



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0119737
(43) 공개일자 2020년10월20일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/569 (2017.01) C12N 15/115 (2010.01)
C12Q 1/04 (2017.01) G01N 21/77 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
G01N 33/56911 (2013.01)
C12N 15/115 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-0042801
(22) 출원일자 2020년04월08일
심사청구일자 2020년04월08일
- (30) 우선권주장
1020190041997 2019년04월10일 대한민국(KR)
- (71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천광역시 미추홀구 인하로 100(용현동, 인하대학교)
- (72) 발명자
전태준
경기도 수원시 영통구 도청로 65, 5409동 204호(이의동, 자연앤 힐스테이트)
- 김선민
서울특별시 마포구 독막로18길 5, 104동 1804호(상수동, 상수두산위브아파트)
- (74) 대리인
김순웅

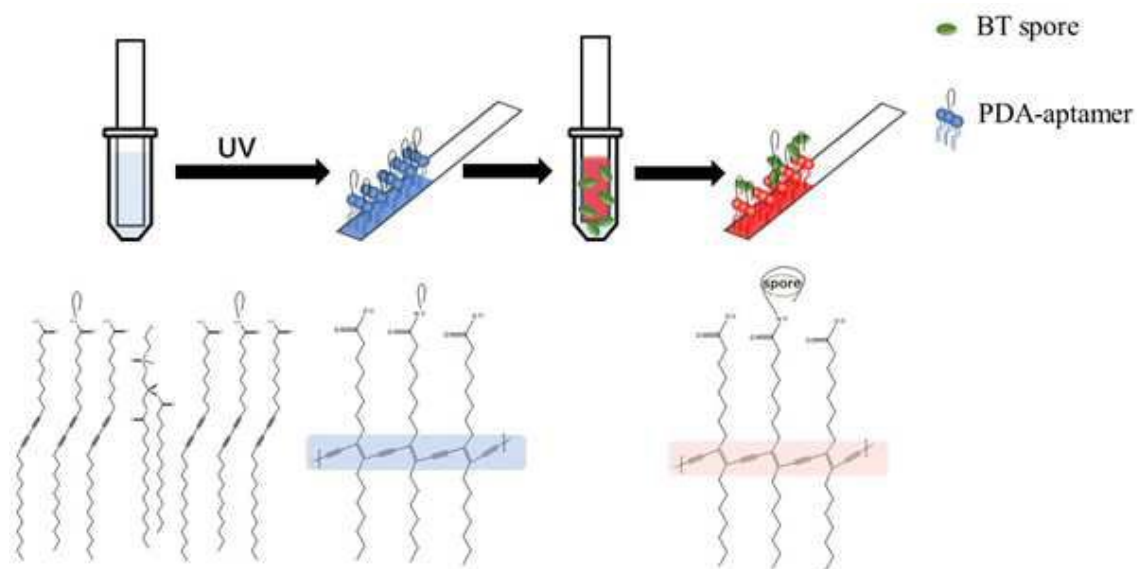
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 바실러스 균 포자 검출용 바이오 센서

(57) 요약

본 발명은 바실러스 균 포자 특이적 아민 압타머가 결합된 폴리디아세틸렌 리포솜을 포함하는 바실러스 균 포자 검출용 조성물, 종이 센서 및 이를 이용한 바실러스 균 포자 검출 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 바실러스 균 포자 특이적 아민 압타머가 결합된 폴리디아세틸렌 리포솜을 포함하는, 바실러스 균 포자 검출용 조성물 및 상기 조성물이 코팅된 바실러스 균 포자 검출용 종이 센서는 시료 내 존재하는 바실러스 균을 높은 감도로 검출할 수 있고, 색전이를 통해 쉽고 빠르게 검출이 가능하므로, 식품 등에 존재하는 바실러스 균의 검출에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Q 1/04 (2013.01)

G01N 33/54353 (2013.01)

G01N 33/54386 (2013.01)

G01N 2021/7759 (2013.01)

(72) 발명자

허윤석

인천광역시 연수구 해돋이로84번길 30, 101동 100
2호 (송도동, 송도금호어울림아파트)

주조가

인천광역시 미추홀구 경인남길102번길 95-12, 102
호(용현동)

유태영

인천광역시 미추홀구 용오로 82, 1동 304호 (동아
아파트)

류현일

서울특별시 성북구 월곡로18길 5-12 (하월곡동)
301호

장희수

인천광역시 남동구 논현로 81, 402동 1203호 (하늘
마을 4단지)

정우진

경기도 고양시 덕양구 지도로103번길 48, 104동
201호 (풍림아이원아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711099502

과제번호 2019R1A2C1084787

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)

연구과제명 활성산소 기전 분석 및 항산화제 스크리닝을 위한 인공생체막·세포칩 기반 통합 플

랫폼 개발

기 여 율 1/2

과제수행기관명 인하대학교

연구기간 2019.09.01 ~ 2020.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1395059243

과제번호 PJ014238042019

부처명 농촌진흥청

과제관리(전문)기관명 농촌진흥청

연구사업명 농축산물생산현장의안전관리기술개발(R&D)

연구과제명 축산물 및 축산물가공품의 안전성 확보를 위한 화학적 위해요소 현장진단기술 개발

기 여 율 1/2

과제수행기관명 인하대학교산학협력단

연구기간 2019.01.01 ~ 2019.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

바실러스 균 포자 특이적 아민 압타머가 결합된 폴리디아세틸렌 리포솜을 포함하는, 바실러스 균 포자 검출용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 바실러스 균은 바실러스 튜링겐시스(*B. thuringensis*), 바실러스 세레우스(*B. cereus*), 바실러스안트라시스(*B. anthracis*), 바실러스 슈도미코이데스(*B. pseudomyoides*), 바실러스 웨이헨스테펜시스(*B. weihenstephanensis*), 바실러스 토요이엔시스(*B. toyonensis*) 및 바실러스 미코이데스(*B. myoides*) 로 이루어진 군에서 선택된 1종인, 바실러스 균 포자 검출용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 바실러스 균은 바실러스 튜링겐시스이고, 상기 아민 압타머의 압타머 서열은 서열번호 1로 표시되는 것인, 바실러스 균 포자 검출용 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 조성물이 코팅된, 바실러스 균 포자 검출용 종이 센서.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 코팅은 폴리불화비닐리덴(polyvinylidene fluoride, PVDF) 종이에 코팅된 것인, 바실러스 균 포자 검출용 종이 센서.

청구항 6

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 조성물을 시료와 접촉시키는 단계; 를 포함하는 시료 내 바실러스 균 포자 검출 방법.

청구항 7

제4항의 종이센서를 시료와 접촉시키는 단계; 를 포함하는 시료 내 바실러스 균 포자 검출 방법.

청구항 8

바실러스 균 포자 특이적 아민 압타머가 결합된 폴리디아세틸렌(PDA)-압타머를 제조하는 단계; 를 포함하는, 바실러스 균 포자 검출용 조성물의 제조방법.

청구항 9

바실러스 균 포자 특이적 아민 압타머가 결합된 TCDA(10,12-Tricosadiynoic acid)-압타머를 제조하는 단계;

TCDA-압타머를 종이에 코팅하여 고정하는 단계; 및

상기 TCDA-압타머가 코팅된 종이에 자외선을 조사하는 단계; 를 포함하는 바실러스 균 포자 검출용 종이 센서의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 바실러스 균 포자 특이적 아민 압타머가 결합된 폴리디아세틸렌 리포솜을 포함하는 바실러스 균 포자 검출용 조성물, 종이 센서 및 이를 이용한 바실러스 균 포자 검출 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 바이오센서 시스템은 세포 수준(cellular level)이나 생체 내 수준(in vivo level)에서 형광을 띠는 나노물질의 특성을 이용하여 신호를 검출함으로써 데이터를 분석하는데 보다 쉽고 유용한 정보를 제공해 줄 수 있다. 화학 및 바이오센서는 측정 대상물로부터 정보를 감지, 측정하여 그 측정량을 인식 가능한 유용한 신호로 변화하는 물질 또는 장치이다.

[0004] 센서는 표적(target)으로부터 정보를 획득할 때 색, 형광, 전기적 신호 등과 같이 인식 가능한 신호로 변환시켜 인간의 판단을 돕는다. 센서가 표적물질을 인식하면 사람이 인식할 수 있도록 신호 변환기를 통해서 신호를 보내게 된다. 특히, 바이오센서에 이용되는 센서는 검출하고자 하는 표적 물질에 대한 높은 선택성과 감도가 요구된다. 효소와 항체의 경우 뛰어난 기질 특이성과 높은 결합력을 가지고 있으나 센서 장치에 고정화되었을 때 안정성이 떨어지고 가격이 비싼 단점을 지닌다.

[0005] 한편 센서 소재로 연구되고 있는 폴리디아세틸렌(polydiacetylene, PDA)은 자기 조립된 디아세틸렌(diacetylene) 단량체의 광중합에 의해 만들어진다. 디아세틸렌 단량체들이 조직적으로 배열되고, 분자 간의 거리가 충분히 가까울 경우 254nm의 자외선 노광에 의해 1,4-첨가 중합이 일어나 고분자 주쇄에 이중 결합과 삼중 결합이 교대로 존재하는 PDA가 만들어진다.

[0006] 폴리디아세틸렌은 수용액 상에서 합성이 쉬운 장점을 지닌다. DNA, 단백질, 탄수화물, 및 이온 등과 같은 생물학적으로 중요한 표적물질은 대부분 친수성을 띠기 때문에 센서물질 또한 수용성이거나 친수성인 것이 유리하다. 또한 폴리디아세틸렌은 부가적인 촉매 또는 개시제의 사용이 요구되지 않고 UV 자극에 의해 청색에서 적색으로 색 전이가 일어나는 것으로 알려져 있다.

[0007] 한편 바실러스 튜링겐시스(*B. thuringiensis*)와 그람 양성 포자 형성 세균인 바실러스 세레우스(*B. cereus*), 바실러스안트라시스(*B. anthracis*), 바실러스 슈도미코이데스(*B. pseudomycooides*), 바실러스 웨이헨스테펜시스(*B. weihenstephanensis*), 바실러스 토요이엔시스(*B. toyonensis*) 및 바실러스 미코이데스(*B. mycooides*)의 등 6종은 주로 토양에서 검출된다. 이 박테리아는 유전자형 및 표현형이 매우 유사하기 때문에 바실러스 세레우스(*B. cereus*) 그룹으로 분류된다. 이들 중 바실러스 세레우스(*B. cereus*)와 바실러스 튜링겐시스(*B. thuringiensis*)는 재배 및 배양 중 농업 토양 원료에서 관찰되기 때문에 식품에서 많이 검출되는 균이다. 또한 바실러스 세레우스(*B. cereus*)와 바실러스 튜링겐시스(*B. thuringiensis*)는 높은 유사성(>99%)을 나타내고, 유전적 및 표현형 분석을 사용하여 분류할 수 없다. 바실러스 튜링겐시스와 바실러스 세레우스는 인간의 식중독과 관련되어 있거나, 설사를 유발할 수 있으므로 이들을 식품에서 검출하는 것은 매우 중요하다.

[0008] 그러나 아직까지 이들을 쉽고 빠르게 검출할 수 있는 센서에 대해서는 널리 연구되지 않아, 육안으로 쉽고 빠르게 검출할 수 있는 새로운 센서에 대한 필요성이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0010] (특허문헌 0001) KR 10-2008-0047683
(특허문헌 0002) KR 10-2018-0087662

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명자들은 바실러스 균의 포자를 특이적으로 검출할 수 있는 바이오센서에 대해 탐색하던 중, 바실러스 균 포자 특이적 압타머를 결합시킨 PDA 바이오 센서, 특히 종이 센서를 이용하면 높은 감도로 바실러스 균을 검출할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.
- [0012] 따라서 본 발명은 바실러스 균 포자 특이적 아민 압타머가 결합된 폴리디아세틸렌 리포솜을 포함하는 바실러스 균 포자 검출용 조성물 및 센서, 이를 이용한 바실러스 균 포자 검출 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0014] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 바실러스 균 포자 특이적 아민 압타머가 결합된 폴리디아세틸렌 리포솜을 포함하는, 바실러스 균 포자 검출용 조성물을 제공한다.
- [0015] 또한 본 발명은 바실러스 균 포자 특이적 아민 압타머가 결합된 폴리디아세틸렌 리포솜이 코팅된, 바실러스 균 포자 검출용 종이 센서를 제공한다.
- [0016] 또한 본 발명은 바실러스 균 포자 특이적 아민 압타머가 결합된 폴리디아세틸렌 리포솜을 포함하는, 바실러스 균 포자 검출용 조성물을 시료와 접촉시키는 단계; 를 포함하는 시료 내 바실러스 균 포자 검출 방법을 제공한다.
- [0017] 또한 본 발명은 바실러스 균 포자 특이적 아민 압타머가 결합된 폴리디아세틸렌 리포솜이 코팅된, 바실러스 균 포자 검출용 종이 센서를 시료에 접촉시키는 단계; 를 포함하는 시료 내 바실러스 균 포자 검출 방법을 제공한다.
- [0018] 또한 본 발명은 바실러스 균 포자 특이적 아민 압타머가 결합된 폴리디아세틸렌(PDA)-압타머를 제조하는 단계; 를 포함하는, 바실러스 균 포자 검출용 조성물의 제조방법을 제공한다.
- [0019] 또한 본 발명은 바실러스 균 포자 특이적 아민 압타머가 결합된 TCDA(10,12-Tricosadiynoic acid)-압타머를 제조하는 단계; TCDA-압타머를 종이에 코팅하여 고정하는 단계; 및 상기 TCDA-압타머가 코팅된 종이에 자외선을 조사하는 단계; 를 포함하는 바실러스 균 포자 검출용 종이 센서의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0021] 본 발명에 따른 바실러스 균 포자 특이적 아민 압타머가 결합된 폴리디아세틸렌 리포솜을 포함하는, 바실러스 균 포자 검출용 조성물 및 상기 조성물이 코팅된 바실러스 균 포자 검출용 종이 센서는 시료 내 존재하는 바실러스 균을 높은 감도로 검출할 수 있고, 색전이를 통해 쉽고 빠르게 검출이 가능하므로, 식품 등에 존재하는 바실러스 균의 검출에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0023] 도 1은 본 발명에 따른 바실러스 균 포자 검출용 종이 센서의 모식도이다.
- 도 2는 PDA-압타머 리포솜 용액을 이용한 바실러스 튀링겐시스 포자 검출 결과를 확인한 결과를 나타낸 도이다 (a: 바실러스 튀링겐시스 포자 농도에 따른 색 검출 결과, b: 바실러스 튀링겐시스 포자 농도에 따른 Color Response percentage(CR%)).
- 도 3은 PDA 종이 센서를 이용한 바실러스 튀링겐시스 포자 검출 결과를 확인한 결과를 나타낸 도이다 (a: 바실

러스 튜링겐시스 포자 농도에 따른 색 검출 결과, b: 바실러스 튜링겐시스 포자 농도 및 반응 시간에 따른 색 전이 퍼센트 RCS (%)).

도 4는 PDA-압타머 종이 센서의 바실러스 튜링겐시스 포자 특이적 검출능을 바실러스 튜링겐시스, 대장균에서 압타머 존재 유무를 통해 확인한 결과를 나타낸 도이다 (a: 색 검출 결과, b: 색 전이 퍼센트 RCS (%)).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 본 발명은 바실러스 균 포자 특이적 아민 압타머가 결합된 폴리디아세틸렌 리포솜을 포함하는, 바실러스 균 포자 검출용 조성물 및 상기 바실러스 균 포자 특이적 아민 압타머가 결합된 폴리디아세틸렌 리포솜이 코팅된 종이 센서를 제공한다.
- [0025] 본 발명의 바실러스 균 포자 특이적 아민 압타머가 결합된 폴리디아세틸렌 리포솜은 시료 내에 존재하는 바실러스 균을 색전이를 통해 특이적으로 검출할 수 있으며, 특히 종이 센서에 부착된 경우, 보다 높은 감도 및 준-정량적으로 검출할 수 있는 것을 특징으로 한다.
- [0026] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0027] 본 발명의 바실러스 균 포자 검출용 조성물 및 종이 센서는, 본 발명의 폴리디아세틸렌 리포솜에 결합될 수 있는 바실러스 균 포자 검출 압타머를 이용하여 다양한 바실러스 균을 특이적으로 검출할 수 있다. 본 발명에 따른 바실러스 균은 바람직하게는 바실러스 세레우스 그룹에 속하는 균일 수 있으며, 바실러스 튜링겐시스(*B. thuringensis*), 바실러스 세레우스(*B. cereus*), 바실러스안트라시스(*B. anthracis*), 바실러스 슈도미코이데스(*B. pseudomycooides*), 바실러스 웨이헨스테펜시스(*B. weihenstephanensis*), 바실러스 토요이엔시스(*B. toyonensis*) 및 바실러스 미코이데스(*B. mycooides*) 로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상, 더욱 바람직하게는 바실러스 튜링겐시스(*B. thuringensis*), 바실러스 세레우스(*B. cereus*) 일 수 있고, 본 발명에서는 일 예로 바실러스 튜링겐시스를 사용하였다.
- [0028] 본 발명의 바실러스 균 포자 특이적 아민 압타머는 바실러스 균을 선택적으로 검출할 수 있으면서, 폴리디아세틸렌 리포솜에 결합될 수 있는 압타머일 수 있으며, 예컨대 검출대상 바실러스 균이 바실러스 튜링겐시스(*B. thuringensis*) 또는 바실러스 세레우스(*B. cereus*) 인 경우 서열번호 1로 표시되는 압타머, 또는 이와 90% 이상의 상동성을 갖는 서열로 표시되는 압타머 일 수 있다.
- [0029] 상기 폴리디아세틸렌(PDA) 리포솜은 디아세틸렌 계열의 지질로 구성된 소포 형태의 구조체로, 지질의 꼬리 부분에 두 개의 3중 결합을 가지고 있어, 가교를 통해 색 변화하는 특성을 가진다. 청색의 폴리디아세틸렌 소포는 온도, pH, 용매, 물리적 자극, 화학적 자극 등과 같은 외부 환경의 변화에 의해 약 540nm에서 최대 흡수 파장을 지니는 붉은색으로 전이가 일어나면서 적색의 폴리디아세틸렌 형광체가 된다.
- [0030] 본 발명의 폴리디아세틸렌 리포솜은 UV 조사에 의해 청색을 나타내며, 시료 내 존재하는 바실러스 균 포자와 반응하는 경우, 적색으로의 색전이를 나타내는 것을 특징으로 한다. 따라서, 본 발명의 검출용 조성물 및 종이 센서를 이용하면 육안으로 시료 내 바실러스 균 포자의 존재를 확인할 수 있으며, 특히 시료 내 존재하는 바실러스 균 포자의 농도에 따라, 색 전이가 농도 의존적, 시간 의존적인 뚜렷한 차이를 나타내므로, 시료 내 존재하는 포자 농도의 정량적 비교를 가능하게 할 수 있다.
- [0031] 특히 본 발명은 바실러스 균 포자 특이적 아민 압타머가 결합된 폴리디아세틸렌 리포솜이 용액이 아닌 고체상에 고정된 종이 센서를 제공한다.
- [0032] 바실러스 균 포자 특이적 아민 압타머가 결합된 폴리디아세틸렌 리포솜이 고정된 종이 센서는 바실러스 균 포자 용액과 반응하여 색 전이를 발생시킬 수 있으며, 바실러스 균 농도에 따라 각기 다른 색 전이 (RCS) % 를 나타내어 준-정량적 분석이 가능하게 하는 특징이 있다. 또한 본 발명에 따른 종이 센서는 용액상의 검출용 조성물과 비교하여 고체상을 제공함으로써 반응을 촉진하고 반응의 손실을 감소시켜 반응 감도를 약 100 배 이상 증가시킬 수 있는 특징이 있다.
- [0033] 본 발명의 종이 센서는 바실러스 균 포자 특이적 아민 압타머가 결합된 폴리디아세틸렌 리포솜이 고정될 수 있는 재료의 종이라면 당 분야에 공지된 재료를 제한없이 사용할 수 있으며, 본 발명에서는 바람직한 일 예로 폴리불화비닐리덴(polyvinylidene fluoride, PVDF) 종이를 이용하여 바실러스 균 포자 특이적 아민 압타머가 폴리불화비닐리덴에 코팅된 종이 센서를 제공한다.

- [0035] 또한 본 발명은 상기 검출용 조성물 또는 종이 센서를 시료와 접촉시키는 단계를 포함하는 시료 내 바실러스 균 포자 검출 방법을 제공한다.
- [0036] 본 발명에서 시료는 바실러스 균의 존재 여부를 확인하기 위한 미지의 시료를 의미하며, 바실러스 균 포자 특이적 아민 압타머가 결합된 폴리디아세틸렌 리포솜과 반응할 수 있도록 용액 상인 것이 바람직하다.
- [0037] 미지의 시료 내에 바실러스 균 포자가 존재하는 경우, 바실러스 균 포자 특이적 아민 압타머가 결합된 폴리디아세틸렌 리포솜은 청색에서 적색으로 색 전이가 일어나게 되며, 바실러스 균 포자의 농도에 따라 다른 RCS 값을 나타내는 바, 이를 통해 시료 내 바실러스 균 포자 여부 및 상대적 농도를 확인할 수 있다.
- [0039] 또한 본 발명은 바실러스 균 포자 특이적 아민 압타머가 결합된 폴리디아세틸렌(PDA)-압타머를 제조하는 단계; 를 포함하는, 바실러스 균 포자 검출용 조성물의 제조방법을 제공한다.
- [0040] 또한 본 발명은 바실러스 균 포자 특이적 아민 압타머가 결합된 TCDA(10,12-Tricosadiynoic acid)-압타머를 제조하는 단계; TCDA-압타머를 종이에 코팅하여 고정하는 단계; 및 상기 TCDA-압타머가 코팅된 종이에 자외선을 조사하는 단계; 를 포함하는 바실러스 균 포자 검출용 종이 센서의 제조방법을 제공한다.
- [0041] 본 발명의 바실러스 균 포자 특이적 아민 압타머는 검출하고자 하는 바실러스 균 종류에 따라 특이적으로 설계될 수 있으며, 예컨대 바실러스 튜링겐시스를 검출하고자 하는 경우 상기 압타머는 서열번호 1로 표시되는 헤어핀 구조의 압타머를 사용할 수 있다.
- [0042] 상기 압타머는 폴리디아세틸렌에 결합될 수 있으며, NHS 변형된 디아세틸렌 단량체 (TCDA-NHS) 에 EDC/NHS 짝지음 반응을 이용하여 결합될 수 있다.
- [0043] 본 발명의 바실러스 균 포자 검출용 종이 센서는 폴리디아세틸렌(PDA)-압타머가 종이에 고정, 즉 코팅된 상태일 수 있으며, 상기 코팅은 TCDA-압타머를 DMPE와 1:1내지 3 의 비율로 클로로포름에 혼합하여 TCDA-압타머가 혼합된 클로로포름 용액을 제조하고, 이에 고정판이 되는 종이, 바람직하게는 PVDF 를 빠르게 투입했다 꺼내는 과정을 통해 달성될 수 있다. 따라서 상기 TCDA-압타머를 종이에 코팅하여 고정하는 단계는 TCDA-압타머가 혼합된 클로로포름에 PVDF를 투입하고 꺼낸 후, 코팅된 PVDF 에 UV 를 조사하는 방식으로 이루어질 수 있다.
- [0044] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0047] 실시예 1. 바실러스 튜링겐시스 (*Bacillus thuringiensis*) 포자 준비

- [0048] 바실러스 튜링겐시스(BT, ATCC 35866)를 영양액 배지에서 배양 및 GYS 배지에서 24시간 동안 배양하였다. 이후 원심 분리 및 세척을 수행하여 PBS 완충액(pH 7.5, 5mM)상에서 포자 스탁 용액을 제조하였다. 포자가 형성된 것을 현미경(TE2000-U, Nikon)으로 확인할 수 있었으며, 상기 포자 스탁 용액의 CFU 값은 희석된 스탁 용액을 영양 아가 배지에 분주하고 24시간동안 37℃에서 배양한 후, 콜로니의 수를 파악하여 결정하였다. 이와 같은 방법으로 상기 포자 스탁 용액의 바실러스 튜링겐시스 포자 농도를 계산한 결과 농도는 3×10^{11} CFU/mL로 계산되었으며 상기 포자 용액은 -20℃로 유지하여 더 이상의 농도 변화가 없도록 고정하였다.

[0050] 실시예 2. 바실러스 튜링겐시스 포자 검출을 위한 폴리디아세틸렌(PDA) 리포솜 용액의 준비

- [0051] PDA (polydiacetylene) 리포솜을 제조하기 위하여 NHS 변형된 디아세틸렌 단량체 (TCDA-NHS)를 제조하였다. TCDA (10,12-Tricosadiynoic acid)를 숙신이미딜 활성 에스테르(succinimidyl active esters)로 전환하기 위한 과정을 수행하였다. 상기 TCDA-NHS (10,12-tricosadiynoic acid- N -hydroxysuccinimide)준비를 위해 TCDA 0.25g(0.72mmol), EDC-HCL 0.26g(1.35mmol), NHS 0.12g (1.07mmol)을 4mL의 메틸렌 클로라이드 용액에 용해시킨 후, 상온에서 상기 용액을 2시간동안 교반 하였다. 교반한 상기 용액 중 용매는 아르곤 증기를 이용해 증발시키고 남은 물질을 에틸 아세테이트를 이용한 분별 깔때기 방법을 이용하여 정제하여, 디아세틸렌 단량체인 고체의 TCDA-NHS 단량체를 준비하였다. 단량체 디아세틸렌은 자외선 조사에 의하여 PDA (polydiacetylene) 로 쉽

게 다량체화 될 수 있다.

- [0052] TCDA-NHS에 바실러스 튀링겐시스 포자를 특이적으로 검출할 수 있는 아민 압타머를 결합시키기 위하여, 포자 특이적 압타머를 EDC/NHS 짝지음 반응을 이용하여 결합하였다.
- [0053] PDA 베지클은 TCDA 및 DMPC를 혼합하여 제조하였으며, TCDA 단량체의 카르복실기가 EDC/NHS 와 반응하며, EDC는 카르복실기와 반응하여 아민-반응성 중간체를 형성한다. NHS 는 제조된 중간체를 아민-반응성 NHS 에스테르로 전환하여 아민-반응성 중간체를 안정화시키고 EDC에 의한 커플링 반응의 효율을 증가시킬 수 있다.
- [0054] 구체적으로 헤어핀 구조를 가진 아민 압타머(amine-aptamer)와 TCDA-NHS를 결합하기 위하여, 앞서 준비한 TCDA-NHS 500nmol(0.23mg)를 상기 압타머 16 μ l과 DMSO 20 μ l에서 혼합하여 4시간동안 37℃를 유지하며 반응시켰다.
- [0055] 사용된 압타머 서열은 하기와 같다.

표 1

바실러스 튜링겐시스 특이적 압타머 서열	
1	5'-AmMC6-CAT CCG TCA CAC CTG CTC TGG CCA CTA ACA TGG GGA CCA GGT GGT GTT GGC TCC CGT ATC-3'
*AmMC6=amine modifier C6	

- [0057] 반응하지 않은 숙신이미딜 활성 에스테르는 에탄올라민(ethanolamine)으로 불활성화시켰고, 압타머가 결합된 TCDA-압타머를 제조하였다. Dimethyl-2-(dimethylphosphino)ethylphosphine (DMPE) 및 PCDA(10,12-Pentacosadiynoic acid)를 DMPE: PCDA 1:1의 molar 비율로 클로로포름(chloroform)에서 혼합한 후 아르곤 가스를 이용해 용매는 모두 증발시켰다. 상기 PCDA와 DMPE의 혼합물은 HEPES 완충액(5mM, pH 7.5)에서 지질 농도 3mM을 이루도록 재부유시킨 후 80℃에서 1시간동안 가열하였다. 혼합물을 가열한 상태에서, 앞서 준비한 DMSO 내 TCDA-압타머를 투입하고 10분 동안 용액을 초음파처리 하였다(sonics VCS-750 Vibra Sonic Processor). 초음파 처리한 용액은 0.8 μ m의 필터(Advantec dismic-25cs)에 의해 여과한 후 밤새 4℃로 유지하였다. 이후 리포솜 용액을 254nm UV 광으로 5분 동안 처리하였고, 배열된 디아세틸렌 단량체는 중합을 형성하여, 청색의 PDA 리포솜 용액을 제조하였다.

[0059] 실시예 3. 바실러스 튀링겐시스 포자 검출을 위한 PDA 종이 센서 준비

- [0060] 바실러스 튀링겐시스 포자 특이적 PDA 센서를 제조하기 위하여, 상기 실시예 2에서 제조된 TCDA-압타머를 이용하였다. PCDA를 DMPE와 1:1의 비율로 클로로포름에서 혼합하고, 그 후 TCDA-압타머를 800 μ l의 클로로포름에 용해시켜, TCDA-압타머 5%를 포함한 총 지질 농도 3mM의 PDA-클로로포름 용액을 준비하였다.
- [0061] PDA 종이 센서를 제작하기 위해 미리 PVDF (polyvinylidene fluoride) 종이를 1cm x 5cm의 크기로 준비하고 이를 TCDA-압타머가 용해된 클로로포름 용액에 빠르게 투입했다가 꺼내는 과정을 수행하여 TCDA-압타머를 균일하게 코팅시켰다. TCDA-압타머가 코팅된 PVDF 종이를 상온에서 건조시켰으며, 254nm UV 광으로 45초 동안 처리하면 PDA를 형성하고, 청색을 나타내는 것을 확인하였다.

[0063] 실시예 4. PDA 종이 센서와 바실러스 튀링겐시스 포자간의 반응

- [0064] 실시예 3을 통해 준비한 PDA 종이 센서에는 PDA-압타머가 고정되어 있으며, UV 노출에 의해 청색을 낸다. 상기 PDA 종이센서를 바실러스 튀링겐시스 포자 용액과 반응시킬 경우, PDA 종이 센서에 고정된 PDA-압타머와 바실러스 튀링겐시스 포자의 결합을 통해 적색으로의 색 전이가 발생하며, 그 과정을 도 1에 나타내었다.

[0065]

[0066] 실험예 1. PDA-압타머 리포솜 용액의 바실러스 튀링겐시스 포자 검출능 분석

- [0067] 3×10^8 , 3×10^9 , 3×10^{10} CFU/mL의 바실러스 튀링겐시스 포자 용액과 실시예 2의 PDA-압타머 리포솜 용액을 4시간 동안 배양하였으며, PBS 완충액 (pH 7.5, 5mM)을 대조군으로 사용하였다. 4시간 배양 후 PDA 압타머 리포솜의 CR% (Color response percentage)를 농도에 따라 확인하였으며, 그 결과를 도 2에 나타내었다.
- [0068] 이때, Color Response percentage(CR%)는 다음과 같은 방법으로 정의된다. 바실러스 튀링겐시스 포자 용액과

PDA-압타머 리포솜 용액을 함께 배양하여 바실러스 튀링겐시스 포자와 압타머의 결합을 통해 청색에서 적색으로의 색 전이가 발생하며 이는 microplate absorption spectrophotometer에 의해 기록된다.

먼저, 청색 퍼센트(percent blue, PB)는

$$PB = \frac{A_{blue}}{A_{blue} + A_{red}} \times 100\%$$

로 정의된다. 이때, A_{blue} 는 620nm(청색)의 peak에서의 흡광도, A_{red} 는 520nm(적색)의 peak에서의 흡광도이다.

이때, Color Response percentage(CR%)는

$$CR = \frac{PB_0 - PB_f}{PB_0} \times 100\%$$

로 정의된다. 이때, PB_0 는 바실러스 튀링겐시스 포자를 처리하기 전 PB 값이며, PB_f 는 바실러스 튀링겐시스 포자를 처리한 후의 PB 값이다. 상기 CR% 계산식을 통해 각 농도에서의 CR%를 계산하였다.

도 2에 나타난 바와 같이, 바실러스 튀링겐시스 포자 용액의 농도 의존적으로 Color Response percentage(CR%)가 증가하였다. 또한, 3×10^8 CFU/mL 에서는 명백한 CR%의 증가가 이루어지지 않았으나, 3×10^9 CFU/mL 농도에서는 CR%가 15.2로 나타났다. 상기 결과를 통해 PDA-압타머 리포솜 용액은 3×10^9 CFU/mL 농도 이상의 바실러스 튀링겐시스 포자 검출이 가능하며, Limit of Detection(LOD)값은 3×10^9 CFU/mL이며, 농도가 증가할수록 CR%가 증가함을 알 수 있다.

실험예 2. PDA 종이 센서의 포자 검출능 분석

PDA-압타머가 코팅된 종이 센서를 각기 다른 농도의 바실러스 튀링겐시스 포자 용액과 함께 1시간마다 색 전이를 관찰하며 4시간 동안 배양하였다. 음성대조군과 양성대조군을 각각 PBS 완충액(pH 7.5, 5mM)과 1M NaOH 용액으로 하여, 3×10^7 , 3×10^8 , 3×10^9 , 3×10^{10} , 3×10^{11} CFU/mL 농도의 바실러스 튀링겐시스 포자 용액에서 색 전이를 관찰하였고, 그 결과를 도 3에 나타내었다. 이때, 정량화된 적색 색 전이 수치를 얻기 위해서, 종이 센서의 이미지를 Image J software로 분석하여 image-averaged RGB(red-green-blue) 값을 얻었다. 상기 Image J software로부터 얻은 RGB의 평균값을 통해 적색 전이 정도(red chromaticity lever, r)를 계산했으며, 적색 전이 정도를 계산하는 식은 다음과 같다.

$$r = \frac{R}{R + G + B}$$

청색으로부터 적색으로의 색 전이 퍼센트(RCS)는 하기 식으로 정의되며, r_{sample} 은 포자 용액에 배양된 종이 센서의 평균 적색 색전이 수치, r_0 는 완충액에 배양된 종이 센서의 평균 적색 색전이 수치이며(음성대조군), r_{max} 는 최대 평균 적색 색전이 수치, 즉 1 mM NaOH에서 배양된 종이 센서의 적색 색전이 수치(양성 대조군)를 나타낸다.

$$RCS = \frac{r_{sample} - r_0}{r_{max} - r_0} \times 100\%$$

도 3에 나타난 바와 같이 1시간 이내에 육안으로 청색에서 보라색으로의 색전이를 관찰할 수 있었으며, 시간이 지남에 따라 분홍/적색으로 색전이가 관찰되었다.

색 전이는(RCS) 농도 의존적, 시간 의존적으로 증가함을 알 수 있다. 특히, 3×10^{11} CFU/mL의 바실러스 튀링겐시스

스 포자 농도에서는 1시간 이후에는 20.4%의 RCS값을, 2시간 이후에는 35.8%의 RCS 값을 얻었고, 4시간의 배양 후에는 가장 높은 RCS 값인 53.7%의 RCS 값을 얻었다.

[0086] 또한, PDA-압타머 종이 센서는 바실러스 튀링겐시스 농도에 따라 각기 다른 RCS%를 나타내기 때문에 준-정량적 분석을 가능하게 한다. 실험 결과 3×10^7 CFU/mL, 3×10^8 CFU/mL, 3×10^9 CFU/mL, 3×10^{10} CFU/mL, 3×10^{11} CFU/mL의 순서대로 22.1%, 26.8%, 28.6%, 33.9%, 53.7%의 RCS 값을 나타내었다. 각기 다른 농도의 포자 용액에 대하여, PDA-압타머 종이 센서는 육안으로 구별가능한 색 전이를 관찰할 수 있게 한다.

[0087] 또한, 실험예 1에서에서의 PDA-압타머 리포솜 용액 실험의 LOD (Limit of Detection) 3×10^9 CFU/mL와 비교하여 PDA-압타머 종이 센서는 3×10^7 CFU/mL 농도의 바실러스 튀링겐시스 포자 검출이 가능하며, LOD 값은 3×10^7 CFU/mL임을 알 수 있다. 따라서, 고정된 PDA-압타머는 PDA-압타머 리포솜 용액에 비해 고체상을 제공함으로써 색 전이를 위한 반응을 촉진하고 반응의 손실을 감소시켜 반응의 감도가 100배 증가함을 확인하였다.

[0088] 상기 결과를 통해 농도와 시간에 의존적인 색전이(RCS)를 관찰했으며, PDA-압타머 종이 센서는 3×10^7 CFU/mL 농도 이상의 바실러스 튀링겐시스 포자 검출이 가능함을 알 수 있다.

[0089]

[0090] 실험예 3. PDA-압타머 종이 센서의 바실러스 튀링겐시스 포자 특이성 분석

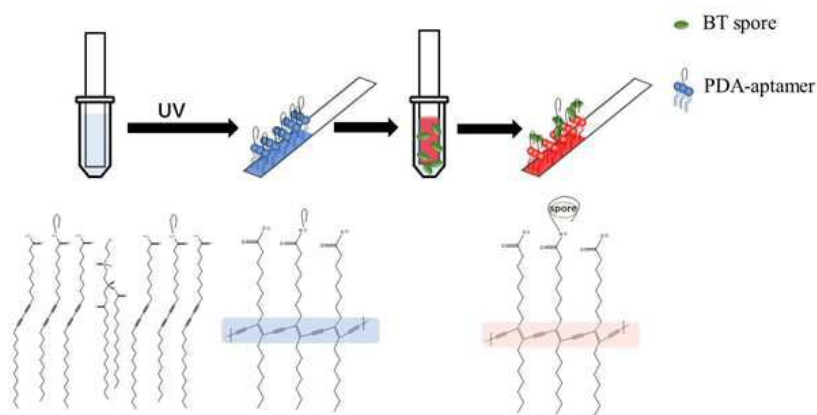
[0091] PDA-압타머 종이 센서의 포자 특이성 분석을 위해 압타머의 존재 유무, 3×10^{11} CFU/mL 농도의 바실러스 튀링겐시스 포자의 유무 또는 3×10^{11} CFU/mL 농도의 대장균의 존재 유무에 따라 4시간 동안 배양 후의 색전이 정도를 관찰하였으며, 음성대조군과 양성대조군을 각각 PBS 완충액(pH 7.5, 5mM)과 1M NaOH 용액으로 하였다. 실험 결과를 도 4에 나타내었다.

[0092] 도 4에 나타낸 바와 같이, PDA-압타머 종이 센서의 바실러스 튀링겐시스 포자와의 반응에서의 RCS 값은 53.7% RCS로서 압타머가 없는 PDA 종이 센서의 바실러스 튀링겐시스 포자와의 반응에서의 RCS값(6.4%)보다 7배 높은 수치를 보였다. 또한, PDA-압타머 종이 센서의 대장균과의 반응에서의 RCS값(7.5%)보다 6배 높은 수치를 보였다.

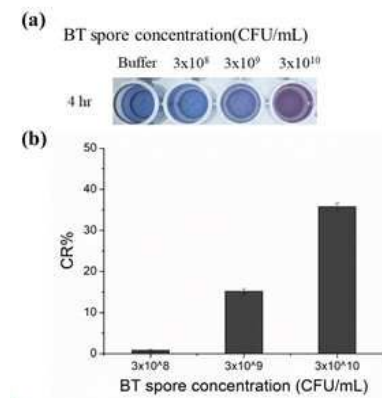
[0093] 상기 결과를 통해 PDA-압타머 종이 센서는 바실러스 튀링겐시스에 대해 특이적으로 높은 색전이가 발생함을 알 수 있으며, 따라서 PDA-압타머 종이 센서는 바실러스 튀링겐시스를 특이적으로 검출할 수 있음을 알 수 있다.

도면

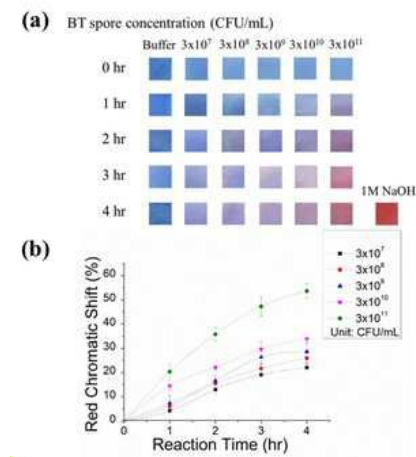
도면1



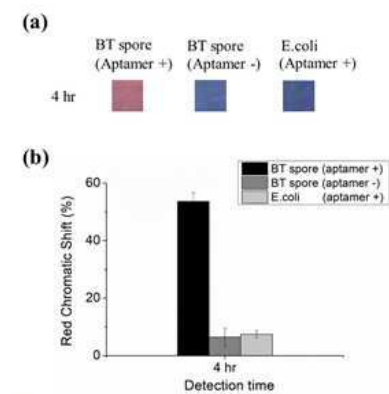
도면2



도면3



도면4



서열 목록

- <110> Inha University Research and Business Foundation
- <120> Biosensor for detecting spore of Bacillus
- <130> inh1.291P_1
- <150> KR 10-2019-0041997
- <151> 2019-04-10

<160> 1
 <170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> aptamer for bacillus thuringensis
 <400> 1
 catccgtcac acctgctctg gccactaaca tggggaccag gtggtgttgg ctcccgtatc 60
 60