

유전자 칩 기반 형광/발광 동물세포 및 미생물 환경 바이오센서 개발

구만복

(광주과학기술원 환경생물공학국가지정연구실)

e-mail: mbgu@gist.ac.kr

의학계를 중심으로 널리 활용되는 바이오센서를 환경오염 탐지에 적용하기 위한 환경바이오센서 연구가 활발히 진행되고 있다. 기존 기기분석법에 의한 환경 오염 분석은 농도 중심의 정보를 제공하였지만 바이오센서에 의한 환경오염 분석은 샘플에 대한 독성 정보를 제공한다는 장점이 있다. DNA로부터 고등 생물체에 이르기까지 다양한 종류의 환경바이오센서가 개발되어 사용되고 있다. 이중에서도 특히 형광/발광 세포를 이용한 환경바이오센서 개발에 많은 관심이 집중되고 있다. 본 연구에서는 다양한 종류의 형광/발광 세포 환경바이오센서와 이를 활용하기 위한 플랫폼 기술, 그리고 환경바이오센서 기술에서의 유전자 칩의 활용에 대해 기술하고자 한다.

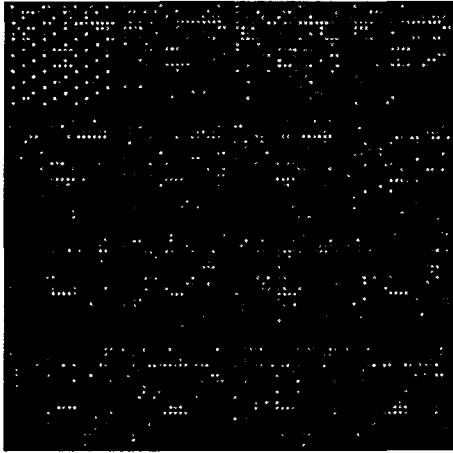
유전자 재조합 동물세포 및 미생물 세포 제작

환경 독성에 민감하게 반응하는 재조합 동물세포 제작을 위해 생명체의 사멸에 관계하는 *c-fos* 프로모터에 fluorescence를 내는 *gfp* 유전자를 결합시켜 재조합 CHO 세포를 개발하여 유전자 손상에 대한 반응을 확인하였다. (BI *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2002). 유전자 손상을 일으키는 것으로 알려진 마이토마이신시와 γ -ray, 그리고 EDCs로 알려지거나 가능성이 있는 것으로 알려진 bisphenol A, nonylphenol, ziram, methyl bromide를 샘플로 선정하여 개발된 재조합 동물세포를 반응시켰다. 대부분의 샘플에 대해서 매우 민감한 반응이 나타났으며 단지 빠르고 경제적인 장점 뿐만 아니라 환경호르몬 계열의 탐지도 가능함을 확인하였다.

박테리아 세포를 이용한 환경바이오센서 개발도 활발히 진행되었다. Prokaryotic 미생물 내에는 여러 가지 환경 스트레스에 민감하게 반응하는 다수의 스트레스 프로모터가 존재하며 이 스트레스 프로모터를 이용하면 환경 스트레스에 대해서 민감하게 반응하는 재조합 박테리아를 개발하게 된다. 많은 종류의 재조합 발광 박테리아가 개발되어서 환경바이오센서로 사용되고 있다. SoxRS regulon에 속한 *sodA* 유전자를 빛을 내는 *luxCDABE*에 결합시켜서 산화적 손상에 민감하게 반응하는 재조합 박테리아를 개발하였다 (Lee and Gu, 2003). 최근에는 스트레스의

종류에 따라서 한 박테리아 안에서 발광과 형광을 동시에 내는 dual bacterial biosensors가 개발되었다 (Mitchell and Gu, 2004).

(가)



(나)

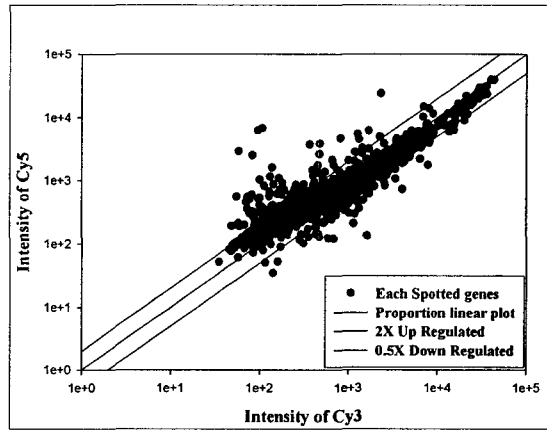


그림 1. (가) 대장균에 paraquat을 노출 시킨 후 유전자 발현 패턴 결과 (나) 발현 유전자의 Scatter plot 분포

유전자칩을 이용한 환경독성탐지와 환경바이오센서개발

새롭게 대두된 유전자 칩 기술은 다양한 생물체의 유전자 염기서열해석이 완료됨에 따라 다른 생물체에 대한 독성 반응 유전자 발현양상을 효율적으로 빠르게 해석하는데 사용되고 있다. 이러한 유전자 칩 기술을 이용하여 환경 내 존재하는 독성물질에 대한 생물체의 발현양상을 분석 할 수 있을 뿐만 아니라, 복합화 된 독성물질에 특이적이고, 더 민감하게 반응하는 유전자를 선별할 수 있게 되었다. 그림 1은 *E. coli* 6K oligo 칩을 사용한 paraquat에 노출된 대장균의 유전자 발현 결과를 보여준다.

궁극적으로 paraquat에 노출된 대장균의 유전자 발현 패턴에 근거하여 얻어진 정보는 대장균의 functional categories에 근거한 화학물질의 독성 분석이 가능하다. 또한 동물세포 유전자칩을 이용한 장기적인 관점에서의 독성 (chronic toxicity) 분석이 가능하다. 그림 2는 개발된 *Japanese Medaka* fish의 functional DNA 칩을 이용하여 phenol 150 uM에 지속적으로 노출된 medaka fish의 유전자 발현 패턴 차이를 보여준다. 지속적인 화학물질의 노출은 지속적인 특정 유전자 발현 패턴 변화를 유발하며 DNA chip을 활용하여 장기적인 관점에서의 독성 분석 수행이 진행 될 수 있음을 보여 준다.

또한 유전자 칩은 독성물질에 대한 방어 유전자 칩 분석 결과를 통해 새로운 바이오 마커 (biomarker)의 선별에 응용될 수 있다.

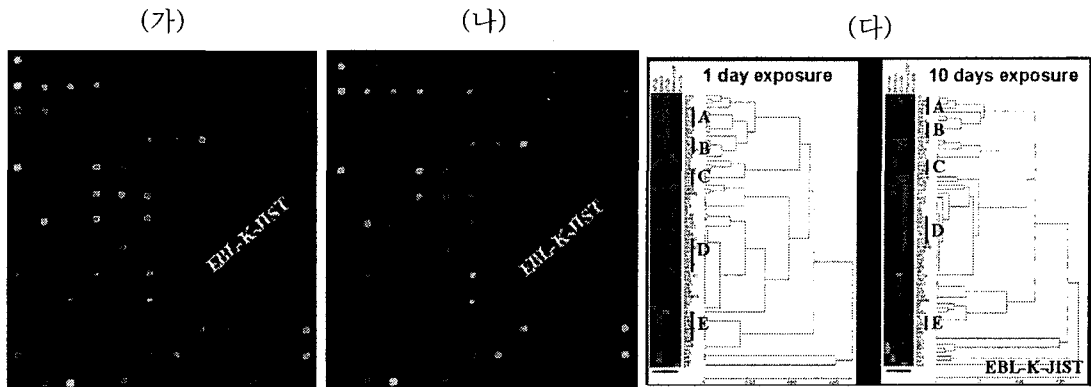


그림 2. (가) Japanese medaka에 150 uM phenol을 노출 시킨 후 유전자 발현 패턴 분석 결과 (가) 1 일, (나) 10일 후, (다) Japanese medaka 에 EDCs 류, 페놀 등을 각각 1일 10일 동안 노출 시킨 후 유전자 발현 패턴을 clustering 한 결과

그림 3은 paraquat에 노출된 대장균 유전자칩의 발현 결과를 토대로 제작된 재조합 발광 박테리아의 발현량 변화와 유전자칩에서 나타난 paraquat에 대한 반응 비교를 나타내고 있다. 즉, 유전자칩 결과를 기반으로 스트레스 유전자를 선별하여 프로모터인 발광(*lux*) 유전자를 결합시켜 새로운 형태의 유전자재조합 바이오센서를 개발할 수 있음 보여주며, 이렇게 제작된 재조합 생물체의 독성 반응이 유전자칩 발현 양상과 비례적으로 발현됨을 알 수 있다. 이러한 실험을 바탕으로 DNA 칩이 transcription 수준에서의 발현 여부를 알려줄 뿐만 아니라 이를 기반으로 선별된 스트레스 유전자로부터 개발한 바이오센서는 translation 수준 즉 단백질 발현 수준에서의 독성 평가에 활용될 수 있다는 측면에서 서로상호 보완적인 관계로 발전해 나갈 수 있는 가능성을 제시 하고 있다.

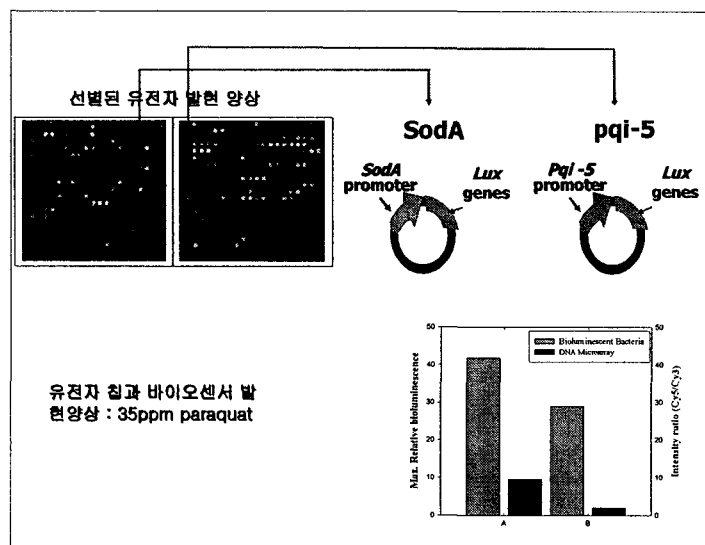


그림 3. 선별된 유전자에서 개발된 바이오 센서와 그 발현 양상

환경바이오센서개발및응용

개발된 미생물과 동물세포를 환경오염 탐지에 사용하기 위해 여러 가지 종류의 환경바이오센서 시스템이 개발되었다. 생물반응기를 이용한 바이오모니터링 시스템이 수중 독성을 탐지하기 위해 적용되었다. 기존의 생물 반응기는 한 개의 반응기를 사용하여 연속적인 생물 배양 과정을 하게 되며 이 과정 중 샘플을 주입하여 샘플에 의한 반응기 내부의 발광량 변화를 측정하여 환경 오염을 탐지하였다. 그러나, 고농도의 오염 물질 유입 시 반응기 내부의 미생물이 사멸되어 시스템 전체가 shut down된다는 단점이 있다. 이런 단점을 보완하기 위해서 two-stage 연속독성탐지 장치가 개발되었다 (Gu *et al.*, 1999). Two-stage 연속독성탐지 장치는 두개의 반응기를 연결하여 첫번째 반응기에서는 세포의 배양을, 두 번째 반응기에서는 샘플과의 반응을 일으키도록 고안되었다. 배양 반응기와 테스트 반응기의 분리를 통해 고농도의 오염물이 유입되어 두 번째 반응기의 미생물이 사멸되더라도 첫번째 반응기에서 신선한 미생물들이 공급되게 되고 결국 시스템의 독성 탐지 기능을 회복할 수 있게 된다. 이런 시스템의 성질을 통해 본 시스템을 이용한 연속적인 수중 독성탐지가 가능하다. 발광박테리아의 장점 중 하나는 다양한 프로모터를 이용하여서 독성에 대한 분류탐지가 가능하다는 것이다. 이런 발광박테리아의 장점을 활용하기 위해서 two-stage 연속독성탐지 장치를 기반으로 멀티채널연속수중독성탐지 장치가 개발되었다. 멀티채널연속수중독성탐지 장치는 4개의 이단 연속독성탐지 장치를 병렬로 배열한 형태로 각각의 채널마다 서로 다른 종류의 발광 박테리아를 배양할 수 있도록 제작되었다. 본 시스템을 이용해서 독성의 연속 분류 탐지가 성공적으로 수행되었으며 (Gu and Gil, 2001) 다양한 현장 적용 실험도 실시되어서 현장에서도 성공적으로 시스템이 작동함을 확인하였다. 특히 본 시스템을 이용하여 연속적인 하천의 오염도 감시가 가능하고 (Kim and Gu, 2004), 정수처리장의 원수와 댐의 배출수 모니터링 (Gu *et al.*, 2001), 그리고 화력발전소의 배출수에 대한 독성 모니터링 (Kim and Gu, 2004)을 성공적으로 수행하였다.

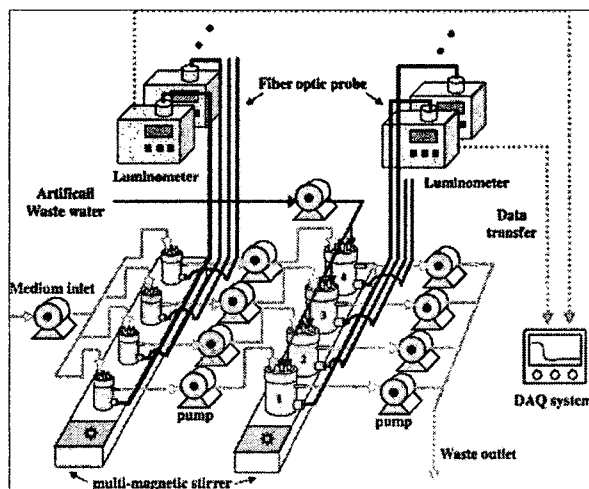


그림 4. 멀티채널연속수중독성탐지 장치

이 외에도 고정화 기술을 사용해서 제작된 토양독성탐지시스템 (Gu and Chang, 2001), 가스독성탐지시스템 (Gu et al., 2000), 그리고 휴대용 바이오센서 시스템 (Choi and Gu, 2002) 이 개발되어서 사용되고 있다. 앞의 토양, 가스독성탐지 시스템은 agar를 이용한 고정화를 사용해 제작된 시스템으로 상시발현균주인 GC2를 사용해서 독성에 따른 빛의 감소 정도를 측정하여 독성을 분석하는 장치이다. 특히 토양독성탐지 시스템의 경우 토양 내 흡착되어 있는 독성 물질과 반응을 위해서 계면활성제를 사용하였다. 토양 내에 존재하는 PAH를 계면활성제 rhamnolipids를 통해서 추출하여 고정화되어있는 발광박테리아와 반응하여 발광량에 변화를 일으키게 된다. 가스독성탐지 시스템의 경우도 마찬가지로 agar에 고정화되어 있는 발광박테리아가 벤젠이 노출되었을 때 농도에 따라 반응이 증가하는 dose-dependent 반응을 나타냈다. 휴대용 바이오센서 시스템의 경우 동결건조 방식을 이용하여 제작되며 여러 종류의 발광박테리아를 사용하여 독성 분류 탐지를 실시한다.

High throughput 독성 탐지를 위한 high throughput 바이오센서 시스템 (Kim and Gu, 2003) 이 개발되었는데, 96well plate에 4가지 종류의 발광 박테리아를 고정화하여 여러 농도의 샘플에 대한 독성 정도를 획득하는 장치이다. 또한 독성에 대한 다양한 정보를 한번의 실험을 통해 획득하기 위한 cell array 바이오센서도 개발되었다 (Lee et al., 2004). 이 시스템은 20가지 종류의 서로 다른 발광 박테리아를 사용하여 각각의 스팟에서 나오는 발광 반응을 통해 샘플 독성을 분석하고 규명하는 데 사용될 수 있다.

참고문헌

- Bi, J.X., Wirth, M., Beer, C., Kim, E.J., Gu, M.B., Zeng, A.P., 2002. Dynamic characterization of recombinant Chinese hamster ovary cells containing an inducible *c-fos* promoter GFP expression system as a biomarker. *J. Biotech.* 93, 231-242.
- Choi, S.H., Gu, M.B., 2002. A portable toxicity biosensors using freeze-dried recombinant bioluminescent bacteria. *Biosens. Bioelectron.* 17, 433-440.
- Gil, G.C., Robert J.M., Chang, S.T., Gu, M.B., 2000. A biosensor for the detection of gas toxicity using a recombinant bioluminescent bacterium. *Biosens. Bioelectron.* 15, 23-30.
- Gu, M.B., Chang, S.T., 2001. Soil biosensor for the detection of PAH toxicity using an immobilized recombinant bacterium and a biosurfactant. *Biosens. Bioelectron.* 16, 667-674.
- Gu, M.B., Gil, G.C. 2001. A multi-channel continuous toxicity monitoring system using recombinant bioluminescent bacteria for classification of toxicity.

- Biosen. & Bioelectro. 16, 661-666.
- Gu, M.B., Gil, G.C., Kim, J.H., 1999. A two-stage minibioreactor system for continuous toxicity monitoring. Biosens. Bioelectron. 14, 355-361.
- Gu, M.B., Kim, B.C., Cho, J.W., Peter D.H., 2001. The continuous monitoring of field water samples with a novel multi-channel two-stage mini-bioreactor system. Env. Monitoring & Assess. 70, 71-81.
- Kim, B.C., and Gu, M.B., 2004. A multi-channel continuous water toxicity monitoring system: Its evaluation and application to water discharged from a power plant. Env. Monitoring & Assess. In press.
- Kim, B.C., and Gu, M.B., 2004. A multi-channel continuous water toxicity monitoring system: Its evaluation and application to water discharged from a power plant. Env. Monitoring & Assess. In press
- Kim, B.C., Gu, M.B., 2003. A bioluminescent sensor for high throughput toxicity classification. Biosens. Bioelectron. 18, 1015-1021.
- Kim, B.C., Park J.H., Gu, M.B., 2004. Development of a DNA microarray chip for the identification of sludge bacteria using an unsequenced random genomic DNA hybridization method. Envi. Sci. Tech. Accepted.
- Kim, E.J., Lee, J.E., Gu, M.B., 2002. Application of recombinant fluorescent mammalian cells as a toxicity biosensor. Water Sci. Tech. 46(3), 51-56.
- Lee, H.J., Gu, M.B., 2003. Construction of a *sodA::luxCDABE* fusion *Escherichia coli*: comparison with a *katG* fusion strain through their responses to oxidative stresses. Appl. Microbiol. Biotechnol. 60, 577-580.
- Lee, J.H., Robert J.M., Kim, B.C., Gu, M.B., 2004. A cell array biosensor for environmental toxicity analysis. Biosens. Bioelectron. Accepted.
- Robert J.M., Gu, M.B., 2004. Construction and characterization of novel dual stress-responsive bacterial biosensors. Biosen. Bioelectron. 19(9), 977-985.