

내분비교란물질(Alachlor)의 검출을 위한 광간섭 바이오센서의 개발

김춘일, 류천수, 이종민, 김병우

성균관대학교 화학공학과, 환경공학연구소

전화 (031) 290-7256, FAX (031) 290-7272

서론

산업 발전과 함께 면역기능을 약화시키고 imposex 현상을 일으키는 내분비 교란물질들이 커다란 환경문제로 대두되었다. 살충제 혹은 제초제로 잘 알려진 alachlor는 내분비 교란물질의 하나로 보고되고 있다 (1, 2).

본 실험에서 사용된 유전자 재조합 균주 *E. coli* ACV1003는 외부오염물질에 대한 DNA damage 발생시 대응효소로서 β -galactosidase를 분비하며, 이 β -galactosidase의 생성량을 분석함으로써 환경호르몬으로 널리 알려진 물질들을 정량적으로 검출하고자 한다.

본 실험에서는 기존의 생물학적 분석법과 porous silicon wafer 표면 위의 광간섭 효과를 이용한 분석법을 비교 분석하였다.

이론

대부분의 bacteria에는 외부로부터의 열충격, DNA damage, 중금속 등의 충격이 가해져도 특정 유전자적 시스템에 의해 새로운 환경에 적응하며 살아갈 수가 있다. 특히 DNA damage가 있을 경우 SOS 레귤론 시스템이란 반응 시스템에 의해 복구되어 살아가게 된다. 이 SOS 레귤론 시스템에서 있어서 LexA protein은 SOS 반응을 억제하는 억제자로서의 역할을 수행하는데 DNA damage나 복제저해가 일어나면 RecA와 같은 protease가 형성되어 SOS 반응의 억제자인 LexA protein을 분해한다. 이런과정에서 SOS 반응에 의한 product가 생성되게 된다. 그리고 외부로부터의 충격이 복구되면 RecA protein의 활성이 떨어지고 LexA protein이 다시 축적되어 SOS gene이 다시 억제된다(3, 4).

생성된 β -galactosidase는 고전적인 enzyme assay 방식으로 정량할 수 있으나, 이를 위해 cell harvest 및 여러 단계의 추출과정등으로 시간이 소요되는 단점이 있다. 본 연구에서는 이를 상대적으로 신속히 측정할 수 있는 광간섭 biosensor를 적용코자 한다. 이 biosensor는 Si-wafer를 식각해 다공성(pore 크기: 25~100nm)으로 만들고 다공성 표면상 부착되는 β -galactosidase의 농도에 따라 광간섭이 일어나는 현상을 이용한다. 여기에서 pore는 ethanolic HF solution의 농도, etching 시간, 또

는 전류의 량에 따라서 그 size의 조절이 가능하다(5).

실험

1) Miller's enzyme assay

균주의 배양은 30°C에서 ampicillin(Sigma Co.)이 10 µl/ml 첨가된 LB 배지에 agar를 첨가한 고형배지에서 배양하였다. 그리고 TBT의 농도별 비교 실험은 2ml의 ampicillin이 첨가된 LB배지에서 10 h 정도 배양한 후 다시 LB배지에 균을 접종하여 shaking incubator에서 200 rpm으로 OD가 0.2~0.3 정도 될 때까지 배양하고 TBT를 첨가하여 30분마다 sample을 채취하여 실험하였다.

β-galactosidase의 enzyme assay는 Miller(4)의 방법에 의해 실행되었는데 β-galactosidase의 활성은 다음의 식으로 계산되었다.

$$\beta - galactosidase = \frac{1000(OD_{420} - 1.75OD_{550})}{t \times V \times OD_{600}}$$

t = reaction time(min)

V = reaction volume(ml)

2) 페브리 페릿 간섭줄무늬(Fabry-Perot reflection fringe)의 측정

실험에 사용된 p-type(boron-doped, 100) Si wafer는 식각에 앞서 ohmic contact 형성을 위해 wafer 뒷면에 aluminum을 피복시킨다 (2). 만들어진 wafer는 teflon 재질의 식각기 내부에서 HF/ethanol 혼합용액으로 일정시간동안 양극식각하였다. 식각이 진행되는 동안 pore의 깊이를 고르게 하기위해 UV light (254 nm)를 조사하였다. β-galactosidase (Sigma Aldrich, Grade VI, 5,000 units)를 다양한 농도로 희석시킨 sample을 Si layer 표면에 30분간 방치 후 질소를 불어넣어 건조하였으며 CCD detector (S2000, Ocean Optics, Inc., Dunedin, Florida, U.S.A.)를 사용하여 광간섭효과를 관찰하였다.

각 sample의 측정이 끝나면 증류수와 ethanol을 사용하여 잔류효소를 최대한 제거하였고 probe의 광원을 제외한 광침투를 방지하기 위하여 암상자에서 실험을 진행하였다.

결과

1) 광간섭 바이오센서에 이용할 porous Si wafer를 위의 실험 조건에서 etching 한 결과 실험에 적합한 pore size를 조절할 수 있음을 알 수 있었다.

2) 저농도 β-galactosidase activity의 검출을 위해서는 광간섭을 이용한 biosensing method를 이용할 수 있다. β-galactosidase의 농도에 따라 effective

optical thickness의 변화량은 sigmoid type으로 증가한다(Fig. 1).

3) *E. coli* ACV1003이 alachlor의 영향으로 분비한 β -galactosidase의 양이 시간에 따라 증가함을 enzyme assay를 통하여 확인할 수 있다.

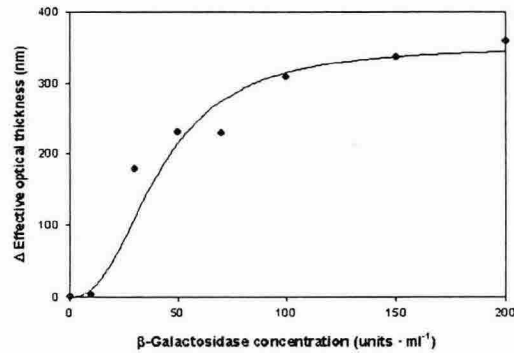


Fig. 1. Change of Δ effective optical thickness

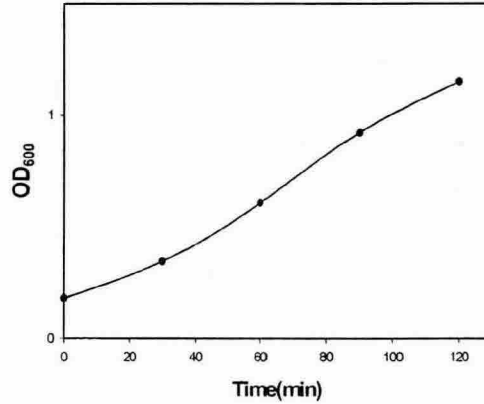


Fig. 2. Growth curve of *E. coli* ACV1003 at 30°C

참고문헌

1. Bryan GW, Gibbs PE (1991) Impact of low concentrations of tributyltin on marine organisms, In: Newman MC, McIntosh AW eds. *Metal Ecotoxicology: Concepts and Applications*. Lewis Pub. Inc, Michigan, USA

2. Jobling S, Nolan M, Tyler CR, Brighty G, Sumpter JP (1998) Widespread sexual disruption in wild fish. *Environ. Sci. Technol.* 32: 2498-2506
3. Heitman J, Model P (1991) SOS induction as an in vivo assay of enzyme-DNA interactions. *Gene* 103: 1-9
4. Vollmer AC, Belkin S, Smulski DR, Van Dyk TK, LaRossa, RA (1997) Detection of DNA damage by use of *E. coli* carrying *recA::lux*, *uvrA::lux*, or *alkA::lux* reporter plasmids. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2566-2571
5. Hérlion, R. Properties of porous silicon; Datareview Ser. No. 18; Canham: London, 1997; pp 89-96
6. Andreade Janshoff, Keiki-pua S. Dancil, Macroproous p-type silicon Fabry-perot Layer Fabrication, Characterization, and Applications in Biosensing, *J. Am. Chm. Soc.* 1998, 120, 12108-12116
7. Miller JH (1972) *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N. Y.
8. Walker GC (1984) Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *E. coli*. *Microbiol. Rev.* 48: 60-93