

## 중금속, 제초제 및 항생제 검출용 남세균 유래 바이오 리포터

김수연<sup>1</sup>, 정원중<sup>2</sup>, 서계홍<sup>3</sup>, 유장렬<sup>2</sup>, 박연일<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>충남대학교 생물학과, <sup>2</sup>한국생명공학연구원 식물유전체연구센터, <sup>3</sup>대구대학교 생물학과

### Cyanobacterial bioreporters for detection of heavy metals, herbicide, and antibiotics

Soo Youn Kim<sup>1</sup>, Won Joong Jeong<sup>2</sup>, Kye-Hong Suh<sup>3</sup>, Jang Ryol Liu<sup>2</sup>, and Youn-Il Park<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

<sup>2</sup>Plant Genome Research Center, KRIBB, Daejeon 305-806, Korea

<sup>3</sup>Department of Biology, Daegu University, Gyeongsan 713-714, Korea

**ABSTRACT** In this study, glucose-inducible intergenic sequences were used to generate bioreporters of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 that could monitor environmental pollutants. Luciferase genes *LuxAB* from the marine bacterium *Vibrio fischeri* under the control of glucose-inducible intergenic sequences of eight genes (*atpI*, *ndaA*, *ctaD1*, *tkt*, *pgi*, *pdh*, *ppc*, and *cydA*) were successfully expressed in the cyanobacterial transformants, showing 5-25 fold increases in bioluminescence upon exposure to glucose. In addition, glucose-inducible cyanobacterial bioreporters were very sensitive to various chemicals such as heavy metals ( $Hg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ), electron transport inhibitors (DCMU, DBMIB, CN<sup>-</sup>), and antibiotics (chloramphenicol and rifampicin). These glucose-inducible cyanobacterial bioreporters would be useful to develop biosensors for rapid screening of environmental samples.

## 서 론

환경독성 물질은 여러 가지의 최신 분석기법과 기기를 활용하여 단시간 내에 대량으로 검출할 수 있다. 그러나 이화학적 분석법으로는 조사대상 물질의 잠재적인 독성 및 유전독성 등의 생물학적 위해성이나 화학물의 이용률 (availability), 화학물질 간의 상승작용 (synergism) 또는 길항작용 (antagonism) 등에 대한 정보를 얻을 수 없다. 이러한 문제점은 생물기원 검체인 바이오센서 (biosensor)를 사용함으로써 해결될 수 있다 (Belkin 2003; Verma and Singh 2005).

특히, 재조합 생물발광 세균 균주 (recombinant biolumine-

scent bacterial strains)는 고감도 (high sensitivity), 선택성, 저비용, 운용의 용이성 및 단시간 내 측정이 가능하다는 점에서 바이오센서로 각광받고 있으며, 세포 어레이 바이오센서의 소재로 적합한 것으로 판단된다. 또한 동결건조 또는 고정화 기질 (immobilization matrices)을 사용하여 휴대용 독성 측정용 바이오센서 (Choi and Gu 2002)나 고처리율 센서 (high throughput sensors) (Kim and Gu 2003; Lee et al. 2005)로도 개발된 바 있다.

바이오센서는 종 특이성이 있으므로 식/작물 연구, 제초제 개발 또는 자연 호소에서 수서 생태계 독성물질 모니터링 등에는 대장균이나 다른 세균 보다는 광합성을 수행하는 바이오센서의 개발 필요에 의해서 야생종 남세균 또는 분리된 광계2 복합체 등이 제초제를 개발하거나 환경독성 물질의 생체이용률 (bioavailability) 측정을 위한 바이오센서

\*Corresponding author Tel 042-821-5493 Fax 042-822-9690

E-mail: yipark@cnu.ac.kr

로 사용되었으나, 엽록소 형광 분석기기와 같은 복잡한 기기를 필요로 하고 일차 작용부위가 광합성에 국한될 뿐만 아니라 센서의 수명이 짧고 시스템이 불안정한 점 등의 여러 단점이 발견되었다. 이러한 단점은 반딧불이 루시페라제를 *trp*와 *lac* 프로모터의 하이브리드인 *tac* 프로모터에 융합한 후 도입하여 루시페라제를 항상적으로 (constitutively) 발현시키는 남세균 (Shao et al. 2002)을 개발함으로써 개선되었다. 그러나 이들 남세균 바이오센서는 호흡율이 3-4배 낮은 광독립영양 상태의 세포에 기반을 두고 있으므로 세포 호흡율이 왕성한 광중속영양상태에서 남세균 고유의 프로모터에 기반을 둔 바이오센서의 개발이 필요하다. 본 연구에서는 *Synechocystis* sp. PCC6803에서 탄수화물 대사와 호흡에 관련된 포도당 유도성 유전자의 프로모터 부위를 발굴하여 환경위해 물질 감지능력이 향상된 남세균 바이오리포터를 개발하고자 시도되었다.

## 재료 및 방법

### 균주배양

남세균 *Synechocystis* sp. PCC 6803 (*Synechocystis*) 야생종과 바이오리포터를 본 연구의 실험 재료로 사용하였다. 각 균주를 5 mM pH 완충액 N-tris (hydroxymethyl) methyl-2-aminoethane-sulfonic acid (TES)-NaOH (pH 8.0)가 포함된 무기 배지 BG-11로 28°C 온도와 30  $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 의 광이 유지되는 배양기 (Hanback, Korea)에서 배양하였다 (Ryu et al. 2004).

### DNA 추출

지수 성장기의 세포를 원심분리 (3,000×g, 15분, 4°C) 하여 세포를 수확하였다. 수확된 세포를 200  $\mu\text{l}$  TEN 완충액 (10 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, 100 mM EDTA)에 현탁 한 뒤, 10  $\mu\text{l}$  lysozyme (20 mg  $\text{ml}^{-1}$ )을 첨가하여 37°C에서 15분 반응시켜 세포를 파괴한 뒤, 10% SDS 5  $\mu\text{l}$ 을 첨가하여 흔들어 주었다. 이 반응물질에 5  $\mu\text{l}$  protease K (20 mg  $\text{ml}^{-1}$ )을 첨가하여 60°C에서 1시간 반응 시켰다. 반응 후, 400  $\mu\text{l}$  페놀을 첨가한 뒤, 원심분리 (3,500 rpm, 3분, 상온)하여 상등액을 새 튜브에 옮겼다. 상등액과 동일량의 페놀 : 클로로포름 : 아이소아밀 알코올을 첨가하여 상온에서 3-5분 흔들어 주었

다. 다시 원심분리 (3,500 rpm, 3분, 상온)후, 얻어진 상등액은 20  $\mu\text{l}$  3 M sodium acetate (pH 5.2), 400  $\mu\text{l}$  에탄올과 혼합한 뒤, 원심분리 (3,500 rpm, 3분, 상온)를 통해 DNA만 얻었다.

포도당 유도성 유전자 프로모터가 삽입된 발광유전자 리포터 벡터 제작

8종의 포도당 유도성 유전자 (*atpI*, *ndbA*, *ctaD1*, *tkl*, *pgi*, *pdh*, *ppc*, 그리고 *cydA*; Lee et al. 2007)의 프로모터 부위를 포함하는 유전자간 염기서열 (intergenic sequences) (Table 1)을 야생종 *Synechocystis* sp. PCC6803에서 추출한 DNA를 주형으로 하여 제한효소 *Pst* I과 *Kpn* I 서열의 링커를 붙인 프라이머 (Table 1)를 이용하여 PCR한 후, 제한효소 *Pst* I/*Kpn* I로 절단된 pIL1 벡터 (Genbank AJ251840)에 클로닝하였다.

지수 성장기의 *Synechocystis* 야생종을 2 ml (3-5  $\mu\text{g Chl a}$ ) 수확하여 200  $\mu\text{l}$ 의 액체 BG-11 배지로 재현탁시킨 후, 최종 1  $\mu\text{g ml}^{-1}$ 가 되도록 카나마이신 항생제 카세트가 삽입된 8종의 재조합 플라스미드 DNA를 섞어준 후 28-30°C 암소에서 4-6시간 방치하여 형질 전환 시켰다. 형질 전환이 이루어진 세포를 포함한 현탁액은 40°C 이하로 식힌 3 ml의 0.5% bacto 아가가 포함된 BG-11과 섞여 10 mM 포도당이 포함되거나 (+ Glucose) 포함되지 않은 (- Glucose) BG-11 고체 배지위에 얹고 균주 유지용 저온 배양기에서 배양하였다. 36시간 (+Glucose)이나 48시간 (-Glucose) 배양 후 최종 농도 5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ 가 되도록 항생제를 고체 배지 아래쪽에 항생제 농도 구배가 생기도록 도말하여 항생제 저항성 콜로니 (colony)가 나올 때까지 약 2주간 배양한 후 새로운 배지로 3-4회의 추가 분리 (segregation)하였다.

### 루미노미터를 이용한 인광 측정

야생종과 형질전환 세포를 20 ml의 BG11 배지에서 30°C, 40  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 의 광 조건 하에서 배양한 후, OD<sub>750</sub>에서 0.1에 맞춰 다시 계대배양하였다. 2-3일 경과 후 OD<sub>750</sub>에서 0.5가 되게 세포를 수확한 후 100  $\mu\text{l}$ 의 BG11 배지에 재현탁하였다. 여기에 루시페라제의 기질인 테칸올 10  $\mu\text{M}$ 을 첨가하여 10초씩 루미노미터 (20/20<sup>th</sup>, 터너 바이오시스템즈(Turner Biosystems, USA)를 사용하여 인광을 측정하였다. 포도당 첨가에 의한 발광 증가는 세포에 10 mM 포도당을 첨가하여 1시간 동안 반응시킨 후 측정하였다.

Table 1 List of primer and location of intergenic sequences used in this study.

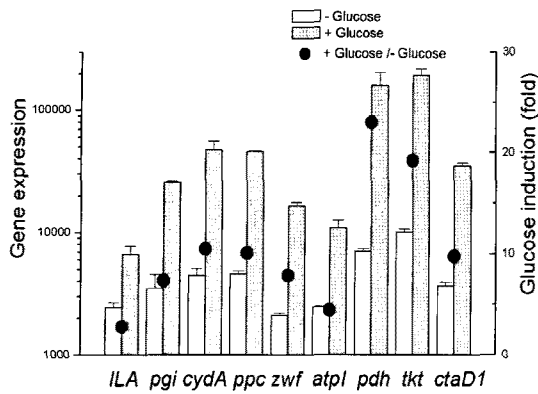
Gene	Locus	Primer	Location of intergenic sequence
<i>atpI</i>	slr1322	Forward 5'-AACTGCAGCCTCTTTACCCCGTCAATCTCAC-3'	177591-177320
		Reverse 5'-GGGGTACCCCAAGAGGTTGCAAATGTTTGCC-3'	
<i>ndbA</i>	slr0851	Forward 5'-AACTGCAGTTATCTGCTTGGTTGCTTGCCAG-3'	1336799-1337359
		Reverse 5'-GGGGTACCGGCAAAGCCGCCCCGACAATA-3'	
<i>catD1</i>	slr1137	Forward 5'-AACTGCAGTCTGTGCTGAGTTGTGTGGTGC-3'	791559-791819
		Reverse 5'-GGGGTACCCCATGGATTCCGTTGGAGCCGG-3'	
<i>tkl</i>	slr1070	Forward 5'-AACTGCAGATAGTGGATGTAGCCCTATCCAAC-3'	820479-819919
		Reverse 5'-GGGGTACCGGCTAAAAGCGAATGGCATTAAATA-3'	
<i>pgi</i>	slr1349	Forward 5'-AACTGCAGTTGGTGGTTAACCACACACTGTC-3'	1744103-1744558
		Reverse 5'-GGGGTACCGAGGCCACCATGGTAATAAAGC-3'	
<i>pdh</i>	slr1721	Forward 5'-AACTGCAGAGCCTTCGCCTTTGTGCCCTAAT-3'	955927-955367
		Reverse 5'-GGGGTACCCCGTCCCATTCTTCGTCAAGGG-3'	
<i>ppc</i>	slr0920	Forward 5'-AACTGCAGAAACGCCACTATTTAGTTTTTGT-3'	1997674-1997191
		Reverse 5'-GGGGTACCACCATTGCCATTACCAGACCAG-3'	
<i>cydA</i>	slr1379	Forward 5'-AACTGCAGGCGTGAGTCAGCAGAAGAGGAA,	673559-674188
		Reverse 5'-GGGGTACCGGCAGTGACGGCAAATTGTAGC-3'	

## 결과 및 고찰

당 (sugar)은 모든 생물체에서 에너지 공급원, 삼투 조절 물질, 거대분자 생합성의 전구물질로서 작용할 뿐만 아니라, 유전자 발현, 성장 및 발달에 영향을 미치는 조절신호 (regulatory signal)로 작용한다. 단일세포 광합성 세균인 남세균 *Synechocystis*에서의 포도당 감지 및 신호전달 경로는 중속영양 세균인 대장균 (*Escherichia coli*)과 상이하다. 고등식물의 경우, 포도당 감지는 1) 포도당 센서로서의 헥소키나아제 (hexokinase), 2) 헥소키나아제 비의존성 포도당 신호전달, 및 3) 대사작용 의존성 포도당 감지 경로가 제안되었다 (Moore et al. 2003). 남세균에서의 포도당 신호전달 경로에 대한 연구는 대장균이나 효모 및 고등식물에 비해 연구가 미진하다. 최근에 카로티노이드 생합성 유전자의 발현에 포도당이 관여하며, 신호전달은 세포질 redox state와 pH의 증가에 의한 것으로 보고된 바 있다 (Ryu et al. 2004; Lee et

al. 2007).

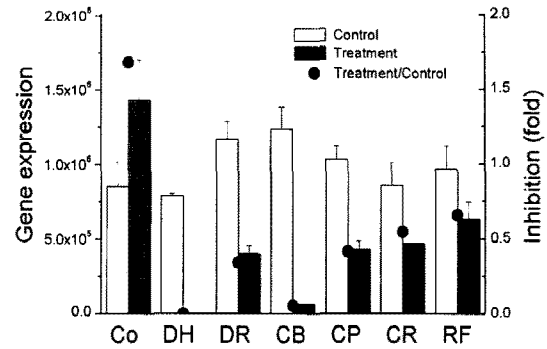
포도당 특이적으로 유전자 발현이 증가하는 호흡관련 유전자 (Lee et al. 2007) 중에서 *pgi*, *cydA*, *ppc*, *atpI*, *ndbA*, *pdh*, *tkl* 및 *catD1*의 프로모터 부위를 포함하는 유전자간 염기 (intergenic sequence)가 바이오센서로 이용될 수 있는지를 조사하였다. *LuxA/LuxB* 유전자를 포함하는 플라스미드 pILA를 갖는 균주를 대조구로 하여 프로모터 부위를 포함하는 형질전환 균주에 각각 10 mM의 포도당을 생장광 조건 하에서 1시간 처리한 후 생물발광량을 측정하였다. Fig. 1에 나타난 바와 같이, pILA 대조구 균주에 비해 포도당 유도성 유전자의 프로모터 부위를 함유하는 균주는 적게는 2배에서 많게는 약 40배까지 포도당 처리에 의해 생물발광량이 증가하였으며, *pdh*와 *tkl* 프로모터 부위를 함유하는 균주가 가장 강력한 활성을 나타내었다. 이러한 포도당 유도성 생물발광량 증가결과는 남세균 고유의 포도당 유도성 프로모터를 활용한 생물검정용 바이오센서가 개발되었음을 의미한다.



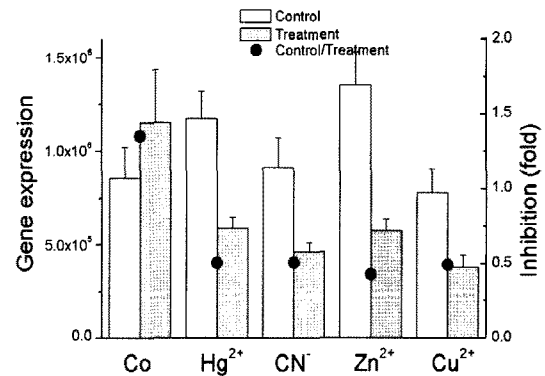
**Figure 1.** Changes in luminescence of *Synechocystis* sp. PCC 6803 transformants grown under photoautotrophic growth condition (- Glucose) and then exposed to 10 mM glucose in the light for 1 hr (+ Glucose).

개발된 바이오센서가 ATP 생산을 억제하는 여러 가지의 대사물질에 의해 민감하게 영향을 받는지를 조사하였다. 광합성 기구의 광계2에 작용하는 제초제 디우론 (diuron)의 일종인 DCMU (dichlorophenyl dimethyl urea: D), 호흡전자전달계의 NAD (P) H 탈수소효소의 작용을 억제하는 Hg<sup>2+</sup> (H)와 로테논 (R), 시토크롬 b<sub>6</sub>/f 복합체 환원을 억제하는 DBMIB (dibromothymoquinone: B), 말단 시토크롬 옥시다제를 억제하는 CN<sup>-</sup> (C), 전자전달에 의한 양성자 기울기 발달을 억제하는 짝폴림인자인 CCCP (carbonylcyanide m-chlorophenyl-hydrazine: CP) 등 (Ryu et al. 2004)을 10 mM 포도당으로 12 시간 처리된 *ILA*와 *pdh* 균주에 처리하였다. Fig. 2에 나타낸 바와 같이, *ILA* 균주에 비교하여, *pdh* 균주의 경우, 포도당에 의해 생물발광량이 7배 이상 높았다 (대조구, Co). 한편, 전자전달억제제의 처리에 의해 생물발광량이 감소하였는데, 특히 DCMU와 Hg<sup>2+</sup>가 동시에 처리된 경우 (DH) 현저하게 억제되었다. 또한, mRNA 합성과 단백질 생합성 억제제인 리팜피신 (Rf)과 클로람페니콜 (CR)이 처리되었을 경우에도 각각 20%와 50%의 저해효과를 보여주었다. 유전자 발현 억제제가 대사억제제에 비해서 저해 효과가 미약한 것은 *LuxA/LuxB* 생물발광 시스템이 유전자 발현에 의해서보다는 세포내 ATP 함량에 더욱 민감하게 반응함을 의미한다. 이는 Shao 등 (2002)에 의해서 개발된 라이트-오프 어세이 시스템이 세포내 ATP 생합성이 원활하지 못할 경우 환경 위해물질 검출에 한계가 있을 수 있음을 의미한다.

우리나라 하천 호소 및 해역에서 유해/오염물질로 분류되는 항목 중 시안 (0.01 ppm), 수은 (0.0005 ppm), 아연 (0.1 ppm) 및 구리 (0.02 ppm)의 기준치 (환경정책기본법 제10조, 동법



**Figure 2.** Effects of electron transport inhibitors and antibiotics on luminescence responses in *Synechocystis* sp. PCC 6803 transformants with *pdh* intergenic sequence. Cells were treated 10 mM glucose for 12 hr in the growth light condition and then treated with various chemicals for 1.5 hr before measurement. Co, control; DH, 10 μM DCMU + 10 μM Hg<sup>2+</sup>; DR, 10 μM DCMU + 50 μM Rotenone; CB, 100 μM KCN + 10 μM DBMIB; CP, 50 μM CCCP; CR, 125 μg ml<sup>-1</sup> chloramphenicol; RF, 300 μg ml<sup>-1</sup> rifampicin.



**Figure 3.** Effects of heavy metals and CN<sup>-</sup> on luminescence responses in *Synechocystis* sp. PCC 6803 transformants with *pdh* intergenic sequence. Cells were treated 10 mM glucose for 12 hr in the growth light condition and then treated with various chemicals for 1.5 hr before measurement.

시행령 제2조) 조건에서 개발된 남세균 리포터가 이들을 검출할 수 있는지를 조사하였다. 기준치 농도에서 각 유해물질을 각각 4시간 처리한 후 발광을 측정된 결과 (Fig. 3), 유해물질이 처리되지 않은 대조구 (Co)에 비해서 *pdh* 유전자의 프로모터를 포함하는 바이오센서 모두에서 수은 (Hg<sup>2+</sup>), 시안 (CN<sup>-</sup>) 및 아연 (Zn<sup>2+</sup>)에 대해 약 50-70%의 억제를 보였다. 따라서 포도당 유도성 프로모터를 갖는 *Synechocystis* 바이오센서는 우리나라 수환경의 유해물질을 검출하는데 적용될 수 있을 것으로 판단된다.

Shao 등 (2002)에 의해 개발된 남세균 라이트-오프 어세이 시스템에서 발광 세기는 루시페라제의 발현정도 뿐만 아

니라 세포내 ATP 양에 의해서도 결정된다. 즉, 사용된 *tac* 프로모터가 강력하기 때문에 바이오센서 세포 내의 루시페라제의 양은 충분할 것이지만, 광독립영양 (photoautotrophic) 성장조건에서는 성장율과 호흡율이 광종속영양 (photoheterotrophic) 성장조건에 비해 약 3-4배 낮기 때문에 (Lee et al. 2005), 호흡을 통해 생성되는 ATP 양은 제한적일 것으로 생각된다. 따라서 Shao 등 (2002)이 개발한 바이오센서는 에너지 대사가 낮은 상태에서 작용하므로, 광대역의 리포터로서의 바이오센서로서 적용하기에 어려움이 있다. 또한, 사용된 *tac* 프로모터는 대장균의 *trp*과 *lac* 프로모터를 재조합한 프로모터로서, 세포내 물질대사의 변화에 상관없이 항상적으로 발현되는 것이다.

본 연구에서 개발된 남세균 바이오센서는 Shao 등 (2002)에서 개발된 남세균에 비해서 포도당을 감지하는 기능을 가지며, 특히 매우 활동적인 물질대사 상태를 유지하므로 현저히 증가된 감도를 갖는다. 또한, 바이오센서 작동에 필요한 에너지인 ATP 생산을 교란하는 환경독성 물질, 예를 들어 중금속, 시안, 제초제, 탄소원의 양적 변화에 민감하게 반응할 뿐 아니라, 포도당 유도성 유전자의 전사와 번역 억제제에도 민감하게 반응한다. 따라서 개발된 남세균 센서는 포도당과 같은 영양물질이나 중금속, 시안을 검출하거나 제초제나 항생제의 생체검정에 사용될 바이오센서를 제공함으로써, 제약산업, 항생제나 제초제와 같은 신약개발이나 수생태계 환경독성 물질 검출 및 잔류농약이나 중금속의 실시간·비파괴적 검출에 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

## 적 요

본 연구는 남세균 고유의 프로모터를 포함하는 유전자간 염기서열에 기반하여 환경위해성 검출용 바이오센서를 개발하고자 시도되었다. 포도당 처리에 의해서 유도되는 8종의 유전자 (*atpI*, *ndbA*, *ctaD1*, *tki*, *pgi*, *pdh*, *ppc*, 그리고 *cydA*)의 프로모터 부위를 리포터 유전자의 일종인 발광유전자 (*luxAB*) 벡터 pILA (Genbank: AJ251840)에 도입시켜 재조합 벡터를 제조한 후 *Synechocystis* sp. PCC6803을 형질전환시킨 결과, pILA 벡터만을 포함하고 있는 대조구에 비해서 포도당 처리에 의해서 생물발광량이 5-25배 정도 현저히 증가함을 확인하였다. 또한 Hg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>과 같은 중금속, CN<sup>-</sup>, DCMU, DBMIB와 같은 제초제, 그리고 클로람페니콜이나 리팜피신

과 같은 항생제에 의해서 생물발광이 현저히 억제되었다.

## 사 사

본 연구는 2007년 특구연구개발사업 (보유기술 사업화 개발사업)의 지원으로 수행되었습니다.

## 인용문헌

- Belkin S (2003) Microbial whole-cell sensing systems of environmental pollutants. *Curr Opin Microbiol* 6: 206-212
- Choi SH, Gu MB (2002) A portable toxicity biosensors using freeze-dried recombinant bioluminescent bacteria. *Biosens Bioelectron* 17: 434-440
- Kim BC, Gu MB (2003) A bioluminescent sensor for high throughput toxicity classification. *Biosens Bioelectron* 18: 1015-1021
- Lee JH, Mitchell RJ, Kim BC, Cullen DC, Gu MB (2005) A cell array biosensor for environmental toxicity analysis. *Biosens Bioelectron* 21: 500-507
- Lee JM, Ryu JY, Kim HH, Choi SB, Tandeau de Marsac N, Park Y-I (2005) Identification of a glucokinase that generates a major glucose phosphorylation activity in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Mol Cells* 19: 256-261
- Lee SH, Ryu JY, Kim SY, Jeon JH, Song JY, Cho HT, Choi SB, Choi D, N Tandeau de Marsac, and Park Y-I (2007) Transcriptional regulation of the respiratory genes in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 during the early response to glucose feeding. *Plant Physiol* 145 (3): 1018-1030
- Moore B, Zhou L, Rolland F, Hall Q, Cheng WH, Liu YX, Jones TL, Sheen J (2003) Role of the Arabidopsis glucose sensor HXK1 in nutrient, light and hormonal signaling. *Science*, 300: 332-336
- Shao CY, Howe CJ, Porter AJR, Glover LA (2002) Novel cyanobacterial biosensor for detection of herbicides. *Appl Environ Microbiol* 68: 5026-5033
- Ryu JY, Song JY, Lee JM, Jeong SW, Chow WS, Choi SB, Pogson BJ, Park Y-I (2004) Glucose-induced expression of carotenoid biosynthesis genes in the dark is mediated by cytosolic pH in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J Biol Chem* 279: 25320-25325
- Verma N, Singh M (2005) Biosensors for heavy metals. *BioMaterials* 18: 121-129

(접수일자 2008년 6월 10일, 수리일자 2008년 6월 26일)