

현장에서 초음파 파쇄와 형광시약을 이용한 포자의 조기 탐지

하연철*, 최기봉

The Early Detection of the Spore Using Sonication and Fluorescent Dye in the Field

Yeon-Chul Ha* and Ki-Bong Choi

접수: 2011년 4월 19일 / 게재승인: 2011년 8월 8일
© 2011 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: This study was carried out to establish the optimum condition of cell disruption with a sonicator for the detection of the spore, *Bacillus anthracis* Δ -sterne for the purpose of developing automatic fluorometer. The efficiency of sonication on the Δ -sterne spore disruption was very weak. The Δ -sterne spore with zirconia bead showed greater disruption than the Δ -sterne spore alone when sonicated. The volumn of the zirconia bead added in the spore solution has little effect on the disruption efficiency. The detection limit of the Δ -sterne spore with zirconia bead and the Δ -sterne spore alone was 10^6 CFU/mL and 5×10^7 CFU/mL respectively, when sample was sonicated for 20 seconds with a sonicator probe of 13 mm diameter.

Keywords: sonication, Fluorescent, Spore, Zirconia

1. 서론

생물학무기란 Webster 사전에 따르면 사람·동물·식물에 해를 끼치는 살아있는 미생물이나 미생물 독소를 포함하는 무기라고 정의되어 있으며, 생물학작용제는 사람·동물·식물에서 질병을 일으키거나 물질을 변질시키는 미생물과 미생물 독소를 말한다. 생물학 무기는 일단 살포되면 적절한 환경에서 증식되기 때문에 사실상 화학무기나 핵무기 보다 더 무서

운 살상력과 공포심을 유발시킨다. 생물학 무기는 여러 가지 경로, 즉 호흡기 (에어로졸), 구강 (음식이나 물), 경피적으로 흡수되어 감염을 일으키게 된다. 이중 에어로졸 형태의 호흡기 경로가 가장 위협적인 경로이다. 생물학작용제가 인체에 감염되면, 독성이 바로 나타나는 것이 아니고, 잠복기를 거쳐서 발병되고, 기하급수적으로 전염되기 때문에 조기 경보가 필수적이다. 조기 경보체계를 구축하기 위해서는, 먼저 이상 증후가 발견되면 에어로졸을 수집하고 수집된 시료를 가지고 단시간 내에 현장에서 생물학작용제의 존재 유무를 탐지하는 것이 필요하다. 생물학무기에 대표적인 미생물로서는 탄저 (anthrax)를 일으키는 탄저균 (*Bacillus anthracis*)이라 할 수 있다. 탄저균은 인수공통 전염병을 일으키며, 쉽게 에어로졸화가 가능하고 수십 년 동안 포자 형태로 생명력을 유지할 수 있기 때문에 생물학전이나 테러리스트에게 유용하게 이용될 수 있다 [1-2]. 포자를 파쇄하는 연구는 고주파를 이용한 초음파 파쇄방법 [3-4], bead와 초음파 파쇄의 혼용 방법 [5-6], bead mill homogenization를 이용하는 방법 [7-8] 등 다양하게 연구 되었지만, 현장에서 직접 DNA 탐지를 위한 체계적인 연구는 미약하여, 본 연구에서는 sonicator를 장착하여 세포막을 파쇄하고 현장에서 형광반응을 이용하여 조작성 간편하고 단시간에 포자의 DNA를 측정할 수 있는 자동화 된 형광기를 개발하기 위하여 포자인 *Bacillus anthracis* Δ -sterne를 대상으로 최적의 세포막 파쇄조건을 확립하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 균주 및 재료

실험에 사용한 포자 균주는 *Bacillus anthracis* Δ -sterne이며,

국방과학연구소 5-4
The 5th Institute-4, Agency for Defense Development, Daejeon, 305-600, Korea
Tel: +82-42-821-4686, Fax: +82-42-823-3400
e-mail: hyc0311@naver.com

포자 제조방법은 활성화 시킨 배양액을 집중액으로 사용하여 포자를 수확하였다. 즉, 균주를 순수 배양하여 18시간 후 단일 콜로니를 얻었고, 얻어진 단일 콜로니를 5 mL의 LB배지 (Luria-Bertani; tryptone 10 g/L, yeast extract 5 g/L, sodium chloride 5 g/L)에 접종하고 37°C 200 rpm의 교반배양기에서 18시간 배양하였다. 이를 다시 37°C 200 rpm의 교반배양기에서 4시간 배양한 후, 본 배양을 위한 집중액 500 µL를 2 × SG 배지 (Difco nutrient broth 16.0 g/L, KCl 2.0g/L, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g/L, 1 M Ca (NO₃)₂ 1.0 mL/L, 0.1 M MnCl₂ · 4H₂O 1.0 mL/L, 1 mM FeSO₄ 1.0 mL/L, 50% (w/v) 포도당/L, Agar 15 g/L)에 접종하여 37°C에서 7일 동안 배양한 후 배지 표면에 있던 포자를 수확하고 lysozyme (200 mg/mL)을 첨가하여 37°C 항온수조에서 10분 동안 처리하고 8,000 rpm으로 10분 동안 원심분리하여 침전물을 수확하였다. 배양 후 얻어진 조포자액으로부터 순수한 포자를 얻기 위해 여러 단계의 정제 과정을 실시하였다. 즉, 4배의 멸균증류수로 3회 반복하여 세척한 후 65°C에서 30분동안 열처리하여 잔존하는 영양세포를 제거하였고, 이를 다시 4배의 멸균증류수로 4°C에서 10분동안 2,000 g에서 원심분리를 3회 반복하여 세척된 용액을 순수포자 원액으로 사용하였다 [9]. SybrGreen Green 1 nucleic acid gel stain 형광시약은 Molecular Probes사 (S7563), BSA와 Quant-iT Protein Assay Kit는 Molecular Probes사 (Q33210), zirconia bead는 BioSpec Products사 (11079101z, 0.1 mm)의 제품을 사용하였다.

2.2. 생균수 측정 및 기기분석

미생물의 생균수 측정은 LB agar 배지에 도말하여 37°C에서 16시간 배양한 후 형성된 colony를 계수하였다. 용액중의 미생물 입자 부피는 시료 100 µL를 10 mL의 Diluent에 희석하여 20 mL의 sample cup에 넣고 Beckman사의 Multisizer-3 (Aperture size 30 µm, 300 Size Bins)를 이용하여 측정하였다. DNA의 형광은 OptiPlate Black 96-Well plate (PerkinElmer사, 6005279)에 시료 180 µL와 최종농도가 1X가 되도록 SybrGreen 형광시약 20 µL를 혼합하여 200 µL를 분주하고 1분동안 반응을 시킨 후 PerkinElmer사의 1,420 Multilabel Counter (Ex. 485 nm/Em. 535 nm, CW-Lamp Energy: 1548, counting time: 1 sec)를 이용하여 측정하였다. 단백질의 형광 측정은 Quant-iT 시약을 사용하여 Emission 파장을 595 nm로 설정하고 DNA의 형광 측정방법과 동일하였다. 20 kHz sonicator는 Sonic & Materials사의 130 Watt Ultrasonic Processor (VCX 130)를 사용하였다. sonication에 따른 시료의 형태 변화는 Scanning Electron Microscope (Hitachi S-3000N)를 이용하여 분석하였다.

2.3. 포자농도별 초음파 처리에 대한 형광량

단백질을 측정하는 Quant-iT 시약과 포자와의 반응성을 알아보고, 초음파 처리가 포자에 미치는 파쇄 영향을 알아보기 위하여 0, 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸, 10⁹ CFU/mL의 *Bacillus anthracis* Δ-sterne 포자 2 mL를 15 mL의 disposable centrifuge tube에 주입하여 직경이 13 mm probe를 사용하여 20 kHz에서 20 초 동안 sonication하고, 형광시약 SybrGreen과 Quant-iT

의 농도를 1.0X가 되도록 첨가하여 DNA와 단백질의 형광량을 각각 4회 측정하여 평균하였다.

2.4. Zirconia bead 처리에 대한 형광량

zirconia bead가 포자를 초음파로 파쇄할 때 미치는 파쇄 영향을 살펴보기 위하여 총 파쇄하는 시료 부피가 2 mL가 되게 10⁸ CFU/mL의 Δ-sterne 포자와 zirconia bead의 비율이 1:0, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1이 되도록 하였다. zirconia bead 0 g, 0.4 g, 0.5 g, 0.67 g, 1 g을 10⁸ CFU/mL의 포자 2 mL, 1.6 mL, 1.5 mL, 1.33 mL, 1.0 mL에 각각 혼합하여 15 mL의 disposable centrifuge tube에 주입하고 직경이 13 mm probe를 사용하여 시료 표면에서 10 mm 잠기게 한 후, 각각 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60초 동안 sonication 시키고 형광시약 SybrGreen의 농도를 1.0X가 되도록 첨가하여 DNA의 형광량을 각각 4회 측정하여 평균하였다.

2.5. sonication 처리시간에 따른 형광량

한 실험구에서는 zirconia bead를 첨가하지 않고 10⁸ CFU/mL의 *Bacillus anthracis* Δ-sterne 포자 2 mL를 15 mL의 disposable centrifuge tube에 주입하고, 다른 실험구에서는 포자 1.5 mL를 15 mL의 disposable centrifuge tube에 주입하고 zirconia bead를 0.5 g을 첨가하였다. 직경이 13 mm probe를 사용하여 시료 표면에서 10 mm 잠기게 한 후 각각 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60초 동안 sonication 시켜 형광시약 SybrGreen의 농도를 1.0X가 되도록 첨가하여 DNA의 형광량을 각각 4회 측정하여 평균하였다. 또한 이때 시료 중의 미생물 입자의 부피 변화를 sonication 시간별로 3회 측정하여 평균하였고 시간별로 sonication시킨 시료 100 µL를 3개로 분주하고 각각 colony counting하고 평균하여 생균수를 측정하였으며, 시료 중의 포자 입자가 sonication 시간에 따른 형태의 변화를 SEM 영상으로 관찰하였다.

2.6. 포자 탐지농도

한 실험구에서는 zirconia bead를 첨가하지 않고 0, 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸ CFU/mL의 *Bacillus anthracis* Δ-sterne 포자 2 mL를 15 mL의 disposable centrifuge tube에 주입하고, 다른 실험구에서는 포자 1.5 mL를 15 mL의 disposable centrifuge tube에 주입하고 zirconia bead를 0.5 g을 첨가하였다. 직경이 13 mm probe를 사용하여 시료를 20 kHz에서 20초 동안 sonificating시키고, 형광시약 Sybrgreen의 농도를 1.0X가 되도록 첨가하여 DNA의 형광량을 각각 4회 측정하여 평균하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 포자농도별 초음파 처리에 대한 형광량

단백질 및 DNA와 결합하여 형광을 발생하는 Quant-iT 및 SybrGreen 형광시약을 이용하여 *Bacillus anthracis* Δ-sterne 포자의 농도별로 초음파 처리후 측정된 형광값 측정 결과는 Fig. 1에 나타냈다. 포자에 대한 Quant-iT 시약과의 반응성

은 10^7 CFU/mL 부터 증가되며 20초 동안 sonication 시킨 시료가 약간 낮은 값을 나타내었다. 또한 SybrGreen를 사용한 경우, sonication을 시키지 않은 포자의 형광값이 sonication 시킨 포자의 형광값과 별 차이가 없는 것으로 나타나 포자가 잘 파쇄되지 않는 것으로 판단되었다.

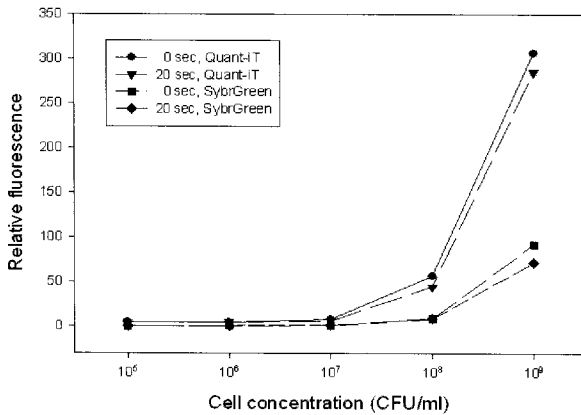


Fig. 1. Relative fluorescence of *Bacillus anthracis* Δ-sterne spore mixed with SYBR Green or Quant-iT reagent after sonificating the spore for 0 sec and 20 sec, respectively. The sonication was operated for 20 second at 20 kHz with a 13 mm probe tip which was placed 10 mm below the sample surface.

3.2. Zirconia bead 처리

Bacillus anthracis Δ-sterne 포자를 초음파로 파쇄할 때 zirconia bead가 포자의 파쇄에 미치는 영향을 SybrGreen를 이용하여 측정 한 형광 값의 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 포자 만을 파쇄한 시료는 sonication 10초 후 증가하다가 감소하는 경향을 보였다. 포자와 zirconia bead의 비율이 1 : 1, 2 : 1, 3 : 1, 4 : 1인 시료는 포자 만을 파쇄한 시료 보다 형광 값이 훨씬 높게 나타나 초음파로 포자를 파쇄 할 때 zirconia bead의 사용은 유용한 방법으로 판단된다. 하지만 포자와 zirconia bead의 비율에 따른 차이는 zirconia bead의 양이 많을수록 높은 경향은 있으나 유의성은 없는 것으로 나타났다.

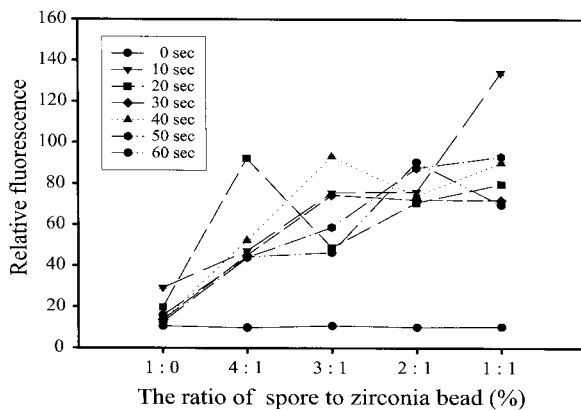


Fig. 2. Relative fluorescence of *Bacillus anthracis* Δ-sterne spore depending on the various ratio of spore and zirconia bead and sonication time. The sonication was operated at 20 kHz with a 13 mm probe tip which was placed 10 mm below the sample surface: Δ-sterne spore, 10^8 CFU/mL.

3.3. sonication 처리시간

Zirconia bead를 첨가하지 않은 *Bacillus anthracis* Δ-sterne 포자 시료와 zirconia bead를 첨가한 포자 시료가 sonication 시간에 따른 포자 파쇄에 미치는 영향을 측정 한 형광 값의 결과는 Fig. 3에 나타내었다. 이때 포자 입자의 부피 변화를 sonication 시간별로 측정 한 결과는 Fig. 4에, 그리고 평균 수의 변화를 측정 한 결과는 Fig. 5에 나타내었으며, zirconia bead를 첨가하지 않은 포자와 zirconia bead를 첨가한 포자의 sonication 시간에 따른 형태 변화를 관찰 한 결과는 Fig. 6,7에 나타내었다.

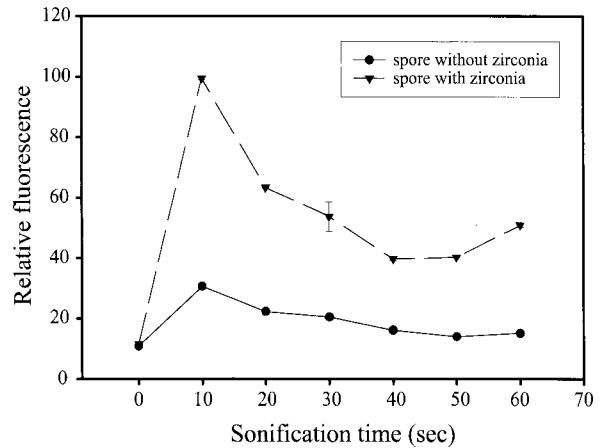


Fig. 3. Relative fluorescence of *Bacillus anthracis* Δ-sterne spore depending on the sonication time in the absence or presence of the zirconia bead. The sonication was operated at 20 kHz with a 13 mm probe tip which was placed 10 mm below the sample surface: Δ-sterne spore, 10^8 CFU/mL.

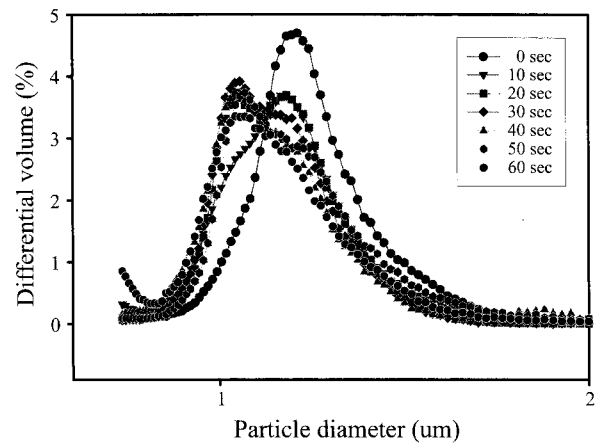


Fig. 4. Differential volume of *Bacillus anthracis* Δ-sterne spore depending on the sonication time without the zirconia bead. The sonication was operated at 20 kHz with a 13 mm probe tip which was placed 10 mm below the sample surface: Δ-sterne spore, 10^8 CFU/mL.

Fig. 3에서, sonication시간이 10초까지는 파쇄가 잘되어 형광량이 증가하나 10초 이후에는 sonication에 의한 마찰열 발생으로 DNA의 변성에 의해 형광량이 감소하는 것으로 판단된다. 또한 포자를 초음파로 처리하는 시간이 길수록 zirconia bead를 첨가한 시험군은 zirconia bead를 첨가하지

않은 시험군 보다 형광 값이 높게 나타나서 zirconia bead 첨가시 포자의 파쇄가 훨씬 잘 일어나는 것으로 판단된다. Zirconia bead 첨가 유무에 따른 포자의 파쇄 효과를 관찰하기 위하여 포자 입자의 부피 변화를 측정하였다. Zirconia bead를 첨가하지 않은 시험군의 측정 결과를 Fig. 4에, zirconia bead를 첨가한 시험군의 측정 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 두 시험군 모두 원래 포자 크기에서 입자의 부피가 감소 되었으나 zirconia bead를 첨가하지 않은 시험군에서 작은 크기의 입자가 증가가 훨씬 뚜렷하여 전체적으로 zirconia bead를 첨가한 시험군이 훨씬 파쇄가 잘 일어나는 것으로 나타났다. 생존수의 변화를 측정한 Fig. 6의 결과도 zirconia bead를 첨가한 시험군이 훨씬 생존수의 감소율이 크게 나타났다.

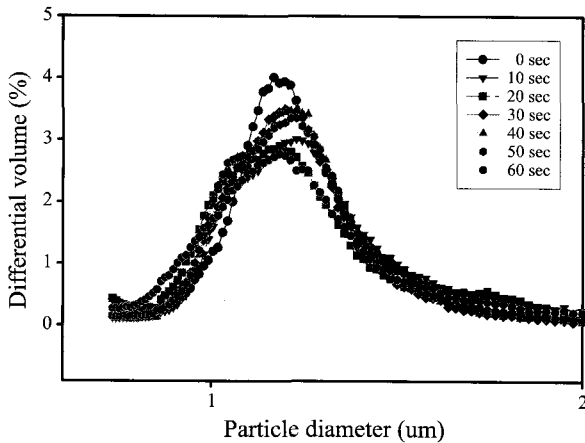


Fig. 5. Differential volume of *Bacillus anthracis* Δ-sterne spore depending on the sonication time with 0.5 g of the zirconia bead. The sonication was operated at 20 kHz with a 13 mm probe tip which was placed 10 mm below the sample surface : Δ-sterne spore, 10⁸ CFU/mL.

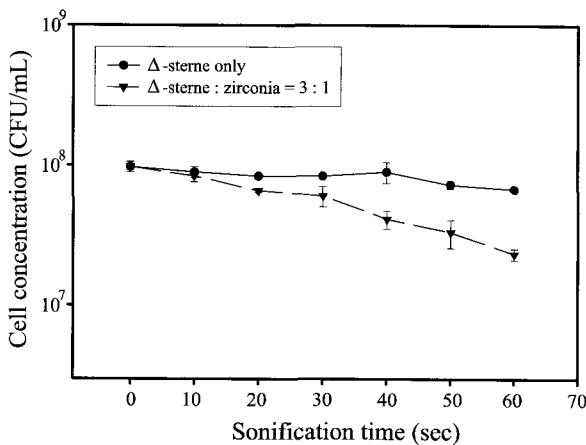


Fig. 6. Live cell number of *Bacillus anthracis* Δ-sterne spore depending on the sonication time with 0 g and 0.5 g of the zirconia bead. The sonication was operated at 20 kHz with a 13 mm probe tip which was placed 10 mm below the sample surface: Δ-sterne spore, 10⁸ CFU/mL.

Zirconia bead를 첨가하지 않은 시험군과 zirconia bead를 첨가한 시험군이 sonication 시간에 따른 포자의 표면 변화를

관찰한 결과를 Fig. 7,8에 나타내었다. zirconia bead를 첨가하지 않은 시험군은 sonication 시간에 따라 포자의 표면 변화가 약간 발생되어 일부 leaking이 발생한 것으로 나타났으며, sonication으로 포자를 파쇄하는데 zirconia bead가 큰 상승 작용을 하는 것으로 나타났다.

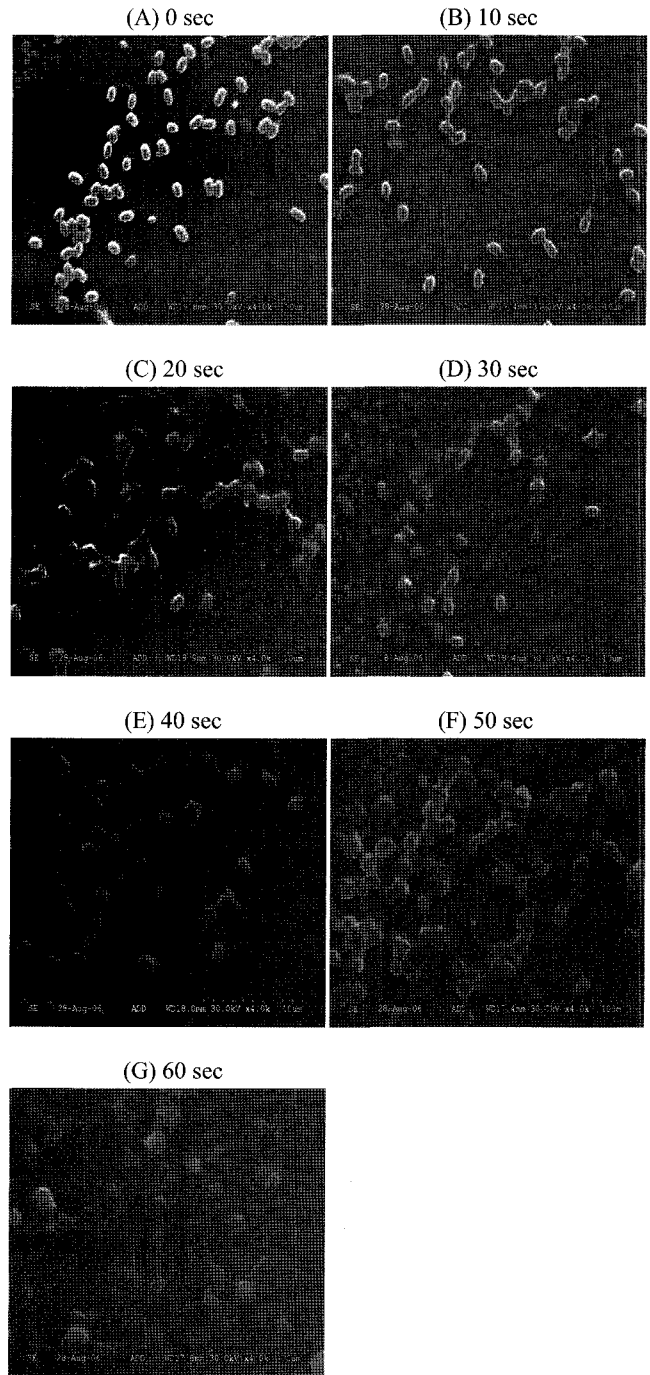


Fig. 7. Scanning electron microscope images of *Bacillus anthracis* Δ-sterne spore according to the sonication time without the zirconia bead.

3.4. 포자 탐지농도

Bacillus anthracis Δ-sterne 포자에 zirconia bead를 첨가한

시험군과 zirconia bead를 첨가하지 않은 시험군을 sonication 한 후 형광에 의한 포자의 최소탐지능을 측정한 결과는 Fig. 9에 나타내었다. Zirconia bead를 첨가한 시험군에서는 10^6 CFU/mL 농도의 포자를 탐지 가능한 것으로 나타났으며, zirconia bead를 첨가하지 않은 시험군에서는 5×10^7 CFU/mL의 농도에서 탐지 가능한 것으로 나타나 sonication으로 포자를 파쇄할 때 zirconia bead는 중요한 역할을 하는 것으로 나타났다.

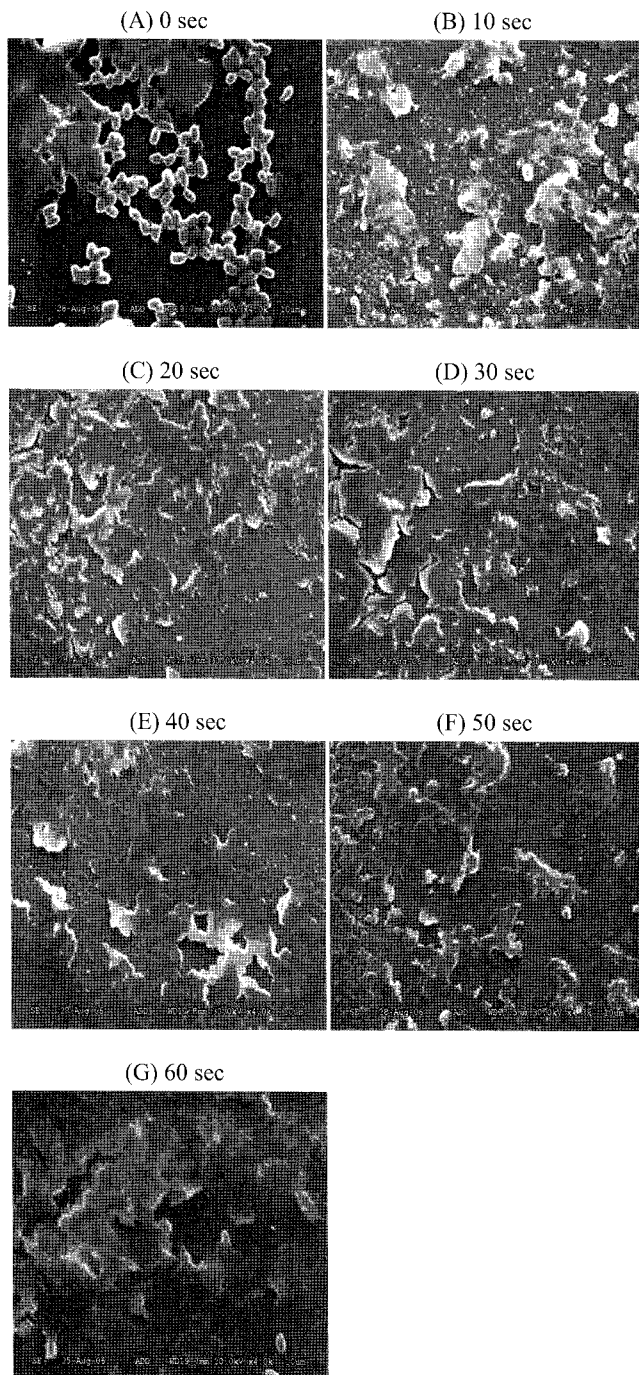


Fig. 8. Scanning electron microscope images of *Bacillus anthracis* Δ -sterne spore according to the sonication time with 0.5 g of the zirconia.

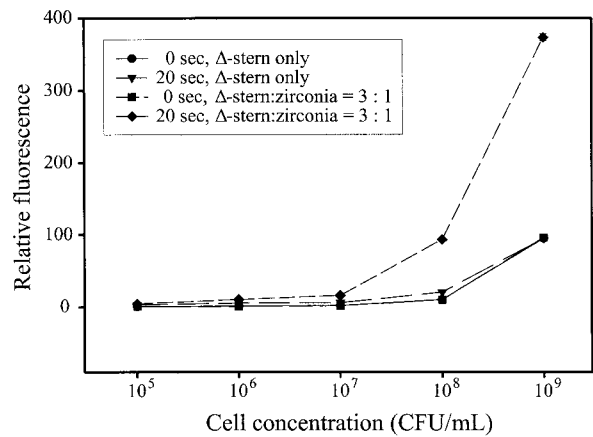


Fig. 9. Detection profile of *Bacillus anthracis* Δ -sterne spore after the sonication with 0 g and 0.5 g of the zirconia bead.

4. 결론

본 연구에서는 sonicator를 장착하여 세포막을 파쇄하고 현장에서 형광을 이용하여 조작이 간편하고 단시간에 DNA를 측정할 수 있는 자동화 된 형광기를 개발하기 위하여 포자인 *Bacillus anthracis* Δ -sterne을 대상으로 최적의 세포 파쇄조건을 확립하고자 하였다.

Zirconia bead를 첨가하여 초음파 파쇄를 시킨 포자 시험군은 zirconia bead를 첨가하지 않고 초음파 파쇄를 시킨 포자 시험군 보다 형광값이 높게 나타나서 zirconia bead의 첨가가 포자의 파쇄에 중요한 역할을 하는 것으로 판단되었다. 이러한 사실은 초음파 파쇄 전후의 포자 입자의 부피 변화와 생존수 변화를 통해서도 확인되었다. 하지만 포자와 zirconia bead의 비율에 따른 차이는 zirconia bead의 양이 많을수록 높은 경향은 있으나 유의성은 없는 것으로 나타났다. Zirconia bead를 첨가한 시험군에서는 10^6 CFU/mL 농도의 포자를 탐지 가능한 것으로 나타났으며, zirconia bead를 첨가하지 않은 시험군에서는 5×10^7 CFU/mL의 농도의 포자를 탐지 가능하였다. 따라서 Zirconia bead와 포자를 1:3 비율로 혼합한 후 20초 동안 sonication하는 것이 포자의 최적 파쇄조건으로 나타났다.

References

1. Reisa, J. (1999) *Chemical and Biological Terrorism*. National Academy Press, Washington, D. C. USA.
2. Turnbull, P. C., R. Bohm, O. Cosivi, M. Doganay, M. E. Hugh-Jones, D. D. Joshi, and M. K. Lalitha (1998) Guidelines for the Surveillance and Control of Anthrax in Human and Animals, *WHO/EMC/ZDI 3rd ed.* pp. 12-18. Switzerland.
3. Chandler, D. P., J. Brown, C. J., Bruckner-Lea, L. Olson, G. J. Posakony, J. R. Stults, N. B. Valentine, and L. J. Bond (2001) Continuous spore disruption using radially focused, high-frequency ultrasound. *Anal. Chem.* 73: 3784-3789.
4. Marentis, T. C., B. Kusler, G. G. Yaralioglu, S. Liu, E. O. Hæggröm, and B. T. Khuri-Yakub (2005) Microfluidic sonicator

- for real-time disruption of eukaryotic cells and bacterial spores for DNA analysis. *Ultrasound in Med. & Biol.* 31: 1265-1277.
5. Belgrader, P., D. Hansford, G. T. A. Kovacs, K. Venkateswaran, R. Mariella, Jr. F. Milanovich, S. Nasarabadi, M. Okuzumi, F. Pourahmadi, and M. A. Northrup (1999) A minisonicator to rapidly disrupt bacterial spores for DNA analysis. *Anal. Chem.* 71: 4232-4236.
 6. Taylor, M. T., P. Belgrader, B. J. Furman, F. Pourahmadi, G. T. A. Kovacs, and M. A. Northrup (2001) Lysing bacterial spores by sonification through a flexible interface in a microfluidic system. *Anal. Chem.* 73: 492-496.
 7. Kuske, C. R., K. L. Banton, D. L. Adorada, P. C. Stark, K. K. Hill, and P. J. Jackson (1998) Small-scale DNA sample preparation method for field PCR detection of microbial cells and spores in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2463-2472.
 8. Moré, M. I., J. B. Herrick, M. C. Silva, W. C. Ghiorse, and E. L. Madsen (1994) Quantitative cell lysis of indigenous microorganisms and rapid extraction of microbial DNA from sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1572-1580.
 9. Leighton, T. J. and R. H. Doi (1971) The stability of messenger ribonucleic acid during sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 246: 3189-3195.