

Acridine Orange에 의한 *Salmonella pullorum*의 세포벽 변화

김 종 배 · 마 접 술
서울대학교 수의과대학
(1985. 9. 1 接受)

Acridine Orange-induced Changes in Cell Wall of *Salmonella pullorum*

Jong-bae Kim and Jum-sool Mah
College of Veterinary Medicine, Seoul National University
(Received September 1, 1985)

Abstract: *Salmonella pullorum* strain W was serially passaged on the brain heart infusion agar containing acridine orange(AO) as a concentration of 100 mcg/ml. *S. pullorum* AO60 and *S. pullorum* AO150, which were subcultured 60 and 150 passages on AO media, were examined for permeability barrier function of the cell wall. AO60 and AO150 were appeared to be decreased in susceptibility against hydrophobic substances such as crystal violet, chloramphenicol and rifamycin, which might be resulted from the changes of permeability barrier function of the cell wall. In sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of bacterial protein, the protein profiles of AO60 and AO 150 didn't differ significantly from W, but increased amount of the band of MW 140,000-145,000 was confirmed. And (G+C) contents of DNA in AO60 and AO150 were decreased than that of W.

서 론

acridine orange (AO)는 세포 내의 핵산과 결합하여 형광을 발하므로¹⁾ 형광색소로 많이 이용되고 있으며, 유전학 분야에서는 frameshift mutagen으로도 사용되고 있다. Watanabe와 Fukasawa²⁾는 acridine계 색소가 항생물질 내성세균의 R factor를 제거하는 효과가 있다고 하였다. 그러나 acridine계 물질의 작용기전에 대하여는 아직 명백하게 밝혀지지 않았으며 이들 물질이 근접한 핵산의 염기 사이에 개입함으로써 돌연변이를 초래하는 것으로 추정하고 있다.²⁾ 한편 *E. coli*에서 acridine계 색소에 대한 저항성을 결정하는 *acrA* 유전자는 세포막 성분의 합성과 밀접한 관계가 있으며¹⁷⁾, *acrA* 유전자의 변이는 세포막의 성분변화에 기인한 투

과성의 변화로 말미암아 acridine계 색소 및 소수성 물질에 대한 감수성을 증가시킨다.¹⁸⁾ Lambert와 Le Pecq¹⁹⁾는 4급 암모니움 유도체로서 DNA와 결합력이 높은 ethidium bromide의 *E. coli* 세포내 흡수시험에서 세균체로의 ethidium bromide 흡수 정도는 세포막 투과성 외에도 핵산으로의 지향성과도 관련이 있을 것이라고 하였다.

본 실험에서는 닭을 비롯하여 칠면조, 오리, 꿩, 참새 및 기타의 야생조류에 병원성이 있으며²⁰⁾, 감염된 모계로부터 난황을 통한 수직감염율이 높은 *S. pullorum*⁸⁾을 계대배양하는 과정에서 frameshift mutagen인 AO로써 지속적인 처리를 하여 AO에 의한 *S. pullorum*의 돌연변이 여부를 조사할 목적으로 여러가지 발육억제 물질에 대한 감수성, 세균체 구성 단백질의 분리상 및

Abbreviations: AO; acridine orange, BHIA; brain heart infusion agar, W; *Salmonella pullorum* W, AO60; *S. pullorum* AO60, AO150; *S. pullorum* AO150, SDS-PAGE; sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.

DNA의 (G+C) 함량 변화를 조사하였다.

재료 및 방법

*S. pullorum*의 acridine orange 처리 : *S. pullorum* W(가축위생연구소로부터 분양 받은 W strain)를 100 mcg/ml의 농도로 AO를 첨가한 BHIA(Difco) 평판에서 single colony를 취하여 60대 및 150대를 계대배양하였다. 이들 세균의 배양은 37°C에서 24~48시간 실시하였다. 이와 같은 방법으로 AO 처리한 *S. pullorum* AO60 및 *S. pullorum* AO150과 처리하지 않은 W의 세균주를 Ames 등¹¹⁾의 세균주 보관법에 따라 -70°C에 냉동보관하면서 실험에 사용하였다. 한편 발육억제물질에 대한 감수성 시험에서 대조로 사용한 *S. pullorum* B50은 *S. pullorum* W를 AO를 첨가하지 않은 BHIA에서 50대 계대배양 하였다.

색소, 항생물질 및 계면활성제에 대한 감수성 시험 : AO 배지에서 계대배양한 AO60 및 AO150의 여러가지 발육억제물질에 대한 감수성을 AO 처리하기 전의 W와 비교하였다. 발육억제물질로서 crystal violet, methylene blue, methyl green, pyronin Y, toluidine blue 등의 색소, sodium dodecyl sulfate, sodium deoxycholate 등의 계면활성제, chloramphenicol, tetracycline, erythromycin, neomycin, rifamycin, nalidixic acid 등의 항생물질을 희석하여 농도별로 첨가한 감수성 검사용 배지를 PG 배지¹⁷⁾를 기초배지로 하여 제작하였다. 이들 감수성검사 배지에 W, AO60 및 AO150 세균을 접종하고 37°C에서 72시간 배양한 후 발육억제물질의 함유농도에 따른 세균 집락의 형성 유무로써 결과를 판정하여 각 물질의 최소발육저지농도를 구하였다.

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis : AO 처리 세균의 단백질 변화를 SDS-PAGE로 비교 조사하였다. 즉 W, AO60 및 AO150의 세균으로부터 Osborn 등²¹⁾의 방법으로 세균 세포막을 분리한 후 각각의 세균 세포막 및 세균체를 시료용 완충액에 용해시켰다. 이와 같이 처리한 단백질을 discontinuous gel system¹²⁾을 이용한 10% polyacrylamide slab gel을 전개지지체로 이용하여 30mA로 4시간 전기영동하였다. 전기영동한 gel은 coomassie brilliant blue R로 염색하였으며 각 단백질의 분자량은 phosphorylase b (MW 94,000), bovine serum albumin (MW 67,000), ovalbumin (MW 43,000), carbonic anhydrase (MW 30,000) 및 soybean trypsin inhibitor (MW 20,000)가 혼합된 marker protein(Pharmacia Fine Chemical)을 동시에 전기 영동하여 비교하였다.

(G+C)량의 정량분석 : *S. pullorum*의 AO 처리로 인한 돌연변이 여부를 조사하기 위하여 W, AO60 및 AO150으로부터 Sato와 Miura²³⁾의 방법에 준하여 DNA를 분리하고 Skidmore와 Duggan²⁵⁾의 방법에 따라(G+C)량을 정량분석하였다. 즉 각 세균주로부터 분리한 DNA를 7% perchloric acid로 가열처리 후 190~350 nm에서 scanning하였다(UV-VIS Perkin-Elmer Spectrophotometer). (G+C)량은 각 DNA의 흡광도 곡선으로부터 $(A+T) = 1.064 \times \left[\left(\frac{A_{264}^{DNA} - A_{286}^{DNA}}{A_{273}^{DNA}} \right) \right]$ 의 동식을 이용하여 계산하였다.

결 과

발육억제물질에 대한 감수성 변화 : AO 처리한 *S. pullorum*의 발육억제물질에 대한 투과성의 변화를 조사하기 위하여 항생물질, 계면활성제 및 색소에 대한 감수성의 변화와 이들 물질의 소수성 정도를 비교하였다. AO 처리하지 않은 W와 AO 처리 세균의 각 물질에 대한 최소 발육저지농도는 Table 1에서와 같다. 즉 소수성 정도가 큰 crystal violet, chloramphenicol 및 rifamycin 등에 대한 감수성은 AO 처리세균에서 감소하였으나 소수성 정도가 낮은 erythromycin, sodium deoxycholate, sodium dodecyl sulfate 및 crystal violet을 제외한 색소 모두에는 감수성의 변화가 없었다. 이와 같은 결과로부터 AO 처리세균은 소수성 물질에 대한 투과성이 변화된 것을 알 수 있었다.

구심 단백질의 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis에 의한 분리상 : AO 처리로 인한 세균체 단백질의 변화를 조사하기 위하여 세포막 및 whole cell lysates의 단백질을 SDS-PAGE하였다. SDS-PAGE 결과 전체적인 단백질분리상은 큰 변화가 없었으나(Fig. 1), whole cell lysates의 경우 MW140,000~145,000인 band(화살표 a)에는 차이가 있었다. AO 처리 세균에서는 이 band의 양적인 증가가 인정되었으며 AO150에서 이 같은 현상이 더욱 뚜렷하였다. 또한 이 단백질의 분자량은 AO 배지에서의 계대회수가 많을수록 감소되었으나 세포막 단백질에서는 뚜렷하지 않았다. 한편 MW 33,000~36,000인 band(화살표 b)는 세균의 lipopolysaccharide 조성 및 밀접한 관계가 있는 물질²²⁾으로서 whole cell lysates에서 보다 세포막 단백질에서 많은 차이를 보이며 AO 처리세균에서 양적으로 감소하였다.

DNA의 (G+C)함량비 : AO 처리세균의 돌연변이 여부를 조사하기 위하여 AO 처리 세균으로부터 DNA를 추출하여 W의 DNA(G+C) 함량과 비교하였다. 표 2에서와 같이 W의 (G+C)함량은 54.2mole%였으나 AO

Table 1. Alteration of Sensitivity of W, AO60 and AO150 Strains of *S. pullorum* to Inhibitory Substances

	Minimal inhibitory conc. (mcg/ml)			Partition coefficient*
	W	AO60	AO150	
Decreased sensitivity to:				
Crystal violet	50	200	200	14.4
Chloramphenicol	3.12	6.25	6.25	12.4
Rifamycin	6.25	12.5	12.5	8.8
Nalidixic acid	3.12	6.25	6.25	3.16
Tetracycline	1.56	3.12	3.12	0.07
No change in sensitivity to:				
Erythromycin	25	25	25	0.79
Sodium deoxycholate	>20,000	>20,000	>20,000	1.09
Sodium dodecyl sulfate	>20,000	>20,000	>20,000	0.79
Methylene blue	200	200	200	0.02
Methyl green	200	200	200	0.02
Pyronin Y	200	200	200	
Toluidine blue	>800	>800	>800	

* Partition coefficients are from Coleman and Leive.²³

These authors designated a substance hydrophilic if its partition coefficient was less than 0.02.

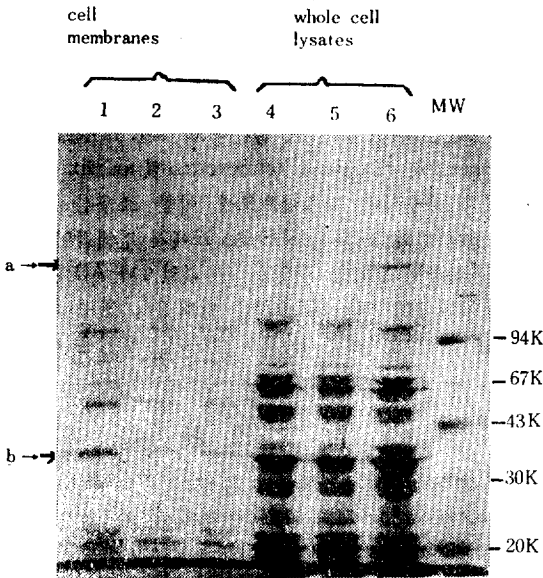


Fig. 1. SDS-PAGE of cell membrane proteins and whole cell lysates from AO-treated and parental strains. Lane 1 and 4, W; lane 2 and 5, AO60; lane 3 and 6, AO150. The lane marked MW contained molecular weight standards.

60의 [G+C] 함량은 48.2mole%, 그리고 AO150은 46.5mole%였다. 한편 AO60을 AO150, BHI에서 10

대씩 계대배양하여도 이들 세균의 [G+C] 함량은 변하지 않았다. 이와 같은 결과로 보아 AO60과 AO150은 AO배지에서 계대배양함으로써 변이가 일어났음을 알 수 있었으며 AO150이 AO60에 비하여 [G+C] 함량이 더욱 감소한 것으로 나타났다.

Table 2. Alteration in [G+C] Content of DNA from W, AO60 and AO150 Strains of *S. pullorum*

DNA	[G+C] content, mole%
<i>S. pullorum</i> W	54.2
<i>S. pullorum</i> AO60	48.2
<i>S. pullorum</i> AO150	46.5

고 찰

acridine orange에 의한 변이 *S. pullorum*의 특성을 조사하기 위하여 여러가지 발육억제물질에 대한 감수성 시험, 구성단백질의 SDS-PAGE상 및 DNA의 [G+C] 함량을 조사하였다. AO 처리 *S. pullorum*은 발육억제물질에 대한 감수성 시험에서 crystal violet, chloramphenicol, rifamycin 등의 소수성 정도가 높은 물질에 대한 감수성이 감소한 반면 소수성 정도가 낮은 erythromycin, sodium deoxycholate, sodium dodecyl sulfate 및 색소에 대한 감수성은 변화하지 않았다.

Nakamura¹⁷⁾는 *E. coli*의 *acrA* 유전자는 acriflavin과 phenethyl alcohol에 대한 저항성을 지배한다고 하였으며, Coleman과 Leive¹⁸⁾는 ethyl methane sulfonate 처리로 *acrA*를 소실케 한 *E. coli*는 partition coefficient 0.02 이상의 소수성 물질에 대한 감수성이 증가한다고 하였다. crystal violet, chloramphenicol, rifamycin 등의 소수성이 높은 물질은 세균체 외막의 permeability barrier 기능을 조사하는데 많이 이용되는 물질로서, 이들 물질에 대한 감수성이 증가된 세균은 lipopolysaccharide의 polysaccharide chain의 일부 또는 전부를 소실한 변이세균으로 보고¹⁹⁾되어 있다. 그러나 본 실험 결과 이들 소수성이 높은 물질에 대한 감수성이 감소한 것은 AO 처리로 인하여 lipopolysaccharide의 polysaccharide repeating unit, 수효가 오히려 증가되었기 때문인 것으로 추정된다.

세포막 및 세균체 단백질의 SDS-PAGE에서는 AO 처리세균의 MW 145,000인 단백질의 양적인 변화를 제외하고는 세균 단백질의 분리상에 큰 변화가 없었다. Buxton 등⁴⁾은 *E. coli*의 dye 변이세균에서 세포막 단백질을 분리하여 SDS-PAGE한 결과 전체적인 단백질 분리상은 야외세균주와 큰 차이가 없다고 하였으며 이것은 세포막 단백질의 변화가 미량단백질에 국한하기 때문이라고 하였다. 본 실험에서의 SDS-PAGE 결과도 이와 같은 이유 때문에 단백질 분리상에는 큰 차이가 없었던 것으로 생각한다.

AO 처리로 인한 *S. pullorum*의 돌연변이 여부를 확인하기 위하여 AO 처리세균의 (G+C) 함량을 조사하였다. AO 처리세균의 (G+C) 함량은 AO 처리하지 않은 W에서보다 AO60은 6.0%, AO150은 7.7%가 감소하였다. 이와 같은 (G+C) 함량의 감소는 AO 처리로 인한 *S. pullorum*의 돌연변이를 인정할 수 있다. ICR 화합물, proflavin, acridine yellow 등의 acridine계 색소는 세균에서 frameshift mutation을 유도하는 것으로 알려져 있다.^{11,20,26)} proflavine 등의 acridine계 색소는 T4 bacteriophage에서는 강력한 mutagen으로 작용하지만²²⁾ 일반적으로 세균에 있어서는 돌연변이 효과가 미약한 것으로 알려져 있다.¹⁴⁾ 그러나 세균에서도 acridine계 색소의 세포내로의 투과성을 증대시키면 세균에 대한 돌연변이 효과도 증가된다²⁴⁾고 한다. 이와 같이 mutagen의 투과성을 증대시키지 않고 세균의 돌연변이를 유도하는 경우에는 그 세균의 증식은 가능하지만 집락형성을 지연시키는 준치사량의 농도로 대상세균이 12~15세대이상 세포분열을 할 수 있는 긴 시간 동안 작용시켜야 한다.¹⁵⁾ 본 실험에서 *S. pullorum*의 AO 처리에 사용한 AO의 농도는 *S. pullorum*에

대한 준치사량 농도로서 이와 같은 농도하에서 지속적으로 장기간에 걸쳐 계대배양함으로써 얻어진 변이세균주는 이와 같은 사실에 부합된다고 할 수 있다. acridine계 색소의 작용기전은 아직 명확히 밝혀지지 않고 있으나 ICR191은 세균 핵산의 염기를 제거하거나 추가함으로써 돌연변이를 유도한다고 생각되며 특히 (G:C) 염기쌍에 주로 작용한다고 추측된다.⁸⁾ 또한 AO도 핵산의 (A:U) 염기쌍보다 (G:C) 염기쌍에 친화성이 더 높은 것으로 알려져 있다.¹⁰⁾ 한편 Karpuscinski와 Darzynkiewicz⁹⁾는 송아지 흉선 DNA에 AO를 혼합하면 DNA의 용해점(T_m)이 낮아지며 DNA의 일부염기쌍이 파괴되어 변성된다고 하였다. 이와 같은 DNA의 용해점의 하강은 (G+C) 함량을 구하는 $\%(G+C) = \frac{T_m - 69.3}{0.41}$ 의 공식¹⁰⁾에 따르면 DNA의 (G+C) 함량 저하를 의미한다. 그러므로 본 실험에서 AO 처리세균 DNA의 (G+C) 함량 저하는 이와 같은 이유에서 비롯된 것으로 생각된다.

결 론

S. pullorum 세균의 AO에 의한 세포벽의 변화 및 돌연변이 여부를 조사할 목적으로 *S. pullorum* W를 AO 배지에서 계대배양하여 얻은 AO60 및 AO150에 대하여 발육억제물질에 대한 감수성, 세균체 구성 단백질 및 DNA의 (G+C) 함량을 조사하였다. AO60 및 AO150은 소수성 발육억제 물질인 crystal violet, chloramphenicol, rifamycin, tetracycline 및 nalidixic acid에 대한 감수성이 감소함으로써 이들 소수성 물질의 투과성이 변화하였다. SDS-PAGE에서 전체적인 세균 단백질분리상의 변화는 확인할 수 없었으나 AO 처리세균은 MW 140,000~145,000인 단백질의 함량이 증가하였으며, 이들 세균 DNA의 (G+C) 함량은 감소하였다.

참 고 문 헌

1. Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E.: Methods for detecting carcinogens and mutagens with salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test, Mut. Res. (1975) 31:347.
2. Ames, G.F.: Resolution of bacterial proteins by polyacrylamide gel electrophoresis on slabs, J. Biol. Chem. (1974) 249:634.
3. Bossi, L., Kohno, T. and Roth, J.R.: Genetic characterization of the SufJ frameshift suppressor in *Salmonella typhimurium*, Genetics(1983) 103:31.

4. Buxton, R.S., Drucy, L.S. and Curtis, C.A. M.: Dye sensitivity correlated with envelope protein changes in dye (sfrA) mutants of *Escherichia coli* K12 defective in the expression on the sex factor F. J. Gen. Microbiol. (1983) 129: 3363.
5. Coleman, W.G. Jr. and Leive, L.: Two mutations which affect the barrier function of the *Escherichia coli* K-12 outer membrane. J. Bacteriol. (1979) 139:899.
6. De, D.N. and Bhanja, F.: A phenomenon of photoenhancement of acridine orange-induced fluorescence. J. Histochem. Cytochem. (1976) 24: 674.
7. Gordon, R.F.: *Salmonella pullorum* disease. In Poultry Disease, 1st ed., Balliere Tindall, London. (1977) p.10.
8. Jefferies, C.D. and Holtman, D.F.: Growth response of *Salmonella pullorum* in the chick embryo. Am. J. Vet. Res. (1958) 19:736.
9. Kapuscinski, J. and Darzynkiewicz, Z.: Increased accessibility of bases in DNA upon binding of acridine orange. Nucleic Acids Res. (1983) 11:7555.
10. Kapuscinski, J., Darzynkiewicz, Z. and Melamed, M.R.: Interactions of acridine orange with nucleic acids. Biochem. Pharmacol. (1983) 32:3679.
11. Kohno, T., Bossi, L. and Roth, J.R.: New suppressors of frameshift mutations in *Salmonella typhimurium*. Genetics (1983) 103:23.
12. Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (1970) 227:680.
13. Lambert, B. and Le Pecq, J.: Effect of mutation, electric membrane potential, and metabolic inhibitors on the accessibility of nucleic acids to ethidium bromide in *Escherichia coli* cells. Biochemistry (1984) 23:166.
14. Lerman, L.S.: The structure of the DNA-acridine complex. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1963) 49:94.
15. Miller, J.J.: Mutagenesis with frameshift mutagen; ICR191. In Experiments in molecular genetics, 1st ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (1972) p.130.
16. Moore, J. A. Jr.: Determination of the molar percentage of guanine+cytosine in deoxyribonucleic acids. In Laskin, E.I. & Lechvalier, H. A. (Ed.), Handbook of Microbiology, 2nd Ed., Vol.3, CRC press Inc., Boca Raton (1981) p.757.
17. Nakamura, H.: Genetic determination of resistance to acriflavin, phenethyl alcohol, and sodium dodecyl sulfate in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. (1968) 96:987.
18. Nakamura, H., Tojo, T. and Greenberg, J.: Interaction of the expression of two membrane genes, *acrA* and *plsA*, in *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. (1975) 122:874.
19. Nikaido, H.: Outer membranes of *Salmonella typhimurium*. Transmembrane diffusion of some hydrophobic substances. Biochim. Biophys. Acta. (1976) 433:118.
20. Oeschger, N.S. and Hartman, P.E.: ICR-induced frameshift mutations in the histidine operon of *Salmonella*. J. Bacteriol. (1970) 101:490.
21. Osborn, M.J., Gander, J.E., Parisi, E. and Carson, J.: Mechanism of assembly of the outer membrane of *Salmonella typhimurium*. Isolation and characterization of cytoplasmic and outer membrane. J. Biol. Chem. (1972) 247:3962.
22. Roth, J.R.: Frameshift mutations. Ann. Rev. Genet. (1974) 8:319.
23. Sato, H. and Miura, K.I.: Preparation of transforming deoxyribonucleic acid by phenol treatment. Biochim. Biophys. Acta (1963) 72:619.
24. Silver, S.: Acridine sensitivity of bacteriophage T2: A virus gene affecting cell permeability. J. Mol. Biol. (1967) 29:191.
25. Skidmore, W.D. and Duggan, E.L.: Base composition of nucleic acids. In Methods in Microbiology, Norris, J.R. Ed., Vol.5B, Academic Press, New York (1971) p.631.
26. Stewart, C.R.: Mutagenesis by acridine yellow in *Bacillus subtilis*. Genetics (1968) 59:23.
27. Watanabe, T. and Fukasawa, T.: Episome-mediated transfer of drug resistance in *Enterobacteriaceae*. II. Elimination of resistance factor with acridine dyes. J. Bacteriol. (1961) 81:679.