병원성 미생물 및 바이러스 검출 앱타센서(aptasensor) 개발

엄현주, 이상희, 김양훈 _ 충북대학교 자연과학대학 미생물학과

최근 기후온난화 및 기상이변으로 인해 전 세계 각국은 병원성 미생물 및 바이러스와 같은 생물학적 환경오염에 쉽게 노출됨에 따라 각종 환경성 인체 질환발생이 급격한 증가추세에 있다. 이러한 병원성 세균 및 바이러스에 의한 급성/만성 질환 및 중독성 인체 질환 유발은 국가 보건 사회적 문제들을 끊임없이 발생시키고 있다. 뿐만 아니라, 각종 바이러스로 인해 유발되는 전염성 가축질병의 급증은 환경보건 문제와 더불어 국가사회 경제 전반에 매우 부정적인 파급요소로 작용함으로서 국제적 공동대처가 요구되는 핵심 이슈로 주목 받고 있는 실정이다. 따라서 무엇보다 음용수, 각종 비가공/가공식품, 동물사료 등 노출된 자연계 환경에서의 다양한 복합 시료에 존재하는 병원성 미생물 및 독성 바이러스 조기 검출 방법 확립은 공중 보건 및 경제사회적 측면에서 매우 중요하다. 미생물의 배양 및 항체-항원 assay 기법을 기반으로 한 종래의 병원성 미생물 및 독성 바이러스 검출 기법은 장시간에 걸쳐 복잡한 분석 설비와 전문 분석 인력을 요구하는 고비용 분석 시스템으로 복합 시료에서 보다 빠르고, 재현성이 높으며, 특이성이 높은 새로운 형태의 병원성 미생물 및 독성 바이러스에 대한 조기 검출 기법 개발이 절실히 요구되고 있다. 최근 표적물질(예를 들면, 병원성 미생물, 바이러스, 독성 단백질 혹은 다양한 생체분자물질 등)을 선택적이면서 특이적으로 검출하기 위한 다양한 생물학적 인지 요소(예를 들면, 효소, 항체, 리셉터, 핵산, 앱타머 등)와 다양한 변환기(Transducer)(예를 들면, 전기화학적 기반(Electrochemical-based), 광학기반(Optical-based), 질량기반(Mass-dependent))를 이용한 바이오센서 개발이 활발히 진행되고 있다. 특히, 다양한 바이오센서 중에서도 음용수, 식품 등 환경 복합 시료에서 병원성 미생물 및 독성 바이러스와 같은 생물 표적물질에 강한 결합력을 갖고 특이적으로 검출 할 수 있는 다양한 앱타머(Aptamer) 및 이를 기반으로 한 앱타센서(Aptasensor)가 주목받고 있다.

분자생물학적 인지 요소인 "앱타머"

앱타머는 짧은 DNA 또는 RNA 올리고 뉴클레오타이드(Oligonucleotide)로 그 자체가 안정된 삼차구조를 가지고 있어 다양한 표적물질(Target molecules) (예를 들면, 아미노산, 단백질, 미생물, 화학물질, 중금속, 혹은 다양한 생체분자물질 등)과 높은 결합력과 특이성을 가지고 있다. 표적물질에 대한 광범위한 스펙트럼 및 높은 친화력, 특이성을 가지는 앱타머는 최근 의료, 환경, 식품, 산업, 군사 등 폭넓

은 응용분야에서 활용되고 있다. 충북대학교 시스템생물학 연구실에서는 환경독성 중금속인 비소(Arsenic)를 선택적으로 결합하는 앱타머를 확보하고 이를 활용한 비소 탐지센서 시스템 및 자연계내 환경독성 비소를 효과적으로 제거할 수 있는 제거시스템을 개발하여 앱타머를 활용한 다양한 응용성을 제시하였다. 일반적으로 각종 인체질환의 조기 진단과 검출 분석에 활용되는 앱타머와 항체는 표적물질과 특이적으로 결합한다는 유사한 특징을 가지고 있다. 하지만, 앱타머는 뉴클레오타이드로 *in vitro*에서 화학적으로 대량 합성이 가능하며, 합성 비용이 비교적 저렴하고, 크고 작은 분자 외에도 면역성이 낮은 물질이나 독성물질 등 다양한 표적물질과도 특이적인 결합이 가능하다는 장점을 가지고 있다. 뿐만 아니라, 항체와 비교하였을 때 온도에 매우 안정하며, 재사용이 가능하다는 장점을 가지고 있어 최근 항체 대체 진단 물질로 활용한 예에 대한 연구보고가 늘고 있다. 특히, 앱타머는 병원성 미생물 및 바이러스의 구조적 변화 또는 세포막 분자 물질에 대한 정확한 정보 없이도 표적 병원성 미생물 및 목적 바이러스와 특이적으로 결합할 수 있는 능력을 가지고 있어 복합 샘플에 대한 복잡한 전처리(Culture, DNA 추출 등) 없이 표적물질의 검출이 가능하다.

병원성 미생물 및 바이러스 검출을 위한 다양한 SELEX 기법 개발

표적물질과 특이적으로 결합하는 앱타머는 랜덤 서열(Random sequence)을 포함하고 있는 거대한 랜덤 핵산 라이브러리를 효소적으로 증폭하고, 표적물질과 특이적으로 결합하는 앱타머를 선별하는 반복적 과정을 통해 표적물질과 특이적으로 결합하는 앱타머를 선별하는 전형적인 기술

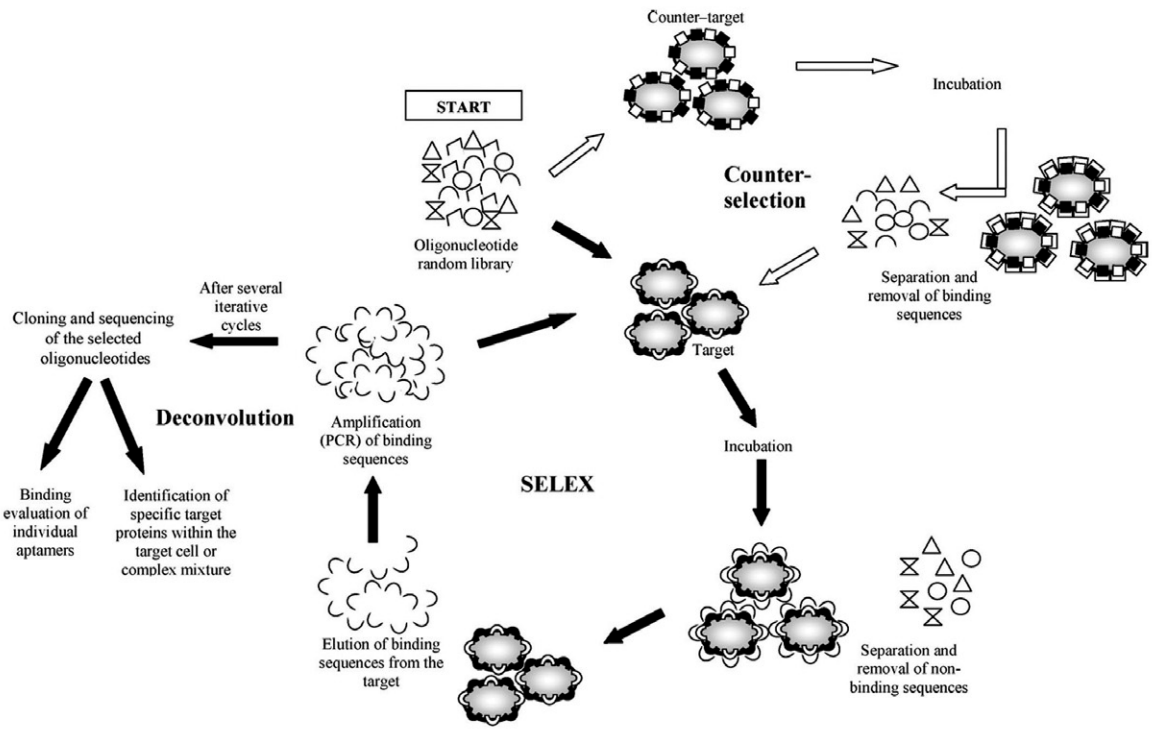

Figure 1. General illustration of complex-target aptamer election strategies
(Edith Torres-Chavolla and Evangelyn C. Alocilja, 2009)

인 SELEX(Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) 기법을 이용하여 선별된다(Figure 1). 전형적인 SELEX의 표적물질에는 정제된 활성형 단백질(Purified soluble protein)이 사용된다. 하지만 대부분의 병원성 미생물 및 독성 바이러스의 경우 진단용 바이오마커 단백질 및 병원성 인자들이 대부분 세포 표면에 존재하기 때문에 순수한 정제 및 활성형 단백질로의 회수가 어렵다는 문제점을 가진다. 따라서 질환의 조기 진단을 위해서는 Cell fragment preparations(non-whole cell (cell surface molecules, membrane fragments, bacterial lysates, and viral particles))이나 whole cell과 같은 "복합 표적물질(Complex target)"을 탐지할 수 있는 특별한 기술 개발이 요구되고 있다. 따라서 최근에는 병원성 미생물과 바이러스의 non-whole cell 및 whole-cell의 복합 표적을 대상으로 앱타머를 선별하기 위한 다양한 SELEX 기법이 연구 개발이 보고되고 있다(Table 1). 최근 세계 여러 연구팀에 의해 복합 표적물질과 특이적으로 결합하는 앱타머를 선별을 위한 Complex-target SELEX, alive Cell Surface-SELEX(CS-SELEX), Capillary Electrophoresis SELEX(CE-SELEX), MonoLEX(one-step selection method), Counter SELEX 기술 등이 보고되고 있으며, 이를 이용한 병원성 미생물 및 바이러스 고감도 검출센서 개발 및 감염성 인체질환 타겟 차세대 앱타머 치료제 개발 연구가 활발히 진행되고 있다.

Complex-target SELEX 기법은 순수, 분리, 확보에 어려움이 있는 표적물질에 대한 앱타머 선별 기법으로, 선별된 앱타머는 *in vivo*에서 복합 표적물질에 직접 결합함으로서 더 높은 결합력을 보이며, 좋은 치료 효과 또는 진단 효율을 이끌어낸다. 1998년 Morris와 그의 동료들에 의하여 적혈구 세포막에 특이적으로 결합하는 앱타머를 선별할 수 있는 Complex- target SELEX 기법이 개발된 이후, 많은 연구진들은 이 기법을 활용하여 *Mycobacteria tuberculosis*, *Campylobacter jejuni*, *Bacillus anthracis* 등의 whole cell과 직접 결합 가능한 앱타머를 제작, 선별하여 병원성 미

Table 1. Summary of microbial and viral pathgen aptamers
(Edith Torres-Chavolla and Evangelyn C. Alocilja, 2009)

Target	Application	Identification of specific target molecule(s)	Reference
Whole-cell targets			
B. anthracis Sterne strain spores	Detection	Non-identified	Bruno and Kiel (1999), Kiel et al. (2004b), Zhen et al. (2002)
B. thuringiensis spores	Detection	Non-identified	Ikanovic et al. (2007)
E. coli DH5α	Detection	Non-identified	So et al. (2008)
M. tuberculosis	Anti-mycobacterial agents	Membrane protein	Chen et al. (2007)
T. brucei	Anti-parasitic drug	Parasite flagellar protein	Homann and Goringer (1999)
T. cruzi	Invasion inhibitor agents	Parasite receptors for the host cell matrix molecules laminin, fibronecitin, thrombospondin and heparin sulfate.	Ulrich et al. (2002)
Human Influenza A virus (H3N2) (A/Panama)	Influenza A virus genotyping and inhibitor agent	Haemagglutinin (HA1 peptide chain)	Gopinath et al. (2006)

Target	Application	Identification of specific target molecule(s)	Reference
Non-Whole-cell targets			
F. tularensis bacterial protein lysate	Detection	Non-identified	Vivekananda and Kiel (2006)
Rous Sarcoma virus (RSV) particles	Virus inhibitor agent	Non-identified	Pan et al. (1995)
Vaccinia virus (VACV) particles	Infection inhibitor agent	Non-identified	Nitsche et al. (2007)
Microbial and viral protein /toxin targets			
Cholera whole toxin	Detection		Bruno and Kiel (2002)
E. coli release factor 1 (RF-1)	Non-sense-suppression-based technology		Sando et al. (2007)
Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis recombinant MAP0105c gene product	Detection		Bannantine et al. (2007)
S. enterica serobar Typhi IVP pili protein (pre-PilS protein)	Cell invasion inhibitor agent		Pan et al. (2005)
Shiga toxin	Detection		Kiel et al. (2004a)
Staphylococcal enterotoxin B (SEB)	Detection		Bruno and Kiel (2002)
Hepartitis C virus (HCV) non-structural protein 3 (NS3) protease	Anti-HCV agents		Fukuda et al. (2000)
HCV NS3 helicase	Therapeutics and diagnostic		Hwang et al. (2004)
HCV NS5B RNA polymerase	Polymerase inhibition		Biroccio et al. (2002)
Human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) reverse transcriptase (RT)	Reverse transcription inhibition		DeStefano et al. (2006)
HIV-1 protein trans-activator of transcription (Tat protein)	Transcription inhibition and detection		Yamamoto et al. (2000)
HIV-1 R5 SU glycoprotein (gp120)	Antiviral		Khati et al. (2003)
Influenza A virus (H5N1) HA1 protein	Antiviral		Cheng et al. (2008)
SARS coronavirus (SCV) NTPase/Helicase	Anti-SCV agent		Jang et al. (2008)

생물 검출에 활용하였다. 그 외에도 Complex-target SELEX 기법은 일부 바이러스 용해제(virus lysate), 바이러스 미립자(virus particle) 등과 같은 non-whole cell과 특이적으로 결합하는 앱타머 선별에도 활용되고 있으며, 선별된 앱타머는 바이러스성 질환에 대한 새로운 진단법 및 치료제 개발에 적극 활용되고 있다.

Complex-target SELEX 기법과 유사한 기법인 alive Cell Surface-SELEX(CS-SELEX) 기법은 표적물질에 대한 고순도 활성형 단백질 정제과정 없이 세포 표면에 존재하는 막단백질(Membrane proteins), 막당단백질(Transmembrane glycoproteins) 등과 특이적으로 결합하는 앱타머를 직접 선별하는 기법으로 이렇게 선별된 앱타머는 정제, 회수된 표적 단백질을 이용하여 제작된 앱타머 보다 *in vivo*에서 표적물질과 더욱 특이적으로 결합한다는 장점을 가지고 있어 치료용 제제로의 활용 가능성이 높은 앱타머를 선별, 제작할 수 있다. 실제 2009년 Chen et al.은 CS-SELEX 기법을 활용하여 HCV의 envelope 표면에 존재하는 glycoprotein E2를 직접 검출할 수 있는 ssDNA aptamer(ZE2)를 선별/확보하는데 성공하였으며, 현재 이들은 ssDNA aptamer(ZE2)를 HCV 질환 치료 및 탐지에 활용하고자 하는 연구를 수행중이다.

병원성 미생물 및 바이러스를 직접 검출할 수 있는 앱타머를 제작, 선별할 수 있는 또 다른 방법 중 하나인 MonoLEX 기법은 one-step 앱타머 선별 기법으로 affinity chromatography를 이용하여 표적물질과 특이적으로 결합하는 앱타머를 회수하는 방법이다. 2007년 Nitsche et al.은 생물학적 무기로 사용될 수 있는 Orthopox virus(OPV)와 유사한 Vaccinia virus(VACV)과 특이적으로 결합하는 앱타머를 MonoLEX 기법으로 선별, 확보하였다. 확보된 앱타머는 VACV의 particle에 특이적으로 결합하며, 바이러스의 감염 억제 및 바이러스 탐지에 활용될 수 있다. 이와 같은 연구를 통하여 확보된 기반 기술들은 OPV에 의한 생물학적 테러 방지에도 적극 활용될 수 있을 것으로 기대되고 있다. 이처럼 복합 표적물질에 대한 SELEX에서는 표적물질과 앱타머 간의 결합 특이성을 높이기 위하여 추가적인 counter 선별 과정이 종종 추가된다. Counter SELEX는 복합 표적물질과 밀접한 관련이 있는 미생물 또는 바이러스와 랜덤 뉴클레오타이드 라이브러리간의 반응시간을 통하여 복합 표적물질과 비특이적으로 결합하는 앱타머를 제거하는 과정을 의미한다. 이와 같은 과정은 표적물질과 특이적으로 결합하는 앱타머 선별과정인 반복적 "positive cycles" 전후에서 수행된다(Figure 1).

앞서 언급한 것과 같이 Non-whole-cell 및 whole-cell은 병원성 미생물 및 바이러스의 용해제(lysate), 세포막 성분, 막단백질, 막당단백질 등으로 이들의 대부분은 질환을 직·간접적으로 유발하는 병원성 인자로 다양한 SELEX 기술로부터 확보되는 non-whole-cell 및 whole-cell과 특이적으로 결합하는 앱타머는 병원성 미생물 및 바이러스에 의해 유발되는 질환의 진단 및 치료제로의 개발이 가능할 뿐만 아니라 암 진단, 식품 안전성 확인, 생물 테러 물질 확인 등을 할 수 있어 의료, 환경, 식품, 산업, 군사 분야 등 다양한 분야에서 폭넓게 활용 가능하다.

앱타센서 플랫폼 기술

병원성 미생물 및 바이러스에 의한 질환을 진단하기 위하여 현재 활용되고 있는 가장 전형적인 방법은 배양을 통한 병원체 분리 및 동정을 통한 진단 기법으로 정확한 질환의 진단 결과를 확보하기 위해서는 최소 2일 이상의 시간이 요구된다는 단점을 가지고 있다. 이에 최근 몇 년 동안 질환의 진단을 빠르게 하기 위하여 PCR(Polymerase Chain Reaction) 기반의 탐지 기법, DNA 기반의 나노바코드(Nanobarcode) 등의 다양한 기술이 제시되었다. 그러나 이러한 방법들은 표적 세포를 용해하여 DNA를 확보하여야하는 전처리 과정에 따른 많은 시간과 비용이 요구된다는 단점을 가지고 있다. 이에 병원성 미생물 및 바이러스를 쉽고 빠르게 검출할 수 있으며, 경제적인 새로운 형태의 초고속, 저비용 진단 기법의 개발이 요구되고 있다. 이러한 요구로 인하여 최근 표적물질과 특이적으로 결합한다는 특징 외에도 화학적 변형이 용이하여 nanoparticle 및 센서칩 표면을 기능화 하는데 활용이 가능한 앱타머를 앱타센서에 활용하고자 하는 시도가 다방면에서 이루어지고 있다. 또한 앱타머는 열 또는 pH에 의해 변성(Denaturation) 및 회복(Renaturation)을 반복할 수 있다는 특징을 가지고 있어 표적물질 탐지를 위하여 제작된 앱타센서 플랫폼의 재사용을

가능하게 한다. 이에 2002년 O'Sullivan et al.에 의하여 앱타머를 이용한 앱타센서 개발 가능성이 보고된 이후, 앱타머의 장점과 구조적 특징을 기반으로 하는 전기적기반 앱타센서(Electrical-based aptasensor), 광학기반 앱타센서(Optical-based aptasensor), 질량기반 앱타센서(Mass-dependant aptasensor) 등 다양한 앱타센서가 개발 보고되고 있다.

전기적 앱타센서(Electrical-based aptasensor)는 분석 속도가 빠르며, 분석 비용이 저렴하고, 샘플 분석을 위해 고가의 광학 기기를 요구하지 않는다는 장점과 앱타머와 표적물질이 결합한 복합체에 대한 탐지 민감도를 생촉매 결합물질을 이용하여 증가시킬 수 있으며, 이를 통하여 앱타센서의 탐지 시그널 또한 증폭 시킬 수 있다는 장점을 가지고 있다. 뿐만 아니라, 전기적 기반 앱타센서는 광학 표지를 하지 않고도 표적물질을 탐지할 수 있으며, 앱타머의 변성 및 회복성질을 이용하여 손쉽게 재사용이 가능하다는 특징을 가지고 있다. 이와 같은 여러 장점 때문에 현재 의료, 환경, 군사 분야 등 다양한 분야에서 전기적 기반 앱타센서가 활용되고 있다. 전기적 기반 앱타센서에는 (a) 효소를 labeling 탐지시스템에 이용하는 전기화학적(electrochemical) 플랫폼, redox reporter로 기능화 된 앱타머, label-free impedance spectroscope transduction, (b) single-walled carbon nanotubes를 이용한 field-effect transistors, (c) microgravimetric analysis를 사용한 piezoelectric quartz crystals이 포함된다.

광학기반 앱타센서(Optical-based aptasensor)는 앱타머가 화학적 변형이 손쉽다는 특징을 이용하여 시그널 물질로 앱타머를 변형시킨 후 표적물질을 검출하는 방법으로 질환 진단 분야에서 가장 보편적으로 활용되는 기법 중 하나이다. 가장 보편적인 광학기반 앱타센서는 표적물질과 특이적으로 결합하는 앱타머에 서로 다른 파장을 가지는 두 개의 형광염료를 부착시켜, 표적물질과 결합하는 앱타머의 quenching 및 fluorescence resonance energy transfor (FRET) 효과를 이용하여 표적물질을 탐지하는 방법이다. 하지만 광학기반 앱타센서는 복합 표적물질내 존재하는 생물학적 구성성분들에 의한 형광 시그널의 소멸 및 간섭현상 때문에 식품, 환자 sera 등 복합 샘플에서의 활용에 한계가 있는 단점을 보인다.

질량기반 앱타센서(Mass-dependant aptasensor)는 센서 표면에 앱타머를 고정시킨 후 표적물질과 앱타머가 결합할 때 일어나는 질량의 변화를 측정하는 방식으로 가장 대표적인 비표지 방식의 표적물질 탐지 기법이며, 여기에는 evanescent wave 방식의 surface plasmon resonance-(SPR), acoustic wave 방식의 Quartz crystal microbalance(QCM), surface acoustic wave(SAW), 그리고 micromechanical cantilever 방식 등이 여기에 포함된다. Tombelli et al. (2005)은 transducer sulface 위에 biotin-avidin이 linking 되어 있는 SPR 및 QCM 앱타센서를 이용한 앱타머 고정화 실험을 통해 앱타머와 표적물질간의 결합에 따른 질량변화 확인하였으며 이를 통해 표적물질 유무를 탐지하는 센서로 샘플에 대한 민감도 및 특이성이 매우 높고, 재사용이 가능하며, 앱타머와 표적물질간의 결합력을 정량할 수 있다는 장점을 지니고 있음을 보고하였다. 반면, 다양한 이온들이 섞여있는 복합 시료를 대상으로 한 표적물질 탐지는 효율이 급격히 떨어져 샘플 정제 및 buffer change 작업 등의 상대적으로 복잡한 샘플 전처리 과정 및 고가의 분석 장비가 필요하여 활용범위가 제한적인 단점을 지니고 있다.

병원성 미생물 및 바이러스 탐지용 앱타센서 개발

2004년 Minumni et al. (Biosens. Bioelectron., 20;1149-1156)은 piezoelectric quartz crystal에 RNA 앱타머 고정화하여 HIV(Human immunodeficiency virus)-1 Tat (Transactiviating responsive) protein을 탐지하는 앱타센서를 개발 보고하였으며, 2007년 Lee et al. (Biochem. Biophys. Res. Commun., 358;47-52)은 HCV의 핵심 항원과 특이적으로 결합하는 앱타머를 선별하고, 선별된 HCV 핵심 항원과 특이적으로 결합하는 앱타머를 이용

하여 sol-gel-based immobilization 앱타센서를 제작하였다. 센서칩 위에 고정된 앱타머와 재조합 core-항원(core-antigen)를 같이 incubation한 결과, 앱타머와 HCV-core 간의 특이적인 상호결합을 확인할 수 있었다. 이와 같은 특이적인 결합 반응을 탐지할 수 있는 앱타센서는 정제된 재조합 core-항원 탐지 뿐만 아니라, HCV 감염 환자의 sera로부터 core-항원 탐지에서도 활용 가능함을 제시하였다.

최근까지 앱타센서를 이용한 병원성 미생물 및 바이러스를 탐지 분야는 아직도 많은 부분이 미개척 분야로 남아 있어 현재도 다양한 소재를 이용한 표적물질 탐지에 관한 연구가 시도되고 있다. 2007년에는 quantum dot(QD)을 이용한 *Bacillus thuringiensis* spores 탐지에 대한 연구 결과가 보고되었다. 2007년 Ikanovic et al. (J. Fluoresc., 17; 193-199)은 QD로 기능화된 앱타머를 *Bacillus thuringiensis* spores를 탐지에 활용하였다. 이를 위해 *B. thuringiensis*와 특이적으로 결합하는 앱타머를 선별하고 zinc sulfide-capped cadmium selenide QDs로 기능화한 후 표적물질과 반응하고 spore을 회수, 세척한 후 fluorescence를 측정하였다. 그 결과 QD 이용한 탐지 시스템은 103 CFU/ml의 spore를 탐지할 수 있는 민감도를 가지고 있었으며, 105 CFU/ml 이상의 농도에서는 *B. globigii*와 *B. thuringiensis*의 spore를 구별할 수 있는 특이성을 가지고 있었다.

앞서 다양하게 기술한 앱타센서는 앱타머의 표적물질에 대한 특이성, 민감도, 재현성 등을 보여주었으며, 종래의 면역센서(Immunosensor)와 비슷하거나 더욱 우수한 detection limit를 보여주었다. 하지만 위에 기술된 다양한 형태의 앱타센서들은 빠르고, 쉽게 질환을 탐지하는데 활용할 수 있다는 장점을 가지고 있는 반면, 복합 표적물질에 대해 간섭현상 없이 표적물질만을 특이적으로 탐지하는데 한계점을 보여주었다. 최근 이러한 문제점을 극복하기 위하여 나노담체(Nanoparticle)와 탄소나노튜브(CNT: carbon nanotubes)를 이용한 whole-cell 탐지 앱타센서로 개발한 새로운 연구시도가 보고되고 있다.

Nanoparticle 기반 앱타센서

현재 연구보고 되어 있는 대부분의 Nanoparticle 기반 앱타센서는 gold nanoparticles(AuNPs)와 QDs를 이용한 앱타센서 플랫폼으로 AuNPs의 광학성질은 색변화를 이용한 탐지(colorimetric detection) 시스템 응용에 활용되며, AuNPs는 색의 변화로 surface resonance frequency을 변형할 수 있다는 장점을 가지고 있다. 이와 같이 여러 가지 색을 이용한 탐지가 가능하기 때문에 multiple detection을 가능하게 하며, 육안 탐지를 통한 고가의 시각화 장비를 요구하지 않게 한다. 뿐만 아니라, Nanoparticle이라는 고유의 지지체를 가지고 있기 때문에 solution 내에 직접 반응 할 수 있어 고정 플랫폼의 단점을 극복할 수 있다. 2007년 Lie et al.은 AuNPs와 QD을 이용하여 solution에 존재하는 adenosine과 cocaine을 탐지할 수 있는 two-solution-based colorimetric 탐지 시스템 개발에 성공하였다. 이 시스템은 먼저 AuNP에 앱타머를 링크 시킬 수 있는 올리고 뉴클레오타이드를 고정시킨 후, 이를 이용하여 adenosine과 cocaine에 특이적으로 결합하는 QDs-앱타머를 link 시켰다. 이때, adenosine 또는 cocaine과 특이적으로 결합하는 QDs-앱타머는 표적물질이 없는 상황에서는 고유의 구조를 이루며 QDs 시그널이 quenching 되어 있는 것을 확인 할 수 있었다. 하지만 adenosine 또는 cocaine 존재하의 앱타머는 표적물질과 결합하기 위하여 앱타머 구조를 변형하게 되며 이로 인해 QDs 시그널이 발생하게 된다(Figure 2). 이들의 실험에서 QDs-앱타머는 1 mM cocain과 2 mM adenosine에서 즉각적인 색인 변화를 보여주며 표적물질의 유무를 확인 시켜주었다. 비록 nanoparticle 기반 앱타센서가 병원성 미생물 및 바이러스를 탐지하는데 활용된 구체적인 예는 없지만 탐지 특이성 및 민감도가 매우 높으며, solution에 직접 탐지 결과를 시각적으로 보여줄 수 있다는 강점을 가지고 있어 향후 음용수, 음식물 등의 혼합 샘플에 존재하는 병원성 미생물 및 바이러스 탐지에 손쉽게 활용 될 수 있을 것으로 기대된다.

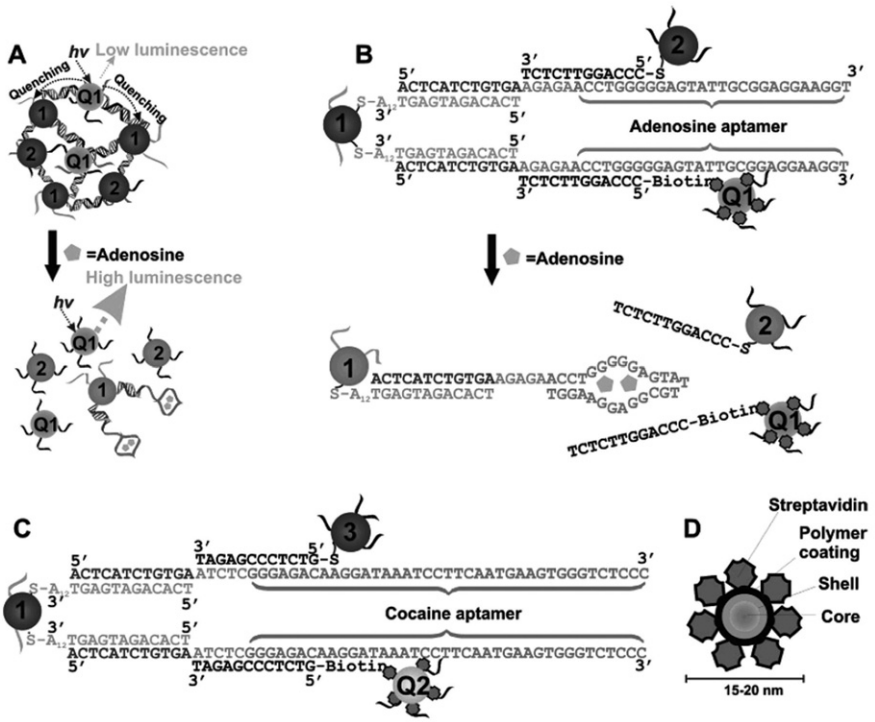

Figure 2. QD-encoded aptamer-linked nanostructures for multiplex detection(Juewen Liu et al., 2007)

탄소나노튜브(Carbon nanotube) 기반 앱타센서

한편 병원성 미생물 및 바이러스를 직접 탐지하기 위해 높은 전기 전도도와 화학적 안정성을 가지고 있는 탄소나노튜브를 앱타센서에 적용방법이 보고되고 있다. 2008년 스페인 Zelada-Guillen G.A., 연구팀은 single-walled carbon nanotubes(SWCNTs)에 살모넬라-앱타머를 고정하여 실시간으로 살모넬라 유무를 확인할 수 있는 앱타센서를 개발하였다(Figure 3). 탄소나노튜브 기반의 앱타센서를 제작하기 위하여 먼저 살모넬라와 특이적으로 결합하는 앱타머의 3′ 말단을 아민기(-$(CH_2)_5NH_2$)와 5개의 carbon spacer로 변형시킨 후, 카르복실화된 SWCNTs의 표면에 공유결합을 이용하여 고정시킴으로 살모넬라 탐지용 carbon nanotube 기반 앱타센서를 확보할 수 있었다. 확보된 탄소나노튜브 앱타센서에 고정된 앱타머는 표적 병원성 미생물의 존재에 따라 구조적 변화를 일으킨다. 이때, SWCNT 측면에서 대규모 이온화가 진행되면서 SWCNT의 전하의 변화가 유발된다. 이러한 전하의 변화량을 검출기로 읽어 일련의 계산과정을 통해 복합 샘플 내 표적 병원성 미생물의 농도를 정량할 수 있다. 이러한 반응은 매우 즉각적으로 일어나는 반응으로 실시간으로 표적물질의 유무를 확인할 수 있게 되는 것이다. 이들은 개발한 살모넬라 탐지용 탄소나노튜브 기반 앱타센서는 실시간 검출이 가능할 뿐만 아니라, 검출 특이성이 매우 높아 1 CFU/ml 농도의 표적물질을 검출할 수 있을 만큼 민감도 또한 매우 높은 것을 확인 할 수 있었다. 그러나 아직까지는 살모넬라에만 적용 가능한 센서로 다른 병원성 미생물 및 바이러스 검출에는 적용이 불가능하다는 단점을 가지고 있다. 향후 많은 병원성 미생물 및 독성 바이러스를 탐지용 앱타머를 확보하게 된다면 질환진단, 식품 안정성 평가 등 다양한 분야에서 산업적 활용도가 더 높아 질 것으로 기대된다.

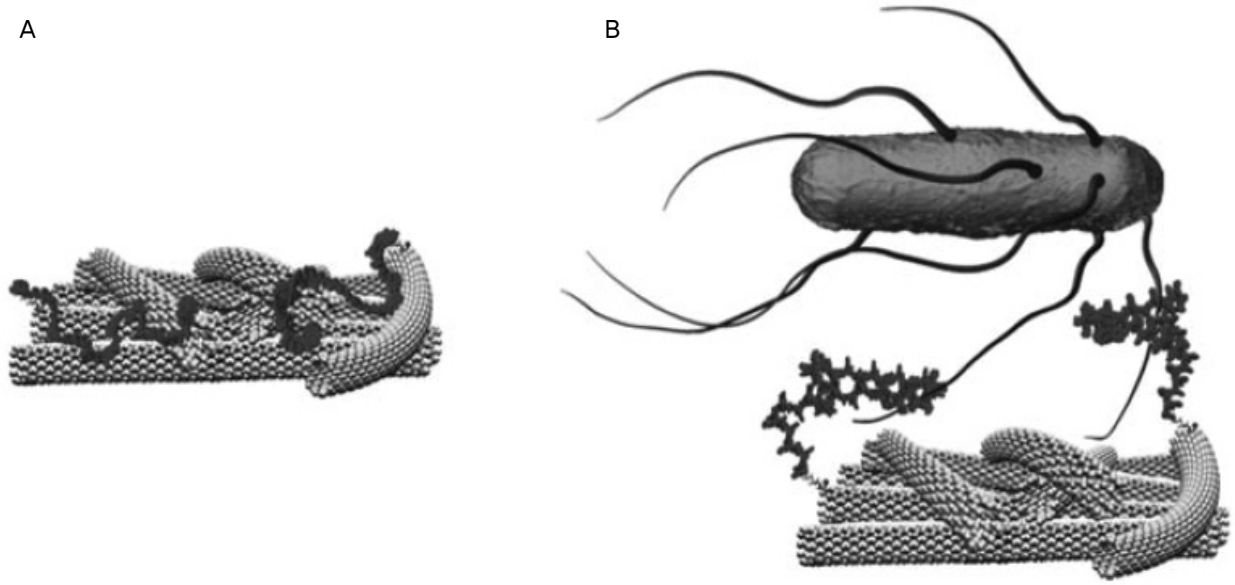

Figure 3. A) Possible conformations of the aptamers that are self-assembled on carbon nanotubes. B) Schematic representation of the interaction between the target bacteria and the hybrid aptamer-SWCNT system (Gustavo A. Zelada-Guillen et al., 2009)

결론

복합 시료내에서 표적 병원성 미생물 및 바이러스를 실시간으로 검출하고 정량하기 위해 보다 빠르고, 감도가 좋으며, 검출 비용이 비교적 저렴한 새로운 형태의 탐지 기법을 개발하기 위한 연구자들의 수많은 연구를 진행하였다. 하지만 기존의 탐지 기법들은 복합 시료내 존재하는 수많은 이온, 단백질, 당 등 다양한 불필요한 구성성분들의 의한 간섭 또는 cross 반응으로 인해 표적 병원성 미생물 및 바이러스를 대상으로 하는 샘플 농축, 추출, 또는 정제 등의 까다로운 샘플 전처리 과정을 요구한다. 이러한 전처리 과정은 표적물질에 대한 탐지시간과 비용을 직접적으로 증가시키는 요인으로 작용한다. 이를 극복하기 위해 whole-cell(병원성 미생물 및 바이러스)을 직접, 실시간으로 탐지하기 위한 새로운 방법을 개발하기 위한 끊임없는 노력이 계속되고 있다. 최근 복합 표적물질과 특이적으로 결합하는 앱타머를 선별할 수 있는 다양한 SELEX 기법들이 개발되면서 앱타머를 이용하여 복합 샘플에서 병원성 미생물 및 바이러스 등의 질환 유발 인자를 직접 검출할 수 있는 새로운 앱타센서를 개발하고자 하는 많은 연구가 시도되고 있다. 그 결과 복합 표적물질과 특이적으로 결합하는 앱타머에 대한 동정은 앱타머의 분자적 진단 플랫폼으로의 응용가능성 뿐만 아니라 감염 저해 및 질환 치료제로서의 응용 가능성을 보여주고 있다. 특히, whole-cell을 대상으로 하는 앱타머 선별 기법은 아직까지 알려지지 않은 미지의 표적물질에 대한 탐지 및 제어 가능성을 시사는 것으로 진단, 의약, 환경, 군사 등 다양한 분야에서의 폭넓은 활용 가능성을 보여주고 있다. 다양한 활용을 위해서는 세포벽에 존재하는 복합 표적물질과 앱타머간의 결합표준화(binding standardization)가 해결되어야 하는 우선적인 당면 과제가 존재하나, 현재의 다양한 앱타머 연구와 앱타센서 개발시도를 통해 가까운 미래에 문제가 해결될 것으로 사료되며 이를 통한 초고감도 앱타센서의 무한한 잠재적 가능성을 극대화 시킬 수 있는 새롭고 다양한 응용분야가 제시될 수 있을 것으로 예상된다.

*참고문헌

1. Cella L.N., Sanchez P., Zhong W., Myung N.V., Chen W., and Mulchandani A., Nano aptasensor for protective antigen toxin of anthrax. *Anal. Chem.* 2010 1, 2042–2047.
2. Chen F., Hu Y., Li D., Chen H., and Zhang X.L., CS-SELEX generates high-affinity ssDNA aptamers as molecular probes for hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. *PLoS One* 2009, 3, e8142.
3. Kim M., Um H.J., Bang S., Lee S.H., Oh S.J., Han J.H., Kim K.W., Min J., and Kim Y.H., Arsenic removal from Vietnamese groundwater using the arsenic-binding DNA aptamer. *Environ. Sci. Technol.* 2009, 15, 9335–9340.
4. Liu J., Lee J.H., Lu Y., Quantum dot encoding of aptamer-linked nanostructures for one-pot simultaneous detection of multiple analytes. *Anal. Chem.* 2007, 1, 4120–4125.
5. Nitsche A., Kurth A., Dunkhorst A., Pänke O., Sielaff H., Junge W., Muth D., Scheller F., Stöcklein W., Dahmen C., Pauli G., and Kage A., One-step selection of Vaccinia virus-binding DNA aptamers by MonoLEX. *BMC Biotechnol.* 2007, 15, 48.
6. Tombelli S., Minunni A., Luzi E., Mascini M., Aptamer-based biosensors for the detection of HIV-1 Tat protein. *Bioelectrochemistry* 2005, 67(2), 135–141.
7. Torres-Chavolla E., and Alocilja E.C., Aptasensors for detection of microbial and viral pathogens. *Biosens. Bioelectron.* 2009, 15, 3175–3182.
8. Zelada-Guillén G.A., Riu J., Düzgün A., and Rius F.X., Immediate detection of living bacteria at ultralow concentrations using a carbon nanotube based potentiometric aptasensor. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2009, 48, 7334–7337.