

유전자 재조합 형광 단백질 발현 동물세포의 고정화 및 바이오센서의 개발

이정은, 구만복

광주과학기술원 환경공학과, 환경 생물공학 연구실

전화 (062)970-2440, FAX(062)970-2434

Abstract

Mammalian cell based biosensor kits are expected to be in assessment of samples toxicity more sensitive and accurate. A recombinant fluorescent Chinese Hamster Ovary (CHO) cell line was known to be responsive to the various toxicants. Specially, KFC-A10 cell line, which contain the c-fos SRE::GFP plasmid (pKFG), was found to be able to detect toxicants sensitively. A biosensor kit was developed by using an immobilized KFC-A10 cell line. Immobilized recombinant fluorescent cells within agarose, known as a representative hydrogel matrix, have been maintained in the matrix viably and have shown constant fluorescent levels for long time. Immobilized cells have shown the ability to detect the chemical toxicity in the keep of fluorescent level as the metabolism is inhibited under toxic conditions.

서론

현재 환경호르몬을 포함한 다양한 형태의 유해화학물질이 생태계 뿐만 아니라 인류의 건강을 위협하고 있다. 따라서 환경 모니터링 기술로써 바이오 센서의 개발은 서로 다른 유해 화학물질에 대한 우리 인간에게 독성을 미치는 지표로서 매우 중요하다.

환경 독성물질은 토양이나 물, 그리고 대기 중에 많이 존재하며, 인간에게 미치는 영향 또한 다양하다. 다이옥신이나 메틸브로마이드 등과 같은 내분비계 교란물질¹⁾과 유전자 손상이나 세포 성장을 저해시키는 질병 치료제에 이르기까지²⁾ 그 예이다. 특히 최근 주요 관심사 중의 하나인 내분비 교란물질은 환경 중에 배출된 화학물질이 체내에 유입되어 마치 호르몬처럼 작용한다고 하여 환경 호르몬이라 불리기도 한다. 이들이 체내에 유입되었을 때 생체 호르몬과는 달리 쉽게 분해 되지 않고 지방 및 조직등에 축적될 뿐만 아니라 인간이나 동물의 경우 생식기의 기형화에 영향을 주는 것으로 알려져 있다³⁾.

지금까지 대부분의 환경 바이오 센서는 원핵 세포인 박테리아 시스템⁴⁾에 중점을 둔 반면 진핵 세포를 이용한 바이오 센서에 대한 연구는 많이 이루어지지 않고 있다.

본 연구에 사용한 유전자 재조합 형광 동물세포는 CMV promoter와 c-fos promoter를 GFP⁵와 재조합하여 만들어진 plasmid, pEGFP-N1과 pKCFG를 CHO (Chinese Hamster Ovary) cell에 transfection하여 재조합 하였다. 이렇게 재조합된 동물세포는 유해 독성물질 하에서 녹색 형광수준의 변화를 통해 모니터링 할 수 있는 시스템을 가진다.

본 연구에서는 박테리아에 비해서 민감도가 훨씬 좋은 유전자 재조합 포유 동물세포를 이용하여 환경 독성 물질을 신속히 탐지하기 위한 바이오센서를 개발하였다.

실험방법

cell 고정화와 fluorescence 측정

본 실험에 사용한 균주는 EFC-500과 KFC-A10이며 각 균주는 각각 4% FBS(Fetal Bovin Serum) DMEM에 H/T supplement 와 P/S antibiotics(Gibco-BRL,USA)를 포함한 배지에 배양한다. 세포가 지수성장기에 이르렀을 때 세포를 회수한 뒤 96well plate (Falcon, USA)에 1×10^5 cells/ml cell로 넣어준 후 plate에 잘 붙어 자랄 수 있도록 5% CO₂, 37°C incubator에 24시간 동안 넣어둔다. 그런 다음 배지만을 제외시키고 1% agarose solution을 100μl씩 넣어 실온에서 방치한 후 테스트한다.

Fluorescence측정은 Microplate fluorescence reader (BIO-TEK,UK)를 사용하였고 excitation 파장은 485nm를, emission 파장은 530nm를 맞추어 사용하였다. 모든 실험은 3개의 sample을 사용하여 평균화 하였고 각 chemical에 대한 독성탐지 정도는 fluorescence level (FL)로 나타내었다.

Chemicals

Bisphenol A, Mitomycin C, β-estradiol, Methyl bromide (Sigma Chem.Co.)
Hydrogen peroxide(H₂O₂, Merck Co.)

표1. 실험에 사용된 chemicals의 종류

| EDCs | DNA damage agent | Oxidative damage agent |
|--|------------------|------------------------|
| Bisphenol A β-estradiol Methyl bromide | Mitomycin C | Hydrogen peroxide |

결과 및 고찰

서로 다른 고정화 조건에 대한 FL의 안정성

agarose solution의 온도 민감성으로 인해 배지와 homogeneous한 mixture 제조가 어려워 배지를 제외한 서로 다른 agarose solution에 대해서 고정화한 세포의 fluorescence level에 대한 안정성을 알아보았다.

그림1에서 보는 바와 같이 배지를 제외한 agarose solution만을 이용하여 고정화한 세포에서 또한 실온에서 7일동안 비슷한 수준의 FL값을 보였다.

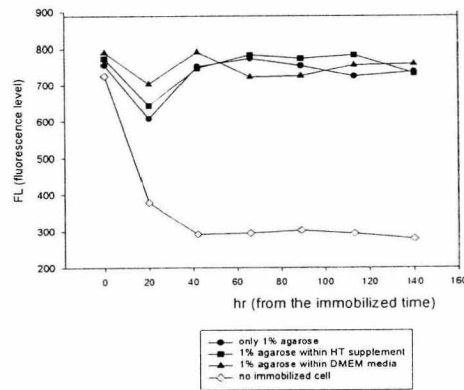


그림 1 서로다른 고정화 solution에서의 FL 비교

다양한 Chemical에 대해 고정화 된 KFC-A10의 영향

다양한 독성물질을 고정화한 cell에 반응시켜 본 결과 최소 탐지 가능한 독성물질의 농도가 고정화 하지 않은 cell에서의 농도와 유사하게 나타났으며 박테리아와 비교해 볼 때 민감도도 훨씬 좋음을 확인 할 수 있었다.

(data not shown)

감사의 글

본 연구는 한국 과학 기술부 2001년 국가지정 연구실(NRL) 사업지원에 의해 수행되었으며 이에 감사 드립니다.

참고문헌

1. Cantrell et al., Correlation of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced apoptotic cell death in the embryonic vasculature with embryotoxicity(1998), *Toxicol. and Appl. Pharmacology*, 148,24-34
2. Min J.H., et al., Distinct responses of a *recA::luxCEABE Escherichia coli* strain to direct and indirect DNA damaging agents(1999),*Mutat. Res*, 422,61-68
3. Nishikawa J. et al., New screening methods for chemicals with hormonal activities using interaction of nuclear hormone receptor with coactivator(1999), *Toxicol. and Appl. Pharmacology*, 154, 76-83
4. Gu M.B. et al., A miniature bioreactor for sensing toxicity using recombinant bioluminescent *Escherichia coli* cells, *Biotechnol. Prog.* 12, 393-397
5. Knight A.W. et al., development of a flow-through detector for monitoring genotoxic compounds by quantifying the expression of green fluorescent protein in genetically modified yeast cells, *Measa Sci. Technol.* 10,211-217