



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년04월25일

(11) 등록번호 10-2526120

(24) 등록일자 2023년04월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/70 (2006.01) **G01N 21/552** (2014.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C12Q 1/70 (2022.05)
G01N 21/554 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0001312

(22) 출원일자 2021년01월06일

심사청구일자 2021년01월06일

(65) 공개번호 10-2022-0099274

(43) 공개일자 2022년07월13일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020100134103 A*

KR1020160002279 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

변재철

서울특별시 서초구 잠원로 46-38, 101동 301호(잠원동, 브라운스톤잠원)

(74) 대리인

남건필, 박중수, 차상윤

전체 청구항 수 : 총 13 항

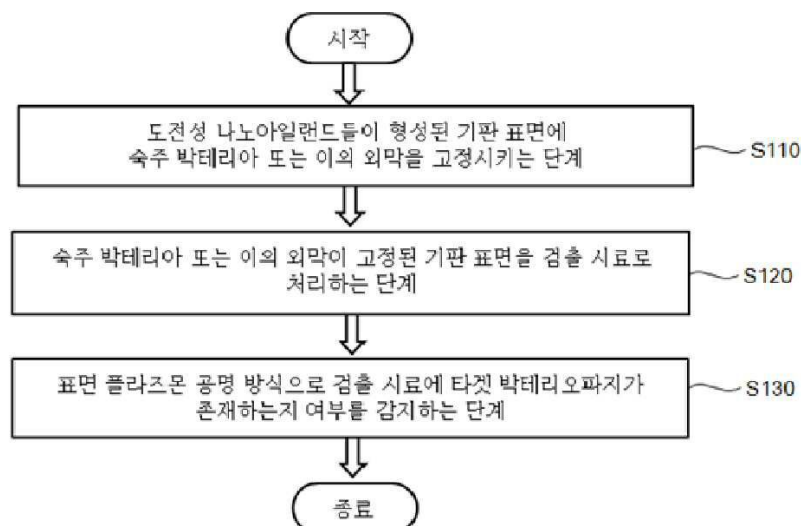
심사관 : 김현태

(54) 발명의 명칭 타겟 박테리오파지의 감지방법, 선별 방법, 배양방법 그리고 선별 및 동정 방법

(57) 요약

타겟 박테리오파지의 감지 방법이 개시된다. 타겟 박테리오파지의 감지 방법은 도전성 나노아일랜드들이 형성된 기관 표면에 타겟 박테리오파지와 선택적으로 반응하는 숙주 박테리아 또는 이의 외막을 고정시키는 단계; 상기 숙주 박테리아 또는 이의 외막이 고정된 기관 표면을 검출 시료로 처리하는 단계; 및 표면 플라즈몬 공명(SPR) 방식으로 상기 검출 시료에 상기 타겟 박테리오파지가 존재하는지 여부를 감지하는 단계를 구비한다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류
G01N 33/6851 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

도전성 나노아일랜드들이 형성된 기판 표면에 타겟 박테리오파지와 선택적으로 반응하는 숙주 박테리아의 외막을 고정시키는 제1 단계;

상기 숙주 박테리아의 외막이 고정된 기판 표면을 검출 시료로 처리하는 제2 단계; 및

표면 플라즈몬 공명(SPR) 방식으로 상기 검출 시료에 상기 타겟 박테리오파지가 존재하는지 여부를 감지하는 제3 단계를 포함하는, 타겟 박테리오파지의 감지 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 도전성 나노아일랜드들은 금속, 준금속, 합금 또는 도전성 금속 산화물로 형성된 것을 특징으로 하는, 타겟 박테리오파지의 감지 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 숙주 박테리아는 링커(linker) 화합물을 통해 상기 기판의 표면에 고정되는 것을 특징으로 하는, 타겟 박테리오파지의 감지 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 숙주 박테리아의 외막은 그람음성균(gram-negative bacteria)의 세포외막(outer membrane)을 포함하고,

상기 제1 단계에서 상기 세포외막은 소수성 처리된 상기 기판의 표면에 코팅층을 형성하는 것을 특징으로 하는, 타겟 박테리오파지의 감지 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 제3 단계에서, 상기 검출시료가 처리된 기판에 광을 조사하여 상기 도전성 나노아일랜드의 표면에 야기되는 표면 플라즈몬파의 공명 파장 또는 공명 각도의 변화를 측정함으로써 상기 검출 시료에 상기 타겟 박테리오파지가 존재하는지 여부를 판별하는 것을 특징으로 하는, 타겟 박테리오파지의 감지 방법.

청구항 6

기판 표면에 타겟 박테리오파지와 선택적으로 반응하는 숙주 박테리아의 외막을 고정시키는 제1 단계; 및

상기 숙주 박테리아의 외막이 고정된 기판 표면을 상기 타겟 박테리오파지를 함유하는 검출 시료로 처리하는 제2 단계; 및

상기 검출 시료 중 미반응 물질을 제거하는 제3 단계를 포함하고,

상기 제2 단계에서 상기 검출 시료에 포함된 타겟 박테리오파지는 상기 숙주 박테리아의 외막과 반응하여, 상기 제3 단계에서 제거되지 않고 잔존하는 것을 특징으로 하는, 타겟 박테리오파지의 선별 방법.

청구항 7

기판 표면에 타겟 박테리오파지와 선택적으로 반응하는 숙주 박테리아의 외막을 고정시키는 제1 단계; 및

상기 숙주 박테리아의 외막이 고정된 기판 표면을 상기 타겟 박테리오파지를 함유하는 검출 시료로 처리하는 제

2 단계;

상기 검출 시료 중 미반응 물질을 제거하는 제3 단계; 및

상기 숙주 박테리아의 외막에 상기 타겟 박테리오파지가 반응된 기관을 상기 숙주 박테리아의 배양액에 투입하여 상기 타겟 박테리오파지를 배양하는 제4 단계를 포함하는, 타겟 박테리오파지의 배양 방법.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 숙주 박테리아의 외막은 그람음성균(gram-negative bacteria)의 세포외막(outer membrane)을 포함하고,

상기 제1 단계에서 상기 세포외막은 소수성 처리된 상기 기관의 표면에 코팅층을 형성하는 것을 특징으로 하는, 타겟 박테리오파지의 선별 방법.

청구항 9

기관 표면에 타겟 박테리오파지와 선택적으로 반응하는 숙주 박테리아의 외막을 고정시키는 제1 단계;

상기 숙주 박테리아의 외막이 고정된 기관 표면을 상기 타겟 박테리오파지를 함유하는 검출 시료로 처리하는 제2 단계; 및

레이저 탈착 및 이온화 질량분석법(Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry, LDI-MS)을 통해 상기 숙주 박테리아의 외막에 결합된 타겟 박테리오파지를 동정하는 제3 단계를 포함하는, 타겟 박테리오파지의 선별 및 동정 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 제3 단계는 무기 매트릭스를 이용한 레이저 탈착 및 이온화 질량분석법(LDI-MS)을 통해 수행되는 것을 특징으로 하는, 타겟 박테리오파지의 선별 및 동정 방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 무기 매트릭스는 반도체 나노선 및 상기 반도체 나노선 표면에 결합된 다공성 금속 나노입자를 포함하는 것을 특징으로 하는, 타겟 박테리오파지의 선별 및 동정 방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 반도체 나노선은 이산화티타늄(TiO_2), 산화아연(ZnO), 이산화지르코늄(ZrO_2) 또는 삼산화텅스텐(WO_3)으로 형성되고,

상기 다공성 금속 나노입자는 금(Au)으로 형성된 것을 특징으로 하는, 타겟 박테리오파지의 선별 및 동정 방법.

청구항 13

제7항에 있어서,

상기 숙주 박테리아의 외막은 그람음성균(gram-negative bacteria)의 세포외막(outer membrane)을 포함하고,

상기 제1 단계에서 상기 세포외막은 소수성 처리된 상기 기관의 표면에 코팅층을 형성하는 것을 특징으로 하는, 타겟 박테리오파지의 배양 방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 검출 시료로부터 타겟 박테리오파지를 감지하거나 선별할 수 있고, 또한, 이를 배양하거나 동정할 수

[0001]

방법들에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 박테리오파지는 숙주 박테리아에 감염을 일으켜 숙주 박테리아의 사멸을 유도할 수 있다. 따라서 최근 박테리오파지를 특정 박테리아의 사멸 및 생장억제에 효과가 있는 항생제 대용제로 활용하기 위한 연구가 활발히 수행되고 있고, 특정 박테리아를 감염시킬 수 있는 타겟 박테리오파지를 단시간에 대량으로 획득할 수 있는 기술의 개발이 요구되고 있다.
- [0003] 종래에는 특정 박테리아를 감염시킬 수 있는 타겟 박테리오파지를 선별하기 위해, 박테리아와 박테리오파지의 혼합을 혼합한 후 플레이트에 배양하여 박테리아의 사멸에 의한 플라크(plaque)의 발생을 추적하는 방식이 주로 사용되었다. 하지만, 이러한 종래기술에 따르면, 여러 박테리오파지가 혼합되어 있는 시료로부터 타겟 박테리오파지를 선별하기 위해서는, 상기 박테리오파지들의 혼합물을 박테리아와 배양하고 선별하는 과정을 반복하여 수행하여야 하므로, 타겟 박테리오파지를 선별하는데 장시간이 소요될 뿐만 아니라 선별 가능성도 매우 낮은 문제점이 있었다.
- [0004] 따라서 박테리오파지들의 혼합물로부터 타겟 박테리오파지를 단시간에 선별하고 이를 배양 또는 동정할 수 있는 기술의 개발이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0005] 본 발명의 일 목적은 숙주 박테리오파지 또는 이의 외막이 고정된 기판을 이용하여 타겟 박테리오파지를 단시간에 감지할 수 있는 타겟 박테리오파지의 감지방법을 제공하는 것이다.
- [0006] 본 발명의 다른 목적은 숙주 박테리오파지 또는 이의 외막이 고정된 기판을 이용하여 타겟 박테리오파지를 단시간에 선별할 수 있는 타겟 박테리오파지의 선별방법을 제공하는 것이다.
- [0007] 본 발명의 또 다른 목적은 숙주 박테리오파지 또는 이의 외막이 고정된 기판을 이용하여 타겟 박테리오파지를 단시간에 선별한 후 배양할 수 있는 타겟 박테리오파지의 배양방법을 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 또 다른 목적은 숙주 박테리오파지 또는 이의 외막이 고정된 기판을 이용하여 타겟 박테리오파지를 단시간에 선별한 후 동정할 수 있는 타겟 박테리오파지의 선별 및 동정 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0009] 본 발명의 실시예에 따른 타겟 박테리오파지의 감지 방법은 도전성 나노아일랜드들이 형성된 기판 표면에 타겟 박테리오파지와 선택적으로 반응하는 숙주 박테리아 또는 이의 외막을 고정시키는 제1 단계; 상기 숙주 박테리아 또는 이의 외막이 고정된 기판 표면을 검출 시료로 처리하는 제2 단계; 및 표면 플라즈몬 공명(SPR) 방식으로 상기 검출 시료에 상기 타겟 박테리오파지가 존재하는지 여부를 감지하는 제3 단계를 포함한다.
- [0010] 일 실시예에 있어서, 상기 도전성 나노아일랜드들은 금속, 준금속, 합금 또는 도전성 금속 산화물로 형성될 수 있다.
- [0011] 일 실시예에 있어서, 상기 숙주 박테리아는 링커(linker) 화합물을 통해 상기 기판의 표면에 고정될 수 있다.
- [0012] 일 실시예에 있어서, 상기 숙주 박테리아의 외막은 그람음성균(gram-negative bacteria)의 세포외막(outer membrane)을 포함하고, 상기 제1 단계에서 상기 세포외막은 소수성 처리된 상기 기판의 표면에 코팅층을 형성할 수 있다.
- [0013] 일 실시예에 있어서, 상기 제3 단계에서, 상기 검출시료가 처리된 기판에 광을 조사하여 상기 도전성 나노아일랜드의 표면에 야기되는 표면 플라즈몬파의 공명 파장 또는 공명 각도의 변화를 측정함으로써 상기 검출 시료에 상기 타겟 박테리오파지가 존재하는지 여부를 판별할 수 있다.
- [0014] 본 발명의 실시예에 따른 타겟 박테리오파지의 선별 방법은 기판 표면에 타겟 박테리오파지와 선택적으로 반응하는 숙주 박테리아 또는 이의 외막을 고정시키는 제1 단계; 및 상기 숙주 박테리아 또는 이의 외막이 고정된 기판 표면을 상기 타겟 박테리오파지를 함유하는 검출 시료로 처리하는 제2 단계; 및 상기 검출 시료 중 미반응 물질을 제거하는 제3 단계를 포함하고, 상기 제2 단계에서 상기 검출 시료에 포함된 타겟 박테리오파지는 상기

숙주 박테리아 또는 이의 외막과 반응하여, 상기 제3 단계에서 제거되지 않고 잔존할 수 있다.

- [0015] 본 발명의 실시예에 따른 타겟 박테리오파지의 배양 방법은 기관 표면에 타겟 박테리오파지와 선택적으로 반응하는 숙주 박테리아 또는 이의 외막을 고정시키는 제1 단계; 상기 숙주 박테리아 또는 이의 외막이 고정된 기관 표면을 상기 타겟 박테리오파지를 함유하는 검출 시료로 처리하는 제2 단계; 상기 검출 시료 중 미반응 물질을 제거하는 제3 단계; 및 상기 숙주 박테리아 또는 이의 외막에 상기 타겟 박테리오파지가 반응된 기관을 상기 숙주 박테리아의 배양액에 투입하여 상기 타겟 박테리오파지를 배양하는 제4 단계를 포함한다.
- [0016] 일 실시예에 있어서, 상기 숙주 박테리아의 외막은 그람음성균(gram-negative bacteria)의 세포외막(outer membrane)을 포함하고, 상기 제1 단계에서 상기 세포외막은 소수성 처리된 상기 기관의 표면에 코팅층을 형성할 수 있다.
- [0017] 본 발명의 실시예에 따른 타겟 박테리오파지의 선별 및 동정 방법은 기관 표면에 타겟 박테리오파지와 선택적으로 반응하는 숙주 박테리아 또는 이의 외막을 고정시키는 제1 단계; 상기 숙주 박테리아 또는 이의 외막이 고정된 기관 표면을 상기 타겟 박테리오파지를 함유하는 검출 시료로 처리하는 제2 단계; 및 레이저 탈착 및 이온화 질량분석법(Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry, LDI-MS)을 통해 상기 숙주 박테리아 또는 이의 외막에 결합된 타겟 박테리오파지를 동정하는 제3 단계를 포함한다.
- [0018] 일 실시예에 있어서, 상기 제3 단계는 무기 매트릭스를 이용한 레이저 탈착 및 이온화 질량분석법(LDI-MS)을 통해 수행될 수 있다.
- [0019] 일 실시예에 있어서, 상기 무기 매트릭스는 반도체 나노선 및 상기 반도체 나노선 표면에 결합된 다공성 금속 나노입자를 포함할 수 있다.
- [0020] 일 실시예에 있어서, 상기 반도체 나노선은 이산화티타늄(TiO_2), 산화아연(ZnO), 이산화지르코늄(ZrO_2) 또는 삼산화텅스텐(WO_3)으로 형성되고, 상기 다공성 금속 나노입자는 금(Au)으로 형성될 수 있다.

발명의 효과

- [0021] 본 발명의 타겟 박테리오파지 감지 방법, 선별 방법, 배양 방법 그리고 선별 및 동정 방법에 따르면, 기관에 고정된 숙주 박테리아 또는 이의 외막을 이용하여 타겟 박테리오파지를 선별할 수 있으므로, 다양한 종의 박테리오파지를 포함하는 검출 시료로부터 타겟 박테리오파지를 선별하는 경우에도 반복적인 선별 과정을 수행할 필요가 없으므로 단시간에 타겟 박테리오파지를 선별할 수 있다.
- [0022] 그리고, 동일한 기관을 이용하여 선별된 타겟 박테리오파지를 배양하거나 동정하는 것이 가능하므로, 타겟 박테리오파지를 단시간에 대량으로 획득하는 것이 가능하다.

도면의 간단한 설명

- [0023] 도 1a 및 도 1b는 본 발명의 일 실시예에 따른 타겟 박테리오파지의 감지방법을 설명하기 위한 순서도 및 모식도이고, 도 1c는 표면플라즈몬 공명을 이용한 타겟 박테리오파지의 감지 단계를 설명하기 위한 도면이다.
- 도 2는 도전성 나노아일랜드가 형성된 기관들에 각각 고정된 “BL21”, “E.coli 0157”, “Salmonella typhimurium” 및 “Salmonella enteritidis”의 외막들을 타겟 박테리오파지로 처리한 후 측정된 표면플라즈몬 공명의 흡광피크를 나타내는 그래프들이다.
- 도 3a는 본 발명의 일 실시예에 따른 타겟 박테리오파지의 선별 또는 배양 방법을 설명하기 위한 순서도이고, 도 3b는 숙주 박테리아의 외막을 고정된 바이오칩을 이용하여 타겟 박테리오파지를 배양하는 방법을 설명하기 위한 도면이다.
- 도 4는 “Salmonella enteritidis”의 외막을 고정된 기관을 통해 선별된 타겟 박테리오파지를 “Salmonella enteritidis”, “BL21”, “E.coli 0157” 및 “Salmonella typhimurium”를 각각 함유하는 배양액들에 처리한 결과를 나타내는 이미지들이다.
- 도 5a 및 도 5b는 본 발명의 실시예에 따른 타겟 박테리오파지의 선별 및 동정(identification) 방법을 설명하기 위한 순서도 및 모식도이고, 도 5c는 상기 타겟 박테리오파지를 동정하기 위한 레이저 탈착 및 이온화 질량분석에 적용되는 매트릭스의 일 실시예를 설명하기 위한 도면이다.
- 도 6a는 유기물인 CHCA(α -cyano-4-hydroxycinnamic acid) 및 DHB(Dihydroxybenzoic acid)를 각각 매트릭스로

사용하여 박테리오파지에 대한 말디툼 질량분석을 수행한 결과들이고, 도 6b는 무기물인 TiO₂ 나노입자, TiO₂ 나노선 및 TiO₂ 나노입자/나노선 복합체를 각각 매트릭스로 사용하여 상기 박테리오파지에 대한 말디툼 질량분석을 수행한 결과들이다.

도 7은 기관들에 각각 고정된 “BL21”, “E.coli 0157”, “Salmonella typhimurium” 및 “Salmonella enteritidis”의 외막들을 타겟 박테리오파지로 처리한 후 측정된 탈착 및 이온화 질량분석법의 질량피크들을 나타내는 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 이하, 첨부한 도면을 참조하여 본 발명의 실시예에 대해 상세히 설명한다. 본 발명은 다양한 변경을 가할 수 있고 여러 가지 형태를 가질 수 있는 바, 특정 실시 예들을 도면에 예시하고 본문에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나 이는 본 발명을 특정한 개시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변경, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 각 도면을 설명하면서 유사한 참조부호를 유사한 구성요소에 대해 사용하였다. 첨부된 도면에 있어서, 구조물들의 치수는 본 발명의 명확성을 기하기 위하여 실제보다 확대하여 도시한 것이다.
- [0025] 본 출원에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시 예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 본 발명을 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 출원에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.
- [0026] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.
- [0028] 도 1a 및 도 1b는 본 발명의 일 실시예에 따른 타겟 박테리오파지의 감지방법을 설명하기 위한 순서도 및 모식도이고, 도 1c는 표면플라즈몬 공명을 이용한 타겟 박테리오파지의 감지 단계를 설명하기 위한 도면이다.
- [0029] 도 1a 내지 도 1c를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 타겟 박테리오파지의 감지 방법은, 도전성 나노아일랜드들이 형성된 기관 표면에 상기 타겟 박테리오파지와 선택적으로 반응하는 숙주 박테리아 또는 이의 외막을 고정시키는 제1 단계(S110); 상기 숙주 박테리아 또는 이의 외막이 고정된 기관 표면을 검출 시료로 처리하는 제2 단계(S120); 및 표면 플라즈몬 공명(SPR) 방식으로 상기 검출 시료에 상기 타겟 박테리오파지가 존재하는지 여부를 감지하는 제3 단계(S130)를 포함할 수 있다.
- [0030] 상기 제1 단계(S110)에 있어서, 상기 타겟 박테리오파지는 특별히 제한되지 않는다. 일 실시예로, 상기 타겟 박테리오파지는 체세포 콜리파지, 특이성 F-RNA 박테리오파지, 박테로이데스프라길리스를 감염시키는 박테리오파지 등을 포함할 수 있다. 예를 들면, 상기 박테리오파지는 락토바실루스 불가리쿠스, 락토바실루스 락티스, 락토바실루스 헬베티쿠스, 락토바실루스 플란타룸, 스트렙토코쿠스 테르모필루스와 같은 락트산 박테리아를 감염시킬 수 있는 박테리오파지를 포함할 수 있다.
- [0031] 상기 기관은 광을 투과시킬 수 있는 재질로 형성될 수 있다. 예를 들면, 상기 기관은 투명 고분자 또는 글라스 재료로 형성될 수 있다.
- [0032] 상기 도전성 나노아일랜드들은 상기 기관의 표면 상에서 서로 이격되게 배치될 수 있다. 상기 도전성 나노아일랜드들에 의해 국소 표면 플라즈몬 공명(localized plasmon resonance)이 야기될 수 있다. 일 실시예로, 상기 도전성 나노아일랜드들은 금속, 준금속, 합금, 도전성 금속 산화물 등으로 형성될 수 있다. 상기 도전성 나노아일랜드들은 직접 상기 기관 표면에 결합될 수도 있고, 바인더 소재를 통해 상기 기관에 결합될 수도 있다.
- [0033] 일 실시예로, 상기 도전성 나노아일랜드들이 제1 금속과 제2 금속의 합금으로 형성된 경우, 도 1b에 도시된 바와 같이, 기관 상에 제1 금속의 박막 및 제2 금속의 박막을 순차적으로 형성한 후 상기 제1 및 제2 금속의 용융 온도보다 낮은 온도에서 열처리함으로써 상기 기관 상에 상기 도전성 나노아일랜드들을 형성할 수 있다. 증착 직후 상기 제1 금속의 박막 및 상기 제2 금속의 박막은 열역학적으로 불안정하므로, 상기 열처리에 표면 에너지를 최소화하기 위해 상기 제1 및 제2 금속은 상기 기관의 표면에서 디웨팅 또는 응집되어 상기 합금 나노입자

들을 형성할 수 있다.

- [0034] 상기 숙주 박테리아 또는 이의 외막을 상기 기관 표면에 부착하는 방법은 특별히 제한되지 않는다.
- [0035] 일 실시예에 있어서, 상기 숙주 박테리아를 상기 기관의 표면에 고정시키는 경우, 상기 숙주 박테리아는 공지의 다양한 방법들을 통해 상기 기관에 고정될 수 있다. 일 실시예로, 상기 숙주 박테리아는 링커(linker) 화합물을 통해 상기 기관의 표면에 고정될 수 있다. 예를 들면, 상기 기관의 표면을 아비딘 또는 아비딘 유래 단백질 등의 생물학적 물질로 수식하고, 상기 숙주 박테리아를 비오티닐화한 후 상기 아비딘 또는 아비딘 유래 단백질 물질과 상기 숙주 박테리아에 도입된 비오티인 사이의 상호작용을 통해 상기 숙주 박테리아를 상기 기관 표면에 고정시킬 수 있다.
- [0036] 다른 실시예에 있어서, 상기 숙주 박테리아의 외막을 상기 기관 표면에 고정시키는 경우, 상기 숙주 박테리아는 그람음성균(gram-negative bacteria)일 수 있고, 상기 외막은 세포외막(outer membrane)인 지질이중층을 포함할 수 있으며, 상기 그람음성균(gram-negative bacteria)으로부터 분리된 세포외막 입자들을 함유하는 수용액을 소수성을 갖는 상기 기관 표면에 도포함으로써 상기 기관 표면에 상기 숙주 박테리아의 세포외막의 코팅층을 형성할 수 있다.
- [0037] 상기 숙주 박테리아의 외막을 상기 기관 표면에 고정시키는 경우, 타겟 박테리오파지의 감염에 의해 숙주 박테리아가 분해되지 않고 고정된 외막에 결합한 상태를 유지할 수 있다. 이와 같은 방법을 이용하여 기존 숙주 박테리아가 감염 후 분해되는 반응을 통해 타겟 박테리오파지를 선별하는 방법에서 요구되는 반복적인 바이오패닝을 피할 수 있어 높은 효율로 타겟 박테리오파지를 선별하는 것이 가능하다.
- [0038] 일반적으로 그람음성균은 세포외막(outer membrane), 세포내막(inner membrane) 및 이들 사이에 위치하는 펩티도글리칸층(peptidoglycan layer)을 포함하고, 본 발명에서는 상기 세포외막을 분리하여 타겟 박테리오파지를 감지하는데 사용할 수 있다.
- [0039] 일 실시예에 있어서, 상기 그람음성균으로부터 세포외막을 분리하는 방법은 특별히 제한되지 않고, 공지의 다양한 방법들이 적용될 수 있다. 일 실시예로, 상기 세포외막은 상기 숙주 박테리아에 리소자임(lysozymes)을 사용한 효소처리를 통해 상기 펩티도글리칸층을 가수분해(hydrolysis)하고, 이어서 원심분리함으로써 분리될 수 있다. 상기 효소처리에 의해 상기 세포외막은 리포솜(liposome)의 형태로 분리되고, 원심분리에 의해 그람음성균의 세포 분리물(cell lysate)로부터 상기 세포외막이 입자 형태로 회수될 수 있다. 상기 분리된 세포외막 입자는 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide)로 이루어진 친수성 표면 및 상기 친수성 표면 내부에 위치하고 소수성 지질단백질(lipoproteins) 및 펩티도글리칸(peptidoglycans)으로 이루어진 코어를 포함할 수 있다.
- [0040] 그리고 상기 소수성 코어 및 친수성 표면을 구비하는 세포외막 입자들을 함유하는 수용액을 소수성 특성을 갖는 기관 표면에 도포함으로써, 상기 기관 표면에 세포외막 코팅층을 형성할 수 있다.
- [0041] 상기 제2 단계(S120)에 있어서, 상기 기관 표면에 고정된 숙주 박테리아 또는 이의 외막을 상기 검출 시료에 노출시킬 수 있다. 이 경우, 상기 검출 시료가 상기 타겟 박테리오파지를 함유하는 경우, 상기 숙주 박테리아 또는 이의 외막은 상기 타겟 박테리아파지에 의해 감염될 수 있다.
- [0042] 상기 제3 단계(S130)에 있어서, 상기 검출시료가 처리된 기관에 광을 조사하여 상기 도전성 나노아일랜드의 표면에 야기되는 표면 플라즈몬파의 공명 파장 또는 공명 각도의 변화를 측정함으로써 상기 검출 시료에 상기 타겟 박테리오파지가 존재하는지 여부를 판별할 수 있다.
- [0043] 외부에서 도전성 나노아일랜드와 유전체의 경계면에 특정 파장의 광을 조사하면 상기 도전성 나노아일랜드 표면에 상기 특정 파장의 광의 광자와 상기 도전성 나노아일랜드의 전자가 결합되어 생성된 표면 플라즈몬 폴라리톤(surface plasmon polaritons, SPPs)의 흐름, 즉, 표면 플라즈몬파가 발생되고, 이러한 표면 플라즈몬파의 공명 파장 또는 공명 각도는 유전체인 상기 도전성 나노아일랜드 주변의 환경에 따라 변화하며, 본 발명에서는 이러한 표면 플라즈몬파의 공명 파장 또는 공명 각도의 변화를 측정함으로써 상기 검출 시료에 상기 타겟 박테리오파지가 존재하는지 여부를 판별할 수 있다. 예를 들면, 상기 숙주 박테리아 또는 이의 외막에 상기 타겟 박테리오파지가 결합된 경우, 상기 도전성 나노아일랜드 주변 유전체의 굴절률이 변화하고, 그 결과 상기 표면 플라즈몬파의 공명 파장 또는 공명 각도가 변화하므로, 본 발명에서는 이러한 표면 플라즈몬파의 공명 파장 또는 공명 각도가 변화를 통해 상기 검출 시료에 상기 타겟 박테리오파지가 존재하는지 여부를 판별할 수 있다.
- [0044] 일 실시예에 있어서, 도 1c에 도시된 바와 같이, 숙주 박테리아의 외막이 고정되기 전의 금 나노아일랜드 형성된 기관 및 숙주 박테리아의 외막이 고정된 기관에 대해 광을 조사한 경우에는 약 560nm 및 565nm 파장에서 각

각 흡광 피크가 나타남에 반해, 상기 숙주 박테리아의 외막을 타겟 박테리오파지로 감염시킨 기관에 대해 광을 조사한 경우에는 약 595nm 파장에서 흡광 피크가 나타났다. 즉, 숙주 박테리아의 외막을 타겟 박테리오파지로 감염시키는 경우 흡광 피크가 이동하고, 본 발명에서는 이러한 흡광 피크의 이동을 관찰함으로써 검출 시료에 상기 타겟 박테리오파지가 존재하는지 여부를 감지하거나 다양한 바이오 물질로부터 상기 타겟 박테리오파지를 선별할 수 있다.

[0045] 도 2는 도전성 나노아일랜드가 형성된 기관들에 각각 고정된 “BL21”, “E.coli 0157”, “Salmonella typhimurium” 및 “Salmonella. enteritidis”의 외막들을 타겟 박테리오파지로 처리한 후 측정된 표면플라즈몬 공명의 흡광피크를 나타내는 그래프들이다. 상기 타겟 박테리오파지로는 “enteritidis”를 선택적으로 감염시키는 박테리오파지가 사용되었다.

[0046] 도 2를 참조하면, 숙주 박테리아의 외막이 고정된 직후에 측정된 흡광피크와 타겟 박테리오파지를 처리한 후에 측정된 흡광피크를 비교하면, “Salmonella. enteritidis”의 외막이 고정된 기관에 대해서만 흡광피크가 이동하였다. 이는 도전성 나노아일랜드가 형성된 기관에 고정된 숙주 박테리아의 외막을 이용하는 경우, 타겟 박테리오파지를 선별하는 것이 가능한 것을 보여준다.

[0047] 도 3a는 본 발명의 일 실시예에 따른 타겟 박테리오파지의 선별 또는 배양 방법을 설명하기 위한 순서도이고, 도 3b는 숙주 박테리아의 외막을 고정한 바이오칩을 이용하여 타겟 박테리오파지를 배양하는 방법을 설명하기 위한 도면이다.

[0048] 도 3a 및 도 3b를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 타겟 박테리오파지의 선별 또는 배양 방법은, 기관 표면에 상기 타겟 박테리오파지와 선택적으로 반응하는 숙주 박테리아 또는 이의 외막을 고정시키는 제1 단계(S210); 상기 숙주 박테리아 또는 이의 외막이 고정된 기관 표면을 상기 타겟 박테리오파지를 함유하는 검출 시료로 처리하는 제2 단계(S220); 상기 검출 시료 중 미반응 물질을 제거하는 제3 단계(S230); 및 상기 숙주 박테리아 또는 이의 외막에 상기 타겟 박테리오파지가 반응된 기관을 상기 숙주 박테리아의 배양액에 투입하여 상기 타겟 박테리오파지를 배양하는 제4 단계(S240)를 포함할 수 있다.

[0049] 상기 제1 단계(S210) 및 제2 단계(S220)는 도 1을 참조하여 설명한 타겟 박테리오파지의 감지방법의 제1 단계(S110) 및 제2 단계(S120)와 실질적으로 동일 또는 유사하므로, 이들에 대한 중복된 상세한 설명은 생략한다. 다만, 본 실시예의 타겟 박테리오파지의 선별 또는 배양 방법에 적용되는 기관에는 도전성 나노아일랜드가 형성되지 않을 수 있다. 또한, 광학적 분석이 적용되지 않을 수 있으므로, 상기 기관으로는 투명한 기관 외에 불투명 기관도 적용될 수 있다. 예를 들면, 상기 기관으로는 그람음성균의 외막을 고정시킬 수 있는 재료, 예를 들면, 폴리스티렌(PS), 폴리프로필렌(PP), 폴리에틸렌 등의 고분자 재료나 글라스 재료, 금속 재료, 반도체 재료 등으로 형성될 수 있다.

[0050] 상기 제3 단계(S230)에 있어서, 상기 검출 시료에는 상기 타겟 박테리오파지 이외의 다른 박테리오파지 등이 포함될 수 있고, 상기 숙주 박테리아 또는 이의 외막이 고정된 기관에 상기 검출 시료를 도포하는 경우, 상기 타겟 박테리오파지만이 상기 숙주 박테리아 또는 이의 외막에 반응할 수 있고, 상기 기관에 도포된 검출 시료 중 상기 타겟 박테리오파지를 제외한 다른 박테리오파지 등의 미반응물은 상기 기관으로부터 제거될 수 있다. 상기 검출 시료 중 미반응물을 제거하는 방법은 특별히 제한되지 않는다. 예를 들면, 상기 기관을 린싱 용액에 침지함으로써 상기 미반응물을 상기 기관으로부터 제거할 수 있다.

[0051] 상기 제4 단계(S240)에 있어서, 상기 숙주 박테리아 또는 이의 외막을 통해 상기 타겟 박테리오파지가 결합된 기관을 상기 숙주 박테리아의 배양액에 투입하여 상기 타겟 박테리오파지를 배양할 수 있다. 상기 숙주 박테리아의 배양액은 상기 숙주 박테리아 및 이의 영양분을 포함한다면, 특별히 제한되지 않는다.

[0052] 일 실시예로, 도 3b에 도시된 바와 같이, 기관 상에 고정된 숙주 박테리아의 외막을 이용하여 타겟 박테리오파지를 선별한 후 이를 배양하는 경우, 고정된 타겟 박테리오파지가 숙주 박테리아를 감염시켜 타겟 박테리오파지가 복제될 수 있고, 이에 따라 숙주 박테리아는 분해될 수 있다. 일 예로, 상기 타겟 박테리오파지가 숙주 박테리아를 효과적으로 감염시키기 위해서는 상기 숙주 박테리아의 외막을 통해 기관에 고정된 타겟 박테리오파지를 염산 등과 같은 산성 용액으로 약 3 내지 10분 동안 처리하여 상기 타겟 박테리오파지를 기관으로부터 분리한 후 숙주 박테리아를 포함하는 배양액에 투입하여 타겟 박테리오파지를 복제할 수 있다.

[0053] 도 4는 “Salmonella. enteritidis”의 외막을 고정된 기관을 통해 선별된 타겟 박테리오파지를 “Salmonella. enteritidis”, “BL21”, “E.coli 0157” 및 “Salmonella typhimurium”를 각각 함유하는 배양액들에 처리한 결과를 나타내는 이미지들이다. 상기 배양액들은 형광(acridine orange) 시약으로 처리되어 박테리아가 분해되

는 경우 오렌지색을 띠도록 처리되었다.

- [0054] 도 4를 참조하면, "Salmonella. enteritidis"를 함유하는 배양액만이 오렌지색으로 변화하였음을 확인할 수 있다. 이로부터 "Salmonella. enteritidis"의 외막을 통해 선별된 타겟 박테리오파지는 숙주 박테리아인 "Salmonella. enteritidis"를 선택적으로 분해하면서 복제될 수 있음을 알 수 있다.
- [0055] 도 5a 및 도 5b는 본 발명의 실시예에 따른 타겟 박테리오파지의 선별 및 동정(identification) 방법을 설명하기 위한 순서도 및 모식도이고, 도 5c는 상기 타겟 박테리오파지를 동정하기 위한 레이저 탈착 및 이온화 질량 분석에 적용되는 매트릭스의 일 실시예를 설명하기 위한 도면이다.
- [0056] 도 5a 내지 도 5c를 참조하면, 본 발명의 실시예에 따른 타겟 박테리오파지의 선별 및 동정 방법은, 기관 표면에 상기 타겟 박테리오파지와 선택적으로 반응하는 숙주 박테리아 또는 이의 외막을 고정시키는 제1 단계(S310); 상기 숙주 박테리아 또는 이의 외막이 고정된 기관 표면을 상기 타겟 박테리오파지를 함유하는 검출 시료로 처리하는 제2 단계(S320); 및 레이저 탈착 및 이온화 질량분석법(Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry, LDI-MS)을 통해 상기 숙주 박테리아 또는 이의 외막에 결합된 타겟 박테리오파지를 동정하는 제3 단계(S330)를 포함할 수 있다.
- [0057] 상기 제1 단계(S310) 및 제2 단계(S320)는 도 1a를 참조하여 설명한 타겟 박테리오파지의 감지방법의 제1 단계(S110) 및 제2 단계(S120)과 실질적으로 동일 또는 유사하므로, 이들에 대한 중복된 상세한 설명은 생략한다. 다만, 본 실시예의 타겟 박테리오파지의 선별 및 동정 방법에 적용되는 기관에는 도전성 나노아일랜드가 형성되지 않을 수 있고, 상기 기관으로는 투명 기관 또는 불투명 기관이 사용될 수 있다.
- [0058] 상기 제3 단계(S330)에 있어서, 상기 타겟 박테리오파지에 대한 동정(identification)은 무기 매트릭스를 이용한 레이저 탈착 및 이온화 질량분석법(LDI-MS)을 통해 수행될 수 있다.
- [0059] 일 실시예에 있어서, 상기 타겟 박테리오파지가 결합된 기관 상에 무기 매트릭스를 투입한 후 자외선 레이저를 인가하여 상기 타겟 박테리오파지를 탈착 및 이온화시키고, 상기 이온화 타겟 박테리오파지에 대한 질량분석을 수행함으로써 상기 타겟 박테리오파지를 동정할 수 있다.
- [0060] 일 실시예에 있어서, 도 5c에 도시된 바와 같이, 상기 무기 매트릭스(100)는 반도체 나노선(110) 및 상기 반도체 나노선(110) 표면에 결합된 다공성 금속 나노입자(120)를 포함할 수 있다.
- [0061] 상기 반도체 나노선(110)은 광촉매 활성을 갖는 반도체 재료로 형성될 수 있다. 예를 들면, 상기 반도체 나노선(110)은 이산화티타늄(TiO_2), 산화아연(ZnO), 이산화지르코늄(ZrO_2), 삼산화텅스텐(WO_3) 등으로부터 선택된 하나 이상의 반도체 재료로 형성될 수 있다.
- [0062] 일 실시예에 있어서, 상기 반도체 나노선(110)은 이산화티타늄으로 형성될 수 있다. 상기 이산화티타늄 나노선은 약 3.2 eV의 밴드갭 에너지를 가지는 반도체로서 레이저 탈착 및 이온화 질량분석(LDI-MS)에서 주로 사용되고 있는 약 337 nm 파장의 자외선 레이저를 흡수할 수 있을 뿐만 아니라 광촉매 활성을 가지므로 레이저 에너지를 흡수하여 분석 대상물의 광화학 반응을 촉진함으로써 분석 대상물의 이온화를 촉진할 수 있다.
- [0063] 상기 다공성 금속 나노입자(120)는 상기 반도체 나노선(110)의 표면에 결합될 수 있다. 상기 다공성 금속 나노입자(120)는 낮은 비열(specific heat), 높은 열전도도(heat conductivity)를 갖는 금속 재료로 형성될 수 있고, 표면 또는 내부에 형성된 기공을 구비할 수 있다. 예를 들면, 상기 다공성 금속 나노입자(120)는 바이오 분자에 대한 친화성이 우수한 금속 재료, 예를 들면, 금(Au), 은(Ag), 티타늄(Ti), 로듐(Rh), 니오븀(Nb), 몰리브덴(Mo), 탄탈럼(Ta), 지르코늄(Zr), 텅스텐(W), 주석(Sn) 등으로 형성될 수 있다.
- [0064] 일 실시예에 있어서, 상기 다공성 금속 나노입자(120)는 이의 열확산 거리(heat diffusion length)와 동일하거나 이보다 작은 크기를 가질 수 있다. 이 경우, 레이저 조사에 의해 상기 다공성 금속 나노입자(120)의 균일한 가열이 가능하고, 이로 인해 상기 분석 대상물의 탈착을 위해 요구되는 레이저 강도의 임계값을 감소시킬 수 있다. 예를 들면, 상기 다공성 금속 나노입자(120)는 약 20 내지 200 nm의 크기를 가질 수 있다.
- [0065] 일 실시예에 있어서, 상기 무기 복합 매트릭스(100)는 상기 반도체 나노선(110)과 상기 다공성 금속 나노입자(120)를 약 1:0.01 내지 1:0.05의 무게비율로 포함할 수 있다. 예를 들면, 상기 무기 복합 매트릭스(100)는 상기 반도체 나노선(110)과 상기 다공성 금속 나노입자(120)를 약 1:0.02 내지 1:0.03, 바람직하게는 1:0.0208 내지 1:0.0211의 무게비율로 포함할 수 있다.
- [0066] 상기 무기 매트릭스(100)는 다공성 금속 나노입자(120)의 높은 광열변환 효율 및 낮은 비열(specific heat)로

인해 향상된 지열적인 열 방출 능력을 가질 수 있을 뿐만 아니라 반도체 나노선(110)과 다공성 금속 나노입자(120)의 계면에 형성된 쇼트키 전위 장벽(Schottky potential barrier)으로 인해 전하 캐리어의 분리 능력을 향상시킬 수 있고, 그 결과 분석 대상물의 탈착 및 이온화 능력이 향상될 수 있다.

[0067] 그리고, 상기 다공성 금속 나노입자(120)의 광열 변환으로부터 야기되는 레이저에 의해 유도된 상기 다공성 금속 나노입자(120)의 표면 재구조화(restructuring) 및 용융(melting) 현상은 상기 다공성 금속 나노입자(120)에서의 스트레인의 변화를 야기하고, 이는 인접하게 위치한 상기 반도체 나노선(110)의 스트레인 변화 및 산소 공공을 생성하며, 이와 같이 생성된 상기 반도체 나노선(110) 내의 산소 공공은 전자에 대한 얇은 트랩 준위를 생성할 수 있다. 상기 산소 공공에 의한 트랩 준위는 쇼트키 장벽과 함께 광 유도 전하들의 재결합 속도를 더욱 낮출 수 있다.

[0068] 또한, 상기 다공성 금속 나노입자(120)의 표면에 존재하는 땀글링 결합(dangling bonds)은 열적인 전자 움직임을 지연시킬 수 있고, 그 결과 상기 다공성 금속 나노입자(120) 내부로의 열 구속 효과를 향상시킬 수 있다. 따라서, 비다공성 금속 나노입자에 비해, 상기 다공성 금속 나노입자(120)는 레이저 조사시 증가된 표면 공간을(surface voidage)로 인해 더 높은 표면 온도를 유도할 수 있다.

[0069] 도 6a는 유기물인 CHCA(α -cyano-4-hydroxycinnamic acid) 및 DHB(Dihydroxybenzoic acid)를 각각 매트릭스로 사용하여 박테리오파지에 대한 말디툼 질량분석을 수행한 결과들이고, 도 6b는 무기물인 TiO₂ 나노입자, TiO₂ 나노선 및 TiO₂ 나노입자/나노선 복합체를 각각 매트릭스로 사용하여 상기 박테리오파지에 대한 말디툼 질량분석을 수행한 결과들이다.

[0070] 도 6a를 참조하면, CHCA 및 DHB의 유기 매트릭스를 사용한 말디툼 질량분석의 경우, 박테리오파지에 대한 특이 질량피크가 발생하지 않았고, 저분자 영역(500 Da이하)에서 유기매트릭스가 레이저에 의해 분해되어 매트릭스의 질량피크가 발생하였다. 유기 매트릭스의 질량피크는 측정시마다 다르게 발생하고, 저분자 영역에서 분석물질의 질량피크와 구별하기 어려우므로, 유기 매트릭스를 사용하는 경우 저분자 분석물질에 대한 분석이 어려운 문제점이 있다.

[0071] 도 6b를 참조하면, TiO₂ 나노입자, TiO₂ 나노선 및 TiO₂ 나노입자/나노선 복합체의 무기 매트릭스를 사용한 말디프 질량분석의 경우, 박테리오파지에 대한 특이 질량피크가 m/z=191, 207에서 발생하였고, 매트릭스 자체의 질량피크는 발생되지 않았다.

[0072] 이러한 결과로부터, 무기 매트릭스를 사용하는 탈착 및 이온화 질량분석법을 이용하는 경우, 박테리오파지에 대한 동정(identification)이 가능함을 알 수 있다.

[0073] 도 7은 기관들에 각각 고정된 “BL21”, “E.coli 0157”, “Salmonella typimurium” 및 “Salmonella enteritidis”의 외막들을 타겟 박테리오파지로 처리한 후 측정된 탈착 및 이온화 질량분석법의 질량피크들을 나타내는 도면이다. 상기 타겟 박테리오파지로는 “enteritidis”를 선택적으로 간염시키는 것이 사용되었다.

[0074] 도 7을 참조하면, “Salmonella. enteritidis”의 외막이 고정된 기관에 대해서만 타겟 박테리오파지에 대응되는 질량피크가 관찰되었다. 이로부터 숙주 박테리아의 외막이 고정된 기관을 이용하는 경우, 타겟 박테리오파지의 선별 후 탈착 및 이온화 질량분석법을 이용하여 바로 상기 타겟 박테리오파지의 동정(identification)이 가능함을 알 수 있다.

[0075] 본 발명의 타겟 박테리오파지 감지 방법, 선별 방법, 배양 방법 그리고 선별 및 동정 방법에 따르면, 기관에 고정된 숙주 박테리아 또는 이의 외막을 이용하여 타겟 박테리오파지를 선별할 수 있으므로, 다양한 종의 박테리오파지를 포함하는 검출 시료로부터 타겟 박테리오파지를 선별하는 경우에도 반복적인 선별 과정을 수행할 필요가 없으므로 단시간에 타겟 박테리오파지를 선별할 수 있다.

[0076] 그리고, 동일한 기관을 이용하여 선별된 타겟 박테리오파지를 배양하거나 동정하는 것이 가능하므로, 타겟 박테리오파지를 단시간에 대량으로 획득하는 것이 가능하다.

[0077] 상기에서는 본 발명의 바람직한 실시예를 참조하여 설명하였지만, 해당 기술 분야의 숙련된 당업자는 하기의 특허 청구 범위에 기재된 본 발명의 사상 및 영역으로부터 벗어나지 않는 범위 내에서 본 발명을 다양하게 수정 및 변경시킬 수 있음을 이해할 수 있을 것이다.

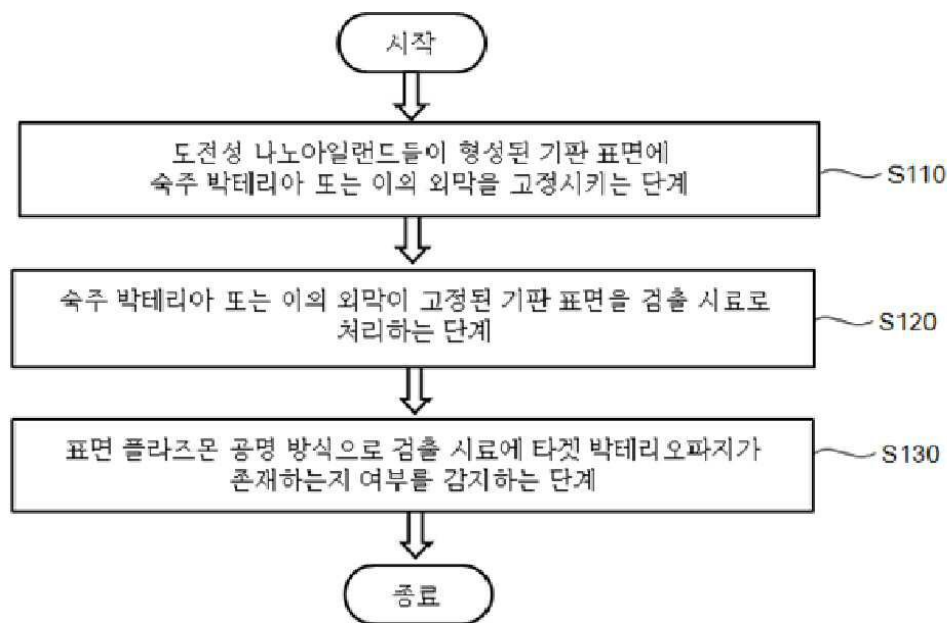
부호의 설명

[0078] 100: 무기 매트릭스 110: 반도체 나노선

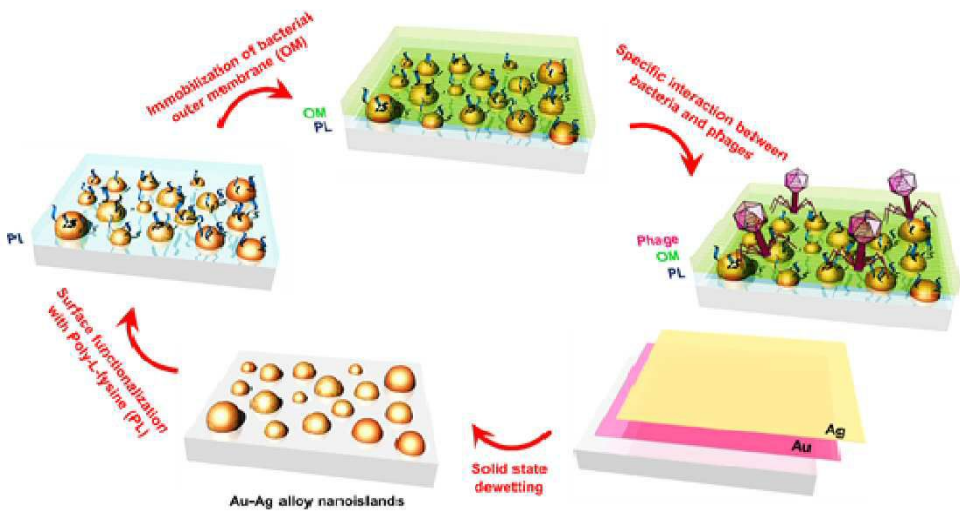
120: 다공성 금속 나노입자

도면

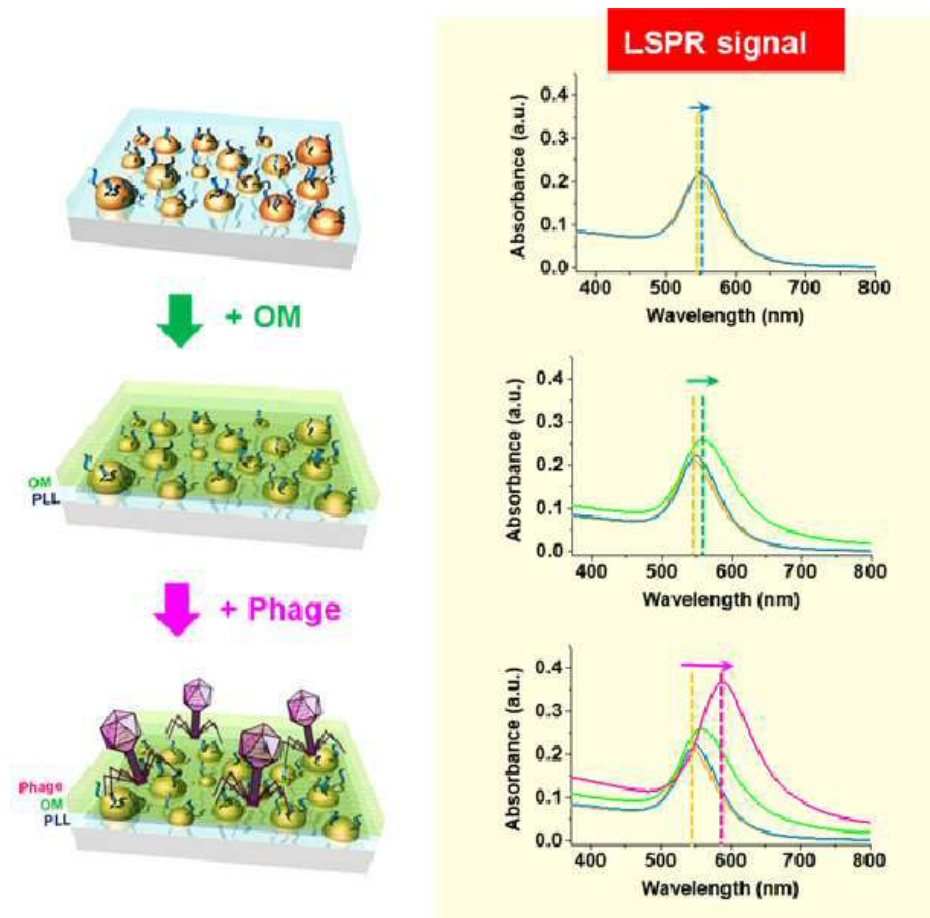
도면1a



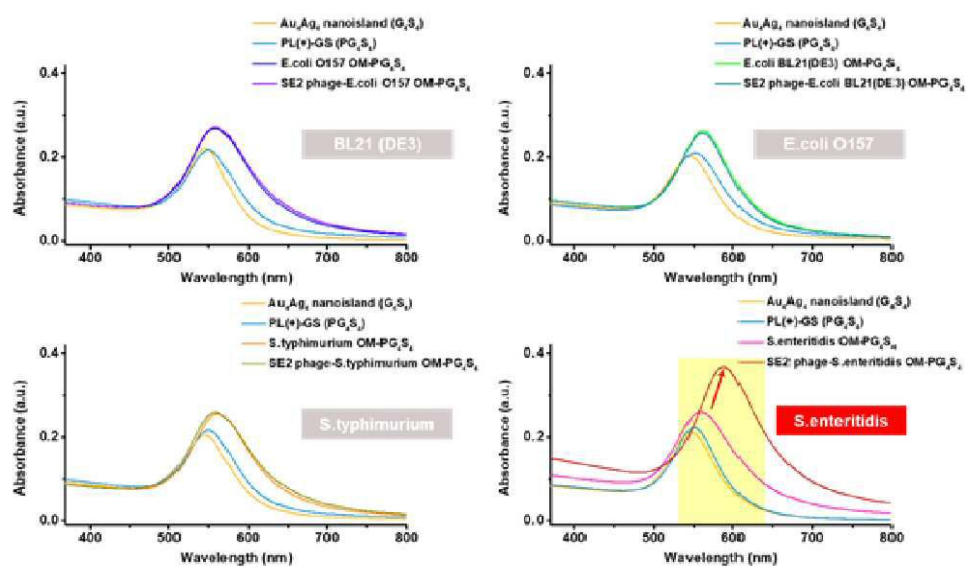
도면1b



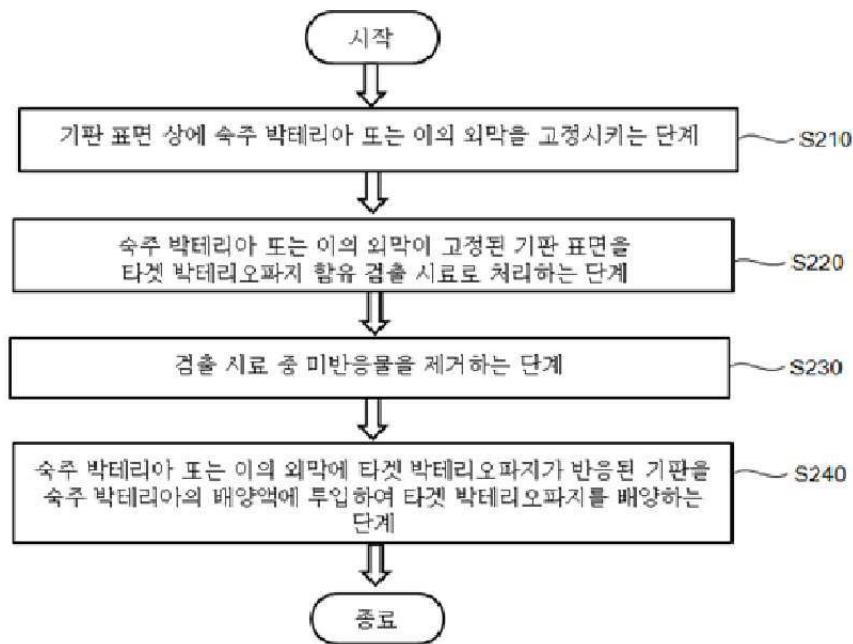
도면1c



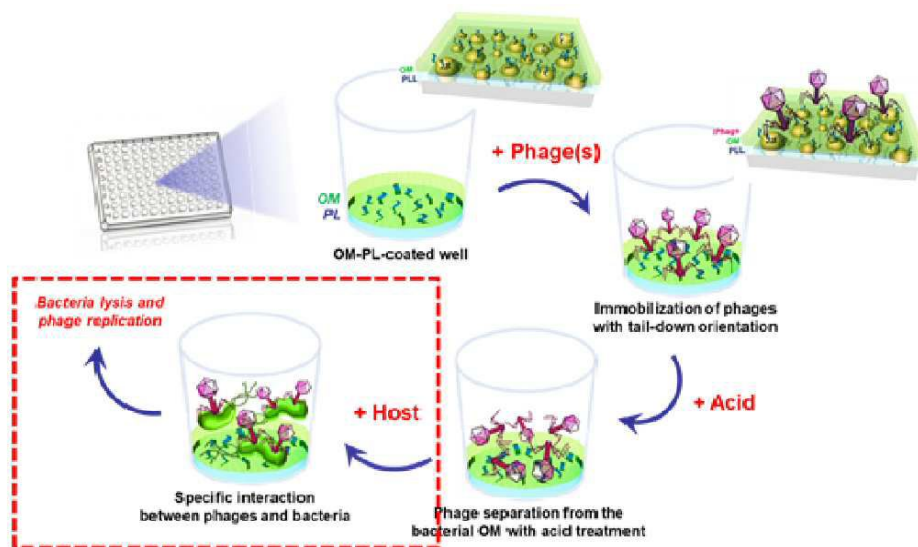
도면2



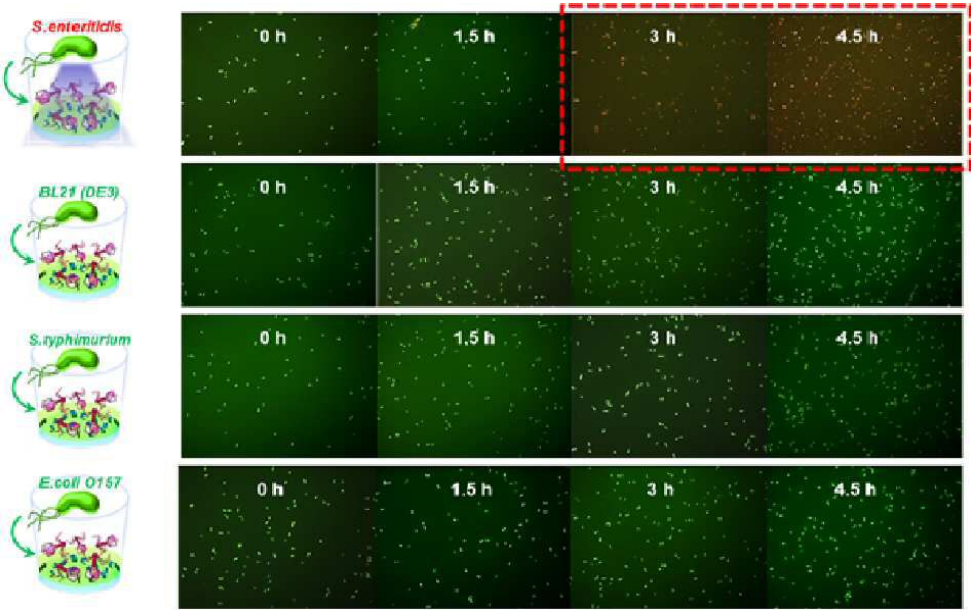
도면3a



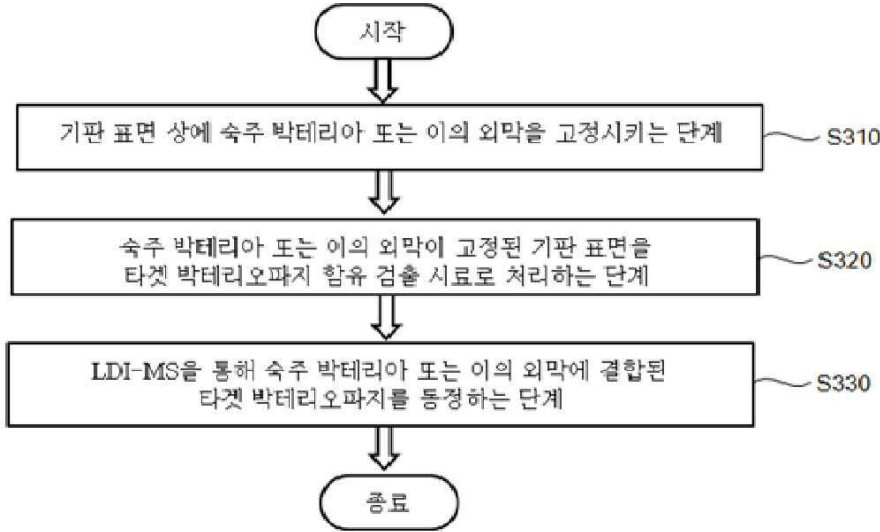
도면3b



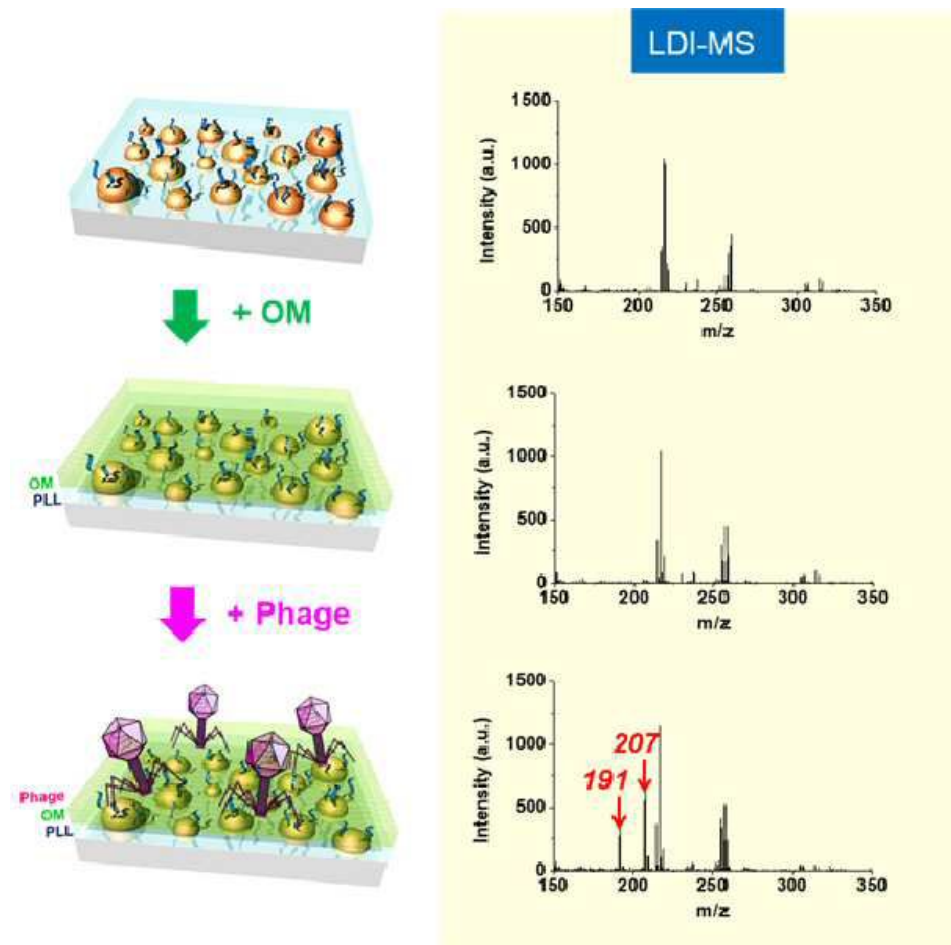
도면4



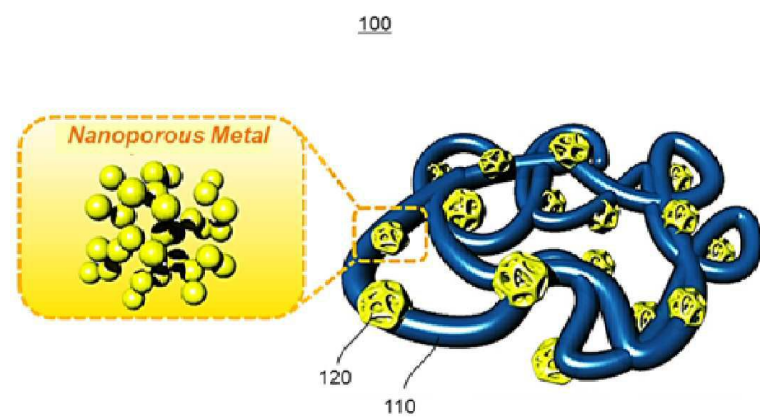
도면5a



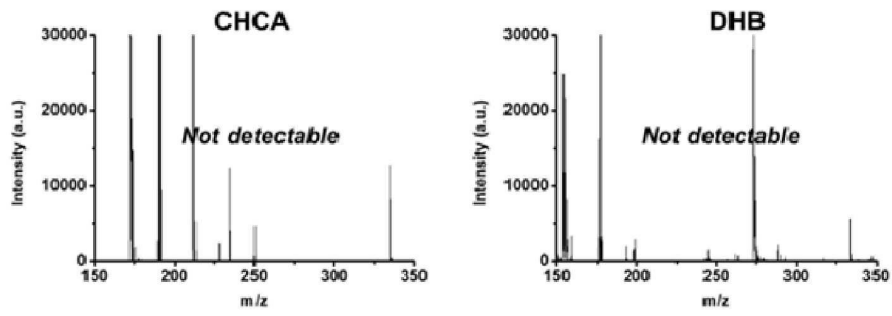
도면5b



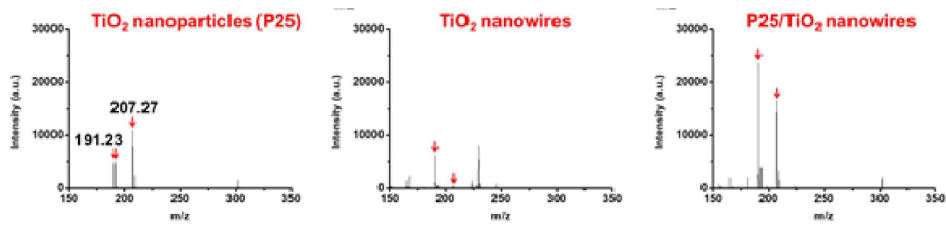
도면5c



도면6a



도면6b



도면7

