



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년04월24일
(11) 등록번호 10-0824541
(24) 등록일자 2008년04월16일

(51) Int. Cl.

C12N 1/19 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0019279

(22) 출원일자 2007년02월26일

심사청구일자 2007년02월26일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020060116418 A

(뒷면에 계속)

(73) 특허권자

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자

박우준

서울 성북구 길음동 길음뉴타운 대우푸르지오 22
1동 504호

강윤석

제주 제주시 화북1동 1943-10번지

(74) 대리인

김선애

전체 청구항 수 : 총 16 항

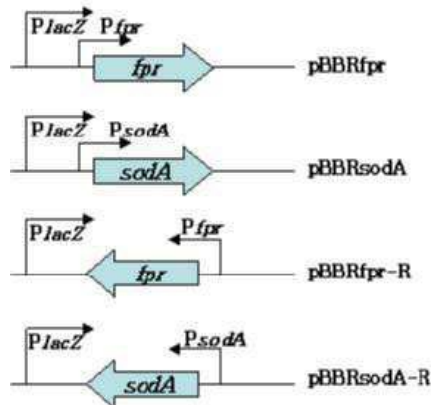
심사관 : 이재정

(54) 항산화 효소의 과발현을 통해 환경오염물질 분해능이향상된 균주

(57) 요약

본 발명은 환경오염물질 분해능이 향상된 슈도모나스 균주(*Pseudomonas frederiksbergensis* strain As1)에 관한 것이다. 본 발명은 항산화 효소인 fpr 또는 sod의 과발현을 통해 환경오염물질인 PAH를 분해시 발생하는 산화적 스트레스를 감소시켜 환경오염물질을 보다 효율적으로 분해할 수 있는 슈도모나스 균주 및 이를 이용하여 미생물이 받는 산화적 스트레스를 감지하는 바이오 모니터링 방법을 제공한다.

대표도 - 도1a



(56) 선행기술조사문헌
US20060234337 A1
KR1020030040923 A
KR1020060132587 A
서열

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 3의 염기서열을 갖는, 항산화 효소 페레독신 NADP⁺ 리덕타제(ferredoxin-NADP⁺ reductase; fpr) 유전자 및 그 프로모터의 fpr 절편을 포함하는 슈도모나스 균주(*Pseudomonas frederiksbergensis* As1).

청구항 2

서열번호 7의 염기서열을 갖는, 항산화 효소 수퍼옥사이드 디스무타제(superoxide dismutase; sod) 유전자 및 그 프로모터의 sod 절편을 포함하는 슈도모나스 균주(*Pseudomonas frederiksbergensis* As1).

청구항 3

서열번호 3의 염기서열을 갖는, 항산화 효소 fpr 유전자 및 그 프로모터의 fpr 절편을 포함하여 항산화 효소의 과다발현을 유도하는 벡터.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 fpr 절편을 HindIII 및 XhoI의 제한효소로 처리하여 pBBR1 MCS2에 리게이션한, 항산화 효소의 과다발현을 유도하는 벡터(pBBRfpr).

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 fpr 절편을 HindIII 및 KpnI의 제한효소로 처리하여 pBBR1 MCS2에 리게이션한, 산화적 스트레스 하에서 항산화 효소의 과다발현을 유도하는 벡터(pBBRfpr-R).

청구항 6

서열번호 7의 염기서열을 갖는, 항산화 효소 sodA 유전자 및 그 프로모터의 sodA 절편을 포함하여 항산화 효소의 과다발현을 유도하는 벡터.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 sodA 절편을 HindIII 및 BamHI의 제한효소로 처리하여 pBBR1 MCS2에 리게이션한, 항산화 효소의 과다발현을 유도하는 벡터(pBBRsodA).

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 sodA 절편을 HindIII 및 SalI의 제한효소로 처리하여 pBBR1 MCS2에 리게이션한, 산화적 스트레스 하에서 항산화 효소의 과다발현을 유도하는 벡터(pBBRsodA-R).

청구항 9

제3항 내지 제8항 중 어느 한 항에 기재된 벡터를 포함하는 재조합 슈도모나스 균주.

청구항 10

제3항 내지 제8항 중 어느 한 항에 기재된 벡터; 및

서열번호 11의 염기서열을 갖는, fpr 유전자와 그 프로모터의 fpr 절편을 포함하는 산화적 스트레스 측정 바이오센서 벡터를 포함하는 재조합 슈도모나스 균주(*Pseudomonas frederiksbergensis* strain As1).

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 바이오센서 벡터는 pRK415gfp 벡터를 포함하는 바이오센서 벡터(pDCFPRgfp)인 균주.

청구항 12

제10항의 균주를 이용하여 미생물이 받는 산화적 스트레스를 감지하는 바이오 모니터링 방법.

청구항 13

항산화 효소인 fpr 또는 sodA의 과발현을 통해 오염물질 분해 미생물의 오염물질 분해능을 향상시키는 방법.

청구항 14

서열번호 3의 염기서열을 갖는 fpr 절편을 증폭하기 위한 서열번호 1, 서열번호 2 또는 서열번호 4로 표시되는 PCR용 프라이머.

청구항 15

서열번호 7의 염기서열을 갖는 sodA 절편을 증폭하기 위한 서열번호 5, 서열번호 6 또는 서열번호 8로 표시되는 PCR용 프라이머.

청구항 16

서열번호 11의 염기서열을 갖는 fpr 절편을 증폭하기 위한 서열번호 9 또는 서열번호 10으로 표시되는 PCR용 프라이머.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <8> 본 발명은 환경오염물질 분해능이 향상된 균주에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 항산화 효소의 과발현을 통해 환경오염물질인 PAH를 효율적으로 분해할 수 있는 슈도모나스 균주(*Pseudomonas frederiksbergensis* strain As1) 및 이를 이용하여 미생물이 받는 산화적 스트레스를 감지하는 바이오모니터링 방법에 관한 것이다.
- <9> 환경오염물질인 다환방향족 화합물(PAH)은 화석연료의 불완전연소에 의해 생성될 수 있으며, 유류 수송선의 사고에 의하여 해양 및 해안이 PAH에 의하여 오염되거나 유류의 저장시설에서 유류가 누출되어 인간을 비롯한 자연 생태계에 큰 환경적 위험을 야기하며 심각한 환경오염문제로 대두되고 있다.
- <10> 나아가 PAH는 돌연변이와 암을 야기하는 유해물질로서, 분해가 용이하지 않은 난분해성 물질로 알려져 있다. 따라서 PAH 오염으로부터 지구생태계를 보호하기 위해서는 PAH를 경제적이며 환경 친화적으로 분해하는 기술의 개발이 시급히 요구되고 있다.
- <11> 최근 PAH를 환경 친화적으로 분해하기 위한 방법으로 PAH 분해능이 우수한 미생물을 오염현장에 접종시켜 분해 활성을 향상시키는 생물학적 방법이 활용되고 있다. 그러나 PAH의 낮은 물 용해성으로 인해 미생물에 의한 생분해 역시 큰 효과를 기대하기 힘들고, 더욱이 PAH가 분해되면서 발생하는 활성산소족은 미생물에 독성 기작으로 작용하기도 한다. 따라서 이러한 생물학적 방법은 PAH를 효율적으로 분해할 수 있는 유용 미생물 자원 확보가 관건이라 할 수 있어 우수한 PAH 분해능을 발휘할 수 있는 유용 미생물의 확보가 절실히 요구되고 있다.
- <12> 오염토양으로부터 분리한 슈도모나스 균주(*Pseudomonas frederiksbergensis* As1)는 PAH 분해능이 있는 것으로 알려져 있으며(Kang *et al.*, 2006, Journal of Microbiology and Biotechnology, 16: 1819-1825), 대한민국 특허 제10-0325252호에는 방향족 화합물을 분해하는 미생물 로도코커스피리디노보란스 PDB9이 개시되어 있다.
- <13> 기존 보고된 미생물에 의한 방향족 화합물 분해는 대부분이 균주 자체의 분해능에 의존하고 있으며, PAH 분해 균주가 방향족 화합물 분해시에 발생하는 활성산소에 의해 야기되는 산화적 스트레스를 항산화효소의 과발현을 통해 감소시켜 오염물질의 분해능을 향상시키는 연구에 대해서는 현재까지 보고된 바가 없다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

- <14> 본 발명은 종래 기술의 문제점 및 상기 요구를 해결하기 위해 안출된 것으로, 본 발명의 목적은 PAH 분해 균주가 방향족 화합물 분해시에 발생하는 활성산소에 의해 야기되는 산화적 스트레스를 항산화효소(FPR, SOD)의 과발현을 통해 감소시켜 오염물질 분해능이 향상된 균주를 제공하는 것이다.

- <15> 본 발명의 다른 목적은 오염물질 분해능을 향상시키기 위해 균주에 도입되는 항산화효소 과발현을 유도하는 벡터를 제공하는 것이다.
- <16> 본 발명의 또 다른 목적은 상기 균주를 이용하여 미생물이 받는 산화적 스트레스를 감지하는 바이오 모니터링 방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

- <17> 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명자들은 항산화효소의 과발현을 통해 PAH 분해 균주가 방향족 화합물 분해시에 발생하는 활성산소를 제거하여 미생물에 의한 PAH 분해 효율을 높일 수 있다는 것을 확인하여 본 발명을 완성하게 되었다.
- <18> 따라서 본 발명은 항산화 효소 유전자 및 그 프로모터를 포함하여 항산화 효소가 과다발현되는 슈도모나스 균주(*Pseudomonas frederiksbergensis* As1)를 제공한다.
- <19> 바람직하게는 상기 균주는 서열번호 3의 염기서열을 갖는, 항산화 효소 페레독신 NADP+ 리덕타제(ferredoxin-NADP+ reductase; 이하, fpr라고 함) 유전자 및 그 프로모터의 fpr 절편을 포함한다.
- <20> 바람직하게 상기 균주는 서열번호 7의 염기서열을 갖는, 항산화 효소 슈퍼옥사이드 디스뮤타제(superoxide dismutase; 이하, sod라고 함) 유전자 및 그 프로모터의 sodA 절편을 포함한다.
- <21> 본 발명은 서열번호 3의 염기서열을 갖는, 항산화 효소 fpr 유전자 및 그 프로모터의 fpr 절편을 포함하여 항산화 효소의 과다발현을 유도하는 벡터를 제공한다.
- <22> 바람직하게는 상기 벡터는 상기 fpr 절편을 HindIII 및 XhoI의 제한효소로 처리하여 pBBR1 MCS2에 리게이션한, 항산화 효소의 과다발현을 유도하는 벡터(pBBRfpr)이다.
- <23> 또한, 상기 벡터는 상기 fpr 절편을 HindIII 및 KpnI의 제한효소로 처리하여 pBBR1 MCS2에 리게이션한, 산화적 스트레스 하에서 항산화 효소의 과다발현을 유도하는 벡터(pBBRfpr-R)이다.
- <24> 나아가 본 발명은 서열번호 7의 염기서열을 갖는, 항산화 효소 sod 유전자 및 그 프로모터의 sodA 절편을 포함하여 항산화 효소의 과다발현을 유도하는 벡터를 제공한다.
- <25> 바람직하게는 상기 벡터는 상기 sodA 절편을 HindIII 및 BamHI의 제한효소로 처리하여 pBBR1 MCS2에 리게이션한, 항산화 효소의 과다발현을 유도하는 벡터(pBBRsodA)이다.
- <26> 또한, 상기 벡터는 상기 sodA 절편을 HindIII 및 SalI의 제한효소로 처리하여 pBBR1 MCS2에 리게이션한, 산화적 스트레스 하에서 항산화 효소의 과다발현을 유도하는 벡터(pBBRsodA-R)이다.
- <27> 상기 pBBRfpr과 pBBRsodA는 pBBR1 MCS2 벡터의 lacZ 프로모터(promoter) 및 각각의 항산화 효소 프로모터에 의해 항산화 효소가 항상 발현되며, pBBRfpr-R과 pBBRsodA-R은 각각의 항산화 효소 프로모터에 의해서만, 특히 산화적 스트레스 하에서 발현되어진다.
- <28> 상기 서열번호 3의 fpr 절편 및 서열번호 7의 sodA 절편은 슈도모나스 푸티다 KT2440 (*Pseudomonas putida* KT2440, GenBank accession number; NC002947)에서 유래한다.
- <29> 상기 본 발명에 의해 제작된 벡터들은 공지의 접합(conjugation) 방법(Lee et al., 2006, Biochemical and Biophysical Research Communications, 339: 1246-1254)을 통해 슈도모나스 균주(*Pseudomonas frederiksbergensis* strain As1)로 옮겨질 수 있다.
- <30> 본 발명에 의한 상기 균주들은 항산화 효소인 FPR 또는 SOD의 과발현을 통해 나프탈렌 등 PAH의 분해 시 발생하는 산화적 스트레스를 감소시켜 슈도모나스 균주(*Pseudomonas frederiksbergensis* strain As1)의 환경오염물질 분해능을 향상시킬 수 있다. 상기한 구성의 본 발명에 의하면 환경 오염물질 분해에 소모되는 시간과 경비를 절감할 수 있는 효과를 도모할 수 있다.
- <31> 나아가 본 발명은 상기 본 발명에 의한 벡터들 중 어느 하나와 산화적 스트레스 측정 바이오센서 벡터를 포함하는 제조합 슈도모나스(*Pseudomonas frederiksbergensis* strain As1) 균주를 제공한다.
- <32> 바람직하게는 상기 바이오센서 벡터는 서열번호 11의 염기서열을 갖는, fpr 유전자와 그 프로모터의 fpr 절편 및 pRK415gfp 벡터를 포함한다.

- <33> 상기 서열번호 11의 *fpr* 절편은 슈도모나스 시링게 DC3000(*Pseudomonas syringae* DC3000) 균주(GenBank accession number: AE016853, 1234bp)에서 유래한다.
- <34> 나아가 본 발명은 서열번호 3의 염기서열을 갖는 *fpr* 절편을 증폭하기 위한 서열번호 1, 서열번호 2 또는 서열번호 4로 표시되는 PCR용 프라이머를 제공한다.
- <35> 또한, 본 발명은 서열번호 7의 염기서열을 갖는 *sodA* 절편을 증폭하기 위한 서열번호 5, 서열번호 6 또는 서열번호 8로 표시되는 PCR용 프라이머를 제공한다.
- <36> 본 발명은 서열번호 11의 염기서열을 갖는 *fpr* 절편을 증폭하기 위한 서열번호 9 또는 서열번호 10으로 표시되는 PCR용 프라이머도 제공한다.
- <37> 상기 제조함 슈도모나스 (*Pseudomonas frederiksbergensis* strain As1) 균주를 이용하면 오염 환경 내에서 미생물이 받는 산화적 스트레스를 감지하는 바이오 모니터링이 가능하다. 따라서 본원발명은 미생물에 의한 보다 효율적인 폐수처리, 오염토양 정화 및 환경 복원 등의 생물학적 복원연구와 미생물을 이용한 유용물질 생산에 크게 기여할 수 있어 매우 유용한 발명이라 할 것이다.
- <38> 이와 더불어 상기 명시된 2종류의 항산화 효소를 과발현시킨 슈도모나스 (*Pseudomonas frederiksbergensis* strain As1) 균주는 향상된 오염물질 분해능뿐만 아니라, 일반 미생물 배지에서도 높은 성장능을 보여 다량의 미생물을 이용한 산업 및 공업 분야에서 응용되어질 수 있다
- <39> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- <40> **실시예 1: 항산화 효소 FPR (ferredoxin-NADP+ reductase)와 SOD (superoxide dimutase)의 발현 균주 구축**
- <41> 토양 미생물 슈도모나스 푸티다 KT2440(*Pseudomonas putida* KT2440; GenBank accession number; NC002947)으로부터 *fpr* 유전자의 프로모터와 ORF 부분을 Fpr-OF1 (CGCAAGCTTGGCGACGAAGACTTGCATTGACG; 서열번호 1)과 Fpr-yt2 (CGCCTCGAGGCTGCGCCTTACTTCTCGA; 서열번호 2)의 프라이머를 이용하여 어닐링(annealing) 61℃에서 PCR을 통해 얻었다[94℃ 1분 30초(1 cycle), 94℃ 45초- 61℃ 45초- 72℃ 45초(35 cycle), 72℃ 5분(1 cycle); *Han-Taq* PCR kit(Genenmed, Korea)].
- <42> 여기서 얻은 FPR 절편(945 bp, 서열번호 3) 산물과 벡터(pBBR1 MCS2, Kovach *et al.*, 1995, Gene, 166:175-176)를 제한효소(HindIII, XhoI)로 각각 처리하여 37℃에서 3시간 반응하여 얻은 PCR 산물과 벡터를 T4 리가아제(ligase)를 통해 상온에서 2시간 동안 리게이션(ligation)시켰다. 상기 리게이션 산물 3μL를 대장균 TOP10(*Esecherichia coli* TOP10) 균주의 형질전환성세포(competent cell)에 형질전환(transformation) 시켰다. 벡터 프라이머(T7, M13R, Kovach *et al.*, 1995, Gene, 166:175-176)와 *fpr* 프라이머를 통해 FPR의 삽입(insertion)을 확인하였다.
- <43> 이렇게 구축된 *E. coli* TOP10(*fpr*) 균주와 슈도모나스 (Strain As1) 모균주 그리고 플라스미드의 이동을 도와주는 *E. coli* HB101(pRK2013)과의 접합(30℃, LB plate에서 8시간 혼합배양)을 통해 pBBR1 MCS2-*fpr* 벡터(도 1a 참조)를 As1 균주로 이동시켰고 pBBR1 MCS2 벡터의 *lacZ* 프로모터와 *fpr* 프로모터인 Pfpr에 의해 FPR이 산화적 스트레스에 관계없이 항상 발현되는 슈도모나스 As1(*fpr*) 균주를 제작하였다.
- <44> 제한효소(KpnI)를 달리하여 Fpr-OF2 (CGCGGTACCGGCGACGAAGACTTGCATTGACG; 서열번호 4)와 Fpr-yt2를 이용하여 산화적 스트레스 하에서만 발현되는 벡터(도 1a의 pBBRfpr-R)를 포함하는 As1(*fpr*-R) 균주를 만들었다(도 1a 참조). 이때, 상기 pBBRfpr-R 벡터의 구축은 상기 pBBR1fpr 벡터를 제작할 때와 동일한 방법으로 하고 상기 As1(*fpr*-R) 균주 제작시 접합 등도 As1(*fpr*) 균주 제작시와 동일한 방법으로 진행되었다. 상기 As1(*fpr*-R) 균주는 As1(*fpr*) 균주와 달리 *lacZ* 프로모터에 의해서는 발현이 되지 않으며 산화적 스트레스 하에서만 *fpr* 프로모터에 의해 항산화 효소 FPR이 발현되어진다.
- <45> 한편, SOD 관련 발현 균주는 상기 FPR과 같은 방법으로 프로모터 부분(*Pseudomonas putida* KT2440 genome full sequence 참조)을 포함하여 *sodA*-F (CGCAAGCTTCTGCCAAGCCGGATGTAAC; 서열번호 5, HindIII)와 *sodA*-R (CGCGGATCCGCGCCAGCCAGCAAAAG; 서열번호 6, BamHI)로부터 얻은 754 bp의 *sodA* 단편(fragment, 서열번호 7)을 통해 As1(*sodA*) 균주를 구축하였고, 역시 제한효소를 달리한 *sodA*-F와 *sodA*-R2 (CGCGTCGACGCGCCAGCCAGCAAAAG; 서열번호 8, SalI)로부터 As1(*sodA*-R) 균주를 제작하였다 (도 1a 참조).

- <46> 상기 As1(sodA) 균주의 경우 pBBR1 MCS2 벡터의 *lacZ* 프로모터에 의해 항산화 효소 SOD가 항시 발현되고, As1(sodA-R) 균주의 경우는 *sod* 프로모터에 의해 산화적 스트레스하에서만 항산화 효소 SOD가 발현되어진다.
- <47> 위의 결과를 확인하기 위하여 파라코트(paraquat)의 존재하에서 *fpr* 과 *sodA* 유전자의 발현을 노던 분석(Northern blot analysis)을 통하여 확인하였다. 그 결과 도 1b에 도시된 바와 같이, As1(*fpr*) 균주와 As1(*sodA*) 균주는 산화적 스트레스를 처리하지 않은 조건하에서도 삽입된 유전자가 많은 양으로 발현되었고, As1(*fpr*-R) 균주와 As1(*sodA*-R) 균주는 파라코트(paraquat)를 처리한 실험 구에서 많은 양의 유전자가 발현되어지는 것을 확인하였다.
- <48> **실시예 2: 항산화 효소 과발현 균주의 나프탈렌 이용**
- <49> 항산화 효소를 과발현시켜 세포 내에서 발생하는 산화적 스트레스를 감소시킨 균주가 야생형 균주에 비해 나프탈렌을 더 효율적으로 분해하는지를 알아보았다. 실시예 1에서 제작된 본 발명에 의한 형질 전환된 균주와 야생형 균주를 나프탈렌 농도 0.5 %를 함유한 최소영양배지인 MSB에 접종하여 분당 220 rpm으로 30 °C에서 배양하면서 일정 시간 균을 채취한 후, 분광광도계를 이용하여 600 nm에서 세포의 성장곡선을 조사하였다.
- <50> 도 2a에 나타난 바와 같이, 야생형 균주(closed diamond)가 약 12 시간의 유도기(Lag. phase)를 갖는 반면, 형질 전환된 균주들은 모두 5-8 시간의 훨씬 짧은 유도기(Lag. phase)를 보였다. 형질 전환된 균주들은 짧은 유도기(Lag. phase) 이외에도 야생형 균주에 비해 높은 성장률(growth rate)을 보였다. 구체적으로 야생형 균주는 0.17 ± 0.01 이었고, As1(*fpr*) 균주는 0.29 ± 0.02 였고, As1(*fpr*-R) 균주는 0.23 ± 0.04 이었고, As1(*sodA*) 균주는 0.26 ± 0.03 이었고, As1(*sodA*-R) 균주는 0.25 ± 0.04 이었다.
- <51> 성장곡선과 함께 고속액체 크로마토그래피(HPLC)를 이용하여 각 균주들의 나프탈렌 분해능을 알아보았다. 물에 용해되어 있는 30 ppm의 나프탈렌을 동량의 MSB 배지와 혼합하여 균을 접종하였다. 정치된 상태에서 배양된 실험구를 일정한 시간 간격으로 얻어진 샘플(sample)의 나프탈렌 농도를 C-18 역상 칼럼(COMOSIL, Japan)을 통해 70 % 아세토니트릴(acetonitrile)을 이동상으로 분당 1 mL의 유출 속도로 240 nm의 파장에서 측정하여 결과를 얻었다. 상기와 같이 나프탈렌 잔여 농도를 측정하여 나타난 각 균주의 나프탈렌 분해능 역시 형질 전환된 균주가 야생형 균주에 비해 짧은 시간에 더 효율적으로 나프탈렌을 이용하는 것을 보였다(도 2b 참조).
- <52> **실시예 3: 환경오염물질 분해에 따른 항산화 효소 활성 측정**
- <53> 나프탈렌을 탄소원으로 하여 자란 균주들의 SOD 및 카탈라아제(catalase) 활성을 측정하였다. 2 % 글루코오스(glucose)에서 밤새(overnight) 키운 균주를 PBS (phosphate buffered saline, pH 7.2)에서 세척(washing)하여 나프탈렌이 들어있는 배지에서 OD₆₀₀ 이 0.3정도까지 키운 후 원심분리를 통해 세포를 얻었다.
- <54> 위 과정으로부터 얻어진 세포들은 소니케이터(sonicator, SONICS, USA)에 의해 세포를 파쇄하여 조효소액을 얻었다. 여기서 얻어진 조효소액을 SOD 와 카탈라아제(catalase)의 활성을 측정하는 데 사용하였다.
- <55> SOD 발현은 전기영동을 통해 Native PAGE 방법을 통해 7 % 비-변성겔(non-denaturing gel)에서 실행되었다. 보다 구체적으로는 SOD 활성 염색 겔(activity staining gel)은 7 % 비-변성 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 겔(non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis gel)을 사용하여 각 균주로부터 얻은 조효소액을 단백질 정량을 통해 15 ug의 단백질을 각 레인(lane)에 로딩(loading) 하였다. 100 V에서 로딩된 겔은 50 mM K-포스페이트(K-phosphate, pH 7.2)에 28 mM TEMED, 28 μM 리보플라빈(riboflavin)과 2.5 mM NBT를 넣은 후, 30분 동안 암실에서 진탕(shaking) 배양 후, 형광 조건하에서 밴드가 나타날 때까지 진탕 배양하였다.
- <56> 야생형 균주에 비해 SOD가 과발현된 균주는 다른 형태의 SOD 밴드(band)가 발현되어지는 것을 확인하였고, FPR 이 과발현된 균주 역시 야생형 균주에 비해 SOD의 활성이 더 좋은 것을 알 수 있었다(도 3 참조).
- <57> 카탈라아제(catalase) 활성은 20 mM H₂O₂가 함유된 50 mM K-포스페이트 버퍼(K-phosphate buffer)에 조효소액을 첨가하면서 반응을 시작하였다. 카탈라아제 활성은 240 nm에서 측정하였다. 형질전환된 균주의 카탈라아제 활성은 야생형 균주에 비해 약 2.5-4.5 배의 더 높은 활성을 보였다. 형질전환된 균주에서의 높은 카탈라아제 활성은 나프탈렌의 분해에서 발생한 산화적 스트레스가 활성산소종인 슈퍼옥사이드 음이온(superoxide anion)의 반응 생성물인 과산화수소(hydrogen peroxide)임을 알게 해준다(도 3 참조).
- <58> **실시예 4: 산화적 스트레스 정도를 측정하는 리포터(reporter) 균주 개발**
- <59> 본 발명자들에 의해 발견된 파라코트(paraquat)에 의해 고효율로 유도가능한(highly inducible)한 슈도모나스 시링게 DC3000(*Pseudomonas syringae* DC3000; GenBank accession number: AE016853, 1234bp) 균주의 *fpr* 유전

자와 프로모터 부분을 Pfnr-gfp1 (CGCGAATTCGGCCATCGACCGCATTTCT; 서열번호 9, EcoRI)과 Pfnr-gfp2 (CGCGGTACCTGGACGCTGAGGACACG; 서열번호 10, KpnI)의 프라이머를 이용하여 어닐링(annealing) 61℃에서 PCR을 통해 얻었다[94℃ 1분 30초(1 cycle), 94℃ 45초- 61℃ 45초- 72℃ 45초(35 cycle), 72℃ 5분(1 cycle); Eppendorf HotMasterMix(Eppendorf, USA)]. 제한 효소를 처리한 후, 얻은 PCR 절편(서열번호 11)을 녹색형광단백질 (GFP)을 가지고 있는 프로모터 확인용 벡터(promoter probing vector)인 pRK415gfp (Yin *et al.*, Appl. Environ. Microbiol. 2003)에 리게이션(ligation)하였다. 클로닝(cloning)된 벡터(pDCFPRgfp)는 시퀀싱(sequencing)하여 삽입(insert)을 확인하였다.

- <60> 위 과정에서 제작된 벡터를 접합 방법에 의해 슈도모나스(*Pseudomonas frederiksbergensis* Strain As1) 균주와 본 발명에 의한 형질전환 균주에 도입하여 각 균주에서의 산화적 스트레스 정도를 측정하였다.
- <61> 탄소원을 달리하여 키운 후, 각 탄소원별로 세포 배양시 발생하는 산화적 스트레스 정도를, 형광현미경 사진(Carlzeiss, Germany)을 얻어, 마이크로티터 플레이트 판독기(microtiter plate reader, VICTOR, Biorad)를 이용하여 GFP의 형광 강도(intensity)를 비교하였다. 이때 수치는 각 탄소원에서 자란 배양균주의 형광강도/OD₆₀₀(Fluorescence intensity/OD₆₀₀ of cells incubated on each carbon sources)으로 나타내었다.
- <62> 도 4a에 나타난 바와 같이, 글루코오스(Glucose)와 파이루베이트(pyruvate)를 탄소원으로 자란 균주는 산화적 스트레스를 받지 않는 반면, 나프탈렌과 살리실레이트(salicylate)를 탄소원으로 이용한 실험구에서는 각각 20배와 30배의 산화적 스트레스를 더 받는 것을 관찰할 수 있었다. 특히, 나프탈렌의 대사산물인 살리실레이트(salicylate) 같은 경우에는 세포에 더 강한 독성을 야기하는 것을 알 수 있었다.
- <63> 도 4b는 본 발명에 의한 산화적 스트레스 감지 벡터인 pDCFPRgfp를 함유한 모균주와 본 발명에 의한 형질전환 균주가 활성산소족인 수퍼옥사이드 음이온(superoxide anion) 생성물질인 파라코트(paraquat)에 노출시 받는 산화적 스트레스를 마이크로티터 플레이트 판독기(microtiter plate reader)로 측정한 결과와 형광현미경 사진을 보인 도면이다.
- <64> 상기 도면에 도시된 바와 같이, 본 발명에 의한 형질전환 균주들은 파라코트 처리시 야생형 균주에 비해 산화적 스트레스를 덜 받는 것으로 나타났다.
- <65> 이러한 결과로부터 본 발명에 의한 산화적 스트레스 리포터 균주가 신뢰성이 높고 산화적 스트레스 유발 환경오염물질 감지 및 분해능 향상에 유용하게 쓰일 것으로 기대한다.

발명의 효과

- <66> 상술한 바와 같이, 본 발명은 토양 모델 미생물인 슈도모나스 푸티다KT2440(*Pseudomonas putida* KT2440)의 FPR(ferredoxin-NADP⁺ reductase)와 SOD(superoxide dismutase)의 항산화 효소를 슈도모나스 (*Pseudomonas frederiksbergensis* strain As1) 균주에서 과발현 시킴으로써 나프탈렌 등 PAH의 분해 시 발생하는 산화적 스트레스를 감소시켜 PAH의 분해능을 향상시키고, 환경 오염물질 분해에 소모되는 시간과 경비를 절감할 수 있는 효과를 도모할 수 있다.
- <67> 이와 더불어 상기 명시된 2종류의 항산화 효소를 과발현시킨 슈도모나스 (*Pseudomonas frederiksbergensis* strain As1) 균주는 향상된 오염물질 분해능뿐만 아니라, 일반 미생물 배지에서도 높은 성장능을 보여 다량의 미생물을 이용한 산업 및 공업 분야에서 응용되어질 수 있다.
- <68> 나아가 본 발명은 녹색형광단백질(GFP)을 갖는 프로모터 확인용 벡터가 도입되어 오염 환경 내에서 세포 내의 산화적 스트레스를 측정할 수 있는 리포터(reporter) 균주를 제공하여 바이오 모니터링도 가능하다. 이러한 본원발명은 미생물에 의한 보다 효율적인 폐수처리, 오염토양 정화 및 환경 복원 등의 생물학적 복원연구와 미생물을 이용한 유용물질 생산에 크게 기여할 수 있어 매우 유용한 발명이라 할 것이다.

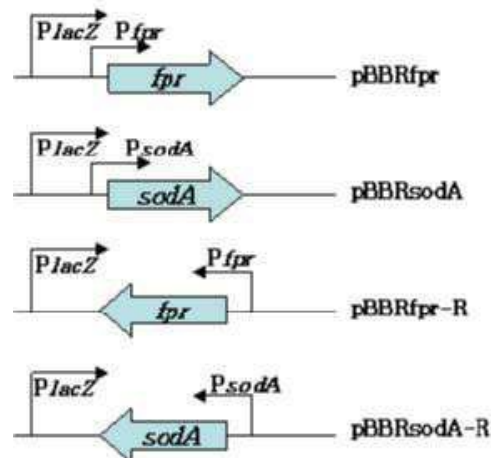
도면의 간단한 설명

- <1> 도 1a는 슈도모나스 푸티다 KT2440(*Pseudomonas putida* KT2440)의 항산화 효소인 *fpr*과 *sodA* 유전자(gene)가 삽입된 본 발명에 의한 벡터, pBBR1 MCS2를 간략히 나타낸 개략도이다.
- <2> 도 1b는 도 1a의 벡터들을 포함하는 각각의 형질전환 균주들에 산화적 스트레스인 파라코트(paraquat)를 처리한 후에 삽입된 *fpr*과 *sodA* mRNA 발현 양상을 노던 분석(Northern blot analysis)으로 확인한 결과를 보인 도면이다.

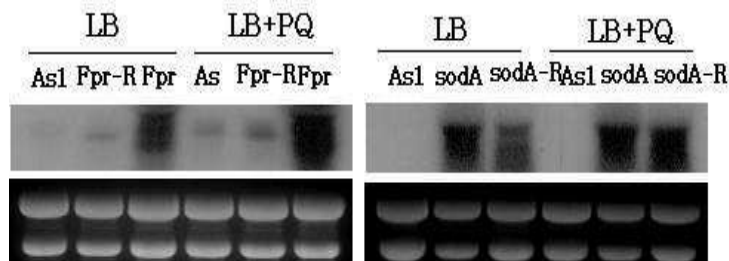
- <3> 도 2a는 본 발명에 의한 형질전환 균주와 모균주를 나프탈렌이 함유된 최소영양배지인 MSB에 접종 및 배양한 후 일정 시간마다 균을 채취하여 세포의 성장곡선을 측정한 결과를 보인 도면이다.
- <4> 도 2b는 고속액체 크로마토그래피 (HPLC)를 통해 배양 균주에 의한 나프탈렌의 잔여 농도를 측정하여 본 발명에 의한 균주들의 나프탈렌 분해능을 보인 도면이다.
- <5> 도 3은 모균주와 본 발명에 의한 형질전환 균주가 나프탈렌을 탄소원으로 하여 자랄 때, 세포 내 존재하는 카탈라아제(catalase)와 SOD 항산화 효소의 활성을 나타낸 도면이다.
- <6> 도 4a는 본 발명에 의한 산화적 스트레스 감지 벡터인 pDCFPRgfp가 삽입된 나프탈렌 분해 균주인 슈도모나스 균주(*Pseudomonas frederiksbergensis* strain As1)가 각 탄소원별로 생장시 발현되는 산화적 스트레스 정도를 마이크로티터 플레이트 판독기(microtiter plate reader)로 측정한 결과와 형광현미경 사진을 보인 도면이다.
- <7> 도 4b는 본 발명에 의한 산화적 스트레스 감지 벡터인 pDCFPRgfp를 함유한 모균주와 본 발명에 의한 형질전환 균주가 활성산소족인 수퍼옥사이드 음이온(superoxide anion) 생성물질인 파라코트(paraquat)에 노출시 받는 산화적 스트레스를 마이크로티터 플레이트 판독기(microtiter plate reader)로 측정한 결과와 형광현미경 사진을 보인 도면이다.

도면

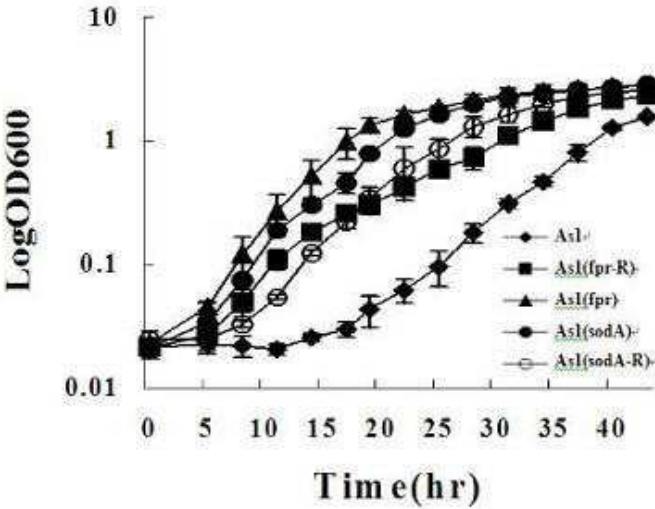
도면1a



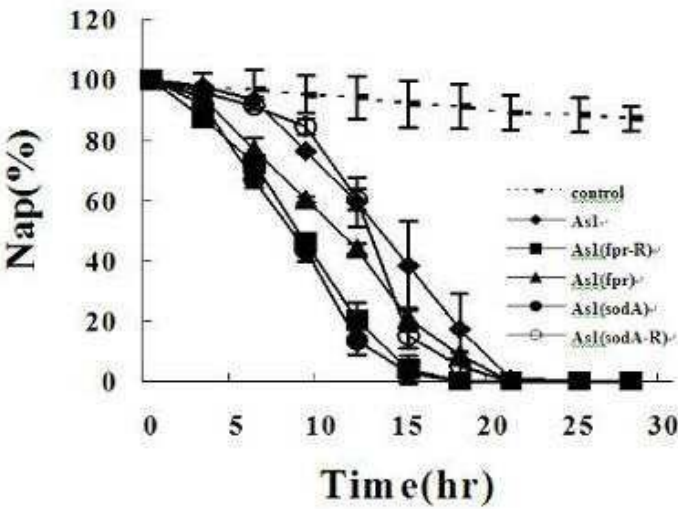
도면1b



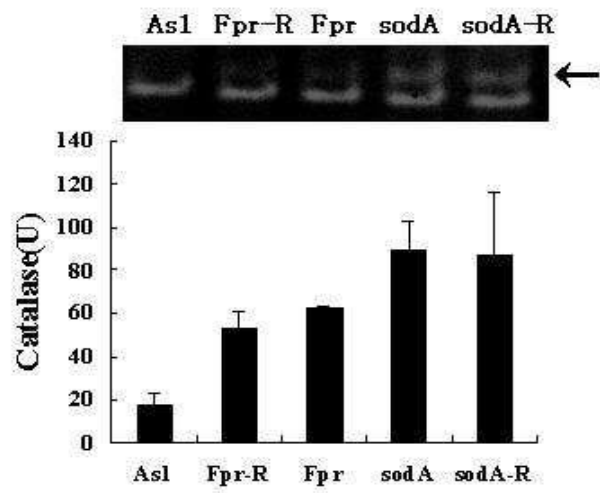
도면2a



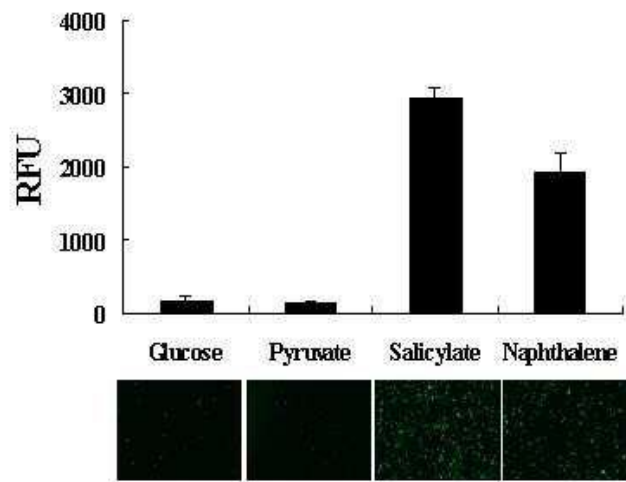
도면2b



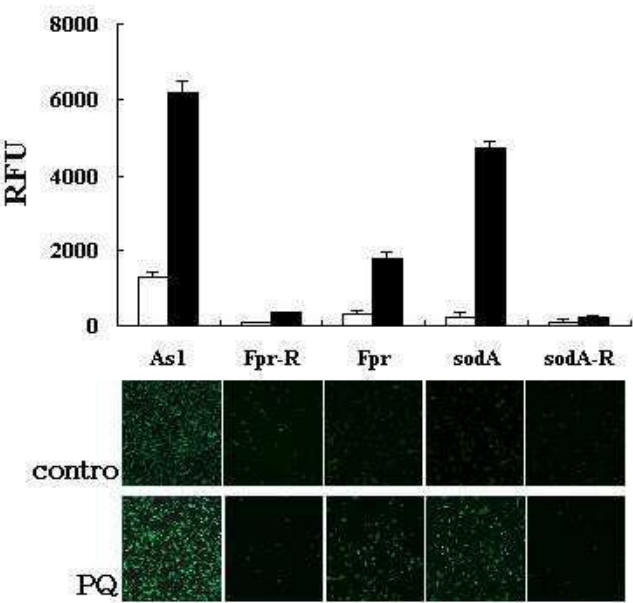
도면3



도면4a



도면4b



서열목록

[서열목록 전자파일 첨부](#)