



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0115990
(43) 공개일자 2024년07월29일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/24 (2017.01) C12N 15/10 (2017.01)
C12Q 1/6806 (2018.01) G01N 33/569 (2017.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C12Q 1/24 (2013.01)
C12N 15/1013 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2023-0007938
(22) 출원일자 2023년01월19일
심사청구일자 2023년01월19일</p> | <p>(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)</p> <p>(72) 발명자
이기자
서울특별시 노원구 덕릉로 517, 105동 1208호(중계동, 중계건영2차아파트)</p> <p>안병기
서울특별시 동대문구 외대역동로 63-12, 101동 2003호(회경동, 이문회경 지웰에스테이트)</p> <p>김근대
서울특별시 동대문구 외대역동로 63-12, 101동 2001호(회경동, 이문회경 지웰에스테이트)</p> <p>(74) 대리인
특허법인태백</p> |
|--|--|

전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 세균 특이 펩타이드를 이용한 세균 분리 및 비원심 기반의 세균 DNA 추출 방법

(57) 요약

본 발명은 세균 특이 펩타이드를 이용한 세균 분리 및 비원심 기반의 세균 DNA 추출 방법에 관한 것으로서, 상세하게는, 현장에서 원심분리기와 같은 특별한 장비 없이도 간편하고 효율적으로 세균 DNA를 추출하기 위하여, 검체에서 세균만을 포획, 분리한 후에 그 세균을 용해하여 DNA를 추출하는 방법을 개발하였다. 즉, 세균 분리-세균 용해-DNA 추출의 3-step 전처리 과정을 통해 순도 높은 DNA 샘플을 회수함으로써, real-time PCR이나 NGS 분석 시 저해요소로 작용할 수 있는 다량의 host DNA를 제거할 수 있으며, 이를 통해 분석하고자 하는 세균 DNA 증폭 최대화와 PCR의 비특이적 산물을 줄일 수 있어 결과의 정확성과 객관성을 확보할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Q 1/6806 (2018.05)

G01N 33/56911 (2013.01)

C12Q 2563/143 (2013.01)

C12Q 2563/155 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711137928
과제번호	KMDF_PR_20200901_0023
부처명	과학기술정보통신부, 산업통상자원부, 보건복지부, 식품의약품안전처
과제관리(전문)기관명	(재)범부처전주기의료기기연구개발사업단
연구사업명	범부처전주기의료기기연구개발사업
연구과제명	타액 기반의 현장형 전처리 모듈 및 구강 내 병원성 세균 신속 검사키트 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교 산학협력단
연구기간	2020.09.01 ~ 2024.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

- 1) 서열번호 1로 표시된 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드와 링크 아마이드 수지(link amide resin)가 결합된 펩타이드-마이크로입자 및 아민 자성나노입자의 혼합물;
- 2) 25 내지 100 mM NaOH 및 0.125% 내지 0.5% SDS가 함유된 세균 용해액; 및
- 3) 10 내지 15% PEG 8000, 1.25 M NaCl 및 COOH-자성입자가 함유된 고상 가역 고정화(solid phase reversible immobilization; SPRI) 용액을 포함하는 병원성 세균 분리 및 DNA 추출용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 펩타이드-마이크로입자는 PBS 완충액 내에 0.125 내지 0.25 mg/500 μ L로 포함되는 것을 특징으로 하는 병원성 세균 분리 및 DNA 추출용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 병원성 세균은 아이케넬라 코로덴스(*Eikenella corrodens*), 스트렙토코커스 소브리누스(*Streptococcus sobrinus*), 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*) 및 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*)로 이루어진 그룹에서 선택된 어느 하나 이상의 병원성 세균인 것을 특징으로 하는 병원성 세균 분리 및 DNA 추출용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 링크 아마이드 수지는 폴리스티렌(polystyrene; PS) 수지인 것을 특징으로 하는 병원성 세균 분리 및 DNA 추출용 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 병원성 세균 분리 및 DNA 추출용 키트.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 키트는 소프트 튜브형인 것을 특징으로 하는 병원성 세균 분리 및 DNA 추출용 키트.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 소프트 튜브형은 폴리에틸렌(polyethylene; PE) 필터가 장착된 것을 특징으로 하는 병원성 세균 분리 및 DNA 추출용 키트.

청구항 8

- 1) 서열번호 1로 표시된 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드와 링크 아마이드 수지(link amide resin)가 결합된 펩타이드-마이크로입자 및 아민 자성나노입자의 혼합물에 시료를 접촉시키고 반응시켜 병원성 세균을 분리하는 단계;
- 2) 상기 분리된 병원성 세균에 25 내지 100 mM NaOH 및 0.125% 내지 0.5% SDS가 함유된 세균 용해액을 반응시켜, 병원성 세균을 용해하는 단계; 및
- 3) 상기 병원성 세균이 용해된 용해액에 10 내지 15% PEG 8000, 1.25 M NaCl 및 COOH-자성입자가 함유된 SPRI 용액을 첨가하고 반응시켜 병원성 세균의 DNA를 추출하는 단계를 포함하는 병원성 세균 분리 및 DNA 추출 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 2) 단계는 상온에서 10분 동안 반응시키며, 2 내지 5회 탭핑(tapping)하는 것을 특징으로

하는 병원성 세균 분리 및 DNA 추출 방법.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 2) 단계 이후에 폴리프로필렌(polypropylene; PP) 실린지 필터로 불순물을 제거하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 병원성 세균 분리 및 DNA 추출 방법.

청구항 11

제8항에 있어서, 상기 3) 단계는 상기 SPRI 용액 첨가 및 반응 이후에 Tris-EDTA 용출액을 첨가하여 상온에서 5 내지 20분 동안 반응시키는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 병원성 세균 분리 및 DNA 추출 방법.

청구항 12

제8항에 있어서, 상기 시료는 타액인 것을 특징으로 하는 병원성 세균 분리 및 DNA 추출 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 시료는 아이케넬라 코로덴스(*Eikenella corrodens*), 스트렙토코커스 소브리누스(*Streptococcus sobrinus*), 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*) 및 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*)로 이루어진 그룹에서 선택된 어느 하나 이상의 병원성 세균이 포함된 시료인 것을 특징으로 하는 병원성 세균 분리 및 DNA 추출 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 세균 특이 펩타이드를 이용한 세균 분리 및 비원심 기반의 세균 DNA 추출 방법에 대한 것이다.

배경 기술

[0002] 구강 마이크로바이옴은 구강 내 존재하고 있는 미생물들과 이들의 유전정보 전체를 말하는 것으로, 구강 미생물총의 생태계 균형이 불균형 상태로 전환될 때나 구강 미생물총의 복잡성이 증대될 때 가장 흔한 구강질환이자 감염성 질환에 속하는 치아우식증이나 치주질환이 발생한다. 따라서 구강 내 세균에 대한 정확한 분석은 구강질환의 진단 뿐 아니라 전신질환에 대한 예방, 관리에도 큰 도움을 줄 수 있다. 특히 타액은 샘플 채취가 비교적 용이하고 구강 내 세균 상태를 반영할 수 있기 때문에, 타액을 이용한 세균 바이오마커에 대한 분석은 충치나 치주질환 진단 및 치료 효능 평가, 예측 도구로 활용할 수 있으며, 구강 질환과 전신 질환의 상호연계성 파악, 전신 질환 보조 진단에 활용함으로써 기존의 혈액검사를 대체할 수 있는 유용한 수단이 될 수 있을 것으로 기대된다.

[0003] 기존에는 구강 세균을 분석하는 방법으로 세균 배양법이 일반적으로 사용되었으나 시간이 오래 걸릴 뿐 아니라 배양이 안되는 수많은 세균들로 인해 그 정보를 알기가 어려웠으나, 최근 next generation sequencing(NGS) 기술의 발달로 구강 세균에 대한 정보가 증가되었고 real-time polymerase chain reaction(PCR) 기술을 이용하여 임상 검체에서 세균을 검출하고 정량적으로 분석하는 방법이 활발히 사용되고 있다. 현재 타액 내 존재하는 구강 세균에 대한 정량 검사가 일부 치과 병원에서 이루어지고 있지만, 주로 분석 서비스 형태로 진행되기 때문에 환자의 구강 세척액을 서비스 기관에 배송하여 검사를 진행하고 약 3-5일 후에 결과보고서를 받게 되어 환자들의 선호가 낮고 비용부담이 높은 상황이다. 따라서 현장에서 개인에 대한 검사가 신속하게 이루어지고 그에 대한 결과 및 진단적 의미를 바로 부여할 수 있는 구강 세균 신속검사가 필요하다.

[0004] 타액을 이용한 구강 세균 검사는 크게 시료 전처리와 real-time PCR 또는 NGS 분석으로 나눌 수 있는데, real-time PCR이나 NGS 분석은 기기에서 시행되는 반면, 시료 전처리의 경우에는 반드시 전문 인력에 의해서 이루어져야 하고 기기와 기구들을 이용하여 여러 단계의 복잡한 과정을 시행해야 하기 때문에 노동집약적인 과정이 필요하다. 시료 전처리는 주로 Qiagen의 microbiome kit가 활용되는데, 일반적인 DNA 추출과정과 다르게 세균 DNA 추출을 위해 host DNA를 제거하는 단계가 초기 과정에 포함된다. 왜냐하면 다량의 host DNA가 포함될 경우 세균 DNA에 대한 분석시에 저해 요소로 작용할 수 있기 때문이다. 이로 인해 host DNA를 제거하기 위해서 약 2시간 정도의 추가 시간이 필요하게 된다.

[0005] 이에, 현장에서 원심분리기와 같은 특별한 장비 없이도 간편하고 효율적으로 세균 DNA를 추출하기 위한, 세균

분리 및 DNA 추출 방법의 개발이 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-2026683호(2019.09.24 등록)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 세균 특이 펩타이드-마이크로입자 및 아민 자성나노입자의 혼합물, 세균 용해액 및 고상 가역 고정화(solid phase reversible immobilization; SPRI) 용액을 포함하는 병원성 세균 분리 및 DNA 추출용 조성물을 제공하는데 있다.

[0008] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 병원성 세균 분리 및 DNA 추출용 키트를 제공하는데 있다.

[0009] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 이용한 병원성 세균 분리 및 DNA 추출 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 1) 서열번호 1로 표시된 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드와 링크 아마이드 수지(link amide resin)가 결합된 펩타이드-마이크로입자 및 아민 자성나노입자의 혼합물; 2) 25 내지 100 mM NaOH 및 0.125% 내지 0.5% sodium dodecyl sulfate(SDS)가 함유된 세균 용해액; 및 3) 10 내지 15% polyethylene glycol(PEG) 8000, 1.25 M NaCl 및 COOH-자성입자가 함유된 SPRI 용액을 포함하는 병원성 세균 분리 및 DNA 추출용 조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 조성물을 포함하는 병원성 세균 분리 및 DNA 추출용 키트를 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 1) 서열번호 1로 표시된 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드와 링크 아마이드 수지가 결합된 펩타이드-마이크로입자 및 아민 자성나노입자의 혼합물에 시료를 접촉시키고 반응시켜 병원성 세균을 분리하는 단계; 2) 상기 분리된 병원성 세균에 25 내지 100 mM NaOH 및 0.125% 내지 0.5% SDS가 함유된 세균 용해액을 반응시켜, 병원성 세균을 용해하는 단계; 및 3) 상기 병원성 세균이 용해된 용해액에 10 내지 15% PEG 8000, 1.25 M NaCl 및 COOH-자성입자가 함유된 SPRI 용액을 첨가하고 반응시켜 병원성 세균의 DNA를 추출하는 단계를 포함하는 병원성 세균 분리 및 DNA 추출 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명은 세균 특이 펩타이드를 이용한 세균 분리 및 비원심 기반의 세균 DNA 추출 방법에 관한 것으로서, 상 세하게는, 현장에서 원심분리기와 같은 특별한 장비 없이도 간편하고 효율적으로 세균 DNA를 추출하기 위하여, 검체에서 세균만을 포획, 분리한 후에 그 세균을 용해하여 DNA를 추출하는 방법을 개발하였다. 즉, 세균 분리-세균 용해-DNA 추출의 3-step 전처리 과정을 통해 순도 높은 DNA 샘플을 회수함으로써, real-time PCR이나 NGS 분석시 저해요소로 작용할 수 있는 다량의 host DNA를 제거할 수 있으며, 이를 통해 분석하고자 하는 세균 DNA 증폭 최대화와 PCR의 비특이적 산물을 줄일 수 있어 결과의 정확성과 객관성을 확보할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 비원심 기반의 3-step 전처리 프로토콜의 핵심 요소와 최적 조건들을 나타낸다.

도 2는 DNA 추출 효율 평가방법을 나타낸다.

도 3은 SPRI-LB2 농도를 달리하여 추출된 용액에 대한 DNA 농도, 순도 및 Ct 값 결과를 나타낸다.

도 4는 소프트 튜브(soft tube)형 세균 분리 도구와 자석을 이용한 세균 분리 방법을 나타낸다.

도 5는 각각 Odor-마이크로입자 기반의 3-step 전처리 방법과, 상용화된 Qiagen kit로 회수된 DNA 용액에 대한

여, DNA 농도별 Ct 값 검정곡선 비교 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 이에, 본 발명자들은 다음의 기술적 특징을 가진 세균 분리 및 DNA 추출 방법을 개발하였다. 본 발명은 1) 세균 외막에 존재하는 주요 구성 요소와 결합력이 우수한 펩타이드를 이용하여 시료에서 세균들만을 포획, 분리하는 것이며, 2) 필터가 내장된 소프트 튜브를 세균 분리 도구로 사용하여 현장에서 간편하게 시료를 전처리하여 세균을 분리할 수 있다는 점이다. 또한, 3) 분리된 세균에 대해 세균 용해액과 DNA 결합 용액 및 회수액을 이용하여 세균 DNA를 추출하는 데 있어서, 현장에서의 사용성을 고려하여 원심분리를 사용하지 않는다는 것이고, 4) 기존의 상용화된 키트와 비교했을 때 전체 과정과 시간을 최소화하여 효율적인 세균 DNA 추출이 가능하다는 점이다(도 1).
- [0016] 본 발명은 1) 서열번호 1로 표시된 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드와 링크 아미이드 수지가 결합된 펩타이드-마이크로입자 및 아민 자성나노입자의 혼합물; 2) 25 내지 100 mM NaOH 및 0.125% 내지 0.5% SDS가 함유된 세균 용해액; 및 3) 10 내지 15% PEG 8000, 1.25 M NaCl 및 COOH-자성입자가 함유된 SPRI 용액을 포함하는 병원성 세균 분리 및 DNA 추출용 조성물을 제공한다.
- [0017] 바람직하게는, 상기 펩타이드-마이크로입자는 PBS 완충액 내에 0.125 내지 0.25 mg/500 μ L로 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0018] 바람직하게는, 상기 병원성 세균은 아이케넬라 코로덴스(*E. corrodens*), 스트렙토코커스 소브리누스(*S. sobrinus*), 스트렙토코커스 뮤탄스(*S. mutans*) 및 락토바실러스 카제이(*L. casei*)로 이루어진 그룹에서 선택된 어느 하나 이상의 병원성 세균일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0019] 바람직하게는, 상기 링크 아미이드 수지는 폴리스티렌(polystyrene; PS) 수지일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0020] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 병원성 세균 분리 및 DNA 추출용 키트를 제공한다. 상기 키트에는 효과적인 병원성 세균 분리 및 DNA 추출에 필요한 pH 조절 등을 위한 완충액 등이 추가적으로 포함될 수 있다.
- [0021] 바람직하게는, 상기 키트는 소프트 튜브형일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0022] 보다 바람직하게는, 상기 소프트 튜브형은 폴리에틸렌(polyethylene; PE) 필터가 장착될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0023] 상기 키트는 단일 조성물일 수 있거나, 병원성 세균 분리 및 DNA 추출용 조성물의 개별 성분을 사용 전 혼합을 위해 개별적으로 보관할 수 있다. 이처럼, 본 발명의 키트 내의 병원성 세균 분리 및 DNA 추출용 조성물의 성분을 별개로 포장할 수 있거나, 성분 임의의 조합으로 하나 이상의 혼합물로 포장될 수 있다. 개별 성분 각각 또는 하나 이상의 혼합물이 상이한 용기 내에 둘 수 있고, 단일 용기에 전체 키트를 포함할 수도 있다.
- [0024] 또한, 본 발명은 1) 서열번호 1로 표시된 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드와 링크 아미이드 수지가 결합된 펩타이드-마이크로입자 및 아민 자성나노입자의 혼합물에 시료를 접촉시키고 반응시켜 병원성 세균을 분리하는 단계; 2) 상기 분리된 병원성 세균에 25 내지 100 mM NaOH 및 0.125% 내지 0.5% SDS가 함유된 세균 용해액을 반응시켜, 병원성 세균을 용해하는 단계; 및 3) 상기 병원성 세균이 용해된 용해액에 10 내지 15% PEG 8000, 1.25 M NaCl 및 COOH-자성입자가 함유된 SPRI 용액을 첨가하고 반응시켜 병원성 세균의 DNA를 추출하는 단계를 포함하는 병원성 세균 분리 및 DNA 추출 방법을 제공한다.
- [0025] 바람직하게는, 상기 2) 단계는 상온에서 10분 동안 반응시키며, 2 내지 5회 탭핑(tapping)할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0026] 바람직하게는, 상기 2) 단계 이후에 폴리프로필렌(polypropylene; PP) 실린지 필터로 불순물을 제거하는 단계를 추가로 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0027] 바람직하게는, 상기 3) 단계는 상기 SPRI 용액 첨가 및 반응 이후에 Tris-EDTA 용출액을 첨가하여 상온에서 5 내지 20분 동안 반응시키는 단계를 추가로 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0028] 바람직하게는, 상기 시료는 병원성 세균이 포함된 것으로 의심되는 객체의 분변, 소변, 눈물, 타액, 피부의 외부 분비물, 호흡관의 외부 분비물, 장관의 외부 분비물, 소화관의 외부 분비물, 혈장, 혈청, 혈액, 척수액, 림프액, 체액 및 조직일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 보다 바람직하게는 상기 시료는 타액일 수 있다.

[0029] 보다 바람직하게는, 상기 시료는 아이케넬라 코로덴스(*E. corrodens*), 스트렙토코커스 소브리누스(*S. sobrinus*), 스트렙토코커스 뮤탄스(*S. mutans*) 및 락토바실러스 카제이(*L. casei*)로 이루어진 그룹에서 선택된 어느 하나 이상의 병원성 세균이 포함된 시료일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0030] 이하에서는, 본 발명을 한정하지 않는 실시예에 따라 본 발명을 상세히 설명한다. 본 발명의 하기 실시예는 본 발명을 구체화하기 위한 것일 뿐 본 발명의 권리범위를 제한하거나 한정하는 것이 아님은 물론이다. 따라서, 본 발명의 상세한 설명 및 실시예로부터 본 발명이 속하는 기술분야의 전문가가 용이하게 유추할 수 있는 것은 본 발명의 권리범위에 속하는 것으로 해석된다.

[0031] <실시예 1> 세균 포획, 분리를 위한 세균 특이 펩타이드-마이크로입자의 제작 및 세균 분리 효율 평가

[0032] 1. 세균 분리를 위한 세균 특이 펩타이드 Odor-마이크로입자 제작

[0033] 세균 분리를 위한 세균 특이 펩타이드는 분자 인식 물질로 많이 활용되는 항균 펩타이드 중 선행출원 (한국특허출원 제10-2022-0090339호)를 통해 그람 양성균과 그람 음성균 모두에서 분리 효율이 우수한 Odorranin-HP (Odor)을 사용하였다. Odor 펩타이드의 서열은 GLLRASSVWGRKYYVDLAGCAKA(서열번호 1)이며, 23개 아미노산으로 구성되었다.

[0034] Odor 펩타이드를 폴리스티렌 재질의 링크 아마이드 수지(100 ~ 200 mesh)에 고정한 세균 분리용 Odor-마이크로입자는 ㈜펩트론에서 자동합성기 (ASP48S, Pepton, Inc.)를 사용하여 표준 고체상 펩타이드 합성 프로토콜 (9-Fluorenyl methyl oxycarbonyl solid phase peptide synthesis; Fmoc-SPPS)을 사용하여 제작되었다. 보다 구체적으로는 Fmoc 보호 그룹은 20% piperidine/dimethylformamide (DMF)에서 10분 동안 교반하여 제거하는 과정을 2회 실시하였다. 2시간 동안 DMF에서 Fmoc 아미노산 (6 eq), HOBt (6 eq), HBTU (6 eq), DIPEA (12 eq)를 사용하여 커플링을 수행하였다. 각 단계에서는 DMF를 사용하여 resin을 2회 세척하였다.

[0035] Odor 펩타이드 서열 생성이 완료되면 15분 동안 30% Trifluoroacetic acid/methylene chloride로 측쇄 보호기를 제거하여 탈 보호 작업을 종료하였다. Odor 펩타이드가 결합된 resin을 모아 methylene chloride로 세척한 후 자연 건조하여 제작을 완료하였다. 분말 형태로 보관하며 사용 전날 5 mg/mL (1X phosphate buffered saline, PBS, pH 7.4) 농도로 용액을 준비하였다.

[0036] 2. Odor-마이크로입자의 세균 분리 효율 평가

[0037] (1) 병원성 세균 선정 및 배양

[0038] 치주질환을 유발하는 것으로 알려진 구강 세균 중, 특별한 기구나 기기 없이도 세균 배양이 가능하고 유전자 재조합에 사용되지 않는 Biosafety level 2 균주 4종을 선택하여 생물자원센터 (Korea Collection for Type Cultures, KCTC)로부터 활성 배양체 (active culture)로 분양받아 배양하였다(표 1).

표 1

[0039] 본 발명에 사용된 균주 4종

	Species	Gram stain	산소요구성
1	<i>Streptococcus mutans</i> (<i>S. mutans</i>)	Gram-Positive	통성혐기
2	<i>Streptococcus sobrinus</i> (<i>S. sobrinus</i>)	Gram-Positive	통성혐기
3	<i>Lactobacillus casei</i> (<i>L. casei</i>)	Gram-Positive	통성혐기
4	<i>Eikenella corrodens</i> (<i>E. corrodens</i>)	Gram-Negative	호기

[0040] 선정된 균주는 각각의 배양용액과 배양조건에서 배양하였으며(표 2), UV-Visible spectrophotometer를 통해 흡광도 (optical density, OD)를 측정하여 세균 배양액의 농도를 계산하였다.

표 2

[0041]

본 발명에 사용된 4종 균주에 대한 배양조건 및 OD별 세균수

	Species	배양액	배양조건	OD ₆₀₀ =1 기준 세균수 (CFU/mL)
1	<i>S. mutans</i>	Brain Heart Infusion (BHI) broth & BHI agar	37 °C, 5% CO ₂ incubator, 24 ~ 48 h	5×10^8
2	<i>S. sobrinus</i>	BHI broth & BHI agar	37 °C, 5% CO ₂ incubator, 24 ~ 48 h	2×10^8
3	<i>L. casei</i>	De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth (w/5% Glucose) & MRS Agar	37 °C, 5% CO ₂ incubator, 24 ~ 48 h	4×10^8
4	<i>E. corrodens</i>	Columbia broth (w/5% sheep blood) & Chocolate agar	37 °C shaking incubator, 24 ~ 72 h	1×10^8

[0042]

(2) Odor-마이크로입자 단독 사용에 따른 세균 분리 효율 평가

[0043]

세균 특이 펩타이드-마이크로 입자의 경우, resin 에 펩타이드를 붙여놓은 상태인데 고정된 펩타이드의 양이 많으면 펩타이드를 꺼리 뭉칠 수 있어서 오히려 세균과의 결합을 방해할 수 있다. 따라서 선행출원 (한국특허출원 제10-2022-0090339호)에서는 세균 특이 펩타이드-마이크로입자를 사용 전에 미리 pH 4.5 용액에서 충분한 시간을 두어 펩타이드들의 뭉침을 최대한 풀어서 사용하였다. 하지만 고정되는 펩타이드의 양을 줄이게 되면 중성 pH에서도 펩타이드 간 뭉침을 감소시킬 수 있을 뿐 아니라 비용 효율적일 수 있다.

[0044]

그램양성균, 그람음성균 모두에 사용할 수 있는 Odor-마이크로입자에 대해, resin 에 고정하는 펩타이드의 양을 1/10 수준으로 줄여서 제작하였으며, 제작된 Odor-마이크로 입자의 세균 분리 효율을 평가하였다.

[0045]

4종의 세균 - *S. mutans*, *S. sobrinus*, *L. casei*, *E. corrodens* - 에 대해 일정 세균 수 (1×10^7 CFU/250 μ L 생리식염수)로 준비하고, Odor-마이크로입자 (0.125 mg/250 μ L, 1X PBS, pH 7.4)를 1:1로 (각 250 μ L씩) 혼합하여 세균과 상온에서 15분간 반응시켰다.

[0046]

대조군으로는 동일한 수의 세균에 대해, Odor 펩타이드가 10배 많이 고정된 마이크로입자 (Odor-10X-마이크로입자; 0.125 mg/250 μ L, 10 mM sodium dihydrogen phosphate, pH 4.5)를 1:1로 (각 250 μ L씩) 혼합하여 동일한 방법으로 세균과 상온에서 15분간 반응시켰다.

[0047]

반응 후 PS plate (200 ~ 250 mesh, filter 역할)가 장착된 실린지를 통과시켰다. 이때, 세균이 포획된 세균 분리용 펩타이드-마이크로입자는 PS plate에 걸리게 되고, 포획되지 않은 세균만 통과하게 되므로, 이 elute를 이용하여 1X PBS, 0.1% BSA 용액으로 연속 희석하고 각각의 세균 영양배지 agar plate에 도말 후 생성된 세균의 colony를 계수하여 평가하였다.

[0048]

그 결과, 3종의 그람 양성균에 대해 Odor-마이크로입자는 중성 pH 조건에서도 Odor-10X-마이크로입자와 유사한 세균 분리 효율을 보였으며, *E. corrodens*에 대해서는 Odor-10X-마이크로입자의 약 56% 정도 세균을 분리하였다 (표 3).

표 3

[0049]

세균 분리용 Odor-마이크로입자의 세균 분리 효율 평가 결과

균주	세균 분리 효율 (%)	
	Odor-마이크로입자 (pH 7.4)	Odor-10X-마이크로입자 (pH 4.5)
<i>E. corrodens</i> (-)	48	86
<i>S. mutans</i> (+)	72	70
<i>S. sobrinus</i> (+)	79	74
<i>L. casei</i> (+)	93	91

(3) Odor-마이크로입자와 아민 나노입자 혼합 사용에 따른 세균 분리 효율 평가

추가로 선행출원 (한국특허출원 제10-2022-0090339호)에서와 같이, Odor-마이크로입자와 아민 나노입자를 함께 사용하였을 때 세균 분리 효율이 향상되는지 확인하였다.

우선, 아민기가 도입된 자성 나노입자 (400 nm, 0.5 g/25 mL) 1.6 mL을 1× PBS 500 μL로 세척하고 용액을 제거하였다. 4종의 세균에 대해 일정 세균 수 (1×10^7 CFU/250 μL 생리식염수)로 준비하고, Odor-마이크로입자 (0.125 mg/250 μL, 1X PBS, pH 7.4)와 준비된 아민 자성 나노입자를 혼합하여 세균과 상온에서 15분간 반응시켰다.

반응 후에는 위와 동일한 방법으로 PS plate가 장착된 실린지를 통과시켰으며, elute를 이용하여 1X PBS, 0.1% BSA 용액으로 연속 희석하고 각각의 세균 영양배지 agar plate에 도말 후 생성된 세균의 colony를 계수하여 평가하였다.

그 결과, Odor-마이크로입자와 아민 자성입자의 혼합 사용을 통해 4종의 세균 모두를 90% 이상 분리할 수 있음을 확인하였다(표 4).

표 4

Odor-마이크로입자와 아민 나노입자의 혼합 사용에 의한 세균 분리 효율 평가 결과

균주	세균 분리 효율 (%)
<i>E. corrodens</i> (-)	100
<i>S. mutans</i> (+)	100
<i>S. sobrinus</i> (+)	100
<i>L. casei</i> (+)	90

<실시예 2> 현장형 DNA 추출 프로토콜 선정 및 추출 성능 평가

1. 세균 용해액을 이용한 세균 DNA 추출 효율 평가

원심분리를 사용하지 않고도, 현장에서 빠르고 간편하게 DNA를 추출하기 위한 방법으로 SPRI 방법을 사용하였다. PEG와 NaCl을 이용하여 DNA 가닥을 뭉치게 하고, 카르복실기가 도입된 자성입자 (COOH-자성입자)를 이용하여 DNA와 결합하는 방법으로 Tris-EDTA 버퍼 용액 (pH 8.0)을 이용하여 간단히 DNA를 회수할 수 있다는 장점이 있다.

SPRI 방법에 의한 DNA 추출 효율을 평가하기 위해, QIAamp DNA microbiome kit (Qiagen kit)에서 제시하는 방법으로 처리된 세균 용해액 (*S. mutans*, OD 0.5, 1.0, 2.0)에 대하여 각각 SPRI 방법과 Qiagen 키트의 column (참고 표준)을 이용하여 DNA를 회수한 후 DNA 농도, 순도 (A260/A280), qPCR의 Ct 값을 비교하였다(도 2).

우선, *S. mutans* 세균의 single colony를 액체 영양배지에서 밤샘 배양 후, 다음날 계대배양된 세균 배양액을 OD₆₀₀ 0.5, 1.0, 2.0의 샘플로 준비하고, Qiagen kit에서 제시하는 방법대로 세균을 용해한 후 원심분리 (10,000g, 1분)하여 상층액 (lysate)을 회수하였다. 상층액을 동등한 볼륨으로 나누어 하나는 SPRI 방법으로, 다른 하나는 Qiagen kit 방법으로 DNA를 추출하였다.

SPRI 방법의 경우, 상층액에 최종 1.25 M NaCl, 10% PEG 8000을 처리하고 COOH-자성입자 (400 nm, 0.5 g/25 mL) 100 μL를 첨가한 뒤 tapping하고 상온에서 10분간 반응시킨 후 magnetic separation rack을 이용하여 COOH-자성입자를 회수하고 70% 에탄올 1 mL로 2회 세척한 후 5분간 상온에 두어 에탄올을 제거하였다. DNA 회수를 위해 Tris-EDTA buffer 50 μL (warm at 56°C)를 처리하여 vortex로 혼합하고 상온에서 5분간 반응하여 COOH-자성입자를 제거한 후 용액을 회수하였으며, 회수된 용액은 Nanodrop 측정으로 DNA 농도와 순도를 확인하였다.

추가적으로, 회수된 용액 5 μL를 DNA template으로 사용하여 qPCR을 시행하였다. *S. mutans* probe-primer (Sm PP)를 이용하여 20 μL qPCR 샘플 (5 μL DNA template, 10 μL 2X master mix, 2 μL Sm PP, 3 μL DW)을 이용하여 qPCR 장비 (Open qPCR, Chai Bio)에서 초기 변성 (95°C; 10분-1 cycle)을 시킨 후 2-step PCR (변성 95°C; 15초, 결합 & 신장 60°C; 1분-45 cycles)을 실시하여 Ct 값을 측정하였다.

Qiagen kit 방법의 경우, 상층액을 70°C incubator에서 10분간 반응 후 200 μL 에탄올을 첨가하여 섞어준 후

QIAamp UCP mini column에 점적하였다. 원심분리로 용액을 제거하고, column에 500 μ l AW1 buffer와 AW2 buffer를 이용하여 연속으로 세척 후, 원심분리 (최고 스피드, 1분)로 세척액을 제거하였다. DNA 회수를 위해 AVE buffer 50 μ L를 처리하여 상온에서 5분간 반응하고 원심분리를 이용하여 용액을 회수하였으며, 회수된 용액은 Nanodrop 측정으로 DNA 농도와 순도를 확인하고 qPCR을 수행하여 Ct 값을 측정하였다.

[0064] Nanodrop 측정 결과, SPRI 방법으로 추출된 세균 DNA가 Qiagen kit로 추출된 세균 DNA보다 높은 농도로 측정되어 회수율이 우수하며, DNA 순도도 우수하였다(≥ 1.8). qPCR 결과도 SPRI 방법으로 추출된 DNA가 Qiagen kit 방법으로 추출된 DNA보다 낮은 Ct 값으로 측정되었다(표 5).

[0065] 이는 qPCR에 사용된 초기 DNA 양이 SPRI 방법으로 회수된 DNA 농도가 높았음을 확인할 수 있으며, PCR 증폭 효율의 결과로 SPRI 방법으로 추출된 DNA 내에는 PCR 저해요소가 포함되어 있지 않은 순도 높은 샘플이라 할 수 있다.

표 5

[0066] SPRI 방법과 Qiagen kit로 추출된 DNA의 농도, 순도 및 Ct 값 비교 결과

<i>S. mutans</i>	SPRI 방법			Qiagen kit		
	DNA 농도 (ng/ μ L)	DNA 순도 (A260/A280)	Ct 값	DNA 농도 (ng/ μ L)	DNA 순도 (A260/A280)	Ct 값
OD ₆₀₀ 0.5	24.60 $\pm$ 3.6	1.84 $\pm$ 0.07	16.4 $\pm$ 0.92	16.90 $\pm$ 1.9	2.0 $\pm$ 0.01	18.6 $\pm$ 0.36
OD ₆₀₀ 1.0	38.33 $\pm$ 3.6	1.93 $\pm$ 0.02	15.0 $\pm$ 0.67	26.70 $\pm$ 1.4	2.0 $\pm$ 0.01	17.5 $\pm$ 0.91
OD ₆₀₀ 2.0	89.23 $\pm$ 4.8	1.85 $\pm$ 0.08	13.8 $\pm$ 0.07	38.03 $\pm$ 2.2	2.0 $\pm$ 0.01	16.3 $\pm$ 0.70

[0067] 추가적으로, *S. mutans* 세균 수를 1×10^3 , 1×10^5 , 1×10^7 CFU/mL로 달리하여 처리된 세균 용해액에 대해, 각각 SPRI 방법과 Qiagen kit로 DNA를 분리한 후 각각에서 추출된 DNA의 농도, 순도, Ct 값을 비교 평가하였다.

[0068] 그 결과, SPRI 방법에서 더 낮은 Ct 값을 보여 추출된 세균 DNA의 농도가 더 높은 것을 알 수 있었으며, DNA 순도 또한 우수함 (≥ 1.8)을 확인하였다(표 6).

표 6

[0069] 세균수 별 SPRI 방법과 Qiagen kit로 추출된 DNA 농도, 순도 및 Ct 값 비교 결과

<i>S. mutans</i>	SPRI 방법			Qiagen kit		
	DNA 농도 (ng/ μ L)	DNA 순도 (A260/A280)	Ct 값	DNA 농도 (ng/ μ L)	DNA 순도 (A260/A280)	Ct 값
1×10^3 CFU/mL	3.8	1.82	32.45	1.1	2	32.62
1×10^5 CFU/mL	3.8	1.85	25.99	0.9	2	28.21
1×10^7 CFU/mL	4.2	1.85	20.46	1.3	2	23.36

[0070] <실시예 3> SPRI 기반 DNA 추출을 위한 세균 용해 조건 확립 및 SPRI 용액 최적화

[0071] 1. 세균 용해액 1차 스크리닝

[0072] SPRI 방법을 이용한 DNA 추출에 적합한 세균 용해액을 선정하기 위해, 1차적으로 2 종의 세균 용해액 (표 7)과 상용화된 one-step DNA/RNA extraction buffer (ChaiBio)를 이용하여 세균을 각각 용해한 후 DNA 추출과정은 SPRI 방법으로 동일하게 수행하였다. 회수된 각 용액에 대해 qPCR을 시행하여 Ct 값을 비교하였다. 이때 대조군은 Qiagen kit를 이용하여 세균 용해와 DNA 추출과정이 실시되었다.

표 7

[0073] 2종의 세균 용해액 조성

	세균 용해액	조성
1	SPRI-Lysis buffer 1 (SPRI-LB1)	50 mM Tris-Cl (pH 7.4), 500 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 1% SDS, 2 mM EDTA

2	SPRI-Lysis buffer 2 (SPRI-LB2)	200 mM NaOH, 1% SDS
---	--------------------------------	---------------------

- [0074] *S. mutans* 세균 pellet ($OD_{600} = 1$, 5×10^8 CFU/500 μ L)에 대해, 각각 2종의 세균 용해액과 상용화 one-step buffer (2X) 500 μ L를 추가하고 10분 동안 vortex를 실시하여 세균을 용해시킨 후 원심분리 (10,000 g, 1분) 하여 lysate를 준비하였다.
- [0075] SPRI 방법에 따라, 상층액에 최종 1.25 M NaCl, 10% PEG 8000을 처리하고 COOH-자성입자 100 μ L를 첨가한 뒤 tapping하고 상온에서 10분간 반응시킨 후 magnetic separation rack을 이용하여 COOH-자성입자를 회수하고 70% 에탄올 1 mL로 2회 세척한 후 5분간 상온에 두어 에탄올을 제거하였다. DNA 회수를 위해 Tris-EDTA buffer 50 μ L (warm at 56°C)를 처리하여 vortex로 혼합하고 상온에서 5분간 반응하여 COOH-자성입자를 제거한 후 용액을 회수하였으며, 회수된 용액은 Nanodrop으로 DNA 농도와 순도를 확인하고 Sm pp를 이용하여 qPCR을 수행하고 Ct 값을 측정하였다.
- [0076] 대조군의 경우, Qiagen kit는 위와 동일한 방법으로 DNA를 추출하였으며, 회수된 용액은 동일하게 Nanodrop으로 DNA 농도와 순도를 확인하고 qPCR Ct 값을 측정하였다.
- [0077] 그 결과, SPRI-LB1과 SPRI-LB2 모두 상용화된 one-step buffer 에 비해 낮은 Ct 값을 나타내어 세균 용해력과 함께 SPRI에 더 적합하다는 것을 알 수 있었다. 특히 SPRI-LB2로 세균을 용해하고 SPRI로 DNA를 추출한 경우는 Qiagen kit로 추출된 DNA 농도, 순도 및 Ct값이 모두 유사함을 확인하였다(표 8). 따라서 최종 세균 용해액은 SPRI-LB2로 선정하였다.

표 8

- [0078] *S. mutans* pellet을 이용한 SPRI용 세균 용해액 스크리닝 결과

Parameters	세균 용해액 종류 (DNA 추출은 SPRI 방법으로 동일)			Qiagen kit
	SPRI-LB1	SPRI-LB2	One-step buffer	
DNA 농도 (ng/ μ L)	4.5	11.2	18.3	12.1
DNA 순도 (A260/A280)	0.8	2	0.8	2
qPCR Ct 값	19.21	16.45	20.45	16.55

- [0079] 2. 세균 용해액 SPRI-LB2의 농도 최적화
- [0080] 실제 타액 샘플 분석에 활용할 수 있도록 세균 용액 500 μ L 에 대해, SPRI-LB2 500 μ L (1:1) 추가되는 조건에서 SPRI-LB2의 농도 변화에 따른 DNA 추출 효율을 비교하였다.
- [0081] 400 mM NaOH와 2% SDS으로 제조된 SPRI-LB2(1X)를 기준으로, 각각 2배 (0.5X), 4배 (0.25X), 8배 (0.125X), 40배 (0.025X) 희석하여 제조된 용액을 이용하여, *S. mutans* 세균 ($OD_{600} = 1$) 500 μ L에 각각의 SPRI-LB2 용액 500 μ L (total 1 mL)를 추가하고 10분 동안 vortex를 실시하여 세균을 용해시킨 후 원심분리 (10,000 g, 1분)하여 lysate를 준비하였다.
- [0082] 위와 동일하게 SPRI 방법을 사용하여 최종 용액을 회수하였으며, 회수된 용액은 Nanodrop으로 DNA 농도와 순도를 확인하고 Sm pp를 이용하여 qPCR을 수행하고 Ct값을 측정하였다.
- [0083] 그 결과, 0.025X의 SPRI-LB2 용액에서 가장 많은 양의 DNA가 회수되었으며, DNA 순도는 0.125X ~ 1X 모두에서 1.8 이상으로 나타났다. 또한 0.025X의 SPRI-LB2 용액에서 가장 낮은 Ct 값을 나타내어 가장 많은 세균 DNA가 추출되었음을 확인하였다. 따라서 SPRI-LB2의 최종 농도 (total 1 mL 기준)는 50 mM NaOH와 0.25% SDS 로 최적화하였다(도 3).
- [0084] 3. SPRI-LB2로 용해된 세균 DNA 추출을 위한 SPRI 용액의 최적화
- [0085] 최종 농도 기준 50 mM NaOH와 0.25% SDS의 SPRI-LB2 용액으로 처리된 세균 용액에서 세균 DNA를 효과적으로 추출하기 위해, SPRI 용액을 구성하는 PEG의 농도를 변화시켜서 DNA 추출 효율을 비교하였다.

[0086] *S. mutans* 세균 (OD₆₀₀ = 1) 500 μ L에 SPRI-LB2 용액 500 μ L (최종 농도: 50 mM NaOH, 0.25% SDS)를 추가하고 위와 동일하게 10분 동안 vortex를 실시하여 세균을 용해시킨 후 원심분리 (10,000 g, 1분)하여 상층액을 준비하였다.

[0087] SPRI 용액 내 PEG 농도에 따른 차이를 확인하기 위하여, 준비된 상층액에 PEG 8000의 최종 농도가 각각 0, 5, 10, 15%가 되도록 첨가하고, 각각에 동일하게 1.25 M NaCl과 COOH-자성입자 100 μ L를 추가한 후 tapping하고 상온에서 10분간 반응시켰다. Magnetic separation rack을 이용하여 COOH-자성입자를 회수하고 70% 에탄올 1 mL로 2회 세척한 후 5분간 상온에 두어 에탄올을 제거하였다. DNA 회수를 위해 Tris-EDTA buffer 50 μ L (warm at 56°C)를 처리하여 vortex로 혼합하고 상온에서 5분간 반응하여 COOH-자성입자를 제거한 후 용액을 회수하였으며, 회수된 용액은 Nanodrop으로 DNA 농도와 순도를 확인하고 Sm pp를 이용하여 qPCR을 수행하고 Ct 값을 측정하였다.

[0088] 그 결과, PEG 8000은 10% 이상 되어야 1.8 이상의 순도를 가지는 DNA가 추출되었으며, 특히 10%에서 가장 낮은 Ct 값을 나타내어 가장 많은 세균 DNA가 추출되었음을 알 수 있었다. 따라서 SPRI 용액의 최종 농도는 10% PEG 8000과 1.25 M NaCl로 선정하였다(표 9).

표 9

[0089] SPRI 용액 내 PEG 8000의 농도 변화에 따른 추출 DNA 농도, 순도 및 qPCR Ct 값 결과

Parameters	PEG 8000 농도 (%)			
	0	5	10	15
DNA 농도 (ng/ μ L)	1.2	1.4	6.3	5.9
DNA 순도 (A260/A280)	1.37	1.52	2.05	2
Ct 값	22.74	22.66	15.31	16.08

[0090] <실시예 4> 비원심 기반의 3-step 전처리를 위한 프로토콜 최적화

[0091] 1. 세균 용해시 물리적 자극 최적화

[0092] 현장에서 특별한 도구를 사용하지 않고도 빠르고 간편하게 DNA를 추출하기 위한 방법을 구현하기 위해, 우선 물리적 자극 방법을 최적화하였다.

[0093] *S. mutans* 세균 (OD₆₀₀ = 1) 500 μ L에 SPRI-LB2 용액 500 μ L (최종 농도: 50 mM NaOH, 0.25% SDS)를 추가하고 10분간의 세균 용해시 1) 그대로 두는 경우, 2) 총 5회 vortexing (시작 시 1회 실시 후 2분 30초 간격), 3) 계속 vortexing 하는 방법을 비교해 본 결과, 그대로 두는 경우에서 가장 높은 Ct 값을 나타내었고, 중간중간 vortex를 하여 총 5회 자극을 주는 경우는 10분간 계속해서 자극을 주는 경우와 유사한 Ct 값을 나타내었다(표 10).

[0094] 따라서, vortexing은 tapping 과 같은 자극으로 대체하고, 간헐적으로 자극을 주는 것이 현장형 전처리 모듈 구성에 가장 적합할 것으로 판단되었다.

표 10

[0095] 세균 용해 시 물리적 자극 차이에 따른 추출 DNA 농도, 순도 및 qPCR Ct 값 결과

Parameters	물리적 자극 여부		
	그대로 두는 경우 (무자극)	5회 자극	연속적으로 자극
DNA 농도 (ng/ μ L)	8.7	7.9	7.7
DNA 순도 (A260/A280)	2.05	2.05	1.95
Ct 값	18.13	17	16.49

[0096] 2. 세균 용해 후 불순물 제거과정 최적화

[0097] 원심분리기를 사용하지 않고 현장에서 쉽고 빠르게 전처리를 시행하기 위해, 불순물 제거과정을 최적화하였다.

[0098] *S. mutans* 세균 ($OD_{600} = 1$) 500 μ L에 SPRI-LB2 용액 500 μ L (최종 농도: 50 mM NaOH, 0.25% SDS)를 추가하고 10분간의 세균 용해 후, 1) 원심분리 하지 않은 경우와 2) 원심분리를 하여 상층액을 사용하는 경우, 원심분리 대신 2종류의 실린지 필터를 사용한 경우를 비교하였다. 이 때 실린지 필터는 각각 0.45 μ m pore 크기를 가지는 폴리프로필렌 (pp)과 나일론을 사용하였다.

[0099] 그 결과, 원심분리를 하지 않은 경우 추출된 DNA의 순도가 가장 낮았다. 원심분리 대신 필터를 사용한 경우 폴리프로필렌에서 가장 낮은 Ct 값을 보였고, DNA 순도 역시 1.8 이상으로 우수하였다(표 11).

[0100] 따라서, 원심분리를 하지 않고, 폴리프로필렌 필터를 사용하는 것이 현장형 전처리 모듈 구성에 가장 적합할 것으로 판단되었다.

표 11

[0101] 세균 용해 후 불순물 제거방법에 따른 추출 DNA 농도, 순도 및 qPCR Ct 값 결과

Parameters	원심분리나 필터를 사용하지 않은 경우	원심분리	필터 (0.45 μ m)	
			폴리프로필렌	나일론
DNA 농도 (ng/ μ L)	41	9.6	12.3	21.4
DNA 순도 (A260/A280)	1.56	1.87	2.02	1.69
Ct 값	15.38	15.05	14.87	15.7

[0102] 3. 용출액 부피 및 추출 시간 최적화 (상온 기준)

[0103] 위의 SPRI 추출 방법에서는 최종 DNA 회수를 위해 56도로 데워진 Tris-EDTA buffer 50 μ L 를 사용하여 상온에서 5분간 반응하여 용액을 회수하였다. 용출액의 온도가 높으면 DNA 용출 속도가 빠르긴 하지만, 현장에서의 사용성을 고려해야 하기 때문에 상온의 용출액을 사용하는 대신 용출 시간을 증가시켰다. 또한, 전처리 도구 상에서 50 μ L 와 같은 작은 부피의 회수는 오차가 크게 발생할 수 있어 부피를 증가시켰다.

[0104] 우선, 상온에서 5분간 용출하는 것을 기준으로, Tris-EDTA buffer의 부피를 각각 100과 200 μ L 로 변화시켜, 추출된 DNA의 양과 순도를 측정하였다.

[0105] 그 결과, 100과 200 μ L 모두 1.8 이상의 순도를 가지는 DNA가 추출되었다.

[0106] 추가적으로, 100 μ L를 기준으로 상온에서 각각 5, 10, 20분간 추출하였을 때 회수된 DNA의 농도와 순도를 측정해 본 결과, 모두 1.8 이상의 순도를 가지는 DNA 가 추출되었고 시간이 증가할수록 회수된 DNA 농도가 증가하였으나 10분 이후 증가폭은 그리 크지 않아, 현장에서의 사용성을 고려하여 최종적으로 상온 상태의 Tris-EDTA buffer 100 μ L 로 상온에서 10분간 추출하는 것으로 선정하였다(표 12).

표 12

[0107] 용출액을 이용한 용출 시간 변화에 따른 추출 DNA 농도 및 순도 결과

Parameters	용출 시간 (분) - 상온 100 μ L 기준		
	5	10	20
DNA 농도 (ng/ μ L)	6.72 $\pm$ 0.22	7.17 $\pm$ 0.84	7.95 $\pm$ 1.03
DNA 순도 (A260/A280)	1.84 $\pm$ 0.07	1.91 $\pm$ 0.12	1.83 $\pm$ 0.10

[0108] 4. 비원심 기반의 세균 DNA 추출 프로토콜 확립

[0109] 현장에서 원심분리를 사용하지 않고 간편하게 세균 DNA를 추출하기 위한 프로토콜을 다음과 같이 확립하였다.

[0110] - 세균 용해액 최종 농도: 50 mM NaOH, 0.25% SDS

[0111] - 세균 용해 시간, 온도 및 물리적 자극: 10분, 상온, 총 5회 자극 (간헐적 자극)

[0112] - 세균 용해 후 불순물 제거: 폴리프로필렌 실린지 필터 (0.45 μ m)

[0113] - DNA 결합을 위한 SPRI 용액 최종 농도: 10% PEG 8000, 1.25 M NaCl (-COOH 자성입자 추가)

- [0114] - DNA 결합 시간: 10분
- [0115] - 세척: 70% 에탄올 1 mL, 2회
- [0116] - 건조: 5분 이상
- [0117] - 용출액: Tris-EDTA buffer 100 μ L
- [0118] - 용출시간: 상온 10분
- [0119] <실시예 5> 세균 특이 펩타이드 Odor-마이크로입자와 아민 나노입자를 이용하여 분리된 세균에 대한 비원심 기반의 DNA 추출
- [0120] 1. 소프트 튜브 (soft tube)형 세균 분리 도구와 자석을 이용한 세균 분리
- [0121] 소량의 타액 시료에서 세균을 분리하기 위하여 선행출원 (한국특허출원 제10-2022-0090339호)에서 제시한 소프트 튜브형 세균 분리도구를 사용하였다. 폴리에틸렌 (PE) 소재의 필터가 내장된 소프트 튜브 (PVC 재질)를 이용하여 세균 펩타이드 Odor-마이크로입자와 아민 자성입자를 추가한 뒤 세균을 넣고 상온에서 반응시킨 후, magnetic rack을 이용하여 아민 나노입자를 고정된 상태에서 소프트 튜브를 손으로 누르게 되면 세균과 결합한 Odor-마이크로입자는 PE 필터를 통과하지 못하고 튜브 내에 남게 되고 나머지 용액은 쉽게 제거될 수 있다. 또한, 이후 세척 과정에서도 편리하게 활용될 수 있다(도 4).
- [0122] 2. 세균 DNA에 대한 qPCR 분석을 위한 Odor-마이크로입자의 농도 최적화
- [0123] 수집되는 타액량 1 mL을 기준으로, 세균 포획 분리를 위해 사용되는 Odor-마이크로 입자의 농도를 최적화하였다.
- [0124] 우선, 아민기가 도입된 자성 나노입자 (400 nm, 0.5 g/25 mL) 1.6 mL을 1× PBS 500 μ L로 세척하고 용액을 제거하였다.
- [0125] 소프트 튜브에 Odor-마이크로 입자를 각각 0.0625, 0.125, 0.25 mg/500 μ L (1X PBS, pH 7.4)이 되도록 추가하고, 준비된 아민 자성 나노입자를 혼합한 후 세균 *S. mutans* 용액 1 mL (1×10^7 CFU/mL)을 넣은 후 상온에서 15분간 rocking 하면서 반응시켰다.
- [0126] 자석을 이용하여 세균과 결합한 아민 자성 나노입자를 고정된 후 소프트 튜브를 손으로 눌러 용액을 제거하고 세균과 결합한 Odor-마이크로 입자를 남긴다. 이 때, 튜브를 통과하여 나온 용액은 1X PBS, 0.1% BSA 용액으로 연속 희석하고 *S. mutans* 세균 영양배지 agar plate에 도말 후 생성된 세균의 colony를 계수하여 세균 분리 효율을 평가하였다.
- [0127] 세균과 결합한 Odor-마이크로 입자와 아민 자성 나노입자가 남아있는 소프트 튜브에 PBS 용액 1 mL을 추가한 후 동일하게 자석과 튜브 내 필터를 이용하여 세척액을 제거하는 방식으로 3회 세척하였다.
- [0128] 이와 같이 분리된 세균에 대해, 실시예 2에서 확립된 세균 DNA 추출 프로토콜 중 DNA 결합조건을 적용하여 DNA를 회수하였다. 즉 세균과 결합한 Odor-마이크로 입자와 아민 자성 나노입자가 들어있는 소프트 튜브에 SPRI-LB-2 세균 용해액 500 μ L (최종 농도 200 mM NaOH, 1% SDS)을 첨가한 후 상온에서 10분간 용해시켰다. 이때 첫 1회를 포함하여 2분 30초 간격으로 총 5회 tapping 하면서 자극을 준다. 용해된 세균 용액은 폴리프로필렌 필터가 도입된 실린지에 넣은 후 자석을 이용하여 남아있는 아민 자성나노입자를 고정된 뒤 플런저로 눌러 필터를 통과시켜 새로운 microtube 에 용액만을 회수하였다. 회수된 용액에 최종농도가 10% PEG 8000, 1.25 M NaCl 용액이 되도록 1:1 비율로 추가하고 -COOH 자성입자 100 μ L를 넣은 후 상온에서 10분간 반응시켰다. 자석을 이용하여 자성입자를 고정된 뒤 용액을 제거하고 70% 에탄올 1 mL로 2회 세척한 뒤 5분간 건조시켰다. Tris-EDTA buffer 50 μ L를 첨가한 후 상온에서 5분간 용출시킨 후 자석을 이용하여 자성입자를 고정된 뒤 최종적으로 DNA 용액을 회수하였다.
- [0129] 회수된 용액 5 μ L를 DNA template으로 사용하여 qPCR을 시행하였다. Sm PP를 이용하여 20 μ L qPCR 샘플 (5 μ L DNA template, 10 μ L 2X master mix, 2 μ L Sm PP, 3 μ L DW)을 이용하여 qPCR 장비 (Open qPCR, Chai Bio)에서 초기 변성 (95°C; 10분-1 cycle)을 시킨 후 2-step PCR (변성 95°C; 15초, 결합 & 신장 60°C; 1분-45 cycles)을 실시하여 Ct값을 측정하였다.
- [0130] 우선, colony counting을 통해 세균 분리 효율을 확인해 본 결과, Odor-마이크로입자 0.0625 mg/500 μ L를 사용한 경우 91%의 분리 효율을 나타낸 반면 0.125와 0.25 mg/500 μ L에서는 모두 100% 분리되었다. 하지만, 0.5

mg/500 μ L로 증가하게 되면 오히려 세균 분리 효율이 95%로 감소되었다(표 13).

[0131] 또한, qPCR Ct 값을 확인해 본 결과, 0.25 mg/500 μ L까지는 Odor-마이크로입자 양이 증가할수록 Ct 값이 낮아졌으나, 0.125 mg/500 μ L 이상에서는 큰 차이를 나타내지는 않았다(표 13).

[0132] 따라서, 100%의 세균 분리 효율을 나타내면서 가장 낮은 Ct 값을 보인 0.25 mg/500 μ L를 최적 농도로 선정하였다.

표 13

[0133] Odor-마이크로입자의 농도에 따른 *S. mutans* 분리 효율과 qPCR Ct 값 결과

Parameters	Odor-마이크로입자 농도 (mg/500 μ L)				
	Control (0)	0.0625	0.125	0.25	0.5
<i>S. mutans</i> 분리 효율(%)	-	91	100	100	95
qPCR Ct 값	30.02	24.66	23.69	23.63	23.68

[0134] 3. Odor-마이크로입자와 아민 나노입자를 이용해 분리된 세균에 대한 용해조건 최적화

[0135] Odor-마이크로입자와 아민 자성 나노입자를 이용해 분리된 세균에 대해, 실시예 2에서 확립된 세균 DNA 추출 프로토콜 중 세균 용해조건과 DNA 회수조건을 추가 적용하여 DNA를 회수하고 qPCR의 Ct 값을 비교하였다.

[0136] 우선, *S. mutans* 세균 (1×10^7 CFU/mL)과 결합한 Odor-마이크로 입자 (0.25 mg/500 μ L)와 아민 자성 나노입자가 들어있는 소프트 튜브에 SPRI-LB-2 세균 용해액 500 μ L를 추가할 때, 최종 농도를 각각 1) 200 mM NaOH, 1% SDS 와 2) 50 mM NaOH, 0.25% SDS로 다르게 하여 상온에서 10분간 용해시켰다. 이때 2분 30초 간격으로 총 5회 vortexing 하였고, 용해된 세균 용액은 위와 동일하게 10% PEG 8000, 1.25 M NaCl 용액과 -COOH 자성입자로 DNA 결합 후 Tris-EDTA buffer 50 μ L를 첨가한 후 상온에서 5분간 용출시키는 방법으로 DNA를 회수하여 Sm pp를 이용하여 qPCR을 시행하여 Ct 값을 측정하였다.

[0137] 그 결과, 200 mM NaOH, 1% SDS 의 용해액 (Ct = 23.64)보다는, 실시예 2에서 확립된 조건과 동일한 50 mM NaOH, 0.25% SDS (최종 농도) 용액에서 더 낮은 Ct 값 (Ct = 23.41)을 나타내었다.

[0138] 하지만, 상용화된 Qiagen kit를 통해 회수한 DNA 용액에서 측정되는 qPCR Ct 값 (16.29)에 비해 높은 Ct 값을 나타내는데, 이는 상온에서 10분간의 용해 조건에서 세균 용해 효율이 다소 떨어지기 때문으로 판단되므로, 세균 용해 효율을 향상시킬 필요가 있다.

[0139] 세균 용해 효율을 향상시키기 위해, 세균 용해액의 부피를 1 mL로 증가시키고 상온에서 10분 간 용해시 물리적 자극 정도를 각각 1) 2회 tapping, 2) 2회 vortexing, 3) 5회 vortexing (2분 30초 간격), 4) 11회 vortexing (1분 간격)으로 변화시키면서 용해시켰다.

[0140] 각각의 용액은 위와 동일하게 10% PEG 8000, 1.25 M NaCl 용액과 -COOH 자성입자로 DNA 결합 후, 실시예 2에서 확립된 DNA 회수 조건인 Tris-EDTA buffer 100 μ L를 첨가한 후 상온에서 10분간 용출시키는 방법으로 DNA를 회수하여 Sm pp를 이용하여 qPCR을 시행하여 Ct 값을 측정하였다.

[0141] 그 결과, 세균 용해액 부피 증가로 인해 이전보다 전체적으로 Ct 값이 낮아졌으며, tapping 보다는 vortexing에서 더 낮은 Ct 값을 보였다. 5회 vortexing을 시행하여 회수한 용액에서 가장 낮은 Ct 값을 나타내었으나 vortexing 회수에 따른 Ct 값의 차이는 크지 않았다(표 14).

표 14

[0142] 세균 용해시 자극 정도를 달리하여 회수한 시료에 대한 qPCR Ct 값 결과

Parameter	세균 용해시 자극 정도			
	2회 tapping	2회 vortexing	5회 vortexing	11회 vortexing
qPCR Ct 값	21.02	20.39	19.92	20.05

[0143] 하지만 현장에서 vortex mixer를 사용하지 않고 세균을 용해하기 위해 tapping을 사용하였으며, tapping 회수를 증가시켜 1) 2회 tapping 과 2) 5회 tapping을 실시한 후 회수한 DNA 용액에 대해 각각 DNA 순도와 Sm pp를 이

용한 qPCR Ct 값을 측정하여 비교한 결과, 둘 다 DNA 순도는 1.8 이상으로 우수하였고, Ct 값은 5번 tapping 한 경우가 더 낮았다(표 15).

[0144]

표 15

[0145]

세균 용해시 tapping 횟수를 달리하여 회수한 DNA 용액의 순도와 qPCR Ct 값 결과

Parameters	positive control	Tapping 횟수	
		2회	5회
DNA 순도 (A260/A280)	-	1.86	1.84
qPCR Ct 값	16.89	21.48	20.76

[0146]

4. Odor-마이크로입자 기반의 3-step 전처리 방법과, 상용화된 키트로 회수된 DNA 용액에 대한 비교 평가

[0147]

S. mutans 세균 (1×10^7 CFU/mL) 용액에 대해 Odor-마이크로입자와 아민 자성 나노입자를 이용해 분리된 세균을 이용하여 세균 용해와 DNA 추출과정을 통해 최종 회수된 DNA 용액을 각각 0.1, 1, 10, 100, 1000, 10000 ng 으로 희석 제조하여 qPCR을 시행하였다.

[0148]

대조군으로, 상용화된 Qiagen kit를 이용하여 동일한 세균수의 용액에 대해 전처리하여 회수된 DNA 용액을 위와 동일한 농도로 희석하여 qPCR을 시행하였다.

[0149]

Sm PP를 이용하여 20 μ L qPCR 샘플 (5 μ L DNA template, 10 μ L 2X master mix, 2 μ L Sm PP, 3 μ L DW)을 이용하여 qPCR 장비 (Open qPCR, Chai Bio)에서 초기 변성 (95 $^{\circ}$ C; 10분-1 cycle)을 시킨 후 2-step PCR (변성 95 $^{\circ}$ C; 15초, 결합 & 신장 60 $^{\circ}$ C; 1분-45 cycles)을 실시하여 Ct 값을 측정하였다.

[0150]

두 방법으로 전처리된 DNA에 대해 농도별 Ct 값을 plat 해 본 결과, Qiagen kit로 얻어진 DNA는 3.3517 의 slope ($R^2 = 0.9986$)을 나타내어 98.8%의 PCR efficiency를 나타내었고, 3-step 전처리로 얻어진 DNA는 3.4543 의 slope ($R^2 = 0.9991$)을 나타내어 94.8%의 PCR efficiency를 나타내었다. Qiagen kit에서 회수된 DNA를 기준으로 하여 상대적인 효율을 비교하면, 3-step 전처리의 PCR 효율은 Qiagen kit의 약 96%이며, 전체 전처리 과정에 소요되는 시간과 사용의 편리성 등을 종합적으로 고려할 때 매우 우수한 전처리 효율을 가짐을 확인할 수 있었다(도 5).

[0151]

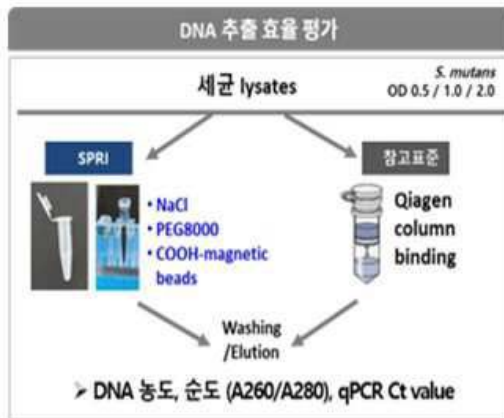
이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

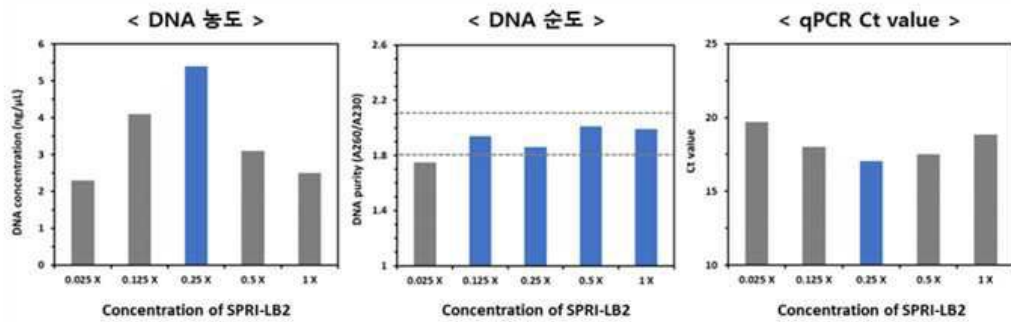
도면1



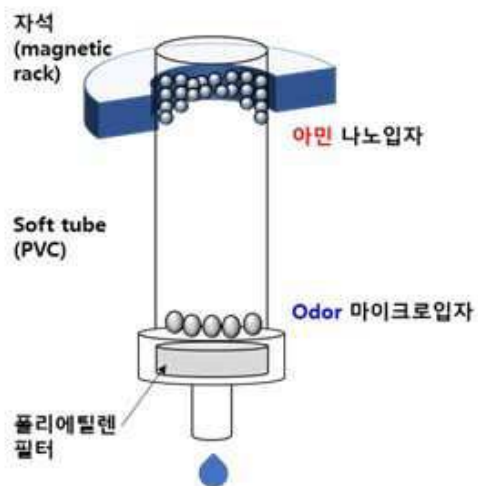
도면2



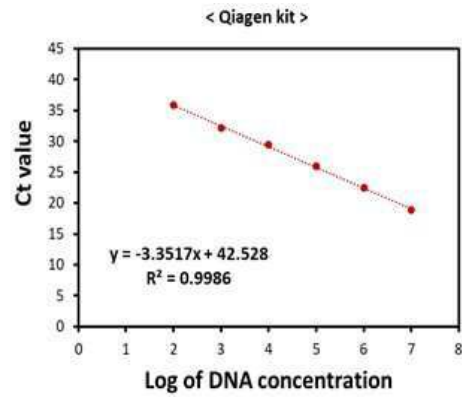
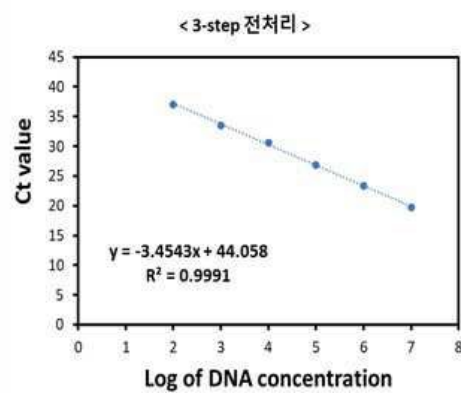
도면3



도면4



도면5



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.