

## lux Operon과 Heat Shock Promoter 유전자 재조합을 통한 독성물질 탐지용 대장균의 개발

유승오 · 이은관 · 김현숙 · 정계훈 · 전억한\*

경희대학교 생명과학부 식품가공학과

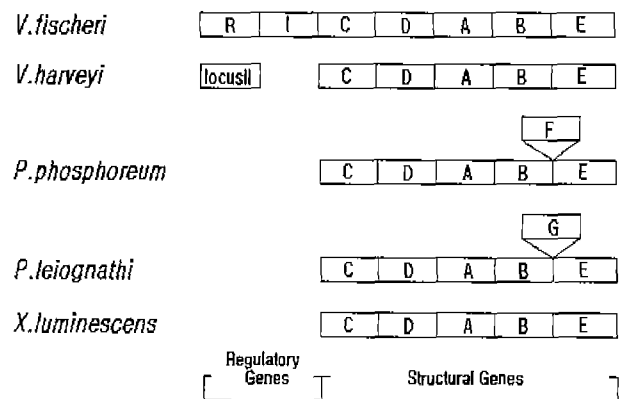
**Construction of Bioluminescent *Escherichia coli* form lux Operon and Heat Shock Promoter for the Detection of Toxic Substances.** Yoo, Seung-O, Eun-Kwan Lee, Hyun-Suk Kim, Kye-Hun Chung, and Uck-Han Chun\*. Department of Food Technology and Science, Faculty of Life Science, Kyung Hee University, Suwon, Kyungki 449-701, Korea – In order to use heat shock promoter for the detection of toxic substances, *dnaK* promoter was amplified from *E. coli* genomic DNA by using a polymerase chain reaction(PCR) followed by sequencing and sub-cloning into the multi-cloning site of the plasmid, pUCD615. The pUCD615 is a broad-host-range vector containing promoterless lux operon originated from *V. fischeri*. The recombinant plasmid was transferred to *E. coli* DH5 $\alpha$  through electroporation. The recombinant *E. coli* showed several patterns of bioluminescent responses to ethanol stress. The bioluminescent *E. coli* also showed responses to other toxic substances including FeK<sub>3</sub>(CN)<sub>6</sub>, CdCl<sub>2</sub>, *p*-nitrophenol and HgCl<sub>2</sub>. The increases of RLU(Relative Light Unit) were observed at 100 ppm of FeK<sub>3</sub>(CN)<sub>6</sub>, 10 ppm and 100 ppm of CdCl<sub>2</sub>, 1 ppm and 10 ppm of *p*-nitrophenol and at 1 ppm of HgCl<sub>2</sub>.

**Key words:** *dnaK* promoter, *E. coli*, pUCD615, bioluminescence

최근 생체발광을 응용하는 연구가 많이 진행되고 있으며 환경, 식품, 의학분야에서 연구가 활발히 이루어지고 있다 [14]. lux 유전자가 도입된 재조합 bacteria는 독성물질이나 환경상태가 생화학적 기능에 저해요소로서 작용하면 세포의 viability가 감소되며 빛 발산량도 감소한다. 근래에 들어서 lux 유전자를 도입한 미생물들을 개발하고 독성물질의 독성정도 및 농도 등을 측정할 수 있는 monitoring system 개발에 관한 연구가 활발히 진행되고 있으며 재래의 방법들보다 경제성, 신속성, 민감성이 우수하여 환경분야에서 많은 응용이 기대되고 있다[8, 10, 11, 19, 20, 21].

생체발광 미생물의 luciferase는 Fig. 1에서 보듯이  $\alpha$ ,  $\beta$  subunit로 구성되어 있으며, luxA와 luxB 유전자가 차례로 복제되어진다[9]. lux operon에 관해서는 대부분의 연구가 Vibrio와 Photobacterium에 관해서 이루어졌으며, luxA와 luxB 유전자 외에 luxC, luxD, luxE 유전자들이 lux operon에 들어있다. 이들 luxC, D, E 유전자들은 fatty acid reductase를 암호화하고 그밖에 V. fischeri의 경우 lux 발현의 조절유전자로서 luxR과 luxI 유전자가 luxC, D 유전자 상단부위에 위치하고 있으며[16, 17] 종들간에 operon을 이루는 구조 유전자의 배열 순서는 비슷하다. 이외에도 아직 기능이 밝혀지지 않은 유전자들(luxF, luxG, luxH, luxY)에 대한 연구가 진행되고 있다[17].

Bacteria가 stress 물질에 노출되었을 때 약 10종 내외의



Genes	Gene products
LuxR	Positive regulatory protein(requires autoinducer)
LuxI	Protein needed for autoinducer production
LuxA	Luciferase
LuxB	
LuxC	Fatty acid reductase complex
LuxD	
LuxE	
LuxF, G	Unknown function.

Fig. 1. Genes and gene organization of the lux operons in various species of luminous bacteria.

특정단백질(heat shock protein)의 합성을 크게 증가시키고 이들을 세포 내에 축적시킨다[2]. Heat shock protein은 크기에 따라 대략 4가지로 분류되는데, 83-90 kD의 large-molecular-weight heat shock protein, 66-78 kD의 hsp70

\*Corresponding author

Tel. 0331-201-2626, Fax. 0331-204-8116

E-mail: uhchun@nms.kyunghee.ac.kr

family, bacteria나 mitochondria 또는 chloroplast에 있는 hsp60 family, 15-30 kD 이하의 단백질들이 만들어지며 heat shock protein을 발현시키는 sigma factor는  $\sigma^{32}$ 이다. 즉 heat shock protein이  $\sigma^{32}$ 에 의해 조절되는 것을 의미한다[12, 15]. Heat shock protein이 생성되면 다른 유전자는 stress의 영향으로 발현이 저해된다. 즉, heat shock이나 stress에 의해서 일반적인 유전자의 발현 형태는 크게 변한다. Heat shock protein은 stress의 종류에 따라 크게 2종류로 대별되며 첫째는, heat shock이나 중금속 오염, 산소의 결핍, ethanol 처리, 아미노산 analog, virus 감염 등으로 그 합성이 크게 유도 증가되는 heat shock proteins(hsp's)이고 둘째는, 세포 배양액에서의 glucose 결핍, 세포 내  $Ca^{2+}$ 의 항상성을 파괴하는  $Ca^{2+}$ -ionophore 나 EGTA, 그리고 단백질 합성 후 변형과정(glycosylation 이나 disulfide bond형성)을 방해하는 tunicamycin이나  $\beta$ -mercaptoethanol, 아미노산 analog, 미토콘드리아 기능 저해제 처리 등에 의해서 합성이 증가되는 glucose-regulated proteins(grp's)이다. Heat shock protein 중 가장 많이 연구되고 그 기능이 상당히 많이 밝혀진 것이 hsp70에 속하는 단백질들인데 *E. coli* 같은 미생물에서 DNA replication 과정에 관여하는 dnaK 단백질이 grp75 및 hsp70 단백질과 구조적으로 유사한 것으로 밝혀졌다[3, 13, 24].

본 연구에서는 *V. fischeri*의 lux operon의 전 구조 유전자들이 모두 삽입되어 있으나 control할 수 있는 promoter가 없는 broad-host-range vector로 고안된 plasmid vector pUCD615(Fig. 2)의 multicloning site에 dnaK heat shock promoter를 삽입하고 *E. coli*에서 발현시킴으로서 stress 물질에 노출시켰을 때 bioluminescence가 증가함으로

서 독성물질의 유무를 측정할 수 있는 reporter 균주를 제조하였다.

## 재료 및 방법

### 사용 균주

Plasmid vector pUCD615를 얻기 위한 host균주로 *E. coli* DH5 $\alpha$ (pUCD615)VUN02200 사용하였으며, *E. coli* LE392(KCTC 1042)는 dnaK promoter의 증폭 및 competent cell을 만드는데 사용하였다.

### DnaK promoter의 복제

Cowing 등[6]의 dnaK operon promoter의 염기서열을 이용하여 dnaK promoter를 복제하기 위한 source organism을 찾기 위해 internet GenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에서 homology 조사를 하였다. Homology 조사를 한 결과 *E. coli* K-12 genome DNA에서 일치 하는 부분이 존재하였다. *E. coli* K-12의 변종인 *E. coli* LE392(KCTC 1042)로부터 genomic DNA를 추출하여 spectrophotometer로  $\lambda$  260에서 농도를 측정하고 50 ng/ $\mu$ l로 희석한 후[22] PCR 반응의 template DNA로 사용하였다. PCR 반응액 성분의 농도는 DNA polymerase 1U, 250  $\mu$ M 각각의 dNTP, 50 mM Tris-HCl(pH 8.3), 40 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>이었으며 template DNA는 50 ng, primers는 각각 10 pmole씩을 첨가하였다. Primer의 디자인은 Hitachi사의 DNASIS for Windows(ver 2.5)프로그램을 이용하였다. Forward primer에는 XbaI제한효소 인식서열을, backward primer에는 BamHI인식 서열을 삽입하여 다음에 오는 enzyme 처리를 유리하게 하였다. PCR반응은 predenaturation을 94°C에서 3분, denaturation을 94°C에서 1분, annealing을 64.1°C에서 1분, extension을 72°C에서 1분하였으며, 반응량 20  $\mu$ l로 30회 실시하였다.

### PCR product의 검증

PCR로 증폭된 DNA fragment가 dnaK promoter인지를 확인하기 위해서 2% agarose gel에 PCR 반응이 종료된 후 2  $\mu$ l를 전기영동 하여 크기를 조사하였다. 또한 염기서열 분석을 위하여, pUC19 1  $\mu$ g을 NEB사의 BamHI과 XbaI으로 double digestion 하였다. 이때 buffer는 No.2를 사용하였고 reaction volume은 10  $\mu$ l, 온도는 37°C, 시간은 2시간 동안 반응하였다. 반응 후 QIAGEN사의 Qiaquick Nucleotide Removal kit으로 degest된 plasmid DNA와 PCR product를 각각 정제한 후, pUC19 정제 액에서 4  $\mu$ l(약 300 ng), PCR product 정제 액에서 1  $\mu$ l(약 100 ng), Promega사의 T4 DNA ligase buffer 1  $\mu$ l, DDW 4  $\mu$ l를 1.5 ml microfuge tube에 옮겨 담고 T4 DNA ligase 1.5 unit을 첨가한 후 22°C에서 3시간 반응하였다. 반응 후

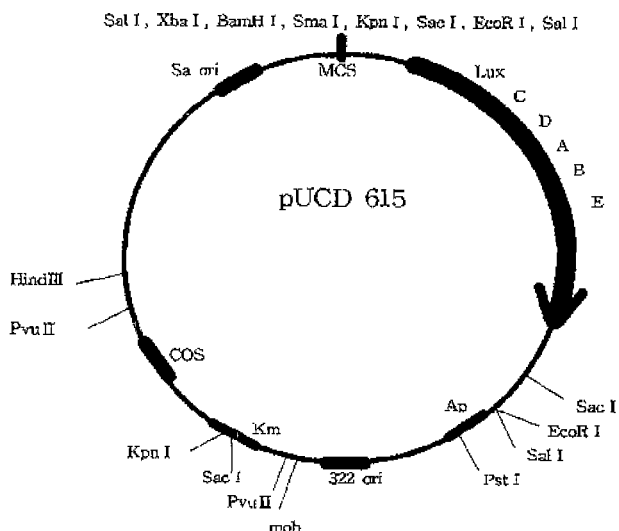


Fig. 2. Genetic map of pUCD615. The vector has two origins of DNA replication (Sa from pSa and 322 from pBR322) and two antibiotic resistance selectable markers (kanamycin and ampicillin).

CaCl<sub>2</sub>로 처리하여 만든 competent cell 60 µl에 ligation 반응액 5 µl를 넣고 형질 전환시켰다[4]. Blue-white screening을 위하여 LB plate(ampicillin 50 µg/ml)에 40 µg의 X-gal stock(20 mg/ml) 용액을 골고루 편 후 transformation이 끝난 배양액을 적당량 plate에 spread 하여 3 °C에서 overnight 하고 white colony 1개를 분리하여 LB broth (ampicillin 50 µg/ml)에서 overnight 배양한 후 염기서열 분석에 사용할 plasmid DNA를 추출하였으며 추출된 plasmid를 QIAGEN사의 Qiaquick Nucleotide Removal kit으로 정제한 후 염기서열을 분석하였다.

#### Plasmid pUCD615의 MCS에 *dnaK* promoter의 sub-cloning

Plasmid pUCD615의 multicloning site(MCS)를 *Xba*I과 *Bam*HI으로 자른 후, DNA를 정제하고 앞서 정제된 *dnaK* promoter와 ligation 하였다. 반응 후 competent *E. coli* LE392 40 µl와 ligation이 끝난 반응액 1 µl를 혼합한 후 transformation 효율을 높이기 위해 electroporation 방법을 이용하여 형질 전환하였다[1]. Electroporation system은 BIO-RAD사의 Gene Pulser II를 사용하였으며 2.5 kV, 25 µF, 200 Ω의 조건에서 시행하였다. Vector로 사용한 pUCD615의 multicloning site에는 recombination을 확인할 수 있는 marker가 없기 때문에 형질 전환시킨 후 LB agar(ampicillin 50 µg/ml) plate에서 1차로 선별된 colony들 중 *dnaK* promoter가 제대로 삽입된 재조합 균주를 선별하기 위해 이들 colony들을 다시 LB broth (ampicillin 50 µg/ml)에서 8시간 배양하고 배양액 1 ml씩 5개를 취한 후 ethanol을 0(control), 1, 2, 3, 4(%) 되도록 첨가하여 stress를 가한 후 Lumat LB9507(BERTHOLD사)로 생체발광량의 변화를 1시간 동안 관찰하였다. RLU(Relative Light Unit)값이 상승하는 배양액의 세포를 solid media에 다시 접종하여 bioluminescence의 유도효과를 보이는 colony를 분리하였으며 *E. coli*(KHα)로 명명하였다.

#### Plasmid vector pUCD615에 삽입된 *dnaK* promoter의 검증

Vector에 *dnaK* promoter가 삽입된 여부를 확인하기 위해 앞에서 분리된 즉, ethanol에 대해 bioluminescence가 유도된 2개의 colony를 LB broth(ampicillin 50 µg/ml)에 접종하고 overnight 배양하여 plasmids를 추출한 후 2% agarose gel에 전기 영동 하였으며 이때 hybridization의 검증을 위해 증폭된 *dnaK* promoter를 함께 전기영동 하였다. 전기영동 후 gel을 적당한 size로 절단한 후 depurination 15분, denaturation 30분, neutralization 30분 과정을 거쳐 48시간 동안 nitrocellulose membrane으로 transfer하였다. Membrane을 80 °C에서 2시간 동안 baking하였다. Probe DNA는 PCR을 이용하여 만들었으며 앞의 PCR 반응조건

과 같으나 dNTP 외에 추가로 당일 제조된 α<sup>32</sup>P dATP 4 µl를 첨가하였다. Prehybridization은 65 °C에서 3시간 하였고 hybridization은 같은 온도로 16시간 반응시켰으며 -70 °C에서 24시간 X-ray film에 노출시켰다.

#### Recombinant *E. coli*의 농도에 따른 ethanol stress에 대한 반응

재조합된 *E. coli*를 이용하여 여러 독성물질에 대한 반응을 측정하기 전, 농도에 따른 ethanol stress에 대한 반응성을 관찰하였다. LB broth(ampicillin 50 µg/ml)에 이미 선별된 재조합 *E. coli*의 colony를 접종한 후 37 °C, 150 rpm으로 배양하면서 6시간 배양액으로부터 1 ml를 취해 OD<sub>600</sub>를 측정하고 ethanol(4%)을 첨가하여 1시간 동안 luminometer로 RLU를 측정하였다.

#### Recombinant *E. coli*의 독성물질에 대한 반응 시험

Recombinant *E. coli*의 여러 독성물질에 대한 반응을 조사하기 위하여 균주를 LB broth(ampicillin 50 µg/ml)에 접종한 후 37 °C, 150 rpm으로 약 8시간 배양하여 ethanol에 대한 반응성이 가장 높았던 농도의 세포(OD<sub>600</sub> 0.3±0.02) 1 ml씩 5개를 취하여 FeK<sub>3</sub>(CN)<sub>6</sub>를 0(control), 0.1, 1, 10, 100(ppm) 되도록 첨가하여 luminometer로 RLU를 1시간 동안 측정하였다. Control은 DDW 10 µl를 첨가하였으며, 나머지의 농도는 최종적으로 100배가 희석 될 수 있도록 여러 농도의 FeK<sub>3</sub>(CN)<sub>6</sub> stock solution으로부터 10 µl씩을 첨가하여 동일한 조건으로 stress를 가하였다. 같은 방법으로 *p*-nitrophenol, cadmium chloride, lead chloride, mercuric chloride 등에 대해서도 반응을 측정하였다. 특히 CdCl<sub>2</sub>는 1,000 ppm에서도 bioluminescence 유도효과를 측정하였다.

#### 배지, 시약 및 장비

사용된 *E. coli*용 배지는 LB 배지로서 조성은 NaCl 10 g/l, tryptone 10 g/l, yeast extract 5 g/l이고 고체배지는 agar를 15 g/l의 농도를 첨가하였다. Selective marker로서 ampicillin의 농도를 모두 50 µg/ml로 하였다. PCR은 BIONEER사의 AccuPower™ PCR PreMix를 사용하였고, Template DNA의 농도는 SHIMADZU UV-1201 spectrophotometer로 260 nm에서 측정하였다. Primer는 BIONEER사로부터 주문 합성하였다. Enzyme reaction과 plasmid를 추출한 후 DNA의 gel로부터의 정제는 각각 QIAGEN사의 Qiaquick Nucleotide Removal kit, Qiaquick Gel Extraction kit를 사용하였다. 효소는 NEB사로부터 *Bam*HI과 *Xba*I을 Promega사로부터 T4 DNA ligase를 주문하였다. 염기서열 분석은 Amersham사의 T7 Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing kit을 사용하였고 isotope는 동회사의 [α<sup>35</sup>S] dATP AG 1000을 사용하였으며, southern hybridization의 probe DNA의 labelling은 [α<sup>32</sup>P] dATP AA 0004를 사용

하였다. Electroporation system은 BIO-RAD사의 Gene Pulser II를 사용하였으며, Bioluminescence의 측정은 BERTHOLD사의 Lumat LB9507로 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 복제된 PCR product의 검증

*DnaK* promoter를 복제하기 위하여 DNASIS 프로그램을 이용하여 디자인한 primer를 Table 1에 나타내었다. 디자인된 26 bp 각각의 primer에 9 bp의 제한효소인식서열을 삽입하였으며 PCR 반응의 annealing 온도는 64.1 °C이었다. Forward primer의 G와 C의 염기의 함량은 33%이고 backward primer에서의 함량은 37%이었다. *E. coli* K-12의 변종인 *E. coli* LE392의 chromosomal DNA를 template로 PCR을 한 후 그 product를 2% agarose gel에서 150 V로 1시간 전기영동을 한 결과 Fig. 3에서 보듯이 약 200 bp의 DNA fragment(lane2)가 증폭되었다. 또한, PCR product의 염기서열을 분석한 결과는 Table 2에 나타내었으며 이것은 Cowing 등[6]의 것과 일치하였다.

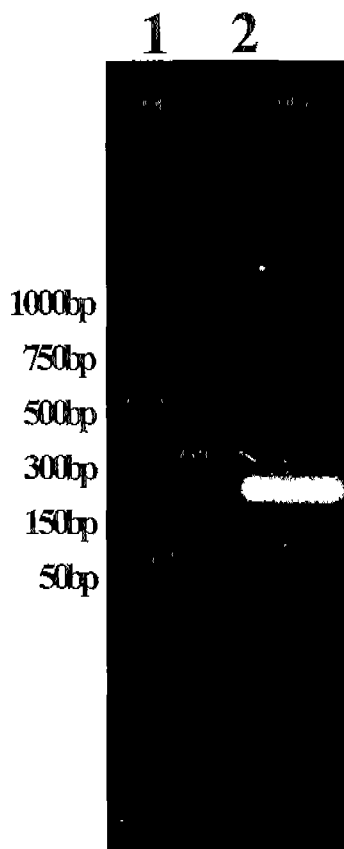


Fig. 3. PCR product amplified with *E. coli* LE392 genomic DNA as a template (lane 1 size marker: from the top, 1 kbp, 750 bp, 500 bp, 300 bp, 150 bp, 50 bp)

Table 1. Primers designed in this study

	G/C(%)	Tm	Sequence *
Forward	33	64.1	<u>ccgctc</u> gagcgcaaaagcaca <del>aaaaattttt</del> gcat
Backward	37	64.1	<u>cgggat</u> cccacatctaaacgtctccactatataitcg

\*To construct primers, restriction enzyme recognition sequences(*Xba*I ctegag, *Bam*HI ggatcc) were included and underlined.

Table 2. Sequence of DNA fragment amplified by PCR

Sequence
aaaagcaca aaaattttg catctcccc tgatgacgt ggttacgac cccattagtagtcaaccgc agtgagtgag tctgcaaaaa aatgaaattg ggcagttgaa accagacgtt tcgccctat tacagactca caaccacatg algaccgaat atagtaggga gacgtttagatg

### 재조합 *E. coli*의 screening 및 세포 농도의 최적조건

*DnaK* promoter가 plasmid pUCD615의 multi-cloning site에 삽입된 *E. coli*를 선별하기 위해 형질전환 후 강력한 heat shock response를 유도하는 ethanol[22, 23] stress를 가하여 1시간 동안의 RLU(Relative Light Unit)의 변화량을 측정하였으며 culture broth를 solid media에 배양 후 bioluminescence 유도 현상을 보이는 colony를 선별하였다. 선별된 형질 전환된 균주는 ethanol농도를 달리하여 bioluminescence 유도 효과를 조사하였으며 약 20분이 경과 하면서 RLU값이 모든 농도의 ethanol에 대하여 상승하였고 농도가 높아질수록 RLU값이 상승하였다. Fig. 4에서 보듯이 ethanol을 첨가하지 않았을 때는 거의 bioluminescence량이 변화되지 않았고 ethanol의 농도를 증가시키면 따라 RLU 값이 비례 증가하였다. Ethanol 농도가 3%와 4%에서는 RLU값이 비슷하게 나타났다. 이것은 Dyk[7]등이 ethanol 2%와 4%로 실험하였을 때의 결과와 비슷하며 vector에 삽입된 *dnaK* promoter가 주어진 ethanol stress에 의해 유도되었기 때문이다. 또한 Fig. 5에서 보여지듯이 최대치의 bioluminescence를 생성하는 세포의 농도는 OD<sub>600</sub> 0.29일 때이며 ethanol을 가한 후 20분 정도가 지나면서 RLU가 증가하기 시작하였고 세포농도가 OD<sub>600</sub> 0.36부터는 RLU의 값이 낮아졌다. 또한 세포농도가 OD<sub>600</sub> 0.29일 때 최대치의 RLU 값을 보였다.

### pUCD615의 MCS에 *dnaK* promoter 삽입

Ethanol에 대해 RLU값이 증가한 colony1과 colony2를 얻었으며 이들로부터 plasmid DNA를 추출하고 *dnaK* promoter가 vector에 삽입되었는지를 Southern hybridization으로 확인하였다. Fig. 6에서 보듯이 lane 2에는 *dnaK* promoter를 loading하여 hybridization을 검증하는 marker로 사용하였고, lane 3과 lane 4에는 2개의 colony로부터 추출한 plasmids를 각각 loading 하였다. 왼쪽 사진은 전기 영동 한 후 찍은 gel 상의 사진이며 오른쪽은 X-

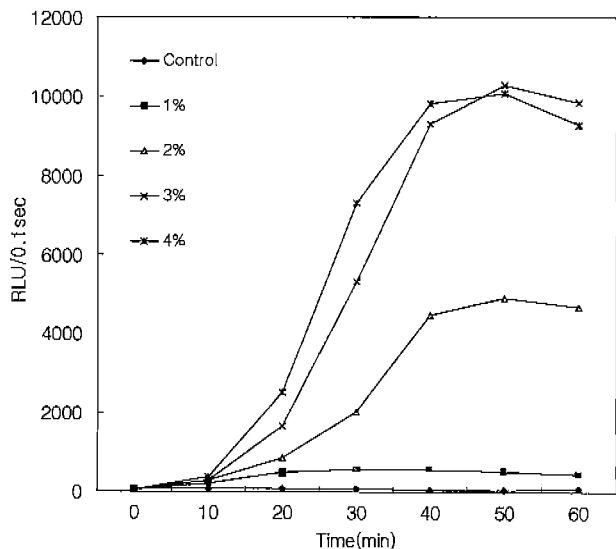


Fig. 4. Bioluminescence production from recombinant *E. coli* (KH  $\alpha$ ) stressed with various ethanol concentrations ranging from 0 to 4%. The concentration of cell was 0.32 at OD<sub>600</sub> and cells were cultivated at 37 °C.

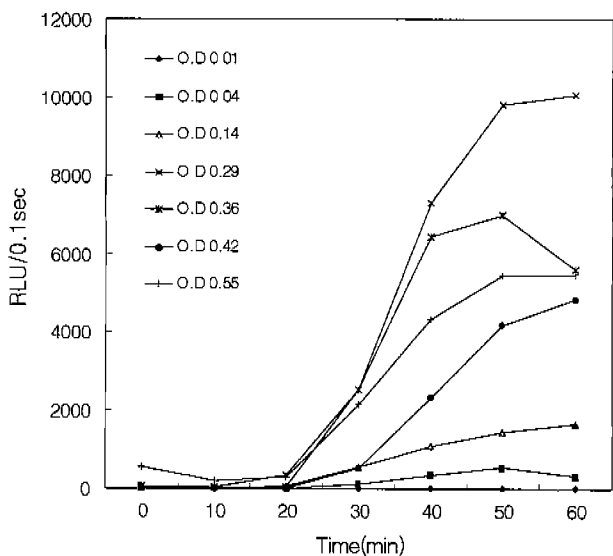


Fig. 5. Bioluminescence responses of various concentrations of recombinant *E. coli* (KH  $\alpha$ ) with 4% (w/w) ethanol.

ray 필름에 노출시킨 결과사진이다. Probe의 염기서열은 lane 2의 *dnaK* promoter와 같고 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dATP로 labeling 되었다. 오른쪽 사진에서 lane 2의 *dnaK* promoter와 probe가 hybridization이 되었으므로 이 반응은 옳음을 검증할 수 있으며 lane 3과 lane 4의 각각의 plasmid에서도 probe가 hybridization이 되었으므로 *dnaK* promoter가 삽입되었음이 확인되었다.

독성물질 반응 시험

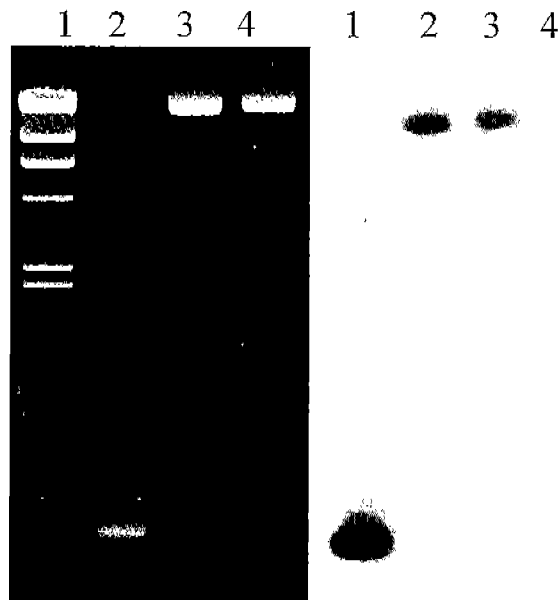


Fig. 6. *dnaK* promoter inserted into the MCS of pUCD615 was identified with southern hybridization. (lane 1:  $\lambda$  Hind III marker; from the top, 23,130 bp, 9,416 bp, 6,557 bp, 4,361 bp, 2,322 bp, 2,027 bp, lane 2: PCR product, lane 3, 4: plasmid of colony 1, colony 2).

독성물질은 FeK<sub>3</sub>(CN)<sub>6</sub>, *p*-nitrophenol, cadmium chloride, lead chloride, mercuric chloride를 사용하였으며 각각의 독성물질에 대하여 3차례 반복실험을 행하였다. 세포의 농도는 37 °C에서 150 rpm으로 약 8시간 배양하여 OD<sub>600</sub> 0.3±0.02일 때 실험에 이용하였으며 독성물질을 첨가 후 10분단위로 RLU를 측정하였다. PbCl<sub>2</sub>의 경우는 뚜렷한 반응이 관찰되지 않았으나, 나머지 물질들에 대해서는 stress 후 RLU값이 상승하였다.

FeK<sub>3</sub>(CN)<sub>6</sub>의 경우 Fig. 7에서 보듯이 100 ppm의 농도에서 40분이 경과하면서 RLU값이 상승하였다. 초기 RLU값이 80분이 경과한 후 약 250으로 background 수치의 5배의 bioluminescence가 발생하였다. 그러나 FeK<sub>3</sub>(CN)<sub>6</sub>이 10 ppm 농도이하에서는 RLU값의 뚜렷한 변화가 없는데 이것은 대개의 생물은 stress가 없는 정상조건에서도 상당한 양의 heat shock proteins을 계속해서 생산하므로 0.1 ppm과 1 ppm의 FeK<sub>3</sub>(CN)<sub>6</sub>의 독성과 정상조건에서 만들어지는 heat shock proteins과의 원충작용 때문이라 생각된다.

Cadmium chloride의 경우는 10 ppm, 100 ppm에서 약 40분이 경과하면서 RLU 값이 상승했으며 10 ppm의 경우 60분 경과 후 초기보다 약 2.3배, 100 ppm의 경우 약 2.7배가 각각 증가하였다(Fig. 8). 특히 100 ppm의 경우 stress후 45분까지 RLU가 서서히 감소하다가 상승하는데 이것은 주어진 stress로 인하여 세포의 viability가 감소하다가 heat shock protein이 대량으로 발현되어 체내 축적이 됨으로써 회복하기 때문인 듯하다[6].

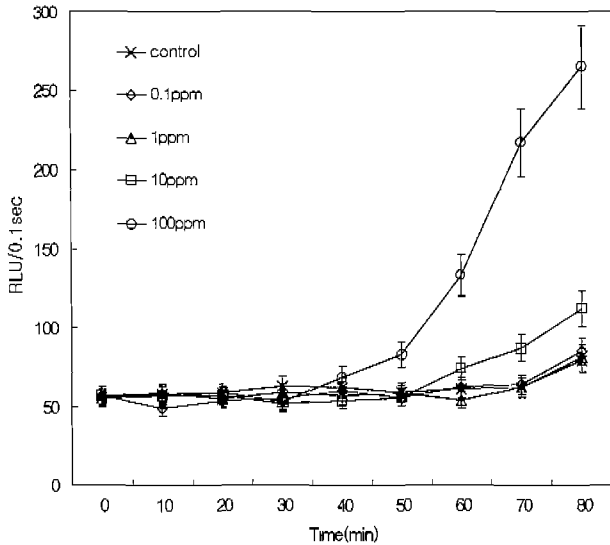


Fig. 7. Bioluminescent responses of *E. coli*(KH  $\alpha$ ) to various concentrations of  $\text{FeK}_3(\text{CN})_6$ . The cell concentration used was  $0.3 \pm 0.02$  at  $\text{OD}_{600}$ .

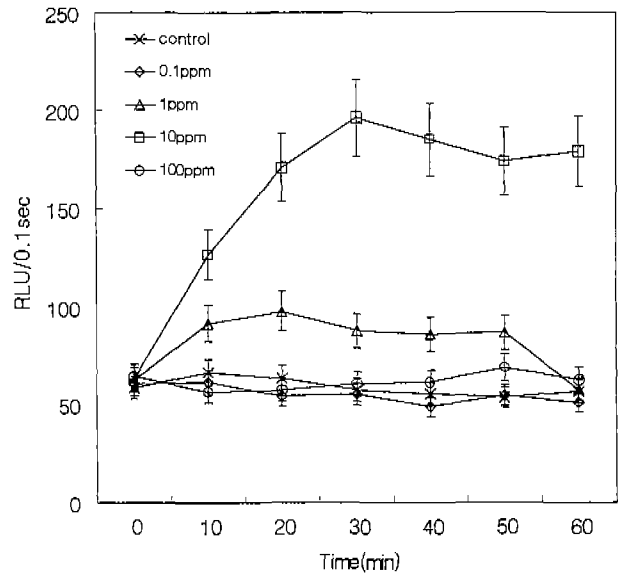


Fig. 9. Bioluminescent responses of *E. coli*(KH  $\alpha$ ) to various concentrations of *p*-nitrophenol. The cell concentration used was  $0.3 \pm 0.02$  at  $\text{OD}_{600}$ .

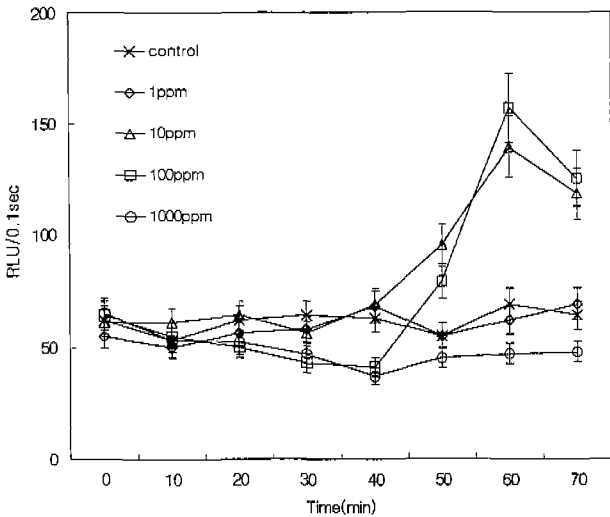


Fig. 8. Bioluminescent responses of *E. coli*(KH  $\alpha$ ) to various concentrations of  $\text{CdCl}_2$ . The cell concentration used was  $0.3 \pm 0.02$  at  $\text{OD}_{600}$ .

*p*-nitrophenol은 1 ppm, 10 ppm에서 10분이 채 경과하지 않았음에도 RLU값이 상승하였고 1 ppm의 경우 20분 경과 후 back ground 값보다 약 1.5배 증가하였으며 10 ppm의 경우 30분 경과 후 약 4배가 증가하였다(Fig. 9). Heat shock protein의 유도는 stress물질에 따라 1-2분내에 일어나기도 하는데[18] 본 실험의 경우 *p*-nitrophenol이 test한 독성물질 중 가장 빠른 반응속도를 나타내었다. 이것은 아마도 phenol류의 유기용매가 중금속보다 세포 내 heat shock protein의 생산속도가 급격하게 증가되고 bioluminescence expression도 활성화되는 것으로 사료된다.

Fig. 10에서 보듯이 mercuric chloride의 경우 1 ppm에

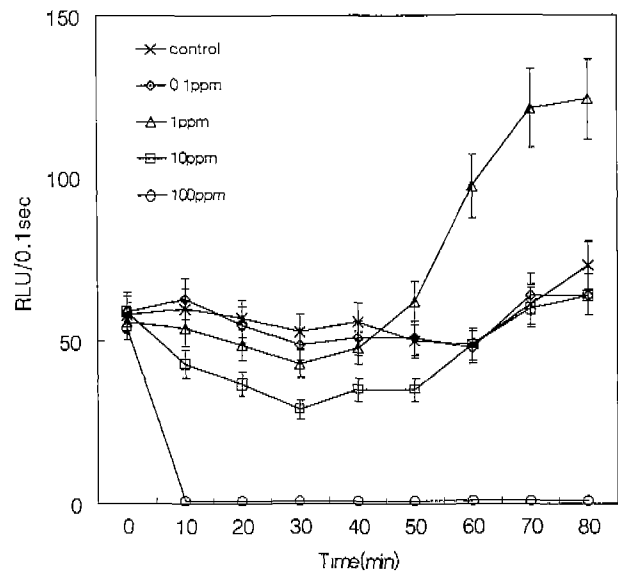


Fig. 10. Bioluminescent responses of *E. coli*(KH  $\alpha$ ) to various concentrations of  $\text{HgCl}_2$ . The cell concentration used was  $0.3 \pm 0.02$  at  $\text{OD}_{600}$ .

서 40분이 경과하면서 반응이 나타났다. 80분이 경과하였을 때 RLU가 초기 값보다 약 2배가 증가하였다. 그러나 100 ppm이 첨가되었을 때는 급격히 감소하여 10분이 채 안되어 RLU값이 거의 측정되지 않았으며 10 ppm의 농도에서는 RLU값이 감소하다가 서서히 회복하는 결과를 보였다. 이는 10 ppm이상의  $\text{HgCl}_2$  농도에서는 세포의 viability가 떨어져서 빛 발생 mechanism에 저해가 일어나기 때문이며 특히, 100 ppm에서는 세포의 생존이 불가능하기 때문에

bioluminescence 생성이 중단된 것이다.

Test한 5개의 독성물질중 *p*-nitrophenol의 경우 반응시간이 10분 미만으로 가장 빨랐으며 PbCl<sub>2</sub>를 제외한 나머지 물질들의 경우 공통적으로 약 40분에서 50분 정도가 소요되었고 앞에서 측정된 ethanol의 경우 약 20분 정도가 소요되었다. 대개의 미생물은 stress가 없을 때에도 heat shock protein은 어느 정도 계속해서 생성되며, 장현수[12]는 *E. coli* LE392에 CdCl<sub>2</sub>를 첨가하여 stress를 주었을 때 220, 73, 53, 43, 42, 41, 30, 38, 37, 25KD의 protein 생산이 증가되었으며, 100 ppm의 CdCl<sub>2</sub>이 첨가되어도 cell이 성장하였으나 100 ppm을 초과한 농도에서는 cell이 성장하지 못함을 보고하고 있는데 이는 Fig. 8의 결과와 유사하다. 정상 조건에서 생성되는 heat shock protein의 완충능력이, 독성물질이 cell에 미치는 독성과 비교할 때 비슷하거나 약간의 차이가 있을 경우 RLU는 변화가 없거나 (CdCl<sub>2</sub> 1 ppm; FeK<sub>3</sub>(CN)<sub>6</sub> 0.1 ppm, 1 ppm; *p*-nitrophenol 0.1 ppm; HgCl<sub>2</sub> 0.1 ppm의 경우) 서서히 증가하며 (FeK<sub>3</sub>(CN)<sub>6</sub> 10 ppm의 경우) 독성이 너무 강할 경우는 cell의 viability를 감소시키며 오히려 RLU를 떨어뜨리는 것으로 나타났다(HgCl<sub>2</sub> 100 ppm의 경우). 또한 독성이 강하긴 하나 치명적이지 못할 경우는 반응 초기에 cell의 viability가 감소하며 RLU가 일시적으로 감소하지만 heat shock proteins의 생산이 빨라지면서 서서히 회복하기도 한다(CdCl<sub>2</sub> 100 ppm, 1,000 ppm; HgCl<sub>2</sub> 1 ppm, 10 ppm의 경우). 본 연구에서의 heat shock promoter와 lux operon을 도입한 재조합 *E. coli*의 경우 FeK<sub>3</sub>(CN)<sub>6</sub>은 10 ppm 이상, CdCl<sub>2</sub>은 10 ppm 이상, *p*-nitrophenol은 1 ppm 이상 그리고 HgCl<sub>2</sub>는 1 ppm 이상일 때 독성물질의 유무를 나타내는 반응이 나타났다. 반응의 민감성을 높이기 위하여 *E. coli*의 outer membrane을 제거하여 cytotoxic물질에 대한 독성반응이 민감하게 일어나게 한 보고도 있으며[5], bioluminescence 유전자를 도입한 미생물을 이용한 독성물질의 monitoring system 개발을 위하여 본 연구가 진행되었으며 특정 독성 물질에만 반응하는 promoter의 개발을 통해 검출 특이성을 향상시키고, cell membrane의 투과성을 개선하여 검출농도에 대한 민감성을 높일 수 있는 연구가 계속 요구되어진다.

## 요 약

Stress에 반응하여 bioluminescence를 증가시키는 재조합 *E. coli*를 만들기 위해 lux operon의 구조유전자와 heat shock promoter를 연결하였으며, 재조합 대장균을 5가지의 독성물질에 대하여 bioluminescence 유도효과를 실험하였다. 독성물질로 사용한 FeK<sub>3</sub>(CN)<sub>6</sub>, CdCl<sub>2</sub>, *p*-nitrophenol, HgCl<sub>2</sub>, PbCl<sub>2</sub> 중 FeK<sub>3</sub>(CN)<sub>6</sub>의 경우 100 ppm의 농도에서, cadmium chloride의 경우는 10 ppm, 100 ppm에서, *p*-nitrophenol은

1 ppm, 10 ppm에서, mercuric chloride은 1 ppm에서 각각 RLU 값이 증가하였으며 PbCl<sub>2</sub>의 경우는 거의 반응이 나타나지 않았다. Stress를 가한 후 *p*-nitrophenol은 10분 미만에서 나머지는 약 40분이 경과해서 각각 반응이 나타났다.

## 감사의 글

본 연구는 1998년도 학술진흥재단 자유공모과제(학진300-1138)의 지원으로 수행된 연구결과이며 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

1. Ausubel, F., R. Bren, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl. 1995. *Short Protocols in Molecular Biology*, pp. 1-22-1-23. Wiley, 3th ed.
2. Buzin, C. H. and N. B. Vardiabasiasin. 1982. In *Heat Shock from Bacteria to man*, pp. 387-394. CSH Laboratory, CSH, NY.
3. Banecki, B. and M. Zylicz. 1996. Real time kinetics of the DnaK/DnaJ/GrpE Molecular chaperone machine action. *J. Biol. Chem.* **271**: 6137-6143.
4. Bloom, F. M. 1996. *Laboratory DNA Science*, pp.125-140. The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc.
5. Beja, O. and E. Bibi. 1996. Functional expression of mouse Mdr1 in an outer membrane permeability mutant of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 5969-5974.
6. Cowing, D. W., J. C. A. Bardwell, E. A. Craig, C. Woolford, R. W. Hendrix, and C.A. Gross. 1985. Consensus sequence for *Escherichia coli* heat shock gene promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 2679-2683.
7. Dyk, T. K. V., W. R. Majarian, K. B. Konstantinov, R. M. Young, P. S. Dhurjati, and R. A. Larossa. 1994. Rapid and sensitive pollutant detection by induction of heat shock gene-bioluminescence gene fusions. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:1414-1420.
8. Erbe, J. L., A. C. Adams, K. B. Taylor, and L. M. Hall. 1996. Cyanobacteria carrying on *smt-lux* transcriptional fusion as biosensors for the detection of heavy metal cations. *J. Indust. Microbiol.* **17**: 80-83.
9. Foran, D. R. and W. M. Brown. 1988. Nucleotide sequence of the luxA and luxB genes of the bioluminescent marine bacterium *Vibrio fischeri*. *Nucleic Acids Res.* **16**: 777-779.
10. Heitzer, A., O. F. Webb, J. E. Thennard, and G. S. Saylor. 1992. Specific and quantitative assessment of naphthalene and salicylate bioavailability by using a bioluminescent catabolic reporter bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1839-1846.
11. Heitzer, A., K. Malachowsky, J. E. Thonnard, P. R. Bienkowski, D. C. White, and G.S. Saylor. 1994. Optical biosensors for environmental on-line monitoring of naphthalene and salicylate bioavailability with and immobilized bioluminescent catabolic reporter bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 1487-1494.

12. Jang, H. S., 1996. *Studies on the Stress Proteins of Aquatic Microbes Induced by Toxic Materials*, pp. 22–48. Ms. Thesis. Kyunghee university.
13. James, P., C. Pfund, and E. A. Craig. 1997. Functional specificity among Hsp70 molecular chaperones. *Science* **275**: 17.
14. Loessner, M. J., M. Rudolf, and S. Scherer. 1997. Evaluation of luciferase reporter bacteriophage *AS11::luxAB* for detection of *Listeria monocytogenes* in contaminated foods. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 2961–2965.
15. Lewin, B. 1997. *Genes*(6th edition), pp. 246–251. Oxford University Press.
16. Meighen, E. A. 1988. Enzymes and genes from the *lux* operons of bioluminescent bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **42**: 151–176.
17. Meighen, E. A. 1991. Molecular biology of bacterial bioluminescence. *Microbiol. Rev.* **55**: 123–142.
18. Neidhardt, F., R. Vanbogelen, and V. Vaughn. 1984. The genetics and regulation of heat shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* **18**: 295–329.
19. Ptitsyn, L. R., G. Horneck, O. Komova, S. Kozubek, E. A. Krasavin, M. Bonev, and P. Rettberg. 1997. A biosensor for environmental genotoxic screening based on an SOS lux assay in recombinant *Escherichia coli* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4377–4384.
20. Rouch, D. A., J. Porkhill, and N. L. Brown. 1995. Induction of bacterial mercury and copper responsive promoters: Functional differences between inducible systems and implication for their use in gene-fusions for *in vivo* metal biosensors. *J. Indust. Microbiol.* **14**: 349–353.
21. Selifonova, O., R. Burlage, and T. Barkay. 1993. Bioluminescent sensors for detection of bioavailable Hg(II) in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 3083–3090.
22. Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, pp. 9–13. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
23. Welch, W. 1990. *The mammalian stress response : Cell physiology and biochemistry of stress proteins*, pp. 223–278. In R. I. Mortimoto, A. Tissieres, and C. Georgopoulos(eds.), *Stress Proteins in Biology and Medicine*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
24. Zhu, X., X. Zhao, W. F. Burkholder, A. Gragerov, C. M. Ogata, M. E. Gottesman, and W. A. Hendrickson. 1996. Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone *DnaK*. *Science* **272**: 14–16.

(Received January 7, 1999)