

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0022690 (43) 공개일자 2012년03월12일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12Q 1/02 (2006.01)	(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울 성북구 안암동5가 1	
(21) 출원번호 10-2011-0144458(분할)	(72) 발명자	
(22) 출원일자 2011년12월28일	구만복	
심사청구일자 2011년12월28일	서울특별시 동대문구 이문2동 264-453	
(62) 원출원 특허 10-2010-0057291	안주명	
원출원일자 2010년06월16일	경기도 부천시 오정구 원종1동 동문아파트 7-302	
심사청구일자 2010년06월16일	(뒷면에 계속)	
	(74) 대리인	
	이처영	

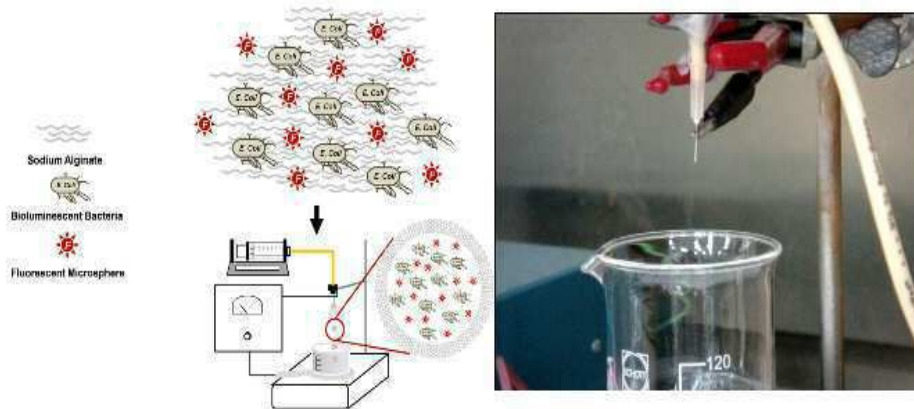
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **제조합 발광박테리아의 자기 확인 코드 기반 기능성 마이크로비드 개발과 이를 이용한 바이오 센서 응용 및 독성 탐지 방법**

(57) 요약

본 발명은 제조합 발광박테리아의 자기 확인 코드 기반 기능성 마이크로비드 개발과 이를 이용한 바이오 센서 응용 및 독성 탐지 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

김중현

대전광역시 유성구 과학로 어은동 111

김지훈

서울특별시 성북구 종암동 31-26번지 105호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2010-220-D0019

부처명 한국연구재단

연구사업명 글로벌연구네트워크지원사업

연구과제명 독성진단용 기능성 세포 및 자기확인 기반 스마트 세포칩

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2010.09.01 ~ 2013.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

하기 표에 기재된 균주로 구성된 재조합 발광박테리아 및 형광물질을 포함하는 마이크로비드를 세포칩에 무작위 배열하는 단계를 포함하는 무작위 배열 마이크로비드 세포칩의 제조방법.

균주	플라즈미드
EBHJ1	pSodALux(Vibrio fisheri luxCDABE)
EBHJ2	pSodALux(Vibrio fisheri luxCDABE)
DK1	pKatGLux(Photorhabdus luminescens)
DS1	pSodALux(Photorhabdus luminescens)
EBJM1	pPqi-5Lux(Vibrio fisheri luxCDABE)
DP5	pPqi-5Lux(Photorhabdus luminescens)
DP1	pPqi-5Lux(Photorhabdus luminescens)
DUAL22	pDK1(pKatGLux Photorhabdus luminescens) and ACRG43(recA::GFPuv4)
Duo-1	pRGDK1(GFPuv4::recA-katG::lux P. luminescens)
Duo-2	pRGDK2(recA::GFPuv4-katG::lux P. luminescens)
DNT5	pDNT5(nagR-nagAa::lux P. luminescens)
NAGK-1768	pNAGK1(nagR-nagAa::lux V. fisheri lux)
DC1	pClpB::luxCDABE (P. luminescens)
KAN3	pUCDK (pAac(6)-Ib ::luxCDABE (V. fisheri lux))
SC122/pUCDK	pUCDK (pAac(6)-Ib ::luxCDABE (V. fisheri lux))
ID18/pUCDK	pUCDK (pAac(6)-Ib ::luxCDABE (V. fisheri lux))
WL2 (fadR)/pUCDK	pUCDK (pAac(6)-Ib ::luxCDABE (V. fisheri lux))
K165/pUCDK	pUCDK (pAac(6)-Ib ::luxCDABE (V. fisheri lux))
DO2	pOmpT::luxCDABE (P. luminescens)
DRP1	pRpoS::luxCDABE (P. luminescens)
BM401	pLuxRLux (P. luminescens)
EBSoxR	pBCSoxR-lux (V. fisheri lux)
EBInaA	pBCInaA-lux (V. fisheri lux)
EBFumC	pBCFumC-lux (V. fisheri lux)
EBHmp	pBCHmp-lux (V. fisheri lux)
E6BMalkA	pMalKLux(V. fisheri lux)
ZWF	pZwfLux (V. fisheri lux)
FPR	pFprLuX (V. fisheri lux)
AGZWF1	pZwfLux (V. fisheri lux)
AGZWF2	pZwfLux (V. fisheri lux)
AGFPR1	pFprLuX (V. fisheri lux)
AGFPR2	pFprLuX (V. fisheri lux)
RAZWF	pZwfLux (V. fisheri lux)
RAFPR	pFprLuX (V. fisheri lux)
PGRFM	pPGLUX (pPgiLux/V. fisheri lux)

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 무작위 배열단계는

a)상기 표에 기재된 재조합 발광박테리아 및 형광물질을 포함하는 각각의 기능성 마이크로비드를 혼합하여, 구멍이 뚫려 있는 세포칩에 무작위로 떨어뜨리는 단계; 및

b) 기능성 마이크로비드가 구멍 안에 들어가도록 한 후, 과량의 기능성 비드를 제거 한 후, 세포칩의 윗부분을 고정화시키는 단계를 포함하는 무작위 배열 마이크로비드 세포칩의 제조방법.

청구항 3

제 1항 또는 제 2항의 제조방법에 의하여 제조된 무작위 배열 마이크로비드 세포칩.

청구항 4

제 3항의 세포칩을 이용하여 독성물질을 탐지 또는 진단하는 방법.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 탐지 또는 진단은 형광 이미지, 발광 이미지 또는 픽셀 강도에 의해 탐지 또는 진단하는 것을 특징으로 하는 탐지 또는 진단하는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 재조합 발광박테리아의 자기 확인 코드 기반 기능성 마이크로비드 개발과 이를 이용한 바이오센서 응용 및 독성 탐지 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 바이오칩(biochip)이란, 생물에서 유래된 효소, 단백질, 항체, DNA, 미생물, 동식물 세포 및 기관, 신경세포 등과 같은 생체 유기물을 유리, 실리콘 및 나일론 등의 재질로 된 기관 위에 집적시켜 만든 혼성 소자(hybrid device)로서, 유전자의 발현 양상, 유전자 결합, 단백질 분포, 반응 양상 등을 분석할 수 있으며 질병 진단 및 신약 개발 등의 역할을 할 수 있다.

[0003] 이러한 바이오칩의 구성 요소 중 하나인 바이오칩용 기관은 일회용이 대부분이므로 바이오칩이 일반화되는 시점에서 연간 소모량은 천문학적 숫자가 될 것이 틀림없다. 현재 국내외의 바이오 및 의료 관련 기업의 경우, 이러한 잠재적 거대 시장에서의 시장 선점을 위하여 바이오칩용 기관을 이용한 바이오칩 제작에 총력을 기울이고 있다.

[0004] 기존의 세포칩 연구는 가장 큰 문제점은 많은 세포 중에 어떤 세포가 어느 위치에 고정화 되어있는지 확인하여 배열하고 인식하기 위한 프로그램이 필수적으로 필요하였다. 특히 기존의 연구는 이러한 자기 확인 인식 등에 대한 연구보다는 대부분이 세포의 고정화 방법에 치중하게 되어, 실제로 전기적 회로망 기반 칩과 나일론 멤브레인 어레이 그리고 광학적 탐지 어레이와 한천 (Agar)을 기반으로 한 고정화 방법 어레이 등과 같이 칩에 세포를 고정화하는 방법에 치중하여 연구되어 왔다.

[0005] 이러한 방법은 세포를 배열하는 세포 어레이 칩으로 여전히 각각의 세포에 대한 인식이 필수적으로 제작 뿐만 아니라 분석 시간이 오래 걸리게 되어 실제 독성을 빠르게 탐지하는데 적합하지 않다. 바이오 센서로 기존의 독성 평가 및 진단에 있어 이러한 기술은 비용과 시간면에서 효율적이지 않고, 적용범위가 다양하지 않으며 바이오센서로 응용하는 데에 있어 제한적인 문제점들이 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기의 문제점을 해결하고 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 세포 칩 제조를 위한 마이크로비드를 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 독성 분석에 효율적인 세포칩 개발 방법을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 효율적인 독성 평가와 진단 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 재조합 발광박테리아 및 형광물질을 포함하는 마이크로비드를 제공한

다.

- [0010] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 형광물질은 Cy3(그린), Cy5(레드), FITC(그린), 알렉사(Alexa), 보디피(BODIPY), 로다민(Rhodamine), 및 Quantum-도트(dot)로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 형광물질 또는 형광비드, 바람직하게는 형광 폴리스타일렌 비드(인비트로젠)인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0011] 본 발명의 바람직한 구현예에 있어서 상기 마이크로비드는 독성물질 탐지용 마이크로비드인 것이 바람직하고, 상기 독성은 유전 독성, 산화적 손상 또는 세포막 독성인 것이 바람직하며, 상기 독성 물질은 미토마이신 C(MMC), 1-메틸-1-니트로소-N-메틸구아니딘(MNNG), 과산화수소, 파라콰트(Paraquat), 및 살리실산(SA)으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 물질인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0012] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 마이크로비드를 이용하여 독성물질을 탐지 또는 진단하는 방법을 제공한다.
- [0013] 또한 본 발명은 a) 발광 박테리아를 천연고분자와 형광 물질을 넣어 혼합하여 혼합물을 제조하는 단계; 및 b) 상기 혼합물을 비드화하는 단계를 포함하는 재조합 발광박테리아 및 형광물질을 포함하는 마이크로비드의 제조 방법을 제공한다.
- [0014] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 제조방법은 상기 b)단계 후에 상기 마이크로비드를 정제하는 단계를 더욱 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0015] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 천연다당류는 알긴산, 알긴산나트륨, 글루코만난 (Glucomannan), 아가(agar), 또는 카파-카라지닌(carrageenin) 또는 그의 유도체인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0016] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 b)단계는 전기방사법에 의하여 수행되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0017] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 재조합 발광박테리아 및 형광물질을 포함하는 마이크로비드를 세포칩에 무작위 배열하는 단계를 포함하는 무작위 배열 마이크로비드 세포칩의 제조방법을 제공한다.
- [0018] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 무작위 배열단계는 a)상기 본 발명의 재조합 발광박테리아 및 형광물질을 포함하는 각각의 기능성 마이크로비드를 혼합하여, 구멍이 뚫려 있는 세포칩에 무작위로 떨어뜨리는 단계; 및 b) 표면 장력을 이용하여 기능성 마이크로비드가 모두 구멍 안에 들어가도록 한 후, 배지와 과량의 기능성 비드를 제거 한 후, 커버 글라스를 이용하여 세포칩의 윗부분을 고정화시키는 단계를 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0019] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 제조방법에 의하여 제조된 무작위 배열 마이크로비드 세포칩을 제공한다.
- [0020] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 세포칩을 이용하여 독성물질을 탐지 또는 진단하는 방법을 제공한다.
- [0021] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 탐지 또는 진단은 형광 이미지, 발광 이미지 또는 픽셀 강도에 의해 탐지 또는 진단하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0022] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 제조방법에 의하여 제조된 재조합 발광박테리아 및 형광물질을 포함하는 마이크로비드를 포함하는 모세관 (capillary)형태의 컬럼칩을 제공한다. 이와 관련된 실시예 등은 도 7 등에 기재된다.
- [0023] 이하 본 발명을 설명한다.
- [0024] 본 발명은 재조합 발광 박테리아를 기반으로 한 자기 확인 코드를 갖는 기능성 마이크로비드 개발 및 세포칩 개발에 관한 것이다. 발광박테리아는 기존에 환경 독성을 pre-screening 기반으로 그 탐지능을 여러 가지 독성 분류 즉 유전 독성, 산화적 손상, 막 손상 그리고 단백질 손상을 모니터링 하는데 중요한 역할을 한다. 이러한 다양한 발광 박테리아를 다양한 독성을 한꺼번에 탐지하고자 하는 high throughput 기반 시스템으로 개발하기 위해 세포칩 개발 연구가 진행되고 있는 것이 사실이다. 이에 본 연구는 전기 방사법을 이용하여 각각의 발광 박테리아를 각기 다른 형광 물질에 의해 캡슐화 되어 기능성 마이크로비드를 개발 하고 이러한 자기 확인 코드 시스템을 이용한 무작위 분포 세포칩 개발 및 독성 평가 방법에 대한 개발이 가능하게 되었다.
- [0025] 본 발명은 각각의 특이적 스트레스에 반응하는 재조합 발광 박테리아를 이용하여, 형광 물질과 바이오 폴리머인 알긴산을 이용하여 기능성 마이크로비드를 개발하여, 무작위 배열 마이크로비드 세포칩을 개발 하고 독성 물질을 분석하는 것을 특징으로 한다.
- [0026] 이에, 본 발명자들은 다른 특이적 스트레스를 탐지하는 DPD2794, DPD2540, DPD2511를 포함 본 연구실에서 제작

되어 보관 중인 43 개의 재조합 발광 박테리아 (표 1) 와 형광 물질 (표 2) 을 동시에 고정화 하는 기능성 마이크로비드를 개발하여, 형광물질이 각각의 재조합 발광 박테리아를 인지하는 자가 인식 시스템을 구축하였으며, 이는 세포칩 제작에 있어 각각의 재조합 발광 박테리아를 일일이 배열할 필요 없이 무작위로 분포시켜 세포칩 제작하여 본 발명을 완성하게 되었다.

표 1

No.	Strain	Plasmid	Specific-stress
1	EBHJ1	pSodALux(Vibrio fischeri luxCDABE)	산화적 손상
2	EBHJ2	pSodALux(Vibrio fischeri luxCDABE)	산화적 손상
3	DK1	pKatGLux(Photorhabdus luminescens)	산화적 손상
4	DS1	pSodALux(Photorhabdus luminescens)	산화적 손상
5	EBJM1	pPqi-5Lux(Vibrio fischeri luxCDABE)	산화적 손상
6	DP5	pPqi-5Lux(Photorhabdus luminescens)	산화적 손상
7	DP1	pPqi-5Lux(Photorhabdus luminescens)	산화적 손상
8	DUAL22	pDK1(pKatGLux Photorhabdus luminescens) and ACRG43(recA::GFPuv4)	산화적 손상, 유전자 손상
9	Duo-1	pRGDK1(GFPuv4::recA-katG::lux P. luminescens)	산화적 손상, 유전자 손상
10	Duo-2	pRGDK2(recA::GFPuv4-katG::lux P. luminescens)	산화적 손상, 유전자 손상
11	DNT5	pDNT5(nagR-nagAa::lux P. luminescens)	살리실릭 산 특이적 탐지
12	NAGK-1768	pNAGK1(nagR-nagAa::lux V. fischeri lux)	살리실릭 산 특이적 탐지
13	DC1	pClpB::luxCDABE (P. luminescens)	세포막 손상
14	KAN3	pUCDK (pAac(6)-Ib::luxCDABE (V. fischeri lux))	벤조산 및 페놀 특이 탐지
15	SC122/pUCDK	pUCDK (pAac(6)-Ib::luxCDABE (V. fischeri lux))	-
16	ID18/pUCDK	pUCDK (pAac(6)-Ib::luxCDABE (V. fischeri lux))	-
17	WL2 (fadR)/pUCDK	pUCDK (pAac(6)-Ib::luxCDABE (V. fischeri lux))	-
18	K165/pUCDK	pUCDK (pAac(6)-Ib::luxCDABE (V. fischeri lux))	-
19	DO2	pOmpT::luxCDABE (P. luminescens)	세포막 손상
20	DRP1	pRpoS::luxCDABE (P. luminescens)	단백질 손상
21	BM401	pLuxRLux (P. luminescens)	-
22	EBSoxR	pBCSoxR-lux (V. fischeri lux)	산화적 손상
23	EBSoxS	pBCSoxS-lux (V. fischeri lux)	산화적 손상
24	EBInaA	pBCInaA-lux (V. fischeri lux)	산화적 손상
25	EBFumC	pBCFumC-lux (V. fischeri lux)	산화적 손상
26	EBHmp	pBCHmp-lux (V. fischeri lux)	산화적 손상
27	EBJM2	pGltA-lux (P. luminescens)	유전자 손상
28	EBMalkA	pMalKLux(V. fischeri lux)	산화적 손상
29	ZWF	pZwfLux (V. fischeri lux)	산화적 손상
30	FPR	pFprLuX (V. fischeri lux)	산화적 손상
31	AGZWF1	pZwfLux (V. fischeri lux)	산화적 손상
32	AGZWF2	pZwfLux (V. fischeri lux)	산화적 손상
33	AGFPR1	pFprLuX (V. fischeri lux)	산화적 손상
34	AGFPR2	pFprLuX (V. fischeri lux)	산화적 손상
35	RAZWF	pZwfLux (V. fischeri lux)	산화적 손상
36	RAFPR	pFprLuX (V. fischeri lux)	산화적 손상
37	EBalkA	pCHalkALux (P. luminescens)	유전자 손상 (alkylation)
38	EBsulA	pCHsulALux (P. luminescens)	유전자 손상
39	BBTNrdA	pETNrdALux (P. luminescens)	유전자 손상
40	BBTRecN	pJMrecNLux (P. luminescens)	유전자 손상
41	BBTSbmC	pJMSbmCLux (P. luminescens)	유전자 손상
42	BBTDinI	pJMdinILux (P. luminescens)	유전자 손상
43	PGRFM	pPGLUX (pPgiLux/V. fischeri lux)	산화적 손상

[0028] 표 1은 본 발명자가 개발 또는 보유 중인 자체 개발 균주를 나타낸 표이다.

표 2

[0029]

No.	형광 물질	Abs (nm)	Em (nm)
1	Green	427	468
2	Red	570	598
3	Orange	534	554
4	Yellow (Green + Red)	427/570	468/598

[0030] 표 2는 본 발명에서 사용된 형광 물질의 특성을 기재한 표이다.

[0031] 본 발명에 따른 기능성 마이크로비드 제작과 이를 이용한 무작위 배열 마이크로비드 세포칩 개발 과정은 다음과 같다.

[0032] 1) 각각의 재조합 발광 박테리아를 배양하여 세포 농축하는 단계;

[0033] 2) 2% 알긴산에 농축한 각각의 발광박테리아 세포, 그리고 형광 물질을 혼합하는 단계;

[0034] 3) 상기 2)에서 혼합물을 사용하여 전기 방사법을 이용하여 기능성 마이크로비드를 제작 및 획득하는 단계;

[0035] 4) 획득한 기능성 마이크로비드를 정제하는 단계; 및

[0036] 5) 각각의 재조합 발광 박테리아가 고정화된 기능성 마이크로비드를 세포칩에 무작위 배열하는 단계;를 포함한다.

[0037] 이를 상세히 설명하면, 먼저 재조합 발광 박테리아를 순수 배양시킨다. 순수배양을 통해 얻어진 발광 박테리아를 원심분리기를 이용하여 세포를 농축한다. 농축한 각각의 발광박테리아를 2% 알긴산과 각각의 다른 형광물질을 이용하여 균일하게 혼합시킨다. 이때 사용하는 형광물질은 서로 다른 종류의 형광 파장을 이용하는 것을 기본으로 한다.

[0038] 다음 단계로, 혼합된 재조합 발광 박테리아와 형광물질, 그리고 알긴산을 전기 방사법을 이용한 마이크로비드를 제작하기 위해 주사기에 넣고 syringe pump에 연결한다.

[0039] 이어 2% 염화칼슘 용액을 마그네틱 바와 함께 비커에 넣어 (+) 전극이 연결된 바닥에 놓고, 혼합물이 연결된 주사 바늘은 (-) 전극에 연결한다. 전압을 걸어 주사 바늘에서 떨어지는 마이크로비드를 2% 염화칼슘 용액에서 1시간 이상 계속 휘저어 마이크로비드 표면을 경화시킨다.

[0040] 그 후에, 상기에서 제작된 마이크로비드를 LB 배지에 넣고 3번 이상 정제시킨다.

[0041] 상기에서 정제된 마이크로비드를 세포칩에 무작위 분포시키는 단계로써, 제작된 각각의 기능성 마이크로비드를 혼합하여, 파스퇴르 파이펫을 이용하여 96개의 hole이 뚫려 있는 4 cm x 2 cm 세포칩에 무작위로 떨어뜨린다.

[0042] 마지막으로, 표면 장력을 이용하여 기능성 마이크로비드가 모두 hole 안에 들어가도록 한 후, 전기 파이펫을 이용하여 LB 배지와 과량의 기능성 비드를 제거 한 후, 커버 글라스를 이용하여 세포칩의 윗부분을 고정화시켜 제작하는 무작위 배열 세포칩 개발을 그 특징으로 한다.

[0043] 이와 같이 제작된 무작위 배열 세포칩을 이용하여 형광 탐지 및 CCD 카메라를 이용하여 다양한 독성 물질을 형광/발광 이미지뿐만 아니라, pixel intensity로 탐지할 수 있다.

발명의 효과

[0044] 본 발명을 통하여 알 수 있는 바와 같이, 본 발명에 기능성 마이크로비드를 이용한 독성 탐지는 정확한 위치에 배열하는 기존의 세포칩 분야에서 무작위로 배열하여도 세포의 자기 확인이 가능하기 때문에 하나씩 배열해야 하는데 들어가는 비용과 시간을 절감하고, 독성 따른 정확한 정보뿐만 아니라 독성을 일으키는 방식에 대한 정보까지 제공 할 수 있어 탐지 실패율을 낮추는 효과가 있다. 또한, 다양한 독성 원인 물질에 대한 동시 진단이 가능 하고, 정확한 정보를 빠르게 탐지하기 때문에, 문제발생시 보다 근원적인 해결책을 수립하여, 미래과학 중 하나인 우주항공 뿐만 아니라 신약개발, 환경, 식품 등에서의 독성 탐지를 확대 적용하여, 궁극적으로 국민보건

의 향상에 기여할 것으로 예상된다.

도면의 간단한 설명

- [0045] 도 1은 재조합 발광 박테리아를 제작하기 위한 재조합 플라스미드 제작 방법을 나타낸 그림.
- 도 2는 도 1에서 제작된 플라스미드의 형질 전환된 박테리아를 이용하여 파라콰트에 노출시켜, 시간과 농도에 의해 발광이 증가하는 것을 확인할 수 있다는 것을 보여주는 그림.
- 도 3은 발광박테리아와 형광 물질의 전기방사법을 이용한 기능성 마이크로비드 제작 방법을 나타낸 그림.
- 도 4는 나열된 기능성 마이크로비드의 형광에 의한 map 과 각각의 독성에 따른 발광 및 pixel intensity 변화를 나타낸 그림.
- 도 5는 혼합된 각기 다른 발광박테리아의 기능성 마이크로비드를 임의로 96 micro-well 에 나열하는 방법을 보여주는 그림.
- 도 6은 무작위 분포된 기능성 마이크로비드의 형광에 의한 자기 확인 (identification) 과 발광에 의한 독성 탐지를 나타내는 그림.
- 도 7 a와 b 는 제작된 기능성 마이크로비드의 capillary 형태 (a) 의 센서와 배열되지 않은 혼합된 비드를 이용한 센서 (b) 의 응용 방법을 보여주는 그림.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0046] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의거하여 더욱 상세히 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위하여 기재한 것으로서 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.
- [0047] 제조예: 재조합 발광박테리아 제조방법:
- [0048] 본 발명의 재조합 발광박테리아의 제조방법은 본 발명의 발명자의 특허인 대한민국 특허 등록 10-0473350 등에 자세하게 기재되어 있으며, 본 발명에서는 그 방법을 참고하여 제조하였다. 요약하면,
- [0049] 1) 유전자 프로모터는 대장균 RFM443의 게놈(Genomic) DNA로부터 각각의 유전자에 프로모터 부분에 맞는 프라이머를 제작하여 PCR 을 이용하여 증폭한다.
- [0050] 프라이머 pqi-5 프로모터 증폭에 사용된 프라이머 set는 아래의 프라이머를 사용하였다.
- [0051] 5'-프라이머(서열번호 1): 5'-TAGGGATCCTCAAACCAAG-3'
- [0052] 3'-프라이머(서열번호 2): 5'-CTAGAATTCGCACATTGGTA-3'
- [0053] 2) 이 PCR 산물을 BamHI 과 EcoRI 과 같은 제한효소로 처리하고 플라스미드 벡터 pUCD615 (프로모터가 없는 luxCDABE operon을 갖고 있는 벡터)를 역시 같은 제한효소로 잘라낸다. 이것을 14 °C에서 8시간 T4 라이가아제 (T4 ligase) 를 이용하여 재조합 플라스미드를 pXXX ((도면 1예시) pPQI5) 제작하였다.
- [0054] 3) 이를 RFM443 대장균에 형질전환하여 RFM443/pXXX 를 카나마이신이 포함된 아가 플레이트에 키워 선별된 콜로니를 카나마이신이 포함된 LB 배지에서 밤새 키웠다.
- [0055] 4) 형질전환된 재조합 발광 박테리아의 발광을 확인하기 위해 스트레스 물질 (도면 2 예시 파라콰트, paraquat) 즉, 독성 물질에 노출시켜 실시간 발광을 측정하였다 (도면 2).

[0056] 실시예 1

- [0057] 본 발명을 테스트하기 위하여 5가지 다른 독성 물질을 사용하여 기능성 마이크로비드의 탐지능을 실행하였다. 우선, 유전 독성을 일으키는 mitomycin C (MMC), 유전독성 중 DNA alkylation을 일으키는 1-methyl-1-nitroso-N-methylguanidine (MNNG), OH²에 의한 산화적 손상을 일으키는 H₂O₂, O₂에 의한 산화적 손상을 일으키는 paraquat, 마지막으로 세포막 독성을 일으키는 salicylic acid (SA)를 탐지하기 위한 실험을 다음과 같이 수행하였다.
- [0058] DPD2794, DPD2511, DPD2540, EBA1kA와 EBSoxS, 총 5종의 재조합 발광 박테리아를 배양하고, 다음과 같은 방법

으로 기능성 마이크로비드를 제작하였다.

[0059] 5종의 100 ml의 발광 박테리아를 $OD_{600} = 0.7$ 까지 배양하여 원심 분리기를 이용하여 12,000 rpm에서 20분간 세포를 농축하였다. 2% 알긴산을 이용하여 농축된 세포를 재 현탁 후 형광 물질을 넣고 함께 혼합하여 12 ml 멸균된 주사기에 넣는다. 전기 방사법을 하기 위해 2% 염화칼슘을 비커에 넣고 (+) 전극이 연결된 부분에 넣고, 혼합물이 들어있는 주사기의 바늘을 (-) 전극에 연결시킨다. 고전압 DC unit을 이용하여 전압을 흐르게 하여 떨어지는 혼합물이 2% 염화칼슘 용액에서 비드화 되게 계속 회전어 준다. 비드를 경화시키기 위해 2% 염화칼슘 용액에서 1시간 동안 회전어 준다. 기능성 마이크로비드에서 2% 염화칼슘 제거 하기위해 LB 배지에 담귀 3번 세척한다. [도 3 참조].

[0060] 각기 다른 발광 박테리아를 이용한 기능성 마이크로비드의 탐지능을 실험하기 위해 1mm 크기의 96개 구멍이 뚫어져 있는 4 cm x 2 cm 크기의 칩을 이용하여 배열하였다. 칩에 기본 발광을 테스트하기 위한 LB 배지 만 노출된 칩을 포함하여 상기 명시된 5가지 화학물질을 노출시킨 후, 10분마다 cooled CCD 카메라를 이용하여 2시간 동안 측정하였다. MMC는 유전 독성을 탐지하는 DPD2794에서만 특이적으로 반응하였으며, MNNG는 유전독성을 탐지하는 DPD2974와 Alkylation을 탐지하는 EBAlkA에서 반응하는 것을 확인할 수 있었다. H_2O_2 노출 결과 간접적으로 유전독성을 일으키며 DPD2794 와 $OH^?$ 에 의한 산화적 손상에 반응하는 DPD2511이 반응 하였으며 약간의 EBSoxS에서도 반응이 나타나는 것을 확인할 수 있었다. $O_2^?$ 에 의한 산화적 손상을 일으키는 paraquat은 EBSoxS에 특이적으로 반응하였으며, 산화적 손상에 의한 세포막 손상을 일으키는 salicylic acid는 DPD2511과 DPD2540에서 약하게 반응 하는 것을 확인 할 수 있었다. 이러한 반응은 눈으로 확인하는 발광의 정도뿐만 아니라 pixel density에 의한 분석도 가능 하다는 것을 확인할 수 있었다. [도 4 참조].

[0061] 실시예 2

[0062] 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 제작된 기능성 마이크로비드를 이용하여, 무작위 배열 세포칩을 제작 하여 본 발명을 확인하였다. 5가지 기능성 마이크로비드를 균일한 개수로 세어 모두 LB배지에 혼합시킨다. 혼합된 마이크로비드는 파스퇴르 파이프를 이용하여 1mm 크기의 96개 구멍이 뚫린 세포칩에 무작위로 떨어뜨려, 기능성 마이크로비드가 구멍에 모두 채우게 된다. [도 5 참조] 이렇게 제작된 무작위 배열 세포칩은 실시예 1과 같은 화학물질을 이용하여 그 탐지능을 테스트 하였다. 우선, 무작위 배열된 기능성 마이크로비드의 자기확인 코드를 확인하기 위해 형광 이미지 맵을 측정한 후 독성물질을 노출하여 실시예 1과 같이 10분마다 cooled CCD 카메라를 이용하여 2시간 동안 발광을 측정하였다. 측정 결과 특정 형광을 띄는 기능성 마이크로비드에서 특이적인 스트레스를 나타내는 화학물질을 탐지하여 발광을 나타내는 것을 확인하였다. [도 6 참조].

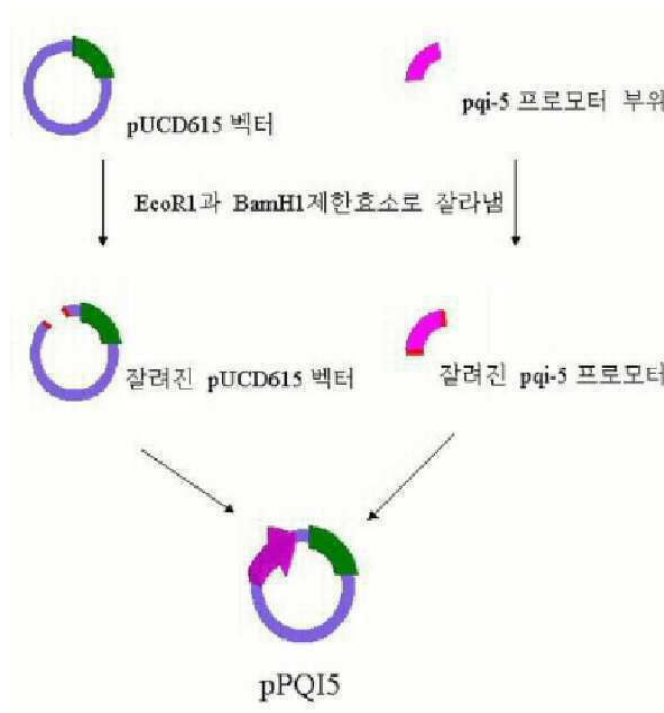
[0063]

[0064] 실시예 3

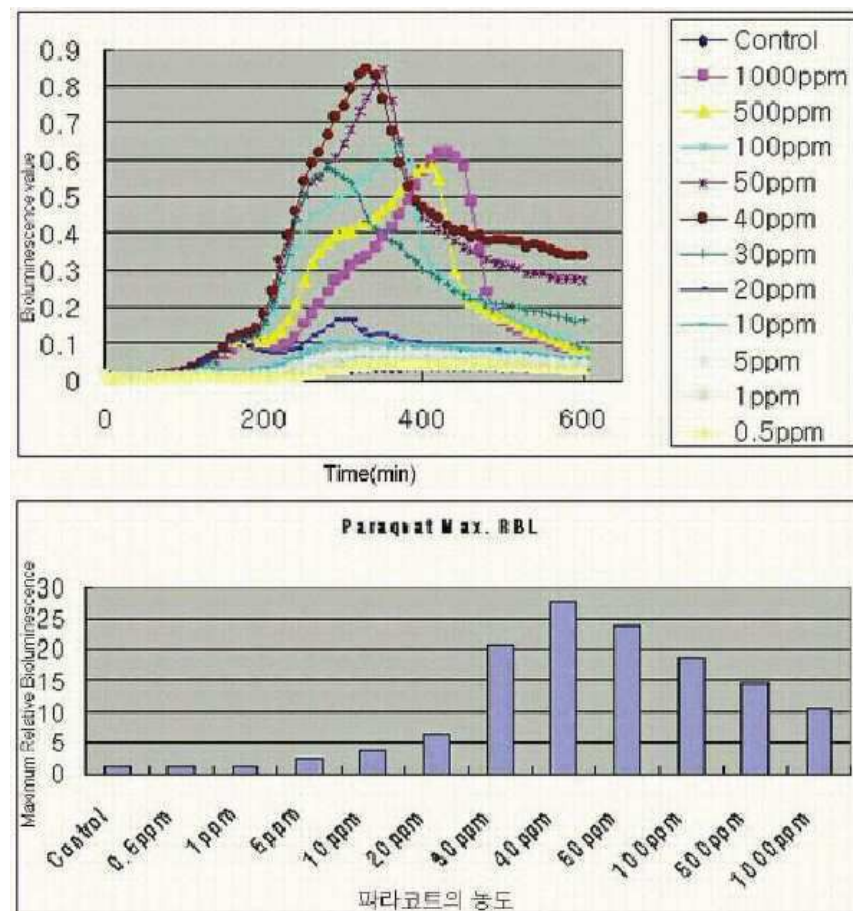
[0065] 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 제작된 기능성 마이크로비드는 그 사이즈가 1 mm 크기보다 작아 다양한 응용가능성있다. 이를 1 mm 크기의 모세관에 넣고 탐지 가능성을 형광을 탐지하여 확인하였다. 실시예 2에서 확인한 것과 같이 형광 이미지를 확인하였다. [도 7 참조].

도면

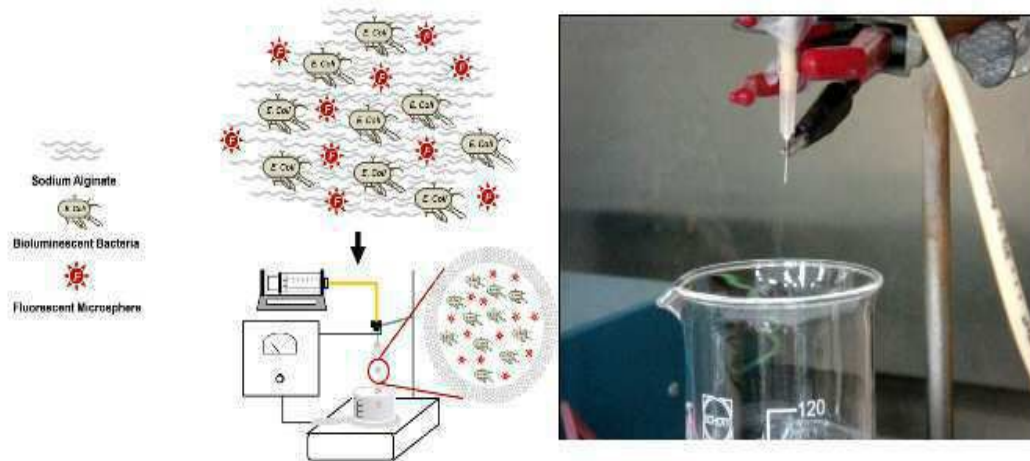
도면1



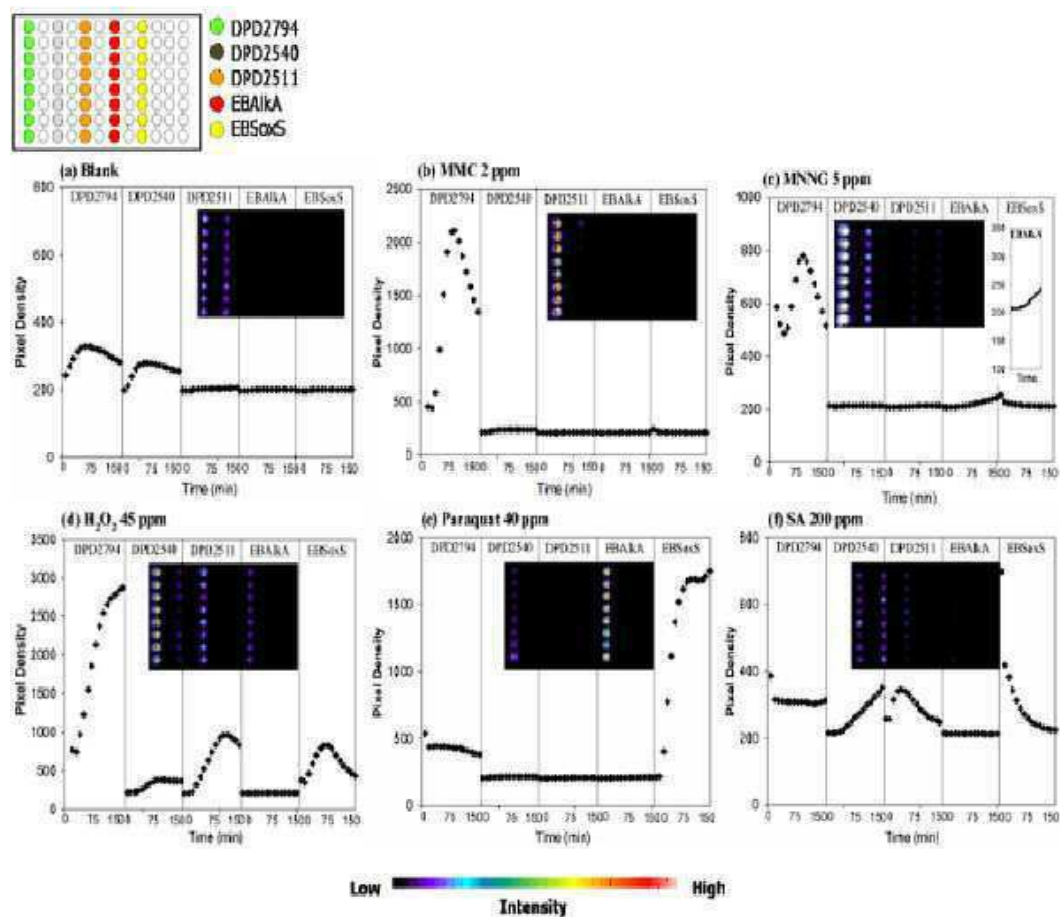
도면2



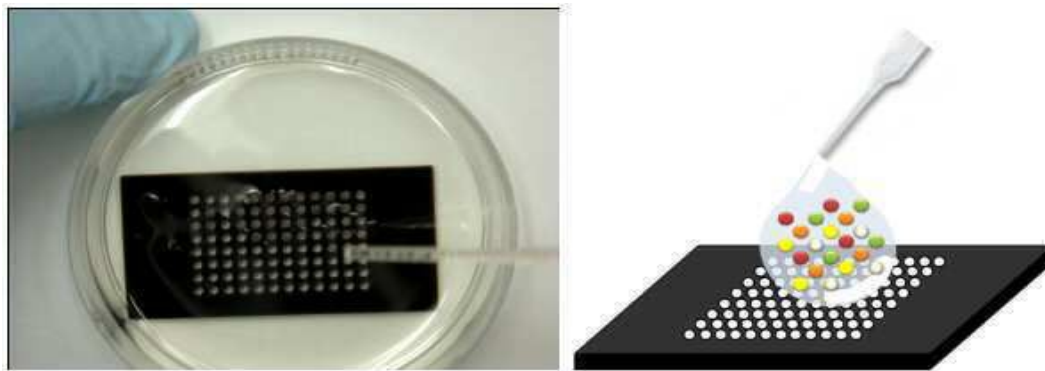
도면3



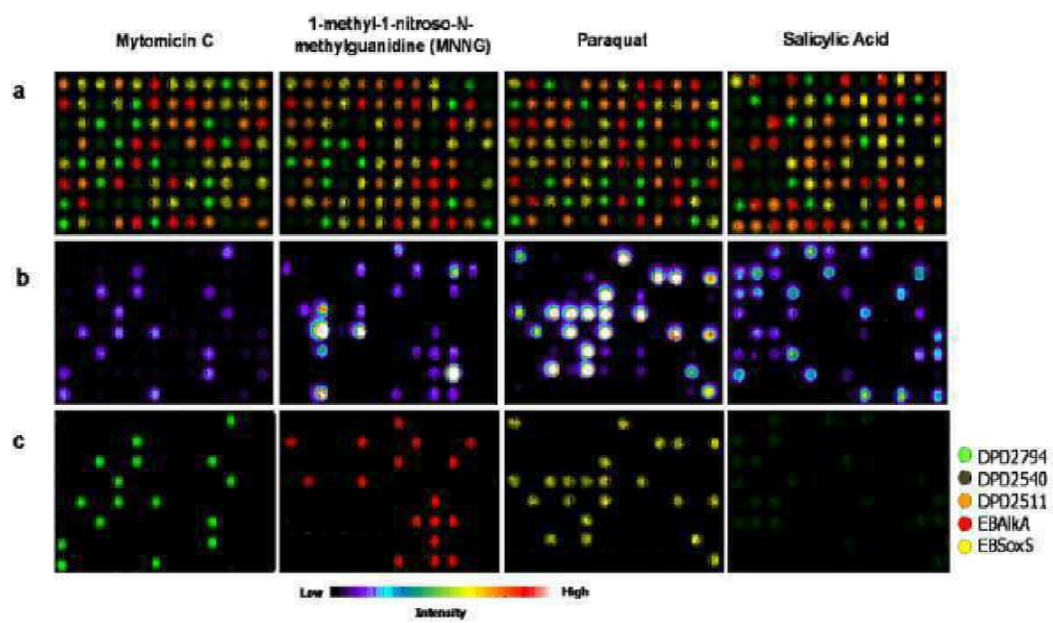
도면4



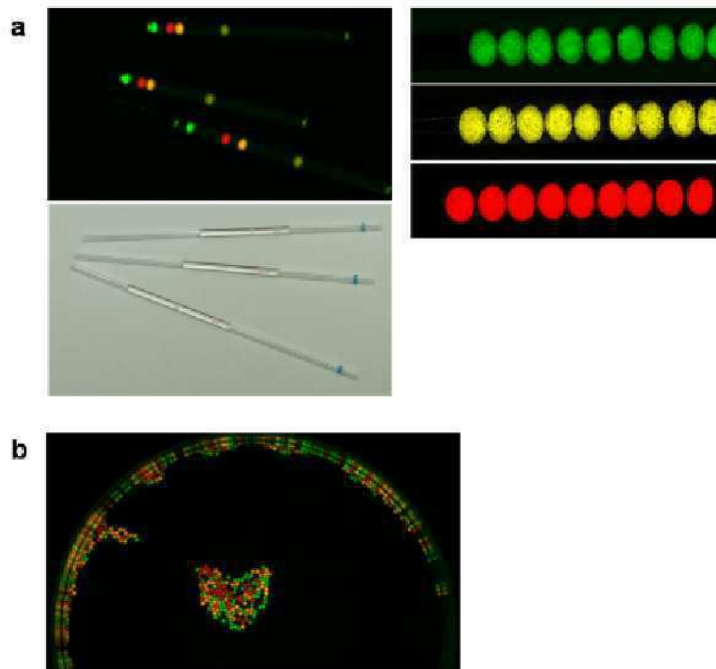
도면5



도면6



도면7



서열 목록

<110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION

<120> Functional microbead for fluorescent coding with recombinant
bioluminescent bacteria and biochip for toxicity analysis

<160> 2

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 1

tagggatcct caaaccaag

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

primer

<400> 2

ctagaattcg cacattgta

19

20