

명세서

발명의 명칭

수용성 고분자가 결합된 나노물질을 포함하는 소광제 및 이의 용도

기술분야

본 발명은 수용성 고분자가 결합된 나노물질을 포함하는 소광제 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경기술

특정한 핵산(DNA 또는 RNA) 또는 단백질을 검출하는 방법은 과학연구 분야에서 중요한 기술이다. 특정한 핵산 또는 단백질을 검출할 수 있게 됨으로써, 연구자들은 어떤 유전적, 생물학적 표지가 사람의 건강상태를 나타내는 지표가 되는지를 판정할 수 있게 되었다. 이러한 핵산과 단백질을 검출하는 방법을 이용하면 시료에 존재하는 병원체 유전자의 변형, 또는 특정 유전자의 발현 등을 발견할 수 있다.

한편, 산화그래핀과 같이 2차원 격자 내로 채워진 평면 구조를 갖는 유기 또는 무기 고분자와 그 유도체들은 전자 전달이 가능하다. 이러한 전자 전달은 이들의 결정 및 격자 구조와 같은 물리적 특성에 기인한다. 특히, 형광 공명 에너지 전달(fluorescence resonance energy transfer, FRET) 현상을 통해 유기형광 염료의 형광 신호를 소광시킬 수 있다.

따라서, 산화그래핀과 같은 물질의 물리적 특성을 이용하여 형광염료가 결합된 핵산 고분자의 형광 신호 변화를 관찰할 수 있고, 이를 통하여 핵산 및 단백질과 같은 바이오 물질을 검출할 수 있게 되었다(대한민국 등록특허공보 제10-1496671호). 또한, 이러한 물질을 이용하여 형광분석기반 효소 활성을

검출하는 방법이 개발되었다(대한민국 등록특허공보 제10-1554173호). 최근에는, 이러한 물질을 이용한 기술은 시료에 존재하는 병원체의 유전자나 단백질 등을 관찰할 수 있어 질병 및 질환의 초기 연구에 중요하게 되었다.

그러나, 이와 같이 산화그래핀을 이용한 검출방법은 간단하지만 시료내에 포함된 표적 물질의 양에 큰 영향을 받을 수 있으며, 검출에 사용되는 핵산 고분자들의 크기 분포가 고르지 않아 오차 범위가 넓다. 또한, 체외진단을 위한 생체 외 환경에서 상기 고분자들이 불안정하여 재현성이 떨어진다는 단점이 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

본 발명의 목적은 수용성 고분자가 결합된 나노물질을 포함하는 소광제 및 상기 소광제 및 형광 물질이 결합된 프로브를 포함하는 조성물을 제공하는 것이다. 또한, 본 발명의 다른 목적은, 상기 조성물을 이용하여 질환의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.

기술적 해결방법

상기 목적을 달성하기 위하여,

본 발명의 수용성 고분자가 결합된 나노물질을 포함하는 소광제를 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 소광제 및 형광 물질이 결합된 프로브를 포함하는 조성물을 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 조성물 및 분리된 시료를 혼합하여 혼합물을 준비하는 단계, 상기 혼합물의 형광 수준을 측정하는 단계 및 정상 대조군 시료의 형광 수준과 비교하는 단계를 포함하는 질환의 진단에 필요한 정보 제공 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 소광제 및 형광 물질이 결합된 프로브를 포함하는 키트를 제공한다.

유리한 효과

본 발명의 수용성 고분자가 결합된 나노물질을 포함하는 소광제는 형광 물질이 결합된 프로브에서 나오는 형광을 효과적으로 소광시킨다. 또한, 수용성 고분자가 결합된 나노물질과 형광 물질이 결합된 프로브가 안정적으로 결합한다. 뿐만 아니라, 표적물질 존재시 프로브는 표적물질에 결합하여, 수용성 고분자가 결합된 나노물질로부터 용이하게 이탈할 수 있어 효율적으로 표적물질을 검출할 수 있다. 따라서, 상기 소광제 및 형광 물질이 결합된 프로브를 포함하는 조성물은 낮은 농도로 존재하는 표적 물질도 검출할 수 있다. 그러므로, 바이오물질 검출 또는 질환의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위한 조성물 또는 키트로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 수용성 고분자가 결합된 나노물질을 제조하는 방법 및 이렇게 제조된 물질을 이용하여 바이오물질을 검출하는 방법을 나타내는 모식도이다.

도 2는 일 실시예에서 제조된 그래핀 옥사이드 나노콜로이드(GON)를 원자력 현미경(AFM)으로 촬영한 사진이다.

도 3은 일 실시예에서 제조된 2차원 나노물질인 이산화망간을 주사투과현미경(TEM)(a) 및 AFM(b)으로 촬영한 사진이다.

도 4는 일 실시예에서 제조된 나노 그래핀 옥사이드(NGO)를 AFM으로 촬영한 사진이다.

도 5는 텍스트란에 의해 표면이 개질된 그래핀 옥사이드 나노콜로이드(DReGON)를 AFM으로 촬영한 사진(a) 및 라만 스펙트럼으로 분석한

그래프(b)이다.

도 6은 폴리에틸렌글리콜에 의해 표면이 개질된 NGO(PEG-NGO)(a), 또는 PEG 및 폴리에틸렌이민(PEI)에 의해 표면이 개질된 GON(PEG-PEI-GON)(b)을 AFM으로 촬영한 사진이다.

도 7은 검출용 조성물의 형성 여부를 확인하기 위하여, DReGON과 프로브인 PNA-US5-2(a) 또는 PNA-DENV(b)를 혼합하여, 이의 형광 신호를 확인한 그래프이다.

도 8은 검출용 조성물의 형성 여부를 확인하기 위하여, PEG-NGO와 프로브인 PNA-Sa(a) 또는 PNA-Pa(b)를 혼합하여, 이의 형광 신호를 확인한 그래프이다.

도 9는 검출용 조성물의 형성 여부를 확인하기 위하여, PEG-PEI-GON과 프로브인 PNA-TS를 혼합하여, 이의 형광 신호를 확인한 그래프이다.

도 10은 GON(a)의 형광 안정성을 DReGON(b)과 비교한 것이다.

도 11은 DReGON(a) 및 GON(b)의 표적 물질 검출능을 확인한 그래프이다.

도 12는 표적 물질로서 다양한 농도의 miR-21(a) 또는 miR-223(b)을 첨가하였을 때 PEG-NGO의 검출능을 확인한 그래프이다.

도 13은 표적 물질로서 다양한 농도의 miR-TS를 첨가하였을 때 PEG-PEI-GON의 검출능을 확인한 그래프이다.

도 14는 다양한 암 세포주에 프로브를 혼합하지 않았을 경우 형광 시그널이 검출되지 않는다는 것을 확인한 사진이다.

도 15는 다양한 암 세포주에서 프로브인 PNA484 또는 PNA31과 혼합된 DReGON의 암세포 검출능을 확인한 그래프이다.

도 16은 혈구세포에서 프로브인 PNA21, PNA223, Let-7a 또는 이들의 혼합물(scrambled)과 혼합된 DReGON의 혈구세포 검출능을 확인한 그래프이다.

도 17은 녹농균(a) 또는 황색포도상구균(b)에 특이적으로 결합하는 형광 표지된 핵산 염기서열을 농도를 달리하여 PEG-NGO와 혼합한 후, 이를 녹농균 및 황색포도상구균과 혼합한 후 나타나는 형광 수준을 측정한 그래프이다.

도 18은 인간 사이토메갈로바이러스(a) 또는 뎅기바이러스(b)에 특이적으로

결합하는 핵산 염기서열을 DReGON과 혼합한 후, 이를 인간 사이토메갈로바이러스 및 Dengue 바이러스에 혼합한 후 나타나는 형광 수준을 측정하는 그래프이다.

발명의 상세한 설명

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명의 일 측면으로서 수용성 고분자가 결합된 나노물질을 포함하는 소광제를 제공한다.

본 명세서에서 사용된 용어 "수용성 고분자"란, 물에 녹거나 물 속에서 미세한 입자로 분산될 수 있는 수지 또는 고분자를 의미한다. 상기 수용성 고분자는 천연 고분자, 반 합성 고분자 또는 합성 고분자일 수 있다. 본 발명에서 사용가능한 수용성 고분자는 1 내지 20 kDa, 5 내지 15 kDa 또는 8 내지 12 kDa의 분자량을 가질 수 있다. 일 실시예로서 상기 수용성 고분자는 10 kDa일 수 있다.

상기 수용성 고분자는 키토산 및 그의 유도체, 키토산염, 덱스트란 및 그의 유도체, 히알루론산 및 그의 유도체, 히알루론산염, 펙틴 및 그의 유도체, 펙틴염, 알긴산염 및 그의 유도체, 알긴산, 아가, 갈락토만난 및 그의 유도체, 갈락토만난염, 잔탄 및 그의 유도체, 잔탄염, 베타-사이클로덱스트린 및 그의 유도체, 베타-사이클로덱스트린염, 폴리에틸렌글리콜(PEG), 폴리에틸렌이민(PEI) 및 그의 조합으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다. 일 실시예로서 상기 수용성 고분자는 덱스트란, 폴리에틸렌글리콜, 폴리에틸렌이민 및 그의 조합으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.

본 명세서에서 사용된 용어 "나노물질"이란 나노 크기를 갖는 물질을 의미한다. 이는 크기가 작아 세포막을 용이하게 통과할 수 있다. 상기 나노물질은 시트 형태 또는 입자 형태일 수 있다. 상기 시트는 단일층 또는 복수의 층으로 구성될 수 있다. 또한, 시트 형태는 평면 또는 곡면을 포함할 수 있으며, 다양한

형태로 존재할 수 있다. 일 실시예로는 상기 나노물질은 2차원 단일층 시트 형태인 나노물질일 수 있다. 또한, 입자 형태는 구형, 타원형, 막대형 및 다각형 등 다양한 형태를 포함할 수 있다.

상기 나노물질의 입자 크기는 약 10 내지 500 nm, 약 10 내지 200 nm, 약 10 내지 150 nm, 약 10 내지 100 nm, 약 10 내지 50 nm, 약 20 내지 200 nm, 약 20 내지 150 nm, 약 20 내지 100 nm, 약 20 내지 50 nm, 약 30 내지 200 nm, 약 30 내지 150 nm, 약 30 내지 100 nm, 약 30 내지 50 nm, 약 50 내지 200 nm, 약 50 내지 150 nm, 약 50 내지 100 nm, 약 50 내지 80 nm, 약 60 내지 200 nm, 약 60 내지 100 nm, 약 60 내지 80 nm, 약 80 내지 200 nm, 약 80 내지 150 nm, 약 80 내지 100 nm, 약 90 내지 200 nm, 약 90 내지 150 nm 또는 약 90 내지 100 nm일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 일 실시예에서, 상기 나노물질은 50 내지 80 nm, 90 내지 200 nm, 90 내지 150 nm 또는 80 내지 100 nm일 수 있다. 이때, 상기 입자 크기는 동적 광 산란(Dynamic Light Scattering)을 이용한 측정으로 얻어진 실험값 또는 원자력 현미경(AFM)이나 주사투과현미경(TEM) 이미지에서 보여지는 크기를 평균해서 계산한 값으로, 나노물질이 구형 또는 원형이라고 가정하고 얻어지는 값을 의미한다.

상기 나노물질은 탄소나노물질 또는 이산화망간으로 제조될 수 있다. 이때, 상기 탄소나노물질은 나노 그래핀 옥사이드(NGO) 및 이의 유도체, 환원된 산화그래핀 및 이의 유도체, 그래핀 옥사이드 나노콜로이드(GON), 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다. 일 실시예로서, 상기 나노물질은 나노 그래핀 옥사이드, 그래핀 옥사이드 나노콜로이드 또는 이산화망간일 수 있다.

본 명세서에서 사용된 용어 "소광제"는 빛 또는 파장을 흡수하여 형광을 내는 물질의 형광 에너지를 흡수하는 물질을 의미한다. 소광 효과는 형광을 내는 물질과 나노물질 간의 상호 작용으로 일어난다. 형광물질과 나노물질이 10 nm 정도 또는 그 이하의 근거리에 위치할 때 주로 발생한다. 이때 형광물질은 에너지 주게(energy donor) 역할을 하며, 나노물질은 에너지 받게(energy acceptor) 역할을 한다.

상기 소광제는 수용성 고분자에 의해 나노물질의 표면이 개질된 것일 수 있다. 이때, 상기 수용성 고분자 및 나노물질이 화학적 또는 물리적으로 결합된 것일 수 있다. 상기 화학적 결합은 아마이드 결합, 에스테르 결합, 에테르 결합 등이 가능하나 이에 한정되지 않는다. 또한, 화학적 결합은 가교제를 통해 이루어질 수 있다. 일 실시예로, 수용성 고분자와 나노물질은 EDC 커플링(coupling)을 통해 결합될 수 있다. 또한, 상기 물리적 결합은 정전기적 인력, 수소결합, 반데르발스 결합 일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 또한, 이와 같이 수용성 고분자에 의해 표면이 개질된 나노물질은 분산 능력 및 안정성이 향상될 수 있고, 생체 친화성이 향상될 수 있다.

또한, 본 발명의 다른 측면에서, 본 발명은 상기 소광제 및 형광 물질이 결합된 프로브를 포함하는 조성물을 제공한다.

본 명세서에서 사용된 용어 "프로브"란, 표적 물질에 특이적으로 결합할 수 있는 물질을 의미한다. 상기 프로브는 항체, 핵산, 펩타이드, 단백질 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다. 이외에도 원하는 표적 물질과 높은 친화성을 갖는 물질로 알려진 물질이면 모두 사용가능하다. 일 실시예로, 상기 항체는 표적 단백질의 에피토프와 특이적으로 결합하여 표적 물질을 검출할 수 있다. 또한, 상기 핵산이 표적 물질의 핵산의 서열과 상보적인 서열을 갖는다면, 상기 핵산은 표적 염기서열에 결합하여 표적 물질을 검출할 수 있다. 또한, 상기 펩타이드는 세포의 표면에 발현되어 있는 수용체 또는 리간드 등에 특이적으로 결합하여 표적 물질을 검출할 수 있다.

상기 핵산은 DNA, RNA, mRNA, miRNA, 비번역 RNA, 이중나선 RNA, 이중나선 DNA, DNA 기반 효소, 디옥시리보자임, 앵타머, 펩타이드 핵산(Peptide Nucleic acid, PNA), 잠금 핵산(Locked nucleic Acid, LNA) 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.

이때, 상기 핵산은 10 내지 50개, 10 내지 30개, 12 내지 28개, 15 내지 25개, 18 내지 22개의 염기로 구성될 수 있으나, 표적 핵산 서열과 상보적인 결합을 할

수 있다면 염기의 개수는 이에 한정되지 않는다. 일 실시예로서 상기 핵산은 15 내지 22개의 염기로 구성될 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서, 상기 핵산은 서열번호 1 내지 20으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나일 수 있다.

본 발명에 따른 프로브에는 형광 물질이 결합되어 있다. 상기 형광 물질은 수용성 고분자가 결합된 나노물질에 의해 형광 에너지가 흡수되어 소광된 상태로 존재하다가, 상기 프로브가 표적 물질과 특이적으로 결합하여, 나노물질로부터 유리되면 형광을 나타내게 된다. 상기 형광 물질은 프로브의 한쪽 말단 또는 중간에 결합될 수 있다. 프로브가 핵산인 경우, 형광 물질은 핵산의 5' 또는 3' 위치 또는 핵산의 내부에 위치할 수 있다. 프로브가 펩타이드일 경우, 형광 물질은 펩타이드의 N 말단, C 말단 또는 내부에 결합할 수 있다. 형광 물질은 프로브에 직접 결합하거나 가교제를 통해 결합할 수 있다.

상기 형광 물질은 플루오레신, 플루오레신 클로로트리아지닐, 로다민 그린, 로다민 레드, 테트라메틸로다민, 플루오레세인이소티오시안산염(fluorescein isothiocyanate, FITC), 오레곤 그린(oregon green), 알렉스 플루오로, 카복시플루오레스세인(carboxyfluorescein, FAM), 6-카복시-4',5'-디클로로-2',7'-디메톡시플루오레스세인(JOE), 카복시-X-로다민(ROX), 6-카복시-2',4,4',5',7, 7'-헥사클로로플루오레스세인(HEX), 텍사스 레드(sulforhodamine 101 acid chloride), 6-카복시-2',4,7',7'-테트라클로로플루오레스세인(TET), 테트라메틸로다민-이소티오시아네이트(TRITC), 카복시테트라메틸로다민(TAMRA), 시아닌 계열 염료, 씨아디카르보시아닌 염료 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다. 상기 시아닌 계열 염료는 Cy3, Cy5, Cy5.5, Cy7 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.

상기 소광제는 하나 이상의 표적을 탐지할 수 있다. 하나 이상의 표적을 탐지하기 위해서 나노물질은 서로 다른 두 종류 이상의 프로브를 포함할 수 있다. 이때, 각각의 프로브는 상이한 형광 물질을 포함할 수 있다. 이때 각각의 프로브는 상이한 표적 물질과 결합함으로써 서로 다른 표적 물질을 검출할 수 있다.

또한, 상기 조성물은 바이오물질의 검출 또는 질환의 진단에 필요한 정보를 제공하는데 이용될 수 있다. 상기 질환은 암, 감염성 질환, 염증성 질환 또는 유전자 질환일 수 있고, 일 실시예에서 상기 질환은 암 또는 감염성 질환일 수 있다.

상기 암은 유방암, 폐암, 간암, 췌장암, 위암, 대장암, 골암, 피부암, 뇌암, 육종암, 안암, 골수암, 혈액암 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다. 한편, 상기 감염성 질환은 박테리아, 곰팡이, 바이러스, 기생충 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다. 이때, 상기 박테리아는 장내세균 또는 장구균일 수 있다. 상기 박테리아의 예로는 녹농균, 황색포도상구균 및 아시테노박터 바우마니균 등이 있다. 본 발명의 일 실시예에서, 상기 박테리아는 녹농균 또는 황색포도상구균일 수 있다.

상기 바이러스는 이중가닥 DNA 바이러스, 단일가닥 DNA 바이러스, 이중가닥 RNA 바이러스, 양성-극성 단일가닥 RNA 바이러스, 음성-극성 단일가닥 RNA 바이러스, 단일가닥 RNA-역전사 바이러스 및 이중가닥 DNA-역전사 바이러스 등을 포함할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서, 상기 바이러스는 사이토메갈로바이러스, 뎅기 바이러스 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.

본 발명의 또 다른 측면으로, 상기 소광제와 형광 물질이 결합된 프로브를 포함하는 조성물 및 분리된 시료를 혼합하는 단계; 상기 혼합물의 형광을 측정하는 단계; 및 정상 대조군 시료의 형광 수준과 비교하는 단계를 포함하는 질환의 진단에 필요한 정보 제공 방법을 제공한다.

상기 조성물에 포함되는 소광제 및 형광 물질이 결합된 프로브는 상기 서술한 바와 같다. 또한, 상기 시료는 진단 대상으로부터 분리, 배출된 시료로서, 세포, 세포배양액, 조직, 타액, 소변, 대변, 정액, 혈액, 혈장 또는 혈청일 수 있다. 또한, 정상 대조군 시료는 질환을 갖지 않는 정상인으로부터 분리 배출된 시료를 의

미한다.

본 발명에 따른 방법은 핵산 또는 단백질과 같은 바이오 물질을 검출하거나, 상기 서술한 바와 같은 질환의 진단에 사용될 수 있다. 이때, 상기 형광은 나노물질에 의해 소광된 형광 물질이 표적 물질과 특이적으로 접촉 또는 결합함으로써 유리되면서 발광하게 되는 것을 측정하여 알 수 있다. 상기 형광 수준의 측정을 위해서는 유세포분석(flow-cytometry), 유세포분리(fluorescence activated cell sorting, FACS), 또는 형광 신호나 이미지를 분석하는 방법을 사용할 수 있다.

또한, 본 발명의 다른 측면에서, 본 발명은 상기 소광제 및 형광 물질이 결합된 프로브를 포함하는 키트를 제공한다. 상기 조성물에 포함되는 소광제 및 형광 물질이 결합된 프로브는 상기 서술한 바와 같다. 상기 키트는 핵산 또는 단백질과 같은 바이오 물질을 검출하거나, 상기 서술한 바와 같은 질환의 진단에 사용될 수 있다.

이하, 하기 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명이 이들에 의해 제한되는 것은 아니다.

I. 2차원 나노물질의 제조

실시예 1. 그래핀 옥사이드 나노콜로이드(GON)의 제조

4 g의 $K_2S_2O_8$ 및 4 g의 P_4O_{10} 을 50 mL의 H_2SO_4 에 첨가하여 교반하며 용해시켰다. 여기에 2 g의 그래파이트 나노파이버(graphite nanofiber)를 첨가하고, 90°C에서 16시간 동안 가열하였다. 가열된 혼합물을 상온으로 식히고 250 mL의 증류수를 첨가한 뒤, 이를 종이 필터(Whatman, GE Healthcare, 미국)로 정제하였다. 정제된 혼합물을 증류수로 2회 이상 세척하고 공기 중에서 건조시켰다.

1.5 g의 상기 건조된 가루형태의 그래파이트 나노파이버를 250 mL의 H_2SO_4 에 첨가하고, 여기에 10 g의 $KMnO_4$ 를 조금씩 첨가하면서 교반하여 반응시켰다. 이때, 반응 온도는 $10^\circ C$ 가 넘지 않도록 하였다. 반응물을 $35^\circ C$ 의 증류수에서 중탕으로 6시간 동안 교반하며 더 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 1,000 mL의 증류수를 첨가하였고, 이때 온도는 $55^\circ C$ 이하로 유지하였다. 여기에 50 mL의 H_2O_2 를 첨가하여 반응시키고, 혼합물을 10,000 rpm의 조건으로 30분 동안 원심분리하여 펠렛을 수득하였다. 수득된 펠렛은 3.4 % (w/w)의 HCl 및 아세톤으로 원심분리기를 사용하여 각각 3번 이상 세척하였다.

최종 수득된 갈색 빛의 상층액에 포함된 아세톤을 진공 상태에서 제거하고, 여기에 증류수를 넣어 최종 농도가 1 mg/mL이 되도록 맞추고 볼텍싱하여 충분히 분산시켰다. 상기 수득물을 10,000 Da의 투석 막(dialysis membrane)을 사용하여 정제 및 중성화시키고, 최종 수득된 산물을 동결건조하여 파우더 형태의 GON을 수득하였다. 수득된 GON을 원자력 현미경(AFM)으로 관찰한 결과를 도 2에 나타내었다. 도 2에 나타난 바와 같이, 100 nm 이하의 크기 및 2 nm 이하의 두께를 갖는 GON을 수득하였다.

실시예 2. 이산화망간(MnO_2)의 제조

32 mL의 도데실황산나트륨(sodium dodecyl sulfate, SDS) 및 1.6 mL의 H_2SO_4 용액에 증류수를 첨가하여 최종 부피를 300 mL로 맞추었다. 이를 $95^\circ C$ 에서 15분 동안 가열하고, 3.2 mL의 $KMnO_4$ 용액을 빠르게 첨가하였다. 이 후, 60분 동안 가열을 지속하여 짙은 갈색의 용액인 이산화망간 시트를 수득하였다.

수득된 이산화망간 시트에 3차 증류수 및 알코올을 부피비로 1:1로 첨가하고, 12,000 rpm에서 원심분리하여 펠렛을 수득하였다. 동일한 조건으로 원심분리를 2회 더 반복하여 수득된 산물을 3차 증류수에 분산시켜 최종 산물을 수득하였다. 수득된 MnO_2 를 주사투과현미경(Transmittance Electron Microscopy, TEM) 및 원자력 현미경(atomic force microscopy, AFM)으로 관찰한 결과를 도 3에

나타내었다. 도 3b에 나타난 바와 같이, 200 nm 이하의 크기 및 2 nm 이하의 두께를 갖는 MnO_2 를 수득하였다.

실시예 3. 나노 그래핀 옥사이드(NGO)의 제조

0.5 g의 Na_2NO_3 를 23 mL의 H_2SO_4 에 첨가하여, 이를 교반하며 용해시켰다. 여기에 0.5 g의 그래파이트 나노파이버를 첨가한 뒤, 3 g의 KMnO_4 를 조금씩 첨가하면서 교반하여 반응시켰다. 이때, 반응온도는 10°C 가 넘지 않도록 하였다. 반응물을 35°C 의 증류수에서 중탕으로 1시간 동안 교반하며 더 반응시키고, 이후에는 90°C 에서 30분 동안 추가로 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 1 mL의 증류수를 첨가하였고, 이때 온도는 55°C 이하로 유지하였다. 상기 반응물에 3 mL의 H_2O_2 를 첨가하여 반응시키고, 이를 상온으로 식힌 뒤 250 mL의 증류수를 첨가하였다. 이를 종이필터로 여과한 뒤, 여과물을 증류수로 2회 이상 세척하고 공기 중에서 건조시켰다.

산화그래핀(GO)을 제조하기 위해 10 mg/mL 농도의 산화그래핀 용액에 50 mL의 9 M NaOH를 첨가한 뒤, 90분 동안 팁-초음파 분해(tip-sonication)를 하였다. 이를 3,800 Da의 투석막을 사용하여 정제 및 중성화시키고, 최종 수득된 산물을 동결건조하여 파우더 형태의 NGO를 수득하였다. 수득된 NGO를 AFM으로 관찰한 결과를 도 4에 나타내었다. 도 4에 나타난 바와 같이, 200 nm 이하의 크기 및 1.5 nm 이하의 두께를 갖는 NGO를 수득하였다.

II. 고분자로 표면이 개질된 2차원 나노물질의 제조

실시예 4. 덱스트란에 의해 표면이 개질된 그래핀 옥사이드 나노콜로이드(DReGON)의 제조

상기 실시예 1에서 수득된 그래핀 옥사이드 나노콜로이드의 표면을

덱스트란을 이용해 개질시켰다. 구체적으로, 50 mg의 그래핀 옥사이드 나노콜로이드를 50 mL의 증류수에 분산시키고, 0.1 % (w/w)의 덱스트란 수용액을 첨가하였다. 상기 혼합물을 30분 동안 초음파 처리한 뒤, 25 μ L의 암모니아 수용액을 첨가하여 95°C에서 3시간 동안 교반하여 반응시켰다. 상기 반응물을 증류수로 세척한 뒤, 10,000 rpm의 조건으로 30분 동안 원심분리하여 분리하고, 동결건조시켜 최종 산물인 DReGON을 수득하였다.

수득된 DReGON을 사용하여 라만 분석을 수행하였다. 구체적으로, 실리콘웨이퍼에 DReGON을 넣고, 라만기기(LabRAM HR UV/vis/NIR)에 상기 실리콘웨이퍼를 장착한 뒤, 514 nm 파장의 CW 레이저를 조사하여 스펙트럼을 분석하였다.

상기 수득된 DReGON을 AFM으로 관찰한 결과를 도 5a에, 라만 스펙트럼으로 분석한 결과를 도 5b에 나타내었다. 도 5a에 나타난 바와 같이, 100 nm 이하의 크기 및 7 nm 이하의 두께를 갖는 DReGON을 수득하였다. 한편, 도 5b에 나타난 바와 같이, 1370 cm^{-1} 및 1600 cm^{-1} 영역에서 D 및 G 피크가 관찰되었고, ID/IG 값이 0.85였다.

실시예 5. 폴리에틸렌글리콜(PEG)에 의해 표면이 개질된 NGO의 제조

상기 실시예 3에서 수득된 NGO의 표면을 PEG을 이용해 개질시켰다. 구체적으로, 5 mg의 NGO 및 동량의 폴리에틸렌글리콜(10 kDa)을 섞어서 수조-초음파 분해(bath-sonication)를 하였다. 여기에 5 mg의 EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide)를 첨가하여 5분간 더 수조-초음파 분해를 하였다. 상기 혼합물을 6시간 동안 교반한 뒤, 10,000 Da의 투석 막을 사용하여 정제 및 중성화시키고, 최종 수득된 산물을 동결건조하여 파우더 형태의, 폴리에틸렌글리콜에 의해 표면이 개질된 NGO(PEG-NGO)를 수득하였다.

상기 수득된 PGE-NGO를 AFM으로 관찰한 결과를 도 6a에 나타내었다. 도 6a에 나타난 바와 같이, 200 nm 이하의 크기 및 1 nm 이하의 두께를 갖는 PGE-

NGO를 수득하였다.

실시예 6. 폴리에틸렌글리콜 및 폴리에틸렌이민(PEI)에 의해 표면이 개질된 GON의 제조

상기 실시예 3에서 수득된 GON의 표면을 PEG 및 PEI를 이용해 개질시켰다. 구체적으로, 2 mg/ml 농도의 GON 용액 10 ml에 20 mg의 PEG(10 kDa)를 첨가하고, 5분 동안 수조-초음파 분해하였다. 여기에 20 mg의 EDC를 첨가하고 5분간 더 수조-초음파 분해를 하였다. 상기 반응물에 10 mg의 PEI를 첨가하고 5분 동안, EDC를 첨가하고 5분 동안 상기와 같이 수조-초음파 분해를 한 뒤, 이를 상온에서 6시간 동안 교반하여 반응이 고르게 되도록 하였다. 이 후, 상기 혼합물을 12,000 Da의 투석 막을 사용하여 정제 및 중성화시키고, 최종 수득된 산물을 동결건조하여 파우더 형태의, PEG 및 PEI에 의해 표면이 개질된 GON(PGE-PEI-GON)를 수득하였다.

상기 수득된 PEG-PEI-GON를 AFM으로 관찰한 결과를 도 6b에 나타내었다. 도 6b에 나타난 바와 같이, 100 nm 이하의 크기 및 10 nm 이하의 두께를 갖는 PGE-PEI-GON를 수득하였다.

III. 고분자로 표면이 개질된 2차원 나노물질의 검출용 조성물 형성 확인

실험예 1. 고분자로 표면이 개질된 2차원 나노물질의 검출용 조성물 형성 확인

실험예 1-1. DReGON의 검출용 조성물 형성 확인-(1)

상기 실시예 4에서 제조한 DReGON이 표적 물질 검출용 조성물로서 사용될 수 있는지 확인하기 위하여 다음과 같은 실험을 하였다. 구체적으로, 표적 물질을 탐지하기 위한 PNA(peptide nucleic acid) 프로브는 5'-말단에 Cy5가 표지되고, Cy5

및 프로브 서열 사이에 하나의 산소에 두 개의 탄소가 결합한 형태의 단위체 2개를 링커로 포함하도록 파나진(한국)에 의뢰하여 제작하였다. 상기 1 μ M의 PNA 프로브를 20 μ l의 뉴클레아제-프리 워터(nuclease-free water)에 첨가하고, 이를 80°C로 약 3분간 가열하면서 완전히 용해시켰다. 용해된 PNA 프로브 20 μ l를 상기 실시예 4에서 제조한 DReGON과 혼합하여, 상온에서 30분 동안 반응시켰다. 반응 4, 8, 12 또는 24시간 후, Ex/Em=647/670 nm에서 형광리더기로 형광 신호를 측정하였다. 이때, 대조군으로는 PNA 프로브만을 사용하였다.

그 결과, PNA 프로브 자체의 형광 신호를 100% 하였을 때, 고분자로 표면이 개질된 2차원 나노물질과 반응시키는 경우 형광 신호가 5% 미만으로 감소됨으로써, 상기 물질이 검출용 조성물을 형성함을 확인하였다.

실험예 1-2. DReGON의 검출용 조성물 형성 확인-(2)

상기 실시예 4에서 제조한 DReGON이 표적 물질 검출용 조성물로서 사용될 수 있는지 확인하기 위하여, 상기 실험예 1-1과 동일한 조건 및 방법으로 실험을 수행하였다. 이때, PNA 프로브는 하기 표 2에 기재된 PNA-US5-2 또는 PNA-DENV를 사용하였다. 10 pmol의 PNA 프로브를 각각 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4 또는 1.6 μ g의 DReGON과 혼합하였다. 그 결과, 측정한 형광 신호의 값을 도 7에 나타내었다. 도 7에 나타난 바와 같이, 첨가된 PNA 프로브의 농도에 의존적으로 형광 신호가 감소됨으로써, 상기 물질이 검출용 조성물을 형성함을 확인하였다.

실험예 1-3. PEG-NGO의 검출용 조성물 형성 확인

상기 실시예 5에서 제조한 PEG-NGO가 표적 물질 검출용 조성물로서 사용될 수 있는지 확인하기 위하여, 상기 실험예 1-1과 동일한 조건 및 방법으로 실험을 수행하였다. 이때, 10 pmol의 PNA 프로브를 0, 0.1, 0.2, 0.5 또는 1.0 μ g의 PEG-

NGO와 혼합하였다. 상기 PNA 프로브는 하기 표 1에 기재된 PNA-Sa 또는 PNA-Pa에 Cy5 형광염료가 결합된 것을 사용하였다. 그 결과, 측정된 형광 신호의 값은 도 8에 나타내었다. 도 8에 나타난 바와 같이, 첨가된 PNA 프로브의 농도에 의존적으로 형광 신호가 감소됨으로써, 상기 물질이 검출용 조성물을 형성함을 확인하였다.

실험예 1-4. PEG-PEI-GON의 검출용 조성물 형성 확인

상기 실시예 6에서 제조한 PEG-PEI-GON이 표적 물질 검출용 조성물로 사용될 수 있는지 확인하기 위하여, 상기 실험예 1-1과 동일한 조건 및 방법으로 실험을 수행하였다. 이때, 10 pmol의 PNA 프로브를 0, 0.1, 0.2, 0.5 또는 1.0 μ g의 PEG-PEI-GON과 혼합하였다. 상기 PNA 프로브는 하기 표 1에 기재된 PNA-TS에 FITC 형광염료가 결합된 것을 사용하였다. 그 결과, 측정된 형광 신호의 값은 도 9에 나타내었다. 도 9에 나타난 바와 같이, 첨가된 PNA 프로브의 농도에 의존적으로 형광 신호가 감소됨으로써, 상기 물질이 검출용 조성물을 형성함을 확인하였다.

실험예 2. DReGON 입자의 안정성 확인

상기 실시예 4에서 제조한 DReGON 입자의 안정성을 확인하기 위하여 다음과 같은 실험을 하였다. 구체적으로 0.1 mg/mL 농도의 DReGON 용액을 혈청이 포함되어 있는 PBS 용액에 잘 현탁하여 0, 4, 8, 12 또는 24시간 동안 상온에 두어 각 시간별 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 실시예 1에서 제조된 그래핀 옥사이드 나노콜로이드(GON)를 사용하였다. 그 결과, 도 10에 나타난 바와 같이, DReGON(b)은 GON(a)보다 장시간 동안 생리활성 환경에서 안정적인 흡광 스펙트럼을 보였고, 이러한 안정적 분산능은 24시간 이상 지속되었다.

IV. 고분자에 의해 표면이 개질된 2차원 나노물질의 표적물질 검출능 확인

실험예 3. 암 세포 특이적 핵산 염기서열 검출능 확인

실험예 3-1. DReGON의 검출능 확인

상기 실시예 4에서 제조한 DReGON의 검출 한계를 측정하기 위하여 다음과 같은 실험을 하였다. 먼저, 실험예 1-1과 동일한 조건 및 방법으로 프로브인 PNA21 및 DReGON을 혼합하여 반응시켰다. 반응 30분 후, 반응물에 암 세포 특이적 서열을 포함하는 표적 물질인 miR-21을 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 또는 1,000 nM의 농도가 되도록 첨가하여 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 이를 Ex/Em=647/670 nm에서 형광리더기로 형광 신호를 측정하였다. 실험에 사용된 PNA 프로브 및 표적 물질의 서열은 각각 하기 표 1 및 2에 나타내었다.

【표 1】

표적질환	프로브	서열(5'→3')	서열번호
암	PNA21	TCAACATCAGTCTGATAAGCTA	서열번호 1
	PNA31	AGCTATGCCAGCATCTTGCCT	서열번호 2
	PNA223	ATTTGACAAACTGAC	서열번호 3
	PNA484	GGAGGGGACTGAGCCTG	서열번호 4
	Let-7a	AACTATACAACCTACTACCTCA	서열번호 5
	PNA-TS	CTGCCCCAAAATGCCT	서열번호 6
박테리아성 질환	PNA-Pa	GCGGCATGGCTGGATC	서열번호 7
	PNA-Sa	ACAGAGTTTTACGATC	서열번호 8
바이러스성 질환	PNA-US5-2	AGACATCGTCACACCTATCATA	서열번호 9
	PNA-DENV	GCGTTTCAGCATATTGA	서열번호 10

【표 2】

표적질환	표적물질	서열(5'→3')	서열번호
암	miR-21	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	서열번호 11
	miR-31	AGGCAAGAUGCUGGCAUAGCU	서열번호 12
	miR-223	GUCAGUUUGUCAAAU	서열번호 13
	miR-484	CAGGCUCAGUCCCCUCC	서열번호 14
	Let-7a	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	서열번호 15
	miR-TS	AGGCAUUUUGGGGCAG	서열번호 16
박테리아성 질환	miR-Pa	GAUCCAGCCAUGCCGC	서열번호 17
	miR-Sa	GAUCGUAAAACUCUGU	서열번호 18
바이러스성 질환	miR-US5-2	UAUGAUAGGUGUGACGAUGUCU	서열번호 19
	miR-DENV	UCAAUAUGCUGAAACGC	서열번호 20

표적 물질을 첨가하기 전과 후의 형광 변화를 하기 수학식 1에 대입하여 도출한 결과를 도 11에 나타내었다. 이때, 대조군으로는 실시예 1에서 제조한 GON을 사용하였다.

【수학식 1】

$$\text{검출한계} = 3.3 \left(\frac{SD}{S} \right)$$

*SD: 표준편차, S: 교정선(calibration line)의 경사도

도 11에 나타난 바와 같이, GON은 230 pM 농도까지의 표적 물질을 검출하였으나, DReGON은 10 pM 농도까지의 표적물질을 검출하였다. 이로부터, 본 발명의 고분자로 표면이 개질된 2차원 나노물질이 시료 내에 낮은 농도로 존재하는 표적 핵산도 검출할 수 있음을 확인하였다.

실험예 3-2. PEG-NGO의 검출능 확인

상기 실험예 3-1과 동일한 조건 및 방법으로 PEG-NGO의 암 세포 특이적 핵산 염기서열의 검출능을 확인하였다. 이때, DReGON 대신 실시예 5에서 제조한 PEG-NGO를 10 pmol의 농도로 사용하고, 프로브로서 PNA21 및 PNA233과 표적 물질로서 miR-21 및 miR-233을 0, 0.002, 0.02, 0.2, 2, 20, 200 또는 2,000 nM의 농도로 사용하였다. 또한, 표적물질을 첨가하고 4시간 동안 반응시키면서 20분 간격으로 형광 변화를 측정하여 도 12에 나타내었다. 도 12에 나타난 바와 같이, 표적 물질의 농도가 증가하면서 형광신호가 강해졌으며, 프로브의 농도 및 종류에 따라 다른 수준으로 형광이 회복되었다.

실험예 3-3. PEG-PEI-GON의 검출능 확인

상기 실험예 3-1과 동일한 조건 및 방법으로 PEG-PEI-NGO의 암 세포 특이적 핵산 염기서열의 검출능을 확인하였다. 이때, DReGON 대신 실시예 6에서 제조한 PEG-PEI-NGO를 10 pmol의 농도로 사용하고, 프로브로서 PNA-TS와 표적 물질로서 miR-TS를 100, 200, 300 또는 500 nM의 농도로 사용하였다. 또한, 표적물질을 첨가하고 4시간 동안 반응시키면서 20분 간격으로 형광 변화를 측정하여 도 13에 나타내었다. 도 13에 나타난 바와 같이, 표적 물질의 농도가 증가하면서 형광신호가 강해졌으며, 프로브의 농도 및 종류에 따라 다른 수준으로 형광이 회복되었다.

실험예 3-4. 암 세포주에서 DReGON의 검출능 확인

다양한 종류의 암 세포주를 사용하여 DReGON의 암 세포 특이적 핵산 염기서열의 검출능을 확인하였다. 먼저, MCF-7, HeLa, SW620 세포주는 DMEM 또는 RPMI 배지를 사용하여 배양하여 준비하였다. 한편, 실험예 1-1과 동일한 조건 및 방법으로 프로브인 PNA484 또는 PNA31을 DReGON과 혼합하여 반응시켰다. 준비된 세포를 웰당 1×10^5 개의 세포가 되도록 12웰 플레이트에

분주하고, 24시간 후 DReGON, 및 PNA484 또는 PNA31의 반응물을 80 pmol의 농도가 되도록 세포에 첨가하였다.

14 시간 후, 형광현미경을 사용하여 관찰된 세포의 형광 신호를 촬영하여 도 15에 나타내었다. 이때, 대조군으로 세포에 프로브를 첨가하지 않고 촬영한 사진은 도 14에 나타내었다. 도 15에 나타난 바와 같이, DReGON에 의해 표적 물질이 탐지된 것을 형광 물질이 결합된 프로브의 형광 신호를 통해 알 수 있었다.

실험예 3-5. 혈구세포에서 DReGON의 검출능 확인

혈구세포 속에 존재하는 특정 염기서열에 대한 DReGON의 검출능을 확인하기 위하여, 다음과 같은 실험을 하였다. 구체적으로, 건강한 사람의 혈액 10 mL에서 혈구세포들을 공지의 방법으로 수집하고, 이를 RPMI 배지를 이용하여 배양하였다. 배양된 세포를 고정하고, 여기에 3.0 μ g의 DReGON과 Cy5 형광이 결합된 200 nM의 PNA 프로브를 첨가하였다. 이때, PNA 프로브로서 PNA21, PNA223, Let-7a 또는 이들의 혼합물(scrambled)을 사용하였다. 대조군으로서 아무것도 처리하지 않은 세포군을 사용하였다.

4시간 이후, 유세포 분석기를 사용하여, 혈구세포에서 회복된 형광의 세기를 도 16에 나타내었다. 도 16에 나타난 바와 같이, PNA 프로브에 의해 혈구세포에서 발현 중인 표적 염기서열이 검출됨을 확인하였다.

실험예 4. PEG-NGO의 박테리아 특이적 핵산 염기서열 검출능 확인

상기 실험예 3-1과 동일한 조건 및 방법으로 PEG-NGO의 녹농균 또는 황색포도상구균 특이적 핵산 염기서열의 검출능을 확인하였다. 이때, DReGON 대신 실시예 5에서 제조한 0.2 μ g의 PEG-NGO, 및 10 pmol의 PNA-Pa 또는 PNA-Sa를 첨가하고, 여기에 표적 물질로서 0, 10, 20, 40, 70 또는 100 nM 농도의 녹농균 또는 황색포도상구균 AS-DNA를 첨가하였다. 그 결과, 측정된 형광 변화를

도 17에 나타내었다. 도 17에 나타난 바와 같이, 첨가된 녹농균 또는 황색포도상구균 AS-DNA의 농도 의존적으로 형광의 세기가 증가하였다.

실험예 5. DReGON의 바이러스 특이적 핵산 염기서열 검출능 확인

상기 실험예 3-1과 동일한 조건 및 방법으로 DReGON의 인간 사이토메갈로바이러스(HCMV) 또는 뎅기바이러스(DENV) 특이적 핵산 염기서열의 검출능을 확인하였다. 이때, 0.5 μ g의 DReGON, 및 20 pmol의 PNA-US5-2 또는 PNA-DENV를 첨가하고, 여기에 표적 물질로서 20 pmol의 miR-US5-2 또는 miR-DENV를 첨가하였다. 그 결과, 반응시간별로 측정된 형광 변화를 도 18에 나타내었다. 도 18에 나타난 바와 같이, 반응시간 의존적으로 첨가된 HCMV 또는 DENV 특이적 핵산 염기서열에 대한 형광 세기가 증가하였다.

결론적으로, 상기 결과들로부터 본 발명의 조성물은 마이크로어레이 또는 RT-PCR와 달리 용이하게 표적 서열을 검출할 수 있을 뿐만 아니라, 그 농도를 간접적으로 확인하는데 사용될 수 있다.

서열목록 프리텍스트

서열번호 1: tcaacatcag tctgataagc ta

서열번호 2: agctatgcca gcatcttgcc t

서열번호 3: atttgacaaa ctgac

서열번호 4: ggaggggact gagcctg

서열번호 5: aactatacaa cctactacct ca

서열번호 6: ctgccccaaa atgcct

서열번호 7: gcggcatggc tggatc

서열번호 8: acagagtttt acgatc

서열번호 9: agacatcgtc acacctatca ta

서열번호 10: gcgtttcagc atattga

서열번호 11: uagcuuauca gacugauguu ga
서열번호 12: aggcaagaug cuggcauagc u
서열번호 13: gucaguuugu caaau
서열번호 14: caggcucagu cccucc
서열번호 15: ugagguagua gguuguauag uu
서열번호 16: aggcauuuug gggcag
서열번호 17: gauccagcca ugccgc
서열번호 18: gaucguaaaa cucugu
서열번호 19: uaugauaggu gugacgaugu cu
서열번호 20: ucaauaugcu gaaacgc