(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0132850
(43) 공개일자 2019년11월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) *G01N 21/64* (2006.01)
G01N 33/18 (2006.01) *G01N 33/543* (2006.01)
G01N 33/544 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/68 (2013.01)
G01N 21/6428 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0057907
(22) 출원일자 2018년05월21일
심사청구일자 2018년05월21일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
손아정
서울특별시 마포구 백범로 230 (신공덕동, 브라운스톤 공덕아파트) 102동 604호
이은희
서울특별시 성북구 월곡로14길 26 (하월곡동, 월곡래미안루나밸리아파트) 109동 2303호
(74) 대리인
손민

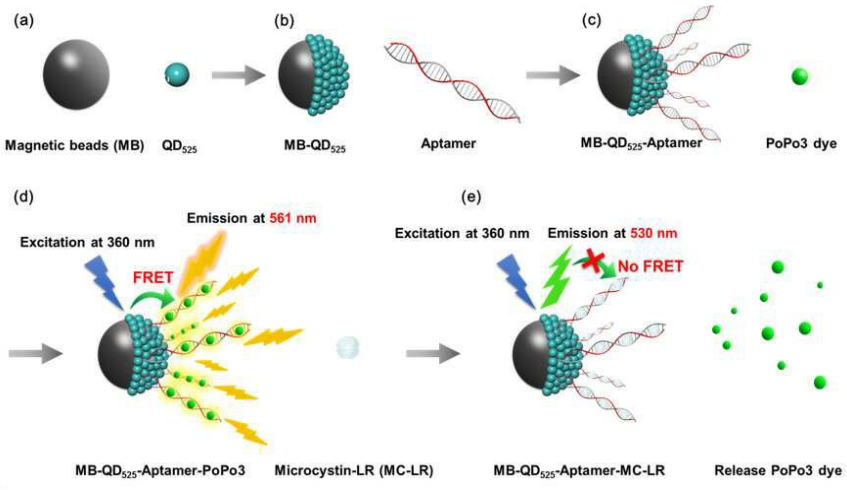
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **자성 비드, 양자점 및 DNA 삽입 염료를 포함하는 마이크로시스틴-LR 검출용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 자성 비드(magnetic bead); 525 nm에서 최대 방출파장을 갖는, 2개 이상의 양자점(QD_{525}); 마이크로시스틴-LR(microcystin-LR)에 특이적으로 결합하는 DNA 앱타머(aptamer); 및 PoPo3 염료를 포함하는 마이크로시스틴-LR 검출용 조성물, 이를 포함하는 마이크로시스틴-LR 검출용 키트 및 이를 이용한 마이크로시스틴-LR의 검출 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
G01N 33/1826 (2013.01)
G01N 33/54346 (2013.01)
G01N 33/544 (2013.01)
G01N 2458/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2017R1A2B4005133
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 기초연구사업(학술진흥)(2017)-중견연구자지원사업
연구과제명 환경시료의 지중 진단 실현을 위한 원천기술과 제품화 사이 : 무엇이 더 필요한가?
기 여 율 1/1
주관기관 이화여자대학교 산학협력단
연구기간 2017.03.01 ~ 2020.02.29

명 세 서

청구범위

청구항 1

자성 비드(magnetic bead);

525 nm에서 최대 방출파장을 갖는, 2개 이상의 양자점(QD_{525});

마이크로시스틴-LR(microcystin-LR)에 특이적으로 결합하는 DNA 앱타머(aptamer); 및

PoPo3 염료(2-((E)-3-[1-(3-[[3-(dimethyl(3-[4-[(E)-3-(3-methyl-1,3-benzoxazol-3-ium-2-yl)-2-propenylidene]-1(4H)-pyridinyl]propyl)ammonio) propyl](dimethyl)ammonio]propyl)-4(1H)-pyridinylidene]-1-propenyl)-3-methyl-1,3-benzoxazol-3-ium tetraiodide)를 포함하는 마이크로시스틴-LR 검출용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 마이크로시스틴-LR(microcystin-LR)에 특이적으로 결합하는 DNA 앱타머는 서열번호 1의 염기서열로 구성된 앱타머인 것인 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 양자점은 자성 비드의 표면에 결합되고, DNA 앱타머는 양자점 상에 결합된 것인 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 PoPo3 염료는 마이크로시스틴-LR 부재시 DNA 앱타머에 삽입(intercalation)되고, 마이크로시스틴-LR과 접촉시 탈착되는 것인 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 조성물은, 마이크로시스틴-LR 부재시, 500 내지 550 nm 파장의 빛을 조사하여 여기시키는 경우 PoPo3 염료의 형광 스펙트럼과 일치하는 영역에서 발광 스펙트럼을 나타내는 것인 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 조성물은, 마이크로시스틴-LR과 접촉시, 500 내지 550 nm 파장의 빛을 조사하여 여기시키는 경우 양자점 QD_{525}의 발광 스펙트럼을 나타내는 것인 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 자성 비드의 표면 및 앱타머의 일 말단은 아민기로 수식되고, 양자점 QD_{525}의 표면은 카르복실기로 개질되거나, 자성 비드의 표면 및 앱타머의 일 말단은 카르복실기로 수식되고, 양자점 QD_{525}의 표면은 아민기로 개질된 것인 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 자성 비드 표면과 양자점 및 양자점 표면과 앱타머는 각각의 말단에 포함된 카르복실기와 아민기를 통한 N-히드록시석신이미드(N-hydroxysuccinimide; NHS) 및 에틸카보디이미드 하이드로클로라이드(ethylcarbodiimide hydrochloride; EDC)와의 반응에 의해 결합된 것인 조성물.

청구항 9

제1항의 조성물을 포함하는 마이크로시스틴-LR 검출용 키트.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 조성물은 표면이 아민기로 수식된 자성 비드, 일 말단에 아민기가 수식된 앱타머 및 표면이 카르복실기로 개질된 양자점 QD_{525}인 전구체의 형태로 N-히드록시석신이미드(N-hydroxysuccinimide; NHS) 및 에틸카보디이미드 하이드로클로라이드(ethylcarbodiimide hydrochloride; EDC)와 함께 제공되는 것인 키트.

청구항 11

마이크로시스틴-LR로 오염된 것으로 의심되는 물 시료를 자성 비드; 상기 자성 비드의 표면에 결합된, 525 nm에서 최대 방출파장을 갖는, 2개 이상의 양자점; 상기 양자점 상에 결합된 마이크로시스틴-LR에 특이적으로 결합하는 DNA 앱타머; 및 상기 DNA 앱타머에 삽입된 PoPo3 염료를 포함하는 프로브와 접촉시키는 제1단계; 및

500 내지 550 nm 파장의 빛을 조사하고 PoPo3 염료의 발광 스펙트럼을 측정하는 제2단계;를 포함하는 물 시료 중의 마이크로시스틴-LR 검출 방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

제1단계에 앞서 자성 비드; 상기 자성 비드의 표면에 결합된, 525 nm에서 최대 방출파장을 갖는, 2개 이상의 양자점; 상기 양자점 상에 결합된 마이크로시스틴-LR에 특이적으로 결합하는 DNA 앱타머; 및 상기 DNA 앱타머에 삽입된 PoPo3 염료를 포함하는 프로브에 500 내지 550 nm 파장의 빛을 조사하고 PoPo3 염료의 발광 스펙트럼을 측정하는 제1-1단계를 추가로 포함하는 것인 마이크로시스틴-LR 검출 방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

제2단계로부터 측정된 스펙트럼과 제1-1단계로부터 측정된 스펙트럼을 비교하여 제2단계로부터 측정된 스펙트럼의 발광 신호가 더 낮은 경우 해당 물 시료는 마이크로시스틴-LR을 함유하는 것으로 판단하는 제3단계를 추가로 포함하는 것인 마이크로시스틴-LR 검출 방법.

청구항 14

제13항에 있어서,

제1-1단계로부터 측정된 스펙트럼과 비교하여 제2단계로부터 측정된 스펙트럼의 발광 신호의 감소된 정도로부터 해당 물 시료에 함유된 마이크로시스틴-LR의 농도를 산출하는 것인 마이크로시스틴-LR 검출 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 자성 비드(magnetic bead); 525 nm에서 최대 방출파장을 갖는, 2개 이상의 양자점(QD_{525}); 마이크로시스틴-LR(microcystin-LR)에 특이적으로 결합하는 DNA 앱타머(aptamer); 및 PoPo3 염료를 포함하는 마이크로시스틴-LR 검출용 조성물, 이를 포함하는 마이크로시스틴-LR 검출용 키트 및 이를 이용한 마이크로시스틴-LR의 검출 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 시아노박테리아 유해 조류 수화현상(cyanobacterial harmful algal blooms; CyanoHABs 또는 CHABs)은 수중 생태계(aquatic ecosystem), 물 지속성(water sustainability), 및 공중위생(public health)을 위협하는 범세계적인 주제이다. 미국 내에서 이에 따른 사회경제적 손실(socioeconomic loss)은 연간 2.2 내지 4.6십억 달러에 이르는 것으로 추산된다. 오하이오 톨레도 및 중국 우시에서의 식수난(drinking water crisis)은 대표적인 예이다. 2014년 여름, 이리호 인근의 40만명 이상의 주민들이 유독한 남조류 수화현상(toxic cyanobacterial bloom)으로 인해 3일 동안 식수 부족으로 고통받았다. 중국의 타이후호에서는, 1980년대 이래로 식수 사고가 반복적인 반복적으로 일어났으며, 그로 인해 적어도 일주일의 수돗물 금지령이 내려졌다. 2개 사건 모두 주민들에 과량의 마이크로시스틴-LR(microcystin-LR; MC-LR)에 의해 야기되는 "음용 금지(do not drink)" 경고가 내려졌다.

[0005] MC-LR은 사이토박테리아에 의해 주로 생성되는 가장 유독하며 광범위한 간독소들 중 하나이다. 예를 들어, 마우스에 대한 MC-LR의 치사량(lethal dose) 50(또는 LD_{50})은 50 μg/kg이다. 마이크로시스틴은 세포 내에서 생성되며 세포 사멸 및 용해에 따라 주변 물로 방출된다. 물에 방출된 후, 독소는 생물축적(bioaccumulation)을 통해 수중 생물(aquatic organisms)에서 발견되고 먹이사슬(food web)을 통해 인간에까지 전달될 수 있다. 결과적으로, 인체에서 마이크로시스틴 중독은 유독한 남조류 수화현상 동안 발생할 수 있다. 마이크로시스틴은 주로 인간의 간을 표적으로 하므로, 급성 노출(acute exposure)은 간출혈(liver hemorrhage) 및 간부전(liver failure)과 같은 심각한 간손상을 유발할 수 있다.

[0007] 현재까지 100여종 이상의 마이크로시스틴 변이체들(variants)이 보고되었으며, 이들 변이체들은 가변 L-아미노산 영역(variable L-amino acid region)의 페어의 차이로 인해 발생하였다. 이들은 다양한 크로마토그래피 기법(예컨대, HPLC, LC/MS, 및 GC/MS)과 효소결합면역흡착측정법(enzyme-linked immuno-sorbent assay; ELISA)에 의해 밝혀졌다. 이러한 분석 방법은 다양한 마이크로시스틴 동질체들(congeners)을 정성적으로 분석하기 위한 정확하고 정밀한(accurate and precise) 결과를 제공할 수 있다. 그러나, 이들 방법은 변이체들의 간섭(interferences) 및 교차 반응성(cross reactivity)에 취약하다. 따라서, 이들 방법은 분리, 정제, 희석 및 농축과 같은 선처리 단계를 필요로하기도 한다.

[0009] 이러한 시간 소모적인 선처리 과정은 다양한 간섭물질들과 동질체들이 공존하는 환경 물시료 중의 MC-LR 검출을 방해할 수 있다. 휴대 방식으로 MC-LR 검출을 위한 환경 물 시료를 다루기 위해서는, 분리 및 정제를 필요로 하지 않는, 고도의 특이성을 갖는 방법이 유리하다. 나아가, 비처리 환경 물시료는 0.1 내지 10 μg/L의 관련성 있게 넓은 범위의 용존(dissolved) MC-LR 농도를 나타내는 것으로 알려져 있다. 이러한 광범위한 표적의 정성분석은 분석에 앞서 농축과 희석의 반복적인 과정을 필요로 한다. 따라서, 넓은 범위를 검출하는(즉, 높은 민감도를 갖는) 방법은 환경 시료중의 MC-LR 검출에 유리하다.

[0011] 이와 관련하여, 면역센서(immunosensor), 효소센서(enzymatic sensor) 및 앱타센서(aptasensor)를 포함하는 대안적인 접근법이 다양한 선처리 단계를 회피함으로써 신속성 및 휴대성을 보장하는 MC-LR의 특이적인 인식방법으로 시도되고 있다. 이러한 방법들은 인식을 위한 성분으로 항체, 효소 및 앱타머를 사용하여 이들의 유사 피분석체들(cognate analytes)의 특이적이며 민감한 모니터링을 가능하게 한다.

[0013] 앱타머는 표적 분자를 인식할 수 있는 합성 단일 가닥 핵산(예컨대, DNA 또는 RNA)으로서, 항체에 대한 대안으로 개발되고 있다. AN6 앱타머는 Ng 등에 의해 MC-LR 동질체에 대해 친화력(affinity)을 갖는 것으로 최초로 보고되었다(Environ. Sci. Technol., 2012, 46: 10697-10703). 앱타머가 표적 분자와 결합할 때, 앱타머의 구조(configuration) 변화가 발생한다. AN6 앱타머의 결합 친화력을 이용하여, 높은 결합성과 특이성으로 MC-LR을 검출하기 위한 비색법, 전기화학법 및 형광 검출법과 결합시킨 다양한 앱타센서가 제안되었다.

[0015] 형광공명에너지전이(fluorescence resonance energy transfer; FRET)는 여기된 공여 형광체로부터 수용 형광체로의 비방사성 에너지 전이를 통한 거리 의존적 물리적 과정이다. 이는 공여체-수용체 분자의 인접성이 10 내지 100 Å 이내일 때에만 발생할 수 있다. 이는 FRET을 리간드-수용체 결합 및 표적 분자에 대한 반응하는 핵산의 구조 변화와 같은 분자간 상호작용의 정확하고 민감한 측정을 위한 중요한 수단이게 한다. 나아가, 신호의 비용리 검출(elution (wash) free detection)은 빠르고 간단한 분석에 장점을 갖는다.

[0017] 이에, 본 발명자들은 환경으로부터 채취한 부영양화된(eutrophic) 물 시료 중의 MC-LR 독소(toxin) 검출을 위한 감도는 물론 선택성이 높으면서도 현장에서 즉시 수행할 수 있는 간단한 검출 방법을 발굴하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 특정 파장대에서 흡수 및 방출 스펙트럼을 갖는 양자점과 표적 물질인 마이크로시스틴-LR에 특이적으로 결합하는 DNA 앱타머 및 상기 DNA 앱타머에 삽입되는 염료를 포함하는 양자점-앱타머 복합체를 이용하되, 특정한 양자점 및 염료의 조합을 선택하여 제조한 양자점-앱타센서(Aptasensor)를 선택함으로써 형광공명에너지전이를 통해 고감도의 마이크로시스틴-LR 검출 및 정량분석이 가능함을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0019] 본 발명의 하나의 목적은 자성 비드(magnetic bead); 525 nm에서 최대 방출파장을 갖는, 2개 이상의 양자점(QD_{525}); 마이크로시스틴-LR(microcystin-LR)에 특이적으로 결합하는 DNA 앱타머(aptamer); 및 PoPo3 염료(2-((E)-3-[1-(3-[[3-(dimethyl(3-[4-[(E)-3-(3-methyl-1,3-benzoxazol-3-ium-2-yl)-2-propenylidene]-1(4H)-pyridinyl]propyl)ammonio)propyl](dimethyl)ammonio]propyl)-4(1H)-pyridinylidene]-1-propenyl)-3-methyl-1,3-benzoxazol-3-ium tetraiodide)를 포함하는 마이크로시스틴-LR 검출용 조성물을 제공하는 것이다.

[0020] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 마이크로시스틴-LR 검출용 조성물을 포함하는 마이크로시스틴-LR 검출용 키트를 제공하는 것이다.

[0021] 본 발명의 또 하나의 목적은 마이크로시스틴-LR로 오염된 것으로 의심되는 물 시료를 자성 비드; 상기 자성 비드의 표면에 결합된, 525 nm에서 최대 방출파장을 갖는, 2개 이상의 양자점; 상기 양자점 상에 결합된 마이크로

시스틴-LR에 특이적으로 결합하는 DNA 앱타머; 및 상기 DNA 앱타머에 삽입된 PoPo3 염료를 포함하는 프로브와 접촉시키는 제1단계; 및 500 내지 550 nm 파장의 빛을 조사하고 PoPo3 염료의 발광 스펙트럼을 측정하는 제2단계;를 포함하는 물 시료 중의 마이크로시스틴-LR 검출 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0023] 상기 목적을 달성하기 위한, 본 발명의 제1양태는 자성 비드(magnetic bead); 525 nm에서 최대 방출파장을 갖는, 2개 이상의 양자점(QD_{525}); 마이크로시스틴-LR(microcystin-LR)에 특이적으로 결합하는 DNA 앱타머(aptamer); 및 PoPo3 염료(2-((E)-3-[1-(3-[[3-(dimethyl(3-[4-[(E)-3-(3-methyl-1,3-benzoxazol-3-ium-2-yl)-2-propenylidene]-1(4H)-pyridinyl]propyl)ammonio)propyl](dimethyl)ammonio] propyl)-4(1H)-pyridinylidene]-1-propenyl)-3-methyl-1,3-benzoxazol-3-ium tetraiodide)를 포함하는 마이크로시스틴-LR 검출용 조성물을 제공한다.

[0025] 본 발명의 용어, "마이크로시스틴(microcystin)"은 몇몇 민물 시아노박테리아, 주로 마이크로시스티스 애루지노사(*Microcystis aeruginosa*)에 의해 생산되는 독소의 일종이다. 현재까지 100종 이상의 상이한 마이크로시스틴들이 발견되었으며, 가장 유명한 것은 마이크로시스틴-LR이다. 화학적으로는 비리보솜 펩티드 합성효소(nonribosomal peptide synthase)를 통해 생산되는 고리형 헤파펩티드(cyclic heptapeptide)이다. 이들 마이크로시스틴은 조류 수화현상(algal blooms) 동안 대량으로 생산될 수 있으며, 식수 및 관개용수(irrigation water) 공습은 물론 크게는 환경에 대한 주된 위협을 제기할 수 있다. 구체적으로 마이크로시스틴은 간에 심각한 손상을 야기할 수 있는 간독성(hepatotoxic) 물질이다. 일단 섭취되면, 대부분은 담즙산 운반계(bile acid transport system)을 통해 간으로 이동하여 축적되며, 일부는 혈류에 잔류하여 조직을 오염시킬 수 있다. 발암과의 연관성이 보고되기도 하였으나, 마이크로시스틴에의 노출여부를 정확히 측정하기 어려워 입증이 용이하지 않다.

[0026] 본 발명에서 검출하고자 하는 표적물질인, "마이크로시스틴-LR(microcystin-LR)"은 시아노박테리아(cyanobacteria)에 의해 생산되는 독소이며, 100여종 이상의 독성 마이크로시스틴 변이체 중 가장 독성이 높은 형태의 변이체로서, 화학, 약리학, 생물학 및 환경학과 같은 다양한 분야에서 널리 연구되고 있다. 화학적으로 마이크로시스틴-LR은 비단백질성 아미노산(Non-proteinogenic amino acid)인 Adda, D-γ-Glu, NMe-ΔAla, D-Ala, L-Leu(L), D-β-Me-isoAsp 및 L-Arg(R)의 7개 단위가 차례로 연결되고 L-Arg가 다시 Adda로 연결되는 환형의 구조를 갖는 화합물로, 상기 L-Leu 및/또는 L-Arg의 위치에 다른 아미노산 잔기가 치환된 다양한 유사체가 존재한다. 현재까지 알려진 마이크로시스틴은 마이크로시스틴-LR을 포함하여, 마이크로시스틴-YR, 마이크로시스틴-LY, 마이크로시스틴-LW, 마이크로시스틴-RR, 마이크로시스틴-LF 및 마이크로시스틴-LA 등이 있으며, 이외에 시아노박테리아로부터 생산되는, 이와 유사한 화학적 구조를 갖는 독소로는 노둘라린(nodularin)이 있다(표 2 참조). 전술한 바와 같이, 마이크로시스틴-LR은 이들 시아노박테리아로부터 생산되는 독소 중 가장 높은 독성을 나타내는 바, 물 시료 중의 마이크로시스틴-LR의 존재를 선택적으로 확인하고 고감도로 정량하는 것은 중요하다.

[0028] 본 발명은 부영양화된 민물에서 발생하는 시아노박테리아 수화현상에 의해 발생하는 독소 중 가장 독성이 높은 물질인 마이크로시스틴-LR을 이들의 유사체와의 혼합물로부터 선택적으로 검출함은 물론, 시료 중 함유된 미량의 마이크로시스틴-LR도 검출할 수 있는 높은 민감성의 검출 수단 및/또는 방법을 발굴하고자 고안된 것이다. 이에, 검출 민감성이 높은 형광공명에너지전이(fluorescence resonance energy transfer; FRET) 현상을 이용하되, 시간의 경과나 환경에 따라 소광될 수 있는 유기 분자가 아닌, 양자점을 공여체로 사용하고, 검출하고자 하는 대상물질인 마이크로시스틴-LR에 특이적으로 결합하는 DNA 앱타머 예컨대, AN6(서열번호 1)를 상기 양자점에 직접 결합시킨 후, 형광 수용체로는 DNA에 삽입되는 염료를 사용하였다. 구체적으로, 보다 효율적인 검출을 위하여, FRET 효율을 극대화할 수 있는 공여체와 수용체의 쌍으로서, 공여체인 양자점으로는 525 nm에서 최대 방출파장을 갖는 양자점인 QD_{525}와 수용체인 DNA에 삽입되는 염료로는, 533 nm에서 최대 흡수파장을 갖는, PoPo3 염료의 조합을 선택하였다.

[0029] 이때, 마이크로미터 크기의 자성 입자에 복수의 양자점을 결합시킴으로써 단일 자성 입자으로부터 강한 신호를

발생할 수 있을 뿐만 아니라 필요에 따라 분리에 이용할 수 있도록 하였다.

[0030] 예컨대, 개별 양자점이 직경 약 4 nm의 크기를 갖는 것을 고려할 때, 직경 2.5 μm 크기의 자성 입자는 단일 입자의 표면에 최대 1.6×10^{6}개까지의 양자점 입자를 부착시킬 수 있다. 이는 상기 자성 입자의 도입으로 현저한 신호의 향상을 달성할 수 있음을 나타내는 것이다. 그러나, 이는 단지 하나의 예시일 뿐, 자성 입자의 크기를 조절하여 이에 도입되는 양자점의 갯수를 조절할 수 있다.

[0031] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 직경 2.5 μm 크기의 자성 비드와 직경 약 4 nm의 크기의 양자점 입자을 사용함에 있어서, 이들의 혼합 비율을 조절하면서 신호 변화를 관찰하였으며, 10^{7}개의 자성 비드를 4×10^{-11} 몰(약 2.4×10^{6}개 입자)의 양자점 입자와 반응시켜 제조하였을 때, 가장 높은 신호를 나타내었다(도 2(d)). 보다 구체적으로, 자성 비드의 양은 고정하고 양자점의 사용량만을 변화시키는 것을 고려할 때, 자성 비드의 사용량에 무관하게, 그 정도의 차이는 있으나, 양자점의 양이 증가함에 따라 형광 세기는 증가하였다. 자성 비드의 양은 고정하고 양자점의 사용량만을 변화시킨 경우에는, 양자점 사용량이 낮은 경우 즉, 2×10^{-11} 몰 이하인 경우 자성 비드의 사용량이 증가함에 따라 형광세기가 증가하였으나, 양자점 사용량이 4×10^{-11} 몰로 높은 경우에는 자성 비드의 사용량이 1×10^{7}개로부터 4×10^{7}개까지 증가하면서 형광세기는 오히려 감소하였다. 이는 자성 비드의 사용량이 소정의 수준 이상으로 높은 경우 자성 비드의 존재에 의해 양자점의 형광이 간섭을 받아 오히려 감소할 수 있음을 나타내는 것이다. 한편, 상기 양자점은 자성 비드의 표면에 결합하므로, 양자점은 자성 비드 상에서 중첩되어 결합하지 못하고, 단일층을 형성하며, 따라서 사용하는 자성 비드 및 양자점의 상대적인 크기를 고려할 때, 단일 자성 비드가 최대로 수용할 수 있는 양자점의 갯수는 결합하는 양자점의 단면의 총 합이 자성 비드의 표면적과 동등한 수준으로 결정될 수 있다.

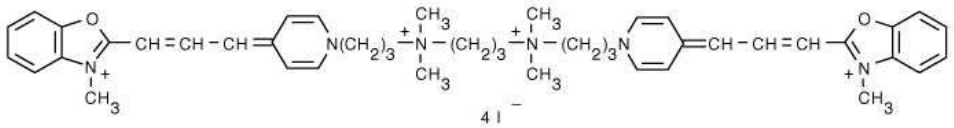
[0032] 따라서, 전술한 자성 비드에 의한 간섭 및/또는 자성 비드 당 수용 가능한 양자점의 양을 종합적으로 고려하여, 자성 비드 및 양자점의 사용량 및 이들의 혼합 비율을 결정하는 것이 바람직하다.

[0034] 상기 조성물에서 마이크로시스틴-LR(microcystin-LR)에 특이적으로 결합하는 DNA 앱타머는 서열번호 1의 염기서열(5'-GGC GCC AAA CAG GAC CAC CAT GAC AAT TAC CCA TAC CAC CTC ATT ATG CCC CAT CTC CGC-3')로 구성된 AN6 앱타머일 수 있다.

[0036] 상기 조성물에서, 양자점은 자성 비드의 표면에 결합되고, DNA 앱타머는 양자점 상에 결합될 수 있다. 이들이 서로 결합된 복합체 구조물의 예를 도 1에 도식화하여 나타내었다. 상기 도 1은 이들 구성요소 간의 결합 관계를 특징적으로 나타내기 위한 것으로 각각의 상대적인 규모는 실제와 상이할 수 있다.

[0038] 한편, 상기 "PoPo3 염료"는 2-((E)-3-[1-(3-[[3-(디메틸(3-[4-[(E)-3-(3-메틸-1,3-벤즈옥사졸-3-이움-2-일)-2-프로페닐리덴]-1(4H)-피리디닐]프로필)암모니오)프로필](디메틸)암모니오]프로필)-4(1H)-피리디닐리덴]-1-프로페닐)-3-메틸-1,3-벤즈옥사졸-3-이움 테트라아이오다이드(2-((E)-3-[1-(3-[[3-(dimethyl(3-[4-[(E)-3-(3-methyl-1,3-benzoxazol-3-ium-2-yl)-2-propenylidene]-1(4H)-pyridinyl]propyl)ammonio)propyl](dimethyl)ammonio]propyl)-4(1H)-pyridinylidene]-1-propenyl)-3-methyl-1,3-benzoxazol-3-ium tetraiodide)의 화학식명의 화합물로, 하기 화학식 1로 표시되는 화학 구조식을 갖는다. 상기 PoPo3 염료는 마이크로시스틴-LR 부재시 DNA 앱타머에 삽입(intercalation)되고, 마이크로시스틴-LR과 접촉시 탈착되는 것이 특징이다. 구체적으로, PoPo3이 DNA 앱타머 내에 삽입된 경우, 상기 앱타머가 부착된 양자점과의 거리가 형광공명에너지전이를 나타낼 수 있는 10 nm 이내로 유지될 수 있는 반면, 상기 복합체가 마이크로시스틴-LR와 접촉하는 경우, DNA 앱타머는 마이크로시스틴-LR과 특이적으로 결합하면서 이에 삽입된 PoPo3 염료를 방출하게되며, 이에 따라 양자점으로부터 PoPo3으로의 형광공명에너지전이는 더 이상 발생하지 않는다.

[0039] [화학식 1]



[0040]

[0042] 예컨대, 상기 조성물은, 마이크로시스틴-LR 부재시, 500 내지 550 nm 파장의 빛을 조사하여 여기시키는 경우 PoPo3 염료의 형광 스펙트럼과 일치하는 영역에서 발광 스펙트럼을 나타낼 수 있다.

[0043] 반면, 상기 조성물은, 마이크로시스틴-LR과 접촉시, 500 내지 550 nm 파장의 빛을 조사하여 여기시키는 경우 양자점 QD_{525}의 발광 스펙트럼을 나타낼 수 있다.

[0045] 예컨대, 본 발명의 조성물은 각 구성 성분을 원하는 순서로 결합시키기 위하여, 상기 자성 비드의 표면 및 앱타머의 일 말단은 아민기로 수식되고, 양자점 QD_{525}의 표면은 카르복실기로 개질되거나, 자성 비드의 표면 및 앱타머의 일 말단은 카르복실기로 수식되고, 양자점 QD_{525}의 표면은 아민기로 개질될 수 있다.

[0047] 이와 같이, 각각 아민기 또는 카르복실기로 개질 또는 수식된 자성 비드 표면과 양자점 및 양자점 표면과 앱타머는 각각의 말단에 포함된 카르복실기와 아민기를 통한 N-히드록시석신이미드(N-hydroxysuccinimide; NHS) 및 에틸카보디이미드 하이드로클로라이드(ethylcarbodiimide hydrochloride; EDC)와의 반응에 의해 결합될 수 있다.

[0048] 예컨대, 본 발명의 조성물은 i) 아민화된 자성 비드(aminated magnetic beads)와 카르복실기로 개질된 양자점(carboxylic quantum dots)을 소정의 비율로, 예컨대, 10^7개 자성 비드를 1 내지 4×10^{-11} 몰의 양자점과 혼합하고 NHS 및 EDC를 첨가하여 반응시킴으로써 자성 비드의 표면에 복수의 양자점이 결합된 중간체를 수득한 후, ii) 상기 중간체를 NHS 및 EDC 존재 하에 일 말단이 아민기로 수식된 마이크로시스틴-LR 특이적 DNA 앱타머와 반응시켜, 양자점 상의, 자성 비드와의 결합에 참여하지 않은, 미반응 카르복실기에 DNA 앱타머가 이의 일 말단에 위치한 아민기를 통해 결합할 수 있도록 함으로써 자성 비드-양자점-앱타머 복합체를 제조할 수 있다. PoPo3 염료의 삽입은 상기 복합체를 PoPo3 염료 용액에 침지시키는 단순한 과정을 통해 달성할 수 있다.

[0050] 나아가, 본 발명은 자성 비드, 형광 공여체로서 양자점, DNA 앱타머 및 형광 수용체인 염료를 포함하는 복합체를 이용한 FRET에 의해 표적 물질 예컨대, 마이크로시스틴-LR을 검출에 최적화된 형광 공여체와 형광 수용체의 조합을 제안한다. 이를 위하여, 본 발명의 구체적인 실시예에서는 비교예로서 형광 공여체로서 양자점(QD_{565})을 포함하되, 이에 상응하는 형광 수용체로서, 상기 양자점의 최대 방출 파장에서 흡수하여 형광을 나타내는 유기 형광체인 카르복시-X-로다민(carboxy-X-rhodamnine; ROX)가 앱타머에 공유결합된 복합체를 사용하여 표적 물질의 검출을 시도하였으며, 그 결과 상기 복합체를 이용한 검출 시스템은 표적 물질의 농도를 일정 수준까지 증가시켜도 대조군 즉, 표적 물질을 불포함하는 경우와 동일한 수준의 신호를 나타내어 표적 물질의 특이적인 검출이 불가함을 확인하였다(비교예 1 및 도 11). 이는 양자점-앱타머-염료 복합체를 기반으로 하는 FRET을 이용하더라도 형광 공여체와 수용체의 조합에 따라 표적 물질의 검출이 불가할 수 있음을 나타내는 것이며, 구체적으로 FRET 현상을 나타내기에 적합한 스펙트럼을 갖는 형광 공여체와 수용체의 조합을 선택하더라도 FRET에 의한 표적 물질의 검출이 불가할 수 있음을 나타내는 것이다. 따라서, 당업자라 하더라도 특정한 조합의 양자점-앱타머-염료 복합체를 이용하여 FRET에 의해 표적 물질을 검출하는 시스템은 용이하게 도출할 수 없다. 이러한 예측 불가능성을 토대로, 본 발명에서는 525 nm에서 최대 방출파장을 갖는 양자점(QD_{525}), 마이크로시스틴-LR에 특이적으로 결합하는 DNA 앱타머 및 상기 DNA 앱타머에 삽입되는 PoPo3 염료의 조합이 마이크로시스틴-LR의 특이적이며 민감한 검출에 최적의 조합임을 제안한다.

[0052] 본 발명의 제2양태는 상기 제1양태의 마이크로시스틴-LR 검출용 조성물을 포함하는 마이크로시스틴-LR 검출용 키트를 제공한다.

[0054] 전술한 바와 같이, 본 발명의 마이크로시스틴-LR 검출용 조성물은 자성 비드(magnetic bead); 525 nm에서 최대 방출파장을 갖는, 2개 이상의 양자점(QD_{525}); 마이크로시스틴-LR(microcystin-LR)에 특이적으로 결합하는 DNA 앱타머(aptamer); 및 PoPo3 염료를 포함하며, 상기 양자점은 자성 비드의 표면에 결합되고, DNA 앱타머는 양자점 상에 결합된 복합체의 형태로 제공될 수 있다. 또는, 본 발명의 키트는 상기 조성물을 전구체 상태 즉, 표면이 아민기로 수식된 자성 비드, 일 말단에 아민기가 수식된 앱타머 및 표면이 카르복실기로 개질된 양자점 QD_{525}인 전구체의 형태로 포함하며, 이들 구성 성분 간의 결합을 유도할 수 있도록 N-히드록시석신이미드(N-hydroxysuccinimide; NHS) 및 에틸카보디이미드 하이드로클로라이드(ethylcarbodiimide hydrochloride; EDC)와 함께 제공할 수 있다. 또한 PoPo3 염료는 상기 복합체에 삽입된 상태로 제공되거나, 용액 또는 분말의 형태로, 선택적으로 용매와 함께, 별도로 제공될 수 있다.

[0056] 본 발명의 제3양태는 마이크로시스틴-LR로 오염된 것으로 의심되는 물 시료를 자성 비드; 상기 자성 비드의 표면에 결합된, 525 nm에서 최대 방출파장을 갖는, 2개 이상의 양자점; 상기 양자점 상에 결합된 마이크로시스틴-LR에 특이적으로 결합하는 DNA 앱타머; 및 상기 DNA 앱타머에 삽입된 PoPo3 염료를 포함하는 프로브와 접촉시키는 제1단계; 및 500 내지 550 nm 파장의 빛을 조사하고 PoPo3 염료의 발광 스펙트럼을 측정하는 제2단계;를 포함하는 물 시료 중의 마이크로시스틴-LR 검출 방법을 제공한다.

[0058] 예컨대, 본 발명의 검출 방법은 제1단계에 앞서 자성 비드; 상기 자성 비드의 표면에 결합된, 525 nm에서 최대 방출파장을 갖는, 2개 이상의 양자점; 상기 양자점 상에 결합된 마이크로시스틴-LR에 특이적으로 결합하는 DNA 앱타머; 및 상기 DNA 앱타머에 삽입된 PoPo3 염료를 포함하는 프로브에 500 내지 550 nm 파장의 빛을 조사하고 PoPo3 염료의 발광 스펙트럼을 측정하는 제1-1단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 제1-1단계를 통해 측정된 스펙트럼은 이후 측정되는 스펙트럼으로부터 시료의 마이크로시스틴-LR 함유 여부 및/또는 함량을 판단하기 위한 기준으로 사용될 수 있다.

[0059] 구체적으로, 제2단계로부터 측정된 스펙트럼과 제1-1단계로부터 측정된 스펙트럼을 비교하여 제2단계로부터 측정된 스펙트럼의 발광 신호가 더 낮은 경우 해당 물 시료는 마이크로시스틴-LR을 함유하는 것으로 판단하는 제3단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0061] 나아가, 상기 제1-1단계로부터 측정된 스펙트럼과 비교하여 제2단계로부터 측정된 스펙트럼의 발광 신호의 감소된 정도로부터 해당 물 시료에 함유된 마이크로시스틴-LR의 농도를 산출함으로써, 물 시료 중의 마이크로시스틴-LR을 정량적으로 분석할 수 있다.

[0063] 본 발명의 제4양태는 500 내지 550 nm 파장의 빛을 조사할 수 있는 광원부; 상기 광원부로부터 조사된 빛의 경로에 위치한 시료 주입부; 상기 시료주입부로부터 광원부와 직각인 방향으로 시료 주입부와 소정의 거리만큼 이격되어 위치한, 550 내지 610 nm 범위에서 선택된 파장의 광신호를 검출할 수 있는 검출부;를 구비한 마이크로시스틴-LR 검출을 위한 분석 장치를 제공한다.

[0065] 전술한 바와 같이, 본 발명의 양자점과 앱타머의 복합체를 이용하는 FRET에 기초한 마이크로시스틴-LR 검출용 조성물은 그 발광 효율이 매우 높고 낮은 검출한계를 가지므로, 복잡한 증폭장치 등의 도움 없이도 검출 가능하므로, 상기 분석 장치는 작은 휴대용 장비로 구현될 수 있다.

[0066] 상기 분석 장치에서 언급된 각 구성부의 상대적인 위치는 광경로를 의미하는 것으로, 광경로 상에는 입사광 및 형광 신호의 가이드, 집광 등을 위하여, 일련의 렌즈 및/또는 미러 등의 옵틱스가 도입될 수 있으며, 이들 옵틱스의 개입에 따라 변경될 수 있다. 즉, 본 발명의 분석 장치는 FRET 즉, 형광을 측정하기 위한 것인 특성상, 입

사광에 의한 간섭을 최소화하기 위하여 시료에 입사되는 빛으로부터 직각인 방향으로 방출되는 빛을 검출부로 유도할 수 있는 한, 상기 각 구성부의 상대적인 위치는 전술한 절대적인 위치 및/또는 배열에 제한되지 않는다.

발명의 효과

[0068] 본 발명의 마이크로시스틴-LR 검출용 조성물은 525 nm에서 최대 방출파장을 갖는 양자점 및 PoPo3 염료의 조합을 형광 공여체와 수용체로 포함하는 FRET을 이용하여, 마이크로시스틴-LR에 대해 높은 선택성 및/또는 민감성을 나타내므로, 종래 ELISA 어세이에 비해 현저히 낮은 검출한계까지 정량적으로 검출할 수 있으므로, 휴대용 분석 장치로도 검출 가능하므로, 실제 환경 물 시료에 함유된 미량의 마이크로시스틴-LR의 현장 분석에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0070] 도 1은 MC-LR 검출을 위한 FRET 기반 QD-앱타센서의 제조방법 및 이를 이용한 검출 원리를 개략적으로 나타낸 도이다.

도 2는 (a) MC-LR 첨가에 의한 앱타머의 원평광 이색성(circular dichroism; CD) 스펙트럼 변화, (b) PoPo3 염료 첨가에 의한 앱타머의 CD 스펙트럼 변화, (c) 앱타머 내로의 효율적인 삽입을 위한 PoPo3 염료 농도의 최적화, (d) MB-QD_{525}의 제조를 위한 자성 비드(magnetic beads; MB) 및 양자점(quantum dots; QD)의 최적 비율, (e) FRET 설정(configuration)을 위한 실행가능성(feasibility) 테스트 및 (f) MB-QD_{525}-앱타머 복합체의 안정화 효과를 나타낸 도이다.

도 3은 앱타머 내로의 삽입에 의한 PoPo3 염료의 형광 변화를 나타낸 도이다.

도 4는 FRET 기반 QD-앱타센서의 현미경 이미지를 나타낸 도이다. (a)는 MB-QD_{525} 복합체의 주사전자현미경 이미지(scanning electron microscopic images)를, (b)는 PoPo3 염료가 삽입된 MB-QD_{525}-앱타머의 공초점 현미경 이미지(confocal microscopic images)를 나타낸다.

도 5는 (a) 반응 동안 FRET 기반 QD-앱타센서의 상대적인 정상화된 형광의 변화 및 (b) 6시간의 반응에서 MC-LR 검출을 위한 민감성 확인 결과를 나타낸 도이다.

도 6은 1 ng/mL 농도의 표적 물질에서 FRET 기반 QD-앱타센서의 민감성 확인 결과를 나타낸 도이다.

도 7은 ELISA 키트를 이용한 MC-LR 정량화의 표준 곡선을 나타낸 도이다.

도 8은 FRET 기반 QD-앱타센서를 이용한 마이크로시스티스 애루지노사(*Microcystis aeruginosa*) UTEX 2388(*M. aeruginosa*) 세포에 대한 MC-LR 분석 결과를 나타낸 도이다. (a)는 MC-LR 부재시(연두색) 및 QD-앱타센서(파란색) 및 ELISA 어세이(빨간색)를 통한 배양 배지의 MC-LR 농도에 따른 조류 성장 곡선을, (b)는 *M. aeruginosa*의 특이적 성장속도를, (c)는 QD-앱타센서와 ELISA 어세이 간의 MC-LR 농도의 피어슨 상관관계(Pearson correlation)를 나타낸다.

도 9는 (a) 시료채취 지점을 표시한 사이트 맵, 음성대조군 지점으로부터 채취한 시료인 (b) NC1 및 (c) NC2와 연구지점으로부터 채취한 시료인 (d) S1 (e) S2 (f) S3 및 (g) S4를 육안으로 관찰한 결과를 나타낸 도이다.

도 10은 FRET 기반 QD-앱타센서 및 ELISA 어세이를 이용한 환경 물 시료 중의 MC-LR 분석 결과를 나타낸 도이다. (a)는 각 지점에서 수집한 시료 중의 MC-LR 농도를, (b)는 QD-앱타센서와 ELISA 어세이 간의 MC-LR 농도의 피어슨 상관관계를 나타낸다.

도 11은 유기 형광체를 수용체로 이용하는 QD-앱타센서 기반 검출 방법을 이용한 DEHP((di-2-ethylhexyl)phthalate) 검출 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0071] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0073] **실시예 1: FRET 기반 양자점-앱타머 센서의 고안 및 작동원리**

[0075] 양자점-앱타머 센서(QD-Aptasensor; QD-앱타센서)는 자성 비드, 양자점 나노입자 및 앱타머로 구성된다. 도 1에 나타난 바와 같이, 카르복실기로 개질된 양자점 나노입자(carboxylic quantum dot nanoparticles; QD_{525})를 아민화된(aminated) 자성 비드(magnetic beads; MB)의 표면에 고정하였다(도 1a 및 1 b). 결과로 획득한 복합체(MB-QD_{525})를 마이크로시스틴-LR(microcystin-LR; MC-LR) 분자에 높은 친화력(affinity)을 갖는 아민화된 앱타머와 결합시켰다(도 1c). 이어서 MB-QD_{525}-앱타머 복합체의 앱타머에 PoPo3 염료를 삽입(intercalation)하였다(도 1d). QD_{525}(형광 공여체; donor fluorophore) 및 PoPo3 염료(형광 수용체; acceptor fluorophore)는 각각 360 nm 및 530 nm 파장으로 여기되어 530 nm 및 561 nm에서 형광을 방출한다. 이는 360 nm에서 여기된 QD_{525}로부터 형광공명에너지전이(fluorescence resonance energy transfer; FRET을 통해 PoPo3 염료가 방출하도록 한다. 앱타머가 MC-LR 분자를 포획함에 따라, PoPo3 염료는 MB-QD_{525}-앱타머 복합체로부터 방출된다(도 1e). 결과적으로, PoPo3 염료는 QD_{525} 나노입자로부터 분리되어 360 nm에서 FRET 매개를 통해 방출하지 않는다.

[0076] 도 1에는 MB-QD_{525}-앱타머-PoPo3 디자인의 FRET 기반 형광 변화에 의한 MC-LR 정량분석 방법을 도식화하여 나타내었다. 이를 위하여, 2개 형광체 즉, QD_{525} 및 PoPo3 염료를 FRET 쌍으로 선택하였다. PoPo3 염료의 여기 스펙트럼은 QD_{525} 나노입자의 방출 스펙트럼과 중첩되었다. QD_{525} 나노입자를 여기된 분자 형광체(excited molecular fluorophore, 공여체; donor)로 사용하였다. QD_{525}의 여기 에너지는, 이미 앱타머에 삽입된, 2량체 시아닌(dimeric cyanine) PoPo3 염료 분자(형광 수용체; acceptor fluorophore)에 전달되었다. 그 결과, PoPo3 염료는, 분자간 원거리 쌍극자-쌍극자 커플링(long-range dipole-dipole coupling)에 의한, QD_{525} 나노입자의 FRET을 통해 방출하였다. MC-LR의 결합은 앱타머의 구조적 변화를 유도하였으며, 그 결과로 해당 구조물로부터 PoPo3 염료 분자들을 방출하여 PoPo3 염료 방출의 감소를 야기하였다. FRET 효율은 공여체와 수용체의 근접성(donor-acceptor proximity)에 의존하므로, 공여체-수용체 쌍의 결합-유도 분리(binding-induced separation)에 적합한, 이러한 거리-의존적 과정은 MC-LR의 고도로 민감한 검출을 허용할 수 있다.

[0078] **실시예 2: FRET을 기반으로 하는 QD-앱타센서의 제조**

[0080] **2-1. MC-LR에 대한 앱타머의 구조적 변화**

[0081] MC-LR의 검출을 위해 단일 가닥 DNA(single stranded DNA; ssDNA) 앱타머 AN6(5'-NH_2-GGC GCC AAA CAG GAC CAC CAT GAC AAT TAC CCA TAC CAC CTC ATT ATG CCC CAT CTC CGC-3', Bioneer Corporation, Daejeon, Korea)를 사용하였다. 본래의 형태(original form)로부터 아민기를 부착함으로써 앱타머를 개질하여, MC-LR에 대한 상기 앱타머의 결합 친화력(binding affinity)을 원편광 이색성(circular dichroism; CD) 분광편광 분석법(spectropolarimetry)으로 시험하였다. 10 μmole/L 농도의 앱타머 60 μL를, 0.01% SDS, 20 mmole/L $MgCl_2$, 40 mmole/L KCl, 및 100 mmole/L NaCl을 함유하는, 0.02 mole/L 농도의 Tris-HCl 완충액(Tris buffer, pH 8.0) 225 μL에 첨가하였다. 이어서, 다양한 농도(10 fg/mL, 1 pg/mL, 및 10 pg/mL)의 MC-LR 용액을 15 μL씩 상기 용액에 첨가하고(총 부피 300 μL), 실온에서 밤새도록 인큐베이션하였다. 상기 앱타머 용액을 1 mm의 광학경로(optical path length)를 갖는 쿼츠 큐벳에 옮겼다. 펠티에 자동온도조절 셀 홀더(Peltier thermostatic cell holder)를 구비한 Jasco J-1500 분광광도계(Jasco Inc., Easton, MD, USA)를 사용하여 25℃ CD 스펙트럼을 스캔하였다. 350 nm로부터 200nm까지 50 nm/min 속도로 CD 스펙트럼 스캔을 수행하였다. 각 스펙트럼은 바탕선(완충액 단독) 보정하였으며, 3회 데이터 축적하여 획득하였다. 실험은 2회 반복하여 수행하였다.

[0082] 도 2a에 나타난 바와 같이, CD 스펙트럼은 앱타머가, 275 nm 및 245 nm에서 각각 양성 및 음성 밴드를 갖는, 전형적인 B-형태의 DNA임을 나타낸다. 보다 구체적으로, B-형 DNA의 양성 밴드 피크는 DNA의 염기 스태킹(base stacking)에 의해 260 내지 280 nm 근처에서 나타나는 반면, 음성 밴드는 DNA의 오른 방향 헬리시티(right-handed helicity)로 인해 약 245 nm에서 나타난다. 도 2a에서 빨간 점선의 원으로 표시한 구역에 나타난 바와

같이, 앱타머와 MC-LR의 상호작용은 ~245 nm에서 CD 스펙트럼의 변화를 유도하였다. MC-LR을 첨가한 후, ~245 nm에서의 음성 CD 밴드는 -0.8916 mdeg(앱타머 단독)로부터 -0.6477 mdeg(10 pg/mL의 MC-LR을 첨가한 앱타머)까지의 감소를 나타낸 반면, ~275 nm에서의 양성 밴드는 적은 영향을 받는 것으로 나타났다. 일반적으로, 음성 CD 밴드에서의 변화는 DNA 삽입 이벤트에서 관찰될 수 있다. 구체적으로, 음성 CD 밴드의 세기 감소는 표적 분자가 나선형 DNA 축에 수직으로 삽입되었을 때 발생할 수 있다. ~245 nm에서의 피크는 도 2a에서 유일한 음성 CD 밴드이며 해당 피크에서 세기 감소가 존재하므로, MC-LR 분자들이 염기쌍에 수직으로 삽입되어 앱타머에 결합하는 것으로 결론지을 수 있다.

[0084] **2-2. PoPo3 염료 첨가에 의한 앱타머의 구조적 변화**

[0085] PoPo3 염료 첨가에 따른 앱타머의 구조적 변화(conformational change)를 상기 실시예 2-1에서와 같이 CD 분광편광법으로 확인하였다. 용액은 상기 실시예 2-1에서와 동일한 방법으로 준비하였다. 간략히, 10 μmole/L 앱타머 분액(aliquots, 60 μL)을 0.02 mole/L Tris-HCl 완충액(pH 8.0) 210 μL을 포함하는 1.5 mL 바이알에 옮겼다. 이어서, 30 μL의 요오드화 PoPo™-3 염료(Dimeric cyanine nucleic acid stains, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 상기 바이알에 첨가하여 최종 농도 0.1 μmole/L가 되도록 하였다. 상기 바이알은 실온에서 밤새도록 인큐베이션하였다. 용액을 큐벳이 옮기고, 상기 실시예 2-1에서와 동일한 방법으로 CD 스펙트럼을 측정하였다.

[0087] **2-3. 앱타머 내로의 PoPo3 염료의 삽입**

[0088] 0.02 mole/L 농도의 Tris 완충액 90 μL에 앱타머를 다양한 양(0, 10, 50, 100, 200, 및 500 pmole)으로 부유시켰다(suspend). 상기 용액을 불투명한 96-웰 마이크로플레이트(Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA)에 옮겼다. 이어서, 상기 마이크로플레이트에 10 μL의 PoPo3 염료를 첨가하여 최종 농도 0.1, 1, 2.5, 5, 및 10 μmole/L로 Tris 완충액 용액을 제조하였다. 530 nm 여기 파장으로 561 nm에서 PoPo3 염료의 형광을 SpectraMax M2 분광형광계(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 측정하고, 10분 간격으로 2시간 동안 기록하였다. 모든 실험은 3회 반복하여 수행하였다.

[0089] 도 2b에서 빨간 점선의 원으로 표시한 바와 같이, ~245 nm에서 앱타머의 음성 CD 피크는 0.1 μmole/L 농도의 PoPo3 염료 첨가에 의해 변화하였다. 이와 동일한 방식으로, 음성 피크에서 값의 감소는 PoPo3이 수직 방향으로의 삽입에 의해 앱타머에 삽입되었음을 나타내는 것이다. 앱타머로 PoPo3 염료의 삽입을 사용하여, 앱타머의 단위 사용량에 대한 PoPo3 염료의 농도를 다양하게 변화시키면서 테스트하여 최적의 앱타머 농도를 결정하였다(도 2c). 도 3에서 결정된 바와 같이, PoPo3 염료와 앱타머를 함께 10분 동안 인큐베이션한 후, 삽입된 PoPo3 염료의 형광 신호($RFU_{561\ nm}$)는 다양한 PoPo3 염료 농도에서 앱타머 양에 대해 비례적으로 증가하였다. 선형 회귀 분석(linear regression analysis)에 의해 앱타머 양과 PoPo3 염료 농도 사이의 관계를 산출하였다. 형광 신호($RFU_{561\ nm}$)와 앱타머 양 사이의 결정 상수(coefficient of determination, r^2)를 획득하였다. 2.5 및 5 μmole/L 농도의 PoPo3 염료 모두 각각 0.992 및 0.993의 가장 높은 결정 상수를 나타내었다. 10 μmole/L 농도의 PoPo3 염료는 가장 높은 형광을 나타내었음에도 불구하고, 다양한 앱타머 농도에서 효율적인 삽입을 위하여 5 μmole/L 농도의 PoPo3 염료를 선택하였다(도 2c의 화살표).

[0091] **2-4. 자성 비드 대 양자점의 최적 비율**

[0092] QD_{525}의 가장 높은 형광 신호를 획득하기 위하여, MB(1, 2, 및 4×10^7개 입자, Invitrogen)와 QD_{525}(1, 2, 및 4×10^{-11} 몰, Invitrogen) 간의 다양한 비율을 시험하였다. 2시간 동안 NHS/EDC(N-hydroxysuccinimide/ethylcarbodiimide hydrochloride, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA)와의 반응을 통해 아민화된 MB를 카르복실기로 개질된 QD_{525}와 결합시켰다. 결합되지 않은 QD_{525} 나노입자들은 0.02 mole/L Tris 완충액으로 세척하여 제거하였다. 결과로 수득한 MB-QD_{525} 복합체를 동일한 완충액 200 μL에 재분산시켜 불투명한 96-웰 마이크로플레이트에 옮겼다. 360 nm 파장으로 여기시키고 530 nm에서 형광을 측정하였다. 모든 실험은 4회 반복하여 수행하였다.

[0093] 단위 QD_{525} 당 MB 입자의 다양한 혼합 비율을 테스트하여 MB-QD_{525} 복합체의 형성을 최적화하였다. 도 2d(빨간 점선 원)와 관련하여, 4×10^{-11} 몰의 QD_{525} 및 10^7 입자의 MB에서 QD_{525}의 가장 높은 형광 신호($RFU_{530\ nm}$)를 달성하였다. 4×10^{-11} 몰의 QD_{525}에서, 형광은, 10^7로부터 4×10^7까지, 보다 많은 MB 입자의 첨가에 의해 감소되었다. 이는 QD_{525}의 형광이 크기 차이로 인해 MB 입자들에 의해 간섭받을 수 있음을 나타내는 것이다. 사용한 MB 및 QD_{525} 입자는 각각 ~2.5 μm와 ~4 nm의 직경을 갖는다. MB(10^7 입자) 및 QD_{525}(4×10^{-11} 몰) 입자의 혼합 비율을 선택하여 이후 실험에 사용하였다. 한편, QD_{525} 입자의 사용량이 1 또는 2×10^{-11} 몰로 상대적으로 적을 때에는 사용한 MB 입자의 수가 많을 수록 오히려 측정된 형광 신호가 증가하였는데, 이는 보다 넓은 표면적을 제공함으로써 양자점의 부착 기회를 높여 효율적인 신호 수집을 가능하게 하기 때문인 것으로 사료된다.

[0095] **2-5. FRET 설정의 실행가능성**

[0096] FRET 설정(configuration)(도 1d)을 MB-QD_{525}-앱타머 복합체 내로의 PoPo3 염료의 삽입으로 입증하였다. MB(1×10^7 입자) 및 QD_{525}(4×10^{-11} mole)의 최적 비율에 따라 MB-QD_{525} 복합체를 준비하였다. MB-QD_{525} 복합체의 분액(100 μL)을 6개의 1.5 mL 바이알에 옮겼다. 5' 말단에 아민 작용기를 갖는 앱타머 용액(10 μmole/L) 20 μL를 3개 바이알에 첨가하고, 이어서 다음과 같이 NHS/EDC 반응을 통해 MB-QD_{525}-앱타머 복합체를 형성하였다.

[0097] $$\text{MB-QD-COOH} + \text{NH}_2\text{-Aptamer} \xrightarrow{\text{NHS/EDC}} \text{MB-QD-Aptamer}$$

[0098] 결합하지 않은 앱타머를 0.02 mole/L Tris 완충액으로 2회 세척하여 제거하고, MB-QD_{525}-앱타머 복합체를 동일한 완충액에 재분산시켰다. 비교를 위하여, 음성대조군으로 MB-QD_{525} 복합체를 다른 3개 바이알에 동시에 준비하였다. 바이알 내의 각각의 용액을 마이크로플레이트에 옮기고, PoPo3 염료(최종 농도로서 5 μmole/L)를 상기 플레이트에 첨가하였다. 플레이트를 MixMate 셰이커(Eppendorf, Hamburg, Germany)에서 1,200 rpm으로 교반(agitation)하면서 실온에서 10분 동안 인큐베이션하였다. SpectraMax M2 분광형광계를 사용하여 360 nm 파장으로 여기하여 561 nm에서 PoPo3 염료의 FRET-매개된 형광 방출(RFU_{561nm})을 측정하였다. 모든 실험은 3회 반복하여 수행하였다.

[0099] FRET 기반 PoPo3 염료 방출의 실현가능성을 테스트하였으며, 그 결과를 도 2e에 나타내었다. 삽입을 위하여 MB-QD_{525}-앱타머를 PoPo3 염료와 인큐베이션하였다. 결합되지 않은 PoPo3 염료를 세척한 후, 측정된 PoPo3 염료의 형광($RFU_{561\ nm}$=258±6)은 앱타머 내에서 PoPo3 염료의 유의미한 삽입이 발생하였음을 나타내었다. 예상되는 바와 같이, 앱타머가 없는 MB-QD_{525}(음성대조군)는 바탕 잡음에 상응하는 신호 값($RFU_{561\ nm}$=43±18)을 나타내었다. 이는 PoPo3 염료의 형광은 QD_{525}의 방출에 의한 여기에 의해 성공적으로 방출되었으며, 이는 대부분 MB-QD_{525}-앱타머에 대한 PoPo3 염료의 삽입으로부터 유도되었음을 나타내는 것이다. 바탕 잡음 신호(background noise signal)는 20% 미만이었다.

[0101] **2-6. MB-QD_{525}-앱타머의 안정화**

[0102] 소디움 보로하이드라이드($NaBH_4$) 용액을 사용하여 MB-QD_{525}-앱타머 복합체를 안정화하였다(passivated). $NaBH_4$ 용액은 0.05% SDS 함유 2X SSC에서 132 mmole/L의 최종 농도로 신선하게 제조하였다. MB-QD_{525}-앱타머 복합체의 분액(100 μL)을 1.5 mL 바이알에 옮겼다. 상기 $NaBH_4$ 용액(100 μL)을 총 36개 바이알의 절반에 첨가하고, 다른 절반의 바이알에는 비교를 위하여 초고순도 증류수(ultrapure distilled water, DNase/RNase/Protease free, Intron Bio-technology, Gyeonggi, Korea)를 첨가하였다. 이들 바이알은 MixMate 셰이커에서 1,200 rpm으로 교반하면서 실온에서 5 내지 30분 동안 인큐베이션하였다. 다른 반응 시간 동안 안정화 후, MB-QD_{525}-앱타머 복합체를 0.02 mole/L Tris 완충액으로 2회 세척하고, 동일한 완충액에 재분산시켰다. MB-QD_{525}-앱타머 복합

체를 불투명한 96-웰 마이크로플레이트에 옮기고, PoPo3 염료(최종 농도로서 5 μmole/L)를 상기 용액에 첨가하였다. 10분 동안의 인큐베이션 후, SpectraMax M2 분광형광계를 이용하여 동일한 360 nm 파장에서 여기 후 각각 530 nm 및 561 nm에서 QD_{525} 및 FRET-기반 PoPo3 염료의 형광 신호를 측정하였다. 각각의 형광을 이용하여, 다음의 식 (1)으로 정상화한 형광(normalized fluorescence)을 결정하였다. 모든 실험은 3회 반복하여 수행하였다.

[0103]
$$Normalized\ fluorescence\ (NF, PoPo3/QD_{525}) = \frac{Fluorescence\ of\ PoPo3\ dye}{Fluorescence\ of\ QD_{525}\ nanoparticles} \quad (1)$$

[0104] 도 2f는 시간에 따른 $NaBH_4$에 의한 MB-QD_{525}-앱타머의 안정화 결과를 나타낸다. MB-QD_{525}-앱타머의 정상화된 형광($PoPo3/QD_{525}$)은, 복합체가 $NaBH_4$에 의해 안정화되었을 때(도 2f에서 닫힌 원), 더 높았다(즉, 향상되었다). 특히, 5분 안정화(도 2f의 빨간색 화살표)는 가장 높은 정상화된 형광을 나타내었으며, 따라서 이를 선택하여 이후 실험에 사용하였다. MB-QD_{525}-앱타머의 작용기를 환원제인 $NaBH_4$로의 캡핑에 의해 불활성화하였다. 이는 PoPo3 염료의 비특이적인 결합 또는 응집을 차단할 수 있다.

[0106] **2-7. QD-앱타센서의 현미경 이미지 분석**

[0107] 복합체의 구조를 가시적으로 확인하기 위하여, 주사전자현미경(scanning electron microscopy) 및 공초점현미경(confocal microscopy)을 포함한 현미경 이미지 분석(microscopic image analysis)을 수행하였다. 실시예 2을 통해 MB-QD_{525} 및 MB-QD_{525}-앱타머 복합체를 각각 준비하였다. 상기 MB-QD_{525} 복합체의 표면을 30 kV의 가속 전압으로 전계방출-주사전자현미경(field emission-scanning electron microscopy; FE-SEM, SU-70, Hitachi High Technologies Corp., Tokyo, Japan)을 사용하여 분석하였다. 상기 MB-QD_{525}-앱타머 복합체의 형성을 공초점현미경으로 확인하였다. 앱타머의 시각적 입증(visual verification)을 위하여, PoPo3 염료를 MB-QD_{525}-앱타머 복합체에 첨가하였다. 앱타머에 PoPo3 염료 삽입 후, QD_{525} 및 PoPo3 염료를 포함하는 앱타머의 형광 이미지를 각각 530 nm 및 560 nm 방출 파장에서 고해상도(super resolution) 공초점현미경(TCS SP8 STED, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)으로 촬영하였다.

[0108] QD-앱타센서 복합체의 형성을 현미경 분석으로 확인하였다(도 4). 도 4a에서 화살표로 나타낸 바와 같이, SEM 이미지는 QD_{525} 나노입자들이 MB 입자의 표면에 고정화되었음을 나타내었다. 또한, 공초점 현미경 관찰을 통해 이를 가시적으로 나타내었다(도 4b). 도 4b의 하단 좌측 도면은 530 nm에서만 발광하는 QD_{525} 나노입자들을 나타낸다. 도 4b의 하단 우측 도면은 360 nm 여기 하에 FRET 기반 560 nm 방출을 찍은 삽입된 PoPo3 염료를 나타낸다(도 1d). 공초점 현미경 이미지는 MB-QD_{525}-앱타머 콘쥬게이트 내에 PoPo3 염료가 성공적으로 삽입되었음을 나타내었다. 앱타머는 FRET 기반 PoPo3 염료의 형광 이미지를 찍어 가시화하였다.

[0110] **실시예 3: QD-앱타센서의 민감성 확인**

[0112] MB-QD_{525}-앱타머 복합체의 분액(160 μL)을 마이크로플레이트에 옮기고, PoPo3 염료(20 μL)를 마이크로플레이트에 첨가하여 삽입되도록 하였다. 10분 동안 앱타머에 PoPo3 염료를 삽입한 후, 10배 연속 희석된 MC-LR(10^{-4} 내지 10^{2} ng/mL, Enzo Life Sciences, New York, NY, USA)을 총 부피 200 μL가 되도록 상기 마이크로플레이트에 첨가하였다. 음성대조군(negative control; NC)으로는, MC-LR 대신에 초고순도 증류수를 첨가하였다. 상기 마이크로플레이트를 MixMate에서 1,200 rpm으로 교반하면서 10시간 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 주어진 인큐베이션 시간 동안, QD_{525} 및 FRET-매개된 PoPo3 염료의 형광을 SpectraMax M2 분광형광계를 사용하여 360 nm 여기 하에 530 nm 및 561 nm에서 정해진 시점(0, 0.17, 1, 2, 4, 6, 8, 및 10시간)에 측정하였다. 이어서, 음성대조군(NF_{NC}) 및 시료(NF_{Sample})의 정상화된 형광(normalized fluorescence, $PoPo3/QD_{525}$)을 상기 식 (1)에 따라 계산하였다. NF_{NC} 및 NF_{Sample} 간의 차이에 의한 정상화된 형광에서의 상대적인 감소($\Delta(PoPo3/QD_{525})$)는, 하기 식 (2)에 나타난 바와 같이, 본 발명에서 제안된 방법의 민감성(sensitivity) 및 선택성(selectivity) 확인

(verification)에 사용되었다(도 5 및 6). 모든 실험은 3회 반복하여 수행하였다.

[0113] $$\text{상대적인 정상화된 형광}(\Delta(PoPo3/QD_{525}))=NF_{NC}\left(\frac{PoPo3\text{ 염료의 형광}}{QD_{525}\text{ 나노입자의 형광}}\right)-NF_{Sample}\left(\frac{PoPo3\text{ 염료의 형광}}{QD_{525}\text{ 나노입자의 형광}}\right) \quad (2)$$

[0114] FRET 기반 QD-앱타센서는 MC-LR 분자를 검출 및 정량화할 수 있었다. 10시간 반응 동안 상대적인 정상화된 형광($\Delta(PoPo3/QD_{525})$)을 모니터하였으며, 신호는 시간에 따라 증가하였다(도 5a). 이는 FRET이 시간-의존적 형광 변화를 측정할 수 있음을 나타낸다. 도 5a에 나타난 바와 같이, 상대적인 정상화된 형광은 반응 초기에 빠르게 증가하였으며, 이후 6시간 반응 후에 거의 포화되었다. 따라서, MC-LR 검출을 위한 QD-앱타센서의 추가적인 민감성 입증을 위해 6시간에서 상대적인 정상화된 형광을 사용하였다. 도 5b와 관련하여, 상대적인 정상화된 형광은 10^{-4} 내지 10^{2} ng/mL(ppb or nmole/L) 범위에서 MC-LR의 농도에 선형적으로 비례하였다. $y=0.15\log_{10}x+0.93$($r^2=0.94$)의 회귀를 나타내었다. 이때, 상대적인 정상화된 형광은 y-축이며, MC-LR 농도는 x-축이다. 분석적 검출한계(limit of detection; LOD)는 10^{-4} ng/mL(nmole/L)이었으며, 이는 음용수에 대한 WHO 지침 수준인 1 ng/mL 보다 훨씬 더 낮다. 하기 표 1에는 당업계에 공지된 다양한 앱타머 기반 MC-LR 정량화 방법에 대한 검출한계를 요약하였다. 이는 본 발명에 따른 FRET 기반 QD-앱타센서가, 다른 앱타머 기반의 분석 방법에 비해, MC-LR 분자에 대해 가장 높은 수준의 민감성을 가짐을 나타내는 것이다.

표 1

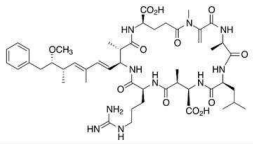
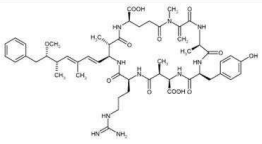
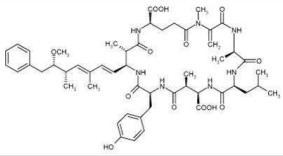
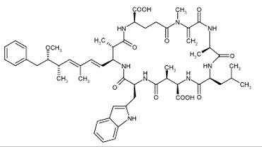
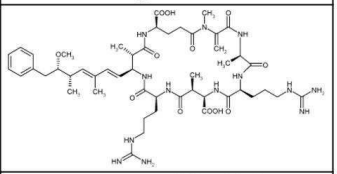
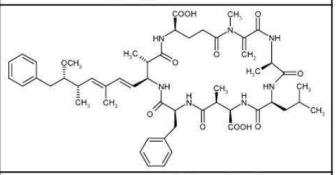
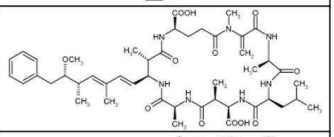
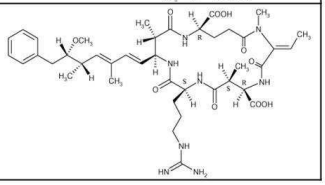
[0115]

검출 방법	검출 한계 (ng/mL)	문헌
비색적 앱타센서	0.37	J. Hazard. Mater. 304 (2016) 474-480
비색적 앱타센서	0.05	Biosens. Bioelectron. 68 (2015) 475-480
전기화학적 앱타센서	11.8×10^{-3}	Environ. Sci. Technol. 46 (2012) 10697-10703
미세캔틸레버 어레이 바이오센서	1	Sensor. Actuat. B-Chem. 260 (2018) 42-47
전기화학적 앱타톡시센서	0.04	Sensors (Basel) 16 (2016) E1901
전압전류 앱타센서	1.9×10^{-3}	Anal. Chem. 86 (2014) 7551-7557
전기화학적 임피던스 바이오센서	1.8×10^{-2}	Talanta 103 (2013) 371-374
형광 앱타센서	0.139	Talanta 166 (2017) 187-192
업컨버젼 기반 형광 앱타센서	2×10^{-3}	Biosens. Bioelectron. 90 (2017) 203-209
이중 FRET 앱타센서	0.1	Anal. Bioanal. Chem. 407 (2015) 1303-1312
FRET 기반 QD-앱타센서	10^{-4}	본 발명

[0117] **실시예 4: QD-앱타센서의 선택성 확인**

[0119] $MB\text{-}QD_{525}$-앱타머 복합체의 분액(160 μL)을 마이크로플레이트에 옮기고, PoPo3 염료(20 μL)를 마이크로플레이트에 첨가하였다. 선택성 확인을 위하여, 총 7개의 MC-LR 유사체(analogs)(MC-YR, MC-LY, MC-LW, MC-RR, MC-LF, MC-LA, 및 Nodularin)를 Enzo Life Sciences Inc.로부터 입수하였다. 유사체들의 구체적인 정보는 하기 표 2에 열거하였다. 각각의 유사체 화합물 20 μL를, 최종 농도 1 ng/mL이 되도록, QD-앱타센서 반응에 첨가하였다. 상기 농도 1 ng/mL는 세계보건기구(World Health Organization; WHO) 지침 상의 마이크로시스틴 농도에 상응한다. 추가적으로, MC-LR 및 초고순도 증류수를 각각 양성대조군 및 음성대조군으로 반응에 첨가하였다. 상기 마이크로플레이트를 MixMate에서 1,200 rpm으로 교반하면서 6시간 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, QD_{525} 및 FRET-기반 PoPo3 염료의 형광을 SpectraMax M2 분광형광계를 이용하여 측정하였다. 상대적인 정상화된 형광은 상기 식 (2)에 따라 결정하였다. 모든 실험은 3회 반복하여 수행하였다.

표 2

명칭	약어	화학식	분자량 ($g \cdot mole^{-1}$)	2D 구조
Microcystin-LR	MC-LR	$C_{49}H_{74}N_{10}O_{12}$	995.19	
Microcystin-YR	MC-YR	$C_{52}H_{72}N_{10}O_{13}$	1045.2	
Microcystin-LY	MC-LY	$C_{52}H_{71}N_7O_{13}$	1002.2	
Microcystin-LW	MC-LW	$C_{54}H_{72}N_8O_{12}$	1025.2	
Microcystin-RR	MC-RR	$C_{49}H_{75}N_{13}O_{12}$	1038.2	
Microcystin-LF	MC-LF	$C_{52}H_{71}N_7O_{12}$	986.2	
Microcystin-LA	MC-LA	$C_{46}H_{67}N_7O_{12}$	910.0	
Nodularin	-	$C_{41}H_{60}N_8O_{10}$	825.0	

[0120]

[0121] FRET 기반 QD-앱타센서의 선택성을 MC-LR 및 이의 유사 화합물(its analogous chemicals)을 이용하여 검증하였다. 상기 표 2에 나타난 바와 같이, MC-LR과 화학 구조적 유사성을 갖는 7종의 유사체(구체적으로 MC-YR, MC-LY, MC-LW, MC-RR, MC-LF, MC-LA, 및 노둘라린(nodularin))를 선택하였다. 도 6에 나타난 바와 같이, MC-LR은 FRET 기반 QD-앱타센서에 의해 1 ng/mL 농도에서 선택적으로 검출되었다. 가장 높은 MC-LR의 상대적인 정상화된 형광은 다른 유사체들과 비교하여 MC-LR의 가장 높은 친화력을 나타내는 것이다. MC-LR에 대한 친화력을 100%로 설정하였을 때, MC-YR 및 MC-LA에 대한 상대적인 결합력은 모두 0%에 가까웠다. 반면, MC-LY, MC-RR, 및 노둘라린은 약 13 내지 15%의 상대적인 친화력을 나타내었으며, MC-LW 및 MC-LF는 각각 28 및 36%의 값을 나타내었다. 통계적 분석을 사용하여, MC-LR에 대한 결합 친화력은 다른 유도체들에 대한 값으로부터 유의미하게 상이하였다 (t-테스트에 의해 결정된 바, p-value $\ll$ 0.01).

[0123] **실시예 5: QD-앱타센서 및 ELISA 어세이를 통한 순수 시아노박테리아 배양 중의 세포 내 MC-LR 분석**

[0125] 간독소 생산자(producer of hepatotoxin)로 알려진 마이크로시스티스 애루지노사(*Microcystis aeruginosa*; *M. aeruginosa*) 균주(strain) UTEX 2388을 미국 텍사스 대학의 조류 배양물 수집소(Culture Collection of Algae)로부터 입수하였다. 이들 100 mL의 토양수(soil water)가 제거된 modified Bold 3N medium을 포함하는 250 mL 삼각플라스크에 세균을 접종하였다. 상기 세균을 100 rpm으로 교반(Orbital shaker, DAIHAN Scientific, Gangwon, Korea)하면서, 계속조명(continuous illumination) 하에(20,000 lux, 30 W, SL230D, City E.L.G., Incheon, Korea), 실온에서 265시간(약 11일) 동안 배양하였다. 배양하면서 플라스크로부터 배양 배지(culture broth)를 주기적으로 채취하였다(0, 18.5, 42.5, 74.5, 96, 114, 139, 163, 186.5, 210.5, 235, 및 265시간). *M. aeruginosa*의 세포 성장은 SpectraMax M2 분광형광계로 680 nm에서 배양물의 흡광도를 분석하여 측정하였다. 세포 내 MC-LR 추출을 위하여, 14,000 rpm에서 3분 동안 원심분리(Centrifuge 5418, Eppendorf, Hamburg, Germany)하여 *M. aeruginosa* 배양물의 분액(1.5 mL)을 1.7 mL 바이알에 수집하였다. 수집된 세포를 1 mL의 증류수에 부유시켰다. 바이알을 얼음 위에 두고 10 W에서 P-3 미세탐침을 구비한 XL-2000 초음파 파쇄기(ultrasonic dismembrator, Qsonica, Newtown, CT, USA)로 3회 순환(1 순환: 30초 작동 및 30초 냉각)하여 초음파처리하였다. 용해된 세포는 동일한 작동 방식으로 원심분리를 통해 제거하였다. 상층액은 25 mm 나일론 실린지 필터(0.45 μm, CHMLAB, Barcelona, Spain)로 여과하였다. 수득한 추출물을 QD-앱타센서 및 ELISA를 이용한 추가적인 MC-LR 분석에 사용하였다. 상기 민감성 확인에서의 실험 과정에 따라 QD-앱타센서를 준비하였다. *M. aeruginosa* 배양 추출물을 플레이트에 첨가하고, MixMate에서 1,200 rpm으로 교반하면서 6시간 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, QD_{525} 및 FRET-기반 PoPo3 염료의 형광을 SpectraMax M2 분광형광계를 이용하여 측정하였다. 상대적인 정상화된 형광은 상기 식 (2)에 따라 결정하였다. 모든 실험은 3회 반복하여 수행하였다. MC-LR 농도에 따른 상대적인 정상화 형광을 플롯한 검정 곡선으로부터 MC-LR 농도를 계산하였다(도 5b). 비교를 위하여, *M. aeruginosa* 배양 추출물을 또한 제조업자의 지시에 따라 ELISA 어세이 키트(Microcystin-LR ELISA Kit, Abnova, Taipei City, Taiwan)로 분석하였다. 추출물 중의 MC-LR 농도를 상업적인 ELISA 키트로부터 얻어진 표준 곡선으로부터 추산하였다(0.1 내지 2.5 ng/mL, 도 7). 모든 실험은 3회 반복하여 수행하였다.

[0126] 순수 시아노박타리아 배양물 및 환경 물 시료를 이용하여 FRET 기반 QD-앱타센서의 적용 가능성을 확인하였다. 먼저, *M. aeruginosa* 배양배지의 세포 내 MC-LR 농도를 세포 성장에 따라 FRET 기반 QD-앱타센서를 이용하여 정량적으로 측정하였으며, 또한 비교를 위하여 종래의 ELISA 어세이를 이용하여 분석하였다.

[0127] 도 8a에 나타난 바와 같이, *M. aeruginosa* 세포를 18.5시간의 유도기(lag period) 후 성장시켰다. 초기 단계에서의 지수적 성장에 이어, 약 139시간의 인큐베이션에서 고정 성장기(stationary growth phase)가 시작되었다. 최대 비성장률(maximum specific growth rate, μ_{max})은 0.0199 ± 0.0002 h^{-1}에 달하였다(도 8b). 각각의 MC-LR 농도를 FRET 기반 QD-앱타센서 및 ELISA 어세이 모두를 통해 동시에 측정하였다(도 8a). ELISA 어세이는 42.5시간의 유도기 및 초기-지수 성장기 동안 MC-LR의 정량분석이 불가한 반면, FRET 기반 QD-앱타센서는 0.02 - 0.15 ng/mL-시아노박테리아 배양물로 검출하였다. 이는 MC-LR 검출에 대한 FRET 기반 QD-앱타센서의 우수성(예컨대, 보다 낮은 LOD)에 기인할 수 있다. 도 7 및 도 5b에 나타난 바와 같이, ELISA 어세이의 분석 범위는 MC-LR에 대해 0.1 내지 2.5 ng/mL인 반면, QD-앱타센서의 분석 범위는 10^{-4} 내지 10^{2} ng/mL였다. 2개 방법 모두 139시간의 지수상까지 약 3.5 ng/mL-시아노박테리아 배양물 보다 낮은 세포 내 MC-LR 농도를 나타내었으며, 이후 139시간으로부터 210.5시간까지 초기 고정상에서 12.7 - 15.8 ng/mL-시아노박테리아 배양물까지 빠르게 증가하였다. 그러나, 세포 내 MC-LR 농도는 이후 1.9 내지 4.2 ng/mL-시아노박테리아 배양물까지 상당히 감소하였다. 후기 지수기(late exponential phase) 동안의 감소는 세포 용해로 인한 것으로 보이며, 이에 따라 10.8 내지 11.6 ng/mL-시아노박테리아 배양물의 MC-LR 분자가 세포 내부로부터 배양 배지로 방출되었다. 결과적으로, 측정된 세포 내 MC-LR 농도는 최대 농도에 비해 훨씬 더 낮았다. 이는 이전의 연구들과도 일치하였다. 남조류 수화현상의 후기 단계에서 보다 많은 세포가 용해됨에 따라, 세포 외 MC-LR가 수 중에 보다 풍부해졌다. FRET 기반 QD-앱타센서에 의해 측정된 세포 내 MC-LR 농도는 ELISA 어세이에 의한 결과와 유의적인 양의 상관관계를 나타내었다(도 8c). 이는 2개 변수 간에 r= 0.981의 피어슨 상관 계수(p-value << 0.01)를 나타낸다.

[0129] **실시예 6: QD-앱타센서를 통한 실제 물 시료 중의 MC-LR 분석**

[0131] 2016년 8월 한강으로부터 환경 물 시료(environmental water samples)를 수집하였다. 물 시료채취를 위하여 6개 지점(NC1 및 NC2의 2개 음성대조군 지점 및 S1, S2, S3, 및 S4의 연구 지점)을 선정하였다. 사이트 맵과 수질정보는 각각 도 9 및 하기 표 3에 나타내었다. S1, S2, S3, 및 S4의 조류 밀도는 각각 8.6×10^{3}, 6.5×10^{3}, 2.7×10^{5}, 및 6.6×10^{7} cells/mL이었다. NC1 및 NC2에 *M. aeruginosa* 배양물을 소량 첨가하여 2개 양성대조군(PC1 및 PC2)도 준비하였다. 물 시료의 분액(1 mL)을 1.5 mL 바이알에 옮겼다. 상기 바이알을 얼음 위에 두고, 상기 실시예에서와 같은 방식으로 XL-2000 초음파 파쇄기를 사용하여 3회 순환하여 초음파 처리하였다. 초음파 처리 후, 물 시료를 25 mm 나일론 실린지 필터(0.45 μm)로 여과하였다. 여액(filtrates, 20 μL)은 QD-앱타센서 및 ELISA 어세이를 이용한 MC-LR의 추가적인 분석에 사용하였다. *M. aeruginosa* 배양물 중의 MC-LR 분석에서 묘사된 바와 같이, QD-앱타센서 및 ELISA 어세이를 수행하였다. QD-앱타센서 및 ELISA 어세이의 표준 곡선(도 5b 및 도 7)을 이용하여, 환경 부영양화된(environmental eutrophic) 물 시료 중의 MC-LR 농도를 추산하였다. 모든 실험은 3회 반복하여 수행하였다.

표 3

[0132]

시료	위치	위도/경도	수온 (℃)	pH	DO (mg/L)	BOD (mg/L)	COD (mg/L)	SS (mg/L)	T-N (mg/L)	T-P (mg/L)
NC1	서울 서초	37.47/127.03	29.2	7.9	7.9	1.5	5.0	6.8	5.02	0.317
NC2	경기 안양	37.39/126.97	28.4	7.6	4.5	3.8	7.7	5.6	7.73	0.040
S1	서울 강동	37.54/127.11	28.2	7.9	8.3	2.0	4.7	5.5	2.37	0.036
S2	서울 성동	37.53/127.03	29.1	8.1	6.7	0.8	3.6	3.4	2.44	0.031
S3	서울 용산	37.52/126.96	29.6	7.4	4.2	1.5	4.3	6.8	3.45	0.084
S4	서울 영등포	37.55/126.89	30	7.7	5.1	1.4	5.4	11.6	3.19	0.103

[0133] 또한 실제 환경 물 시료들을 사용하여 FRET 기반 QD-앱타센서의 성능을 평가하였다. 도 10a에 나타난 바와 같이, 표적 독소인, MC-LR은 각각 1.0, 7.2, 2.8, 및 2.3 ng/mL-water의 농도로 S3, S4, PC1, 및 PC2의 시료들에서만 검출되었다. 비교를 위하여, 이들 시료를 통상적인 ELISA 어세이로 분석하였으며, 그 결과 측정된MC-LR는 각각 0.2, 5.3, 3.7, 및 2.3 ng/mL-water의 농도로 확인되었다. 이들 두가지 분석 방법 모두 부영양화된 물 시료 중 시아노톡신(cyanotoxins)의 분리 및 정제 없이 MC-LR의 농도를 측정하였다. QD-앱타센서를 통해 측정된 MC-LR 농도는, 동일한 물 시료에서 마이크로시스틴 합성효소 D(microcystin synthetase D; *mcyD*) 유전자를 정량하는, 본 발명자들의 이전의 연구에서와 유사하였다(Environ. Sci. Technol., 2018, 52: 1375-1385). S3, S4, PC1, 및 PC2 시료들은 각각 3.5×10^{3}, 5.6×10^{6}, 1.2×10^{5}, 및 2.0×10^{5} *mcyD* 유전자 카피 수(gene copy number)/mL-water를 나타내었다. ELISA 어세이에 대해 QD-앱타센서에 의해 분석된 MC-LR 농도는 강한 양의 선형 상관관계를 나타내었다(도 10b). 이는 r=0.862(p-value << 0.01)의 피어슨 상관 계수를 나타내었다.

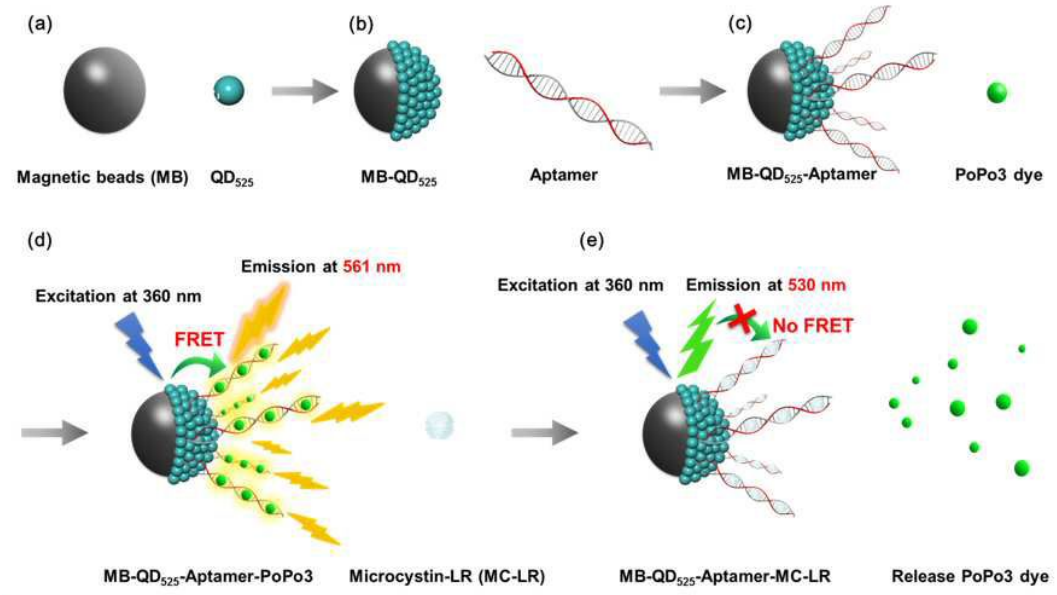
[0135] 본 발명에서 개발한 FRET 기반 QD-앱타센서는 실험실 및 실제 물 시료에서 모두 MC-LR 검출에 적합하였다. 이는 기존의 ELISA 어세이에 필적할만한 성능을 갖는다. 보다 중요한 것은, 실험실 배양의 MC-LR 농도는 시아노박테리아 성장 동안 0.02 내지 15.8 ng/mL의 넓은 범위를 나타낸다는 점이다. 전술한 바와 같이, 기존의 ELISA 어세이는 0.1 내지 2.5 ng/mL의 좁은 분석 범위를 가지며, 따라서 분석에 앞서 시료의 선농축 또는 희석을 필요로 한다. 반면, FRET 기반 QD-앱타센서는 추가적인 전처리 과정 없이 MC-LR 분석을 수행할 수 있다. 이는 본 발명에서 개발된 FRET 기반 QD-앱타센서가 고도로 민감하고 선택적인 *in-situ* MC-LR 검출을 가능하게 하는 적합한 수단임을 나타내는 것이다.

[0137] **비교예 1: 유기 형광체를 수용체로 이용하는 QD-앱타센서 기반 검출 방법**

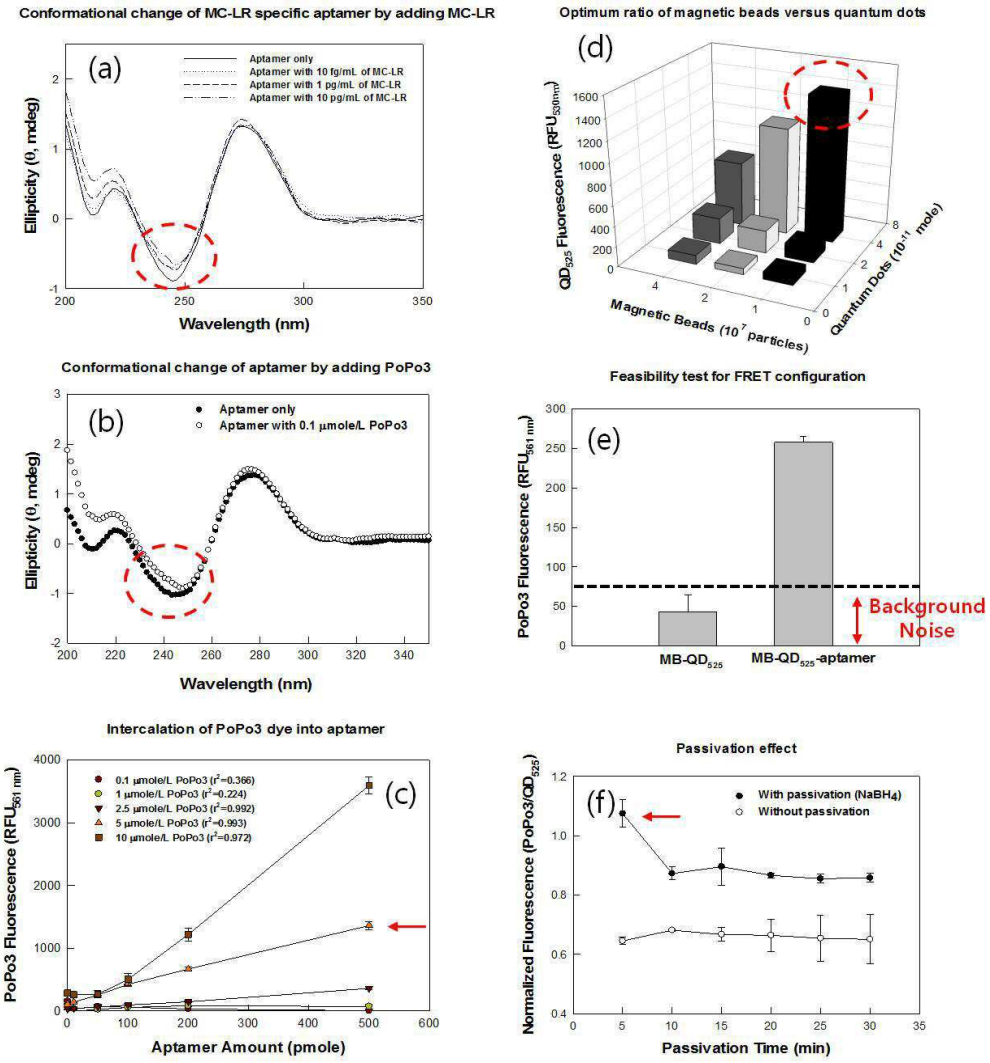
[0139] QD-앱타센서를 이용한 FRET에 의한 검출 방법에 있어서, 형광 공여체와 수용체의 조합에 의한 효과를 확인하기 위하여, 본 발명의 QD-앱타센서와 유사한 복합체를 준비하되, 양자점으로는 565 nm에서 최대 방출을 나타내는 QD_{565}를 사용하고, DEHP((di-2-ethylhexyl)phthalate)에 특이적으로 결합하는 앱타머를 이에 결합시켰으며, 형광 수용체로는 유기 형광체인 카르복시-X-로다민(carboxy-X-rhodamine; ROX)를 상기 앱타머에 공유결합시켰다. 이상과 같이 준비한 복합체를 다양한 농도의 DEHP와 접촉시키면서 검출을 수행하고, 그 결과를 도 11에 나타내었다. 도 11에 나타난 바와 같이, 형광 수용체로서 앱타머에 유기 형광체가 공유결합된 복합체를 사용하는 경우, 전체 농도에서 대조군(control) 즉, DEHP를 불포함하는 용매만을 처리한 경우와 동일한 패턴의 신호를 나타내었다. 이는 FRET을 발생시킬 수 있도록 파장을 매치시킨 형광 공여체와 수용체를 조합하더라도 시료의 검출이 불가할 수 있음을 나타내는 것이다.

도면

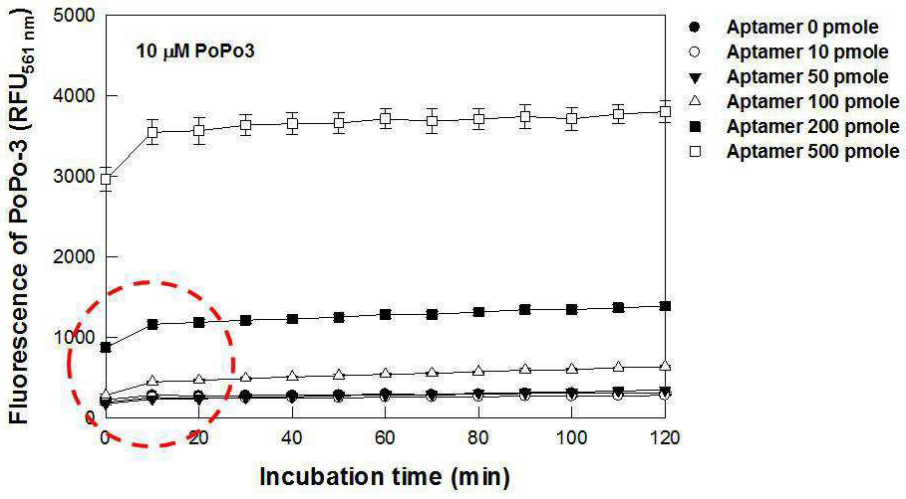
도면1



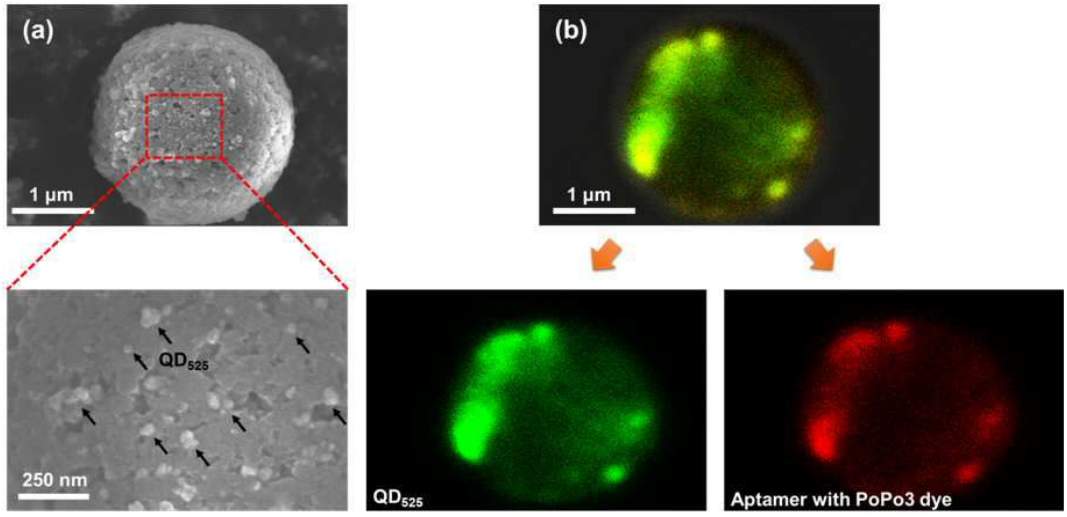
도면2


Conformational change of MC-LR specific aptamer by adding MC-LR
(a)
Aptamer only
Aptamer with 10 fg/mL of MC-LR
Aptamer with 1 pg/mL of MC-LR
Aptamer with 10 pg/mL of MC-LR
Ellipticity (θ, mdeg)
Wavelength (nm)
Optimum ratio of magnetic beads versus quantum dots
(d)
QD525 Fluorescence (RFU530nm)
Magnetic Beads (10^7 particles)
Quantum Dots (10^-11 mole)
Conformational change of aptamer by adding PoPo3
(b)
Aptamer only
Aptamer with 0.1 μmole/L PoPo3
Ellipticity (θ, mdeg)
Wavelength (nm)
Feasibility test for FRET configuration
(e)
PoPo3 Fluorescence (RFU561 nm)
Background Noise
MB-QD525
MB-QD525-aptamer
Intercalation of PoPo3 dye into aptamer
(c)
0.1 μmole/L PoPo3 (r²=0.366)
1 μmole/L PoPo3 (r²=0.224)
2.5 μmole/L PoPo3 (r²=0.992)
5 μmole/L PoPo3 (r²=0.993)
10 μmole/L PoPo3 (r²=0.972)
PoPo3 Fluorescence (RFU561 nm)
Aptamer Amount (pmole)
Passivation effect
(f)
With passivation (NaBH4)
Without passivation
Normalized Fluorescence (PoPo3/QD525)
Passivation Time (min)

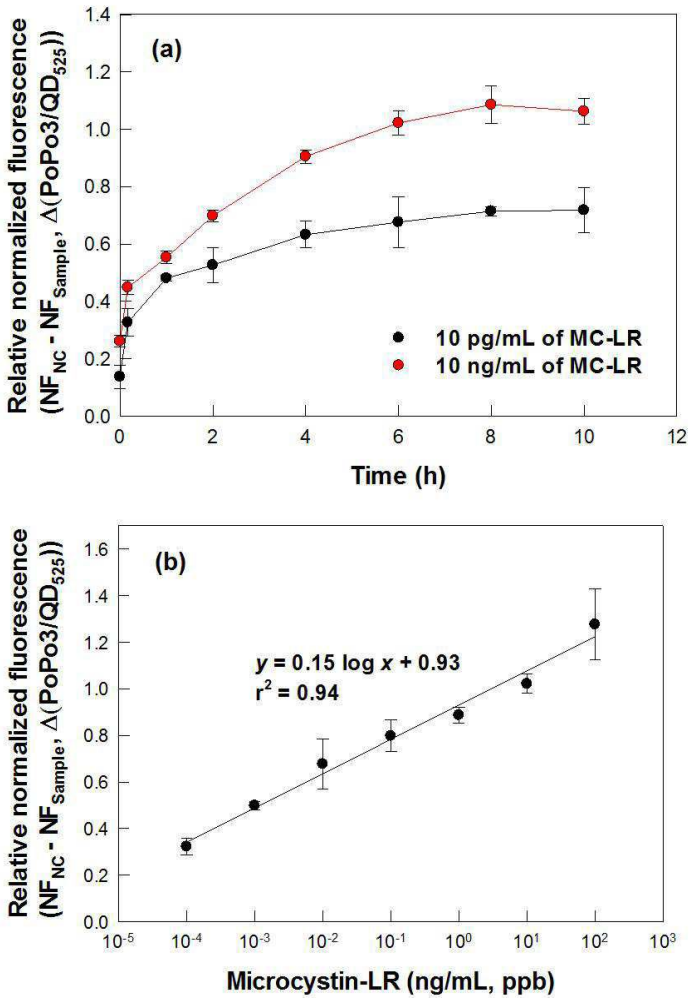
도면3


10 μM PoPo3
Aptamer 0 pmole
Aptamer 10 pmole
Aptamer 50 pmole
Aptamer 100 pmole
Aptamer 200 pmole
Aptamer 500 pmole
Fluorescence of PoPo-3 (RFU561 nm)
Incubation time (min)

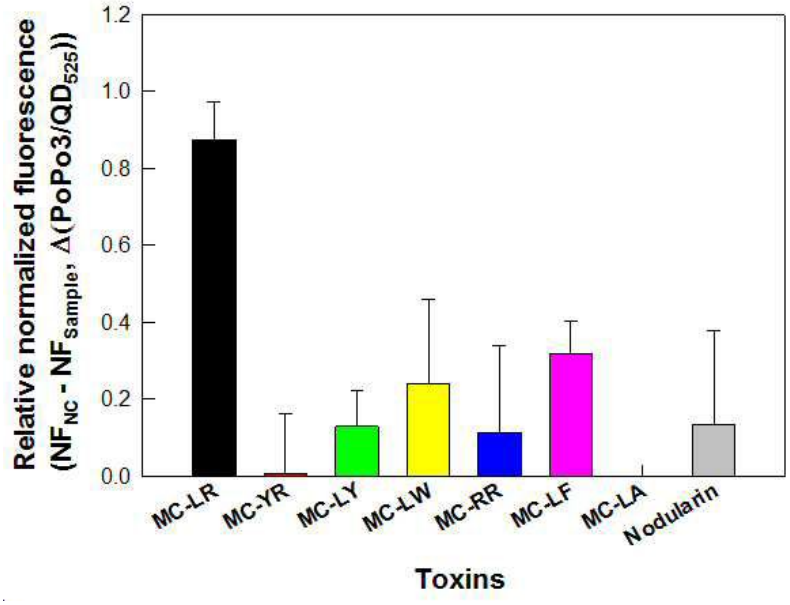
도면4


(a)
1 μm
(b)
1 μm
QD525
250 nm
QD525
Aptamer with PoPo3 dye

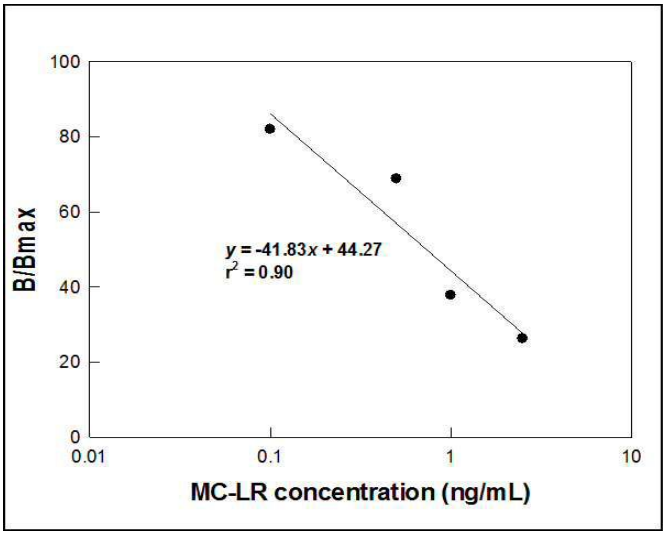
도면5


(a)
Relative normalized fluorescence (NFNC - NFSample, Δ(PoPo3/QD525))
Time (h)
10 pg/mL of MC-LR
10 ng/mL of MC-LR
(b)
y = 0.15 log x + 0.93
r2 = 0.94
Microcystin-LR (ng/mL, ppb)

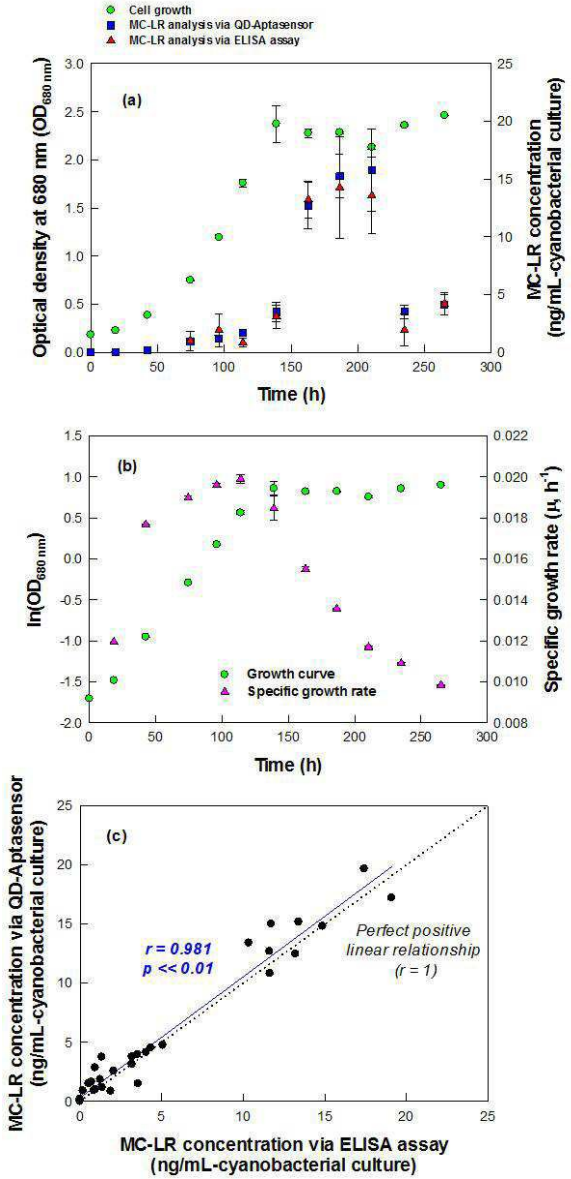
도면6


Relative normalized fluorescence
(NFNC - NFSample, Δ(PoPo3/QD525))
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
MC-LR
MC-YR
MC-LY
MC-LW
MC-RR
MC-LF
MC-LA
Nodularin
Toxins

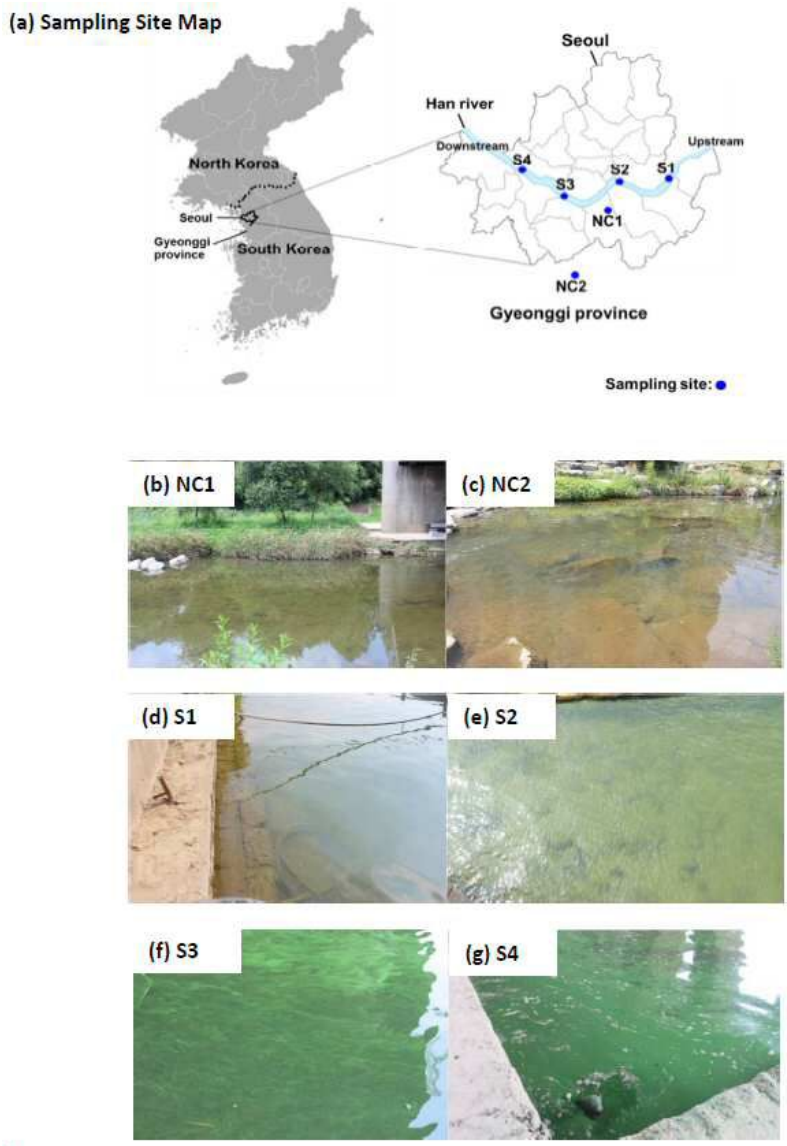
도면7


B/Bmax
100
80
60
40
20
0
y = -41.83x + 44.27
r2 = 0.90
0.01
0.1
1
10
MC-LR concentration (ng/mL)

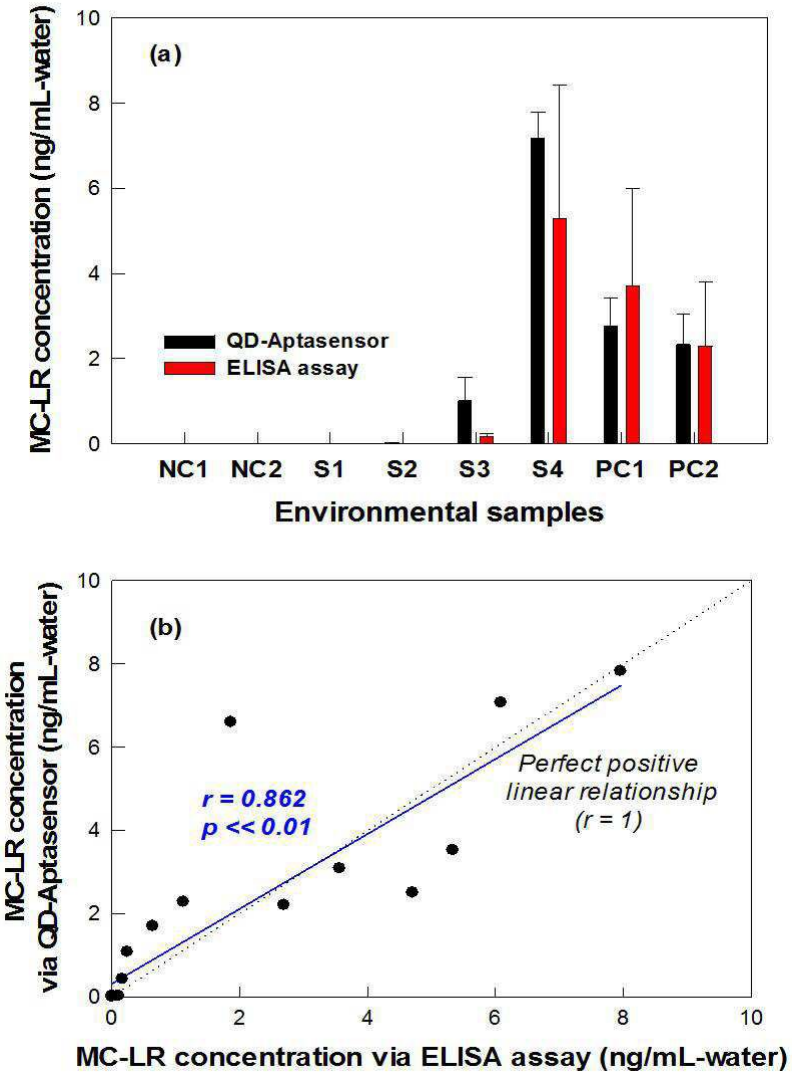
도면8


Cell growth
MC-LR analysis via QD-Aptasensor
MC-LR analysis via ELISA assay
(a)
Optical density at 680 nm (OD680 nm)
MC-LR concentration (ng/mL-cyanobacterial culture)
Time (h)
(b)
ln(OD680 nm)
Specific growth rate (μ, h-1)
Growth curve
Specific growth rate
Time (h)
(c)
MC-LR concentration via QD-Aptasensor (ng/mL-cyanobacterial culture)
r = 0.981
p << 0.01
Perfect positive linear relationship (r = 1)
MC-LR concentration via ELISA assay (ng/mL-cyanobacterial culture)

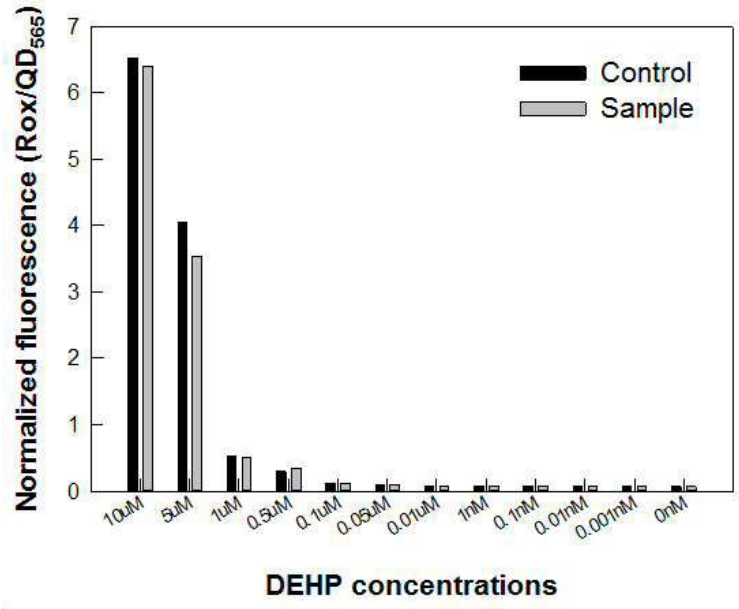
도면9


(a) Sampling Site Map
North Korea
Seoul
Gyeonggi province
South Korea
Seoul
Han river
Downstream
Upstream
S4
S3
S2
S1
NC1
NC2
Gyeonggi province
Sampling site:
(b) NC1
(c) NC2
(d) S1
(e) S2
(f) S3
(g) S4

도면10


(a)
MC-LR concentration (ng/mL-water)
QD-Aptasensor
ELISA assay
NC1
NC2
S1
S2
S3
S4
PC1
PC2
Environmental samples
(b)
MC-LR concentration via QD-Aptasensor (ng/mL-water)
r = 0.862
p << 0.01
Perfect positive linear relationship (r = 1)
MC-LR concentration via ELISA assay (ng/mL-water)

도면11



서 열 목 록

<110> Ewha University-Industry Collaboration Foundation

<120> Composition for detecting microcystin-LR comprising magnetic beads, quantum dots and DNA intercalating dyes

<130> KPA180400-KR

<160> 1

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AN6 aptamer

<400> 1

ggcgccaaac aggaccacca tgacaattac ccataccacc tcattatgcc ccatctccgc 60