

## Lux operon을 함유한 유전자 재조합 *Escherichia coli*의 발광 안정화 조건 및 독성물질에 대한 민감성

<sup>1,2</sup>배희경 · <sup>1</sup>이상민 · <sup>1</sup>정윤철 · <sup>3</sup>송방호 · <sup>†</sup>신평균

<sup>1</sup>한국과학기술연구원 수질환경 및 복원연구센터, <sup>2</sup>국립환경연구원 위해성평가과, <sup>3</sup>경북대학교 생물교육학과  
(접수 : 2002. 12. 2., 게재승인 : 2002. 12. 26.)

### Conditions for Stable Light Production of Recombinant *Escherichia coli* Containing Lux Operon and Sensitivity to Toxic Chemicals

Heekyung Bae<sup>1,2</sup>, Sang Min Lee<sup>1</sup>, Yun Chul Jung<sup>1</sup>, Bang Ho Song<sup>3</sup>, and Pyong Kyun Shin<sup>†1</sup>

<sup>1</sup>Water Environment Research Center, Korea Institute of Science and Technology, Seoul, Korea

<sup>2</sup>Environmental Risk Assessment Division, National Institute of Environmental Research, Incheon, Korea

<sup>3</sup>Department of Biology, Teachers College, Kyungpook National University, Daegu, Korea

(Received : 2002. 12. 2., Accepted : 2002. 12. 26.)

Recombinant *E. coli* DH5  $\alpha$ /pSB311 was made by cloning the genes encoding bacterial luciferase and aldehyde substrate proteins from *Photobacterium luminescense*, to complement defects of Lumistox, which is normally used in bioassays to monitor toxic substances in water environmental systems. The conditions for stable light production by the recombinant strains were investigated with respect to cell growth stage, cell number, and buffer conditions. The optimum growth stage was a middle-exponential stage with an OD<sub>660nm</sub> value of 0.6-0.7. About 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> cells per test tube was optimum for stable light emission. The effect of buffer was not significant if an optimum viable cell number was maintained. The bioluminescence of the recombinant *E. coli* harboring the *lux* operon of *Photobacterium luminescense* was not affected by temperature, while the bioluminescence of Lumistox was temperature sensitive. The recombinant *E. coli* was more sensitive to heavy metals (Cd, Cu, Hg, Zn) than Lumistox, because it does not require high concentrations of NaCl in the buffer.

**Key Words** : Recombinant *E. coli*, bioluminescence, stability, lumistox, heavy metal

#### 서론

수계로 오염되는 유해독성물질 탐지 방법에서 생물지표종을 이용한 방법은 물속에 존재하는 특정 생물체의 생존도나 활성을 확인하는 간접적인 방법을 통해 대상 오염물질의 존재 여부를 결정하는 방법으로, 미생물을 이용하면 다른 고등 생물체에 비해 민감하게 반응하기 때문에 낮은 농도의 독성 오염물질에 대해서 활용이 가능하며, life cycle이 짧아서 신속한 대처 방안이 가능하다. 이점에 착안하여 유독물질이 해양발광 미생물인 *Photobacterium phosphoreum*의 발광량에 끼치는 영향을 이용한 Microbics사의 Microtox Assay System(1)

과 독일 Drlange사의 Lumistox가 상용화되어 현재 수질 독성 평가에 적용되고 있다.

이 *Photobacterium phosphoreum*은 490 nm에서 푸른 빛을 발산하는데, 독성물질에 노출되면 미생물 대사에 저해를 줌으로써 발광량이 감소하게 된다. 발광반응은 O<sub>2</sub> 존재하에서 *lux* CDE 유전자에 의해 code되는 단백질에 의한 aldehyde substrate, *lux* AB 유전자에 의해 code되는 luciferase의 촉매 작용, 환원된 형태의 FMNH<sub>2</sub>의 산화현상에 의해 일어나게 된다(7). 그러나 상용화된 assay의 경우, 해양 미생물에 맞는 낮은 온도(15°C)와 높은 NaCl 농도를 유지해야 하고, 시료 측정시에는 rehydration이 요구된다. 이런 사용상의 단점을 보완하기 위해, *E. coli*, *B. subtilis*, *P. fluorescens* 등의 strain을 이용하여 *lux* 유전자 자체 및 특정 환경관련 물질에 의해 유도되는 유전자를 *lux* 유전자와 결합하여 독성물질을 감지하는데 이용하고자하는 연구가 진행되어 왔다(2,10). 이들은 heat shock promoter나 SOS system을 이용하여 특정 물질에 대해서만 발광이 유도되는 기작들로 이루어져 있는데, 이 또

<sup>†</sup> Corresponding Author : Department of Chemical and Biochemical Engineering U. of Maryland Baltimore County, 1000, Hilltop Circle, Baltimore, MD 21250, USA  
Tel : +1-410-455-3403  
E-mail : pshin58@hotmail.com

Table 1. Bacterial strain and plasmids used in this study

Strain and plasmid	Genotype	Reference or source
Strain		
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	F' RecA <i>endA gyrA96 thi-1 hsdR17</i> $\Delta$ ( <i>lacZ YA-argF</i> )	Laboratory stock, (9)
<i>E. coli</i> S17-1	Mobilizing donor strain; <i>hsd pro recA</i>	Laboratory stock, (9)
Lumistox	<i>Photobacterium phosphoreum</i>	Drlange Corp. Germany
Plasmids		
pSB311	6.96-kb <i>EcoR</i> I fragment containing the <i>lux</i> operon from <i>Photobacterium luminescens</i> in pACYC 184	
pUT/luxAB	2.0-kb Not I fragment containing the <i>luxAB</i> gene from <i>Vibrio harveyi</i> in pUT	(15)

한 유도에 관여하는 물질이 아닌 경우 아무런 반응을 보이지 않을 것이고, 독성물질에 의해 발광이 유도될 경우도 그 독성물질이 세포자체에 해를 주는 현상은 간과하고 있고, 유도에 의해 발광이 되는데도 시간이 필요한 단점이 있다.

본 연구에서는 독성유해물질이 유입될 경우 세포자체의 대사에 저해를 줌으로써 세포가 갖고 있는 발광량이 줄어드는 것에 따라 독성정도를 탐지하는 기작에 기본 근거를 두고, 가장 잘 알려진 organism이며 재조합 DNA 기술도 가장 안정된 *E. coli*를 이용하여 고가의 기질 첨가의 번거로움이 없는 *lux* operon을 *E. coli*에 융합하여 독성 검사시 기본이 되는 발광의 안정성 조건을 적정 생장 상태와 세포수, 측정 완충용액 등에서 조사하였고, 일차적으로 안정화된 bioluminescence에 있어 온도에 대한 영향과, 중금속에 대한 독성도를 상용화된 Lumistox와 비교해 봄으로써 재조합 *E. coli*의 Biosensor 이용가능성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 plasmid

본 실험에 사용한 균주와 plasmid는 Table 1과 같다.

### 배지 및 배양방법

실험에 사용한 균주의 배양에는 LB 배지(Luria-Bertani ; tryptone 10 g/L, yeast extract 5 g/L, sodium chloride 5 g/L)를 사용하였으며, 항생제 내성 균주의 배양을 위해서는 Ampicilline(Sigma Co., U.S.A.)을 첨가하였고, *E. coli*는 호기적 조건하에서 37°C, 180 rpm의 교반배양기(Vision Scientific Co., K.M.C.8480SF, Korea)에서 배양하였다.

### 발광미생물의 활성화

2% NaCl 용액(pH 7.0±0.2)을 먼저 준비하고, 냉동 상태의 배양용액을 상온의 물에 녹이고 incubator에 넣어 15분간 배양한다. 냉동된 발광미생물을 꺼내 물이 담긴 비이커에 3/4 정도 담구어 2분간 해동하고 배양용액을 0.5 mL 첨가 후 살며시 흔들어주고 incubator에 놓아둔 후 발광미생물을 배양액이 담긴 cuvette으로 모두 이동시킨다.

### 생균수 측정 및 세포 농도 측정

생균수는 plate count 방법으로 평판도말법을 이용하였으며, 적절한 수의 colony를 얻기 위해 각 시료를 10배율로 0.85% NaCl 생리 식염수에 희석하여 PCA(plate count agar) 배지에

도말하여 37°C에서 24~36시간 동안 배양한 후 형성된 colony를 계수하였고, 세포 농도는 측정 시료 1 mL을 cuvette에 취한 후 UV-visible spectrophotometer를 이용하여 660 nm에서 측정하였다.

### Transformation

Plasmid pSB311을 transformation 하기 위해서 competent cell의 제조는 CaCl<sub>2</sub> Method에 따라 *E. coli* DH5  $\alpha$ 를 하루 전 LB 액체 배지에 접종하여 37°C에서 배양한다. 50 mL LB 액체 배지에 배양액 0.5 mL을 접종시킨 후 37°C shaking incubator에서 OD(660 nm) 0.4 정도로 배양 후 얼음에 10분간 둔다. 4°C, 5000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 버리고 멸균된 CaCl<sub>2</sub>의 차가운 용액을 10 mL 첨가 후 흔탁시켜 얼음에 20분간 두었다가 4°C, 5000 rpm에서 10분간 원심분리한다. 상등액을 조심스럽게 버리고 1 mL CaCl<sub>2</sub> 용액을 첨가, 현탁시킨 후 30분간 얼음에 두었다가 eppendorf tube에 0.1 mL씩 나누어 놓는다. Competent cell 0.1 mL에 plasmid 5  $\mu$ L를 섞은 다음 얼음에 30분간 방치 후 42°C에서 2분간 열처리한 후 0°C에서 15분간 둔다. LB 액체배지를 1 mL을 tube에 첨가하여 37°C에서 1시간 배양하고 0.1 mL을 선택배지(Tc 10  $\mu$ g/mL)에 도말하여 37°C에서 12~16시간 배양한다.

### Bioluminescence의 측정

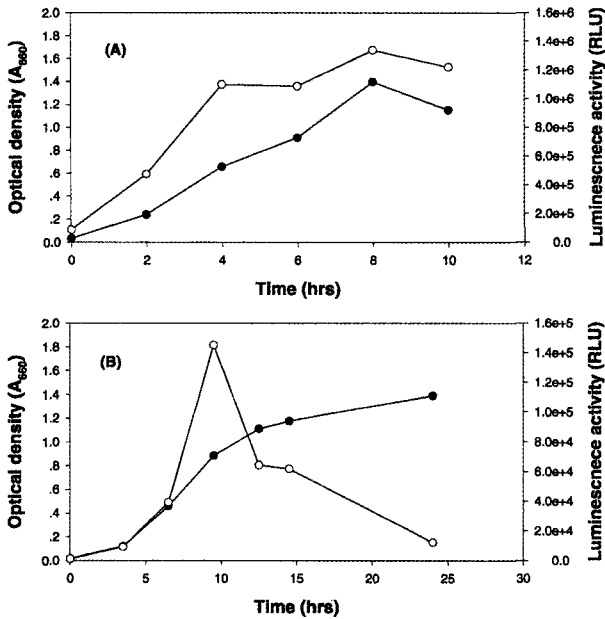
10% 접종한 후 적정시간이 지난 균주를 생리 식염수에 10, 100배 희석한 후 cuvette에 1 mL을 취하여 Luminometer (Berthold Lumate LB 9501)로 측정하였다. 모든 시료는 상온에서 측정하였으며 시간은 1초로 하였다. Luminescence의 단위는 RLU(Relative Light Unit)로 1분 당 1 mL의 시료에서 발생하는 빛의 양을 mV로 나타낸 것이다.

### 온도변화에 따른 Bioluminescence의 변화

*E. coli* DH5  $\alpha$ /pSB311을 overnight 배양하여 이것을 접종원으로 하여 mid-exponential stage(4시간)까지 배양한 배양액과 Lumistox를 실온(25~30°C)과 15°C의 온도에서 시간 경과에 따른 발광량의 안정성과 변화를 측정하였다.

### 중금속 이온에 대한 독성도 실험

CuSO<sub>4</sub>, CdCl<sub>2</sub>, HgCl<sub>2</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, PbCl<sub>2</sub>를 증류수에 용해시켜 stock 수용액을 만들어 실험시 적정 농도로 희석하여 사용하였다. *E. coli* DH5  $\alpha$ /pSB311을 overnight 배양하여 이것을 접종원으로 하여 mid-exponential stage(4시간)까지 배양한 배양



**Figure 1.** Typical luminescence activity and optical density of *E. coli* (A) DH5  $\alpha$ /pSB311 and (B) S17-1/pUTluxAB cultivation : (●) growth, (○) luminescence.

액과 활성화된 Lumistox를 15°C와 실온(25~30°C)에서 중급 속도에 노출, 30분 후의 발광량 감소율을 측정하였다.

**독성도 분석**

독성실험에서 독성을 나타내는 방법으로 EC(effective concentration)값을 구하였다. 중급속 노출 30분 후에 50%의 발광량 감소를 보이는 농도를 EC50으로 나타내는데, 먼저 CF(correction factor)와 Ic 값을 구한 다음,  $\Gamma$ (Gamma)값 즉, 남아있는 발광량과 초기의 발광량에서 없어진 발광량의 비가 1이 되는( $\Gamma=1$ ) 독성물질의 농도가 EC50이다(1).

(1) Calculating the correction factor (CF)

$I_0$  = Initial value

$I_{50}$  = Final value

$CF = I_{50} / I_0$

(2)  $I_c$  = corrected  $I_{50}$  value =  $I_0 \times CF$

(3) %  $I_{50}$  value

$(I_c - I_{50}) \times 100 / I_c = \% I_{50}$

(4) Gamma value

$\% I_{50} / (100 - \% I_{50}) = \Gamma$

**결과 및 고찰**

**재조합 *E. coli*의 성장과 발광량과의 상관관계**

미생물의 성장은 세포 수의 변화로부터 측정할 수 있다. 세포 수의 상대적 측정법인 흡광도 측정법을 이용하여 재조합 *E. coli*의 성장에 따른 발광량을 알아보았다. *Photorhabdus luminescens*의 luxCDABE 유전자가 plasmid vector내의 tetracycline promoter에 의해 유도되어지도록 유전적으로 재조합된 *E. coli* DH5  $\alpha$ /pSB311을 LB 배지에서 10  $\mu$ g/mL 농도의 tetracycline을 첨가하여 배양한 경우, 발광량은 exponential

stage의 초기부터 증가하기 시작하여 exponential stage의 끝에서 최대 발광량을 보였고, 세포가 stationary stage에 들어서 세포의 수가 감소함에 따라 발광량도 감소하였다(Figure 1A). 이는 transcription level에서 세포 농도에 비례적으로 auto-induction되는 기작에 따른 조절현상이라 할 수 있다(12). 반면, *Vibrio harveyi*의 luxAB 유전자만 융합되어 재조합된 *E. coli* S17-1/pUTluxAB의 경우에는 luciferase의 기질을 합성할 수 없으므로 1% n-decyl aldehyde를 40  $\mu$ L 첨가하고 4분 후 발광량을 측정하였다. luxCDABE 유전자를 전부 갖고 있는 재조합 *E. coli* DH5  $\alpha$ /pSB311과 마찬가지로 exponential stage 끝에서 최대 발광량을 보이는 것은 같으나, stationary stage에서는 급격하게 발광량이 떨어지는 것을 확인할 수 있었다(Figure 1B). 이는 *V. harveyi* luciferase의 경우 stationary stage에 이르면 intracellular proteases에 의해 빠르게 분해되는 경향(11)과 일치하는 것으로, lux 유전자를 이용하여 재조합 발광미생물을 제조하는데 있어 lux 유전자의 source가 luciferase의 안정성면에 큰 영향을 미침을 보여주고 있다. 한편 lux operon 전체를 cloning하여 기질을 별도로 첨가하지 않고도 원하는 발광의 효과를 얻을 수 있어 기질 첨가의 번거로움이 없는 lux operon 전체가 융합된 재조합 *E. coli*를 사용하는 것이 유리한 것으로 판단된다.

**발광의 안정화 조건**

폐수를 포함한 수환경에 영향을 미치는 환경오염원이나 독성물질의 영향을 확인하기 위해 생물학적 경보장치로 현재 상용화된 Microtox와 Lumistox의 경우, 해양미생물을 사용하기 때문에 발광이라는 생리적 특징을 발현하기 위해서는 검사하려는 시료에 많은 양의 염분을 첨가해 주어야 하고, 15°C라는 낮은 온도가 적정 생육온도이기 때문에 겨울을 제외한 상온에서 독성 검사시 온도에 대한 영향을 많이 받을 뿐더러 운전 방식에 있어서도 앰플 시험균주를 rehydration 시킨 후 시료와 혼합해야 하는 단점이 있다.

이런 단점을 보완하기 위해 재조합된 *E. coli*를 사용하기 위해서는 발광하는데 있어 적절한 성장 상태와 생균수, 발광 측정 완충액과 같은 조건들이 우선 확립되어야 한다. 이전 연구에서 *V. harveyi*의 luxAB 유전자만을 가진 재조합 *E. coli*를 가지고 Hank's buffer(HBSS)-gelatine에서 late-exponential stage 균을 희석하여 안정화된 발광을 보이는 실험을 하였다(7). 현재 발표되는 논문들도 이전의 이러한 luxAB 유전자만을 가진 재조합 *E. coli*를 가지고 실험한 data를 응용하여 late-exponential stage까지 배양한 후 독성시험이나 장기 보존을 위한 저장용 시료로 사용하고 있으나 lux operon이 융합된 재조합 *E. coli*에 대한 기본적인 실험에 대해서는 발표된 바가 없다. 이에 lux operon을 가진 재조합 *E. coli*를 가지고 발광 측정 완충액과 exponential stage 중에서도 growth stage를 달리하여 세포수도 10배, 100배 희석하여 발광의 안정성을 비교해 보았다.

발광량을 측정하기 위한 완충용액으로는 *E. coli*를 배양하는 배지인 LB 액체 배지와 0.85% sodium chloride 생리 식염수를 사용하였다. Figure 2의 경우, Figure 1의 성장곡선에 근거를 두고 exponential stage 중에서 early-middle-late exponential stage로 나누어 early stage는 2시간 배양, middle sage

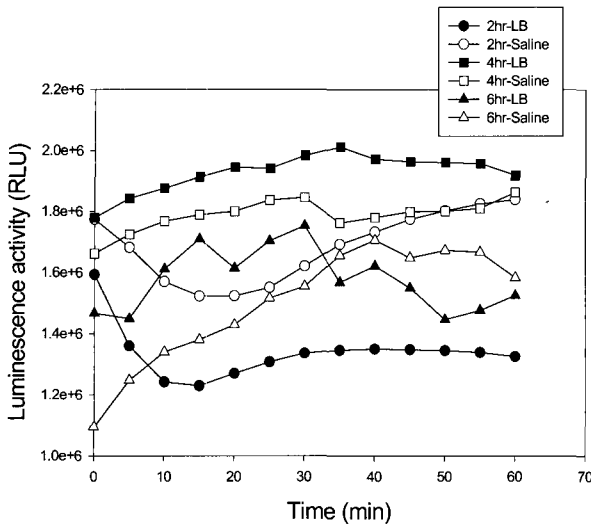


Figure 2. Typical light emission curves of *E. coli* DH5  $\alpha$ /pSB311 in two different buffer during exponential stage (sample was diluted 10 times).

는 4시간 배양, late stage는 6시간 배양한 후 시료를 채취하여 LB 배지와 생리 식염수에서 10배 희석 후 발광량을 측정 한 것이다.

Early stage까지 배양한 경우, OD<sub>660</sub>에서 흡광도는 0.241이었고, plate count agar에 평판 도말하여 측정한 생균수는  $1.9 \times 10^8$  CFU/mL이었다. 측정 완충용액으로 LB, 생리 식염수 모두 15분 정도는 발광량이 줄어들다가 그 이후 발광량이 증가하는 것으로 나타났다. 이것은 세포가 자라는 단계에서 세포내에 auto-induction을 유도하는 물질이 축적되지 않은 상태에서 시간이 경과함에 따라 발광량이 떨어지다가 세포상태가 자라면서 발광량도 증가하는 현상을 보였다.

Middle stage까지 배양한 경우의 세포농도는 0.659이었고, 생균수는  $7.5 \times 10^8$  CFU/mL이었으며, middle stage 또한 세포가 분열, 자라는 단계로 시간이 경과함에 따라 발광량이 증가하는 것을 보이나 그 증가폭이 그렇게 크지는 않았다.

Late stage까지 배양한 경우의 흡광도는 0.910이었고 생균수는  $1.3 \times 10^9$  CFU/mL이었는데, LB, saline 모두 불규칙하게, 발광량도 middle stage 때 보다 낮았다. 이는 세포가 가장 왕성하게 성장 분열하는 시기에다가 높은 세포수에 의한 탁도 간섭 즉, inner filter effect로 빛을 밖으로 발산할 뿐 아니라 흡수되고 분산되는 현상을 보이기 때문으로 생각된다(8).

반면에 각 stage까지 배양한 세포를 LB와 saline에서 100배 희석한 결과, 세포농도, 수에 비례적으로 발광량이 증가하는 현상을 보이고, LB, saline 모두 안정화된 발광현상을 보여 주었다(Figure 3). 이때 생균수가 early stage가  $1.9 \times 10^6$  CFU/mL, middle stage가  $7.5 \times 10^6$  CFU/mL, late stage가  $1.3 \times 10^7$  CFU/mL로  $10^6 \sim 10^7$  CFU/mL 정도의 생균수가 안정화된 발광량을 보이는데 적정 세포수임을 알 수 있었다.

이런 결과로 인해 측정완충용액의 안정성은 적정 세포수가 유지되면 그 종류에 크게 영향을 받지 않으며, 적정 세포수라 할지라도 growth stage에 따라서 early-exponential stage인 경우  $10^6$  정도의 희석에서는 상관없지만  $10^7$  정도 희석범위에서는 계속 세포가 성장함에 따른 발광량이 증가하는 추세

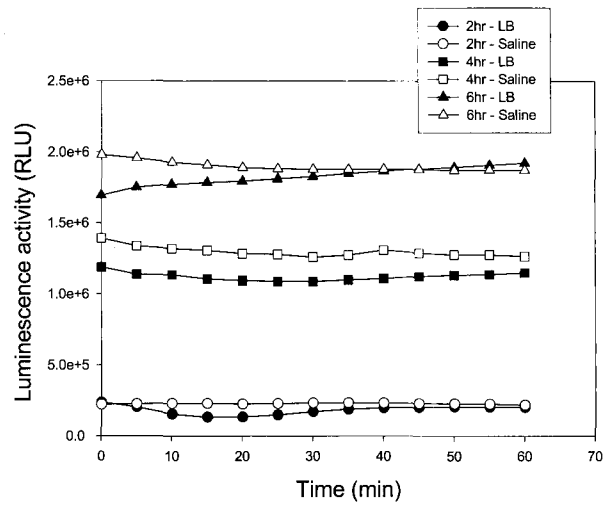


Figure 3. Typical light emission curves of *E. coli* DH5  $\alpha$ /pSB311 in two different buffer during exponential stage (sample was diluted 100 times).

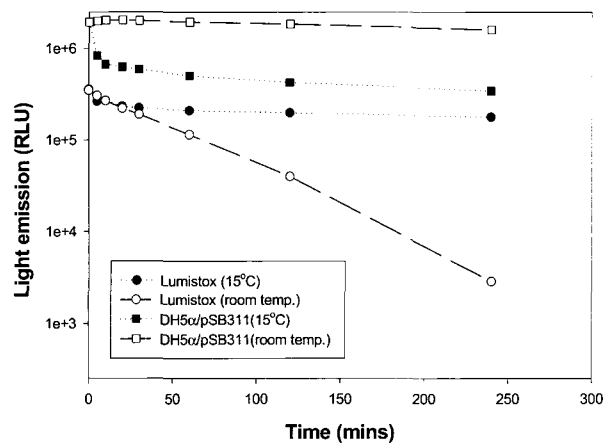


Figure 4. Typical light emission curves of Lumistox and *E. coli* DH5  $\alpha$ /pSB311 at two different temperature.

를 보이고, late-exponential stage 경우는  $10^7$  정도 희석에서는 안정화된 양상을 보여줬지만  $10^8$  정도의 희석에서는 inner filter effect 등으로 불안정한 발광량을 보여줬다. 그러나 middle-exponential stage 경우는 배양상에서도 시간에 따른 발광량의 증가속도도 가장 높고,  $10^6$ ,  $10^7$  정도의 희석 범위에서 높고 안정화된 발광량을 보여줬기 때문에 *E. coli*를 이용한 재조합 발광미생물인 경우 middle-exponential stage까지 배양, OD<sub>660</sub> 0.6~0.7 정도의 세포 배양액이 가장 안정화된 cell age라고 생각된다.

#### 온도에 따른 *E. coli*와 Lumistox의 Bioluminescence의 변화

Lumistox의 경우 15°C에서는 발광량이 일정하게 유지되나, 실온(25~30°C)에서는 시간이 경과함에 따라  $10^3$  정도 급격히 감소하는 경향을 보였다(Figure 4). 이는 Lumistox의 *Vibrio fischeri*가 해양 미생물로 심해에 그 성장 근원을 두고 있기 때문에, 낮은 온도에서 성장하고 발광량이 안정하다는 것은 독성물질을 확인하는 방법으로 사용하는데 있어 여러 가지

**Table 2.** Comparison of sensitivity of the construction *E. coli* DH5  $\alpha$ /pSB311 with Lumistox for several heavy metal

Substances	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ /pSB311			Lumistox		
	EC <sub>20</sub>	EC <sub>50</sub>	EC <sub>90</sub>	EC <sub>20</sub>	EC <sub>50</sub>	EC <sub>90</sub>
CuSO <sub>4</sub>	-	3.1	12.5	5.0	7.0	14.0
CdCl <sub>2</sub>	5.2	22.0	-	14.5	20.0	25.0
HgCl <sub>2</sub>	0.45	0.6	0.80	0.39	0.42	0.50
ZnSO <sub>4</sub>	3.20	6.30	22.9	14.30	25.70	16.70
PbCl <sub>2</sub>	-	25.0	31.3	0.90	3.60	22.90

**Table 3.** Comparison of sensitivity of the construction *E. coli* DH5  $\alpha$ /pSB311 and Lumistox with three other bioassays for several heavy metals

Substances	EC <sub>50</sub> (mg/L)				
	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ /pSB311	Lumistox	Microtox <sup>14</sup>	<i>E. coli</i> BW322/pCSS108 <sup>7</sup>	<i>Photobacterium phosphoreum</i> <sup>5</sup>
	30-min	30-min	5-min	10-min	30-min
CuSO <sub>4</sub>	3.1	7.0	8.0	4.7	
CdCl <sub>2</sub>	22.0	20.0		0.5	3.0
HgCl <sub>2</sub>	0.6	0.42	0.07	0.2	0.005
ZnSO <sub>4</sub>	6.30	25.70	2.5	0.8	12
PbCl <sub>2</sub>	25.0	3.60		110	

<sup>5, 7, 14</sup> Adapted from reference

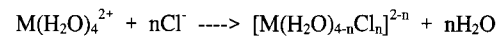
화학물질들이 온도에 의존적이라는 점을 감안할 때 이 또한 하나의 제한요인이 되는 것이다. 반면, *E. coli*의 경우는 실온에서는 발광량이 유지되고, 15°C에서는 한 order 정도 떨어지는 경향을 보여 Lumistox의 온도에 대한 제한된 조건을 해결해 줄 수 있는 경향으로 보아진다. 실제로 여러 종류의 발광 미생물에서 발광 관련 유전자를 *E. coli*에 cloning시켰을 때, *Vibrio fischeri*는 30°C 이상에서는 불안정했고, *Vibrio harveyi*는 37°C까지 안정했고, *Photobacterium luminescence*는 42°C 이상에서도 안정하다고 보고된 바 있다(13). 그러므로 재조합 미생물의 성장온도와 적용 범위에 따라서 발광유전자를 선택하는데도 고려되어야 하고, 이러한 근거를 바탕으로 *E. coli* DH5  $\alpha$ /pSB311은 *Photobacterium luminescence*의 lux operon을 함유함으로써 42°C 이상의 높은 온도에 대해서도 안정하여 *Vibrio fischeri*로 만든 Lumistox보다 온도에 대한 영향을 많이 받지 않음을 확인할 수 있었다.

#### 중금속에 의한 *E. coli*와 Lumistox의 Bioluminescence 변화

Cu, Cd, Hg, Zn, Pb에 대한 발광량의 변화를 조사하기 위해서 *E. coli*와 Lumistox를 이들 물질에 노출, 30분 후의 발광량의 변화를 조사하였다. 발광량의 intensity는 RLU값으로 나타내었으며, 일정한 시간내에 발광량이 20, 50, 90%로 감소하는데 필요한 독성물질의 농도를 EC(effective concentration) 값으로 산출하였다.

Table 2의 EC 값 전체를 비교해 보면, Cu, Cd, Hg, Zn에 대해서 *E. coli* DH5  $\alpha$ /pSB311이 Lumistox보다 더 민감하거나 유사하게 반응하는 것에 반해 Pb에 대해서는 Lumistox가 더 민감하게 반응하였다. 이는 Table 3에서 lux AB 유전자를 함유한 *E. coli* BW322/pCSS108을 가지고 실험하여 Microtox와 비교하였을 때 Cu, Zn에서 더 민감하게 나왔고, 전(5)의 *Photobacterium phosphoreum*을 가지고 중금속에 대한 반응성

을 본 실험과도 비교해 본 결과 Cd, Zn에 있어서 두 종류의 *E. coli* DH5  $\alpha$ /pSB311과 BW322/pCS108이 더 민감한 것으로 나타났다. 이것은 높은 chloride의 농도에서 모든 중금속은 다음의 식에 따른 아주 안정화된 복합체를 형성한다(6).



이 복합체는 낮은 온도에서 더 안정하고, 중금속의 독성 농도를 획기적으로 감하는 역할을 한다. 이에 상용화된 Microtox와 Lumistox의 해양 발광 미생물(*Photobacterium phosphoreum*) 뿐만 아니라 현재 많은 연구가 되고 있는 다른 해양 발광 미생물 모두 배양이나 독성도 측정을 위해 2.0~2.5%의 NaCl 용액을 사용하고 있는데 이는 발광의 안정성은 부여할지 모르나 중금속의 독성도를 test함에 있어서는 민감도가 떨어지게 하는 요인이 된다(7). 그러므로 중금속의 독성도를 측정함에 있어서는 해양 발광 미생물을 biosensor로 이용하기 보다는 *E. coli*와 같이 saline 0.85%의 낮은 salt상에서도 안정화된 발광을 보이는 strain을 사용하는 것이 바람직하다고 생각된다.

#### 요 약

수환경에 영향을 미치는 독성물질을 확인하기 위한 생물학적 경보장치로 현재 상용화된 Lumistox의 단점을 보완하기 위해, *Photobacterium luminescence*의 lux CDABE 유전자가 융합되어 기질첨가의 번거러움이 없는 재조합 *E. coli* DH5  $\alpha$ /pSB311을 제조하였다. 적정 성장 상태와 생균수, 발광 측정 완충용액들을 중심으로 재조합 *E. coli* DH5  $\alpha$ /pSB311의 발광 안정화 조건을 조사한 결과, 적정 세포수가 유지되면 측정 완충용액은 그 종류에 크게 영향을 받지 않으며, OD<sub>660nm</sub> 0.6~0.7 정도의 middle-exponential stage까지의 cell age를 가

지고  $10^6 \sim 10^7$  정도 희석한 세포수가 가장 안정화된 발광량을 보여 주는 것으로 확인되었다. 온도에 따른 재조합 *E. coli*와 Lumistox의 발광량의 변화를 살펴보면, Lumistox는 15°C에서는 안정하나 실온(25 ~ 30°C)에서는 급격하게 발광량이 감소하는 현상을 보이는 반면, *E. coli* DH5  $\alpha$ /pSB311은 *Photobacterium luminescence*의 lux operon을 함유함으로써 온도에 대한 영향을 많이 받지 않음을 확인하였다. 그리고 재조합 *E. coli*와 Lumistox의 중금속에 대한 독성정도를 EC값으로 산출하였다. Cd, Cu, Hg, Zn에 대해서 *E. coli* DH5  $\alpha$ /pSB311은 Lumistox보다 더 민감하거나 유사한 반응을 보였다. 이는 Lumistox의 성장과 발광을 안정화시켜 주는 고농도의 salt에 의한 민감도의 저하에 따른 현상으로, 광산이나 공장폐수와 같은 수계의 중금속 독성도를 측정하기 위한 생물경보장치로 사용하기에는 해양 발광 미생물을 이용하기보다는 재조합 *E. coli*가 더 효과적임을 알 수 있었다.

### 감 사

Plasmid pSB311을 분양받은 영국 Nottingham 대학의 Christine 교수님과, *E. coli* S17-1(pUT/luxAB)를 분양받은 한국의국어대 이규호 교수님께 감사드립니다.

### REFERENCES

1. Anthony A. Bulich (1982), A practical and reliable method for monitoring the toxicity of aquatic samples, *Process Biochemistry*, March/April, 45-47.
2. Armin H., K. Malachowsky, J. E. Thonnard, P. R. Bienkowski, D. C. White, and G. S. Saylor (1994), Optical biosensor for environmental on-line monitoring of naphthalene and salicylate bioavailability with an immobilized bioluminescent catabolic reporter bacterium, *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 1487-1494.
3. Britz M. L., N. Simonov, and U. H. Chun (1997), Stabilization of bioluminescence of immobilized *Photobacterium phosphorium* and monitoring of environmental pollutants, *J. Microbiol. and Biotechnol.* **7**, 242-249.
4. Bulich A. A. and M. W. Greene (1979), Use of luminescent bacteria for biological monitoring of water quality, 193-211, *In* E. Schram and P. Stanley(Eds.), International symposium on analytical applications of bioluminescence and chemiluminescence, State printing and publishing, westlake viilage, CA
5. Chung K. H., H. S. Kim, E. S. Lee, S. J. Jung, J. G. Lee, E. K. Kim, and U. H. Chun (1999), Response of *Photobacterium phosphoreum* to heavy metal, *Korea J. Biotechnol. Bioeng.* **14**, 342-350.
6. Hinwood A. L. and M. J. McCormick (1987), The effect of ionic solutes on EC<sub>50</sub> values measured using the Microtox test, *Toxic. Assess.* **2**, 449-461.
7. Jorma L., M. Korpela, P. Saviranta, R. Kroneid, and M. Karp (1990), Use of *Escherichia coli* cloned with genes encoding bacterial luciferase for evolution of chemical toxicity, *Toxic. Assess.* **5**, 337-350.
8. Konstantinov K. B., P. Dhurjati, T. V. Dyk, W. Majarian, and R. Larossa (1993), Real-time compensation of the inner filter effect in high-density bioluminescent cultures, *Biotechnol. Bioeng.* **42**, 1190-1198.
9. Luis M. M., A. Schafer, J. Kalinowski, J. F. Martin, and A. Puhler (1996), Intergration of narrow-host range vectors from *Escherichia coli* into the genomes of amino acid-producing *Corynebacteria* after inter generic conjugation, *J. Bacteriol.* **178**, 5768-5775.
10. Matti Karp (1989), Expression of bacterial luciferase genes from *Vibrio harveyi* in *Bacillus subtilis* and in *Escherichia coli*, *Biochemica. et Biophysica.* **1007**, 84-90.
11. Matti K. and M. Karp (1998), Stable-light producing *Escherichia coli*, *Biotechnol. Lett.* **10**, 383-388.
12. Paul V. Dunlap (1991), Organization and regulation of bacterial luminescence genes, *Photochem. Photobiol.* **54**, 1157-1170.
13. Philip J. H., C. E. D. Rees, M. K. Winson, and G. S. A. B. Stewart (1993), The application of lux genes, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **17**, 3-14.
14. Ribo J. M. and K. L. E. Kasier (1987), *Photobacterium phosphoreum*, toxicity bioassay, *Toxic. Assess.* **2**, 305-323.
15. Victor D. L., M. Herrero, U. Jakubzik, and K. N. Timmis (1990), Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria, *J. Bacteriol.* **172**, 6568-6572.