

세포배양시 contamination 예방법

Contamination(이하, 오염)이란 배양 세포 이외의 생물(주로 곰팡이, 효모, bacteria)이 혼입되어 생육하는 상태를 말하며, 세포배양시 흔히 일어나는 문제이므로, 다음과 같은 마음가짐이 중요하다.

- ① “반드시 일어날 수 있는 것이다” 라는 태도를 가진다.
“오염은 수치스런 것 이라고 생각하여 절대 일어나서는 안돼” 라고 생각하면 모르는 사이 오염되는 경우가 있다.
- ② 오염의 발생률은 주의하면 충분히 최소화할 수 있다.

본 고에서는 중요한 오염의 원인과 그 방지법에 대하여 설명하고 “오염은 반드시 일어난다” 라는 것을 인식하여, 오염되었을 경우 오염을 제거하는 방법에 대하여 설명한다.

■ 오염의 주원인과 방지법

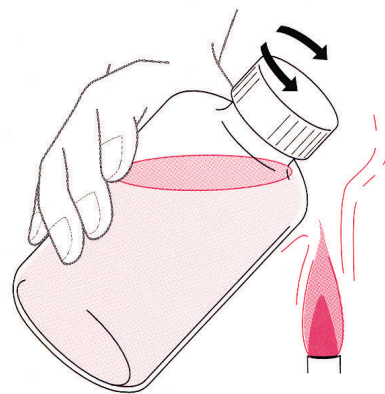
오염의 원인은 상당히 많으나, 본 고에서는 흔히 일어나는 주된 오염원인에 대해서 서술하고자 한다.

【원인 1】 37℃ water bath의 물

의외라고 생각할지도 모르겠지만 가장 빈번히 오염이 일어나는 곳이다. 일상적으로 37℃ water bath는 배지나 trypsin 용액을 따뜻하게 하거나, glutamin 용액, 혈청, 동결 세포, 그 외 동결 시약을 녹이기 위해 사용하지만 개방된 채로 방치되어 있어 water bath에 노출된 medium의 표면은 미생물로 오염되어있다. Ampicillin이 들어있지 않은 LB plate에 water bath 물을 spread하여 37℃에서 하루 밤 배양하면 오염정도를 알 수 있다.

【방지책】

- ① 병의 표면을 paper towel 등으로 잘 닦은 후 70% EtOH로 닦거나 분무기로 뿌린다.
- ② 병뚜껑을 열기 전, 그림처럼 뚜껑 주변 뿐 아니라 병의 윗부분도 화염 멸균한다.



* 1 Ethanol을 충분히 뿌려, 말린 후 화염멸균(Column: 70% EtOH로 균의 제거)

【원인 2】 손의 오염

손은 의외로 오염되기 쉽다. Ampicillin이 들어있지 않은 LB plate에 손바닥을 담근 후 37℃에서 하루밤 방치 해보면 손의 오염정도를 알 수 있다. 의외로 범하기 쉬운 실수인데 한번 깨끗하게 닦은 손으로 clean bench 밖의 물건을 만지거나 손이 오염되어 있음에도 불구하고 그대로 clean bench 내의 조작을 하는 경우가 있다. 배양실 내의 물건은 비교적 청결하지만 항온 수조의 물 등은 상당히 오염되어 있으므로 주의해야한다.

【방지책】

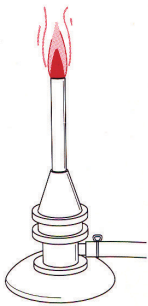
- ① 실험하기 전 반드시 손을 닦을 것.
- ② 자신이 없는 사람은 전날 반드시 목욕을 할 것. 몸을 청결히 하는 것을 말한다*1.
- ③ Clean bench내에서 실험 하기 전에 70% EtOH로 손을 잘 닦을 것.
- ④ Clean bench 밖의 오염된 물건을 clean bench 내로 유입할 경우 실험하기 전에 반드시 70% EtOH로 손을 닦는다.



* 1 심리적인 효과가 크다.

» 컬럼: 70% EtOH로 세균 제거 «

매우 신중한 학생이 clean bench 내에서 실험하기 앞서 손뿐만 아니라 팔까지 70% EtOH로 닦았다. 덕분에 오염이 없었을 뿐만 아니라 의외의 효과를 얻었다.



첫번째 잘 닦는 것이 중요하지만 팔까지 EtOH로 닦아 burner의 불에 순식간에 털이 타버렸다(털이 많은 경우는 좋다).

두번째 알코올을 많이 먹지 않았는데도, 이처럼 다량의 70% EtOH로 세균을 하여 붉은 얼굴로 실험하는 경우가 있었다(덕분에 지도교수로부터 “술이 취해서 실험을 하느냐”라는 의구심을 받았다).

교훈: 70% EtOH은 숨에 잘 적셔서 사용하며 EtOH이 충분히 날라간 후에 실험을 실시할것.

【원인 3】 실험 중 외부에서 반입되는 기구

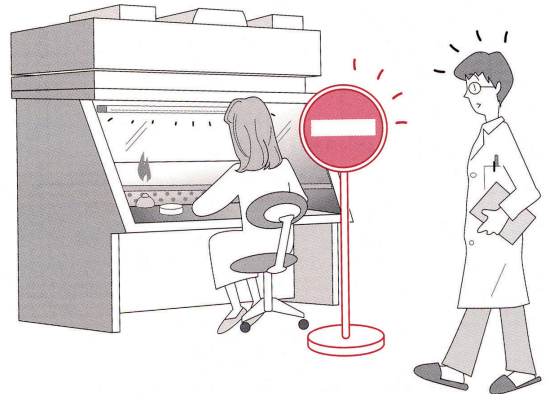
Clean bench 내에서 실험하고 있는 도중에 dish가 부족한 경우가 있는데, 실험 중에는 기구를 반입해서는 안 된다.

【방지책】

- ① 실험하기 전 필요한 물품을 미리 준비 한다. 특히 멸균 캔의 내용물을 확인한다. 멸균 캔이 clean bench 내에 있어도 빈 캔이면 소용없다.
- ② 부족한 것이 있으면 보충하고, 20분이상 충분히 UV하에서 멸균한다.

【원인 4】 Clean bench 뒤를 사람이 오고 다닐 때 일어나는 바람

“이것이 무엇인가?” 라고 물어보는 사람도 많을 것이다. Clean bench에서 실험하고 있는 사람의 뒤를 사람이 통행할 때 발생하는 바람은 사람 자체 또는 다른 유래의 미생물 오염이 일어날 수 있다. 특히 clean bench의 prefilter가 장착되어 풍량이 작아지는 경우는 오염 가능성이 훨씬 높다. Cooler나 heater의 바람도 위험하다.



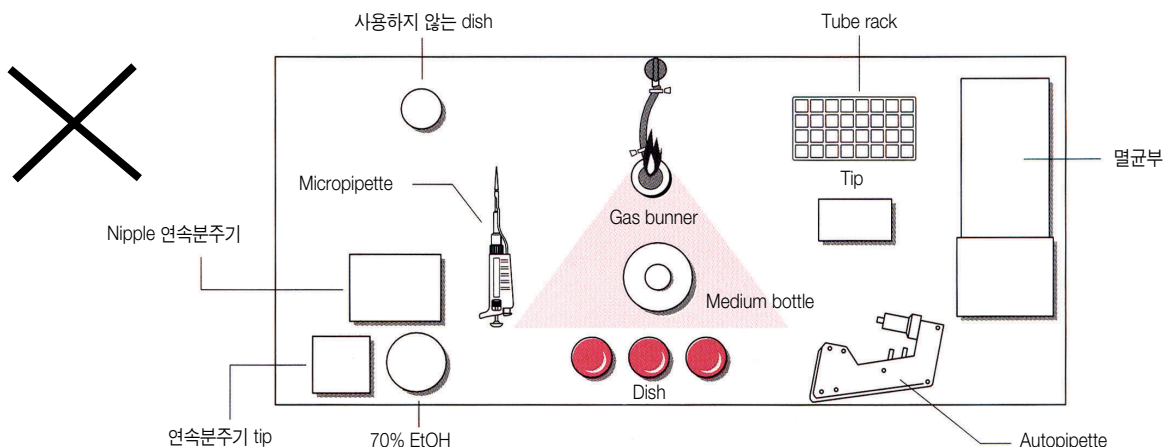
【방지책】

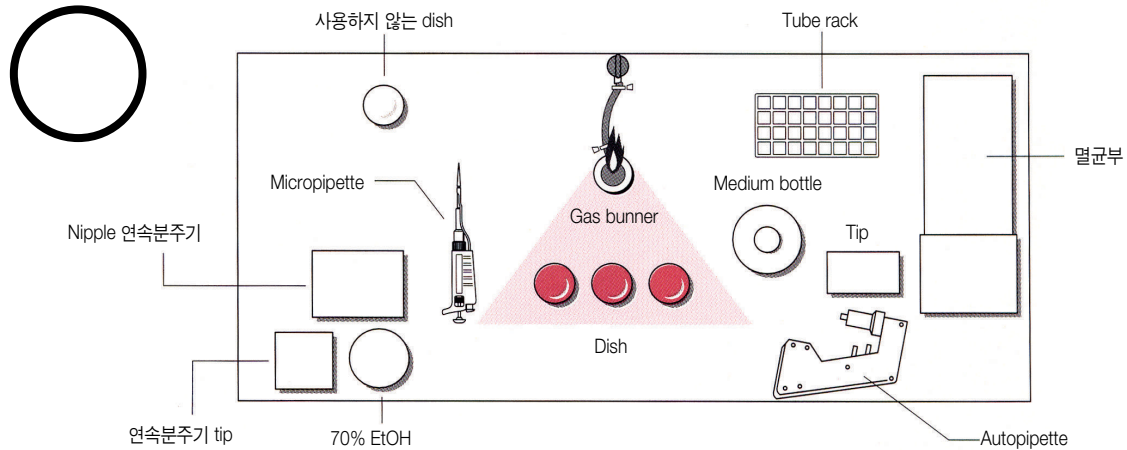
- ① 실험하는 사람의 뒤는 통행하지 않도록 주의한다.
- ② 어쩔수 없이 통행해야 하는 경우, 통행하기 앞서 미리 알리고 실험을 일단 중단한 후 후드를 내리고 clean bench 내로 바람이 들어가지 않도록 한 후 통행한다.
- ③ Clean bench를 설치할 때 cooler나 heater의 바람이 직접 닿지 않는 장소를 선택하며, 가능하면 clean bench에서 실험할때 cooler나 heater 사용을 중지하는 것이 좋다.

【원인 5】 Clean bench내의 기구배치

Clean bench내에서 실험을 편하게 하기 위해서는 실험 전 적절한 기구배치가 필요하다. 예를 들면 아래 그림의 배치는 dish위에 medium 병이 있어 손이 dish 위를 통과할 수 밖에 없어, medium 병이 오염되어 있으면 오염이 바람에 따라 dish로 이동할 수 있다. 또 dish가 clean bench 끝에 치우쳐 있으면 외부 오염의 위험성이 높다.

Clean bench의 대부분은 위에서 아래로, 안쪽에서 바깥쪽으로 바람이 불어오므로, 이 배치는 오염의 원인에 대하여 “어서오세요. dish로 들어오세요.” 라고 말하는 것과 같다.





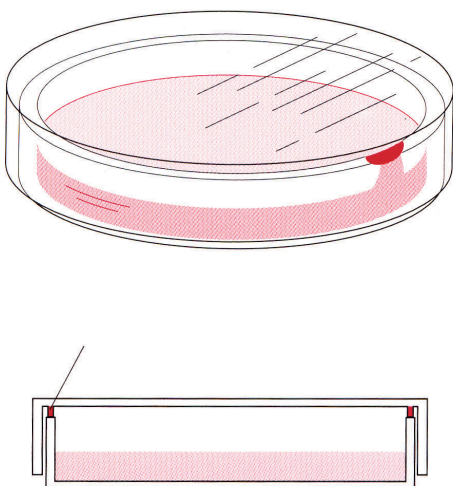
【방지책】

위 그림처럼 자신과 물건의 동선이 겹치지 않도록 한다.
특히 dish의 위쪽에는 gas burner 이 외에는 아무 것도 두지 않는 것이 좋다. 이처럼 실험하기 쉬운 배치로 두면 dish의 뚜껑이 열린 시간을 줄일 수 있어 오염 발생율을 저하시킬 수 있다.

【원인 6】 배지가 묻은 dish의 뚜껑

- ① 배지의 교반, 첨가를 거칠게 하여, 배지가 뚜껑에 묻어 버렸다.
- ② 배지의 교반, 첨가 시 거품이 생겨 뚜껑에 묻어 버렸다.
- ③ 배지가 넘쳐 뚜껑에 묻어 버렸다.

아래 그림은 dish의 안과 밖이 배지를 사이에 두고 통과해 버리므로 밖에 서 미생물 침입하기 쉬워진다 *1.

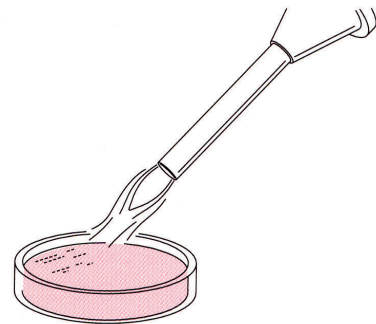


* 1 본래 세포배양용 dish는 뚜껑에 볼록 튀어 나온 곳이 있어, 완전하게는 닫히지 않고 뜯은 상태가 되어 공기가 통하게 되어 있다.

【방지책】

- ① 배지가 dish 뚜껑에 붙지 않도록 주의 깊게 조작한다.
- ② 배지에 거품이 생기면, 뚜껑을 닫기 전에 오른쪽 그림과 같이 burner로 화염하여 제거한다. 만일 dish의 뚜껑이 젖어 dish의 안과 밖이 배지를

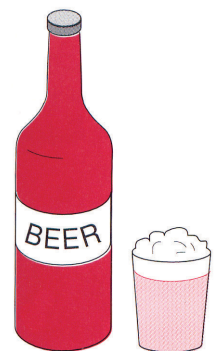
사이에 두고 통과하고 있으면, 잘 말린 70% EtOH 솜으로 닦아내고 burner로 가볍게 말린다.



* 2 화염은 단시간 사용한다.

》컬럼: 맥주의 유혹《

효모를 여과처리하지 않은 맥주(Weizen 맥주 등)가 있는데, 맛있기는 하지만 이 맥주를 먹은 당일에서 다음날까지는 세포 배양을 하지 않는 것이 좋다. 간혹 맥주를 먹고 효모로 오염시킨 사람들이 많이 있으며, 오염의 큰 원인 중의 하나이므로 주의해야 한다.
가끔 효모를 연구하는 친구들과 술을 마신 후에는 웬지 효모가 오염이 된 듯한 기분이 들기도 한다.



【원인 7】 CO₂ incubator 내의 오염

CO₂ incubator 안은 항상 청결하게 유지해야 한다. 특히 CO₂ incubator 안의 습도 유지를 위하여 넣는 물은 곰팡이, 효소, 박테리아, 그 밖의 다른 것에 의해 오염되기 쉬우므로 주의한다.

【방지책】

- ① CO₂ incubator의 안쪽을 3~4개월에 한 번은 70% EtOH 솜으로 잘 닦아내어 세균번식을 억제한다.
- ② 습도 유지를 위하여 넣는 물은 autoclave한 탈이온수를 사용하고, 곰팡이

- 이 제거제로 p-Hydroxybenzoic acid methyl ester를 첨가한다.
- CO₂ incubator에 새로운 tray를 넣을 때는 70% EtOH 솜으로 잘 닦는다.
 - ①~③과 같은 주의를 해도, 한 번 곰팡이로 오염되면 포자가 형성되므로, 아무리 오염을 제거해도 오염이 지속된다. 이런 경우
 - 세포 배양을 dish에서 flask로 바꾼다.
 - 70% EtOH로 잘 닦은 CO₂ incubator 내에 UV 램프를 넣어, CO₂ incubator의 문을 닫고 1~2시간정도 둔다.

여러 가지 방법이 있지만 무엇보다도 CO₂ incubator 안의 청결 유지를 위한 끊임없는 노력이 필요하다.

■ 오염된 경우 처리법

오염을 발견하였을 경우 당황하지 말고 빨리 autoclave하고 오염된 것을 모두 버리는 것이 가장 좋다. 용액 등이 오염되었을 경우 절대 뚜껑을 열지 말고 병째 (2) 오염된 배지 · 세포의 처리 조작을 한다.

(1) 오염된 세포를 처리하기 전에

오염을 발견한 경우에는,

- 절대로 뚜껑을 열지 말 것.
- 빨리 autoclave하여 버릴 것.
- 같은 방을 사용하고 있는 사람에게 오염을 알릴 것.

이중 ③을 가장 확실히 해야한다. 오염되어 부끄럽다, 혹은 서투르다는 소리를 들을지 몰라 숨기려고 해서는 안 된다. 확률은 낮지만 본인의 잘못보다는 다른 원인일 경우에, 빨리 연구실 전체에서 오염원인을 해결하기 위함이다. 결국 오염은 부끄러운 것이 아니라 오염된 것을 숨기려는 것이 더 부끄러운 것이다. 즉, 오염은 누구에게라도 일어날 수 있는 것이다.

오염 처리에 있어 중요한 것은 “다른 곳에 오염을 확장시키지 않는다.”는 것이다. 그러나 오염되어 자라고 있는 생물은 kanamycin 등의 항생물질로 억제할 수 없으므로 전멸시킨다는 생각으로 주의해야하며, 특히 포자를 형성하는 것은 오염된 dish의 뚜껑을 절대로 열어서는 안 된다. 왜냐하면, 포자는 주위로 날라가기 쉽고, 포자 형태는 UV 내성으로 되어 있기 때문이다.

24 well, 96 well plate의 중 하나의 well이라도 오염되면 버려야 하지만, 다른 것을 버릴 수 없는 경우에는 우선 오염된 well에 1N NaOH를 몇 방울 살짝 첨가한다. 단, 위험하므로 가능한 한 빨리 다른 well을 다른 plate로 옮겨 오염된 plate를 autoclave bag에 넣어 autoclave한 후 버려야 하며, 초보자는 오염된 세포를 과감하게 단념하는 것이 중요하다.

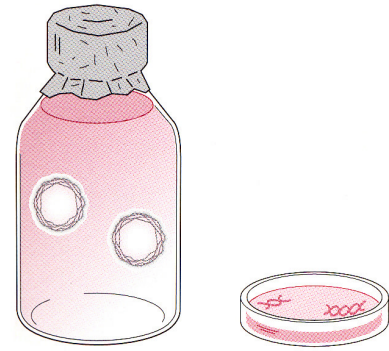
(2) 오염된 배지 · 세포의 처리

【준비】

Autoclave

【방법】

- 배지의 상태가 평상시와 다르다*1.
 - 배지의 색이 평상시와 달리 황색 또는 적색으로 되어 있다.
 - 배지의 탁함이 심하다.
 - 배지에 큰 이물질이 떠 있다.

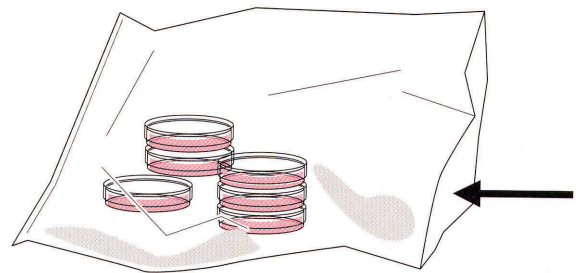


- Dish의 경우에는 현미경으로 관찰한다*2.

Medium bottle의 경우에는 뚜껑을 열지 않고 실온에서 2~3일 방치하여, 탁함이 증가하는지 조사한다. 탁함이 증가하면 5) 이후의 처리를 한다.

- 익숙한 사람이 있을 때는 그 사람에게 처리 방법을 묻는다.

- 조언을 구할 수 없을 경우는 뚜껑을 열지 말고 autoclave bag에 넣어*3, 즉시 bag의 입구를 막는다.



- Autoclave 후, 버린다*4.

- 같은 CO₂ incubator를 사용하고 있는 사람이 있다면, 오염된 것을 전한다*5.

- *1 원핵 미생물이 혼입된 경우에는 배지가 황색으로 되는 경우가 많다. 효모가 혼입된 경우에는 배지가 빨강색 되거나 황색으로 된다. ③과 같이 대형의 이물질이 떠 있는 경우에는, 대개 곰팡이다. 이 이물질은 수면에 떠 있는 경우와 수중에 녹조류처럼 떠 있는 경우가 있지만, 수면에 떠 있는 것은 포자를 형성하고 있는 것이 많아 포자가 흩날리는 것을 방지하기 위하여 절대 뚜껑을 열어서는 안 된다.
- *2 혼입한 것을 확인한다. 오염이라고 생각한 것이 실제로는 혈청 침전물이거나, 단순한 조직인 경우가 많다.
- *3 Autoclave bag에 넣을 때 뚜껑이 열리지 않도록 주의한다. 오염된 것을 넣은 후 바로 autoclave bag의 입구를 닫으면 일단 안심이다.
- *4 Autoclave 후에는 곧 쓰레기로 버린다. 방치한 채로 두면 바로 미생물이 또 생긴다.
- *5 개인적인 원인이 아닌 경우도 있으므로, 주위 사람들에게 주의를 주어야 한다. 나중에는 주위의 사람들이 판단한다.