



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0025249
(43) 공개일자 2020년03월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/115 (2010.01) G01N 33/537 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/115 (2013.01)
G01N 33/537 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0102316
(22) 출원일자 2018년08월29일
심사청구일자 2018년08월29일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
손아정
서울특별시 마포구 백범로 230(신공덕동, 브라운스톤 공덕 아파트) 102동 604호
임현정
서울특별시 마포구 월드컵북로9길 33 (성산동) 성산혜승빌 302호
(74) 대리인
특허법인한일

전체 청구항 수 : 총 13 항

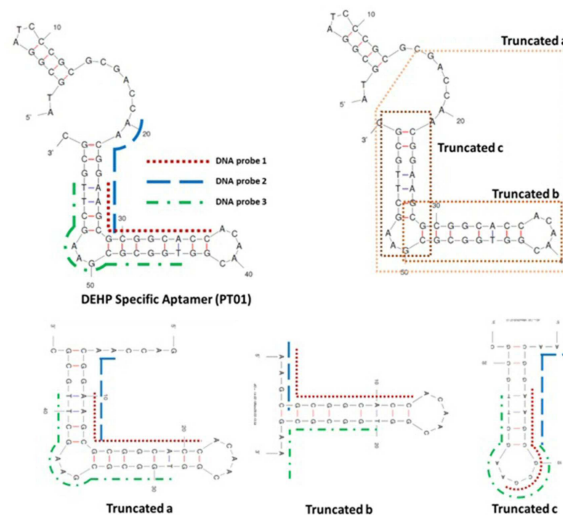
(54) 발명의 명칭 DEHP 검출을 위한 앵타머 및 이를 이용한 DEHP 검출장치

(57) 요약

본 발명은 디-2-에틸헥실 프탈레이트(di-2-ethylhexyl phthalate)에 특이적으로 결합하는 앵타머, 상기 앵타머를 기반으로 앵타머, 양자점 및 자성 비드를 조합하여 고안한 DEHP 검출용 양자점(Quantum Dot; QD)-앵타센서, 상기 QD-앵타센서를 기반으로 고안한 휴대용 분석기에 관한 것이다.

본 발명의 앵타머, 및 양자점(Quantum Dot; QD)-앵타센서는 높은 감도 및 선택성을 나타내므로, DEHP 검출에 효과적으로 활용될 수 있으며, 상기 QD-앵타센서를 기반으로 하는 휴대용 분석기는 시료의 운반을 필요로 하지 않으며, 실험실 환경과 동등한 수준으로 DEHP를 검출할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 33/54326 (2013.01)

G01N 33/54346 (2013.01)

C12N 2310/16 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017R1A2B4005133

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기초연구사업(학술진흥)(2017)-중견연구자지원사업

연구과제명 환경시료의 지중 진단 실현을 위한 원천기술과 제품화 사이: 무엇이 더 필요한가?

기 여 율 1/2

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2017.03.01 ~ 2020.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015M3C8A6A06012735

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 원천기술개발사업(학술진흥)(2015)-사회문제해결을 위한 시민연구사업-생활·환경 기술개발사업

연구과제명 마이크로 플루이딕스 기반 환경호르몬 감지시스템 개발

기 여 율 1/2

주관기관 한국연구재단

연구기간 2015.06.11 ~ 2018.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 13의 염기서열로 구성되고 디-2-에틸헥실 프탈레이트(di-2-ethylhexyl phthalate; DEHP)에 특이적으로 결합하는, 앵타머.

청구항 2

제1항의 앵타머를 포함하는, DEHP 검출용 조성물.

청구항 3

제1항의 앵타머를 포함하는, DEHP 검출용 키트.

청구항 4

- (a) DEHP가 존재할 것으로 예상되는 시약에 제1항의 앵타머를 가하여 반응물을 수득하는 단계; 및
- (b) 상기 반응물로부터 앵타머-DEHP 복합체를 검출하는 단계를 포함하는, DEHP 검출방법.

청구항 5

제1항의 앵타머 및 서열번호 14의 염기서열로 구성되는 DNA 프로브를 포함하는, DEHP 검출용 양자점(Quantum Dot; QD)-앵타센서.

청구항 6

자성 비드(Magnetic Bead; MB), 양자점 나노입자(QD₅₆₅) 및 제1항의 앵타머로 구성되는 제1복합체; 및
서열번호 14의 염기서열로 구성되는 DNA 프로브 및 양자점 나노입자(QD₆₅₅)로 구성되는 제2복합체를 포함하는,
DEHP 검출용 QD-앵타센서.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 제1복합체와 제2복합체는 결합하고 있다가 상기 제1복합체가 DEHP와 반응하면 상기 제2복합체가 제1복합체로부터 분리되는, DEHP 검출용 QD-앵타센서.

청구항 8

제5항 내지 제7항 중 어느 한 항의 QD-앵타센서를 포함하는, DEHP 검출용 조성물.

청구항 9

제5항 내지 제7항 중 어느 한 항의 QD-애타센서를 포함하는, DEHP 검출용 키트.

청구항 10

- (a) DEHP가 존재할 것으로 예상되는 시약에 제5항 내지 제7항 중 어느 한 항의 QD-애타센서를 접촉시키는 단계; 및
- (b) 상기 QD-애타센서의 정규화된 형광(QD_{655}/QD_{565}) 값의 감소 여부를 확인하는 단계를 포함하는, DEHP 검출방법.

청구항 11

제5항 내지 제7항 중 어느 한 항의 QD-애타센서를 포함하는, DEHP 검출용 휴대용 분석기.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 휴대용 분석기는 투입구, 반응 용기, 반응부, 및 검출부를 포함하는 것인, DEHP 검출용 휴대용 분석기.

청구항 13

DEHP가 존재할 것으로 예상되는 시약을 투입하는 단계를 포함하는, 제11항에 따른 DEHP 검출용 휴대용 분석기를 이용한 DEHP 검출방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 디-2-에틸헥실 프탈레이트(di-2-ethylhexyl phthalate; DEHP)에 특이적으로 결합하는 애타머, 상기 애타머를 기반으로 애타머, 양자점 및 자성 비드를 조합하여 고안한 DEHP 검출용 양자점(Quantum Dot; QD)-애타센서, 상기 QD-애타센서를 기반으로 고안한 휴대용 분석기에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 프탈레이트 혹은 프탈산 에스터는 가장 널리 사용되는 산업 화학물질 중 하나다. 이 화학물질은 통상적으로 투명하고, 신축성 및 탄성이 있는 플라스틱을 제조하기 위한 가소제로서 사용된다. 이런 플라스틱의 예로는 대표적으로 폴리비닐 클로라이드(PVC)를 들 수 있으며, 음식 포장 물질, 접착제, 전자기기, 약 포장, 화장품과 아이를 위한 장난감 등 다양한 물건의 제조에 사용된다. 세계적으로 프탈레이트의 생산량은 1990년대 약 4백만톤/년에서 2011년 8백만톤/년을 훌쩍 넘을 만큼 급격히 증가했다. 불행히도, 디부틸프탈레이트, 벤질부틸프탈레이트, 및 디-2-에틸헥실 프탈레이트(DEHP)와 같은 저분자량 프탈레이트는 내분비계 교란 화합물(endocrine disrupting compounds)로서, 암, 천식 그리고 생식 장애 등과 같은 무수히 많은 질병을 일으키는데 기여하는 것으로 알려져 있다(Kimber and J.Dearman 2010; Ventrice et al. 2013). 그 중 DEHP는 가장 널리 사용되는 가소제이며(Heise and Litz 2004), 체내에서 안드로겐 차단제(blocker) (Johnson et al. 2012)로 행동하는 특성으로 인하여 특별 관심사 중 하나다.

[0004] DEHP의 사용은 이미 규제되고 있으며 인간 내에서의 반감기가 불과 몇 시간 밖에 되지 않지만, 이는 언제 어디서나 존재하여 계속적으로 영향을 행사한다. DEHP는 매립지로부터 계속 침출되고 있으며 상수도로 흘러 들어간다. 이전의 연구에 따르면, 지표수에서 100 $\mu\text{g/L}$ 까지; 음용수에서 1 $\mu\text{g/L}$ 까지; 폐수에서 100 $\mu\text{g/L}$ 까지 포함

될 수 있다. 참고로, 지표수와 음용수의 DEHP 최대 허용치는 각각 1.3 µg/L. (유럽연합) (EU 2013), 그리고 6 µg/L (미국) 이다(EPA 2012).

[0005] 이에, 물 속 DEHP의 *in situ* 탐지는 우리의 상수도 보호 및 주요 공공건강위기를 막는데 필수적이다. DEHP 탐지의 통상적인 방법은 기체 크로마토그래피, 고성능 액체 크로마토그래피 또는 질량분석기를 함께 사용하는 것이다(Chang-Liao et al. 2013; Shen et al. 2007; Takatori et al. 2004). 이러한 방법들은 높은 감도 및 선택성으로 DEHP를 탐지할 수 있다. 하지만, 이러한 기술들은 매우 비싸며 시간이 오래 걸리고, 부피가 큰 장비들이 필요하기 때문에 DEHP의 *in situ* 탐지에는 적합하지 않다.

[0006] DEHP 검출을 위한 하나의 방법으로서, 앵타머가 개발되고 있다. 앵타머는 분자 수준 감지 및 비스페놀 A와 테트라시클린과 같은 화합물의 탐지에 널리 사용되어왔다. 그러나, 프탈레이트에 관해서는, Han et al.에 의해 고안된 i-motif 앵타머가 존재한다. 그러나, i-motif 앵타머의 결합 부위는 다소 넓어, 프탈산 에스터 그룹을 타겟으로 하고, 특정 프탈레이트에 특이적이지 않으므로, DEHP 검출을 위해 고안된 특이적인 앵타머 존재의 필요성은 여전히 남아있다.

[0007] 이러한 배경하에서, 본 발명자들은 SELEX(systematic evolution of ligands by exponential enrichment) 및 환원 그래핀 옥사이드(reduced graphene oxide; rGO)-기반 스크리닝 방법을 통해 고안한 DEHP 특이적 앵타머, 상기 앵타머를 기반으로 앵타머, 양자점 및 자성 비드를 조합하여 고안한 DEHP 검출용 QD-앵타센서, 상기 QD-앵타센서를 기반으로 고안한 휴대용 분석기가 높은 감도 및 선택성을 가졌음을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 하나의 목적은 디-2-에틸헥실 프탈레이트(di-2-ethylhexyl phthalate; DEHP)에 특이적으로 결합하는 앵타머를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 앵타머를 포함하는 DEHP 검출용 조성물, 키트 및 상기 앵타머를 이용한 DEHP 검출방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 앵타머를 포함하는 DEHP 검출용 양자점(QD)-앵타센서를 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 QD-앵타센서를 포함하는 DEHP 검출용 조성물, 키트 및 상기 QD-앵타센서를 이용한 DEHP 검출방법을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 QD-앵타센서를 포함하는 DEHP 검출용 휴대용 분석기를 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 휴대용 분석기를 이용한 DEHP 검출방법을 제공하는 것이다.

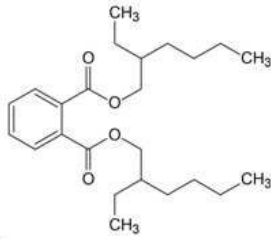
과제의 해결 수단

[0016] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 하나의 양태는 디-2-에틸헥실 프탈레이트(di-2-ethylhexyl phthalate; DEHP)에 특이적으로 결합하는 앵타머를 제공한다.

[0017] 구체적으로, 상기 앵타머는 서열번호 13의 염기서열로 구성되고, DEHP와 특이적으로 결합할 수 있는 앵타머를 의미하는 것으로 해석될 수 있다.

[0019] 본 발명의 용어, "디-2-에틸헥실 프탈레이트(di-2-ethylhexyl phthalate; DEHP)"는 프탈레이트 계통의 화학물질로서, PVC와 같은 플라스틱을 제조하기 위해 사용되는 대표적인 가소제 중 하나이며, 하기 화학식 1의 화합물을 의미한다. 상기 DEHP는 내분비계 교란 화합물(endocrine disrupting compounds)의 일종으로 확인되어, 이를 효과적으로 검출하여야 할 필요성이 대두되고 있다.

[0020] [화학식 1]



[0021]

[0023] 본 발명의 용어, "앱타머(aptamer)"는 그 자체로 안정된 삼차 구조를 가지면서 표적 분자에 높은 친화성과 특이성으로 결합할 수 있는 특징을 가진 특별한 종류의 단일가닥 핵산(DNA, RNA 또는 변형핵산)으로 구성된 폴리뉴클레오타이드의 일종을 의미한다. 상기 앱타머는 폴리뉴클레오타이드, 폴리펩타이드, 화합물, 중합체 등의 다양한 물질을 표적분자로서 사용할 수 있고, 단백질보다 안정성이 우수하며, 구조가 간단하면서도, 핵산으로 구성되어 합성이 용이하기 때문에, 다양한 표적분자를 검출하는 방법에 이용되고 있다.

[0024] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 서열번호 13의 염기서열을 갖는 앱타머는 종래의 앱타머(서열번호 1의 염기서열을 가지는 앱타머)에 비하여 단순한 2차원적 구조를 나타내고(도 1), 이로 인하여 표적물질인 DEHP에 대하여 증가된 검출감도를 나타낼 수 있다.

[0026] 본 발명은 다른 하나의 양태로서 상기 앱타머를 포함하는 DEHP 검출용 조성물을 제공한다.

[0027] 전술한 바와 같이, 본 발명에서 제공하는 서열번호 13의 앱타머는 종래의 앱타머에 비하여 단순한 2차원적 구조를 나타내고, 이로 인하여 표적물질인 DEHP에 대하여 증가된 검출감도를 나타낼 수 있으므로, 상기 앱타머를 포함하는 조성물은 DEHP를 검출하는데 사용될 수 있다.

[0029] 본 발명의 또 다른 하나의 양태로서 상기 앱타머를 포함하는 DEHP 검출용 키트를 제공한다.

[0030] 본 발명의 키트는 상기 앱타머를 이용하여 DEHP를 검출하는데 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치가 포함될 수도 있으며, 구체적으로 ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay) 키트가 될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0032] 본 발명의 또 다른 하나의 양태로서 상기 앱타머를 이용한 DEHP 검출방법을 제공한다.

[0033] 구체적으로, 본 발명의 DEHP 검출방법은 (a) DEHP가 존재할 것으로 예상되는 시약에 제1항의 앱타머를 가하여 반응물을 수득하는 단계; 및 (b) 상기 반응물로부터 앱타머-DEHP 복합체를 검출하는 단계를 포함한다.

[0035] 본 발명의 또 다른 하나의 양태로서 상기 앱타머 및 서열번호 14의 염기서열로 구성되는 DNA 프로브를 포함하는 DEHP 검출용 양자점(QD)-앱타센서를 제공한다.

[0036] 구체적으로, 본 발명의 QD-앱타센서는 자성 비드(Magnetic Bead; MB), 양자점 나노입자(QD₅₆₅) 및 제1항의 앱타머로 구성되는 제1복합체; 및 서열번호 14의 염기서열로 구성되는 DNA 프로브 및 양자점 나노입자(QD₆₅₅)로 구성되는 제2복합체를 포함하는 DEHP 검출용 QD-앱타센서일 수 있다.

[0038] 본 발명의 용어, "프로브(probe)"는 프로브 내의 적어도 하나의 서열과 표적 영역 내의 서열의 상보성으로 인해 표적 핵산 내의 서열과 듀플렉스 구조를 형성하는 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 검출의 용이함을 위해 육안 또는 센서를 이용하여 감지할 수 있는 신호를 발생시키는 물질인 표지물질로 표지(labeling 가능하며, 상기 표지물질의 예로 양자점, 효소, 콜로이드 금, 전기화학적 작용기, 형광물질, 방사능 표지, 형광 염료 또는 색소

등이 사용될 수 있으며, 구체적으로 양자점 나노입자(QD₆₅₅)가 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0039] 구체적으로 서열번호 14 내지 16의 염기서열을 가지는 DNA 프로브가 본 발명에서 사용될 수 있으며, 보다 구체적으로 서열번호 14의 염기서열을 가지는 DNA 프로브로 해석될 수 있다.
- [0041] DEHP 부재 시, DEHP 특이적 앵타머 및 이에 상보적인 DNA 프로브는 서로 결합하며, DEHP 존재 시, DNA 프로브는 DEHP 특이적 앵타머로부터 분리된다(도 2). DNA 프로브의 양은 QD₆₅₅로부터의 형광에 의해 주어지고, QD₅₆₅로부터의 형광에 의해 정규화(normalized)된다. 따라서, 정규화된 형광(QD₆₅₅/QD₅₆₅)은 DEHP가 존재하여 상기 DEHP 특이적 앵타머와 DNA 프로브가 분리됨에 따라 감소한다.
- [0043] 본 발명의 용어, "앵타센서(aptasensor)"는 앵타머를 이용한 바이오 센서를 의미한다. 구체적으로, 본 발명에서의 QD-앵타센서(QD-aptasensor)는 양자점 앵타센서를 의미한다.
- [0045] 본 발명의 용어, "자성 비드(magnetic bead)"는 자성을 띠는 물질로서, 본 발명의 목적상, 앵타머 및 양자점 나노입자와 결합하여 복합체를 형성할 수 있으며, DEHP와 앵타머의 결합 여부와 관계 없이, 양자점 나노입자와 결합하여 일정한 신호를 방출할 수 있다면, 구체적인 재질, 종류나 크기 등에 제한 없이 이용될 수 있다.
- [0047] 본 발명의 용어, "양자점(quantum dot)"은 자체적으로 빛을 내는 수 나노미터(nm) 크기의 반도체 결정을 의미하며, 입자 크기별로 다른 길이의 빛 파장이 발생되어 다양한 색을 낼 수 있다. 또한, 본 발명에서의 양자점은 자성 비드의 표면에 결합되고, 앵타머는 양자점 상에 결합될 수 있다. 이들의 서로 결합된 복합체 구조물의 예로도 도 2에 도식화하여 나타내었다. 상기 도 2은 이들 구성요소 간의 결합 관계를 특징적으로 나타내기 위한 것으로 각각의 상대적인 규모는 실제와 상이할 수 있다.
- [0049] 본 발명의 일 실시예에서, 본 발명의 제1복합체는 각 구성 성분을 결합시키기 위하여, 상기 자성 비드를 에틸카르보디이미드 하이드로클로라이드(EDC) 및 N-하이드록시석신이미드(NHS)를 이용하여 카르복실 양자점 나노입자(QD₅₆₅)와 아미드 결합을 형성하였고, 5'-아미노화 ssDNA 앵타머를 또 다시 EDC 및 NHS를 이용하여 카르복실 양자점 나노입자(QD₅₆₅)에 부착하였다. 또한, 본 발명의 제2복합체는 각 구성 성분을 결합시키기 위하여, 5'-아미노화 DNA 프로브를 EDC 및 NHS를 이용하여 카르복실 양자점 나노입자(QD₆₅₅)에 부착하였다.
- [0051] DEHP 부재 시, 상기 제1복합체와 제2복합체는 결합하고 있으며, DEHP 존재 시, 상기 제1복합체가 DEHP와 반응하면 상기 제2복합체는 제1복합체로부터 분리된다. 이러한 DEHP의 존재 유무에 따라 제1복합체 및 제2복합체 내의 양자점의 신호 변화를 측정함으로써, DEHP를 검출하는 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 정규화된 형광(QD₆₅₅/QD₅₆₅) 값을 확인하여, 그 값이 감소하는 경우 DEHP가 존재한다고 판단할 수 있다.
- [0053] 본 발명의 일 실시예에서, DNA 프로브 1 내지 3 및 절단 a 내지 c 앵타머/PT01 앵타머의 가능한 조합 중 최상의 조합을 동정하기 위하여 실험한 결과, DNA 프로브 1 및 절단 c 앵타머(22-mer)의 조합을 이용한 QD-앵타센서는 DEHP 농도 범위(0 내지 10000 ng/mL)에 대한 회귀 방정식에서 가장 높은 수치, $R^2 = 0.74$ 를 나타내어 최상의 조합임을 확인하였다(도 4 및 표 3). 또한, 상기 최상 조합의 QD-앵타센서는 DEHP 농도 범위(0.0005 내지 100 ng/mL)에 대해 LOQ = 0.5 pg/mL의 높은 감도를 나타내며, 또한 정규화된 형광에서 38% 변화로 다른 프탈레이트 유사체 보다 DEHP에 대해 우수한 선택성을 나타냄을 확인하였다. 즉, 종래의 PT01 앵타머와 비교하여, 절단 c 앵타머 및 이를 포함하는 QD-앵타센서가 보다 감도 및 선택성이 우수함을 확인할 수 있었다.

- [0055] 본 발명은 다른 하나의 양태로서 상기 QD-애포타센서를 포함하는 DEHP 검출용 조성물을 제공한다.
- [0056] 전술한 바와 같이, 본 발명에서 제공하는 QD-애포타센서는 표적물질인 DEHP에 대하여 증가된 검출감도 및 선택성을 나타낼 수 있으므로, 상기 QD-애포타센서를 포함하는 조성물은 DEHP를 검출하는데 사용될 수 있다.
- [0058] 본 발명의 또 다른 하나의 양태로서 상기 QD-애포타센서를 포함하는 DEHP 검출용 키트를 제공한다.
- [0059] 본 발명의 키트는 상기 QD-애포타센서를 이용하여 DEHP를 검출하는데 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치가 포함될 수도 있으며, 구체적으로 ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay) 키트가 될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0061] 본 발명의 또 다른 하나의 양태로서 상기 QD-애포타센서를 이용한 DEHP 검출방법을 제공한다.
- [0062] 구체적으로, 본 발명의 DEHP 검출방법은 (a) DEHP가 존재할 것으로 예상되는 시약에 제5항 내지 제7항 중 어느 한 항의 QD-애포타센서를 접촉시키는 단계; 및 (b) 상기 QD-애포타센서의 정규화된 형광(QD_{655}/QD_{665}) 값의 감소 여부를 확인하는 단계를 포함한다.
- [0064] 본 발명의 또 다른 하나의 양태로서 상기 QD-애포타센서를 포함한 DEHP 검출용 휴대용 분석기를 제공한다.
- [0065] 구체적으로, 상기 DEHP 검출용 휴대용 분석기는 투입구, 반응 용기, 반응부, 및 검출부를 포함할 수 있다.
- [0067] 상기 투입구는 시약의 주입 및 회수가 가능한 본 발명의 분석기의 일 구성요소이다. 시약의 주입 및 회수를 가능하게 하는 것이라면 당업계에서 사용되는 것으로 제한 없이 사용할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 소형 연동 펌프 및 슬라이딩 마운트를 이용하여 시약을 주입 및 회수 하고 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0069] 상기 반응 용기는 제1복합체 및 DEHP가 반응하는 본 발명의 분석기의 일 구성 요소이다. 본 발명의 일 실시예에서는 상기 반응 용기로서 큐벳(cuvette)을 이용하였으나, 제1복합체가 DEHP와 반응하여, 그에 따른 형광의 변화만 측정할 수 있다면, 당업계에서 사용되는 것으로 제한 없이 사용될 수 있다.
- [0071] 상기 반응부는 결합하지 않은 DEHP 및 제1복합체, 및 제1복합체와 분리된 제2복합체를 제거하는 제거수단을 추가로 구비할 수 있으며, 제거수단을 포함함으로써 제1복합체-DEHP가 아닌 다른 물질에서 방출되는 신호를 제거할 수 있다.
- [0072] 또한, 상기 반응부는 상기 반응 용기를 진동시키는 동력원을 추가로 구비하는 것일 수 있고, 구체적으로 상기 동력원은 상기 반응 용기를 교반시켜 반응 용기 내 물질을 혼합시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 일 실시예에서는 상기 동력원으로서 진동 모터를 이용하고 있으며, 이로 인하여 반응 용기 내 물질이 침전되는 것을 방지하고, 그로 인하여 보다 높은 감도로 DEHP를 검출할 수 있다는 이점이 있다.
- [0074] 상기 검출부는 양자점의 신호 변화를 검출 및 측정할 수 있는 한, 제한되지 않는다. 본 발명의 일 실시예에서는 포토다이오드 및 UV LED를 이용하였으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 검출부는 정규화된 형광(QD_{655}/QD_{665}) 값으로부터 DEHP의 농도를 연산할 수 있는 연산 수단을 추가로 구비할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0076] 본 발명의 또 다른 하나의 양태로서 상기 검출용 휴대용 분석기를 이용한 DEHP 검출방법을 제공한다. 구체적으로, 본 발명의 검출방법은 DEHP가 존재할 것으로 예상되는 시약을 투입하는 단계를 포함한다.

[0078] 본 발명의 일 실시예에서, QD-애타센서 기반 휴대용 분석기는 실험실 프로토콜과 좋은 상관 관계($r = 0.86$)를 나타내었는데, 이는 QD-애타센서 기반 휴대용 분석기를 환경적으로 관련된 농도($< 100 \text{ ng/mL}$)에서 DEHP검출을 할 수 있음을 의미한다.

발명의 효과

[0080] 본 발명의 디-2-에틸헥실 프탈레이트(di-2-ethylhexyl phthalate)에 특이적으로 결합하는 애타머, 상기 애타머를 기반으로 애타머, 양자점 및 자성 비드를 조합하여 고안한 DEHP 검출용 양자점(Quantum Dot; QD)-애타센서는 높은 감도 및 선택성을 나타내므로, DEHP 검출에 효과적으로 활용될 수 있으며, 상기 QD-애타센서를 기반으로 고안한 휴대용 분석기는 시료의 운반을 필요로 하지 않으며, 실험실과 유사한 수준으로 DEHP를 검출할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0082] 도 1은 PT01 애타머, 절단 a, b, c 애타머 및 이들의 구조를 기반으로 한 DNA 프로브 1, 2, 및 3 고안을 나타낸 것이다.

도 2의 (a)는 DEHP 부존재 시 QD-애타센서를 도식화한 것이며, (b)는 DEHP 존재 시 QD-애타센서를 도식화한 것이다.

도 3의 (a)는 PT01 애타머의 DEHP와의 결합 친화도를 나타낸 것이며, (b)는 DEHP, MINP, 및 MBP에 대한 PT01 애타머의 선택성을 나타낸 것이다. 이때, MINP 및 MBP는 각각 모노이소노닐 프탈레이트 및 모노부틸 프탈레이트를 지칭한다.

도 4는 다양한 농도의 DEHP에 대하여, PT01 애타머 및 3개의 절단 애타머와 (a) DNA 프로브 1, (b) DNA 프로브 2, (c) DNA 프로브 3을 조합한 QD-애타센서에 의한 DEHP 검출을 나타낸 것이다.

도 5의 (a)는 DEHP의 특이적 결합 부위에 상응하는 부분 구조를 가진 화합물을 나타낸 것이며, (b)는 선택성 실험을 위하여 사용된 DEHP 유사체를 나타낸 것이다.

도 6의 (a)는 DEHP의 특이적 결합 부위에 상응하는 부분 구조를 가지는 화합물의 존재 하에서, QD-애타센서의 정규화된 형광 값(QD_{665}/QD_{565})을 나타낸 것이며, (b) 내지 (d)는 다양한 농도의 DEHP, 벤조산, 및 2-에틸헥실 아세테이트와 절단 c 애타머의 CD 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 7은 절단 c 애타머 및 DNA 프로브 1을 이용한 QD-애타센서에 의한 DEHP 검출의 (a) 감도 및 (b) 선택성을 나타낸 것이다.

도 8의 (a)는 QD-애타센서를 통한 DEHP 검출을 위한 휴대용 분석기를 도식화 한 것이며, (b)는 QD-애타센서를 통한 DEHP 검출을 위한 휴대용 분석기의 사진을 나타낸 것이다.

도 9는 실험실 프로토콜을 통한 정규화된 형광 및 휴대용 분석기의 정규화된 포토다이오드 반응의 상관관계를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0083] 이하, 하기 실시예에 의하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

[0085] 실시예 1. DEHP 특이적 애타머의 개발

[0087] 실시예 1-1. ssDNA 라이브러리의 준비

[0088] DEHP에 특이적인 단일-가닥 DNA(single-stranded DNA; ssDNA) 애타머의 라이브러리를 준비하기 위하여, 30-mer 올리고뉴클레오타이드 서열을 무작위로 선택하였다. 그 후, 정방향 및 역방향 프라이머 부분을 5' 및 3' 각각에서

총 60-mer 뉴클레오타이드를 차지하기 위하여 삽입하였다. 100 $\mu\text{mol/L}$ 의 정방향 프라이머(밀줄 친 위치에 *BamH I* 을 갖는 5'-ATGCGGATCCCGCGC-3') 및 10 $\mu\text{mol/mL}$ 의 역방향 프라이머(밀줄 친 위치에 *Hind III*를 갖는 5'-GCGCAAGCTTCGCGC-3')를 주형 ssDNA 라이브러리(Bioneer Corporation, Daejeon, Korea)의 비대칭 PCR에 사용하였다. PCR 반응 조건은 다음과 같다. 주형의 변성(denaturation)은 94°C에서 3분 동안 가열함으로써 수행하였다. 주형을 94°C에서 40초 동안 배양 후, 55°C에서 40초 동안 결합(annealing)하였다. 72°C에서 20초 동안의 신장(extension) 후, 상기 세 단계를 45회 반복하였다. 마지막으로, 72°C에서 10분 동안 신장을 수행하였다. PCR 반응 후, ssDNA 라이브러리 생성물을 분쇄 및 침지 방법(Pfeiffer and Mayer 2016) 및 에탄올 침전을 통해 12% DNA-네이티브 겔로 추출 및 정제하였다. 추출에 의해 회수된 ssDNA 라이브러리의 농도는 SpectraMax M2 spectrometer(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 측정하였고, 하기 스크리닝 절차에 사용되었다.

[0090] **실시예 1-2. SELEX 전, MEHP의 고정(immobilization)**

[0091] DEHP 특이적 앵타머를 스크리닝하기 위하여, MEHP 고정 과정을 다음과 같이 수행하였다. 모노-2-에틸헥실 프탈레이트(mono-2-ethylhexyl phthalate; MEHP)가 플레이트 상에서 향상된 고정을 나타내므로, DEHP의 대체물로 선택하였다. MEHP는 말단에 카르복실기가 존재하여 MEHP로 하여금 플레이트 상의 에틸렌디아민 링커(linker)의 아민기와 공유 아마이드 결합을 형성 가능하게 하는 반면, DEHP는 말단에 메틸기만 존재하여 결합 형성이 불가능하다. N-옥시석신이미드로 기능화된 플레이트에 에틸렌디아민 링커를 처리하여 약염기 조건(pH 8.5) 하에서 이미드 결합을 형성하게 하였다. 이 반응을 위하여, 1 mol/L 농도의 EDA 200 μL 를 상온에서 1시간 동안 배양 후, 1×PBST(pH 8.5, 137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na_2HPO_4 , 2 mmol/L KH_2PO_4 , 및 0.1 % Tween 20 in dH_2O)로 5회 세척하였다. 이어서, 10 mmol/L의 에틸카르보디이미드 하이드로클로라이드(EDC, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) 및 250 mmol/L의 N-하이드록시석신이미드(NHS, Sigma-Aldrich)를 사용하여 에틸렌디아민 링커 아민기와 MEHP 카르복실기 사이의 아마이드 결합의 형성을 통해 40 mmol/L의 MEHP를 2.5시간 동안 고정하였다. 앵타머 스크리닝 전, MEHP 결합 플레이트를 1×PBST 버퍼로 10회 세척하였다.

[0093] **실시예 1-3. SELEX를 통한 MEHP(DEHP 대체물) 특이적 앵타머의 스크리닝**

[0094] 시험관 내(*in vitro*)에서의 올리고뉴클레오타이드의 선별은 MEHP(DEHP 대체물) 및 ssDNA 뉴클레오타이드 라이브러리로 고정화된 플레이트 상에서 수행하였다. 총 8 라운드의 SELEX가 수행되었다. 각각의 배양 후, 비결합 또는 약한 결합 앵타머를 1×PBST 버퍼(pH 8.5, 137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na_2HPO_4 , 2 mmol/L KH_2PO_4 , 및 0.1 % Tween 20)로 세척하여 제거한 반면, MEHP 결합 앵타머는 용출 버퍼(pH 11, 40 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L EDTA, 및 10 mmol/L NaOH)를 이용하여 회수하였다. 용출된 ssDNA 라이브러리의 증폭을 위하여 비대칭 PCR을 수행하였으며, ssDNA 라이브러리는 DNA-네이티브겔(12%) 전기영동 및 이후의 라운드를 위한 분쇄 및 침지 방법을 통해 수득하였다. 5 및 6 라운드 중, MEHP 대신에 모노이소노닐 프탈레이트를 첨가하였다. 그 결과, 모노이소노닐 프탈레이트 결합 앵타머는 제거되어 MEHP 특이성을 향상시켰다. 남아있는 앵타머는 이후의 SELEX 라운드를 위하여 사용하였다. SELEX로부터 수득한 ssDNA 서열을 분석하기 위하여, 상기 비대칭 PCR 방법(100 $\mu\text{mol/L}$ 대신에 10 $\mu\text{mol/L}$ 농도의 프라이머를 사용한다는 점만 다름)으로 용출된 ssDNA를 다시 증폭시켰다. 이후, dsDNA를 pET-28a 벡터에 삽입하였다. DNA가 삽입된 벡터는 *BamH I* 및 *Hind III* 제한 효소로 절단하였고, 라이게이션(ligation) 생성물을 추가로 생성시켰다. 라이게이션 생성물 내의 DNA 서열은 서열 분석법(Macrogen Inc., Seoul, Korea)을 통해 결정하였다. 그 결과, 표 1에 나열된 바와 같이, ssDNA 앵타머의 총 10 개의 후보를 선별하였으며, PT01 내지 PT10으로 지칭하였다. 특히, 가장 적합한 앵타머(PT01)를 이후의 모든 실험에서 사용하였다.

표 1

Name	Sequence	Frequency	서열번호
PT01	5'-ATGCGGATCCCGCGC GACCAACGGAAGCGCGCACCAACGGTG GCGCGAAGCTTGCGC-3'	21	1
PT02	5'-ATGCGGATCCCGCGC GGGTCTGAGGAGTGCGCGGTGCCAGTGAGTGCGCGAAGCTTGCGC-3'	4	2
PT03	5'-ATGCGGATCCCGCGC GGACAACGGGGCTGCTCCATATGCAITG GCGCGAAGCTTGCGC-3'	3	3
PT04	5'-ATGCGGATCCCGCGC CGCATAGCAGTGGGGGACGTTTCTGCAITG GCGCGAAGCTTGCGC-3'	2	4
PT05	5'-ATGCGGATCCCGCGC GGGGACGGTGTGCTGCTTGGGGGGTG GCGCGAAGCTTGCGC-3'	1	5
PT06	5'-ATGCGGATCCCGCGC GCACGGTGGACAACGCACGCTGCATAC GCGCGAAGCTTGCGC-3'	1	6
PT07	5'-ATGCGGATCCCGCGC CGTCGAAGGTCGCTCCATGATGGCCGTG GCGCGAAGCTTGCGC-3'	1	7
PT08	5'-ATGCGGATCCCGCGC TGGACGAGGTGCCGTGTTCCCTCCTATCG GCGCGAAGCTTGCGC-3'	1	8
PT09	5'-ATGCGGATCCCGCGC GAATGGCGGAATCGAGGAGGAGTCACT GCGCGAAGCTTGCGC-3'	1	9
PT10	5'-ATGCGGATCCCGCGC TGGGCACCGGGCAGTCGGGGTGC AAGAGT GCGCGAAGCTTGCGC-3'	1	10

실시예 1-4. DHEP-특이적 앵타머 PT01의 특성화

특성화는 앵타머-DEHP 상호작용에 의해 환원된 그래핀 옥사이드(reduced grapheme oxide; rGO)의 형광 회복 테스트를 통해 수행하였다. PT01 앵타머는 5' 말단에 FAM(6-카복시플루오레세인; 6-carboxyfluorescein) 염료로 변형하였다. DEHP와 앵타머의 결합 친화도를 계산하기 위하여, 다양한 농도의 앵타머(125, 250, 500, 1000, 2000, 및 4000 nmol/L) 200 μ L를 100 μ g rGO와 1×PBS 버퍼로 30분 동안 배양하여 형광 시그널을 소멸시켰다. 이후, DEHP와의 반응 전에 원심분리를 수행하여 비결합 앵타머로부터 rGO-앵타머 복합체를 분리하였다. 1 mmol/L 농도의 DEHP 200 μ L를 rGO-앵타머 복합체에 첨가하고, 1시간 동안 배양하였다. 앵타머의 농도에 따른 회수된 형광의 플롯 데이터에 기초하여, K_d 값을 다음 방정식 (1)에 의해 계산하였으며,

$$Y = B_{max} \times \frac{x^h}{(K_d)^h + x^h} \quad (1)$$

상기 Y는 형광 강도로 표현된 특이적 결합; 상기 X는 앵타머의 농도; 상기 B_{max} 는 분석에서 결합 부위의 최대 수; 상기 K_d 는 평형 반-결합을 달성하는데 요구되는 앵타머의 농도; h는 언덕 기울기(hill slope; 본 발명에서, h=1);를 나타낸다.

DEHP에 대한 PT01 앵타머 선택성을 조사하기 위하여, DEHP 유사체로서 1 mmol/L의 모노-이소노닐 프탈레이트 및 모노-부틸 프탈레이트를 rGO-앵타머 복합체와 함께 배양하였다. 배양 후, SpectraMax M2 spectrometer를 이용하여 형광을 측정하였다.

그 결과, 다음과 같은 PT01 앵타머 및 DEHP 사이의 결합 특성을 확인할 수 있었다.

SELEX를 통해 발견된 앵타머 고안 10개의 후보 중, PT01 앵타머는 가장 높은 빈도(21회)를 나타낸 반면, 다른 9개의 앵타머는 1 내지 4회의 빈도를 나타냈다(표 1). 따라서, PT01 앵타머를 QD-앵타센서에서의 사용을 위하여 선택하였다. PT01 앵타머의, DEHP 존재하의 결합 친화도, 선택성, 및 구조적 변화를 추가로 특징화하였다.

전술한 바와 같이, PT01 앵타머의 결합 친화도는 rGO-스크리닝에서 형광의 회복에 의해 결정되었다. PT01 앵타머의 결합 곡선을 도 3(a)에 나타내었다. 형광은 PT01 앵타머의 농도에 따라 증가하였고, ~ 1000 nmol/mL의 DEHP에서 포화에 도달하였다. PT01 앵타머의 해리 상수, K_d 를 방정식 (1)을 통해 계산한 값은 213.0 nmol/L이었다. nmol 수준의 K_d 값은 DEHP에 대한 PT01 앵타머의 높은 결합 친화도를 나타낸다(Sun and Zu 2015; Tombelli et al. 2005).

DEHP에 대한 PT01 앵타머의 선택성을 2개의 프탈레이트 유사체, 즉 모노이소노닐 프탈레이트 및 모노부틸 프탈레이트를 이용하여 추가로 조사하였다. 도 4(b)에서, rGO-스크리닝으로부터 얻어진 형광 시그널은 1 mmol/L 모노이소노닐 프탈레이트 및 모노부틸 프탈레이트를 갖는 PT01 앵타머 농도 범위에 걸쳐 나타내었다. 4000 nmol/L의 PT01 앵타머 농도에서, 형광 회복은 DEHP보다 모노이소노닐 프탈레이트(58%) 및 모노부틸 프탈레이트(40%)에 대해 현저히 낮음을 확인하였다. 이러한 결과는 PT01 앵타머가 유사한 프탈레이트 유사체보다 DEHP에 대해 현저히 높은 특이성을 가진다는 것을 의미한다.

[0109] 실시예 2. QD-애포타센서를 위한 절단 애포타머 및 DNA 프로브

[0110] PT01 애포타머를 절단하고 DNA 프로브를 선별하여 QD-애포타센서를 구성하였다. PT01 애포타머의 절단은 QD-애포타센서에서 애포타머의 접근성 및 결합 기능을 향상시키기 위하여 수행하였다. SELEX로 스크리닝된 PT01 애포타머(5'-NH₂-C₆-ATG CGG ATC CCG CGC GAC CAA CGG AAG CGC GGC ACC ACA ACG GTG GCG CGA AGC TTG CGC-3')의 ssDNA 서열로부터, 3개의 절단 애포타머를 고안하여 표 2에 나열하였다. 도 1에 나타난 바와 같이, (i) truncated a, (ii) truncated b, (iii) truncated c로 표시된, 3개의 절단 애포타머는 각각 45, 28, 및 22-mer 애포타머에 상응한다. 각각의 절단 애포타머는 원래 PT01 애포타머의 하나 이상의 루프-스텝 구조를 가지고 있다.

표 2

Name	Sequences of oligonucleotides (5' → 3')	Size	서열번호
PT01 aptamer	NH ₂ -C ₆ -ATG CGG ATC CCG CGC GAC CAA CGG AAG CGC GGC ACC ACA ACG GTG GCG CGA AGC TTG CGC	60 mer	1
Truncated a aptamer	NH ₂ -C ₆ -GAC CAA CGG AAG CGC GGC ACC ACA ACG GTG GCG CGA AGC TTG CGC	45 mer	11
Truncated b aptamer	NH ₂ -C ₆ -AAG CGC GGC ACC ACA ACG GTG GCG CGA A	28 mer	12
Truncated c aptamer	NH ₂ -C ₆ -AAC GGA AGC GCG AAG CTT GCG C	22 mer	13
DNA probe 1	NH ₂ -C ₆ -GGT GCC GCG CTT	12 mer	14
DNA probe 2	NH ₂ -C ₆ -GCT TCC GTT	9 mer	15
DNA probe 3	NH ₂ -C ₆ -AAG CTT CGC GCC A	13 mer	16

[0111]

[0113] 또한, 도 1 및 표 2에 나타난 바와 같이, PT01 및 절단 a, b, 및 c 애포타머와 결합하는 3개의 상보적 DNA 프로브를 고안하였다. DNA 프로브 1, 2, 및 3으로 표시된 3개의 DNA 프로브는 각각 12, 9, 및 13-mer 길이를 가진다. 본 발명에서 사용되는 모든 애포타머 및 DNA 프로브는 상업적으로 합성하였으며, 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동(polyacrylamide gel electrophoresis; PAGE)을 이용하여 정제하였고, 양자점 입자와의 추가 컨쥬게이션을 위하여 5' 말단(Bioneer Corporation)에 아민기와 C6 스페이서(spacer)로 변형하였다. 애포타머의 2차 구조는 DNA 폴딩 프로그램, Mfold(Zuker 2003)로 예측하였다.

[0114] QD-애포타센서를 위한 애포타머-DNA 프로브 최상의 조합을 결정하기 위해 추가 실험을 수행하였다. DEHP 농도별(10, 100, 1000, 및 10000 ng/mL)로 4개의 애포타머 고안 및 3개의 DNA 프로브의 QD-애포타센서 복합체에 적용하였다.

[0116] 그 결과, 다음과 같은 QD-애포타센서를 위한 애포타머-DNA 프로브 최상의 조합을 확인할 수 있었다.

[0118] 상이한 DNA 프로브 및 애포타머를 가진 QD-애포타센서에 대한 결과를 도 4에 나타내었다. QD-애포타센서를 위한 가장 적절한 애포타머-DNA 프로브 조합을 선택하기 위하여, 정규화된 형광 대 DEHP 농도를 회귀 곡선으로 도시하였다. 가장 높은 R² 값을 가진 애포타머-DNA 프로브 조합이 가장 적절한 QD-애포타센서에 해당한다. 12개의 가능한 애포타머-DNA 프로브 조합에 대한 R² 결과를 표 3에 나타내었다. 절단 c 애포타머를 가진(도 4(a), 점선 박스) DNA 프로브 1은 DEHP 농도 범위에 걸쳐 점진적으로 감소하는 기울기(-1.16)를 가지며, 가장 높은 R² 값(0.74)를 가진다. 따

라서, QD-애포타센서를 위한 애포타머-DNA 프로브의 최상의 조합은 절단 c 애포타머를 가진 DNA 프로브 1임을 확인 하였다.

표 3

DNA Probe	Aptamer	Regression equation	R ²
DNA probe 1	Truncated a	$y = -2.01 \log_{10}(x) + 22.18$	0.70
	Truncated b	$y = -1.45 \log_{10}(x) + 23.69$	0.43
	Truncated c	$y = -1.16 \log_{10}(x) + 20.14$	0.74
	Original PT01	$y = 0.19 \log_{10}(x) + 20.20$	0.04
DNA probe 2	Truncated a	$y = -0.33 \log_{10}(x) + 8.48$	0.22
	Truncated b	$y = -0.14 \log_{10}(x) + 6.79$	0.02
	Truncated c	$y = -0.52 \log_{10}(x) + 8.79$	0.30
	Original PT01	$y = -0.13 \log_{10}(x) + 6.41$	0.03
DNA probe 3	Truncated a	$y = -0.84 \log_{10}(x) + 15.55$	0.34
	Truncated b	$y = -2.02 \log_{10}(x) + 20.28$	0.65
	Truncated c	$y = -0.90 \log_{10}(x) + 17.84$	0.27
	Original PT01	$y = -0.73 \log_{10}(x) + 16.57$	0.32

실시예 3. DEHP 결합 부위와 QD-애포타센서의 상호작용

도 5(a)에 나타난 바와 같이, DEHP는 여러 가능한 애포타머와의 결합 부위가 존재한다. 이러한 결합 부위를 개별적으로 조사하기 위하여, 이러한 결합 부위와 동일한 구조를 가지는 화합물을 사용하였다. 이러한 화합물은 프탈산, 벤조산, 에틸 아세테이트, 및 2-에틸헥실 아세테이트이다. 이들 모두는 도 5(a)에 나타난 바와 같이, DEHP의 부분 구조를 가지므로, DEHP와 절단 c 애포타머의 결합 패턴을 조사할 수 있게 한다. 각 용액 100 ng/mL을 동일한 반응 버퍼에서 제조하였다. 음성 대조군(즉, 타겟 화합물이 없음)으로, 초순수(ultrapure) 증류수(DNase/RNase/Protease free, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하였다. 양성 대조군으로, 반응 버퍼에서의 최종 농도가 100 ng/mL인 DEHP 표준 용액을 사용하였다. 본 발명에서, 사용된 QD-애포타센서는 절단 c 애포타머 및 DNA 프로브 1을 기반으로 하였다.

4개의 화합물(즉, 프탈산, 벤조산, 에틸 아세테이트, 및 2-에틸헥실 아세테이트)과의 결합 시 절단 c 애포타머의 구조적 변화를 관찰하기 위하여, 원편광 이색성(circular dichroism; CD) 분광편광법(spectropolarimetry)의 스펙트럼을 사용하였다. 절단 c 애포타머를 0.02 mol/L 농도의 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (Daejung, Gyunggido, Korea), 0.04 mol/L 농도의 KCl(Duksan, Gyunggido, Korea), 0.1 mol/L 농도의 NaCl(Junsei, Tokyo, Japan), 및 0.005% 농도의 소듐 도데실 설페이트(SDS, Sigma-Aldrich)와 함께, 0.02 mol/L 농도의 Tris-HCl 버퍼(pH 8.0, Sigma-Aldrich) 300 μ L에 현탁시켰다. 절단 c 애포타머(4 μ mol/L), 다양한 농도(0, 0.1, 1, 및 5 mg/L)의 DEHP 또는 상기 4개의 화합물, 및 0.02 mol/L 농도의 Tris-HCl 버퍼로 구성되는 300 μ L의 용액을 실온에서 밤새 배양하였다.

CD 스펙트럼은 25°C에서 Peltier 항온 셀 홀더를 장착한 Jasco J-1500 분광편광계(Jasco Inc., Eaton, USA)를 이용하여 기록하였다. 상기 샘플을 광학 경로 길이가 1 mm인 석영 큐벳으로 옮기고, 25°C에서 50 nm/min의 스캔 속도로 350 내지 200 nm로 스펙트럼을 얻었다. 스펙트럼은 버퍼 만의 CD 신호로 기준선-감산(baseline-subtracted)되었다. 데이터는 3회 스캔으로부터 수집하였다.

그 결과, 다음과 같은 DEHP 결합 부위와 절단 c 애포타머의 상호작용을 확인할 수 있었다.

도 6(a)에 나타난 바와 같이, 대조군과 비교하여 DEHP, 프탈산, 벤조산, 에틸 아세테이트, 및 2-에틸헥실 아세테이트에 대한 정규화된 형광에서의 감소는 각각 $24.4 \pm 3.3 \%$, $11.2 \pm 0.8 \%$, $20.1 \pm 5.2 \%$, $11.2 \pm 13.3 \%$, 및 $27.1 \pm 16.3 \%$ 이다. 정규화된 형광에서의 더 높은 감소는 더 많은, DNA 프로브 1의 해리 및 각각의 화합물의 절단 c 애포타머와의 결합을 나타낸다. 대조군 실험은 벤조산 및 2-에틸헥실 아세테이트 모두 애포타머와의 결

합을 담당함을 시사한다.

[0129] 각각의 화합물에 의한 절단 c 앵타머의 구조적 변화는 도 6(b) 내지 6(d)에 나타내었다. 절단 c 앵타머를 DEHP와 배양할 때, ~250 nm 및 ~320 nm에서의 네거티브 CD 밴드는 DEHP 농도가 증가함에 따라 증가함을 보였다(도 6(b), 화살표). 벤조산 또한 벤조산 농도가 증가함에 따라 ~250 nm에서의 네거티브 CD 밴드가 증가함을 보였다(도 6(c), 화살표). 벤조산 농도가 0에서 5 mg/L로 증가할 때, 타원율(ellipticity, $\Delta \epsilon = -18.01 \text{ L/mol} \cdot \text{cm}$, ~28%)에서의 변화가 발생하였다. 반면에, 2-에틸헥실 아세테이트는 2-에틸헥실 아세테이트의 농도가 증가함에 따라 ~320 nm에서의 네거티브 밴드의 약한 증가를 보였다(도 6(d), 화살표).

[0130] ~250 nm에서 밴드의 네거티브 증가는 절단 c 앵타머로의 타겟 인터칼레이션(intercalation)에 의한 것임을 알 수 있다. 이는 타겟 분자가 특정 염기 쌍 내에서 인터칼레이션할 때, 기저 배향의 변화로부터 유도 될 수 있다 (Monnot et al. 1992; Sarkar et al. 2008). 2-에틸헥실 아세테이트 및 DEHP 모두에서 관찰되는, ~320 nm에서 밴드의 또 다른 네거티브 증가는 인터칼레이팅 분자가 DNA 앵타머와 리간드 전이 모멘트를 형성 할 때 발생할 수 있다(Deiana et al. 2015; Garbett et al. 2007; Monnot et al. 1992).

[0131] 도 5에 나타난 바와 같이, 벤조산 및 2-에틸헥실 아세테이트는 DEHP 부분 구조와 유사하다. 벤젠 고리를 가진 벤조산은 DEHP의 머리 부분과 유사하고, 알킬 결사슬을 가진 2-에틸헥실 아세테이트는 DEHP의 꼬리 부분과 유사하다. DEHP와 결합할 때, ~250 및 ~350 nm에서 CD 밴드에 나타난 앵타머의 구조적 변화는 벤조산 및 2-에틸헥실 아세테이트 상호작용을 각각 포함한다. CD 스펙트럼의 변화가 적고, 결합 메커니즘을 설명하기 위한 연구가 더 필요하지만, 도 6에 나타난 결과는 절단 c 앵타머가 벤조의 그룹(벤젠 고리) 및 2-에틸헥실 그룹(알킬 결사슬) 모두와 결합할 수 있음을 나타낸다.

[0133] 실시예 4. QD-앵타센서에 의한 DEHP의 정량 검출

[0134] QD-앵타센서는 다음과 같이 합성하였다: 아민화된 자성 비드(MB, 2×10^9 beads/mL, Dynabead M270, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 에틸카르보디이미드 하이드로클로라이드(EDC, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) 및 N-하이드록시석신이미드(NHS, Sigma-Aldrich)를 이용한 아미드 결합 형성을 통해 카르복실 양자점 나노 입자(QD₅₆₅, 2 $\mu\text{mol/L}$, Invitrogen, Carlsbad, USA)와 공유결합시켰다. 5'-아미노화 ssDNA 앵타머는 다시 EDC/NHS 반응을 통해 MB-QD₅₆₅ 입자의 카르복시기에 부착하여, MD-QD₅₆₅-앵타머 복합체의 최종 형태가 되었다. 이후, 비-특이적 결합을 줄이기 위하여, MB-QD₅₆₅-앵타머 및 DNA 프로브-QD₆₅₅의 복합체를 42°C에서 20분 동안 NaBH₄ 용액으로 부동태화(passivated)시켜, 비사용 작용기를 비활성시켜 QD-앵타센서를 완성하였다. 마지막으로, QD-앵타센서(MB-QD₅₆₅-앵타머 및 DNA 프로브-QD₆₅₅ 복합체)를 180 μL 의 반응 버퍼(0.02 mol/L MgCl₂ · 6H₂O, 0.04 mol/L KCl, 0.1 mol/L NaCl, 및 0.005 % SDS로 구성된 0.02 mol/L Tris-HCl 버퍼)에 현탁시켰다.

[0135] DEHP 표준 용액은 AccuStandard(New Haven, CT, USA)로부터 구입하였으며, MeOH에 용해하여 최종 농도를 1000 mg/L로 만들었다. DEHP 표준 용액의 10배 희석액 시리즈는 증류수로 만들었으며, 용액 20 μL 을 QD-앵타센서(MB-QD₅₆₅-앵타머 및 DNA 프로브-QD₆₅₅ 복합체)를 포함하는 상기 반응 버퍼에 처리하였다. 이 용액들을 300 rpm(MixMate shaker, Eppendorf, Hamburg, Germany)에서 부드럽게 혼합되며 실온에서 4시간 동안 배양하였다. 배양 후, 비결합 DNA 프로브-QD₆₅₅를 제거하기 위하여, DEHP-앵타머 복합체를 0.02 mol/L Tris-HCl 게 버퍼(즉, 상기 반응 버퍼와 동일한 조성)로 2회 행겼다. 이후, 복합체를 200 μL 의 동일한 Tris-HCl 버퍼에 재현탁하고, SpectraMax M2 분광편광계를 이용하여 형광 측정을 수행하였다. QD₅₆₅ 및 QD₆₅₅의 형광은 360 nm의 여기 파장(excitation wavelength) 하에서 각각 570 및 660 nm의 방출 파장(emission wavelength)에서 측정하였다. 모든 실험은 3회 수행하였으며, 결과는 방정식 (2)에 주어진 바와 같이, 정규화된 형광으로 결정되었다.

$$\text{Normalized fluorescence} = \frac{\text{Fluorescence of QD}_{565}}{\text{Fluorescence of QD}_{655}} \quad (2)$$

[0138] QD-앵타센서의 감도를 조사하기 위하여, 순차적으로 희석된 DEHP 표준 용액 20 μL 를 QD-앵타센서 복합체를 포함하는 배양 버퍼 180 μL 에 첨가하여, DEHP 최종 농도를 0.0005, 0.0025, 0.025, 0.25, 2.5, 25, 및 100 ng/mL로 만들었다. 20 μL 의 초순수 증류수를 음성 대조군으로 사용하였다.

- [0139] 도 5(b)에 나타난 바와 같이, DEHP에 대한 QD-애포타센서의 감도는 8개의 DEHP 유사체, 즉 디메틸 프탈레이트(dimethyl phthalate; DMP), 디에틸 프탈레이트(diethyl phthalate; DEP), 디-n-부틸 프탈레이트(di-n-butyl phthalate; DBP), 디-n-헥실 프탈레이트(di-n-hexyl phthalate; DHP), 디이소부틸 프탈레이트(diisobutyl phthalate; DIBP), 디이소노닐 프탈레이트(diisononyl phthalate; DINP), 부틸-벤질 프탈레이트(butyl-benzyl phthalate; BBP), 및 디페닐 프탈레이트(diphenyl phthalate; DPP)를 이용하여 측정하였다. DMP, DEP, DBP, 및 BBP는 AccuStandard에서, DHP, DIBP, DINP, 및 DPP는 Sigma-Aldrich에서 구입하였다. 양성 대조군인 DEHP를 포함하는 9개의 모든 화학물질(100 ng/mL)을 QD-애포타센서로 추가 실험하였다. 초순수 증류수는 음성 대조군으로 사용하였다. 모든 샘플은 3회분으로 준비하였다.
- [0141] 그 결과, 다음과 같은 DEHP 검출을 위한 QD-애포타센서의 감도 및 선택성을 확인할 수 있었다.
- [0143] QD-애포타센서(DNA 프로브 1 및 절단 c 애포타머)를 통한 DEHP의 정량화를 도 7(a)에 나타내었다. 점선은 음성 대조군(즉, 0 ng/mL DEHP)의 정규화된 형광을 나타낸다. 정규화된 형광은 DEHP 농도가 증가함(5차수의 크기로, 0.001 내지 100 ng/mL, ppb)에 따라 직선성($R^2 = 0.77$, $y = -0.58 \log_{10} x + 9.98$)을 가지고 감소한다. 정량 한계(limit of quantification; LOQ)는 ~ 0.5 pg/mL(ppt)로 측정되었다. 프탈레이트 검출에 관한 다른 유사한 연구와 비교하여, 본 발명의 QD-애포타센서는 낮은 LOQ를 가진다. 구체적으로, 이전의 유사한 프탈레이트 검출 연구의 간략한 요약은 다음과 같다: DBP 검출을 위한 면역분석법(immunoassay)은 0.05 ng/mL(Zhang et al. 2007), DIBP 검출은 5.82 ng/mL(Cui et al. 2015), 및 DEP 검출은 6 ng/mL(Tian et al. 2015)의 LOQ를 가진다. 나노섬유 폴리아닐린 필름을 이용한 석영 결정 마이크로저울 센서는 기체 샘플에서 DBP의 검출 한계가 20 ppb이다(Wang et al. 2013). 프탈산 에스터를 위해 개발된 전기화학적 애포타센서는 DEHP에 대해 3.9 pg/mL의 LOQ를 가진다(Han et al. 2017).
- [0144] 도 7(b)에 나타난 바와 같이, 선형 알킬기를 가진 유사체는 선-무늬 막대로 도시하였고, 이소알킬기 및 아릴기를 가진 유사체는 어두운-파란색 및 초록색 막대로 각각 도시하였다. 대조군과 관련하여, DEHP는 정규화된 형광에서 가장 큰 변화를 나타내었다(~ 38.0%). 이와 비교하여, 대부분의 유사체는 정규화된 형광에서 유의한 변화가 없었다. DMP 및 DEP와 같은 DEHP와 유사한 프탈레이트의 경우, 정규화된 형광의 변화는 각각 11.8% 및 25.1%이다. 이는 애포타머의 벤젠 고리의 인터칼레이션이 결사슬의 인터칼레이션 보다 우수하다는 것과 일치하는 결과이다. 그럼에도 불구하고, QD-애포타센서는 DEHP에 특이성을 나타내었다.
- [0146] **실시예 5. DEHP 검출을 위한 휴대용 분석기**
- [0147] 도 8에서 나타난 바와 같이, QE-애포타센서에 의한 DEHP 검출을 위한 휴대용 분석기를 개발하였다. 상기 분석기는 진동 모터(Model Z7AL2B1690002, Jinlong Machinery and Electronics, China)가 부착된 큐벳 홀더로 구성되었다. 형광 측정은 565 및 655 nm 포토다이오드(S6430-01 and S6429-01, Hamamatsu Photonics K.K., Japan)와 큐벳 홀더의 측면에 부착된 UV LED(10 W, 400 - 405 nm, Epiled, China)를 통해 수행되었다. 맞춤형 충전 통합 회로가 응답을 측정하고 각각의 포토다이오드를 위한 출력 전압을 생성하였다. 출력 전압은 컨트롤러(Mega 2560, Arduino, Italy)에 의해 판독되고, 각각 0 내지 5 V에 반응하는 아날로그-디지털 값 0 내지 1024로 표시되었다. 이러한 전압은 판독 포트를 통해 외부 데이터로거(PCS10, 4-Channel Recorder, Velleman, UK)를 이용하여 동시에 읽을 수 있다. 서보 모터(TowerPro SG90 Servo, 4.8 V, Taiwan)는 자석(neodymium, N35, square 10 X 15 X 2 mm, JH company, Seoul, Korea)을 큐벳을 향하여 또는 큐벳으로부터 멀리 위치시키기 위하여 사용되었다. 시약을 주입하고 회수하기 위하여, 2개의 소형 연동 펌프(Dolomite Miniature Peristaltic Pump, Dolomite, Royston, UK)를 사용하였다. 시약은 수직 작동기에 부착된 슬라이딩 마운트(mount)를 통해 차례로 들어 올려 지거나 큐벳에 내려졌다. 모든 동작은 LCD, 메뉴 토글(toggle) 및 제어 버튼을 사용하는 컨트롤러 및 사용자 인터페이스를 통해 타이밍이 맞춰졌다. UV LED 전압 표시기는 UV LED에 인가된 전압(applied voltage)을 나타내었다. 전원은 스테레오 포트를 통해 충전될 수 있는 온보드 배터리로 공급되었다.
- [0148] 작동 전, 샘플이 들어있는 큐벳을 먼저 큐벳 홀더에 넣었다. 시약(QD-애포타센서 포함)을 큐벳에 주입하였다. 배양 중, 진동 모터를 사용하여 복합체를 현탁 상태로 유지하였다. 세척 중, 자석은 큐벳에 가깝게 이동하여 결합된 QD-애포타센서 복합체를 그 자리에 고정하였다. 형광 측정은 QD-애포타센서를 여기시키기 위해 UV LED를 이용하

여 수행하는 반면에 포토다이오드는 565 및 655 nm 방출을 측정하였다. 정규화된 형광 측정은 방정식 (3)으로 주어진다:

$$\text{Normalized Fluorescence} = \frac{\text{Photodiode Response from QD655}}{\text{Photodiode Response QD565}} \quad (3)$$

실시에 6. 휴대용 분석기를 통한 DEHP의 정량 검출

총 200 μL 의 반응물을 UV/vis 범위에 대해 세미-마이크로 큐벳(PMMA, Kartell[®], Milan, Italy)에 준비하였다. 반응물은 180 μL 의 QD-애타센서 복합체 및 20 μL 의 DEHP(0.0005, 0.0025, 0.025, 0.25, 2.5, 25, 및 100 ng/mL)를 포함하는 샘플을 포함한다. 20 μL 의 초순수 증류수를 DEHP 대신에 음성 대조군으로 사용하였다. 각각의 샘플을 실온에서 30분 동안 배양한 후, 0.02 mol/L 농도의 Tris-HCl 계 버퍼(실험실 프로토콜에서 QD-애타센서 반응과 동일한 버퍼)로 행겼다. 배양 후, 자석을 큐벳 홀더에 가깝게 이동하여, MB-QD₅₆₅-애타머-DNA 프로브-QD₆₅₅ 복합체를 끌어당기기 위하여 20초 동안 그 위치에 유지하였다. 해리된 및 비결합된 DNA 프로브-QD₆₅₅를 포함하는 폐액은 연동 펌프를 통해 폐기된다. 200 μL 의 깨끗한 버퍼를 펌프를 통해 큐벳에 도입하였다. 자석을 큐벳으로부터 멀리 이동하고, 진동 모터는 재현탁을 위하여 복합체를 흔들었다. 이 세척 주기를 2회 반복하였다. 형광 측정 전, 샘플 부피는 400 μL 로 조정하였다.

그 결과, 다음과 같은 QD-애타센서 기반 휴대용 분석기에 의한 DEHP 검출을 확인할 수 있었다.

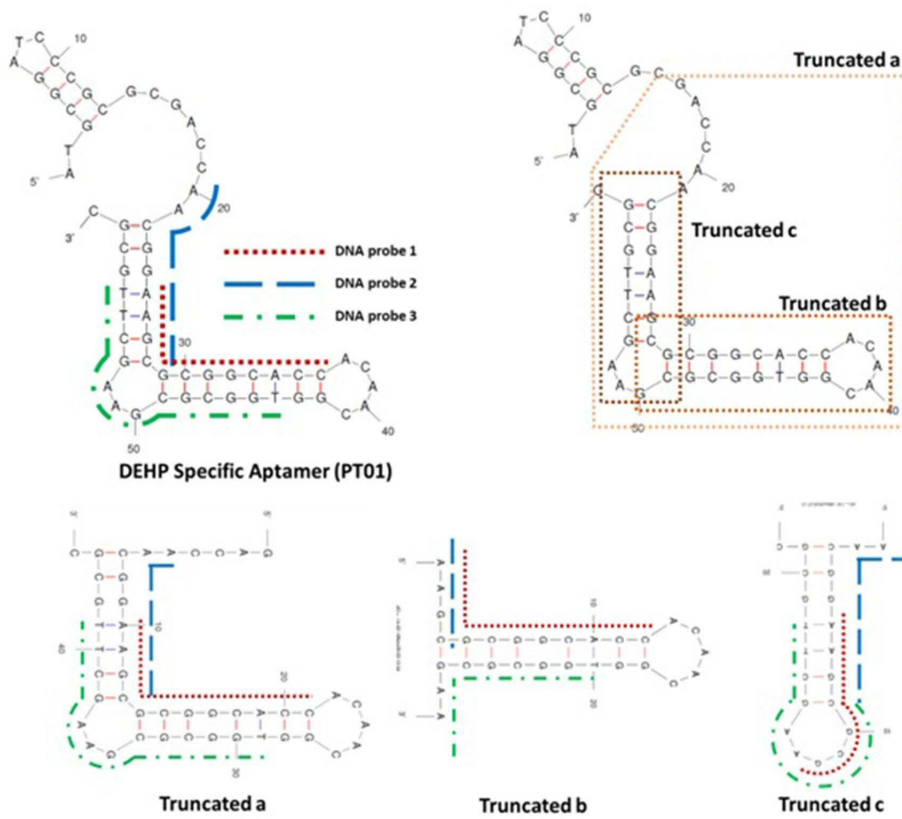
도 9에 나타난 바와 같이, 실험실 프로토콜을 통한 정규화된 형광 및 휴대용 분석기의 정규화된 포토다이오드 반응은 DEHP 농도 범위(0.0005 내지 1000 ng/mL)에 대해 잘 상관(피어슨 상관 계수, $r = 0.86$, $P\text{-value} < 0.001$)된다. 이러한 상관 관계는 휴대용 분석기에서 QD-애타센서를 작동하는 것이 실험실 환경에서 수행하는 것과 동등하다는 것을 의미한다. 즉, 환경적으로 관련된 DEHP 농도(< 100 ng/mL)를 감지하는데 휴대용 분석기를 사용할 수 있다.

본 발명에서는 213 nmol/L의 결합 친화도를 갖는 DEHP에 특이적인 60-mer 애타머(PT01)를 동정하였다. 3개의 DNA 프로브(DNA 프로브 1 내지 3)뿐만 아니라 PT01 애타머 및 3개의 이의 절단 애타머(절단 a 내지 c 애타머)의 가능한 조합을 조사하여, QD-애타센서를 위한 최상의 애타머-DNA 프로브 조합을 동정하였다. 특히, DNA 프로브 1 및 절단 c 애타머(22-mer)의 조합을 이용한 QD-애타센서는 DEHP 농도 범위(0 내지 10000 ng/mL)에 대한 회귀 방정식에서 가장 높은 수치, $R^2 = 0.74$ 를 나타내어, 최상의 조합임을 확인하였다. 절단 c 애타머과 DEHP 사이의 결합 메커니즘을 연구한 결과, 애타머는 벤조익 그룹(벤젠 고리) 및 2-에틸헥실 그룹(알킬 결사슬) 모두와 인터칼레이션을 통해 결합할 수 있다. QD-애타센서는 DEHP 농도 범위(0.0005 내지 100 ng/mL)에 대해 LOQ = 0.5 pg/mL의 높은 감도를 나타내며, 또한 정규화된 형광에서 38% 변화로 다른 프탈레이트 유사체 보다 DEHP에 대해 우수한 선택성을 나타냄을 확인하였다. 마지막으로, QD-애타센서 기반 휴대용 분석기는 실험실 프로토콜과 좋은 상관 관계($r = 0.86$)를 나타내었는데, 이는 QD-애타센서 기반 휴대용 분석기를 환경적으로 관련된 농도(< 100 ng/mL)에서 DEHP검출을 할 수 있음을 의미한다.

이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

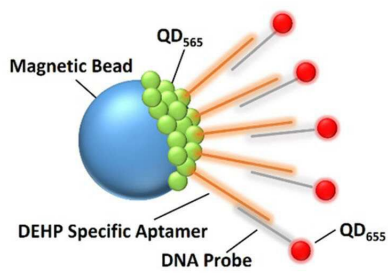
도면

도면1

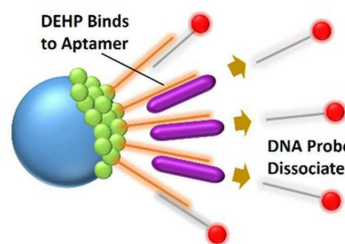


도면2

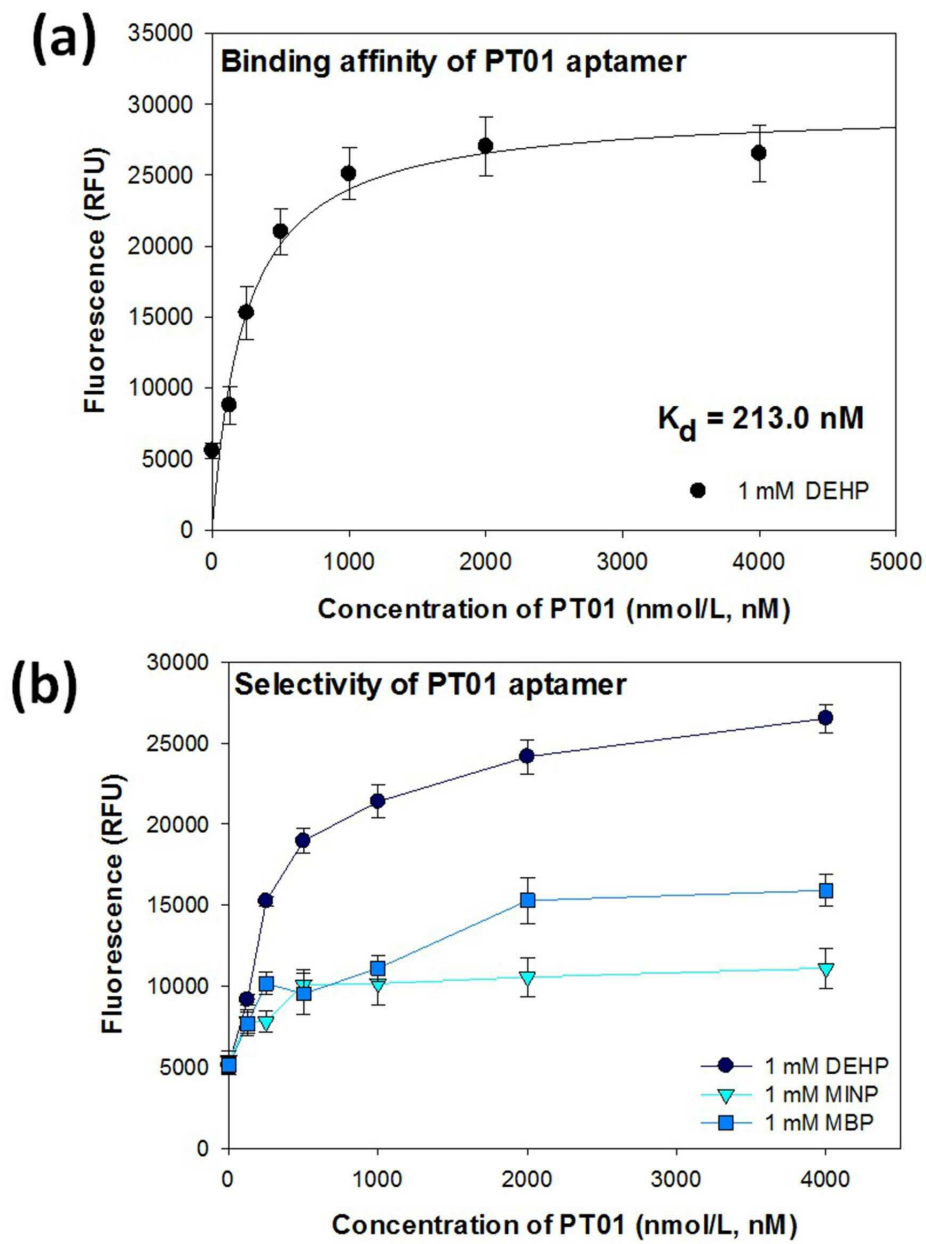
(a)



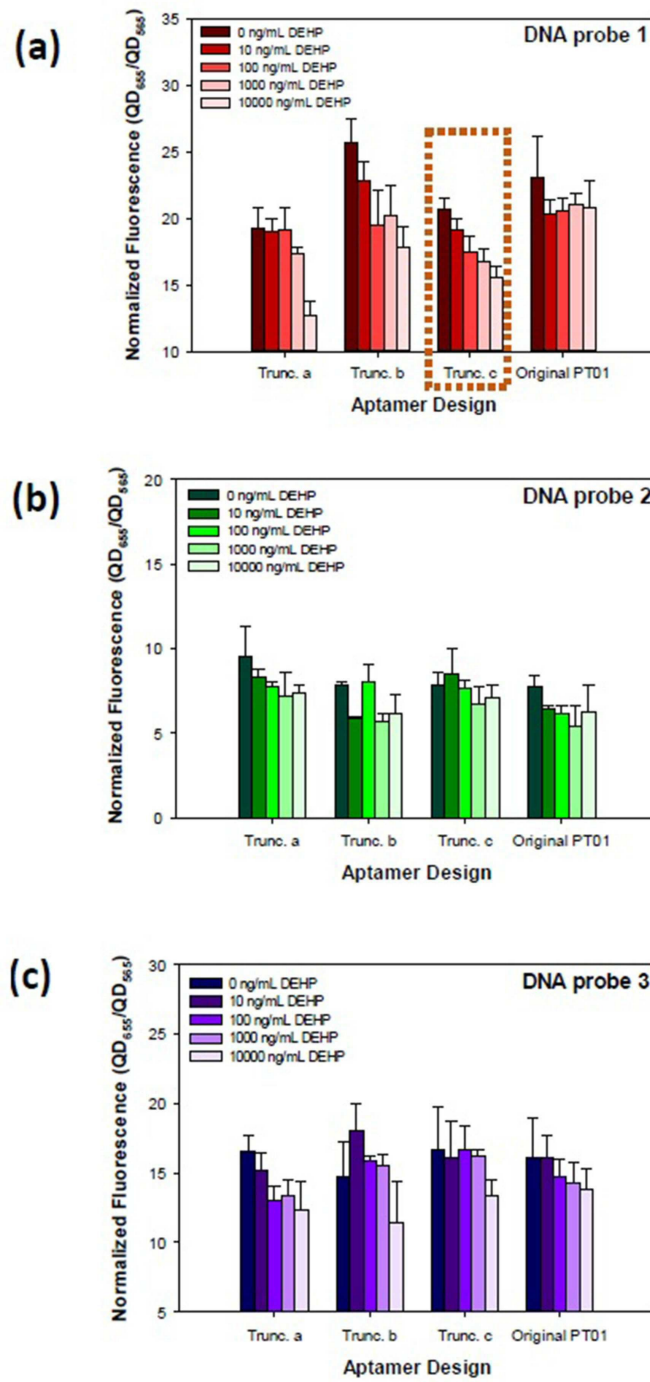
(b)



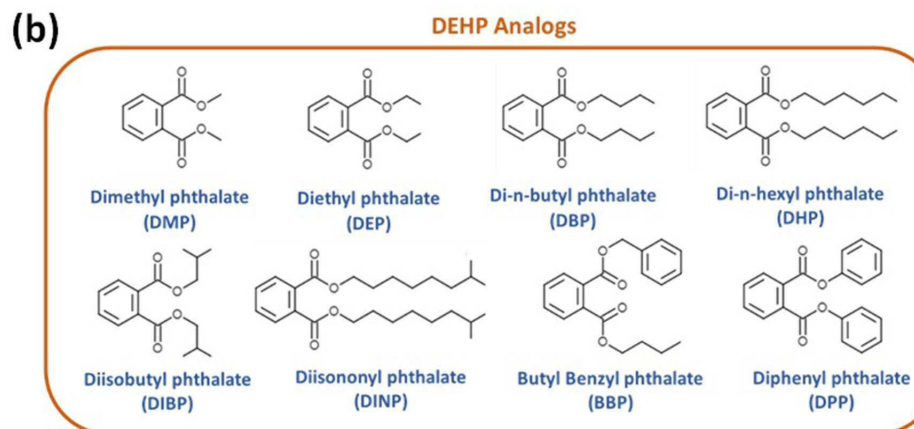
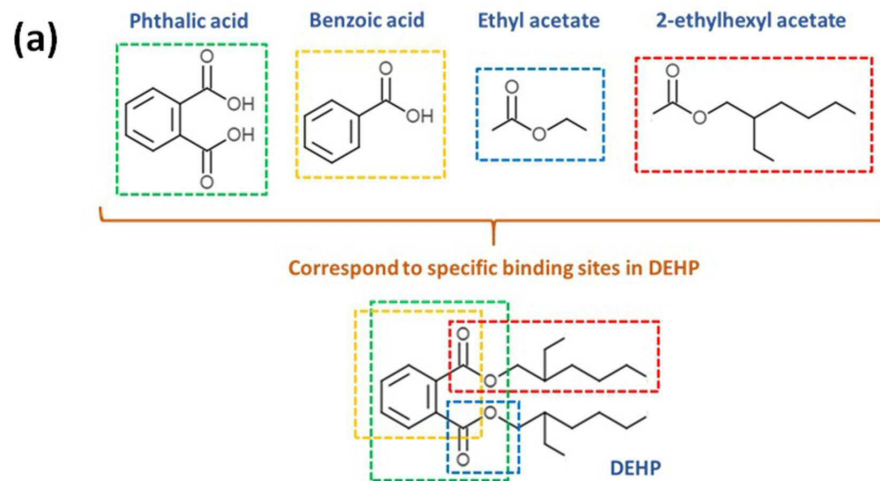
도면3



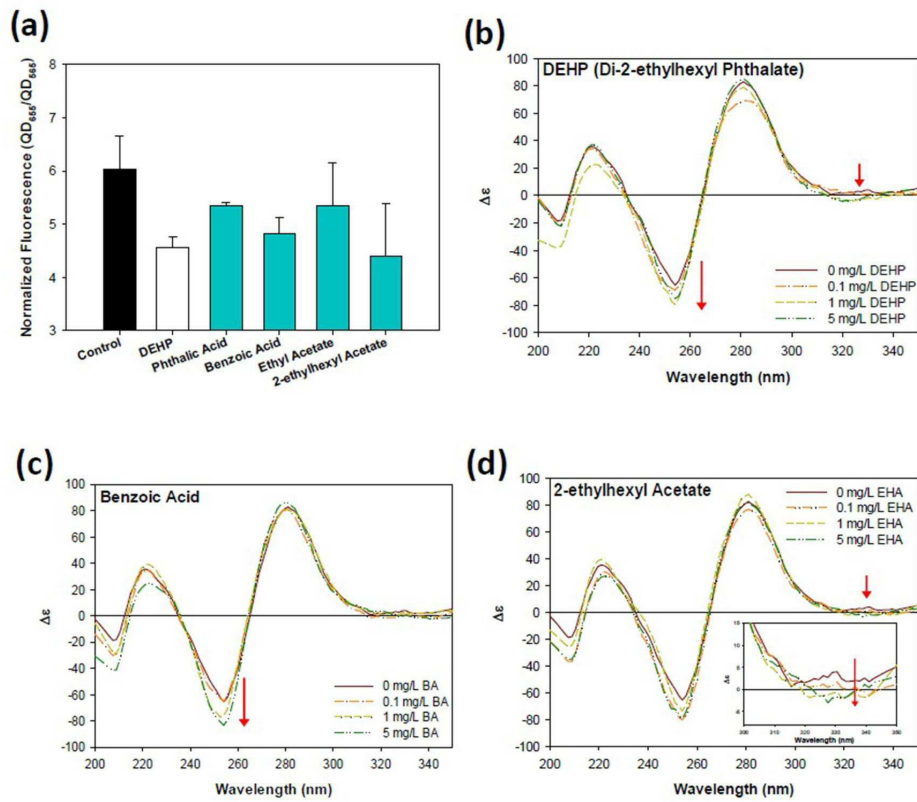
도면4



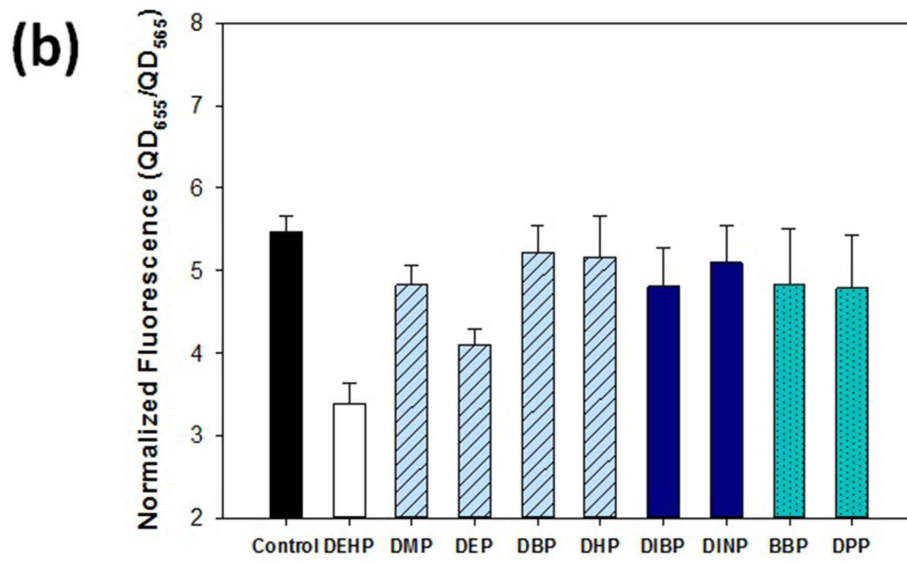
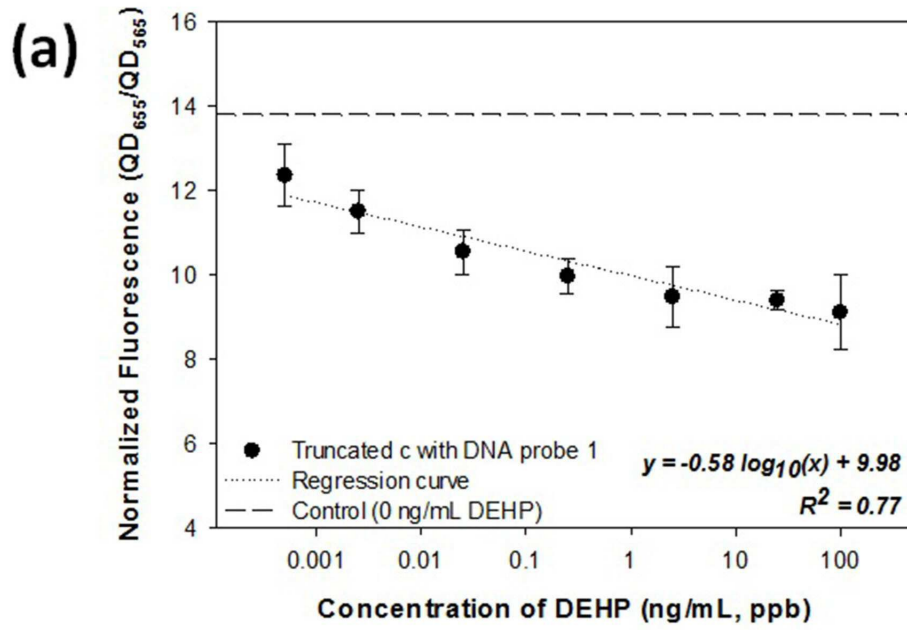
도면5



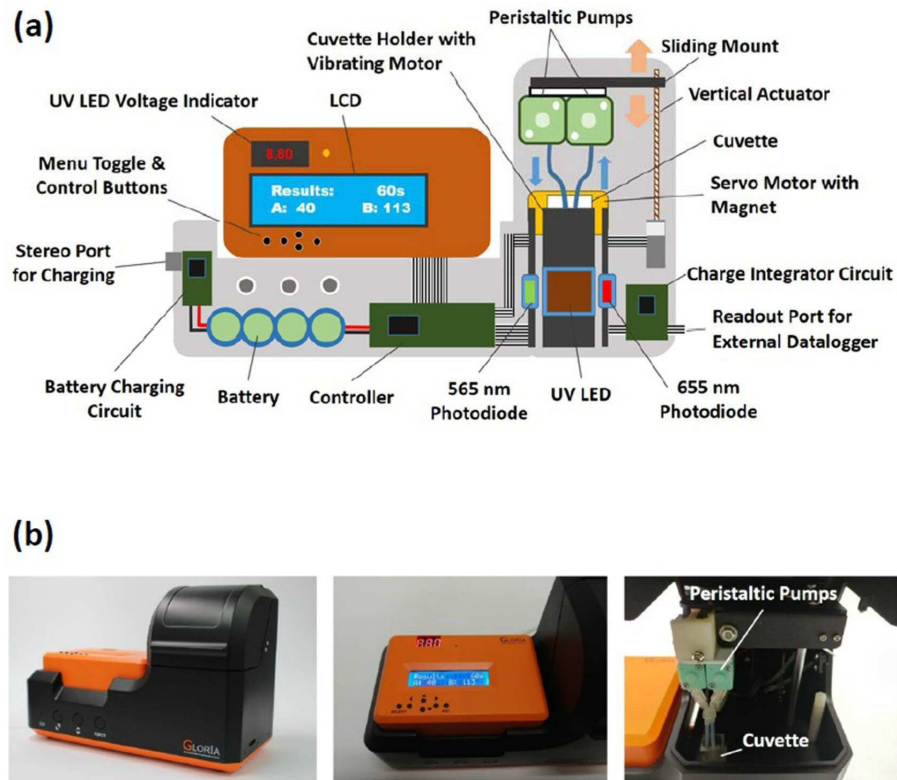
도면6



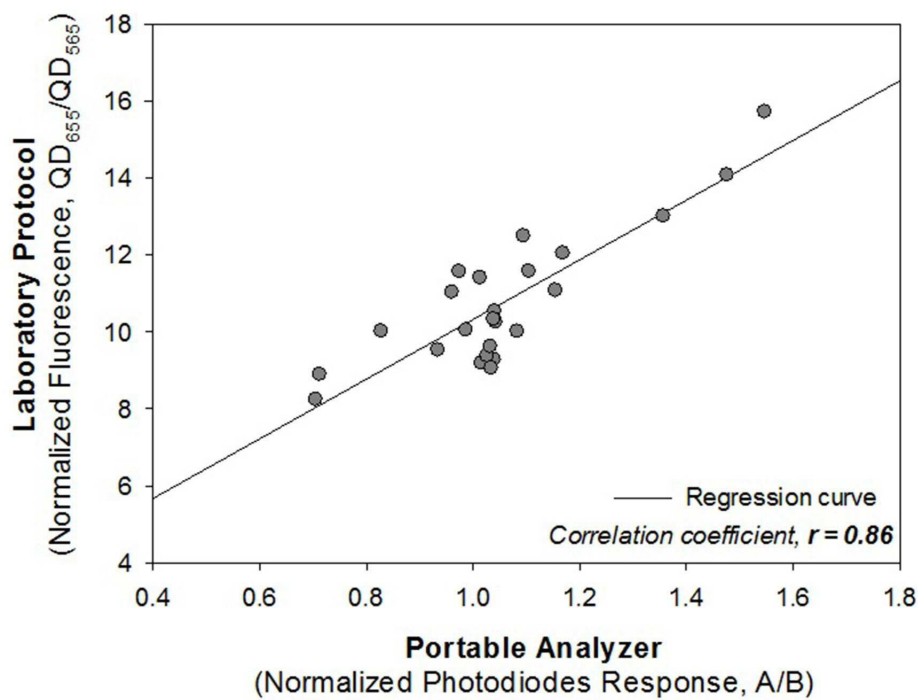
도면7



도면8



도면9



서열 목록

<110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation

<120> Aptamer for DEHP detection and DEHP detecting device using the

same

<130> KPA180885-KR

<160> 16

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PT01 aptamer

<400> 1

atgcggatcc cgcgcgacca acggaagcgc ggcaccacaa cgggtggcgcg aagcttgcg 60

60

<210> 2

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PT02 aptamer

<400> 2

atgcggatcc cgcgcggttc tgaggagtgc gcggtgccag tgagtgcgcg aagcttgcg 60

60

<210> 3

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PT03 aptamer

<400> 3

atgcggatcc cgcgcggaca acggggctgc tccatactgc atgtggcgcg aagcttgcg 60

60

<210> 4

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PT04 aptamer

<400> 4
atgcggatcc cgcgccgcat agcagtgggg gacgtttcct gcatggcgcg aagcttgcg 60
60

<210> 5
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> PT05 aptamer
<400> 5
atgcggatcc cgcgcgggga cgggtgctgcg tcctttgggg gggtagcgcg aagcttgcg 60
60

<210> 6
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> PT06 aptamer
<400> 6
atgcggatcc cgcgcgacg gtggacaacg cagcctgca tacacgcgcg aagcttgcg 60
60

<210> 7
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> PT07 aptamer
<400> 7
atgcggatcc cgcgccgtcg aagggtgctg ccatgatggc cgtgtgcgcg aagcttgcg 60
60

<210> 8
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> PT08 aptamer
<400> 8

atgcggatcc cgcgctggac gaggtgccgt gttccctcc tatcggcgcg aagcttgcg 60
60

<210> 9
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> PT09 aptamer
<400> 9

atgcggatcc cgcgcgaatg ggcggaatcg caggaggag tcaactgcgcg aagcttgcg 60
60

<210> 10
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> PT10 aptamer
<400> 10

atgcggatcc cgcgctgggc accgggcagt cggggttgca agagtgcgcg aagcttgcg 60
60

<210> 11
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Truncated a aptamer
<400> 11

gaccaacgga agcgcggcac cacaacggtg gcgcgaagct tgcgc 45

<210> 12
<211> 28
<212> DNA

<213> Artificial Sequence
<220><223> Truncated b aptamer
<400> 12

aagcgcggca ccacaacggt ggcgcgaa 28
<210> 13

<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Truncated c aptamer	
<400>	13	
aacggaagcg cgaagcttgc gc		22
<210>	14	
<211>	12	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	DNA probe 1	
<400>	14	
ggtgccgcgc tt		12
<210>	15	
<211>	9	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	DNA probe 2	
<400>	15	
gcttcggtt		9
<210>	16	
<211>	13	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	DNA probe 3	
<400>	16	
aagcttcgcg cca		13