(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0132882
(43) 공개일자 2011년12월09일

(51) Int. Cl.
B01D 71/74 (2006.01) *G01N 33/50* (2006.01)
C12Q 1/00 (2006.01) *A61K 9/24* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0052471
(22) 출원일자 2010년06월03일
심사청구일자 2010년06월03일

(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천 남구 용현동 253 인하대학교
(72) 발명자
전태준
인천광역시 남구 용현4동 인하대학교 생명공학부
백유효
인천광역시 남구 용현4동 인하대학교 생명공학부
(74) 대리인
양부현

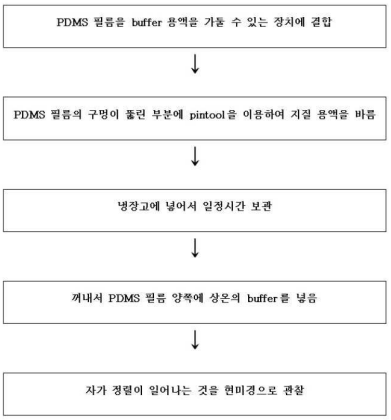
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 지질 이중막의 제조방법

(57) 요 약

본 발명은 (a) 물보다 높은 어는점 및 상온보다는 낮은 어는점을 가지는 유기용액 및 지질을 혼합하여 지질 유기용액을 제조하는 단계; (b) 상기 지질 유기용액을 동공(hole)이 형성된 소수성 지지체의 동공에 도포하는 단계; 및 (c) 상기 유기용액의 어는점보다 높은 온도에서 상기 동공에 도포된 지질 유기용액의 지질을 자가정렬시켜 지질 이중막을 형성시키는 단계를 포함하는 지질 이중막의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 본 발명은 소수성의 지지체에 지질 유기용액을 도포하고 얼린 상태의 즉, 지질 이중막이 만들어지기 전의 전구체 상태의 안정화된 장치를 이용하므로 이동성을 확보 할 수 있으므로 장소의 제한이 크지 않다. 또한, 기존의 지질 이중막의 제조 방법에서는 지질 이중막의 재건 방법이 특수한 기술을 요구하기 때문에 이 기술을 가지고 있는 숙련된 전문가가 필요 했지만 본 발명은 산업에 적용하는 자가 특별한 전문 기술이 없더라도 간단하게 산업에 바로 적용할 수 있는 장점을 가지고 있다. 본 발명을 이용하면 현재의 기술 보다 더 저렴하게 만들 수 있고 산업 이용 분야에 따라 자가정렬의 방법의 시간과 지속 시간 등을 조절 할 수 있음으로 고효율의 장치에 적용 할 수 있다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2009-0088893
부처명 한국연구재단
연구관리전문기관
연구사업명 기초연구사업/기본연구사업
연구과제명 인공세포막을 이용한 단분자 거동 및 디텍션 시스템 연구 개발
기여율
주관기관 인하대학교 산학협력단
연구기간 2009년 09월 01일 ~ 2010년 08월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

다음 단계를 포함하는 지질 이중막의 제조방법:

(a) 물보다 높은 어는점 및 상온보다는 낮은 어는점을 가지는 유기용액 및 지질을 혼합하여 지질 유기용액을 제조하는 단계;

(b) 상기 지질 유기용액을 동공(hole)이 형성된 소수성 지지체의 동공에 도포하는 단계; 및

(c) 상기 유기용액의 어는점보다 높은 온도에서 상기 동공에 도포된 지질 유기용액의 지질을 자가정렬시켜 지질 이중막을 형성시키는 단계.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 유기용액의 어는점은 4℃-15℃인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 유기용액은 도난(nonane), 데칸(decane), 도데칸(dodecane), 테트라데칸(tetradecane), 헥사데칸(hexadecane), 스쿠알렌, 사이클로헥산, 폴리비닐알코올, 라우르산, 아세트산, 포름산, 벤젠, 나프탈렌, 니트로벤젠, 페놀 및 에틸렌 브로마이드으로 구성된 최소 하나의 유기용매인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 상기 유기용액은 데칸과 헥사데칸의 혼합물 또는 스쿠알렌과 헥사데칸의 혼합물인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 유기용액은 1:9-2:8의 데칸:헥사데칸 또는 스쿠알렌:헥사데칸의 중량비를 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 지질 유기용액은 1-3 wt%의 지질 함량을 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 소수성 지지체는 폴리다이메틸실록산(PDMS)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 소수성 지지체는 챔버에 설치되어 있으며 상기 소수성 지지체는 상기 챔버를 분할하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (b) 이후에 상기 단계 (b)에 의해 상기 지질 유기용액이 동공에 도포된 소수성 지지체는 상기 유기용액의 어는점보다 낮은 온도에서 보관하여 상기 지질 유기용액을 동결시키는 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 8 항에 있어서, 상기 단계 (c)는 상기 소수성 지지체에 의해 분할된 상기 챔버의 두 부분에 완충용액을 첨가하여 실시하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 상기 단계 (c)는 막 단백질을 추가적으로 이용하여 실시되며 상기 막 단백질은 상기 형성된 지질 이중막에 삽입(incorporation) 되는 것을 특징으로 하는 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 신규한 지질 이중막의 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 지질 이중막(Lipid Bilayer)은 생체막의 일종으로 모든 생명체가 가지고 있는 막이다. 지질의 구조를 살펴보면 소수성의 머리 부분과 친수성의 꼬리 부분으로 구성이 되어 있다. 지질 이중막은 이러한 지질의 친수성의 꼬리 부분이 맞닿아 있는 두 개의 층으로 구성되어 있는 것이다. 이러한 지질 이중막은 생명체에서 세포나 미생물의 내부와 외부를 구분 해주는 역할을 하고 물질 이동통로가 되는 단백질이나 다른 생체막 구성 물질을 지지하는 역할을 한다(Bayley, H.; Cremer, P. S., Stochastic sensors inspired by biology. *Nature* **2001,** 413, (6852), 226-230; Denyer, J.; Worley, J.; Cox, B.; Allenby, G.; Banks, M., HTS approaches to voltage-gated ion channel drug discovery. *Drug Discovery Today* **1998,** 3, (7), 323-332)).

[0003] 이러한 지질 이중막의 실험실에서의 합성은 1962년 네이쳐(Nature)지에 보고된 이후 여러 가지 제조 방법들이 고안되었으나 기존의 방법들(Montal, M.; Mueller, P., Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1972,**69, (12), 3561-6; Mueller, P.; Rudin, D. O.; Tien, H. T.; Wescott, W. C., Reconstitution of cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system. *Nature* **1962,** 194, 979-80)은 실험 방법의 까다로움으로 인해 일부의 전문가 집단 또는 실험실에 국한되어 이용되어 왔다.

[0004] 따라서 이 기술을 산업적으로 적용하기 어렵고 적용을 한다 하더라도 그 기술을 익힌 전문가가 있어야 하기 때문에 노동 집약적이다. 그리고 전통적인 방법 이용시 지질 이중막이 약하기 때문에 이동하는 데에 제약이 따른다. 따라서 실험을 하는 그 곳에서 직접 지질 이중막을 제작 하여야 하는데, 이 때문에 실험을 수행하는 공간적인 제약이 발생하게 된다. 그리고 기존의 기술은 재건의 실패율이 높아서 산업에 적용의 한계가 있다. 또한 기존의 기술을 이용하여 마이크로 칩과 같은 형태로 자동화를 시도하였지만 비용이 많이 들고 성공률이 낮아서 실제 산업에서 자동화된 사례가 없다.

[0005] 한편, 지질 이중막 제조 기술은 종래의 이온통로에 대한 연구와 이온통로와 관련된 신약 개발 또는 스크리닝(screening) 분야에도 적용할 수 있다(Bayley, H.; Cremer, P. S., Stochastic sensors inspired by biology. *Nature* **2001,** 413, (6852), 226-230; Denyer, J.; Worley, J.; Cox, B.; Allenby, G.; Banks, M., HTS approaches to voltage-gated ion channel drug discovery. *Drug Discovery Today* **1998,** 3, (7), 323-332)). 기존의 이온통로에 관한 연구는 패치클램핑(patch-clamping) 방법에 의해서 수행 되어 왔는데, 이러한 방법은

위에서 지질 이중막의 재건 방법에서와 마찬가지로 상당한 비용, 시간 및 전문성을 요구한다.

[0006] 또한 인공 세포막의 불안정성 등 여러 문제점 때문에 칩(chip)형태나 고효율(high-throughput) 스크리닝이 가능한 어레이(array)형태로의 개발이 제한되어 있다.

[0007] 따라서 고비용 기술 집약적인 기술이이면서 비용 적인 면에서 효율은 상당히 떨어지는 기술이다. 예를 들어 신약을 개발하기 위해서 수만 가지의 물질을 테스트해야 하지만 이 기술을 이용하면 실험자 한 사람이 한 번에 한 종류의 물질에 대해서만 탐색이 가능하고 시간도 오래 걸리기 때문에 전체 실험 시간이 길어져 산업에 직접적으로 이용하는데 어려움이 있다.

[0008] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명자들은 지질 이중막을 보다 편의하면서도 실제적으로 제조할 수 있는 방법을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 높은 어는점(즉 빙점)을 가지는 유기용액을 이용하고 적합한 소수성 지지체를 이용하는 경우에는 편의성 및 산업적 응용 가능성이 개선될 뿐만 아니라, 운반성(transportability) 및 저장성(storability)도 개선된 지질 이중막 제조방법을 제공할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0010] 따라서, 본 발명의 목적은 지질 이중막의 제조방법을 제공하는 데 있다.

[0011] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명의 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 지질 이중막의 제조방법을 제공한다:

[0013] (a) 물보다 높은 어는점 및 상온보다는 낮은 어는점을 가지는 유기용액 및 지질을 혼합하여 지질 유기용액을 제조하는 단계;

[0014] (b) 상기 지질 유기용액을 동공(hole)이 형성된 소수성 지지체의 동공에 도포하는 단계; 및

[0015] (c) 상기 유기용액의 어는점보다 높은 온도에서 상기 동공에 도포된 지질 유기용액의 지질을 자가정렬시켜 지질 이중막을 형성시키는 단계.

[0016] 본 발명자들은 지질 이중막을 보다 편의하면서도 실제적으로 제조할 수 있는 방법을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 높은 어는점(즉 빙점)을 가지는 유기용액을 이용하고 적합한 소수성 지지체를 이용하는 경우에는 편의성 및 산업적 응용 가능성이 개선될 뿐만 아니라, 운반성(transportability) 및 저장성(storability)도 개선된 지질 이중막 제조방법을 제공할 수 있음을 확인하였다.

[0017] 본 발명의 기본적인 전략은 물보다 높은 어는점 및 상온보다는 낮은 어는점을 가지는 유기용액을 사용하여 지질 유기용액을 제조하는 것과 유기용매를 흡수하는 성질을 갖는 소수성 지지체를 이용하여 지질 이중막의 자가정렬을 유도하는 것이다.

[0018] 본 발명의 방법에 따르면, 우선 물보다 높은 어는점 및 상온보다는 낮은 어는점을 가지는 유기용액 및 지질을 혼합하여 지질 유기용액을 제조한다.

[0019] 본 발명에서 지질을 용해하고 적합한 어는점을 가지도록 하는 유기용액은 물보다 높은 어는점 및 상온보다는 낮

은 어는점을 가져야 한다.

[0020] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에서 사용되는 유기용액의 어는점은 4℃-15℃이다.

[0021] 본 발명에 적합한 유기용액은 도난(nonane), 데칸(decane), 도데칸(dodecane), 테트라데칸(tetradecane), 헥사데칸(hexadecane), 스쿠알렌, 사이클로헥산, 폴리비닐알코올, 라우르산, 아세트산, 포름산, 벤젠, 나프탈렌, 니트로벤젠, 페놀 및 에틸렌 브로마이드으로 구성된 최소 하나의 유기용매이다.

[0022] 바람직하게는 본 발명에 적합한 유기용액은 빙점이 높은 헥사데칸을 포함한 유기용매의 혼합물이고, 보다 바람직하게는 본 발명에 적합한 유기용액은 데칸과 헥사데칸의 혼합물 또는 스쿠알렌과 헥사데칸의 혼합물이다. 이 때 헥사데칸은 18℃로 높은 온도에서도 쉽게 얼기 때문에 본 발명에 적합하며, n-데칸 또는 스쿠알렌은 지질을 쉽게 용해시키고, 헥사데칸의 점성을 낮추어 주며, 헥사데칸의 어는점을 조절할 수 있어 본 발명에 적합하다. 이러한 데칸과 헥사데칸 또는 스쿠알렌과 헥사데칸의 혼합용액을 이용하면, 높은 온도에서 어는 지질 이중막의 전구체를 쉽게 얻을 수 있다.

[0023] 데칸과 헥사데칸의 혼합물을 지질 유기용액의 제조에 이용하는 경우, 1:9-2:8의 데칸:헥사데칸의 중량비를 가지는 것이 바람직하며, 스쿠알렌과 헥사데칸의 경우에도 1:9-2:8의 중량비가 바람직하다. 또한 하기의 실시예에서 볼 수 있듯이 1:9의 데칸:헥사데칸의 중량비 또는 2:8의 스쿠알렌:헥사데칸의 중량비가 보다 바람직하다.

[0024] 지질 이중막 전구체로서의 지질 유기용액의 제조에 사용되는 지질은 당업계에서 지질 이중막을 제조할 때 사용하는 어떠한 지질과 친수성과 소수성을 포함하는 블록공중합체(AB diblock copolymer, ABA triblock copolymer)도 포함한다. 예를 들어, 본 발명에 적합한 지질은 포스파티딜콜린, 포스파티딜세린, 포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜글리세롤, 포스파티딜이노시톨, 카르디오리핀(cardiolipin), 콜레스테롤 및 스핑고마이엘린이다. 보다 구체적으로, 본 발명에 적합한 지질은 다이파이타노일포스파티딜콜린(Diphytanoylphosphatidylcholine), DPPC(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), DHPC(1,2-diheptanoyl -sn-glycero-3-phosphocholine), DHPE(1,2-dihexanoyl-sn-glycero- 3-phosphoethanolamine), DMPC(1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), DIODPC(1,2-DiODodecyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine), DMPS(dimyristoyl phophatidylserine), DLPC(dimyristoyl phosphatidylglycerol, dilauryl phosphatidycholine), DMPE(1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), DMPG(1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-[phospho-rac-(1-glycerol)]), Lyso PC(1-myristoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphocholine), Lyso PE(1-oleoyl-2 -hydroxy-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), DDPC(1,2-didecanoyl-sn- glycero-3-phosphocholine), DEPA-NA(1,2-dierucoyl-sn-glycero-3-phosphate (sodium salt)), DEPC(1,2-erucoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), DEPE(1,2- dierucoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), DLOPC(1,2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), DLPA-NA(1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphate (sodium salt)), DLPE(1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), DLPS-NA(1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphoserine (sodium salt)), DMPA-NA(1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphate (sodium salt)), DMPS-NA(1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoserine (sodium salt)), DOPA-NA(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphate (sodium salt)), DOPC(1,2-oleoyl -sn-glycero-3-phosphocholine), DOPE(1,2-dioleoyl-sn- glycero-3-phosphoethanolamine), DOPS-NA(1,2-dioleoyl-sn- glycero-3-phosphoserine (sodium salt)), DPPA-NA(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphate (sodium salt)), DPPE(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero- 3-phosphoethanolamine), DPPS-NA(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoserine (sodium salt)), DSPA-NA(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphate (sodium salt)), DSPC(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), DSPE(1,2-diostearpyl- sn-glycero-3-phosphoethanolamine), MSPC(1-myristoyl, 2-stearoyl-sn-glycero 3-phosphocholine), PMPC(1-palmitoyl, 2-myristoyl-sn-glycero 3-phosphocholine), POPC(1-palmitoyl, 2-oleoyl-sn-glycero 3-phosphocholine), POPE(1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), PSPC(1-palmitoyl, 2-stearoyl-sn-glycero 3-phosphocholine), SMPC(1-stearoyl, 2-myristoyl-sn-glycero 3-phosphocholine), SOPC(1-stearoyl, 2-palmitoyl-sn-glycero 3-phosphocholine), 및 SPPC(1-stearoyl, 2-palmitoyl-sn-glycero 3-phosphocholine), PCDA(10,12- pentacosadiynoic acid), 및 PMOXA-PDMS-PMOXA(poly(methyloxazoline)-poly(dimethylsiloxane)-poly(methyloxazoline)을 포함한다.

[0025] 지질 유기용액에서 지질의 농도는 특별하게 제한되지 않지만, 바람직하게는 0.1-19 wt%이고, 보다 바람직하게는 1-3 wt%이다.

[0026] 상기 지질 용액을 동공(hole)이 형성된 소수성 지지체의 동공에 도포한다.

[0027] 본 발명에 지지체의 선택도 매우 중요한 사항이다. 지지체는 소수성을 가지는 지지체를 이용하여야 한다. 지지체 상에서 지질 유기용액 내의 지질이 자가정렬(self assembly)하여 지질 이중막을 형성한다.

[0028] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에 적합한 소수성 지지체는 폴리다이메틸실록산(PDMS), 파라필름 또는 테프론이며, 가장 바람직하게는 PDMS이다.

[0029] PDMS는 유기용매를 흡수하며 신축성이 있어 본 발명에 적합하다. 종래 기술들은 대부분 테프론을 지지체로 이용하지만, 본 발명에 따르면 테프론보다 PDMS가 지질의 자가정렬을 더 효율적으로 유도하고 지질 이중막의 생성 속도를 빠르게 한다.

[0030] 지지체에 있는 동공의 직경은 특별하게 제한되지 않으며, 바람직하게는 0.1-5 ㎜, 보다 바람직하게는 0.2-3 ㎜, 보다 더 바람직하게는 0.3-1 ㎜, 가장 바람직하게는 0.4-0.6 ㎜이다.

[0031] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 소수성 지지체는 챔버에 설치되어 있으며 상기 소수성 지지체는 상기 챔버를 분할한다(참조: 도 1a 및 1b). 챔버는 소수성 지지체를 수용할 수 있는 일정한 공간을 가지는 어떠한 콘테이너(container)도 다 가능하다.

[0032] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 단계 (b) 이후에 상기 단계 (b)에 의해 상기 지질 유기용액이 동공에 도포된 소수성 지지체는 상기 유기용액의 어는점보다 낮은 온도에서 보관하여 상기 지질 유기용액을 동결시키는 단계를 추가적으로 포함한다. 예를 들어, 데칸과 헥사데칸의 혼합 유기용액으로 제조된 지질 유기용액을 이용하는 경우, 지질 유기용액이 동공에 도포된 소수성 지지체를 4℃에서 보관하여 동결시켜 저장 또는 운반할 수 있다. 이 경우, 지질 유기용액 즉 지질 이중막 전구체는 지질 이중막을 생성하지 않는다. 본 발명에 따르면, 지질 이중막이 만들어지기 전의 전구체 상태로서 이동성을 확보 할 수 있으므로 장소의 제한이 크지 않다.

[0033] 필요에 따라, 동결된 지질 유기용액을 해동시켜 지질 이중막을 형성하도록 유도할 수 있다.

[0034] 최종적으로, 상기 유기용액의 어는점보다 높은 온도에서 상기 동공에 도포된 지질 유기용액의 지질을 자가정렬시켜 지질 이중막을 형성시킨다.

[0035] 지지체의 동공에 도포된 지질 유기용액의 지질은 유기용액의 어는점보다 높은 온도에서 자가정렬되어 지질 이중막을 형성한다.

[0036] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 단계 (c)는 상기 소수성 지지체에 의해 분할된 상기 챔버의 두 부분에 완충용액을 첨가하여 실시한다. 보다 바람직하게는 완충용액은 pH 6.0-8.7에서 완충력을 가지는 완충 수용액이다. 보다 더 바람직하게는, 완충용액은 Tris-HCl, NaH_2PO_4, 소듐 바이카보네이트, 이미다졸(글라이옥살린)-HCl 또는 MOPS 완충용액이다. 챔버에 완충용액을 첨가하는 간단한 과정을 통하여 지질의 자가정렬을 유도할 수 있으며, 이를 통하여 최종적으로 지질 이중막을 얻는다.

[0037] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 단계 (c)는 막 단백질을 추가적이용하여 실시되며 상기 막 단백질은 형성된 지질 이중막에 삽입(incorporation)되어, 막 단백질이 삽입된 지질 이중막의 재구축(reconstruction)된다. 막 단백질은 완충액에 포함시켜 단계 (c)를 시작할 때 사용할 수 있으며 또는 단계 (c)에서 지질 이중막이 어는 정도 생성된 이 후 적합한 시점에서 단계 (c)의 챔버에 첨가시켜 사용할 수 있다. 또한 막단백질 또는 막에 존재하는 펩티드 중 유기용매에 용해되었을 때 변형이 되지 않는 경우, 지질 이중막의 전구체에 같이 용해하여 냉동 보관이 가능하다. 이 경우 추가로 막단백질을 삽입하지 않아도 되는 이점이 있어서, 이중 지질막의 사용 범위를 넓힐 수 있다.

[0038] 본 발명에서 지질 이중막에 삽입시킬 수 있는 막 단백질은 당업계에 공지된 어떠한 막 단백질도 포함한다. 예를 들어, 본 발명에 적합한 막 단백질은 GPCR(G protein-coupled receptor), 타이로신 키나아제 수용체, 이온 채널, 리간드 게이티드 채널, 전압 게이티드 채널, 능동수송시스템 및 포린(예컨대, α-헤모라이신)이다.

[0039] 하기의 실시예에서 입증된 바와 같이, 본 발명에 따르면 막 단백질이 지질 이중막에서 성공적으로 재구축될 수 있다.

발명의 효과

[0040] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0041] (a) 본 발명은 소수성의 지지체에 지질 유기용액을 도포하고 얼린 상태의 즉, 지질 이중막이 만들어지기 전의 전구체 상태의 안정화된 장치를 이용하므로 이동성을 확보 할 수 있으므로 장소의 제한이 크지 않다.

[0042] (b) 또한 지질 이중막의 용매로 사용한 유기용매를 물보다 어는점이 높은 유기용매를 사용하여 이동함에 있어서 전구체를 냉동상태로 유지하는데 들어가는 에너지 비용도 줄일 수 있다.

[0043] (c) 본 발명의 가장 바람직한 구현예에 따르면, 헥사데칸의 어는점은 18℃로 높은 온도에서도 쉽게 얼기 때문에 헥사데칸과 지질을 쉽게 녹일 수 있는 n-데칸 또는 스쿠알렌의 혼합 용액을 이용함으로써 높은 온도에서 어는 지질 이중막의 전구체를 쉽게 만들 수 있다.

[0044] (d) 또한 전구체의 생성으로 지질 이중막의 자가정렬을 유도할 때에 완충액 용액을 장치에 넣는 것만으로 자가정렬을 유도 할 수 있다.

[0045] (e) 얼린 전구체 상태에서 이동이 가능하기 때문에 높은 온도에서 어는 지질 이중막 전구체가 사용되는 장소 또한 실제 실험이 이루어지는 실험실에서 국한 되지 않고 전구체를 어느 한 제조 시설에서 만들고 그것을 다양한 분야 및 장소에서 사용이 가능 하다.

[0046] (f) 그리고 유기용매를 흡수하는 지지체(가장 바람직하게는 PDMS)를 이용함으로써 기존의 방법에서 자가정렬이 유도 되는데 걸리는 시간을 단축하고 흡수되는 정도를 조절함에 따라 유도되는 시간을 조절 할 수 있다.

[0047] (g) 기존의 지질 이중막의 제조 방법에서는 지질 이중막의 재건 방법이 특수한 기술을 요구하기 때문에 이 기술을 가지고 있는 숙련된 전문가가 필요 했지만 본 발명은 산업에 적용하는 자가 특별한 전문 기술이 없더라도 간단하게 산업에 바로 적용 할 수 있는 장점을 가지고 있다.

[0048] (h) 또한 본 발명을 이용하면 현재의 기술 보다 더 저렴하게 만들 수 있고 산업 이용 분야에 따라 자가정렬의 방법의 시간 지속 시간 등을 조절 할 수 있음으로 고효율의 장치에 적용 할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0049] 도 1은 본 발명에 따른 지질 이중막의 자가 정렬 방법의 구체적인 일 구현예를 보여주는 플로우 차트이다.

도 2a는 본 발명에서 사용된 챔버와 PDMS 막의 결합을 나타낸 모식도이다.

도 2a는 본 발명에서 사용된 PDMS 막에서 지질 이중막의 형성 과정을 보여주는 모식도이다.

도 3a는 본 발명에서 지질 이중막이 생성되기 전 지질 유기용액이 용해되어 PDMS 동공에 도포되어 있는 양상을 보여주는 이미지이다.

도 3b는 지질 이중막의 자가정렬이 개시되는 시점의 이미지이다.

도 3c는 지질 이중막의 자가정렬이 어느 정도 진행된 시점의 이미지이다.

도 4는 α-HL 단백질을 이용하여 지질 이중막의 생성 여부를 확인하는 전기적 측정 결과 그래프이다.

도 5는 지질 이중막이 생성되는 동안 삼각파형의 전압에 대한 전류 값을 측정한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0050] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0051] **실시예**

[0052] **실시예 1: 지질 유기용액 제조**

[0053] 헥사데칸(Hexadecane, Sigma-Aldrich)과 n-데칸(n-decane, Sigma-Aldrich)의 8:2(중량비) 또는 9:1(중량비) 혼합물에 다이파이타노일포스파티딜콜린(Diphytanoylphosphatidylcholine, DPhPC, Avanti Polra Lipids)를 용해

하여 1% 지질 유기용액을 제조하였다. 보다 상세하게는, DPhPC를 n-데칸에 용해한 후 12시간 정도 교반기를 이용하여 충분히 용해하였다. 이어, n-데칸의 4배 용량의 헥사데칸을 혼합하여 최종 지질 농도가 1 w/v%가 되도록 조절하였다.

[0054] **실시예 2: PDMS 필름의 제조**

[0055] Sylgard polymer(Dow Corning)와 경화제 DC-184B(Dow Corning)를 10:1(중량비)의 비율로 혼합하였다. 두 물질이 잘 혼합하도록 교반하였다. 두 물질을 일정량 페트리 디쉬에 담고 넓게 펴서 두께를 일정하게 조절하였다. 그 후 혼합물 속에 생성된 기포를 빼내기 위해서 진공 펌프를 이용하여 약 1시간 정도 기포를 제거하고 60℃의 오븐에서 10시간 처리하여 최종적으로 PDMS 필름을 수득하였다.

[0056] **실시예 3: 어는점이 높은 지질 혼합 유기용액과 유기용매를 흡수하는 PDMS 필름을 이용한 지질 이중막 자가 정렬에 관한 실험**

[0057] 지질 혼합 유기용액을 이용하여 PDMS 필름에서 지질 이중막의 자가정렬을 실험하였다. 우선 Micropunch(Harris, Uni-Core 0.50)를 이용하여 0.305 mm 두께의 PDMS 필름의 중앙 부분에 0.5 mm의 구멍을 뚫고 도 2a와 같이 챔버와 결합시켰다.

[0058] 결합된 챔버를 4℃ 냉장고에 일정 시간 보관 하여 PDMS 필름을 냉각시켰다. PDMS 필름을 차게 한 경우에 지질 혼합 유기용액이 더 잘 도포되는 것을 확인 할 수 있었다. 이어, 1 w/v% 지질 혼합 유기용액을 핀 툴을 이용하여 PDMS 필름의 구멍에 도포 하였다. 이때 약간 깊숙이 핀 툴을 찔러 지질 혼합 유기용액이 골고루 퍼지게 하였다. 도포 한 후 바로 냉장고(4℃)에서 10분 냉각시켰다. 그런 다음, 챔버를 냉장고로부터 꺼내고 PDMS 막의 챔버 양쪽에 완충액(1 M KCl, 1 mM EDTA 및 10 nM Tris-HCl (pH 8.5))을 넣고 구멍에 도포된 지질 혼합 유기용액을 녹이면서 자가정렬되는 것을 현미경(Digital blue, QX-5)으로 200X로 관찰하였다.

[0059] 완충액을 첨가하면 즉시 동결 막 전구체가 해빙되고 지질 이중막의 자가정렬이 시작되었다. 저온의 완충액을 이용하는 경우에는, 버블이 막 형성을 방해하였다. 박화(thinning out) 과정이 시작되면서 지질 이중막의 두께가 변화되었다. 도 3a-3c는 지질 이중막 형성 과정을 보여준다. 실험 결과 약 10분후에 자가정렬이 시작되며 약 46분 정도 자가정렬 현상이 진행되면서 막이 형성 되는 것을 확인 하였다.

[0060] 한편, 지질 이중막의 형성은 전류 측정으로도 확인할 수 있다. 전도력은 저항의 역수이다. 본 발명자들은 Axopatch(Axon Instrument)를 이용하여 전류를 측정하였으며, 전압을 10 mV로 고정하였다. 전도력의 연장은 지질 이중막의 면적이 증가하는 것을 나타낸다. 도 5에서 볼 수 있듯이, 막의 면적은 각각 276 μm^2, 294 μm^2 및 346 μm^2으로 증가하였다. 면적은 다음과 같은 공식으로 계산된다:

[0061] **수학식 1**

[0062] $$C = I \times \frac{dv}{dt} = \frac{\varepsilon_0 \times \varepsilon_s \times A}{d}$$

[0063] 수학식에서, I:전류, V:전압, t:시간, ε:자유면적의 유전율, ε_s: 지질의 유전상수

[0064] 한편, 지질 유기용액의 조성을 달리하여 지질 이중막을 제조하였고, 그 패턴을 관찰하였다(참조: 표 1).

표 1

[0065]

분류	1:9 PDMS with pre-painting	2:8 PDMS with pre-painting	1:9 PDMS without pre-painting	2:8 PDMS without pre-painting
평균 박화시간(Mean thinning out time)	15.8 min (± 8.8)	13.9 min (± 13.3)	13.6 min (± 10.3)	-
지질 이중막 성공률	100%	55.6%	50%	0%

[0066] 상기 표 1에서 볼 수 있듯이, 1:9(n-데칸:헥사데칸)의 지질 유기용액을 이용한 경우가 가장 우수한 이질 이중막 생성 성공률을 나타내었다. 전-도포(pre-painting)은 PDMS 지지체에 지질 용액이 결합하는 것을 향상시켰다.

표 2

[0067]

분류	2:8, n-데칸:헥사데칸 혼합물 PDMS with pre-painting	2:8, 스쿠알렌:헥사데칸 혼합물 PDMS with pre-painting
평균 박화시간(Mean thinning out time)	13.9 min (± 13.3)	45.51 min (± 10.96)
지질 이중막 성공률	55.6%	69.2%

[0068] 한편, 상기 표 2에서 볼 수 있듯이 n-데칸을 사용하였을 때 보다 스쿠알렌(Avanti Polra Lipids))을 2:8의 중량비로 사용하였을 때 평균 박화시간(Mean thinning out time)이 늘어나는 결과를 보인다. 하지만 표준편차가 줄어들어 n-데칸을 사용 하였을 때 보다 더 일정한 평균 박화시간을 가짐으로 어느 정도 예상 할 수 있는 결과를 보인다.

[0069] **실시예 4: α-HL을 이용한 지질 이중막 생성 여부 확인**

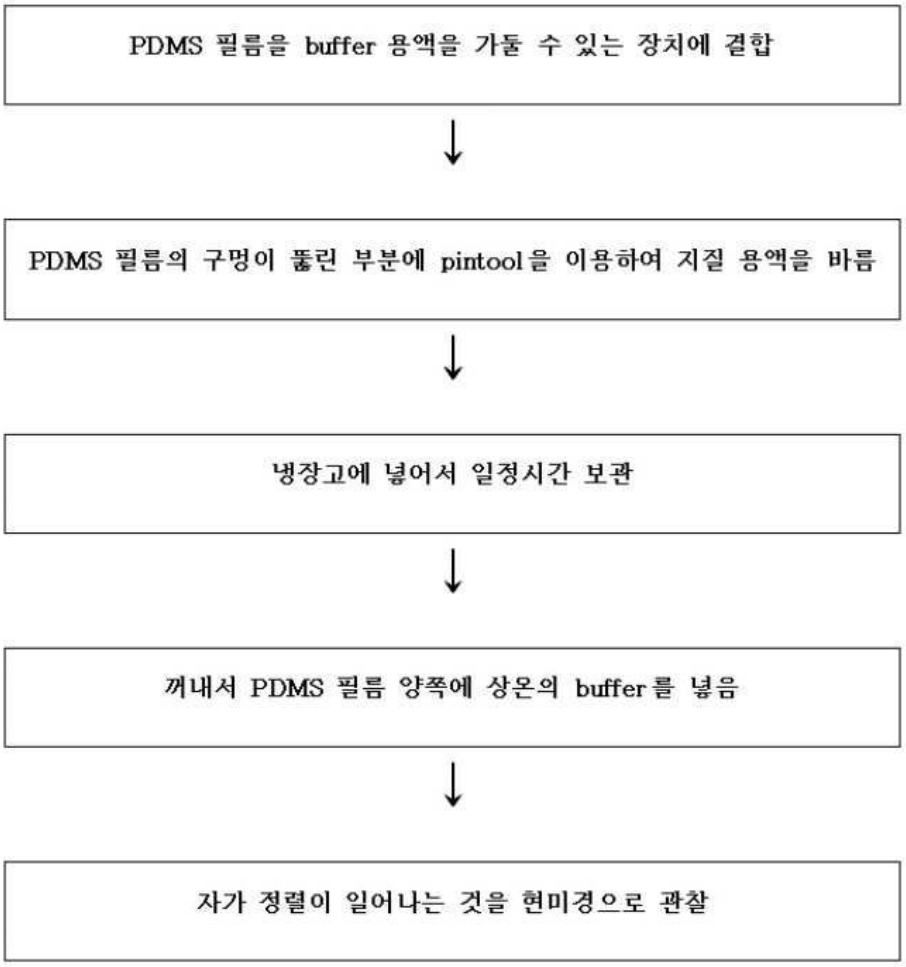
[0070] 지질 이중막의 형성을 확인하기 위하여, 막 단백질을 막에 재구성하여 전기적 특성을 측정하였다. α-헤모라이신(α-Hemolysin)은 지질 이중막에 채널을 형성하는 단백질이다. 이 단백질이 만드는 특성은 한 개의 단백질이 지질 이중막에 채널을 만들 경우 약 0.8 nS의 컨덕턴스를 형성한다(Jeon, T. J.; Malmstadt, N.; Schmidt, J. J., Hydrogel-encapsulated lipid membranes. *Journal of the American Chemical Society* 2006, 128, (1), 42-43). 상술한 바와 같이, 지질 이중막 전구체가 준비된 챔버의 한 쪽에 1.7 ng α-헤모라이신(Sigma-Aldrich)을 첨가하였다. 이어, Ag/AgCl(A-M Systems) 전극을 챔버의 양쪽에 위치시키고 Axopatch(Axon Instrument)를 이용하여 전류를 측정하였다.

[0071] 도 4에서 확인할 수 있듯이, 동결 막 전구체로부터 형성된 지질 이중막 내에 α-HL이 삽입되었다. 0.8 nS의 컨덕턴스가 증가하였으며, 이는 본 발명에 의해 제조된 지질 이중막이 생체막과 동일한 특성을 가짐을 보여준다.

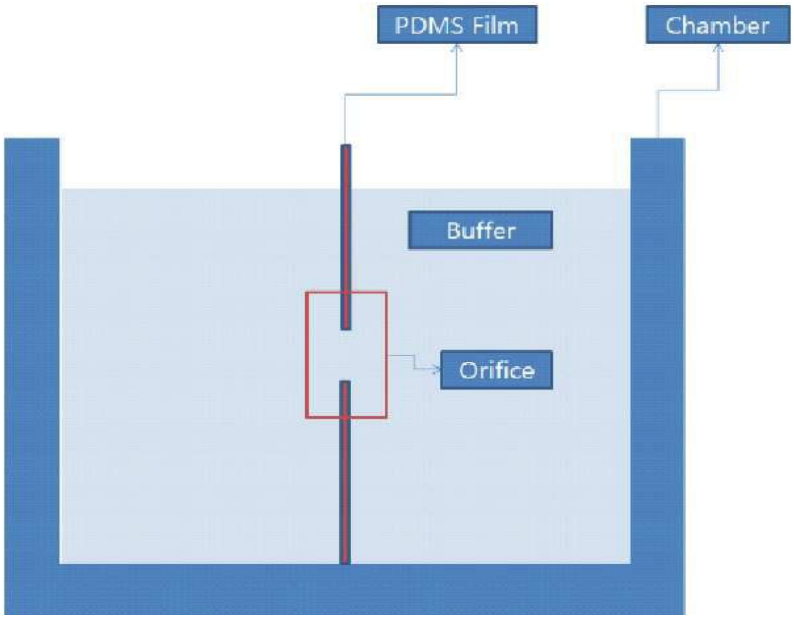
[0072] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

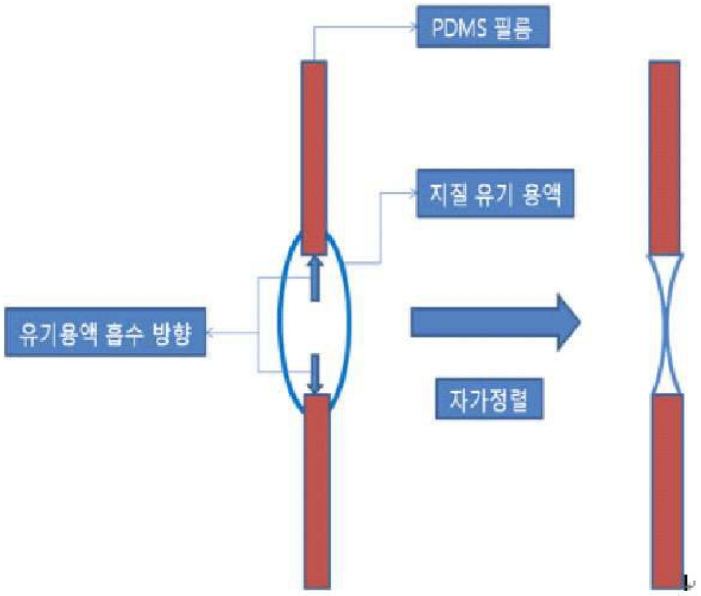
도면1


PDMS 필름을 buffer 용액을 가둘 수 있는 장치에 결합
PDMS 필름의 구멍이 뚫린 부분에 pintool을 이용하여 지질 용액을 바름
냉장고에 넣어서 일정시간 보관
꺼내서 PDMS 필름 양쪽에 상온의 buffer를 넣음
자가 정렬이 일어나는 것을 현미경으로 관찰

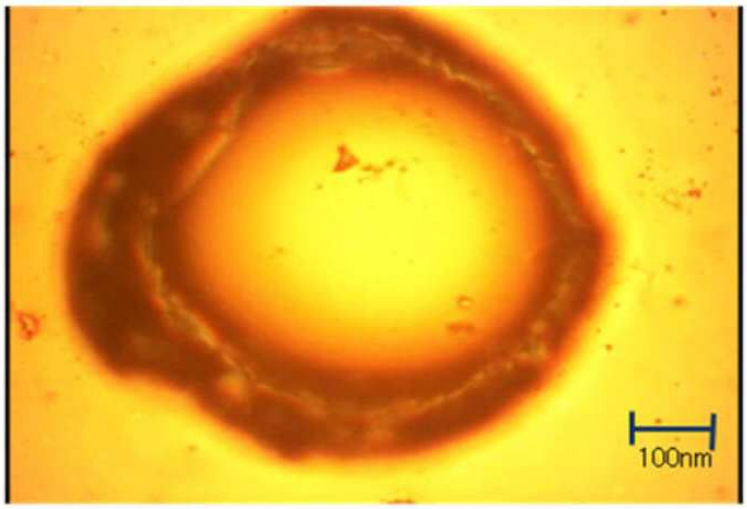
도면2a


PDMS Film
Chamber
Buffer
Orifice

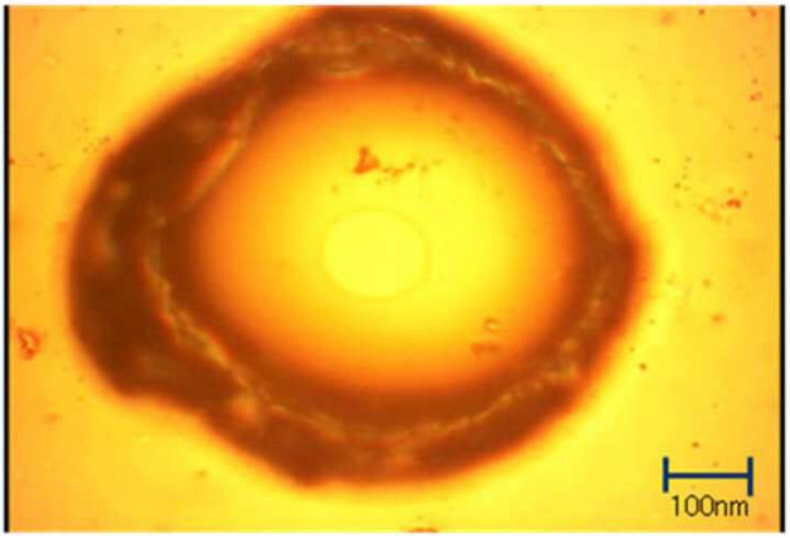
도면2b


PDMS 필름
지질 유기 용액
유기용액 흡수 방향
자가정렬

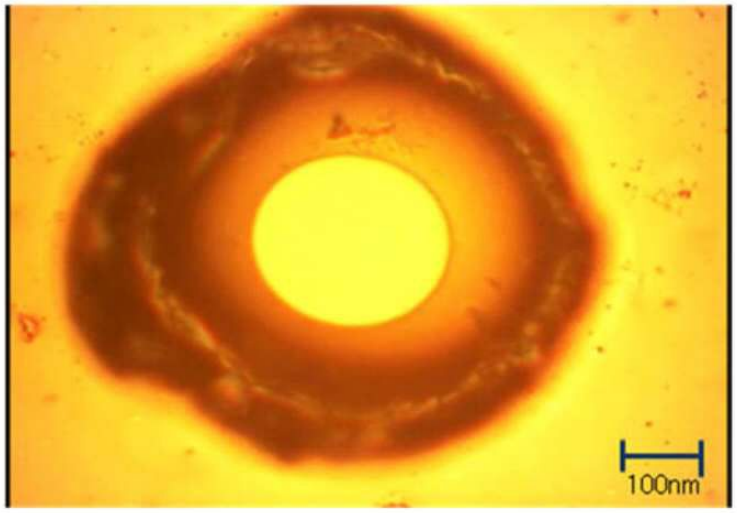
도면3a



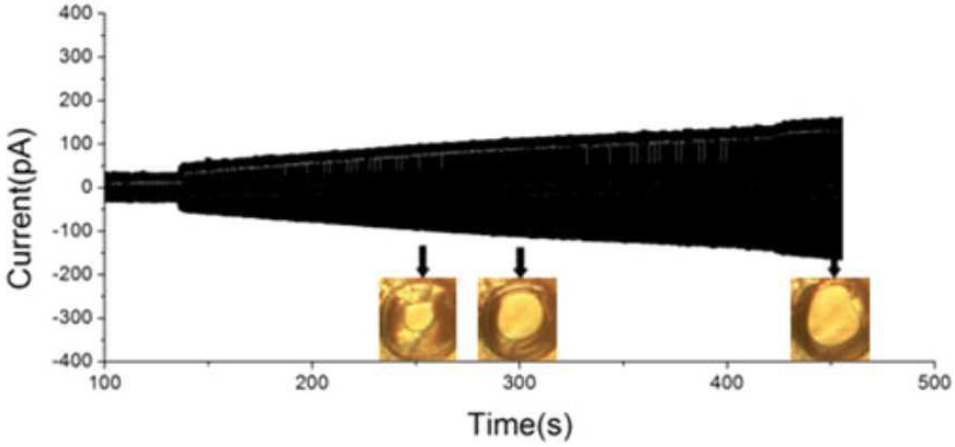
도면3b



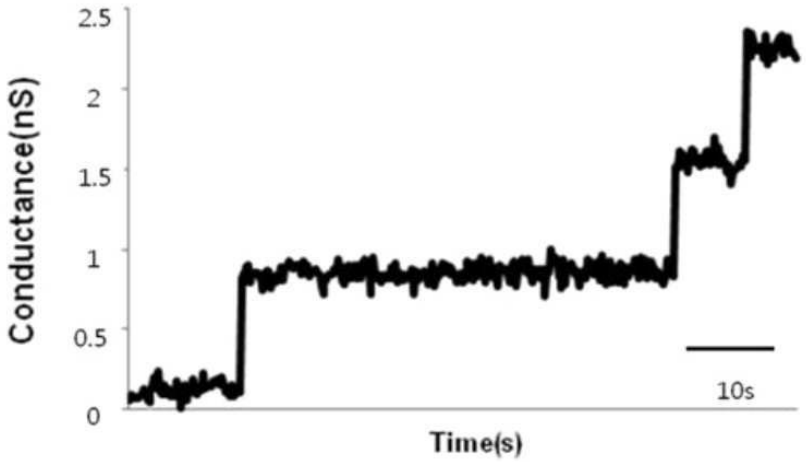
도면3c



도면4


Current(pA)
400
300
200
100
0
-100
-200
-300
-400
100
200
300
400
500
Time(s)

도면5


Conductance(nS)
2.5
2
1.5
1
0.5
0
10s
Time(s)