



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년06월26일

(11) 등록번호 10-2127111

(24) 등록일자 2020년06월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/487 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 33/48721 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0012832

(22) 출원일자 2019년01월31일

심사청구일자 2019년01월31일

(56) 선행기술조사문헌

Kleefen A. 등, Nano Letters, 2010, 10권, 페이지 5080-5087.(2010.10.27.)*

Lorent J., the journal of biological chemistry, 2013, 288권, 20호, 페이지 14000-14017.(2013.12.31.)*

JP2017523424 A

JP2019524155 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

김영록

경기도 안산시 단원구 선부광장1로 9, 910동 201호(선부동, 주공9단지아파트)

정기백

경기도 화성시 동탄문화센터로 38, 414동 1402호(반송동, 솔빛마을서해그랑블아파트)

임민철

서울특별시 광진구 능동로4길 78, 103동 1001호(자양동, 우방리버파크)

(74) 대리인

김연권

전체 청구항 수 : 총 13 항

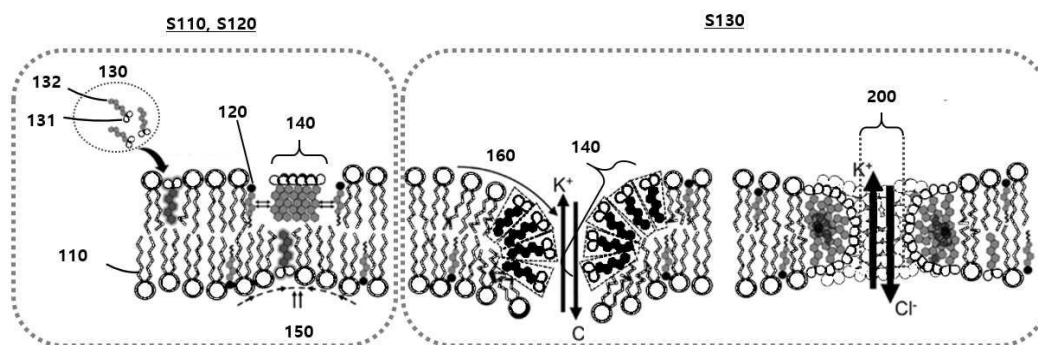
심사관 : 박성철

(54) 발명의 명칭 나노포어의 제조 방법 및 이를 통해 제조된 나노포어 구조체

(57) 요약

본 발명은 나노포어의 제조 방법 및 이를 통해 제조된 나노포어 구조체를 개시한다. 본 발명은 나노포어의 제조 방법이 콜레스테롤을 포함하는 지질막 내에 사포닌계 양친매성 물질을 첨가하는 단계; 상기 콜레스테롤을 포함하는 지질막 내에 양친매성 물질이 삽입되어 사포닌계 양친매성 물질 도메인을 형성하는 단계; 및 상기 사포닌계 양친매성 물질 도메인에 의한 자발적 양의 곡률(spontaneous positive curvature) 형성에 의해 나노포어를 형성하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.

대표도 - 도1



공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

콜레스테롤을 포함하는 지질막 내에 사포닌계 양친매성 물질을 첨가하는 단계;

상기 콜레스테롤을 포함하는 지질막 내에 양친매성 물질이 삽입되어 사포닌계 양친매성 물질 도메인을 형성하는 단계; 및

상기 사포닌계 양친매성 물질 도메인에 의한 자발적 양의 곡률(spontaneous positive curvature) 형성에 의해 나노포어를 형성하는 단계를 포함하고,

상기 콜레스테롤을 포함하는 지질막 내에 사포닌계 양친매성 물질을 첨가하는 단계는,

상기 콜레스테롤을 포함하는 지질막 내에 폴리디아세틸렌(Polydiacetylene, PDA)를 첨가하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 것을 특징으로 하는 나노포어의 제조 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 사포닌계 양친매성 물질은 알파-헤더린(α -hederin), 베타-에스신(β -escin), 베타-시토스테롤(β -sitosterol), 디지토닌(Digitonin), 글리시리진산(Glycyrrhetic acid), 헤테라코사이드계(Hederacoside), 진세노사이드계(Ginsenoside), 듀란타닌(Durantanin), 알비조사이드계(Albizoside), 코리아리오사이드계(Coriaroside), 줄리브로사이드계(Julibroside), 바코파사포닌계(Bacopasaponin), 디오스진(Dioscin), 프론도사이드(Frondoside), 하이드로코시사포닌(Hydrocosisaponin), 카리오카로사이드(Caryocaroside), 폴리필린(Polyphyllin), 팻시아사이드(Fatsiaside), 대시사이핀(Dasyscyphin), 기간테오사이드(Giganteoside), 과이아인(Guaianin), 시냅토사이드(Synaptoside), 고르도노사이드(Gordonosides), 디안벌시코사이드(Dianversicoside), 히드로코틸로사이드(Hydrocotyloside), 임페이셔노사이드(Impatienoside), 카필리포사이드(Capilliposide), 그라실린(Gracillin), 발라니틴(Balanitin), 피세노사이드(Physenoside), 지토닌(Gitonin), 부들레자사포닌(Buddlejasaponin), 인터시덴사이드(Intercedenside), 필리아스파로사이드(Filiasparoside), 사핀무사포닌(Sapinmusaponin), 아스파필리오사이드(Aspafilioside), 엡실란드로사이드(Ypsilandroside), 아스파라고사이드(Asparagoside), 아스파오리고닌(Aspaoligonin), 보리빌리아노사이드(Borivilianoside), 폴리펑토사이드(Polypunctoside), 디갈락토티고닌(Degalactotigonin) 및 아스파라닌(Asparanin) 중 적어도 어느 하나를 포함하는 것을 특징으로 하는 나노포어의 제조 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 콜레스테롤을 포함하는 지질막 내에 사포닌계 양친매성 물질을 첨가하는 단계는,

상기 사포닌계 양친매성 물질의 친수성 부분이 상기 콜레스테롤을 포함하는 지질막의 외부로 향하도록 삽입되는 것을 특징으로 하는 나노포어의 제조 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 콜레스테롤을 포함하는 지질막 내에 사포닌계 양친매성 물질을 첨가하는 단계는,

상기 지질막의 물농도는 30mM 내지 200mM 인 것을 특징으로 하는 나노포어의 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 콜레스테롤을 포함하는 지질막 내에 사포닌계 양친매성 물질을 첨가하는 단계는,

상기 사포닌계 양친매성 물질의 물농도는 1 μ M 내지 1mM인 것을 특징으로 하는 나노포어의 제조방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 사포닌계 양친매성 물질 도메인에 의한 자발적 양의 곡률 형성에 의해 나노포어를 형성하는 단계는,

상기 콜레스테롤의 농도에 따라 상기 나노포어의 형성빈도(frequency), 상기 나노포어의 크기 및 상기 나노포어의 수명 중 적어도 어느 하나가 조절되는 것을 특징으로 하는 나노포어의 제조 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 콜레스테롤의 농도는 상기 콜레스테롤을 포함하는 지질막의 전체 농도 대비 1.5 mM 내지 140 mM인 것을 특징으로 하는 나노포어의 제조 방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 사포닌계 양친매성 물질 도메인에 의한 자발적 양의 곡률(spontaneous positive curvature) 형성에 의해 나노포어를 형성하는 단계는,

상기 사포닌계 양친매성 물질의 물농도에 따라 상기 나노포어의 형성빈도 또는 상기 나노포어의 수명이 조절되는 것을 특징으로 하는 나노포어의 제조 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 사포닌계 양친매성 물질의 물농도는 1 μ M 내지 1mM 인 것을 특징으로 하는 나노포어의 제조 방법.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 지질막은 1,2-디피타노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DPhPC), 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DPPC), 1,2-디헥사노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dihexanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DHPC), 1,2-디라우로일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DLPC), 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DMPC), 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphorylethanolamine DMPE), 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포릴글리세롤(1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphorylglycerol, DMPG), 1,2-디올레오일-sn-글리세

로-3-포스포-L-세린(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine, DOPS), 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, DOPE), 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포글리세롤(1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol, DOPG), 디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DSPC) 및 1-팔미토일-2-올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1-Palmitoyl-2-oleoyl-SN-glycero-3-phosphocholine, POPC) 중 적어도 어느 하나를 포함하는 것을 특징으로 하는 나노포어의 제조 방법.

청구항 11

삭제

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 폴리디아세틸렌은 10,12-펜타코사다이에노익산(10,12-pentacosadiynoic acid, PCDA), 10,12-트라이코사다이에노익산(10,12-tricosadiynoic acid, TCDA) 및 8,10-헨네인코사다이에노익산(8,10-heneicosadiynoic acid, HCDA) 중 적어도 어느 하나를 포함하는 것을 특징으로 하는 나노포어의 제조 방법.

청구항 13

제1항에 있어서,

상기 콜레스테롤을 포함하는 지질막 내에 폴리디아세틸렌을 첨가하는 단계는,

상기 폴리디아세틸렌의 농도에 따라 상기 나노포어의 개수가 조절되는 것을 특징으로 하는 나노포어의 제조 방법.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 폴리디아세틸렌의 농도는 상기 콜레스테롤을 포함하는 지질막의 전체 농도 대비 0.3 mM 내지 100 mM 인 것을 특징으로 하는 나노포어의 제조 방법.

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 나노포어의 제조 방법 및 이를 통해 제조된 나노포어 구조체에 관한 것으로, 보다 상세하게는 생체 분자 간 상호 작용을 통한 자가조립에 의해 간단한 공정으로 우수한 공간분해능을 갖는 나노포어의 제조 방법 및 이를 통해 제조된 나노포어 구조체에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 전 세계적으로 질병 진단과 밀접한 관련이 있는 바이오 마커의 검출이나 염기 서열 분석에 있어서 비표지·고효율 분석이 가능한 다양한 소재의 나노포어 플랫폼 기술들이 개발되고 있다.

[0004] 시료 내에서 핵산(DNA, RNA)과 같은 표적 생분자를 검출하고 염기서열을 결정하기 위해 다양한 방법이 개발되고 있는데, 그 중에서 나노포어(nanopore)를 이용한 방법은 고감도 핵산 검출 시스템으로 각광을 받고 있다. 나노포어를 이용한 DNA 검출 시스템은 DNA가 나노포어를 통과할 때 발생하는 전류의 미세 변동을 감지하여 DNA의 염기 서열을 결정하거나(DNA sequencing), DNA 내 메틸화된 부위 또는 이로 인한 구조의 변화 또는 DNA와 결합하고 있는 단백질의 크기 및 위치를 분석할 수 있다. 그 외에도 RNA의 구조나 단백질-약물성분의 결합여부 및 상호작용을 분석할 수 있다. 대표적으로 연구되고 있는 나노포어 플랫폼 기술은 단백질 나노포어 및 고체상 나노포어 기술이다. 단백질 나노포어의 경우, 높은 신호 대 잡음 비(signal to noise ratio) 특성을 바탕으로 우수한 분석 해상도를 가지고 있으나 플랫폼의 안정성이 낮고 채널 단백질의 구조가 고정되어있기 때문에 포어의 크기를 제어할 수 없는 단점을 가지고 있어, 적용할 수 있는 검체의 종류에 제약이 따른다.

[0005] 한편, 고체상 나노포어는 안정성이 높고 포어 크기의 제어가 가능하다는 장점이 있으나 저압화학기상증착, 포토 리소그래피, Reactive-ion etching, 그리고 TEM Drilling 등 제작공정이 매우 복잡하고 제작에 소요되는 비용이 높을 뿐 아니라, 검체와의 비특이적 결합에 따른 포어 막힘(clogging) 문제와 낮은 신호 대 잡음 비(signal to noise ratio)에 기인하여 분석 해상도가 낮다는 단점이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-1922127호(2018.11.20), "향상된 감도를 갖는 나노포어 소자 및 그 제조 방법"

(특허문헌 0002) 대한민국 공개특허 제 10-2017-0118229호(2017.10.24), "경쟁 검정법을 통한 저분자의 나노포어 검출"

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 실시예는 지질막 내에서 사포닌계 양친매성 물질의 상호 작용에 기인한 자가조립을 통해 크기제어가 가능한 나노포어의 제조 방법을 제공하고자 한다.

[0009] 본 발명의 실시예는 지질막 내에서 사포닌계 양친매성 물질의 상호 작용에 기인한 자가조립을 통해 간단한 공정 및 저비용으로 제조할 수 있는 나노포어의 제조 방법을 제공하고자 한다.

[0010] 본 발명의 실시예는 인공 생체막을 기반으로 제조하여 생체막 고유의 높은 신호 대 잡음 비(signal to noise ratio) 특성을 바탕으로 검체 분석 시 우수한 분석 해상도를 가질 수 있는 나노포어의 제조 방법을 제공하고자 한다.

[0011] 본 발명의 실시예는 지질막 내에서 사포닌계 양친매성 물질의 상호 작용에 기인한 자가조립을 통해 나노포어의 직경, 두께 및 구조를 조절하여 기존의 단백질 나노포어 또는 고체상 나노포어 대비 공간 분해능이 개선된 나노포어 구조체를 제공하고자 한다.

[0012] 더욱이, 본 발명의 실시예는 크기가 다른 검체(이중가닥DNA, 단일가닥 DNA 또는 단백질)의 분석뿐 아니라 단일 염기(A, T, G, C)의 검지도 가능하여 염기서열분석 플랫폼 기술로 적용할 수 있는 신규 나노포어 구조체를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0014] 본 발명의 실시예에 따른 나노포어 제조 방법은 콜레스테롤을 포함하는 지질막 내에 사포닌계 양친매성 물질을 첨가하는 단계; 상기 콜레스테롤을 포함하는 지질막 내에 양친매성 물질이 삽입되어 사포닌계 양친매성 물질 도메인을 형성하는 단계; 및 상기 사포닌계 양친매성 물질 도메인에 의한 자발적 양의 곡률(spontaneous positive curvature) 형성에 의해 나노포어를 형성하는 단계를 포함한다.
- [0015] 상기 사포닌계 양친매성 물질은 알파-헤더린(α -hederin), 베타-에스신(β -escin), 베타-시토스테롤(β -sitosterol), 디지토닌(Digitonin), 글리시리진산(Glycyrrhetic acid), 헤데라코사이드계(Hederacoside), 진세노사이드계(Ginsenoside), 듀란타닌(Durantanin), 알비조사이드계(Albizoside), 코리아리오사이드계(Corarioside), 줄리브로사이드계(Julibroside), 바코파사포닌계(Bacopasaponin), 디오스진(Dioscin), 프론도사이드(Frondoside), 하이드로코시사포닌(Hydrocosisaponin), 카리오카로사이드(Caryocaroside), 폴리필린(Polyphyllin), 팻시아사이드(Fatsiaside), 대시사이핀(Dasyscyphin), 기간테오사이드(Giganteoside), 과이아인(Guaianin), 시냅토사이드(Synaptoside), 고르도노사이드(Gordonosides), 디안벌시코사이드(Dianversicoside), 히드로코틸로사이드(Hydrocotyloside), 임페이셔노사이드(Impatienoside), 카필리포사이드(Capilliposide), 그라실린(Gracillin), 발라니틴(Balanitin), 피세노사이드(Physenoside), 지토닌(Gitonin), 부들레자사포닌(Buddlejasaponin), 인터시덴사이드(Intercedenside), 필리아스파로사이드(Filiasparoside), 사핀무사포닌(Sapimusaponin), 아스파필리오사이드(Aspafilioside), 엡실란드로사이드(Ypsilandroside), 아스파라고사이드(Asparagoside), 아스파올리곤닌(Aspaoligonin), 보리빌리아노사이드(Borivilianoside), 폴리펑토사이드(Polypunctoside), 디갈락토티곤닌(Degalactotigonin) 및 아스파라닌(Asparanin) 중 적어도 어느 하나를 포함할 수 있다.
- [0016] 상기 콜레스테롤을 포함하는 지질막 내에 사포닌계 양친매성 물질을 첨가하는 단계는, 상기 사포닌계 양친매성 물질의 친수성 부분이 상기 콜레스테롤을 포함하는 지질막의 외부로 향하도록 삽입될 수 있다.
- [0017] 상기 콜레스테롤을 포함하는 지질막 내에 사포닌계 양친매성 물질을 첨가하는 단계는, 상기 지질막의 물농도가 30mM 내지 200mM일 수 있다.
- [0018] 상기 콜레스테롤을 포함하는 지질막 내에 사포닌계 양친매성 물질을 첨가하는 단계는, 상기 사포닌계 양친매성 물질의 물농도가 1 μ M 내지 1mM일 수 있다.
- [0019] 상기 사포닌계 양친매성 물질 도메인에 의한 자발적 양의 곡률 형성에 의해 나노포어를 형성하는 단계는, 상기 콜레스테롤의 농도에 따라 상기 나노포어의 형성빈도(frequency), 상기 나노포어의 크기 및 상기 나노포어의 수명 중 적어도 어느 하나가 조절될 수 있다.
- [0020] 상기 콜레스테롤의 농도는 상기 콜레스테롤을 포함하는 지질막의 전체 농도 대비 1.5 mM 내지 140 mM일 수 있다.
- [0021] 상기 사포닌계 양친매성 물질 도메인에 의한 자발적 양의 곡률(spontaneous positive curvature) 형성에 의해 나노포어를 형성하는 단계는, 상기 사포닌계 양친매성 물질의 물농도에 따라 상기 나노포어의 형성빈도 또는 상기 나노포어의 수명이 조절될 수 있다.
- [0022] 상기 사포닌계 양친매성 물질의 물농도는 1 μ M 내지 1mM 일 수 있다.
- [0023] 상기 지질막은 1,2-디피타노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DPhPC), 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DPPC), 1,2-디헥사노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dihexanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DHPC), 1,2-디라우로일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DLPC), 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DMPC), 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphorylethanolamine DMPE), 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포릴글리세롤(1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphorylglycerol, DMPG), 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포-L-세린(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine, DOPS), 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, DOPE), 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포글리세롤(1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol, DOPG), 디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DSPC) 및 1-팔미토일-2-올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1-Palmitoyl-2-oleoyl-SN-glycero-3-phosphocholine, POPC) 중 적어도 어느 하나를 포함할 수 있다.

- [0024] 상기 콜레스테롤을 포함하는 지질막 내에 사포닌계 양친매성 물질을 첨가하는 단계는, 상기 콜레스테롤을 포함하는 지질막 내에 폴리디아세틸렌(Polydiacetylene, PDA)를 첨가하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0025] 상기 폴리디아세틸렌은 10,12-펜타코사다이에노익산(10,12-pentacosadiynoic acid, PCDA), 10,12-트라이코사다이에노익산(10,12-tricosadiynoic acid, TCDA) 및 8,10-헨네인코사다이에노익산(8,10-heneicosadiynoic acid, HCDA) 중 적어도 어느 하나를 포함할 수 있다.
- [0026] 상기 콜레스테롤을 포함하는 지질막 내에 폴리디아세틸렌을 첨가하는 단계는, 상기 폴리디아세틸렌의 농도에 따라 상기 나노포어의 개수가 조절될 수 있다.
- [0027] 상기 폴리디아세틸렌의 농도는 상기 콜레스테롤을 포함하는 지질막의 전체 농도 대비 0.3 mM 내지 100 mM일 수 있다.
- [0028] 본 발명의 실시예에 따른 나노포어 구조체는 콜레스테롤을 포함하는 지질막 내에 형성된 적어도 하나의 나노포어를 포함하고, 상기 적어도 하나의 나노포어의 내벽은 사포닌계 양친매성 도메인을 포함한다.
- [0029] 상기 사포닌계 양친매성 물질은 알파-헤더린(α -hederin), 베타-에스신(β -escin), 베타-시토스테롤(β -sitosterol), 디지토닌(Digitonin), 글리시리진산(Glycyrrhetic acid), 헤데라코사이드계(Hederacoside), 진세노사이드계(Ginsenoside), 듀란타닌(Durantanin), 알비조사이드계(Albizoside), 코리아리오사이드계(Coriariside), 줄리브로사이드계(Julibroside), 바코파사포닌계(Bacopasaponin), 디오스진(Dioscin), 프론도사이드(Frondoside), 하이드로코시사포닌(Hydrocosisaponin), 카리오카로사이드(Caryocaroside), 폴리필린(Polyphyllin), 팻시아사이드(Fatsiaside), 대시사이핀(Dasyscyphin), 기간테오사이드(Giganteoside), 과이아인(Guaianin), 시냅토사이드(Synaptoside), 고르도노사이드(Gordonosides), 디안벌시코사이드(Dianversicoside), 히드로코틸로사이드(Hydrocotyloside), 임페셔노사이드(Impatienoside), 카필리포사이드(Capilliposide), 그라실린(Gracillin), 발라니틴(Balanitin), 피세노사이드(Physenoside), 지토닌(Gitonin), 부들레자사포닌(Buddlejasaponin), 인터시덴사이드(Intercedenside), 필리아스파로사이드(Filiasparoside), 사핀무사포닌(Sapinmusaponin), 아스파필리오사이드(Aspafilioside), 엡실란드로사이드(Ypsilandroside), 아스파라고사이드(Asparagoside), 아스파올리곤닌(Aspaoligonin), 보리빌리아노사이드(Borivilianoside), 폴리펑토사이드(Polypunctoside), 디갈락토티곤닌(Degalactotigonin) 및 아스파라닌(Asparanin) 중 적어도 어느 하나를 포함할 수 있다.
- [0030] 상기 사포닌계 양친매성 물질 도메인은 양의 곡률(positive curvature)을 가질 수 있다.
- [0031] 상기 적어도 하나의 나노포어의 직경은 0.6nm 내지 2.5nm 일 수 있다.

발명의 효과

- [0033] 본 발명의 실시예에 따르면, 지질막 내에서 사포닌계 양친매성 물질의 상호 작용에 기인한 자가조립을 통해 크기 제어가 가능한 나노포어의 제조 방법을 제공할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 실시예에 따르면, 지질막 내에서 사포닌계 양친매성 물질의 상호 작용에 기인한 자가조립을 통해 나노포어의 크기를 제어하여 다양한 크기를 가지는 검체 분석에 있어서 호환성이 향상된 나노포어의 제조 방법을 제공할 수 있다.
- [0035] 본 발명의 실시예에 따르면, 지질막 내에서 사포닌계 양친매성 물질의 상호 작용에 기인한 자가조립을 통해 간단한 공정 및 저비용으로 제조할 수 있는 나노포어의 제조 방법을 제공할 수 있다.
- [0036] 본 발명의 실시예에 따르면, 지질막을 기반으로 제조하여 지질막 고유의 높은 신호 대 잡음 비(signal to noise ratio) 특성을 바탕으로 검체 분석 시 우수한 분석해상도를 가질 수 있는 나노포어의 제조 방법을 제공할 수 있다.
- [0037] 본 발명의 실시예에 따르면, 지질막 내에서 사포닌계 양친매성 물질의 상호 작용에 기인한 자가조립을 통해 나노포어의 직경, 두께 및 구조를 조절하여 기존 단백질 나노포어 대비 공간 분해능이 개선된 나노포어 구조체를 제공할 수 있다.
- [0038] 더욱이, 본 발명의 실시예에 따르면, 크기가 다른 검체(이중가닥DNA, 단일가닥 DNA, RNA, 단백질 또는 단일분자)의 분석뿐 아니라 단일염기(A, T, G, C)의 검지도 가능한 신규 염기서열분석 플랫폼으로 적용할 수 있는 나노포어 구조체를 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0040] 도 1은 본 발명의 실시예에 따른 나노포어의 제조 방법을 도시한 개략도이다.
- 도 2는 본 발명의 실시예에 따른 나노포어의 제조 방법에 따라 제조된 본 발명의 실시예에 따른 나노포어 구조체를 도시한 개략도이다.
- 도 3a는 DPhPC의 화학식을 도시한 이미지이고, 도 3b는 콜레스테롤의 화학식을 도시한 이미지이며, 도 3c는 알파-헤더린의 화학식을 도시한 이미지이고, 도 3d는 폴리디아세틸렌의 화학식을 도시한 이미지이다.
- 도 4는 본 발명의 실시예에 따른 나노포어의 제조 방법에 따라 제조된 나노포어의 존재 여부에 따른 미세 전류 측정 결과를 도시한 이미지이다.
- 도 5a 및 도 5b는 본 발명의 실시예에 따른 나노포어 구조체를 이용한 단일가닥 DNA의 분석결과를 도시한 그래프이며, 도 5c 및 도 5d는 본 발명의 실시예에 따른 나노포어 구조체를 이용한 단일가닥 DNA의 검체 통과 신호의 통계적 분석을 도시한 그래프이다.
- 도 6a는 본 발명의 실시예에 따른 나노포어 구조체를 이용한 DNA 호모폴리머(Poly-A40, Poly-T40, Poly-C40)의 분석결과인 시간에 따른 전류량의 변화(current trace)를 도시한 그래프이고, 도 6b는 본 발명의 실시예에 따른 나노포어 구조체를 이용한 DNA 호모폴리머의 검체 통과 신호의 통계적 분석을 도시한 그래프이다.
- 도 7a는 본 발명의 실시예에 따른 나노포어 구조체를 이용한 단일염기의 분석결과를 도시한 그래프이며, 도 7b 및 도 7c는 본 발명의 실시예에 따른 나노포어 구조체를 이용한 단일염기의 검체 통과 신호의 통계적 분석을 도시한 그래프이다.
- 도 8a는 콜레스테롤의 농도에 따른 본 발명의 실시예에 따른 나노포어 구조체의 전류량의 변화(current trace)를 도시한 그래프이고, 도 8b는 콜레스테롤의 농도에 따른 본 발명의 실시예에 따른 나노포어 구조체로부터 유래된 나노포어의 전도도별 빈도를 도시한 그래프이다.
- 도 9a는 폴리디아세틸렌(PDA)의 농도에 따른 본 발명의 실시예에 따른 나노포어 구조체의 전류량의 변화(current trace)를 도시한 그래프이고, 도 9b는 폴리디아세틸렌/지질막 몰비에 따른 나노포어 형성빈도를 도시한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0041] 이하에서 본 발명을 설명함에 있어서, 관련된 공지 기능 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐리는 경우 그 상세한 설명을 생략하기로 한다. 또한, 후술되는 용어들은 본 발명에서의 기능을 고려하여 설정된 용어들로서 이는 생산자의 의도 또는 당업계의 관례에 따라 달라질 수 있으므로 그 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다.
- [0042] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시예에 따른 나노포어의 제조 방법 및 나노포어 구조체에 대해 설명하기로 한다.
- [0044] 도 1은 본 발명의 실시예에 따른 나노포어의 제조 방법을 도시한 개략도이다.
- [0045] 본 발명의 실시예에 따른 나노포어 제조 방법은 콜레스테롤(120)을 포함하는 지질막(110) 내에 사포닌계 양친매성 물질(130)을 첨가하는 단계(S110), 콜레스테롤(120)을 포함하는 지질막(110) 내에 사포닌계 양친매성 물질(130)이 삽입되어 사포닌계 양친매성 물질 도메인(140)을 형성하는 단계(S120) 및 사포닌계 양친매성 물질 도메인(140)에 의한 자발적 양의 곡률(spontaneous positive curvature; 160) 형성에 의해 나노포어를 형성하는 단계(S130)를 포함한다.
- [0046] 따라서, 본 발명의 실시예에 따른 나노포어 제조 방법은 콜레스테롤(120)을 포함하는 지질막(110) 내에서 사포닌계 양친매성 물질(130)의 상호 작용에 기인한 자가조립을 통해 나노포어(200)의 직경, 두께 및 구조를 조절하여 기존 단백질 나노포어 대비 공간 분해능을 개선할 수 있다.
- [0047] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 나노포어 제조 방법은 지질막(110), 콜레스테롤(120) 및 사포닌계 양친매성 물질(130)과 같은 인공 생체막을 사용함으로써, 생체막 고유의 높은 신호 대 잡음 비(signal to noise ratio) 특성을 바탕으로 검체 분석 시 우수한 분석해상도를 가질 수 있다.
- [0048] 먼저, 본 발명의 실시예에 따른 나노포어 제조 방법은 콜레스테롤(120)을 포함하는 지질막(110) 내에 사포닌계

양친매성 물질(130)을 첨가하는 단계(S110)를 진행한다.

- [0049] 보다 구체적으로, 콜레스테롤(120)을 포함하는 지질막(110) 내에 사포닌계 양친매성 물질(130)을 첨가하는 단계(S110)는 용매(예; 물) 및 1M의 염화칼륨(KCl)을 포함하는 전해질 용액 내에 용매(예; 물), 콜레스테롤(120) 및 인지질을 포함하는 지질 용액을 첨가하여 콜레스테롤(120)을 포함하는 지질막(110)을 제조한 후, 사포닌계 양친매성 물질(130)을 포함하는 전해질 용액을 첨가할 수 있다.
- [0050] 사포닌계 양친매성 물질(130)은 알파-헤더린(α -hederin), 베타-에스신(β -escin), 베타-시토스테롤(β -sitosterol), 디지토닌(Digitonin), 글리시리진산(Glycyrrhetic acid), 헤데라코사이드계(Hederacoside), 진세노사이드계(Ginsenoside), 듀란타닌(Durantanin), 알비조사이드계(Albizoside), 코리아리오사이드계(Coriarioside), 줄리브로사이드계(Julibroside), 바코파사포닌계(Bacopasaponin), 디오스진(Dioscin), 프론도사이드(Frondoside), 하이드로코시사포닌(Hydrocosisaponin), 카리오카로사이드(Caryocaroside), 폴리필린(Polyphyllin), 팻시아사이드(Fatsiaside), 대시사이핀(Dasyscyphin), 기간테오사이드(Giganteoside), 과이아인(Guaianin), 시냅토사이드(Synaptoside), 고르도노사이드(Gordonosides), 디안벌시코사이드(Dianversicoside), 히드로코틸로사이드(Hydrocotyloside), 임페이셔노사이드(Impatienoside), 카필리포사이드(Capilliposide), 그라실린(Gracillin), 발라니틴(Balanitin), 피세노사이드(Physenoside), 지토닌(Gitonin), 부들레자사포닌(Buddlejasaponin), 인터시덴사이드(Intercedenside), 필리아스파로사이드(Filiasparoside), 사핀무사포닌(Sapinmusaponin), 아스파필리오사이드(Aspafilioside), 엡실란드로사이드(Ypsilandroside), 아스파라고사이드(Asparagoside), 아스파올리곤닌(Aspaoligonin), 보리빌리아노사이드(Borivilianoside), 폴리펑토사이드(Polypunctoside), 디갈락토티고닌(Degalactotigonin) 및 아스파라닌(Asparanin) 중 적어도 어느 하나를 포함할 수 있고, 바람직하게는, 사포닌계 양친매성 물질(130)은 알파-헤더린을 포함할 수 있다.
- [0051] 사포닌계 양친매성 물질(130)은 양친매성 물질로 한쪽 끝에는 친수성 부분(131)을 포함하고, 다른 끝에는 소수성 부분(132)을 포함할 수 있다.
- [0052] 따라서, 사포닌계 양친매성 물질(130)의 친수성 부분(131)은 콜레스테롤(120)을 포함하는 지질막(110)의 외부(표면)로 향하도록 콜레스테롤(120)을 포함하는 지질막(110) 내에 삽입될 수 있다.
- [0053] 예를 들어, 사포닌계 양친매성 물질(130)로 알파-헤더린을 사용하는 경우, 알파-헤더린의 친수성 당 부분(hydrophilic sugar moiety, 131)은 지질막(110)의 외부(표면)로 향하고, 알파 헤더린의 트리테르페닉 부분(triterpenic part, 132)은 지질막(110)의 소수성 코어(hydrophobic core) 부분으로 향하도록 삽입될 수 있다.
- [0054] 즉, 알파-헤더린의 트리테르페닉 부분(132)은 구조 내 친수성을 가지는 카르복실 기(carboxyl group)에 기인한 콜레스테롤(120)의 소수성 부분과 척력(repulsive force)을 나타내어 콜레스테롤(120)을 포함하는 지질막(110) 내에서 알파-헤더린이 분리됨으로써, 알파-헤더린 사포닌계 양친매성 물질 도메인(140)을 형성할 수 있다.
- [0055] 따라서, 본 발명의 실시예에 따른 나노포어 제조 방법은 콜레스테롤(120)을 포함하는 지질막(110) 내에서 사포닌계 양친매성 물질(130)의 상호 작용에 기인한 사포닌계 양친매성 물질 도메인(140)의 크기를 제어함으로써 나노포어(200)의 크기를 조절할 수 있으며, 이를 통해 다양한 크기를 가지는 검체 분석의 호환성을 향상시킬 수 있다.
- [0056] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 나노포어 제조 방법은 콜레스테롤(120)을 포함하는 지질막(110) 내에서 사포닌계 양친매성 물질(130)의 상호 작용에 기인한 자가조립을 통해 간단한 공정 및 저비용으로 나노포어(200)를 제조할 수 있다.
- [0057] 지질막(110) 내에 포함되는 콜레스테롤(120)은 양친매성 물질로, 콜레스테롤(120)을 포함하는 지질막(110)의 안정성을 증가시킬 수 있고, 콜레스테롤(120)은 나노포어(200) 형성 개수에 영향을 줄 수 있으며, 콜레스테롤(120)은 지질막(110)의 탄성도에 영향을 줌으로써 나노포어(200)의 분리력(disjoining force)이 변화됨에 따라 나노포어(200) 수명이 조절될 수 있다.
- [0058] 따라서, 본 발명의 실시예에 따른 나노포어 제조 방법은 콜레스테롤(120)의 농도에 따라 나노포어(200)의 형성 빈도(frequency), 나노포어(200)의 크기 및 나노포어(200)의 수명 중 적어도 어느 하나를 조절할 수 있다.
- [0059] 지질막(110)을 형성하고 있는 인지질은 양친매성 물질로, 나노포어(200)의 지지체로 사용될 수 있다.
- [0060] 예를 들어, 지질막(110)은 1,2-디피타노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DPhPC), 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DPPC), 1,2-디헥사노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dihexanoyl-sn-glycero-3-

phosphocholine, DHPC), 1,2-디라우로일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DLPC), 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DMPC), 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포틸에탄올아민(1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphorylethanolamine DMPE), 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포틸글리세롤(1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphorylglycerol, DMPG), 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포-L-세린(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine, DOPS), 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, DOPE), 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포글리세롤(1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol, DOPG), 디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DSPC) 및 1-팔미토일-2-올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1-Palmitoyl-2-oleoyl-SN-glycero-3-phosphocholine, POPC) 중 적어도 어느 하나를 포함할 수 있다.

- [0061] 콜레스테롤(120)을 포함하는 지질막(110)의 형성에 사용되는 지질 용액(콜레스테롤+인지질)의 물농도 대비 인지질의 물농도는 9mM 내지 190mM일 수 있고, 인지질의 물농도가 9 mM 이하이면 지질막(110)을 형성할 때 이중막의 안정성이 감소되고, 190 mM 이상이면 다중막 형성률이 높아 사포닌계 양친매성 물질(130)에 의한 나노포어(200) 형성률이 감소될 수 있다.
- [0062] 콜레스테롤(120)을 포함하는 지질막(110)의 형성에 사용되는 지질 용액(콜레스테롤+인지질)의 물농도는 30mM 내지 200mM일 수 있다.
- [0063] 예를 들어, 인지질의 물농도는 콜레스테롤(120)을 포함하는 지질막(110)을 형성하기 위한 지질 용액(콜레스테롤+인지질)의 전체 농도 대비 지질막(110)의 최종 물농도일 수 있다.
- [0064] 사포닌계 양친매성 물질(130)의 물농도는 1 μ M 내지 1mM일 수 있고, 사포닌계 양친매성 물질(130)의 물농도가 1 μ M 이하이면 나노포어(140) 형성률이 낮아지고, 나노포어(140) 형성 시간이 길어지는 문제가 있으며, 1 mM 이상이면 지질막(110)에 다중 포어가 높은 빈도로 형성되는 문제가 있다.
- [0065] 예를 들어, 사포닌계 양친매성 물질(130)의 물농도는 사포닌계 양친매성 물질(130)을 포함하는 전해질 용액의 전체 농도 대비 사포닌계 양친매성 물질(130)의 최종 물농도일 수 있다.
- [0066] 실시예에 따라, 콜레스테롤(120)을 포함하는 지질막(110) 내에 사포닌계 양친매성 물질을 첨가하는 단계(S110)는, 콜레스테롤(120)을 포함하는 지질막(110) 내에 폴리디아세틸렌(Polydiacetylene, PDA)을 첨가하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0067] 폴리디아세틸렌은 10,12-펜타코사다이에노익산(10,12-pentacosadiynoic acid, PCDA), 10,12-트라이코사다이에노익산(10,12-tricosadiynoic acid, TCDA) 및 8,10-헤네인코사다이에노익산(8,10-heneicosadiynoic acid, HCDA) 중 적어도 어느 하나를 포함할 수 있다.
- [0068] 본 발명의 실시예에 따른 나노포어의 제조 방법은 폴리디아세틸렌을 추가함으로써, 콜레스테롤(120)을 포함하는 지질막(110) 내에 나노포어(200)의 형성 빈도수를 낮추어 하나의 나노포어(200)를 확보할 수 있는 확률을 증가시킬 수 있다.
- [0069] 폴리디아세틸렌은 콜레스테롤(120)을 포함하는 지질막(110) 내에서 폴리디아세틸렌 간의 도메인(폴리디아세틸렌 도메인)을 형성하고, 폴리디아세틸렌으로 구성된 도메인 내에서는 사포닌계 양친매성 물질(130)이 나노 구조체를 형성할 수 없기 때문에, 사포닌계 양친매성 물질(130)은 콜레스테롤(120)을 포함하는 지질막(110) 내로만 삽입되어 나노포어(200)의 형성 개수를 감소시킬 수 있다.
- [0070] 구체적으로, 콜레스테롤(120)을 포함하는 지질막(110) 내에 1개의 나노포어(200)만 형성하기 위해서는 나노포어(200)의 형성 빈도수(형성 빈도)가 제어되어야 하는데, 나노포어(200)의 형성 빈도수(형성 빈도)는 콜레스테롤(120)을 포함하는 지질막(110) 내의 폴리디아세틸렌의 농도에 따라 조절될 수 있다.
- [0071] 나노포어(200)의 형성 빈도수(형성 빈도)는 폴리디아세틸렌의 농도에 반비례하기 때문에, 콜레스테롤(120)을 포함하는 지질막(110) 내에 폴리디아세틸렌의 농도를 증가시키면, 나노포어(200)의 형성 빈도수(형성 빈도)가 감소되어, 나노포어(200)의 개수를 감소시킬 수 있다.
- [0072] 본 발명의 실시예에 따른 나노포어의 제조 방법은 폴리디아세틸렌의 농도가 콜레스테롤(120)을 포함하는 지질막(100)의 전체 농도 대비 0.3 mM 내지 100 mM일 수 있고, 폴리디아세틸렌의 농도가 0.3 mM 이하이면, 나노포어(200) 개수에 끼치는 영향이 적고, 100 mM 이상이면, 나노포어(200) 형성 빈도가 매우 낮아지는 문제가 있다.

- [0073] 이때, 콜레스테롤(120)을 포함하는 지질막(100)의 전체 농도는 30mM 내지 200mM일 수 있다. 따라서, 지질 용액(인지질+콜레스테롤)의 전체 농도는 30mM 내지 200mM일 수 있다.
- [0074] 예를 들면, 폴리디아세틸렌의 농도는 지질 용액(콜레스테롤+인지질+폴리디아세틸렌)의 전체 농도 대비 폴리디아세틸렌의 농도일 수 있다.
- [0075] 이 후, 본 발명의 실시예에 따른 나노포어의 제조 방법은 콜레스테롤(120)을 포함하는 지질막(110) 내에 사포닌계 양친매성 물질(130)이 삽입되어 사포닌계 양친매성 물질 도메인(140)을 형성하는 단계(S120)를 진행한다.
- [0076] 콜레스테롤(120)을 포함하는 지질막(110) 내에 사포닌계 양친매성 물질(130)이 첨가되면, 사포닌계 양친매성 물질(130)과 지질막(110) 사이에는 인력이 발생되어, 지질막(110) 내에 사포닌계 양친매성 물질(130)이 삽입되게 되고, 콜레스테롤(120)과는 척력이 발생하게 되어, 콜레스테롤(120)을 포함하는 지질막(110) 내에 사포닌계 양친매성 물질 도메인(140)이 형성될 수 있다.
- [0077] 마지막으로, 본 발명의 실시예에 따른 나노포어의 제조 방법은 사포닌계 양친매성 물질 도메인(140)을 통한 자발적 양의 곡률(160)에 의해 나노포어(200)를 형성하는 단계(S130)를 진행한다.
- [0078] 콜레스테롤(120)을 포함하는 지질막(110) 내에서 콜레스테롤(120)과 사포닌계 양친매성 물질(130) 사이의 상호작용에 의해 유도된 사포닌계 양친매성 물질 도메인(140)은 원추형상(cone-shape)인 사포닌계 양친매성 물질(130)의 구조적 특징에 기인하여 마이셀화(micellization)되는데, 지질막(110; 보다 구체적으로, 인지질)과의 인력에 의해 콜레스테롤(120)을 포함하는 지질막(110) 내에서 자발적인 양의 곡률(160)을 유도하고, 이러한 작용에 의해 콜레스테롤(120)을 포함하는 지질막(110) 내에 나노포어(200)가 형성될 수 있다.
- [0079] 또한, 사포닌계 양친매성 물질 도메인(140)을 통한 자발적 양의 곡률(160)에 의해 나노포어(200)를 형성하는 단계(S130)는, 사포닌계 양친매성 물질(130)의 농도에 따라 나노포어(200)의 형성 빈도 및 나노포어(200)의 수명이 조절될 수 있다.
- [0080] 콜레스테롤(120)을 포함하는 지질막(110) 내에 사포닌계 양친매성 물질(130)의 농도가 증가할수록 사포닌계 양친매성 물질 도메인(140)이 증가하게 되어 나노포어(200)의 수가 증가될 수 있다.
- [0081] 또한, 콜레스테롤(120)을 포함하는 지질막(110)에 사포닌계 양친매성 물질(130)의 삽입에 따른 지질막(110)의 무질서화(150) 현상에 기인하여 막의 두께가 얇아질 수 있다. 따라서, 콜레스테롤(120)을 포함하는 지질막(110)과 나노포어(200) 간의 소수성부정합(hydrophobic mismatch)이 감소됨으로써, 나노포어(200)에 가해지는 분리력이 감소되어 나노포어(200)의 수명이 증가될 수 있다.
- [0082] 바람직하게는, 사포닌계 양친매성 물질(130)의 물농도는 1 μ M 내지 1 mM일 수 있고, 사포닌계 양친매성 물질(130)의 물농도가 1 μ M 이하이면, 나노포어(200) 형성에 오랜 시간이 소요될 수 있고, 1mM 이상이면, 콜레스테롤(120)을 포함하는 지질막(110)에 다중 포어가 높은 빈도로 형성되는 문제가 있고, 사포닌계 양친매성 물질(130)의 계면활성제 특성에 기인하여 지질막(110)의 안정성이 감소될 수 있다.
- [0083] 예를 들면, 사포닌계 양친매성 물질(130)의 농도는 사포닌계 양친매성 물질(130)을 포함하는 전해질 용액의 전체 농도 대비 사포닌계 양친매성 물질(130)의 농도일 수 있다.
- [0084] 또한, 사포닌계 양친매성 물질 도메인(140)을 통한 자발적 양의 곡률(160)에 의해 나노포어(200)를 형성하는 단계(S130)는, 콜레스테롤(120)의 농도에 따라 나노포어(200)의 형성 빈도, 나노포어(200)의 크기 및 나노포어의 수명 중 적어도 어느 하나가 조절될 수 있다.
- [0085] 구체적으로, 지질막(110) 내에 콜레스테롤(120)의 농도가 증가하면, 콜레스테롤(120)을 포함하는 지질막(110)의 탄성(elasticity)이 감소될 수 있고, 이에 따라 나노포어(200)를 형성하기 위한 분리력(disjoining force)이 감소되어, 나노포어(200)의 수명이 증가됨으로써, 사포닌계 양친매성 물질 도메인(140) 형성이 촉진되기에, 나노포어(200)의 형성 빈도수가 증가하고, 더 나아가 직경이 큰 나노포어(200)의 형성 빈도수를 증가시킬 수 있다.
- [0086] 따라서, 지질막(110) 내에 콜레스테롤(120)의 농도가 증가하면, 콜레스테롤(120)을 포함하는 지질막(110) 내에서 사포닌계 양친매성 물질(130)의 나노포어(200)의 형성 활성 및 나노포어(200)의 안정성을 향상시킬 수 있다.
- [0087] 바람직하게는, 콜레스테롤(120)의 농도는 콜레스테롤(120)을 포함하는 지질막(110)의 전체 농도 대비 1.5 mM 내지 140 mM 일 수 있고, 콜레스테롤(120)의 농도가 1.5 mM 이하이면, 나노포어(200)의 형성 빈도수가 매우 감소

되고, 140 mM 이상이면, 지질막(110)의 안정성이 감소되는 문제가 있다.

- [0088] 예를 들면, 콜레스테롤(120)의 농도는 지질 용액(콜레스테롤+인지질)의 전체 농도 대비 콜레스테롤(120)의 농도 일 수 있다.
- [0089] 실시예에 따라, 사포닌계 양친매성 물질 도메인(140)을 통한 자발적 양의 곡률(160)에 의해 나노포어(200)를 형성하는 단계(S130)는, 폴리디아세틸렌의 농도에 따라 나노포어(200)의 개수가 조절될 수 있다.
- [0090] 구체적으로, 나노포어(200)의 형성 활성은 폴리디아세틸렌의 농도에 반비례하기 때문에, 지질막(110) 내에 폴리디아세틸렌의 농도를 증가시키면, 나노포어(200)의 형성 속도가 감소되어, 나노포어(200)의 개수가 감소될 수 있다.
- [0091] 폴리디아세틸렌의 농도는 콜레스테롤(120)을 포함하는 지질막(110)의 전체 농도(30mM 내지 200mM) 대비 0.3 mM 내지 100 mM일 수 있고, 폴리디아세틸렌의 농도의 농도가 0.3 mM 이하이면, 나노포어(200) 형성 개수에 끼치는 영향이 적을 수 있고, 100 mM 이상이면, 나노포어(200) 형성 빈도가 낮아지는 문제가 있다.
- [0092] 이때, 콜레스테롤(120)을 포함하는 지질막(110)의 전체 농도는 30mM 내지 200mM일 수 있다.
- [0093] 예를 들면, 폴리디아세틸렌의 농도는 지질 용액(콜레스테롤+인지질+폴리디아세틸렌)의 전체 농도 대비 폴리디아세틸렌의 농도일 수 있다.
- [0094] 따라서, 본 발명의 실시예에 따른 나노포어의 제조 방법은 복잡한 공정을 수반하는 기존의 단백질 나노포어 또는 고체상 나노포어 기술보다 간단한 공정으로 제조가 가능할뿐만 아니라, 자발적인 양의 곡률(160)에 따른 자가조립을 통해 나노포어(120)의 직경, 두께 및 구조를 조절하여 기존 단백질 나노포어 대비 공간 분해능을 향상시켜, 작은 분자부터 크기가 큰 고분자까지 적용할 수 있는 검체의 스펙트럼이 넓어질 수 있다
- [0095] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 나노포어의 제조 방법은 기존의 나노포어의 제조 방법과는 전혀 다른 메커니즘을 통해 제조됨으로써 다양한 분야에 적용되고 있는 기존의 나노포어를 대체할 수 있다.
- [0096] 특히, 본 발명의 실시예에 따른 나노포어의 제조 방법은 크기가 다른 검체(이중가닥DNA, 단일가닥 DNA, RNA, 단백질 또는 단일분자)의 분석뿐만 아니라 단일염기(A, T, G, C)의 검지도 가능한 신규 염기서열분석 플랫폼 기술로 적용할 수 있다.
- [0097] 본 발명의 실시예에 따른 나노포어의 제조 방법은 복잡한 공정 없이 시료(인지질, 콜레스테롤, 사포닌계 양친매성 물질 또는 폴리디아세틸렌)간 자가조립 반응에 의해 나노포어(120)를 형성하기 때문에 공정 단가를 낮출 수 있다.
- [0099] 도 2는 본 발명의 실시예에 따른 나노포어의 제조 방법에 따라 제조된 본 발명의 실시예에 따른 나노포어 구조체를 도시한 개략도이다.
- [0100] 본 발명의 실시예에 따른 나노포어 구조체는 콜레스테롤(120)을 포함하는 지질막(110) 내에 형성된 적어도 하나의 나노포어(200)를 포함하고, 적어도 하나의 나노포어(200)의 내벽은 사포닌계 양친매성 물질 도메인(140)을 포함한다.
- [0101] 본 발명의 실시예에 따른 나노포어 구조체에 포함되는 적어도 하나의 나노포어(140)는 본 발명의 실시예에 따른 나노포어의 제조 방법에 의해 제조되므로, 동일한 구성 요소에 대해서는 생략하기로 한다.
- [0102] 사포닌계 양친매성 물질 도메인(140)은 알파-헤더린(α -hederin), 베타-에스신(β -escin), 베타-시토스테롤(β -sitosterol), 디지토닌(Digitonin), 글리시리진산(Glycyrrhetic acid), 헤테라코사이드계(Hederacoside), 진세노사이드계(Ginsenoside), 듀란타닌(Durantinin), 알비조사이드계(Albizoside), 코리아리오사이드계(Coriaroside), 줄리브로사이드계(Julibroside), 바코파사포닌계(Bacopasaponin), 디오스신(Dioscin), 프론도사이드(Frondoside), 하이드로코시사포닌(Hydrocosisaponin), 카리오카로사이드(Caryocaroside), 폴리필린(Polyphyllin), 팻시아사이드(Fatsiaside), 대시사이핀(Dasyscyphin), 기간테오사이드(Giganteoside), 과이아인(Guaianin), 시냅토사이드(Synaptoside), 고르도노사이드(Gordonosides), 디안벌시코사이드(Dianversicoside), 히드로코틸로사이드(Hydrocotyloside), 임페이셔노사이드(Impatienoside), 카필리포사이드(Capilliposide), 그라실린(Gracillin), 발라니틴(Balanitin), 피세노사이드(Physenoside), 지토닌(Gitonin), 부들레자사포닌(Buddlejasaponin), 인터시덴사이드(Intercedenside), 필리아스파로사이드(Filiasparoside), 사핀무사포닌(Sapinmusaponin), 아스파필리오사이드(Aspafilioside), 엡실란드로사이드(Ypsilandroside), 아스파라고사이드(Asparagoside), 아스파오리고닌(Aspaoligonin), 보리빌리아노사이드(Borivilianoside), 폴리펩

토사이드(Polypunctoside), 디갈락토티고닌(Degalactotigonin) 및 아스파라닌(Asparanin) 중 적어도 어느 하나를 포함할 수 있고, 바람직하게는, 사포닌계 양친매성 물질 도메인(140)은 알파-헤더린을 포함할 수 있다.

[0103] 사포닌계 양친매성 물질 도메인(140)은 양의 곡률(positive curvature)을 가지고 있고, 이는 사포닌계 양친매성 물질의 분자구조에 기인한다. 사포닌계 양친매성 물질은 친수성 부분(친수성 헤드그룹)이 크고, 소수성 부분(소수성 테일부분)이 상대적으로 작은 구조를 가짐으로, 사포닌계 양친매성 물질 도메인(140)을 형성했을 시, 자발적으로 양의 곡률을 가져 원추 형상을 갖게 된다. 따라서, 나노포어(200)의 센싱 부위의 두께는 지질막(110)의 두께보다 더 감소되어, 높은 분석해상도를 얻을 수 있다.

[0104] 나노포어(200)의 직경(D)은 0.6nm 내지 2.5nm일 수 있고, 전술한 범위를 벗어나면 나노포어(200)의 안정성이 감소하여 나노포어(200)의 발생 빈도수가 감소될 수 있다.

[0105] 나노포어(200)의 두께(T)는 0.3nm 내지 5.0nm일 수 있다. 나노포어(200)는 단일 염기(A, T, G, C) 중 링 구조가 2개인 퓨린(A, G)과 링 구조가 1개인 피리미딘(T, C)을 구분할 수가 있기에 나노포어(200)의 두께는 0.3 nm 가 될 수 있고, 나노포어(200)는 인공생체막의 두께보다 얇기 때문에 분자동역학 시뮬레이션(Molecular dynamics simulation, MD)을 통해 5 nm 이하가 될 수 있다.

[0106] 또한, 한 개의 지질막(110) 내에 형성되는 나노포어(200)의 개수는 1개 내지 수십 개일 수 있고, 나노포어(200)의 개수가 수십 개를 초과하면 단분자 수준의 검체 분석이 어려운 문제가 있다. 예를 들면, 수십 개는 99개 일 수 있다.

[0107] 따라서, 본 발명의 본 발명의 실시예에 따른 나노포어 구조체는 핵산의 증폭이나 수용체의 고정화가 필요 없는 고감도 지표지 진단/검출용 바이오센서(biosensor)로 사용될 수 있다.

[0108] 구체적으로, 본 발명의 실시예에 따른 나노포어 구조체는 개별 분자의 구조나 분자 간 상호작용을 규명하는 분석에 활용이 가능하고, 특히, DNA나 RNA의 염기서열 분석에 활용될 수 있다.

[0109] 특히, 본 발명의 실시예에 따른 나노포어 구조체는 1nm 이하의 작은 펩타이드나 단일염기 수준의 검출 및 분석이 가능하기 때문에 단백질 아미노산 서열 및 핵산(DNA, RNA)의 염기서열 분석 기술로 적용이 가능하다.

[0110] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 나노포어 구조체는 질병 진단 시스템, 약물 스크리닝, 유해물질 검출, 단백질 분석, 핵산(DNA, RNA) 염기 서열 분석 시스템, 단분자 기반의 DNA 분석 기술, 펩타이드 분석 또는 고분자 분석 시스템에 사용될 수 있다.

[0112] 제조예 1

[0113] 0%(0mM), 15%(5mM), 25%(9mM) 및 35%(13mM)의 상이한 비율의 콜레스테롤을 포함(상이한 콜레스테롤의 비율은 인지질과 콜레스테롤의 몰비이고, 따라서, 인지질 및 콜레스테롤의 몰비를 100:0, 85:15, 75:25 및 65:35로 변화시켜 제조하였다)하고 있는 DPhPC를 클로로포름에 용해시킨 다음, 질소 가스를 이용하여 용매를 제거하여 지질/콜레스테롤 스톡(lipid/cholesterol stock)을 제조하였다.

[0114] 지질/콜레스테롤 스톡을 n-데칸(n-decane)에 용해시켜 2.6%(wt/v)의 농도를 갖는 혼합물을 제조한 다음, 하나의 구멍을 가지고 있는 테프론(Teflon) 필름에 선도장(pre-painted)한 다음, 두 개의 챔버(chamber) 사이에 고정시키고 15분동안 진공 건조시켜 용매를 제거하였다.

[0115] 이 후, 테프론 필름 양쪽에 있는 챔버에 1M KCl용액 2ml를 각각 투입하고, 전기적 측정을 위해 양쪽 챔버에 Ag/AgCl 전극을 연결하였다. 지질막을 형성시키기 위해 마이크로 피펫으로 상기 지질/콜레스테롤 스톡이 선도장된 테프론 필름의 구멍에 미량의 DPhPC를 배출함으로써 단일 지질막을 확보하였다.

[0116] 10mM의 알파-헤더린 스톡(10 mM Tris-HCl에 용해(1 % DMSO가 함유되어 있고 pH 7.4))을 최종농도가 1μM에서 1mM 사이가 되도록 챔버에 첨가하여 나노포어를 형성하였다.

[0118] 제조예 2

[0119] PDA/지질/콜레스테롤 스톡은 10%(4mM), 30%(12mM), 50%(20mM)의 상이한 비율의 PDA(PDA의 비율은 전체 지질용액(인지질+콜레스테롤) 대비 PDA의 몰비이고, 따라서, 지질용액(인지질+콜레스테롤) 및 PDA의 몰비를 90:10, 70:30 및 50:50으로 변화시켜 제조하였다)를 클로로포름에 용해하여 지질/콜레스테롤(지질과 콜레스테롤의 몰비는 1:2로 일정하게 유지하였다)와 섞어주고 질소 가스를 이용하여 용매를 제거하여 PDA/지질/콜레스테롤 스톡을 제조하였다.

- [0120] PDA/지질/콜레스테롤 스택을 n-데칸(n-decane)에 용해시켜 40mM의 농도를 갖는 혼합물을 제조한 다음, -20℃에서 저장하였고, 이 후의 공정은 제조예 1과 동일하게 제조되었다.
- [0121] 상기 PDA/지질/콜레스테롤 기반 인공생체막에서 알파-헤더린으로 형성한 나노포어를 통해 흐르는 전류를 전압별로 측정하여 I/V curve를 확인함으로써 옴의 법칙을 따르는 안정적인 포어임을 확인하고, 검체(단일가닥핵산)를 챔버에 넣어주고 발생하는 전류 막힘(blockade current)신호를 측정 및 통계분석 하였다.
- [0122] 비슷한 누수전류(leakage current)를 보이는 나노포어 조건에서 DNA호모폴리머(Poly A40, PolyT40 및 PolyC40)를 챔버에 넣어주고 발생하는 전류 막힘신호를 측정 및 통계분석 후 비교하였다.
- [0123] 또한, 비슷한 누수전류(leakage current)를 보이는 나노포어 조건에서 단일염기(A, T, G, C)를 챔버에 넣어주고 발생하는 전류막힘신호를 측정 및 통계분석 후 비교하였다.
- [0125] 도 3a는 DPhPC의 화학식을 도시한 이미지이고, 도 3b는 콜레스테롤의 화학식을 도시한 이미지이며, 도 3c는 알파-헤더린의 화학식을 도시한 이미지이고, 도 3d는 폴리디아세틸렌의 화학식을 도시한 이미지이다.
- [0126] 예를 들어, 본 발명의 실시예에 따른 나노포어 제조 방법에 사용되는 지질막으로는 도 3a에 도시한 바와 같은 DPhPC이 사용될 수 있고, 콜레스테롤은 도 3b와 같은 구조를 가지며, 사포닌계 양친매성 물질로는 도 3c에 도시한 바와 같은 알파-헤더린이 사용될 수 있고, 폴리디아세틸렌은 도 3d와 같은 구조를 갖는다.
- [0128] 도 4는 본 발명의 실시예에 따른 나노포어의 제조 방법에 따라 제조된 나노포어의 존재 여부에 따른 미세 전류 측정을 도시한 이미지이다.
- [0129] 도 4를 참조하면, 인공 생체막 내에서 콜레스테롤이 존재할 때 발생하는 사포닌계 양친매성 물질의 자가조립 현상에 따라 나노포어가 형성되고, 자가조립 현상에 의해 나노포어가 형성(I_{open})되어 있을 때만 이온이 이동하여 전류 변화가 나타나는 것을 알 수 있다.
- [0130] 즉, 나노포어가 형성되지 않은 지질막은 전류(open current)가 흐르지 않는 것을 알 수 있다.
- [0132] 도 5a 및 도 5b는 본 발명의 실시예에 따른 나노포어 구조체를 이용한 단일가닥 DNA의 분석결과를 도시한 그래프이며, 도 5c 및 도 5d는 본 발명의 실시예에 따른 나노포어 구조체를 이용한 단일가닥 DNA의 검체 통과 신호의 통계적 분석을 도시한 그래프이다.
- [0133] 도 5c 및 도 5d는 단일가닥 DNA의 검체 통과 신호의 수(normalized count)를 도시한다.
- [0134] 도 5a 및 도 5b는 200mV의 바이어스 전압 및 1M KCl(pH 8.0) 용액에서 ~1.0nm의 직경을 갖는 나노포어를 통해 단일가닥 DNA(70 bases)가 빠져나갈 때 발생하는 전류 막힘(current blockade)을 측정하였고, 검출신호는 나노포어가 열려(I_{open})있을 때만 나타났다.
- [0135] 도 5a 및 도 5b를 참조하면, 본 발명의 실시예에 따른 나노포어 구조체는 나노포어가 형성이 되었을 때, 전기영동에 의해 단일가닥 DNA이 나노포어를 통해 이동을 하고, 이 때, 상기 나노포어 내 전류의 흐름이 일시적으로 줄어드는 전류 막힘(current blockade) 현상이 발생하는 것을 알 수 있다.
- [0136] 또한, 도 5c 및 도 5d를 참조하면, 단일가닥 DNA가 나노포어를 통과할 때 발생하는 신호(event)의 분포가 하나의 가우시안 피크(Gaussian peak)로 나타나는 것으로 보아, 테스트에 사용한 한 종류의 단일가닥 DNA가 빠져나감으로 발생하는 신호임을 확인할 수 있다.
- [0138] 도 6a는 본 발명의 실시예에 따른 나노포어 구조체를 이용한 DNA 호모폴리머(Poly-A40, Poly-T40, Poly-C40)의 분석결과인 시간에 따른 전류량의 변화(current trace)를 도시한 그래프이고, 도 6b는 본 발명의 실시예에 따른 나노포어 구조체를 이용한 DNA 호모폴리머의 검체 통과 신호의 통계적 분석을 도시한 그래프이다.
- [0139] 도 6b는 DNA 호모폴리머의 검체 통과 신호의 수(normalized count)를 도시한다.
- [0140] 도 6a 및 도 6b는 200mV의 바이어스 전압 및 1M KCl(pH 8.0) 용액에서 ~0.9 nm의 직경을 가지는 나노포어를 통해 DNA 호모폴리머가 전기영동 현상에 의해 빠져나가면서 발생하는 전류 막힘(current blockade)을 측정한 결과 및 통계적 분석결과이다.
- [0141] 도 6a 및 도 6b는 본 발명의 실시예에 따른 나노포어 구조체는 나노포어가 형성이 되었을 때, Poly-A40, Poly-T40 및 Poly-C40 각각의 DNA 호모폴리머를 검출하였고, Poly-A40의 전류 막힘(current blockade) 평균값은 0.85 ± 0.07 nS이며, poly-C40의 전류 막힘 평균값은 0.64 ± 0.08 nS이고, poly-T40의 전류 막힘 평균값은 0.44

± 0.04 nS이었다.

- [0142] 도 6a 및 도 6b를 참조하면, Poly-A40, Poly-T40 및 Poly-C40들이 나노포어를 통과할 때 각각 다른 평균 전도도 봉쇄값을 나타내고 있다. 각각의 DNA 호모폴리머는 염기구조의 차이로 인해 직경에 있어서 미세한 차이를 보이고 있으며 이는 나노포어를 통과할 때 발생하는 전도도 봉쇄값의 차이로 정확히 반영이 되고 있다. 이를 통해 본 발명의 실시예에 따른 나노포어 구조체는 다른 종류의 DNA 호모폴리머의 차이를 높은 신뢰도로 비교 분석할 수 있음을 보여준다.
- [0144] 도 7a는 본 발명의 실시예에 따른 나노포어 구조체를 이용한 단일염기의 분석결과를 도시한 그래프이며, 도 7b 및 도 7c는 본 발명의 실시예에 따른 나노포어 구조체를 이용한 단일염기의 검체 통과 신호의 통계적 분석을 도시한 그래프이다.
- [0145] 도 7b 및 도 7c는 각각의 전도도 봉쇄값과 드웰시간을 가지는 신호의 수(normalized count)를 도시한다.
- [0146] 도 7a 내지 7c는 200mV의 바이어스 전압 및 1M KCl(pH 8.0) 용액에서 $\sim 0.8\text{nm}$ 의 직경을 가지는 나노포어를 통해 단일염기가 전위(translocation)될 때 발생하는 전류 막힘(current blockade)을 측정하였고, 전위 신호(translocation event)는 나노포어가 열려있을 때만 나타났다.
- [0147] 도 7a 내지 도 7c를 참조하면, 본 발명의 실시예에 따른 나노포어 구조체는 나노포어가 형성이 되었을 때, dATP, dGTP, dCTP, dTTP 각각의 단일염기를 검출하였고, dATP의 전류 막힘 평균값은 0.53 ± 0.13 nS이며, dGTP의 전류 막힘 평균값은 0.47 ± 0.15 nS이고, dCTP의 전류 막힘 평균값은 0.37 ± 0.03 nS이며, dTTP의 전류 막힘 평균값은 0.33 ± 0.05 nS이었다.
- [0148] 또한, dATP의 드웰 시간 평균값(mean values of the dwell time)은 1.41 ms이고, dGTP의 드웰 시간 평균값은 4.58 ms이며, dCTP의 드웰 시간 평균값은 2.43 ms이고, dTTP의 드웰 시간 평균값은 0.11 ms이었다.
- [0149] 또한, 도 7a 및 도 7c를 참조하면, dATP, dGTP, dCTP, dTTP 등이 상기 나노포어를 통과할 때 측정된 신호들의 경향을 평균화 후 비교한 결과, 테스트 물질의 종류에 따라 개별 가우시안피크(Gaussian peak)를 나타내고 있으며, 이는 본 발명의 실시예에 따른 나노포어 구조체가 단일염기를 분석할 수 있음을 보여주고 있다.
- [0151] 도 8a는 콜레스테롤의 농도에 따른 본 발명의 실시예에 따른 나노포어 구조체의 전류량의 변화(current trace)를 도시한 그래프이고, 도 8b는 콜레스테롤의 농도에 따른 본 발명의 실시예에 따른 나노포어 구조체로부터 유래된 나노포어의 전도도별 빈도를 도시한 그래프이다.
- [0152] 도 8a 및 도 8b를 참조하면, 콜레스테롤의 농도에 비례하여 나노포어 형성 활성 및 투과 전도도(transmembrane conductance)가 현저히 증가되는 것을 알 수 있다.
- [0154] 도 9a는 폴리디아세틸렌(PDA)의 농도에 따른 본 발명의 실시예에 따른 나노포어 구조체의 전류량의 변화(current trace)를 도시한 그래프이고, 도 9b는 폴리디아세틸렌/지질막 몰비에 따른 나노포어 형성빈도를 도시한 그래프이다.
- [0155] 도 9a 및 도 9b를 참조하면, 50몰%(지질 용액 대비 15mM 내지 100mM) 농도의 폴리디아세틸렌을 포함할 때, 가장 긴 수명 및 일정한 전도도를 나타내는 것을 알 수 있고, 폴리디아세틸렌의 농도가 증가함에 따라 나노포어 형성 빈도가 감소되는 것을 알 수 있다.
- [0157] 이상과 같이 본 발명은 비록 한정된 실시예와 도면에 의해 설명되었으나, 본 발명은 상기의 실시예에 한정되는 것은 아니며, 본 발명이 속하는 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이러한 기재로부터 다양한 수정 및 변형이 가능하다. 그러므로, 본 발명의 범위는 설명된 실시예에 국한되어 정해져서는 아니 되며, 후술하는 특허청구범위뿐 아니라 이 특허청구범위와 균등한 것들에 의해 정해져야 한다.

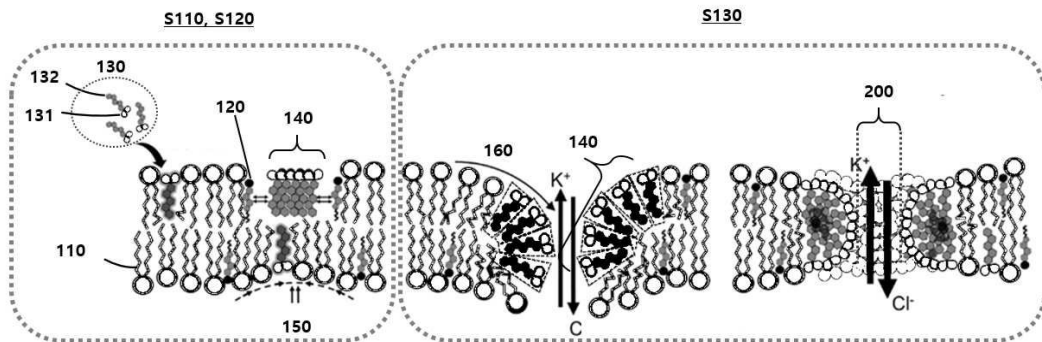
부호의 설명

- [0159]
- | | |
|-------------------|------------------------|
| 110: 지질막 | 120: 콜레스테롤 |
| 130: 사포닌계 양친매성 물질 | 131: 친수성 부분 |
| 132: 소수성 부분 | 140: 사포닌계 양친매성 물질 도메인 |
| 150: 무질서화 | 160: 자발적인 양의 곡률, 원추 형상 |
| 200: 나노포어 | D: 나노포어의 너비 |

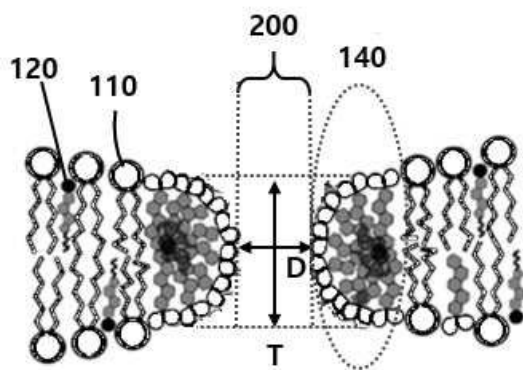
T: 나노포어의 두께

도면

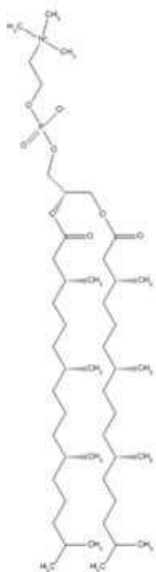
도면1



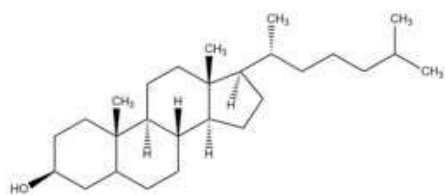
도면2



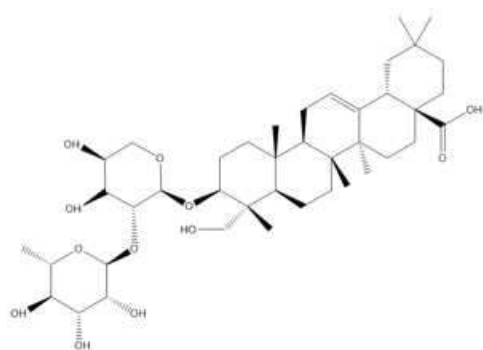
도면3a



도면3b



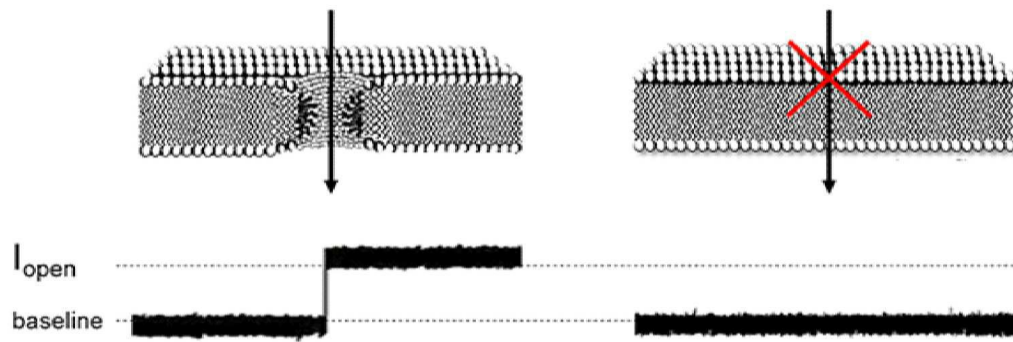
도면3c



도면3d



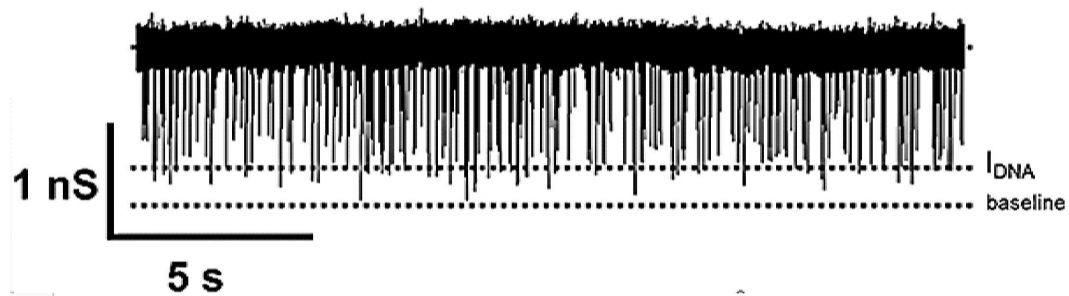
도면4



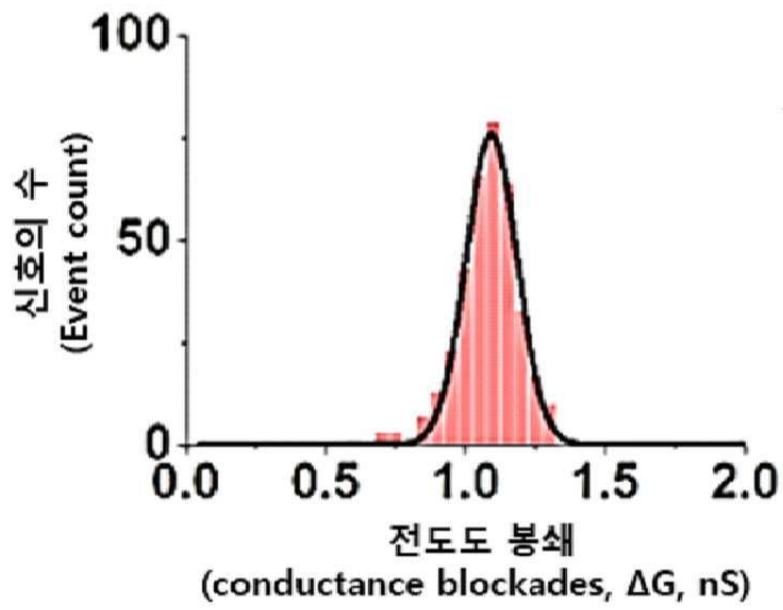
도면5a



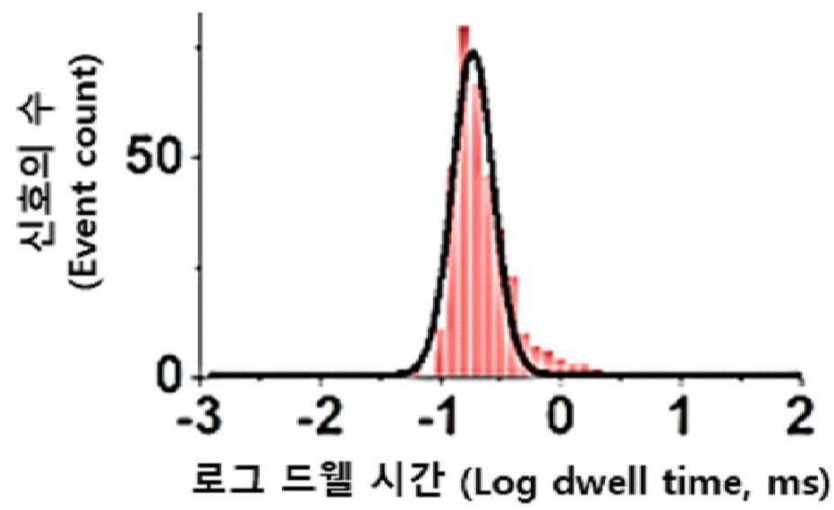
도면5b



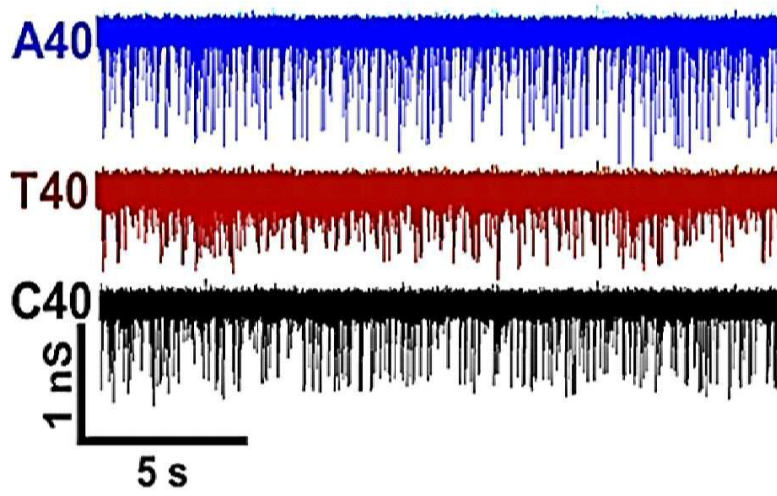
도면5c



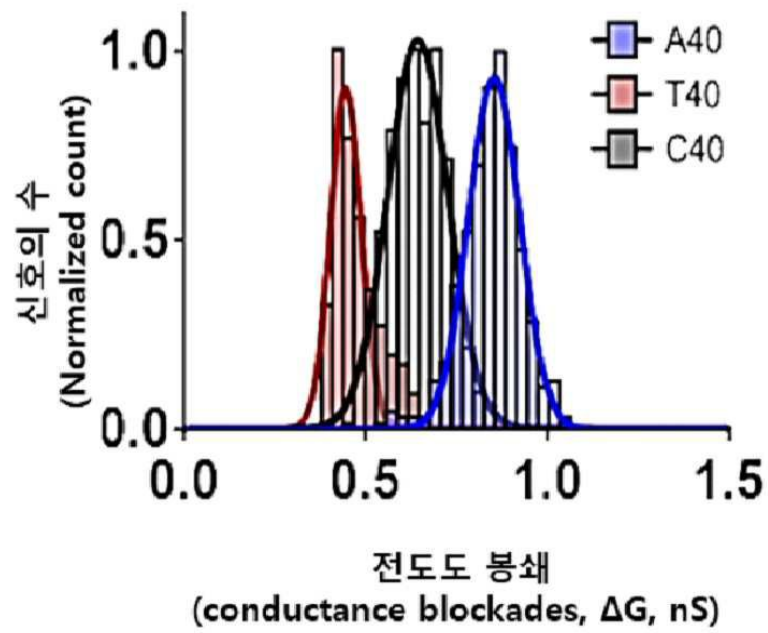
도면5d



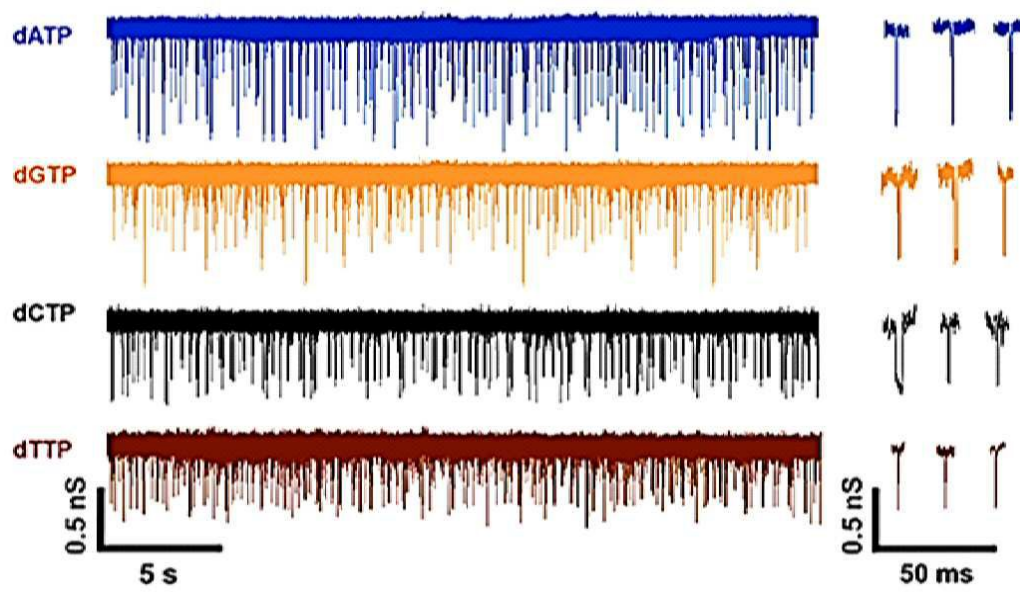
도면6a



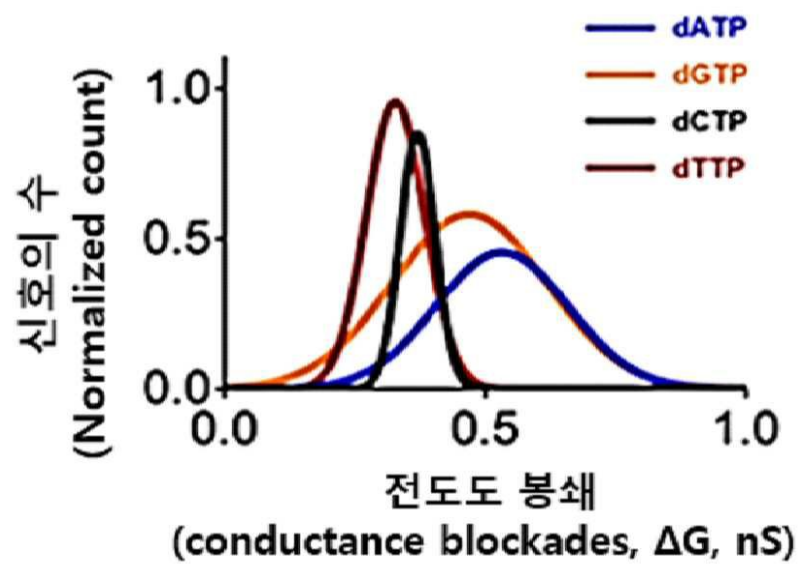
도면6b



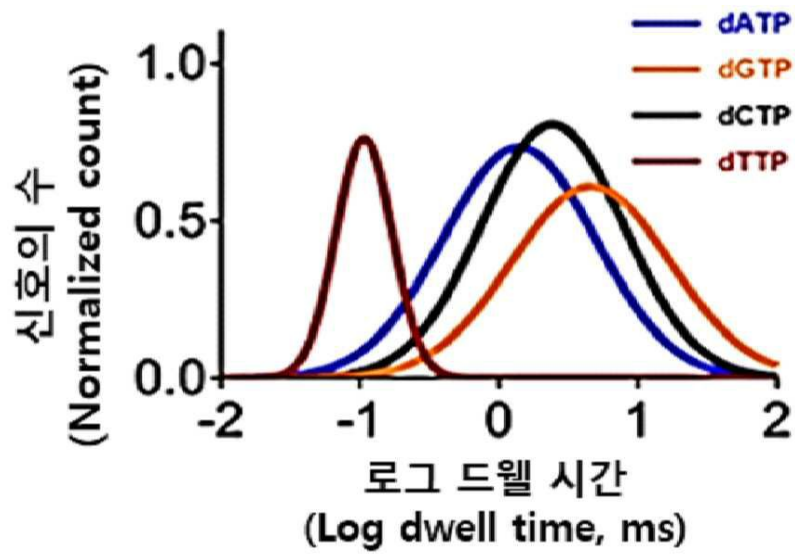
도면7a



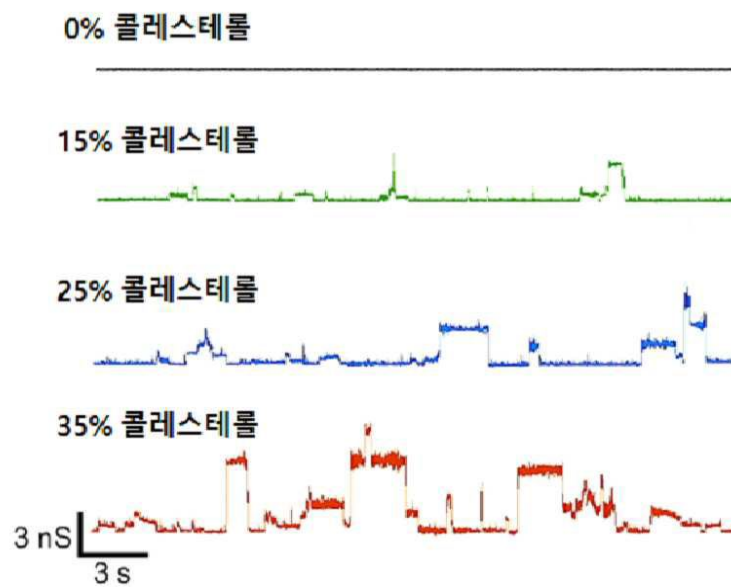
도면7b



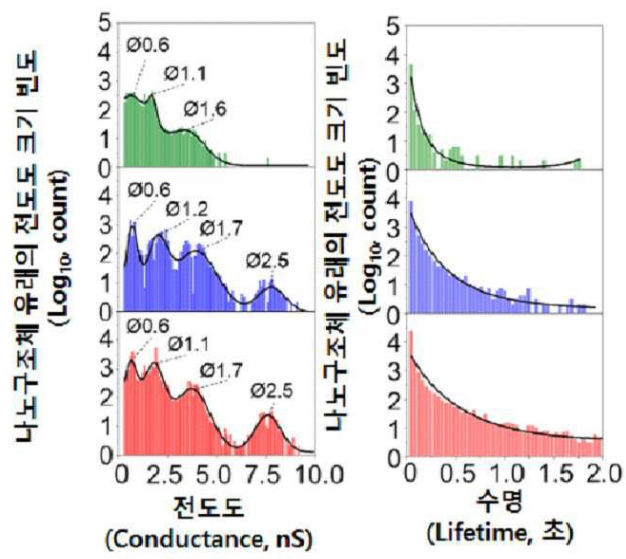
도면7c



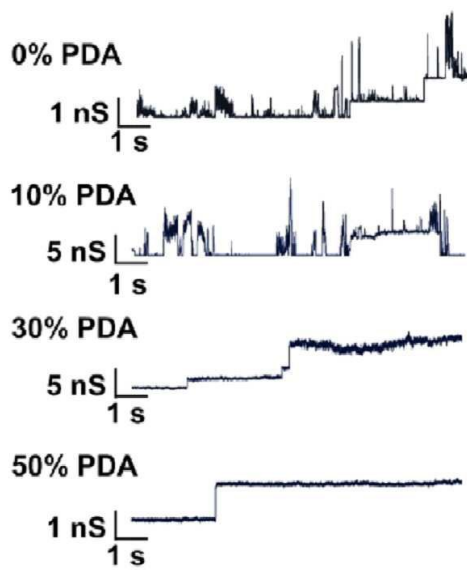
도면8a



도면8b



도면9a



도면9b

