



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/00 (2006.01) G01N 31/22 (2006.01)

G01N 21/78 (2006.01)

(21) 출원번호

10-2013-0064867

(22) 출원일자

2013년06월05일

심사청구일자

2014년05월14일

기술이전 희망 :

기술양도, 실시권허여, 기술지도

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

(72) 발명자

김의경

경상남도 진주시 석갑로53번길 10, 101동 206호

(평가동, 들말대경아파트)

채진호

경기도 군포시 고산로517번길 20, 907동 1603호

(산본동, 금강1차아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인충정

전체 청구항 수 : 총 12 항

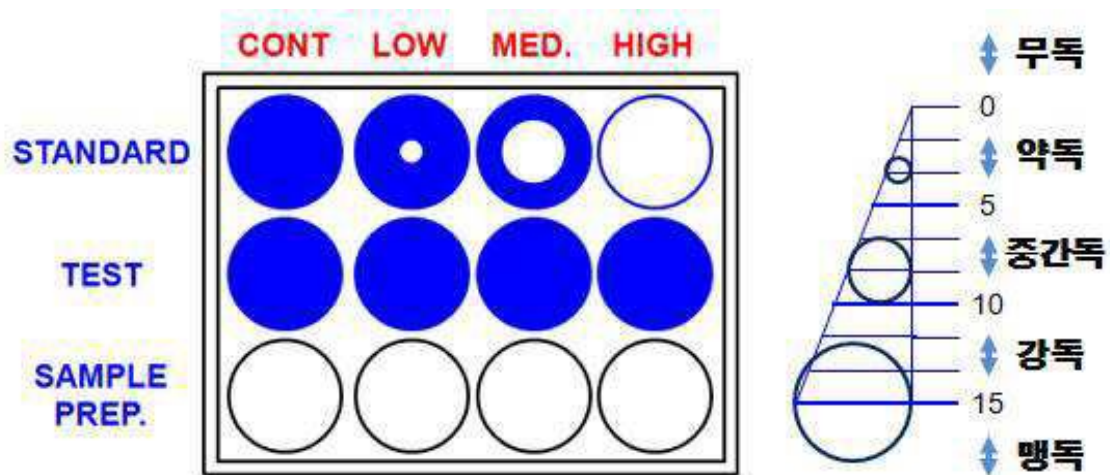
(54) 발명의 명칭 천연독 독성 평가 방법 및 키트

(57) 요약

본 발명은 천연독 독성 평가 방법 및 키트에 관한 것으로, 구체적으로는 젤라틴과 ELISA 코팅 버퍼(ELISA coating buffer)의 혼합 용액이 담겨있는 웰 플레이트(well plate)를 이용하여 천연독에 의한 사고 현장에서 신속하고 정확하게 독성을 평가할 수 있는 천연독 독성 평가 방법 및 키트에 관한 것이다.

본 발명의 천연독 독성 평가 방법 및 키트는 보다 간편하면서도 신속·정확하게 천연독의 독성을 평가할 수 있게 해주므로, 천연독에 의한 사고 현장에서 직접 활용될 수 있으며, 보관상 어려움이 없기 때문에 응급실 등에 비치되어 사용될 수 있다.

대표도 - 도5



(72) 발명자

윤원득

부산광역시 기장군 기장읍 차성로 461, 105동 140
4호 (이진캐스빌블루 1차아파트)

정은선

충청북도 청원군 강내면 태성탑연로 262, 101동-
나 425호(태암수정아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0927

부처명 국토해양부

연구관리전문기관 국립수산물과학원

연구사업명 유해해양생물 해파리 피해예방연구사업

연구과제명 해파리 독성 측정을 위한 현장키트 개발

기 여 율 1/1

주관기관 (주)한국종합환경연구소

연구기간 2011.11.09 ~ 2012.05.31

특허청구의 범위

청구항 1

젤라틴과 ELISA 코팅 버퍼(ELISA coating buffer)를 혼합한 용액을 웰 플레이트(well plate)에 분주하여 응고시키는 단계;

천연독이 포함된 시료를 용매와 섞어 균질화시킨 후 상기 웰 플레이트(well plate)에 분주하여 젤라틴과 반응시키는 단계;

상기 시료를 쏟아내고 상기 웰 플레이트(well plate)를 세척하는 단계;

젤라틴 염색약을 이용하여 상기 웰 플레이트(well plate) 안에 남아있는 젤라틴을 염색하는 단계;

상기 염색약을 쏟아내고 상기 웰 플레이트(well plate)를 세척하는 단계; 및

상기 웰 플레이트(well plate) 가운데 나타나는 투명한 부분의 지름을 측정하여 독성을 평가하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 천연독 독성 평가 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 ELISA 코팅 버퍼(ELISA coating buffer)는 Na-Carbonate 버퍼인 것을 특징으로 하는 천연독 독성 평가 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 균질화는 천연독이 포함된 시료를 용매와 함께 주사기에 넣어 주사바늘을 끼운 채 빈 웰 플레이트(well plate)에 분사함으로써 이루어지는 것을 특징으로 하는 천연독 독성 평가 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 용매는 증류수, PBS 용액 또는 리액션 버퍼(Reaction buffer, 25 mM MgCl₂ 수용액)인 것을 특징으로 하는 천연독 독성 평가 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 염색약은 폰소S(Ponceau S), 폰소3R(Ponceau 3R), 아미노블랙(Amido Black), 쿠마시브릴리언트블루(Coomassie Brilliant Blue), 브롬페놀블루(Brom Phenol Blue), 리사민그린(Lissamine Green), 니그로신(Nigrosine), 아조카르민(Azocarmine) 및 산성푸크신(Acid Fuchsin)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 천연독 독성 평가 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 지름이 0mm인 경우는 무독, 0mm 초과 5mm 이하인 경우는 약독, 5mm 초과 10mm 이하인 경우는 중간독, 10mm 초과 15mm 이하인 경우는 강독, 15mm 초과인 경우는 맹독인 것으로 독성을 평가하는 것을 특징으로 하는 천연독 독성 평가 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 천연독은 해파리, 뱀, 전갈 또는 거미의 독인 것을 특징으로 하는 천연독 독성 평가 방법.

청구항 8

젤라틴과 ELISA 코팅 버퍼(ELISA coating buffer)의 혼합 용액이 담겨있는 대조군 웰 플레이트(well plate)와 시험용 웰 플레이트(well plate) 및 시료 균질화용 웰 플레이트(well plate)를 포함하는 것을 특징으로 하는 천연독 독성 평가 키트.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 대조군 웰 플레이트(well plate) 대신 반응 크기에 따른 독성 평가 결과가 도시되어 있는 대조표를 포함하는 것을 특징으로 하는 천연독 독성 평가 키트.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 시험용 웰 플레이트(well plate)는 바닥에 반응 크기를 측정하기 위한 눈금이 표시되어 있는 것을 특징으로 하는 천연독 독성 평가 키트.

청구항 11

제8항에 있어서,

시료 균질화용 주사기를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 천연독 독성 평가 키트.

청구항 12

제8항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 천연독은 해파리, 뱀, 전갈 또는 거미의 독인 것을 특징으로 하는 천연독 독성 평가 키트.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 천연독 독성 평가 방법 및 키트에 관한 것으로, 구체적으로는 젤라틴과 ELISA 코팅 버퍼(ELISA coating buffer) 혼합 용액이 담겨있는 웰 플레이트(well plate)를 이용하여 천연독에 의한 사고 현장에서 신속하고 정확하게 독성을 평가할 수 있는 천연독 독성 평가 방법 및 키트에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 뱀, 거미, 전갈, 해파리 등은 천연독을 만들어내는 대표적인 생물로, 산과 바다 등지에서 사람이 이들에게 물리거나 쏘여 천연독의 피해를 입는 일이 끊임없이 발생해 왔다. 따라서 이러한 천연독에 의한 피해에 대처하기 위하여 천연독의 성분을 분석하거나 독성을 평가하는 방법이 지속적으로 연구되어 왔다.

[0003] 최근 시료 분석 기술이 발달함에 따라 다양한 천연독 성분 분석이 시행되었으며, 그 결과 생물이 가지는 천연독에는 대부분 단백질을 분해하는 MMP(matrix metalloproteinase)가 포함되어 있다는 사실이 밝혀졌다. 특히 뱀과 거미[Olga *et al.*, Toxins, 3(309-344), 2011], 전갈[Ramin *et al.*, Toxicon, 56(521-525), 2010] 및 해파리[Lee *et al.*, Toxicon, 58(277-84), 2011]의 독은 15종의 MMP 타입 중 젤라티나아제(gelatinase) 타입의 MMP를 포함하는 것으로 알려져 있다.

[0004] 독성을 평가하는 방법으로는 기존에는 세포독성시험(cytotoxicity test)이 주로 사용되었으며, 쥐(Mouse)나 아르테미아(Artemia, Brine shrimp)를 이용한 독성 평가 방법도 사용되어 왔다. 그러나 이러한 방법들은 비용과 시간 면에서 효율성이 떨어지고, 특히 현미경 등의 실험 장비가 제대로 갖추어진 실험실 내에서만 실험이 이루어질 수 있어서 사고 현장에서 곧바로 독성을 측정함에 어려움이 있어 왔다.

- [0005] 그런데 최근 본 발명자들의 다른 선행연구에 의해 기존의 세포독성시험이나 쥐, 아르테미아 독성 평가법보다 효과적이면서 정확한 독성 평가법이 반영된 젤라틴 키트가 공개된바 있는데, 간편하게 휴대 가능하기 때문에 사고 현장에서 곧바로 사용하여 독성을 평가할 수 있다는 장점을 가지는 것으로 확인되었다[김의경, 한국종합환경연구소 연구보고서, 2011].
- [0006] 상기 젤라틴 키트를 보다 구체적으로 살펴보면, 젤라틴 키트에는 용액 상태로 균질화된 젤라틴이 담겨있는 웰 플레이트(well plate)가 포함된다. 이러한 웰 플레이트(well plate)에 독성을 지닌 생체 시료를 주사기를 이용하여 균질화 시킨 후 분주하여 30분 정도 상온에서 반응시키게 되면, 독성에 포함된 젤라티나아제(gelatinase)에 의하여 젤라틴의 일부가 분해되어 웰 플레이트(well plate)로부터 떨어져 나가게 되며, 웰 플레이트(well plate)에 남아있는 젤라틴을 염색하여 색깔을 대조군과 비교함으로써 독성 평가를 수행할 수 있다.
- [0007] 그러나 이러한 독성 평가 키트 및 방법에 대해서는 실험 중 바닥에 코팅된 젤라틴이 탈락 및 유실될 수 있다는 점, 감수성이 높지 않아 정확한 평가가 어렵다는 점 및 정성평가만 가능할 뿐 정량평가가 불가능하다는 점, 색깔을 정확하게 비교하기 위해서는 고가의 흡광도가 필요하여 보급이 어렵다는 점 등의 문제점이 제기되어 왔다.
- [0008] 또한 젤라틴을 사용한 키트와 관련하여 대한민국 특허공보 제2003-0096986호에서는 젤라티나아제(gelatinase)의 활성을 측정하는 키트를 제공하는 방법이, PCT 특허공보 제2006-041130호에는 젤라틴을 이용하여 MMP의 활성을 평가하는 방법이 개시되어 있으나, 이들 발명은 젤라틴의 분해로 인하여 시료의 pH가 달라지는 것을 지시약으로 확인하는 방법에 관한 것이거나 SDS-PAGE법을 위한 기관 형태의 키트에 대한 것으로, 젤라틴이 젤라티나아제(gelatinase)와 반응하여 웰 플레이트(well-plate)로부터 유실됨으로 인하여 남은 젤라틴의 염색 정도가 달라지는 것에 관한 내용 및 독성을 평가하는 구체적인 방법은 전혀 기재되어 있지 않다.
- [0009] 따라서 천연독에 의한 사고 현장에서 간편하면서도 신속·정확하게 천연독의 독성을 평가할 수 있는 독성 평가 방법과 키트는 당 분야에 있어서 계속적으로 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0010] (특허문헌 0001) 대한민국 특허공보 제2003-0096986호
(특허문헌 0002) PCT 특허공보 제2006-041130호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명자들은 젤라틴과 ELISA 코팅 버퍼(ELISA coating buffer) 혼합 용액이 담겨있는 웰 플레이트(well plate)를 이용하여 보다 간편하면서도 신속·정확하게 천연독의 독성을 평가할 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0012] 따라서, 본 발명의 목적은 간편하면서도 신속·정확하게 천연독의 독성을 평가할 수 있는 천연독 독성 평가 방법을 제공하는 것이다.
- [0013] 또한, 본 발명의 다른 목적은 간편하면서도 신속·정확하게 천연독의 독성을 평가할 수 있게 해주는 천연독 독성 평가 키트를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 젤라틴과 ELISA 코팅 버퍼(ELISA coating buffer)를 혼합한 용액을 웰 플레이트(well plate)에 분주하여 응고시키는 단계; 천연독이 포함된 시료를 용매와 섞어 균질화시킨 후 상기 웰 플레이트(well plate)에 분주하여 젤라틴과 반응시키는 단계; 상기 시료를 쏟아내고 상기 웰 플레이트(well plate)를 세척하는 단계; 젤라틴 염색약을 이용하여 상기 웰 플레이트(well plate) 안에 남아있는 젤라틴을 염색하는 단계; 상기 염색약을 쏟아내고 상기 웰 플레이트(well plate)를 세척하는 단계; 및 상기 웰 플레이트(well plate) 가운데 나타나는 투명한 부분의 지름을 측정하여 독성을 평가하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 천연독 독성 평가 방법을 제공한다.

[0015] 상기 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 젤라틴과 ELISA 코팅 버퍼(ELISA coating buffer)의 혼합 용액이 담겨있는 대조군 웰 플레이트(well plate)와 시험용 웰 플레이트(well plate) 및 시료 균질화용 웰 플레이트(well plate)를 포함하는 것을 특징으로 하는 천연독 독성 평가 키트를 제공한다.

발명의 효과

[0016] 본 발명의 천연독 독성 평가 방법 및 키트는 보다 간편하면서도 신속·정확하게 천연독의 독성을 평가할 수 있게 해주므로, 천연독에 의한 사고 현장에서 직접 활용될 수 있으며, 보관상 어려움이 없기 때문에 응급실 등에 비치되어 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 본 발명의 일실시예에 따라 제조된 ELISA 코팅 버퍼(ELISA coating buffer)와 젤라틴의 혼합 용액이 분주된 웰 플레이트(well plate)를 이용하여 노무라입깃해파리의 독성을 평가하였을 때(좌측 2개의 열)와, 기존의 방식에 따라 제조된 젤라틴 용액만이 분주된 웰 플레이트(well plate)를 이용하여 노무라입깃해파리의 독성을 평가하였을 때(우측 2개의 열)를 비교한 사진이다.

도 2는 본 발명의 일실시예에 따라 얼리지 않은 신선한 상태의 시료를 사용하여 독성을 평가하였을 때(위)와, 동결보관된 시료를 사용하여 독성을 평가하였을 때(아래)를 비교한 사진이다.

도 3은 본 발명의 일실시예에 따라 천연독이 포함된 시료를 균질화 시키기 위한 용매로 증류수, PBS 용액 및 리액션 버퍼(Reaction buffer)를 사용했을 때 나타나는 결과의 민감도를 비교한 사진이다.

도 4는 본 발명의 일실시예에 따라 독소의 농도를 0.25 mg/ml 에서 4.0 mg/ml로 증가시켰을 때 젤라틴이 깎여나간 반응 부분의 크기 변화를 나타낸 사진(좌) 및 그래프(우)다.

도 5는 본 발명의 일실시예에 따라 젤라틴이 깎여나간 반응 부분의 크기에 따른 독성 평가 결과가 도시되어 있는 대조표이다.

도 6은 본 발명의 일실시예에 따라 5종의 해파리로부터 얻은 26개 시료를 본 발명에 따라 제조된 웰 플레이트(well plate)에 반응시킨 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 하기의 정의를 가지며 본 발명의 관련 분야에서 통상의 기술자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미에 부합된다. 또한 본 명세서에는 바람직한 방법이나 시료가 기재되나, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 도입된다.

[0019] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0020] 본 발명의 일실시예에 따르면, 간편하면서도 신속·정확하게 천연독의 독성을 평가하기 위하여 젤라틴과 ELISA 코팅 버퍼(ELISA coating buffer)를 혼합한 후 웰 플레이트(well plate)에 분주하고 이를 클린벤치에서 24시간 건조시켜 시험용 웰 플레이트(well plate)를 만들 수 있다. 그리고 천연독이 함유되어 있는 해파리 촉수를 용매와 섞어 균질화시킨 후 제조된 웰 플레이트(well plate)에 분주하여 30분 가량 반응시킨 다음, 가볍게 세척하고 웰 플레이트(well plate)의 남은 부분을 염색한 후 다시 동일한 방법으로 세척하는 과정을 수행할 경우, 독성에 포함된 젤라티나아제(gelatinase)에 의하여 분해된 젤라틴이 웰 플레이트(well plate)로부터 떨어져 나가 웰 플레이트(well plate) 가운데 원형의 투명한 부분이 생겨나게 되며, 원의 지름을 측정함으로써 독성을 평가할 수 있다.

[0021] 이에 본 발명은, 젤라틴과 ELISA 코팅 버퍼(ELISA coating buffer)를 혼합한 용액을 웰 플레이트(well plate)에 분주하여 응고시키는 단계; 천연독이 포함된 시료를 용매와 섞어 균질화시킨 후 상기 웰 플레이트(well plate)에 분주하여 젤라틴과 반응시키는 단계; 상기 시료를 쏟아내고 상기 웰 플레이트(well plate)를 세척하는 단계; 젤라틴 염색약을 이용하여 상기 웰 플레이트(well plate) 안에 남아있는 젤라틴을 염색하는 단계; 상기 염색약을 쏟아내고 상기 웰 플레이트(well plate)를 세척하는 단계; 및 상기 웰 플레이트(well plate) 가운데

나타나는 투명한 부분의 지름을 측정하여 독성을 평가하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 천연독 독성 평가 방법을 제공한다. 이때 젤라틴을 염색하는 단계와 천연독이 포함된 시료를 웰 플레이트(well plate)에 분주하여 반응시키는 단계는 순서를 바꾸어 진행할 수도 있다.

[0022] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 ELISA 코팅 버퍼(ELISA coating buffer)는 Na-Carbonate 버퍼(H_2O 1000 ml, Na_2CO_3 1.6g, $NaHCO_3$ 2.4g)일 수 있는데, ELISA 실험(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)에 사용되는 코팅 버퍼(coating buffer)라면 Na-Carbonate 버퍼 외에도 PBS 용액($NaCl$ 8.0g, KH_2PO_4 0.2g, Na_2HPO_4 1.1g) 등이 사용될 수 있다.

[0023] 상기 웰 플레이트(well plate)를 제조함에 있어, 젤라틴만 단독으로 사용하는 기존의 방법에 의할 경우 독소의 효소활성에 의하여 젤라틴이 전체적으로 깎여나가 색상 변화를 관찰하는 정성적인 방법으로 독성을 평가할 수밖에 없었다. 그러나 ELISA 코팅 버퍼(ELISA coating buffer)를 젤라틴과 혼합하여 사용함으로써 인하여 독소의 효소활성에 의한 젤라틴 깎임 현상이 웰 플레이트(well plate) 가운데를 중심으로 원형으로 나타나게 되었으며, 젤라틴이 깎여 나가서 생긴 원의 직경(diameter)을 측정하는 방법을 통해 독성을 정량적으로 평가할 수 있게 되었다(도 1 참조).

[0024] 이는 ELISA 실험시 강한 소수성을 갖는 웰 플레이트(well plate) 표면에 항체를 부착시키기 위해 코팅 버퍼(coating buffer)를 사용하는 원리를 본 발명의 천연독 독성 평가 방법에 적용한 것으로, 본 발명자들은 웰 플레이트(well plate)와 젤라틴의 흡착이 강해질 경우 코팅된 젤라틴이 벗겨져서 떨어지지 않는다는 원리에 착안하여 본 발명의 천연독 독성 평가 방법을 고안해 내었으며, 실험을 통해 젤라틴 깎임 현상이 실제로 독소의 효소활성 정도에 비례하는 크기의 원형으로 발생하는 것을 확인할 수 있었다.

[0025] 이때 젤라틴 코팅은 젤라틴을 웰 플레이트(well plate)에 분주한 후 편평한 테이블 위에 두어 건조함으로써 이루어지는데, 코팅 버퍼(coating buffer)가 첨가된 경우 젤라틴의 웰 플레이트(well plate)에 대한 흡착력이 강화되어 가장자리 부분이 젤라틴이 몰려 두꺼워지게 된다. 반면 웰 플레이트(well plate)의 가운데 부분은 상대적으로 얇게 코팅되어 반응 상태를 쉽게 관찰할 수 있게 되며, 효소에 의하여 젤라틴이 분해될 경우 가운데 부분부터 원 모양으로 젤라틴 유실현상이 발생하게 된다.

[0026] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 시료를 용매와 섞어 균질화 시키는 단계는 천연독이 포함된 시료를 용매와 함께 주사기에 넣어 주사바늘을 끼운 채 빈 웰 플레이트(well plate)에 분사함으로써 이루어질 수 있으며, 바람직하게는 상기 과정을 3회 내지 7회 반복함으로써 이루어질 수 있다.

[0027] 이때 천연독이 포함된 시료는 $-70^{\circ}C$ 에서 동결보관된 것을 녹여서 사용하더라도 얼리지 않은 신선한 상태의 시료를 사용한 경우와 큰 차이를 보이지 않으므로, 상기 천연독이 포함된 시료로는 얼리지 않은 신선한 상태의 시료와 동결보관된 시료를 모두 사용할 수 있다(도 2 참조).

[0028] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 시료를 균질화 시키기 위한 용매로는 증류수, PBS 용액 또는 리액션 버퍼(Reaction buffer, 25 mM $MgCl_2$ 수용액)가 사용될 수 있으며, 바람직하게는 리액션 버퍼(Reaction buffer)가 사용될 수 있는데, 리액션 버퍼(Reaction buffer)는 zymography 실험의 gel incubation 단계에서 사용하는 버퍼로 여러 종류의 양이온이 포함되어 있어 효소반응을 촉진시킬 수 있으므로, 이를 용매로 사용할 경우 더욱 민감한 결과를 얻을 수 있다(도 3 참조).

[0029] 이렇게 용매에 균질화된 시료를 제조된 웰 플레이트(well plate)에 분주하여 상온에서 30분정도 반응시키면 시료의 독성에 포함된 젤라티나아제(gelatinase)가 웰 플레이트(well plate)에 부착되어 있는 젤라틴을 분해하게 되고, 증류수로 가볍게 세척하면 분해된 젤라틴이 웰 플레이트(well plate)에의 흡착력을 상실하여 떨어져 나가기 때문에 남아있는 젤라틴의 양을 염색 등의 방법으로 파악함으로써 시료의 독성을 평가할 수 있다.

[0030] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 염색약으로는 폰소S(Ponceau S), 폰소3R(Ponceau 3R), 아미노블랙(Amido Black), 쿠마시브릴리언트블루(Coomassie Brilliant Blue), 브롬페놀블루(Brom Phenol Blue), 리사민그린(Lissamine Green), 니그로신(Nigrosine), 아조카르민(Azocarmine) 및 산성푸크신(Acid Fuchsin)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나가 사용될 수 있으며, 바람직하게는 쿠마시브릴리언트블루(Coomassie Brilliant Blue)가 사용될 수 있다.

[0031] 상기 염색약을 웰 플레이트(well plate)에 분사하고 30분 정도가 지난 후 증류수로 웰 플레이트(well plate)를 가볍게 세척하면, 반응이 일어난 가운데 부분을 제외한 가장자리의 젤라틴만 염색되어 남아있는 것을 확인할 수 있다. 이때 반응이 일어난 부분은 웰 플레이트(well plate) 중앙 부분에서 투명한 원형 형태로 나타나는데, 독

성의 농도에 비례하여 가운데 원의 크기가 증가하게 되므로 원의 지름을 측정함으로써 독성을 평가할 수 있다 (도 4 참조).

[0032] 본 발명의 일실시예에 따르면 상기 지름이 0mm인 경우는 무독, 0mm 초과 5mm 이하인 경우는 약독, 5mm 초과 10mm 이하인 경우는 중간독, 10mm 초과 15mm 이하인 경우는 강독, 15mm 초과인 경우는 맹독인 것으로 독성을 평가할 수 있으며, 무독은 독이 없는 것, 약독은 경미한 독성을 가지는 것, 맹독은 수 시간 내에 사망에 이를 수 있는 매우 강한 독성을 가지는 것, 그리고 중간독, 강독은 그 중간 단계를 의미하는 것이나, 이는 시료를 균질화 시키기 위한 용매로 증류수를 사용했을 때의 수치로, 리액션 버퍼(Reaction buffer)를 용매로 사용할 경우 MMP 활성에 영향을 주는 이가(2+) 양이온에 의하여 기준 수치가 더 높아질 수 있으며, 상기 독성 평가기준은 실험자가 환자의 반응에 따라 적절히 조절하여 사용 가능한 것이다. 따라서 본 발명에 따른 독성 평가 방법을 사용할 경우 천연독에 의한 사고 현장에서 즉시 사고 원인 독성을 평가하여 적절한 응급조치를 시행할 수 있다(도 5 참조).

[0033] 본 발명은 또한, 젤라틴과 ELISA 코팅 버퍼(ELISA coating buffer)의 혼합 용액이 담겨있는 대조군 웰 플레이트(well plate)와 시험용 웰 플레이트(well plate) 및 시료 균질화용 웰 플레이트(well plate)를 포함하는 것을 특징으로 하는 천연독 독성 평가 키트를 제공한다.

[0034] 상기 대조군과 시험용 웰 플레이트(well plate)는 키트 구성 단계에서 미리 웰 플레이트(well plate)에 염색약을 분주하는 방식으로 염색 처리하여 사용할 수 있으며, 경우에 따라서는 독성 시료를 먼저 반응시킨 후 남아있는 젤라틴을 염색하는 방식을 선택할 수도 있으나, 후자의 경우 염색약이 키트의 구성으로 포함되어야 하므로 전자의 방법이 바람직하다.

[0035] 키트의 구성에 있어 12 웰 플레이트(12 well plate)를 사용할 수 있는데, 8개의 웰 플레이트(well plate)에 젤라틴과 ELISA 코팅 버퍼(ELISA coating buffer)의 혼합 용액을 분주하여 4개는 이미 독성이 평가된 기준 시료를 반응시키는 대조군으로, 4개는 독성 평가가 필요한 시료를 반응시키는 시험용으로 사용할 수 있으며, 나머지 비어있는 4개의 웰 플레이트(well plate)는 시료를 분쇄하고 용매에 녹이는 시료 균질화용으로 사용할 수 있다.

[0036] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 대조군 웰 플레이트(well plate) 대신 반응 크기에 따른 독성 평가 결과가 도시되어 있는 대조표를 포함할 수 있는데, 여기서 반응 크기는 천연독이 포함된 시료의 효소활성에 의하여 젤라틴이 깎여 나간 원형 부분의 직경을 의미한다. 독성 평가 결과가 도시되어 있는 대조표를 제작하기 위해서는 미리 기준이 되는 독성을 평가해 놓아야 하며, 특정 용매에만 적용될 수 있으므로 용매가 달라질 경우 다른 대조표를 제작해야 하지만, 일단 대조표가 제작되고 나면 별도의 대조군을 사용하지 않고 곧바로 약독, 중간독, 강독 및 맹독으로 독성을 평가할 수 있다.

[0037] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 시험용 웰 플레이트(well plate)는 바닥에 반응 크기를 측정하기 위한 눈금이 표시되어 있는 것을 사용할 수 있는데, 1 mm 단위로 눈금을 표시하거나, 약독, 중간독, 강독 및 맹독의 경계선을 표시하는 방식으로 웰 플레이트(well plate) 바닥에 눈금을 표시하여 사용할 경우, 젤라틴이 깎여나가 투명해진 가운데 부분을 통해 눈금을 확인할 수 있게 되어 보다 편리하고 정확하게 독성을 평가할 수 있다.

[0038] 본 발명의 일실시예에 따르면, 시료 균질화용 주사기를 더 포함할 수 있는데, 주사기에 시료와 증류수, PBS 용액 또는 리액션 버퍼(Reaction buffer)를 넣은 후 바늘을 끼운 채 분사하는 과정을 반복하여 시료를 균질화시킬 수 있다.

[0039] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 천연독은 해파리, 뱀, 전갈 또는 거미의 독일 수 있으나, 이에 제한되는 것이 아니라 젤라티나아제(gelatinase) 타입의 MMP가 포함되어 있는 천연독이라면 어떠한 생물의 독도 본 발명에 따른 천연독 평가 방법 및 키트를 이용하여 독성을 평가할 수 있다.

[0040] 이하, 실시예 및 실험예를 통하여 본 발명을 상세하게 설명하고자 한다. 실시예 및 실험예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이러한 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

[0041] [실시예 1] 독성 평가 방법

[0042] 본 발명자들은 젤라티나아제(gelatinase) 타입의 MMP가 포함된 천연독을 생산하는 생물 중 하나인 해파리를 대

상으로 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0043] **재료 및 방법**

[0044] 우리나라 연안에서 노무라입깃해파리, 커튼원양해파리, 보름달물해파리, 야광원양해파리 및 팔방라드케해파리를 채집하여 축수를 -70 °C에서 동결보관 시킨 후 실험 당일에 녹여서 사용하였다.

표 1

[0045] 사용된 해파리 샘플

번호	해파리 종류	채집 날짜	채집 위치	정보
1	N. nomurai	11.10.11	부산	
2	D. quinquecirrha	11.08.25	통영 죽림만	
3	D. quinquecirrha	12.05.22	마산만	갯지름 12cm
4	D. quinquecirrha	12.05.22	마산만	갯지름 13cm
5	D. quinquecirrha	12.05.22	마산만	갯지름 18cm
6	D. quinquecirrha	12.05.22	마산만	갯지름 20cm
7	D. quinquecirrha	12.05.23	마산만	갯지름 ~10cm
8	D. quinquecirrha	12.05.23	마산만	갯지름 10~20cm
9	D. quinquecirrha	12.05.23	마산만	갯지름 20~30cm
10	D. quinquecirrha	12.06.14	통영 복신만	갯지름 ~10cm
11	D. quinquecirrha	12.06.14	통영 복신만	갯지름 10~20cm
12	D. quinquecirrha	12.06.15	마산만	갯지름 20~30cm
13	D. quinquecirrha	12.06.15	진동만	갯지름 20~30cm
14	D. quinquecirrha	12.06.15	진동만	갯지름 30~40cm
15	A. aurita	11.08.25	통영 죽림만	
16	A. aurita	12.05.23	마산만	갯지름 ~5cm
17	A. aurita	12.05.23	마산만	갯지름 5~cm
18	A. aurita	12.06.15	마산만	갯지름 5~10cm
19	A. aurita	12.06.15	마산만	갯지름 10~20cm
20	A. aurita	12.06.15	진동만	갯지름 5~10cm
21	A. aurita	12.06.15	진동만	갯지름 10~20cm
22	P. noctiluca	12.06.20	제주 성산포	갯지름 10cm
23	P. noctiluca	12.06.20	제주 성산포	갯지름 30cm
24	R. octopunctata	12.02.21	부산 대변항	
25	R. octopunctata	12.03.13	부산 대변항	
26	P. physalis	12.07.07	제주 중문 해수욕장	autolysis 많이 됨

[0046] **독성 시험용 웰 플레이트(well plate) 제조**

[0047] 4 %(w/v)의 젤라틴을 37 °C에서 30분간 균질화(homogenization) 시켜 용액 상태로 만든 후, 2X 농도의 ELISA 코팅 버퍼(ELISA coating buffer, Na-Carbonate 버퍼)와 1:1(v/v) 비율로 섞어 혼합 용액을 만들었다. 그리고 웰 플레이트(well plate)에 300 ul/well로 분주한 후 환풍기가 작동 중인 클린벤치에서 24시간 건조시켜 응고시킴으로써 독성 시험용 웰 플레이트(well plate)를 제조하였다.

[0048] **독성 시료 반응 및 염색**

[0049] 완전히 녹은 해파리의 축수를 작은 크기로 잘라 물과 1:1(v/v) 비율로 섞은 후 주사기에 1~3 ml 넣고 주사바늘을 끼운 채 빈 웰 플레이트(well plate)에 힘차게 분사시키는 것을 5회 가량 반복하여 시료를 균질화 시켰다.

[0050] 이렇게 균질화 과정을 마친 시료를 제조된 웰 플레이트(well plate)에 0.5 ml 분주하여 상온에서 30분간 반응시켰으며, 반응이 끝난 후 시료를 쏟아내어 제거하고 증류수 0.5 ml 를 이용하여 가볍게 세척하였다.

[0051] 세척을 마친 웰 플레이트(well plate)에 염색약인 0.25 %(w/v)의 쿠마시브릴리언트블루(Coomassie Brilliant

Blue) 0.5 ml를 분주하여 30분간 남아있는 젤라틴을 염색하였으며, 반응이 끝난 후 염색약을 쏟아내어 제거하고 증류수 0.5 ml를 이용하여 동일한 방법으로 가볍게 세척하였다.

[0052] 독성 평가

[0053] 상기 과정들을 수행한 결과 중앙 부분의 젤라틴이 독성 시료의 효소반응에 의하여 깎여나간 웰 플레이트(well plate)를 얻을 수 있었는데, 깎여나간 부분의 크기를 측정된 후 도 5의 방법으로 독성을 평가하였다.

[0054] 그 결과 노무라입깃해파리(1)는 시료가 한 가지 뿐이어서 달리 비교할 대상이 없었으나, 커튼원양해파리(2~14)는 채집 시기나 위치에 따라 독성이 다르게 나타남을 알 수 있었다. 또한, 보름달물해파리(15~21)와 야광원양해파리(22~23)는 독성이 거의 없는 무독인 반면, 팔방라드케해파리(24~25)는 독성이 매우 강한 강독임을 확인할 수 있었다. 특히 제주도에서 채집한 작은부레관해파리(26)는 독성이 가장 높은 맹독인 것으로 나타났다(도 6 참조).

[0055] 도 6의 결과는 도 5에 제시된 기준에 따라 정량적으로 평가될 수 있는데, 1번, 3번, 4번, 8번 및 24번 내지 26번의 결과에서 모두 가운데 원의 크기가 8mm 이상으로 관찰되었으며, 이러한 독성은 중간독으로 평가될 수 있다.

[0056] [실시예 2] 독성 평가 키트 제조

[0057] 12 웰 플레이트(12 well plate)를 이용하여 독성 평가 키트를 제조하였는데, 8개의 웰 플레이트(well plate)에는 젤라틴과 ELISA 코팅 버퍼(ELISA coating buffer)의 혼합 용액을 300 ul/well씩 분주하여 4개는 이미 독성이 평가된 기준 시료를 반응시키는 대조군으로, 4개는 독성 평가가 필요한 시료를 반응시키는 시험용으로 사용될 수 있도록 하였으며, 나머지 비어있는 4개의 웰 플레이트(well plate)는 시료를 분쇄하고 용매에 녹이는 시료 균질화용으로 사용될 수 있도록 구성하였다.

[0058] 그리고 대조군 및 시험용 웰 플레이트(well plate)에 쿠마시브릴리언트블루(Coomassie Brilliant Blue) 0.5 ml를 분주하여 30분간 남아있는 젤라틴을 염색하였으며, 반응이 끝난 후 염색약을 쏟아내어 제거하고 증류수 0.5 ml를 이용하여 가볍게 세척한 후 완전히 건조시켜 간편하게 사용 가능한 형태로 키트를 제조하였다.

[0059] [실험예] 정량분석의 정확성 확인

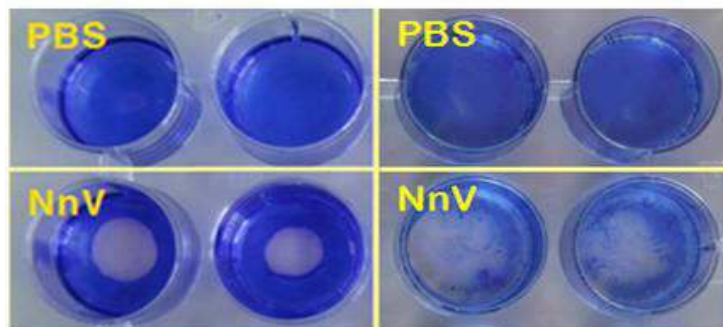
[0060] 본 발명에 따른 천연독 독성 평가 방법 및 키트를 통해 이루어지는 독성의 정량적인 평가가 실제 독소의 농도를 반영하는 것인지 확인하기 위하여, 독소의 농도를 달리하며 반응 부분의 크기 변화를 관찰하였다.

[0061] 그 결과 독소의 농도가 0.25 mg/ml 에서 4.0 mg/ml로 증가함에 따라 가운데 젤라틴이 깎여나간 부분의 크기가 매우 정확한 형태로 비례하여 증가하는 것을 확인할 수 있었다(도 4 참조). 이는 본 발명에 따른 천연독 독성 평가 방법 및 키트를 통해 독소의 효소활성 정도를 정확하게 평가할 수 있다는 것을 의미한다.

[0062] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

도면1



노무라입깃해파리 추출독 0.3mg/well

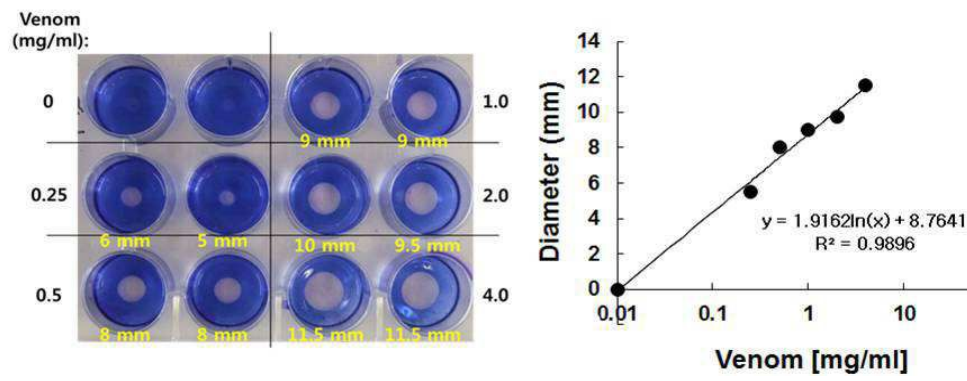
도면2

CONT	Venom	CONT	Venom	
				노무라입깃해파리 생 축수
				노무라입깃해파리 동결보관 축수

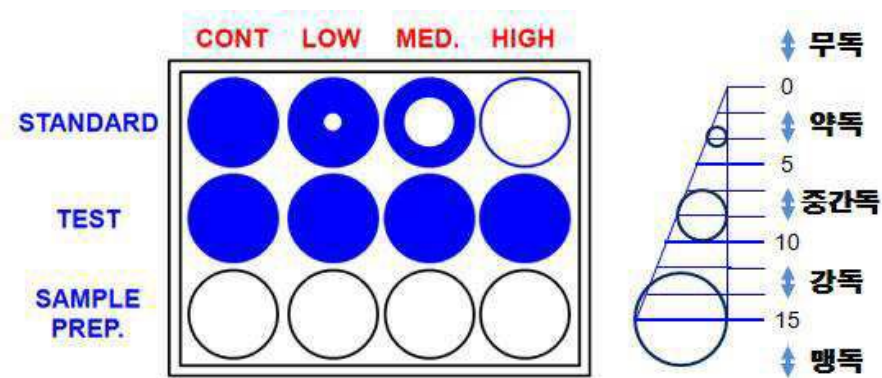
도면3

	Control	N. nomurai thawed tentacles		
D.W.				
PBS				
Rx. Buf.				

도면4



도면5



도면6

