



광주과학기술원

환경생물공학 국가지정 연구실 전자 소식지

(E-news letter of NRL on Environmental Biotechnology Lab.)

500-712, 광주광역시 북구 오룡동 1 번지 광주과학기술원 환경공학과

환경생물공학 국가지정 연구실

Tel. 062-970-2454 Fax. 062-970-2434 e-mail : mbgu@gist.ac.kr

연구실 구성원

☐ 연구 책임자 :

구 만 복 교수

☐ 박사 후 과정 :

김 병 찬 박사

☐ 박사 과정 :

박 경 서
이 진 형
안 주 명
김 연 석

☐ 석사과정

김 한 나
Danusia
윤 철 희

발행인 : 구만복

편집인 : 김연석

2005. 5.

제10 호

연구 내용 소개

1. DNA Microarray Chip을 이용한 미생물 종의 동시 탐지 시스템 개발 연구

- 국제 SCI 저널 게재-

B.C. Kim, J.H. Park, and M.B. Gu (2005) Multiple and simultaneous detection of specific bacteria in enriched Bacterial communities using a DNA microarray chip with randomly generated genomic DNA probes, *Analytical Chemistry*, 77, 2311-2317

2. 독성탐지용 세포칩 기반 바이오센서 개발 연구

- 국제 SCI 저널 게재-

J.H. Lee, R.J. Mitchell, B.C. Kim, D.C. Cullen and M.B. Gu (2005) A Cell Array Biosensor for Environmental Toxicity Analysis. *Biosensors and Bioelectronics*, In press

글 쓰는 순서

P2 연구 내용 소개

P9 알림



연구 내용 소개

1. DNA Microarray Chip을 이용한 미생물 종의 동시 탐지 시스템 개발 연구

환경 내에 존재하는 다양한 미생물들을 탐지하기 위해서 항체 분석, 미생물의 형태적 특징 분석 등의 많은 방법들이 시도되어왔다. 그러나 형태적 특징 분석의 경우는 해당하는 특이적 미생물 외에 다른 미생물들의 구분은 어려우며 지방산 분석이나 항체 분석 방법은 시간이 많이 걸리고, 복잡한 실험 과정을 거치는 단점을 가지고 있다. 또한 16S rDNA 서열에 기초한 특이적 올리고 핵산의 서열을 이용하여 미생물 군집을 분석하는 접근방법도 있지만, 아직 모든 종에 대한 16S rDNA의 서열이 밝혀진 것은 아니며, 여전히 database의 업데이트를 필요로 하는 상황이라 분석의 어려움이 있다. 이에 다양하게 섞여 있는 군집을 단시간에 손 쉽게 처리하여 탐지할 수 있는 high-throughput screening 기술의 필요성이 부각되고 있다.

최근 DNA microarray의 이용이 병원균 및 특이 미생물이나 바이러스의 탐지를 위해 응용되고 있는 바, 본 연구실에서는 임의적으로 잘린 genomic DNA 절편을 탐침으로 이용한 환경 내에 존재하는 특이적 미생물들을 탐지하기 위한 microarray를 개발하였다.

먼저 폐수처리공정에서 스컴이나 포밍을 일으킨다고 알려진 활성 슬러지 내에 존재하는 *Gordonia amarae*, *Mycobacterium peregrinum*, *Zooglea ramigera* 의 세 종에 대한 미생물 탐지용 DNA Microarray Chip을 제작하여 가능성을 확인한 후 13종의 미생물들을 동시에 탐지할 수 있는 DNA Microarray Chip을 제작하였다.

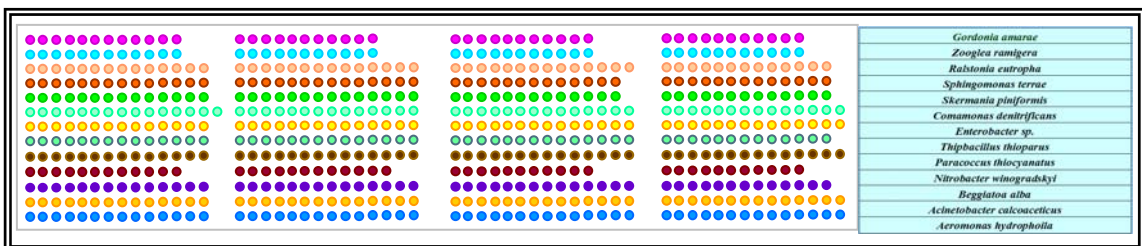


그림 1. 미생물 탐지용 DNA Microarray Chip 구성도

DNA microarray Chip은 13종의 각각의 미생물들을 순수 배양하여 유전자를 분리하고 Random Priming을 통하여 특이적 염기 서열이 없는 임의적인 genomic DNA 절편을 증폭한 후 증폭된 DNA 절편을 chip 위에 고정화 하여 제작하였다.

13종의 각각의 미생물들은 제작된 DNA microarray Chip을 이용하여 특이적으로 탐지할 수 있었다.

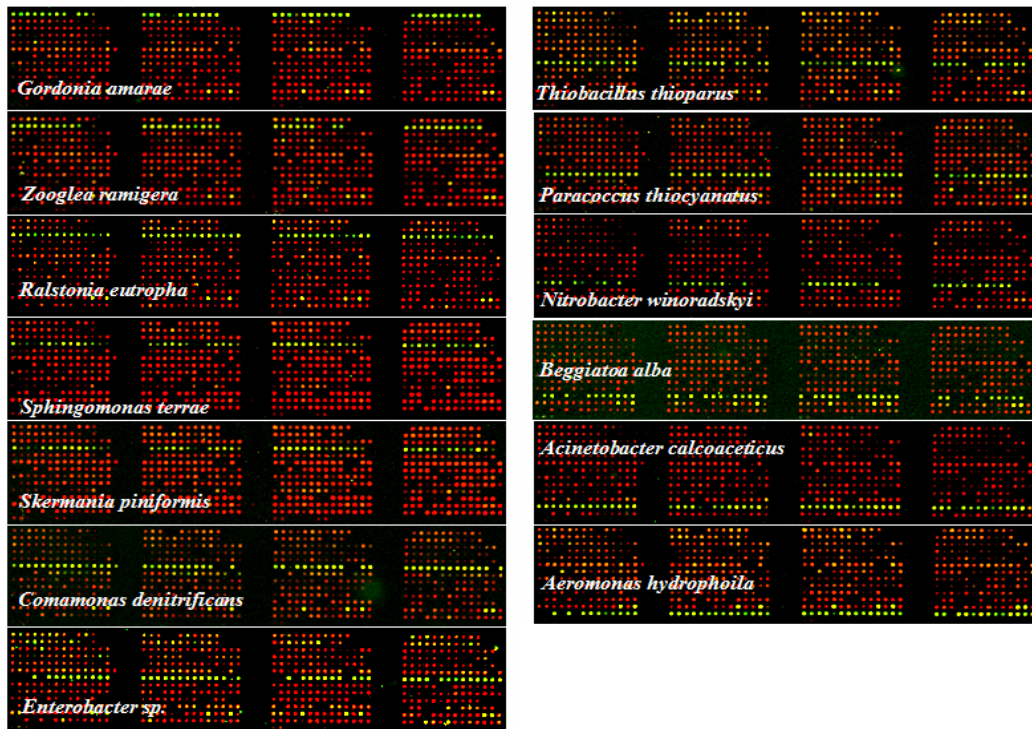


그림 2. 각각의 미생물 중에 대한 DNA microarray Chip 스캔 이미지

또한 혼합하여 자라게 한 미생물에 대하여 각각 특이적인 반응을 보임으로, 혼합되어 있는 활성 슬러지 샘플에서도 특이적 미생물 종을 탐지할 수 있는 유용성을 확인할 수 있었다.

아래 그림은 *A. Hydrophoila*, *C. Denitrificans*, *G. Amarae* 혼합 샘플에 대한 실험 결과이다.

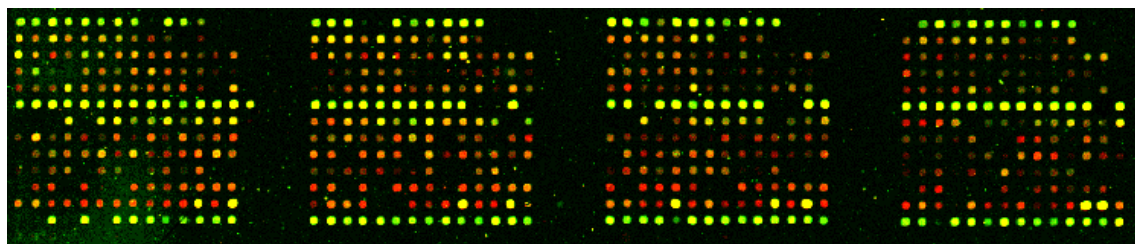


그림 3. 세 종의 미생물을 동시에 탐지한 DNA microarray Chip 스캔 이미지

또한 빛의 강도를 통하여 시료에 있는 해당 DNA 농도, 즉 시료에 있는 해당 미생물의 수를 상대적으로 예측할 수 있다. 이 연구를 통하여 임의적인 절편으로 제작된 DNA microarray를 이용하여 활성 슬러지 내에 문제시 되는 미생물의 특이적 탐지가 가능할 뿐 아니라 그 미생물 수도 예측 할 수 있는 가능성을 보였다. 아래 그림은 *G. Amarae* 30ng과 *T. Thioparus* 60ng의 혼합 샘플에 대한 Signal Intensity 분석 결과이다.

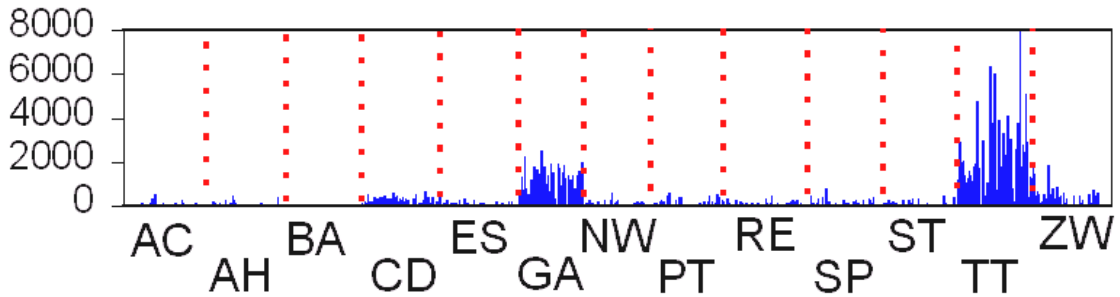


그림 4. *G. Amarae* 30ng, *T. Thioparus* 60ng의 혼합샘플에 대한 Signal Intensity 분석 결과

위와 같은 연구 결과를 바탕으로 탐지하고자 하는 미생물 종에 대한 유전자 염기 서열 정보가 없다 해도, 이런 임의적 genomic DNA microarray 기술을 통해 활성 슬러지 같은, 환경에 존재하는 복잡한 미생물 군집의 특이적 탐지가 가능하다는 것을 확인할 수 있다.

이 연구 결과는 국제 SCI 저널인 *Analytical Chemistry* 77권호에 Multiple and simultaneous detection of specific bacteria in enriched Bacterial communities using a DNA microarray chip with randomly generated genomic DNA probes의 제목으로 게재 되었다.

2. 독성탐지용 세포칩 기반 바이오센서 개발 연구

산업 활동을 통해서 우리는 매일 방대한 양의 오염 물질을 방출하고 있으며 또한 새로운 종류의 화학 물질들을 생성하고 있다. 하지만 아직 이런 물질이 생명체에 미치는 영향에 대한 정확한 분석이 이루어지지 않고 있으며 따라서 이런 배출 물질들에 대한 독성 분석이 시급히 요청되고 있다. 기존 환경오염 물질을 탐지하기 위해서 사용되던 화학적 분석 방법은 오염 물질의 농도에 대한 정보는 제공하지만 생명체에 직접적으로 영향을 주는 독성에 대한 정보는 제공하지 못하는 단점이 있다. 이런 화학적 분석 방법의 단점을 보완하고자 나온 것이 생물학적 매개체를 이용한 바이오센서다. 바이오센서를 이용한 환경오염 탐지는 농도 중심의 분석에서 탈피하여 실제 생명체에 직접적인 영향을 주는 독성 중심의 분석을 할 수 있기 때문에 환경오염 분석 탐지에 유용하게 사용될 수 있다. 물고기, 물벼룩, 쥐, 해조류, 박테리아 등 다양한 종류의 환경 바이오센서가 개발되어 사용되고 있지만 그 중에서도 특히 유전자 재조합 발광박테리아를 이용한 환경오염 탐지가 주목을 받고 있다. 지구상에 존재하는 오염 물질들이 생명체 내에서 일으키는 독성 반응은 다양하며 이 독성 반응에 따라서 오염 물질 처리 방법도 달라진다. 유전자 재조합 기술은 특정 독성에 특이적인 반응을 나타내는 프로모터 유전자를 사용하기 때문에 다양한 프로모터를 이용한 재조합 발광 박테리아의 제작이 가능하며 이렇게 제작된 발광 박테리아는 수질, 토양, 대기 오염을 탐지하는 환경오염 모니터링 시스템에 적용하여 활용되었다. 그러나, 이런 시스템에서 사용될 수 있는 발광 박테리아의 수는 제한적이며, 각각의 박테리아는 샘플에 대한 독특한 독성 정보를 제공한다는 측면에서 적은 종류의 박테리아 사용은 제한적 독성 정보를 얻게 된다는 결과를 가져온다.

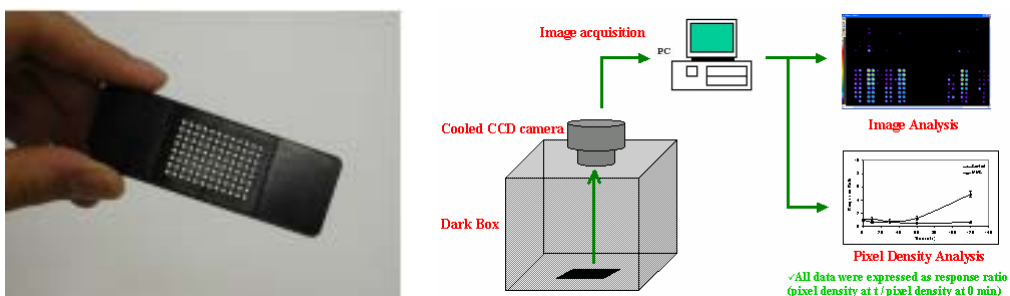


그림 5. 박테리아 세포칩(좌)와 Cooled CCD 를 이용한 데이터 획득 과정 모식도

본 연구에서는 샘플의 독성에 대한 다양한 정보를 획득할 수 있는 high throughput 방식의 독성 분석을 실시하기 위해 칩 어레이 기술을 이용하여 박테리아 세포칩을 제작하였다. 발광박테리아 칩은 20가지의 서로 다른 프로모터를 가진 균주를 Agar와 LB가 혼합된 고정화 물질과 섞어서 아크릴 재질로 제작된 칩과 386 well plate의 각 well에 고정화하여 만들었다.

Strain	Plasmid	Host	Strain	Plasmid	Host
DS1	<i>pSodALux(XI^a)</i>	RFM443 ^b	DK1	<i>pKatGLux(XI)</i>	RFM443
DP1	<i>pPqi-5Lux(XI)</i>	RFM443	NagK	<i>pNagRLux(Vf)</i>	P.putidaKCTC1768
EBSoxR	<i>pSoxRLux(XI)</i>	RFM443	TV1061	<i>pGripELux(Vf)</i>	RFM443
EBFumC	<i>pFumCLux(Vf)</i>	RFM443	DC1	<i>pCipBLux(XI)</i>	RFM443
EBSoxS	<i>pSoxSLux(Vf)</i>	RFM443	DO2	<i>pOmpTLux(XI)</i>	RFM443
EBInaA	<i>pInaALux(Vf)</i>	RFM443	BM401	<i>pLuxRLux(XI)</i>	RFM443
EBHmp	<i>pHmpLux(Vf)</i>	RFM443	GC2	<i>pLacLux(XI)</i>	RFM443
DPD1710	<i>pRecALux(Vf)</i>	JC7623 ^c	DRP1	<i>pRpoSLux(XI)</i>	W3110 ^d
EBJM2	<i>pGltALux(XI)</i>	RFM443	Kan3	<i>pKanLux(Vf)</i>	W3110
DPD2540	<i>pFabALux(Vf)</i>	RFM443	RFM443	<i>NA</i>	RFM443

^a *Vf*: *lux* genes are from *Vibrio fischeri*. *XI*: *lux* genes are from *Xenorhabdus luminescens*.

^b The genotype of RFM443 is (*rpsL* - (StrR), *galK2*, *lacΔ74*).

^c The genotype of JC7623 is (AB1157, *recC22*, *recB21*, *sbcB15*, *sbcC201*).

^d The genotype of W3110 is (F⁻ *lam-lin* (*rrnD-rrnE*)1 *rph-I*).

표 1. 본 실험에 사용된 균주와 재조합 플라스미드 및 host strain.

전체 칩 실험의 negative control 로 *lux* 유전자가 없는 RFM443를 사용하여 노이즈를 제거하는 데 사용하였다. 독성 반응에 의한 루미노센스의 변화는 민감도가 뛰어난 cooled CCD 카메라로 촬영하여 각 시간에 따른 독성 변화를 비교 분석하였다. 또한 컴퓨터 소프트웨어를 이용하여 pixel density를 측정하여 이를 이용하여 빛의 변화를 분석하였다. 사용된 독성 물질은 산화적 손상을 일으키는 파라콰트와 유전자 손상을 유발하는 마이토마이신시 그리고 단백질/세포막 손상을 일으키는 살리실릭엑시드를 사용하였다.

파라콰트는 생체 내부에서 슈퍼옥사이드를 발생시켜서 산화적 손상을 일으키는 것으로 알려져 있다. 슈퍼옥사이드는 반응성이 매우 높아서 유전자의 결합을 파괴하고 여러 가지 생물학적 분자에서 양자를 빼앗아서 세포 내에 심각한 손상을 일으킨다. 세포칩에 배열된 균주 중에서 DS1 (*sodA::luxCDABE*)와 EBSoxS(*soxS::luxCDABE*)에서 발광 반응을 나타냈다. 두 균주 모두 산화적 손상이 있을 때 방어기작으로 발현하는 SoxRS regulon에 속한 유전자로써 *sodA*의 경우 슈퍼옥사이드 라디칼을 독성이 없는 다른 물질로 전이시킬 반응에 촉매로 사용되는 물질을 생산하는 유전자이고 *soxS*의 경우 SoxRS regulon의 발현이 시작될 수 있는 activator인 SoxS를 생산하는 유전자이다. 두 균주에서 각각 현저한 반응이 나타나서

발현량의 증가가 나타났다. 같은 독성 물질에 동일한 시간에 노출되었지만 그 발현량이나 발현 시간에 있어서 두 균주에서 차이가 나타났다. 먼저 DS1의 경우 샘플에 노출시킨 후 10분만에 프로모터 발현이 나타났지만 EBSoxS의 경우 한시간이 지난 후부터 발현량이 화면상에서 확인되었다. 비록 EBSoxS의 발현 시간이 느리지만 발현량은 DS1에 비해 훨씬 높은 것으로 나타났다.

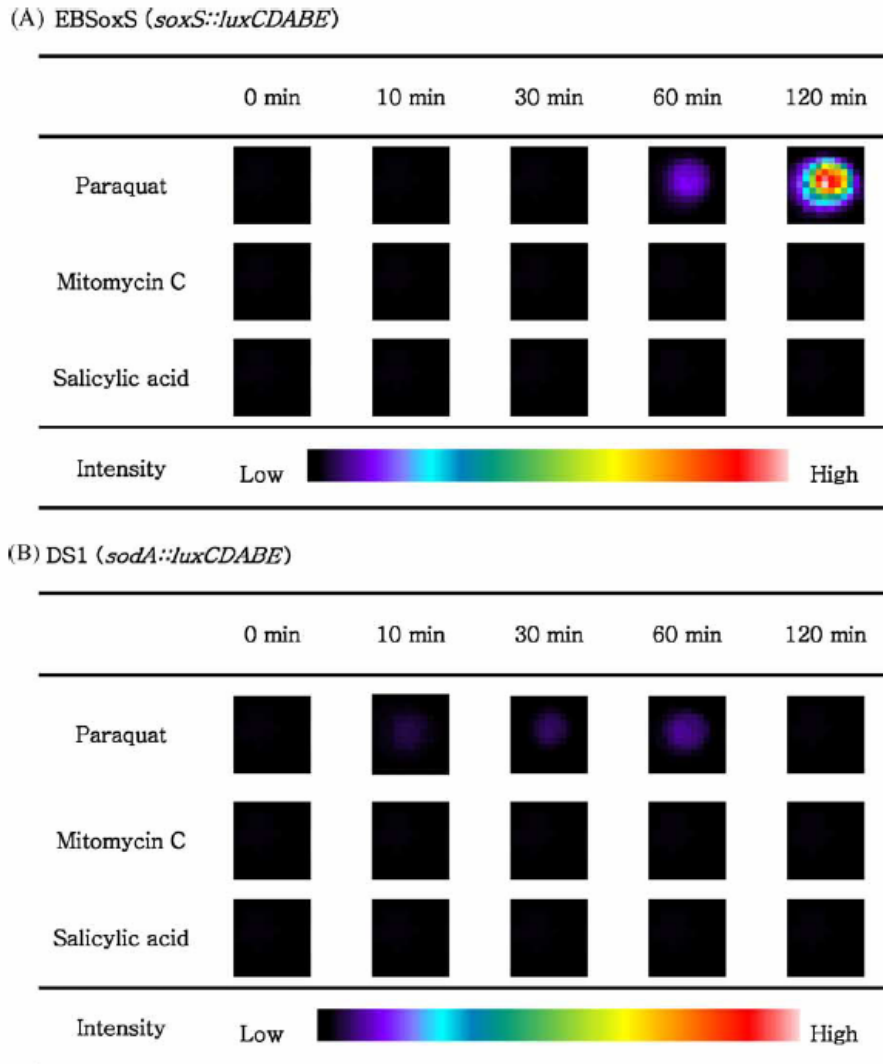


그림 6. 세가지 샘플에 대한 (A) EBSoxS 와 (B) DS1의 시간에 따른 발현 반응.

유전자 손상을 일으키는 마이토마이신시의 경우 카메라로 촬영된 화면상에서는 별다른 발광량의 변화가 탐지되지 않았다. 하지만 pixel density를 통한 분석에서는 DPD1710(*recA::luxCDABE*)과 EBJM2(*gltA::luxCDABE*)에서 반응을 나타내었다. 비록

화면상에는 나타나지 않았지만 DPD1710의 경우 control에 비해 4배나 많은 양의 빛을 나타내었고 EBJM2의 경우 2배 높은 빛의 증가가 나타났다.

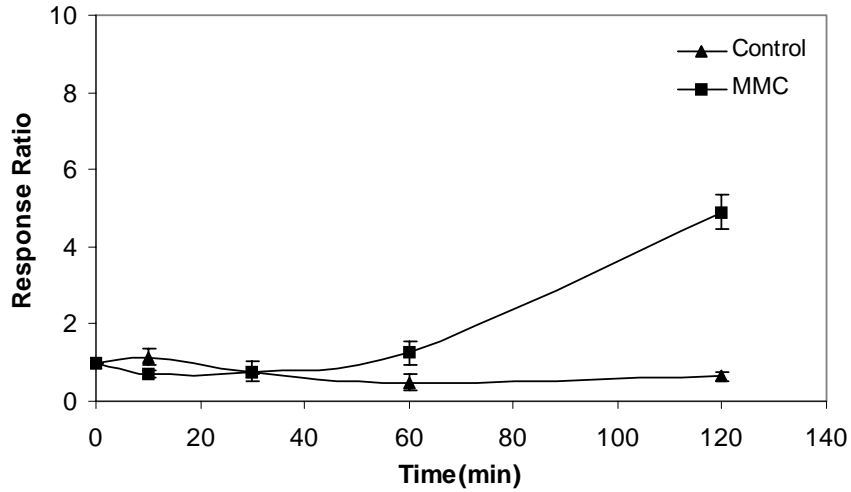


그림 7. 마이토마이신시와 Distilled water에 대한 DPD1710의 반응

마지막으로 단백질 손상과 세포막 손상을 일으키는 살리실릭엑시드에 대해서는 TV1061과 DPD2540이 반응을 일으켰으며 이는 기존 문헌과 본 연구실 실험 결과와도 일치하는 결과이다.

위에서 언급된 반응 균주들을 보면 모두 각각의 샘플에 대해서 특이적인 반응을 보이고 있는 것으로 확인되었다. 이 결과는 본 연구를 통해 개발된 세포칩이 다양한 환경 독성에 대해서 특이적인 반응을 나타내는 것을 보여주며 이 특이적인 반응을 통해 독성 분류 탐지 분석이 가능함을 확인시켜준다. 또한 반응을 나타낸 모든 균주는 적어도 3개 이상의 스팟에서 동일한 반응을 나타내고 있어서 그 반응의 신뢰성을 확인시켜주고 있다.

본 칩은 간단한 실험 방법과 경제성으로 인해 휴대용 환경 바이오센서와 high throughput 방식의 독성 분석이 필요한 곳에 사용될 수 있을 것이며 미지의 샘플에 대한 독성 분석에도 유용하게 사용될 수 있다.

알 림

[졸업]

➤ **김병찬 박사**

광주과학기술원(원장 나정웅)은 2005년 2월 15일 오후 2시 광주과기원 행정동 1층 대강당에서 임상규 과학기술혁신 본부장, 박광대 광주광역시장, 교직원, 학부모 등 700여 명이 참석한 가운데 '2004 학년도 전기 학위수여식'을 갖었다. 이날 학위수여식에서는 정보통신공학과 김정훈 박사, 신소재공학과 송준오 박사, 기전공학과 변홍석 박사, 환경공학과 김병찬 박사와 롱비아오 시양, 생명과학과 이정수 박사 등 6명에게 우수논문상이, 정보통신공학과 김강희 박사에게는 공로상이 각각 주어졌다.

[수상]

➤ **최우수 논문 발표 CJ Bio 상 (2004 추계 한국화학공학회 생물화공분과위)**

박지현, 김병찬 학생이 2004년 10월 29일부터 30일까지 이틀간 호서대학교 아산캠퍼스에서 열린 2004년 화학공학회/공업화학회 공동 학술대회에서 “Development and application of bacterial species identification DNA chip in real field” 라는 제목의 논문 발표로 최우수 논문 발표 CJ Bio 상을 수상하였습니다.

➤ **우수 포스터 논문 발표상 (2004 추계 한국 미생물 생명공학회)**

홍한나, 박경서 학생이 2004년 6월 21일부터 23일까지 3일간 대구 인터볼고호텔에서 “New Challenges Functionl Microbiology and Biotechnology”라는 주제로 열린 2004년도 추계 한국미생물생명공학회 국제심포지움 및 에서 “Analysis of Biomarker and Endogenous Control Genes and their Distinct Expression Kinetics in Japanese Medaka using Real-Time PCR” 의 논문 발표로 우수 포스터 논문상을 수상하였습니다.

➤ **우수 논문상 수상 (2004 추계 대한환경공학회)**

2005년 4월 28일 수원월드컵경기장에서 열린 대한환경공학회에서 박지현, 김병찬 학생이 우수 논문상을 수상하였습니다. 논문 제목은 ‘Analysis of microbial communities in the activated sludge using DNA microarray and T-RFLP’로 2004년도 추계 환경공학회에서 발표되었습니다.

[해외연수]

➤ ERC 해외현지연구실 과제 수행

연 구 자 : 박사과정 안주명

파견기관 : Gesellschaft für Biotechnologische Forschung(GBF), Germany

기 간 : 2005년 2월 2일 ~ 2005년 5월 2일

연구내용 : DNA Microarray를 기반으로한 대장균의 독성학적 메커니즘 네트워크 구성 연구

➤ BK 21 장기 해외 연수

연 구 자 : 박사과정 이진형

파견기관 : Pacific Northwest National Laboratory (PNNL), USA

기 간 : 2005년 1월 22일 ~ 2005년 4월 20일

연구내용 : 고정화 효소를 이용한 물질 분해 및 이를 이용한 환경 센서의

➤ 광주과학기술원 기관고유사업 (MDSN) 연구 수행

연 구 자 : 박사과정 김연석

파견기관 : Institute of Scientific and Industrial Research(ISIR), Osaka University, Japan

기 간 : 2005년 1월 5일 ~ 2005년 2월 26일

연구내용 : 환경호르몬 탐지를 위한 aptamer 바이오센서 개발. 본 센서의 개발을 위한 plate form 제작 및 전기 화학적 변화 탐지 방법 연구

➤ 과학재단 이공계과학도 교류사업 일환연수프로그램 참여

연 구 자 : 석사과정 박지현

파견기관 : National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Japan

기 간 : 2005년 1월 5일 ~ 2005년 2월 19일

연구내용 : Yeast 내에서의 유전자 발현 패턴 분석

➤ 과학재단 이공계과학도 교류사업 일환연수프로그램 참여

연 구 자 : 석사과정 홍한나

파견기관 : National Institute of Environmental Study (NIES), Japan

기 간 : 2005년 1월 5일 ~ 2005년 2월 19일

연구내용 : 재조합 단백질을 이용한 EDCs 탐지 시스템 개발

➤ 과학재단 해외공동연구사업

연 구 자 : 박사과정 김병찬

파견기관 : Pacific Northwest National Laboratory (PNNL), USA

기 간 : 2004년 9월 1일 ~ 2005년 2월 28일

연구내용 : 나노 공극 물질을 이용한 고정화 효소 개발 및 이를 이용한 바이오센서의
민감도 향상 연구



광주 과학기술원 환경공학과
환경생물공학 국가지정 연구실
광주광역시 북구 오룡동 1번지
Tel) 062-970-2454, Fax) 062-970-2434

Gwangju Institute of Science and Technology (GIST)
1 Oryung-dong, Puk-gu, Gwangju 500-712, Korea
Tel : +82-62-970-2454, Fax : + 82-62-970-2434
E - mail : mbgu@gist.ac.kr
Home : <http://env1.gist.ac.kr/lab/EBL>