



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0108667
(43) 공개일자 2020년09월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/74 (2006.01) C07K 14/255 (2006.01)
C12N 15/65 (2006.01) C12Q 1/18 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C12N 15/74 (2013.01)
C07K 14/255 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0027633

(22) 출원일자 2019년03월11일

심사청구일자 2019년03월11일

(71) 출원인

조선대학교산학협력단

광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)

(72) 발명자

방일수

광주광역시 남구 제석로80번길 5, 105동 803호(봉선동, 제일풍경채 ELITE PARK)

(74) 대리인

리앤목특허법인

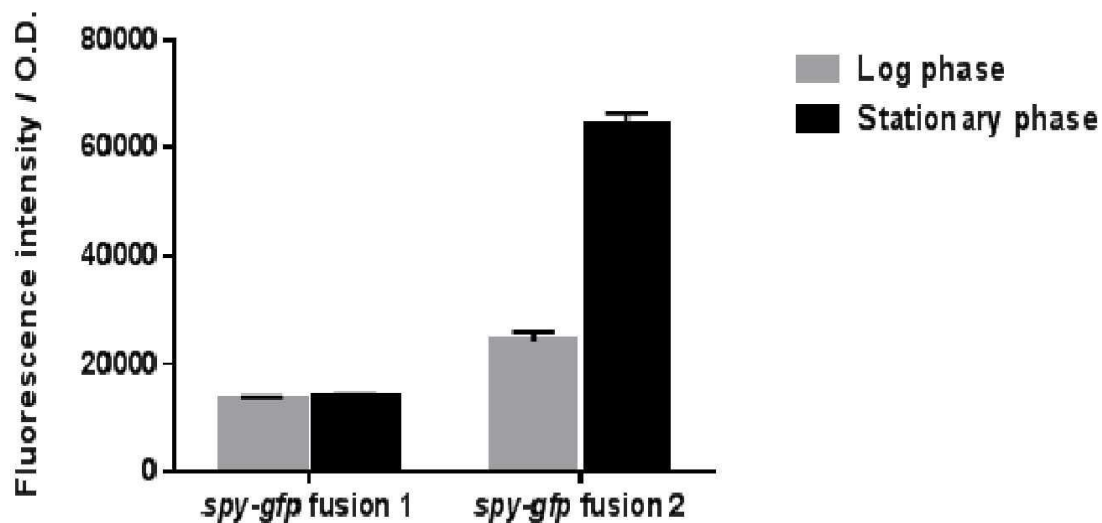
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 spy 유전자를 포함하는 살모넬라 속 미생물, 이를 포함하는 세균막 스트레스 검출용 조성물 및 항생제 후보물질 검출 방법

(57) 요약

spy 유전자를 포함하는 살모넬라 속 미생물, 이를 포함하는 세균막 스트레스 검출용 조성물, 이를 포함하는 항생제 효능 검출용 조성물, 및 이를 이용한 세균막 파괴 효과를 검출하는 방법 및 항생제 후보물질 스크리닝 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 15/65 (2013.01)

C12Q 1/18 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345281638

부처명 교육부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구지원사업

연구과제명 산화질소와 세균 무기인산 흡수체계의 분자적 상호작용에 의한 새로운 세균 병독성 발현기전

기 여 율 1/2

과제수행기관명 조선대학교

연구기간 2018.06.01 ~ 2019.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711054393

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원사업

연구과제명 세균 무기인산과 산화질소의 상호작용

기 여 율 1/2

과제수행기관명 조선대학교

연구기간 2016.06.01 ~ 2018.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

spy(spheroplast protein Y) 유전자의 프로모터 부위 및 구조 유전자를 포함하는 살모넬라(*salmonella*) 속 미생물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 *spy* 유전자는 서열번호 1로 표시되는 것인 살모넬라 속 미생물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 미생물은 *spy* 유전자의 프로모터 부위 및 구조 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질 전환된 것인 살모넬라 속 미생물

청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 구조 유전자는 서열번호 2로 표시되는 것인 살모넬라 속 미생물.

청구항 5

청구항 3에 있어서, 상기 재조합 벡터는 리포터 유전자를 더 포함하는 것인 살모넬라 속 미생물.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 리포터 유전자가 발현하는 단백질은 적색형광단백질(red fluorescent protein; RFP), 증강된 적색 형광 단백질(enhanced red fluorescent protein : ERFP), 녹색형광단백질(green fluorescence protein : GFP), 변형된 녹색 형광 단백질(modified green fluorescent protein : MGFP), 증강된 녹색 형광 단백질(enhanced green fluorescent protein : EGFP), 청색 형광 단백질(blue fluorescent protein : BFP), 증강된 청색 형광 단백질(enhanced blue fluorescent protein : EBFP), 시안 형광 단백질(cyan Fluorescent Protein : CFP), 증강된 시안 형광 단백질(enhanced cyan Fluorescent Protein : ECFP), 황색형광단백질(yellow fluorescent protein : YFP), 및 증강된 황색 형광 단백질(enhanced yellow fluorescent protein : EYFP)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나인 것인 살모넬라 속 미생물.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 미생물은 *Salmonella* Enteritidis 또는 *Salmonella* Gallinarum인 것인 살모넬라 속 미생물.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 *spy* 유전자가 발현하는 단백질은 세균막 외부공간에 위치하는 것인 살모넬라 속 미생물.

청구항 9

청구항 1의 살모넬라 속 미생물을 포함하는, 세균막 스트레스 검출용 조성물.

청구항 10

청구항 1의 살모넬라 속 미생물을 포함하는, 항생제 효능 검출용 조성물.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 상기 항생제는 세균막을 표적으로 하는 것인, 항생제 효능 검출용 조성물.

청구항 12

청구항 11에 있어서, 상기 항생제는 polymyxin B 또는 polymyxin E인 것인, 항생제 효능 검출용 조성물.

청구항 13

청구항 1의 살모넬라 속 미생물에 시료를 첨가하는 단계; 및 상기 미생물로부터 *spy* 유전자의 발현을 측정하는 단계를 포함하는, 살모넬라 속 미생물의 세균막을 파괴하는 시료를 검출하는 방법.

청구항 14

청구항 13에 있어서, 상기 미생물은 *spy* 유전자의 프로모터 부위를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 것인, 살모넬라 속 미생물의 세균막을 파괴하는 시료를 검출하는 방법.

청구항 15

청구항 14에 있어서, 상기 재조합 벡터는 리포터 유전자를 더 포함하는 것인, 살모넬라 속 미생물의 세균막을 파괴하는 시료를 검출하는 방법.

청구항 16

청구항 15에 있어서, 상기 리포터 유전자가 발현하는 단백질은 적색형광단백질(red fluorescent protein; RFP), 증강된 적색 형광 단백질(enhanced red fluorescent protein : ERFP), 녹색형광단백질(green fluorescence protein : GFP), 변형된 녹색 형광 단백질(modified green fluorescent protein : MGFP), 증강된 녹색 형광 단백질(enhanced green fluorescent protein : EGFP), 청색 형광 단백질(blue fluorescent protein : BFP), 증강된 청색 형광 단백질(enhanced blue fluorescent protein : EBFP), 시안 형광 단백질(cyan Fluorescent Protein : CFP), 증강된 시안 형광 단백질(enhanced cyan Fluorescent Protein : ECFP), 황색형광단백질(yellow fluorescent protein : YFP), 및 증강된 황색 형광 단백질(enhanced yellow fluorescent protein : EYFP)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나인 것인, 살모넬라 속 미생물의 세균막을 파괴하는 시료를 검출하는 방법.

청구항 17

청구항 1의 살모넬라 미생물에 항생제 후보물질을 첨가하는 단계; 및 상기 미생물로부터 *spy* 유전자의 발현을 측정하는 단계를 포함하는, 항생제 후보물질 스크리닝 방법.

청구항 18

청구항 17에 있어서, 상기 항생제는 미생물의 세균막을 표적으로 하는 항생제인 것인, 항생제 후보물질 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] *spy* 유전자 및 이를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 살모넬라 속 미생물, 이를 포함하는 검출용 조성물 및 이를 이용한 검출 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 장내세균과의 일종인 살모넬라균은 통성혐기성 그람 음성 간균으로 사람이나 동물 숙주에 침투하여 단순한 장염부터 생명을 위협하는 장티푸스(Typhoid)성 질환까지 다양한 살모넬라증(salmonellosis)을 일으킨다. 낙농 제품과 유제품 및 유가공 제품의 생산과 유통에 있어서 살모넬라균 감염에 의한 피해는 매우 빈번하며, 오염된 제품에 의한 대대적인 식중독 발병의 경우 또한 세계적으로 빈번하다. 특히, 유가공 제품의 생산에 쓰이는 시설과 기구들에서 발생하는 생균막(biofilm)이 큰 위험인자인데, 생균막내에도 많은 살모넬라균의 존재가 확인되고, 이들에 의해 발생하는 감염사례 또한 살모넬라균 제어의 필요성을 보여준다. 살모넬라균은 감염 숙주 동물이 다양한 약 2500종류의 혈청형을 가진 *Salmonella enterica* 중에서 비롯되며, 인간 숙주에 한정적으로 장티푸스를 일으키는 *Salmonella* Typhi와 *Salmonella*. Paratyphi를 제외한 모든 혈청형이 농축산업과 유가공 산업 등에 직, 간접적으로 위협이 될 수 있다.

[0003] 살모넬라균의 항생제에 대한 내성은 세계적으로 증가하는 추세이며, 이에 따른 새로운 항생제의 개발은 살모넬라균 감염 조절에 필수적이다. 많은 항생제들은 세균의 막과 막 외부 주변 공간의 훼손을 목표로 하는데, 그것은 세균막의 직접적인 훼손뿐 아니라 세균 생존에 필수적인 세균의 외부환경 신호 전달체계를 훼손함으로써 효과적으로 세균의 증식을 제어 할 수 있기 때문이다. 하지만 개발되는 항생제가 세균막 및 막 외부 주변 공간에 효과적으로 작용하는지를 검색하는 것은 여전히 많은 노력과 비용을 수반함에 따라(Wolf, D. and Mascher, T. 2016. Appl. Microbiol. Biotechnol. 100:4817-4829.), 이를 보다 쉽고 저비용으로 구별할 수 있는 물질 또는 방법의 개발이 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 일 양상은 *spy* 유전자를 포함하는 살모넬라(*salmonella*) 속 미생물을 제공하는 것이다.

[0005] 다른 양상은 *spy* 유전자를 포함하는 살모넬라 속 미생물을 포함하는 세균막 스트레스 검출용 조성물을 제공하는 것이다..

[0006] 다른 양상은 *spy* 유전자를 포함하는 살모넬라 속 미생물을 포함하는, 항생제 효능 검출용 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 또 다른 양상은 *spy* 유전자를 포함하는 살모넬라 속 미생물에 시료를 첨가하는 단계; 및 상기 미생물로부터 *spy* 유전자의 발현을 측정하는 단계를 포함하는, 살모넬라 속 미생물의 세균막을 파괴하는 시료를 검출하는 방법을 제공하는 것이다.

[0008] 또 다른 양상은 *spy* 유전자를 포함하는 살모넬라 미생물에 항생제 후보물질을 첨가하는 단계; 및 상기 미생물로부터 *spy* 유전자의 발현을 측정하는 단계를 포함하는, 항생제 후보물질 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 출원의 다른 목적 및 이점은 첨부한 청구범위 및 도면과 함께 하기의 상세한 설명에 의해 보다 명확해질 것

이다. 본 명세서에 기재되지 않은 내용은 본 출원의 기술 분야 또는 유사한 기술 분야 내 숙련된 자이면 충분히 인식하고 유추할 수 있는 것이므로 그 설명을 생략한다.

과제의 해결 수단

- [0010] 일 양상은 *spy* 유전자의 프로모터 부위 및 구조 유전자를 포함하는 살모넬라(*salmonella*) 속 미생물을 제공한다. 일 구체예에서 상기 *spy* 유전자의 프로모터 부위와 구조 유전자를 모두 포함하는 것은 서열번호 1로 표시되는 것일 수 있고, 프로모터 부위만을 포함하는 것은 서열번호 2로 표시되는 것일 수 있다.
- [0011] *spy* 유전자는 138개의 아미노산을 가진 작은 주변세포질 샤페론 단백질(ATP-independent periplasmic protein-refolding chaperone)을 코딩하는 유전자이다. 이 단백질은 대장균(*E. coli*)가 여러 자극에 의해 세포벽, 즉 세균 외막과 원형질막 사이에 존재하는 세포벽인 펩티도글리칸(peptidoglycan) 층이 거의 다 제거된 상태인 spheroplast가 형성 될 때 세균 외막과 원형질막 사이에 존재할 수 있다. 다시 말해, 일 구체예에서 상기 단백질은 원형질막 외부공간에서 위치하는 것일 수 있다. 상기 단백질은 4개의 α -helix의 긴 헤어핀(hairpin)과 같은 구조로 독특한 접힘(folding) 구조를 형성할 수 있다. 따라서, 유연성을 지니고 있기 때문에 많은 종류의 단백질의 구조 안정화에 기여할 수 있다(Quan, S. et al. 2011. Nat. Struct. Mol. Biol. 18:262-269).
- [0012] 또한, 일 구체예에 있어서, 상기 살모넬라 속 미생물은 *spy* 유전자의 프로모터 부위 및 구조 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 것일 수 있다. 벡터(vector)란 핵산 서열의 인위적 운반자로 사용되는 DNA 분자를 의미한다. 세포 내에서 복제가 가능하며 유전자 발현을 일으킬 수 있다. 구체적으로, 제한효소로 벡터의 특정 부위를 끊어 버린 뒤, 필요로 하는 핵산 서열을 삽입하여 이를 다시 숙주세포에 넣어 배양하여 발현시킬 수 있다. 벡터는 핵산 서열을 삽입할 수 있는 전달체를 역할을 할 수 있는데, 이 핵산 서열은 외생(exogenous) 또는 이종(heterologous)의 서열일 수 있다. 벡터의 종류에는 플라스미드, 코스미드 및 박테리오파지와 같은 바이러스 등이 있을 수 있다. '재조합 벡터'는 유전자 재조합(genetic recombination) 방법을 이용하여 특정 유전자를 상술한 벡터(vector)에 삽입하여 만든 새로운 DNA를 의미한다. 유전자 재조합은 임의의 생물의 DNA 단편을 다른 DNA 분자에 결합시키는 기술로서, 형질전환, 형질도입, 접합(교배) 및 세포융합 등을 통해 이루어질 수 있다.
- [0013] 일 구체예에서, 상기 재조합 벡터는 리포터 유전자를 더 포함하는 것일 수 있다. 용어 "리포터 유전자"란 유전자 발현시 생물발광, 형광 또는 발색 등을 나타냄으로써 그 발현 여부를 시각적으로 쉽게 확인할 수 있는 유전자를 말한다. 상기 리포터 유전자는 형광단백질을 암호화할 수 있다. 상기 형광단백질은 적색형광단백질(red fluorescent protein; RFP), 증강된 적색 형광 단백질(enhanced red fluorescent protein : ERFP), 녹색형광단백질(green fluorescence protein : GFP), 변형된 녹색 형광 단백질(modified green fluorescent protein : MGFP), 증강된 녹색 형광 단백질(enhanced green fluorescent protein : EGFP), 청색 형광 단백질(blue fluorescent protein : BFP), 증강된 청색 형광 단백질(enhanced blue fluorescent protein : EBFP), 시안 형광 단백질(cyan Fluorescent Protein : CFP), 증강된 시안 형광 단백질(enhanced cyan Fluorescent Protein : ECFP), 황색형광단백질(yellow fluorescent protein : YFP), 및 증강된 황색 형광 단백질(enhanced yellow fluorescent protein : EYFP)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다. 일 구체예에 따른 상기 살모넬라 속 미생물은 형질전환된 재조합 미생물로, 재조합 벡터는 *spy* 유전자 프로모터 부위와 구조유전자 전체 및 형광단백질 GFP를 코딩하는 리포터 유전자 *gfp*가 삽입된 pFPV25 벡터일 수 있다. 일 실시예에 따르면, 상기 재조합 벡터로 형질전환된 살모넬라 속 미생물에 세균막 스트레스, 예를 들면 세포막을 훼손하는 항생제 첨가나 spheroplast의 형성, 또는 에탄올의 첨가시 *spy* 유전자와 *gfp* 유전자가 발현된다.
- [0014] 일 구체예에 있어서, 상기 살모넬라 속 미생물은 *Salmonella* Enteritidis. 또는 *Salmonella* Gallinarum인 것일 수 있다. *Salmonella* Enteritidis와 *Salmonella* Gallinarum은 살모넬라 항원 그룹 D1에 속하는 혈청형으로서, 인수공통 감염을 일으킬 수 있는 미생물이다. *S. Typhimurium*은 살모넬라 항원 그룹 B에 속하는 혈청형으로서, 역시 인수공통 감염을 일으키는 미생물인데, *S. Typhimurium*은 *E. coli*와 함께 이인자 신호전달 체계인 *CpxR*과 *BaeR*에 의해서 *spy* 유전자의 전사 유도 조절을 하는 것으로 알려져 있다. 일 실시예에 따르면 *BaeR*과 *CpxR*이 결손된 *Salmonella* Enteritidis와 *Salmonella* Gallinarum은 세포막 스트레스의 발생시 *spy* 단백질을 발현시키지 못했다. 이는 *Salmonella* Enteritidis와 *Salmonella* Gallinarum이 *CpxR*과 *BaeR*을 통해 *spy* 유전자의 전사를 유도 및 조절한다는 점을 암시한다. 따라서, *spy* 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질변환된 *Salmonella* Enteritidis와 *Salmonella* Gallinarum은 세균막 스트레스가 있을 경우, *spy* 유전자를 전사시킬 수 있는 것이다.
- [0015] 다른 양상은 일 양상의 살모넬라 속 미생물을 포함하는, 세균막 스트레스 검출용 조성물을 제공한다. 일 실시예에 따르면, 에탄올의 첨가나 항생제 첨가 또는 spheroplast 형성 등의 방법으로 세균막에 스트레스를 가할

경우, 일 양상의 살모넬라 속 미생물은 *spy* 유전자와 *gfp* 유전자의 전사를 유도하고, 이에 따라 발현된 형광단백질의 형광 세기를 측정하여 세균막 스트레스의 정도를 측정 내지 검출할 수 있다. 따라서, 상기 살모넬라 속 미생물은 세균막 스트레스 측정을 위한 검출용 조성물의 유효물질로 사용될 수 있다.

- [0016] 상기 일 양상의 살모넬라 속 미생물에서 언급된 용어 또는 요소 중 상기 세균막 스트레스 검출용 조성물에서 언급된 용어 또는 요소와 같은 것은 동일한 것으로 이해된다.
- [0017] 다른 양상은 일 양상의 살모넬라 속 미생물을 포함하는, 항생제 효능 검출용 조성물을 제공한다. 용어 '항생제'는 미생물에 의하여 만들어진 물질로서, 다른 미생물의 성장이나 생명을 막는 물질"을 의미한다. 항생제 중에는 미생물에서 유래한 천연 항생제와 유래하지 않고 합성된 합성 항생제, 또는 기존 천연 항생제의 구조 중 일부를 변경하여 만든 반합성 항생제가 있을 수 있다. 항생제의 작용기전은 크게 세포벽 합성 억제, 세균막 투과성의 변화, 단백질 합성 억제, 핵산 합성 억제 및 염산 합성 억제로 나눌 수 있고, 일 구체예에서, 상기 항생제는 세균막을 표적으로 하는 것일 수 있다
- [0018] 구체적으로, 세균막은 투과 장벽으로 선택적 능동수송을 수행함으로써 세포 내부의 구성물질을 조절하는데, 이러한 투과성이 변화되면 고분자 물질이나 이온들이 세포를 빠져나와 세포가 사멸될 수 있다. 즉, 세균막에 작용하는 항생제는 세균막의 투과성을 변화시켜 세균으로 하여금 세포 내, 외부의 균형을 잃게 하여 사멸시킬 수 있다. 세균막 기능을 억제하는 약제로는 그람 음성균에 작용하는 폴리믹신(polymyxin) 등이 있을 수 있다.
- [0019] 일 구체예에서도 상기 항생제는 polymyxin B 또는 polymyxin E인 것일 수 있다. 일 실시예에 따르면, polymyxin B를 상기 검출용 조성물에 첨가할 경우, 상기 검출용 조성물로부터 *spy* 유전자의 발현이 증가하고, 이에 따라 *gfp* 유전자의 발현에 따른 형광 강도를 측정함으로써, 세균막을 표적으로 하는 항생제인 polymyxin B의 효능을 검출할 수 있다. 따라서, 상기 살모넬라 속 미생물은 항생제의 효능 측정을 위한 검출용 조성물의 유효물질로 사용될 수 있는 바, 개발되는 항생제가 세균막 및 막 외부 주변 공간에 효과적으로 작용하는지를 검색하는 데 소요되는 노력과 비용을 줄일 수 있다.
- [0020] 상기 일 양상의 살모넬라 속 미생물에서 언급된 용어 또는 요소 중 상기 항생제 효능 검출용 조성물에서 언급된 용어 또는 요소와 같은 것은 동일한 것으로 이해된다.
- [0021] 또 다른 양상은 일 양상의 살모넬라 속 미생물에 시료를 첨가하는 단계 및 상기 미생물로부터 *spy* 유전자의 발현을 측정하는 단계를 포함하는, 살모넬라 속 미생물의 세균막을 파괴하는 시료를 검출하는 방법을 제공한다. 상기 방법에서 상기 *spy* 유전자의 발현을 측정하는 단계는 *spy* 유전자가 발현하는 단백질, GFP 단백질 또는 spheroplast 형성을 확인하는 것을 포함할 수 있다. 또한, 상기 단계는 GFP의 발현 정도를 측정하는 단계나, 형성된 spheroplast 또는 GFP의 발광 자체를 현미경으로 직접 관찰하는 단계를 포함할 수 있다. 추가적으로, 상기 방법은 시료의 측정된 형광 강도 값, 즉 GFP의 발현량이 무처리 대조군 내지 유사한 효능이 있을 것으로 예상되는 시료를 첨가한 비교 대조군에 비하여 크거나 현미경으로 관찰된 형광색의 점들이 보다 많을수록, 살모넬라 속 미생물에 대한 시료의 세균막 파괴 효과가 큰 것으로 결정하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0022] 상기 검출 방법에 따르면, 시료 및 정상 대조군의 GFP 단백질의 발현량을 비교함으로써 살모넬라 속 미생물의 세균막을 파괴하는 시료를 검출할 수 있다. 구체적으로는, 세균막을 파괴할 것으로 예상되는 시료와 대조군의 GFP 단백질의 발현량을 측정하고 비교하여, 시료에서 GFP 단백질의 발현량이 더 증가하는 정도에 따라 세균막의 파괴 여부 및 그 정도를 측정할 수 있다.
- [0023] 일 구체예에서 상기 미생물은 *spy* 유전자의 프로모터 부위를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 것일 수 있다. 또한, 상기 재조합 벡터는 리포터 유전자를 더 포함하는 것일 수 있고, 상기 리포터 유전자는 적색형광단백질(red fluorescent protein; RFP), 증강된 적색 형광 단백질(enhanced red fluorescent protein : ERFP), 녹색형광단백질(green fluorescence protein : GFP), 변형된 녹색 형광 단백질(modified green fluorescent protein : MGFP), 증강된 녹색 형광 단백질(enhanced green fluorescent protein : EGFP), 청색 형광 단백질(blue fluorescent protein : BFP), 증강된 청색 형광 단백질(enhanced blue fluorescent protein : EBFP), 시안 형광 단백질(cyan Fluorescent Protein : CFP), 증강된 시안 형광 단백질(enhanced cyan Fluorescent Protein : ECFP), 황색형광단백질(yellow fluorescent protein : YFP), 및 증강된 황색 형광 단백질(enhanced yellow fluorescent protein : EYFP)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나인 것일 수 있다.
- [0024] 상기 일 양상의 살모넬라 속 미생물에서 언급된 용어 또는 요소 중에서 살모넬라 속 미생물의 세균막을 파괴하는 시료를 검출하는 방법으로서 언급된 용어 또는 요소와 같은 것은 동일한 것으로 이해된다.
- [0025] 일 실시예에 따르면, 일 양상의 살모넬라 속 미생물에 시료로써 수크로스(sucrose), 리소자임 또는 EDTA와 같은

spheroplast를 형성시킬 수 있는 물질을 첨가한 후, 이에 따른 *spy* 유전자의 발현 정도에 따라 각 시료의 spheroplast 형성 효과 내지 세균막 파괴 효과를 측정할 수 있다. 따라서, 상기 방법은 살모넬라 속 미생물의 세균막을 파괴하는 시료를 검출하는 적절한 방법이 될 수 있다.

[0026] 또 다른 양상은 살모넬라 속 미생물에 항생제 후보물질을 첨가하는 단계; 및 상기 미생물로부터 *spy* 유전자의 발현을 측정하는 단계를 포함하는, 항생제 후보물질 스크리닝 방법을 제공한다. 상기 방법에서 상기 *spy* 유전자의 발현을 측정하는 단계는 *spy* 유전자가 발현하는 단백질, GFP 단백질 또는 spheroplast 형성을 확인하는 것을 포함할 수 있다. 또한, 상기 단계는, GFP의 형광 강도를 측정하는 단계 또는 형성된 spheroplast 또는 GFP의 발광 자체를 현미경으로 직접 관찰하는 단계를 포함할 수 있다. 추가적으로, 상기 방법은 측정된 형광강도 값이 다른 항생제를 사용한 대조군 내지 무처리 대조군에 비하여 크거나 관찰된 형광색의 점들이 보다 많이 관찰될수록 항생제의 효능이 보다 큰 것으로 선별하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0027] 상기 검출 방법에 따르면, 시료 및 대조군의 GFP 단백질의 발현량을 비교함으로써 세균막을 표적으로 하는 항생제의 효능을 검출할 수 있다. 구체적으로는, 항생제 후보물질 처리군과 무처리 대조군의 GFP 단백질의 발현량을 측정하고 비교하여, 항생제 후보물질에서 GFP 단백질의 발현량이 더 증가하는 정도에 따라 항생제 후보물질의 세균막 표적 여부 및 그 효능의 수준을 측정할 수 있다. 따라서, 상기 방법은 항생제 후보 물질을 스크리닝하는 적절한 방법이 될 수 있다.

[0028] 일 구체예에서, 상기 항생제는 미생물의 세균막을 표적으로 하는 항생제인 것일 수 있다. 또한, 일 구체예에서 상기 미생물은 *spy* 유전자의 프로모터 부위를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 것일 수 있다. 상기 재조합 벡터는 리포터 유전자를 더 포함하는 것일 수 있고, 상기 리포터 유전자는 적색형광단백질(red fluorescent protein; RFP), 증강된 적색 형광 단백질(enhanced red fluorescent protein : ERFP), 녹색형광단백질(green fluorescence protein : GFP), 변형된 녹색 형광 단백질(modified green fluorescent protein : MGFP), 증강된 녹색 형광 단백질(enhanced green fluorescent protein : EGFP), 청색 형광 단백질(blue fluorescent protein : BFP), 증강된 청색 형광 단백질(enhanced blue fluorescent protein : EBFP), 시안 형광 단백질(cyan Fluorescent Protein : CFP), 증강된 시안 형광 단백질(enhanced cyan Fluorescent Protein : ECFP), 황색형광 단백질(yellow fluorescent protein : YFP), 및 증강된 황색 형광 단백질(enhanced yellow fluorescent protein : EYFP)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나인 것일 수 있다.

[0029] 본 명세서에서 용어 "스크리닝"은 하나 이상의 유전자 변형된 생물체를 사용하여, 하나 이상의 특정 표적 유전자 및/또는 표적 단백질의 활성화에 작용하는 물질을 탐색하는 모든 유형을 포함한다. 원칙적으로, 모든 유형의 물질, 예를 들면 모든 유형의 천연 물질(즉, 천연적으로 존재하는 분자, 특히 생체분자)뿐 만 아니라, 천연에 존재하지 않는, 합성에 의해 제조된 화학물질 및 천연 물질, 특히 생물학적 분자로 부터 유도된 물질/유도체(예: 변형된 펩티드 또는 올리고뉴클레오티드)가 적합하다.

[0030] 상기 일 양상의 살모넬라 속 미생물에서 언급된 용어 또는 요소 중 항생제 후보물질 스크리닝 방법에서 언급된 용어 또는 요소와 같은 것은 동일한 것으로 이해된다.

[0031] 본 출원에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 출원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 출원의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

발명의 효과

[0032] 일 양상에 따른 *spy* 유전자를 포함하는 살모넬라 속 미생물, 이를 포함하는 세균막 스트레스 검출용 조성물, 이를 포함하는 항생제 효능 검출용 조성물, 및 이를 이용한 세균막 파괴 효과를 검출하는 방법 및 항생제 후보물질 스크리닝 방법은 *spy* 유전자의 전사량 내지 발현량을 쉽게 측정할 수 있어 다른 물질 또는 방법과 달리 저비용으로 정밀한 측정 결과를 나타냄으로써, 세균막의 스트레스 정도를 효과적으로 검출할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0033] 도 1은 *spy-gfp* fusion 1 및 *spy-gfp* fusion 2의 대수기 및 정지기에서 발현된 GFP의 정도를 나타내는 그래프이다.

도 2는 *S. Enteritidis/pspy-gfp1*과 *S. Gallinarum/pspy-gfp1*에 polymyxin B 를 처리한 균주들에서 GFP의 정도를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 3a 및 3b는 *S. Enteritidis/pspy-gfp1*과 *S. Gallinarum/pspy-gfp1*에 spheroplast의 형성 및 GFP의 발현을 관찰한 현미경 영상이다.

도 4a는 *S. Enteritidis/pspy-gfp1*과 *S. Gallinarum/pspy-gfp1*에 4%의 에탄올 및 polymyxin B를 처리한 균주들에서 *CpxR* 또는 *BaeR*이 결손된 경우, 발현된 GFP 정도를 측정한 그래프이다.

도 4b 및 4c는 *S. Enteritidis/pspy-gfp1*과 *S. Gallinarum/pspy-gfp1*에 한 균주들에서 *CpxR* 또는 *BaeR*을 결손시킨 후, spheroplast의 형성 및 발현된 GFP를 관찰한 현미경 영상이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

실시예 1. *spy-gfp* 오페론 융합 플라스미드(*spy-gfp fusion 1*)의 제조

본 실시예에서는 *spy* 유전자의 프로모터 부위를 포함하는 *spy* 구조 유전자 전체 및 *gfp* 리포터 유전자를 포함하는 오페론 융합 플라스미드를 만들고자 하였다. 먼저 PCR 증폭을 통해 원하는 각 유전자 산물을 얻고자 하였다. PCR 증폭에 사용된 유전자의 주형은 *Salmonella* Typhimurium 14028s 염색체이고, 전체 살모넬라 유전체에서 *spy* 프로모터 부분 및 구조 유전자를 포함하는 유전자를 증폭시키기 위해 제한효소 자리 염기를 붙인 서열번호 3으로 표시되는 *spy* linker SacI Forward-1 프라이머와 서열번호 4로 표시되는 *spy* linker BamHI Reverse-1 프라이머를 사용하였다. 각 프라이머의 서열은 아래 표 1과 같다.

[표 1]

DNA oligomers	Sequences (5'-3')
<i>spy</i> linker SacI Fw-1	TATGAGCTCTGCTATATCATGCTGTTGTA
<i>spy</i> linker BamHI Rev-1	TATGGATCCAGGACGGCTATAGAATTCTCTG

그리고 i-pfu DNA 중합효소(iNtRON Biotechnology Inc, Korea)를 이용해 PCR 증폭을 시켰다. 증폭된 PCR 산물은 PCR 정제키트(GeneAll Biotechnology Co. Ltd, Korea)를 사용하여 정제하였고, 프라이머 부분에 붙인 SacI과 BamHI(NEB Inc, USA) 부위를 제한효소를 이용하여 잘라냈다. 제한효소 처리를 한 유전자를 pFPV25 벡터와 함께 정제 키트(GeneAll)로 정제 후 T4 DNA ligase (NEB)를 이용하여 결합시켜 *E. coli* DH5α에 형질전환시켰다. 형질전환된 콜로니들의 플라스미드를 분리하고 삽입유전자의 염기서열을 확인하였다. 최종적으로, *spy-gfp fusion 1*을 제조하였다.

비교예 1. *spy-gfp* 오페론 융합 플라스미드 간 특성 비교

본 비교예에서는 *spy* 유전자의 프로모터 부위와 *gfp* 리포터 유전자만 포함하는 오페론 융합 플라스미드(*spy-gfp fusion 2*)를 제조하여, 상기 실시예 1.의 *spy-gfp fusion 1*와 *spy* 유전자 발현량 측정 효과를 비교하고자 하였다. 이를 위해 먼저 PCR 증폭을 통해 원하는 각 유전자 산물을 얻고자 하였다. PCR 증폭에 사용된 *spy* 유전자의 주형은 *Salmonella*. Typhimurium 14028s 염색체이고, 전체 살모넬라 유전체에서 *spy* 프로모터 부분에 해당하는 유전자를 증폭시키기 위해 제한효소 자리 염기를 붙인 서열번호 5로 표시되는 *spy* linker SacI Forward-2 프라이머와 서열번호 6으로 *spy* linker BamHI Reverse-2 프라이머를 사용하였다. 각 프라이머의 서열은 아래 표 2과 같다.

[표 2]

DNA oligomers	Sequences (5'-3')
<i>spy</i> linker SacI Fw-2	TATGAGCTCTGCTATATCATGCTGTTGTA
<i>spy</i> linker BamHI Rev-2	TATGGATCCTACCTTTATGCTG CATCATT

이후 과정은 상기 실시예 1.과 동일하고, 최종적으로, *spy* 유전자의 프로모터 부위 및 *gfp* 리포터 유전자를 포

합하는 오페론 융합 플라스미드 *spy-gfp* fusion 2를 제조하였다. 그리고 대수기(log phase)와 정지기(stationary phase)에서 실시예 1.에서 제조한 *spy-gfp* fusion 1와 상기 *spy-gfp* fusion 2의 각 *spy-gfp* 발현량을 비교하였다.

[0045] 먼저 제조된 재조합 벡터 *spy-gfp* fusion 1 및 2을 각각 *S. Typhimurium* 14028s에 형질전환시킨 후, 이들의 대수기와 정지기에서 *spy-gfp* 전사의 발현량을 확인하였다. 이에 대한 결과는 도 1에 나타내었다.

[0046] 도 1에 나타난 바와 같이, *spy-gfp* fusion 1에 비해 *spy-gfp* fusion 2는 균주의 대수기와 정지기 모두에서 발현량이 큰 것으로 확인되었다. *spy-gfp* fusion 2가 포함된 균주는 대수기와 정지기에서 모두 큰 발현량을 나타내기 때문에, 세균막 스트레스에 대한 *spy* 유전자 전사의 유도를 관찰하기가 어려웠다. *spy-gfp* fusion 1은 *spy* 유전자의 전사 유도를 측정 및 관찰하는데 더 유용하다는 것을 본 비교예를 통해 알 수 있었다.

[0047] **실시예 2. 항생제에 의한 *spy-gfp*의 전사량 측정**

[0048] 본 실시예에서는, 상기 실시예 1에서 제조한 *spy-gfp* fusion 1를 보유하는 *S. Enteritidis*(*S. Enteritidis/pspy-gfp1*)과 *S. Gallinarum*(*S. Gallinarum/pspy-gfp1*)의 항생제에 대한 *spy* 유전자 전사량을 측정하고자 하였다. 우선, 살모넬라 균주 *Salmonella* Enteritidis 균주와 *Salmonella* Gallinarum 균주에 *spy-gfp* fusion 1를 형질전환하였다. 상기 각 균주를 LB 영양배지에서 밤새 배양 한 다음, 새로운 LB 영양배지에서 1:1000으로 희석해 접종하여 37°C, 220 rpm의 진탕 배양기(HST, Korea)에서 대수기인 O.D 600nm=0.4 이 될 때까지 배양한 후, 각 균주에 세균막을 표적으로 하는 항생제로 알려진 polymyxin 계열의 항생제 polymyxin B를 *S. Enteritidis*에는 1 및 2 µg/ml, *S. Gallinarum*에는 3 및 6 µg/ml의 농도로 처리한 후 1시간 동안 추가로 더 배양하였다. polymyxin B를 처리하기 전 배양액과 처리한 후의 배양액을 원심분리하여 PBS(phosphate buffer saline, pH 7.0)로 2번 세척 후 Black 96-well plate(SPL, Korea)에서 각 세균액(OD600nm=1.0)의 형광 강도를 485nm excitation과 535nm emission에서 마이크로플레이트 리더(DTX 880 Beckmna Coulter, USA)로 측정하였다. 해당 결과는 도 2에 나타내었다.

[0049] 도 2에 나타난 바와 같이, *S. Enteritidis/pspy-gfp1*과 *S. Gallinarum/pspy-gfp1*에서 형광도를 측정한 결과, 각 LB 영양배지에서 대수기(OD600nm=0.4)까지 배양한 균주에서는 발현하지 않는 것을 확인하였고, 아무것도 처리하지 않은 균주에 비해 polymyxin B를 처리한 균주들에서 *spy-gfp*의 발현이 크게 증가하는 것을 하였다. 도 1의 (A)에서 나타낸 바와 같이, *S. Enteritidis/pspy-gfp1*의 경우 1 ug/ml 및 2 ug/ml 농도의 polymyxin B에 의해 각각 3.9배, 13.8배, (B)에서 나타내는 바와 같이 *S. Gallinarum/pspy-gfp1*의 경우 3ug/ml 및 6ug/ml 농도의 polymyxin B에 의해 각각 1.6배, 2배 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 세균막을 표적으로 하는 항생제인 polymyxin B에 의해 *spy-gfp*의 전사가 유도된 것으로 확인된다. 상기 결과를 통해, 세균막을 표적으로하는 항생제인 polymyxin B에 의해 *spy* 유전자의 전사가 유도되었고, 항생제에 농도-의존적이라는 것을 알 수 있다.

[0050] **실시예 3. Spheroplast의 형성에 의한 *spy-gfp*의 전사량 측정**

[0051] Spheroplast은 그 형성 과정 중에 세균막에 스트레스를 주는 것으로 알려져 있다. 이에 따라 본 실시예에서는 spheroplast 형성 중에 발생하는 세균막 스트레스에 따른 *spy*유전자의 발현 정도를 측정하고자 하였다. 이를 위해 우선, *S. Enteritidis/pspy-gfp1*과 *S. Gallinarum/pspy-gfp1*을 LB 영양배지에서 밤새 배양 한 다음, 새로운 LB 영양배지에 4:1로 접종하여 37°C, 220 rpm의 진탕 배양기에서 O.D600nm=0.8이 될 때까지 배양한 후 25°C, 5,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 상층액을 버리고 1 M Tris-HCl (pH 8.0)을 0.01M로 희석시킨 용액으로 같은 양을 첨가하여 한번 세척 시켰다. 다시 한 번 원심분리하여 상층액을 제거 후 0.5 M sucrose(Bioshop, Canada)가 포함된 Tris-buffer로 같은 양으로 첨가하여 실온에서 10분간 반응시킨 후 lysozyme(200 µg/ml)을 첨가하고 10분 반응시킨 후 Tris-HCl (10mM, pH8.0) buffer을 1:1 비율로 첨가한 후에 20 mM의 EDTA를 처리하여 37°C에서 4시간 동안 반응시켰다. spheroplast가 형성되는 각 과정은 일부 세균을 덜어내 1% agarose 로 코팅한 후 Axioscope A1(Carl zeiss, Germany) 현미경으로 관찰하고 현미경에 연결된 CCD 카메라로 촬영하였다. 이에 대한 결과는 S. 도 3a 및 3b에 나타내었다.

[0052] 도 3a 및 3b에 나타난 바와 같이, spheroplast 형성 과정 중, 수크로스와 리소자임까지 처리까지 하였을 때는 spheroplast가 뚜렷하게 형성 되지 않았고, sucrose, lysozyme 및 EDTA를 모두 처리한 경우 spheroplast가 형성되었으며, 이때 *gfp* 발현이 크게 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 하지만, sucrose와 lysozyme 및 EDTA를 각각 처리했을 때는 *gfp*의 발현을 볼 수 없었다. 이 결과는 sucrose에 의한 삼투압에 대한 노출, lysozyme에 의한 펩티도글리칸의 용해, 그리고 EDTA에 의한 세균막 스트레스를 통하여 순차적으로 spheroplast가 형성될 때만 *S. Enteritidis*과 *S. Gallinarum*에서 *spy*의 전사가 유도될 수 있음을 보여준다. 또한, 세균막 스트레스에 의하

여 세균막이 파괴될 때, *spy* 유전자의 전사가 유도되는 것임을 나타낸다.

실시예 4. *spy* 전사 유도 과정에서 *CpxR* 또는 *BaeR*의 역할 확인

본 실시예에서는 *S. Enteritidis*와 *S. Gallinarum*에서 *spy* 유전자의 전사가 이인자 신호전달 체계인 *CpxR*과 *BaeR*에 의해서 조절되는지 알아보고자 하였다. 우선, 모두 *CpxR*과 *BaeR*이 결손된 두 돌연변이 균주에 polymyxin B 첨가, 4%의 에탄올 첨가 및 spheroplast 형성을 각각 별도로 진행하였다. 그리고, 야생형 대조군(WT)과 *spy-gfp* 발현량을 비교하였다. 그 결과는 도 4a 내지 4c에 나타내었다.

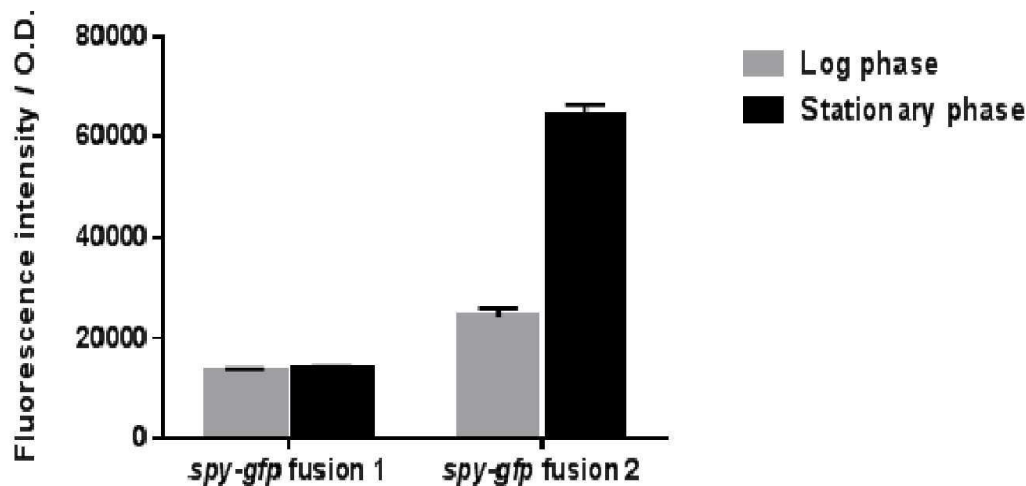
도 4a에서 나타내는 바와 같이, polymyxin B 또는 에탄올을 첨가하였 때, *CpxR*과 *BaeR*이 결손된 두 돌연변이 균주에서는 *spy* 유전자의 발현이 거의 되지 않는 것을 확인하였다.

또한, 도 4b 및 4c에 나타낸 바와 같이, *CpxR*과 *BaeR*이 결손된 돌연변이 각 균주들의 spheroplast 형성과정에서 도 *spy* 유전자의 발현은 관찰되지 않았다.

이러한 결과들은 polymyxin B 또는 에탄올 등과 같은 세균막 훼손 요인과 spheroplast 형성과정 동안 생기는 세균막 스트레스로 인해 *S. Enteritidis*와 *S. Gallinarum*의 *spy* 유전자 발현이 크게 증가하고, 이 유도과정에 조절자 *CpxR*과 *BaeR*의 역할이 필수적임을 보여준다.

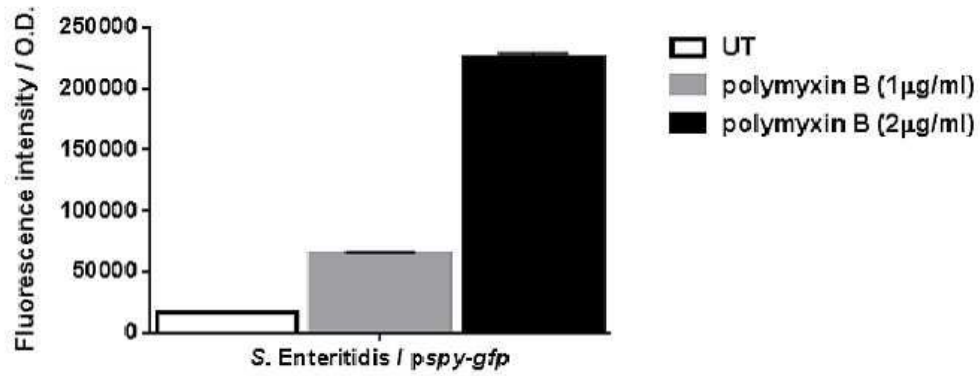
도면

도면1

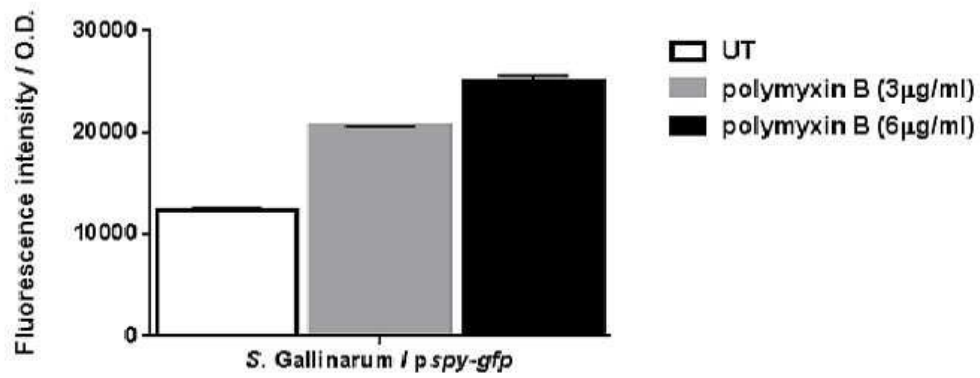


도면2

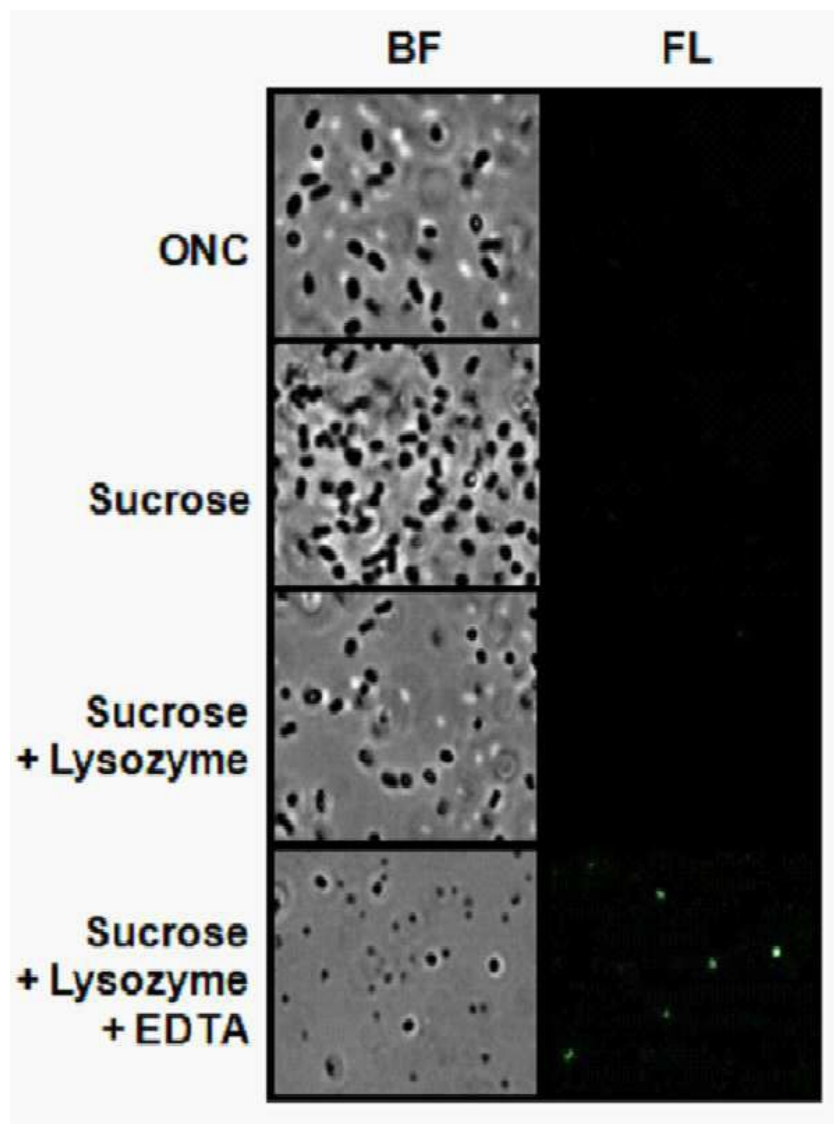
(A)



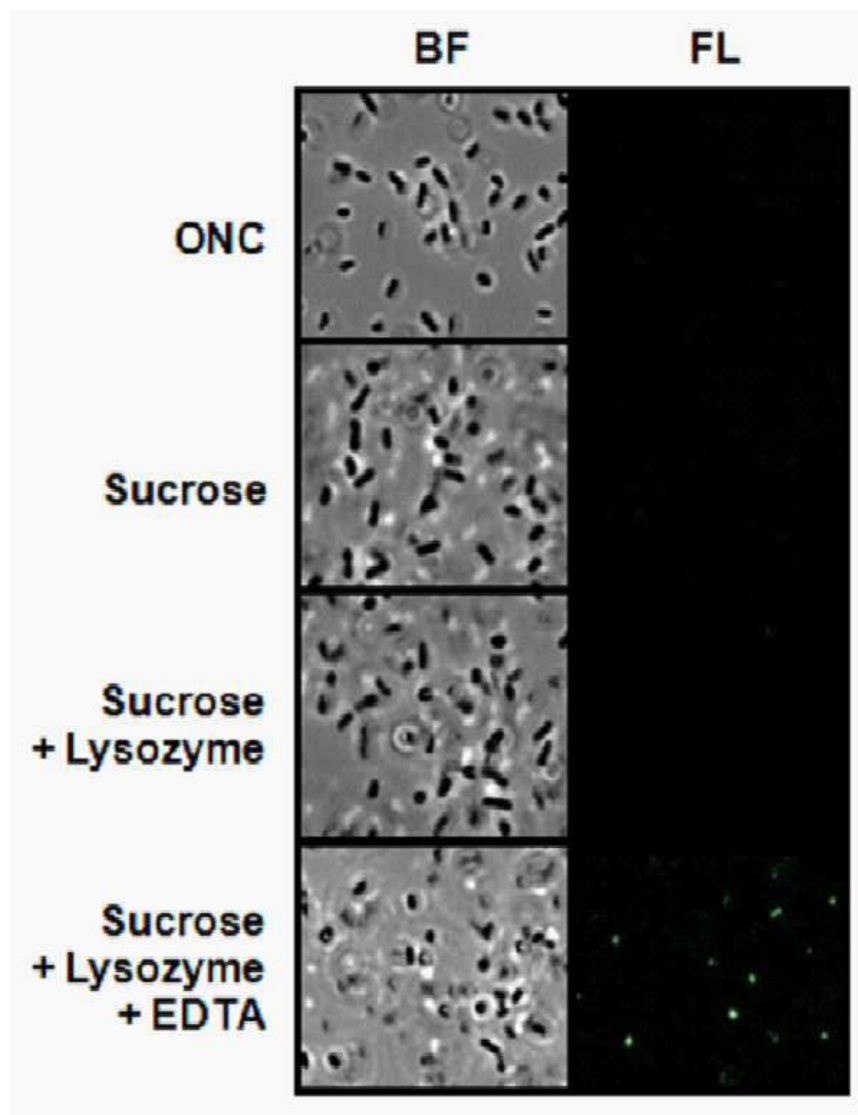
(B)



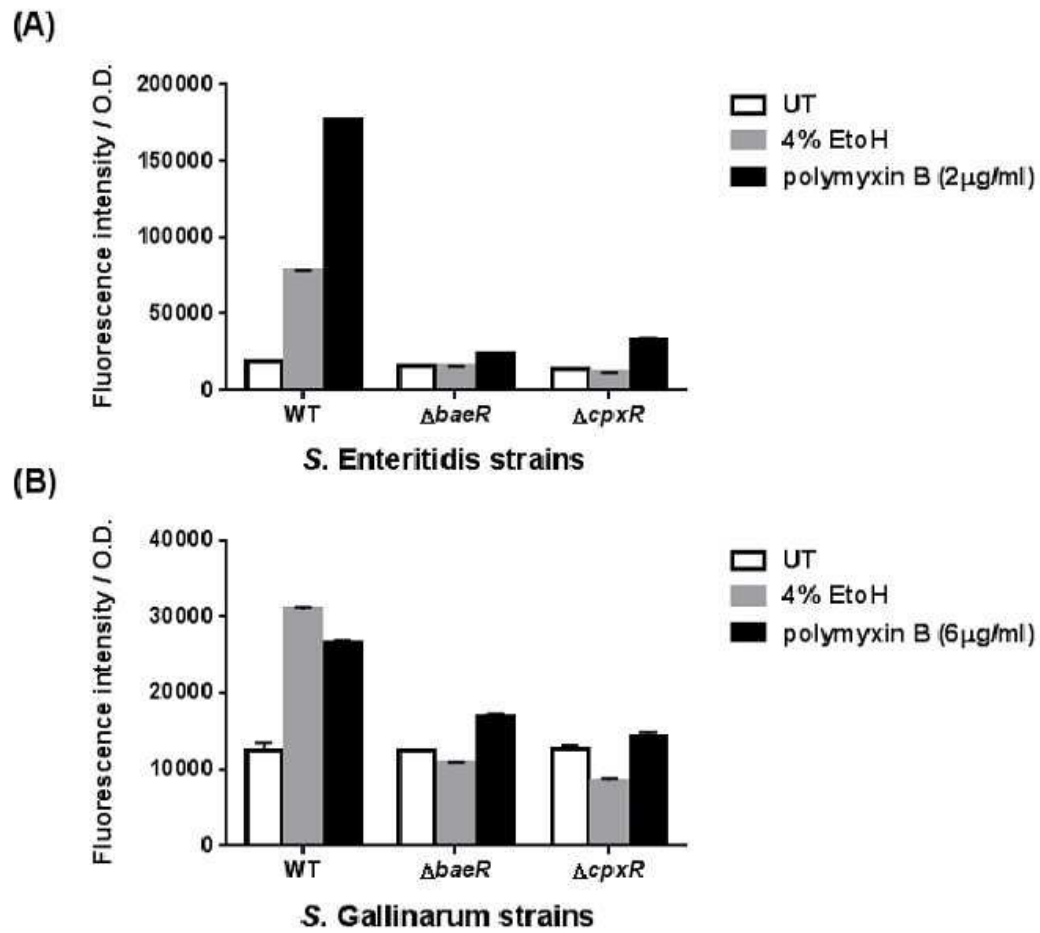
도면3a



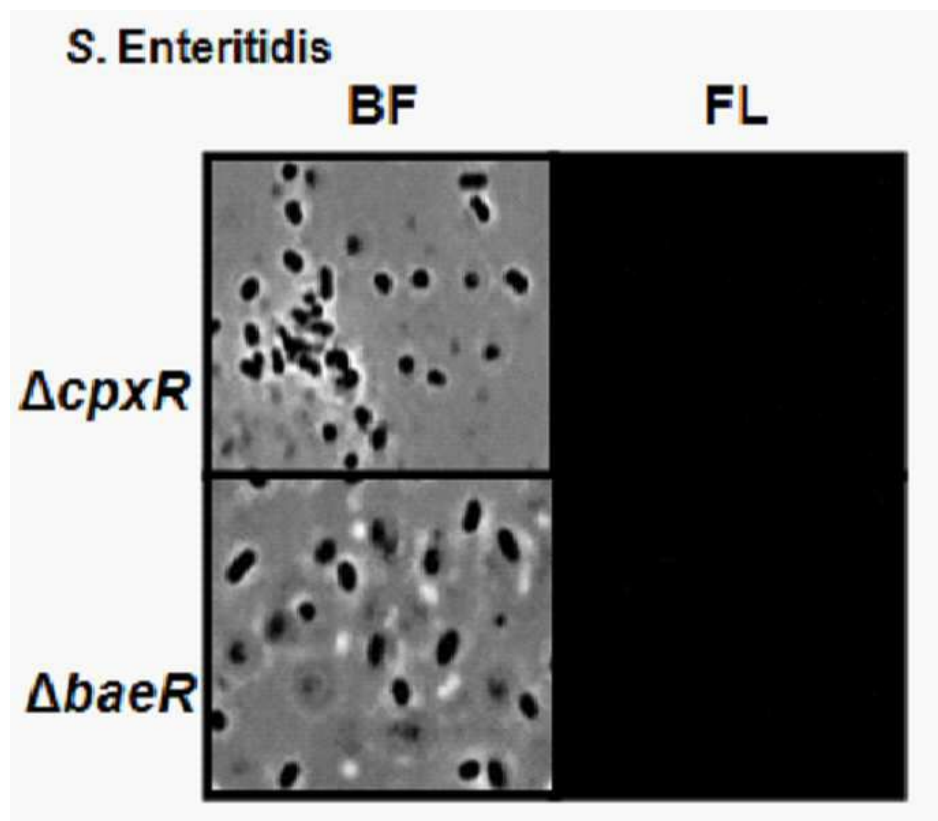
도면3b



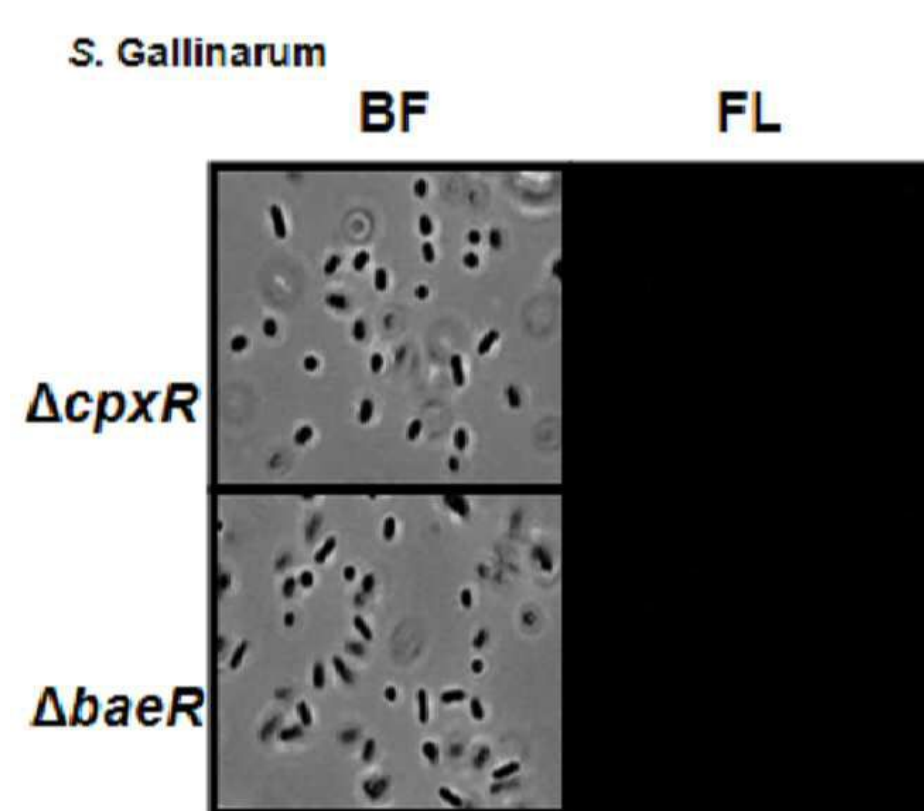
도면4a



도면4b



도면4c



서열 목록

<110>	INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION CHOSUN UNIVERSITY	
<120>	Salmonella spp comprising spy gene, composition for detecting envelope stress comprising same and method for screening antibiotic agent	
<130>	PN125489	
<160>	6	
<170>	KoPatentIn 3.0	
<210>	1	
<211>	851	
<212>	DNA	
<213>	Salmonella typhimurium	
<400>	1	
	tgctatatca tgctgttgta tatttctctt tcaactctgc gcaatttatt cttttttct	60
	tcacaattgg cgaaaaagtg ttttttatac ttccattgtt ttaccgttgt tatgactaat	120
	tgacgctaag acggttaaag ttaatcacga caacacggcg ctgttttaaa tatgccgtaa	180
	aaataactga aaggaaggat agaaatatgc gtaaaactgac tgctctatct gttgcctcta	240
	ccctggcgat ggggtgctgcg aatctcgctc atgccgctga gactaccacc gccgcgccag	300
	cggatgcgaa gccaatgatg cagcataaag gtaaatgttg cccacatcac gatatgatgt	360
	ttaaaaaact gaacctgacg gacgcacaga agcaacaaat tcgcgacatt atgaaagcgc	420
	agcgcgagca aatgaaacgt ccgctgctgg aagagcgtcg cgccatgcat gatattatcg	480
	ccagcgatac cttcgataaa gccaaagccg aagcgcaaat tacgaaaatg gaagcgcagc	540
	gcaaggccaa tatgctggcg catatggaaa ccagaataa aatttataac gttctgacgc	600
	cggagcagaa aaagcaatat aacgctaatt ttgagaagcg tctgacggaa cgcccggcgc	660
	aagaaggtaa aatgcctgct gcggcagaat aactttccgc ataatttaag accgccggtc	720
	ttgtcgacaa cacaatcgtt gaggtggaca ggatcggcgg ttttctttat gactggcgac	780
	agtcggtgtg cagttcaatg atctcatatt gacctgacat taacggttta cagagaatct	840
	tatagccgtc c	851
<210>	2	
<211>	333	
<212>	DNA	
<213>	Salmonella typhimurium	

<400> 2
 tgctatatca tgctgttgta tttttctctt tcaactctgc gcaatttatt ctttttttct 60
 tcacaattgg cgaaaaagtg ttttttatac ttccattgtt ttaccgttgt tatgactaat 120
 tgacgctaag acggtttaaag ttaatcacga caacacggcg ctgttttaaa tatgccgtaa 180
 aaataactga aaggaaggat agaaatatgc gtaaactgac tgctctatct gttgcctcta 240
 ccctggcgat ggggtgctgcg aatctcgctc atgccgctga gactaccacc gccgcgccag 300
 cggatgcgaa gccaatgatg cagcataaag gta 333

<210> 3
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> spy linker SacI Forward-1
 <400> 3
 tatgagctct gctatatcat gctgttgta 29

<210> 4
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> spy linker BamHI Reverse-1
 <400> 4
 tatggatcca ggacggctat agaattctct g 31

<210> 5
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> spy linker SacI Forward-2

<400> 5
 tatgagctct gctatacatg ctgttgta 28
 <210> 6
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> spy linker BamHI Reverse-2

<400> 6

tatggatcct acctttatgc tgcattcatt

29