



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0116221
(43) 공개일자 2009년11월11일

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01) *C12N 1/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0042027

(22) 출원일자 2008년05월06일

심사청구일자 2008년05월06일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 궁동 220번지 충남대학교

연세대학교 산학협력단

서울 서대문구 신촌동 134 연세대학교

(72) 발명자

조상래

서울특별시 양천구 목6동 911 신시가지아파트 60
8동 406호

신성재

대전광역시 중구 문화1동 6번지 충남대학교의과대
학 미생물학교실 301-747

(74) 대리인

김순웅

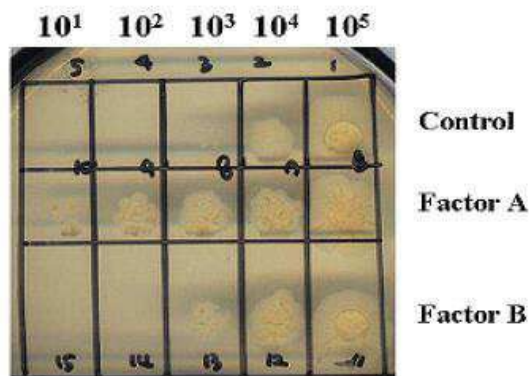
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 결핵균의 성장을 촉진시키는 배양 배지 및 이를 이용한배양 방법

(57) 요약

본 발명은 결핵균을 배양하는 배지와 이의 제조방법, 및 이를 이용하여 결핵균을 배양하는 방법에 관한 것으로, 좀 더 상세하게는 본 발명의 결핵균 배양 배지는 대량 배양된 결핵균의 균체로부터 얻은 결핵균 세포벽 성분 및 라이소자임을 포함하여, 결핵균의 성장을 촉진시킬 수 있도록 한 것이다. 본 발명의 배양배지는 결핵균의 배양을 촉진시켜 보다 빠르게 결핵균을 배양할 수 있어, 결핵의 감염여부에 대한 조속한 진단을 할 수 있게 하여 결핵의 치료를 신속하고 용이하게 하고, 보균자를 선별함으로써 결핵의 전파를 예방할 수 있는 효과가 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 R13-2007-020-01000-0

부처명 한국과학재단

연구사업명 기초의과학연구센터(MRC)

연구과제명 감염신호네트워크응용연구센터

주관기관 충남대학교의과대학(MRC)

연구기간 2007년 05월 01일 ~ 2016년 02월 28일

특허청구의 범위

청구항 1

대량 배양된 결핵균으로부터 분리한 세포벽 성분과 라이소자임을 포함함으로써, 결핵균의 성장을 촉진시키는 결핵균 배양배지.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 세포벽 성분은 탄수화물을 포함하고, 지질 또는 지질단백질을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 배양 배지.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 결핵균은 마이코박테리움 튜버큐로시스, 마이코박테리움 파라튜버큐로시스, 마이코박테리움 레프라에, 비결핵성 마이코박테리움 (NTM: Nontuberculous mycobacterium) 또는 비정형 결핵균(MOTT; Mycobacterium other than tuberculosis)을 포함하는 마이코박테리움 균속인 것을 특징으로 하는 배양 배지.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 세포벽 성분의 농도는 50 ~100 $\mu\text{g/ml}$ 인 것을 특징으로 하는 배지.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 라이소자임의 농도는 10 ~ 100 $\mu\text{g/ml}$ 인 것을 특징으로 하는 배지.

청구항 6

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 따른 배양배지에서 결핵균을 배양함으로써 결핵균의 성장을 촉진시키는 결핵균의 배양 방법.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 결핵균의 배양은 10일 내지 20일 동안 이루어짐을 특징으로 하는 배양방법.

청구항 8

결핵균을 배양하여 초기 배양액을 제조하는 a)단계;

상기 초기 배양액에서 결핵균체를 수거하여 상기 결핵균체로부터 세포벽 분획물을 얻는 b)단계;

상기 세포벽 분획물에서 세포벽 성분을 분리하는 c)단계; 및

상기 세포벽 성분과 라이소자임을 일반 배지에 첨가하는 d)단계;를 포함하여 이루어지는 결핵균 성장을 촉진시키는 배양 배지의 제조 방법.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 세포벽 성분의 농도는 50 ~ 100 $\mu\text{g/ml}$ 인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 8 항에 있어서, 상기 라이소자임의 농도는 10 ~ 100 $\mu\text{g/ml}$ 인 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

<1> 본 발명은 결핵균의 성장을 촉진하는 결핵균 배양 배지 및 이를 이용하여 결핵균을 배양하는 방법에 관한 것으로, 좀 더 상세하게는 대량 배양된 결핵균의 균체로부터 얻은 결핵균 세포벽 성분과 라이소자임을 포함하는 배

양배지와 이를 이용한 배양방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

- <2> 결핵균과 나병균을 포함한 병원성 마이코박테리아(mycobacteria)의 감염증은 현재까지 세균성 질병으로는 인류에 가장 심각한 피해를 주고 있다. 결핵균에 의한 결핵 하나만 보더라도 결핵은 세계 10대 사망 원인의 하나로 국제적인 중요성이 가장 큰 감염 질환이며 현재에도 전 세계 인구의 1/3인 20억명 정도가 이 균에 감염되어 있다. 우리나라는 OECD 가입 30개국 중 결핵사망을 1위로 인구 10만명 당 5.5명 (하루 평균 7.4명이 사망)이 사망하고 있으며 (2005년도 사망 통계) 이는 일본의 3.9배, 미국의 23.3배이다. 병원성 마이코박테리움(mycobacterium)의 감염증 중 결핵 하나만 보더라도 국내 감염 질환의 80% 이상을 결핵이 차지하고 있으며 단일 질병으로는 국내사망 요인 중 5번째 안에 있을 정도로 매우 심각하다.
- <3> 지난 50년간 국가결핵관리사업 추진결과로 결핵에 의한 사망률이 많이 감소하였다 하더라도 2000년대에 들어 신환자수의 감소 추세가 둔화되고 있으며 최근 3년간 결핵환자의 수는 점차 증가하고 있는 추세이다. 이러한 이유는 여러 가지 측면에서 고려할 필요가 있으나 항생제에 의존한 치료방법에 기인하여 다제내성결핵균의 확산, 면역억제 질병 및 치료 증가 (예: 장기이식), 급격한 노인 인구의 증가와 외국인 유입, 국제 여행 증가 등에 의하여 결핵은 언제든지 사회적인 문제로 대두될 수 있다. 더욱이 지구 온난화 현상으로 감염질환의 패턴이 변화할 것으로 추정되고 있기 때문에 아프리카, 동남아시아, 브라질 등 기후가 (아)열대 지방에 만연한 결핵을 포함한 마이코박테리아 감염증은 그 중요성을 인식하고 사회적으로 대비할 필요성이 있다.
- <4> 현재까지 결핵을 확진할 수 있는 방법은 M. tuberculosis를 객담 등의 시료에서 분리 배양후, PCR 법등으로 동정하는 것이다. 하지만 M. tuberculosis 균은 배양조건이 좋은 상태에서도 배양하는 시간이 약 4주 이상이 소요된다. 또한 latent TB 상태에서는 결핵균을 in vitro에서 배양하기가 매우 까다롭다. 현재에도 BD 회사에서 개발된 7H9과 supplement로 OADC를 첨가한 broth 배지가 결핵균을 배양하는데 널리 사용되고 있으나 이 배지는 고가이고 이 배지를 사용하더라도 4주 이상의 시간이 소요된다. 또한 국내는 이러한 배지를 전량 수입에 의존하고 있다. 최근에 개발된 BD 회사의 MGIT (Mycobacterial Growth Indicator Tube)은 자동화된 시스템으로 임상적으로 결핵균의 배양을 촉진시켰으나 이는 배지에 의한 것보다 검출하는 sensor의 민감도가 높기 때문이다. 또한 이러한 MGIT 시스템은 7H9 broth를 바탕으로 하고 있으며 매우 고가여서 모든 임상에 적용하기에 한계가 있다.
- <5> 그러나 결핵균을 빠르게 배양할 수 있는 배지 첨가 성분이나 새로운 조합의 배지가 절실히 필요함에도 불구하고, 현재까지 결핵균의 성분을 이용하여 결핵균의 성장을 특이적으로 촉진시킬 수 있는 배지의 성분은 개발되어 있지 않다.
- <6> 이에 본 연구자들은 결핵균의 세포벽 성분이 일반 세균과는 매우 다르게 구성되어있다는 것과 배지 성분 중 식 에너지원으로 탄수화물 (carbohydrate)이 절대적으로 많이 필요하다는 것에 착안하여 결핵균이 갖고 있는 세포벽 성분 (주로 carbohydrate)과 결핵균의 성장에 세포벽의 재배열과 관련된 resuscitation-promoting factor 와 구조적으로 유사하며 가수분해효과가 있는 라이소자임을 이용하여, 결핵균의 성장을 특이적으로 촉진하는 배지 성분을 개발하고, 이러한 배지성분이 포함된 배양배지에서 결핵균을 배양시 결핵균의 성장이 일반 배지보다 월등하게 촉진됨을 확인함으로써 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <7> 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위해서 안출된 것으로서, 본 발명은 결핵균을 대량 배양하여 얻어진 결핵균의 균체로부터 추출된 결핵균 세포벽 성분과, resuscitation-promoting factor 와 구조적으로 유사하며 가수분해효과가 있는 라이소자임을 포함함으로써 결핵균의 배양을 촉진시킬 수 있는 배지성분을 제공하고자 한다. 또한 본 발명은 상기 결핵균의 배양을 촉진시키는 배지성분이 포함된 배양배지에서 결핵균을 배양함으로써 보다 신속하고 간편하게 결핵균을 배양시키는 방법을 제공하고자 한다.

과제 해결수단

- <8> 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 결핵균 배양 배지와 이의 제조방법, 및 이를 이용하여 결핵균을 배양하는 방법을 제공한다. 보다 상세하게는 대량 배양된 결핵균의 균체로부터 얻은 결핵균 세포벽 성분과

라이소자임을 포함함으로써 결핵균의 성장을 촉진시키는 배양배지에 관한 것이다.

<9> 이하 본 발명을 자세히 설명한다.

<10> 본 발명의 제 1 견지에 의하면, 본 발명에 따른 결핵균의 배양을 촉진시키는 배지는 대량 배양된 결핵균의 균체로부터 얻은 결핵균 세포벽 성분과 라이소자임을 포함하는 것을 특징으로 한다.

<11> 바람직하게는, 본 발명에 있어서 상기 세포벽 성분은 탄수화물을 포함하고, 지질 또는 지질단백질(lipoprotein)을 더 포함할 수 있다. 마이코박테리움 튜버큘로시스(Mycobacterium tuberculosis)는 다른 일반적인 세균에 비해서 세포벽(cell wall)에 지질층과 탄수화물(carbohydrate)층이 매우 두껍게 형성되어 있으며, 이러한 지질층 및 탄수화물(예: LAM, peptidoglycan)의 대사과정에는 더욱 많은 에너지가 소모된다. 또한, 각 마이코박테리아의 세포벽 성분은 그 종(species)에 따라 다르다고 알려져 있으며 이는 각 마이코박테리아가 만드는 세포벽 성분이 다르다는 것을 의미한다. 특히, 세포벽의 생성과 관련된 지방산의 생성 및 대사에 관련된 유전자들은 보통 복제가 빠른 *E. coli*에 비해서 4배 이상의 많은 유전자들이 관여하고 있다. 그리고, 상기 지질에는 이에 한정하는 것은 아니지만 예를 들어, 포스포티딜-L-세린(phosphatidyl-L-serine), 디올레오일 포스포티딜-L-세린(dioleoyl phosphatidyl-L-serine), 포스티딜콜린(phosphatidylcholine), 또는 포스포티딜에탄올아민(phosphatidylethanolamine), 투버쿨로스테아릭산(tuberculostearic acid), 아라키돈산, 이중결합이 존재 또는 비존재하는 C18~C31인 지방산 및 이중결합이 존재 또는 비존재하는 C18~C18인 지방산 에스테르와 같은 인지질 또는 인지질의 성분을 포함한다. 상기 지질 단백질은 세균의 세포벽을 구성하는 펩티도글라이칸을 포함하고, 상기 탄수화물은 탄소와 수산기를 포함하는 것을 말한다.

<12> 또한, 본 발명에 있어서, 바람직하게는 상기 세포벽 성분의 농도가 50 ~ 100 µg/ml 인 것을 특징으로 한다. 상기 결핵균의 배양은 결핵균의 세포벽 성분에 의존하여 촉진되는데, 상기 결핵균의 세포벽 분해물의 농도가 100 µg/ml 까지는 농도 의존적으로 성장이 촉진되지만 그 이상에서는 100 µg/ml 보다 효과가 적었다. 이에 따라 결핵의 감염 여부를 진단할 때, 50 ~100 µg/ml 까지는 그에 대한 민감도가 크므로 상기 범위 이내에서 행하여 지는 것이 바람직하다.

<13> 또한 본 발명에 있어서, 보다 바람직하게는 상기 라이소자임의 농도는 10 ~ 100 µg/ml 인 것을 특징으로 한다.

<14> 일반적으로 결핵균의 배양에 사용되고 있는 7H9 broth 배지의 성분은 주로 무기화합물(inorganic compounds), 탄수화물 등으로 구성되어 있으며 아직까지 마이코박테리움 튜버큘로시스 및 느리게 자라는 마이코박테리아의 성장을 촉진하거나 선택적으로 배양할 수 있는 배지는 개발되지 않았다. 최근의 보고들에 의하면, 마이코박테리움 튜버큘로시스는 스트레스 환경에서 dormant (휴지기 또는 non-replicating phase, 비복제기)에 빠지게 되며 휴지기 상태에서 재성장하기 위해서는 항휴지기 인자(anti-dormancy factor)인 resuscitation-promoting factor (Rpf)가 필요하다고 알려져 있으며 펩티도글라이칸의 재배열(rearrangement)이 선행되어야 한다고 알려져 있다. Rpf는 라이소자임과 매우 유사한 구조적 도메인을 갖고 있으며 펩티도글라이칸을 분해시킨다고 알려져 있다. 이러한 사실은 휴지기의 결핵균이 재활성화되기 위해서는 펩티도글라이칸의 가수분해(hydrolysis)가 필요하며 이러한 기전은 세포벽의 기계적인 특성 및 구조를 변화시킴으로써 세포의 분화 또는 분해된 산물에 의한 항휴지기 신호전달을 통하여 결핵균이 휴지기에서 재활성화되거나 휴지기에 빠지는 것을 막는 것으로 추정된다.

<15> 따라서, 본 발명에서 첨가하는 라이소자임은 결핵균의 휴지기에 있게 되는 것을 막음으로써 결핵균이 보다 잘 배양되게 하는 것이다. 상기 라이소자임의 농도는 10 µg/ml 이하인 경우에는 상기 펩티도글라이칸의 가수분해가 일어나지 않으며 100 µg/ml 이상인 경우에는 세포벽이 과도하게 분해가 되므로 상기 범위내에서 라이소자임을 첨가하는 것이 바람직하다.

<16> 또한 본 발명에 있어서, 상기 결핵균은 마이코박테리움 균속(Mycobacterium sp.)에 속하는 것을 특징으로 한다. 상기 결핵균은 항산성균으로서 사람에게 결핵을 일으키는 균으로, 상기 결핵균은 이에 제한하는 것은 아니나 객담, 혈액, 조직 등에서 채취되어 배양된다. 상기 결핵균은 이에 한정되는 것은 아니지만 보다 바람직하게는, 상기 마이코박테리움 균속은 마이코박테리움 튜버큘로시스, 마이코박테리움 파라튜버큘로시스, 마이코박테리움 레프라에, 비결핵성 마이코박테리움 (NTM: Nontuberculous mycobacterium) 또는 비정형 결핵균(MOTT; Mycobacterium other than tuberculosis)으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

<17> 본 발명의 제 2 견지에 의하면,

<18> 본 발명은, 상기에서 설명한 결핵균의 배양배지에서 결핵균을 배양하는 방법에 관한 것이다. 상기 배양배지에

서 배양함으로써 결핵균의 배양이 촉진되어, 통상의 결핵균 배양기간인 30일인데 반하여 본 발명은 10 일 내지 20일의 기간 내로 결핵균을 배양시킬 수 있다.

- <19> 상기한 본 발명의 배지를 제조하기 위하여 일반 배지에 대량배양된 결핵균의 균체로부터 세포벽 분획물 또는 세포벽 분획물과 라이소자임을 처리할 수 있는데, 본 발명에서 적합한 상기 일반 배지는 이에 한정하는 것은 아니나 예를 들어, 7H9, 7H10, 7H11, 7H12B, Sauton's 배지, Dubos 배지, mWR 배지 또는 Lowenstein-Jensen 배지와 같은 계란기초배지 (egg-based media)등을 들 수 있다.
- <20> 상기와 같이 본 발명에 의하여 결핵균을 배양하는 경우, 결핵균의 배양을 촉진시켜 보다 빠르게 결핵균을 배양할 수 있어, 결핵의 감염여부에 대한 조속한 진단을 할 수 있게 하여 결핵의 치료를 신속하고 용이하게 하고, 보균자를 선별함으로써 결핵의 전파를 예방할 수 있다.
- <21> 한편, 결핵의 감염 여부를 진단하는 방법에는 병소에서 결핵균이 확인되지 않은 경우에도 흉부방사선검사나 다른 여러 가지 증거를 종합한 의사의 임상적 판단으로 결핵을 진단하는 방법이 있으며, 검사실 진단 방법으로는 항산균 염색, 항산균 배양 및 동정, 분자생물학적 방법, 면역학적 방법, 약제 감수성 검사 방법들이 있다. 따라서, 본 발명의 배지에서, 객담, 혈액, 조직 등의 시료에서 분리한 결핵균을 배양하고, PCR법으로 동정하여 결핵의 감염 여부를 진단할 수 있다. 또한, 본 발명의 결핵균의 배양을 촉진시키는 배지를 포함하는 진단키트를 이용하여 결핵의 감염여부를 진단할 수 있다. 상기 키트에 의하여 결핵 감염 여부를 알아내는 방법으로는 본 기술분야에서 공지된 방법인 상기 배지로부터 배양된 결핵균을 염색, 면역학적 방법, 약제 감수성 검사 방법을 사용하여 알아낼 수 있다. 상기 진단 키트는 본 발명의 결핵균 배양을 촉진시키는 배양배지를 포함하므로, 결핵균의 배양을 촉진시켜 보다 쉽게 상기 결핵균의 감염 여부에 대한 확진 시간을 단축할 수 있게 한다.
- <22> 본 발명의 제 3 견지에 의하면,
- <23> 본 발명은, 상기에서 설명한 결핵균의 배양배지를 제조하는 방법에 관한 것이다. 상기 제 3 견지에 의한 방법은 결핵균을 배양하여 초기 배양액을 제조하는 a)단계, 상기 초기 배양액에서 결핵균체를 수거하여 상기 결핵균체로부터 세포벽 분획물을 얻는 b)단계, 상기 세포벽 분획물에서 세포벽 성분을 분리하는 c)단계 및 상기 세포벽 성분과 라이소자임을 일반 배지에 첨가하는 d)단계를 포함하여 이루어지는 것을 특징으로 한다.
- <24> 본 발명의 일 실시예에서는, 수거된 결핵균체를 분쇄시키고 결핵균체를 이루고 있는 성분을 보다 잘 분리하기 위하여, 수거된 결핵균체를 가압멸균하고 초음파 분쇄 후에 원심분리를 통하여 상기 세포벽 분획물을 얻었고, 상기 세포벽 성분은 상기 세포벽 분획물을 재부유하고 초음파 분쇄한 후 이를 다시 재부유시켜 부유물을 회수함으로써 분리하였다. 세포벽 성분으로부터 탄수화물과 지질 또는 지질단백질 성분을 보다 효율적으로 얻기 위하여 세포벽 분획물을 다시 재부유하여 부유물을 회수한 것이다.
- <25> 본 발명에 있어서, 바람직하게는 상기 세포벽 성분의 농도는 50 ~ 100 $\mu\text{g/ml}$ 인 것을 특징으로 하고, 상기 라이소자임의 농도는 10 ~ 100 $\mu\text{g/ml}$ 인 것을 특징으로 한다.

효 과

- <26> 이상에서 상술한 바와 같이 상기와 같은 본 발명의 결핵균 배양 배지는 대량 배양된 결핵균의 균체로부터 얻은 결핵균의 세포벽 성분을 함유한 분획물, 라이소자임을 포함함으로써 결핵균의 배양을 촉진시켜 보다 빠르게 결핵균을 배양할 수 있으며, 이를 통하여 결핵의 감염여부에 대한 조속한 진단 및 약제 감수성 검사를 빠르게 할 수 있게 하여 결핵의 치료를 용이하게 하고, 결핵을 예방할 수 있는 효과가 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <27> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 하기 실시예는 본 발명을 보다 잘 이해하기 위한 것이며, 본 발명을 이로써 한정하고자 위함이 아니다.

<실시예 1 - 결핵균의 초기배양: Preparation of single cell suspension>

- <29> 7H10-OADC 한천 플레이트에서 결핵균 (*M. tuberculosis* H37Rv, ATCC 27294)과 K 균주 (*M. tuberculosis* K-strain, 국내 유행균주, 연세대학교 의과대학)의 단일집락을 picking-up하여 5 ml의 7H9-OADC 브로쓰에 접종하고 37° C에서 30일간 배양하였다. 배양된 각 균주는 8,000 rpm에서 30분간 원심 분리하여 세균의 펠렛만을 수거하였고 이를 다시 100 ml의 7H9-OADC에 접종하여 37° C에서 30일간 배양하였다. 배양액을 위와 동일하게 제거하고 10 mM PBS (pH7.4)로 세 번 세척하여 펠렛만을 수거하였다. 수거된 펠렛은 균질화하여 단일 균세포

(single bacterial cell)로 만든 후, 1.2 μm 의 주사기 필터를 이용하여 여과한 뒤 현미경으로 관찰하였으며 90% 이상 단세포의 유무를 확인하였다. 이렇게 만든 결핵균의 초기배양액 (Seedlot)은 1ml씩 분주하여 -80°C 에 서 보관하였다. 다른 마이코박테리움 역시 위의 방법으로 초기배양 균주를 제조하였다.

<30> <실시예 2 - 결핵균의 대량배양 및 세포벽 분획 수집>

<31> 상기 실시예 1에 기재된 방법으로 만든 결핵균의 보존 단세포를 7H10-OADC 한천에 확산시켜 집락계수를 실시하였다. 100 μL 의 10^8 CFU/mL의 결핵균을 35 ml의 mWR (pH 6.0) 브로쓰 배지가 들어있는 플라스크에 접종하고 (한 번에 1L 배양, 약 33개의 플라스크) 37°C 에서 표면 스탠딩 배양을 실시한다. 약 한달 동안 37°C 에서 배양한 후, 10,000 x g에서 원심하여 균체만을 모은다. 모아진 균체는 10mM PBS (pH 7.4)로 3번 세척한다. 약 10g의 균체를 50mL의 원추형 관(conical tube)에 분주하고 121도에서 10분간 고압멸균 (autoclaving)하여 균을 사멸시킨다. 10g의 균체를 10ml의 10mM PBS (pH 7.4)에 재부유시키고 초음파 분쇄(45% power, 2분 30초 간격, 6회)를 실시하였다. 초음파 분쇄 후, 3,000 rpm에서 원심하여 상층액만 모으고 이를 다시 27,000 x g에서 30분간 원심하여 펠렛만을 수거하였다. 이 펠렛 분획은 결핵균의 세포벽 성분으로 다량의 탄수화물과 지질 또는 지질단백질을 함유하고 있다.

<32> 수거한 펠렛을 10 ml의 10mM PBS (pH 7.4)에 재부유한 후 10분간 bath sonicator를 이용하여 초음파 분쇄를 실시하여 펠렛이 남지 않도록 재부유하였다. 이를 본 실험의 성장 촉진 인자라 명명하였고 결핵균의 성장을 촉진하는지에 대한 유무를 다양한 실험으로 확인하였다. 본 실험에서는 종 특이적 성장 촉진인자 (species-specific 성장 촉진 인자)를 알아보기 위하여 대조군으로 결핵균의 family에 속하는 *M. bovis* BCG의 추출물을 이용하였다.

<33> 성장 촉진 인자는 다음과 같이 크게 3가지 그룹으로 나누었다.

<34> ① 세포벽 분획

<35> ② 세포벽 분획 + 라이소자임 100 μg /mL (High lysozyme, 하루 동안 37°C 에서 배양)

<36> ③ 세포벽 분획 + 라이소자임 10 μg /mL (Low lysozyme, 하루 동안 37°C 에서 배양)

<37> <실시예 3 - Growth factor의 성장 촉진에 대한 영향>

<38> 본 실시예에서는 상기 실시예 2의 방법으로 추출한 세포벽 분획의 결핵균 성장 촉진 유무를 관찰하기 위하여 성장 촉진 인자를 첨가하는 것과 첨가하지 않은 상태에서 결핵균을 배양하였다.

<39> 위의 실험방법에서 얻어진 결핵균 K 균주의 초기배양액을 CFU 농도별로 나누었고 ($10^1 \sim 10^5$ CFU/mL) 아무것도 첨가하지 않는 대조군그룹(세포벽 분획 only)과 성장인자의 농도를 달리한 Factor A (1:100, 1.0%), Factor B (1:1000, 0.1%)를 첨가하여 7H10-OADC 배지에 각각 5 μL 씩 스폿팅하였고 37°C 에서 3주간 배양하였다. 그 결과 도 1을 참고하면, 대조군 (control)에서는 3주 배양시 10^1 과 10^2 에서는 집락을 관찰할 수 없었으나 성장 촉진 인자가 첨가된 Factor A 와 Factor B에서는 모두 자라는 것이 확인되었다. 또한 농도 의존적으로 결핵균의 성장속도가 촉진되는 것을 확인하였다 (Factor A 와 Factor B).

<40> 결론적으로 같은 배양시간의 조건에서 성장 촉진 인자를 첨가하여 배양한 결핵균에서는 대조군에 비하여 결핵균의 성장이 촉진되었고 1% 포함한 Factor A에서는 10^2 CFU의 집락의 크기가 대조군의 10^4 CFU 정도와 유사함을 확인하였다 (약 100배의 성장 효과 관찰). 이는 높은 농도의 균수보다 낮은 농도의 균수가 존재할 때 더욱 효과적으로 결핵균의 증식을 촉진시킨다는 것을 의미한다. 도 2를 참고하면, 위의 실험을 반복하였을 때 역시 동일한 결과를 얻었다.

<41> <실시예 4 - 성장 촉진 인자의 브로쓰 배양에 대한 영향>

<42> 본 실시예에서는 추출한 성장 촉진 인자가 브로쓰 배양에서도 효과가 있는지를 알아보기 위하여 resazurin microtitre assay (REMA) plate method 실험을 실시하였다. 7H9-OADC 브로쓰에 1:100의 비율로 성장 촉진 인자를 첨가한 것 (1%, Factor A)과 1:1000 (0.1%, Factor B)으로 첨가한 것을 아무것도 첨가하지 않은 대조군 (control)과 비교하였다.

<43> 그 결과 도 3을 참고하면, 브로쓰 배양시에도 성장 인자의 농도 의존적으로 약 100배의 성장 촉진 효과가 관찰되었다 (Factor A: 10^1 , control: 10^3).

<44> <실시예 5 - 종 특이적 성장 촉진인자의 확인 >

<45> 라이소자임과 함께 종 특이적 성장 촉진인자의 확인 (Species-specific 성장 촉진 인자)을 위하여 BCG의 세포벽 추출물을 이용하였다 (도 4). 그룹은 크게 동일한 양의 세포벽에 (1%, 1:100 dilution in broth media) 높은 농도의 라이소자임 (HL: high concentration of lysozyme, 100 μ g/mL)과 낮은 농도의 라이소자임 (LL: low concentration of lysozyme, 10 μ g/mL)을 첨가하여 배양하였다.

<46> 그 결과, 결핵균 K 균주의 성장에 BCG 추출물보다 특이적으로 결핵균 K 균주의 세포벽 성분을 첨가하였을 때 유의적으로 빠른 성장을 보였다. 또한 라이소자임을 첨가하였을 때 유의적으로 결핵균의 성장이 촉진됨을 확인할 수 있었다. 도 4에 나타난 바와 같이, 대조군 (control)의 7일째 배양에서 얻어진 균 수는 성장 촉진 인자와 라이소자임을 첨가한 그룹의 4일째의 균 수와 유사하였고 결핵균의 성장을 특이적으로 촉진함을 확인하였다.

<47> <실시예 6 - 마이코박테리아 파지에서 종 특이적 성장 촉진인자의 확인>

<48> 마이코박테리아 파지 (mycobacterial phage)를 이용하여 실시예 5와 동일한 실험을 실시하였다. 즉, 균 수가 많으면 마이코박테리아 파지가 결핵균을 용해시키는 비율이 높으므로 성장이 촉진되면 그 만큼 마이코박테리아 파지에 대한 용해가 높게 일어난다. 이를 바탕으로 마이코박테리아 파지를 이용하여 relative lysis unit (RLU)을 측정하였을 때 control에 비하여 성장 촉진 인자가 첨가된 결핵균은 그 성장이 매우 빠르게 촉진되었다.

<49> 도 5를 참고하면, control의 8일째 성장비율은 성장 촉진 인자와 라이소자임이 첨가된 결핵균의 2.5일에서 5일 정도로 매우 빠르게 성장이 촉진되는 것을 확인하였다.

<50> 본 발명은 실시예를 참고로 설명되었으나, 이는 예시적인 것에 불과하며, 본 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 타 실시예가 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서, 본 발명의 진정한 기술적 보호 범위는 첨부된 특허청구범위의 기술적 사상에 의해 정해져야 할 것이다.

도면의 간단한 설명

<51> 도 1은 성장촉진 인자에 따른 결핵균 K 균주의 성장 속도를 비교한 것을 나타낸 도면;

<52> 도 2는 동일한 실험에 의한 성장촉진 인자에 따른 결핵균 K 균주의 성장 속도를 비교한 것을 나타낸 도면;

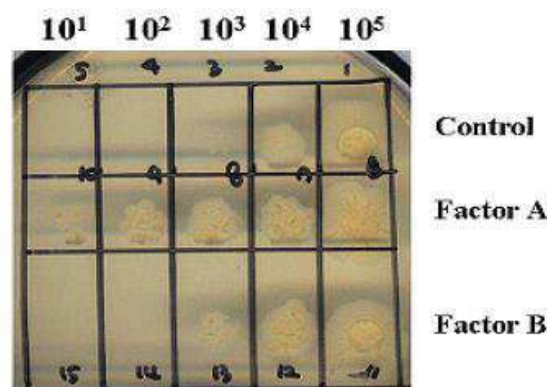
<53> 도 3은 성장촉진인자의 농도에 따른 효과를 나타낸 도면;

<54> 도 4는 종 특이적 성장 촉진인자를 나타내는 그래프; 및

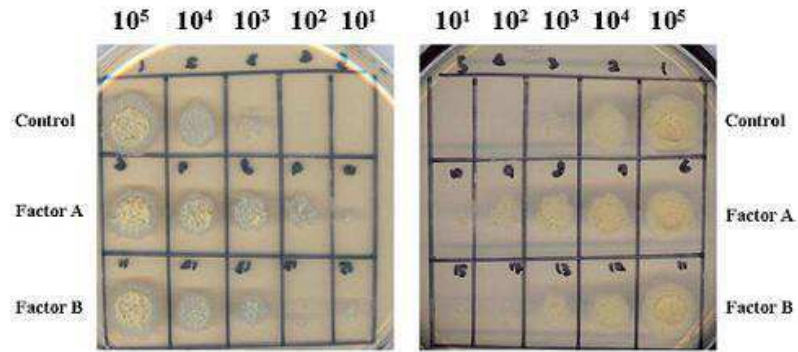
<55> 도 5는 마이코박테라아 파지를 이용하여 종 특이적 성장 촉진 인자를 나타낸 그래프이다.

도면

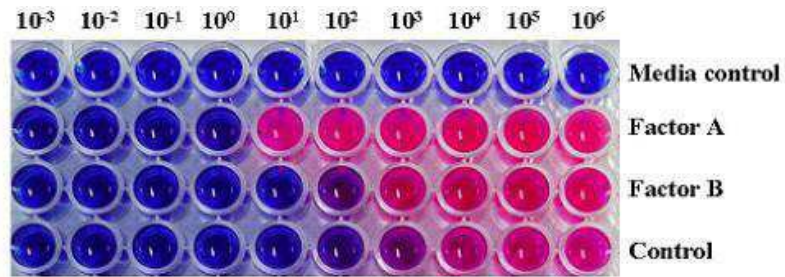
도면1



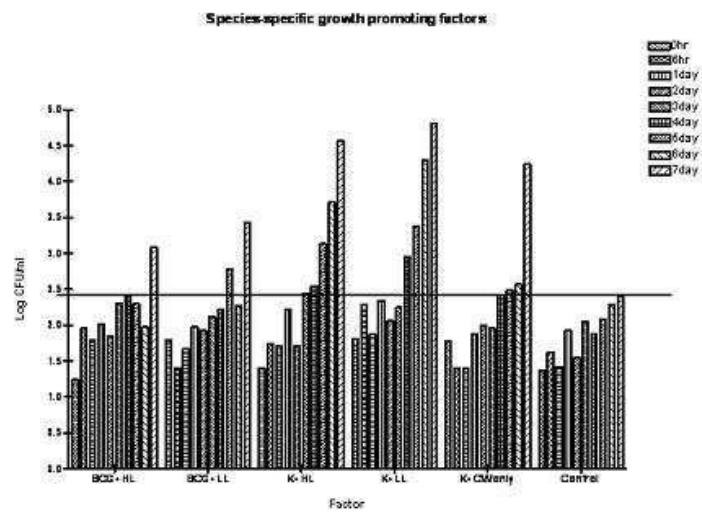
도면2



도면3



도면4



도면5

