

|                                                                                                                                                                       |                                    |                                                                                                                                                                                            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                                      | (19) 대한민국특허청(KR)<br>(12) 공개특허공보(A) | (11) 공개번호 10-2012-0117190<br>(43) 공개일자 2012년10월24일                                                                                                                                         |
| (51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br>C12Q 1/02 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)<br>G01N 33/68 (2006.01)<br>(21) 출원번호 10-2011-0034791<br>(22) 출원일자 2011년04월14일<br>심사청구일자 2011년04월14일 |                                    | (71) 출원인<br>고려대학교 산학협력단<br>서울 성북구 안암동5가 1<br>(72) 발명자<br>백세환<br>서울특별시 광진구 아차산로 552, 극동2차 아파트<br>10동 503호 (광장동)<br>조일훈<br>서울특별시 성북구 정릉로10길 108, 영빈빌라 2동<br>307호 (정릉동)<br>(74) 대리인<br>한양특허법인 |

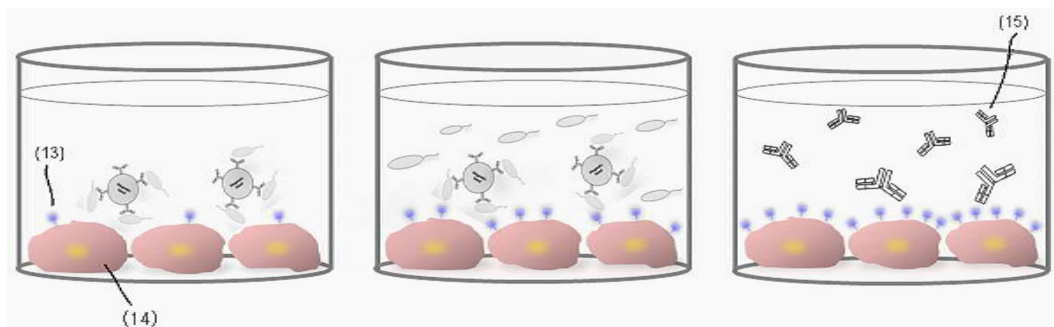
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 동물 세포를 이용한 바이오센싱 방법 및 동물 세포를 이용한 감염 진단 바이오 키트

### (57) 요약

본 발명은 동물 세포를 이용한 바이오센싱 방법 및 동물 세포를 이용한 감염 진단 바이오 키트에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 감염 및 오염 등에 의한 외부환경의 변화 시, 동물 세포 표면에 발현되어 감염원과 반응하는 세포 수용체, 당단백, 당지질 등의 바이오 마커를 탐지체와 결합시킴으로써, 신속하고 간편하게 감염원에 대한 감지를 실시간으로 모니터링 할 수 있는 동물 세포를 이용한 바이오센싱 방법 및 동물 세포를 이용한 감염 진단 바이오 키트에 관한 것이다.

### 대표도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2010K001372

부처명 교육과학기술부

연구사업명 신기술 융합형 성장동력사업

연구과제명 [2차년도] 연속 나노진단 기술 개발

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2010.07.01 ~ 2011.06.30

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

- a) 감염원이 동물 세포가 배양된 배지에 접종되는 단계 및
- b) 상기 동물 세포의 바이오 마커가 표지물질이 부착된 탐지체와 반응되는 단계가 포함되는 동물 세포를 이용한 바이오센싱 방법.

### 청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 감염원이 살아있는 병원성 미생물인 것을 특징으로 하는 동물 세포를 이용한 바이오센싱 방법.

### 청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 동물 세포가 세포기아 상태인 것을 특징으로 하는 동물 세포를 이용한 바이오센싱 방법.

### 청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 동물 세포는 부착형 세포 또는 부유형 세포인 것을 특징으로 하는 동물 세포를 이용한 바이오센싱 방법.

### 청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 바이오 마커가 세포 수용체 단백질, 세포부착 단백질, 당지질 및 당단백으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 동물 세포를 이용한 바이오센싱 방법.

### 청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 세포 수용체 단백질이 툴-유사 수용체, 이온채널 수용체, G-단백질 결합 수용체, 리셉터 구아닐일 시클라아제, 리셉터 티로신 키나아제, 사이토카인 리셉터 슈퍼패밀리, 티로신 포스파타아제 및 세린/트레오닌 프로테인 키나아제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 동물 세포를 이용한 바이오센싱 방법.

### 청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 툴-유사 수용체가 툴-유사 수용체 1, 툴-유사 수용체 2 및 툴-유사 수용체 4로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 동물 세포를 이용한 바이오센싱 방법.

### 청구항 8

청구항 5에 있어서, 상기 세포부착 단백질은 인테그린, 셀렉틴 및 카데린으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 동물 세포를 이용한 바이오센싱 방법.

### 청구항 9

청구항 1에 있어서, 상기 탐지체가 상기 바이오 마커와 특이적으로 결합되는 항체, 결합 단백질, 핵산, 효소, 압타머 및 펩티드로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 동물 세포를 이용한 바이오센싱 방법.

### 청구항 10

청구항 1에 있어서, 상기 표지물질이 형광체, 발광체, 효소, 금속입자, 플라스틱 입자 및 자성입자로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 동물 세포를 이용한 바이오센싱 방법.

### 청구항 11

청구항 1에 있어서, 상기 감염원이 동물 세포가 배양된 배지에 접종되기 전에 자성비드에 고정된 포획인식 성분과 결합되는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 동물 세포를 이용한 바이오센싱 방법.

## 청구항 12

동물 세포를 수용한 웰 및

표지물질이 부착되어 있고, 동물 세포의 바이오 마커를 탐지할 수 있는 탐지체를 포함하는 동물 세포를 이용한 감염 진단 바이오 키트.

## 청구항 13

청구항 12에 있어서, 상기 바이오 키트가 감염원을 인식하는 포획인식 성분을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 동물 세포를 이용한 감염 진단 바이오 키트.

## 명세서

### 기술분야

[0001] 본 발명은 동물 세포를 이용한 바이오센싱 방법 및 동물 세포를 이용한 감염 진단 바이오 키트에 관한 것이다.

### 배경기술

[0002] 최근 들어 대상물질 분석방법의 핵심 감지체로 사용되던 유전자 또는 항체를 대신해 동물 세포를 이용하여 균, 독소, 환경호르몬 및 유해화합물 등의 분석물질을 탐지할 수 있는 동물 세포 기반 바이오센서의 개념이 새로이 도입되었다.

[0003] 동물 세포를 이용한 바이오센서의 특징은 살아있는 세포를 통해 외부로부터 열, 화학물질, 충격, 감염 등의 자극에 대한 세포의 생리화학적 반응을 관찰할 수가 있다는 점이다. 이런 생리화학적 반응을 통해 세포의 물질대사(cellular metabolism), 세포독성에 대한 세포의 응답(cytotoxic responses) 및 약물의 생리화학적 이용 효능(bioavailability) 등과 같은 유용한 정보를 얻을 수 있음이 보고 되고 있다.

[0004] 기존의 전통적인 분석방법은 분석하고자 하는 대상물질에 대한 정확한 정보를 필요로 하고, 상기 대상물질에 대해 특이적으로 반응하는 감지체로 항체 등을 이용하지만, 실제 다양한 분석대상 샘플에는 우리가 알지 못하는 물질들로 균, 독소 등이 다수 포함되어 있는 경우가 대부분이기 때문에 기존의 독립적인 물질에만 국한하는 분석방법으로는 검사대상이 제한적이라는 단점이 있다.

[0005] 그러나, 세포를 이용한 바이오센서는 실제 세포에 위해를 가하는 물질에 대해서만 주로 반응을 하는 특징이 있기 때문에, 기존 분석방법에 비해 보다 선택적으로 위해 물질을 스크리닝 할 수 있다. 또한, 이러한 특징을 가지고 있는 동물 세포 기반의 바이오센서 기반기술은 식품분야뿐만 아니라, 농업, 국방, 수산 및 축산 등과 같은 환경분야로 확대시킬 수 있는 장점을 가지고 있다.

[0006] 현재까지 세포 기반 바이오센서의 동향은 대부분 외부자극에 대한 세포의 대사 및 형태 변화로부터 야기되는 전기적인 신호, 즉 임피던스(Impedance)의 변화 또는 pH 변화를 감지하거나, 세포 내외로 분비되는 화학물질 및 효소를 발색, 발광시킴으로써 얻어지는 신호를 감지하는 기술들이 보고 되고 있다.

[0007] 상기의 방법들은 세포의 변화를 실시간으로 감지할 수 있어 탐지기술의 발달에 따라 세포기반 바이오센서의 소형화 및 간편화를 구현할 수 있는 발전가능성을 내포하고 있다. 하지만 현재까지 이와 같은 분석방법은 외부 자극에 대한 세포의 물리적 또는 화학적인 반응을 검출하는데까지 소요되는 시간이 길다는 단점을 가지고 있다.

[0008] 현재까지 식중독균의 대표적인 검사방법으로는 플레이트의 동정배지에 배양된 미생물의 콜로니를 통해 1 CFU/ml의 극 저농도까지 계수하여 동정하는 전통적인 방법이 주로 사용되고 있다. 그러나 최종결과를 도출하기까지 복잡한 공정절차와 많은 노동력, 균 분리 및 최종 동정까지 약 1주일의 오랜 분석시간이 소요되는 등 문제점을 수반하기 때문에, 그 정확성에도 불구하고 신속탐지에는 적용이 불가능한 방법이다.

[0009] 이와 같은 분석시간 상의 단점을 보완하고자 중합효소 연쇄 반응 (polymerase chain reaction, PCR)을 이용한 유전자 분석법, 생화학적 분석법, 그리고 효소결합 면역고상 분석법 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)를 이용한 면역화학 분석방법 등이 도입되었다.

- [0010] 그러나 이러한 분석방법들도 비록 전통적 미생물 배양법에 비해 상대적으로 빠르고 민감한 결과를 나타내긴 하였지만 여전히 복잡한 공정절차, 추가적인 미생물 배양 실시로 인하여 최장 약 1일의 오랜 분석시간 및 고가의 기기를 통한 분석으로 인한 장소의 제약 등의 문제점을 여전히 내포하고 있는 실정이다.
- [0011] 추가적인 대안기술로서 앞에서 언급한 효소결합 면역고상 분석법과 같은 항원-항체 반응을 이용하여 샘플의 공급만으로도 식중독균을 약 20분 이내에 신속하게 검출할 수 있는 측면흐름(lateral flow) 기반의 면역크로마토그래피 (immunochromatographic assay, ICA) 분석법이 보고되었다. 이 기술은 몇 종류의 멤브레인 패드(membrane pad) 상에서 이루어지는 모세관 현상을 기반으로 고정된 항체와 골드콜로이드를 표지한 항체와의 샌드위치(sandwich) 결합을 통해 기존의 복잡한 절차 없이 비교적 간편하게 육안으로 식중독균 검사 결과를 정성적으로 알 수 있다는 장점을 내포하고 있다.
- [0012] 그러나, 이 기술 역시 신속검사 방법에서 가장 중요시 되고 있는 민감도 측면에서 기존 효소결합 면역고상 분석법에 비해 낮은 분석성능을 보이고 있어, 탐지할 수 있는 균의 농도범위에 이르기까지 약 24시간 이상이 소요되어, 상대적으로 장시간의 균 배양시간을 추가로 필요로 하게 되는 문제점이 있다.
- [0013] 이와 같은 면역크로마토그래피 분석방법의 단점인 분석민감도를 보완하여 신속하게 식중독균을 탐지할 수 있도록, 실험실 수준에서 수행하였던 효소결합 면역고상 분석법을 면역크로마토그래피와 결합한 EOC(ELISA-on-a-chip)바이오센서가 개발되어 보고되었다. 상기 분석법은 효소를 도입하여 기존의 신호발생원으로 사용하였던 골드콜로이드를 대체함으로써, 교차흐름을 통한 신호발생 시 기존 육안으로 확인하였던 면역크로마토그래피 분석방법 대비 약 20 내지 50배로 분석민감도를 향상시켰다. 이를 통해 총 분석시간을 해당 식중독균의 전배양을 포함하여 약 8 내지 9시간 안에 이루어지게 함으로써 신속하게 식중독균을 검출할 수 있는 방법을 제시하였다.
- [0014] 그러나, 그 장점에도 불구하고 식중독균 전배양 공정이 최소 6시간 이상 이루어져야 하고, 민감도를 향상시키기 위하여 추가적으로 면역자성분리(immuno-magnetic separation)를 통한 농축과 분리공정을 필요로 하여, 결과 도출까지의 분석절차가 복잡하고 노동력이 많이 소요되는 문제점이 있다. 나아가, 식중독균 탐지물질로 항체를 이용함으로써 특정 타겟 균에 대한 특이성 및 식중독균 종간의 교차반응성이 문제된다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0015] 상기와 같은 종래의 문제점을 해결하고자, 본 발명은 병원성 미생물 등의 감염 또는 오염으로 인해 발현되는 동물 세포의 바이오 마커를 이용하고 상기 바이오 마커를 직접 탐지함으로써, 감염원에 대하여 공정절차가 단축되고 간편하게 분석할 수 있는 동물 세포를 이용한 바이오센싱 방법 및 동물 세포를 이용한 감염 진단 바이오 키트를 제공하는 것을 목적으로 한다.

### 과제의 해결 수단

- [0016] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 a) 감염원이 동물 세포가 배양된 배지에 접종되는 단계 및 b) 상기 동물 세포의 바이오 마커가 표지물질이 부착된 탐지체와 반응되는 단계가 포함되는 동물 세포를 이용한 바이오센싱 방법을 제공한다.
- [0017] 또한, 본 발명은 동물 세포를 수용한 웰 및 표지물질이 부착되어 있고, 동물 세포의 바이오 마커를 탐지할 수 있는 탐지체를 포함하는 동물 세포를 이용한 감염 진단 바이오 키트를 제공한다.

### 발명의 효과

- [0018] 본 발명의 a) 감염원이 동물 세포가 배양된 배지에 접종되는 단계 및 b) 상기 동물 세포의 바이오 마커가 표지물질이 부착된 탐지체와 반응되는 단계가 포함됨으로써, 공정절차가 단축되고 간편하게 상기 감염원을 분석하는 바이오센싱 방법을 제공한다.
- [0019] 또한, 본 발명의 동물 세포를 수용한 웰 및 표지물질이 부착되어 있고, 동물 세포의 바이오 마커를 탐지할 수 있는 탐지체를 포함함으로써, 공정절차가 단축되고 간편하며, 실시간으로 감염원을 분석하는 감염 진단 바이오 키트를 제공한다.

### 도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 감염원이 자성비드-복합클론항체와 결합된 도식도이다.

도 2는 감염원의 감염으로 동물 세포에서 발현된 바이오 마커를 탐지체를 이용하여 직접 탐지하여 분석하는 동물 세포를 이용한 바이오센싱 방법의 도식적 설명이다.

도 3은 살아있는 감염원 및 사멸한 감염원을 각각 동물 세포에 감염시켰을 때 나타나는 TLR 1의 발현 양상을 나타내는 그래프이다.

도 4는 대장균(*Escherichia coli*) 및 시겔라소네이균(*Shigella sonnei*)에 대한 A-549 및 RAW264.7의 TLR 1 및 TLR 2 발현 응답시간 분석을 나타내는 그래프이다.

도 5는 면역자성분리 및 농축을 통한 톨-유사 수용체(TLRs) 발현의 응답시간 향상 효과를 나타내는 그래프이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 본 발명은 a) 감염원이 동물 세포가 배양된 배지에 접종되는 단계 및 b) 상기 동물 세포의 바이오 마커가 표지 물질이 부착된 탐지체와 반응되는 단계가 포함되는 동물 세포를 이용한 바이오센싱 방법을 제공한다.

[0022] 상기 감염원은 살아있는 병원성 미생물인 것이 바람직하며, 보다 바람직하게는 병원성 박테리아와 같은 식품유래의 감염원이다. 이때, 상기 감염원에 의한 감염 여부를, 동물 세포를 도입하여 세포의 외부에 노출된 바이오 마커와 특이적이고 결합친화도가 높은 탐지체를 이용하여 신속하게 감지하는 바이오센싱 방법이다.

[0023] 상기 바이오 마커는 세포 수용체 단백질, 세포부착 단백질, 당지질 및 당단백으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것이 바람직하다. 상기 세포 수용체 단백질은 톨-유사 수용체(Toll-like Receptor, TLRs), 이온채널 수용체(Ion channel receptor) 및 G-단백질 결합 수용체(G-protein coupled receptor), 리셉터 구아닐릴 시클라아제(Receptor guanylyl cyclase), 리셉터 티로신 키나아제(Receptor tyrosine kinase, RTK), 사이토카인 리셉터 슈퍼패밀리(Cytokine receptor superfamily), 티로신 포스파타아제(Tyrosine phosphatases) 및 세린/트레오닌 프로테인 키나아제(Serine/threonine protein kinases)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것이 바람직하며, 상기 톨-유사 수용체가 톨-유사 수용체 1(TLR 1), 톨-유사 수용체 2(TLR 2) 및 톨-유사 수용체 4(TLR 4)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것이 바람직하다. 또한, 상기 세포부착 단백질은 인테그린(Integrin), 셀렉틴(Selectin) 및 카데린(Cadherin)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것이 바람직하다.

[0024] 상기 배지에 감염원을 접종하여 동물 세포를 감염 시키면 동물 세포 표면에 일정량 노출된 바이오 마커 중 하나인 톨-유사 수용체(TLRs)는 침입한 감염원의 특정 병원균-연관 분자패턴(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) 부위를 인지하게 되며, 그 결과로 세포 내부로 외부 침입에 대한 경고를 알리는 신호전달이 일어나게 된다.

[0025] 또한, 동물 세포에 감염을 유발시킨 감염원은 시간이 지남에 따라 동물 세포 배지의 영양분을 통해 증식하게 되고, 증가된 감염원의 추가적인 자극에 대응하기 위해 동물 세포는 톨-유사 수용체(TLRs)와 같은 바이오 마커의 발현량을 증가시키게 된다. 상기 증가된 바이오 마커, 즉 톨-유사 수용체(TLRs)는 세포 내로 감염에 대한 경고 신호를 더욱 강하게 전달하며 이를 통해 염증반응 유도를 가속화 시키게 된다.

[0026] 감염시간이 경과할수록 해당 감염에 대해 염증반응을 유발하는 톨-유사 수용체(TLRs)가 세포 외막으로 발현되는 양은 지속적으로 증가를 하게 되는데, 이는 감염원의 증식속도와 비례하여 일어나게 된다.

[0027] 상기 탐지체는 동물 세포의 표면에서 발현되는 바이오 마커와 결합하며, 탐지체에 부착되는 표지물질에 의하여 바이오 마커의 발현 정도를 확인할 수 있고, 궁극적으로 감염원으로부터 동물 세포가 감염되어 면역 반응이 일어나는지 여부를 확인할 수 있는 역할을 한다. 이때, 상기 탐지체는 상기 바이오 마커와 특이적으로 결합되는 항체, 결합 단백질, 핵산, 효소, 압타머(Aptamer) 및 펩티드로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것이 바람직하다.

[0028] 상기 표지물질은 탐지체에 부착되어 상기 탐지체의 바이오 마커에 대한 결합 여부를 나타내는 물질로, 형광체, 발광체, 효소, 금속입자, 플라스틱 입자 및 자성입자로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것이 바람직하며, 구체적으로 상기 형광체는 FITC(fluorescein isothiocyanate:황녹색 형광), TRITC(tetramethylrhodamine isothiocyanate:적등색 형광), 양자점(Quantum dot) 등이 있고, 상기 발광체는 디페닐옥살레이트(Diphenyl oxalate, Cyalume), 루미놀(Luminol), 루시페린(Luciferin) 등이 있고, 상기 효소는 퍼옥시다아제(Peroxidase, Horseradish(서양고추냉이) 등), 산성포스파타아제(acid phosphatase), 알칼리성

포스파타아제(alkaline phosphatase), 글루코오스옥시다아제(glucose oxidase) 등이 있고, 상기 금속입자는 콜로이드알골드(colloidal gold) 등이 있고, 상기 플라스틱 입자는 라텍스 비드(Latex bead) 등이 있고, 자성입자는 철 산화물 나노입자 등이 있으며, 이에 한정하는 것은 아니다.

[0029] 나아가, 본 발명에서 톨-유사 수용체(TLRs)와 같은 바이오 마커와 결합되는 탐지체에 효소를 이용한 효소면역분석법의 다단계 절차가 아닌, 형광체 및 양자점(Quantum dot) 등의 표지를 통하여 실시간 바이오 마커의 모니터링을 구현하여 감염을 인지하는데 소요되는 시간을 더욱 단축시킬 수 있다.

[0030] 즉, 상기 탐지체에 표지물질인 형광체 및 양자점을 화학적 방법을 통해 상호결합을 시킨 후, 동물 세포가 배양된 곳에 감염원 접종 전 미리 최적화 된 양을 첨가하여 준다. 접종 초기에는 상기 탐지체와 표지물질은 동물 세포의 바이오 마커와 반응을 거의 하지 않지만, 감염원 접종 후 시간이 지남에 따라 세포 표면에 발현되는 바이오 마커에 비례하여 탐지체의 결합이 증가하게 된다. 기존 효소면역분석에서는 단계별로 세척을 하여 미반응 탐지체의 제거가 필수적으로 요구되었지만, 형광체 및 양자점을 이용한 중합체의 적용 시에는 세척/분리 등의 공정이 없이 특정 파장대의 빛을 지속적으로 조사하여 바이오 마커와 결합된 탐지체의 형광체 및 양자점을 여기(excitation)시킴으로써 감지되는 형광신호를 측정하여 추가적인 탐지체를 이용하지 않고도 실시간으로 바이오 마커의 변화를 감지할 수 있는 시스템을 구축할 수 있다. 따라서, 감염원의 접종만으로도 바이오 마커인 톨-유사 수용체(TLRs) 등의 발현 양상을 실시간으로 관찰하는 것이 가능하게 됨으로써 기존의 복잡한 식중독 발병 박테리아 등의 분석법을 동물 세포를 기반으로 한 분석방법으로 변화시킬 수 있다.

[0031] 특히 200 CFU 이하의 낮은 접종량의 경우, 기존의 분석 시스템으로는 감염원의 장시간 전배양 공정 및 면역자성농축 등 복잡한 공정을 통해서야 검출할 수 있었던 반면, 본 발명의 동물 세포를 이용한 바이오센싱 방법에서는 복잡한 공정절차 없이 감염원의 접종만으로도 낮은 농도의 감염원을 짧은 시간 안에 검출할 수 있다.

[0032] 보다 구체적으로, 상기 발현된 톨-유사 수용체(TLRs)는 각 수용체의 타입(types) 즉, TLR 1, TLR 2, TLR 4, TLR 5 및 TLR 6 등은 탐지체, 즉 상기 톨-유사 수용체(TLRs)를 인식할 수 있는 항체를 통해 동물 세포막 외부에서 탐지될 수 있다. 즉, 동물 세포의 염증반응 유도 후 감염원을 제거한 후, 톨-유사 수용체(TLRs)에 대한 탐지체인 항체와 효소표지가 된 이차항체를 이용하는 효소결합 면역고상 분석법을 사용하여 그 발현량을 모니터링할 수 있으며, 이를 통해 검출된 신호의 양은 발현된 톨-유사 수용체(TLRs)의 양에 비례하여 나타난다.

[0033] 상기 바이오센싱 방법에 있어서 사용되는 동물 세포가 세포기아(Starvation)상태인 것이 바람직하다. 이는 96-웰 마이크로티터 플레이트(96-well microtiter plate) 등과 같은 세포배양 기판에 동물 세포주를 배양하여 부착 및 세포기아(starvation)상태를 거쳐 감염원으로 인한 외부자극에 대하여 동물 세포가 민감하게 반응할 수 있도록 하는 역할을 한다.

[0034] 상기 동물 세포는 조직에서 분리한 일차세포(primary cell) 또는 세포주(cell line)이며, 상기 일차세포 또는 세포주는 부착형 세포 또는 부유형 세포인 것이 바람직하다. 상기 부착형 세포는 상피세포(epithelial cell), 섬유아세포(fibroblast) 및 내피세포(endothelial cell) 등이 있고, 상기 부유형 세포는 T-세포, B-세포, 수지상세포(dendritic cell), 단구(monocyte) 및 대식세포(macrophage) 등이 있으며, 이에 한정하지 않는다.

[0035] 상기 동물 세포가 감염원을 인지한 후 염증 신호전달경로를 통해 추가적으로 유도되는 톨-유사 수용체(TLRs)의 발현에 영향을 미치는 주요 인자를 규명하기 위해서, 살아있는 박테리아와 단백질 보존제로 사용하고 있는 프로클린(Proclin)을 첨가하여 사멸시킨 박테리아를 감염시켜 그 양상을 비교할 수 있다. 즉, 상기 프로클린(Proclin)은 박테리아 등의 세포막을 침투하여 크렙 사이클(Kreb cycle)과 같은 세포내의 대사회로에서 중요한 역할을 하는 특정 효소 즉, 피루브산탈수소효소(pyruvate dehydrogenase), 알파-케토글루타르산탈수소효소( $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase), 석신산탈수소효소(succinate dehydrogenase), NADH 탈수소효소(NADH dehydrogenase) 등을 저해함으로써 세포대사 및 거대분자 합성을 막아 세포 내 에너지 수준을 급격히 감소시켜 세포를 사멸시킨다고 보고되고 있으므로, 세포외부 PAMPs에 대한 손상을 배제시켜 해당 톨-유사 수용체(TLRs)가 정상적으로 인지할 수 있도록 하여 이를 확인할 수 있다.

[0036] 사멸된 감염원도 외벽의 당지질, 지질단백질 등의 병원균-연관 분자패턴 구조는 변형없이 그대로 유지가 되므로 감염초기 일차적으로 세포표면에 발현된 톨-유사 수용체(TLRs)에 의해 감지된다. 세포 내 신호전달에 의해 활성화된 전사인자(NF- $\kappa$ B)는 염증관련 유전자의 전사를 통해 전구염증 사이토카인(pro-inflammatory cytokines)인 인터루킨-1 $\beta$ (Interleukin-1 $\beta$ ), 종양괴사인자- $\alpha$ (Tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ), 인터페론- $\gamma$ (Interferon- $\gamma$ )등을 세포 외로 분비하는데, 이들은 다른 세포를 자극하여 추가적인 염증반응을 유도함으로써 다른 세포에서도 톨-유사 수용체(TLRs)의 추가적인 발현을 유발하게 된다.

- [0037] 그러나 도 3의 결과를 통해, 이와 같은 2차적인 톨-유사 수용체(TLRs)의 유도현상은 직접적으로 감염원에 의해 유발되는 톨-유사 수용체(TLRs) 발현 속도에 비해 매우 느림을 알 수 있다. 이와 같은 현상은 열-사멸 박테리아(heat-killed bacteria)를 감염시킨 경우에도 유사한 패턴을 보임을 알 수 있는데, 이를 통해 세포간 염증신호 전달에 의한 상대적으로 느린 톨-유사 수용체(TLRs)의 발현 양상을 확인할 수 있다.
- [0038] 나아가, 상기 감염원이 자성비드에 고정된 포획인식 성분과 결합되는 단계를 더 포함하는 것이 바람직하다. 즉, 상기 감염원 접종 전, 감염원을 농축시켜 보다 빠른 분석결과를 얻기 위해 상기 감염원에 대하여 특이하게 반응하는 포획인식 성분을 자성비드에 고정시켜 상기 감염원을 분리 및 농축시키는 것이 바람직하다.(Immuno-magnetic separation) 상기 자성비드를 통해 낮은 농도로 샘플에 존재하는 감염원을 약 100배 정도의 농도로 농축시킬 수 있으며, 이와 같이 농축되어진 감염원을 배지에 접종하여 고정된 동물 세포를 감염시킨다. 따라서 적은 양의 감염원에 대한 분석 시, 기존의 경우 상기 감염원을 배양하여 그 양을 늘린 후 분석해야만 했던 문제점이 있었던 반면, 자성비드를 도입함으로써 이러한 단계를 생략할 수 있어 분석시간을 단축시킬 수 있다.
- [0039] 또한, 상기 자성비드를 도입하여 실제 샘플에 존재하는 감염원 이외의 방해 물질 또는 동물세포에 영향을 미칠 수 있는 물질 등을 사전에 제거하여 분석의 안정성 및 신뢰성을 높일 수 있는 장점이 있다.
- [0040] 도 5에서 각 감염원의 감염에 대한 각 동물 세포의 응답시간에 대한 톨-유사 수용체(TLRs)의 발현량을 살펴보면, 자성농축 후 4 시간의 감염시간을 실제로는 더 앞당길 수 있음을 예상할 수 있다. 즉, 본 발명의 동물 세포를 이용한 바이오센싱 방법에 있어서, 감염원의 농도를 더 크게 하고, 면역자성분리를 통해 감염원의 농도를 더욱 농축시키면 4시간 미만의 시간으로 동물 세포에 대한 감염여부를 확인할 수 있다. 따라서 상기 면역자성분리의 도입은 해당 감염성 균주의 탐지시간을 획기적으로 단축하며, 분석 대상에 대한 본 동물 세포를 이용한 바이오센싱 방법의 특이성을 확보하는 역할을 하게 된다.
- [0041] 또한, 면역자성분리를 하더라도 감염원의 추가 분리 공정이 필요 없어 해당 감염원의 농축 시간이 약 1 시간 이내로 비교적 짧고, 항체 등의 탐지체를 이용함으로써 기존의 세포기반 바이오센서가 가질 수 있는 취약점인 특이성을 확보할 수 있으며, 총 분석시간을 4 시간 이내로 가능하게 하여 기존의 감염원 분석 방법에 비하여 매우 우수한 성능을 나타낸다.
- [0042] 상기 세포의 염증유발 시스템에 핵심 역할을 하는 바이오 마커를 이용한 바이오센싱 방법은 기존의 감염원에 대한 바이오센싱 방법에서 주로 이용하였던 디옥시리보핵산(DNA), 항체 등과 같은 특이적인 생체물질을 이용한 것이 아닌, 체내 선천성 면역반응 시스템을 감염 센서로써 직접적으로 이용했다는 점에 그 특징이 있다. 이를 통해 단지 해당 감염원의 접종만으로 대량의 감염원 배양 등의 복잡한 절차를 배제시킬 수 있어 공정의 단축 및 간편화를 구현할 수 있다.
- [0043] 본 발명에 따르면, 동물 세포의 바이오 마커에 특이적이고 친화도가 높은 탐지체를 통해 신속하게 감염원으로부터의 감염여부를 탐지하는 바이오센싱 방법으로, 기존 병원성 미생물 탐지 시 복잡했던 공정절차를 단축 및 간편화하고, 상기 동물세포기반의 바이오센싱을 이용하여 실시간(real-time)으로 감염여부를 탐지할 수 있다.
- [0044] 즉, 식중독 유발 박테리아 등과 같은 감염원에 대한 동물세포의 물리적 또는 화학적 변화를 측정하는 것이 아닌, 세포의 염증유발 시스템에 핵심 역할을 하는 톨-유사 수용체(TLRs)와 같은 바이오 마커를 도입하여 이를 직접적으로 탐지함으로써 감염원에 대한 특이성과 낮은 개체 수의 감염원에 대한 측정 민감도를 동시에 향상시키는 결과를 도출할 수 있다.
- [0045] 나아가 본 발명은 동물 세포를 수용한 웰 및 표지물질이 부착되어 있고, 동물 세포의 바이오 마커를 탐지할 수 있는 탐지체를 포함하는 동물 세포를 이용한 감염 진단 바이오 키트를 제공한다. 이때, 상기 바이오 키트가 감염원을 인식하는 포획인식 성분을 더 포함하는 것이 바람직하다. 즉, 상기 바이오 키트가 동물 세포의 배양 및 활성을 유지하고, 상기 바이오 키트에 감염원의 자성농축 자동화 모듈이 도입되고, 탐지체에 부착된 표지물질 의한 신호발생 감지를 위한 탐지기가 도입되어 동물 세포를 이용한 감염 진단 바이오 키트로 사용하는 것이 가능하다.
- [0046] 나아가, IT 기술을 도입하여 소형화 된 측정장비를 보강하고, 이를 통해 실험실 밖의 현장에서도 본 발명의 바이오센싱 방법을 사용하는 것이 가능하다.
- [0047] 본 발명을 하기의 실시예를 통하여 보다 구체적으로 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 단지 예시적인 것일 뿐, 본 발명의 기술적 범위를 한정하는 것은 아니다.

- [0048] <실시예>
- [0049] <실시예 1> 살아있는 병원성 미생물과 사멸된 병원성 미생물
- [0050] 1. 세포 배양 및 부착화
- [0051] RPMI1640 medium에 우태아혈청(Fetal Bovine Serum, FBS) (10% (v/v), 최종농도)과 페니실린-스트렙토마이신 용액(Penicillin-streptomycin, 1% (v/v), 최종농도)를 혼합한 배지를 이용하여, 인간 폐 상피세포주인 A-549 (ATCC CCL-185)가 각 웰(well) 당  $6 \times 10^4$  cells의 개수로 유지할 수 있도록 96-웰 세포 배양 플레이트(96-well cell culture plate)에 각각  $200\mu\text{l}$ 씩 주입한 후, 온도  $37^\circ\text{C}$  및 이산화탄소( $\text{CO}_2$ ) 5% 가 유지되는 조건하에서 24 시간 동안 배양을 하였다. 배양을 통해 A-549가 웰 표면에 고착화 된 것을 광학현미경으로 확인(100X) 한 후, 상기 페니실린-스트렙토마이신 용액, 즉 항생제 제거를 위하여 흡입기로 배지를 제거한 후, DPBS (+/+)를  $200\mu\text{l}$ 로 첨가하여 세척하였다. 세척 후 다시 흡입기로 잔여 항생제를 제거한 뒤 RPMI1640 medium 무혈청 배지를  $200\mu\text{l}$ 로 첨가하여 1시간을 경과시켜 세포기아(starvation)상태로 만들었다.
- [0052] 2. 감염원의 감염
- [0053] 염증반응을 통한 TLR 1의 발현을 유도하기 위해 살아있는 대장균(*Escherichia coli*)  $1 \times 10^8$  cells/ml과 단백질 보존제로 프로클린 300(Proclin 300)이 처리되어 사멸된 대장균(*Escherichia coli*)  $1 \times 10^9$  cells/ml를 RPMI1640 medium에 1/10 비율로 순차적으로 희석하여  $10^1$  내지  $10^7$  cells/ml를 준비하였고, 각 농도당  $22\mu\text{l}$ 씩 해당 웰(well)에 분주하여 (최종농도는  $10^0$  내지  $10^6$  cells/ml) 온도  $37^\circ\text{C}$ 와 이산화탄소( $\text{CO}_2$ ) 5% 인 조건에서 각각 2 시간 및 6 시간 동안 감염시켰다. 대장균(*Escherichia coli*)을 전혀 첨가하지 않는 웰은 대조구로서 사용되었다.
- [0054] 각 감염시간 종료 후 흡입기를 통해 배지와 대장균을 제거하였고, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline/modified with Calcium and Magnesium (DPBS(+/+))를  $200\mu\text{l}$ 로 첨가하여 1회 세척하였다.
- [0055] 3. 세포기반 효소면역 분석
- [0056] 감염된 세포는 4% 포르말린 용액을  $100\mu\text{l}$ 로 첨가하여 실내온도에서 30분 동안 처리하여 감염세포를 웰(well)에 고정시켰으며(fixation), 다음 흡입기로 4% 포르말린 용액을 제거 후 고정화가 이루어지지 않은 잔여표면을 Dulbecco's Phosphate Buffered Saline/modified without Calcium and Magnesium (DPBS(-/-))에 0.5% (w/v) 농도로 용해되어 있는 카제인단백질-인산완충용액(Casein-PBS)을  $200\mu\text{l}$ 로 분주하여 습도가 100% 유지되고 온도  $37^\circ\text{C}$  조건에서 1 시간 동안 반응시켰다.
- [0057] 다음 TLR 1 과 특이적으로 결합되는 TLR 1 (H-90) 토끼 복합클론 항체 (rabbit polyclonal antibody)를 0.1% (v/v) tween 20이 포함된 Casein-PBS (Casein-PBS-Tw)를 사용하여 1/300의 비율로 희석하여  $100\mu\text{l}$ 씩 분주하여 동일조건에서 1 시간 동안 반응시킨 후, 반응액을 버리고 0.1% tween 20이 포함된 인산완충용액(PBST)를 이용하여  $200\mu\text{l}$ 씩 3회 세척을 통해 반응되지 않은 항체를 제거하였다. 다음, 이차항체인 HRP conjugated goat anti-rabbit IgG도 0.1% (v/v) tween 20이 포함된 Casein-PBS (Casein-PBS-Tw)를 사용하여 1/5000의 비율로 희석하여  $100\mu\text{l}$ 씩 분주하여 동일 조건에서 1 시간 동안 반응시킨 후, PBST로 같은 방법으로 3회 세척하였다.
- [0058] 50mM acetate, 1% 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) (w/v) 및 3% 과산화수소(v/v)를 1000 : 10 : 1의 비율로 혼합하여 신호발생을 위한 발색기질용액을 제조하고, 상기 발색기질용액을  $200\mu\text{l}$  분주하여 15분 동안 발색 반응을 관찰한 후 2M 황산  $50\mu\text{l}$ 를 분주하여 반응을 정지시켰다. 최종적으로 발색된 신호는 450nm 파장에서 ELISA plate reader (Versamax; Molecular Device, 미국)로 탐지하였다.
- [0059] <실시예 2> 감염원에 의한 동물 세포 감염 및 발현 양상
- [0060] RPMI1640 medium, MEM Eagles with Earle's Balanced Salts(MEM/EBSS) 및 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)에 FBS (10% (v/v), 최종농도)와 페니실린-스트렙토마이신 용액(1% (v/v), 최종농도)을 혼합한 배지를 사용하고, A-549, 인간 자궁경부 상피세포주인 HeLa (ATCC CCL-2) 및 마우스 대식세포주인 RAW264.7 (KCLB 40071)를 각 웰 당  $6 \times 10^4$  cells의 개수로 유지할 수 있도록 96-well cell culture plate에 각각  $200\mu\text{l}$ 씩 주입한 후, 온도  $37^\circ\text{C}$  및 이산화탄소( $\text{CO}_2$ ) 5% 로 유지되는 조건하에서 표면에 부착시켜 24시간 동안 배양하였

다. 배양 후 상기 페니실린-스트렙토마이신 용액, 즉 항생제 제거를 위하여 배지를 흡입기로 제거한 다음, DPBS (+/+)를 200 $\mu$ l로 첨가하여 세척하고, 다시 흡입기로 잔여 항생물질을 제거한 다음 각 세포 별 무혈청 배지를 200 $\mu$ l로 첨가하여 1 시간 동안 세포기아(starvation)상태로 만들었다. 감염을 위하여  $1 \times 10^8$  cells/ml 농도로 보관된 8종의 감염원 즉, 대장균(*Escherichia coli*, ATCC 25922), 장염비브리오균(*Vibrio parahaemolyticus*, ATCC 17802), 살모넬라 엔테리티디스(*Salmonella enteritidis*, KCTC 2514) 및 시겔라소네이균(*Shigella sonnei*, KCTC 2518)을 각 동물 세포에 사용되어진 무혈청 배지에  $10^3$ ,  $10^4$  및  $10^5$  cells/ml 농도로 희석하여 각 웰에 22  $\mu$ l씩 접종을 실시하여 상기한 조건과 동일한 상태에서 감염을 6시간 동안 수행하였다.

[0061] 감염시간 종료 후 TLRs와 특이적으로 결합되는 항체로 TLR 1 (H-90) 토끼 복합클론 항체 (rabbit polyclonal antibody) 및 TLR 2 (H-175) 토끼 복합클론 항체 및 TLR 4 (M-300) 토끼 복합클론 항체를 각각 1/300, 1/200, 1/500로 Casein-PBS-Tw에 희석하여 100 $\mu$ l씩 분주한 것을 제외하고, 상기 실시예 1의 세포기반 효소면역 분석과 동일하게 실시하였다.

[0062] <실시예 3> 응답시간 분석

[0063] 박테리아 감염에 대한 동물세포주의 염증반응을 통한 TLR 1과 TLR 2 발현의 응답시간을 분석하기 위하여 대장균 (*Escherichia coli*)  $1 \times 10^8$  cells/ml 및 시겔라소네이균(*Shigella sonnei*)  $1 \times 10^8$  cells/ml을 각각 RPMI1640 medium 및 DMEM 무혈청 배지에 1/10씩 순차적으로 희석하여  $10^1$  내지  $10^4$  cells/ml를 준비하였고, 각 농도의 균에서 200 $\mu$ l를 취하여 LB agar 배지(G. Bertani, J. Bacteriology, Vol. 186, Page 595-600, 2004)에 스프레딩 (spreading)하여 온도 37°C에서 24시간 배양하여 균 수를 계산하였다.

[0064] 또한, 각 농도당 22 $\mu$ l씩 해당 웰(well)에 분주하여 최종 접종한 균의 개수가 0.2, 2, 20 및 200 CFU/well이 되도록 하고, 온도 37°C 및 이산화탄소(CO<sub>2</sub>) 5%로 유지된 조건하에서 감염을 수행하였다. 이때, 대장균 (*Escherichia coli*) 및 시겔라소네이균(*Shigella sonnei*)를 전혀 첨가하지 않은 웰은 대조구로서 사용되었다.

[0065] 1시간 30분 간격으로 감염반응 종료를 실시하였으며, 9시간까지 감염반응을 수행하였다. 각 감염시간 종료 후에는 흡입기를 통해 배지와 균을 제거하였고, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline/modified with Calcium and Magnesium (DPBS(+/-))를 200 $\mu$ l로 첨가하여 세척을 1회 더 수행하였다.

[0066] 각 시간마다의 TLR 1 및 TLR 2의 응답시간 및 발현량은 상기 실시예 1의 세포기반 효소면역 분석에서 TLRs와 특이적으로 결합되는 항체로 TLR 2 (H-175) 토끼 복합클론 항체를 더 포함하는 것을 제외하고 실시예 1과 동일하게 실시하였다.

[0067] <실시예 4> 자성비드-복합클론항체의 제조 및 성능 검사

[0068] 1. 면역 자성비드 중합체 제조

[0069] 총  $4 \times 10^8$  개의 아민기가 기능화 된 자성비드(Magnetic beads, Dynabeads M-270 Amine, 2.8  $\mu$ m in diameter, 33 $\mu$ l of 30 mg/ml)를 pH 4.5, 100 mM 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) 버퍼를 이용하여 충분히 세척한 후, 1 mg/ml의 대장균 탐지용 염소 복합클론 항체(goat anti-E. coli polyclonal antibody) 20 $\mu$ l 및 증류수로 용해시킨 0.26  $\mu$ M의 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) 120 $\mu$ l를 첨가하여 상온에서 2시간 동안 화학적인 결합을 유도하였다.

[0070] 반응이 완료된 후 pH 8.5, 1 M 에탄올아민(ethanolamine)을 1.2 $\mu$ l로 첨가한 후, 15분간 반응시켜 잔여 반응기를 불활성화 시켰고, 비특이 흡착방지 및 자성비드의 안정성을 향상시키기 위해 pH 7.4, 0.5 % 카제인단백질이 혼합된 Dulbecco's Phosphate Buffered Saline/modified without Calcium and Magnesium (DPBS(-/-))로 실온에서 30분간 코팅을 실시하였다.

[0071] 자석을 이용하여 잔여 반응물을 자성비드-복합클론항체와 3 분간 분리시킨 후, 수용액에서 분리된 자성비드-복합클론항체에 200 $\mu$ l의 카제인-인산완충용액을 첨가함으로써 최종 농도가 5 mg/ml이 되도록 하여, 면역 자성비드 중합체를 제조하였다. 상기 면역 자성비드 중합체는 사용 시까지 온도 4°C에 보관하였다.

[0072] 2. 자성농축 절차 및 성능평가

[0073] 감염원인 대장균(*Escherichia coli*) 및 시겔라소네이균(*Shigella sonnei*)가 각각 접종된 10ml의 무혈청 배지

(대장균은 RPMI1640 medium, 시겔라소네이균은 DMEM)에 제조된 자성비드-복합클론항체를 200 $\mu$ l 첨가하여 상온에서 30분 동안 회전 혼합기(roller mixer)에서 반응시켰다. 반응 후 자석을 이용하여 3분 동안 상기 감염원과 결합한 자성비드-복합클론항체를 제외한 수용액을 제거하였다. 상기 각 균에 대한 무혈청 배지를 100 $\mu$ l 첨가하여 재부유(resuspension) 후 대장균(*Escherichia coli*)은 A-549가 배양된 웰로, 시겔라소네이균(*Shigella sonnei*)은 RAW264.7이 배양된 웰로 각각 100 $\mu$ l씩 분주하여 4시간 동안 감염을 실시하였다.

[0074] 각 시간마다의 TLR 1 및 TLR 2의 응답시간 및 발현량은 상기 실시예 1의 세포기반 효소면역 분석에서 TLRs와 특이적으로 결합되는 항체로 TLR 2 (H-175) 토끼 복합클론 항체를 더 포함하는 것을 제외하고 실시예 1과 동일하게 실시하였다.

[0075] 실시예 1의 경우, 도 3에 나타난 바와 같이 감염원으로 대장균을 선정하였으며 폐 상피세포주인 A-549를 배양 후 무혈청 배지 조건에서 살아있는 대장균과 프로클린(Proclin)을 처리하여 사멸된 대장균을 농도 별로 접종시켜 각각 2시간 및 6시간 동안 염증반응을 유도한 후 톨-유사 수용체 1(TLR 1)의 발현정도를 비교하였다.

[0076] 2시간의 염증반응 유도 후의 TLR 1발현 양상은, 살아있는 대장균과 프로클린(Proclin)에 의해 사멸된 대장균에서 TLR 1발현 양상에 차이가 있음을 알 수 있다. 즉, 살아있는 대장균의 경우 10<sup>4</sup> cells/ml 이상의 접종 농도에서 A-549 세포표면으로 TLR 1의 발현이 일어남을 확인할 수 있는 반면, 사멸된 대장균에 의한 감염에서는 10<sup>6</sup> cells/ml의 고농도의 대장균 접종으로도 TLR 1의 발현이 이루어지지 않음을 알 수 있다.

[0077] 6시간의 염증 반응 후의 TLR 1발현 양상에서는 살아있는 대장균의 경우 지속적으로 TLR 1이 증가하여 10<sup>2</sup> cells/ml의 이상의 저농도에서도 감염여부를 감지할 수 있었다. 사멸된 대장균을 접종한 경우, 2시간의 염증반응 시간에는 감지되지 않았던 TLR 1의 신호가 6시간의 염증반응 시간에서는 10<sup>5</sup> cells/ml 이상의 고농도에서 탐지가 됨을 확인할 수 있는데, 이는 대장균의 증식이 추가적으로 이루어지지 않은 상태에서 세포간의 염증 신호 전달 과정에서 이루어진 것임을 알 수 있다.

[0078] 반면 살아있는 감염원은 시간이 지남에 따라 배지의 영양성분인 아미노산, 비타민, 무기염류, 포도당 등을 바탕으로 지속적으로 증식하며, 이는 접종 농도가 높을수록 그에 비례하여 톨-유사 수용체(TLRs)의 발현이 증가하는데, 도 3에서 10<sup>5</sup> cells/ml이상의 대장균의 경우, 2시간 이내의 짧은 감염시간 만으로도 TLR 1을 발현시켜 대장균을 탐지할 수 있음을 알 수 있다. 즉, 고농도의 감염원에서는 비교적 짧은 유도기(lag phase)를 거치며, 상기 대장균의 증식이 빨리 일어나기 때문이다.

[0079] 따라서, 톨-유사 수용체(TLRs)의 발현인자 규명 실험을 통해, 감염원의 감염에 의한 톨-유사 수용체(TLRs)발현의 주 인자는 사이토카인 또는 케모카인(chemokines)과 같은 세포간의 신호전달 물질 보다는, 직접적으로 톨-유사 수용체(TLRs)에 작용하여 발현을 유도하는 증식된 감염원의 수 임을 알 수 있다.

[0080] 실시예 2의 경우, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup> 및 10<sup>5</sup> cells/ml의 감염원 농도에 대한 TLRs신호 증가 추이를 분석하여, TLR 1, TLR 2 및 TLR 4의 상대적인 증가량에 따라 각각 비반응성(non-reactive), 약반응성(weakly reactive), 중간반응성(reactive) 및 고반응성(highly reactive)로 평가하고, 하기의 표 1에 나타내었다.

표 1

[0081]

|           |       | 대장균( <i>Escherichia coli</i> ) | 장염비브리오균( <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ) | 살모넬라 엔테리티디스( <i>Salmonella enteritidis</i> ) | 시겔라소네이균( <i>Shigella sonnei</i> ) |
|-----------|-------|--------------------------------|-------------------------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------|
| A-549     | TLR 1 | +++                            | +                                         | -                                            | +                                 |
|           | TLR 2 | +                              | -                                         | +                                            | ++                                |
|           | TLR 4 | +                              | -                                         | ++                                           | ++                                |
| HeLa      | TLR 1 | +                              | +                                         | -                                            | +                                 |
|           | TLR 2 | +                              | -                                         | +                                            | +++                               |
|           | TLR 4 | +                              | ++                                        | ++                                           | ++                                |
| RAW 264.7 | TLR 1 | +                              | ++                                        | +                                            | +                                 |
|           | TLR 2 | +                              | ++                                        | ++                                           | +++                               |
|           | TLR 4 | ++                             | ++                                        | ++                                           | ++                                |

- : 비반응성  
+ : 약반응성  
++ : 중간반응성  
+++ : 고반응성

- [0082] 상기의 표 1의 분석결과를 통해 각 동물 세포마다 병원성 미생물의 감염에 대한 반응성은 약간의 차이가 있음을 알 수 있다. 우선 폐 상피세포주(lung epithelial cell)인 A-549의 경우 대장균(*Escherichia coli*)과 살모넬라 엔테리티디스(*Salmonella enteritidis*) 및 시겔라소네이균(*Shigella sonnei*)에 대한 톨-유사 수용체(TLRs)의 반응성이 있는 반면 이를 제외한 다른 병원성 미생물에 대하여는 반응성이 전혀 없거나 미약한 것을 알 수 있다. HeLa의 경우에는 A-549 보다는 반응 스펙트럼이 넓지만 반응성은 시겔라소네이균(*Shigella sonnei*)를 제외하고는 미약한 경향이 보임을 알 수 있다. 면역 관련 대식세포인 RAW264.7에서는 A-549와 비교적 유사한 패턴을 보이지만, 특히 장염비브리오균(*Vibrio parahaemolyticus*)의 감염에 대해서는 다른 두 세포주에 비해 강한 톨-유사 수용체(TLRs) 반응성을 나타냄을 알 수 있다.
- [0083] 즉, 각 동물 세포에 따라 감염원에 대응하는 세포 내 반응 메커니즘이 서로 상이함에 기인한다고 생각할 수 있으며, 이는 수많은 종류의 각기 다른 감염원의 감염에 대해 체내의 각 세포들은 세포 내에서 유전적으로는 동일한 신호전달 등이 이루어 지게 되지만, 각 세포가 위치하고 있는 조직에 따라 그에 대한 반응양상은 다를 것이기 때문이다. 또한 감염원 마다 세포를 감염시키는 메커니즘도 다르기 때문에 톨-유사 수용체(TLRs)발현양상이 다른 것이라고 알 수 있다.
- [0084] 실시예 3에서, 대장균(*Escherichia coli*)은 A-549에, 시겔라소네이균(*Shigella sonnei*)은 RAW264.7 세포에 각각 접종을 시켜 해당 TLR 1 및 TLR 2 수용체의 발현을 유도하여 그 발현량을 시간에 따라 분석하여 도 4에 나타내었다.
- [0085] 대장균(*Escherichia coli*) 감염에 대한 A-549 세포의 TLR 1 응답시간의 경우 대장균(*Escherichia coli*)의 접종량에 따라 발현되는 시간이 단축되는 경향이 보임을 관찰할 수 있다.(도 4, 왼쪽) 200 CFU로 접종한 경우에는 약 4시간 30분부터, 20 CFU로 접종한 경우에는 6시간 이후부터, 그리고 2 CFU로 접종한 경우라도 7시간 이내에는 검출할 수 있음을 알 수 있다. 반면 대조구로서 0 CFU에서는 9시간의 감염시간 동안 TLR 1의 발현이 전혀 이루어지지 않음을 알 수 있다.
- [0086] 시겔라소네이균(*Shigella sonnei*)감염에 대한 RAW264.7의 TLR 2 응답시간 분석의 경우에도 대장균(*Escherichia coli*)의 TLR 1 발현과 유사한 패턴으로 TLR 2가 발현이 되고 있음을 관찰할 수 있다.(도 4, 오른쪽)
- [0087] 실시예 4에서, 대장균(*Escherichia coli*) 및 시겔라소네이균(*Shigella sonnei*)의 감염원에서 각각 대장균(*Escherichia coli*)의 경우는 20 CFU, 시겔라소네이균(*Shigella sonnei*)의 경우 2 CFU로 동물 세포에 감염을 시켰고, 시간에 따라 해당 감염원에 대한 동물 세포의 톨-유사 수용체(TLRs)의 발현 여부를 모니터링 하였다.
- [0088] 한편 면역자성분리의 효과를 위하여 동일한 초기농도의 균을 10 ml에서 100  $\mu$ l로 1/100 비율로 자성농축한 후 동물세포에 접종하여 4 시간의 감염시간을 주어 해당 톨-유사 수용체(TLRs)의 발현량을 분석하여 도 5에 나타내었다. 즉, 20 CFU를 접종시켰던 대장균(*Escherichia coli*)의 경우, 자성농축 후 4 시간의 감염시간으로도 자성농축 전 8시간의 감염시간에서 TLR 1 발현정도와 비슷한 수준의 TLR 1이 발현됨을 관찰할 수 있었고, 또한 시겔라소네이균(*Shigella sonnei*)의 경우에도 농축 후 4 시간의 감염시간 만으로 농축 전 9시간에 상당하는 TLR 2의 발현량을 탐지할 수 있음을 알 수 있다.

### 산업상 이용가능성

- [0089] 본 발명의 동물 세포의 바이오 마커를 감염원의 인식성분으로 이용하여 기존 분석방법에 비해 보다 신속하고, 상기 감염원을 탐지하는데 한번의 접종만으로 결과를 도출하기까지 공정절차를 간소화 시킬 수 있다. 이는, 동물 세포의 배양공정 최적화 및 바이오멤스(Bio-MEMS) 등의 기술 도입을 통해 기존 실험실에 국한하였던 병원성 미생물 등 감염원의 검출방법을 실험실 밖의 현장에서도 사용할 수 있도록 구성부품 및 제작방법이 획기적으로 단순화될 수 있음을 의미한다.

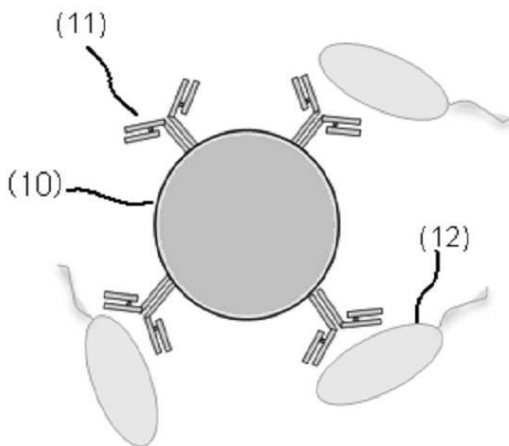
[0090] 또한, 본 발명의 동물 세포를 이용한 바이오센싱 방법을 통해 수질 오염물질 탐지 시스템, 독성물질 탐지 시스템, 신약 스크리닝 시스템, 축산농가에서의 바이러스 탐지 시스템, 생물공정 모니터링 시스템, 식품 생산공정 모니터링 시스템 등산업 전반에서 널리 활용될 수 있다.

### 부호의 설명

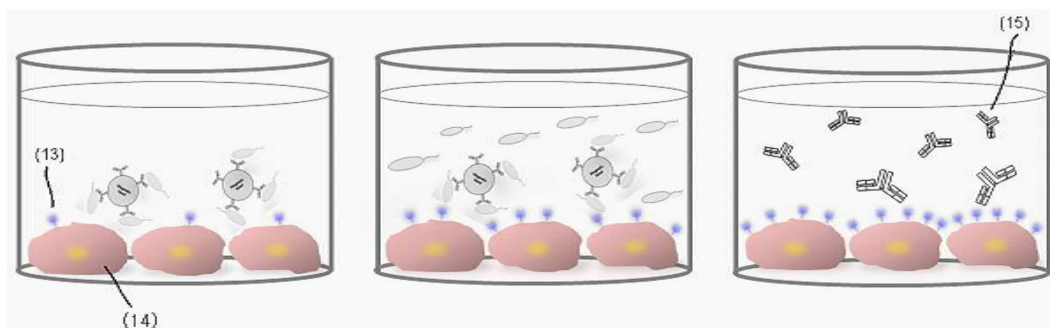
[0091] 10 : 자성비드  
11 : 포획인식 성분  
12 : 감염원  
13 : 바이오 마커  
14 : 동물 세포  
15 : 탐지체

### 도면

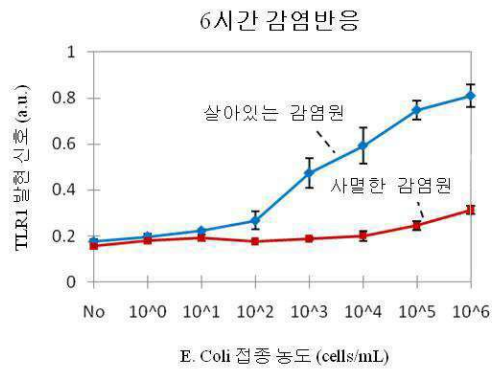
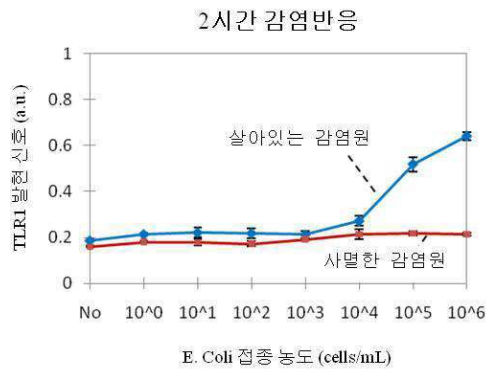
도면1



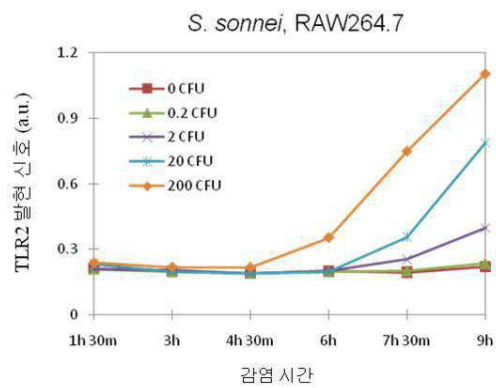
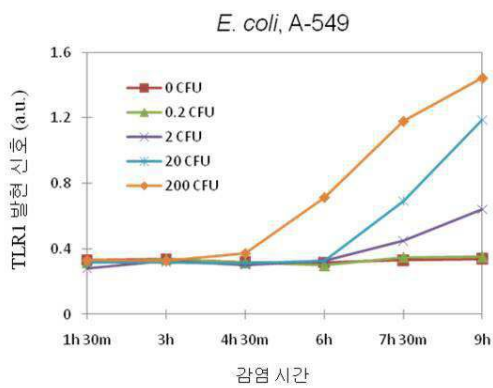
도면2



도면3



도면4



도면5

