



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0091079
(43) 공개일자 2009년08월26일

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0014848

(22) 출원일자 2009년02월23일

심사청구일자 2009년02월23일

(30) 우선권주장

1020080016322 2008년02월22일 대한민국(KR)

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교내

(72) 발명자

최진호

서울특별시 강서구 등촌동 715번지 I-Park 아파트 114동 1901호

박대환

대전광역시 대덕구 비래동 한신희플러스 아파트 105동 1007호

오제민

서울특별시 서초구 서초4동 삼풍아파트 16동 1406호

(74) 대리인

이원희

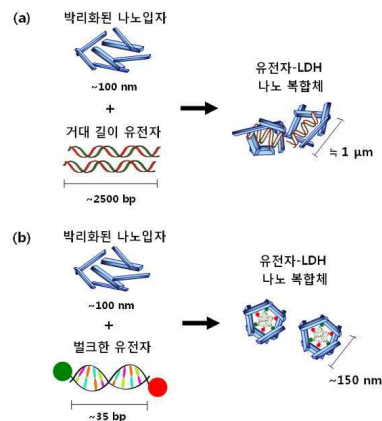
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 코어-셀 구조를 갖는 유전자-무기 나노하이브리드 복합체 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 바이오 분자인 유전자를 포함하는 코어-셀 바이오-무기 나노 복합체 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 구체적으로는 박리된 금속 이중층 수산화물(layered double hydroxide, LDH)과 같은 2차원 나노시트가 거대 유전자 분자와 재조합되면서 형성된 무기 나노공동(nano cavity) 안에 유전자가 삽입된 구조의 유전자 코어-LDH 셀 복합체 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 상기 유전자 코어-LDH 셀 복합체를 이용하여 거대한 유전자를 무기 담체에 담지할 수 있으며, 외부 환경에 안정성이 뛰어나고, 저장·전달 및 그 기능을 증가시킬 수 있어 유용하다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

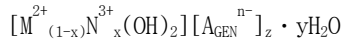
과제고유번호	R11-2005-008-00000-0
부처명	교육과학기술부
연구사업명	우수연구집단육성사업우수연구센터(SRC)
연구과제명	지능형나노바이오의약품전달소재합성
주관기관	한국과학재단
연구기간	2008.03.01 ~ 2009.02.28

특허청구의 범위

청구항 1

무기 나노 공동에 유전자가 캡슐화되어 있는 하기 화학식 1로 표시되는 유전자-무기 나노하이브리드 복합체:

[화학식 1]



(상기 화학식 1에서,

M^{2+} 는 2가 금속 양이온이고,

N^{3+} 는 3가 금속 양이온이며,

A_{GEN} 는 유전자이고,

n 은 A_{GEN} 의 유전자의 전하수이며,

x 는 0.1 초과 0.4 미만의 수이며,

z 와 y 는 0을 초과하는 양수이다).

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 유전자-무기 나노하이브리드 복합체는 유전자 코어-무기 셀 구조를 특징으로 하는 유전자-무기 나노하이브리드 복합체.

청구항 3

제1항에 있어서, M 은 마그네슘(Mg^{2+}), 니켈(Ni^{2+}), 구리(Cu^{2+}) 및 아연(Zn^{2+})으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 유전자-무기 나노하이브리드 복합체.

청구항 4

제1항에 있어서, N 은 알루미늄(Al^{3+}), 철(Fe^{3+}), 바나듐(V^{3+}), 티타늄(Ti^{3+}) 및 갈륨(Ga^{3+})으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 유전자-무기 나노하이브리드 복합체.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 유전자는 2500 bp 이하의 거대 길이 유전자 또는 입체적으로 거대한 크기의 유전자인 것을 특징으로 하는 유전자-무기 나노하이브리드 복합체.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 유전자는 단일가닥 유전자, 이중가닥 유전자, 플라스미드 유전자, 인공 유전자인 PNP(Peptide nucleic acid) 또는 유기체 형광체 또는 무기체 형광체 화학종이 부착된 유전자로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 유전자-무기 나노하이브리드 복합체.

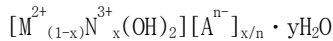
청구항 7

2가 양이온과 3가 양이온 금속염의 수용액을 염기성 물질로 공침시키고 수열 반응하여 하기 화학식 2의 LDH를 형성하는 단계(단계 1);

상기 단계 1에서 형성된 LDH를 박리화시키는 단계(단계 2); 및

상기 단계 2에서 박리된 LDH를 거대 유전자 또는 형광체가 부착된 거대 유전자와 혼합하여 코어-셀 유전자-무기 나노하이브리드 복합체를 생성하는 단계(단계 3)를 포함하는 제1항의 유전자-무기 나노하이브리드 복합체의 제조방법:

[화학식 2]



(상기 화학식 2에서,

M^{2+} 는 2가 금속 양이온이고,

N^{3+} 는 3가 금속 양이온이고,

x는 0.1 초과 0.4 미만의 수이며,

상기 A는 음이온계 게스트(Guest) 화학종이며,

n은 A의 음이온의 전하수이며,

y는 0을 초과하는 양수이다).

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

- <1> 본 발명은 무기 나노 공동에 거대 유전자가 캡슐화되어 있는 유전자-무기 나노하이브리드 복합체 및 이의 제조 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- <2> 무기-무기 하이브리드, 유기-무기 하이브리드, 바이오-무기 하이브리드와 같은 나노 단위에서 두 요소를 융합하는 하이브리드 기술은 분자 단위에서 새로운 물리화학적 특성을 나타내거나 상호보완적인 시너지 효과를 얻을 수 있어 최근 주목받고 있다. 특히 바이오 분자 혹은 바이오 활성 기능을 갖고 있는 분자개체의 취약점을 극복 하면서 기능성 및 효능을 증가시키기 위한 관점에서 무기 나노입자와의 하이브리드 연구가 진행되어오고 있다 (*J. Phys. Chem. Solids*, 65, 373, 2004).
- <3> 바이오 활성 분자 중에서도 유전자, 즉 DNA는 다양한 정보를 함유하고 있는 이상적인 분자로써 새로운 기능을 갖도록 염기서열 및 구조를 디자인할 수 있어서 유기물 혹은 무기물이 부착된 합성 유전자 디자인, 질병 유발 유전자 발현의 진단 및 치료 유전자의 세포 내 전달을 통한 치료, 극소량의 거대분자(macromolecule) 검출 등 유전자를 적용하는 합성화학, 생명공학, 의학 등의 분야에서 연구가 활발히 이루어지고 있다. 하지만 유전자 자체는 외부 환경에 노출되었을 경우 여러 가지 요인(효소환경, 화학적, 물리적 환경 등)에 의하여 쉽게 파괴되고 변형이 일어날 수 있기 때문에, 적절한 안정화 조치 없이는 실효성의 한계에 부딪힌다.
- <4> 따라서 유전자 자체가 갖는 불안정한 문제점을 극복하면서 저장, 보관 및 전달 효과를 높이기 위하여, 유전자를 안정화시킬 수 있는 무기 담체로서 층상형 무기 나노입자인 금속 이중층 수산화물(layered double hydroxide, 이하 "LDH")이 주목받고 있으며, 이에 대한 연구가 계속되어 왔다. 하기 화학식 2로 표시되는, 금속 이중층 수산화물 중의 하나인 LDH는 음이온 점토(anionic clays)라 불리며 양전하를 띤 금속 수산화물 층과 층간에 이 양전하를 상쇄시킬 음이온과 물로 구성되어 있다.
- <5> [화학식 2]
- <6> $[M^{2+}_{(1-x)}N^{3+}_x(OH)_2][A^{n-}]_{x/n} \cdot yH_2O$
- <7> (상기 화학식 2로 표시되는 LDH에 있어서,
- <8> 상기 M은 2가 금속 양이온이고;
- <9> 상기 N은 3가 금속 양이온이고;
- <10> 상기 x는 0.1 초과 0.4 미만의 수이며;

- <11> 상기 A는 음이온계 게스트(Guest) 화학종이며;
- <12> 상기 n은 A의 음이온의 전하수이며;
- <13> 상기 y는 0을 초과하는 양수이다.)
- <14>
- <15> 현재까지는 바이오 활성 분자를 상기 LDH에 담지하기 위하여 이온 교환 반응 및 공침 반응의 중간 삽입 화학을 이용하였고, 그 결과 층상형 바이오-무기 나노 복합체가 제조된 바 있다. 또한 유전자가 LDH에 삽입된 유전자-LDH 나노 복합체 역시 이온 교환 반응 및 공침 반응을 통해 음이온인 유전자가 양이온성 충전하를 갖는 LDH의 층간에 강한 정전기적 인력에 의해 도입되어 유전자-LDH가 교대로 쌓여있는 2차원 층상 구조의 바이오-무기 나노 복합체가 제조된 바 있다. 이와 같이 무기 나노입자에 캡슐화되어 안정화된 유전자는 효소환경에서도 변성되지 않으며, 산성 조건에서는 LDH가 가역적으로 손쉽게 해리되고 유전자가 서서히 방출되면서 기능이 발휘되는 것으로 보고되어 있다(국내등록특허 제10-0359716호 *J. Am. Chem. Soc.* 121, 1399, 1999. *Angew. Chem. Int. Ed.* 39, 4041, 2000 국내등록특허 제10-0849465호 *Adv. Mater.*, 16, 14, 2004).
- <16> 그러나, 종래 유전자와 같은 바이오 활성 분자를 안정화시키기 위하여 도입한 층상형 무기 나노입자인 LDH와 2차원 다층형 바이오-무기 나노 복합체 혹은 유전자-LDH 나노 복합체를 제조하기 위한 종래의 이온 교환법 및 공침법은 다음과 같은 문제점이 있다. 1)LDH의 층간 간격은 팽창될 수 있는 정도에 한계가 있으므로 플라스미드 유전자, 양자 효과를 나타내는 나노입자가 부착된 유전자, 유기 형광체가 부착된 유전자 등과 같은 3차원적으로 거대하거나 특이한 구조의 유전자를 담지할 수 없으며, 2)LDH의 층간에 삽입되더라도 LDH의 입도에 따라 안정화될 수 있는 유전자의 길이 혹은 크기가 제약을 받으며(*J. Phys. Chem. Solids.* 67, 1028, 2006), 3)유기물 및 무기물이 부착되어 일부 양전하를 함유하는 음이온성 유전자는 담지되기가 매우 어려우며, 4)단일상(Single phase)의 유전자-LDH 나노 복합체 제조를 위해서는 화학반응 단계에서 과량의 유전자 및 장시간의 반응시간이 요구되어 경제적으로 불리하다는 문제점이 있다.
- <17> 이에 본 발명자들은 거대한 바이오 활성 분자가 무기 나노입자로 캡슐화된 바이오-무기 나노하이브리드 복합체, 입체적으로 거대하거나 특이한 구조의 유전자 혹은 일부 양전하를 띠는 유전자가 LDH에 캡슐화되고 외부 환경에 안정성이 우수한 유전자-LDH 나노하이브리드 복합체 및 LDH의 입도와 유전자의 길이 및 크기에 관계없이 안정화된 유전자-LDH 나노하이브리드 복합체를 제조하기 위해 연구하던 중, 박리화-재조합에 의해서 거대한 유전자를 LDH 무기 담체에 캡슐화하여 외부 환경에 안정성이 우수하고, 저장, 전달 및 그 기능을 증가시키며, 유전자의 안정성이 LDH의 입도에 의존하는 다층상형 유전자-LDH 나노 복합체의 취약점을 개선하고, 유전자뿐만 아니라 거대 바이오 분자를 안정화할 수 있는 코어-셀 바이오-무기 나노 복합체의 제조방법을 알아내고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <18> 본 발명의 목적은 무기 나노 공동에 유전자가 캡슐화되어 있는 유전자-무기 나노하이브리드 복합체를 제공하는 데 있다.
- <19> 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 유전자-무기 나노하이브리드 복합체의 제조방법을 제공하는 데 있다.

과제 해결수단

- <20> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 유전자-무기 나노하이브리드 복합체를 제공한다:
- <21> [화학식 1]
- <22>
$$[M^{2+}_{(1-x)}N^{3+}_x(OH)_2][A_{GEN}^{n-}]_z \cdot yH_2O$$
- <23> (상기 화학식 1에서, 상기 M, N, A, n, x, y 및 z는 본 명세서 내에 정의한 바와 같다).
- <24> 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 유전자-무기 나노하이브리드 복합체의 제조방법을 제공한다. 상기 화학식 1로 표시되는 유전자-무기 나노하이브리드 복합체는 LDH의 박리화-재조합에 의해 거대한 유전자를 LDH

무기 담체에 캡슐화하여 외부 환경에 안정성이 우수하고, 저장, 전달 및 그 기능을 증가시키며, 유전자의 안정성이 LDH의 입도에 의존하는 다층상형 유전자-LDH 나노 복합체의 취약점을 개선하고, 유전자뿐만 아니라 거대 바이오 분자를 안정화할 수 있다.

효 과

<25> 본 발명에 따르면 LDH의 박리화-재조합에 의해 거대한 유전자가 LDH 무기 담체에 캡슐화되어 외부 환경에 안정성이 우수하고, 저장, 전달 및 그 기능을 증가시킬 수 있는 코어-셀 유전자-LDH 나노하이브리드 복합체를 제공함으로써, 거대 유전자를 캡슐화할 수 없었던 종래의 층간 삽입법의 제약 및 유전자의 안정성이 LDH의 입도에 의존하는 다층상형 유전자-LDH 나노하이브리드 복합체의 취약점을 개선할 수 있을 뿐만 아니라, 유전자 이외의 거대 바이오 분자의 안정화를 위한 무기 캡슐화에도 사용하여 코어-셀 바이오-무기 나노 복합체를 제공하는 데도 유용하게 적용할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<26> 본 발명은 코어-셀 구조를 갖는 거대 유전자-무기 나노하이브리드 복합체를 제공한다.

<27> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

<28> 본 발명은 LDH가 박리화-재조합(exfoliation-reassembling)되어 형성된 나노공동 안에 거대한 유전자가 삽입되어 외부 환경으로부터 안정화된 하기 화학식 1로 표시되는 유전자-무기 나노하이브리드 복합체를 제공한다:

화학식 1

<29> $[M^{2+}_{(1-x)}N^{3+}_x(OH)_2][A_{GEN}^{n-}]_z \cdot yH_2O$

<30> 상기 화학식 1에서,

<31> M^{2+} 는 2가 금속 양이온이고;

<32> N^{3+} 는 3가 금속 양이온이며;

<33> A_{GEN} 는 유전자이고;

<34> n은 A_{GEN} 의 유전자의 전하수이며;

<35> x는 0.1 초과 0.4 미만의 수이며;

<36> z와 y는 0을 초과하는 양수이다.

<37> 바람직하게는,

<38> 상기 화학식 1에서,

<39> 상기 M은 마그네슘(Mg^{2+}), 니켈(Ni^{2+}), 구리(Cu^{2+}), 아연(Zn^{2+}) 등에서 선택될 수 있고;

<40> 상기 N은 알루미늄(Al^{3+}), 철(Fe^{3+}), 바나듐(V^{3+}), 티타늄(Ti^{3+}), 갈륨(Ga^{3+}) 등에서 선택될 수 있고;

<41> 상기 A는 50 내지 2500 bp 이하의 거대 길이 유전자 또는 입체적으로 거대한 유전자로서, 단일가닥 유전자, 이중가닥 유전자, 플라스미드 유전자, 인공 유전자인 PNP(Peptide nucleic acid) 또는 유기체 형광체 또는 무기체 형광체 화학종이 부착된 유전자 등을 포함할 수 있다.

<42> 또한, 본 발명은

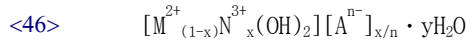
<43> 2가 양이온과 3가 양이온 금속염의 수용액을 염기성 물질로 공침시키고 수열 반응하여 하기 화학식 2의 LDH를 형성하는 단계(단계 1);

<44> 상기 단계 1에서 형성된 LDH를 박리화시키는 단계(단계 2); 및

<45> 상기 단계 2에서 박리된 LDH를 거대 유전자 또는 형광체가 부착된 거대 유전자와 혼합하여 코어-셀 유전자-무기 나노하이브리드 복합체를 생성하는 단계(단계 3)를 포함하여 이루어지는 화학식 1의 유전자-무기 나노하이

브리드 복합체의 제조방법을 제공한다.

화학식 2



<47> 상기 화학식 2에서

<48> M^{2+} 는 2가 금속 양이온이고;

<49> N^{3+} 는 3가 금속 양이온이고;

<50> x는 0.1 초과 0.4 미만의 수이며;

<51> A는 음이온계 게스트(Guest) 화학종이며;

<52> n은 A의 음이온의 전하수이며;

<53> y는 0을 초과하는 양수이다.

<54> 이하, 본 발명에 따른 상기 제조방법을 단계별로 더욱 구체적으로 설명한다.

<55> 먼저, 본 발명에 따른 상기 단계 1은 2가 양이온과 3가 양이온 금속염의 수용액을 염기성 물질로 공침시키고 수열 반응하여 LDH를 형성하는 단계이다. 상기 LDH는 2가 금속염과 3가 금속염을 용액으로 만들고, 염기 용액으로 적정하여 합성한다. 바람직하게는, 2가의 금속은 마그네슘(Mg^{2+}), 니켈(Ni^{2+}), 구리(Cu^{2+}), 아연(Zn^{2+}) 등에서 선택될 수 있고, 3가의 금속은 알루미늄(Al^{3+}), 철(Fe^{3+}), 바나듐(V^{3+}), 티타늄(Ti^{3+}), 갈륨(Ga^{3+}) 등에서 선택될 수 있으며, 염기 용액은 수산화나트륨(NaOH) 또는 암모니아(NH_3)를 사용할 수 있다. 침전반응시 반응용액의 pH는 5 내지 12인 것이 바람직하며, 9 내지 11인 것이 더욱 바람직하다. 반응용액의 pH가 5 이하거나 pH가 12 이상인 경우에는 금속 이중층 수산화염으로 공침되는 영역을 벗어나기 때문에 단일 금속 이중층 수산화염 또는 금속 산화물이 생성되는 문제가 있다. 또한, 공기 중의 이산화탄소에 의한 탄산 이온(CO_3^{2-}) 생성을 방지하기 위하여 반응 중에 질소 또는 불활성 기체를 연속적으로 투입하고 반응시키는 것이 바람직하다.

<56>

<57> 다음으로, 상기 단계 2는 상기 단계 1에서 형성한 LDH를 2차원 나노시트로 박리화하는 단계이다.

<58> 본 발명의 방법에서 LDH와 같은 층상 화합물은 양이온성 충전하를 띠고 있기 때문에 정전기적 인력으로 음이온성 인산기를 갖는 유전자와 상호결합하는 원리를 이용하여 상기 유전자를 캡슐화시킨다. 상기 캡슐화 단계는 종래에 알려진 이온교환 반응이나 공침 방법에 의해 수행될 수 있으나, LDH 층간 사이에 유전자를 삽입하는 종래의 방법은 무기 나노입자의 크기에 따라 삽입되고 보호되는 유전자의 길이가 제한되고, 3차원적으로 거대하거나 특이한 구조의 유전자를 담지할 수 없으며, 일부 양전하를 함유하는 음이온성 유전자는 담지하기가 매우 어렵다. 이러한 단점을 보완하기 위해서 LDH가 박리화-재조립(Exfoliation-Reassembling)되어 형성된 나노공동 안에 거대한 유전자가 삽입되어 외부 환경으로부터 안정화된 코어-셸 유전자-무기 나노하이브리드 복합체를 제조하는 방법을 발명하였다.

<59> 상기 단계 1에서 형성된 LDH는 이온 교환 방법이나 특정한 용매를 사용하여 박리화시킬 수 있다. LDH는 층간에 존재하는 질산(NO_3^-), 염화(Cl^-), 탄산(CO_3^{2-}) 등의 이온을 긴 탄소사슬의 음이온성 이온으로 치환하면 얇은 조각 층으로 분리되고, 포름아마이드(Formamide, $HCONH_2$)를 용매로 사용하면 포름아마이드가 금속 이중층 수산화물의 층간에 존재하는 층간수와 강한 수소 결합력으로 층 사이에 삽입되고 층간의 사이를 팽창시켜 판상 격자가 날장으로 쪼개진다(JP4019138 *Chem. Mater.* 2005, 17, 4386).

<60> 본 발명에서는 바이오 활성분자인 유전자와 재조합하므로, 온도를 가해주지 않아도 박리화 상태를 유지하는 포름아마이드를 이용한 박리화 방법이 바람직하며, 박리된 2차원 나노시트의 농도는 0.01 내지 0.10 중량%인 것이 바람직하다. 상기 2차원 나노시트의 농도가 0.10 중량% 이상일 경우 단일층으로 박리화되지 않은 금속 이중층 수산화물이 존재하는 문제가 있다.

- <61> 다음으로, 상기 단계 3은 상기 단계 2에서 박리된 LDH를 거대 유전자와 혼합하여 코어-셀 유전자-무기 나노하이브리드 복합체를 생성하는 단계이다.
- <62> 상기 유전자는 50 내지 2500 bp 이하의 거대 길이 유전자 또는 입체적으로 거대한 유전자로서, 단일가닥 유전자, 이중가닥 유전자, 플라스미드 유전자, 인공 유전자인 PNP(Peptide nucleic acid) 또는 유기체 형광체 또는 무기체 형광체 화학종이 부착된 유전자 등을 포함할 수 있고, 상기 유전자의 양은 박리된 2차원 나노시트의 전체 중량을 기준으로 약 0.1 내지 10배의 중량비를 사용하는 것이 바람직하다, 상기 유전자의 양이 10배 중량비 이상일 경우 유전자를 완벽하게 캡슐화시키지 못하여 일부분의 유전자가 외부환경에 노출되는 문제가 있다.
- <63> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.
- <64> 단, 하기의 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기의 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- <65> <실시예 1> 거대한 길이의 유전자가 캡슐화된 코어-셀 유전자-LDH 나노 복합체 합성
- <66> 단계 1 : LDH의 형성
- <67> 공침과 수열합성을 통하여 100 nm크기의 LDH를 형성하였다. 0.3 M $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$, 0.15 M $Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ 를 탄산 이온(CO_3^{2-})이 제거된 3차 증류수에 녹이고, pH가 10 내지 11이 될 때까지 0.5 M NaOH로 적정한 후, 상온에서 30분간 강하게 교반하여 LDH 결정체를 얻었다. 공침된 LDH를 수열합성 용기에 넣고 100° C에서 12시간 동안 교반한 후, 원심분리기로 분리하며 세척과정을 통해 미반응 염을 제거하여 100 nm의 균일한 크기의 LDH를 얻었다. 전 과정은 공기 중의 이산화탄소에 의한 탄산 이온(CO_3^{2-}) 생성을 방지하기 위하여 질소 분위기하에서 진행하였다.
- <68> 단계 2 : LDH의 박리화
- <69> 상기 단계 1에서 합성한 LDH를 포름아마이드에 0.05 중량 %로 분산시켜, 상온에서 질소 분위기를 유지하며 2일간 강하게 교반하여 박리화된 LDH 나노시트를 얻었다.
- <70> 단계 3 : 코어-셀 유전자-LDH 나노 복합체 합성
- <71> 상기 단계 2에서 박리된 LDH 나노시트 콜로이드 용액에 50 내지 2500 bp 크기의 이중가닥 청어 유전자(Herring testis DNA)를 1:1의 중량 비율로 혼합하여 상온에서 1시간 교반시켰다. 반응이 끝난 후 원심분리기로 분리하며 세척과정을 통해 과량의 유전자를 완전히 제거하여 코어-셀 유전자-LDH 나노 복합체를 얻었다. 전 과정은 공기 중의 이산화탄소에 의한 탄산 이온(CO_3^{2-}) 생성을 방지하기 위하여 질소 분위기하에서 진행하였다.
- <72> <실시예 2> 형광체가 부착된 유전자가 캡슐화된 코어-셀 유전자-LDH 나노 복합체 합성
- <73> 상기 실시예 1의 단계 2에서 박리된 LDH 나노시트 콜로이드 용액에 시아닌 3(녹색) 및 시아닌 5(적색)의 유기 형광체가 부착된 35 bp 크기의 이중가닥 유전자를 1:0.75의 중량 비율로 혼합하여 상온에서 1시간 교반시켰다. 반응이 끝난 후 원심분리기로 분리하며 세척과정을 통해 과량의 유전자를 완전히 제거하여 코어-셀 유전자-LDH 나노 복합체를 얻었다. 전 과정은 공기 중의 이산화탄소에 의한 탄산 이온(CO_3^{2-}) 생성을 방지하기 위하여 질소 분위기하에서 진행하였다.
- <74> <실험예 1> 유전자-LDH 나노 복합체의 X선 회절 분석
- <75> 상기 실시예 1의 단계 1에서 제조한 LDH 및 상기 실시예 1의 단계 3과 상기 실시예 2에서 제조한 유전자-LDH 나노 복합체의 결정 구조를 확인하기 위하여 X 선 회절 분석을 수행하였다.
- <76> 그 결과를 도 2에 나타내었다.
- <77> 도 2의 (a)에서 알 수 있는 바와 같이, 상기 실시예 1의 단계 1에서 제조한 LDH의 층간 간격은 0.79 nm로 질산 이온(NO_3^-)이 삽입되어 있는 전형적인 LDH임을 확인하였다. 도 2의 (b)와 (c)에서 알 수 있는 바와 같이, 상기 실시예 1의 단계 3과 상기 실시예 2에서 제조된 유전자-LDH 나노 복합체는 $2\theta < 15^\circ$ 인 저각에서의 회절이 없으

므로, 더 이상 다층상 구조의 나노 복합체가 아닌 무정형 구조의 유전자-LDH 나노 복합체임을 알 수 있다.

<78> <실험예 2> 유전자-LDH 나노 복합체의 투과 전자 현미경 분석

<79> 상기 실시예 1의 단계 1에서 제조한 LDH 및 상기 실시예 1의 단계 3과 상기 실시예 2에서 제조한 유전자-LDH 나노 복합체의 형상 및 결정 구조를 미세하게 확인하기 위하여 투과 전자 현미경 분석을 수행하였다. 각각의 시편을 에폭시 수지에 고정하여 50 nm 두께로 절단하여 특정한 염색 과정 없이 관찰하였다.

<80> 그 결과를 도 3에 나타내었다.

<81> 도 3의 (a)에서 알 수 있는 바와 같이, 상기 실시예 1의 단계 1에서 제조한 LDH는 약 100 nm의 균일한 크기의 육각 형상의 입자이며, 층간 간격은 약 0.8 nm로 질산 이온(NO_3^-)이 삽입되어 있는 LDH임을 확인하였다. 도 3의 (b)에서 알 수 있는 바와 같이, 상기 실시예 1의 단계 3에서 제조한 유전자-LDH 나노 복합체는 매우 얇은 LDH 나노시트가 무질서하게 거대한 길이의 유전자를 수 μm 크기로 캡슐화하여 카드의 집(House of card)형태에 가까운 무정형 구조의 코어-셀 나노 복합체가 형성되었음을 알 수 있다. 도 3의 (c)에서 알 수 있는 바와 같이, 상기 실시예 2에서 제조된 유전자-LDH 나노 복합체는 박리된 LDH가 제조회되면서 약 10 nm 두께로 무기 공동을 형성하였고, 유전자가 그 안에 캡슐화된 약 150 nm 크기의 완벽한 코어-셀 구조의 유전자-LDH 나노 복합체임을 알 수 있다.

<82> <실험예 3> 캡슐화된 유전자의 안정성 평가 실험

<83> 상기 실시예 1 및 2에서 LDH에 캡슐화된 유전자의 안정성을 알아보기 위해 하기의 실험을 수행하였다. 유전자-LDH 나노 복합체를 TE(Tris-EDTA) 완충용액 10 μl 에 각각 10 μg 씩 분산시키고, DNA 분해효소인 DNase I(1000 unit) 20 μl 와 반응 완충용액(200 mM Tris-HCl, pH 8.3, 20 mM MgCl_2) 20 μl 를 첨가하여 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 그리고 중단 완충용액(50 mM EDTA) 20 μl 를 첨가하여 70℃에서 10분간 인큐베이션한 후, 원심 분리하여 효소와 완충용액을 제거하였다. 효소 반응이 끝난 후에 pH 4의 염산 완충용액에 분산시킨 후, 상온에서 5시간 동안 용해시켜 유전자를 추출하여, 1% 또는 5% 아가로스 젤에서 전기영동하였다.

<84> 그 결과를 도 4에 나타내었다.

<85> 도 4의 (a)에서 알 수 있는 바와 같이, 상기 실시예 1에서 제조한 코어-셀 유전자-LDH 나노 복합체에서 50 내지 2500 bp의 거대한 길이의 유전자가 효소환경에 안정화되었음을 확인할 수 있었다. 도 4의 (b)에서 알 수 있는 바와 같이, 상기 실시예 2에서 제조한 코어-셀 유전자-LDH 나노 복합체에서 입체적으로 거대한 형광체가 부착된 유전자가 효소 환경에 안정화되었음을 확인할 수 있었다. 이에, 본 발명에 따른 코어-셀 유전자-LDH 나노 복합체는 길이 및 구조에 관계없이 거대한 크기의 유전자를 캡슐화할 수 있고 외부 환경에 대한 안정성을 획득하여, 유전자의 보관, 전달 및 그 기능을 증가시키는 것을 알 수 있다.

도면의 간단한 설명

<86> 도 1은 본 발명에 따른 유전자-LDH 나노 복합체의 형성 구조를 예측한 도식도이고((a)실시예 1, (b)실시예 2);

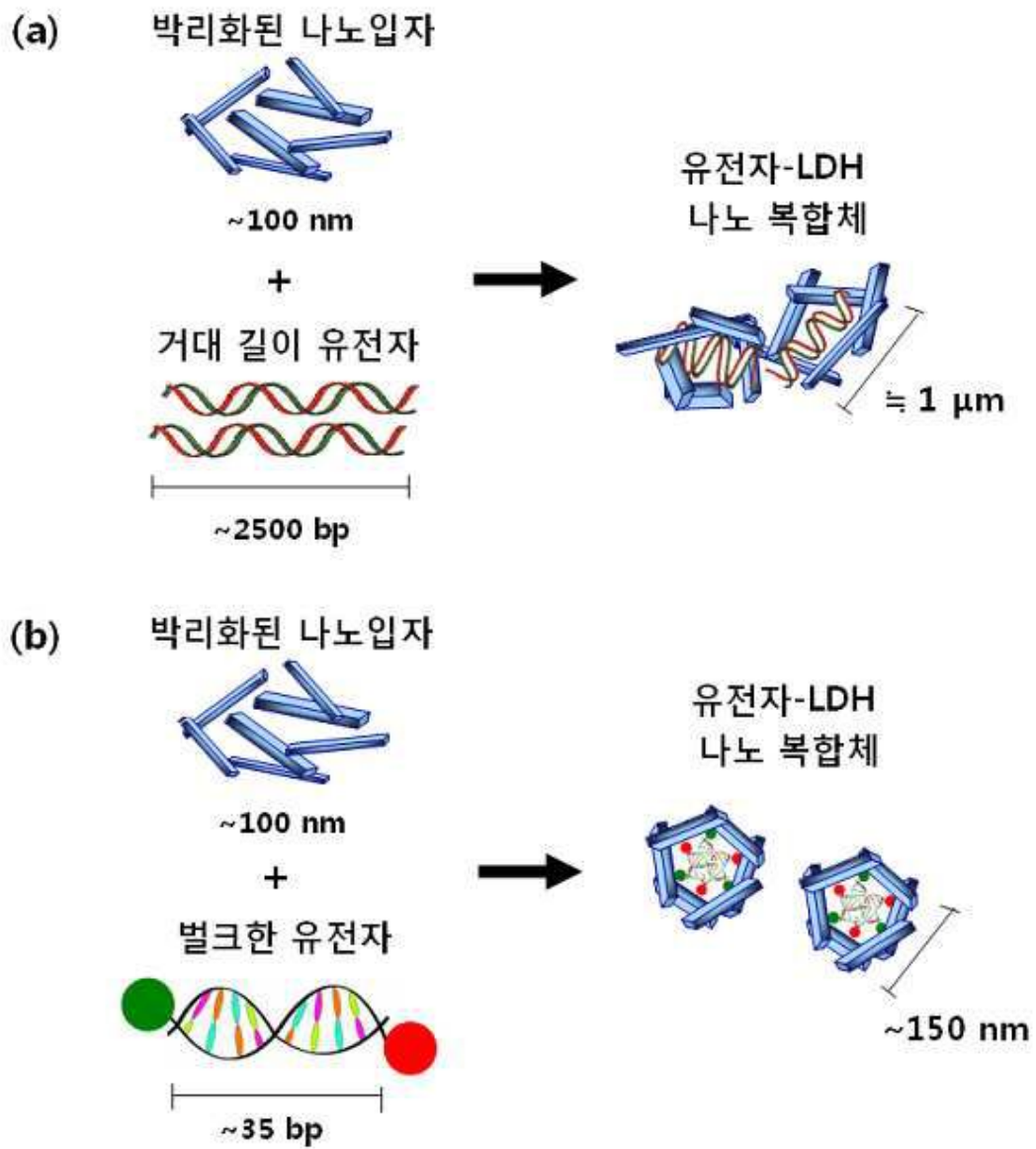
<87> 도 2는 본 발명에 따른 유전자-LDH 나노 복합체의 X선 회절도이고((a)실시예 1의 단계 1, (b)실시예 1의 단계 3, (c)실시예 2);

<88> 도 3은 본 발명에 따른 유전자-LDH 나노 복합체의 투과 전자 현미경 이미지이고((a)실시예 1의 단계 1, (b)실시예 1의 단계 3, (c)실시예 2);

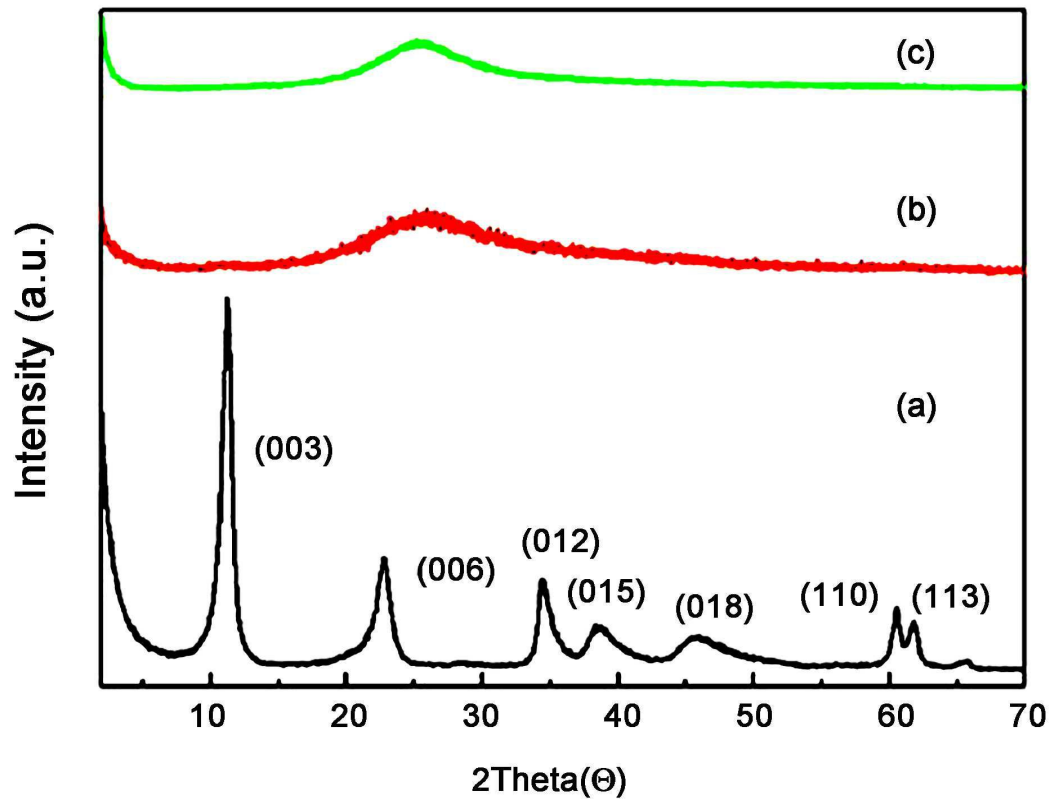
<89> 도 4는 본 발명에 따른 유전자-LDH 나노 복합체에 캡슐화된 유전자의 안정성 평가 실험 결과를 나타낸 전기영동 이미지이다((a)실시예 1의 단계 3; lane 1: 100 bp 마커, lane 2: 50-2500 bp 유전자 비교군, lane 3: 실험예 3, (b)실시예 2의 단계 3; lane 1: 5 bp 마커, lane 2: 35 bp 유전자 비교군, lane 3: 실험예 3).

도면

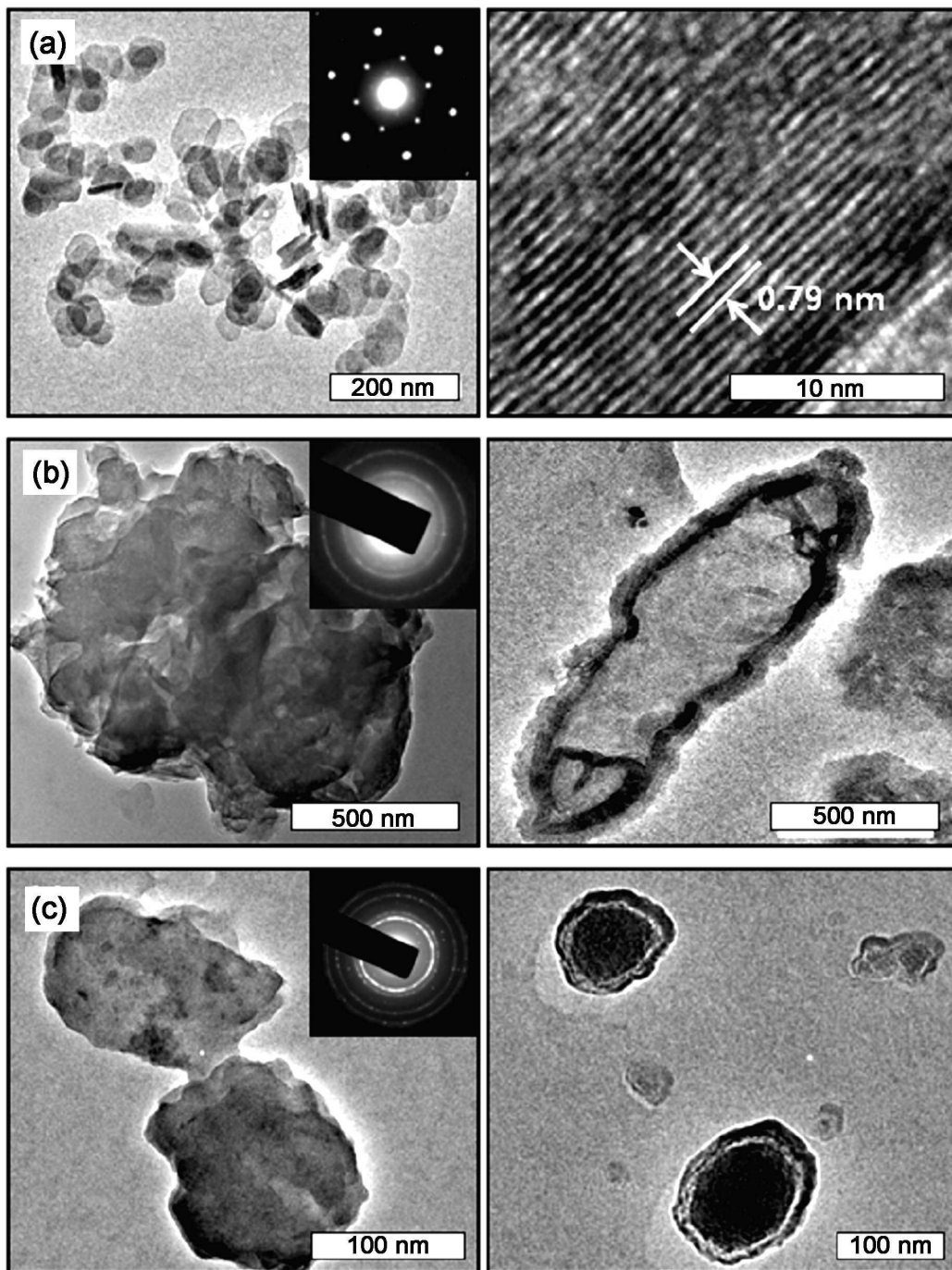
도면1



도면2



도면3



도면4

