



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년07월11일

(11) 등록번호 10-2684373

(24) 등록일자 2024년07월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 307/92 (2006.01) *C09K 11/06* (2006.01)
C12Q 1/04 (2017.01) *G01N 21/64* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07D 307/92 (2013.01)
C09K 11/06 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2023-0010020
(22) 출원일자 2023년01월26일
심사청구일자 2023년01월26일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020180129253 A
KR102318379 B1
KR101524915 B1
허광일 외., Research in Plant Disease, Vol.
23, No. 4, 2017, pp. 306-313.

(73) 특허권자
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경
희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
김도경
서울특별시 동대문구 경희대로 26 경희대학교 의
과대학 의학관 518호
진지혜
전라북도 익산시 궁동로 151-9, 102동 1603호
(74) 대리인
위병갑

전체 청구항 수 : 총 15 항

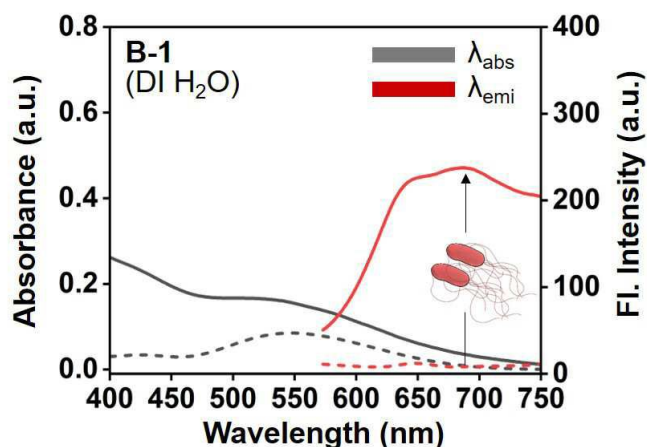
심사관 : 이민영

(54) 발명의 명칭 **과수화상병 원인균 검출용 형광체 및 이의 용도**

(57) 요약

본 발명은 형광을 기반으로 과수화상병을 진단하기 위한 형광체 화합물 및 이의 용도에 관한 것으로, 상기 화합물은 과수화상병의 원인균인 에르위니아 아밀로보라(*Erwinia amylovora*)를 선택적으로 감지하여 붉은색 형광을 방출할 수 있으며, 빠른 진단 속도와 높은 민감성을 가지므로, 전문 장비의 필요 없이 분무 또는 면봉을 이용하는 것과 같이 다양하고 간편한 방법으로 과수화상병의 진단에 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

C12Q 1/04 (2013.01)
C09K 2211/1088 (2013.01)
C12Q 2304/00 (2013.01)
G01N 2021/6439 (2013.01)
G01N 2333/27 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345352778
과제번호	NRF-2018-R1A6A1A03025124
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중점연구소 지원사업
연구과제명	활성산소 조절을 통한 만성질환 예방 치료에 관한 연구
기 여 율	10/100
과제수행기관명	경희대학교 산학협력단
연구기간	2022.03.01 ~ 2023.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711158125
과제번호	NRF-2021- M3A9I5030523
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	원천기술개발사업
연구과제명	형광 이미징 기반 비파괴 방식의 화상병 진단 기술 개발
기 여 율	90/100
과제수행기관명	경희대학교 산학협력단
연구기간	2022.01.01 ~ 2022.12.31

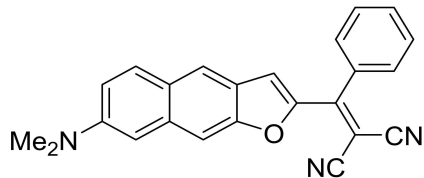
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물:

[화학식 1]



청구항 2

제1항에 있어서,

상기 화합물은 과수화상병 원인균 감지가 가능한 형광체인 것인, 화합물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 화합물은 에르위니아 아밀로보라(*Erwinia amylovora*)와 반응하여 붉은색 형광을 방출하는 것인, 화합물.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 화합물은 에르위니아 아밀로보라의 농도가 증가할수록 방출되는 형광이 증가하는 것인, 화합물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 화합물은 과수화상병 진단용으로 사용 가능한 것인, 화합물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 화합물은 과수화상병이 감염된 개체에서 형광을 나타내는 것인, 화합물.

청구항 7

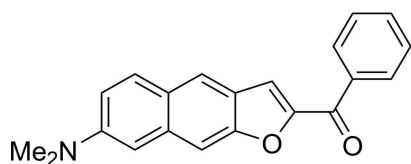
제5항에 있어서,

상기 화합물을 과수화상병이 감염된 개체 표면에 스왑(swap), 도포 또는 분무하여 UV 파장의 빛을 조사하였을 때 발생하는 형광을 측정하여 과수화상병 감염 여부를 진단하는 것인, 화합물.

청구항 8

하기 화학식 2로 표시되는 화합물 2를 말로노나이트릴(malononitrile)과 반응시켜 제1항의 화학식 1로 표시되는 화합물을 수득하는 단계;를 포함하는 제1항의 화합물의 제조방법:

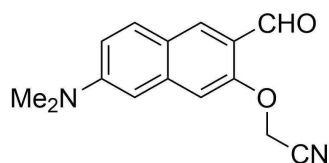
[화학식 2]



청구항 9

제8항에 있어서, 상기 화합물 2는 하기 화학식 3으로 표시되는 화합물 3을 페닐보론산(phenyl boronic acid), 트리플루오로아세트산(trifluoroacetic acid), 팔라듐(II) 트리플루오로아세테이트(palladium(II) trifluoroacetate) 및 6,6'-다이메틸-2,2'-다이피리딜(6,6'-dimethyl-2,2'-dipyridyl)과 반응시켜 수득하는 것인, 제1항의 화합물의 제조방법:

[화학식 3]



청구항 10

제9항에 있어서,

상기 화합물 3은 6-(다이메틸아미노)-3-하이드록시-2-나프탈데하이드(6-(Dimethylamino)-3-hydroxy-2-naphthaldehyde)를 브로모아세토나이트릴(bromoacetonitrile) 및 포타슘 카보네이트(potassium carbonate)와 반응시켜 수득하는 것인, 제1항의 화합물의 제조방법.

청구항 11

제1항의 화합물을 포함하는, 에르위니아 아밀로보라(*Erwinia amylovora*) 검출용 조성물.

청구항 12

제1항의 화합물을 시료에 첨가하여 발생하는 형광을 측정하는 단계를 포함하는, 에르위니아 아밀로보라(*Erwinia amylovora*) 검출 방법.

청구항 13

제1항의 화합물을 포함하는, 과수화상병 진단용 조성물.

청구항 14

제1항의 화합물을 과수화상병 감염 의심 시료에 첨가하여 발생하는 형광을 측정하는 단계를 포함하는, 과수화상병 진단 방법.

청구항 15

제1항의 화합물 및 에르위니아 아밀로보라(*Erwinia amylovora*)를 포함하는, 과수화상병 방제용 물질 스크리닝용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 과수화상병 원인균 검출 및 과수화상병 진단용 형광체 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 과수화상병(fire blight)은 배, 사과, 살구 등 장미과 속 식물을 기주로 하며 에르위니아 아밀로보라(*Erwinia*

amylovora; *E. amylovora*)를 병원체로 하는 대표적인 식물감염병이다. 과수화상병에 감염된 식물은 불에 탄 것과 같이 마르거나 검게 변하는 증상을 보이며 꽃, 잎, 가지, 과실 등 식물의 모든 기관에서 나타날 수 있다. 과수화상병의 질병 주기에 따르면, *E. amylovora*는 주로 나뭇가지나 발병 부위에서 낮은 농도로 월동하고, 봄에 곤충, 비, 바람 등을 매개로 하여 전파된다. 특히, 식물의 주요 기관 중 하나인 꽃에 *E. amylovora*가 노출되면 감염 개체 전체 및 주위 토양으로의 감염을 야기한다.

[0003] 과수화상병은 한 번 발병하면 방제가 어렵고, 전파 속도가 빨라 감염된 식물은 바로 소각 및 매몰이 불가피하다. 우리나라에서도 2015년 경기도 안성의 일부 과수원에서 최초로 발병된 후 매년 발병 사례가 나타나고 있으며, 발병 지역이 확대됨에 따라 감염 과수를 처분하기 위한 시간적, 경제적 비용이 계속해서 증가하고 있다.

[0004] 따라서 과수화상병의 방제를 위해서는 감염이 확대되기 전 감염된 식물에 존재하는 원인균을 정확하게 검출하는 것이 필수적이다. 기존의 과수화상병의 진단 방법은 PCR 및 DNA 기반 진단 스트립에 의존하고 있다. PCR 기반 진단 방법은 높은 민감도를 가지지만, 전문가와 전문 장비를 필요로 하여 현장 적용성이 떨어진다는 한계를 가진다. 또한 DNA 기반 진단 스트립의 경우에는 다소 파괴적인 방법으로 시료를 채취하는 전처리 과정을 수반하고 있어 추가적인 병원균 누출이 발생할 수 있다.

[0005] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 현장에서의 적용이 가능하고, 비파괴적이며 신속한 과수화상병 진단 방법을 개발하고자 노력한 결과, *E. amylovora*를 특이적으로 염색할 수 있는 형광체를 개발하였고, 해당 형광체를 이용하여 실제 과수 식물에서 *E. amylovora*를 검출할 수 있음을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-1524915호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 에르위니아 아밀로보라(*Erwinia amylovora*) 검출용 및 과수화상병 진단용 형광체 화합물 및 이와 관련된 진단 방법을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 화합물의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 화합물을 포함하는 에르위니아 아밀로보라(*Erwinia amylovora*) 검출용 및 과수화상병 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

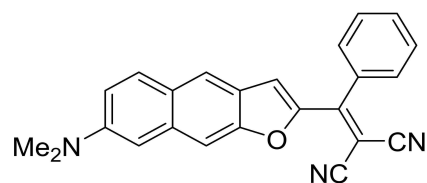
[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 화합물을 이용한 에르위니아 아밀로보라(*Erwinia amylovora*) 검출 방법 및 과수화상병 진단 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여,

[0012] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 제공한다:

[0013] [화학식 1]

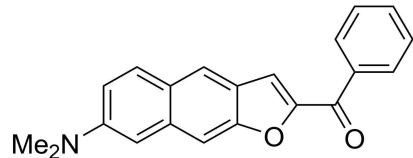


[0014]

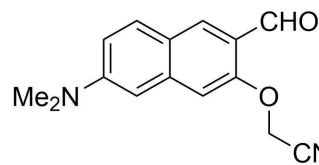
[0015] 또한, 본 발명은 6-(다이메틸아미노)-3-하이드록시-2-나프탈데하이드(6-(Dimethylamino)-3-hydroxy-2-naphthaldehyde)를 브로모아세토나이트릴(bromoacetonitrile) 및 포타슘 카보네이트(potassium carbonate)와

반응시켜 하기 화학식 3으로 표시되는 화합물 3을 수득하는 단계; 상기 화합물 3을 페닐보론산(phenylboronic acid), 트리플루오로아세트산(trifluoroacetic acid), 팔라듐(II) 트리플루오로아세테이트(palladium(II) trifluoroacetate) 및 6,6'-다이메틸-2,2'-다이피리딜(6,6'-dimethyl-2,2'-dipyridyl)과 반응시켜 하기 화학식 2로 표시되는 화합물 2를 수득하는 단계; 및 상기 화합물 2를 말로노나이트릴(malononitrile)과 반응시켜 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 수득하는 단계;를 포함하는 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법을 제공한다:

[화학식 2]



[화학식 3]



나아가, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는, 에르위니아 아밀로보라(*Erwinia amylovora*) 검출용 조성물을 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 이용한 에르위니아 아밀로보라(*Erwinia amylovora*) 검출 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는, 과수화상병 진단용 조성물을 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 이용한 과수화상병 진단 방법을 제공한다.

더 나아가, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 및 에르위니아 아밀로보라(*Erwinia amylovora*)를 포함하는, 과수화상병 방제용 물질 스크리닝용 조성물 및 이를 이용한 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

본 발명에서 합성된 형광체 화합물 B-1은 과수화상병의 원인균인 에르위니아 아밀로보라(*Erwinia amylovora*)를 감지하여 붉은색 형광을 방출할 수 있고, *E. amylovora*에 높은 선택성과 민감도를 갖는 효과가 있다.

또한, 상기 화합물은 전문 장비의 필요 없이 분무 또는 면봉을 이용하는 것과 같이 다양하고 간편한 방법으로 시료에 도포하여 UV 파장의 빛을 조사해 형광을 확인하는 간단한 절차를 통해 과수화상병 감염 여부를 진단할 수 있으므로, 과수화상병의 진단에 유용하게 활용될 수 있으며, 특히, 기존의 과수화상병 진단 방법인 PCR, DNA 기반 진단 스트립과 비교하였을 때에도 빠른 속도와 높은 민감성을 가지므로, 단 시간 내에 *E. amylovora*를 검출할 수 있어 과수농가와 같은 현장에서 이용하기에 적합하다.

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명의 과수화상병 원인균(*Erwinia amylovora*) 특이적 형광체(B-1)의 합성 방법을 나타낸 모식도이다. 각 합성 단계는 다음과 같은 조건 하에 진행되었다. (a) Bromoacetonitrile, K_2CO_3 , DMF, $50^\circ C$, 2 h. (b) Phenylboronic acid, $Pd(TFA)_2$, 6,6'-dimethyl-2,2'-dipyridyl, trifluoroacetic acid (TFA), 2-MeTHF, $80^\circ C$, 24 h. (c) Malononitrile, pyridine, $70^\circ C$, overnight.

도 2는 *E. amylovora*에 의한 B-1의 흡수 및 형광 변화를 나타낸 그래프이다.

도 3은 *E. amylovora*의 농도에 따른 B-1의 형광 증가를 나타낸 그래프이다.

도 4는 B-1의 *E. amylovora* 검출 한계를 나타낸 그래프이다.

도 5는 B-1의 *E. amylovora* 반응 시간에 따른 형광 변화 그래프이다.

도 6은 B-1의 *E. amylovora* 염색 능력을 나타낸 도면으로, B-1과 DAPI를 함께 염색하였다.

도 7는 B-1을 분무하여 실제 식물 표면에 존재하는 *E. amylovora*를 감지하는 방법 및 결과를 나타내는 도면이다: (a) B-1을 분무하여 *E. amylovora*를 검출하는 방법에 대한 모식도; (b) B-1을 분무하여 애기사과와 사과나무 꽃에 존재하는 다양한 농도의 *E. amylovora*를 검출한 결과; (c, d) (b)의 형광 변화를 나타낸 그래프; 및 (e) (b)의 실험을 교차 검증하기 위하여 PCR을 진행한 결과.

도 8는 B-1을 분무하거나, 면봉을 이용하여 실제 식물 표면에 존재하는 *E. amylovora*를 감지하는 방법 및 결과를 나타내는 도면이다: (a) B-1을 분무하거나, 면봉을 이용하여 실제 식물 표면에 존재하는 *E. amylovora*를 감지하는 방법을 나타낸 모식도; (b) B-1을 분무하여 사과나무 가지에 존재하는 *E. amylovora*를 검출한 결과; 및 (c, d) 면봉에 B-1 용액을 적셔 사과나무 꽃과 잎에 존재하는 *E. amylovora*를 검출한 결과.

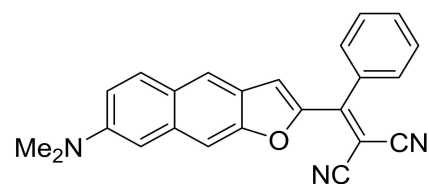
도 9는 B-1을 분무하여 농기구 표면에 존재하는 *E. amylovora*를 감지하는 방법 및 결과를 나타내는 도면이다: (a) B-1을 분무하여 농기구 표면에 묻은 *E. amylovora*를 감지하는 방법을 나타내는 모식도; 및 (b) B-1을 분무하여 농기구 표면에 존재하는 *E. amylovora*를 검출한 결과.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 본 발명자들은 기존의 과수화상병 진단 방법인 PCR 또는 DNA 기반 진단 스트립이 가지는 시간적, 공간적 문제를 극복한 새로운 진단 방법을 개발하고자 노력하였으며, 과수화상병 원인균(*Erwinia amylovora*)에 특이적으로 반응할 수 있는 화합물을 고안하고, 그 화합물이 *E. amylovora*와 반응하여 형광 증가를 유발할 수 있음에 착안하여 본 발명의 형광체를 개발하게 되었다.

[0030] 본 발명의 일 양상은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 제공한다:

화학식 1



- [0031]
- [0032] 본 발명의 실시예에서는 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 'B-1'로 명명하여 표기하였다.
- [0033] 본 발명의 일구현예에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 과수화상병의 원인균인 감지가 가능한 형광체일 수 있다. 상기 과수화상병의 원인균은 에르위니아 아밀로보라(*Erwinia amylovora*)일 수 있다.
- [0034] 본 발명의 일구현예에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 에르위니아 아밀로보라에 선택적, 특이적으로 반응하는 것일 수 있으며, 에르위니아 아밀로보라와 반응하여 붉은색 형광을 방출하는 것일 수 있고, 에르위니아 아밀로보라의 농도가 증가할수록 방출되는 형광이 증가하는 것일 수 있다.
- [0035] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 식물 및 사물에 존재하는 에르위니아 아밀로보라를 염색하여 시각화할 수 있다.
- [0036] 본 발명의 일 실시예에서는, 본 발명에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 화합물에 *E. amylovora*를 처리할 경우 686 nm에서 형광이 크게 증가하는 것을 확인하였으며(실시예 2), *E. amylovora*의 농도가 증가함에 따라 형광 또한 증가하는 것을 확인하였다(실시예 3).
- [0037] 본 발명의 다른 실시예에서는, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 최대 10^2 CFU/mL의 *E. amylovora*까지 검출이 가능함을 확인하였으며(실시예 4), 10분 내에 빠른 형광 증가를 보여주었다(실시예 5).
- [0038] 본 발명의 다른 실시예에서는, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물이 살아 있는 *E. amylovora*의 염색이 가능하며, 공초점 레이저 스캐닝 현미경 촬영을 통해 붉은색 형광을 방출하는 것을 보여주었다(실시예 6).
- [0039] 본 발명의 다른 실시예에서는, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물이 사물 및 식물 표면에서의 *E. amylovora*의 검

출이 가능함을 확인하였다(실시예 7-9). 실시예 7, 8에서 사과나무 열매, 가지, 꽃 등에서 10^2 CFU/mL 까지의 *E. amylovora*를 효과적으로 검출하였고, 분무하는 방법, 먼봉을 이용하는 방법 등의 응용 가능성을 확인하였다. 또한 실시예 9에서는 농기구 표면에 있는 *E. amylovora*도 효율적으로 검출할 수 있음을 확인하였다.

[0040] 이에 따라, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 과수화상병의 원인균인 에르위니아 아밀로보라(*Erwinia amylovora*)에 특이적 형광 방출을 이용하여, 과수화상병 감염 여부를 확인하는데 적용할 수 있다.

[0041] 본 발명의 일구현예에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 과수화상병 진단용으로 사용 가능한 것일 수 있다.

[0042] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 과수화상병이 감염된 개체에서 형광을 나타내는 것일 수 있다.

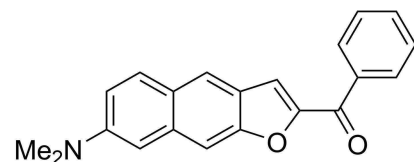
[0043] 상기 과수화상병이 감염된 개체는 과수화상병이 발생할 수 있는 식물, 과수화상병이 감염된 식물이 식재된 토양, 및 과수화상병이 감염된 식물 또는 토양과 접촉된 기구 또는 장비를 모두 포함하는 것일 수 있다. 상기 식물은 과수일 수 있고, 예를 들어, 사과, 마가목 및 장미과 식물로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 상기 기구 또는 장비는 농기구 등을 포함하는 것일 수 있고, 예를 들어, 전정가위, 모종삽 등을 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0044] 본 발명의 일구현예에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 과수화상병이 감염된 개체 표면에 스왑(swap), 도포 또는 분무하여 UV 파장의 빛을 조사하였을 때 발생하는 형광을 측정하여 과수화상병 감염 여부를 진단하는 것일 수 있다.

[0045] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 UV 파장의 빛은 손전등, 랜턴 또는 램프를 이용하여 조사하는 것일 수 있다. 상기 UV 파장의 빛은 350 내지 370 nm의 파장일 수 있고, 바람직하게는 360 내지 370 nm일 수 있으며, 365 nm 파장의 빛을 조사하는 것이 가장 바람직하다.

[0047] 본 발명의 다른 양상은 하기 화학식 2로 표시되는 화합물 2를 말로노나이트릴(malononitrile)과 반응시켜 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 수득하는 단계;를 포함하는 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법을 제공한다:

화학식 2

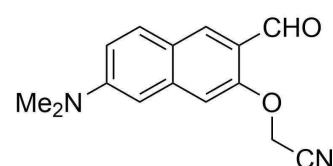


[0048]

[0049] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 수득하기 위한 반응은, 상기 화합물 2 및 말로노나이트릴을 피리딘(pyridine)에 녹여 반응시키는 것일 수 있다.

[0050] 본 발명의 일구현예에 있어서, 상기 화합물 2는 하기 화학식 3으로 표시되는 화합물 3을 페닐보론산(phenylboronic acid), 트리플루오로아세트산(trifluoroacetic acid), 팔라듐(II) 트리플루오로아세테이트(palladium(II) trifluoroacetate) 및 6,6'-다이메틸-2,2'-다이피리딜(6,6'-dimethyl-2,2'-dipyridyl)과 반응시켜 수득하는 것일 수 있다:

화학식 3



[0051]

[0052] 상기 화합물 2를 수득하기 위한 반응은, 상기 화합물 3을 페닐보론산, 트리플루오로아세트산, 팔라듐 트리플루

오로아세테이트 및 6,6'-다이메틸-2,2'-다이피리딜을 2-메틸테트라하이드로퓨란(2-methyltetrahydrofuran; 2-MeTHF)에 녹여 반응시키는 것일 수 있다.

[0053] 본 발명의 일구현예에 있어서, 상기 화합물 3은 6-(다이메틸아미노)-3-하이드록시-2-나프탈데하이드(6-(Dimethylamino)-3-hydroxy-2-naphthaldehyde)를 브로모아세토나이트릴(bromoacetonitrile) 및 포타슘카보네이트(potassium carbonate)와 반응시켜 수득하는 것일 수 있다.

[0054] 상기 화합물 3을 수득하기 위한 반응은, 상기 6-(다이메틸아미노)-3-하이드록시-2-나프탈데하이드와 브로모아세토나이트릴 및 포타슘 카보네이트를 다이메틸폼아마이드(*N,N*-Dimethylmethanamide; DMF) 내에서 혼합하여 반응시키는 것일 수 있다.

[0055] 본 발명의 일구현예에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법은 도 1과 같이 나타낼 수 있으며, 바람직하게는, 6-(다이메틸아미노)-3-하이드록시-2-나프탈데하이드(6-(Dimethylamino)-3-hydroxy-2-naphthaldehyde)를 브로모아세토나이트릴(bromoacetonitrile) 및 포타슘 카보네이트(potassium carbonate)와 반응시켜 상기 화학식 3으로 표시되는 화합물 3을 수득하는 단계; 상기 화합물 3을 페닐보론산(phenylboronic acid), 트리플루오로아세트산(trifluoroacetic acid), 팔라듐(II) 트리플루오로아세테이트(palladium(II) trifluoroacetate) 및 6,6'-다이메틸-2,2'-다이피리딜(6,6'-dimethyl-2,2'-dipyridyl)과 반응시켜 상기 화학식 2로 표시되는 화합물 2를 수득하는 단계; 및 상기 화합물 2를 말로노나이트릴(malononitrile)과 반응시켜 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 수득하는 단계;를 포함하는 것일 수 있다.

[0057] 본 발명의 다른 양상은 본 발명의 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는, 에르위니아 아밀로보라(*Erwinia amylovora*) 검출용 조성물을 제공한다.

[0058] 또한, 본 발명의 다른 양상은 본 발명의 화학식 1로 표시되는 화합물을 시료에 첨가하여 발생하는 형광을 측정하는 단계를 포함하는, 에르위니아 아밀로보라(*Erwinia amylovora*) 검출 방법을 제공한다.

[0059] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 에르위니아 아밀로보라 검출용 조성물은, 시료 중에서 에르위니아 아밀로보라를 선택적으로 검출하는 것일 수 있다.

[0060] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 에르위니아 아밀로보라 검출용 조성물은 용매, 산, 염기, 및 버퍼 용액 중에서 선택된 하나 이상을 더 포함할 수 있다. 상기 에르위니아 아밀로보라 검출용 조성물은 용매, 버퍼 용액 또는 이들의 혼합물에 전술한 화합물을 첨가하고, 여기에 산, 및/또는 염기를 첨가하여 준비될 수 있다. 또한 상기 에르위니아 아밀로보라 검출용 조성물은 당해 기술분야에서 사용할 수 있는 다른 첨가제를 추가적으로 포함할 수 있다. 상기 조성물이 포함하는 용매, 산, 염기, 및 버퍼 용액의 함량은 요구되는 성능에 따라 적절히 조절될 수 있다. 상기 용매는 물, THF, 메탄올, 에탄올, HI 수용액, *N,N*-디메틸포름아미드, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.

[0061] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 에르위니아 아밀로보라 검출 방법은 측정 대상 시료의 형광 발광 및 형광 세기가 전술한 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이를 포함하는 에르위니아 아밀로보라 검출용 조성물을 첨가하기 전의 시료 또는 정상 대조군 시료의 형광 발광 및 형광 세기의 변화가 나타나는 것을 확인하는 단계를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 에르위니아 아밀로보라 존재시 선택적으로 반응함에 따른 붉은(적색) 형광이 방출되는 것일 수 있고, 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이를 포함하는 에르위니아 아밀로보라 검출용 조성물을 첨가하기 전의 시료 또는 정상 대조군 시료에 비해 측정 대상 시료에서 형광 발광 또는 형광 세기가 증가되는 경우 에르위니아 아밀로보라가 존재하는 것으로 판단할 수 있다.

[0062] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 형광을 측정하는 단계는 공초점 형광 현미경, 이광자 형광 현미경, 광간섭성 단층 촬영기, 및 이광자 형광 현미경 및 광간섭성 단층 촬영기로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 장치를 이용하여 수행되는 것일 수 있고, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이를 포함하는 에르위니아 아밀로보라 검출용 조성물이 첨가된 시료에 손전등, 랜턴 또는 램프를 이용하여 UV 파장의 빛을 조사하여 방출되는 형광 변화를 관찰함으로써 수행되는 것일 수 있다.

[0063] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 UV 파장의 빛은 350 내지 370 nm의 파장일 수 있고, 바람직하게는 360 내지 370 nm일 수 있으며, 365 nm 파장의 빛을 조사하는 것이 가장 바람직하다.

[0064] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 시료는 에르위니아 아밀로보라가 존재할 것으로 의심되는 식물, 토양 또는 사물을 모두 포함하는 것일 수 있다. 상기 식물은 과수일 수 있고, 배, 사과, 마가목 및 장미과 식물로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 상기 사물은 농기구 등의 기구 또는 장비를

포함하는 것일 수 있고, 예를 들어, 전정가위, 모종삽 등을 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

- [0066] 본 발명의 다른 양상은 본 발명의 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는, 과수화상병 진단용 조성물을 제공한다.
- [0067] 또한, 본 발명의 다른 양상은 본 발명의 화학식 1로 표시되는 화합물을 과수화상병 감염 의심 시료에 첨가하여 발생하는 형광을 측정하는 단계를 포함하는, 과수화상병 진단 방법을 제공한다.
- [0068] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 과수화상병 진단용 조성물은, 시료 중에 존재하는 에르위니아 아밀로보라를 선택적으로 검출함으로써, 과수화상병을 진단하는 것일 수 있다.
- [0069] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 과수화상병 진단용 조성물은 용매, 산, 염기, 및 버퍼 용액 중에서 선택된 하나 이상을 더 포함할 수 있다. 상기 과수화상병 진단용 조성물은 용매, 버퍼 용액 또는 이들의 혼합물에 진술한 화합물을 첨가하고, 여기에 산, 및/또는 염기를 첨가하여 준비될 수 있다. 또한 상기 과수화상병 진단용 조성물은 당해 기술분야에서 사용할 수 있는 다른 첨가제를 추가적으로 포함할 수 있다. 상기 조성물이 포함하는 용매, 산, 염기, 및 버퍼 용액의 함량은 요구되는 성능에 따라 적절히 조절될 수 있다. 상기 용매는 물, THF, 메탄올, 에탄올, HI 수용액, N,N-디메틸포름아미드, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.
- [0070] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 과수화상병 진단 방법은 측정 대상 시료의 형광 발광 및 형광 세기가 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이를 포함하는 과수화상병 진단용 조성물을 첨가하기 전의 시료 또는 정상 대조군 시료의 형광 발광 및 형광 세기에 비해 증가된 것을 확인하는 단계를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 과수화상병에 감염시 붉은(적색) 형광이 방출되는 것일 수 있고, 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이를 포함하는 과수화상병 진단용 조성물을 첨가하기 전의 시료 또는 정상 대조군 시료에 비해 측정 대상 시료에서 형광 발광 또는 형광 세기가 증가되는 경우 과수화상병에 감염된 것으로 판단할 수 있다.
- [0071] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 첨가는 과수화상병 감염 의심 시료 표면에 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이를 포함하는 과수화상병 진단용 조성물을 스왑(swap), 도포 또는 분무 방식으로 첨가하는 것일 수 있고, 상기 형광은, UV 파장의 빛을 조사하였을 때 발생하는 형광을 측정하는 것일 수 있다.
- [0072] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 형광을 측정하는 단계는 공초점 형광 현미경, 이광자 형광 현미경, 광간섭성 단층 촬영기, 및 이광자 형광 현미경 및 광간섭성 단층 촬영기로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 장치를 이용하여 수행되는 것일 수 있고, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이를 포함하는 과수화상병 진단용 조성물이 첨가된 시료에 손전등, 랜턴 또는 램프를 이용하여 UV 파장의 빛을 조사하여 방출되는 형광 변화를 관찰함으로써 수행되는 것일 수 있다.
- [0073] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 UV 파장의 빛은 350 내지 370 nm의 파장일 수 있고, 바람직하게는 360 내지 370 nm일 수 있으며, 365 nm 파장의 빛을 조사하는 것이 가장 바람직하다.
- [0074] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 과수화상병 감염 의심 시료는 과수화상병이 감염되었을 것으로 의심되는 식물, 토양 또는 사물을 모두 포함하는 것일 수 있다. 상기 식물은 과수일 수 있고, 배, 사과, 마가목 및 장미과 식물로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 상기 사물은 농기구 등의 기구 또는 장비를 포함하는 것일 수 있고, 예를 들어, 전정가위, 모종삽 등을 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0075] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 과수화상병 진단용 조성물 및 과수화상병 진단 방법은 과수농가 등 현장에서 적용되는 것일 수 있다.
- [0077] 본 발명의 다른 양상은 본 발명의 화학식 1로 표시되는 화합물 및 에르위니아 아밀로보라(*Erwinia amylovora*)를 포함하는, 과수화상병 방제용 물질 스크리닝용 조성물을 제공한다.
- [0078] 또한, 본 발명의 다른 양상은 본 발명의 화학식 1로 표시되는 화합물이 처리된 에르위니아 아밀로보라(*Erwinia amylovora*)에 후보 물질을 첨가하여 형광 변화를 측정하는 단계를 포함하는, 과수화상병 방제용 물질 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0079] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 과수화상병 방제용 물질 스크리닝용 조성물 및 스크리닝 방법은, 화학식 1로 표시되는 화합물이 처리된 에르위니아 아밀로보라(측정 대상 시료)에 과수화상병 방제용 물질로 예상되는 시료(후보 물질)를 처리하여, 과수화상병 원인균인 에르위니아 아밀로보라의 농도/수의 감소 또는 농도/수의 증가 억제 나타나는지를 판단하는 과정을 통해 과수화상병 방제용 물질을 스크리닝하는 것일 수 있다.

- [0080] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 과수화상병 방제용 물질 스크리닝용 조성물 및 스크리닝 방법은, 화학식 1로 표시되는 화합물 및 에르위니아 아밀로보라를 포함하는 측정 대상 시료에 과수화상병 방제용 물질로 예상되는 시료(후보 물질)를 첨가하여, 측정 대상 시료의 형광 발광 및 형광 세기가 과수화상병 방제용 후보물질을 첨가하기 전의 시료의 형광 발광 및 형광 세기에 비해 감소된 것을 확인하는 단계를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 에르위니아 아밀로보라 존재시 화학식 1로 표시되는 화합물과의 반응에 의해 붉은(적색) 형광이 방출되는 것일 수 있고, 후보 물질을 첨가하기 전의 측정 대상 시료에 비해 후보 물질을 첨가한 측정 대상 시료에서 형광 발광 또는 형광 세기가 감소되는 경우, 후보 물질이 과수화상병을 개선, 억제, 저감 또는 방제할 수 있는 물질인 것으로 판단할 수 있다.
- [0081] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 형광을 측정하는 단계는 공초점 형광 현미경, 이광자 형광 현미경, 광간섭성 단층 촬영기, 및 이광자 형광 현미경 및 광간섭성 단층 촬영기로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 장치를 이용하여 수행되는 것일 수 있고, 측정 대상 시료에 손전등, 랜턴 또는 램프를 이용하여 UV 파장의 빛을 조사하여 방출되는 형광 변화를 관찰함으로써 수행되는 것일 수 있다.
- [0082] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 UV 파장의 빛은 350 내지 370 nm의 파장일 수 있고, 바람직하게는 360 내지 370 nm일 수 있으며, 365 nm 파장의 빛을 조사하는 것이 가장 바람직하다.
- [0084] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.
- [0086] **실시예 1. *E. amylovora* 특이적 형광체(B-1)의 합성 및 정제**
- [0087] 본 발명자들은 *E. amylovora* 특이적 형광체(B-1)를 개발하기 위해 한국등록특허 제10-1524915호의 화합물을 기반으로 하여 도 1과 같이 유기 합성을 진행하였다.
- [0088] **1-1. 화합물 3의 합성**
- [0089] 구체적으로 화염 건조한 5 mL 둥근 플라스크에 합성 출발 물질인 6-(다이메틸아미노)-3-하이드록시-2-나프탈데하이드(6-(dimethylamino)-3-hydroxy-2-naphtaldehyde; DMHNA, 30 mg, 0.139 mmol), 브로모아세토나이트릴(bromoacetonitrile, 14 μ L, 0.209 mmol), 포타슘 카보네이트(potassium carbonate, 29 mg, 0.209 mmol)을 다이메틸폼아미드(*N,N*-Dimethylmethanamide; DMF, 1.5 mL)에 넣고 아르곤 풍선을 꽂아 주었으며 실리콘 오일 용기를 이용하여 50°C에서 2시간동안 교반하였다. 이후 에틸 아세테이트(EtOAc, 100 mL), 증류수(deionized water; DI H₂O, 100 mL), 포화 소금물(30 mL)을 이용하여 합성된 유기물질을 추출하였다. 모아진 유기층은 무수 황산나트륨(Na₂SO₄, 5 g)을 첨가하여 탈수하고 회전증발농축기로 용매를 제거하였다. 이후 30% EtOAc/헥세인(Hex) (v/v)을 전개 액으로 이용한 실리카 컬럼 크로마토그래피로 분리하여 노란 색을 띠는 화합물 3을 수득하였다(수득률: 92%).
- [0090] ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): 3.13 (s, 6H), 4.97 (s, 2H), 6.77 (d, 1H), 7.04 (s, 1H), 7.05-7.07 (m, 1H), 7.74-7.78 (d, 1H), 8.25 (s, 1H), 10.34 (s, 1H).
- [0091] ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): 40.5, 53.8, 104.4, 106.0, 115.0, 115.3, 121.6, 121.8, 131.4, 132.9, 139.3, 151.1, 155.1, 188.6.
- [0092] HRMS (ESI) m/z: [M + H]⁺ calcd for C₁₅H₁₄N₂O₂, 254.1055; found, 254.1057
- [0094] **1-2. 화합물 2의 합성**
- [0095] 구체적으로 합성 출발 물질인 화합물 3(29 mg, 0.115 mmol), 페닐보론산(phenyl boronic acid, 28 mg, 0.230 mmol), 트리플루오로아세트산(trifluoroacetic acid, 88 μ L, 1.15 mmol), 팔라듐(II) 트리플루오로아세테이트(palladium(II) trifluoroacetate, 30 mg, 0.09 mmol), 그리고 6,6'-다이메틸-2,2'-다이피리디닐(6,6'-dimethyl-2,2'-dipyridyl, 33 mg, 0.180 mmol)을 2-메틸테트라하이드로퓨란(2-methyltetrahydrofuran, 1.5 mL)에 녹인 후, 화염 건조한 Schlenk 튜브에 넣어 15분간 상온에서 교반하였다. 이어서 실리콘 오일 용기를 이용해 80°C로 가열하여 24시간동안 추가로 반응하였다. 이후 EtOAc(100 mL), DI H₂O(100 mL), 포화 소금물(30 mL)을 이용하여 합성된 유기물질을 추출하였다. 모아진 유기층은 무수황산나트륨(Na₂SO₄, 5 g)을 첨가하여 탈수하고 회전증발농축기로 용매를 제거하였다. 이후 10% EtOAc/Hex (v/v)을 전개 액으로 이용한 실리카 컬럼 크로마토그래피로 분

리하여 주황색을 띠는 화합물 2를 수득하였다(수득률: 41%).

[0096] ^1H NMR (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ): 3.06 (s, 6H), 7.02-7.03 (d, 1H), 7.25-7.28 (m, 1H), 7.61-7.64 (m, 2H), 7.71-7.75 (m, 1H), 7.83 (d, 1H), 7.89-7.92 (m, 2H), 7.99-8.01 (m, 2H), 8.23 (s, 1H).

[0097] ^{13}C NMR (125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ): 40.8, 105.1, 105.4, 116.1, 117.7, 122.3, 124.4, 125.1, 128.7, 129.5, 129.6, 132.8, 136.1, 137.8, 148.8, 152.6, 155.4, 184.7.

[0098] HRMS (ESI) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{NO}_2$, 315.1259; found, 315.1261

[0100] 1-3. 화합물 B-1의 합성

[0101] 구체적으로 화염 건조한 둥근 플라스크에 합성 출발 물질인 화합물 2(10 mg, 0.032 mmol), 말로노나이트릴(malononitrile, 4 mg, 0.063 mmol)과 피리딘(pyridine, 1.5 mL)을 넣고 환류장치를 연결하였으며 아르곤 풍선을 꽂고 70℃에서 밤새 교반하였다. 이후 용매를 회전증발농축기로 제거하고, EtOAc, DI H_2O 및 포화 소금물을 이용하여 합성된 유기물질을 추출하였다. 모아진 유기층은 . 이후 20% EtOAc/Hex (v/v)을 전개 액으로 이용한 실리카 컬럼 크로마토그래피를 통해 분리하여 보라색을 띠는 화합물 B-1을 수득하였다(수득률: 41%).

[0102] ^1H NMR (500 MHz, CD_3COCD_3 , δ): 3.14 (s, 6H), 7.10 (d, 1H), 7.21 (d, 1H), 7.27-7.30 (m, 1H), 7.64 (t, 1H), 7.66 (t, 1H), 7.68-7.70 (m, 1H), 7.71-7.73 (m, 2H), 7.79 (s, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.87 (d, 1H), 8.14 (s, 1H).

[0103] ^{13}C NMR (500 MHz, CD_3COCD_3): 40.5, 78.8, 105.0, 105.3, 114.9, 115.3, 117.2, 122.7, 123.6, 125.3, 126.1, 129.7, 130.5, 130.8, 132.0, 132.2, 134.8, 138.0, 150.4, 152.3, 156.4, 157.4.

[0104] HRMS (ESI) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}$, 363.1372; found, 363.1369

[0106] 실시예 2. B-1의 흡수 및 형광 특성 확인

[0107] 실시예 1에서 제조된 형광체 화합물 B-1의 흡수 및 형광 특성을 확인하기 위하여, 수용액에서, 그리고 과산화수소의 원인균인 에르위니아 아밀로보라(*Erwinia amylovora*)의 반응 하에서 B-1의 흡수 및 형광 스펙트럼 변화를 측정하였으며, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0108] 구체적으로, 실험에 사용된 *E. amylovora*는 LB(Luria-Bertani) 액체 배지에서 26℃로 밤새 배양시켰다. 이후 10000 rcf에서 원심분리를 통해 *E. amylovora*를 수득하였다. 먼저 수용액상에서 B-1을 첨가하여 흡수 및 형광 스펙트럼을 분석하였으며, 이후 B-1을 함유하는 수용액에 *E. amylovora* (4.3×10^8 CFU)를 첨가하여 흡수 및 형광 스펙트럼을 분석하였다. 흡수 스펙트럼(absorbance spectra) 특성을 분석하기 위해 흡수 분광광도계(UV/Vis spectrophotometer; Agilent, USA)를 사용하였고, 형광 스펙트럼(fluorescence spectra)분석을 위해 형광 광도계(SHIMADZU CORP. RF-6000, Japan)를 사용하였다. 이때 각 스펙트럼 측정 시 사면이 1 cm 두께인 표준 석영 셀(standard quartz cell; Hellma Analytics, Germany)을 사용하였다.

[0109] 측정 결과는 도 2에 나타내었으며, B-1(10 μM)의 수용액상에서의 흡수 및 형광 스펙트럼은 파선으로, *E. amylovora*와의 반응 하에서의 흡수 및 형광 스펙트럼은 실선으로 나타내었다.

[0110] 수용액상에서 B-1은 550 nm에서 최대 흡수를 보였고, 이를 여기파장으로 하여 형광을 측정한 결과, 형광이 거의 관찰되지 않았다. 이후 *E. amylovora* (4.3×10^8 CFU)를 첨가하였을 때, 흡수 스펙트럼은 전체적으로 약간 증가하였으며, 550 nm를 여기파장으로 형광을 측정하였을 때 수용액상에서보다 형광 세기가 크게 증가하였고, 근적외선 파장대인 686 nm에서 가장 높은 형광 증가를 보였다. 이를 통해 B-1이 *E. amylovora*를 감지하여 붉은 색 형광을 띠는 것을 확인하였다.

[0112] 실시예 3. *E. amylovora* 농도에 따른 B-1의 형광 변화

[0113] *E. amylovora*의 농도에 따른 실시예 1에서 제조된 형광체 화합물 B-1의 형광 변화를 측정하였으며, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

- [0114] 구체적으로, 실시예 2와 같이 수득된 *E. amylovora*의 농도를 측정하기 위해서 600 nm에서의 흡수를 계산하였다 (OD₆₀₀ 0.1=1×10⁸ cells). 이후 DI H₂O를 이용하여 *E. amylovora*를 DI H₂O에서 2×10⁶-4×10⁸ CFU/mL로 희석하였고, 각각 10 μM의 B-1과 함께 반응시킨 뒤, 550 nm를 여기파장으로 하여 686 nm에서의 형광 세기를 그래프로 나타내었다. 그 결과, *E. amylovora*의 농도가 증가함에 따라 B-1의 형광 또한 증가하는 것을 확인하였다. 그래프 안에 있는 사진은 위와 같은 농도 조건의 *E. amylovora*와 B-1을 96웰 플레이트에서 반응시키고, 이를 형광 신호 분석 시스템(VISQUE In Vivo Smart-LF, Korea)을 이용하여 촬영한 사진으로, 상기 결과와 마찬가지로 *E. amylovora*의 농도 증가에 따른 형광 증가를 보여주었다.
- [0116] **실시예 4. B-1의 *E. amylovora* 최소 감지 능력 확인**
- [0117] *E. amylovora*를 단계별로 희석하여 실시예 1에서 제조된 형광체 화합물 B-1과 반응시켜 최소 감지 능력을 확인하였으며, 그 결과를 도 4에 나타내었다.
- [0118] 구체적으로 실시예 3과 같이 정량된 *E. amylovora*와 5 μM의 B-1을 DI H₂O에서 반응시켰다. 이후 551 nm를 여기파장으로 하여 686 nm에서의 형광 값을 측정하여 그래프로 나타내었다.
- [0119] 단계별로 희석된 *E. amylovora*와 반응시킨 결과, 최대 10² CFU/mL의 *E. amylovora*까지 감지할 수 있음을 확인하였다. 10² CFU/mL은 겨울철 월동하는 *E. amylovora*의 농도에 근접한 것으로, PCR 및 DNA 기반 진단 스트립과 같은 기존의 진단 방법과 비교하여도 상당히 높은 민감도를 보임을 확인하였다.
- [0121] **실시예 5. 시간에 따른 B-1의 *E. amylovora* 감지 능력 확인**
- [0122] *E. amylovora* 존재 하에 실시예 1에서 제조된 형광체 화합물 B-1의 시간에 따른 형광 변화 특성을 확인하였으며, 그 결과를 도 5에 나타내었다.
- [0123] 구체적으로, 10 μM의 B-1을 10⁸ CFU/mL의 실시예 3과 같이 정량된 *E. amylovora*와 DI H₂O 상에서 반응을 진행한다. 이후, 550 nm를 여기파장으로 하여 686 nm에서의 형광 변화를 최대 40분까지 관찰하였다. 그 결과, 도 5에서 보이는 바와 같이 B-1은 *E. amylovora*와 반응하여 10분 내에 급격한 형광 변화를 보였다. 이를 통해, B-1의 *E. amylovora*에 대한 빠른 감지 특성을 가짐을 확인하였다.
- [0125] **실시예 6. B-1의 *E. amylovora* 염색 능력 확인**
- [0126] 실시예 1에서 제조된 형광체 화합물 B-1의 *E. amylovora* 염색 능력을 확인하였으며, 그 결과를 도 6에 나타내었다.
- [0127] 구체적으로 구체적으로 실시예 2와 같이 수득된 *E. amylovora*를 PBS(phosphate-buffered saline)상에서 30 μM의 B-1과 1시간동안 반응시켜 염색하였다. 살아있는 *E. amylovora*만을 확인하기 위해서 대조 염색으로 300 nM의 4', 6-다이아미디노-2-페닐인돌(4', 6-diamidino-2-phenylindole; DAPI)이 함께 염색되었다. 이후 염색된 *E. amylovora*는 PBS로 3번 세척하여 잔여 B-1과 DAPI를 제거하였고, 열 고정을 통해 슬라이드 글라스 위에 얹어 공초점 레이저 스캐닝 현미경(Carl Zeiss, Germany)으로 촬영을 진행하였다. 공초점 레이저 스캐닝 현미경 촬영을 진행할 때 미분간섭(differential interference contrast, DIC)도 함께 촬영되었으며, B-1, DAPI 촬영을 위하여 이용된 파장은 다음과 같다; [DAPI] 여기파장: 405 nm, 방출파장: 410-530 nm, [B-1] 여기파장: 561 nm, 방출파장: 600-700 nm.
- [0128] 도 6은 공초점 레이저 스캐닝 촬영 결과를 각각 DIC, DAPI, B-1, 그리고 이 모두를 합친 사진을 나타낸 것이다. 그 결과, DIC에서 관찰된 *E. amylovora*에서 DAPI 및 B-1의 형광을 모두 확인할 수 있었고, 형광 신호들이 모두 중첩되는 것을 통해 B-1을 살아있는 *E. amylovora*를 염색할 수 있으며 강한 붉은색 형광을 나타낼 수 있음을 확인하였다.
- [0130] **실시예 7. B-1을 이용한 식물 표면의 *E. amylovora* 감응 능력 확인 (분무)**
- [0131] 실시예 1에서 제조된 형광체 화합물 B-1을 이용하여 실제 식물 표면에 존재하는 *E. amylovora*를 검출할 수 있는지를 확인하기 위하여, 사과나무(fuji apple tree)의 조직(organ: 열매, 꽃)에 B-1을 분무하는 방식으로 검출을 진행하였으며, 그 과정 및 결과를 도 7에 나타내었다.
- [0132] 구체적으로 도 7a에서 나타낸 것과 같이 과수화상병에 감염된 식물을 모방하기 위해서 실시예 3과 같이 정량된

10^2 - 10^8 CFU/mL의 *E. amylovora*를 각각 애기사과(immature apples(fruits)), 사과나무 꽃(apple blossoms)에 붓을 이용하여 도포하였다. *E. amylovora*를 식물 표면에 고정하기 위해서 10분간 자연 건조를 진행하였다. 이후 검출을 위하여 DI H₂O에 희석된 100 μ M의 B-1 용액을 두 차례 분무하여 10분 뒤 365 nm 손전등 아래에서 형광 변화를 관찰하였다.

[0133] 그 결과 애기사과와 사과나무 꽃 위에 존재하는 모든 농도의 *E. amylovora*에서 붉은색 형광을 관찰할 수 있었다(도 7b). 각 관심 영역을 Image-J 프로그램을 이용하여 *E. amylovora* 도포 농도에 따른 B-1의 형광 강도를 분석하여 그래프화하여 도 7c, 7d에 나타낸 결과, *E. amylovora*의 농도가 증가할수록 B-1의 형광이 유의적으로 높아짐을 보였고, 실제 식물 표면에서도 10^2 CFU/mL의 *E. amylovora*까지 검출이 가능하다는 것을 확인하였다.

[0134] 또한, B-1의 형광 변화를 통해 검출된 *E. amylovora*를 교차 검증하기 위하여 기존의 과수화상병 진단 방법인 PCR 분석을 수행하였고, 그 결과를 도 7e에 나타내었다. PCR 분석은 *E. amylovora*의 DNA 마커인 pEA29 플라스미드를 타겟으로 진행하였으며, 주형으로는 도 7a에서 B-1을 분무하여 형광 변화를 보였던 꽃잎과 *E. amylovora* (양성 대조군)를 이용하였다. 형광 변화를 보였던 꽃에서 한 장의 꽃잎을 떼어 내어 1.75 mL 튜브에 100 μ L의 DI H₂O와 함께 넣었으며, 피펫 팁(tip)을 이용하여 10회 이상 씻어냈다. 이용된 프라이머(primer) 서열은 다음과 같다; Forward: GCACTGAGGTTTTAGGGATATCCGCTG, Reverse: GCTCAATCGCCAGGAAATGATATCGGC. PCR 반응은 Invitrogen사의 Platinum™ II Taq Hot-Start DNA polymerase를 이용하여 진행하였으며, 제조사의 지시에 따라 진행되었다.

[0135] 그 결과 B-1을 분무하여 *E. amylovora*를 검출한 결과와 거의 일치하는 결과를 얻을 수 있었으며, 이를 통해 B-1이 식물 표면에 존재하는 *E. amylovora*를 높은 민감도로 검출할 수 있음을 확인하였다.

[0137] 실시예 8. B-1을 이용한 식물 표면의 *E. amylovora* 감응 능력 확인 (분무, 먼봉)

[0138] 실시예 1에서 제조된 형광체 화합물 B-1을 다양한 방법으로 응용하여 식물 표면의 *E. amylovora*의 검출을 시도하였으며, 그 결과를 도 8에 나타내었다.

[0139] 구체적으로, 도 8a에 나타낸 것과 같이 사과나무 조직(가지, 꽃, 잎)을 과수화상병에 감염시키기 위하여 LB 한천 배지 위에 *E. amylovora*(10^8 CFU/mL)와 함께 사과나무 가지(twig), 꽃(blossom) 및 잎(leaf) 각각의 조직을 얹어 26°C에서 밤새 배양시켰다. 이후 100 μ M의 B-1 용액을 분무하거나, B-1을 흡수시킨 먼봉을 문질러는 방법(swab)을 통해 각 식물 조직에서 *E. amylovora*의 검출을 시도하였으며, 365 nm 손전등을 비추어 형광 변화를 관찰하였다.

[0140] 그 결과, 과수화상병이 감염된 사과나무 가지에 B-1을 분무하였을 때, 붉은색의 형광을 관찰할 수 있었다(도 8b). 마찬가지로, 과수화상병에 감염된 사과나무 꽃과 잎에 B-1이 흡수되어 있는 먼봉을 문질렀을 때(swab), 먼봉에서 붉은색 형광을 방출하는 것을 확인할 수 있었다(도 8c, 8d). 이를 통해 *E. amylovora*를 검출하기 위한 B-1의 사용 방법에 있어서 다양한 응용이 가능하다는 것을 확인하였다.

[0142] 실시예 9. B-1을 이용한 농기구 표면의 *E. amylovora* 감응 능력 확인

[0143] 실시예 1에서 제조된 형광체 화합물 B-1이 사물에 존재하는 *E. amylovora*를 검출할 수 있는지 확인하기 위하여, B-1을 분무하는 방식으로 검출을 시도하였다. 검출에 이용된 사물로는 과수농가에서 과수화상병 감염 개체로부터 교차오염을 발생시키는 원인 중 하나인 농기구(farming tools)를 이용하였으며, 그 과정 및 결과를 도 9에 나타내었다.

[0144] 구체적으로 도 9a와 같이 *E. amylovora*에 노출된 농기구를 모방하기 위하여, 전정가위(pruning shears)와 모종삽(trowel)을 이용하여 과수화상병에 감염된 식물을 직접 자르거나, *E. amylovora*에 오염된 흙에 문질렀다. *E. amylovora*의 검출은 100 μ M의 B-1 용액을 2번 분무하는 방식으로 이루어졌으며, 365 nm 손전등 아래에서 촬영이 이루어졌다.

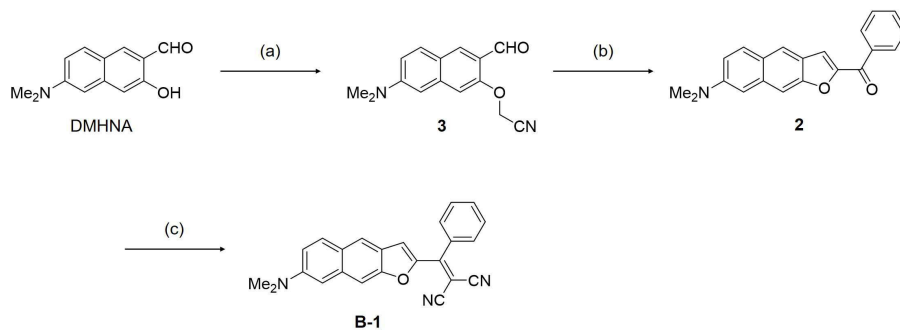
[0145] 그 결과 도 9b와 같이 전정가위, 모종삽 모두에서 *E. amylovora*가 존재하는 부분은 붉은색 형광을 방출하였으며, 이를 통해 B-1을 이용하여 사물에서의 *E. amylovora*의 검출이 가능하다는 것을 확인하였다.

[0147] 상기 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것

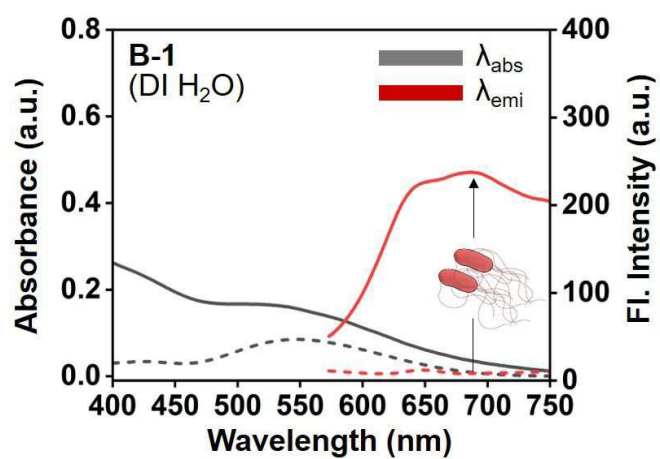
으로 이해해야만 한다.

도면

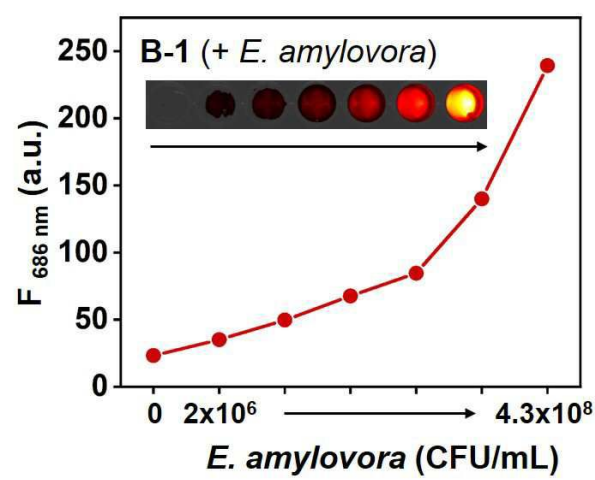
도면1



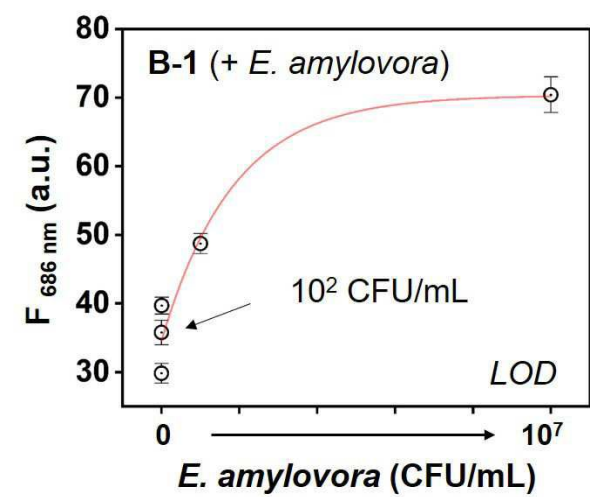
도면2



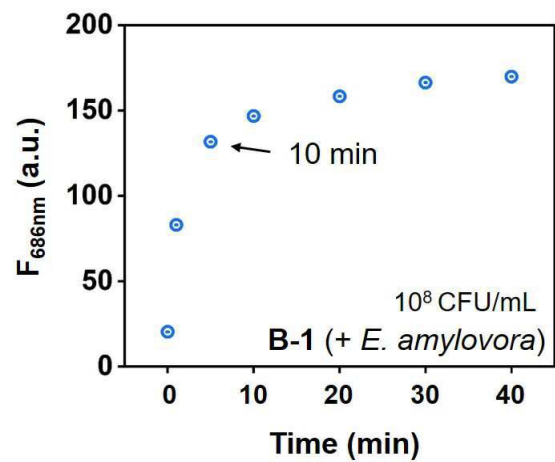
도면3



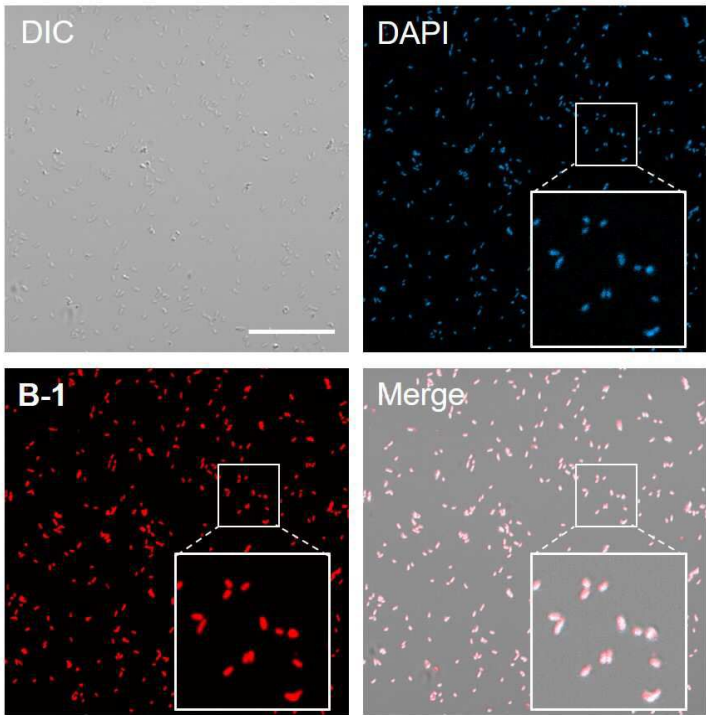
도면4



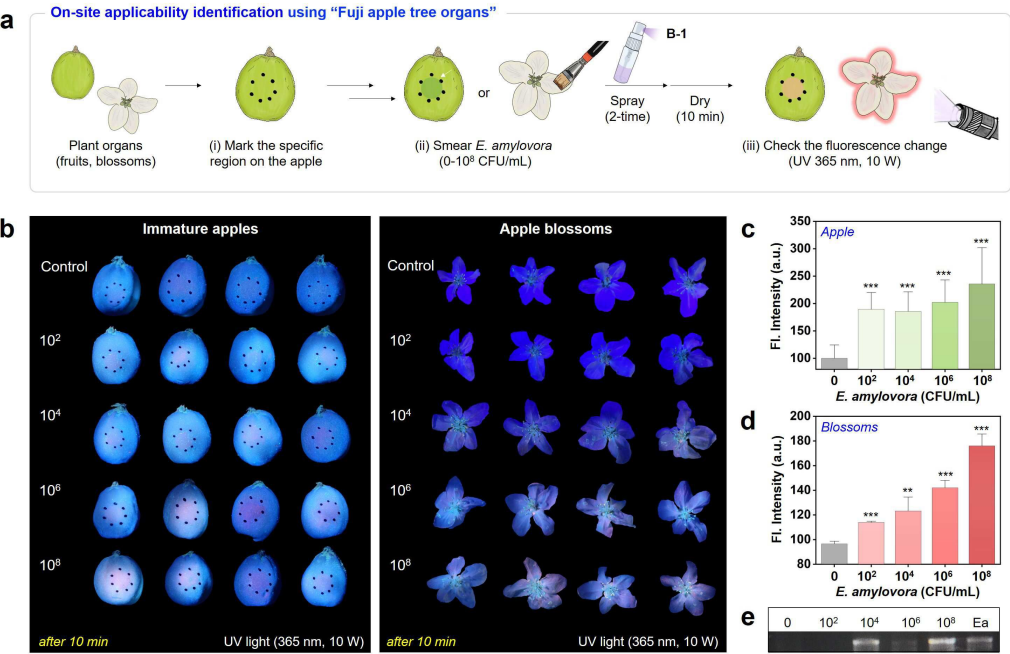
도면5



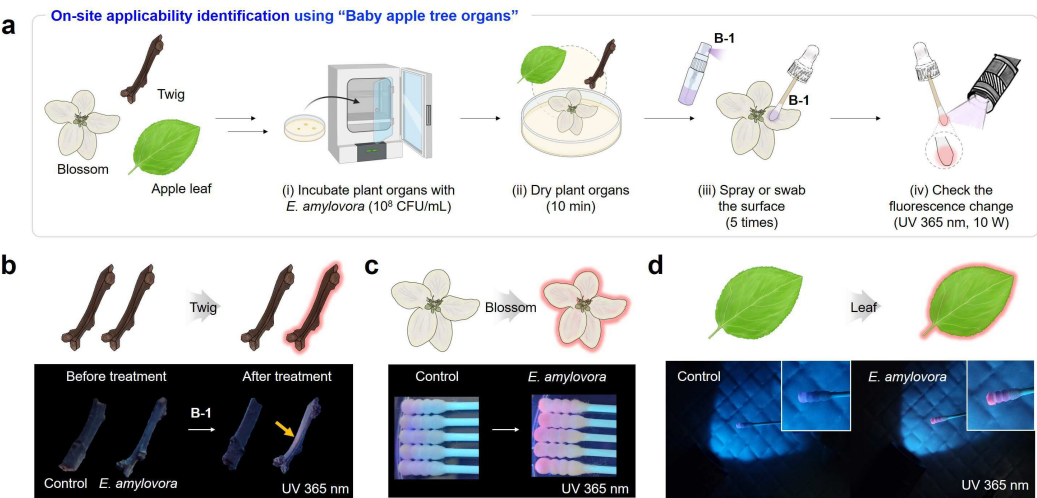
도면6



도면7



도면8



도면9

