



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0084356
(43) 공개일자 2025년06월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6816 (2018.01) G01N 33/53 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6816 (2018.05)
G01N 33/5308 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0172725
(22) 출원일자 2023년12월01일
심사청구일자 2023년12월01일

(71) 출원인
성균관대학교산학협력단
경기도 수원시 장안구 서부로 2066 (천천동, 성균관대학교내)
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
조규봉
서울특별시 마포구 서강로3길 32, 101동 303호 (창전동, 마포웨스트리버 태영데시앙)
이정현
서울특별시 서초구 청두곳4길 14-17, 401호 (방배동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
리엔목특허법인

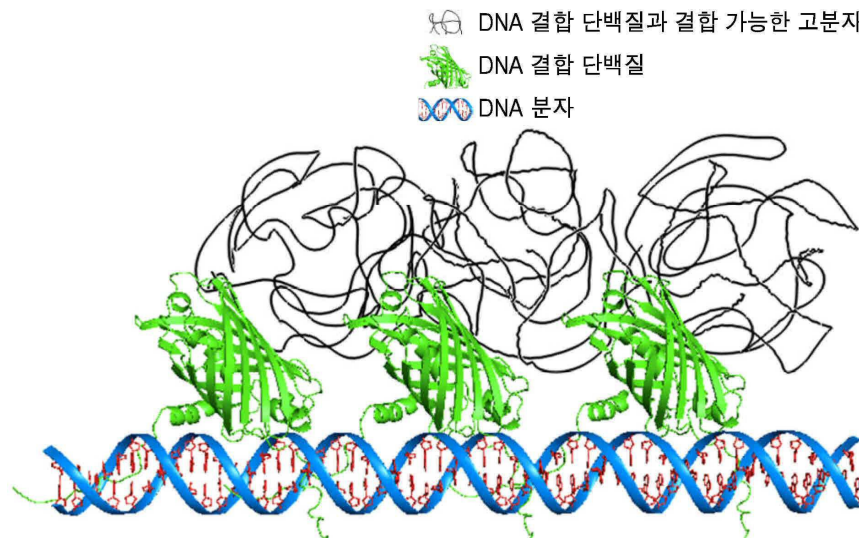
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 주사전자현미경(SEM)을 통해 DNA를 분석하기 위한 DNA 분석 키트, DNA-단백질-고분자 복합체, 상기 DNA-단백질-고분자 복합체를 포함하는 조성물, 및 상기 DNA-단백질-고분자 복합체를 이용한 DNA 분석방법

(57) 요약

주사전자현미경(SEM)을 통해 DNA를 분석하기 위한 DNA 분석 키트, DNA-단백질-고분자 복합체, 상기 DNA-단백질-고분자 복합체를 포함하는 조성물, 및 상기 DNA-단백질-고분자 복합체를 이용한 DNA 분석방법을 개시한다. 상기 DNA-단백질-고분자 복합체는 DNA 분자; 상기 DNA 분자와 결합가능한 아미노산 서열 및 양 말단 중 적어도 하나에 1종 이상의 관능기를 갖는 펩타이드를 포함하는 DNA 결합 단백질; 및 상기 DNA 결합 단백질과 분자간 정전기적 인력에 의해 결합가능한 고분자, 이의 무수물, 또는 이의 염을 포함할 수 있다. 상기 DNA-단백질-고분자 복합체는 금속-프리(free)이며, 주사전자현미경(SEM)을 통해 거의 실시간 속도로 다양한 형상 및 길이를 갖는 DNA 분자에 대해 높은 해상도로 관찰과 분석이 가능하다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Q 2563/107 (2013.01)

C12Q 2563/173 (2013.01)

C12Q 2565/601 (2013.01)

(72) 발명자

노찬영

서울특별시 용산구 청파로71길 19, 라온빌 303호
(청파동1가)

라마사미 순달바부 프리안트

경기도 수원시 장안구 일월로90번길 42-10, 101호
(천천동)

장준혁

경기도 수원시 장안구 화산로141번길 9-6, 201호(
천천동)

명세서

청구범위

청구항 1

DNA 분자와 정전기적 상호작용, 인터칼레이션(intercalation), 및 그루브 바인딩(groove binding) 중 하나 이상을 통해 결합가능한 DNA 결합 단백질; 및

상기 DNA 결합 단백질과 분자간 정전기적 인력에 의해 결합가능한 고분자, 이의 무수물, 또는 이의 염을 포함하는, 주사전자현미경(SEM)을 통해 DNA를 분석하기 위한 DNA 분석 키트.

청구항 2

제1항에 있어서,

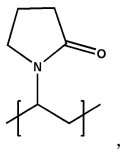
상기 DNA 결합 단백질이 형광 단백질을 포함하는, DNA 분석 키트.

청구항 3

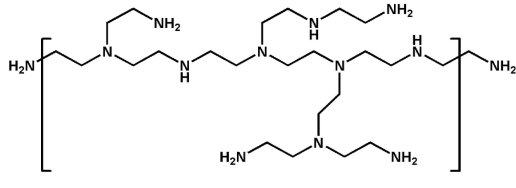
제1항에 있어서,

상기 고분자, 이의 무수물, 또는 이의 염이 하기 화학식 1 내지 화학식 9로 표시되는 구조단위 중 1종 이상을 포함하고, 이들 각각의 중량평균분자량이 10 Kilodalton 내지 100 Kilodalton인, DNA 분석 키트:

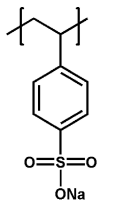
[화학식 1]



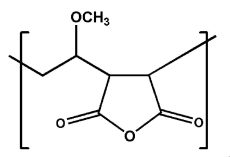
[화학식 2]



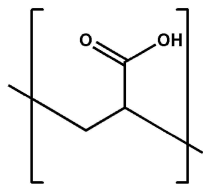
[화학식 3]



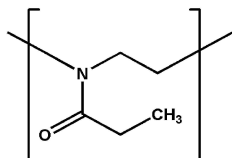
[화학식 4]



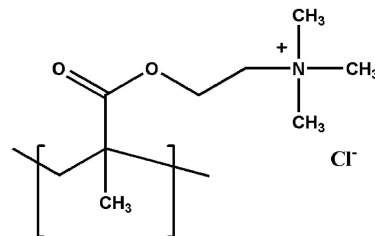
[화학식 5]



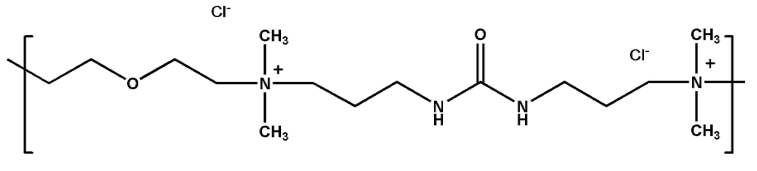
[화학식 6]



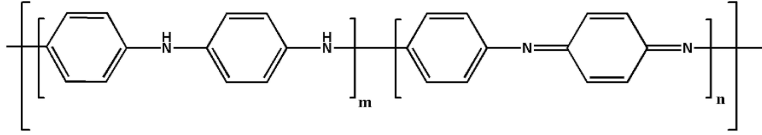
[화학식 7]



[화학식 8]



[화학식 9]



식 중에서,

$m+n$ 은 1이다.

청구항 4

DNA 분자;

상기 DNA 분자와 결합가능한 아미노산 서열 및 양 말단 중 적어도 하나에 1종 이상의 관능기를 갖는 펩타이드를 포함하는 DNA 결합 단백질; 및

상기 DNA 결합 단백질과 분자간 정전기적 인력에 의해 결합가능한 고분자, 이의 무수물, 또는 이의 염을 포함하는, DNA-단백질-고분자 복합체.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 고분자가 산소 및 질소 중 1종 이상의 원자를 포함하는, DNA-단백질-고분자 복합체.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 고분자의 산소 원자 또는 질소 원자가 상기 DNA 결합 단백질에 포함된 O-H 결합의 수소원자 또는 N-H 결합의 수소원자와 수소결합에 의해 결합가능한, DNA-단백질-고분자 복합체.

청구항 7

제4항에 있어서,

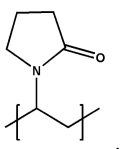
상기 고분자, 이의 무수물, 또는 이의 염이 응집체(aggregates) 형태인, DNA-단백질-고분자 복합체.

청구항 8

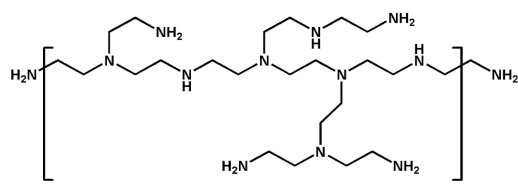
제4항에 있어서,

상기 고분자, 이의 무수물, 또는 이의 염이 하기 화학식 1 내지 화학식 9로 표시되는 구조단위 중 1종 이상을 포함하고, 이들 각각의 중량평균분자량이 10 Kilodalton 내지 100 Kilodalton인, DNA-단백질-고분자 복합체:

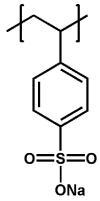
[화학식 1]



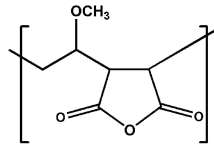
[화학식 2]



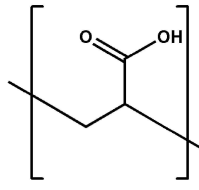
[화학식 3]



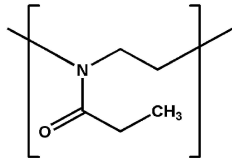
[화학식 4]



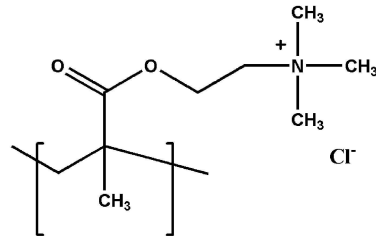
[화학식 5]



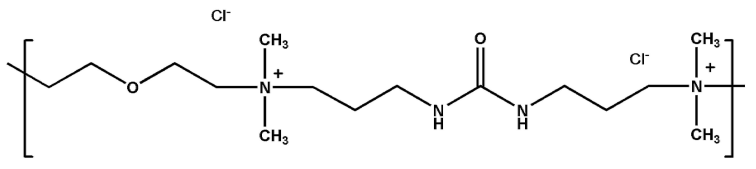
[화학식 6]



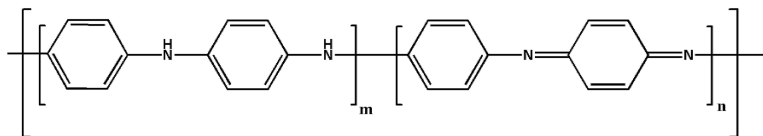
[화학식 7]



[화학식 8]



[화학식 9]



식 중에서,

$m+n$ 은 1이다.

청구항 9

제4항에 있어서,

상기 DNA 분자가 선형, 원형, 나선형, 슈퍼코일형, 크리스마스-트리형, 이중 가닥, 또는 단일 가닥 형상을 갖는, DNA-단백질-고분자 복합체.

청구항 10

제4항에 있어서,

상기 DNA 결합 단백질이 형광 단백질인, DNA-단백질-고분자 복합체.

청구항 11

제4항에 있어서,

상기 DNA 분자와 상기 DNA 결합 단백질이 정전기적 상호작용, 인터칼레이션(intercalation), 및 그루브 바인딩(groove binding) 중 하나 이상을 통해 결합 가능한, DNA-단백질-고분자 복합체.

청구항 12

제4항에 있어서,

상기 복합체의 굽기(thickness)가 9 nm 내지 20 nm인, DNA-단백질-고분자 복합체.

청구항 13

제4항에 있어서,

상기 복합체가 2차원 또는 3차원 형상을 갖는 DNA를 염색하여 주사전자현미경(SEM)을 통해 시각화 가능하도록 사용되는, DNA-단백질-고분자 복합체.

청구항 14

제4항에 있어서,

상기 복합체가 주사전자현미경(SEM)을 통해 연속적인 형상으로 DNA에 대한 시각화 가능하도록 사용되는, DNA-단백질-고분자 복합체.

청구항 15

제4항에 있어서,

상기 복합체가 금속-프리(free)인, DNA-단백질-고분자 복합체.

청구항 16

제4항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 DNA-단백질-고분자 복합체; 및

용매, 산, 염기, 및 버퍼 용액 중에서 선택된 1종 이상을 포함하는, 조성물.

청구항 17

양전하로 표면개질된 실리콘 기판을 제공하는 단계;

상기 실리콘 기판 표면에서 제16항에 따른 조성물을 주입한 PDMS 마이크로채널을 사용하여 DNA 분자를 고정 및 신장시키는 단계; 및

상기 PDMS 마이크로채널장치를 상기 실리콘 기판에서 제거하고 상기 고정 및 신장된 DNA 분자에 대해 주사전자현미경을 통하여 관찰하는 단계;를 포함하는, DNA-단백질-고분자 복합체를 이용한 DNA 분석방법.

청구항 18

제17항에 있어서,

상기 양전하로 표면개질된 실리콘 기판을 제공하는 단계는,

산화실리콘막이 형성된 실리콘 기판을 준비하는 단계; 및

상기 산화실리콘막이 형성된 실리콘 기판과 암모늄염 전구체를 접촉시켜 양전하로 표면개질된 실리콘 기판을 제공하는 단계;를 포함하는, DNA-단백질-고분자 복합체를 이용한 DNA 분석방법.

청구항 19

제18항에 있어서,

상기 암모늄염 전구체가 암모니아수, 암모늄 클로라이드계 화합물, 암모늄 설페이트계 화합물, 암모늄 카보네이트계 화합물, 암모늄 바이카보네이트계 화합물, 및 암모늄 아세테이트계 화합물로부터 선택된 1종 이상을 포함하는, DNA-단백질-고분자 복합체를 이용한 DNA 분석방법.

청구항 20

제17항에 있어서,

상기 PDMS 마이크로채널장치를 상기 실리콘 기판에서 제거하기 전, 상기 조성물을 건조하는 단계를 더 포

합하는, DNA-단백질-고분자 복합체를 이용한 DNA 분석방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 개시는 주사전자현미경(SEM)을 통해 DNA를 분석하기 위한 DNA 분석 키트, DNA-단백질-고분자 복합체, 상기 DNA-단백질-고분자 복합체를 포함하는 조성물, 및 상기 DNA-단백질-고분자 복합체를 이용한 DNA 분석방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] DNA 이미징은 유전체학에서 중추적인 위치를 차지하고 있다. 예전에는 투과전자현미경(TEM)이 DNA 단일 분자에 대한 시각화를 담당하여 왔다. 그러나 투과전자현미경(TEM)을 사용하는 경우, 중금속 또는 중금속과 세도우 캐스팅(shadow casting)법을 결합하여 DNA 이미징을 수행하고 있다. 이 때문에 투과전자현미경(TEM)을 통해 DNA 분자를 관찰하는 데에 많은 시간과 복잡한 절차가 수반된다.

[0003] 이러한 투과전자현미경(TEM)을 대신하여 형광현미경(fluorescence microscopy; FM) 및 원자힘 현미경(atomic force microscopy; AFM) 등이 사용되어 왔다. 이 중, 형광현미경(FM) 기반의 DNA 이미징은 단순하고 접근이 용이하며, 라이브 이미징(live imaging) 능력 때문에 광범위하게 채택되어 왔다. 또한 형광현미경(FM) 기반의 DNA 이미징은 미세유체 장치 및 화학적으로 관능화된 표면과 양립할 수 있다. 그러나 형광현미경(FM)은 해상도가 낮아 다양한 형상과 길이를 갖는 DNA 이미징을 거의 그대로 관찰하기 어려운 문제가 있다.

[0004] 이에 따라, 대안으로 주사전자현미경(scanning electron microscopy; SEM)이 사용되고 있다. SEM을 통한 DNA 관찰은 나노미터 굵기 스케일의 높은 해상도의 장점을 가질 뿐만 아니라, 카본 필름을 대신하여 화학적으로 관능화된 다양한 표면을 갖는 실리콘 웨이퍼와 같은 기판에 사용할 수 있고 DNA 분자를 배열하는데 사용될 수 있는 미세유체 장치에도 사용할 수 있다. 그러나 2 nm 굵기의 DNA 분자 이미징은 종래 주사전자현미경(SEM) 이미징 기술의 검출 한계에 못 미친다. DNA 분자의 시각성을 향상시키기 위해, 나노입자 부착, 나노와이어 성장 등의 방법이 사용되어왔다. 그러나 이러한 방법들은 주로 인공적으로 구성된 DNA 나노구조체를 시각화하는 데 사용될 뿐, DNA에 적용할 경우 큰 어려움을 갖는다.

[0005] 따라서 주사전자현미경(SEM)을 통해 거의 실시간 속도로 다양한 형상 및 길이를 갖는 DNA 분자에 대해 높은 해상도로 관찰과 분석이 가능한 신규한 주사전자현미경(SEM)을 통해 DNA를 분석하기 위한 DNA 분석 키트, DNA 복합체, 상기 DNA 복합체를 포함하는 조성물, 및 상기 DNA 복합체를 이용한 DNA 분석방법에 대한 요구가 여전히 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 일 측면은 주사전자현미경(SEM)을 통해 DNA를 분석하기 위한 DNA 분석 키트를 제공하는 것이다.

[0007] 다른 일 측면은 주사전자현미경(SEM)을 통해 거의 실시간 속도로 다양한 형상 및 길이를 갖는 DNA 분자에 대해 높은 해상도로 관찰과 분석이 가능한 금속-프리(free) DNA-단백질-고분자 복합체를 제공하는 것이다.

[0008] 또 다른 일 측면은 상기 DNA-단백질-고분자 복합체를 포함하는 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 또 다른 일 측면은 상기 DNA-단백질-고분자 복합체를 이용한 DNA 분석방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 일 측면에 따라,

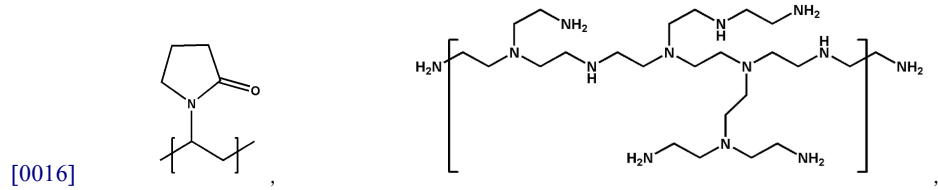
[0011] DNA 분자와 정전기적 상호작용, 인터칼레이션(intercalation), 및 그루브 바인딩(groove binding) 중 하나 이상을 통해 결합가능한 DNA 결합 단백질; 및

[0012] 상기 DNA 결합 단백질과 분자간 정전기적 인력에 의해 결합가능한 고분자, 이의 무수물, 또는 이의 염을 포함하는, 주사전자현미경(SEM)을 통해 DNA를 분석하기 위한 DNA 분석 키트가 제공된다.

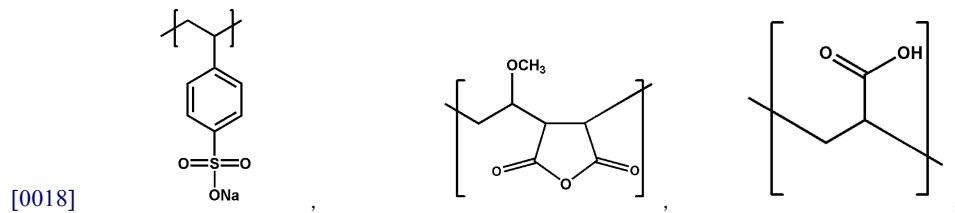
[0013] 상기 DNA 결합 단백질은 형광 단백질을 포함할 수 있다.

[0014] 상기 고분자, 이의 무수물, 또는 이의 염은 하기 화학식 1 내지 화학식 9로 표시되는 구조단위 중 1종 이상을 포함하고, 이들 각각의 중량평균분자량은 10 Kilodalton 내지 100 Kilodalton일 수 있다:

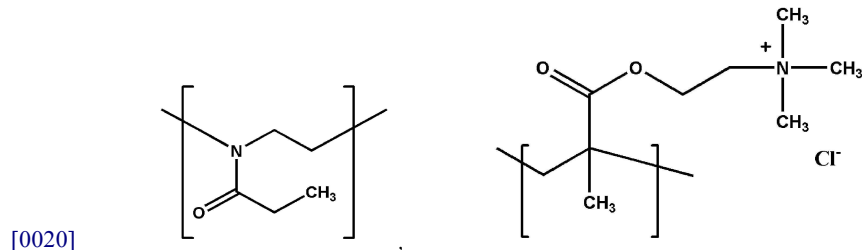
[0015] [화학식 1] [화학식 2]



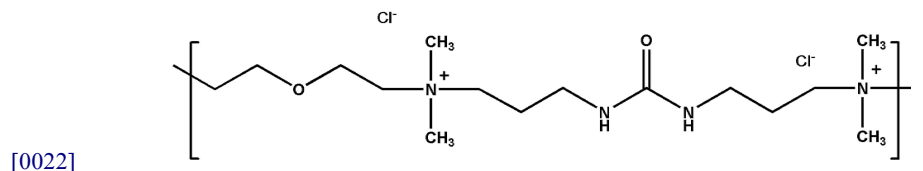
[0017] [화학식 3] [화학식 4] [화학식 5]



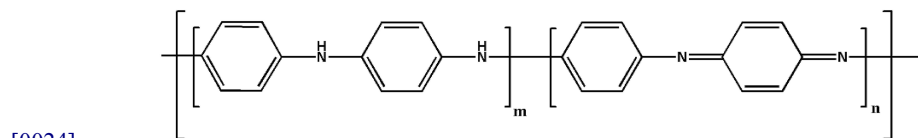
[0019] [화학식 6] [화학식 7]



[0021] [화학식 8]



[0023] [화학식 9]



[0025] 식 중에서,

[0026] m+n은 1일 수 있다.

[0027] 다른 일 측면에 따라,

[0028] DNA 분자;

[0029] 상기 DNA 분자와 결합가능한 아미노산 서열 및 양 말단 중 적어도 하나에 1종 이상의 관능기를 갖는 펩타이드를 포함하는 DNA 결합 단백질; 및

[0030] 상기 DNA 결합 단백질과 분자간 정전기적 인력에 의해 결합가능한 고분자, 이의 무수물, 또는 이의 염을 포함하

는, DNA-단백질-고분자 복합체가 제공된다.

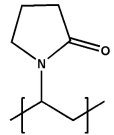
[0031] 상기 고분자는 산소 및 질소 중 1종 이상의 원자를 포함할 수 있다.

[0032] 상기 고분자의 산소 원자 또는 질소 원자는 상기 DNA 결합 단백질에 포함된 O-H 결합의 수소원자 또는 N-H 결합의 수소원자와 수소결합에 의해 결합가능하다.

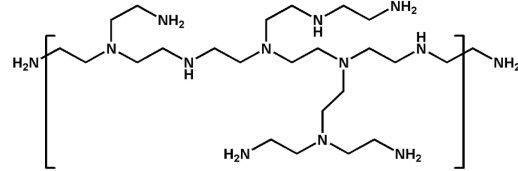
[0033] 상기 고분자, 이의 무수물, 또는 이의 염은 응집체(aggregates) 형태일 수 있다.

[0034] 상기 고분자, 이의 무수물, 또는 이의 염은 하기 화학식 1 내지 화학식 9로 표시되는 구조단위 중 1종 이상을 포함하고, 이들 각각의 중량평균분자량이 10 Kilodalton 내지 100 Kilodalton일 수 있다:

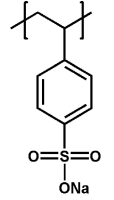
[화학식 1]



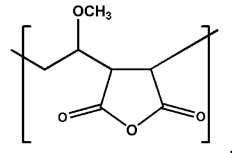
[화학식 2]



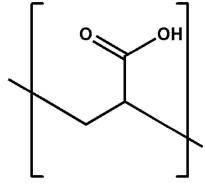
[화학식 3]



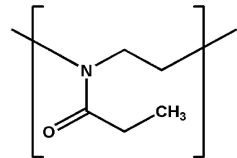
[화학식 4]



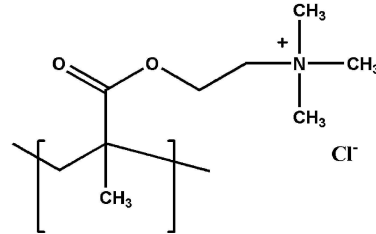
[화학식 5]



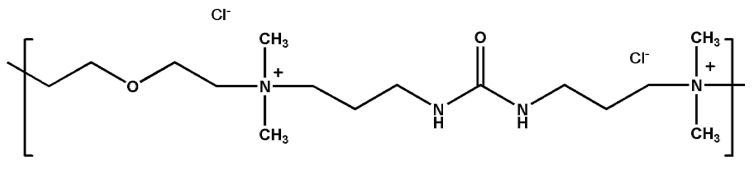
[화학식 6]



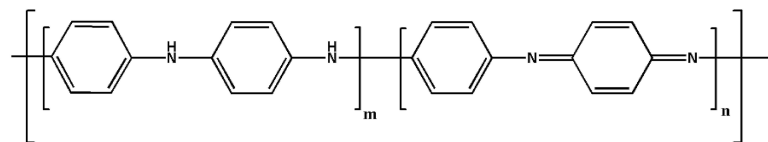
[화학식 7]



[화학식 8]



[화학식 9]



식 중에서,

m+n은 1일 수 있다.

상기 DNA 분자는 선형, 원형, 나선형, 슈퍼코일형, 크리스마스-트리형, 이중 가닥, 또는 단일 가닥 형상을 가

질 수 있다.

- [0048] 상기 DNA 결합 단백질은 형광 단백질을 더 포함할 수 있다.
- [0049] 상기 DNA 분자와 상기 DNA 결합 단백질은 정전기적 상호작용, 인터칼레이션(intercalation), 및 그루브 바인딩(groove binding) 중 하나 이상을 통해 결합 가능하다.
- [0050] 상기 복합체의 굽기(thickness)는 9 nm 내지 20 nm일 수 있다.
- [0051] 상기 복합체는 2차원 또는 3차원 형상을 갖는 DNA를 염색하여 주사전자현미경(SEM)을 통해 시각화 가능하도록 사용될 수 있다.
- [0052] 상기 복합체는 주사전자현미경(SEM)을 통해 연속적인 형상으로 DNA에 대한 시각화 가능하도록 사용될 수 있다.
- [0053] 상기 복합체는 금속-프리(free)일 수 있다.
- [0054] 또 다른 일 측면에 따라,
- [0055] 전술한 DNA-단백질-고분자 복합체; 및
- [0056] 용매, 산, 염기, 및 버퍼 용액 중에서 선택된 1종 이상을 포함하는, 조성물이 제공된다.
- [0057] 또 다른 일 측면에 따라,
- [0058] 양전하로 표면개질된 실리콘 기판을 제공하는 단계;
- [0059] 상기 실리콘 기판 표면에서 전술한 조성물을 주입한 PDMS 마이크로채널을 사용하여 DNA 분자를 고정 및 신장시키는 단계; 및
- [0060] 상기 PDMS 마이크로채널을 상기 실리콘 기판에서 제거하고 상기 고정 및 신장된 DNA 분자에 대해 주사전자현미경을 통하여 관찰하는 단계;를 포함하는, DNA-단백질-고분자 복합체를 이용한 DNA 분석방법이 제공된다.
- [0061] 상기 양전하로 표면개질된 실리콘 기판을 제공하는 단계는,
- [0062] 산화실리콘막이 형성된 실리콘 기판을 준비하는 단계; 및
- [0063] 상기 산화실리콘막이 형성된 실리콘 기판과 암모늄염 전구체를 접촉시켜 양전하로 표면개질된 실리콘 기판을 제공하는 단계;를 포함할 수 있다.
- [0064] 상기 암모늄염 전구체는 암모니아수, 암모늄 클로라이드계 화합물, 암모늄 설페이트계 화합물, 암모늄 카보네이트계 화합물, 암모늄 바이카보네이트계 화합물, 및 암모늄 아세테이트계 화합물로부터 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [0065] 상기 PDMS 마이크로채널을 상기 실리콘 기판에서 제거하기 전, 상기 조성물을 건조하는 단계를 더 포함할 수 있다.

발명의 효과

- [0066] 주사전자현미경(SEM)을 통해 DNA를 분석하기 위한 DNA 분석 키트, DNA-단백질-고분자 복합체, 이를 포함하는 조성물, 및 상기 DNA-단백질-고분자 복합체를 이용한 DNA 분석방법에 관한 발명이다.
- [0067] 일 측면에 따른 DNA-단백질-고분자 복합체는 DNA 분자, 상기 DNA 분자와 결합가능한 아미노산 서열 및 양 말단 중 적어도 하나에 1종 이상의 관능기를 갖는 펩타이드를 포함하는 DNA 결합 단백질, 및 상기 DNA 결합 단백질과 분자간 정전기적 인력에 의해 결합가능한 고분자, 이의 무수물, 또는 이의 염을 포함한다. 상기 DNA-단백질-고분자 복합체는 금속-프리(free)이며 주사전자현미경(SEM)을 통해 거의 실시간 속도로 다양한 형상 및 길이를 갖는 DNA분자에 대해 높은 해상도로 관찰 및 분석을 할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0068] 도 1은 일 구현예에 따른 DNA-단백질-고분자 복합체의 모식도이다.
- 도 2는 일 구현예에 따른 PDMS 마이크로채널 장치의 모식도이다.
- 도 3a는 참고예 1에 따른 양이온으로 표면개질된 실리콘 웨이퍼에서 실시예 7에 따른 DNA-mNeonGreen-HMG-PVP

복합체 조성물을 이용하여 염색된 DNA 분자를 FE-SEM에 의해 관찰한 결과이다.

도 3b는 참고예 2에 따른 산화실리콘 웨이퍼에서 실시예 7에 따른 DNA-mNeonGreen-HMG-PVP 복합체 조성물을 이용하여 염색된 DNA 분자를 FE-SEM에 의해 관찰한 결과이다.

도 3c는 참고예 3에 따른 실리콘 웨이퍼에서 실시예 7에 따른 DNA-mNeonGreen-HMG-PVP 복합체 조성물을 이용하여 염색된 DNA 분자를 FE-SEM에 의해 관찰한 결과이다.

도 3d는 참고예 4에 따른 Pt 코팅된 실리콘 웨이퍼에서 실시예 7에 따른 DNA-mNeonGreen-HMG-PVP 복합체 조성물을 이용하여 염색된 DNA 분자를 FE-SEM에 의해 관찰한 결과이다.

도 4a 및 도 4b는 각각 PDMS 마이크로채널 장치를 사용하지 않고 실시예 7에 따른 DNA-mNeonGreen-HMG-PVP 복합체 조성물을 이용하여 염색된 DNA 분자를 FE-SEM 및 FM에 의해 각각 관찰한 결과이다.

도 5는 PDMS 마이크로채널 장치를 사용하고 실시예 7에 따른 DNA-mNeonGreen-HMG-PVP 복합체 조성물을 이용하여 염색된 DNA 분자를 FE-SEM으로 관찰한 결과이다.

도 6a는 PDMS 마이크로채널 장치를 사용하고 실시예 5에 따른 DNA-mNeonGreen-HMG-PEOX 복합체 조성물을 이용하여 염색된 DNA 분자를 FE-SEM으로 관찰한 결과이다.

도 6b는 PDMS 마이크로채널 장치를 사용하지 않고 실시예 5에 따른 DNA-mNeonGreen-HMG-PEOX 복합체 조성물을 이용하여 염색된 DNA 분자를 FE-SEM으로 관찰한 결과이다.

도 7a 및 도 7b는 각각 실시예 1에 따른 DNA-단백질-고분자 복합체 조성물을 이용하여 염색된 DNA 분자를 FE-SEM 및 FM으로 관찰한 결과이다.

도 8은 실시예 2에 따른 DNA-단백질-고분자 복합체 조성물을 이용하여 염색된 DNA 분자를 FE-SEM으로 관찰한 결과이다.

도 9a 및 도 9b는 각각 실시예 3에 따른 DNA-단백질-고분자 복합체 조성물을 이용하여 염색된 DNA 분자를 FE-SEM 및 FM으로 관찰한 결과이다.

도 10a 및 도 10b는 각각 실시예 4에 따른 DNA-단백질-고분자 복합체 조성물을 이용하여 염색된 DNA 분자를 FE-SEM 및 FM으로 관찰한 결과이다.

도 11은 실시예 6에 따른 DNA-단백질-고분자 복합체 조성물을 이용하여 염색된 DNA 분자를 FE-SEM으로 관찰한 결과이다.

도 12는 비교예 1에 따른 DNA 용액을 이용하여 FE-SEM으로 DNA 분자를 관찰한 결과이다.

도 13a 및 도 13b는 각각 비교예 3에 따른 DNA-mNeonGreen-HMG 혼합물을 이용하여 FE-SEM 및 FM으로 DNA 분자를 관찰한 결과이다.

도 14는 비교예 3에 따른 DNA-PVP 혼합물을 이용하여 FE-SEM으로 염색된 DNA 분자를 관찰한 결과이다.

도 15는 비교예 4에 따른 DNA-PANI 혼합물을 이용하여 FE-SEM으로 염색된 DNA 분자를 관찰한 결과이다.

도 16a 및 도 16b는 각각 실시예 7에 따른 DNA-mNeonGreen-HMG-PVP 복합체 조성물을 이용하여 FE-SEM 및 FM으로 염색된 DNA 분자를 관찰한 결과이다.

도 16c는 실시예 7에 따른 DNA-mNeonGreen-HMG-PVP 복합체 조성물을 이용하여 DNA-mNeonGreen-HMG-PVP 복합체를 인버트된 FE-SEM로 관찰한 결과이다.

도 16d는 실시예 7에 따른 DNA-mNeonGreen-HMG-PVP 복합체에 대해 반치폭 매크로 프로파일을 이용한 그래프이다.

도 17a 및 도 17b는 각각 DNA-mNeonGreen-HMG-PVP 복합체 조성물을 이용하여 염색된 DNA 분자를 FE-SEM 및 FM으로 관찰한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0069]

이하, 첨부된 도면을 참조하면서 본 발명의 일 구현예에 따른 주사전자현미경(SEM)을 통해 DNA를 분석하기 위한 DNA 분석 키트, DNA-단백질-고분자 복합체, 상기 DNA-단백질-고분자 복합체를 포함하는 조성물, 및 상기 DNA-단

백질-고분자 복합체를 이용한 DNA 분석방법에 관하여 상세히 설명하기로 한다. 이하는 예시로서 제시되는 것으로, 이에 의해 본 발명이 한정되지는 않으며 본 발명은 후술할 특허청구범위의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

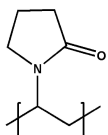
[0070] 이하에서, "상부" 또는 "상"이라고 기재된 것은 접촉하여 바로 위에 있는 것뿐만 아니라 비접촉으로 위에 있는 것도 포함할 수 있다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 또한 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다. 본 명세서에서 "조합"이라는 용어는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 혼합물, 합금, 반응 생성물 등을 포함한다. 제1, 제2, 제3, 제4 등의 용어는 다양한 구성요소들을 설명하는데 사용될 수 있지만, 구성요소들은 용어들에 의해 한정되어서는 안 된다. 용어들은 하나의 구성요소를 다른 구성요소로부터 구별하는 목적으로만 사용된다. "또는"은 달리 명시하지 않는 한 "및/또는"을 의미한다. 본 명세서에서 "연결된"이라는 용어는 직접 연결, 간접 연결, 또는 간접 통신을 지칭할 수 있다. 본 명세서 전반에 걸쳐 "일구현예", "구현예" 등은 실시예와 관련하여 기술된 특정요소가 본 명세서에 기재된 적어도 하나의 실시예에 포함되며 다른 실시예에 존재할 수도 존재하지 않을 수도 있음을 의미한다. 또한, 기재된 요소들은 다양한 실시예들에서 임의의 적절한 방식으로 결합될 수 있음을 이해해야한다. 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 기술적 및 과학적 용어는 본 출원이 속하는 기술분야의 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 인용된 모든 특허, 특허출원 및 기타 참고문헌은 그 전체가 본원에 참고로 포함된다. 그러나, 본 명세서의 용어가 통합된 참조의 용어와 모순되거나 충돌하는 경우, 본 명세서로부터의 용어는 통합된 참조에서 상충하는 용어보다 우선한다. 특정 실시예 및 구현예가 설명되었지만, 현재 예상하지 못하거나 예상할 수 없는 대안, 수정, 변형, 개선 및 실질적인 균등물이 출원인 또는 당업자에게 발생할 수 있다. 따라서, 첨부된 특허청구범위 및 보정 대상은 그러한 모든 대안, 변형 변형, 개선 및 실질적 균등물을 포함하는 것으로 의도된다.

[0071] 일 구현예에 따른 주사전자현미경(SEM)을 통해 DNA를 분석하기 위한 DNA 분석 키트는 DNA 분자와 정전기적 상호작용, 인터칼레이션(intercalation), 및 그루브 바인딩(groove binding) 중 하나 이상을 통해 결합가능한 DNA 결합 단백질; 및 상기 DNA 결합 단백질과 분자간 정전기적 인력에 의해 결합가능한 고분자, 이의 무수물, 또는 이의 염을 포함할 수 있다.

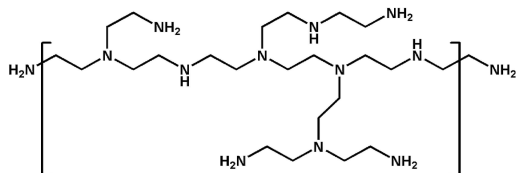
[0072] 상기 DNA 결합 단백질은 형광 단백질을 포함할 수 있다.

[0073] 상기 고분자, 이의 무수물, 또는 이의 염은 하기 화학식 1 내지 화학식 9로 표시되는 구조단위 중 1종 이상을 포함하고, 이들 각각의 중량평균분자량이 10 Kilodalton 내지 100 Kilodalton일 수 있다:

[0074] [화학식 1]

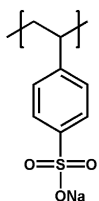


[화학식 2]

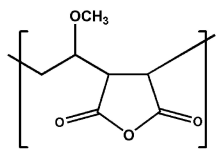


[0075]

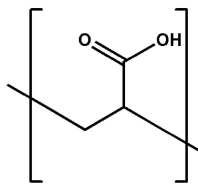
[0076] [화학식 3]



[화학식 4]



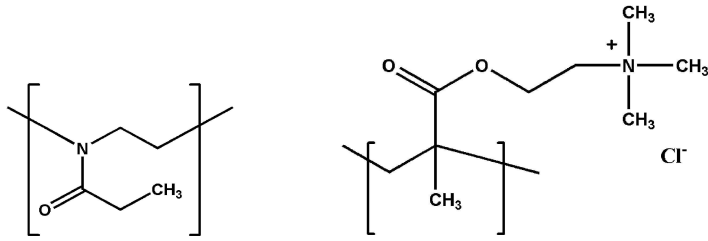
[화학식 5]



[0077]

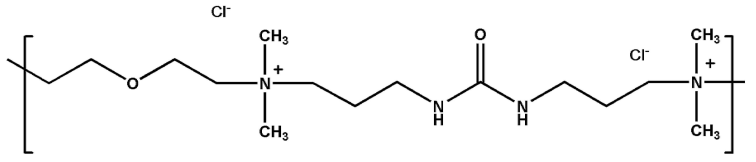
[0078] [화학식 6]

[화학식 7]



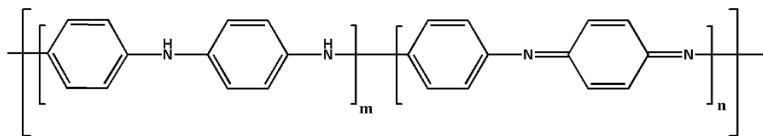
[0079]

[0080] [화학식 8]



[0081]

[0082] [화학식 9]



[0083]

[0084] 식 중에서,

[0085] $m+n$ 은 1일 수 있다.

[0086] 도 1은 일 구현예에 따른 DNA-단백질-고분자 복합체의 모식도이다.

[0087] 도 1을 참조하면, 일 구현예에 따른 DNA-단백질-고분자 복합체는 DNA 분자, 상기 DNA 분자와 결합가능한 DNA 결합 단백질, 및 상기 DNA 결합 단백질과 결합가능한 고분자로 구성되어 있다. 복합체는 2종 이상의 구성요소가 결합된 일 구조체를 말한다. 본 명세서에서 DNA-단백질-고분자 복합체는 DNA, 단백질, 및 고분자가 결합된 일 구조체를 말한다.

[0088] DNA 분자는 뉴클레오타이드의 중합체로 디옥시리보스를 중심으로 한 쪽에는 인산염이 결합되어 있고 다른 한 쪽에는 4 종류의 핵염기 가운데 하나가 결합되어 있는 구조이다. DNA 분자는 유전자의 본체를 구성한다.

[0089] 일 구현예에 따른 DNA 분자는 구조, 길이, 및 형상에 관계없이 모든 DNA 분자를 사용할 수 있다. DNA 분자는 수 kbp 내지 수 Mbp의 길이를 갖는 DNA 분자일 수도 있다. 예시적인 일 구현예에 따른 DNA 분자는 나노 크기의 굵기와 마이크로 크기의 길이를 갖는 DNA일 수 있다. 이러한 DNA 분자의 예로는 λ 파지 DNA (48.5 kb) 또는 M13mp18 이중가닥 DNA 등을 포함할 수 있다. 예를 들어, DNA 분자는 선형, 원형, 나선형, 슈퍼코일형, 크리스마스-트리형, 이중 가닥, 또는 단일 가닥 형상을 가질 수 있다.

[0090] DNA 결합 단백질은 DNA 결합 도메인과 DNA 분자에 특이적 또는 비특이적 친화력을 갖는 단백질이다. 일 구현예에 따른 DNA 결합 단백질은 DNA 분자와 결합가능한 아미노산 서열 및 양 말단 중 적어도 하나에 1종 이상의 관능기를 갖는 펩타이드를 포함할 수 있다.

[0091] 아미노산 서열은 리신(lysine, Lys), 트립토판(tryptophan, Trp), 아르기닌 (Arginine, Arg), 히스티딘 (Histidine, His), 페닐알라닌(Phenylalanine, Phe), 알라닌(Alanine, Ala) 및 티로신(Tyrosine, Tyr) 중 1종 이상을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않고 DNA 결합 단백질에 사용 가능한 모든 아미노산 서열을 이용할 수 있다.

[0092] DNA 분자와 DNA 결합 단백질의 결합은 정전기적 상호작용, 인터칼레이션(intercalation), 및 그루브 바인딩 (groove binding) 중 하나 이상을 통해 결합가능하다. 예시적인 일 구현예에 따른 펩타이드는 양전하의 아미노산 잔기들을 포함하여 음전하의 DNA 분자와 정전기적 상호작용할 수 있다. DNA 분자와 정전기적 상호작용에 의해 결합하는 펩타이드는 아르기닌, 히스티딘, 및 리신 중 1종 이상을 포함하는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 그루브 바인딩은 DNA 분자의 노출된 염기와 상기 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드가 결합하는 것으로, 상기 펩타이드는 DNA와 그루브 바인딩을 통해 결합할 수 있다. 인터칼레이션은 층상구조가 있는 물질의 층간에

분자, 원자와 이온이 삽입되는 현상으로, 상기 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드는 DNA 분자 내로 삽입될 수 있다. 이 때, DNA 분자와 인터칼레이션에 의해 결합되는 펩타이드는 방향족 고리를 가진 아미노산인 페닐알라닌, 티로신, 및 트립토판 중 1종 이상을 포함하는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0093] 펩타이드는 정전기적 상호작용과 더불어 DNA 분자와 그루브 바인딩 또는 인터칼레이션할 수 있거나 또는 정전기적 상호작용과 더불어 인터칼레이션 및 그루브 바인딩 모두 가능하다.

[0094] 펩타이드는 양 말단, 즉 N-말단 및 C-말단 중 적어도 하나에 1종 이상의 관능기를 가질 수 있다. 관능기는 티올기, 아민, 카르복실기, 시스테인(cysteine)기, 아자이드(Azide)기, 알킨(Alkyne)기, 글루타르알데히드(glutaraldehyde)기, 및 말레이미드(maleimide)기 중 1종 이상을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않고 DNA 결합 단백질에 사용 가능한 모든 펩타이드를 포함할 수 있다. 예를 들어, 펩타이드는 DNA 분자와 결합하여 DNA 분자에 상술한 관능기를 제공할 수 있다.

[0095] 예시적인 일 구현예에 따른 DNA 결합 단백질은 Truncated TALE(tTALE), H-NS, Cro, HMG 등의 히스톤-유사 뉴클레오티드 구조 단백질을 포함할 수 있다.

[0096] 예시적인 일 구현예에 따른 DNA 결합 단백질은 형광 단백질을 더 포함할 수 있다. 형광 단백질은 특별히 제한되지 않고 공지의 모든 형광 단백질을 포함할 수 있다. 형광 단백질은 후술하는 고분자의 우수한 도킹 사이트(docking site)의 역할을 한다. 또한 형광 단백질의 올리고머화는 후술하는 고분자와의 결합력을 향상시킬 수 있고 후술하는 고분자와 더불어 DNA 분자 주위에 집합체로 존재할 수 있다.

[0097] 예시적인 일 구현예에 따른 DNA 결합 단백질은 형광 단백질과 링커를 통해 결합될 수 있거나 또는 링커없이 DBP와 FP가 직접 결합될 수 있다. DNA 결합 단백질-형광 단백질의 예로는 Truncated TALE(tTALE)-emGFP, H-NS-mScarlet, Cro-mNeonGreen, 및 mNeonGreen-HMG 등을 포함할 수 있다. 이러한 DNA 결합 단백질-형광 단백질은 전자현미경을 통해 DNA 분자를 시각화하는데 필요한 밝기 및 DNA 분자 신장에 영향을 줄 수 있다.

[0098] 본 명세서에서, 상기 DNA 결합 단백질과 결합가능한 고분자는 고분자 이외에 이의 무수물, 또는 이의 염을 포함한다. 염은 무기염 또는 유기염일 수 있다. 예를 들어, 염은 무기염 또는 유기염일 수 있다. 예를 들어, 염은 양이온 무기염일 수 있다.

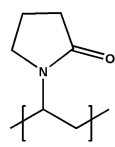
[0099] 예시적인 일 구현예에 따른 고분자는 산소 및 질소 중 1종 이상의 원자를 포함할 수 있다.

[0100] 예시적인 일 구현예에 따른 고분자의 산소 원자 또는 질소 원자는 상기 DNA 결합 단백질에 포함된 O-H 결합의 수소원자 또는 N-H 결합의 수소원자와 수소결합에 의해 결합가능하다. 이러한 수소결합은 분자간의 결합에 해당되며 화학결합과는 구별된다.

[0101] 예시적인 일 구현예에 따른 고분자, 이의 무수물, 또는 이의 염은 응집체(aggregates) 형태일 수 있다.

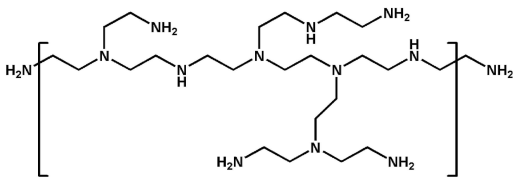
[0102] 예시적인 일 구현예에 따른 고분자, 이의 무수물, 또는 이의 염은 하기 화학식 1 내지 화학식 9로 표시되는 구조단위 중 1종 이상을 포함할 수 있다:

[0103] [화학식 1]

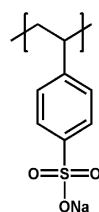


[0104]

[화학식 2]

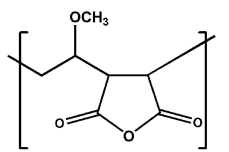


[0105] [화학식 3]



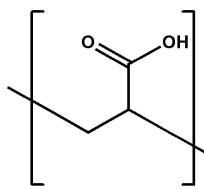
[0106]

[화학식 4]

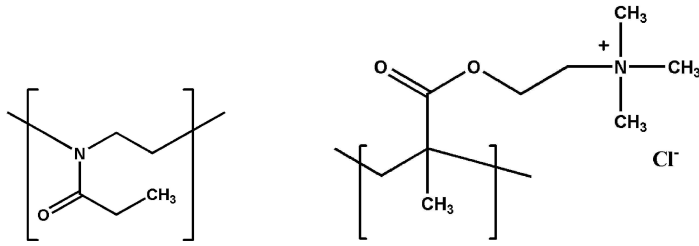


[0107] [화학식 6]

[화학식 5]

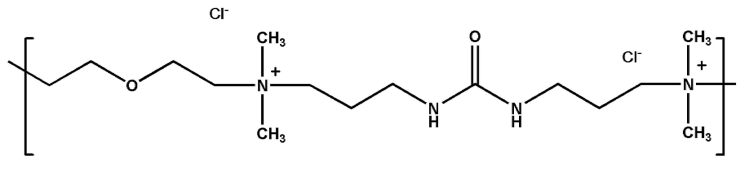


[화학식 7]



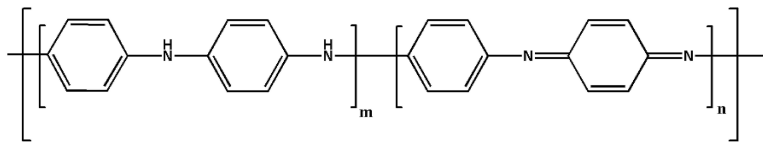
[0108]

[0109] [화학식 8]



[0110]

[0111] [화학식 9]



[0112]

[0113] 식 중에서,

[0114] $m+n$ 은 1일 수 있다.

[0115] 예시적인 일 구현예에 따른 고분자, 이의 무수물, 또는 이의 염의 중량평균분자량(Mw)은 10 Kilodalton 내지 100 Kilodalton일 수 있다. 예를 들어 고분자, 이의 무수물, 또는 이의 염의 중량평균분자량(Mw)은 20 Kilodalton 내지 100 Kilodalton이거나 30 Kilodalton 내지 100 Kilodalton이거나 40 Kilodalton 내지 100 Kilodalton이거나 40 Kilodalton 내지 90 Kilodalton이거나 또는 40 Kilodalton 내지 90 Kilodalton일 수 있다.

[0116] 예시적인 일 구현예에 따른 고분자, 이의 무수물, 또는 이의 염은 상술한 DNA 결합 단백질과 함께 DNA 분자를 검은색으로 염색하여 주사전자현미경(SEM)을 통한 DNA 분자의 시각화에 기여할 수 있다.

[0117] 예시적인 일 구현예에 따른 복합체의 굽기(thickness)는 9 nm 내지 20 nm일 수 있다. 예시적인 일 구현예에 따른 복합체의 평균 굽기는 약 15.0 ± 4.0 nm일 수 있다.

[0118] 일 구현예에 따른 복합체는 2차원 또는 3차원 형상을 갖는 DNA를 염색하여 주사전자현미경(SEM)을 통해 시각화 가능하도록 사용될 수 있다.

[0119] 일 구현예에 따른 복합체는 주사전자현미경(SEM)을 통해 연속적인 형상으로 DNA에 대한 시각화 가능하도록 사용될 수 있다.

[0120] 일 구현예에 따른 복합체는 금속-프리(free)일 수 있다. 이에 따라, 투과전자현미경(TEM)을 통해 DNA 분자를 관찰하는 데에 많은 시간 및 복잡한 절차가 필요치 않다.

[0121] 다른 일 구현예에 따른 조성물은 전술한 DNA-단백질-고분자 복합체; 및 용매, 산, 염기, 및 버퍼 용액 중에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다. 상기 조성물은 용매, 버퍼 용액 또는 이들의 혼합물에 전술한 DNA-단백질-고분자 복합체를 첨가하고, 여기에 산, 및/또는 염기를 첨가하여 준비될 수 있다. 또한 상기 조성물은 당해 기술분야에서 사용할 수 있는 다른 첨가제를 추가적으로 포함할 수 있다. 상기 조성물이 포함하는 용매, 산, 염기, 및 버퍼 용액의 함량은 요구되는 성능에 따라 적절히 조절될 수 있다. 또는 상기 조성물은 시료(sample)와 혼합될 수 있다.

[0122] 또 다른 일 구현예에 따른 DNA-단백질-고분자 복합체를 이용한 DNA 분석방법은 양전하로 표면개질된 실리콘 기판을 제공하는 단계; 상기 실리콘 기판 표면에서 전술한 조성물을 주입한 PDMS 마이크로채널을 사용하여 DNA 분자를 고정 및 신장시키는 단계; 및 상기 PDMS 마이크로채널을 상기 실리콘 기판에서 제거하고 상기 고정 및 신

장된 DNA 분자에 대해 주사전자현미경을 통하여 관찰하는 단계;를 포함할 수 있다.

- [0123] 양전하로 표면개질된 실리콘 기판은 DNA 분자를 고정시키는 역할을 한다. 이와 비교하여, 형광현미경(FM) 이미징에 사용되는 유리 기판 표면은 전자 전하 효과(electron charging effects)를 유도하기 때문에 주사전자현미경을 통하여 DNA 분자를 관찰하는데 적합하지 않다. 또한 금(Au) 또는 백금(Pt)과 같은 전도성 금속이 코팅된 표면을 갖는 기판은 주사전자현미경(SEM)을 통하여 DNA 분자를 관찰할 때, 2 nm 굵기의 DNA 분자 이미지가 묻혀 흐릿하게 나타나 적합하지 않다. 본 발명에 사용된 실리콘 기판은 반도체 특성을 가지기 때문에 효과적인 전하 이동이 가능하다.
- [0124] 양전하로 표면개질된 실리콘 기판을 제공하는 단계는, 산화실리콘막이 형성된 실리콘 기판을 준비하는 단계; 및 상기 산화실리콘막이 형성된 실리콘 기판과 암모늄염 전구체를 접촉시켜 양전하로 표면개질된 실리콘 기판을 제공하는 단계;를 포함할 수 있다.
- [0125] 산화실리콘막이 형성된 표면에 암모늄염의 양전하로 표면개질된 실리콘 기판은 DNA 분자 백본을 고정시키는 역할을 한다. 산화실리콘막의 두께는 수 나노 두께 또는 수십 나노 두께 범위일 수 있다. 산화실리콘막의 두께는 양전하로 표면 개질함에 따라 양전하를 유지하는 범위 내에서 두께를 적절히 조절할 수 있다.
- [0126] 암모늄염 전구체는 암모니아수, 암모늄 클로라이드계 화합물, 암모늄 설페이트계 화합물, 암모늄 카보네이트계 화합물, 암모늄 바이카보네이트계 화합물, 및 암모늄 아세테이트계 화합물로부터 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다. 예를 들어, 암모늄염 전구체는 암모늄 클로라이드계 화합물일 수 있다. 예를 들어, 암모늄염 전구체는 N-트리메톡시실릴프로필-N,N,N-트리메틸암모늄클로라이드일 수 있다.
- [0127] 예시적인 일 구현예에 따른 DNA 분석방법은 PDMS 마이크로채널을 상기 실리콘 기판에서 제거하기 전, 상기 조성물을 건조하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0128] PDMS 마이크로채널은 폴리디메틸실록산 마이크로채널이며, DNA-단백질-고분자 복합체 조성물을 마이크로채널을 통해 가이드하는 역할을 한다. PDMS 마이크로채널은 DNA 분자를 신장하여 주사전자현미경(SEM)을 통해 관찰시 평행하게 잘 배열된 이미지로 보이게 한다. DNA-단백질-고분자 복합체 조성물을 상온에서 30분 내지 1 시간 동안 건조한 뒤, 주사전자현미경(SEM)을 통한 이미지 관찰을 한다.
- [0129] 이하 본 발명의 실시예 및 비교예를 기재한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 일 실시예일뿐 본 발명이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0130]
- [0131] [실시예]
- [0132] 물질
- [0133] 달리 명시하지 않는 한, 다음과 같은 물질을 사용하였다.
- [0134] QIAprep 스핀 미니프랩 키트, Ni-NTA 아가로스 수지는 Qiagen (Hilden, Germany)에서 구입하였다. λ 파지 DNA (48.5 kb), Nb. BssSI, M13mp18 이중가닥 DNA (7.2 kb), 및 DNA 중합효소 I은 뉴잉글랜드 바이오랩 (Ipswich, MA)에서 구입하였다. T4 GT7 DNA는 nippongene (Tokyo, Japan)에서 구입하였다. 돼지 췌장에서 유래한 트립신은 시그마-알드리치 (St. Louis, Missouri)에서 구입하였다. 콜세미드(Colcemid)는 로슈 (Basel, Swiss)에서 구입하였다. AccuRapid 클로닝 키트, DEPC-DW는 바이오니아 (대전, 한국)에서 구입하였다. DMEM (고농도 글루코스, 피루베이트), FBS (소태아혈청, qualified, 미국), 항생제-항진균제 (100x), 및 트리신-EDTA (0.25%, 페놀 레드)는 gibco (Waltham, MA)에서 구입하였다. 울트라 LMP 아가로스는 Invitrogen (Waltham, MA)에서 구입하였다. 단백질분해효소 K는 Enzymonics (대전, 한국)에서 구입하였다. AMPure XP 비드는 Beckman Coulter (Brea, California)에서 구입하였다. 폴리비닐피롤리돈 (PVP, 중량평균분자량: 40,000), 폴리 (2-에틸-2-옥사졸린), 폴리아닐린 (에메랄딘 염), 25 nm MCE막, 및 포름알데히드 용액 (물 중, 37%)은 Merck Millipore (Burlington, MA)에서 구입하였다. 포름아미드는 JUNSE (Tokyo, Japan)에서 구입하였다. Qdot 585 스트렙타비딘 컨쥬게이트는 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA)에서 구입하였다. SU-8 포토레지스트 (2005, 2015) 및 SU-8 현상제는 Kayaku Advanced Materials (Westborough, MA)에서 구입하였다. PDMS 및 이의 경화제는 K1 solution (광명, 한국)에서 구입하였다. 에틸 알코올 (99.9%), 메틸 알코올, 황산, 과산화수소는 Jin Chemical (시흥, 한국)에서 구입하였다. 빙초산은 duksan 시약 (안산, 한국)에서 구입하였다. 50% 메탄올 중에 N-트리메톡시실릴프로필-N,N,N-트리메틸암모늄클로라이드는 Gelest (Morrisville, PA)에서 구입하였다.

- [0135] PDMS 마이크로채널
- [0136] PDMS 마이크로채널을 "Counting DNA molecules on a microchannel surface for quantitative analysis, *Talanta* 2023, **252**: 123826"에 기재된 바와 같이 제작하였다.
- [0137] PDMS 장치는 표준 소프트-리소그래피 복제 성형기술을 사용하여 제작하였다. 우선, 마이크로채널 템플릿은 반복된 포토리소그래피 절차를 이용하여 실리콘 웨이퍼 상에 2층으로 증착한 다음, Kayaku Advanced Materials SU-8 2000 데이터시트에 설명된 프로토콜에 따랐다. 다음으로, 스핀 코터 (Midas System SPIN-1200D, 대전, 한국)를 사용하여 SU-8 2015 포토레지스트 20 μm 층을 실리콘 웨이퍼 상에 도포하였다. 이어서, 스핀 코팅된 웨이퍼는 마스크를 통해 얼라이너 (Midas System MDA-400LJ, 대전, 한국)를 사용하여 350 nm 방사선에 노출시켰다. SU-8 현상기를 사용하여 웨이퍼를 베이킹 및 현상한 후, 제2층에는 SmartPrint (SmartForce Technologies, La Tronche, 프랑스)의 마스크 없는 리소그래피 시스템을 사용하여 현상된 웨이퍼 상에 제2층의 정밀한 패터닝을 가능하게 하였다. SmartPrint가 g-라인 포토레지스트와 호환되기 때문에, SU-8 TF 6002를 사용하였다. 템플릿 웨이퍼 제작 후, 실리콘 웨이퍼 상에 위치한 마이크로채널 템플릿은 PDMS 프리-폴리머 및 경화제의 혼합물(10:1 중량비)로 코팅하였고, 65 °C에서 12 시간 동안 인큐베이션하였다. 웨이퍼에서 경화된 PDMS를 박리한 후, PDMS 내로 채널을 물리적으로 펀칭하여 챔버를 생성하였다. 이어서, PDMS 마이크로채널은 에어 플라즈마 발생기 (Femto Science Cute Basic, 한국)로 100 W에서 30초 동안 산화를 수행하였다. 마지막으로, PDMS 장치를 세척하고 탈이온수에 저장하여 도 2와 같이 PDMS 마이크로채널을 제작하였다 (100 μm x 2.4 μm).
- [0138] (DNA 결합 단백질)
- [0139] **제조예 1: Truncated TALE(tTALE)-emGFP**
- [0140] tTALE-emGFP 플라스미드는 "Truncated TALE-FP as DNA Staining Dye in a High-salt Buffer. *Sci Rep-Uk* **9**, 17197 (2019)" 및 "21 Fluorescent Protein-Based DNA Staining Dyes. *Molecules* **27** (2022)"에 기재된 바와 같이 제조하였다.
- [0141] tTALE-emGFP 플라스미드는 emGFP 형광 단백질을 DNA 결합 단백질 TALE의 C-말단 영역에 연결하는 확장중합효소 연쇄반응을 통해 생성하였다. 브릿지(bridging) 아미노산 서열은 GGSGG이었다. 컨스트럭트 tTALE-EmGFP 플라스미드는 표준 클로닝 절차를 이용하여 *E. coli* BL21(DE3) 균주로 형질전환하였다. tTALE-emGFP에 대한 아미노산 서열은 하기 표 1에 기재하였다.
- [0142] **제조예 2: H-NS**
- [0143] H-NS 플라스미드는 *Analyst* **144**, 921-927 (2019)에 기재된 H-NS-mCherry로부터 H-NS 유전자를 증폭하여 구성하였다. 플라스미드 pET15b는 제한효소 NdeI (CA⁺TATG) 및 *Bam*HI (G⁺GATCC)로 절단하였다. 그리고나서, H-NS 유전자를 AccuRapid 클로닝 키트를 사용하여 플라스미드에 삽입 및 라이게이션(ligation)하여 H-NS 플라스미드를 생성하였다. 컨스트럭트 H-NS 플라스미드는 표준 클로닝 절차를 이용하여 *E. coli* BL21 (DE3) 균주로 형질전환하였다. H-NS에 대한 아미노산 서열은 하기 표 1에 기재하였다.
- [0144] **제조예 3: H-NS-mScarlet**
- [0145] H-NS-mScarlet 플라스미드는 "AT-specific DNA visualization revisits the directionality of bacteriophage lambda DNA ejection. *Nucleic Acids Research* (2023)"에 기재된 바와 같이 제조하였다.
- [0146] H-NS 플라스미드는 *Bam*HI (G⁺GATCC)로 절단하였다. 그리고나서, 증폭된 mScarlet 유전자도 AccuRapid 클로닝 키트를 사용하여 H-NS 플라스미드에 삽입 및 라이게이션(ligation)하였다. 컨스트럭트 H-NS-mScarlet 플라스미드는 표준 클로닝 절차를 이용하여 *E. coli* BL21 (DE3) 균주로 형질전환하였다. H-NS-mScarlet에 대한 아미노산 서열은 하기 표 1에 기재하였다.
- [0147] **제조예 4: Cro-mNeonGreen**
- [0148] Cro-mNeonGreen 플라스미드는 "Negative nanopore sequencing for mapping biochemical processes on DNA molecules. *Chemical Communications* **59**, 9388-9391 (2023)"에 기재된 바와 같이 제조하였다.
- [0149] 카세트 벡터(cassette vector) 시스템을 사용하여 DNA 결합 단백질 코딩 유전자인 Cro를 mNeonGreen 플라스미드에 삽입하여 Cro-mNeonGreen 플라스미드를 생성하였다.
- [0150] mNeonGreen 플라스미드는 pET15b 벡터 내의 NdeI(CA⁺TATG) 및 *Xma*I(C⁺CCGGG) 제한 부위 사이에 mNeonGreen 유

전자를 삽입하여 생성하였다. Cro 유전자는 박테리오파지 λ DNA를 주형으로 사용하여 PCR로 증폭하였다. 컨스트럭트 Cro-mNeonGreen 플라스미드는 표준 클로닝 절차를 이용하여 *E. coli* BL21(DE3) 균주로 형질전환하였다. Cro-mNeonGreen에 대한 아미노산 서열은 하기 표 1에 기재하였다.

[0151] **제조예 5: mNeonGreen-HMG**

[0152] 상기 mNeongreen-HMG 플라스미드는 "21 Fluorescent Protein-Based DNA Staining Dyes. *Molecules* 2022, 27(16)"에 기재된 바와 같이 제조하였다.

[0153] mNeongreen-HMG 플라스미드는 형광 단백질을 DNA 결합 단백질인 HMG(high mobility group)의 N-말단 영역에 연결하는 확장중합효소 연쇄반응을 이용하여 생성하였다. 브릿지(bridging) 아미노산 서열은 GGSGG이었다. mNeongreen의 경우, Lamp1-mNeonGreen은 Dorus Gadella (Addgene plasmid # 98882)에 의해 제공된 것을 사용하였다. Addgene 컨스트럭트는 HMG와 GGSGG 링커를 포함한 확장 PCR 결과물을 만드는 템플릿 역할을 하였다. mNeongreen-HMG에 대한 아미노산 서열을 하기 표 1에 기재하였다.

[0154] 컨스트럭트 mNeongreen-HMG 플라스미드는 표준 클로닝 절차를 이용하여 *E. coli* BL21(DE3) 균주로 형질전환하였다. DNA 결합 단백질을 발현하기 위해 플라스미드를 포함하는 BL21 세포 동결(cell stock)은 빠르게 해동한 다음, 암피실린이 보충된 신선한 LB 배지에서 37°C로 밤새 배양하였다. 배양물이 포화 상태에 도달하면, 밤새 배양한 1 mL를 암피실린이 포함된 신선한 LB 배지 100 mL에 옮기고 600 nm (OD600)에서 광학밀도가 0.4-0.6이 될 때까지 37°C에서 배양하였다. 이 후, 1 mM IPTG를 첨가하고 셰이커 (Dlab Scientific Co., Beijing, China)에서 20-25°C 및 200 rpm에서 밤새 배양하여 단백질을 유도하였다. 세포용해를 수행하기 위해, 15분 동안 초음파 처리를 수행하였고, 생성된 세포 잔해를 4°C, 10,000 rpm에서 10분 동안 원심분리를 수행하였다. DNA 결합 단백질의 정제는 Ni-NTA 아가로스 수지에 대한 친화성(affinity) 크로마토그래피를 사용하여 수행하였다. 세포 단백질과 수지의 혼합물을 셰이커 플랫폼 상에서 4°C, 3시간 동안 배양하였다. Ni-NTA 아가로스 수지에 결합한 용해물에 존재하는 단백질을 친화성 칼럼에 로딩하였다. 이후, 이 칼럼을 단백질 세척 버퍼 용액 (50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl 및 20 mM 이미다졸, pH 8.0)으로 세척하고, DNA 결합 단백질을 단백질 용출 버퍼 용액 (50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl 및 250 mM 이미다졸, pH 8.0)으로 용출하였다. 정제된 단백질을 1XPBS (인산-완충 생리 식염수: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 및 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4)로 버퍼-교환하였고 글리세롤 첨가와 함께 -20°C에서 보관하였다. 정제된 단백질의 흡광도는 NanoDrop 분광광도계 (Ependorf, Hamburg, Germany)를 이용하여 측정하였다.

표 1

[0155]

이름	아미노산 서열	서열번호
mNeonGreen-HMG	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMMLPGCMLMVSKGEEDNMSALPATHELHIFGSINGVDFDMVGQGTGNPNDGYEE LNLKSTKGDLQFSPWILVPHIGYGFHQYLPYPDGMSPFQAAMVDGSGYQVHRTMQFEDGASLTVNRYRTYEGSH IKGEAQVKGTFPADGPVMTNSLTAADWCRSKKTYPNDKTIIISTFKWSYTTGNGKRYRSTARTTYTFAKPMAAN YLKNQPMYVFRKTELKHSKTELNFKEWQKAFTDVMGMDELYKLETPKRPRGRPKMLGSGC (31.79 kDa)	1
Truncated TALE(tTALE)- emGFP	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMDLRTLGYSSQQQEKIKPKVRSTVAQHHEALVGHGFTHAHIVALSQHPAALGTV AVKYQDMI AALPEATHEAIVGVGKQWSGARALEALLTVAGELRGPPQLDGTQLLKI AKRGVTAVEAVHAWRN ALTGAPLNLTPAQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQDHGLTPAQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQA HGLTPDQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQDHGLTPAQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPD QVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPAQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQDHGGSGGMVSKG EELFTGVVPIVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTFAAYGLQCFARYPDHM KQHDFFKSAMPEGYVQERTISFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGTDFKEDGNILGHKLEYNYSNHNVI TADKQKNGIKANFKIRHNIEDGSVQLADHYQNTPIGDGPVLLPDNHYLSQTSALSKDPNEKRDMVLLFEVTA AGITLGMDELYK (64.7 kDa)	2
H-NS	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMMSEALKILNNIRTLRAQARECTLEMLEKLEVVVNERREEESAAAAEEVEE RTRKLQYREMLIADGIDPNELNLSLAAVKSGTKAKRAQRPAYSYVDENGETKTWTGQGRTPAVIKKAMDEQG KSLDDFLIKQSGSC (18.10 kDa)	3
H-NS- mScarlet	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMMSEALKILNNIRTLRAQARECTLEMLEKLEVVVNERREEESAAAAEEVEE RTRKLQYREMLIADGIDPNELNLSLAAVKSGTKAKRAQRPAYSYVDENGETKTWTGQGRTPAVIKKAMDEQK SLDDFLIKQFEMVSKGEAVIKEFMRFKVMHEGSMNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQAKLKVTKGGPLPFSWDILS PQFMYGSAFTKHPADIPDYKQSFPEGFKEWVMNFEDGGAVTVTQDTSLEDGTLIYKVKLRGTNFPDPDPVM QKKTMGWEASTERLYPEDGVLKGDIKMALRLKDGGRYLADFKTTYKAKKPVQMPGAYNVDRKLDITSHNEDYTV VEQYERSEGRHSTGGMDELYKSGSC (44.75 kDa)	4

Cro-mNeonGreen	MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMMEQRITLKDYAMRFGQTKAKDLGVYQSAINKAITHAGRKIFLTINADGSVYAE EVKPFPSNKKTTAGSGGPGMVSKGEEDNMASLPATHELHIFGSINGVDFDMVGQGTGNPNDGYEELNLKSTKG DLQFSPWILVPHIGYGFHQYLPYPDGMSPFQAAMVDGSGYQVHRMQFEDGASLTVNYRYTYEGSHIKGEAQVK GTGFPADGPMVMTNSLTAADWCRSKKTYPNDKTIIISTFKWSYTTGNGKRYRSTARTTYTFAKPMANLYLKNQPMY VFRKTELKHSKTELNFKEWQKAFTDVMGMDELKYGSGC (37.07 kDa)	5
----------------	---	---

[0156] (DNA 결합 단백질-고분자 복합체 조성물)

[0157] **실시예 1: DNA-Truncated TALE(tTALE)-emGFP-PVP 복합체 조성물**

[0158] λ 파지 DNA 분자(48.5 kb) 1 ng을 제조예 1에 따른 396 nM Truncated TALE(tTALE)-emGFP, DNA 결합 단백질-형광 단백질과 상온에서 10분간 혼합하여 혼합물을 제조하였다. 상기 혼합물을 1X TE 버퍼용액으로 희석한 다음, 40 Kilodalton 5% 폴리비닐피롤리딘(PVP) 수용액을 동일한 부피로 첨가하고 5분 동안 반응시켜 DNA-Truncated TALE(tTALE)-emGFP-PVP 복합체 조성물을 제조하였다.

[0159] **실시예 2: DNA-H-NS-PVP 복합체 조성물**

[0160] DNA 결합 단백질-형광 단백질로서, 제조예 1에 따른 396 nM Truncated TALE(tTALE)-emGFP 대신 DNA 결합 단백질로서, 제조예 2에 따른 264 nM H-NS를 사용한 것을 제외하고는, 실시예 1과 동일한 방법으로 DNA-H-NS-PVP 복합체 조성물을 제조하였다.

[0161] **실시예 3: DNA-H-NS-mScarlet -PVP 복합체 조성물**

[0162] DNA 결합 단백질-형광 단백질로서, 제조예 1에 따른 396 nM Truncated TALE(tTALE)-emGFP 대신 제조예 3에 따른 264 nM H-NS-mScarlet을 사용한 것을 제외하고는, 실시예 1과 동일한 방법으로 DNA-H-NS-mScarlet-PVP 복합체 조성물을 제조하였다.

[0163] **실시예 4: DNA- Cro-mNeonGreen -PVP 복합체 조성물**

[0164] DNA 결합 단백질-형광 단백질로서, 제조예 1에 따른 396 nM Truncated TALE(tTALE)-emGFP 대신 제조예 4에 따른 264 nM Cro-mNeonGreen을 사용한 것을 제외하고는, 실시예 1과 동일한 방법으로 DNA-Cro-mNeonGreen-PVP 복합체 조성물을 제조하였다.

[0165] **실시예 5: DNA- mNeonGreen-HMG-PEOX 복합체 조성물**

[0166] DNA 결합 단백질-형광 단백질로서, 제조예 1에 따른 396 nM Truncated TALE(tTALE)-emGFP 대신 제조예 5에 따른 132 nM mNeonGreen-HMG를 사용하였고, 40 Kilodalton 5% 폴리비닐피롤리딘(PVP) 수용액 대신 50 Kilodalton 1% PEOX (폴리 2-에틸-2-옥사졸린) 수용액을 사용한 것을 제외하고는, 실시예 1과 동일한 방법으로 DNA-mNeonGreen-HMG-PEOX 복합체 조성물을 제조하였다.

[0167] **실시예 6: DNA- mNeonGreen-HMG -PANI 복합체 조성물**

[0168] DNA 결합 단백질-형광 단백질로서, 제조예 1에 따른 396 nM Truncated TALE(tTALE)-emGFP 대신 제조예 5에 따른 396 nM mNeonGreen-HMG를 사용하였고, 40 Kilodalton 5% 폴리비닐피롤리딘(PVP) 수용액 대신 0.1 % 폴리아닐린(PANI) 수용액을 사용한 것을 제외하고는, 실시예 1과 동일한 방법으로 DNA-mNeonGreen-HMG-PANI 복합체 조성물을 제조하였다.

[0169] **실시예 7: DNA- mNeonGreen-HMG -PVP 복합체 조성물**

[0170] DNA 결합 단백질-형광 단백질로서, 제조예 1에 따른 396 nM Truncated TALE(tTALE)-emGFP 대신 제조예 5에 따른 132 nM mNeonGreen-HMG를 사용한 것을 제외하고는, 실시예 1과 동일한 방법으로 DNA-mNeonGreen-HMG-PVP 복합체 조성물을 제조하였다.

[0171] **실시예 8: DNA- mNeonGreen-HMG -PVP 복합체 조성물**

[0172] DNA 분자로서, λ 파지 DNA 분자(48.5 kb) 1 ng 대신 M13mp18 이중가닥 DNA (7.2 kb) 1 ng을 사용하였고, DNA 결합 단백질-형광 단백질로서, 제조예 1에 따른 396 nM Truncated TALE(tTALE)-emGFP 대신 제조예 5에 따른 132 nM mNeonGreen-HMG를 사용한 것을 제외하고는, 실시예 1과 동일한 방법으로 DNA-mNeonGreen-HMG-PVP 복합체 조성물을 제조하였다.

[0173] **비교예 1: DNA 용액**

[0174] λ 파지 DNA 분자(48.5 kb) 1 ng을 1×TE (Tris-EDTA) (Tris 10 mM EDTA 1 mM pH 8.0) 버퍼 용액으로 희석하여 DNA 용액을 준비하였다.

[0175]

[0176] **비교예 2: DNA- mNeonGreen-HMG 혼합물**

[0177] λ 파지 DNA 분자(48.5 kb) 1 ng을 제조예 5에 따른 792 nM mNeonGreen-HMG, DNA 결합 단백질-형광 단백질과 상온에서 10분간 혼합하여 DNA-mNeonGreen-HMG 혼합물을 제조하였다.

[0178]

[0179] **비교예 3: DNA-PVP 혼합물**

[0180] λ 파지 DNA 분자(48.5 kb) 1 ng을 40 Kilodalton 5% 폴리비닐피롤리딘(PVP, 40 Kilodalton) 수용액에 첨가하고 상온에서 10분간 혼합하여 DNA-PVP 혼합물을 제조하였다.

[0181]

[0182] **비교예 4: DNA-PANI 혼합물**

[0183] λ 파지 DNA 분자(48.5 kb, 32 Megadalton) 2.5 ng을 0.1% 폴리아닐린(PANI) 수용액에 첨가하고 상온에서 10분간 혼합하여 DNA-PANI 혼합물을 제조하였다.

[0184] (표면이 다른 실리콘 웨이퍼)

[0185] **참고예 1: 양이온으로 표면개질된 실리콘 웨이퍼**

[0186] 30 nm 두께의 산화실리콘막을 갖는 산화실리콘 웨이퍼를 wafer market (용인, 한국)에서 구입하여 준비하였다. 산화실리콘 웨이퍼 또는 유리 커버슬립을 테프론 랙 (Teflon rack)에 배치하고 피라냐 에칭액 (30:70 v/v H₂O₂/H₂SO₄)에 3시간 동안 담그었다. 웨이퍼 및 커버슬립을 탈이온수로 철저히 세척한 다음, 중성 pH 7인지 여부를 확인하기 위하여 pH 7 종이를 사용하였다. 이어서, 웨이퍼 및 커버슬립을 30분 동안 탈이온수에 초음파 처리하였고 다시 탈이온수로 행귀 피라냐 표면이 노출되도록 하였다. 1.1 mM 농도의 용액을 제조하기 위해, 탈이온수 250 mL에 50% 메탄올에 Q-실록산 (N-트리메톡시실릴프로필-N,N,N-트리메틸 암모늄 클로라이드) 150 μ L를 첨가하였다. 웨이퍼 및 커버슬립을 65 °C 및 100 rpm에서 16시간 동안 인큐베이션하였다. 마지막으로, 99.9 % 에탄올로 3회 행구고 99.9% 에탄올에 저장하여 양이온으로 표면개질된 실리콘 웨이퍼를 제작하였다.

[0187] **참고예 2~4: 산화실리콘 웨이퍼, 실리콘 웨이퍼, 및 Pt 코팅된 실리콘 웨이퍼**

[0188] 참고예 2에 따른 산화실리콘 웨이퍼, 참고예 3에 따른 실리콘 웨이퍼, 및 참고예 4에 따른 Pt 코팅된 실리콘 웨이퍼는 wafer market (용인, 한국)에서 구입하여 준비하였다.

[0189] **분석예 1: 기관 표면에서 FE-SEM로 염색된 DNA 분자 관찰**

[0190] 참고예 1~4에 따른 실리콘 웨이퍼 표면에서 실시예 7에 따른 DNA-mNeonGreen-HMG-PVP 복합체 조성물을 이용하여 염색된 DNA 분자를 FE-SEM에 의해 다음과 같은 방법으로 관찰하였다. 전계방출 주사전자현미경(FE-SEM)은 JSM-7100F, JEOL사 현미경을 사용하였다. 그 결과를 도 3a 내지 도 3d에 나타내었다.

[0191] 먼저, 상기 복합체 조성물을 상술한 PDMS 마이크로채널 장치(도 2)의 화살표 부분에 주입하였다. 다음으로, 참고예 1~4에 따른 실리콘 웨이퍼 표면에 상기 복합체 조성물의 DNA 분자를 고정 및 신장시켰다. 다음으로, PDMS 마이크로채널 장치를 참고예 1~4에 따른 실리콘 웨이퍼로부터 박리하기 전, PDMS 마이크로채널 내부의 상기 복합체 조성물을 50분간 건조하여 DNA-mNeonGreen-HMG-PVP 복합체의 염색된 DNA 분자를 관찰하였다.

[0192] 도 3a 내지 도 3c를 참조하면, 참고예 1~3에 따른 실리콘 웨이퍼 표면에서 DNA-mNeonGreen-HMG-PVP 복합체의 이미지(검은색)와 인접하는 실리콘 웨이퍼 영역의 이미지(회색) 사이의 경계는 모두 명확히 구별되었다. 이 중에서, 참고예 1에 따른 양이온으로 표면개질된 실리콘 웨이퍼 표면에 DNA-mNeonGreen-HMG-PVP 복합체의 이미지(검은색)는 보다 명확한 검은색으로 보였고, 인접하는 실리콘 웨이퍼 영역의 이미지(회색) 사이의 경계도 현저히 명확하게 구별되었다.

[0193] 도 4를 참조하면, 참고예 4에 따른 Pt 코팅된 실리콘 웨이퍼 표면에서 DNA-mNeonGreen-HMG-PVP 복합체의 이미지 및 인접하는 실리콘 웨이퍼 영역의 이미지는 모두 검은색으로 구별이 어려웠고, 이들 사이의 경계(점선으로 표

시한 부분)도 회피하여 구별이 어려웠다.

[0194] 참고예 1~3에 따른 실리콘 웨이퍼 표면에서의 결과는 DNA-mNeonGreen-HMG-PVP 복합체의 고분자 PVP는 상기 실리콘 웨이퍼 표면에서 2차 전자의 방출을 방해하여 어두운 형태로 나타나기 때문에, DNA-mNeonGreen-HMG-PVP 복합체의 이미지가 검게 보이는 것으로 여겨진다. 참고예 1에 따른 양이온으로 표면개질된 실리콘 웨이퍼 표면에서의 결과는 DNA-mNeonGreen-HMG-PVP 복합체의 고분자 PVP가 양이온으로 표면개질된 실리콘 웨이퍼 표면에서 2차 전자의 방출을 방해할 뿐만 아니라 DNA 백본을 견고하게 고정시킬 수 있기에, DNA-mNeonGreen-HMG-PVP 복합체의 이미지(검은색)가 보다 명확하게 보이는 것으로 여겨진다. 이로부터, 양이온으로 표면개질된 실리콘 웨이퍼는 DNA-단백질-고분자 복합체의 DNA 분자를 고정하는 역할을 하는 것을 알 수 있다.

[0195] 이와 비교하여, 참고예 4에 따른 Pt 코팅된 실리콘 웨이퍼 표면에서의 결과는 Pt 코팅된 표면이 완전 전도성이므로, 실리콘 웨이퍼 표면의 PVP 함유층을 통과할 수 있는 2차 전자의 급증 및 방출로 상기 복합체와 인접하는 실리콘 웨이퍼 간에 콘트라스트가 감소된 것으로 여겨진다.

[0196] 분석예 2: PDMS 마이크로채널 장치 사용여부에 따른 DNA 관찰

[0197] 실시예 7에 따른 DNA-mNeonGreen-HMG-PVP 복합체 조성물 및 실시예 5에 따른 DNA-mNeonGreen-HMG-PEOX 복합체 조성물을 이용하여 다음과 같이 PDMS 마이크로채널 장치를 사용하지 않은 경우와 사용한 경우로 나눠 FE-SEM (및 FM)에 의해 염색된 DNA 분자를 관찰하였다. 그 결과를 도 4a, 도 4b, 도 5, 도 6a, 및 도 6b에 나타내었다.

[0198] PDMS 마이크로채널 장치를 사용하지 않은 경우

[0199] 상기 복합체 조성물을 참고예 1에 따른 양이온으로 표면개질된 실리콘 웨이퍼 표면에 도포하고 건조한 후, FE-SEM 및 FM으로 이들 복합체의 염색된 DNA 분자를 관찰하였다.

[0200] PDMS 마이크로채널 장치를 사용한 경우

[0201] 상기 복합체 조성물을 상술한 PDMS 마이크로채널 장치(도 2)의 화살표 부분에 주입한 다음, 참고예 1에 따른 양이온으로 표면개질된 실리콘 웨이퍼 표면에서 상기 복합체의 DNA 분자를 고정 및 신장시켰다. PDMS 마이크로채널 장치를 참고예 1에 따른 실리콘 웨이퍼로부터 박리하기 전, PDMS 마이크로채널 내부의 상기 복합체 조성물을 50분간 건조한 후, FE-SEM으로 DNA-단백질-고분자 복합체의 염색된 DNA 분자를 관찰하였다.

[0202] FE-SEM 기기

[0203] JEOL사, JSM-7100F의 전계방출 주사전자현미경(FE-SEM)을 15 kV에서 x 5000 배율로 사용하였다.

[0204] FM 기기

[0205] 형광현미경(FM)은 FM 시스템으로 100 x Olympus UplanSApo 오일 침지 대물렌즈를 장착한 인버트된 현미경(Olympus IX70, 도쿄, 일본) 및 조명을 위해 LED 광원(SOLA SM II 라이트 엔진, 루멘코, 비버턴, OR)으로 구성된 것을 사용하였다. 형광이미지는 과학등급 보완 금속-산화물-반도체 디지털 카메라(2048 x 2048, Prime sCMOS 카메라, 포토메트릭, 투손, AZ)를 사용하여 캡처하였고, Micro-manager 소프트웨어를 사용하여 16비트 TIFF 포맷으로 저장하였다. 다색 이미지의 오버레이(overlay)를 포함하여 이미지 프로세싱을 위해 ImageJ 소프트웨어를 사용하였다.

[0206] 2-1. DNA-mNeonGreen-HMG-PVP 복합체

[0207] 도 4a 및 도 4b는 PDMS 마이크로채널 장치를 사용하지 않고 실시예 7에 따른 DNA-mNeonGreen-HMG-PVP 복합체 조성물을 이용하여 염색된 DNA 분자를 FE-SEM 및 FM으로 각각 관찰한 결과이다. 도 5는 PDMS 마이크로채널 장치를 사용하고 실시예 7에 따른 DNA-mNeonGreen-HMG-PVP 복합체 조성물을 이용하여 염색된 DNA 분자를 FE-SEM으로 관찰한 결과이다.

[0208] 도 4a 및 도 4b를 참조하면, PDMS 마이크로채널 장치를 사용하지 않고도 FE-SEM으로 관찰한 DNA-mNeonGreen-HMG-PVP 복합체의 염색된 DNA 분자 이미지(도 4a)는 FM으로 관찰한 DNA-mNeonGreen-HMG-PVP 복합체의 염색된 DNA 분자 이미지(도 4b)와 비교하여 검은색 선으로 잘 보였다.

[0209] 도 5를 참조하면, PDMS 마이크로채널 장치를 사용하여 FE-SEM으로 관찰한 DNA-mNeonGreen-HMG-PVP 복합체의 염색된 DNA 분자는 양이온으로 표면개질된 실리콘 웨이퍼 표면에 고정되어 평행한 검은색 선으로 보였다.

[0210] 2-2. DNA-mNeonGreen-HMG-PEOX 복합체

- [0211] 도 6a는 PDMS 마이크로채널 장치를 사용하고 실시예 5에 따른 DNA-mNeonGreen-HMG-PEOX 복합체 조성물을 이용하여 염색된 DNA 분자를 FE-SEM으로 관찰한 결과이다. 도 6b는 PDMS 마이크로채널 장치를 사용하지 않고 실시예 5에 따른 DNA-mNeonGreen-HMG-PEOX 복합체 조성물을 이용하여 염색된 DNA 분자를 FE-SEM으로 관찰한 결과이다.
- [0212] 도 6a 및 도 6b를 참조하면, PDMS 마이크로채널 장치를 사용하고 실시예 5에 따른 DNA-mNeonGreen-HMG-PEOX 복합체 조성물을 이용한 염색된 DNA 분자는 양이온으로 표면개질된 실리콘 웨이퍼 표면에 고정되어 평행한 검은색 선으로 보였다. 이로부터, PDMS 마이크로 채널장치는 양이온으로 표면개질된 실리콘 웨이퍼 표면에 DNA-단백질-고분자 복합체의 DNA 분자를 평행하게 신장시키는 역할을 하는 것을 알 수 있다.
- [0213] 이와 비교하여, PDMS 마이크로채널 장치를 사용하지 않고 실시예 5에 따른 DNA-mNeonGreen-HMG-PEOX 복합체 조성물을 이용한 염색된 DNA 분자는 양이온으로 표면개질된 실리콘 웨이퍼 표면에서 플로우(flow)가 일정하지 않아 일 방향으로 신장되지 않으므로 랜덤하게 배열되었다.
- [0214] **분석예 3: 복합체, 분자, 및 혼합물에 대한 FE-SEM 및/또는 FM로 DNA 관찰**
- [0215] 실시예 1~6에 따른 DNA-단백질-고분자 복합체 조성물 및 비교예 1~4에 따른 DNA 분자, DNA-단백질 혼합물, 또는 DNA-고분자 혼합물을 이용하고 비교예 1에 따른 양이온으로 표면개질된 실리콘 웨이퍼에서 PDMS 마이크로채널 장치를 사용하여 FE-SEM 및/또는 FM에 의해 염색된 DNA 분자를 관찰하였다. DNA 관찰방법은 분석예 2의 PDMS 마이크로채널 장치를 사용한 경우와 동일한 방법을 사용하였다. FE-SEM 및 FM도 분석예 2의 기기들과 동일한 것을 사용하였다. 그 결과를 도 7a, 도 7b, 도 8, 도 9a, 도 9b, 도 10a, 도 10b, 도 11, 도 12, 도 13a, 도 13b, 도 14, 도 15에 각각 나타내었다.
- [0216] **3-1. DNA-단백질-고분자 복합체에 대한 DNA 관찰**
- [0217] 도 7a 및 도 7b는 실시예 1에 따른 DNA-단백질-고분자 복합체 조성물을 이용하여 염색된 DNA 분자를 FE-SEM 및 FM으로 각각 관찰한 결과이다. 도 9a 및 도 9b는 실시예 3에 따른 DNA-단백질-고분자 복합체 조성물을 이용하여 염색된 DNA 분자를 FE-SEM 및 FM으로 각각 관찰한 결과이다. 도 10a 및 도 10b는 실시예 4에 따른 DNA-단백질-고분자 복합체 조성물을 이용하여 염색된 DNA 분자를 FE-SEM 및 FM으로 각각 관찰한 결과이다.
- [0218] 도 7a, 도 9a, 및 도 10a를 참조하면, 실시예 1, 실시예 3, 및 실시예 5에 따른 DNA-단백질-고분자 복합체 조성물을 이용하여 염색된 DNA 분자를 FE-SEM로 관찰할 때, 염색된 DNA 분자는 대체로 섬세하고 연속적인 검은색 선으로 보였다. 이와 비교하여, 도 7a, 도 9a, 및 도 10a를 참조하면, 실시예 1, 실시예 3, 및 실시예 5에 따른 DNA-단백질-고분자 복합체 조성물을 이용하여 염색된 DNA 분자를 FM으로 관찰할 때, 염색된 DNA 분자는 일부 선들만 보였고 끊어지고 굵게 보였다.
- [0219] 도 8은 실시예 2에 따른 DNA-단백질-고분자 복합체 조성물을 이용하여 염색된 DNA 분자를 FE-SEM으로 관찰한 결과이다. 도 11은 실시예 6에 따른 DNA-단백질-고분자 복합체 조성물을 이용하여 염색된 DNA 분자를 FE-SEM으로 관찰한 결과이다.
- [0220] 도 8 및 도 11을 참조하면, 실시예 2 및 실시예 6에 따른 DNA-단백질-고분자 복합체 조성물을 이용하여 염색된 DNA 분자를 FE-SEM으로 관찰할 때, 염색된 DNA 분자는 약간 흐리지만 대체로 연속적인 검은색 선으로 섬세하게 보였다.
- [0221]
- [0222] **3-2. DNA 분자, DNA-단백질 혼합물, DNA-고분자 혼합물에 대한 DNA 관찰**
- [0223] 도 12는 비교예 1에 따른 DNA 용액을 이용하여 FE-SEM으로 DNA 분자를 관찰한 결과이다. 도 14는 비교예 3에 따른 DNA-PVP 혼합물을 이용하여 FE-SEM으로 염색된 DNA 분자를 관찰한 결과이다. 도 15는 비교예 4에 따른 DNA-PANI 혼합물을 이용하여 FE-SEM으로 염색된 DNA 분자를 관찰한 결과이다.
- [0224] 도 12, 도 14, 및 도 15를 참조하면, DNA 용액 및 DNA-고분자 혼합물을 이용하여 염색된 DNA 분자를 FE-SEM으로 관찰할 때, 염색된 DNA 분자는 점 또는 랜덤하게 배열된 실선으로 보였다.
- [0225] 도 13a 및 도 13b는 비교예 3에 따른 DNA-mNeonGreen-HMG 혼합물을 이용하여 FE-SEM 및 FM으로 DNA 분자를 각각 관찰한 결과이다.
- [0226] 도 13a 및 도 13b를 참조하면, DNA-단백질 혼합물을 이용하여 FE-SEM 및 FM으로 DNA 분자를 관찰할 때, DNA 분자는 염색되지 않았고 점 또는 끊어진 굵은 선으로 보였다.

[0227] 이로부터, FE-SEM는 FM과 비교하여 잘 배열된 염색된 DNA 분자 이미지를 높은 해상도로 얻을 수 있으며, DNA 분자에 대한 효과적인 전자-염색(electro-stain)을 위해 DNA 분자와 결합 가능한 DNA 결합 단백질 및 상기 DNA 결합 단백질과 결합 가능한 고분자 성분이 필요함을 알 수 있다.

[0228] **분석예 4: FE-SEM로 DNA-단백질-고분자 복합체 굵기 및 반치폭(FWHM)**

[0229] 실시예 7에 따른 DNA-mNeonGreen-HMG-PVP 복합체 조성물을 이용하고 참고예 1에 따른 양이온으로 표면개질된 실리콘 웨이퍼에서 PDMS 마이크로채널 장치를 사용하여 FE-SEM 및 FM으로 DNA-mNeonGreen-HMG-PVP 복합체의 굵기를 관찰하였다. DNA 관찰방법은 분석예 2의 PDMS 마이크로채널 장치를 사용한 경우와 동일한 방법을 사용하였다. FE-SEM 및 FM도 분석예 2의 기기들과 동일한 것을 사용하였다. 그 결과를 도 16a 및 도 16b에 나타내었다.

[0230] 도 16a 및 도 16b를 참조하면, 실시예 7에 따른 DNA-mNeonGreen-HMG-PVP 복합체 조성물을 이용하여 FE-SEM 및 FM으로 염색된 DNA 분자를 각각 관찰할 때, 염색된 DNA 분자 이미지는 FE-SEM이 FM과 비교하여 섬세하고 연속적인 검은색 선으로 높은 해상도를 보였고, DNA-mNeonGreen-HMG-PVP 복합체 굵기도 각각 15 nm, 450 nm로 많은 차이를 보였다.

[0231] DNA-mNeonGreen-HMG-PVP 복합체 굵기를 정확하게 측정하기 위하여 반치폭(FWHM) 매크로 프로파일을 이용하였다. 반치폭(FWHM) 매크로 프로파일을 이용하기 위해 DNA-mNeonGreen-HMG-PVP 복합체의 굵기 측정은 인버트된 FE-SEM을 사용하였다. 반치폭(FWHM) 매크로는 GitHub에서 다운로드하여 FE-SEM에서 검은색 선으로 관찰된 DNA 분자의 강도를 프로파일링하고 프로파일의 반치폭(FWHM)을 측정하여 FWHM 매크로는 ImageJ 플러그인으로 사용하였다. 그 결과를 도 16c 및 도 16d로 나타내었다.

[0232] 도 16c를 참조하면, 실시예 7에 따른 DNA-mNeonGreen-HMG-PVP 복합체 조성물을 이용하여 상기 복합체를 인버트된 FE-SEM로 관찰할 때, DNA-mNeonGreen-HMG-PVP 복합체의 평균 반치폭(사선의 반폭)은 약 15.0 ± 4.0 nm이었고, 9.4 nm 내지 22.8 nm의 범위였다.

[0233] 도 16d를 참조하면, 실시예 7에 따른 DNA-mNeonGreen-HMG-PVP 복합체에 대해 반치폭 매크로 프로파일을 이용할 때, 상기 복합체의 반치폭은 9.4 nm로 계산되어 도 16c의 인버트된 FE-SEM로 관찰 결과와 동일하였다.

[0234] 반치폭 계산은 DNA 분자의 굵기가 2 nm이고, mNeonGreen-HMG 단백질의 직경이 2.4 nm 및 높이 4.2 nm이고, PVP 고분자의 중량평균분자량(Mw)은 40 Kilodalton이고 "Enhancement in Elastic Bending Rigidity of Polymer Loaded Reverse Microemulsion. *Langmuir* 2017, **33**(45): 13014-13026"의 기준값에 대해 R_g 가 3.8 nm인 것을 기초로 하였다. PVP 고분자가 원형임을 가정할 때, PVP 고분자의 외경(d_{out})이 하기 식 1에 의하여 약 9.8 nm이었다. DNA 분자를 둘러싸고 있는 단백질 및 고분자의 집합체는 도 16c에서 관찰된 상기 복합체의 평균 반치폭(사선의 반폭)에 많은 기여를 하는 것으로 보았다.

[0235] [식 1]

[0236]
$$d_{out} = 2\sqrt{5/3}R_g$$

[0237] 이로부터, 전형적인 DNA 분자 굵기보다 굵은 거대한 DNA 분자도 DNA-단백질-고분자 복합체를 이용하여 FE-SEM에 의해 관찰가능함을 알 수 있다.

[0238] **분석예 5: FE-SEM로 다양한 DNA 형상 관찰**

[0239] 실시예 8에 따른 DNA-mNeonGreen-HMG-PVP 복합체 조성물을 이용하고 참고예 1에 따른 양이온으로 표면개질된 실리콘 웨이퍼에서 PDMS 마이크로채널 장치를 사용하여 FE-SEM 및 FM으로 염색된 다양한 형상을 갖는 DNA 분자를 관찰하였다. DNA 관찰방법은 분석예 2의 PDMS 마이크로채널 장치를 사용한 경우와 동일한 방법을 사용하였다. FE-SEM 및 FM도 분석예 2의 기기들과 동일한 것을 사용하였다. 그 결과를 도 17a 및 도 17b에 나타내었다.

[0240] 도 17a를 참조하면, DNA-mNeonGreen-HMG-PVP 복합체 조성물을 이용하여 염색된 DNA 분자를 FE-SEM으로 관찰할 때, 염색된 DNA 분자의 형상으로 선형 외에 원형, 나선형, 슈퍼코일형, 또는 이중 가닥 등의 형상을 볼 수 있었다.

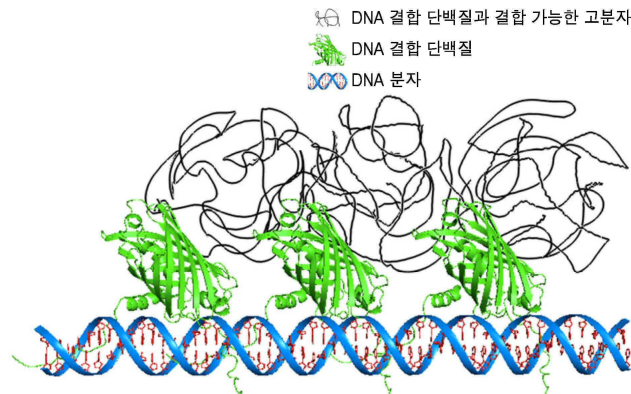
[0241] 도 17b를 참조하면, DNA-mNeonGreen-HMG-PVP 복합체 조성물을 이용하여 염색된 DNA 분자를 FM으로 관찰할 때, 명확한 형상을 볼 수 없고 단지 점들만 보였다.

[0242] 이로부터, DNA-단백질-고분자 복합체를 이용하여 FE-SEM에 의해 다양한 형상을 갖는 염색된 DNA 분자에 대해 높은 해상도로 관찰할 수 있다.

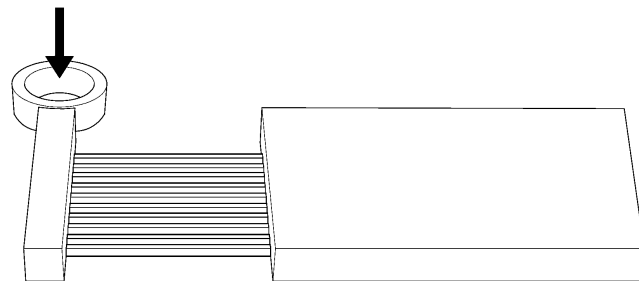
[0243] 지금까지, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 예시적인 구현예가 설명되고 첨부된 도면에 도시되었다. 그러나, 이러한 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이고 이를 한정하지 않는다는 점이 이해되어야 할 것이다. 그리고 본 발명은 도시되고 설명된 설명에 국한되지 않는다는 점이 이해되어야 할 것이다. 이는 다양한 다른 변형이 본 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 일어날 수 있기 때문이다.

도면

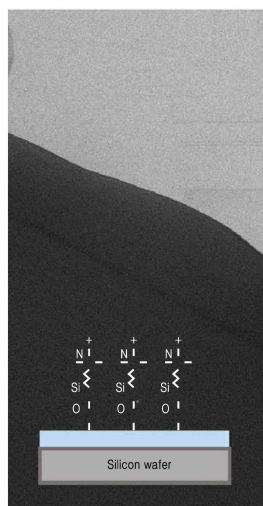
도면1



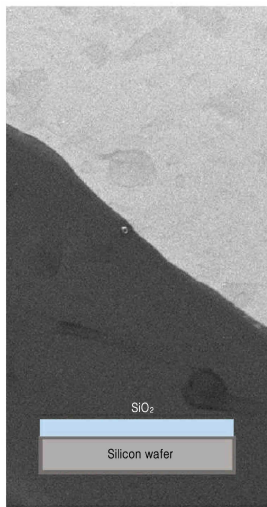
도면2



도면3a



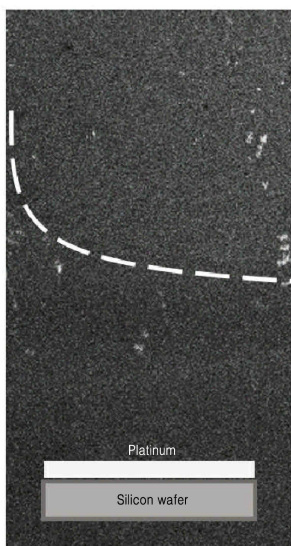
도면3b



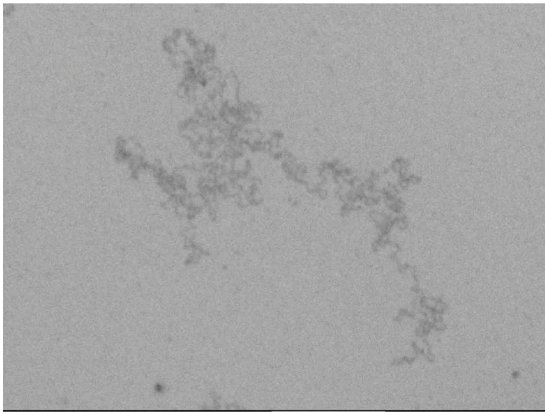
도면3c



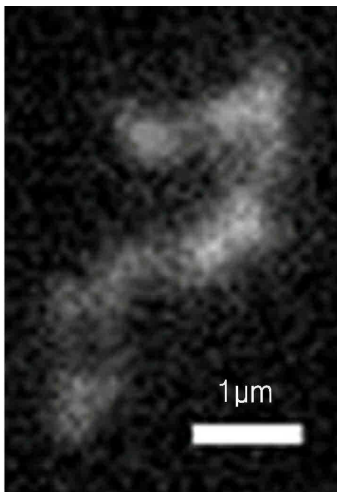
도면3d



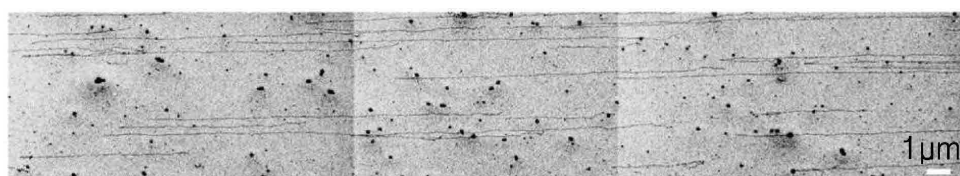
도면4a



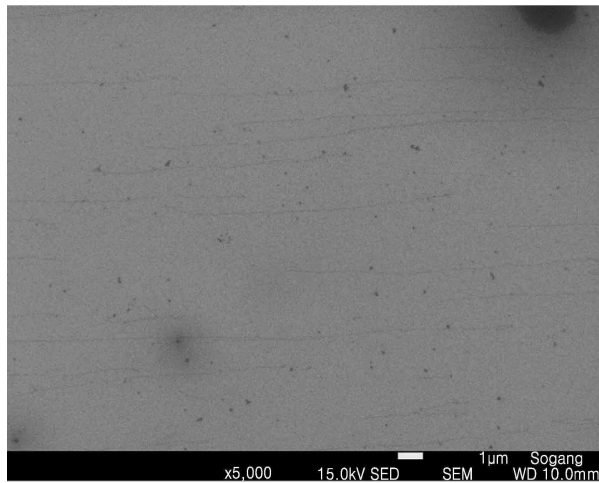
도면4b



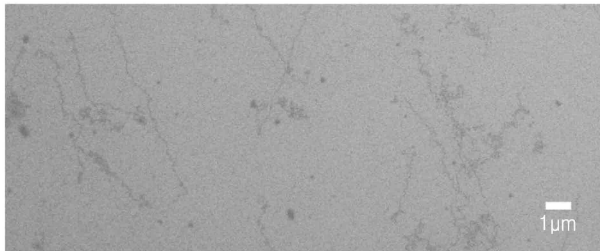
도면5



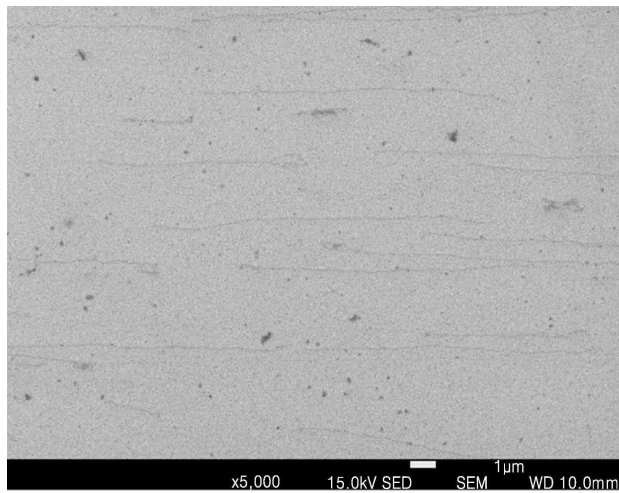
도면6a



도면6b



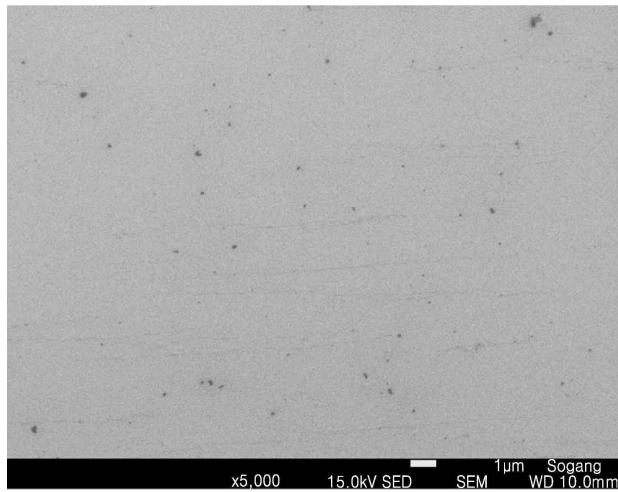
도면7a



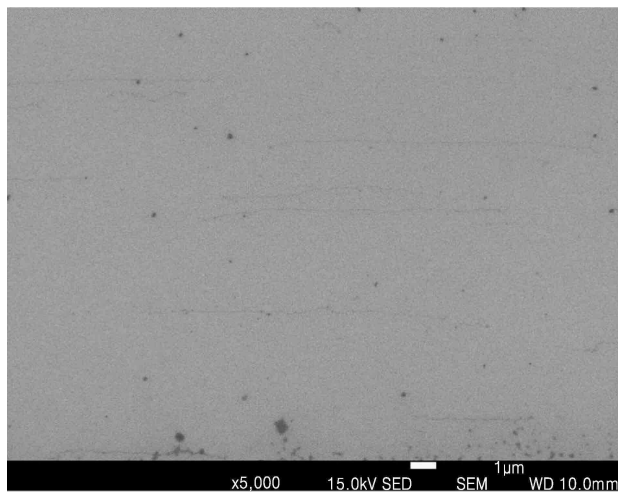
도면7b



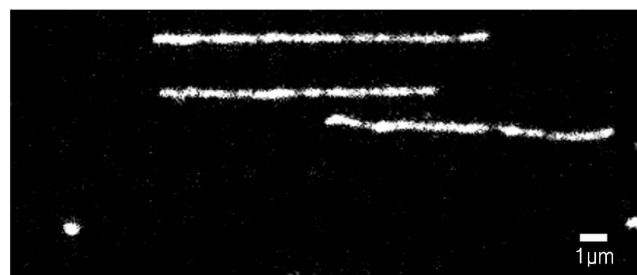
도면8



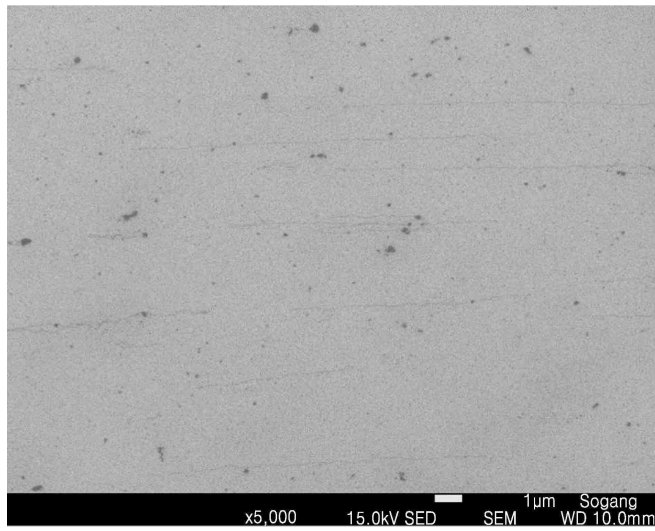
도면9a



도면9b



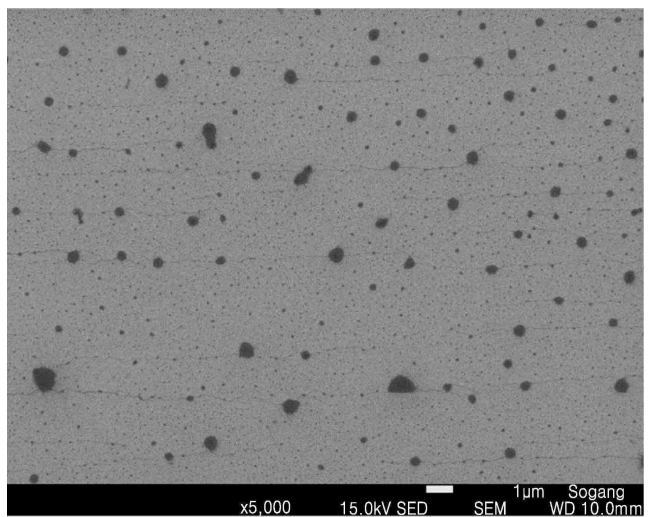
도면10a



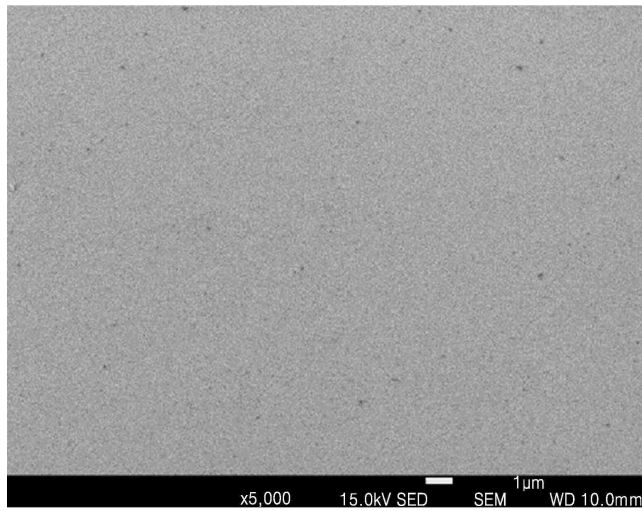
도면10b



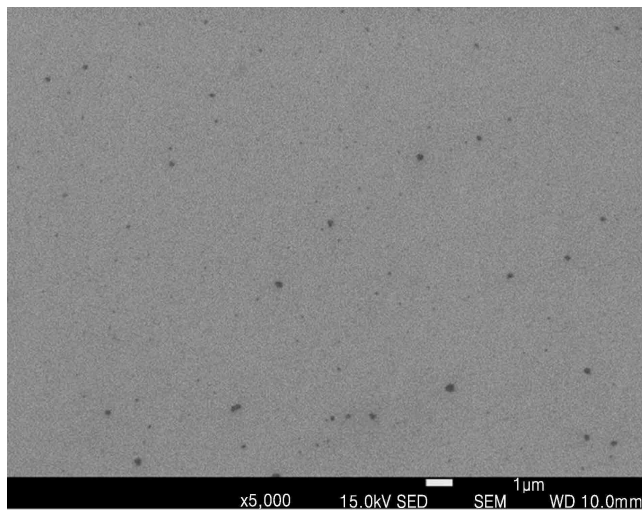
도면11



도면12



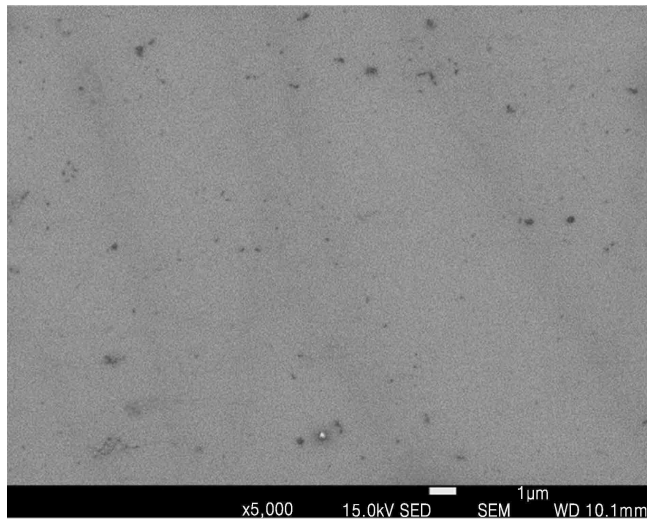
도면13a



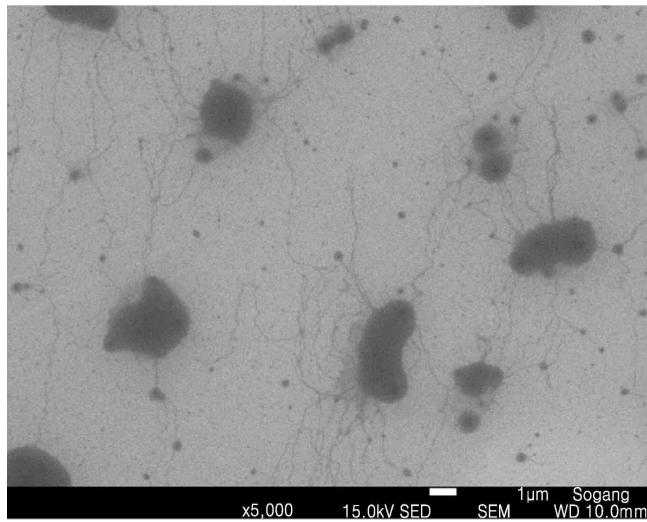
도면13b



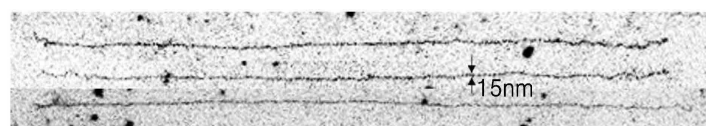
도면14



도면15



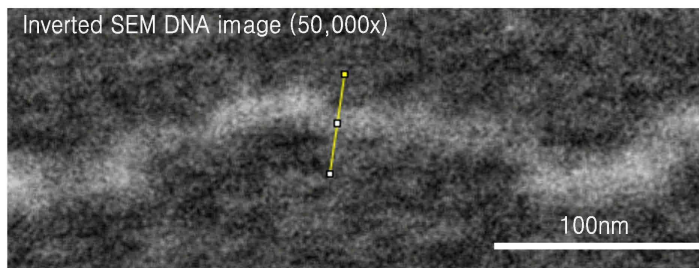
도면16a



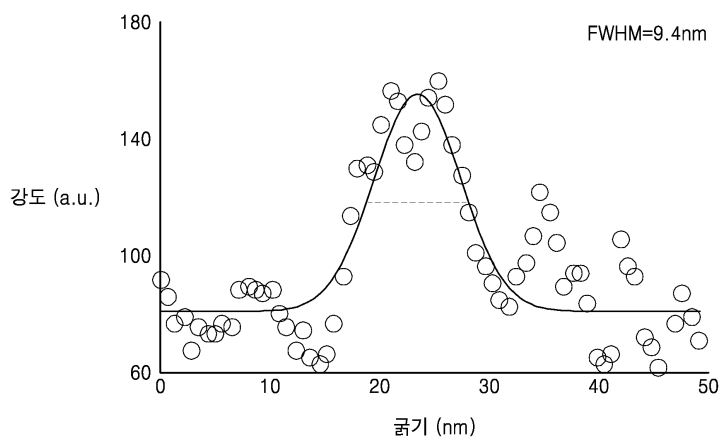
도면16b



도면16c



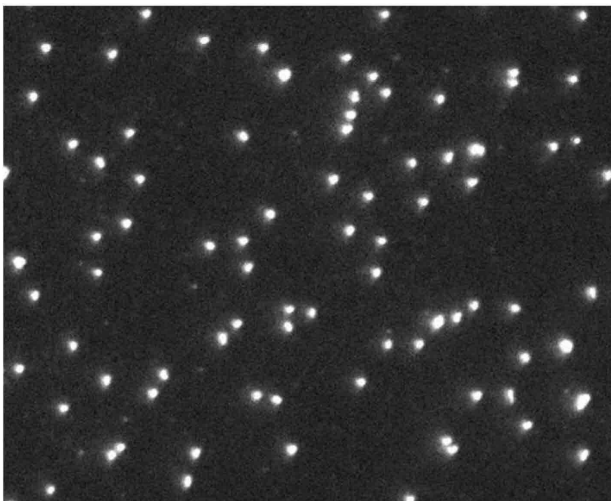
도면16d



도면17a



도면17b



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.