



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0108281
(43) 공개일자 2018년10월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/487 (2006.01) G01N 27/327 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/48721 (2013.01)
G01N 27/3278 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0037829
(22) 출원일자 2017년03월24일
심사청구일자 2017년03월24일

(71) 출원인
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)
(72) 발명자
박윤경
전라남도 장성군 장성읍 매화7길 4
튜더 루치안
광주광역시 동구 필문대로 309 조선대학교 (서석동)
(73) 권리자
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최규환

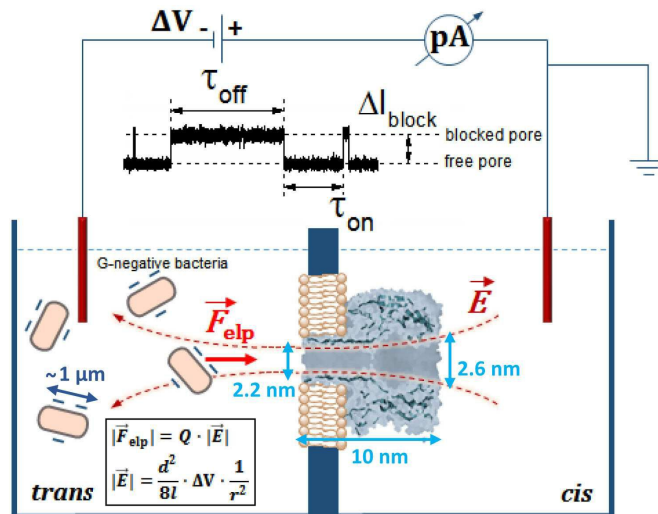
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 α-헤모라이신 단백질과 항미생물 펩티드를 함유하는 수계 시료 내의 박테리아 검출용 센서 및 상기 센서를 이용한 수계 시료 내의 박테리아 검출 방법

(57) 요약

본 발명은 전해질이 포함된 유체가 들어있는 용기; 상기 용기 내에 위치하여 제 1 유체 구획과 제 2 유체 구획으로 분리하는 지지체; 상기 지지체에 고정된 지질 이중막; 상기 지질 이중막 사이에 위치하며 상기 제 1 유체 구획과 제 2 유체 구획을 유체 연결하는 단일 나노포어를 생성하는 단백질; 및 상기 제 1 유체 구획과 제 2 유체 구획간의 전기적 신호의 변화를 측정할 수 있는 장치를 포함하는 수계 시료 내의 박테리아 검출용 센서 및 상기 센서를 이용한 수계 시료 내 박테리아 검출 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

오렐리아 아페트리

광주광역시 동구 필문대로 309 조선대학교 (서석동)

안드레이 치우카

광주광역시 동구 필문대로 309 조선대학교 (서석동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711041488

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 집단연구지원

연구과제명 전염성 Superbugs 확산 제어를 위한 항생펩타이드 설계 및 원천기술 개발

기 여 율 1/3

주관기관 조선대학교

연구기간 2016.07.01 ~ 2017.06.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1415149738

부처명 산업통상자원부

연구관리전문기관 한국산업기술진흥원

연구사업명 산업기술국제협력

연구과제명 Acne vulgaris 세균에 작용하는 항생펩타이드 설계 및 코스메슈티컬 소재 개발

기 여 율 1/3

주관기관 조선대학교 산학협력단

연구기간 2016.11.01 ~ 2017.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711038282

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 개인연구지원

연구과제명 담석증 환자에서 분리한 Quinolone계와 Macrolide계 항생물질 다제 내성 세균에 작용하는 항균 펩타이드 개발 및 제제화 연구

기 여 율 1/3

주관기관 조선대학교

연구기간 2016.06.01 ~ 2017.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

전해질이 포함된 유체가 들어있는 용기;

상기 용기 내에 위치하여 제1 유체 구획과 제2 유체 구획으로 분리하는 지지체;

상기 지지체에 고정된 지질 이중막;

상기 지질 이중막 사이에 위치하며 상기 제1 유체 구획과 제2 유체 구획을 유체 연결하는 단일 나노포어를 생성하는 단백질; 및

상기 제1 유체 구획과 제2 유체 구획간의 전기적 신호의 변화를 측정할 수 있는 장치를 포함하는 수계 시료 내의 박테리아 검출용 센서.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 나노포어를 생성하는 단백질은 α -헤모라이신 단백질인 것을 특징으로 하는 박테리아 검출용 센서.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 전기적 신호는 나노포어를 통한 전류의 변화인 것을 특징으로 하는 박테리아 검출용 센서.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 제1 유체 구획은 박테리아 함유 의심 시료를 포함하는 것을 특징으로 하는 박테리아 검출용 센서.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 제1 유체에 항미생물 펩티드를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 박테리아 검출용 센서.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 항미생물 펩티드는 순전하(net charge)가 양전하인 것을 특징으로 하는 박테리아 검출용 센서.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 박테리아 검출용 센서를 이용하여 수계 시료 내의 박테리아를 검출하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 박테리아 검출용 센서의 제1 유체 구획에 박테리아 함유 의심 시료를 첨가하는 단계;

상기 박테리아 함유 의심 시료를 첨가한 검출용 센서의 제1 유체 구획과 제2 유체 구획간의 전기적 신호의 변화를 측정하는 단계; 및

상기 측정된 전기적 신호의 변화를 분석하여 시료 내 박테리아 존재 여부를 판단하는 단계;를 포함하는 수계 시료 내의 박테리아를 검출하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 박테리아 함유 의심 시료가 첨가된 제1 유체 구획에 항미생물 펩티드를 첨가하는 단계를 추가로 포함하는, 수계 시료 내의 박테리아를 검출하는 방법.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 전기적 신호의 변화는 나노포어를 통한 전류의 변화인 것을 특징으로 하는 수계 시료 내의 박테리아를 검출하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 α -헤모라이신 단백질과 항미생물 펩티드를 함유하는 수계 시료 내의 박테리아 검출용 센서 및 상기 센서를 이용한 수계 시료 내의 박테리아 검출 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 건강과 관련하여 명백하고 당면한 위협 중 하나는 세계화된 식음료의 생산 및 공급 또는 생물전의 형태로 주로 기인되어 광범위하게 퍼져있는 후천적인 미생물 감염이다. 그와 같은 발생이 고소득국가, 빈곤국 또는 개발도상국에 동일하게 일어나는 반면, 빈곤국 또는 개발도상국은 여전히 그와 같은 위험에 보다 더 많이 노출된 상태로 놓여있는데, 사하라 사막 이남의 아프리카에서 다양한 감염증에 의해 2백만 이상이 사망하고 있음을 보여주는 세계보건기구(WHO)의 2012년 보고서를 통해 이러한 상황을 확인할 수 있다.

[0003] 빈곤국 또는 개발도상국의 상기와 같은 현실은 저렴한 운송, 쉬운 사용법 및 향상된 미생물 검출 방법이 요구되는 이유이다. 병원균의 검출 및 확인을 위해서, 광범위하게 사용되는 방법들 중 효소면역측정법(enzyme-linked immunosorbent assay), 면역자기분리법(immunomagnetic separation), 표면 플라즈몬 공명 검출법(surface plasmon resonance detection) 및 핵산 기반 증합효소연쇄반응과 같은 기술은 전통적인 시료 구축 방법이다. 하지만 그들의 증명된 가능성에도 불구하고, 상기의 기술들은 시간 소모적이며, 고비용 및 노동 집약적인 특징과 장비가 잘 갖추어진 무균의 실험환경과 고도로 훈련된 인원의 요구 등과 같은 다수의 결점으로 인해 휴대가능하고 신속한 병원균 검출을 위한 방법으로 선택받기에 어려움이 있다.

[0004] 그래서, 복잡한 기반시설 및 시료 준비 과정의 필요성의 면에서 병원균의 검출 및 분석을 위한 미소유체 플랫폼 또는 나노물질 기반의 소형화된 진단 시스템의 개발에 노력을 기울여, 믿을 수 있는 역학 결과를 제공함과 동시에 감소된 실행 비용과 보다 빠른 진단을 용이하게 해야한다.

[0005] 생물학적 활성을 가진 화합물의 민감하고 선택적이며 고속 처리 검출을 위한 최신의 패러다임 중 하나는 강력한 분석 능력을 가진 물질로 드러난 단백질 또는 고체 상태 나노포어 기반의 바이오센서이다. 나노포어 기반의 바이오센서 발상은 단일 거대분자의 포획 및 그 분자와 포어간의 상호작용으로 나노포어 채널에서 전해질의 이동을 야기하고, 저잡음 피드백 루프 연산증폭기를 사용하여 상기 전해질 이동을 분석하여 이루어진다. 나노포어 매개 전류의 그와 같은 특징적인 변화는 분석물(analyte)의 물리화학적 및 위상적(topological) 특징에 의존하기 때문에, 추계학의(stochastics) 전기 차단 특징의 분석은 분석물의 농도, 정제 및 확산 계수, 용량, 전하 등과 같은 다른 미세한 특징을 밝히는데 사용될 수 있다.

[0006] 분자 검출 영역에서 나노포어의 유용성을 보여주는 결과들로는, RNA 및 DNA 검출 및 분석(Clarke J. *et al.*, Nat Nanotechnol. 2009;4:265-70; Aksimentiev A., Nanoscale. 2010;2(4):468-83), 펩티드(Movileanu L *et al.*, Biophys J. 2005;89(2):1030-45; Apetrei A. *et al.*, J Bioenerg Biomembr. 2010;42(2):173-80) 및 단백질(Oukhaled A. *et al.*, ACS Chem Biol. 2012;7(12):1935-49; Mereuta L. *et al.*, ACS Appl Mater Interfaces. 2014;6(15):13242-56) 검출 및 분석, 금속이온, 아미노산, 신경전달물질 또는 β -락탐 패밀리에 속하는 항생제 물질 등과 같은 미량 분석물의 검출 및 분석 등이 있다. 상기와 같은 결과들로 인해 나노포어 또는 이온 채널 기반의 바이오센서가 건강 관리, 약물 스크리닝, 환경 모니터링 또는 식품 안전성 검사의 최신 패러다임을 형성할 수 있을 것으로 받아들여지고 있다.

[0007] 한편, 한국등록특허 제10-1349332호에는 '확산 흐름을 이용한 포어 구조체를 구비하는 단백질 바이오센서 및 이의 제조방법'이 게시되어 있고, 한국등록특허 제10-1503596호에는 '단백질 센서'가 게시되어 있으나, 본 발명의 α -헤모라이신 단백질과 항미생물 펩티드를 함유하는 수계 시료 내의 박테리아 검출용 센서 및 상기 센서를 이

용한 수계 시료 내의 박테리아 검출 방법에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 α -헤모라이신 나노포어가 인공 지질 이중막 사이에 위치하며 전해질이 포함된 제 1 유체 구획과 제 2 유체 구획을 유체 연결하는 박테리아 검출용 센서를 제작하고, 상기 제 1 유체 구획에 박테리아를 첨가하여 제 1 유체 및 제 2 유체 구획간의 전기적 신호 변화를 측정하여 제작된 박테리아 검출용 센서의 작용을 확인하였으며, 제 1 유체 구획에 항미생물 펩티드를 추가로 첨가하여 전기적 신호 변화를 측정 분석한 결과, 항미생물 펩티드에 의해 박테리아 센싱이 보다 더 잘 이루어짐을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 전해질이 포함된 유체가 들어있는 용기; 상기 용기 내에 위치하여 제 1 유체 구획과 제 2 유체 구획으로 분리하는 지지체; 상기 지지체에 고정된 지질 이중막; 상기 지질 이중막 사이에 위치하며 상기 제 1 유체 구획과 제 2 유체 구획을 유체 연결하는 단일 나노포어를 생성하는 단백질; 및 상기 제 1 유체 구획과 제 2 유체 구획간의 전기적 신호의 변화를 측정할 수 있는 장치를 포함하는 수계 시료 내의 박테리아 검출용 센서를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 센서를 이용한 수계 시료 내의 박테리아 검출 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명의 박테리아 검출용 센서는 휴대가 용이하며, 실시간으로 시료 내 박테리아 존재 여부를 검출할 수 있으며, 검출하고자 하는 박테리아에 특이적으로 결합하는 항미생물 펩티드를 적용하여 맞춤형 제작이 가능하므로, 다양한 박테리아 검출에 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 α -헤모라이신(α -HL) 나노포어 기반의 박테리아 검출 센서의 작동 원리를 보여주는 그림이다. F_{elp} , 박테리아에 작용하는 전기영동적 힘의 절대값; Q , 박테리아 표면의 음전하; E , 전계, r , 포어로부터 방사상 거리; ΔV , 적용된 막전위.

도 2는 $\Delta V = -80\text{mV}$ 조건에서 α -HL 나노포어로 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*, P.a.)과 대장균(*Escherichia coli*, E.c.)을 검출한 결과를 보여주는 것으로, a와 b는 전류 흐름을 기록한 결과이고, c와 d는 나노포어의 구별되는 상태를 표시한 산점도(scatter plot)이다. τ_{on} , 박테리아와 α -HL 나노포어 상호작용의 빈도; τ_{off} , 박테리아와 α -HL 나노포어 상호작용의 지속정도.

도 3은 박테리아가 없는 상태에서 α -HL 나노포어의 전류 기록을 보여주는 결과(a)와 양전하로 편향된 나노포어에 박테리아를 첨가하여 전류 기록을 보여주는 결과(b 및 c)로, 상기 경우에 나노포어의 막힘(박테리아와 나노포어 간의 상호작용)이 일어나지 않음을 보여준다.

도 4는 적용되는 막전위에 따른 α -HL 나노포어에 의한 녹농균(P.a.)과 대장균(E.c.)의 포획 경향을 보여주는 그래프이다. rate_{on} , 박테리아와 나노포어의 결합; CMA3, 항미생물 펩티드.

도 5는 $\Delta V = -80\text{mV}$ 조건에서 $20\mu\text{M}$ 의 항미생물 펩티드(CMA3)를 첨가한 경우의 α -HL 나노포어로 녹농균(P.a.)과 대장균(E.c.)을 검출한 결과를 보여주는 것으로, a와 b는 전류 흐름을 기록한 결과이고, c와 d는 각 경우의 산점도이다.

도 6은 박테리아 및 항미생물 펩티드가 없는 상태에서 다양한 막전위 조건에서 α -HL 나노포어의 전류 기록을 보여주는 결과(a)와 박테리아 없이 항미생물 펩티드(CMA3)만 첨가하여 전류 기록을 보여주는 결과(b)로, α -HL 나노포어의 막힘(박테리아와 나노포어 간의 상호작용)이 일어나지 않음을 보여준다.

도 7은 나노포어의 박테리아 포획 과정에 있어서 항미생물 펩티드의 추정되는 역할을 반영한 도식이다.

도 8은 중성 및 산성 조건에서 α -HL 나노포어와 녹농균(P.a.)의 전류 흐름을 기록한 결과(a, b)와 산점도(c,

d)이다.

도 9는 pH 4의 산성 조건에서 항미생물 펩티드 CMA3 유무에 따른 α -HL 나노포어에 의한 녹농균(P.a.)의 포획 경향을 다양한 막전위 조건에서 확인한 결과이다.

도 10은 $\Delta V = -80\text{mV}$ 조건, 중성 조건에서 α -HL 나노포어에 의한 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)의 검출 결과로, a는 항미생물 펩티드 무첨가, b는 항미생물 펩티드 첨가 경우의 전류 흐름을 기록한 결과이고, c와 d는 각 경우의 산점도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은,

[0014] 전해질이 포함된 유체가 들어있는 용기;

[0015] 상기 용기 내에 위치하여 제 1 유체 구획과 제 2 유체 구획으로 분리하는 지지체;

[0016] 상기 지지체에 고정된 지질 이중막;

[0017] 상기 지질 이중막 사이에 위치하며 상기 제 1 유체 구획과 제 2 유체 구획을 유체 연결하는 단일 나노포어를 생성하는 단백질; 및

[0018] 상기 제 1 유체 구획과 제 2 유체 구획간의 전기적 신호의 변화를 측정할 수 있는 장치를 포함하는 수계 시료 내의 박테리아 검출용 센서를 제공한다.

[0019] 용어 '전해질(electrolyte)'은 화학적으로 물 또는 극성용매 속에서 양이온과 음이온으로 전리하여, 그 용액이 전도성을 나타내도록 하는 물질을 의미하는 것으로, 전해질이 포함된 용액에 2개의 전극을 넣어 전압을 걸면 이온이 전하를 운반하고 양극간에 전류가 흐르게 된다. 본 발명의 상기 전해질이 포함된 유체는 0.3~0.7M 염화칼륨(KCl)이 녹아있는 HEPES 완충용액 또는 MES 완충용액일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0020] 본 발명의 상기 전해질이 포함된 유체를 함유하는 용기는 크기에는 제한이 없으며, 유체 내의 전기적 신호 변화에 영향을 미치지 않는 재질로 이루어진 용기로 폴리카보네이트(polycarbonate) 등의 플라스틱 용기 또는 유리 용기일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0021] 본 발명의 일 구현 예에 따른 박테리아 검출용 센서에 있어서, 상기 나노포어를 생성하는 단백질은 α -헤모라이신(α -hemolysin) 단백질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0022] α -헤모라이신 단백질은 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)이 분비하는 독소 단백질로서, 분리막에 꽂혀 구멍을 만들 수 있는 모양을 하고 있는데 이렇게 만들어진 구멍은 이온 통로로서 전기적 분석을 통하여 그 특성을 유추할 수 있는 특징이 있다.

[0023] 본 발명의 α -헤모라이신 나노포어는 지지체에 고정된 지질 이중막 상에 형성될 수 있는데, 상기 지지체는 테프론 소재의 지지체일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 상기 지질 이중막은 나노포어가 안정적으로 형성될 수 있는 기반이 되는 것으로서 지질 이중막의 표면을 따라 전기(electric field)가 형성되는 특징이 있으며 그 종류는, 생물 유래 지질 이중막 또는 인공 지질 이중막일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0024] 본 발명의 박테리아 검출용 센서는, 제 1 유체 구획에 박테리아 함유 의심 시료를 포함할 수 있고, 상기 제 1 유체에 항미생물 펩티드를 추가로 포함할 수 있다.

[0025] 본 발명의 일 구현 예에 따른 박테리아 검출용 센서에 있어서, 상기 박테리아는 그람양성균 또는 그람음성균일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 항미생물 펩티드는 순전하(net charge)가 양전하인 펩티드로, 구체적으로는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 항미생물 펩티드일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0026] 본 발명의 일 구현 예에 따른 박테리아 검출용 센서에 있어서, 상기 전기적 신호는 나노포어를 통한 전류의 변화일 수 있고, 더욱 구체적으로는 제 1 유체 구획에서 나노포어의 입구가 막히지 않은 상태일 때와 박테리아에 의해 나노포어의 입구가 막힐 때의 이온 전류 흐름의 변화일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 박테리아에 의한 나노포어 입구의 막힘은 지질 이중막을 가로질러 발생한 전위차에 의해 전기영동적인 힘으로 박테리아가 나노포어의 입구쪽으로 유도되어 발생한다.

[0027] 본 발명은 또한, 본 발명의 박테리아 검출용 센서를 이용하여 수계 시료 내의 박테리아를 검출하는 방법을 제공

한다. 구체적으로는,

- [0028] 본 발명의 검출용 센서의 제 1 유체 구획에 박테리아 함유 의심 시료를 첨가하는 단계;
- [0029] 상기 박테리아 함유 의심 시료를 첨가한 검출용 센서의 제 1 유체 구획과 제 2 유체 구획간의 전기적 신호의 변화를 측정하는 단계; 및
- [0030] 상기 측정된 전기적 신호의 변화를 분석하여 시료 내 박테리아 존재 여부를 판단하는 단계;를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0031] 또한, 본 발명의 박테리아 검출 방법은, 상기 박테리아 함유 의심 시료가 첨가된 제 1 유체에 항미생물 펩티드를 첨가하는 단계를 추가로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0032] 상기 항미생물 펩티드는 전술한 바와 같으며, 검출하고자 하는 박테리아의 종류에 따라 특이적인 결합력을 가진 항미생물 펩티드를 사용할 수 있다.
- [0033] 본 발명의 일 구현 예에 따른 박테리아 검출 방법에 있어서, 상기 박테리아는 그람양성균 또는 그람음성균일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0034] 본 발명의 일 구현 예에 따른 박테리아 검출 방법에 있어서, 상기 전기적 신호는 나노포어를 통한 전류의 변화일 수 있고, 더욱 구체적으로는 제 1 유체 구획에서 나노포어의 입구가 막히지 않을 때와 박테리아에 의해 나노포어의 입구가 막힐 때의 전류 흐름의 변화일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 박테리아에 의한 나노포어 입구의 막힘은 지질 이중막을 가로질러 발생한 전위차에 의해 전기영동적인 힘으로 박테리아가 나노포어의 입구쪽으로 유도되어 발생한다.
- [0035] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0036] 재료 및 방법

[0037] 미생물 배양

[0038] 대장균(*Escherichia coli*, ATCC 25922), 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 15692) 및 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*, ATCC 25922)은 미국의 ATCC(American Type Culture Collection)로부터 구입하였다. 구입한 박테리아는 37℃의 적당한 배양 배지(LB 배지 또는 0.05% 염화나트륨 함유 LB 배지)에서 배양하였다. UV 분광광도계를 사용하여 세포 수를 계산하였고, 그 후 4,000xg의 속도로 5분간 원심분리하여 세포 펠렛을 얻은 후 PBS(phosphate-buffered saline)로 세척하고 동결건조기로 5분동안 수분을 제거하였다.

[0039] 항미생물 펩티드 합성 및 분리정제

[0040] CMA3 펩티드(KWKLLKKHIGIKHFLSAKKF-NH₂; 서열번호 1) 및 HP(2-20) 펩티드(AKKVFKRLEKLFISKIQNDK-NH₂; 서열번호 2)는 amide 4-methyl benzhydrylamine 레진(0.55 mmol/g; Novabiochem, 독일)이 연결된 Fmoc(9-fluorenylmethoxycarbonyl) 고체상 방법을 이용하여 Liberty 마이크로파 펩티드 합성기(CEM Co, 미국)로 합성하였다. 상기 항미생물 펩티드의 카복시 말단에 -NH₂기를 연결시켜놓으면 펩티드의 안정성이 증가된다. 아미노 말단에 형광이 표지된 펩티드를 얻기 위해서, 레진이 결합된 펩티드를 20%(v/v) 피페리딘(piperidine)(in dimethylformamide)을 처리하여 아미노 말단의 아미노산 잔기로부터 Fmoc 그룹을 제거하였다. 그 후 펩티드를 해당 레진으로부터 떼어낸 후 에테르를 사용하여 침전시키고 추출하였다. 그 결과로 생긴 조 펩티드는 0.05% TFA(trifluoroacetic acid)를 포함하고 있는 아세트니트릴 용액의 0~60% 농도구배 조건을 사용하여 Jupiter C18 컬럼(250 x 21.2mm, 15 μm, 300 Å)의 역상 Prep-HPLC(preparative high-performance liquid chromatography)를 통해 분리하였다. 추출된 펩티드의 순도는 Jupiter proteo C18 컬럼(250 x 4.6mm, 4 μm, 90 Å)의 역상 HPLC를 이용하여 확인하였다. 펩티드의 분자량은 매트릭스 보조 레이저 탈착 이온화 질량 분광계(matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry, MALDI II; Kratos Analytical, Inc., 미국)를 사용하여 확인하였다.

[0041] 전기생리학 실험(Electrophysiology)

[0042] 단일 헵타머릭(heptameric) 알파-헤모라이신(α-hemolysin, α-HL, Sigma-Aldrich, 독일) 단백질 포어는 리코딩 전지의 두 개의 폴리카보네이트 챔버(1ml 용량)를 분리하는 10%(v/v) 헥사데칸/펜탄(hexadecane/pentane, Sigma-Aldrich)으로 전처리된 25 μm 두께의 테프론 필름(Goodfellow, 미국) 상에 1,2-diphytanoyl-sn-glycero-

phosphocholine(Avanti Polar Lipids, 미국)으로 구성된 인공 지질막 사이에 자가 조립되도록 하여, 약 $\sim 150\mu\text{m}$ 직경의 원형의 구멍을 가로질러 재구성하였다.

[0043] 상기 리코딩 전지의 챔버는 0.5M 염화칼륨 용액이 포함된 10mM HEPES(pH 7.0) 또는 0.5M 염화칼륨 용액이 포함된 5mM MES(pH 4.0)으로 채웠다. 트랜스(*trans*; not grounded) 챔버는 동일 전해질액에 동결건조된 박테리아의 재수화를 통해 얻어진 $\sim 1.2 \times 10^8$ cfu/ml의 대장균, 녹농균 또는 황색포도상구균을 포함하는 세포 현탁액으로 채웠다. 막의 시스(*cis*; grounded) 챔버 쪽에는 0.5M 염화칼륨 용액에 α -HL의 단량체 스타크 용액 $1\mu\text{l}$ 를 추가하고, 약 5분 동안 지속적으로 휘저어, 헤파타머릭 α -HL 나노포어의 성공적인 삽입을 발생시켰다.

[0044] α -HL 나노포어에 의해 매개되는 이온 전류는 22°C의 상온에서 Axopatch 200B 패치 클램프 증폭기(Molecular Devices, 미국)를 가지고 패치 클램프 모드로 기록하였다. 항미생물 펩티드 CMA3 또는 HP(2-20)의 존재 하에 실험을 수행할 경우에는, CMA3 펩티드는 $20\mu\text{M}$, HP(2-20)는 $10\mu\text{M}$ 의 벌크 농도로 *trans* 챔버에 가하고, 전기 신호 기록을 시작하기 전 10분 동안 박테리아 외막과 반응하도록 하였다. 증폭된 전기 신호는 α -HL 나노포어를 통한 이온 전류를 반영하는 것으로 10kHz의 절점 주파수의 수준에서 저역대는 여과하여 기록하였다.

[0045] 데이터 획득은 50kHz의 샘플링 주파수에서 16 비트 획득 보드의 NI PCI 6221(National Instruments, 미국)을 가지고 LabVIEW 8.20 가상계기를 사용하여 수행하였으며, 획득된 데이터의 수치 분석 및 그래프 표현은 Origin 6(OriginLab, 미국) 및 pClamp 6.03(Axon Instruments, 미국) 소프트웨어를 이용하였다.

[0046] **실시예 1. 단일 α -HL 나노포어를 통한 박테리아 검출 분석**

[0047] 도 1은 본 발명의 α -HL 나노포어를 사용한 단일 박테리아 검출의 실험적인 원리를 보여준다. *Trans* 챔버 쪽의 전위(electric potential)가 음전하로 편향된 지질막에 삽입된 단일 나노포어의 근접에서, *trans* 챔버 쪽에 첨가된 음전하로 대전된 박테리아는 막전위(막횡단 전위)에 의해 생성된 전기장(electric field)에 의해 나노포어 단백질의 루멘 입구쪽으로 유도된다. 이동의 미세한 복잡함에도 불구하고, 훨씬 큰 박테리아의 유체역학적 반경, 그래서 매우 약해진 확산 계수 및 기계적 가변형성 때문에, 개개의 펩티드 또는 DNA 분자와 비교하여 박테리아의 이동은 차이가 있는데, 박테리아의 실질적인 전기영동 계수는 상기에서 언급한 것과 같은 다른 작은 분자들의 규모의 밀집 대형이다. 그러므로 단일 α -HL 나노포어에 의한 박테리아 포획의 물리적 작용기작은 생체 분자의 경우와 유사할 것이다. 박테리아 세포는 LPS(lipopolysaccharide) 분자의 음성의 인산염과 카복시 그룹 때문에 표면에 알짜 음전하를 가지고 있으며, 낮은 염 농도의 버퍼에서 측정된 제타 전위값이 대장균의 경우는 -22mV 에서 -55mV 의 수준이고, 녹농균은 -11mV 에서 -42mV 의 수준으로 확인되었다. 본 발명자들은, *trans* 챔버 쪽의 음전하의 막전위가 벌크 전해액으로부터 나노포어의 입구까지 확장된 전기장을 생성하며, 이로부터 박테리아가 α -HL 나노포어의 루멘 입구쪽으로 전기영동적인 이동을 할 수 있게 하여 나노포어를 통한 이온 전류 흐름의 일시적인 감소를 유발하는 것으로 단일 입자 수준으로 박테리아 세포의 검출을 가능케 할 수 있을 것으로 결론내렸다.

[0048] 도 2는 음전하로 편향된 지질막의 *trans* 쪽에 녹농균 또는 대장균을 1.2×10^8 cfu/ml의 농도로 첨가하였을 때, 단일 α -HL 나노포어를 통한 이온 전류에 있어서 가역적인 변화를 확인한 전형적인 기록 결과를 보여준다. 박테리아의 무첨가 조건 또는 양전하로 편향된 지질막의 *trans* 쪽에 박테리아를 첨가한 조건에서 수행한 실험의 결과가 대조군으로, 이 경우에는 어떠한 나노포어 막힘 사건이 일어나지 않았음을 확인할 수 있었다(도 3).

[0049] 막전위(ΔV) -80mV 에서 α -HL 나노포어를 통한 전류 막힘의 특징은 박테리아 세포와 α -HL의 충돌에 의해 야기되는 것으로, -28 ± 0.5 pA(open nanopore)에서 -3.8 ± 0.6 pA(blocked nanopore) 까지의 위쪽으로 향하는 전류 스파이크로 관찰되었다. 도 2의 c와 d의 산점도의 점들은 사건 간 시간 분포에 대응하는 것으로, α -HL에 대한 박테리아의 결합 시간을 의미하고, free 포어 분포에 속하는 사건의 시간 분포로부터 계산되었는데, 대장균의 경우($\tau_{\text{on}}^{\text{E.c.}} = 0.23 \pm 0.004$ 초)가 녹농균의 경우($\tau_{\text{on}}^{\text{P.a.}} = 1.47 \pm 0.05$ 초)보다 빠른 것으로 확인되었다. 이를 추가로 확인하기 위해서, 박테리아 세포와 단일 α -HL 나노포어 간 가역적인 결합의 역학 관계를 다른 전위차(potential) 조건에서 분석하였고, 사건 간 시간의 평균(τ_{on}), 즉 박테리아와 α -HL 결합 속도(rate_{on})를 산출하였다. 그 결과, 두 종의 박테리아에 대한 rate_{on}은 적용 전압에 대해 기하급수적으로 증가하는 것으로 확인되었으며, 대장균이 녹농균보다 빠르게 α -HL에 결합하는 것으로 관찰되었다(도 4).

[0050] **실시예 2. 항미생물 펩티드 첨가에 따른 α -HL 나노포어를 통한 세균 검출 분석**

[0051] 본 발명자들은 자연적으로 생성된 항미생물 펩티드의 일종인 cecropin A와 magainin 2로부터 유래한, CMA3로 일

결어진 합성된 항미생물 펩티드가 약물 저항성 대장균 및 약물 저항성 녹농균에 대한 항미생물 활성이 있음을 확인하였다. 항미생물 펩티드에 의한 미생물의 용균(lysis)에 이르는 중요한 단계는, 펩티드-박테리아 간 정전 기적이며 소수성의 상호작용의 조합에 의해 유도되며, 박테리아 막에 항미생물 펩티드의 결합 및 뒤이은 삽입 단계가 이어진다. 그 결과, 음전하의 LPS를 포함하는 박테리아 외막에 양이온성의 CMA3 펩티드의 결합은 박테리아 표면의 음전하를 계속해서 중화시키게 된다.

[0052] 상기와 같은 사실에 기반하여, 본 발명에서는 α -HL 나노포어를 이용한 박테리아의 검출에 있어서 박테리아의 분자인식인자로서 CMA3 펩티드를 사용하였다.

[0053] 도 5는 $\Delta V = -80\text{mV}$ 조건에서 $20\mu\text{M}$ 의 항미생물 펩티드(CMA3)를 첨가한 경우의 α -HL 나노포어로 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*, P.a.)과 대장균(*Escherichia coli*, E.c.)을 검출한 결과를 보여주는 결과로, 가역적인 이온 전류 막힘의 기록을 확인할 수 있었다. CMA3는 중성의 pH 조건에서 알짜전하가 양전하($+81e^{-1}$)로, CMA3 펩티드와 나노포어간의 상호작용은 배제되므로 이온 전류의 막힘 사건은 오로지 박테리아와 α -HL 나노포어 충돌에 의한 것으로 해석할 수 있다. 이와 같은 사실을 입증하기 위해서, 항미생물 펩티드가 없는 상태에서 이온 전류의 기록을 확인한 결과, 어떠한 나노포어 막힘 사건이 일어나지 않음을 알 수 있었다(도 6).

[0054] 상기에서 주장한 바에 따라, 박테리아에 대한 양이온의 CMA3의 흡착은 박테리아 외막의 음전하의 전체 값을 감소시킬 수 있고, 이는 α -HL 나노포어에 의한 세균의 전기영동적으로 유도된 포획 속도를 낮출 것으로 유추되었다. 하지만, 도 5의 산점도(c 및 d) 결과를 보면, 항미생물 펩티드 무첨가의 경우와 비교하여 나노포어에 의한 박테리아의 포획 속도의 증가가 예상된 것과는 달리, α -HL의 입구에 대한 두 종의 박테리아의 결합 속도는 눈에 보이지 않는 수준의 감소만 확인되었다. 보다 정량적인 측정을 위해서, CMA3 펩티드의 첨가 유무 조건에서 일어나는 박테리아와 α -HL 나노포어간의 가역적인 결합의 역학 관계를 나노포어에 의한 박테리아 포획 속도(rate_{on})로서, 나노포어에 대한 박테리아 세포의 평균 결합 시간(τ_{on})의 역으로 계산하였다.

[0055] 그 결과, 막전위의 증가에 따라 α -HL에 대한 박테리아의 결합 시간은 낮아지는 것으로 확인되었으며, 이는 박테리아에 작용하는 전기영동적인 힘의 증가 때문으로 예상되어졌으며, 결합 과정은 대장균이 녹농균보다 빠른 것으로 확인되었다. 반면, 막전위의 값을 고려하였을 때, 전반적으로 전압 의존적인 결합은 펩티드 프리 박테리아의 경우와 동일한 경향이긴 하지만, 전체 표면 전하가 결손된 것으로 보여지는 CMA3 펩티드와 복합체를 이룬 박테리아는 α -HL 나노포어에 보다 빠르게 결합하는 것으로 확인되었다(도 4). 그래서, CMA3 펩티드 유무의 조건에서 α -HL와 두 종의 박테리아간 상호관계의 최적의 기록을 가능케 하는 막전위의 범위(녹농균은 $\Delta V = -80\text{mV} \div -110\text{mV}$, 대장균은 $\Delta V = -50\text{mV} \div -90\text{mV}$)에서, $20\mu\text{M}$ 의 CMA3의 첨가는 박테리아 세포의 연속적인 포획 사건 간에 측정된 평균 시간을 녹농균은 $26.5 \pm 6.2\%$, 대장균은 $39.3 \pm 6.9\%$ 씩 감소시켰다.

[0056] 상기의 결과를 통해, CMA3 펩티드와의 결합으로 인해 박테리아 표면에 존재하는 음전하의 감소는, 나노포어에 부착하기 위해 반드시 넘어야하는 박테리아 에너지 준위의 정전(electrostatic) 요소 감소 및 감소된 박테리아-나노포어 반발력을 통해 장벽 입구에서 박테리아 세포의 농도 증가에 기여하는 것으로 판단되었다.

[0057] 실시예 3. pH 조건에 따른 α -HL 나노포어를 통한 박테리아 검출 분석

[0058] α -HL 루멘과 박테리아 세포간의 분명한 정전기적 상호작용의 관련성을 조사하기 위해서, 본 발명의 α -HL 나노포어 바이오센서의 양 쪽 챔버에 pH=4의 조건을 구성하고 실험하였다. 산성의 조건 하에서는, 14개의 아스파르트산(α -HL 나노포어 조합의 헵타머 상의 각 127번째 및 128번째 아스파르트산)이 부분적으로 양성화되어(protonated) 포어의 입구에 음전하가 급격하게 감소될 것으로 예상되었다. 본 발명에 사용된 세균 세포는 광범위한 pH 조건에서 음전하를 띠는 것을 사용하였다. 하지만, 대장균에 대해 보고된 것처럼, 산성의 pH 및 특정한 박테리아 종류에 따라 세균 세포 외막의 총 표면 전하는 중성의 pH에 비교하여 약간 감소될 수 있다.

[0059] 실험을 통해 관찰된 결과는 상기 예상과 전적으로 일치하였는데, pH=4의 조건에서 박테리아- α -HL의 결합 시간의 평균은 중성의 pH 조건에서 보다 거의 두 배 정도 감소하였다(도 8). 상기 결과는 산성의 전해액이 박테리아- α -HL의 결합을 기록하기에 보다 좋은 기회를 줄 수 있음을 제시하였고, 나노포어를 가로지른 염 농도 구배의 사용과 같은 박테리아 포획 속도를 증가시키기 위한 목적의 다른 방안과 함께 본 발명의 방법의 검출 한계를 향상시키기 위한 추후 연구에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 예상되었다.

[0060] 흥미롭게도, 산성의 조건에서 항미생물 펩티드의 첨가 유무에 따른 α -HL의 박테리아 포획 경향은 중성의 pH 조건에서의 결과와 다르게 확인되었는데, 항미생물 펩티드의 첨가가 박테리아 포획에 영향을 미치지 않는 것으로 관찰되었다(도 9). 이러한 결과는 산성의 pH의 조건에서 항미생물 펩티드의 박테리아 표면에 결합할 수 있는 능

력의 감소때문인 것으로 예상되었으며, 이는 항미생물 펩티드가 완충 용액에 첨가된 경우에도 박테리아의 전체적인 표면 전하가 대부분 변화되지 않은 상태로 남아있음을 의미하였다.

[0061] 실시예 4. 다른 종류의 항미생물 펩티드와 α -HLL 나노포어를 통한 박테리아 검출 분석

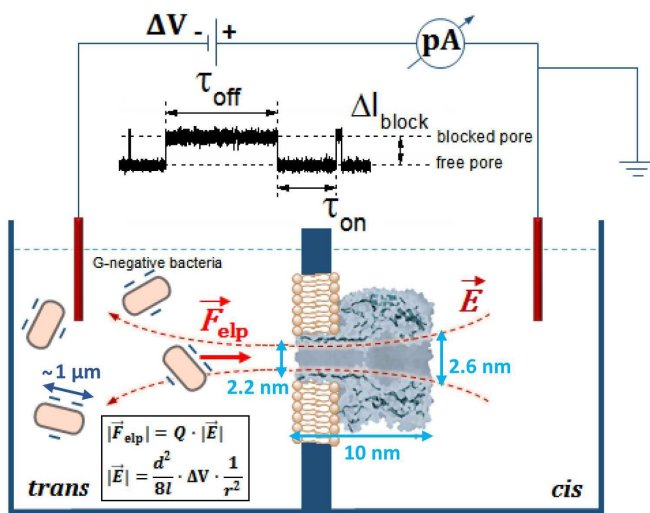
[0062] 전술한 실시예 1 내지 3과 다른 종류의 항미생물 펩티드(HP(2-20))를 이용하여 α -HLL 나노포어의 그람양성균인 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)의 검출능을 분석하였다.

[0063] 도 10은 $\Delta V = -80\text{mV}$ 조건에서 $10\ \mu\text{M}$ 의 항미생물 펩티드(HP(2-20))를 첨가한 경우의 α -HLL 나노포어로 황색포도상구균(*S. aureus*)을 검출한 결과를 보여주는 결과로, 가역적인 이온 전류 막힘의 기록을 확인할 수 있었다.

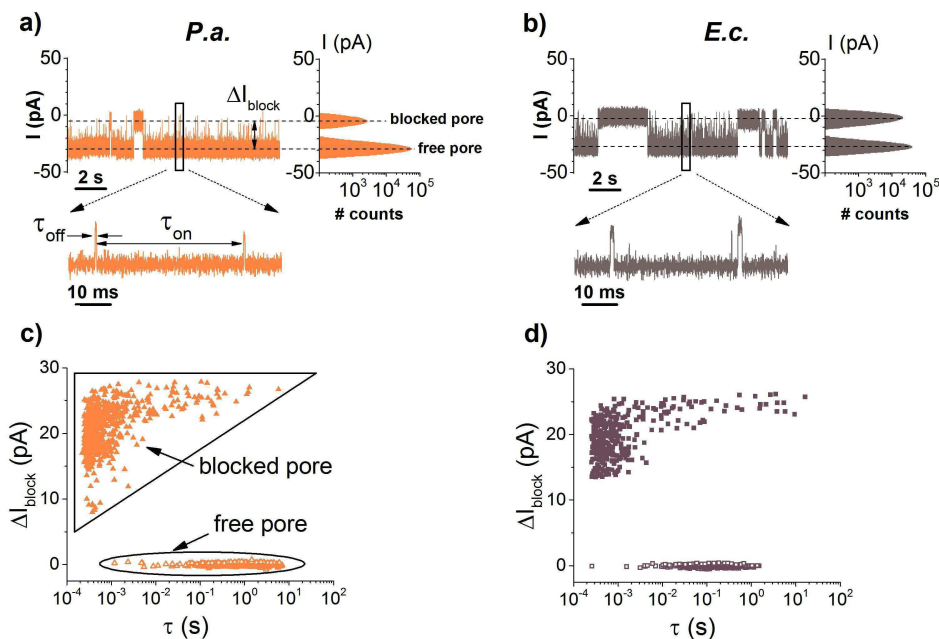
[0064] 상기의 결과를 통해, α -HLL 나노포어와 항미생물 펩티드의 조합을 통해 다양한 박테리아를 검출할 수 있음을 알 수 있었다.

도면

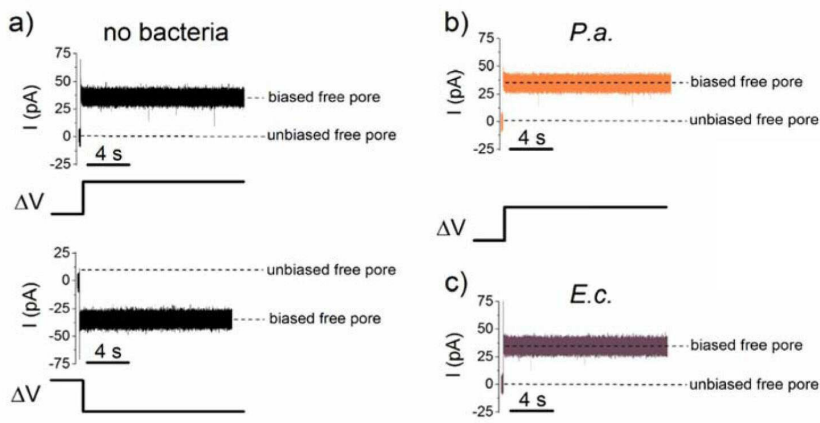
도면1



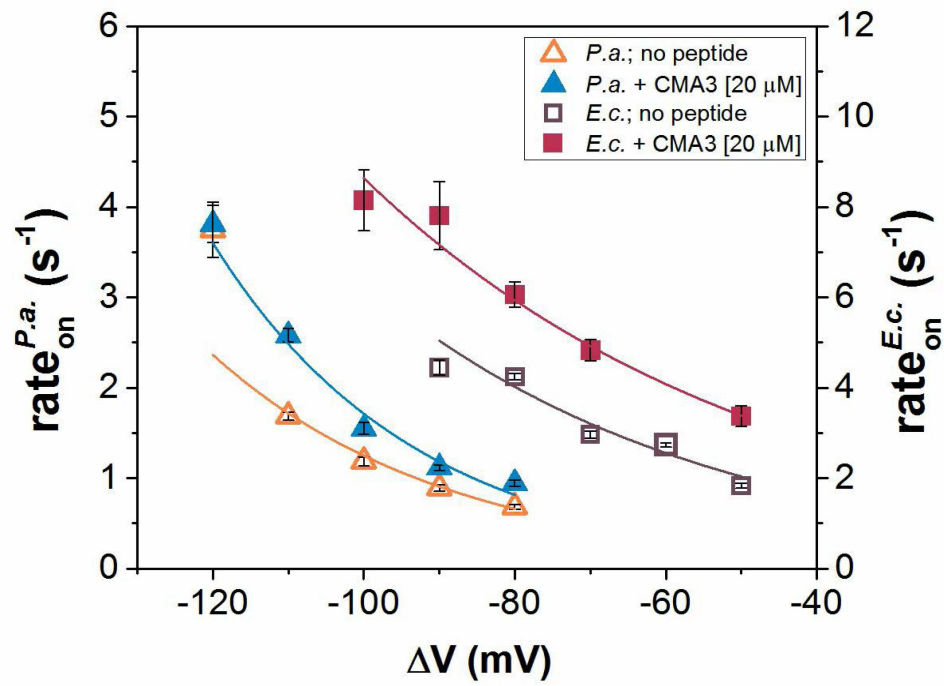
도면2



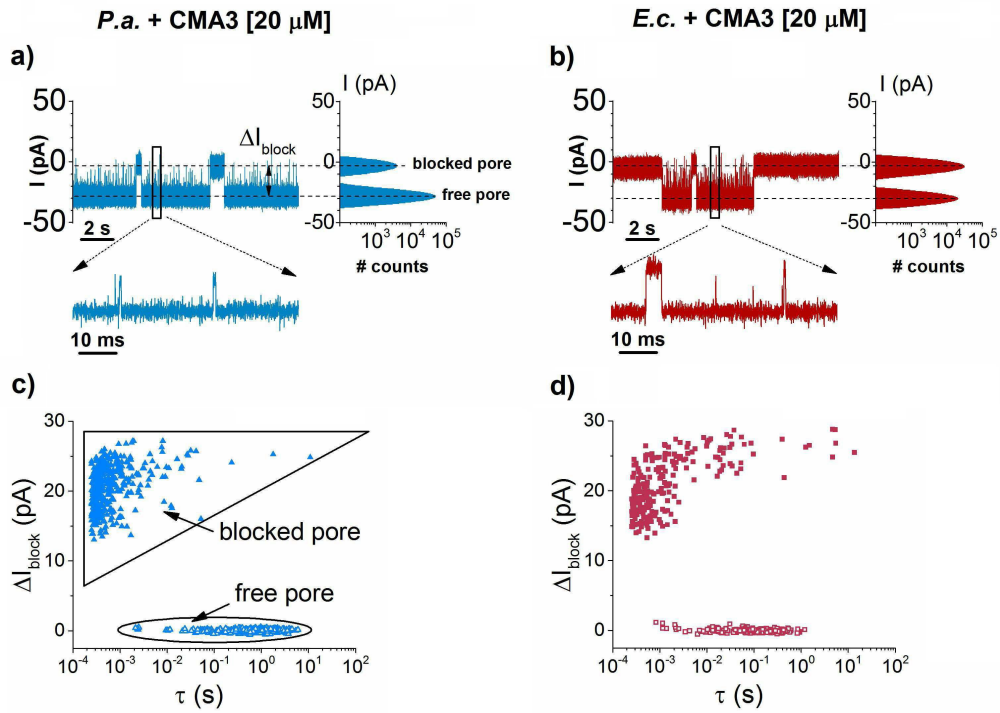
도면3



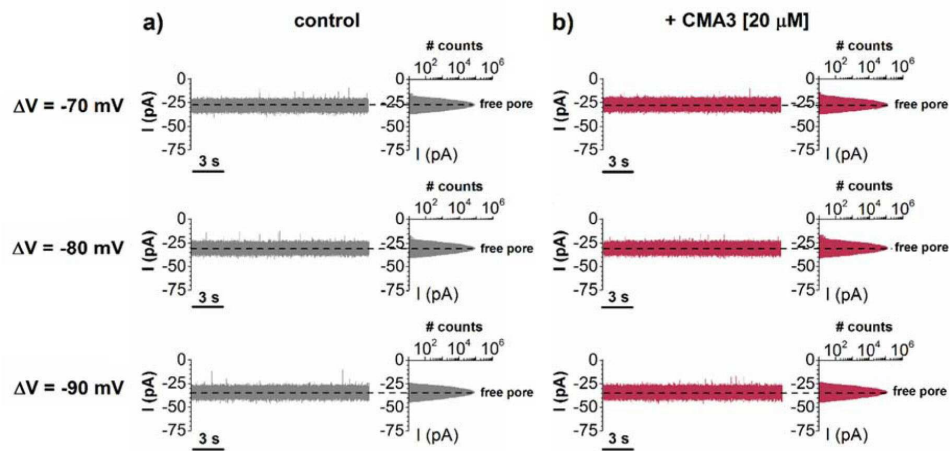
도면4



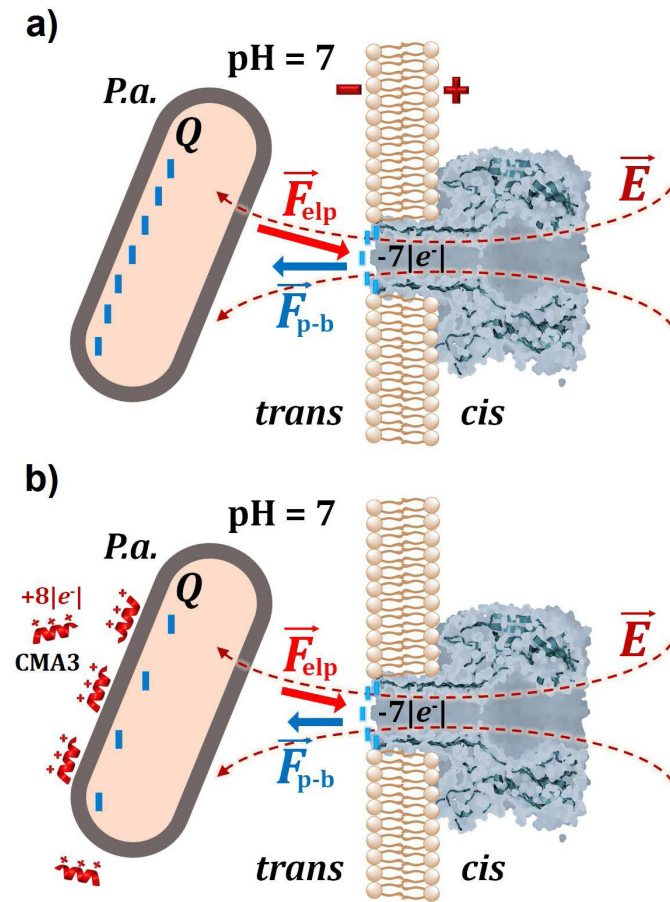
도면5



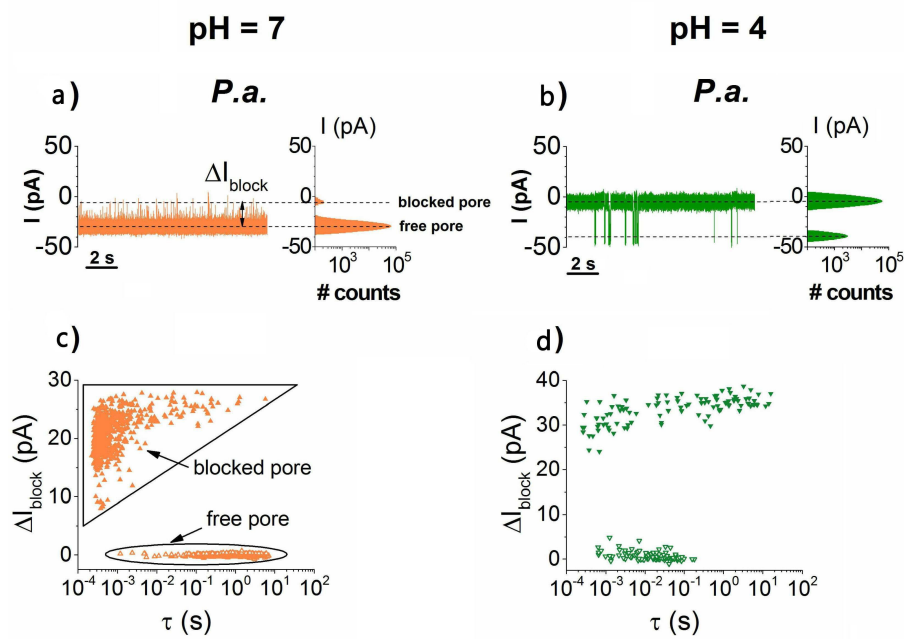
도면6



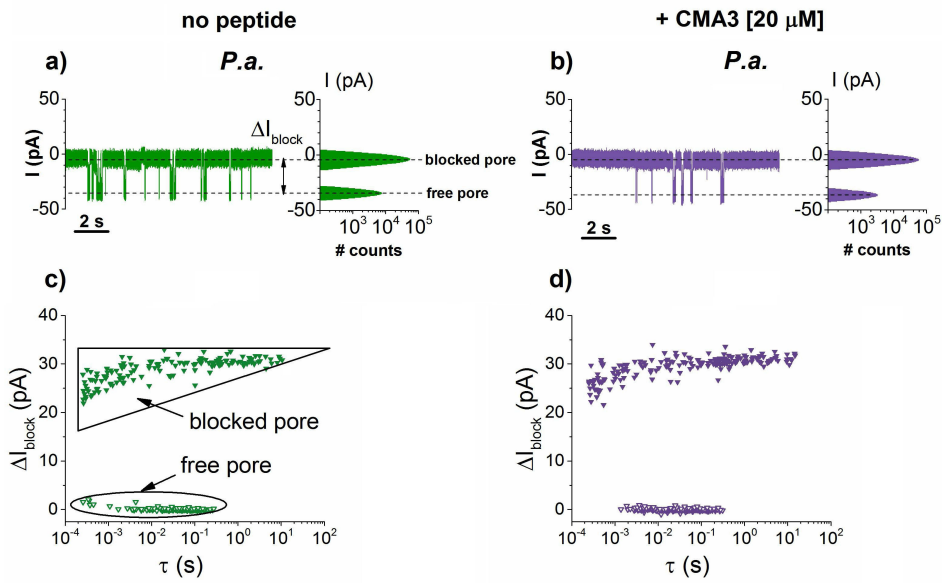
도면7



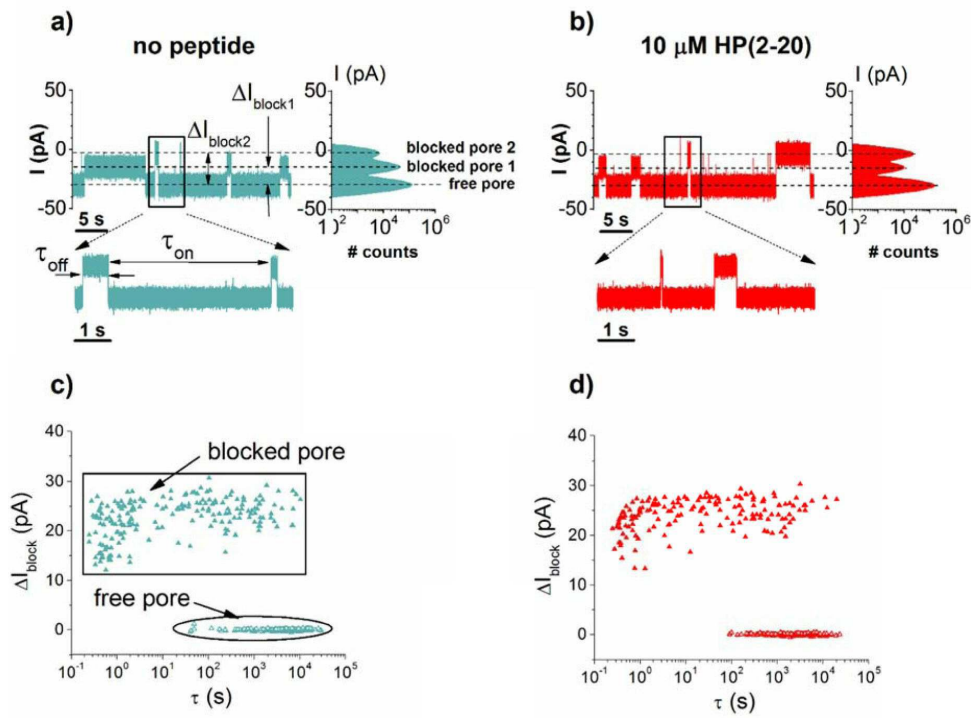
도면8



도면9



도면10



서열 목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Chosun University
- <120> Sensor for detecting bacteria in aqueous sample containing α -hemolysin and antimicrobial peptide and method for detecting bacteria in aqueous sample using the same}
- <130> PN16462
- <160> 2

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CMA3 peptide

<400> 1

Lys Trp Lys Leu Lys Lys His Ile Gly Ile Gly Lys His Phe Leu Ser

1 5 10 15

Ala Lys Lys Phe

20

<210> 2

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HP(2-20) peptide

<400> 2

Ala Lys Lys Val Phe Lys Arg Leu Glu Lys Leu Phe Ser Lys Ile Gln

1 5 10 15

Asn Asp Lys