



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2014년10월22일  
 (11) 등록번호 10-1449628  
 (24) 등록일자 2014년10월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C12N 1/20* (2006.01) *C12N 1/36* (2006.01)  
 (21) 출원번호 10-2013-0097715  
 (22) 출원일자 2013년08월19일  
 심사청구일자 2013년08월19일  
 (56) 선행기술조사문헌  
 Amro A. Amara. The scientific world journal.  
 Vol. 2013, 페이지 1-7 (2013.01.)\*  
 \*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
 배재대학교 산학협력단  
 대전광역시 서구 배재로 155-40 (도마동)  
 (72) 발명자  
 최창원  
 대전 서구 배재로 155-40, 생물의약학과 (도마동, 배재대학교)  
 김세창  
 대전 서구 배재로 155-40, 생물의약학과 (도마동, 배재대학교)  
 비노드 나가라잔  
 대전 서구 배재로 155-40, 생물의약학과 (도마동, 배재대학교)  
 (74) 대리인  
 권오식, 김종관, 박창희

전체 청구항 수 : 총 8 항

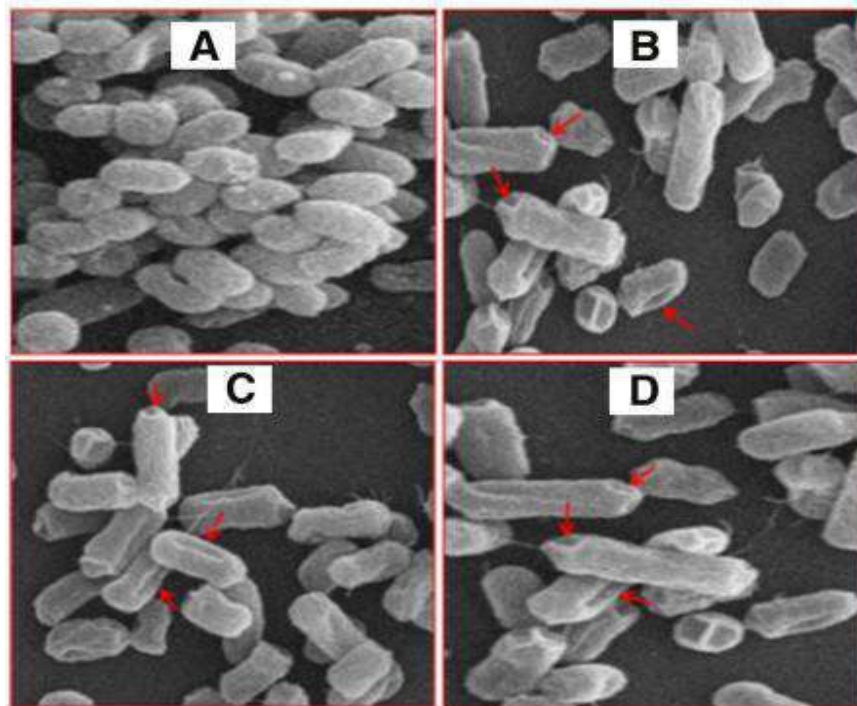
심사관 : 이영기

(54) 발명의 명칭 **화학물질 처리에 의한 박테리아 고스트 제조방법**

**(57) 요약**

본 발명은 그람 음성균의 성장을 억제하는 3종 화학물질의 최소억제농도를 이용하여 박테리아 고스트를 제조하는 방법 및 상기 방법으로 제조된 박테리아 고스트를 제공한다. 본 발명은 형질전환 등의 분자생물학적 처리 없이 그람 음성균의 성장을 억제하는 화학물질을 처리함으로써 저렴하고 신속하게 박테리아 고스트를 제조할 수 있는 장점을 가지고 있으며, 본 발명에서 제조된 박테리아 고스트는 사백신 및 외래 항원 운반체로 유용하게 활용될 것으로 기대된다.

**대표도** - 도5



## 특허청구의 범위

### 청구항 1

그람 음성균에 황산암모늄, 염화칼슘 및 에틸렌다이아민테트라아세트산으로 이루어진 균으로부터 선택된 어느 하나의 화학물질을 처리하여 박테리아 고스트(bacterial ghost, BG)를 제조하는 방법.

### 청구항 2

제 1항에 있어서, 그람 음성균은 대장균(*E. coli*), *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Helicobacter pylori*, *Vibrio cholerae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Ralstonia eutropha*, 및 *Pectobacterium cypripedii* 로 이루어진 균으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 박테리아 고스트를 제조하는 방법.

### 청구항 3

제 2항에 있어서, 대장균(*E. coli*)은 대장균(*E. coli*) DH5a 균주인 것을 특징으로 하는 박테리아 고스트를 제조하는 방법.

### 청구항 4

제 1항에 있어서, 황산암모늄의 처리는 배양기에서 35 내지 40℃에서 30분에서 90분, 염화칼슘의 처리는 배양기에서 35 내지 40℃에서 60분에서 90분 및 에틸렌다이아민테트라아세트산의 처리는 배양기에서 35 내지 40℃에서 45분에서 90분 동안 수행되는 것을 특징으로 하는 박테리아 고스트를 제조하는 방법.

### 청구항 5

제 1항에 있어서, 화학물질은 최소억제농도로 처리되는 것을 특징으로 하는 박테리아 고스트를 제조하는 방법.

### 청구항 6

제 5항에 있어서, 화학물질의 최소억제농도는 황산암모늄 187.50mg/ml, 염화칼슘 125mg/ml 또는 에틸렌다이아민테트라아세트산 25mg/ml인 것을 특징으로 하는 박테리아 고스트를 제조하는 방법.

### 청구항 7

제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항의 방법으로 제조된 박테리아 고스트.

### 청구항 8

제 7항에 있어서, 박테리아 고스트는 사백신 또는 외래 항원 운반체로 사용되는 것을 특징으로 하는 박테리아 고스트.

## 명세서

**기술분야**

[0001] 본 발명은 그람 음성균(Gram-negative bacteria)의 증식을 억제할 수 있는 3종의 화학물질을 이용하여 사백신 혹은 외래 항원 운반체로 활용되는 박테리아 고스트(Bacterial ghost; BG)를 쉽게 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

**배경기술**

[0002] 박테리아 고스트는 박테리아 세포 내 구성물(세포질 함유물)을 제거하여 내부는 텅 빈 상태이지만, 외막(envelope)의 형태를 완전하게 유지하는 구조체로 간단히 정의할 수 있다. 최근 그람 음성균을 박테리아 고스트로 제조하여 사백신 혹은 외래 항원 운반체로 활용하는 연구가 활발히 진행되고 있다(Ebensen, T. et al., J. Immunol. 2004, Vol. 172, pp. 6858-6865). 게다가 박테리아 고스트는 유전물질이 결여된 사균 상태이기 때문에 유전자 재조합생물체(GMO)로 간주되지 않는다.

[0003] 상기 박테리아 고스트는 생균의 외막과 마찬가지로 항원 결정부위(antigenic determinant)를 보유하기 때문에 기능적으로 생백신과 유사한 효과를 나타낸다. 발표된 연구에 의하면 BG는 외래적인 보조제(adjuvant)를 첨가하지 않고도 내재면역과 적응면역 시스템을 쉽게 자극할 수 있다. 또한, 불활성화된(inactivated) 박테리아 고스트는 동물, 인간 혹은 식물의 특수한 조직이나 세포에 부착할 수 있을 뿐만 아니라, 내부로 도입될 수 있기 때문에 재조합 항원이나 핵산을 표적 세포에 효과적으로 전달할 수 있는 운반시스템(delivery system)으로 활용할 수 있다. 박테리아 종(species)에 따라서 차이는 있지만, 표적 세포는 수지상세포(dendritic cell), 대식세포(macrophage), 결장암(colon cancer), 백혈병(leukemia), 흑색종(melanoma), 미소혈관 상피세포(microvascular endothelial cells) 등을 포함할 수 있다. 따라서 박테리아 고스트는 의료용 및 산업용 단백질, 핵산, 의약 등을 전달할 수 있는 운반시스템으로 널리 활용할 수 있다.

[0004] 상기 박테리아 고스트를 생산하는 가장 일반적인 방법은 E 단백질 매개 용해법으로서 박테리오파지(bacteriophage)  $\phi$ X174 용해유전자 E를 클로닝한 플라스미드(plasmid)를 그람 음성균에 형질전환(transformation)하여 이를 발현시키는 방법이다. 형질전환된 박테리아는 E 유전자를 억제하였다가 온도 변화에 따라 E 단백질을 발현하는데, 합성된 E 단백질은 박테리아 표면 구조에 물리화학적 손상을 주지 않고 박테리아 세포막 및 세포벽에 막관통 터널을 형성하여 궁극적으로 세포구성물을 방출시킨다(Haidinger, W. et al., Appl. Environ. Microbiol. 2003, Vol. 69(1), pp. 468-474). Lubitz는 상기와 같은 방법으로 제조된 박테리아 고스트의 마지막 불활성화를 위해 멸균제로 사용되는 베타프로피오락톤(beta-propiolactone)을 처리하여 생균이 감소된 박테리아 고스트를 생산하는 방법을 제안하였다(US 7968323 B2).

[0005] 상기 박테리아 고스트를 생산하기 위해서는 다단계 과정의 분자생물학적 기술과 고가의 비용 및 장기간의 제조시간이 필요하다. 따라서 박테리아 고스트 대량생산을 위한 간단한 제조기술, 저가의 생산 비용 및 시간을 절약할 수 있는 새로운 제조방법이 필요하다. 최근 Amara 등은 대장균(*E. coli* BL21 (DE3) pLysS)을 모델로 하여 화학물질인 SDS, NaOH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리함으로써 박테리아 고스트를 제조하는 방법을 보고하였다.

[0006] 본 발명에서는 그람 음성균의 세포벽에 영향을 미치는 화학실험에서 일반적으로 사용되는 화학물질인 황산암모늄, 염화칼슘 및 에틸렌다이아민테트라아세트산의 최소억제농도(minimum inhibitory concentration, MIC)에 기반을 둔 박테리아 고스트 제조방법을 개발하였다.

**선행기술문헌**

**특허문헌**

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허공보 제10-0273847호, 2000. 12. 15. 공고  
 (특허문헌 0002) 대한민국 등록특허공보 제10-0765357호, 2007. 10. 10. 공고

(특허문헌 0003) US 7968323 B2, 2011. 6. 28. 공개

**비특허문헌**

- [0008] (비특허문헌 0001) Haidinger, W. et al., Appl. Environ. Microbiol. 2003, Vol. 69(1), pp. 468-474
- (비특허문헌 0002) Ebensen, T. et al., J. Immunol. 2004, Vol. 172, pp. 6858-6865
- (비특허문헌 0003) Konopa, G. & Taylor, K., Biochim. Biophys. Acta. 1975, Vol. 399(2), pp. 460-467
- (비특허문헌 0004) Amara, A. A. et al., The Scientific World Journal, 2013, Vol. 2013, Article ID 545741, 7 pages, doi:10.1155/2013/545741

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

- [0009] 위와 같은 필요성을 해결하기 위하여 본 발명에서는 그람 음성균인 대장균(*Escherichia coli*)의 성장을 억제할 수 있는 화학물질의 MIC를 결정하고, 이를 이용하여 박테리아 고스트를 제조하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다. 이하 본 발명의 해결 수단을 더 상세히 설명한다.

**과제의 해결 수단**

- [0010] 위와 같은 발명의 목적을 달성하기 위하여 본 발명에서는 그람 음성균의 성장을 억제할 수 있는 황산암모늄((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 염화칼슘(CaCl<sub>2</sub>), 에틸렌다이아민테트라아세트산(EthyleneDiamineTetraAcetic Acid, EDTA)의 MIC를 결정하였다. 배양된 대장균에 3종의 화학물질을 각각의 MIC에 맞추어 첨가한 후 배양하고, 박테리아 고스트를 수확하였다.

**발명의 효과**

- [0011] 본 발명에서는 그람 음성균의 성장을 억제하는 3종 화학물질의 MIC를 이용하여 박테리아 고스트를 제조하는 방법을 제공한다. 제조된 박테리아 고스트는 사백신 및 외래 항원 운반체로 유용하게 활용될 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0012] 도 1은 two-fold broth dilution 방법에 의해 시험관에서 배양한 대장균의 증식을 억제하는 3종 화학물질의 최소억제농도(MIC)를 보여주고 있다. (A) 황산암모늄((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), (B) 염화칼슘(CaCl<sub>2</sub>), (C) 에틸렌다이아민테트라아세트산(EDTA).

도 2는 화학물질 처리 후 시간에 따른 분해곡선으로서 분해율은 다음과 같은 공식에 대입하여 결정한다. 분해율 = (1-완전히 용해된 CFU/화학물질 처리 전 CFU) x 100%

도 3은 실시예에서 제조된 대장균 박테리아 고스트가 LB 배지 위에서의 성장하지 않는 모습을 보여주고 있다. 1: 무처리 대조구, 2: 황산암모늄 처리구, 3: 염화칼슘 처리구, 4: 에틸렌다이아민테트라아세트산 처리구.

도 4A는 제조된 대장균 박테리아 고스트에서 추출한 총단백질(total protein)의 SDS-PAGE 분석 결과를 보여주고 있고, 도 4B는 제조된 대장균 박테리아 고스트에서 추출한 유전체 DNA의 아가로스(agarose) 전기영동 결과를 보여주고 있다. M: 단백질 분자량 마커, 레인(lane) 1: 무처리 대조구, 2: 황산암모늄 처리구, 3: 염화칼슘 처리구, 4: 에틸렌다이아민테트라아세트산 처리구.

도 5는 3종의 화학물질을 처리하여 제조된 대장균 박테리아 고스트의 주사전자현미경 분석 결과를 보여주고 있다. A: 무처리 대조구, B: 황산암모늄 처리구, C: 염화칼슘 처리구, D: 에틸렌다이아민테트라아세트산 처리구.

화살표는 대장균의 막이 용해되어 형성된 막관통(transmembrane) 터널(tunnel)을 표시하고 있다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0013] 이하에서 본 발명을 좀 더 상세히 설명한다.
- [0014] 본 발명은 그람 음성균에 황산암모늄, 염화칼슘 및 에틸렌다이아민테트라아세트산으로 이루어진 균으로부터 선택된 어느 하나의 화학물질을 처리하여 박테리아 고스트(bacterial ghost, BG)를 제조하는 방법에 관한 것이다.
- [0015] 바람직하게는 그람 음성균은 대장균(*E. coli*), *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Helicobacter pylori*, *Vibrio cholerae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Ralstonia eutropha*, 및 *Pectobacterium cypripedii* 로 이루어진 균으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것이며, 기타 다른 균에 대해서도 같은 방식으로 적용될 수 있음은 이 기술분야에 있어서 통상의 지식을 가진 자에게 자명한 사항이다. 더 바람직하게는 대장균(*E. coli*)은 대장균(*E. coli*) DH5 α 균주인 것을 특징으로 한다.
- [0016] 상기 제조하는 방법에서 화학물질의 처리는 배양기에서 각각 황산암모늄은 35 내지 40℃에서 30분에서 90분, 염화칼슘은 35 내지 40℃에서 60분에서 90분 및 에틸렌다이아민테트라아세트산의 처리는 35 내지 40℃에서 45분에서 90분 동안 수행되는 것이 바람직하다. 상기의 온도와 시간은 대장균 생장에 최적온도 및 최대생장을 나타내기 때문이다. 만일 상기의 온도를 낮추거나 높일 경우 최대생장에 걸리는 시간이 더 걸리거나 증식률이 더 낮아질 수 있다.
- [0017] 상기 각각 화학물질의 농도범위 이하일 경우 용해율이 완벽하지 않아 생존한 박테리아가 존재했으며 농도범위 이상일 경우 박테리아가 분해되어 완벽한 터널 구조를 형성할 수 없기 때문에 고스트의 제조가 불가능하다.
- [0018] 상기 화학물질의 최소억제농도 결정 후 박테리아 고스트 제조에 사용되는 대장균은 배양기에서 37℃로 72시간 배양한 후 수행되는 것이 바람직하다. 그 이유는 박테리아 성장단계에서 대수증시기(exponential growth phase)에 있는 세포들의 세포벽은 본 발명에 사용된 화학물질에 민감하나 72시간 배양된 세포는 탄력이 있는 세포벽을 갖기 때문에 용해된 터널 구조를 형성하는데 더 효과적이다.
- [0019] 상기 박테리아 고스트를 제조하는 방법에서 최소억제농도 화학물질을 처리한 후 배양기에서 최대 1.5시간동안 배양한 후 수행되는 것이 바람직하다. 상기 화학물질 처리 15분 후에 모두 20% 이상의 용해율을 보이나, 100% 박테리아 고스트를 완전하게 제조함에 있어서 걸리는 최소 시간은 황산암모늄의 경우 60분, 염화칼슘의 경우 60분, 또는 에틸렌다이아민테트라아세트산의 경우 45분이 소요되는 것을 특징으로 한다.
- [0020] 또한, 본 발명은 상기 박테리아의 제조방법으로 제조된 박테리아 고스트에 관한 것이다. 바람직하게는 상기 박테리아 고스트는 사백신 또는 외래 항원 운반체로 사용되는 것을 특징으로 한다.
- [0021] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 보다 상세히 설명하고자 한다. 하지만, 본 발명은 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 아이디어와 범위 내에서 여러 가지 변형 또는 수정할 수 있음은 이 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명한 것이다.
- [0022] 이때 사용되는 기술용어 및 과학용어에 있어 다른 정의가 없다면, 이 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 일반적으로 이해하는 의미를 지닌다. 또한, 종래와 동일한 기술적 구성 및 작용에 대한 반복되는 설명은 생략하기로 한다.

**실시예 1**

[0023] 대장균을 이용한 박테리아 고스트의 제조

[0024] 1. 대상 균주 및 배양조건

[0025] 본 발명에 사용된 그람 음성균은 대장균(*E. coli*) DH5 $\alpha$ 로서 Luria-Bertani(LB) 배지에 접종하고 37 $^{\circ}$ C, 200 rpm 조건에서 철야(overnight) 진탕배양하였다. 대장균의 성장과 용균은 Biochrom Libra S22 분광광도계 (spectrophotometer)를 이용하여 0.D. 600nm에서 측정하였다.

[0026] 2. 최소억제농도(MIC)의 결정

[0027] 황산암모늄, 염화칼슘, 및 에틸렌다이아민테트라아세트산의 MIC 값은 two-fold broth dilution 법(Penna et al., *Infec. Dis.* 2001, Vol. 1, pp. 1-8)을 이용하여 측정하였다. 먼저 3종의 화학물질을 각각 단계 희석 (serial dilution)하여 대장균 10<sup>6</sup> CFU/ml를 접종한 LB 액체배지에 첨가하고, 37 $^{\circ}$ C에서 18시간 배양하였다. 대장균의 최소억제농도는 0.D. 600nm에서 측정하였다.

[0028] LB 액체배지에서 대장균의 성장에 대해 3종의 화학물질을 농도별로 처리한 결과는 도 1과 같다. 도 1에서 볼 수 있는 바와 같이, 대장균의 성장을 억제하는 각 화학물질의 최소억제농도는 다양하였으며, 황산암모늄, 염화칼슘 및 에틸렌다이아민테트라아세트산의 MIC는 각각 187.50mg/ml, 125mg/ml, 9.38mg/ml일 때 성장이 효과적으로 억제되었다(표 1. (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub> 및 EDTA의 최소억제농도(MIC) 참조). 에틸렌다이아민테트라아세트산이 작은 농도에서도 대장균의 성장을 효과적으로 억제하는 것을 알 수 있다.

[0029] 최소 억제농도 이상일 경우에는 박테리아가 분해되어 완벽한 터널이 형성되기 어려우며 농도가 너무 낮을 경우 용해율이 완벽하지 않아 생존한 박테리아가 존재할 수 있다. 따라서, 최소 억제농도 이하일 경우 용해율이 완벽하지 않으나 용해가 가능하다. 상기 화학물질의 농도는 각각 0(mg/ml)을 초과하며 하기 표의 MIC 농도 이하인 것이 바람직하다. 더 바람직하게는 황산암모늄은 180~190(mg/ml)인 것이며, 염화칼슘은 120 내지 125(mg/ml)인 것이며, 에틸렌다이아민테트라아세트산은 8 내지 10(mg/ml)인 것이다.

**표 1**

| Chemical agents                                 | MIC (mg/ml) | MIC%  |
|---|-------------|-------|
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 187.50      | 17.07 |
| CaCl <sub>2</sub>                               | 125.00      | 22.80 |
| EDTA  | 9.38        | 0.09  |

[0031]

[0032] 3. 박테리아 고스트의 제조

[0033] 박테리아 고스트를 제조하기 위해 LB 액체배지에서 72시간 배양한 대장균 배양액을 10,000g에서 10분간 원심분리한 후 침전물을 수확하여 phosphate-buffered saline(PBS, pH 7.0) 버퍼용액으로 세척하고, 대장균의 농도를 10<sup>6</sup> CFU/ml로 조정하였다. 황산암모늄, 염화칼슘, 에틸렌다이아민테트라아세트산의 농축용액(5x) 각각 1 ml을 2 ml의 박테리아 현탁액에 첨가하고 멸균수로 각 화학물질의 농도가 1x가 되도록 적정한 후 37 $^{\circ}$ C에서 90분간 배양하였다. 대장균의 용해가 완료된 후 PBS 버퍼용액으로 2회 세척하고, 10,000g에서 15분간 원심분리하여 박테리아 고스트를 수확하였다.

[0034] 4. 박테리아 고스트 제조 최소시간 결정

[0035] 상기의 방법으로 박테리아 고스트를 제조하기 위해 90분간 배양하면서 15분 간격(15분, 30분, 45분, 60분,

75분, 90분)으로 각각 박테리아 고스트를 수확한 후 용해율을 측정하였다.

## 실시예 2

- [0036] 제조된 박테리아 고스트의 평가
- [0037] 1. 박테리아 고스트의 제조 효율성
- [0038] 3종의 화학물질을 처리하여 제조한 박테리아 고스트를 대상으로 대장균의 Colony Forming Unit(CFU) 수를 측정하기 위하여 표준 분석법인 도말법(plating)을 실시하였다. 각 처리구는 각각 5개의 LB agar 배지에 도말하고, 37℃에서 48시간 배양한 후 생존하여 성장하는 콜로니 수를 측정하였다. 박테리아 고스트의 제조 효율은 다음과 같은 공식으로 계산하였다.
- [0039] 용해율(lysis rate) = (1-CFU of lysis completed / CFU before induction) x 100%
- [0040] 도 2에서 보는 바와 같이 박테리아 고스트를 100% 완벽하게 제조하는데 걸리는 최소 시간은 황산암모늄의 경우 60분, 염화칼슘의 경우 60분, 또는 에틸렌다이아민테트라아세트산의 경우 45분이 소요되는 것을 알 수 있다.
- [0041] 도 3에서 보는 바와 같이 최소억제농도(MIC)를 기초로 3종의 화학물질을 처리하여 제조된 박테리아 고스트를 도말한 LB agar 배지에서 생존한 콜로니는 전혀 관찰되지 않았다. 상기 공식으로 계산한 용해율은 100%로서 이 결과는 E 유전자에 의한 박테리아의 용해율, 99.9% 보다 높았다. 따라서 단순히 상기 화학물질을 처리함으로써 박테리아 고스트를 효율적으로 제조할 수 있다는 것을 알 수 있다.
- [0042] 2. 박테리아 고스트 세포 내에 잔존하는 성분
- [0043] (1) SDS-PAGE를 이용한 단백질 분석
- [0044] 상기 실시예 1에서 제조된 다양한 박테리아 고스트 시료를 확보하여 변성 완충액(Laemmli, 1970, Nature 227:680-685)을 첨가하고, 3-5분간 가열한 후 변성된 시료를 준비된 젤에 적재하여 지속적인 전류 40 mA에서 12% SDS-PAGE 전기영동을 4시간 실시하였다. 전기영동이 완료된 후 젤은 Coomassie brilliant blue 용액 (methanol: glacial acetic acid: water = 5:1:5 v/v/v 혼합액에 0.05% Coomassie brilliant blue R-250를 용해시킴)으로 염색하여 단백질을 분석하였다.
- [0045] 도 4A에서 보는 바와 같이 SDS-PAGE 분석 결과, 각 처리구의 박테리아 고스트에 잔존하는 단백질은 무처리구의 대장균보다 소량의 단백질 밴드가 관찰되었다. 박테리아 고스트에 존재하는 단백질 밴드는 세포질에 존재하는 단백질은 결여되고, 박테리아 고스트의 구조를 유지하는 세포벽에 존재하는 단백질로 판단된다.
- [0046] (2) 아가로스 젤(agarose gel)을 이용한 DNA 분석
- [0047] 박테리아 고스트 세포 내에 게놈 DNA가 존재하는가를 분석하기 위해서 ethidium bromide(EtBr 0.5g/ml, w/v)가 들어간 1% 아가로스 젤에 각 처리구의 박테리아 고스트를 적재하고 전기영동을 실시하였다.
- [0048] 도 4B에서 보는 바와 같이 아가로스 젤 전기영동 분석 결과, 각 처리구의 박테리아 고스트에 잔존하는 DNA는 전혀 관찰되지 않았으나, 무처리구의 대장균에서는 게놈 DNA 밴드가 관찰되었다.

[0049] 상기에서 살펴본 바와 같이 단순히 화학물질을 처리하여 제조된 박테리아 고스트는 게놈 DNA와 세포질 내의 단백질을 전혀 포함하지 않고, 세포벽만을 유지하고 있는 완벽한 형태의 박테리아 고스트를 구성하였다.

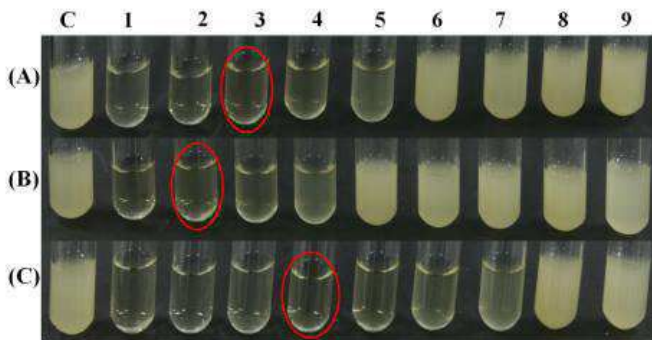
[0050] 3. 주사 전자현미경(Scanning electron microscopy; SEM) 분석

[0051] 3종의 화학물질을 처리하여 제조된 박테리아 고스트는 2.5% glutaraldehyde를 첨가한 PBS 용액에 4℃에서 2시간 고정된 후 같은 용액으로 세척하고 1% osmium tetroxide(OsO4) 용액에 4℃에서 1.5시간 고정하였다. 이후에 단계 희석된 에탄올로 박테리아 고스트를 탈수시키고, 액화 이산화탄소로 건조 시킨 후 polaron high-resolution sputter를 이용하여 금(gold) 코팅하였다. 상기 방법으로 준비된 각 처리구의 박테리아 고스트를 Leo 1455VP 주사 전자현미경으로 관찰하였다.

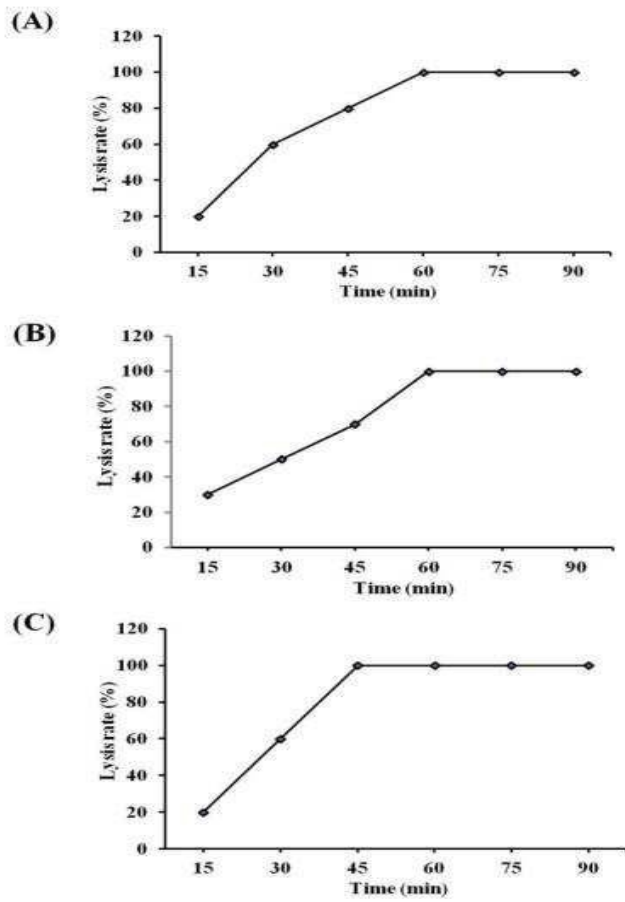
[0052] 도 5에서 보는 바와 같이 박테리아 고스트의 형태를 무처리구 대장균과 비교한 결과, 황산암모늄, 염화칼슘, 에틸렌디아민사아세트산을 처리하여 제조한 대장균박테리아 고스트에서는 용해된 터널 구조가 잘 관찰되었으나, 무처리구는 대장균의 완벽한 형태가 관찰되었다. 박테리아 고스트에서 직경이 100-500nm의 다양한 터널 이외에는 세포막의 손상은 관찰되지 않았다.

도면

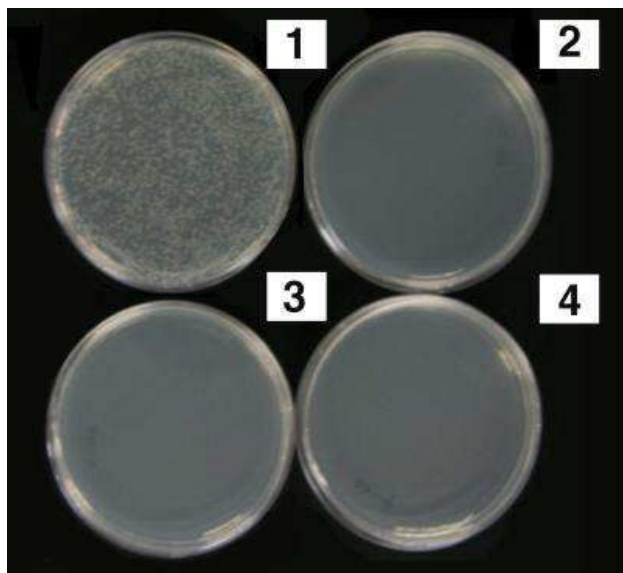
도면1



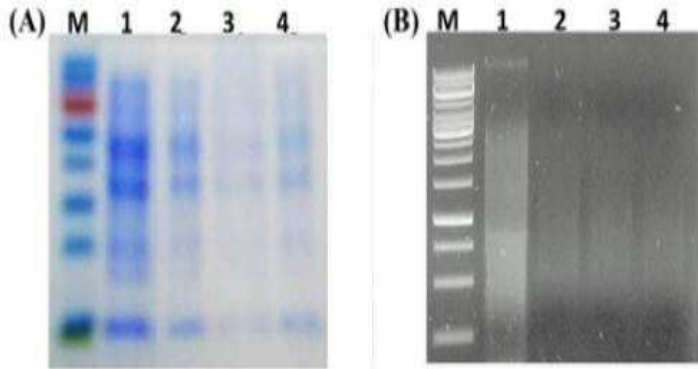
도면2



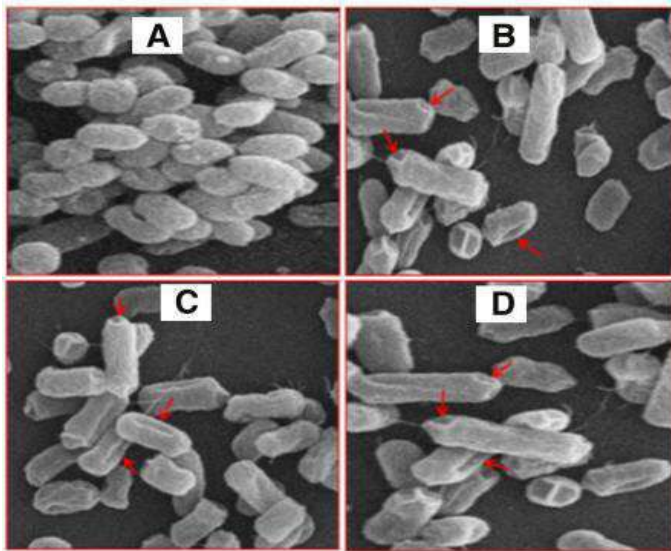
도면3



도면4



도면5



【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 제6항

【변경전】

황산암모늄: 187.50mg/ml, 염화칼슘: 125mg/ml 또는 에틸렌디아민테트라아세트산: 25mg/ml

【변경후】

황산암모늄 187.50mg/ml, 염화칼슘 125mg/ml 또는 에틸렌디아민테트라아세트산 25mg/ml