



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0131491
(43) 공개일자 2024년09월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/548 (2006.01) G01N 21/64 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/548 (2013.01)
G01N 21/64 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0024085
(22) 출원일자 2023년02월23일
심사청구일자 2023년02월23일

(71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
홍종찬
경상남도 진주시 집현면 신당길50번길 40-3
카담 율하스
경상남도 진주시 내동면 신율길 7, 103호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김동완

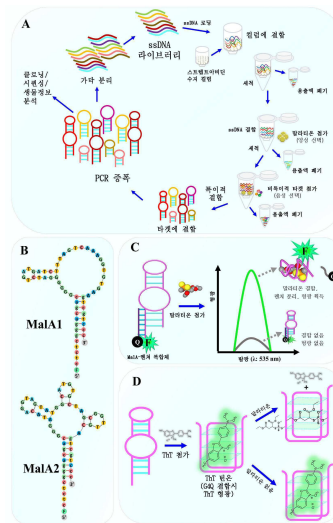
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 독성 살충제 말라티온 검출용 신규 앵타머 바이오센서

(57) 요약

본 발명은 유기인산염 독성 살충제 말라티온 검출용 신규 앵타머 바이오 센서에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 서열번호: 1의 뉴클레오타이드 서열을 지니는 MalA1 앵타머 또는 서열번호: 2의 뉴클레오타이드 서열을 지니는 MalA2 앵타머와 ThT 형광염료를 결합시켜 무표지로 말라티온을 검출하는 바이오센서에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Q 2525/205 (2013.01)

G01N 2430/10 (2013.01)

(72) 발명자

조유한

경상남도 진주시 가호로 26 진주가좌주공아파트
201동 104호

칸 티 마이 효영

경상남도 진주시 가좌길40번길 11-1, 104호

이혜비

부산광역시 기장군 기장읍 청강로 76, 104동 1101
호

김유정

경상남도 진주시 진주대로500번길 12-3, 203호

김선동

경상남도 진주시 호탄길28번길 10-1, 202호

강재희

경상남도 진주시 진주역로 116 더퍼스트웰가시티
416호

정우식

경상남도 진주시 가좌안골길21번길 5, 102동 1305
호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711161638
과제번호	2020R1F1A1074027
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	SGR5와 결합하는 Zinc-Finger Homeodomain단백질 연구를 통한 식물의 중력굴성
연구(3차년도)	
기 여 율	1/4
과제수행기관명	경상국립대학교
연구기간	2022.03.01 ~ 2023.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345350941
과제번호	2020R1A6A1A03044344
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축
연구과제명	(식물생명공학연구소)식물 신호 시스템 엔지니어링
기 여 율	1/4
과제수행기관명	경상국립대학교
연구기간	2022.03.01 ~ 2023.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395071851
과제번호	G24016235012022
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	바이오그린연계농생명혁신기술개발(R&D)
연구과제명	(RCMS)환경유해인자 감지 바이오센서 및 실용화(2차년도)
기 여 율	1/4
과제수행기관명	경상대학교
연구기간	2022.01.01 ~ 2022.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345354032
과제번호	2022R1I1A1A01064372
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축
연구과제명	농산물 잔류농약 탐지를 위한 나노기술 기반 CRISPR 활용 LFA 바이오센서개발 및 활
용	
기 여 율	1/4
과제수행기관명	경상국립대학교
연구기간	2022.06.01 ~ 2023.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호: 1의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 MalA1 앵타머를 티오플라빈-T(ThT) 염료와 결합시켜 형광을 발광시키고 말라티온 존재시 형광이 소광되는 무표지로 말라티온을 검출하는 앵타머 바이오 센서.

청구항 2

서열번호: 2의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 MalA2 앵타머를 티오플라빈-T(ThT) 염료와 결합시켜 형광을 발광시키고 말라티온 존재시 형광이 소광되는 무표지로 말라티온을 검출하는 앵타머 바이오 센서.

청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서, MalA1 앵타머 또는 MalA2 앵타머와 티오플라빈-T(ThT) 염료의 비율이 1:6 몰 비율임을 특징으로 하는 앵타머 바이오 센서.

청구항 4

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 MalA1 앵타머 또는 MalA2 앵타머는 나노 몰 범위(ptb)에서도 결합 친화도와 높은 민감도를 나타내고, ThT 형광 염료는 앵타머 서열 내의 구아닌-4중체(G4Q)와 결합하여 형광을 발광시키고 말라티온 존재시 형광이 소광됨을 특징으로 하는 앵타머 바이오 센서.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 유기인산염 독성 살충제 말라티온 검출용 신규 앵타머 바이오 센서에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 서열번호: 1의 뉴클레오타이드 서열을 지니는 MalA1 앵타머 또는 서열번호: 2의 뉴클레오타이드 서열을 지니는 MalA2 앵타머와 ThT 형광염료를 결합시켜 무표지로 말라티온을 검출하는 바이오센서에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 말라티온은 유기인산염 화합물질(OPC)이며 식품 품질, 인간 건강, 생물 다양성 및 환경에 악영향을 미치는 독성 오염 물질이다. 종종 OPC를 분석하는 데 사용되는 크로마토그래피 방법은 비용, 부동성, 노동력, 현장 진단 설정에 대한 부적합 등 여러 가지 단점이 있다. 따라서 신속하고 저렴한 식품 검사를 위한 구체적이고 민감한 진단 센서의 개발이 필수적이다.

[0005] 20세기는 인구 폭발로 인해 식량과 에너지에 대한 수요가 급격히 증가하였으며 이는 농작물과 동물을 보호하기 위해 독성 OPC의 사용을 요구 하였다. 결과적으로 OPC의 지속적인 소비는 식품, 토양, 물 및 환경의 오염을 증가시켰다. 이러한 오염은 농업 및 기타 인간 활동에 독성 OPC 살충제를 무차별적으로 사용하는 것에 주로 기인한다. 작물 보호에 사용되는 OPC는 음식이나 물을 통해 환경으로 빠르게 퍼질 수 있기 때문에 가장 해로운 신경 독성 화합물질이다.

[0007] OPC는 매우 위험한 유기 화학 물질 그룹으로 전 세계 살충제 소비량의 약 40%를 차지한다. 모든 OPC 중에서 말

라티온은 가장 많이 사용되는 살충제 중 하나이다. 이는 화학식 $C_{10}H_{19}O_6PS_2$, 분자량 330.36 Da의 인공적으로 합성한 저분자 살충제이다. 색깔은 황갈색이고 마늘 같은 냄새가 난다.

[0009] 말라티온은 일반적으로 농업 곤충과 공중 보건의 통제에 사용된다. 또한 저농도에서 머릿니를 치료하는 의약품으로 사용되었으며, 도입된 이레 액상, 가루, 건조 또는 습식 분말 및 에멀전의 다양한 제형이 상업적으로 이용되고 있다.

[0011] 말라티온의 작용 방식은 다른 OPC와 마찬가지로 곤충의 중추신경계를 방해하며 효소 아세틸콜린에스테라아제에 결합하여 그 활동을 차단한다. 결과적으로 이러한 효소는 신경 전달 물질인 아세틸콜린을 콜린과 아세트산으로 분해 시킬 수 없게 하여 콜린성 뉴런이 활성화 후 휴식 상태로 돌아갈 수 없게 한다. 따라서 신경 전달 물질 신호가 멈추지 않기 때문에 곤충이 수축하여 사망하게 된다. 또한 살충제로 인한 식품 오염은 신경 독성 및 발암 효과 가능성으로 인해 인간 건강에 중대한 영향을 미치게 된다.

[0013] 이러한 위험한 살충제의 과도한 사용은 식품을 포함한 토양, 물 및 천연 자원에 살충제를 퍼뜨린다. 결과적으로 이러한 화학 물질은 생체내에서 확산되어 인간을 포함한 모든 살아있는 유기체에 영향을 미치게 된다. 더욱이 말라티온과 같은 OPC의 흡수는 동물의 피부, 호흡기관, 폐, 섭취 및 위장관을 통해 상대적으로 빠르게 이루어진다. 인간이 말라티온과 접촉하면 즉각적인 메스꺼움, 두통, 가슴 답답함, 심한 경련, 졸음, 면역 반응 장애를 유발하거나 심지어 사망에 이를 수도 있다. 따라서 말라티온의 유해한 영향으로부터 보호하기 위해서는 조기 발견을 위한 고감도 분석법을 설계 및 개발하고 식품 및 물과 같은 천연 자원의 오염을 방지하는 것이 요구된다.

[0015] 식품, 물, 토양 및 환경에서 말라티온 잔류물을 검출하기 위해 일반적으로 사용되는 방법은 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 또는 가스 크로마토그래피(GC) 또는 질량 분석 기반 분석이다. 이러한 방법은 민감하고 신뢰할 수 있으나 비용, 복잡성, 경직성, 시간 소모 및 실시간 테스트 적용 어려움과 같은 중요한 단점이 존재한다. 따라서 새롭고 빠르고 강력하며 간단하고 저렴한 분석 센서를 개발하는 것이 필수적이다. 앵타머 기반 감지 분석은 앵타머 센서가 맞춤형하기 쉽고 합성 비용이 저렴하며 현장 진단 기술(POCT)로 개발될 수 있기 때문에 OPC 분석에서 매력적인 대체 접근 방식을 제공하는 것이다.

[0017] 앵타머는 짧은 ssDNA(또는 RNA) 올리고뉴클레오타이드이며 일반적으로 30~90개 염기로 구조 전환 능력을 지니며 타겟 분자에 결합할 가능성이 높다. 앵타머 기술은 1990년대에 개발되었다. 그 이후로 병원체 또는 단백질 검출을 포함하여 소분자에서 단일 세포에 이르기까지 다양한 타겟에 대해 다수의 앵타머가 보고되었다.

[0019] 앵타머는 지수적 농축에 의한 리간드의 체계적 진화(SELEX)라고 하는 시험관 내 선택 과정을 통해 선택된다. 앵타머는 생성 과정 중에서 저장이 쉽고 면역원성이 없으며, 항체와 같은 다른 분자인식 엘레먼트(MRE)에 비해 장점을 지닌다. 또한 인공 올리고 합성 플랫폼을 사용하여 합성을 완전히 자동화할 수 있다. 따라서 앵타머 기반 바이오센서는 식품 검사 및 생체 안전성 분석에 유리하다.

[0021] 따라서 본 발명은 친화성 크로마토그래피와 결합된 SELEX 공정을 사용하여 말라티온에 특정한 새로운 구조의 ssDNA 앵타머를 개발한 것이다. 또한 본 발명자들은 ssDNA 앵타머 서열에 ThT 형광염료 첨가시켜, ThT 형광염료가 ssDNA의 특수한 형태인 구아닌-4중체(G4Q)와 결합하여 형광을 발광시키고 말라티온 존재시에는 형광이 소광되는 2.01ppb의 높은 검출 한도를 지닌 말라티온의 무 표지 검출 방법을 개발함으로써 본 발명을 완성하게 된 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0023] 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 ssDNA 앵타머 서열에 ThT 형광염료 첨가시켜, ThT 형광염료가 ssDNA의 특수한 형태인 구아닌-4중체(G4Q)와 결합하여 형광을 발광시키고 말라티온 존재시에는 형광이 소광되는 2.01ppb의 높은 검출 한도를 지닌 말라티온의 무 표지 검출 방법을 개발코자 한 것이다.

과제의 해결 수단

- [0025] 본 발명은 서열번호: 1의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 MalA1 앵타머를 티오플라빈-T(ThT) 염료와 결합시켜 형광을 발광시키고 말라티온 존재시 형광이 소광되는 무표지로 말라티온을 검출하는 앵타머 바이오 센서를 제공하는 것이다.

- [0027] 또한 본 발명은 서열번호: 2의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 MalA2 앵타머를 티오플라빈-T(ThT) 염료와 결합시켜 형광을 발광시키고 말라티온 존재시 형광이 소광되는 무표지로 말라티온을 검출하는 앵타머 바이오 센서를 제공하는 것이다.

- [0029] 이때 MalA1 앵타머 또는 MalA2 앵타머와 티오플라빈-T(ThT) 염료의 비율이 1:6 몰 비율임을 특징으로 한다.

- [0031] 또한 상기 MalA1 앵타머 또는 MalA2 앵타머는 나노 몰 범위(ptb)에서도 결합 친화도와 높은 민감도를 나타내고, ThT 형광 염료는 앵타머 서열 내의 구아닌-4중체(G4Q)와 결합하여 형광을 발광시키고 말라티온 존재시 형광이 소광됨을 특징으로 한다.

발명의 효과

- [0033] 본 발명의 효과는 친화성 크로마토그래피와 결합된 SELEX 공정을 사용하여 말라티온에 특정한 새로운 구조의 ssDNA 앵타머를 제공하는 것이다. 또한 ssDNA 앵타머 서열에 ThT 형광염료 첨가시켜, ThT 형광염료가 ssDNA의 특수한 형태인 구아닌-4중체(G4Q)와 결합하여 형광을 발광시키고 말라티온 존재시에는 형광이 소광되는 2.01ppb의 높은 검출 한도를 지닌 말라티온의 무 표지 검출방법을 제공하는 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0035] 도 1은 구조 전환 ssDNA 앵타머를 위한 SELEX 프로세스 및 분석 설계를 나타낸 도면이다.

A는 약 10^{16} 개의 분자를 포함하는 ssDNA 라이브러리를 로드하는 구조 전환 종속 SELEX 프로세스의 도면이다. 그 후 라이브러리와 캡처 가닥(1:5)을 혼합하고 인큐베이션한 다음 컬럼에 로딩한다. ssDNA의 결합되지 않은 분획은 음의 선택 압력을 사용하여 세척되었다. 특정(양성) 타겟을 추가하고 결합된 ssDNA를 용리 단계로 채집하고 PCR 반응으로 증폭하고 클로닝 및 서열분석 하였다.

B는 Mfold 웹 서버(MalA1 및 MalA2)를 이용한 2차 구조 예측을 나타낸 도면이다.

C는 유기인계 살충제인 말라티온의 검출을 위한 형광 소광 및 검출 모델을 기반으로 한 분석 설계의 개략도이다. 이러한 분석에서 FAM-표지된 ssDNA 앵타머는 dabcy1-켄처를 운반하는 짧은 ssDNA에 의해 소광되었다. 구조 전환으로 인해 말라티온(타겟 분자)과의 상호작용 시 켄처가 방출된다. 켄처의 방출은 형광 신호를 수득한다.

D는 ThT 염료 변위에 기반한 라벨-프리 검출 모드의 그래픽 표현을 나타낸 도면이다. 유리된 형태의 ThT는 그 자체로 형광 신호를 생성하지 않는다. 그러나 G4Q라고 하는 특별한 형태의 ssDNA와 상호 작용한다. 이러한 인터칼레이션은 신호를 활성화하므로 이 전략은 타겟의 라벨-프리 검출을 위한 유용한 도구이다.

도 2는 AM 결합 MalA1 및 MalA2 앵타머 센서를 사용한 검출 한계의 감도 및 측정 분석을 나타낸 도면이다.

A: MalA1-FAM 소광, B: MalA2-FAM 소광, C: MalA1-FAM 센서 테스트, D: MalA2-FAM 센서 테스트, E: MalA1을 이용한 검출한계 계산 및 F: MalA2를 사용한 검출 한계의 계산을 나타낸다. 사용된 앵타머 농도는 50nM이었다.

도 3은 말라티온 검출을 위한 ThT 변위의 라벨-프리 전략을 나타낸 도면이다.

A: ThT 결합 및 형광 조명을 사용한 MalA1 앵타머의 해리 상수(Kd) 추정. B: MalA1 ThT 변위 에세이를 사용한 말라티온의 LOD 측정, C: MalA1 앵타머와 ThT 염료를 이용한 오이 채소 추출물의 말라티온 측정, D: MalA2 앵타머에 대한 해리 상수(Kd)의 추정, E: MalA2 ThT 변위 검정을 사용한 말라티온의 LOD 측정. F: MalA2 앵타머와 ThT 염료를 이용한 오이 채소 추출물의 말라티온 측정을 나타낸다. 앵타머:ThT의 비율은 μM 단위의 농도에서 1:6이었다.

도 4는 MalA1 및 MalA2의 3D 구조의 분자 모델링을 나타낸 도면이다.

A 및 B: 각각 MalA1 및 MalA2의 백본 RMSD의 그래프 표현, C 및 D: 20ns MD 시뮬레이션 후 수득된 MalA1 및 MalA2의 3차원 모델을 나타낸다

도 5는 MalA1 및 MalA2 앵타머와 도킹된 리간드의 예측된 분자간 상호작용 분석을 나타낸 도면이다.

MalA1; A: 선택된 모든 MalA1-리간드 복합체의 중첩, B에서 F까지: 각각 리간드 ThT, 말라티온, 파라티온, 페니트로티온 및 파라옥손의 분자간 상호작용을 나타낸다. MalA2; G: 선택된 모든 MalA1-리간드 복합체의 중첩, H 내지 L: 각각 리간드 ThT, 말라티온, 파라티온, 페니트로티온 및 파라옥손의 분자간 상호작용을 나타낸다.

MalA1 및 MalA2의 백본은 회색 색상의 튜브 표현으로 나타나는 반면에 상호 작용하는 뉴클레오타이드는 회색 색상 막대로 나타내었다. 리간드는 다른 색상 막대 표현으로 나타내었다. 기존의 수소결합은 녹색 점선, 탄소-수소 결합은 연한 녹색 점선, 정전기적 상호작용, 파이-파이 상호작용은 각각 오렌지색 점선과 분홍색 점선으로 나타내었다.

도 6은 CD(원편광 이색성) 분광법을 기반으로 분석된 새로운 G4Q 앵타머의 구조적 변화 및 구조 전환 메커니즘을 나타낸 도면이다.

A: 말라티온 단독의 CD 스펙트럼, B: ThT 염료 단독의 CD 스펙트럼, C: MalA1 단독, 말라티온을 포함하는 MalA1, ThT를 포함하는 MalA1 및 말라티온 및 ThT를 포함하는 MalA1의 CD 스펙트럼, D: MalA1 단독, 말라티온이 있는 MalA1, ThT가 있는 MalA1 및 말라티온과 ThT가 있는 MalA1의 CD 스펙트럼을 나타낸다. CD 분석에 사용된 농도는 다음과 같다: $15\mu\text{M}$, $50\mu\text{M}$ 말라티온 및 $15\mu\text{M}$ ThT에서 MalA1 및 MalA2.

도 7은 새로운 ssDNA 앵타머의 타겟 인식 가능성 평가를 나타낸 도면이다.

A: MalA1-FAM 센서의 인식 특이성, B: MalA2-FAM 센서의 인식 특이성 및 C: 유기인계 화학 살충제, 말라티온, 파라티온, 페니트로티온 및 파라옥손의 분자 구조를 나타낸다.

도 8은 실제 식물성 식품 샘플(오이 및 배추)에서 말라티온 분석을 위한 새로운 바이오센서 MalA2의 최적화를 나타낸 도면이다.

A: 오이추출물, B: 배추 추출물. 각각의 야채 추출물의 서로 다른 희석액에서 $1\mu\text{M}$ MalA2: $6\mu\text{M}$ 의 ThT를 사용하는 라벨-프리 말라티온 검출 에세이를 나타낸다. 각각의 컬럼은 다음을 나타낸다. 컬럼 1은 1x ThT 버퍼 만의 형광 신호이다. 컬럼 2는 $6\mu\text{M}$ ThT 단독의 신호이다. 컬럼 3은 $1\mu\text{M}$ MalA2 앵타머 단독의 신호이다. 컬럼 4는 1x 야채 추출물에서 비율 1:6의 복합 S:ThT의 신호이다.

컬럼 5는 10x 야채 추출물 내에서 비율 1:6의 복합 센서:ThT의 신호이다. 컬럼 6은 100x 야채 추출물 내에서 비율 1:6의 복합 센서:ThT의 신호이다. 컬럼 7은 1000x 야채 추출물에서 비율 1:6의 복합 센서:ThT의 신호이다. 컬럼 8은 스파이크된 ThT 버퍼(양성 대조군)에서 비율 1:6의 복합 센서:ThT의 신호이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

1. SELEX 공정을 이용한 후보 앵타머 선정 및 말라티온 검출 설계

말라티온에 대해 매우 선택적이고 민감한 앵타머를 확인하기 위해 총 18회에 걸친 SELEX 공정을 수행하였다(도

면 1A). 첫 번째 라운드에서는 초기 라이브러리의 500 pmole을 스트랩트아비딘 수지 컬럼에 적용했으며 100 μ M 말라티온을 13번째 라운드까지 양성 선택으로 사용하였다(표 S1). 파라티온, 파라옥손 및 페니트로티온(각각 1 μ M)의 음성 선택은 10번째부터 최종 라운드까지 추가되었다. 14번째 라운드부터 1 μ M의 말라티온이 사용되었다(표 S1). 각각의 라운드 후에 수득된 용출된 ssDNA 프로파일을 PCR을 사용하여 증폭하고 아가로스 겔 전기영동으로 분리하였다. 라운드 후 13, 15 및 18에서 선택된 ssDNA는 단편을 클로닝하는 데 사용되었으며 이 중 24개의 무작위 클론이 시퀀싱을 위해 선택되었다. 선택된 클론 중 18, 15 및 12개 그룹이 서열 분석 결과로 밝혀졌다(표 S2, S3 및 S4).

[0040] 13 라운드 이후의 DNA 시퀀싱 데이터는 모든 선택된 후보들 사이에서 높은 서열 유사성을 나타내었다. 'TTT'와 'GGG' 염기서열의 짧은 반복은 14개 클론, 즉 58%에서 관찰되었다. 이러한 시퀀스 중 18-mer 길이의 'ATGATCTTTAGTCAAAGGTGT'는 시퀀스 후보의 25%를 차지하는 6개의 클론에서 관찰되었다(표 S1). 그룹화된 서열의 수는 이전 시퀀싱 라운드의 그룹 수와 비교하여 15번째 라운드 이후에 감소하였다. 그러나 특정 시퀀스의 카피 수는 매 라운드마다 증가하였다. 이것은 SELEX 프로세스가 적절한 ssDNA 앵타머의 식별에 성공적이고 효과적이라는 것을 나타낸다(도면 S1). 서열은 많은 유사한 특징을 지니고 있으며 일부는 몇 개의 뉴클레오타이드의 차이만 존재한다. 이들 염기서열의 공통적인 특징 중 하나는 4개 뉴클레오타이드의 짧은 영역인 'GGGA'가 14개 염기서열에서 관찰되어 58%를 차지한다는 것이다. 따라서 15라운드 이후의 시퀀싱 데이터에서 놀랍게도 총 12개의 하위 그룹이 발견되었다. 이러한 그룹은 3 개의 큰 클러스터로 다시 그룹화 될 수 있다.

[0042] 첫 번째 클러스터는 8개의 서열을 지니고 있었으며 3개의 뉴클레오타이드 차이만 있었고 그 유사도는 91%였다. 두 번째 그룹에는 7개의 서열을 지닌다. 이들 서열은 '다섯개' 뉴클레오타이드(TTGCA)로 구성된 상동성 모티프를 공유하였다. 그룹의 상동성 수준은 13.88%이다. 다른 그룹은 많은 짧은 유사성을 지닌다: 그들은 각각의 서열을 간접하였다(표 S2-S4). 카피 수가 가장 많은(10, 9, 9, 9) 4개의 후보 앵타머가 추가 분석을 위해 선택되고 MalA1, MalA2, MalA3 및 MalA4로 명명되었다(표 S5, 도면 1B 및 도면 S2).

[0044] 이들 앵타머의 2차 구조는 Mfold 웹서버를 이용하여 예측하였으며 온도와 염농도(Mg^{2+} , Na^{+} 등)와 같은 조건은 SELEX 공정과 동일하였다.

[0046] 또한 후보 앵타머 센서의 예상 깃스 자유 에너지 상태는 -9.07(MalA1), -8.95(MalA2), -8.48(MalA3) 및 -10.66 kcal/mol(MalA4)이었다(도면 S2). MalA1 및 MalA2의 앵타머 서열(도면 1B)은 형광 라벨링(도면 1C) 및 라벨-프리 검출(도면 1D)에 채택되었다.

[0048] 2. 6-FAM 결합을 이용한 새로운 앵타머 센서의 민감도 분석

[0049]

[0050] 신호 생성 전략으로서 모든 후보 앵타머는 5'-말단에서 형광단, 6-플루오레세인(6-FAM)과의 공유 접합을 사용하여 우선 합성되었다. 말라티온을 검출하기 위해, 앵타머에 결합하고 형광을 켜는 13-머 dabcy1 켄처를 사용하여 형광 소광 분석을 설계하였다(도면 1B-C). 그러나 말라티온의 존재 하에서 앵타머는 구조를 변화시키고 살충제에 결합하며 형태의 변화는 형광을 회복하는 데 도움이 된다(도면 1C). 형광의 손실과 증가는 앵타머의 결합 친화도, 특이성 및 민감도를 측정하는 데 사용되었다.

[0052] 이러한 전략을 사용하여 모든 6-FAM 변형 앵타머 센서 MalA1, MalA2, MalA3 및 MalA4에 대해 13-머 dabcy1 켄처로 켄칭 분석을 수행하였다(도면 S3). 켄칭 분석 결과, MalA1-FAM 및 MalA2-FAM 앵타센서는 센서와 켄처의 비율이 1:5일 때 뛰어난 켄칭 효율(80% 이상)을 나타내었다(도면 2). MalA3 및 MalA4는 말라티온에 특이적이지만 충분한 켄칭 효율을 나타내지 못하여(수율 80% 미만) 추가 분석에 사용되지 않았다.

- [0054] 이러한 켄칭 분석을 기반으로 각각 MalA1 및 MalA2에 대한 결합 친화도(K_d)인 28.5nM의 $K_{d,eff1}(R^2 = 0.9485)$ 및 37.40nM의 $K_{d,eff1}(R^2 = 0.9931)$ 을 계산하였다(도면 2A-B). 말라티온 검출을 위해 센서-켄처 복합체(SQ)의 고정 농도, 즉 1:5 비율이 사용되었다. 이는 센서 50nM 대 켄처 250nM에 상응하며(비율은 도면 2A 및 B에서 과생됨) 다양한 농도의 말라티온이 추가되었다. 말라티온과 함께 SQ 복합체를 배양한 후, 결과적으로 켄처가 SQ 복합체에서 방출되었다. 그 후 두 앵타머 모두에 대해서 형광 증가를 측정하였다.
- [0056] 이러한 데이터를 사용하여 두 번째 해리 상수를 계산하였다. MalA1-FAM 및 MalA2-FAM 센서에 대해 각각 $K_{d,eff2} = 4.61(R^2 = 0.9499)$ 및 $K_{d,eff2} = 2.057(R^2 = 0.97)$ 이었다(도면 2C 및 D). $K_{d,eff2}$ 는 단위가 없는 양이다. 최종 K_d 는 $K_{d,eff1}$ 및 $K_{d,eff2}$ 를 사용하여 도출되었다. MalA1-FAM 및 MalA2-FAM 센서에 대해 각각 6.18nM 및 18.18nM의 계산된 K_d 가 발견되었다(도면 2E 및 F). 또한 Armbruster 및 Pry(2008)에 개시된 방법을 사용하여 이러한 6-FAM 센서에 대한 검출 한계(LOD)를 측정하였다. MalA1-FAM 및 MalA2-FAM의 LOD는 각각 1.0 μ M 및 0.25 μ M이다.
- [0058] 3. 말라티온에 대한 ThT 기반 라벨-프리 에세이 개발
- [0060] ThT 염료 변위 접근법을 사용하여 새로운 라벨-프리 분석법을 개발하기 위해서 모든 후보 앵타머는 말단 8 개의 클레오타이드가 5' 말단에서, 3개 클레오타이드가 3' 말단에서 삭제됨으로써 변형되었다. 변형된 앵타머는 줄기가 더 짧았으며 MalA-T 센서로 명명되었다(표 S6, 도면 1B 및 도면 S2). 다음으로 ThT 염료에 대한 이러한 센서의 결합 가능성을 평가하였다. 자유 형태의 ThT 염료 또는 앵타머는 형광 신호를 거의 생성하지 않는다. ThT 염료의 특징은 G4Q와 같은 독특한 구조를 형성하는 앵타머와 결합하면 형광이 커진다는 점이다.
- [0062] 말라티온과 같은 타겟 분자가 존재하면 앵타머에서 ThT 염료가 방출되며 형광이 감소하게 된다(도면 1D). 본 발명자들의 분석에 따르면 4개의 후보 앵타머 중 두 개의 앵타머 센서(MalA1 및 MalA2)만이 ThT 염료와 효율적인 결합 상호 작용을 나타내었다(도면 S4). 그러나 앵타머 센서와 성공적으로 상호 작용하면 앵타머-ThT 복합체를 형성하여 상당히 높은 형광 신호를 생성한다. 본 발명자들은 본 발명에서 ThT 염료가 앵타머에 결합할 때 형광이 10배 이상 증가하는 것을 관찰하였다. 이러한 앵타머 센서의 최대 신호는 앵타머 대 ThT 염료의 1:6 비율에서 관찰되었다(도면 S5). 이러한 신호 강화는 이들 앵타머 센서가 G4Q 구조를 형성할 수 있음을 확인하였다.
- [0064] G4Q는 ThT 염료와 강력하게 상호 작용하는 것으로 알려져 있으며 라벨-프리 센서를 개발하는 데 성공적으로 사용되었다. 또한 'G4Hunter' 소프트웨어를 사용하여 G4Q 구조를 형성하는 앵타머의 능력을 검증하였다. 그러나 'G4Hunter' 프로그램을 기반으로, MalA1 앵타머만이 G4Q 구조를 생성하였으며 MalA2는 생성하지 못 하였다.(도면 S6). G4Hunter 프로그램은 MalA2 앵타머에서 G4Q 구조를 예측하는 데 실패하였으나 ThT 염료 치환 분석에서는 매우 잘 수행되었다. ThT 염료를 사용한 예비 스크리닝을 기반으로 추가의 라벨-프리 분석을 위해 MalA1 및 MalA2 앵타머 센서가 선택되었다. 결과는 MalA1 센서가 말라티온에 대해 매우 민감하고 33.59nM의 K_d 를 생성함을 나타내었다(도 3A).
- [0066] 반대로 MalA2 센서는 감도가 낮으며 K_d 값이 22.56nM으로 약간 더 우수하였다(도면 3B). 이들 센서의 측정된 LOD는 각각 7.5nM 및 9.2nM인 것으로 나타났다(도 3C 및 D). ThT 염료 변위는 6-FAM 라벨링-기반 형광 분석에 비해 더 나은 LOD를 생성하였다. 이는 6-FAM 라벨링의 경우, 앵타머의 공유 변형이 말라티온에 대한 결합 잠재력을 방해할 수 있는 것과 같이 에세이 디자인의 특정 차이에 기인할 수 있다.
- [0068] ThT 염료 변위 분석은 이러한 앵타머의 공유 변형을 포함하지 않는 반면에 결과적으로 앵타머의 기본 구조는 교란되지 않으며 앵타머는 ThT 염료 또는 말라티온에 대한 높은 결합 친화력을 유지한다. 따라서 매우 높은 감도

를 달성할 수 있다. 또한 이러한 센서는 식물성 조직 추출물에서 말라티온을 검출하는 데 성공적으로 사용되었다(도면 3E 및 F).

[0070] 4. MalA1 및 MalA2 앵타머의 분자 모델링

[0072] 2D 구조를 생성하기 위해 MalA1 및 MalA2의 단일 가닥 서열을 Mfold에 제출하였다(도면 1B 및 도면 S6). 서버는 쿼리 서열과 다양한 통계 파라미터 모두에 대해 가능한 형태를 예측한다. 상세한 시각화 후 가장 낮은 결합 자유 에너지 값을 기준으로 최상의 형태를 선택하였다(표 S6). 그런 다음 동등한 3D ssRNA 구조를 생성하기 위해 선택된 형태의 점-광호 확인을 RNAComposer에 제출하였다. 그 후 생성된 구조를 DS로 가져오고 "Build and Edit Nucleic Acid" 모듈을 사용하여 3D ssDNA로 변환하였다. 마지막으로 MalA1 및 MalA2 모두에 대해 생성된 ssDNA 모델의 검증이 MD 시뮬레이션을 사용하여 수행되었다.

[0074] MalA1 및 MalA2 앵타머에 대한 안정적인 분자 3배체 모델을 획득하기 위해 20ns 시뮬레이션을 수행하였다(도면 4). 시뮬레이션 실행 동안 3D 구조의 안정성을 확인하기 위해 두 구조의 기하학적 특징 루트 평균 제곱 편차(RMSD) 플롯이 사용되었다. MalA1의 백본 RMSD 플롯은 구조가 15ns까지 변동하였으나 그 이후에는 안정되었음을 나타낸다(도면 4A). MalA2는 5ns의 시뮬레이션 후 안정화 되었으나 유의미한 변동은 관찰되지 않았다(도면 4B). 결과적으로 MalA1과 MalA2의 궁극적인 3D 구조는 마지막 5ns의 안정적인 시뮬레이션 궤적에서 검색되었다(도면 4C-D).

[0076] 5. 분자 도킹을 이용한 말라티온 결합 포켓 탐색

[0078] 앵타머 MalA1 및 MalA2를 사용한 선택된 리간드의 도킹 연구는 PatchDock 웹서버 및 AutoDock 프로그램을 사용하여 수행되었다(도면 5). 결합 부위에 대한 정보가 부족했기 때문에, 도킹 실험 중에 가장 가능성이 높은 앵타머 결합 부위를 찾기 위해 모든 리간드는 2 개의 앵타머와 자유롭게 상호 작용하도록 허용되었다. 앵타머와 그 타겟의 결합 부위를 예측하기 위해 이전 연구와 유사한 접근법이 채택되었다.

표 1

MalA1과 도킹된 리간드 간의 분자 상호작용					
시리얼 번호	PatchDock 스코어	수소결합 상호작용	정전기적 상호작용	C-H 결합	$\pi-\pi$ T-형/ π -알킬 상호작용
티오퍼라민 T 말라티온	4016 3804	- C14:O3' - MAL:S2	- T15:O1P - MAL:P3	C14:O2 - ThT:C20 C14:H4' - MAL:O8 C14:H4' - MAL:O8 C22:H5'1 - MAL:O5	C14 - ThT C22 - MAL:C16
파라티온	3546	A17:H61 - PT:O6	G16 - PT:O6 G16:O1P - PT:N8	T21:H5'1 - PT:O7 A20:H1' - PT:O7	A12 - PT:C17 A20 - PT T21 - PT:C17 C22 - PT:C17
페니트로티온	3412	A17:H61 - FEN:O7 T21:O3' - FEN:S1	G16:O1P - FEN:N8 A17 - FEN:O6	C14:H4' - FEN:O3 C22:O4' - FEN:C16	A17 - FEN:C15
파라옥손	3374	A17:H61 - FEN:O6	G16:O1P - FEN:N8	T15:H4' - FEN:O7 T15:H5'1 - FEN:O7 T21:O2 - FEN:C11	A12 - FEN:C18 A20 - FEN

[0080]

[0082] 두 프로그램의 도킹 솔루션은 생성된 이형태체의 클러스터링을 기반으로 분석되었다. 클러스터링 분석 결과 PatchDock의 경우 모든 리간드 중에서 2개 이상의 도킹 부위가 가능할 수 있음이 밝혀졌다. 그러나 AutoDock 결과는 2개의 가능한 결합 부위를 예측하였다(도면 S7, 참조 화합물 ThT에 대한 데이터만 표시됨). 예상되는 2개의 가능한 결합 부위를 추가로 분석하고 클러스터 크기가 가장 크고 도킹 점수가 가장 높은 결합 부위를 가장 적합한 결합 부위로 선택하였다(도면 S8-S9). 흥미롭게도 동일한 결합 포켓을 예측하는 두 개의 상이한 프로그램에서 가장 많이 채워진 클러스터가 최종 결합 부위를 선택하는 데 도움이 되는 것을 관찰하였다.

[0084] PatchDock 결과에서 각 앵타머-리간드 복합체의 최상의 포즈는 복합체의 결합 모드에 대한 세부 정보를 얻기 위해 중첩되었으며, MalA1과 도킹된 모든 리간드가 유사한 결합 모드를 따르는 것으로 관찰되었다(도면 5). 표 1은 ThT가 다른 리간드보다 더 높은 도킹 점수를 나타냄을 시사한다. 그 다음으로 말라티온, 파라티온, 페니트로티온, 파라옥손 순이었다. 상세한 분자 상호작용 분석은 ThT가 MalA1의 염기 C14와 탄소-수소(C-H) 결합 및 파이-파이 상호작용을 형성한다는 것을 나타내었다(도 5B). 흥미롭게도 말라티온, 파라티온, 페니트로티온 및 파라옥손은 MalA1의 C14, T15, C22, A20, A21, C22와 T15, G16, A17 및 C-H 결합 및 수소 결합(H-결합) 상호작용을 형성하였다.

[0086] 또한 이러한 리간드의 상호작용은 A12, A17, A20, T21 및 C22와의 파이-파이 T형 알킬 상호작용에 의해 강화되었다(표 1; 도면 5C-F). G4Q 구조에 대해 예측된 3D 시뮬레이션 모델은 없었으나 X선 결정학을 통해 수득된 3D 구조가 거의 없다는 것을 발견하였다(도면 S10A-B, 출처: PDB 데이터베이스, PDB ID: 5CMX 4중체 DNA 앵타머 및 PDB ID: 7BQ3, DNA 앵타머). 이러한 구조를 3D 시뮬레이션 된 MalA1 및 MalA2 ssDNA 앵타머 모델과 비교하였다(도면 S10C-D). 실험 분석과 컴퓨터 시뮬레이션 구조의 접근 방식이 상이하기 때문에 이러한 구조 간에는 최소한의 유사성이 존재한다.

[0088] 그러나 3D에서 G4Q와 같은 구조에 대한 아이디어를 얻기 위해서는 이러한 PDB 모델이 유용하고 밀접하게 관련되어 있다. 관찰은 PDB에서 G4-4중체의 위치를 나타낸다(삽도 참조). 유사하게 MalA1 및 MalA2 앵타머의 경우 전형적인 패턴이 나타났으며 이는 MalA1 및 MalA2 모델에서 G4Q 형성의 가능한 위치를 나타낸다(도면 S10C-D).

[0090] PatchDock 결과에서 각 MalA2-리간드 복합체의 최상의 포즈 중첩은 모든 도킹된 리간드가 유사한 결합 모드를 따른다는 것을 나타낸다(도 5G). 또한 선택된 도킹 형태는 말라티온이 가장 높은 도킹 점수를 나타냈으며 ThT, 파라티온, 페니트로티온 및 파라옥손이 그 뒤를 따름을 나타낸다(표 2). 상세한 분자 상호작용 분석은 ThT가 MalA2의 T31, G45, A32 및 G6과 각각 정전기적 상호작용, C-H 결합 및 파이-파이 상호작용을 형성함을 나타내었다(도 5H). 말라티온, 파라티온 및 페니트로티온은 뉴클레오타이드 T43과 H-결합 상호작용을 형성하는 반면에 파라옥손은 G3과 H-결합 상호작용을 형성한다(도면 5I-L).

[0092] 모든 리간드는 T31과 정전기적 상호작용을 나타내었다; 또한 말라티온은 A32와 정전기적 상호작용을 나타내었으며 파라티온, 파라옥손 및 페니트로티온은 G45와 상호작용을 나타내었다. 또한 이러한 리간드에서 다양한 C-H 결합 및 파이-파이 T-형 알킬 상호작용이 관찰되었다(표 2 및 도 5I-L).

표 2

MalA2와 도킹된 리간드 간의 분자 반응					
시리얼 번호	PatchDock 스코어	수소결합 상호작용	전기적 상호작용	C-H 결합	파이-파이 상호작용
티오폴라빈 T	4088	-	T31:O1P - ThT:N2 G45:O1P - ThT:N2	A32:O2P - ThT:C20	G6 - ThT
말라티온	4124	T43:O2 - MAL:S2 T43:O4 - MAL:S2	T31:O1P - MAL:P3 A32:O2P - MAL:P3	A4:N3 - MAL:C15 A4:C2 - MAL:O9 C5:O2 - MAL:C18 T31:O1P - MAL:C19 A32:O2P - MAL:C19 C44:O2 - MAL:C15	A4 - MAL:C17
파라티온	3418	T43:O2 - PT:S1	T31:O1P - PT:P2 G45:O1P - PT:N8	C5:HI' - PT:O3 T31:O1P - PT:C11	A4 - PO
파라옥손	3344	G3:H22 - PO:O6	T31:O1P - PO:P1 G45:O1P - PO:N8	C5:O2 - PO:C10 A4:H4' - PO:O7 A4:HI' - PO:O7 T43:HI' - PO:O5	A4 - PO G6 - PO:C17 G6 - PO:C17
페니트로티온	3214	T43:O2 - FEN:S1	T31:O1P - FEN:P2 G45:O1P - FEN:N8	C5:HI' - FEN:O3 G45:H4' - FEN:O7 T31:O1P - FEN:C16	A4 - FEN:C15 A4 - FEN:C15

[0096] 6. 앵타머 구조의 구조적 변화를 이용한 특이적 결합 상호작용 분석

- [0098] 원편광 이색성(CD) 분광법을 이용한 생물물리학적 분석은 앵타머와 타겟 분자의 특이적 결합 상호작용을 밝힐 수 있다. CD는 핵산 및 단백질 나선의 2차 형태의 구조적 변화를 추적하기 위해 가장 일반적으로 사용되는 생물물리학적 기술이다(참조). 앵타머는 원형 편광이 타겟 분자와 특정 방식으로 상호작용한 후 스펙트럼의 변화를 산출할 수 있다. 또한 구아닌 잔기 함량이 높은 앵타머는 CD 분석에서 강력한 스펙트럼 이동을 생성한다. 따라서 이들은 G4Q 분석에 쉽게 적용할 수 있다. G4Hunter 프로그램(도 S6)을 사용한 예측과 앵타머와 ThT 염료(G4Q 결합 분자)의 상호작용에 대한 생물물리학적 연구 후, 본 발명자들은 CD 분석을 사용하여 말라티온과 상호작용할 때 MalA1 및 MalA2 앵타머의 구조적 변화를 탐구하였다.
- [0099]
- [0100] 이전에 본 발명자들의 최근 연구는 CD 분광법이 ThT 및 피프로닐과 같은 작은 분자의 앵타머-특이적 결합 상호작용을 밝히는 데 유용한 도구임을 입증하였다. 그러나 스펙트럼 특성은 ssDNA 앵타머의 구성 및 구조에 따라 다양했다. G4Q는 ssDNA 앵타머의 평행 또는 역평행 방향에 기반한 고유한 특성 피크를 나타낸다. 본 발명자들은 연구된 두 앵타머의 CD 스펙트럼이 표준 G4Q 또는 B-DNA 2차 구조에서 변동한다는 것을 발견하였다.
- [0101]
- [0102] 우선, ThT 염료 및 말라티온 살충제와 같은 대조군 시약의 CD 스펙트럼을 수득한다(도면 6A-B). 다음으로, MalA1과 MalA2의 스펙트럼이 생성되었으며 이들은 독특한 2차 구조를 생성하였다. 두 앵타머 모두 평행 및 역평행 G4Q 접합의 혼합 스펙트럼 특징을 나타냈기 때문이다(도면 6C-D).
- [0104] 또한 스펙트럼 특성에 대한 ThT 및 말라티온 결합의 결과를 조사하였다. 각각의 앵타머와 함께 인큐베이션 시, 두 분자 모두 앵타머와 명확하게 상호작용하며 강력한 형태 변화를 생성하였다(도면 6C-D). 그것은 이러한 앵타머들이 ThT 염료를 사용하여 라벨-프리 검출 및 정량화를 개발하기 위한 전체 조건인 G4Q 유사 구조를 형성했음을 나타낸다.
- [0106] 7. 6-FAM 및 ThT 센서를 이용한 새로운 앵타머 센서의 특이성 테스트
- [0108] 이상적인 바이오센서의 주요 특징은 유사하게 보이는 화학 물질의 혼합물에서 특정 타겟 분자를 식별하는 능력이다. 따라서 본 발명자들은 특정 타겟 인식 가능성을 증명하기 위해 새로운 앵타머 센서 MalA1 및 A2를 적용하였다. 본 발명은 FAM 센서(도면 7A-B)와 ThT 염료 치환 분석(도면 S11A-B)을 사용하여 음성 타겟 살충제인 파라티온, 페니트로티온 및 파라옥손과의 비특이적 상호작용을 측정하였다. 음성 타겟 중은 말라티온과 밀접한 관련이 있는 분자 특징을 지니고 있다(도면 7C).
- [0110] 결과는 시험된 모든 앵타머가 말라티온에 대한 매우 높은 특이성을 나타내고 유사하게 보이는 비-타겟 화학물질에 대한 최소한의 결합을 나타냄을 시사한다. 현장 조건에서 살충제를 검출하기 위한 센서의 성공적인 배치를 위해서는 주어진 분자에 대해 명확해야 한다. 따라서 이는 MalA1 및 A2 센서의 특이성 잠재력을 입증하였다. MalA2 센서는 모든 음성 타겟에 대해 더 높은 선택성을 나타내었으며(도 7 및 S11) 비특이적 타겟에는 결합하지 않았다.
- [0112] 8. 새로운 MalA2-ThT 센서를 사용한 실제 샘플 분석
- [0114] 앵타머 센서의 식별 및 설계 후 야채 추출물을 사용하여 실제 식품에서 말라티온을 검출하기 위한 MalA2-ThT 센서의 타당성을 시험하였다. 결과는 오이와 배추의 야채 추출물에서 양성 타겟의 선택적 분석과 말라티온의 정확한 정량화를 위한 이 센서의 적용 가능성을 입증하였다(도면 8A-B). 야채 추출물에 10nM(2.686ppb) 말라티온 용액을 첨가하였다.

- [0116] 더 높은 농도의 말라티온을 샘플에 첨가함에 따라 형광 강도는 비례적으로 감소하였으며 에세이 내에서 말라티온에 의한 ThT 염료의 직접적인 대체를 나타낸다. 식물 색소는 자가 형광을 생성하는 것으로 알려져 있다. 식물 조직 추출물은 분석에 대한 자가형광 효과를 최소화하기 위해 희석되었으며 희석된 샘플은 상대적으로 더 잘 수행되었다(도 S13).
- [0118] 대조적으로 음성 타겟을 사용한 대조군 실험은 (더 높은 농도에서도) 형광을 감소시키는 데 실패하였다. 이는 음성 타겟이 ThT 염료를 변위시킬 수 없음을 나타내었다. 따라서 비특이적 상호 작용으로 인해 센서에서 구조적 전환이 발생하지 않았다. 이러한 특정 ThT 염료 변위는 정량화 곡선을 플롯하는 데 유용하였다. 즉 에세이는 말라티온에 대해 정확했으며 음성 타겟과 앵타머 센서가 있는 ThT 염료 간에 경쟁이 없었다. 또한 라벨-프리 검출 분석을 수행하는 데 필요한 비용과 시간의 비교는 표준 HPLC 방법보다 상대적으로 훨씬 작았다.
- [0120] 다양한 규제 기관에서는 다양한 식품 및 채소에 최대 허용 잔류물 수준을 0.2ppm-8ppm으로 설정하였다. 현재 센서는 2.01ppb의 LOD를 표시하여 말라티온에 의한 식품 오염을 평가하기 위한 실제 적용에 배치될 가능성을 시사한다. 전반적으로 분석 결과 MalA2가 말라티온 검출을 위한 정밀하고 초민감도 센서임을 입증하였다.
- [0122] SELEX 프로세스의 18라운드 후에 4개의 후보 앵타머가 식별되었다. 식품에서 말라티온을 검출하기 위해 형광 라벨링(6-FAM 접합)과 라벨-프리 검출(ThT 변위)라는 두 가지 독립적인 접근법을 설계하고 개발하였다. 또한 다른 비특이적 OPC와의 상호 작용을 연구하여 말라티온에 대한 이러한 센서의 민감도와 특이성을 평가하였다. 또한 CD 분광법의 생물물리학적 방법과 컴퓨터 시뮬레이션을 사용하여 앵타머-리간드 상호작용 및 구조적 특징을 해명하였다.
- [0124] 또한 MalA1 및 MalA2 앵타머는 ThT에 대해 높은 친화도를 나타내었으며 강한 형광 신호를 생성하였다. MalA1은 'GGGG' 풍부한 서열을 가지고 있으나 두 앵타머 모두 아마도 G4Q 유사 구조의 형성을 통해 ThT 염료와 상호작용하는 것으로 나타났다. 또한 MalA2 앵타머는 말라티온에 대한 더 나은 친화도 및 음성 타겟과의 낮은 교차 반응성을 나타내었다. 야채 샘플에서 말라티온 검출을 위해 높은 감도와 선택성을 지닌 G4Q 유사 앵타머 센서를 시연한 첫 번째 리포트이다.
- [0126] 라벨 프리 앵타머 센서는 실제 식물성 식품 샘플에서 말라티온과 같은 OPC를 신속하고 저렴하며 매우 민감하고 특이적으로 검출할 수 있다. 궁극적으로 앵타머 기술은 식품, 물, 천연 자원 및 환경에서 독성 OPC의 오염을 포함할 수도 있다.
- [0128] 이하 실시예를 통해서 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.
- [0130] (실시예 1) ssDNA 라이브러리 및 화학 시약
- [0132] 말라티온-특이적 앵타머 서열의 식별 및 선택을 위해 Nakatsuka 등에 의해 보고된 ssDNA 라이브러리를 사용하였다. ssDNA 라이브러리는 COSMO Tech Company(대한민국 서울)에서 화학적으로 합성되고 구입하였다. 소분자 OPC인 말라티온, 파라옥손, 파라티온 및 페니트로티온은 Kemidas Company(대한민국 경기도 수원시)로부터 구입하였다. Tris-HCl, HCl, NaOH, NaCl, KCl, HEPES, TBE, TAE, MgCl₂, ThT 및 아가로스 분말을 포함하는 다른 분자 생물학 등급 화학 물질은 Sigma-Aldrich Co, Ltd(대한민국 서울)로부터 입수하였다.

[0134] (실시예 2) SELEX 프로세스 중에 사용되는 스톱 솔루션 및 버퍼

[0136] SELEX 버퍼(SB; 20mM HEPES, 1mM NaCl, 10mM MgCl₂, 5mM KCl 및 pH 7.5)는 SELEX 프로세스 동안 앵타머를 선택하고 확인하는 데 사용되었다. PCR 증폭 후 dsDNA 가닥을 ssDNA로 분리하기 위해 분리 버퍼(SEPB; 20mM HEPES, 300mM NaCl, pH 7.5)를 사용하였다. ThT 염료를 사용한 라벨-프리 검출을 수행하기 위해 ThT 버퍼(ThTB; 10mM Tris-HCl, 10mM NaCl 및 pH 7.5)를 사용하였다. 모든 살충제를 1mL의 아세톤에 용해하여 저장 용액을 만들고 수정 완충액으로 희석하여 ppm 또는 몰농도의 원하는 농도인 작업 용액을 수득하였다(표 S10).

[0138] (실시예 3) PCR 조건

[0140] 각 라운드 후에 식별된 앵타머 서열의 프로필을 확인하기 위해 소규모 PCR을 사용하였다. PCR은 5 µL의 10x PCR 완충액, 1 µL의 dNTP 혼합물(10mM), 5 µL의 각 프라이머(4pmol/µL), 31.25 µL의 뉴클레아제가 없는 물, 0.25 µL의 Taq 중합효소(5U/µL), 2.5 µL의 용출/수집된 분획의 DNA 템플릿 용액으로 구성되었다. DNA 증폭을 위한 PCR 프로그램은 95°C에서 2분간의 1주기, [92°C에서 15초; 59°C에서 30초; 및 72°C에서 45초]의 N 주기, 72°C에서 2분간의 1주기로 구성되었다. 일반적으로 N = 10주기를 사용하였다. 그러나 PCR 수율 및 요구 사항에 따라 주기 수를 조정할 수 있다. PCR 산물의 품질을 확인하기 위해 3% 아가로스 겔에서 25-30분 동안 100 V에서 전기영동을 수행하였다. 겔 염색은 브로마인화 에티듐(EtBr)로 수행하였으며 ChemiDoc MP 이미지 시스템을 사용하여 이미지를 기록하였다.

[0142] (실시예 4) 새로운 라이브러리 준비 및 강화

[0144] SELEX 프로세스의 다음 라운드를 위한 새 라이브러리를 준비하기 위해 대규모 PCR(1mL)을 사용하였다. 비오틀화된 역방 프라이머를 이 단계에 추가하였다. 각각 10 µL PCR 마스터 믹스가 포함된 5개의 PCR 반응을 서로 다른 PCR 주기(N = 8, 10, 12, 14 및 16)에서 실행하였다. 모든 PCR 반응의 산물은 20분 동안 100V에서 아가로스 겔 전기영동으로 분리하여 비교하였다. 이 단계는 대규모 PCR을 사용하여 DNA 증폭을 위한 주기 수를 최적화하는 데 도움이 되었다(도 S12). PCR 산물을 19,320g에서 원심분리하고 10 KDa Amicon® 필터를 사용하여 원래 부피(100 µL)의 1/10로 농축하였다. 50 µL 스트랩트아비딘 수지로 미니 컬럼을 준비하고 1x SB를 사용하여 6회 세척하였다. 농축된 PCR 산물을 컬럼에 로딩하고 용출된 용액을 수집하였다. 이러한 단계를 3회 반복하였다. 그 후 컬럼을 1x SB를 사용하여 10회 세척하였다. 마개를 사용하여 닫고 400 µL의 0.2 M NaOH를 첨가한 후 실온(RT)에서 10분 동안 배양하였다. 다음으로 용출액을 수집하고 동량의 0.2M HCl을 첨가하여 pH를 7.5로 중화한 후 여기에 750 µL의 2x SB를 첨가하였다. 그 후 용액을 19,320g에서 5분 동안 원심분리하여 3 KDa Amicon® 필터로 100 µL로 농축하였다. 마지막으로 ssDNA 농도를 측정하고 100 pmole의 새로운 라이브러리를 SELEX 프로세스의 다음 라운드에 사용하였다.

[0146] (실시예 5) 클로닝, 시퀀싱 및 서열 유사성 분석

[0147]

[0148] 말라티온 친화도가 높은 가장 풍부한 ssDNA를 용출, 선택하고 서열 분석을 위해 T-Blunt™ PCR 클로닝 키트(대한민국 서울, SolGent, Co. Ltd, Cat# SOT01-K020)를 사용하여 클로닝하였다. 복제 단계는 제조사 지침에 따라 수행되었다. 클로닝을 위한 DNA는 다음과 같이 준비되었다: 모든 양성 용출액을 10 KDa Amicon® 필터에서 19320g로 원심분리하여 농축하고 400 µL의 증류수로 2회 세척하였다. PCR 반응은 소규모 PCR 프로토콜을 사용하여 수행하였다. 사용된 PCR 프로그램은 다음과 같다: 95°C, 2분간의 1주기, [92°C, 15초; 59°C, 30초; 72°C, 45초]의 N주기이며 최종 연신 사이클은 72°C에서 2분이다.

[0150] Cycle 수(N)는 DNA의 농도에 따라 상이하며 대부분 N=10을 사용하였다. PCR 산물의 양은 Nanodrop® 머신(OD

260 nm/280 nm)을 이용하여 측정하였으며 품질은 아가로스 겔 전기영동에서 밴드의 세기를 비교하여 확인하였다 (도 S1 및 S12). 24개의 무작위 흰색 클론을 선택하고 플라스미드 DNA를 각 콜로니에서 분리하여 시퀀싱 하였다. 서열을 분석하고 웹 기반 Omega 서버를 사용하여 유사성 검사를 수행하였다. 그 후 새로운 ssDNA 서열의 2차(2D) 구조를 예측하고 각 앵타머 센서에 대해 최적화하였다. Mfold 웹 서버는 2D 구조 ssDNA 앵타머를 예측하는 데 사용되었다. 프로그램은 또한 각 앵타머 2차원 구조의 안정성과 자유에너지를 예측하였다.

[0152] (실시예 6) 0.2pp칭 에세이를 사용한 형광 표지 및 검출

[0154] ssDNA 앵타머는 6-FAM으로 라벨링되었으며 MalA-F 센서로 언급되었다. MalA-F 센서(S) 농도는 50nM으로 고정된 반면에 다른 dabcy1 0.2pp칭(Q) 농도는 센서 대 퀀처 비율을 최적화하는 데 사용되었다. 본 발명자들은 S:Q의 1:5 비율이 정량화 연구를 수행하는 데 최적이라는 것을 발견하였다. 60 μ L의 센서를 60 μ L의 상이한 퀀처 농도와 개별적으로 혼합하고 혼합물을 90℃로 5분 동안 가열한 후 실온에서 20분 동안 천천히 냉각시켰다. 이렇게 새로 형성된 SQ 복합체 100 μ L를 형광 측정을 위해 96-웰 검정/투명 바닥 플레이트에 로딩하였다.

[0156] 사용된 여기 파장은 485nm이며 방출은 535nm에서 수집되었다. SpectraMax Gemini™ XPS/EM 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 형광 분석을 수행하였다. 형광 데이터를 분석하고 비선형 회귀, 해리-1상 붕괴 함수를 사용하여 곡선을 플로팅하였다(GraphPad Prism 5.0 소프트웨어). 해리 상수는 Hu 및 Easley(2011)에 따라 계산되었다.

[0158] (실시예 7) 6-FAM 라벨 앵타머 센서의 평가

[0160] FAM 라벨 센서의 평가를 위해 퀀칭 효과가 80%보다 상당히 높을 때만 센서 테스트를 위한 센서-퀀처(SQ)의 비율을 선택하였다. SQ 복합체를 5분간 90℃로 가열하고 실온으로 냉각시켰다. 그 후 60 μ L의 SQ 복합체를 다양한 농도의 타겟을 포함하는 60 μ L의 시료 용액에 첨가하고 실온에서 40분간 배양하였다. 이 혼합물 100 μ L를 형광 측정을 위해 96-웰 검정/투명 바닥 플레이트에 로딩하였다.

[0162] 형광 데이터를 기록하고 비선형 회귀 및 해리 1상 붕괴 함수를 사용하여 분석하였다(GraphPad Prism 5.0 소프트웨어). 그런 다음 두 번째 Kd, 즉 단위 없는 상수인 $K_{d,eff2}$ 를 측정하였다.

[0164] (실시예 8) ThT 변위 분석을 사용한 라벨 프리 검출

[0166] 변형되지 않은 ssDNA 서열을 앵타머 센서로 사용하였으며 MalA-T 센서로 언급되었다. MalA1 및 MalA2 앵타머를 5분간 90℃로 가열하고 20분간 실온으로 냉각시켰다. ThT 염료의 농도는 5 μ M으로 고정되었으며 MalA-T 센서의 가변 농도가 추가되었다. MalA-T 앵타머(60 μ L) 및 ThT 염료(60 μ L)의 혼합물을 상호작용하도록 허용하고 40분간 실온에서 배양하였다. 425nm에서의 여기 및 492nm에서의 측정 방출에 의한 형광 관찰을 위해 MalA-T와 ThT 혼합물 100 μ L를 96-웰 검정/투명 바닥 플레이트에 로딩하였다. 형광 강도를 기록하고 각 실험에 대한 곡선을 비선형 회귀, 해리-1상 붕괴 함수를 사용하여 플로팅 하였다(GraphPad 소프트웨어 5.0).

[0168] 대안적으로 앵타머 센서의 농도를 일정하게 유지하고(1.0 μ M) 상이한 비율의 ThT 염료를 첨가하였다. 혼합물을 5분간 90℃로 가열하고 20분간 실온으로 냉각시켰다. 혼합물을 40분간 실온에서 인큐베이션 하였다. 이 중 100 μ L의 혼합물을 425nm 여기 및 492nm 방출을 사용한 형광 측정을 위해 96-웰 검정/투명 바닥 플레이트에 로딩하였다. 형광 데이터는 비선형 회귀, 해리-1상 붕괴 함수를 사용하여 플로팅 되었다.

- [0170] 다음으로 실제 샘플 분석을 위해 형광 신호가 포화되었을 때 MalA와 ThT의 비율을 사용하였다. 60 μ L의 MalA-ThT 복합체를 다양한 농도로 60 μ L의 타겟에 첨가하였다. 들 용액을 40분간 실온으로 유지하였다. 이 중 형광 분석을 위해 100 μ L의 용액(MalA-ThT-타겟)을 96-웰 검정/투명 바닥 플레이트에 로딩하였다.
- [0172] (실시예 9) MalA1 및 MalA2의 분자 모델링
- [0174] 앵타머 MalA1 및 MalA2의 3차원(3D) 모델은 계산 리소스를 사용하여 생성되었다. 3D ssDNA 모델링을 위한 컴퓨터 도구를 사용할 수 없기 때문에 모델링 연구의 첫 번째 단계는 2D 2차 구조를 예측하는 것이다. 이것은 구조 예측 웹 서버 프로그램 'multiple fold'(Mfold, <http://www.unafold.org/>)를 사용하여 수행되었다. 두 앵타머의 시퀀스는 FASTA 포맷의 입력으로 제공되었다. 이온화 조건 및 온도는 각각 $[Na^+] = 1.0mM$, $[Mg^{++}] = 0.0M$ 및 37°C로 설정하고 나머지 파라미터는 표준으로 설정하였다.
- [0176] Mfold의 결과 출력 2D 구조를 분석하였다. 열역학적 프로파일을 기반으로 ssDNA 앵타머의 3D 구조를 생성하기 위해 가장 안정적인 형태가 선택되었다. 선택한 2D 형태의 점관호 확인은 Mfold 서버에서 다운로드한 후 RNAComposer 웹 서버(<https://rnacomposer.cs.put.poznan.pl/>)를 사용하여 동등한 3D RNA 구조를 생성하기 위해 제출되었다.
- [0177]
- [0178] MalA1 및 MalA2의 생성된 RNA PDB 구조를 Discovery Studio(DS) v19(www.accelrys.com)에서 시각화 되었으며, 2'의 각각의 리보스 당(-OH)을 데옥시리보스(H)로 치환하고 DS의 'Build and Edit Nucleic Acid' 모듈을 사용하여 H-5 원자를 메틸기(CH₃)으로 치환하여 우라실 잔기를 변형함으로써 DNA로 전환시켰다.
- [0179]
- [0180] 또한 분자 역학(MD) 시뮬레이션을 앵타머 최소화 및 정제에 사용하였다. MD 시뮬레이션은 Groningen Machine for Chemical Simulations(GROMACS v5.1.4)를 사용하여 수행되었다. MalA1 및 MalA2 시뮬레이션을 위한 토폴로지 파일은 AMBER99SB-ILDN 역장을 사용하여 생성되었다. 각각의 앵타머 구조는 12면체 상자에 배치되었으며 TIP3P 물 모델은 독립적으로 용매화에 사용되었다.
- [0182] MalA1 및 MalA2 시스템은 44 및 45 Na^+ 이온에 의해 중화되었다. 준비된 시스템은 최속 하강 알고리즘을 사용하여 에너지 최소화 단계를 거쳤으며 이후 500ps 동안 일정한 수의 입자, 부피 및 온도(NVT) 및 압력(NPT)으로 평형화되었다. 마지막으로, 이전 보고서에서 설명된 자세한 시뮬레이션 절차에 따라 MalA1 및 MalA2에 대한 20ns의 시뮬레이션 실행을 수행하였다. DS를 이용하여 시뮬레이션 결과를 분석하고 수득된 정제된 3D 모델을 사용하여 분자 도킹 연구를 통해 선택된 리간드와의 결합 친화도를 예측하였다.
- [0184] (실시예 10) 선택된 리간드로 MalA1 및 MalA2의 분자 도킹
- [0186] 도킹 연구는 로컬 기능 매핑을 사용하여 결합 부위를 식별하는 기하학 기반 웹 서버인 자동 온라인 웹 서버 PatchDock을 사용하여 수행되었다. PatchDock은 수용체 및 리간드 Connolly 도트 표면 표현을 오목, 볼록 및 평평한 패치로 나눈다. 그 후 잠재적인 변형을 생성하기 위해 보완 패치를 일치시킨다. 이러한 변환은 기하학적 맞춤 및 탈용매화 에너지를 기반으로 하는 스코어링 함수에 의해 더욱 평가되었다. 마지막으로 컨센서스 클러스터링 접근 방식을 적용하여 최고 스코어 복합체를 결정하였다. 리간드 즉, 말라티온, 파라티온, 페니트로티온, 파라옥손 및 ThT는 PubChem 데이터베이스(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)에서 수득한 후 DS에서 최소화하고 분자 도킹을 위한 단백질 데이터 뱅크(PDB) 포맷으로 저장하였다.

[0188] 컨센서스 번호, 도킹 스코어 및 분자 상호 작용을 기반으로 각각의 리간드에 대해 30개의 도킹 컨포머 (conformer)를 생성하고 분석하였다. PatchDock 결과는 PyRx 도구와 AutoDock Vina 프로그램을 사용하여 검증되었다. AutoDock vina는 정의된 결합 포켓에서 유연한 도킹을 수행한다. 가능한 모든 결합 모드를 수득하기 위해 도킹 실행 중에 앵타머의 전체 표면을 덮었다.

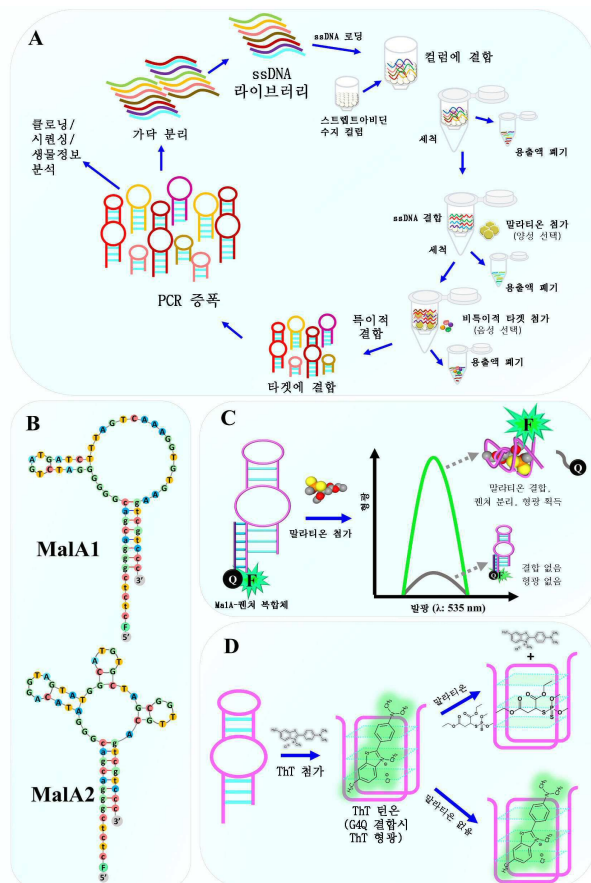
[0190] 거드 박스는 각각 MalA1의 경우 X: 69.10, Y: 68.75, Z: 31.97, MalA2의 경우 X: 54.51, Y: 53.02, Z: 24.04에 중심을 두었다. 도킹은 Lamarckian 구조 검색을 사용하여 10개의 유전자 알고리즘 실행에 대해 설정되었다. AutoDock 결과는 생성된 컨포머의 클러스터링을 기반으로 또한 분석되었으며 가장 낮은 에너지 포즈는 PatchDock 결과와 비교되었다.

[0192] (실시예 11) 실제 식물 조직 분석

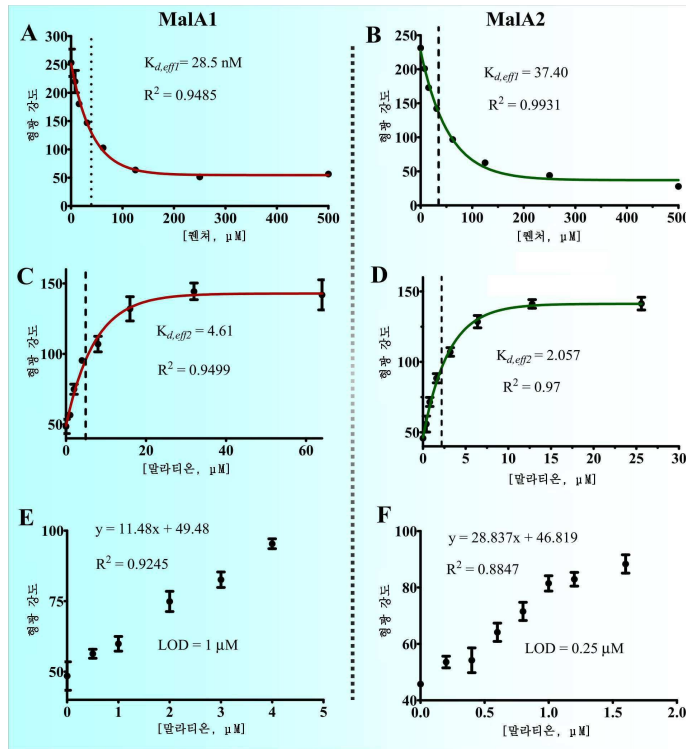
[0194] 본 발명자들은 실제 식물 조직에서 말라티온을 검출하기 위한 앵타머 센서의 새로운 응용 프로그램을 개발하기 위해 다양한 야채와 과일을 사영하였다. 이를 위해 식물조직(배추, 오이, 고추, 사과) 50g을 믹서기를 이용하여 2×SB로 분쇄하였다. 초기 분쇄 단계와 후기 분쇄 단계에서 식물 조직에 다양한 모의 농도를 첨가하였다. 혼합물을 여과지로 여과한 후, 용액을 19320g에서 10분 동안 원심분리하였다. 용액의 pH를 7.5로 조정하였다(강 알칼리, 2.0M NaOH 사용). 자가형광을 최소화하기 위해 식물 조직을 10배 희석하였다(도면 S13).

도면

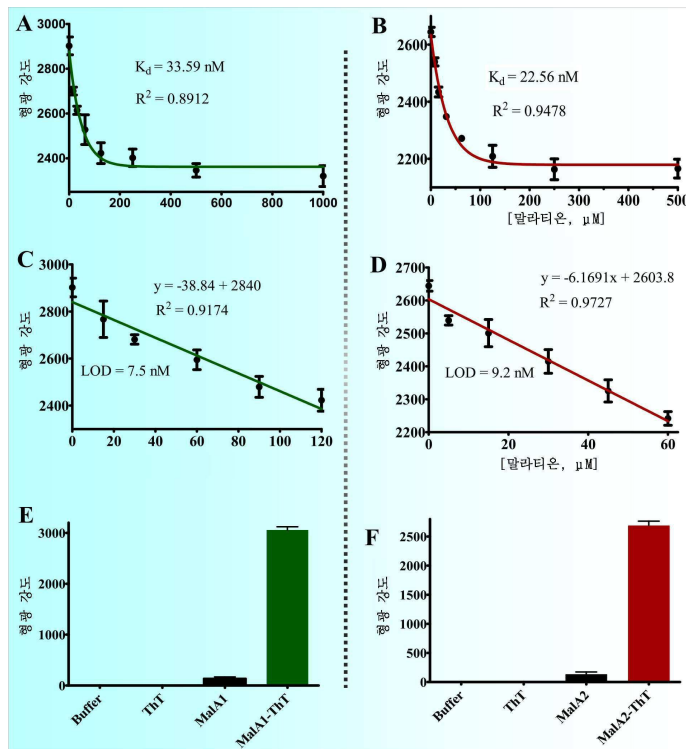
도면1



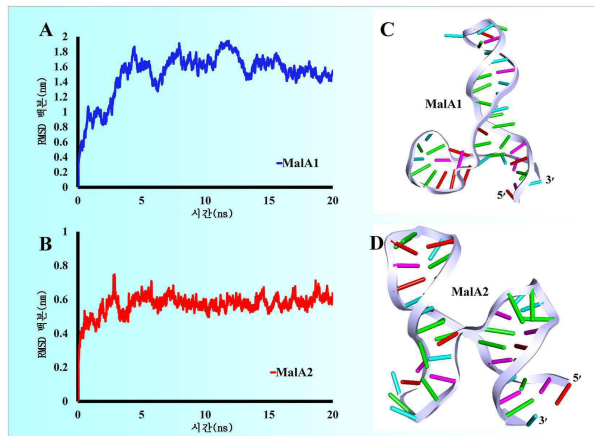
도면2



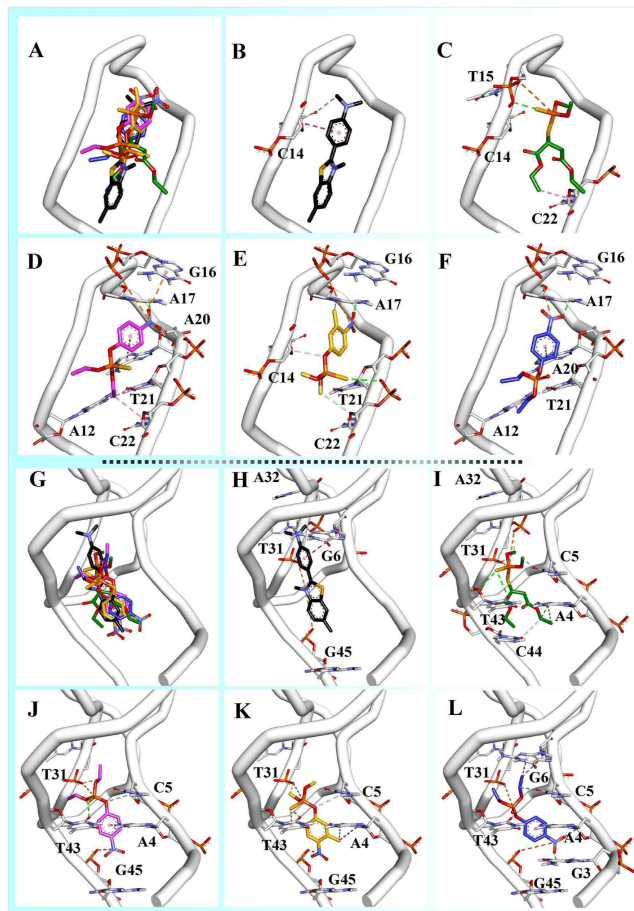
도면3



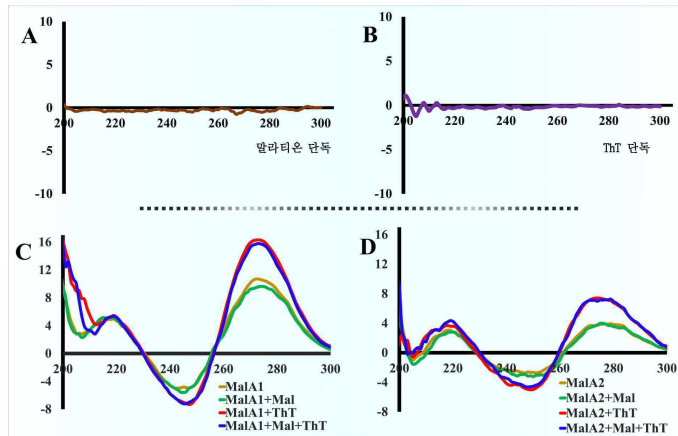
도면4



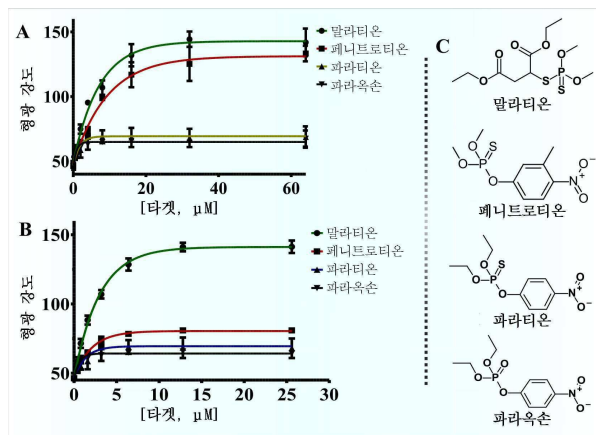
도면5



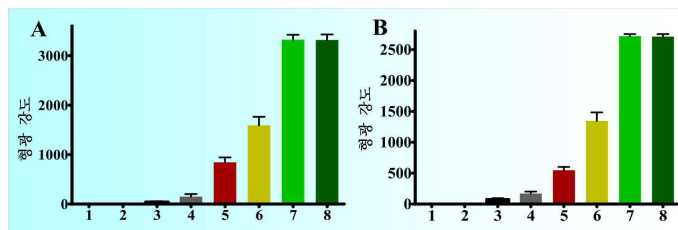
도면6



도면7



도면8



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.