

BSPE00537-966-3

해양 세균의 생체 발광 반응의  
기작과 응용(II)

Mechanism and Application of  
Bioluminescence Reaction of Luminous  
Marine Bacteria (II)

1997. 2.

한국해양연구소

## 제 출 문

한국 해양 연구소장 귀하

본 보고서를 “해양 발광 세균의 생체 발광 반응의 기작과 응용 (II)” 과제의 보고서로 제출합니다.

1997 년 2 월

연구기관 : 한국해양연구소

연구책임자 : 조 기 응

# 요 약 문

## I. 제목

해양 발광 세균의 생체 발광 반응의 기작과 응용 (II)

## II. 연구의 목적 및 중요성

해양 세균들의 몇몇 종에 의한 생체 발광 반응은 매우 특이한 현상으로 그 반응 기작이 화학 반응에 의해 여기 상태의 산물이 생성된다는 점에서 흥미로울 뿐만 아니라 이들의 생체 발광을 고감도의 분석에 응용하여 미량물질의 정량에도 이용범위가 넓다.

## III. 연구 내용 및 범위

본연구에서는 해양 발광세균에서의 생체 발광 반응의 응용면에서 이러한 생체 발광반응을 이용하여 생체내 생리 대사에 매우 중요한 효소들의 활성 측정법을 개발한다.

## IV. 연구 개발 결과 및 활용에 대한 건의

본연구에서는 해양 발광세균에서의 생체 발광 반응의 전반적인 기작을 논의하고 이러한 생체 발광반응을 이용하여 생체내 생리 대사에 매우 중요한 효소인 Flavokinase의 활성 측정법을 개발하였다.

# Summary

## I. Title

Mechanism and Application of Bioluminescence of Luminous Marine Bacteria (II)

## II. Objectives and Significance

The bacterial bioluminescence reaction found in a few marine bacteria such as *Vibrio* or *Photobacterium* is very unique in that a electronically excited product is generated as a result of chemical reaction. The reaction mechanism of this bacterial bioluminescence is in itself very interesting and the application of bioluminescence reaction in microanalysis is a hot field in analytical biochemistry.

## III. Contents and Scope

In this research, in order to develop an application of bioluminescence reaction, an assay method for flavokinase (riboflavin kinase) which has a critical role in the uptake of riboflavin and the synthesis of FMN and FAD was developed.

## IV. Results and Suggestions

In this research, a new assay method for riboflavin kinase was developed.

## 목차

요약문	1
목차	3
그림목차	5
표목차	5
제 1 장 서론	6
제 2 장 실험 방법	15
제 3 장 연구결과	18
luciferase를 이용한 Flavokinase 활성측정법	
제 4 장 참고문헌	30

## Content

Summary	1
Content	3
List of Figure	5
List of table	5
Chapter 1. Introduction	6
Chapter 2. Experimental Methods	15
Chapter 3. Results	18
Bioluminescence Assay of Flavokinase Using Bacterial Luciferase	
Chapter 4. References	30

## List of Figure (그림 목차)

Figure 1. General reaction scheme of bacterial bioluminescence reaction.

Figure 2. Degradation of Intermediate III through Chemcally Induced Electron exchange Luminescence (CIEEL) mechanism.

Figure 3. Standard curve of Initial light intensity versus FMN concentration.

Figure 4. Time dependent production of FMN by riboflavin kinase analyzed with bacterial luciferase coupled reaction.

Figure 5. Dependence of riboflavin kinase activity upon pH.

Figure 6. Dependence of riboflavin kinase activity upon temperature.

Figure 7. Dependence of riboflavin kinase activity upon the concentration of riboflavin

Figure 8. Dependence of riboflavin kinase activity upon the concentration of ATP.

Figure 9. Circiut diagram of Hastings type pre-amplifier.

## List of Table (표 목차)

Table 1. Initial light intensity of Riboflavin, FMN and FAD at saturated tetradecanal.

Table 2. Partial purification of Riboflavin kinase from Bovine liver

## 제 1 장. 서론

모든 생체발광 반응의 공통점은 산소에 의해 기질(luciferin)을 효소(luciferase)에 의한 산화반응을 통하여 최종적으로 빛을 발하는 물질(Lumiphore)를 여기상태로 생성한다는 점인데 그 luciferin 이나 lumiphore의 구조나 luciferase의 성격은 종에 따라 매우 다양한 차이를 보이고있다 (Hastings et al., 1985). 해양세균에서의 발광 현상은 *Photobacterium* (*P. phosphoreum* *P. leiognathi*), *Vibrio* (*V. fischeri* *V. harveyi* *V. orientalis*), *Schewanella* (*S. hanedai*) 등 3 속(genera)에서 발견되는데 그 성격은 약간의 차이를 제외하고는 본질적으로 유사하다. 어류 등의 발광기에 공생하는 발광 세균의 경우 실험실에서 배양이 불가능하여 오랫동안 그 분류 작업이 완결되지 못하였으나 최근 16s RNA 염기 서열을 PCR을 이용하여 분석한 결과 주로 *Vibrio* 속에 속하는 균주로 동정된바 있다. 세균의 발광 반응은 환원형 Flavin Mononucleotide (FMNH<sub>2</sub>)와 아세트알데히드나 탄소수 7 이상 18 이하인 긴사슬 지방족 알데히드 (Decanal 또는 Tetradecanal)를 산소를 이용하여 각각 FMN과 동일한 길이의 긴사슬 카르복시산 (지방산)으로 산화 시키면서 약 490 nm에서 최대값을 보이는 녹색빛을 띤 푸른빛을 발하는 현상으로 이 반응의 광수율은 대략 0.1 정도로 알려져 있으며 이는 10 개의 알데히드가 산화될 때 대략 1 개의 광자가 생산된다는 의미이다 (Cho et al., 1986; Nealson and Hastings, 1979). 이에 작용하는 효소 (Bacterial luciferase)는 분자량 41,000(α) 과 37,000(β) 정도의 2 개의 subunit으로 구성된 heterodimeric 효소로 lux operon에 각각luxA, luxB로 coding되어 있는데 직접 발광 반응을 촉매하는 기능은 α-subunit에 존재하는 것으로 밝혀졌다 (Meighen, 1988).

Luciferase의 반응순서는 Figure 1.에 요약되어 있는데 우선 환원형 FMN이 luciferase에 부착되어 중간체 I (L'ase:FMNH<sub>2</sub>)을 형성한 후 이 flavin 고리의 4a-탄소에 산소가 반응하여 중간체 II (L'ase:FMNH-4a-OOH)를 만들게 되는데 이 II는 효소반응의 중간체로서는 대단히 안정하여 영하 20 도에서 50 % ethylene glycol을 포함한 완충액을 써서 column chromatography를 이용하여 처음 분리되었으며 (Balny and Hastings, 1973), 그 안정도가 dodecanol이나 dodecamine등의 지방족 화합물에 의하여 크게 증대되므로 dodecanol로 포화된 완충액과 spin column을 이용한 centrifugal chromatography를 통하여 4 °C 에서도 90 % 정도의 수율로



분리가 가능하다 (Tu, 1986). 형성된 중간체 II는 최종 기질인 지방족 알데히드가 없는 상태에서는 luciferase와 FMN, 과산화수소로 분해되는데 이 과정에서도 알데히드가 존재할 때에 비해 약 0.1 % 정도의 약한 빛 (endogeneous bioluminescence) 이 생성된다. 만일 이 순서가 뒤바뀌어 알데히드가 FMNH<sub>2</sub>보다 먼저 luciferase에 부착될 경우 특히 *V. harveyi*에서 분리된 luciferase의 경우 알데히드에 의한 기질 저해가 일어나는데 이는 luciferase의 FMNH<sub>2</sub> 부착 위치에 알데히드가 경쟁관계로 부착되어 경쟁적 저해를 보이는 것으로 최근 밝혀졌다 (Lei et al., 1984). 발광 반응에서 가장 중요한 과정은 이 중간체 II의 4a-peroxide 음이온이 긴사슬 알데히드의 카르보닐 탄소에 nucleophilic addition 반응을 통해 중간체 III (L'ase:FMNH-4a-OO-CH(OH)-R)을 형성한 후 이 중간체의 분해를 통해 지방산과 최종 발광체로 인정받고 있는 중간체 IV (L'ase:FMNH-4a-OH)를 여기상태로 생성해 내는 과정이다 (Eberhard and Hastings, 1972). 중간체 IV는 생체발광과 동일한 형광 spectrum을 보이고 있음이 확인되었고 여기상태의 중간체 IV는 발광후 기저상태에서 탈수 반응을 거쳐 luciferase와 FMN으로 유리되며 이 역시 지방족 화합물 존재하에서 안정화되므로 중간체 II와 동일한 과정을 거쳐 분리되었다 (Kurfurst et al., 1984).

이 과정에서 중간체 III의 Flavin-oxygen-aldehyde 복합체의 실존에 대하여서는 몇몇 간접적인 결과를 바탕으로 일반적으로 인정되고 있으나 직접적인 증거는 아직 불충분한 상태이다. 단지 최근 Macheroux등에 의하여 영하 4 도에서 발광반응을 일으키며 그 흡광 spectrum을 분석하여 중간체 III으로 믿어지는 물질의 흡광 spectrum을 얻었고 (1994), 중간체 III의 C<sub>1</sub>-OH를 H로 치환한 구조 유사체 (L'ase:FMNH-4a-OO-CH<sub>2</sub>-R)를 *in situ* 조건에서 생성시켜 발광을 확인함으로써 중간체 III의 존재를 뒷받침하고 있다 (Cho, 1994).

중간체 III에서 여기상태의 산물이 형성되는 기작으로는 그동안 많은 가설들이 제시되어 왔으나 (Baldwin and Ziegler, 1991) 현재 가장 일반적으로 받아들여지고 있는 것이 Figure 2. 에서 나타낸 소위 Chemically Initiated Electron Exchange Luminescence (CIEEL) 기작인데 이는 반딧불의 생체발광 기작으로 제시되어 실험적으로 증명된 이론으로 광합성 과정의 역반응이라 할수 있으며 현재 얻어진 거의 모든 실험 결과를 만족 시키고 있다 (Koo et al., 1978). 이 기작에서는 우선 중간체 III의 peroxide bond의 분해가 일어나는데 이 과정은 주변에서 1 개의 전자를

peroxide bond에 공여하여 분해를 촉진시키며 이 과정은 Fenton 반응에서 Fe(II)가 hydrogen peroxide에 1 개의 전자를 제공하여 자신은 Fe(III)로 산화되면서 hydrogen peroxide를 hydroxyl radical과 hydroxyl 음이온으로 분해 시키는 과정과 유사하다.



단 발광반응의 경우 1 개의 전자를 공여하는 것은 flavin ring이 된다. 이 CIEEL 기작에서는 가장 중요한 과정은 flavin ring에서 peroxide bond로 1 개의 전자를 공여하는 과정인데 이 flavin ring의 전자 공여능력과 반응 속도간의 상관 관계를 redox potential이 다른 여러종류의 8-substituted FMN 들을 사용하여 고찰한 결과 flavin ring의 전자 공여능력이 우수할수록 발광 반응이 촉진되는 현상이 확인되었다 (Macherous et al., 1987). 결국 flavin ring은 전체적으로 1 개의 전자를 결여한 (양이온 radical) 중간체 IV의 형태를 띠게 된다. 또 다른 한편으로 생성되는 지방족 알데히드의 유도체는 카르보닐 탄소에 hydroxyl 기와 산소 radical을 갖는 형태로 생성되는데 (R-CH(OH)-O·) 이는 최종 산물인 지방산으로 전환될 때 1 개의 전자가 남게 되므로 이를 flavin 양이온 radical에 돌려주게 된다. 이 때 이동되는 전자가 Lowest Unoccupied Molecular orbital (LUMO)에서 유래 되었을 경우 중간체 IV가 여기상태로 형성되고 Highest Occupied Molecular Orbital (HOMO)일 경우는 지방산이 여기상태로 형성될 것으로 기대된다. 중간체 IV가 여기상태로 형성될 경우는 그 자체로 발광체이므로 문제가 없으나 지방산이 여기상태로 형성될 경우는 포화 지방산에 lumiphore가 없으므로 그자체로 발광하지 못하고 그 여기 에너지를 기저상태의 중간체 IV나 lumazine protein (LP)의 lumazine, yellow fluorescence protein (YFP)의 FMN등 여타 최종 발광체에 전달하여 발광을 유도하게 되리라고 생각된다 (Mager et al., 1988). 여기서 LP는 *Photobacterium phosphoreum* 나 *P. leiognathi* 종류에서 발견된 분자량 20,000 정도의 작은 단백질로서 그 cofactor로서 6,7-dimethyl-8-ribityl lumazine을 갖고 있으며 발광반응시 luciferase와 복합체를 이루어 발광되는 빛의 색을 조절하는 특수한 역할을 수행하는데 bacterial luciferase와 마찬가지로 *lux operon* 내에 lum P로 coding 되어 있다 (Koka and Lee, 1979; Prasher et al., 1990). 이 단백질의 존재하에서는 생체

발광 반응의 속도가 luciferase만에 의한 반응보다 2 배 이상 빨라지며, 전체 광수율이 2배까지 증대되고 가장 중요한 점으로서는 원래 490 nm에서 최대 값을 보이던 생체 발광 spectrum이 475 nm로 약 15 nm정도 blue-shifted되는 현상이라 하겠다 (Gast and Lee, 1978). 이 현상은 475 nm의 빛이 바닷속에서 가장 투과력이 높은 파장임을 감안할때 이를 위한 특별한 진화과정의 산물이라고 여겨진다. FMN을 cofactor로 갖는 LP와 비슷한 크기의 yellow fluorescence protein (YFP)도 *Vibrio fischeri* Y-1 strain에서 발견되어 이들을 여기상태로 전이시키는 기작에 관한 연구가 진행중이다 (Ruby and Neelson, 1977). YFP의 경우는 490 nm의 빛을 540 nm로 전환 시키므로 처음에는 Foster type 의 energy transfer로 여겨졌으나 반응속도와 광수율을 증대 시키고 특히 560 nm의 빛을 내게하는 인공 기질인 2-thio FMNH<sub>2</sub>을 FMNH<sub>2</sub> 대신 사용하여도 YFP는 560 nm의 빛을 540 nm로 20 nm 정도 blue-shifted 시키는 현상이 발견되어 이 역시 Foster type 의 energy transfer만으로는 설명되지 않고 lumazine protein과 마찬가지로의 기작에 의해 여기상태로 전이된다고 여겨진다. YFP는 *lux operon*의 여타 단백질들과 함께 유도되어 생합성되는 단백질임이 발견되었고 (Cho et al., 1989) 결국 *lux operon*에 Lux Y로 존재함이 확인되었다 (Baldwin et al., 1990).

이러한 LP나 YFP의 여기상태로의 전이 기작에 관하여 에너지 공여체가 여기상태로 생성된 지방산이라는 논의에 대하여 실제로 여기상태의 지방산이 생성되는지를 확인하는것이 우선적으로 필요하다. 이를 위하여서는 형광을 낼수 있는 fluorophore를 갖고 있으면서 luciferase의 기질로 작용할수 있는 형광성 알데히드 기질을 사용하면 반응결과 형성된 여기상태의 지방산이 이 fluorophore에 의하여 그 자체로 발광이 가능하리라고 기대되었다. McCapra등에 의해 처음으로 flavin등을 fluorophore로 decanal등에 결합시킨 형광성알데히드가 기질로 사용하고자 시도하였으며 (McCapra et al., 1984) 최근에 형광을 보이는 conjugated tetraene을 갖는 parinaric aldehyde (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-(CH=CH)<sub>4</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>COOH)를 기질로 이용하여 발광 spectrum을 조사함으로써 여기상태의 지방산이 생성되지 않으며 중간체 IV나 LP 또는 YFP가 직접 여기상태로 형성된다는 사실이 확인되었다 (Cho et al., 1993)

lumazine protein 이나 YFP의 여기상태로의 직접 생성은 공통의 여기에너지 제공자로 여겨졌던 여기상태의 지방산의 존재가 부정되어 이를 설명하는 새로운 기작이 제시되었다. 즉, lumazine protein이나 YFP는 실제로 luciferase와 복합체를

이루고 있으므로 반응이 진행되는 동안 중간체 III의 flavin ring과 lumazine protein의 lumazine 또는 YFP의 FMN이 공간상으로 거의 겹쳐있는 상태이며 이에 따라 초기에 peroxide bond로 전자를 공여하는 주체가 중간체 III의 flavin ring과 lumazine protein의 lumazine 또는 YFP의 FMN간의 복합체이며 peroxide bond의 분해 결과 형성된 지방족 radical의 LUMO에서 온 1 개의 전자가 되돌아 올때 어느 쪽이 전자 수용체로 작용하는가에 따라 주된 최종 발광체가 결정된다고 여겨진다. YFP의 경우 최적 조건에서 중간체 IV보다 약 10 배까지 우월하게 최종 발광체로 선택되는 현상을 보인다 (Ecketein et al., 1990).

이 경우 lumazine이나 FMN이 이미 산화된 상태의 분자인데 여기서 추가로 산화가 가능한지가 문제의 초점이 되는데 실제로 산화된 형태의 lumazine이나 FMN에서 1 개의 전자를 더 산화시킨 "superoxidized" FMN 이나 "superoxidized" lumazine이 생성가능함을 전기 화학적 방법으로 확인하였고 여기에 1 개의 전자를 가하여 FMN이나 lumazine으로 환원 시킬때 여기상태의 FMN이 생성됨을 화학 발광 현상으로 확인되었다 (Tu et al., 1991).

생체내에서 이 발광 반응에 관여하는 효소체계는 luciferase 이외에 환원형 flavin을 공급하는 효소체계, 긴사슬 알데히드를 공급하는 효소체계등이 추가로 알려져있는데 우선 FMN을 FMNH<sub>2</sub>로 환원시켜 기질로 공급하는 효소로 NADH:FMN Oxidoreductase와 이와 비슷한 NADPH:FMN oxidoreductase가 보고되어 있고 이외에 NADH와 NADPH 모두를 사용할수 있는 제 3 의 reductase도 보고되어있다 (Hastings et al., 1978). 이들 FMN reductase들은 lux operon과는 무관한 효소들로 어떤 면에서는 생체 발광과도 무관하게 거의 모든 세균에서 생산되는 효소로 lux 유전자들을 *E. coli*등에 cloning할 때 FMNH<sub>2</sub> 를 공급하는 중요한 효소가 된다.

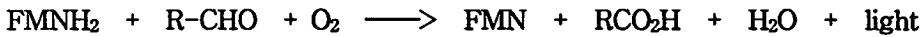
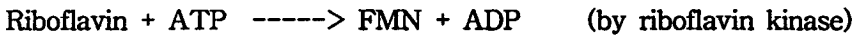
긴사슬 알데히드 (생체내에서는 주로 Tetradecanal)을 공급하는 효소는 fatty acid reductase complex라는 3 종류의 polypeptides로 구성되어 있는데 이들은 tetradecanoic acid (myristic acid, C<sub>14:0</sub>)를 세포막 구성 인지질로부터 공급하는 acyl-transferase ( $\delta$ ), 공급된 tetradecanoic acid를 ATP를 이용하여 acyl-AMP로 활성화한 후 스스로를 acylation시키는 acyl-protein synthetase ( $\epsilon$ ), 그리고 이 acylated 된 acyl-protein synthetase를 NADPH를 이용하여 알데히드로 환원시켜 luciferase에 최종적으로 기질을 공급하는 역할을 수행하는 reductase ( $\gamma$ ) 들이다. 이들은 Luciferase와 마찬가지로 lux operon에 Lux D, Lux E 그리고 Lux C로

coding 되어있으며 이외에도 lux gene의 발현을 조절 통제하는 기능을 갖는 lux R 과 lux I가 존재한다 (Rodriguez et al., 1986).

Riboflavin은 Vitamin B<sub>2</sub>으로도 알려져 있는 필수 영양 요소로서 세포내에서는 주로 flavin mononucleotide (FMN)이나 flavin adenine dinucleotide (FAD)의 형태로 존재한다. 많은 종류의 효소들이 이 flavin 계열의 물질을 coenzymes으로 이용하고 있으며 특히 ATP를 생성하는 전자 전달계에서 이 물질들이 차지하는 위치는 매우 중요하다. Flavin system은 특히 산화 환원 반응에서 단전자 산화 환원 반응과 전자쌍 산화 환원 반응이 모두 가능하다는 특징을 지니고 있다. 생체내로의 흡수는 주로 riboflavin의 형태로 이루어지고 이들이 흡수된 후 FMN이나 FAD로 전환되는데 여기서 가장 중요한 반응이 riboflavin의 ribityl group의 5번 hydroxyl group에 ATP로부터 phosphate를 전달하여 FMN으로 전환시키는 반응이며 이 반응을 촉매하는 효소가 riboflavin kinase이다. 이 phosphate group의 존재에 의하여 세포내 수용액상에서 용해도가 크게 증가하며 그 이용도도 함께 극대화되는 것이다. 이 효소는 여러종류의 식물과 동물 특히 간조직과 신장등 흡수기작에 기여하는 효소를 생산하거나 이용하는 기관에서 거의 공통적으로 발견된다. 이외에 일부 종류의 yeast에서도 본 효소의 존재가 보고된바 있다. *E. coli*에서는 ATP 대신에 glucose-1-phosphate를 phosphate donor로 이용하는 유사한 효소가 보고되었다. 이 효소의 활성도 측정에는 대단한 어려움이 있는데 그 이유는 riboflavin과 FMN이 동일한 isoalloxazine ring system을 갖고있어 UV-Visible absorbance나 fluorescence 등의 spectrophotometric 성격이 거의 동일하기 때문이다. 따라서 본 효소의 분석에는 많이 사용되는 spectrophotometer나 fluorometer의 사용이 불가능하고 물에대한 용해도의 차이 및 phosphate group의 유무에 따른 ionic character의 차이를 이용한 방법을 사용해 왔다. 또 방사선 동위원소로 표지된 <sup>32</sup>P-ATP를 기질로 사용하여 정량하는 방법도 사용되어왔다. 그러나 이모든 방법이 기질과 산물의 분리를 전제로 하며 이 분리에는 주로 paper chromatography나 HPLC와 같은 chromatographic method에 의존해 왔다. 그러나 이방법은 일반적으로 많은 시간과 비용 그리고 노력이 필요하여 효소의 신속한 분석에는 부적합하다.

최근들어 고감도 신속 분석법으로 화학발광 (chemiluminescence)이나 생물발광 (bioluminescence)를 사용하는 추세가 늘어나고 있는데 그 이유는 방사선 동위원소

를 사용하는 분석 수준의 높은 감도를 갖고 있으면서도 그 위험도가 거의 없는 방법이기 때문이다. 이러한 발광 체계중의 하나가 bacterial luciferase를 이용하는 것인데 그 내용에 대해서는 이미 언급한바 있다. 본 riboflavin kinase의 활성 검사법에도 이를 적용할 수있다고 여겨지는데 그것은 riboflavin kinase의 반응결과 생성물이 FMN으로 이를 환원시키면 바로 bacterial luciferase 반응으로 전환시켜 분석할 수 있기 때문이다.



(by bacterial luciferase)

본 보고서에서는 이 riboflavin kinase를 bacterial luciferase를 사용한 효율적으로 분석할 수 있는 새로운 발광 분석법을 개발하였다. 여기서는 riboflavin kinase에 의하여 생성된 FMN과 기질로 남아있는 미반응 riboflavin을 chromatography 과정등을 통하여 분리하는 과정없이 함께 sodium dithionite로 환원시킨 후 환원형 FMN 만이 발광 현상을 보이는 점을 이용하여 Riboflavin kinase의 활성도를 분석하는 방법을 개발하였다.

Figure 1. Reaction steps of bacterial bioluminescence reaction. E1 is bacterial luciferase, E2 is flavin reductase, and E3 is fatty acid reductase complex.

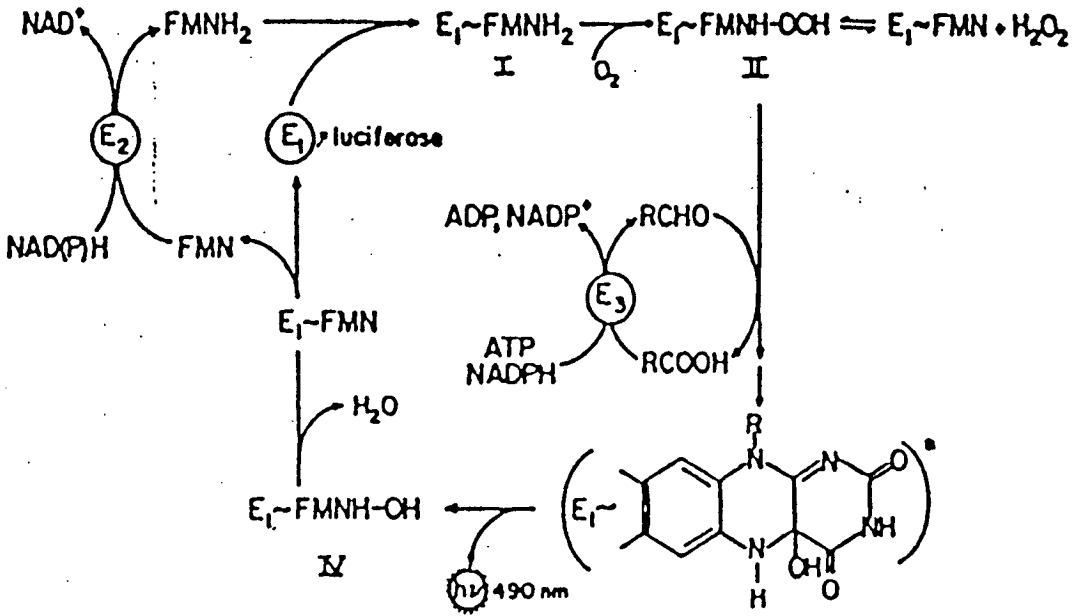
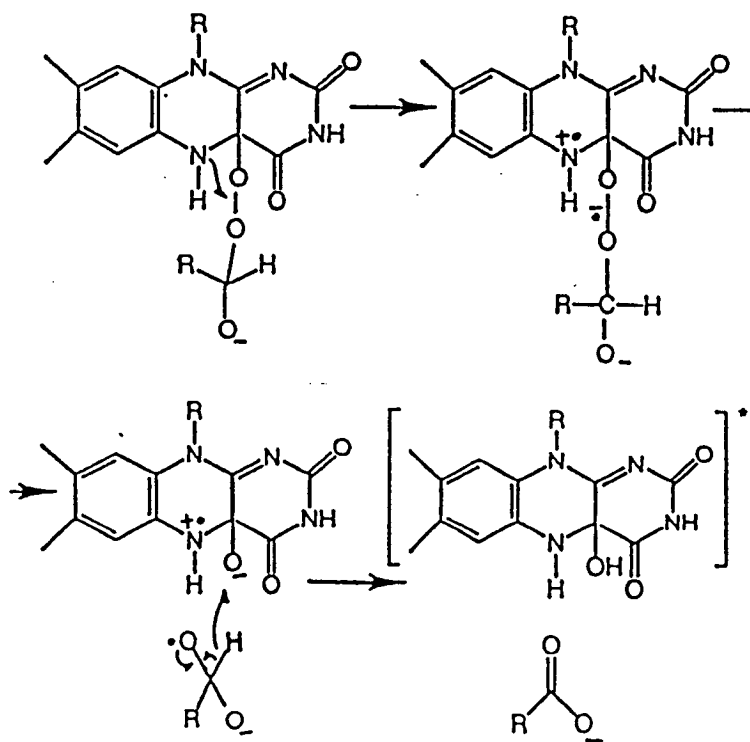


Figure 2. Degradation of Intermediate III through Chemically Induced Electron Exchange Luminescence (CIEEL) mechanism leading to the formation of electronically excited intermediate IV and fatty acid.





## 제 2 장 실험방법

### 2.1. 사용한 시약 및 재료

Riboflavin, flavin mononucleotide (FMN), flavin adenine dinucleotide (FAD), adenosine triphosphate (ATP) 그리고 tetradecanal 등 long chain aliphatic aldehydes들은 Sigma Chemical Co (USA)에서 구입하였다. DEAE-cellulose, DEAE-sephadex A-25, Sephadex G-200등도 Sigma Chemical Co (USA)에서 구입하였다. FMN 시료는 일반적으로 소량의 riboflavin을 함유하고 있으므로 DEAE-cellulose column (1.5 X 5 cm)을 사용한 chromatography로 정제하여 사용하였다. 정제는 DEAE-cellulose column에 5 mM 정도의 FMN 시료를 1 ml 가하고 증류수로 씻어 riboflavin을 얻고 다시 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0)으로 씻어 흡착된 FMN을 얻어낸다. 노란색의 flavin compound의 이동은 눈으로도 보이므로 쉽게 정제할 수 있다. Riboflavin kinase의 기질로 사용한 riboflavin도 소량의 FMN과 FAD를 함유하고 있으므로 동일한 요령으로 정제하였다. 정제된 riboflavin과 FMN의 농도는 spectrophotometric method로 445 nm에서의 흡광도를 이용하여 결정하였다 (extinction coefficient of  $12,200 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ). FMN의 환원제로 사용된 Sodium dithionite는 Aldrich Chemical Co.(USA)에서 구입하였다.

### 2.2. 효소

Bacterial luciferase는 해양 발광세균 *Photobacterium phosphoreum*로부터 Hastings 등(1978)의 방법에 따라 순도 95 %로 분리 정제하였으며 이때의 specific activity는 포화된 농도의 tetradecanal을 기질로 "dithionite assay"로 분석했을 때  $4 \times 10^{14} \text{ quanta}\cdot\text{sec}^{-1}\text{mg}^{-1}$ 를 보였다.

균체 배양은 sea water complete 배지 (5 g Tryptone, 3 g yeast extract, 3 ml glycerol in 1 liter of 70 % aged sea water, pH 7.0)에서 25 oC에서 배양하여 cell mass가 5 g/l 정도일때 Sorvall RC-5C high speed centrifuge와 SS-34 rotor에 장착된 continous centrifuge system을 이용하여 균체를 수확하였다.

20 liter 배양액에서 100 g 정도의 균체를 얻은후 이를 멸균된 비닐 봉지에 넣

어 두께 1 cm 되는 시루떡 형태로 모양을 잡아 영하 20 °C에서 한시간 얼린후 다시 녹이고 또다시 얼리기를 2 차례 반복하여 세포벽 구조를 약화 시키고 여기에 미리 4 °C로 식혀둔 900ml의 lysis buffer (5 mM phosphate buffer, 10 mM EDTA, pH 7.0)를 가하여 cold room에서 1 시간동안 교반 시킨다. 이 과정에서 염농도가 높은 배지에서 자란 균체들이 염농도가 낮은 lysis buffer에서 삼투압 차이에 의하여 터지는 소위 osmotic lysis에 의하여 세포내 물질들이 녹아 나오게된다. 세포 파괴를 보다 확실히 하기위하여 초음파분쇄기를 이용하여 얼음물에 담긴 상태에서 1 분간 초음파를 가하고 1 분간 교반 시키는 과정을 5 회 반복한다.

세포내 추출물을 분리하고 파괴된 세포 부스러기를 제거하기위하여 GSA rotor 를 이용하여 10,000 rpm 에서 30 분간 원심분리하여 상등액을 회수하였다. 이 상등액에 DEAE-cellulose를 가하여 30 분간 교반한후 column (5 cm x 50 cm)에 충전하였다. DEAE-cellulose에 흡착되지 않은 물질들을 흘려 내리고 500 ml의 50 mM phosphate buffer (pH 7.0)으로 resin을 씻어 약하게 흡착된 물질들을 제거한다. 다시 500 ml의 150 mM phosphate buffer (pH 7.0)으로 resin 을 씻어 중간정도로 흡착된 물질들을 제거한후 0.5 M phosphate buffer (pH 7.0)로 흡착된 luciferase를 용출시킨다. 이때는 fraction collector (Eyela DC-1200)을 이용하여 10 ml 씩 분취하여 각각의 luciferase활성도와 단백질 함량을 측정한후 luciferase활성도를 보이는 분액들을 합친후 이를 ammonium sulfate 35%와 75 % 사이의 포화도에서 침전된 침전물을 회수한다.

이를 20 ml (혹은 녹일수 있는 최소 volume)의 50 mM phosphate buffer (pH 7.0)에 녹인후 Bio-Rad DG-10 desalting column으로 ammonium sulfate를 제거한 뒤 DEAE-Sephadex column (2.5 cm x 30 cm)에 가하고 column을 100 ml의 동일한 buffer로 씻어주고 여기서 50 mM에서 500 mM 까지 phosphate buffer 농도구배로 column을 용출시켜 5 ml씩 분취하여 luciferase활성도를 보이는 분액을 회수하여 효소량을 결정한 뒤 -70 oC에 보존하여 사용하였다.

Riboflavin kinase는 신선한 상태로 시장에서 구입한 bovine liver로부터 McKormick등의 방법 (1982)에 따라 부분정제 하였다. 정제 내용은 실험결과에 명시하였다.

### 2.3. 분석방법

Dithionite assay는 다음과 같이 수행한다. Phosphate buffer (50 mM, pH 7.0)에 녹아있는 1 ml의 50  $\mu$ M FMN solution을 20 ml 짜리 scintillation vial에 넣고 여기에 10  $\mu$ l의 bacterial luciferase solution을 가한 후 전체 혼합물을 바로 제조한 sodium dithionite solution (about 10  $\mu$ l of 1.5 % solution)으로 환원시킨다. 환원되는 것은 FMN의 노란색과 UV-lamp를 쬐었을 때 나타나는 형광이 사라지는 것으로 알 수 있으며 환원은 거의 즉각적으로 이루어진다. 약간 과량의 dithionite를 가하여 녹아들어가는 공기중의 산소에 의한 FMNH<sub>2</sub>의 autooxidation을 막아준다. 이 환원된 혼합물을 luminometer에 넣고 미리 준비한 1 ml의 aldehyde 용액을 3 ml hypodermic syringe (with 20 gauge 7.5 cm long needle)로 가하여 발광 반응을 유도한다. Aldehyde 용액은 10  $\mu$ l의 tetradecanal solution (in MeOH)을 1 ml의 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0)에 희석한 용액으로 공기에 의해 산소로 포화된 상태이므로 발광 반응에 필요한 양이상의 산소가 공급될 수 있다.

A riboflavin kinase-bacterial luciferase coupled reaction ; 20  $\mu$ M riboflavin, 20 mM MgCl<sub>2</sub> 그리고 2 mM ATP를 포함하고 있는 0.5 ml의 50 mM phosphate buffer (pH 7.5)에 10  $\mu$ l의 riboflavin kinase를 가하고 짧게 vortex로 섞어 반응을 시작한다. 이 반응액을 shaker위에서 흔들어주면서 25 °C에서 반응시킨다음 매 5 분마다 10  $\mu$ l의 aliquots를 따서 1 ml의 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0)에 희석한 다음 여기에 10  $\mu$ l의 bacterial luciferase 용액을 가하고 전체 혼합물을 sodium dithionite로 환원시킨다. 이 환원된 혼합물을 luminometer에 넣고 미리 준비한 aldehyde 용액을 3 ml hypodermic syringe로 가하여 발광 반응을 유도한다. Aldehyde 용액은 10  $\mu$ l의 tetradecanal solution (in MeOH)을 1 ml의 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0)에 희석한 용액이다. 낮은 FMNH<sub>2</sub> 농도에서는 (below Km, the Km of FMNH<sub>2</sub> is about 0.5  $\mu$ M), 발광 반응의 초기발광 강도가 FMNH<sub>2</sub> 농도에 직선적으로 비례하므로 이를 이용하여 riboflavin kinase에 의하여 생성된 FMN의 농도를 알수있다.

발광 반응의 초기발광 강도(I<sub>0</sub>)는 Hamamatsu R-447 phototube와 Mitchell-Hasting type pre-amplifier를 장착한 photomultiplier photometer로 측정하

었다. 여기에는 고압직류전원 공급을 위한 GW-3000 power supply (건우과학)와 strip chart recorder (Linear-1200, Linear Co., USA)를 연결하여 결과를 기록하였다. 발광량의 calibration은 Hastings and Weber (1972)에 의한 continuous light source를 사용하였고 1 light unit (LU)은  $2 \times 10^9$  quanta per second로 정의하였다. Spectrophotometer는 MR-3000 photodiode array spectrophotometer (Milton-Roy Co., USA)를 사용하였고 fraction collector는 Retriever-600 model (ISCO Co., USA)을 사용하였다.

### 제 3 장 연구결과

#### 3.1. Standard curve for the concentration of FMN

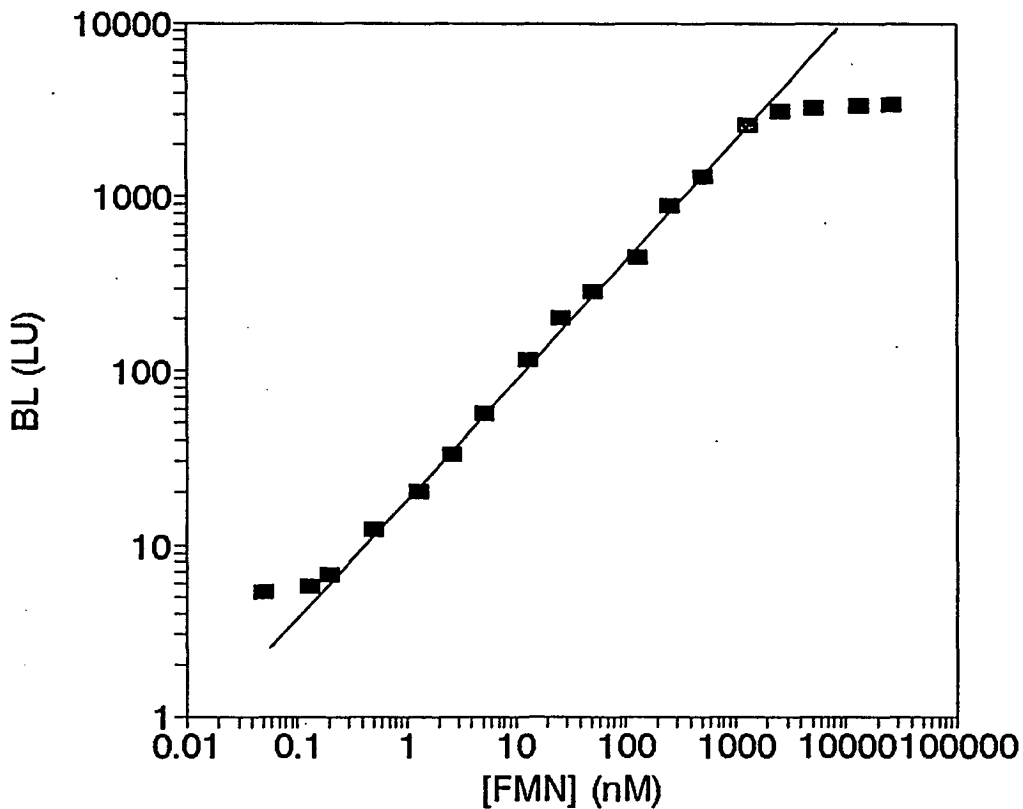
Riboflavin kinase assay를 위한 FMN의 정량을 위하여 dithionite assay를 이용하여 FMN의 농도에 따른 초기 발광강도의 standard curve를 구하였다 (Fig. 3). 낮은 FMNH<sub>2</sub> 농도에서는 (below Km, the Km of FMNH<sub>2</sub> is about 0.5 μM) 발광 반응의 초기발광 강도가 FMNH<sub>2</sub> 농도에 직선적으로 비례하므로 이를 이용하여 riboflavin kinase에 의하여 생성된 FMN의 농도를 알수있다. Riboflavin kinase 반응에서 반응액중에는 반응하지 않은 riboflavin, FMN, ATP, ADP 등이 포함되어 있는데 이를 dithionite로 처리하면 이들중 riboflavin과 FMN이 환원형으로 전환된다. Riboflavin이 bacterial luciferase 반응에서 FMN 대신 사용되었을 경우 그 발광 강도는 FMN에 비하여 0.5 % 정도에 불과하므로 거의 무시할 수있다 (Table 1). 이 때 bacterial luciferase가 존재하면 환원형 FMN은 luciferase에 binding하게 되는 반면 환원형 riboflavin은 그렇지 못하다. 이렇게 luciferase에 binding한 환원형 FMN은 2 차로 가해진 aldehyde와 산소에 의하여 발광 반응을 유도 빛을 내게되므로 이에 따라 초기 혼합물내의 FMN의 농도를 측정할 수 있다. Figure 3에서 FMN의 농도 0.1 nM에서 500 nM 범위에서 직선적인 의존도를 보였으며 이를 이용하여 FMN의 농도를 측정하였다.

Table 1. Initial light intensity of Riboflavin, FMN and FAD  
at saurated tetradecanal.

Compound	concentration (uM)	Initial light Intensity ( $I_0$ ) quanta $\cdot$ sec $^{-1}$ mg $^{-1}$	Ratio
Riboflavin	75	$2 \times 10^{12}$	0.5
FMN	50	$4 \times 10^{14}$	100
FAD	50	$7 \times 10^{12}$	1.8

Figure 3. Standard curve of Initial light intensity versus FMN concentration.

### Standard curve for $I_0$ vs [FMN]



### 3.2. Isolation of riboflavin kinase from Bovine liver;

대형 supermarket에서 신선한 돼지간을 구입하여 잘게 조각낸 후 차가운 0.1 M phosphate buffer (0.1 M NaCl, 10 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 7.2)로 씻고 이를 10 배 부피의 동일 buffer에서 Waring blender로 갈아 (3 min. X 3 times) 난후 이를 다시 homogenizer로 1 분씩 5회 도합 5 분간 처리하였다 (15,000 rpm). 이를 Whatmann #1 filter paper 2 장으로 걸러 섬유질을 제거하고 8,000 rpm에서 centrifuge하여 상등액을 취하였다. 이를 다시 ammonium sulfate 35 %에서 74 %에 침전되는 분획을 모아 0.1 M phosphate buffer (0.1 M NaCl, 10 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 7.2)에 녹인 뒤 Desalting column (Bio-Rad Econo DG-10)으로 salt를 제거하였다. DEAE-cellulose column (5 cm X 30 cm)을 동일 buffer로 평형시킨후 시료를 가하고 동일 buffer 500 ml로 washing하여 binding 되지않은 물질을 제거하였다. 이 column에 0.1 M phosphate buffer (0.1 M NaCl, 10 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 7.2)부터 0.1 M phosphate buffer (0.8 M NaCl, 10 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 7.2)로 NaCl 농도 구배를 걸어 각 분획을 5 ml 씩 fraction collector로 분취하였다. 각 fraction을 bioluminescent method로 분석하여 활성도를 보인 분획을 취하여 함께 모으고 이를 Ultrafiltration (PM30, MWCO=30,000 dalton)으로 농축하였다. 이렇게 부분정제된 Riboflavin kinase는 초기 crude extract에 비하여 약 2 배정도로 정제되었고 이 경우 특히 중요한 것은 내부에 함유되었던 FAD나 FMN등 assay에 영향을 줄 수 있는 low molecular weight material은 제거되었다는 점이다. Crude extract에서도 riboflavin kinase 활성을 볼수 있으나 이 경우 원래의 cell 내부에 함유되어 있던 FAD나 FMN등이 있을 경우 bioluminescent assay에 영향을 줄수 있다. 본 부분정제의 목적은 새로 개발된 bioluminescent assay method의 실효성을 검증하기 위한 riboflavin kinase를 얻기위한 것이 목적이므로 riboflavin kinase를 고순도로 분리 정제하는 것이 아니므로 이 수준에서 정제를 종료하였다. 그 부분 정제 과정은 Table 2에 명시하였다. 부분 정제된 riboflavin kinase는 영하 70 도에 1 ml씩 분주하여 보관하고 실험에 사용하였다.

Table 2. Partial purification of Riboflavin kinase from Bovine liver

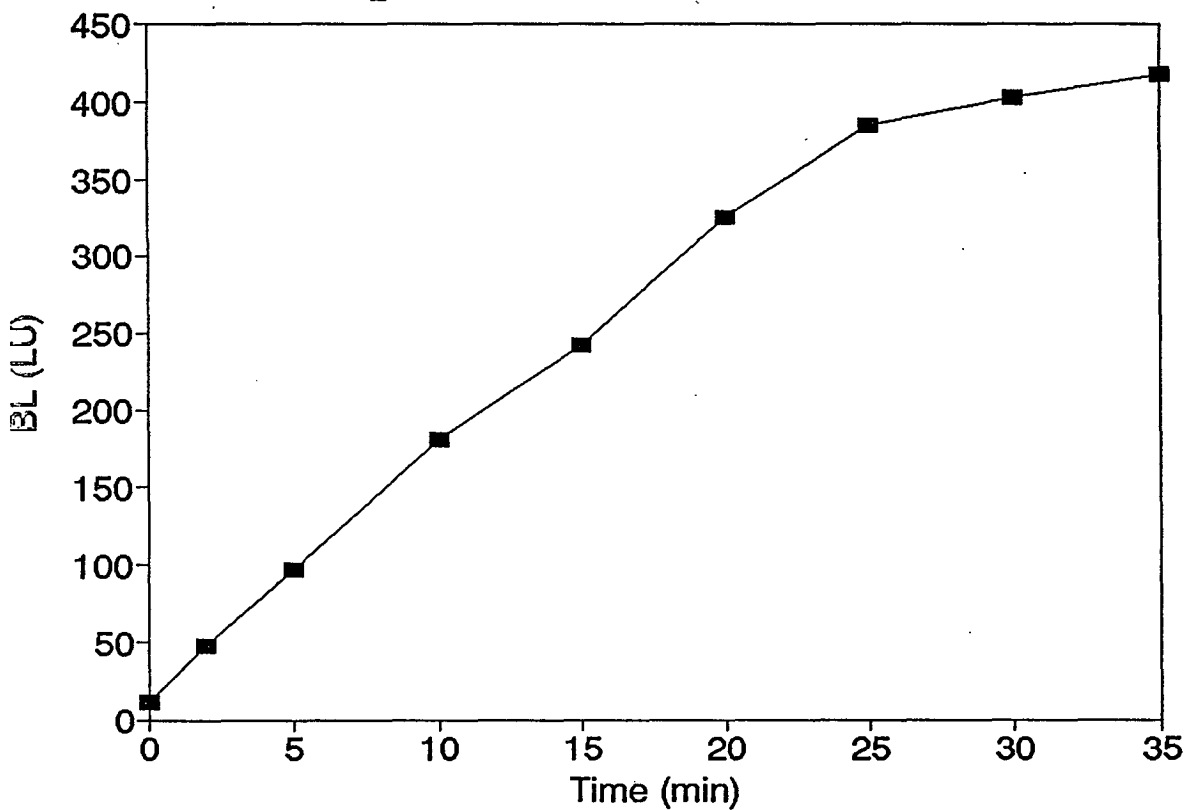
Step	total protein (mg)	Total activity (unit)	specific activity (mUnit/mg)	Purification fold
Crude extract	1,426	84	58.9	1
35-75 % AS ppt	634	39	61.5	1.04
DEAE-cellulose column	230	22	95.7	1.62
Ultrafiltration	180	20	111.1	1.89

### 3.3. 최적 실험 조건 수립

Riboflavin kinase assay를 수행하면서 매 5 분 마다 10 ul aliquot를 취하여 bioluminescence assay로 분석하였다. 20  $\mu$ M riboflavin, 20 mM  $MgCl_2$  그리고 2 mM ATP를 포함하고 있는 0.5 ml의 50 mM phosphate buffer (pH 7.5)에 10  $\mu$ l의 riboflavin kinase를 가하고 짧게 vortex로 섞어 반응을 시작한다. 이 반응액을 shaker위에서 흔들어서 25  $^{\circ}$ C에서 반응시킨다음 매 5 분마다 10  $\mu$ l의 aliquots 을 따서 1 ml의 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0)에 희석한 다음 여기에 10  $\mu$ l의 bacterial luciferase 용액을 가하고 전체 혼합물을 sodium dithionite로 환원시킨다. 시간에 따른 FMN의 생성은 25 분 까지 직선으로 증가하였고 이후 증가율의 감소 추세를 보였다 (Fig. 4). 이에 따라 20분간의 반응시간을 최적반응시간으로 설정하고 이후의 반응은 이에 따라 수행하였다.

Figure 4. Time dependent production of FMN by riboflavin kinase analyzed with bacterial luciferase coupled reaction.

## Time dependent FMN Production





### 3.3. pH and Temperature dependence:

Riboflavin kinase 활성도가 온도와 pH에 의한 영향을 고찰하기 위하여 여러 가지 온도와 pH에서 실험을 수행하였다. 온도에 의한 영향에서는 35 °C가 최적 반응 온도로 설정되었고 pH는 pH 7에서 최적으로 나타났다. pH는 pH 4에서 pH 10까지 고찰하였는데 아래 명시된 buffer를 사용하였다.

#### \* List of Buffer used in pH dependent Assay

---

- a. pH 4 : Acetate buffer (50 mM)
  - b. pH 5 : Acetate buffer (50 mM)
  - c. pH 6 : Phosphate buffer (50 mM)
  - d. pH 7 : Phosphate buffer (50 mM)
  - e. pH 8 : TrisHCl buffer (50 mM)
  - f. pH 9 : TrisHCl buffer (50 mM)
  - g. pH 10: Borate buffer or Carbonate buffer (50 mM)
-

Figure 5. Dependence of riboflavin kinase activity upon pH.

### pH dependence

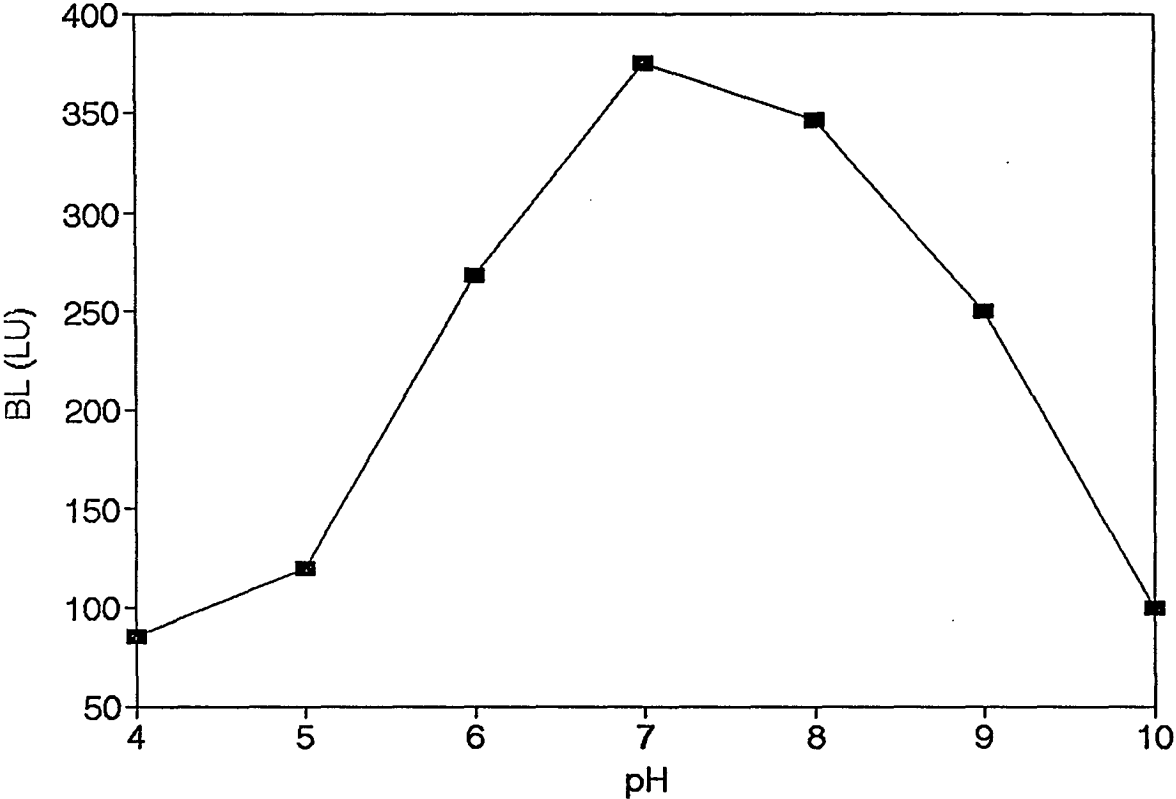
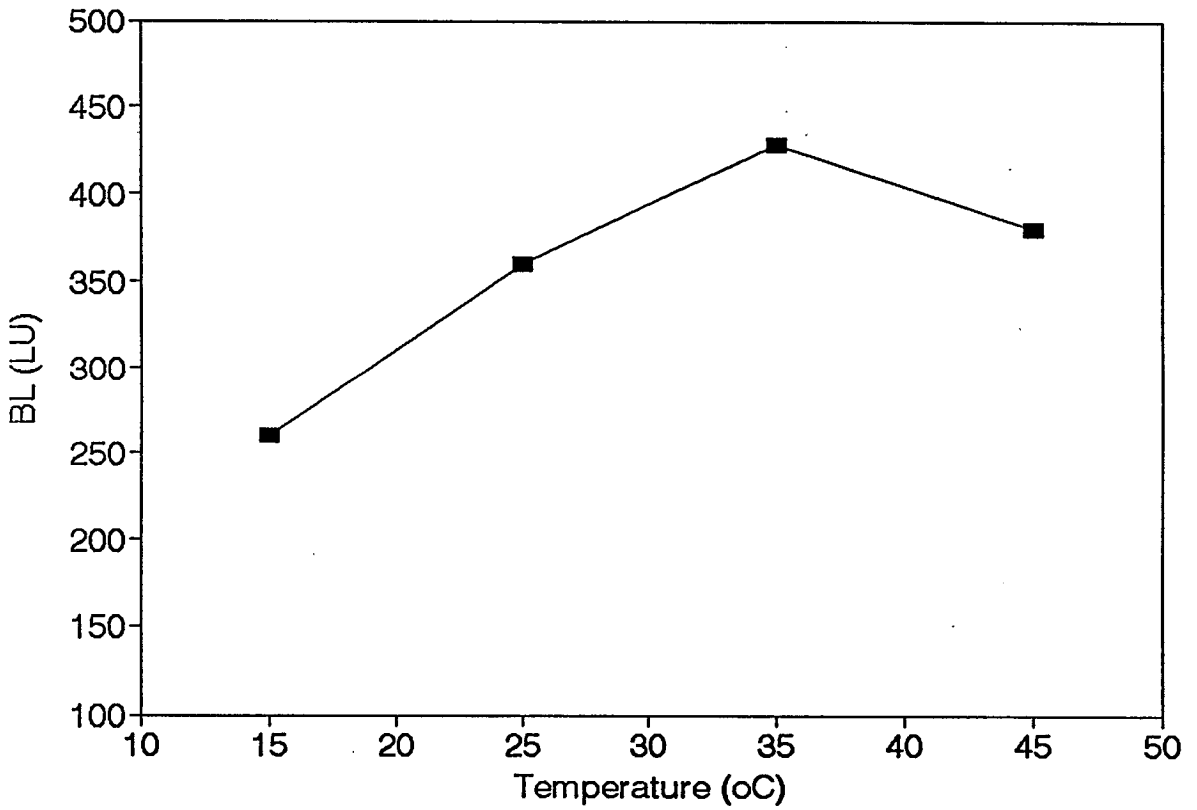


Figure 6. Dependence of riboflavin kinase activity upon temperature.

## Temperature dependence



### 3.4. Dependence on riboflavin and ATP concentration:

Riboflavin kinase의 2 종류 기질인 riboflavin과 ATP에 대한 영향을 고찰하였다. 각 기질의 농도는 한쪽기질을 saturated concentration을 가한 조건에서 다른 기질의 농도를 변화시켜가며 고찰하였다. Riboflavin의 농도변화에서는 ATP의 농도를 1 mM로 고정시키고 riboflavin의 농도를 0부터 0.2 mM 까지 변화시켰다. 여기서 얻어진 activity curve를 double reciprocal plot으로 전환하여 riboflavin에 대한 Km 값을 얻었다 (Fig. 7). Riboflavin의 Km 값은 25 uM로 얻어졌으며 이는 여타 방법을 사용하여 얻어진 Bovine liver riboflavin kinase의 riboflavin에 대한 Km 값과 일치하였다. ATP의 농도에 대한 영향은 riboflavin의 수용액에 대한 용해도가 낮아 riboflavin의 농도를 0.2 mM로 고정하고 수행하였다. 동일한 과정을 거쳐 얻어진 ATP의 Km 값은 64 uM로서 이역시 보고된 값과 5 %내의 오차로 일치하였다 (Fig. 8). 본 실험의 결과로 미루어 볼 때 bacterial luciferase coupled assay는 HPLC 등에 의한 분석법과 비교하여 거의 유사한 결과를 얻을수 있었고 반면에 실험에 소요되는 시간과 비용에서 유리한 점이 많았다. 단지 본연구에서 사용된 bioluminescence assay 방법이 아직 많이 보급되어 있지 않아 bacterial luciferase의 정제가 어려운점의 하나이나 실제로 *Photobacterium fischeri* type과 *Vibrio harveyi* type의 bacterial luciferase는 부분 정제된 형태로 구입이가능하므로 큰 문제는 없으리라고 사료된다. 아울러 발광 반응의 분석에 이용되는 luminometer가 보급되어 있지 않은것도 문제일 수 있으나 최근들어 발광 분석법의 보급과 함께 성능이 우수한 기종이 많이 사용되고 있으며 각 실험실에서도 큰 어려움 없이 제작이 가능하다. 실제로 본 연구에 사용된 luminometer도 photomultiplier phototube (Hammatzu R-447)를 구입하여 제작하였고 Hasting's type preamplifier는 회로도에 의거 해양기기실에서 제작하였다 (Fig. 9). Strip chart recorder는 chromatography 등에서 많이 사용되는 일반 model (Linear-1200)을 사용하고 High voltage DC-power supply는 DNA sequencing 용 electrophoresis kit에 사용하는 것으로 좋은 제품이 많이 나와 있으며 본 연구에서도 국내에서 제작 판매하는 GW-3000 model (건우과학)을 사용하였다.

Figure 7. Dependence of riboflavin kinase activity upon the concentration of riboflavin

curve for  $I_0$  vs [Riboflavin]

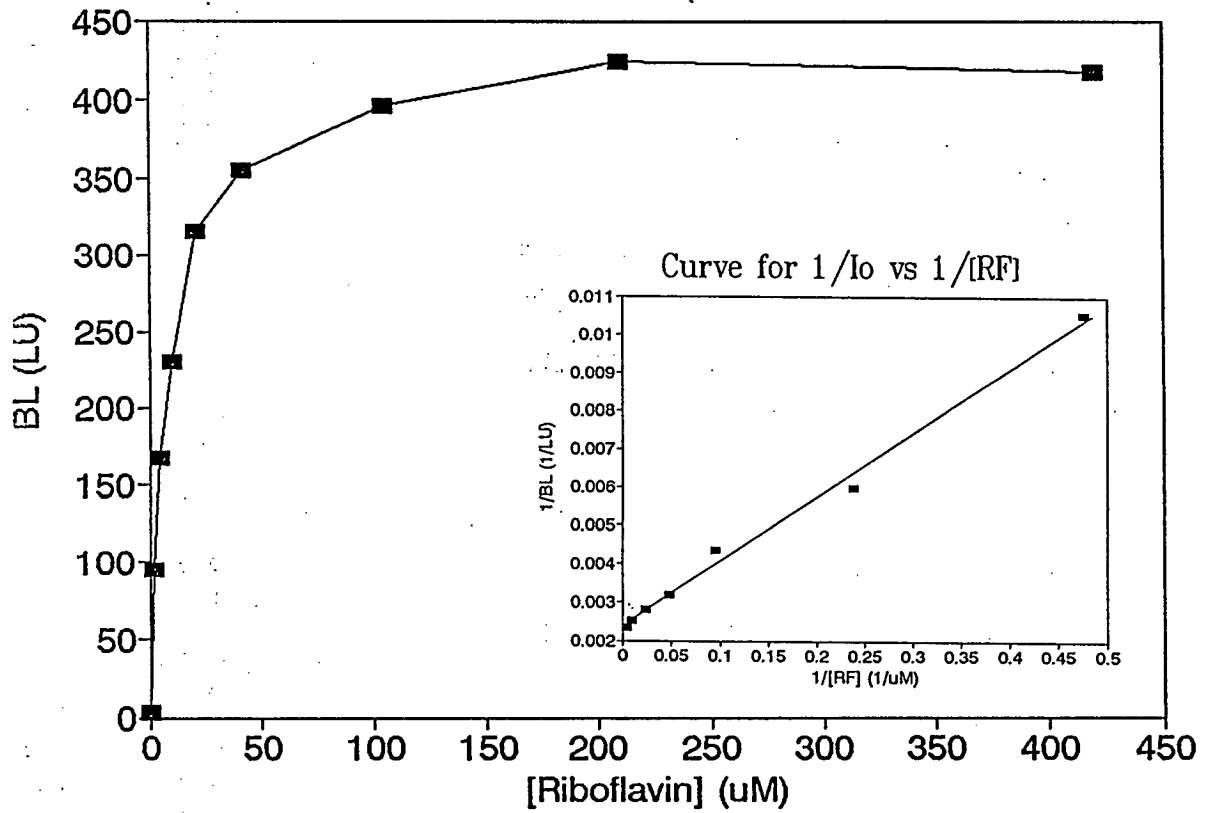


Figure 9. Circuit diagram of hasting type pre-amplifier.

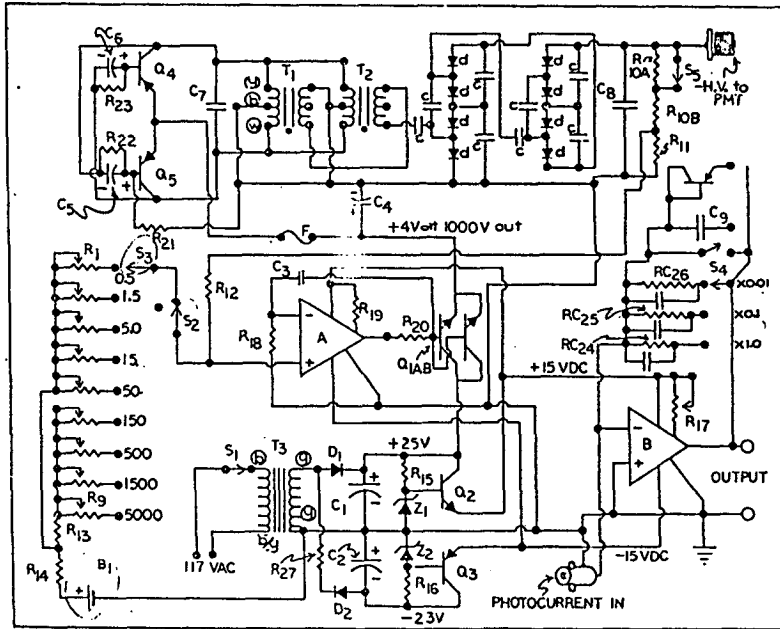


FIG. 2. Circuit schematic of complete photometer. Abbreviations used in component listing are:  $\mu f$ , microfarad ( $10^{-6}$  farad); pf, picofarad ( $10^{-12}$  farad); k $\Omega$ ,  $10^3$  ohms; m $\Omega$ ,  $10^0$  ohms. All fixed resistors are 1/4 W, 5% tolerance, carbon composition unless otherwise noted. Electrolytic capacitors are designated by  $\pm$  polarization symbols. Components are as follows:

- Q<sub>1A</sub>, Q<sub>1B</sub>, RCA transistors No. 40625 with attached heat sinks
- Q<sub>2</sub>, transistor type 2N1304
- Q<sub>3</sub>, Q<sub>4</sub>, Q<sub>5</sub>, transistor type 2N404
- R<sub>1</sub> through R<sub>6</sub>, 100 k $\Omega$ , Bourns "E-Z-trim," 15 turn composition element trimming potentiometers or equivalent
- R<sub>10A</sub>, R<sub>10B</sub>, 22 m $\Omega$
- R<sub>11</sub>, 360 k $\Omega$
- R<sub>12</sub>, 330 k $\Omega$
- R<sub>13</sub>, 51 k $\Omega$
- R<sub>14</sub>, 33 k $\Omega$
- R<sub>15</sub>, R<sub>16</sub>, 3.6 k $\Omega$
- R<sub>17</sub>, 2 k $\Omega$ , 15 turn Bourns "E-Z-trim" potentiometer
- R<sub>18</sub>, 22 k $\Omega$
- R<sub>19</sub>, trimming resistor supplied by amplifier manufacturer
- R<sub>20</sub>, 330  $\Omega$
- R<sub>21</sub>, 3.3 k $\Omega$
- R<sub>22</sub>, R<sub>23</sub>, 5.1 k $\Omega$
- RC<sub>24</sub>, 1 m $\Omega$ , 1% resistor, 560 pf ceramic capacitor

#### 제 4 장 참고문헌

- Baldwin, T.O., M.L.Treat, and S.C.Daubner (1990) *Biochem*, 29, 5509-5515
- Baldwin,T.O and M.M.Ziegler (1991) in "Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes", Vol III, CRC press, Boca Raton, FL
- Balny,C and J.W.Hastings (1975) *Biochem*. 14, 4719-4723.
- Buck,J.B. (1978) *Bioluminescence in Action*, 419-460, Academic Press, New York.
- Cho K.W., H.J.Lee, and S.C.Shim (1986), *J.Kor.Biochem*.19, 151
- Cho K.W.and S.C.Tu (1991) *Flavins and Flavoproteins*, 281-284
- Cho, K. W. (1993a), *Marine Research*, 15, 101-108.
- Cho, K. W. (1993b), *Kor. J. Microbiol.*, 31, 532-536.
- Cho,K.W. (1994) *Spring Meeting of Korean Biochemical Society*
- Cho,K.W. H.J.Lee and S.C.Shim (1986) *Photochem. Photobiol.*, 43, 477-480
- Cho,K.W. P.Colepicolo and J.W.Hastings (1989) *Photochem. Photobiol.*, 50, 671-677
- Cline, T.W. and J.W. Hastings (1971) *Proc. Natl.Acsd.Sci.U.S.A.*, 68, 500-504.
- Colepicolo,P., K.W.Cho, and J.W.Hastings (1989) *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 2601-2606
- Dies,E. and S.Mong (1990) *J.Biol.Chem.*, 265, 14654-14661
- Eberhard,A. and J.W.Hastings, (1972) *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 47, 348-353
- Eckstein,J.W., K.W.Cho, P.Colepicolo, S.Ghisla, J.W.Hastings and T.Wilson (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87, 1466-1470
- Gast,R.N. and J.Lee (1978) *Proc.Natl.Acad.Sci.*,75, 833-837
- Harveyi, E.N. (1952) *Bioluminescence*, New York, Academy Press.
- Hastings , J.W., T.O.Baldwin, M.Z.Nicoli (1978) *Methods in Enzymology*, Vol. 57 Ed. by M.DeLuca, 135-152, Academic Press, NY
- Hastings, J.W. and G. Weber (1963) *J.Opt.Soc.Am.*, 53, 1410-1415
- Hastings,J.W. (1976) *Oceanus*, 19, 17-27
- Hastings,J.W. (1983) *Bull.Marine Science*, 33, 818-828
- Hastings,J.W. C.J.Potrikus, S.C.Gupta, M.Kurfurst and J.C.Makemson (1985), *Adv.*

- Microb. Physiol., 26, 235-291
- Herring, P.J. (1987) *J.Biol.Chem.*, 1, 147-163
- K.W.Cho, R.Shao and S.C.Tu (1993) *Photochem. Photobiol.*, 57, 396-402.
- Koka, P, and J.Lee (1979) *Proc.Natl.Acad.Sci.* 76, 3068-3072
- Koo,J.Y., S.P.Schmidt and G.B.Schuster (1978) *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 75, 30-33
- Kurfurst, M, S.Ghisla and J.W.Hastings (1984) *Proc.Natl.Acad.Sci.* 81, 2990-2994
- Lei,B. K.W.Cho and S.C.Tu (1994) *J. Biol. Chem.*, 269, 5612-5618
- Macheroux, P., Eckstein, J, and S.Ghisla (1987) *Flavins and Flavoproteins*, 613-619
- Macheroux, P., S.Ghisla and J.W.Hastings (1994) *Biochem.* 32, 14183-14186
- Mager H.L.X. and S.C.Tu (1990) *Photochem.Photobiol.*, 51, 223
- Mager,H.L.X. D.Sazou, Y.H.Liu, S.C.Tu and K.M.Kadish (1988) *J.Am.Chem.Soc.*, 110, 3759-3764
- McCapra,F., C.S.J.Walpole, and I.P.Street (1984) *Flavins and Flavoproteins*, 673-677
- McCormick (1975) "Metabolism of Riboflavin" in *Riboflavin* p153-198.
- Meighen,E. (1988) *Ann.Rev.Microbiol.*, 42, 151-176
- Mitchell, G. and J.W.Hastings (1971) *Anal.Biochem.*, 39, 243-250
- Nealson,K.H. and J.W.Hastings (1979), *Microbiol.Review*, 43, 496-518
- Prasher,D.C., D.O'Kane,J.Lee and B.Woodward, (1990), *Nucl.Acid.Res.* 18, 6450
- Reynolds, L.J., L.L.Hughes, and E.A.Dennis, (1992), *Anal. Biochem.*, 204, 190-197
- Riendeau, D. and E.A.Meighen (1979) *J.Biol.Chem.*, 254, 7488-7490
- Rodriguez,A., W.Lee, D.Riendeau, and E.Meighen (1986) *Methods in Enzymology*, 133, 172-182
- Ruby, E.G. and Nealson, K.H. (1977) *Science*, 196, 432-434
- Tu S.C. (1979) *Biochem.*, 18, 5940
- Tu,S.C. (1986) *Methods in Enzymology*, 133, 128-139
- Tu,S.C. H.L.X.Mager, R.Shao, K.W.Cho and L.Xi (1991) *Flavins and Flavoproteins*, 253-260.
- Ulizer, S and J.W. Hastings (1978) *Methods in Enzymology*, Vol. 57 (Ed. by



M.DeLuca), pp189-194, Academic Press, NY

Van den Bosch, H. (1980) *Biochim.Biophys.Acta* 604, 191-246

Watanabe H. and J.W.Hastings (1987). *J.Biochem.(Japan)* 79,489

Xi,L., K.W.Cho and S.C.Tu (1991) *J. Bacteriology*, 173, 1399-1405