

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2024-0013937
(43) 공개일자 2024년01월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 7/08 (2006.01) C07K 14/00 (2006.01)
C12Q 1/24 (2017.01)
(52) CPC특허분류
C07K 7/08 (2013.01)
C07K 14/001 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0090339
(22) 출원일자 2022년07월21일
심사청구일자 2022년07월21일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
이기자
서울특별시 노원구 덕릉로 517, 105동 1208호(중계동, 중계건영2차아파트)
이영주
서울특별시 노원구 마들로3길 37, 402동 910호(월계동, 성원아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

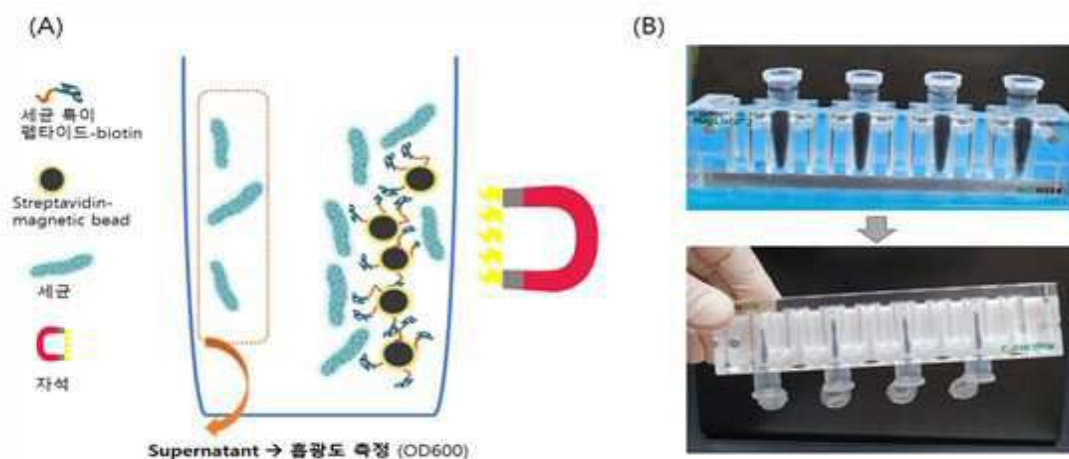
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 세균 특이 펩타이드를 이용한 병원성 세균 분리 방법

(57) 요약

본 발명은 세균 특이 펩타이드를 이용한 병원성 세균 분리 방법에 관한 것으로서, 상세하게는, 세균 외막에 존재하는 주요 구성 요소와 결합력이 우수한 펩타이드를 이용하여 시료에서 병원성 세균들만을 포획, 분리하는 방법에 대한 것이다. 현장에서 빠르고 간편한 구강 내 세균 신속검사를 위한 검체 전처리 프로토콜 및 현장형 시료 전처리 도구로 개발하여 현장진단에 활용 가능하며, 병원성 세균에 대한 포획 및 분리 파트만을 분리하여 도구화하게 되면 시료 내 존재하는 세균을 효과적으로 제거 가능한 시료 정제 도구로도 활용 가능하다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Q 1/24 (2013.01)

(72) 발명자

안병기

서울특별시 동대문구 외대역동로 63-12, 101동
2003호(휘경동, 이문휘경 지웰에스테이트)

김근대

서울특별시 동대문구 외대역동로 63-12, 101동
2001호(휘경동, 이문휘경 지웰에스테이트)

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	경희대학교산학협력단
연구기간	2020.09.01 ~ 2024.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 표시된 아미노산 서열, 서열번호 3으로 표시된 아미노산 서열 또는 서열번호 4로 표시된 아미노산 서열로 이루어진 병원성 세균 분리용 펩타이드.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 서열번호 1로 표시된 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드는 그람음성균 분리용인 것을 특징으로 하고, 상기 서열번호 3으로 표시된 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드는 그람양성균 분리용인 것을 특징으로 하는 병원성 세균 분리용 펩타이드.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 그람음성균은 아이케넬라 코로덴스(*Eikenella corrodens*)이고, 상기 그람양성균은 스트렙토코커스 소브리누스(*Streptococcus sobrinus*), 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*) 또는 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) 인 것을 특징으로 하는 병원성 세균 분리용 펩타이드.

청구항 4

제1항의 펩타이드 및 링크 아마이드 수지(link amide resin)가 결합된 병원성 세균 분리용 펩타이드-마이크로입자.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 링크 아마이드 수지는 폴리스티렌(polystyrene; PS) 수지인 것을 특징으로 하는 병원성 세균 분리용 펩타이드-마이크로입자.

청구항 6

제1항의 펩타이드 또는 제4항의 펩타이드-마이크로입자를 유효성분으로 포함하는 병원성 세균 분리용 조성물.

청구항 7

제1항의 펩타이드 또는 제4항의 펩타이드-마이크로입자; 및 아민 나노입자를 유효성분으로 포함하는 병원성 세균 분리용 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 아민 나노입자는 아민 자성나노입자인 것을 특징으로 하는 병원성 세균 분리용 조성물.

청구항 9

제6항 내지 제8항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 병원성 세균 분리용 키트.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 키트는 실린지형 또는 소프트 튜브형인 것을 특징으로 하는 병원성 세균 분리용 키트.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 실린지형은 폴리스티렌(polystyrene; PS) 플레이트(plate)가 장착된 것을 특징으로 하고, 상기 소프트 튜브형은 폴리에틸렌(polyethylene; PE) 필터가 장착된 것을 특징으로 하는 병원성 세균 분리용 키트.

청구항 12

제6항 내지 제8항 중 어느 한 항의 조성물을 시료와 접촉시켜 반응시키는 단계를 포함하는 병원성 세균 분리 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 시료는 타액인 것을 특징으로 하는 병원성 세균 분리 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 세균 특이 펩타이드를 이용한 병원성 세균 분리 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. 뿐만 아니라, 치주질환은 당뇨, 심혈관질환, 치매 등 전신질환의 발병위험을 높이는 것으로 알려졌고 류마티스관절염의 경우 1.93 배까지 발병위험이 높아지는 것으로 보고되었다. 이는 치주염을 일으키는 대표적인 그람음성 혐기성 세균인 *Porphyromonas gingivalis*가 peptidylarginine deiminase(PADs)를 분비하여 류마티스관절염의 항CCP 항체(anti-cyclic citrullinated peptide Ab) 생성에 기여하기 때문으로 알려져있다. 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 NGS 기술의 발달로 구강 세균에 대한 정보가 증가되었고 real-time PCR 기술을 이용하여 임상 검체에서 세균을 검출하고 정량적으로 분석하는 방법이 활발히 사용되고 있다. 현재 타액 내 존재하는 구강 세균에 대한 정량 검사가 일부 치과 병의원에서 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.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-2260012호(2021.05.28 등록)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 세균 특이 펩타이드로 이루어진 병원성 세균 분리용 펩타이드, 병원성 세균 분리용 펩타이드-마이크로입자, 상기 펩타이드 또는 상기 펩타이드-마이크로입자를 유효성분으로 포함하는 병원성 세균 분리용 조성물, 상기 펩타이드 또는 상기 펩타이드-마이크로입자; 및 아민 나노입자를 유효성분으로 포함하는 병원성 세균 분리용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 병원성 세균 분리용 키트 및 상기 조성물을 시료와 접촉시켜 반응시키는 단계를 포함하는 병원성 세균 분리 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1로 표시된 아미노산 서열, 서열번호 3으로 표시된 아미노산

서열 또는 서열번호 4로 표시된 아미노산 서열로 이루어진 병원성 세균 분리용 펩타이드를 제공한다.

- [0007] 또한, 본 발명은 상기 펩타이드 및 링크 아마이드 수지(link amide resin)가 결합된 병원성 세균 분리용 펩타이드-마이크로입자를 제공한다.
- [0008] 또한, 본 발명은 상기 펩타이드 또는 상기 펩타이드-마이크로입자를 유효성분으로 포함하는 병원성 세균 분리용 조성물을 제공한다.
- [0009] 또한, 본 발명은 상기 펩타이드 또는 상기 펩타이드-마이크로입자; 및 아민 나노입자를 유효성분으로 포함하는 병원성 세균 분리용 조성물을 제공한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 병원성 세균 분리용 키트를 제공한다.
- [0011] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 시료와 접촉시켜 반응시키는 단계를 포함하는 병원성 세균 분리 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0012] 본 발명은 세균 특이 펩타이드를 이용한 병원성 세균 분리 방법에 관한 것으로서, 상세하게는, 세균 외막에 존재하는 주요 구성 요소와 결합력이 우수한 펩타이드를 이용하여 시료에서 병원성 세균들만을 포획, 분리하는 방법에 대한 것이다. 현장에서 빠르고 간편한 구강 내 세균 신속검사를 위한 검체 전처리 프로토콜 및 현장형 시료 전처리 도구로 개발하여 현장진단에 활용 가능하며, 병원성 세균에 대한 포획 및 분리 파트만을 분리하여 도구화하게 되면 시료 내 존재하는 세균을 효과적으로 제거 가능한 시료 정제 도구로도 활용 가능하다.

도면의 간단한 설명

- [0013] 도 1은 세균 특이 펩타이드의 성능 평가 과정을 나타낸다. (A) 세균 특이 펩타이드를 이용한 세균 분리 실험 방법의 개략도, (B) Magnetic separation rack을 이용한 세균 포획 및 분리.
- 도 2는 LBP의 그람음성균 분리 효율 평가 결과를 나타낸다.
- 도 3은 Leuco의 그람양성균과 그람음성균에 대한 분리 효율 평가 결과를 나타낸다.
- 도 4는 Odor의 그람양성균과 그람음성균에 대한 분리 효율 평가 결과를 나타낸다.
- 도 5는 OAK의 그람양성균과 그람음성균에 대한 분리 효율 평가 결과를 나타낸다.
- 도 6은 NH_2 -자성 비드(magnetic bead)의 부피(volume)에 따른 4종 균주의 분리 효율 평가 결과를 나타낸다.
- 도 7은 COOH -자성 비드(magnetic bead)의 부피(volume)에 따른 4종 균주의 분리 효율 평가 결과를 나타낸다.
- 도 8은 세균 특이 펩타이드와 아민기를 이용한 세균 분리 효율 평가법인 agar plate counting 방법을 나타낸다.
- 도 9는 Leuco를 이용한 그람양성균과 그람음성균에 대한 2차 세균 분리 효율 평가 결과를 나타낸다.
- 도 10은 Odor를 이용한 그람양성균과 그람음성균에 대한 2차 세균 분리 효율 평가 결과를 나타낸다.
- 도 11은 세균 특이 펩타이드-마이크로입자를 이용한 세균 분리 효율 평가법을 나타낸다.
- 도 12는 세균 특이 펩타이드-마이크로입자를 이용한 소프트 튜브(soft tube) 형 세균 분리 도구를 나타낸다.
- 도 13은 세균 특이 펩타이드-마이크로입자와 아민 자성나노입자 혼합 사용을 위한 세균 분리 도구를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0014] 본 발명은 서열번호 1로 표시된 아미노산 서열, 서열번호 3으로 표시된 아미노산 서열 또는 서열번호 4로 표시된 아미노산 서열로 이루어진 병원성 세균 분리용 펩타이드를 제공한다.
- [0015] 바람직하게는, 상기 서열번호 1로 표시된 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드는 그람음성균 분리용인 것을 특징으로 하고, 상기 서열번호 3으로 표시된 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드는 그람양성균 분리용일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0016] 보다 자세하게는, 상기 그람음성균은 아이케넬라 코로덴스(*Eikenella corrodens*)이고, 상기 그람양성균은 스트렙토코커스 소브리누스(*Streptococcus sobrinus*), 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*) 또는 락토바

실러스 카제이(*Lactobacillus casei*)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0017] 또한, 본 발명은 상기 펩타이드 및 링크 아마이드 수지(rink amide resin)가 결합된 병원성 세균 분리용 펩타이드-마이크로입자를 제공한다.
- [0018] 바람직하게는, 상기 링크 아마이드 수지는 폴리스티렌(polystyrene; PS) 수지일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0019] 또한, 본 발명은 상기 펩타이드 또는 상기 펩타이드-마이크로입자를 유효성분으로 포함하는 병원성 세균 분리용 조성물을 제공한다.
- [0020] 또한, 본 발명은 상기 펩타이드 또는 상기 펩타이드-마이크로입자; 및 아민 나노입자를 유효성분으로 포함하는 병원성 세균 분리용 조성물을 제공한다.
- [0021] 바람직하게는, 상기 아민 나노입자는 아민 자성나노입자일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0022] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 병원성 세균 분리용 키트를 제공한다. 상기 키트에는 효과적인 병원성 세균 분리에 필요한 pH 조절 등을 위한 완충액 등이 추가적으로 포함될 수 있다.
- [0023] 바람직하게는, 상기 키트는 실린지형 또는 소프트 튜브형일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0024] 보다 바람직하게는, 상기 실린지형은 폴리스티렌(polystyrene; PS) 플레이트(plate)가 장착된 것을 특징으로 하고, 상기 소프트 튜브형은 폴리에틸렌(polyethylene; PE) 필터가 장착될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0025] 상기 키트는 단일 조성물일 수 있거나, 병원성 세균 분리용 조성물의 개별 성분을 사용 전 혼합을 위해 개별적으로 보관할 수 있다. 이처럼, 본 발명의 키트 내의 병원성 세균 분리용 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.
- [0026] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 시료와 접촉시켜 반응시키는 단계를 포함하는 병원성 세균 분리 방법을 제공한다.
- [0027] 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.
- [0028] 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.
- [0029] <실시예 1> 세균 분리를 위한 세균 특이 펩타이드 및 화학 작용기 선정
- [0030] 1. 세균 특이 펩타이드 제작
- [0031] 세균 특이 펩타이드 후보군으로 i) 다종의 병원성 세균 표면을 인식하는 혈장 면역 단백질(c-reactive protein, lipopolysaccharide (LPS)-binding protein, mannose binding lectin 등)의 역할을 하는 lipopolysaccharide (LPS)-binding peptide (LBP)와, ii) 분자 인식 물질로 많이 활용되는 항균 펩타이드 (Antimicrobial peptides) 3종과 iii) 항균 펩타이드의 1차 구조(primary structure)와 기능(function)을 모사하기 위해 합성된 peptidomimetic oligomer (antimicrobial copolymer) 1종을 선정하여 총 5종을 제작하였다(표 1). 이때, 세균 분리 효능 평가를 위해 각 펩타이드 서열의 3' 말단에 리신(lysine; K)를 추가하여 비오틴(biotin) 작용기를 도입하였다.
- [0032] 펩타이드에 대한 합성과 정제는 (주)펩트론에서 자동합성기 (ASP48S, Pepton, Inc.)를 사용하여 Fmoc-SPPS (9-Fluorenyl methyl oxycarbonyl solid phase peptide synthesis) 방법으로 합성하였다. 고형화 형태로 얻어진 침전물을 Vydac Everest C18 column (250 mm × 22 mm, 10 μm, USA)을 사용하는 고성능 액체 크로마토그래피 기기 (Shimadzu Prominence HPLC, Japan)를 이용하여 0.1%(v/v) Trifluoroacetic acid를 포함하는 Water - Acetonitrile liner gradient(Acetonitrile 농도: 10~75%(v/v)) 방법으로 분리하였다.
- [0033] 정제된 펩타이드의 분자량은 liquid chromatography-mass spectrometry (Shimadzu LC/Mass-2020, Japan)로 확

인하고, 순수정제된 분획물을 동결건조시켜 백색 분말 형태의 TFA (Trifluoroacetic acid) 염으로 얻게 되며, 분말 형태의 펩타이드는 1 mg/ml distilled water (DW) 또는 1× PBS (pH 7.2)에 녹여서 사용하였다.

표 1

	세균 분리용 후보 펩타이드		펩타이드 서열	타겟 세균종
1	LPS binding peptide (LBP)		KYSSSISSIRAC (12 a.a.) (서열번호 1)	그람 음성균
2	Anti-microbial peptides	Magainin I (Maga)	GIGKFLHSAGKFGKAFVGEIMKS (23 a.a.) (서열번호 2)	그람 음성균
3		Leucocin A (Leuco)	KYYGNGVHCTKSGCSVNWGEAFSAGVHRLANGGNGFW (37 a.a.) (서열번호 3)	그람 양성균
4		Odorranin-HP (Odor)	GLLRASSVWGRKYVVDLAGCAKA (23 a.a.) (서열번호 4)	Broad-spectrum
5	Peptidomimetic oligomer	Oligoacylllysine (OAK)	K-IKIKIKIKIKIKa (1, aminolauryl; a, amide) (서열번호 5)	Broad-spectrum

2. 병원성 세균 선정 및 배양

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 2).

표 2

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

선정된 균주는 각각의 배양용액과 배양조건에서 배양하였으며(표 3), UV-Visible spectrophotometer를 통해 흡광도 (optical density, OD)를 측정하여 세균 배양액의 농도를 계산하였다.

표 3

	Species	배양액	배양조건	OD ₆₀₀ =1 기준 세균수 (CFU/mL)
1	<i>Streptococcus mutans</i>	Brain Heart Infusion (BHI) broth & BHI agar	37 °C, 5% CO ₂ incubator, 24 ~ 48 h	5×10^8
2	<i>Streptococcus sobrinus</i>	BHI broth & BHI agar	37 °C, 5% CO ₂ incubator, 24 ~ 48 h	2×10^8
3	<i>Lactobacillus 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>Eikenella corrodens</i>	Columbia broth (w/5% sheep blood) & Chocolate agar	37 °C shaking incubator, 24 ~ 72 h	1×10^8

3. 세균 특이 펩타이드 1차 선정을 위한 스크리닝 테스트

- [0041] 제작된 펩타이드를 이용하여 세균을 포획(capture)하고 분리할 수 있는지 여부를 평가하기 위해, 도 1과 같이 스트렙타비딘-자성 비드(streptavidin-magnetic bead)에 비오틴(biotin) 작용기가 도입된 5종의 펩타이드를 고정시킨 후 세균과 결합시키며, 반응 종료 후 자석(magnetic separation rack)으로 자성 비드(magnetic bead)만을 회수한 후 용액 내에 남아있는 잔존 세균의 흡광도를 측정하여 세균 분리 효율을 평가하였다.
- [0042] (1) 후보 5종의 세균 특이 펩타이드를 이용한 세균 분리 효율 평가
- [0043] ① LBP (그람음성균 분리용)
- [0044] 스트렙타비딘-자성 비드(Streptavidin-magnetic bead) (400 nm, 10 mg/mL) 400 μ L를 1 $\times$ PBS 500 μ L로 세척하고 용액을 제거한 뒤, 각각 0, 50, 100, 200 μ g/mL (1 $\times$ PBS, 0.1% BSA) 농도로 제작된 비오틴(biotin)-도입 LBP 용액 500 μ L를 추가하여 상온에서 15분간 반응시켰다. 이후, 반응 용액을 제거하고 1 $\times$ PBS 500 μ L로 세척한 후, LBP가 고정된 자성 비드(magnetic bead)를 1 $\times$ PBS 500 μ L에 재분산시켰다.
- [0045] 그람음성균 *E. corrodens*와, 그람양성균 *S. sobrinus*, *S. mutans*, *L. casei* ($OD_{600} = 0.3/500$ μ L)를 LBP가 고정된 자성 비드(magnetic bead) 용액 500 μ L에 각각 추가하고 상온에서 교반하면서 15분간 반응시킨 후, 자석을 이용하여 LBP가 고정된 자성 비드(magnetic bead)를 수거하고, 용액 내 존재하는 잔존 세균의 흡광도를 측정하여 세균 분리 효율을 평가하였다.
- [0046] 그 결과, 그람음성균에만 결합하는 LBP가 그람음성균인 *E. corrodens*만을 선택적으로 분리하며, 최대 48% 분리 효율 (200 μ g/mL LBP 기준)을 나타내었다(도 2).
- [0047] ② Magainin I (Maga) (그람음성균 분리용)
- [0048] 스트렙타비딘-자성 비드(Streptavidin-magnetic bead) (400 nm, 10 mg/mL) 200 μ L를 동일한 방법으로 준비한 뒤, 각각 0, 12.5, 25, 50, 100 μ g/mL (1 $\times$ PBS, 0.1% BSA) 농도로 제작된 비오틴(biotin)-도입 Maga 용액 500 μ L를 추가하여 상온에서 15분간 반응시켰다. 이후, 동일한 방법으로 재분산시켰다.
- [0049] 그람음성균 *E. corrodens*와 그람양성균 *S. sobrinus*, *S. mutans*, *L. casei* ($OD_{600} = 0.3/500$ μ L)를 각각 추가하고 상온에서 교반하면서 15분간 반응시킨 후, 동일한 방법으로 세균 분리 효율을 평가하였다.
- [0050] 그 결과, 중성의 반응 조건하에서는 4종의 세균 모두 전혀 결합되지 않았으며, 자성 비드(magnetic bead) 양을 변화 (100, 200, 400 μ L) 시켜도 전혀 분리되지 않았다. 이는 Maga 펩타이드가 중성의 수용액에서는 그람음성균과의 결합에 필요한 2차 구조를 거의 형성하지 않기 때문으로 판단되었다. 추가적으로, pH 4.0 조건으로 *E. corrodens*와 반응시켜 본 결과, 최대 35%의 세균 분리 효율을 나타내었으나 LBP (중성 조건)에 비해 효율은 낮았다.
- [0051] ③ Leucocin A (Leuco) (그람양성균 분리용)
- [0052] 스트렙타비딘-자성 비드(Streptavidin-magnetic bead) (400 nm, 10 mg/mL) 200 μ L를 동일한 방법으로 준비한 뒤, 각각 0, 1.56, 3.125, 6.25, 12.5 μ g/mL (1 $\times$ PBS, 0.1% BSA) 농도로 제작된 비오틴(biotin)-도입 Leuco 용액 500 μ L를 추가하여 상온에서 15분간 반응시켰다. 이후, 동일한 방법으로 재분산시켰다.
- [0053] 그람양성균 *S. sobrinus*, *S. mutans*, *L. casei*와 그람음성균 *E. corrodens* ($OD_{600} = 0.3/500$ μ L)를 각각 추가하고 상온에서 교반하면서 15분간 반응시킨 후, 동일한 방법으로 세균 분리 효율을 평가하였다.
- [0054] 그 결과, *S. mutans*의 경우 최대 29%의 분리 효율 (6.25 μ g/mL Leuco 기준)을 나타냈고, *S. sobrinus*는 최대 14%의 분리 효율 (3.125 μ g/mL Leuco 기준)을 보였으나, 그람 양성균인 *L. casei*와는 결합되지 않았음. 또한, 그람음성균 *E. corrodens*는 분리되지 않았다(도 3).
- [0055] ④ Odorranin-HP (Odor) (Broad-spectrum)
- [0056] 스트렙타비딘-자성 비드(Streptavidin-magnetic bead) (400 nm, 10 mg/mL) 200 μ L를 1 $\times$ PBS 500 μ L로 세척하고 용액을 제거한 뒤, 각각 0, 12.5, 25, 50, 100 μ g/mL (1 $\times$ PBS, 0.1% BSA) 농도로 제작된 비오틴(biotin)-도입 Odor 용액 500 μ L를 추가하여 상온에서 15분간 반응시켰다. 이후, 동일한 방법으로 재분산시켰다.
- [0057] 그람음성균 *E. corrodens*와 그람양성균 *S. sobrinus*, *S. mutans*, *L. casei* ($OD_{600} = 0.3/500$ μ L)를 각각 추가하고 상온에서 교반하면서 15분간 반응시킨 후, 동일한 방법으로 세균 분리 효율을 평가하였다.

- [0058] 그 결과, Odor는 그람음성균, 그람양성균 모두를 타겟으로 하는 펩타이드임에도 불구하고 *E. corrodens* 에 대해서만 최대 34%의 분리 효율 (50 $\mu\text{g/mL}$ Odor 기준)을 나타내었고, 그람양성균 3종은 모두 분리되지 않았다(도 4).
- [0059] ⑤ Oligoacetyllysine (OAK) (Broad-spectrum)
- [0060] 스트렙타비딘-자성 비드(Streptavidin-magnetic bead) (400 nm, 10 mg/mL) 200 μL 를 동일한 방법으로 준비한 뒤, 각각 0, 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$ (1 $\times$ PBS, 0.1% BSA) 농도로 제작된 비오틴(biotin)-도입 OAK 용액 500 μL 를 추가하여 상온에서 15분간 반응시켰다. 이후, 동일한 방법으로 재분산시켰다.
- [0061] 그람음성균 *E. corrodens* 와 그람양성균 *S. sobrinus*, *S. mutans*, *L. casei* ($\text{OD}_{600} = 0.3/500 \mu\text{L}$)를 각각 추가하고 상온에서 교반하면서 15분간 반응시킨 후, 동일한 방법으로 세균 분리 효율을 평가하였다. 이때, *S. sobrinus* 의 경우, OAK 농도를 800 $\mu\text{g/mL}$ 까지 증가시켰고, *L. casei* 의 경우는 6.25 $\mu\text{g/mL}$ 까지 감소시켰다.
- [0062] 그 결과, 그람음성균, 그람양성균 모두를 타겟으로 하는 OAK는 *E. corrodens* 에 대해 최대 88% (200 $\mu\text{g/mL}$ OAK 기준), *S. sobrinus* 에 대해서는 최대 61%의 분리 효율 (800 $\mu\text{g/mL}$ OAK 기준)을 나타내었으나, *L. casei* 와 *S. mutans* 는 전혀 분리되지 않았다(도 5).
- [0063] 총 5종의 펩타이드에 대하여 흡광도 분석을 통해 세균 분리 효율을 평가한 결과는 표 4와 같다. OAK의 경우 *E. corrodens* 와 *S. sobrinus* 에 대해 비교적 우수한 분리 효율을 나타내었으나, 포획/분리를 위해 사용되는 펩타이드의 농도가 높은 편이었다. OAK의 경우 서열 내 존재하는 아민기를 통해 세균을 포획할 것으로 판단되므로, 아민기 자체에 대한 세균 분리 효율 평가를 이후 실험에서 진행하였다.

표 4

균주	세균 특이 펩타이드별 세균에 대한 최대 분리 효율 (%)				
	LBP(-)	Maga(-)	Leuco(+)	Odor(-/+)	OAK(-/+)
<i>E. corrodens</i> (-)	48 (200 $\mu\text{g/mL}$)	0	0	34 (50 $\mu\text{g/mL}$)	88 (200 $\mu\text{g/mL}$)
<i>S. mutans</i> (+)	0	0	29 (6.25 $\mu\text{g/mL}$)	0	0
<i>S. sobrinus</i> (+)	0	0	14 (3.125 $\mu\text{g/mL}$)	0	61 (800 $\mu\text{g/mL}$)
<i>L. casei</i> (+)	0	0	0	0	0

- [0065] (2) 화학 작용기를 이용한 세균 분리 효율 평가
- [0066] 화학 작용기들과 세균막 사이의 정전기적 상호작용 (electrostatic interaction)의 효과를 알아보기 위해, 아민기 (NH_2)와 카르복실기 (COOH)를 이용하여 세균 분리 효율을 테스트하였다.
- [0067] ① 아민기 (NH_2)
- [0068] NH_2 -자성 비드(magnetic bead) (400 nm, 0.5 g/25 mL)를 각각 0, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 mL 씩 준비한 뒤 1 $\times$ PBS 500 μL 로 세척하고 용액을 제거하였다.
- [0069] 그람음성균 *E. corrodens* 와 그람양성균 *S. sobrinus*, *S. mutans*, *L. casei* ($\text{OD}_{600} = 0.3/500 \mu\text{L}$) (1 $\times$ PBS, 0.1% BSA)를 각각 추가하고 상온에서 15분간 교반하며 반응시킨 후, 자석을 이용하여 NH_2 -자성 비드(magnetic bead)를 수거하고 용액 내 잔존 세균의 흡광도를 측정하여 세균 분리 효율을 평가하였다.
- [0070] 그 결과, 아민기는 *E. corrodens* 에 대해 최대 76% (0.4 mL 기준; 75%, 1.6 mL 기준), *S. sobrinus* 는 최대 97% (1.6 mL 기준; 71 %, 0.8 mL 기준), *S. mutans* 은 최대 48% (1.6 mL 기준), *L. casei* 는 최대 25%의 분리 효율 (1.6 mL 기준)을 나타내었다(도 6).
- [0071] ② 카르복실기 (COOH)
- [0072] COOH -자성 비드(magnetic bead) (400 nm, 0.5 g/25 mL)를 각각 0, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 mL 씩 준비한 뒤 동일한

게 처리한 후 4종의 세균 ($OD_{600} = 0.3/500 \mu\text{L}$)을 각각 추가하고 동일하게 반응시킨 후 동일한 방법으로 세균 분리 효율을 평가하였다.

그 결과, 카르복실기는 *E. corrodens* 에 대해 최대 71, *S. sobrinus* 는 최대 25%, *S. mutans* 은 최대 16%, *L. casei* 는 최대 25%의 분리 효율 (모두 1.6 mL 기준)을 나타내었다(도 7).

아민기와 카르복실기를 이용하여 흡광도 분석을 통해 세균 분리 효율을 평가한 결과는 표 5와 같다. 결과적으로, 카르복실기보다는 아민기를 이용한 세균 분리가 더 효과적일 것으로 판단되었다.

표 5

균주	화학 작용기별 세균에 대한 최대 분리 효율 (%)	
	NH ₂	COOH
<i>E. corrodens</i> (-)	76	71
<i>S. mutans</i> (+)	48	16
<i>S. sobrinus</i> (+)	97	25
<i>L. casei</i> (+)	25	25

특히 OAK의 경우 *E. corrodens* 와 *S. sobrinus* 에 대해서만 좋은 분리 효율을 나타낸 반면, 아민기는 OAK가 분리하지 못한 *L. casei* 와 *S. mutans* 에 대해서도 분리할 수 있었다. 따라서 OAK 대신, 아민기를 활용하는 것이 더 효율적이라고 판단되었다.

최종적으로, 그람음성균 분리용 LBP, 그람양성균 분리용 Leuco, broad-spectrum의 Odor 총 3종의 펩타이드와 아민기를 1차 선정하였다.

4. 세균 특이 펩타이드에 대한 검증

1차 선정된 LBP, Leuco, Odor와 아민기 중, 1차 세균 분리 효율 평가시 50% 이하의 세균 분리 효율을 나타낸 Leuco와 Odor에 대해 2차 세균 분리 효율을 평가하였다.

1차 세균 분리 효율 평가시, 동일한 OD ($OD_{600} = 0.3/500 \mu\text{L}$)의 세균수를 사용하였고 흡광 분석을 통해 평가하였는데, 세균종별로 OD가 같아도 세균수가 다를 뿐 아니라 흡광 분석의 경우 낮은 측정 감도로 인해 적은 수의 세균수 변화를 측정하는 것이 어려울 것으로 생각되어 세균 분리 효율 평가법을 변경하였다.

4종의 세균에 대해 동일한 세균수 (3×10^7 CFU/500 μL)를 사용하고, 세균 포획 후 용액 내 남아있는 잔존 세균의 생존 수를 직접 계수하는 agar plate counting 방법을 이용하여, 2차 세균 분리 효율을 평가하였다(도 8).

(1) 2종의 세균 특이 펩타이드에 대한 세균 분리 효율 평가 (2차)

① Leuco (그람양성균 분리용)

스트렙타비딘-자성 비드(Streptavidin-magnetic bead) (400 nm, 10 mg/mL) 200 μL 를 1× PBS 500 μL 로 세척하고 용액을 제거한 뒤, 각각 0, 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ (1× PBS, 0.1% BSA) 농도로 제작된 비오틴(biotin)-도입 Leuco 용액 500 μL 를 추가하여 상온에서 15분간 반응시켰다. 이후, 반응 용액을 제거하고 1X PBS 500 μL 로 세척하고 용액을 제거하였다.

그람양성균 *S. sobrinus*, *S. mutans*, *L. casei* 와 그람음성균 *E. corrodens* (3×10^7 CFU/500 μL)를 각각 추가하고 상온에서 교반하면서 15분간 반응시켰다. 자석을 이용하여 Leuco가 고정된 자성 비드(magnetic bead)를 수거하고, 용액 내 존재하는 잔존 세균을 1× PBS (0.1% BSA) 용액으로 연속 희석하여 세균주 각각의 agar plate에 도말 후 생성된 colony를 계수하여 평가하였다.

그 결과, *S. mutans* 의 경우 최대 59% (12.5 $\mu\text{g/mL}$ Leuco 기준), *S. sobrinus* 는 최대 49% (50 $\mu\text{g/mL}$ Leuco 기준), *L. casei* 는 최대 66% (25 $\mu\text{g/mL}$ Leuco 기준) 분리 효율을 나타내었으며, 그람음성균 *E. corrodens* 는 분리되지 않았다(도 9).

② Odor (Broad-spectrum)

스트렙타비딘-자성 비드(Streptavidin-magnetic bead) (400 nm, 10 mg/mL) 200 μL 를 동일한 방법으로 준비한

뒤, 각각 0, 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ ($1\times$ PBS, 0.1% BSA) 농도로 제작된 비오틴(biotin)-도입 Odor 용액 500 μL 를 추가하여 상온에서 15분간 반응시켰다. 이후, 동일한 방법으로 세척한 뒤 그람음성균 *E. corrodens*와 그람양성균 *S. sobrinus*, *S. mutans*, *L. casei* (3×10^7 CFU/500 μL)를 각각 추가하고 상온에서 교반하면서 15분간 반응시킨 후, 동일한 방법으로 colony를 계수하여 세균 분리 효율을 평가하였다.

그 결과, *S. mutans*의 경우 최대 69% (25 $\mu\text{g/mL}$ Leuco 기준; 64%, 50 $\mu\text{g/mL}$ Leuco 기준), *S. sobrinus*는 최대 68% (50 $\mu\text{g/mL}$ Leuco 기준), *L. casei*는 최대 17% (100 $\mu\text{g/mL}$ Leuco 기준) 분리 효율을 나타내었으며, 그람음성균 *E. corrodens*에 대해서는 최대 48% (100 $\mu\text{g/mL}$ Leuco 기준, 45%, 50 $\mu\text{g/mL}$ Leuco 기준) 분리 효율을 나타내었다(도 10).

2종의 펩타이드에 대하여 agar plate counting 방법을 통해 세균 분리 효율을 평가한 결과는 표 6과 같다. 1차 세균 분리 효율 평가에 비해 전반적으로 값이 향상되었으나, 각 세균에 대해 완전히 결합되지는 못하는 것으로 판단되었다. 또한 각 세균에 따라 최대 분리 효율을 보이는 펩타이드 농도가 다른데, 이는 세균별로 크기가 다를 뿐 아니라 현 조건 (상온, 15분)에서 자성입자 표면에 고정되는 펩타이드 양이 각각 다르기 때문으로 생각되었다.

표 6

균주	세균 특이 펩타이드별 세균에 대한 최대 분리 효율 (%)	
	Leuco(+)	Odor(-/+)
<i>E. corrodens</i> (-)	0	48 (100 $\mu\text{g/mL}$)
<i>S. mutans</i> (+)	59 (12.5 $\mu\text{g/mL}$)	69 (25 $\mu\text{g/mL}$)
<i>S. sobrinus</i> (+)	49 (50 $\mu\text{g/mL}$)	68 (50 $\mu\text{g/mL}$)
<i>L. casei</i> (+)	66 (25 $\mu\text{g/mL}$)	17 (100 $\mu\text{g/mL}$)

(2) 3종의 세균 특이 펩타이드 고정화 효율 향상

표면에 고정되어 세균과 직접 결합하는 펩타이드 양을 최대화하기 위해, 1차로 선정된 3종의 세균 특이 펩타이드에 대해 스트렙타비딘-자성 비드(streptavidin-magnetic bead)와의 반응시간을 증가시켜 고정화 효율을 높인 후 세균 분리 효율을 평가하였다.

스트렙타비딘-자성 비드(Streptavidin-magnetic bead) (200 μL)를 동일한 방법으로 준비한 뒤, 각각 비오틴(biotin)-도입 LBP, Leuco, Odor (100 $\mu\text{g/mL}$) 500 μL 를 추가하여 상온에서 18 시간 동안 반응시켰다. 이후, 반응 용액을 제거하고 $1\times$ PBS 500 μL 로 세척하고 용액을 제거하였다.

그람음성균 *E. corrodens*와 그람양성균 *S. sobrinus*, *S. mutans*, *L. casei* (3×10^7 CFU/500 μL)를 각각 추가하고 상온에서 교반하면서 15분간 반응시킨 후, 자석을 이용하여 각 펩타이드가 고정된 자성 비드(magnetic bead)를 수거하고, 용액 내 존재하는 잔존 세균을 동일한 방법으로 agar plate에 도말 후 생성된 colony를 계수하여 평가하였다.

그 결과, 밤샘 고정한 경우 전체적으로 4종의 세균에 대한 분리 효율이 향상되었다(표 7). 하지만, 그람음성균 혹은 그람양성균에 대한 특이적 결합능력은 감소하였다. 따라서 표면에 고정시키는 세균 특이 펩타이드의 양이나 세균과의 결합 시간을 조절함으로써 세균에 대한 선택성을 높힐 수 있을 것으로 판단되었다.

표 7

균주	세균 특이 펩타이드별 세균에 대한 최대 분리 효율 (%)		
	LBP(-)	Leuco(+)	Odor(-/+)
<i>E. corrodens</i> (-)	100	58	100
<i>S. mutans</i> (+)	32	83	69
<i>S. sobrinus</i> (+)	24	77	78
<i>L. casei</i> (+)	17	100	63

- [0098] (3) 세균 특이 펩타이드와 아민기 혼합 사용에 따른 세균 분리 효율 평가
- [0099] 3종의 세균 특이 펩타이드와 아민기를 함께 사용함으로써 세균에 대한 분리 효율을 향상시킬 수 있는지를 확인하였다. 이 경우 아민기로 인해 그람음성균 또는 그람양성균에 대한 선택성은 없기 때문에, 그람음성균에 대해서는 LBP와 아민기 혼합 사용만을, 그람양성균에 대해서는 Leuco와 아민기의 혼합사용만을 평가하였다. Odor와 아민기 혼합사용은 4종 세균에 모두 적용하였다.
- [0100] ① 세균 수 고정 (3×10^7 CFU/500 μ L)
- [0101] 스트렙타비딘-자성 비드(Streptavidin-magnetic bead) (400 nm, 10 mg/mL) 200 μ L를 동일한 방법으로 준비한 뒤, 각각 비오틴(biotin)-도입 LBP, Leuco, Odor (100 μ g/mL) 500 μ L를 추가하여 상온에서 18 시간 동안 반응시킨 후 반응 용액을 제거하고 1 $\times$ PBS 500 μ L로 세척하였다.
- [0102] NH₂-magnetic bead (400 nm, 0.5 g/25 mL) 1.6 mL을 1 $\times$ PBS 500 μ L로 세척한 후, 펩타이드가 고정된 자성 비드(magnetic bead)와 혼합하였다.
- [0103] 그람음성균 *E. corrodens* 와 그람양성균 *S. sobrinus*, *S. mutans*, *L. casei* (3×10^7 CFU/500 μ L)를 각각 추가하고 상온에서 교반하면서 15분간 반응시킨 후, 자석을 이용하여 각 펩타이드가 고정된 자성 비드(magnetic bead)를 수거하고, 동일한 plate counting 방법으로 평가하였다.
- [0104] 그 결과, 4종의 세균에 대해 모두 90% 이상의 분리 효율을 나타내었다(표 8).

표 8

균주	세균 분리 효율 (%) (n=3)	
	LBP(-) & -NH ₂ 또는 Leuco(+) & -NH ₂	Odor(-/+) & -NH ₂
<i>E. corrodens</i> (-)	92.1 $\pm$ 2.5	92.8 $\pm$ 1.5
<i>S. mutans</i> (+)	97.1 $\pm$ 1.5	95.7 $\pm$ 3.1
<i>S. sobrinus</i> (+)	97.6 $\pm$ 1.4	95.9 $\pm$ 2.3
<i>L. casei</i> (+)	99.6 $\pm$ 0.3	92.3 $\pm$ 5.4

- [0106] ② 세균 수 변화 ($1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^7$ CFU/500 μ L)
- [0107] 위와 동일하게 스트렙타비딘-자성 비드(streptavidin-magnetic bead) (400 nm, 10 mg/mL) 200 μ L를 준비한 뒤, 각각 비오틴(biotin)-도입 LBP, Leuco, Odor (100 μ g/mL) 500 μ L를 추가하여 상온에서 18 시간 동안 반응시켜 준비하였다. NH₂-magnetic bead (400 nm, 0.5 g/25 mL) 1.6 mL 역시 동일한 방법으로 준비하고, 펩타이드가 고정된 자성 비드(magnetic bead)와 혼합하였다.
- [0108] 그람음성균 *E. corrodens* 와 그람양성균 *S. sobrinus*, *S. mutans*, *L. casei* 를 각각 1×10^3 , 1×10^5 , 1×10^7 CFU/500 μ L 추가하고 상온에서 교반하면서 15분간 반응시킨 후, 동일한 plate counting 방법으로 평가하였다.
- [0109] 그 결과, 세균 특이 펩타이드와 아민기의 혼합 사용은 적은 수의 세균에 대해서도 90% 이상의 분리 효율을 나타낼 수 있음을 확인하였다(표 9). 따라서, LBP/Leuco/NH₂의 혼합 사용이나, Odor/NH₂의 혼합 사용을 통해 다양한 종류의 세균들을 효과적으로 분리할 수 있을 것으로 생각된다.

표 9

균주	세균 분리 효율 (%) (n=3)		
	1×10^3 /500 μ L	1×10^5 /500 μ L	1×10^7 /500 μ L
<i>E. corrodens</i> (-)	94.5 $\pm$ 0.8	92.8 $\pm$ 1.9	93.2 $\pm$ 1.5
<i>S. mutans</i> (+)	97.2 $\pm$ 1.2	97.0 $\pm$ 1.8	95.3 $\pm$ 1.8

<i>S. sobrinus</i> (+)	95.5 ± 3.6	96.0 ± 2.5	96.8 ± 2.6
<i>L. casei</i> (+)	94.6 ± 4.8	90.5 ± 7.8	90.7 ± 8.3

<실시예 2> 세균 특이 펩타이드-마이크로입자의 제작 및 성능평가

1. 세균 분리용 세균 특이 펩타이드-마이크로입자 제작

3종의 세균 특이 펩타이드를 rink amide resin (polystyrene (PS) resin, 100 ~ 200 mesh)에 결합한 세균 분리용 세균 특이 펩타이드-마이크로입자를 제작하였다. 보다 구체적으로는, 표준 고체상 펩타이드 합성 프로토콜을 사용하여 합성되었다. 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.

각각의 펩타이드 서열 생성이 완료되면 15분 동안 30% Trifluoroacetic acid/methylene chloride로 측쇄 보호기를 제거하여 탈 보호 작업을 종료하였다. 펩타이드가 결합된 resin을 모아 methylene chloride로 세척한 후 자연 건조하여 제작을 완료하였다. 분말 형태로 보관하며 사용 하루 전, 5 mg/mL (10 mM sodium dihydrogen phosphate, pH 4.5)로 준비하였다.

2. 세균 분리용 세균 특이 펩타이드-마이크로입자의 성능평가

4종의 세균에 대해 일정 세균 수 (1×10^7 CFU/250 μ L 생리식염수)로 준비하고, 3종의 세균 특이 펩타이드 (LBP, Leuco, Odor)-마이크로입자 (0.125 mg/250 μ L, 10 mM sodium dihydrogen phosphate, pH 4.5)를 각각 1:1로 (각 250 μ L씩) 혼합하여 세균과 상온에서 15분간 반응시켰다.

반응 후, PS plate (200 ~ 250 mesh, filter 역할)가 장착된 실린지를 통과시켰다. 이 때, 세균이 포획된 세균 분리용 펩타이드-마이크로입자는 PS plate에 걸리게 되고, 포획되지 않은 세균만 통과하게 되므로 이 elute를 이용하여 1× PBS, 0.1% BSA 용액으로 연속 희석하고 각각의 세균 영양배지 agar plate에 도말 후 생성된 세균의 colony를 계수하여 평가하였다(도 11).

그 결과, LBP-마이크로입자는 그람 음성균에 대해 높은 분리 효율을 나타내었으나, Leuco-마이크로입자의 경우는 그람 양성균에 대해 50% 이하의 분리 효율을 나타내었다. Odor-마이크로입자는 4종의 세균 모두에서 50% 이상의 분리 효율을 나타내었다(표 10).

표 10

균주	세균 분리 효율 (%)		
	LBP(-)	Leuco(+)	Odor(-/+)
<i>E. corrodens</i> (-)	92.9	-	89.2 ± 9.8
<i>S. mutans</i> (+)	3.0	39.1 ± 10.4	64.8 ± 3.8
<i>S. sobrinus</i> (+)	6.8	47.5 ± 2.8	67.6 ± 7.5
<i>L. casei</i> (+)	-	28.3 ± 16.8	68.3 ± 19.9

3. 세균 특이 펩타이드-마이크로입자와 아민 나노입자의 혼합 사용

3종의 세균 특이 펩타이드-마이크로입자와 아민 나노입자를 함께 사용함으로써 세균에 대한 분리 효율을 향상시킬 수 있는지를 확인하였다. 이 경우에도, 아민기로 인해 그람음성균 또는 그람양성균에 대한 선택성은 없기 때문에, 그람음성균에 대해서는 LBP와 아민기 혼합 사용만을, 그람양성균에 대해서는 Leuco와 아민기의 혼합사용만을 평가하였다. Odor와 아민기 혼합사용은 4종 세균에 모두 적용하였다.

NH₂-magnetic bead (400 nm, 0.5 g/25 mL) 1.6 mL을 1× PBS 500 μ L로 세척하고 용액을 제거하였다.

4종의 세균에 대해 일정 세균 수 (1×10^7 CFU/250 μ L 생리식염수)로 준비하고, 3종의 세균 특이 펩타이드 (LBP, Leuco, Odor)-마이크로입자 (0.125 mg/250 μ L, 10 mM sodium dihydrogen phosphate, pH 4.5)와 준비된 NH₂-magnetic bead를 혼합하여 세균과 상온에서 15분간 반응시켰다.

- [0125] 반응 후, PS plate (200 ~ 250 mesh, filter 역할)가 장착된 실린지를 통과시킨 후, elute에 대해 자석 (magnetic separation rack)을 이용하여 자성 비드(magnetic bead)를 수거하고 용액에 남아있는 세균을 agar plate counting 방법으로 평가하였다.
- [0126] 그 결과, Odor-마이크로입자와 아민 자성입자의 혼합사용을 통해 4종의 세균 모두를 94% 이상 분리할 수 있음을 확인하였다(표 11).

표 11

균주	세균 분리 효율 (%)	
	LBP(-) & -NH ₂ 또는 Leuco(+) & -NH ₂	Odor(-/+) & -NH ₂
<i>E. corrodens</i> (-)	100	100
<i>S. mutans</i> (+)	100	100
<i>S. sobrinus</i> (+)	100	100
<i>L. casei</i> (+)	53	94

[0128] <실시예 3> 현장형 세균 검사를 위한 세균 분리 도구의 제작

[0129] 1. 사용자 친화적인 현장형 도구 제작

[0130] (1) 세균 특이 펩타이드-마이크로입자를 이용한 세균 분리 도구

[0131] ① 실린지형

[0132] 다양한 부피를 가지는 시료에서 세균을 분리, 제거할 수 있는 도구를 개발하기 위해, 실린지형 도구를 구성하였다. 처리할 시료의 부피에 따라, 실린지를 선택하고 내부에 PS plate를 토출구 쪽으로 배치하였다.

[0133] 세균 펩타이드 Odor-마이크로입자를 실린지 내에 첨가한 후 세균이 들어있는 시료와 상온에서 15분간 반응시킨 후 plunger를 이용하여 누르면 세균이 결합된 Odor-마이크로입자는 실린지 내에 남게 되어 세균만 분리된다.

[0134] 실린지 내에 분리된 세균은 추가적으로 3회의 세척 과정을 거친 후 전용 lysis buffer와 전용 DNA 추출법을 활용하여 순도 높은 세균 genomic DNA를 얻을 수 있다.

[0135] ② 소프트 튜브(Soft tube) 형

[0136] 1 mL 이하의 소량 시료에서 세균을 분리할 수 있는 도구를 개발하기 위해, 폴리에틸렌 (PE) 소재의 필터가 내장된 소프트 튜브(soft tube) (PVC 재질)를 구성하였다(도 12).

[0137] 그람음성균 혹은 그람양성균에 대한 선택적인 분리를 위해서는, 세균 펩타이드 LBP-마이크로입자 (그람음성균 분리용) 또는 Leuco-마이크로입자 (그람양성균 분리용)를 튜브에 추가한 후 세균이 있는 시료를 넣고 상온에서 15분간 반응시킨 후, 손으로 튜브를 누르게 되면 세균 특이 펩타이드 (LBP 또는 Leuco)-마이크로입자는 PE 필터를 통과하지 못하고 튜브 내에 남게 되어 세균만 분리된다.

[0138] 그람음성균 혹은 그람양성균에 대한 구분없이 모든 세균을 분리하고자 할 때에는, 세균 펩타이드 Odor-마이크로입자를 튜브에 추가하거나, 아민기가 도입된 필터 paper를 PE 필터와 함께 사용한다. Soft tube의 캡 부분에 내장된 PE 필터 위에 아민기가 도입된 필터 paper를 추가한 뒤, 세균 펩타이드 Odor-마이크로입자를 튜브에 넣고 세균이 있는 시료와 혼합한다. 튜브를 거꾸로 한 뒤 상온에서 15분간 반응시킨 후, 손으로 튜브를 누르게 되면 펩타이드 또는 펩타이드와 아민기에 결합된 세균만이 튜브 내에 남게 된다(도 12).

[0139] (2) 세균 특이 펩타이드 마이크로입자와 아민 나노입자를 이용한 세균 분리 도구

[0140] 세균 펩타이드-마이크로입자와 아민 자성나노입자를 혼합 사용하여 세균을 분리하기 위해서는 소프트 튜브에 별도의 자석 (magnetic rack)만 추가하여 사용할 수 있다(도 13).

[0141] 세균 펩타이드 Odor-마이크로입자와 아민 나노입자가 첨가된 도구에 세균을 넣고 상온에서 15분간 반응시킨 후, 자석 (magnetic rack)을 이용하여 아민 나노입자를 고정된 상태에서 소프트 튜브(soft tube)를 손으로 누르게 되면 세균 특이 펩타이드 Odor-마이크로입자는 PE 필터를 통과하지 못하고 튜브 내에 남게 되어 분리된다. 튜브 내에 분리된 세균은 추가적으로 3회의 세척 과정을 거친 후 전용 lysis buffer와 전용 DNA 추출법을 활용하여

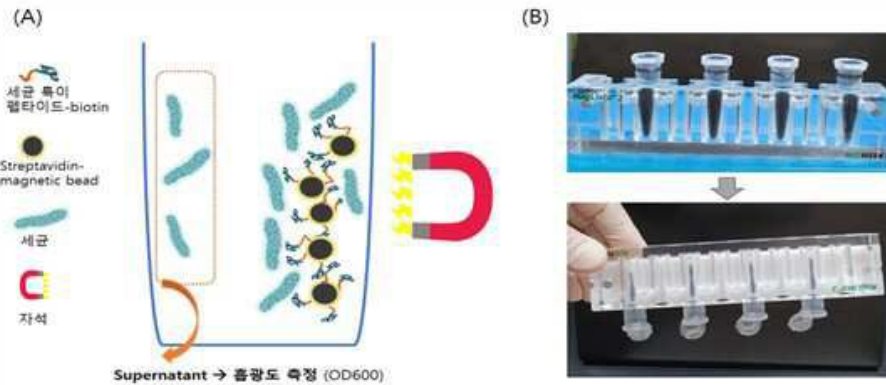
순도 높은 세균 genomic DNA를 얻을 수 있다.

[0142]

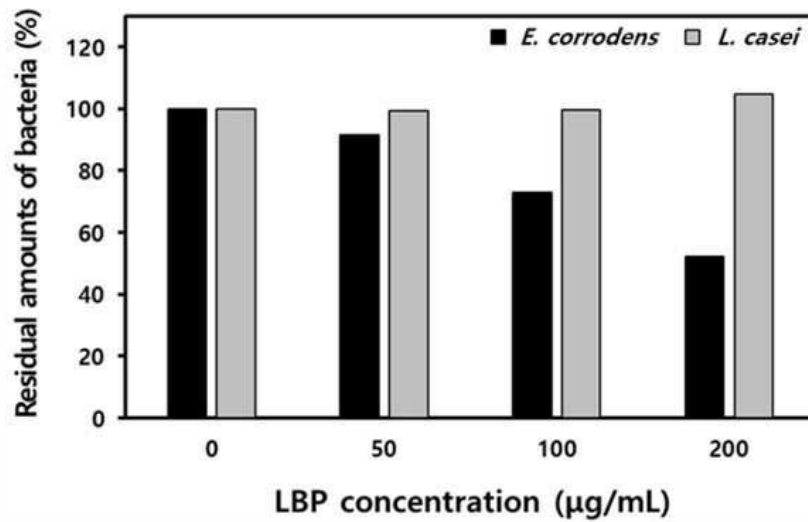
이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

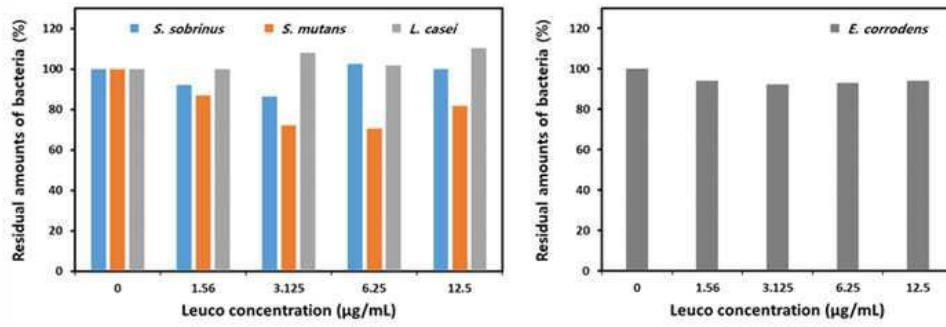
도면1



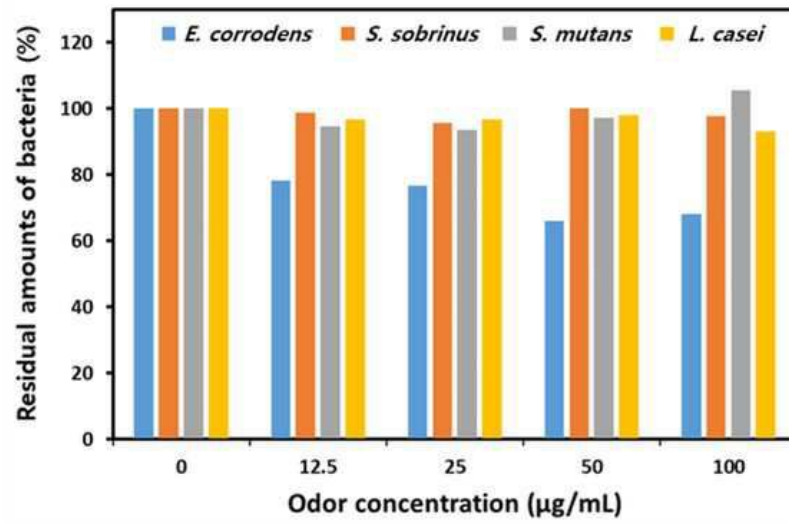
도면2



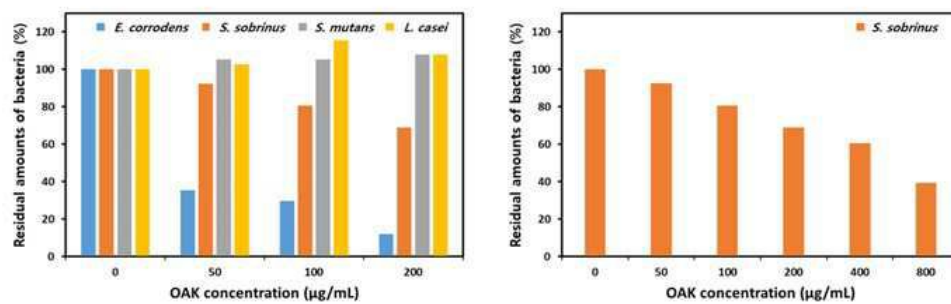
도면3



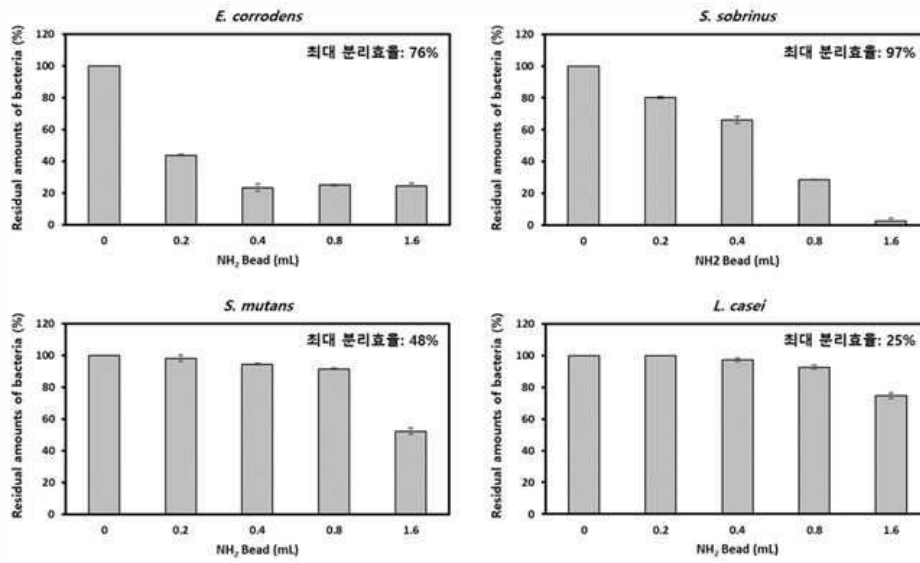
도면4



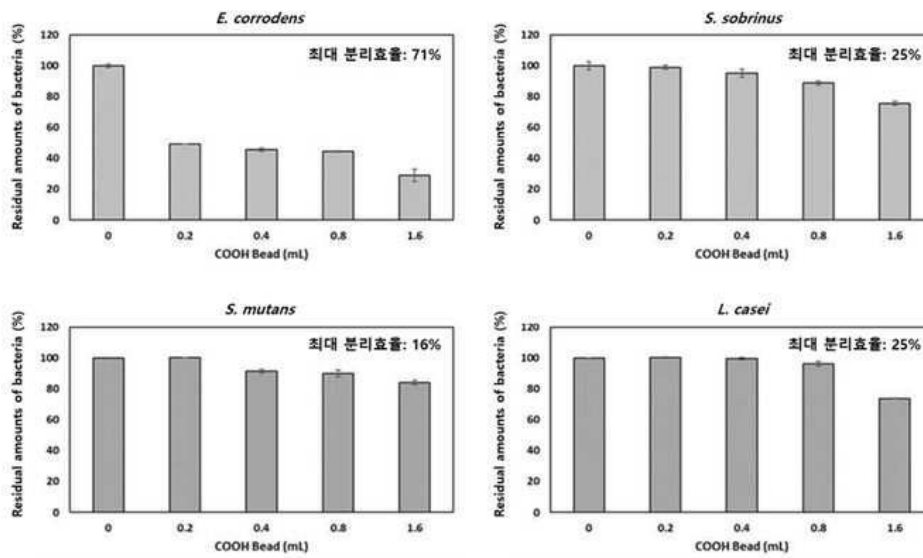
도면5



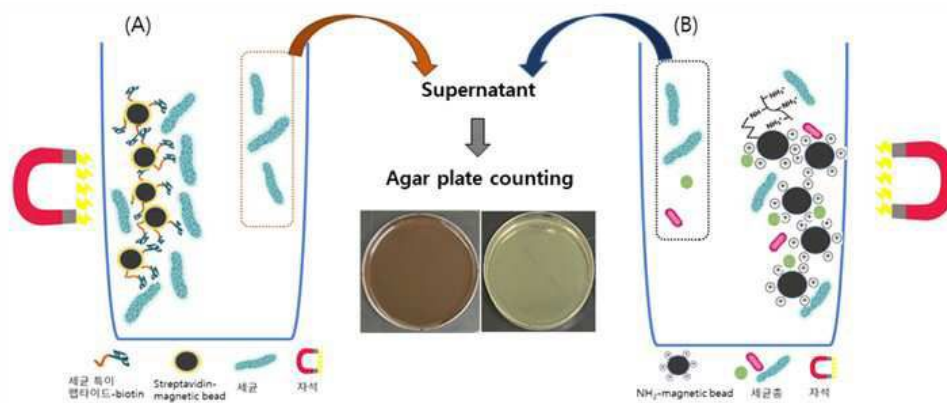
도면6



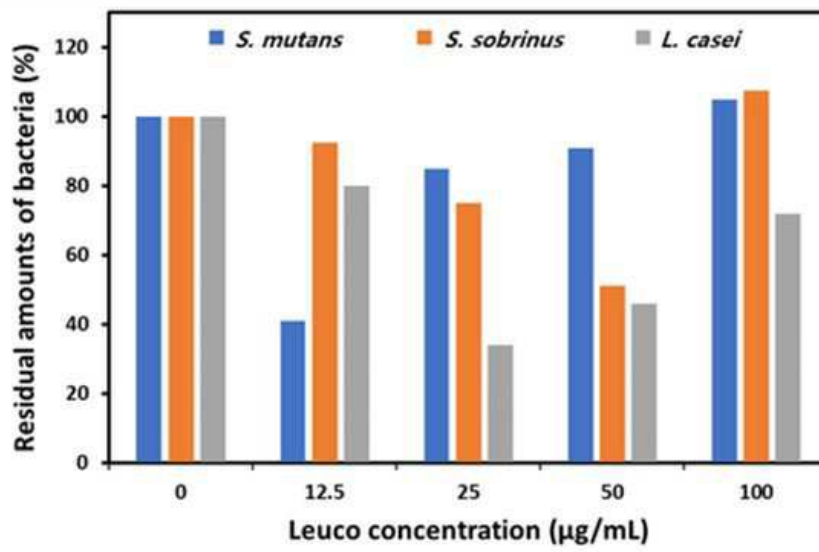
도면7



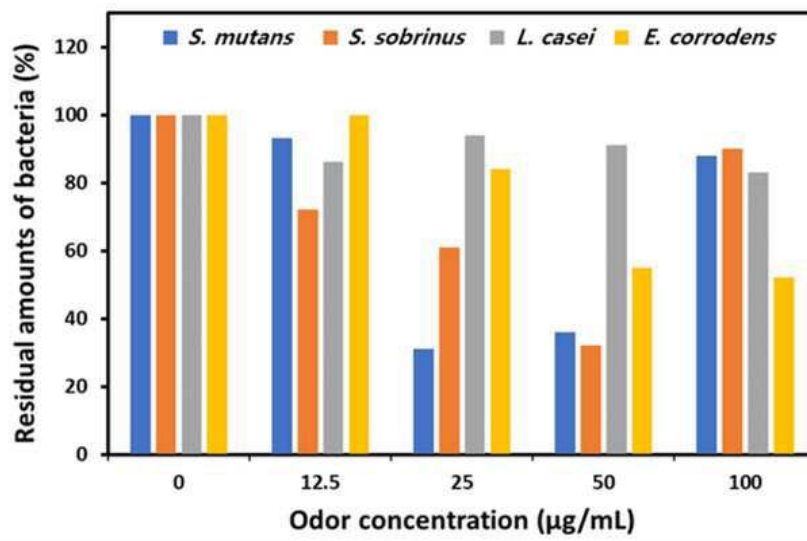
도면8



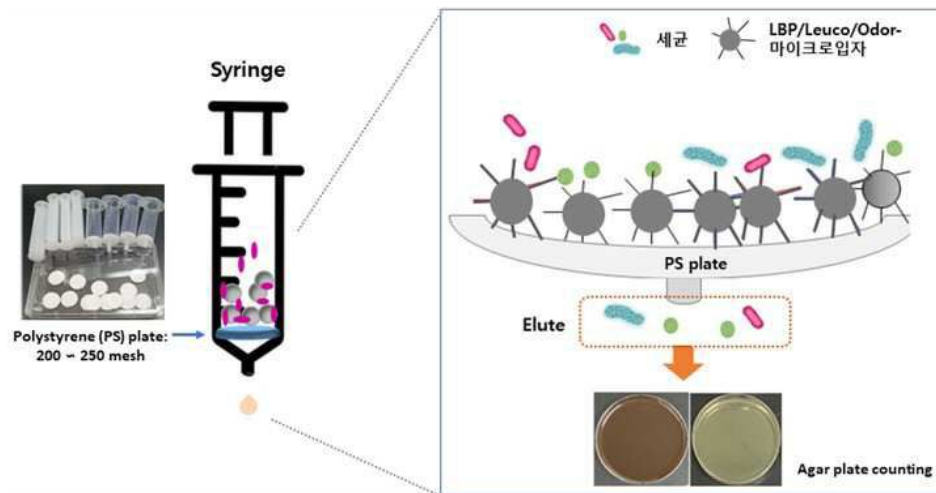
도면9



도면10



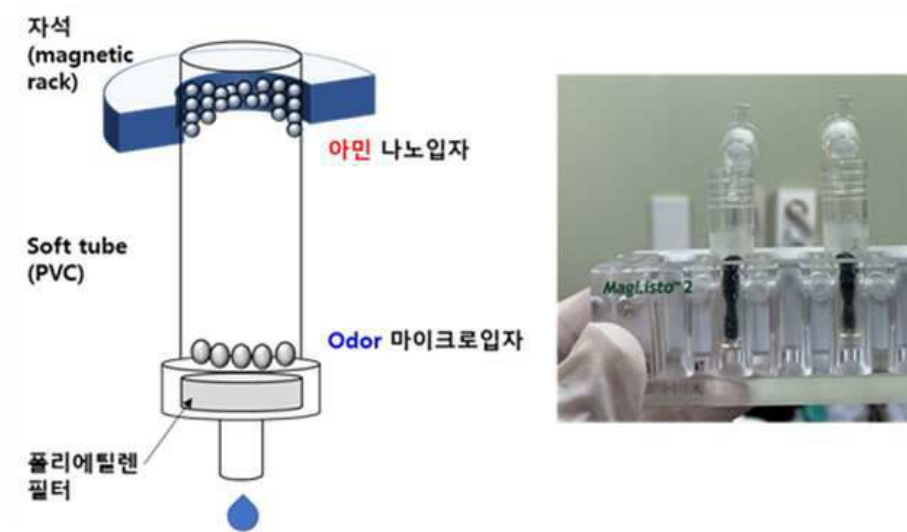
도면11



도면12



도면13



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.