

MTT 방법에 의한 항진균성 활성효과의 측정

이동건 · 이성구 · 김길룡 · 함경수*

한국과학기술연구원 생명공학연구소 펩타이드 공학연구그룹

The Measurement of Antifungal Effect by MTT Assay. Dong Gun Lee, Sung Gu Lee, Kil Lyong Kim and Kyung-Soo Hahm* Peptide Engineering Research Unit, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KIST, Taejon 305-600, Korea - In this study, we show a convenient MTT assay for detect the susceptibility of yeast-like form of *Trichosporon beigelii* against antifungal agents. This assay was developed based on mitochondrial respiration by determining reduction of 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) to formazan. Cells of *T. beigelii* are seeded into 96-well microtiter plates, and antifungal agents, amphotericin B, magainin and CA-ME hybrid peptide were added with various concentrations. After 24 hr incubation, MTT was added, then incubations were continued for 4 hr. Formazan formation was quantified photometrically after extraction of the formazan with acid sodium dodesyl sulfate (SDS). From this assay, we could obtained MICs of antifungal agents against *T. beigelii*. The presented method can easily be used as an effective methods to assess the antifungal action of various agents on yeasts with minimal amounts of antifungal agents.

지금까지 항진균성 활성을 측정하는 방법에 있어서 그 기술적인 면에서, 보다 간편성을 부여시키는 방법을 찾는 데 많은 노력을 기울여 왔다(1-3). 하지만 항진균성 활성을 측정하는 방법에 있어서 기존의 colony 수를 count 하는데 효모와 사상균에서 세포의 응집때문에 정확한 계수에 많은 문제점이 있었고 그 절차가 복잡하였다. 또한 그 세포수의 혼탁도(turbidity)를 측정하는데도 그 정확도가 떨어지는 경향이 있어서 그 한계성이 대두 되었다(4, 5). 특히 사상균의 경우는 그 건조 균체량 (dry weight)을 측정함으로써 항진균 활성을 측정하는 방법을 많이 사용하였다. 최근들어 동물이나 식물에 많은 손상을 주는 병원성 곰팡이를 중심으로 그 항진균성 물질을 찾는 데 많은 관심이 모여지고 있으며 그 물질들을 screening하는 과정에서 보다 효율적이고 간단한 측정 방법이 요구되고 있는 실정이다. 본 연구에서는 기존의 항진균성 물질로 널리 알려진 amphotericin B와 본 연구실에서 합성디자인하여 *Fusarium oxysporum*에 대해 항진균활성을 가지는 것으로 보고된 벌독의 melittin(ME)(6)과 cecropin A(CA)(7)를 접목하여 만든 CA-ME hybrid peptide(8) 그리고 기존의 항진균성 펩타이드로 알려졌으며(9), 특히 *Aspergillus*속에서 항진균활성을 가진다고 보고된 magainin-2(10)을 이용하여 사모증(white piedra)이라는 병징(11, 12)을 일으키는 것으로 알려진 병원성

곰팡이 *Trichosporon beigelii*의 성장에 미치는 항진균활성을 MTT [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide] assay를 통해 기존의 방법보다 간단하면서도 보다 정확하게 항진균 활성을 측정하는 방법을 소개하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양조건

본 실험에 사용한 *T. beigelii* KCTC 7251는 한국과학기술연구원 생명공학연구소의 균주보관 센터에서 분양을 받아 사용하였다. 사용배지는 Difco사(U.S.A)의 YM 배지(1% glucose, 0.3% malt extract, 0.5% peptone, 0.3% yeast extract, pH 6.0)를 사용하였으며 배양온도는 28°C에서 배양하였다.

세포수의 측정

희석 평판법을 사용하였으며 28°C의 배양온도에서 24시간 동안 배양하였다. 균수의 측정은 희석 평판법에 의해 3회 반복하여 행하였다.

펩타이드 합성

펩타이드의 합성은 본 연구실에서 개발한 펩타이드 합성 장치를 이용한 수동 합성 방법을 이용하였으며, Fmoc을 N α -amino group의 보호기(protecting group)로 사용하는 고상합성법(solid phase method)(13)으로 합성하였다. 본 실험에서 사용한 합성 펩타이드와 아미

*Corresponding author

Tel. 82-42-860-4160, Fax. 82-42-860-4593

E-mail: hahmks@kribb4680.kribb.re.kr

Key words: Antifungal activity, Melittin hybrid peptide, Amphotericin B

Table 1. Amino acid sequences of the parental and synthetic hybridpeptides used in this study

Peptides	Sequences	Remarks
CA	KWKLFFKKIEKVGQNIRDGIIKAGPAVAVVVGQATQI AK-NH ₂	parental
ME	GIGAVLKVLTGLPALISWIKRKROQ-NH ₂	parental
MA-2	GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS-NH ₂	
CA-ME	KWKLFFKKIGIGAVLKVLTG-NH ₂	CA:1-8 ME:1-12

노산 서열은 Table 1에 나타내었다.

MTT 방법에 의한 항진균 활성 측정

MTT assay는 다음과 같은 방법에 의해 실시하였다. 먼저 *T. beigelii* 세포수를 2×10^5 /ml이 되도록 YM 배지로 희석한 후, flat-bottom 96-well microtiter plates (Nunc, Sweden)에 그 희석액 100 μ l씩 각각의 well에 분주한 후, 본 연구실에서 합성 디자인한 CA-ME hybrid peptide 그리고 magainin-2(Table 1)와 강력한 항진균 활성물질로 알려진 amphotericin B를 serial dilution 방법에 의해 20, 10, 5, 2.5 1.25 μ g/ml의 농도로 첨가한 다음, 28°C에서 24 시간 배양하였다. 배양 후 배지의 pH를 10×phosphate buffered saline (PBS, pH 7.0)용액 10 μ l를 첨가하여 중화 시킨 후, MTT(Sigma, U.S.A.)용액 10 μ l (5 mg/ml)를 첨가 한 후, 37°C에서 4 시간 반응 시켰다. 반응 후 생성된 formazan을 발색 시키기 위하여 SDS 용액(20% sodium dodesyl sulfate, 0.1 N HCl)을 30 μ l씩 첨가한 다음 37°C에서 12 시간 발색을 시킨 다음 Emax precision microplate reader를 사용하여 흡광도 570 nm에서 그 발색정도를 측정하였다. 이 측정값을 가지고 *T. beigelii*에 대한 CA-ME hybrid peptide와 magainin-2 그리고 amphotericin B의 최소 생육 저해농도(MIC: Minimum Inhibitory Concentration)값을 3회 반복 측정하여 구하였다.

결과 및 고찰

먼저 본 실험에서 항진균활성을 측정하기에 앞서 formazan의 생성 정도의 발색 수치를 가지고 *T. beigelii* 생균수와 관계의 관계를 알아 본 결과 10^3 - 10^5 의 균체 농도에서 MTT [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide]의 대사산물인 formazan의 생성 정도가 그 생균수에 대해 비례함을 알 수 있었다(Fig. 1.). 이러한 결과를 가지고 생각해 볼 때, 살아 있는 세포의 미토콘드리아의 호흡활동이 일련의 간단한 발색과정에 의해 정량적으로 최소규모에서 생균수의 측정이 가능하며 항진균 활성이 있는 물질에 의해 균체의 성장이 억제되거나 균체가 파괴 되었다면 항진균성 물질에 의한 잔존 생균수를 MTT를 첨가함으로써 생성되는 formazan을 정량함으로써 측정이 가능하리라 생각되어 진

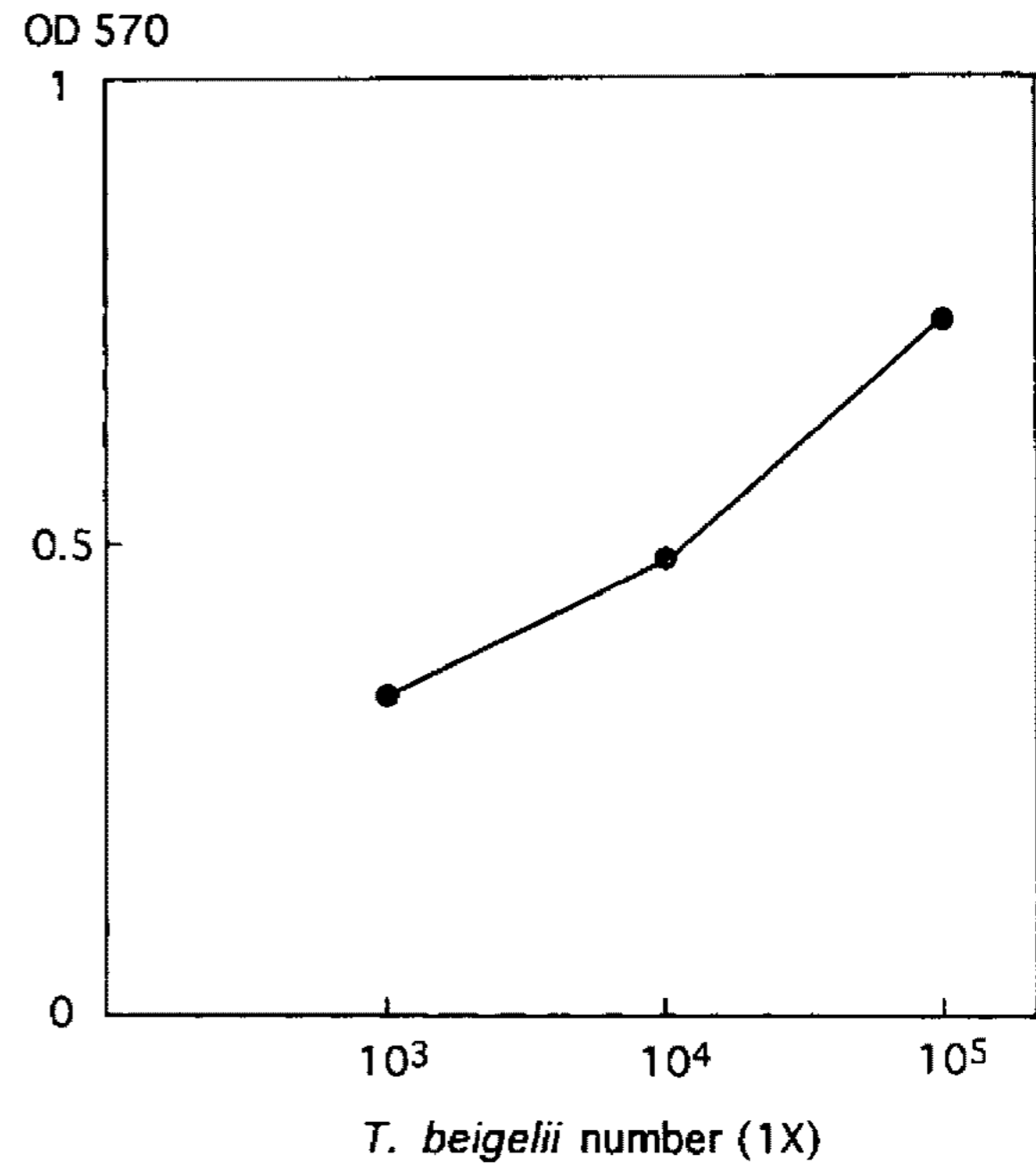


Fig. 1. Correlation between number of viable *T. beigelii* and formazan formation.

Various numbers of *T. beigelii* were incubated with MTT. After 4 hr, formazan was extracted and measured photometrically. A good correlation was seen between absorption and the number of fungal organisms. All assays were performed as triplicates.

다. 이러한 방법은 기존의 진핵세포 생균수 측정에 사용되어 왔으나 본 실험에서는 이를 응용하여 항진균활성을 측정하는데 이용하고자 하였으며 기존에 알려진 항진균성 물질인 amphotericin B와 강한 항균펩타이드로 알려진 magainin-2 그리고 CA-ME hybrid peptide를 선택하였다. CA-ME 합성 펩타이드는 벌독에서 분리한 melittin을 기초로 하였으며 melittin의 경우는 강한 항균활성을 가지고는 있지만 세포독성이 강한 것으로 알려져 있어 이러한 세포독성의 문제점을 보완하기 위하여 cecropin A의 1-8 아미노산 부위와 melittin의 1-12 아미노산을 접목시켜 합성하였다. 이렇게 합성한 CA-ME hybrid peptide는 *F. oxysporum*에 대하여 강한 항진균활성을 가지며 세포독성을 나타내지 않은 것으로 확인되었다(8). 그리고 magainin-2는 강한 항균활성 및 항진균활성을 나타낸다고 보고 되어지고 있으며(9) 본 연구실에서는 기존의 magainin 펩타이드를 합성하여 *Aspergillus*속에 대하여 강한 항진균활성을 나타내는 것을 확인하였다(10). 실제로 강한 항진균 활성을 나타낸다고

Table 2. Antifungal activities of the peptides

Peptides	MIC ^a (μg/ml) values
CA	ND ^b
ME	5
MA-2	2.5
CA-ME	10
Amphotericin B	5

^aMinimal inhibition concentration (MIC) was determined by serial dilution of peptide. ^bNot Determined.

이미 보고된 바 있는 amphotericin B (Sigma co, U.S. A.)와 함께 항진균 활성을 가지는 것으로 확인된 CA(1-8)-ME(1-12) hybrid peptide 그리고 magainin-2를 사용하였고, 비교대상으로 cecropin과 melittin을 사용하였다.

MTT를 첨가한 후 생성되는 formazan의 발색정도로써 *T. beigeli*에 대한 항진균 활성을 측정 하였다. 그 결과 amphotericin B의 최소저해 농도(MIC)는 5 μg/ml를 나타내었고 CA-ME hybrid peptide의 MIC는 10 μg/ml 그리고 magainin-2에서는 2.5 μg/ml을 나타내었다 (Table 2). 본 방법은 측정 scale의 최소화가 가능하기 때문에 항진균성 물질의 사용량도 최소 scale로 줄일수 있으며 빠른 시간내에 보다 많은 대상의 항진균 활성 측정을 가능케 할 수 있을 것으로 생각되어 진다.

참고문헌

1. Fromtling, R. A., J. N. Gaigiani, M. A. Pfaller, A. Espinel-ingroff, K. F., Bartizal, M. S. Bartlett, B. A. Body, C. Frey, G. Hall, G. D. Roberts, F. B. Nolte, F. C. Odds, M. G. Rinaldi, A. M. Sugar and K. Villareal. 1993. Multicenter evaluation of a broth macrodilution antifungal susceptibility test for yeasts. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**: 39-45.
2. Galgiani, J. N. 1993. Susceptibility testing of fungi: current status of the standardization process. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**: 2517-2521.
3. Pfaller, M. A., B. Dupont, G. S. Kobayashi, J. Muller, M.

- G. Rinaldi, A. Espinel-ingroff, S. Shadomy, P. F. Troke, T. J. Walsh, and D. W. Warnock. 1992. Standardized susceptibility testing of fluconazole: an international collaborative study. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**: 1805-1809.
4. Denning, D. W., L. H. Hanson, A. M. Periman and D. A. Stevens. 1992. *In vitro* susceptibility and synergy studies of *Aspergillus* species to conventional and new agents. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **15**: 21-34.
5. Dermoumi, H. 1994. *In vitro* susceptibility of fungal isolates of clinically important specimens to itraconazole, fluconazole and amphotericin B. *Chemotherapy* **40**: 92-98.
6. Tosteson, M. T., S. J. Holmes, M. Razin and D. C. Tosteson. 1985. Melittin lysis of red cells. *J. Membr. Biol.* **87**: 35-44.
7. Lee, J. Y., A. Boman, C. Sun, M. Anderson, H. Jornvall, V. Mutt and H. G. Boman. 1989. Antibacterial peptides from pig intestine: isolation of a mammalian cecropin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**: 9159-9162.
8. Lee, D. G., S. Y. Shin, S. G. Lee, M. K. Lee and K. S. Hahm. 1996. Antifungal Effect of Melittin-Hybrid Synthetic Peptides for *Fusarium oxysporum*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 529-533.
9. Zasloff, M. 1987. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**: 5449-5453.
10. Lee, M. K., D. G. Lee, S. Y. Shin, S. G. Lee, J. H. Kang and K. S. Hahm. 1996. Antifungal activities of peptides with the sequence 10-17 of Magainin 2 at the N-termini against *Aspergillus fumigatus*. *J. Microbiol.* **34**: 274-278.
11. Walsh, T. J. 1989. Trichosporonosis. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **3**: 43-52.
12. Walsh, T. J., K. A. Newman, M. Moody, R. Wharton and J. C. Wade. 1986. Trichosporonosis in patients with neoplastic disease. *Medicine (Baltimore)* **65**: 268-279.
13. Merrifield, R. B. 1986. Solid phase synthesis. *Science* **232**: 341-347.

(Received 28 January 1997)