

내분비 장애 물질 bisphenol A에 대응한 재조합 대장균 내 β -galactosidase의 생성

임성혁, 김춘일, 김수영, 정제윤, 김병우
성균관대학교 화학공학과 환경공학연구소

Production of β -galactosidase by recombinant *E. coli* responding to an endocrine disruptor, bisphenol A

Sung-Hyuk Lim, Chun-Il Kim, Soo-Young Kim, Jea-Yoon Joung, Byung-Woo Kim
Department of Chemical Engineering, Sungkyunkwan Univ.

서론

20세기에 들어서 커다란 문제로 대두된 내분비 교란물질은 생체 내에서 estrogen 유사 기능을 통하여 생물의 성장에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 이러한 내분비 교란 물질은 그 용도 및 물질 군이 매우 다양하며 현대 인간 생활에서 광범위하게 유용하게 사용되고 있으나 내분비계에 나타나는 유해로 인하여 인류전체의 생존이 위협받을 수 있는 점 때문에 내분비계 장애물질의 환경 잔류실태에 대한 연구가 진행되고 있다.

그 중 Bisphenol A (4,4-isopropylidene diphenol BPA, Fig.1)는 식품 포장용 캔 내부의 도장용 락카, 병마개, 치과용 수지에 사용되는 epoxy resin이나 polycarbonate의 생산에 이용되는 단량체로 최근 내분비계 장애를 유발하는 것으로 보고 되었다(1,2). 특히 인체에는 직접적인 접촉에 의해 피부염을 발생시킨 후, 빛에 의해 지속적으로 재발하는 광알레르기성의 독성을 가지며 극소량으로 estrogen과 같은 성 호르몬의 이상을 유발하는 물질로 알려져 있다.

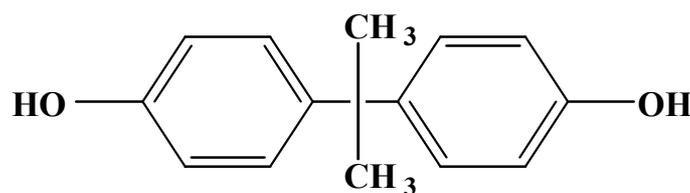


Figure 1. Chemical structure of bisphenol-A.

본 실험에서는 사용된 유전자 재조합 균주들(*E. coli* GW1030, *E. coli* GW1040)을 이용하여 외부오염물질에 대한 DNA damage가 발생시 대응효소로서 β -galactosidase를 분비하며, 이 β -galactosidase의 activity를 분석함으로써 극저농도의 Bisphenol A를 정량적으로 검출하고자 한다.

상당수의 bacteria는 외부로부터의 열충격, DNA damage, 중금속 등의 충격이 가해져도 특정 유전자적 시스템에 의해 새로운 환경에 적응하며 살아갈 수가 있다. 특히 DNA damage가 있을 경우 SOS 레귤론이란 반응 시스템에 의해 복구된다(3). 이 SOS 레귤론 시

스텝에서 있어서 LexA protein은 SOS 반응을 억제하는 억제자로서의 역할을 수행하는데 DNA damage나 복제저해가 일어나면 RecA와 같은 protease가 형성되어 SOS 반응의 억제자인 LexA protein을 분해한다. 이런 과정에서 SOS 반응에 의한 product가 생성되게 된다. 그리고 외부로부터의 충격이 복구되면 RecA protein의 활성이 떨어지고 LexA protein이 다시 축적되어 SOS gene이 다시 억제된다(3, 4).

실험방법

세균배양 및 bisphenol A 노출

균주의 배양은 36°C에서 LB 배지에 agar를 첨가한 고형배지에서 배양하였다. 그리고 Bisphenol A의 농도별 비교 실험은 LB배지에서 12 h 정도 배양한 후 다시 LB배지에 균을 접종하여 shaking incubator에서 130 rpm으로 OD가 0.2~0.3 정도 될 때까지 배양하고 Bisphenol A를 첨가하여 30분마다 sample을 채취하여 흡광도(600 nm)를 측정하여 세균 농도를 결정하였다.

Miller 's enzyme assay

Sample의 일부를 Z-buffer, SDS, chloroform이 첨가된 test tube에 넣고 10초간 격렬히 교반한 뒤 ONPG를 투입하였다. *o*-nitrophenol β -galactosidase가 ONPG를 분해하여 *o*-nitrophenol과 D-glucose를 생성하게 된다(Fig. 2). 충분한 색의 변화가 일어나면 Na₂CO₃ 용액을 첨가해 반응을 종결시키고 반응시간을 기록하였다. 혼합물을 원심분리 후 상등액을 취하여 420, 550nm에서 각각 흡광도를 측정하였다. β -galactosidase의 활성은 다음의 식으로 계산되었다(식 1).

$$\beta\text{-galactosidase} = \frac{1000(OD_{420} - 1.75OD_{550})}{t \times V \times OD_{600}} \quad (1)$$

t = reaction time (min)

V = reaction volume (ml)

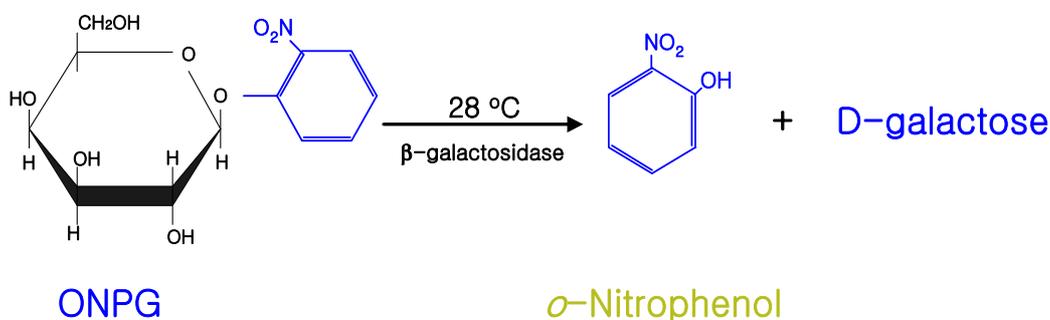


Figure 2. ONPG degradation by β -galactosidase.

결과 및 고찰

재조합 대장균(*E. coli* GW1040)을 사용한 Bisphenol A 검출실험으로 대응효소인 β -galactosidase의 response ratio를 측정된 결과 Bisphenol A 농도 1, 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 최대 1.37, 0.97로 나타났다(Fig. 3). 그리고, 재조합 대장균(*E. coli* GW1010)의 경우 β -galactosidase의 response ratio를 측정된 결과 Bisphenol A 농도 1, 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 최대 1.2, 1.1로 나타났다(Fig. 4). *E. coli* GW1010의 경우 *E. coli* GW1040보다 검출 시간이 비교적 적게 소요된다는 점을 확인하였다. 이는 β -galactosidase의 response를 이용한 biochip의 검출시간을 단축시킴으로써 독성물질을 효율적으로 검량할 수 있게 한다.

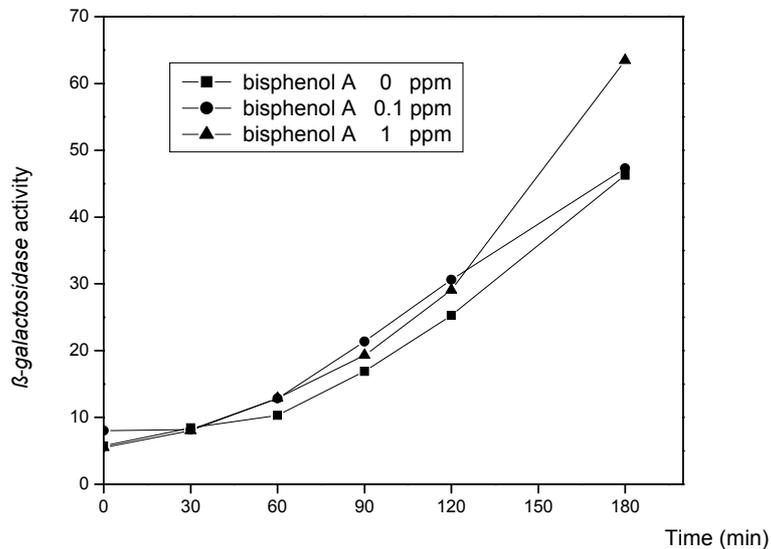


Figure 3. Variation of β -galactosidase activity in *E. coli* GW1040 by Bisphenol A at 36°C.

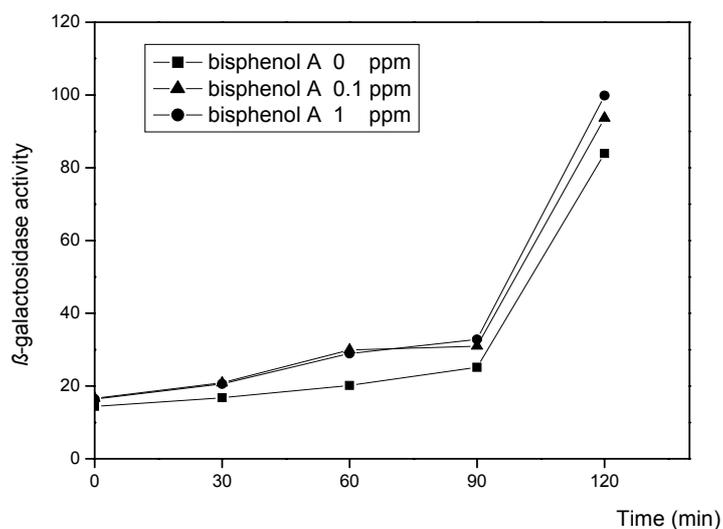


Figure 4. Variation of β -galactosidase activity in *E. coli* GW1010 by Bisphenol A at 36°C.

참고 문헌

1. Brotons, J. A., Olea-Serrano, M. F., Villalobos, M., Pedraza, V., and Olea, N. (1995). Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans. *Environ. Health Perspect.* 103: 608-612.
2. OLEA, N., PULGER, R., PE`REZ, P., OLEA-SERRANO, F., RIVAS, A., NOVILLOFERTRELL, A. PEDRAZA, V., SOTO, A.M. and SONNENSCHHEIN, C.(1996), Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environ. Health Perspect.* 104: 298-305.
3. Walker GC (1984) Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *E. coli*. *Microbiol. Rev.* 48: 60-93
4. Heitman J, Model P (1991) SOS induction as an in vivo assay of enzyme-DNA interactions. *Gene* 103: 1-9
5. Vollmer AC, Belkin S, Smulski DR, Van Dyk TK, LaRossa, RA (1997) Detection of DNA damage by use of *E. coli* carrying *recA::lux*, *uvrA::lux*, or *alkA::lux* reporter plasmids. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2566-2571