(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년03월25일
(11) 등록번호 10-1247206
(24) 등록일자 2013년03월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/65 (2006.01) *C12N 15/56* (2006.01)
C12N 15/74 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0109317
(22) 출원일자 2010년11월04일
심사청구일자 2010년11월04일
(65) 공개번호 10-2012-0047635
(43) 공개일자 2012년05월14일
(56) 선행기술조사문헌
Christopher Rensing 등. Ecotoxicology and Environmental Safety. 2003. Vol. 56, No. 1, 페이지 140-147.*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
한국원자력연구원
대전광역시 유성구 대덕대로989번길 111(덕진동)
(72) 발명자
조민호
전북 정읍시 시기동 100번지 센트럴카운티 102-1001호
김동호
전라북도 정읍시 학산로 103-4, 101동 1112호 (상동, 대우드림채)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이원희

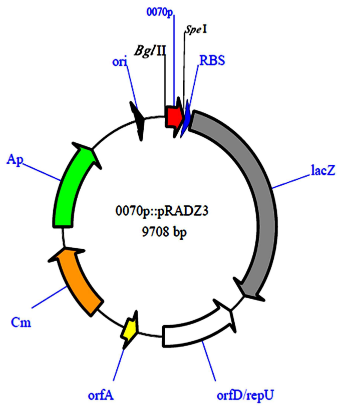
전체 청구항 수 : 총 6 항 심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 **카드뮴 검출용 바이오센서 및 이의 제조 방법**

(57) 요 약

본 발명은 카드뮴 검출용 바이오센서 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 구체적으로, 대표적인 방사선 저항성 미생물인 데이노코커스 레디오듀란스(*Deinococcus radiodurans*)의 DR_0070 유전자의 프로모터를 포함하는 유전자 컨스트럭트, 상기 컨스트럭트로 형질전환된 세포를 포함하는 바이오센서, 이의 제조 방법 및 이를 이용한 카드뮴 검출 방법에 관한 것이다. 본 발명의 바이오센서는 종래의 미생물 바이오센서에 비해 카드뮴에 대해 특이성과 감도가 매우 뛰어나므로, 카드뮴 검출 방법에 유용하게 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도2



(72) 발명자
임상용
대전광역시 유성구 노은로426번길 15, 송림마을 6단지 601동 301호 (하기동)

송현파
광주광역시 서구 화개1로78번길 13, 남양 아파트 105동 806호 (금호동)

특허청구의 범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

서열번호 5로 기재되는 데이노코커스 레디오듀란스(*Deinococcus radiodurans*)의 DR_0070 유전자의 프로모터와 상기 DR_0070 유전자의 프로모터에 작동가능하도록 연결된 리포터(reporter) 유전자를 포함하는 발현 벡터가 형질전환된 재조합 형질전환체를 포함하는 카드뮴 특이적 검출용 바이오센서.

청구항 9

1) 서열번호 5로 기재되는 데이노코커스 레디오듀란스(*Deinococcus radiodurans*)의 DR_0070 유전자의 프로모터와 상기 DR_0070 유전자의 프로모터에 작동가능하도록 연결된 리포터(reporter) 유전자를 포함하는 유전자 컨스트럭트가 포함된 발현 벡터를 제조하는 단계; 및

2) 상기 단계 1)의 발현 벡터를 숙주세포에 형질전환시킨 재조합 형질전환체를 포함하는 카드뮴 검출용 바이오센서를 제조하는 단계를 포함하는 카드뮴 특이적 검출용 바이오센서의 제조 방법.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 단계 1)의 리포터 유전자는 β-갈락토시다제(galactosidase, lacZ)를 암호화하는 유전자인 것을 특징으로 하는 제조 방법.

청구항 11

삭제

청구항 12

제 9항에 있어서, 상기 단계 2)의 숙주세포는 데이노코커스 레디오듀란스(*Deinococcus radiodurans*)인 것을 특징으로 하는 제조 방법.

청구항 13

1) 피검시료를 제 8항의 바이오센서에 노출시키는 단계; 및

2) 상기 단계 1)의 바이오센서를 통해 서열번호 5로 기재되는 DR_0070 유전자의 프로모터의 작동에 의한 리포터 유전자의 발현 정도를 측정하는 단계를 포함하는 시료 내 카드뮴 특이적 검출 방법.

청구항 14

삭제

청구항 15

제 13항에 있어서, 상기 리포터 유전자는 β-갈락토시다제(galactosidase, lacZ)를 암호화하는 유전자인 것을 특징으로 하는 카드뮴 특이적 검출 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 카드뮴 검출용 바이오센서 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 카드뮴(Cd^{2+})은 도금이나 안료, 치료용 아말감, 비닐제작 등에 널리 사용되는 중금속 중 하나이다. 그러나 카드뮴의 생물학적 기능은 현재까지 알려진 바 없으며 심각한 세포손상을 유발하는 중금속이다. 카드뮴은 반응성 산소종의 생성을 유발하여 단백질과 세포막 지질의 산화(Manca et al., Toxicology, 67, 303-323, (1991)), 그리고 DNA 손상을 초래한다(Stohs S.J. et al., Free. Radic. Biol. Med., 18, 321-336(1995)). 또한 카드뮴은 DNA 교정작용 저해(Jin Y.H. et al., Nat. Genet., 34, 326-329, (2003)) 및 핵산과 단백질 합성을 저해하며(Mitra R.S., Appl. Environ. Microbiol., 47, 1012-1016, (1984)), 인체 내 축적 시에는 DNA 손상, 신경계 손상, 그리고 신장 독성 등의 증상을 나타내는 “이타이이타이”병을 유발시키는 원인으로 알려져 있다. 이와 같이 카드뮴은 낮은 농도에서도 생명체에 매우 해로운 중금속이므로 자연환경의 카드뮴 오염은 정밀하게 측정되고 규제되어 직접적 또는 먹이사슬을 통한 간접적 인체 내 축적을 예방해야 한다.

[0003] 카드뮴을 포함한 중금속의 농도 측정은 원자 흡수 분광법(cold vapour atomic absorption spectrometry), 자외선 및 가시광선 분광법(UV-visible spectrophotometry), 그리고 X-선 흡수 분광법(X-ray absorption spectroscopy) 등의 방법들이 이용되어왔다. 그러나 이들 기기 화학적 방법은 고가의 장비로 비용이 많이 드는 점과 복잡한 처리에 의해 시간이 오래 걸리고 실험실 내에서만 사용 가능하며 전문가가 아니면 활용이 용이하지 않는 점이 경제적 및 기술적 효과가 부각되지 않고 있는 실정이다. 그러므로 카드뮴을 보다 신속 간단하고 낮은 비용으로 정확하게 검출하는 기술의 개발은 경제적 및 환경 기술적 차원에서 매우 중요하다. 따라서 최근에는 기존 기술의 대안으로 특이성이 높고, 측정 비용이 저렴하고, 다루기 쉽고 이동 가능한 바이오센서를 개발하려 많은 연구가 진행되고 있다(Verma N. et al., Biometals, 18, 121-129, (2005)).

[0004] 바이오센서란 고정화된 생물학적 구성요소와 생화학적 신호를 정량화할 수 있는 전기적 신호로 전환해주는 변환기(transducer)로 이루어진 장치로서 다양한 환경 내에 있는 물질들을 저 농도에서 신속하고 정확하게 감지할 수 있는 분석기술이다. 바이오센서는 크게 단백질을 기초로 한 것과 세포를 기초로 한 방법으로 나누어지며, 생물학적 응용성과 선택성, 편리성 그리고 측정 감도 등의 관점에서 세포를 기초로 한 전세포 바이오센서(whole-cell biosensor)의 연구가 많이 이루어지고 있다. 전세포 바이오센서는 환경 오염물질로 인한 독성에

특이적으로 반응할 수 있는 프로모터와 β-갈락토시다제나 반딧불 루시퍼라제(firefly luciferase) 등의 리포터 시스템으로 구성된 유전공학적으로 변형된 재조합 세포를 이용하여 강, 호수, 및 상·하수원, 토양 등의 환경오염 측정에 응용될 수 있는 첨단 바이오 모니터링 기술이다. 카드뮴을 측정하는 대부분의 전세포 바이오센서는 주로 원핵 미생물을 사용한다. 그 예로는 포도상구균(*Staphylococcus aureus*)의 카드뮴 저항성 유전자 *cadA*의 프로모터와 반딧불 루시퍼라제를 결합한 재조합 플라스미드 형질 전환체(Tauriainen S. et al., Biosens. Bioelectron., 13, 931-938, (1998)), 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*)의 카드뮴 저항성을 조절하는 *cadR* 유전자의 프로모터와 녹색 형광단백질(green fluorenscent protein)을 결합한 재조합 플라스미드 형질전환체(Wu C.H., Biotechnol. Prog., 25, 898-903, (2009)), 대장균의 *cadAC* 유전자의 프로모터와 녹색 형광단백질을 결합한 재조합 플라스미드 형질전환체(Shetty R.S. et al., Anal. Bioanal. Chem., 376, 11-17, (2003)) 등이 보고되었다. 그러나, 세포 자체가 병원성 미생물이거나 카드뮴 특이성이 비교적 낮거나, 또는 기초 발현도가 높은 단점이 있다. 따라서, 카드뮴을 더욱 특이적이고 민감하게 탐지할 수 있는 바이오센서에 대한 필요성은 여전히 존재한다.

[0005] 한편, 데이노코커스 레디오듀란스(*Deinococcus radiodurans*)는 대표적인 방사선 저항성 미생물로, 방사선 이외에도 자외선, 건조 및 과산화수소 등 DNA 손상물질 또는 환경에 대한 높은 저항성을 가지고 있으므로, 상기 미생물은 DNA 손상을 유발하는 카드뮴을 측정하기 위한 전세포 바이오센서의 숙주로의 이용에 다른 미생물에 비해 유망하다고 할 수 있다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 방사선 저항성 미생물인 데이노코커스 레디오듀란스(*Deinococcus radiodurans*) 균주의 DR_0070 유전자의 발현율이 카드뮴 노출에 의해 특이적으로 높아지는 것을 확인하고, 상기 DR_0070 유전자의 프로모터와 β-갈락토시다제 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드를 제조하고, 이를 데이노코커스 야생형에 형질전환하여, 재조합 형질전환체를 제조하였으며, 상기 재조합 형질전환체가 카드뮴에 대해 특이성과 민감도가 매우 높음을 확인함으로써, 상기 형질전환체를 카드뮴 검출용 바이오센서로 유용하게 사용할 수 있음을 밝힘으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 데이노코커스 레디오듀란스(*Deinococcus radiodurans*) 균주의 DR_0070 유전자의 프로모터를 포함하는 유전자 컨스트럭트, 상기 컨스트럭트를 포함하는 발현 벡터, 상기 발현벡터가 형질전환된 재조합 형질전환체, 상기 형질전환체를 포함하는 바이오센서, 상기 바이오센서의 제조 방법 및 상기 바이오센서를 이용한 카드뮴 검출 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 데이노코커스 레디오듀란스(*Deinococcus radiodurans*)의 DR_0070 유전자의 프로모터와 상기 DR_0070 유전자의 프로모터에 작동가능하도록 연결된 리포터(reporter) 유전자를 포함하는 유전자 컨스트럭트(gene construct)를 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 유전자 컨스트럭트를 포함하는 발현 벡터를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 발현 벡터가 숙주세포에 형질전환된 재조합 형질전환체를 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 재조합 형질전환체를 포함하는 카드뮴 검출용 바이오센서를 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 카드뮴 검출용 바이오센서의 제조 방법을 제공한다:

[0013] 1) 데이노코커스 레디오듀란스(*Deinococcus radiodurans*)의 DR_0070 유전자의 프로모터와 상기 DR_0070 유전자의 프로모터에 작동가능하도록 연결된 리포터(reporter) 유전자를 포함하는 유전자 컨스트럭트가 포함된 발현 벡터를 제조하는 단계; 및

[0014] 2) 상기 단계 1)의 발현 벡터를 숙주세포에 형질전환시킨 재조합 형질전환체를 포함하는 카드뮴 검출용 바이오센서를 제조하는 단계.

[0015] 아울러, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 카드뮴 검출 방법을 제공한다:

[0016] 1) 피검시료를 본 발명의 바이오센서에 노출시키는 단계; 및

[0017] 2) 상기 단계 1)의 바이오센서를 통해 DR_0070 유전자의 프로모터의 작동에 의한 리포터 유전자의 발현 정도를 측정하는 단계.

발명의 효과

[0018] 본 발명의 데이노코커스 레디오듀란스의 DR_0070 유전자의 프로모터와 리포터 유전자인 LacZ가 연결된 유전자를 포함하는 전세포 바이오센서는 종래 카드뮴 검출 방법에 비해 그 특이성 및 민감도가 매우 뛰어나므로, 카드뮴을 더욱 민감하고 정확하게 검출할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 DR_0070 유전자의 중금속 처리에 따른 발현 양상을 나타낸 결과이다.

도 2는 0070p::pRADZ3 재조합 플라스미드의 구조를 나타낸 그림이다.

도 3은 0070p의 다양한 중금속 처리에 따른 발현 양상을 나타낸 결과이다.

도 4는 0070p의 카드뮴 농도에 따른 발현 양상을 나타낸 결과이다.

도 5는 0070p의 카드뮴 처리 시간에 따른 발현 양상을 나타낸 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0021] 본 발명은 데이노코커스 레디오듀란스(*Deinococcus radiodurans*)의 DR_0070 유전자의 프로모터와 상기 DR_0070 유전자의 프로모터에 작동가능하도록 연결된 리포터(reporter) 유전자를 포함하는 유전자 컨스트럭트(gene construct)를 제공한다.

[0022] 상기 DR_0070 유전자의 프로모터는 중합 효소 연쇄반응에 의해 서열번호 3 및 4에 기재된 프라이머쌍으로 증폭되는 염기서열을 갖는 것이 바람직하나, 이에 한정하지 않는다.

[0023] 상기 DR_0070 유전자의 프로모터는 서열번호 5로 기재되는 염기서열을 갖는 것이 바람직하나, 이에 한정하지 않는다.

[0024] 상기 리포터 유전자는 DR_0745 유전자의 프로모터에 의해 발현되도록 작동가능하게 연결될 수 있다면 다양한 공지의 리포터 유전자들이 이용가능하며, 형광단백질(GFP), 루시페라제(luciferase), 알칼라인 포스파타제(alkaline phosphatase), 및 β-갈락토시다제(galactosidase)를 암호화하는 유전자로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 리포터 유전자인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않으며, β-갈락토시다제(galactosidase, lacZ)를 암호화하는 유전자인 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정하지 않는다.

[0025] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 데이노코커스 레디오듀란스의 DR_0070 유전자의 발현이 카드뮴에 특이적으로 매우 높게 나타남을 확인하였고(도 1 참조), DR_0070 유전자에 특이적인 PCR 프라이머 서열에, 정방향 프라이머(서열번호 3) 말단에는 BglII, DR_0070 역방향 프라이머(서열번호 4) 말단에는 SpeI 제한효소 인식서열을 첨가하여 제작하고, 데이노코커스 레디오듀란스의 게놈 DNA를 주형으로 상기 두 프라이머를 사용하여 중합효소 연쇄반응을 수행하였다. 상기 반응액을DR_0070 유전자의 프로모터 DNA(0070p)를 분리 농축하였으며, 상기 0070p를 BglII와 SpeI 제한효소로 처리하여 절단한 후, 정제하였다. 이후, pRADZ3 발현벡터를 BglII와 SpeI 제한효소로 처리한 후 *lacZ* 유전자에 연결된 프로모터가 제거된 벡터 부위를 정제한 다음, 정제된 프로모터 DNA와 pRADZ3 벡터를 연결하여 0070p:pRADZ3 재조합 플라스미드를 제작하였다(도 2 참조). 상기 재조합 플라스미드를 데이노

코커스 야생형에 형질전환하여 카드뮴 바이오센서용 형질전환체 KDH049를 제조하였다.

[0026] 또한, 본 발명의 또 다른 구체적인 실시예에서, 상기 제조된 바이오센서가 카드뮴에만 매우 특이적으로 반응하고(도 3 참조), 낮은 카드뮴 농도에서도 유전자의 발현이 증가하여(도 4 참조), 카드뮴에 대해 높은 민감도를 지니고 있을 뿐 아니라, 0070p의 발현이 시간이 증가함에 따라 점진적으로 증가하는 것을 확인하여(도 5 참조), 본 발명의 바이오센서에서 0070p의 발현이 카드뮴의 농도에 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다.

[0027] 또한, 본 발명은 데이노코커스 레디오듀란스(*Deinococcus radiodurans*) 균주의 DR_0070 유전자의 프로모터와 상기 DR_0070 유전자의 프로모터에 작동가능하도록 연결된 리포터 유전자를 포함하는 유전자 컨스트럭트를 포함하는 발현 벡터를 제공한다.

[0028] 또한, 본 발명은 상기 발현 벡터가 숙주세포에 형질전환된 재조합 형질전환체를 제공한다.

[0029] 또한, 본 발명은 상기 재조합 형질전환체를 포함하는 카드뮴 검출용 바이오센서를 제공한다.

[0030] 상기 DR_0070 유전자의 프로모터는 중합 효소 연쇄반응에 의해 서열번호 3 및 4에 기재된 프라이머쌍으로 증폭되는 염기서열을 갖는 것이 바람직하나, 이에 한정하지 않는다.

[0031] 상기 DR_0070 유전자의 프로모터는 서열번호 5로 기재되는 염기서열을 갖는 것이 바람직하나, 이에 한정하지 않는다.

[0032] 상기 리포터 유전자는 DR_0745 유전자의 프로모터에 의해 발현되도록 작동가능하게 연결될 수 있다면 다양한 공지의 리포터 유전자들이 이용가능하며, 형광단백질(GFP), 루시페라제(luciferase), 알칼라인 포스파타제(alkaline phosphatase), 및 β-갈락토시다제(galactosidase)를 암호화하는 유전자로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 리포터 유전자인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않으며, β-갈락토시다제(galactosidase, lacZ)를 암호화하는 유전자인 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정하지 않는다.

[0033] 상기 발현 벡터는 pRADZ3인 것이 바람직하나, 이에 한정하지 않는다.

[0034] 상기 숙주세포는 데이노코커스 레디오듀란스(*Deinococcus radiodurans*)인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0035] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 데이노코커스 레디오듀란스의 DR_0070 유전자의 발현이 카드뮴에 특이적으로 매우 높게 나타남을 확인하고, DR_0070 유전자에 특이적인 PCR 프라이머를 이용하여 데이노코커스 레디오듀란스의 게놈 DNA를 주형으로 중합효소 연쇄반응을 수행하여 얻어진 DNA를 분리 농축, 절단 후 정제하였다. 이후, 정제된 프로모터 DNA와 pRADZ3 벡터를 연결하여 0070p:pRADZ3 재조합 플라스미드를 제작하였으며, 상기 재조합 플라스미드를 데이노코커스 야생형에 형질전환하여 카드뮴 바이오센서용 형질전환체 KDH049를 제조하였다.

[0036] 또한, 본 발명의 또 다른 구체적인 실시예에서, 상기 제조된 바이오센서가 카드뮴에만 매우 특이적으로 반응하고, 낮은 카드뮴 농도에서도 유전자의 발현이 증가하여, 카드뮴에 대해 높은 민감도를 지니고 있을 뿐 아니라, 0070p의 발현이 시간이 증가함에 따라 점진적으로 증가하는 것을 확인하여, 본 발명의 바이오센서에서 0070p의 발현이 카드뮴의 농도에 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다.

[0037] 따라서, 본 발명의 DR_0070 유전자의 프로모터가 포함된 유전자 컨스트럭트가 형질전환된 형질전환체를 포함하는 바이오센서는 카드뮴을 검출하는 바이오센서로 유용하게 이용될 수 있다.

[0038] 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 카드뮴 검출용 바이오센서의 제조 방법을 제공한다:

[0039] 1) 데이노코커스 레디오듀란스(*Deinococcus radiodurans*)의 DR_0070 유전자의 프로모터와 상기 DR_0070 유전자의 프로모터에 작동가능하도록 연결된 리포터(reporter) 유전자를 포함하는 유전자 컨스트럭트가 포함된 발현 벡터를 제조하는 단계; 및

[0040] 2) 상기 단계 1)의 발현 벡터를 숙주세포에 형질전환시킨 재조합 형질전환체를 포함하는 카드뮴 검출용 바이오센서를 제조하는 단계.

[0041] 상기 단계 1)의 리포터 유전자는 DR_0745 유전자의 프로모터에 의해 발현되도록 작동가능하게 연결될 수 있다면 다양한 공지의 리포터 유전자들이 이용가능하며, 형광단백질(GFP), 루시페라제(luciferase), 알칼라인 포스

파타제(alkaline phosphatase), 및 β-갈락토시다제(galactosidase)를 암호화하는 유전자로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 리포터 유전자인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않으며, β-갈락토시다제(galactosidase, lacZ)를 암호화하는 유전자인 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정하지 않는다.

[0042] 상기 발현 벡터는 pRADZ3인 것이 바람직하나, 이에 한정하지 않는다.

[0043] 상기 단계 2)의 숙주세포는 데이노코커스 레디오듀란스(*Deinococcus radiodurans*)인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0044] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 데이노코커스 레디오듀란스의 DR_0070 유전자의 발현이 카드뮴에 특이적으로 매우 높게 나타남을 확인하고, DR_0070 유전자에 특이적인 PCR 프라이머를 이용하여 데이노코커스 레디오듀란스의 게놈 DNA를 주형으로 중합효소 연쇄반응을 수행하여 얻어진 DNA를 분리 농축, 절단 후 정제하였다. 이후, 정제된 프로모터 DNA와 pRADZ3 벡터를 연결하여 0070p::pRADZ3 재조합 플라스미드를 제작하였으며, 상기 재조합 플라스미드를 데이노코커스 야생형에 형질전환하여 카드뮴 바이오센서용 형질전환체 KDH049를 제조하였다.

[0045] 또한, 본 발명의 또 다른 구체적인 실시예에서, 상기 제조된 바이오센서가 카드뮴에만 매우 특이적으로 반응하고, 낮은 카드뮴 농도에서도 유전자의 발현이 증가하여, 카드뮴에 대해 높은 민감도를 지니고 있을 뿐 아니라, 0070p의 발현이 시간이 증가함에 따라 점진적으로 증가하는 것을 확인하여, 본 발명의 바이오센서에서 0070p의 발현이 카드뮴의 농도에 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다.

[0046] 따라서, 본 발명의 바이오센서는 카드뮴에 대해 매우 특이적이고 민감성이 높으므로, 본 발명의 DR_0070 유전자의 프로모터가 포함된 유전자 컨스트럭트가 형질전환된 형질전환체는 카드뮴 검출용 바이오센서의 제조 방법에 유용하게 사용될 수 있다.

[0047] 아울러, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 카드뮴 검출 방법을 제공한다:

[0048] 1) 피검시료를 본 발명의 바이오센서에 노출시키는 단계; 및

[0049] 2) 상기 단계 1)의 바이오센서를 통해 DR_0070 유전자의 프로모터의 작동에 의한 리포터 유전자의 발현 정도를 측정하는 단계.

[0050] 상기 DR_0070 유전자의 프로모터는 서열번호 5로 기재되는 염기서열을 갖는 것이 바람직하나, 이에 한정하지 않는다.

[0051] 상기 단계 2)의 리포터 유전자는 DR_0745 유전자의 프로모터에 의해 발현되도록 작동가능하게 연결될 수 있다면 다양한 공지의 리포터 유전자들이 이용가능하며, 형광단백질(GFP), 루시페라제(luciferase), 알칼라인 포스파타제(alkaline phosphatase), 및 β-갈락토시다제(galactosidase)를 암호화하는 유전자로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 리포터 유전자인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않으며, β-갈락토시다제(galactosidase, lacZ)를 암호화하는 유전자인 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정하지 않는다.

[0052] 분석대상인 카드뮴은 표면에 흡착되거나, 액체 매질중에 용해되어 있는 경우에 바이오센서를 사용하여 측정할 수 있다. 입자에 부착되거나, 수성 시료에 용해되어 있는 카드뮴을 검출하기 위하여 바이오센서를 사용할 수 있으나, 일반적으로는 액상에서 측정하는 것이 바람직하다. 상기 유전자 컨스트럭트를 포함하는 바이오센서가 확실히 기능을 할 수 있도록 충분한 수분을 이용할 수 있으면 되고, 시료를 분석 전에 적당한 완충 조성물로 희석하여, 이 용액 내에서 배양하는 것이 바람직하다. 또한, 분석대상은 선택적 투과성 막이나 용매 등을 이용하여 분석 전에 시료로부터 분리할 수 있다. 예를 들면, 적당한 고체 흡착제를 통과시켜 분석물을 분석전에 농축할 수도 있다.

[0053] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 데이노코커스 레디오듀란스의 DR_0070 유전자의 발현이 카드뮴에 특이적으로 매우 높게 나타남을 확인하고, DR_0070 유전자에 특이적인 PCR 프라이머를 이용하여 데이노코커스 레디오듀란스의 게놈 DNA를 주형으로 중합효소 연쇄반응을 수행하여 얻어진 DNA를 분리 농축, 절단 후 정제하였다. 이후, 정제된 프로모터 DNA와 pRADZ3 벡터를 연결하여 0070p:pRADZ3 재조합 플라스미드를 제작하였으며, 상기 재조합 플라스미드를 데이노코커스 야생형에 형질전환하여 카드뮴 바이오센서용 형질전환체 KDH049를 제조하였다.

[0054] 또한, 본 발명의 또 다른 구체적인 실시예에서, 상기 제조된 바이오센서가 카드뮴에만 매우 특이적으로 반응하고, 낮은 카드뮴 농도에서도 유전자의 발현이 증가하여, 카드뮴에 대해 높은 민감도를 지니고 있을 뿐 아니라, 0070p의 발현이 시간이 증가함에 따라 점진적으로 증가하는 것을 확인하여, 본 발명의 바이오센서에서 0070p의

발현이 카드뮴의 농도에 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다.

[0055] 따라서, 본 발명의 바이오센서는 카드뮴에 대해 매우 특이적이고 민감성이 높으므로, 본 발명의 DR_0070 유전자의 프로모터가 포함된 유전자 컨스트럭트가 형질전환된 형질전환체는 카드뮴의 검출 방법에 유용하게 사용될 수 있다.

[0056] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

[0057] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

[0058] <실시예 1> DR_0070 유전자의 중금속에 대한 발현율 비교

[0059] 데이노코커스 레디오듀란스의 DR_0070 유전자의 중금속에 대한 발현율을 정량적으로 상호 비교하기 위하여, 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)을 이용하였다.

[0060] 구체적으로, 야생형 데이노코커스 레디오듀란스(농촌진흥청 농업유전자원정보센터, *Deinococcus radiodurans*, KACC No. 12248)를 TGY 액상배지(0.5% tryptone, 0.2% yeast extract, 0.02% glucose)에 24시간 동안 30℃에서 현탁배양하였다(200 rpm). 상기 전배양액을 새로운 배지 부피에 1% 재접종하고 대수 생장기(OD_{600}=0.6, ~1×10^8 cells/L)까지 배양한 후 염화카드뮴($CdCl_2$), 염화크롬($CrCl_3$), 염화납($PbCl_2$), 염화니켈($NiCl_2$), 염화아연($ZnCl_2$), 염화철($FeCl_2$), 염화구리($CuCl_2$), 염화비소($AsCl_3$), 염화망간($MnCl_2$), 및 염화수은($HgCl_2$)을 각각 10 uM 농도로 첨가하였으며, 이후, 1시간 동안 배양한 다음, 상기 배양액 5 ml을 원심분리하여 상등액을 제거하고 배양세포를 회수하였다. 이후, 회수한 세포에 RiboEx 용액(GeneAll Biotechnology, Korea) 1 ml 및 0.1 mm 지르코니아/실리카 비드(zirconia/silica bead)를 첨가한 후 비드 비터(bead beater, Bertin Technoligies, France)를 사용하여 세포를 분쇄하고 전체 RNA를 추출하였다. 전체 RNA 10 ㎍에 역전사용 프라이머를 첨가하고 70℃에서 가열 냉각한 후 역전사 반응용 완충용액, dNTP, 역전사효소 혼합물을 첨가하였다. 역전사 반응은 42℃에서 2시간 동안 수행하였으며, 0.5 M NaOH와 50 mM EDTA를 첨가하여 반응을 정지시키고, 70 ℃에서 15분 동안 열처리하여 DNA/RNA 혼성물을 변성시킨 다음, 0.5 M HCl을 첨가하여 반응을 중화시켰으며, 위의 반응액을 Minielute PCR 정제키트(QIAGEN, USA)을 사용하여 cDNA를 분리 농축하였다. 이후, 상기 합성한 cDNA를 주형으로 DR_0070 유전자 내부의 서열(서열번호 1: 5‘-TAAGGAGGAGGCAGATGTTG-3' 및 서열번호 2: 5‘-CGATGGGAAACTGGTAGCC-3')을 포함하는 프라이머를 이용한 RT-PCR(94℃ 30초, 55℃ 30초, 72℃ 30초)을 SYBRPremix Ex TaqTM(Takara Biotechnology, Japan)과 SmartCycler II(Cepheid, USA)를 사용하여 중금속을 처리하지 않은 세포와 중금속을 처리한 세포에서 DR_0070 유전자의 발현율을 측정하였다.

[0061] 그 결과, 데이노코커스 레디오듀란스의 DR_0070 유전자는 다른 중금속 처리시에는 대조군과 비교하여 그 발현율에 큰 차이가 없었으나, 카드뮴에는 그 발현율이 특이적으로 매우 높게 나타났다(도 1).

[0062] <실시예 2> DR_0070 유전자의 프로모터 및 β-갈락토시다제 유전자(*lacZ*)를 포함하는 바이오센서의 제조

[0063] DR_0070 유전자의 프로모터 및 β-갈락토시다제 유전자(*lacZ*)를 포함하는 전세포 바이오센서를 제조하기 위하여, 먼저 DR_0070 유전자의 프로모터를 포함하는 재조합 플라스미드를 제조하고, 이를 세포에 형질전환하였다.

[0064] 구체적으로, pRADZ3(Meima R. et al., Appl. Environ. Microbiol., 66, 3856-3867, (2000))에 DR_0070 유전자의 프로모터를 연결하기 위하여, DR_0070 유전자에 특이적인 PCR 프라이머(서열 3: 5‘-TCAAGATCTCTTATCGAGTGCGTGCACT-3’ 및 서열번호 4: 5‘-GTAACTAGTCTTTCATGCTCCACGTTCA-3’)에 DR_0070 정방향 프라이머(서열번호 3) 말단에는 BglII, DR_0070 역방향 프라이머(서열번호 4) 말단에는 SpeI 제한효소 인식서열을 첨가하여 제작하였다. 데이노코커스 레디오듀란스의 게놈 DNA를 주형으로 상기 두 프라이머 및 TaKaRa LA Taq™ kit(Takara Biotechnology, Japan)를 사용하여 중합효소 연쇄반응(94℃ 30초, 55℃ 30초, 72℃ 30초)을 30회 수행하였다. 상기 반응액을 Minielute PCR 정제 키트(QIAGEN, USA)을 사용하여 267 bp 길이의 DR_0070 유전자의 프로모터 DNA(0070p)를 분리 농축하였으며, 상기 0070p를 BglII와 SpeI 제한효소로 처리하여 절단한

후, Minielute PCR 정제키트(QIAGEN, USA)을 사용하여 정제하였다. 이후, 발현벡터인 pRADZ3는 BglII와 SpeI 제한효소로 처리한 후 절단하여 아가로즈 젤 상에서 전기영동을 한 후 *lacZ* 유전자에 연결된 프로모터가 제거된 벡터 부위를 Gel extraction kit(QIAGEN, USA)를 사용하여 정제하였다. 제한효소 처리 후 정제된 프로모터 DNA와 pRADZ3 벡터를 T4 DNA 리가제(Takara Biotechnology, Japan)를 사용하여 연결하여 0070p::pRADZ3 재조합 플라스미드를 제작하였다(도 2). 상기 재조합 플라스미드를 데이노코커스 야생형에 형질전환하여 카드뮴 바이오센서용 형질전환체 KDH049를 제조하였다.

[0065] <실험예 1> 바이오센서의 카드뮴 특이성 확인

[0066] 본 발명의 바이오센서의 카드뮴 특이성을 확인하기 위하여, 상기 <실시예 2>에서 제조된 형질전환체 KDH049를 배양한 후, 염화카드뮴($CdCl_2$), 염화크롬($CrCl_3$), 염화납($PbCl_2$), 염화니켈($NiCl_2$), 염화아연($ZnCl_2$), 염화철($FeCl_2$), 염화구리($CuCl_2$), 염화비소($AsCl_3$), 염화망간($MnCl_2$), 및 염화수은($HgCl_2$)을 각각 10 uM 농도로 첨가하였으며, 이후, 1시간 동안 배양한 다음, 배양하고 얻어진 배양액 1 ml을 원심분리하여 상등액을 제거한 다음, 세포를 회수하였다. 상기 회수한 세포에 100 ㎕의 세포 용해를 위한 완충용액(10 mM TRIS-HCl (pH 8), 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1.5 %(w/v) SDS, 2.5 %(v/v) Triton X100)을 첨가하여 세포를 용해시키고, 10분간 30℃ 수조에 정치하였다. 이후, Sommer의 방법(Sommer S. et al., Mol. Gen. Genet. 198, 456464, (1985))을 이용하여 상기 용해된 세포 내 β-갈락토시다제 활성을 측정하였다.

[0067] 그 결과, DR_0070의 프로모터 0070p는 카드뮴에만 매우 특이적으로 반응하고 다른 중금속(염화크롬($CrCl_3$), 염화납($PbCl_2$), 염화니켈($NiCl_2$), 염화아연($ZnCl_2$), 염화철($FeCl_2$), 염화구리($CuCl_2$), 염화비소($AsCl_3$))에는 거의 반응하지 않는 것으로 나타났으며(도 3), 본 발명의 바이오센서는 카드뮴에서 특이적으로 반응함을 확인하였다.

[0068] <실험예 2> 바이오센서의 카드뮴 민감도 확인

[0069] 본 발명의 바이오센서의 카드뮴에 대한 민감도를 확인하기 위하여, 바이오센서의 카드뮴 농도에 따른 발현 양상을 확인하였다.

[0070] 구체적으로, 상기 <실시예 2>에서 제조된 형질전환체 KDH049를 TGY 액상배지에 24시간 동안 30℃에서 현탁배양하였다(200 rpm). 이후, 상기 전배양액을 새로운 배지 부피의 1%가 되게 재접종하고 대수 생장기(OD_{600}=0.6, ~1×10^8 cells/L)까지 배양한 후 염화카드뮴($CdCl_2$)을 1nM, 10uM, 100nM, 200nM, 500nM, 1uM, 5uM 및 10uM 농도로 첨가하고 무첨가 대조군과 동일하게 1 시간 동안 배양한 다음, 얻어진 배양액 1 ml을 원심분리하여 상등액을 제거하고 세포를 회수하였다. 이후, Sommer의 방법(Sommer S. et al., Mol. Gen. Genet. 198, 456464, (1985))을 이용하여 상기 회수한 세포의 β-갈락토시다제 활성을 측정하였다.

[0071] 그 결과, 10 nM 이하의 카드뮴 농도에서는 0070p의 발현이 아주 낮게 나타났으나, 카드뮴 100 nM부터 5 uM 농도로 처리한 실험군에서는 0070p의 발현이 카드뮴 농도 증가에 따라 점진적으로 증가하는 것으로 나타났으며(도 4), 본 발명의 바이오센서는 낮은 카드뮴 농도에서도 그 발현이 증가하여, 카드뮴에 대해 높은 민감도를 지니고 있음을 확인하였다.

[0072] <실험예 3> 바이오센서의 카드뮴 처리 시간에 따른 발현 양상 확인

[0073] 본 발명의 바이오센서의 카드뮴 처리 시간에 따른 발현 양상을 확인하기 위하여, 바이오센서에 카드뮴을 처리하고 0070p의 시간에 따른 발현율을 측정하였다.

[0074] 구체적으로, 상기 <실시예 2>에서 제조된 형질전환체 KDH049를 배양한 후, 전배양액을 새로운 배지 부피에 1 %로 재접종하고, 대수 생장기(OD_{600}=0.6, ~1×10^8 cells/L)까지 배양하였다. 이후, 상기 배양액에 염화카드뮴($CdCl_2$) 5 uM을 첨가하고 무첨가 대조군과 동일하게 0분, 15분, 30분, 1시간, 그리고 2시간 동안 배양한 다음, 배양액 1 ml을 원심분리하여 상등액을 제거하고 세포를 회수하였다. 이후, Sommer의 방법(Sommer S. et al., Mol. Gen. Genet. 198, 456464, (1985))을 이용하여 상기 회수한 세포의 β-갈락토시다제 활성을 측정하였다.

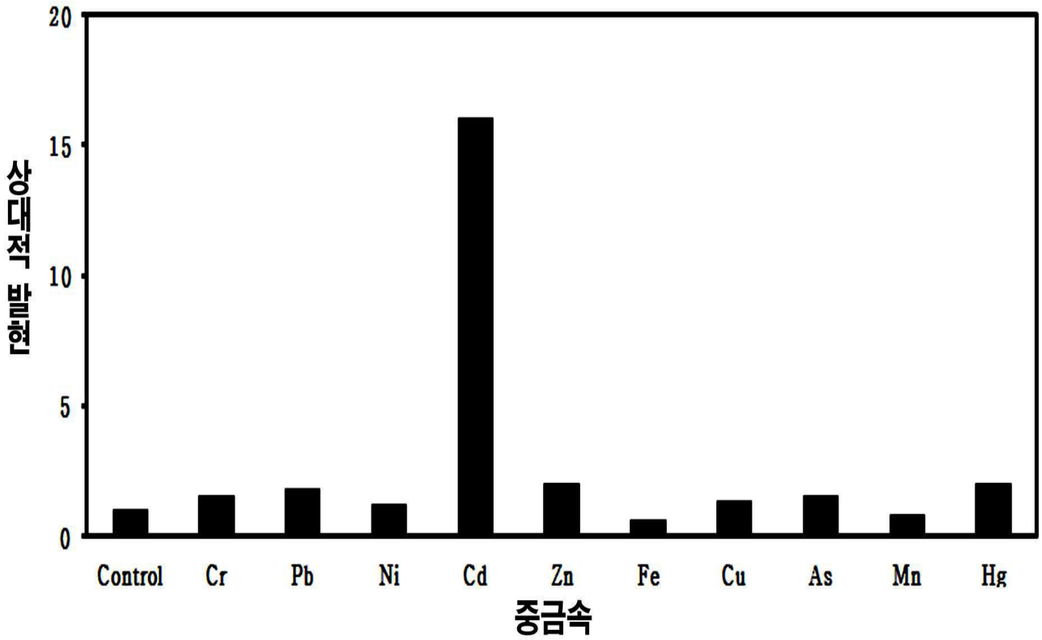
[0075] 그 결과, 0070p의 발현이 시간이 증가함에 따라 점진적으로 증가하는 것으로 나타났으며(도 5), 이를 통해, 본 발명의 바이오센서에서 0070p의 발현이 카드뮴의 농도에 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다.

산업상 이용가능성

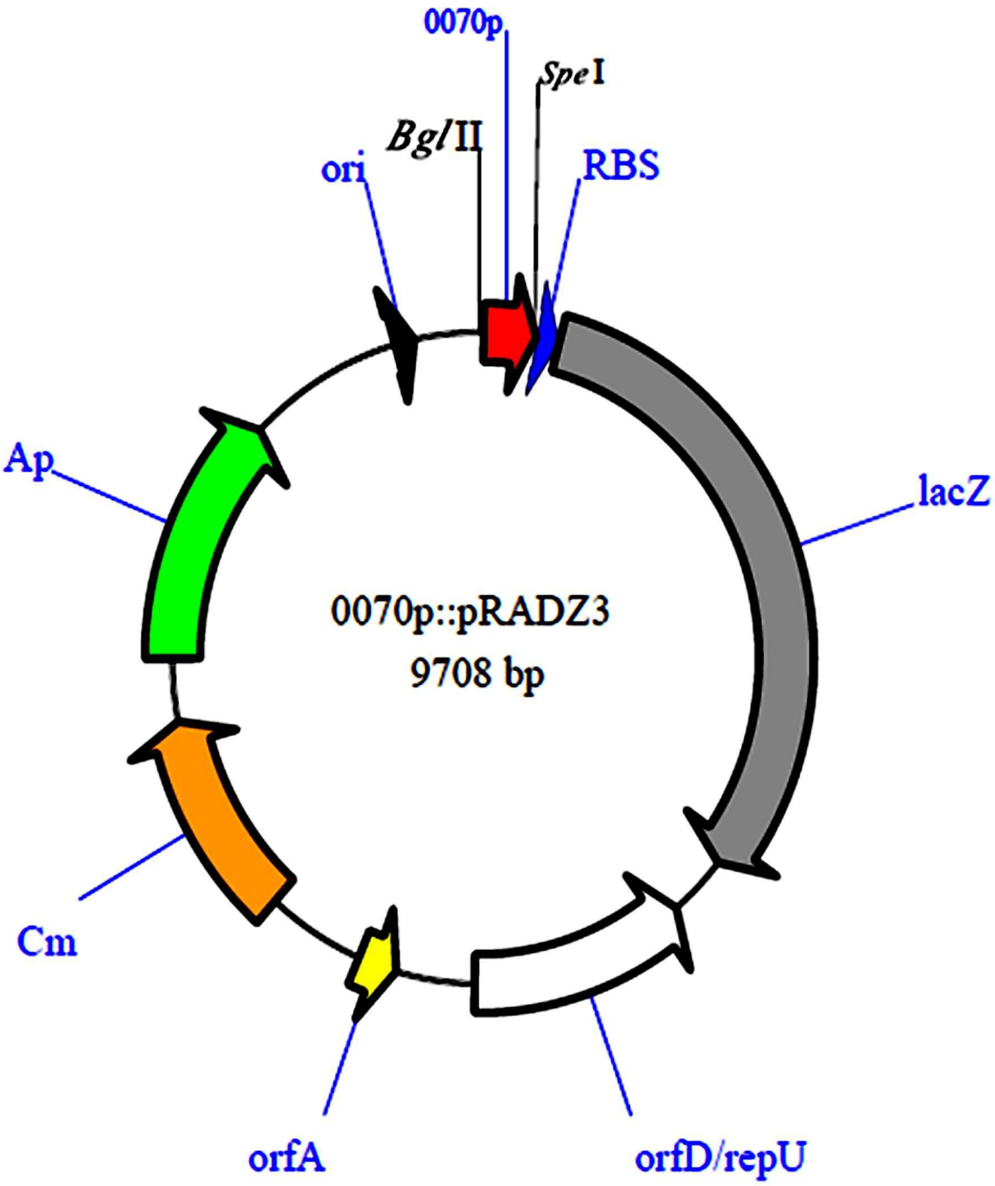
[0076] 상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 데이노코커스 레디오듀란스의 DR_0070 유전자의 프로모터를 포함하는 바이오센서는 인체 및 환경에 대한 카드뮴 바이오센서 및 세포 기반 바이오센서로서 매우 유용하게 이용될 수 있다.

도면

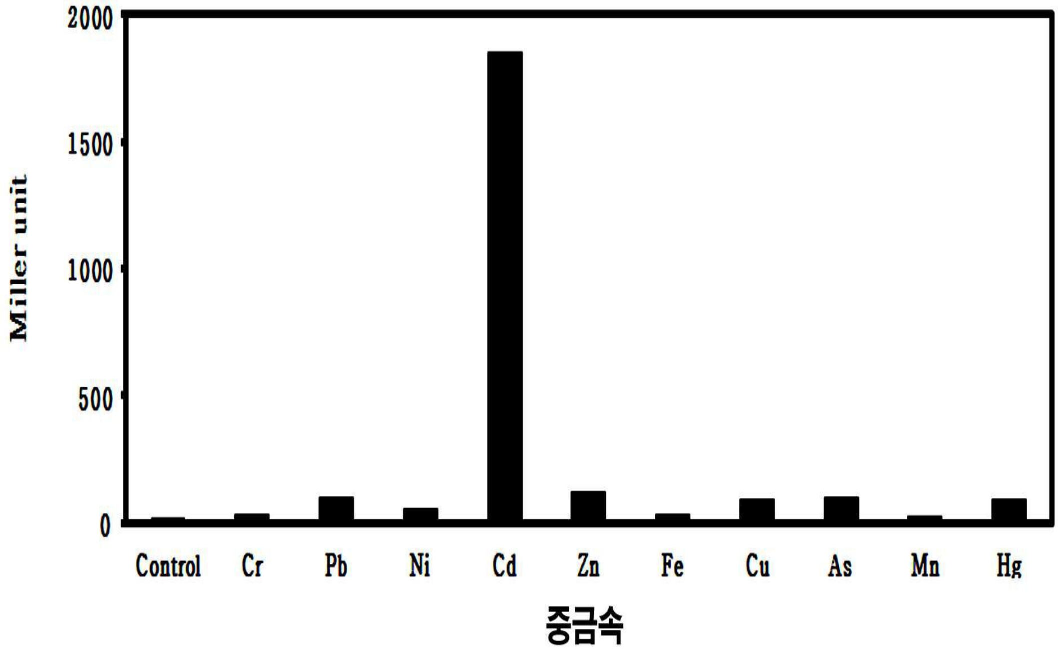
도면1



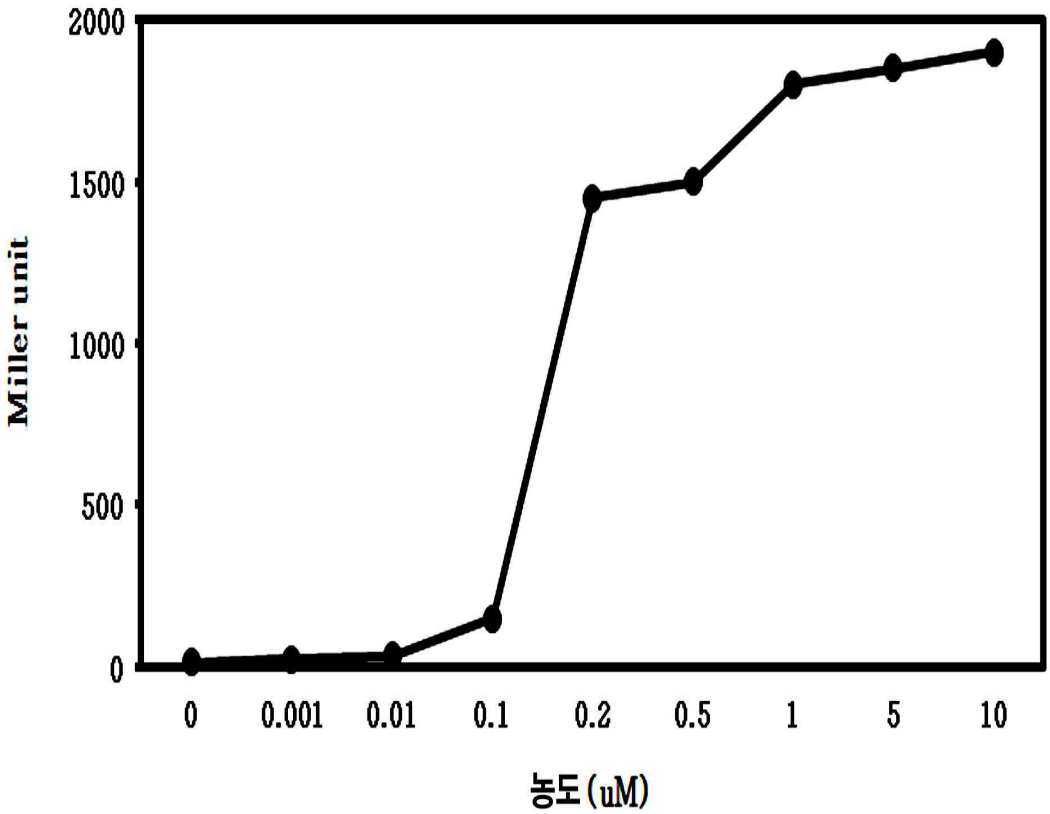
도면2


0070p
SpeI
BglII
ori
RBS
Ap
lacZ
0070p::pRADZ3
9708 bp
Cm
orfA
orfD/repU

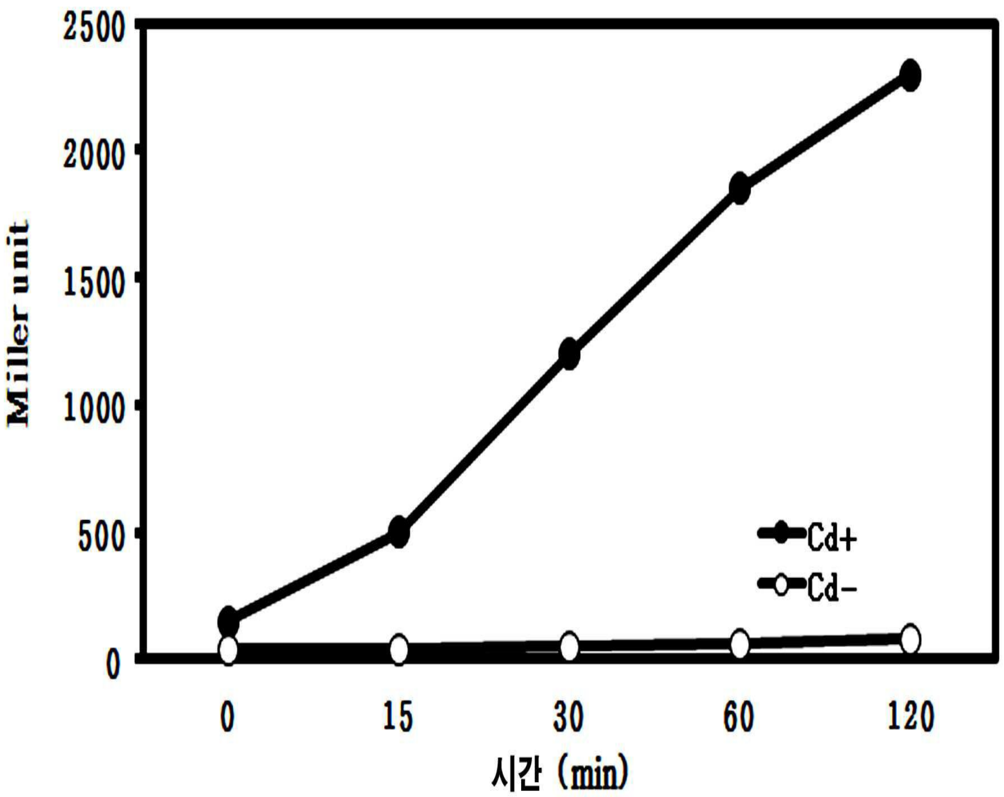
도면3


2000
1500
1000
500
0
Miller unit
Control
Cr
Pb
Ni
Cd
Zn
Fe
Cu
As
Mn
Hg
중금속

도면4


2000
1500
1000
500
0
Miller unit
0
0.001
0.01
0.1
0.2
0.5
1
5
10
농도(uM)

도면5



서 열 목 록

<110> Korea Atomic Energy Research Institute

<120> Biosensor for detecting cadmium and the manufacturing method thereof

<130> 10p-10-13

<160> 5

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DR_0070 gene forward primer

<400> 1

taaggaggag gcagatgttg 20

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DR_0070 gene reverse primer

<400> 2

cgatgggaaa ctggtagcc 19

<210> 3

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DR_0070 gene promoter forward primer

<400> 3

tcaagatctc ttatcgagtg cgtgcact 28

<210> 4

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DR_0070 gene promoter reverse primer

<400> 4

gtaactagtc tttcatgctc cacgttca 28

<210> 5

<211> 267

<212> DNA

<213> Deinococcus radiodurans

<220><221> promoter

<222> (1)..(267)

<223> DR_0070 gene promoter sequence

<400> 5

cttatcgagt gcgtgcactg cggcttgcag cgccgggtga ccatgcccag cctccctgct 60

ccagcgcccg cccgcaaacc cgagcggcgg ctgttcgggc tcttgcgaat ctgaaggtct 120

tggtgcccgg cctctgctgg gaggcgggac actggcaccg gcttccccga tgtgttatgt 180

tatttacgta aggaggaggc agatgttgca gattgaattt atcaccgacc tgggtgcgcg 240

ggtcacggtg aacgtggagc atgaaag 267