(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년07월25일
(11) 등록번호 10-1882133
(24) 등록일자 2018년07월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/10 (2017.01) *C12Q 1/68* (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/1006 (2013.01)
C12Q 1/6806 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2017-0022734
(22) 출원일자 2017년02월21일
심사청구일자 2017년02월21일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020150015615 A*
JP2011520813 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
성균관대학교산학협력단
경기도 수원시 장안구 서부로 2066 (천천동, 성균관대학교내)
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
이정헌
서울특별시 서초구 청두곶4길 14-17(방배동), 401호
조규봉
서울특별시 서대문구 북아현로1길 50(북아현동, 아현역푸르지오), 206동 303호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
남건필, 박종수, 차상윤

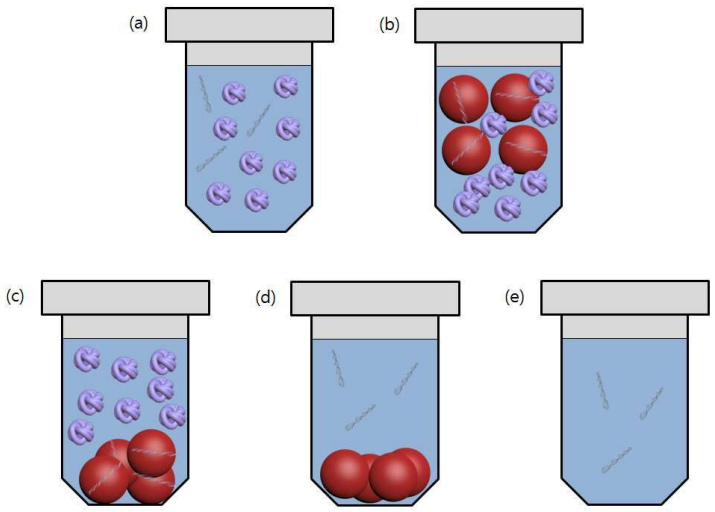
전체 청구항 수 : 총 13 항 심사관 : 김정태

(54) 발명의 명칭 **핵산과 결합 가능한 펩타이드를 이용하여 핵산을 분리하는 방법**

(57) 요 약

본 발명의 핵산을 분리하는 방법은 핵산을 포함하는 바이오(bio) 샘플과, 상기 핵산과 결합 가능한 아미노산 서열을 포함하고 말단에 적어도 하나의 작용기가 도입된 펩타이드 및 상기 펩타이드의 작용기와 결합 가능한 입자를 반응시켜, 핵산-펩타이드-입자 복합체를 형성하는 단계, 상기 핵산-펩타이드-입자 복합체를 상기 바이오 샘플로부터 분리하는 단계, 및 상기 핵산-펩타이드-입자 복합체로부터 핵산을 분리하는 단계를 포함한다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

김경일

경기도 수원시 장안구 서부로 2066(천천동), 기숙사 의관 2322호

이성현

경기도 군포시 고산로185번길 6(당정동, 한솔솔파크아파트), 102동 302호

윤석영

부산광역시 금정구 금샘로 262(구서동, 쌍용예가아파트), 203동 904호

김도근

인천광역시 부평구 후정동로 5(삼산동, 대보아파트), 8동 308호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345254317
부처명 교육부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 이공학개인기초연구지원
연구과제명 육안으로 검지가 가능한 무채색에서 유채색으로 변하는 나노입자 기반 색변환 센서 개발
기 여 율 5/10
주관기관 성균관대학교(자연과학캠퍼스)
연구기간 2016.11.01 ~ 2017.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345254049
부처명 교육부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 이공학개인기초연구지원
연구과제명 단일 분자 DNA를 이용한 혈액 순환 종양 표지 DNA 정량분석 방법 개발
기 여 율 5/10
주관기관 서강대학교
연구기간 2016.11.01 ~ 2017.10.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

핵산을 포함하는 바이오(bio) 샘플과, 상기 핵산과 결합 가능한 아미노산 서열을 포함하고 말단에 적어도 하나의 작용기가 도입된 펩타이드 및 상기 펩타이드의 작용기와 결합 가능한 입자를 반응시켜, 상기 펩타이드가 상기 핵산 및 상기 입자와 각각 결합하여 상기 핵산 및 상기 입자가 상기 펩타이드를 통해 연결된 구조를 갖는 핵산-펩타이드-입자 복합체를 형성하는 단계;

상기 핵산-펩타이드-입자 복합체를 상기 바이오 샘플로부터 분리하는 단계; 및

계면활성제 처리, pH 조절, 이온농도 조절, EDTA 처리 및 열 처리 중 적어도 어느 하나를 통해 상기 핵산-펩타이드-입자 복합체로부터 핵산을 용리(elution)하여, 상기 핵산-펩타이드-입자 복합체로부터 핵산을 분리하는 단계를 포함하는,

바이오 샘플로부터 선택적으로 핵산을 분리하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 바이오 샘플은 혈액, 혈장, 세포 현탁액 및 버퍼(buffer) 중 적어도 어느 하나를 포함하는 것을 특징으로 하는,

핵산을 분리하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 핵산-펩타이드-입자 복합체를 형성하는 단계는,

핵산을 포함하는 바이오 샘플에, 핵산과 결합 가능한 아미노산 서열을 포함하고 말단에 적어도 하나의 작용기가 도입된 펩타이드를 첨가하여, 상기 핵산 및 상기 펩타이드의 반응을 통해, 핵산-펩타이드 복합체를 형성하는 단계; 및

상기 핵산-펩타이드 복합체가 형성된 바이오 샘플에, 상기 펩타이드의 작용기와 결합 가능한 입자를 첨가하여, 상기 핵산-펩타이드 복합체 및 상기 입자의 결합을 통해, 핵산-펩타이드-입자 복합체를 형성하는 단계를 포함하는,

핵산을 분리하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 핵산-펩타이드-입자 복합체를 형성하는 단계는,

핵산과 결합 가능한 아미노산 서열을 포함하고 말단에 적어도 하나의 작용기가 도입된 펩타이드 및 상기 펩타이드의 작용기와 결합 가능한 입자를 반응시켜, 펩타이드-입자 복합체를 준비하는 단계; 및

핵산을 포함하는 바이오 샘플에 상기 펩타이드-입자 복합체를 첨가하여, 상기 핵산 및 상기 펩타이드-입자 복합체의 반응을 통해, 핵산-펩타이드-입자 복합체를 형성하는 단계를 포함하는,

핵산을 분리하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 펩타이드는 상기 핵산과 정전기적 상호작용(electrostatic interaction), 인터칼레이션(intercalation), 및 그루브 바인딩(groove binding) 중 적어도 어느 하나의 반응을 통해 복합체를 형성하는 것을 특징으로 하는,

핵산을 분리하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 펩타이드는 N-말단 및 C-말단 중 적어도 어느 하나에, 적어도 하나의 작용기가 도입된 것을 특징으로 하는,

핵산을 분리하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 작용기는 티올기(thiol groups), 아민기(amine groups), 카르복시기(carboxyl groups), 말레이미드기(maleimidegroups), 및 아자이드기(azide groups) 중 적어도 어느 하나를 포함하는 것을 특징으로 하는,

핵산을 분리하는 방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 입자는 마이크로 크기 또는 나노 크기인 것을 특징으로 하는,

핵산을 분리하는 방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 입자는 금속, 실리카, 및 폴리머 중 적어도 어느 하나로 형성된 것을 특징을 하는,

핵산을 분리하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 금속은 금(Au), 은(Ag), 티타늄(Ti), 구리(Cu), 백금(Pt), 팔라듐(Pd), 철(Fe), 아연(Zn), 납(Pb), 주석(Sn), 코발트(Co), 니켈(Ni), 망간(Mn), 세슘(Cs), 인듐(In), 비스무트(Bi), 카드뮴(Cd), 갈륨(Ga), 이리듐(Ir), 알루미늄(Al), 탄탈럼(Ta), 텅스텐(W), 바나듐(V), 란타늄(La), 망간(Mn), 네오디뮴(Nd), 스트론튬(Sr), 지르코늄(Zr), 가돌리늄(Gd), 몰리브데넘(Mo), 루테늄(Ru), 및 레늄(Re) 중 적어도 어느 하나를 포함하는 것을

특징으로 하는,

핵산을 분리하는 방법.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 폴리머는 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol, PEG), 폴리에틸렌이민(polyethyleneimine, PEI), 락트산(lactic acid), 폴리락트산(polylactic acid, PLA), 폴리락틱-co-글라이콜레이트(polylactic-co-glycolic acid, PLGA), 폴리에틸렌옥사이드(polyethylene oxide, PEO), 폴리카프로락톤(poly-epsilon-caprolactone, PCL), 폴리스티렌(polystyrene, PS), 폴리아크릴레이트(polyacrylate), 폴리메틸메타아크릴레이트(poly(methylmethacrylate), PMMA), 인지질(phospholipid), 올레산(oleic acid), 엽산(folic acid), 또는 상기 폴리머 중 적어도 하나 이상을 포함하는 폴리머 중합체를 포함하는 것을 특징으로 하는,

핵산을 분리하는 방법.

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 핵산-펩타이드-입자 복합체를 분리하는 단계는 원심분리, 자성분리, 용해도 분리 및 핵산-펩타이드-입자 복합체의 크기에 따른 분리 중 적어도 어느 하나에 의해 수행하는 것을 특징으로 하는,

핵산을 분리하는 방법.

청구항 13

삭제

청구항 14

제1항에 있어서,

상기 핵산은 혈액 종양 DNA(Circulating Tumor DNA, ctDNA)을 포함하는 것을 특징으로 하는,

핵산을 분리하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 핵산을 분리하는 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 마이크로/나노 크기의 입자와 핵산과 결합 가능한 펩타이드를 이용하여 바이오샘플로부터 핵산을 분리하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 핵산은 아데닌(Adenine, A), 티민(Thymine, T), 구아닌(Guanine, G), 시토신(Cytosine, C), 우라실(Uracil, U)의 다섯 종류 뉴클레오타이드(nucleotide)로 구성된 바이오 물질(biomolecule)로, 유전 정보를 포함하고 있다. 때문에, 핵산은 해당 개체의 유전정보 분석 및 핵산 자체의 연구를 비롯한 핵산에서 기인한 단백질 연구, 유전자 재조합 및 암 연구 등 다양한 분야에서 응용될 수 있다. 이러한 핵산의 연구를 위해서는 고순도의 핵산을 분리해내는 것이 가장 중요하며, 고순도의 핵산을 얻기 위한 분리 기술이 오랜 기간 동안 연구되고 있다.

[0003] 대표적인 핵산 분리 방법 중 하나인 페놀-클로로포름 추출법의 경우, 단백질을 변성 시킬 수 있는 페놀을 이용하여 샘플 내에 존재하는 핵산을 분리해내는 기술로, 높은 수율과 고순도의 결과물을 얻을 수 있다는 장점이 있는 반면, 시간이 오래 걸리고 유해한 화학약품을 많이 사용해야 한다는 단점을 가지고 있다.

[0004] 또 다른 방법 중 하나인 실리카 레진 흡착법은 실리카 레진 (silica resin)에 핵산을 결합시켜 분리하는 방법으로, 카오트로픽(chaotropic) 염의 유무에 따라 핵산과 실리카 레진이 선택적으로 결합하는 성질을 이용하는 방법이다. 실리카 레진 흡착법은 비교적 쉽고 빠르게 핵산을 분리해낼 수 있다는 장점이 있어, 현재 가장 널리 사용되는 방법이다. 하지만, 핵산 분리 과정에서 사용하는 카오트로픽 염과 에탄올을 완벽하게 제거하기 어렵다는 단점이 있고, 때문에, 적은 부피의 샘플의 핵산 분리 과정에서 카오트로픽 염과 에탄올을 완벽하게 제거하기 위해서는 많은 노력이 필요하다는 한계가 있다.

[0005] 한편, 핵산을 분리하기 위해 키트 형식으로 제작된 제품의 경우, 한 번에 추출할 수 있는 핵산의 양이 제한적이기 때문에, 많은 양의 핵산을 한꺼번에 분리할 수 없다는 한계점이 있다.

[0006] 때문에, 핵산을 보호하면서 신속하고 용이하게 다양한 물질들이 혼합되어 있는 용액으로부터 핵산만을 선택적으로 분리할 수 있는 새로운 핵산 분리 방법이 요구되고 있는 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 일 목적은 핵산과 상호작용할 수 있는 펩타이드 및 상기 펩타이드와 상호작용 가능한 입자를 이용하여, 용이하고 신속하게 바이오 샘플 내에 존재하는 핵산을 분리하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명의 일 목적을 위한 핵산을 분리하는 방법은 핵산을 포함하는 바이오(bio) 샘플과, 상기 핵산과 결합 가능한 아미노산 서열을 포함하고 말단에 적어도 하나의 작용기가 도입된 펩타이드 및 상기 펩타이드의 작용기와 결합 가능한 입자를 반응시켜, 핵산-펩타이드-입자 복합체를 형성하는 단계, 상기 핵산-펩타이드-입자 복합체를 상기 바이오 샘플로부터 분리하는 단계, 및 상기 핵산-펩타이드-입자 복합체로부터 핵산을 분리하는 단계를 포함한다.

[0009] 일 실시예에서, 상기 바이오 샘플은 혈액, 혈장, 세포 현탁액 및 버퍼(buffer) 중 적어도 어느 하나를 포함할 수 있다.

[0010] 일 실시예에서, 상기 핵산-펩타이드-입자 복합체를 형성하는 단계는, 핵산을 포함하는 바이오 샘플에, 핵산과 결합 가능한 아미노산 서열을 포함하고 말단에 적어도 하나의 작용기가 도입된 펩타이드를 첨가하여, 상기 핵산 및 상기 펩타이드의 반응을 통해, 핵산-펩타이드 복합체를 형성하는 단계 및 상기 핵산-펩타이드 복합체가 형성된 바이오 샘플에, 상기 펩타이드의 작용기와 결합 가능한 입자를 첨가하여, 상기 핵산-펩타이드 복합체 및 상기 입자의 결합을 통해, 핵산-펩타이드-입자 복합체를 형성하는 단계를 포함할 수 있다.

[0011] 일 실시예에서, 상기 핵산-펩타이드-입자 복합체를 형성하는 단계는, 핵산과 결합 가능한 아미노산 서열을 포함하고 말단에 적어도 하나의 작용기가 도입된 펩타이드 및 상기 펩타이드의 작용기와 결합 가능한 입자를 반응시켜, 펩타이드-입자 복합체를 준비하는 단계 및 핵산을 포함하는 바이오 샘플에 상기 펩타이드-입자 복합체를 첨가하여, 상기 핵산 및 상기 펩타이드-입자 복합체의 반응을 통해, 핵산-펩타이드-입자 복합체를 형성하는 단계를 포함할 수 있다.

[0012] 일 실시예에서, 상기 펩타이드는 상기 핵산과 정전기적 상호작용(electrostatic interaction), 인터칼레이션(intercalation), 및 그루브 바인딩(groove binding) 중 적어도 어느 하나의 반응을 통해 복합체를 형성할 수 있다.

[0013] 일 실시예에서, 상기 펩타이드는 N-말단 및 C-말단 중 적어도 어느 하나에, 적어도 하나의 작용기가 도입된 것일 수 있다.

[0014] 이때, 상기 작용기는 티올기(thiol groups), 아민기(amine groups), 카르복시기(carboxyl groups), 말레이미드기(maleimidegroups), 및 아자이드기(azide groups) 중 적어도 어느 하나를 포함할 수 있다.

[0015] 일 실시예에서, 상기 입자는 마이크로 크기 또는 나노 크기일 수 있다.

[0016] 일 실시예에서, 상기 입자는 금속, 실리카, 및 폴리머 중 적어도 어느 하나로 형성될 수 있다.

[0017] 이때, 상기 금속은 금(Au), 은(Ag), 티타늄(Ti), 구리(Cu), 백금(Pt), 팔라듐(Pd), 철(Fe), 아연(Zn), 납(Pb), 주석(Sn), 코발트(Co), 니켈(Ni), 망간(Mn), 세슘(Cs), 인듐(In), 비스무트(Bi), 카드뮴(Cd), 갈륨(Ga), 이리

듐(Ir), 알루미늄(Al), 탄탈럼(Ta), 텅스텐(W), 바나듐(V), 란타늄(La), 망간(Mn), 네오디뮴(Nd), 스트론튬(Sr), 지르코늄(Zr), 가돌리늄(Gd), 몰리브데넘(Mo), 루테늄(Ru), 및 레늄(Re) 중 적어도 어느 하나를 포함할 수 있다.

[0018] 이때, 상기 폴리머는 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol, PEG), 폴리에틸렌이민(polyethyleneimine, PEI), 락트산(lactic acid), 폴리락트산(polylactic acid, PLA), 폴리락틱-co-글라이콜레이트(polylactic-co-glycolic acid, PLGA), 폴리에틸렌옥사이드(polyethylene oxide, PEO), 폴리카프로락톤(poly-epsilon-caprolactone, PCL), 폴리스티렌(polystyrene, PS), 폴리아크릴레이트(polyacrylate), 폴리메틸메타아크릴레이트(poly(methylmethacrylate), PMMA), 인지질(phospholipid), 올레산(oleic acid), 엽산(folic acid), 또는 상기 폴리머 중 적어도 하나 이상을 포함하는 폴리머 중합체를 포함할 수 있다.

[0019] 일 실시예에서, 상기 핵산-펩타이드-입자 복합체를 분리하는 단계는, 원심분리, 자성분리, 용해도 분리 및 핵산-펩타이드-입자 복합체의 크기에 따른 분리 중 적어도 어느 하나에 의해 수행할 수 있다.

[0020] 일 실시예에서, 상기 핵산을 분리하는 단계는, 계면활성제 처리, pH 조절, 이온농도 조절, EDTA 처리 및 열 처리 중 적어도 어느 하나에 의해, 상기 핵산-펩타이드-입자 복합체로부터 핵산을 용리(elution)하여 수행할 수 있다.

[0021] 일 실시예에서, 상기 핵산은 혈액 종양 DNA(Circulating Tumor DNA, ctDNA)을 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0022] 본 발명의 핵산을 분리하는 방법에 따르면, 용이하고 신속하게 혈액이나 혈장, 세포 현탁액, 샘플 등에 존재하는 DNA나 RNA와 같은 핵산을 보호하면서 분리할 수 있다. 구체적으로, 본 발명에 따르면, 본 발명은 핵산에서의 완벽한 제거가 어려운 염을 사용하는 핵산 추출 기법과 달리, 핵산을 분리함에 있어, 마이크로/나노입자와 화학적으로 결합할 수 있는 펩타이드를 이용하여, 핵산과 펩타이드의 결합을 통해 효과적으로 핵산을 보호할 수 있고 이에 따라 주변 환경 또는 효소 작용 등에 의해 쉽게 훼손되는 핵산 자체의 안정성을 향상시킬 수 있다. 또한, 핵산과 펩타이드와 함께 마이크로/나노 크기의 입자를 고정시켜 핵산을 보다 안정적으로 보호할 수 있을 뿐만 아니라 핵산-펩타이드-입자 복합체로부터 pH 조절, 이온 농도 조절, EDTA 처리와 같은 방법을 이용하여 핵산만을 용이하게 분리할 수 있다. 게다가, 핵산을 분리하는 과정에서 사용하는 증류수나 버퍼와 같은 용액의 부피를 조절함으로써, 분리되는 핵산의 농도를 조절할 수 있으며 이에 따라 핵산을 농축하는 효과를 얻을 수 있다. 또한, 본 발명에 따르면, 분리하고자 하는 핵산의 종류나 길이 등에 관계없이 혈액이나 혈장이나 그 밖의 다양한 바이오 샘플로부터 핵산을 분리할 수 있기 때문에 다양한 응용 분야에 적용할 수 있고, 분리된 핵산을 이용하여 암 분석을 비롯한 여러 가지 분석을 수행할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 핵산을 분리하는 방법을 설명하기 위한 도면이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 핵산의 분리를 설명하기 위한 도면이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 입자를 설명하기 위한 도면이다.

도 4는 λDNA의 최대 흡수 피크에서의 농도별 흡광도를 설명하기 위한 도면이다.

도 5는 본 발명의 다른 실시예에 따른 핵산의 분리를 설명하기 위한 도면이다.

도 6은 본 발명의 또 다른 실시예에 따른 핵산의 분리를 설명하기 위한 도면이다.

도 7은 본 발명에 따른 핵산의 분리를 설명하기 위한 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 이하, 첨부한 도면을 참조하여 본 발명의 실시예에 대해 상세히 설명한다. 본 발명은 다양한 변경을 가할 수 있고 여러 가지 형태를 가질 수 있는 바, 특정 실시예들을 도면에 예시하고 본문에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나 이는 본 발명을 특정한 개시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변경, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

[0025] 본 출원에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시 예를 설명하기 위해 사용된 것으로서 본 발명을 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 출원에서, "포

함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 단계, 동작, 구성요소, 부분품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 단계, 동작, 구성요소, 부분품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[0026] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[0027] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 핵산을 분리하는 방법을 설명하기 위한 도면이다.

[0028] 도 1에서 (a)는 핵산을 포함하는 바이오 샘플을 설명하기 위한 도면이고, (b)는 펩타이드 및 입자를 첨가한 후의 샘플을 설명하기 위한 도면이며, (c) 내지 (e)는 샘플로부터 핵산을 분리하는 공정을 설명하기 위한 도면이다.

[0029] 도 1에서는 본 발명의 일 실시예에 따른 핵산을 분리하는 공정을 도시하였을 뿐, 본 발명이 이에 제한되는 것은 아니며, 보다 구체적인 본 발명에 따른 핵산을 분리하는 방법은 하기 상세한 설명에서 설명하기로 한다.

[0030] 도 1을 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따라 핵산을 분리하기 위해, 핵산을 포함하는 바이오 샘플에 펩타이드를 첨가한다(도 1의 (a) 참조).

[0031] 이때, 상기 펩타이드는 상기 핵산과 정전기적 상호작용(electrostatic interaction), 인터칼레이션(intercalation), 및 그루브 바인딩(groove binding) 중 적어도 어느 하나의 반응을 통해, 핵산-펩타이드 복합체를 형성할 수 있다.

[0032] 핵산(nucleic acid)은 퓨린염기 및 피리미딘 염기, 당, 인산으로 이루어진 고분자 물질로, 염기, 펜토오스, 인산으로 구성된 뉴클레오티드(nucleotide)가 인산디에스테르결합으로 중합되어 긴사슬 모양의 분자를 형성하고 있다. 핵산은 당부분이 데옥시리보오스인 데옥시리보핵산(DNA), 리보오스인 리보핵산(RNA)으로 크게 분류할 수 있다. 뉴클레오티드를 구성하는 염기는 아데닌 (Adenine, A), 티민 (Thymine, T), 구아닌 (Guanine, G), 시토신 (Cytosine, C), 우라실 (Uracil, U) 5 종류로, 염기 중 아데닌(A), 구아닌(G), 시토신(C)은 공통이지만 DNA는 티민(T)을 함유하고 RNA는 우라실(U)을 함유한다.

[0033] 상기 핵산을 포함하는 바이오 샘플은 생물로부터 채취한, 핵산과 그 외의 단백질 등의 다양한 물질을 포함하는 혈액, 혈장, 세포 현탁액과 같은 샘플일 수 있고, 바이오물질인 핵산을 포함하는 버퍼(buffer)와 같은 다양한 유형의 샘플을 의미한다. 본 발명에 따르면, 분리하고자 하는 핵산의 종류에 관계없이 혈액이나 혈장 등의 다양한 샘플로부터 핵산을 분리할 수 있다. 일례로, 상기 핵산은 혈액 종양 DNA(Circulating Tumor DNA, ctDNA)일 수 있다. 혈액 종양 DNA, ctDNA는 환자의 파열된 종양 세포로부터 유래되는 환자의 혈류 속에 존재하는 핵산 단편이다. ctDNA는 암 세포의 돌연변이 연구 및 암 완치 여부 등을 판단하는데 이용될 수 있는 중요한 바이오마커(biomarker)로, 때문에, ctDNA를 혈액으로부터 분리하여 암 관련 연구에 이용할 수 있다. ctDNA는 혈액 속에 존재하는 양이 매우 적어 혈액으로부터 ctDNA를 분리하는 것은 매우 어려우나, 본 발명에 따르면, 저농도의 ctDNA도 효과적으로 분리할 수 있다.

[0034] 펩타이드(도면 미도시)는 2개 이상의 α-아미노산이 펩티드 결합으로 연결된 형태의 화합물을 의미하고, 본 발명의 펩타이드는 핵산과 결합 가능한 아미노산 서열을 포함한다. 일례로, 상기 펩타이드의 핵산과 결합 가능한 아미노산 서열은 리신(lysine, Lys), 트립토판(tryptophan, Trp), 아르기닌(Arginine, Arg), 히스티딘(Histidine, His), 페닐알라닌(Phenylalanine, Phe), 및 티로신(Tyrosine, Tyr) 중 적어도 어느 하나를 포함할 수 있다.

[0035] 본 발명의 펩타이드는 양성적으로 전하된 아미노산의 잔기들을 포함하고 있어 일반적으로 음성적으로 전하된 핵산 분자와 정전기적 상호작용할 수 있다. 이때, 상기 핵산과 정전기적 상호작용에 의해 결합하는 펩타이드는 아르기닌, 히스티딘, 및 리신 중 적어도 어느 하나를 포함하는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 펩타이드는 정전기적 상호작용과 더불어 핵산과 인터칼레이션이나 그루브 바인딩할 수 있고, 또는 이와 달리, 정전기적 상호작용과 더불어 인터칼레이션 및 그루브 바인딩을 모두 할 수 있다. 인터칼레이션은 층상구조가 있는 물질의 층간에 분자, 원자와 이온이 삽입되는 현상으로, 상기 펩타이드는 핵산 내로 삽입될 수 있다. 이때, 상기 핵산과 인터칼레이션에 의해 결합되는 펩타이드는 방향족 고리를 가진 아미노산인 페닐알라닌, 티로신, 및 트립토판 중 적어도 어느 하나를 포함하는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 그루브 바인딩은 핵산의 노출된 염

기와 상기 펩타이드가 결합하는 것으로, 상기 펩타이드는 핵산과 그루브 바인딩을 통해 결합할 수 있다.

[0036] 즉, 본 발명의 펩타이드는 상기에서 설명한 바와 같이, 핵산과 결합 가능한 아미노산들을 적어도 하나를 포함하고 있어, 정전기적 상호작용, 인터칼레이션, 및 그루브 바인딩 중 적어도 어느 하나의 반응을 통해 핵산과 결합할 수 있다. 상기에서 핵산과 결합 가능한 아미노산 서열을 포함하는 본 발명의 펩타이드를 예시적으로 설명하였으나, 본 발명이 이에 제한되는 것은 아니다.

[0037] 또한, 본 발명의 펩타이드는 N-말단 또는 C-말단에 적어도 하나의 작용기가 도입된 것이거나, N-말단 및 C-말단 모두에 적어도 하나의 작용기가 도입된 것일 수 있다. 상기 작용기는 하기에서 설명할 입자와 결합 가능한 작용기일 수 있고, 일례로, 티올기(thiol groups), 아민기(amine groups), 카르복시기(carboxyl groups), 말레이미드기(maleimidegroups), 및 아자이드기(azide groups) 중 적어도 어느 하나를 포함할 수 있다.

[0038] 상기 펩타이드는 상기 핵산과 복합체를 형성함으로써, 상기 핵산에 작용기를 제공할 수 있고, 상기 펩타이드 말단에 도입된 작용기의 밀집도 및 종류를 조절하여, 결과적으로 상기 핵산에 제공된 작용기를 조절할 수 있다. 즉, 핵산-펩타이드 복합체의 작용기의 밀도를 조절 할 수 있다. 일례로, 상기 핵산 분자에 적어도 하나의 작용기를 갖는 펩타이드 다수 개가 결합할 수 있고, 이때, 상기 펩타이드와 결합한 핵산은 고밀도의 작용기를 포함할 수 있다.

[0039] 본 발명에 따르면, 상기 샘플 내의 핵산이 펩타이드와 반응하여 핵산-펩타이드 복합체를 형성함으로써, 쉽게 훼손되는 핵산의 안정성을 향상시킬 수 있다. 즉, 샘플 내의 핵산을 펩타이드와 결합시켜 복합체를 형성함으로써 보호할 수 있다.

[0040] 도 1을 계속 참조하면, 핵산-펩타이드 복합체가 형성된 샘플에 상기 펩타이드의 작용기와 결합 가능한 입자를 첨가한다(도 1의 (b) 참조).

[0041] 이때, 상기 핵산-펩타이드 복합체의 작용기와 상기 입자가 결합하여 헥산-펩타이드-입자 복합체를 형성한다.

[0042] 본 발명의 입자는 마이크로 크기 또는 나노 크기의 입자를 의미하고, 본 발명의 입자는 금속, 실리카, 및 폴리머 중 적어도 어느 하나로 형성된 입자일 수 있다. 상기 금속은 금(Au), 은(Ag), 티타늄(Ti), 구리(Cu), 백금(Pt), 팔라듐(Pd), 철(Fe), 아연(Zn), 납(Pb), 주석(Sn), 코발트(Co), 니켈(Ni), 망간(Mn), 세슘(Cs), 인듐(In), 비스무트(Bi), 카드뮴(Cd), 갈륨(Ga), 이리듐(Ir), 알루미늄(Al), 탄탈럼(Ta), 텅스텐(W), 바나듐(V), 란타늄(La), 망간(Mn), 네오디뮴(Nd), 스트론튬(Sr), 지르코늄(Zr), 가돌리늄(Gd), 몰리브데넘(Mo), 루테늄(Ru), 및 레늄(Re) 중 적어도 어느 하나를 포함할 수 있고, 상기 폴리머는 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol, PEG), 폴리에틸렌이민(polyethyleneimine, PEI), 락트산(lactic acid), 폴리락트산(polylactic acid, PLA), 폴리락틱-co-글라이콜레이트(polylactic-co-glycolic acid, PLGA), 폴리에틸렌옥사이드(polyethylene oxide, PEO), 폴리카프로락톤(poly-epsilon-caprolactone, PCL), 폴리스티렌(polystyrene, PS), 폴리아크릴레이트(polyacrylate), 폴리메틸메타아크릴레이트(poly(methylmethacrylate), PMMA), 인지질(phospholipid), 올레산(oleic acid), 엽산(folic acid), 또는 상기 폴리머 중 적어도 하나 이상을 포함하는 폴리머 중합체를 포함할 수 있다. 일례로, 상기 입자는 폴리머 코팅된 금 나노입자일 수 있다. 또한, 본 발명의 입자는 자성을 갖는 물질인 자성체(magnetic substance)일 수 있다.

[0043] 상기 핵산-펩타이드 복합체는 상기에서 설명한 것과 같이, 상기 핵산-펩타이드 복합체를 구성하는 펩타이드의 말단에 상기 입자와 결합 가능한 적어도 하나의 작용기를 포함하고 있어, 상기 입자를 첨가 시, 상기 핵산-펩타이드 복합체의 작용기와 상기 입자의 결합을 통해, 핵산-펩타이드-입자 복합체를 형성할 수 있다.

[0044] 한편, 이와 달리, 도면에는 도시하지 않았으나, 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 상기에서 설명한 것과 같은 핵산과 결합 가능한 아미노산 서열을 포함하고 말단에 적어도 하나의 작용기가 도입된 펩타이드와, 상기 펩타이드의 적어도 하나의 작용기를 통해 결합된 입자를 포함하는, 펩타이드-입자 복합체를 바이오 샘플 내의 핵산과 반응시켜, 핵산-펩타이드-입자 복합체를 형성할 수도 있다.

[0045] 구체적으로, 핵산을 포함하는 바이오 샘플에, 상기 펩타이드-입자 복합체를 첨가하여, 상기 펩타이드-입자 복합체를 구성하는 펩타이드와 상기 핵산 사이의 반응을 통해, 핵산-펩타이드-입자 복합체를 형성할 수 있다. 이때, 상기 펩타이드와 상기 핵산은 상기에서 설명한 것과 동일하게 정전기적 상호작용, 인터칼레이션 및 그루브 바인딩 중 적어도 어느 하나의 반응을 통해 결합될 수 있다.

[0046] 다시 말하면, 본 발명의 핵산-펩타이드-입자 복합체는 핵산과 펩타이드를 반응시켜 핵산-펩타이드 복합체를 형성한 후, 상기 핵산-펩타이드 복합체를 입자와 결합하여, 핵산-펩타이드-입자 복합체를 형성하거나, 이와 달리,

펩타이드-입자 복합체를 형성한 후, 상기 펩타이드-입자 복합체와 상기 핵산을 결합시켜, 핵산-펩타이드-입자 복합체를 형성할 수 있다.

[0047] 상기 핵산은 펩타이드 및 입자와 복합체를 형성함으로써, 더 안정될 수 있다. 즉, 본 발명에 따라, 핵산-펩타이드-입자 복합체로 형성함으로써, 상기 바이오 샘플 내의 핵산을 안정하게 보호할 수 있고 안정한 상태를 유지하면서 샘플로부터 분리할 수 있다.

[0048] 도 1을 계속 참조하면, 핵산-펩타이드-입자 복합체를 상기 샘플로부터 분리한다(도 1의 (c) 내지 (e) 참조).

[0049] 이때, 상기 핵산-펩타이드-입자 복합체는 상기 샘플로부터 원심분리, 자성분리, 용해도 분리 및 핵산-펩타이드-입자 복합체의 크기에 따른 분리 중 적어도 어느 하나에 의해 분리될 수 있다.

[0050] 구체적으로, 상기 샘플을 원심분리하여 상기 샘플 내의 핵산-펩타이드-입자 복합체를 침전시키거나, 상기 핵산-펩타이드-입자 복합체의 무게에 의한 침전을 통해, 침전된 핵산-펩타이드-입자 복합체를 수득하여 상기 샘플로부터 상기 핵산-펩타이드-입자 복합체를 분리할 수 있다. 또는, 상기 입자가 자성체인 경우, 상기 핵산-펩타이드-입자 복합체를 자성을 이용하여 상기 샘플로부터 분리할 수 있다. 또한, 용매에 대한 용해도 차이를 이용하여 상기 샘플로부터 상기 핵산-펩타이드-입자 복합체를 분리할 수도 있다. 또한, 핵산-펩타이드-입자 복합체 보다 작은 크기의 기공을 갖는 분리막 또는 다공성 구조체를 이용하여, 핵산-펩타이드-입자 복합체의 크기에 따라 분리할 수 있다.

[0051] 또한, 도 1의 (d) 및 (e)에 도시한 것과 같이, 분리된 상기 핵산-펩타이드-입자 복합체로부터 핵산을 분리한다.

[0052] 이때, 분리된 상기 핵산-펩타이드-입자 복합체는 분산 용액에 분산시킬 수 있다. 상기 분산 용액는 3차 증류수 또는 버퍼일 수 있고, 상기 분산 용액의 첨가 부피를 제어하여 최종 분리된 핵산의 농도를 조절할 수 있다.

[0053] 핵산-펩타이드-입자 복합체로부터 핵산의 분리는 계면활성제 처리, pH 조절, 이온농도 조절, EDTA 처리 및 열처리 중 적어도 어느 하나의 방법을 통해, 상기 핵산-펩타이드-입자 복합체로부터 핵산만을 용리(elution)하여 수행할 수 있다. 또한, 핵산-펩타이드-입자 복합체로부터 분리된 핵산은 분산 용액의 상등액에 존재하고, 핵산이 분리된 펩타이드-입자 복합체는 분산 용액 내에 침전되므로, 상기 펩타이드-입자 복합체를 분산 용액 내에서 제거하거나 분산 용액의 상등액만을 분리하여, 핵산을 분리할 수 있다. 이때, 분리된 핵산은 상기에서 설명한 것과 같은 분산 용매의 첨가되는 부피에 따라 농도가 제어될 수 있으며, 이에 따라, 상기 분산 용매의 농도를 제어하여 핵산을 농축할 수도 있다.

[0054] 즉, 정리하면, 본 발명은 핵산과 상호작용할 수 있는 펩타이드와 상기 펩타이드와 상호작용 가능한 입자를 이용하여 용이한 공정으로 혈장과 같은 바이오 샘플 내에 존재하는 핵산을 보호하며 분리할 수 있는 방법으로, 구체적으로, 본 발명에 따르면, 핵산과 반응할 수 있는 펩타이드 및 상기 펩타이드와 결합 가능한 마이크로/나노 크기의 입자를 이용하여 핵산을 펩타이드 및 입자에 부착하여 핵산-펩타이드 복합체를 형성한 후, 이를 원심 분리나 자성 분리, 용해도의 차이에 따른 분리 등의 입자 분리 방법을 이용하여 샘플로부터 핵산을 보호하고 분리할 수 있다. 또한, 본 발명에 따르면, 기존의 방법과 달리 제거가 어려운 염을 거의 사용하지 않기 때문에, 고순도의 핵산을 용이하고 신속하게 분리할 수 있다. 또한, 본 발명에 이용하는 펩타이드의 조성, 펩타이드에 도입되는 작용기, 사용하는 입자의 종류 및 크기를 조절함으로써 다양한 분야에 응용이 가능하다는 장점이 있다.

[0055] 이하에서는, 본 발명의 핵산을 분리하는 방법을 구체적인 실시예들을 들어, 보다 상세히 설명하기로 한다.

[0056] **실시예 1**

[0057] 본 발명의 일 실시예에 따라 핵산을 분리하기 위해 분리를 확인하기 위해, 핵산은 선형의 pET-15b 벡터(vector)를 이용하였고, 동일 농도의 핵산이 포함된 버퍼 샘플에 리신 및 트립토판을 포함하는 아미노산 서열을 가지고 C-말단에 티올기(-SH)가 도입된 DNA 결합 펩타이드(C-terminus thiol tagged DNA Bing Peptide)인, DBP-SH(KWKWKKA-SH) (Peptron에서 구입하였음)를 첨가한 후, 입자로서 13 nm의 금 나노입자(gold nanoparticle, AuNP)를 첨가하였다.

[0058] 13 nm 금 나노입자는 50 mM의 금(III) 클로라이드 트리하이드레이트(Gold (III) chloride trihydrate, $HAuCl_4$) (Sigma Aldrich에서 구입하였음) 20 mL를 3차 증류수 98 mL가 채워진 플라스크(two-neck flask)에 첨가한 후 가열하여 내부 용액을 환류(reflux)하였다. 그 다음, 38.8 mM의 트리소듐 시트레이트 다이하이드레이트(trisodium citrate dihydrate) (Sigma Aldrich에서 구입하였음) 10 mL를 첨가하고, 10분 동안 상온에서 충분히 반응시켰다.

[0059] 샘플에 DBP-SH 및 금 나노입자 첨가에 따른 샘플의 상등액의 흡광도 변화를 측정하였고, 그 결과를 도 2에 나타낸다.

[0060] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 핵산의 분리를 설명하기 위한 도면이다.

[0061] 도 2에서 "DNA"는 pET-15b 벡터만을 포함하는 샘플의 흡광도를 나타내고, "DNA+DBP-SH"는 DBP-SH 펩타이드를 첨가한 샘플의 흡광도를 나타낸다. "DNA-DBP-AuNP"는 DBP-SH를 첨가한 샘플에 금 나노입자를 첨가한 후의 흡광도를 나타내고, 첨가된 금 나노입자의 농도가 증가함에 따른 흡광도를 "DNA-DBP-AuNP (1)" 및 "DNA-DBP-AuNP (2)"에 나타낸다. 또한, "DNA+AuNP"는 pET-15b 벡터만을 포함하는 샘플에 금 나노입자만을 첨가한 후의 흡광도를 나타낸다.

[0062] 도 2를 참조하면, pET-15b 벡터만이 존재하는 "DNA" 샘플에서는 260 nm의 파장에서 흡광 피크가 나타나는 것을 확인할 수 있고, DBP-SH 펩타이드를 첨가한 "DNA + DBP-SH" 샘플에서는 260 nm 파장에서 흡광도가 증가하는 것을 확인할 수 있다. 이것은 핵산이 가지는 260 nm 파장에서의 흡광도와 펩타이드가 가지는 280 nm 파장에서의 흡광도가 중첩되어 합해져, 흡광도가 증가하였음을 의미한다. 한편, DBP-SH 및 금 나노입자를 모두 첨가한 후의 샘플 "DNA-DBP-AuNP"에서는 260 nm 파장에서의 흡광도가 감소함을 확인할 수 있다. 반면, DNA 및 금 나노입자만을 첨가한 "DNA+AuNP" 샘플에서는 "DNA" 샘플과 유사한 흡광도를 나타내는 것을 확인할 수 있다. 다시 말하면, pET-15b 벡터가 존재하는 샘플에 DBP-SH만을 첨가하는 경우에는 샘플의 흡광도가 증가하고, 금 나노입자만을 첨가하는 경우에는 흡광도의 변화가 발생하지 않으며, DBP-SH 및 금 나노입자를 모두 첨가하는 경우, 흡광도가 감소한다. 즉, DBP-SH 및 금 나노입자를 모두 첨가함으로써 상등액에 존재하는 pET-15b 벡터의 양이 감소하였음을 확인할 수 있고, 이것은 pET-15b 벡터가 DBP-SH 및 금 나노입자와 상호작용하여 복합체를 형성하는 것을 의미한다.

[0063] 한편, "DNA-DBP-AuNP (1)" 및 "DNA-DBP-AuNP (2)"를 비교하면, 더 많은 농도의 금 나노입자가 첨가된 "DNA-DBP-AuNP (2)"에서 흡광 피크가 더 감소하는 것을 확인할 수 있다. 이것은 첨가된 금 나노입자의 농도가 증가함에 따라, pET-15b 벡터가 결합할 수 있는 표면적이 증가하여 샘플의 상등액에 존재하는 pET-15b 벡터가 감소하였음을 나타낸다.

[0064] 따라서, 본 발명에 따라, 핵산이 존재하는 샘플에 핵산과 결합 가능한 아미노산 서열을 포함하고 말단에 작용기가 도입된 펩타이드 및 상기 작용기와 결합 가능한 나노입자를 처리함으로써, 핵산-펩타이드-나노입자 복합체를 형성할 수 있음을 확인할 수 있고, 이에 따라, 샘플로부터 핵산-펩타이드-나노입자 복합체를 분리할 수 있음을 확인할 수 있다.

[0065] **실시예 2**

[0066] 본 발명의 다른 실시예에 따라 핵산을 분리하기 위해, 핵산으로 λDNA를 이용하고, 펩타이드로서 DBP-SH(KWKWKKA-SH) 및 말단에 티올기가 도입된 DNA 비결합 펩타이드(DNA nonbinding peptide), NBP-SH(EWEWEEA-SH)를 이용하였으며, 입자로서, BSPP 코팅된 금 나노입자를 이용하였다.

[0067] 본 발명의 다른 실시예에 따라 핵산을 분리하기 이전에, BSPP 코팅된 금 나노입자를 제조하였다. BSPP 코팅된 금 나노입자(이하, AuNP-BSPP)는, 상기 제조한 13 nm 금 나노입자를 포함하는 용액 50 mL에 비스(p-설포네이토페닐)페닐포스핀 다이하이드레이트 다이포타슘염(Bis(p-sulfonatophenyl)phenylphosphine dihydrate dipotassium salt, BSPP) (Sigma Aldrich에서 구입하였음) 2 g을 첨가한 후 12시간 동안 보관한 다음, 17,000 g의 속도로 15분 동안 원심분리하고, 상등액을 제거한 다음, 2 mM의 BSPP 용액에 첨가하였으며, 원심분리 후 상등액 제거와 BSPP 용액에 첨가하는 공정을 2회 반복하여 제조하였다.

[0068] 상기에서 제조한 13nm의 금 나노입자(이하, AuNP) 및 AuNP-BSPP의 안정도를 UV-Vis 흡광도를 측정하여 확인하였다. 그 결과를 도 3에 나타낸다.

[0069] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 입자를 설명하기 위한 도면이다.

[0070] 도 3의 (a)는 13 nm 금 나노입자의 UV-Vis 흡광도를 나타내고, (b)에서 "13 nm AuNP-citrate"는 합성 직후 13 nm 금 나노입자의 UV-Vis 흡광도를 나타내고, "13 nm AuNP-BSPP"는 BSPP를 코팅한 13 nm 금 나노입자의 UV-Vis 흡광도를 나타낸다.

[0071] 도 3을 참조하면, 상기 제조한 13 nm 금 나노입자, AuNP는 약 520 nm의 파장에서 최대 흡수 피크를 나타내는 것을 확인할 수 있고, 이것은 상기 제조한 AuNP가 안정한 나노입자임을 의미한다.

[0072] 또한, BSPP가 코팅된 13 nm 금 나노입자, AuNP-BSPP의 최대 흡수 피크가 AuNP의 최대 흡수 피크 보다 오른쪽으로 이동하였음을 확인할 수 있고, 이것은 AuNP에 BSPP가 코팅되어 발생하는 굴절률의 변화에 기인함을 나타낸다. 즉, AuNP에 BSPP가 코팅되었음을 확인할 수 있다.

[0073] 뿐만 아니라, 도 3의 (b)에 도시한 것과 같이, 합성 직후 13 nm 금 나노입자, AuNP-citrate와 비교하여 BSPP 코팅된 금 나노입자인 AuNP-BSPP은 유사한 흡광도를 나타내는 것을 확인할 수 있다. 만약, BSPP의 코팅으로 금 나노입자의 안정성이 저하된다면, 520 nm 파장에서의 흡광도의 세기가 증가하는 경향을 나타낼 것이나, 본 발명의 BSPP 코팅된 금 나노입자는 시트레이트가 아닌 BSPP를 코팅함으로써 발생하는 표면의 유전율 변화에 기인하는 약간의 최대 파장 이동만을 나타낼 뿐, AuNP-citrate의 흡광도 그래프 개형과 동일한 그래프 개형을 나타내는 것을 확인할 수 있다. 즉, BSPP 코팅에 따른 금 나노입자의 안정성에는 변화가 없는 것을 확인할 수 있다.

[0074] 다시 말하면, 금 나노입자가 전체적으로 안정한 상태를 유지함을 확인할 수 있고, 금 나노입자의 안정성 유지는 핵산 분리를 위한 표면적 확보나 입자 제어에서 매우 중요한 요인으로, 본 발명에 따른 AuNP-BSPP는 안정성을 유지할 수 있어, 핵산 분리 및 입자 제어에 있어 유리할 수 있음을 확인할 수 있다.

[0075] 따라서, 본 발명에 따라 BSPP가 코팅된 금 나노입자(AuNP-BSPP)를 형성하였음을 확인할 수 있고, AuNP-BSPP는 안정함을 확인할 수 있다.

[0076] 또한, 본 발명의 다른 실시예에 따라 핵산을 분리하기 이전에, 핵산인 λDNA의 농도별 흡광도를 정량화하였다. λDNA의 농도별 흡광도를 정량화하기 위해, 500 ng/μl, 200 ng/μl, 100 ng/μl, 50 ng/μl, 및 20 ng/μl 농도의 λDNA의 UV-Vis 흡광도를 측정하고, λDNA의 최대 흡수 피크에서의 각 농도별 흡광도를 측정하여, 이를 그래프화하였다. 그 결과를 도 4에 나타낸다.

[0077] 도 4는 λDNA의 최대 흡수 피크에서의 농도별 흡광도를 설명하기 위한 도면이다.

[0078] 도 4를 참조하면, 각각의 λDNA 농도에서의 최대 흡수 피크는 260 nm이었고, 260 nm에서의 흡광도가 선형적으로 나타나는 것을 확인할 수 있다. 이에 기인하여, λDNA가 포함된 샘플의 흡광도를 측정한 값으로서, λDNA의 농도를 역으로 계산할 수 있음을 확인할 수 있다.

[0079] 이어서, 본 발명의 다른 실시예에 따라 핵산을 분리하기 위해, 먼저, λDNA(Bioneer에서 구입하였음) 200 ng/μl를 DBP-SH 및 NBP-SH (Peptron에서 구입하였음)와 각각 혼합하고 λDNA가 DBP-SH 및 NBP-SH와 각각 충분히 반응할 수 있도록 30분 동안 보관하여, 샘플 1 내지 3을 준비하였다. 샘플 1은 λDNA만을 포함하는 샘플이고, 샘플 2는 λDNA 및 DBP-SH를 포함하는 샘플이며, 샘플 3은 λDNA 및 NBP-SH를 포함하는 샘플이다. 샘플 1은 실험에 사용하는 λDNA의 초기 농도를 확인하기 위한 대조군으로 사용하였고, 샘플 3은 펩타이드의 종류에 따른 λDNA 분리 여부를 확인하기 위한 대조군으로 사용하였다.

[0080] 그 다음, BSPP 코팅된 13 nm 금 나노입자 3 mL를 원심분리하여 75배 농축하였다. 원심분리는 17,000 rpm으로 15분 동안 1회 수행하였다. BSPP 코팅된 금 나노입자의 최종 부피는 40 μL이다.

[0081] 이어서, 상기 제조한 샘플 1 내지 3 각각에 상기 농축한 AuNP-BSPP 용액을 첨가한 후, 30분 동안 반응시켰다. 그 후, 원심분리하여 상등액을 분리한 다음, 분리한 상등액의 흡광도를 260 nm에서 측정하고, 이로부터 상기 샘플 1 내지 3의 상등액에 존재하는 λDNA의 농도를 계산하였으며, 그 결과를 도 5에 나타낸다.

[0082] 도 5는 본 발명의 다른 실시예에 따른 핵산의 분리를 설명하기 위한 도면이다.

[0083] 도 5를 참조하면, λDNA만을 포함하는 샘플 1과 DNA 비결합 펩타이드, NBP-SH를 첨가한 샘플 3의 상등액에서는 고농도의 λDNA가 존재하고, 구체적으로 NBP-SH를 첨가한 샘플 3의 상등액에는 λDNA만을 포함하는 샘플 1과 유사한 수준의 λDNA가 함유되어 있는 반면, DNA 결합 펩타이드, DBP-SH를 첨가한 샘플 2의 상등액에는 미량의 λDNA만이 존재함을 확인할 수 있다. 즉, DBP-SH를 첨가한 샘플 2에서는 상등액 내에 λDNA가 감소하였음을 확인할 수 있다.

[0084] 이것은 DNA와 결합 가능한 아미노산 서열을 포함하지 않는 DNA 비결합 펩타이드인 NBP-SH를 첨가한 경우에는, 샘플의 λDNA와 펩타이드가 결합하지 않아 복합체를 형성하지 않고, 말단에 티올기를 포함하는 펩타이드만이 AuNP-BSPP와 결합함으로써 원심분리에 의해 함께 침전되며, 샘플 내에 존재하는 대부분의 λDNA는 계속 상등액에 존재함을 나타내는 반면, DNA 결합 가능한 아미노산 서열을 포함하는 DNA 결합 펩타이드인 DBP-SH를 첨가한 경우, DBP-SH가 λDNA와 반응하여 복합체(이하, λDNA-DBP-SH)를 형성하고, 동시에 DBP-SH는 티올기를 통해 AuNP-BSPP와 결합함으로써 핵산, 펩타이드, 금 나노입자 복합체(이하, λDNA-DBP-AuNP-BSPP)를 형성하고, 샘플

의 원심분리에 의해 λDNA-DBP-AuNP-BSPP이 침전되어 샘플의 상등액에는 λDNA가 미량 존재함을 나타낸다.

[0085] 즉, 핵산과 결합 가능한 아미노산 서열을 포함하고 말단에 입자와 결합 가능한 작용기가 도입된 펩타이드가 핵산과 입자와 각각 결합함으로써, 핵산-펩타이드-입자 복합체를 형성할 수 있음을 확인할 수 있고, 이로부터 샘플 내의 핵산-펩타이드-입자 복합체를 원심분리 등의 방법을 통해, 샘플로부터 분리할 수 있음을 확인할 수 있다.

[0086] **실시예 3**

[0087] 본 발명의 또 다른 실시예에 따라 핵산-펩타이드-입자로부터의 핵산 분리를 확인하기 위해, 상기 원심분리한 샘플 1 내지 3의 상등액을 제거한 다음, 침전물을 NaOH를 포함하는 3차 증류수에 첨가하여 분산시켰다. 그 다음, 17,000 rpm에서 15분 동안 1회 원심분리 후, 상등액을 분리하여 상등액의 흡광도를 측정하였다. 그 결과를 도 6에 나타낸다.

[0088] 도 6은 본 발명의 또 다른 실시예에 따른 핵산의 분리를 설명하기 위한 도면이다.

[0089] 도 6을 참조하면, 샘플 2의 상등액에는 초기 λDNA에 근접한 농도의 λDNA가 존재하는 것을 확인할 수 있는 반면, 샘플 3의 상등액에는 미량의 λDNA만이 존재함을 확인할 수 있다. 이것은 상기 샘플 2의 침전물, 즉, λDNA-DBP-AuNP-BSPP를 NaOH로 처리함으로써, pH를 조절하여 상기 λDNA-DBP-AuNP-BSPP로부터 λDNA를 분리하였음을 나타낸다.

[0090] 구체적으로, 상기 λDNA-DBP-AuNP-BSPP를 NaOH를 포함하는 3차 증류수에 첨가하여 분산시킴으로써, 상기 λDNA-DBP-AuNP-BSPP의 DNA와 DBP-SH 사이의 결합을 끊을 수 있고, 이에 따라, 상기 λDNA-DBP-AuNP-BSPP로부터 λDNA를 분리할 수 있으며, 이를 원심분리함으로써 DBP-AuNP-BSPP는 침전시켜 제거하고 상등액에 존재하는 λDNA를 분리할 수 있는 반면, 샘플 3의 침전물에는 NBP-AuNP-BAPP와 미량의 λDNA가 존재하므로, 샘플 3을 샘플 2와 동일한 방법으로 처리하여도, 샘플 3으로부터는 매우 미량의 λDNA만이 분리됨을 확인할 수 있다.

[0091] 즉, 본 발명에 따라 pH 조절과 같은 용이한 공정을 통해 핵산-펩타이드-입자 복합체로부터 핵산을 신속하고 효과적으로 분리할 수 있음을 확인할 수 있다.

[0092] 도 7은 본 발명에 따른 핵산의 분리를 설명하기 위한 도면으로, 상기 도 5 및 도 6을 참조하여 설명한 것을 보다 구체적으로 도 7을 참조하여 다시 설명하기로 한다.

[0093] 도 7을 도 5 및 도 6과 함께 참조하면, 티올기가 포함된 DNA 결합 펩타이드, DBP-SH를 이용한 경우, 순수한 λDNA의 분리 효율은 전체 λDNA 대비 93.65%이고, 샘플 1과 비교하여 83.88%의 분리 효율을 나타내는 반면, 티올기가 포함된 DNA 비결합 펩타이드, NBP-SH를 이용한 경우의 순수한 λDNA의 분리 효율은 전체 λDNA 대비 5.34%이고, 샘플 1과 비교하여 5.3%의 분리 효율을 나타냄을 확인할 수 있다.

[0094] 즉, 본 발명에 따라 λDNA와 결합 가능하고, 말단의 작용기가 AuNP-BSPP와 결합 가능한 펩타이드인 DBP-SH를 이용함으로써, λDNA를 λDNA-DBP-AuNP-BAPP 복합체의 형태로 샘플로부터 분리할 수 있고, 상기 λDNA-DBP-AuNP-BAPP 복합체로부터 pH 조절을 통해 용이하게 λDNA만을 효율적으로 분리할 수도 있음을 확인할 수 있다.

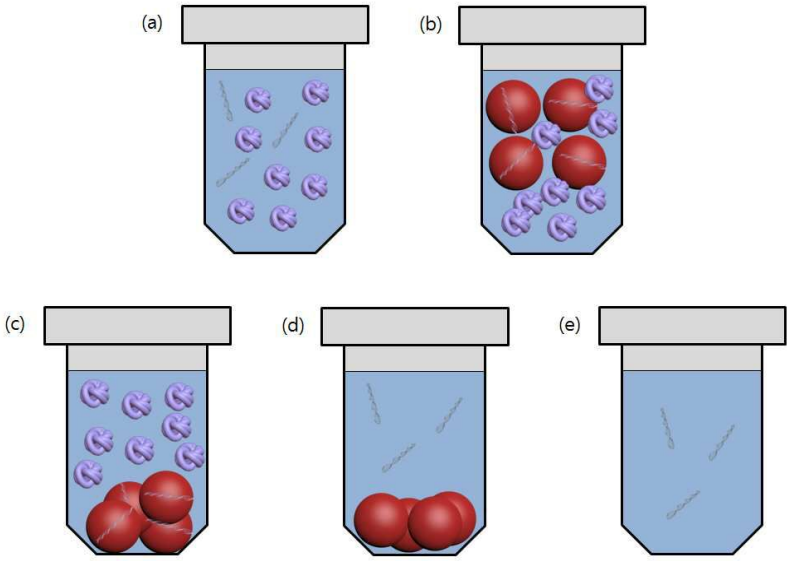
[0095] 다시 말하면, 본 발명에 따라, 핵산과 결합 가능한 아미노산 서열을 포함하고 말단에 입자와 결합 가능한 작용기가 도입된 펩타이드를 이용함으로써, 상기 펩타이드를 통해 핵산 및 입자가 결합된, 핵산-펩타이드-입자 복합체를 형성할 수 있고, 이에 기인하여, 샘플로부터 핵산을 상기 핵산-펩타이드-입자 복합체의 형태로 분리할 수 있으며, 나아가, 상기 핵산-펩타이드-입자 복합체로부터 용이한 공정을 통해 순수한 핵산을 고농도로 안정하게 분리할 수 있음을 확인할 수 있다.

[0096] 따라서, 본 발명에 따라 사용하는 펩타이드의 종류 및 성질에 따라 다양한 종류의 핵산을 용이한 공정으로 신속하고 효과적으로 분리할 수 있음을 확인할 수 있다.

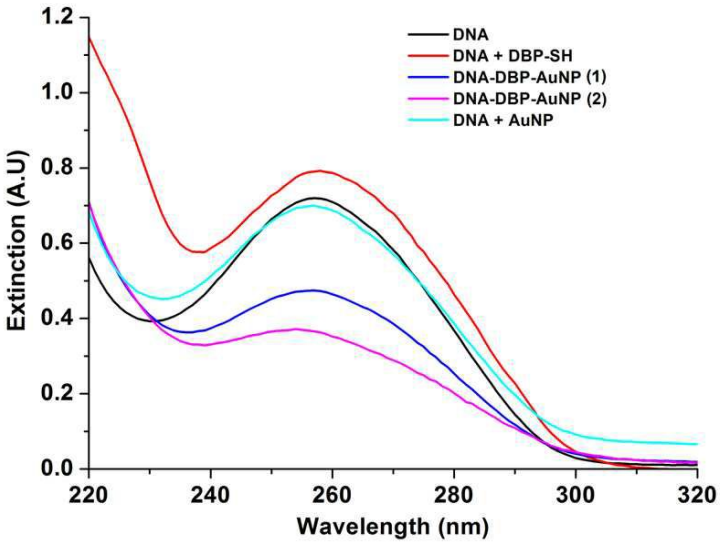
[0097] 상기에서는 본 발명의 바람직한 실시예를 참조하여 설명하였지만, 해당 기술 분야의 숙련된 당업자는 하기의 특허 청구 범위에 기재된 본 발명의 사상 및 영역으로부터 벗어나지 않는 범위 내에서 본 발명을 다양하게 수정 및 변경시킬 수 있음을 이해할 수 있을 것이다.

도면

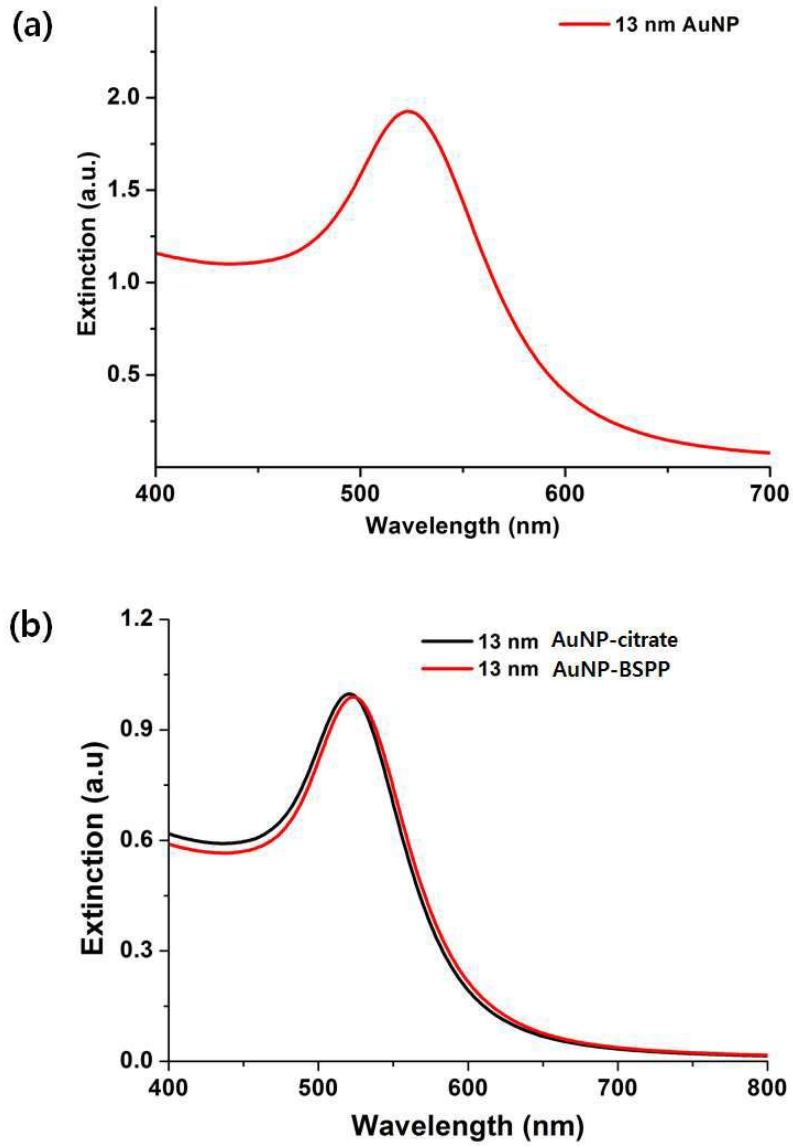
도면1


(a)
(b)
(c)
(d)
(e)

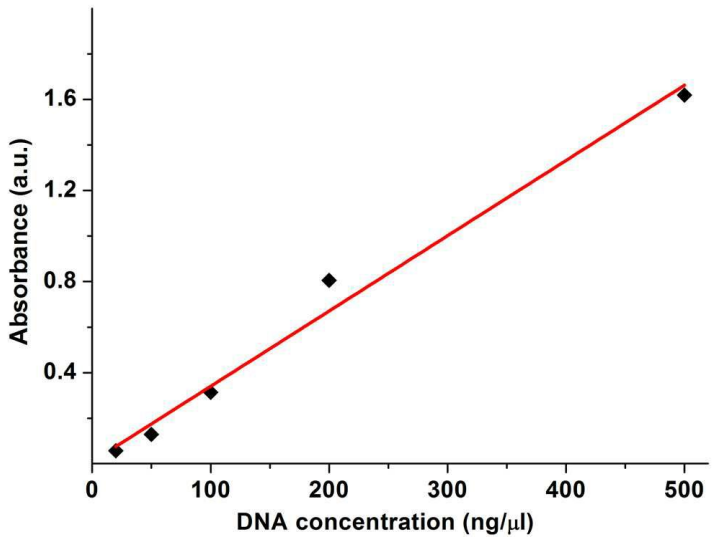
도면2


DNA
DNA + DBP-SH
DNA-DBP-AuNP (1)
DNA-DBP-AuNP (2)
DNA + AuNP
Extinction (A.U)
Wavelength (nm)
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
220
240
260
280
300
320

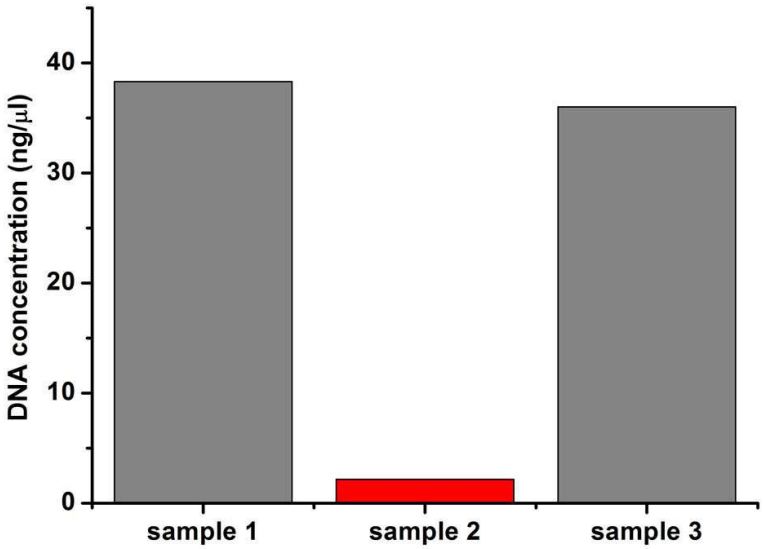
도면3


(a)
13 nm AuNP
Extinction (a.u.)
2.0
1.5
1.0
0.5
400
500
600
700
Wavelength (nm)
(b)
13 nm AuNP-citrate
13 nm AuNP-BSPP
Extinction (a.u)
1.2
0.9
0.6
0.3
0.0
400
500
600
700
800
Wavelength (nm)

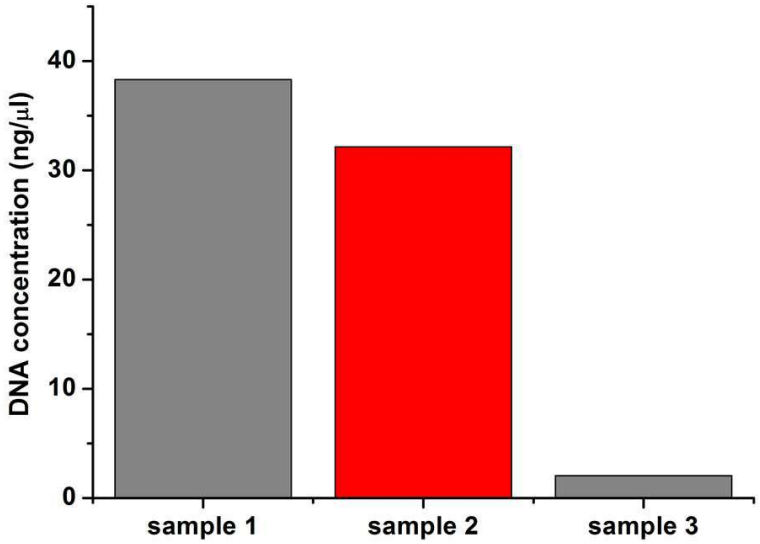
도면4


Absorbance (a.u.)
1.6
1.2
0.8
0.4
0
100
200
300
400
500
DNA concentration (ng/μl)

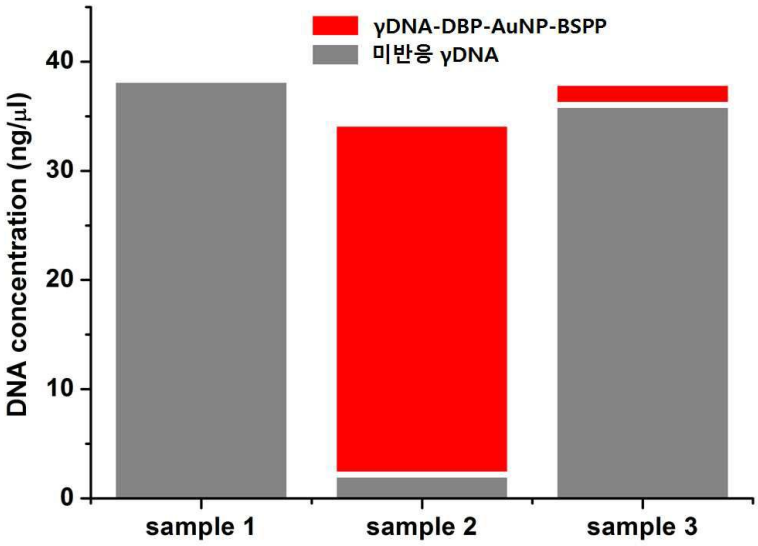
도면5


DNA concentration (ng/μl)
0
10
20
30
40
sample 1
sample 2
sample 3

도면6


DNA concentration (ng/μl)
0
10
20
30
40
sample 1
sample 2
sample 3

도면7


γDNA-DBP-AuNP-BSPP
미반응 γDNA
DNA concentration (ng/μl)
40
30
20
10
0
sample 1
sample 2
sample 3