

A Recombinant Microbial Biosensor for Cadmium and Lead Detection

Hae Ja Shin*

Energy Environmental Engineering Major, Division of Energy Bioengineering, Dongseo University, Busan 47011, Korea

Received January 4, 2016 / Revised May 11, 2016 / Accepted May 16, 2016

Biosensors have been used as first-step monitoring tools to detect on-site samples in a simple and cost-effective manner. Numerous recombinant microbial biosensors have been exploited for monitoring on-site toxic chemicals and biological signals. Herein, a recombinant microbial biosensor was constructed for monitoring cadmium. The cadmium responding *cadC* regulatory gene and its promoter from *Staphylococcus aureus* was amplified through PCR, fused with the *lacZ* gene, and transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3) cells. In the presence of cadmium, the biosensor cells express β -galactosidase showing red color development with chlorophenol red β -galactopyranoside (CPRG) as the enzymatic substrate. The biosensor cells showed the best β -galactosidase activity after 3 hr induction with cadmium at pH 5 and a detection range from 0.01 μ M to 10 mM cadmium with a linearity from 0.01 to 0.1 μ M cadmium ($y = 0.98x + 0.142$, $R^2 = 0.98$). Among the heavy metals, cadmium and lead showed good responses, tin and cobalt showed medium responses, and mercury and copper showed no responses. The biosensor cells showed good responses to several waste waters similar to buffer solution, all spiked with cadmium. The biosensor described herein could be applied for on-site cadmium monitoring in a simple and cost-effective manner without sample pretreatments.

Key words : Cadmium, heavy metals, recombinant microbial biosensor

서 론

중금속은 자연계에 널리 분포하고 있을 뿐만 아니라 자동차 배기가스, 납-산 배터리, 화학비료, 광산업 등 많은 산업분야의 생활, 농업, 의학 등 여러 기술 분야에서 배출되고 있어 인간은 매일 많은 중금속에 노출되어 살아가고 있다[20]. 난분해성 중금속은 자연 생태계에서 인체로 들어와 축적되며 잘 알려진 이따이이따이병, 미나마타병, 폐암, 치매나 파킨슨씨병과 같은 뇌기능장애, 골연화증, 신장병 등을 일으킨다고 보고되었다[20].

이러한 중금속 검출은 고전적인 방법으로 주로 AAS나 ICP-MS와 같은 고가의 기기를 활용하는 데 숙련된 운영 방법 및 인력을 필요로 한다[2]. 고가의 기기적인 검출방법은 매우 정밀하고 정교한 장점이 있으나 복잡하며 전처리 과정이 필요하고 많은 현장시료를 분석하는 데 고비용 비효율적이다. 또한 고가의 기기들은 생태계에 잔류하는 총 화합물들의 농도에 대한 정보는 공급할 수 있으나 생물체 내 유효성에 대한 정보와 생물체에 미치는 독성농도에 대한 정보를 줄 수 없다[1, 3, 6, 9]. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 세포 근거 센싱

시스템을 활용하거나 중금속과 결합하는 단백질과의 상호작용을 연구하는 다양한 접근 방법이 시도되고 있다[16, 18]. 다양한 독성 화합물을 검출하기 위해 미생물이 가지고 있는 특정 화합물들을 센싱하는 기능을 이용하여 세포 근거 센싱 시스템들이 개발되고 있다. 이러한 시스템들은 유전자 재조합 미생물을 활용하거나 미생물이 독성 물질들의 존재를 인지하여 검출신호를 내는 고유의 유전자를 갖는 세포들을 활용한다 [7-8, 11-13, 17, 21-23].

독성 중금속을 센싱하는 시스템을 디자인하기 위해 미생물은 독성 금속 환경에서도 살아남을 수 있어야 한다. 미생물은 독성 중금속을 인지하고 단백질을 생산하여 독성을 비독성으로 바꾸거나 세포내 침전 또는 축적한 후 세포 밖으로 배출한다[16, 18]. 일부 금속들은 미생물의 필수 영양소이나 생물학적으로 아무런 기능이 없는 카드뮴, 구리, 수은, 주석 등은 미생물의 다양한 거부 기작을 통해 세포 밖으로 배출된다[5, 14].

본 연구에서는 재조합 미생물 바이오센서를 활용하여 간단하고 저렴하게 카드뮴을 모니터링 하였다. 중금속 카드뮴 조절 유전자, *cadC*을 리포터 유전자 *lacZ*와 결합하여 미생물 바이오센서 플라스미드를 만들고 이를 대장균에 형질 전환하여 카드뮴 검출용 바이오센서를 제작하고 최적 조건과 여러 시료 중 카드뮴의 검출 가능성을 조사하였다.

재료 및 방법

세포 배양

*Staphylococcus aureus*은 tryptic soy broth, 37°C에서 진탕

*Corresponding author

Tel : +82-51-320-1791, Fax : +82-51-320-1781

E-mail : hjshin@gdsu.dongseo.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

배양하였다. 형질 전환된 *Escherichia coli* DH5a와 BL21 (DE3)는 30 µg/ml ampicillin을 포함하는 TYS media (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 그리고 0.5% NaCl), 37°C에서 키웠다.

시약

본 연구에서 사용한 시약은 모두 특급시약을 사용하였으며 대부분 Sigma-Aldrich에서 주문하여 정제 없이 사용하였다.

pLZCadC 바이오센서 plasmid 제작

바이오센서 plasmid (pLZCadC) 제작을 위해 미국 NCBI gene bank를 검색하고 *cadC* regulatory 유전자와 관련 promoter 유전자를 *Staphylococcus aureus* 염색체 유전자로부터 다음과 같은 primers를 사용하여 94°C 1분, 57°C 3분, 72°C 3분에서 25 cycles로 PCR 증폭하고 증폭된 유전자를 전기영동으로 확인하였다: forward 5'-GAA GCG GGT ACC TTG ACT ATT TGT TTA TAG (Kpn I 자리 포함), reverse 5'-GAA GCG GCT AGC CTA TCC AAT ACT AGC AAC (Nhe I 자리 포함). 증폭된 *cadC* 유전자를 TA cloning vector에 넣고 blue colony를 선별하고 전기영동으로 확인한 후 Kpn I 과 Nhe I 으로 자르고 gel-isolation 하였다. 잘린 *cadC* 유전자를 같은 제한 효소로 자른 pLZCapR [13]의 backbone과 ligation한 후 이 플라즈미드(pLZCadC)를 *E. coli* DH5a에 transform하고 colony PCR로 확인/선별한 후 선별된 colony의 miniprep plasmids을 다시 *E. coli* BL21 (DE3)에 형질 전환하여 바이오센서 세포로 활용하였다. 염색체 DNA는 NucleoSpin Microbial DNA 정제 kit (Macherey-Nagel, Germany)로 플라즈미드 DNA는 Qiagen spin column kit (Qiagen, Germany)을 이용하여 정제하였으며 Cloning과 ligation은 표준 방법[19]을 이용하여 수행하였고 plasmid pLZCadC은 CaCl₂방법으로 *E. coli* DH5a와 BL21 (DE3)에 형질 전환하였다.

실험 조건 최적화 연구

실험 조건의 최적화를 결정하기 위해 다양한 세포량(10~60 µl), induction 시간(1~5 hr), 및 pH (pH 4&5은 50 mM acetate buffer, pH 6&7은 50 mM Bis-Tris buffer, pH 8~10은 50 mM bicine buffer를 사용) 등의 실험 조건에서 바이오센서 세포의 β-galactosidase activity를 측정하였다.

β-galactosidase assay

β-galactosidase 기질로 chlorophenol red-β-D-galactopyranoside (CPRG)를 선택하여 기질의 분해를 노란색에서 붉은 색으로 변색됨으로 확연히 구별되도록 하였다. 바이오센서 세포를 96 multiwells에 넣고 카드뮴이 있는(현장)시료를 첨가하고 3시간 유도한 후에 원심분리로 세포를 모아 5% Triton X-100 (in 50 mM phosphate buffer, pH 7)를 넣어 lysis하였다. Lysis한 세포에 CPRG를 넣고 1시간 정도 incubate한 후 Elisa

plate reader (Versa Max, VA)을 사용하여 570 nm에서 CPRG 분해를 흡광도로 정량적으로 측정하여 분석하였다[4].

민감도 및 특이성 조사

바이오센서 세포의 민감도는 카드뮴 최종 농도가 0.01 µM에서 10 mM까지 되도록 바이오센서 세포에 넣고 3시간 유도한 후 β-galactosidase의 활성을 OD₅₇₀ nm에서 측정하였다. 또한 카드뮴 검출용 바이오센서의 특이성은 바이오센서가 다른 금속에 반응을 보이는 지를 통해 조사하였다. 최종 농도가 1 µM이 되도록 CdCl₂, PbCl₂, HgCl₂, SnCl₂, CoCl₂, CuCl₂를 같은 양의 세포에 넣고 3시간 유도 후 β-galactosidase의 활성을 조사하였다.

시료 측정

각 폐수처리장에서 수집하여 온 폐수는 0.2 mm 크기의 막을 통해 여과를 하거나 여과 없이 카드뮴(최종농도 1 µM)을 spike하고 바이오센서 세포가 있는 wells에 넣고 3시간 후 β-galactosidase의 활성을 조사하고 같은 조건에서 카드뮴으로 spike한 완충용액 결과와 비교 검토하였다.

결과 및 고찰

pLZCadC 제작

카드뮴 검출용 바이오센서 플라즈미드를 제작하기 위해 *Staphylococcus aureus*로부터 카드뮴에 반응하는 유전자 *cadC*와 프로모터 유전자를 PCR로 증폭하고 *lacZ* 유전자와 결합하여 플라즈미드, pLZCadC를 제작한 후 *E. coli* BL21 (DE3)에 형질 전환 하였다(Fig. 1). CadC 단백질은 항상 소량으로 생합성 되고 관련 프로모터에 결합하여 RNA 전사를 방해하는 음성 조절인자이나 카드뮴이 존재할 때는 CadC 단백질이 카드뮴과 결합하여 프로모터에서 떨어져 나와 RNA 전사가 일어나도록 조절한다고 알려져 있다[20, 24]. 본 연구에서는 프로모터 자리 바로 다음에 *lacZ* 유전자를 도입하여 전사가 일어날 때에 β-galactosidase가 발현되도록 하였다.

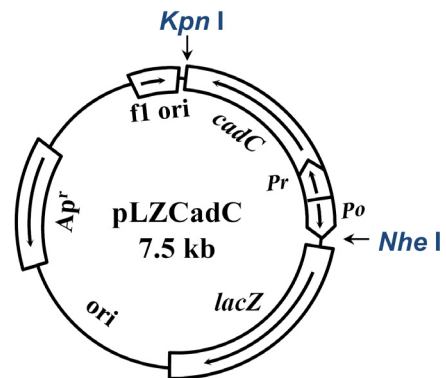


Fig. 1. Schematics of pLZCadC.

카드뮴 검출용 바이오센서의 최적 조건 연구

카드뮴은 세포 안으로 들어가 CadC 단백질과 결합하여 전사를 시작하게 하며 β -galactosidase를 발현시키고 β -galactosidase 기질인 CPRG의 분해 산물이 세포 밖으로 배출되어 발색되게 한다. 그러므로, 카드뮴 바이오센서는 미생물 세포의 생리적 상태와 세포의 생존에 영향을 미치는 다양한 실험 변수들에 의해 영향을 받을 수 있다[10, 15]. 카드뮴 검출용 바이오센서의 최적 조건을 조사하기 위하여 다양한 조건에서 바이오센서의 β -galactosidase의 활성을 측정하였다. 먼저 카드뮴이 세포로 들어가서 얼마나 빠르게 β -galactosidase를 활성화시키는 지 조사하였다(Fig. 2A). 정해진 세포의 양에 같은 양의 카드뮴(최종농도 1 μ M CdCl₂)을 시간 별로 처리한 후 세포를 5% Triton x-100 (in 0.1 M phosphate buffer, pH 7)으로 lysis 하고 CPRG을 기질로 β -galactosidase의 활성을 측정하였다. β -galactosidase의 활성은 3시간까지 증가하다가 3시간에서 최고 활성을 나타낸 후 감소하였다(Fig. 2A). 다른 바이오센서 세포의 유도에서도 대략적으로 2~3시간 또는 5~6시간 정도 걸리는 것으로 보고 되고 있다[7-8, 11, 13, 23]. 따라서 모든 실험의 유도시간을 3시간으로 하였다. Control 실험으로 expression vector를 갖지 않는 *E. coli* BL21 (DE3)을 똑같이 처리하여 5시간까지 관찰하였으며 바이오센서 세포와 같은 반응을 보여 주지 않았다. Fig. 2B에서는 세포의 양에 따른 β -galactosidase의 활성을 조사하였다(Fig. 2B). 유도 발현되는 β -galactosidase의 양은 세포의 양에 비례되므로 주어진 실험 조건에서 최적의 세포량을 조사하였다. 다양한 세포량(10~60 μ l)을 OD₆₀₀ nm에서 흡광도로 세포의 밀도를 측정하고 동시에 같은 양의 세포로 β -galactosidase의 활성을 측정하였다. Fig. 2B에서 세포의 양에 따라 OD₆₀₀ nm의 흡광도가 증가하였고, 비슷하게 β -galactosidase의 활성(OD₅₇₀ nm의 흡광도)도 증가하나 50 μ l까지 증가하다가 약간 감소되는 것이 관찰되었으며 이전 바이오센서 연구와 비슷한 양상을 보여주었다[7-8, 11, 13, 23]. 이 후 모든 실험에서 50 μ l 세포량을 최적 세포량으로 활용하였다. 유도물질인 카드뮴은 금속의 특징으로 산성에서 잘 용해되나 염기성 용액에서는 침전이 생길 수 있으므로 pH에 따른 β -galactosidase의 활성을 조사할 필요가 있다. 다양한 pH의 완충용액에서 카드뮴을 유도시켰을 때 β -galactosidase의 활성에 어떤 영향을 미치는 지 조사하였다(Fig. 2C). 이전 연구와 비슷하게[16] 카드뮴 검출용 바이오센서는 pH 5에서 가장 좋은 β -galactosidase 활성을 보여주었으며 그 다음 pH 7에서도 상당히 좋은 활성을 보여주었다(Fig. 2C). 따라서 바이오센서 미생물을 키울 때는 대장균의 적정 pH 7 배지에서 하룻밤 키운 후 pH 5 조건에서 카드뮴 유도를 실시하였다.

카드뮴 검출용 바이오센서의 민감도 및 특이성

민감도는 바이오센서 시스템에서 중요한 하나의 요인이다. 이 요인을 조사하기 위해 다양한 카드뮴 농도에 따른 바이오

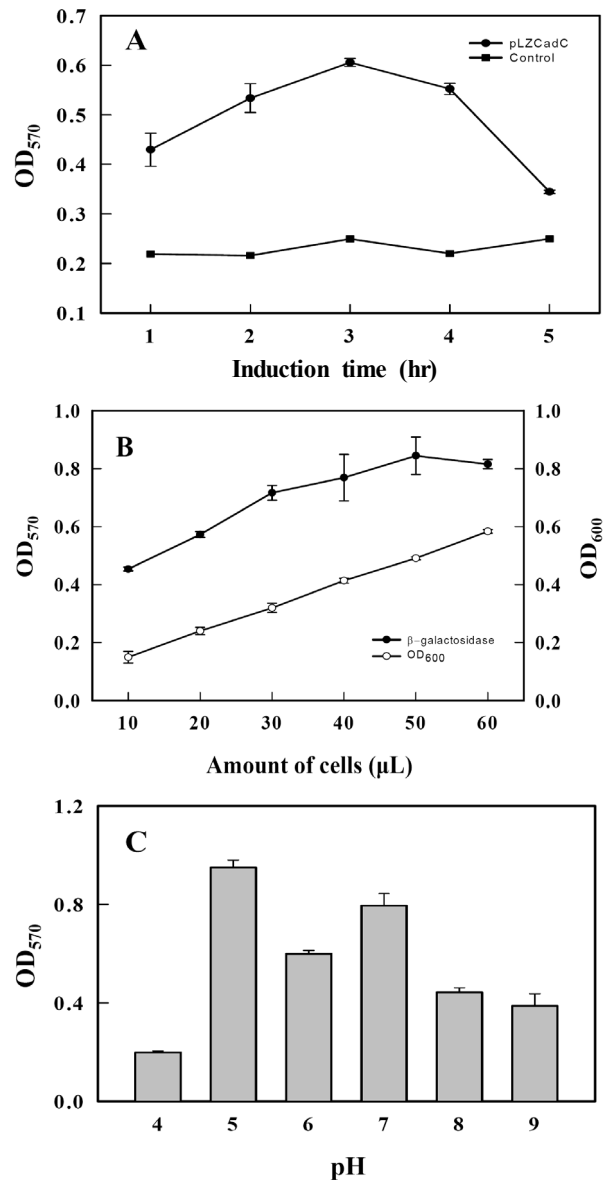


Fig. 2. Effects of induction time, cell number and pH on the activity of the biosensor. *E. coli* BL21 (DE3) cells harboring plasmid pLZCadC were treated with 1 μ M cadmium and β -galactosidase activity was quantified at OD₅₇₀ nm as described in Materials and Methods. (A) β -galactosidase activity was measured after indicated induction time (1~5 hr) with cadmium. (B) β -galactosidase activity (closed circles) was measured at OD₅₇₀ nm 3 hr after cadmium induction with various amount of cells (10~60 μ l) and cell density (open circles) was measured at OD₆₀₀ nm. (C) β -galactosidase activity was measured under various pHs (4~10). The data represent the average of two to four independent experiments, and are given with standard deviations.

센서의 활성도를 측정하였다(Fig. 3). 카드뮴 최종 농도를 0.01 μ M에서 10 mM까지 되도록 바이오센서 세포에 넣고 3시간

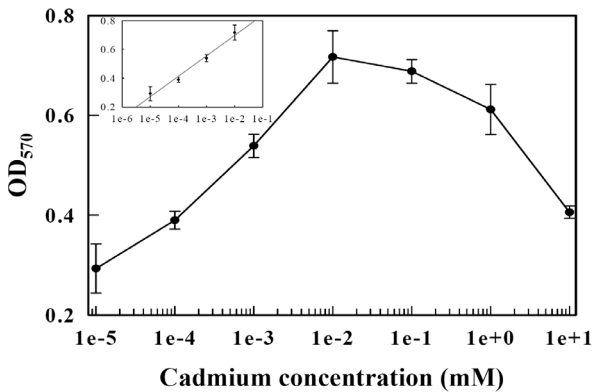


Fig. 3. The β -galactosidase activities of the biosensor to various cadmium concentrations. Biosensor cells were treated with various concentrations of cadmium (0.01 μ M to 10 mM). After 3 hr, the β -galactosidase activities were measured at OD_{570 nm}. The regression curve ($y = 0.98x + 0.142$, $R^2 = 0.98$ at 0.01~10 μ M) is shown in the inset.

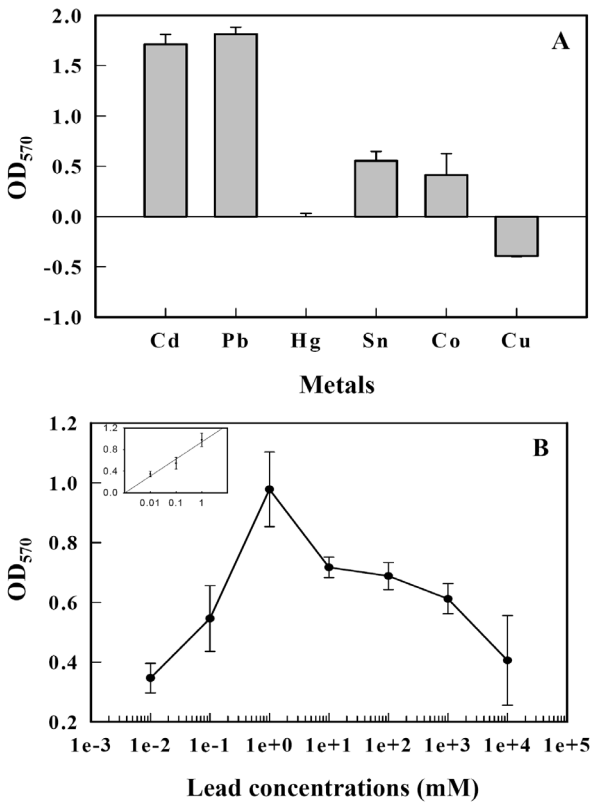


Fig. 4. Responses of biosensor cells to various heavy metals (A) and the β -galactosidase activities of the biosensor to various lead concentrations (B). Biosensor cells were prepared as described in Materials and Methods, and then separately incubated for 3 hr in the presence of 1 μ M of various heavy metals or various concentrations of lead (0.01 μ M to 10 mM) and the β -galactosidase activities were measured at OD_{570 nm}. The regression curve ($y = 0.41x + 0.57$, $R^2 = 0.95$ at 0.01~1 μ M lead) is shown in the inset.

유도한 후 β -galactosidase의 활성을 OD_{570 nm}에서 측정하였다. 카드뮴 농도 0.01 mM에서 최고 활성을 보여주었으며 그 이후로 점차 감소되었다. 검정선 (regression curve)은 0.01~10 μ M에서 직선관계($y = 0.98X + 0.142$, $R^2=0.98$)를 보여주어 같은 세포를 사용하여 측정하는 미지시료의 표준 검정선으로 사용 가능함을 시사하였다. 이 결과는 다른 논문과 비슷한 검출 범위(0.1~10 μ M [16] 또는 0.1 nM~0.1 μ M 농도 범위[20])에서 반응함을 보여주나 최고 활성은 10 배 정도 다른 연구의 바이오센서보다 높은 농도 수준을 보여주고 있다[16, 20]. Fig. 4에서는 카드뮴 검출용 바이오센서가 다른 금속에 반응을 보이는지 카드뮴 검출용 바이오센서의 특이성을 조사하였다. 최종 농도가 1 μ M이 되도록 CdCl₂, PbCl₂, HgCl₂, SnCl₂, CoCl₂, CuCl₂를 같은 양의 세포에 넣고 3시간 유도 후 β -galactosidase의 활성을 조사하였다. 카드뮴과 납에서 높은 반응성을 보여주었으나 주석과 코발트에서 낮은 수준의 반응을 보여주었고 수은과 구리에서 전혀 반응을 보이지 않았다(Fig. 4A). 이 결과는 납, 아연에서 반응성을 보여준 이전 연구[16, 20]와 수은, 구리, 니켈, 망간, 납, 그리고 아연에서도 반응성을 나타낸 이전 연구[24]와 다른 양상을 보여주고 있어 다양한 세포들의 금속에 대한 다양한 반응과 반응 기작을 가지고 있음을 시사한다. Fig. 4A에서 납이 카드뮴보다 더 높은 반응성을 보여주어 납의 농도별 반응성을 조사하였다(Fig. 4B). 납에 대한 바이오센서 세포의 활성은 카드뮴에서와 같이 0.01 μ M에서 10 mM까지 납 농도범위에서 바이오센서 세포를 3시간 유도한 후 β -galactosidase의 활성을 OD_{570 nm}에서 측정하였다. 납 농도 1 μ M에서 최고 활성을 보여주었으며 그 이후로 점차 감소되었으며 0.01~1 μ M에서 직선관계($y = 0.41X + 0.57$, $R^2=0.95$)를 보여주었다. 따라서 본 바이오센서는 카드뮴뿐만 아니라 납의 검출에도 활용될 수 있음을 시사한다.

시료 측정

마지막으로 실험실 시료에 반응하는 카드뮴 검출용 바이오센서가 현장 폐수 속 카드뮴도 검출하는지 조사하였다(Fig. 5). 다양한 현장 공장폐수와 완충용액에 최종 1 μ M 카드뮴을 spike하고 바이오센서 세포로 β -galactosidase 활성을 측정하여 비교 검토하였다. 다양한 현장 폐수에서 측정된 β -galactosidase 값이 실험실 완충용액에서의 값과 거의 비슷하거나(B, C, D, F) 또는 낮게(A) 혹은 높게(E) 나타나 이전 연구와 비슷한 결과를 보여 주었다[13, 21]. 이는 폐수의 다른 오염물질에 의한 간섭효과일 것으로 사료된다. 적어도 바이오센서가 현장 폐수에서도 전혀리 없이 발색되고 카드뮴의 존재 유무를 파악할 수 있어 현장에서의 활용 가능성을 시사한다. 바이오센서 결과는 오염물질의 농도뿐만 아니라 세포에 미치는 오염물질의 독성까지 나타낸다고 보고되었다[1, 3, 6, 9]. 또한 96-well plate 활용으로 훨씬 간단하고 한꺼번에 96개의 시료를 측정할 수 있는 장점과 적은 시료의 측정으로 인해 환경 및 경제적인

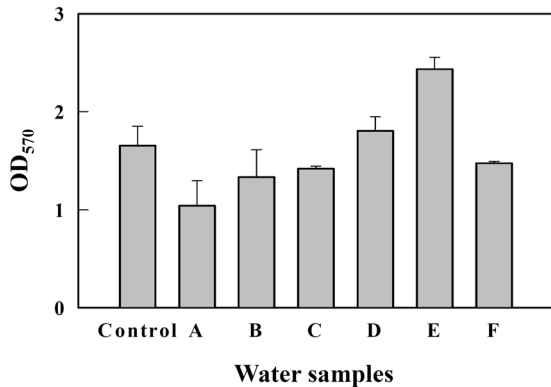


Fig. 5. Detection of cadmium in various water samples. Biosensor cells were treated for 3 hr with various waste waters and buffer, all spiked with 1 μ M cadmium and the β -galactosidase activities were measured at OD_{570 nm}.

로 이득이 될 것으로 사료된다. 본 바이오센서는 카드뮴 이외의 다른 중금속도 검출 가능하므로 폐수에서의 중금속에 대한 더 자세한 농도와 구성을 결정하기 위해 추후 기기적 분석이 필요할 것이다. 결론적으로, 이 결과들은 pLZCadC을 함유하는 *E. coli* 바이오센서 세포가 간편하게 전처리 없이 현장의 오염된 토양과 폐수 중 카드뮴과 납의 일차적 검출에 사용될 수 있음을 검증하였다.

감사의 글

본 연구는 과학창의재단 2015년 URP과제와 2015년도 동서대학교 공학교육혁신과제 지원에 의하여 이루어졌으며 이에 감사드립니다. 또한 2015년 URP과제에 참여한 손창빈, 김미선, 김건우 학생들에게 감사드립니다.

References

- Belkin, S. 2003. Microbial whole-cell sensing systems of environmental pollutants. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**, 206-212.
- Beveridge, T. J., Hughes, M. N., Lee, H., Leung, K. T., Poole, R. K., Savvaidis, I., Silver, S. and Trevors, J. T. 1997. Metal-microbe interaction: contemporary approaches. *Adv. Microb. Physiol.* **38**, 177-243.
- D'Souza, S. F. 2001. Microbial biosensors. *Biosens. Bioelectron.* **16**, 337-353.
- Eustice, D. C., Feldman, P. A., Colberg-Poley, A. M., Buckery, R. M. and Neubaue, R. H. 1991. A sensitive method for the detection of beta-galactosidase transfected mammalian cells. *Biotechniques* **6**, 739-743.
- Gatti, D., Mitra, B. and Rosen, B. P. 2000. *Escherichia coli* soft metal ion-translocating ATPases. *J. Biol. Chem.* **275**, 34009-34012.
- Harms, H., Wells, M. C. and van der Meer, J. R. 2006. Whole-cell living biosensors-are they ready for environmental application? *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **70**, 273-280.
- Kim, M. N., Park, H. H., Lim, W. K. and Shin, H. J. 2003. Viability and luciferase activity of freeze-dried recombinant biosensor cells for detecting aromatic hydrocarbons. *J. Biomed. Lab. Sci.* **9**, 195-201.
- Kim, M. N., Park, H. H., Lim, W. K. and Shin, H. J. 2005. Construction and comparison of *Escherichia coli* whole-cell biosensors capable of detecting aromatic compounds. *J. Microbiol. Methods* **60**, 235-245.
- Lei, Y., Chen, W. and Mulchandani, A. 2006. Microbial biosensors. *Anal. Chim. Acta* **568**, 200-210.
- Moat, A. G. and Foster, J. W. 1995. *Microbial Physiology*. Wiley/Liss, New York.
- Park, H. H., Lee, H. Y., Lim, W. K. and Shin, H. J. 2005b. NahR: effects of replacements at Asn 169 and Arg 248 on promoter binding and inducer recognition. *Arch. Biochem. Biophys.* **434**, 67-74.
- Park, H. H., Lim, W. K. and Shin, H. J. 2005a. *In vitro* binding of purified NahR regulatory protein with promoter P_{sal}. *Biochim. Biophys. Acta* **1725**, 247-255.
- Park, S. M., Park, H. H., Lim, W. K. and Shin, H. J. 2003. A new variant activator involved in the degradation of phenolic compounds from a strain of *Pseudomonas putida*. *J. Biotechnol.* **103**, 227-236.
- Pena, M. M., Koch, K. A. and Thiele, D. J. 1998. Dynamic regulation of copper uptake and detoxification genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 2514-2523.
- Rapoport, N., Smirnov, A. I., Timoshin, A., Pratt, A. M. and Pitt, W. G. 1997. Factors affecting the permeability of *Pseudomonas aeruginosa* cell walls toward lipophilic compounds: Effects of ultrasound and cell age. *Arch. Biochem. Biophys.* **344**, 114-124.
- Rensing, C., Sun, Y., Mitra, B. and Rosen, B. P. 1998. Pb(II)-translocating P-type ATPase. *J. Biol. Chem.* **273**, 32614-32617.
- Ron, E. Z. 2007. Biosensing environmental pollution. *Curr. Opin. Biotechnol.* **18**, 252-256.
- Rosen, B. P., Bhattacharjee, H., Zhou, T. and Walmsley, A. R. 1999. Mechanism of the ArsA ATPase. *Biochim. Biophys. Acta.* **1461**, 207-215.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Shetty, R. S., Deo, S. K., Shah, P., Sun, Y., Rosen, B. P. and Daunert, S. 2003. Luminescence-based whole-cell-sensing systems for cadmium and lead using genetically engineered bacteria. *Anal. Bioanal. Chem.* **376**, 11-17.
- Shin, H. J., Park, H. H. and Lim, W. K. 2005. Freeze-dried recombinant bacteria for on-site detection of phenolic compounds by color change. *J. Biotechnol.* **119**, 36-43.
- Shin, H. J. 2011. Genetically engineered microbial biosensors for in situ monitoring of environmental pollution. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **89**, 867-877.
- Shin, H. J. 2010. Development of highly-sensitive microbial biosensor by mutation of the nahR regulatory gene. *J. Biotechnol.* **150**, 246-250.
- Wu, C. H., Le, D., Mulchandani, A. and Chen, W. 2009. Optimization of a whole-cell cadmium sensor with a toggle gene circuit. *Biotechnol. Prog.* **25**, 898-903.

초록 : 카드뮴 및 납 검출을 위한 재조합 미생물 바이오센서

신혜자*

(동서대학교 에너지생명공학부 에너지환경공학전공)

바이오센서는 간단하고 저렴하게 일차적으로 현장 시료를 분석할 수 있는 장점이 있다. 본 연구에서는 유전자 재조합으로 카드뮴을 검출할 수 있는 미생물 유래 바이오센서를 제작하였다. 이를 위해 카드뮴과 반응하는 CadC 유전자와 관련 프로모터를 PCR로 증폭하고 β -galactosidase 유전자(lacZ)와 결합하고 *E. coli* BL21 (DE3)에 형질 전환하였다. 이 바이오센서 세포는 카드뮴 존재 하에서 β -galactosidase를 발현하며 기질인 CPRG을 분해하여 붉은색으로 발색된다. 카드뮴 검출용 바이오센서는 카드뮴으로 3시간 유도하였을 때 β -galactosidase 활성의 최고값을 보여주었으며 pH 5에서 가장 좋은 활성도를 나타내었다. 카드뮴 검출용 바이오센서는 0.01 μ M에서 10 mM 카드뮴에서 검출범위를 보여주었으며 0.01~10 μ M에서 직선관계의 검정선($y=0.98 X + 0.142$, $R^2=0.98$)를 나타내었다. 중금속 중에서 카드뮴과 납에서 높은 반응성을 보여주었으며 수은과 구리에서는 전혀 반응하지 않았으나 주석과 코발트에서도 약간의 반응성을 나타내었다. 카드뮴을 spike 한 폐수에서의 반응이 완충용액에 spike한 것(control)과 비슷하게 나타났다. 이는 카드뮴 검출용 바이오센서가 전처리를 하지 않은 현장시료에서도 반응성을 보여주어 현장시료의 간단하고 저렴한 일차적 검출에 활용될 수 있음을 시사한다.