(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0006391
(43) 공개일자 2025년01월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*C12Q 1/689* (2018.01) *C12Q 1/28* (2006.01)
*C12Q 1/682* (2018.01)
(52) CPC특허분류
*C12Q 1/689* (2018.05)
*C12Q 1/28* (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0085852
(22) 출원일자 2023년07월03일
심사청구일자 2023년07월03일

(71) 출원인
**고려대학교 산학협력단**
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
**구만복**
서울특별시 동대문구 이문로12길 3-10, 103동 1101호 (이문동,래미안이문2차아파트)
**니구엔티탄퀴**
서울특별시 성북구 안암로 145, 하나과학관 A동 613호 (안암동5가)
(74) 대리인
**특허법인리체**

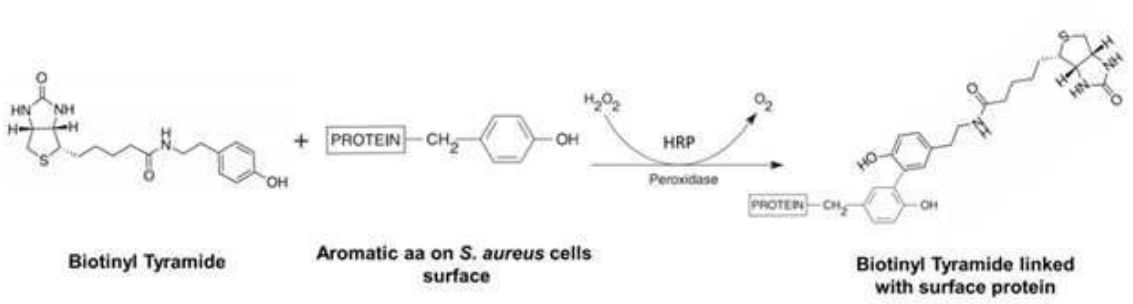
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **티라미드 신호 증폭 방식을 이용한 식중독균 검출용 키트 및 식중독균 검출방법**

## (57) 요 약

본 발명은 식중독균 검출용 키트 및 식중독균 검출방법에 관한 것이다. 티라미드를 이용해 다량의 과산화효소를 검출 대상 식중독균에 결합시킨 후 과산화효소 기질을 처리 및 반응시켜 발생하는 전기화학적 신호를 측정함으로써 높은 민감도로 식중독균을 검출할 수 있다.

*대 표 도* - 도1



(52) CPC특허분류
***C12Q 1/682*** (2018.05)
*C12Q 2326/12* (2013.01)
*C12Q 2326/20* (2013.01)
*C12Q 2525/205* (2013.01)
*C12Q 2563/131* (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

| | |
|---|---|
| 과제고유번호 | 1711167908 |
| 과제번호 | 2021R1A2C2013396 |
| 부처명 | 과학기술정보통신부 |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국연구재단 |
| 연구사업명 | 개인기초연구(과기정통부) |
| 연구과제명 | 효소-질량분석 기반 Engineered 앱타머를 통한 고성능앱타머 바이오센서 기술 개발 |
| 기 여 율 | 1/1 |
| 과제수행기관명 | 고려대학교 산학협력단 |
| 연구기간 | 2022.03.01 ~ 2023.02.28 |

# 명 세 서

## 청구범위

### 청구항 1

검출 대상 식중독균에 특이적으로 결합하는 제1 앱타머; 상기 검출 대상 식중독균에 특이적으로 결합하고 과산화효소가 결합된 제2 앱타머; 바이오틴이 결합된 티라미드; 과산화물 및 아비딘 또는 아비딘 유사체가 결합된 과산화효소를 포함하는, 식중독균 검출용 키트.

### 청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 식중독균은 황색포도상구균, 리스테리아 모노사이토제니스, 시겔라 보이디, 시겔라 플렉스너리, 시겔라 소네이, 클로스트리듐 페르프린젠스, 클로스트리디움 보툴리눔, 캄필로박터 제주니, 바실러스 세레우스, 에르시니아 엔테로콜리티카, 살모넬라 엔테리티디스, 비브리오 파라헤몰리티쿠스, 살모넬라 티피뮤리움 및 병원성 대장균으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인, 식중독균 검출용 키트.

### 청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 아비딘 유사체는 스트렙타비딘, 뉴트라비딘 또는 캡타비딘인, 식중독균 검출용 키트.

### 청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 제1 앱타머는 서열번호 1의 핵산서열로 이루어지고, 상기 제2 앱타머는 서열번호 2의 핵산서열로 이루어진, 식중독균 검출용 키트.

### 청구항 5

전극에 고정된, 검출 대상 식중독균에 특이적으로 결합하는 제1 앱타머에 시료를 처리하는 단계;

상기 처리된 시료에 상기 제1 앱타머와 결합부위가 상이하고 상기 검출 대상 식중독균에 특이적으로 결합하는, 과산화효소가 결합된 제2 앱타머를 처리하는 단계;

상기 제2 앱타머에 바이오틴이 결합된 티라미드 및 과산화물을 처리하는 단계; 및

상기 티라미드에 아비딘 또는 아비딘 유사체가 결합된 과산화효소를 처리하는 단계를 포함하는, 식중독균 검출방법.

### 청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 식중독균은 황색포도상구균, 리스테리아 모노사이토제니스, 시겔라 보이디, 시겔라 플렉스너리, 시겔라 소네이, 클로스트리듐 페르프린젠스, 클로스트리디움 보툴리눔, 캄필로박터 제주니, 바실러스 세레우스, 에르시니아 엔테로콜리티카, 살모넬라 엔테리티디스, 비브리오 파라헤몰리티쿠스, 살모넬라 티피뮤리움 및 병원성 대장균으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인, 식중독균 검출방법.

### 청구항 7

청구항 5에 있어서, 상기 아비딘 유사체는 스트렙타비딘, 뉴트라비딘 또는 캡타비딘인, 식중독균 검출방법.

**청구항 8**

청구항 5에 있어서, 상기 제1 앱타머는 서열번호 1의 핵산서열로 이루어지고, 상기 제2 앱타머는 서열번호 2의 핵산서열로 이루어진, 식중독균 검출방법.

**청구항 9**

청구항 5에 있어서, 상기 시료는 물 또는 육류 추출물인, 식중독균 검출방법.

**청구항 10**

청구항 5에 있어서, 상기 아비딘 또는 아비딘 유사체가 결합된 과산화효소에 테트라메틸벤지딘, 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘, 오르쏘페닐렌디아민, 2,2'-아조비스 및 테트라메틸피페라진으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나를 처리하여 생성되는 전기화학 신호를 측정하는 단계를 더 포함하는, 식중독균 검출방법.

## *발명의 설명*

### *기 술 분 야*

[0001] 본 발명은 티라미드 신호 증폭 방식을 이용한 식중독균 검출용 키트 및 식중독균 검출방법에 관한 것이다.

### *배 경 기 술*

[0003] 식중독을 일으키는 원인에는 식중독균, 기생충, 혹은 화학물질 등이 있다. 미국 식품의약국 (FDA) 자료에 따르면, 세계에서 가장 안전한 식량 공급 국가 중 하나인 미국에서도 매년 4,800만 건의 식중독 사례가 발생하고 있다. 식중독은 주로 사람들이 식중독균에 오염된 음식을 먹거나 마실 때 발생한다. 대표적인 식중독 원인이 되는 병원균, 즉 식중독균으로는 대장균 (E.coli), 살모넬라균 (Salmonella spp.), 리스테리아 모노사이토제네스 (Listeria monocytogenes), 황색포도상구균 (Staphylococcus aureus), 바실러스 세레우스 (Bacillus cereus), 클로스트리디움 보툴리눔 (Clostridium botulinum), 비브리오균 (Vibrio spp.) 등이 있다. 식중독균은 포자 내열성 또는 내열성 독소를 가질 수도 있다. 전 세계인구의 약 10%에 해당하는 약 6억 명의 인구는 오염된 음식을 섭취하여 식중독에 걸리고, 그중 42만 명이 매년 사망한다. 저소득 및 중소득 국가에서는 안전하지 않은 식품으로 인해 매년 1,100억 달러의 생산성과 의료비가 손실되고 있다. 세계보건기구 (WHO) 자료에 따르면, 식중독은 의료보험제도에 부담을 주고, 경제와 관광, 그리고 무역에 해를 끼침으로써 국가 경제 발전을 저해한다.

[0004] 일반적으로, 식중독이 발병하려면 어느 정도 양의 식중독균이나 그것의 독소를 섭취해야 한다. 하지만 일부 독성 식중독균은 아주 적은 양만으로도, 혹은 매우 적은 양의 독소를 섭취하는 것만으로도 환자에게 치명적인 질병을 유발할 수 있다. 따라서, 이를 민감하게 검출하는 기술이 필요하다.

### *선행기술문헌*

#### *특허문헌*

[0006] (특허문헌 0001) 한국공개특허 10-2020-0070792 호

## *발명의 내용*

## 해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 식중독균 검출용 키트를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0008] 본 발명은 식중독균 검출방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

## 과제의 해결 수단

[0010] 1. 검출 대상 식중독균에 특이적으로 결합하는 제1 앱타머; 상기 검출 대상 식중독균에 특이적으로 결합하고 과산화효소가 결합된 제2 앱타머; 바이오틴이 결합된 티라미드; 과산화물 및 아비딘 또는 아비딘 유사체가 결합된 과산화효소를 포함하는, 식중독균 검출용 키트.

[0011] 2. 위 1에 있어서, 상기 식중독균은 황색포도상구균, 리스테리아 모노사이토제니스, 시겔라 보이디, 시겔라 플렉스너리, 시겔라 소네이, 클로스트리듐 페르프린젠스, 클로스트리디움 보툴리눔, 캄필로박터 제주니, 바실러스 세레우스, 에르시니아 엔테로콜리티카, 살모넬라 엔테리티디스, 비브리오 파라헤몰리티쿠스, 살모넬라 티피뮤리움 및 병원성 대장균으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인, 식중독균 검출용 키트.

[0012] 3. 위 1에 있어서, 상기 아비딘 유사체는 스트렙타비딘, 뉴트라비딘 또는 캡타비딘인, 식중독균 검출용 키트.

[0013] 4. 위 1에 있어서, 상기 제1 앱타머는 서열번호 1의 핵산서열로 이루어지고, 상기 제2 앱타머는 서열번호 2의 핵산서열로 이루어진, 식중독균 검출용 키트.

[0014] 5. 전극에 고정된, 검출 대상 식중독균에 특이적으로 결합하는 제1 앱타머에 시료를 처리하는 단계; 상기 처리된 시료에 상기 제1 앱타머와 결합부위가 상이하고 상기 검출 대상 식중독균에 특이적으로 결합하는, 과산화효소가 결합된 제2 앱타머를 처리하는 단계; 상기 제2 앱타머에 바이오틴이 결합된 티라미드 및 과산화물을 처리하는 단계; 및 상기 티라미드에 아비딘 또는 아비딘 유사체가 결합된 과산화효소를 처리하는 단계를 포함하는, 식중독균 검출방법.

[0015] 6. 위 5에 있어서, 상기 식중독균은 황색포도상구균, 리스테리아 모노사이토제니스, 시겔라 보이디, 시겔라 플렉스너리, 시겔라 소네이, 클로스트리듐 페르프린젠스, 클로스트리디움 보툴리눔, 캄필로박터 제주니, 바실러스 세레우스, 에르시니아 엔테로콜리티카, 살모넬라 엔테리티디스, 비브리오 파라헤몰리티쿠스, 살모넬라 티피뮤리움 및 병원성 대장균으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인, 식중독균 검출방법.

[0016] 7. 위 5에 있어서, 상기 아비딘 유사체는 스트렙타비딘, 뉴트라비딘 또는 캡타비딘인, 식중독균 검출방법.

[0017] 8. 위 5에 있어서, 상기 제1 앱타머는 서열번호 1의 핵산서열로 이루어지고, 상기 제2 앱타머는 서열번호 2의 핵산서열로 이루어진, 식중독균 검출방법.

[0018] 9. 위 5에 있어서, 상기 시료는 물 또는 육류 추출물인, 식중독균 검출방법.

[0019] 10. 위 5에 있어서, 상기 아비딘 또는 아비딘 유사체가 결합된 과산화효소에 테트라메틸벤지딘, 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘, 오르쏘페닐렌디아민, 2,2'-아조비스 및 테트라메틸피페라진으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나를 처리하여 생성되는 전기화학 신호를 측정하는 단계를 더 포함하는, 식중독균 검출방법.

## 발명의 효과

[0021] 본 발명의 키트를 이용해 높은 민감도로 식중독균을 검출할 수 있다.

[0022] 본 발명의 검출방법을 이용함으로써 높은 민감도로 식중독균을 검출할 수 있다.

## 도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 과산화효소(HRP) 및 과산화물($H_2O_2$) 존재 하에서 티라미드가 산화되어 황색포도상구균 표면 단백질에 결합함을 보여준다.

도 2는 본 발명의 키트를 이용하여 황색포도상구균을 검출하는 과정을 개략적으로 나타낸 것이다.

도 3은 티라미드 신호 증폭 효과를 형광을 통해 확인한 결과이다. A는 형광물질을 접합시킨 제2 앱타머를(SA81@FAM) 황색포도상구균 세포막에 결합시킨 후 발하는 형광을 확인한 것이다. B는 황색포도상구균에 과산화효소가 결합된 제2 앱타머를 처리하지 않고 $H_2O_2$가 있는 환경에서 AF488 티라미드 처리시의 형광을 확인한 것이다. 과산화 효소 없이 티라미드 처리만으로는 형광이 발생하지 않음을 알 수 있다. C는 황색포도상구균에 과산화효소가 결합된 제2 앱타머(SA81@HRP) 처리하고 $H_2O_2$가 있는 환경에서 AF488 티라미드 처리 후의 형광을 나타낸다. 티라미드 처리로 형광이 증가함을 확인하였다. D는 황색포도상구균 하나의 세포에 결합시킨 과산화효소가 결합된 제2 앱타머(SA81@HRP)가 있을 때, $H_2O_2$가 있는 환경에서 AF488 티라미드 처리시의 형광을 확인한 것이다.

도 4는 시료 내 황색포도상구균 농도에 따른 측정된 전류의 세기를 제1 앱타머(SA37)의 농도 별로 측정한 결과에 관한 것이다.

도 5는 겨자무과산화효소가 결합된 제2 앱타머(SA81@HRP)의 농도에 따른 전류의 세기를 측정한 결과이다. Blank는 황색포도상구균이 없는 시료를 이용하여 측정한 대조군, 3125 CFUs/mL은 해당 농도의 황색포도상구균이 포함된 시료를 이용하여 측정한 실험군이다.

도 6은 황색포도상구균 검출 과정에서 사용한 (A)BSA 용액 농도, (B)황색포도상구균 배양시간, (C)바이오틴이 결합된 티라미드의 농도, (D)HRP와 스트렙타비딘 반응시간 및 (E) 바이오틴이 결합된 티라미드의 농도에 따른 전류의 세기 변화를 측정한 것이다. Blank는 황색포도상구균이 없는 시료를 이용하여 측정한 대조군, 3125 CFUs/mL은 해당 농도의 황색포도상구균이 포함된 시료를 이용하여 측정한 실험군이다.

도 7은 본 발명의 키트를 사용한 경우, 일부 구성요소가 없는 키트를 사용한 경우의 측정된 전류의 세기 비교실험 결과를 나타낸다.

i) SA37-SA81@HRP: 제1 앱타머(SA37) 및 과산화효소가 결합된 제2 앱타머(SA81@HRP)만 처리한 경우, ii) SA37-S. aureus-SA81@HRP: 제1 앱타머(SA37), 황색포도상구균 및 과산화효소가 결합된 제2 앱타머(SA81@HRP)만 처리한 경우, iii)SA37-SA81@HRP-TB@STV-HRP: 황색포도상구균 없이 본 발명 키트(제1 앱타머(SA37), 과산화효소가 결합된 제2 앱타머(SA81@HRP), 바이오틴이 결합된 티라미드 및 아비딘 또는 아비딘 유사체가 결합된 과산화효소)만을 처리한 경우, iv) SA37-S. aureus-SA81@HRP-TB@STV-HRP: 황색포도상구균과 본 발명 키트(제1 앱타머(SA37), 과산화효소가 결합된 제2 앱타머(SA81@HRP), 바이오틴이 결합된 티라미드 및 스트렙타비딘이 결합된 과산화효소)를 처리한 경우, v) 제1 앱타머(SA37), 황색포도상구균, 바이오틴과 과산화효소가 결합된 제2 앱타머 및 스트렙타비딘이 결합된 과산화효소만 처리한 경우.

도 8은 본 발명의 키트를 이용해 시료 내 식중독균을 검출할 때 전자전달반응이 정상적으로 작동하는지 여부를 순환전압전류법(Cyclic Voltammetry, CV)을 이용해 확인한 결과이다.

도 9는 도 8과 마찬가지로 본 발명의 키트를 이용해 시료 내 식중독균을 검출할 때 전자전달반응이 정상적으로 작동하는지 여부를 확인한 결과이다. 각각의 제작 단계마다 변형된 전극이 나타내는 특성의 변화를 전기화학 임피던스 분광법(Electrochemical impedance spectroscopy, EIS)을 통해 확인한 결과이다.

도 10 내지 12는 각각 시료로 버퍼(50 mM Tris-HCl, 5 mM KCl, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl2, pH 7.4), 수돗물, 소고기 추출물을 이용하였을 때의 측정된 전류의 세기 및 황색포도상구균 검출 가능 최소 농도를 나타낸다. 제1 앱타머는 서열번호 1의 핵산서열로 이루어진 앱타머, 제2 앱타머는 서열번호 3의 핵산서열로 이루어진 앱타머를 사용하였다.

## *발명을 실시하기 위한 구체적인 내용*

[0025] 본 발명은 식중독균 검출용 키트 및 식중독균 검출방법에 관한 것이다. 티라미드를 이용해 다량의 과산화효소를 검출 대상 식중독균에 결합시킨 후 과산화효소 기질을 처리 및 반응시켜 발생하는 전기화학적 신호를 측정함으로써 높은 민감도로 식중독균을 검출할 수 있다.

[0026] 본 발명은 검출 대상 식중독균에 특이적으로 결합하는 제1 앱타머; 상기 검출 대상 식중독균에 특이적으로 결합하고 과산화효소가 결합된 제2 앱타머; 바이오틴이 결합된 티라미드; 과산화물 및 아비딘 또는 아비딘 유사체가 결합된 과산화효소를 포함하는, 식중독균 검출용 키트를 제공한다.

[0027] 식중독균(BACTERIA)은 황색포도상구균(Staphylococcus aureus), 리스테리아 모노사이토제니스(Listeria

monocytogenes), 시겔라 보이디(Shigella boydii), 시겔라 플렉스너리(Shigella flexneri), 시겔라 소네이(Shigella sonnei), 클로스트리듐 페르프린젠스(Clostridium perfringens), 클로스트리디움 보툴리눔(Clostridium botulinum), 캄필로박터 제주니(Campylobacter jejuni), 바실러스 세레우스(Bacillus cereus), 에르시니아 엔테로콜리티카(Yersinia enterocolitica), 살모넬라 엔테리티디스(Salmonella Enteritidis), 비브리오 파라헤몰리티쿠스(Vibrio parahaemolyticus), 살모넬라 티피뮤리움(Salmonella Typhimurium) 및 병원성 대장균(E. coli)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0028] 제1 앱타머는 전극에 고정된 것일 수 있다. 공지된 방법을 이용해 제1 앱타머를 전극에 고정시킬 수 있으며, 예컨대 티올(thiol)이 결합된 제1 앱타머를 전극에 로딩 및 반응시킴으로써 제1 앱타머를 전극에 고정시킬 수 있다.

[0029] 전극에는 블로킹 분자가 더 고정되어 있을 수 있다. 블로킹 분자는 전극에 검출 대상인 식중독균 외에 다른 물질이 결합하는 것을 방지하기 위한 것으로, 분자의 양 말단에 히드록시기(-OH) 및 머캅토(-SH)기가 노출된 유기 분자를 사용할 수 있다. 예컨대 블로킹 분자로 6-머캅토헥산올(6-mercaptohexanol, MCH)이 사용될 수 있다.

[0030] 제1 앱타머는 검출 대상 식중독균에 특이적으로 결합하는 앱타머로, 제1 고정된 앱타머에 시료를 처리하면 시료 내 검출대상 식중독균이 제1 앱타머에 결합한다. 제1 앱타머는 예컨대 황색포도상구균에 특이적으로 결합하는 서열번호 1의 핵산서열로 이루어진 앱타머일 수 있다.

[0031] 제2 앱타머는 상기 검출 대상 식중독균에 특이적으로 결합하지만 상기 제1 앱타머와 표적 부위가 다른 앱타머로, 제1 앱타머와 제2 앱타머는 샌드위치 방식으로 검출 대상 식중독균에 결합할 수 있다. 제2 앱타머는 예컨대 황색포도상구균에 특이적으로 결합하는 서열번호 2의 핵산서열로 이루어진 앱타머일 수 있다.

[0032] 제2 앱타머에는 과산화효소가 결합되어 있어, 이후 바이오틴이 결합된 티라미드 및 과산화물을 처리하는 경우 과산화물 주변에서 티라미드는 산화되어 상기 제1 앱타머 및 제2 앱타머에 결합되어 있는 검출 대상 식중독균에 결합하게 된다.

[0033] 상기 과산화효소(peroxidase)는 겨자무과산화효소(horseradish peroxidase, HRP), 대두 아스코르베이트 과산화효소(Soybean ascorbate peroxidase), 애기장대 아스코르베이트 과산화효소 (Arabidopsis ascorbate peroxidase), 시금치 아스코르베이트 과산화효소 (Spinach ascorbate peroxidase), 사카로미세스 세레비시에 시토크롬 c 과산화효소 (Saccharomyces cerevisiae cytochrome c peroxidase), 파네로카에테 크리소스포리움 과산화효소 PCL1 (Phanerochaete chrysosporium PCL1), 파네로카에테 크리소스포리움 과산화효소 PCM (Phanerochaete chrysosporium PCM), 코프리놉시스 시네레아 과산화효소 (Coprinopsis cinerea peroxidase), 땅콩 과산화효소 (Peanut Peroxidase), 애기장대 과산화효소 ATPA2 (Arabidopsis ATPA2) 등의 공지된 과산화효소일 수 있으며, 바람직하게는 겨자무과산화효소일 수 있다.

[0034] 상기 과산화물(peroxide)은 과산화수소($H_2O_2$), tert-부틸 과산화물(tert-butyl hydroperoxide), 디메틸 과산화물 (dimethyl peroxide) 등의 공지된 과산화물일 수 있으며, 바람직하게는 과산화수소일 수 있다.

[0035] 티라미드에는 바이오틴이 결합되어 있어, 이후 산화되어 식중독균에 결합된 티라미드에 아비딘(avidin) 또는 아비딘 유사체가 결합된 과산화효소를 처리함으로써 티라미드에 과산화효소를 결합시킬 수 있다. 상기 과산화효소는 앞서 설명한 것들 중 하나일 수 있으며, 바람직하게는 겨자무과산화효소(HRP)일 수 있다.

[0036] 아비딘 유사체는 바이오틴 결합 기능을 갖는 바이오틴 결합 단백질로, 예컨대 스트렙타비딘(streptavidin), 뉴트라비딘(neutravidin) 또는 캡타비딘(captavidin)일 수 있다.

[0037] 산화된 티라미드는 식중독균에 결합하고, 티라미드에 과산화효소가 결합하게 되므로, 결과적으로 다량의 과산화효소들이 검출 대상 식중독균에 분포하게 된다. 이후 과산화물과 과산화효소의 기질을 처리 및 반응시켜 생성되는 전기화학적 신호를 측정함으로써 대상 식중독균을 검출할 수 있다. 식중독균이 저농도로 존재한다 하더라도 식중독균에는 다량의 과산화효소가 분포해 있기 때문에 과산화 효소 기질을 산화시켜 발생시키는 전기화학적 신호를 측정하여 식중독균을 검출할 수 있다.

[0038] 본 발명의 식중독균 검출용 키트는 전기화학신호 발생용 과산화효소 기질을 더 포함할 수 있다.

[0039] 상기 과산화효소의 기질은 상기 과산화효소 기질(peroxidase substrate)은 과산화효소의 촉매작용으로 산화하여 전기신호를 발생시키는 기질로 예컨대, 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(TMB), 오르쏘페닐렌디아민(o-Phenylenediamine),2,2'-아조비스(3-에틸벤조티아졸린-6-스룰포닉산) (ABTS) 및 테트라메틸피페라진으로 이루어

진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있으며, 바람직하게는 TMB일 수 있다.

[0040] 본 발명의 키트는 민감도가 우수하여 시료 내 극소량으로 존재하는 식중독균도 검출할 수 있다. 예컨대 시료 내 10 CFU/ml 이하의 농도로 존재하는 식중독균도 검출할 수 있다.

[0041] 본 발명의 일 실시예에서 본 발명 키트를 이용하여 황색포도상구균 검출 가능한 최소 농도(Limit of Detection, LOD)는 3 CFU/ml임을 확인하였다.

[0042] 시료는 특별히 제한되지 않으며, 물, 육류 등을 포함한다. 예컨대 시료는 수돗물, 육류 추출물일 수 있다.

[0043] 본 발명은 전극에 고정된, 검출 대상 식중독균에 특이적으로 결합하는 제1 앱타머에 시료를 처리하는 단계;

[0044] 상기 처리된 시료에 상기 제1 앱타머와 결합부위가 상이하고 상기 검출 대상 식중독균에 특이적으로 결합하는, 과산화효소가 결합된 제2 앱타머를 처리하는 단계;

[0045] 상기 제2 앱타머에 바이오틴이 결합된 티라미드 및 과산화물을 처리하는 단계; 및

[0046] 상기 티라미드에 아비딘 또는 아비딘 유사체가 결합된 과산화효소를 처리하는 단계를 포함하는, 식중독균 검출 방법을 제공한다.

[0047] 식중독균, 제1 앱타머, 제2 앱타머, 티라미드, 아비딘 유사체, 과산화효소는 앞서 키트에 대해 설명한 것과 동일하다.

[0048] 상기 전극에는 블로킹 분자가 더 고정되어 있을 수 있다. 블로킹 분자는 앞서 키트에 대해 설명한 것과 동일하다.

[0049] 처리된 시료 내 검출 대상 식중독균이 있는 경우, 식중독균은 제1 앱타머에 결합한다. 제2 앱타머는 상기 검출 대상 식중독균에 결합하며, 제1 앱타머와 샌드위치 방식으로 식중독균에 결합한다.

[0050] 바이오틴이 결합된 티라미드 및 과산화물을 제2 앱타머에 처리하는 단계에서, 제2 앱타머에 결합된 과산화효소는 티라미드를 산화시켜 상기 검출 대상 식중독균에 결합되도록 한다. 과산화효소가 촉매작용을 하여 과산화물이 티라미드를 산화시키며, 산화된 다량의 티라미드는 과산화효소에 근접해 있는 검출 대상 식중독균과 과산화효소에 결합하게 된다.

[0051] 상기 바이오틴이 결합된 티라미드에 아비딘 또는 아비딘 유사체가 결합된 과산화효소를 처리하는 단계에서, 상기 바이오틴에 아비딘 또는 아비딘 유사체가 결합하게 되는 바, 티라미드에 과산화효소가 연결되어 결과적으로 다량의 과산화효소가 검출 대상 식중독균에 분포하게 된다.

[0052] 이와 같이 다량의 과산화효소가 식중독균에 분포되어 있어, 이후 저농도의 식중독균도 검출 가능한 전기화학적 신호를 발생시킬 수 있다.

[0053] 본 발명의 식중독균 검출방법은 상기 아비딘 또는 아비딘 유사체가 결합된 과산화효소에 과산화물 및 과산화효소 기질을 처리하여 생성되는 전기화학 신호를 측정하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0054] 과산화물과 과산화효소 기질을 처리함으로써 검출 대상 식중독균에 분포해 있는 과산화효소가 촉매작용을 하여 전기화학적 신호를 발생시킨다. 발생한 전기화학적 신호를 측정함으로써 대상 식중독균을 검출할 수 있다.

[0055] 상기 과산화효소 기질은 과산화효소의 촉매작용으로 산화하여 전기신호를 발생시키는 기질로, 예컨대 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(TMB), 오르쏘페닐렌디아민(o-Phenylenediamine),2,2'-아조비스(3-에틸벤조티아졸린-6-스룰포닉산)(ABTS) 및 테트라메틸피페라진으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있으며, 바람직하게는 TMB일 수 있다.

[0056] 본 발명의 방법으로 시료 내 극소량 존재하는 식중독균도 검출할 수 있다.

[0057] 시료는 특별히 제한되지 않으며, 물, 육류 등을 포함한다. 예컨대 시료는 수돗물, 육류 추출물일 수 있다.

[0059] 이하, 실시예를 통해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0061] **실시예**

[0062] **1. 본 발명의 식중독균 검출 키트 또는 식중독균 검출 방법을 이용한 식중독균 검출**

[0063] **(1) 본 발명의 검출 키트 및 검출 방법**

[0064] 0 - 1.2 V의 순환 전위 조건에서 screen-printed gold electrode (SPGE)에 0.5 M $H_2SO_4$ 용액을 처리함으로써 전기화학적으로 활성화하였다. 이어, 1 μM의 티올(thiol)이 부착된 제1 앱타머 (SA37) 용액 중에서 10 μL을 작업 전극 (WE) 위에 로딩하고, 앱타머 고정을 위해 16시간 동안 반응시켰다. 결합하지 않은 앱타머를 제거하고, 작업 전극 내 비특이적인 물질 결합을 막기 위해 2 mM의 MCH와 1% BSA 용액을 처리했다.

[0065] 바이오틴이 연결된 제2 앱타머(SA81)는 Streptavidin-HRP(STV@HRP)와 4℃에서 2시간 동안 반응시켰다. 추가로 모든 단계 사이에는 전극을 초순수로 세척하고 질소 가스로 건조하는 과정을 포함되어 있다. 결합하지 않은 앱타머와 STV@HRP는 100kDa Amicon 필터 (Millipore)를 이용한 원심분리를 통해 제거되었다.

[0066] 도 2에 개시된 바와 같이 제1 앱타머가 부착된 전극에 다양한 농도의 황색포도상구균을 상온에서 30분간 반응시켰다. 부착되지 않은 세포를 세척한 후, 샌드위치 복합체를 얻기 위해 6 μL의 과산화효소가 결합된 제2 앱타머(SA81@HRP, 80 ng/mL)를 상온에서 30분간 반응시켰다. 이후, 바이오틴이 결합된 티라미드(TB, 6 μg/mL)를 포함하고 있는 바인딩 버퍼 (0.003% $H_2O_2$를 포함)를 15분간 상온에서 반응시켰다. 이때 $H_2O_2$의 도움으로 제2 앱타머에 결합된 HRP의 과산화효소 활성이 티라미드가 자유 라디칼을 형성하도록 하였다. 활성화된 자유 라디칼 상태의 티라미드는 박테리아 세포막과 HRP의 고리 모양 단백질 작용기에 부착할 수 있었다. 마지막으로, 대량의 스트렙타비딘이 결합된 HRP(STV-HRP)를 추가하고 30분간 반응시켜서 티라미드-HRP 복합체(TB@STV-HRP)를 만들었다. 추가적으로, 각각의 반응 단계 이후엔 잔여 물질들을 제거하기 위해 0.05% Tween-20가 포함된 1xBB로 전극을 세척했다.

[0067] **(2) 비교예**

[0068] 본 발명 키트 및 방법의 우수한 민감도를 확인하기 위해 키트의 일부 구성 또는 검출 방법의 일부 단계를 배제시킨, 비교실험을 진행하였다. 배제된 구성 또는 단계 외에는 위 (1)에서의 방법과 동일한 절차를 따랐다. i) SA37-SA81@HRP: 제1 앱타머(SA37) 및 과산화효소가 결합된 제2 앱타머(SA81@HRP)만 처리한 경우, ii) SA37-S. aureus-SA81@HRP: 제1 앱타머(SA37), 황색포도상구균 및 과산화효소가 결합된 제2 앱타머(SA81@HRP)만 처리한 경우, iii)SA37-SA81@HRP-TB@STV-HRP: 황색포도상구균 없이 본 발명 키트(제1 앱타머(SA37), 과산화효소가 결합된 제2 앱타머(SA81@HRP), 바이오틴이 결합된 티라미드 및 스트렙타비딘이 결합된 과산화효소)만을 처리한 경우, iv) SA37-S. aureus-SA81@HRP-TB@STV-HRP: 황색포도상구균과 본 발명 키트(제1 앱타머(SA37), 과산화효소가 결합된 제2 앱타머(SA81@HRP), 바이오틴이 결합된 티라미드 및 스트렙타비딘이 결합된 과산화효소)를 처리한 경우, v) 제1 앱타머(SA37), 황색포도상구균, 바이오틴과 과산화효소가 결합된 제2 앱타머 및 스트렙타비딘이 결합된 과산화효소만 처리한 경우.

[0069] 그 결과 도 7에 도시된 바와 같이, 본 발명의 검출 키트 또는 검출 방법을 이용한 iv) SA37-S. aureus-SA81@HRP-TB@STV-HRP을 이용했을 때 측정된 전류의 세기가 가장 컸으며, 이를 통해 본 발명 검출 키트 또는 검출 방법의 현저히 우수한 민감도를 알 수 있었다.

[0070]

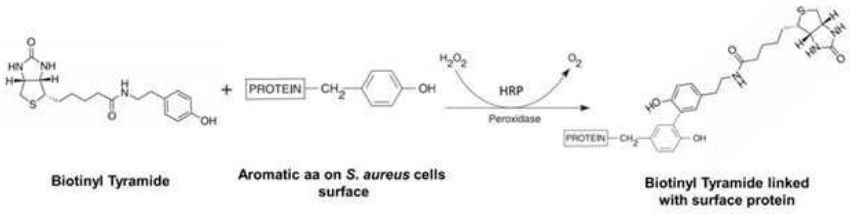
[0071] **2. 전기화학 측정을 통한 식중독균 검출**

[0072] 전기화학 측정은 Autolab potentiostats/galvanostats 전기화학 분석기 (Metrohm, 스위스)를 통해 이루어졌다. 45μL의 TMB 용액을 더해 시간대전류법(Chronoamperometry, CA) 측정으로 정량분석을 하였다.

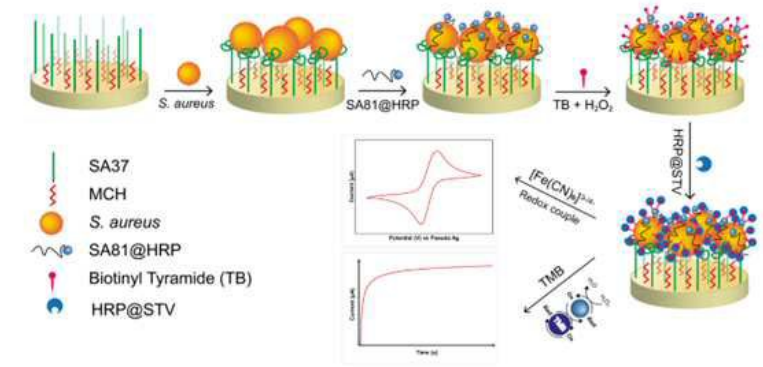
[0073] 샌드위치 방식 결합으로 발생한 신호 증폭 분석을 위해 순환전압전류법(Cyclic Voltammetry, CV)은 -0.4~0.6 V 조건에서 측정하였고, 전기화학 임피던스 분광법(Electrochemical impedance spectroscopy, EIS)은 주파수 102-104 Hz, 전위 220 mV, 교류전압: 5mV의 조건에서 측정하였는데, 이는 10 mM의 Fe(CN)63-이 포함된 0.1 M의 KCl 내에서 실행되었다. 타겟에 대해 앱타머 쌍이 샌드위치 방식으로 결합하고, 이어서 신호 증폭 물질이 순서대로 결합하는 것을 도 6에 개시된 바와 같이 전류의 변화로 측정하고, 이어 도 7에 개시된 바와 같이 저항의 변화로 측정하였다. 모든 측정은 상온에서 3회 반복 측정하였다.

도면

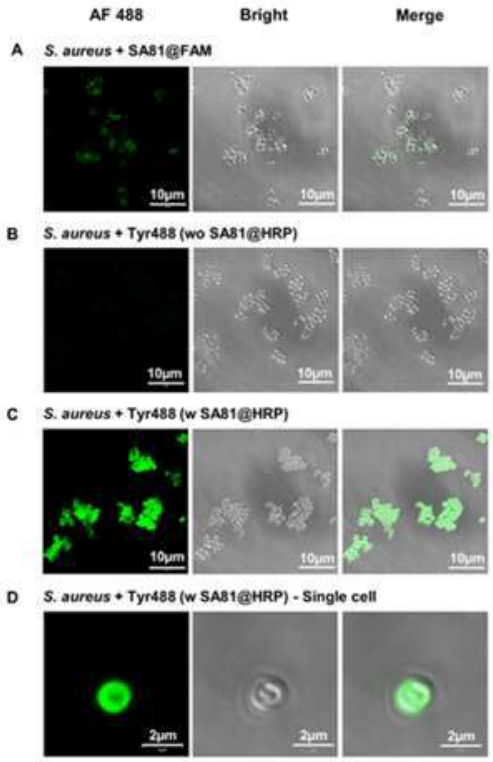
도면1


PROTEIN
HRP
Peroxidase
Biotinyl Tyramide
Aromatic aa on S. aureus cells surface
Biotinyl Tyramide linked with surface protein

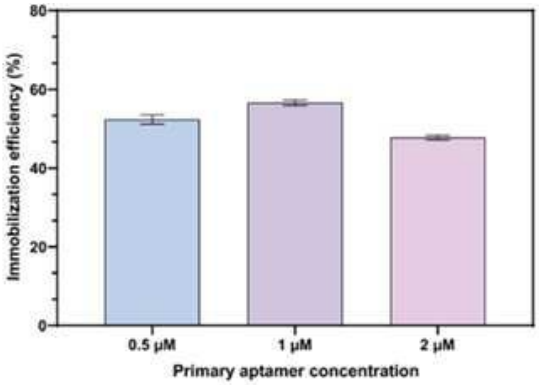
도면2

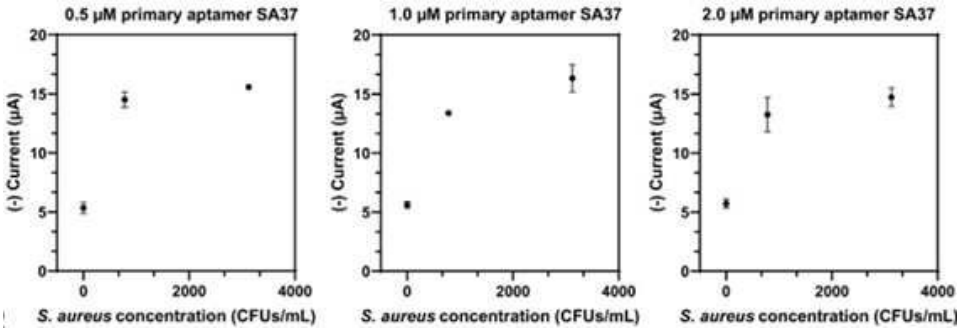

S. aureus
SA81@HRP
TB + H2O2
HRP@STV
SA37
MCH
S. aureus
SA81@HRP
Biotinyl Tyramide (TB)
HRP@STV
Redox couple
TMB

도면3

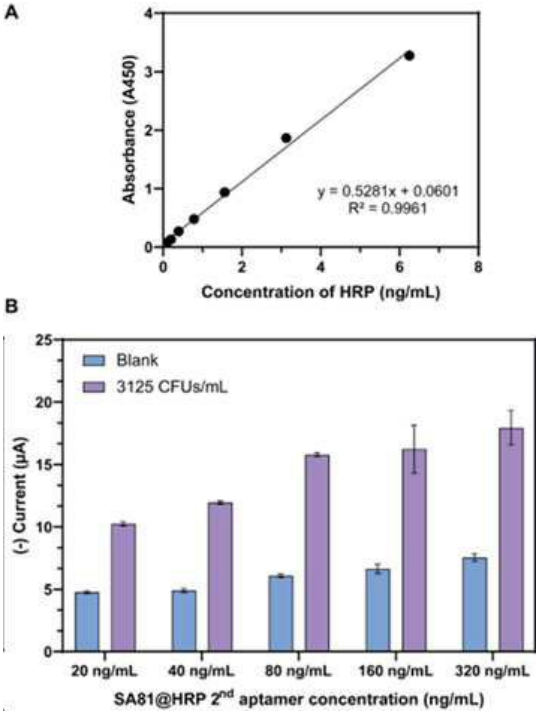

AF 488
Bright
Merge
A S. aureus + SA81@FAM
B S. aureus + Tyr488 (wo SA81@HRP)
C S. aureus + Tyr488 (w SA81@HRP)
D S. aureus + Tyr488 (w SA81@HRP) - Single cell
10μm
2μm

도면4

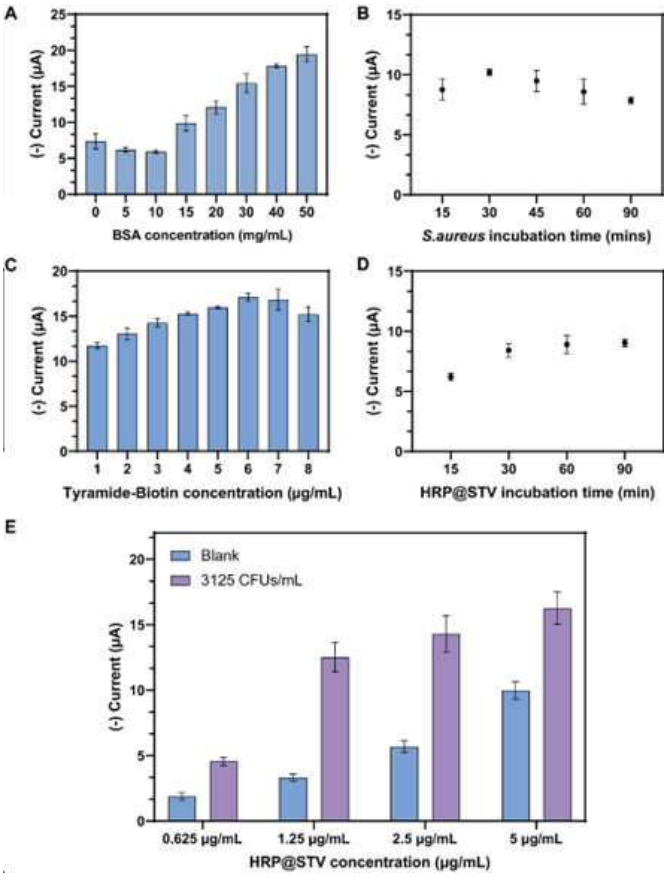

Immobilization efficiency (%)
0
20
40
60
80
0.5 μM
1 μM
2 μM
Primary aptamer concentration


0.5 μM primary aptamer SA37
1.0 μM primary aptamer SA37
2.0 μM primary aptamer SA37
(-) Current (μA)
0
5
10
15
20
0
2000
4000
S. aureus concentration (CFUs/mL)

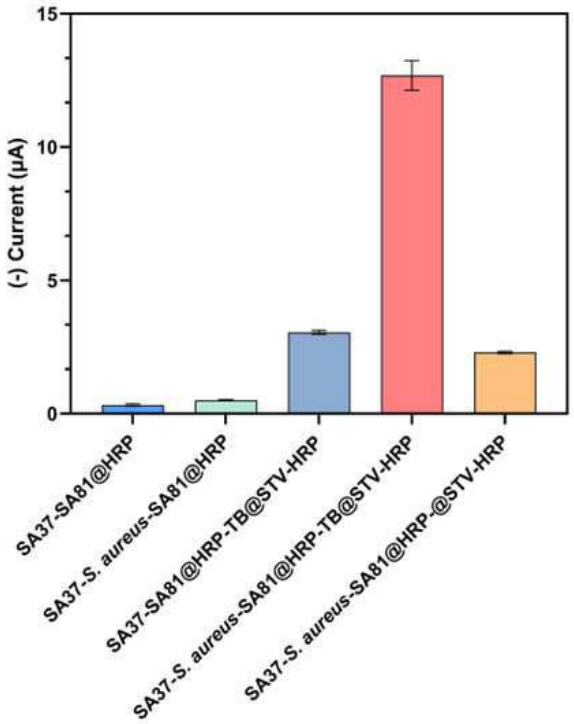
도면5


A
Absorbance (A450)
y = 0.5281x + 0.0601
R² = 0.9961
Concentration of HRP (ng/mL)
B
Blank
3125 CFUs/mL
(-) Current (μA)
20 ng/mL
40 ng/mL
80 ng/mL
160 ng/mL
320 ng/mL
SA81@HRP 2nd aptamer concentration (ng/mL)

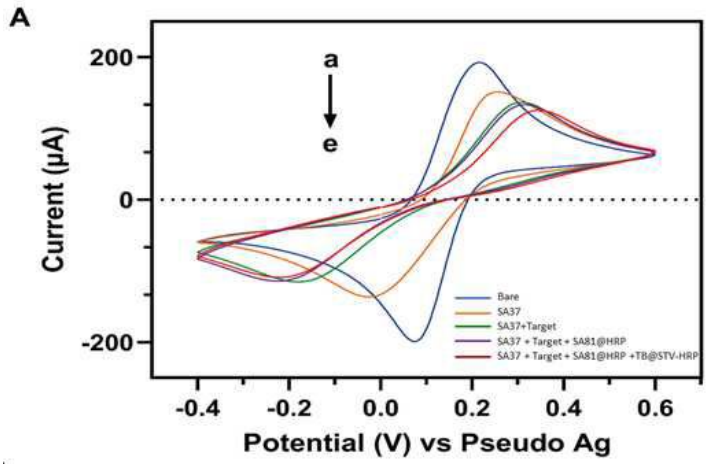
도면6


A
(-) Current (μA)
BSA concentration (mg/mL)
B
(-) Current (μA)
S.aureus incubation time (mins)
C
(-) Current (μA)
Tyramide-Biotin concentration (μg/mL)
D
(-) Current (μA)
HRP@STV incubation time (min)
E
Blank
3125 CFUs/mL
(-) Current (μA)
0.625 μg/mL
1.25 μg/mL
2.5 μg/mL
5 μg/mL
HRP@STV concentration (μg/mL)

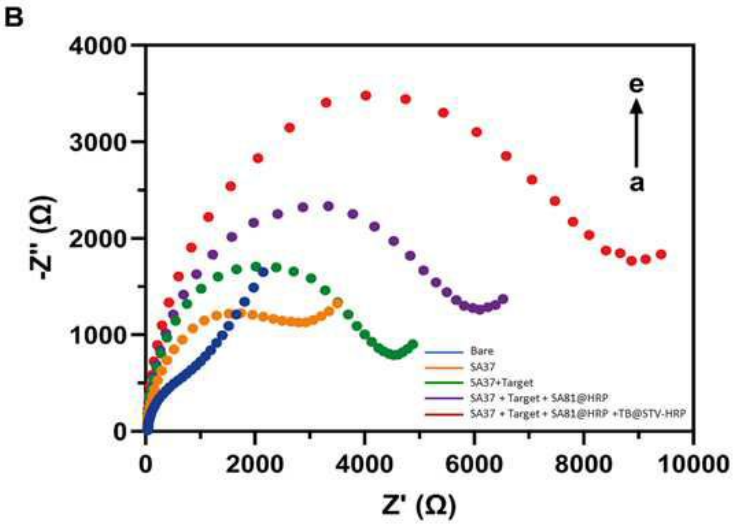
도면7


15
10
5
0
(-) Current (μA)
SA37-SA81@HRP
SA37-S. aureus-SA81@HRP
SA37-SA81@HRP-TB@STV-HRP
SA37-S. aureus-SA81@HRP-TB@STV-HRP
SA37-S. aureus-SA81@HRP-@STV-HRP

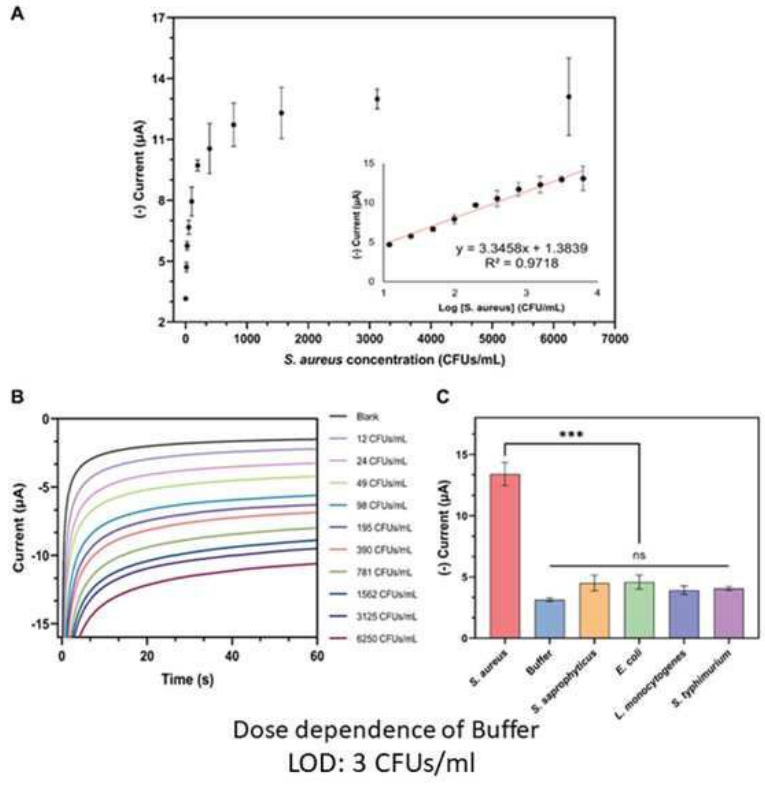
도면8


A
200
0
-200
Current (μA)
a
e
Bare
SA37
SA37+Target
SA37 + Target + SA81@HRP
SA37 + Target + SA81@HRP +TB@STV-HRP
-0.4
-0.2
0.0
0.2
0.4
0.6
Potential (V) vs Pseudo Ag

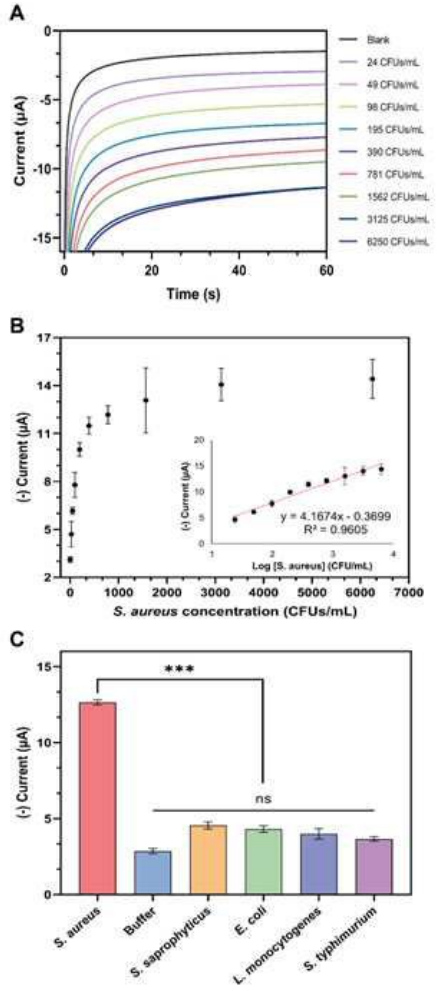
도면9


B
4000
3000
2000
1000
0
-Z'' (Ω)
0
2000
4000
6000
8000
10000
Z' (Ω)
e
a
Bare
SA37
SA37+Target
SA37 + Target + SA81@HRP
SA37 + Target + SA81@HRP +TB@STV-HRP

도면10


A
(-) Current (μA)
S. aureus concentration (CFUs/mL)
y = 3.3458x + 1.3839
R² = 0.9718
Log [S. aureus] (CFU/mL)
B
Current (μA)
Time (s)
Bare
12 CFUs/mL
24 CFUs/mL
49 CFUs/mL
98 CFUs/mL
195 CFUs/mL
390 CFUs/mL
781 CFUs/mL
1562 CFUs/mL
3125 CFUs/mL
6250 CFUs/mL
C
(-) Current (μA)
***
ns
S. aureus
Buffer
S. saprophyticus
E. coli
L. monocytogenes
S. typhimurium
Dose dependence of Buffer
LOD: 3 CFUs/ml

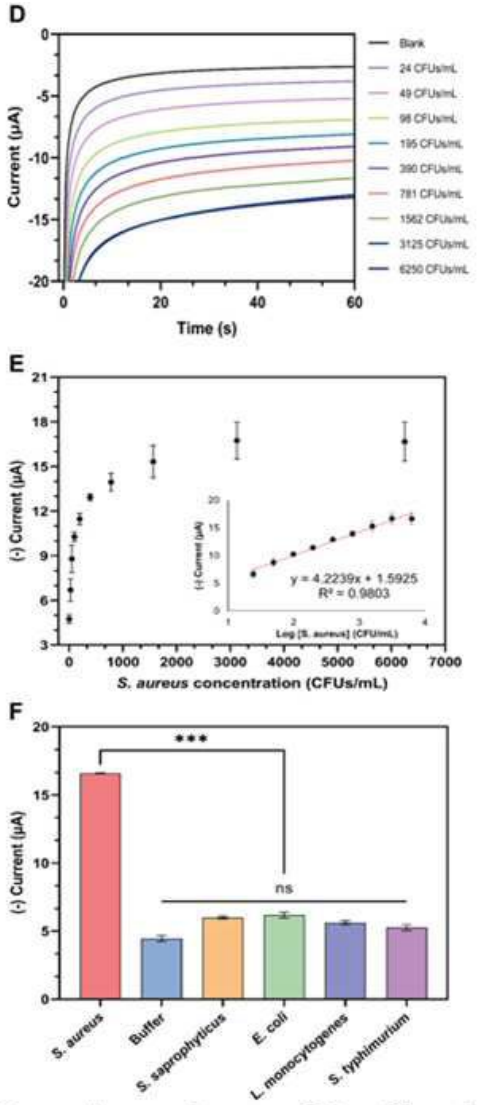
도면11




Dose dependence of Tap water

LOD: 8 CFUs/ml

도면12




Dose dependence of Beef broth

LOD: 8 CFUs/ml

*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.