



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0066522
(43) 공개일자 2024년05월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 7/08 (2006.01) G01N 21/552 (2014.01)
G01N 33/02 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 7/08 (2013.01)
G01N 21/554 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0146259
(22) 출원일자 2022년11월04일
심사청구일자 2022년11월04일

(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천광역시 미추홀구 인하로 100(용현동, 인하대 학교)
(72) 발명자
허윤석
인천광역시 연수구 랜드마크로 110, 109동 1904 호(송도동, 송도 오션파크 베르디움)
유진곤
서울특별시 강동구 천호대로188길 26, 206호(둔촌동, 동호리츠빌아파트)
한수빈
인천광역시 미추홀구 경인남길 122, 305호(용현동)
(74) 대리인
특허법인정진

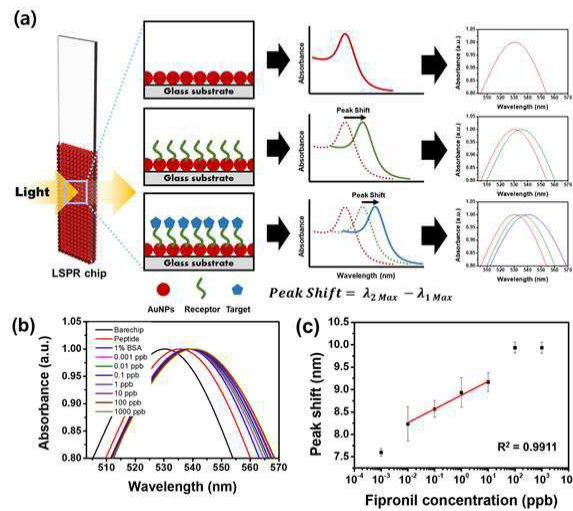
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 피프로닐 검출용 펩타이드 및 이를 포함하는 표면 플라즈몬 공명용 칩

(57) 요약

본 발명은 피프로닐에 대해 높은 특이도와 민감도를 보이는 신규한 펩타이드 및 이를 기반으로 제작한 LSPR 센서 칩에 대한 것으로, 상기 펩타이드 및 LSPR 센서칩은 회석과정을 거치지 않은 피프로닐 보유 식품 유래 시료에서도 피프로닐을 우수하게 검출할 수 있음을 확인한 바, 본 발명에 따른 피프로닐 특이적 검출 펩타이드 및 이를 이용한 LSPR 센서칩은 다양한 식품 산업에서의 현장 검출에서 유용하게 활용할 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

G01N 33/02 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395072523
과제번호	PJ014238042022
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	농축산물 생산현장의안전관리기술개발
연구과제명	축산물 생산단계 중 위해요소 오염 저감기술 개발(4공통)
기 여 율	1/1
과제수행기관명	인하대학교산학협력단
연구기간	2022.01.01 ~ 2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 피프로닐(fipronil) 검출용 펩타이드 또는 이의 단편.

청구항 2

서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 피프로닐 검출용 펩타이드 또는 이의 단편을 포함하는 피프로닐 검출용 조성물.

청구항 3

서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 피프로닐 검출용 펩타이드 또는 이의 단편을 포함하는 피프로닐 검출용 키트.

청구항 4

서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 피프로닐 검출용 펩타이드 또는 이의 단편을 시료에 처리하는 단계; 및 상기 펩타이드와 시료의 반응을 검출하는 단계;를 포함하는, 시료내 피프로닐 검출 방법.

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 반응의 검출은 순환 전압 전류법(Cyclic Voltammetry), 사각파전압전류법(Square Wave Voltammetry), 전기화학 임피던스 분광법(Electrochemical impedance spectroscopy), 수정 진동자 마이크로밸런스(quartz crystal microbalance), 표면 플라스몬 공명(Surface plasmon resonance), LFA(Lateral flow assay)/VFA(Variable flip angle), 효소 결합 면역 분석법(Enzyme linked immunoassay), 형광 공명 에너지 전달(Fluorescence resonance energy transfer) 및 표면증강 라만 분광법(Surface-enhanced Raman spectroscopy)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 방법으로 수행되는 것을 특징으로 하는, 검출 방법.

청구항 6

제 4항에 있어서,

상기 시료는 식품 시료인, 검출 방법.

청구항 7

서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 피프로닐 검출용 펩타이드 또는 이의 단편을 포함하는 피프로닐 검출용 바이오칩.

청구항 8

서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 피프로닐 검출용 펩타이드 또는 이의 단편이 고정된 금속 나노입자가 기판 표면에 코팅된 피프로닐 검출용 키트.

청구항 9

제 8항에 있어서,

상기 금속은 금, 은 및 백금으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 금속인 것을 특징으로 하는, 키트.

청구항 10

제 8항에 있어서,

상기 키트는 국소 표면 플라즈몬공명(localized surface plasmon resonance, LSPR) 측정 키트인 것을 특징으로 하는, 키트.

청구항 11

시료와 제 8항의 피프로닐 검출용 키트를 접촉시키는 단계; 및

상기 시료의 LSPR에 의한 산란 이미지 또는 산란 스펙트럼을 측정하는 단계;를 포함하는 시료내 피프로닐 검출 방법.

청구항 12

기판에 금속 나노입자를 코팅하는 단계; 및

상기 금속 나노입자에 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 피프로닐 검출용 펩타이드 또는 이의 단편을 고정하는 단계;를 포함하는 피프로닐 검출용 LSPR 센서칩의 제조 방법.

청구항 13

제 12항에 있어서,

상기 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 피프로닐 검출용 펩타이드 또는 이의 단편은 20 내지 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 의 농도로 금속 나노입자에 고정되는 것을 특징으로 하는, 제조 방법.

청구항 14

제 12항에 있어서,

상기 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 피프로닐 검출용 펩타이드 또는 이의 단편은 30 내지 60 분 동안 금속입자에 고정되는 것을 특징으로 하는, 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 피프로닐에 대해 특이적인 검출 효과를 보이는 신규한 펩타이드 및 이를 포함하는 국소 표면 플라즈몬공명(localized surface plasmon resonance, LSPR)용 칩에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0003] 최근 식품의 안정성에 대한 소비자의 관심이 높아짐에 따라 농축수산물 등의 유해물질 함유 여부를 정확하게 분석하는 기술이 대두되고 있다. 또한, 농축수산물에 함유될 수 있는 유해물질이 시대의 변화와 다양한 생산 방식에 따라 다양하게 증가하고 있으므로, 농축수산물의 유해물질 함유 여부를 분석하는 기술 또한 다양하게 연구되고 있다.
- [0004] 농축수산물의 안전성을 검증하기 위하여, 잔류농약(살충제), 항생제, 곰팡이독소의 분석은 필수적인 과정으로 여겨지고 있으며, 식품에 함유되어 있는 유해물질 분석을 위하여 주로 LC-MS(Liquid chromatography-mass spectrometry) 장비와 GC-MS(Gas chromatography-mass spectrometry) 장비를 이용한 분석이 수행되고 있다. 하지만 LC-MS 장비와 GC-MS 장비를 이용하여 농축수산물에 함유된 각종 유해물질을 분석하는 경우, 유해물질 분석에 많은 시간이 소요되고, 유해물질의 분석 정확도를 얻기는 어려운 문제점이 있다. CS-MS 분석의 경우, 잔류농약(살충제) 성분만 분석이 가능하고, LC-MS 분석의 경우, 잔류농약(살충제), 항생제, 곰팡이독의 분석은 가능하나 검사를 위한 시료데이터의 한정으로 인하여 정확한 검사를 수행하기 어려운 문제점이 있었다.
- [0005] 따라서 보다 간단하면서도 향상된 정확도를 보이는 분석 방법의 개발이 요구되고 있다.
- [0006] 한편, 페닐피라졸(phenylpyrazole) 유도체인 피프로닐(fipronil)은 메리알(Merial)의 전신인 롱프랭(Rhone-Poulenc) 농화학회사(영국) 웅가 리서치 센터(Ongar Research Center)의 에드가 파넬(Edgar Parnell) 등에 의하여 1987년에 합성, 개발되어 1993년에 시판되기 시작한 살충제이다.
- [0007] 초기에는 곡물, 과일 등 농작물 그리고 골프장 등의 해충을 관리하기 위하여 사용하였다. 하지만 1994년에 동물에 기생하는 절지동물을 치료, 관리하는데 유효하다는 사실이 알려져, 그리고 개, 고양이 등 반려동물의 위생 곤충, 진드기 등을 치료, 예방하는 새로운 약제로서 프론트라인 (Frontline)이란 이름으로 1996년 미국, 2000년 한국에 소개되었으며, 현재 전세계 100여국에서 사용하고 있다. 더불어 수년전 영국에서는 공중보건향상을 위한 살충제로서 5년 동안에 걸쳐 잠정적 사용을 승인한 바 있다. 한편 피프로닐은 미세한 백색 또는 백색에 가까운 분말로서 메탄올에 잘 용해되며, 클로로포름에는 중간 수준, 물에는 거의 용해되지 않으며 융점은 203~205℃이다. 정상 온도에서는 1년정도 안정한 상태를 유지하지만 금속 이온존재시 불안정해진다.
- [0008] 그러나 피프로닐은 흡입, 섭취 또는 피부접촉을 통해 인체에 노출되면 현기증, 감각이상, 근력약화, 호흡곤란, 기침, 천식, 피부자극, 홍반, 가려움증 등의 다양한 증상이 나타나는 부작용을 유발한다. 이러한 인체 독성으로 인해 유럽식품안전청(European Food Safety Administration)은 피프로닐을 함유한 식물 보호 제품의 사용을 금지하였고, 미국 환경보호청(Environmental Protection Agency)은 피프로닐을 인체 발암물질의 한 종류인 발암물질-C(carcinogens-C)로 분류하였다. 이러한 전 세계적인 규제에도 불구하고 2017년 7월 유럽에서 피프로닐에 오염된 계란이 유통된지 한 달 만에 국내에서도 유통되는 계란에서 피프로닐이 검출되어 큰 논란을 일으켰다. 이에 따라 세계 각국의 농림축산식품부는 산란장 난자에 대한 잔류농약 검사를 정기적으로 실시하고 있으나, 현장에서 신속하게 피프로닐을 분석할수 있는 방법이 현재까지도 미비해 효과적인 관리·감독에 어려움이 있다.
- [0009] 따라서 농축수산물, 특히 달걀에서 피프로닐을 간단하면서도 정확하게 검출할 수 있는 방법의 개발이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명자들은 피프로닐에 대해 특이적인 검출 효과를 보이는 신규한 펩타이드를 발굴하고, 이를 이용한 국소 표면 플라즈몬공명(localized surface plasmon resonance, LSPR) 측정용 칩을 개발한 후, 이의 피프로닐에 대한 우수한 검출 효과를 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [0012] 본 발명의 목적은 피프로닐(fipronil) 검출용 펩타이드 또는 이의 단편을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은 피프로닐 검출용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적은 피프로닐 검출용 키트를 제공하는 것이다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 목적은 시료내 피프로닐 검출 방법을 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 또 다른 목적은 피프로닐 검출용 바이오칩을 제공하는 것이다.

[0017] 본 발명의 또 다른 목적은 피프로닐 검출용 LSPR 센서칩의 제조 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0019] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 피프로닐(fipronil) 검출용 펩타이드 또는 이의 단편을 제공한다.

[0020] 또한 상기 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 피프로닐 검출용 펩타이드 또는 이의 단편을 포함하는 피프로닐 검출용 조성물을 제공한다.

[0021] 또한 상기 또다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 피프로닐 검출용 펩타이드 또는 이의 단편을 포함하는 피프로닐 검출용 키트를 제공한다.

[0022] 또한 상기 또다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 피프로닐 검출용 펩타이드 또는 이의 단편을 시료에 처리하는 단계; 및 상기 펩타이드와 시료의 반응을 검출하는 단계;를 포함하는, 시료내 피프로닐 검출 방법을 제공한다.

[0023] 또한 상기 또다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 피프로닐 검출용 펩타이드 또는 이의 단편을 포함하는 피프로닐 검출용 바이오칩을 제공한다.

[0024] 또한 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 피프로닐 검출용 펩타이드 또는 이의 단편이 고정된 금속 나노입자가 기판 표면에 코팅된 피프로닐 검출용 키트를 제공한다.

[0025] 또한 본 발명은 시료와 본 발명에 따른 피프로닐 검출용 LSPR 센서칩을 접촉시키는 단계; 및 상기 시료의 LSPR에 의한 산란 이미지 또는 산란 스펙트럼을 측정하는 단계;를 포함하는 시료내 피프로닐 검출 방법을 제공한다.

[0026] 또한 상기 또다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 기판에 금속 나노입자를 코팅하는 단계; 및 상기 금속입자에 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 피프로닐 검출용 펩타이드 또는 이의 단편을 고정하는 단계;를 포함하는 피프로닐 검출용 LSPR 센서칩의 제조 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0028] 본 발명에 따른 신규한 펩타이드는 피프로닐에 대해 높은 특이도와 민감도를 보이며, 이를 기반으로 제작한 LSPR 센서칩 또한 희석과정을 거치지 않은 피프로닐 보유 식품 유래 시료에서도 피프로닐을 우수하게 검출할 수 있음을 확인하였다. 따라서 본 발명에 따른 피프로닐 특이적 검출 펩타이드 및 이를 이용한 LSPR 센서칩은 다양한 식품 산업에서의 현장 검출에서 유용하게 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0030] 도 1은 파지 디스플레이 기술을 통하여 발굴한 피프로닐 결합 펩타이드에 대한 결과로, 도 1(a)는 ELISA를 이용하여 상기 펩타이드의 피프로닐에 대한 특이도 및 민감도를 확인한 결과이고, 도 1(b)는 LSPR 센서칩에 적용될 최종 피프로닐 수용체로의 선정을 위하여, 도 1(a)를 통해 선정된 피프로닐에 대해 가장 높은 특이도와 민감도를 보이는 펩타이드의 UV-VIS 분광계를 통한 피크 이동(peak shift)을 확인한 결과이다.

도 2는 본 발명에 따른 피프로닐 결합 펩타이드 기반 LSPR 센서칩 제작에 있어서 최적 조건을 확인한 것으로, 도 2(a)는 피프로닐 결합 펩타이드의 최적의 농도를 확인한 결과이고, 도 2(b)는 피프로닐 결합 펩타이드 고정화의 최적 시간을 확인한 결과이다.

도 3은 본 발명에 따른 피프로닐 검출용 LSPR 센서칩의 성능을 확인한 결과로, 도 3(a)는 본 발명에 따른 피프로닐 검출용 LSPR 센서칩의 작동시 발생하는 피크 이동량 및 이의 계산식을 나타낸 것이고, 도 3(b)는 본 발명에 따른 피프로닐 검출용 LSPR 센서칩의 피프로닐에 대한 민감성을 확인한 결과이고, 도 3(c)는 본 발명에 따른 피프로닐 검출용 LSPR 센서칩의 검출한계(Limit of detection, LOD) 값을 확인한 결과이다.

도 4는 피프로닐 스파이크(spike) 계란 샘플에서의 본 발명에 따른 피프로닐 검출용 LSPR 센서칩의 성능을 확인한 결과로, 도 4(a)는 시료내 다른 농도의 피프로닐 존재에 따른 플라즈몬 공명 변화로 인한 피크 이동을 나타낸 결과이고, 도 4(b)는 LOD 값을 확인한 결과이다.

도 5는 본 발명에 따른 피프로닐 검출용 LSPR 센서칩의 제작 과정 및 구조를 나타낸 모식도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0031] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.
- [0032] 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 피프로닐(fipronil) 검출용 펩타이드 또는 이의 단편을 제공한다.
- [0033] 본 발명에 따른 펩타이드의 아미노산 서열은 박테리오파지 무작위 펩타이드 라이브러리(phage display peptide library) Ph.D.-12를 이용하여 피프로닐에 결합하는 서열을 찾아낸 것이다. 상기 Ph.D.-12는 각각 M13 박테리오파지의 게놈중에서 외피단백질(coat protein)의 일종인 pIII를 생산하는 유전자 말단에 12개의 무작위 아미노산 서열을 갖는 선형의 펩타이드가 발현되도록 인위적으로 유전자 서열을 삽입한 후, 대장균 (*E.coli*)에 감염시켜 얻은 수억 이상의 서로 다른 펩타이드를 발현한 재조합 M13 박테리오파지로 구성되어 있다.
- [0034] 본 발명에서 사용된 상기 M13 박테리오파지는 특정 형질(strain)의 대장균만 감염되는 성질을 지니는 나노크기의 물질이며 돌연변이를 일으켜 인체에 감염될 가능성에 대해서는 현재까지 전혀 보고된 바 없다. 특히 2006년 FDA의 승인을 얻어 인스턴트식품의 세균 오염 방지용 첨가물로 활용되고 있으며, 항생제의 내성 문제는 해결할 수 있는 대체제뿐만 아니라 인체에 무해한 생체 친화형 나노물질로 각광을 받고 있다. 더불어 상기 박테리오파지를 이용하는 경우, 제조 공정이 간단하며 생산성과 안정성의 향상을 기대할 수 있고, 다양한 유전공학적, 화학적 변형을 활용할 수 있는 장점이 있다.
- [0035] 본 발명에 따른 펩타이드는 저분자 펩타이드로서 그 크기가 작아서 3차원적으로 안정화되어 있고 접막을 쉽게 통과하며 조직 깊은 곳에서도 분자 목표물을 인지할 수 있는 장점이 있다. 또한 본 발명에 따른 저분자 펩타이드는 대량 생산이 항체에 비해 상대적으로 간단하고, 독성이 거의 없다. 이외에도 본 발명에 따른 저분자 펩타이드는 표적 물질에 대한 결합력이 높은 장점이 있으며, 열/화학 처리시에도 변성이 일어나지 않는다. 또한 분자 크기가 작기 때문에 다른 단백질에 붙어서 융합 단백질로의 이용이 가능하다.
- [0036] 본 발명에 따른 펩타이드는 당업계에 공지된 화학적 합성에 의해 제조될 수 있다. 대표적인 방법으로는 액체 또는 고체상 합성, 단편 응축, F-MOC(9-fluorenylmethoxycarbonyl) 또는 T-BOC(tert-butyloxycarbonyl) 화학법이 포함되나, 반드시 이에 제한되는 것은 아니다. 또한 본 발명의 펩타이드는 유전공학적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 우선, 통상적인 방법에 따라 상기 펩타이드를 코딩하는 DNA 서열을 작제한다. DNA 서열은 적절한 프라이머를 사용하여 PCR 증폭함으로써 작제할 수 있다. 다른 방법으로 당업계에 공지된 표준 방법에 의해, 예컨대, 자동 DNA 합성기(예: Biosearch 또는 Applied Biosystems사에서 판매하는 것)를 사용하여 DNA 서열을 합성할 수도 있다. 제작된 DNA 서열은 이 DNA 서열에 작동가능하게 연결되어(operatively linked) 그 DNA 서열의 발현을 조절하는 하나 또는 그 이상의 발현 조절 서열(expression control sequence)(예: 프로모터, 인핸서 등)을 포함하는 벡터에 삽입시키고, 이로부터 형성된 재조합 발현 벡터로 숙주세포를 형질전환시킨다. 생성된 형질전환체를 상기 DNA 서열이 발현되도록 적절한 배지 및 조건 하에서 배양하여, 배양물로부터 상기 DNA 서열에 의해 코딩된 실질적으로 순수한 펩타이드를 회수한다. 상기 회수는 이 기술분야에서 공지된 방법(예컨대, 크로마토그래피)을 이용하여 수행할 수 있다. 상기에서 '실질적으로 순수한 펩타이드'라 함은 본 발명에 따른 펩타이드가 숙주로부터 유래된 어떠한 다른 단백질도 실질적으로 포함하지 않는 것을 의미한다. 더불어 본 발명에 따른 펩타이드는 생체 내의 단백질 절단 효소들로부터 보호하고 안정성을 증가시키기 위해서 N 말단 또는 C 말단을 변형하거나 여러 유기단으로 보호한 형태일 수 있다. 즉, 상기 펩타이드의 C 말단은 안정성을 증가시키기 위해서 변형될 수 있는 형태라면, 특별한 제한은 없으나 바람직하게는 히드록시기(-OH) 또는 아미노기(-NH₂)로 변형되는 것일 수 있다. 또한 상기 펩타이드의 N 말단은 안정성을 증가시키기 위해서 변형될 수 있는 형태라면, 특별한 제한은 없으나 바람직하게는 아세틸(Acetyl)기, 플루오레닐 메톡시카르보닐(Fmoc)기, 포르밀(Formyl)기, 팔미토일(Palmitoyl)기, 미리스틸(Myristyl)기, 스테아릴(Stearyl)기 및 폴리에틸렌글리콜(PEG)로 이루어진 군에서 선택되는 기로 변형되는 것일 수 있다.
- [0037] 또한 본 발명에 따른 펩타이드는 D형, L형, 펩타이드 모노머를 포함한 펩타이드 모방체 또는 비천연 아미노산 중의 어느 하나의 아미노산을 갖는 것을 특징으로 한다.

- [0038] 또한 본 발명에 따른 펩타이드는 이중체(dimer), 삼중체(trimer) 또는 다중체(multimer)인 것을 특징으로 하며, N 말단 혹은 C 말단에 다양한 기능기를 포함할 수 있다.
- [0039] 상기 다양한 기능기의 예시로서, N 말단의 기능기는 자유아민(free amine), 아세틸화(acetylation), 바이오틴(biotin) 및 형광단(fluorophore)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있고, C 말단의 기능기는 유리산(free acid), 아미드화(amidation), 비오틴(biotin) 및 형광단(fluorophore)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 더불어 본 발명에 따른 펩타이드는 검출 또는 동정을 위하여 표지될 수 있으며, 발색효소, 방사선 동위원소, 크로모포어(chromophore), 발광물질 및 형광물질로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나로 표지될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0040] 상기 발색효소는 예를 들어, 퍼옥시다제(peroxidase), 알칼라인 포스파타제(alkaline phosphatase)일 수 있고, 상기 방사성 동위원소는 예를 들어, ^{124}I , ^{125}I , ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{32}P , ^{35}S 일 수 있으며, 상기 발광물질 또는 형광물질은 예를 들어, FITC, RITC, 로다민(rhodamine), 텍사스레드(Texas Red), 플루레세인(fluorescein), 피코에리트린(phycoerythrin), 퀀텀닷(quantum dots) 등일 수 있다.
- [0041] 유사하게, 상기 검출 가능한 표지는 항체 에피토프(epitope), 기질(substrate), 보조인자(cofactor), 저해제 또는 친화 리간드일 수 있다. 이러한 표지는 본 발명의 펩타이드를 합성하는 과정 중에 수행할 수도 있고, 이미 합성된 펩타이드에 추가로 수행될 수도 있다.
- [0042] 만약 검출가능한 표지로 형광물질을 이용하는 경우에는 형광단층촬영(Fluorescence mediated tomography, FMT)으로 피프로닐에 결합한 펩타이드의 형광 패턴을 관찰할 수 있고, 형광이 관찰되는 패턴에 따라, 피프로닐을 검출할 수 있다.
- [0043] 본 발명의 피프로닐 검출용 펩타이드 범위에 포함될 수 있는 생물학적 기능 균등물은 본 발명의 펩타이드와 균등한 생물학적 활성을 발휘하는 아미노산 서열의 변이를 포함하는데에 한정될 것이라는 것은 당업자에게 명확하다.
- [0044] 이러한 아미노산 변이는 아미노산 결사슬 치환체의 상대적 유사성, 예컨대, 소수성, 친수성, 전하, 크기 등에 기초하여 이루어진다. 아미노산 결사슬 치환체의 크기, 모양 및 종류에 대한 분석에 의하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘은 모두 양전하를 띤 잔기이고; 알라닌, 글라이신과 세린은 유사한 크기를 가지며; 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 유사한 모양을 갖는다는 것을 알 수 있다. 따라서 이러한 고려 사항에 기초하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘; 알라닌, 글라이신과 세린; 그리고 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 생물학적으로 기능 균등물이라 할 수 있다.
- [0045] 변이를 도입하는 데 있어서, 아미노산의 소수성 인덱스(hydrophobic index)가 고려될 수 있다. 각각의 아미노산은 소수성과 전하에 따라 소수성 인덱스가 부여되어 있다: 아이소루이신 (+4.5); 발린 (+4.2); 루이신(+3.8); 페닐알라닌(+2.8); 시스테인/시스타인 (+2.5); 메티오닌 (+1.9); 알라닌 (+1.8); 글라이신 (-0.4); 트레오닌 (-0.7); 세린 (-0.8); 트립토판 (-0.9); 타이로신 (-1.3); 프롤린 (-1.6); 히스티딘 (-3.2); 글루타메이트 (-3.5); 글루타민 (-3.5); 아스파르테이트 (-3.5); 아스파라긴 (-3.5); 라이신 (-3.9); 및 아르기닌 (-4.5).
- [0046] 펩타이드의 상호적인 생물학적 기능(interactive biological function)을 부여하는 데 있어서 소수성 아미노산 인덱스는 매우 중요하다. 유사한 소수성 인덱스를 가지는 아미노산으로 치환하여야 유사한 생물학적 활성을 보유했을 수 있다는 것은 공지된 사실이다. 소수성 인덱스를 참조하여 변이를 도입시키는 경우, 바람직하게는 ± 2 이내, 보다 바람직하게는 ± 1 이내, 보다 더 바람직하게는 ± 0.5 이내의 소수성 인덱스 차이를 나타내는 아미노산 사이에 치환을 한다.
- [0047] 한편, 유사한 친수성 값(hydrophilicity value)을 가지는 아미노산 사이의 치환이 균등한 생물학적 활성을 갖는 펩타이드를 초래한다는 것도 잘 알려져 있다. 미국 특허 제4,554,101호에 개시된 바와 같이, 다음의 친수성 값이 각각의 아미노산 잔기에 부여되어 있다: 아르기닌 (+3.0); 라이신 (+3.0); 아스파르테이트(+3.0 $\pm$ 1); 글루타메이트 (+3.0 $\pm$ 1); 세린 (+0.3); 아스파라긴 (+0.2); 글루타민 (+0.2); 글라이신 (0); 트레오닌 (-0.4); 프롤린 (-0.5 $\pm$ 1); 알라닌 (-0.5); 히스티딘 (-0.5); 시스테인 (-1.0); 메티오닌 (-1.3); 발린 (-1.5); 루이신 (-1.8); 아이소루이신 (-1.8); 타이로신 (-2.3); 페닐알라닌 (-2.5); 트립토판 (-3.4).
- [0048] 친수성 값을 참조하여 변이를 도입시키는 경우, 바람직하게는 ± 2 이내, 보다 바람직하게는 ± 1 이내, 보다 더 바람직하게는 ± 0.5 이내의 친수성 값 차이를 나타내는 아미노산 사이에 치환을 한다.
- [0049] 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 펩타이드에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다(H.

Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979). 가장 통상적으로 일어나는 교환은 아미노산 잔기 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly 간의 교환이다.

- [0050] 상술한 생물학적 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 본 발명의 피프로닐 검출용 펩타이드는 서열목록에 기재된 서열과 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 본 발명의 펩타이드 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 80% 이상의 상동성, 보다 바람직하게는 90% 이상의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다. 서열 비교를 위한 얼라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있는 어떤 방법이라도 제한없이 사용할 수 있다.
- [0051] 더불어 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 피프로닐 검출용 펩타이드 또는 이의 단편을 포함하는 피프로닐 검출용 조성물을 제공한다.
- [0052] 또한 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 피프로닐 검출용 펩타이드 또는 이의 단편을 포함하는 피프로닐 검출용 키트를 제공한다.
- [0053] 본 발명의 피프로닐 검출용 키트에는 피프로닐 검출을 위한 펩타이드의 분석 방법에 적합한 하나 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물 또는 장치가 포함될 수 있고, 펩타이드의 구조 또는 생리 활성을 안정하게 유지시키는 완충액 또는 반응액이 추가로 포함될 수 있다. 또한, 안정성을 유지하기 위해, 4℃로 유지된 상태로 제공될 수 있다.
- [0054] 피프로닐에 결합한 본 발명에 따른 펩타이드의 확인, 검출 및 정량을 용이하게 하기 위하여, 본 발명의 키트에 포함되는 펩타이드는 상술한 바와 같이 표지된 상태로 제공될 수 있다. 한편, 본 발명의 펩타이드가 표지되지 않은 채로 제공되는 경우에는, 본 발명의 키트는 본 발명의 펩타이드의 시험관 내 또는 생체 내에서 피프로닐과의 결합 정도 또는 그 위치를 탐색하기 위한 성분을 추가로 포함할 수 있다. 상기 성분은 본 발명의 펩타이드의 표지를 위한 공지의 화합물이거나, 항원-항체반응을 통한 탐색을 위하여 본 발명의 펩타이드 또는 본 발명의 펩타이드와 결합하는 특정 수용체에 대한 항체 또는 이들에 대한 2차 항체 및 이의 검출을 위한 시약일 수 있다. 일 구체예로서 본 발명의 키트는 다양한 대상, 예를 들어 농산물 또는 수산물 등의 피프로닐 보유 여부를 확인하기 위하여 사용될 수 있고, 피프로닐을 보유한 물질의 섭취 여부를 확인하기 위하여 사용될 수 있다. 상기 확인은 종래의 면역분석(immunoassay) 방식 또는 프로토콜을 변형하여 실시될 수 있다. 예컨대, 종래 면역분석에서 항체 대신에, 본 발명의 펩타이드를 사용하고, 프로세스는 동일하게 하여 진단을 실시할 수 있다.
- [0055] 더불어 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 피프로닐 검출용 펩타이드 또는 이의 단편을 시료에 처리하는 단계; 및 상기 펩타이드와 시료의 반응을 검출하는 단계;를 포함하는, 시료내 피프로닐 검출 방법을 제공한다.
- [0056] 이를 통해 시료 내 피프로닐의 존재 유무를 검출하거나, 피프로닐의 양을 정량할 수 있고, 피프로닐을 보유한 물질의 섭취 여부를 확인할 수 있다.
- [0057] 본 발명에 있어서 상기 “시료”는 가장 광범위한 의미로 사용된다. 한편으로는 생물학적 및 환경적 시료 양자 모두를 포함하는 의미이다. 더불어 시료는 합성 기원의 검체를 포함할 수 있다. 또한 한편으로 이는 검체 또는 배양물(예를 들어 미생물 배양물)을 포함할 수 있다. 상기 시료는 농산물 또는 수산물 유래 시료일 수 있다. 상기 농산물 시료에 있어서, 식품 시료, 예컨대 계란일 수 있다. 상기 시료는 시료 그 자체를 사용할 수 있으며, 필요에 따라 희석하여 사용할 수 있다. 더불어 상기 생물학적 시료는 본 발명에 따른 펩타이드를 이용하여 피프로닐을 보유한 물질의 섭취 여부를 확인할 때 사용될 수 있으며, 전혈(whole blood), 혈장(plasma), 혈청(serum), 객담(sputum), 눈물(tears), 점액(mucus), 세비액(nasal washes), 비강 흡인물(nasal aspirate), 호흡(breath), 소변(urine), 정액(semen), 침(saliva), 복강 세척액(peritoneal washings), 복수(ascites), 낭종액(cystic fluid), 뇌척수막 액(meningeal fluid), 양수(amniotic fluid), 백혈구(leukocytes), 말초혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cells), 백혈구 연층(buffy coat), 선액(glandular fluid), 췌장액(pancreatic fluid), 림프액(lymph fluid), 흉수(pleural fluid), 유두 흡인물(nipple aspirate), 기관지 흡인물(bronchial aspirate), 활액(synovial fluid), 관절 흡인물(joint aspirate), 기관 분비물(organ secretions), 세포(cell), 세포 추출물(cell extract) 및 뇌척수액(cerebrospinal fluid)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0058] 본 발명의 방법에 있어서, 상기 반응의 검출은 순환 전압 전류법(Cyclic Voltammetry), 사각파전압전류법

(Square Wave Voltammetry), 전기화학 임피던스 분광법(Electrochemical impedance spectroscopy), 수정 진동자 마이크로밸런스(quartz crystal microbalance), 표면 플라스몬 공명(Surface plasmon resonance), LFA(Lateral flow assay)/VFA(Variable flip angle), 효소 결합 면역 분석법(Enzyme linked immunoassay), 형광 공명 에너지 전달(Fluorescence resonance energy transfer) 및 표면증강 라만 분광법(Surface-enhanced Raman spectroscopy)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 방법으로 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0059] 더불어 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 피프로닐 검출용 펩타이드 또는 이의 단편을 포함하는 피프로닐 검출용 바이오칩을 제공한다.
- [0060] 본 발명에 따른 펩타이드는 바이오칩으로 사용 가능한 다양한 칩 (금(gold), 은(silver), 자성 비드(magnetic bead), 실리카(silica), 그래핀(graphene), 탄소 나노튜브(carbon nanotube) 등) 상에 특이적으로 고정될 수 있다. 다만, 본 발명의 특징은 전술한 펩타이드의 특징과 관련되며 이와 같이 펩타이드를 바이오칩으로 제조하는 것은 공지기술에 따라 할 수 있는 부분이다.
- [0061] 본 발명에 따른 피프로닐 검출용 바이오칩을 이용하여 단백질과 단백질 간의 반응, 단백질과 반응리간드 간의 반응, 목적리간드와 반응단백질 간의 반응 또는 목적리간드와 반응리간드간의 반응을 검출할 수 있다.
- [0062] 상기 반응리간드는 단백질이나 펩타이드와 반응하는 저분자량의 생체물질, 펩티드, 탄수화물, 앵타머, 지방산 또는 지질일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 더불어 상기 반응단백질은 효소 또는 항체일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한 상기 목적리간드는 단백질이나 펩타이드와 반응하는 저분자량의 화합물, 핵산, 펩티드, 탄수화물, 앵타머, 지방산 또는 지질일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 더불어 상기 반응 검출은 표지 혹은 비표지체를 이용하여 수행할 수 있다.
- [0063] 더불어 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 피프로닐 검출용 펩타이드 또는 이의 단편이 고정된 금속 나노입자가 기판 표면에 코팅된 피프로닐 검출용 키트를 제공한다.
- [0064] 상기 키트는 국소 표면 플라스몬공명(localized surface plasmon resonance, LSPR) 측정 키트일 수 있으며, 상기 LSPR은 금, 은과 같은 금속 나노입자와 같이 국부적인 표면을 갖는 물질에 다양한 파장의 빛을 조사하여, 나노입자 표면에 편광이 발생하고 국부적으로 진동하는 특성을 이용한 검출 방법이다. 따라서 본 발명에 있어서, 상기 금속은 금, 은 및 백금으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 금속일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 일실시예에서는 금 나노입자에 피프로닐 검출용 펩타이드를 고정하였다.
- [0065] 상기 기판은 빛이 투과될 수 있는 기판이면 제한없이 사용 가능하며, 그 구조 또한 평면 또는 입체 등에 제한받지 않는다. 예를 들어, 유리, 에틸렌 테레프탈레이트 필름(polyethylene terephthalate film) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 일실시예에서는 유리를 기판으로 사용하였다.
- [0066] 또한 본 발명은 시료와 상기 제조방법에 따라 제조된, 피프로닐 검출용 LSPR 센서칩을 접촉시키는 단계; 및 상기 시료의 LSPR에 의한 산란 이미지 또는 산란 스펙트럼을 측정하는 단계;를 포함하는 시료내 피프로닐 검출 방법을 제공한다.
- [0067] 더불어 본 발명은 기판에 금속 나노입자를 코팅하는 단계; 및 상기 금속입자에 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 피프로닐 검출용 펩타이드 또는 이의 단편을 고정하는 단계;를 포함하는 피프로닐 검출용 LSPR 센서칩의 제조 방법을 제공한다.
- [0068] 본 발명에 따른 피프로닐 검출용 LSPR 센서칩의 제조 방법 및 이의 구조적 모식도는 도 5에 나타내었다. 도 5에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 펩타이드는 12개의 서열을 갖는 펩타이드의 말단에 시스테인 잔기를 부착한 것으로, 티올-금 상호작용(Thiol-gold interaction)을 통하여 본 발명에 따른 펩타이드를 금 나노입자에 부착하였다.
- [0069] 따라서 본 발명은 상기 제조 방법을 통해 제조한, 피프로닐에 특이적으로 결합하는 펩타이드가 고정된 금속 나노입자를 기판 표면에 코팅한, 현장에서 활용 가능한 LSPR 센서칩을 제공할 수 있다.
- [0070] 본 발명의 일실시예에 따르면, 본 발명에 따른 피프로닐 결합 펩타이드 기반 LSPR 센서칩 제작에 있어서 최적 조건을 확인한 결과, 피프로닐 결합 펩타이드의 최적의 농도는 $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ 임을 확인하였다. $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ 미만의 농도에서는 피크 이동이 다소 감소하였으므로, LSPR 센서칩에 적합한 조건이 아님을 확인하였다.
- [0071] 따라서 본 발명의 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 피프로닐 검출용 펩타이드 또는 이의 단편

은 20 내지 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 의 농도로 금속입자에 고정되는 것을 특징으로 한다. 보다 바람직하게는 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 의 농도로 금속입자에 고정될 수 있다.

[0072] 더불어 본 발명에 따른 피프로닐 결합 펩타이드 기반 LSPR 센서칩 제작에 있어서, 피프로닐 결합 펩타이드의 최적의 고정화 시간을 확인한 결과, 30분까지는 시간이 증가할수록 LSPR 피크가 유의하게 증가한 것을 확인하였다. 반면, 30분 이후에는 피크의 큰 차이가 없는 포화 곡선(saturation curve)이 형성되는 것을 확인하였다.

[0073] 따라서 본 발명의 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 피프로닐 검출용 펩타이드 또는 이의 단편은 30 내지 60분 동안 금속입자에 고정되는 것을 특징으로 한다. 보다 바람직하게는 30분 동안 금속입자에 고정될 수 있다.

[0074] 본 발명의 일실시예에 따르면 본 발명에 따른 피프로닐 검출용 LSPR 센서칩은 회석하지 않고, 균질화한 계란 시료내의 피프로닐을 우수하게 검출한 바, 시료의 회석 과정을 배제할 수 있어 좀 더 간편하게 시료내 피프로닐 존재 여부를 확인할 수 있다.

[0076] 상술한 본 발명의 내용은 상호 모순되지 않는 한, 서로 동일하게 적용되며, 당해 기술분야의 통상의 기술자가 적절한 변경을 가해 실시하는 것 또한 본 발명의 범주에 포함된다.

[0078] 이하 본 발명을 실시예를 통해 상세하게 설명하나 본 발명의 범위가 하기 실시예로만 한정되는 것은 아니다.

[0080] 실험예 1. 시약 및 재료

[0081] 금(III) 염화물 삼수화물(Gold (III) chloride trihydrate, ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, ≥ 99.9), 피프로닐(fipronil, $\text{C}_{12}\text{H}_4\text{C}_{12}\text{F}_6\text{N}_4\text{OS}$, 3-Aminopropyl), 트리에톡시실란(triethoxysilane (APTES, $\text{C}_9\text{H}_{23}\text{NO}_3\text{Si}$, $\geq 98.0\%$)), NaCl(sodium chloride), 테트라사이클린(tetracycline, ($\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_8$)), 글리신(glycine, ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$)), PEG(polyethylene glycol, ($\text{C}_{2n}\text{H}_{4n+2}\text{O}_{n+1}$)), NaI(sodium iodide), 및 BSA(bovine serum albumin)는 Sigma-Aldrich (USA)에서 구입하였다. 구연산 3 나트륨 이수화물(trisodium citrate dihydrate, ($\text{C}_6\text{H}_9\text{Na}_3\text{O}_9$))는 Kanto Chemical Co., Inc. (Japan)에서 제공받았다. 메틸 알코올(Methyl alcohol, (CH_3OH , 99.5%))은 Samchun Pure Chemical Co., LTD. (South Korea)에서 구입하였다. LB배지(Luria-Bertani broth)는 BD DIFCO에서 구입하였고, 말레산 무수물(Maleic anhydride)이 활성화된 플레이트(8 웰 스트립(8-well strip) 및 PBS(phosphate buffered saline, ($\text{C}_{12}\text{H}_3\text{K}_2\text{Na}_3\text{O}_8\text{P}_2$))는 Thermo Fisher (Waltham, Massachusetts, United States)에서 제공받았다. 파지 디스플레이 이(Ph.D.-12) 라이브러리 키트(Phage display library kit) 및 대장균(*Escherichia coli*) ER2738 균주는 New England Biolabs(Ipswich, Massachusetts, United States)에서 공급받았다. 유리기판(Glass substrate)은 한국 화학시험연구원(과천, 한국)에서 구입했다. 흡광도 스펙트럼(absorbance spectra)은 V-770 UV-Visible/NIR Spectrophotometer(한국)을 이용하여 기록하였다. 합성된 금 나노입자(AuNPs)의 특성은 전계방출 주사전자현미경(FE-SEM(field emission scanning electron microscopy); JITACHI S-4300 system)과 전계방출 투과전자현미경(FE-TEM(field-emission transmission electron microscopy); JEM2100F, JEOL Ltd., USA)을 이용하여 분석하였다.

[0083] 실시예 1. 파지 디스플레이 기술을 통한 피프로닐 결합 펩타이드의 스크리닝

[0084] 100 μM 의 피프로닐을 혼합한 증류수(DW) 100 μL 를 말레산 무수물 활성화 96웰 플레이트에 넣고 밤새 실온에서 처리하였다. 피프로닐을 6회 고정된 후 플레이트를 0.1% PBST 100 μL 로 세척하였다. 다음으로, 100 μL 의 파지 라이브러리(Ph.D.-12)(PBS내 1×10^{11} pfu mL^{-1})를 150 rpm의 속도로 오비탈 셰이커(orbital shaker)에서 1시간동안 인큐베이션하며 고정된 피프로닐에 결합시켰다. 그런 다음 200 μL 의 0.1% PBST로 플레이트를 10회 세척하여 결합되지 않은 파지를 제거하였다. 그 후 플레이트를 0.2 M 글리신-HCl(Glycine-HCl(pH 2.2)) 및 1mg mL^{-1} BSA

와 함께 150 rpm의 속도로 15분동안 오비탈 셰이커에서 처리하여 피프로닐 결합 파지를 용출하였다. 중화를 위해 용리액에 1.0M Tris-HCl(pH 9.1) 15 μ L를 첨가한 후, 1.5 mL 마이크로튜브로 옮겼다.

[0085] DNA 시퀀싱을 위해 *E.coli*(ER2738)의 단일 플라크(single plaque)를 LB 배지에 접종하여 600nm에서 광학밀도(optical density)가 0.3~0.5가 될 때까지 밤새 배양하였다. 이 용액을 37℃의 진탕기 인큐베이터(shaker incubator)에서 200 rpm의 속도로 4.5 시간동안 배양하였다. 4℃에서 14,000 rpm으로 1분동안 원심분리한 후, 상층액을 마이크로 튜브에 옮기고, DNA 준비를 위해 그 중 500 μ L의 상층액을 다른 튜브에 옮겨 500 μ L PEG-NaCl과 함께 오비탈 셰이커에서 15분간 배양하였다. 또 다른 200 μ L의 상층액은 ELISA 테스트에 사용하였다. 오비탈 셰이커에서 15분 배양이 끝난 후, 용액을 4℃에서 14,000rpm으로 10분간 원심분리하였다. 상층액을 완전히 제거한 후, 100 μ L의 요오드(iodide) 완충액을 사용하여 펠릿을 용해했다. 이어서, 100% 에탄올을 첨가하고 15분간 인큐베이션하였다. 그 후, 4℃에서 14,000 rpm으로 10분동안 원심분리하였다. 이후 상층액을 제거하고 동일한 조건으로 70% 에탄올을 첨가하고, 4℃에서 14,000 rpm으로 10분동안 원심분리하였다. 최종적으로 펠릿(파지 DNA)를 클린 벤치에서 밤새 건조시킨 후, TE 완충액을 사용하여 용해시키고 -20℃에서 보관하였다. 후에 솔젠트(대전, 한국)에 의뢰하여 DNA 시퀀싱을 수행하였다.

[0086] 그 결과 하기 표 1의 4개의 펩타이드 후보를 선정하였고, 민감도 확인을 위한 ELISA 테스트를 수행하였다.

표 1

펩타이드 명칭	아미노산 서열
MA24	TPSSNSYDWLVAGG
MA31	INQDARTMVMVPGGG
MA38	SNTALPSKFYGYGGG
MA46	GHQGHWYGMFRAGGG

[0088] 상기 4개의 펩타이드를 이용하여 ELISA(M13-HRP antibody, 96-well plate 사용 (SPL 사에서 구입))를 수행한 결과 도 1(a)에 나타난 바와 같이, 펩타이드 MA24(Peptide MA24) 및 펩타이드 MA38(Peptide MA38)이 피프로닐에 대해 가장 높은 특이도와 민감도를 보였다. 특히 MA38이 MA24 대비 더 높은 특이도를 보임을 확인하였다. 이를 기반으로 피프로닐에 대해 더 특이적 반응을 보인 MA38을 이용해 LSPR 센서 실험을 수행하여 피크 이동(peak shift)를 확인하였다.

[0089] 이를 위하여 LSPR 센서의 큐벳에 상기 MA38을 넣고 30분간 반응시켰다. 더불어 비특이적 결합을 방지하기 위하여, 1% BSA를 큐벳에 넣고 10분간 반응시켰다. 그 후 피프로닐을 0.01, 0.1, 1, 10, 100, 1000 ppb의 농도로 첨가한 후(용매로 물 이용) 저농도부터 10분간 반응시켰다. 상기 실험은 한가지 LSPR 센서를 이용하여 수행하였으며, 각 반응이 완료된 후 400 내지 700nm에서 흡광도를 분석하였다.

[0090] 그 결과, 도 1(b)에 나타난 바와 같이, MA38은 피프로닐에 대해 큰 피크 이동을 보임을 확인한 바, 상기 펩타이드 MA38을 LSPR 센서칩에 적용될 최종 피프로닐 수용체로 선택하였다.

[0092] 실시예 2. 피프로닐 검출용 LSPR 센서칩 제작

[0093] 먼저, 플라즈몬 나노입자(Plasmonic nanoparticle)을 위하여, Turkvich/Frens 반응을 통해 금 나노입자(AuNPs)를 합성하였다. 반응 용기에 DW 700 mL을 넣고 물에 10% HAuCl 용액 0.7 mL을 넣은 후, 380℃까지 승온한 다음 200 rpm으로 교반하였다.

[0094] 용액이 끓기 시작하면 구연산삼나트륨(trisodium citrate) 용액을 넣고 용액이 적포도주색으로 변할때까지 교반하였다. 합성한 AuNPs는 LSPR 센서칩 제조에 사용하였으며, AuNPs의 크기와 모양을 확인하기 위하여 FE-SEM 및 FE-TEM 분석을 수행하였다. 그 결과, 합성된 AuNPs는 12.32 ± 1.01 nm의 균일한 크기를 가졌으며, 격자 간격(lattice spacing)은 0.23 nm였고 구형의 형태를 나타냄을 확인하였다.

[0095] LSPR 센서 칩의 유리 기판(8mm×50mm)을 메탄올 용액에 1시간동안 침지하였다. 그런 다음 15-20분 동안 초음파 처리하고 탈이온수(deionized water)로 완전히 세척하였다. 그 후 유리 기판을 0.5% APTES(3-Aminopropyl)triethoxysilane) 용액이 담긴 큐벳에 담그고 60℃의 오븐에서 1시간동안 보관하였다. 그런 후 유리 기판을 탈이온수로 5회 세척하여 결합되지 않고 남아있는 APTES 용액을 제거하였다. 그런 다음 유리 기판을 AuNPs 용액에 밤새 담가 AuNPs가 유리 기판상에 단일층으로 부착되도록 하였다. 선택적 피프로닐 검출을

위하여, 상기 실시예 1에서 수득한 펩타이드 M38를 플라즈몬 활성 기질의 AuNPs에 고정시켰다. 이를 위하여 펩타이드를 물로 희석한 후, LSPR 기질을 펩타이드 고정용 용액에 담그고, 탈이온수로 세척하여 결합하지 않은 펩타이드를 제거하였다.

[0096] LSPR 센서칩 매개변수의 최적화는 높은 감도와 특이성을 달성하는데 중요한 바, 펩타이드 농도와 LSPR 기질과의 펩타이드 반응 시간의 두 가지 매개 변수를 고려하였다. 최종 최적 조건은 UV-VIS 분광계에 의해 관찰된 피크 이동을 기반으로 선택하였다. 마지막으로 피프로닐에 대한 펩타이드의 특이성을 확인하고 비특이적 결합을 줄이기 위해 1% BSA를 사용하여 펩타이드 기능화된 기질을 블로킹(Blocking)하였다.

[0097] 본 발명에 따른 펩타이드, MA38의 농도와 반응시간을 조정하여 LSPR 센서칩의 최적 조건을 확인하여 도 2에 나타내었다.

[0098] 농도별 MA38 펩타이드($1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ 내지 $30.0 \mu\text{g mL}^{-1}$)와 LSPR 센서칩을 반응시킨 후, LSPR 피크 이동을 측정하여 펩타이드 농도의 영향을 확인하였다. 그 결과 도 2(a)에 나타낸 바와 같이, $20.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ 의 MA38 펩타이드에 있어서, 최대 5.9 nm까지 피크 이동 변화가 나타남을 확인하였다. 반면 $20.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ 미만의 농도에서는 피크 이동이 다소 감소하였으므로, LSPR 센서칩에 적합한 조건이 아님을 확인하였다.

[0099] 이와 더불어 LSPR 센서칩의 표면에 최대량의 펩타이드를 부착하기 위한, 최적화된 반응시간을 분석하였다. 그 결과 도 2(b)에 나타낸 바와 같이, 30분까지는 시간이 증가할수록 LSPR 피크가 유의하게 증가한 것을 확인하였다. 반면, 30분 이후에는 피크의 큰 차이가 없는 포화 곡선(saturation curve)이 형성되는 것을 확인하였다.

[0100] 그러므로, 피프로닐을 선택적으로 검출할 수 있는 본 발명의 LSPR 센서칩에 있어서, MA38 펩타이드의 농도는 $20.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ 인 것이 바람직하며, 30분동안 반응시키는 것이 바람직함을 확인하였다.

[0102] 실시예 3. 피프로닐 검출용 LSPR 센서칩의 성능 확인

[0103] 표준 피프로닐 용액을 이용하여 본 발명에 따른 LSPR 센서칩의 성능을 확인하였다. 본 발명에 따른 펩타이드 기반 LSPR 센서 칩을 다양한 농도의 피프로닐 표준용액에 10분간 담근 후 DW로 세척하여 펩타이드 수용체와 결합하지 않은 피프로닐을 제거하였다. 그 후 700 nm에서 400 nm 사이의 흡수 스펙트럼(absorption spectrum)을 UV-VIS 분광광도계로 확인하였다. 이때 상기 표준 피프로닐 용액은 표준 시료(피프로닐)를 각각 0, 0.001, 0.1, 1, 10, 100, 1000 ppb로 희석하여 준비하였다.

[0104] 본 발명에 따른 피프로닐 특이적 LSPR 센서칩은 발생하는 피크 이동량을 계산하여 작동시켰다(도 3(a) 참고). 칩의 유리기관에 AuNPs만을 코팅했을 때, 535 nm에서 피크가 나타났다. 상대적으로 특성 피크(characteristic peak)인 540nm인 50nm의 적색 쉬프트(red-shift)는 피프로닐 특이적 결합 펩타이드가 전도 전자(conduction electrons)의 집합 진동(collective oscillation)을 통해 AuNP에 부착되었을 때 발생하였다. 따라서 540nm 피크부터, AuNPs 표면의 본 발명에 따른 MA38에 피프로닐이 부착됨에 따라, 적색-쉬프트가 한번 더 발생하였으며, 피프로닐의 농도가 높을수록 더 강한 피크 차이가 발생하였다.

[0105] 0, 0.001, 0.1, 1, 10, 100, 1000 ppb로 희석하여 준비한 표준 피프로닐 용액을 이용하여 본 발명에 따른 LSPR 센서칩의 검출한계(Limit of detection, LOD) 값을 확인하였다. 그 결과 도 3(b)와 같이, 피프로닐의 농도가 증가함에 따라 플라즈몬 스펙트럼(plasmon spectrum)이 적색-쉬프트를 나타내기 시작하였으므로, 본 발명에 따른 LSPR 센서칩은 피프로닐에 대해 매우 높은 민감성을 가짐을 알 수 있었다. 또한, 정량 분석을 위하여, 피크 이동 값을 사용하는 선형 곡선을 표준 피프로닐 농도 범위에서 농도 변화의 함수로 표시하고(plotted) 동적 범위(dynamic range)를 달성하였다. 그 결과 도 3(c)에 나타낸 바와 같이, 달성된 동적 범위를 고려하였을 때 본 발명에 따른 피프로닐 특이적 LSPR 센서칩은 0.1ppb의 LOD 값을 나타내었다. 따라서 이를 통해 본 발명에 따른 LSPR 센서칩은 표준용액에서 피프로닐에 대해 높은 민감도와 우수한 안정성을 보임을 확인하였다.

[0107] 실시예 4. 피프로닐 스파이크(spike) 계란 샘플에서의 피프로닐 검출용 LSPR 센서칩의 성능 확인

[0108] 실제 식품에서 피프로닐이 검출될 수 있는지 확인하기 위하여, 피프로닐을 스파이크한 계란 샘플을 준비하였다. 시중에서 구입할 수 있는 계란을 믹서에 갈아 균질화한 후, 이의 1mL에 다양한 농도의 피프로닐(1ppt ~ 1ppm)을 첨가하였다. 이를 이용하여 상기 실시예 3과 동일한 방법으로 본 발명에 따른 LSPR 센서칩의 검출 능력을 확인

하였다.

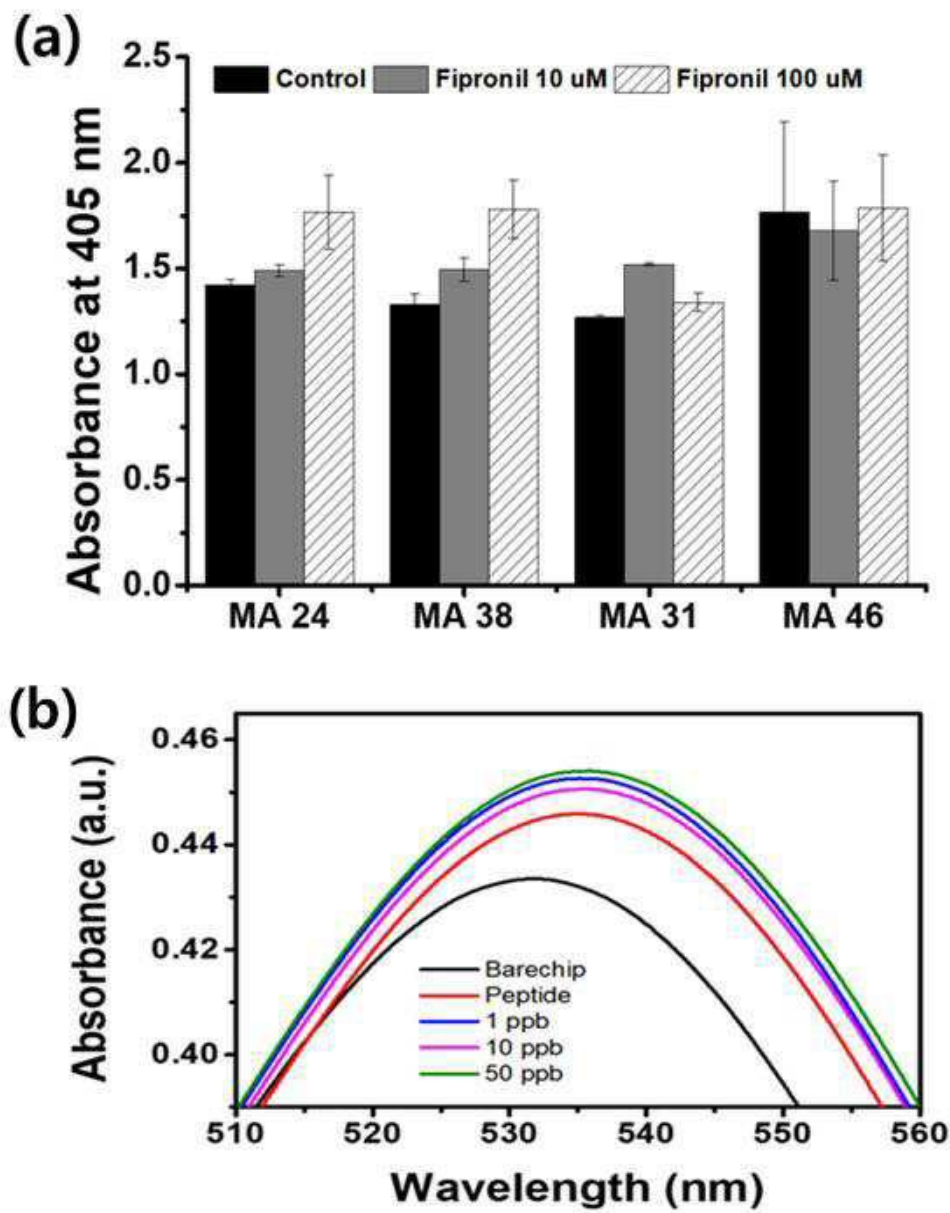
[0109] 그 결과 도 4(a)에 나타난 바와 같이, 서로 다른 농도의 피프로닐이 존재할 때 유전체 물질의 플라즈몬 공명 변화로 인해 적색 피크 이동이 관찰되었다. 또한 선형 동적 범위는 도 4(b)에 나타난 바와 같이, LOD 값은 0.01 ppb로, 표준 용액에서의 결과와 동일하게 확인되었다. 흡광도 값에는 변화가 없었으므로, 시료를 희석하지 않고 전체로 사용해도 매트릭트 효과(matrix effect)가 없음을 확인하였다.

[0110] 그러므로 본 발명에 따른 LSPR 센서칩은 피프로닐 검출에 대한 유망한 효과를 지니고 있으며, 다양한 식품 산업에 유용하게 활용될 수 있음을 확인하였다.

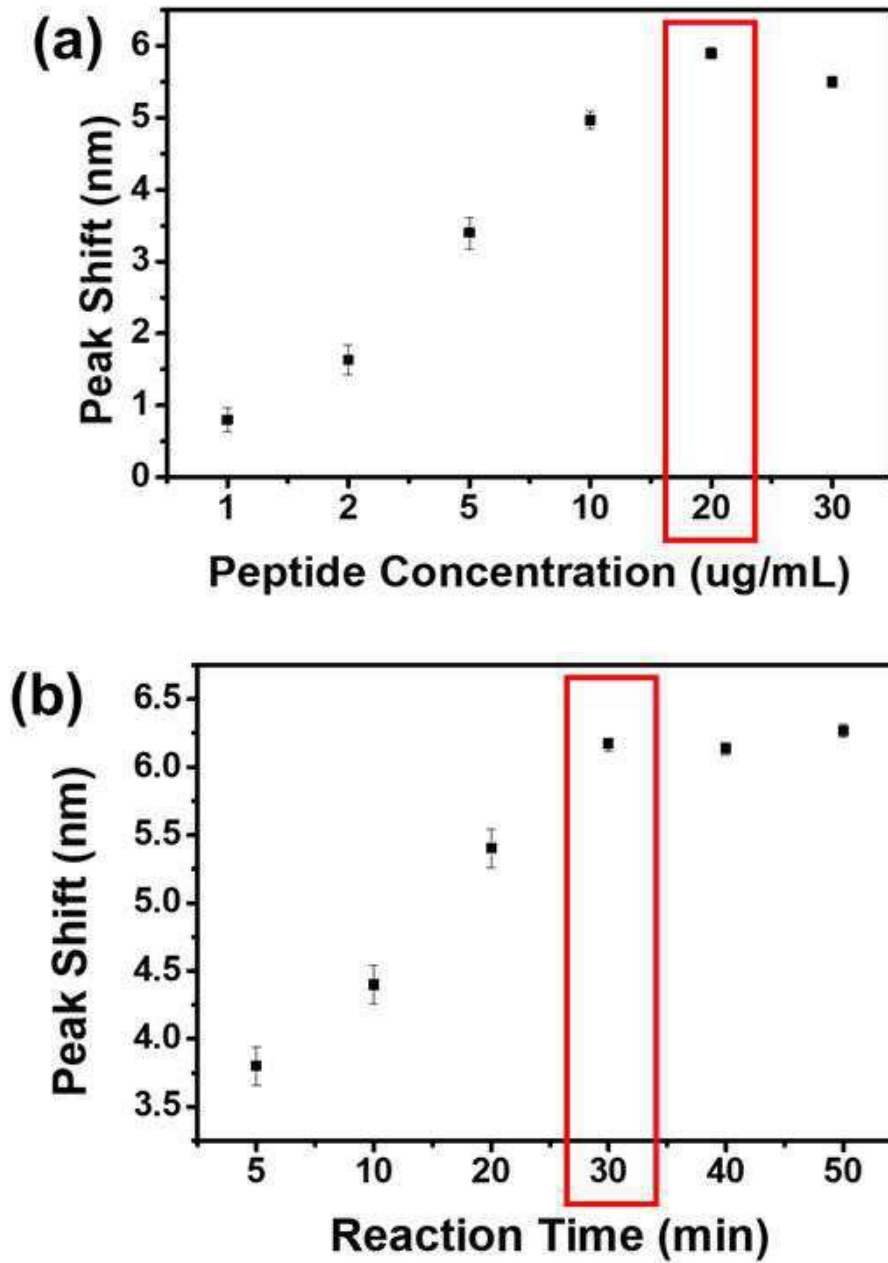
[0112] 종합적으로, 본 발명은 피프로닐을 특이적으로 검출할 수 있는 신규한 펩타이드를 합성하고, 이의 피프로닐에 대한 특이적 검출 효과를 확인하였으며, 이를 기반으로 제작한 LSPR 센서칩 또한 희석과정을 거치지 않은 피프로닐 보유 식품 유래 시료에서도 피프로닐을 우수하게 검출할 수 있음을 확인하였다. 따라서 본 발명에 따른 피프로닐 특이적 검출 펩타이드 및 이를 이용한 LSPR 센서는 다양한 식품 산업에서의 현장 검출에서 유용하게 활용될 수 있다.

도면

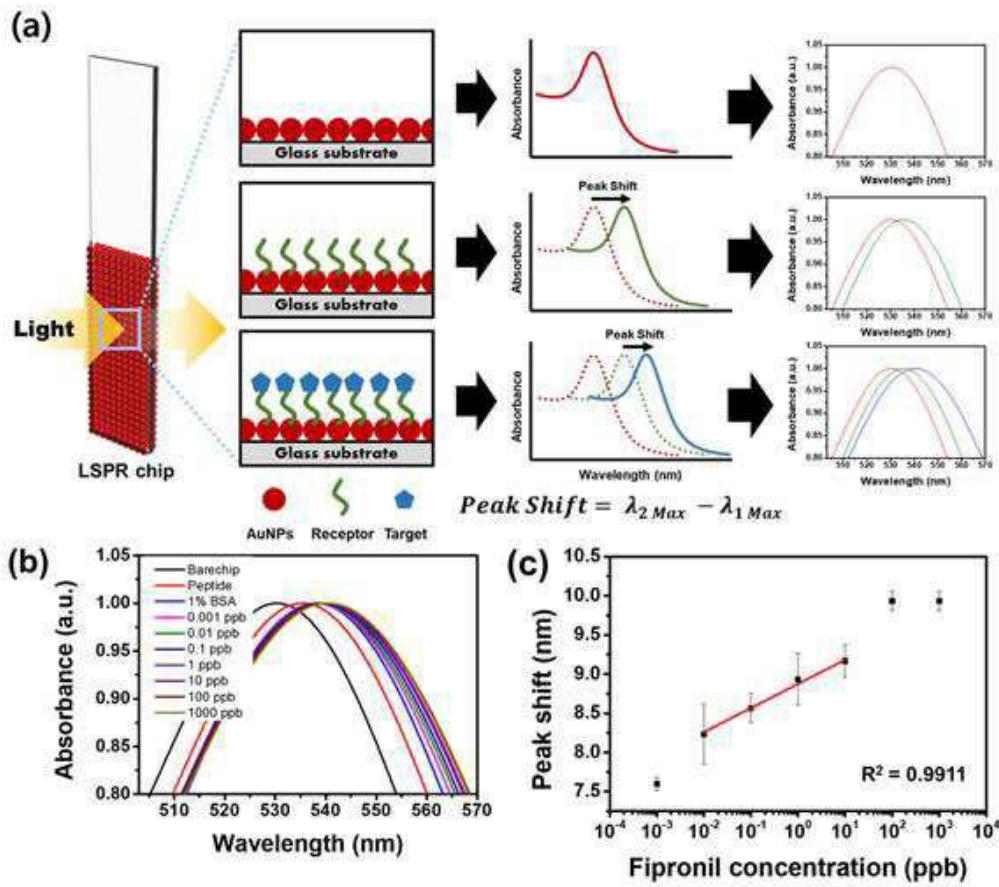
도면1



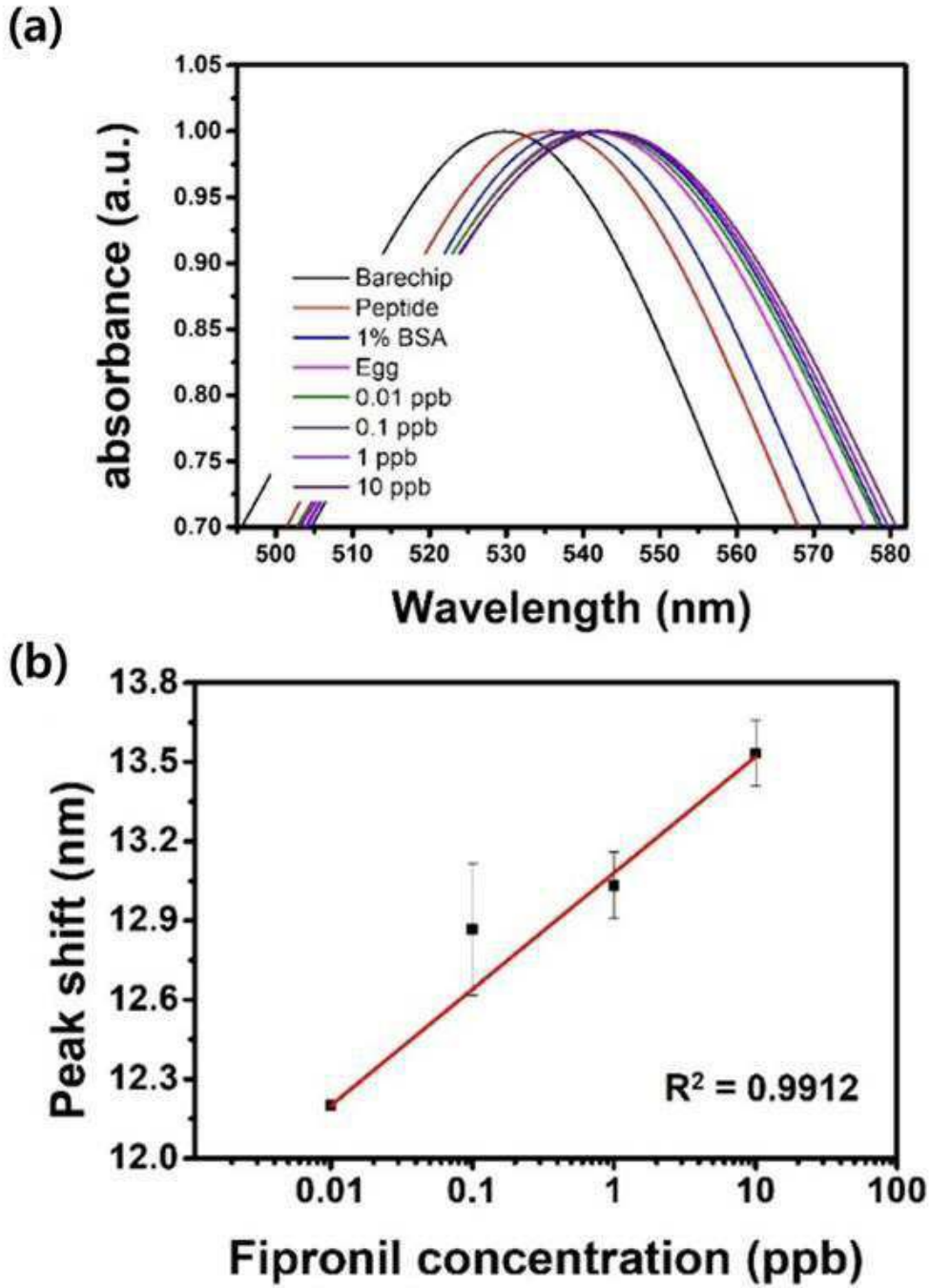
도면2



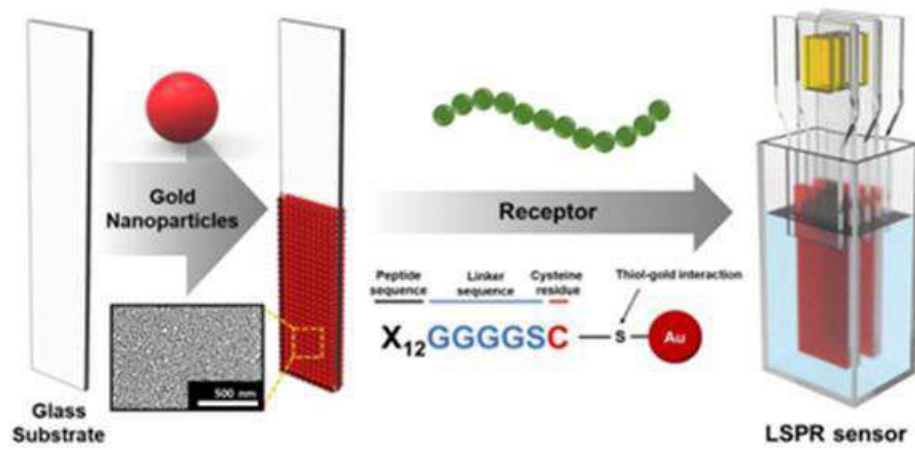
도면3



도면4



도면5



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.