

***Mycobacterium leprae*의 장기간 보관시 온도와 배지가 균의 생존력에 미치는 영향****박진호, 김윤지, 김종필**

한국한센복지협회 연구원

**Effect of temperature and medium on the viability of *Mycobacterium leprae* during long term-storage**

Jin-Ho Park, Yun-Ji Kim, Jong-Pill Kim

Institute for Leprosy Research, Korean Hansen Welfare Association

**Background**

*Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) is pathogenic bacterium with polymorphic, acid-fast properties and causes leprosy that it is called Hansen's disease. Leprosy can be completely cured using multidrug therapy (MDT), but it is not easy to eradicate leprosy and *M. leprae* on the planet.

**Object**

We still do not understand the exact pathogenesis mechanism of leprosy. The main reason is that we cannot grow bacteria in vitro. Therefore, quantitative measurement and damage-free storage of live *M. leprae* are very important.

**Methods**

Here, we generated bacteria stocks of *M. leprae* using HBSS with 0.05% tween 80 or freezing solution 11 months ago and evaluated conditional survival of bacteria by Propidium monoazide (PMA) staining, real-time PCR.

**Results**

There were assessed for bacteria viability under the conditions of each temperature or medium by delta-Ct level of real-time PCR. We also observed that frozen-stored *M. leprae* (2.14) compare to refrigerated-stored *M. leprae* (1.03) was significant decreased delta-Ct in HBSS ( $P < 0.05$ ). However, frozen-stored *M. leprae* (1.14) was not difference refrigerated-stored *M. leprae* (0.84) in freezing solution ( $P = NS$ ). Real-time PCR with SYBR green method was reliable for results and statistical significance, but data for real-time PCR with probe method were unreliable.

**Conclusions**

Taken together, these results indicated that freezing solution regardless of temperature increase much more bacterial survival. In addition, if use not freezing solution, *M. leprae* must be stored frozen.

■ **Key words:** Leprosy, *Mycobacterium leprae*, Propidium monoazide, Real-time PCR

## 서론

*Mycobacterium leprae*(나균)는 한센병(Hansen's disease, leprosy)를 유발하는 세포 내의 다형성, 항산성을 가지는 병원성 박테리아이다<sup>1</sup>. 인간에게 질병을 일으키는 최초의 박테리아로 밝혀졌지만 아직까지 지구상에서 완전히 퇴치하지 못하는 병으로 알려져 있다<sup>2</sup>.

한센병은 현재 multidrug treatment(MDT; dapsone, rifampin, clofazimine)을 통해서 *M. leprae*의 전염성을 없애 완치판정이 가능한 질병임에도 불구하고<sup>3</sup>, *M. leprae*는 연구를 목적으로 한 Koch's postulates에 따라 In vitro에서 균을 배양하는 것이 일반적으로 불가능하기 때문이다<sup>4</sup>. 현재 *M. leprae*는 T-세포가 결핍된 누드마우스의 발바닥에 접종하여 족저 모델을 만들어 사육하는 방식으로 균을 유지한다<sup>5</sup>. *M. leprae* 유지를 위한 동물모델 제작을 위하여 생균의 효율적인 보존은 매우 중요하다. 일반적으로 *M. leprae*는 Ziehl-Neelsen staining 같은 acid-fast bacilli(afb) staining으로 균의 존재를 확인한다<sup>6</sup>. 균의 생존력 측정은 *M. leprae*의 연구나 특히 동물모델 유지에 매우 중요하지만, 기존의 방법들은 연구자의 테크닉이나 경험에 따라 편차가 생길 수 있어서 균의 생존력을 정확하고 반복적으로 측정할 수 있는 새로운 방법이 필요한 실정이다.

최근 미생물의 생존 여부를 Propidium monoazide(PMA) 염색을 이용하여 판단한 사례가 있다<sup>7-10</sup>. PMA는 DNA 안으로 삽입되어 polymerase chain reaction(PCR, 중합효소연쇄반응)으로 DNA의 증폭을 억제하는 광반응성 DNA 결합 염료이다. PMA는 손상되거나 죽은 세포벽 안으로 침투하여 DNA에 삽입된다. Real-time PCR은 아주 미세한 양의 DNA만으로도 기존의 조직 염색들이나 PCR보다 더 *M. leprae*를 정량적으로 검출가능 하다<sup>6</sup>. 더군다나

PMA-염색된 DNA는 PCR으로 인해 DNA의 증폭이 일어나지 않기 때문에 균의 생존을 빠르고 간단하게 판단 가능하다.

이번 연구에서는 *M. leprae*를 장기간 보관함에 있어서 배지 및 보관 온도에 따른 생균의 보존상태를 PMA staining 및 real-time PCR로 보다 객관적인 데이터로 관찰하여 더 나은 균 보관 조건을 찾아 *M. leprae* 연구에 기여하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. *M. leprae* 샘플 준비

*M. leprae*는 한국한센복지협회 연구원의 동물실험실에서 누드마우스에 계대배양하여 보관한 현탁액을 사용했다. 현탁액은 각각 Hank's balanced salt solution(HBSS) with 0.05% tween 80과 Trombone AP's freezing solution(7H9 medium with 10% oleic acid-albumin-dextrose-catalase, 20% glycerol)(이하 Freezing sol.)<sup>11</sup>에 현탁되어 냉장(4℃), 냉동(-20℃) 상태로 11개월 동안 보관되었다.

### 2. Propidium monoazide (PMA) 염색

Freezing sol.을 사용하여 장기간 균을 냉동했을 때, 균의 보존상태를 평가하기 위해 죽은 균 조건 없이 생균 조건만 실험을 실시했다. 균 현탁액에 PMA 100 μM을 넣고 10분간 빛에 노출시키지 않고 상온 상태를 유지했다. 이후 QIAGEN사의 BLU-V Viability PMA kit를 이용하여 제조사의 실험 프로토콜에 따라 10분간 빛에 노출하였다. 20,000g, 5분간 원심분리하여 상층액을 버리고 DNA를 추출하였다.

### 3. DNA 추출

PMA-염색된 균을 QIAGEN사의 AE buffer 200μL로 재부유 했다. AE buffer에 현탁된 균액을 Acid washed glass bead로 QIAGEN사의 균질기를 사용하여 50Hz, 5분간 균질화한 후 100℃에서 10분 동안 가열했다. 샘플을 상온에서 2분간 꺼내어 두고 12000 RPM, 2분간 원심분리 하였다. 깨끗한 1.5mL

Corresponding author : Jin-Ho Park  
Jin-Ho Park, 0000-0002-2613-7246  
Email : pjh718g@gmail.com  
Received : October 30, 2019  
Accepted : December 4, 2019  
Copyright © 2019 Korean Leprosy Bulletin

튜브에 QIAshredder columne(QIAGEN, USA)을 조립하고, Acid washed glass bead를 제외한 상층액을 columne으로 조심스럽게 옮긴다. 이후 8000RPM, 분간 원심분리하여 DNA를 얻었다.

#### 4. Real-time PCR

*M. leprae*를 위한 Freezing solution의 사용유무와 보존 온도간 생균의 양 차이를 정량적으로 알아보기 위해 real-time PCR을 수행했다. Real-time PCR은 각각 SYBR green과 probe 법을 이용한 두 가지 방법으로 진행하였다. SYBR green을 사용한 PCR의 *M. leprae*의 RLEP4 시발체(forward: ACCATTTCTGCCGCTGGTAT, reverse: ATCTGCGCTAGAAGGTTGCC)와 probe법을 사용한 PCR의 ML-RLEP probe(forward: CGCCGACGCGCGGATCATCGA), 시발체(forward: GCAGCAGTATCGTGTTAGTGAA, reverse: CGCTAGAAGGTTGCCGTAT)는 각각 이전 논문과 동일한 것을 사용했다<sup>7</sup>. 또한 기존의 방법과 다른 probe법으로도 실험을 수행하였다. PMA 염색된 혹은 염색되지 않은 DNA를 주형으로 하여 QuantiNova SYBR® Green PCR kits(QIAGEN, USA)를

사용하여 제조사의 지침에 따라 실험을 수행하고 DNA 양 변화를 real-time PCR을 통해 장기간 보관동안 온도와 보관 배지에 따른 Ct값을 관찰한다.

#### 5. 분석 및 통계

이번 실험의  $\Delta Ct$ 값은 PMA로 염색된 샘플의 Ct값에서 PMA염색을 하지 않은 샘플의 Ct값을 감하여 계산했다. 통계분석은 NSCC 통계 프로그램으로 수행되었다.  $\Delta Ct$ 값을 기준으로 하여 Freezing solution의 사용유무와 샘플 보관온도를 이용하여 Mann-Whitney U 검정(NCSS, USA)을 수행했다. 통계적 유의성은  $P < 0.05$ 로 정했다.

## 결 과

### 1. SYBR green을 이용한 real-time PCR

#### 1) 배지에 따른 균의 보존 결과

먼저 *M. leprae*를 장기간 보관하였을 때, 배지가 균의 생존에 영향을 주는지 균 배양에 사용하는 HBSS(non-freezing solution)군과 freezing solution 군의 각 표본을 PMA 염색하고 PMA 염색되지 않은 대조군을 같이 DNA 추출한 후 SYBR

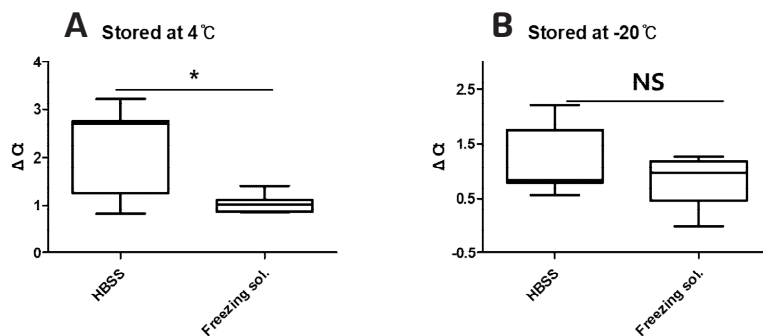


Fig. 1. Real-time PCR for differences in stored media

PMA-stained *M. leprae* was confirmed by real-time PCR of SYBR green method. A)  $\Delta Ct$  of Freezing solution group (Freezing sol.,  $n=7$ ) was significantly decreased at 4°C compare to HBSS group (HBSS,  $n=7$ )(HBSS 2.14 vs Freezing sol. 1.03,  $*p < 0.05$ ). B)  $\Delta Ct$  of Freezing solution group (Freezing sol.,  $n=7$ ) was decreased at -20°C compare to HBSS group (HBSS,  $n=7$ )(HBSS 1.14 vs Freezing sol. 0.84, NS). Samples were stored for 11 months in HBSS or freezing solution (Mean  $\pm$  S.E.M;  $*p < 0.05$ ; NS, Not significant; each data point is represented on graphs).

green을 이용하여 real-time PCR을 시행하였다. 먼저 11개월간 냉장(4°C) 보관한 샘플들의  $\Delta Ct$ 값을 구한 결과, HBSS에 보관하였던 샘플의  $\Delta Ct$ 값의 평균은 2.14이었고 freezing solution에 보관하였던 샘플의  $\Delta Ct$ 값은 1.03으로 관찰되었다. Freezing solution에 현탁되어 냉장 보관했던 샘플들은 HBSS에 보관했던 샘플에 비해 평균  $Ct$ 값이 1.12만큼 통계적으로 유의하게 감소했다 (HBSS 2.14 vs Freezing sol. 1.3,  $*p<0.05$ )(Fig. 1A).

## 2) 온도에 따른 균의 보존 결과

우리는 *M. leprae*를 장기간 보관할 때 배지의 영향만큼, 온도도 영향을 주는지 실험을  $\Delta Ct$ 값을 비교하여 확인하였다. HBSS에 11개월간 냉동(-20°C) 보관했을 때에는 평균  $\Delta Ct$ 값은 1.14으로 냉장 (4°C) 보관하였을 때의 평균  $\Delta Ct$ 값인 2.14보다 1.0만큼 유의하게 감소하였다(4°C 2.14 vs -20°C 1.14,  $*p<0.05$ )(Fig. 2A). Freezing solution을 사용하지 못한다면 균을 냉동보관 하는 것이 균의 상태를 보존하기에 더 나은 조건인 것을 확인하였다. 반면에 Freezing solution에 *M. leprae*를 11개월간 냉동(-20°C) 보관했을 때에는 평균  $\Delta Ct$ 값이 0.84로

다음으로는 각각 HBSS과 freezing solution에 11개월간 냉동(-20°C) 보관했던 샘플을 PMA 염색하여 비교 실험하였다. Freezing solution에 현탁되어 냉동 보관되었던 샘플의  $\Delta Ct$ 값은 0.84으로 HBSS에 현탁되어 보관되었던 샘플보다 0.3만큼 감소했다(HBSS 1.14 vs Freezing sol. 0.84, NS)(Fig. 1B). 감소된  $\Delta Ct$ 을 통해 *M. leprae*의 장기 보관시에 freezing solution의 사용 유무는 *M. leprae* 생존에 도움을 줄 수 있는 것을 확인하였다.

냉장 보관하였을 때의 평균  $\Delta Ct$ 값인 1.03과 평균  $\Delta Ct$ 값의 차이는 0.19로 통계적으로는 유의한 차이를 보이지 않았다(4°C 1.03 vs -20°C 0.84, NS)(Fig. 2B). 하지만 이를 통해 Freezing solution에 *M. leprae*를 현탁하여 보관한다면 약 1년간 냉장보관 하여도 보관된 생균의 숫자를 크게 다르지 않음을 확인하였다. 특히 Fig. 1A의 결과와 대조하여 볼 때 *M. leprae*를 냉장 보관할 시 Freezing solution의 사용은 *M. leprae*의 생존을 유의하게 개선시킴을 확인할 수 있었다. 이번 실험의 raw data는 다음 표와 같다(Table 1).

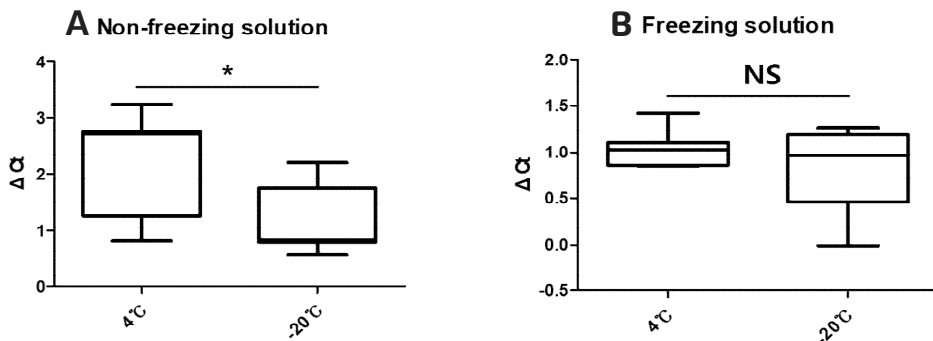


Fig. 2. Real-time PCR for differences in stored temperature

PMA-stained *M. leprae* was confirmed by real-time PCR of SYBR green method. A)  $\Delta Ct$  of refrigerated group (4°C, n=7) was significantly decreased in HBSS compare to frozen group (-20°C, n=7)(4°C 2.14 vs -20°C 1.14,  $*p<0.05$ ). B)  $\Delta Ct$  of refrigerated group (4°C, n=7) was decreased in freezing solution compare to frozen group (-20°C, n=7)(4°C 1.03 vs -20°C 0.84, NS). Samples were stored for 11 months in HBSS or freezing solution. (Mean  $\pm$  S.E.M;  $*p<0.05$ ; NS, Not significant; each data point is represented on graphs).

**Table 1. Results of real-time PCR for SYBR green method**

Response Variable	ΔCT						
Group Variables	TEP, MED						
Difference	(TEP=-20, MED=Freezing sol.) - (TEP=-20, MED=HBSS)						
Descriptive Statistics							
Variable	Count	Mean	Standard Deviation of Data	Standard Error of Mean	T*	95% LCL of Mean	95% UCL of Mean
TEP=-20, MED=HBSS	7	1.141429	0.5978414	0.2259628	2.4469	0.5885175	1.69434
TEP=-20, MED=Freezing sol.	7	0.8357143	0.4559919	0.1723487	2.4469	0.4139922	1.257436
Response Variable	ΔCT						
Group Variables	TEP, MED						
Difference	(TEP=4, MED=Freezing sol.) - (TEP=-20, MED=Freezing sol.)						
Descriptive Statistics							
Variable	Count	Mean	Standard Deviation of Data	Standard Error of Mean	T*	95% LCL of Mean	95% UCL of Mean
TEP=4, MED=Freezing sol.	7	1.027143	0.2023787	0.07649196	2.4469	0.8399737	1.214312
TEP=-20, MED=Freezing sol.	7	0.8357143	0.4559919	0.1723487	2.4469	0.4139922	1.257436
Response Variable	ΔCT						
Group Variables	TEP, MED						
Difference	(TEP=4, MED=HBSS) - (TEP=-20, MED=HBSS)						
Descriptive Statistics							
Variable	Count	Mean	Standard Deviation of Data	Standard Error of Mean	T*	95% LCL of Mean	95% UCL of Mean
TEP=4, MED=HBSS	7	2.137143	0.9413592	0.3558003	2.4469	1.266531	3.007755
TEP=-20, MED=HBSS	7	1.141429	0.5978414	0.2259628	2.4469	0.5885175	1.69434
Response Variable	ΔCT						
Group Variables	TEP, MED						
Difference	(TEP=4, MED=HBSS) - (TEP=4, MED=Freezing sol.)						
Descriptive Statistics							
Variable	Count	Mean	Standard Deviation of Data	Standard Error of Mean	T*	95% LCL of Mean	95% UCL of Mean
TEP=4, MED=HBSS	7	2.137143	0.9413592	0.3558003	2.4469	1.266531	3.007755
TEP=4, MED=Freezing sol.	7	1.027143	0.2023787	0.07649196	2.4469	0.8399737	1.214312

## 2. Probe를 이용한 real-time PCR

### 1) 배지에 따른 균의 보존 결과

우리는 PCR 방식에 따라 real-time PCR 결과 및 통계가 달라지는지 확인하기 위해서 SYBR green을 이용한 real-time PCR에 사용된 PMA 염색한 샘플과 그 대조군 샘플을 그대로 사용했다. HBSS 군과 freezing solution 군의 각 표본을 PMA 염색하여 DNA를 추출한 후 probe를 real-time PCR을 시행하였다. 냉장(4℃) 보관한 HBSS 샘플의 평균  $\Delta Ct$ 값은 -0.03이었고

### 2) 온도에 따른 균의 보존 결과

Probe를 이용한 real-time PCR에서도 온도에 따라 결과 및 통계가 달라지는지 확인했다. HBSS에 *M. leprae*를 냉장(4℃) 보관했을 때 평균  $\Delta Ct$ 값은 -0.03이었고 냉동(-20℃) 보관했던 샘플의 평균  $\Delta Ct$ 값은 0.41으로 관찰되었다(4℃ -0.03 vs -20℃ 0.41, NS)(Fig. 4A).

마찬가지로 *M. leprae*를 Freezing solution에

freezing solution에 보관하였던 샘플의 평균  $\Delta Ct$ 값은 0.31으로 관찰되었다(HBSS -0.03 vs Freezing sol. 0.31, NS)(Fig. 3A).

또한 냉동(-20℃) 보관했을 때에도 HBSS 샘플의 평균  $\Delta Ct$ 값은 0.41로 freezing solution 샘플의 평균  $\Delta Ct$ 값인 0.6보다 낮게 확인되었다. Freezing solution의 평균  $\Delta Ct$ 값보다 오히려 HBSS에 보관한 샘플의  $\Delta Ct$ 값의 편차가 적었다(HBSS 0.41 vs Freezing sol. 0.6, NS)(Fig. 3B).

냉장(4℃) 보관했을 때 평균  $\Delta Ct$ 값은 0.31이었고 냉동(-20℃) 보관했던 샘플의 평균  $\Delta Ct$ 값은 0.6으로 관찰되었다(4℃ 0.31 vs -20℃ 0.6, NS)(Fig. 4B). Probe를 이용한 real-time PCR 결과는 SYBR green을 사용한 실험과는 다르게 오히려 freezing solution 샘플들의  $\Delta Ct$ 값이 소폭 높았으며, 모두 통계적으로 유의하지 않았다. 이번 실험의 raw data는 다음 표과 같다(Table 2).

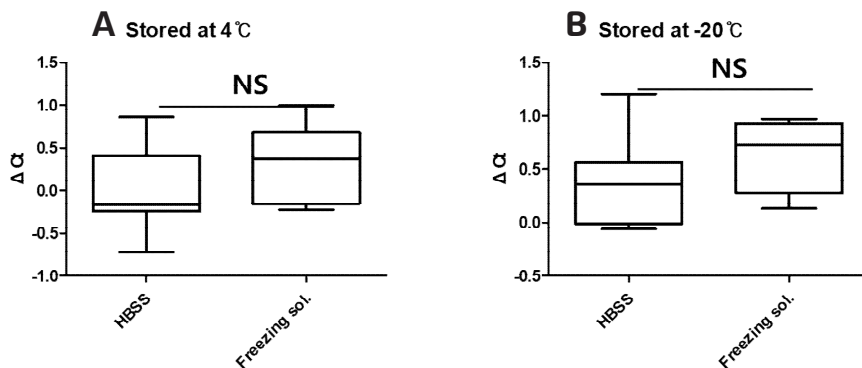


Fig. 3. Real-time PCR for differences in stored media

PMA-stained *M. leprae* was confirmed by real-time PCR of probe method. A)  $\Delta Ct$  of freezing solution group (Freezing sol., n=7) was increased at 4℃ compare to HBSS group (HBSS, n=7)(HBSS -0.03 vs Freezing sol. 0.31, NS). B)  $\Delta Ct$  of freezing solution group (Freezing sol., n=7) was increased at -20℃ compare to HBSS group (HBSS, n=7)(HBSS 0.41 vs Freezing sol. 0.6, NS). Samples were stored for 11 months in HBSS or freezing solution (Mean  $\pm$  S.E.M; NS, Not significant; each data point is represented on graphs).

## 고 찰

*Mycobacterium leprae*의 full genome이 밝혀진 현재에도, *M. leprae* 연구자들의 가장 큰 장벽은 배양이 불가능하다는 점이다. 제한적인 in vitro 환경이나 아르마딜로를 이용하여 *M. leprae*를 배양할 수 있지만, 아직까지는 mouse foot pad(MFP) model을 이용한 균 유지가 그나마 효과적인 실정이다<sup>5</sup>. *M. leprae*는 아직까지도 in vitro에서 자유자재로 배양하는 것이 불가능하기 때문에 MFP에 injection하여 4~6개월을 배양한 뒤에 마우스를 희생하여 균을 확보하는 것이 가장 나은 방법으로 알려져 있다<sup>3, 5</sup>. 그렇기 때문에 확보한 *M. leprae*의 데미지를 최소화하여 장기적으로 보관하는 것은 무엇보다 중요하다.

우리는 freezing solution에 장기간 보관했던 *M. leprae*가 HBSS에 보관했던 *M. leprae*보다 평균  $\Delta Ct$ 의 값이 확연하게 감소한 것을 확인했다(Fig. 1). 이것은 *M. leprae*가 HBSS보다 freezing solution에서 더 fresh하게 보관되었고, 장기간

보관에도 손상이 적었음을 시사한다. Trombone 에 따르면, 감염된 조직 직접 보관하는 것보다 *M. leprae*를 freezing solution에 현탁해서 동결 및 보관하는 것이 더 효율적이라고 한다<sup>11</sup>. 우리의 결과 또한 이전 연구와 같이 freezing solution에 장기간 보관했던 *M. leprae*의 상태가 좋았음을 증명했다. 이는 장기간 보관된 *M. leprae*의 pellet 상태에서도 육안으로 드러났다. Freezing solution에 보관했던 균에 비해 HBSS에 보관되었던 균 현탁액은 해동 후에 pellet이 제대로 응집되지 못하고 풀려있거나 배지의 변색이 관찰되었다(data not shown). 또한 freezing solution을 사용하거나 그렇지 못한 경우에도 1년 미만의 기간에서 균을 보관한다면 냉동 보관하는 것이 더 효율적인 것을 확인했다(Fig. 2). 현재로서는 살아있는 *M. leprae*만을 정확하게 구별해내기는 힘들다. 그럼에도 불구하고 PMA는 *M. leprae* 연구에서 생균의 정량검사에서 활용할 수 있는 가능성은 충분하다고 생각된다<sup>7, 9, 10, 12</sup>. PMA를 이용한 real-time PCR의 효율 및 신뢰도를 높이기

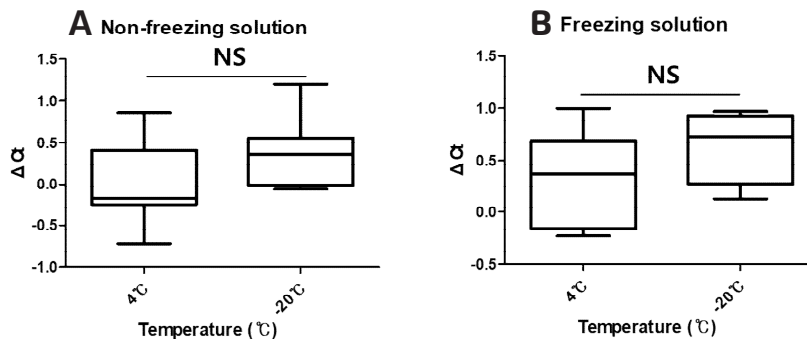


Fig. 4. Real-time PCR for differences in stored temperature

PMA-stained *M. leprae* was confirmed by real-time PCR of probe method. A)  $\Delta Ct$  of refrigerated group (4°C, n=7) was increased in HBSS compare to frozen group (-20°C, n=7)(4°C -0.03 vs -20°C 0.41, NS). B)  $\Delta Ct$  of refrigerated group (4°C, n=7) was increased in freezing solution compare to frozen group (-20°C, n=7)(4°C 0.31 vs -20°C 0.6, NS). Samples were stored for 11 months in HBSS or freezing solution. (Mean  $\pm$  S.E.M; \* $p$ <0.05; NS, Not significant; each data point is represented on graphs).



**Tables 2. Results of real-time PCR for probe method**

Response Variable  $\Delta CT$   
 Group Variables TEP, MED  
 Difference (TEP=-20, MED=Freezing sol.) - (TEP=-20, MED=HBSS)

**Descriptive Statistics**

Variable	Count	Mean	Standard Deviation of Data	Standard Error of Mean	T*	95% LCL of Mean	95% UCL of Mean
TEP=-20, MED=HBSS	7	0.4071428	0.4182788	0.1580945	2.4469	0.0202995	0.7939862
TEP=-20, MED=Freezing sol.	7	0.6042857	0.3479395	0.1315088	2.4469	0.2824953	0.9260761

Response Variable  $\Delta CT$   
 Group Variables TEP, MED  
 Difference (TEP=4, MED=Freezing sol.) - (TEP=-20, MED=Freezing sol.)

**Descriptive Statistics**

Variable	Count	Mean	Standard Deviation of Data	Standard Error of Mean	T*	95% LCL of Mean	95% UCL of Mean
TEP=4, MED=Freezing sol.	7	0.3071429	0.4445115	0.1680095	2.4469	-0.1039617	0.7182474
TEP=-20, MED=Freezing sol.	7	0.6042857	0.3479395	0.1315088	2.4469	0.2824953	0.9260761

Response Variable  $\Delta CT$   
 Group Variables TEP, MED  
 Difference (TEP=4, MED=HBSS) - (TEP=-20, MED=HBSS)

**Descriptive Statistics**

Variable	Count	Mean	Standard Deviation of Data	Standard Error of Mean	T*	95% LCL of Mean	95% UCL of Mean
TEP=4, MED=HBSS	7	-0.02571429	0.5107138	0.1930317	2.4469	-0.4980458	0.4466172
TEP=-20, MED=HBSS	7	0.4071428	0.4182788	0.1580945	2.4469	0.0202995	0.7939862

Response Variable  $\Delta CT$   
 Group Variables TEP, MED  
 Difference (TEP=4, MED=HBSS) - (TEP=4, MED=Freezing sol.)

**Descriptive Statistics**

Variable	Count	Mean	Standard Deviation of Data	Standard Error of Mean	T*	95% LCL of Mean	95% UCL of Mean
TEP=4, MED=HBSS	7	-0.02571429	0.5107138	0.1930317	2.4469	-0.4980458	0.4466172
TEP=4, MED=Freezing sol.	7	0.3071429	0.4445115	0.1680095	2.4469	-0.1039617	0.7182474



위해서는 이번 연구에 사용했던 probe법의 PCR의 근본적인 troubleshooting이 필요하다(Fig. 5). 죽은 균의 DNA가 남아있다가 같이 PCR이 되어 생균과 사균을 정확히 구분할 수 없다는 연구가 있었으나<sup>7, 10</sup>, 우리의 결과는 이와 상반되게 확실한 차이가 있었고 이전보다 PCR 기술이 발달하였기 때문에 충분히 극복이 가능하다고 생각된다(Fig. 1A, 2A). Freezing solution이나 균의 냉동 보관상태에서 오히려 DNA 증폭이 잘 되지 않은 원인을 찾는다면(Fig. 3, 4), PMA-PCR의 신뢰성을 더 높여 정확한 생균의 수를 정량 할 수 있을 것으로 기대된다. *M. leprae*와 비슷한 *Mycobacterium tuberculosis*(결핵균)도 PMA를 이용한 정량방법이 활발히 연구되고 있다<sup>13</sup>.

다른 균에 비해 연구속도가 더디지만, *M. leprae*를 마우스 유래의 단핵구, 대식세포, 상피세포 그리고 슈반세포 등에 감염시켜 관찰한 in vitro 연구 결과들도 점차 발표되고 있다<sup>2, 14-17</sup>. 우리의 연구 결과는 동물세포에서의 객관적인 균 정량에도

많은 도움을 줄 수 있을 것이라고 생각된다. in vitro 연구들은 *M. leprae*와 비슷한 결핵균 연구를 참고하여도 많은 도움이 될 것이라고 생각한다<sup>18</sup>.

## 결론

본 연구에서는 *M. leprae*의 상태를 더 나은 방법으로 보관할 수 있는 조건을 분자생물학 실험을 통해 확인했다. 기존의 *M. leprae*의 정량방법인 AFB staining보다 PMA staining 및 real-time PCR은 실험 수행이 더 간편하고 정량에 있어서도 객관적인 신뢰성이 높다. 장기적으로 배양할 수 있는 *M. leprae*의 질과 양이 늘어난다면, *M. leprae*의 in vitro 배양방법 확립에 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

## ORCID

Jin-Ho Park, 0000-0002-2613-7246

Yun-Ji Kim, 0000-0002-0003-8880

Jong-Pill Kim, 0000-0003-0421-6389

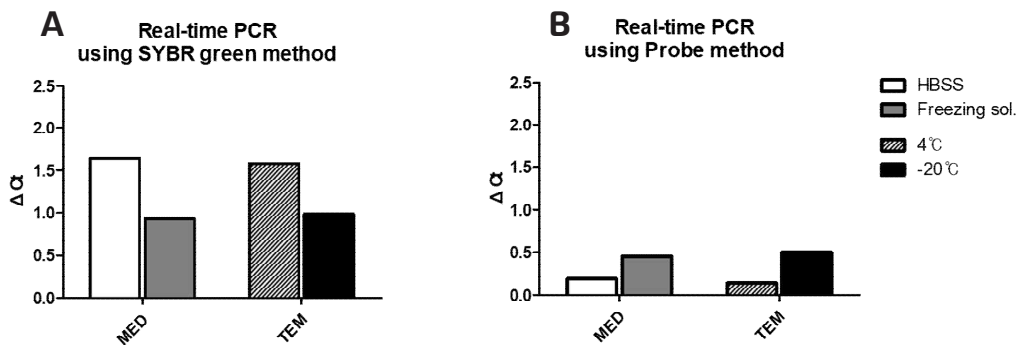


Fig. 5. Summary in this experiment

PMA-stained *M. leprae* was confirmed by real-time PCR. The results of experiments using real-time PCR of SYBR green showed increase  $\Delta C_t$  deviation compare to real-time PCR of probe method. However, Contrary to SYBR green method, probe method results are unreliable because group of each observed  $\Delta C_t$ .

## 참고문헌

1. McMurray DN. *Mycobacteria and nocardia*. Medical Microbiology 4th edition: University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996
2. Hess S, Rambukkana AJMs. Cell biology of intracellular adaptation of *ycobacterium leprae* in the peripheral nervous system. 2019;7(4)
3. Martinez AN, Lahiri R, Pittman TL, Scollard D, Truman R, Moraes MO, et al. Molecular determination of *ycobacterium leprae* viability by use of real-time PCR. 2009;47(7):2124-2130
4. Lahiri R, Randhawa B, Krahenbuhl JJJomm. Application of a viability-staining method for *Mycobacterium leprae* derived from the athymic (nu/nu) mouse foot pad. 2005;54(3):235-242
5. Levy L, Ji BJLr. The mouse foot-pad technique for cultivation of *Mycobacterium leprae*. 2006;77(1):5
6. Yan W, Xing Y, Yuan LC, De Yang R, Tan FY, Zhang Y, et al. Application of RLEP real-time PCR for detection of M. leprae DNA in paraffin-embedded skin biopsy specimens for diagnosis of paucibacillary leprosy. 2014;90(3):524-529
7. JP K, YS K, CW K. Evaluation of Propidium Monoazide Real-Time PCR for Viability of *Mycobacterium leprae*. The Society of Korean Leprologists. 2016;49(1):13-22
8. SY K. Selective detection of viable enterococcus faecalis using propidium monoazide in combination with real-time PCR. Restorative Dentistry and Endodontics 2008;33(6):537-544
9. Nocker A, Sossa-Fernandez P, Burr MD, Camper AKJAEM. Use of propidium monoazide for live/dead distinction in microbial ecology. 2007;73(16):5111-5117
10. Fittipaldi M, Nocker A, Codony FJJomm. Progress in understanding preferential detection of live cells using viability dyes in combination with DNA amplification. 2012;91(2):276-289
11. Trombone AP, Pedrini SC, Diorio SM, Belone Ade F, Fachin LR, do Nascimento DC, et al. Optimized protocols for *Mycobacterium leprae* strain management: frozen stock preservation and maintenance in athymic nude mice. Journal of visualized experiments : JoVE. 2014 Mar 23(85). doi: 10.3791/50620. PubMed PMID: 24686247; PubMed Central PMCID: PMC4155980
12. Nocker A, Sossa KE, Camper AKJJomm. Molecular monitoring of disinfection efficacy using propidium monoazide in combination with quantitative PCR. 2007;70(2):252-260
13. Ditommaso S, Giacomuzzi M, Memoli G, Cavallo R, Curtioni A, Avolio M, et al. Reduction of turnaround time for non-tuberculous mycobacteria detection in heater-cooler units by propidium monoazide-real-time polymerase chain reaction. In press 2019
14. Batista-Silva L, Rodrigues LS, de Carvalho Vivarini A, Costa FdMR, De Mattos KA, Costa MRSN, et al. *Mycobacterium leprae*-induced Insulin-like Growth Factor I attenuates antimicrobial mechanisms, promoting bacterial survival in macrophages. 2016;6:27632
15. Silva CA, Danelishvili L, McNamara M, Berredo-Pinho M, Bildfell R, Biet F, et al. Interaction of *Mycobacterium leprae* with human airway epithelial cells: adherence, entry, survival, and identification of potential adhesins by surface proteome analysis. 2013;81(7):2645-2659
16. Tanigawa K, Suzuki K, Nakamura K, Akama T, Kawashima A, Wu H, et al. Expression of adipose differentiation-related protein (ADRP) and perilipin in macrophages infected with *Mycobacterium leprae*. 2008;289(1):72-79
17. Fukutomi Y, Matsuoka M, Minagawa F, Toratani S, McCormick G, Krahenbuhl JJljol, et al. IL-10 treatment of macrophages bolsters intracellular survival of *Mycobacterium leprae*. 2004;72:16-26
18. Kim YJ, Lee SM, Park BK, Kim SS, Yi J, Kim HH, et al. Evaluation of propidium monoazide real-time PCR for early detection of viable *Mycobacterium tuberculosis* in clinical respiratory specimens. 2014;34(3):203-209