



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0101961
(43) 공개일자 2012년09월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/68 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01) B82Y 15/00 (2011.01)

(21) 출원번호 10-2011-0020130

(22) 출원일자 2011년03월07일

심사청구일자 2011년03월07일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가 1

(72) 발명자

이지원

서울특별시 광진구 아차산로70길 62, 현대3차 아파트 310동 204호 (광장동)

서혁성

서울특별시 강동구 아리수로97길 20, 507동 502호 (강일동, 강일리버파크)

(74) 대리인

특허법인다나

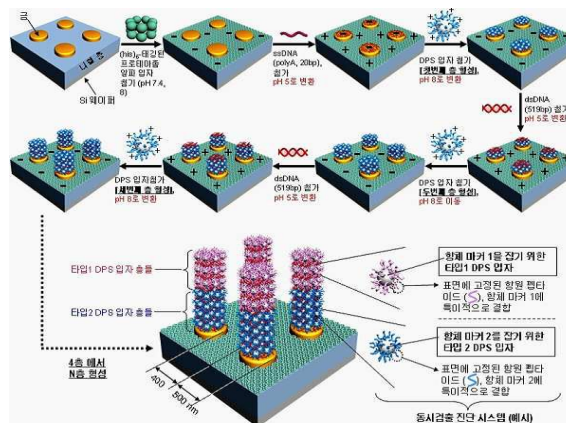
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 단백질 나노입자를 이용한 3차원 나노구조체

(57) 요약

본 발명은 단백질 나노 입자 및 DNA를 금속 나노닷 위에 선택적이고 순차적으로 쌓아올려 3차원의 나노구조체를 만들고 이 구조체를 바이오센서로 활용하는 기술에 관한 것이다. 본 발명에 따르면 pH를 변화시켜 컨트롤 단백질의 네트 전하를 쌓아올리고자 하는 단백질 또는 DNA와 동일한 전하로 조정함으로써, 단백질이나 DNA가 컨트롤 단백질이 아닌 DNA층이나 단백질층에 선택적이고 순차적으로 적층할 수 있게 된다. 이렇게 제조된 3차원의 단백질-DNA 다층 나노구조체는 타겟 물질을 검출할 수 있는 바이오센서에 적용할 수 있다.

대표도 - 도7



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 R0706934

부처명 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원_도약연구

연구과제명 생체나노프로그를 활용한 초고감도 나노바이오센서 기술

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2010.07.01 ~ 2011.06.30

특허청구의 범위

청구항 1

금속 나노닷이 표면에 형성되어 있는 기재의 금속 나노닷을 제외한 부분에 pH에 따라 네트 전하가 변화하는 컨트롤 단백질을 고정화하고, pH를 변화시켜 상기 컨트롤 단백질의 네트 전하를 조정함으로써 금속 나노닷 상에 DNA층과 단백질층을 순차적으로 반복하여 적층하는 것을 포함하는 단백질-DNA 다층 나노구조체의 제조 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 컨트롤 단백질의 네트 전하가 적층될 순서의 DNA 또는 단백질과 동일한 전하를 띠도록 조정되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 적층되는 단백질층이 동중 또는 이중의 단백질 입자로 이루어진 것인 방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 적층되는 단백질이 N-말단 또는 C-말단에 캡처 펩타이드를 포함하는 것인 방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 캡처 펩타이드가 항원 또는 항체 결합 도메인인 방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 캡처 펩타이드가 항원인 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 캡처 펩타이드가 암에 대한 항원인 방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

컨트롤 단백질은 프로테아좀 α 인 방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 기재는 금속으로 이루어진 것인 방법.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 기재는 니켈로 이루어진 것인 방법.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 기제는 니켈로 이루어진 것이고, 컨트롤 단백질은 히스티딘 태그를 포함하는 재조합 컨트롤 단백질인 방법.

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 금속 나노당은 금 나노당인 방법.

청구항 13

제1항에 있어서,

상기 금속 나노당은 금 나노당이고,

pH를 변화시켜 상기 컨트롤 단백질의 네트 전하를 조정함으로써 금 나노당 상에 폴리아데닌 올리고머를 결합시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 14

제3항에 있어서,

적층되는 단백질이 양전하를 띠는 복수개의 아미노산을 추가로 포함하는 재조합 단백질인 방법.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 형성된 단백질-DNA 다층 나노구조체.

청구항 16

금속 나노당이 표면에 형성되어 있는 기제;

상기 기제의 금속 나노당을 제외한 부분에 고정되어 있는 pH에 따라 네트 전하가 변화하는 컨트롤 단백질; 및

pH를 변화시켜 상기 컨트롤 단백질의 네트 전하를 조정함으로써 금속 나노당 상에 순차적으로 반복하여 적층시킨 DNA층과 단백질층을 포함하는 단백질-DNA 다층 나노구조체

를 포함하는 바이오센서.

청구항 17

제15항의 단백질-DNA 다층 나노구조체를 시료와 접촉시키고 타겟 물질의 존재를 확인하는 것을 포함하는 타겟 물질의 탐지 방법.

청구항 18

제15항에 있어서,

상기 타겟 물질은 항체 또는 항원인 방법.

청구항 19

제17항에 있어서,

상기 타겟 물질의 존재를 확인하는 것은 신호 물질을 이용하여 수행하는 것인 방법.

청구항 20

제17항에 있어서,

상기 신호 물질은 형광 물질, 발색 물질 또는 퀀텀닷인 방법.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 단백질 나노 입자 및 DNA를 금속 나노닷 위에 선택적이고 순차적으로 쌓아올려 3차원의 나노구조체를 만들고 이 구조체를 바이오센서로 활용하는 기술에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 타겟 물질의 존재를 확인하거나 시험물질의 활성을 확인하는 과정에서 프로브로써 단백질을 사용할 때 기존 보고된 기술들에서는 일반적으로 단백질의 2차원적 어레이를 사용해 왔다. 만일 단백질의 3차원적 다층구조체를 만들 수 있다면 반응할 수 있어 표면적을 증가하므로 크기가 작으면서도 민감도는 높은 바이오센서를 만드는데 매우 유리할 것이다.

[0003] 그러나 기존에 보고된 3차원 다층구조체를 만드는 기술은 pH조건이 산성이거나 제조 온도가 고온이거나 하는 등의 제조 조건이 단백질에는 적합하지 않고, 또한 쌓아올리는 재료물질에 특별한 화학적 처리가 필요하고, 공정 시간이 상대적으로 긴 문제점이 있었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명은 기재 상에 형성된 금속 나노닷에만 선택적으로 DNA 층과 단백질층을 순차적으로 반복하여 쌓아올려 3차원 단백질 다층 나노구조체를 제조하는 방법 및 이에 따라 제조된 단백질 다층 나노구조체, 이를 포함하는 바이오센서를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0005] 본 발명은

[0006] 금속 나노닷이 표면에 형성되어 있는 기재의 금속 나노닷을 제외한 부분에 pH에 따라 네트 전하가 변화하는 컨트롤 단백질을 고정화하고, pH를 변화시켜 상기 컨트롤 단백질의 네트 전하를 조정함으로써 금속 나노닷 상에 DNA층과 단백질층이 순차적으로 반복하여 적층되어 있는 단백질 다층 나노구조체를 제조하는 방법을 제공한다.

[0007] 본 발명에서는, 단백질-DNA 다층 나노구조체를 제조하기 위한 기재로서 금속 나노닷이 표면에 형성되어 있는 기재를 사용한다. 본 발명에서 사용되는 기재의 소재는 특별히 한정되지 않는다. 단백질과의 결합성이 우수하거나, 단백질을 기재와 결합시키기 위한 기능기를 도입하기에 적합한 소재이면 어떠한 것이든 사용할 수 있다. 한 구체예에서, 금속 나노닷이 표면에 형성되어 있는 기재는 금속으로 이루어진 것일 수 있다. 이 때 금속 기재와 금속 나노닷은 서로 상이한 소재인 것이 바람직할 것이다.

[0008] 기재의 표면에 형성되어 있는 금속 나노닷의 소재 또한 특별히 한정되지 않는다. 단백질이나 DNA와의 결합성이 우수하거나, 단백질이나 DNA와 결합시키기 위한 기능기를 도입하기에 적합한 소재이면 어떠한 것이든 사용할 수 있다.

[0009] 기재나 금속 나노닷의 소재로 사용할 수 있는 금속으로써, 단백질이나 DNA와 결합성이 우수한 것으로 알려져 있는 니켈이나 금과 같은 금속을 예로 들 수 있다. 니켈은 히스티딘과의 결합성이 우수한 것으로 알려져 있으며, 금은 폴리아데닌 올리고머와의 결합성이 우수한 것으로 알려져 있다. 또한, 예를 들어, 티올기와 같은 공지의 기능기를 이용하여 금과 같은 금속 표면에 단백질이나 DNA를 표면에 결합시킬 수도 있다.

[0010] 한편, 표면에 금속 나노닷이 형성되어 있는 기재는 당업계에 공지된 방법을 이용하여 쉽게 제조할 수 있다. 도 1은 표면에 금속 나노닷이 형성되어 있는 기재의 일 예로서, 금 나노닷이 형성되어 있는 니켈 기재를 제조하는 공정을 개략하여 도시한 것이다. 도 1을 예로 들어 설명하면, 먼저 니켈을 실리콘 웨이퍼위에 전자빔 증착법(e-beam evaporation)으로 증착시키고, 그 위에 LOL™2000 (Shipley Ltd.)을 스핀코팅(spin-coating) 한 후에 실리콘 마스터몰드(master mold)를 붙이고 산소플라즈마를 이용한 산소 반응성 이온 에칭(oxygen reactive ion etching (RIE))을 한 후, 다시 금(Gold)을 전자빔 증착법으로 증착시킨다. 그런 다음 레지스트-제거 용액(Resist-removing solution)을 이용하여 리프트-오프(lift-off) 공정을 진행하면 니켈 표면 위에 일정한 간격의 골드닷(Gold dot)을 만들 수 있다.

- [0011] 금속 나노돛이 표면에 형성되어 있는 기재 상에는 pH에 따라 네트 전하가 변화하는 “컨트롤 단백질”을 고정화한다. 본 발명에 있어서, “컨트롤 단백질”이란 pH에 따라 네트 전하가 변화하는 단백질을 의미하는 것으로 구체적인 단백질의 종류는 특별히 제한되지 않는다. “컨트롤 단백질”은 pH에 따라 네트 전하가 변화하여 적층하고자 하는 DNA나 단백질과 동일한 전하를 띠게 되어 DNA나 단백질이 컨트롤 단백질 위가 아닌 금속 나노돛 상에 이미 적층되어 있는 단백질층이나 DNA층에 적층될 수 있도록 하는 중요한 역할을 한다. “컨트롤 단백질”은 이러한 역할을 수행하기 위해 금속 기재 중 금속 나노돛을 제외한 부분에 고정화된다. “컨트롤 단백질”을 기재 상에 고정화하는 방법은 특별히 제한되지 않으며, 당업자에게 알려져 있는 공지의 단백질 고정화 방법을 사용할 수 있다.
- [0012] 컨트롤 단백질을 기재의 금속 나노돛을 제외한 부분에 고정화한 후에는, 금속 나노돛 상에는 1차적으로 DNA층이나 단백질층을 형성하게 된다. 앞서 설명한 바와 같이, 금속 나노돛 상에 DNA나 단백질을 도입하는 방법에 대해서는 당업계에 잘 알려져 있다.
- [0013] 금속 나노돛 상에 1차적으로 DNA층이나 단백질층을 형성하고 나면, pH를 조정하여 “컨트롤 단백질”의 네트 전하가 적층하고자 하는 단백질이나 DNA와 동일한 전하를 띠도록 조정함으로써 적층하고자 하는 단백질이나 DNA가 1차적으로 금속 나노돛 상에 형성되어 있는 DNA층이나 단백질층에 적층되도록 할 수 있다.
- [0014] 상기 “컨트롤 단백질”의 네트 전하는 컨트롤 단백질 자체의 pI 값과 금속 나노돛 상에 적층시킬 DNA나 단백질을 포함하는 용액의 pH 값에 따라 변화한다. 단백질의 pI 값은 고정되어 있으므로, 선택된 컨트롤 단백질의 pI 값을 고려하여 금속 나노돛 상에 적층시킬 DNA나 단백질을 포함하는 용액의 pH 값을 조정함으로써 컨트롤 단백질의 네트 전하를 조정할 수 있을 것이다.
- [0015] “컨트롤 단백질”의 pH에 따른 네트 전하 변화를 이용한 DNA나 단백질의 적층 방법을 보다 구체적으로 설명하기 위해 본 발명의 실시예에서 “컨트롤 단백질”로서 사용한 프로테아좀 α 를 예로 들어 설명하도록 한다. 예를 들어, DNA를 포함하는 완충액의 pH가 7.5 내지 8.5일 때, 프로테아좀 α 의 네트 전하는 음전하를 띠게 되어, 동일한 음전하를 띠는 DNA는 프로테아좀 α 에 결합하지 않고 금속 나노돛 또는 금속 나노돛 상에 적층되어 있는 단백질층에만 결합하게 된다. 또한, 완충액의 pH가 5.5 내지 6.5일 때, 프로테아좀 α 의 네트 전하는 상대적으로 DNA에 비해 양전하를 띠게 되어, 적층하고자 하는 단백질이 동일한 양전하를 띠는 프로테아좀 α 에 결합하지 않고 음전하를 띠는 DNA와 결합하도록 해 준다.
- [0016] 즉, 본 발명은 컨트롤 단백질의 네트 전하를 적층될 순서의 DNA 또는 단백질과 동일한 전하를 띠도록 조정함으로써, 적층하고자 하는 DNA나 단백질이 프로테아좀 α 가 아닌 단백질층이나 DNA층에 선택적이고 순차적으로 적층되도록 하는 것을 특징으로 한다.
- [0017] 본 발명에 따른 단백질-DNA 다층 나노구조체에 있어서, 적층되는 각각의 단백질층은 동종 또는 이종의 단백질 입자로 이루어진 것일 수 있다.
- [0018] 만일 본 발명에 따른 단백질-DNA 다층 나노구조체에서, 상기 각각의 단백질층이 모두 동일한 종류의 단백질로 이루어져 있는 경우에는 단일한 타겟 물질을 탐지할 수 있게 된다. 반면, 본 발명에 따른 단백질-DNA 다층 나노구조체에서, 각각의 단백질층이 2 이상의 상이한 종류의 단백질, 예컨대 2 이상의 상이한 종류의 캡처 펩타이드를 포함하는 재조합 단백질로 이루어져 있는 경우 복수의 타겟 물질을 동시에 탐지할 수 있게 된다.
- [0019] 만일 적층되는 각각의 층이 이종의 단백질 입자로 이루어진 것일 경우, 타겟물질에 대한 프로브로서의 결합력을 높이기 위해 단백질층은 2 이상의 층이 연속적으로 동종의 단백질층으로 적층되어 있는 것이 바람직할 것이다. 예를 들어, 상기 재조합 단백질층이 총 7층일 때, 제1 내지 4의 재조합 단백질층이 서로 동일한 종류의 단백질층으로 적층되어 있고, 제5 내지 제7의 재조합 단백질층은 이와는 다른 종류의 단백질층으로 적층되어 있을 수 있다.
- [0020] 만일 적층되는 각각의 층이 이종의 단백질 입자로 이루어진 것일 경우, 본 발명에 따른 단백질-DNA 다층 나노구조체의 가장 윗층은 시료와 접촉할 수 있는 표면적이 다른 층에 비해 더 넓기 때문에 윗 부분에 적층되는 단백질층들은 아랫 부분에 적층되는 단백질층에 비해 적층되는 층의 수가 적을 수 있을 것이다. 한편, 본 발명에 따른 단백질-DNA 다층 나노구조체에 있어서, 상기 적층되는 단백질은 단백질이 시료 내의 존재 여부를 탐지하고자 하는 타겟 물질에 대한 프로브로서 사용될 수 있도록 N-말단 또는 C-말단에 캡처 펩타이드를 포함할 수 있다.
- [0021] 상기 캡처 펩타이드는 항원 또는 항체 결합 도메인일 수 있다. 탐지하고자 하는 타겟 물질의 종류에 따라 적당한 항원 또는 항체 결합 도메인을 선택하고 이를 캡처 펩타이드로서 재조합 단백질 내에 포함시킬 수 있다. 예

를 들어, 캡처 펩타이드로서 항체 결합 도메인을 사용할 경우에는 이에 결합하는 항체가 타겟 물질을 탐지하는 프로브로서 작용하게 되므로 본 발명에 따른 단백질-DNA 다층 나노구조체에 이러한 항체를 추가적으로 결합시켜 사용하게 될 것이다.

[0022] 한 구체예에서, 상기 캡처 펩타이드는 항원일 수 있다. 시료 내에 존재하는지 탐지하고자 하는 타겟 물질이 항체일 때, 캡처 펩타이드는 항원일 수 있다. 타겟 물질의 종류를 탐지할 수 있도록 사용되는 캡처 펩타이드로서의 항원의 종류는 특별히 제한되지 않는다. 바람직하게는 시료, 예컨대 혈액 내에 존재하는 항체를 탐지해 낼 수 있는 것이면 어떠한 것이든 관계 없다. 예를 들어, 상기 항원은 암에 대한 항원일 수 있다. 이 경우, 이를 통해 혈액 내에 존재하는지 탐지하고자 하는 항체는 이러한 암 항원에 대한 자가항체일 수 있다.

[0023] 본 발명의 한 구체예에서, 컨트롤 단백질은 프로테아좀 α 일 수 있다.

[0024] 한 구체예에서, 상기 기제는 금속으로 이루어진 것일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서, 상기 기제는 니켈로 이루어진 것일 수 있다.

[0025] 컨트롤 단백질을 니켈 기제 상에 고정할 때에는 컨트롤 단백질에 히스티딘 태그(His-tag)를 포함시킨 재조합 컨트롤 단백질을 이용하는 것이 유리할 수 있다. 예를 들어, 표면에 금 나노돛이 형성되어 있는 니켈 기제에 히스티딘 태그를 포함하는 재조합 프로테아좀 α 입자를 함유하는 완충액을 처리하면 금 나노돛이 형성되어 있는 부분을 제외한 나머지 니켈 부위에 재조합 프로테아좀 α 을 선택적으로 결합시킬 수 있게 된다. 따라서, 한 구체예에서, 상기 기제는 니켈로 이루어진 것이고, 컨트롤 단백질은 히스티딘 태그를 포함하는 재조합 컨트롤 단백질일 수 있다.

[0026] 한 구체예에서, 금속 나노돛은 금 나노돛일 수 있다.

[0027] 금속 나노돛이 금 나노돛일 때에는 금 나노돛 상에 단백질을 적층시키기 위한 전 단계로서 폴리아데닌 올리고머를 결합시키는 단계를 포함하는 것이 유리할 수 있다.

[0028] 폴리아데닌 올리고머는 금과 선택적으로 결합하는 것으로 잘 알려져 있다. 폴리아데닌 올리고머가 기제 상에 이미 고정되어 있는 컨트롤 단백질에 결합하지 않고 금 나노돛에만 결합하도록 하기 위해서는, pH를 변화시켜 컨트롤 단백질의 네트 전하를 음전하로 조정함으로써, 동일한 음전하를 띠는 폴리아데닌 올리고머가 금 나노입자에만 선택적으로 결합하도록 할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 단백질-DNA 다층 나노구조체의 제조 방법의 한 구체예에서, 상기 금속 나노돛이 금 나노돛일 경우, pH를 변화시켜 상기 컨트롤 단백질의 네트 전하를 조정함으로써 금 나노돛 상에 폴리아데닌 올리고머를 결합시키는 단계를 포함할 수 있다.

[0029] 금속 나노돛 상에 DNA층을 형성하는 것은 상기 방법에 제한되지 않으며, 당업계에 알려져 있는 통상의 방법을 이용할 수 있다.

[0030] 금속 나노돛 상에 DNA층이나 단백질층을 1차적으로 형성하고 나면, 앞서 설명한 바와 같이 pH를 변화시켜 상기 컨트롤 단백질의 네트 전하를 조정함으로써 매우 간단하게 금속 나노돛 상에 DNA층과 단백질층을 순차적으로 반복하여 적층할 수 있게 된다.

[0031] 한편, 본 발명에 따른 단백질-DNA 다층 나노구조체를 제조함에 있어서, 적층시키고자 하는 단백질에는 강한 양전하를 부여할 수 있는 아미노산이 포함되어 있는 것이 바람직할 수 있다. 따라서, 한 구체예에서, 적층되는 단백질은 양전하를 띠는 복수개의 아미노산을 추가로 포함하는 재조합 단백질일 수 있다. 예를 들어, 적층되는 단백질은 N-말단 또는 C-말단에 라이신, 아르기닌 또는 히스티딘과 같은 양전하성 아미노산을 추가로 포함할 수 있다. 다르게는, 본 발명의 실시예에서 사용한 Dps 단백질과 같이 폴리라이신과 같은 양전하성 아미노산을 포함하는 단백질을 적층시킬 단백질로 선택하고, 이의 일 말단에 캡처 펩타이드를 갖도록 재조합 단백질을 제조하여 본 발명에 따른 단백질-DNA 다층 나노구조체의 제조에 사용할 수도 있다.

[0032] 본 발명에서 사용되는 재조합 단백질들은 정제의 편의를 위해 N- 또는 C-말단에 히스티딘 태그를 포함시킬 수도 있다. 한편, 단백질층과 단백질층 사이에 적층하게 되는 DNA는 충분한 음전하를 제공해 줄 정도의 길이만 충족시키면 되고, 상기 DNA 서열을 이루고 있는 핵산의 구체적인 구성은 문제가 되지 않는다. 충분한 음전하를 제공해 줄 정도의 DNA의 길이는 사용되는 재조합 단백질의 종류, 크기에 따라 달라질 수 있으며, 이는 당업자가 적절히 조절할 수 있을 것이다.

[0033] 한편, 금속 나노돛 상에 DNA층과 단백질층을 적층하는 과정의 반복 횟수에 따라 적층되는 단백질층의 수를 조정할 수 있다. 이에 제한되는 것은 아니나, 본 발명에 따른 단백질-DNA 다층 나노구조체는 2 내지 20층의 단백질

층을 포함할 수 있다.

- [0034] 본 발명은 또한 상기 제조 방법에 의해 제조된 단백질-DNA 다층 나노구조체 및 이를 포함하는 바이오센서를 제공한다. 각각의 구성요소에 대한 설명은 앞서 설명한 바를 인용한다.
- [0035] 본 발명은 금속 나노다트 표면에 형성되어 있는 기재; 상기 기재의 금속 나노다트를 제외한 부분에 고정되어 있는 pH에 따라 네트 전하가 변화하는 컨트롤 단백질; 및 pH를 변화시켜 상기 컨트롤 단백질의 네트 전하를 조정함으로써 금속 나노다트 상에 순차적으로 반복하여 적층시킨 DNA층과 단백질층을 포함하는 단백질-DNA 다층 나노구조체를 포함하는 바이오센서를 제공한다.
- [0036] 이러한 바이오센서는 적층되는 단백질층이 모두 동일한 종류의 단백질로 이루어져 있는 단백질-DNA 다층 나노구조체를 포함할 수도 있고, 적층되는 단백질층에 따라 상이한 종류의 단백질로 이루어져 있는 단백질-DNA 다층 나노구조체를 포함할 수도 있다. 제조할 단백질층이 모두 동일한 종류의 제조할 단백질로 이루어져 있는 단백질-DNA 다층 나노구조체가 바이오센서에 포함되는 경우에는 하나의 단백질-DNA 다층 나노구조체를 하나의 단위로 하여, 여러 종류의 단백질-DNA 다층 나노구조체를 포함하는 수 개의 단위를 포함하는 형태로 구성함으로써 동시에 여러가지 타겟물질을 탐지할 수 있도록 할 수 있을 것이다.
- [0037] 본 발명은 또한 앞서 설명한 단백질-DNA 다층 나노구조체를 시료와 접촉시키고 타겟 물질의 존재를 확인하는 것을 포함하는 타겟 물질의 탐지 방법을 제공한다.
- [0038] 한 구체예에서, 상기 타겟 물질은 항체 또는 항원일 수 있다. 다른 구체예에서, 상기 타겟 물질은 항체일 수 있다.
- [0039] 한편, 상기 타겟 물질의 존재를 확인하는 것은 신호 물질을 이용하여 수행될 수 있다. 신호 물질은 타겟 물질에 결합하여 타겟 물질이 본 발명에 따른 단백질-DNA 다층 나노구조체 상의 캡처 펩타이드에 결합되었는지를 모니터링할 수 있게 해 준다. 시각적으로 쉽게 확인할 수 있도록 상기 신호 물질로는 형광 물질, 발색 물질, 퀀텀닷 등을 이용할 수 있다. 예를 들어, 상기 타겟 물질이 항체인 경우, 신호물질은 상기 항체에 결합될 수 있는 항원 모티프를 포함하며, 형광 단백질을 포함하는 재조합 단백질일 수 있다.
- [0040] 본 발명에서 유전공학적 기술과 관련된 사항은 샘브룩 등의 문헌(Sambrook, et al. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (2001)) 및 프레드릭 등의 문헌(Frederick M. Ausubel et al., Current protocols in molecular biology volume 1, 2, 3, John Wiley & Sons, Inc. (1994))에 개시되어 있는 내용에 의해 보다 명확하게 된다.

발명의 효과

- [0041] 본 발명에 따르면 pH를 변화시켜 컨트롤 단백질의 네트 전하를 쌓아올리고자 하는 단백질 또는 DNA와 동일한 전하로 조정함으로써, 단백질이나 DNA가 컨트롤 단백질이 아닌 DNA층이나 단백질층에 선택적이고 순차적으로 적층할 수 있게 된다. 이렇게 제조된 3차원의 단백질-DNA 다층 나노구조체는 타겟 물질을 검출할 수 있는 바이오센서에 적용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0042] 도 1은 표면에 금 나노다트 형성되어 있는 니켈 기재를 제조하는 공정을 예시한 도면이다.
- 도 2는 유방암 또는 대장암 항체에 의해 특이적으로 인식되는 항원 펩타이드[BRCA1(breast cancer associated antigen 1)의 610-619 단편 또는 인간 HDAC3(histone deacetylase 3)의 411-428 단편]가 각각의 DPS 모노머의 C-말단에 연결되도록 E. Coli DPS를 유전공학적으로 조작한 재조합 DPS 단백질의 구조를 보여주는 도면이다.
- 도 3은 재조합 DPS와 프로테아솜 α 나노입자가 pH 5.0 및 8.0의 수용액에서 고유의 나노구조를 유지함을 보여주는 사진이다.
- 도 4는 재조합 프로테아솜 α 입자의 등전점을 보여주는 제타 포텐셜 분석의 결과이다.
- 도 5는 유전공학적으로 조작된 재조합 DPS 단백질 입자가 야생형 DPS 단백질 입자와 동일한 DNA 결합 친화성을 갖는다는 것을 보여주는 젤 시프트 어세이의 결과이다.
- 도 6은 야생형 DPS 단백질 입자 및 재조합 DPS 단백질 나노입자의 DNA 결합 활성이 산성 조건 (pH 5)하에서 더

높음을 보여준다.

도 7은 본 발명에 따른 단백질-DNA 다층 나노구조체의 제조를 위한 단백질 나노입자와 DNA의 반복적인 layer-by-layer 어셈블리에 대한 구체적인 과정을 개략적으로 보여주는 모식도이다.

도 8은 AFM에 의한 2D 및 3D 이미지와 수직 섹션 분석 결과를 보여준다.

도 9는 각기 다른 항원성 펩타이드를 입자 표면에 디스플레이 하고 있는 각기 다른 타입의 재조합 DPS 입자를 이용한 이중성의 단백질-DNA 다층 나노구조체를 이용하여 복수의 항체 마커의 동시적 탐지가 가능함을 보여주는 모식도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0043] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[0044] [실시예]

[0045] 실시예 1: 골드닷의패턴화된어레이를갖는니켈플레이트의제조

[0046] Si 마스터 몰드를 통상적인 DUV 리소그래피 및 CF₄ 플라스마로 반응성 이온에칭에 의해 제조하였다. SEM으로 확인해 본 바에 따르면, 상기 Si 마스터는 500 nm의 직경, 900 nm의 간격, 그리고 16 nm의 높이를 갖는 육각형과 유사한 모양의 닷 어레이 구조를 갖는다. 점착 방지 처리를 위해, HDFs-SAM을 상기 Si 마스터 몰드 상에 코팅하였다^[2]. 도 1은 니켈 층 상에 Au 나노닷을 제조하기 위한 과정의 개략도를 보여준다. 우선, 100nm의 두께를 갖는 니켈층을 선제정된 Si 웨이퍼 상에 전자빔 증착법(e-beam evaporation)을 통해 증착시켰다. LOLTM2000 (Shipley Ltd.)를 Ni이 코팅된 Si 웨이퍼 상에 30초 동안 6000 rpm에서 스핀 코팅하였다. 그런 다음, 적량의 모노머 기반 열 경화성 수지를 상기 기재에 적가하고, 상기 HDFs-SAM 층을 포함하는 Si 마스터 몰드를 상기 기재 상에 두었다. Si 마스터 몰드를 균일하게 가압하기 위하여, 압력-용기 타입의 임프린팅 시스템을 사용하였다. 임프린팅 과정은 20 atm, 120℃에서 5분 동안 수행되었다^[3]. 임프린팅 과정이 완료된 후, Si 마스터 몰드를 상기 기재로부터 떼어내고, 산소 플라스마로 반응성 이온 에칭 공정을 수행하였다. 이러한 산소 반응성 이온 에칭(RIE) 공정은 200 W의 전압, 40 mTorr의 압력, 그리고 40 sccm의 산소 주입 속도로 90초 동안 수행되었다^[4]. 산소 RIE 후, 두께 16 nm의 Au 층이 전자빔 증착법에 의해 임프린팅된 패턴을 갖는 기재 상에 증착되었다. 레지스트-제거 용액으로 리프트-오프 공정(lift-off process)을 통해 Ni 층이 코팅된 Si 웨이퍼 상에 두께 16 nm의 Au 닷 어레이를 형성하였다.

[0047] 실시예 2: 유전공학적으로조작된 DPS, 프로테아좀-α 나노입자, eGFP, 및 DsRed의합성

[0048] 자기 조립되어 원통형의 나노입자를 형성하는 14개의 프로테아제 α 서브유닛으로 이루어진 *T. acidophilum* 프로테아좀 α^[33-36]는 각각의 서브 유닛의 N-말단에 헥사히스티딘을 갖도록 유전공학적으로 조작되었다.

[0049] NH₂-NcoI-헥사히스티딘-[*T. acidophilum* 프로테아좀 α의 모노머 서브유닛]-HindIII-COOH를 코딩하는 유전자 클론을 적당한 프라이머를 이용하여 PCR 증폭하고 pET28a (Kan⁺)(Novagen, Germany)의 NcoI-HindIII 클로닝 사이트에 라이게이션시켜, 재조합 프로테아좀 α 나노입자의 합성을 코딩하는 발현 벡터 pET28a-PROT를 제조하였다.

[0050] 한편, 12개의 모노머 서브유닛으로 이루어진 고유의 *E. coli* DPS는 *E. coli* 세포질 중에서 자기조립을 통해 10nm 직경의 구형 나노입자를 형성하며, 이는 N-말단 리신 클러스터로 인하여 높은 양성 표면 전하를 가지며, 그로 인하여 DNA에 대한 강한 친화성을 나타낸다^[32].

[0051] *E. coli* DPS 나노입자의 N- 및 C-말단은 입자의 바깥은 향해 있으므로 (도 2), DPS 입자 표면을 다양한 항원 펩타이드를 결합시켜 다양하게 기능화시킬 수 있다. 이를 이용하여, 도 2에서 볼 수 있는 바와 같이, 각각의 DPS

모노머의 C-말단에 각각 유방암 또는 대장암 항체에 의해 특이적으로 인식되는 항원 펩타이드[즉, BRCA1(breast cancer associated antigen 1)의 610-619 단편 또는 인간 HDAC3(histone deacetylase 3)의 411-428 단편]가 각각의 DPS 모노머의 C-말단에 연결되도록 E. Coli DPS를 유전공학적으로 조작하였다. 또한 금속 친화성 정제를 용이하게 하기 위해 히스티딘 태그를 DPS의 말단에 연결시켰다. 이렇게 유전공학적으로 조작된 DPS 나노입자는 DNA, 질환 마커, 및 니켈에 대한 3중의 친화성을 갖게 된다.

[0052] 이를 위해, NH₂-NdeI-헥사히스티딘-[E. coli DPS의 모노머 서브유닛]-G2SG2SGSGS-XhoI-COOH 및 NH₂-XhoI-[HDAC3의 411-429 단편]-BamHI-COOH (또는 NH₂-XhoI-[BRCA1의 610-619 단편]-BamHI-COOH)을 코딩하는 유전자 클론들을 적당한 프라이머를 이용하여 PCR 증폭하고, pT7-7 (Amp^r)의 NdeI-XhoI-BamHI 클로닝 사이트에 라이게이션시켜 표면에 노출된 펩타이드 HDAC3 (또는 BRCA1)를 갖는 재조합 DPS 나노입자의 합성을 코딩하는 발현 벡터 pT7-DPS-HDAC3 (또는 pT7-DPS-BRCA1)를 제조하였다(도 2).

[0053] NH₂-NdeI-헥사히스티딘-[eGFP(enhanced green fluorescence protein)]-G2SG2SGSGS-XhoI-COOH 및 NH₂-XhoI-[BRCA1의 610-619 단편]-BamHI-COOH 을 코딩하는 유전자 클론들을 PCR-증폭시키고, pT7-7의 NdeI-XhoI-BamHI 클로닝 부위에 라이게이션시켜 펩타이드 BRCA1과 연결된 재조합 eGFP의 합성을 코딩하는 발현 벡터 pT7-GFP-BRCA1를 생산하였다(도 2). 유사하게, pT7-7의 동일한 클로닝 부위 NdeI-XhoI-BamHI를 사용하여 NH₂-NdeI-헥사히스티딘-[DsRed(red fluorescence protein)]-G2SG2SGSGS-XhoI-COOH 및 NH₂-XhoI-[HDAC3의 411-429 단편]-BamHI-COOH을 코딩하는 PCR 증폭된 유전자 클론들을 라이게이션시켜 펩타이드 HDAC3와 연결된 재조합 DsRed의 합성을 코딩하는 발현 벡터 pT7-RED-HDAC3를 생산하였다(도 2).

[0054] DNA 시퀀싱을 완료한 후, 상기 발현 벡터들로 E. coli BL21 (DE3)[F⁻ompThsdS_B(rB⁻mB⁻)]을 형질전환시키고, 암피실린- (또는 카나마이신-) 내성 형질전환체를 최종적으로 선별하였다. 재조합 E. coli 배양, 유전자 발현, 단백질 나노입자의 정제는 우리의 이전 논문에 잘 기술되어 있다^[5, 6]. 유전공학적으로 조작된 DPS 및 프로테아솜 α의 합성은 SDS-PAGE 어세이를 통해 확인하였다.

[0055] 도 3에서 볼 수 있는 바와 같이, 재조합 DPS와 프로테아솜 α 나노입자는 pH 5.0 및 8.0의 수용액에서 충분히 긴 기간 동안 고유의 나노구조를 유지하였으며, 이는 이들 단백질 나노입자가 layer by layer 어셈블리의 공정을 위해 사용되기에 충분히 안정함을 나타낸다. 한편, 도 4에서 볼 수 있는 바와 같이, 재조합 프로테아솜 α 입자의 등전점은 제타 포텐셜 분석의 결과에서 6.6으로 나타났다.

[0056] **실시예 3: DPS 돌연변이입자에 대한 DNA의 결합을 평가하기 위한 젤시프트어세이(Gel shift assay)**

[0057] 유전공학적으로 조작된 DPS 입자가 야생형 DPS 입자와 동일한 DNA 결합 친화성을 갖는다는 것을 입증하기 위하여 DNA 프로브와 DPS 돌연변이 입자들의 배양 혼합물로 젤 시프트 어세이를 수행하였다.

[0058] 구체적으로, 야생형 DPS 입자와 표면에 노출된 BRCA1 또는 HDAC3 펩타이드를 갖는 DPS 돌연변이 입자의 DNA-결합 활성을 DNA 프로브로서 슈퍼-코일 형태의 pET 28a DNA (5369 bp, 20 nM)를 이용하여 젤 시프트 어세이를 통해 평가하였다^[6]. 재조합 프로테아솜 α 입자 또한 음성 대조군으로서 시험하였다. DNA 프로브를 TAE 버퍼 중에서 야생형 및 변이된 DPS 입자(3 mM)와 함께 pH 5 및 8에서 30분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. DNA 프로브 및 DNA-단백질 인큐베이션 혼합물을 동일한 TAE 버퍼 중에서 1% 아가로스 젤을 이용하여 젤-전기영동하였다.

[0059] 도 5는 단백질이 없는 DNA 프로브, 그리고 DNA 프로브 및 프로테아솜 α 입자의 배양 혼합물과 비교할 때, DNA 프로브와 야생형/돌연변이 DPS 입자의 배양 혼합물의 이동이 아가로스 젤 중에서 유의하게 지연되어 있음을 보여준다. 이는 야생형과 돌연변이 DPS 입자가 모두 DNA에 강하게 결합함을 나타낸다. 이전에 보고된 바와 같이,^[1] 도 6에서도 DPS 및 그의 2 개의 돌연변이의 DNA 결합 활성은 산성 조건 (pH 5)하에서 더 높음을 관찰할 수 있었다.

[0060] **실시예 4: layer-by-layer 어셈블리 및 다층 단백질 나노구조의 패턴화된 배열**

[0061] 도 7은 단백질 다층의 패턴화된 어레이에 대한 단백질 나노입자와 DNA의 반복적인 layer-by-layer 어셈블리에

대한 구체적인 과정을 개략적으로 설명하고 있다.

- [0062] 우선, 골드닷이 패턴화되어 배열되어 있는 니켈 플레이트를 96웰 플레이트 (Cat. No. 3599, Corning, NY, US A)의 각 웰에 맞출 수 있는 크기로(4 mm x 4 mm) 잘랐다(DASOM RMS, Seoul, Korea). 어셈블리 가공을 시작하기 전에 니켈 플레이트를 세척하고 아세톤으로 세정하였다. 그런 다음 1분의 초음파 분해 후 플레이트를 에탄올에 적시고 물로 3회 세척한 후, 다시 1분 동안 초음파 분해를 실시하였다.
- [0063] 그런 다음, PBS 버퍼(137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7.4) 중의 재조합 프로테아좀 α 입자(1.2 g/L)를 니켈 플레이트에 가하고, 천천히 교반하면서 20분 동안 인큐베이션한 후, 5분 동안 PBS 완충액(pH 7.4)으로 3회 세척하였다. 프로테아좀 α 입자에 결합된 핵사히스티딘 펩타이드의 니켈 친화성으로 인하여 재조합 프로테아좀 α 입자는 니켈 영역에 선택적으로 결합된다.
- [0064] 그 후, 단일 가닥 폴리A 올리고머 (20 bp) (pH 8.0 의 PBS 중 100 μM)를 플레이트에 가하고, 10분 동안 인큐베이션하고, 5분 동안 PBS 완충액(pH 8.0)으로 2회 세척하였다. 이는 폴리아데닌과 금 간의 강력하고도 선택적인 친화성[37,38]을 이용한 것으로서, 골드닷에만 선택적으로 폴리A가 결합되게 된다. 폴리A 올리고뉴클레오타이드가 골드 닷에 결합할 때에는 완충액의 pH가 8.0을 유지하게 되므로, 재조합 프로테아좀 α 입자의 네트 전하는 음전하를 띠게 됨으로써(도 4), 가해진 폴리A와 프로테아좀 α 입자 간의 비선택적인 결합을 방지할 수 있게 된다.
- [0065] 그 다음에는, 완충액을 교환하여 pH를 5.0으로 전환시키고, PBS 완충액 (pH 5.0) 중의 재조합 DPS 입자(0.5 g/L)를 가하고, 천천히 교반하면서 플레이트와 함께 5분 동안 인큐베이션한 후, PBS 완충액 (pH 7.4)으로 5분 동안 2회 세척하여, 골드닷에만 형성된 DPS의 제1층을 만들었다. 완충액을 교환하여 다시 pH를 8.0으로 되돌려, 제1층의 DPS 입자에만 결합하도록 이중가닥 DNA 분자(519 bp) (34 nM, pH 8.0)를 가한 후, 10분 동안 인큐베이션하고, PBS 완충액 (pH 8.0)으로 5분 동안 2회 세척하였다. 제2층부터 제7층까지의 DPS 입자의 형성을 위해, 재조합 DPS 입자와 이중 가닥 DNA가 교대로 가해졌으며 동시에 완충액을 교환하여 pH 또한 8.0 내지 5. 변동시켰다.
- [0066] 가해진 Dps 입자와 이중 가닥 DNA는 니켈 표면을 덮고 있는 프로테아좀 α 입자와는 거의 결합하지 않는다. 왜냐하면 프로테아좀 α 입자의 네트 전하가 적당한 버퍼 pH 전환에 의해 Dps 입자 또는 이중 가닥 DNA와 동일한 전하로 조정되고 있기 때문이다(도 8). Layer-by-layer 어셈블리는 골드닷 상에서만 발생하게 되므로, Dps 입자의 다층은 골드닷과 동일한 어레이 패턴을 갖게 된다.
- [0067] **실시예 5: TEM 및 AFM 분석**
- [0068] 전자 현미경 관찰을 위한 정제된 단백질 용액의 염색되지 않은 샘플을 탄소 코팅된 구리 전자 현미경 그리드 (grids) 상에 샘플 용액의 작은 방울을 자연건조시켜 제조하였다. 단백질 나노입자의 염색된 이미지를 얻기 위해, 자연 건조된 샘플을 포함하는 전자 현미경 그리드를 2% (w/v) 수성 우라닐 아세테이트 용액과 함께 10분 동안 실온에서 인큐베이션하고, 증류수로 3-4회 세척하였다. 단백질 나노입자 이미지를 Philips Technai 120 kV 전자 현미경을 이용하여 관찰하였다. 높은 회절 강도를 얻기 위하여 단백질 나노입자가 차지하고 있는 선택된 영역으로부터 전자 회절 패턴을 기록하였다. 단백질 다층의 패턴화된 배열의 AFM 분석을 위한 스캐닝 프로브 실험을 탭핑 모드에서 상업적인 기계를 이용하여 수행하였다(AutoProbe CP from Park Scientific Instruments (PSI), Sunnyvale, CA).
- [0069] AFM(도 8)에 의한 2D 및 3D 이미지와 수직 섹션 분석을 통해, 재조합 Dps 입자의 layer-by-layer 어셈블리와 다층 단백질 나노기둥의 패턴화된 어레이의 형성은 주어진 주형 상에 성공적으로 이행되는 것을 주목할 수 있었다. 상대적으로 큰 크기(519 bp)를 갖는 최초로 가해진 이중 가닥 DNA가 이중 가닥 DNA와 음으로 하전된 프로테아좀 α 입자 간의 반발로 인하여, 높은 측면의 표면에 결합하지 않고, 제1 DPS 층의 넓은 윗쪽 표면에 보다 잘 결합하는 것으로 나타났다. 유사하게 새로이 가해진 이중 가닥 DNA와 이전에 결합된 이중 가닥 DNA 간의 동일한 전하-전하 반발력은 계속적으로 가해진 이중 가닥 DNA가 DPS 층의 넓은 윗쪽 표면에 더 잘 결합하도록 유도하였으며, 이는 수직 방향으로의 연속적인 다층 성장이 일어나도록 하였다.
- [0070] **실시예 4: 유방암및대장암항체마커의탐지**
- [0071] 각기 다른 항원성 펩타이드를 입자 표면에 디스플레이 하고 있는 각기 다른 타입의 재조합 DPS 입자를 이용하여 이중성의 다층을 쉽게 형성할 수 있으며, 이들 각각은 항체 마커에 대하여 특이적이다(도 7). 이는 이중성 다층

의 패턴화된 어레이를 이용하여 복수의 항체 마커의 동시적 탐지가 가능함을 나타낸다 (도 9a). 탐지 신호는 항체-특이적 항원성 펩타이드(즉, BRCA1 (유방암의 항원성 펩타이드) 또는 HDAC3 (대장암의 항원성 펩타이드))와 결합된 재조합 녹색 또는 적색 형광 단백질(즉, 유전공학적으로 조작된 eGFP 또는 DsRed) (도 2 및 도 9a)을 이용하였다. 유방암과 대장암은 개발도상국과 선진국 모두에서 가장 흔한 암이며, 그들이 조기에 탐지될 때 상대적으로 치료가 가능한 암에 해당한다^[39]. 최근, 혈청 항체들이 암의 탐지에서 유용한 바이오마커로서 출현하였다^[40]. 보고된 바에 따르면^[41], 펩타이드 BRCA1 에피토프는 65%의 유방암 검체에서 양성 발현을 나타내며, 이는 그의 혈청 항체 수준이 유방암 진단을 위해 도움이 될 수 있음을 제시한다. 또한, Weichert 등은 대장암에 대한 혈청학적 항원/바이오마커로서 HDAC3에 대한 항체의 탐지를 제안한 바 있다^[42]. 이러한 최근의 발견들은 항체 탐지 기반의 진단이 암 진단에 대해 임상적으로 유의할 수 있음을 제시한다.

[0072] 우선, 우리는 표면에 노출된 BRCA1를 갖는 재조합 DPS 입자를 이용하여 1, 3, 5, 및 7 층의 나노구조를 갖는 4 개의 상이한 어레이를 준비하고, 상기 동질의 다층을 유방암 항체 마커 (1 pM)를 탐지하기 위해 사용하였다 (도 9a).

[0073] 보다 구체적으로, 상기 DPS 다층의 패턴화된 어레이에, PBS 중에 포함된 래빗 항-BRCA1 다클론 항체(1.0 pM) (Cat. No. ab36962, Abcam, Cambridge, UK) 및/또는 마우스 항-HDAC3 단클론 항체(1.0 pM) (Cat. No. ab49992, Abcam, Cambridge, UK)를 가하고, 1시간 동안 천천히 교반하면서 인큐베이션하고, PBS 완충액 (pH 7.4)으로 15 분 동안 2회 세척하였다.

[0074] 그런 다음, 상기 항체의 존재를 알려주는 신호입자로서 사용되는, 유전공학적으로 조작된 BRCA1 펩타이드가 결합되어 있는 eGFP (0.2 g/L) 및/또는 HDAC3 펩타이드가 결합되어 있는 DsRed (0.2 g/L)를 가하고, 1시간 동안 천천히 교반하면서 인큐베이션한 후, PBS 완충액 (pH 7.4)으로 15분 동안 2회 세척하고, 마이크로플레이트 리더기(GENios, Tecan, Austria)를 이용하여 녹색과 적색 형광을 측정하였다. 녹색 형광에 대한 여기 및 발광 파장은 각각 485 및 535 nm였다. 음성 대조군 실험에 대하여, 우리는 비-마커 항체, 또는 항-염소 폴리클로날 IgG (1.0 pM) (Cat. No. sc2384, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)를 사용하였다.

[0075] 그 결과, 녹색 형광 강도는 전체 층 수가 증가함에 따라 점진적으로 증가하였으며(도 9b)), 이는 3차원적 배치가 보다 선택적으로 마커들을 탐지함을 나타낸다. 보고된 바에 따르면, 3차원적 나노구조는 타겟 단백질 마커가 캡처 프로브에 대한 향상된 접근성을 갖도록 해 준다.^[28, 43] 이 경우, 다층 단백질 나노구조는, 통상적인 이차원적 분석법에서 오직 선행 분산이 일어나는 것과 달리, 항체 마커와 같은 큰 분자의 방사형의 분산을 허락해주며, 그에 따라 센싱 부위에 대한 접근성과 탐지 민감도를 유의하게 증가시킨다. DPS 입자가 한 층도 없는 경우 형광 신호는 무시할만 했다는 점(도 9b)도 주목할만 했다. 이는 템플릿의 니켈 표면이 재조합 프로테아좀 α 입자에 의해 완전히 덮여, 재조합 eGFP가 노출된 니켈 표면에 결합하는 것을 막았다는 것을 의미한다.

[0076] 다음으로, 2종의 상이한 유형의 재조합 DPS 입자를 이용하여 이중성 다층 어셈블리를 형성하였다. 즉, 제1층 내지 제4층과 제5층 내지 제7층이 각각 HDAC3와 BRCA1 펩타이드를 갖는 각기 다른 DPS 입자로 이루어져 있는 이중성 다층 어셈블리를 형성하였다(도 7 및 도 9a). 이중성 7층의 나노구조의 어레이를 유방암과 대장암 마커 모두의 탐지를 위해 사용하였을 때(도 9a), 유방암과 대장암 항체(1 pM)가 그들을 별도로 어레이에 가했을 때 재빨리 탐지되었다(도 9c). 항체 마커들 모두가 동일한 샘플 내에 존재할 때, 그들은 또한 동시에 녹색과 적색 형광을 발광하며 명확하게 관찰되었다(도 9c). 게다가, 2종의 항체 마커(1 pM)의 다중 탐지는 상기 마커들이 인간 혈청 중에 함유되어 있을 때조차도 성공적으로 재현되었다(도 9d). 2개의 음성 대조군 분석이 또한 수행되었다(도 9c 및 도 9d). 음성 대조군 1은 항체 마커가 없는 PBS 완충액 또는 인간 혈청(NC1)으로 수행되었으며, 음성 대조군 2는 비-마커 항체 (즉, 소 항-염소 폴리클로날 IgG)를 함유한 PBS 완충액 또는 인간 혈청(NC2)으로 수행되었다. 음성 대조군 양쪽 모두에서, 형광 신호는 항체 마커 어레이와 비교하여 충분히 낮았으며, 이는 2개의 상이한 암 마커의 독립적인 그리고 동시적인 분석에서 탐지가 특이적이었음을 나타낸다.

[0077] 참고문헌

- [0078] [1] R. A. Fischer, C. Woll, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, *48*, 6205.
- [0079] [2] J. Cho, J. F. Quinn, F. Caruso, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 2270.
- [0080] [3] H. P. Yap, J. F. Quinn, S. M. Ng, J. Cho, F. Caruso, *Langmuir* **2005**, *21*, 4328.
- [0081] [4] J. Cho, J. Hong, K. Char, F. Caruso, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9935.

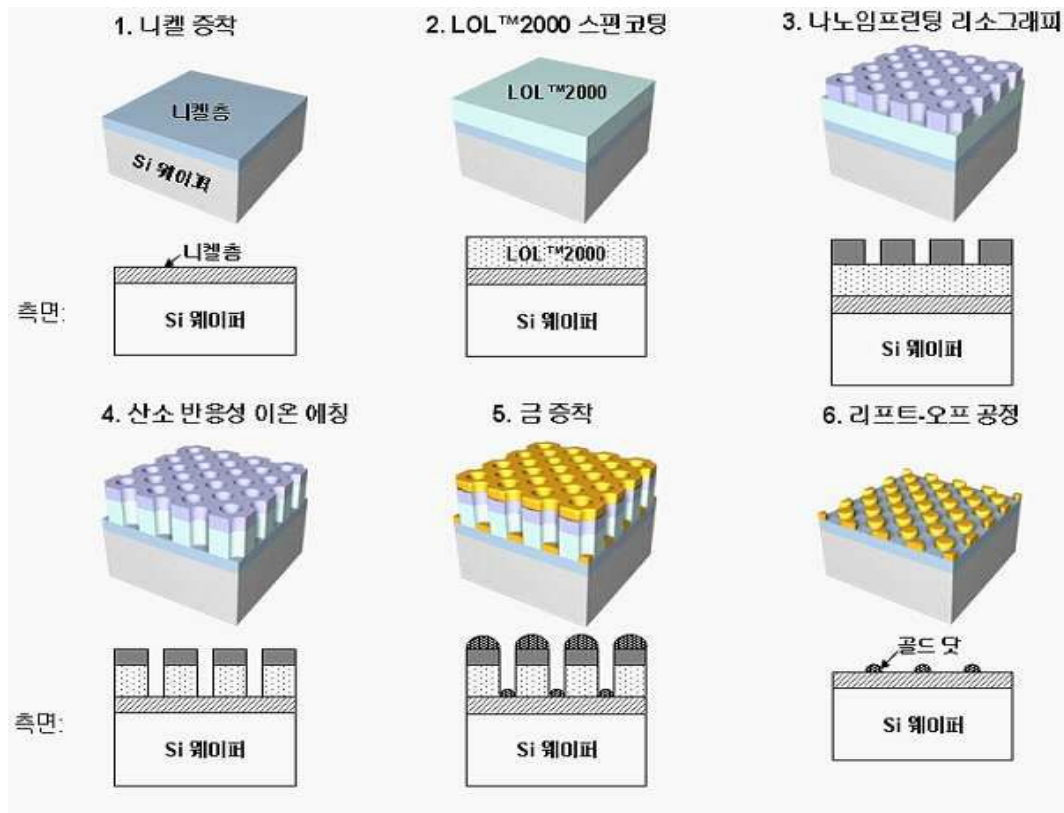
- [0082] [5] J. S. Lee, J. Cho, C. Lee, I. Kim, J. Park, Y. M. Kim, H. Shin, J. Lee, F. Caruso, *Nat. Nanotechnol.* **2007**, 2, 790.
- [0083] [6] J. Cho, H. Jang, B. Yeom, H. Kim, R. Kim, S. Kim, K. Char, F. Caruso, *Langmuir* **2006**, 22, 1356.
- [0084] [7] C. H. Choi, C. J. Kim, *Nanotechnology* **2006**, 17, 5326.
- [0085] [8] M. Park, C. Harrison, P. M. Chaikin, R. A. Register, D. H. Adamson, *Science* **1997**, 279, 1401.
- [0086] [9] O. H. Park, J. Y. Cheng, M. Hart, T. Topuria, P. M. Rice, L. E. Krupp, R. D. Miller, H. Ito, H.-C. Kim, *Adv. Mater.* **2008**, 20, 738.
- [0087] [10] Y. Kim, H. J. Joyce, Q. Gao, H. H. Tan, C. Jagadish, M. Paladugu, J. Zou, A. A. Suvorova, *Nano Lett.* **2006**, 6, 599.
- [0088] [11] J. H. Woodruff, J. B. Ratchford, I. A. Goldthorpe, P. C. McIntyre, C. E. Chidsey, *Nano Lett.* **2007**, 7, 1637.
- [0089] [12] S. Y. Yang, M. F. Rubner, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 2100.
- [0090] [13] F. Hua, J. Shi, Y. Lvov, T. Cui, *Nano Lett.* **2002**, 2, 1219.
- [0091] [14] H. P. Zheng, I. Lee, M. F. Rubner, P. T. Hammond, *Adv. Mater.* **2002**, 14, 569.
- [0092] [15] S. Jaffar, K. T. Nam, A. Khademhosseini, J. Xing, R. S. Langer, A. M. Belcher, *Nano Lett.* **2004**, 4, 1421.
- [0093] [16] M. L. Yuri, L. Zhongqing, B. S. John, Z. Xiaolin, F. R. James, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 4073.
- [0094] [17] S. Kang, P. A. Suci, C. C. Broomell, K. Iwahori, M. Kobayashi, I. Yamashita, M. Young, T. Douglas, *Nano Lett.* **2009**, 9, 2360.
- [0095] [18] N. F. Steinmetz, G. Calder, G. P. Lomonossoff, D. J. Evans, *Langmuir* **2006**, 22, 10032.
- [0096] [19] P. A. Suci, M. T. Klem, F. T. Arce, T. Douglas, M. Young, *Langmuir* **2006**, 22, 8891.
- [0097] [20] N. F. Steinmetz, E. Bock, R. P. Richter, J. P. Spatz, G. P. Lomonossoff, D. J. Evans, *Biomacromolecules* **2008**, 9, 456.
- [0098] [21] J. Fu, R. B. Schoch, A. L. Stevens, S. R. Tannenbaum, J. Han, *Nat. Nanotechnol.* **2007**, 2, 121.
- [0099] [22] M. Yamada, P. Mao, J. Fu, J. Han, *Anal. Chem.* **2009**, 81, 7067.
- [0100] [23] K. Y. Hwang, H. K. Lim, S. Y. Jung, K. Namkoong, J. H. Kim, N. Huh, C. Ko, J. C. Park, *Anal. Chem.* **2008**, 80, 7786.
- [0101] [24] J. H. Park, M. G. Allen, M. R. Prausnitz, *J. Control Release*, **2005**, 104, 51.
- [0102] [25] T. Sjoström, M. J. Dalby, A. Hart, R. Tare, R. O. Oreffo, B. Su, *Acta Biomater.* **2009**, 5, 1433.
- [0103] [26] M. Nematollahi, D. W. Hamilton, N. J. Jaeger, D. M. Brunette, *J. Biomed. Mater. Res. A*, **2009**, 91, 149.
- [0104] [27] A. J. Swiston, C. Cheng, S. H. Um, D. J. Irvine, R. E. Cohen, M. F. Rubner, *Nano Lett.* **2008**, 8, 4446.
- [0105] [28] J. S. Park, M. K. Cho, E. J. Lee, K. Y. Ahn, K. E. Lee, J. H. Jung, Y. Cho, S. S. Han, Y. K. Kim, J. Lee, *Nat. Nanotechnol.* **2009**, 4, 259.
- [0106] [29] J. D. Wulfschle, L. A. Liotta, E. F. Petricoin, *Nat. Rev. Cancer* **2003**, 3, 267.
- [0107] [30] D. Sidransky, *Nat. Rev. Cancer* **2002**, 2, 210.
- [0108] [31] M. Carpelan-Holmström, J. Louhimo, U. H. Stenman, H. Alfthan, C. Haglund, *Anticancer Res.*

2002, 22, 2311.

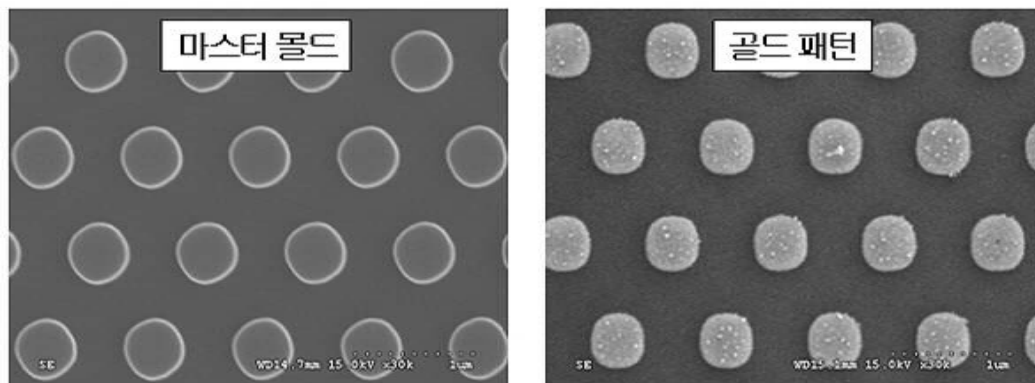
- [0109] [32] P. Ceci, S. Cellai, E. Falvo, C. Rivetti, G. L. Rossi, E. Chiancone, *Nucleic Acids Res.* **2004**, 32, 5935.
- [0110] [33] P. Zwickl, J. Kleinz, W. Baumeister, *Nat. Struct. Biol.* **1994**, 1, 765.
- [0111] [34] A. Grziwa, S. Maack, G. Puhler, G. Wiegand, W. Baumeister, R. Jaenicke, *Eur. J. Biochem.* **1994**, 223, 1061.
- [0112] [35] P. Zwickl, F. Lottspeich, W. Baumeister, *FEBS Lett.* **1992**, 312, 157.
- [0113] [36] S. Hutschenreiter, A. Tinazli, K. Model, R. Tampe, *EMBO J.* **2004**, 23, 2488.
- [0114] [37] A. Opdahl, D. Y. Petrovykh, H. Kimura-Suda, M. J. Tarlov, L. J. Whitman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, 104, 9.
- [0115] [38] R. E. Kelly, W. Xu, M. Lukas, R. Otero, M. Mura, Y. J. Lee, E. Laegsgaard, I. Stensgaard, L. N. Kantorovich, F. Besenbacher, *Small* **2008**, 4, 1494.
- [0116] [39] P. Pisani, F. Bray, D. M. Parkin, *Int. J. Cancer* **2002**, 97, 72.
- [0117] [40] H. Lu, V. Goodell, M. L. Disis, *Expert Opin. Ther. Targets* **2007**, 11, 235.
- [0118] [41] D. Cui, G. Jin, T. Gao, T. Sun, F. Tian, G. G. Estrada, H. Gao, A. Sarai, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2004**, 13, 1136.
- [0119] [42] W. Weichert, A. Roske, S. Niesporek, A. Noske, A. C. Buckendahl, M. Dietel, V. Gekeler, M. Boehm, T. Beckers, C. Denkert, *Clin. Cancer Res.* **2008**, 14, 1669.
- [0120] [43] J. H. Lee, J. S. Kim, J. S. Park, W. Lee, K. E. Lee, S. S. Han, K. B. Lee, J. Lee, *Adv. Funct. Mater.* **2010**, 20, 2004.

도면

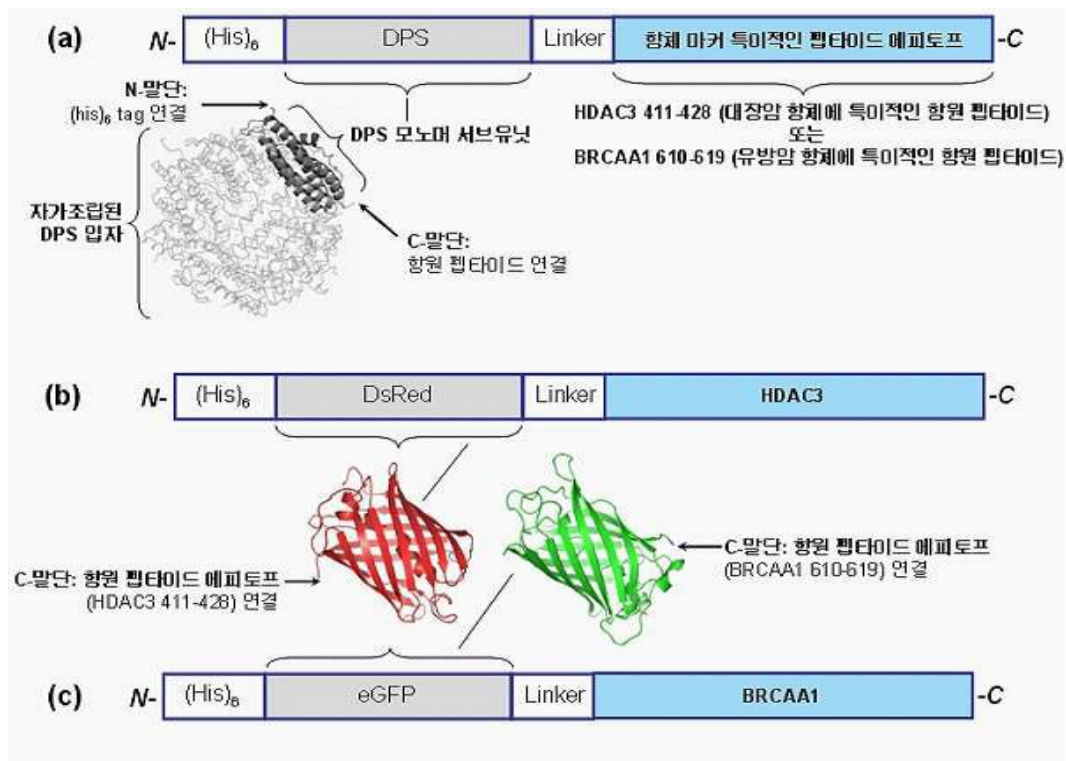
도면1a



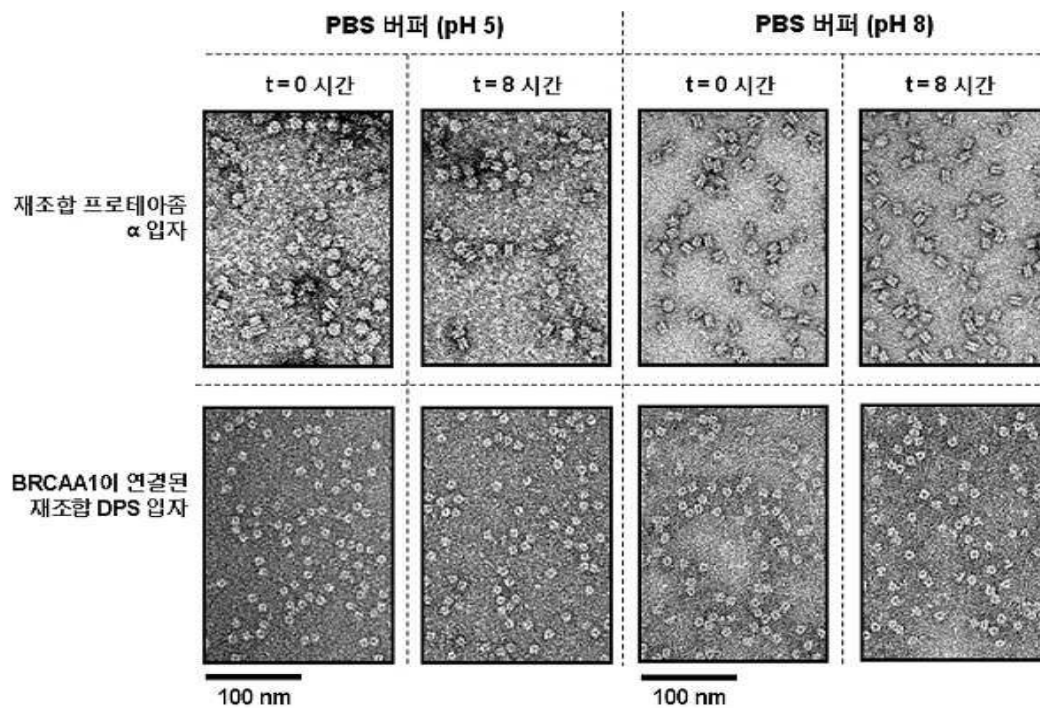
도면1b



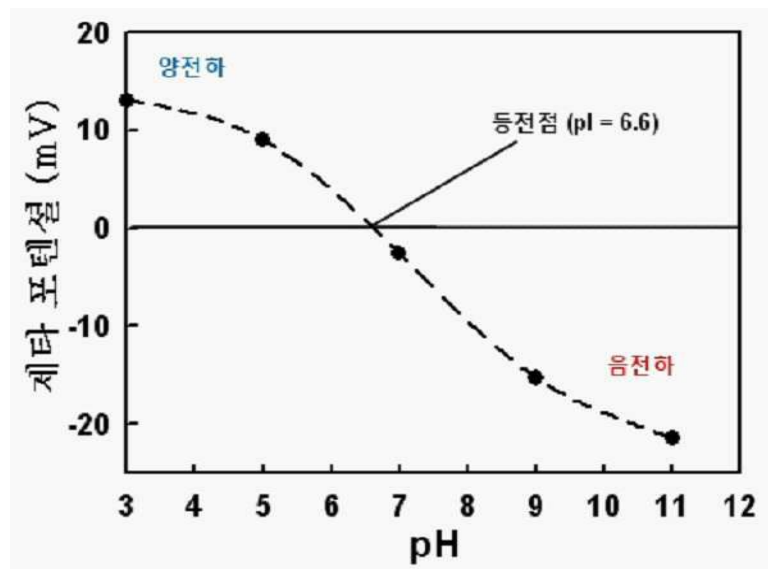
도면2



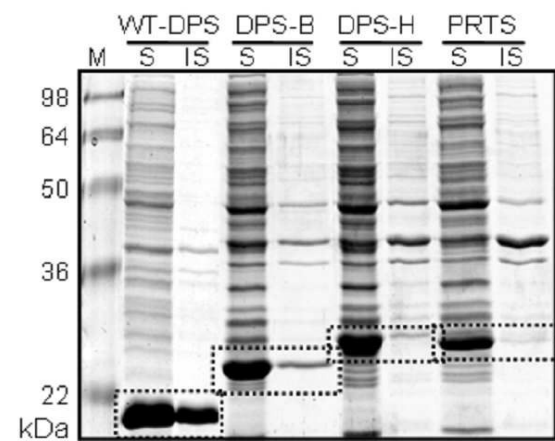
도면3



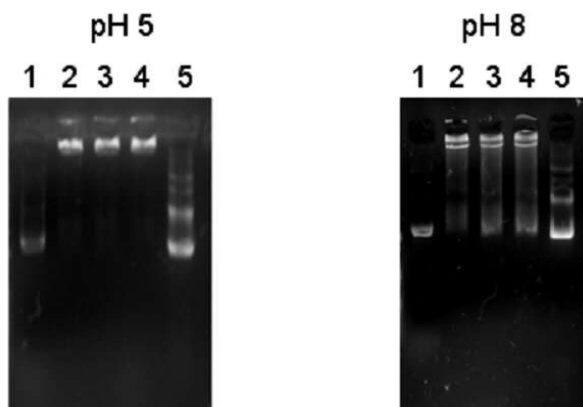
도면4



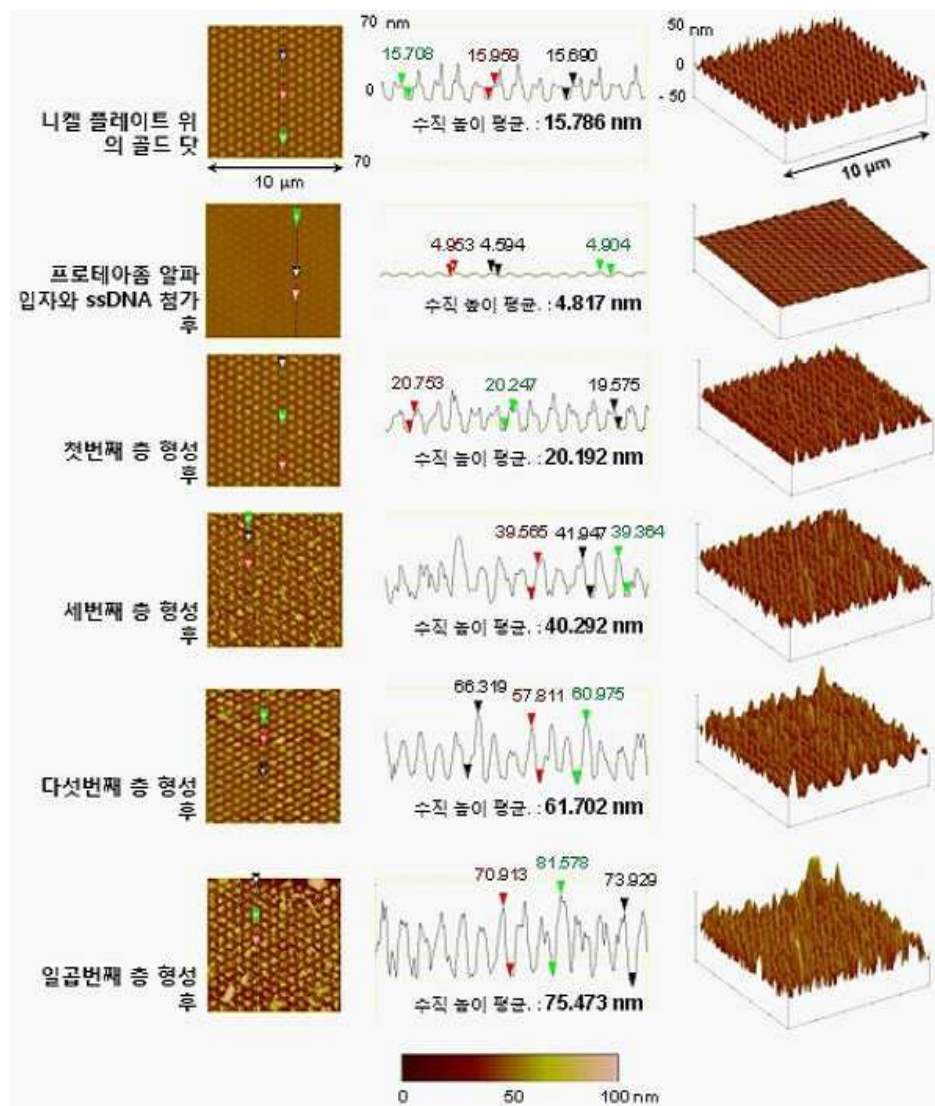
도면5



도면6



도면8



도면9

