

독성물질 검출을 위한 Plasmid Vector 개발

최연주 · 유진삼 · 하진목 · 백형석*
부산대학교 자연과학대학 미생물학과

Development of Plasmid Vector for Detection of Mutagen. Yeon Joo Choi, Jin Sam You, Jin Mok Ha and Hyung Suk Baik*. Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea—After DNA damage, *umuDC* is the only SOS operon that must be induced to promote SOS mutagenesis in *Escherichia coli*. The recombinant plasmid pBC401 and pBC402 were constructed to fuse the *lac* structural genes with promoter region of *umuDC* operon to induce the expression of *lacZ* gene by DNA damage. We transformed the plasmid pBC401 and pBC402 into *E. coli* MC1061, *lacZ* deleted strain and determined the activity of β -galactosidase for various mutagen; UV, mitomycin C (MMC), N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG), 4-nitroquinoline-1-oxide (NQO), ethyl methanesulfonate (EMS). The β -galactosidase activities of pBC401 and pBC402 for UV, MMC, and NQO were increased in proportion to expression time until 3 hours thereafter, the activities were constant or slightly decreased. The activities for MNNG and EMS were not so high as for UV, MMC, and NQO. When MNNG and EMS were treated, β -galactosidase activity of pBC402 was slightly lower than pBC401 but when UV, MMC, and NQO were treated in pBC402, β -galactosidase activity was slightly higher than in pBC401. Therefore, the pBC402 was better than the pBC401 in terms of sensitivity for frameshift mutagen. We suggest that the plasmid pBC401 and pBC402 are easy to detect mutagens which cause frameshift mutation rather than point mutation.

*Escherichia coli*에 있어서 SOS 돌연변이유발과정(SOS mutagenesis)은 DNA가 손상된 이후에 SOS 유전자인 *umuDC* operon의 발현이 유도됨으로써 진행된다(1, 2, 3, 4). *umuDC* operon의 발현은 *recA*와 *lexA*의 유전자산물에 의해 조절되며, 발현시 DNA의 손상을 복구하고 UV나 다른 화학물질에 대한 저항성을 증가시키는 DNA 복구기능을 활성화시킨다(5). LexA 단백질은 억제자(repressor)로서, SOS 유전자의 상부(upstream)에 해당하는 "SOS boxes"에 결합하여 평상시에 SOS 유전자가 무작위로 전사되고 발현되는 것을 저해한다(6). DNA가 손상되면, SOS 신호가 발생되고, 이에 따라 LexA 억제자가 절단되어 불활성화된다. 이런 LexA의 절단에 RecA 단백질이 보조단백질분해효소(coprotease)로 작용한다. 정상상태에서는 세포 하나당 약 180 분자의 UmuD가 감지되는데(7), 이렇게 낮은 기저농도로 발현되던 UmuDC가 DNA 손상 이후에 RecA를 활성화시킨다(8, 9). 활성화된 RecA는 LexA의 Ala-Gly결합을 절단함으로써 *umuDC* 유전자 및 다른 SOS계에 의해 조절되는 유전자들의 발현을 완전히 유도하며, 또한 활성화된 RecA 자체는 UmuD가 UmuD'으로 성숙하는데 관여하여 실제 복구기능을 가지도록 한다(10, 11, 12, 13).

즉, UmuD' 두 분자가 UmuC 한 분자와 기능적으로 복합체를 이루어 UmuD'C형태로 SOS 돌연변이유발과정을 수행하게 되는 것이다(14). 그리고 이런 SOS 복구과정에서 RecA의 기능은 LexA의 절단 및 활성화된 UmuD'를 형성시키기 위한 조절기능 뿐만 아니라 직접적으로는 UmuDC와 다단백질 복합체(multiprotein complex)를 형성하여(15), DNA 손상부위에서 DNA 복제과정을 수행한다(13, 16). 정상상태에서 세포내 RecA의 수준은 매우 억제된 상태로서 세포내 상주하는 UmuD를 절단하는 데는 불충분하다. 그리고 이 상태에서 RecA 수준만을 높여 주어서는 SOS 돌연변이유발정도가 증진되지 않으며, 또한 UmuDC 분자들이 높은 농도로 존재하는 상태에서 RecA 수준을 증가시켜도 SOS 돌연변이유발과정에는 크게 영향을 주지 못한다. 따라서 *E. coli*의 *umuDC* operon은 DNA손상 이후에 SOS 돌연변이유발을 증진시키도록 유도되는 유일한 operon이다(4).

본 연구는 이러한 SOS 유전자의 발현 특성을 이용하여 DNA에 손상을 유발하는 각종 유해 독성물질을 검출할 수 있는 plasmid vector를 고안하는데 주안점을 두었다. 이제까지 많은 독성물질들의 돌연변이적 영향을 조사하는데 가장 보편적으로 이용되는 방법은 "Ames test"이다(17, 18, 19). Ames와 그 동료들에 의해 고안된 이 방법의 원리는 생육에 histidine을 요구하는 *Salmonella typhimurium* LT-2의 *his*- 돌연변이체를 이용한 것으로서, 미지의 화학물질 처리로 인해 histidine 요구주가

*Corresponding author

Tel. 82-51-510-2271, Fax. 82-51-514-1778

E-mail: hsubaik@164.125.9.3

Key words: *umuDC* operon, β -galactosidase assay, Mutagen detection

histidine를 생육에 요구하지 않는 복귀변이주로 전환되는 빈도를 측정하여 처리한 물질의 독성여부와 그 정도를 판단한다. 이와같은 *in vitro* 단기검사방법은 돌연변이원이나 발암물질을 검색하는데 있어서 그 적용 방법은 단순하지만, 잠재적으로 나타날 수 있는 자연돌연변이의 결과를 고려해야 하고, 오차가 발생할 가능성이 높다. 본 연구에서는 DNA에 손상을 유발하는 독성물질에 의해 발현이 유도되는 *umuDC*의 promoter부분을 *lacZ* 유전자의 promoter부분에 연결시킴으로써, DNA가 손상됨과 동시에 *lacZ*가 발현되도록 하여 *lacZ*의 발현유무 및 그 정도에 따라, 처리된 물질의 독성 유무 및 그 정도를 가늠해 볼 수 있는 plasmid를 고안하고자 하였다. 즉, promoter부분을 포함한 *umuD* 및 *umuDC* 단편을 *lac* fusion vector인 pMC874에(20) cloning한 뒤 각종 돌연변이원을 처리하여 *umuD* 및 *umuDC*의 발현을 유도함으로써 *lacZ* 유전자가 발현되도록 plasmid를 재조합하여 미지의 물질에 대한 독성의 유무 및 그 정도를 판별할 수 있는 plasmid vector를 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주와 배지 및 plasmid

*E. coli*의 SOS 유전자인 *umu*를 cloning하는데 사용된 plasmid 및 재조합 plasmid의 발현을 조사하기 위해 사용된 균주와 그 대표적 특성은 Table 1에 나타내었다. 완전배지는 Luria Bertani(LB) broth(21)를 사용하였고 최소배지는 Vogel-Bonner(VB)와 M9배지(24)를 사용하였으며, 항생제는 선별배지에 따라 ampicillin (50 µg/ml)과 kanamycin (50 µg/ml)을 첨가하였다.

Plasmid DNA의 재조합 및 Cloning

Cloning에 사용한 plasmid DNA는 Sambrook 등(21)

의 방법에 따라 분리하였다. 제한효소는 POSCO와 IBI Co.로부터 구입하였고 T4 DNA ligase는 EPICENTRE TECH NOLOGIES에서 구입하여 사용하였다. DNA 단편의 회수는 QIAGEN GmbH (Max-Volmer-Straße 440724 Hilden, Germany)의 QUIEX gel extraction kit를 사용하여 행하였고, cloning을 위한 *Bam*HI DNA linker는 Promega Co.에서 구입하여 사용하였다. 각 반응조건은 공급회사의 사용지침에 따랐다. 전기영동은 0.8%와 1% agarose gel에서 TAE buffer(40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA)를 사용하여 실시하였다. Transformation은 Cohen과 Chang의 방법(23)을 일부 변형하여 competent cells을 제조하여 실시하였다. Cloning 여부를 재확인하기 위해서 Enhanced chemiluminescence (ECL) system (Amersham International plc.)의 방법에 따라 hybridization을 행하였으며, 이때 사용한 probe는 pSE117(24)유래의 *umuDC* 1 kb 단편이었고, hybridization buffer와 detection agent의 양은 구입회사의 지시대로 nitrocellulose filter 면적에 비례하여 사용하였다.

돌연변이원(mutagen)에 대한 생존률의 측정

β-Galactosidase assay에 앞서 처리할 돌연변이원, 즉 UV, MNNG, NQO 및 MMC와 EMS의 적정처리농도를 결정하기 위해서 각종 돌연변이원에 대한 생존율을 재조합균주 pBC401과 pBC402 그리고 pMC874를 대상으로 조사하였다.

LB broth 5 ml에 실험균주를 접종하여 37°C에서 하룻밤 배양한 후 1% casamino acid와 0.2% glucose가 첨가된 M9 최소배지에 1:100으로 접종하여 600 nm에서의 흡광도가 0.3~0.5정도 될 때까지 배양하였다. 각 돌연변이원을 농도별로 처리하여 37°C에서 3시간 정지배양한 후, 0.1 ml씩 취하여 적당히 희석한 뒤 각각 3개의 LB agar plate에서 하룻밤 배양하였다. 각 plate의 colony들의 수를 세고 생존률(survival fraction)을 구하였다.

돌연변이원의 처리 및 -Galactosidase Assay

각 실험균주는 적당한 항생제를 포함하는 LB broth에 하룻밤 배양한 뒤 1% casamino acid와 0.2% glucose가 첨가된 M9 최소배지에 100배 희석하여 접종한 후 3 × 10⁷ cells/ml (OD₆₀₀=0.28~0.70)이 되도록 배양하였다. UV 조사는 멸균된 페트리디쉬에 배양액 10 ml를 부어 9.1 erg/mm² · sec의 에너지 비율로 20초간 조사하였고, 화학돌연변이원인 MNNG, NQO, MMC, 및 EMS는 배양액 5 ml당 적정농도로 처리한 다음, *lacZ* 유전자의 발현이 유도될 수 있도록 37°C에서 1~4시간 동안 정지배양하였다. 이후 β-galactosidase 활성은 Miller의 방법(25)에 따라 측정하였다.

Table 1. Bacterial strains and plasmids

Strains or plasmids	Relevant properties	Source
Bacterial strains		
<i>E. coli</i> DH5α	<i>endA1 hsdR17 supE44 thi-1 recA1</i>	BRL
<i>E. coli</i> MC1061	<i>gyrA96 relA1 Δ(lacfZYA-argF) hsdR mcrB araD139 Δ(araABC-leu) 7679 ΔlacX74 galU galK</i>	Meissner et al. (21)
Plasmid		
pMC874	Km ^r <i>lacZ</i> protein fusion vector	G. C. Walker (5)
pSE117	Km ^r <i>umuD</i> ⁺ C; pBR322	G. C. Walker (5)
pBC401	Km ^r <i>umuD</i> ⁺ (<i>umuC</i> '- <i>lacZ</i> ')	This work
pBC402	Km ^r <i>umuD</i> '- <i>lacZ</i> '	This work

결과 및 고찰

재조합 Plasmid의 설계 및 동정

umu 유전자를 포함하고 있는 pSE117을 *Bgl*III로 절단시킨 다음, *umu* gene의 조절부위가 포함된 1 kb 단편을 분리하였다. "lacZ fusion vector"인 pMC874를 *Bam*HI으로 절단시킨 다음, *umu*의 조절부위가 포함된 1 kb 단편을 pMC874에 연결시켜 *lacZ* 결손(deletion)균주인 *E. coli* MC1061에 도입하였다(Fig. 1). X-gal과 kanamycin을 포함하는 선택배지에서 kanamycin에 저항성을 나타내는 light blue colony들을 선별하였고, 전기영동상에서 cloning의 여부를 우선 확인한 다음(Fig.2), 이 colony들 중에서 UV조사에 의해 β-galactosidase 합성이 유도되는 colony들을 재차 분리하였다. 이때 UV는 9.1 erg/mm² · sec의 에너지 비율로 15초간 조사하였으며, 4시간 동안 발현시킨 다음 측정된 β-galactosidase 활성이 250~320 units인 재조합 plasmid를 pBC401로 명명하였다.

umu 유전자의 조절부위와 *lacZ* 유전자를 더욱 인접하게 연결시키기 위해서 pBC401에 포함된 *umuDC* 1 kb 단편을 다시 *Hinc*II로 절단하여 promotor부분과 *umuD* 유전자의 일부만 포함된 약 0.7 kb 단편을 분리하였고, pMC874에 연결시켜 cloning하였다(Fig. 3). X-gal과 kanamycin을 포함하는 선택배지에서 kanamycin에 저항성을 나타내는 light blue colony를 선별하였고, 전기영동상에서 cloning의 여부를 우선 확인한 다음(Fig. 4), pBC401을 선택하는 방법과 동일하게 *umuD'*-*lacZ*를 포

함하는 pBC402를 선별하였다. pSE117 유래의 1 kb *umuDC* 단편을 probe를 사용하여 southern hybridization을 실시하여 pBC401과 pBC402에 *umu* 단편이 제대로 cloning되었음을 재확인하였다(Fig. 5).

각 돌연변이원에 대한 생존률 조사

Cloning된 *umu*단편이 숙주의 생존률에 영향을 미칠지의 여부를 확인함과 동시에, fusion strain인 pBC401과

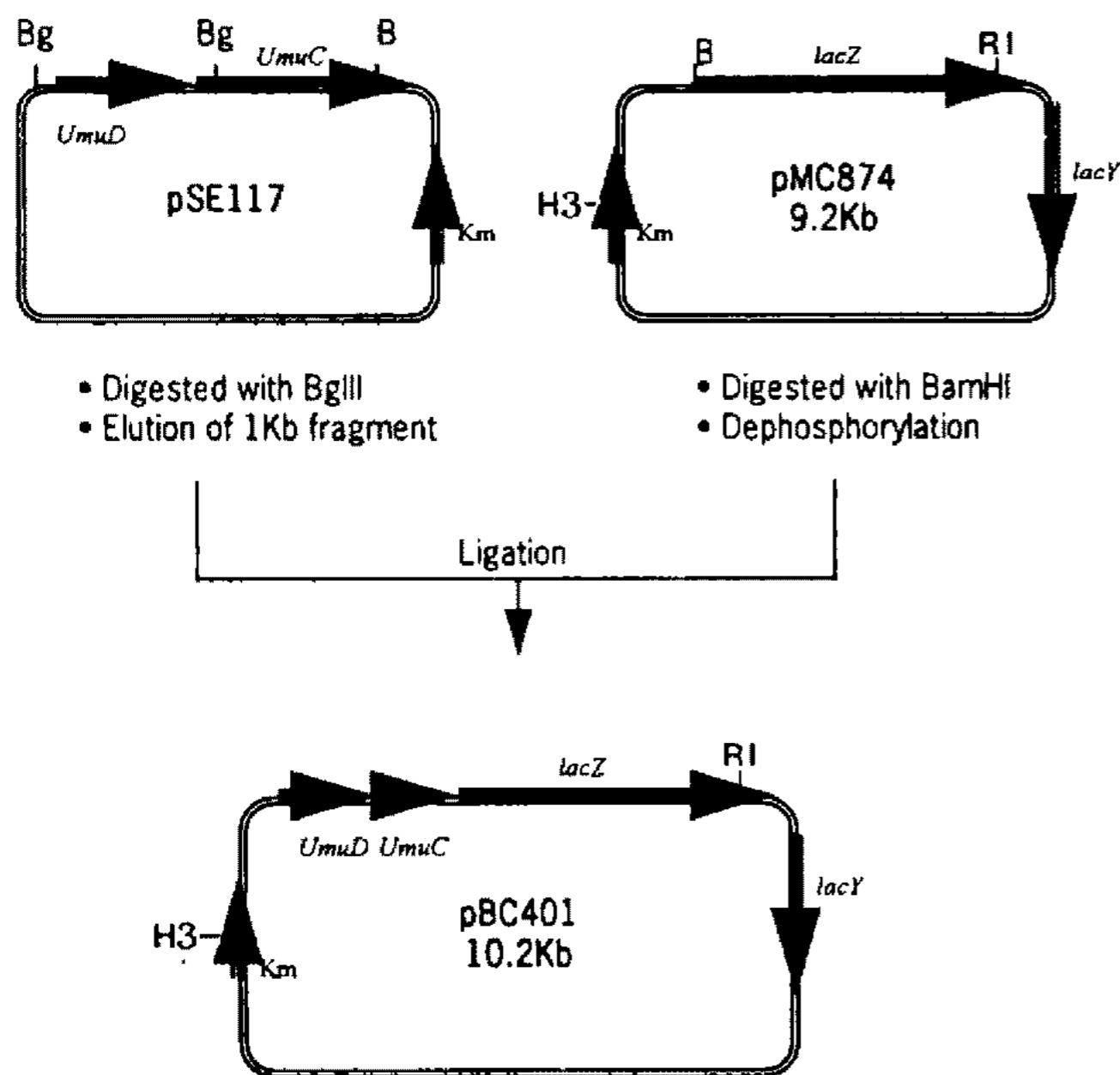


Fig. 1. Schematic representation of the construction of plasmid pBC401. Abbreviations for restriction sites are as follows: B, *Bam*HI; Bg, *Bgl*/II; RI, *Eco*RI; H3, *Hind*III.

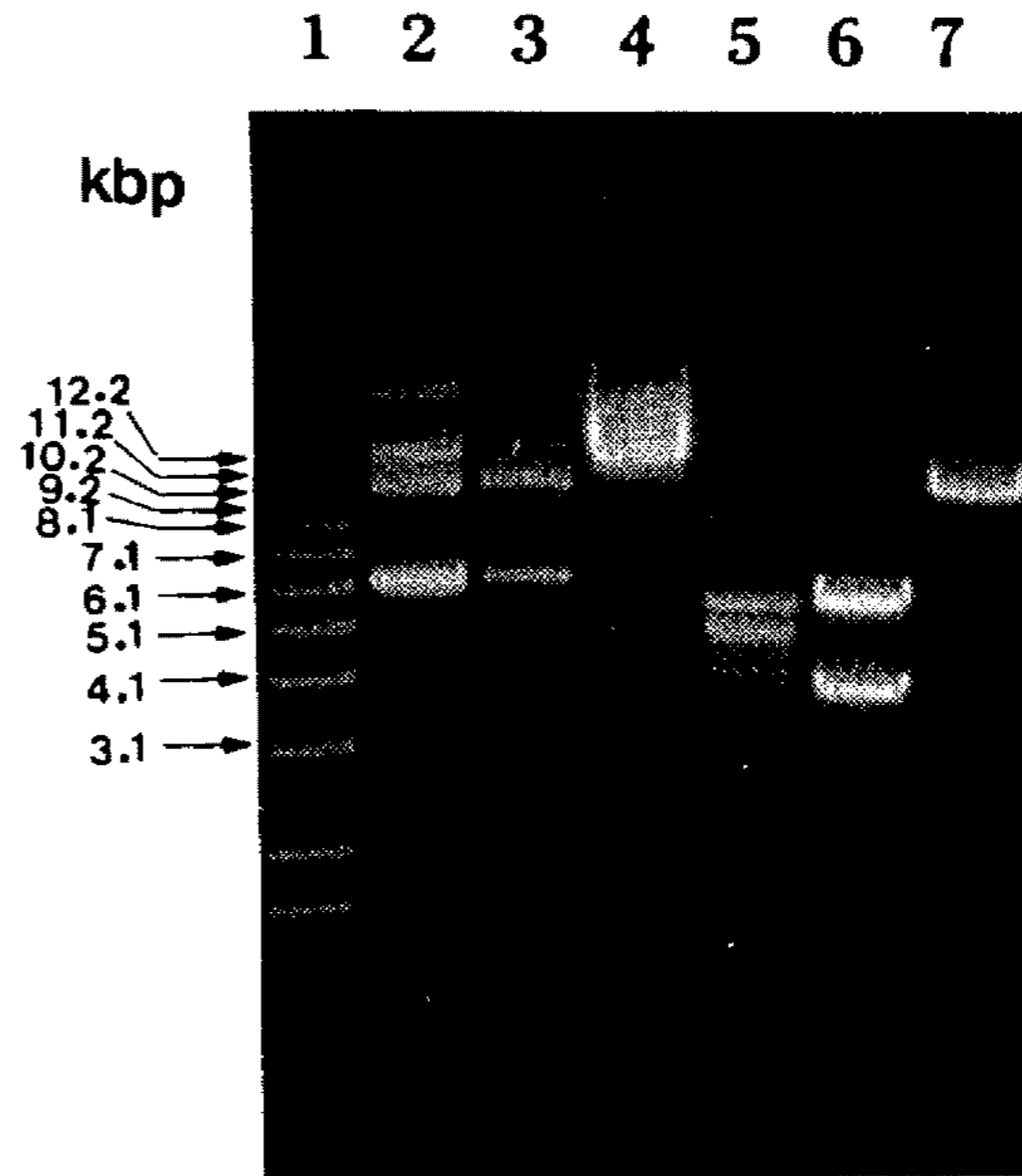


Fig. 2 Agarose gel electrophoresis pattern of recombinant plasmid pBC401.

lane 1: size marker (1 kb ladder), lane 2 and 3: plasmid pBC 401, lane 4: pBC401 digested with *Eco*RI, lane 5: pBC401 digested with *Hind*III and *Eco*RI, lane 6: pMC874 digested with *Hind*III and *Eco*RI, lane 7: pMC874 digested with *Bam*HI.

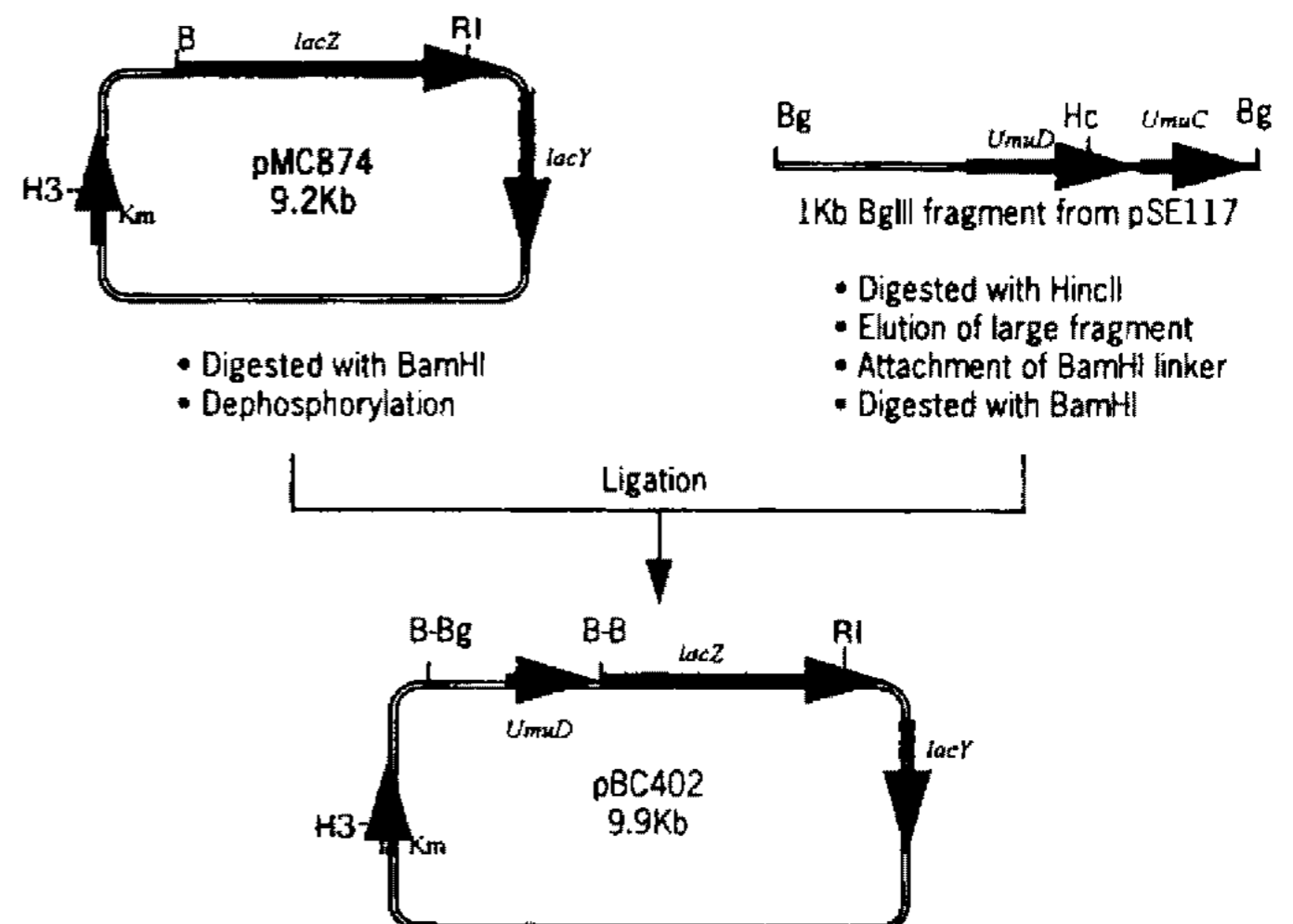


Fig. 3. Schematic representation of the construction of plasmid pBC402. Abbreviations for restriction sites are as follows: B, *Bam*HI; Bg, *Bal*/II; Hc, *Hinc*II; RI, *Eco*RI; H3, *Hind*III.

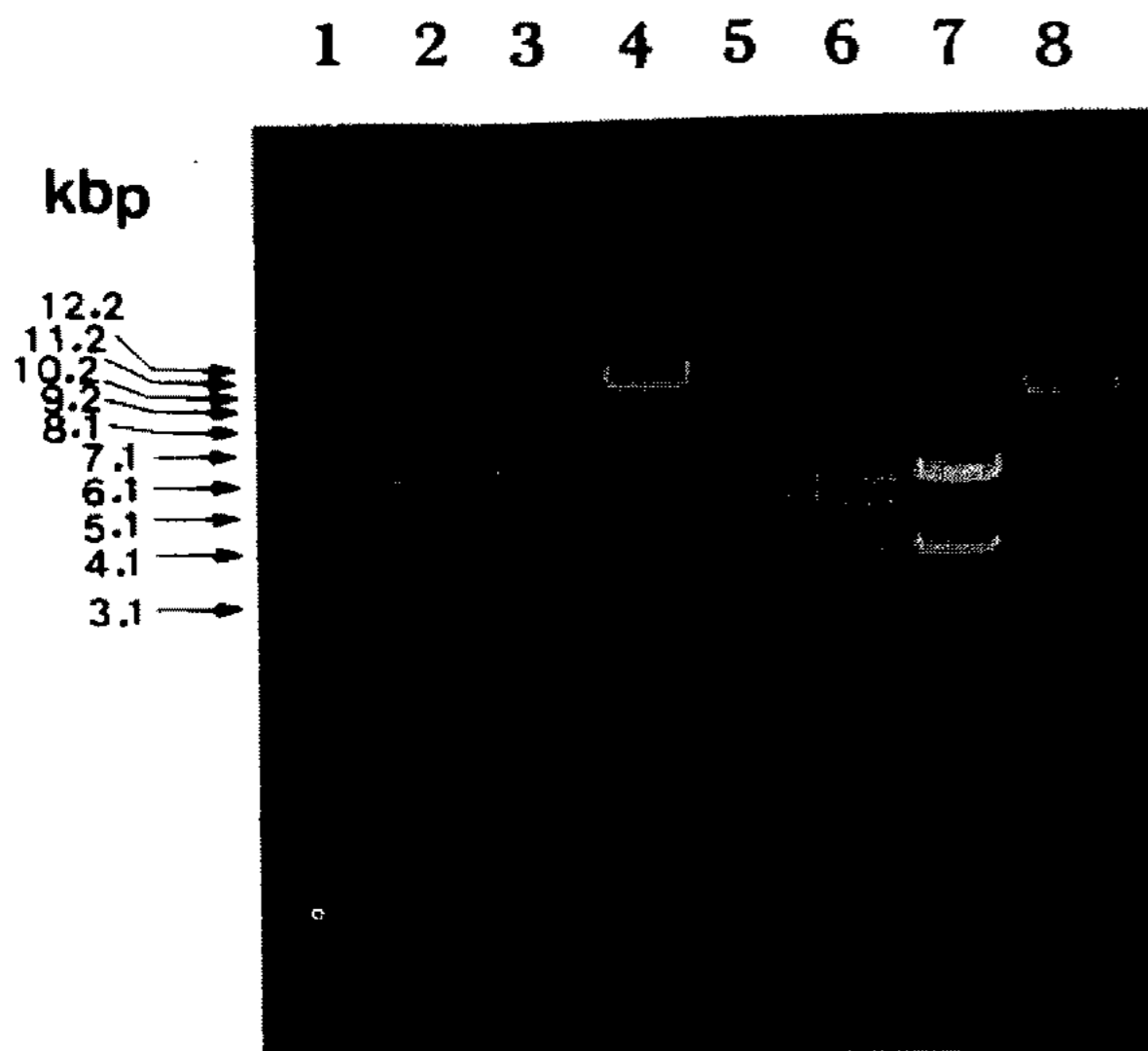


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis pattern of recombinant plasmid pBC402.

lane 1: size marker (1 kb ladder), lane 2 and 3: plasmid pBC402, lane 4: pBC402 digested with *EcoRI*, lane 5: pBC402 digested with *HindIII* and *EcoRI*, lane 6: pBC401 digested with *HindIII* and *EcoRI*, lane 7: pMC874 digested with *HindIII* and *EcoRI*, lane 8: pMC874 digested with *BamHI*.

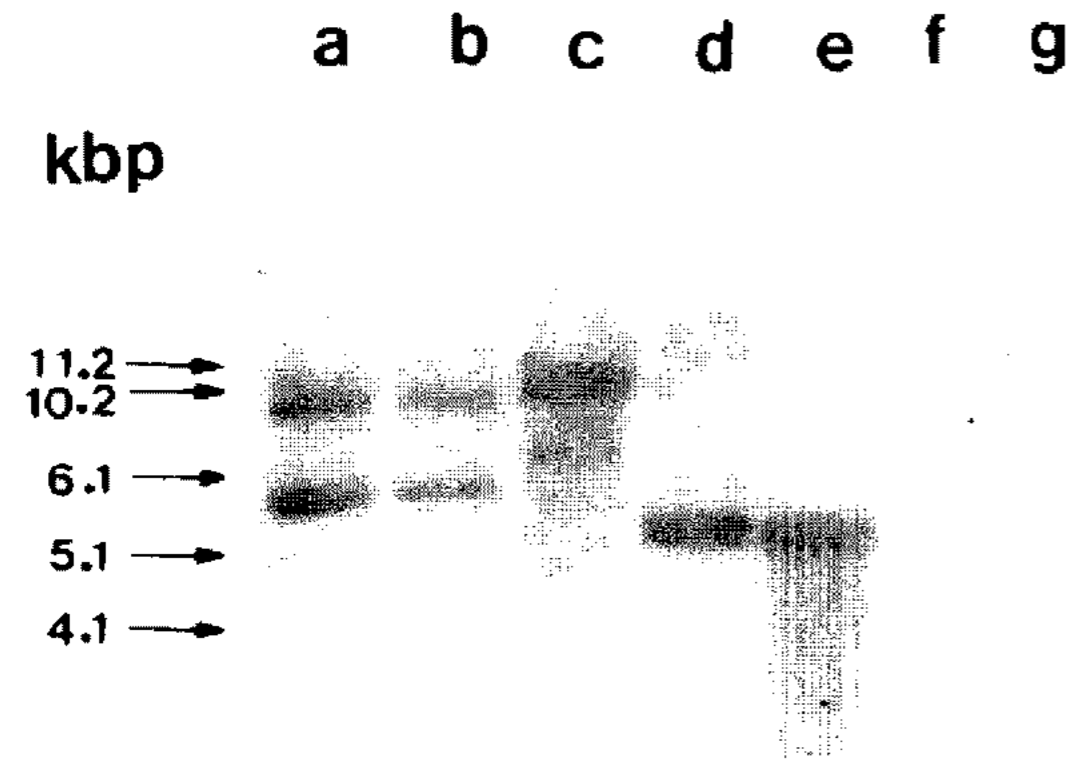


Fig. 5. Southern hybridization analysis of pBC401 and pBC402.

Each lane electrophored through a 0.8% agarose gel and was hybridized with *umuDC* (1 kb fragment) probe. lane a: plasmid pBC401, lane b: plasmid pBC402, lane c: pBC402 digested with *EcoRI*, lane d: pBC402 digested with *HindIII* and *EcoRI*, lane e: pBC401 digested with *HindIII* and *EcoRI*, lane f: pMC874 digested with *HindIII* and *EcoRI*, lane g: pMC874 digested with *BamHI*.

pBC402의 생존률(survival fraction)이 근사값이 되도록 하는 돌연변이원의 처리농도를 결정하기 위해서, 5종류의 돌연변이유발원 즉, UV, MMC, MNNG, NQO, 그리고 EMS를 각 농도별로 처리하여 생존률을 조사하였다(Fig. 6). 그 결과 각 돌연변이원의 농도가 높아질수록 생존률이 감소되는 양상은 pBC401, pBC402, 그리고 pMC874에서 모두 유사하였고, 따라서 vector내 *umu* 유

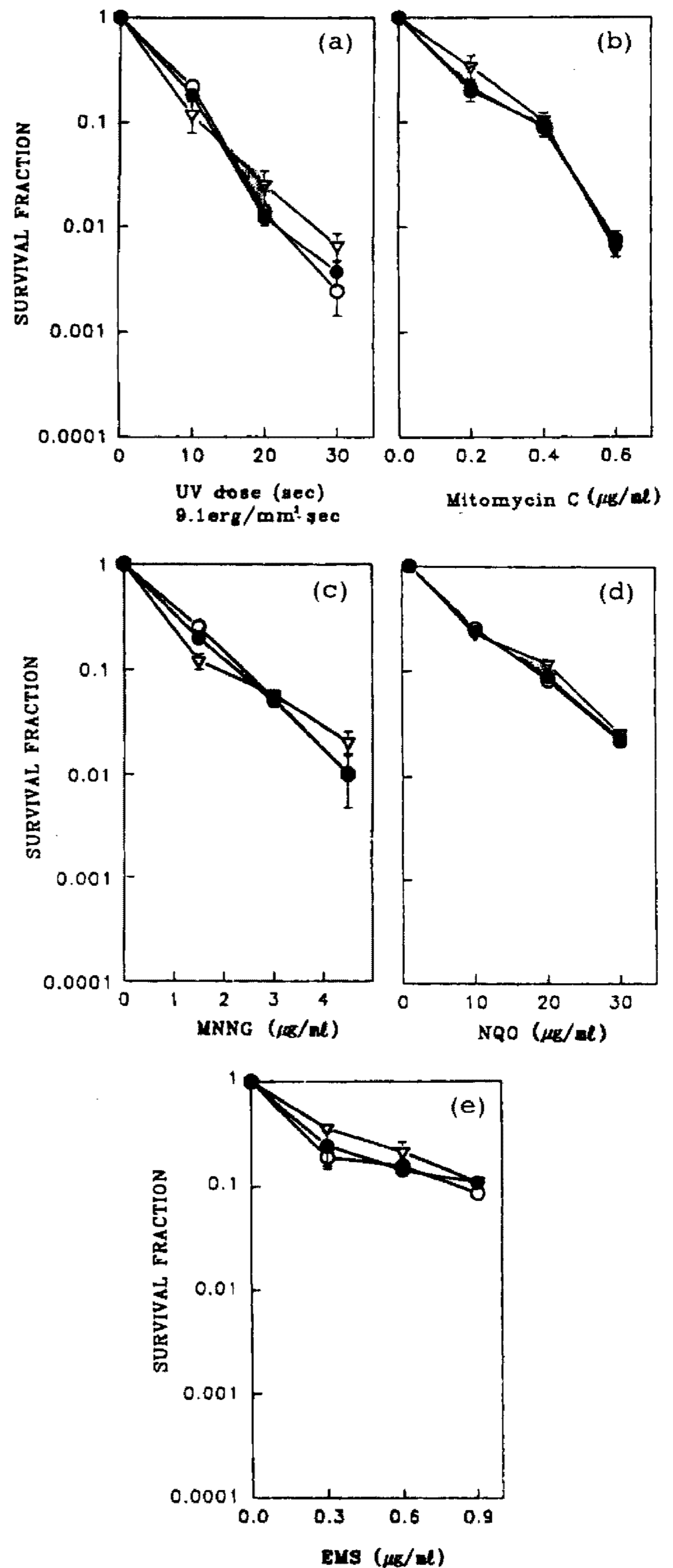


Fig. 6. Log-survival vs.

(a) UV-dose, (b) Mitomycin C (MMC), (c) N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG), (d) 4-Nitroquinoline-1-oxide (NQO), and (e) Ethyl Methanesulfonate (EMS) for pBC401 (○), pBC402 (●), and pMC874 (▽).

전자는 숙주의 생존률과는 그다지 관련이 없는 것으로 생각되었다. 또한 각 돌연변이원에 대한 pBC401과 pBC402의 감도를 측정하기 위한 돌연변이원의 처리농도

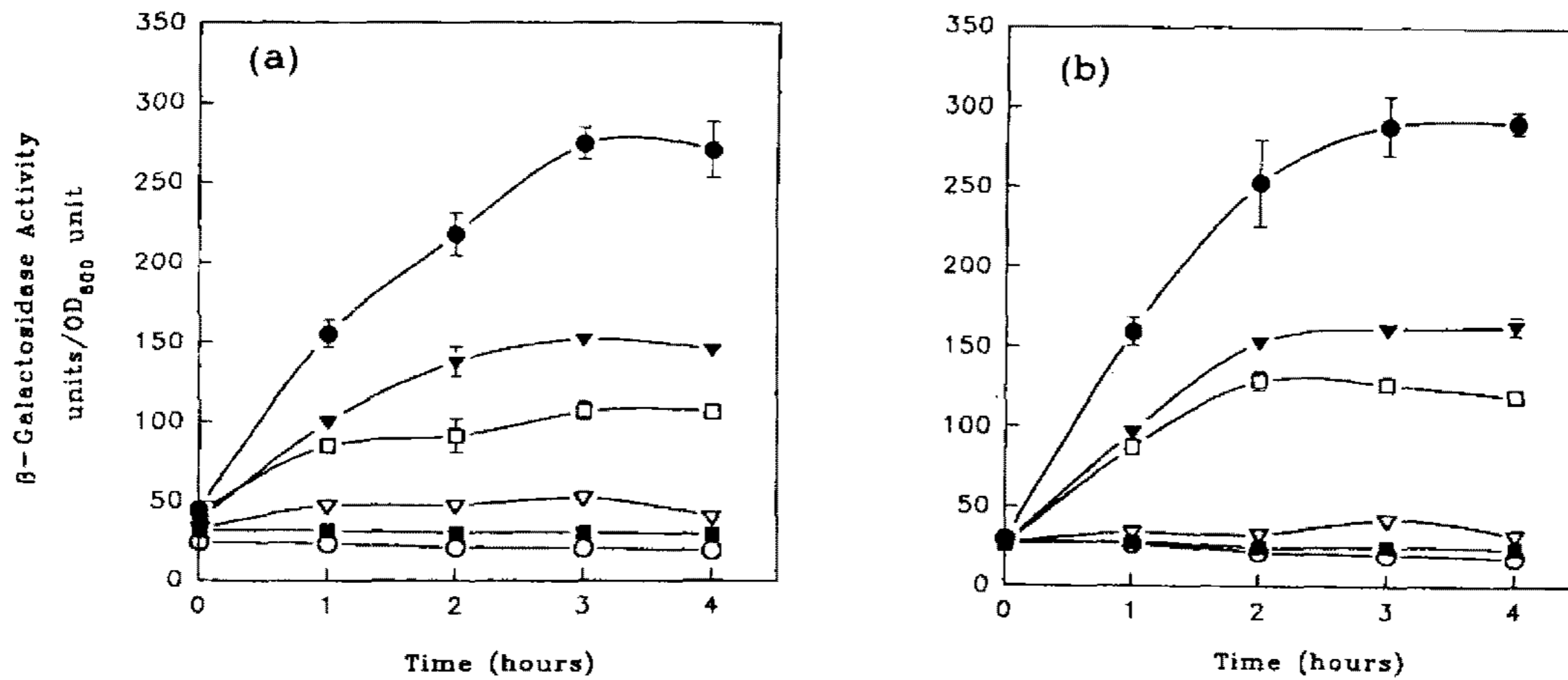


Fig. 7. Kinetics of induction of β -galactosidase activity in strain containing plasmid pBC401(a) and pBC402(b).

Cells were grown in supplemented minimal media at 37°C. Cells were treated with 20 seconds of UV irradiation in 9.1 erg/mm² · sec (●), 0.4 μ g/ml of mitomycin C (▼), 20 μ g/ml of NQO (□), 3 μ g/ml of MNNG (▽), and 0.6 μ g/ml of EMS (■), and without other mutagen (○).

는 pBC401, pBC402, 그리고 pMC874의 생존률이 가장 근사치를 보였던 농도, 즉 UV는 9.1 erg/mm² · sec로 20초간 조사하고, MMC는 0.4 μ g/ml로, NQO는 20 μ g/ml로, MNNG는 3 μ g/ml로, 그리고 EMS는 0.6 μ g/ml로 결정하였다.

돌연변이원 처리에 따른 *lacZ*의 발현

umu promoter의 작동에 의한 *lacZ*의 발현이 유도되는 정도는 돌연변이원을 처리한 즉시부터 4시간 경과점까지 매시간 간격으로 β -galactosidase assay를 실시하여 측정하였다(Fig 7). 이때 돌연변이원을 처리한 시점의 OD₆₀₀에서의 흡광도는 0.3~0.4정도였고, 4시간 경과점까지 0.6~0.7정도를 유지하여 활성측정에 적합하였다. Fusion strain인 pBC401과 pBC402의 β -galactosidase 활성은 돌연변이원을 처리한 경우가 처리하지 않았을 때 보다 높게 측정되었으며, 다른 것에 비해 비교적 낮은 농도로 처리된 EMS의 경우가 돌연변이원을 처리하지 않았을 때와 거의 유사한 활성을 나타내었다. pBC401의 경우에 EMS와 MNNG를 처리하였을 때는 발현시간이 경과해도 β -galactosidase 활성이 큰 변화없이 비교적 낮은 편이었으나, UV와 MMC 및 NQO를 처리하였을 때는 발현시간이 경과함에 따라 β -galactosidase 활성도 급격히 증가하며 비교적 높게 측정되었다. 즉, 활성값은 *lacZ* 발현의 3시간 경과점까지 비교적 증가하다가, 4시간 경과점부터는 오히려 감소하는 경향을 보였다. pBC402에서도 β -galactosidase 활성이 유도되는 양상은 전반적으로 pBC401과 유사하였다. 그러나 EMS와 MNNG를 처리하였을 때는 pBC401에서의 활성값보다 낮아지고, UV와 MMC 및 NQO를 처리하였을 때의 활성값은 pBC401의 경우보다 높아진 결과를 얻었다. pBC402의 *lacZ* 발현도 pBC401과 마찬가지로 3시간 발현점까지 비교적 활성이

Table 2. Induction of β -Galactosidase in fusion strain by various agents^a

Chemical	Concentration (μ g/ml)	β -Galactosidase Activity (U at OD ₆₀₀)		
		pBC401 ^b	pBC402 ^c	pMC874
None	.	20	20	4
Mitomycin C	0.4	152	161	5
4-Nitroquinoline-1-oxide	20	106	126	4
Ethyl Methanesulfonate	0.6	30	25	4
N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine	3	52	42	45
UV	20 seconds (9.1 erg/mm ² · sec)	274	289	5

^aAn exponentially growing culture of strains in minimal medium was split into several sample. One sample was untreated, and chemicals were added to others to the concentrations shown. The cells were then incubated at 37°C for 3 h, and the β -galactosidase activity was determined. ^bFusion strain (*umuC'*-*lacZ'*). ^cFusion strain (*umuD'*-*lacZ'*).

증가하는 경향을 보였다. 따라서 β -galactosidase assay에서의 3시간 발현점을 돌연변이원의 독성여부를 판단하는 기준점으로 설정하여 그 활성값을 Table 2에 나타내었다. 앞에서 결정했던 각 돌연변이원 처리농도에서의 생존률을 고려하여 β -galactosidase 활성값을 비교하면, UV를 조사하였을 때는 초발생균수의 1%가 나타내는 활성값이 pBC401과 pBC402에서 각각 274 units와 289 units로 측정된 반면, MNNG를 처리하였을 때는 초발생균수의 5%가 각각 52와 42 units를 나타내었고, MMC를 처리하였을 때는 9%가 각각 152와 161 units를 나타내었다. 즉, 생존률이 높다고 해서 β -galactosidase 활성이

높은 것도 아니었고, 또한 생존률이 낮다고 해서 활성이 높은 것도 아니었다. 따라서 pBC401과 pBC402에서 *lacZ*의 발현은 survival fraction과의 상관관계보다는 돌연변이원 자체의 성질, 다시 말하면 돌연변이원이 DNA에 손상을 미치는 특징과 정도의 차이에 따라 promoter의 발현 개시빈도가 달라지는 것으로 생각된다. 선정한 돌연변이원 중에서 NQO는 대사적으로 활성을 띠게 되면 DNA상의 모든 G·C 염기쌍을 C·G, T·A 혹은 A·T 염기쌍으로 치환시킬뿐만 아니라 +1G, -1G, +1A, 및 -1A 등의 구조이동(frameshift) 돌연변이를 복합적으로 유발시키며, MMC도 G·C→T·A 및 T·A→G·C의 염기치환과 함께 -1G와 -2(C·G)의 구조이동돌연변이를 유발하는 것으로 알려져 있다. Watanabe 등의 보고에 따르면, NQO나 MMC등은 *umuDC* 유전자를 활성화하여 돌연변이율을 증가시키고 손상부위를 복구시키기도 하였다(25, 26). 반면에 MNNG나 EMS 등은 C·G서열에서 구조이동돌연변이를 유발하기도 하지만, 주로 O⁶-methylguanine이나 O⁴-methylthymine를 생성시켜 G·C→A·T 및 A·T→G·C의 염기치환돌연변이를 일으킨다. 측정된 β-galactosidase 활성값을 이러한 화학적 돌연변이원의 특성과 관련하여 비교하면, 다양한 유형의 염기치환과 구조이동돌연변이를 복합적으로 유발하여 DNA에 손상을 일으키는 NQO와 MMC의 경우 3시간 발현점까지 활성값이 현저히 증가하여 높게 측정된 반면, MNNG와 EMS는 활성값의 증가정도가 상대적으로 낮게 측정되었다. 따라서 *umu* promoter의 발현은 DNA상에 복합적으로 돌연변이를 일으키는 물질을 처리할 때 발현개시가 더욱 원활히 이루어지므로, 구조이동돌연변이 등의 치명적 손상을 유발하는 독성물질의 검출에 용이할 것으로 생각된다.

많은 독성물질의 돌연변이적 영향을 조사하는 데는 여러가지 방법들 중에서 가장 일반적으로 이용되는 "Ames test"는 *Salmonella typhimurum* LT-2의 *his*-돌연변이주에 미지의 돌연변이원을 처리함으로써 *his*⁺ 복귀변이주로 전환되는 빈도를 측정하여, 처리된 물질의 독성여부 및 그 정도를 판단한다. 구조이동돌연변이된 *his*⁻ 유전자를 가지는 TA98 균주와 염기치환돌연변이된 *his*⁻ 유전자를 가지는 TA100 균주를 histidine이 제한된 최소배지에서 돌연변이원과 함께 배양하면 *his*⁺로 복귀된 균주만 콜로니를 형성하므로, 생성된 복귀변이주를 계수하여 염기치환이나 구조이동 등의 돌연변이 유발여부를 측정한다. 그러나 TA100의 경우는 상당수가 자연복귀되고, 복귀변이주의 수도 plate마다 큰 차이를 보이는 경우가 많아 계수 및 통계과정에서 오차가 발생할 확률이 높다. 그리고 영양요구성변이주를 이용한 검사법이므로 최소배지에서 배양해야 하고 복귀변이주를 계수하기까지 최소 3일이 소요된다. 이러한 관점에서 볼때, fusion strain인

pBC401과 pBC402를 이용한 독성물질의 검색방법은 물질의 독성여부를 판단하는 주과정인 β-galactosidase assay이므로, 물질을 처리하고 β-galactosidase 활성을 측정하여 독성여부를 판단하기까지 전과정이 하루 안에 진행되므로 보다 신속한 독성물질 검색이 이루어질 것으로 기대된다.

요 약

E. coli 염색체의 SOS 유전자인 *umuDC* operon은 DNA가 손상되었을 때 발현이 유도되며 SOS 돌연변이 유발과정에 절대 필수적이다. 이런 특성의 *umuDC* promoter부분을 *lacZ* promoter부분에 연결시킴으로써, DNA손상으로 인한 *umu*의 발현 유도가 *lacZ*의 발현으로 이어질 수 있도록 재조합 plasmid pBC401과 pBC402를 고안하였으며, 이를 *lac* 결손균주인 MC1061에 도입시킨 후, 여러가지 돌연변이원을 처리하고 β-galactosidase assay를 실시하여 *umu* promoter의 작동에 의한 *lacZ*의 발현 정도를 측정하였다. UV와 MMC 및 NQO를 처리하였을 때는 pBC401의 β-galactosidase 활성이 발현시간의 경과에 따라 급격히 증가하여 3시간 발현점에서 비교적 높게 측정되었으나, MNNG와 EMS를 처리하였을 때는 발현시간이 경과하여도 활성은 큰 변화없이 비교적 낮은 편이었다. pBC402에서도 β-galactosidase 활성이 유도되는 양상은 전반적으로 pBC401과 유사하였으나, 3시간 발현점에서의 β-galactosidase 활성을 비교해 보면, EMS와 MNNG에 대한 감도는 pBC401보다 조금 더 낮아진 편이었고, UV, MMC 및 NQO에 대한 감도는 pBC401보다 조금 더 높아진 것으로 판단되었다. 따라서 재조합 plasmid pBC401과 pBC402를 이용한 돌연변이원의 검색은 염기치환 및 구조이동돌연변이를 복합적으로 야기하는 물질의 검출에 용이할 것으로 생각되며, 검색의 주과정인 β-galactosidase assay이므로 기존의 독성물질 검사법에 비하여 보다 신속한 독성여부의 판단이 이루어질 것으로 기대된다.

참고문헌

1. Elledge, J. S. and G. C. Walker. 1983. Proteins required for ultraviolet light and chemical mutagenesis. Identification of the products of the *umuC* locus of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **164**: 175-192.
2. Shinagawa, H., T. Kato, T. Ise, K. Makino, and A. Nakata. 1983. Cloning and characterization of the *umu* operon for inducible mutagenesis in *Escherichia coli*. *Gene* **23**: 167-174.
3. Perry, K. L., S. J. Elledge, B. B. Mitchell, L. Marsh, and G. C. Walker. 1985. *umuDC* and *mucAB* operons whose products are required for UV light-and chemical-induced

- mutagenesis: UmuD, MucA, and LexA proteins share homology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**: 4331-4335.
4. Sommer, S., J. Knezevic, A. Bailone, and R. Devoret. 1993. Induction of only one SOS operon, *umuDC*, is required for SOS mutagenesis in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **239**: 137-144.
 5. Walker, G. C. 1985. Inducible DNA repair system. *Ann. Rev. Biochem.* **54**: 425-457.
 6. Little, J. W. and D. W. Mount. 1982. The SOS regulatory system of *E. coli*. *Cell* **29**: 11-22.
 7. Woodgate, R. and D. G. Ennis. 1991. Levels of chromosomally encoded Umu proteins and requirements for in vitro UmuD cleavage. *Mol. Gen. Genet.* **229**: 10-16.
 8. Little, J. W., S. H. Edmiston, L. Z. Pacelli, and D. W. Mount. 1980. Cleavage of LexA protein by RecA protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**: 3225-3229.
 9. Little, J. W. 1984. Autodigestion of LexA and phage λ repressors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**: 1375-1379.
 10. Burckhardt, S. E., R. Woodgate, R. H. Scheurmann, and H. Echols. 1988. UmuD mutagenesis protein of *Escherichia coli*: overproduction, purification and cleavage by RecA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**: 1811-1815.
 11. Shinagawa, H., H. Iwasaki, T. Kato, and A. Nakata. 1988. RecA protein-dependent cleavage of UmuD protein and SOS mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**: 1806-1810.
 12. Nohmi, T., J. R. Battista, L. A. Dodson, and G. C. Walker. 1988. RecA-mediated cleavage activates UmuD for mutagenesis: mechanistic relationship between transcriptional derepression and posttranslational activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**: 1816-1820.
 13. Bailone, A., S. Sommer, J. Knezevic, M. Dutreix, and R. Devoret. 1991. A RecA protein mutant deficient in its interaction with the UmuDC complex. *Biochimie.* **73**: 479-484.
 14. Woodgate, R., M. Rajagopalan, C. Lu, and H. Echols. 1989. UmuC mutagenesis protein of *Escherichia coli*: Purification and interaction with UmuD and UmuC. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**: 7301-7305.
 15. Freitag, N. and K. McEntee. 1989. "Activated"-RecA protein affinity chromatography of LexA repressor and other SOS-regulated proteins. *proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**: 8363-8367.
 16. Dutreix, M., P. L. Moreau, A. Bailone, F. Galiberit, J. R. Battista, G. C. Walker, and R. Devoret. 1989. New *recA* mutations that dissociate the various RecA protein activities in *Escherichia coli* provide evidence for an additional role of RecA protein in UV-mutagenesis. *J. Bacteriol.* **171**: 2415-2423.
 17. Maron, D. M. and Ames, B. N. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* **113**: 173-215.
 18. Kier, L. E., D. J. Brusick, A. E. Auletta, E. S. VonHalle, M. M. Brown, V. F. Simmon, V. Dunkel, J. McCann, K. Mortelmans, M. Prival, T. K. Rao, and V. Ray. 1986. The *Salmonella typhimurium/mammalian* microsomal assay: a report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res.* **168**: 169-240.
 19. Amdur, M. O., J. Doull, C. D. Klaassen. 1991. Casarett and Doull's Toxicology: the basic science of poisons. 4th ed. Pergamon Press, Inc.
 20. Casadaban, M. J., J. Chou, and S. N. Cohen. 1980. In vitro gene fusions that join an enzymatically active β -galactosidase segment to amino-terminal fragments of exogenous proteins: *Escherichia coli* plasmid vectors for the detection and cloning of translational initiation signals. *J. Bacteriol.* **143**: 971-980.
 21. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning, 2nd ed., Cold Spring Harbor, New York.
 22. Cohen, S. N., A.C.Y. Chang, and L. Hsu. 1973. Non-chromosomal antibiotic resistance in bacteria; genetic transformation of *E. coli* by R factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **69**: 2100-2114.
 23. Marsh, L. and G. C. Walker. 1985. Cold sensitivity induced by overproduction of UmuDC in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **162**: 155-161.
 24. Miller, J. H. 1992. A short course in bacterial genetics, Cold Spring Harbor, New York.
 25. Watanabe, M., T. Nohmi and T. Ohta. 1994. Effects of the *umuDC*, *mucAB*, and *samAB* operons on the mutational specificity of chemical mutagenesis in *Escherichia coli*: I. Frameshift mutagenesis. *Mutat. Res.* **314**: 27-37.
 25. Watanabe, M., T. Nohmi and T. Ohta. 1994. Effects of the *umuDC*, *mucAB*, and *samAB* operons on the mutational specificity of chemical mutagenesis in *Escherichia coli*: II. Base substitution mutagenesis. *Mutat. Res.* **314**: 39-49.

(Received 8 September 1996)