

금 나노 입자를 이용한  
결핵균 검사법에 관한 연구

연세대학교 보건환경대학원  
의생명과학전공

강 민 호

금 나노 입자를 이용한  
결핵균 검사법에 관한 연구

지도 이 혜 영 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2011 년 12 월 일

연세대학교 보건환경대학원  
의생명과학전공

강 민 호

# 강민호의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

연세대학교 보건환경대학원

2011년 12 월 일

# 차 례

그림 차례	iii
표 차례	v
약기호표	vi
국문요약	vii
제 1 장 서론	1
제 2 장 재료 및 방법	9
1. 금 나노 입자 합성	9
2. 금 나노 입자의 흡광도 측정	12
3. 균주 및 배양	13
4. 핵산 추출	14
5. Nucleic Acid Sequence Based Amplification	16
6. 금 나노 입자와 결핵균군 특이 프로브의 결합	19
7. 금 나노 입자와 결합된 결핵균군 특이 프로브와 16S rRNA의 혼성화	21
제 3 장 결과	22
1. 금 나노 입자 합성 방법에 따른 최대 흡광도의 차이	22

2. 투과 전자현미경을 이용한 금 나노 입자의 크기 및 균 질도 측정 .....	24
3. 구연산 나트륨의 농도가 금 나노 입자의 크기에 미치는 영향.....	29
4. 금 나노 입자에 결합한 결핵균균 특이 프로브의 특이도----	31
5. 금 나노 입자에 결합한 결핵균균 특이 프로브의 민감도----	34
 제 4 장 고찰.....	 38
 참고문헌 .....	 41
영문요약 .....	48

# 그림 차례

Figure 1. The gold nanoparticle aggregation induced by probe-DNA hybridization -----	6
Figure 2. Absorbanc spectra of gold-nanoparticle solutions produced by designed in this study-----	23
Figure 3. Tramission electron microscopic images of gold nanoparticles produced by different experimental methods -----	26
Figure 4. Absorbanc spectra of gold-nanoparticle solutions produced with different concentrations of citrates varying from 38.8 mM to 42.8 mM-----	30
Figure 5. Absorbance changes of gold nanoparticles with MTC specific probe molecules after hybridization with 16S rRNA NASBA amplicons -----	33
Figure 6. Absorbance changes of gold nanoparticles attached to MTC specific probe moleucules after hybridization with supernatants of cell lysates obtaine by bead-beating of varying amount of <i>M. bovis</i> BCG cells -----	35
Figure 7. <i>M. bovis</i> BCG cell lysate when binding with the	

sensitivity of Gold-nanoparticle addition  $\text{MgCl}_2$  -----37

## 표 차례

Table 1. Chemical compositions used to produce gold-nanoparticles-----	11
Table 2. Primers for amplification of 16S rRNA using NASBA and probe linked to the gold nanoparticle for detection of <i>M. tuberculosis</i> -----	18
Table 3. Particle diameters and relative standard deviation (%)-----	28



## 약 기 호 표

BCG	:	bacille de Calmette-Guerin vaccine
CFU	:	colony forming unit
MTC	:	Mycobacterium tuberculosis complex
DTT	:	dithiothretol
EDS	:	energy dispersive spectroscopy
HIV	:	human immunodeficiency virus
NASBA	:	nucleic acid sequence-based amplification
PCR	:	polymerase chain reaction
SDS	:	sodium dodecyl sulfat
TEM	:	transmission electron microscopy

## 국 문 요 약

# 금 나노 입자를 이용한 결핵균 검사법에 관한 연구

결핵 검사를 위해 사용되는 표준 검사법은 오랜 시간이 소요되고 민감도와 특이도에 한계가 있어 최근 새로운 검사법들이 연구, 개발되고 있다. 본 연구에서는 금 나노 입자를 이용한 결핵균 검사법 개발을 위한 금 나노 입자 합성의 최적화된 방법을 연구하였다. 결핵 검사를 위한 금 나노 입자를 합성하고 입자의 크기와 균일도 및 흡광도를 비교한 결과, 15 nm의 금 나노 입자를 합성할 때 금 나노 입자의 크기가 균질하였다. 한편, 금 나노 입자와 결핵균 특이 프로브의 결합은 pH 7.0의 washing buffer와 pH 8.3의 re-suspend buffer를 사용하였을 때 결핵균 특이 프로브와 표적물질인 *Mycobacterium bovis* BCG 16S rRNA와의 결합이 최적화되는 것으로 나타났다. 또한, 0.2 M의 MgCl<sub>2</sub>를 사용했을 때 240 분이 소요되던 응집반

응이 40분으로 단축되어 신속한 진단에 유용한 조건을 확립하였다. *M. bovis* BCG 균을 파쇄하여 얻은 상층액에 존재하는 16S rRNA를 표적물질로 사용하여 결핵균 특이 프로브가 부착된 금 나노 입자의 *M. bovis* BCG 균 검출 민감도를 확인한 결과  $10^5$  CFU/ml였으며 *M. smegmatis* 와 *Escherichia coli*를 이용하여 특이도를 확인하였다. 본 연구의 결과는 향후 금 나노 입자를 이용한 다양한 진단법 개발에 도움이 될 것으로 사료된다.

---

핵심 되는 말 : 금 나노 입자, 결핵검사, 분자진단

## 제 1 장 서론

결핵(tuberculosis)은 인형 결핵균(*mycobacterium tuberculosis*)이 폐 등 주로 호흡기를 감염하는 전염성 질환이다. 현재 세계 인구의 1/3 정도가 결핵균에 감염되어 있을 것으로 추정하며, 2010년 한해에만 940만명의 새로운 결핵 환자가 발생하고 170만명이 결핵으로 사망하고 있다 <sup>1,2,3</sup>.

특히 아프리카와 아시아의 저개발 국가가 높은 결핵 유병률을 나타내고 <sup>4,5</sup> 국내에서도 2007년 결핵 신환자 발병률이 인구 10만명당 71.6명이었고, 노령층과 20대 신환자 발병률이 높은 편이다 <sup>6</sup>. 최근 인간면역결핍 바이러스(human immunodeficiency virus, HIV)의 창궐과 함께 다제/광역내성결핵(multi/ extensively drug resistant tuberculosis, MDR/ XDR-TB)의 출현으로 결핵의 위험이 급격히 증가하고 있다 <sup>4,5</sup>.

이러한 결핵에 대하여 세계보건기구는 이미 1993년 ‘세계 결핵 비상(Global Tuberculosis Emergency)’을 선포하여 결핵이 인류 건강을 심각히 위협하고 있음을 알려 왔으나 상황은 나아지지 않고 있다.

이에 2000년 세계보건기구는 유엔과 함께 ‘2015 새천년 발전 목표 (Millennium Development Goals)’를 정하고 전 세계의 결핵 발병률과 사망률을 낮추기 위하여 국제적인 대응을 진행하고 있다<sup>2</sup>. 이를 위해 결핵의 치료와 관리의 향상 및 정확하고 신속한 결핵 진단법 개발을 위한 노력이 활발한 실정이다<sup>7</sup>.

결핵 진단의 표준 검사법인 항산균 도말 검사는 검사 방법이 간단하고 경제적인 장점 때문에 세계적으로 널리 사용되고 있다. 배양검사에 비해 민감도가 낮으며 결핵균 이외의 항산균을 구분할 수 없다는 단점이 있음에도 아직 이를 대체할 만한 검사가 없다<sup>8,9,10,11</sup>. 이에 비해 Ogawa 배지 등의 고체배지를 이용한 전통적인 배양 검사는 원인균을 검사하는 가장 정확한 방법이다. 하지만 결핵균은 증식시간이 길고, 세포벽의 지질 함량이 높아서 강한 소수성을 보이기 때문에 균들끼리 엉겨 붙어서 배지로부터 영양 공급을 충분히 받지 못하여 배양에 오랜 시간(4 ~ 8주)이 소요되고 오염의 가능성이 높으며 비용이 많이 든다<sup>12,13</sup>.

이러한 문제점을 보완하기 위해 최근 MGIT(Mycobacteria Growth Indicator Tube 960 system, Becton Dickinson, Sparks, MD, U.S.A.) 등의

액체배지를 이용한 자동화 검사법이 개발되어 1 ~ 2주 내에 배양결과를 확인할 수 있다. 이에 미국질병관리본부와 세계보건기구는 액체배지를 이용한 결핵균 배양을 권고하고 있다<sup>13, 14</sup>. 그러나 액체배지를 이용한 결핵균 배양은 고체 배지를 이용한 배양보다 오염률이 높다. 이와 같은 이유로 많은 병원들이 액체배지와 고체배지를 병용하여 사용하고 있다. 따라서 짧은 시간 내에 적은 비용으로 결핵균을 검출할 수 있는 새로운 검사 방법의 필요성이 증가하고 있다.

이에 보다 신속하고 정확한 검사를 위해 새로운 방법인 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR), 실시간-중합효소연쇄반응(real-time PCR) 등으로 결핵균의 DNA를 확인하는 핵산증폭 검사가 개발되고 있다<sup>15, 16, 17</sup>. 핵산 증폭검사는 검출 민감도가 매우 뛰어나다는 장점이 있지만 검사실에서 신속, 정확하고 간단하게 검출하는데 목표가 있다는 것을 감안할 때 핵산증폭 검사는 숙련된 인력과 비용 및 자동화 장비가 필요하므로 임상검사실에서 이용하는데 많은 제한이 있다. 따라서 기존에 개발된 핵산증폭 검사의 민감도를 확보하면서도 단점을 극복할 수 있는 다양한 새로운 진단법의 개발

이 필요한 실정이다.

최근 전기적, 자기적 그리고 광학적 특성을 갖는 금 나노 입자에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다<sup>18, 19, 20</sup>. 나노 입자란  $1.0 \times 10^9$  m의 아주 작은 크기를 가지는 극 미세 입자를 말한다. 나노 입자는 기존 물질에 비해 현저히 증가된 표면적을 가진다. 이러한 높은 표면적 때문에 기존 물질과는 다른 표면효과를 가지게 된다. 금 나노 입자의 표면에서 가시광선 영역대에 강한 흡수 현상인 플라즈몬(Plasmon) 밴드 경향이 일어난다. 금 나노 입자의 표면에 존재하는 전도대의 6s 전자와 입사되는 전자기장과의 작용에 의하여 플라즈몬 밴드가 생기게 되며, 530 nm 파장 근처에서 강한 흡수를 보인다<sup>21</sup>. 플라즈몬 흡수 특성과 주위 환경의 변화에 민감하게 반응하는 점을 이용하여 금 나노 입자는 단백질-단백질 상호 작용과 단백질-리간드, 항원-항체 상호 작용 및 DNA 배열 해독에 이용된다<sup>22</sup>.

금 나노 입자는 용액 중에 분산되었을 때 입자의 사이즈에 따라서 서로 다른 흡수 스펙트럼을 갖는다<sup>23</sup>. 예를 들면 약 13 nm의 지름을 지니는 금 나노 입자가 수용액 상태에서 잘 분산되었을 때

는 약 530 nm의 최대흡수파장을 가지며 용액은 붉은색을 띄게 된다. 그러나 입자가 모여서 집합체(aggregation)가 형성이 되었을 때는 최대 흡수 파장이 장파장으로 이동하게 되고 용액의 색은 보라색으로 변한다<sup>24</sup>.

이러한 원리를 사용하여 금 나노 입자를 이용한 활발한 연구가 이루어지고 있으며 금 나노 입자 표면에 염기배열의 순서를 알고 있는 단일가닥 DNA를 붙이고 이 DNA와 상보적인 염기순서를 지니는 DNA와 반응시켰다<sup>25</sup>. 그 결과 금 나노 입자 표면의 DNA가 상보적인 DNA 가닥을 인식하여 이중나선구조를 이루며 금 나노 입자들의 집합체를 형성하였다(Figure 1). 따라서 용액의 색은 표적 DNA가 없을 때는 붉은색을 나타내다가 표적 DNA가 있을 때에는 보라색을 띄었다<sup>26</sup>.



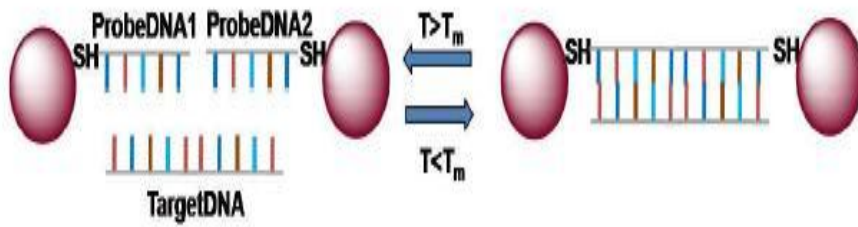


Figure 1. The gold nanoparticle aggregation induced by probe-DNA hybridization <sup>25</sup>

이와 같은 특성을 이용하여 최근 들어 금 나노 입자를 이용한 검사법들이 연구되고 있다<sup>27, 28</sup>. 그러나 현재까지 연구된 금 나노 입자를 이용한 분자진단법은 금 나노 입자표면에 항체를 고정하여 표적분자를 선택적으로 검출하는 항체 분석법들이며, 그 검출한계가  $10^5 \sim 10^6$  cells/ml 정도여서 실제 임상에 적용하는데 많은 어려움이 있었다<sup>29</sup>.

하지만 금 나노 입자는 기존의 분자진단에 사용되는 여타 소재에 비해 가격이 저렴하고, 별다른 고가의 장비 없이 색의 변화로 반응이 일어났는지를 확인할 수 있다는 점에서 향후 분자진단에 이용하기 위한 목적으로 연구하기에 충분한 가치를 지닌다고 할 수 있겠다.

항원-항체 반응을 이용한 분자진단 보다 민감도를 향상할 수 있는 방법은 프로브-표적 검출을 이용하는 것이다. 16S rRNA는 세포 내에 1 분자 존재하는 유전체 DNA와 비교할 때 상대적으로 많은 분자수가 존재( $10^3 \sim 10^4$  개)할 뿐 아니라 messenger RNA (mRNA)보다 안정하며 전체 RNA의 약 80%를 차지하여 병원성 세균의 진단에 유용하게 사용되고 있다<sup>30</sup>.

이에 본 연구에서는 향후 금 나노 입자를 이용한 결핵균 검사  
법 개발을 목적으로 결핵균 특이 프로브가 결합된 금 나노 입자를  
생성하고 그 민감도와 특이도를 확인하였다.

## 제 2 장 재료 및 방법

### 1. 금 나노 입자 합성

금 나노 입자의 크기와 모양을 균일하게 합성하는 방법에는 방사선 분해, hydrogen reduction, citrate reduction 등의 방법이 있으며<sup>31</sup>, 본 연구에서는 citrate reduction법을 이용하여 합성하였다<sup>32</sup>. Citrate reduction의 방법은 합성과정이 간단하면서도 다른 방법에 비해 화학반응의 위험성이 적다. 금 염화 수소산(Hydrogen tetra chloroaurate (III), H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub>)과 구연산 나트륨(Sodium citrate tribasic dehydrate)을 이용하여 원하는 크기의 금 나노 입자를 합성하였다. 연구에 사용되어진 시약은 Sigma-aldrich (St. Louis, U.S.A.)로부터 구입하여 사용하였다.

금 나노 입자 합성은 기존에 보고된 논문을 참고하여, Hill과 Mirkin<sup>32</sup>의 방법을 A라 정하고 Natan<sup>33</sup> 방법을 B, A와 B 방법과 시약의 농도를 달리한 방법을 C라 정하였다. A, B, C 각 방법에 사용된 화학물의 조성을 Table 1에 나타내었다. 금 나노 입자 합성에 사

용된 방법은 500 ml의 Nano pure water에 금 염화 수소산(III)을 넣고 교반하면서 끓여주다가 용액이 끓을 때 구연산나트륨을 첨가하여 15 분간 교반시킨 후 25℃에서 3 ~ 4시간 동안 놓아두었다. 교반시키는 15 분 동안 용액의 색깔은 노란색에서 투명, 검정색, 짙은 보라색으로 변하였다.

Table 1. Chemical compositions used to produce gold- nanoparticles

Method	Hydrogen tetra chloroaurate (III) (g/1000 ml)	Sodium citrate tribasic dehydrate (g/100 ml)	Reaction Time (min)
A	1.00 mM (0.3398 g)	38.8 mM (1.1408 g)	15
B	1.15 mM (0.3938 g)	38.8 mM (1.1408 g)	
C	1.15 mM (0.3938 g)	45.0 mM (1.3408 g)	

## 2. 금 나노 입자의 흡광도 측정

합성된 금 나노 입자는 환원되면서 흡수하는 빛의 파장영역이 변화하므로 나노 입자의 합성을 확인하기 위하여 분광광도계 (Spectrophotometer, OPTIZEN 3220UV, MECASYS, Daejeon, Korea)로 흡광도를 측정하였다. 합성한 금 나노 입자의 크기와 균질도를 확인하기 위하여 강원대학교 공동실험실습관에 의뢰하여 투과전자현미경 (Transmission electron microscopy, TEM, JEM-2010, JEOL, Japan)으로 관찰하였다.

### 3. 균주 및 배양

결핵균인 *Mycobacterium tuberculosis* 배양은 고위험균이므로 결핵균과 같은 complex에 속하는 결핵균군 (*M. tuberculosis* complex)인 *M. bovis* BCG(Pasteur 1173P2)를 실험에 사용하였다. 또한, 결핵균군 프로브의 특이도를 확인하기 위해 *M. smegmatis* (ATCC 25855)와 *Escherichia coli* (ATCC 25922)를 사용하였다. *M. bovis* BCG와 *M. smegmatis*는 Middlebrook7H9 액체배지에서 진탕 배양하여 사용하였으며, *Escherichia coli*는 brain heart infusion (BHI) 액체배지에서 진탕 배양하여 사용하였다.



#### 4. 핵산 추출

배양된 균주는 McFarland Standard (BioMèrieux, Durham, NC, U.S.A.) 탁도계를 이용하여 균액의 농도를 확인하였다. 균수를 확인하기 위해 3 mm glass bead (Sigma-aldrich, St. Louis, Mo, U.S.A.)와 균덩어리가 들어있는 50 ml conical tube를 2 분동안 섞어 균덩어리를 풀어주고, 멸균한 증류수 10 ml를 넣어 30초 더 섞어준 후 상층액만을 떠서 멸균한 1 회용 튜브에 조금씩 넣으면서 McFarland Standard 탁도계를 이용하여 균액의 농도를 확인하였다. 정확한 균수 확인을 위해 희석액 20  $\mu$ l을 Middlebrook 7H11 고체배지에 접종하고, 37°C 2주간 배양 후 집락을 확인하였다.

균수 (colony forming unit, CFU)가 확인된 균액을 생리 식염수 (0.85% sodium chloride, NaCl)로 10 배로 단계별 희석 ( $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^2$  CFU/ml)하여 핵산 추출에 사용하였다<sup>34, 35, 36, 37</sup>.

핵산 추출을 위해 희석한 균주를 7,500  $\times$  g에서 20 분 간 원심분리한 후 1.5 ml microcentrifuge tube에 옮긴 후 다시 12,000  $\times$  g에서 10 분 간 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 침전된 균주에 2 mm

glass bead를 넣고 Precellys 24 bead-beater (Bertin Technologies, bis Avenue Ampère, Montigny-le-Bretonneux, France)를 이용하여 에서 60 초 간 2회 bead-beating하고 4°C, 12,000 × g에서 10 분간 원심분리하였다. 이어 상층액층을 새로운 1.5 ml microcentrifuge tube에 옮겨 사용하였다.

## 5. Nucleic Acid Sequence Based Amplification

추출한 핵산 중 RNA를 주형으로 하여 Nucleic Acid Sequence Based Amplification (NASBA)를 이용한 RNA 증폭을 시행하였다. 결핵균의 16S rRNA 유전자 특이 T7 RNA polymerase promotor 염기서열이 포함된 forward primer와 reverse primer를 사용하였으며 NASBA premix는 NucliSens EasyQ Basic kit V2 (bioMérieux, Chemin de l'Orme, Marcy-l'Etoile, France)를 사용하였다(Table 2). 증폭반응을 위한 PCR thermal cycler는 GeneAmp PCR System 2700(Applied Biosystems, Foster city, CA, U.S.A.)를 사용하였다.

시약 및 주형 RNA의 조성으로 reagent solution 64  $\mu\text{l}$ , 80 mM KCl working solution 24  $\mu\text{l}$ , primer mixture 8  $\mu\text{l}$ 를 섞어 master mixture를 만든 후, master mixture 5  $\mu\text{l}$ 와 희석( $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^2$  CFU/ml)한 주형 RNA 5  $\mu\text{l}$ 를 이용하여 총 10  $\mu\text{l}$ 의 반응용액을 사용하였다. 반응조건은 RNA 2차 구조를 풀어주기 위하여 65°C에서 5 분 반응하고, AMV reverse transcriptase, RNase H, T7 RNA polymerase가 포함된 enzyme solution 2.5  $\mu\text{l}$ 를 첨가하여 총 12.5  $\mu\text{l}$ 의 반응용액을 41°C에

서 2 시간 30 분간 반응하였다.

Table 2. Primers for amplification of 16S rRNA using NASBA and probe linked to the gold nanoparticle for detection of *M. tuberculosis*

Primers and the probe	Oligonucleotides (5' → 3')
F	[T7*]-[Extra**]-CTT CGG GAT AAG CCT GGG AAA
R	CAC CCC ACC AAC AAG CTG ATA
MTC***-probe	5-thiol-AAA AAA AAA A GGT GGA AAG CGC TTT AGC GGT-3'

\*T7 : T7 RNA polymerase promotor sequence, [AAT TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG G]

\*\*Extra : Extra purine residues, [AGA AGG]

\*\*\*MTC : *Mycobacterium tuberculosis* complex

## 6. 금 나노 입자와 결핵균 특이 프로브의 결합

결핵균의 16S rRNA 유전자에 특이적으로 결합하는 결핵균 특이 프로브<sup>38</sup>를 선택, 주문제작하여(Genotech, Daejeon, Korea) 사용하였다. Thiol기로 치환된 프로브를 활성화 시키기 위하여 Dithiothreitol (DTT) 0.1 M 과 170 mM phosphate buffer (disulfide cleavage buffer, pH 8.0)를 이용하여 1 ml 만들고 준비된 프로브를 10 nM이 되도록 1 M DTT로 희석시켰다. 알루미늄 호일에 싼 후 25°C에서 2 ~ 3시간 반응시키면서 가끔씩 섞어주었다. 이어, Nap-5 칼럼(GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK)을 이용하여 생성된 프로브 용액 100  $\mu$ l를 칼럼에 흘려준 뒤에 Nano pure water 400  $\mu$ l를 흘려주어 샘플의 양을 500  $\mu$ l 만들어서 사용하였다.

금 나노 입자와 결핵균 특이 프로브를 결합하기 위하여 결핵균 특이 프로브의 농도를 5 nM로 하여 15 nm 금 나노 입자와 혼합하였다. 빛에 의한 산화를 방지하기 위하여 용액이 들어 있는 tube를 호일에 싸서 25°C 에서 12 시간이상 교반기를 이용하여 교반하였다. 빛이 들어가지 않도록 한 상태에서 용액에 5  $\mu$ l 100 mM phosphate

buffer (pH 7.0), 10% sodium dodecyl surfate (surfactant solution, SDS) 100  $\mu$ l를 넣어 25°C에서 30 분간 교반하였다. 교반이 끝난 용액에 2 M sodium chloride (NaCl, pH 7.0, salting buffer)를 전체의 양이 300  $\mu$ l가 되도록 6 ~ 8 시간의 여유를 두고 4 ~ 6 회 반복을 통하여 넣어주었다. 용액을 한 방울씩 떨어뜨려서 넣고 가벼운 교반을 병행하고 용액을 넣은 후에는 세워 둔 상태로 보관하였다. 용액의 안정화를 위하여 12 시간 이상 25°C에서 세워 보관하도록 하였다.

준비된 용액을 12,000  $\times$  g에서 30 분간 원심분리 후에 상층액을 제거하여 주고 100  $\mu$ l 150 mM NaCl에 100 $\mu$ l 10 mM phosphate buffer (pH 7.4)를 이용하여 원심분리 하여 불순물이 있는 상층액을 제거하여 주었다. 2 ~ 3회 반복을 통하여 불순물이 완전히 제거되면 300  $\mu$ l의 0.3 M potassium chloride에, 300  $\mu$ l 0.1% (v/v) Triton X-100, 400  $\mu$ l의 20 mM Tris-HCl (pH 8.3) resuspension buffer를 이용하여 보관하였다. 약 4°C의 냉장상태에서 보관하고 결과는 분광광도계를 이용하여 확인하였다.

## 7. 금 나노 입자와 결합된 결핵균균 특이 프로브와 16S rRNA의 혼성화

$1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^2$  CFU/ml의 *M. bovis* BCG 배양액을 대상으로 bead-beating을 시행하여 추출한 핵산 추출물 10  $\mu$ l와 결핵균균 특이 프로브가 결합된 5 nM의 금 나노 입자 50  $\mu$ l를 반응시키고 2 시간 동안 반응결과를 관찰하였다. 반응을 30 분 진행 한 이후 0.2 M 농도의 MgCl<sub>2</sub>를 첨가해 주는 경우 15 분 이내에 금 나노 입자의 색깔 변화를 관찰할 수 있었다.



## 제 3 장 결과

### 1. 금 나노 입자 합성 방법에 따른 최대 흡광도의 차이

금 나노 입자 합성은 Table 1에 제시된 A, B, C의 방법처럼 금 염화 수소산과 구연산 나트륨 농도를 달리하여 시행하였다. 금 나노 입자가 합성되면 530 nm의 과장을 흡수하므로 금 나노 입자의 합성을 흡광도 변화로 측정하였다(Figure 2). 실험에 사용된 A, B, C 세 방법 모두, 최대 흡광도가 520 ~ 530 nm에서 나타나 금 나노 입자가 합성되었음을 알 수 있었다. 한편, 금 나노 입자 제조 방법에 따라 최대 흡광도의 크기에는 차이가 있었는데 Natan<sup>33</sup>에 의한 제조 방법인 B 방법을 사용하였을 때 금 나노 입자의 흡광도가 가장 컸다.

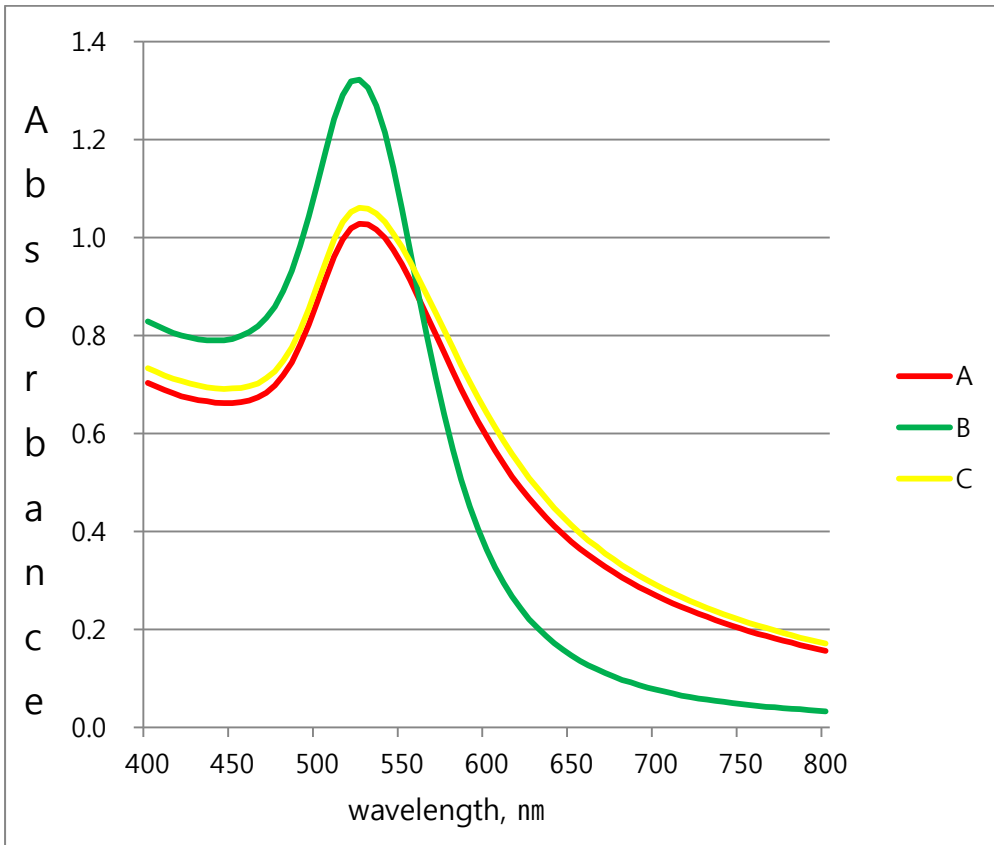


Figure 2. Absorbance spectra of gold-nanoparticle solutions produced by (A) Hill & Mirkin's method<sup>32</sup>, (B) Natan's method<sup>33</sup>, and (C) the new experimental method which was designed in this study.

## 2. 투과 전자현미경을 이용한 금 나노 입자의 크기 및 균 질도 측정

합성 방법을 달리하여 제조한 금 나노 입자의 크기를 투과 전자현미경으로 관찰하였다(Figure 3). 그 결과에 따르면 합성된 금 나노 입자의 크기는 12 ~ 25 nm로 나타났는데, A 방법에 의해 합성된 금 나노 입자는 약 15 nm ( $\pm 2.1$  nm)로서 입자가 단분자층으로 고르게 분포되어 있음을 확인할 수 있다. 반면, B 방법에 의해 합성된 금 나노 입자는 약 22 nm ( $\pm 5.4$  nm)로서 입자가 쌓여있을 뿐 아니라 금 나노 입자의 표면이 매끄럽지 않고 크기 또한 균일하지 않음을 보였다. C 방법에 의해 합성된 금 나노 입자는 15 nm ( $\pm 3.2$  nm)로서 원하는 크기를 얻었지만 입자가 쌓여있는 것을 볼 수 있었다. 앞의 결과 1에서 최대 흡광도가 가장 컸던 B 방법을 사용한 경우, 금 나노 입자의 크기가 가장 크게 나타나, 최대 흡광도의 크기와 금 나노 입자 크기와 상관관계가 있다는 것을 알 수 있었다.

이어 합성된 금 나노 입자의 에너지 분광분석(energy dispersive spectroscopy)을 측정한 결과, 금 입자가 확인 되어 합성한 용액 내

에서 관찰되는 것이 금 성분임을 확인할 수 있었다(Figure 3. D).

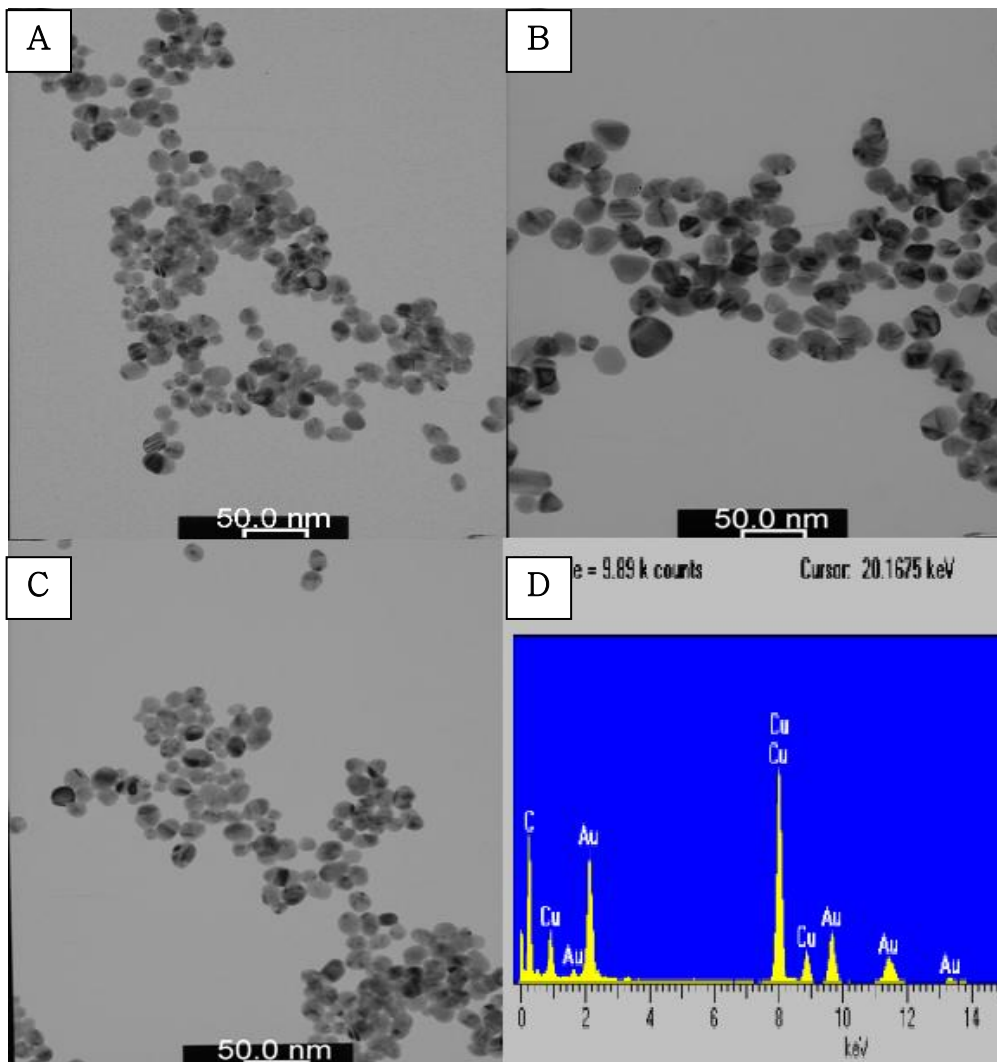


Figure 3. Transmission electron microscopic images of gold nanoparticles produced by different experimental methods, (A) Hill & Mirkin's method<sup>32</sup>, (B) Natan's method<sup>33</sup>, and (C) the new experimental method which was designed in this study. (D) Energy dispersive spectroscopy image of solutions containing gold nanoparticles which show the presence of gold particles in the solutions.

한편, 금 나노 입자의 크기는 같은 방법에 의해 제조된 경우에도 9.8% ~ 23.9%의 상대 표준편차를 보였다(Table 3). 이 중 A 방법을 사용한 경우, 금 나노 입자 크기의 표준 편차가 가장 작아 금 나노 입자를 균질한 크기로 만들기에 A 방법이 가장 적합할 것으로 생각되었다.

Table 3. Particle diameters and relative standard deviation (%)

method	Mean diameter (nm)	Relative standard deviation (%)
A	15 ( $\pm$ 2.1)	9.8
B	22 ( $\pm$ 5.4)	23.9
C	15 ( $\pm$ 3.2)	10.8

### 3. 구연산 나트륨의 농도가 금 나노 입자의 크기에 미치는 영향

앞의 2의 결과에서 금 나노 입자의 크기가 클수록 최대 흡광도가 커지는 것을 관찰한 바 있다. 이와 같은 점을 이용하여 구연산 나트륨의 농도가 금 나노 입자의 크기에 미치는 영향을 확인하고자 하였다.

이를 위해 일정량 (1.0 mM)의 금 염화 수소산 (III)에 구연산 나트륨의 농도를 39.8 mM ~ 42.8 mM로 달리하여 금 나노 입자를 합성하고 그 산물의 흡광도를 분광광도계로 측정하였다(Figure 4).

그 결과, 구연산 나트륨의 농도를 추가할 때 일정양의 비율로 흡광도가 감소하는 것을 볼 수 있었다. 따라서 구연산 나트륨의 양 조절로 환원율을 달리하여 금 나노 입자의 크기를 조절할 수 있을 것으로 생각된다.



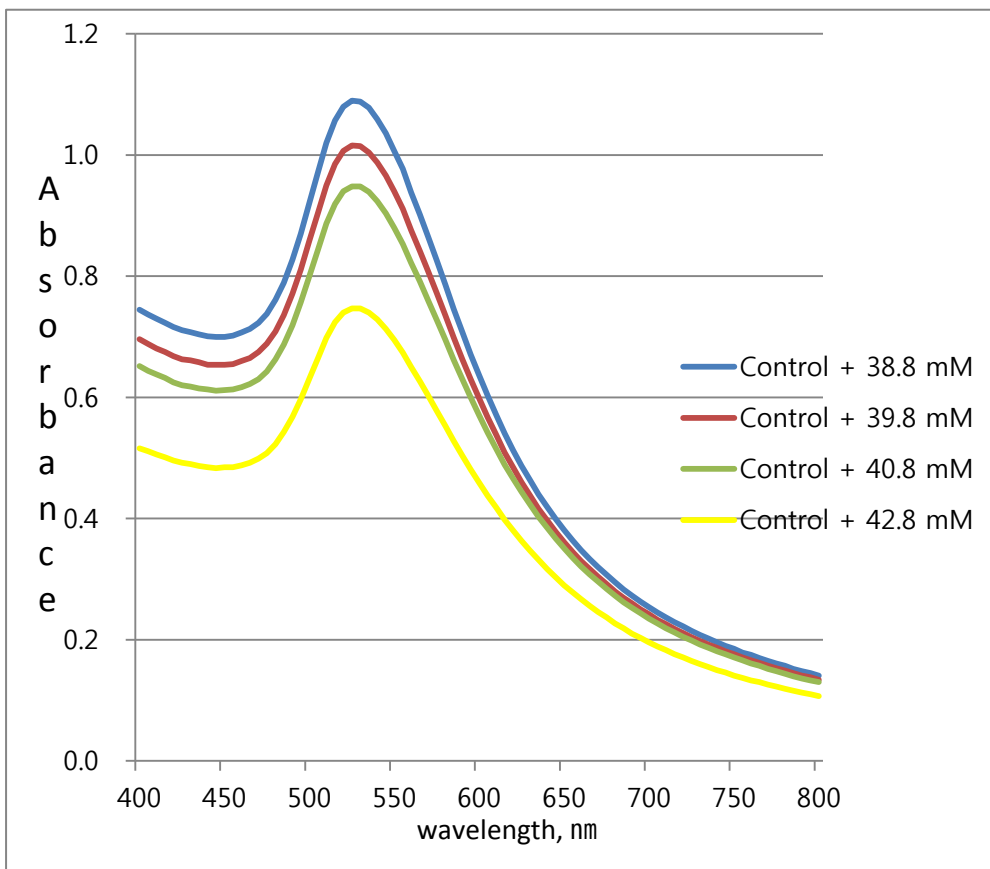


Figure 4. Absorbance spectra of gold-nanoparticle solutions produced with different concentrations of citrates varying from 38.8 mM to 42.8 mM. As the concentration of citrate increases, the maximum absorbance of the gold nanoparticles decreases indicating the concentration of the citrate influences the sizes of the gold nanoparticles.

#### 4. 금 나노 입자에 결합한 결핵균균 특이 프로브의 특이도

재료 및 방법에 제시한 방법을 이용하여 금 나노 입자에 결핵균균 특이 프로브를 혼성화하고, 이어 금 나노 입자와 결합시킨 결핵균균 특이 프로브의 특이도와 민감도를 확인하였다. 실험에 사용된 결핵균균 특이 프로브로는 결핵균균의 16S rRNA를 표적으로 결합하는 올리고머가 사용되었다.

결핵균균 특이 프로브의 특이도를 확인하기 위해 자연상태의 *M. bovis* BCG에 존재하는 16S rRNA 보다 많은 양의 표적 RNA를 증폭하기 위해 nucleic acid sequence based amplification (NASBA)를 이용하여 16S rRNA 표적부위를 증폭하였다.

이어 결핵균균 특이 프로브와 결합된 금 나노 입자 5 nM이 들어 있는 50  $\mu$ l 용액에 16S rRNA NASBA 증폭산물 10  $\mu$ l를 넣어 금 나노 입자와 결합한 결핵균균 특이 프로브와 16S rRNA 표적 부위를 혼성화하고 그 결과를 확인하기 위해 흡광도의 변화를 측정하였다. 프로브와 표적 유전물질간의 혼성화가 이뤄지면 Figure 1에서 설명되었 듯이 붉은색의 용액에서 보라색으로 금 나노 입자 용액의

색깔 변화가 일어나게 되고 이는 흡광도의 변화로 관찰 될 수 있다. (Figure 5). 음성 대조군으로 *E. coli* 와 *M. smegmais*의 16S rRNA NASBA 증폭산물 사용하여 같은 방식으로 혼성화 결과를 비교하였다.

Figure 5에서 볼 수 있듯이, *E. coli*와 *M. smegmais*의 NASBA 증폭산물과 혼성화한 경우에는 흡광도의 변화가 적은 반면(Figure 5. A, B), *M. bovis* BCG의 NASBA 증폭산물과 혼성화 시킨 경우에는 확연한 흡광도 차이를 보였다(Figure 5.C). 흡광도 530 nm에서 값을 비교해보면 *E. coli* 증폭산물에서는 0.115가 감소하였고, *M. smegmais* 증폭산물에서는 0.145가 감소하였으나 *M. bovis* BCG의 증폭산물에서는 0.421가 감소하여 변화가 두드러짐을 확인할 수 있었다.

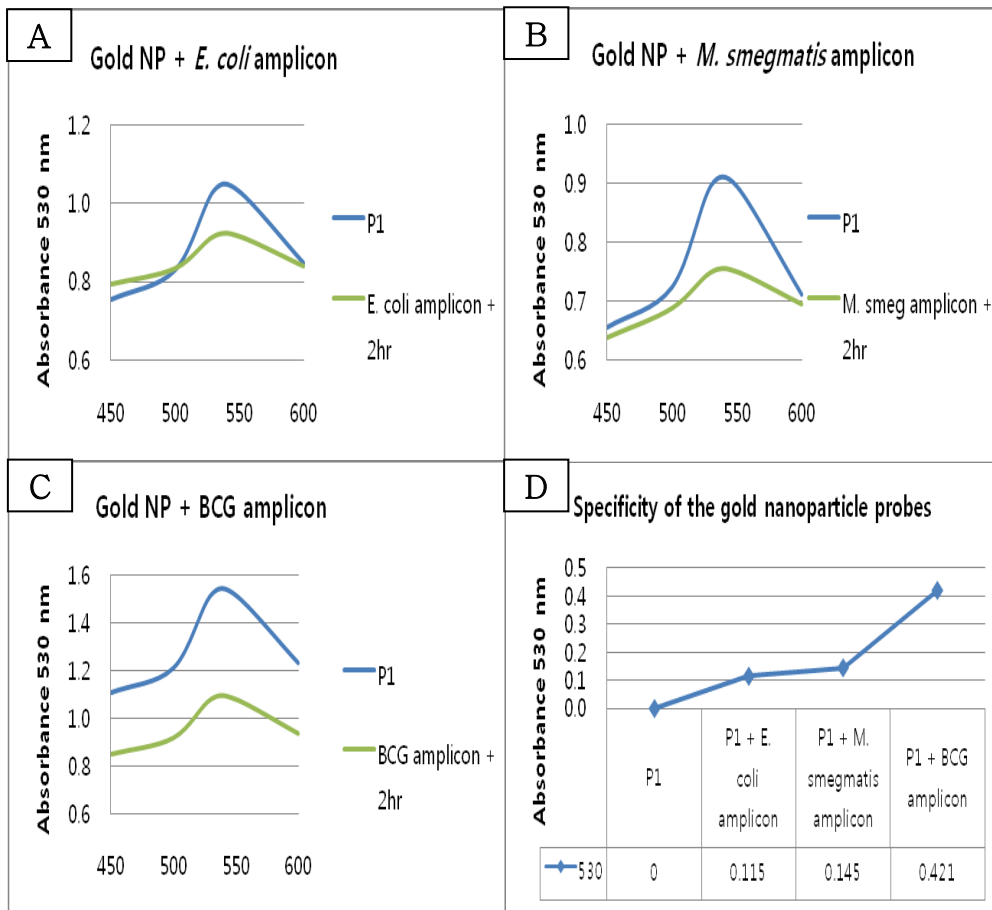


Figure 5. Absorbance changes of gold nanoparticles with MTC specific probe molecules after hybridization with 16S rRNA NASBA amplicons of (A) *E. coli*, (B) *M. smegmatis*, and (C) *M. bovis* BCG. Blue lines (P1) represent the absorbance measured with the probe attached gold nanoparticles only, whereas the green lines represent the absorbance measured with hybridized products of the amplicons using *E. coli*, *M. smegmatis*, and BCG and the probe attached gold nanoparticles. +2hr represents the time the absorbance was measured after hybridization. (D) Absorbance changes at 530 nm before and after hybridization were numerized and compared.

## 5. 금 나노 입자에 결합한 결핵균군 특이 프로브의 민감도

결핵균군 특이 프로브가 결합된 금 나노 입자의 결핵균군 검출 민감도를 확인하기 위해 *M. bovis* BCG 배양액을  $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^2$  CFU/ml으로 계대 희석하여 bead-beating 후 상층액을 사용하였다. bead-beating은 16S rRNA를 포함한 핵산을 추출하는 가장 간단한 방법으로 금 나노 입자를 이용한 분자진단을 가장 간단하고 편리한 방식으로 이용하는 경우 어떤 민감도를 얻을 수 있는지를 보기위해 선택한 핵산 추출법이다.

16S rRNA가 포함된 상층액 10  $\mu$ l를 결핵균군 프로브와 결합된 5 nM의 금 나노 입자가 들어 있는 50 $\mu$ l 용액에 혼성화하고 그 결과를 530nm의 흡광도 측정으로 관찰한 결과 흡광도의 변화가  $1 \times 10^5$  CFU/ml에서 얻은 상층액까지 관찰되어 가장 간단한 방법으로 *M. bovis* BCG의 16S rRNA 를 추출하여 사용하는 경우 금 나노 입자를 이용한 결핵균군 검출의 민감도는  $1 \times 10^5$  CFU/ml인 것으로 나타났다(Figure 6).

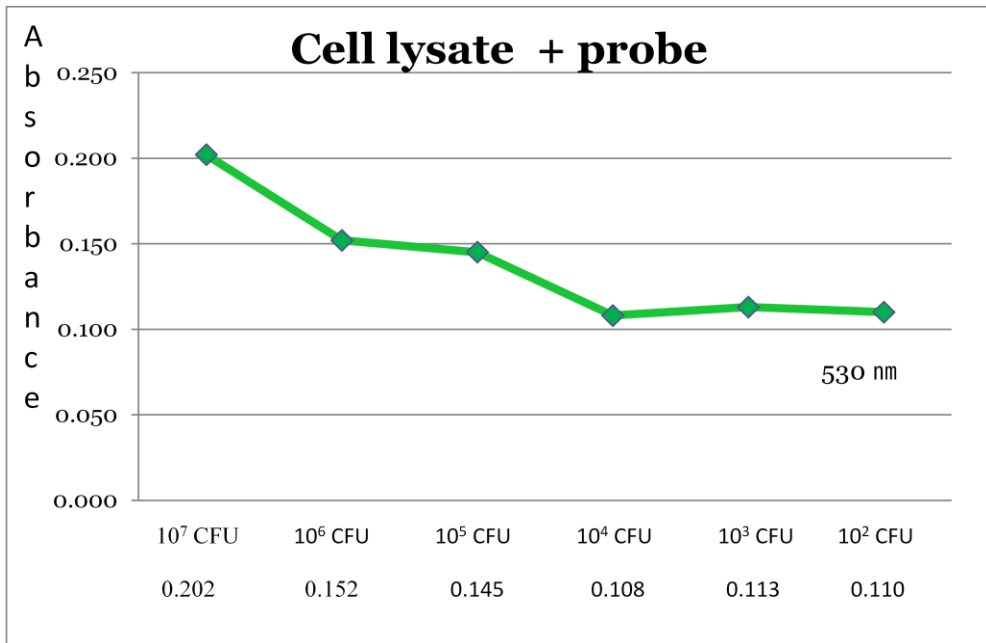


Figure 6. Absorbance changes of gold nanoparticles attached to MTC specific probe molecules after hybridization with supernatants of cell lysates obtained by bead-beating of varying amount ( $10^2$ - $10^7$ CFU/ml) of *M. bovis* BCG cells.

한편, Figure 6의 흡광도 변화는 금 나노 입자 용액의 색깔 변화로도 관찰되어 Figure 7에서 볼수 있듯이  $1 \times 10^5$  CFU/ml의 상층액과 혼성화시킨 반응물에서부터 색깔 변화가 진한 붉은 색으로부터 연한 보라색으로 관찰되어 금 나노 입자간의 응집 현상이 일어났음을 알 수 있었다

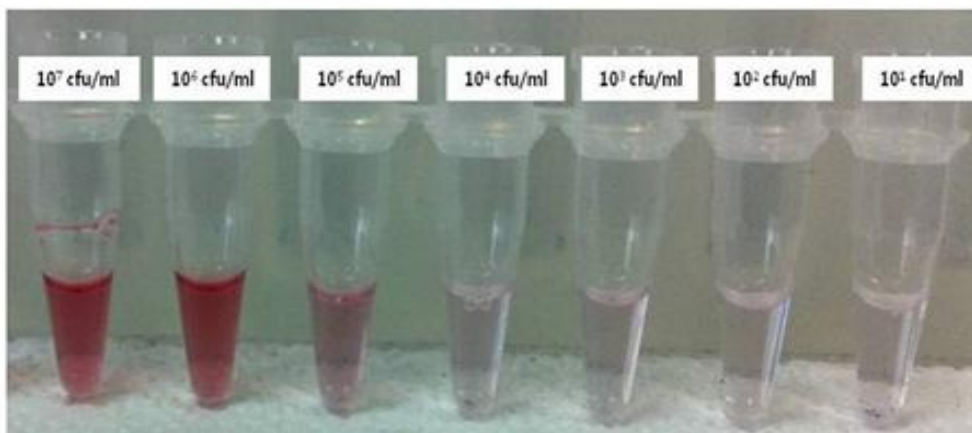


Figure 7. *M. bovis* BCG cell lysate when binding with the sensitivity of Gold-nanoparticle addition MgCl<sub>2</sub>.



## 제 4 장 고찰

결핵균의 신속한 검출은 결핵의 진단 및 치료를 위해 매우 중요하며 최근 급격하게 결핵의 위험성 또한 증가하고 있다. 이에 본 연구에서는 최근 연구가 활발히 진행 되고 있는 금 나노 입자를 연구에 이용하여 새로운 결핵 검사법을 연구 개발 하고자 하였다.

금 나노 입자를 이용하여 결핵균 검사법을 연구하는데 있어서 금 나노 입자의 합성, 금 나노 입자와 결핵균 특이 프로브와의 결합의 과정 등을 표준화하는 것은 금 나노 입자를 이용한 분자진단법 연구에 매우 중요하다고 할 수 있다. 본 연구에서는 기존에 보고된 바 있는 연구결과를 토대로 핵산 유전자 표적을 목적으로 한 금 나노 입자의 합성 및 표적 유전자와의 혼성화 과정을 연구하였다.

여러가지 방법을 이용하여 금 나노 입자를 합성하였고 분광광도계와 투과 전자 현미경으로 결과를 측정하였다. 그 결과 Hill과 Mirkin<sup>32</sup>의 방법이 15 nm의 가장 균질한 금 나노 입자를 합성하고 단분자 층을 보였으며, 금 나노 입자의 크기의

표준편차가 가장 적었다. 제조된 금 나노 입자의 크기가 다양한 것은 금 나노 입자를 제조하는 과정에서 aurate 수용액에 citrate를 첨가할 때의 반응속도와 시약의 환원 속도가 금 나노 입자의 합성에 영향을 미치기 때문인 것으로 생각된다. 따라서 균질한 금 나노 입자의 합성을 위해 이 과정을 최적화하는 것이 중요할 것으로 생각된다.

금 나노 입자의 균질도가 금 나노 입자의 분자진단에서의 유용성에 어떤 영향을 미칠지에 대한 향후 연구도 중요할 것으로 보인다.

금 나노 입자와 결합한 결핵균 특이 프로브의 특이도를 확인하기 위하여 *M. bovis* BCG, *E. coli*, *M. smegmatis* NASBA 증폭 산물을 이용하여 혼성화한 결과 BCG 산물과의 결합에서 흡광도가 확연히 차이를 보이는 것을 확인하였다.

금 나노 입자와 결합한 결핵균 특이 프로브와의 민감도를 알아보기 위하여 일정비율로 계대 희석하여 bead-beating한 상층액 용액을 결합시켜 보았다. 그 결과,  $1 \times 10^5$  CFU/ml의 민감도를 확인하였다. 금 나노 입자가 나타낸  $1 \times 10^5$  CFU/ml의 민감도는 결핵균을 직접

검체로부터 진단하는 목적으로 사용하기에는 매우 낮은 민감도이다. 그러나 배양된 균을 대상으로 결핵균임을 확인하는 목적의 분자단단 분야에 중합효소연쇄반응 (polymerase chain reacton)이 사용되고 있는 현시점에서 볼 때, 본 연구에서 사용한 가장 간단한 방식의 핵산 추출법으로 추출된 핵산을 대상으로 금 나노 입자를 이용한 결핵균 감별 검사가 가능한 민감도라고 생각된다. 이를 입증하기 위해서는 배양된 임상검체를 대상으로한 결핵균 감별검사에 본 연구에서 제조한 금 나노 입자의 유용성을 확인해 보는 향후 실험이 필요할 것으로 생각된다. 본 연구에서 제조된 금 나노 입자의 결핵균 감별 특이도 역시 향후 임상 검체를 이용한 연구를 통해 임상적 유용성이 확인되어야 할 것으로 생각된다.

본 연구를 통해 간편하며 정확한 금 나노 입자를 이용한 분자진단법의 기초가 확보되었다고 생각되며 향후 금 나노 입자를 이용한 결핵균 검사법의 연구 및 개발에 크게 기여할 수 있을 것으로 기대한다.

## 참 고 문 헌

1. Kumar V, Abbas A, Fausto N, Mitchell R. Robbins basic pathology (8<sup>th</sup> Ed) :Saunders Elsevier;2011.
2. WHO. Tuberculosis fact sheet No 104.World Health Organization 2011,Geneva;2011:5
3. KCDC. Annual report on the notified tuberculosis patients in Korea 2010.Korea centers for disease control & prevention,Osong;2010:1
4. Tuberc Respir Dis. Scientific committee in Korean academy of tuberculosis and respiratory disease. national survey of mycobacterial diseases other than tuberculosis in Korea,1995b;42:277-94
5. WHO. Global tuberculosis control report 2010,Geneva;2010:3
6. 질병관리본부. 2007 결핵환자 신고현황 연보,Seoul;2007:1
7. WHO. Diagnostics for tuberculosis: global demand and market potential. 2008,Geneva;2008:19-29
8. 질병관리본부 결핵진료지침 개발위원회, 결핵 진료지침. 대한결핵 및 호흡기학회 2011,Osong;2011:29-36
9. Bates J. Diagnosis of tuberculosis, Chest 1979;76(suppl.):757-63

10. Kent P, Kubica G, Public health mycobacteriology. A guide for the level III laboratory. US Public Health Service. Washington DC:US Government Printing Office;1985:57-68
11. Nolte F, Metchock B, Murray P, Baron E, Faller M, Tenover F, Tenover F, Yolken R. Manual of clinical microbiology, American Society for Microbiology;1995:400-37
12. Tenover F, Crawford J, Huebner R, Geiter L, Horsburgh C. The resurgence of tuberculosis: is your laboratory ready?, J. Clinical Microbiol 1993;31:767-70
13. Woods G. Molecular techniques in mycobacterial detection, Archives of Pathology Laboratory Medicine. 2001;125:122-6
14. Cho S. Current issues on molecular and immunological diagnosis of tuberculosis, Yonsei Medical J. 2007;48:347-59.
15. Beavis K, Lichty M, Jungkind D, Giger O. Evaluation of amplicor PCR for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* from sputum specimens, J. Clinical Microbiol 1995;33:2582-6.
16. Reischl U, Lehn N, Wolf H, Naumann L. Clinical evaluation of the automated cobas amplicor MTB assay for testing respiratory and nonrespiratory specimens, J. Clinical Microbiol 1998;36:2853-60

17. Kraus G, Cleary T, Miller N, Seivright R, Young A, Spruill G. Rapid and specific detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using fluorogenic probes and real-time PCR, *Molecular and Cellular Probes* 2001;15:375-83
18. Kim D, Kim J, Park M. Modulation of biological processes in the nucleus by delivery of DNA oligonucleotides conjugated with gold nanoparticle, *Biomaterials* 2011;32:2593-604
19. Gill P, Amir-Houshang A. Colorimetric detection of *Helicobacter pylori* DNA using isothermal helicase-dependent amplification and gold nanoparticle probes, *Diagnostic Microbiology & Infectious Disease* 2008;62:119-24
20. E-Saued I, Huang X, E-Saude M. Surface plasmon resonance scattering and absorption of anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticle in cancer diagnostics: applications in oral cancer, *Nano Lett* 2005;5:829-34
21. Son W, Youk J, Park W. Anti microbial cellulose acetate nanofibers containing silver nanoparticles, *Carbohydrate Polymers* 2006; 65:430-34

22. Huang Z, Zhang Z, Kotaki M, Ramakrishna S. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their application in nanocomposites, *Composites Science and Technology* 2003;64: 2223-35
23. Barnes W, Dereux A, Ebbesen T. Surface plasmon subwavelength optics, *Nature* 2003;424:824-30
24. Bohren C, Huffman D. Absorption and scattering of light by small particles, John Wiley 1983, New York
25. Mirkin C, Lestinger R, Mucic J. A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials, *Nature* 1996;382:607-9
26. Link S, El-sayed M. Spectral properties and relaxation dynamics of surface plasmon electronic oscillations in gold and silver nanodots and nanorods, *J. Physics Chemistry B* 1999;103:8410-26
27. Huixiang L, Lewis J. Label-free colorimetric detection of specific sequences in genomic DNA amplified by the polymerase chain reaction, *J. America Chemical Society*. 2004;126:10958-61

28. Jin R, Wu G, Mirkin C. What controls the melting properties of DNA-linked gold nano particle Assemblies, *J. American Chemical Society*. 2003; 125:1643
29. Santiago F, Krug J. Simultaneous detection of marine fish pathogens by using multiplex PCR and a DNA microarray, *J. Clinical Microbiol* 2004;42:1414
30. Levidiotou S, vrioni G, Galanakis E. Four-year experience of use of the cobas amplicor system for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory and nonrespiratory specimens in Greece, *J. Clinical Microbiol* 2003;22:349-56
31. Henglein A., ErshovJ B, Malow M. Absorption spectrum and some chemical reactions of colloidal platinum in aqueous solution, *J. Physics Chemistry* 1995;99:14129-36.
32. Hill, D, Mirkin C. The-bio-barcode assay for the detection of protein and nucleic acid targets using DTT-induced ligand exchange, *Nature* 2006;67:735-43
33. Grabar K, Natan M. Preparation and charateric of Au colloid monolayers, *Anal chem.* 1995;67:735-43



34. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Schmidheini T, Bodmer T. Automated detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis, *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:2054-8
35. Lemarchand K, Berthiaume F, Maynard C, Harel J, Payment P, Bayardelle P. Optimization of microbial DNA extraction and purification from raw wastewater samples for downstream pathogen detection by microarrays, *J. Microbio Methods* 2005;63:115-26.
36. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal Biochem* 1987;162:156-9
37. Bunschoten A, Tiemersma E, Schouls L, Kampman E. Simultaneous determination of polymorphism in N-acetyltransferase 1 and 2 genes by reverse line blot hybridization, *Anal Biochem* 2000;285:156-62
38. Hong S, Evaluation of molecular technologies by using RNA for tuberculosis diagnosis, *Yonsei Univ* 2011:16-20

39. Bruno V, Diana M, Pedro V. Au-nanoprobes for detection of SNPs associated with antibiotic resistance in *Mycoacterium tuberculosis*, Nanotechnology 2001;21:415101
40. Nie S, Emory S. Probing single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced raman scattering, Science 1997; 21:1102-6.

# **ABSTRACT**

## **Tuberculosis Diagnosis using Gold nano-particles**

Kang, Min Ho

Dept. of Biomedical Life Science

The Graduate school of Health and Environment

Yonsei University

Standard bacteriological testing method that is currently being used for tuberculosis diagnosis takes a great deal of time and has limited in the sensitivity and specificity. Therefore, there have been continual research and studies to find a new test method. This study aims to present the base way of making gold nano particles composition in order to develop tuberculosis diagnosis method by using it. As a result of analyzing each particle size, uniformity and absorbance that is composing gold nano particles, it was found that 15nm of gold nano particle composition makes the particle size

uniform. In the regards to the combination of gold nano particles and the tuberculosis specific probes, it was found that the *Mycobacterium bovis* BCG 16S rRNA, target substance has the best combination to that probes when the pH 7.0 of washing buffer and pH 8.3 of re-suspend buffer are used. Moreover, it took only 40 min to find the aggregation reaction that was used to take 240 min before by using 0.2 M of MgCl<sub>2</sub>, so it became one of the valuable conditions for the quick diagnosis. It was found that the 10<sup>5</sup> CFU/ml is the result of the sensitivity to detect *M. bovis* BCG from the gold nano particle when 16S rRNA was used as a target substance and that exists in the upper part of solution that was obtained by cell lysate the *M. bovis* BCG. Also the specificity was confirmed through the *M. smegmatis* and *Escherichia coli*. I think this study will be greatly helpful to develop variable kinds of diagnosis methods using gold nano particles in the future.

---

Key words : Gold nano particle, Tuberculosis diagnosis, molecular diagnosis