

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 15/78 (2006.01)

C12Q 1/02 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2006-0116418

(43) 공개일자 2006년11월15일

(21) 출원번호 10-2005-0038678

(22) 출원일자 2005년05월10일

(71) 출원인 고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자 박우준
서울 성북구 종암동 I-PARK 현대아파트 105동 503호
이윤호
서울 강서구 방화1동 248-8 301호
정의용
서울 중구 신당동 남산타운 아파트 3동 1503호

(74) 대리인 김선애

심사청구 : 있음

(54) 산화적 스트레스 탐지용 유전자 구조체 및 이를 이용한바이오센서

요약

본 발명은 토양 모델 미생물인 슈도모나스 푸티다 KT2440(*Pseudomonas putida* KT2440)의 페레독신-NADP⁺ 리덕타제(Ferredoxin-NADP⁺ reductase; *fpr*) 프로모터의 프로모터 및 상기 프로모터에 작동가능하게 연결된 GFP(green fluorescent protein; GFP) 유전자를 포함하는 유전자 구조체(transcriptional fusion construct) 및 상기 유전자 구조체로 형질전환된 슈도모나스 푸티다 KT2440(*Pseudomonas putida* KT2440) 리포터 균주를 포함하는 산화적 스트레스 유발 오염물질을 탐지할 수 있는 바이오센서에 관한 것이다. 상기한 구성의 본 발명에 의하면, 파라코트, 메나디온, 과산화수소 등 다양한 산화적 스트레스 유발 환경오염물질을 신속, 정확하고 경제적으로 탐지할 수 있는 이점이 있다.

대표도

도 5

색인어

산화적 스트레스, GFP 발현, 슈도모나스 푸티다 KT2440, 환경오염, 바이오모니터링

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명에 의한 슈도모나스 KT2440(*Pseudomonas putida* KT2440)의 페레독신-NADP⁺ 리덕타제 유전자(*fpr*)가 파라코트에 의해 유도되는 것을 나타내는 노던분석 결과 도면이다.

도 2는 본 발명에 의한 슈도모나스 KT2440(*Pseudomonas putida* KT2440)의 페레독신-NADP⁺ 리덕타제 유전자(*fpr*)의 프로모터 염기서열을 나타내는 도면이다.

도 3a ~ 도 3d는 산화적 스트레스 유발 오염물질 바이오모니터링을 위하여 제작된 본 발명에 의한 슈도모나스 푸티다 KT2440(*Pseudomonas putida* KT2440) 리포터 균주를 이용하여 파라코트(paraquat; PQ)에 의해 GFP가 발현된 상태를 보인 사진들이다.

도 3a: 위상차 현미경(Phase contrast microscope)을 이용하여 얻어진 LB 배지(Luria-Burtani media)에서의 미생물 사진, 도 3b: 형광현미경을 이용하여 얻어진 LB 배지에서의 미생물 사진, 도 3c: 위상차 현미경을 이용하여 얻어진 파라코트(0.2mM)를 함유한 LB 배지에서의 미생물 사진, 도 3d: 형광현미경을 이용하여 얻어진 파라코트(0.2mM)를 함유한 LB 배지에서의 미생물 사진.

도 3e는 도 3b 및 도 3d의 미생물의 GFP 형광정도를 측정하기 위해, 형광측정기(victor³)를 이용하여 측정된 상대적 형광값을 나타내는 그래프이다.

도 4는 파라코트 주입 농도 및 주입 후 배양시간에 따른 본 발명에 의한 리포터 균주의 액체배양중의 형광값을 나타내는 그래프이다.

도 5는 환경오염물질별 주입 농도 및 주입 후 배양시간에 따른 본 발명에 의한 리포터 균주의 배양중의 형광값을 나타내는 그래프이다.

도 6은 환경오염물질의 존재 하에 본 발명에 의한 리포터 균주의 발현여부를 확인하기 위해 노던분석한 결과를 나타내는 도면이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 산화적 스트레스 탐지용 유전자 구조체, 이를 이용한 리포터 균주를 포함하는 바이오센서 및 상기 바이오센서를 이용하여 산화적 스트레스 유발 오염물질을 탐지하는 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 다양한 산화적 스트레스 유발 오염물질을 단시간 내에 경제적으로 탐지할 수 있는 산화적 스트레스 탐지용 유전자 구조체, 이를 이용한 바이오모니터링 리포터 균주를 포함하는 바이오센서 및 상기 바이오센서를 이용한 산화적 스트레스 유발 오염물질을 탐지하는 방법에 관한 것이다.

산화적 스트레스는 활성산소종인 자유라디칼의 형태로 세포막, 단백질, 핵산 등의 생체 고분자를 변형시킴으로써 생태계를 이루는 미생물, 식물, 동물에 심각한 손상을 주며, 또한 인간에 있어서도 알츠하이머와 같은 퇴행성 정신질환, 당뇨병 그리고 노화와 여러 종류의 암에 이르는 치명적인 질환을 유발한다고 알려져 있다. 따라서 이러한 산화적 스트레스를 야기시키는 자연적 또는 인위적인 유해 오염물질에 대한 평가가 요구되는 실정이다.

환경오염물질의 모니터링에 있어서 미생물을 이용한 홀-셀 리포터(whole-cell reporter)는 화학적으로 오염물질을 확인하는 방법에 비해 경제적이며 간단하여 많은 각광을 받고 있다. 따라서 오염물질의 대사에 의해 피해를 확인할 수 있는 생물학적 탐지방법에 대해 많은 연구가 이루어지고 있다.

보다 구체적으로는 세포의 유전자 손상시 발현되는 관련 유전자의 프로모터와 유전자군을 리포터 유전자와 결합하여 손쉽게 유전자 손상 물질의 탐지할 수 있는 유전자 재조합체 개발이 이루어지고 있다.

국내 특허 제473350호에는 과산화수소는 물론 파라코트 등의 산화적 손상을 주는 물질에 민감하게 반응하는 Pqi-5 단백질의 pqi-5 프로모터와 발광유전자를 결합하여 재조합 플라스미드 pPQI5를 제작하고 이 플라스미드를 대장균에 도입하여 세포의 산화적 손상을 유도하는 물질을 탐지하게 될 경우 발광성이 증가하도록 형질 전환하여, 리포터 유전자의 종류에 따라 화학물질의 독성 정도를 산화적 손상으로 구분하여 민감하게 평가할 수 있도록 한 재조합 박테리아에 대해 개시되어 있다.

이러한 연구에도 불구하고 산화적 스트레스를 유발하는 보다 다양한 환경오염물질을 신속하고, 정확하게 저렴한 비용으로 탐지할 수 있는 방법에 대한 요구가 계속적으로 있어 왔다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 산화적 스트레스를 유발하는 보다 다양한 환경오염물질을 신속하고, 정확하게 저렴한 비용으로 탐지할 수 있는 유전자 구조체를 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 상기 유전자 구조체에 의해 형질전환된 리포터 균주를 포함하는 산화적 스트레스 유발 오염물질을 탐지할 수 있는 바이오센서를 제공하고자 하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 상기 신규의 바이오센서를 이용하여 다양한 환경오염물질을 탐지하는 방법을 제공하고자 하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

상기 목적을 달성하기 위해, 슈도모나스 푸티다 KT2440(*Pseudomonas putida* KT2440)의 페레독신-NADP⁺ 리덕타제(*fpr*) 유전자의 프로모터 및 상기 프로모터에 작동가능하게 연결된 GFP(Green Fluorescent Protein) 유전자를 포함하는 유전자 구조체를 제공한다.

또한, 본 발명은 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida* KT2440)의 페레독신-NADP⁺ 리덕타제(*fpr*) 유전자의 프로모터를 GFP 유전자를 포함하는 pRK415gfp에 도입하여 제작된 재조합백터를 제공한다.

나아가, 본 발명은 상기 유전자 구조체 또는 재조합백터를 도입하여 형질전환된 슈도모나스(*Pseudomonas*) 리포터 균주를 포함하는, 산화적 스트레스 유발 물질을 탐지하기 위한 바이오센서를 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 바이오센서를 산화적 스트레스 유발 오염물질에 노출시키고 GFP에 의한 형광값을 측정하여 산화적 스트레스 유발 오염물질을 탐지하는 산화적 스트레스 유발 오염물질의 탐지방법을 제공한다.

상기 슈도모나스는 리팜핀 내성 균주인 슈도모나스 푸티다 KT2440-R(*P. putida* KT2240-R) 균주인 것을 특징으로 한다.

상기 산화적 스트레스 유발 오염물질은 파라코트, 메나디온, 과산화수소, 가솔린, 디젤, 톨루엔, 페인트시너, 얼룩제거제, 담배연기, 살리실산염 및 벤조에이트 중 어느 하나인 것을 특징으로 한다.

이하, 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다.

본 발명자들은 파라코트(paraquat; 제초제)에 의해 강하게 유도되는 토양 모델 미생물인 슈도모나스 푸티다 KT2440(*Pseudomonas putida* KT2440)의 페레독신-NADP⁺ 리덕타제(ferredoxin-NADP⁺ reductase;*fpr*) 유전자를 발견하고, 이 유전자의 프로모터 및 안정적이고 다른 기질을 필요로 하지 않는 GFP 유전자를 포함하는 유전자 구조체(transcriptional fusion construct)를 제작하고 이를 포함한 리포터 균주의 탐지능력을 확인하여 본 발명을 완성하게 되었다.

보다 구체적으로 상기 *fpr* 유전자의 프로모터 부분은 슈도모나스 푸티다 KT2440(*Pseudomonas putida* KT2440)의 게놈 DNA 및 프라이머 Fpr-pro1 (CGCGAATTTCGCCGTTGAGCAGGTCTTC; 서열번호 1) 및, Fpr-pro3 (CGCGGATCCACGTTTCGTGGTTCATGTTGCTCA; 서열번호 2)을 이용하여 증폭된다.

이렇게 얻어진 417 bp의 유전자 단편(fragment; 서열번호 3)은 GFP를 가지고 있는 프로모터 확인용 벡터(promoter probing vector)에 도입되고 이 벡터를 이용하여 슈도모나스 속 균주가 형질전환되어 리포터 균주가 제작된다.

상기 프로모터 확인용 벡터는 예를 들어 pRK415gfp (Yin *et al.*, Appl. Environ. Microbiol. 2003)일 수 있고, 슈도모나스 속 균주는 리팜핀 내성 균주인 슈도모나스 푸티다 KT2440-R(*P. putida* KT2240-R) 균주일 수 있다.

이렇게 제작된 리포터 균주는 다양한 산화적 스트레스 유발 오염물질에 노출되면 GFP에 의한 형광값이 증가되므로 이를 확인하여 신속하고 경제적으로 산화적 스트레스 유발 오염물질을 탐지할 수 있다.

이하 실시예를 이용하여 상기와 같이 구성된 본 발명에 대해 보다 구체적으로 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명한 것이다.

실시예 1: 수퍼옥사이드 유발(superoxide-generating) 물질인 파라코트에 반응하는 리포터 균주 제작

슈도모나스 푸티다 KT2440의 페레독신-NADP⁺ 리덕타제(Ferredoxin-NADP⁺ reductase: *fpr*) 유전자가 파라코트(PQ)에 의해 강하게 유도되는 것을 노던분석 결과 확인하였다. 노던분석 결과를 도 1에 나타냈으며, 도 1에서 MD는 메나디온을, NO는 산화질소(nitric oxide)를 나타낸다.

상기 *fpr* 유전자의 프로모터 부분을 Fpr-pro1 (CGCGAATTCGCCGTTGAGCAGGTCTTC: 서열번호 1) 및, Fpr-pro3 (CGCGGATCCACGTTTCGTGGTTCATGTTGCTCA: 서열번호 2)의 프라이머 및 슈도모나스 푸티다(*P. putida* KT2440)의 게놈 DNA를 이용하여 증폭시켰다.

이때 PCR 조건은 다음과 같았다. 각 튜브의 반응혼합물(50 μ l)은 각 프라이머(0.5 μ m), 1X PCR 버퍼(Gibco BRL, Gaithersburg, MD), dNTP (0.2 mM), MgCl₂ (1.5 mM), 및 *Taq* DNA 폴리머라제 1.25 유닛(Gibco BRL, Gaithersburg, MD)로 구성되었다. 사이클은 94 °C에서 5분(1 cycle), 94 °C에서 1 분, 60 °C에서 1 분, 72 °C에서 1 분 (35 cycles); 72 °C에서 5 분(1 cycle)으로 이루어졌다. 앰프리콘(Amplicons)은 2% 아가로즈겔에서 전기영동으로 분리되었다.

이렇게 얻은 417 bp의 유전자 단편(도 2, 서열번호 3)을 GFP를 가지고 있는 프로모터 확인용 벡터인 pRK415gfp의 *EcoRI*/*Bam*HI 사이트에 리게이션(ligation)하여 S17-1 람다 *pir* 형질전환(S17-1 lamda *pir* transformation)하여 넣었다 (Simon R, Priefer U, Puhler A (1983), A broad host-range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. Bio/Technology 1:784-791; Yin, S., Fuangthong, M., Laratta, W. P., and Shapleigh, J. P. (2003), Use of a green fluorescent protein-based reporter fusion for detection of nitric oxide produced by denitrifiers. Appl. Environ. Microbiol. 69, 3938-3944). 이렇게 클로닝된 벡터(pFPRgfp)는 시퀀싱(sequencing)하여 삽입을 확인하였다.

S17-1 람다 *pir* (pFPRgfp)는 리팜핀 내성(rifampin resistant) 균주인 슈도모나스 푸티다 KT2440-R(*P. putida* KT2440-R) 균주와 바이패렌탈 컨쥬게이션(biparental conjugation)에 의하여 슈도모나스 푸티다 KT2440(*P. putida* KT2440 (pFPRgfp))을 제작하였다. 구체적인 실험방법은 상기 참고문헌을 따랐다.

실시예 2: 리포터 균주의 파라코트 노출시 형광도 측정

실시예 1에서 제작된 균주는 파라코트(paraquat)의 존재 하에서 LB배지(LB agar plate)에서 밤새(overnight) 키운 후 균주를 Axioskop 2 현광현미경(low-power objectives for scanning and a 100X Plan-Neofluar Objective, N.A 1.30)을 이용하여 형광이미지와 위상차현미경 이미지를 얻었다. 이미지들은 AxioCam를 이용하여 캡처하였으며 AxioVision 소프트웨어(AxioVision Version 3.1)를 이용하여 분석하였다(도 3a ~ 도 3d).

그 결과 파라코트 존재 하에서는 대조구(LB plate culture)의 경우 보다 훨씬 높은 GFP의 발현이 관찰되었다. 마이크로 플레이트 리더(microtiter plate reader VICTOR³, Biorad)를 이용하여 GFP의 형광값을 비교한 결과 (도 3e), 현미경의 결과와 마찬가지로 파라코트 존재 하에서 높은 RFU를 얻었다. 상기 RFU (relative fluorescence unit)은 배양균주의 형광값을 배양균주의 OD₆₀₀ 값으로 나누어 보정한 값이다. 표시된 값은 세 번의 독립된 실험 후 얻은 평균값과 표준편차이다.

상기 결과로 실시예 1에서 제작된 산화적 스트레스 탐지용 리포터 균주가 신뢰할 수 있으며 산화적 스트레스 유발 환경오염물질의 탐지에 유용하게 쓰일 것으로 기대된다.

실시예 3: 농도, 시간별 파라코트에 의한 GFP 발현정도 측정

실시예 1에서 제작된 리포터 균주를 이용하여 파라코트에 의한 농도별, 시간별 GFP 발현 정도를 측정한 결과를 도 4에 나타냈다. 도 4는 다양한 파라코트 농도와 배양 시간에서 파라코트를 넣은 후 리포터 균주인 슈도모나스 푸티다 KT2440(*P. putida* KT2440 (pFPRgfp)) 액체배양 중의 형광값을 얻은 것을 나타낸 것이다. 도 4의 비(Ratio)는 다음의 식에 의한 값이다.

$$\text{비(Ratio)} =$$

[형광값/오염물질에 노출된 세포의 OD₆₀₀(fluorescence intensity/OD₆₀₀ of exposed cells)]/[형광값/오염물질에 노출되지 않은 미처리 세포의 OD₆₀₀(fluorescence intensity/OD₆₀₀ in chemical untreated bacterial cells)]

상기 도면에 도시된 바와 같이 농도별 발현정도에서는 0.05 ~ 1.0 mM 파라코트 범위에서는 대체로 비례하여 증가하는 것으로 나타났으며, 높은 10 mM 파라코트에서는 1.0 mM 파라코트의 효과보다 감소되는 결과를 얻었다. 10 mM정도 되는 높은 파라코트 농도는 심하게 생장을 억제하기 때문에 GFP의 발현이 제대로 일어나지 않았거나 프로모터 결합부위(binding site)가 포화되었을 가능성이 있다.

시간별 발현정도에서는 3 시간 및 6시간에서 가장 높은 발현을 보였으며 24시간 후에는 3시간의 경우보다 발현이 감소되는 결과를 얻었다.

실시예 4: 환경 오염물질별 산화적 스트레스 유발 정도 측정

제작된 리포터 균주를 이용하여 환경 오염물질별 산화적 스트레스 유발정도를 측정하였다. LB 액체배지에서 밤새(overnight) 키운 균주를 다시 후레쉬(fresh)하게 OD₆₀₀ 이 0.3정도 될 때까지 키운 후 오염물질의 존재 하에 다시 3시간을 더 배양하였다.

2 ml의 균주를 취한 후 원심분리하여 스핀다운(spin down)하고 그 후 800 μ l의 PBS(phosphate buffered saline)으로 두 번 세척한 후 형광값(fluorescence intensity)을 측정하여 그 결과를 도 5에 나타내었다. 백그라운드 대조군(Background control)은 LB 액체배지에 다른 화학물질을 넣지 않고 3시간 배양한 값이다. 담배연기의 경우 피운 담배 2모금을 15 mL 팔콘튜브(falcon tube)에 넣은 후 밀봉하고 3시간 배양 후 얻은 값이다.

그 결과 파라코트뿐만 아니라 메나디온(menadione; MD), 과산화수소 모두 *fpr-gfp* 구조체(construct)의 발현을 증가시켰다. 특히 페인트시너(paint thinner 1%)와 얼룩제거제(stain cleaner 0.5%)는 GFP 발현을 가장 크게 증가시켰으며 거의 모든 석유제품(petroleum product; gasoline, diesel, was polisher etc)은 리포터균주의 GFP 발현을 증가시켰다.

벤조에이트의 경우 Cu²⁺와 함께 존재할 때 더 많은 GFP 발현을 증가시키는 보아, 금속이 산화환원 싸이클 시약(redox-cycling reagent)의 수퍼옥사이드 생성을 촉진시킬 수 있다는 결과를 얻었다. 톨루엔과 살리실산염(salicylate) 모두 3 ~ 4배의 GFP 발현 증가를 보였다.

나프탈렌의 경우에는 GFP 발현정도가 증가하지 않는 것으로 보아 산화적 스트레스는 크게 유발하지 않는 것으로 보인다. 무독성 대조군(non-toxic negative control)으로는 10 mM 숙신산(succinate)과 2% 글루코즈(glucose)를 LB 액체배지에 넣어 배양하였고 그 결과 GFP 발현이 증가하지 않았다.

상기 결과들을 종합해 볼 때, 제작된 리포터 균주를 이용하면 다양한 오염물질의 산화적 스트레스 유발과 정도를 신뢰할 수 있게 측정할 수 있다.

실시예 5: 노던분석(Northern blot analysis)을 통한 오염물질의 산화적 스트레스 유발 확인

상기 결과를 확인하기 위하여 파라코트, 메나디온, 과산화수소, 벤조에이트 존재 하에 *fpr* 유전자의 발현을 실제 mRNA의 양 측정을 통해 확인하기 위해, 노던분석을 하였고 그 결과를 도 6에 나타냈다. 상기 도면에 표시되어 있는 화학물질의 농도로 10분간 처리하여 총RNA를 분리하였으며 10 μ g의 총RNA를 로딩하였다.

그 결과 리포터 균주와 동일한 결과를 얻었으며 벤조에이트는 Cu²⁺ 존재 하에 훨씬 많은 *fpr* 유전자 발현의 결과를 얻었다. 메나디온의 경우 리포터 균주에서 얻은 발현정도보다 더 큰 차이를 노던분석에서 얻었으며 이는 측정시간내의 mRNA의 양을 측정하는 노던분석과 *gfp*의 단백질 발현을 측정하는 리포터 균주에서의 차이일 수도 있다.

발명의 효과

이상에서 설명한 바와 같이, 본 발명은 다양한 산화적 스트레스 유발 오염물질을 신속, 정확하고 저렴한 비용으로 탐지할 수 있는 유전자 구조체, 상기 유전자 구조체에 의해 형질전환된 리포터 균주를 포함하는 바이오센서 및 이를 이용한 산화적 스트레스 유발 오염물질의 탐지방법을 제공한다.

따라서 본 발명은 인간을 비롯한 생태계에 치명적인 손상을 줄 수 있는 산화적 스트레스에 대한 유해성 평가의 중요한 기준이 되는 환경모니터링 분야에서 매우 유용한 발명이라 할 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

슈도모나스 푸티다 KT2440(*Pseudomonas putida* KT2440)의 페레독신-NADP⁺ 리덕타제(*fpr*) 유전자의 프로모터 및 상기 프로모터에 작동가능하게 연결된 GFP(Green Fluorescent Protein) 유전자를 포함하는 유전자 구조체.

청구항 2.

슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida* KT2440)의 페레독신-NADP⁺ 리덕타제(*fpr*) 유전자의 프로모터를 GFP 유전자를 포함하는 pRK415gfp에 도입하여 제작된 재조합벡터.

청구항 3.

제1항 기재의 유전자 구조체 또는 제2항 기재의 재조합벡터를 도입하여 형질전환된 슈도모나스(*Pseudomonas*) 리포터 균주를 포함하는, 산화적 스트레스 유발 오염물질을 탐지하기 위한 바이오센서.

청구항 4.

제3항에 있어서, 상기 슈도모나스는 리팜핀 내성 균주인 슈도모나스 푸티다KT2440-R(*P. putida* KT2240-R) 균주인 것을 특징으로 바이오센서.

청구항 5.

제1항 기재의 유전자 구조체 또는 제2항 기재의 재조합벡터를 도입하여 형질전환된 슈도모나스(*Pseudomonas*) 리포터 균주를 포함하는 바이오센서를 산화적 스트레스 유발 오염물질에 노출시키고 GFP에 의한 형광값을 측정하여 산화적 스트레스 유발 오염물질을 탐지하는 산화적 스트레스 유발 오염물질의 탐지방법.

청구항 6.

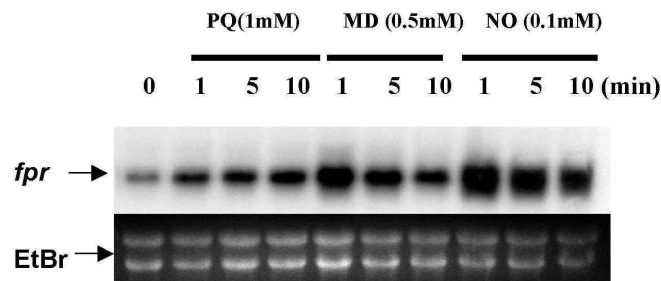
제5항에 있어서, 상기 산화적 스트레스 유발 오염물질은 파라코트, 메나디온, 과산화수소, 가솔린, 디젤, 톨루엔, 페인트시너, 얼룩제거제, 담배연기, 살리실산염 및 벤조에이트 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는 산화적 스트레스 유발 오염물질의 탐지방법.

청구항 7.

제5항에 있어서, 상기 형광값 측정은 상기 리포터 군주가 산화적 스트레스 유발 오염물질 노출되고 3 ~ 6 시간 배양된 후 이루어지는 것을 특징으로 하는 산화적 스트레스 유발 오염물질의 탐지방법.

도면

도면1



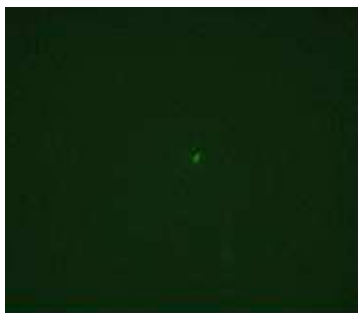
도면2

```
CGCGAATTCGCCGTTGAGCAGGTCTTCGATTTCTTGGCCTGGTCAAGCAGGGCTACT
GCTTGTGGCAGCAATTGATGGCCCAGGGCATTGAGGGCCAGGCGTTTGCCGGCACGGT
CGAACAGCTGGCAGCTCGATTGCCGCTCCAGTTCCGTGATAGAGGTACTGGCGGCCGA
CTGCGACAGCGCCAACAGGCTGGCGGCCCGAGAGACGCTTTGGTGCTGGGCGACGGC
GACGAAGACTTGCAATTGACGGAGTGTGAATCGCATATCGATATAACCGATAACACA
TATCTTGATAATCCAGTTAACAGATATTGTGCTGCCCCCTAAACTATTGCGCAACTGT
GCGCTTTGCGCGCGCGTTTTTCTTCAGGAGCCCCATCGATGAGCAACATGAACCACGA
ACGTGGATCCGCG
```

도면3a



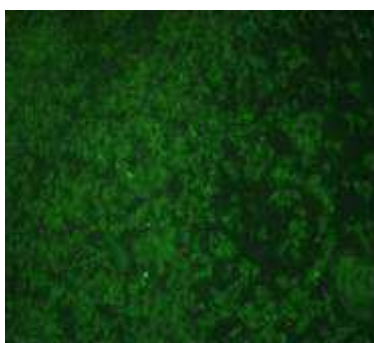
도면3b



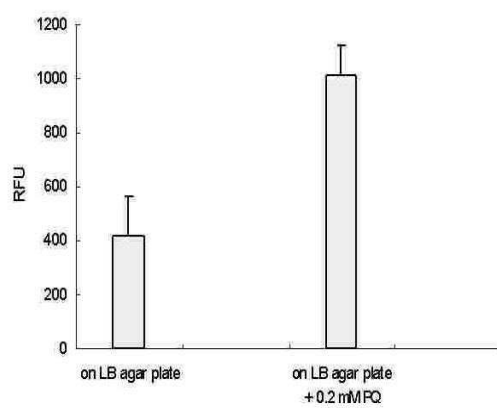
도면3c



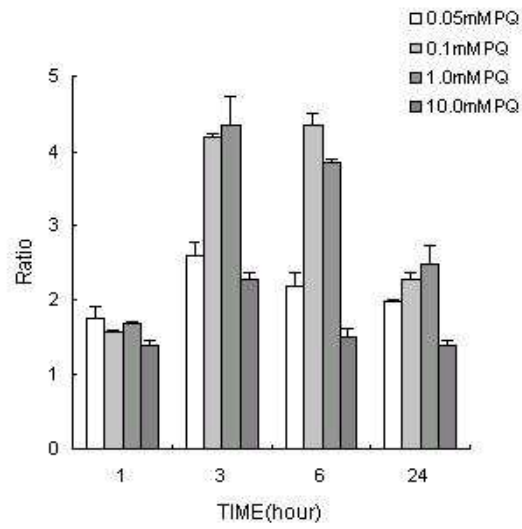
도면3d



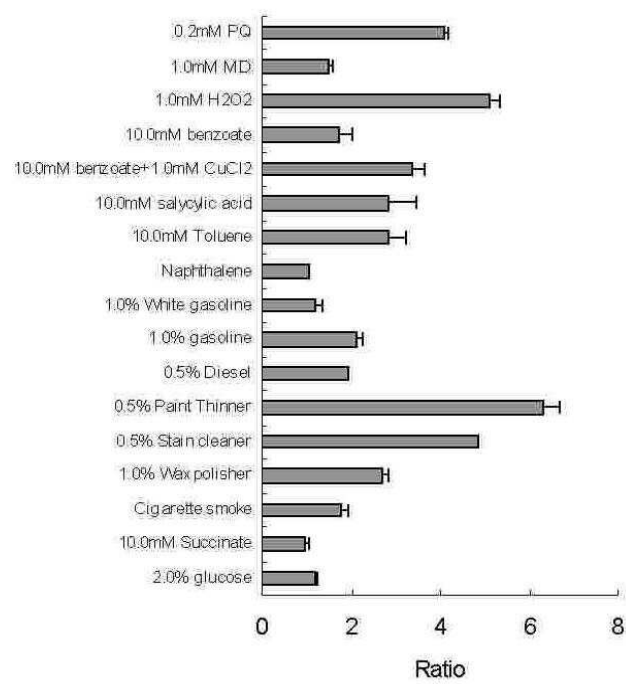
도면3e



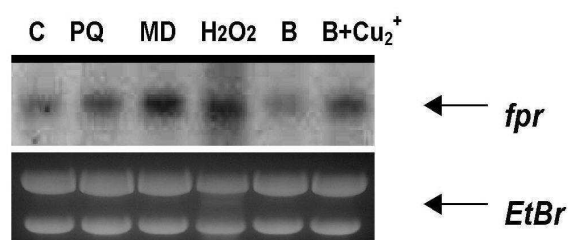
도면4



도면5



도면6



서열목록

<110>	Korea University Industry and Academy Cooperation Foundation	
<120>	Genetic construct for detection oxidative stress and biosensor using the same	
<130>	P11-050426-01	
<160>	3	
<170>	KopatentIn 1.71	
<210>	1	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	PCR PRIMER	
<400>	1	
	cgcgaaattcg ccgttgagca ggtcttc	27
<210>	2	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	PCR PRIMER	
<400>	2	
	cgcggatcca cgctcgtggg tcatgttgct ca	32
<210>	3	
<211>	417	
<212>	DNA	
<213>	Pseudomonas putida KT2440	
<400>	3	
	cgcgaaattcg ccgttgagca ggtcttcgat ttccttggcc tggtaagca gggctactgc	60
	ttgtggcagc aattgatggc ccagggcatt gagggccagg cgtttgccgg cacggtcgaa	120
	cagctggcag ctcgattgcc gctccagttc cgtgatagag gtactggcgg ccgactgcga	180

cagcgccaac aggctggcgg cccgagagac gctttggtgc tgggcgacgg cgacgaagac	240
ttgcatttga cggagtgtga atcgcatatc gatataaccg ataacacata tcttgataat	300
ccagttaaca gatattgtcg ctgcccctaa actattgcgc aactgtgcgc tttgcgcgcg	360
cgtttttctt caggagcccc atcgatgagc aacatgaacc acgaacgtgg atccgcg	417