

## 유기인계 및 카바메이트계 농약의 고감수성 아세틸콜린에스테라이즈의 대량생산

김영미 · 조문제\* · 김소미<sup>1,\*</sup>

제주대학교 의과대학, '제주도 하이테크 산업진흥원

(2003년 10월 7일 접수, 2003년 10월 21일 수리)

본 실험에서는 acetylcholinesterase(AChE, EC 3.1.1.7)를 이용한 간이 잔류농약 검사법에 필요한, 유기인계 및 카바메이트계 살충제에 대한 감수성이 증가된 AChE(MAChE)를 baculovirus를 이용하여 대량으로 생산하는 시스템을 구축하고 생산된 효소의 특성을 관찰하였다. 한라산에서 채취한 초파리에서 AChE의 cDNA를 합성한 후 PCR을 이용하여 AChE의 lipid anchor부분을 제거하고 site directed mutagenesis에 의해 E107Y, F368L, L408F의 염기서열을 변화시켜 재조합된 MAChE cDNA를 합성하였고 baculovirus vector에 삽입하여 대량생산을 시도하였다. 대량 증식에 필요한 조건으로 감염횟수가 네 번일 때, 그리고 세포수가  $2 \times 10^6$  cell/ml일 때 세포의 증식과 효소의 활성이 극대화됨을 알 수 있었다. His tag을 붙여 Ni-NTA affinity column을 이용하여 MAChE를 정제하였으며, 정제된 효소는 실험조건하에서는 pH(3-10)와 온도(20-50°C)의 변화에 영향을 받지 않았다. 농약 추출액으로 methanol을 사용했을 때가 ethanol을 사용할 때 보다 효과적임을 알 수 있었다. 대표적인 유기인계와 카바메이트계 농약에 대한 저해율을 조사한 결과 재조합된 MAChE는 대만의 집파리 및 변형되지 않은 AChE에 비하여 전반적으로 농약에 대한 감수성이 높은 것으로 나타났다.

**Key words:** site directed mutagenesis, acetylcholinesterase, 유기인계 및 카바메이트계 살충제

### 서 론

국내에서의 채소 시설재배 면적이 해마다 늘고 있고, 소득수준 향상과 더불어 소비자의 안전 농산물에 대한 수요와 관심이 증대되고 있으며, 신선도가 생명인 농산물에 있어서 국가기관에 의한 농산물 잔류농약 검사는 생산자나 소비자에게 실질적인 도움을 주지 못하고 있다. 더욱이 1995년부터는 WTO가 발족됨에 따라서 잔류농약이 무역장벽의 빌미가 되지 않도록 하기 위한 대책을 강구하고 있으며, 국제무역에서는 FAO/WHO 합동 Codex Alimentarius Commission에서 설정하는 국제적인 농약잔류 허용기준, 이른바 Codex기준을 따르도록 권장하고 있다<sup>10</sup>. 또한, 소비자의 안전 농산물에 대한 관심이 증대되고, 농산물에 대한 수입개방정책으로 농산물이 대량으로 수입되어 저렴한 가격으로 공급되고 있어 상대적으로 고가인 국산 농산물은 수입 농산물에 대하여 가격 경쟁으로는 버티어 낼 수 없는 현실이다. 이러한 상황에서 국산 농산물이 신뢰를 받고 수입 농산물과의 경쟁에서 이기는 유일한 길은 우수한 농산물의 생산으로 품질 경쟁력에서 앞서 가는 것이다.

농약은 사용목적에 따라 살균제, 살충제, 제초제 등으로 분류하며 화학조성 및 구조에 의하여 유기인계, 유기염소계, 카바메이트계 등으로 분류된다. 이러한 농약들 중에서 유기인계와 카바메이트계 살충제를 검사하는 방법은 농약성분에 의한

곤충의 신경전달계 효소인 acetylcholinesterase(AChE, EC 3.1.1.7)에 대한 저해 특성을 이용하는데<sup>4,11</sup> 그 작용기작을 보면, 곤충에서 중추신경계(CNS)의 주된 흥분성 신경전달물질인 아세틸콜린은 연접후 세포막에 자리잡은 수용기와 결합하여 신경정보를 전달한 후에는 연접후 신경세포의 막에 자리잡은 그리고 그 부근에 존재하는 AChE에 의해 choline과 초산으로 가수분해되어 활성을 잃는다.

아세틸콜린은 아래의 Fig. 1에서 보는바와 같이 2개의 부차부위에서 AChE와 결합한다. 유기인계 살충제는 천연 기질인 아세틸콜린과 구조적으로 유사한 ester화합물이다. 살충제의 인산기는 AChE의 ester부위에 끌리고, 나머지 부위는 비록 양하전기가 없을 지라도, AChE의 여러 아미노산 잔기와 상호작용에 의해 효소표면에 배열된다. 유기인계 살충제는 아세틸콜린과 마찬가지로의 과정을 거쳐 분해되고 효소를 인산화시킨다. 그러나 효소와 인산기 간의 ester결합은 아세틸화된 ester결합에 비하여 가수분해에 매우 안정하다. 인산기가 dimethylphosphate인 경우에 효소의 반이 회복하는 데 걸리는 시간은 약 80분이 소요되고, diethylphosphate인 경우에는 전자에 비해 6배나 더 오래 걸린다고 알려져 있다. 이러한 시간은 천연적으로 아세틸화된 효소가 회복하는 데에 걸리는 시간에 비해 약 100만 배 이상 더 오래 걸리는 시간이다. 유기인계 살충제에 의해 인산화된 AChE 즉 저해된 AChE는 간극에 방출된 아세틸콜린을 분해할 수 없게되고, 축적된 아세틸콜린은 지속적으로 신경충격(nerve impulse)을 만들어, 신경전달에 교란이 야기되고 에너지는 고갈되어 결국에는 곤충은 마비되어 죽게 된다. 또한, 카바메이트계 살충제도 유기인계 살충제와 마찬가지로 일종의 ester화합물이며, 카바메이트계 살충제의 작용기작은

\*연락처자

Phone: 82-64-724-0792; Fax: 82-64-724-5690

E-mail: gtp@korea.com

Phone: 82-64-754-3738; Fax: 82-64-725-2593

E-mail: moonjcho@cheju.ac.kr

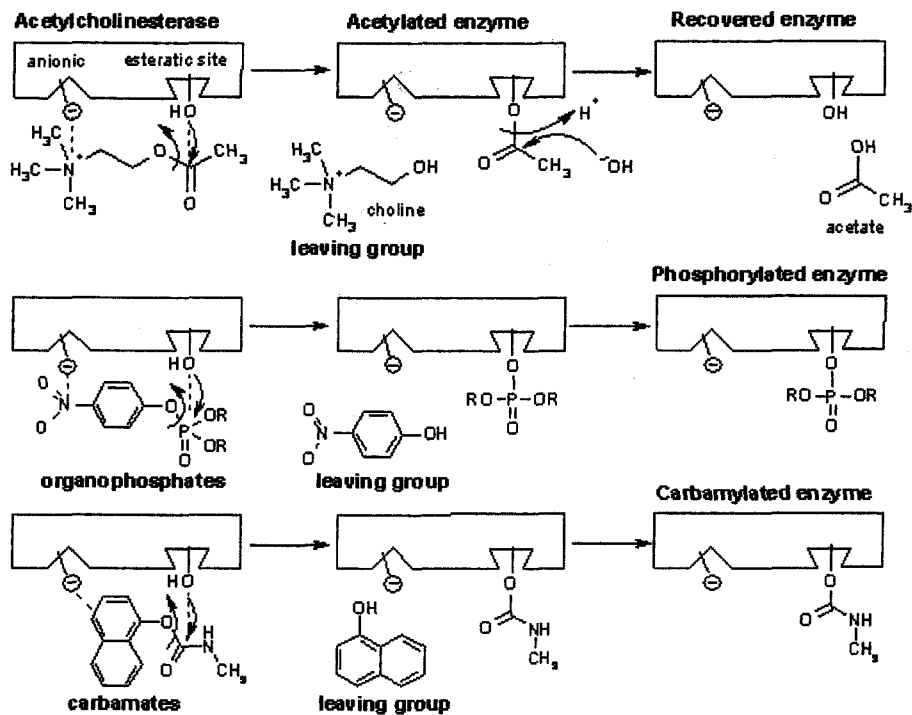


Fig. 1. Acetylcholine by hydrolysis and inhibition of acetylcholinesterase by organophosphate or carbamate insecticides.

본질적으로 유기인계 살충제의 그것과 유사하다. 그러므로 같은 원리를 이용하여 *in vitro*에서 곤충으로부터 분리한 AChE의 농약에 대한 잔류여부를 알아낼 수 있는 것이다.

본 실험에서는 AChE를 이용한 간이 잔류농약 검사법에 필요한, AChE의 유기인계 및 카바메이트계 살충제에 대한 감수성이 증가된 AChE(MAChE)를 대량으로 생산하는 시스템을 구축하고 생산된 효소의 특성을 연구하였다. Membrane bound 효소인 AChE를 분자생물학적 기법으로 lipid가 붙는 자리를 제거한 AChE를 만들어 곤충 cell에 넣어줌으로써 이들 숙주가 세포 밖의 배지로 AChE를 방출시키므로 숙주세포의 사멸을 방지하고 지속적으로 AChE를 생산할 수 있었으며, 유전자 조작 시에 붙여준 histidine tag를 이용하여 affinity column을 이용한 효소의 순수분리가 더욱 간편해졌다. 또한, AChE의 site direct mutagenesis 방법을 이용하여 유기인계에 대한 감수성이 증가하는 것으로 알려진 아미노산을 변형시켜 기존의 AChE보다 농약에 대한 민감도가 높은 효소를 개발하여 잔류농약 속성검사 키트의 재료로 사용하였다. 또한, Insect cell-baculovirus 시스템을 이용한 재조합 단백질의 대량생산을 위한 감염시기 및 배지조성에 대한 조건과 cell의 대량배양을 위한 현탁배양을 확립하여 대량으로 단백질을 얻는 것을 가능케 하였다.

## 재료 및 방법

**AChE bacmid 제작 및 transfection.** AChE의 유전자 서열 중에서 소수성 부위를 제거하기 위하여 다음과 같이 제작된 primer를 가지고, polymerase chain reaction(PCR)을 행한 후에 PCR산물을 pGEM-T Easy vector(Promega, USA)에 클로닝 하였다.

AChE forward primer: 5'-AAACTCGAGGCCATCTCCTGT-3'

AChE reverse primer: 5'-GGGGTACCCTGGAGCCTCGGG GATATG-3'

PCR에 사용한 Taq DNA polymerase는 iNtRON(Seoul, Korea)사의 제품을 사용하였으며, 95°C 2분, 94°C 1분, 60°C 1분, 72°C 2분, 35회로 반응시켜 반응시킨 후 4°C로 온도를 낮추어 반응을 끝냈다. Site direct mutagenesis를 위한 primer는 다음과 같이 설계하여, PCR을 하였으며, PCR에 사용한 *pfu* Taq DNA polymerase, *DpnI*등은 Stratagen(La Jolla, USA)사에서 구입하여 사용하였다.

E107Y: 5'-TCGGCCACCTGCGTCCAATACCGTTACGAGT ACTTC-3'

F368L: 5'-TCGGGCATCCTCAGCTTACCCTCGGCGCCCA CC-3'

L408F: 5'-GGGATGAGGGCACTTTCTTCTTGCTGTACG-3'

PCR조건은 95°C 30초 1회, 95°C 30초, 55°C 1분, 68°C 2분, 15회로 반응시킨 후 4°C로 온도를 낮추어 반응을 끝냈다.<sup>13,7,18)</sup> PCR로 증폭시킨 AChE 유전자를 pGEM-T Easy vector를 이용하여 클로닝 한 후 얻은 colony를 screening하여 AChE가 들어있는 plasmid를 추출한 후 제한효소인 *KpnI*과 *XhoI*(New England Biolab, UK)을 이용하여 절단하였다. 절단하여 얻은 유전자를 Bac-to-Bac Baculovirus Expression System(Invitrogen, USA)의 pFastBac™ HTb vector(4856 bp)를 이용하여 cloning 후 screening하여 재조합된 AChE bacmid DNA(MAChE bacmid)를 얻었으며, 이 vector는 4062-4079부위에 his tag이 붙어있어 affinity chromatography를 이용한 정제 단계에 사용하였다. Cloning된 유전자 서열의 확인과 mutation된 부분의 확인은 Terminator Big-Dye kit를 이용한, ABI

PRISM 3100 genetic analyzer(Applied Biosystems, USA)를 사용하였고, sequencing용 primer는 vector primer와 AChE 유전자를 이용하여 알맞은 부위를 선택하여 사용하였다. 위에서 사용된 모든 primer는 Bioneer(Seoul, Korea)사에 주문 제작 후 사용하였다. 재조합된 bacmid DNA가 들어있는 cell을 20 ml LB배지에서 37°C에서 24시간 shaking 배양후, 1,500 rpm에서 10분간 원심분리하여 cell을 얻어 buffer I(resuspension), buffer II(lysis), buffer III(neutralization)를 처리하여 얻은 상등액에 동량의 isopropanol을 처리하여 DNA를 얻었다. 얻은 DNA를 50 ul의 nucleotide free water에 녹여 transfection의 시료로 사용하였다.

**세포배양.** 사용된 곤충세포 *Trichoplus ni*(BTI-Tn-5B1-4, High 5)의 배양에 사용한 배지는 Express Five SFM(Gibco-BRL, USA)배지를 기본 배지로 하여 여기에 2.92 g/l의 L-glutamine을 섞어 사용하였으며, *Spodoptera frugiperda*(Sf9) 배양에 사용된 배지는 SF 900 II SFM(Gibco-BRL, USA)를 기본배지로 사용하였다. TC-100(Gibco-BRL, USA)기본배지는 Sf9의 배양배지로 10%의 FBS를 넣고 사용하였다. 이 두 cell line은 27°C의 온도를 유지하면서 배양하였으며, shaking 배양시는 27°C, 120 rpm의 조건으로 배양하였다.

**Infection.** 우선 분리한 재조합된 bacmid DNA는 lipofectamine reagent(Invitrogen, USA)와 섞은 후 15분간 incubation후 배지 0.8 ml과 섞어 미리  $7 \times 10^5$  cell/ml의 cell을 부착시켜놓은 6 well plate에 조심스럽게 한 방울씩 떨어뜨린 다음 5시간 동안 shaking incubation 후 새 배지를 2 ml/넣고, 27°C의 배양기에서 4일간 배양했다. Shaking culture시에는  $3 \times 10^6$  cell/ml이 되도록 곤충세포를 미리 배양한 후 subculture하여  $1 \times 10^6$  cell/ml의 농도의 cell이 들어있는 shaking culture bottle에 T75 flask에 미리 하룻동안 감염시킨 곤충세포를 넣어 배양하였다.<sup>1,12,17)</sup>

**MACHe 활성측정.** 바이러스를 감염시킨 후 하루간격으로 media를 채취하여 원심분리기로 세포를 침전시킨 후 96 well plate에서 Ellman방법<sup>3)</sup>을 약간 변형시킨 방법으로써 0.1 M 인산나트륨 완충용액(pH 8.0) 220  $\mu$ l에 효소용액 10  $\mu$ l와 20  $\mu$ l color substrate reagent인 2.7 mM acetylthiocholine iodide(ATCI)와 4.5 mM 5, 5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid(DTNB)를 가한 후, 37°C에서 5분간 incubation시켜 choline과 DTNB가 결합하여 생성된 5-thio-2-nitrobenzoate를 이용하여 412 nm의 파장에서의 흡광도를 측정하여 반응의 초기 속도로서 MACHe의 활성도를 구하였다.

**MACHe의 정제.** 세포를 배양하여 원심분리(1000 rpm, 10 min at 20°C)후 얻은 상등액 33 ml에 sucrose cushion(25% sucrose(w/w) in 5 mM NaCl, 10 mM EDTA)액 3 ml을 넣고 잘 섞어 80,000 $\times$ g, 75 min, 4°C의 조건으로 초원심분리했다. 그런 다음 상등액을 취하여 효소실험과 정제단계의 시료로 사용하였다. Affinity gel은 CNBr-activated sepharose 4B에 procainamide(Fluka, USA)를 결합시켜 만들었는데, 1 M HCl(pH 4.5)에 두시간 동안 녹인 0.1 M 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodi-imide hydrochloride solution에 procainamide(5.44 g; 100  $\mu$ mol/ml)을 넣어 20-25°C에서 24시간

동안 살살 돌리면서 gel에 붙여 affinity column을 만들었다. Procainamide가 잘 붙었는지의 여부는 278 nm에서 흡광도 상수가 16150 M<sup>-1</sup>이 되었는지의 여부로 확인하였다. 다음단계로 histidine tag를 이용한 affinity column으로 Ni-NTA column(Novagen, USA)을 이용해 분리 정제하였다.<sup>5,14)</sup>

**MACHe 안정성.** MACHe 활성에 미치는 pH와 온도의 영향을 검토하였다. pH에 대한 효소의 영향을 측정하기 위하여 효소활성 측정시 사용하는 완충용액을 pH 3-10까지 변화를 주어 10분간 반응시킨 후 효소의 잔존활성도를 측정하였다. 이때 사용한 완충용액은 pH 3, 4, 5, 6은 citrate-phosphate buffer, pH 6, 7, 8은 Tris-HCl buffer, pH 8, 9, 10은 carbonate buffer를 사용하였다. 효소활성에 미치는 온도의 영향을 검토하기 위해 반응온도를 10-50°C의 범위에서 10°C간격으로 효소액을 10분단위로 열처리를 해서 효소의 잔존활성도를 측정하였다.

**농약추출액이 효소에 미치는 영향 측정.** Methanol 또는 ethanol 1 ml에 표준농약시료를 넣은 후 bromide water 20  $\mu$ l를 넣고 hood에서 5분간 방치하였다. 그런 다음 추출시료 75  $\mu$ l와 완충액 125  $\mu$ l를 섞어 농약추출 반응액의 시료로 사용하였다.

**농약에 대한 MACHe의 저해활성 측정.** 96 well plate에 완충용액 220  $\mu$ l를 넣고 효소용액 10  $\mu$ l와 ethanol에 녹인 표준농약시료 20  $\mu$ l를 넣고 혼합한 용액을 반응용액으로 하고, 여기에 ATCI와 DTNB 40  $\mu$ l를 넣어 5분간 412 nm에서 측정하였다.

효소활성의 저해율은 다음 식과 같이 계산하였다.

$$\text{저해율}(\%) = ((\text{Control의 효소활성도} - \text{양성시료의 효소활성도}) / \text{Control의 효소활성도}) \times 100$$

Control의 효소 활성도 = 농약이 첨가되지 않아 정상적으로 남아있는 효소양

양성시료의 효소활성도 = 농약이 첨가되어 효소가 불활성된 후 남아있는 효소양

## 결과 및 고찰

**Insect cell 종류와 배지에 따른 MACHe의 활성비교.** 지수적 성장을 하고 있는 곤충세포에서 baculovirus의 감염시기에 의한 MACHe의 발현양을 조사해 본 결과 성장초기에 감염시키는 것이 세포당 발현율이 높았으며(data not shown), Tn-5B1-4(High 5)와 Sf9 cell line에 baculovirus를 감염시켜본 결과 이 두 cell line 모두 감염횟수가 세 번일 때부터 활성이 높아지기 시작하여 네 번일 때 가장 높아 이때 얻은 배지를 virus stock으로 하여 보관하였다. Cell line종류별로 실험한 결과는 High 5일때가(Fig. 2A) Sf9일 때(Fig. 2B) 보다 5배가량 효소활성이 더 높게 나타났으며, 이 두 cell line은 FBS가 없는 배지에서도 배양이 잘 되므로, 단가가 높은 FBS를 배지에 넣지 않고도 원하는 단백질을 얻을 수 있었다. 하지만 High 5 cell용 배지인 Express Five SFM배지와 Sf9 cell용 배지는 매우 고가이어서 저가의 배지를 사용하여 같은 실험을 반복하였다. 즉, 가격이 약 10배 가량 저가인 TC-100을 기본배지로 하여 여기에 10%의 FBS를 첨가하여 Sf9을 배양 후 감염시켰으나 효소의 활성은 기대한 만큼 증가하지 않았다(Fig. 2C).

MACHe의 발현에 따른 수득율과 배지가격을 비교해 볼 때

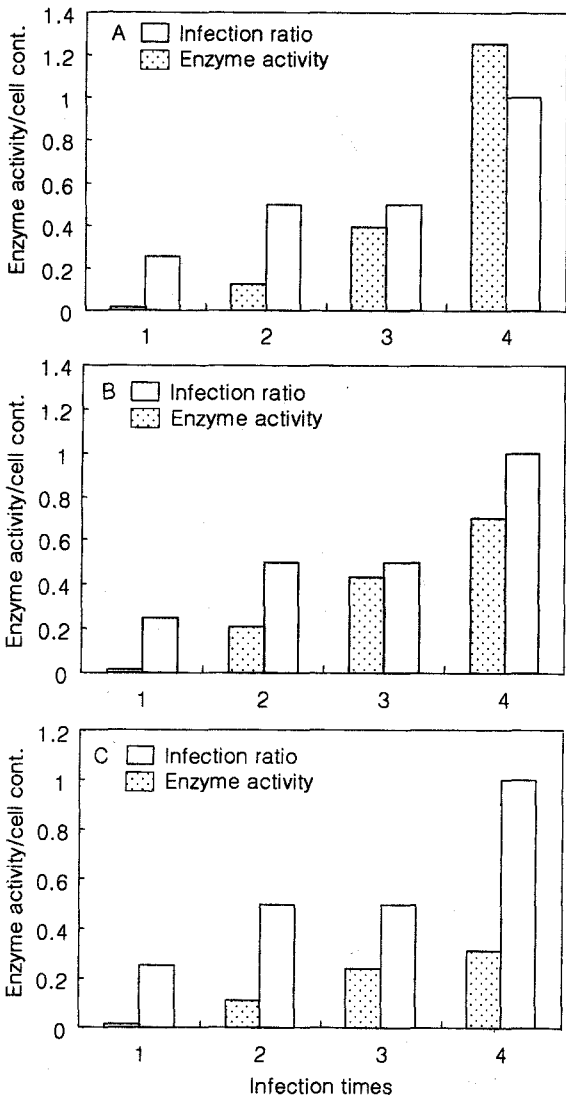


Fig. 2. Total AChE activity changes upon infection times. A: High 5(Express Five SFM), B: Sf9 (SF 900 II SFM), C: Sf9 (TC-100).

cell line을 High 5로 사용하여 baculovirus를 감염시켜 MACHe를 얻는 것이 결과적으로는 저가의 생산비가 들어, 모든 실험을 High 5 cell을 이용하여 MACHe의 발현을 위한 실험재료로 사용하였다. 하지만 앞으로는 High 5 cell의 생장에 필요한 저가의 배지를 개발할 필요성은 있다고 사료된다.

재조합 MACHe의 발현율을 높이기 위한 가장 적당한 세포 농도를 구하기 위해 한 마리당 감염시킬 바이러스 개수인 MOI (multiplicity infection)를 10으로 일정하게 유지하면서 세포농도 별로 실험한 결과 세포수가  $9 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ 의 작은 경우와  $4 \times 10^6$ 의 세포농도가 높은 경우에는 세포들이 재조합된 단백질을 발현시키기 보다는 세포수만 증가하거나, 재조합단백질의 발현율이 그다지 높지 않았다. 높은 세포농도에서의 발현율이 낮은 원인으로는 필수 영양성분의 고갈, 발현을 저해하는 산물의 축적, 세포 농도로 인한 세포간 상호작용, 배지내 산소 고갈등에 의한 것으로 사료된다. 따라서 세포수가  $2 \times 10^6$ 인 경우에서 재조합 MACHe 활성이 가장 높게 나타났다(Fig. 3).

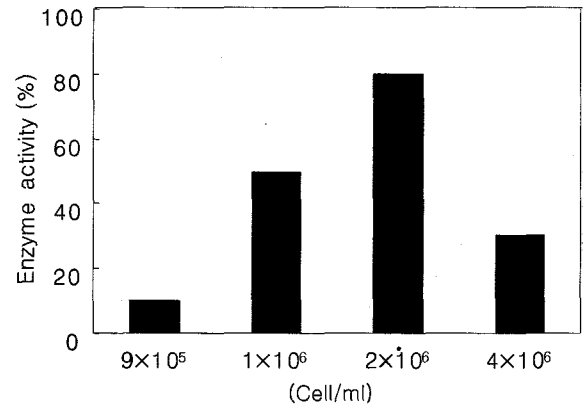


Fig. 3. Optimal cell density of the infection for maximum production of MACHe.

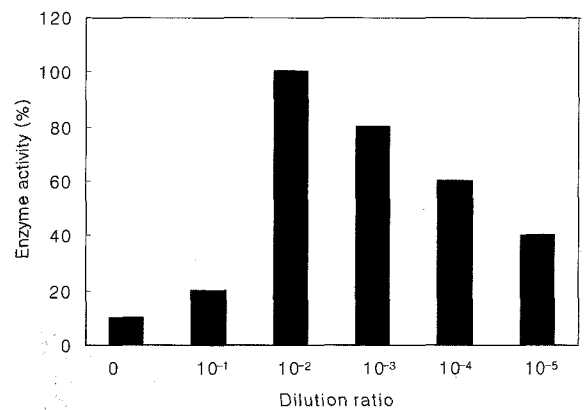


Fig. 4. Relative MACHe activities after four day culture with different amount of virus infections. For the reinfection, full grown virus containing media was diluted and reinfected in new cell culture ( $2 \times 10^6$  cell/ml). Total AChE activity was measured after 4 day culture and compared with activity of inoculated media.

재조합된 MACHe의 최적 발현율을 얻기 위해 세포농도를 일정하게 유지하면서 배지를 희석하여 희석배수별로 감염시켜 본 결과, 희석배수가  $10^{-2}$ 일 때 MACHe의 발현이 가장 높았다(Fig. 4).

**MACHe의 분리 및 정제.** Cell을 배양하여 원심분리(1000 rpm, 10 min at  $20^\circ\text{C}$ )후 얻은 상등액에 sucrose cushion액을 넣고 잘 섞어 초원심분리후 얻은 상등액을 가지고 정제를 하였다. 먼저 CNBr-activated sepharose 4B에 procainamide를 결합시켜 만든 procainamide linked CH-Sepharose column을 이용하였으며, 다음단계로 histidine tag을 이용한 affinity column으로 Ni-NTA column을 이용해 분리 정제한 결과 63 kDa의 정제된 단백질을 얻을 수가 있었다(Fig. 5).

**MACHe의 pH와 온도에 따른 안정성.** MACHe의 pH에 대한 안정성은 활성을 측정할 때 완충용액으로 사용하는 완충용액의 pH를 3-10까지 변화시키면서 활성을 측정한 결과 모든 pH에서 일정한 값을 보였지만, pH 7에서는 약간 상승하였다(Fig. 6A).

$20^\circ\text{C}$ 에서부터  $50^\circ\text{C}$ 까지  $10^\circ\text{C}$ 의 차를 주면서 온도에 대한 안정성을 측정한 결과 온도차리는  $50^\circ\text{C}$ 까지 MACHe의 활성저하

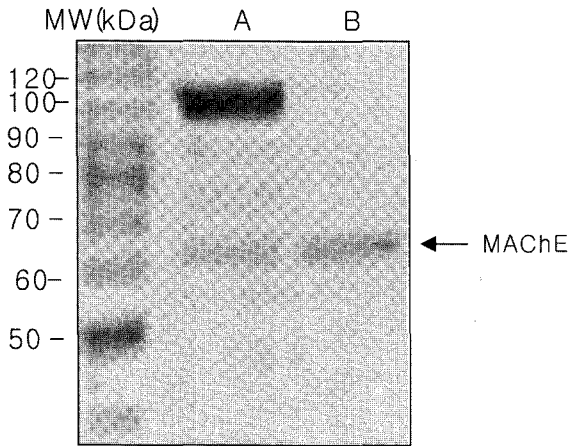


Fig. 5. SDS PAGE analysis of the purified recombinant MACHe. A: Enzyme expression media, B: Purified MACHe by Ni-NTA column.

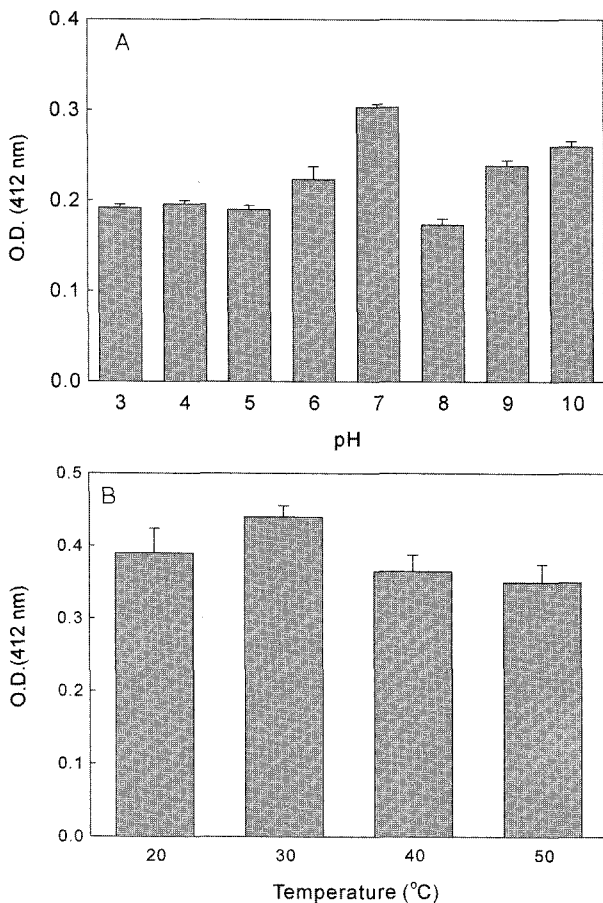


Fig. 6. Effect of pH and temperature on the stability of MACHe activity. A: Activity after 5 minutes incubation at each temperature (20-50°C) at pH 7, B: Activity was measured in different pHs at 30°C.

를 발견할 수 없었다(Fig. 6B). 이는 일반적으로 온도에 민감한 효소들에 비해 재조합된 MACHe인 경우 온도에 대하여 낮은 민감도를 보여 주었으며, 이는 효소를 이용한 잔류농약 검정용 진단시약으로 상품화하기에 유리한 조건으로 작용할 것으로 사료된다.

농약에 대한 MACHe의 민감도 비교. 잔류농약의 유무를

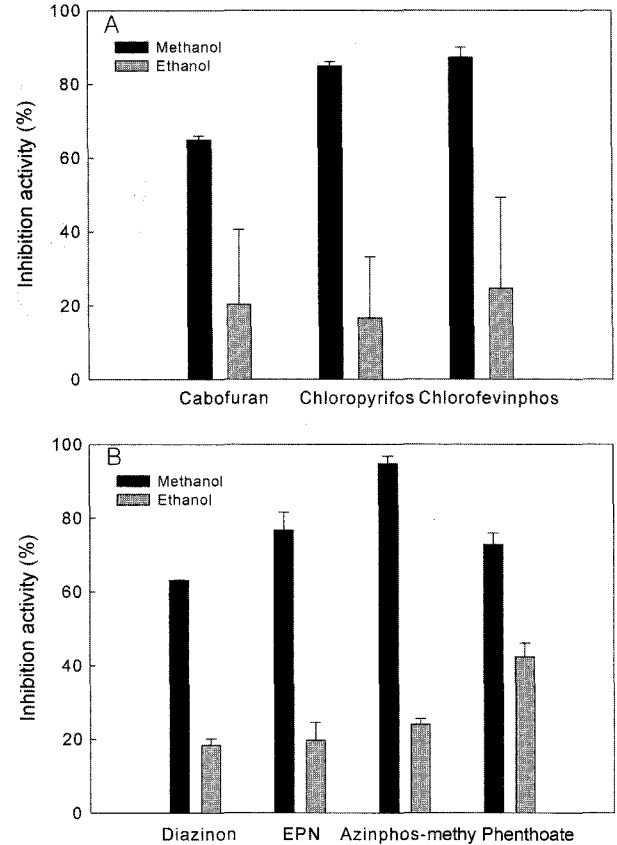


Fig. 7. Effects of extraction solvents on MACHe inhibition by organophosphates and carbamates insecticides.

알기 위하여 시료로부터 농약을 추출해 내기 위하여 용매를 사용하는데, 이 용매의 존재는 효소의 활성에 영향을 줄 수 있기 때문에 흔히 사용하는 용매에 대한 효소의 저해여부를 측정하였다. 이를 위하여 각각의 표준농약별로 50%저해되는 농도의 표준농약을 추출액으로 사용되는 ethanol과 methanol을 각각 혼합한 후 실험방법에 따라 효소의 활성도를 측정하였다. 그 결과 Fig. 7에서 보는 바와 같이 methanol을 추출용매로 사용했을 때가 ethanol을 사용했을 때보다 농약 종류에 따라 0.5배에서 3배 정도 농약에 의한 저해도가 좋은 것으로 나타났다. 이는 농약 추출액으로 ethanol보다 methanol을 사용하는 것이 적당함을 알 수 있었는데, 특히 추출시 농약을 넣지 않고 추출액인 ethanol과 methanol만 넣었을 때는 MACHe의 활성에는 변화의 차이가 크지 않았다(data not shown).

각 농약별로 50%저해값을 보이는 표준농약시료를 공시 시료로 하여 추출용매와 혼합한 농약시료에 의한 MACHe의 저해율을 측정하였다. 그 결과 카바메이트계 살충제인 카보후란에서는 대만효소, AChE, MACHe 모두 높은 저해율을 보였다(Fig. 8).

카바메이트계 살충제는 모두 40여종이 사용되고 있는데, 현재 살충제 시장에서 유기인계 살충제 다음으로 큰 시장을 형성하고 있으며, 전 세계적으로 널리 사용되고 있다. 유기인계에 비해 카바메이트계는 가격이 좀 비싸지만 살비성이 더 뛰어나며, 유기인계 살충제로 방제가 곤란하거나 유기인계에 저항성을 띤 곤충과 응애에 대하여서도 효과가 있는 편이라서 유기인

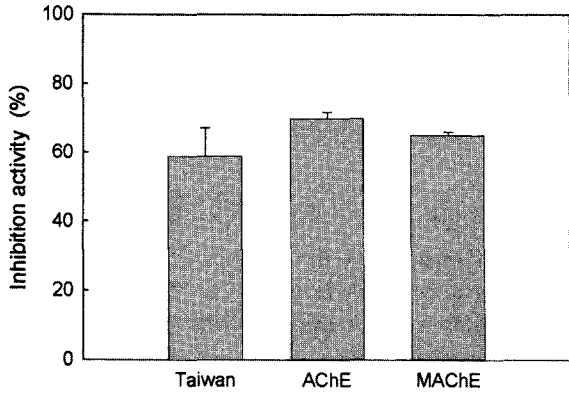


Fig. 8. Inhibition assay of the MACHe activity on the cabofuran for carbamate insecticides.

계와 상호 보완적으로 사용되고 있다.

현재 유기인계 살충제는 살충제 시장의 1위를 차지하고 있는데, 유기염소계 살충제가 지용성이 강하고 환경 및 생체 중

에서 안정한 관계로 1970년대 이후에 유기염소계 살충제를 대체하여 사용되고 있다. 그러나 유기인계 살충제는 유기염소계 살충제에 비하여 급성독성은 더 강한 편이다. 유기인계 살충제는 낮은 지속성 접촉 살충제, 부분적 침투성 살충제, 훈증작용 살충제, 토양처리 살충제등이 있는데, 이 중 토양처리 살충제에 속하는 클로르피리포스는 본 연구에서 재조합한 MACHe가 대만효소에 비교하여 저해율에서 떨어지지 않았으며, 클로르페빈포스인 경우는 월등히 높은 저해율을 보였다(Fig. 9A, 9B).

유기인계 살충제 중에서 부분적 침투성 살충제인 다이아지논과 아진포스메칠인 경우 다이아지논에서는 대만, AChE, MACHe 모두 비슷한 저해율을 보였지만, MACHe에서 더 높은 저해율을 보였다. 특히 클로르페빈포스인 경우는 MACHe에서 아주 높은 값의 저해율을 나타냈다(Fig. 9C, 9D).

이외에도 펜토에이트에서는 대만, AChE, MACHe는 모두 비슷한 저해율을 보였으며(Fig. 9E), EPN에서는 AChE는 낮은 저해율을 보였지만, MACHe에서는 대만효소보다 높은 저해율을 보였다(Fig. 9F). 이러한 결과는 대부분의 농약에 있어서

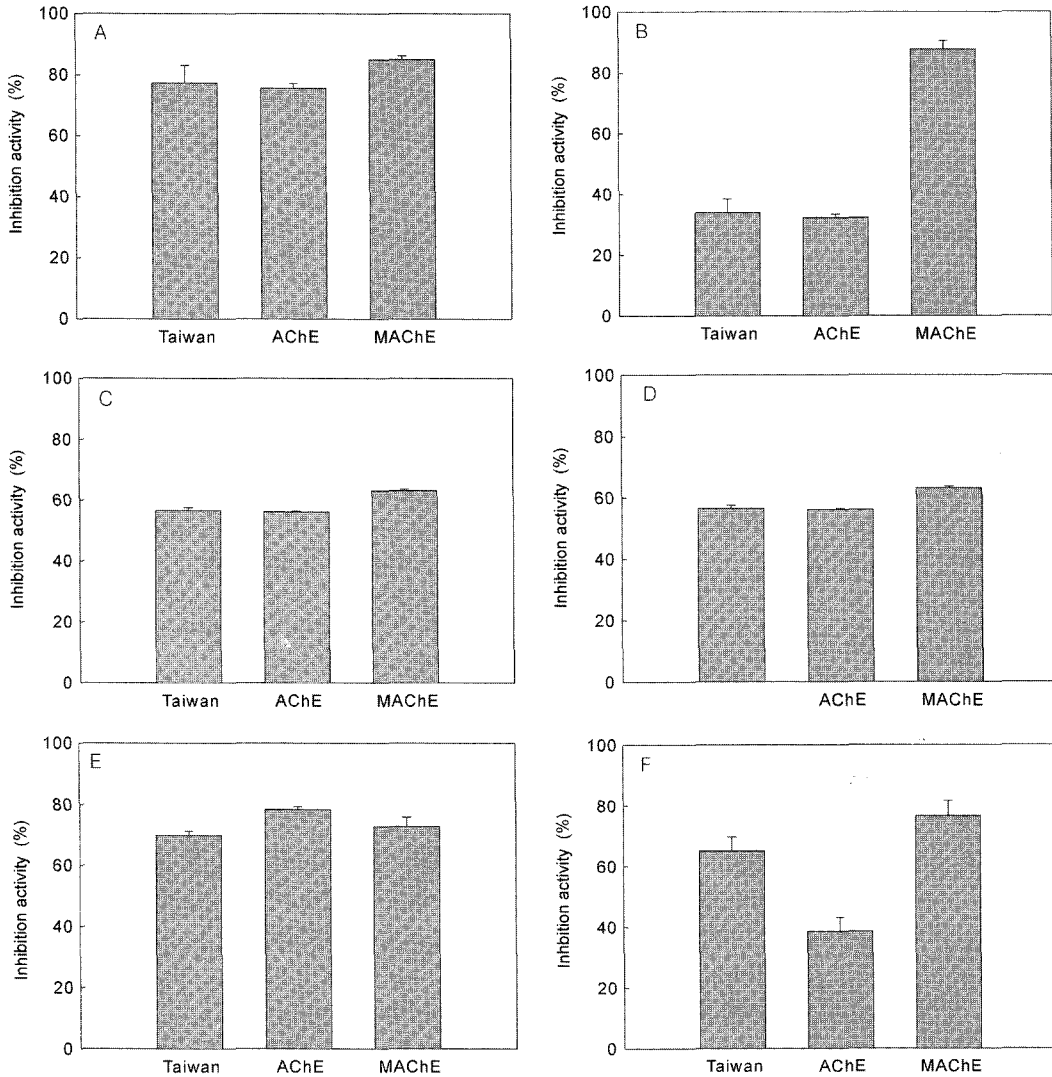


Fig. 9. Inhibition assay of the MACHe activity on the organophosphorus insecticides. A: Chloropyrifos, B: Chlorofevinfos, C: Diazinon, D: Azinphos-methyl, E: Phenthoate, F: EPN

MACHe가 기존에 간이농약 검출용으로 사용되고 있는 AChE 보다 농약 검출능에서 우수하다는 것을 입증하는 결과로 보여진다. 기존의 대만제품의 경우에서도 공시시료의 50%저해값을 사용하였는데도 대부분 50%이상의 저해율을 나타낸 것은 기존의 데이터는 추출용매를 ethanol에 의존했으나 본 실험에서는 methanol을 이용함으로써 전반적인 저해율 혹은 시료추출능이 뛰어난 데 기인한 것으로 사료된다.

이미 AChE를 이용하여 유기인계 및 카바메이트계 살충제의 잔류 유무를 측정하는 간이법은 사용되고 있으나 대부분의 검사용 효소가 대만에서 수입되고 있는 실정이고 이는 효소의 저장상태나 유통상의 문제로 실질적으로 널리 사용되고 있지 못한 실정이다.

이러한 잔류농약 속성검사법은 검사할 수 있는 농약이 유기인계와 카바메이트계 살충제로 한정되어 있다는 점과 이들 농약이 어떠한 농도로 잔류하는지를 알 수 가 없다는 문제점을 갖고 있다. 그러나 실제로 국내에서 농산물에 잔류하여 기준치를 초과하는 농약성분의 대부분(70-80%)이 유기인계 및 카바메이트계 살충제로 나타나고 있으며, 독성학적인 측면에서 인체에 가장 해로운 농약들이 유기인계, 카바메이트계 살충제이므로 농산물의 안정성 측면에서 충분히 그 효과를 볼 수 있을 것으로 사료된다.

또한, 생산지에서 검사를 실시함으로써 생산자가 농약 사용을 자제하고, 또한 판매지에서는 농약에 오염된 농산물의 판매를 금지하여 신선한 농산물을 소비자가 소비할 수 있다. 유기농산물 및 출하 전 농작물에 대한 잔류허용량을 설정하여 부적합한 농산물의 출하 및 유통을 사전에 예방할 수 있는 것이다.

## 감사의 글

본 연구는 농림부 농림기술개발사업의 지원을 받아 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Breitbach, K. and Donald, L. J. (2001) Improved glycosylation of a foreign protein by Tn-5B1-4 cells engineered to express mammalian glycosyltransferases. *Biotechnol. Bioeng.* **74**, 230-239.
- Chaabihi, H., Fournier, D., Fedon, Y., Bossy, JP., Ravallec, M., Devauchelle, G. and Cerutti, M. (1994) Biochemical-Characterization of *Drosophila melanogaster* Acetylcholinesterase Expressed by Recombinant Baculoviruses. *Biochem. Bioph. Res. Co.* **203**, 734-742.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. Jr. and Featherstone, R. M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **7**, 88-95.
- Eto, M. (1974) Organophosphorus pesticides organic and biological Chemistry. CRC Press. pp. 1-368.
- Estrada-Mondaca, S. and Fournier, D. (1998) Stabilization of Recombinant *Drosophila* Acetylcholinesterase. *Protein Expr. Purif.* **12**, 166-172.
- Fei, Li. and Zhaojun, H. (2002) Purification and characterization of acetylcholinesterase from cotton aphid (*Aphis gossypii* Glover). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **51**, 37-45.
- Fremaux, I., Mazeret, S., Brisson-Lougarre, A., Arnaud, M., Ladurantie, C. and Fournier, D. (2002) Improvement of *Drosophila* acetylcholinesterase stability by elimination of a free cysteine. *BMC Biochem.* **30**, 21-210.
- Kim, G. E. The Introduction of Rapid Bioassay for Pesticide Residues (R.B.P.R) to Enhance Marketing System of Safe Farm Products.
- Kim, J. H. and Kim, Y. H. (1998) Inhibition of Acetylcholinesterase Activity on the Organophosphorus and Carbamate Pesticides. *J. Kor. Env.* **7**, 52-56.
- Kim, Y. C., Won, K. P. and Lee, S. R. (1999) Studies on the Improvement of Detailed Inspection of Imported Foods, Pub. No. A0063-65433-57-9911, *Kor. Health Ind. Develop. Ins.* 234-302.
- Kuhr, R. J. and Dorrough, H. W. (1977) Carbamate insecticides-chemistry. biochem. Toxol. CRC Press. pp. 41-142.
- Saarinien, M. A., Troutner, K. A., Gladden, S. G., Mitchell-Logean, C. M. and Murhammer, D. W. (1999) Recombinant Protein Synthesis in *Trichoplusia ni* BTI-Tn-5B1-4 Insect Cell Aggregates. *Biotechnol. Bioeng.* **63**, 612-617.
- Sandino, E. M., Andree, L. and Fournier, D. (1998) *Drosophila* Acetylcholinesterase: Effect of post-traductional modifications on the production in the baculovirus system and substrate metabolism. *Arch. Insect Biochem. Phy.* **38**, 84-90.
- Ralston, J. S., Main, A. R., Kilpatrick, B. F. and Chasson, A. L. (1983) Use of procainamide gels in the purification of human and horse serum cholinesterases. *Biochem. J.* **211**, 243-250.
- Lee, S. R. and Lee M. G. (2001) Present Status and Remedial Actions with Regard to Legal Limits of Pesticide Residues in Korea. *Kor. J. Environ. Agri.* **20**, 34-43.
- Yvan, B., Pascale, S. A., Andree, L., Muriel, A., Francois, V., Sandino, E. M. and Fournier, D. (2002) Acetylcholinesterase engineering for detection of insecticide residues. *Protein Eng.* **15**, 43-50.
- Zhao, Y., Chapman, D. A. and Jones, I. M. (2003) Improving baculovirus recombination. *Nucleic Acids Res.* **31**, E6-6.
- Villatte, F., Marcel, V., Estrada-Mondaca, S. and Fournier, D. (1998) Engineering sensitive acetylcholinesterase for detection of organophosphate and carbamate insecticides. *Biosens Bioelectron.* **13**, 157-64.

---

**Mass-Production of Acetylcholinesterase Sensitive to Organophosphates and Carbamates Insecticides**

Youngmee Kim, Moonjae Cho\* and Somi K. Cho<sup>1,\*</sup> (*Medical School; <sup>1</sup>Cheju National University, Jeju Hi-Tech Industry Development Institute, Jeju 690-756, Korea*)

**Abstract:** For the simple rapid bioassay of organophosphorus and carbamate pesticide residues, a mass-production system of acetylcholinesterase (AChE, EC 3.1.1.7, MACHe) using baculovirus and insect cell culture was constructed. The cDNA for AChE was synthesized from *Drosophila melanogaster* in Halla Mountain, the lipid anchor tail was removed by PCR and was used for the site-directed mutagenesis of three amino acid residues (E107Y, F368L, L408F). The mutated cDNA was inserted into the baculovirus vector and expressed in insect cells. Maximum cell growth and enzyme activity were reached when the cells ( $2 \times 10^6$  cell/ml) were infected four times at four-day-intervals. His-tag containing MACHe was purified using Ni-NTA column and used for characterization. The activity was maintained under various pHs (3-10) and temperatures (20-50°C) under experimental conditions. As an extraction solution for pesticides, methanol is more effective than ethanol. Against major organophosphate and carbamate pesticides, the MACHe showed better sensitivity than AChE and AChE from housefly (Taiwan).

---

Key words: site-direct mutagenesis, acetylcholinesterase, organophosphorus and carbamate pesticides

\*Corresponding author