



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

약학석사학위논문

Reporter Gene(SupF) Assay에  
기초한 BPDE 유발 정량적 DNA  
손상 평가법 개발

BPDE induced DNA damage quantitative  
determination based on reporter gene(SupF)  
assay

2013년 2월

서울대학교 대학원  
약학과 약품분석학전공  
김 병 주

## 국 문 초 록

발암 물질에 대한 경각심이 높아지고 있는 현대사회에서 담배, 식품이 함유하는 발암물질에 대한 정량분석 및 그 영향에 대한 연구가 중요해졌다. 본 연구는 reporter gene assay를 기반으로 DNA 손상의 정량분석을 시도하였다. ( $\pm$ )-7 $\beta$ ,8 $\alpha$ -dihydroxy-9 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene (BPDE)는 담배 및 식품에 함유된 발암물질이자 돌연변이 유발물질인 benzo[a]pyrene의 한 대사체이다. 이 BPDE를 DNA에 직접 처리하여 DNA 돌연변이를 유발하고, DNA 돌연변이에 기인한 단백질 변형에 따른 발현률 변화를 측정하였다. 발암물질 처리를 하는 목표 DNA는 SupF gene으로 원핵세포 뿐 아니라 진핵세포에도 적용이 가능한 유전자이다. 전체 Plasmid에 돌연변이 유도 물질을 처리하던 기존의 방식과 달리, 음성오류를 제거하기 위해 목표 유전자인 SupF gene(117bp)에만 BPDE를 시간(12-48 h)과 농도(10-500  $\mu$ M)를 다르게 처리하였다. 흡광도 측정법에 기초해서 4개의 BPDE-SupF gene Adduct의 농도를 구한 후, 형성된 4가지 종류의 BPDE-SupF gene adduct들을 잔여 셔틀 벡터 (pAcGFP1-N1)와 재조합하여 4가지 BPDE-SupF gene adduct 포함 재조합 plasmid를 얻었다. 그 결과 원핵세포 뿐 아니라 진핵세포에서도 적용이 가능한 벡터융합체계를 구축하였다. BPDE 처리 조건과 돌연변이가 형성된 SupF-AcGFP1 Fusion plasmid의 단백질 발현률 변화 상관관계를 측정할 수 있는 정량적 조건을 확립하였고, 이를 기반으로 DNA 손상 정도의 측정 뿐 아니라 회복률 까지 측정할 수 있는 기반을 마련하였다. 단세포에 직접적으로 형광 이미징 기술을 이용하여 측정을 함으로써, 앞으로 DNA 손상 정도 및 약물 화학물질 독성의 척도로 응용

될 수 있을 것으로 기대된다.

주요어: Reporter gene assay, 융합백터체계, BPDE, SupF gene, 녹색 형광 단백질

학번: 2011-21703

# 목 차

국문초록 .....	i
목 차 .....	iii
List of Figures .....	iv
List of Tables .....	v
List of Abbreviations .....	vi
I. 서 론 .....	1
II. 실험 .....	3
1. 실험재료 .....	3
1-1. 시약 및 용매 .....	3
1-2. 실험 기구 .....	4
1-3. 분석기기 .....	5
2. 실험방법 .....	6
2-1. Target gene 준비 .....	7
2-2. Remaining Vector 준비 .....	10
2-3. BPDE처리 .....	14
2-4. Fusion plasmid vector 재조합 .....	16
2-5. Transfection .....	17
2-6. 형광이미지 분석 .....	18
III. 결과 .....	19
1. SupF PCR .....	19
2. GFP 제한효소 처리 .....	21
3. SupF gene BPDE 처리 결과 .....	23
4. BPDE-SupF adduct와 재조합 plasmids 확인 .....	25
5. BPDE-SupF adduct 함유한 Fusion vector의 형광 발현 확인 .....	27
IV. 결론 .....	34
V. 참고문헌 .....	35
Abstract .....	38

## List of Figures

Fig. 1. Schematic illustration of fusion plasmid vector construction	6
Fig. 2. Schematic illustration of target gene amplification .....	9
Fig. 3. Schematic illustration of GFP amplification .....	11
Fig. 4. Schematic illustration of BPDE treatment strategy to SupF gene .....	15
Fig. 5. Gel image of SupF gene .....	19
Fig. 6. Gel image of pAcGFP1-N1 enzyme restriction .....	22
Fig. 7. Absorbance graph of BPDE-SupF adduct .....	23
Fig. 8. Gel image of BPDE-SupF adducts .....	25
Fig. 9. Gel image of fusion plasmids containing BPDE-SupF adducts .....	26
Fig. 10. (1-4) Cellular images .....	27,28,29,30,31
Fig. 11. Relationship of GFP expression and non-BPDE-treated plasmids and plasmids containing BPDE - SupF adducts .....	33

## List of Tables

Table 1. Composition of PCR mixture .....	8
Table 2. PCR thermal cycle conditions .....	8
Table 3. Reaction condition for restriction .....	13
Table 4. Different reaction conditions for the BPDE treatments ...	14
Table 5. Reaction conditions for recombination .....	16
Table 6. Gradient annealing temperature result .....	20
Table 7. Final concentration of BPDE-SupF adduct .....	24
Table 8. Comparison of GFP expression of non-BPDE-treated plasmids and plasmids containing BPDE - SupF adducts .....	32

## List of Abbreviations

AOTF : Acousto-optic tunable filter

BPDE : ( $\pm$ )-7 $\beta$ ,8 $\alpha$ -dihydroxy-9 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -epoxy-7,8,9,10-tetrahydro  
-benzo[a]pyrene

CCD : Charge-coupled device

DMEM : Dulbecco's modified Eagle's medium

EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid

FBS : Fetal bovine serum

GFP : Green fluorescent protein

HEK293 : Human embryonic kidney cells

Midi. Prep. : Medium preparation

PCR : Polymerase chain reaction

RCF : Relative centrifugal force

RPM : Revolution per minute

THF : Tetrahydrofuran



## I. 서론

최근 보건복지부에서 발표한 주요 사망원인별 사망률을 보면 악성 신생물 (암)으로 인한 사망자수가 인구 10만 명당 112.8명(2011년 기준)으로 가장 높았다. 이는 차 순위인 뇌혈관질환 37.8명, 심장질환 37.6명에 비해 월등히 높으며, 지난 10년 이상 암은 가장 큰 사망원인이었다. 그 중에 폐암은 그 발생률이 암 중에 네 번째로 많으며 5년 상대생존율은 두 번째로 낮다. 폐암의 가장 큰 원인 중 하나인 담배에는 40여종 이상의 치명적인 발암물질이 들어있는데, 그 중 벤조피렌(benzopyrene)에 대한 연구가 가장 활발히 진행 중이다. 벤조피렌은 그 자체로는 위험하지 않지만 체내로 들어가 대사되어 여러 유해 물질로 바뀐다. 그 대사 산화체 중 하나인 ( $\pm$ )-7 $\beta$ ,8 $\alpha$ -dihydroxy-9 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene (BPDE)는 DNA와 결합하여 DNA adduct를 생성시켜 DNA변형을 유발하고 암을 유발하며, 원핵 세포 뿐 아니라 진핵 세포 모두에서도 점 돌연변이 및 세포 독성을 유발한다고 현재까지 알려져 있다. 이에 본 연구에서는 SupF reporter gene과 pAcGFP1-N1 vector를 융합한 fusion plasmid vector를 이용하여 BPDE로 인한 DNA변형과 이로 인한 이상 단백질 발현의 정도를 정량적으로 측정하고자 하였다. 기존의 reporter gene assay들은 대부분 plasmid DNA 전체에 손상을 입혀, 음성오류 유발 등 정확한 정량을 하기에 제한이 있었다. 그러나 본 연구에서는 target gene인 SupF gene에만 발암물질을 처리하여 재조합하여 실험의 정확성을 높였다. Green florescent protein(GFP)은 동물 및 인간 세포에 비 독성이고, 다른 기질이나 조효소들을 요구하지 않으므로 DNA손상과 변형된 단백질 발현을 측정하는데 적합한 reporter domain이다. 또한 SupF gene은 원핵 세포 뿐 아니라 진핵 세포에도 적용이 가능한 reporter gene이다. 따라서 이 두 개의 DNA를 재조합

한 새로운 fusion plasmid vector의 구축은 DNA 손상 검출을 위한 훌륭한 선택이자 향후 다양한 분야에서 응용 가능성이 많은 방법이다.

## II. 실험

### 1. 실험재료

#### 1-1. 시약 및 용매

- Bacto™ Agar (BD Biosciences, NJ, USA)
- Bacto™ Trptone (BD Biosciences, NJ, USA)
- Bacto™ Yesat Extract (BD Biosciences, NJ, USA)
- BamH I restrict enzyme (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)
- BPDE (NCI Chemical Carcinogen Repository, Midwest Research Institute, Kansas City, MO, USA)
- DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, 11995, Gibco, NY, USA)
- D-PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Gibco, NY, USA)
- EcoR I restrict enzyme (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)
- Ethanol (Sigma Aldrich, St. Louis, Mo, USA)
- Ethylenediamine tetraacetic Acid, Disodium Salt (Shinyo pure chemicals co.,Japan)
- FBS (Fetal bovine serum, 16000-044, Gibco, NY, USA)
- FuGENE HD Transfection Reagent(E2311, Promega, Madison, WI, USA)
- Gel extraction kit (QIAquick gel extraction kit, Qiagen, Valencia, CA, USA)

- HEK293 cell (Korean Cell Line Bank, South Korea)
- Iso-propyl Alcohol (Sigma Aldrich, St. Louis, Mo, USA)
- Midi kit (QIAfilter™ plasmid Midi kit, Qiagen, Valencia, CA, USA)
- Opti-MEM®I (Reduced Serum Medium, Gibco, NY, USA)
- pAcGFP1-N1 (Clontech, Palo Alto, CA, USA)
- Pen Strep (Penicillin Strptomycin, Gibco, NY, USA)
- SeaKem®LE Agarose (Lonza®, Rockland, ME, USA)
- Sodium chloride (Junsei, Japan)
- TBE Buffer 10X Molecular Biology Grade (Promega, Maidison, WI, USA)
- Trypan blue solution 0.4% (Sigma Aldrich, St. Louis, Mo, USA)

## 1-2. 실험 기구

- Adjust pipette (0.5-10μL, 20-200μL, 100-1000μL, Eppendorf AG, Hamburg, Germany)
- Autoclave (JSAC-60, JSR, South Korea)
- Bacteria Incubator (NB-201, N-Biotek, South Korea)
- Cell culture flask (75T, SPL Life Sciences, South Korea)
- Cell Incubator (US AutoFlowt, NuAire, Plymouth, MN, USA)
- Centrifuger (5810R, Eppendorf AG, Hamburg, Germany)
- Conical tube (15 mL, 50 mL, SPL Life Sciences, South Korea)
- DURAN 500mL Flask (Schott Glaswerke, Mainz, Germany)
- Horizontal Electrophoresis System (GH-100, GelHaus, )
- IR Concentrator(IR Micro-CENVAC NB-503CIR, N-Biotek,

South Korea)

- Microtube (1.5 mL, Eppendorf AG, Hamburg, Germany)
- Midi Power Supply (MP-300N, Gentaur, Kampenhout, Belgium)
- Parafilm (Pechiney Plastic Packaging, USA)
- PCR Program Temp Control System (PC-818, ASTEC, Shizuoka, Japan)
- Petri Dish (90x15mm, SPL Life Sciences, South Korea)
- Pipet-aid (Drummond, USA)
- Serological pipet (10mL, SPL Life Sciences, South Korea)
- Shakers (Rocker NB-104, N-Biotek, South Korea)
- Stirrer Water Bath (NB-302, N-Biotek, South Korea)

### 1-3. 분석기기

- Haemocytometer Counting Chamber (Tiefe Depth profondeur 0.100mm, Marienfeld-Superior, Germany)
- MetaMorph (Version 7.6.2.0, Molecular Devices)
- Microscopy (CKX41, OLYMPUS, Melville, NY)
- pH Meter (HI2210, HANNA, South Korea)
- UV-Visible Spectrophotometer (Evolution 60S, Thermo Scientific, Madison, WI USA)
- VISIONlite Version 2.2(Thermo Scientific Thermo Scientific, Madison, WI USA)

## 2. 실험방법

본 실험의 중요한 전략인 fusion plasmid vector 제작의 이해를 돕기 위해 Fig. 1에 그림으로 나타내었다. GFP발현을 위한 pAcGFP1-N1 plasmid에 제한효소를 처리하여 remaining vector를 확보하고, 여기에 target gene인 SupF gene을 재조합하여 fusion plasmid vector를 완성하였다.

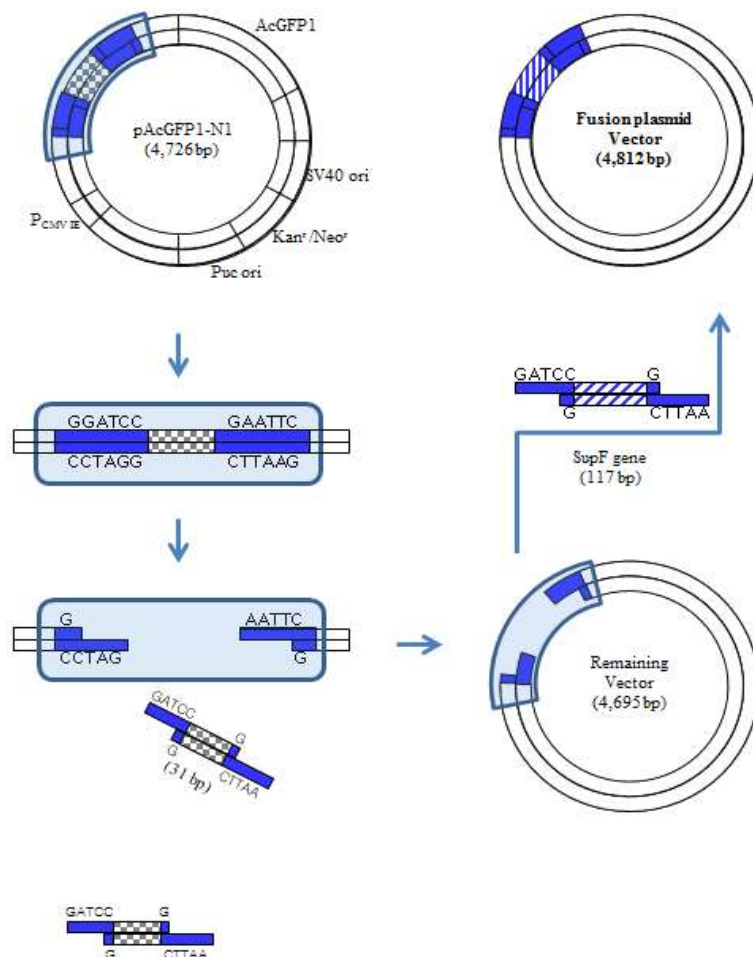


Fig. 1. Schematic of illustration of fusion plasmid vector construction

## 2-1. Target gene 준비

Target gene인 SupF gene을 합성하기 위해 Bioneer corp.에서 GAATTCGAATTCTGTGGTGGGGTTCCCGAGCGGCCAAAGGGA GCAGACTCTAAATCTGCCGTCATCGACTTCGAAGGTTCTGAATC CTTCCCCCACCACCAGCGGCCGCGCGGCCG (117bp)의 sequence로 주문 제작하였다. 주문 제작한 SupF는 그 양이 많지 않기에, 실험을 진행하기 위해선 polymerase chain reaction(PCR)을 통한 증폭이 필요하다. PCR을 하기 위한 primer 제작 또한 Bioneer corp. 에서 DNA에 처리할 제한효소(BamH I, EcoR I)에 상보적으로 합성하였다. Forward Primer (5'-CCGGGATCCTGTGGTGGGGTTCC), Reverse Primer (5'-CGCGAATTCTGGTGGTGGGGGA)를 이용하여 PCR을 진행하였다. Table 1은 PCR 진행을 위한 구성이며, Table 2는 PCR 각 단계 별 온도와 시간을 표시한 것이다. 성공적인 PCR을 위해서는 Table 2의 annealing step의 온도를 찾는 것이 중요하다. 이에 60°C-64°C의 gradient를 설정하여 가장 적합한 annealing temperature를 찾았다.

Table 1. Composition of PCR mixture

Sample, Reagent	Concentration	Volume
Template DNA(SupF gene)	20ng/ $\mu$ l	1 $\mu$ l
Forward primer	10pmole	5 $\mu$ l
Reverse primer	10pmole	5 $\mu$ l
dNTP	10mM	1 $\mu$ l
DNA polymerase buffer	5 $\times$	10 $\mu$ l
DNA polymerase	5U/ $\mu$ l	0.25 $\mu$ l
Autoclaved deionized water		27.75 $\mu$ l
Total volume		50 $\mu$ l

Table 2. PCR thermal cycle conditions

Step	Temperature	Time	Cycle
First denaturing step	94 $^{\circ}$ C	5 min	1
Denaturing step	94 $^{\circ}$ C	15 sec	30
Annealing step	61 $^{\circ}$ C	15 sec	
Extension step	72 $^{\circ}$ C	15 sec	
Last extension step	72 $^{\circ}$ C	5 min	1

PCR 반응이 끝난 후 PCR product를 High Pure PCR Cleanup Microkit를 이용하여 purification을 진행하였다. PCR product 100  $\mu$ l 당 200  $\mu$ l binding buffer와 200  $\mu$ l binding enhancer를 넣고 잘 섞어 준 후, 8000 rcf 로 60초 원심분리 하였다. 걸러진 용액을 제거 한 다음 400  $\mu$ l wash buffer와 300  $\mu$ l wash buffer를 순차적으로 8000 rcf 에서 60초 원심 분리하여 걸러진 용액을 제거해 주었다. 마지막으로 max. speed에서 60초 원심 분리하여 남은 용액을 모두 제거해 준 다음 20  $\mu$ l elution buffer, 8000 rcf 로 60초 원심 분리하여 순수한



SupF gene을 확보하였다. PCR이 제대로 수행 되었는지 확인하기 위해 2.0 % agarose gel에 전기영동을 실시하였다. (Fig. 2).

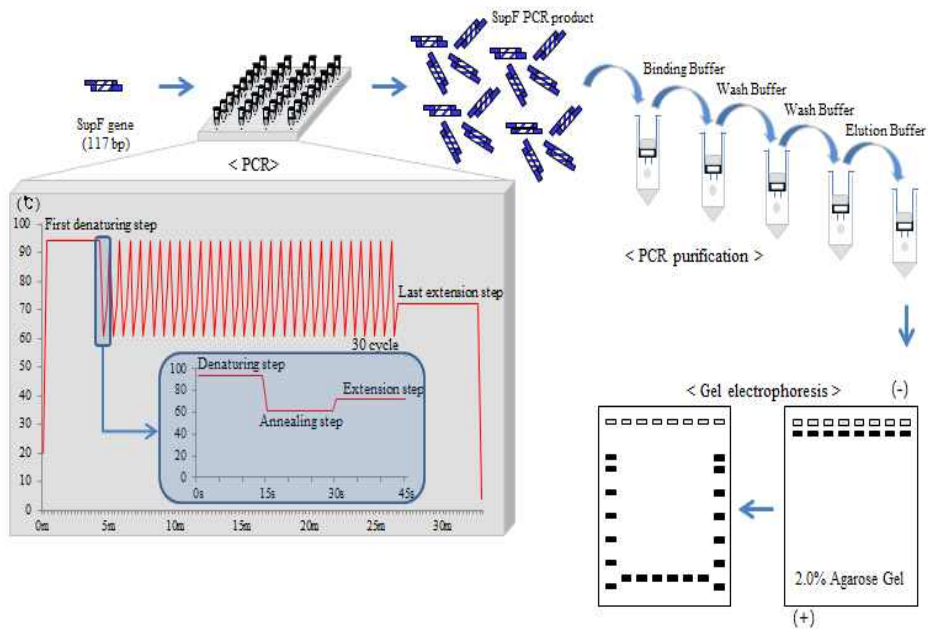


Fig. 2. Schematic illustration of target gene amplification

## 2-2. Remaining vector 준비

### 2-2-1. GFP 증폭

Target gene과 결합할 remaining vector를 다량으로 얻기 위해 GFP를 암호화 하는 GFP plasmid vector를 증폭할 수 있는 transformation(형질전환)을 진행하였다 (Fig. 3). 먼저  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 보관된 competent cell인 *Escherichia coli*(E. Coli.) NEB 5- $\alpha$ 를 얼음 안에 넣어 서서히 녹여주었다. Competent cell은 열에 민감하기 때문에 얼음 안에 넣은 채 실험을 진행하였다. GFP plasmid DNA의 부피가 competent cell의 부피에 10%가 넘지 않도록 NEB 5- $\alpha$  100  $\mu\text{l}$ 에 GFP plasmid DNA 10  $\mu\text{l}$ 를 넣고 잘 섞어준 뒤, 섞어준 용액을 얼음 안에서 10분간 보관 후 GFP plasmid DNA가 competent cell 안으로 들어갈 수 있도록  $42^{\circ}\text{C}$ 에서 45초간 열 충격(heat shock)을 주었다. 열 충격에 의하여 GFP plasmid DNA가 competent cell안으로 들어갈 수 있다. 열 충격 후 바로 얼음 안에서 2분 동안 보관한 후, 배양액인 LB broth 배지 800  $\mu\text{l}$  (tryptone 0.8 g, yeast extract 0.4 g, NaCl 0.8 g)에 넣고 잘 섞어주고 진탕배양기(shaking incubator)를  $37^{\circ}\text{C}$ , 225 rpm으로 맞춰 놓은 후 혼합용액을 한시간정도 배양시켰다. 성공적으로 형질전환이 된 plasmid를 분리하기 위하여 LB agar 배지에 kanamycin(0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )을 넣어 만들어 놓는다. 진탕 배양기에서 배양된 혼합용액을 kanamycin이 함유된 LB agar 배지 plate 위에 뿌려준 후, 배지에 잘 스며들 수 있도록 멸균된 smear봉으로 spreading을 해준다. Spreading 후  $37^{\circ}\text{C}$  배양기에 넣고 16-18시간 동안 배양하였다. 충분히 배양된 plate안에 GFP plasmid가 형질 전환된 콜로니(colony) 중 하나를 떼어 kanamycin이 함유된 LB broth 배지 3 mL에 넣고 2시간  $37^{\circ}\text{C}$ , 225 rpm 진탕배양을 시켰다. 그 후 kanamycin이 함유된

LB broth배지 27 mL를 더 넣어 준 후 16시간 정도 더 배양하였다.

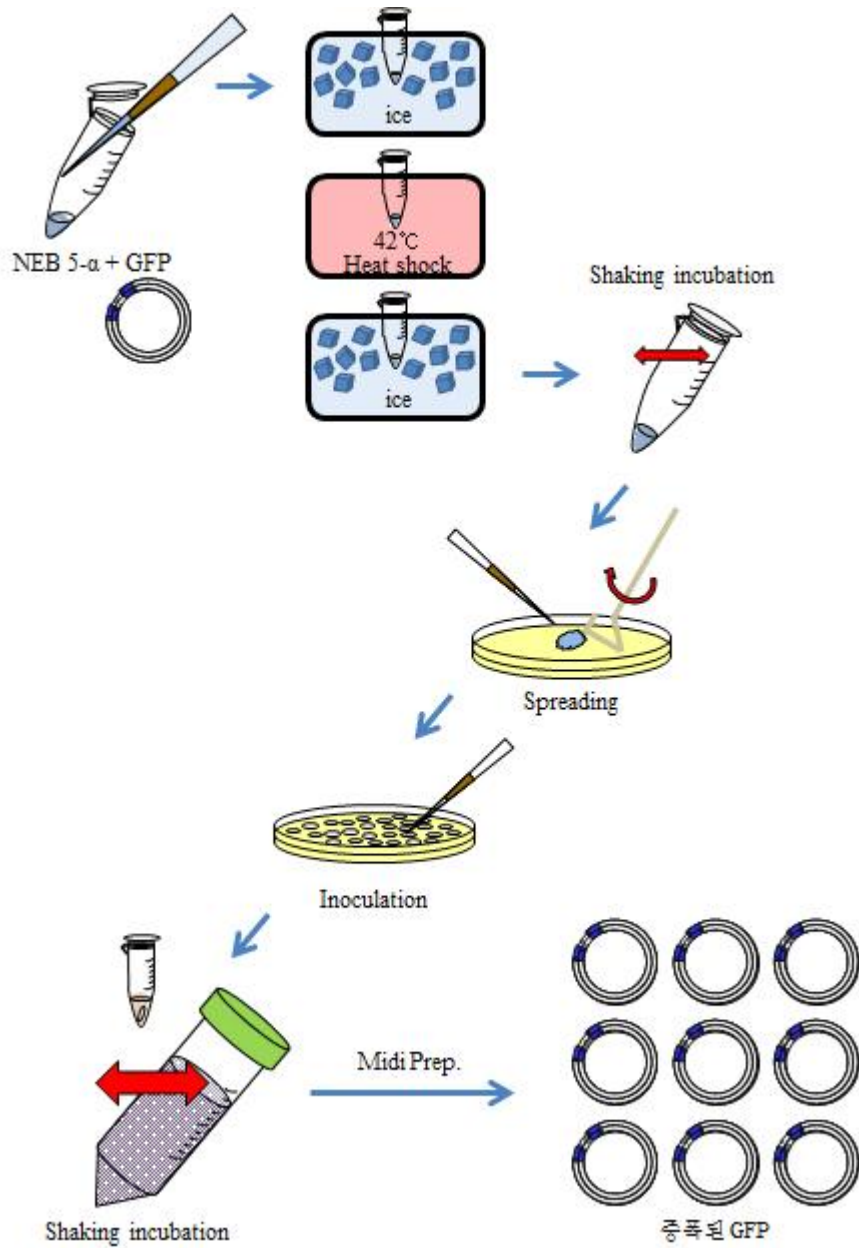


Fig. 3. Schematic illustration of GFP amplification

## 2-2-2. Midi. Prep. (Medium preparation)

Medium preparation kit를 이용하여 DNA를 추출하고 16시간 배양한 뒤 4°C, 6000×g에서 15분간 원심분리 하였다. 펠렛을 제외한 나머지 용액을 조심스레 제거한 후, 4°C에 보관된 RNase A(buffer P1)을 4 mL 넣어주고 잘 섞어준다. 펠렛이 buffer P1에 고루 섞인 것을 확인한 뒤 4 mL buffer P2를 넣고 상온에서 5분 동안 반응시켰으며 이때 용액이 파란색으로 바뀌는 것을 확인할 수 있었다. 그 후 4 mL buffer P3를 넣어 파란색이 제거됨을 확인 한 후, QIAfilter cartridge에 옮겨 상온에서 10분 정도 안정화 시킨다. 동시에 QIAGEN-tip에 4 mL buffer QBT를 넣고 용액이 다 내려갈 때까지 기다린다. QIAfilter cartridge에 plunger를 삽입 한 후 QIAGEN-tip에 조심스레 내용물을 따라 주었다. 마찬가지로 혼합 용액이 다 내려갈 때까지 기다린 후, 10 mL의 buffer QC로 두 번 washing 해 주었다. 마지막으로 65°C로 예열한 5 mL의 buffer QF로 DNA를 추출하였다. 3.5 mL의 isopropanol을 첨가한 뒤 4°C, 15000×g에서 30분간 원심 분리하고 상층액을 조심스레 제거한다. 여기에 다시 70% ethanol 2 mL을 첨가하여 DNA 펠렛을 세척한 후, 4°C, 15000×g에서 10분간 원심 분리하여 상층액을 제거하였다. 멸균된 TE buffer (pH 8.0) 50  $\mu$ L에 녹여 순수한 DNA용액을 확보하였다.

## 2-2-3. Restriction, Gel electrophoresis and Gel extraction

증폭된 GFP plasmid vector에 제한효소를 처리하여 remaining vector를 얻었다. 제한효소로는 EcoR I 과 BamH I 를 이용하여 target gene의 양 말단과 상보적으로 연결할 수 있도록 remaining vector를 만들었다. 제한효소는 37°C에 3시간 반응시켰으며 (Table 3). 그 후 65°C에서 15분 동안 제한효소가 비활성화 시켰다. 제한효소 반응이

끝난 후 1.2% agarose gel에 전기영동을 하여 밴드를 확인하고, remaining vector를 추출하기 위해 해당하는 gel을 잘라 내었다. 잘라 낸 젤의 무게를 측정한 후 젤 추출 완충용액(buffer QG)을 알맞게 넣어준 후 50°C에서 10분간 잘 녹여주었다. 노란색의 용액에 젤이 완전히 녹았는지 확인한 후, 혼합용액을 컬럼에 옮겨 13000 rpm에서 1분간 원심 분리하였다. 컬럼 아래 부분으로 걸러진 용액은 버리고, 컬럼에 750  $\mu$ l wash A 용액을 넣어 1분간 13000 rpm 으로 원심 분리하여 걸러진 용액을 제거했다. 마지막으로 용출 완충용액 30  $\mu$ l 넣고 13000 rpm, 1분 원심 분리하여 remaining vector를 확보하였다.

Table 3. Reaction condition for restriction

Sample, Reagent	Concentration	Volume
pAcGFP1-N1 plasmid vector	130 ng/ $\mu$ l	4 $\mu$ l
BamH I	20 U/ $\mu$ l	1 $\mu$ l
EcoR I	20 U/ $\mu$ l	1 $\mu$ l
10X Restriction Enzyme Buffer	10X	2 $\mu$ l
Autoclaved deionized water		12 $\mu$ l
Total Volume		20 $\mu$ l

### 2-3. BPDE처리

PCR을 통해 증폭 시킨 SupF gene을 각각  $1 \times 10^{-6}$  M 농도로 준비한 후, 3 mM의 EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)와 0.1 M NaCl이 포함된 5 mM의 sodium cacodylate 완충용액으로 만들었다. 이 용액에 1% 이하의 THF용액에 녹인 BPDE를 넣어 반응을 시작하였다. BPDE는 4가지의 다른 조건 (Table 4)으로 처리 하였으며, 반응이 끝난 후 에테르 (ether)와 에탄올 (ethanol)을 이용하여 추출하였다. 반응물과 같은 부피의 에테르를 넣고 30분 반응시킨 뒤 13000 rpm 원심 분리하여 상층액을 제거하였다. 3번의 반복 에테르 추출을 하여 반응하지 않은 BPDE를 제거한 후 3.0 M sodium acetate (pH 5.3)을 10배 부피로 넣어줬다. 그 후 BPDE-SupF adduct 용액 2.5배 부피의 100% 에탄올 (ethanol)을 넣고  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 overnight 시켰다. 다음 날 13000 rpm 20분 원심 분리하여 상층액을 조심스레 제거 한 후 70% 에탄올로 한 번 더 세척을 해준 후 마찬가지로 13000 rpm 20분 원심 분리하여 상층액 제거를 해주었다. 여기에 마지막으로 cacodylate 완충용액을 넣고 BPDE-SupF adduct가 포함된 DNA용액을 만들었다 (Fig. 4).

Table 4. Different reaction conditions for the BPDE treatments

	1 <sup>st</sup> adduct	2 <sup>nd</sup> adduct	3 <sup>rd</sup> adduct	4 <sup>th</sup> adduct
SupF concentration	$1 \times 10^{-6}$ M	$1 \times 10^{-6}$ M	$1 \times 10^{-6}$ M	$1 \times 10^{-6}$ M
Final concentration of BPDE	$1 \times 10^{-5}$ M	$1 \times 10^{-5}$ M	$1 \times 10^{-4}$ M	$5 \times 10^{-4}$ M
Exposure time	12 hours	48 hours	24 hours	48 hours

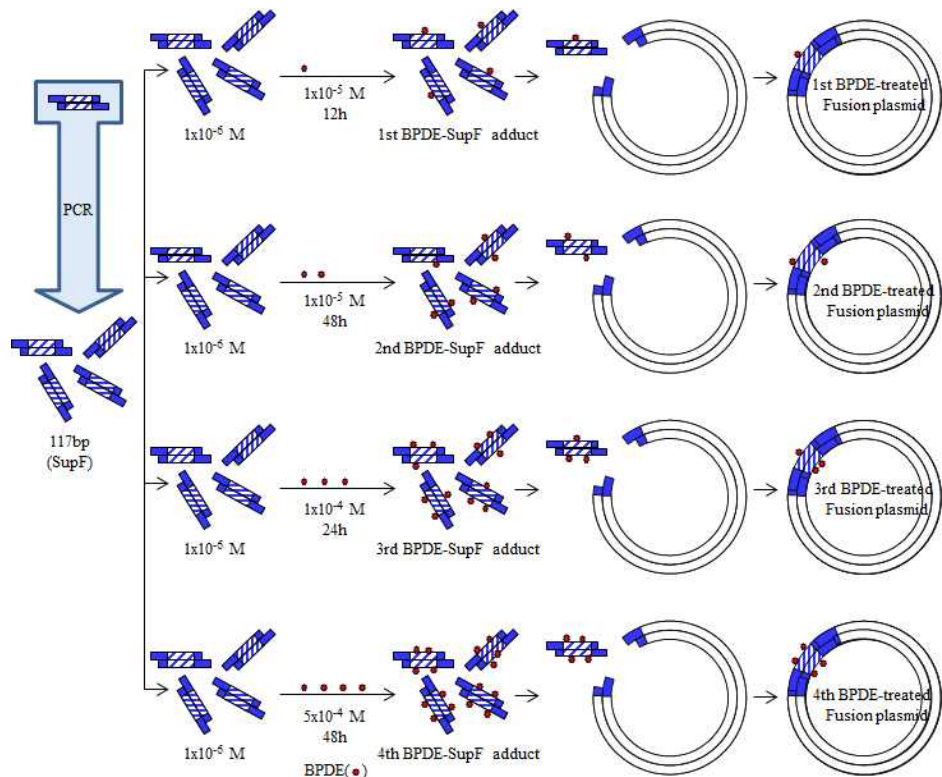


Fig. 4. Schematic illustration of BPDE treatment strategy to SupF gene

## 2-4. Fusion plasmid vector 재조합

Insert로 들어갈 target gene인 SupF gene과 remaining vector인 제한효소 처리 된 pAcGFP1-N1을 3:1의 몰분율로 준비하였다. 그 후 Table 5에 나타낸 조건으로 상온에서 3시간 반응 시켜 연결 효소 (ligation enzyme)으로 두 DNA를 연결(ligation)시켰다. 반응이 끝난 연결 효소는 70°C에서 10분 동안 처리해 비활성화 시킨 후 형질전환 과 접종, 배양, 추출 과정을 하여 재조합된 fusion plasmid vector를 충분히 획득하였다.

Table 5. Reaction conditions for recombination

Sample, Reagent		Concentration	volume
Insert DNA (BPDE-SupF adduct)	1 <sup>st</sup> adduct	$5.62 \times 10^{-7}$ M	1 $\mu$ l
	2 <sup>nd</sup> adduct	$6.03 \times 10^{-7}$ M	
	3 <sup>rd</sup> adduct	$1.84 \times 10^{-6}$ M	
	4 <sup>th</sup> adduct	$5.59 \times 10^{-6}$ M	
Remaining vector		25 ng/ $\mu$ l	6 $\mu$ l
T4 DNA Ligase		1 U/ $\mu$ l	1 $\mu$ l
Ligase Buffer		10X	1 $\mu$ l
D.W			1 $\mu$ l
total volume			10 $\mu$ l



## 2-5. Transfection

형질주입 하기 하루 전 full medium(DMEM+FBS+Pen Strep) 안에 세포개수  $1 \times 10^5$ /mL 로 12-well plate에 subculture 해준다. 다음 날 full medium을 제거한 후 항생제(Pen Strep)가 빠진 배지 (DMEM+FBS) 1.0 mL로 갈아 준 후 6시간이 지난 다음 형질주입을 시작하였다. 1.5 mL eppendorf tube에 opti-MEM I 배지 100  $\mu$ l와 plasmid DNA 1  $\mu$ g을 넣고 잘 섞어준 후 FuGENE HD transfection reagent 3  $\mu$ l와 을 넣고 상온에서 15분 동안 배양한다. 배지를 갈아 준 12-well plate에 혼합용액을 조심스레 넣고 조심스레 흔들어 준 후 배양기에 넣고 48시간 배양하였다. 형질전환 reagent로 흔히 사용하는 lipofectamine의 경우 세포 독성이 있어, FuGENE HD transfection reagent를 사용하여 reagent로 인한 실험의 오차를 줄였다. 형질주입 후 reagent 제거 없이 그대로 배양이 가능하여 세포 손실을 줄이고, 정확한 형질전환을 할 수 있었다.

## 2-6. 형광이미지 분석

실험실에서 자체 제작한 세포 형광이미지 분석 장치를 통해 녹색 형광단백질의 형광을 관측하였다. 먼저 488 nm의 Ar ion laser(Melles Griot Laser Group, 35-LAP-421-220, Carlsbad, CA, USA)를 통해 형광물질을 발광 시키고, interference filter (U-MGFPHQ, OLYMPUS, Melville, NY, USA)로 filtering하였다. Ar ion 빔은 샘플인 HEK293 세포에 조사되는데, 세포로부터 나온 형광 발광은 렌즈를 통해 모아져 복굴절 crystal을 통과하며 회절이 된다. 이 회절된 빔은 음향광학 파장 가변형 필터 AOTF (TEAF10-0.45-0.7-S, Brimrose, USA)를 통과하여 CCD camera(A05F871008, CoolSNAP cf mono, photo-metrics, USA)를 통해 감지된다. 이렇게 얻어진 데이터는 상용화된 소프트웨어인 MetaMorph(Version 7.6.2.0, Molecular Devices)를 사용하여 자동으로 분석하였다.

### Ⅲ. 결과

#### 1. SupF PCR

주문 제작 한 SupF gene (117 bp)의 전기영동 상 위치를 확인하기 위하여 gel 전기영동을 시행하였다. Fig. 5에서 볼 수 있듯이 SupF gene (117 bp)의 밴드는 ladder (lane M) 제일 아래쪽에 있는 100 bp 보다 약간 위에 존재함을 확인 할 수 있었다. 1, 2, 3, 4번 well 에는 순차적으로 25, 50, 75, 100 ng 의 SupF gene을 loading 하여 ladder 와 비교해 보았다.

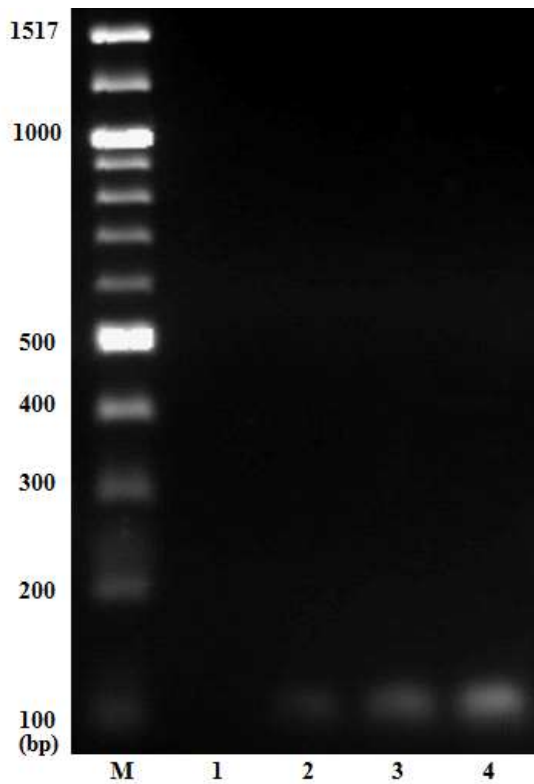


Fig. 5. Gel image of SupF gene

PCR의 알맞은 annealing temperature를 설정하기 위하여 60-64°C에서 각각 PCR을 진행하였으며 (Table 6), 그 결과 61°C에서 그 결과 61°C에서 가장 성공적인 SupF gene의 PCR 결과를 얻을 수 있었고, 충분한 양의 SupF gene을 확보하기 위하여 annealing temperature를 61°C 설정하여 PCR을 진행하였다.

Table 6. Gradient annealing temperature result

Annealing temp.	260 nm absorbance	SupF concentration
60°C	0.157	235.5 ng/ $\mu$ l
61°C	0.179	268.5 ng/ $\mu$ l
62°C	0.173	259.5 ng/ $\mu$ l
63°C	0.171	256.5 ng/ $\mu$ l
64°C	0.168	252.0 ng/ $\mu$ l

## 2. GFP 제한효소 처리

Remaining vector를 얻기 위하여 GFP에 제한효소(EcoR I 과 BamH I)를 처리 하였다 (Fig. 6). 1번과 2번 well 에는 각각 하나의 제한효소만 처리하여 linear 형태로 Ladder와 크기 비교를 하였으며, 원래 크기가 4,726 bp 인 AcGFP1-N1은 4000 bp 와 5000 bp 사이에서 밴드를 확인 할 수 있었다. 3번부터 6번 well 은 remaining vector를 얻기 위해 두 가지 제한효소를 모두 처리한 결과이다. 두 제한효소 처리 시 4,695 bp와 31 bp로 나뉘지는데, 31 bp 는 그 크기가 너무 작아 1.2% agarose gel을 빠져나가고 4,695 bp 의 밴드만 관찰되었다. 1, 2번 well 에 있는 4,726 bp 와 비슷한 위치에 해당 밴드가 나타남을 확인 할 수 있었다. 7번 well 에는 control로 제한효소 처리하지 않은 pAcGFP1-N1를 확인해 보았다. 제한효소 처리 되지 않은 DNA는 super coiled 형태로 본래 크기보다 더 작은 것처럼 아랫부분에 위치하게 됨을 확인 할 수 있다.

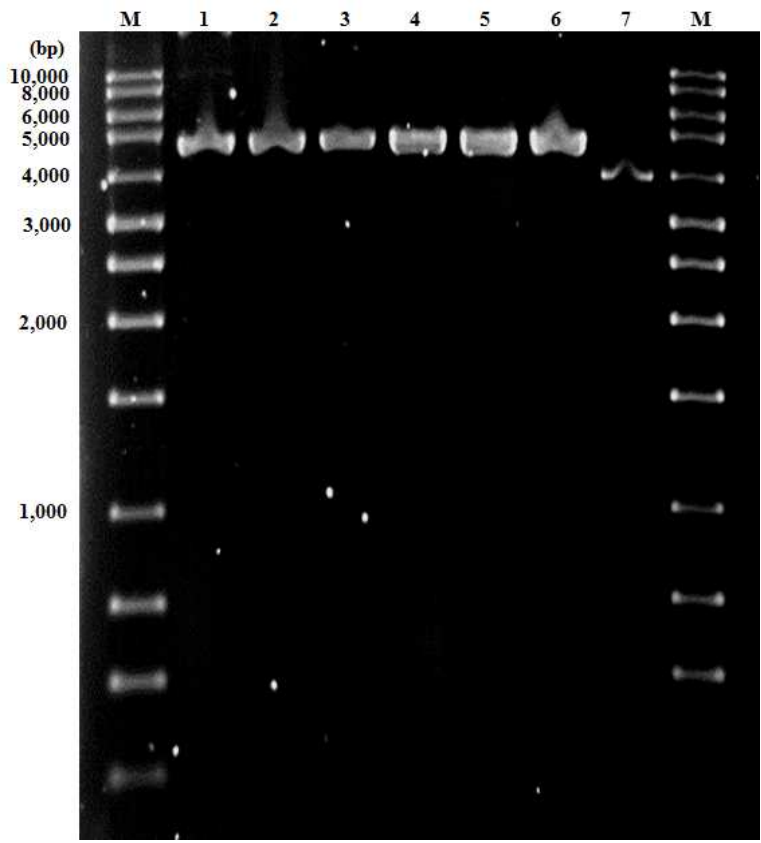


Fig. 6. Gel image of pAcGFP1-N1 enzyme restriction

### 3. SupF gene BPDE 처리 결과

BPDE를 처리한 BPDE-SupF adduct를 3.0 mM EDTA와 0.1 M NaCl이 포함된 5.0 mM의 sodium cacodylate 완충 용액에 녹인 후 완충 용액을 공시험(Blank)으로 자외선 분광광도계로 흡광도를 측정하였다. 그 결과 Fig. 7에서 볼 수 있듯이 농도, 시간 별로 다르게 처리한 네 가지 BPDE-SupF adduct가 첫 번째부터 네 번째까지 순차적으로 흡광도가 증가함을 확인할 수 있었다. SupF gene에 처리한 BPDE는 346 nm에서 흡광 계수  $29,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 을 갖는다. 따라서 BPDE-SupF adduct의 흡광도로부터 SupF gene과 결합한 BPDE의 양을 측정할 수 있다. Table 6에 흡광도에 기초하여 구한 BPDE-SupF adduct의 농도를 표로 나타내었다.

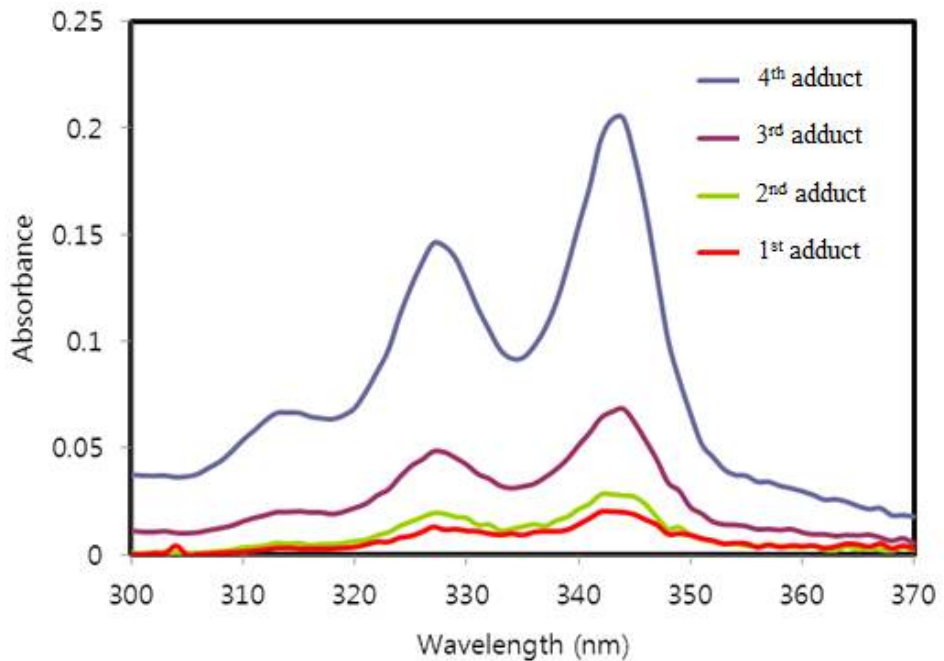


Fig. 7. Absorbance graph of BPDE-SupF adduct

Table 7. Final concentration of BPDE-SupF adduct

	1 <sup>st</sup> adduct	2 <sup>nd</sup> adduct	3 <sup>rd</sup> adduct	4 <sup>th</sup> adduct
SupF concentration	$1 \times 10^{-6}$ M	$1 \times 10^{-6}$ M	$1 \times 10^{-6}$ M	$1 \times 10^{-6}$ M
BPDE final concentration	$1 \times 10^{-5}$ M	$1 \times 10^{-5}$ M	$1 \times 10^{-4}$ M	$5 \times 10^{-4}$ M
Exposure time	12 hours	48 hours	24 hours	48 hours
BPDE-SupF adduct concentration	$5.62 \times 10^{-7}$ M	$6.03 \times 10^{-7}$ M	$1.84 \times 10^{-6}$ M	$5.59 \times 10^{-6}$ M



#### 4. BPDE-SupF adduct와 재조합 Plasmids 확인

Fig. 8은 2% agarose gel을 사용하여 얻은 네 가지의 BPDE-SupF adducts를 전기영동 하여 얻은 결과이다. Fig. 5에서 확인 한 바와 같이 SupF gene은 117 bp 에 위치함을 확인 할 수 있다. Lane 1, 2, 3, 4 는 각각 BPDE-SupF adduct 1, 2, 3, 4를 나타낸다. 네 가지 밴드 모두 117 bp 에 위치함을 보여준다.

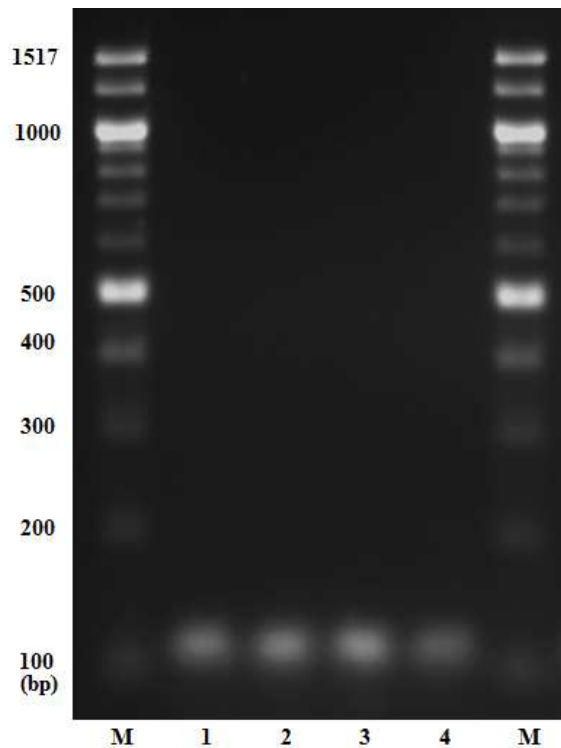


Fig. 8. Gel image of BPDE-SupF adducts

Fig. 8에서 확인한 네 종류의 BPDE-SupF adduct를 각각 remaining vector 와 재조합하여 얻은 결과를 Fig. 9에서 확인할 수 있다. 앞에서 설명한 바와 같이 본래 크기인 4,812 bp 보다 약간 아래에 밴드가 위치함을 확인 할 수 있다.

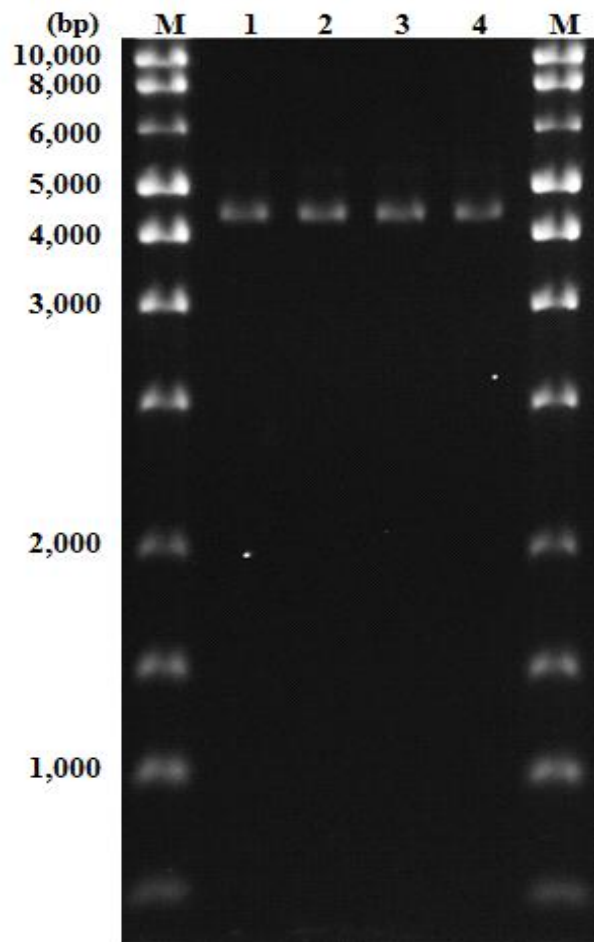


Fig. 9. Gel image of fusion plasmids containing BPDE-SupF adducts

## 5. BPDE-SupF adduct 함유한 Fusion vector의 형광 발현 확인

Fig. 10-1은 BPDE를 처리하지 않은 fusion plasmid vector를 HEK293 세포에 형질 주입하여 얻은 이미지 결과이다. 대조군으로서 BPDE를 처리한 실험군과의 비교를 위한 충분한 발현률을 보였다.

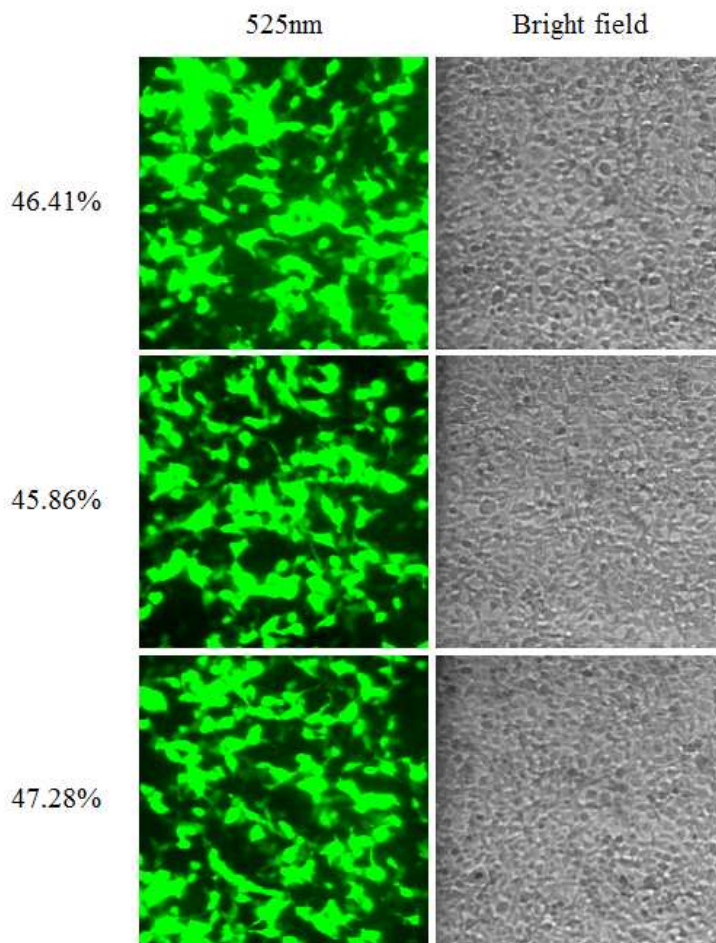


Fig. 10-1. Cellular images of GFP protein by non-BPDE-treated fusion plasmids

Fig. 10-2는 1<sup>st</sup> BPDE-SupF adduct ( $5.62 \times 10^{-7}$  M)를 함유하는 fusion plasmids를 형질 주입하여 얻은 GFP 발현을 형광현미경으로 얻은 이미지이다. 대조군에 비해 형광 발현이 감소한 것을 볼 수 있으며, 각각 세 번의 측정을 통해 실험 오차를 줄였다.

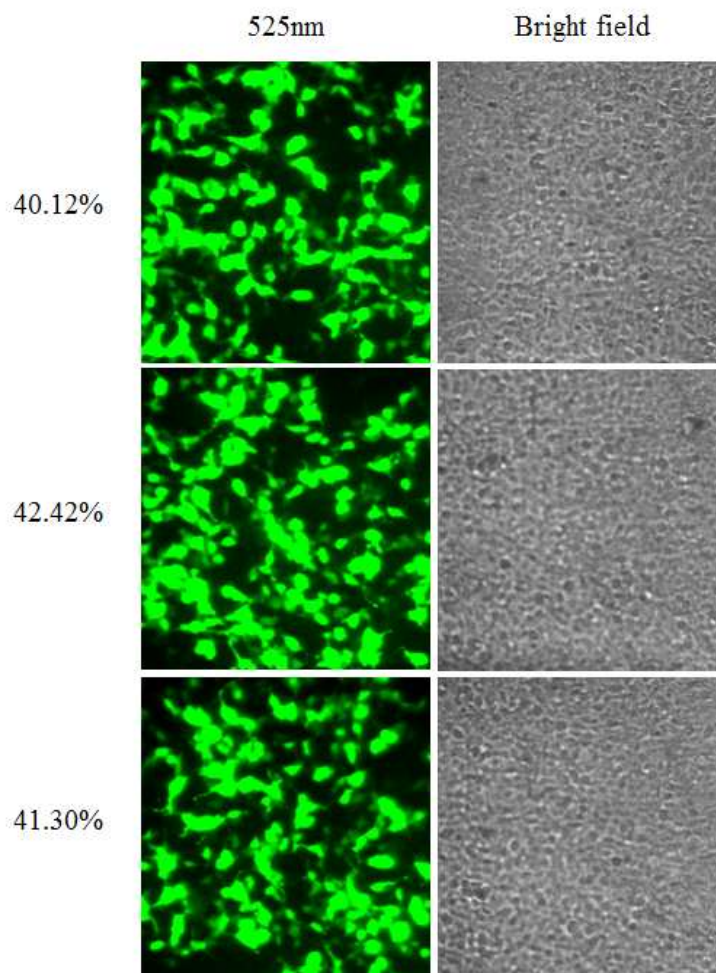


Fig. 10-2. Cellular images of GFP protein by 1<sup>st</sup> BPDE-SupF adduct-treated plasmids

Fig. 10-3은 2<sup>nd</sup> BPDE-SupF adduct ( $6.03 \times 10^{-7}$  M)를 재조합하여 얻은 결과로 Fig. 10-2와 비교하여 형광 단백질 발현이 감소한 것을 볼 수 있다. 이를 통해 BPDE를 같은 농도로 처리 하였을 때, 처리 시간이 길어질수록 BPDE-SupF adduct 증가로 인한 약간의 발현률 감소를 볼 수 있었다.

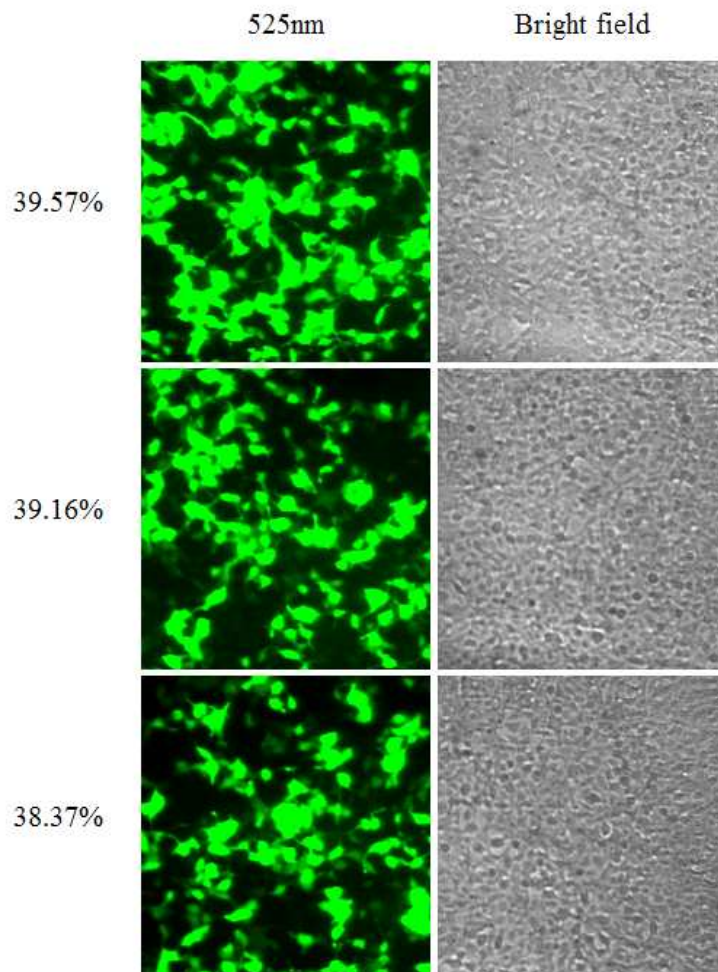


Fig. 10-3. Cellular images of GFP protein by 2<sup>nd</sup> BPDE-SupF adduct-treated plasmids

3<sup>rd</sup> BPDE-SupF adduct를 함유한 fusion plasmids의 발현률은 평균 33.98%로 형광 단백질의 발현이 확연히 감소한 것을 확인할 수 있다. Fig. 4과 Fig. 10-3을 비교해 볼 때 BPDE로 인한 돌연변이 생성량은 시간보다 농도에 더 민감하게 반응하는 것을 알 수 있다.

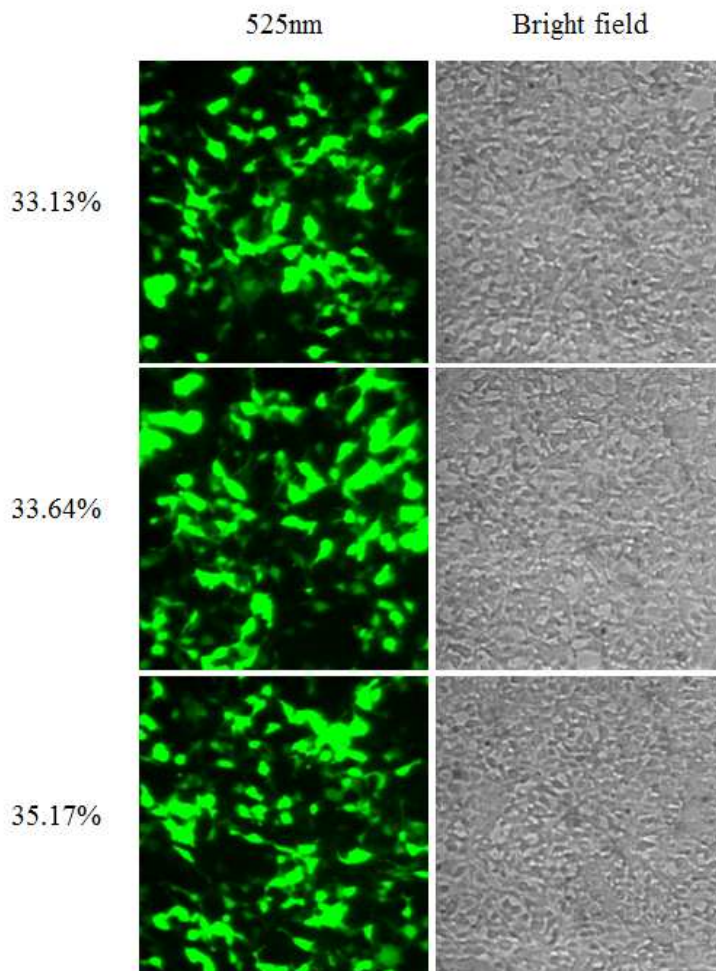


Fig. 10-4. Cellular images of GFP protein by 3<sup>rd</sup> BPDE-SupF adduct-treated plasmids



4<sup>th</sup> BPDE-SupF adduct ( $5.59 \times 10^{-6}$  M)를 통한 fusion plasmids의 형광 이미지 결과 (Fig. 10-5), 대조군에 비해 형광의 세기가 많이 감소된 것을 볼 수 있다. 이로써 BPDE로 인한 SupF gene의 돌연변이 유발과 녹색 형광 단백질 발현의 감소를 확인 할 수 있었다.

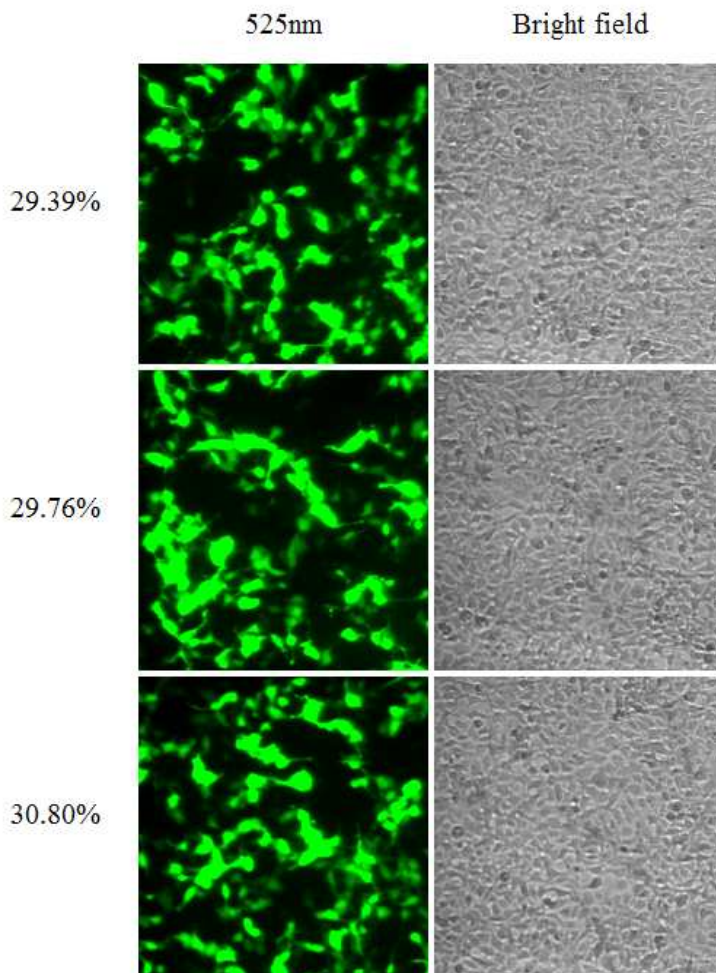


Fig. 10-5. Cellular images of GFP protein by 4<sup>th</sup> BPDE-SupF adduct-treated plasmids

Table 8.은 위의 이미지들의 형광 단백질 발현률을 평균 및 표준편차로 분석 표이다. Average 행을 보면 BPDE를 더 많이 처리 할수록, 더 오래 처리 할수록 형광 단백질의 발현이 감소하는 것을 알 수 있다.

Table 8. Comparison of GFP expression of non-BPDE-treated plasmids and plasmids containing BPDE - SupF adducts

Insert \ Measurement	Non BPDE-treated SupF	1 <sup>st</sup> BPDE-SupF adduct (5.62x10 <sup>-7</sup> M)	2 <sup>nd</sup> BPDE-SupF adduct (6.03x10 <sup>-7</sup> M)	3 <sup>rd</sup> BPDE - SupF adduct (1.84x10 <sup>-6</sup> M)	4 <sup>th</sup> BPDE-SupF adduct (5.59x10 <sup>-6</sup> M)
1	46.41	40.12	39.57	33.13	29.39
2	45.86	42.42	39.16	33.64	29.76
3	47.28	41.30	38.37	35.17	30.80
Average	46.52	41.28	39.03	33.98	29.98
Standard deviation	0.71	1.15	0.61	1.06	0.73

Table 8의 결과를 Fig. 11에 그래프로 도식화 하였으며, 이를 통해 BPDE 처리와 GFP 발현의 상관관계를 손쉽게 알 수 있었다.



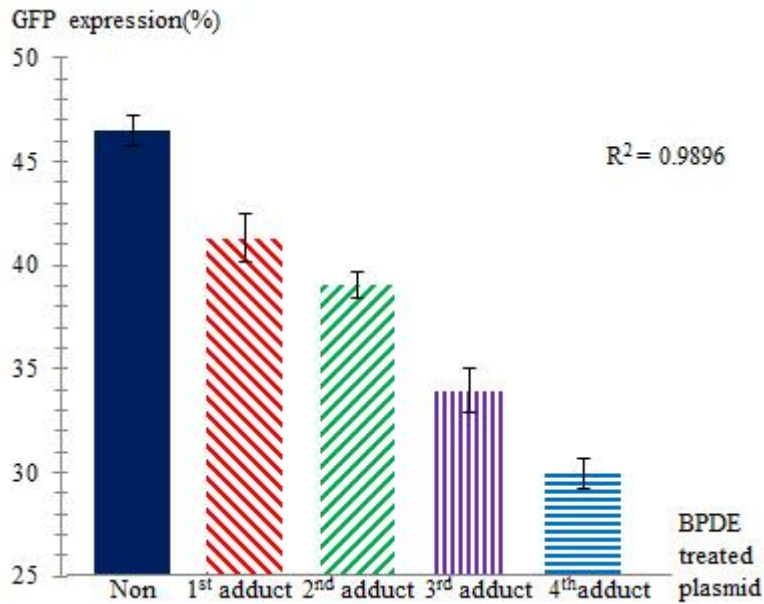


Fig. 11. Relationship of GFP expression and non-BPDE-treated plasmids and plasmids containing BPDE - SupF adducts

BPDE를 처리하지 않은 대조군에 비해 BPDE를 처리한 실험군에서 GFP 발현이 줄어드는 것을 확인할 수 있었으며, 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup>, 4<sup>th</sup>의 순으로 그 발현률이 줄어들었다. 이 발현률의 정량적인 결과를 위해 3회의 측정을 통한 수치의 평균값과 표준편차로 나타내었다. BPDE의 노출 조건이 커질수록 BPDE-SupF adduct의 생성이 많아지고, 이에 따른 GFP 발현률이 정량적으로 감소됨을 알 수 있다.

## IV. 결론

본 연구의 목표는 reporter gene assay를 기반으로 하여 fusion plasmid vector를 재조합하고, 이를 이용하여 발암물질로 인한 돌연변이 정도를 측정할 수 있는 GFP 센서를 개발하는 것이다. 원핵 세포 뿐 아니라 인간 세포를 포함한 진핵 세포에도 적용이 가능한 SupF gene을 GFP reporter gene과 융합하여 다양한 분자 생물학적 연구에 활용 할 수 있게 하였다. GFP 발현 측정은 형광 이미징 기술을 이용하여 세포 수준에서 직접 측정함으로써, 세포막의 파괴와 추출을 거치지 않고 세포의 손실 없이 발현된 녹색 형광 단백질을 측정할 수 있었다. 또한 전체 plasmids에 발암물질을 처리한 기존의 방법과 다르게 target gene에만 발암물질을 처리하여 이를 통한 정확한 정량이 가능하였다. 실험 결과, 매우 성공적으로 네 가지의 발암물질 처리 조건에 따른 BPDE 유발 SupF gene의 손상률을 확인할 수 있었으며, BPDE 처리 농도가 높아질수록, 처리 시간이 길어질수록 보다 많은 SupF gene의 돌연변이가 유발되었다. 본 연구는 발암 물질에 의한 돌연변이 관찰의 새로운 도구 확립을 보여주었으며, 나아가 BPDE 외 다른 발암성 화학 물질 연구에도 활용이 될 수 있음을 기대한다.

## V. 참고문헌

- 1) H.T. Wang, M. Weng, W. Chen, M. Yobin, J. Pan, F.L. Chung, X.R. Wu, W. Rom, M. Tang, 2012. Effect of CpG methylation at different sequence context on acrolein- and BPDE-DNA binding and mutagenesis, *Carcinogenesis*. 0,1-8.
- 2) J. H. Yoon, L. E. Smith, Z. Feng, M. Tang, J. S. Lee, G. P. Pfeifer, 2001. Methylated CpG Dinucleotides Are the Preferential Targets for G-to-T Transversion Mutations Induced by Benzo[a]pyrene Diol Epoxide in Mammalian Cells: Similarities with the p53 Mutation Spectrum in Smoking-associated Lung Cancers, *Cancer Res*. 61, 7110-7117.
- 3) N. F. Cariello, S. Narayanan, P. Kwanyuen, H. Muth, W. M. Casey, 1998. A novel bacterial reversion and forward mutation assay based on green fluorescent protein, *Mutat. Res*. 414, 95-05.
- 4) R.J.C. Slebos, D.S. Oh, D.M. Umbach, J.A. Taylor, 2002. Mutations in Tetranucleotide Repeats following DNA Damage Depend on Repeat Sequence and Carcinogenic Agent, *Cancer Res*, 62, 6052 - 6060.
- 5) A. Yamane, K. Shinmura, N. Sunaga, T. Saitoh, S. Yamaguchi, Y. Shinmura, K. Yoshimura, H. Murakami, Y. Nojima, T. Kohno, J. Yokota, 2003. Suppressive activities of OGG1 and MYH proteins against G:C to T:A mutations caused by 8-hydroxyguanine but not by benzo[a]pyrene diol epoxide in human cells in vivo, *Carcinogenesis*. 24, 1031-1037.
- 6) M. Lodovici, C. Luceri, F. Guglielmi, C. Bacci, V. Akpan, M.L.

- Fonnesu, V. Boddi, P. Dolara, 2004. Benzo(a)pyrene diolepoxide (BPDE) DNA adduct levels in leukocytes of smokers in relation to polymorphism of CYP1A1,GSTM1,GSTP1,GSTT1, and mEH, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 13, 1342-348.
- 7) Y. K. Tak, P. K. Naoghare, K. H. Lee, S. S. Park, J. M. Song, 2008. Green fluorescent protein (GFP) as a direct biosensor for mutation detection: Elimination of false-negative errors in target gene expression, *Anal. Biochem.* 380, 91 - 98.
- 8) S. Mukhopadhyay, D. R. Clark, N. B. Watson, W. Zacharias, W. G. McGregor, 2004. REV1 accumulates in DNA damage-induced nuclear foci in human cells and is implicated in mutagenesis by benzo[a]pyrenediol epoxide, *Nucleic Acids Res.* 32, 5820 - 5826
- 9) K. I. E. McLuckie, M. Gaskell, P. B. Farmer, E. A. Martin, G. D. D.Jones, M. N. Routledge, 2004. Effects of the order of exposure to a binary mixture of mutagens on the induced mutation spectra in the supF gene, *Mutagen.* 19, 137-141.
- 10) C. J. Hanrahan, M. D. Bacolod, R. R. Vyas, T. Liu, N. E. Geacintov, E. L. Loechler, A. K. Basu, 1997. Sequence Specific Mutagenesis of the Major (+)-anti-Benzo[a]pyrene Diol Epoxide-DNA Adduct at a Mutational Hot Spot in Vitro and in Escherichia coli Cells, *Chem. Res. Toxicol.* 10, 369-377.
- 11) H. Bartsch, U. Nair, A. Risch, M. Rojas, H. Wilkman, K. Alexandrov, 2000. Genetic polymorphism of CYP genes, alone or in combination, as a risk modifier of tobacco-related cancers, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 9, 3-8.

- 12) S. E. Porter, J. J. Champoux, 1989. The basis for camptothecin enhancement of DNA breakage by eukaryotic topoisomerase I, *Nucleic Acids Res.* 17, 8521-8532.
- 13) M.A. Wani, Q. Zhu, M. El-Mahdy, S. Venkatachalam, A.A. Wani, 2000. Enhanced sensitivity to anti-benzo(a)pyrene-diol-epoxide DNA damage correlates with decreased global genomic repair attributable to abrogated p53 function in human cells, *Cancer Res.* 60, 2273-2280.
- 14) N. Billinton, M.G. Barker, C.E. Michel, A.W. Knight, W.-D. Heyer, N.J. Goddard, P.R. Fielden, R.M. Walmsley, 1998. Development of a green fluorescent protein reporter for a yeast genotoxicity biosensor, *Biosens. Bioelectron.* 13, 831-38.
- 15) R. Heim, R.Y. Tsien, 1996. Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer, *Curr. Biol.* 6, 178-82.
- 16) R. Heim, A.B. Cubitt, R.Y. Tsien, 1995. Improved green fluorescence, *Nature.* 373, 663-64.
- 17) Ministry of health & welfare, 2012. Ministry of health and welfare statistical year book, 58, 8-9.
- 18) M. Yu, T. Chalfie, G. Guskirchen, W.W. Ward, D.C. Parsher, 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression, *Science.* 263, 802-05.

## Abstract

# BPDE induced DNA damage quantitative determination based on reporter gene (SupF) assay

Byoung Joo Kim

Department of Pharmacy, Pharmaceutical Analysis

The Graduate School

Seoul National University

Modern society needs awareness about carcinogens and research on quantitative analysis of carcinogens in cigarette and food has been important. Herein, we studied quantitative analysis of DNA damage based on reporter gene assay.  $(\pm)$ -7 $\beta$ ,8 $\alpha$ -dihydroxy-9 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene (BPDE) is a carcinogen contained in cigarette and food, and one of metabolites of benzo[a]pyrene. In this study, BPDE was directly treated to SupF gene for causing mutation in target DNA, then change in rate of expression caused by the mutation was examined. SupF gene is

able to apply to prokaryotic and eukaryotic cells. As a result, fusion vector system was established for both prokaryotic and eukaryotic cells. Previously, entire plasmid was treated by mutagen but in this study target gene was treated with BPDE by varying time (12-48 h) and concentrations (10-500  $\mu$ M) to remove negative error. The concentrations of 4 BPDE-SupF adducts were obtained by the measurement of its absorption. The recombinant plasmids containing 4 kinds of BPDE-SupF gene adduct was obtained by recombining 4 kinds of BPDE-SupF gene adduct and remaining shuttle vector (pAcGFP1-N1). Quantitative correlation between BPDE treated condition and change in protein expression rate of mutated SupF-AcGFP1 fusion plasmid was established. By measuring single cells with fluorescence imaging technology, it is expected that this method could be applied to measuring amount of DNA damage and toxicity of chemical carcinogens.

Keywords: Reporter gene assay, Fusion vector system, BPDE, SupF gene, Green fluorescent protein.

Student Number : 2011-21703