

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2019년 5월 9일 (09.05.2019)

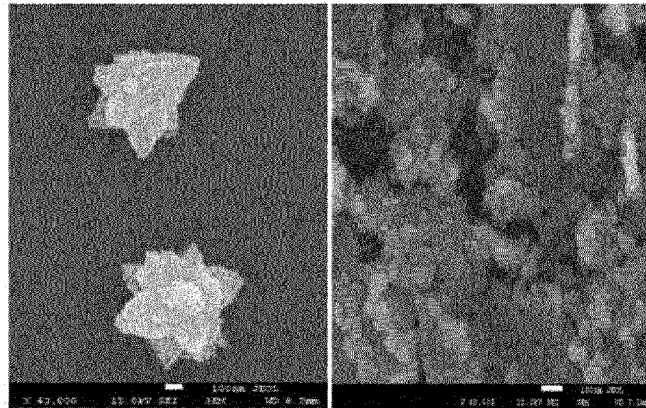


(10) 국제공개번호
WO 2019/088527 A2

- (51) 국제특허분류: 미분류
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2018/012339
- (22) 국제출원일: 2018년 10월 18일 (18.10.2018)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2017-0142590 2017년 10월 30일 (30.10.2017)KR
10-2018-0124184 2018년 10월 18일 (18.10.2018)KR
- (71) 출원인: 울산대학교 산학협력단 (UNIVERSITY OF ULSAN FOUNDATION FOR INDUSTRY COOPERATION) [KR/KR]; 44610 울산시 남구 대학로 93, Ulsan (KR). 재단법인 아산사회복지재단 (THE ASAN FOUNDATION) [KR/KR]; 05505 서울시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동), Seoul (KR).
- (72) 발명자: 신용 (SHIN, Yong); 05505 서울시 송파구 올림픽로43길 88, 아산생명과학연구원 융합연구관 6층, Seoul (KR). 리우후이팡 (LIU, Huifang); 44610 울산시 남구 대학로 93, Ulsan (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 태백 (TAEBAEK INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 08506 서울시 금천구 가산디지털1로151 이노플렉스1차 601호, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD,

(54) Title: PATHOGEN LYSIS AND NUCLEIC ACID EXTRACTION METHOD USING ZINC OXIDE NANOSTAR

(54) 발명의 명칭: 산화아연 나노스타를 이용한 병원체 용균 및 핵산 추출 방법



(57) Abstract: The present invention relates to a pathogen lysis and nucleic acid extraction method using a zinc oxide nanostar. A nucleic acid extraction method using a zinc oxide nanostar according to the present invention enables the extraction of nucleic acid through cell lysis of pathogens without using a lysis buffer and allows for the extraction of nucleic acids at high purity and high concentration by preventing nucleic acid degradation and fragmentation attributed to various materials in a lysis buffer, including a high concentration of salts. In addition, zinc oxide nanostars (200 to 900 nm) according to the present invention, which are superior conventional zinc oxide nanoparticles (20 to 50 nm) in terms of cell lysis potential, improve nucleic acid extraction efficiency thanks to their cell lysis potential and allow extraction at room temperature without a heating step, thus finding application as a diagnostic method in the field.

(57) 요약서: 본 발명은 산화아연 나노스타를 이용한 병원체 용균 및 핵산 추출 방법에 관한 것으로, 본 발명의 산화아연 나노스타를 이용한 핵산 추출 방법은 용해 완충액의 사용 없이 병원체의 세포를 용해하여 핵산을 추출할 수 있으며, 용해 완충액에 함유되어 있는 높은 농도의 염을 비롯한 다양한 물질에 의한 핵산 분해 (degradation) 및 단편화 (fragmentation) 를 방지함으로써 고순도 및 고농도의 핵산 추출을 가능하게 한다. 또한, 본 발명의 산화아연 나노스타 (200 내지 900 nm) 은 종래 산화아연 나노입자 (20 내지 50 nm) 에 비하여 세포 용해능이 우수하여 핵산 추출 효율을 증가시키며, 가열 단계 없이 상온에서 추출이 가능하여 현장 진단 방법으로 활용이 가능하다.

WO 2019/088527 A2

SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역
내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE,
LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유
럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK,
MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별
도 공개함 (규칙 48.2(g))

명세서

발명의 명칭: 산화아연 나노스타를 이용한 병원체 용균 및 핵산 추출 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 산화아연 나노스타를 이용한 병원체 용균 및 핵산 추출 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 핵산은 질병 상태를 확인하기 위한 중요한 분석 수단이며, DNA 생체표지자 (biomarker) 예를 들어, 단일염기다형성 (single nucleotide polymorphism; SNP), 돌연변이 또는 DNA 메틸화 (DNA methylation)는 연구자가 암의 원인을 찾도록 돕고 질병의 초기 단계 동안 질병의 상태를 진단하고 관찰하는 것은 물론 예후와 감시에 대한 큰 기회를 제공하는 데 중요한 실마리를 제공한다.
- [3] DNA와 같은 핵산은 단백질과 같은 다른 성분에 비해 매우 낮은 생리적 농도로 존재하기 때문에 (예를 들어, 전혈 마이크로리터당 수십 나노그램의 DNA 대 수십 마이크로그램의 단백질), 임상 시료로부터 DNA를 효과적으로 추출하고 예비 농축하는 것은 증폭 및 검출과 같은 이후의 공정에 매우 중요하다.
- [4] 최근 들어 생명공학을 비롯한 진단의학, 약물의학, 대사의학 등 다양한 분야에서 고순도로 정제된 핵산의 사용량이 늘어남에 따라 다양한 생물 시료로부터 보다 신속하고 순수하게 핵산을 분리하고자 하는 노력이 계속되고 있다.
- [5] 그러나 현재까지 핵산의 분리 방법에 있어 가장 크게 발전한 부분은 유전체 DNA, 플라스미드 DNA, 메신저 RNA, 단백질, 세포 잔해 입자 등 세포 용해 용액 내에 포함된 여러 종류의 물질들로부터 특이적으로 핵산만을 흡착시키는 담체에 관한 기술 등 거의 모든 연구의 초점은 핵산을 흡착시키는 물질에 관한 연구와 개발에 집중되어 있는 한계가 있었다.
- [6] 이에, 다양한 생물 시료로부터 보다 신속하고 순수하게 핵산을 분리하기 위하여 무엇보다 세포 잔해 입자와 단백질 변성 응집물, 기타 다양한 세포 분해 물질들로부터 신속하게 원하는 핵산만을 분리할 수 있는 기술의 개발이 절실한 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명의 목적은 산화아연 나노스타를 포함하는 병원체 용균용 조성물, 이를 이용한 병원체 용균 방법 및 키트; 산화아연 나노스타를 포함하는 핵산 추출용 조성물, 이를 이용한 핵산 추출 방법 및 키트;를 제공하는 데에 있다.

과제 해결 수단

- [8] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 산화아연 나노스타를 포함하는

- 병원체 용균용 조성물을 제공한다.
- [9] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 병원체 용균용 키트를 제공한다.
- [10] 또한, 본 발명은 산화아연 나노스타를 병원체가 함유된 시료에 접촉시키는 단계를 포함하는 병원체 용균 방법을 제공한다.
- [11] 또한, 본 발명은 산화아연 나노스타를 포함하는 핵산 추출용 조성물을 제공한다.
- [12] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 핵산 추출용 키트를 제공한다.
- [13] 또한, 본 발명은 산화아연 나노스타를 핵산 시료에 첨가하고 반응시켜 혼합물을 제조하는 제 1단계; 및 상기 혼합물로부터 핵산을 추출하는 제 2단계;를 포함하는 핵산 추출 방법을 제공한다.
- [14] 또한, 본 발명은 산화아연 나노스타를 핵산 시료에 첨가하고 반응시켜 혼합물을 제조하는 제 1단계; 상기 혼합물에 실란 화합물로 개질된 규조토를 첨가하고, 디메틸 아디프이미데이트(dimethyl adipimidate; DMA), 디메틸 피멜리미데이트(dimethyl pimelimidate; DMP), 디메틸 수베르이미데이트(Dimethyl suberimidate; DMS) 및 디메틸 3,3'-디티오비스프로피온이미데이트(Dimethyl 3,3'-dithiobispropionimidate; DTBP)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 첨가하여 반응 혼합물을 제조하는 제 2단계; 및 상기 반응 혼합물로부터 핵산을 추출하는 제 3단계;를 포함하는 핵산 추출 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [15] 본 발명의 산화아연 나노스타를 이용한 핵산 추출 방법은 용해 완충액 (lysis buffer)의 사용 없이 병원체의 세포를 용해하여 핵산을 추출할 수 있으며, 용해 완충액에 함유되어 있는 높은 농도의 염을 비롯한 다양한 물질에 의한 핵산 분해 (degradation) 및 단편화 (fragmentation)를 방지함으로써 고순도 및 고농도의 핵산 추출을 가능하게 한다. 또한, 본 발명의 산화아연 나노스타 (200 내지 900 nm)는 종래 산화아연 나노입자 (20 내지 50 nm)에 비하여 세포 용해능이 우수하여 핵산 추출 효율을 증가시키며, 가열 단계 없이 상온에서 추출이 가능하여 현장 진단 방법으로 활용이 가능하다.

도면의 간단한 설명

- [16] 도 1은 (A) 산화아연 나노스타 및 (B) 산화아연 나노입자의 크기 및 형태를 비교한 것이다.
- [17] 도 2는 산화아연 나노스타 및 산화아연 나노입자의 구조를 라만 기법으로 비교한 것이다.
- [18] 도 3은 브루셀라균을 이용한 산화아연 나노스타의 용해능 및 핵산 추출 효율을 산화아연 나노입자 및 종래 핵산 추출 키트 (Qiagen)와 비교한 것이다.
- [19] 도 4는 브루셀라균, 대장균, 황색포도상구균 및 바실러스 세레우스균을 이용한 산화아연 나노스타의 용해능 및 핵산 추출 효율을 종래 핵산 추출 키트

(Qiagen)와 비교한 것이다.

- [20] 도 5는 산화아연 나노스타를 종래 핵산 추출 키트 (Qiagen)의 컬럼과 접목시켜 핵산 추출이 가능함을 확인한 것이다.
- [21] 도 6은 산화아연 나노스타를 규조토 또는 동형2기능성 이미도에스터와 접목시켜 핵산 추출이 가능함을 확인한 것이다.
- [22] 도 7은 대장암 세포주인 HCT116을 이용하여 입자 크기에 따른 산화아연 나노스타의 핵산 추출 효율을 산화아연 나노입자와 비교한 것이다.
- [23] 도 8은 대장암 세포주인 HCT116을 이용하여 종래 핵산 추출 키트 (Qiagen), 산화아연 나노스타, 산화아연 나노입자의 (A) DNA 추출 및 (B) RNA 추출 효율을 비교한 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [24] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [25] 본 발명의 발명자들은 병원체 용해 및 핵산을 추출할 수 있는 추출 방법을 개발하였으며, 본 발명의 산화아연 나노스타 (ZnO nanostar; ZnO NS)는 종래 산화아연 나노입자와 비교하여 병원체의 세포막 및 핵의 용해능을 증가시킬 수 있는 크기 및 형태를 가짐으로써 고농도의 핵산을 추출할 수 있으며, 또한, 본 발명의 산화아연 나노스타를 이용한 핵산 추출 방법은 용해 완충액 (lysis buffer) 및 가열 단계 없이 고순도 및 고농도의 핵산을 추출하여 현장 즉시형 진단이 가능함을 밝혀내며 본 발명을 완성하였다.
- [26]
- [27] 본 발명은 산화아연 나노스타를 포함하는 병원체 용균용 조성물을 제공한다.
- [28] 상기 산화아연 나노스타는 복수 개의 뾰족한 돌기가 환상으로 배열된 나노입자를 의미한다.
- [29] 상기 산화아연 나노스타는 200 내지 900 nm의 평균 입경을 가지며, 바람직하게는, 350 내지 900 nm의 평균 입경을 가지며, 더욱 바람직하게는 500 nm의 평균 입경을 가질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.
- [30] 상기 병원체는 미생물이며, 상기 미생물은 바이러스, 세균, 진균, 원충, 리케차 또는 스피로헤타일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.
- [31]
- [32] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 병원체 용균용 키트를 제공한다.
- [33]
- [34] 또한, 본 발명은 산화아연 나노스타를 병원체가 함유된 시료에 접촉시키는 단계를 포함하는 병원체 용균 방법을 제공한다.
- [35] 상기 병원체가 함유된 시료는 병원체에 감염된 것으로 의심되는 객체의 분변, 소변, 눈물, 타액, 피부의 외부 분비물, 호흡관의 외부 분비물, 장관의 외부 분비물, 소화관의 외부 분비물, 혈장, 혈청, 혈액, 척수액, 림프액, 체액 및 조직으로 이루어진 균에서 선택된 어느 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은

아님을 명시한다.

[36] 상기 병원체는 미생물이며, 상기 미생물은 바이러스, 세균, 진균, 원충, 리케차 또는 스피로헤타일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[37]

[38] 또한, 본 발명은 산화아연 나노스타를 포함하는 핵산 추출용 조성물을 제공한다.

[39] 상기 산화아연 나노스타는 복수 개의 뾰족한 돌기가 환상으로 배열된 나노입자를 의미한다.

[40] 상기 산화아연 나노스타는 200 내지 900 nm의 평균 입경을 가지며, 바람직하게는, 350 내지 900 nm의 평균 입경을 가지며, 더욱 바람직하게는 500 nm의 평균 입경을 가질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[41] 상기 핵산은 DNA 또는 RNA일 수 있다.

[42]

[43] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 핵산 추출용 키트를 제공한다.

[44]

[45] 또한, 본 발명은 산화아연 나노스타를 핵산 시료에 첨가하고 반응시켜 혼합물을 제조하는 제 1단계; 및 상기 혼합물로부터 핵산을 추출하는 제 2단계;를 포함하는 핵산 추출 방법을 제공한다.

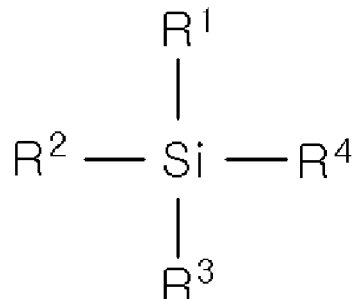
[46]

[47] 또한, 본 발명은 산화아연 나노스타를 핵산 시료에 첨가하고 반응시켜 혼합물을 제조하는 제 1단계; 상기 혼합물에 실란 화합물로 개질된 규조토를 첨가하고, 디메틸 아디피미데이트(dimethyl adipimidate; DMA), 디메틸 피멜리미데이트(dimethyl pimelimidate; DMP), 디메틸 수베리미데이트(Dimethyl suberimidate; DMS) 및 디메틸 3,3'-디티오비스프로피온이미데이트(Dimethyl 3,3'-dithiobispropionimidate; DTBP)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 첨가하여 반응 혼합물을 제조하는 제 2단계; 및 상기 반응 혼합물로부터 핵산을 추출하는 제 3단계;를 포함하는 핵산 추출 방법을 제공한다.

[48] 상기 실란 화합물은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[49] [화학식 1]

[50]



[51] 상기 식에서, R¹ 내지 R³는 각각 같거나 다를 수 있으며, C1 내지 C4의 알킬 또는 C1 내지 C4의 알콕시 중 어느 하나이고, R⁴는 아미노(C1 내지 C10)알킬, 3-(2-아미노(C1 내지 C4)알킬아미노)(C1 내지 C4)알킬 또는 3-[2-(2-아미노(C1 내지 C4)알킬아미노)(C1 내지 C4)알킬아미노](C1 내지 C4)알킬 중 어느 하나임.

[52] 상기 실란 화합물은

(3-아미노프로필)트리에톡시실란((3-aminopropyl)triethoxysilane; APTES),

(3-아미노프로필)트리메톡시실란((3-aminopropyl)trimethoxysilane),

(1-아미노메틸)트리에톡시실란((1-aminomethyl)triethoxysilane),

(2-아미노에틸)트리에톡시실란((2-aminoethyl)triethoxysilane),

(4-아미노부틸)트리에톡시실란((4-aminobutyl)triethoxysilane),

(5-아미노펜틸)트리에톡시실란((5-aminopentyl)triethoxysilane),

(6-아미노헥실)트리에톡시실란((6-aminohexyl)triethoxysilane),

3-아미노프로필(디에톡시)메틸실란(3-aminopropyl(diethoxy)methylsilane;

APDMS),

N-[3-(트리메톡시실릴)프로필]에틸렌디아민(N-[3-(trimethoxysilyl)propyl]ethylene diamine),

N-[3-(트리메톡시실릴)프로필]디에틸렌트리아민(N-[3-(trimethoxysilyl)propyl]diethylenetriamine),

[3-(2-아미노에틸아미노)프로필]트리메톡시실란([3-(2-aminoethylamino)propyl]trimethoxysilane; AEAPTMS) 및

3-[(트리메톡시실릴)프로필]디에틸렌트리아민(3-[(trimethoxysilyl)propyl]diethylenetriamine; TMPTA)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[53]

[54] 또한, 본 발명은 질산아연 6수화물 (zinc nitrate hexahydrat) 및

헥사데실트리메틸암모늄 브로마이드 (hexadecyltrimethylammonium bromide)를 물에 첨가하여 혼합물을 제조하는 제 1단계; 상기 혼합물을 85 내지 95°C에서 30 내지 80분 동안 가열하여 반응 혼합물을 제조하는 제 2단계; 및 상기 반응 혼합물에 수산화 암모늄을 적가하여 콜로이드 용액을 제조하는 제 3단계;를 포함하는 산화아연 나노스타의 제조방법을 제공한다.

발명의 실시를 위한 형태

[55] 이하에서는 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.

[56]

[57] 실시예 1: 화학 물질 및 시약

[58] 모든 시약은 분석 등급으로 정제없이 사용하였다. 질산아연 6수화물 (zinc nitrate hexahydrate; $Zn NO_3 \cdot 6H_2O$, 98%), 수산화 암모늄 용액 (ammonium hydroxide solution; H_2O 중 28% NH_3 , 99.99% 미량 금속 기준), (3-아미노프로필)트리에톡시실란 ((3-aminopropyl)triethoxysilane; APTES, 98%)은 Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)에서 구매하였다. 헥사데실트리메틸암모늄 브로마이드 (hexadecyltrimethylammonium bromide = cetyltrimethylammonium bromide; CTAB) ($C_{19}H_{42}BrN$, > 98%)는 Tokyo Chemical Industry에서 구매하였다. 상업용 산화아연 나노입자 (분산액, H_2O 중 40 nm 미만의 사이즈 20 wt%)는 대조군으로 사용하였다. 새로운 핵산 추출 시스템을 설계하기 위해, Sigma-Aldrich에서 생체 적합성 규조토 (diatomaceous earth) 분말을 구매하였다. 또한, 18 M Ω 보다 큰 저항값을 가지는 Milli-Q 물, 99% 에틸 알코올, 인산완충식염수 (PBS, 10x, pH 7.4) 및 스트렙타비딘 (streptavidin) 결합 자성 비드 (Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1)를 사용하였다.

[59]

[60] **실시예 2 : 실험 기기**

[61] 시료의 형태학 (morphology)은 주사 전자 현미경 (field-emission scanning electron microscopy; FE-SEM, JEOL JSM-7500F)을 이용하여 분석하였다. 산화아연 나노물질의 결정 구조를 분석하기 위해, 연속 스캔 2 θ 모드로 40 kV 전압 및 30 mA 전류에서 X-선 회절 (X-ray diffraction; XRD, Scintag-SDS 2000)을 수행하였고, 시료의 화학적 특성을 분석하기 위해, 푸리에 변환 적외선 분광학 (Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy, Nicolet 6700)을 수행하였다. 라만 (raman) 측정은 Via 라만 현미경 시스템 (Renishaw, UK)의 Renishaw를 이용하여 수행하였다. 또한, DNA 추출을 위해, 상업용 QIAamp DNA/RNA 미니 키트 (Spin Colum)를 사용하였다. 원심 분리기 (CF-5, 100 내지 240 Vas, 50/60 Hz, 8 W), 볼텍서 (Vortex Mixer, T5AL, 60 Hz, 30 W, 250 V) 및 MSH-30d 교반-가열기는 Dortan Scientific Co에서 구매하였다. Ariamx 실시간 PCR 시스템 (Agilent technologies), Gene Amp PCR 시스템 9700 (LSK), 전기영동 장치 (Submerge-Mini), 전기영동 겔 기록장치 (Gel documentation system) 및 Nanodrop 2000 (PeqLab)은 핵산 검출 실험을 위해 사용하였다.

[62]

[63] **실시예 3 : 세포 및 병원균**

[64] 실험에 사용된 세포는 대장암 세포주인 HCT116 (ATCC CCL-247)을 사용하였고, 병원균으로는 브루셀라균 (*Brucella ovis*, ATCC 25840), 대장균 (*Escherichia coli*; *E. coli*, ATCC 25922), 황색포도상구균 (*Staphylococcus aureus*; *S. aureus*) 및 바실러스 세레우스균 (*Bacillus cereus*; *B. cereus*)을 사용하였다.

[65]

[66] **실시예 4 : 산화아연 나노스타의 합성 및 형태학 분석**

[67] 산화아연 나노스타 (Zno nanostar; Zno NS) 결정체는 알칼리성 배지에서 수열

법 (hydrothermal method)으로 합성하였다.

- [68] 1 M의 질산아연 6수화물 1 ml과 1 M의 CTAB 1 ml를 Milli-Q 물 98 ml이 담긴 플라스크에 적절한 순서로 첨가하고, 90°C에서 50분 동안 가열하면서 교반 (500 rpm) 하였다. 이후, 안정한 교반 조건 하에서, 수산화 암모늄 용액 2 ml를 반응 혼합물에 적가하고, 유백색 콜로이드 용액이 생성될 때까지 몇 분간 교반하였다.
- [69] 산화아연 나노스타의 균일한 생성을 위해, 반응 온도, 반응 시간 및 교반 속도를 조절하였다. 산화아연 나노스타의 생성을 조절하기 위해, 얼음 상자의 반응 플라스크를 바로 꺼내어 원심 분리하고, 실온에서 건조시킨 후, Milli-Q 물로 세척하였다. 모든 합성은 특별한 처리없이 수행하였고, 마지막으로 시료는 에탄올 (99 %)에 보관하였다.
- [70]
- [71] 도 1을 참조하여 보면, (A) 산화아연 나노스타는 평균 200 내지 600 nm의 입자 크기를 가지며 복수 개의 뾰족한 돌기가 환상으로 배열된 입자 형태를 나타내었으며, (B) 산화아연 나노입자는 평균 20 내지 60 nm의 입자 크기를 가지며 불규칙한 구형의 입자 형태를 나타내는 것을 확인하였다.
- [72] 또한, 도 2를 참조하여 보면, 산화아연 나노스타와 산화아연 나노입자의 구조가 서로 상이한 것을 라만 기법으로 확인하였다.
- [73] 따라서, 본 발명의 산화아연 나노스타는 종래의 산화아연 나노입자에 비해 큰 입자 크기를 가지며, 복수 개의 뾰족한 돌기가 환상으로 배열된 모양의 입자 형태를 가져 병원균의 세포막 및 핵을 더 용이하게 용해할 수 있음을 확인하였다.
- [74]
- [75] **실시예 5 : 산화아연 나노스타의 용해능 검증**
- [76] 상용화 키트는 산화아연 나노스타의 용해 특성을 비교 분석하는데 사용하였다.
- [77] 먼저, 시료 (브루셀라균)를 용해하기 위해, 시료 1.5 ml에 AL 완충액을 첨가하고, DNA 추출을 위해 56°C에서 10분 동안 배양한 후, RNA 추출을 위해 상온에서 1분간 배양하였다. 준비된 시료를 Qiagen 컬럼으로 옮기고, 세척 및 용출 단계를 수행하였다.
- [78] 반면, 본 발명에서는 상용화 AL 완충액 대신 산화아연 나노스타를 이용하여 대량으로 고품질의 핵산을 추출하기 위한 조건을 최적화하였고, 추출 방법을 단순화하였다.
- [79] 추출된 핵산의 양 및 순도는 Ariamx 실시간 PCR 시스템, Gene Amp PCR 시스템 9700, 전기영동 장치, 전기영동 겔 기록장치 및 Nanodrop 2000으로 측정하였다.
- [80]
- [81] 도 3 및 하기 표 1은 브루셀라균의 핵산 추출에 있어서, 종래의 핵산 추출 키트 (Qiagen) + 용해 완충액 사용, 산화아연 나노입자 + 용해 완충액 미사용, 산화아연 나노스타 + 용해 완충액 미사용, 종래 핵산 추출 키트 (Qiagen) + 용해 완충액 미사용 조건으로 핵산을 추출하여 용해능을 비교한 결과로, 본 발명의 산화아연

나노스타의 핵산 추출이 가장 우수한 것을 확인하였다.

[82]

[83] [표1]

Cq (ΔR)	Tm Product 1 (-R'(T))	10 ⁵ 브루셀라균 (RT)
23.74	81.5	Qiagen + 용해 완충액
25.38	81.5	산화아연 나노입자 (RT)
21.5	81.5	산화아연 나노스타 (RT)
25.45	81	Qiagen
35.4	83.5	음성 대조군

[84]

[85] 또한, 상기 방법과 동일하게, 브루셀라균, 대장균, 황색포도상구균 및 바실러스 세레우스균을 이용하여 산화아연 나노스타의 용해 특성을 비교 분석하였다.

[86] 그 결과, 도 4를 참조하여 보면, 상기 4종류의 균 모두에서 본 발명의 산화아연 나노스타가 종래의 핵산 추출 키트보다 용해능 및 핵산 추출이 우수한 것을 확인하였다.

[87]

[88] 또한, 도 5는 본 발명의 산화아연 나노스타가 종래의 핵산 추출 키트 (Qiagen) 컬럼에 접목하여 핵산 추출이 가능한지를 분석한 것이다. 하기 표 2와 같이 조건을 달리하여 핵산 추출 효율을 비교한 결과, 산화아연 나노스타는 가열 단계 없이 상온에서도 효율적인 핵산 추출이 가능함을 확인하였다.

[89]

[90] [표2]

	A1	A2	B1	B2	C1	C2
핵산 추출 조성물	Qiagen	Qiagen	Qiagen +산화아연 나노스타	Qiagen +산화아연 나노스타	Qiagen	Qiagen
용해 완충액	사용	사용	미사용	미사용	미사용	미사용
온도 (°C)	56	상온	56	상온	56	상온
시간 (분)	10	10	10	10	10	10

[91]

[92] 실시예 6 : 단일 튜브 핵산 추출을 위한 기능화된 구조도 및 광학 산화아연 나노스타의 용해능 검증

[93] 산화아연 나노스타의 용해 특성을 추가적으로 분석하기 위해, 단일 튜브 핵산

추출 시스템을 사용하였으며, 이는 이전 논문 (Biosensors and Bioelectronics 99 (2018) 443-449.)을 참고하여 수행하였다.

[94] 간략하게, (1) 규조토의 기공 구조는 다양한 분자를 수용할 수 있고, 벽에 있는 고밀도의 실라놀기 (silanol group)는 기능성 아민기와 연결하는데 유리하기 때문에, 세척한 규조토를 APTES로 기능화하였다. 상세한 실험 과정은 하기와 같다.

[95]

[96] i) APTES 2 ml를 95% 에탄올 용액 100 ml에 적가하고 상온에서 400 rpm으로 3분 동안 교반하였다.

[97] ii) 세척한 규조토 500 mg을 상기 용액에 600 rpm으로 4시간 동안 분산시켰다.

[98] iii) 개질 후, 유리 실라놀을 제거하기 위해, 침전물을 에탄올로 2회 세척하였다.

[99] iv) 원심 분리하여 APTES로 기능화된 규조토를 획득하고, 진공 하에 상온에서 밤새 건조시켰다.

[100] v) 마지막으로 APTES로 기능화된 규조토를 증류수에 50 mg/ml 농도로 분산시켰다.

[101]

[102] APTES로 기능화된 규조토 및 순수한 규조토의 특성은 전계 방출 주사 전자 현미경, 푸리에 변환 적외선 분광학 및 라만 현미경 시스템으로 분석하였다.

[103]

[104] (2) 상기 개질에 기초하여, APTES로 기능화된 규조토 및 이미도에스터 가교제 (Dimethyl suberimidate · 2 HCl, DMS)를 준비된 생물학적 시료가 담긴 5 ml 튜브에 첨가하여 핵산을 추출하였다. 상세한 실험 과정은 하기와 같다.

[105]

[106] i) 시료 용액 100 μ l를 프로테아제 K 10 μ l와 용해 완충액 (M-SDS 용해 완충액 또는 산화아연 나노스타 용액) 10 μ l가 담긴 1.5 ml 튜브에 첨가하고, 파이펫을 이용하여 섞어준 후, 상온에서 1분 동안 배양하였다. DNase 10 μ l는 RNA 추출을 위해 첨가하였다.

[107] ii) 이후, 규조토-APTES 2 mg/ml를 첨가한 다음 100 mg/ml 농도의 DMS 용액 100 μ l를 첨가하였다.

[108] iii) 혼합 후, M-SDS 용해를 위해 56°C에서 10분 동안 배양하거나 산화아연 나노스타 용해를 위해 파이펫으로 섞어주며 상온에서 2분 동안 배양하였다.

[109] iv) 배양 후, 상층액을 제거하고 침전물을 PBS 200 μ l로 2회 세척하였다.

[110] v) 마지막으로, 용출 완충액 (pH ~ 10.6 NaHCO₃) 60 μ l를 첨가하고 실온에서 1분 동안 배양하였다.

[111] vi) 원심 분리한 후, 상층액을 1.5 ml 튜브로 옮기고, 추출된 DNA 또는 RNA는 -20 °C에서 보관하였다.

[112]

[113] 추출된 핵산의 양 및 순도는 Ariamx 실시간 PCR 시스템, Gene Amp PCR 시스템

9700, 전기영동 장치, 전기영동 겔 기록장치 및 Nanodrop 2000으로 측정하였다.

[114]

[115] 도 6은 본 발명의 산화아연 나노스타가 APTES로 기능화된 구조토 및 동형2기능성 이미도에스터 [디메틸 아디피미데이트 (Dimethyl adipimidate; DMA), 디메틸 피멜리미데이트 (Dimethyl pimelimidate; DMP), 디메틸 수베르이미데이트 (Dimethyl suberimidate; DMS) 또는 디메틸 3,3'-디티오비스프로피온이미데이트 (Dimethyl 3,3'-dithiobispropionimidate; DTBP)]와 접목이 가능한지를 분석한 것이다.

[116] 본 발명의 산화아연 나노스타를 APTES로 기능화된 구조토 및 DMS와 함께 접목시키고, 하기 표 3과 같이, 조건을 달리하여 핵산 추출 효율을 비교한 결과, 산화아연 나노스타는 가열 단계 없이 상온에서도 효율적인 핵산 추출이 가능함을 확인하였다. 또한, 용해 완충액을 사용하지 않기 때문에, 핵산에 손상을 적게 주어, 최종적인 PCR 등을 통한 검출 기법에 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

[117]

[118] [표3]

	Qiagen	A1	A2	A3	B1	B2	B3
용해 완충액	사용	사용	산화아연 나노스타	미사용	사용	산화아연 나노스타	미사용
온도(°C)	56	56	56	56	상온	상온	상온
시간(분)	10	10	10	10	2	2	2

[119]

[120] 또한, 도 7 및 하기 표 4를 참조하여 보면, 입자 크기에 따른 핵산 추출 효율을 비교한 것으로, 350 내지 900 nm의 입자 크기를 가지는 산화아연 나노스타의 핵산 추출 효율이 가장 우수하였으며, 특히 500 nm의 입자 크기를 가지는 산화아연 나노스타가 최적의 조건임을 확인하였다.

[121]

[122] [표4]

Cq (ΔR)	Tm Product 1 (-R'(T))	HCT 116 10 ⁴ /ml 100 μl (60 μl DNA)
26.63	85	~20 nm 산화아연 나노입자
26.2	85	~100 nm 산화아연 나노스타
25.75	90	~350 nm 산화아연 나노스타
25.21	85.5	~500 nm 산화아연 나노스타
25.25	85.5	~900 nm 산화아연 나노스타
27.21	85	~1000 nm 산화아연 나노스타
30.78	85	음성 대조군

[123]

[124] 실시예 7: 산화아연 나노스타를 이용한 핵산 추출 방법

[125] 7-1. 산화아연 나노스타의 합성

[126] 산화아연 나노스타는 알칼리성 배지에서 수열 법으로 합성하였다.

[127]

[128] i) 1 M의 질산아연 6수화물 1 ml과 1M의 CTAB 1 ml를 Milli-Q 물 98 ml이 담긴 플라스크에 적정한 순서로 첨가하고, 90°C에서 50분 동안 가열하면서 교반 (500 rpm) 하였다.

[129] ii) 이후, 안정한 교반 조건 하에서, 수산화 암모늄 용액 2 ml를 반응 혼합물에 첨가하고, 유백색 콜로이드 용액이 생성될 때까지 몇 분간 교반하였다.

[130]

[131] 산화아연 나노스타의 균일한 생성을 위해, 반응 온도, 반응 시간 및 교반 속도를 조절하였다.

[132]

[133] iii) 산화아연 나노스타의 생성을 조절하기 위해, 얼음 상자의 반응 플라스크를 바로 꺼내어 원심 분리하고, 실온에서 건조시킨 후, Milli-Q 물로 세척하였다. 모든 합성은 특별한 처리없이 수행하였고, 마지막으로 시료는 에탄올 (99 %)에 보관하였다.

[134]

[135] 7-2. 산화아연 나노스타 및 Qiagen kit를 이용한 핵산 추출 방법

[136] i) 산화아연 나노스타 용액을 브루셀라균 (CFU: 10^5 /ml) 100 μ l가 담겨 있는 1.5 ml 튜브에 첨가하고, 파이펫을 이용하여 상온에서 10분 이내로 부드럽게 섞어주었다.

[137] ii) 이어서, 준비된 시료를 Qiagen 컬럼에 옮기고, 세척한 후 DNA를 Qiagen 용출 완충액 60 μ l로 용출시켰다.

[138]

[139] 7-3. 산화아연 나노스타, 규조토-APTES 및 이미도에스터를 이용한 핵산 추출 방법

[140] i) 브루셀라균 100 μ l를 프로테아제 K 10 μ l와 용해 완충액 (M-SDS 용해 완충액 또는 산화아연 나노스타 용액) 10 μ l가 담긴 1.5 ml 튜브에 첨가하고, 파이펫을 이용하여 섞어준 후, 상온에서 1분 동안 배양하였다. DNase 10 μ l는 RNA 추출을 위해 첨가하였다.

[141] ii) 이후, 규조토-APTES 2 mg/ml (50 mg/ml, 40 μ l)를 첨가한 다음 100 mg/ml 농도의 DMS 용액 100 μ l를 첨가하였다. 혼합 후, M-SDS 용해를 위해 56°C에서 10분 동안 배양하거나 산화아연 나노스타 용해를 위해 파이펫으로 섞어주며 상온에서 2분 동안 배양하였다.

[142] iii) 배양 후, 상층액을 제거하고 침전물을 PBS 200 μ l로 2회 세척하였다.

[143] iv) 마지막으로, 용출 완충액 (pH ~ 10.6 NaHCO_3) 60 μ l를 첨가하고 실온에서 1분 동안 배양하였다.

[144]

[145] 7-4. DNA 추출 효율 분석을 위한 실시간 PCR

[146] 템플릿 (NA) 5 μ l를 이용하여 96 웰 플레이트 (96 Well Plate)에서 수행하였다.

[147]

[148] i) 멀티 채널 파이펫을 이용하여 96 웰 플레이트의 각 웰에 master mix 20 μ l를 분주하였다.

[149] ii) 상기 master mix에 템플릿 (NA) 5 μ l를 넣고 파이펫으로 잘 섞어주었다.

[150] iii) 교차 오염을 방지하고 뚜껑의 표면을 얼룩지게하지 않도록 주의하면서 웰에 광학 스트립 뚜껑을 놓았다.

[151] iv) 96 웰 플레이트를 2000 rpm으로 1분간 원심 분리하였다.

[152] v) qPCR 기계에 96 웰 플레이트를 올바른 방향으로 놓고 하기 조건으로 실시간 PCR을 수행하였다.

[153] 1 단계 : 95°C, 10분

[154] 2 단계 : 95°C, 10초; 60°C, 20초; 72°C, 20초 (40 내지 45 사이클)

[155] 3 단계 : 72°C, 10분

[156] vi) 데이터 분석을 수행하였다.

[157]

[158] **실시예 8: 진핵 세포를 이용한 산화아연 나노스타의 용해능 검증**

[159] 진핵 세포에서 산화아연 나노스타의 유용성을 검증하기 위해, 대장암 세포주인

HCT116 세포를 1~10⁴ 세포/100 μ l의 농도가 되도록 연속 희석 (serial dilution) 한 후, 산화아연 나노스타, 산화아연 나노입자 및 종래 핵산 추출 키트 (Qiagen)를 이용하여 DNA 및 RNA를 추출 효율을 분석하였다.

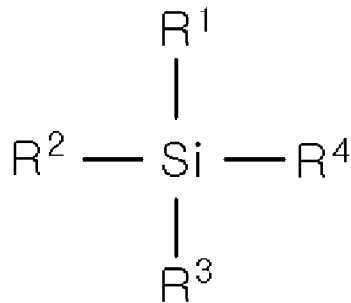
- [160] 그 결과, 도 8을 참조하여 보면, 최적화된 조건으로 본 발명의 산화아연 나노스타를 이용한 경우, DNA 및 RNA가 모두 1 세포/ml까지 검출되는 것을 확인할 수 있었다. 산화아연 나노스타의 검출 한계는 종래 핵산 추출 키트보다 DNA의 경우 100배, RNA의 경우 10배 우수하였다.
- [161] 또한, 산화아연 나노스타와 산화아연 나노입자의 세포 용해능을 비교한 결과, 산화아연 나노스타가 산화아연 나노입자 (20 nm) 보다 DNA 및 RNA를 1~1.5 사이클 더 빨리 검출하는 것을 확인할 수 있었다.
- [162] 더불어, 산화아연 나노스타는 종래 핵산 추출 키트 보다 고농도 및 고순도로 핵산을 추출하였으며, 심지어 적은 수의 세포에서도 RNA를 고농도 및 고순도(10⁴ 세포/100 μ l에서 3.5 \pm 2.3 ng/ μ l 및 1.73 \pm 0.26)로 추출하였다.
- [163] 산화아연 나노스타는 다양한 유형의 세포에서 용해 완충액의 사용 없이 상온에서 신속한 세포 용해를 가능하게 하는 바, 임상 환경에서 진단 시스템으로 유용하게 활용될 수 있다.
- [164]
- [165] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술한 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.
- [166] 본 발명의 범위는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.
- [167]
- [168]
- [169]
- [170]

청구범위

- [청구항 1] 산화아연 나노스타를 포함하는 병원체 용균용 조성물.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 산화아연 나노스타는 200 내지 900 nm의 평균 입경을 가지는 것을 특징으로 하는 병원체 용균용 조성물.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서, 상기 병원체는 미생물인 것을 특징으로 하는 병원체 용균용 조성물.
- [청구항 4] 제 3항에 있어서, 상기 미생물은 바이러스, 세균, 진균, 원충, 리케차 또는 스피로헤타인 것을 특징으로 하는 병원체 용균용 조성물.
- [청구항 5] 제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 병원체 용균용 키트.
- [청구항 6] 산화아연 나노스타를 병원체가 함유된 시료에 접촉시키는 단계를 포함하는 병원체 용균 방법.
- [청구항 7] 제 6항에 있어서, 상기 병원체가 함유된 시료는 병원체에 감염된 것으로 의심되는 객체의 분변, 소변, 눈물, 타액, 피부의 외부 분비물, 호흡관의 외부 분비물, 장관의 외부 분비물, 소화관의 외부 분비물, 혈장, 혈청, 혈액, 척수액, 림프액, 체액 및 조직으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 병원체 용균 방법.
- [청구항 8] 제 6항에 있어서, 상기 병원체는 미생물인 것을 특징으로 하는 병원체 용균 방법.
- [청구항 9] 제 8항에 있어서, 상기 미생물은 바이러스, 세균, 진균, 원충, 리케차 또는 스피로헤타인 것을 특징으로 하는 병원체 용균 방법.
- [청구항 10] 산화아연 나노스타를 포함하는 핵산 추출용 조성물.
- [청구항 11] 제 10항에 있어서, 상기 산화아연 나노스타는 200 내지 900 nm의 평균 입경을 가지는 것을 특징으로 하는 핵산 추출용 조성물.
- [청구항 12] 제 10항에 있어서, 상기 핵산은 DNA 또는 RNA인 것을 특징으로 하는 핵산 추출용 조성물.
- [청구항 13] 제 10항 내지 제 12항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 핵산 추출용 키트.
- [청구항 14] 산화아연 나노스타를 핵산 시료에 첨가하고 반응시켜 혼합물을 제조하는 제 1단계; 및
상기 혼합물로부터 핵산을 추출하는 제 2단계;를 포함하는 핵산 추출 방법.
- [청구항 15] 산화아연 나노스타를 핵산 시료에 첨가하고 반응시켜 혼합물을 제조하는 제 1단계;
상기 혼합물에 실란 화합물로 개질된 규조토를 첨가하고, 디메틸 아디프이미데이트(dimethyl adipimidate; DMA), 디메틸 피멜리미데이트(dimethyl pimelimidate; DMP), 디메틸

수베르이미데이트(Dimethyl suberimide; DMS) 및 디메틸 3,3'-디티오비스프로피온이미데이트(Dimethyl 3,3'-dithiobispropionimide; DTBP)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 첨가하여 반응 혼합물을 제조하는 제 2단계; 및 상기 반응 혼합물로부터 핵산을 추출하는 제 3단계;를 포함하는 핵산 추출 방법.

[청구항 16] 제 15항에 있어서, 상기 실란 화합물은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 핵산 추출 방법:
[화학식 1]

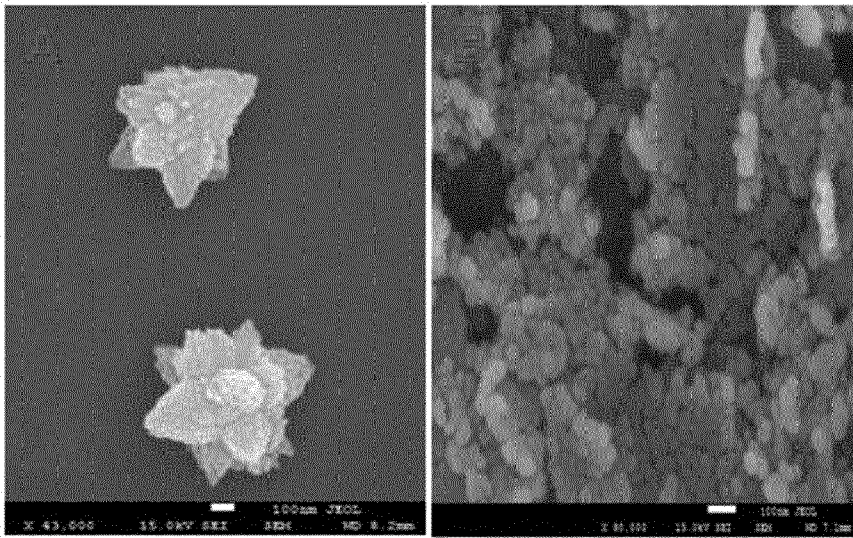


상기 식에서, R¹ 내지 R³는 각각 같거나 다를 수 있으며, C1 내지 C4의 알킬 또는 C1 내지 C4의 알콕시 중 어느 하나이고, R⁴는 아미노(C1 내지 C10)알킬, 3-(2아미노(C1 내지 C4)알킬아미노)(C1 내지 C4)알킬 또는 3-[2-(2-아미노(C1 내지 C4)알킬아미노)(C1 내지 C4)알킬아미노](C1 내지 C4)알킬 중 어느 하나임.

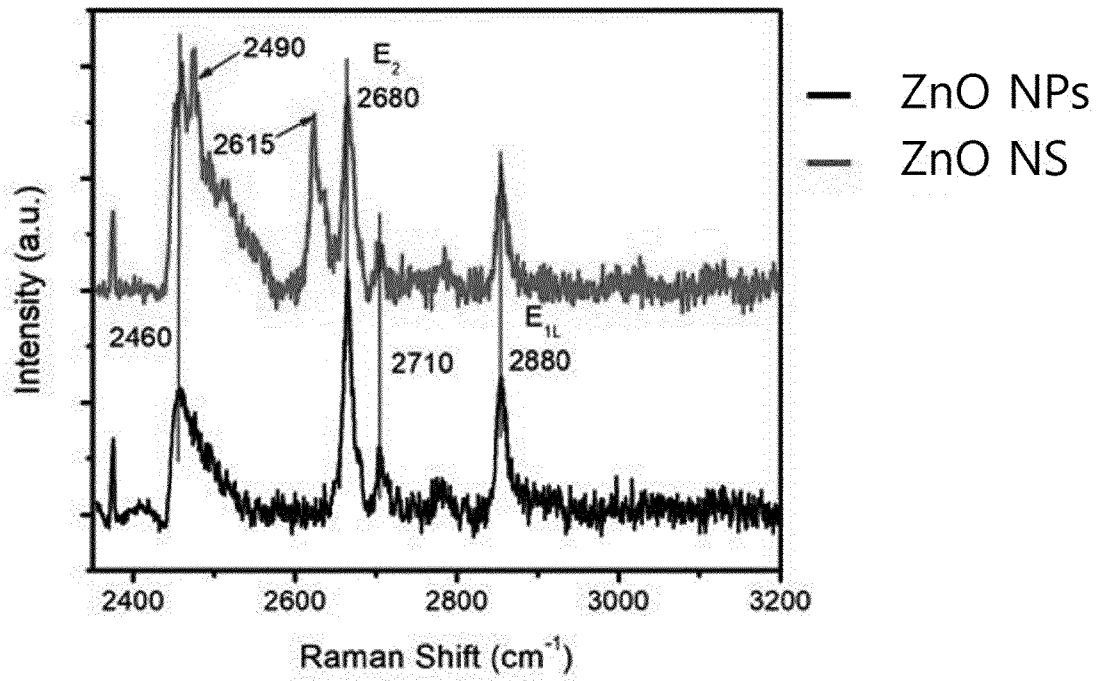
[청구항 17] 제 16항에 있어서, 상기 실란 화합물은 (3-아미노프로필)트리에톡시실란((3-aminopropyl)triethoxysilane; APTES), (3-아미노프로필)트리메톡시실란((3-aminopropyl)trimethoxysilane), (1-아미노메틸)트리에톡시실란((1-aminomethyl)triethoxysilane), (2-아미노에틸)트리에톡시실란((2-aminoethyl)triethoxysilane), (4-아미노부틸)트리에톡시실란((4-aminobutyl)triethoxysilane), (5-아미노펜틸)트리에톡시실란((5-aminopentyl)triethoxysilane), (6-아미노헥실)트리에톡시실란((6-aminohexyl)triethoxysilane), 3-아미노프로필(디에톡시)메틸실란(3-aminopropyl(diethoxy)methylsilane; APDMS), N-[3-(트리메톡시실릴)프로필]에틸렌디아민(N-[3-(trimethoxysilyl)propyl]ethylenediamine), N-[3-(트리메톡시실릴)프로필]디에틸렌트리아민(N-[3-(trimethoxysilyl)propyl]diethylenetriamine), [3-(2-아미노에틸아미노)프로필]트리메톡시실란([3-(2-aminoethylamino)propyl]trimethoxysilane; AEAPTMS) 및

3-[(트리메톡시실릴)프로필]디에틸렌트리아민(3-[(trimethoxysilyl)propyl]diethylenetriamine; TMPTA)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 헥산 추출 방법.

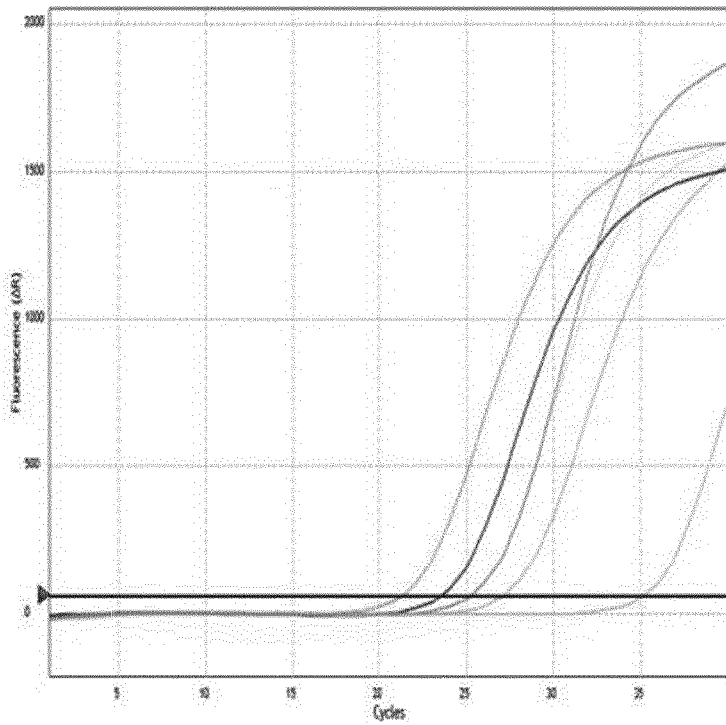
[도1]



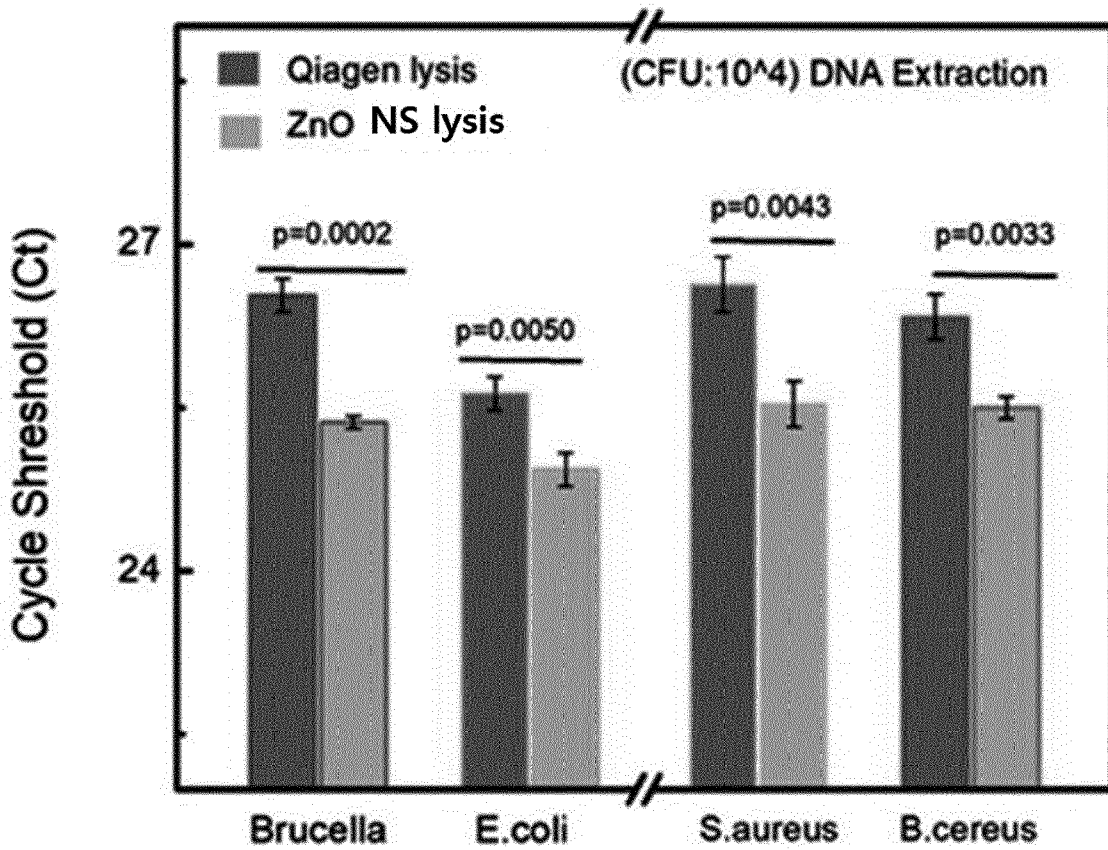
[도2]



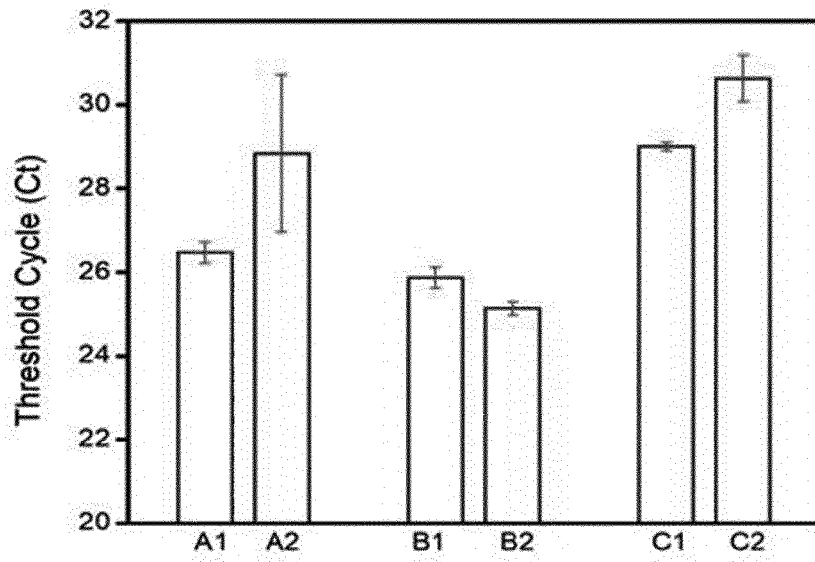
[도3]



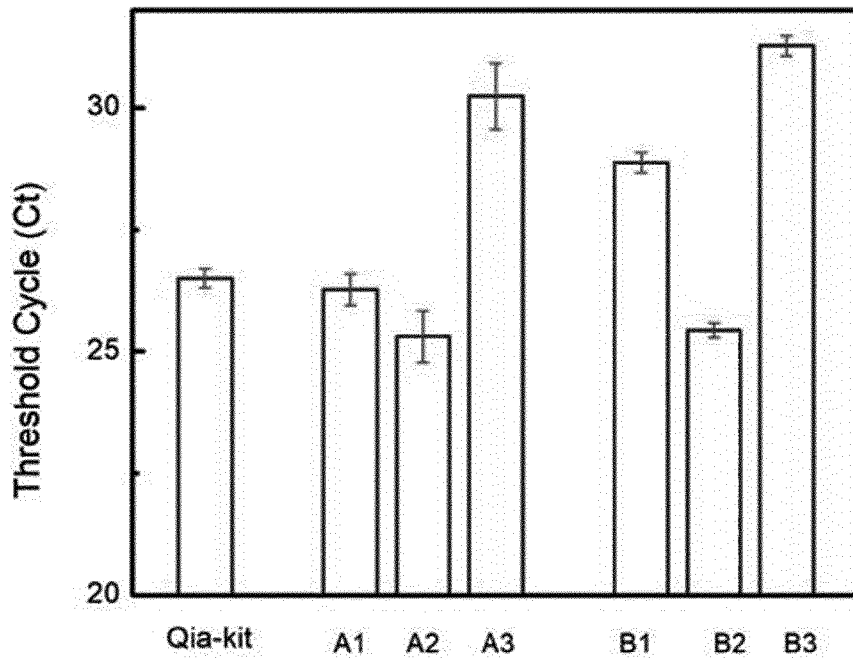
[도4]



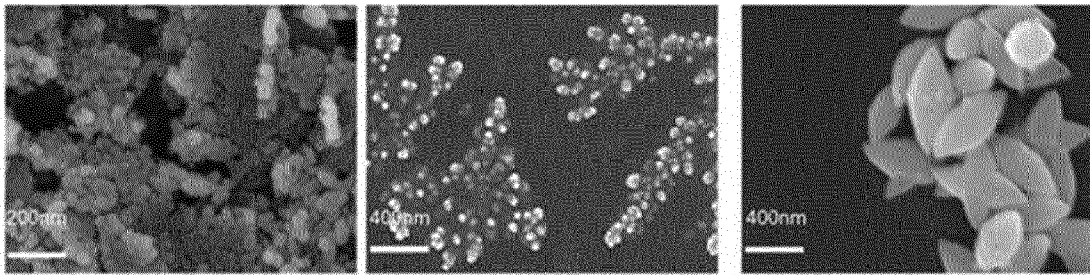
[도5]



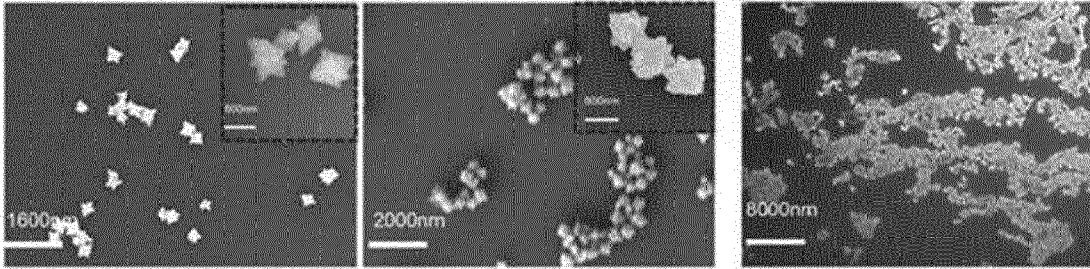
[도6]



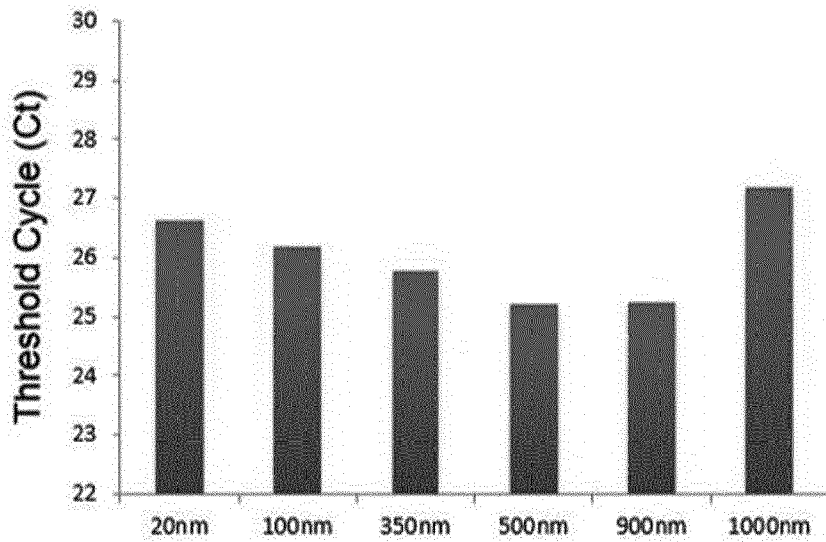
[도7]



a)~20nm ZnO NP (Commercial) b)~100nm ZnO NS (Synthesis) c)~350nm ZnO NS (Synthesis)



d)~500nm ZnO NS (Synthesis) e)~900nm ZnO NS (Synthesis) f)>1000nm ZnO NS (Synthesis)



[도8]

