

## 현장에서 초음파 파쇄와 형광시약을 이용한 단백질 독소의 조기 탐지

† 하연철 · 최기봉 · 김성주 · <sup>1</sup>최정도  
국방과학연구소 1-2-1, <sup>1</sup>충북대 생화학과  
(접수 : 2006. 12. 20., 게재승인 : 2007. 2. 3.)

### The Early Detection of the Protein Toxin using Sonification and Fluorescent Dye in the Field

Yeon-chul Ha<sup>†</sup>, Ki-bong Choi, Seong-joo Kim, and Jung-do Choi<sup>1</sup>  
GSDC-2-1, Agency for Defense Development  
<sup>1</sup>Department of Biochemistry, Chungbuk National University  
(Received : 2006. 12. 20., Accepted : 2007. 2. 3.)

This study was carried out to establish the optimum disruption condition of a sonicator for the protein toxin for the purpose of developing automatic biological agent detector equipped a sonicator. One of the best-known collisional quenchers is molecular oxygen, which quenches almost all known fluorophores. The sonification does an excellent job of degassing, which decreased the quenching effect and increased the fluorescence quantity. The fluorescence measurement for the protein using 0.7 X fluorescent dye concentration and above must be done in 1 minute and the fluorescence measurement for the protein using 0.3 X fluorescent dye concentration and below has to be done between 2 and 3 minute. The fluorescence quantity of the sonificated protein sample was much higher that of the non-sonificated protein sample. Sonificating the sample turned out to be favorable for the fluorescence measurement when measuring at the low protein concentration.

**Key Words** : Sonification, fluorescence, protein

#### 서론

단백질을 정량하는 것은 수많은 생화학적 응용에 기본적인 단계이며, 따라서 용액 중 단백질의 정확하고, 신뢰성 있는 분석 방법 개발에 많은 노력을 기울여 왔다. 단백질들의 다양성, 이물질의 간섭현상, 시기적절한 시약 첨가와 반응시간 등이 단백질 정량분석에 주요 제한사항이다.

흡광을 기반으로 하는 단백질 정량분석 방법들이 장점과 단점을 지닌 채 폭넓게 사용되고 있다. Bicinchoninic acid (BCA) 분석방법은 알칼리 환경 하에서  $Cu^{++}$  이온이 단백질에 의해 환원되어  $Cu^+$  이온으로 되어 BCA 용액과 반응하여 자주색의 화합물을 생성하게 되며 562 nm에서 흡광을 측정하여 정량하는 방법으로 대부분의 계면활성제와 반응이 일어나지 않는 장점이 있는 반면, 환원제와는 반응이 일어나며 신뢰성 있는 결과를 위해서는 10분 이내에 흡광을 측정해야 하는 단점이 있다(1). Bradford 분석방법은 Van der

Waals force와 hydrophobic interaction에 의해 Coomassie dye가 단백질과 결합되면 최대흡광도가 465 nm에서 615 nm로 spectral shift가 발생되며 그 차이가 가장 큰 595 nm에서 흡광을 측정하는 방법으로 환원제와는 반응이 일어나지 않으며 가장 빠르고 손쉬운 장점이 있는 반면, Coomassie dye가 arginine, lysine, histidine 같은 염기성 아미노산과 단백질 3차 구조와 결합하기 때문에 단백질간 차이가 있으며, dye가 산성으로 용해성이 낮아 민감도가 떨어지고, 또한 계면활성제와 반응이 일어나는 단점이 있다(2). Lowry 분석방법은 단백질에 tartrate와 alkaline cupric sulfate를 가하여 상온에서 10분간 반응시키면 4개의 펩티드 결합과 구리 한 개 원자로부터 연파란색의 tetradentate copper complex가 형성되고 Folin phenol 시약을 첨가하면 tetradentate copper complex의 전자가 Folin phenol 시약으로 전이되어 강한 파란색을 띠게 되어 750 nm에서 흡광을 측정하는 방법으로 측정 범위가 넓고 민감도가 높으며 단백질간 차이가 없는 장점이 있는 반면, 절차가 복잡하고 chelating agent, 환원제, 계면활성제와 반응이 일어나는 단점이 있다(3). 자외선 흡광 정량 방법은 280 nm에서 방향족 아미노산 (티로신, 트립토판, 페닐알라닌) 등이 자외선을 흡수하는 것을 이용하는 신속하고 비파괴적인 방법이나 민감도가 떨어지는 단점이 있다.

† Corresponding Author : GSDC-2-1, Agency for Defense Development, Yuseong P. O. Box 35-1, Daejeon 305-600, Korea  
Tel : +82-42-821-4686, Fax : +82-42-821-2880  
E-mail : hyc0311@hanafos.com

형광을 기반으로 하는 단백질 정량분석 방법은 흡광을 기반으로 하는 방법보다 낮은 잡음 신호, 넓은 측정 범위, 그리고 높은 민감도를 나타내는데 일반적으로 크게 두가지 방법이 있다. 첫 번째 방법은 비형광 물질이나 단백질의 아민과 공유결합이 되면 형광을 발생시키는 fluorescamine(4), 3-(4-carboxybenzoyl)quinoline-2-carboxaldehyde(CBQCA)(5), o-phthaldialdehyde (OPA)(6) 등의 dye를 이용하거나, 다른 방법은 단백질의 hydrophobic region 혹은 detergent-coated protein과 비공유결합을 하는 Nile red(7, 8), SYPRO(9, 10), merocyanine(11, 12) 등의 dye가 이용되고 있다.

본 연구에서는 초음파 파쇄를 이용하여 세포막을 파쇄하고 현장에서 형광을 이용하여 단시간 내에 현장에서 미생물과 단백질 독소의 존재 유무를 동시에 탐지하는 형광 측정기를 개발하기 위하여 그람음성균(13)과 그람양성균(14)의 탐지에 관한 연구에 이어 단백질을 탐지하는데 민감도가 높고 시료 전처리가 필요없으며, dynamic range가 넓고 단백질 간의 분석 편차가 적은 merocyanine 계열인 Quant-iT protein assay kit를 이용하여 최적의 단백질 탐지 조건들을 확립하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 재료

실험에 사용한 균주는 그람 음성균인 *E. coli* (MC1061), 그람 양성균으로 간균인 *Bacillus globigii* (KCCM 11314)와 구균인 *Streptococcus epidermidis* (ATCC 1917)이며, LB배지 (Luria-Bertani; tryptone 10 g/L, yeast extract 5 g/L, sodium chloride 5 g/L)를 사용하여 37°C 200 rpm의 교반배양기에서 4시간 배양 하였다. 배양후 4°C에서 10분동안 2000 g에서 원심분리하고 PBS buffer로 3회 세척하여 수확하였다. 형광시약과 BSA는 Molecular Probes사의 Quant-iT Protein Assay Kit (Q33210)사의 제품을 사용하였다.

### 단백질 분석

단백질 형광 분석은 OptiPlate Black 96-Well plate (PerkinElmer사, 6005279)에 시료 180  $\mu$ l와 형광시약 20  $\mu$ l를 혼합하여 200  $\mu$ l를 분주하고 1분동안 반응을 시킨 후 PerkinElmer사의 1420 Multilabel Counter (Ex. 485 nm/Em. 595 nm, CW-Lamp Energy: 1548, counting time: 1 sec)를 이용하여 측정하였다. 20 kHz sonicator는 Sonic & Materials 사의 130 Watt Ultrasonic Processor (VCX 130)를 사용하였다.

### 단백질 탐지에 Sonification의 영향

단백질 탐지에 sonification이 미치는 영향을 알아보기 위하여 0, 0.125, 0.25, 0.5, 1  $\mu$ g/ml 농도의 BSA 시료 2 ml를 15 ml의 disposable centrifuge tube에 주입하고 20 kHz sonicator의 13 mm probe를 사용하여 20초 동안 초음파 파쇄를 별도로 2 회를 실시하여 총 4 ml의 시료를 sonification 시킨 후 형광시약인 Quant-iT의 최종농도를 0.1, 0.3, 0.7, 1.0 X가 되도록 시료에 첨가하고 sonification 전과 후의 형광량 변화를 각각 4회 측정하여 평균하였다.

### 반응 시간

Quant-iT protein assay kit의 형광시약을 용해시키는 protein 버퍼와 반응시간이 단백질 탐지에 미치는 영향을 알아보기 위하여 BSA를 1  $\mu$ g/ml 농도의 시료를 제조한 후, 각각의 시료 2 ml를 15 ml의 disposable centrifuge tube에 주입하고 20 kHz sonicator의 13 mm probe를 사용하여 20초 동안 sonification시키고 protein 버퍼와 버퍼 대신에 증류수 대체 가능성을 확인해 보고자 증류수에 각각 형광시약 Quant-iT의 최종농도를 0.1, 0.3, 0.7, 1.0 X가 되도록 시료에 첨가하여 1분 간격으로 10분 동안 반응시키면서 형광을 측정하여 각각 4회 반복하여 평균하였다.

### 가열처리

단백질 시료를 sonification 후에 가열처리에 의한 형광량의 변화를 시험하기 위해서 0, 0.125, 0.25, 0.5, 1  $\mu$ g/ml와 단백질 BSA 시료를 제조하여 각 농도별로 시료 2 ml를 15 ml의 disposable centrifuge tube에 주입하고 20 kHz sonicator의 13 mm probe를 사용하여 20초 동안 초음파 파쇄를 시키고 각각 형광시약 Quant-iT의 최종농도를 0.1 X가 되도록 시료에 첨가한 후 1 ml를 microcentrifuge tube에 주입하고 각각 1분 간격으로 5분 동안 98°C 끓는 물에서 가열 처리한 후 상온에서 냉각하고 가열처리에 따른 형광량을 각각 4회 측정하여 평균하였다.

### 형광시약과 미생물의 반응성

그람 음성균인 *Escherchia coli*, 그람양성균의 간균인 *Bacillus globigii*와 구균인 *Streptococcus epidermidis*에 대한 형광시약 Quant-iT와의 반응성을 알아보기 위하여 각각 0, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup>, 10<sup>8</sup>, 10<sup>9</sup> CFU/ml 시료 2 ml를 15 ml의 disposable centrifuge tube에 주입하여 13 mm probe를 사용하여 20 kHz에서 20초 동안 sonification하고, 형광시약 Quant-iT의 농도를 0.1 X가 되도록 시료에 첨가하여 1분 동안 반응시킨 후 미생물 농도에 따른 형광량의 변화를 측정하여 각각 4회 반복하여 평균하였다.

### 형광시약 농도별 단백질 측정범위 및 탐지한계

단백질의 측정 가능한 측정 범위를 알아보기 위하여 0, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 10, 100, 1000, 10000  $\mu$ g/ml의 단백질 BSA 시료를 제조하고 각각 2 ml를 15 ml의 disposable centrifuge tube에 주입하여 13 mm probe를 사용하여 20 kHz에서 20초 동안 sonification시킨 후, 형광시약 Quant-iT의 최종농도를 0.1, 0.3, 0.7, 1.0 X가 되도록 시료에 첨가하여 1분 동안 반응시킨 후 단백질 농도에 따른 형광량을 각각 4회 측정하여 평균하였다.

## 결과 및 고찰

### 단백질 탐지에 Sonification의 영향

단백질을 탐지하는데 sonification이 미치는 영향을 알아보기 위하여 형광시약 농도 별로 sonification을 시키지 않은 시료와 20초 동안 sonification시킨 시료의 형광을 측정

한 결과를 Fig. 1과 2에 나타내었다. Sonification을 시키지 않은 시료를 측정할 때 Fig. 1을 살펴보면 0.3, 0.7, 1.0 X 형광시약 농도에서는 단백질의 농도가 1  $\mu\text{g/ml}$  이상에서 탐지되며, 0.1 X 형광시약 농도에서는 0.125  $\mu\text{g/ml}$  농도에서도 탐지되는 것으로 나타났다. Sonification을 시킨 시료를 측정할 때 Fig. 2를 살펴보면 0.7, 1.0X 형광시약 농도에서는 단백질의 농도가 1  $\mu\text{g/ml}$  이상에서 탐지되며, 0.1, 0.3 X 형광시약 농도에서는 0.125  $\mu\text{g/ml}$  농도에서도 탐지되는 것으로 나타났으며, 형광시약 농도가 낮을수록 detection limit이 더 낮아지는 결과를 얻었다. 또한 sonification을 시키지 않은 시료보다 sonification을 시킨 시료를 측정할 때 형광 값이 보다 높은 형광 값을 나타내었다. 이것은 시료 용액 중에 녹아 있는 공기 중의 산소가 collisional quenching을 일으켜 형광량이 감소되는데, sonification을 통하여 산소가 제거됨으로써 quenching 효과가 크게 감소되어 형광량이 증가하므로 단백질을 탐지하는데 sonification을 시키는 것이 훨씬 좋은 결과를 나타냈다. 즉 1  $\mu\text{g/ml}$  이하의 낮은 농도에서 단백질을 탐지하기 위해서는 sonification을 실시하여 형

광을 quenching시키는 용존 산소를 제거하고 0.1 X의 형광시약 농도로 측정하는 것이 가장 효과적이며, 이때 탐지한 계는 0.125  $\mu\text{g/ml}$ 으로 sonification을 시키지 않은 시료보다 훨씬 우수하였다.

**반응 시간**

단백질 시료에, 증류수에 용해시킨 형광시약의 최종농도를 0.1, 0.3, 0.7, 1.0 X가 되도록 첨가하여 1분 간격으로 10분 동안 반응시키면서 형광을 측정할 때 Fig. 3에 나타내었다. 0.7, 1.0 X의 형광시약 농도에서는 형광값이 급격히 감소하고, 0.3 X의 형광시약 농도에서는 형광값이 증가하다가 감소하며, 0.1 X의 형광시약 농도에서는 10분 동안 반응시키는 동안 점진적으로 증가되는 경향을 나타내었다. 그리고 단백질 시료에, 버퍼에 용해시킨 형광시약의 최종농도를 0.1, 0.3, 0.7, 1.0 X가 되도록 첨가하여 1분 간격으로 10분 동안 반응시키면서 형광을 측정할 때 Fig. 4에 나타내었다. 버퍼에 용해된 각각의 형광시약 농도에서의 형광값이 변화되는 결과는 증류수에 용해된 형광시약의 결과에 비해

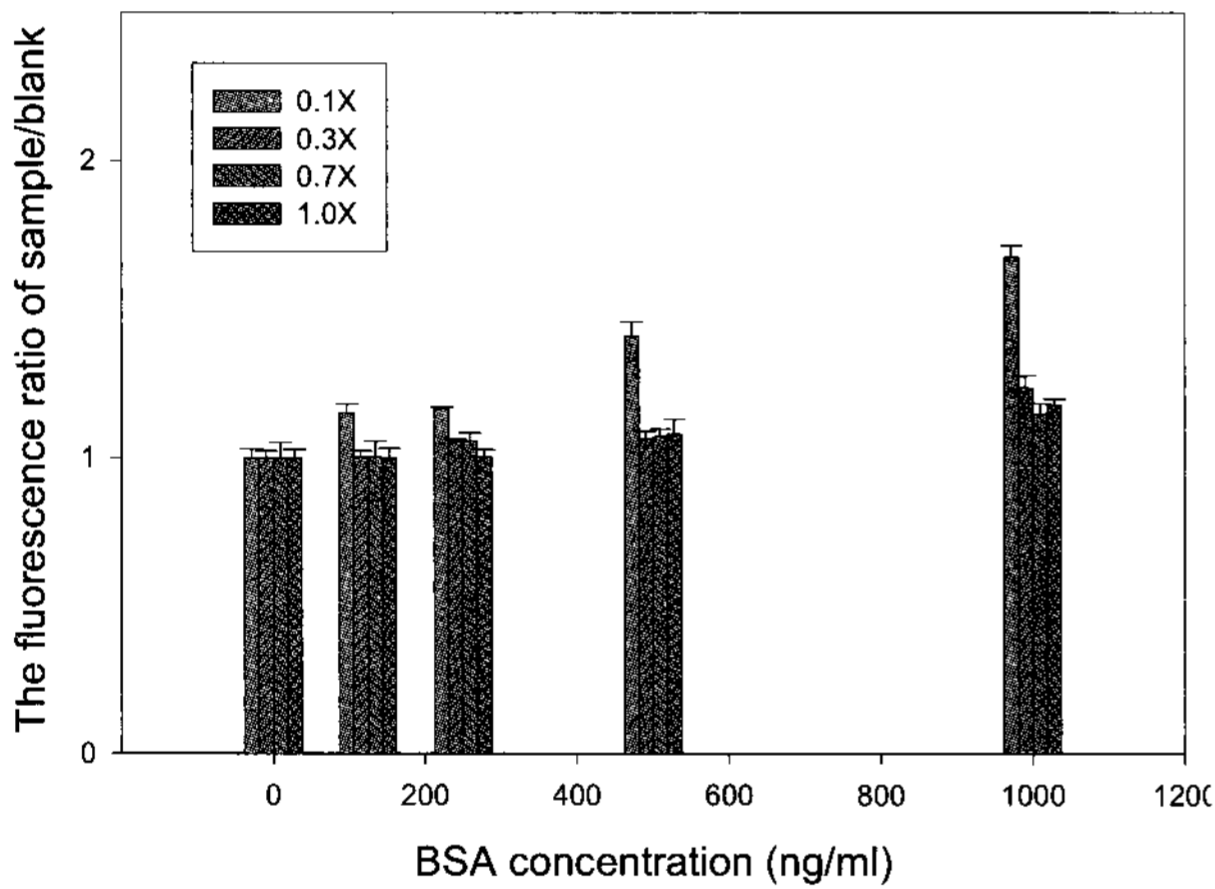


Figure 1. Relative fluorescence ratio of the non-sonification sample to the non-sonification blank depending on the BSA concentration at the different fluorescent dye concentrations.

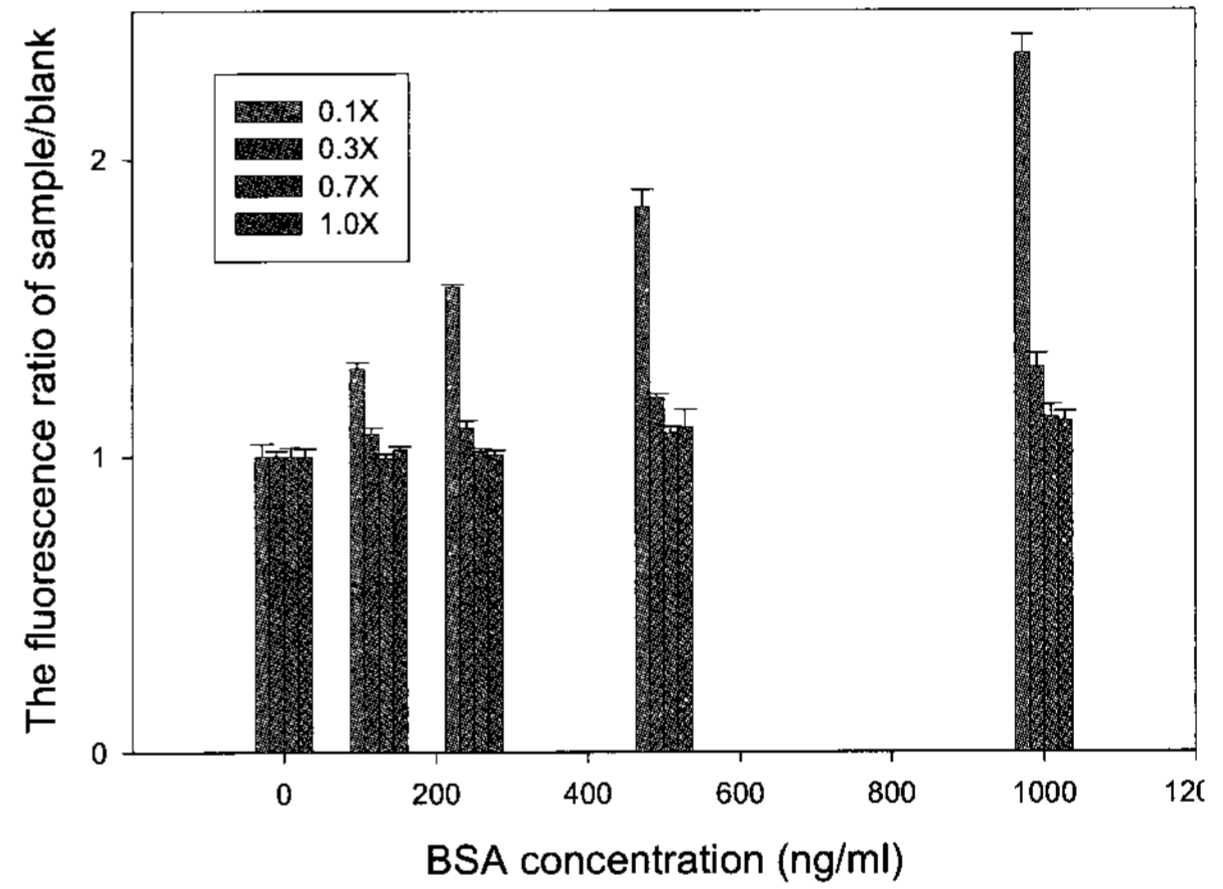


Figure 2. Relative fluorescence ratio of the 20 sec-sonication sample to the 20 sec-sonication blank depending on the BSA concentration at the different fluorescent dye concentrations.

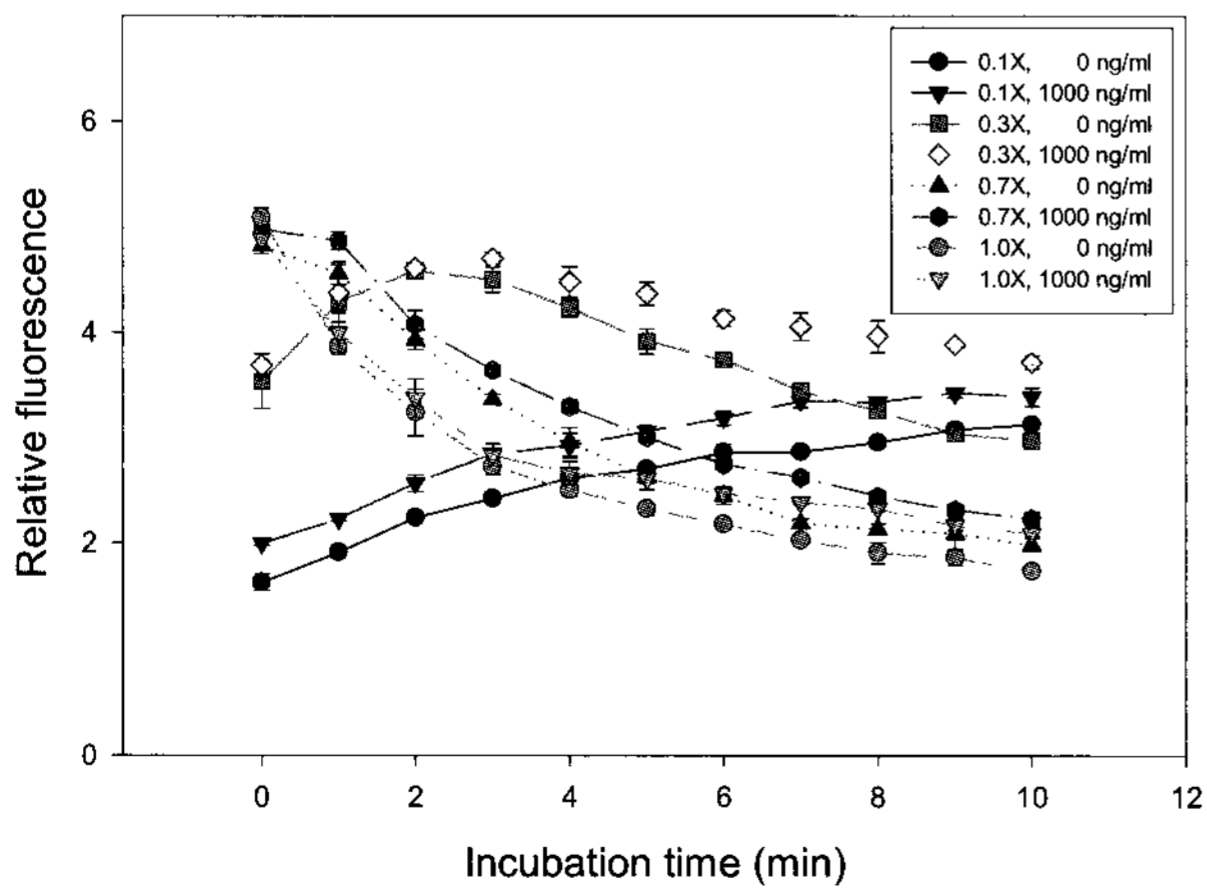


Figure 3. Relative fluorescence of the blank and sample depending on the incubation time at the different fluorescent dye concentrations when solved fluorescent dye in DW.

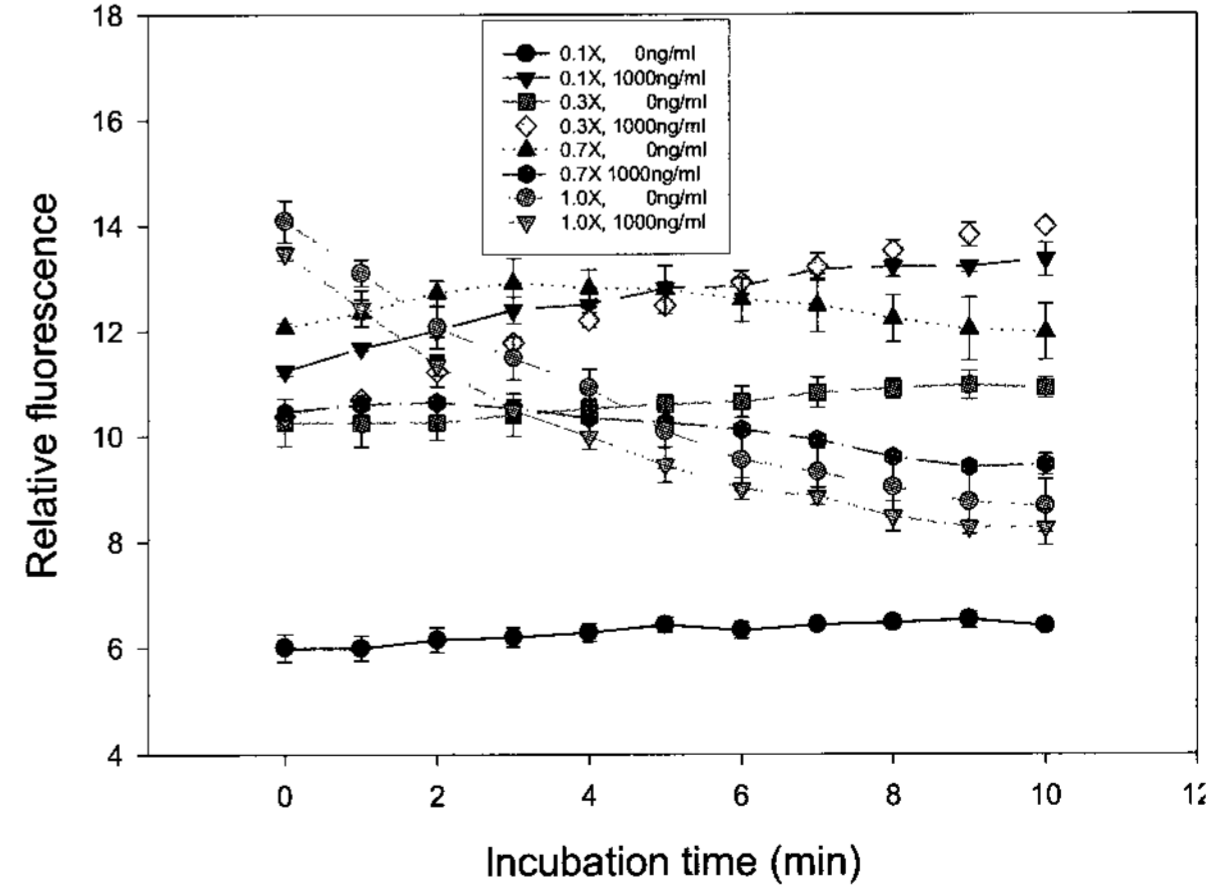
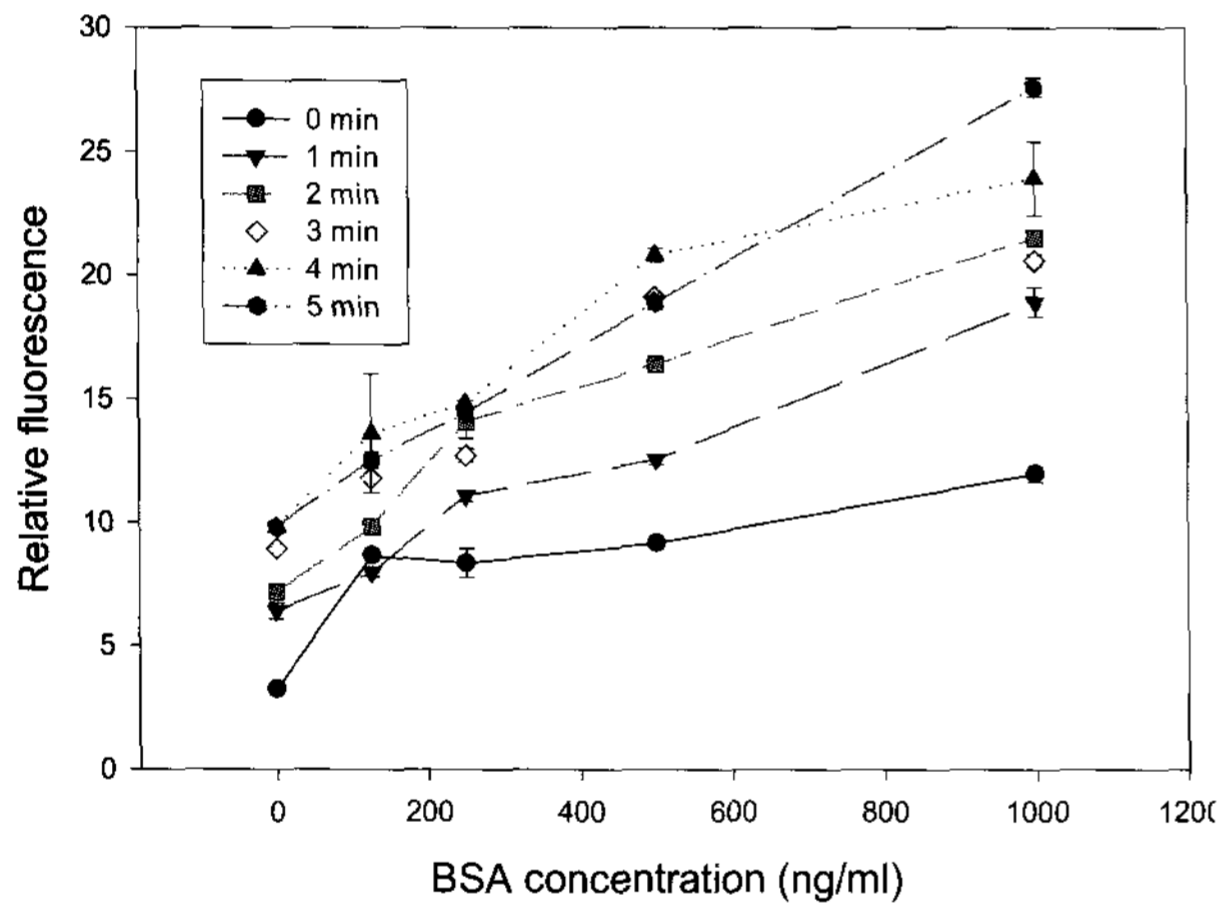


Figure 4. Relative fluorescence of the blank and sample depending on the incubation time at the different fluorescent dye concentrations when solved fluorescent dye in buffer.

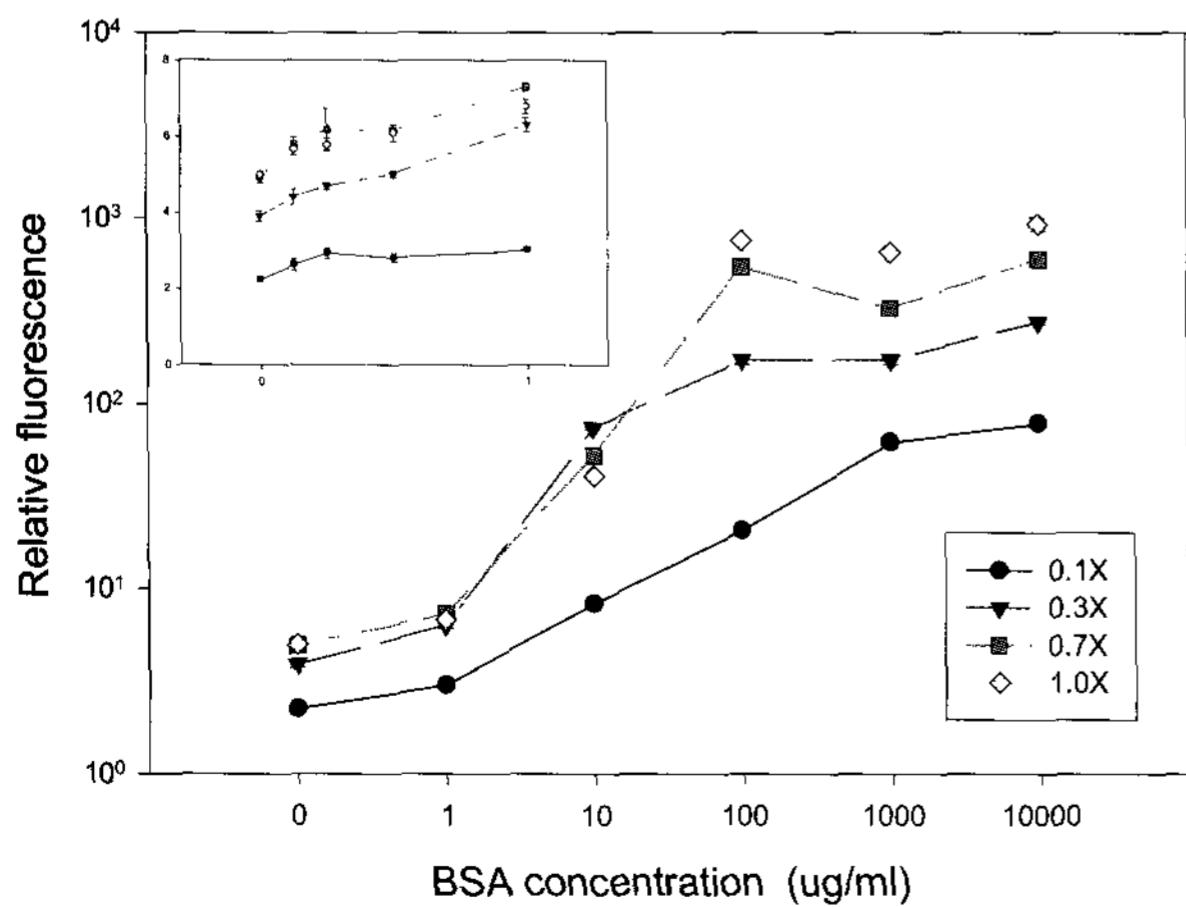
형광값 자체는 크게 나타났지만 경향은 비슷하였다. 따라서 버퍼를 사용하지 않아도 되며 0.7 X 이상의 형광시약 농도에서는 반응시작 후 1분 이내에 측정해야 하고 0.3 X 이하의 형광시약 농도에서는 반응시작 후 2~3분 사이에 측정하는 것이 바람직한 결과를 얻었다.

**가열처리**

형광시약의 농도 0.1 X에서 sonification 후에 단백질 시료를 탐지하는데 가열처리가 미치는 영향을 측정한 결과는 각각 Fig. 5에 나타내었다. 가열처리를 하면 형광 값이 증가하는데 가열처리도 용액 중에 용해된 공기를 제거하는 효과를 나타내 oxygen quenching이 감소되어 형광 값이 증가되는 결과를 나타냈다. 또한 0.1 X의 형광시약의 농도에서는 가열시간이 길수록 blank에 비해서 단백질의 농도에 따른 형광값의 증가폭이 커지는 결과를 나타냈으나, 측정된 형광값이 불안정한 결과를 나타내고 빠른 탐지를 필요로 하기 때문에 가열처리는 큰 의미가 없는 것으로 판단된다.



**Figure 5.** Relative fluorescence of the different BSA concentrations depending on the heating time in boiling water at 0.1 X fluorescent dye concentration after sonicating the sample for 20 sec.



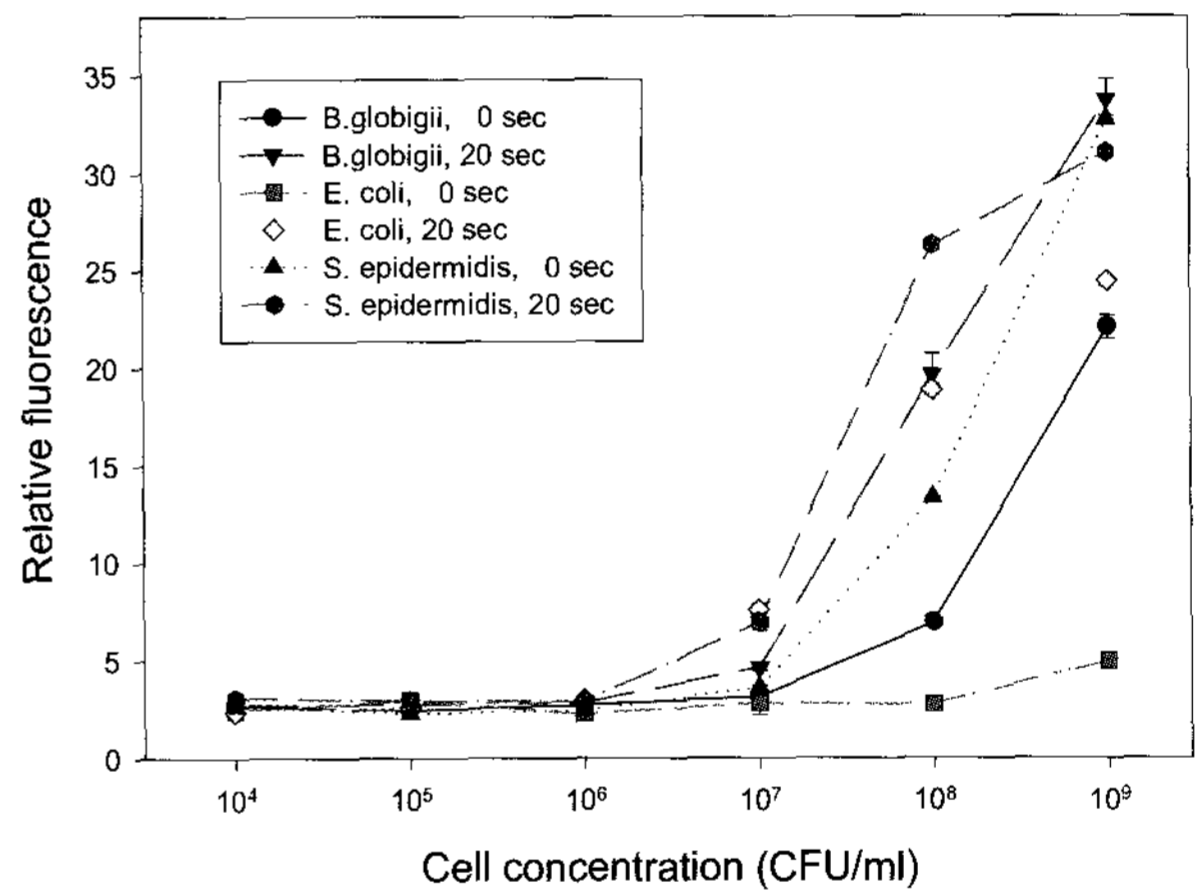
**Figure 7.** Detection profile of BSA according to the fluorescent dye concentration without the sonification.

**형광시약과 미생물의 반응성**

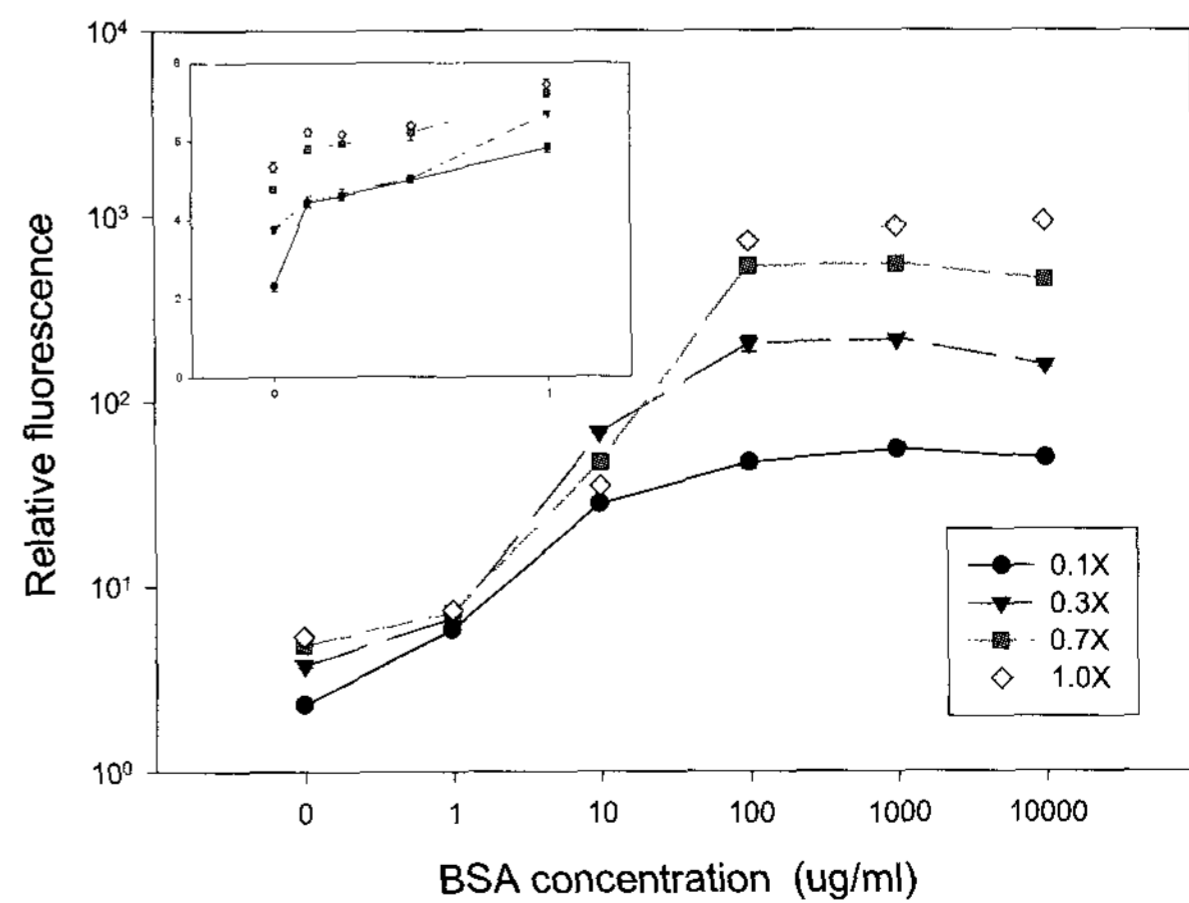
그람 음성균인 *Escherchia coli*, 그람 양성균의 간균인 *Bacillus globigii*와 구균인 *Streptococcus epidermidis*에 대한 형광시약과의 반응성을 측정한 결과는 Fig. 6에 나타내었다. *Escherchia coli*의 경우는 sonification을 시키지 않은 시료는  $10^9$  CFU/ml 농도부터 증가하는데 다른 미생물보다 cell의 표면을 구성하는 단백질 함량이 낮은 것으로 판단되며, sonification을 시킨 시료는 파쇄가 잘 일어나서 cell 내부의 단백질이 유리된 결과로 판단된다. *Bacillus globigii*와 *Streptococcus epidermidis* 경우는 cell의 표면을 구성하는 단백질 함량이 *Escherchia coli*보다 높은 것으로 판단된다. sonification시킨 시료와 sonification시키지 않은 시료의 형광값의 차이를 볼 때 초음파에 의해 세포 파쇄는 이루어지며 형광을 통하여 미생물을 측정될 때 단백질 채널에서도 형광 값이 증가되는 결과를 예측할 수 있다.

**형광시약 농도별 단백질 측정범위 및 탐지한계**

단백질의 측정 가능한 측정 범위를 알아보기 위해서



**Figure 6.** Response of *Escherchia coli*, *Bacillus globigii* and *Streptococcus epidermidis* at the 0.1 X fluorescent dye concentration.



**Figure 8.** Detection profile of BSA depending on the fluorescent dye concentration after sonicating the sample for 20 sec.

sonification을 시키지 않은 시료와 sonification을 시킨 시료를 0.1, 0.3, 0.7, 1.0 X 형광시약을 사용하여 측정된 결과는 Fig. 7, 8에 나타내었다. Sonification을 시키지 않은 시료의 형광 값을 측정된 Fig. 7을 보면 0.7, 1.0 X 형광시약 농도에서, 단백질의 측정 가능한 범위는 1  $\mu\text{g/ml}$ 에서 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 형광량이 비례적으로 증가하는 것으로 나타났다. 또한 100  $\mu\text{g/ml}$  이상의 단백질 농도에서는 형광시약이 부족한 것으로 나타났으며, 0.1 X 형광시약을 사용한 시료는 측정범위가 더 넓고, 0.125  $\mu\text{g/ml}$ 의 BSA를 탐지 가능한 것으로 나타났다.

Fig. 8을 보면 100  $\mu\text{g/ml}$  이상의 BSA 농도에서는 형광시약이 포화되었으며 20초 동안 sonification을 시켜도 시료의 온도가 85°C가 되어 단백질이 변성되는 것이 눈에 보일 정도로 불투명해져서 시료 용액의 불투명도로 인해 형광값이 감소되는 경향을 나타내었다. 또한 1  $\mu\text{g/ml}$  이하의 BSA 시료에서는 sonification을 시키지 않은 시료보다 sonification을 시켰을 때 0.125  $\mu\text{g/ml}$ 의 BSA를 훨씬 더 구분이 잘 되는 것으로 나타나 낮은 단백질 농도에서는 sonification시키는 것이 훨씬 유리한 것으로 나타났다.

## 요 약

본 연구에서는 sonificator를 장착하여 세포막을 파쇄하고 현장에서 형광을 이용하여 조작이 간편하고 단시간에 DNA와 단백질을 동시에 측정할 수 있는 자동화된 형광기를 개발하기 위하여 단백질을 측정하는데 최적의 파쇄조건을 확립하고자 하였다.

용액 중에 녹아 있는 공기 중의 oxygen은 collisional quenching을 일으키는데 sonification이나 가열처리를 시키면 oxygen이 제거되어 quenching 효과가 크게 감소되어 높은 형광값을 나타내었다. 0.7 X 이상의 형광시약 농도에서는 반응시작 후 1분 이내에 측정해야 하며, 0.3 X 이하의 형광시약 농도에서는 반응시작 후 2~3분 사이에 반응을 시킨 후 측정하는 것이 바람직한 것으로 나타났다.

100  $\mu\text{g/ml}$  이상의 BSA 농도에서는 형광시약이 포화되었으며, 시료를 sonification시키면 단백질이 변성되어 눈에 보일 정도로 불투명해져서 시료 용액의 불투명도로 인해 형광값이 감소되는 경향을 나타내었으며, 1  $\mu\text{g/ml}$  이하의 BSA 시료에서는 sonification을 시키지 않은 시료보다 sonification을 시켰을 때 0.125  $\mu\text{g/ml}$ 의 BSA를 훨씬 더 구분이 잘 되어 낮은 단백질 농도에서는 sonification시키는 것이 훨씬 유리한 것으로 나타났다.

## REFERENCES

1. Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, and N. M. Goeke (1985), Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal. Biochem.* **150**, 76-85.
2. Bradford, M. M. (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
3. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall (1951), Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
4. Udenfriend, S., S. Stein, P. Bohlen, W. Dairman, W. Leimgruber, and M. Weigele (1972), Fluorescamine: a reagent for assay of amino acids, peptides, proteins, and primary amines in the picomole range, *Science* **178**, 871-872.
5. You, W. W., R. P. Haugland, D. K. Ryan, and R. P. Haugland (1997), 3-(4-carboxybenzoyl)quinoline-2-carboxaldehyde, a reagent with broad dynamic range for the assay of proteins and lipoprotein in solution, *Anal. Biochem.* **244**, 277-282.
6. Benson, J. R. and P. E. Hare (1975), *o*-phthaldialdehyde: fluorogenic detection of primary amines in the picomole range. Comparison with fluorescamine and ninhydrin, *Proc. Natl. Acad. USA* **72**, 619-622.
7. Daban, J. R., S. Bartolome, and M. Samsó (1991), Use of the hydrophobic probe Nile red for the fluorescent staining of protein bands in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels, *Anal. Biochem.* **199**, 162-168.
8. Daban, J. R., S. Bartolome, and M. Samsó (1991), Use of the hydrophobic probe Nile red for the fluorescent staining of protein bands in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels, *Anal. Biochem.* **199**, 169-174.
9. Steinberg, T. H., L. J. Jones, R. P. Haugland, and V. L. Singer (1996), SYPRO orange and SYPRO red protein gel stains: one-step fluorescent staining of denaturing gels for detection of nanogram levels of protein, *Anal. Biochem.* **239**, 223-237.
10. Steinberg, T. H., R. P. Haugland, and V. L. Singer (1996), Applications of SYPRO orange and SYPRO red protein gel stains, *Anal. Biochem.* **239**, 238-245.
11. Haugland, R. P., V. L. Singer, L. J. Jones, and T. H. Steinberg (1997), Inventors, Molecular Probes; assignee, Non-specific protein staining using merocyanine dyes, US patent 5 616 502, Apr. 1.
12. Jones, L. J., R. P. Haugland, and V. L. Singer (2003), Development and characterization of the NanoOrange protein quantitation assay: A fluorescence-based assay of proteins in solution, *BioTechniques* **34**(4), 850-861.
13. Ha, Y. C., K. B. Choi, and J. D. Choi (2006), The early detection of the gram negative bacteria using sonification and fluorescent dye in the field, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **21**(5), 341-346.
14. Ha, Y. C., K. B. Choi, and J. D. Choi (2006), The early detection of the gram positive bacteria using sonification and fluorescent dye in the field, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **21**(5), 347-352.