



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0127042
(43) 공개일자 2010년12월03일

(51) Int. Cl.

C12Q 1/06 (2006.01) *C12Q 1/04* (2006.01)
G01N 33/52 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0045546

(22) 출원일자 2009년05월25일

심사청구일자 2009년05월25일

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교내

(72) 발명자

박성수

서울특별시 영등포구 여의도동 수성아파트 A동 1305호

윤주영

서울특별시 서초구 잠원동 50 롯데캐슬 207동 1703호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인다나

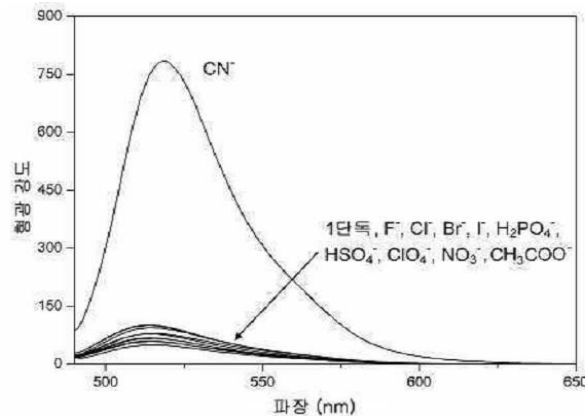
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 시안화 이온 선택성을 갖는 플루오레세인 유도체를 포함하는 형광 센서 및 이를 이용한 녹농균 검출방법

(57) 요약

본 발명은 시안화 이온 선택성을 갖는 플루오레세인 유도체를 포함하는 형광 센서 및 이를 이용한 녹농균 검출 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 시안화 이온과 선택적으로 결합하여 녹색 형광 증강 효과를 나타내는 플루오레세인 유도체를 체내에 주입하여 형광 강도를 측정함으로써 녹농균 감염에서 비롯되는 생체 내 시안화 이온을 해부 없이 실시간으로 검출하여 녹농균 감염 정도를 정량 또는 정성 분석할 수 있는 시안화 이온 선택성을 갖는 플루오레세인 유도체를 포함하는 형광 센서 및 이를 이용한 녹농균 검출 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

남성원

서울특별시 영등포구 여의도동 한양아파트 D동 20
4호

임지선

서울특별시 강남구 역삼동 674-35번지 401호

채 샤오 창

서울특별시 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교
나노바이오기술연구소

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 R11-2005-008-02001-0

부처명 한국과학재단

연구관리전문기관

연구사업명 우수연구센터지원사업

연구과제명 나노구조를 이용한 바이오센서 연구

기여율

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

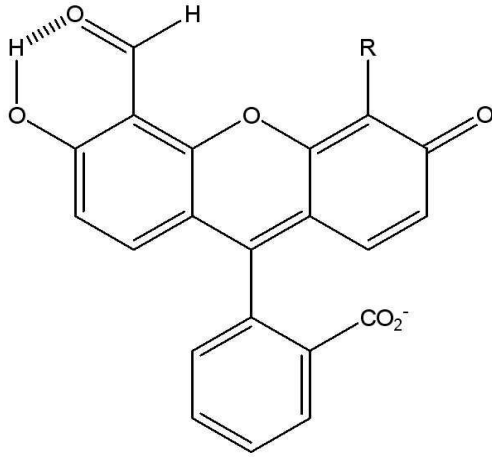
연구기간 2005년 04월 01일 ~ 2012년 03월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 녹농균 검출용 형광센서:

[화학식 1]



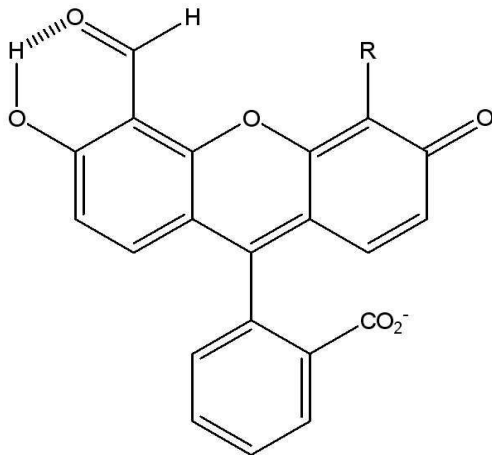
상기 식에서,

R은 수소 또는 알데하이드를 나타낸다.

청구항 2

하기 화학식 1로 표시되는 화합물과 시안화 이온을 반응시키는 단계를 포함하는 녹농균 검출방법:

[화학식 1]



상기 식에서,

R은 수소 또는 알데하이드를 나타낸다.

청구항 3

제2항에 있어서,

반응은 타액, 땀, 혈액 또는 생명체에서 유출되는 분비액 및 생체 조직의 추출액으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 수용액에서 실시하는 녹농균의 검출방법.

청구항 4

제2항에 있어서, 녹농균의 검출은

상기 화학식 1로 표시되는 화합물과, 운동성 및 화학물질에 대한 민감성을 갖는 생명체를 배양하는 단계; 및
상기 생명체에서 발생하는 형광 강도를 측정하는 단계를 포함하는 녹농균의 검출방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

운동성 및 화학물질에 대한 민감성을 갖는 생명체는 섬모충류(*Ciliate*), 짚신벌레(*Paramecium*), 스텐터(*Stentor*), 편모충류(*flagellate*), 선충류(*Nematode*) 및 세균으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 어느 하나인 녹농균의 검출방법.

청구항 6

제2항에 있어서,

녹농균의 검출은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 생명체에 투여하여 상기 생명체에서의 형광 강도를 측정하는 것인 녹농균의 검출방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 생명체는 마우스인 녹농균의 검출방법.

청구항 8

제2항에 있어서,

녹농균의 검출은 수용액 내에서 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 생명체의 조직 절편에 처리하여 상기 조직 절편에서의 형광 강도를 측정하는 것인 녹농균의 검출방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 시안화 이온 선택성을 갖는 플루오레세인 유도체를 포함하는 형광 센서 및 이를 이용한 녹농균 검출 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 시안화 이온과 선택적으로 결합하여 녹색 형광 증강 효과를 나타내는 플루오레세인 유도체를 체내에 주입하여 형광 강도를 측정함으로써 녹농균 감염에서 비롯되는 생체 내 시안화 이온을 해부 없이 실시간으로 검출하여 녹농균 감염 정도를 정량 또는 정성 분석할 수 있는 시안화 이온 선택성을 갖는 플루오레세인 유도체를 포함하는 형광 센서 및 이를 이용한 녹농균 검출 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002]

녹농균은 만성 감염이나 패혈증 및 낭포성 섬유증 환자에게 난치성 감염을 유발하는 병원성 세균이다. 수술이나

화상 등으로 인체 방어력이 약화된 경우에는 만성 감염증이나 패혈증으로 사망에까지 이르게 하며, 특히 낭포성 섬유증 환자에게는 높은 치사율을 나타낸다. 최근에는 녹농균의 요도 감염 및 각막 궤양이 발생하며, 이는 설명에 이르게 하기도 한다. 녹농균 감염의 위험성은 기존 항생제에 대한 내성이며, 이는 녹농균이 생체내의 제한된 산소 공급 조건하에서도 성장할 수 있는 세포 기작과 연관이 있다. 뿐만 아니라 녹농균은 이러한 체내 미세 환경에서 다양한 독성 물질과 함께 많은 양의 시안화 이온을 생성, 배출한다. 시안화물은 세포 내 에너지 대사를 방해하여 세포 사멸을 초래하며, 신체의 산소 운반 기능을 마비시키고, 조직을 가사상태로 만들기 시작한다.

[0003] 시안화물은 반응 속도가 가장 빠른 독극물 중의 하나로써 동물에 특히 유해하며, 구토, 의식 불명을 초래하며 사망에 이르게 한다. 시안화물의 독성으로 사망을 초래하는 혈중 시안화물 농도는 약 23-26 μM 이다.

[0004] 녹농균 감염의 진단은 환자로부터 침 등의 체액을 추출하여 번식하는 세균을 배양하여 분류하거나 체액에 함유된 시안화 이온을 검출하는 방법이 사용되고 있다 (Doring, G., Conway, S.P., Heijerman, H.G.M., Hodson, M.E., Hoiby, N., Smyth, A. & Touw, D.J. *Eur. Respir. J.* 2000, 16, 749-767; Ryall, B., Davies, J.C., Wilson, R., Shoemark, A. & Williams, H.D. *Eur. Respir. J.* 2008, 32, 740-747). 그러나 이러한 방법은 녹농균 감염의 여부에 대한 정보를 제공할 뿐 생체 내의 감염 정도나 감염 부위에 대한 정보는 제공하지 못하였다. 더욱이 시안화 이온의 독성을 감안하면, 녹농균 감염에서 발생하는 생체 내에서의 시안화 이온의 농도나 그 독성 효과에 대한 정보는 전무한 실정이다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

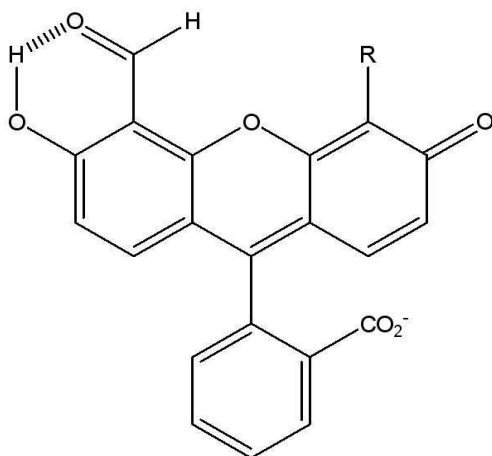
[0005] 본 발명의 목적은 시안화 이온을 선택적으로 검출할 수 있는 플루오레세인 유도체를 이용하여 녹농균을 검출할 수 있는 형광센서를 제공하는 것이다.

[0006] 본 발명의 다른 목적은 상기 플루오레세인 유도체를 이용하여 녹농균이 생명체에 감염될 경우 발생하는 시안화 이온을 생명체 내에서 검출하여 녹농균의 감염 여부, 감염 정도, 감염 부위 등을 감지할 수 있는 녹농균 검출방법을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0007] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 녹농균 검출용 형광센서를 제공한다:

[0008] [화학식 1]



[0009]

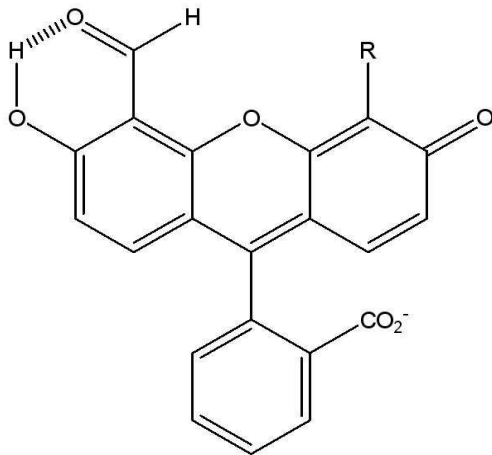
[0010] 상기 식에서,

[0011] R은 수소 또는 알데하이드를 나타낸다.

[0012] 본 발명은 또한 하기 화학식 1로 표시되는 화합물과 시안화 이온을 반응시키는 단계를 포함하는 녹농균 검출방

법을 제공한다:

[화학식 1]



상기 식에서,

R은 수소 또는 알데하이드를 나타낸다.

상기 녹농균의 검출은

상기 화학식 1로 표시되는 화합물과, 운동성 및 화학물질에 대한 민감성을 갖는 생명체를 배양하는 단계; 및

상기 생명체에서 발생하는 형광 강도를 측정하는 단계를 포함하는 것이 바람직하다.

또한, 녹농균의 검출은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 생명체에 투여하여 상기 생명체에서의 형광 강도를 측정하는 단계를 포함할 수 있다.

또한, 녹농균의 검출은 수용액 내에서 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 생명체의 조직 절편에 처리하여 상기 조직 절편에서의 형광 강도를 측정하는 단계를 포함할 수 있다.

효과

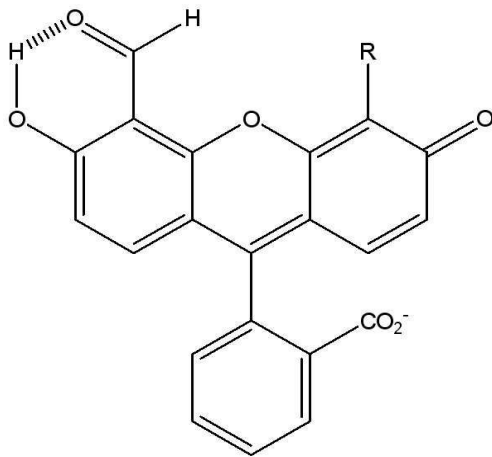
본 발명의 플루오레세인 유도체는 100% 수용액 내에서 시안화 이온과 반응하여 녹색 형광을 발광하므로 "Off-On" 타입의 형광센서로 사용할 수 있다. 또한, 본 발명은 상기 플루오레세인 유도체를 이용하여 녹농균 감염시 발생하는 시안화 이온과 선택적으로 반응시킴으로써 생명체 내에서 녹농균의 감염 여부, 감염 정도, 감염 부위 등을 정량 또는 정성분석할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

이하 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.

본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 녹농균 검출용 형광센서에 관한 것이다:

[0025] [화학식 1]



[0026]

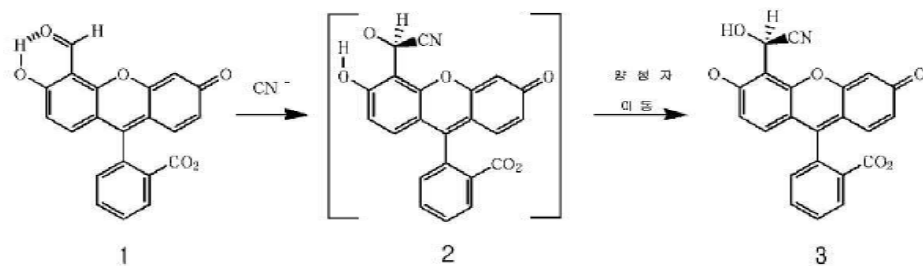
[0027] 상기 식에서,

[0028] R은 수소 또는 알데하이드를 나타낸다.

[0029] 녹농균의 경우 생명체에 감염 시 시안화 이온을 발생시키므로, 상기 시안화 이온에 대한 선택성을 갖는 형광 센서를 이용하면 녹농균의 검출이 가능할 수 있다.

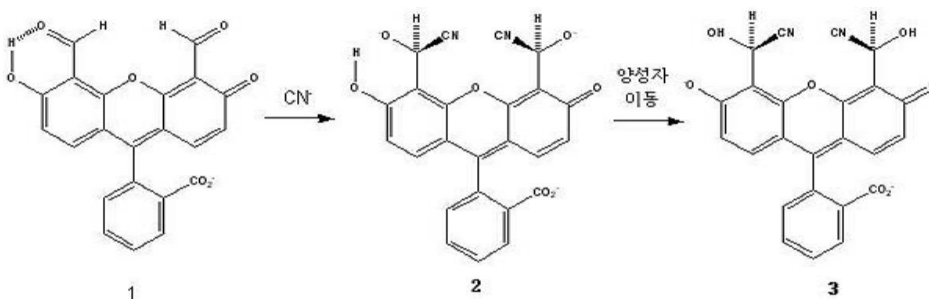
[0030] 하기 반응식 1 또는 2의 메커니즘에 따르면, 수용액 내에서 화학식 1의 플루오레세인 유도체는 시안화 이온과 반응하여 화학식 2의 화합물을 거쳐 양성자 이동 결과 녹색 형광을 발광하는 화학식 3의 화합물을 생성할 수 있다. 상기 플루오레세인 유도체의 시안화 이온에 대한 선택성은 수용액 내에서 시안화물의 친핵성에 기인한 것일 수 있다.

[0031] [반응식 1]



[0032]

[0033] [반응식 2]



[0034]

[0035] 본 발명에 따른 화학식 1의 플루오레세인 모노 또는 다이알데하이드는 100% 수용액에서 CN^- 첨가에 따라 농도의존적으로 520 nm의 여기파장에서 선택적인 킬레이트 증폭 형광 효과를 나타내므로 상기 플루오레세인 유도체를 "Off-On" 타입의 형광 프로브로 사용하여 시안화 이온을 검출할 수 있다.

[0036] 일 구체예에 따르면, NO_3^- 등의 음이온들에 대해서는 형광 변화를 나타내지 않으나, 시안화 이온과 화학식 1의 플루오레세인 모노 또는 다이알데하이드를 반응시키면 농도 의존적으로 큰 폭의 형광 변화를 나타낸다.

[0037] 또한, 시안화 이온의 검출은 비색 변화를 통해 측정할 수도 있다. 보다 구체적으로, 수용액 내에서 플루오레세인 모노 또는 다이알데하이드는 반응하는 시안화 이온의 농도가 증가할수록 색의 채도가 증가하는 색 변화를 나타낸다.

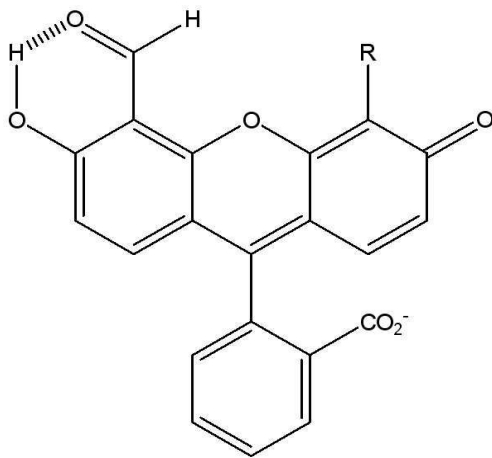
[0038] 따라서, 녹농균에 감염된 생명체의 체액과 상기 화학식 1의 플루오레세인 모노 또는 다이알데하이드를 반응시키면 상기 체액에서 발생하는 시안화 이온과 반응하여 색 변화를 나타내어 녹농균 검출이 가능하다.

[0039] 본 발명의 상기 화학식 1의 화합물의 제조방법은 공지된 방법(W. Wang *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 15949)에 따라 합성할 수 있어, 이에 특별히 제한하지는 않는다.

[0040] 일 구체예에 따르면, 상기 화학식 1의 플루오레세인 다이알데하이드는 플루오레세인, 클로로폼, 메탄올 및 15-crown-5를 혼합하고, 일정 온도, 보다 구체적으로는 40 내지 70℃의 온도를 유지하면서 50% 수산화나트륨 용액을 조심스럽게 넣는다. 이 혼합물을 상기와 같은 온도 범위에서 3 내지 7시간 동안 반응시킨다. 반응이 끝나면 냉각시킨 후 강산을 첨가하여 상기 혼합물을 산성화시킨다. 침전물을 모아서 건조시킨 다음 정제하여 본 발명의 화학식 1의 플루오레세인 다이알데하이드를 수득할 수 있다.

[0041] 본 발명은 또한 하기 화학식 1로 표시되는 화합물과 시안화 이온을 반응시키는 단계를 포함하는 녹농균 검출방법에 관한 것이다:

[0042] [화학식 1]



[0043]

[0044] 상기 식에서,

[0045] R은 수소 또는 알데하이드를 나타낸다.

[0046] 본 발명의 상기 화학식 1의 플루오레세인 모노 또는 다이알데하이드는 시안화 이온을 수용액 상태에서 검출할 수 있는 "OFF-ON" 타입의 센서로서 형광의 세기가 낮은 상태(OFF)에서 시안화 이온을 감지하면 형광의 세기가 매우 커지는 사실(ON)을 센서화시킨 타입의 센서이며, 녹농균에 감염된 생체는 시안화 이온을 발생하므로 상기 화학식 1의 플루오레세인 모노 또는 다이알데하이드는 녹농균의 감염 여부나 정도를 환자의 체액으로부터 별도의 분석 장비 없이 현장에서 실시간으로 진단 할 수 있다.

[0047] 상기 체액은, 예를 들어, 타액, 땀, 혈액 또는 생명체에서 유출되는 분비액, 또는 생체 조직의 추출액 등을 들 수 있다.

[0048] 또한, 상기 화학식 1의 플루오레세인 모노 또는 다이알데하이드에 의한 녹농균의 검출은

- [0049] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물과, 운동성 및 화학물질에 대한 민감성을 갖는 생명체를 배양하는 단계; 및
- [0050] 상기 생명체에서 발생하는 형광 강도를 측정하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0051] 상기 운동성 및 화학물질에 대한 민감성을 갖는 생명체로는 섬모충류(*Ciliate*), 짚신벌레(*Paramecium*), 스텐터(*Stentor*), 편모충류(*flagellate*), 선충류(*Nematode*), 또는 세균 등을 사용할 수 있다. 보다 구체적으로는 꼬마선충(*Caenorhabditis elegans*)과 같은 선충류를 사용할 수 있다.
- [0052] 상기 형광 강도는 실체경으로 실시간 관찰하여 확인할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.
- [0053] 또한, 녹농균의 검출은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 생명체에 투여하여 상기 생명체에서의 형광 강도를 측정하는 것일 수 있다.
- [0054] 보다 구체적으로, 상기 생명체는 마우스일 수 있다.
- [0055] 일 구체예에 따르면, 녹농균에 감염된 마우스의 폐에 직접 주사법을 통해 상기 화학식 1의 플루오레세인 모노 또는 다이알데하이드를 투여할 경우, 마우스의 폐 부위에서 강한 형광을 나타낸다.
- [0056] 다른 구체예에 따르면, 상기 화학식 1의 플루오레세인 모노 또는 다이알데하이드를 마우스에 비강 주사할 경우, 기관지, 폐 등에서 강한 형광이 관찰된다.
- [0057] 생명체에 투여되는 상기 화학식 1의 플루오레세인 모노 또는 다이알데하이드의 제제 형태는 액제인 것이 바람직하나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.
- [0058] 또한, 녹농균의 검출은 수용액 내에서 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 생명체의 조직 절편에 처리하여 상기 조직 절편에서의 형광 강도를 측정하는 것일 수 있다.
- [0059] 일 구체예에 따르면, 수용액 하에서 상기 화학식 1의 플루오레세인 모노 또는 다이알데하이드를 녹농균에 감염된 마우스의 폐 동결 절편에 처리할 경우, 동결 절편에서는 강한 형광이 관찰된다.
- [0060] 상기 수용액은 통상의 완충용액을 사용할 수 있어 특별히 제한하지는 않는다.
- [0061] 상기 결과로부터, 본 발명의 상기 화학식 1의 플루오레세인 모노 또는 다이알데하이드는 녹농균에 감염된 생명체로부터 얻은 체액, 조직 등과 반응하여 강한 형광 또는 색 변화를 나타낼 뿐만 아니라, 생명체 자체에 투여할 경우에도 강한 형광을 나타내므로 녹농균의 감염 여부, 감염 정도, 감염 부위 등을 정량 또는 정성 분석할 수 있다.
- [0062] 이하, 본 발명에 따르는 실시예 및 본 발명에 따르지 않는 비교예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.
- [0063] <실시예 1> 화학식 1의 플루오레세인 다이알데하이드의 제조
- [0064] 상기 화학식 1의 플루오레세인 다이알데하이드는 공지된 방법에 따라 합성할 수 있다(W. Wang *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 15949).
- [0065] 구체적으로, 100 mL 플라스크에 플루오레세인(4 g, 12 mmol), 10 mL 클로로폼, 6 mL 메탄올 및 0.06 g의 15-crown-5를 넣었다. 플라스크의 온도를 50 °C로 유지하면서 20 g의 50% 수산화나트륨 용액을 조심스럽게 넣었다. 이 혼합물을 50 °C의 온도에서 5 시간 동안 반응시킨 다음, 반응이 끝나면 냉각시킨 후, 10 M의 H₂SO₄ 용액을 산성화시켰다. 침전물을 모아서 진공상태에서 건조시키고, 실리카겔을 이용한 크로마토그래피를 수행한 결과 (5:95 = EtOAc:DCM), 142 mg의 흰색 입자인 플루오레세인 다이알데하이드를 얻을 수 있었다(수득률 3.0 %).
- [0066] ¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz) δ (ppm): 6.66 (2H, d, J = 9.0 Hz), 6.86 (2H, d, J = 9.0 HZ), 7.11 (2H, d, J =

7.5 Hz), 7.70-7.59 (2H, m), 8.99 (2H, d, J = 7.5 Hz), 10.59 (2H, s), 12.06 (2H, s).

¹³C NMR (CDCl₃, 62.5 MHz) δ (ppm): 191.80, 168.69, 164.67, 151.87, 151.67, 136.98, 145.66, 130.53, 126.51, 125.55, 123.69, 115.21, 109.48, 109.00, 80.61).

<실험예 1> 화학식 1의 플루오레세인 다이알데하이드의 시안화 음이온에 대한 선택성 측정

CN⁻, F⁻, Cl⁻, Br⁻, I⁻, H₂PO₄⁻, ClO₄⁻, NO₃⁻, HSO₄⁻, CH₃COO⁻ 같은 다양한 음이온들을 아세트니트릴-HEPES (1:2, v/v, 0.01 M, pH 7.4 HEPES) 내에서 3 μM 플루오레세인 다이알데하이드와 반응시켜 발생하는 형광 변화를 측정하여 도 1에 나타내었다(여기 파장: 485 nm, 여기 및 발광 슬릿 폭: 1.5 nm).

도 1에 나타난 바와 같이, 플루오레세인 다이알데하이드와 반응한 음이온들 중 시안화 이온만이 플루오레세인 다이알데하이드와 반응하여 큰 폭의 형광 변화를 나타냄을 알 수 있다.

<실험예 2> 시안화 이온의 농도에 따른 형광 강도 측정

실온에서 CH₃CN-H₂O(1:2, v/v, 0.01 M, pH 7.4) 수용액 내에서 다양한 농도의 시안화물과 3 μM의 플루오레세인 다이알데하이드를 반응시켜 발생하는 형광 강도를 형광 화학 정량계를 사용하여 측정하여 도 2에 나타내었다(여기 파장: 485 nm, 여기 & 발광 슬릿: 1.5 nm).

도 2에 나타난 바와 같이, 형광 강도는 플루오레세인 알데하이드와 반응하는 시안화 이온의 농도가 증가할수록 증가하는 것을 알 수 있었고, 520 nm 파장 부근에서 포화지점을 나타내었다.

<실시예 2> 녹농균에 감염된 예쁜 꼬마 선충 내에서의 시안화 이온의 검출

녹농균 감염으로 발생하는 시안화 이온 검출을 플루오레세인 다이알데하이드로 확인하기 위해 세균 섭취성 선충인 꼬마 선충(*C. elegans*)을 *in vivo* 모델로 사용하였다. 예쁜 꼬마 선충은 이미 녹농균의 독성 실험 모델로 자주 이용되었다(Mahajan-Miklos, S., Tan, M.W., Rahme, L.G. & Ausubel, F.M. *Cell* 1999, 96, 47-56). 구체적으로, 꼬마 선충(*C. elegans*) 야생형 균주 N2는 Caenorhabditis Genetics Center (University of Minnesota, USA)로부터 얻었다. 선충을 25℃ 온도 하에서 대장균(*Escherichia coli*) OP50이 배양된 NGM(nematode growth medium) 아가 플레이트(0.3% NaCl, 0.25% 펩톤, 2.5% 아가, 5 mg/mL 콜레스테롤, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, 25 mM KH₂PO₄)에서 알칼리-블리칭 방법에 따라 공동 배양하였다. 녹농균 감염을 위해서 대장균이 배제된 배지 위에서 하루 동안 유지된 선충을 수집하여 녹농균이 배양된 NGM 아가 플레이트에 4 시간 동안 유지한 후, 선충을 수집하여 NGM 완충용액(0.3% NaCl, 5 mg/mL 콜레스테롤, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, 25 mM KH₂PO₄)으로 3회 세척하였다. NGM 완충용액 내에서 100 mM 센서에 20 분 동안 노출시키고, 다시 선충을 NGM 완충용액으로 3회 세척한 후, Faramount™ aqueous mounting medium (Dako, Glostrup, Denmark)이 있는 유리 슬라이드에 놓았다. 선충에 대한 형광 사진은 200배 확대하여 confocal laser scanning microscope(LSM510, Carl Zeiss)를 이용하여 관찰하였다. 도 3 은 플루오레세인 다이알데하이드에 노출되지 않은 것(Control), 노출된 것(CN sen.)과 녹농균 감염 후 센서에 노출된 (PA14) 꼬마선충의 형광 사진이다.

도 3에 나타난 바와 같이, 플루오레세인 다이알데하이드에 노출 되지 않은 것(Control)이나 노출된 (CN sen.) 선충류는 어떠한 형광도 나타내지 않은 반면, 녹농균 감염 후 센서에 노출된 (PA14) 선충류는 강한 형광을 나타냈다. 이는 플루오레세인 다이알데하이드가 녹농균에서 발생하는 시안화 이온의 *in vivo* 이미지에 매우 적합한 것임을 알 수 있다.

<실시예 3> 녹농균에 감염된 실험용 마우스 내에서의 시안화 이온의 검출

녹농균 감염으로 발생하는 시안화 이온 검출을 플루오레세인 다이알데하이드로 확인하기 위해 선충 모델 외에 실험용 마우스 (6 주령 17-19 g 무게의 BALB/c 누드 마우스)를 사용하였다. 녹농균 감염을 위해 5 mL 배지에서 자란 녹농균 (O.D.0.9)에 2.5% tryptic soy agar (Sigma-Aldrich) 와 50 mL heavy mineral oil (Sigma-Aldrich)을 50℃에서 섞은 후 PBS 완충 용액 (pH 7.4)으로 3 회 세척하여 9×10⁷ CFU/mL 농도의 녹농균을 함유

한 아가 비즈를 제조하였다. 감염 방법은 호흡 관으로의 주입 방법으로 마취제 (zoletil50; Virbac, Carros, France) 주사로 마취 된 마우스에 혀를 구강 밖으로 빼낸 상태에서 24 G 카테터 (BD, CA, USA) 를 이용하여 50 μl (4.5×10^6 CFU) 녹농균 아가 비즈를 호흡 관으로 주입하였다 (intratracheal instillation). 감염 후 18 시간 후에 마우스를 다시 마취시킨 다음 20 μl 1mM 플루오레세인 다이알데하이드를 직접 폐 부위에 0.3 mL 인슐린 주사기를 이용하여 주입한 후, 소형 동물용 형광 촬영 장치(Kodak, Image station IS2000MM)로 형광을 관찰하였다. 도 4는 플루오레세인 다이알데하이드가 주입되지 않은 것(Control), 주입된 것(CN sen.)과 녹농균 감염 후 센서를 주입한(PA14) 실험용 마우스를 소형 동물용 형광 촬영 장치(Kodak, Image station IS2000MM)로 촬영한 사진이다.

[0079] 도 4 에 나타난 바와 같이, 플루오레세인 다이알데하이드가 주입되지 않은 것(Control)이나 주입된 (CN sen.) 마우스는 어떠한 형광도 나타내지 않은 반면, 녹농균 감염 후 센서가 주입된 (PA14) 마우스는 폐 부위에 강한 형광을 나타냈다. 이는 플루오레세인 다이알데하이드가 쥐의 폐에서 녹농균에 의해 발생하는 시안화 이온의 *in vivo* 이미지에 매우 적합한 것임을 알 수 있다.

[0080] 플루오레세인 다이알데하이드의 보다 실용적인 활용을 위하여 비강을 통하여 형광센서를 주입하였다. 상기에 기술한 방법과 같이 녹농균에 감염된 마우스를 18 시간 후에 마취 시킨 후, 200 μl 1mM 플루오레세인 다이알데하이드를 24 G 카테터 (BD, CA, USA)를 이용하여 비강으로 주사하였다. 도 5는 플루오레세인 다이알데하이드가 주입되지 않은 것(Control), 비강을 통해 주입된 것(CN sen.)과 녹농균 감염 후 센서를 비강으로 주입한(PA14) 실험용 마우스를 소형 동물용 형광 촬영 장치(Kodak, Image station IS2000MM)로 촬영한 사진이다.

[0081] 도 5 에 나타난 바와 같이, 플루오레세인 다이알데하이드가 주입되지 않은 것(Control)이나 주입된 (CN sen.) 마우스는 어떠한 형광도 나타내지 않은 반면, 녹농균 감염 후 센서가 비강을 통해 주입된 (PA14) 마우스는 폐 부위의 강한 형광뿐만 아니라 기관지 부근에도 형광이 관찰되었다. 이는 플루오레세인 다이알데하이드가 비강으로 주입 되어도 쥐의 폐에서 녹농균에 의해 발생하는 시안화 이온을 감지할 수 있을 뿐 아니라 기관지 등 다른 감염된 부위의 정보도 함께 제공할 수 있음을 나타낸 것이다.

[0082] <실시예 4> 녹농균에 감염된 마우스 폐 조직의 동결 절편에서의 시안화 이온의 검출

[0083] 플루오레세인 다이알데하이드가 조직학적인 방법에도 활용될 수 있는지를 확인하기 위해서 녹농균에 감염된 폐 동결 절편을 사용하였다. 상기에 기술한 방법과 같이 녹농균에 감염된 마우스를 18 시간 후에 희생 시킨 후에, 폐를 적출하여 20 mm 두께의 동결 절편을 유리 슬라이드에 고정하였다. 30 분간 아세톤으로 고정하고 PBS 완충 용액으로 3 회 세척한 후, 1 시간 동안 10 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 녹농균에 결합하는 항체 (rabbit polyclonal antibody to *Pseudomonas*; Abcam inc. Cambridge, MA, USA)와 반응시켰다. PBS 완충 용액으로 3 회 세척한 후, 30 분 동안 2 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 적색 형광 염료와 결합된 2차 항체(goat anti-rabbit IgG-TRITC; Sigma-Aldrich)와 반응시켰다. PBS 완충 용액으로 3 회 세척한 후, 5 분 동안 2 mM 농도의 플루오레세인 다이알데하이드와 반응시킨 다음, 다시 PBS 완충용액으로 3회 세척한 후, Faramount™ aqueous mounting medium (Dako, Glostrup, Denmark) 에서 유지하였다. 동결 절편에 대한 형광 사진은 400배 확대하여 confocal laser scanning microscope(LSM510, Carl Zeiss)를 이용하여 관찰하였다. 도 6은 플루오레세인 다이알데하이드 및 항체와 반응하지 않은 것(Control), 반응한 것(CN sen.)과 녹농균 감염 후 센서 및 항체에 반응한(PA14) 동결 절편의 형광 사진이다.

[0084] 도 6에 나타난 바와 같이, 플루오레세인 다이알데하이드나 항체와 반응하지 않은 것(Control)이나 반응한 (CN sen.) 동결 절편에서는 어떠한 형광도 나타내지 않은 반면, 녹농균 감염 후 플루오레세인 다이알데하이드나 항체와 반응한(PA14) 동결 절편에서는 강한 형광을 관찰되었다. 이는 플루오레세인 다이알데하이드가 녹농균에 의해 발생하는 시안화 이온의 *in vivo* 이미지에서뿐만 아니라 조직학적인 방법에도 매우 적합한 것임을 알 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0085] 도 1은 실온 상태인 CH_3CN -HEPES 용액에서 다양한 음이온들을 첨가하여 플루오레세인 다이알데하이드와 반응시켜 발생된 형광 변화를 나타낸 그래프이다.

[0086] 도 2는 실온 상태인 CH_3CN - H_2O 용액에서 다양한 농도의 시안화물과 플루오레세인 다이알데하이드를 반응시켜 발

생되는 형광 강도를 측정한 그래프이다.

[0087] 도 3은 플루오레세인 다이알데하이드에 노출되지 않은 것(Control), 노출된 것(CN sen.)과 녹농균 감염 후 센서에 노출된 (PA14) 꼬마 선충의 형광 사진이다.

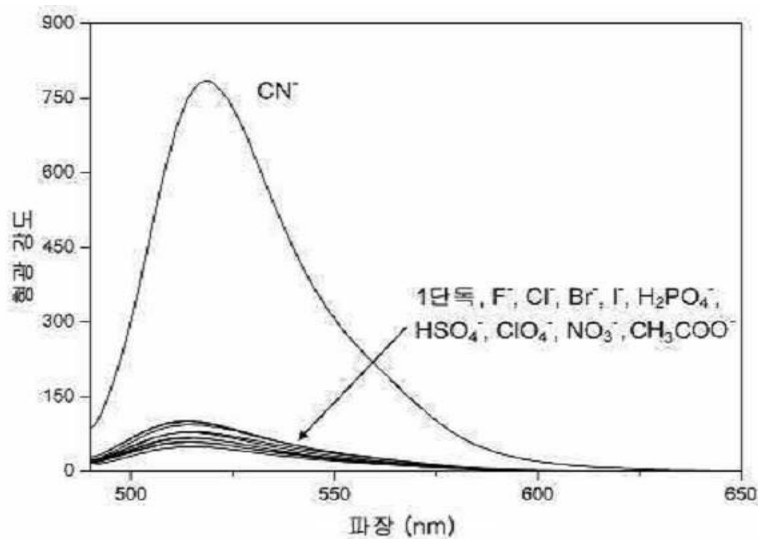
[0088] 도 4는 플루오레세인 다이알데하이드가 주입되지 않은 것(Control), 주입된 것(CN sen.)과 녹농균 감염 후 센서를 주입한(PA14) 실험용 마우스를 소형 동물용 형광 촬영 장치(Kodak, Image station IS2000MM)로 촬영한 사진으로, 각각의 사진 중 위의 사진은 형광 강도가 흑백 대비로 표현된 이미지이며, 아래 사진은 이에 상응하는 형광을 색으로 재 구성된 사진이다 (Kodak 1D Image Analysis Software; Kodak).

[0089] 도 5는 플루오레세인 다이알데하이드가 주입되지 않은 것(Control), 비강을 통해 주입된 것(CN sen.)과 녹농균 감염 후 센서를 비강으로 주입한(PA14) 실험용 마우스를 소형 동물용 형광 촬영 장치(Kodak, Image station IS2000MM)로 촬영한 사진으로, 각각의 사진 중 위의 사진은 형광 강도가 흑백 대비로 표현된 이미지이며, 아래 사진은 이에 상응하는 형광을 색으로 재 구성된 사진이다 (Kodak 1D Image Analysis Software; Kodak).

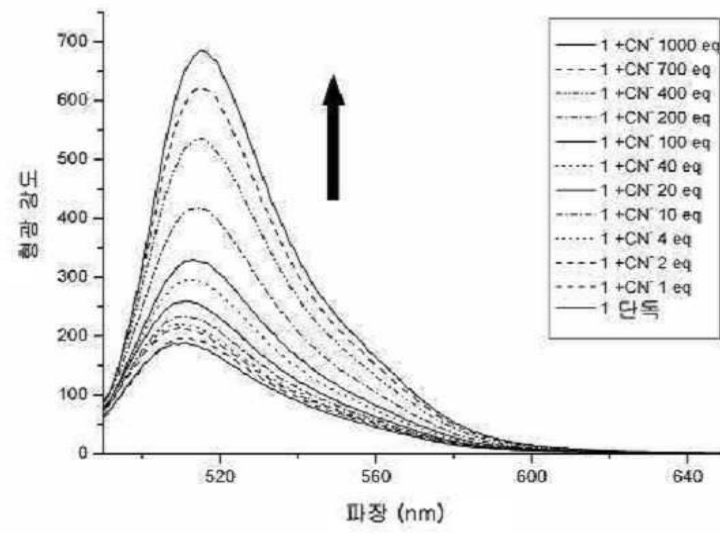
[0090] 도 6은 플루오레세인 다이알데하이드 및 항체와 반응하지 않은 것(Control), 반응한 것(CN sen.)과 녹농균 감염 후 센서 및 항체에 반응한(PA14) 동결 절편의 형광 사진으로, 각각의 사진 중 위의 사진은 플루오레세인 다이알데하이드와 반응한 후의 형광 사진이며, 아래 사진은 녹농균에 결합하는 항체 및 적색 형광 물질을 포함한 항체와 반응한 후의 형광 사진이다.

도면

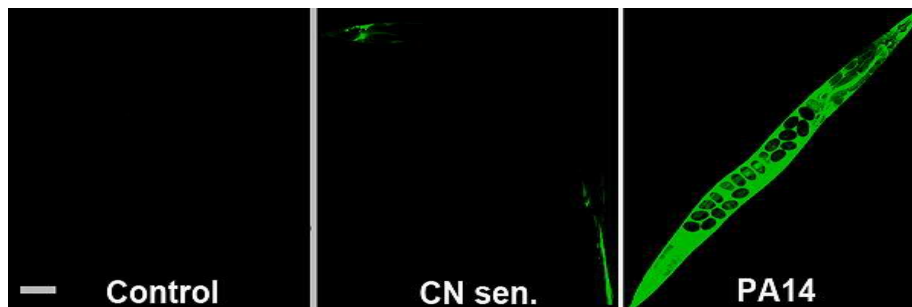
도면1



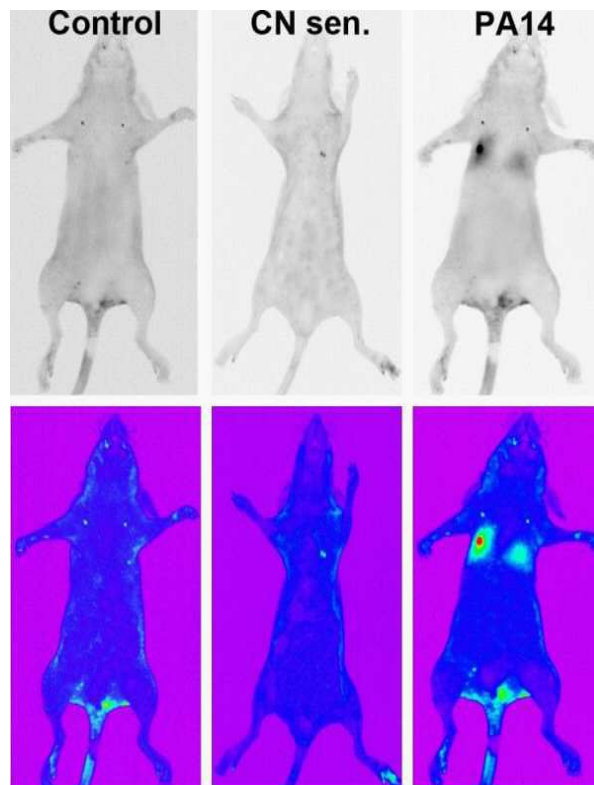
도면2



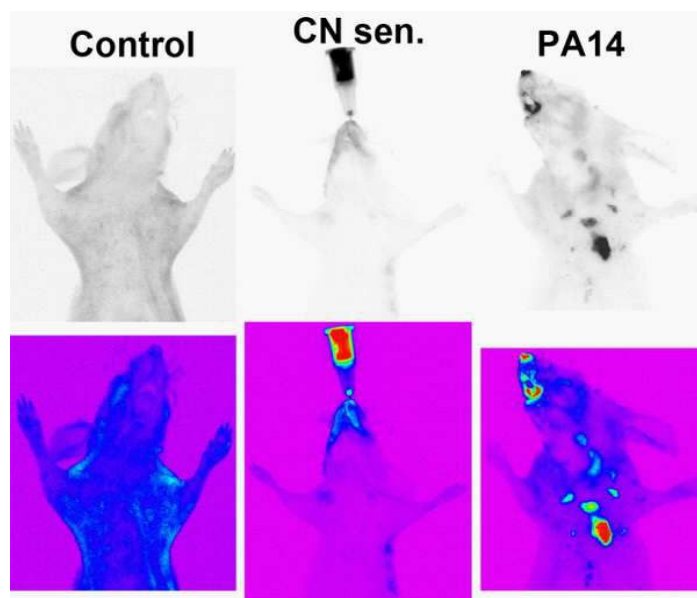
도면3



도면4



도면5



도면6

