

식품의 안전과 품질 보증을 위한 앵타머

Aptamers for Safety and Quality Assurance in the Food

이나리, 장현주 | 안전성연구단

Nari Lee, Hyun-Joo Chang | Food Safety Research Group

서론

식품 산업에서 최고의 목적은 신선하고 안전한 식품 생산이지만 식품은 종종 식중독균에 오염되어 가벼운 증상의 불편함부터 생명을 위협하는 증상까지 다양한 질병의 형태로 나타난다. 그러므로 식중독균의 검출은 건강과 식품 안전 모두에서 중요하며 식중독균의 검출은 식품 안전에서 뿐만 아니라 좋은 환경의 유지와 바이오 디펜스(생물학적 방어)와 같은 다른 분야에서도 관심을 가지고 있다. 2008년 유럽연합은 사람에서 일반적으로 나타나는 인수공통 전염병 발생률에 대한 통계를 내놓았는데(Fig. 1), 여기에 보고된 인수공통 전염병 외에도 황색포도상구균, 보툴리누스균과 같은 여러 종류의 식중독 미생물과 비세균성 위장관염의 가장 중요한 원인 중 하나인 노로바이러스와 같은 여러 그룹의 바이러스들이 사람에게 감염을 일으킨다.

전통적으로 배양방법이 식품에서 식중독균을 검출하는 가장 일반적인 방법이지만, 면역분석법과 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction,

PCR)이 식중독균을 신속하게 검출하는 방법으로 사용되고 있다. 이들 방법은 전통적인 배양방법과 비교했을 때 배설물이나 식품 시료에서 식중독균을 검출하는데 걸리는 시간을 현저히 단축시킨다. 대표적인 예로 식중독균을 단클론이나 다클론 항체로 검출하는 방법인 효소면역분석법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)이 있다. 이 분석법에서 사용되는 항체는 일반적으로 동물 또는 사람의 조직이나 기관에서 만들어진 세포주나 동물에서 만들어진다. 이들 동물자원의 사용은 많은 윤리·도덕적인 거부감이 있으므로 대체할 수 있는 합성된 생물분자 사용에 대한 가능성이 제시되고 있다. 실제로 많은 항체 대체물질이 연구되고 있으나 대부분 낮은 안정성과 친화성 문제 때문에 사용이 제한되고 있다.

앵타머(aptamer)는 그 자체로 안정된 삼차구조를 가지면서 표적 물질에 높은 친화성과 특이성으로 결합할 수 있는 특징을 가진 단일가닥 핵산으로 'to fit'의 의미를 가지는 라틴어 'aptus'에서 그 어원이 유래했다. 이 15~40 mer 길이의 핵산은 1990

년에 콜로라도 대학의 Larry Gold 연구팀에 의해 알려져 단일가닥 핵산 애타머의 분리기술이 발달되었다. 애타머는 의도했던 표적 환경과 복합체를 형성하고 단백질, 세균, 바이러스, 프리온, 저분자 유기물과 같은 다양한 표적 분자에 결합하며, 신약 개발을 위한 유효성 평가에도 이용된다. 항체처럼 결합 특이성이 있는 리간드의 형태로 애타머는 분석 기술이나 기계의 중요한 요소로서 사용될 수 있기 때문에 매우 흥미있는 대상이지만, 이런 가능성에도 불구하고 식품과 같은 복합 매트릭스의 분석에서 일상적으로 응용이 가능해야만 대체 항체로서 받아들여 질 수 있다는 것이다.

애타머는 SELEX(Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment)라는 방법에 의해 선택된 것으로 항체와 같은 생물분자의 장점을 가지고 있다. 일단 발굴된 애타머는 동물이나 세포주로부터 만들어지지 않기 때문에 단시간에 적은 비용으로 화학적 합성에 의해 생산될 수 있다. 애타머는 표적 특이성이 있어 다양한 매트릭스에 존재하는 여러 다른 물질들 사이에서 우선적으로 표적 분자와 결합할 수 있다. 이 특이성이 애타머가 식품에 존재하는 식중독균을 검출할 때 다른 미생물이나 식품 구성성분을 제외한 식중독균에만 단독으로 결

합한다는 장점으로 작용할 것이다. 애타머는 매우 안정하여 일 년 이상 동안 실온에서 동결건조 파우더 상태로 보관이 가능하다. 또한 항체에 비해 온도에 대한 안정성이 매우 높아서 단백질이나 항체 의약품의 경우 실온에서 보관이나 운반이 불가능하지만 애타머는 가능하고, 심지어 멸균 후에도 기능을 유지할 수 있다. 애타머는 혈청에서도 화학적 변형에 의해 분해가 보호될 수 있으므로 복잡한 매트릭스로 구성된 식품에서 식중독균 검출 등에 적용이 가능할 것이다.

식중독균의 검출

식중독균의 검출과 동정은 항체를 이용한 검출 방법이 가능하다 하더라도 우선적으로 선택배지에서 배양하거나 DNA 동정방법 같은 미생물학적, 생화학적인 방법에 의해 이루어진다. 전통적인 배양법이 감도도 좋고 경제적이기는 하지만 시간과 시료가 많이 필요한 단점이 있다. 이 방법은 특정 그룹에 속하는 미생물의 성장에 도움이 되는 선택제(selective agents)를 첨가한 영양이 풍부한 배지에서 매우 정상적인 건강한 식중독균을 증식시켜서 얻

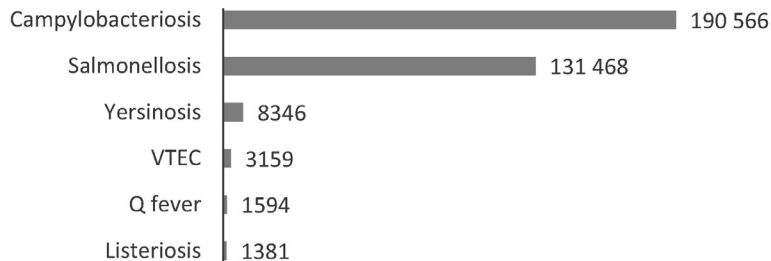


Fig. 1. Most frequently reported zoonotic disease in humans in the European Union in 2008 (The EFSA Journal, 2010)

어내는 결과로 추가적인 생물학적, 혈청학적 검사가 검출된 식중독균 동정에 이용될 수 있다. 일반적으로 식품과 물에 오염되어 있는 대부분의 세균은 매우 적은 양이어서 오염된 균을 검출하기 위해서는 일차 증식을 시키거나 항체에 의한 면역포획법(immunocapture), 면역자기분리법(immunomagnetic separation, IMS), 여과와 원심분리와 같은 미생물 농축방법을 이용하여야 한다. 그러나 미생물 농축 방법은 한 가지 식품이나 미생물에 최적화된 방법을 다른 식품에 적용할 수 없기 때문에 좋은 방법은 되지 못한다.

핵산증폭 방법

핵산증폭 방법은 식품에 있는 미생물 독소의 신속 검출에 많이 이용된다. PCR 방법은 미량의 DNA를 기하급수적으로 증가시키는 자연계에 존재하는 가장 효율적인 생화학적 증폭기술이라고 할 수 있다. 이 PCR법은 미생물 증식이 반드시 필요한 것은 아니며(Fig. 2), 여러 미생물의 종에 따라 다른 종과 구별되는 특이적인 DNA 서열을 프라이머로 사용하여 증폭하는데 미생물에서 잘 보존된 서열인 16S와 23S rRNA 유전자에서 발견되는 미생물의 게놈 내에 variable region이 표적이 된다.

전통적인 PCR법은 신속하고 정확하지만 사균과 생균을 구별할 수 없다. 물론 실제 적용 시 모든 세균이 검출될 필요가 있는 경우에는 장점이다. Lazcka 등은 또 다른 독소검출을 위한 PCR 방법에 대하여 보고했는데 real-time PCR, reverse transcriptase PCR(RT-PCR)과 multiplex-PCR을 대체 PCR 방법으로 제시하였다. Real-time PCR은 정량 PCR(qPCR)이라고도 하는데 형광물질을 이용하여 반응 중 DNA

를 축적함으로써 검출과 정량 결과를 2~3시간 내에 얻을 수 있다. RT-PCR은 5'→3' 방향으로 RNA로부터 단일가닥 DNA를 합성할 수 있도록 효소를 사용하여 살아 있는 미생물의 성장 중에 존재하는 유전자를 검출하는 방법으로 구별해 낼 수 있다. Touron 등은 nested-multiple-PCR 방법으로 세 가지 다른 살모넬라균의 혈청형을 구별하였다. 그 방법은 민감도가 높고 물과 침전물로부터 추출된 DNA로부터 살모넬라균을 검출할 수 있었다. Multiplex-PCR은 여러 쌍의 프라이머를 이용하여 한 번의 반응으로 관심 있는 많은 표적 물질을 동시에 증폭시킬 수 있는 방법이다. Multiplex-PCR 방법을 사용할 때 중요한 문제는 상동성이 높은 염기서열을 공유하고 있는 핵산을 확실히 구분할 수 있는 프라이머의 선택이다. Brukner 등은 고 해상도 DNA typing을 위하여 높은 상동율을 갖는 표적 물질에 대한 특이적인 oligonucleotide probe의 선별을 위한 프로토콜을 제시하고 있다.

면역분석법

면역학적 방법은 식품 원료의 분석과 품질관리에 일반적으로 사용되어 왔으며, 미생물, 포자, 바이러스, 독소의 검출에 매우 유용한 방법이다. 면역분석법은 특정 항원에 결합하는 항체를 기반으로 하는데 검출제(detection agent)로 항체를 활용하는 여러 가지 방법 중에 가장 일반적으로 사용되는 방법이 ELISA법이다. 단일사슬 항체와 peptoid(합성 펩티드)와 같은 전통적인 항체의 대체물에 대한 연구가 진행되고 있으나, 이 대체물의 대부분은 안정성과 낮은 표적 친화성 문제를 가지고 있어 실제 적용에는 한계가 있다.

하이브리드 기법

PCR을 활용한 첫 번째 면역분석법은 immunopolymerase chain reaction(IPCR)으로 IPCR은 전형적인 효소면역분석법(ELISA)에 비하여 검출감도를 100~10,000배 정도 증가시킨 것으로 보고되었으며, 효소면역분석법(ELISA)이 이차항체(detection antibody) 위에 특정 효소를 접합시켜서 신호를 증

폭하는데 반하여, IPCR은 항체에 DNA를 접합시킨 항체-DNA 복합체를 이차항체(detection antibody)로 사용하고 후에 PCR을 이용하여 이차항체 위에 있는 DNA를 복제함으로써 신호를 증폭시킨다 (Fig. 3). 생물무기로 사용되는 리신(ricin)과 리보솜 불활성화단백질(ribosome-inactivating proteins, RIPs), 보툴리누스 식중독균이 만들어 내는 신경 독소 neurotoxin A, 그룹 A에 속하는 연쇄상구균

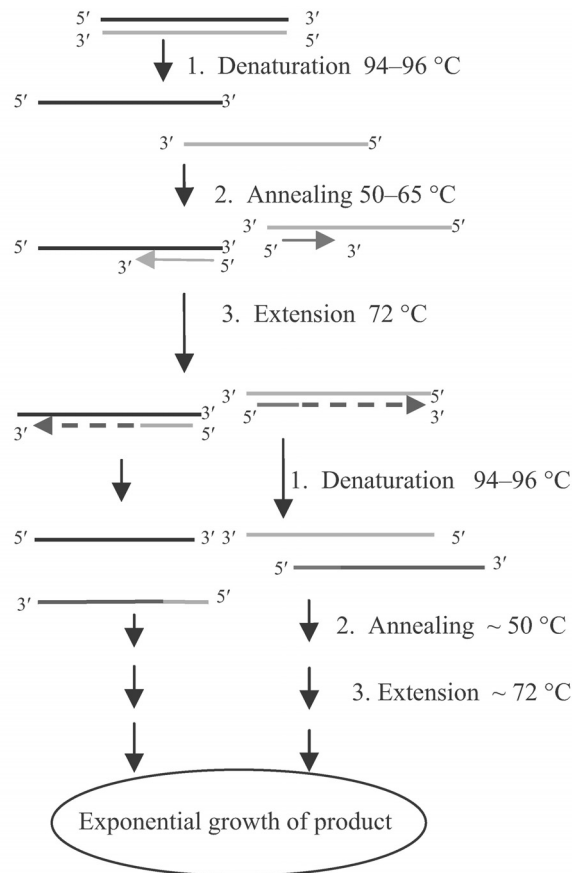


Fig. 2. Polymerase chain reaction, 1. Denaturation separates double stranded DNA into two single strands. 2. Primers bind to the template DNA when the temperature is lowered. 3. Extension allows nucleotides to bind to the template forming a new double stranded DNA. These three steps are repeated 30~40 times to multiply exponentially the short chain of DNA.

(*Streptococcus*), 간염바이러스 B와 HIV 같은 병원성 바이러스들의 검출에 이 방법이 사용된다.

바이오센서

바이오센서는 생물학적 분석물의 검출을 위한 장치로 표적 물질을 검출하기 위한 세 가지 다른 생물학적 인식요소인 효소, 항체, 핵산에 적용할 수 있다. Muhammad-Tahir와 Alocilja는 특이성이 있고 민감도가 좋으며 크기가 작아 식중독균을 실시간으로 검출할 수는 항체를 사용하는 전도도 측정식 바이오센서를 개발하였다. 전기화학적 면역분석법을 이용한 바이오센서는 생물학적 요소로 항체를 이용하여 항체에 결합된 미생물이 시스템에 부착된 전기화학적 변환기에 의해 검출되는 방법으로 *Escherichia coli* O157:H7과 *Salmonella* ssp.에 적용되어 사용된다.

RNA 바이오센서는 세균의 신속검출에 사용되는데 Baeumner 등은 물에서 살아 있는 대장균을 검출하기 위해 고감도, 특이적 RNA 바이오센서를 개발하였다. 고감도 RNA 바이오센서인 NASBA(nucleic acid sequence-based amplification) 방법은 대장균의 mRNA 서열과 고 특이성 DNA probe의 하이브리드를 생성하는 것으로 DNA capture probe는 polyethersulfone막에 고정되고, DNA reporter probe는 리포솜 표면과 결합하는 형태로서 여기에 결합할 수 있는 특이적 대장균 mRNA가 존재하면 DNA capture probe-mRNA-DNA reporter probe의 샌드위치를 형성하여 15~20분의 검출시간이 걸리며 휴대하기 편하고, 저비용의 사용하기 쉬운 바이오센서이다.

표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance, SPR)을 이용한 바이오센서는 표식자가 필요 없는 분석법으로 선택성, 친화도, 반응속도에 대한 데이

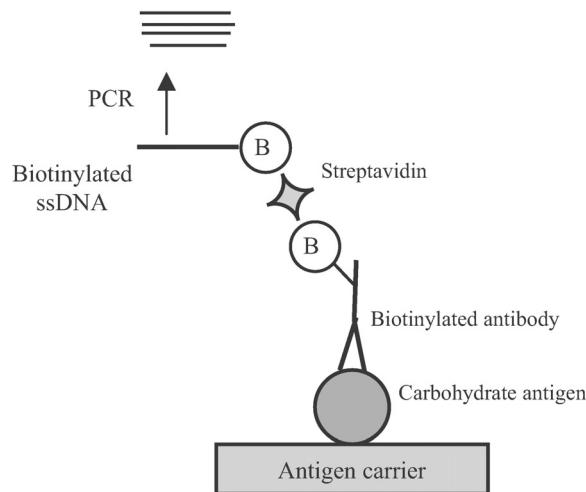


Fig. 3. Schematic illustration of immuno-PCR assay (adapted from Liang *et al.*, 2003). A plate can be used as an antigen carrier and streptavidin can be used as a bridge to link the antibody and the reporter DNA. Assay response can be obtained by PCR amplification of the DNA and detection of PCR products.

터를 제공하면 생물분자의 상호작용을 분석할 수 있다. 표면 플라즈몬 공명이 일어나는 공명각, 즉 반사광이 최소가 되는 각도는 금속 박막 표면층 유전체 질량이 증가하거나 구조가 변형되면 결과적으로 유효 굴절률(effective refractive index)이 변화하여 공명각이 달라지게 된다. 따라서 이러한 물질의 변화를 광학적인 방법으로 계측할 수 있는 SPR 원리를 이용하면 금속 박막 표면층의 적절한 화학적 변형을 통해 다양한 생화학 물질들 사이의 선택적 결합이나 분리와 같은 생화학적 반응을 공명각의 변화로 감지할 수 있어 SPR 센서는 고감도 생화학 센서로 활용할 수 있게 된다.

SPR을 상용화한 제품인 Biacore[®]는 생체물질 간 상호작용을 실시간으로 측정할 수 있는 특징을 갖고 있는 장비로써 신약개발, 항체 특성화, 단백질 체학, 면역유전학, 생물학적 치료제의 개발과 제조와 같은 여러 분야에 응용되고 있다. 또한 식품에서도 비타민 함량 정량, 꿀에서 항생제 스크리닝, 동물성 의약품 잔류량 검색과 같은 식품 감시 분야에 적용되고 있으며 식품 생산에서 일상적인 품질 관리방법으로 사용되는 식중독균에 대한 혈청학적 검색 시험법으로도 개발되었다. Biacore[®] 시스템을 사용한 결과, 시험 능력은 식품 당국이나 식품 제조 연구소 등의 식품을 감시할 수 있는 능력을 증대시키므로 한 개의 육류 가공업체의 SPR 기술을 이용한 일일 항생제 검사비율을 0.1% 미만에서 20% 이상으로 끌어올릴 수 있으며 완전히 자동화된 시험 방법으로 돼지에서 선모충과 살모넬라를 검출할 수 있다.

바이오센서 기술은 PCR, 배양법, ELISA와 같은 전통적인 검출법보다 훨씬 짧은 시간에 신뢰할 수 있는 실험결과를 제시하기 때문에 최근 많은 관심을

받고 있어 곧 전통적인 ELISA를 기반으로 하는 실험법을 앞지를 것으로 예상된다. 또한 앵타머는 항체를 대신하여 바이오센서에 적용되어 병원성 미생물과 바이러스의 검출에 앵타머를 적용한 앵타센서(aptasensors)가 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

앵타머 생산

앵타머는 DNA나 RNA의 라이브러리에서 선택될 수 있다. 일반적으로 DNA 앵타머는 RNA 앵타머와 비교하여 ‘분해’로부터 안정한 특성을 지닌다. 그러므로 식품과 같은 복잡한 매트릭스 안에서 사용되기 위해서는 DNA 앵타머 생산이 훨씬 더 효율적이라고 할 수 있다.

새로운 앵타머는 SELEX를 통해서 생성된다(Fig. 4). 이 과정은 1990년에 Tuerk와 Gold에 의해 처음으로 소개되었고, 전체 SELEX 과정은 Tombelli 등에 의해 광범위하게 검토되었다. 새로운 DNA 앵타머는 5' 및 3' 한정된 염기 서열 측면에 임의로 만들어진 염기 서열로부터 만들어진다. 이중 가닥 DNA(dsDNA)의 1차 거대 풀은 PCR을 통해 만들어지는데, 이는 단일 가닥 DNA(ssDNA)로 전환되며 스타터 라이브러리를 형성한다.

앵타머의 분리는 관심 있는 분자를 핵산의 스타터 라이브러리와 반응시킴으로써 시작된다. 결합하지 않거나 결합력이 약한 뉴클레오티드들은 표적 물질과 결합하는 앵타머들로부터 분리된다. 표적 분자가 클 때에는 여과법이나 원심분리법으로 분리하고, 표적 분자가 작을 때에는 친화 크로마토그래피로 분리한다. 표적 분자에 특이적으로 결합하는 앵타머만 얻기 위해서는 표적 분자의 상대가 되는 물질을 이용한 음성 선택(negative selection)이

사용될 수 있다.

그 다음 단계로 표적 물질과 결합된 앵타머는 분리, 용출, 수집되어 증폭되면서 선택되는 분자의 수를 줄여간다. 이 반복되는 선택 단계를 통해 동일한 결합 특성을 지니거나 동일한 염기 서열을 지닌 분자 풀을 만들게 된다. 선택된 앵타머의 서열과 구조는 핵산 분자의 클로닝과 염기서열분석을 통해 결

정되며, 앵타머의 서열이 결정되면 화학합성법에 의해 양적으로 더 많은 카피수의 앵타머를 일상적으로 생산할 수 있다. 이와 같은 점이 항체 생산이 지니는 단점들, 즉 세포 배양과 같은 비용이 많이 들고 높은 기술 수준을 요구하는 점들에 비해 장점을 가지고 있다. 또한 앵타머 염기 서열의 체계적인 변형에 의해 다양한 환경과 시료 매트릭스에서

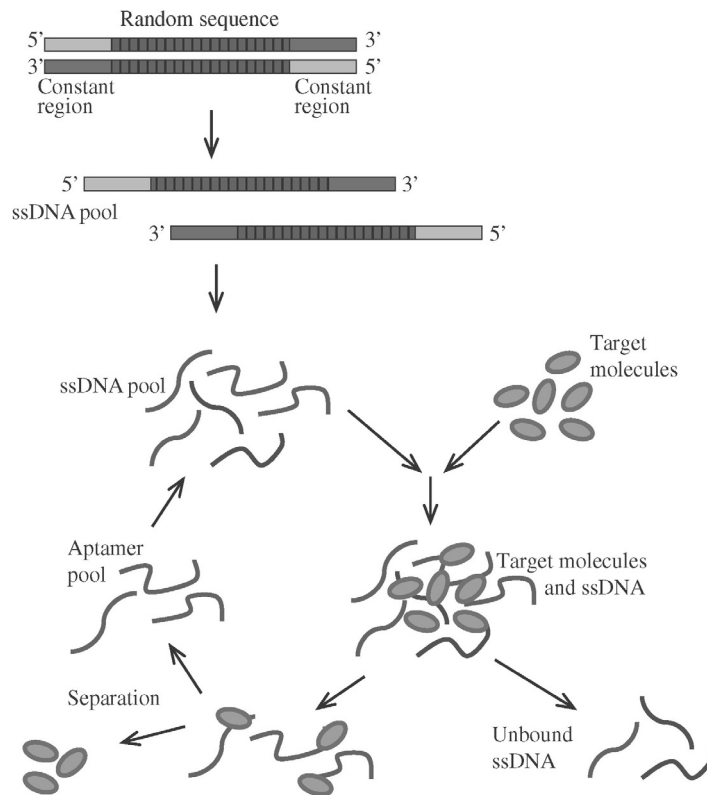


Fig. 4. Scheme of the selection of DNA aptamers. Double stranded DNA (dsDNA) oligonucleotide library containing a randomised nucleotide sequence is synthesised and amplified by PCR, dsDNA is strand separated to single-stranded DNA (ssDNA). The target material is incubated with the ssDNA pool and the non-specific or low-affinity binding nucleic acid molecules are removed. To obtain a new enriched DNA library the captured molecules has to be eluted, recovered and amplified by PCR. The whole cycle is repeated until obtaining a specific population of DNA. Finally the DNA is isolated and characterised.

사용되기 위해 더 잘 적응된 분자들을 생산할 수 있다.

앵타머 표적 물질

앵타머가 표적 물질에 결합하는 방식은 비공유 결합으로서 수소결합, 정전기적 상호작용, 반데르발스 상호작용, 소수성 상호작용이다. 보통의 핵산 결합(A와 U, T 또는 G와 C)은 일어나지 않는다. 항체-항원 반응과 유사하게, 표적 물질의 전체적 3D 모양이나 전하가 선택된 앵타머의 결합 친화력의 강도를 결정한다. 앵타머가 결합할 수 있는 표적 물질은 단백질, 펩타이드, 탄수화물, 다당류, 당단백, 지질, 호르몬, 수용체, 항원, 알리진, 항체, 기질, 대사물, 보조인자, 저해제, 약물, 비타민 등이다. 가장 좋은 앵타머 표적 물질은 상호작용 표면적이 넓은 단백질과 같은 거대 분자이다. 표적 물질은 안정되어야 하고 선택과 증폭을 용이하게 하기 위해 앵타머와 표적물질의 분배가 가능하도록 변형될 수 있다면 유용하다. 선택성이 높은 앵타머는 아미노산인 L-arginine, 발암성의 아로마틱 아민류, 독소들, 세균성 포자와 결합한다. Zn^{2+} 와 같은 이온은 앵타머의 결합 특성을 증진시켜준다.

프리온

치명적인 신경퇴행성질환인 사람의 크로이츠펠트-야콥병과 소의 우해면양뇌증(광우병)은 세포 내 프리온(prion) 단백질의 접힘 이상으로 생긴다. 정상 세포 프리온 단백질의 아미노산 배열(PrP^c)은 병을 유발하는 이소형태(PrP^{Sc})와 동일하다. Takemura

등은 재조합된 사람의 세포 프리온 단백질에 대한 DNA 앵타머를 선택했다. 선택된 앵타머는 재조합 및 포유동물의 PrP^c 와 결합하였고, PrP^{Sc} 나 다른 신경 단백질과는 결합하지 않았다. 이것은 앵타머가 비정상적인 프리온 단백질에 특이적으로 생산될 수 있고, 보건과 안전 응용범위에서 진단 과정의 기초를 형성할 수 있다.

바이러스

앵타머는 바이러스와 같은 복잡한 표적물질 구조와 결합에도 응용될 수 있다. Nitsche 등은 Vaccinia 바이러스에 결합하는 높은 친화력의 DNA 앵타머의 응용을 보고하였다. 선택에 사용되는 방법은 MonoLEX라고 불리는 새로운 윈스텝 선택 방법이었으며, 그 결과 64-base 앵타머가 특이적으로 orthopoxviruses와 결합하였다. 또한 이 앵타머는 농도-의존적인 방식으로 Vaccinia 바이러스나 다른 orthopoxviruses의 *in vitro* 감염을 억제하는 능력을 지녔다. Symensma 등도 바이러스와 결합하는 앵타머에 대하여 연구하였는데, RNA 앵타머 중에 human immunodeficiency virus(HIV) type 1 Rev 단백질과 단단히 상호작용하는 것이 선택되었다. Lee 등은 짧은 RNA 올리고머들이 HIV 조절 단백질 Tat의 결합을 막는다는 것을 제시하였다. Rev 및 Tat 단백질은 모두 HIV-1 복제에 필수적이다. 사람의 인플루엔자 A 바이러스 subtype H3N2는 역시 앵타머로 검출되었다. 이 연구에서 다른 사람의 인플루엔자 바이러스에 대해서가 아니라 단지 subtype H3N2에 특이적으로 결합하는 것을 찾아내려고 *in vitro*법을 이용하였다. 바이러스와 앵타머의 상호작용 연구 결과는 앵타머를 여러 매트

리스로부터 바이러스 검출에 적용할 수 있음을 제시함으로써 앵타머 기반 기술이 잠재적으로 오염된 환경이나 식품 매트릭스 내 병원성 바이러스를 검출하는데 사용될 수 있다는 것을 시사한다.

프로토조아(Protozoa)

아프리카 트리파노소마는 수면병 같은 기생충 질환을 유발하는 일종의 기생충이다. 이것은 일반적으로 PCR 방법으로 검출되지만, Kuboki 등은 loop-mediated isothermal amplification(LAMP)법과 퀵타이드-핵산 probe로 형광 in situ hybridisation 법과 같은 다른 실험법을 소개하였다. 아프리카 트리파노소마를 검출하기 위해 기생충 편모의 표면 단백질에 결합하는 세 종류의 앵타머를 분리하였으며, Lorger 등은 *Trypanosoma brucei* subsp. *brucei*의 표면 당단백질에 결합하는 작고 혈청에 안정한 RNA를 성공적으로 선택하였고, 앵타머 배열, 특정 표적물질 분자 위치와 앵타머 예측 2차 구조가 보고되었다. 이것은 세포 전체가 표적 물질이 되는 첫 번째 예이다.

미생물

미생물의 표면 단백질을 앵타머의 표적 물질로 하여 미생물의 성장을 억제하거나 감소시킬 수 있으며 독소의 생산을 억제할 수 있다. 앵타머는 정제된 표적 물질에 대해 선택되지만 또한 전체 미생물 세포와 결합되기 위해 선택될 수 있다.

*Francisella tularensis*는 tularaemia를 일으키는 고감염성 병원성 세균이고, 생물학적 테러 위협 물질로 사용될 수 있다. *Francisella tularensis* subsp.

japonica 항원에 특이적이고 친화력이 큰 독특한 DNA 염기 서열이 밝혀졌다. 결합 특이성과 친화력이 dot blot assay 뿐만 아니라 aptamer-linked immobilised sorbent assay(ALISA)로 불리는 항체 기반 ELISA법에 의해 설명되었다. 또한 앵타머가 tularaemia의 검출과 확인을 위한 스크리닝 도구로서 사용될 수 있도록 선택되었고 이들의 아종과 결합하는 능력도 확인되었다.

Cao 등의 연구에서 다섯 가지 다른 ssDNA 앵타머는 *S. aureus*의 다른 세포 표면 구성성분에 특이적으로 검출의 민감성을 증진시킬 수 있도록 전체 세균 세포를 표적으로 하였다. *S. enterica* serovar Typhimurium의 포획과 검출을 위한 DNA 앵타머는 Joshi 등에 의해 선택되고 평가되었다. 그들은 앵타머가 전 세균 세포의 포획과 후속의 병원성 세균의 검출을 위한 고 친화 리간드로서 사용될 수 있다고 제시하였는데 바깥쪽 막 단백질이 분리되고 앵타머들의 이들 막 단백질과 결합하기 위해 선택된다. 비면역자성 포획법은 분변 시료 또는 대표적인 식품 매트릭스로부터 전체 미생물 세포를 농축하기 위해 사용될 수 있다. *S. enterica* serovar Typhimurium이 모델 생물체로서 앵타머를 만들기 위해 사용되었으며 복잡한 식품 매트릭스로부터 PCR 검출법에 적용될 수 있다.

여러 가지 적용 분야

의약품

핵산과 결합하지 않고 단백질에만 특이적인 단일사슬 DNA 앵타머가 *in vitro*에서 선택되었는데

그것이 트롬빈 결합 앵타머이다. 이 앵타머는 높은 친화력과 특이성을 가지고 리셉터와 결합을 막고 단백질 활성을 저해함으로써 강력한 항응고능을 나타낸다. 그 구조와 결합특성은 이미 잘 연구되어 있는데 Mir 등은 트롬빈 검출을 위해서 전기화학적 앵타센서의 세 가지 다른 배열을 사용했다. 트롬빈과 앵타머의 상호작용은 트롬빈 효소 반응에 의해 생산되는 *p*-nitroaniline의 정량화로 검출된다. 검출에 사용되는 다른 방법은 효소와 결합된 샌드위치 형태이다. 세 번째 트롬빈 결합 방법은 바이오틴 표시가 된 앵타머와 반응시키는 것이다. 이 바이오틴이 streptavidin-HRP(horseradish peroxidase)와 결합한 후 peroxidase 촉매 반응의 전기화학적 검출로 정량화된다. 앵타머 기반 방법들은 또한 전통적인 ELISA test에 대한 진단 목적으로 사이토키인과 성장인자 분석에 사용되어 왔다. 즉 혈소판 유래 성장 인자(platelet-derived growth factor, PDGF), 항혈관상피세포 성장인자(anti-vascular endothelial growth factor, VEGF) 등과 같은 성장인자를 대상으로 하였으며, VEGF 앵타머는 나이와 관련된 남성 퇴화의 치료제(pegaptanib)로서 사용되었다.

앵타머는 특정 세균 감염의 치료 목적으로 사용되기도 한다. Pan 등은 RNA 앵타머가 사람의 THP-1 세포로 *S. enterica* serovar Typhimurium이 진입하는 것을 크게 저해할 수 있다고 발견하였다. 이런 형태의 앵타머는 세균 형태 IVB pilus-숙주 상호작용의 분석의 도구로 사용되고, *S. enterica* serovar Typhimurium 감염에 대한 새로운 약물 개발에 정보를 제공할 수 있다. Chen 등의 연구에서 병원성 *Mycobacterium tuberculosis*(H37Rv)와 결합하는 고친화력 앵타머를 발견하기 위해 전 세균 SELEX 전략을 사용하였다. NK2로 불리는 분리

된 앵타머는 효과적으로 H37Rv의 표면 단백질 구성분을 저해하고, 세균 수를 감소시키며, 마우스 모델에서 생존을 연장시켰다고 보고하였다.

생물학적 테러 위협 물질 (Biological Terrorist Threat Agents)

전통적인 분석 기법은 주로 미생물 세포, 포자, 바이러스, 독소 등과 같은 생물학적 테러 위협 물질의 검출에 주로 사용되어 왔다. 검출법과 시약들은 일반적으로 표적 물질에 따라 달라지는데, 특이적이고 민감한 핵산 기반 방법이 사용되어 왔다. 면역학 기반 검출 시스템이 빠르고 단단한 방법이라 현재 널리 사용되고 있다. 생물학적 테러 위협 물질을 검출하는데 사용되어 온 앵타머는 강력한 생물학적 무기인 *Bacillus anthracis*로부터 감염성 anthrax 포자의 검출이나 리신, 그람음성균 *Francisella tularensis*의 검출에 사용되어왔다.

식품 안전성 및 품질 보증

항체와 같은 생분자 리간드의 사용에 근거한 분석법은 널리 사용되고 있으며, 그것의 대체물로서 앵타머가 쉽게 예상될 수 있다. 빠르고 일관성 있는 새로운 분석법의 잠재력이 앵타머의 개발과 이용을 통해 또한 제시된다. 한 가지 흥미 있는 앵타머의 응용은 세균의 세포 내 소통인 Quorum Sensing (QS)으로 방해받을 수 있다. 세균 세포는 자동유도 물질(autoinducer)이라고 불리는 분비하고 받는 화학적 신호들에 의해 세균의 밀도에 따라 서로 의사소통하고 그들의 행태를 조절할 수 있다. 잠정적으로 성장 신호를 받는 수용체들은 앵타머들 또는 세

균의 성장을 억제하는 신호분자 유전자 발현을 조절하는 분자들과 결합하는데 표적화된 앵타머들에 의해 저해될 수 있다.

전체 세균을 이용한 병원균에 대한 민감한 분석법을 개발하는데 도전이 되는 것은 세균 세포 표면에 많은 수의 단백질이 존재한다는 사실이다. 그러나 단일한 분자 표적 물질이라기보다 동시에 전 세균 세포에 대한 몇몇 부위를 표적화하는 것은 검출의 민감성을 증가시킬 수 있다. 이 표면 단백질에 결합할 수 있는 한 개 이상 앵타머의 선택 및 여러 가지 표적 물질에 특이적인 앵타머 혼합물의 후속의 이용은 단일 표적 물질에 특이적인 앵타머를 이용하는 것과 비교하여 요구되는 검출 수준을 제공할 수 있다. 식품 유래 미생물 병원균의 검출을 위한 분자 진단 개발 및 응용에 대해 다른 도전이 되는 점은 시료 매트릭스의 복잡성이다. 식품 시료에 존재하는 매트릭스 구성성분은 방해물 초래할 수 있으므로, 미생물 표적 물질의 분리, 농축, 정제는 검출과 확인을 위해 여전히 필수적이라 할 수 있다. 그러나 실제로 복잡한 매트릭스 내에서의 앵타머의 작용 능력은 시간이 많이 소요되고 경비가 많이 드는 과정에 대한 필요가 궁극적으로 줄어들거나 사라질 수 있다고 제안한다. 가열 살균하거나 살아있는 *Campylobacter jejuni*를 완충액이나 쇠고기 추출물, 치킨 주스, 우유와 같은 다른 식품 매트릭스로부터 검출에 앵타머가 사용될 수 있다고 보고되었다.

앞으로의 전망

병원성 또는 변태 미생물에 대한 여러 가지 검출

시스템은 이미 존재하나 시간이 많이 소요된다. 이러한 제한점은 늘어나는 인구와 그대로 또는 단순 조리 과정을 거쳐 섭취할 수 있도록 가공된 즉석섭취식품 형태의 제품을 선호하는 소비자의 트렌드에 따라 초기 생산과 소비 사이의 시간을 감소시키고 그렇기 때문에 식중독균에 대한 잠정적 노출에 대해 소비자를 보호하는 빠른 진단법이 필요성을 증가시켰다. 앵타머는 세균의 검출에서 미래의 식품 안전에서 사용되는 커다란 잠재력을 지닌 것으로 보여 진다. 앵타머는 농축이 필요 없이 식품 매트릭스에서 검출할 수 있는 직접적인 검출법을 개발할 수 있는 잠재력을 지니고 있다. 또한 결합 특이성과 대량 생산 합성이 가능하기 때문에 식품 매트릭스 내에서 세균의 성장을 저해하거나 또는 숙주 세포 표면에 결합하는 것을 저해해서 감염을 막는데 유용하다. 현재 연구는 전체 미생물 세포에 특이적인 앵타머의 빠른 선택법에 대한 연구와 앵타머 검출 시스템에서 사용되는 biomolecular ligand의 수행능력에 대한 연구가 진행 중이며 이는 식품 매트릭스 내 식품 유래 병원균의 검출에 적용될 수 있다.

더 연구되어야 할 부분은 다른 미생물과 결합하는 특이적인 앵타머를 빠르게 선별하는 것과 실험실 환경에서 현장으로 전환될 수 있는 앵타머 기반 검출법을 개발하는 것이다. 항체 기반 검출 시스템에서 앵타머와 같은 다른 생분자 리간드를 사용하는 시스템으로의 변화가능성은 동물 이용의 제거와 같은 몇몇 부가적인 윤리적 실질적 이익을 제공하고, 항체와 관련한 고유한 생물학적인 다양성을 제거함으로써 키트나 장치 생산에 적합한 표준화하는 물질의 생산 능력을 제공할 수 있다.

● 자료출처 ●

Kärkkäinen RM, Drasbek MR, McDowall I, Smith CJ, Young NWG, Bonwick GA, Aptamers for safety and quality assurance in the food industry: detection of pathogens, International Journal of Food Science and Technology, **46**, 445-454, 2011

이 나 리 이학박사

소 속 : 한국식품연구원 안전성연구단
전문분야 : 분자미생물학, 위해미생물검출 및
특성분석

E-mail : nari@kfri.re.kr

T E L : 031-780-9182

본 내용은 자료 출처의 원문을 번역 기술한 것입니다.