



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0091078
(43) 공개일자 2009년08월26일

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006.01) G01N 33/52 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0014715

(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

오제민

서울특별시 서초구 서초4동 삼풍아파트 16동 140
6호

박대환

대전광역시 대덕구 비래동 한신휴플러스 아파트
105동 1007호

(74) 대리인

이원희

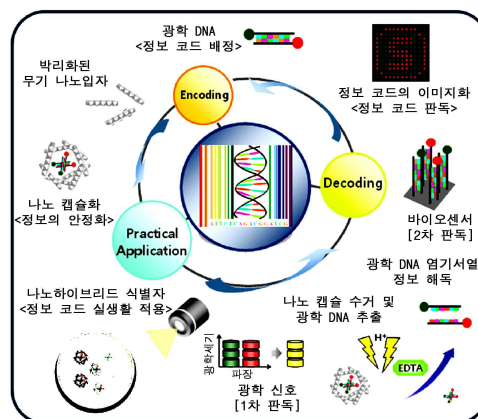
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 나노하이브리드 기술을 이용한 광학 유전자 코드 식별 시스템

(57) 요약

본 발명은 유전자를 이용하여 정보를 코드화하고 이를 판독하는 시스템에 관한 것으로, 구체적으로 형광체가 부착된 광학 유전자가 양이온성 나노물질로 캡슐화된 나노복합체를 포함하는 광학 유전자 코드 식별용 조성물을 이용한 광학 유전자 코드 식별 시스템에 관한 것이다. 본 발명의 광학 유전자 코드 식별 시스템은 진위 판별 및 이력 추적 등에 있어서 훼손 및 복제가 불가하고 신뢰도가 높은 정보를 제공하는 판별시스템으로 구축될 수 있다.

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

- i) 셸(shell)로서, 양이온성 전하를 띄는 나노물질; 및,
- ii) 코어(core)로서, 1차 형광체가 표지된 센스 단일가닥 광학 유전자 및 상기 센스 단일가닥 광학 유전자에 상보적인 염기서열을 갖고, 상기 1차 형광체와 다른 형광 특성을 갖는 2차 형광체가 표지된 안티센스 단일가닥 광학 유전자가 상보적으로 결합하여 형성된 이중가닥 광학 유전자;
- 로 구성된 나노복합체를 포함하는 광학 유전자 코드 식별용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 보안기술, 상품식별기술, 진위판별기술 또는 이력추적시스템, 위조복제 방지기술에 사용되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 형광체는 유기계 또는 무기계인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 유기계 형광체는 CYTM Dyes, Fluorescein, Alexa Fluor[®]Dyes, Bodipy[®]Dyes, CAL Fluor[®] Dyes, Oregon Green Dyes, Oyster[®] Dyes, Rhodamine Dyes, TAMRATM Dyes 및 WellRED Dyes로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 3항에 있어서, 상기 무기계 형광체는 금 나노입자, ZnS, CdSe, CdTe 및 CdS로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 유전자는 10 내지 1500 bp 길이를 갖는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 유전자는 플라스미드(Plasmid) DNA, 엔지니어드(Engineered) DNA, RNA 및 PNP(Peptide Nucleic Acid)를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제 1항에 있어서, 상기 나노물질은 고분자, 생분해성 고분자, 리포솜 및 무기 나노입자로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

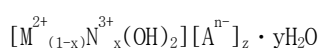
청구항 9

제 8항에 있어서, 상기 무기 나노입자는 양이온성 층전하를 띄는 박리화된 금속 이중층 수산화물(LDH: Layered Double Hydroxide)인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 박리화된 LDH는 하기 화학식 1의 층상형 LDH를 전구체(pristine)로 하며,

[화학식 1]



(상기 화학식 1에서,

M^{2+} 는 2가 금속 양이온이고,

N^{3+} 는 3가 금속 양이온이며,

상기 A는 음이온계 게스트(Guest) 화학종이며,

n은 A의 음이온의 전하수이며,

x는 0.1 초과 0.4 미만의 수이며,

z와 y는 0을 초과하는 양수이다).

M은 마그네슘(Mg^{2+}), 니켈(Ni^{2+}), 구리(Cu^{2+}) 및 아연(Zn^{2+})으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을,

N은 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 조성물.

청구항 11

제 1항에 있어서, 상기 광학 유전자의 염기서열과 형광체 사이에 스페이서를 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 12

제 1항의 조성물 및 도료를 포함하는 광학 유전자 코드 식별 시스템용 잉크 조성물.

청구항 13

제 12항에 있어서, 도료는 위·변조 방지용 특수 잉크, 상용의 잉크, 안료, 염료 및 페인트로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 잉크 조성물.

청구항 14

제 1항의 조성물이 포함된 광학 유전자 코드 식별 시스템용 라벨.

청구항 15

제 14항에 있어서, 상기 조성물은 라벨에 도포되거나, 라벨 제조시 첨가되거나, 라벨에 인쇄되어 포함되는 것을 특징으로 하는 라벨.

청구항 16

(i) 제 1항에 기재된 센스 단일가닥 광학 유전자에 상보적인 염기서열이 순차적으로 연결된 안티센스 단일가닥 유전자 프로브; 또는,

(ii) 제 1항에 기재된 안티센스 단일가닥 광학 유전자에 상보적인 염기서열이 순차적으로 연결된 센스 단일가닥 유전자 프로브;

가 고정기질에 점적된, 광학 유전자 코드 식별용 바이오센서.

청구항 17

- 1) 제 14항의 광학 유전자 코드 식별 시스템용 라벨의 형광을 검출하는 단계;
- 2) 형광이 검출되지 않으면 위조로 판정하고, 형광이 검출된 경우에는 상기 라벨에 산성용액을 처리하여 박리화된 금속 이중층 수산화물로 형성된 캡슐을 분해하는 단계;
- 3) 캡슐이 분해된 라벨로부터 광학 유전자만을 추출하는 단계;
- 4) 추출된 광학 유전자를 변성시킨 후, 제 16항의 바이오센서와 혼성화하는 단계;
- 5) 상기 혼성화된 바이오센서를 세척하여 결합하지 않은 광학 유전자를 제거하는 단계;

- 6) 상기 세척된 바이오센서를 건조한 후, 광학 이미지를 검출하는 단계; 및,
- 7) 상기 단계 6)에서 검출된 광학 이미지가 위조 또는 정품인지를 판별하는 단계를 포함하는, 제 16항의 광학 유전자 코드 식별용 바이오센서를 이용한 코드 식별 방법.

청구항 18

제 17항에 있어서, 단계 3) 광학 유전자 추출은 금속 양이온의 킬레이트를 형성하는 EDTA를 첨가하여 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

<1> 본 발명은 유전자를 이용하여 정보를 코드화하고 이를 판독하는 시스템에 관한 것이다.

배경 기술

<2> 일반적으로 정보 및 암호 코드 인식기술로 가장 많이 사용되는 것이 바코드이다. 바코드란 흑과 백의 막대 모양 기호로 문자나 숫자를 조합한 것으로, 데이터를 빠르게 입력하고 판독하기 위하여 사용된다. 워터마크(Watermark)도 지폐의 진위 판별에 자주 쓰이는 코드체계이며, 생체인식 기술로는 개인마다 다른 지문정보를 추출하여 정보화시키는 지문 인증과 사람마다 고유한 특성을 가진 안구의 홍채 정보를 이용해 사람을 인식하는 홍채인식이 있다. 그 이외에도 소형 반도체 칩을 이용해 사물의 정보와 주 환경정보를 전송·처리하는 비접촉식 인식시스템인 전파식별(Radio frequency identification) 시스템도 코드 인식 체계이다. 코드 및 암호 체계는 세계적인 표준화가 이루어지지 않았고 훼손 및 복제·위조로 인한 진위 여부의 판별 및 증명에 어려움이 발생할 수 있으며 예상치 못한 인권 침해 등을 유발할 수 있다는 문제점 등이 있다.

<3> 이러한 문제점들은 분자 수준의 기술로 극복할 수 있다. 눈에 보이지 않는 미세한 사이즈의 나노 식별자는 해당 개체에 고루 감지되므로 쉽게 탐지되지 않는다는 장점이 있으며 훼손 및 복제·위조 불가능하게 할 수 있다. 이러한 분자 수준의 코드로서 가장 적절한 것이 유전자의 염기서열을 정보 단위로 사용하는 것인데, 유전자의 염기서열은 생물의 모든 유전 정보를 모두 담을 수 있어 정보의 집적화면에서 매우 효율적이며 세계적으로 통용될 수 있는 판단 기준이 있어 신뢰성이 매우 높다. 따라서 의도적으로 디자인한 유전자 합성 기술은 극소량에서도 다중복합적으로 탐색해 낼 수 있는 검출법과 함께 생물 정보학, 의학 진단, 과학 수사 등의 분야에서 연구가 활발히 진행되고 있다(Condon A, *Nat. Rev. Genet.* 7:565-575, 2006). 무기 나노입자 역시 매우 작은 면적에 복잡한 정보 코딩이 가능하여 견고함을 바탕으로 오랫동안 지속할 수 있는 라벨링 기술에 사용되고 있다(Han M, *Nat. Biotechnol.* 19:631-635, 2001). 이와 발맞추어 신속하고 정확하게 단일 분자를 검출할 수 있는 MEMS(Micro Electro Mechanical Systems)나 NEMS(Nano Electro Mechanical Systems)는 회식, 혼합, 반응, 분리, 정량 등 유전자 시료의 모든 전처리 및 분석 단계를 소형화된 바이오센서에서 수행할 수 있는 랩온어칩(Lab on a Chip) 혹은 랩온어디스크(Lab on a Disk) 등의 개발에 접목되어 급진전하고 있다(Harold C, *Nature* 442:387-393, 2006; Cho Y-K *et al.*, *Lab Chip* 7:565-573, 2007).

<4> 최근에는 DNA 염기쌍 배열을 정보의 코드 단위로 사용하는 나노 DNA 바코드 시스템이 제안되었다(대한민국 등록특허 제10-0849465호; Choy JH, *Adv. Mater.*, 16, 1181-1184, 2004). 상기 시스템은 DNA를 무기 나노입자의 층간 사이에 삽입시킴으로써, 외부 환경에 노출되었을 경우 여러 가지 요인(효소, pH, 열) 등에 의하여 쉽게 파괴되고 변형이 일어날 수 있는 DNA를 안정화시켰고, 폴리피롤-마게마이트(polypyrrole-Maghemite)를 사용하여 DNA를 수집한 후, PCR(Polymerase chain reaction) 방법을 DNA 정보 코드를 판독하는 기술로 사용하였다. 하지만 상기 시스템은 실용화 측면에서 다음과 같은 여러 문제점이 있었다. 1) DNA 코드에는 현장 검출을 가능케 하는 탐침 구성 요소가 존재하지 않으며; 2) 거대 DNA 분자까지도 무기 나노 캡슐화시킬 수 없는 합성법의 취약점이 있고; 3) 장시간 소비 및 소량의 DNA가 요구되는 PCR 분석법 사용 등의 제약이 있다. 따라서 DNA가 실제로 바코드와 같은 실용적인 식별 시스템으로 사용되기 위해서는 DNA 정보 코드 생성과 그 분석 방법에 있어서의 획기적인 진보가 필요하다.

<5> 바이오 활성 분자 중에서도 유전자, 즉 DNA는 다양한 정보를 함유하고 있는 이상적인 분자로서 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.

- <6> 따라서 유전자 자체가 갖는 불안정한 문제점을 극복할 수 있으면서도 저장 및 보관 혹은 전달 효과를 높이기 위하여, 유전자를 안정화시킬 수 있는 무기 담체로서 층상형 무기 나노입자인 LDH(Layered double hydroxide)가 상당한 관심을 받고 있는바, 이에 대한 연구 역시 계속되어 왔다. 금속 이중층 수산화물 중의 하나인 LDH는 음이온 점토(anionic clays)라 불리는데, 양전하를 띤 금속 수산화물 층과 층간에 이 양전하를 상쇄시킬 음이온과 물로 구성되어 있다.
- <7> 현재까지는 바이오 활성 분자를 상기 LDH에 담지하기 위하여 이온 교환 반응 및 공침 반응의 층간 삽입 화학을 이용하였고, 그 결과 층상형 바이오-무기 나노 복합체가 제조되었다. 유전자가 LDH에 삽입된 유전자-LDH 나노 복합체 역시 이온 교환 반응 및 공침 반응을 통해 음이온인 유전자가 양이온성 층 전하를 갖는 LDH의 층간에 강한 정전기적 인력에 의해 도입되어 유전자-LDH가 교대로 쌓여있는 2차원 층상 구조의 바이오-무기 나노 복합체를 제조하였다. 이와 같이 무기 나노입자에 캡슐화되어 안정화된 유전자는 효소환경에서도 변성되지 않으며, 산성 조건에서는 LDH가 가역적으로 손쉽게 해리되고 유전자가 서서히 방출되면서 기능이 발휘되는 것으로 보고되어 있다(대한민국 등록특허 제10-0359716호; Choy JH *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 121:1399-1400, 1999; Choy JH *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* 39:4041-4045, 2000; 대한민국 등록특허 제10-0849465호; Choy JH, *Adv. Mater.*, 16, 1181-1184, 2004).
- <8> 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 기존의 이온 교환법 및 공침법은 다음과 같은 문제점이 있다. 1) LDH의 층간 간격은 팽창될 수 있는 정도의 한계가 있으므로 플라스미드 유전자, 퀀텀 효과를 갖는 나노입자가 부착된 유전자, 유기 형광체가 부착된 유전자 등과 같은 3차원적으로 거대하거나 특이한 구조의 유전자를 담지할 수 없으며; 2) LDH층간에 삽입되더라도 LDH의 입도에 따라 안정화될 수 있는 유전자의 길이 혹은 크기가 제약을 받으며(Oh JM., *J. Phys. Chem. Solids.* 67:1028-1031, 2006); 3) 유기물 및 무기물이 부착되어 일부분 양전하를 함유하는 음이온성 유전자는 담지되기가 매우 어려우며; 4) 단일상(Single phase)의 유전자-LDH 나노 복합체 제조를 위해서는 화학반응 단계에서 과량의 유전자 및 장시간이 소요되는 경제적 문제점이 있다.
- <9> 이에, 본 발명자들은
- <10> 1) 각각 다른 형광 특성을 갖는 형광체가 부착된 특정 염기서열의 광학유전자가 박리화된 금속 이중층 수산화물(LDH: Layered Double Hydroxide)로 캡슐화됨으로써, 상기 유전자를 안정적으로 보관할 수 있고;
- <11> 2) 상기 광학유전자-LDH 나노복합체가 포함된 매개체 또는 매체의 형광을 검출함으로써 나노복합체의 파괴 없이 1차 판독이 가능하며;
- <12> 3) 바이오센서를 이용해 상기 나노복합체에 보존된 유전자 코드를 2차 판독함으로써;
- <13> 본 발명의 광학 유전자 코드 식별 시스템이 진위 판별 및 이력 추적 등에 있어서 훼손 및 복제가 불가하고 신뢰도가 높은 정보를 제공하는 판별시스템으로 구축될 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <14> 본 발명의 목적은 광학 유전자 코드 식별용 조성물을 제공하는 것이다.
- <15> 본 발명의 목적은 상기 조성물 및 도료를 포함하는 광학 유전자 코드 식별 시스템용 잉크를 제공하는 것이다.
- <16> 본 발명의 다른 목적은 상기 조성물이 포함된 광학 유전자 코드 식별 시스템용 라벨을 제공하는 것이다.
- <17> 본 발명의 다른 목적은 광학 유전자 코드 식별용 바이오센서를 제공하는 것이다.
- <18> 본 발명의 다른 목적은 상기 라벨 및 바이오센서를 이용한 코드 식별 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

- <19> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은
- <20> i) 셸(shell)로서, 양이온성 전하를 띄는 나노물질; 및,
- <21> ii) 코어(core)로서, 1차 형광체가 표지된 센스 단일가닥 광학 유전자 및 상기 센스 단일가닥 광학 유전자에 상보적인 염기서열을 갖고, 상기 1차 형광체와 다른 형광 특성을 갖는 2차 형광체가 표지된 안티센스 단일가닥 광학 유전자가 상보적으로 결합하여 형성된 이중가닥 광학 유전자;
- <22> 로 구성된 나노복합체를 포함하는 광학 유전자 코드 식별용 조성물을 제공한다.
- <23> 또한, 본 발명은 상기 조성물 및 도료를 포함하는 광학 유전자 코드 식별 시스템용 잉크 조성물을 제공한다.
- <24> 또한, 본 발명은 상기 조성물이 포함된 광학 유전자 코드 식별 시스템용 라벨을 제공한다.
- <25> 또한, 본 발명은
- <26> (i) 상기 센스 단일가닥 광학 유전자에 상보적인 염기서열이 순차적으로 연결된 센스 단일가닥 유전자 프로브; 또는,
- <27> (ii) 상기 안티센스 단일가닥 광학 유전자에 상보적인 염기서열이 순차적으로 연결된 센스 단일가닥 유전자 프로브;
- <28> 가 고형기질에 점적된, 광학 유전자 코드 식별용 바이오센서를 제공한다.
- <29> 아울러, 본 발명은
- <30> 1) 상기 광학 유전자 코드 식별 시스템용 라벨의 형광을 검출하는 단계;
- <31> 2) 형광이 검출되지 않으면 위조로 판정하고, 형광이 검출된 경우에는 상기 라벨에 산성용액을 처리하여 박리화된 금속 이중층 수산화물로 형성된 캡슐을 분해하는 단계;
- <32> 3) 캡슐이 분해된 라벨로부터 광학 유전자만을 추출하는 단계;
- <33> 4) 추출된 광학 유전자를 변성시킨 후, 상기 바이오센서와 혼성화하는 단계;
- <34> 5) 상기 혼성화된 바이오센서를 세척하여 결합하지 않은 광학 유전자를 제거하는 단계;
- <35> 6) 상기 세척된 바이오센서를 건조한 후, 광학 이미지를 검출하는 단계; 및,
- <36> 7) 상기 단계 6)에서 검출된 광학 이미지를 분석하여 위조 또는 정품인지를 판별하는 단계를 포함하는, 상기 광학 유전자 코드 식별용 바이오센서를 이용한 코드 식별 방법을 제공한다.
- <37> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- <38> 본 발명은
- <39> i) 셸(shell)로서, 양이온성 전하를 띄는 나노물질; 및,
- <40> ii) 코어(core)로서, 5' 말단에 1차 형광체가 표지된 센스 단일가닥 광학 유전자 및 상기 센스 단일가닥 광학 유전자에 상보적인 염기서열을 갖고, 5' 말단에 상기 1차 형광체와 다른 형광 특성을 갖는 2차 형광체가 표지된 안티센스 단일가닥 광학 유전자가 상보적으로 결합하여 형성된 이중가닥 광학 유전자;
- <41> 로 구성된 나노복합체를 포함하는 광학 유전자 코드 식별용 조성물을 제공한다.
- <42> 본 발명의 구체적인 실시예에서, 단일가닥 유전자가 헤어핀 루프(Hairpin loops)나 자가 이량체(Self dimer)를 형성하지 않고, 35 bp 정도 길이의 서로 상보적인 염기서열의 5' 말단에 각각 다른 색의 형광체가 부착된 이중가닥 광학 유전자를 설계 및 합성하였다. 구체적으로, 5' 말단에 녹색 형광체가 부착된, 35 bp 길이의 서열번호 1로 기재되는 단일가닥 광학 유전자(Cy3-A); 및 적색 형광체가 부착된, 상기 서열번호 1에 상보적인, 서열번호 2로 기재되는 단일가닥 광학 유전자(Cy5-B)를 제작한 후 혼성화하여 이중가닥 광학 유전자를 합성하였다.
- <43> 상기 단일가닥 광학 유전자를 포름아마이드에 박리화된 LDH(Layered Double Hydroxide) 나노입자 콜로이드 용액에 첨가함으로써 나노하이드리드 식별자인 광학 유전자 무기캡슐을 합성하였다. 이때, 상기 유전자의 길이는 35 bp로 제한되지 않고, 10 내지 3000 bp 정도의 길이일 수 있다. 이는, 포름아마이드에 박리화된 LDH를 담체로 2500 bp 또는 35 bp 길이의 유전자를 캡슐화할 경우(도 2 참조), 무정형 또는 코어-셸 구조의 유전자-LDH 나노복합체를 형성하였고(도 3 및 4 참조), 외부 환경에 대한 안정성을 획득하여(도 7 참조), 유전자의 보관, 전

달 및 기능의 증가가 가능해졌기 때문이다. 또한, 5' 말단에 형광체가 표지된 유전자도 포름아마이드에 박리화된 LDH에 의해 캡슐화되어서(도 5 및 6 참조), 안정적으로 보관되는 것을 확인하였다(도 7b의 오른쪽 패널 참조). 상기와 같이 안정적인 캡슐구조가 확인된 광학 유전자-LDH 나노복합체는 임의의 매체에서 우수한 분산성을 확보하여 적용 분야를 극대화시키고 장기적/항구적으로 안정성을 유지할 수 있다.

<44> 상기 나노물질은 음이온성 전하를 갖는 광학 유전자를 캡슐화하는 경우에는 양이온성 전하를 띄는 것이 바람직하며, 상기 양이온성 전하를 띄는 나노물질에는 고분자, 생분해성 고분자, 리포좀 및 무기 나노입자 등이 사용될 수 있다. 무기 나노입자는 실리카 또는 양이온성 금속 등이 사용될 수 있는데, 양이온성 충전하를 띄는 박리화된 금속 이중층 수산화물(LDH: Layered Double Hydroxide)을 이용하는 것이 바람직하며, 양이온성 충전하를 띄는 박리화된 LDH가 음이온성 광학 유전자와 강한 정전기적 인력에 의한 자가조립(self-assembly)을 통해 재조립되는 특성을 이용하면 광학 유전자 분자를 캡슐화시켜 안정성을 극대화할 수 있다.

<45> 구체적으로, 상기 박리화된 LDH는 하기 화학식 1의 층상형 LDH를 전구체(pristine)로 하며,

화학식 1

<46> $[M^{2+}_{(1-x)}N^{3+}_x(OH)_2][A^{n-}]_z \cdot yH_2O$

<47> (상기 화학식 1에서,

<48> M^{2+} 는 2가 금속 양이온이고,

<49> N^{3+} 는 3가 금속 양이온이며,

<50> 상기 A는 음이온계 게스트(Guest) 화학종이며,

<51> n은 A의 음이온의 전하수이며,

<52> x는 0.1 초과 0.4 미만의 수이며,

<53> z와 y는 0을 초과하는 양수이다).

<54> M은 마그네슘(Mg^{2+}), 니켈(Ni^{2+}), 구리(Cu^{2+}) 및 아연(Zn^{2+})으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을,

<55> N은 알루미늄(Al^{3+}), 철(Fe^{3+}), 바나듐(V^{3+}), 티타늄(Ti^{3+}) 및 갈륨(Ga^{3+})으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 한다.

<56> 상기 단일가닥(Single-stranded) 유전자는 자가 헤어핀 루프(Hairpin loops) 및 자가 이량체(Self dimer)를 형성하지 않도록 설계되는 것이라면 무엇이든지 사용 가능하고, 그 염기서열의 길이는 10 내지 3000 bp의 넓은 범위도 사용가능하다. 그러나 본 발명의 이중가닥 광학 유전자로 구성된 나노복합체가 눈으로 식별할 수 없을 정도의 '나노' 크기인 것이 바람직하므로, 나노단위(일반적으로 500 nm)에 해당하는 복합체를 제조하기 위해서는 유전자는 10 내지 1500 bp 정도가 바람직하며, 더욱 바람직하게는 15 내지 1000 bp, 더욱더 바람직하게는 20 내지 500 bp, 가장 바람직하게는 25 내지 300 bp 정도일 수 있다. 참고로, 이중가닥 유전자의 경우 1 bp가 0.34 nm이므로 1500 bp 유전자의 길이는 510 nm이며, 일반적으로 적어도 10 bp이하의 길이의 프로브는 선택성이 없으므로 제작을 하지 않는다.

<57> 하지만 유전자 코드 식별 시스템에 적용하기 위해서는 10 내지 300 bp 정도가 바람직하며, 더욱 바람직하게는 20 내지 200 bp, 가장 바람직하게는 25 내지 50 bp 정도일 수 있다.

<58> 또한 상기 이중가닥 유전자는 몇 개의 짧은 단일가닥 유전자와 긴 단일가닥 유전자의 혼성체의 형태도 가질 수 있다. 길이가 짧은 여러 개의 단일가닥 유전자의 상보적인 염기서열을 이용하면 독특한 2차, 3차 구조의 다중가닥 유전자로 코드화도 가능하며, 플라스미드(Plasmid) DNA와 엔지니어드(Engineered) DNA도 정보를 부여할 수 있다. 그 이외에도 RNA, 인공 DNA 유사체인 PNP(Peptide Nucleic Acid) 등도 이용할 수 있다. 이러한 다중코드화는 특정 염기서열의 조합 코드와 형광체의 구조/색상/개수 등의 조합 코드로 방대한 정보/암호 코드를 디자인 및 생산할 수 있다.

<59> 상기 형광체는 온도, pH 변화, 열 등의 외부조건으로부터 안정적인 것은 무엇이든지 사용 가능하며, 그 종류에

는 유기계 형광체 혹은 쿼텀(Quantum) 효과를 갖는 무기계 형광체 등이 있다. 상기 유기계 형광체의 구체적인 예로는 CYTM, Fluorescein, Alexa Fluor[®], Bodipy[®], CAL Fluor[®], Oregon Green, Oyster[®], 로다민(Rhodamine), TAMRATM 및 WellRED 등 다양하게 있고, 무기계 형광체 역시 금 나노입자, ZnS, CdSe, CdTe, CdS 등 다양하며, 유전자와 직접적인 공유결합이나 스페이스(Spacer)를 사용하여 5', 3' 또는 중간에 부착이 가능하다. 이때, 형광체 자체가 코드의 단위로 사용할 수 있어서, 상기 1차 형광체와 2차 형광체가 서로 다른 형광 특성(예, 다른 성분, 구조 및 색상)을 갖도록 조합하면 다양한 코드 디자인이 가능하여, ① 형광체에서 발광하는 광학 신호는 광학 유전자로 구성된 나노복합체의 삽입 여부 판별에 이용될 수 있고; 또는 ② 광학 유전자의 염기서열 판독에 쓰이는 분자 센서 요소 및 탐침의 역할도 할 수 있다.

<60> 상기 이중가닥 광학 유전자의 염기서열과 형광체 사이에 스페이스를 추가로 함유할 수 있는데, 상기 스페이스는 광학 유전자의 혼성화에 영향을 주지 않고 유전자와 형광체를 연결할 수 있는 어떤 분자도 가능하며, 예컨대, C-3 링커(linker), C-6 링커, C-6 TFA 링커, C-5 아미노 변형기(amino modifier), C-12 링커, 아미노 dT C2 링커, 아미노 dT C6 링커, 5' 티올(Thiol) C-2 링커, 5' 티올 C-6 링커, 5' 티올 C-6 S-S 등을 포함할 수 있다.

<61> 본 발명의 이중가닥 광학 유전자로 구성된 나노복합체는 염기서열로 코드화된 정보 및 광학 탐침을 안정적으로 보관할 수 있으므로 보안기술, 상품식별기술, 진위판별기술, 이력추적시스템, 위조복제 방지기술 등에 적용될 수 있는 나노하이브리드 식별자로 유용하게 이용될 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 조성물을 i) ID카드, 여권 등 위조 및 복제가 쉬운 보안 제품; ii) 진품, 명품 등 도난 위험이 있는 고가 제품; iii) 제품 이력이 조작 및 둔갑할 수 있는 유통과정에서 품질 관리가 필요한 제품; 등의 다양한 매개체 및 매체에 물리적, 화학적으로 분산 및 도포하여 적용하는 것이 바람직하다. 예를 들면, 본 발명의 조성물을 보안 제품의 제조를 위한 기기감응물질(Machine readable materials), 미세추적물질(Micro tracer), 주화용 신소재, 위·변조 방지용 특수 잉크·안료·페인트·도료 등에 혼합하고 분산시켜 사용하는 방법과 특수 인쇄 보안용지, 제지용 특수 섬유, 고내구성지(Durable papers)에 직접 삽입하는 방법, 이외에도 물리적·화학적 흡착으로 적절하게 개체 및 포장지에 직접 도포하는 방법 등으로 표지하여 사용할 수 있다.

<62> 또한, 본 발명은 상기 조성물 및 도료를 포함하는 광학 유전자 코드 식별 시스템용 잉크 조성물을 제공한다.

<63> 상기 도료는 위·변조 방지용 특수 잉크, 상용의 잉크, 안료, 염료 및 페인트 등을 포함한다.

<64> 또한, 본 발명은 상기 조성물이 포함된 광학 유전자 코드 식별 시스템용 라벨을 제공한다.

<65> 상기 조성물은 라벨에 도포되거나, 라벨 제조시 첨가되거나, 라벨에 인쇄되어 포함될 수 있다. 예를 들면, ① 용매에 분산하여 라벨에 도포하는 방법, ② 종이 등의 상품 제조시 직접 심어 넣는 방법, ③ 페인트나 도료 등에 혼합하여 사용하는 방법 등을 모두 포함한다.

<66> 또한, 본 발명은

<67> (i) 상기 센스 단일가닥 광학 유전자에 상보적인 염기서열이 순차적으로 연결된 안티센스 단일가닥 유전자 프로브; 또는,

<68> (ii) 상기 안티센스 단일가닥 광학 유전자에 상보적인 염기서열이 순차적으로 연결된 센스 단일가닥 유전자 프로브;

<69> 가 고형기질에 점적된, 광학 유전자 코드 식별용 바이오센서를 제공한다.

<70> 본 발명의 조성물은 형광체의 검출을 통해 1차 판독될 수 있다. 본 발명의 구체적인 실시예에서, 상기 나노하이브리드 식별자를 흑색 잉크와 혼합한 후, 상기 나노하이브리드 식별자가 포함된 나노하이브리드 잉크를 유리 슬라이드에 [S] 문자로 각각 날인하고, 광학 스캐너로 이미지를 취득한 결과, 순수한 잉크로 날인한 [S]는 형광 물질을 포함하지 않았고(도 8 참조), 나노하이브리드 잉크로 날인한 [S]는 녹색과 적색 형광체가 병합된 황색 [S] 이미지를 나타내는 것을 확인하였다(도 9 참조). 이에, 상기 황색 [S]이미지의 검출을 통해, 나노 캡슐을 제거하지 않은 상태에서 나노하이브리드 식별자를 1차 판독할 수 있는 것을 확인하였다.

<71> 또한, 본 발명의 나노하이브리드 식별자는 상기 유전자와 상보적인 유전자 서열과의 혼성화 반응의 검출을 통해 2차 판독될 수 있다. 본 발명의 구체적인 실시예에서, 상기 광학 유전자와 상보적인 염기서열을 갖고, 5' 말단에 아민이 부착된 12개의 티민을 포함하는, 탐침 유전자가 적절히 적재된 바이오센서를 제작하였다. 이때, 상기 두 종류의 광학 유전자의 스팟 위치를 적절히 조절함으로써, 판독된 이미지가 녹색 바탕에 적색의 ⑤ 그래픽이 되도록 디자인하였다. 이후, 나노하이브리드 잉크가 [S]자로 날인된 유리 슬라이드로부터 광학 유전자만을

추출하여 혼성화 반응을 수행한 결과, 광학 이미지로 녹색 바탕에 적색의 ⑤ 그래픽을 수득함으로써, 신속·정확하게 광학 유전자 코드를 2차 판독할 수 있었다(도 10 참조).

- <72> 이에 본 발명의 광학 유전자 코드 식별 시스템은 다색 광학 검출법 및 유전자 코드 판독의 2단계의 판독 과정을 거침으로써, 진위 판별 및 이력 추적 등에 있어서 접근성이 높은 식별 시스템으로 구축될 수 있다.
- <73> 본 발명에서, 판독기로 이용하는 "바이오센서"는 생체분자의 고유한 기능을 이용하는 바이오칩(Biochip)과 흡사하다. 바이오센서는 고체 기질의 유리 슬라이드(Glass slide) 표면에 수천 혹은 수 만개 이상의 유전자를 고밀도로 집적화시키고 배열시켜 부착하여 제조한 것으로, 아주 빠르게 유전자 코드를 검색하고 정확하게 검출하는 기능이 있어서 코드화된 염기서열을 검출하고 분석하기 위한 기존의 "PCR기술"을 효과적으로 대체할 수 있는 획기적인 방법이다.
- <74> 상기 바이오센서는 마이크로어레이 형식으로 유리 슬라이드에 알데하이드(Aldehyde; -CHO)를 사용하여 개질하고 여기에 아민(Amine; NH_2)이 말단에 부착되어 있는 탐침 유전자 프로브를 결합하여 제작하였다.
- <75> 본 발명의 프로브와 고정기질 사이에 스페이서(spacer)를 추가로 함유할 수 있는데, 상기 스페이서는 혼성화에 영향을 주지 않고 프로브와 고정기질을 연결할 수 있는 어떤 분자도 가능하며, 예컨대, 아민-올리고 dT 링커(linker), C-3 링커(linker), C-6 링커, C-6 TFA 링커, C-5 아미노 변형기(amino modifier), C-12 링커, 아미노 dT C2 링커, 아미노 dT C6 링커, 5' 티올(Thiol) C-2 링커, 5' 티올 C-6 링커, 5' 티올 C-6 S-S 등을 포함할 수 있다.
- <76> 상기 고정기질은 광학 검출을 허용하며 신호 방출을 심하게 간섭하지 않는다. 상기 고정기질은 이에 제한되지는 않지만 가소성 물질, 세라믹, 유리, 폴리스티렌, 메틸스티렌, 아크릴 중합체, 상자성 물질, 토리아 솔, 탄소 그래파이트, 이산화티탄, 라텍스 또는 가교-결합된 텍스트란 예컨대 세파로스, 셀룰로스, 나일론, 가교 결합된 마이셀(micelle) 및 테플론(Teflon)이 모두 사용될 수 있다. 고정기질의 표면은 개별 스팟에서 프로브의 부착을 허용하기 위해 개질될 수 있다. 구체적으로, 화학적 작용기, 예컨대 아미노기, 카르복시기, 옥소기 및 티올기의 패턴의 첨가는 일반적으로 해당 반응성 작용기 또는 링커 분자를 포함하는 프로브를 공유 결합시키는 데 사용될 수 있다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는, 기질의 표면은 아민기를 갖도록 제조된 프로브가 기질에 용이하게 결합하도록 알데하이드로 개질되었다.
- <77> 본 발명의 바이오센서는 아주 높은 밀도, 높은 밀도, 중간 밀도, 낮은 밀도 또는 아주 낮은 밀도로 프로브가 집적된 스팟을 갖도록 제조될 수 있다. 아주 높은-밀도 바이오센서에 대한 범위는 바이오센서 당 약 10,000,000 내지 약 2,000,000,000 개의 스팟을 갖는다. 높은-밀도 바이오센서의 범위는 약 100,000 내지 약 10,000,000 개의 스팟을 갖는다. 중간 밀도 바이오센서의 범위는 약 10,000 내지 약 50,000 개의 스팟을 갖는다. 낮은-밀도 바이오센서는 일반적으로 10,000 부위 미만이다. 아주 낮은-밀도 바이오센서는 1,000 개 미만의 스팟을 갖는다. 프로브 스팟들은 패턴, 즉 규칙적인 디자인 또는 구성을 포함하거나, 또는 랜덤하게 분포될 수 있다. 규칙적인 패턴 스팟들은 X-Y좌표 평면상에 지정되도록 사용될 수 있다. 따라서 광학 유전자 코드 식별용 바이오센서는 광학 유전자 코드의 상보적인 염기서열이 혼성화되는 위치를 사전에 임의로 디자인하여 판독 결과가 광학 그래픽 이미지로 판독되는 것이 특징이다.
- <78> 아울러, 본 발명은
- <79> 1) 상기 광학 유전자 코드 식별 시스템용 라벨의 형광을 검출하는 단계;
- <80> 2) 형광이 검출되지 않으면 위조로 판정하고, 형광이 검출된 경우에는 상기 라벨에 산성용액을 처리하여 박리화된 금속 이중층 수산화물로 형성된 캡슐을 분해하는 단계;
- <81> 3) 캡슐이 분해된 라벨로부터 광학 유전자만을 추출하는 단계;
- <82> 4) 추출된 광학 유전자를 변성시킨 후, 상기 바이오센서와 혼성화하는 단계;
- <83> 5) 상기 혼성화된 바이오센서를 세척하여 결합하지 않은 광학 유전자를 제거하는 단계;
- <84> 6) 상기 세척된 바이오센서를 건조한 후, 광학 이미지를 검출하는 단계; 및,
- <85> 7) 상기 단계 6)에서 검출된 광학 이미지를 분석하여 위조 또는 정품인지를 판별하는 단계를 포함하는, 상기 광학 유전자 코드 식별용 바이오센서를 이용한 코드 식별 방법을 제공한다.
- <86> 단계 2) 캡슐 분해는 pH 4 이하의 산성 완충 용액을 사용하여 2시간 내지 6시간, 바람직하게는 5시간 동안 용

해시키는 것이 바람직하다. 유전자 코드가 변형되지 않도록 금속 이중층 수산화물만 선택적으로 녹여낸 후에, EDTA(Ethylene diamine tetra acetic acid)를 첨가하면 캡슐을 쉽게 제거하여 안전하게 광학 유전자 코드를 추출할 수 있다. 이중가닥 유전자는 강한 산성 용액에서 오랜 시간 동안 용해되어 있을 경우에 염기쌍 배열(A, T, C, G)이 양성자화(Protonation)되면서 구조적 변형이 일어난다. 그리고 금속 양이온의 존재 하에서는 이중가닥 유전자의 염기쌍과 금속 양이온의 상호작용으로 단일가닥으로 변형되거나, 인산기와의 상호작용으로 복합체를 형성하면서 집결되어 불용성 형태로 유전자가 불안정해진다(Muntean CM *et al.*, *J. Raman Spectrosc.* 36:1047-1051, 2005; Duguid J *et al.*, *Biophys. J.* 65:1916-1928, 1993). 따라서 산성 완충 용액으로 적절한 시간 동안 금속 이중층 수산화물만 선택적으로 녹여낸 후에 2가/3가 금속 양이온과 강하게 결합하여 킬레이트 화합물을 형성하는 약품으로 알려져 있는 EDTA를 첨가하면, 산성 용액에서 용해되어 생성된 금속 양이온과 킬레이트를 형성하여 쉽게 제거됨으로써 광학 유전자를 변형/변성의 위협으로부터 안전하게 추출할 수 있다.

<87> 상기 단계 4)에서 바이오센서와 광학 유전자의 혼성화를 "1초" 동안 수행함으로써 혼성화된 결과 이미지를 얻을 수 있었고, 이를 통해 일순간(一瞬間)에 상보적인 유전자가 혼성화되어 형광 신호를 방출하고, 광학 이미지의 검출 유무를 통해 눈으로 확인/인식하여 정보의 일치 여부를 극단적으로 판단할 수 있다. 따라서, 본 발명의 상기 바이오센서는 정확하고 신속하게 광학 유전자 코드를 분석하여 사전에 부여한 정보/암호와 일치하는 경우에 생물학적 신호가 광학 신호로 전환되어 발신하는 다중 컬러 이미지 코드의 역할을 할 뿐만 아니라, 그 판독 정보를 부가 설명 없이도 누구나 쉽고 간단하게 육안으로 눈 깜짝할 사이에 인식(認識, Recognition)하여 일치 여부를 직감(直感, Intuition)적으로 판별할 수 있도록 사용된다.

효 과

<88> 본 발명의 광학 유전자 코드 식별 시스템은 진위 판별 및 이력 추적 등에 있어서 훼손 및 복제가 불가하고 신뢰도가 높은 정보를 제공하는 판별시스템으로 구축될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<89> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

<90> 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<91> <실시예 1> 거대 길이(~2500 bp)의 유전자가 캡슐화된 나노복합체 합성

<92> <1-1> 박리화된 금속 이중층 수산화물의 합성

<93> 공침과 수열합성을 통하여 100 nm크기의 금속 이중층 수산화물을 합성하였다. 0.3 M $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ 와 0.15M $Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ 를 탄산 이온이 제거된 3차 증류수에 녹이고, pH가 10 내지 11이 될 때까지 0.5 M NaOH로 적정한 후, 상온에서 30분간 강하게 교반하여 금속 이중층 수산화물(LDH: Layered Double Hydroxide) 결정체를 얻었다. 공침된 LDH를 수열합성 용기에 넣고 100℃에서 12시간 동안 교반한 후, 원심분리기로 분리하며 세척과정을 통해 미반응 염을 제거하여 100 nm의 균일한 크기로 LDH를 얻었다. 상기 합성한 LDH를 포름아마이드에 0.05중량%로 분산시켜 상온에서 2일간 강하게 교반하여 박리화된 LDH 나노시트를 얻었다. 전 과정은 공기 중의 이산화탄소에 의한 탄산 이온(CO_3^{2-}) 생성을 방지하기 위하여 질소 분위기하에서 진행되었다.

<94> <1-2> 거대 길이(~2500 bp)의 유전자의 캡슐화

<95> 상기 실시예 1-1에서 박리화된 LDH 콜로이드 용액에 50~2500 bp 크기의 이중가닥 청어 유전자(Herring testis DNA)를 1:1의 중량 비율로 혼합하여 상온에서 1시간 동안 교반시켰다. 반응이 끝난 후 원심분리기로 분리하며 세척과정을 통해 과량의 유전자를 완전히 제거하여 코어-셀 유전자-이중층 수산화물 나노복합체를 얻었다(도 2a). 전 과정은 공기 중의 이산화탄소에 의한 탄산 이온(CO_3^{2-}) 생성을 방지하기 위하여 질소 분위기하에서 진행하였다.

<96> <실시예 2> 형광체가 부착된 유전자가 캡슐화된 나노복합체 합성

<97> <2-1> 광학 유전자 코드화

<98> 녹색 형광체인 시아닌 3가 부착되고, 35 bp 길이의 서열번호 1[5'-(Cy3)ATT CGG ACG CTC ATC ATT CTG GTG TGG CTG CTG GC-3']로 기재되는 단일가닥 광학 유전자(Cy3-A); 및 적색 형광체인 시아닌 5가 부착되고, 서열번호 1에 상보적인, 서열번호 2[5'-(Cy5)GCC AGC AGC CAC ACC AGA ATG ATG AGC GTC CGA AT-3']로 기재되는 단일가닥

광학 유전자(Cy5-B)를 디자인한 후, 상기 단일가닥 광학 유전자를 Integrated DNA Technologies(미국)에 의뢰하여 합성하였다. 이때, 각각의 단일가닥 광학 유전자는 헤어핀 루프(Hairpin loops)나 자가 이량체(Self dimer)가 형성되지 않도록 제조되었다. 단일가닥 광학 유전자를 각각 STE 버퍼(10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA)에 용해시켜 같은 농도로 섞은 후, 94℃에서 2분간 가열한 후 상온에서 천천히 식힘으로써 이중가닥의 광학 유전자로 합성되었다.

<2-2> 광학 유전자-LDH 나노복합체 합성

실시에 2-1에서 준비한 광학 유전자 용액에 박리화된 LDH 콜로이드 용액을 첨가한 후(질량비=0.5~1.5, 부피비=1~2), 15℃에서 1시간 동안 교반시켜 나노하이드브리드 식별자인 광학 유전자 무기캡슐을 합성하였다(도 2b). 전 과정은 공기 중의 이산화탄소에 의한 탄산 이온(CO_3^{2-}) 생성을 방지하기 위하여 질소 분위기하에서 진행되었다.

<실시에 3> 나노복합체의 특징 확인

<3-1> X 선 회절 분석

상기 실시예 1 및 2에서 제조한 LDH 및 유전자-LDH 나노복합체의 결정 구조를 확인하기 위하여 X 선 회절(Rigaku, D/Max 2200, 일본) 분석을 수행하였다.

그 결과, 도 3에서 알 수 있는 바와 같이 LDH의 층간 간격은 0.79 nm로 질산 이온(NO_3^-)이 삽입되어 있는 전형적인 구조임을 확인하였고, 상기 유전자-LDH 나노복합체는 $2\theta < 15^\circ$ 인 저각에서의 회절이 없으므로, 더 이상 다층상 구조의 나노복합체가 아닌 무정형 구조의 유전자-LDH 나노복합체임을 알 수 있었다.

<3-2> 투과 전자 현미경 분석

상기 실시예 1 및 2에서 제조한 LDH 및 유전자-LDH 나노복합체의 형상 및 결정 구조를 미세하게 확인하기 위하여 투과 전자 현미경(JEOL JEM-2000EXII, 일본) 분석을 수행하였다. 각각의 시편은 에폭시 수지에 고정하여 50 nm 두께로 절단하여 염색 과정 없이 관찰하였다.

그 결과, 상기 LDH는 약 100 nm의 균일한 크기의 육각 형상의 입자이며, 층간 간격 약 0.8 nm로 질산 이온(NO_3^-)이 삽입되어 있는 구조임을 확인하였다(도 4a).

상기 거대 유전자-LDH 나노복합체는 거대 유전자를 매우 얇게 박리화된 LDH 나노시트가 수 μm 크기로 무질서하게 캡슐화함으로써, 카드집(House of card) 형태에 가까운 무정형 구조의 코어-셀 나노복합체가 형성되었음을 확인하였다(도 4b).

상기 광학 유전자-LDH 나노복합체는 박리화된 LDH 나노시트가 제조됨과 동시에 약 10 nm 두께로 무기 공동을 형성하였고, 유전자가 그 안에 캡슐화된 약 150 nm 크기의 완벽한 코어-셀 구조의 유전자-LDH 나노복합체임을 확인하였다(도 4c).

<실시에 4> 광학 유전자-LDH 나노복합체의 캡슐화 확인

상기 실시예 1 및 2에서 제조한 광학 유전자, 박리화된 LDH 및 광학 유전자-LDH 나노복합체를 투과 전자 현미경 분석 및 자외선 스펙트로미터(Perkin Elmer Lambda 35, 미국)로 확인하였다.

그 결과, 도 5 및 6에서 나타난 바와 같이 녹색(Cyanine 3)과 적색(Cyanine 5)의 형광체가 표지된 광학 유전자가 박리화된 LDH를 담체로 캡슐화되었음을 확인하였다.

<실시에 5> 유전자-LDH 나노복합체의 캡슐화인 안정성 평가 실험

상기 실시예 1 및 2에서 제조한 유전자-LDH 나노복합체 내에 보존된 상기 유전자의 안정성을 효소 처리 반응으로 검사하였다.

상기 유전자-LDH 나노 복합체를 TE(Tris-EDTA) 완충용액 10 μl 에 각각 10 μg 씩 분산시킨 후, 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 인큐베이션하였다. 이후 반응 중지 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 완충 용액에 분산시킨 후, 상온에서 5시간 동안 용해시켜 무기캡슐만을 선

택적으로 분해하였다. 이후 EDTA를 처리함으로써 금속 양이온과 유전자 간의 상호작용을 최소화하여 순수한 광학 유전자만을 추출하였다. 광학 유전자의 경우, 상기 추출한 광학 유전자 5 μg 을 뉴클레아제가 없는 혼성화 완충용액(30% 포름아마이드, 5X SSC, 0.1% SDS, poly A) 15 μl 에 용해시킨 후, 95℃에서 5분간 가열함으로써 단일가닥 광학 유전자로 만들었다. 상기 추출된 유전자를 각각 1% 혹은 5% 아가로스 젤에서 전기영동한 후, 자외선 및 광학 이미지 분석기(Typhoon 9400, 미국)로 스캔하여 전기영동 이미지를 획득하였다.

<117> 그 결과, 거대 유전자-LDH 나노복합체는 DNA 분해효소로부터 상기 50~2500 bp의 유전자까지 보호되는 것으로 확인되었다(도 7a).

<118> 또한, 광학 유전자-LDH 나노복합체는 DNA 분해효소로부터 35 bp의 유전자가 안정적으로 보호된 것을 자외선 이미지(도 7b의 왼쪽 패널) 및 광학 이미지에서 확인되었다(도 7b의 오른쪽 패널).

<119> 이를 통해 본 발명의 코어-셀 유전자-LDH 나노복합체는 길이 및 구조에 관계없이 DNA 분해 조건으로부터 유전자 및 형광체를 보호할 수 있음을 확인하였다.

<120> <실시예 6> 나노하이드브리드 잉크 제조 및 1차 판독 시험

<121> 실시예 2에서 제조한 나노하이드브리드 식별자를 흑색 스탬프 잉크(Shachihata사, 일본)에 1중량%로 첨가하여 분산시켜 나노하이드브리드 잉크를 얻었다. 순수한 스탬프 잉크와 나노하이드브리드 잉크를 유리 슬라이드에 [S] 문자로 각각 날인하고, 광학 스캐너(Typhoon 9400, 미국)로 이미지를 스캔하였다.

<122> 그 결과, 순수한 잉크로 날인한 [S]는 형광물질을 포함하지 않았고(도 8), 나노하이드브리드 잉크로 날인한 [S]는 녹색과 적색 형광체가 병합된 황색 [S] 이미지를 나타내는 것을 확인하였다(도 9). 이에, 상기 황색 [S]이미지의 검출을 통해, 나노 캡슐을 제거하지 않은 상태에서 나노하이드브리드 식별자를 1차 판독할 수 있는 것을 확인하였다.

<123> <실시예 7> 바이오센서 제작

<124> 실시예 2의 단일가닥 광학 유전자 Cy3-A 및 Cy5-B에 각각 상보적인 염기서열을 갖고, 5' 말단에 아민이 부착된 12개의 티민을 포함하는, 47 bp 길이의 탐침 유전자 서열번호 3으로 기재되는 A' 및 서열번호 4로 기재되는 B'를 제조하였다. 유리 슬라이드 표면을 알데하이드로 개질한 후, 49 mm²의 면적에 총 144개(가로 12 × 세로 12)의 스팟(spot)을 점적함으로써, 기존 방식과 유사한 바이오센서를 제작하였다. 이때, 하나의 스팟에는 한 종류의 탐침 유전자를 이용하였고, 상기 두 종류의 탐침 유전자의 스팟 위치를 적절히 조절함으로써, 판독된 이미지가 녹색 바탕에 적색의 ㉟ 그래픽이 되도록 디자인하였다(도 10 참조).

<125> <실시예 8> 광학 유전자 코드 판독

<126> 실시예 6에서 제조한 나노하이드브리드 잉크가 [S]자로 날인된 유리 슬라이드에 산성 완충 용액(pH4)을 상온에서 5시간 동안 처리한 후, EDTA를 처리함으로써 순수한 광학 유전자만을 추출하였다.

<127> 상기 추출한 광학 유전자 5 μg 을 뉴클레아제가 없는 혼성화 완충용액(30% 포름아마이드, 5X SSC, 0.1% SDS, poly A) 15 μl 에 용해시킨 후, 95℃에서 5분간 가열함으로써 단일가닥 광학 유전자로 만들었다.

<128> 실시예 4에서 제조한 바이오센서에 상기 단일가닥 광학 유전자가 포함된 용액 15 μl 를 올려서 1초 동안 혼성화 반응을 진행한 후, 곧바로 1 내지 3차 세척(1차:SSC 및 SDS; 2차:SSC 및 SDS; 3차:SSC)을 하였다. 상기 세척된 바이오센서를 건조한 뒤, 광학 스캐너(Molecular Devices GenePix 4200B, 미국)로 이미지를 스캔하였다.

<129> 그 결과, 도 10에 나타난 바와 같이 나노하이드브리드 식별자로부터 광학 유전자를 추출하여 바이오센서로 판독한 광학 이미지로 녹색 바탕에 적색의 ㉟ 그래픽을 획득함으로써, 신속·정확하게 광학 유전자 코드를 판독할 수 있었다. 이에 본 발명의 광학 유전자 코드 식별 시스템은 진위 판별 및 이력 추적 등에 있어서 접근성이 높은 식별 시스템으로 구축될 수 있다.

도면의 간단한 설명

<130> 도 1은 본 발명의 전체적인 과정을 보여주는 흐름도이다.

<131> 도 2는 본 발명의 유전자-LDH 나노복합체의 형성 구조를 예측한 도식도이다:

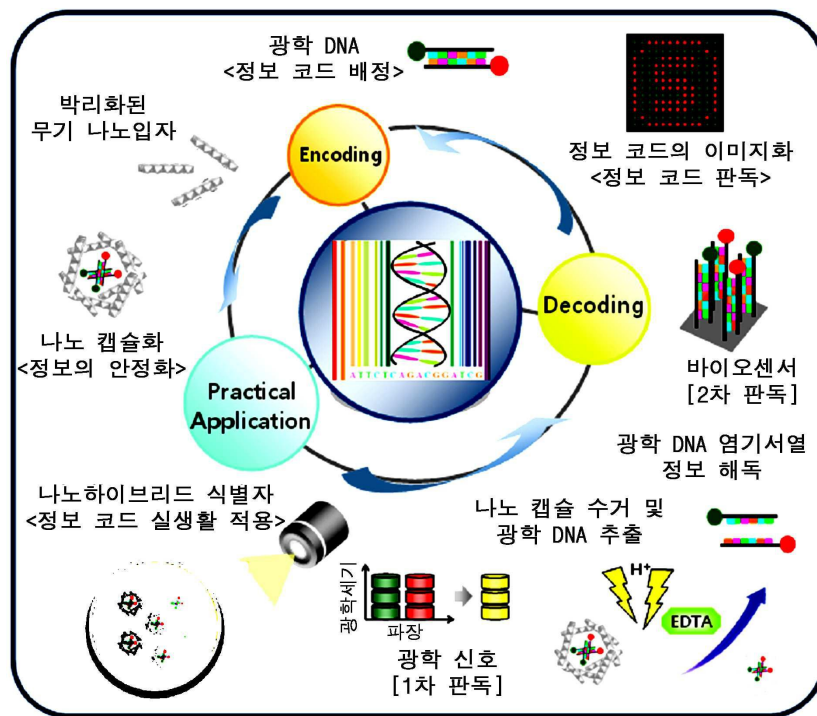
<132> a: 거대 유전자-LDH 나노복합체; 및,

<133> b: 광학 유전자-LDH 나노복합체.

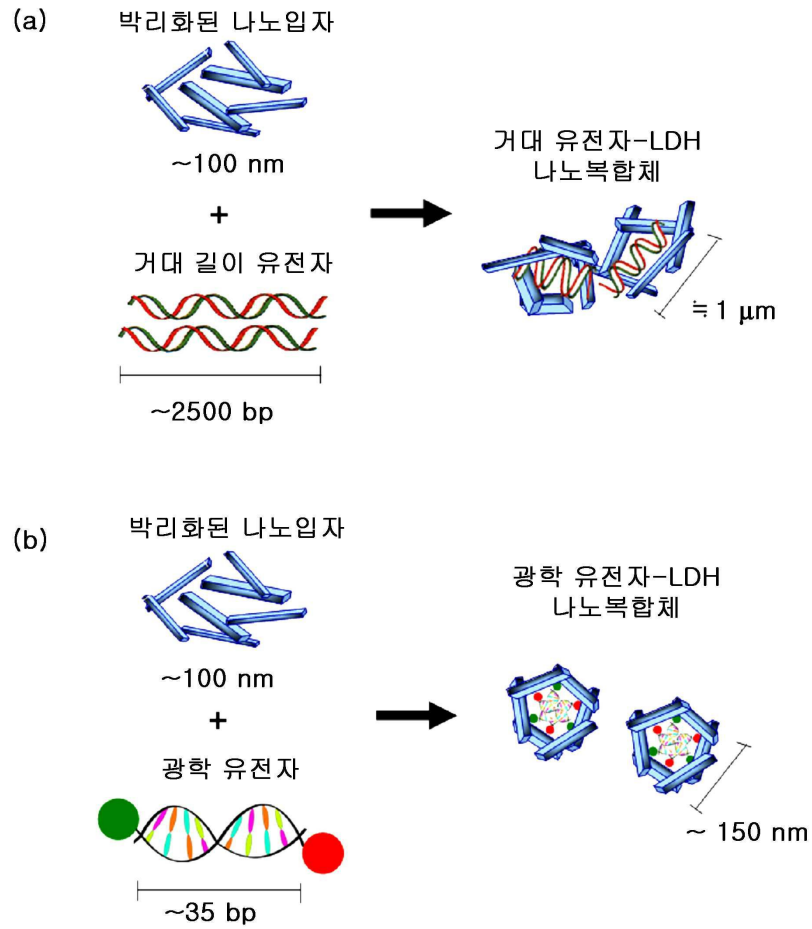
- <134> 도 3은 유전자-LDH 나노 복합체의 X선 회절도를 나타낸 도이다:
- <135> a: LDH;
- <136> b: 거대 유전자-LDH 나노복합체; 및,
- <137> c: 광학 유전자-LDH 나노복합체.
- <138> 도 4는 유전자-LDH 나노 복합체의 투과 전자 현미경 이미지를 나타낸 도이다:
- <139> [왼쪽 패널: 표면분석(morphology), 오른쪽 패널: 내부 구조 분석(cross-section)]
- <140> a: LDH;
- <141> b: 거대 유전자-LDH 나노복합체; 및,
- <142> c: 광학 유전자-LDH 나노복합체.
- <143> 도 5는 광학 유전자-LDH 나노복합체의 투과 전자 현미경 이미지를 나타낸 도이다:
- <144> a: 광학 유전자;
- <145> b: 박리화된 LDH; 및,
- <146> c: 광학 유전자-LDH 나노하이브리드 무기캡슐.
- <147> 도 6은 광학 유전자-LDH 나노복합체의 자외선 스펙트럼 결과를 나타낸 도이다:
- <148> a: 광학 유전자;
- <149> b: 박리화된 LDH; 및,
- <150> c: 광학 유전자-LDH 나노하이브리드 무기캡슐.
- <151> 도 7은 유전자-LDH 나노 복합체의 효소에 대한 안정성 평가 결과를 나타낸 전기영동 이미지이다:
- <152> a: 거대 유전자-LDH 나노복합체; 및,
- <153> b: 광학 유전자-LDH 나노복합체.
- <154> 도 8은 순수한 잉크로 날인한 [S]의 이미지이다:
- <155> a: 사진; 및,
- <156> b: 광학 이미지.
- <157> 도 9는 광학 유전자-LDH 나노복합체가 첨가된 나노하이브리드 잉크로 날인한 [S]의 이미지이다:
- <158> a: 사진; 및,
- <159> b: 광학 이미지.
- <160> 도 10은 본 발명의 광학 유전자 코드 식별 시스템으로 광학 유전자 코드를 판독한 결과를 나타낸 도이다.

도면

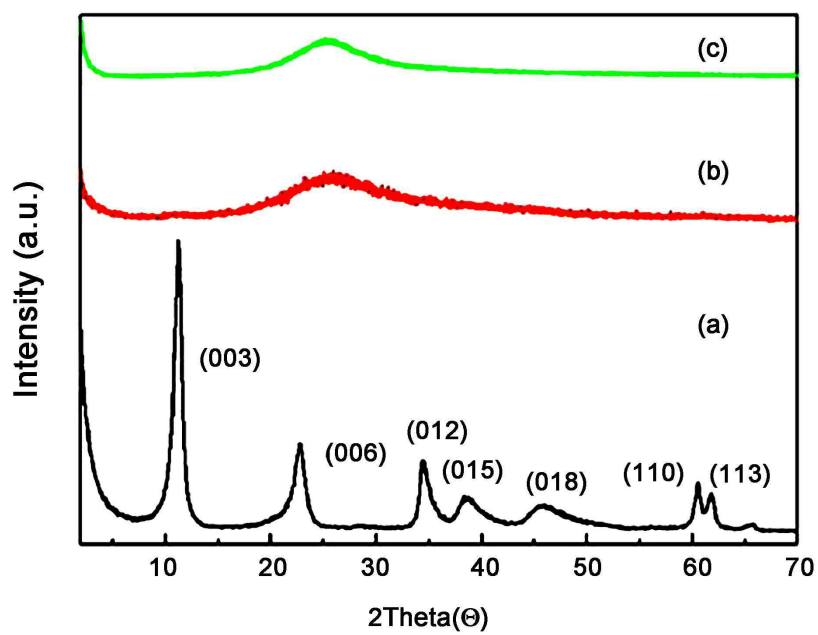
도면1



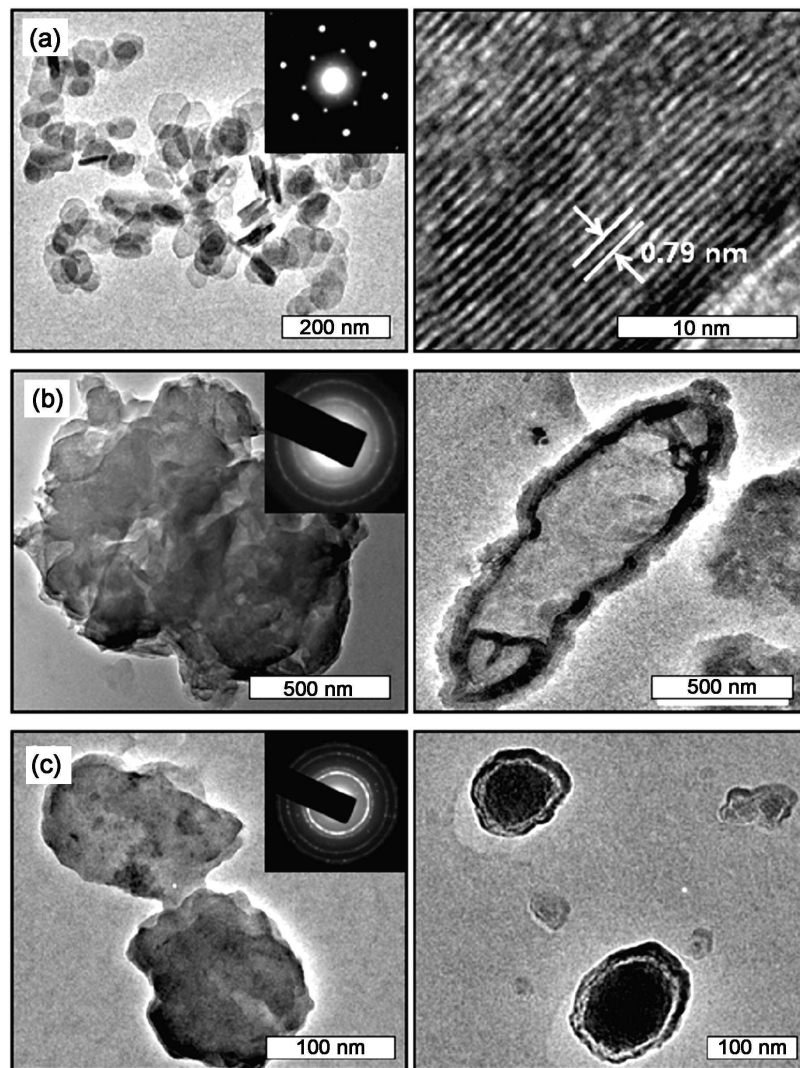
도면2



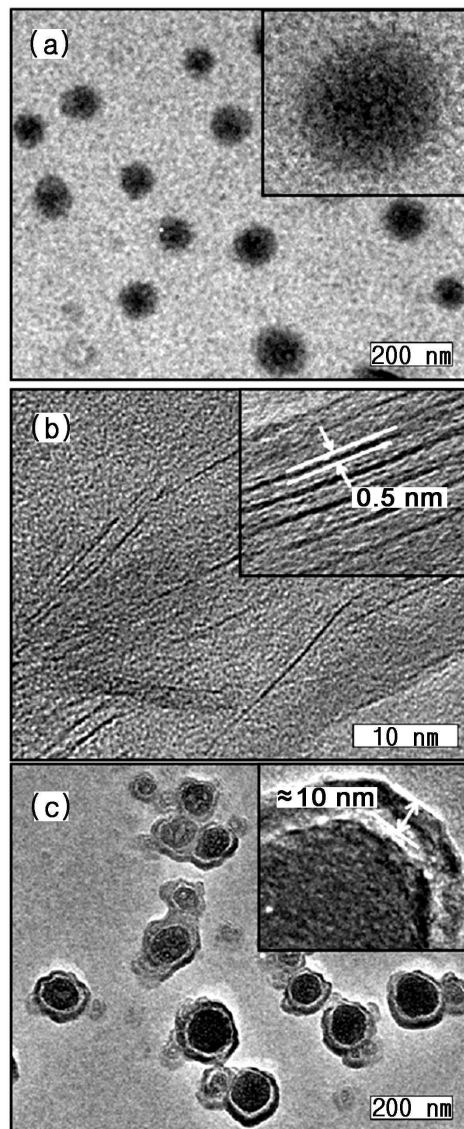
도면3



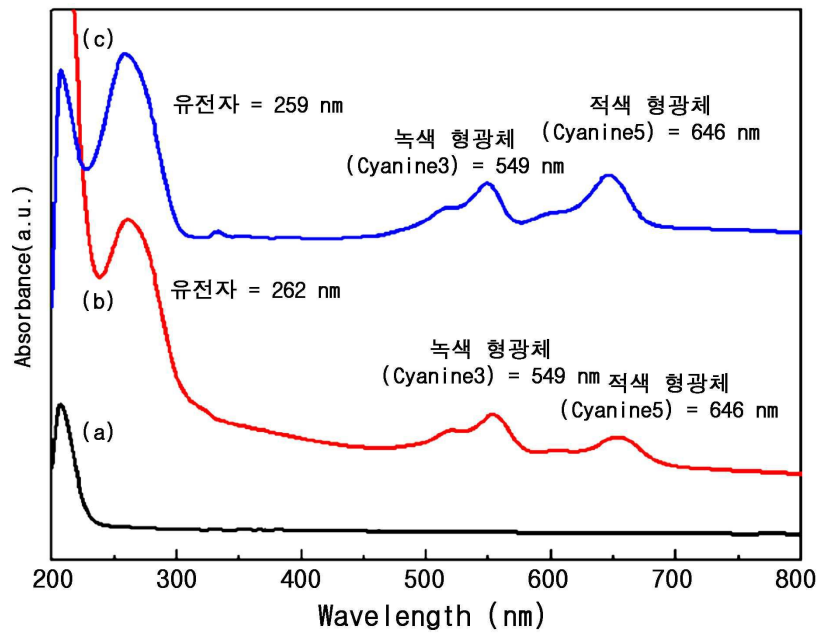
도면4



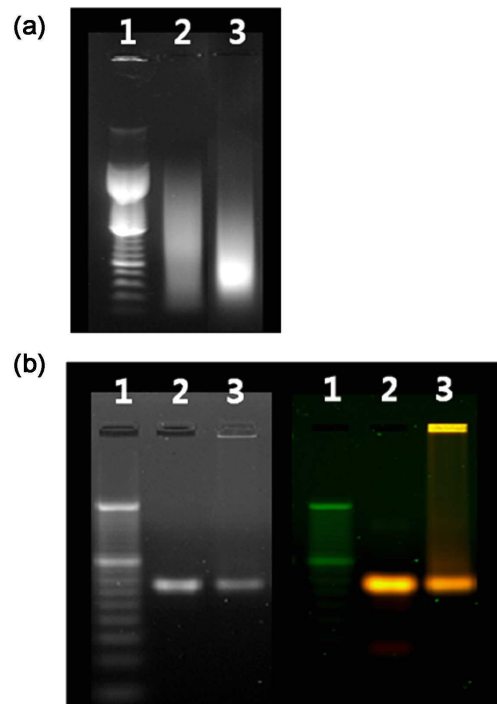
도면5



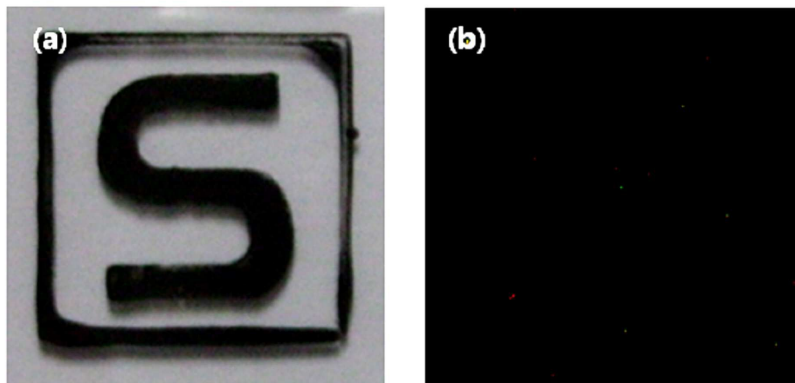
도면6



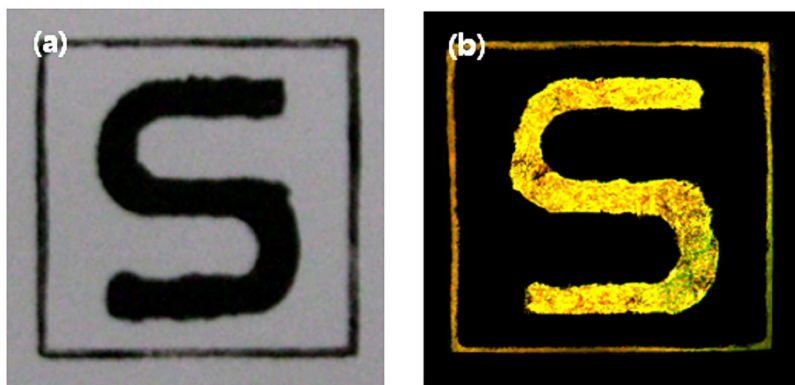
도면7



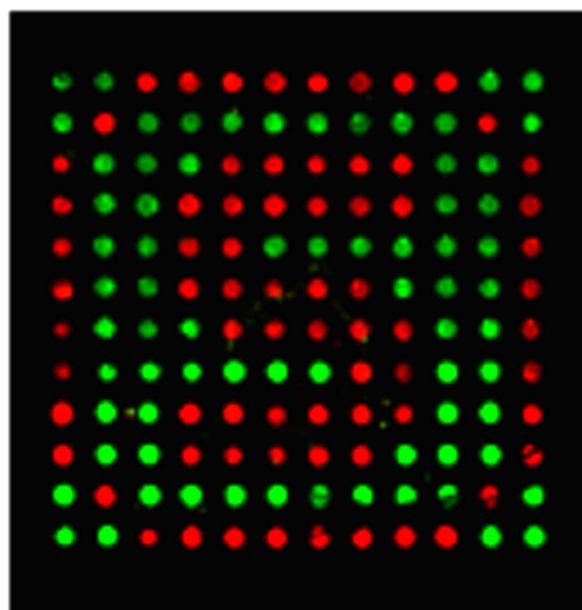
도면8



도면9



도면10



서열 목록

<110> Ewha University-Industry Collaboration Foundation
<120> Nanohybrid-driven Optical DNA Identification System

<130> 9P-02-27

<160> 4

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cy3-A

<400> 1
attcggacgc tcattcattct ggtgtggctg ctggc 35

<210> 2
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cy5-B

<400> 2
gccagcagcc acaccagaat gatgagcgtc cgaat 35

<210> 3
<211> 47
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> A'

<400> 3
tttttttttt ttgccagcag ccacaccaga atgatgagcg tccgaat 47

<210> 4
<211> 47
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> B'

<400> 4
tttttttttt ttattcggac gctcatcatt ctggtgtggc tgctggc 47