(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0072952
(43) 공개일자 2024년05월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0775 (2010.01) *C12Q 1/24* (2017.01)
B82Y 5/00 (2017.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0662 (2013.01)
C12Q 1/24 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0159687
(22) 출원일자 2023년11월17일
심사청구일자 2023년11월17일
(30) 우선권주장
1020220154501 2022년11월17일 대한민국(KR)
기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인
가톨릭대학교 산학협력단
서울특별시 서초구 반포대로 222, 가톨릭대학교 성의교정내 (반포동)
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
조미라
서울특별시 용산구 이촌로 156, 11층 1103호
이선영
서울특별시 강서구 곰달래로15가길 8, 202호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
위병갑

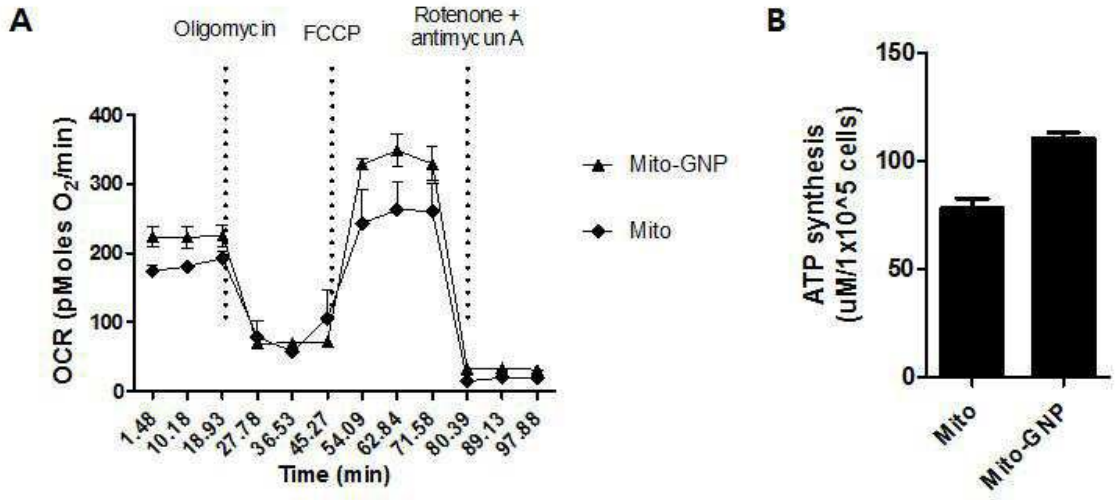
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **나노융합체를 이용한 줄기세포 유래 기능 강화형 미토콘드리아 분리법**

(57) 요 약

본 발명의 금나노입자가 부착된 기능 강화 미토콘드리아는, 미토콘드리아의 호흡량이 증가하고, ATP 합성능이 증가하는 것을 확인하여, 기능 강화된 미토콘드리아를 분리할 수 있는 것을 확인하여, 미토콘드리아 기능을 이용한 치료제 분야에 유용하게 이용할 수 있다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
B82Y 5/00 (2013.01)
C12N 2509/10 (2013.01)
(72) 발명자
우진석
경기도 의정부시 평화로230번길 36, 203동 1403호
이아람
경상남도 진주시 문산읍 월아산로1117번길 5, 104동 1101호
이채림
서울특별시 서초구 효령로 423, 1203호
강태욱
서울특별시 양천구 목동중앙로 143, 101동 406호
조유승
제주특별자치도 제주시 애월읍 광령서길 25-16

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1465038774
과제번호 HV22C0069
부처명 보건복지부
과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원
연구사업명 미래성장 고부가가치 백신 개발사업
연구과제명 비멘틴 병인 표적 난치 자가면역질환 전신경화증 치료용 나노융합 백신 개발
기 여 율 50/100
과제수행기관명 가톨릭대학교 산학협력단
연구기간 2023.01.01 ~ 2023.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711154939
과제번호 2020R1A2C3012167
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명 플라스모닉 메타물질 대면적 고속전사 프린팅 공정기반 집적소자 제작 및 분자 검출 응용
기 여 율 50/100
과제수행기관명 서강대학교
연구기간 2022.03.01 ~ 2023.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

금나노입자(Gold nano particle)가 부착된 기능 강화 미토콘드리아.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 미토콘드리아는 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cells, MSC) 유래 미토콘드리아인 것인, 미토콘드리아.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 금나노 입자는 HAHC-GNP(hydroxylaminehydro chloride-capped GNPs)인 것인, 미토콘드리아.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 기능 강화 미토콘드리아는, 미토콘드리아 호흡량이 증가된 것인, 미토콘드리아.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 기능 강화 미토콘드리아는, ATP 합성능이 증가된 것인, 미토콘드리아.

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 기능 강화 미토콘드리아는, 미토콘드리아 막전위가 증가된 것인, 미토콘드리아.

청구항 7

중간엽 줄기세포에서 미토콘드리아를 분리하는 단계; 및

상기 분리된 미토콘드리아에, 금 나노 입자(Gold nano particle)을 반응 시키는 단계;를 포함하는, 기능 강화 미토콘드리아의 제조 방법.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 금 나노 입자는 HAHC-GNP(hydroxylaminehydro chloride-capped GNPs)인 것인, 제조방법.

청구항 9

중간엽 줄기세포에서 미토콘드리아를 분리하는 단계;

상기 분리된 미토콘드리아에, 금 나노 입자(Gold nano particle)를 부착 시키는 단계; 및

상기 금 나노 입자가 부착된 미토콘드리아에서, 금 나노 입자와 미토콘드리아의 부착을 확인하는 단계;를 포함하는, 기능 강화 미토콘드리아의 분리 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은, 나노융합체를 이용한 줄기세포 유래 기능 강화형 미토콘드리아 분리법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 미토콘드리아는 세포 내 에너지 공급원인 아데노신 트라이포스페이트(ATP)의 합성 및 조절에 관여하는 진핵세포의 세포 소기관이다. 미토콘드리아는 생체 내 다양한 대사 경로, 예를 들어, 세포 신호처리, 세포 분화, 세포사멸 뿐만 아니라, 세포 주기 및 세포 성장의 제어와 연관이 있다. 미토콘드리아는 자신의 유전체를 보유하고 있으며, 세포의 에너지 대사에 중추적 역할을 하는 소기관이다. 미토콘드리아는 전자 전달 및 산화적 인산화 과정을 통해 에너지를 생산하며, 세포사멸 신호 전달 경로에 관여하는 등 중요한 역할을 한다.

[0003] 미토콘드리아의 기능 저하에 의한 에너지 생산 감소는 다양한 질병을 유발하는 것으로 보고된 바 있다. 미토콘드리아 유전체 및 단백체의 변이에 따라 전자전달연쇄반응의 기능이 저하될 경우, ATP 생산 감소, 활성산소 과다 생성, 칼슘 조절 기능의 저하 등이 일어나게 된다. 이러한 경우 미토콘드리아의 막 투과성에 변화가 일어나 세포사멸의 기능이 비정상적으로 일어나게 되고 이에 따른 암 및 난치성 질환이 야기될 수 있다.

[0004] 이와 같이 미토콘드리아 기능 이상에 의해 발생하는 인간 질병으로는 미토콘드리아 관련 유전병, 당뇨병, 심장질환, 파킨슨병이나 알츠하이머병 등과 같은 노인성 치매, 그리고 각종 암의 발생과 암전이 등이 보고된 바 있다. 또한, 200여종 이상의 다양한 암에서 공통적으로 발견되는 특징은 세포사멸(apoptosis) 기능의 손상, 염증반응의 증가, 그리고 비정상적인 대사 작용의 증가로 이루어졌다. 또한, 현재 미토콘드리아와 면역질환과의 관련성에 대한 연구가 진행되고 있다.

[0005] 미토콘드리아 내부에 세포사와 밀접한 관계를 갖는 신호전달기전들이 존재하고 우리가 이들 신호를 해석하고 제어할 수 있다면 질병치료에 응용할 수 있다. 미토콘드리아 기능저하는 단일한 증상이나 질병이 아닌 인체 내 다양한 기관에서 다양한 질병으로 나타날 수 있어, 병든 미토콘드리아와 연관된 병소 및 질병 특이적인 치료법의 가능성이 제기되고 있으나 현재까지 정확한 타깃이나 합당한 치료기술 개발이 시급한 상태이다. 특히 세포내 증가한 활성산소종으로 인한 산화스트레스의 증가는 최근 심혈관·대사질환은 물론 퇴행성신경 질환에서의 세포학적·분자생물학적 근본 기전으로 제시되고 있으나, 현재까지 임상 및 전임상 단계에서 사용되는 대사성치료제 또는 항산화제 치료는 효과는 아직 논란의 여지가 있다. 따라서 손상되지 않은 미토콘드리아를 이식하거나, 미토콘드리아 기능을 직접 제어할 수 있는 막단백질 및 기질 단백질의 발현을 조절할 수 있는 미세표적화치료(micro-targeting therapy)로서의 유전자 치료법은 영구적 또는 반영구적 치료법으로서 가능성이 높은 전략일 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 금나노입자(Gold nano particle)가 부착된 기능 강화 미토콘드리아를 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 중간엽 줄기세포에서 미토콘드리아를 분리하는 단계; 및

[0008] 상기 분리된 미토콘드리아에, 금 나노 입자(Gold nano particle)을 반응 시키는 단계;를 포함하는, 기능 강화 미토콘드리아의 제조 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 중간엽 줄기세포에서 미토콘드리아를 분리하는 단계;

[0010] 상기 분리된 미토콘드리아에, 금 나노 입자(Gold nano particle)를 부착 시키는 단계; 및

[0011] 상기 금 나노 입자가 부착된 미토콘드리아에서, 금 나노 입자와 미토콘드리아의 부착을 확인하는 단계;를 포함하는, 기능 강화 미토콘드리아의 분리 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 금나노입자(Gold nano particle)가 부착된 기능 강화 미토콘드리아를 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 중간엽 줄기세포에서 미토콘드리아를 분리하는 단계; 및

[0014] 상기 분리된 미토콘드리아에, 금 나노 입자(Gold nano particle)을 반응 시키는 단계;를 포함하는, 기능 강화 미토콘드리아의 제조 방법을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 중간엽 줄기세포에서 미토콘드리아를 분리하는 단계;

[0016] 상기 분리된 미토콘드리아에, 금 나노 입자(Gold nano particle)를 부착 시키는 단계; 및

[0017] 상기 금 나노 입자가 부착된 미토콘드리아에서, 금 나노 입자와 미토콘드리아의 부착을 확인하는 단계;를 포함하는, 기능 강화 미토콘드리아의 분리 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0018] 본 발명의 금나노입자가 부착된 기능 강화 미토콘드리아는, 미토콘드리아의 호흡량이 증가하고, ATP 합성능이 증가하는 것을 확인하여, 기능 강화된 미토콘드리아를 분리할 수 있는 것을 확인하여, 미토콘드리아 기능을 이용한 치료제 분야에 유용하게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 본 발명의 금 나노 입자가 부착된 기능 강화 미토콘드리아의 제조 방법을 모식화한 것이다.

도 2는 본 발명의 금 나노 입자가 부착된 기능 강화 미토콘드리아의, 미토콘드리아 기능 강화 효과를 확인한 것이다(A: 미토콘드리아 호흡량 확인, B: ATP 합성능 확인).

도 3은 본 발명의 금 나노 입자가 부착된 기능 강화 미토콘드리아의, 금 나노 입자 부착을 암시야 현미경으로 확인한 도이다.

a: 암시야 현미경을 활용한 Mito-GNP 확인 모식도

b: 미토콘드리아, 금 나노 입자 및 Mito-GNP의 산란 이미지

c: 금 나노 입자의 확산을 활용한 Mito-GNP 형성 과정 확인 모식도

d: 확산 시간에 따른 미토콘드리아 및 금 나노 입자의 부착 확인

e: 한 개의 금 나노 입자에 대한 미토콘드리아 부착 과정 확인

도 4는 본 발명의 금 나노 입자가 부착된 기능 강화 미토콘드리아의 막전위 및 ATP 합성능을 확인한 도이다(A: 미토콘드리아 막전위 확인, B: ATP 합성능 확인).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 이하 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시예들을 상세히 설명한다. 이하의 설명에 있어, 당업자에게 주지 저명한 기술에 대해서는 그 상세한 설명을 생략할 수 있다. 또한, 본 발명을 설명함에 있어서, 관련된 공지 기능 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있다. 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다.

[0021] 따라서 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0022] 본 발명은 금나노입자(Gold nano particle)가 부착된 기능 강화 미토콘드리아를 제공한다.

[0023] 상기 금나노입자는 hydroxylamine hydrochloride가 캐핑 또는 결합된 GNP(HAHC-GNP)일 수 있고, 상기 금나노입자의 제조는 Inner-Membrane-Bound Gold Nanoparticles as Efficient Electron Transfer Mediators for Enhanced Mitochondrial Electron Transport Chain Activity; Nano Lett.2022, 22, 7927-7935에서 제시한 방법으로 제조할 수 있다.

[0024] 본 발명의 “미토콘드리아(mitochondria)”는 세포 소기관의 하나로, 세포 호흡에 관여하며, 호흡이 활발한 세포일수록 많은 미토콘드리아를 포함하고 있다. 미토콘트리아는 이중 막으로 둘러싸여 있으며 내부는 크리스테(Cristae)라고 불리는 구불구불한 내막으로 이루어져 있다. 그 속에는 DNA와 RNA가 존재하며 크기는 0.2~3 μm

로 세포호흡에 관여한다. 미토콘드리아의 가장 중요한 기능은 몸속으로 들어온 음식물을 통해서 에너지원인 ATP를 합성하는 역할이다. 미토콘드리아의 내막에는 'ATP합성효소'라는 단백질이 존재하는데 이것이 ATP를 만들어 내는 역할을 한다. 음식물을 통해 미트콘드리아의 내막과 외막 사이에 만들어진 수소이온이 미토콘드리아 내막으로 유입되고 ATP합성효소에 의해 인산과 ADP(2개의 인산과 아데노신이 결합한 형태)가 결합하여 ATP(3개의 인산과 아데노신이 결합한 형태)가 만들어진다. 또한, 미토콘드리아는 기능이 상실된 세포를 죽이는 역할을 하기도 하며, 이를 아폽토시스라고 하고, DNA가 파괴된 세포를 흡수하거나, DNA를 절편하여, 세포 사멸에 이르게한다. 또한, 이미 기능이 상실된 세포가 암세포나 다른 세포로 변이되는 것을 막기도 한다. 미트콘드리아는 호흡을 관장하는 중심적 구실을 하는 구조체며, 당(糖)이 지질(脂質)의 이화작용(異化作用)으로 생성되는 피루브산, 아세틸 CoA의 산화와 전자전달계를 통한 산화적 인산화에도 관여한다. 이렇게 미토콘드리아는 당과 지방산의 산화와 그것에 수반하는 산화적 인산화에 중심적 역할을 한다.

[0025] 본 발명의 “나노입자(nano-particle)”는 입자크기가 나노미터(nanometer) 단위로 표기될 수 있는 미세입자를 말한다.

[0026] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 미토콘드리아는 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cells, MSC) 유래 미토콘드리아인 것일 수 있다.

[0027] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 기능 강화 미토콘드리아는, 미토콘드리아 호흡량이 증가된 것일 수 있고, ATP 합성능이 증가된 것일 수 있으며, 미토콘드리아 막전위가 증가된 것일 수 있다.

[0028] 또한, 본 발명은 중간엽 줄기세포에서 미토콘드리아를 분리하는 단계; 및

[0029] 상기 분리된 미토콘드리아에, 금 나노 입자(Gold nano particle)을 반응 시키는 단계;를 포함하는, 기능 강화 미토콘드리아의 제조 방법을 제공한다.

[0030] 또한, 본 발명은 중간엽 줄기세포에서 미토콘드리아를 분리하는 단계;

[0031] 상기 분리된 미토콘드리아에, 금 나노 입자(Gold nano particle)를 부착 시키는 단계; 및

[0032] 상기 금 나노 입자가 부착된 미토콘드리아에서, 금 나노 입자와 미토콘드리아의 부착을 확인하는 단계;를 포함하는, 기능 강화 미토콘드리아의 분리 방법을 제공한다.

[0033] 상기 분리된 미토콘드리아와 금나노 입자를 부착하는 단계는 미토콘드리아와 금나노 입자를 1:8 내지 10 비율로 혼합하여 부착시킬 수 있다.

[0034] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0035] **<실시예 1> 금나노입자(Gold nano particle)를 이용한 기능 강화 미토콘드리아의 분리**

[0036] 본 발명의 기능 강화 미토콘드리아를 분리하기 위하여, 금나노입자(Gold nano particle, GNP)를 이용하였다. 구체적으로, 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cells, MSC)에서 미토콘드리아 분리하였다.

[0037] 보다 구체적으로, 미토콘드리아 용해 완충액(mitochondrial lysis buffer) 생성은, 10mM tris (pH7.4)에 수크로즈(sucrose) 250mM, HEPES (pH7.4) 20mM, $MgCl_2$ 5mM, KCl 10mM, EDTA 1mM, EGTA 1mM을 넣은 뒤 10% 디기토닌(digitonin)을 0.02% 프로테아제 억제제(protease inhibitor)와 혼합하였다. 세포는 트립신(trypsin)을 버퍼양의 1/5만큼 추가하여 얼음에서 5분간 배양하였다. 세포는 PBS 1mL로 재현탁 하여 중화시킨 뒤 원심분리 (700g, 5min, 4℃)하였다. PBS 제거 후 미토콘드리아 용해 완충액 1.5 mL를 넣고 현탁액을 2ml 실린더로 옮겼다. 균질화를 위하여 세포를 갈아주고(*homogenizer의 속도를 midium-에서 max 단계별로 올리고 각 세기마다 천천히 5회씩), 균질화가 끝나면 EP-튜브에 옮겼다. 원심분리(700g, 10min, 4℃) 이후 상층액만 새 EP-튜브로 옮겼다. EP-tube를 원심분리(12000g, 15min, 4℃) 하여 상층액을 제거하였다. 미토콘드리아 용해 완충액 200 μL에 현탁하고, 원심분리(12000g, 5min, 4℃)하였다. 상층액을 제거하고 남은 펠렛이 미토콘드리아 펠렛이다.

[0038] 상기 Mitochondrial 분석 마커인 CoxⅣ, cytosolic 마커는 튜불린(tubulin)을 통해 각각의 부분에 양성 또는 음성 마커로서 사용하며, 웨스턴 블롯팅을 하여 미토콘드리아 분리 순도를 확인하였다. 그 후 분리된 미토콘드리아 펠렛 100 μL (3.3μg)과 HAHC-GNP(hydroxylaminehydro chloride-capped GNPs) 900 μL를 혼합하여, 0 ℃ (in ice)에서 10분간 반응시켜, GNP가 라벨된 기능강화 미토콘드리아(미토콘드리아-GNP)를 수득하였다. 전체적인 GNP 기능강화 미토콘드리아의 수득방법은 도 1에 나타내었다.전체적인 GNP 기능강화 미토콘드리아의 수득방

법은 도 1에 나타내었다.

[0039] **<실시예 2> 미토콘드리아-GNP의 기능 강화 확인(1)**

[0040] 본 발명의 미토콘드리아-GNP에서 미토콘드리아의 기능이 강화되었는지 확인하였다. 구체적으로, 상기 실시예 1의 미토콘드리아-GNP(Mito-GNP)의 호흡량을 OCR assay를 이용하여 평가하였으며, OCR assay는 XF seahorse 장비를 이용하여서 측정되었다. Mito-GNP $1x10^6$의 농도로 OCR plate에 넣고, 미토콘드리아 전자전달계 억제제(Oligomycin 7mM, FCCP 3mM, Rotenone 10uM, Antimycin-A 10uM)를 OCR plate에 첨가하였다. 장비 사용은 XF seahorse 프로그램을 통해 진행하였다.

[0041] 또한, 미토콘드리아의 기능 강화를 확인하기 위하여 ATP 합성능을 확인하였으며, Mito-GNP를 $1x10^5$의 농도로 준비한 후, 준비된 Mito-GNP에 ADP 1mM을 자극하여 45분간 반응시킨 뒤, 키트를 이용하여 ATP 양을 측정하였다. 대조군으로는, 아무것도 처리하지 않은 MSC 유래의 미토콘드리아를 이용하였다.

[0042] 그 결과, 도 2A에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 금나노입자가 라벨된 Mito-GNP에서는 미토콘드리아의 호흡량이 대조군과 비교하여 유의적으로 증가한 것을 확인하였다. 또한, ATP 합성능은 Mito-GNP에서 대조군과 비교하여 유의적으로 증가한 것을 확인하여(도 2B), 본 발명의 Mito-GNP가 미토콘드리아의 기능이 강화된 것을 확인하였다.

[0043] **<실시예 3> 암시야 현미경을 이용한 GNP의 미토콘드리아 부착 확인**

[0044] 본 발명의 Mito-GNP 제작 시, 암시야 현미경을 활용하여 금 나노 입자가 미토콘드리아에 정상적으로 부착하는지 확인하였다. 도3a에 나타낸 바와 같이 유리 기판 사이에 미토콘드리아, 금 나노 입자, Mito-GNP 용액을 위치시킨 뒤 산란 이미지를 확인하였다. 그 결과, 미토콘드리아는 청백색을 띠고 있었으며 GNP는 초록색으로 산란하였다. 반면에 Mito-GNP의 경우 산란색은 노란색으로 이는 GNP 사이의 거리가 가까워졌을 때 흡수 파장이 길어져 나타나는 색상이며 산란면적이 미토콘드리아와 유사한 것으로 보아 미토콘드리아에 GNP가 부착된 것을 알 수 있다. (도3b). 다음으로 금 나노 입자가 미토콘드리아에 실시간으로 붙는 과정을 관찰하기 위해 도3c에 나타낸 바와 같이 미토콘드리아를 유리 기판 사이에 물리적으로 위치시킨 뒤 GNP 용액을 흘려주어 미토콘드리아로 확산하도록 설계하였다. 그 결과 도3d에 보이는 것처럼 GNP의 확산 시간이 증가함에 따라 미토콘드리아의 산란색이 백색에서 노란색으로 변화하며 산란 면적 또한 증가함을 확인하였다. 덧붙여 한 개의 GNP 대해 실시간으로 미토콘드리아에 붙는 과정을 추적한 결과 0.8s까지 개별적으로 관측되던 초록색 산란점 (GNP)이 청백색 산란점 (미토콘드리아)과 맞닿은 후 1.2s 이후에 보이지 않는 것으로 미루어 보아 GNP가 미토콘드리아에 부착됨을 알 수 있다 (도3e).

[0045] **<실시예 4> 미토콘드리아-GNP의 기능 강화 확인(2)**

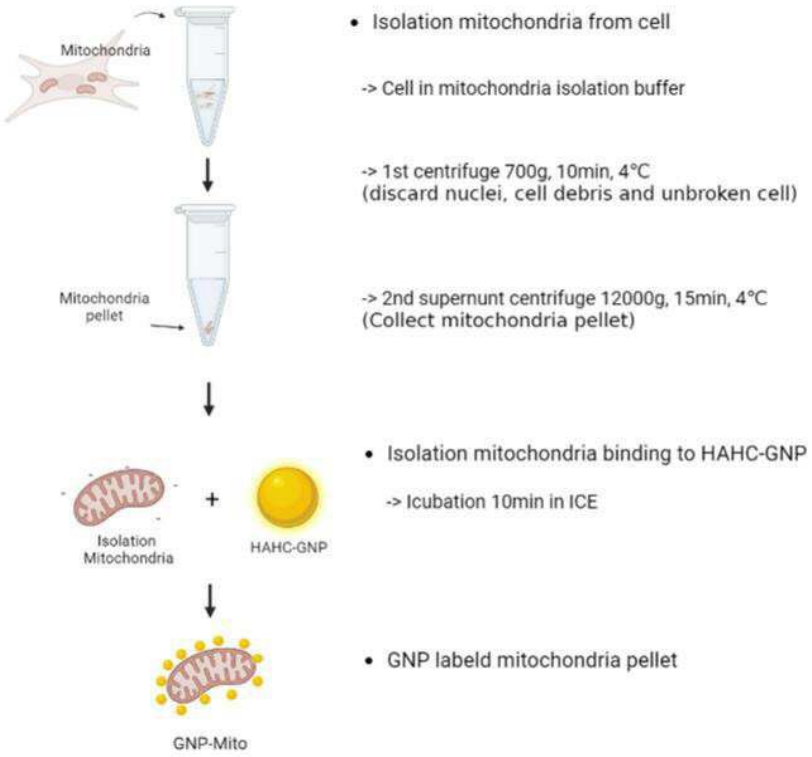
[0046] 본 발명의 Mito-GNP가 미토콘드리아 기능이 강화되었는지 추가로 확인하였다. 구체적으로, MSC에서 분리한 미토콘드리아와 HAHC-GNP를 결합시킨 후, Splenocyte ($5x10^5$cells)와 결합된 Mito-GNP (35 μl, 미토콘드리아 10000개)를 혼합하여, 1일간 공동배양(co-culture)하였다. 그 후 미토콘드리아 기능 평가를 위하여, JC-1 염색으로 미토콘드리아 막 전위를 유세포분석으로 분석하였다. 또한, ATP 합성능을 측정하기 위하여, ATP assay kit을 이용하여, ATP 합성능을 평가하였다.

[0047] 그 결과, 도 4A에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 Mito-GNP는 대조군과 비교하여, 미토콘드리아 막 전위가 유의적으로 증가하였으며, ATP 합성이 증가된 것을 확인하여(도 4B), 금 나노입자로 라벨된 미토콘드리아는, 미토콘드리아의 기능이 강화된 것을 확인하였다.

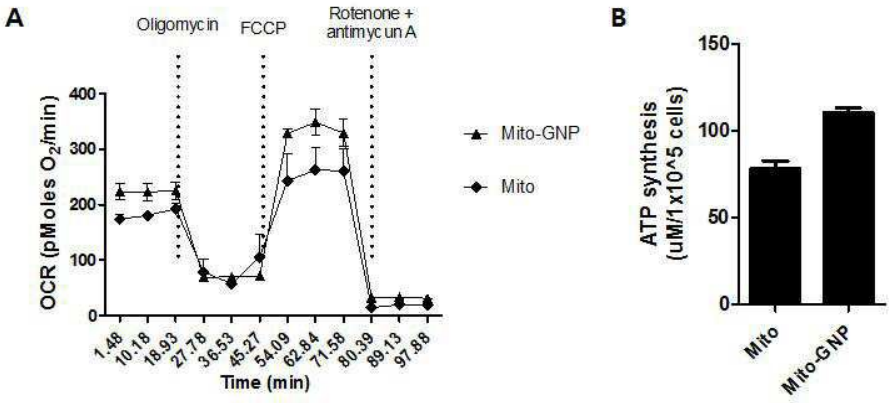
[0048] 따라서, 본 발명의 금나노입자가 라벨된 미토콘드리아는, 미토콘드리아의 호흡량이 증가하고, ATP 합성능이 증가하는 것을 확인하였다. 또한, 금나노입자가 미토콘드리아와 부착되어 있는 것을 확인하였으며, 금나노입자의 처리로, 미토콘드리아의 막전위가 능가하고, ATP 합성능이 증가하는 것을 확인하여, 기능 강화된 미토콘드리아를 분리할 수 있는 것을 확인하였다.

도면

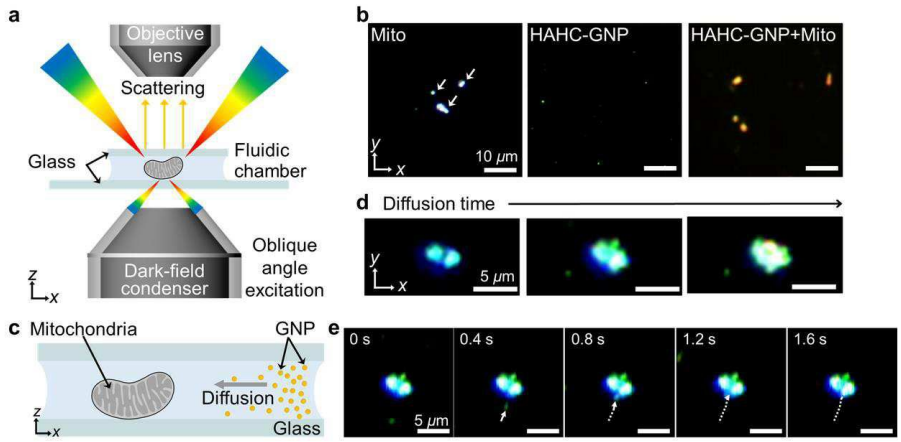
도면1


Mitochondria
• Isolation mitochondria from cell
-> Cell in mitochondria isolation buffer
-> 1st centrifuge 700g, 10min, 4°C
(discard nuclei, cell debris and unbroken cell)
Mitochondria pellet
-> 2nd supernunt centrifuge 12000g, 15min, 4°C
(Collect mitochondria pellet)
• Isolation mitochondria binding to HAHC-GNP
-> Icubation 10min in ICE
Isolation Mitochondria
HAHC-GNP
• GNP labeld mitochondria pellet
GNP-Mito

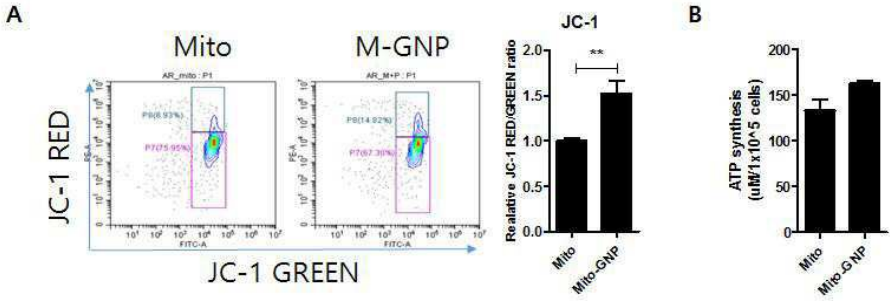
도면2


A
Oligomycin
FCCP
Rotenone + antimycun A
OCR (pMoles O2/min)
Time (min)
Mito-GNP
Mito
B
ATP synthesis (uM/1x10^5 cells)
Mito
Mito-GNP

도면3


a
Objective lens
Scattering
Glass
Fluidic chamber
Dark-field condenser
Oblique angle excitation
b
Mito
HAHC-GNP
HAHC-GNP+Mito
10 μm
d Diffusion time
5 μm
c Mitochondria
GNP
Diffusion
Glass
e
0 s
0.4 s
0.8 s
1.2 s
1.6 s
5 μm

도면4


A
Mito
M-GNP
JC-1 RED
JC-1 GREEN
JC-1
Realative JC-1 RED/GREEN ratio
**
Mito
Mito-GNP
B
ATP synthesis (uM/1x10^5 cells)
Mito
Mito-GNP