



저작자표시-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이 학 석 사 학 위 논 문

영양요구성 재조합 돌연변이
Edwardsiella tarda 제작 및
생물모니터로서의 이용가능성 평가



2012년 02월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 명 의 학 과

강 병 철

이 학 석 사 학 위 논 문

영양요구성 재조합 돌연변이
Edwardsiella tarda 제작 및
생물모니터로서의 이용가능성 평가

지도교수 김 기 홍

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함

2012년 02월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 명 의 학 과

강 병 철

강병철의 이학석사 학위논문을 인준함

2012년 02월 26일



주 심 이학박사 강 주 찬 印

위 원 이학박사 김 기 홍 印

위 원 약학박사 정 준 기 印

목 차

Abstract

I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	3
1. 실험 균주 및 배양 조건	3
2. Green Fluorescence Protein 발현 Δalr <i>Edwardsiella tarda</i> 의 제작	3
2-1. Allelic exchange mutagenesis 유도용 vector의 제작	4
2-2. Total DNA의 분리	6
2-3. PCR	6
2-4. Gel extraction	7
2-5. cloning	7
2-6. Plasmid의 분리	8
2-7. Restriction enzyme의 처리와 ligation	9
2-8. Conjugation을 통한 pCVD442-asdf-b vector의 삽입과 selection	9
3. Δasd <i>Edwardsiella tarda</i> 의 제작	10

4. Antibiotic resistance gene-free and heterologous gene-expressing vector 의 제작	12
4-1. Restriction enzyme 의 처리와 ligation	14
4-2. Antibiotic resistance gene의 제거 및 RFP 유전자의 발현	14
5. Red fluorescent protein 발현의 측정	15
5-1. 자극물질의 투여	15
5-2. 염도에 변화에 따른 발현량의 측정	16
5-3. 측정	18
III. 결 과	19
1. Allelic exchange를 이용한 alanine racemase gene knock-out - GFP expressing <i>Edwardsiella tarda</i> 의 제작	19
2. allelic exchange를 이용한 aspartate semialdehyde dehydrogenase gene knock-out <i>Edwardsiella tarda</i> 의 제작	23
3. pG02- <i>asd</i> -HCE-RFP/ Δ <i>asd</i> <i>Edwardsiella tarda</i> 균주의 제작	23
3-1. 항생물질 농도로 인한 성장률 변화에 따른 RFP발현 변화량의 추이	25
3-2. 중금속 농도로 인한 성장률 변화에 따른 RFP발현 변화량의 추이	27
3-3. Salinity의 변화에 의한 항생물질의 영향 확인	29
3-4. Salinity의 변화에 의한 zinc의 영향 확인	32

IV. 고찰	35
V. 요약	38
VI. 감사의 글	39
VII. 참고문헌	40



Construction of recombinant auxotrophic *Edwardsiella tarda* mutants and evaluation of their usage as a biomonitor

Byoungcheol Kang

Department of Fish pathology, Graduate School,
Pukyong National University

Abstract

In the present study, we have generated recombinant auxotrophic *Edwardsiella tarda* mutants expressing green or red fluorescent protein (GFP or RFP), and evaluated their possible availability as a biomonitor. At first recombinant auxotrophic *E. tarda* mutant expressing GFP was rescued by the allelic exchange method, in which the chromosomal alanine racemase gene (*alr*) that plays essential roles in bacterial cell wall biosynthesis was replaced with an expression cassette harboring a high constitutive promoter (EtPR)-driven GFP gene. However, this *E. tarda* mutant was not sensitive to monitor concentration-dependent toxicity of certain molecules, because of the presence of only one copy of the GFP gene, which might lead to the decrease of sensitivity. Furthermore, to maintain the *alr* knock-out *E. tarda* mutant, D-alanine should be supplemented in the growth medium. To complement these shortcomings, we have conducted additional experiments in that the chromosome-based GFP expression system was replaced with plasmid-based RFP expression system, and newly generated the aspartate semialdehyde dehydrogenase gene (*asd*) knock-out auxotrophic *E. tarda* mutant. Additionally, a newly constructed *asd* expression cassette was inserted into the RFP expressing plasmids, which allow the plasmids can be maintained in the *asd* knock-out *E. tarda* without use of antibiotic-resistant genes and the mutant *E.*

tarda can grow without supplementation of a certain nutrient. By using this recombinant *E. tarda* system, we observed different levels of RFP expression in response to different concentrations of ampicillin or ZnSO₄ in an extensive salinity environment, suggesting that the present *asd* knock-out *E. tarda* expressing RFP might has a potential to be used as a marine biomonitor.



I. 서론

Edwardsiellosis 를 야기하는 *Edwardsiella tarda* 는 장내세균과에 속하는 Gram 음성 단간균으로써 균체 표면에 여러 개의 편모가 존재하는 주모성 세균이다. 이는 전 세계적으로 널리 양식되고 있는 담수어와 해수어의 주요 양식어종에 감염되어 피해를 입히고 있다.(Thune et al., 1993; Plumb, 1999) *E.tarda*는 항생제 종류에 대한 저항성 범위가 넓고 (Waltman and shots, 1986; Aoki and Takahashi, 1987; Aoki et al., 1989) 다양한 O-serotype 의 존재로 인해 (Tamura et al., 1988) 항생제로 치료하거나 vaccine 을 개발함에 있어 많은 어려움이 있다.

최근 본 연구실에서는 allelic exchange를 이용한 homologous recombination을 통해 특정 target gene이 knock-out 되었거나 혹은 다른 유전자로 치환된 여러 종류의 *E. tarda* mutants를 제작하였다. 이러한 돌연변이 균주는 생존과 사멸을 영양분의 공급 여하에 의해 완벽히 통제할 수 있기 때문에 그 자체만으로도 안전한 백신으로서의 가능성을 지니고 있으며 (Choi and Kim, 2011), 다른 병원체 항원을 발현시키거나 혹은 DNA vaccine의 전달도구로 사용할 수 있는 등 2종 이상의 병원체에 대한 복합백신으로 응용할 수 있는 장점이 있다.

본 연구에서는 세균의 영양요구성 필수유전자인 aspartate semialdehyde dehydrogenase gene (*asd*) 과 alaneine racemase gene (*alr*) 을 각각 knock-out시켜 각각의 영양 요구성 물질을 임의로 투여해야만 균이 생존 할 수 있도록 하였다. 또한 본 실험에서는 돌연변이 균주를 제작함에 있어, 간단히 형광강도 측정만을 통해 환경의 독성을 측정할 수 있는 biomonitor로써도 활용할 수 있도록 knock-out되는 유전자의 위치에 형광 단백질을 발현시킬 수 있는 유전자 cassette를 삽입하거나 혹은 형광을 발현하는 벡터를 이용하여 균체를 형광으로 표지할 수 있도록 하였다.

현재 생물을 이용한 독성평가의 대표적인 예로는 어류와 같은 척추동물과 *Daphina*

*manna*와 같은 무척추 수생생물들을 해당 독성물질에 일정시간 이상 노출시킨 후 그 운동 상태나 사멸정도를 파악하거나, *Vibrio fisheri*의 발광저해, *E. coli*나 *Bacillus*균의 생합성 저해등과 같은 미생물 시험법들이 있다 (Kelly, Lajoie et al., 1999). 물고기나 무척추 수생생물을 이용한 독성측정방법은 대상 개체들을 균일한 활성을 유지하도록 배양하는 것이 번거롭고 개체수의 한계로 인한 시험결과의 재현성이 상대적으로 떨어지는 단점이 있다 (Mowat, 1976; Ribo et al., 1987). 그러나 발광 미생물이나 세포내 효소를 이용한 급성독성측정방법은 시험과정의 간편하고 비용이 절감되며, 많은 개체를 대상으로 평가하므로 재현성이 높은 결과를 얻을 수 있다는 장점이 있다.

MicroTox와 LumisTox법은 환경오염물질이나 유해물질의 독성검출을 위해 개발된 것으로 LumisTox법은 MicroTox법과 유사한 방법으로 해양발광세균인 *Vibrio fisheri*를 독성물질에 노출하여 그 발광량의 감소를 측정하는 방법이다.(Brohon and Gorudon et al., 2000). 이 방법은 저온이나 고염농도 조건의 변화가 발생하였을 때 독성물질에 대한 검출 민감도가 감소하는 등의 몇 가지 단점이 존재한다. 이러한 한계를 극복하기 위하여 재조합 발광대장균을 바이오센서로 사용하는 방법이 연구되고 있다. 그러나 선행 연구된 대부분의 재조합 대장균은 lux AB를 발광유전자로 사용하였고 이것이 재조합된 대장균은 n-decanal이라는 고가의 기질이 발광반응에 필요하다 (Lampinen et al., 1990; Paton et al., 1995). 이러한 단점은 기질투여로 인한 단계의 복잡성을 증가시키고 기질구입에 따른 비용을 증가시키게 된다 (Preston et al., 2000; Geiselhart et al., 1992).

게다가 재조합 해수 세균을 대상으로 한 연구는 많이 이루어져 있지 않은 상태이기 때문에 높은 염도나 낮은 온도와 같은 다양한 환경에서의 미생물을 이용한 측정법이 필요한 상황이다. 이에 본 연구에서는 해양에 상재하면서 동시에 어류에 병원체로 작용하는 세균인 *E. tarda* 를 대상으로 형광발현 재조합 세균을 제작 후 생물모니터로서의 활용가능성을 분석하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 균주 및 배양 조건

실험에 사용된 균은 Luria broth(LB; Difco)를 사용하여 배양되었고 형질 전환된 *E.coli* DH5 α 는 50 ug/ml ampicillin(Sigma)이 포함된 LB를 사용하여 37°C에서 배양하였다. *E. tarda* NH1은 양식장에서 채집된 빈사상태의 넙치에게서 분리, 동정되었고, 1.5%의 NaCl이 존재하는 TSB (Difco) 배지에서 배양되었다. 실험에 사용된 Δalr *E. tarda*는 D-alanine (Sigma) 50 ug/ml이, Δasd *E. tarda*는 Diaminopimelic acid (DPA; Sigma) 50 ug/ml과 1.5%의 Agarose가 존재하는 평판배지에서 배양하였다.

2. Green Fluorescence Protein 발현 Δalr *E.tarda*의 제작

*Alr*유전자가 knock-out되고 GFP를 발현하는 *E.tarda*는 allelic exchange mutagenesis에 의해 제작되었다. 이는 ampicillin 내성 유전자와 SacB gene을 포함하는 pCVD442 vector에 의해 제작되었으며, 이 pCVD442 vector는 sucrose의 존재 하와 같은 특이적인 조건에서 세포의 사멸을 야기시키는 suicide vector이다. 이에 고 발현되는 GFP gene cassette를 삽입하였으며, 해당 cassette에 사용된 promoter는 *E. tarda*의 항시 고발현 promoter인 EtPR C28-1 promoter를

사용하였다. 이에 transcription enhancer Shine-Dalgarno sequence와 GFP ORF를 ligation함으로써 항상 고 발현되는 GFP cassette를 제작하였다.

2-1. Allelic exchange mutagenesis 유도용 vector의 제작

E.tarda NH1에서 Allelic exchange mutagenesis를 유도하기 위하여 suicide용 pCVD442 vector construction을 실시하였다. 각 유전자에 대한 primer는 GenBank에 등록되어 있는 *E. tarda* (NC_013508)의 sequence를 이용하여 주문, 합성하였고, 이를 *E. tarda*의 분리된 DNA를 template로 하여 PCR을 실시하였다. 본 실험에 사용된 primer는 표 1에 나타내었다. *alr* 유전자의 N-terminal 시작 부분 바로 앞의 sequence와 C-terminal 끝 부분을 포함한 동일한 sequence를 선정하였으며, 각각 restriction enzyme site와 함께 325bp와 312bp를 선정하였다. 이를 각각 *alrf-Fo-SacI*, *alrf-Re-XhoI*과 *alrb-Fo-NsiI*, *alrb-Re-XbaI*으로 cloning하였다.

Table 1. Oligonucleotides used in this study.

Primers	Sequence (5' -3')
alr f-Fo-Sac I	<u>GAGCTC</u> GACCTTTAACGGTCAGTGGTCG
alr f-Re-Xho I	<u>CTCGAG</u> GTAGGCGTTGGCCTTCACCACG
alr b-Fo-Nsi I	<u>ATGCAT</u> GATACCCGTCTCGGGGTG
alr b-Re-Xba I	<u>TCTAGA</u> CTACGCCTCTTCGCCGATATA
TE+SD cd	GATCTTAACTTTAAGAGGAGGTATA
TE+SD re	CTAGTATACCTCCTCTTAAAGTTAA
EtPR-Fo	<u>GACGTC</u> GGGTAATTGCGCTGC
EtPR-Re	<u>CCATGG</u> TGGCTATGACCTCGCAA
GFP Fo	<u>ACTAGT</u> ATGAAAGGAGAAGAAGACTTTTCAC
GFP Re	<u>CCGCGG</u> TTATTTGTAGAGCTTATCCATGCCAT

(Underlined nucleotides indicate restriction enzyme sites)



2-2. Total DNA 의 분리

Total DNA는 *E.tarda* NH1균주를 LB배지를 이용, 27℃에서 12시간 배양한 배양액을 집균 한 뒤 이를 LaboPass™ Blood Mini Kit (COSMO GENETECH)를 사용하여 다음과 같은 방법으로 분리하였다. 집균된 pellet에 PBS 200 ul를 넣어 재부유 시킨 후 proteinase K solution을 첨가하였다. 이후 buffer BL을 200 ul 넣고 56℃에서 10분간 반응시킨 후 absolute ethanol을 200 ul 첨가하였다. 이 혼합액을 spin column에 옮겨 담아 8,000 rpm에서 1분간 원심분리하였다. Column을 새로운 collection tube에 옮겨 담은 후, buffer BW를 700 ul첨가하여 8,000 rpm에서 1분간 원심분리하였다. 다시금 새로운 collection tube에 column을 옮겨 담고 buffer NW를 500 ul를 첨가한 뒤 8,000 rpm에 1분간 원심분리를 실시하고, 이후 collection tube에 모인 여과액을 제거해 주고 빈 상태의 column을 12,000 rpm에서 2분간 원심분리 하여 주었다. 마지막으로 이 빈 column을 새로운 eppendorf tube에 옮겨 buffer AE 50 ul첨가하여 2분간 실온에서 반응시키고 2분간 12,000 rpm으로 원심분리 해 주었다. 분리된 total DNA는 0.7% agarose gel상에서 0.5X TAE buffer를 완충용액으로 하여 전기영동 한 후 ethidium bromide에서 염색하여 UV상에서 DNA band를 확인하였다.

2-3. PCR

분리된 DNA를 template로 하여 선정된 alrf340 sequence와 alrb300 sequence를 증폭하였다. 각각의 유전자에 제한효소 site를 첨가하여 primer를 제작하였고, 이를 *E. tarda*의 분리된 DNA를 template로 하여 PCR을 실시하였다. Premix (Genetbio)를 이용하였으며, 조건은 4분간의 95℃ pre-denaturation과정과, 95℃의 denaturation 30초, 60℃의 annealing 30초, 72℃의 extension 30초의 반응의 30cycles과 post-extension으로 72℃에서 7분으로 각각의 유전자에 대하여 동일하게 설정하였다.

2-4. Gel extraction

PCR산물을 0.7% agarose gel상에 전기영동 한 후 확인된 band를 잘라내어 eppendorf tube에 옮겨 담은 후 LaboPass™ Gel extraction Kit를 이용하여 다음과 같은 과정으로 정제하였다. 잘라낸 band가 담긴 eppendorf tube에 잘린 agarose gel의 무게에 약 3배에 해당하는(600 ul) GB buffer를 첨가한다. 이를 56℃에서 약 10분정도 반응시켜 agarose gel이 완전히 녹게 하였다. Gel이 완전히 다 녹으면 그 mixture에 앞서 측정된 agarose gel의 무게만큼(200 ul)의 isopropanol을 첨가하였다. 이를 pipetting하여 잘 섞어준 후 그 mixture를 kit에 동봉되어있는 spin column에 옮겨담은 뒤 12,000 rpm에서 1분간 원심 분리를 하고, Column을 새로운 collection tube에 옮겨 담은 후 column에 NW buffer 700 ul를 첨가한 후 12,000 rpm에서 1분간 원심 분리를 하였다. 이후 여과된 액을 제거한 뒤 column만이 존재한 상태에서 12,000 rpm에서 2분간 원심 분리를 하였고, 마지막으로 이 빈 column을 새로운 eppendorf tube에 옮겨 EB buffer를 20 ul첨가하여 2분간 실온에서 반응시키고 2분간 12,000 rpm으로 원심분리 해 주었다. 그리고 cloning을 하기 위해 정제한 DNA는 사용 전까지 -20℃에서 보관하였다.

2-5. cloning

정제한 DNA는 pGEM® T-easy vector system Kit (Invitrogen)를 사용하여 cloning하였다. 우선 정제한 DNA 4 ul를 새로운 eppendorf tube에 옮긴 후, 2X buffer 5 ul, T-easy vector 0.5 ul, T₄ ligase를 첨가해 준 후 이를 잘 pipetting하여 섞어주고, spin down한 뒤 25℃에서 1시간동안 반응시켰다. 그 뒤에 transformation과정으로 앞서 제작한 *E. coli* DH5 *α* competent cell 100 ul를 첨가하여 on ice에서 30분간 반응시키고, 42℃에서 1분 30초 동안 heat-shock을 주었다. 이후 즉시 ice로 옮겨 3분 동안 반응시키고 SOC배지 800 ul를 첨가하여 37℃에서 90분간 진탕배양하였다. 배양액은 집균하여 pellet만 X-Gal 40 ul/ml,

ampicillin 50 ug/ml, IPTG 20 ug/ml이 첨가된 LB plate에 도말하여 37℃에서 24시간 배양하였다. 이후 Blue, white colonies의 집락을 관찰하였다.

2-6. Plasmid의 분리

배양된 blue/white colonies 중에서 하나의 white colony를 취하여 ampicillin 50 ug/ml이 첨가된 LB broth배지에 접종한 뒤 37℃에서 24시간동안 진탕 배양하였다. 이후 배양액을 집균하여 LaboPass™ Plasmid DNA Purification Kit (COSMO GENETECH)를 사용하여 다음과 같은 과정으로 Plasmid DNA를 분리하였다. 먼저 상층액을 제거한 집균된 pellet에 Rnase A가 함유된 S1 buffer 250 ul를 첨가하여 완전히 현탁시켰다. 그 후, 이에 S2 buffer 250 ul를 첨가하여 4회정도 inverting하여 혼합한 뒤 즉시 S3 buffer 350ul를 첨가하여 4회 정도 inverting하였다. 이 혼합액을 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리하였다. 원심 분리 결과 흰색의 침전물이 생성되는데, 이를 제외한 상층액을 동봉되어있는 spin column에 옮겨 담아 한번 더 12,000rpm에서 1분간 원심분리를 실시하였다. 이 후, 여과액은 제거하고 Column은 새로운 collection tube에 옮겨, AW buffer 700 ul를 column에 첨가해준 후 12,000 rpm에 1분간 원심분리 한 뒤 같은 방법으로 PW buffer 700 ul를 첨가하고 1분간 12,000 rpm에서 원심분리 하였다.

이후 여과된 액을 제거한 뒤 column만이 존재한 상태에서 12,000 rpm에서 2분간 원심 분리를 하였고, 마지막으로 이 빈 column을 새로운 eppendorf tube에 옮겨 EB buffer를 50 ul첨가하여 2분간 실온에서 반응시키고 2분간 12,000rpm으로 원심분리 해 주었다. 분리된 plasmid DNA는 염기서열을 분석하고 restriction enzyme을 처리하는 데 사용하였다.

2-7. Restriction enzyme의 처리와 ligation

분리한 plasmid DNA를 각각의 site에 맞는 제한효소로 digestion하였다. 먼저 backbone으로 선택한 plasmid vector인 pUC18에 해당 유전자들을 ligation할 수 있는 multi cloning site (SacI-XhoI-AatII-SpeI-SacII-NsiI-XbaI)를 삽입하였고, 이렇게 만들어진 vector를 pUC18 MCS라 명명하였다. 이에 digestion된 *alr*와 *alrB* gene을 ligase(Elpis biotech)를 이용하여 25℃에서 1시간 이상 ligation하여 pUC18 MCS에서 alanine racemase gene 중 584 bp가 탈락된 plasmid를 완성하였다. 완성된 vector의 *alr*와 *alrB*의 사이에 앞서 cloning한 EtPR TESD GFP cassette를 ligation하여 pUC18-*alr*-EtPR-GFP-*alrB* vector를 제작하였고, 이를 pUC18-*alr*-GFP라 명명하였다. 완성된 plasmid에서부터 SacI-XbaI처리를 통하여 *alr*-GFP gene을 digestion한 뒤 이를 다시 pCVD442 vector에 ligation하였다. 최종 완성된 pCVD442-*alr*-GFP vector는 ampicillin이 포함된 배지에서 SM10 λ pir 균주에 transformation되어 선별되었고, 이를 다시 plasmid 분리를 통하여 농축되어 *E. coli* X7213균주에 transformation, ampicillin과 D-alanine이 존재하는 LB agarose plate에서 분리, 배양 되었다.

2-8. Conjugation을 통한 pCVD442-*alr*-GFP vector의 삽입과 selection

완성된 pCVD442-*alr*-GFP vector를 대상 균주인 *E.tarda* NH1에 삽입하기 위하여 배양된 pCVD442-*alr*-GFP vector를 지니고 있는 X7213균주와 *E.tarda* NH1 균주를 각각 단일 배양하였다. 동량의 균수를 측정하여 각각을 집균 한 뒤 원심 분리를 이용, LB broth배지로 2회 세척해주었다. 이후, 각각을 현탁하여 ampicillin이 포함된 LB broth배지에 세척된 두 균을 동시에 동량을 접종하였다. 이후 약 12시간을 27℃에 배양하였고, 이를 ampicillin이 포함된 LB agarose plate에 도말하여 24시간을 27℃에서 배양하였다.

2차 selection을 위하여 첫 번째 selection이 완료된 균주를 10% (w/v) sucrose가 포함된 LB broth배지에 진탕배양하였다. 이 때, pCVD442에 포함된 SacB gene이 작동하며 이를 보유하고 있는 숙주를 파괴하는데, 이를 막기 위하여 SacB가 포함된 부분의 gene을 제거하는 돌연변이 기작인 Allelic exchange mutagenesis가 일어난다. 이 때에 살아남은 균주는 원하는 방향으로 mutation이 완료된 mutant균주와 wild type으로 돌아간 균주로 나뉘는데, 이를 LB plate, ALB plate, D-alanine이 첨가된 LB plate에 각각 배양해 봄으로써 mutant 균주를 선별할 수 있다.

3. Δasd *E.tarda*의 제작

Δasd *E.tarda*는 GFP발현 Δalr *E.tarda*의 단점을 보완하기 위하여 새롭게 제작되었으며, 이 역시 앞서 제작한 GFP발현 Δalr *E.tarda*의 제작법과 동일한 allelic exchange mutagenesis에 의해 제작되었다. 이에 사용된 primer는 표2에 나타내었다.

Aspartate semialdehyde dehydrogenase gene의 N-terminal과 C-terminal 끝의 일부를 gene cloning하였으며, restriction enzyme을 이용하여 digestion하였다. Δalr *E.tarda*의 제작 시 사용한 pUC18-MCS vector를 backbone으로 하여 digestion하였으며, 이에 semialdehyde dehydrogenase(*asd*) gene의 앞 쪽 330bp와 뒤 쪽 312bp를 삽입하여 semialdehyde dehydrogenase gene의 탈락용 plasmid를 완성하였다. 이를 pUC18- Δasd 이라고 명명하였다. 완성된 pUC18- Δasd vector는 pCVD442 vector에 ligation된 후 *E. coli* X7213에 transformation되었고, *E.tarda*와의 conjugation과정과 allelic exchange mutagenesis를 통하여 Δasd *E.tarda*가 만들어졌다. 이의 selection에는 diaminopimelic acid가 사용되었다.

Table 2. Oligonucleotides used in this study

Primers	Sequence (5' -3')
asdf Fo SacI	<u>GAGCTC</u> TCCCCTGCGGTGC
asdf Re XhoI	<u>CTCGAG</u> TGCAGGTTGAAAAAAGACCG
asdb Fo NsiI	<u>ATGCAT</u> AGGCGATTCCGATCGATGG
asdb Re XbaI	<u>TCTAGA</u> CGGCGGCGCCCCACAG

(Underlined nucleotides indicate restriction enzyme sites)



4. Antibiotic resistance gene-free and heterologous gene-expressing vector 의 제작

Δasd *E.tarda*의 지속적인 생장과 red fluorescent protein의 발현을 위한 vector를 제작하였다. 이를 위해서 G02 promoter와 *asd* gene, RFP gene을 사용하였다. *asd* gene의 낮고 지속적인 발현량을 유지시키기 위하여 G02 promoter를 선택하였고, termination sequence로 rrnBT1을 선택하였다. 해당 gene은 모두 pGEM-T easy vector를 기초로 하여 제작되었으며, 이후 Antibiotic resistance gene의 불활화 과정과 RFP 발현 유전자의 삽입이 이루어졌다.

이에 사용된 primer는 다음 표3에 나타내었다.

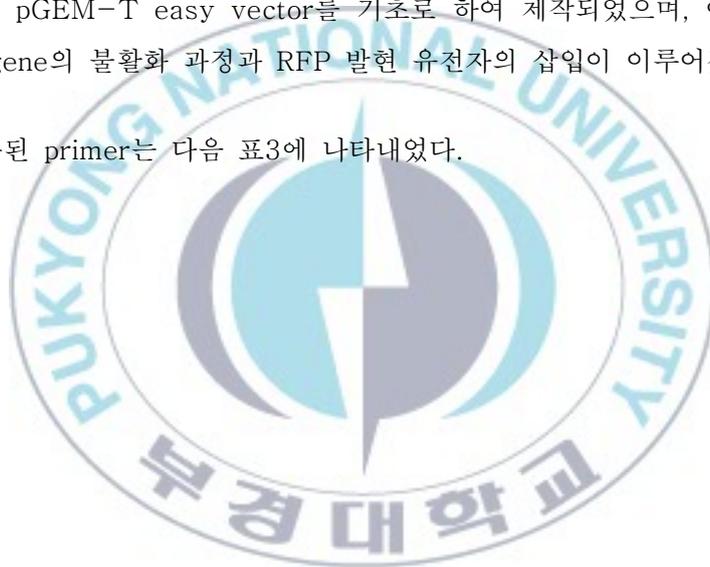


Table 3. Oligonucleotides used in this study

Primers	Sequence (5' –3')
G02 AatII Fw	<u>GACGTC</u> CGTCCGCGCCGTCGGTAAGCG
G02 SpeI Re	<u>ACTAGT</u> AGAGAAGAATGCCGGCGGGAAGATC
asd–ORF Fw	<u>ACTAGT</u> ATGAAAAACGTTGGTTTTATCGGCTGG
asd–ORF Re	<u>GAATTC</u> CTAGAGCAGCAGCCTCAGCATAACGGC
rrnBT1 SacI Fw	ATAAAACGAAAGGCCAGTCTTTCGACTGAGCC TTTCGTTTTATAGCT
rrnBT1 NsiI Re	ATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCC TTTCGTTTTATTGCA
MCS–UP	CCTCGAG GACGTCACTAGTCCGCGGATGCATT
MCS–DOWN	CTAGAATGCATCCGCGGACTAGTGACGTCCTCGAGGAG CTC
HCE AatII Fw	<u>GACGTC</u> GATCTCTCCTTCACAGATTCCCAATC
HCE SpeI Re	<u>ACTAGT</u> TATA TCTCCTTTTT CCAGAAGTGT GAA
RFP–ORF SpeI Fw	<u>ACTAGT</u> ATGGCCTCCTCCGAGAACGTCATCACCG
RFP–ORF SacI Re	<u>GAGCTC</u> CTACAGGAACAGGTGGTGGCGGCCCTCG

(Underlined nucleotides indicate restriction enzyme sites)

4-1. Restriction enzyme 의 처리와 ligation

분리한 plasmid DNA를 각각의 site에 맞는 제한효소로 digestion하였다. G02는 AatII와 SpeI, rrnBT1은 SacI과 NsiI으로, *asd* ORF는 SpeI과 EcoRI으로 각각 digestion하였다. 해당 산물들을 ligation해 줄 수 있는 vector는 pGEM T-easy vector를 사용하였다. 각각의 restriction enzyme을 처리하여 원하는 산물을 0.7% agarose gel 상에서 전기 영동한 후 UV상에서 잘라내어 gel extraction을 실시하였다. 분리된 DNA는 backbone이 되는 vector에 T4 ligase(Elpis biotech)를 이용하여 순차적으로 ligation하였으며, 이를 *Escherichia coli* DH5 α competent cell에 transformation하였다. G02 promoter와 *asd* ORF, rrnBT1이 각각 삽입된 해당 vector를 pG02-*asd*라 명명하였다.

4-2. Antibiotic resistance gene의 제거 및 RFP 유전자의 발현

pG02-*asd*에서 Antibiotic resistance gene (Amp^R)을 제거하기 위하여 제한효소 DraI과 NarI을 사용하였다. 이에 multiple cloning site (DraI-BglII-NcoI-ScaI-NsiI-NarI)의 염기서열을 포함하여 합성한 oligonucleotide를 삽입함으로써 Antibiotic resistance gene이 제거된 pG02-*asd*-MCS vector를 제작하였다. 이에 pdsRed2-1 plasmid에서 cloning한 뒤 SpeI과 SacI으로 digestion한 RFP유전자와, 이를 발현해주기 위한 HCE promoter를 AatII와 SpeI으로 digestion하여 삽입함으로써 pG02-*asd*-HCE-RFP plasmid를 제작하였다. 이의 경우 Antibiotic resistance gene이 제거되어있는 상태였기 때문에 *Escherichia coli* X7213균주를 이용하여 transformation하였고, plasmid는 knock out되어있는 *asd* gene에 의하여 selection되었다.

완성된 pG02-*asd*-HCE-RFP plasmid는 plasmid 분리를 통하여 재 추출 하였고, 이를 10% glycerol을 이용한 Δ *asd* *E.tarda* competent cell을 제작하여 이에 electro-transformation하였다. 이후 heat-shock때와 마찬가지로 SOC 배지

800ul첨가 후 90분간 27℃에서 진탕 배양한 뒤 전 균을 모아 LB agar plate배지에 도말하여 27℃에서 24시간 배양하였다.

5. Red fluorescent protein 발현의 측정

Red fluorescent protein 발현 측정은 96 well plate에서 실시하였으며, 이를 위하여 96 well plate에 LB agar배지를 100 ul씩 분주하여 제작하였다. 이후 제작이 완료된 pG02-*asd*-HCE-RFP/ Δ *asd* *E.tarda* 균주를 LB broth배지에 접종하여 27℃에서 24시간동안 진탕배양하였다. 이후 배지성분의 제거를 위하여 집균시킨 뒤 PBS용액에 washing하는 과정을 거치고, 균체의 양이 OD₆₀₀에서 1.0이 되도록 희석하였다. 희석되어 동량으로 맞춰진 균체는 미리 만들어둔 96well plate LB agar배지에 각각 10ul씩 접종하였고, 이에 대한 대조군으로써, *E. tarda* NH1을 동일한 조건으로 배양 및 처리하여 같은 양의 희석액을 배지에 접종하였다. 모든 실험군에 대한 대조군으로써는 균체가 섞이지 않은 희석액, 즉 PBS용액을 배지에 접종해 주는 것으로 비교하였다.

5-1. 자극물질의 투여

균체에 대한 성장억제 및 발현 억제를 위하여 자극물질을 투여하였다. 자극물질의 농도에 따른 균의 성장률은 RFP의 발현량과 비례하므로 이를 측정하여 성장률을 측정하였다. 자극물질로는 항생물질인 Ampicillin과 중금속인 Zinc가 사용되었으며,

이는 모두 3차 증류수를 용매로 하여 용해되어있는 상태를 이용하였다. 각각의 농도로는, 배지의 최종농도 기준 ampicillin은 30 mg/ml, zinc는 100 mM로써 각각 10배씩 단계희석하여 7단계로 나누어 투여하였다. 이에 대한 대조군으로는 3차 증류수를 투여하였다.

5-2. 염도에 변화에 따른 발현량의 측정

다양한 염도의 조건에 따른 자극물질로부터의 균체의 RFP 발현량을 확인하기 위하여 동일한 조건하에서 염도가 다른 자극물질을 투여하였다. Ampicillin과 zinc 각각 15%과 30%로 염도를 설정하였고, 다른 조건은 모두 동일하게 하였다.

최종적으로 설정된 조건은 다음 표4에 나타내었다.

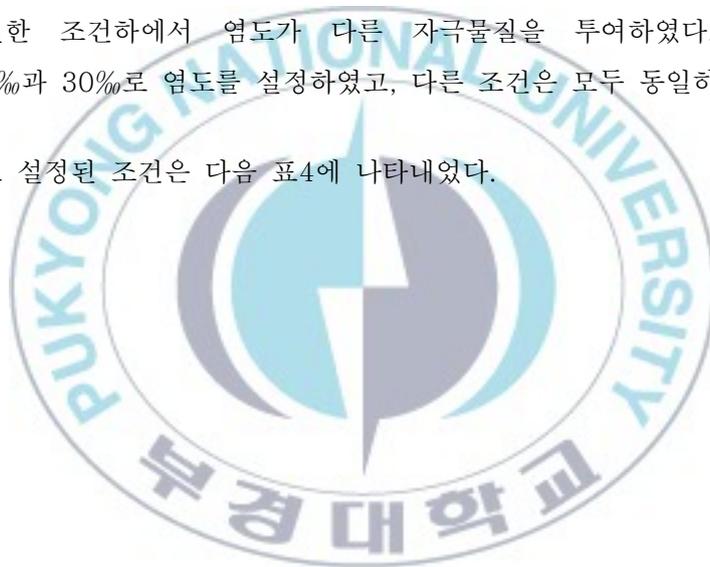


Table 4. Conditions of stimulating substance

<i>pG02-<i>asd</i>-HCE-RFP/Δ<i>asd</i> E.tarda</i>		<i>E.tarda</i> NH1	
NaCl 0‰ Amp 30mg/ml	NaCl 15‰ Amp 30mg/ml	NaCl 30‰ Amp 30mg/ml	
NaCl 0‰ Amp 3mg/ml	NaCl 15‰ Amp 3mg/ml	NaCl 30‰ Amp 3mg/ml	
NaCl 0‰ Amp 300ug/ml	NaCl 15‰ Amp 300ug/ml	NaCl 30‰ Amp 300ug/ml	
NaCl 0‰ Amp 30ug/ml	NaCl 15‰ Amp 30ug/ml	NaCl 30‰ Amp 30ug/ml	
NaCl 0‰ Amp 3ug/ml	NaCl 15‰ Amp 3ug/ml	NaCl 30‰ Amp 3ug/ml	
NaCl 0‰ Amp 300ng/ml	NaCl 15‰ Amp 300ng/ml	NaCl 30‰ Amp 300ng/ml	
NaCl 0‰ Amp 30ng/ml	NaCl 15‰ Amp 30ng/ml	NaCl 30‰ Amp 30ng/ml	
NaCl 0‰	NaCl 15‰	NaCl 30‰	

<i>pG02-<i>asd</i>-HCE-RFP/Δ<i>asd</i> E.tarda</i>		<i>E.tarda</i> NH1	
NaCl 0‰ ZnSO ₄ 100mM	NaCl 15‰ ZnSO ₄ 100mM	NaCl 30‰ ZnSO ₄ 100mM	
NaCl 0‰ ZnSO ₄ 10mM	NaCl 15‰ ZnSO ₄ 10mM	NaCl 30‰ ZnSO ₄ 10mM	
NaCl 0‰ ZnSO ₄ 1mM	NaCl 15‰ ZnSO ₄ 1mM	NaCl 30‰ ZnSO ₄ 1mM	
NaCl 0‰ ZnSO ₄ 100uM	NaCl 15‰ ZnSO ₄ 100uM	NaCl 30‰ ZnSO ₄ 100uM	
NaCl 0‰ ZnSO ₄ 10uM	NaCl 15‰ ZnSO ₄ 10uM	NaCl 30‰ ZnSO ₄ 10uM	
NaCl 0‰ ZnSO ₄ 1uM	NaCl 15‰ ZnSO ₄ 1uM	NaCl 30‰ ZnSO ₄ 1uM	
NaCl 0‰ ZnSO ₄ 100nM	NaCl 15‰ ZnSO ₄ 100nM	NaCl 30‰ ZnSO ₄ 100nM	
NaCl 0‰	NaCl 15‰	NaCl 30‰	

5-3. 측정

각각의 조건에 맞추어 접종된 균체는 27℃에서 배양되었으며, fluorescence reader (TECAN, POLARION)를 이용하여 Excitation wave length 485nm, Emission wave length 635nm에서의 그 결과값을 비교하였다.



Ⅲ. 결 과

1. Allelic exchange를 이용한 alanine racemase gene knock-out-GFP expressing *E.tarda*의 제작

E. tarda 를 대상으로 Alanine racemase (*alr*) 유전자를 knock-out 시키고 그 자리에 Green fluorescent protein (GFP)를 발현하는 cassette를 삽입한 GEM *E. tarda*를 제작하였다. Alanine racemase는 L-alanine을 D-alanine으로 전환시키는 효소로서, D-alanine은 대부분의 세균에서 세포벽 성분인 peptidoglycan의 생합성에 필수적인 역할을 한다. 이 때문에 alanine racemase 유전자가 knock-out된 auxotrophic mutant를 배양 시 D-alanine을 첨가해주지 않으면 균체는 수회 분열 후 세포벽을 합성하지 못하여 사멸하게 된다. *E. tarda* alanine racemase gene knock-out은 *Escherichia coli* χ 7213 (*Δasd*) 및 pCVD442 suicide vector를 이용하여 two step allelic exchange 과정을 통해서 수행하였다. 삽입한 GFP는 *E. tarda*에서부터 찾아낸 강력한 constitutive promoter에 의해 발현되도록 하였다 (Fig. 1).

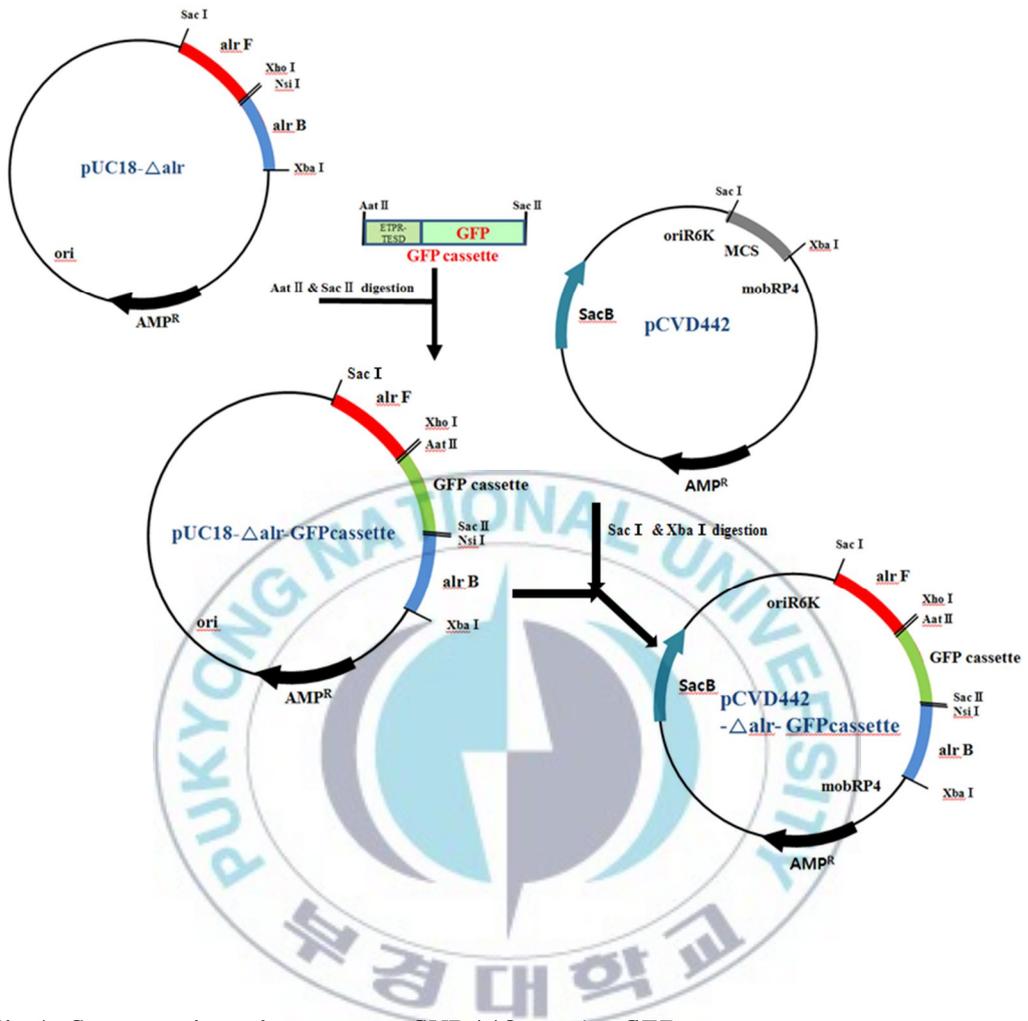


Fig.1. Construction of a vector, pCVD442- Δ alr-GFP

pCVD442 suicide vector의 삽입과 이에 sucrose를 첨가함으로써 두 번의 cross-over 과정을 통하여 alanine racemase gene이 knock-out되고 GFP발현 cassette가 삽입된 *E. tarda* mutant를 제작할 수 있었다.

제작된 auxotrophic mutant *E. tarda*를 D-alanine이 없는 배지에서 culture한 결과 배양이 불가능 한 것을 확인할 수 있었으며, 이에 반해 D-alanine이 첨가된 배지에서는 이상 없이 배양되었으며 해당 집락에 GFP가 발현되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 2).



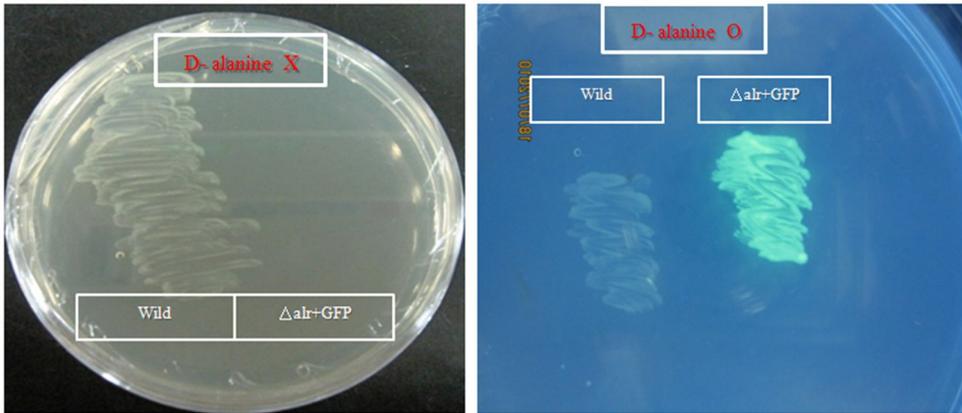


Fig. 2. Confirmation of GFP expression in wild type and mutant type *E. tarda*.

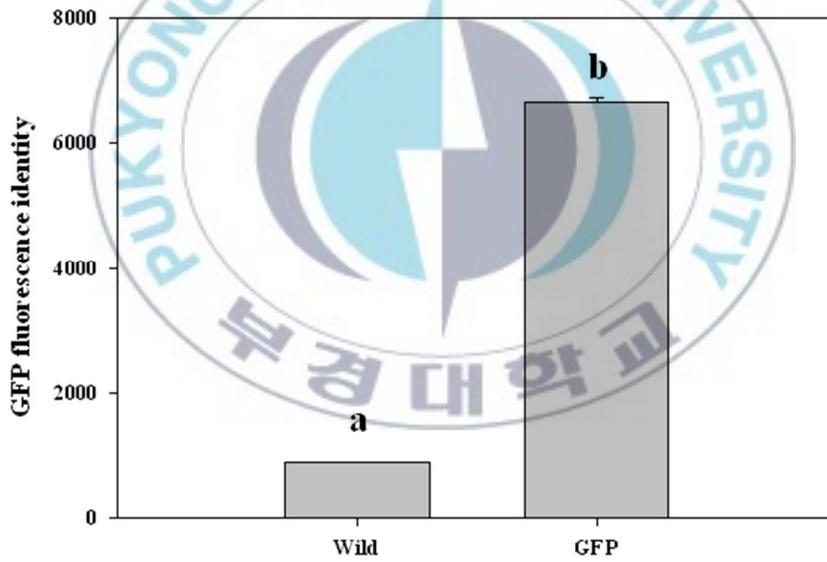


Fig. 3. Δalr -GFP *E. tarda* fluorescence assay.

그러나 해당 GFP의 발현량을 측정한 결과 wild type의 균주에 비하여 그 차이가 그리 크지 않은 것을 확인 할 수 있었다 (Fig. 3).

2. Allelic exchange를 이용한 aspartate semialdehyde dehydrogenase gene knock-out *E.tarda*의 제작

*E.tarda*를 대상으로 aspartate semialdehyde dehydrogenase(*asd*) gene을 knock-out 시킨 GEM *E. tarda*를 제작하였다. *asd* gene은 세균의 생장에 필수적인 lysine과 threonine, 그리고 methionine을 합성하는데 필수적인 요소인 diaminopimelic acid를 생산하는 유전자로써, 이것이 knock-out된 auxotrophic mutant는 DPA를 지속적으로 공급해 주지 않으면 세균의 생존 및 분열에 영향을 받게 되고 최종적으로는 사멸하게 된다.

*E. tarda*의 aspartate semialdehyde dehydrogenase gene knock-out은 *Escherichia coli* χ 7213 (Δ *asd*) 및 pCVD442 suicide vector를 이용하여 two step allelic exchange 과정을 통해서 수행되었으며, 이는 DPA가 존재하지 않는 배지에서 성장이 불가능 한 것을 확인 할 수 있었다. 또한 chromosome DNA를 sequencing한 결과 해당 gene의 중앙 부분이 deletion되어 있는 것을 확인 할 수 있었다.

3. pG02-*asd*-HCE-RFP/ Δ *asd* *E.tarda* 균주의 제작

GFP expressing *E.tarda*균주를 배양함에 있어 성장 억제 물질의 투여에 따른 균체의 성장 및 발현량의 변화를 보기에는 감지되는 파장에서의 LB배지의 검출 값이 GFP의 그것과의 차이가 크지 않아 문제가 발생하였다. 게다가 해당 GFP 유전자가 chromosome에 1 copy로만 존재하기 때문에 특정 물질의 농도에 따른 독성 변화를 모니터링 하기에는 reporter 단백질인 GFP의 발현량이 너무 적었고, 그로 인해 민감

도가 떨어지는 단점이 있었다. 그렇기에 이의 활용도를 높이기 위하여 GFP의 excitation peak와 emission peak가 차이가 나며 세균에서 문제 없이 발현되는 형광 발현 단백질인 Red fluorescence protein DsRed를 *E.tarda*에서 발현시켰다. 이후 해당 plasmid vector에 *asd* gene 발현 cassette를 삽입함으로써 DPA를 공급해주지 않아도 균이 사멸할 염려가 없고, 항생제를 사용하지 않고도 plasmid를 selection하며, plasmid의 필요성에 의해 균체의 분열 도중 유실되지 않도록 하였다.

이를 측정해 본 결과 wild type *E.tarda*의 RFP 발현량에 비해 형질 전환 균주가 최대 50배까지 발현량에 차이를 나타내는 것으로 보였다. 이에 균체가 성장하기 불리한 환경을 조성하여 그에 따른 형질 전환 균주의 RFP 발현 변화량의 추이를 확인하였다.



3-1. 항생물질 농도로 인한 성장률 변화에 따른 RFP발현 변화량의 추이

Ampicillin을 성장 억제용 자극물질로 하여 각 농도별 RFP발현량의 차이를 알아보았다. 실험은 해당 배지의 증발이나 오염이 없는 72시간까지 측정하였고, 3번의 반복구를 두어 각 값의 평균치를 구하여 비교하였다.

LB agarose plate 배지에서의 기본 RFP발현량을 전체 실험의 negative control로 하였으며, 각각의 측정값에서 이를 감하여 나타내었다.

형질 전환된 bacteria에 대한 대조군으로는 *E.tarda* NH1를 동일한 조건으로 접종한 상태에서 비교하였다.

자극물질이 투여 되지 않은 상태에서의 형질 전환 *E.tarda*의 경우 3일째 발현강도의 경우 최초 발현량의 5배 이상의 발현량을 나타내는 것으로 보였으나, 항생물질 농도의 점차적인 증가에 따라 순차적으로 그 발현량이 줄어들었다.

이를 *E.tarda* NH1과 비교하였을 때에는 그 차이를 더 쉽게 알 수 있었다. *E.tarda* NH1은 균의 성장에 따라 RFP의 발현값이 소폭 증가하였으나 그 차이가 경미하였고, 전체적으로 항생물질의 농도나 성장률과 시간에 따른 RFP측정값의 변동이 낮은 폭임을 확인할 수 있었다.

RFP Salinity 0%

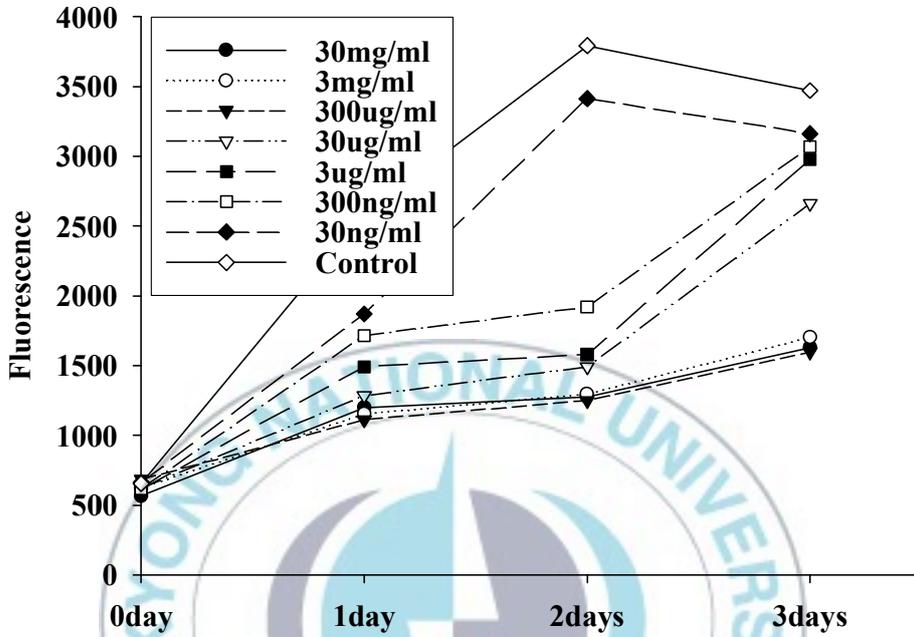


Fig. 4. RFP expression level; 3days in LB plates. Bacteria cultured in 27°C
Stimulation substance; ampicillin.

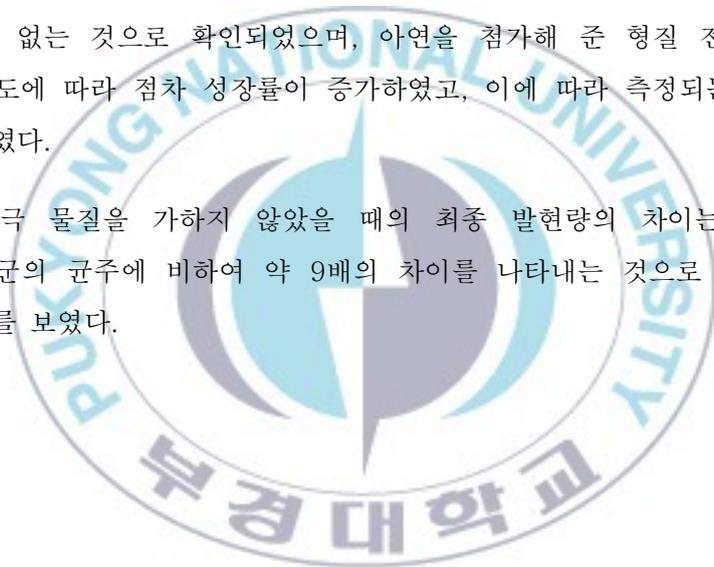
3-2. 중금속 농도로 인한 성장률 변화에 따른 RFP발현 변화량의 추이

자극물질로의 중금속을 정함에 있어 해당 금속염을 녹일 용매가 형질 전환 균주의 성장에 영향을 미치지 않는 용매여야 했다. 이에 $ZnSO_4$ 를 3차 증류수에 녹여 1M 농도로 제작한 뒤 10배씩 단계 희석하였다. 이를 0.2um 구경의 syringe filter를 이용하여 여과하여 사용하였다.

전체적인 실험의 공시험과 대조 실험은 위의 항생제 실험과 동일한 조건하에 실시하였다.

E.tarda NH1의 경우 위의 실험과 마찬가지로 균의 성장에 따른 RFP의 발현량 차이가 거의 없는 것으로 확인되었으며, 아연을 첨가해 준 형질 전환 세균은 각 중금속의 농도에 따라 점차 성장률이 증가하였고, 이에 따라 측정되는 RFP의 양도 함께 증가하였다.

아무런 자극 물질을 가하지 않았을 때의 최종 발현량의 차이는 형질 전환된 균주가 대조균의 균주에 비하여 약 9배의 차이를 나타내는 것으로 위의 실험과는 양적인 차이를 보였다.



RFP Salinity 0%

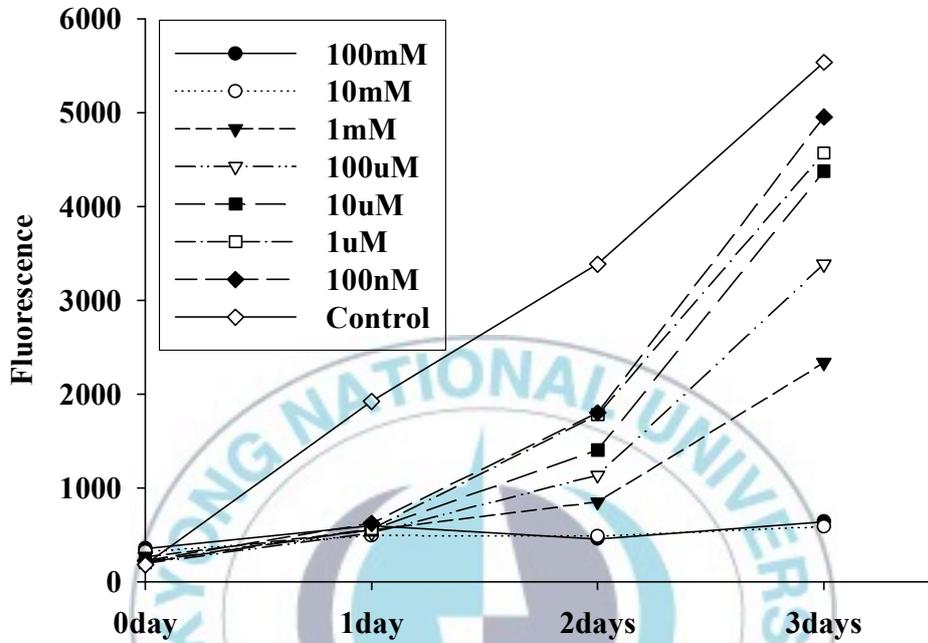


Fig. 5. RFP expression level; 3days in LB plates. Bacteria cultured in 27°C. Stimulation substance; ZnSO₄.

3-3. Salinity의 변화에 의한 항생물질의 영향 확인

자극 물질로의 Ampicillin 투여 시 동등한 조건에서 최종 자극 물질의 염도를 변화시켜 각각의 차이를 확인하였다. 15‰과 30‰의 ampicillin수용액을 제작하였으며 이를 다시 각각의 ampicillin 농도에 따라 투여하여 접종된 균체에서의 RFP발현량을 비교하였다.

실험의 대조군과 공시험의 실행은 앞의 실험과 같은 조건에서 실시되었으며, 투여하는 자극물질의 염도만 변경되었다.

염도의 증가에 따른 형질 전환 균주의 RFP발현량은 차이를 나타내지 못하였으며, 마찬가지로 항생제 농도의 감소에 따라 RFP발현량은 순차적인 증가를 나타냈다.

공시험과 대조군인 *E.tarda* NH1의 경우 다른 대조군의 실험과 동등하게 염도나 항생물질의 영향에 따른 RFP발현 변화는 없는 것으로 나타났다.



RFP Salinity 1.5%

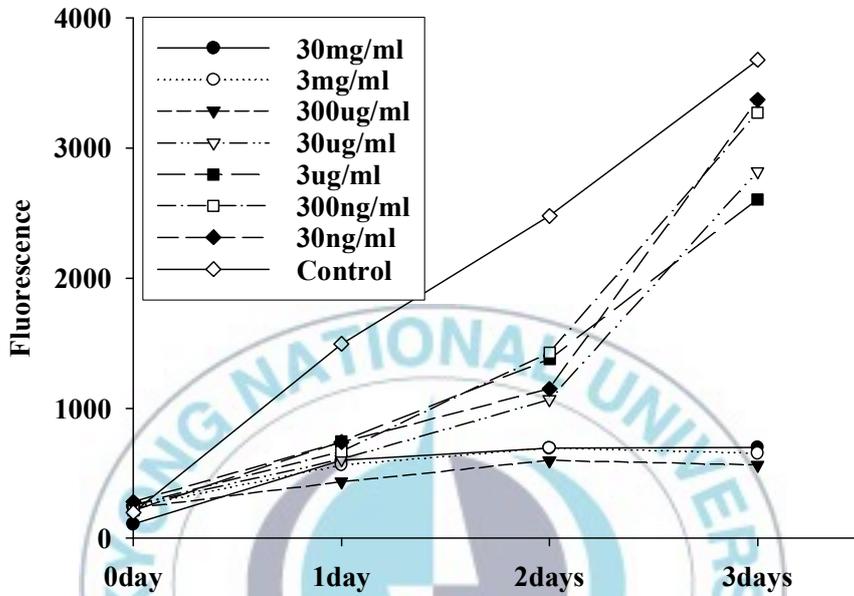


Fig. 6. RFP expression level in salinity 15%. Stimulation substance: ampicillin.

RFP Salinity 3%

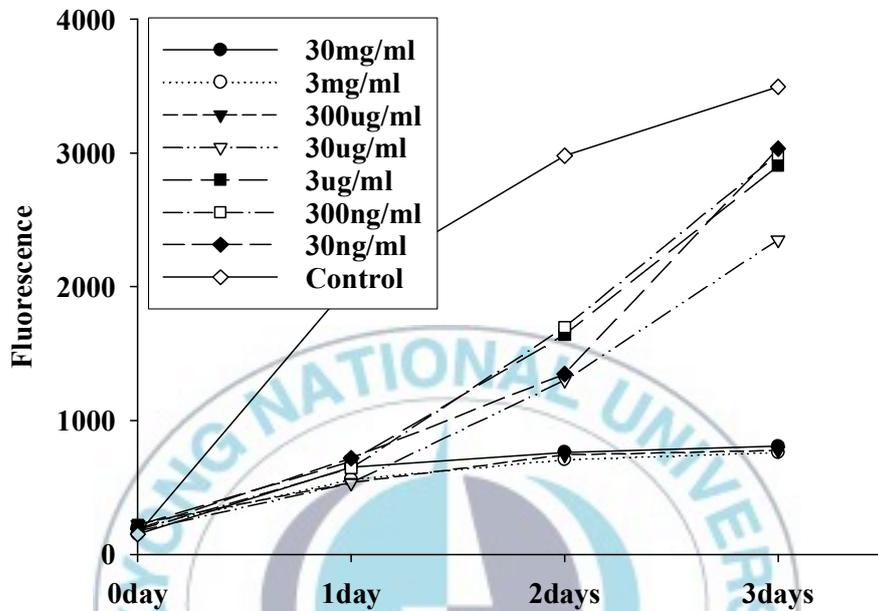


Fig. 7. RFP expression level in salinity 30‰. Stimulation substance: ampicillin

3-4. Salinity 의 변화에 의한 zinc 의 영향 확인

자극 물질로의 $ZnSO_4$ 투여 시 동등한 조건에서 최종 자극 물질의 염도를 변화시켜 각각의 차이를 확인하였다. 15%과 30%의 $ZnSO_4$ 수용액을 제작하였으며 이를 다시 각각의 $ZnSO_4$ 농도에 따라 투여하여 접종된 균체에서의 RFP발현량을 비교하였다.

실험의 대조군과 공시험의 실행은 앞의 실험과 같은 조건에서 실시되었으며, 투여하는 자극물질의 염도만 변경하였다.

염도의 증가에 따른 형질 전환 균주의 RFP발현량은 차이를 나타내지 못하였으며, 마찬가지로 중금속의 농도의 감소에 따라 RFP발현량은 순차적인 증가를 나타냈다.

공시험과 대조군인 *E.tarda* NH1의 경우 다른 대조군의 실험과 동등하게 염도나 항생물질의 영향에 따른 RFP발현 변화는 없는 것으로 나타났다.



RFP Salinity 1.5%

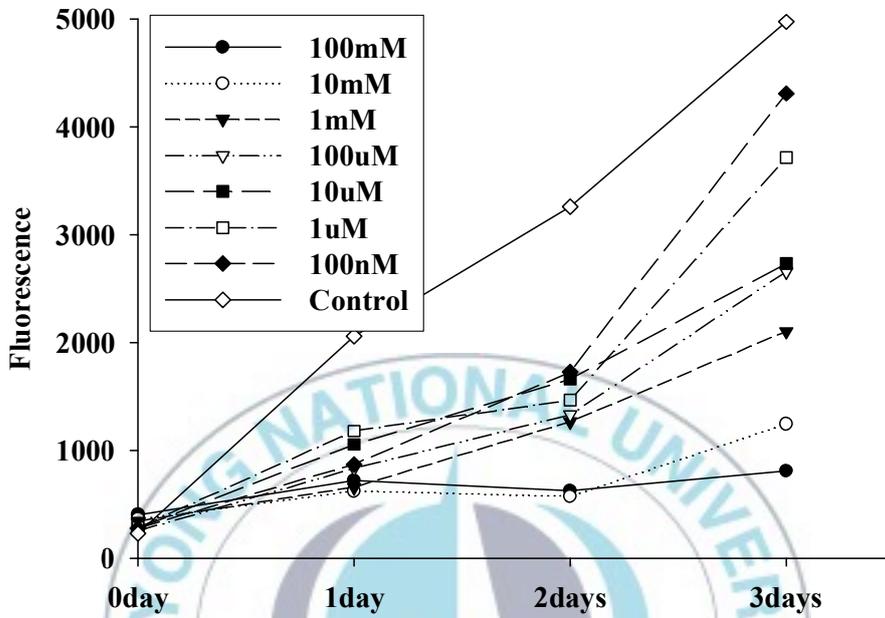


Fig. 8. RFP expression level in salinity 15%. Stimulation substance: ZnSO₄

RFP Salinity 3%

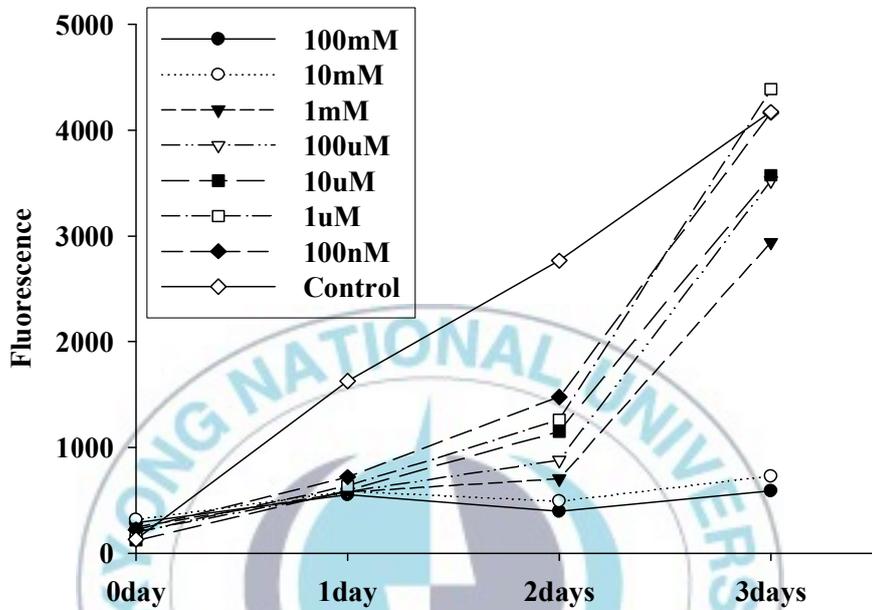


Fig. 9. RFP expression level in salinity 30%. Stimulation substance: ZnSO₄

IV. 고찰

분자생물학 기술의 발전은 여러 유전학적인 techniques를 가능하게 하였다. 그 중 live attenuated bacterial vaccines를 제작함에 있어 allelic exchange를 이용한 homologous recombination은 특정 target gene을 knock-out 시키거나 다른 유전자로 치환할 수 있는 가능성을 지니고 있다 (Geng et al., 2009)

이를 이용하여 세균의 유전자 중 생존에 필수적으로 요구되는 aspartate semialdehyde dehydrogenase (*asd*) gene이나 alanine racemase gene (*alr*)과 같은 영양 요구성 물질에 대한 유전자를 knock-out시킬 경우 해당 균주는 knock-out된 유전자에 해당하는 물질을 첨가하여 주어야만 생존할 수 있게된다. 이처럼 allelic exchange를 이용한 homologous recombination 기술은 특정 미생물의 생존에 대한 조절을 완벽히 해 낼 수 있게 한다 (Sun et al., 2010).

본 연구에서는 이와 같은 homologous recombination 을 이용하여 해양 수중 상재균인 *E.tarda* 균주를 영양요구성 돌연변이화 시키고 이에 형광 발현 단백질을 지표로 삽입하는 실험을 실시하였다.

제조합 *E.tarda* 의 제작은 Alanine racemase gene (*alr*)을 knock-out 시키고 그 자리에 항시 고발현 promoter 에 의해 발현되는 green fluorescent protein (GFP) 유전자 cassette 를 삽입하는 과정으로 이루어졌다. Alanine racemase 는 L-alanine 을 D-alanine 으로 전환시키는 효소로서, D-alanine 은 대부분의 세균에서 세포벽 성분인 peptidoglycan 의 생합성에 필수적인 역할을 한다. 이 때문에 alanine racemase 유전자가 knock-out 된 auxotrophic mutant 를 배양 시 D-alanine 을 첨가해주지 않으면 균체는 수회 분열 후 세포벽을 합성하지 못하여 사멸하게 된다.

결과적으로 본 연구에 의해 배양시 D-alanine 이 필수적이면서 동시에 GFP 를 그 세포질에 발현하는 특징을 가지는 영양 요구성 돌연변이 *E. tarda* 가 제작되었다.

그러나 GFP 를 발현하는 재조합 *E.tarda* 를 이용하여 생물모니터로서의 활용가능성을 분석한 결과 GFP 유전자가 chromosome 에 1 copy 로만 존재하기 때문에 특정 물질의 농도에 따른 독성 변화를 모니터링 하기에는 reporter 단백질인 GFP 발현량이 너무 적었고, 그로 인하여 민감도가 떨어지는 단점이 있었다. 게다가 해당 균체를 배양함에 있어 사용되는 LB agarose 배지의 색이 녹색 계열로써, GFP 의 파장을 검출하는 excitation peak 와 emission peak 와 그 값이 근사하여 측정에 대한 간섭이 있었다

이러한 단점을 보완하기 위해 2 차 실험에서는 reporter 형광단백질을 GFP 가 아닌 적색 계열의 Red fluorescent protein (RFP) DsRED 로 교체하였으며, RFP 발현 cassette 의 copy 수 문제를 해결하기 위해 해당 발현 cassette 를 plasmid 에 삽입하였다. 또한 *E.tarda* 의 chromosome 상에 있는 aspartate semialdehyde dehydrogenase(*asd*) gene 을 knock-out 시키고, *asd* 유전자 발현 cassette 를 RFP 발현 plasmid 에 함께 삽입하여 이를 *asd* 가 knock-out 된 영양요구성 돌연변이 *E.tarda* 에 transformation 함으로써 항생제 내성유전자의 비 존재 하에서도 RFP 발현 plasmids 를 유지할 수 있는 재조합 *E.tarda* 시스템을 구축하였다.

Red fluorescence protein DsRed 는 *Discosoma* sp. (mushroom)으로부터 추출된 적색 형광 발현 단백질로써, 세포에 대한 toxicity 가 나타나지 않고, 원핵생물인 세균에서 발현이 가능 (Knop et al., 2002) 하므로 이를 본 연구에 활용할 수 있었다. Green fluorescence protein 의 경우 분자생물학적으로 매우 유용한 도구로써 많은 분야에서 사용되어 왔으나, 본 실험에서는 LB agarose 배지에 의한 파장의 간섭을 최소화하기 위하여 이의 사용을 배제하였다.

그리하여 발현용 단백질 RFP DsRed 를 constitutive promoter 인 pHCE promoter 로 발현시킨 Δasd *E.tarda* RFP 균주를 완성하였고, 그 발현량에 대한 비교로 해당 균체의 생존률 및 성장률을 비교하였다. RFP DsRed 발현량에 대한 측정은 excitation wavelength 558nm 와 emission wavelength 583nm 에서 그 발현량의 차이를 비교하였다.

준비된 형질 전환 균주에 가상 오염 물질을 투여함에 있어, 그 대상을 항생물질과 중금속으로 지정하였다. 첫 번째로 지정된 자극물질은 항생 물질로써 penicillin 계열의 Ampicillin 이다. 이는 β -lactam 골격의 화학구조식을 가지고 있어 β -lactam 계 항생제라 불리며 살균작용이 강하지만 화학적으로 불안정하여 빛, 열, 산소에 노출되면 효능이 감소되거나 분해된다. 오늘날에는 페니실린 내성 등의 문제로 여러 가지 문제점이 있지만 아직까지는 전 세계적으로 널리 사용되고 있다. (Shitandi and Sternesjo, 2004)

두 번째로 지정한 자극물질은 중금속으로 $ZnSO_4$ 의 수용액을 사용하였다. 아연의 경우 중금속으로 환경에 일정치 이상 존재할 시 급성독성을 지녀 세균의 성장을 억제하게 된다.

이러한 성장 억제 물질들을 농도별로 자극하였을 때 그에 따라 살균작용 및 정균작용이 나타나게 되고, 그로 인하여 나타난 형질 전환 균주의 성장률 저하는 RFP 발현량의 감소를 가져오게 된다.

이처럼 RFP 발현량의 비교 측정은 성장 억제 물질들의 농도를 다시금 추론할 수 있게 한다. 같은 맥락으로 미지의 시료를 자극물질로 하여 배양된 해당 균체의 생존률 및 그에 따른 RFP 발현량의 차이는 그 시료에 대하여 세균이 얼마만큼 잘 살아갈 수 있는 환경인가를 지표해 주는 간이적인 monitor 로써의 결과값이 될 수 있을 것이다.

V. 요약

재조합 세균을 이용한 생물지표 혹은 생물모니터 연구는 주로 대장균을 대상으로 연구가 되어 왔으며, 해수 세균을 대상으로 한 연구는 거의 이루어져 있지 않다. 본 연구에서는 해양에 상재하면서 동시에 어류에 병원체로 작용하는 세균인 *E.tarda*를 대상으로 형광발현 재조합 세균을 제작 후 생물모니터로서의 활용가능성을 분석하였다. 먼저 재조합 *E. tarda*의 제작은 allelic exchange를 이용하여 chromosome DNA에서 alanine racemase gene (*alr*)을 knock-out 시키고 그 자리에 항시고발현 promoter에 의해 발현되는 green fluorescent protein (GFP) 유전자 cassette를 삽입함으로써 배지에 D-alanine의 공급없이 자랄 수 없으면서 동시에 GFP를 그 세포질에 발현하는 영양요구성 돌연변이 *E. tarda*를 제작하였다. 그러나 이 GFP를 발현하는 재조합 *E. tarda*를 이용하여 생물모니터로서의 활용가능성을 분석한 결과 GFP 유전자가 chromosome에 1 copy로만 존재하기 때문에 특정 물질의 농도에 따른 독성 변화를 모니터링 하기에는 reporter 단백질인 GFP의 발현량이 너무 적었고, 그로 인해 민감도가 떨어지는 단점이 있었다. 이러한 단점을 보완하기 위해 2차 실험에서는 형광단백질을 GFP가 아닌 Red fluorescent protein (RFP)로 바꾸었으며, RFP 발현 cassette의 copy 수 문제를 해결하기 위해 그 발현 cassette를 plasmid에 삽입하였다. 또한 *E. tarda*의 chromosome상에 있는 aspartate semialdehyde dehydrogenase (*asd*) 유전자를 knock-out 시키고, *asd* 유전자 발현 cassette를 RFP 발현 plasmid에 함께 삽입하여 이를 *asd*가 knock-out된 *E. tarda*에 transformation 함으로써 항생제 내성유전자의 사용없이도 RFP 발현 plasmids를 유지할 수 있는 재조합 *E. tarda* 시스템을 구축하였다. 이렇게 구축된 재조합 *E. tarda*를 이용해 ampicillin 및 ZnCl₂ 농도별 RFP 발현량을 측정한 결과 농도에 따른 RFP의 발현량이 차이가 있게 나타남으로써 생물모니터로서의 활용이 가능함을 알 수 있었으며, 또한 해수 염분농도를 포함한 다양한 염분농도하에서도 같은 결과가 나타남으로써 해수용 바이오모니터로서의 활용가능성이 있음을 알 수 있었다.

VI. 감사의 글

먼저 이 논문이 완성될 수 있도록 수 없이 많은 조언과 격려를 아끼지 않아 주신 김기홍 교수님께 깊은 감사의 말씀을 올립니다. 언제나 감사하게 생각하고 또 기대에 답해드리지 못하는 점 죄송스럽게 생각하고 있습니다. 그리고 항상 바쁘신 와중에도 저의 논문을 지도하고 검토해주신 강주찬 교수님과 정준기 교수님께 감사 드립니다.

연구를 하고 논문을 작성함에 있어 저의 멘토가 되어 전반적인 조언과 지도를 해주신 최승혁 선배님께 감사 드리며 또한 많은 도움을 아끼지 않아 주셨던 어패류 기생충학 연구실의 실험실원 강예재 선배님, 이은혜 선배님, Zenke Kosuke 선배님, 김민선 선배님, 윤기준 선배님, 그리고 차상준 선배님을 비롯하여 가르침을 주신 모든 선배님들께 감사 드립니다. 부족한 저를 다방면에서 도와주었던 지윤이, 대한이, 일호, 경수, 병우, 지선이, 수진이, 나영이 모두들 너무 감사하고 또 항상 미안한 마음과 고마운 마음을 가지고 있는 학부생활과 대학원생활의 동기 선영에게도 감사의 마음을 전하고 싶습니다.

평생에 한 번 만날 수 있을 지 모를 내 소중한 인연이고 또 그 만큼이나 아끼고 경쟁하는 나의 벗 대근에게도 항상 응원해주어 고맙다는 말을 전하고 싶고 또 그만큼이나 사랑하고 싶고 앞으로는 더 잘 될 테니 지켜봐 달라는 말을 전하고 싶습니다.

언제나 감사하고 죄송한 할머니님, 그리고 지지해 주시는 아버지에게도 감사한다는 말씀 드리고 싶고, 자랑스러운 아들이 되지 못해 죄송스러운 마음이 큼니다. 앞으로 더 지켜봐 달라는 말씀 드리고 싶고 언제나 믿음 가지고 있고 또 사랑한다는 말씀 전하고 싶습니다. 새로운 가족에게도 미안하다는 말 전하고 싶고, 또 언제나 내 편이 되어 준 누나와 귀여운 조카, 자형에게도 감사하고 또 사랑한다고 말하고 싶습니다.

그리고 힘들어할 때나 기뻐할 때도 언제나 곁에서 응원하고 지켜주었던 나의 연인 유미에게도 언제나 사랑하고 감사하며, 더욱 아껴주겠다는 말 전해주고 싶습니다.

마지막으로 하늘나라에서 언제나 잘 지켜봐 주시는 사랑하는 어머님께 그렇다는 말씀과 사랑하고 또 언제나 감사하며 살고 있다는 말씀 전하고 싶습니다.

VII. 참고 문헌

Aoki, T., Takahashi, A., 1987. Class D tetracycline resistance determinants of R plasmids from the fish pathogens *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, and *Pasteurella piscicida*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31, 1278–1280

Brohon, B. and Gorudon, R. 2000. Influence of soil microbial activity level on the determination of contaminated soil toxicity using Lumistox and MetPlate bioassays. *Soil biology & Biochemistry*, 32, 853–857

Choi S H and Kim K H, 2011. Generation of two auxotrophic genes knock-out *Edwardsiella tarda* and assessment of its potential as a combined vaccine in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish & Shellfish Immunology*, 31, 58–65.

Geiselhart, L., Osgood, M., and Holmes, D. 1992 Construction and evaluation of a self-luminescent biosensor. *Ann. NY Acad. Sci.*, 646, 53–60

Shi-Zhong Geng , Xin-An Jiao, Zhi-Ming Pan, Xiao-Juan Chen, Xiao-Ming Zhang, and Xiang Chen, 2009 An Improved Method to Knock Out the *asd* Gene of *Salmonella enterica* Serovar Pullorum. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2009. 646308.

Kelly, C. J., Lajoie, C. A., Layton, A. C., and Saylor, G. S. 1999. Bioluminescent Reporter Bacterium for Toxicity Monitoring in Biological Wastewater Treatment Systems. *Water Environ. Res.*, 71, 31–35

Knop M, Barr F, Riedel CG, Heckel T, Reichel C.. 2002. Improved version of the red fluorescent protein (drFP583/DsRed/RFP) *Biotechniques*. 33(3):592, 524, 596–8

Lampinen, J., Korpela, M., Saviranta, P., Kroneld, R., and Karp, M. 1995. Use of *Escherichia coli* cloned with genes encoding bacterial luciferase for evaluation of chemical toxicity. *Toxic. Assess.*, 5, 337–350

Mowat, A.,1976. Measurement of metal toxicity by biochemical oxygen demand.J. WPCF, 48(5), 853–866.

Paton, G. I., Palmer, G., Kindness, A., Campvell, C., Glover, L. A., and Killham, K. 1995. Use of Luminescence Bacteria to Assess Copper Bioavailability in Malt Whisky Distillery Effluent. Chemosphere, 31(5), 3217–3224

Plumb, J.A., 1999. Edwardsiella septicaemias. In: Woo, P.T.K., Bruno, D.W. (Eds.), Fish Disease and Disorders Vol. 3. Viral, Bacterial and Fungal Infections. CAB International, pp.479–521.

Preston, S., Ciad, N., Towend, J., Killham, K., and Paton, G. I. 2000 Biosensing the Acute Toxicity of Metal Interaction: Are They Additive, Synergistic, or Antagonistic, Environ. Toxicol. Chem., 19(3), 775–780

Ribo, J.M. and Kaiser, K.L.E., 1987. Photobacterium phosphoreum, Toxicity bioassay. I. Test procedures and applications, Toxic. Assess., 2, 305–323.

Shitandi A and Sternesjo A. 2004. Factors contributing to the occurrence of antimicrobial drug residues in Kenyan milk. *J Food Prot* 67, 399–402.

Wei Sun, Kenneth L. Roland, Xiaoying Kuang, Christine G. Branger, and Roy Curtiss III. 2010 *Yersinia pestis* with Regulated Delayed Attenuation as a Vaccine Candidate To Induce Protective Immunity against Plague. *INFECTION AND IMMUNITY*. 78 (3). 1304–1313

Tamura, K., Sakazaki, R., McWhorter, A.C., et al., 1988. *Edwardsiella tarda* serotyping scheme for international use. *J. Clin. Microbiol.* 26, 2343–2346.

Thune, R.L., Stanley, L.A., Cooper, R.K., 1993. Pathogenesis of gram negative bacterial infections in warm water fish. *Annu. Rev. Fish Dis.* 3, 37–68

Waltman, W.D., Shotts, E.B., 1986. Antimicrobial susceptibility of *Edwardsiella tarda* from the United States and Taiwan. *Vet. Microbiol.* 12, 277–282