

## TNT에 대한 세균의 반응기작: 생존율, 스트레스 유도단백질의 SDS-PAGE 및 2-D 전기영동 분석

장효원 · 강형일<sup>1</sup> · 김승일<sup>2</sup> · 오계현\*

순천향대학교 자연과학대학 생명과학부, <sup>1</sup>제주대학교 기초과학연구소,  
<sup>2</sup>기초과학지원연구원 생체고분자분석팀

폭약 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) 스트레스 조건하에서 토양세균 *Pseudomonas* sp. HK-6의 세포반응에 대하여 조사하였다. 다양한 농도의 TNT에 노출됨으로써 약 70-kDa DnaK와 60-kDa GroEL의 스트레스 충격단백질 (stress shock proteins, SSPs)이 단백질이 유도되었다. 이들 SSPs의 존재는 SDS-PAGE와 anti-DnaK와 anti-GroEL monoclonal antibodies를 이용한 Western blot을 통하여 확인되었다. SSPs은 0.5 mM TNT로 6-12 시간 처리된 세포에서 나타났으며, TNT에 노출 후 8 시간대에서 최대의 단백질 유도가 관찰되었다. 30°C에서 42°C로 열변환 충격을 주었을 때의 SSPs는 TNT 노출에서와 유사한 유도양상을 보여주었다. TNT에 노출된 *Pseudomonas* sp. HK-6 세포에서 유도된 SSPs의 존재는 배양된 세포의 수용성 단백질 분획에 대하여 2-D PAGE를 통하여 확인되었다. Coomassie brilliant blue R250로 염색된 젤로부터 pH 3-10 범위에서 약 450 개의 spots이 탐침되었으며, 이들 가운데 12 개의 spots이 TNT 스트레스에 대하여 현저하게 유도되었다. Gel상에서 가장 짙게 나타난 대표적인 spot에 대한 N-말단 아미노산 서열을 분석한 결과, <sup>1</sup>XXAKDVKFGDSARKKML<sup>17</sup>로서, *Pseudomonas putida*의 GroEL의 N-말단 아미노산 염기서열인 <sup>1</sup>MAAKDVKFGDSARKKML<sup>17</sup>과 동일한 것으로 분석되었다.

Key words □ cellular response, *Pseudomonas* sp. HK-6, stress shock proteins, 2,4,6-trinitrotoluene

자연계의 생물체들은 끊임없이 변하는 주위 환경 속에서 그들의 생태계를 유지해 나가고 있다. 따라서 생물체들은 그들이 살아가는 환경이 좋은 경우에는 생물체의 생명 작용에 적절한 영향을 주겠지만, 부적절한 환경 하에서는 생물체에 스트레스로 작용하게 되며 그 결과 생물체내에서는 스트레스에 대한 반응 기작으로 독특한 유전자 집단인 스트레스 충격 단백질(SSPs, stress shock proteins)이 생성되는 것으로 알려져 있다(3).

여러 가지 스트레스 충격 반응 중에서 가장 많은 연구가 이루어진 것은 열 충격(heat shock)반응으로 급격한 온도 상승에 의해 미생물이 열 충격을 받으면, 그에 따른 방어 기작으로 여러 종류의 열 충격 단백질(DnaK, DnaJ, GroE, GroEL, GroES 등)을 신속하게 유도 합성하여 손상된 단백질의 구조를 정상적인 구조로 회복시키는 역할을 한다(9,13,14,16,17,19). 이와 같은 스트레스 충격 단백질을 유도하는 요인에는 온도와 같은 물리적 요인 이외에도 ethanol (15,18), sodium dodecyl sulfate (1), bile salt (11), hydrogen peroxide (10,12) 등과 같은 화학적 요인, 그리고 바이러스 감염과 같은 생물학적 요인 등을 들 수 있다(2,5). 최근에는 산업 활동을 통한 인위적인 산물들이 자연계로 배출되면서 이들 물질이 생물체에 유해물질로 작용되어질 뿐만 아니라 환경 스트레스 원으로 작용하여 충격 단백질이 유도 합성되어지

는 것으로 보고되고 있다. 환경 스트레스원로서 화학물질에 의하여 생성되는 SSPs는 열 충격과 carbon starvation에 의해서 유도되는 SSPs와 일치하나, 상당부분은 각각의 화학물질에 따라 특이한 것으로 보고되었다. 특히 어떤 SSPs는 세균의 생장에 영향을 주지 않는 낮은 농도의 화학물질에서도 유도됨으로써, 이런 SSPs이 환경 오염원의 특징을 확인하고 세균에 미치는 스트레스의 정도를 측정하는 지표(indicator)로 사용될 수 있다는 가능성이 제시되었다(5-8).

2,4,6-Trinitrotoluene (TNT)은 질소방향족 화합물로서 군사적 목적으로 널리 사용되어온 화학물질이지만 구조적으로 분해가 어려워 자연 환경에 노출 시 토양에 잔류하거나 지표수와 지하수를 포함하는 수계를 오염시킬 수 있다. 환경 오염원으로서 TNT는 그 독성이나 환경에 미치는 문제점들이 최근 선진국들에서 보고되어져 왔으며 자연생태계에 축적되어 생물체에 대하여 독성을 나타내어 생존에 영향을 미치는 것으로 알려졌다.

본 연구는 폭발물 TNT가 환경 오염원으로서 자연계에 노출되었을 때 미생물이 받는 스트레스 충격반응을 알아보기 위해 실시하였다. TNT에 노출된 지역의 토양으로부터 TNT를 분해하는 세균인 *Pseudomonas* sp. HK-6를 분리해 내어, TNT에 대한 세균의 반응 기작과 다양한 농도의 TNT와 노출시간에 따른 미생물의 생존율을 조사하였다. 스트레스 반응의 결과로서 유도되는 SSPs인 DnaK와 GroEL을 SDS-PAGE와 Western blot analysis을 통하여 확인하였으며, 2-D PAGE 상에서 전개된 TNT 노출에 의

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 041-530-1353, Fax: 041-530-1350  
E-mail: kyeheon@sch.ac.kr

해 유도된 spot들 가운데, 가장 크게 유도된 spot을 분리하여 N-말단 아미노산 염기서열 분석하여 다른 단백질과의 유사성을 확인하였다.

## 재료 및 방법

### TNT 분해 세균의 분리 및 동정

TNT에 노출된 지역의 토양으로부터 농화 배양기법을 통해 TNT를 분해하는 혼합배양을 획득하였다(8,16). 배양에 사용된 배지는  $K_2HPO_4$  10 mM,  $NaH_2PO_4$  5 mM,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1 mM,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.07 mM,  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  0.04 mM,  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  0.0005 mM,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  0.00035 mM에 0.2 mM의 TNT를 포함하는 배지에 부가 탄소원으로 fructose 2 mM을 첨가하여 사용하였다. 준비된 배지는 1 N NaOH를 이용하여 pH 7.2로 조절한 후 고압 멸균하였으며, 접종 후 30°C에서 분당 150회로 회전하는 진탕 배양기에서 배양하였다. 혼합 배양으로부터 TNT를 포함하는 고체 평판 배지에서 여러 차례에 걸친 도말을 통하여 3 개의 단일 세균을 분리하였다. 그 중 분해능이 탁월한 세균을 본 실험에 사용하였고, BIOLOG Analysis System을 이용하여 생리·화학적 특성을 조사하였다.

### TNT에 의한 분리세균 HK-6의 생존율

LB 액체 배지에서 자란 *Pseudomonas* sp. HK-6가 대수 생장기를 거치면서 파장 660 nm에서 optical density가 0.8일 때 원심 분리 튜브에 넣고 2,000×g에서 10 분간 원심분리 하여 얻어진 pellet을 10 mM phosphate buffer (pH 7.0)로 3회 세척하여 준비된 0, 0.1, 0.3, 0.5 mM의 TNT를 포함하는 무기 액체 배지에 동일한 양의 세척한 균을 첨가하여 2 시간 간격으로 LB고체 배지에 각각 100  $\mu$ l 평판도말 후 30°C에서 배양 후 형성되는 집락을 계수하여, TNT의 농도에 따른 세균의 생존율을 분석하였다.

### 스트레스 충격단백질의 확인

균주 HK-6를 TNT에 의한 스트레스 충격 처리 후 4°C를 유지하면서 2,000×g로 10 분간 원심분리하여 얻어진 pellet을 10 mM phosphate buffer (pH 7.0)로 세척하였다. 그리고 10 mM phosphate buffer에 균체를 현탁하여 초음파 파쇄기(Model M-300, Fischer Scientific, Pittsburg, USA)로 매 30 초간 20-25 회 반복하면서 세포를 파쇄하여 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질은 protein assay kit (Sigma, St. Louis, USA)를 이용하여 단백질 정량을 하였다. 추출한 단백질은 Bollag 등의 방법에 따라 SDS-PAGE를 실시하였다(4). Separating gel은 12%의 acrylamide slab gel을 사용하였으며, stacking gel은 4%로 acrylamide gel을 사용하였다. 전기영동은 60 V에서 100 V로 약 2 시간 30 분 동안 실시하였으며, 얻어진 gel은 gel-staining solution (0.1% Coomassie brilliant blue R-250, 45% methanol, 10% glacial acetic acid)으로 2 시간 염색하였고, gel-destaining solution I (10% methanol, 10% glacial acetic acid)으로 1 시간 동안 처리 후 다시 gel-destaining solution II (5% methanol, 7% glacial acetic acid)로 8

시간 동안 처리하였다. DnaK와 GroEL 스트레스 충격단백질은 anti-DnaK와 anti-GroEL monoclonal antibodies (StressGen Biotechnologies Corp., Victoria, Canada)로 Western blotting하여 분석하였다(18). TNT에 노출된 세포에서 유도된 단백질은 O'Farrell과 Bollag 등에 의해 기술된 방법에 따라 Bio-Rad system (Hercules, USA)을 사용하여 2-D PAGE에 의해 분석되었다(4,23).

### 2-D PAGE electrophoresis

건조된 표본(약 200  $\mu$ g)을 50  $\mu$ l buffer (SDS 0.3%, DTT 0.2 M, Tris-HCl 50 mM)에 녹이고, 95°C에서 5 분간 가열하였다. 얼음에 채운 상태에서 10 분간 5  $\mu$ l buffer II-( $MgCl_2$  50 mM, DNase I 10 unit, RNase 3.75 unit, Tris-HCl 50 mM)에 넣은 후, isoelectrofocusing (IEF)를 수행하기 위하여 Buffer III (urea 9.9 M, NP-40 4%, carrier ampholyte [pH 3-10], DTT 100 mM)에 녹였다. IEF와 SDS-PAGE는 PROTEAN II xi electrophoresis kit (Bio-Rad, Hercules, USA)를 사용하여 실시되었다. Silver staining은 Morisey 방법에 의해 수행되었다(24). 2-D gel 상에서 분리된 단백질 spots는 semi-dry blotting apparatus (Bio-Rad Trans-Blot SD)를 이용하여 2 mA/cm<sup>2</sup>에서 50 분동안 처리하여 PDVF 막에 전달시켰다. PVDF 막은 Coomassie brilliant blue R250로 염색하여 50% methanol로 세척하였다. 염색된 2-D gels는 Image Scanner (Amersham Pharmacia Biotech., Uppsala, Sweden)에 의해 분석되었다.

### N-말단 아미노산 서열 분석

Coomassie blue로 염색된 단백질 spots를 PVDF로 자른 후, 서열분석을 위하여 protein sequencer (Model 491A, Perkin-Elmer, Foster City, USA)의 blot cartridge에 장착시켰다. 염색된 N-말단 염기서열은 단백질 분석을 위하여 NCBI의 BLAST search를 사용하였다.

## 결 과

### TNT 분해 세균의 확보 및 동정

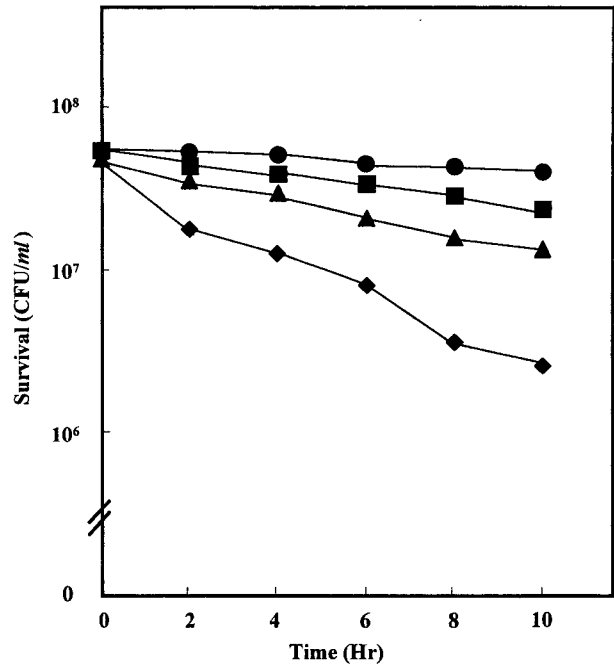
TNT에 노출된 지역의 토양으로부터 농화 배양을 통해 얻어진 미생물 컨소시엄으로부터 TNT를 분해하는 3 개의 단일 균주를 분리하였다. 분리된 세균 가운데 TNT 분해능이 탁월한 균주를 선별하여 본 연구에 사용하였다. 분리 세균은 그람음성이었으며 현미경 관찰을 통하여 짧은 간균 형태임을 확인하였다. BIOLOG analysis system을 이용하여 분리한 세균의 생리·화학적 특성을 조사한 결과 이 세균은 *Pseudomonas putida*와 가장 가까운 균으로 분석되어, *Pseudomonas* sp. HK-6으로 명명하였다(Table 1).

### TNT에 의한 분리세균 HK-6의 생존율

TNT의 노출 농도에 따른 균주 HK-6 세포의 생존율을 시험한 결과, TNT에 노출 후 초기 2 시간 동안의 세포의 생존율은 빠른 속도로 감소하였으나 4 시간이 경과하면서 생존율은 완만한

**Table 1.** Physiological and biochemical characterization of the isolate using the BIOLOG Analysis System

Physiological & biochemical tests	Physiological & biochemical tests	Physiological & biochemical tests
Water	-	<i>p</i> -hydroxyphenylacetic acid -
$\alpha$ -cyclodextrin	-	Itaconic acid -
Dextrin	-	$\alpha$ -ketobutyric acid +
Glycogen	+	$\alpha$ -ketoglutaric acid +
Tween 40	+	$\alpha$ -ketovaleric acid -
Tween 80	+	D,L-lactic acid +
N-acetyl-D-galactosamine	-	Malonic acid +
N-acetyl-D-glucosamine	-	Propionic acid +
Adonitol	-	Quinic acid +
L-arabinose	-	D-saccharic acid +
D-arabitol	+	Sebacic acid -
Cellobiose	-	Succinic acid +
i-erythritol	-	Bromo succinic acid +
D-fructose	-	Succinamic acid -
L-fucose	-	Glucuronamide +
D-galactose	-	Alaninamide +
Gentiobiose	-	D-alanine +
$\alpha$ -D-glucose	+	L-alanine +
<i>m</i> -Inositol	-	L-alanylglycine +
$\alpha$ -D-lactose	-	L-asparagine +
Lactulose	-	L-aspartic acid +
Maltose	-	L-glutamic acid +
D-mannitol	-	Glycyl-L-aspartic acid -
D-mannose	-	Glycyl-L-glutamic acid -
D-melibiose	-	L-histidine +
$\beta$ -methyl D-glucoside	-	Hydroxy-L-proline +
Psicose	-	L-leucine +
D-raffinose	-	L-ornithine -
L-rhamnose	-	L-phenylalanine -
D-sorbitol	-	L-proline +
Sucrose	-	L-pyroglutamic acid +
D-trehalose	-	D-serine -
Turanose	-	L-serine +
Xylitol	-	L-threonine -
Methylpyruvate	-	D,L-carnitine -
Mono-methylsuccinate	+	$\gamma$ -aminobutyric acid +
Acetic acid	+	Urocanic acid -
<i>Cis</i> -aconitic acid	+	Inosine -
Citric acid	+	Uridine -
Formic acid	+	Thymidine -
D-galactonic acid lactone	-	Phenylethylamine +
D-galacturonic acid	+	Putrescine +
D-gluconic acid	+	2-aminoethanol +
D-glucosaminic acid	-	2,3-buthanediol -
D-glucuronic acid	+	Glycerol +
$\alpha$ -hydroxybutyric acid	-	D,L- $\alpha$ -glycerolphosphate -
$\beta$ -hydroxybutyric acid	+	Glucose-1-phosphate -
$\gamma$ -hydroxybutyric acid	-	Glucose-6-phosphate -



**Fig. 1.** Survival rates of *Pseudomonas* sp. HK-6 after TNT treatment. HK-6 cells were maintained at TNT concentrations of 0 mM (●), 0.1 mM (■), 0.3 mM (▲), 0.5 mM (◆) TNT, respectively. At intervals, the number of cells (CFU/ml) was measured.

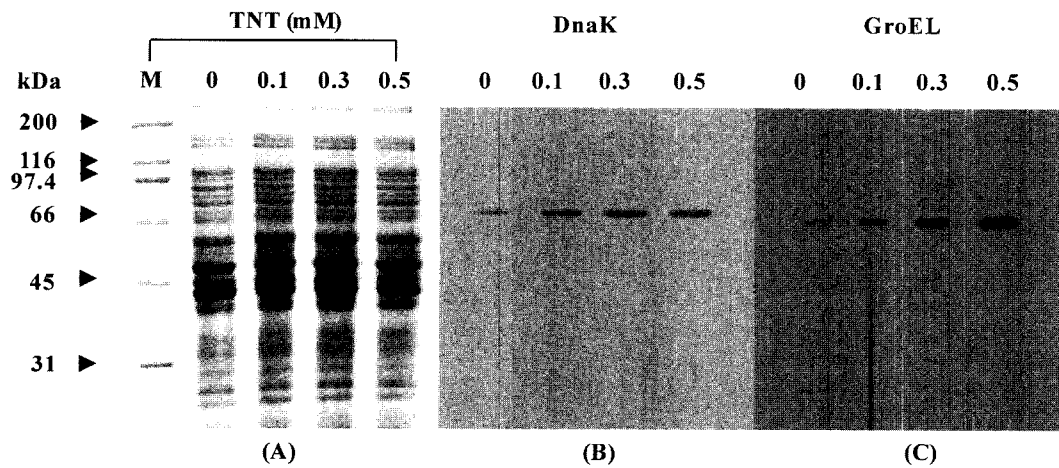
감소율을 보여주었다(Fig. 1). TNT 농도가 높아짐에 따라 같은 시간대에서의 HK-6 세포의 생존율은 더 감소되는 양상을 보여주었다. 낮은 농도의 TNT (0.1-0.3 mM)에 노출된 세포의 생존율은 처리하지 않은 세포의 생존율과 큰 차이를 보이지 않았다.

**TNT에 의한 스트레스 충격 단백질의 생성**

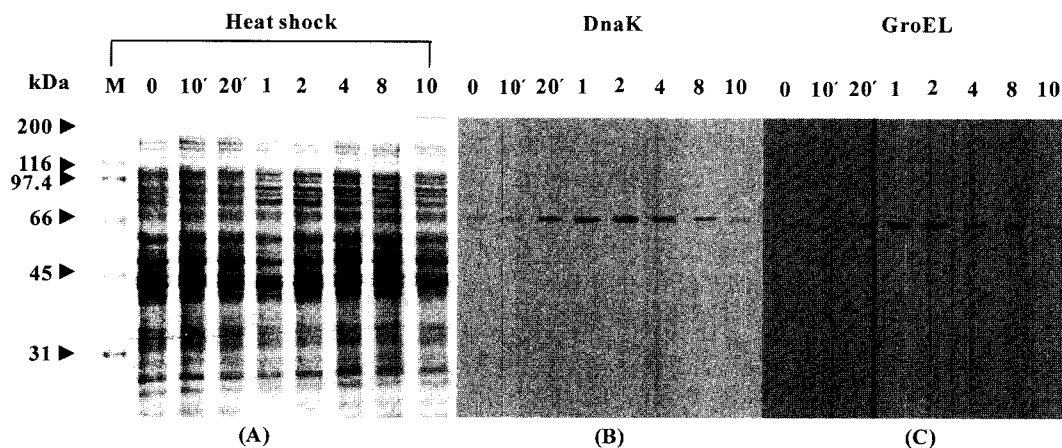
TNT가 균주 HK-6에 대한 스트레스 요인으로 작용하였을 때 스트레스 충격 단백질인 DnaK와 GroEL의 생성을 SDS-PAGE와 Western blot 상에서 관찰하였다. Fig. 2는 균주 HK-6를 여러 농도의 TNT에 8 시간 노출되었을 때 유도되는 DnaK와 GroEL을 보여주고 있다. DnaK와 GroEL의 크기는 각각 70-kDa와 60-kDa였으며 노출된 TNT의 농도에 따라 이들 유도단백질의 양도 비례하여 증가하였다. 그러나, TNT에 노출 후 18 시간대에서 분석한 세포에서는 이들 단백질의 존재가 관찰되지 않았다.

**온도변화에 따른 스트레스 충격 단백질의 생성**

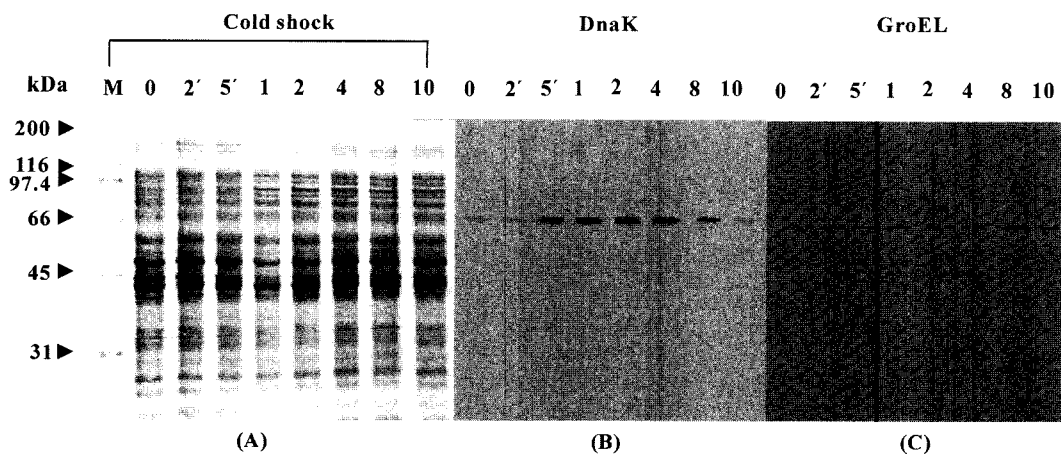
균주 HK-6에 대한 스트레스 요인으로 온도변화에 따른 충격 단백질의 생성을 관찰하였다. Fig. 3은 30°C에서 배양중인 균주 HK-6를 42°C로 heat shock을 주었을 때 유도되는 충격단백질의 유도를 나타낸 그림이다. 그 결과 42°C에서 20 분 동안 노출시켰을 때 DnaK와 GroEL이 처음 생성되었으며, 노출시간에 따른 생성량은 증가하였으나 10 시간 경과 후에는 생성되지 않았다. Cold shock의 경우도 30°C에서 키우던 균주 HK-6의 온도를 4°C로 내린 결과 5 분이 경과하였을 때 DnaK와 GroEL이 생성되기



**Fig. 2.** SSPs induced in *Pseudomonas* sp. HK-6 cells treated with different concentrations of TNT for 8 hr. The SSPs analyzed by SDS-PAGE (A) were used for Western blot with anti-DnaK (B), and anti-GroEL (C) monoclonal antibodies.



**Fig. 3.** SSPs induced in *Pseudomonas* sp. HK-6 cells at the different incubation time points following temperature shift from 30°C to 42°C. The SSPs analyzed by SDS-PAGE (A) were used for Western blot with anti-DnaK (B), and anti-GroEL (C) monoclonal antibodies.



**Fig. 4.** SSPs induced in *Pseudomonas* sp. HK-6 cells at the different incubation time points following temperature shift from 30°C to 4°C. The SSPs analyzed by SDS-PAGE (A) were used for Western blot with anti-DnaK (B), and anti-GroEL (C) monoclonal antibodies.

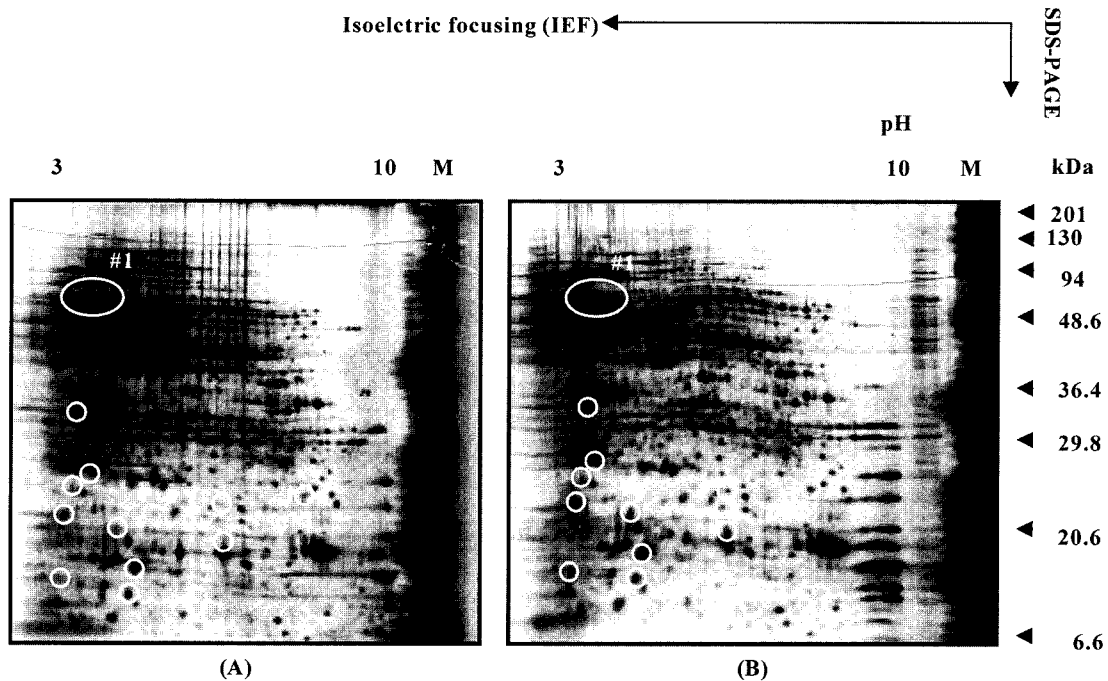


Fig. 5. 2-D PAGE analysis of *Pseudomonas* sp. HK-6 cells; control (A), cells treated with 0.5 mM TNT for 8 hr (B). The circle spots were assumed highly induced and expressed in response to TNT. The protein designated #1 was used for N-terminal amino acid sequencing in this study.

Table 2. N-terminal sequence analysis of TNT stress shock related protein spot

#1 protein spot	<sup>1</sup> XXAKDVKFGDSARKKML <sup>17</sup>
(P48216)GroEL of <i>Pseudomonas putida</i>	<sup>1</sup> MAAKDVKFGDSARKKML <sup>17</sup>

시작하였으며, 10 시간 경과 후에는 생성되지 않았다(Fig. 4).

**2-D PAGE 분석과 N-말단 아미노산 염기서열 분석**

균주 HK-6에 TNT를 노출시킨 후 얻어진 단백질 분획에 대하여 2-D PAGE를 통하여 전개하였다. 전개된 2-D PAGE에서 TNT 노출 전과 후를 비교하여 TNT 스트레스 충격단백질의 생성을 확인하였다(Fig. 5). pH 3-10 범위에서 약 450 개의 spots를 볼 수 있었으며 이 가운데 12 개의 spots가 TNT에 의해 유도되는 것으로 간주되었다. 가장 크게 유도된 spot인 #1 단백질로부터 시료를 채취하여 N-말단 아미노산 서열을 결정하였다. 이를 토대로 하여 유사성을 조사한 결과 *Pseudomonas putida* (P48216)에서 스트레스 단백질로 보고된 GroEL과 동일한 단백질임이 입증되었다(Table 2).

**고 찰**

본 연구에서 사용한 TNT 분해세균, HK-6는 BIOLOG Identification system을 이용한 세균의 특성을 분석한 결과, *Pseudomonas putida*와 계통학적 관계가 가장 가까운 균으로 동정되었으나(Table 1), 아직 유전학적 분석 등이 이루어지지 않았

고, 세밀한 종 동정을 위한 분석 실험이 필요한 것으로 사료되어 *Pseudomonas* sp. HK-6으로 명명하였다.

HK-6 세포의 생존을 시험에서, TNT 농도가 높아짐에 따라 HK-6 세포의 생존율은 더 감소되는 양상을 보여주었다(Fig. 1). 낮은 농도의 TNT (0.1-0.3 mM)에 노출된 세포의 생존율은 처리하지 않은 세포의 생존율과 큰 차이를 보이지 않았는데, 이는 HK-6 세포가 TNT에 대하여 강한 저항성을 갖고 있을 뿐만 아니라, 분해할 수 있는 능력을 갖고 있기 때문으로 사료된다. 0.5 mM 농도의 TNT를 HK-6 세포에 처리한 후, 8-10 시간대에서 분석한 HK-6 세포의 생존율은 TNT를 처리하지 않은 세포에 비하여 약 1.3 배의 감소율을 보였다. 본 연구팀은 이미 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)를 분해하는 세균인 *Burkholderia cepacia* YK-2 또한 높은 농도의 2,4-D에 노출되었을 때 상당한 생존율의 감소를 나타냄을 보고한 바 있다(6,7). 이러한 결과들은 HK-6 세포가 TNT를 분해할 수 있는 능력에도 불구하고, 아주 높은 농도에서는 TNT의 강력한 독성으로 인하여 생존율이 감소할 수 있음을 제시해 준다.

Fig. 2는 HK-6 세균이 다양한 농도의 TNT에 노출되었을 경우에 노출 시간과 농도가 증가함에 따라 스트레스 충격 단백질인 70 kDa DnaK와 60 kDa GroEL이 생성함을 보여주고 있다. 이는 HK-6 세포가 화학적·환경오염원으로써의 TNT에 의해 스트레스를 받으면 이에 대한 생리적 적응현상으로서 유전자 발현 기작이 조절하여 스트레스 충격 단백질을 합성하고 있음을 제시해 주고 있다. 이와 유사한 결과로서 Faber 등(21)은 pentachlorophenol과 monochlorophenol에 노출된 *E. coli*에서 스트레스 충격 단백질이 유도되며, 노출시간에 따라 단백질의 합성이 유도 혹은

억제된다는 것을 확인하였으며, 20 mM benzoate에 15 분 간 노출된 *E. coli*에서는 33 개 종류의 스트레스 충격 단백질이 유도되는 것이 확인되었음을 보고하였다(22). 또한 4-chlorobenzoate 나 biphenyl 그리고 4-hydroxybenzoate와 같은 환경 오염물질에 의한 생존과 스트레스 충격 단백질의 합성 양상이 Park 등(25)에 의하여 연구되었다. 또한 Ko 등(19)은 토양으로부터 분리한 *Pseudomonas putida* DJ-12에 catechol을 처리하여 스트레스 충격 단백질인 DnaK와 GroEL의 생성을 확인하였다. 이같이 유도된 스트레스 충격 단백질 가운데 일부는 다른 환경 오염 요인임에도 불구하고 동일한 충격 단백질로 확인되어졌으며, 그 가운데 상당량은 각각의 화합물에 따라 독특한 것임이 밝혀졌다.

온도의 변화에 따라서 유도되는 스트레스 충격단백질의 분석 실험결과, heat shock과 cold shock 모두에서 동일한 단백질이 유도됨을 확인하였다(Figs. 3 & 4). 많은 미생물에서 발견된 DnaK와 GroEL의 크기는 약 70-kDa과 60-kDa으로 주로 온도의 변화에 따른 스트레스로 인해 나타난다고 보고되었다(2,5,9,13,14). 이와 같은 결과는 TNT에 의해 유도되는 스트레스 충격 단백질과 열충격에 의해서 나타나는 단백질이 동일한 것임을 시사해 주고 있다. 이와 같은 결과는 환경으로 방출되고 있는 독성이 강한 화학물질에 의해서 세포 내에 유도되는 스트레스 충격 단백질이 온도의 변화에 의해서 나타나는 단백질과 동일한 단백질을 제시한 최근 수 년 간의 스트레스 충격단백질에 대한 연구결과(1,6-8,19,20,22)와 일치함을 보여주고 있다.

2-D PAGE를 통하여 TNT에 노출되기 전과 후의 전계를 비교한 결과는 유도된 단백질의 규명에 이용되었으며, N-말단 아미노산 서열을 확인하여 유사성을 조사한 결과 *Pseudomonas putida* (P48216)에서 발견된 스트레스 단백질, GroEL과 동일한 단백질임이 입증되었다(Table 2). 하지만, TNT에 의해 HK-6 세포에서 유도되는 스트레스 단백질의 정확한 실체와 그 역할에 대한 규명은 전체길이의 단백질을 클로닝하고 분석함으로써 밝혀져야 할 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 2001년도 순천향대학교 일반연구과제(No. 20010012) 학술연구비 지원과 일부는 2001년도 한국과학재단 목 적기초연구 지역대학 우수과학자지원 사업(No. R05-2001-000-00318-0)으로 수행되었음.

## 참고문헌

- Adamowicz, M., P.M. Delley, and K.W. Nickerson. 1991. Detergent (sodium dodecyl sulfate) shock proteins in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 173, 229-233.
- Blom, A., W. Harder, and A. Martin. 1992. Unique and overlapping pollutant stress proteins of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 331-334.
- Bollag, D.M., M.D. Rozycki, and S.J. Edelman. 1996. Protein methods, 2nd ed., Wiley-Liss, New York.
- Cho, Y.S., H.Y. Kahng, J.J. Kukor, C.K. Kim, and K.H. Oh. 2002. Physiological and cellular responses of the 2,4-D degrading bacterium, *Burkholderia cepacia* YK-2, to the phenoxyherbicides 2,4-D and 2,4,5-T. *Curr. Microbiol.* 45: in press.
- Cho, Y.S., S.H. Park, C.K. Kim, and K.H. Oh. 2000. Induction of stress shock proteins DnaK and GroEL by phenoxyherbicide 2,4-D in *Burkholderia cepacia* YK-2 isolated from rice field. *Curr. Microbiol.* 41, 33-38.
- Craig, E.A., B.D. Gambill, and R.J. Nelson. 1993. Heat shock proteins: molecular chaperones of protein biogenesis. *Microbiol. Rev.* 57, 402-414.
- Flahaut, S., J. Frere, P. Boutibonnes, and Y. Auffray. 1996. Comparison of the bile salts and sodium dodecyl sulfate stress responses in *Enterococcus faecalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2416-2420.
- Flattery-O'Brien, J., L.P. Collinson, and I.W. Dawes. 1993. *Saccharomyces cerevisiae* has an inducible response to menadione which differs from that to hydrogen peroxide. *J. Gen. Microbiol.* 139, 501-507.
- Faber, F., T. Egli, and W. Harder. 1993. Transient repression of the synthesis of OmpF and aspartate transcarbamoylase in *Escherichia coli* K 12 as a response to pollutant stress. *FEMS Microbiol. Lett.* 111, 189-196.
- Geomes, S.L., J.W. Guber, and L. Shapiro. 1990. Expression of the *Caulobacter* heat shock gene *dnaK* is developmentally controlled during growth at normal temperatures. *J. Bacteriol.* 172, 3051-3059.
- Kamemori, M., H. Mori, and T. Yura. 1994. Induction of heat shock proteins by abnormal proteins results from stabilization and not increased synthesis of  $\sigma^{32}$  in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 176, 5648-5653.
- Kim, C.K. and I.H. Ga. 1992. Ethanol tolerance of *Campylobacter jejuni* by ethanol shock. *Kor. J. Microbiol.* 30, 377-382.
- Ko, Y.J., J.Y. Lim, K.S. Lee, and C.K. Kim. 1999. Biochemical and cytological changes of *Pseudomonas* sp. DJ-12 cells in response to catechol treatment. *Kor. J. Microbiol.* 35, 139-145.
- Langer, T., C. Lu, H. Echols, J. Flanagan, M.K. Hayer, and F.U. Hartl. 1992. Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding. *Nature* 356, 683-689.
- LaRossa, R.A. and T.K. van Dyk. 1991. Physiological roles of the DnaK and GroEL stress proteins: catalysts of protein folding of macromolecular sponges. *Mol. Microbiol.* 5, 529-534.
- Lambert, L.A., K. Abshire, D. Blankenhorn, and J.L. Slonszewski. 1997. Proteins induced in *Escherichia coli* by benzoic acid. *J. Bacteriol.* 179, 7595-7599.
- Lupi, C.G., T. Colangelo, and C.A. Mason. 1995. Two-dimensional gel electrophoresis analysis of the response of *Pseudomonas putida* KT2442 to 2-chlorophenol. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2863-2872.
- Li, D., M. Alic, J.A. Brown, and M.H. Gold. 1995. Regulation of manganese peroxidase gene transcription by hydrogen peroxide, chemical stress, and molecular oxygen. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 341-345.
- Morrisey, J.H. 1981. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels; a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal. Bio. Chem.* 117, 307-310.
- Mason, C.A., J. Danner, P. Indra, and T. Colangelo. 1999. Heat-induced expression and chemically induced expression of the *Escherichia coli* stress protein HtpG are affected by the growth environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3433-3440.

21. O'Farrell, P.H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250, 4007-4021.
22. Park, S.H., Y.J. Ko, and C.K. Kim. 1998. Cellular responses of *Pseudomonas* sp. DJ-12 to the stresses of several aromatic pollutants. *J. Microbiol.* 36, 93-98.
23. Sambrook, J.K., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. Molecular cloning, 2nd ed. Cold Spring Harbor, New York.
24. Teixeira-Gomes, A.P., A. Cloeckeaert, and M.S. Zygmunt. 2000. Characterization of heat, oxidative, and acid stress responses in *Brucella melitensi*. *Infect. Immun.* 68, 2954-2961.

(Received April 9, 2002/Accepted May 27, 2002)

**ABSTRACT: Responses of Bacteria to TNT: Cells' Survival, SDS-PAGE and 2-D Electrophoretic Analyses of Stress-Induced Proteins**

**Hyo-Won Chang, Hyung-Yeel Kahng<sup>1</sup>, Seung-II Kim<sup>2</sup>, and Kye-Heon Oh\*** (Department of Life Science, Soonchunhyang University, Asan 336-600, Korea; <sup>1</sup>Research Institute for Basic Sciences, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea; <sup>2</sup>Biomolecular Research Team, Korea Basic Science Institute, Daejeon 305-333, Korea)

The cellular responses of soil-borne bacterium, *Pseudomonas* sp. HK-6 to explosive 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) were examined. Two stress shock proteins (SSPs), approximately 70-kDa DnaK and a 60-kDa GroEL were found in HK-6 cells in response to TNT. Analyses of SDS-PAGE and Western blot using anti-DnaK and GroEL revealed that SSPs were induced in HK-6 cells exposed to 0.5 mM of TNT for 6-12 hrs. The maximum induction of proteins was achieved at 8-hr incubation point after HK-6 cells' exposure to TNT. Similar SSPs were found to be induced in HK-6 cells by heat shock (shift of temperature, from 30 °C to 42°C) or cold shock (shift of temperature, 30°C to 4°C). 2D-PAGE of soluble protein fractions from the culture of *Pseudomonas* sp. HK-6 exposed to TNT demonstrated that approximately 450 spots were observed on the silver stained gels ranging from pH 3 to pH 10. Among them, 12 spots significantly induced and expressed in response to TNT were selected and analyzed. Approximately 60-kDa protein, which was assumed highly expressed on the gel, was used for amino acid sequencing. N-terminal microsequencing with in-gel digestion showed that N-terminal sequence of the TNT-induced protein, <sup>1</sup>XXAKDVKFGDSARKKML<sup>17</sup>, shared extensive similarity with <sup>1</sup>MAAKDVKFGDSARKKML<sup>17</sup>, N-terminal sequence of (P48216) GroEL of *Pseudomonas putida*.