



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0109131
(43) 공개일자 2017년09월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
B82B 3/00 (2017.01) B82Y 5/00 (2017.01)
(52) CPC특허분류
B82B 3/0038 (2013.01)
B82B 3/0061 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0032283
(22) 출원일자 2016년03월17일
심사청구일자 2016년03월17일

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
최정우
서울특별시 용산구 서빙고로 35 103동 603호 (한강로3가, 용산시티파크1단지아파트)
윤진호
서울특별시 서초구 서운로 221, 102동 2105호 (서초4동, 래미안서초스위트아파트)
김상욱
서울특별시 강동구 암사동 고덕로 131 128동 2704호 (암사제3동, 강동 롯데캐슬퍼스트아파트)
(74) 대리인
윤대웅, 공병욱

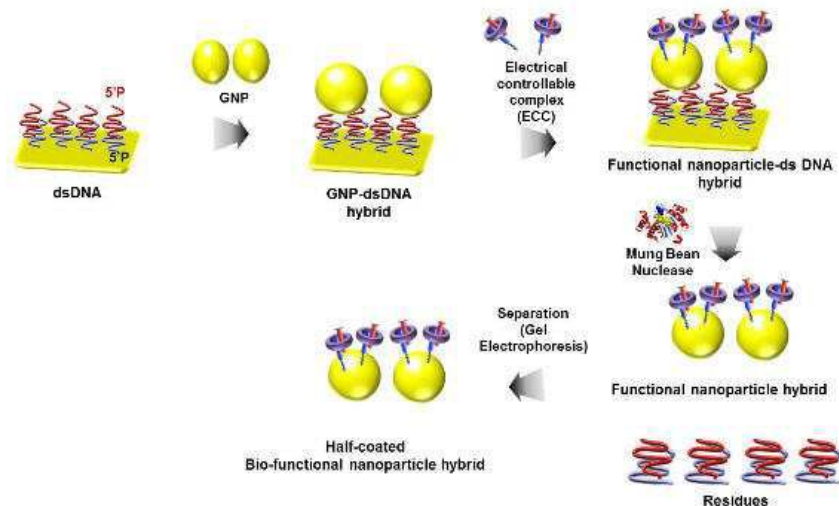
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 나노입자의 하프-코팅 방법

(57) 요약

본 발명은 나노입자의 하프-코팅(half-coating) 방법 및 키트를 제공한다. 본 발명에 따르면, 종래의 야누스 나노입자의 제조방법은 화학적 합성 등의 복잡한 과정을 대체할 수 있고, 비교적 간단하고 경제적인 방법을 통해 나노입자의 하프-코팅을 가능하게 한다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류
B82Y 5/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

다음의 단계를 포함하는 나노입자의 하프-코팅(half-coating) 방법:

- (a) 기판 상에 제1올리고뉴클레오타이드를 자기-조립(self-assembly)시키는 단계;
- (b) 상기 제1올리고뉴클레오타이드의 말단 부위(region)에 상보적인 제2올리고뉴클레오타이드를 혼성화(hybridization)시키는 단계;
- (c) 상기 제2올리고뉴클레오타이드에 나노입자를 결합시키는 단계;
- (d) 상기 나노입자의 노출된 표면을 코팅하는 단계; 및
- (e) 상기 단계 (d)의 결과물에 DNA 가수분해 효소(nuclease)를 처리하여 하프-코팅된 나노입자를 수득하는 단계.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 기판은 금속, 금속 옥사이드, 유리, 세라믹, 석영, 실리콘, 반도체, Si/SiO₂ 웨이퍼, 게르마늄, 갈륨 아르세나이드, 카본, 탄소나노튜브, 폴리머, 세파로스 또는 아가로스인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 제1올리고뉴클레오타이드는 10-100 bp(base pair) 길이인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (b)의 말단 부위는 3'-말단 부위또는 5'-말단 부위인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (b)의 제2올리고뉴클레오타이드는 10-100 bp(base pair) 길이인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (b)의 제2올리고뉴클레오타이드는 제1올리고뉴클레오타이드의 말단 부위에 5-80 bp 길이로 혼성화되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (c)의 나노입자는 제2올리고뉴클레오타이드의 말단에 도입된 티올기(thiol group)에 의해 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (c)의 나노입자는 금속 나노입자, 금속 산화물 나노입자 또는 합금 나노입자 및 반도체 나노입자인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (e)의 DNA 가수분해 효소는 단일가닥 DNA 가수분해 효소 또는 이중가닥 DNA 가수분해 효소인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 1 항에 있어서, 상기 DNA 가수분해 효소는 멍빈 뉴클레아제(mungbean nuclease), 아스퍼질러스 뉴클레아제 S1(*Aspergillus nuclease S1*), P1 뉴클레아제 또는 BAL 31 뉴클레아제인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

(a) 기관; (b) 상기 기관 상에 자가 조립된 제1올리고뉴클레오타이드; (c) 상기 제1올리고뉴클레오타이드의 말단에 부분적으로 혼성화된 제2올리고뉴클레오타이드; 및 (d) DNA 가수분해 효소를 포함하는 나노입자의 하프-코팅(half-coating)용 키트.

청구항 12

제 11 항에 있어서, 상기 기관은 금속, 금속 옥사이드, 유리, 세라믹, 석영, 실리콘, 반도체, Si/SiO₂ 웨이퍼, 게르마늄, 갈륨 아르세나이드, 카본, 탄소나노튜브, 폴리머, 세파로스 또는 아가로스인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 13

제 11 항에 있어서, 상기 제1올리고뉴클레오타이드는 10-100 bp(base pair) 길이인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 14

제 11 항에 있어서, 상기 제1올리고뉴클레오타이드의 말단은 3'-말단 또는 5'-말단인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 15

제 11 항에 있어서, 상기 제2올리고뉴클레오타이드는 10-100 bp(base pair) 길이인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 16

제 11 항에 있어서, 상기 제2올리고뉴클레오타이드는 제1올리고뉴클레오타이드의 말단 부위에 5-80 bp 길이로 혼성화되는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 17

제 11 항에 있어서, 상기 나노입자는 제2올리고뉴클레오타이드의 말단에 도입된 티올기(thiol group)에 의해 결합하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 18

제 11 항에 있어서, 상기 나노입자는 금속 나노입자, 금속 산화물 나노입자 또는 합금 나노입자 및 반도체 나노입자인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 19

제 11 항에 있어서, 상기 DNA 가수분해 효소는 단일가닥 DNA 가수분해 효소 또는 이중가닥 DNA 가수분해 효소인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 20

제 11 항에 있어서, 상기 DNA 가수분해 효소는 멍빈 뉴클레아제(mungbean nuclease), 아스퍼질러스 뉴클레아제 S1(*Aspergillus nuclease S1*), P1 뉴클레아제 또는 BAL 31 뉴클레아제인 것을 특징으로 하는 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 나노입자의 하프-코팅 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 나노입자는 일반적으로 1-100 nm 크기를 가지는 입자를 말한다. 나노기술적 측면에서 나노입자는 그 자체로 운반체나 특정 기능을 수행하는 것으로 정의된다. 나노입자의 경우, 같은 성분으로 구성된 더 큰 크기의 입자와 비교하여 표면적이 비약적으로 증대되어 각 종 반응에서 더 큰 활성을 펼 수 있어 촉매제 역할을 수행하기도 하며, 크기가 감소함에 따라 전자를 국한시키고 양자효과(quantum effect)를 유발하여 기존에 가지지 않던 물리화학적 또는 광학적 특징을 가지기도 한다. 또한, 나노입자의 크기에 따라 발광할 수 있는 빛 에너지가 달라지기 때문에 크기를 기반으로 발광소자 등에 활용될 수 있다.

[0004] 나노입자가 응용될 수 있는 수많은 분야 중에서도 나노입자가 관심을 끄는 분야는 생물학분야이다. 살아있는 생물은 일반적으로 10 μ m 또는 그 보다 작은 세포들로 구성되어 있다. 더욱이, 그 세포를 구성하는 요소들은 나노미터 수준으로 구성되는 경우도 있다. 이런 세포 내 구성물질에 대한 연구 또는 세포 수준의 연구에서 크기가 알맞은 나노입자는 약물이나 유전자 전달, 병원균 검출, 세포 내 레이블링(labeling) 또는 암세포 괴사 등에 다양하게 활용될 수 있다.

[0005] 나아가, 최근 들어 비대칭적인 구조와 서로 다른 표면물질로 구성된 야누스 나노입자(Janus nanoparticle)가 큰 관심을 얻고 있다. 야누스 나노입자는 표면이 서로 다른 물질로 구성된 나노입자이다. 그렇기 때문에 하나의 나노입자가 서로 다른 두가지의 특성을 가질 수 있게 해준다. 예를 들면, 하나의 야누스 나노입자의 절반은 친수성의 특성을 가지고, 나머지 절반은 소수성의 특성을 가지게 해 줄 수가 있다. 그러나 이와 같은 야누스 나노입자의 제작은 상당히 복잡한 과정을 거친다. 대표적으로 이용되는 방법으로는 블록 혼성 중합체를 기반으로 자가조립을 이용한 방법, 서로 다른 물질을 마스크(masking) 방법을 이용하여 야누스 나노입자를 제작하는 방법 등이 있다. 이런 방법들은 블록 혼성 중합체의 열역학적인 특성을 모두 파악하고 자가조립에 미치는 요소 등을 파악하고 있어야 하며, 여러 장치들이 필요하고, 복잡한 과정을 거쳐야 한다는 한계점을 가지고 있다.

[0007] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허

문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0009] (비특허문헌 0001) Shan Jiang et al., Janus Particle Synthesis and Assembly Adv. Mater. 2010, 22, 1060-1071.
- (비특허문헌 0002) Kyle D. Anderson Functional and complex topological application of Plasma Polymerized Ultrathin Films. Georgia Institute of Technology 2012 August.
- (비특허문헌 0003) Yang Song and Shaowei Chen Janus Nanoparticles: Preparation, Characterization, and Applications Chem. Asian J. 2014, 9, 418-430.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명자들은 생체물질을 이용한 나노입자 부분 코팅 방법을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 기관 상에 DNA를 이용하여 나노입자를 고정하고 노출된 표면을 코팅하여 하프-코팅된(half-coated) 나노입자를 제조함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0011] 따라서, 본 발명의 목적은 나노입자의 하프-코팅(half-coating) 방법을 제공하는 데 있다.
- [0012] 본 발명의 다른 목적은 나노입자의 하프-코팅용 키트를 제공하는 데 있다.
- [0014] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0016] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 나노입자의 하프-코팅(half-coating) 방법을 제공한다:
- [0017] (a) 기관 상에 제1올리고뉴클레오타이드를 자기-조립(self-assembly)시키는 단계;
- [0018] (b) 상기 제1올리고뉴클레오타이드의 말단 부위(region)에 상보적인 제2올리고뉴클레오타이드를 혼성화(hybridization)시키는 단계;
- [0019] (c) 상기 제2올리고뉴클레오타이드에 나노입자를 고정하는 단계;
- [0020] (d) 상기 나노입자의 노출된 표면을 코팅하는 단계; 및
- [0021] (e) 상기 단계 (d)의 결과물에 DNA 가수분해 효소(nuclease)를 처리하여 하프-코팅된 나노입자를 수득하는 단계.
- [0023] 본 발명자들은 생체물질을 이용한 나노입자 부분 코팅 방법을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 기관 상에 DNA를 이용하여 나노입자를 고정하고 노출된 표면을 코팅하여 하프-코팅된(half-coated) 나노입자를 제조하였다.
- [0025] 본 발명의 나노입자의 하프-코팅 방법은 야누스 나노입자(Janus nanoparticle)를 제조하는데 이용될 수 있다.

- [0026] 본 명세서에서 용어, “야누스 나노입자(또는 야누스 입자)”는 나노입자의 표면에 2가지 이상의 뚜렷한 물리적 특성을 갖는 나노입자의 한 형태이다(Li, Fan et al. "Colloidal Assembly: The Road from Particles to Colloidal Molecules and Crystals". Angewandte Chemie International Edition (2011) 50 (2): 360388). 상기 야누스 나노입자는 이의 비대칭(asymmetric) 구조 및/또는 기능화(functionalization)과 관련된 특유의 특성을 갖는 입자이다. 상기 야누스 나노입자를 제조하는 종래의 방법에는 (a) 마스크(masking); (b) 블럭 공중합체에 의한 자기-조립; (c) 경쟁적 흡착에 의한 자기-조립; 및 (d) 상 분리(phase separation)의 방법이 있다(https://en.wikipedia.org/wiki/Janus_particles).
- [0027] 종래의 야누스 나노입자의 제조방법은 화학적 합성 등의 복잡한 과정을 거쳐야하는 단점을 갖는다.
- [0029] 본 발명의 나노입자의 하프-코팅 방법을 단계별로 상세히 설명한다.
- [0031] **단계 (a): 제1올리고뉴클레오타이드의 자가조립**
- [0032] 먼저, 기판 상에 제1올리고뉴클레오타이드를 고정시킨다.
- [0033] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 기판은 금속, 금속 옥사이드, 유리, 세라믹, 석영, 실리콘, 반도체, Si/SiO₂ 웨이퍼, 게르마늄, 갈륨 아르세나이드, 카본, 탄소나노튜브, 폴리머, 세파로스 또는 아가로스이다.
- [0034] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 기판은 금속, 금속 옥사이드 또는 유리, 세라믹이다.
- [0035] 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 기판은 금속이다.
- [0036] 하기 실시예에서 입증된 바와 같이, 상기 기판은 금 기판이다.
- [0037] 본 발명의 주요한 특징 중 하나는 생체물질을 통해 기판 상에 나노입자를 고정하여 코팅하는 점이다.
- [0038] 본 발명에서 기판 상에 나노입자를 고정하기 위하여 올리고뉴클레오타이드를 이용한다.
- [0039] 본 명세서에서 용어, “올리고뉴클레오타이드”는 자연의 또는 변형된 모노머 또는 연쇄(linkages)의 선형 올리고머를 의미하며, 디옥시리보뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드를 포함하고 타깃 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 혼성화할 수 있으며, 자연적으로 존재하거나 또는 인위적으로 합성되는 것이다. 올리고뉴클레오타이드는 혼성화에 있어 최대 효율을 위하여 바람직하게는 단일체이다. 바람직하게는, 올리고뉴클레오타이드는 올리고디옥시리보뉴클레오타이드이다. 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 자연(naturally occurring) dNMP(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 뉴클레오타이드 유사체 또는 유도체를 포함할 수 있다. 또한, 올리고뉴클레오타이드는 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있다.
- [0040] 상기 제1올리고뉴클레오타이드는 5'-말단에 도입된 티올기(thiol group)에 의해 기판 상에 결합하여 자기-조립(self-assembly)한다.
- [0041] 본 명세서에서 용어, “자기-조립”은 무질서하게 존재하던 구성요소들이 외부의 지시 없이 구성요소 간의 상호작용에 의해 자발적으로 조직적인 구조나 형태를 형성하는 것을 의미한다.
- [0042] 즉, 기판 상에 제1올리고뉴클레오타이드가 서로 간의 상호작용에 의해 자발적 구조를 형성한다.
- [0043] 본 발명의 나노입자의 하프-코팅에 이용되는 올리고뉴클레오타이드는 기판 상에 자가조립되고 다른 올리고뉴클레오타이드와 혼성화 할 수 있는 길이이다.
- [0044] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 제1올리고뉴클레오타이드는 10-100 bp(base pair) 길이이다.
- [0045] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 제1올리고뉴클레오타이드는 10-80 bp, 10-60 bp, 10-40 bp 또는 10-30 bp 길이이다.
- [0046] 본 발명의 나노입자의 하프-코팅에 이용되는 제1올리고뉴클레오타이드는 어떠한 서열도 가능하다. 이는 본 발명에서 이용하는 DNA 가수분해 효소가 특정 서열을 인식하여 절단하는 제한 효소가 아닌, 단일가닥 DNA 또는 이중가닥 DNA를 인식하여 절단하므로 어떠한 서열도 가능하다.

- [0047] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 제1올리고뉴클레오타이드는 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열이다.
- [0049] **단계 (b): DNA 혼성화**
- [0050] 다음, 상기 제1올리고뉴클레오타이드의 말단 부위(region)에 상보적인 제2올리고뉴클레오타이드를 혼성화(hybridization)시킨다.
- [0051] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 말단 부위는 3'-말단 부위 또는 5'-말단 부위이다.
- [0052] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 말단 부위는 3'-말단 부위이다.
- [0053] 상기 단계 (b)의 제2올리고뉴클레오타이드는 한쪽 말단 부위에 제1올리고뉴클레오타이드에 부분적으로 혼성화하고 반대쪽 말단에 나노입자가 결합하기 적합한 길이를 갖는다.
- [0054] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 제2올리고뉴클레오타이드는 10-100 bp 길이이다.
- [0055] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 제2올리고뉴클레오타이드는 10-80 bp, 10-60 bp, 10-40 bp 또는 10-30 bp 길이이다.
- [0056] 상기 단계 (a)의 제1올리고뉴클레오타이드 및 단계 (b)의 제2올리고뉴클레오타이드는 부분적으로 상보적인(complementary) 서열을 갖는다.
- [0057] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 제1올리고뉴클레오타이드 및 제2올리고뉴클레오타이드는 3'-말단 부위에 상보적인 서열을 갖는다.
- [0058] 본 명세서에서 용어, “상보적”은 소정의 어닐링(annealing) 조건 또는 엄격조건 하에서 제2올리고뉴클레오타이드가 제1올리고뉴클레오타이드에 선택적으로 혼성화할 정도로 충분히 상보적인 것을 의미하며, “실질적으로 상보적(substantially complementary)” 및 “완전히 상보적(perfectly complementary)”인 것을 모두 포괄하는 의미를 가지며, 바람직하게는 완전히 상보적인 것을 의미한다.
- [0059] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 제2올리고뉴클레오타이드는 제1올리고뉴클레오타이드의 말단 부위에 5-80 bp 길이로 혼성화한다.
- [0060] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 제2올리고뉴클레오타이드는 제1올리고뉴클레오타이드의 말단 부위에 5-60 bp, 5-40 bp, 5-30 bp 또는 5-20 bp 길이로 혼성화한다.
- [0061] 본 발명의 나노입자의 하프-코팅에 이용되는 제2올리고뉴클레오타이드는 제1올리고뉴클레오타이드와 부분적으로 혼성화하는 어떠한 서열도 가능하다.
- [0062] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 제2올리고뉴클레오타이드는 서열목록 제2서열의 뉴클레오타이드 서열이다.
- [0063] 상기 제1올리고뉴클레오타이드와 제2올리고뉴클레오타이드가 혼성화되는 부위의 뉴클레오타이드 서열은 안정적인 혼성화를 위하여 GC 함량이 80% 이상이 되도록 디자인한다.
- [0064] 본 명세서에서 사용되는 용어 “혼성화(hybridization)”는 상보적인 단일 가닥 핵산들이 이중-가닥 핵산을 형성하는 것을 의미한다. 혼성화는 2 개의 핵산 가닥 간의 상보성이 완전할 경우(perfect match) 일어나거나 또는 일부 미스매치(mismatch) 염기가 존재하여도 일어날 수 있다. 혼성화에 필요한 상보성의 정도는 혼성화 조건에 따라 달라질 수 있으며, 특히 온도에 의하여 조절될 수 있다.
- [0066] **단계 (c): 나노입자의 고정**
- [0067] 다음, 상기 제2올리고뉴클레오타이드에 나노입자를 결합시킨다.
- [0068] 상기 제2올리고뉴클레오타이드 및 나노입자의 결합은 당업계에 공지된 핵산 및 나노입자의 어떠한 결합도 가능하다. 예컨대, 금 나노입자와 올리고뉴클레오타이드의 말단에 도입된 티올기(thiol group)와의 금-싸울 결합을 통한 결합, 니켈 나노입자와는 히스티딘(histidine) 기를 통한 결합, 은 나노입자와도 싸울기를 통한 결합; 특정작용기와 나노입자의 연결 결합[Bioprocessing Device Composed of Protein/DNA/Inorganic Material Hybrid Advanced Functional Materials, 24(12), 1781-1789, (2014)] 등이 적용될 수 있다.

[0069] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 나노입자는 제2올리고뉴클레오타이드의 말단에 도입된 티올기에 의해 결합된다.

[0070] 본 발명의 나노입자의 하프-코팅에 적용되는 나노입자는 어떠한 나노입자도 가능하다.

[0071] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 나노입자는 금속 나노입자, 금속 산화물 나노입자 또는 합금 나노입자 및 반도체 나노입자이다.

[0073] 단계 (d): 코팅

[0074] 다음, 상기 나노입자의 노출된 표면을 코팅한다.

[0075] 상기 코팅은 당업계에 공지된 어떠한 코팅도 가능하다. 예컨대, 기관 상에 자기-조립된 제1올리고뉴클레오타이드, 상기 제1올리고뉴클레오타이드에 부분적 혼성화된 제2올리고뉴클레오타이드 및 상기 제2올리고뉴클레오타이드에 결합된 나노입자의 구성에 영향을 가하지 않는 어떠한 조건의 코팅도 가능하다.

[0076] 하기 실시예에서 입증된 바와 같이, 단계 (d)의 나노입자의 노출된 표면에 화학물질을 코팅할 수 있다.

[0078] 단계 (e): DNA 가수분해 효소의 처리

[0079] 마지막으로, 상기 단계 (d)의 결과물에 DNA 가수분해 효소(nuclease)를 처리하여 하프-코팅된 나노입자를 수득한다.

[0080] 본 발명의 주요한 특징 중 다른 하나는, 나노입자를 하프-코팅 하기 위해 생체 물질인 DNA 가수분해 효소를 이용하는 점이다.

[0081] 본 명세서에서 용어, “DNA 가수분해 효소”는 핵산의 뉴클레오타이드 서브유닛(subunits) 사이의 인산디에스테르 결합(phosphodiester bonds)을 절단하는 효소이다.

[0082] 본 발명에 이용되는 DNA 가수분해 효소는 당업계에 공지된 어떠한 DNA 가수분해 효소도 이용될 수 있다. 상기 DNA 가수분해 효소는 나노입자와 기관을 연결하는 올리고뉴클레오타이드를 절단하는 어떠한 DNA 가수분해 효소도 가능하다.

[0083] 본 발명의 일 구현예에 따르면, DNA 가수분해 효소는 단일가닥 DNA 가수분해 효소 또는 이중가닥 DNA 가수분해 효소이다.

[0084] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 DNA 가수분해 효소는 단일가닥 DNA 가수분해 효소이다.

[0085] 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 DNA 가수분해 효소는 멍빈 뉴클레아제(mungbean nuclease), 아스퍼질러스 뉴클레아제 S1(*Aspergillus nuclease S1*), P1 뉴클레아제 또는 BAL 31 뉴클레아제이다.

[0086] 하기 실시예에서 입증된 바와 같이, 상기 DNA 가수분해 효소를 처리하여 하프-코팅된 나노입자를 수득한다.

[0088] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 기관; (b) 상기 기관 상에 자가 조립된 제1올리고뉴클레오타이드; (c) 상기 제1올리고뉴클레오타이드의 말단에 부분적으로 혼성화된 제2올리고뉴클레오타이드; 및 (d) DNA 가수분해 효소를 포함하는 나노입자의 하프-코팅용 키트를 제공한다.

[0090] 본 발명의 키트는 상기 나노입자의 하프-코팅 방법을 이용하기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.

발명의 효과

[0092] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

- [0093] (a) 본 발명은 나노입자의 하프-코팅(half-coating) 방법 및 키트를 제공한다.
- [0094] (b) 본 발명은 종래의 야누스 나노입자의 제조방법은 화학적 합성 등의 복잡한 과정을 대체할 수 있다.
- [0095] (c) 본 발명은 비교적 간단하고 경제적인 방법을 통해 나노입자의 하프-코팅을 가능하게 한다.

도면의 간단한 설명

- [0097] 도 1a 및 1b는 멍빈 뉴클레아제(mungbean nuclease)의 단일가닥 DNA에 가수분해를 확인한 결과로, 도 1a는 멍빈 뉴클레아제와 반응시킨 DNA의 전기영동 결과이고, 도 1b는 형광이 링크된 DNA를 이용하여 멍빈 뉴클레아제의 가수분해를 확인한 결과이다.
- 도 2a 및 2b는 DNA에 의해 고정된 기관 상에 금 나노입자의 멍빈 뉴클레아제 처리에 따른 결과를 형광이미지로 나타낸다. 금 나노입자에 형광 다이를 붙여 멍빈 뉴클레아제 처리 전(2a) 및 후(2b)의 형광이미지를 나타낸다.
- 도 3a 및 3b는 DNA에 의해 고정된 기관 상에 금 나노입자의 멍빈 뉴클레아제 처리에 따른 결과를 SEM 이미지로 나타낸다. 멍빈 뉴클레아제 처리 전(3a) 및 후(3b)의 SEM 이미지를 나타낸다.
- 도 4a 내지 4c는 하프-코팅(half-coating) 금 나노입자를 확인한 결과이다. 도 4a 및 4b는 각각 멍빈 뉴클레아제 대조군 및 DNA에 의해 기관 상에 고정되어 화학물질복합체로 하프-코팅된 금 나노입자의 멍빈 뉴클레아제를 처리한 실험군을 TEM 이미지로 나타낸다. 도 4c는 상기 대조군 및 실험군의 흡광도 측정 결과를 나타낸다.
- 도 5는 본 발명의 나노입자의 하프-코팅 방법을 도식화하여 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0098] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0100] 실시예1: 멍빈 뉴클레아제(Mungbean nuclease)의 기능 확인

- [0101] 멍빈 뉴클레아제(Mungbean nuclease)가 단일 가닥 DNA를 분해하는지를 확인하는 실험을 진행하였다. 전기영동과 형광분석장치를 이용한 두 가지 방법으로 확인을 하였다.
- [0102] 우선, 20 bp 크기의 단일 가닥 DNA 샘플(CCCACATTTACTTATGATCC)을 준비하여 전기영동 실험을 진행하였다. 멍빈 뉴클레아제(New England BioLabs)의 경우, 10000 unit/ml의 농도상태로 있기 때문에 반응 완충액(mungbean nuclease reaction buffer:30 mM NaCl, 50 mM 초산나트륨, 1 mM ZnSO₄, pH 5.0, 25℃)으로 농도를 희석하여 2 unit 상태로 만들어서 반응을 시켰다. 1 unit의 기준은 1 μg의 DNA를 37℃에서 분해하는데 필요한 효소의 양을 정의한다. 멍빈 뉴클레아제와 DNA의 반응은 10 마이크로몰 농도의 DNA 100 μl 및 멍빈 뉴클레아제의 반응 완충액에 용해한 멍빈 뉴클레아제 2 unit를 1.5 ml 튜브(ependorf)에 넣어 37℃ 인큐베이터에서 진행하였다.
- [0103] 그 뒤, 아가로스 겔에서 100 V 전압으로 1시간 동안 전기영동을 진행하였고, 밴드 염색은 사이브골드(sybr gold)로 하였다. 전기영동 결과를 보면, 멍빈 뉴클레아제와 반응시킨 DNA 샘플은 DNA가 분해되어 밴드가 나타나지 않음을 확인할 수 있다.
- [0104] 그 뒤, 단일 가닥 DNA의 양 끝에 각각 형광물질인 cy5와 퀀처(quencher)인 BHQ2를 붙인 샘플을 가지고 형광실험을 진행하였다. 사용된 단일 가닥 DNA의 크기는 20 bp로 약 7 나노미터길이로 퀀칭 효과에 따라 DNA를 사이에 두고 cy5와 BHQ2가 연결되어 있을 때에는 형광이 나타나지 않음을 확인할 수 있었다. 그러나, 멍빈 뉴클레아제와 반응시킨 샘플은 DNA가 끊어져 cy5가 BHQ2와 멀어짐에 따라 형광의 세기가 나타남을 확인할 수 있었다. 이를 통하여 멍빈 뉴클레아제가 DNA를 분해시키는 기능을 확인하였다.
- [0105] 도 1a는 DNA와 멍빈 뉴클레아제와 반응시킨 DNA의 전기영동 결과를 보여주고 있고 1b는 형광세기 실험의 결과를 보여주는 사진이다.

[0107] **실시예 2: 금기관 위에 DNA로 고정화된 금 나노입자의 명빈 뉴클레아제 처리 후 떨어져 나감을 형광현미경과 SEM으로 확인**

[0108] 명빈 뉴클레아제를 이용하여 하프-코팅(half-coating)된 금 나노입자를 제작하기 위하여, 금 기관에 DNA를 이용한 금 나노입자의 고정화를 먼저 하였다. 금 기관은 0.5 mm×0.5 mm 사이즈로 실리콘 기관 위에 크롬(5 nm 두께)과 금(20 nm 두께)이 증착된 기관을 사용하였다. 씨올기(thiol group)가 붙어있는 25 bp 크기의 제1단일가닥 DNA(SH-ATAAAAAAACGCGGGGTTCGCG, 25 bp, 서열목록 제1서열; 밑줄 부분이 제2단일가닥 DNA와 상보적인 서열)를 100 μm 농도로 20 μl를 금 기관 위에 자가조립(self-assembly) 방법으로 3시간 동안 고정화한 뒤, 그에 씨올기(thiol group)가 붙어있는 부분상보적인 25 bp 크기의 제2단일가닥 DNA(GCGCCCCCAAGGCGCAAAAATAAAA-SH, 25 bp, 서열목록 제2서열; 밑줄 부분이 제1단일가닥 DNA와 상보적인 서열)를 10 μm 농도로 20 μl를 올리고 3시간 동안 반응시켜 이중 가닥 DNA가 형성되도록 하였다. 상기 제1DNA 및 제2DNA가 상보적으로 결합하여 이중 가닥을 형성하는 부분을 짧게 하여, 그 외 DNA 시퀀스 부분은 명빈 뉴클레아제로 분해하기 위하여 단일 가닥 상태로 존재하도록 하였다. 상보적인 DNA는 이중 가닥 형성 후 위로 향하는 부분의 끝에 씨올기가 있도록 디자인 되어 있어서 금 나노입자를 고정화할 수 있도록 해준다. 그 뒤, 20 nm 크기의 금 나노입자를 3시간 동안 고정화하였다. 이렇게 고정화가 된 금 나노입자는 아랫 부분은 상보적 DNA인 제2DNA와 Au-S 반응으로 고정화되게 되고, 윗부분에는 우리가 원하는 물질을 고정화시킬 수 있게 된다.

[0109] 제1DNA 및 제2DNA로 고정된 금 나노입자가 명빈 뉴클레아제로 인하여 금 기관에서 떨어져 나오는 것을 확인하기 위하여, 금 기관에 DNA로 고정된 금 나노입자의 위 부분에 씨올기가 붙은 cy3 형광물질을 3시간동안 고정화하였다. 이렇게 만들어진 샘플을 형광현미경으로 관측한 뒤, 샘플을 명빈 뉴클레아제가 들어있는 용액과 37℃ 인큐베이터에서 1시간 동안 반응시키고 난 뒤, 샘플을 형광현미경으로 관찰하였다.

[0110] 도 2a 및 2b는 금 기관 위에 DNA를 통하여 고정화된 금 나노입자 위에 붙은 cy3의 형광이 나타나는 사진(2a)과 그 샘플을 명빈 뉴클레아제와 반응시켜 DNA가 분해되어 cy3 형광이 붙은 금 나노입자가금 기관에서 떨어져 나가 형광이 사라진 금 기관의 형광사진(2b)을 보여주고 있다.

[0111] 그 뒤, 위와 같은 실험을 진행한 기관을 SEM을 이용하여 관찰하였다. 명빈 뉴클레아제를 처리하기 전 금 기관은 SEM으로 관찰한 결과, 금 나노입자들이 금 기관 위에 뽕뽕하게 고정화되어 있음을 확인할 수 있었지만, 명빈 뉴클레아제와 반응시킨 뒤에는 금 나노입자들이 대부분 떨어져 나가 사라져 있음을 확인할 수 있었다.

[0112] 도 3a 및 3b는 금 기관 위에 DNA를 통하여 고정화된 금 나노입자의 SEM 사진(3a)과 명빈 뉴클레아제와 반응 한 후 금 나노입자들이 사라진 사진(3b)이다.

[0114] **실시예 3: 명빈 뉴클레아제에 의해 떨어져 나온 하프-코팅된 금 나노입자를 TEM 및 UV-vis로 확인**

[0115] 명빈 뉴클레아제를 이용하여 금 기관으로부터 떨어져 나오는 하프-코팅된 금 나노입자를 확인하기 위하여, 앞에 제시된 방법으로 금 기관에 DNA를 이용한 금 나노입자의 고정화를 먼저 진행하였다. 그 뒤, 금 나노입자 위에 씨올기가 달린 화학물질 복합체를 3시간동안 고정화하였다. 화학물질복합체는 Cucibit [8] Uril (CB), Trp Gly Gly (WGG peptide) 및 5,5'-Bis(mercaptomethyl)-2,2'-bipyridine으로 구성되며 자가조립방법으로 만들어졌다. 이렇게 만들어진 샘플은 명빈 뉴클레아제가 들어있는 용액과 37℃ 인큐베이터에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 뒤, 용액에서 샘플을 꺼낸 뒤, 용액을 EF-TEM으로 관찰하였다. 샘플을 넣기 전의 용액은 EF-TEM으로 분석 결과, 명빈 뉴클레아제만 존재함을 확인할 수 있었다. 이에 반해, 샘플을 담가 1시간 동안 인큐베이터에서 반응시킨 뒤 샘플을 꺼낸 용액에서는 명빈 뉴클레아제와 함께 금 기관에서 떨어져 나온 금 나노입자와 그 위에 하프-코팅된 화학물질복합체가 관찰되는 것을 확인할 수 있었다. 이 후, 두 용액을 각각 UV-vis로 분석한 결과, 명빈 뉴클레아제만 들어있는 용액의 피크(peak)와 비교하여 금 나노입자와 그 위에 하프-코팅된 화학물질의 피크인 250 nm와 270 nm 부근에서 미묘하게 피크가 상승하는 것을 통하여 하프-코팅된 금 나노입자가 떨어져 나온 것을 확인할 수 있었다.

[0116] 도 4a 내지 4c는 명빈 뉴클레아제만 들어있는 용액(4a)과 그 용액에 금 나노입자를 DNA를 이용하여 금 기관 위에 고정화하고 그 위에 화학물질복합체를 고정화한 기관을 담가서 반응시킨 용액(4b)을 각각 TEM을 찍은 사진이다. 도 4c는 위 두 용액의 UV-vis를 측정한 결과이다.

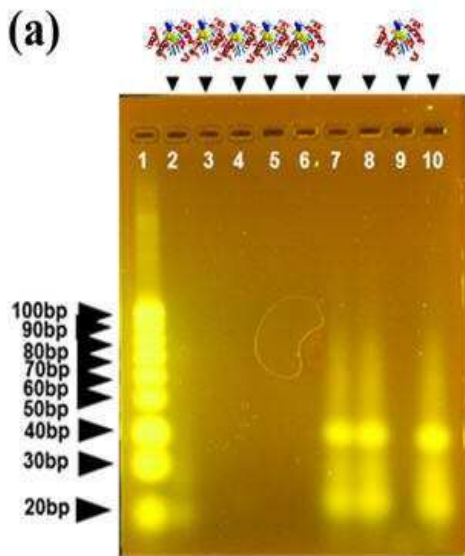
[0117] 도 5는 본 발명의 나노입자의 하프-코팅 방법을 도식화하여 나타낸다. 도 5는 금 기관 위에 DNA를 고정화시킨

뒤에, 그 위에 금 나노입자를 고정화하고 그위에 고정화되는 ‘ELECTRICAL CONTROLLABLE COMPLEX(Cucibit [8] Uril (CB), Trp Gly Gly (WGG peptide) 및 5,5’ -Bis(mercaptomethyl)-2,2’ -bipyridine)을 결합시키고, 그 후에 멍빈 뉴클레아제와 반응시켜 DNA가 분해되어 Cucibit [8] Uril (CB), Trp Gly Gly (WGG peptide) 및 5,5’ -Bis(mercaptomethyl)-2,2’ -bipyridine가 위에 절반만 코팅된 금 나노입자가 기관에서 떨어져 나오는 것이다.

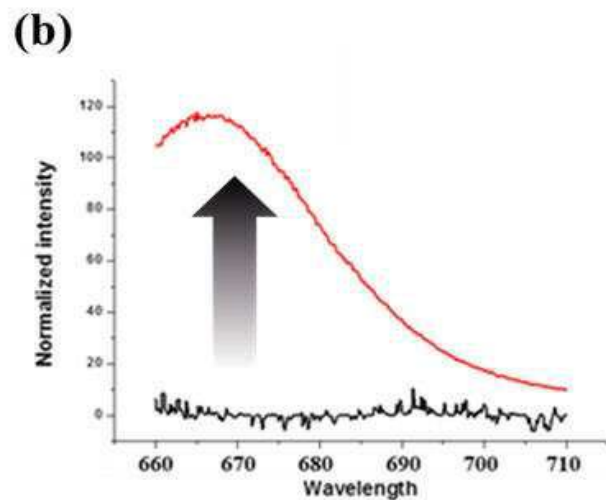
[0119] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

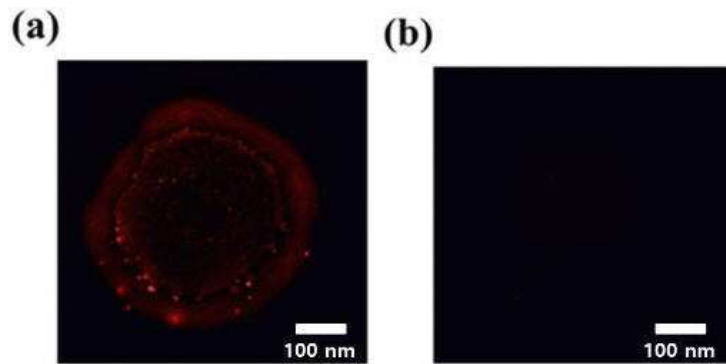
도면1a



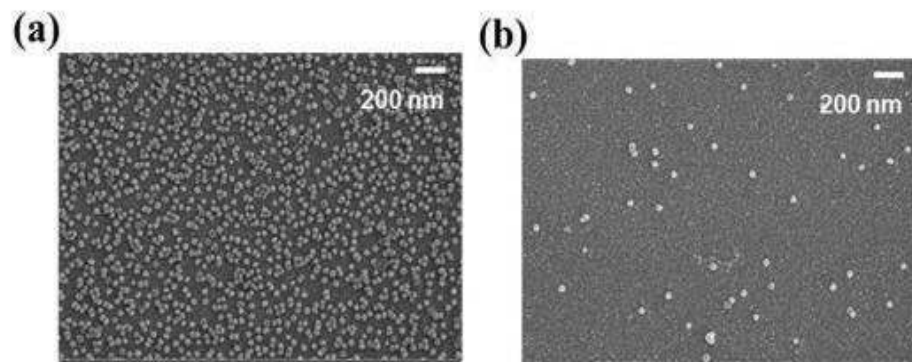
도면1b



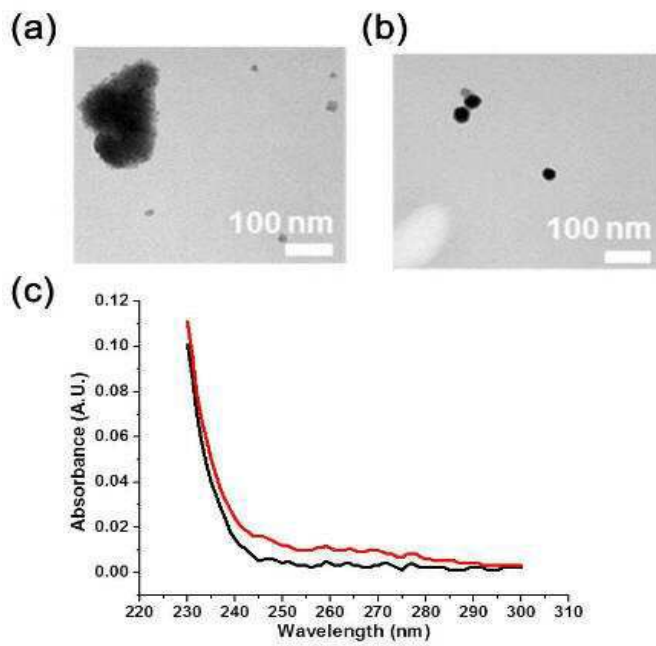
도면2



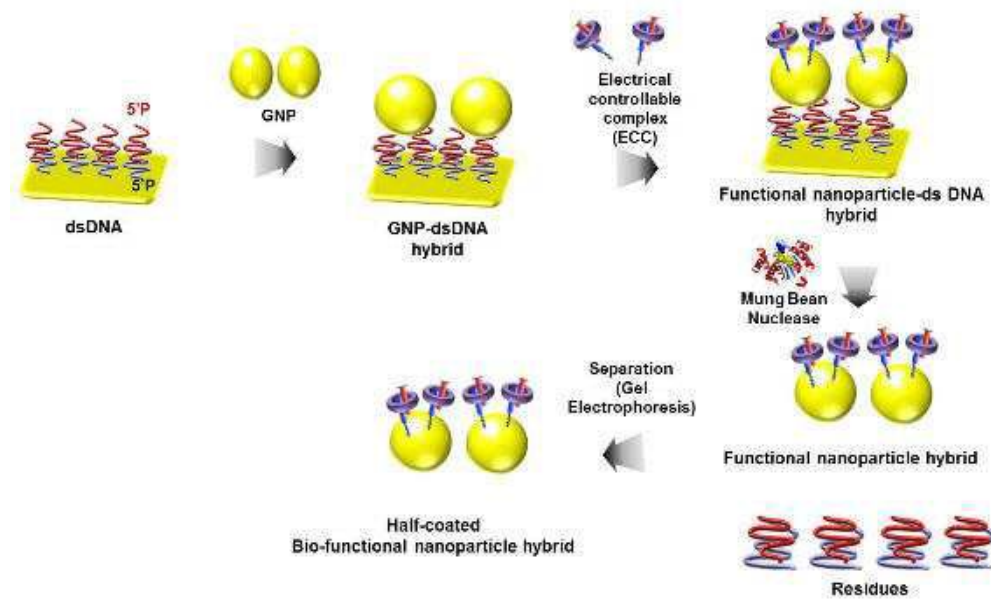
도면3



도면4



도면5



서열 목록

<110> SOGANG UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION

<120> Method for Half-Coating Nanoparticles

<130> PN160080

<160> 2

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> ssDNA 1

<400> 1

ataaaaaaaaaa cgcgggggtt ccgcg

25

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> ssDNA 2

<400> 2

gcgcccccaa ggcgcaaaaa taaaa

25