



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0061635
(43) 공개일자 2024년05월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/04 (2017.01) G01N 33/18 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/04 (2013.01)
G01N 33/1866 (2024.05)
(21) 출원번호 10-2023-0148419
(22) 출원일자 2023년10월31일
심사청구일자 2023년10월31일
(30) 우선권주장
1020220143029 2022년10월31일 대한민국(KR)

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
손아정
서울특별시 마포구 백범로 230 (신공덕동, 브라운스톤 공덕 아파트) 102동 604호
채빌리
서울특별시 마포구 백범로 230 (신공덕동, 브라운스톤 공덕 아파트) 102동 604호
임현정
서울특별시 서대문구 성산로 547 (대신동) 305호
(74) 대리인
특허법인한얼

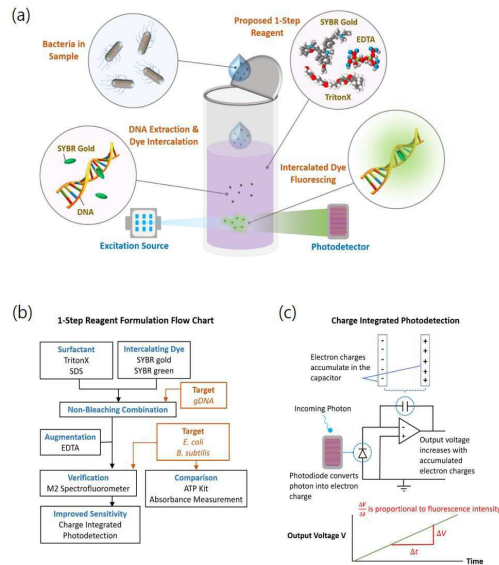
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 원스텝 처리에 의한 음용수 중 총 박테리아 검출용 다기능성 시약

(57) 요약

본 발명은 비이온성 계면활성제로서 트리톤 X-100 및 DNA 중간삽입 염료로서 SYBR 골드를 유효성분으로 포함하는, 박테리아 검출을 위한 원스텝 전처리용 시약 조성물, 및 현장진단 키트; 및 상기 시약 조성물 및 현장진단 키트를 이용한 박테리아 검출 방법, 및 수질 오염도 평가 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Q 2304/10 (2013.01)

C12Q 2563/107 (2013.01)

C12Q 2563/173 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711169611
과제번호	2019R1A2C2084233
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	환경 시료에 의한 바이오 센서 저해 특성 및 해결 기술 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	이화여자대학교
연구기간	2022.03.01 ~ 2023.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

비이온성 계면활성제로서 트리톤 X-100 및 DNA 증간삽입 염료로서 SYBR 골드를 유효성분으로 포함하는, 박테리아 검출을 위한 원스텝 전처리용 시약 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

세포막 용해 및 DNA 형광 염색을 동시에 달성하는 것인, 시약 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

카오트로픽제(chaotropic agent)를 추가로 포함하는 것인, 시약 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 박테리아는 그람 양성 박테리아인 것인, 시약 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

염색된 DNA의 형광 측정을 통해 OD=1인 시료 중의 미생물량을 기준으로 5×10^{-5} 내지 10^{-6} 수준의 검출 한계(limit of detection; LOD)로 검출 가능한 것인, 시약 조성물.

청구항 6

비이온성 계면활성제로서 트리톤 X-100 및 DNA 증간삽입 염료로서 SYBR 골드를 포함하는, 박테리아 검출용 현장 진단 키트.

청구항 7

제6항에 있어서,

카오트로픽제를 추가로 포함하는 것인, 현장진단 키트.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 박테리아는 그램 양성 박테리아인 것인, 현장진단 키트.

청구항 9

박테리아를 포함하는 것으로 의심되는 시료를 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 시약 조성물 또는 제5항 내지 제7항의 현장진단 키트와 접촉시키는 제1단계; 및

상기 시료로부터의 형광 신호를 측정하는 제2단계를 포함하는, 박테리아 검출 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

형광분광기 또는 전하 통합 광검출을 통해 측정 가능한 것인, 검출 방법.

청구항 11

제9항에 있어서,

OD=1인 시료 중의 미생물량을 기준으로 5×10^{-5} 내지 10^{-6} 수준의 검출 한계(limit of detection; LOD)를 달성하는 것인, 검출 방법.

청구항 12

제9항에 있어서,

박테리아를 포함하는 것으로 의심되는 시료는 600 nm에서의 광학밀도(optical density; OD)가 1 이하인 것인, 검출 방법.

청구항 13

제9항에 있어서,

상기 박테리아는 그램 양성 박테리아인 것인, 검출 방법.

청구항 14

테스트하고자 하는 음용수 시료를 제1항 내지 제4항의 시약 조성물 또는 제5항 내지 제7항의 현장진단 키트와 접촉시키는 제1단계;

상기 시료로부터의 형광 신호를 측정하는 제2단계; 및

상기 측정된 형광 신호로부터 총 박테리아량을 산출하여 허용치와 비교하는 제3단계를 포함하는, 음용수 수질 평가 방법.

청구항 15

제14항에 있어서,

형광분광기 또는 전하 통합 광검출을 통해 측정 가능한 것인, 평가 방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 비이온성 계면활성제로서 트리톤 X-100 및 DNA 증간삽입 염료로서 SYBR 골드를 유효성분으로 포함하는, 박테리아 검출을 위한 원스텝 전처리용 시약 조성물, 및 현장진단 키트; 및 상기 시약 조성물 및 현장진단 키트를 이용한 박테리아 검출 방법, 및 수질 오염도 평가 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 고성능 분석 기법 및 간편한 테스트 키트 관행이 가용함에도 불구하고 수인성 박테리아의 발생(water borne bacterial outbreak)은 전세계에 걸친 공중보건(public health) 재앙(catastrophes)을 반복한다. 대장균(*Escherichia coli*), 살모넬라균(*Salmonella enterica*), 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 및 시겔라 소네이(*Shigella sonnei*) 등의 박테리아로 오염된 음용수의 섭취는 위장관 합병증(gastro-intestinal complications), 혈리(bloody diarrhea), 위궤양(stomach ulcers) 및 신부전(kidney failure)을 야기할 수 있다. 세계보건기구(World Health Organization; WHO)는 연간 20억 명이 분변으로 오염된 식수를 마시고, 오염된 음용수로 485,000명이 설사로 인한 사망에 이르는 것으로 추산하고 있다.
- [0004] 일반적인 통념은 특정 병원성 종을 표적으로 하는 고성능 기법(qPCR, NanoGene 어세이 등)으로 음용수를 스크리닝해야 함을 제안한다. 그러나, 이러한 기법들은 종종 엄청난 고가이며 복잡하고 시간이 소요되며, 보다 간편하고 빠르며 저렴하지만 비특이적인 예비스크리닝(preliminary screening) 방법으로 경고된 후 설명적인 측정(elucidatory measures)으로 보다 적합하다. 결국 음용수가 병원성 박테리아(pathogenic bacteria) 없이 유익균(beneficial bacteria)만을 갖는 것은 자연적이지 않다. 따라서, 초기 스크리닝 동안 병원성 박테리아에 특이적인 기술을 사용하는 것은 불필요하며 심지어 비생산적이다. 대신, 병원성 박테리아 특이적 테스트에 앞서 총 박테리아 부하를 측정하는 것이 보다 적절한 조기 경고 테스트일 수 있다.
- [0005] 음용수에 대한 비특이적 테스트 중, 아데노신 5'-트리포스페이트(adenosine 5'-triphosphate; ATP) 검출은 가장 다목적(versatile)이며 사용하기 쉬운(easy-to-use) 기술 중 하나이다. 그 양식(modality)은 실험실 벤치탑 장치(laboratory bench top apparatus), 휴대용 장치(handheld device) 및 미세유체 플랫폼(microfluidic platforms)을 포함한다. 휴대용 ATP 키트는 단일 시약의 사용으로 달성할 수 있다는 사용의 편의성에 있어서 특히 인상적이다. 본 발명에서는 휴대용 ATP 키트와 같은 사용의 편의성을 갖도록 DNA 증간삽입-기반 형광 기법을 재구성하고자 한다. DNA에 접근하여 형광 염료를 증간삽입할 수 있도록 박테리아 세포벽을 침투하는 단일 다기능성(multi-functional) 시약의 제형을 요구한다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0007] (특허문헌 0001) WO 2022/150336 A2

비특허문헌

- [0008] (비특허문헌 0001) WHO, 2022, Drinking water, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/drinking-water>
- (비특허문헌 0002) Environment International, 2022, 166: 107357

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명의 하나의 목적은 상기 목적을 달성하기 위한, 본 발명의 제1양태는 비이온성 계면활성제로서 트리톤 X-100 및 DNA 증간삽입 염료로서 SYBR 골드를 유효성분으로 포함하는, 박테리아 검출을 위한 원스텝 전처리용 시약 조성물을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 다른 하나의 목적은 비이온성 계면활성제로서 트리톤 X-100 및 DNA 증간삽입 염료로서 SYBR 골드를 포함하는, 박테리아 검출용 현장진단 키트를 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 박테리아를 포함하는 것으로 의심되는 시료를 상기 시약 조성물 또는 상기 현장진단 키트와 접촉시키는 제1단계; 및 상기 시료로부터의 형광 신호를 측정하는 제2단계를 포함하는, 박테리아 검출 방법을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 테스트하고자 하는 음용수 시료를 상기 시약 조성물 또는 상기 현장진단 키트와 접촉시키는 제1단계; 상기 시료로부터의 형광 신호를 측정하는 제2단계; 및 상기 측정된 형광 신호로부터 총 박테리아량을 산출하여 허용치와 비교하는 제3단계를 포함하는, 음용수 수질 평가 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0014] 본 발명에서 개시되는 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술되는 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 할 수 없다.
- [0015] 또한, 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 통상의 실험만을 사용하여 본 발명에 기재된 본 발명의 특정 양태에 대한 다수의 등가물을 인지하거나 확인할 수 있다. 또한, 이러한 등가물은 본 발명에 포함되는 것으로 의도된다.
- [0016] 아울러, 본 발명의 명세서 전체에 있어서, 어떤 부분이 어떤 구성 요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [0018] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.
- [0020] 상기 목적을 달성하기 위한, 본 발명의 제1양태는 상기 목적을 달성하기 위한, 본 발명의 제1양태는 비이온성 계면활성제로서 트리톤 X-100 및 DNA 증간삽입 염료로서 SYBR 골드를 유효성분으로 포함하는, 박테리아 검출을 위한 원스텝 전처리용 시약 조성물을 제공한다.
- [0021] 나아가, 본 발명의 제2양태는 비이온성 계면활성제로서 트리톤 X-100 및 DNA 증간삽입 염료로서 SYBR 골드를 포함하는, 박테리아 검출용 현장진단 키트를 제공한다.
- [0023] 본 발명은 비이온성 계면활성제와 DNA 증간삽입 염료의 조합, 특히 트리톤 X-100과 SYBR 골드를 함께 사용함으로써, 단회 처리에 의해 세포막 용해 및 DNA 형광 염색을 달성할 수 있음을 발견한 것에 기초한다. 특히, 상기 조합의 원스텝 시약을 사용함으로써 부가적인 과정 없이 단회의 시약 처리만으로 기존의 형광 측정방법을 이용하여 간단하게 음용수 등 용액 시료에 포함된 박테리아를 효율적으로 검출할 수 있으며, 나아가 전하 통합 광검출을 사용하는 경우 기존의 ATP 측정에 의한 검출법에 비해 보다 낮은 검출한계를 달성할 수 있고 정량적인 분석까지도 가능함을 확인한데 그 특징이 있다.
- [0025] 예컨대, 본 발명의 원스텝 전처리용 시약 조성물은 단회 처리에 의해 세포막 용해 및 DNA 형광 염색을 동시에

달성할 수 있다.

- [0026] 예컨대, 본 발명의 박테리아 검출을 위한 원스텝 전처리용 시약 조성물 또는 현장진단 키트에 있어서 비이온성 계면활성제 및 DNA 증간삽입 염료는 각각 독립적으로 제공되거나 혼합물의 형태로 제공될 수 있다.
- [0028] 본 발명의 용어, "비이온성 계면활성제(non-ionic surfactant)"는 물에 용해시 이온화를 경험하지 않는 계면활성제를 지칭하는 것으로, 분자 내의 일 말단에는 친수성 그룹을, 다른 말단에는 소수성 그룹을 포함할 수 있다. 상기 비이온성 계면활성제는 용액 중에서 이온 상태로 존재하지 않으므로 강한 전해질 무기염, 산 및 알칼리 등의 영향에 덜 민감하며, 고도의 안정성을 갖는다. 또한, 비이온성 계면활성제는 다른 유형의 계면활성제와 우수한 상용성(compatibility)을 가지며, 물과 유기 용매 모두에서 우수한 용해도를 갖는다. 이러한 비이온성 계면활성제는 개별 유형 간의 차이가 미미하므로, 용도에 적합한 특성을 갖는 물질을 선택하여 사용할 수 있다.
- [0029] 예컨대, 본 발명의 박테리아 검출용 조성물 또는 키트에서 상기 비이온성 계면활성제로는 트리톤 X-100을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 트리톤 X-100은 $C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_n$ 의 화학식으로 표시되는 화합물(n 은 자연수)로서, 친수성 폴리에틸렌 옥사이드 사슬(hydrophilic polyethylene oxide chain, 평균 9.5 에틸렌 옥사이드 단위를 포함)과 방향족 탄화수소 친유성 또는 소수성 작용기(aromatic hydrocarbon lipophilic or hydrophobic group)를 포함한다. 이때, 상기 탄화수소 그룹은 4-(1,1,3,3-테트라메틸부틸)-페닐 그룹이다. 상기 트리톤 X-100은 25℃에서 물 및 다수의 유기 용매에 대해 가용성이다.
- [0031] 본 발명의 용어, "DNA 증간삽입 염료(DNA intercalating dye, DNA intercalator)"는 DNA 또는 RNA의 인접한 염기쌍 사이에 결합하는 물질로서, DNA의 시각화를 위한 형광 표지자로 사용될 수 있다. 상기 DNA 증간삽입 염료는 고리 시스템 상에 양전하를 수반하는 발색단을 단독으로 또는 주로 포함하여 구성될 수 있다.
- [0032] 예컨대, 본 발명의 박테리아 검출용 조성물 또는 키트에서 상기 DNA 증간삽입 염료로는 SYBR 골드를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 SYBR 골드는 (Z)-2-(4-((디에틸(메틸)암모니오)메틸)페닐)-6-메톡시-1-메틸-4-((3-메틸벤조[d]옥사졸-2(3H)-일리덴)메틸)퀴놀린-1-이움((Z)-2-(4-((diethyl(methyl)ammonio)methyl)phenyl)-6-methoxy-1-methyl-4-((3-methylbenzo[d]oxazol-2(3H)-ylidene)methyl)quinolin-1-ium)의 명칭을 갖는 비대칭 시아닌 염료(asymmetrical cyanine dye)로서, 이중가닥 DNA(dsDNA), 단일가닥 DNA(ssDNA), RNA의 염색에 사용될 수 있다. SYBR 골드는 핵산 검출을 위한 SYBR 계열(family)의 염료 중 가장 민감한(sensitive) 형광 염료이다. 예컨대, SYBR 골드는 다양한 유형의 핵산 검출에 있어, 에티디움 브로마이드, SYBR 그린 I이나 SYBR 그린 II에 비해 보다 더 민감하다. SYBR 골드의 우수한 민감성은 염료-DNA 복합체의 높은 형광 양자 수율(fluorescence quantum yield)에 기인하며, 염료는 핵산에 결합하여 약 1000배의 상당한 형광 증강을 나타낸다. 상기 SYBR 골드는 DNA에 결합시 300 nm 및 495 nm 근처에서 2개의 최대 형광 여기 피크를 가지며, 537 nm 근처에서 단일 최대 방출 피크를 갖는다. 이러한 SYBR 골드는 DNA 손상을 유발하지 않는 청색광을 조사하여 여기될 수 있으므로 다른 SYBR 계열의 염료에 비해 향상된 DNA 클로닝 효율을 나타낸다. 발생하는 형광 강도는 최대 2.5 μ M 농도까지 DNA에 결합된 염료 분자의 수에 따라 선형적으로 증가하므로 DNA의 정량분석에 사용될 수 있다.
- [0034] 본 발명의 일 실시예에서는 비이온성 계면활성제인 트리톤 X-100 대신에 이온성 계면활성제를 사용한 경우, 형광 염료 자체의 신호에 간섭하여 소광 및/또는 표백시키는 것을 확인하였다. 나아가, 상기 선별된 계면활성제 트리톤 X-100과 DNA 증간삽입 염료와 조합시, SYBR 그린 I과의 조합에서는 트리톤 X-100과의 조합에서도 계면활성제의 농도가 증가함에 따라 형광 신호가 감소하는 것으로 나타난 반면, SYBR 골드를 조합하였을 때는 계면활성제의 농도와 무관하게 간섭없이 일정한 신호를 유지하는 것을 확인하였다(도 2 참조). 이는 트리톤 X-100과 SYBR 골드를 조합하여 사용함으로써 계면활성제에 의한 형광 신호의 감소 없이 형광 신호 측정을 통해 박테리아를 정성/정량적으로 분석할 수 있음을 나타내는 것이다.
- [0036] 예컨대, 본 발명의 박테리아 검출용 조성물 또는 키트는 전술한 유효성분 이외에 카오토로픽제(chaotropic agent)를 추가로 포함할 수 있다. 상기 카오토로픽제는 비이온성 계면활성제 및 DNA 증간삽입 염료와 독립적으로 제공되거나 혼합물의 어느 하나 이상의 성분과의 혼합물의 형태로 제공될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0037] 본 발명의 용어, "카오트로픽제(chaotropic agent)"는 수용액 중에서 물분자들 간의 수소결합네트워크를 저해하는, 즉, 카오토로픽 활성을 발휘하는, 물질을 의미할 수 있다. 이는 소수성 효과를 약화시켜 용액 내 다른 분자, 주로 단백질, 핵산 등의 거대분자의 본래 상태(native state)의 안정성에 영향을 미친다. 본 발명에 있어서 카오토로픽제는 세포막에 작용하여 투과성을 향상시키는 효과를 발휘할 수 있다. 상기 카오토로픽제로는 에틸렌디아민테트라아세트산(ethylene-diamine-tetraacetic acid; EDTA)을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 EDTA를 사용함으로써 전술한 효과를 얻는 것은 물론 금속 이온 등에 결합하는 킬레이트제로 작용할 수 있으므로 금속 이온을 필요로 하는 핵산가수분해효소(nuclease)를 불활성화함으로써 측정 대상인 DNA의 분해를 방지할 수 있다. 이때, 상기 카오토로픽제는 50 mM 이하의 농도로 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0039] 예컨대, 본 발명의 박테리아 검출용 조성물 또는 키트는 그람 양성 박테리아의 검출에 유용할 수 있다.
- [0040] 본 발명의 용어, "그람 양성 박테리아(gram-positive bacteria)"는 그람 염색 검사에서 양성의 결과를 나타내는 박테리아이다. 그람 양성 박테리아는 상기 테스트에 사용되는 크리스탈 바이올렛 염료를 흡수하므로 광학 현미경으로 관찰시 보라색으로 나타난다. 이는 테스트의 탈색 단계에서 시료를 세척한 이후에도 박테리아 세포벽의 두꺼운 펩티도글리칸 층에 염색이 유지되기 때문이다. 이와 같이 보다 두꺼운 펩티도글리칸 층의 존재에도 불구하고 그람 양성 박테리아는 외막이 없으므로 그람 음성 박테리아에 비해 특정 세포벽 표적 항생제를 보다 쉽게 수용하기도 한다. 본 발명의 박테리아 검출용 조성물 또는 키트를 이용하여 검출할 수 있는 그람 양성 박테리아는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*, *B. subtilis*)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0042] 예컨대, 본 발명의 박테리아 검출을 위한 원스텝 전처리용 시약 조성물 또는 현장진단 키트는 형광분광계를 이용한 염색된 DNA의 형광 측정을 통해 5×10^{-5} 수준의 검출한계를, 전하 통합 광검출을 통해 10^{-6} 수준의 검출한계를 달성할 수 있다.
- [0044] 본 발명의 제3양태는 박테리아를 포함하는 것으로 의심되는 시료를 제1양태의 시약 조성물 또는 제2양태의 현장진단 키트와 접촉시키는 제1단계; 및 상기 시료로부터의 형광 신호를 측정하는 제2단계를 포함하는, 박테리아 검출 방법을 제공한다.
- [0045] 본 발명의 용어, "제1양태의 시약 조성물", "제2양태의 현장진단 키트" 및 "카오트로픽제"는 상기에서 설명한 바와 같다.
- [0047] 예컨대, 본 발명의 박테리아 검출 방법에 있어서, 형광 신호의 측정은 형광분광기 또는 전하 통합 광검출(charge integrated photodetection)을 통해 달성할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0049] 예컨대, 본 발명의 박테리아 검출 방법은 형광분광기 또는 전하 통합 광검출(charge integrated photodetection)을 통해 검출함으로써 OD=1인 시료 중의 미생물량을 기준으로 5×10^{-5} 내지 10^{-6} 수준의 검출한계(limit of detection; LOD)를 달성할 수 있다. 이는 ATP 측정법에 의한 1×10^{-4} 의 LOD에 비해 20배 내지 100배 민감한 수준이다.
- [0051] 예컨대, 본 발명의 박테리아 검출 방법에 있어서, 상기 제1단계는 카오토로픽제를 추가로 포함하여 수행할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0053] 예컨대, 상기 박테리아를 포함하는 것으로 의심되는 시료는 600 nm에서의 광학밀도(optical density; OD)가 1 이하로 조절된 것 일 수 있다. 준비한 시료의 OD 값이 1을 초과하는 경우 과량의 박테리아에 의해 측정에 간섭이 발생할 수 있으므로, 소정의 비율로 희석하여 OD를 1 이하로 조절하여 측정 후 박테리아 농도를 산출하는 과정에서 상기 희석 비율을 반영하여 보정할 수 있다.

- [0055] 예컨대, 상기 제1단계는 비이온성 계면활성제 및 DNA 증간삽입 염료를 순차적으로 또는 동시에 투입하여 수행할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0057] 본 발명의 제4양태는 테스트하고자 하는 음용수 시료를 제1양태의 시약 조성물 또는 제2양태의 현장진단 키트와 접촉시키는 제1단계; 상기 시료로부터의 형광 신호를 측정하는 제2단계; 및 상기 측정된 형광 신호로부터 총 박테리아량을 산출하여 허용치와 비교하는 제3단계를 포함하는, 음용수 수질 평가 방법을 제공한다.
- [0058] 본 발명의 용어, "제1양태의 시약 조성물", "제2양태의 현장진단 키트" 및 "카오토로픽제"는 상기에서 설명한 바와 같다.
- [0060] 예컨대, 본 발명의 음용수 수질 평가 방법에 있어서, 형광 신호의 측정은 형광분광기 또는 전하 통합 광검출을 통해 달성할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0062] 예컨대, 음용수 중에는 미생물이 존재하지 않는 것이 바람직하다. 따라서, 바탕신호 이외에 측정되는 신호가 없는 경우, 해당 시료를 자체로서 음용할 수 있는 수준이라 판단할 수 있다.

발명의 효과

- [0064] 본 발명의 박테리아 검출용 원스텝 시약은 계면활성제와 DNA 증간삽입 염료의 최적화된 조합에 의해 단일 단계의 반응 및 통상의 형광 측정 기기를 이용한 간편한 측정에 의해 음용수 중의 박테리아의 현장 검출에, 특히 그램 양성 박테리아의 총 DNA 검출에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0066] 도 1은 본 발명의 박테리아 검출용 조성물을 이용하는 박테리아 검출 방법 및 장치를 개략적으로 나타낸 도이다. (a)는 본 발명의 일 실시예에 따른 박테리아 검출용 원스텝 시약의 작용 원리를, (b)는 상기 원스텝 시약에 대한 제형화 흐름도를, (c)는 형광 측정을 위한 전하 통합 광검출의 원리를 나타낸 도이다.
- 도 2는 본 발명의 박테리아 검출용 원스텝 시약 구성을 위한 형광 증간삽입 염료 및 계면활성제 선별 시험 결과를 나타낸 도이다. (a) 및 (b)는 각각 SYBR 그린 및 SYBR 골드의 계면활성제에 의한 형광 소광을 나타내며, (c) 및 (d)는 각각 트리톤 X 및 EDTA 농도에 따른 그램 양성 *B. subtilis* 및 그램 음성 *E. coli* K12에서 SYBR 골드의 형광 신호를 나타낸다.
- 도 3은 SYBR 골드 농도에 따른 그램 양성 *B. subtilis* 및 그램 음성 *E. coli* K12에서의 형광 변화를 나타낸 도이다.
- 도 4는 다양한 비율로 희석한 그램 양성 *B. subtilis* 및 그램 음성 *E. coli* K12에서 측정 방식에 따른 형광 변화를 나타낸다. (a) 내지 (c)는 각각 본 발명의 원스텝 시약과 M2 분광형광계(spectrofluorometer)를 이용한 측정 결과, 종래 ATP 측정기를 이용한 결과, 및 600 nm 광학 밀도 측정 결과를 나타낸다.
- 도 5는 다양한 비율로 희석한 그램 양성 *B. subtilis* 및 그램 음성 *E. coli* K12에서 측정 방식에 따른 신호의 선형성을 나타낸 도이다. (a)와 (b)는 각각 그램 양성 *B. subtilis* 및 그램 음성 *E. coli* K12에서 ATP 측정 결과를, (c) 및 (d)는 상기 균주에 대한 원스텝 시약과 M2 분광형광계를 이용한 측정 결과를 나타낸다.
- 도 6은 일련의 연속 희석 비율에서 그램 양성 *B. subtilis*에 대한 전하 통합 광검출에 의한 측정 결과를 나타낸다. (a) 내지 (d)는 각각 1×10^{-2} , 1×10^{-3} , 1×10^{-4} 및 1×10^{-5} 의 희석 비율에서 3회 측정된 개별 실험 결과를 나타낸다.
- 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 반복 측정 방식, 장치 및 결과를 나타낸 도이다. (a)는 주어진 농도에서 3

회 측정 개략도를, (b)는 전하 통합 광검출 장치의 실물 사진을, (c)는 1×10^{-6} 의 *B. subtilis*에 대해 전하 통합 광검출에 의한 개별 측정 결과를, (d)는 시간에 따라 측정된 전압의 변화율($\Delta V/\Delta t$)을, (e)는 10^{-6} 으로부터 10^{-2} 까지의 연속 희석 비율에 대한 *B. subtilis*의 $\Delta V/\Delta t$ 를 나타낸다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 원스텝 시약 및 전하 통합 광검출을 이용한 *B. subtilis*에 대해 반복 측정 한 블랭크 측정 결과를 나타낸 도이다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 원스텝 시약 및 전하 통합 광검출을 이용한 *B. subtilis*에 대해 5×10^{-3} 내지 5×10^{-6} 희석 비율에서 반복 측정한 결과를 나타낸 도이다.

도 10은 다양한 방법에 의해 측정된 결과들 간의 상관관계를 나타낸 도이다. (a)는 형광 측정을 위한 전하 통합 광검출 및 M2 분광형광계의 사용 간의 상관관계를, (b)는 형광 측정을 위한 전하 통합 광검출 및 ATP 키트의 사용 간의 상관관계를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0067] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0069] 제조예 1: 박테리아 세포 배양 및 표적 시료 준비

[0070] 에스케리치아 콜라이 (*Escherichia coli* K12, *E. coli* K12 strain SMG 123, ATCC, Manassas, USA) 및 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*, *B. subtilis*, ATCC 6051, ATCC)를 각각 표적 그램 음성 및 그램 양성 박테리아로 사용하였다. *E. coli* K12 및 *B. subtilis*를 각각 100 mL의 LB 배지(Difco™-BD, Franklin Lakes, USA)를 함유한 250 mL 삼각 플라스크에 접종하였다. 상기 플라스크를 진탕배양기(shaking incubator, Wise Cube, Daihan Scientific, Gangwondo, Korea)에서 37℃ 및 150 rpm에 배양하였다. 배양 배지로는 25 g의 LB 배지를 1,000 mL의 멸균된 증류수와 혼합하였다. 배지와 유리기구는 121℃에서 15분 동안 가압멸균처리(autoclave)하였다(Biofree, Seoul, Korea). 상기 박테리아 세포 농도(흡광도 또는 OD₆₀₀)는 UV-vis 분광광도계(UV-vis spectrophotometer, Spectramax)를 사용하여 600 nm에서 측정하였다. 0.63-0.67 OD₆₀₀의 정지상(stationary phase)의 *E. coli* K12 및 *B. subtilis*를 회수하여 PBS 완충액(0.01 M, pH 7.4)으로 세척하고 2회 원심분리(3,000 rpm, 10 min)하였다. 연속적인 희석에 의해 준비한 표적 박테리아 시료를 3,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하고 상층액은 버렸다. 수득한 펠렛은 이후 실험을 위해 재현탁시켰다(re-suspended).

[0072] 실시예 1: 다기능성 원스텝 시약 제형화 전략

[0073] 본 발명에 따른 다기능성 원스텝 시약은 DNA 중간삽입을 통한 세포 게놈 물질의 염색은 물론 세포막 투과(permeabilization) 및 용해에 의한 DNA로의 접근을 제공하는데 필요하다. 세포막 투과 및 용해는 계면활성제를 통해 달성될 수 있다. 이는 적절한 계면활성제를 형광 염료와 조합해야함을 의미한다. 도 1b에 나타난 바와 같이, 이러한 전략은 주로 염료 표백 또는 소광 조합을 선별하는데 사용되었다. 또한 이는 원스텝 시약에 사용되는 계면활성제 및 염료의 적정량을 결정할 수 있다.

[0074] 계면활성제 후보물질은 SDS(sodium dodecyl sulfate, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) 및 트리톤 X-100(Triton-X 100, Sigma-Aldrich, 이하, 트리톤 X로 표기)로, 각각은 이온성 및 비이온성이다. 염료 후보물질은 SYBR 골드 및 SYBR 그린 I 염료(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)이다. 입수(procurement) 후, 상기 염료(10,000×)는 초순수 증류수(ultra-pure distilled water, Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하여 1,000×로 희석하였다. 상기 1,000× 염료 모액(stock dye solution)은 -20℃ 냉동고에 보관하고 사용 직전에 해동하였다. 모든 실험은 3회 반복하여 수행하였다.

[0076] 실험예 1: 계면활성제 및 형광 염료의 표백/소광(bleaching/quenching) 조합의 선별

[0077] *E. coli* K12의 gDNA(genomic DNA, 9.5 ng/μL)를 이용하여 상이한 조합의 계면활성제와 염료를 먼저 선별하였

다. 상기 gDNA는 PowerSoil[®] DNA 분리 키트(Qiagen, Mountain View, CA, USA)로 추출하였다. 상기 게놈 DNA 농도(9.5 ng/ μ L)를 NanoDrop[™] 2000 분광광도계(Thermo Fisher, Wilmington, USA)를 사용하여 OD₂₆₀에서 이어서 측정하였다. 염료 표백을 야기하는 조합을 선별하여 배제하였다.

[0078] 먼저 계면활성제(SDS and TritonX)를 PBS 완충액(0.01 M, pH 7.4)으로 희석하여 0, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 및 2.0% 농도로 준비하였다. 이후 각각의 염료(SYBR 골드 및 SYBR 그린 I, 10 $\times$)를 상기 희석된 계면활성제에 첨가하였다. 이로부터 계면활성제와 염료의 4개 조합쌍을 얻었다(예컨대, SDS-SYBR 골드, SDS-SYBR 그린, 트리톤 X-SYBR 골드, 및 트리톤 X-SYBR 그린). 50 μ L의 gDNA와 50 μ L의 각각의 계면활성제 및 염료 조합을 300 rpm(MixMate Shaker, Eppendorf)에서 가볍게 혼합하면서 10분 동안 인큐베이션하여 gDNA로의 염료의 층간삽입을 촉진하였다. SYBR 그린 및 SYBR 골드의 형광을 각각 $\lambda_{ex}=254$ nm/ $\lambda_{em}=525$ nm 및 $\lambda_{ex}=300$ nm/ $\lambda_{em}=540$ nm에서 측정하였다. 모든 형광 측정은 SpectraMax M2 분광형광계(Molecular Devices, San Jose, CA, USA)를 이용하여 수행하였다. 계면활성제 농도에 따라 측정된 결과를 도 2의 (a) 및 (b)에 나타내었다.

[0079] 도 2의 (a) 및 (b)에 나타난 바와 같이, 사용한 계면활성제 중 SDS는 그 농도가 2중 형광 염료 모두의 표백/소광을 유발하는 것으로 나타났다. 구체적으로, SYBR 그린-SDS 및 SYBR 골드-SDS 쌍의 형광은 계면활성제 농도가 0%로부터 2.0 %까지 증가함에 따라 각각 7614 ± 424 RFU 및 4382 ± 252 RFU로부터 39 ± 9 RFU 및 62 ± 20 RFU까지 감소하였다. 이와 같은 형광 손실은 SDS의 음전하와 2중 SYBR 염료의 양전하 간의 정전기적 상호작용에 기인할 수 있다. 이러한 정전기적 인력은 DNA에 결합하는 대신 계면활성제의 미셀 구조(micellar structure) 내로 SYBR 염료의 격리(sequestration)를 유발하고, 낮은 형광 방출 또는 소광을 유발하였다.

[0080] 반면, 트리톤 X는 염료와 양립 가능한(compatible) 것으로 나타났다. SYBR 그린-트리톤 X 쌍은, SDS와의 조합에 비해 그 정도가 감소되기는 하였으나, 계면활성제 농도가 증가함에 따라(0%로부터 2.0%까지) 형광에서 여전히 관찰 가능한 감소를 나타내었다(7198 ± 382 RFU로부터 3468 ± 308 RFU까지). 그러나, SYBR 골드-트리톤 X 쌍은 0%로부터 2.0%까지 계면활성제 농도가 증가함에 따라 형광에서 유의미한 변화를 나타내지 않았다(P value = 0.233, ANOVA 테스트). 이는, SYBR 골드-트리톤 X 쌍은 원스텝 시약을 위한 제형 기반으로 기능할 수 있음을 시사하는 것이다.

[0082] 실험예 2: 적정 계면활성제 농도 결정

[0083] 계면활성제와 염료의 작업 조합쌍을 동정한 후, 전체 박테리아(i.e., *E. coli* K12 및 *B. subtilis*)를 이용하여 선택된 계면활성제의 적정 농도를 추가로 결정하였다. PBS 완충액을 이용하여 선택된 계면활성제를 다양한 농도(0, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 및 2.0%)로 준비하였다. 앞서 펠렛화한 *E. coli* K12 및 *B. subtilis*를 상이한 농도의 계면활성제 250 μ L에 상온에서 10분 동안 재현탁시켰다. 이어서, 50 μ L의 용해물을 10 $\times$ 의 선택된 염료 50 μ L와 300 rpm에서 가볍게 혼합하면서 추가적으로 10분 동안 인큐베이션하였다(Mixmate Shaker, Eppendorf). 층간삽입된 염료의 형광을 적정 여기 및 방출 파장에서 측정하고, 그 결과를 도 2의 (c)에 나타내었다.

[0084] 도 2의 (c)에 나타난 바와 같이, *E. coli* 및 *B. subtilis* 모두에 대한 형광은 계면활성제, 트리톤 X의 농도가 0%로부터 0.25%로 증가함에 따라 약 500 RFU로부터 1500 RFU 초과까지 증가하였다. 0.25% 이상에서, 상기 형광은 *E. coli*에 대해 약 1600 RFU 및 *B. subtilis*에 대해 약 2000 RFU에서 유지되었다. 특히, 1% 계면활성제에서, *E. coli* K12 및 *B. subtilis*에 대한 형광은 각각 1616 ± 82 RFU 및 2070 ± 125 RFU였다. 이는 안정적인 형광 범위 내에서 편리한 농도이며, 이를 토대로 원스텝 시약을 위한 공칭(nominal) 농도를 지정하였다.

[0086] 실험예 3: EDTA로의 계면활성제 보강

[0087] 상기 선택된 계면활성제를 EDTA로 추가적으로 보강하였다. 이는 수소 결합을 방해하고 소수성 상호작용을 약화하는 카오토로픽제(chaotropic agent)이다. 이는 결과적으로 세포막 투과성을 증가시킬 수 있다. EDTA-이나트륨(Duksan, Ansan, Gyeonggi-do, Korea)을 1%의 선택된 계면활성제(PBS에 희석된)에 용해시켜 최종 농도 0, 5, 10, 25, 50, 및 100 mM이 되도록 하였다. 앞서 펠렛화한 *E. coli* K12 및 *B. subtilis*를 용해 배지(lysis medium) 250 μ L에 상온에서 10분 동안 재현탁시켰다. 이어서, 50 μ L의 용해물을 10 $\times$ 의 선택된 염료 50 μ L와 300 rpm에서 가볍게 혼합하면서 추가적으로 10분 동안 인큐베이션하였다(Mixmate Shaker, Eppendorf). 층간삽입

된 염료의 형광을 적정 여기 및 방출 파장에서 측정하고, 그 결과를 도 2의 (d)에 나타내었다.

[0088] 도 2의 (d)에 나타난 바와 같이, 50 mM EDTA를 첨가했을 때, *B. subtilis*에 대한 형광은 3492 ± 332 RFU까지 추가로 증가하였다(0 mM EDTA에서 1630 ± 104 RFU와 비교). 유사하게, *E. coli* K12에 대한 형광은 1780 ± 117 RFU까지 추가로 증가하였다(0 mM EDTA에서 719 ± 118 RFU와 비교). 이는 각각 114% 및 147%의 형광 증가에 상응하였다. 그러나, 50 mM 초과하는 EDTA 농도는 형광의 유의미한 증가를 유도하는 것으로 나타나지 않았다.

[0090] 실험예 4: 적정 염료 농도 결정

[0091] 상기 선택된 염료를 1%의 선택된 계면활성제(PBS에 희석된)에 희석하여 0, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10, 및 $25\times$ 로 준비하였다. 앞서 펠렛화한 *E. coli* K12 및 *B. subtilis*를 다양한 농도로 선택된 염료를 포함하는 계면활성제 250 μ L에 상온에서 10분 동안 재현탁시켰다. 결과로서 나타나는 중간삽입된 염료의 형광을 적정 여기 및 방출 파장에서 측정하였다. 달리 언급하지 않는 한, 모든 음성 대조군은 펠렛 재현탁 없이 염료를 포함하는 계면활성제로 구성되었다. 과량의 염료는 보다 높은 배경 형광을 야기하고 이에 따라 전체적인 정량화를 저해할 수 있으므로 적정 SYBR 골드 염료의 농도 결정을 위해 테스트하고 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0092] 도 3의 (a) 및 (b)에 나타난 바와 같이, 음성 대조군과 용해된 *E. coli* K12 및 *B. subtilis* 모두의 형광은 SYBR 골드 농도에 따라 증가하였다. *E. coli* K12의 경우, SYBR 골드 농도가 $0.05\times$ 로부터 $25\times$ 까지 증가함에 따라, 형광은 92 ± 7 RFU로부터 878 ± 124 RFU까지 증가하였다. 그러나, 음성 대조군의 형광 또한 35 ± 10 RFU로부터 209 ± 19 RFU까지 증가하였다. 유사하게 *B. subtilis*의 경우, 형광은 115 ± 5 RFU로부터 2796 ± 382 RFU까지 증가하는 한편, 음성 대조군 역시 33 ± 4 RFU로부터 208 ± 2 RFU까지 증가하였다. 이는 정상화된 형광이 적정 SYBR 골드 농도를 동정하는데 보다 유용한 해석일 수 있음을 나타내는 것이다.

$$Normalized\ Fluorescence = \frac{RFU_{Bacteria} - RFU_{Negative\ control}}{RFU_{Negative\ control}} \quad (1)$$

[0093]

[0094] 도 3의 (c) 및 (d)에 나타난 바와 같이, *E. coli* 및 *B. subtilis* 모두에 대한 정상화된 형광의 최대값은 $25\times$ 의 가장 높은 SYBR 골드 농도에서 발생하지 않았다. 대신, *E. coli* K12 및 *B. subtilis*에 대해 각각 $0.5\times$ 및 $2.5\times$ 에서 발생하였다. 이 경우, *E. coli* K12 및 *B. subtilis* 모두에 대해 사용될 수 있는 $1\times$ 의 SYBR 골드 농도를 원스텝 시약에 사용하는 것이 합리적이다. $1\times$ SYBR 골드를 함유하는 PBS 완충액(0.01 M, pH 7.4) 중의 1% 트리톤 X 및 50 mM EDTA로 원스텝 시약의 구성을 최종 결정하였다.

[0096] 실시예 2: *E. coli* 및 *B. subtilis*의 정량화

[0097] 결정된 농도의 앞서 선택된 계면활성제 및 염료를 기반으로, 원스텝 시약 조성은 PBS 완충액 중의 1% TritonX, 50 mM EDTA, 및 $1\times$ SYBR 골드로 구성되었다. *E. coli* K12 및 *B. subtilis* 세포 배양은 $0.64\ OD_{600}$ 까지 성장시켰다. 상기 세포 배양을 PBS 완충액으로 희석하고(1×10^{-2} 로부터 5×10^{-7} 배까지), 이후 펠렛화하였다. 입증하는 동안, $\lambda_{ex}=300\text{ nm}/\lambda_{em}=540\text{ nm}$ (SYBR 골드)에서의 형광 측정에 앞서 상기 펠렛을 상온에서 10분 동안 250 μ L의 원스텝 시약에 첨가하였다.

[0098] 또한, 전하 통합 광검출을 *B. subtilis* 상에서의 형광 측정에 사용하였다(도 1c). 이 경우, 총 전자 전하(total electron charge)에서의 변화율(rate of change, 도착하는 방출 광자로부터 전환됨)은 다음과 같이 출력전압(전하 통합 회로의)의 변화율에 비례한다:

$$\frac{\Delta V}{\Delta t} = \frac{1}{C} \frac{\Delta q}{\Delta t} \quad (2)$$

[0099]

[0100] 여기서 V 는 전하 통합 회로의 출력 전압이고, C 는 축전기(capacitor, 10 μ F, 상수)이며, q 는 전자 전하(도착하는 광자로부터 전환됨)이다. 출력 전압의 변화율은 1초 간격으로 180회 측정하여 계산하였다.

[0101] 비교를 위하여, 동일한 시료를 UV-vis 분광광도계(흡광도 측정)뿐만 아니라 SpectraMax M2 분광형광계, 및 ATP 키트(SystemSure Plus제 ATP Hygiene Monitoring System and UltraSnap제 Surface ATP Test sampler, Hygiena

제, Camarillo, CA, USA)로 측정하였다. 흡광도 측정 및 ATP 키트의 기전을 이하 별도로 상술하였다.

[0103] 상업적으로 사용 가능한 형광 측정 방법(M2 분광형광계)을 이용한 윈스텝 시약의 성능을 도 4의 (a) 및 (b)에 흡광도 및 ATP 측정을 이용한 결과와 함께 나타내었다. UV-vis 분광광도계는 블랭크 및 1×10^{-3} 희석까지의 농도에 대해 ± 0.0010 의 최대 표준 편차를 갖는 0.0000 내지 0.0020 OD_{600nm}의 흡광도 값을 나타내는 것으로 관찰되었다. 따라서, 0.0053 ± 0.0006 및 0.0040 ± 0.0000 OD_{600nm}(각각 *E. coli* K12 및 *B. subtilis*에 대해)의 흡광도 값은 5×10^{-3} 희석의 합리적으로 가장 낮은 농도에 해당하였다.

[0104] 유사하게, ATP 측정기는 ± 1.155 의 최대 표준 편차로 블랭크 및 1×10^{-5} 희석까지의 농도에 대해 0 내지 2 의 (상대) 발광 값을 나타내었다. 따라서, 4.667 ± 0.577 RLU 및 5.667 ± 2.082 RLU(각각 *E. coli* K12 및 *B. subtilis*에 대해)의 발광 값은 5×10^{-5} 희석의 가장 낮은 농도에 상응하며 이를 이후 검출한계(limit of detection; LOD) 계산에 사용하였다.

[0105] M2 분광형광계를 통한 형광 측정을 수반하는 본 발명에 따른 윈스텝 시약의 경우, *E. coli* K12 및 *B. subtilis* 블랭크에 대한 값은 각각 49.192 ± 0.828 RFU 및 50.826 ± 0.465 RFU이었다. LOD 계산에 사용되는 가장 낮은 농도는 5×10^{-7} 희석이었으며 이는 각각 50.024 ± 3.023 RFU 및 49.844 ± 2.590 RFU에 해당하였다.

[0106] 상기 결과가 의미하는 바를 보다 자세히 조사하기 위하여, ATP 및 형광 측정에 대한 데이터를 각각의 최저 농도로부터 재플롯하고(re-plotted) 최적화하였다(fitted)(도 5의 (a) 내지 (d)). LOD를 다음의 방정식 (3a) 및 (3b)로 계산하였다(Armbruster and Pry, 2008):

[0107]
$$LOD = LOB + 1.645(SD_{low\ concentration\ sample}) \quad (3a)$$

[0108]
$$LOB = Mean\ Blank + 1.645(SD_{Blank}) \quad (3b)$$

[0109] 계산된 LOD가 최저 농도 시료보다 더 낮은 경우(적은 표준편차(standard deviation; SD)로 인해), 최저 농도 시료를 LOD로 간주하였다.

[0110] *B. subtilis*의 검출의 경우, ATP 측정에 대한 LOD는 1.06×10^{-4} ($y = 129477x - 10.242$, $R^2 = 0.9986$)인 반면 M2 분광형광계를 수반하는 윈스텝 시약에 대한 결과는 더 낮은 3.85×10^{-5} 였다. 그러나, 이러한 관찰은 *E. coli* K12에 대해 역전되었다. ATP 측정 및 윈스텝 시약(M2 분광형광계를 수반)에 대한 LOD는 각각 5×10^{-5} 및 1.65×10^{-3} 였다. 즉, M2 분광형광계를 수반하는 윈스텝 시약은 *B. subtilis*에 대해서는 매우 잘 작용하였으나(LOD의 측면에서 거의 1승만큼 ATP 측정을 능가(outperformed)), *E. coli* K12에 대해서는 기량을 발휘하지 못하였다(underperformed). 이는 윈스텝 시약 요소의 기전을 확인하여 설명될 수 있었다.

[0111] 전술한 바와 같이, 윈스텝 시약은 계면활성제(트리톤 X), EDTA 및 DNA 증간삽입 형광 염료로 구성되었다. 계면활성제는 EDTA가 내막(인지질층)을 유동화하기 위해 내부로 이동할 수 있도록 외막을 투과성이도록 한다. 이러한 방식에 있어서, 상기 염료는 내부의 DNA까지 전체 막 구조를 통과할 수 있다. 상기 계면활성제 트리톤 X는 비-이온성이며 이에 따라 상대적으로 소수성이므로, 두꺼운 펩티도글리칸(peptidoglycan) 층으로 구성된 그람 양성 박테리아(*B. subtilis*)의 소수성 외막에 결합하였다. 그러나, 트리톤 X는 지질다당류로 구성된 그람 음성 박테리아(*E. coli* K12)의 친수성 외막에는 결합하는 경향이 적었다. 따라서, 상기 윈스텝 시약은 그람 음성 박테리아에 대해 더 낮은 막 투과성 및 이에 따른 낮은 형광을 나타내었다.

[0112] 그람 음성 박테리아에 대한 이의 성능을 향상시키기 위한 가능한 변형은 이의 제형에 SDS와 같은 음이온성 계면활성제(친수성)를 첨가하는 것일 수 있다. 그러나, 도 2의 (b)에 나타난 바와 같이, SDS는 SYBR 골드 염료 또한 표백시킬 수 있다. 따라서, 증간삽입 염료의 선택의 범위를 트리톤 X 및 SDS와 양립 가능한 것들로 넓혀 검색할 필요가 있다.

[0114] **흡광도 측정**

[0115] UV-VIS 분광광도계를 이용하여 용액 중에 분산된 박테리아 세포의 흡광도(*i.e.*, 광학 밀도)를 측정하여 바이오매스를 정량하였다. 이러한 방법은 빠르고 간편하여 널리 사용된다. 수행의 단순성에도 불구하고, 상기 방법은 UV-VIS 분광광도계 성능 의존적이므로, 상대적으로 낮은 민감성을 갖는다.

[0117] ATP 측정

[0118] ATP 테스트는 박테리아 대사산물인 아데노신 삼인산(adenosine triphosphate; ATP)을 표적으로 한다 (Omidbakhsh et al., 2014). 세포 내 ATP는 ATP 테스트 키트 시약인 루시페라아제에 의해 산화될 수 있고, 이러한 상호작용은 발광 신호 유도를 야기한다(Hawronskyj and Holah, 1997). 결과적으로, ATP 테스트 키트는 상대 광량 단위(relative light unit; RLU)의 양에 의해 활성 박테리아의 존재를 확인할 수 있다. ATP 테스트는 일회용 샘플러, 시약 및 ATP 측정기를 구비한 확립된 방법이다. 빠르고 간단한 사용 방법에도 불구하고, 상기 방법은 ATP를 함유하는 미생물 세포에 제한된다. 따라서, 세포 내에 ATP를 함유하지 않는 바이러스는 ATP 테스트에 적합하지 않다. 더욱이, 원핵생물(prokaryotes)에 의한 ATP 생성은 진핵생물(eukaryotes)에 의한 그것에 비해 훨씬 더 적으므로, 박테리아와 같은 원핵세포의 검출은 덜 효과적일 수 있고 보다 낮은 민감성을 나타낼 수 있다.

[0120] 실시예 3: 전하 통합 광검출을 이용하는 원스텝 시약의 성능 개선

[0122] 1×10^{-2} 으로부터 1×10^{-5} 까지 다양한 *B. subtilis* 농도에 상응하는 전하 통합 전압을 측정하여 도 6의 (a) 내지 (d)에 나타내었다. 1×10^{-6} 에 대한 결과는 강조하여 도 7의 (c)에 나타내었다. 블랭크, 5×10^{-3} , 5×10^{-4} , 5×10^{-5} 및 5×10^{-6} 에 대한 결과는 도 8 및 도 9에 나타내었다.

[0123] 상기 전하 통합 전압은 주어진 *B. subtilis* 농도에서 각 3회씩 측정하였다. 각 3회 측정 내에서, 전하 통합 전압의 기울기는 0으로부터 180 s까지의 최적화된 회귀선에 의해 주어졌다. 모든 회귀선에 대한 R^2 은 최소 0.9998이었으며, 이는 전하 통합 전압 측정이 인지할 수 없는(non-perceivable) 전기적 및/또는 광학적 노이즈를 포함하는 매우 안정적이었음을 나타내는 것이다.

[0124] 도 7의 (a) 및 (b)에 나타난 바와 같이, 주어진 농도에 대해 각 3회씩 전하 통합 광검출기에 로딩하였다. 전술한 바와 같이, 3회의 형광을 도착하는(incoming) 광자를 방출되는(outgoing) 전자로 전환하는 포토다이오드로 검출하였다. 따라서, 포토다이오드에 의한 전자 생성 속도(generation rate of electrons)은 형광 세기(들어오는 광자의 속도)와 비례하였다. 이러한 전자 생성 속도는 또한 회로의 축적 축전기 양단(across the accumulation capacitor)에서의 전압 변화에 비례하였다. 도 7의 (c)에 나타난 바와 같이, 이는 시간에 대한 전하 통합 전압의 변화($\Delta V/\Delta t$)로도 간주되었다. 주어진 *B. subtilis* 농도에 대해, 3회 $\Delta V/\Delta t$ 를 평균화하였다(도 7의 (d)).

[0125] 도 8에 나타난 바와 같이, 블랭크 1 내지 5에 대한 회귀 방정식은 $y=0.0060x+0.0051$ ($R^2 = 1$), $y=0.0059x-0.0006$ ($R^2 = 1$), $y=0.0059x-0.0008$ ($R^2 = 0.9999$), $y=0.0058x+9e-7$ ($R^2 = 1$) 및 $y=0.0058x+0.0021$ ($R^2 = 1$)이었다. 이들로부터 $0.00588 \pm 8.37e-5$ 의 블랭크 값을 얻었다. 방정식 3a 및 3b에 따라, 결과적으로 0.006017의 블랭크 한계(limit of blank; LOB)를 얻었다. 최저 농도(1×10^{-6})의 평균 및 표준 편차는 0.006267 ± 0.000379 였다. 결과적인 검출 한계(LOD)는 5×10^{-7} 의 농도에 상응하는 0.006640로 산출되었다. 이는 상기 계산에 사용된 최저 농도인 1×10^{-6} 보다 더 낮으므로, 보다 나은 성능 값인 5×10^{-7} 대신에 LOD로서 1×10^{-6} 을 사용하는 것이 보다 합리적이다.

[0127] 실시예 4: 대체 방법으로서 전하 통합 광검출을 이용하는 원스텝 시약

[0129] 전하 통합 광검출 및 M2분광형광계에 의한 형광 측정 간의 상관관계를 도 10의 (a)에 나타내었다. 피어슨 곱적률 상관관계(Pearson product moment correlation)를 사용할 때, 상관관계 R은 0.806이고 P 값은 0.00484(< 0.05)였다. 이는 전하 통합 광검출과 M2 분광형광계에 의한 형광 측정 간의 양의 상관관계를 제안하였다. 즉, 전하 통합 광검출은 M2 분광형광계에 대한 사용 가능한 대체제이다.

[0130] 마찬가지로, 전하 통합 광검출을 수반하는 윈스텝 시약 또한 ATP 측정과 연관된다(도 10의 (b)). 상관관계 R은 0.685이고 P 값은 0.0288(< 0.05)이었다. 이 또한 전하 통합 광검출을 수반하는 윈스텝 시약이 *B. subtilis*에 대해 ATP 측정에 대한 사용 가능한 대체제로 작용할 수 있음을 시사하였다.

[0132] 실시예 5: 검출 한계 비교

[0134] 하기 표 1에는 ATP 측정과 본 발명에 따른 윈스텝 시약과 M2 분광형광계 또는 전하 통합 광검출을 이용하는 측정 결과를 함께 비교하여 나타내었다.

표 1

표적 박테리아 균주	정량화 변수	검출 방법		
		ATP 측정	1-단계 시약+M2 분광형광계	1-단계 시약+전하 통합 광검출
<i>B. subtilis</i>	회귀방정식	$y = 129477x - 10.242$	$y = 2.5863 \ln(x) + 82.123$	$y = 0.0001 \ln(x) + 0.081$
그램 양성	LOD	1.06×10^{-4}	3.85×10^{-5}	1.00×10^{-6}

[0136] 상기 표 1에 나타난 바와 같이, 그램 양성 박테리아(*B. subtilis*)에 대해 우수한 검출 성능을 나타내었다. 본 발명에 따른 전하 통합 광검출을 수반하는 윈스텝 시약은 1.00×10^{-6} 의 LOD로 *B. subtilis*를 검출할 수 있었고, M2 분광형광계를 사용하는 검출 방법에서도 $3.85.00 \times 10^{-5}$ 의 LOD로 *B. subtilis*를 검출할 수 있었다. 이는 기존의 ATP 측정($LOD\ 1.06 \times 10^{-4}$)의 검출한계보다 1 내지 2승 더 낮은 수준이다. 이는 본 발명에 따른 전하 통합 광검출과 함께 사용되는 윈스텝 시약이 달리 ATP 키트로만 검출할 수 없는 미량의 *B. subtilis*의 존재를 검출할 수 있음을 의미한다.

[0138] <결론>

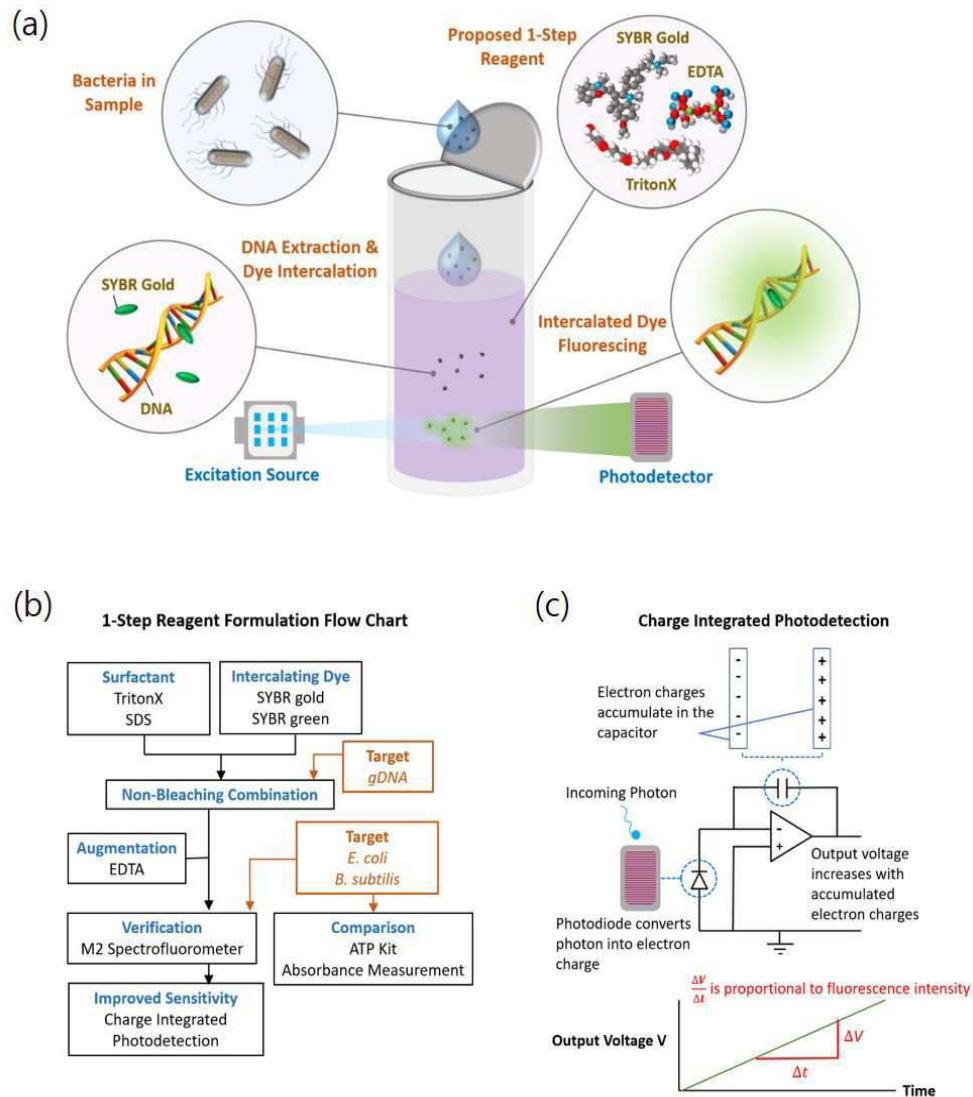
[0139] 본 발명은 박테리아 세포외막을 투과하고 형광 염료를 DNA에 증간삽입하는 단순한 다기능성 윈스텝 시약을 구현하였다. 일련의 선별 실험은 0.01 M PBS(pH 7.4) 중의 1% 트리톤 X, 50 mM EDTA, 1× SYBR 골드로 구성되는 실험 가능한 제형을 제안하였다. 대표적인 그램 양성 및 그램 음성 박테리아로서 *B. subtilis* 및 *E. coli* K12를 사용하여, 본 발명에 따른 윈스텝 시약은 형광 측정을 위한 M2 분광형광계를 사용하여 둘 모두를 검출할 수 있었다. 그러나, 트리톤 X는 상대적으로 소수성이며 그램 음성 *E. coli* K12의 친수성 외막(지질다당류, lipopolysaccharide)에 결합하는 경향이 적으므로, *E. coli* K12(그램 음성)에 대한 이의 성능은 좋지 못하였다. 이는 친수성 계면활성제를 포함하기 위한 추가적인 제형 변경을 요구한다. 그럼에도 불구하고, 그램 양성 *B. subtilis*에 대한 본 발명에 따른 윈스텝 시약의 성능은 상업적으로 이용 가능한 ATP 키트($LOD = 1.06 \times 10^{-4}$)에 비해 2승 더 낮은 검출한계($LOD = 1 \times 10^{-6}$)를 가지므로 상당히 고무적이었다. 이는 전하 통합 광검출을 수반한 상기 윈스텝 시약이 ATP 키트로 검출할 수 없었던 미량의 박테리아를 검출할 수 있음을 의미한다. 전하 통합 광검출기는 이미 손바닥 크기이며 보다 소형화할 수 있으므로, 본 발명에 따른 윈스텝 시약은 수중 총 박테리아 부하(load)의 예비 선별(preliminary screening)을 위한 상업적 ATP 키트에 대한 보다 높은 성능의 대체품으로 제시될 수 있다.

[0141]

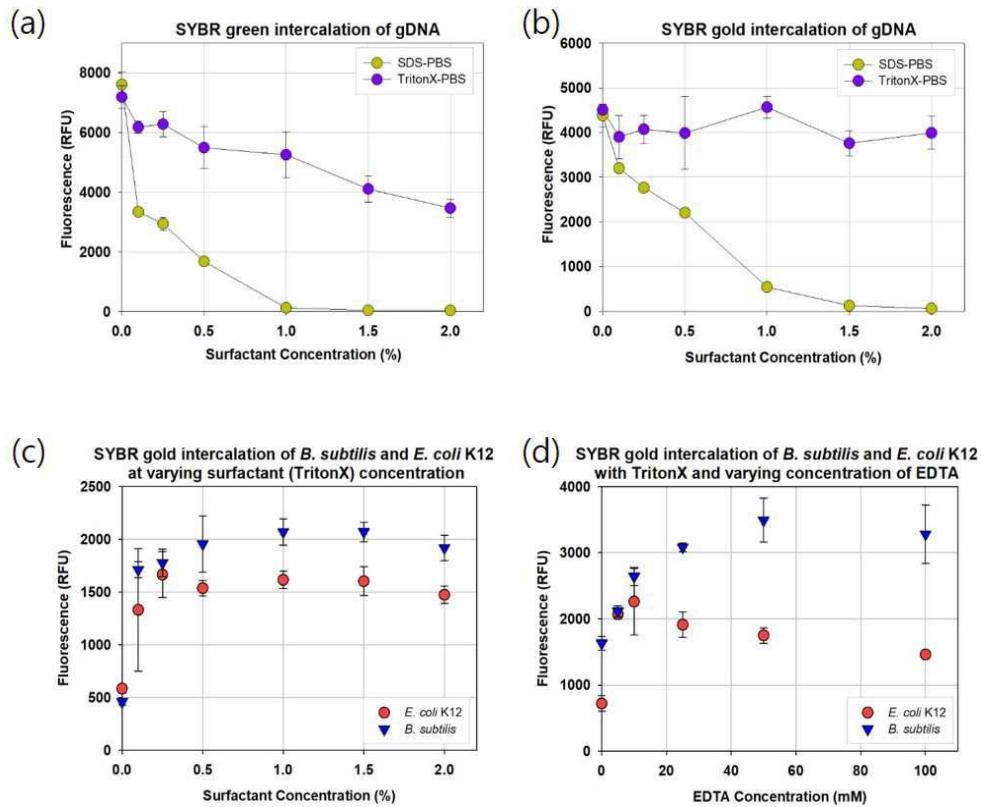
이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

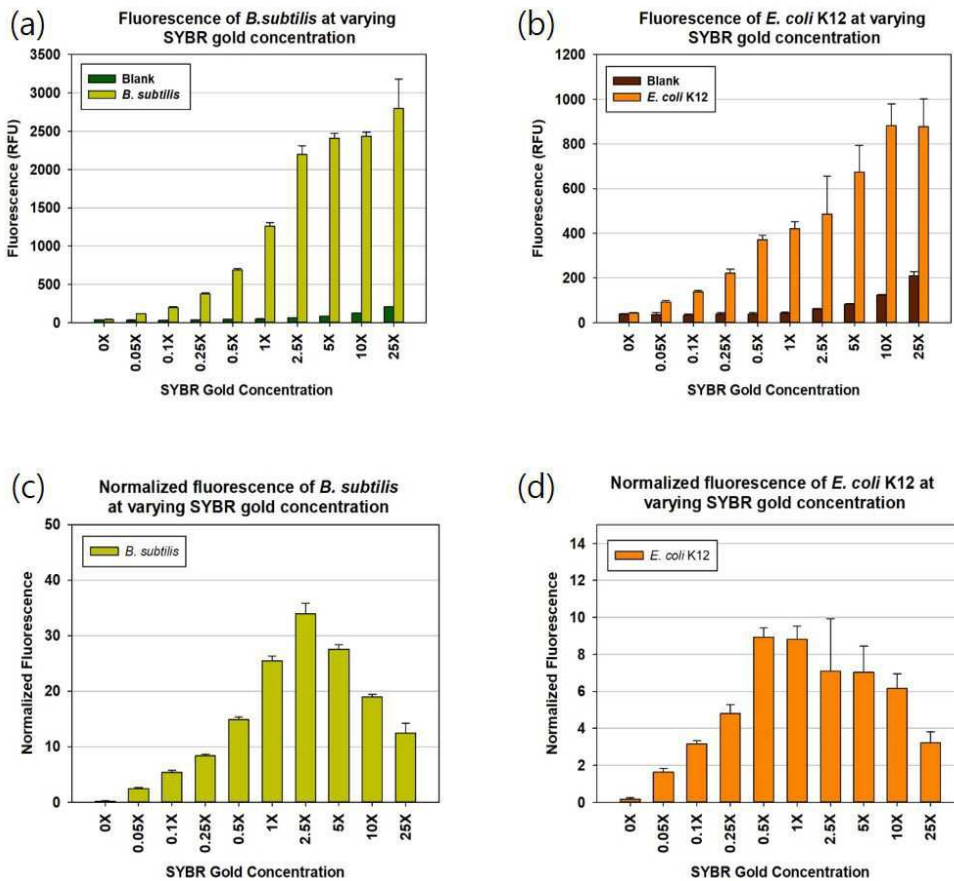
도면1



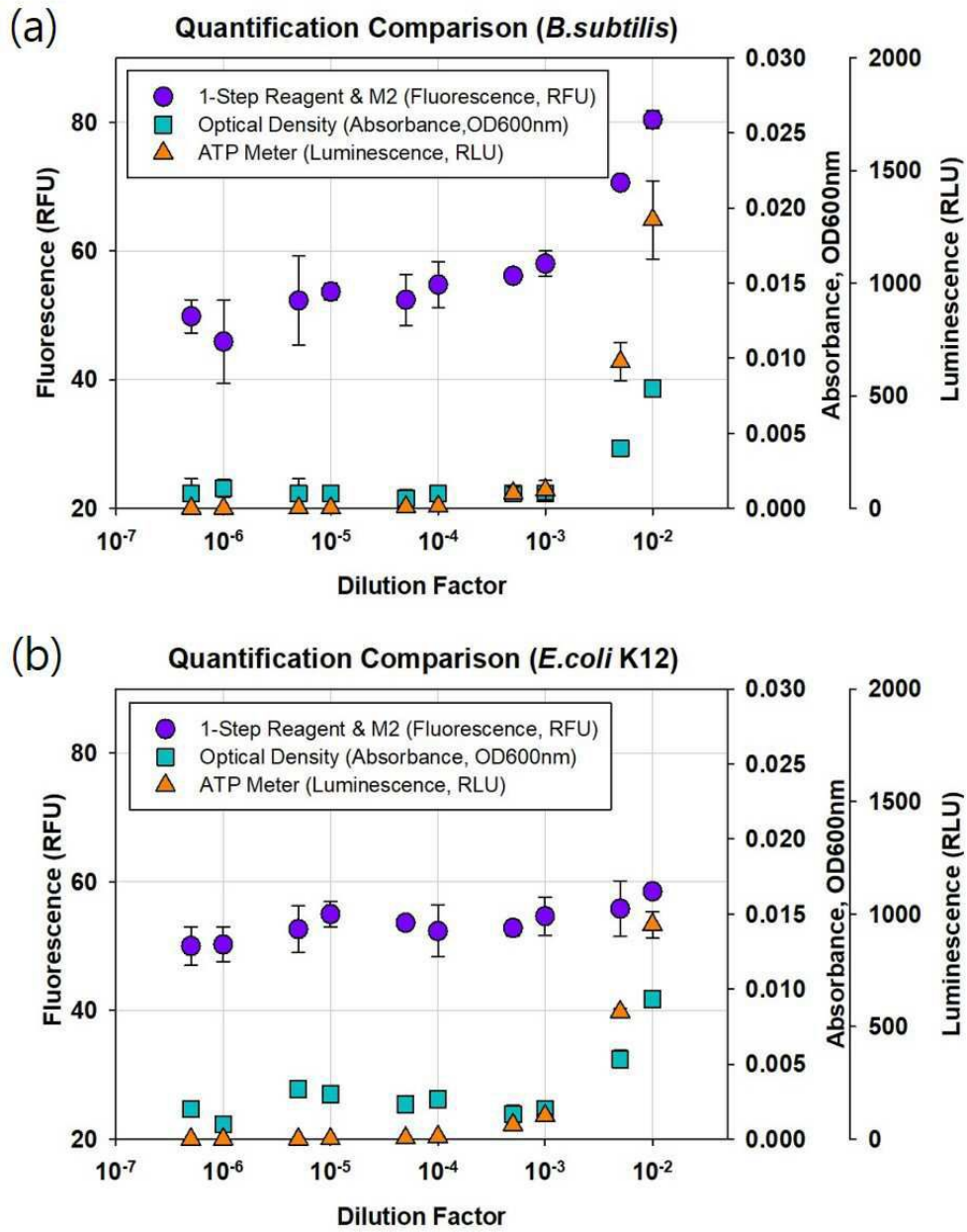
도면2



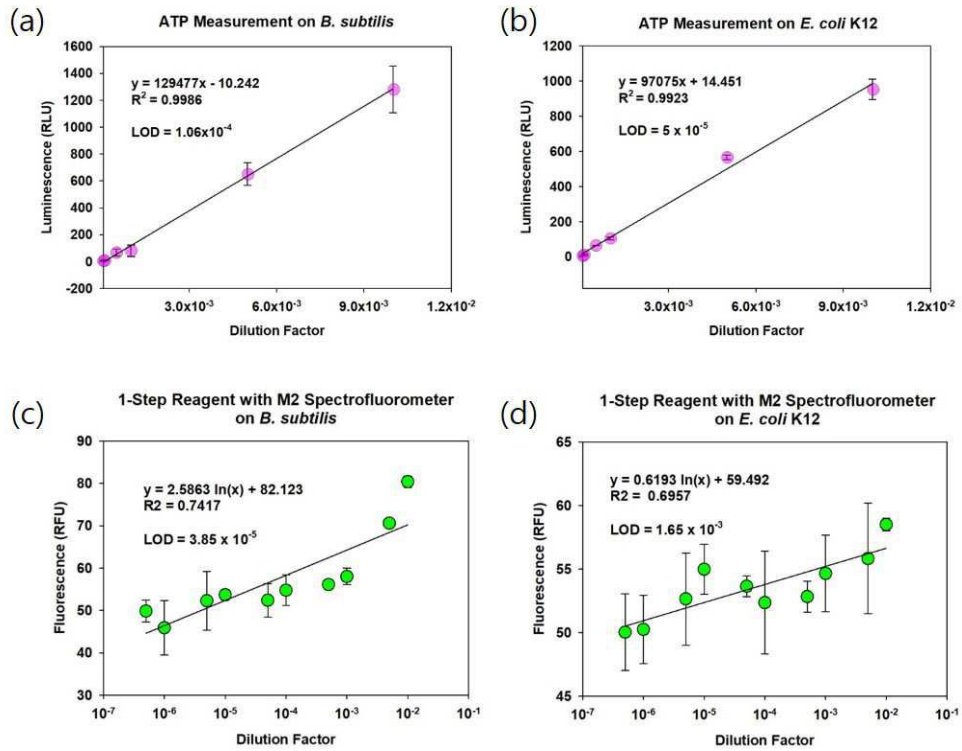
도면3



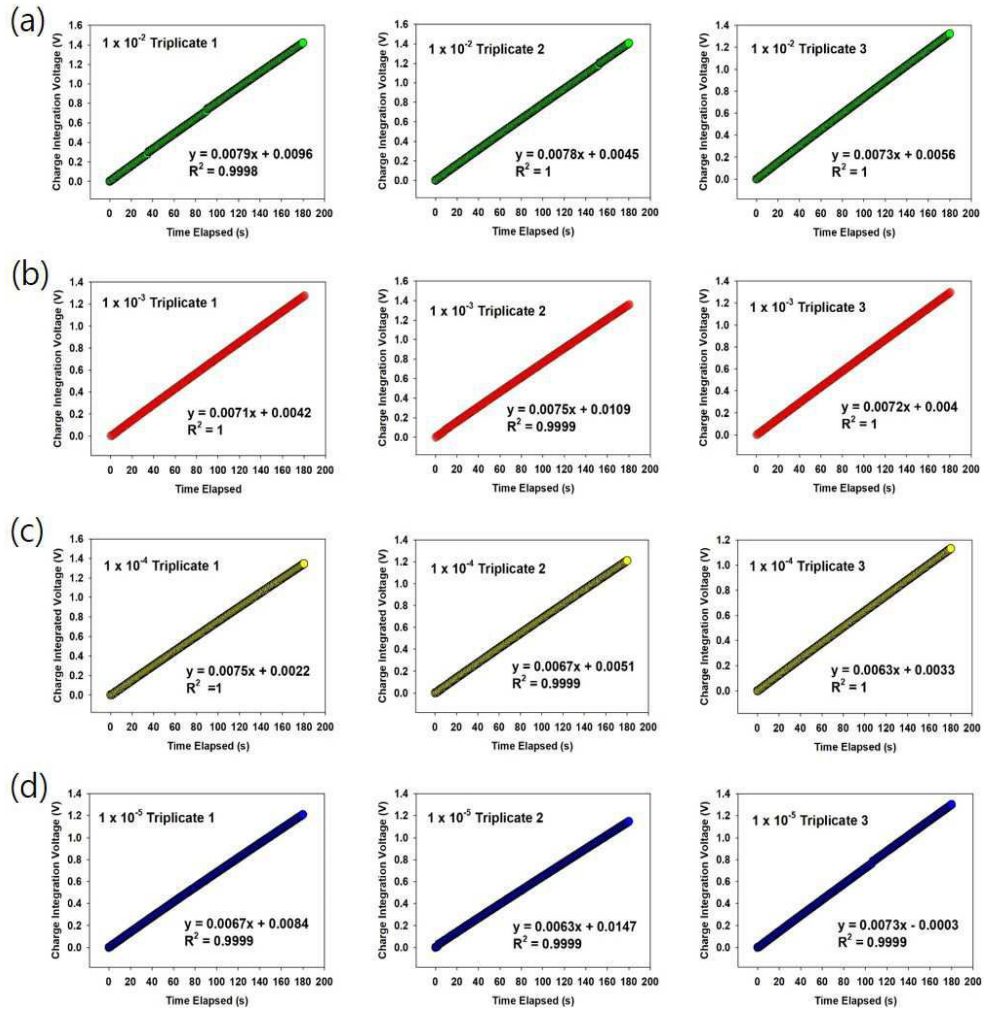
도면4



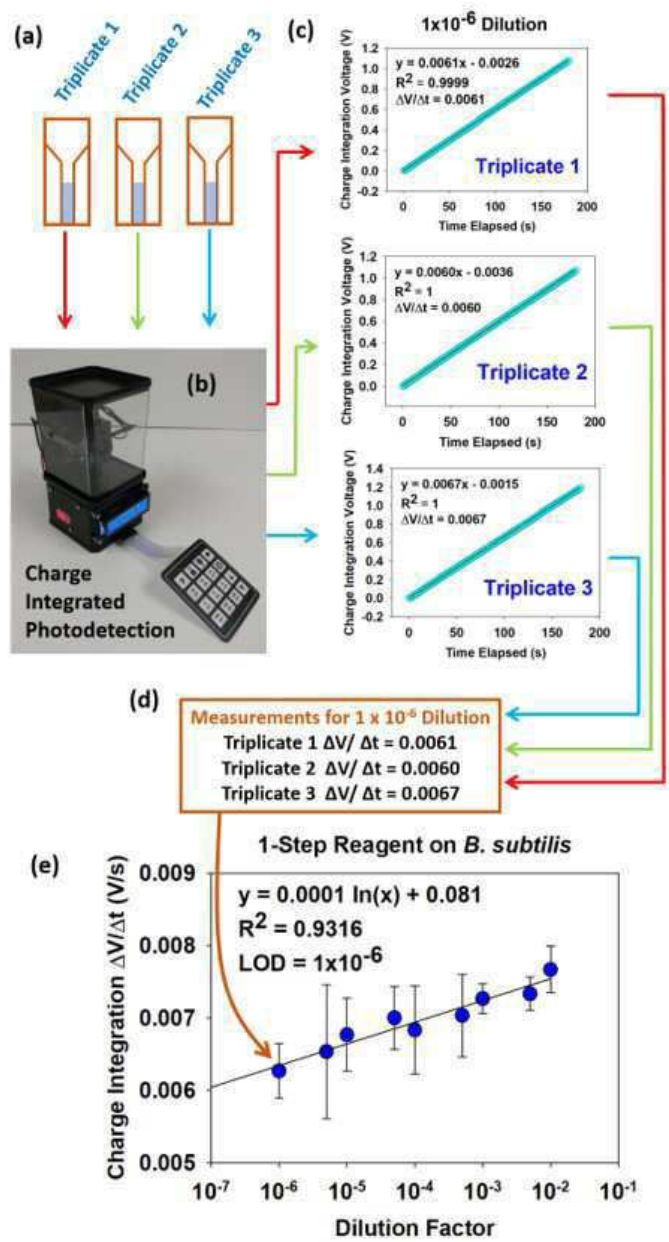
도면5



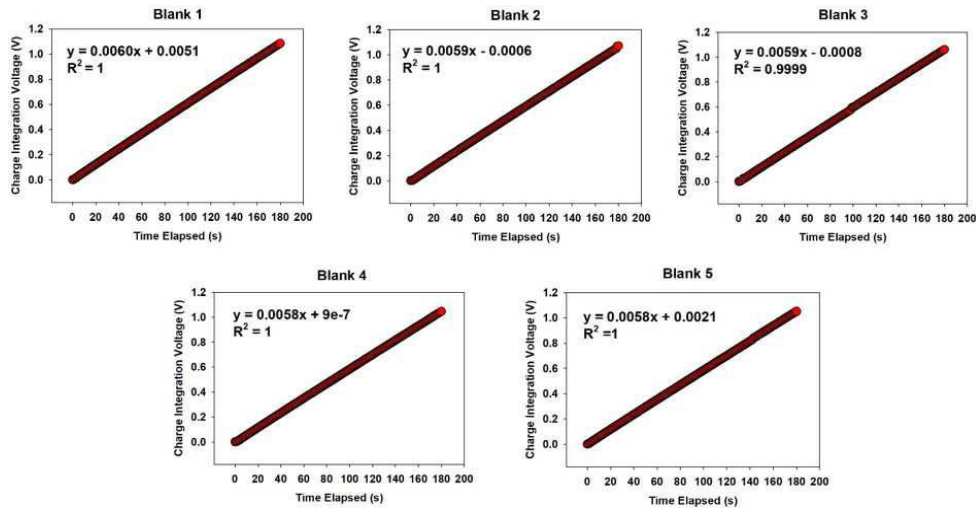
도면6



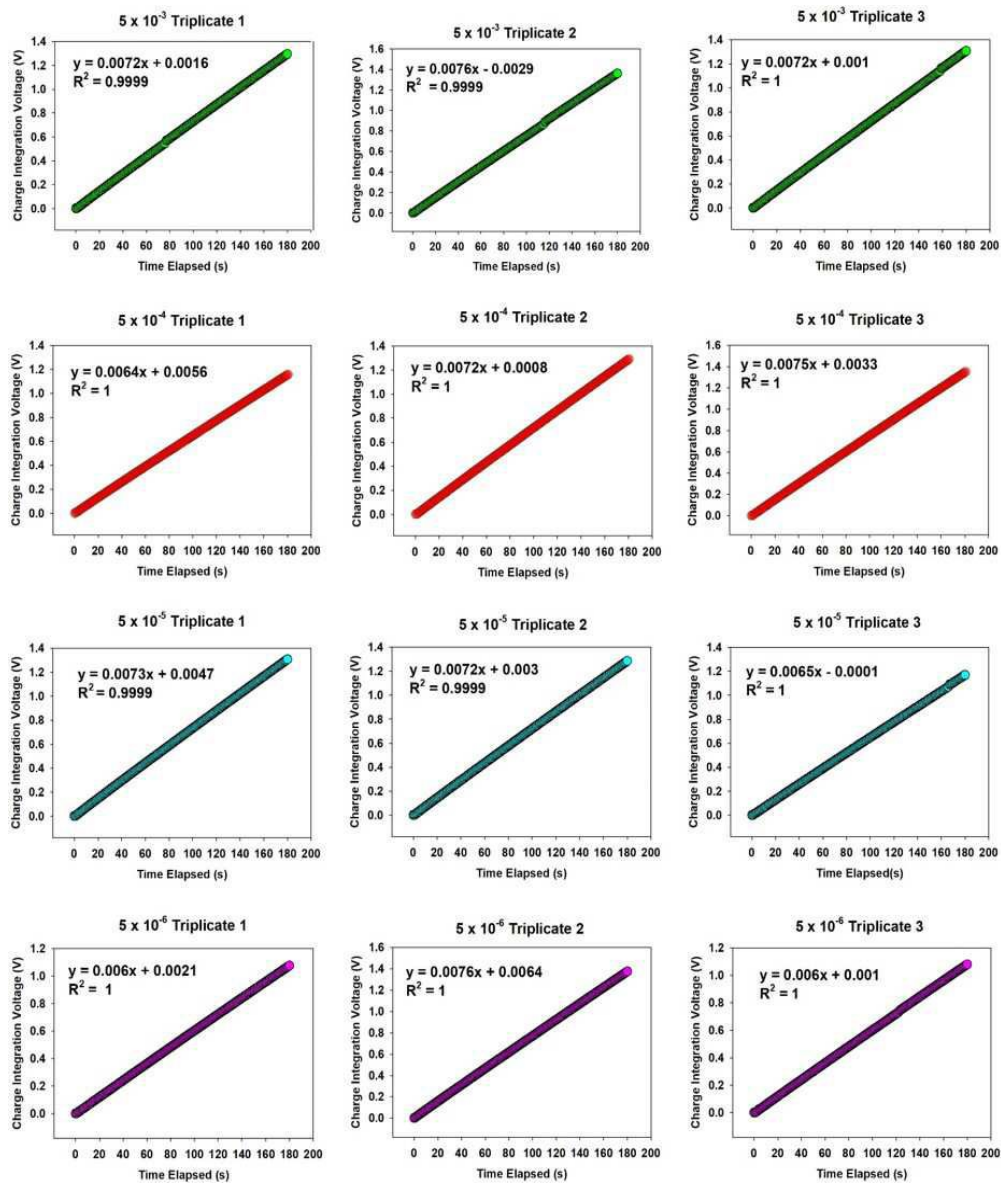
도면7



도면8

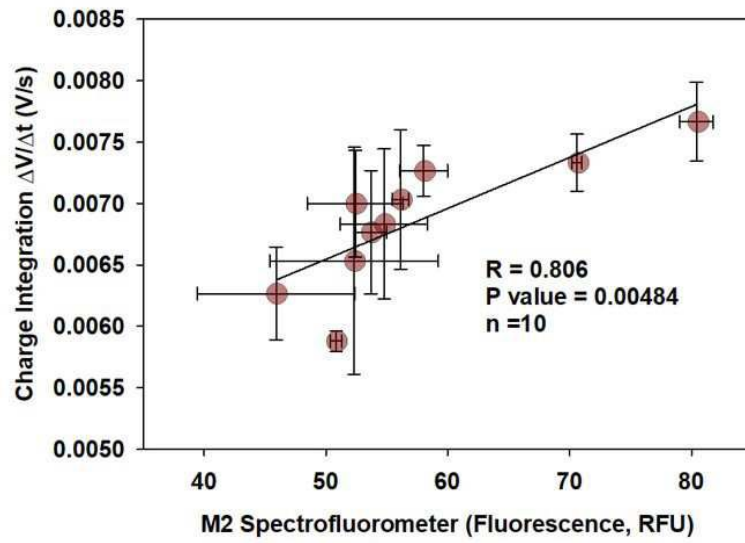


도면9



도면10

(a) Correlation Between Charge Integration and M2 Spectrofluorometer (*B. subtilis*)



(b) Correlation Between Charge Integration and ATP Measurement (*B. subtilis*)

