

Ultrasoft X-ray의 *Escherichia coli* 균과 plasmid DNA에 대한 영향

전 선미 · 김 영민 · †^{1,2}김도만 · ³김도원 · ⁴윤화식 · ⁵Seiya Chiba · ⁵Atsuo Kimura
전남대학교 의공학협동과정, ¹생물화학공학과, ²촉매연구소, ³강릉대학교 물리학과,
⁴포항가속기연구소, ⁵Hokkaido대학교 농업대학원
(접수 : 2000. 1. 28., 게재승인 : 2000. 2. 21.)

The Effects on *Escherichia coli* and Plasmid DNA Using Ultrasoft X-ray

Sun-Mee Jun, Young-Min Kim, Doman Kim^{†1,2}, Do-Won Kim³, Hwa-Shik Youn⁴, and Seiya Chiba⁵, Atsuo Kimura⁵
Department of Biomedical Engineering, ¹Department of Biochemical Engineering,
²The Research Institute for Catalysis, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea
³Department of Physics, Kangnung National University, Kangnung 210-702, Korea
⁴Pohang Accelerator Laboratory, Pohang 790-784, Korea
⁵Division of applied Bioscience, Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060-8589, Japan
(Received : 2000. 1. 28., Accepted : 2000. 2. 21.)

We studied the effect of ultrasoft X-ray obtained from the Pohang Light Source (PLS), on the mutation of *E. coli* and the damage of plasmid. After irradiation, the supercoiled plasmid DNA converted to the relaxed-form, and then to the linear-form. We transformed the irradiated plasmid DNA and isolated β -galactosidase mutants. We also isolated β -galactosidase mutants from the directly irradiated cells. There were preferred mutational sites on DNA induced by ultrasoft X-ray.

Key Words : ultrasoft X-ray, mutation, plasmid, *E. coli*

서론

유전정보의 운반체인 DNA의 분자적 구조 변형을 DNA damage라 하는데(5), DNA의 damage를 일으키는 원인으로는 ionic radiation(12), UV radiation(18), X-ray radiation(6,17) 등의 방사선과 bleomycin(16), NTG, EMS(8) 등의 화학 물질들이 보고되어 있다. 특히 X-ray는 DNA의 사슬 절단을 유도하는 것으로 알려져 있다(4,9,14).

일반적으로 plasmid는 DNA의 이중사슬이 supercoil 형태로 존재하는데, 한 사슬에 nick이 생겨 절단이 발생하면 plasmid가 이완된 형태로 변환하며, 이를 단일사슬절단(single-strand break, SSB)이라 부르고, 같은 염기 짝에서 이중사슬이 모두 절단되어 선형으로 변환하는 경우를 이중사슬절단(double-strand break, DSB)이라 부른다(3,7,13,15).

X-ray중 1 KeV부터 5 KeV까지의 에너지를 가지는 영역을 ultrasoft X-ray라 하며, Kobayashi(11) 등은 인의 K-shell에서 0.57 nm 파장을 지닌 monochromatic X-ray를 발생시켜 효모균에서의

흡수효과에 따른 생존율을 연구하였으며, Hieda(7) 등은 pBR322 plasmid DNA를 이용하여 층돌 단면적이 최대가 되는 2.153 KeV 광자 에너지에서 supercoil 형태의 DNA가 SSB와 DSB로의 전환이 최대가 됨을 확인하였다. Botchway(1) 등은 cold-carbode discharge tube를 이용한 구리의 L-shell의 ultrasoft X-ray와 알루미늄 K-shell의 ultrasoft X-ray가 ⁶⁰Co의 γ -ray를 사용한 경우보다 햄스터의 V79 세포의 DSB 유도를 더욱 효과적으로 유도함을 보고하였다.

본 연구에서는 ultrasoft X-ray가 DNA에 미치는 영향을 알아보기 위해 염기서열을 알고 있는 plasmid DNA를 이용하였다.

재료 및 방법

본 실험에 사용한 DNA는 pBluescript KS(-)(stratagene)이며, 숙주세포로는 *E. coli* DH5 α 와 JM109(stratagene)를 사용하였다. *E. coli*는 LB 배지를 이용하여 37°C에서 18시간동안 배양하였으며 필요에 따라 ampicillin(50 μ g/mL)을 넣어주었다. LB 배지의 조성은 1%(w/v) trypton, 0.5%(w/v) yeast extract, 0.5%(w/v) NaCl이다. 실험에 사용한 시약은 GR 등급을 사용하였다. pBluescript는 이 plasmid를 갖고 있는 *E. coli*를 20 mL 배양하여 QIAprep Spin Miniprep kit(Qiagen사, Germany)을 이용하여 준비하였다.

Ultrasoft X-ray는 포항 방사광 가속기의 Liga 빔라인(9C1)에서 실험을 위해 특수 제작한 알루미늄 chamber 안의 알루미늄 표적

† Corresponding Author : Department of Biochemical Engineering,
The Research Institute for Catalysis, Chonnam National University,
Kwangju 500-757, Korea
Tel : 82-62-530-1844, Fax : 82-62-530-1849
E-mail : dmkm@pasteur.chonnam.ac.kr



Figure 1 The view of photoemission experiment chamber

에 입사시켜 발생하였다(Figure 1). Chamber 안에 헬륨가스를 가득 채워 발생된 ultrasoft X-ray가 고루 퍼질 수 있도록 하였고, 바닥에 균과 DNA를 놓고 일정한 시간 간격으로 빔을 조사하였다. 표적으로 사용한 알루미늄(Al)은 원자번호가 13으로, 원자무게는 26.982이고 밀도는 2.70 g/cm³이다. 알루미늄 전자궤도의 결합에너지(binding energy) K(1)은 1559.6 eV, L(1)은 117.8 eV, L(2)는 73.1 eV이며 L(3)는 72.7 eV를 가진다. 만일 외부에서 입사되어 들어오는 입자들에 의해 알루미늄 K-shell의 전자가 튀어나가면 다른 궤도에서 전자가 원자의 안정화를 위해 이동하게 되며 이때 생기는 에너지의 차이에 의해 ultrasoft X-ray가 발생하게 된다. 알루미늄 K-shell에서 발생하는 ultrasoft X-ray는 1.487 KeV의 에너지를 갖는다. 균은 100 μ L(10^{10} cells/mL)씩 microwell plate(Nalge Nunc International, 167008) hole에 넣어 준비하였고, DNA는 20 μ L(1 μ g/mL)씩 parafilm(American National Can., USA)에 준비하여 실험하였다. 준비된 시료에는 한 hole에 초당 6.4×10^6 개의 광자들이 입사되었다.

빔을 조사한 후 pBluescript DNA를 갖고 있는 *E. coli* 균은 하나의 고체배지당 300균가량 자랄 수 있도록 희석하여 LBAX 배지(1 mg/20 mL ampicillin, 0.8 mg/20 mL X-gal, 그리고 0.8 mg/20 mL IPTG를 포함한 LB고체배지)에 도말하였다. 빔에 직접 조사한 plasmid DNA는 5 μ L를 0.7% agarose gel에 전개하여 구조 변화 여부를 확인하고 정량적인 분석은 NIH Image Program을 이용하였다(10). 또한 1 μ L는 *E. coli* JM109을 숙주세포로 사용하여 CaCl₂ 방법으로 형질전환에 사용하였다(2) 형질전환된 균들은 LBAX배지에 도말하고 생존한 균을 확인하였다.

빔 조사후에 LBAX 배지에서 lactose operon에 이상이 생겨 white colony를 형성(12)하면서 성장한 돌연변이 균들은 ampicillin이 들어간 LB 배지에서 18시간동안 배양하여 plasmid DNA를 분리하여 염기서열을 조사하였다. 염기서열을 조사하기 위한 primer는 forward 방향으로 pBluescript의 860 bp부터 878 bp까지의 19쌍체인 5'-CAACATACGAGCCGGAAGC-3'이다 염기서열 결정은 기초과학 지원연구소 광주지소와 대전지소에 의뢰하였다. 염기서열 설정은 ABI PRISM 377 automatic DNA sequencer(PerkinElmer, USA)를 이용하였다.

결과 및 고찰

Plasmid를 이용하여 시간별로 빔을 조사한 후 DNA를 0.7%

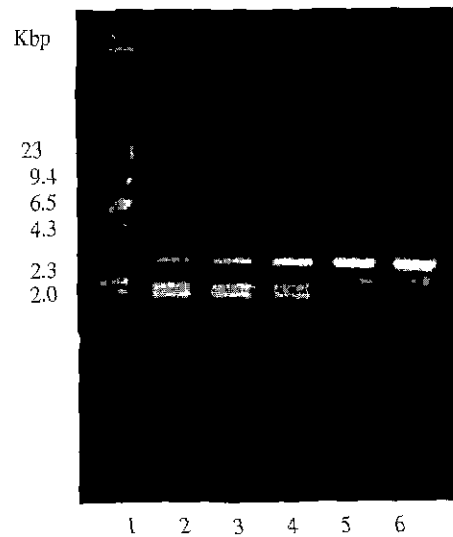


Figure 2. The agarose gel electrophoresis of pBluescript DNA after irradiation. Lane 1, size marker(λ /HindIII), lane 2, control, lane 3~6, plasmid DNA exposed for 10, 30, 60, and 120min, respectively

agarose gel에 전개하여 DNA의 크기를 확인하였다(Figure 2). 빔을 조사하기 전의 supercoil 형태의 DNA(lane 2)는 빔에 노출된 시간이 증가할수록 이중사슬절단이 일어나서 선형의 DNA로 전환하여 2.9 Kbp 위치에 밴드를 보였다(lane 6). 두 DNA 밴드 사이에 위치한 DNA들은 이완된 형태의 DNA로 생각되어진다. 전체 DNA양에서 선형의 DNA양이 차지하는 양을 densitometer로 확인한 결과, control은 3.5%이고(lane 2). 10분 조사한 경우는 8.7%(lane 3), 30분 조사한 경우는 24.5%(lane 4), 60분 조사한 경우는 48.8%(lane 5), 그리고 120분 조사한 경우는 62.5%(lane 6)의 상대적인 양을 보였다. 120분인 경우를 제외하고는 분당 2.2의 기울기를 가지면서 선형 DNA의 상대적 양이 선형적으로 증가한 값을 보였다.

방사선을 직접 조사한 DNA의 변이 가능성 여부를 확인하기 위해 *E. coli* JM109을 숙주세포로 사용하여 형질전환시킨 균을 LBAX배지에 도말하여, 여기서 자란 colony의 수를 비교하였다. Plasmid DNA의 형질전환 효율은 빔 조사 실험의 최소 시간인 10분의 경우를 100%로 할 때, 30분 후에는 48.7%, 60분 후에는 11.9%, 그리고 120분 후에는 0.8%였다. 이것은 방사선을 조사하는 시간이 길어질수록 DNA의 사슬이 방사선에 많은 영향을 받아 형질전환 효율이 감소된 것으로 생각된다. DNA를 ultrasoft X-ray에 노출한 후에 형질전환 시킨 균에서 blue colony와 함께 white colony가 나타났으며, 이는 DNA에 방사선을 직접 조사하여도 돌연변이를 유도할 수 있음을 보였다. 이때 돌연변이 균인 white colony 수는 조사시간에 큰 차이 없이 blue colony 수의 0.1%(± 0.02) 정도였다.

방사선을 직접 조사한 균에 대한 방사선 영향 확인은 조사 시료를 희석하여 LBAX 배지에 도말하여 성장한 세포의 수로 하였으며, 방사선을 직접 균에 조사한 경우 얻어진 colony들 중에 white colony 수는 blue colony 수의 1.1%(± 0.2)로 방사선을 DNA에 직접 조사하여 형질전환 시켜서 얻은 white colony들의 비율에 비해 10배 가량 많은 돌연변이 균을 얻었다. Ultrasoft X-ray에 의해 DNA의 *lacZ* *src*의 어느 부분이 변화되었는지 알아보기 위해 방사선에 직접 조사된 균에서 얻은 white colony 4

661	<u>ccgcggtggc ggcc-gctcta gaactagtgg atccccggg ctgcaggaat tcgatatcaa</u>					
IV		c				
1081	<u>ggcgaqcggt atca-gctcac tcaaagcgg taatacggtt atccacagaa tcaggggata</u>					
III		a				
1141	<u>acgcagqaaa caacatgtga-gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaacc-gt aaaaaggccg</u>					
I			a			
II					c	
VII				-		
1201	<u>cgttgcg-ggc gtttttccat aggcctccgc cccctgacga gcatacmeta aatcgacgct</u>					
I				t	g	
III						-
IV						-
VI						-
VII		t				-
1261	<u>caagtcagag gtggcgaac ccgacagac tataaaga-ta cc-aggcggtt cccctggaa</u>					
I				t	c	-
II				t		-
III						-
IV						-
V					a	
VI						-
VII				t		-
1321	<u>gtcctcct-cgt gcgctctcct gtcccgacc tcgcgcttac c-ggatacctg-tcc-gcctttc</u>					
I	t	t		t		c
II		-		t		
III	t			t		
IV		-		t		
V	t					
VI		-				
VII		-				

Figure 3 DNA Sequences changes of the mutants produced using the irradiated DNA and cell 1~VII, sample No

개와 방사선에 조사된 DNA의 형질전환으로 얻은 white colony 3개의 plasmid DNA를 얻어 T7 promoter로부터의 DNA 염기서열을 조사하였다(Figure 3). 661 bp에서 1380 bp 사이의 염기서열의 변화에서 deletion은 5군데, insertion은 9군데, substitution은 7군데의 염기에서 일어났다. 특히 1310 bp부터 1340 bp 사이의 특정 염기에서는 6개(1315 bp)와 4개(1326 bp), 그리고 3개(1324 bp)에서 deletion이 일어나고, 4개(1338 bp)에서 substitution이 일어나는 등의 집중적인 염기서열에 변화가 나타남을 보였다. 이 DNA 부분의 변화는 다른 3개의 균으로부터 얻은 plasmid DNA의 염기서열을 860bp부터 시작하는 primer(5'-CAACATACGAG-CCGGAAGC -3')를 제작하여 확인한 결과 deletion과 더불어 1324bp의 C가 T(thymine)로 substitution 됨도 확인하여 이 DNA 부분이 ultrasoft X선에 의해서 특히 영향을 받음을 알았다. Wehner(19) 등은 160~190 nm의 vacuum UV를 plasmid에 조사한 경우 "hot spots"이라 부르는 특정한 염기에서 변화가 나타나는 부분이 존재하는 경우를 보고한 바 있는데, 본 연구에서 사용한 ultrasoft X선에 의해서도 돌연변이를 특히 잘 일으키는 부분이 존재함을 알았고, 이 ultrasoft X선은 진공 자외선과 더불어 유용 균의 개발에 효율적으로 이용될 수 있겠다. Ultrasoft X선에 의해 특히 영향을 받는 DNA 서열들의 물리적 특성연구가

진행 중에 있다.

요 약

포항 선형 가속기로부터 얻은 ultrasoft X선이 대장균의 돌연변이 유도과 plasmid DNA 변이에 주는 영향을 알아보았다. 빔을 조사함에 따라 supercoil 형태의 plasmid DNA가 relaxed 형태로 변하고, 그후 선형으로 변해 감을 확인하였다. 빔을 조사한 plasmid DNA를 *E. coli*에 형질전환하여 β -galactosidase의 돌연변이 균을 분리하였고, 빔을 직접 조사한 *E. coli*균으로부터도 β -galactosidase의 돌연변이 균을 얻었다 변이된 plasmid DNA와 변이 대장균들의 plasmid DNA의 염기 부분을 변화를 확인하였으며 이 빔에 의해 주로 변이가 일어나는 부분이 있음을 알았다.

감 사

본 연구는 1998년 한국학술진흥재단의 학술연구비에 의하여 지원되었다 포항방사광가속기에서의 실험은 과학기술부와 포항가속기연구소의 지원을 받았으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Botchway, S. W., D. L. Stevens, M. A. Hill, T. J. Jenner, and P. O'Neill (1997), Induction and rejoining of DNA double-strand breaks in chinese hamster V79-4 cells irradiated with characteristic aluminum k and copper l ultrasoft x rays. *Radiat. Res.* **148**: 317-324.
2. Cohen. S. N., A. C. Y. Chang, and L. Hsu (1972), Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**: 2110-2115.
3. Folkard, M., K. M. Prise, B. Vojnovic, S. Davies, M. J. Roper, and B. D. Michael (1993), Measurement of DNA damage by electrons with energies between 25 and 4000 eV, *Int. J. Radiat. Biol.*, **64**: 651-658.
4. Frankenberg, D., D. T. Goodhead, M. Frankenberg-Schwager, R. Harbich, D. A. Bance, and R. E. Wilkinson (1986), Effectiveness of 1.5 KeV aluminium K and 0.3 KeV carbon K characteristic X-rays at inducing DNA double-strand breaks in yeast cells. *Int. J. Radiat. Biol.* **50**: 727-741.
5. Friedberg, E. C., G. C. Walker, W. Siede (1995), DNA repair and mutagenesis, p. 1. ASM Press, USA.
6. Hieda, K. (1994), DNA damage induced by vacuum and soft X-ray photons from synchrotron radiation. *Int. J. Radiat. Biol.* **66**: 561-567.
7. Hieda, K., T. Hirono, A. Azami, M. Suzuki, Y. Furusawa, H. Maezawa, N. Usami, A. Yokoyama, and K. Kobayashi (1996), Single- and double-strand breaks in pBR322 plasmid DNA by monochromatic X-rays on and off the K-absorption peak of phosphorus. *Int. J. Radiat. Biol.* **70**: 437-445.
8. Ishii, Y. and S. Kondo (1975), Comparative analysis of deletion and base-change mutabilities of *Escherichia coli* B strains differing in DNA repair capacity (wild-type, *uvrA*-, *polA*-, *recA*-) by various mutagens. *Mutat. Res.* **27**: 27-44.
9. Jin, T., D. E. Watt, and K. Kobayashi (1994), Damage induced by monochromatic synchrotron x-rays at the resonance absorption energy of intracellular phosphorous in yeast cells. *Appl. Radiat. Isot.* **45**: 767-772.
10. Kim, D. and J. F. Roby (1995), Dextranuclease constitutive mutants of *Leuconostoc mesenteroides* B-(299). *Enzyme Microbial Technol.* **17**: 1050-1056.
11. Kim, D., D. W. Kim, J. H. Lee, K. H. Park, L. M. Day, and D. F. Day (1997), Development of constitutive dextranuclease hyper-producing mutants of *Leuconostoc mesenteroides* using the synchrotron radiation in the 70~1000 eV region. *Biotechnol. Techniq.* **11**: 319-321.
12. Kobayashi, K., K. Hieda, H. Maezawa, Y. Furusawa, M. Suzuki, and T. Ito (1991), Effects of k-shell x-rays absorption of intracellular phosphorus on yeast cells. *Int. J. Radiat. Biol.* **59**: 643-650.
13. LaMarr, W. A., K. M. Sandman, J. N. Reeve, and P. C. Dedon (1997), Differential effects of DNA supercoiling on radical-mediated DNA strand breaks, *Chem. Res. Toxicol.*, **10**: 1118-1122.
14. Lehninger, A., D. L. Nelson, and M. M. Cox (1993), *Principles of biochemistry*. pp. 946-948. Worth Pub.
15. Menke, H., W. Kohnlein, S. Joksch, and A. Halpern (1991), Strand breaks in plasmid DNA, natural and brominated, by low-energy X-rays, *Int. J. Radiat. Biol.* **59**: 85-96.
16. Michael, B. D., K. M. Prise, M. Folkard, B. Vojnovic, B. Brocklehurst, I. H. Munro, and A. Hopkirk (1994), Action spectra for single- and double- strand break induction in plasmid DNA: studies using synchrotron radiation, *Int. J. Radiat. Biol.*, **66**: 569-572.
17. Povirk, L. F., W. Wubker, W. Kohnlein, and F. Hutchinson (1977), DNA double-strand breaks and alkali-labile bonds produced by bleomycin, *Nucleic Acids Res.*, **4**: 3571-3580.
18. Prise, K. M., M. Folkard, S. Davies, and B. D. Michael (1989) Measurement of DNA damage and cell killing in chinese hamster V79 cells irradiated with aluminum characteristic ultrasoft X rays. *Radiat. Res.* **117**: 489-499.
19. Welner, J. and G. Homeck (1995) Effects of vacuum UV and UVC radiation on dry *E. coli* plasmid pUC19-I. Inactivation, *lacZ* mutation induction and strand breaks. *J. Photochem. photobiol. B: Biol.* **28**: 77-85.