

내분비 계 장애물질 bisphenol A에 대응한 재조합 대장균 내 생성된  $\beta$ -galactosidase 검출을 위한 광간섭 biochip 개발 연구

임성혁, 김수영, 박재숙, 김병우\*  
성균관대학교 화학공학과 환경공학연구소  
(bwkim@skku.ac.kr\*)

A study on the development of interferometric biochip to sense  $\beta$ -galactosidase releasing by recombinant *E. coli* responding to an environmental endocrine disruptor(bisphenol A).

Sung-hyuk Lim , Soo-young Kim, Jae-suk Park, Byung-woo Kim\*  
Department of Chemical Engineering, Sungkyunkwan University  
(bwkim@skku.ac.kr\*)

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 단량제로 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.

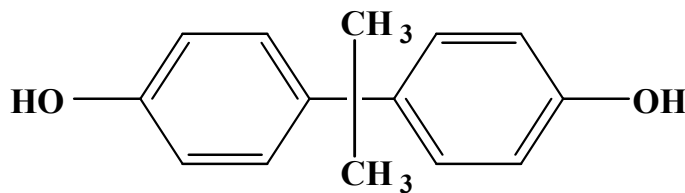


Figure 1. Chemical structure of bisphenol-A.

본 실험에서는 유전자 재조합 균주는 외부오염물질에 대한 DNA damage 발생시 대응 효소로서  $\beta$ -galactosidase를 분비하며, 이  $\beta$ -galactosidase의 생성량을 분석함으로써 극저 농도의 환경독성물질들을 정량적으로 검출할 수 있을 것으로 예상된다(4).

재조합 *E. coli*의 SOS 제어시스템을 통한  $\beta$ -galactosidase 생성량을 분석함으로써, 환경 독성물질으로 널리 알려진 bisphenol A를 검출하고, 다공성 실리콘을 이용한 biochip에서  $\beta$ -galactosidase의 농도 변화에 따른 광간섭 변화를 측정함으로써 미량의  $\beta$ -galactosidase

를 짧은 시간에 검출하고자 한다. 나아가서 기존의 생물학적 방법으로는 비교분석 할 수 없었던 극저준위의  $\beta$ -galactosidase를 검출 할 수 있는 biochip의 제작에 그 목적이 있다.

## 이론

대부분의 bacteria에는 외부로부터의 열충격, DNA damage, 중금속 등의 충격이 가해져도 특정 유전자적 시스템에 의해 새로운 환경에 적응하며 살아갈 수가 있다. 특히 DNA damage가 있을 경우 SOS 레귤론 시스템이란 반응 시스템에 의해 복구되어 살아가게 된다(3). 이 SOS 레귤론 시스템에서 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).

생성된  $\beta$ -galactosidase는 고전적인 enzyme assay 방식으로 정량할 수 있으나, 이를 위해 cell harvest 및 여러 단계의 추출공정등으로 시간이 소요되는 단점이 있다. 본 연구에서는 이를 상대적으로 신속히 측정할 수 있는 광간섭 biosensor를 적용코자 한다. 이 biosensor는 Si-wafer를 식각해 다공성(pore 크기: 25~100nm)으로 만들고 다공성 표면상 부착되는  $\beta$ -galactosidase의 농도에 따라 광간섭이 일어나는 현상을 이용한다. 여기에서 pore는 ethanolic HF solution의 농도, etching 시간, 또는 전류의 량에 따라서 그 size의 조절이 가능하다.

다공성 실리콘의 기능화는 SAM(self-assembled monolayer)을 이용하였다. SAM은 규칙적이며, 핀홀이 없고, 안정한 단분자층을 쉽게 형성하여 생체물질을 고정화하는데 생체물질이 미량으로 필요하게 되며, 여러 가지 측정을 위하여 사용 시간을 연장하더라도 오랜 시간 안정성을 유지할 수 있다.

다공성 실리콘에서 나타나는 Fabry-Perot fringe 패턴에서 일어나는 변화는 다공성 실리콘에 검출대상물질을 고정시킬 수 있는 recognition group과 검출물질간의 binding에 의한 굴절을 변화에 의해서 일어나며, biomolecule을 높은 감도로서 검출할 수 있는 수단으로 사용될 수 있다. 다공성 실리콘에서의 백색광에 의한 반사는 다공성 실리콘 막의 유효광학두께(effective optical thickness)에 관계된 간섭 패턴을 나타낸다. effective optical thickness는 thickness L과 굴절을 n의 곱으로서, 다음과 같이 나타낸다(식1).

$$m\lambda = 2nL \quad (1)$$

여기서  $m$ 은 fring order이고  $\lambda$ 는 빛의 파장이다(5).

## 실험방법

### 1) 세균배양 및 bisphenol A 노출

균주의 배양은 36°C에서 LB 배지에 agar를 첨가한 고형배지에서 배양하였다. 그리고 Bisphenol A의 농도별 비교 실험은 LB배지에서 over night 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.

## 2) Miller's enzyme assay

Sample의 일부를 Z-buffer, SDS, chloroform이 첨가된 test tube에 넣고 10초간 격렬히 교반한 뒤 ONPG를 투입하였다. *o*-nitrophenol  $\beta$ -galactosidase가 ONPG를 분해하여 *o*-nitrophenol과 D-glucose를 생성하게 된다. 충분한 색의 변화가 일어나면  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  용액을 첨가해 반응을 종결시키고 반응시간을 기록하였다. 혼합물을 원심분리 후 상등액을 취하여 420, 550nm에서 각각 흡광도를 측정하였다.  $\beta$ -galactosidase의 활성은 다음의 식으로 계산되었다(식 2).

$$\beta\text{-galactosidase} = \frac{1000(OD_{420} - 1.75OD_{550})}{t \times V \times OD_{600}} \quad (2)$$

t = reaction time (min)

V = reaction volume (ml)

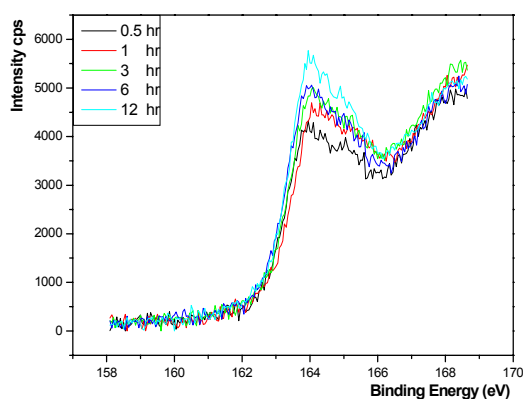
## 3) 광간섭 biosensor용 porous silicon wafer 제조와 기능화

실험에 사용된 p-type(boron-doped, 100) Si wafer는 식각에 앞서 ohmic contact 형성을 위해 wafer 뒷면에 silver paste를 피복시켰다. 만들어진 wafer는 teflon 재질의 식각기 내부에서 HF/ethanol 혼합용액으로 일정 시간동안 양극 식각하였다. 식각이 진행되는 동안 pore의 깊이를 고르게 하기 위해 UV light (254 nm)를 조사하였다.

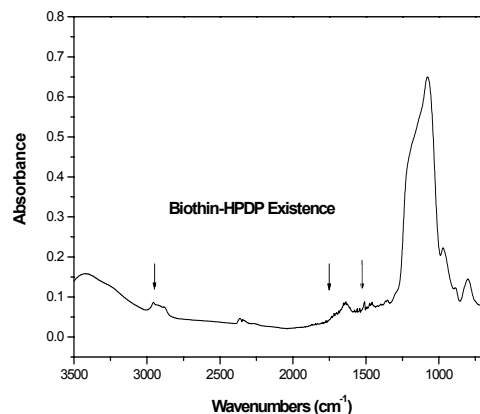
Silicon 표면을 hydrogen peroxide와 sulfonic acid의 혼합 용액으로 상온에서 세척 후 400°C에서 thermal oxidation 시킨다. 이를 3-mercaptopropyl trimethoxysilane를 toluene (60°C)에 녹인 용액을 다공성 실리콘 표면에 흘려 기능화 시켜 준다. 이렇게 기능화 된 sample을 (D+)biotin/DMSO 혼합용액에 의 PBS buffer(phosphate buffered saline)를 첨가한 용액에 다공성 실리콘 wafer를 넣어두어 기능화된 다공성 실리콘 wafer를 얻을 수 있다. CCD detector (S2000, Ocean Optics, Inc., Dunedin, Florida, U.S.A.)를 사용하여 광간섭 효과를 관찰하였다.

**결과 및 고찰**

- 1) 광간섭 바이오센서에 이용할 porous Si wafer를 위의 실험 조건에서 etching한 결과 실험에 적합한 pore size를 조절할 수 있음을 알 수 있었다.
- 2) 3-mercaptopropyl trimethoxysilane와 (D+)biotin을 이용하여 표면을 기능화 하였다. 기능화 후 XPS와 FT-IR을 통하여 기능화 여부를 확인하였다.



(A) The S2p spectral band profiles for films of 3-mercaptopropyl trimethoxysilane with increasing thickness.



(B) FT-IR of functionalized porous silicon wafer

### 참고 문헌

1. Brotons, J. A., Olea-Serrano, M. F., Villalobos, M., Pedraza, V. and Olea, N. , Xenooestrogens released from lacquer coatings in food cans. *Environ. Health Perspect.*, 103, 608-612(1995).
2. Olea, N., Pulger, R., Pe'rez, P., Olea-Serrano, F., Rivas A., Novillo-Fertrell, A., Pedraza, V., Soto, A.M. and Sonnenschein, C., Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environ. Health Perspect.*, 104, 298-305(1996).
3. Walker, GC, Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *E. coli*, *Microbiol. Rev.*, 48, 60-93(1984).
4. Heitman, J., Model, P., SOS induction as an in vivo assay of enzyme-DNA interactions. *Gene* 103, 1-9(1991).
5. Lin, V.S., Motesharei, K., Dancil, K.S., Sailor, M.J. and Ghadiri, M.R., A Porous Silicon-Based Optical Interferometric Biosensor, *Science*, 278, 840-843(1997).
6. Wink, Th., Zuilen, S.J., Bult, A. and Bennekom, W.P., Self-assembled Monolayers for Biosensors, *Analyst*, 122, 43-50(1997).