

요 약 문

I. 연구개요

- 유해 조류 예보 및 경보를 위한 상수원 조류 다량 발생수역에서 신속하게 현장 분석 가능한 휴대용 유해조류 탐지 키트 개발
 - 마이크로시스틴 잔류농도의 제한농도는 1 µg/L (1 ppb) 이하로 규제하고 있으므로 1 µg/L 이하의 마이크로시스틴을 검출할 수 있는 방법 개발

II. 연구의 필요성 및 목적

- 최근 유해 조류 대량 발생으로 인한 부산 상수원 안정성 문제 대두
- 유해 조류발생으로 인한 수질관리 미흡으로 인간에게 미치는 보건문제는 유해남조(예. Microcystis 속 등)가 생산하는 마이크로시스틴 독소 농도에 기인
- 전 지구적 기후변화 및 인간 활동에 의한 환경변화로 강, 하천 등에서 다량 발생하여 상수원에 영향을 미치는 유해 조류의 조기 감지를 위하여 현장에서 신속하게 적용 가능한 조류 독소 탐지 기법 개발 필요

III. 연구의 내용 및 범위

1. 단백질 인산가수분해효소 선정·최적화 및 유전자 클로닝
 - 표적 단백질 인산가수분해효소 3종 선정, 유전자 최적화, 발현벡터 구축, 형질전환된 재조합 균주 확보
2. 단백질 인산가수분해효소 발현 최적화 및 분리·정제
 - 표적 단백질 3종의 발현 조건 탐색
 - 표적 단백질 1종이상의 정제
3. 효소와 마이크로시스틴의 결합 발색반응 테스트
 - 단백질 인산가수분해효소의 고유 발색반응 수행
 - 마이크로시스틴 독소의 농도에 따른 발색반응 정량화 수행
 - 기존 외국 유사제품과 비교 테스트
4. 유해조류발생 조기 감지를 위한 휴대용 탐지 키트 제작
 - 상기 일련의 효소 및 기질 반응 활용 키트 시제품 제작
 - 현장 적용 가능 휴대용 탐지 키트 시약 및 매뉴얼 제작

IV. 연구결과

1. 단백질 인산가수분해효소 선정·최적화 및 유전자 클로닝
 - 3종의 단백질 인산가수분해효소(사람 유래 PP2CA, PP5C, 토끼 유래 PP1AC)를 선정

- 표적 단백질의 대장균 재조합 발현을 위한 유전자 최적화를 수행한 후 3종 유전자 합성
- 합성된 유전자를 삽입한 GST-융합 단백질 발현벡터 3종 구축
- 3종의 발현 벡터가 형질전환된 재조합 대장균 균주 총 15종 구축 (각 유전자별 5종)

2. 단백질 인산가수분해효소 최적 발현 조건 탐색

○ 발현 온도

- 일반적인 조건 (유도물질 IPTG 1mM, 12시간 발현)에서 각 표적 단백질의 발현 온도를 탐색한 결과 37°C와 20°C에서 과발현되거나 전부 불용성으로 발현되는 것으로 확인됨. 온도에 따른 용해도 증가는 확인되지 않음

○ 발현 유도물질 및 발현 유도시간

- 각 표적 단백질의 발현을 조절하기 위하여 유도물질의 농도를 10배 희석하고 발현 시간을 3~5시간으로 단축하였으나 전부 불용성으로 발현되는 것으로 확인됨. 따라서 발현 온도, 유도물질의 농도가 수용성 발현에 영향을 미치지 않는 것으로 판단됨

○ 망가니즈 이온 첨가

- 발현조건은 유도물질 IPTG 0.1mM, 20°C, 12시간 발현으로 고정하고 표적 단백질의 보조소인 망가니즈 이온을 첨가한 배지를 사용한 결과, 발현된 PP5C의 수용성이 증가하는 것으로 판단됨. 하지만 다른 두 표적 단백질의 발현은 여전히 불용성임.

○ 발현 균주에 따른 단백질 발현

- 발현되는 단백질의 접힘을 용이하게 하기 위해 각종 새퍼론 단백질을 발현하는 대장균을 사용하여 형질전환함. GroES/EL 균주에 발현시 수용성 발현이 증가하였음.

○ 최적 발현 조건 확립

- 발현 균주, GroES/EL 발현 대장균; 발현 온도, 10°C; 발현 배지, LB/Amp/Cam/Arabinose/1 mM $MnCl_2$; 발현 유도 물질 및 시간, 0.1 mM IPTG 와 20시간

-

3. 단백질 인산가수분해효소 정제

○ 단백질 정제는 GST-resin을 이용하여 실시하였음

- 배양액 1리터당, PP1A 1.06 mg, PP2A 1.28 mg, PP5C 1.44 mg이 정제되었음

4. 효소와 마이크로시스틴의 결합 발색반응 테스트

- 정제된 단백질들의 비활성 (specific activity) 을 측정한 결과 PP1A는 0.037 umoles/min/mg, PP2A는 0.059 umoles/min/mg, PP5C는 0.44 umoles/min/mg 이었음. 대조구로 사용된 기존 제품의 PP2A는 0.33 umoles/min/mg이었음.

PP5C는 기존 제품과 유사한 비활성을 보이거나 PP1A와 PP2A의 경우 활성이 매우 낮았음. 이는 단백질의 접힘이 여전히 완전하지 못하기 때문일 가능성이 매우 높음.

- PP5C의 반응속도론적 특성인 K_m 은 3.8 mM, V_{max} 는 5.27 nmol/min로 PP1A 등과 유사한 범위를 보임
- 마이크로시스틴 독소량에 따른 PP5C의 효소 반응 저해를 실험한 결과 IC_{50} 는 약 1.8 nM인데 비해 기존 제품인 PP2A는 약 0.9 nM이었음. 이는 기존 제품에 비해 본 연구에서 발현된 PP5C가 20배 가량 마이크로시스틴에 대한 친화도가 낮음을 의미함
- 기존 제품과 PP5C를 이용한 마이크로시스틴 정량실험 결과, PP5C는 2.5 ppb 이상의 마이크로시스틴 농도에서 효과적일 것으로 판단됨

5. 유해조류 발생 조기 감지를 위한 휴대용 탐지 키트 제작

- 정제된 PP5C를 바탕으로 키트의 구성은 PP5C (phosphatase) 4 vial (각 vial당 360 ug), 완충용액 20 ml, 마이크로시스틴 (0.5, 1, 2.5 ppb 각 1병, 1 ml), 발색시약 20 ml, 정지용액 20 ml로 구성하였음
- 기존 제품을 바탕으로 휴대용 탐지 키트의 매뉴얼 제작하였음

V. 연구결과와 활용계획

- 유해 조류발생 조기 탐지를 통한 조류 발생 예보 및 경보 기초자료 제공 가능
- 수질 관리 및 분석 현장에 투입하여, 현장에서 시료 채취 후 즉시 유해 독소량 파악
- 비숙련자도 시료 채취 현장에서 신속하고 쉽게 유해 조류 발생량 파악 가능
- 고가의 외국 제품 수입 대체 효과 및 수출 기대 상승
- 연구사업 종료 시 특허 출원 예정