

생체정보를 이용한 수생태계 주요 유해화학물질 위해성 예측
도구 및 PAH류 검출 랩칩 개발

Development of environmental risk prognostic tools for major
hazardous chemicals using biological information and lab-on-a-chip
for PAH detection in aquatic ecosystem

한국해양과학기술원

환 경 부

CRPN6540011
02588-3

생체정보를 이용한 수생태계 주요 유희회화물질을 위해성 예측
연구 및 PAH류 검출 법칙 개발 예측 도구 및 PAH류 검출
법칙 개발

환경부

제 출 문

환경부장관 귀하

본 보고서를 “생체정보를 이용한 수생태계 주요 유해화학물질 위해성 예측 도구 및 PAH류 검출 랩칩 개발”의 최종보고서로 제출합니다.

2013년 10월 일

주관연구기관명 : 한국해양과학기술원

연구책임자	: 염 승 식
연구 원	: 우 선 옥
”	: 전 혜 영
”	: 김 보 라
”	: 원 효 경
”	: 이 애 경
”	: 김 정 희
”	: 정 석 원
”	: 이 상 민
”	: 런 슈 오

【별지 제7호 서식】

요 약 서

사업명	환경융합신기술개발사업			과제번호	
단위사업명		대분류		중분류	
과제명	생체정보를 이용한 수생태계 주요 유해화학물질 위해성 예측 도구 및 PAH류 검출 랩칩 개발			기술단계	기초,응용
최종성과 기술				참여기업	
연구기관명	한국해양과학기술원	연구책임자	염승식	연구기관유형	정부출연연
연락처	055.639.8540	이메일	syum@kiost.ac	총 연구기간	'10.06~'13.05
개발 목적 및 필요성	<p>- 인간의 활동에 의해 환경으로 유출되는 유해화학물질의 종류와 양이 비약적으로 증가되고 있음. 이에 기존 인지능의 한계를 뛰어넘는 BT, ET, IT 및 NT를 아우르는 첨단융합기술을 이용한 생태/환경 위해성 평가 도구 개발의 필요성이 대두됨</p>				
연구개발 결과	<p>1. Hydra 모델 BaP 대응 DNA methylation Array 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> - Hydra genome 정보를 바탕으로 17,000 여개의 유전자를 추출하고, 이들을 탑재한 Hydra Expressed Gene Microarray (HEGEM) 제작 - HEGEM을 이용하여 PAH류인 BaP 및 POPs에 속하는 PFOS 노출에 의한 차등발현 유전자 프로파일링 수행함으로써, 이들 유해화학물질에 대한 생물의 대사/생리변화를 예측할 수 있는 바이오마커를 발굴 - CLC Main Workbench 프로그램을 활용하여 Hydra genome 내의 CpG 부위를 추출하고, 이들을 탑재한 ENVIHaz-HymMet Array를 제작 - PAH류인 BaP 및 POPs에 속하는 PFOS 노출에 의한 DNA methylation 변화양상을 파악하고, 검증함 <p>2. 내분비계 장애물질 BPA 대응 qPCR Array Kit의 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> · 물벼룩 모델 - 유영능 및 생식능에 대한 EC₅₀ 농도를 결정하고, 이 농도의 노출에 의한 유전자 발현 프로파일링 수행하고, BPA focused array chip을 개발함 - 개발된 BPA focused array chip을 이용하여, BPA 특이 물벼룩 유전자 발굴 - Pathway 분석 및 정량 PCR 분석을 통해 BPA 특이 물벼룩 바이오마커 확정 - BPA 특이 물벼룩 바이오마커의 PCR primer set을 탑재한 ENVIHaz-Daphnia qPCR Array Kit 개발 · 자바송사리 모델 - HazChem Fish Array ver.02를 이용하여 BAP 노출 유전자 발현변화 프로파 				

일링 수행하여 특이 유전자 후보 발굴

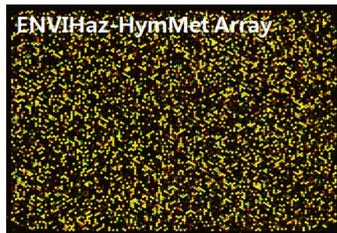
- 정량 PCR 분석을 통해 1차 특이 유전자 선별하고, 이들의 PCR primer를 탑재한 ENVIHaz Fish Array Kit ver. 01 제작
- Microarray 및 정량 PCR 반복 실험을 통해, 특이 유전자 최종 선별하고, 이들의 PCR primer를 탑재한 ENVIHaz Fish Array Kit ver. 02 개발

3. Benzo[a]pyrene 검출 랩칩 개발

- PAH류 중, benzo[a]pyrene에 대한 항체 프로브(microbead와 항체 복합체)를 제작
- 항체프로브에 반응한 benzo-pyrene을 검출 및 분리가 가능한 미세패턴 구조체를 개발
- OCTET-work station을 이용하여 미세유로 칩 분리효율, 민감도, 검출한계 등을 확인
- BLI system을 통해 항체 코팅된 sensor를 이용해서 확인결과 제작된 미세유로칩의 검출한계는 25 ppb로 측정되었음

공정-제품
사진 및 도면

1. ENVIHaz-HymMet Array: 환경유해화학물질에 의한 Hydra DNA의 methylation 변화 검출



2. ENVIHaz-Daphnia qPCR Array Kit: Bisphenol A(10 ppm)의 생태위해성 예측(물벼룩)

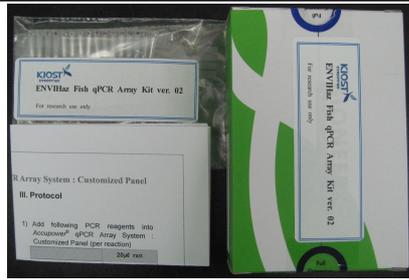
검증된 물벼룩 유전자들의 primer sequence

#	Gene Symbol	Product size	Forward primer sequence	Reverse primer sequence
1	Contig1310	128	CGAAGATAAGCTCTAG	GCTTCGTCTCTCAAC
2	Contig1983	136	CTCTCCGCGACATAAA	CGAAACCCACAGGATC
3	Contig2188	118	CCTTTCGGAGTDMGA	GGGATGGCAGGGATAG
4	Contig2244	110	CGACCTCTCGAGTCTT	CGTACTAGGTGACATCT
5	Contig2639	132	CCAACAGAACCCGAGAA	GGCTAACAGCCGAGATA
6	Contig4119	134	CTGAGAACCAAGAAAGC	GACTCCAGATGAGCTTG
7	Contig4713	126	GACCAACACAGCAAGATC	GCTCTGAAATAGAAACC
8	Contig1757	149	GAGTTAACTTGCATGTC	TGCATTGCTAGTGGATA
9	Contig2943	126	ACTCEACTCTCAACTTC	GAGCTCAGGTTCCTCT
10	Contig4086	121	TGACTCTCACTGGTTTC	GCTTCCGCAATGGATTC
11	Contig4286	126	TACTTCACACAGATGG	GTAGCTTGAACCCCTGAG
12	Contig3762	123	CGTTCATTTGCTGTTA	AGCAGGGAACTCATCTC
13	Contig329	147	TGTTGGATTGCGGATG	CATGGAAGTTGGGATAG
14	Contig779	117	CGGACTGTTCTTCTCT	GTGTCTCGATGGATCTT
15	Contig4978	116	GAAACCAACCTGCTTTC	GACCTCGAGTGTGATGATG
16	Reference	71	CGACACTGTCCTTDSAM	CGGACCCAGCAAAATGG

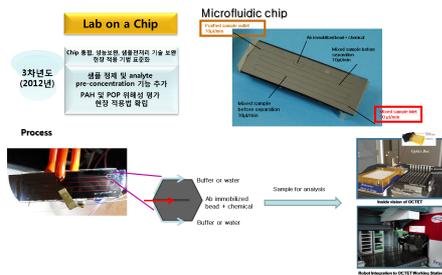
96 well plate 형식의 qPCR panel kit 제작



3. ENVIHaz-Fish qPCR Array Kit: Bisphenol A(80 ppb)의 생태위해성 예측(자바송사리)



4. ENVIHaz-AquaChip: B[a]pyrene 검출(25 ppb)



성능사양 및 기술개발 수준

- ENVIHaz-HymMet Array (PAHs 및 POPs 대응): 300-500 ppb 수준
- ENVIHaz-Daphnia qPCR Array Kit (EDCs, Bisphenol A 대응): 10 ppm 수준
- ENVIHaz-Fish qPCR Array Kit (EDCs, Bisphenol A 대응): 80 ppb 수준
- ENVIHaz AquaChip (PAH류 Benzo[a]pyrene 검출): 25 ppb 수준

활용계획

- 환경유해화학물질에 노출에 의한 유전자 발현 조절의 후성유전학적 해석 틀로 활용
- 내분비계 장애물질(BPA) 노출 여부 확인/위해성 예측 및 신규화학물질의 내분비계 장애유발 여부 확인 도구로 활용
- 수계의 BaP 신속 검출 키트로 활용

주요성과

특허	출원(국내)	3 건	등록(국내)	1 건	
	출원(국외)	1 건	출원(국외)	건	
	논문	SCI급	10 건	일반	2 건
	인증	신기술인증	건	신기술검증	건
	매출	국내매출	백만원	해외수출	백만원
기타 성과					

관련키워드

(한글)	비스페놀A, 벤조파이렌, 과불화합물, 히드라, 물벼룩, 자바송사리
(영문)	Bisphenol A, Benzo[a]pyrene, Perfluorooctane sulfonate, Hydra, Daphnia, Marine medaka

요 약 문

I. 연구과제명

생체정보를 이용한 수생태계 주요 유해화학물질 위해성 예측 도구 및 PAH류 검출 랩칩 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 인간의 활동에 의해 환경으로 유출되는 유해화학물질의 종류와 양이 비약적으로 증가되고 있음
- 이에 기존 인지의 한계를 뛰어넘는 BT, ET, IT 및 NT를 아우르는 첨단융합기술을 이용한 생태/환경 위해성 평가 도구 개발의 필요성이 대두됨

III. 연구개발의 내용 및 범위

1. 생체정보를 이용한 수생태계 위해성 예측 도구 개발
 - ENVIHaz-HymMet Array (PAHs 및 POPs 대응)
 - DNA methylation 일어나는 CpG 부위 예상 및 추출
 - PAH(BaP) 및 POPs(PFOS)의 Hydra LC₅₀ 값 결정
 - 대상 유해화학물질 노출 대응 메틸화 표적 부위 발굴
 - MeDIA-PCR assay법에 의한 DNA methylation 변화 검증
 - ENVIHaz-Daphnia 및 Fish qPCR Array Kit (EDCs, Bisphenol A 대응)
 - 비치사 수준의 노출실험 농도 결정
 - DNA microarray 분석을 통한 BPA 특이 유전자 발굴
 - 정량 PCR 분석에 의해 BPA 특이 유전자 1차 선별
 - Pathway analysis, microarray analysis 및 qPCR analysis 등에 의한 BPA 특이 유전자 2차 선별
2. 수생태계 내 유해화학물질 (PAHs) 검출 랩온어칩 개발을 통해 POCT 실현
 - ENVIHaz AquaChip (PAH류 Benzo[a]pyrene 검출)
 - 미세유로 구조체 및 BaP 항체 프로브 제작
 - 항체의 biotinylation 및 microbead 복합체 형성 확인
 - OCTET machine을 이용한 칩의 분해능 점검

IV. 연구개발 결과

1. 생체정보를 이용한 수생태계 위해성 예측 도구 개발

- ENVIHaz-HymMet Array (PAHs 및 POPs 대응)

비치사 수준의 농도[BaP(500 ppb), PFOS(300 ppb)]에서 DNA methylation 변화를 감지할 수 있는 DNA 메틸화 검출 microarray를 제작

- ENVIHaz-Daphnia 및 Fish qPCR Array Kit (EDCs, Bisphenol A 대응)

내분비계 장애물질인 BPA의 생태/환경 위해성을 예측할 수 있는 물벼룩 및 자바송사리 qPCR Array Kit 개발

2. 수생태계 내 유해화학물질 (PAHs) 검출 랩온어칩 개발을 통해 POCT 실현

- ENVIHaz AquaChip (PAH류 Benzo[a]pyrene 검출)

검출한계 25 ppb인 수계의 BaP 검출 랩칩 제작

V. 연구개발결과의 활용계획

- 환경유해화학물질에 노출에 의한 유전자 발현 조절의 후성유전학적 해석 틀로 활용
- 내분비계 장애물질(BPA) 노출 여부 확인/위해성 예측 및 신규화학물질의 내분비계 장애유발 여부 확인 도구로 활용
- 수계의 BaP 신속 검출 키트로 활용

SUMMARY

(영문요약문)

I. Title

Development of environmental risk prognostic tools for major hazardous chemicals using biological information and lab-on-a-chip for PAH detection in aquatic ecosystem

II. The Objective & Necessity of the Research

- The number and amount of the xenobiotic chemicals which getting into the environments are drastically increasing
- Necessity of the tools by using up-to-date converging technology, including BT, ET, IT and NT for environmental risk assessment is on the rise

III. Contents and Scope

1. Development of the prognostic tools for aquatic environmental risk assessment by using biological information
 - ENVIHaz-HymMet Array (for PAHs and POPs)
 - Prediction and extraction of CpG region where the DNA methylation could be occurred
 - Determination of Hydra LC₅₀forPAH(BaP)andPOPs(PFOS)
 - Extraction of the mathylation target region for xenobiotic chemical exposure
 - Confirmation of DNA methylation changes by MeDIA-PCR assay
 - ENVIHaz-Daphnia and Fish qPCR Array Kit (for EDCs, Bisphenol A)
 - The exposure concentration determination at non-lethal level
 - Identification of BPA responsive genes by DNA microarray analysis
 - Initial sort of BPA responsive genes by quantitative real-time PCR analysis
 - Second sort of BPA responsive genes by pathway analysis, microarray analysis and quantitative real-time PCR analysis
2. Development of lab-on-a-chip for PAHs detection in aquatic environment for POCT
 - ENVIHaz AquaChip (for PAHs, Benzo[a]pyrene detection)

- Microfluidic structure and BaP antibody probe production
- Confirmation of antibody bioinylation and antibody-microbead complex formation
- Test the chip resolution using OCTET machine

IV. Outcomes

1. Development of the prognostic tools for aquatic environmental risk assessment by using biological information

- ENVIHaz-HymMet Array (for PAHs and POPs)

비치사 수준의 농도[BaP(500 ppb), PFOS(300 ppb)]에서 DNA methylation 변화를 감지할 수 있는 DNA 메틸화 검출 microarray를 제작

- ENVIHaz-Daphnia and Fish qPCR Array Kit (for EDCs, Bisphenol A)

Develop the qPCR Array Kit for prognosis for environmental risks of BPA, an endocrine disrupting chemical, in Daphnia and Marine medaka fish

2. Development of lab-on-a-chip for PAHs detection in aquatic environment for POCT

- ENVIHaz AquaChip (for PAHs, Benzo[a]pyrene detection)

Develop the lab-on-a-chip for BaP detection in water mass with detectable limit at 25 ppb

V. Business Application Based the Outcomes

- Practical use as prognostic tool for epigenetic control in differential gene expression induced by environmental chemicals

- Use as prediction tools for the environmental risks of BPA, an endocrine disruption chemical; and diagnostic tools for the detection of the endocrine disruption effect in newly synthesized chemicals

- Use as a tool for rapid detection of BaP in aquatic environment

제 1 장 서 론	1
제1절 연구개발과제의 개요	1
1. 연구개발의 목적 및 필요성	1
2. 연구개발대상 기술의 차별성	18
제2절 연구개발의 국내외 현황	21
제3절 연구개발의 내용 및 범위	24
1. 연구개발의 최종목표	24
2. 연도별 연구개발 목표 및 평가방법	25
3. 연도별 추진체계	26
제 2 장 연구개발 수행내용 및 결과	27
제1절 연구개발 결과 및 토의	27
제2절 연구개발 결과 요약	105
제 3 장 목표 달성도 및 관련분야 기여도	107
제1절 연도별 연구개발목표의 달성도	107
제2절 관련분야의 기술발전 기여도(환경적 성과 포함)	108
제 4 장 연구개발결과의 활용계획 등	110
제1절 연구개발 결과의 활용계획	110
제2절 연구개발과정에서 수집한 해외 과학기술정보	111
제3절 연구개발결과의 보안등급	111
제4절 NTIS에 등록된 연구시설·장비현황	111
제 5 장 참고문헌	112
부 록 (기타 부록, 지침서, 매뉴얼, 안내서, 핸드북 등)	

표 목 차

<표 1.1.1> 광양만 퇴적층의 PAHs 농도	12
<표 1.1.2> PFOS관련 EU 규제연역	13
<표 1.1.3> PFOS의 위해성 평가내용	14
<표 2.1.1> Hydra genome browser의 알고리즘과 그에 대한 설명	27
<표 2.1.2> Hydra에서의 benzo[a]pyrene 반수치사농도	30
<표 2.1.3> Hydra BaP 4 h 노출군에서 발현량이 변화되는 주요 유전자 목록	33
<표 2.1.4> Hydra BaP 12 h 노출군에서 발현량이 변화되는 주요 유전자 목록	34
<표 2.1.5> Hydra BaP 24 h 노출군에서 발현량이 변화되는 주요 유전자 목록	35
<표 2.1.6> Hydra BaP 48 h 노출군에서 발현량이 변화되는 주요 유전자 목록	36
<표 2.1.7> Hydra에서의 benzo[a]pyrene 반수치사농도	37
<표 2.1.8> PFOS 24 시간 및 48 노출군에서 발현량이 4배 이상 증가되는 Hydra 유전자 목록	39
<표 2.1.9> PFOS 24 시간 및 48 노출군에서 발현량이 4배 이상 감소되는 Hydra 유전자 목록	42
<표 2.1.10> Benzo[a]pyrene 노출에 의해 모든 노출군에서 hypermethylated 되는 probe.	46
<표 2.1.11> Benzo[a]pyrene 노출에 의해 모든 노출군에서 hypomethylated 되는 probe	48
<표 2.1.12> PFOS 노출에 의해 모든 노출군에서 hypermethylated되는 probe	53
<표 2.1.13> PFOS 노출에 의해 모든 노출군에서 hypomethylated되는 probe	57
<표 2.1.14> 유영저해율 및 생식능저해율 EC50 농도의 BPA 처리에 의해 추출된 물벼룩의 RNA 농도 결과	65

<표 2.1.15> 생식능 평가 시료에서 2배 이상 과발현된 주요 유전자 목록	66
<표 2.1.16> 생식능 평가 시료에서 2배 이하 저발현된 주요 유전자 목록	67
<표 2.1.17> Sequence alignment를 통해 인간 유전자와 유사성을 가지는 유전자들	69
<표 2.1.18> 선별된 물벼룩 유전자 primer의 타겟 유전자 증폭 커브 확인	73
<표 2.1.19> 선별된 물벼룩 primer의 타겟 유전자 증폭 커브 확인	74
<표 2.1.20> HazChem Fish Array ver. 02에 탑재되어있는 유전자들의 기능적 분류	78
<표 2.1.21> 해수 조건에서 BPA 노출에 의해 발현량이 증가된 유전자 목록	80
<표 2.1.22> 해수 조건에서 BPA 노출에 의해 발현량이 감소된 유전자 목록	84
<표 2.1.23> Clusters of Orthologous Groups(COG)에 의한 차등 발현 유전자들의 기능별 분류	88
<표 2.1.24> 정량 PCR을 위해 선별된 유전자, 그들의 primer 및 증폭 크기	90
<표 2.1.25> BPA 특이 유전자 선별을 위한 microarray 및 정량 PCR 실험 결과	93
<표 2.1.26> Bead functional group에 따른 항체 부착조건	98

그림 목 차

<그림 1.1.1> 다양한 오염원에 의한 수서 생태계 오염 실태	2
<그림 1.1.2> 주변 환경에 노출된 EDC와 그에 따른 인간 및 생태계 오염의 심각성	3
<그림 1.1.3> 광양만 표층퇴적물 중의 PAH 농도 분포	4
<그림 1.1.4> 자포동물 모델 히드라의 모식도	8
<그림 1.1.5> <i>Daphnia magna</i> 의 수컷 (왼쪽)과 암컷 (오른쪽)	9
<그림 1.1.6> <i>Daphnia magna</i> 를 이용한 24시간 급성독성평가	9
<그림 1.1.7> 수생태계 독성 시험 후보어종 자바송사리(<i>Oryzias javanicus</i>). 담수, 기수 및 해수 등 모든 수계에 서식 가능한 특징을 갖고 있음	11
<그림 1.1.8> 다양한 분야에서 사용되고 있는 과불소화합물(PFC)	13
<그림 1.1.9> 물벼룩 배양 및 microarray 기술 보유	16
<그림 1.1.10> PFOA 노출에 의한 물벼룩의 성장과 생식능 저하 및 microarray 분석 결과	16
<그림 1.1.11> 3차원 세포배양 시스템에서 microarray를 이용한 유전자 발현 양상 및 network 분석	17
<그림 1.1.12> Microfluidics 기반의 랩온어칩 개발 모식도	19
<그림 1.1.13> Epigenome 지표의 발굴 및 이를 이용한 DNA methylation 분석	19
<그림 1.1.14> PCR array의 layout 및 실험과정	20
<그림 1.1.15> PCR array의 장점 (민감성, 특이성, 재현성)	21
<그림 1.2.1> Semipermeable membrane devices (SPMD)와 Fish를 이용한 물 속 특이 화학물질 오염 유무 측정 수행 모식도	22
<그림 1.2.2> 물벼룩 유영 저해 감지 시스템 (왼쪽)과 어류를 이용한 수질 독성 모니터링 장치 (오른쪽)	24
<그림 2.1.1> Hydra genome browser의 초기화면	28
<그림 2.1.2> Hydra 유전자 17,000 여개를 탑재한 Hydra Expressed Gene Microarray (HEGEM)의 프리스캔 이미지	28
<그림 2.1.3> CLC Main Workbench 프로그램을 활용한 Hydra genome 내	

의 CpG 부위의 확인	29
<그림 2.1.4> EnviHaz-HymMet Array의 프리스캔이미지	29
<그림 2.1.5> BaP 노출에 의해 두부 재생이 저해되는 농도	31
<그림 2.1.6> BaP 노출에 의한 budding 저해	31
<그림 2.1.7> Benzo[a]pyrene에 노출한 Hydra의 차등 발현 유전자 프로파일링 Hierachial clustering 결과	33
<그림 2.1.8> PFOS 노출에 의해 두부 재생이 저해되는 농도	38
<그림 2.1.9> PFOS 노출에 의한 budding 저해	38
<그림 2.1.10> PFOS에 노출한 Hydra의 차등 발현 유전자 프로파일링 Hierachial clustering 결과	39
<그림 2.1.11> Hydra 메틸화 표적 선별 과정	45
<그림 2.1.12> BaP 노출에 의한 Hydra DNA methylation 분석	46
<그림 2.1.13> PFOS 노출에 의한 Hydra DNA methylation 분석	53
<그림 2.1.14> 유해화학물질 노출에 의한 DNA methylation의 변화 확인을 위한 MeDIA-PCR assay 모식도	60
<그림 2.1.15> 선별된 methylation 변화 부위에 대한 MeDIA-PCR assay 결과	61
<그림 2.1.16> Hydra 유전체 데이터 통합을 위한 자료분석 흐름도	62
<그림 2.1.17> 통합 Hydra 유전체 정보 자료 화면	62
<그림 2.1.18> BPA 처리에 의한 물벼룩의 유영저해율 EC50 값 설정	64
<그림 2.1.19> BPA 처리에 의한 물벼룩의 생식능저해율 EC50 값 설정	65
<그림 2.1.20> Microarray를 통해 선별된 유전자를 이용한 BPA-focused array chip 제작	68
<그림 2.1.21> BPA 반복 노출실험을 통해 제작한 BPA-focused array chip 검증	69
<그림 2.1.22> 물벼룩과 유사 염기서열 가지는 인간 유전자들의 cell process와 disease 관련 pathway	71
<그림 2.1.23> 내분비계 질병 pathway와 관련된 물벼룩 유사염기서열을 가진 homo sapiens putative 유전자 후보군	72
<그림 2.1.24> Agarose gel 상에서 선별된 물벼룩 유전자들의 primer가 타겟 유전자만 증폭 여부 확인	73
<그림 2.1.25> qRT-PCR를 통해 microarray 결과와 동일하게 발현 패턴을 보이는 유전자들 확인	76

<그림 2.1.26> 검증된 primer를 이용한 96 well plate 형식의 qPCR pannel kit 제작	77
<그림 2.1.27> 간으로부터 추출 및 정제한 자바송사리 RNA. 1, 해수 대조군; 2, 해수 노출군; 3, 담수 대조군; 담수 노출군	78
<그림 2.1.28> 해수와 담수 조건에서 BPA에 노출한 간을 이용하여 수행한 차등유전자 발현 프로파일. SW, 해수; FW 담수	80
<그림 2.1.29> 해수 조건에서 BPA에 노출 이후 발현량이 증가한 98종의 유전자에 대한 기능별 분류	84
<그림 2.1.30> 해수 조건에서 BPA에 노출 이후 발현량이 감소한 77종의 유전자에 대한 기능별 분류	87
<그림 2.1.31> qPCR 기법에 의한 유전자 발현 변화 검증	87
<그림 2.1.32> 정량 PCR을 위해 선별된 유전자들의 PCR primer 적용성 확인	89
<그림 2.1.33> 정량 PCR에 의한 유전자 발현변화 재검증	90
<그림 2.1.34> BPA 노출에 대해 발현량이 변화되는 유전자 42종에 대한 PCR primer set을 탑재한 ENVIHaz-Fish qPCR Array Kit ver. 01	93
<그림 2.1.35> ENVIHaz-Fish qPCR Array Kit ver. 02 시제품	95
<그림 2.1.36> 정량 PCR 기기, Qiagen사의 Rotor-Gene Q	95
<그림 2.1.37> Microfluidic chip fabrication 과정	96
<그림 2.1.38> 정Microfluidic chip의 구조 및 적용 전압에 따른 분해능 ..	97
<그림 2.1.39> 항체 바오틴화반응원리 및 microbead부착 실험 방법	99
<그림 2.1.40> 미세유로 칩 분리원리 및 분리결과	99
<그림 2.1.41> Octet 기기의 작동 원리	100
<그림 2.1.42> 실시간 칩 분리 효과 및 결과확인	100
<그림 2.1.43> PAH 검출용 단백질 센서 구성도	101
<그림 2.1.44> 미세유체 칩에서 microbead 분리과정 및 실시간 분리결과확인	101
<그림 2.1.45> 미세유체 칩에서 microbead 분리과정 및 실시간 분리결과확인 원리	102
<그림 2.1.46> 항원 항체 결합 반응 측정 과정	103
<그림 2.1.47> Octet을 이용한 항원 항체affinity 확인 결과	103
<그림 2.1.48> Octet을 이용한 검출한계 및 직선성 확인 결과	104
<그림 2.1.49> SPR 이용한 bisphenol A 검출 system	104

<그림 2.1.50> Colloidal gold 이용한 deoxynivalenol 검출 system 105

본 문 작 성 요 령

1. 본문의 순서는 장, 절, 1, 가, (1), (가), ①, ㉠ 등으로 하고,
2. 장은 원칙적으로 페이지를 바꾸어 시작합니다.
3. 본문은 11포인트 횡으로 작성합니다.
4. 페이지 번호는 하단 중앙 끝에 11포인트로 합니다.
5. 각주(註)는 해당 페이지 하단에 8포인트로 표기하며, 본문과 구분토록 합니다.
6. 페이지수는 편집순서 2의 제출문부터 시작하며, 양면으로 작성합니다.
7. 표지뒷면에는 주의문을 넣습니다.
8. 참고문헌(reference) 인용의 경우 본문중에 사용처를 반드시 표기합니다.

제 1 장 서 론

제1절 연구개발과제의 개요

1. 연구개발의 목적 및 필요성

가. 수생태계의 중요성 및 위험극복

다양한 생명체가 서식하고 있는 지구 환경의 71%가 물 환경이며, 생명체 몸의 약 70%가 물로 구성되어 있다는 것으로 알 수 있듯이 생명체는 물을 논외로 하고는 생각할 수 없다.

물은 모든 생명의 원천이다. 물은 생물에게 직접 에너지를 공급해 줄 뿐만 아니라 복잡한 생리현상이 정교하게 진행되기 위해 필요한 물리적, 화학적 환경을 마련해준다. 또한 온도를 일정하게 유지시켜 주고, 다양한 화학물질들을 녹여 정화시키는 작용을 한다. 이렇듯 물은 끊임없이 순환되면서 자체적으로 정화되고 있으나 오늘날은 극심한 오염으로 자정의 한계를 넘고 있는 실정이다. 오늘날 선진국이나 개발도상국을 불문하고 산업화, 도시화, 영농방식의 변화 등으로 수많은 종류의 오염물질이 상수원 및 하천으로 유입되면서 대부분의 강물이 오염되어 가고 있으며, 점차 질 좋은 수돗물 조차 마시기 어려워지고 있다.

수중은 육상과는 독특한 생태계를 형성하고 있어, 수생태계라 칭하고 있으며, 생명 탄생의 기원지이다. 지구 표면에 존재하는 물의 97.5%는 태평양, 대서양, 인도양, 북극해와 남극해로 구분되는 바다이고, 2.5% 정도의 담수가 극지대의 빙하와 고산지역의 만년설, 지하수, 호수 하천 및 습지를 구성하고 있다. 이와같이 수생태계는 물의 성질이 의해 담수생태계와 해양생태계로 구분된다. 담수생태계는 지구 표면의 0.8%를 차지하고 있으며, 일차생산량의 약 3%가 담수생태계에서 얻어진다. 해양생태계는 총 일차생산량의 32%를 담당하는 등, 지구 에너지 순환의 큰 역할을 담당하고 있다. 일차생산 뿐만 아니라, 수생태계는 몇 가지 중요한 환경 기능을 하고 있는데, 즉, 영양물질을 순환시키고, 물을 정화하며, 홍수를 억제하며, 지하수를 제공하며, 다양한 생물의 서식지를 제공한다. 또한 인간의 휴식을 위해 활용되어, 해안 지방의 경제적 활동에 큰 비중을 차지하는 관광 산업의 활성화에도 도움을 준다. 수생태계는 생물군집과 환경요인으로 이루어져 있으며, 자체조절 및 자활능력을 갖고 있다. 이러한 수생태계의 건강은 완충작용의 한계를 초과하는 환경의 물리적, 화학적, 그리고 생물학적 변화와 같은 스트레스를 받게 되는 경우 악화된다. 물리적 변화는 수온, 물의 흐름 및 광도 등의 변화; 화학적 변화는 물로 흘러들어오는 영양물질, 산소를 소비하는 물질 및 독성물질 등의 변화; 마지막으로 생물학적 변화는 외래 생물의 유입에 의한 변화 등을 생각할 수 있다.

이중 인간 활동에 의해 야기되는 화학적 변화가 수생태계의 심각한 훼손을 초래하는 것으로 나타나고 있다. 즉, 인구증가와 산업 활동의 강화에 따른 생활하수, 축산폐수, 골프장의 농약, 가두리 양식장의 사료와 분뇨, 산업폐기물에서 용출되는 카드뮴, 납, 수은, 시안 등 유독산 중금속들이 제대로 정화되지 않은 채, 강과 호수로 흘러들어가고 있다. 축산 현장과 수산 양식장의 분뇨와 사료는 수중의 부영양화를 일으켜 용존 산소량을 줄어둘게 함으로써, 수생태계의 자정 능력을 상실하도록 한다. 또 산업 폐수에 포함되어 있는 중금속들은 수생태계 뿐만 아니라, 그 물을 마시는 인간에게도 치명적인 결과를 초래한다.

뿐만 아니라, 병충해 방제를 위한 농약사용은 식량생산의 안정화를 가져왔으나, 병충해의 저항력 증가와 수입농산물에 의한 해충 증대로 농약사용량은 계속적으로 증가되어 농약의 과오

용으로 인한 생태계 위협 및 식품 중의 농약잔류가 우려되고 수원오염에도 영향을 미치고 있으며, 화학비료의 저수지 유입 등으로 인한 저수지 부영양화 현상으로 수질을 크게 오염시키고 있다. 이와 같은 다양한 수질오염원들은 인간이 필요로 하는 용수의 부족현상을 심화시키고 있으며, 수서 생태계를 파괴하고 나아가 인간의 생활을 위협하고 있다.



그림 1.1.1 다양한 오염원에 의한 수서 생태계 오염 실태

임해공업단지와 해상수송이 늘어나면서, 지구의 기후와 환경을 지켜주고 식량을 공급하는 중요한 바다 역시 몸살을 앓고 있다. 농업과 공업 생산에 의해 발생하는 산업폐기물의 배출로 오염된 하천물이 바다로 흘러들어가, 연안의 심각한 오염을 발생시키고 있으며, 대형 유조선 사고로 수십만 톤의 기름이 바다에 직접 유출되어 매우 넓은 범위의 연안을 오염시키기도 한다.

지난 1997년 11월부터 2년 6개월 동안 행해진 '낙동강 하구 일원 환경관리 기본계획'용역의 조사 결과, 낙동강 하구 퇴적물과 어패류 생체 내에서 발암과 인체 돌연변이 유발물질인 PCB(polychlorinated biphenyl) 등의 유해물질이 다량 검출되면서, 환경호르몬이 수서 생태계 오염에 영향을 미칠 수 있는 중요한 오염원이며 이로 인한 심각성이 부각되었다. 환경호르몬(Endocrine Disrupting Chemicals, EDC)은 대부분 생물에 의해 잘 분해되지 않기 때문에 장기간에 걸쳐 환경 속에 잔류하고 있으며, 생물체내에 축적됨으로써 상위 포식자일수록 생물농축이 증가된다. 다양한 배출원과 이동경로를 통하여 우리 인간은 물론 어류, 조류, 양서류, 파충류 및 포유류 등의 야생동물에 악영향을 주어 호르몬 분비와 활동에 이상을 일으켜 정상적인 대사기능을 저해하고 정자 수 감소, 성의 혼란 및 개체 수 감소 등의 생식기능을 파괴하는 등 심각한 증상을 일으킬 수 있다. 실제로, 위의 보고에 따르면 낙동강 하구에 사는 어패류 등 생물의 체내에서 검출된 EDC가 하구일대 물과 토양에서 검출된 EDC의 수백 배에 이르는 것으로 드러났다. 뿐만 아니라 이 같은 EDC의 생물농축은 낙동강 하구의 조류에서도 나타났다. '낙동강 하구에서 채집된 야생조류의 PCBs'란 논문에서, 낙동강 하구에서 채집한 도요류 5종의 체내에서 PCB가 검출되었음이 보고된 바 있다.

PCB 뿐만 아니라, Bisphenol A(BPA) 역시 캔 코팅제, 접착제, 인공치아, 음식 포장재료 등에 포함되어 폐기되는 과정에서 수계로 노출되어 오염을 일으킬 수 있다. 특히, BPA는 수중에서

쉽게 분해되지 않고 부유입자에 흡착하여 저층으로 퇴적되는 것으로 알려져 있고, 수서 생물체 내에서 독성작용을 나타내는 것으로 알려져 있다. 실제로 *in vitro* 하에서 BPA 처리에 의한 미성숙 무지개 송어 *Oncorhynchus mykiss*의 vitellogenin 유도(Christiansen et al., 1998), 수컷 잉어 *Cyprinus carpio*의 간세포 배양에서 vitellogenin 분비 유도(Smeets et al., 1999) 등이 보고되고 있으며, *in vivo* 하에서 BPA가 송사리 *Oryzias latipes*의 초기생활에 미치는 영향에 관한 연구(Yokota et al., 2009) 및 수정란 부화와 어미의 산란에 미치는 영향(Na et al., 2000) 등이 보고된 바 있다. 뿐만 아니라, 수질 오염도 평가를 위한 생태기초 연구로서 Kim et al.(2003)은 인구증가와 대규모 공단이 유치되어 수질오염의 가능성이 높은 낙동강 유역을 대상으로 하여 낙동강 표층 퇴적물에 포함된 BPA의 농도를 측정함으로써 오염도를 평가한 연구내용을 보고하였다.



그림 1.1.2 주변 환경에 노출된 EDC와 그에 따른 인간 및 생태계 오염의 심각성

또 다른 수질 오염원인 PAH(Polycyclic aromatic hydrocarbon)은 인간 활동에 의한 화석연료의 이용으로 대기, 토양 및 수질 오염의 주요 성분 중의 하나로 주목받고 있다. PAH는 발암성과 급성 독성 때문에 80년대부터 이에 대한 많은 연구가 세계적으로 이루어져 왔으며, 해양환경으로 방출되는 PAH는 년 간 230,000톤 정도로 추정되고 있다. PAH가 해양으로 유입되는 경로는 유류오염에 따른 유입, 도시화와 산업 활동에 의한 대기로부터의 유입, 도로에서의 아스팔트 입자에 포함되어 하수로 유입하는 경로 등이 있다. 비록 해양으로 유입된 PAH의 양이 많지 않아도 장기간 해양퇴적물에 축적되어 자외선과 가시광선의 흡수에 의해 물벼룩 및 어류와 같은 해양생물에 급성 독성, 발암성 및 돌연변이성 등의 영향을 일으킬 수 있으며, 실제로 PAH에 노출된 어류에서 성장과 생식, 유영능력, 종양 유발 및 호흡에 영향을 미칠 수 있다고 보고된 바 있다(Donald et al., 1987). 이에 미국, 독일, 프랑스, 중국 등 여러 국가들에서는 오래전부터 도시화와 산업화로 인한 PAH 화합물 오염이 예상되는 연안의 하천, 하구역을 중심으로 많은 독성 연구들이 행하여져 왔다. 국내에서도 마산만 (Lee et al., 2005), 진해만(You et al., 2009)으로 유입되는 하천을 중심으로 PAH에 의한 오염을 조사, 분석한 바 있다. 특히, 2003년부터 10월부터 1년 동안 광양만의 환경상태를 조사한 후 발표된 '광양만 해역의 유기오

염물질 오염현황 및 생물독성 검토'에서는 PAH가 퇴적물, 물, 생물체(생물 축적) 및 대기에 포함된 정도를 조사하여 광양만 주변 환경의 PAH에 의한 오염의 심각성을 보고하였다(그림 1.1.3). 이렇듯, 환경호르몬과 PAH에 의한 수계 생태계 오염의 심각성을 인지하여 선진국들을 중심으로 다양한 방법을 통해 위해성 실태 조사가 이루어졌지만, 수생태계에 악영향을 미치는 환경유해물질들을 효율적으로 가려내고 관리하기 위해서는 좀 더 과학적이고 효과적인 위해성 평가 시험 기술과 방법들이 우선적으로 확립되어야 하고, 이를 토대로 실태조사, 용량-반응평가, 노출량 산정 및 위해도 산출 등 일련의 위해성 평가과정이 이루어져야 한다.

이와 같이 물 환경 및 수생태계는 다양한 원인에 의한 다양한 유해화학물질에 의해 심각한 위협상황에 놓여 있으나, 유해화학물질을 실시간 분석하는 기술의 개발, 그리고 생태계 위해성 예측을 위한 도구의 개발은 아직 시작단계에 머물러 있는 것으로 판단되며, 지속적인 투자에 의한 다양한 환경센서의 개발, 현장 적용 실용성이 높은 독성유전체 및 단백질 지표의 발굴을 통한 마이크로어레이 시스템 및 real-time quantitative polymerase chain reaction(qRT-PCR) 분석 툴의 개발이 기대된다.

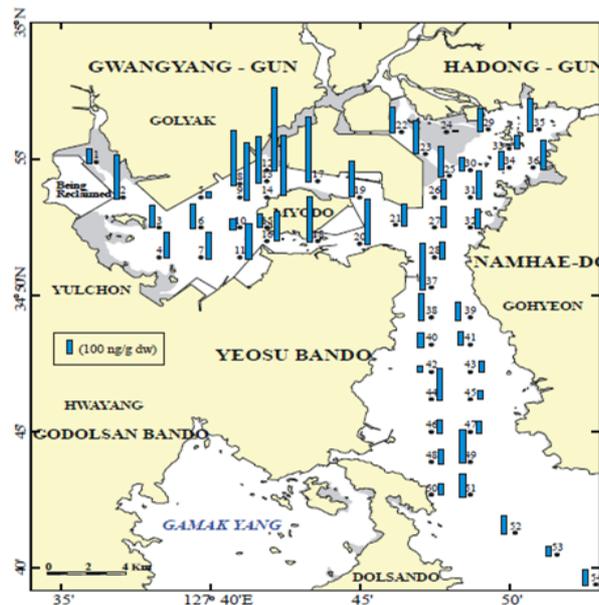


그림 1.1.3 광양만 표층퇴적물 중의 PAH 농도 분포 (한국해양연구원, 2003)

나. Point of Care Testing의 중요성

최근 의료분야에서는 환자의 옆에서 검사를 시행하여, 검사결과를 수분 이내에 얻을 수 있는 신속한 진단을 통한 효과적인 진료를 목적으로 Point of Care Testing(POCT)에 대한 관심이 높아지고 있다. 혈당측정기, 요시험지, 그리고 임신진단 키 등이 현재 보편적으로 이용되고 있는 POCT의 예라고 할 수 있다. 현재 POCT 진단이 일반 검사실의 진단 부분을 포함한 전체 진단의 약 40%에 육박하고 있다고 한다. 암을 포함한 각종 질병을 고기에 진단하고, 치료 결과를 모니터링할 수 있는 다양한 시약 및 키의 설계가 활발히 이루어지고 있어, 각종 검사를 빠

르고 간편하게 실시할 수 있는 POCT 개념의 진단키트의 개발 및 출시가 붐을 이루고 있다. 이러한 진단키트의 설계와 개발은 오랜 기간에 걸친 다양한 생물지표에 대한 연구 결과와 발전을 거듭한 분자생물학적 지식 및 생체정보 이용 기술의 개발에 의해 실현된 것이다. 이러한 POCT 개념의 진단키트는 환경 유해인자의 검출에도 매우 적절히 응용될 수 있는 가능성을 가지고 있으며, 현실화될 경우에는 수생태계 보호에 의한 큰 경제적 이득을 얻을 수 있으며, 상용화에 따른 신산업의 개척, 그리고 이에 의한 신고용창출의 효과를 얻을 수 있을 것으로 예상된다.

다. 랩온어칩과 같은 나노센서의 개발의 중요성

지난 10여 년간 DNA, RNA, 단백질, 세포, 박테리아 등과 같은 바이오 물질의 분석 시 반도체 기술의 발전으로 축적된 마이크로 세계의 물리, 화학적 현상을 적극적으로 활용하여 DNA chip이나 microfluidic chip을 개발해 왔다. 마이크로 스케일에서 생화학 분석을 수행 시 바이오 샘플과 접촉하는 표면적과 부피의 비가 크면 클수록 분석이 용이하게 된다. 이와같이 칩을 이용하여 분석을 수행하면 표면적대 부피비가 획기적으로 증가하기 때문에 칩을 이용한 생화학 분석에 대한 연구가 전 세계적으로 활발히 진행되고 있다. DNA chip이 무수히 반복해서 수행하는 분석을 하나의 칩 위에서 동시에 병렬처리 함으로써 분석의 효율을 높이는 microarray형태로 개발되어온 것과는 대조적으로 microfluidic chip은 칩 안에서 바이오 샘플이 마이크로 채널을 통해 수송되면서 여러 가지 분석을 순차적으로 거치는 형태로 발달되어 왔다. 기존의 생화학 실험실에서 분석할 때 필요한 여러 기능들을 동전 크기만 한 칩으로 모두 옮겨 놓는다는 개념의 Lab-on-a-chip이나 하나의 칩에서 모든 분석을 자동화하여 수행한다는 개념의 Micro Total Analysis System(μ TAS)이 바로 대표적인 microfluidic chip이다. Microfluidic chip은 노동과 시간 집약적이던 기존의 분석방법에 비하여 여러 가지 이점을 가지고 있다. 예를 들어, 샘플 분석 시간이 단축되고, 귀중한 생화학 물질의 소비도 줄일 수 있으며, 집적도가 높아져 복잡한 분석과정을 하나의 칩에서 수행할 수 있어 분석과정을 자동화하여 향상된 분석결과를 기대할 수도 있다. 수생태계내에 존재하는 유해화학물질은 그 농도가 비교적 낮아 기존의 분석 화학적 방법으로 감지하려면 많은 양의 샘플과 분석시간, 다양한 장비 등이 필요하게 되어 현장에서 실시간으로 감지하기 어려운 측면이 있다.

라. 독성유전체 연구 결과의 활용

다양한 모델생물들의 유전체 구조와 그 정보가 밝혀짐에 따라, 유해화학물질의 독성을 유전체 수준에서 이해하려는 노력이 주목받고 있다. 이를 기능유전체학의 한 분야로써 독성유전체학이라 불리어지며, 약제, 독성물질, 그리고 환경유해물질에 의한 유전자 발현 및 단백질 발현 변화를 연구 대상으로 하고 있다. 이 분야의 연구기법 적용에 의해 유해화학물질에 대한 다양한 생물지표의 발굴, 생물지표의 기능을 고려한 분자독성기전의 이해가 가능해 진다. 이러한 지식의 축적은 정확하고, 효율적인 생태-환경 위해성 예측 기술 개발의 기반이 되고 있다. 현재, 마이크로어레이 시스템과 qRT-PCR기법을 적용한 유전자 발현 변화 검출 키트 등과 같은 플랫폼이 개발되어 있다. 특히 마이크로어레이 기술은 다양한 유전자지표의 발현변화를 빠른 시간 내에 확인, 선별이 가능하며, 다양한 유전자지표를 이용하므로, 유전자간의 상관관계를 확인할 수 있다는 장점이 있기 때문에 환경위해성 스크리닝에 적용되고 있다.

마. 후성유전학 연구의 중요성 및 활용

20세기 후반부터 유전체의 후성유전학(epigenetics)적 조절기전에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 후성유전학이란 DNA 염기서열의 변화를 수반하지 않는 유전자 조절의 변화가 일어나는 것을 뜻한다. 후성유전학의 연구는 주로 DNA나 chromatin의 변형, 즉 cytosine의 methylation 및 histone 단백질의 번역후 변형과 같은 기작을 중심으로 진행되고 있는데, 가장 잘 알려진 후성유전에 의한 유전자 조절은 promoter에서 발견되는 CpG island에 hypermethylation이 일어나 유전자의 발현이 억제되는 것이다. 이러한 후성유전학적 변형은 X 염색체의 불활성화, genome imprinting, gene dosage의 조절, 유전자 발현의 조절, transposable element의 억제와 관련되어 있다고 알려져 있다. 이러한 epigenetic code는 DNA 염기서열보다 환경의 영향을 받기 쉽다. 후성유전학은 인간 유전체가 완성됨에 따라 후성유전체학(Epigenomics)로 발전되었다. 현재는 유전자 발현의 조직 특이적 조절에서 cytosine의 methylation의 중요성과 복잡성이 강조되고 있으며, 최근 빠른 속도로 진행되고 있는 기술의 발달은 epigenome 연구의 진행을 더 용이하게 해 줄 것으로 생각된다.

Epigenome 연구는 앞으로의 BT산업의 성장을 위한 필수적인 소재라 할 수 있다. 세계적으로도 국제적 협력을 통한 epigenome 연구를 지향하고 있으며, 특히 일본, 중국, 한국을 중심으로 하는 아시아 지역에서 연구 협력이 활발히 진행되고 있고, 이에 따른 한국의 역할도 중요시되고 있다. 또한 성인병으로 대표되는 현대사회의 복잡한 질병들의 경우, 유전적인 요인뿐만 아니라 환경적 요인이 질환 유발에 큰 영향을 미치고 있다. 따라서 이러한 질병의 원인을 찾는 하나의 방법으로 epigenome 연구의 중요성이 부각되고 있다. 또한, 본 연구를 통해 얻을 수 있는 후성유전자 지도는 유전자 지도와 더불어 데이터베이스화 하여, 다양한 질병 및 유해물질 노출 관련 연구에 효과적인 기초자료를 제공할 수 있을 것으로 기대된다. Epigenome 기전은 암의 발병, 노화 등과 같은 생명현상의 인과 관계 규명에 중요한 역할을 할 것으로 기대되고 있다. 환경오염과 관련된 epigenome 연구의 기획 및 도입은 매우 도전적이며, 환경위해성 예측 및 유해화학물질의 독성기전 연구의 새로운 전기를 마련할 것으로 확신한다. 또한 epigenome 연구는 아직 초기 단계에 있기 때문에 국가적 차원에서 공격적인 지원이 있을 경우, 국제 경쟁력을 갖추어 시류를 리드할 수 있는 가능성이 높은 분야라고 생각된다.

바. Epigenome 지표 개발의 중요성

후성유전체 변화는 현대의 대표적인 질병인 암의 발병 및 성장, 전이 과정에서 매우 다양한 형태로 일어난다. 암 세포에서는 전체적으로 DNA methylation의 감소가 일어나지만 어떤 특정 프로모터 부위에서는 특이한 hypermethylation 패턴이 보이기도 하며, 이들 변화는 histone modification과도 연관되어 있는 것으로 파악된다. Robin Holliday가 1979년 처음으로 DNA methylation이 carcinogenesis와 연관이 있다고 보고한 이후, 암의 발병과 후성 유전학적 변화의 연관성에 대한 보고가 계속되었으며, 현재는 폐암, 대장암, 전립선암 및 각종 암에서 발암유전자와 DNA methylation과의 관계가 밝혀지고 있다. 많은 경우, 암에 있어서 이들 CpG island는 hypermethylation을 보이고 있으며, 이에 따라 관련 유전자의 전사를 일어나지 못하게 하는 요인으로 작용하는 것이 관찰되고 있다. 이 hypermethylation은 비정상적인 de novo

methylation에 의해 발생하는 것으로, 이를 통해 암 억제 유전자들이 발현하지 못하게 되는 것으로 알려져 있다. 이 비정상적인 methylation은 암 발생 초기에는 비정상적인 것으로 보이며 이와 관련된 기전을 밝히는 것이 암을 조기에 진단하는데 매우 중요할 것으로 여겨진다. 암과 관련된 또 다른 메커니즘으로는, global DNA hypomethylation이 있으며 이는 일반적인 암 세포 전반에 걸쳐 나타나는 것으로, 정상세포에서 유전체 내의 반복염기서열들이 전반적으로 메틸화되어 염색체에 대한 접근성을 차단함으로써 chromosomal instability, translocation 및 gene disruption 등을 예방하는 효과를 가지는 것에 대해, 암세포에서는 hypomethylation으로 인해 광범위한 유전적 변형을 일으키는 원인이라고 여겨지고 있다. 이렇게 암의 유발에 후성유전학적인 변화가 큰 원인이 되고 있기 때문에 epigenetic biomarker를 발굴하는 것은 노화와 환경 변화에 의한 암의 발병기작을 설명할 수 있는 진단과 신약개발의 독자적인 분야가 될 수 있을 것으로 기대하고 있다.

사. 수생 생물을 이용한 수생태계 위해성 평가 시스템 개발의 중요성

산업의 발달로 인하여 다양한 화학물질들이 개발되고 생산됨에 따라 새로운 유해화학물질들이 생태계로 유입되고 있다. 특히, 유해화학물질의 수계로의 유입은 우선적으로 수서생물체의 생체 내 기능을 변화시킬 수 있으며, 궁극적으로 이를 섭취하는 인간에게까지 악영향을 미칠 수 있다. 따라서 수계 오염 정도를 조기에 평가하여 예방할 수 있는 위해성 평가 기법의 개발이 절실히 필요하다. 최근 들어, 이러한 수계 위해성 평가 기법 개발의 필요성을 인식하여 전 세계적으로 수계 위해성 관리 체계를 강화하고 좀 더 실질적인 수질 오염 관리 대책 수립 및 평가 기술 개발에 초점을 둔 연구 활동이 활발히 진행되고 있다. 지금까지 수계로 방출된 유해화학물질에 의한 오염을 평가하기 위해 여러 생물종이 이용되었으며, 많은 연구 결과를 종합하여 조류(OECD 2006), 어류(OECD 1992)를 이용한 평가 방법에 대한 공식적인 가이드라인이 제정되기도 하였다. 아래에서는 본 연구에서 대상으로 하는 실험생물들에 대한 특징을 기술하여, 환경위해성 평가에 있어서의 중요성을 알아보도록 하겠다.

(1) 히드라(*Hydra magnipapillata*)

본 연구의 대상생물중의 하나인 히드라(*Hydra magnipapillata*)는 신경세포를 갖고 있는 최초의 다세포 동물로서, 생물 진화의 연구에도 매우 중요한 위치를 차지하고 있다(그림 1.1.4). 이 배엽성 동물로서 번식은 무성 및 유성생식에 의하며, 뛰어난 재생능력을 갖고 있다. 형태형성과 관련된 신호전달계(Hobmayer et al., 2000; Arvizu et al., 2006; Augustin et al., 2006; Kaesbauer et al., 2007), 재생과 관련된 신호 및 신호전달계(Bode, 2003; Fujisawa, 2003; Holstein et al., 2003), 세포분화의 신호전달과 관련된 연구(Thomsen et al., 2004; Philipp et al., 2005) 및 조직의 fate 결정 신호(Bielen et al., 2007)등이 알려져 있다. 이러한 신호전달계는 진화과정을 통해 모든 동물에 공통적으로 존재함으로써, 히드라에서의 신호전달계 이상을 다른 동물에 외삽할 수 있다. 대부분의 동물에서 초기발생과정에만 발현하는 다양한 유전자들이 Hydra에서는 성체에서도 그 발현이 유지된다. 따라서 시기적인 제한을 받지않고 이와 관련된 신호전달계의 연구가 가능하다. 각 세포형에 대한 분자마커들이 알려져 있어, 세포분화에 대한 연구도 가능하다. 유전자 및 단백질 발현의 localization을 위한 in situ hybridization(ISH) 및

immunohistochemistry(IHC)법도 정립되어 있다. 현재 160,000 클론의 ESTs 정보 및 genome data(Chapman et al., 2010)가 DB화되어 있어, 다양한 신호전달계에 속하는 유전자들에 대한 정보 검색이 가능하다.

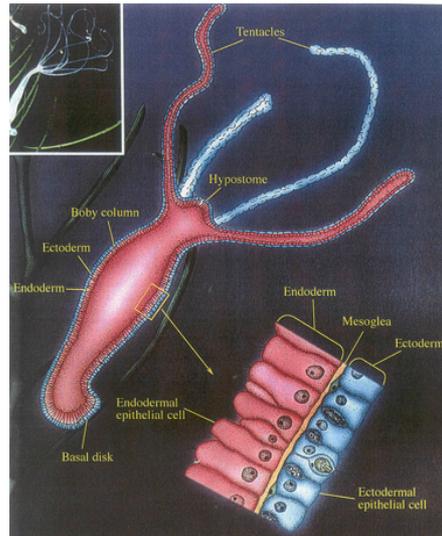


그림 1.1.4 자포동물 모델 히드라의 모식도

(2) 물벼룩(*Daphnia magna*)

수질오염이 점차적으로 심각해짐에 따라 우리나라도 이러한 문제점을 인식하고 전체 수계에 대한 위해성 관리체계를 강화하기 위해 환경부를 중심으로 하여 물벼룩을 이용한 생태독성 통합 관리 제도를 본격적으로 추진하고 있다. 물벼룩은 어류의 피식자이자 조류의 포식자로서 수생태계, 특히 민물의 먹이사슬에 필수적인 역할을 하고 있다. 뿐만 아니라 물벼룩은 광범위한 서식지 분포, 소형, 단성생식, 다산, 빠른 성장률, 독성물질에 대한 민감성 그리고 독성실험 수행의 용이성 등이 뛰어나 생태독성평가에 있어 꾸준히 이용되어 왔다. 독성평가에 있어 주로 사용되고 있는 큰물벼룩(*Daphnia magna*, 그림 1.1.5)은 경제협력개발기구(Organization for Economic Cooperation and Development: OECD), 미국 환경보호청(U.S. Environmental Protection Agency: US EPA), 미국표준시험협회 (American Society for Testing and Materials: ASTM), 캐나다 환경부(Environment Canada) 등에서 수생독성평가를 위한 테스트가이드라인 공식 생물종으로 추천되어 여러 유해화학물질에 의한 수생태계 오염을 평가하는 급성 및 만성 독성 시험을 위해 널리 이용되고 있다.

지금까지 *Daphnia magna*를 이용한 생태독성시험은 주로 번식능력독성시험(Reproduction Test)과 급성독성시험(Acute Immobilization Test)을 중심으로 이루어졌다. Oda et al. (2005, 2006)은 곤충의 발달과 생식을 조절하는 juvenile hormones 또는 그 유도체가 *Daphnia magna*를 수컷으로 발달하도록 하는데 기여하는 역할을 하며, Tatarazako and Oda(2007)은 juvenile hormones 유사 화학물질에 의해 *Daphnia magna*의 성적 분화가 방해되며, 이를 통하여 *Daphnia magna*를 이용한 시험법이 내분비계 장애물질을 포함한 유해화학물질의 노출 스

크리닝 및 위해성을 평가하는데 유용하게 적용될 수 있다고 제시한 바 있다.

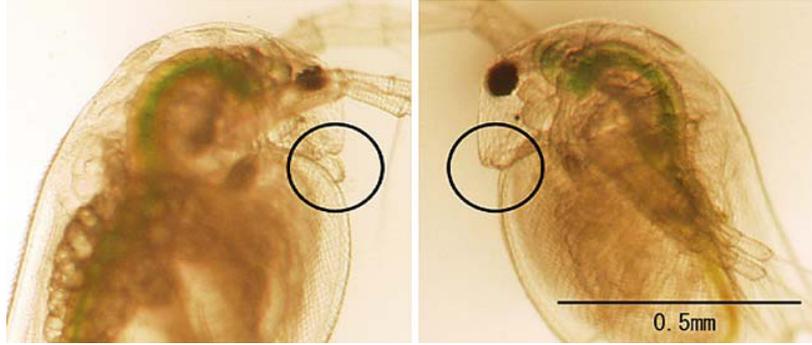


그림 1.1.5 *Daphnia magna*의 수컷 (왼쪽)과 암컷 (오른쪽) (Tatarazako and Oda, 2007)

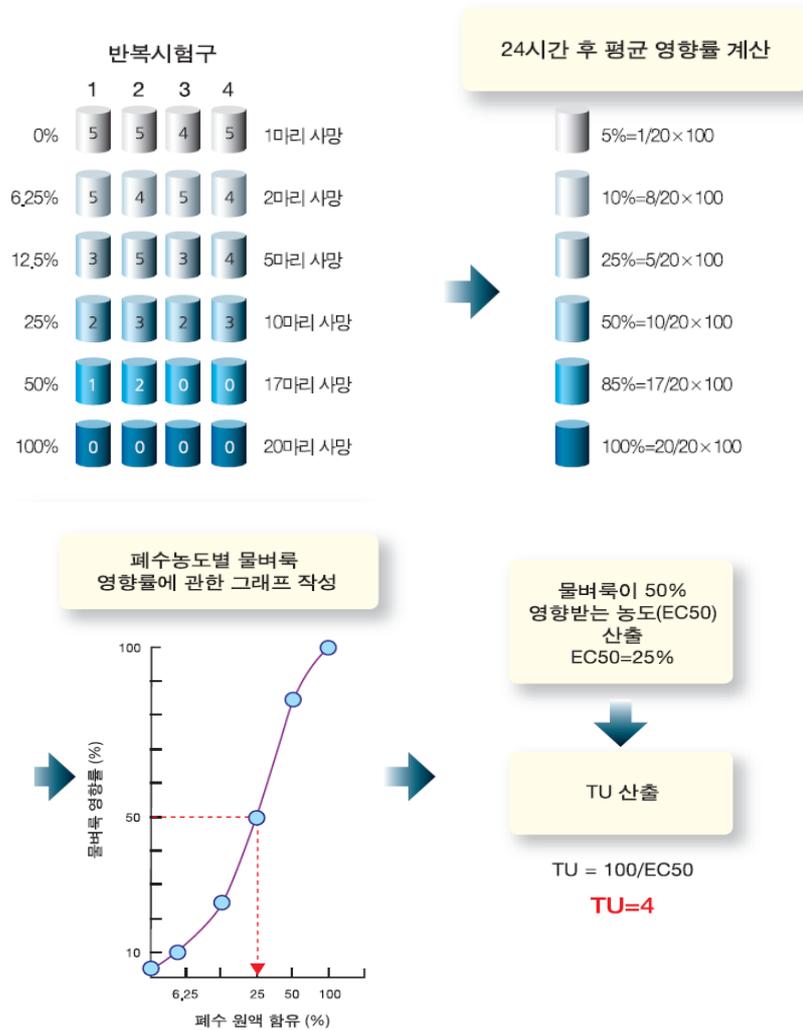


그림 1.1.6 *Daphnia magna*를 이용한 24시간 급성독성평가 (수질오염공정시험법 2007. 10고시)

실질적으로 *Daphnia magna*를 생태독성 확인을 위해 적용한 한 예로, 우리나라 환경부, 국립환경과학원, 환경관리공단 협력 하에 생태독성 관리 제도를 도입하여 산업폐수 방류수 또는 그 방류수 내에 포함된 미지의 수많은 유해물질이 생물체 또는 생물체 그룹에 미치는 독성 영향을 분석하는데 *Daphnia magna*를 이용하고 있다는 사실을 들 수 있다. 즉, 산업폐수가 생물체에 미치는 급성독성(acute toxicity) 정도를 확인하기 위해 *Daphnia magna*를 방류수에 투입하고 24시간 후의 치사율을 측정하여 TU(Toxicity Unit)라는 단위로 생태독성 수준을 표현함으로써 미지의 여러 유해화학물질로 인한 수생태계 오염 정도를 간편하고 체계적으로 관리할 수 있도록 하는 제도를 구축하였다. 이처럼 *Daphnia magna*는 수서생태계의 무척추동물 중에서 상대적으로 독성유전체 연구가 많이 수행되었고 이에 따른 기초자료가 상당히 구축되어 있기 때문에 시제품을 개발해야 하는 응용 융합 연구 분야에서 큰 장점이 될 수 있고 따라서 *Daphnia magna* 모델로 독성유전체기술을 이용한 분석키트 개발 및 예측기술개발의 성공확률이 상당히 높다고 사료된다. 뿐만 아니라 *Daphnia magna*는 환경독성평가의 OECD 공식 수서동물 무척추동물종이기 때문에 연구결과가 국제적으로 인증 받고 수서환경평가기술로서 폭넓게 활용될 가능성이 높아, *Daphnia magna*를 이용하여 환경화학물질의 유해도 분석 기술을 개발하고자 하는 본 연구가 생태독성학 측면에서 큰 의미를 지닌다고 할 수 있다.

(3) 자바송사리(*Oryzias javanicus*)

연안 수계환경의 평가를 위한 시험생물로는 식물플랑크톤, 동물플랑크톤, 무척추동물 등이 개발되어 왔으나, 어류의 경우는 아직 표준화된 생물도 선정되지 않았고, 시험법도 확립되지 않았다. 최근에는 국제 표준 시험종인 담수산 송사리(*Oryzias latipes*)를 해수에 순치시켜 해수 실험에 이용해 보고자 하는 시도가 있어 왔으나, 순치 과정이 상당히 길고, 순치조건 및 순치 개체의 건강이 해양 환경의 평가에 적합하지 않은 것으로 나타나고 있다. 따라서 본 연구에서는 이에 대한 대안으로 기수역에 서식하는 송사리인 자바(바다)송사리(*Oryzias javanicus*)가 주목받고 있다(그림 1.1.7). 국제적으로는 Javanese medaka라는 명칭으로 통용되고 있다. 성어의 최대 전장은 4.5cm 정도인 소형종으로(Seegers, 1997) 인도네시아, 싱가포르, 말레이시아, 태국(Roberts, 1997) 및 메콩강 유역 등지에 분포하는 것으로 알려져 있다(Rainboth, 1996). 아열대 및 열대 수역에 서식하는 종으로 최적 수온은 22 - 25°C, 서식지의 pH 범위는 7.5 - 8.5 이며, 염분에 대한 적응력이 뛰어나, 담수, 기수, 해수의 모든 염분 범위에서 발견되는 종이다. 현재 본 종의 실험실 사육기법 및 대량 생산 기술 개발과 독성물질에 대한 민감도에 대한 평가가 실시되어있으며, 독성유전체 연구기법의 도입을 통해 중금속, PAHs, POPs, 및 EDCs 등과 같은 유해화학물질군에 대한 생체 유전자 지표 2,000여종이 확보되어 있고, 이를 탑재한 HazChem Fish Array ver, 2를 제작한 바 있다. 이 마이크로어레이를 이용하여 수계의 대표적인 내분비계 장애물질인 17 β -estradiol(E2) 특이 유전자들을 동정한 바 있다.



그림 1.1.7 수생태계 독성 시험 후보어종 자바송사리 (Oryzias javanicus). 담수, 기수 및 해수 등 모든 수계에 서식 가능한 특징을 갖고 있음

아. 대상 유해화학물질

(1) 다환방향족탄화수소(Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)

다환방향족탄화수소는 화석연료나 유기물이 풍부한 물질의 연소에 의해 생성되며, 산업폐기물, 소각산물, 자동차배기가스등이 중요한 유입원으로 알려져 있고, 많은 양의 다환방향족탄화수소가 공업화된 지역의 담수 및 해양 침전물에서 전세계적으로 검출되고 있다. 다환방향족탄화수소는 부유물질에 흡착하고 수계 바닥으로 침전되어 저질토에 축적되며, 동물이나 사람의 몸에 들어가 발암, 돌연변이를 유발하며, 호르몬의 작용을 방해, 교란하는 것으로 보고되었다. 또한 원유로부터 직접 유입되거나 정유과정에서 유입되기도 하며 부유물질에 쉽게 흡착되어 바다에 퇴적되면 소수성과 잔류성 때문에 퇴적물중에 높은 농도로 축적될 수 있다. 실제 미국 NOAA의 NS&T사업 조사에서 Hudson/Raritan estuary의 한 조사점에서 29324ng/g dw, Long Island Sound의 조사점에서 10395ng/g dw, Boston Harbor에서 15405ng/g dw 등으로 퇴적물 중 PAH 농도가 매우 높게 조사되었고, 우리나라의 경우 경기만 남동공단에서 1207.9ng/g dw, 인천 만석부두 부근에서 각각 4025.7, 2607.4ng/g dw, 포항 3618.6ng/g dw 등으로 높은 PAH 농도를 기록하였다. 또한 광양만 퇴적층에서의 PAHs 농도가 보고된 바 있다(표 1.1.1).

대표적인 PAHs인 벤조파이렌(Benzo[a]pyrene, BaP)은 다환방향족탄화수소의 일종으로 유기물이 연소하거나 열분해시 생성된다. 독성 때문에 인체위해평가를 위한 특정오염물질 발암등급 분류(IARC)에서 발암물질로 분류하고 있는바, 본 연구에서 대상 유해화학물질로 선정하였다. 탄화수소, 아미노산, 전분 또는 지방산이 600°C 이상 가열될 때 생성된다. 상온에서 노란색 결정의 고체형태를 띠고 있으며, 석탄타르 속에 존재하고 그 밖에 자동차의 배기가스, 담배 연기, 쓰레기 소각가스, 훈제식품 등에 매우 미량이 함유되어 있어, 본 연구에서 대상 유해화학물질로 선정하였다.

(2) 내분비계장애물질(Endocrine disrupting chemicals, EDCs)

내분비계 장애물질은 생체 외부에서 들어와 내분비 기관 안에서 호르몬의 생리 작용을 교란시키는 화합물을 말한다. 잘 알려진 것으로 다이옥신, PCB, PAH, 푸란, 페놀, 그리고 DDT와 같은 일부 살충제 등이 있다. 대표적 예로, 젓병과 같은 음식용기나 CD의 재료로 쓰이는 비스페놀A(Bisphenol A, BPA)가 에스트로겐과 유사한 작용을 함으로써 남성에게서 무정자증을 유발하게 하고 여성에게서는 이상 성장후가 나타나게 하는 등의 작용을 하는 것을 들 수 있다. 현재 BPA는 프탈레이트계 가소제와 함께 한국 정부가 규정한 위험 환경호르몬으로 분류되어 있다. BPA는 내분비계 장애 이외에도 암세포 성장의 자극, 주의력결핍과잉행동장애, 기형아, 유전자 변형 유발 등에도 작용할 것으로 예측되고 있다.

표 1.1.1. 광양만 퇴적층의 PAHs 농도 (Woo et al., 2006)

	Concentration (ng/g dry weight)				
	BaP ^a	∑PAH _{alkyl} ^b	∑PAH _{carc} ^c	∑PAH ₁₆ ^d	∑PAH ₂₄ ^e
St. 1	29.5	36.1	214	696	783
St. 2	371	475	2290	8420	9440
St. 3	8.3	38.9	53.5	167	230
St. 4	87.2	208	417	1540	1920
St. 5	18.0	52.7	102	251	349
St. 6	4.6	38.0	30.8	97.1	151
St. 7	2.6	11.2	16.3	50.5	71.4
St. 8	23.4	76.5	127	313	448
St. 9	12.1	26.6	73.8	192	242
St. 10	7.7	50.8	47.4	141	218
St. 11	14.4	28.4	85.5	245	301
St. 12	93.3	58.4	509	1110	1320
St. 13	6.5	18.0	36.0	93.8	129

최근 미국의 몇몇 지방의회에서는 BPA의 사용을 금지하였고, 캐나다 정부는 2008년 아기 젓병에 BPA의 사용을 금지 시킨 바 있다. 하지만, 우리나라는 BPA의 사용을 금지하고 있지는 않다. 다만 2008년 12월 식약청이 폴리카보네이트 재질의 기구 및 용기의 포장에 한해 BPA의 용출기준을 2.5 ppm에서 0.6 ppm으로 강화한 바 있다. 미국 질병관리센테의 연구에 의하면 미국인 93%의 소변에서 소량의 BPA가 검출되고 있는 것으로 미루어, 대다수의 미국인이 BPA에 광범위하게 노출되어 있다는 것으로 파악된다. 이러한 중요성으로 인해, 본 연구에서는 BPA를 내분비계장애물질의 대상 유해화학물질로 선정하였다.

(3) 지속성유기화합물(Persistent organic pollutants, POPs)

PFOS(Perfluorooctane sulfonate) 및 PFOA(Perfluorooctanoate) 로 대표되는 과불소화합물(Perfluorinated compounds, PFCs)은 우수한 발수성, 발유성, 방수성등의 특징으로 인해 표면 코팅제, 계면활성제등의 관련물질에 사용되고 있을 뿐 아니라, 발수성 의류, 화장품, 샴푸, 건축 자재, 자동차 내장재, 주방용품의 코팅제등 광범위하게 사용되고 있는 물질이다 (그림 1). 이 물질은 분해가 되지 않으므로 잠재적 위험성이 크고, 최근 연구 결과 독성 및 생물농축성의 문제가 제기되어, EU를 비롯한 선진 각국에서는 PFOS(Perfluorooctane sulfonate) 및 관련 화합물에 대한 규제를 예고하고 있다. 과불소화합물 (PFCs: Perfluorinated Compounds)은 환경오염을 유

발시키는 신중 오염물질로써 설치류나 원숭이 대상실험에서 발암성이 입증되었고, 특히 수서생물의 내분비계를 교란함으로써 생물의 번식능에 치명적 손상을 초래할 뿐 아니라, 초기발생단계에 강한 독성을 나타내어 생물자원의 감소를 초래함으로써 수계생태계 파괴를 가중시키는 것으로 보고된 바 있다(Lau et al., 2004). 최근 들어 PFOS가 스톡홀름협약 후보물질로 선정된 바 있고, 미국은 PFOS를 포함한 88종의 불소계화합물을 제조·수입하는 경우 EPA에 통보하도록 하는 등 규제를 강화해 가고 있고. PFOS, PFOA 관련 물질들의 국내 유통량은 2002년 기준으로 약 120톤에 달한다. 과불소화합물(PFCs)는 잔류성이 높은 새로운 환경오염물질군으로 알려져 있으며, 이들의 위해성이 특히 주목받고 있다. 이 화학물질들은 소화포말, 살충제 및 카펫, 가구, 종이 등의 표면처리제, 바닥 광택제, 윤활제 등으로 널리 이용되고 있다(그림 1.1.8). PFOS는 환경 내에서 가수분해, 광분해, 생물분해되지 않으며, 생물체내에 농축된다. PFOA 역시 생태계 내에서 자연분해되기 어려운 화학적 특성을 가지고 있고, 이들의 반감기는 약 97년에 달하는 것으로 알려져 있다(3M Company, 2000). 최근 PFCs의 생물 농축이 극지역에서도 확인되었으며(Yamashita et al., 2005), 생식독성, 신경독성, 간독성 및 면역독성을 나타내며, 발암물질로 파악되고 있는 바(Kudo et al., 2003), 이들 화학물질의 위험성에 대한 우려가 높아지고 있다. 이와 같이 본 화학물질군에 대한 위험성이 심각한 수준이다.



그림 1.1.8 다양한 분야에서 사용되고 있는 과불소화합물(PFC)

표 1.1.2. PFOS관련 EU 규제연역

내용	결정사항
EU위원회 PFOS, PFOA의 사용제한에 관한 지침의 의회 개정안 공표 ('06. 9. 22.)	- 규제 한계치 : 0.005% (50mg/kg) - 법률 채택 후 18개월 후 시행 (2008년 7월 예상)
EU PFOS 규제 확정 ('06. 10. 27.)	- 2008년 중 PFOS EU 전역에서
일본 및 중국, 한국등 규제에 대한 대응	-PFOS의 규제는 특정유해화학물질에 대한 단계적인 규제를 통해 자국 내 산업 및 제품에 대한 보호의 기술장벽으로 활용 가능성

표 1.1.3. PFOS의 위해성 평가내용

생물체	PFOS의 반감기 및 위해성 평가내용
Human	years
Monkey	200 days, hepatotoxicity, mortality, adenomas
Rat	100 days, hepatotoxicity, mortality, adenomas, 2-generation reproductive toxicity, developmental toxicity
Fish	50% clearance times of between 1124 and 4013 in bluegill sunfish, between 200 and 1500 in carp. 96hr LC50 of 4.7 mg/l to fathead minnow
Honey Bee	high acute toxicity
Others	48hr EC ₅₀ of 27 mg/l for <i>Daphnia magna</i> , 3.6 mg/l for Mysid shrimp

(참고: OECD HAZARD ASSESSMENT OF PERFLUOROOCCTANE SULFONATE (PFOS) AND ITS SALTS, ENV/JM/RD(2002)17/FINAL)

생태계내 먹이망을 통한 생물농축은 약 천만배에 달한다(예: 염화탄화수소 수중농도: 0.000003ppm; plankton: 0.04ppm; 소형어류: 0.5ppm; 대형어류: 2ppm; 조류: 25ppm). 이는 인간이 오염된 수계에 사는 어류를 섭취하였을 경우 수계에 잔존하는 독성물질 농도에 비하여 천만배 정도나 많은 양을 섭취하게 되는 대단히 위험한 결과를 초래할 수 있음을 말해준다. 과불소화합물 역시 다양한 어류에 축적되어 어류를 섭취하는 우리들에게 다양한 독성을 나타낼 가능성이 높다. 특히 PFOS 및 PFOA에 과노출 되면 간비대, 간세포괴사, 저지혈증 등이 유발되며(Gilliland and Mandel, 1996) 전립선암, 방광암, 간암(Nakayama et al., 2005) 등을 유발시킨다는 보고가 있다. 혈액검사 결과 미국인의 90% 이상이 PFOS와 PFOA 에 노출되어 있으며(Calafat et al., 2007), 1996-2004 년간 스웨덴인의 혈액과 모유를 검사한 결과에서도 과불소화 화합물의 농도가 각각 32ng/mL, 0.34ng/mL 로 나타났다(Karrman et al., 2007). 이 결과는 대다수의 사람들의 혈액속에 이미 과불소화화합물이 축적되어 있으며, 수유를 통하여 신생아에게 하루 평균 200ng의 과불소화합물이 전달되는 것이므로 대단히 심각한 문제를 야기할 가능성이 높다. 본 과제에서는 발생과정 신호전달계에 대한 과불소화 화합물의 유해한 영향을 Hydra를 이용하여 알아보고, 기형형성과의 연관관계를 살펴봄으로써, 외삽을 통해 인간 및 다른 주요 생물들에 대한 과불소화합물의 영향을 간접적으로 경고할 수 있을 것이다. 또한 본 연구의 결과는 향후 과불소화화합물에 노출에 대한 분자생물지표나 치료방법의 개발에 중요한 정보를 제공할 수 있을 것이다.

자. 환경부 환경기술개발사업으로 이루어진 선행연구 정보

차세대 핵심환경기술개발 사업의 일환으로 통합형과제 '환경 위해성 평가 및 사전 예측을 위한 독성유전체 기술 확립과 시스템 구축 연구'의 세부과제로써 '자바송사리의 독성유전체를 활용한 수계 환경 위해성 평가기술 개발'이 수행된 바 있으며, 본 연구의 개요는 다음과 같다.

(1) 연구과제 개요

- 주관연구기관/연구책임자: 한국해양연구원/염승식
- 연구과제명: 자바송사리의 독성유전체를 활용한 수계 환경 위해성 평가기술 개발

- 기술분류: 공공기반
- 총연구기간: 2007년 4월 - 2010년 3월

(2) 선행연구결과 요약

- 모든 수계에 서식하는 자바송사리를 대상으로, standard 및 subtractive cDNA library, DD-PCR, heterologous hybridization, RT-PCR에 의한 목적 유전자의 분리·동정을 통해, PAHs, POPs, 및 EDCs 등의 환경 유해화학물질 특이적인 독성유전체 지표를 발굴하고, 기능을 고찰함
- 이들을 탑재한 HazChem Fish Array를 개발하여, 환경 유해화학물질의 위해성을 예측하는 방법을 작성함
- 본 선행연구의 특징점은 아래와 같이 요약할 수 있다.
 - 환경 유해화학물질의 위해성 평가에 첨단 기법인 독성유전체 기법도입
 - 환경 유해화학물질 위해성 사전 예측 방법 및 생물독성 분자 기전 연구의 기반 확보
 - 자바송사리를 대상으로 함으로써, 모든 수계 (담수 및 해수)의 위해성 평가가 가능하게 됨
 - 비 모델생물을 대상으로 한 독성유전체 연구의 표준 매뉴얼을 작성

(3) 선행연구와의 차별성 및 연계성

위에서 기술한 선행연구와의 차별성은 다음과 같이 요약된다.

- 수생태계의 유해화학물질 검출을 위한 POCT 개념의 랩온어칩 개발
- 새로운 생태계 모델 생물의 도입: 히드라 및 물벼룩
- 유해화학물질의 독성기전에 대한 후성유전학적 해석
- 기존 연구결과의 재해석 및 가공
- 선행연구에서 발굴된 자바송사리 기원의 유해화학물질 특이 생체 유전자 지표 2,000 여 종에 대한 생물정보학적 검토
- 특이 유전자 지표를 20-30종으로 축소하여, 마이크로어레이 분석보다 간편한 qPCR Array 킷의 설계 및 개발을 계획함

(4) 후속 연구의 필요성

- 선행연구에서 발굴된 대량의 특이 생체 유전자 지표의 가공이 필요함
- 민감하고 많은 정보를 얻을 수 있는 cDNA 마이크로어레이는 물론, 보다 분석방법이 간편하고, 상용화하기 쉬운 qRT-PCR 킷의 개발도 필요함
- 전사체 수준에서의 독성기전 해석을 뛰어넘는 후성유전학적 연구 개시에 적절한 시점임

차. 환경부 사업 이외의 선행연구 정보

(1) 물벼룩 (*Daphnia magna*) 모델을 이용한 환경유해물질 노출 유전자 발현패턴 변화 확인

본 연구진은 지난 5년간 수서 생물종 *Daphnia magna*를 이용하여 유해화학물질 노출에 따른 유전자 발현 패턴 변화를 분석한 경험을 가지고 있다. 특히 민물 수서 생태계로 유입되는 환경호르몬의 위해성을 인지하여 2007년, 대표적인 환경호르몬 중의 하나인 Perfluorooctanoic

acid (일명 PFOA, CAS No. : 335-67-1)를 *Daphnia magna*에 short-term (48시간) 및 long-term (3주) 조건으로 노출시켜 각각의 치사율에 대한 반수영향농도 (EC50)에서 물벼룩의 성장 정도, 생식능 및 DNA chip microarray를 이용하여 유전자 발현 패턴을 분석한 바 있다 (그림 1.1.9).

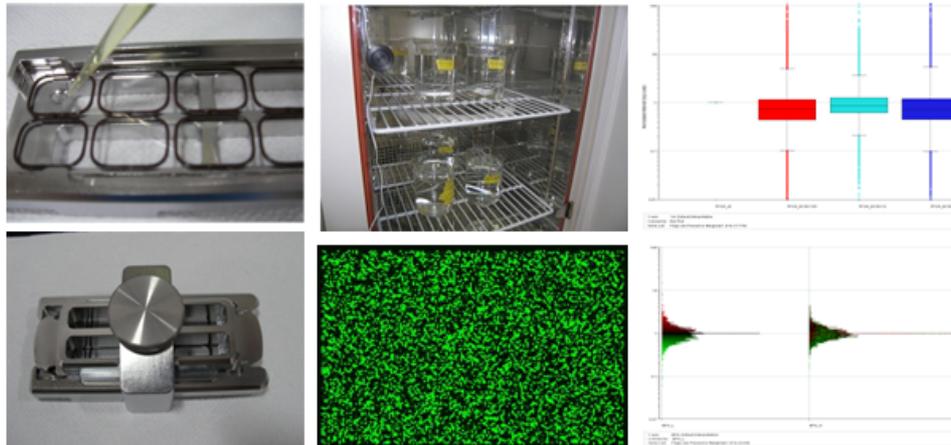
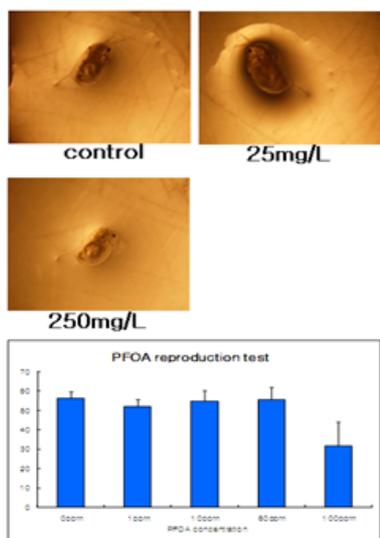


그림 1.1.9 물벼룩 배양 및 microarray 기술 보유



Genebank	Gene ID	Genename
AY737794	52355663	D.magna hemoglobin 4 gene, partial cds
AB021136	4589709	D.magna dhb2 mRNA for hemoglobin, complete cds
E5408204	145902614	8-H4 D. magna, normal Daphnia magna cDNA 5' similar to CARBOXYPEPTIDASE, mRNA sequence
U67067	2105138	D.magna hemoglobin (Dhb1) mRNA, complete cds
DV437858	115429906	1-C5 D. magna, normal Daphnia magna cDNA 5' similar to probable chitinase, mRNA sequence
DV437841	115429896	2-C7 D. magna, normal Daphnia magna cDNA 5' similar to serine collagenase 1 precursor, mRNA sequence
DV437820	115429863	3-C5 D. magna, normal Daphnia magna cDNA 5' similar to dopamine beta-hydroxylase, mRNA sequence
E5408269	145902660	5-F6 D. magna, normal Daphnia magna cDNA 5' similar to CARBOXYLESTERASE, mRNA sequence
E5408222	145902631	8-A6 D. magna, normal Daphnia magna cDNA 5' similar to VITELLINE, mRNA sequence
DV437840	115429895	2-A10 D. magna, normal Daphnia magna cDNA 5' similar to trypsin, mRNA sequence
U34738	1469360	D.magna 12S ribosomal RNA, mitochondrial gene, partial sequence
U13908	535578	D.magna isolate TJC mitochondrion 12S ribosomal RNA gene, partial sequence
DV437846	115429874	3-DS D. magna, normal Daphnia magna cDNA 5' similar to SB gene product, mRNA sequence
DV437857	115429905	2-A6 D. magna, normal Daphnia magna cDNA 5' similar to probable chitinase, mRNA sequence

Genebank	Gene ID	Genename
AY540101	44194152	D.magna pond K2 putative gram negative binding protein mRNA, partial cds
DQ845268	113472681	D.magna heat shock protein 90kDa (HSP90) gene, partial cds
DV437853	115429902	3-ES D. magna, normal Daphnia magna cDNA 5' similar to trypsin, mRNA sequence
AF291913	9930604	D.magna microsatellite Dma14 sequence
AB170020	109944918	D.magna Ubx mRNA for Ultrabithorax, complete cds, Ubx mono mRNA
EU514494	170180309	D.magna heat shock protein 70 (hsp70) mRNA, complete cds
AF070104	3265074	D.magna 18S ribosomal RNA gene, partial sequence
AF346515	17646162	D.magna large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence
AF070499	3249665	D.magna small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence
DV437803	115429846	3-D10 D. magna, normal Daphnia magna cDNA 5' similar to chymotrypsin B1 precursor, mRNA sequence
DV437852	115429901	1-A2 D. magna, normal Daphnia magna cDNA 5' similar to ferritin, mRNA sequence
DV437820	115429861	3-C5 D. magna, normal Daphnia magna cDNA 5' similar to dopamine beta-hydroxylase, mRNA sequence
E5408222	145902631	8-A6 D. magna, normal Daphnia magna cDNA 5' similar to VITELLINE, mRNA sequence
E5408269	145902660	5-F6 D. magna, normal Daphnia magna cDNA 5' similar to CARBOXYLESTERASE, mRNA sequence
E5408206	145902616	9-C9 D. magna, normal Daphnia magna cDNA 5' similar to CARBOXYPEPTIDASE, mRNA sequence

그림 1.1.10 PFOA 노출에 의한 물벼룩의 성장과 생식능 저하 및 microarray 분석 결과

뿐만 아니라, 본 연구진은 물벼룩 모델을 이용한 연구 외에도 다양한 세포배양 시스템을 이용하여, p53 wild type 과 null type의 세포주를 이용한 2-dimensional cell culture system과 3-dimensional cell culture system에서 전리방사선 노출에 따른 세포내 분자생물학적 차이를 연구, 나아가 microarray 기술을 도입하여 인체와 유사한 3차원 세포배양 시스템에서 나타나는 p53-mediated apoptosis signal network를 연구한 바 있다. 이처럼 본 연구진은 3차원적 세포배양 시스템과 같은 고차원적 실험 기술을 보유하고 있고, 다양한 실험 모델에서 microarray를 통한 유전자 발현 양상 및 network를 분석한 경험을 가지고 있다(그림 1.1.13).

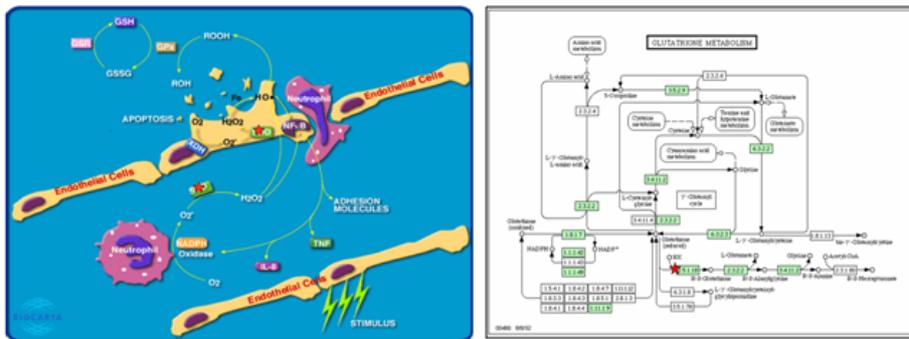
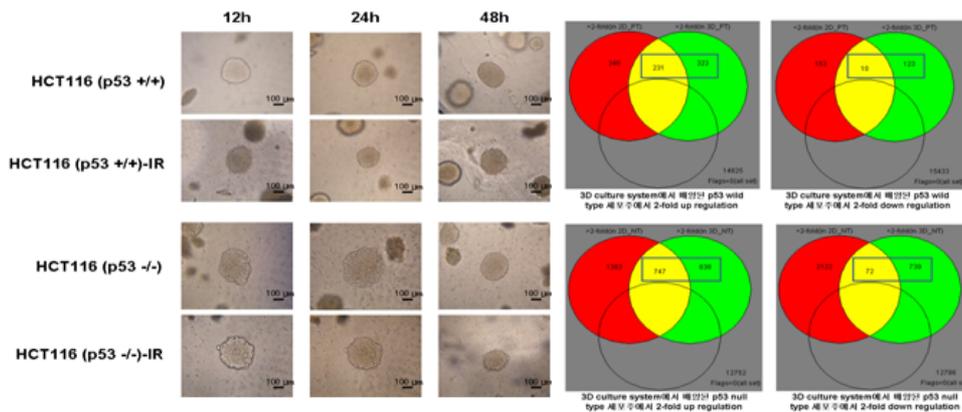


그림 1.1.11 3차원 세포배양 시스템에서 microarray를 이용한 유전자 발현 양상 및 network 분석

특히, 물벼룩 모델을 이용하여 수서 생태계에 노출된 환경유해물질에 의한 유전자 발현 패턴 변화를 분석한 선행 연구는 본 연구진이 수행하고자 하는 EDC에 노출된 물벼룩에서 특이 유전체 지표 탐색 및 위해성 예측·분석 기술 개발을 보다 성공적으로 수립하는데 뒷받침이 되는 연구경험이라 할 수 있으며, 특히 기존에 분석되었던 PFOA에 의한 유전자 발현 변화 양상은 본 연구에서 수행 할 BPA 특이적 바이오마커 발굴·검증 및 유해물질-focused array chip 설계와 개발에 있어 중요한 기초자료를 제공할 수 있을 것이라 사료된다.

본 연구에서는

첫째, 수계생태계내의 유해화학물질을 정성 및 정량적으로 감지할 수 있는 microfluidics기반의 랩온어칩을 개발하고,

둘째, 자포동물 모델인 히드라(*Hydra magnipapillata*)를 대상으로 Eco-epigenomics 연구의 기반을 확립하고, 유해화학물질군(PAHs 및 POPs)의 후성유전학적 영향을 해석을 통해, ENVIHaz-HymMet array의 콘텐츠를 확보, 개발하며,

셋째, 절지동물 모델인 물벼룩(*Daphnia magna*) 유해화학물질군(EDCs, Bisphenol A) 특이 독성유전체 지표를 발굴하고, 이들을 이용한 real-time quantitative polymerase chain reaction(qRT-PCR) 분석 kit인 ENVIHaz-Daphnia qPCR Array Kit을 개발하고,

넷째, 척추동물 모델인 자바송사리에서 확보되어 있는 2,000여종의 독성유전체 지표들에 대한 특성을 해석하고, 유해화학물질군(EDCs, bisphenol A) 특이 전사체 지표를 재발굴하여, 이들을 콘텐츠

로 ENVIHaz-Fish qPCR Array Kit을 개발할 것이다. 개발된 랩온어칩을 이용하여 수생태계의 POCT를 실현하고, 마이크로어레이 및 qPCR Array Kit을 이용하여 위해성 예측을 실현함으로써, 미래 경제 성장의 원동력인 수생태계 환경의 관리 및 보전에 이바지 하고자 한다.

2. 연구개발대상 기술의 차별성

가. 차별성

산업화, 도시화가 진행됨에 따라 기존에 동정되지 않았던 새로운 물질들을 포함하여 무수히 많은 유해화학물질들이 환경으로 노출되어 생태계를 위협하고 있다. 환경부 조사에 의하면 전 세계적으로는 10만 여종이, 국내에서는 39,000여종의 유해화학물질이 제조·사용되고 있으며, 매년 400여종의 신규 화학물질이 수입되거나 제조되고 있다. 특히, 생활하수, 공장폐수 등으로 인하여 수생태계에 노출된 유해화학물질들은 미량으로도 인체 및 수서 생물체에 중대한 영향을 줄 수 있어 엄격하고 철저한 관리가 요구되는 실정이다.

이러한 문제점에 직면하여 지금까지 많은 노력들을 통해 수질 독성 평가를 위한 생태 연구 및 관련 기술이 개발되었지만 기존의 평가 기법들은 대부분 비용과 시간 투자에 비해 단순히 오염 정도를 평가 한다거나 그 결과가 측정 항목에 해당하는 화학물질에 대한 농도 수준만을 확인 가능하기 때문에 이 화학물질이 어떠한 작용 및 기전을 통해 수생태계 즉, 수서생물체에 영향을 미치는지에 대한 근본적인 분석이 어렵다.

이에 본 연구진은 미세유체역학 기반의 환경 유해화학물질 검출 랩온어칩을 개발하고(그림 1.1.12); 환경 수서 생태계의 위해성 평가를 위해 히드라를 대상으로 한 후성유전학 연구를 통해 에피지놈 생체지표를 발굴하여, 이를 탑재한 DNA methylation Array를 개발하고(그림 1.1.13), OECD 공식 생물종인 물벼룩(*D. magna*) 및 자바송사리(*O. javanicus*)의 생태독성유전체를 이용하여 EDC 및 PAH에 의한 수생태계의 위해성 예측 qRT-PCR kit을 개발하여, 지금까지의 평가 기술과는 차별된 진보적이고, 화학물질 특이적 유전자 발현 패턴 변화를 확인할 수 있는 환경화학물질의 유해도 분석 키트를 개발하고자 한다.

본 연구진은 EDC 및 PAH에 노출된 물벼룩의 유전자 발현 변화 패턴을 microarray를 통해 확인 한 후, 이 환경유해물질 특이적으로 일정 수준 이상 과발현 또는 저발현된 유전자만을 선별하여 유해물질 독성평가에 최적화된 유해화학물질-focused array chip을 설계·개발하고자 한다. 이렇게 개발된 chip은 기존의 단순 오염정도를 측정하는 독성평가방법 및 유전자발현 패턴 변화 분석 연구에서 나아가, 변형된 microarray 시험법 하나로 좀 더 간편하고 정확하게 생물체 내에서 작용하는 유해화학물질 특이적인 유전자 발현 패턴 확인·검증 및 독성 작용 기전(mode of action)의 이해를 돕는데 이바지 할 수 있을 것으로 기대된다.

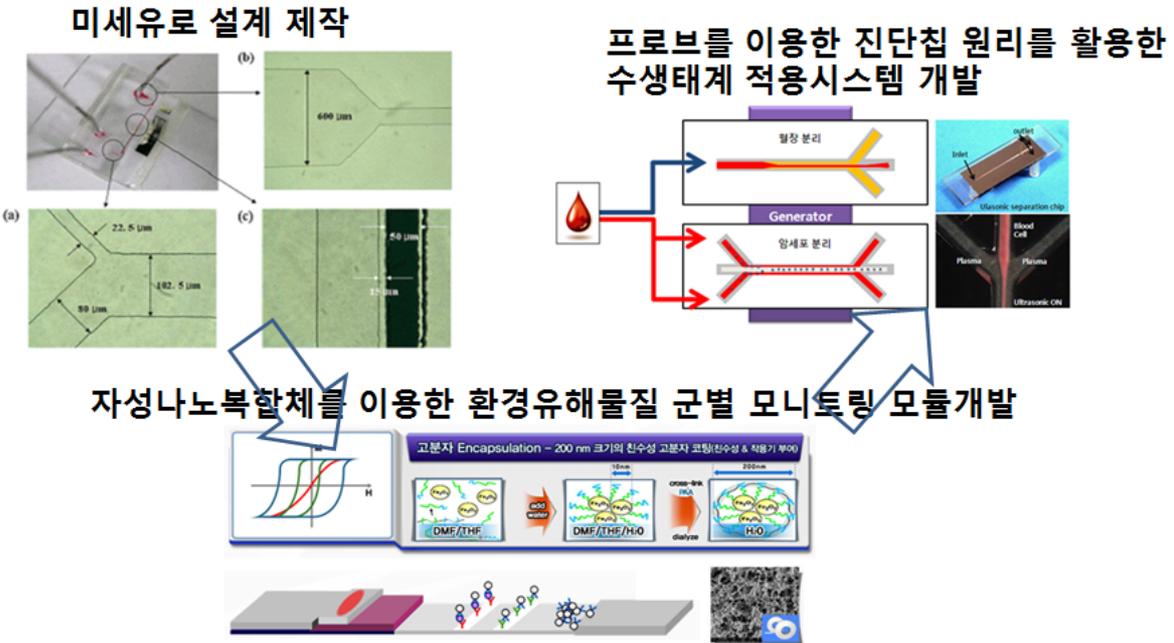


그림 1.1.12 Microfluidics 기반의 랩온어칩 개발 모식도

Methylated DNA Isolation Assay (MeDIA)-mediated CpG microarray/sequencing

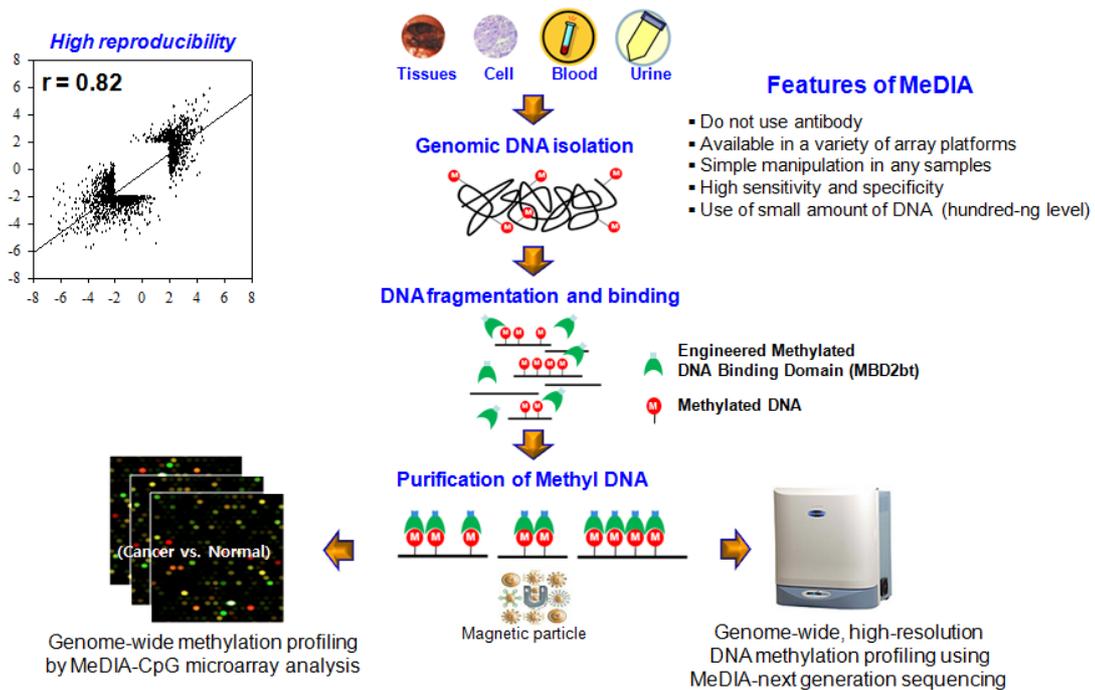


그림 1.1.13 Epigenome 지표의 발굴 및 이를 이용한 DNA methylation 분석

뿐만 아니라 본 연구진은 Real-time qPCR Array System을 이용하여 물벼룩 모델 및 자바송 사리 모델을 대상으로 EDC 및 PAH 유해물질별 유해도 정량 분석 키트인 ENVIHaz-Daphnia 및 ENVIHaz-Fish qPCR Kit을 개발하고자 한다. 이 system 개발 방법은 PCR array를 위해

96-well plate에 유해화학물질-focused array chip을 이용하여 얻어진 좀 더 정확하게 발현이 변화된 유전자 또는 그 유전자와 생물학적인 기전에 관계된 유전자들을 중심으로 선별하여 이를 증폭시킬 수 있는 primer를 미리 점적해 놓는 것이다. 그 후, real-time PCR과 같은 원리로 유해화학물질에 노출된 물벼룩의 RNA를 추출하여 reverse transcription에 의해 cDNA로 합성, Master Mix와 함께 96-well plate에 sample을 넣어 PCR 반응을 진행시켜 발현이 변화된 양상을 분석한다.

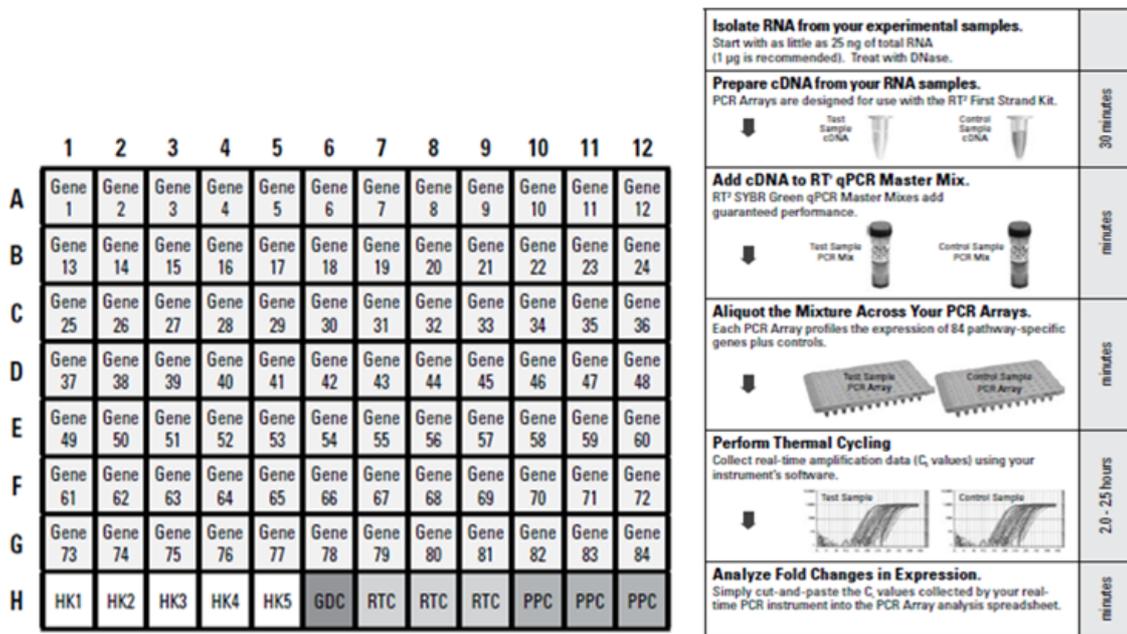


그림 1.1.14 PCR array의 layout 및 실험과정

특히, 본 연구진이 개발하고자 하는 분석키트는 면밀하게 분석되어 선별된 100개 이하의 유전자 범위 내에서 진행되기 때문에 적은양의 sample (민감성, Sensitivity)로도 높은 특이성 (Specificity)과 정확성을 가지는 데이터를 얻을 수 있으며, 96-well plate를 이용하여 어느 실험실에서 누구나 쉽게 사용 가능하기 때문에 접근성이 용이하다. 뿐만 아니라 시험방법이 매우 간단하고 투자하는 시간이 절약되기 때문에 단 시간 내에 반복적인 시험을 통해 일정한 결과 (재현성, Reproducibility)를 얻을 수 있고, 오염물질의 정성 및 정량을 동시에 분석할 수 있다는 장점이 있다.

따라서 유해화학물질에 노출된 수생태계 유해성 평가를 위한 본 연구진의 PCR array 분석 키트 개발은 기존의 단순한 오염 정도를 측정하는 평가 기술과 microarray를 이용한 유전자 발현 변화 패턴을 한 번의 간단한 실험으로 빠르게 확인 할 수 있고, 이를 통해 유해화학물질 특이적인 생물체 내 독성작용 바이오마커 발굴 효과를 동시에 얻을 수 있다. 뿐만 아니라 이 키트는 화학물질 노출에 의해 변화되는 유전자 및 그 작용 기전에 관련된 유전자들로만 구성되어 있기 때문에 기존 microarray의 profiling 능력을 포함한 pathway-focused gene expression

profiling 분석이 가능하여 유해화학물질이 수서 생물체 내에 노출 되었을 때 그 독성 작용 기전을 쉽게 이해할 수 있다는 점에서 기존 평가 시스템과 차별된 기술이라 할 수 있겠다.

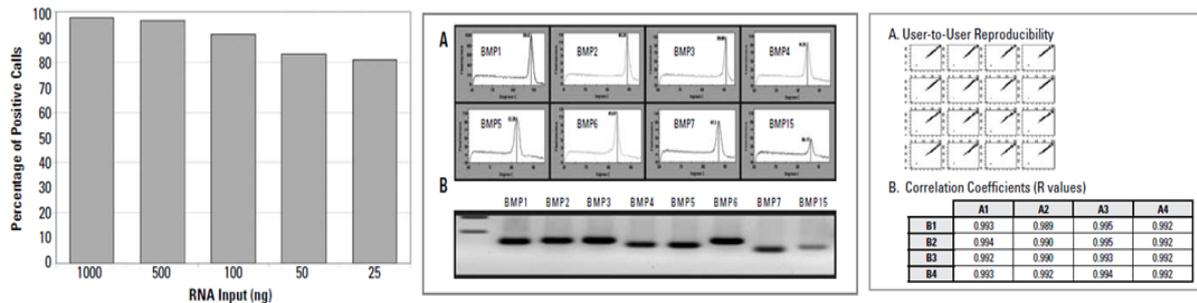


그림 1.1.15 PCR array의 장점 (민감성, 특이성, 재현성)

제2절 연구개발의 국내외 현황

1. 해외 기술개발 동향시장

전 세계적으로 수질오염의 문제가 대두되고 있는 가운데 수질오염의 정도를 측정하는 기술 또한 급격한 발전을 이루고 있다. 이들 중에는 오염의 냄새 정도를 이용해 오염도를 측정하는 기술부터 수중생물의 유전자 발현 패턴의 변화 분석을 이용하는 방법까지 다양한 기술이 응용되고 있다.

이러한 water quality monitoring 기술로써 국외에서 또한 여러 종류가 개발되고 있는 실정이다. 이 중 PAH와 같은 특정 독성물질에 대한 농도를 측정하는 기술 등도 포함된다. 이와 관련한 한 예로 Frank 등은 수중에서의 PAH, PCB 그리고 OCP의 농도를 측정할 수 있는 semipermeable membrane devices(SPMDs)를 개발한 바 있다(Frank et al., 2004). 이들은 암스테르담 근처의 실험용 샘플을 얻어 SPMDs과 함께 *Cyprinus carpio*에서의 PAH 대사산물의 정도를 측정한 결과 서로 다른 두 방법에서 유사한 결과가 도출됨을 확인 한 바 있다(그림 1.2.1).

국제적 기관에서도 이러한 수질 오염도를 측정하기 위한 기술개발을 수행하고 있다. Woodrow wilson international center for scholar에서는 물의 환경 오염도를 측정하기 위해 수서생태종인 *Daphnia magna*를 이용하여 수질의 EPA 함량을 테스트 할 수 있는 2000-gene DNA array for the fathead minnow 라는 기술을 소개한 바 있다. 또한 세계 각국에서도 국가적 정책 수행의 일부로써 수질오염도 측정 기술 개발에 집중적 투자를 하고 있는 실정이다. Amara등은 국가적 차원에서 유럽의 수질 관리 시스템의 개발을 도모하고자 계획된 European Union Water Framework Directive(WFD -2000) 연구의 일환으로 유럽의 water quality를 측정하기 위한 방법으로써 real time measurements와 분석테크닉이 결합된 miniaturized sensors를 이용하여 수질을 측정하는 칩 형 기술을 개발한 바 있다.

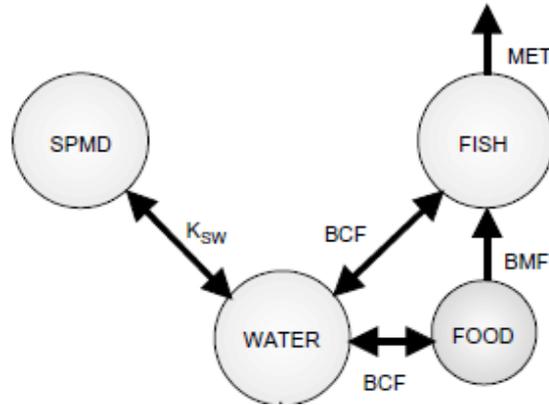


그림 1.2.1 Semipermeable membrane devices (SPMD)와 Fish를 이용한 물 속 특이 화학물질 오염 유무 측정 수행 모식도 (K_{sw} = SPMD-water partitioning coefficient; BCF = bioconcentration factor; BMF = biomagnification factor; MET = metabolic clearance)

2008년 미국의 환경부인 EPA (Environmental Protection Agency)에서는 국가과제로 'Identifying and Monitoring Environmental Toxicity Using Ceriodaphnia Microarrays' 라는 연구과제를 지원한 바 있다. 이는 microarray를 통한 daphnia의 유전자 발현 패턴분석이 환경오염의 identifying, characterizing 그리고 monitoring의 실제적 기술로 이용될 수 있다는 가능성을 제시한 바 있다. 또한 2006년 EPA에서는 'Development and Validation of the Daphnia cDNA Microarray as a Method for Predicting Metal Contamination in Aquatic Environments.'라는 연구를 지원한 바 있다. 근래 많은 연구보고에 의하면 Ecotoxicogenomics 라는 새로운 기술이 수질을 측정하는데 있어 효과적인 방법일 수 있다는 근거들이 제시되고 있다. 이는 수서 생태종에서 화학물질인 오염물질로부터 유발되는 독성 반응에 대한 높은 민감성과 효율성으로 효과적으로 수질을 측정하는데 중요한 기술로써 자리매김하고 있다. 위 연구에서는 cDNA microarray를 이용하여 copper (Cu), cadmium (Cd), zinc (Zn), and lead (Pb)의 노출로부터 유발되는 *Daphnia magna*의 특정 유전자 발현 패턴의 변화를 분석함으로써 이들의 오염도를 측정할 수 있는 기술 마련의 기반을 제공하고 중금속 오염과 관련되는 *Daphnia magna*의 바이오 마커를 찾아냄으로써 국책과제를 수행한 바 있다. 이는 수질과 관련되는 Ecotoxicology 분야에서 cDNA microarray의 유용성을 보여준 사례라 할 수 있겠다.

Microfluidic chip을 이용하여 유해화학물질 및 중금속 오염의 감지나 예측에 직접 적용한 사례는 아직까지 국내외적으로 드물다. 현재까지의 연구동향은, microfluidic chip의 일반적인 기능들 즉, 복잡한 형태로 존재하는 바이오 물질 혼합물로부터 원하는 샘플만을 정제하고 분리하는 샘플 전처리, 마이크로 채널 내에서 샘플을 효과적으로 수송하기 위한 유동제어, 샘플들을 혼합하거나 반응시키는 샘플 반응 및 혼합, 그리고 화학적, 전기화학적, 광학적 혹은 기계적 센서들을 이용하여 원하는 샘플을 감지하는 샘플 감지 등에 대한 일반적인 기술 개발이 주를 이루고 있다(Reyes et al., 2002; Auroux et al., 2002; Vilkner et al., 2004). 개발된 microfluidic

chip은 환경 감시, 질병 진단, 면역측정, 세포 배양, 단백질학, DNA 분리 및 분석, polymerase chain reaction 등 다양한 분야에 적용가능 할 것으로 생각된다(Lion et al., 2003; Vilkner et al., 2004; Erickson and Li, 2004).

환경 감시분야에서는 약 90초 동안 공기 중의 SO₂를 샘플링을 하여 0.7-1.0 ppb 수준의 감지 기능을 갖는 microfluidic chip을 미세 전도율 측정센서와 MEMS (microelectromechanical system) 기술을 사용한 예와(Ohira et al, 2002) 적당한 크기의 기공이 있는 실리카 흡착기를 이용하여 유기 기체 혼합물의 각 성분을 분리해서 ppm 수준으로 탐지하는 microfluidic chip의 예(Ueno et al. 2000)가 있고, 전도율 전극과 isotachopheresis를 사용하여 무기 arsenic and selenium species를 microfluidic chip에서 분석한 예(Prest et al, 2005)가 있다.

에피지놈(epigenome) 관련 시장은 2005년 1억 6,180만 달러를 시작으로, 매년 평균 60.4%의 성장률로 확대되어 2012년에는 41억 달러에 달할 것으로 전망된다(Epigenomics: Emerging Opportunities inBiomarkets, Diagnostics and Therapeutics, BCC Research, 영국, 2007). 에피지놈 연구 관련 시장은 2009년 현재 전 세계적으로 4억 달러를 넘는 것으로 추정되고 매년 60% 이상의 고속성장을 보이고 있다. 현재는 특정 질병이나 암을 조기 진단하는 생물지표의 확립에 초점을 맞추고 있지만, 앞으로는 치료용 약제의 개발 분야에도 활용될 것으로 생각된다. 선진국에서는 경쟁적으로 대형 후성유전학프로젝트를 추진하여 후성유전체 마커를 맵핑함과 동시에 다양한 질병 연구에 관련 레퍼런스를 제공함으로써 시장에서의 유리한 위치를 선점하려고 하고 있다. 이렇듯 미래 생명공학시장에서 에피지놈 연구의 중요성이 부각되고 있음에도 불구하고 국내에서의 연구 지원은 아직도 미흡하다고 할 수 있다.

2. 국내 기술개발 동향시장

최근 국내 산업발달로 인해 발생한 각종 환경호르몬과 유해화학물질이 자연계에 노출됨으로써, 자연생태계 교란 및 인간의 건강에 피해를 주고 있다. 특히, 환경호르몬과 유해화학물질이 수질로 유입되면서 수질오염이 발생하고 이에 따라 수서생태계가 큰 위협을 받고 있다. 이러한 쟁점이 이슈화 되면서, 전 세계적으로 평가지표 중을 이용한 수질오염 측정기술 개발이 필요한 시점이라는 사실이 인식되었다. 따라서 현재, 국내에 이루어지고 있는 평가지표 중을 이용한 수질오염 측정기술개발의 현황을 살펴보면, 대부분의 연구가 다양한 환경호르몬과 유해화학물질에 대한 독성연구가 주를 이루었고 측정기술 개발에 대한 연구는 거의 없다. 특히, 본 연구진에서 수행하고자 하는 PAH의 수질오염 측정기술 개발은 없었다. PAH에 대한 연구는 대부분 토양오염에 대한 생물학적 분해기술로서 미생물을 이용한 친환경적인 분해기술개발 연구가 주를 이루었다. 또한 PAH 이외에 다양한 EDC에 대한 연구들을 보면, PCB의 경우에 수서생태종인 *Daphnia magna*에 급성 농도로 처리한 독성연구가 많았으며, PCB 또한 측정기술 개발에 대한 연구는 미흡한 상황이다. 그리고 BPA에 대한 연구를 살펴보면, BPA를 측정할 수 있는 진단방법을 개발한 한 연구에서는 BPA를 검출하기 위해 phenol 성분을 분해할 수 있는 미생물을 이용하여 분해정도를 측정하여 얼마만큼의 오염정도인지를 확인할 수 있음을 제시하였다. 또한, 중금속의 경우에는 이미 수질에 포함된 중금속의 양을 측정 할 수 있는 센서가 개발되어진 상태이다. 유해화학물질의 종류에 따른 국내현황은 각각의 화학적·생물학적 특성에 맞게 기술개발이 이루어지고 있다. 주로 사용한 수서 생태계 종을 보면 척추동물로서는 송사리가, 무

척추 동물로는 물벼룩이 주로 사용되어 졌다. *Daphnia magna*를 이용한 환경호르몬 및 유해화학물질 검출기술은 *Daphnia magna*의 활동성에 따라 광 다이오드의 진동 정도로 독성을 판단한다. 그리고 물고기를 이용한 수질 독성 모니터링 자치는 물고기가 물의 흐름에 역방향으로 수영하는 것에 착안하여 수영속도가 줄어드는 것을 측정하여 수질 오염을 판단하는 기술이 개발되어졌다. 하지만 이러한 평가 기술들은 수질오염 유무를 판가름할 수는 있지만 특정물질에 대한 정량적인 분석이 어렵다.

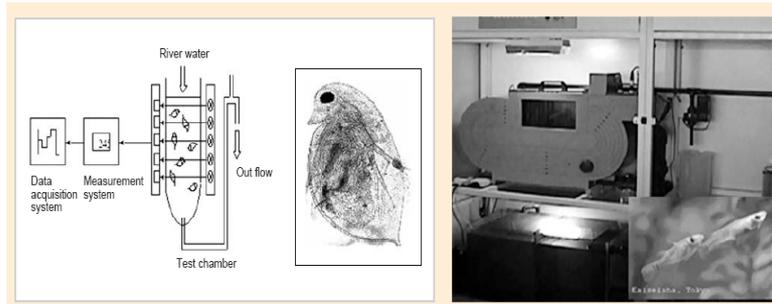


그림 1.2.2 물벼룩 수영 저해 감지 시스템 (왼쪽)과 어류를 이용한 수질 독성 모니터링 장치 (오른쪽) (신기술 특하·동향 BT news, 2006)

수서 생태계의 생물종을 이용한 유해화학물질의 검출 기술 이외에도 DNA chip을 이용하여 특정물질을 측정할 수 있는 기술개발 연구들이 개발되었다. DNA chip의 활용성은 특정 화학물질에 특이적으로 발현하게 되는 다양한 바이오마커를 transcription 수준에서 빠른 시간 내에 선별하고 확보할 수 있다는 장점을 가지고 있기 때문에 최근 들어 앞서 말한 측정 기술보다 각광받고 있다. 한 연구진에 따르면, 환경호르몬으로 잘 알려진 BPA를 검출할 수 있는 기술이 특이적으로 결합하는 핵산 압타머를 이용하여 검출이 가능해졌다고 보고한 바 있다. 하지만 DNA chip을 이용한 측정은 정량적 분석이 어려울 뿐만 아니라 유해화학물질에 직접적인 영향을 받는 수서 생태종 내의 변화를 알지 못한다면 제대로 된 진단 또한 힘들 것이다. 따라서 본 연구진은 이러한 문제점을 보완하고자 *Daphnia magna*의 발현양상을 분석, 파악하여 바이오마커를 발굴하고 PCR array 방법을 통해 변화된 유전자의 발현양상을 통합 분석하여 보다 정량적인 분석에 접근하고자 한다.

이처럼 국내에서는 유해화학물질에 대한 생태 유해성을 인식하고 이를 평가하기 위한 많은 연구가 진행 중에 있다. 특히 앞서 말한 DNA chip을 이용한 환경호르몬 검출 및 진단 시스템은 앞으로 필요한 연구 중에 하나가 될 것이라 사료된다. 본 연구진에서도 유해화학물질에 의한 수질오염의 위험성에 대해 인식하고 수서 생태종 *Daphnia magna*를 이용하여 유해화학물질의 명확한 바이오마커를 제시하고, 이를 이용한 유해성 측정이 정성, 정량적으로 가능한 분석키트를 개발하고자 한다.

제3절 연구개발의 내용 및 범위

1. 연구개발의 최종목표

- 생체정보를 이용한 수생태계 위해성 예측 도구 개발
 - ENVIHaz-HymMet Array (PAHs 및 POPs 대응)
 - ENVIHaz-Daphnia qPCR Array Kit (EDCs, Bisphenol A 대응)
 - ENVIHaz-Fish qPCR Array Kit (EDCs, Bisphenol A 대응)
- 수생태계 내 유해화학물질 (PAHs) 검출 랩온어칩 개발을 통해 POCT 실현
 - ENVIHaz AquaChip (PAH류 Benzo[a]pyrene 검출)

2. 연도별 연구개발 목표 및 평가방법

구분	연구개발의 목표	연구개발의 내용	평가방법
1차년도	○ 수계 유해화학물질 검출을 위한 음파영동 장치 결합 microfluidic chip 설계 및 제작	▶ 특정 저분자 화학물질의 감지 및 결합을 유도하는 단백질 센서 (결합프로브) 물질 조사 및 제작 ▶ 특정 물질 집적, 제거를 위한 microfluidic chip fabrication 방법 선정 및 제작	Microfluidic chip fabrication 제작 여부
	○ Hydra 모델의 ecoepigenomics 연구 기반 확립	▶ Hydra 유전체정보 및 ESTs 정보에 기초한 promoter prediction ▶ ENVIHaz-HymMet array 제작	Promoter 예상 부위 추출 및 Microarray 제작 여부
	○ 자바송사리 모델의 유해화학물질군 (EDCs) 독성유전체 지표의 특성 해석 및 생물대사변동 예측	▶ Bisphenol A(BPA) 노출 실험 ▶ 특이 유전자 probe 기능별 그룹핑 및 대표 유전자 probe 선별	Probe 기능 해석 여부
	○ 독성유전체 기법을 이용한 환경유해화학물질 EDCs의 민물 수생태계 유해성 평가를 위한 지표 발굴	▶ 물벼룩 모델에서 EDCs 유해물질(BPA) 노출을 위한 적정 농도 설정 ▶ 물벼룩 모델에서 microarray를 이용한 BPA 특이 유전체 지표 탐색	EDCs 유해물질 노출을 위한 적정 농도 설정 및 EDCs 유해물질 특이 유전체 지표 발굴 여부
2차년도	○ 수계 유해화학물질(PAHs) 검출을 위한 microfluidic chip 설계 및 제작	▶ Benzo[a]pyrene 결합을 위한 단백질 결합 프로브 물질 제작 ▶ 제작된 microfluidic chip의 표준 시료로부터 BaP 결합, 제거, 처리 능력 확인 및 검증	제작된 microfluidic chip 장치 구동으로 인한 BaP의 반응 여부
	○ Hydra 모델 유해화학물질군(PAHs)의 후성유전학적 영향 해석	▶ BaP 노출 실험 ▶ ENVIHaz-HymMet Array 실험에 의한 DNA methylation 분석	DNA methylation 분석 여부
	○ 자바송사리 모델의 EDCs 대응-Focused Array Chip 개발	▶ 선별 유전자 probe의 발현량 변화 정량 분석 ▶ 재선별된 유전자 probe를 탑재한 Focused Array Chip 설계 및 개발	Focused Array Chip 개발 여부
	○ 환경유해화학물질 EDCs 노출에 따른 민물 수생태계 유해성 평가를 위해 발굴된 지표 검증 및 유해물질-Focused Array Chip 개발	▶ Real-time PCR과 network 분석을 통해 물벼룩 민물 수서동물 모델에서 EDCs 유해물질 노출에 의해 발굴된 지표의 검증 ▶ 검증을 통해 선별된 유전자를 이용하여 EDCs 유해물질의 독성평가에 최적화된 Focused Array Chip 설계 및 개발	EDCs 유해물질 노출에 의해 발굴된 지표의 검증 여부

3차년도	○ Microfluidic chip의 통합, 성능보완 및 on-chip 샘플전처리 기술 보완과 현장 적용기법 표준화	▶ Microfluidic chip에 샘플 정제 및 analyte pre-concentration 기능 추가 ▶ Microfluidic chip을 이용한 PAHs 위해성 평가 현장 적용법 확립	현장 적용법 제시 여부
	○ Hydra 모델 유해화학물질군(POPs)의 후성유전학적 영향 해석	▶ PFOS 노출 실험 ▶ ENVIHazard-HymMet Array 실험에 의한 DNA methylation 분석	DNA methylation 분석 여부
	○ 자바송사리 EDCs 위해성 예측 도구 검증	▶ ENVIHazard-Fish qPCR Array Kit 개발 및 검증	qPCR kit 개발 및 실용성 확인
	○ 환경유해화학물질 EDCs 특이 위해도 정량 분석 키트 개발 및 검증	▶ EDCs 유해물질-Focused Array Chip을 이용해 검증된 유전자를 최종 선별하여 유해도의 정량이 가능한 분석 키트: ENVIHazard-Daphnia (EDCs) qPCR Array Kit 개발	EDCs 유해물질 유해도 정량 분석 키트 ENVIHazard-Daphnia(EDCs) qPCR Array Kit 개발 여부 평가

3. 연도별 추진체계

	유해화학물질 검출 나노에코센서 개발	생체정보이용 위해성 예측 도구 개발		
	Microfluidic Chip	Hydra 모델	Daphnia 모델	자바송사리 모델
1차년도 (2010년)	음파영동장치 결합 microfluidic chip 설계 및 제작 화학물질 감지 및 결합을 유도하는 단백질 센서 물질 조사 및 제작 특정 물질 집적, 제거를 위한 microfluidic chip fabrication 방법 선정 및 제작	Ecoepigenomics 연구 기반 확립 Genome 정보 및 EST 정보에 기초한 Promoter prediction ENVIHazard-HymMet Array 제작	EDCs 위해성 평가지표 발굴 BPA 노출을 위한 적정 농도 설정 Microarray를 이용한 BPA 유해물질 특이 유전체 지표 탐색	EDCs 독성유전체 지표의 특성 해석 및 생물 대사변동 예측 BPA 노출 실험 특이 유전자 지표 기능별 그룹핑 및 대표 유전자 지표 선별
2차년도 (2011년)	PAHs 검출을 위한 microfluidic chip 설계 및 제작 BaP 결합을 위한 단백질 결합 프로브 물질 제작 제작된 microfluidic chip의 수계 시료로부터 BaP 결합, 제거, 처리 능력 확인 및 검증	PAHs 후성유전학적 영향 해석 BaP 노출실험 ENVIHazard-HymMet Array 실험에 의한 DNA Methylation 분석	EDCs 위해성 지표 검증 및 Focused Array Chip 개발 유해물질 노출에 의해 발굴된 지표 검증 선별된 유전자를 이용한 Focused Array Chip 개발	EDCs 위해성 평가 지표 검증 및 유해물질 Focused Array Chip 개발 선별 유전자 지표의 발현량 변화 정량 분석 재선별된 유전자 probe를 탑재한 Focused Array Chip 설계 및 개발
3차년도 (2012년)	Chip 통합, 성능보완, 샘플전처리 기술 보완 현장 적용 기법 표준화 샘플 정제 및 analyte pre-concentration 기능 추가 PAHs 위해성 평가 현장 적용법 확립	POPs 후성유전학적 영향 해석 PFOS 노출실험 ENVIHazard-HymMet Array 실험에 의한 DNA Methylation 분석	EDCs 특이 위해도 정량 분석 Kit 개발 및 검증 ENVIHazard-Daphnia(EDCs) qPCR Array Kit 개발 환경시료 적용을 통한 검증	EDCs 위해성 예측 도구 검증 현장시료 노출 실험 ENVIHazard-Fish qPCR Array Kit 개발 및 검증

제 2 장 연구개발 수행내용 및 결과

제1절 연구개발 결과 및 토의

1. Hydra 모델 BaP 대응 DNA methylation Array 개발

- 후성유전학이란 DNA 염기서열의 변화를 수반하지 않는 유전자 조절에 변화가 일어나는 것을 뜻하며, 20세기 후반부터 유전체의 후성유전학적 조절기전에 대한 연구가 진행중임
- 유전자 발현의 조직 특이적 조절에서 cytosine의 methylation의 중요성과 복잡성이 강조되고 있으며, 최근 빠른 속도로 진행되고 있는 기술의 발달은 epigenome 연구의 진행을 더 용이하게 해 줄 것으로 생각되고 있음
- 후성유전학 연구는 앞으로의 BT산업의 성장을 위한 필수적인 소재라 할 수 있으며, 세계적으로도 국제적 협력을 통한 epigenome 연구를 지향하고 있음
- 이에 본 연구에서는 Hydra모델을 대상으로 환경의 PAHs 및 POPs 노출에 의한 DNA methylation과 관련된 후성유전학 연구를 계획하였음

가. Hydra genome browser의 구조 및 활용법 파악

- Hydra의 genome browser (<http://hydrascope.metazome.net/cgi-bin/gbrowse/hydra/>) (그림 2.1.1)는 다양한 알고리즘을 이용하여 Hydra genome annotation 정보를 23개의 트랙을 통해 제공하고 있음 (표 2.1.1)

표 2.1.1 Hydra genome browser의 알고리즘과 그에 대한 설명

Algorithms	Description
RepeatMasker	Screen DNA sequences for interspersed repeats and low complexity DNA sequences.
ReAs	Recover ancestral sequences for transposable elements (TEs) from the unassembled reads of a whole genome shotgun
RepeatScout	Discover repetitive substrings in DNA
GenomeScan	Predicting the locations and exon-intron structures of genes in genomic sequences from a variety of organisms
AUGUSTUS	Predict genes in eukaryotic genomic sequences
SNAP	Semi-HMM-based Nucleic Acid Parser for gene prediction
BLAT	Identify similarities between DNA sequences and protein sequences
PASA	A eukaryotic genome annotation tool that exploits spliced alignments of expressed transcript sequences to automatically model gene structures, and to maintain gene structure annotation consistent with the most recently available experimental sequence data

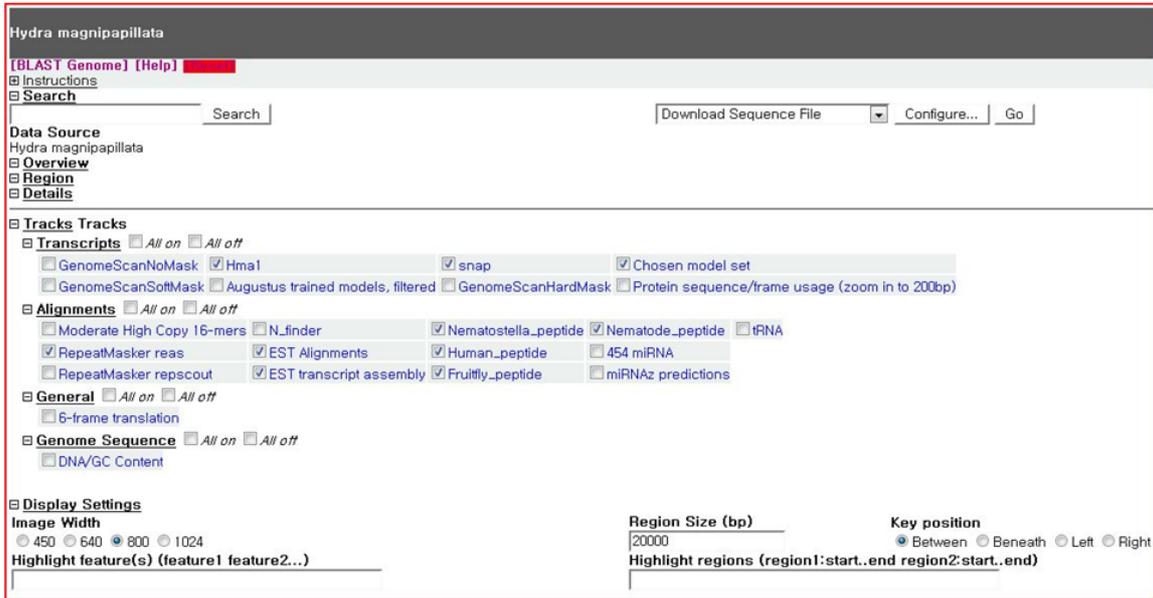


그림 2.1.1 Hydra genome browser의 초기화면

나. Hydra 유전자의 추출 및 microarray의 완성

- Hydra의 genome data base에 저장되어 있는 정보를 토대로 17,000 여개의 singleton을 추출하였음
- 추출된 염기서열정보에 따라 Expression Microarray 제작을 위한 oligo-probe의 디자인을 통해, 이들을 탑재한 Hydra Expressed GenE Microarray (HEGEM)를 완성하였음 (그림 2.1.2). HEGEM은 다양한 환경유해화학물질에 의한 유전자 발현 변화의 초기 스크리닝에 활용될 것임

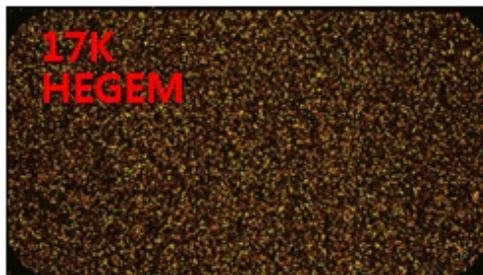


그림 2.1.2 Hydra 유전자 17,000 여개를 탑재한 Hydra Expressed Gene Microarray (HEGEM)의 프리스캔 이미지



그림 2.1.3 CLC Main Workbench 프로그램을 활용한 Hydra genome 내의 CpG 부위의 확인

다. Hydra genome 내 CpG 부위의 추출 및 EnviHaz-HymMet Array의 완성

- 유전자 염기서열 CLC Main Workbench 프로그램을 활용하여 Hydra genome내의 CpG 부위를 확인하였고, 이들을 추출하였음 (그림 2.1.3)
- 추출된 부위의 염기서열을 확인하여, 약 10,000 부위에 대한 oligo-probe를 디자인하였으며, 이들을 탑재한 EnviHaz-HymMet Array를 완성하였음 (그림 2.1.4)
- EnviHaz-HymMet Array는 2차년도에 계획되어 있는 PAHs류인 Benzo(a)pyrene 및 3차년도에 계획되어 있는 POPs류인 PFOS 노출에 의한 유전자 발현조절에 대한 연구에 활용될 것임

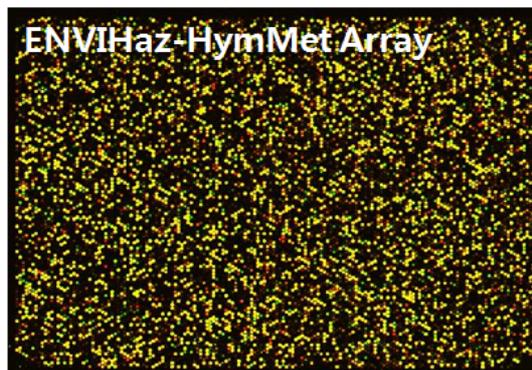


그림 2.1.4 EnviHaz-HymMet Array의 프리스캔이미지. Hydra genome 내의 CpG 부위 10,000 개소에 대한 oligo-probe를 탑재

라. Hydra 모델을 이용한 유해화학물질군(PAHs 및 POPs)의 후성유전학적 영향 해석

- 후성유전학이란 DNA 염기서열의 변화를 수반하지 않는 유전자 조절에 변화가 일어나는 것을 뜻하며, 20세기 후반부터 유전체의 후성유전학적 조절기전에 대한 연구가 진행중 임
- 유전자 발현의 조직 특이적 조절에서 cytosine의 methylation의 중요성과 복잡성이 강조되고 있으며, 최근 빠른 속도로 진행되고 있는 기술의 발달은 epigenome 연구의 진행을 더 용이하게 해 줄 것으로 생각되고 있음
- 후성유전학 연구는 앞으로의 BT산업의 성장을 위한 필수적인 소재라 할 수 있으며, 세계적으로도 국제적 협력을 통한 epigenome 연구를 지향하고 있음
- 이에 본 연구에서는 Hydra모델을 대상으로 환경의 PAHs(2차년도) 및 POPs(3차년도) 노출에 의한 DNA methylation과 관련된 후성유전학 연구를 계획하였음

마. 다환방향족탄화수소류(polycyclic aromatic hydrocarbon, PAHs)의 선정

- PAH류는 화석연료의 연소 또는 산업활동에 의하여 생성되는 오염물질로서, 많은 양의 다환방향족탄화수소가 공업화된 지역의 담수 및 해양 침전물에서 전세계적으로 검출되고 있음. 다환방향족탄화수소는 부유물질에 흡착하고 수계 바닥으로 침전되어 저질토에 축적되며, 고농도의 다환방향족탄화수소는 저서생물의 돌연변이를 유발하거나 사멸시키는 등의 효과를 나타내는 것으로 알려져 있음
- 본 연구에서는 PAHs류 중 발암1등급으로 분류되는 benzo[a]pyrene(BaP)를 대상물질로 선정함

(1) 실험농도의 결정

- Hydra를 대상으로 한 BaP 노출 조건을 확립하기 위해, BaP에 대한 반수치사농도(Lethal concentration 50, LC₅₀)를 결정함(표 2.1.2)

표 2.1.2. Hydra에서의 benzo[a]pyrene 반수치사농도.

Exposure time	LC ₅₀ (mg/L, ppm)
24 h	78.5
48 h	56.6
72 h	28.9

(2) Hydra의 두부 재생 저해

- BaP 노출에 의해 Hydra의 두부 재생이 저해됨을 확인함
- 두부 재생은 LC₅₀의 1/1000 농도(58 µg/L)에서 50%정도 저해되며, 1/500(116 µg/L)에서 100% 저해됨을 확인함(그림 2.1.5)



그림 2.1.5 BaP 노출에 의해 두부 재생이 저해되는 농도

(3) Hydra의 budding 저해

- 두부재생을 저해하는 농도에서 Hydra의 무성생식방법인 budding도 저해되는 것을 확인함(그림 2.1.6)

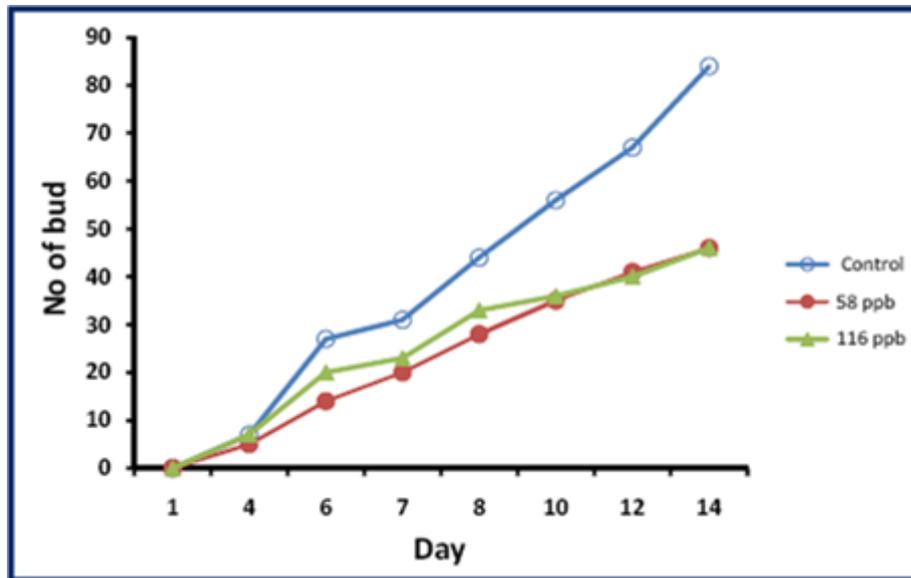


그림 2.1.6 BaP 노출에 의한 budding 저해

(4) BaP 노출에 의한 Hydra의 차등 발현 유전자 프로파일링

- BaP 노출에 의해 발현량이 변화되는 유전자들을 확인하기 위해, 48 h LC₅₀(56.6 mg/L)의 약 1/100에 해당하는 500 µg/L에 Hydra 20 개체를 각각 4 h, 12 h, 24 h, 48 h 동안 노출함
- 각 노출군으로부터 RNA를 추출하고, 이로부터 cDNA를 합성함
- 1차년도에 개발된 17K HEGEM(Hydra Expressed Gene Microarray)를 이용하여 차등 발현 유전자 프로파일링을 수행함(그림 11). 대략적인 방법은 아래와 같음
- 형광물질이 라벨링된 cRNA 시료를 Qiagen PCR purification kit을 사용하여 정제하고, 증류수로 용출함
- 정제된 형광표지-cRNA 시료를 hybridization buffer (3x SSC, 0.3% SDS, 50% formamide, 20 ug Cot-1 DNA, 20 ug yeast tRNA)에 첨가한 후, microcon YM-30으로 농축하여 hybridization mixture를 만들었다. Hybridization mixture를 95°C로 3분 동안 가열하여 변성시키고 12,000 g에서 30초간 원심분리하며 온도를 식힘

- 제조된 Hydra Oligo-DNA 마이크로어레이에 coverslip을 덮고, 변성시킨 hybridization mixture를 pipetting하였다. 마이크로어레이를 GT-Hyb Chamber에 넣고 65°C에서 16시간 동안 반응시킴
- Hybridization이 끝난 후, chamber에서 마이크로어레이를 꺼내어 아래의 순서대로 세척과정을 수행하고, 마이크로어레이를 spin하여 건조한 후 scanning할 때까지 암실에서 보관함
- 실험이 완료된 Hydra 마이크로어레이를 Axon GenePix 4000B scanner (Axon Instrument, USA)를 사용하여 scan하였다. GenePix Pro 6.0 program에서, scan image로 부터 각 spot을 gridding file을 이용하여 gridding하고, quantitation하여 각 spot의 Cy5/Cy3 intensity 및 ratio 등의 분석값이 포함된 GPR file을 얻었음
- GenePix Pro Program에서 얻어진 GPR file로부터, 분석 프로그램인 GeneSpring 7.3.1 (Agilent Technologies, USA)를 이용하여 분석을 수행함
- Normalization은 LOWESS (locally weighted regression scatterplot smoothing)를 이용하여 수행하였음
- Reliable gene은 sum of medians 값이 background 값보다 낮거나, 각 pixel 값의 표준편차가 유의하지 않은 spot을 flag-out함으로써 유의한 유전자를 얻었음
- Significant genes는 normalized ratio 값이 2배 이상 차이를 보이는 spot을 선별하였음(그림 2.1.7)

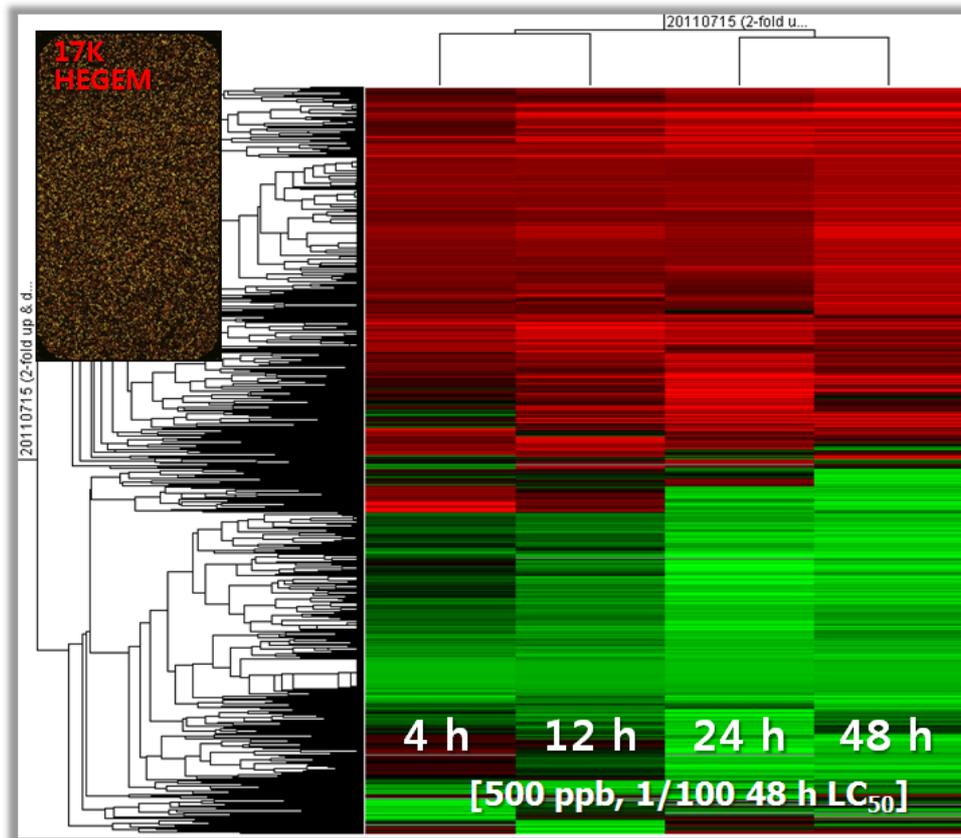


그림 2.1.7 Benzo[a]pyrene에 노출한 Hydra의 차등 발현 유전자 프로파일링 Hierarchical clustering 결과. 48-h LC₅₀의 약 1/50에 해당하는 500 µg/L(ppb)에 4 h, 12 h, 24 h, 48 h 노출

- 그 결과, 4 h 노출군에서는 84종의 유전자(증가 48종, 감소 36종); 12 h 노출군에서는 113종의 유전자(증가 77종, 감소 36종); 24 h 노출군에서는 242종(증가 117종, 감소 125종); 48 h 노출군에서는 273종(증가 165종, 감소 108종)의 유전자 발현이 변화되는 것으로 분석됨
- 노출 12 시간에서 24시간 사이에 변화되는 유전자의 수가 가장 많음. 이는 이 시간대에 급격한 대사/생리 변화가 일어나는 것으로 예측됨
- BaP 4 h 노출군에서의 주요 유전자 목록을 표 2.1.3에 나타냄. 이들을 유전자들을 기능적으로 고찰하면, 분자샤페론, 항산화효소, 발암, 세포사멸 및 조직괴사와 관련된 유전자들임

표 2.1.3 Hydra BaP 4 h 노출군에서 발현량이 변화되는 주요 유전자 목록

Gene	FC
cathepsin L (LOC100200698), partial mRNA	2.11
heat shock protein 90, alpha (cytosolic), class A member 1	4.55
heat shock protein 70 (LOC100197471), partial mRNA	2.13
Glutathione S-transferase (LOC100197231), mRNA	2.25
small heat shock protein (LOC100197466), partial mRNA	2.14
Calpain-5 (LOC100211449), mRNA	2.62
matrix metalloproteinase (LOC100204953), partial mRNA	2.04
Ks1 protein (LOC100200902), mRNA	2.11
caspase 7 (LOC100198668), mRNA	2.26
eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 3	0.43
tetraspanin 33 (LOC100206274), partial mRNA	0.31

- BaP 12 h 노출군에서의 주요 유전자 목록을 표 2.1.4에 나타냄. 이들을 유전자들을 기능적으로 고찰하면, 4 h 노출군에서 얻어진 유전자 이외에 발생, 염증형성, 칼슘대사, Na-K channel, 선천성 면역과 관련된 유전자들임

표 2.1.4 Hydra BaP 12 h 노출군에서 발현량이 변화되는 주요 유전자 목록

Gene	FC
NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex 4, complementation group C	2.28
heat shock protein 90, alpha (cytosolic), class A member 1	2.82
cathepsin L-like protease (LOC100208195), partial mRNA	3.88
IkappaB kinase gamma (LOC100213125), mRNA	2.05
Glutathione S-transferase (LOC100197231), mRNA	2.17
small heat shock protein (LOC100197466), partial mRNA	3.85
heat shock protein 70 (LOC100198161), mRNA	2.84
vascular endothelial growth factor (LOC100207228), mRNA	13.49
noggin 1 (LOC100203713), mRNA	2.79
oxidative stress protein (LOC100206573), mRNA	2.09
SNF1-like kinase 2 (LOC100213733), mRNA	6.73
Ks1 protein (LOC100200902), mRNA	2.59
caspase 7 (LOC100198668), mRNA	2.18
Sox17 alpha (LOC100203472), mRNA	2.28
SRY-box containing gene 32 (LOC100204062), mRNA	0.39
homeobox protein Otx (LOC100211908), mRNA	0.45
Calmodulin CG8472-PA (LOC100204134), partial mRNA	0.50
potassium channel homolog (LOC100207261), mRNA	0.37
hydra Na channel 3 (LOC100203341), mRNA	0.46
	0.45

- BaP 24 h 노출군에서의 주요 유전자 목록을 표 2.1.5에 나타냄. 이들을 유전자들을 기능적으로 고찰하면, 주로 신경세포 관련, 신경전달, 선천성 면역, 종양형성 관련 유전자들임

표 2.1.5 Hydra BaP 24 h 노출군에서 발현량이 변화되는 주요 유전자 목록

Gene	FC
vasa-related protein CnVAS1 (LOC100201627), mRNA	2.42
NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex 4	2.92
caspase 3 preproprotein (LOC100209053), mRNA	2.17
mediator of DNA damage checkpoint 1 (LOC100213447), mRNA	2.45
Glutathione S-transferase (LOC100197231), mRNA	4.02
heat shock protein 70 (LOC100198161), mRNA	2.37
heat shock protein 90, alpha (cytosolic), class A member 1	4.27
IkappaB kinase gamma (LOC100213125), mRNA	2.29
small heat shock protein (LOC100197466), partial mRNA	2.39
stress-induced-phosphoprotein 1 (Hsp70/Hsp90-organizing protein)	2.08
SNF1-like kinase 2 (LOC100213733), mRNA	2.95
caspase 7 (LOC100198668), mRNA	2.30
neogenin (LOC100200275), partial mRNA	2.17
pellino homolog 1 (LOC100204963), mRNA	2.32
complement component C3-like protein	2.00
DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 3	2.05
forkhead box-containing transcription factor FoxQ2b	0.49
homeodomain protein Otx (LOC100207886), mRNA	0.35
Sox17 alpha (LOC100203472), mRNA	0.18
SRY-box containing gene 32 (LOC100204062), mRNA	0.19
Hym-176 preprohormone (LOC100207343), mRNA	0.28
Hym-355 preprohormone (LOC100199707), mRNA	0.46
calcium transporter 2 (LOC100201352), partial mRNA	0.34
Calmodulin CG8472-PA (LOC100204134), partial mRNA	0.14
potassium channel homolog (LOC100207261), mRNA	0.20
Potassium voltage-gated channel subfamily A member 1	0.42
hydra Na channel 4 (hynac4), partial mRNA	0.37
hydra Na channel 2 (LOC100202608), partial mRNA	0.31
calcium channel, voltage-dependent, alpha2/delta subunit 1	0.35
goosecoid (LOC100200175), mRNA	0.43
cholinergic receptor, nicotinic, alpha 9 (LOC100199590), mRNA	0.34
deleted in colorectal carcinoma (LOC100215940), mRNA	0.38
Epidermal growth factor receptor (LOC100199166), partial mRNA	0.42
TNF-receptor-associated factor 1 (LOC100203793), mRNA	0.32

Rho GTPase activating protein 6 (LOC100215916), mRNA	0.35
Neuronal acetylcholine receptor subunit alpha-7 periculin (LOC100200672), mRNA	0.20 0.37

- BaP 48 h 노출군에서의 주요 유전자 목록을 표 2.1.6에 나타냄. 이들을 유전자들을 기능적으로 고찰하면, DNA 수선, 유비퀴티나이션, 발생/분화, 종양 및 발암 관련 유전자들로 파악됨

표 2.1.6 Hydra BaP 48 h 노출군에서 발현량이 변화되는 주요 유전자 목록

Gene	FC
senataxin (LOC100204258), mRNA	2.27
vasa-related protein CnVAS1 (LOC100201627), mRNA	2.34
NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex 4	5.81
RAD50 homolog (<i>S. cerevisiae</i>) (LOC100205929), mRNA	3.21
cathepsin L (LOC100200698), partial mRNA	2.13
DnaJ subfamily A member 2 (LOC100198371), mRNA	2.34
Glutathione S-transferase (LOC100197231), mRNA	5.87
heat shock protein 70 (LOC100198161), mRNA	6.62
heat shock protein 90, alpha (cytosolic), class A member 1	4.76
IkappaB kinase gamma (LOC100213125), mRNA	2.66
ubiquitin specific peptidase 8 (LOC100201504), mRNA	2.15
vascular endothelial growth factor (LOC100207228), mRNA	3.69
caspase 7 (LOC100198668), mRNA	2.46
Cd36/Scavenger receptor class B, member 1-like protein	2.21
FAT tumor suppressor homolog 4 (LOC100200979), mRNA	2.40
neogenin (LOC100200275), partial mRNA	2.46
notch (LOC100208285), mRNA	2.17
novel EGF domain containing protein partial mRNA	2.42
TNF-receptor-associated factor 1 (LOC100204426)	2.16
tyrosine kinase receptor (LOC100197897), mRNA	9.00
aquaporin 9a (LOC100207715), partial mRNA	0.40
translationally controlled tumor protein (LOC100203271), mRNA	0.29
Sox17 alpha (LOC100203472), mRNA	0.47
fibroblast growth factor 24 (LOC100213078), mRNA	0.49
Hym-176 preprohormone (LOC100207343), mRNA	0.24
Hym-355 preprohormone (LOC100199707), mRNA	0.46
ferritin (LOC100206743), mRNA	0.48
potassium channel homolog (LOC100207261), mRNA	0.30
ropporin 1-like (LOC100198973), mRNA	0.41
calcium channel, voltage-dependent, alpha2/delta subunit 1	0.45
Calmodulin (CaM) (LOC100209403), mRNA	0.49
cholinergic receptor, nicotinic, alpha 9 (LOC100199590), mRNA	0.43
deleted in colorectal carcinoma (LOC100215940), mRNA	0.41
TNF-receptor-associated factor 1 (LOC100203793), mRNA	0.45
EGF-like module containing, mucin-like sequence 4	0.42

- 결론적으로 BaP 노출 초기, Hydra는 산화스트레스를 받게되며, 이를 포함한 다양한 스트레스를 극복하기위해 분자샤페론의 발현 증가가 유도됨
- 노출 12시간이 되면, 발생, 염증형성, 칼슘대사, Na-K channel, 면역계의 이상이 초래되는 것으로 예측됨
- 노출 24시간이 되면, 신경계 및 면역계에 이상이 초래되며, 종양형성도 유도됨
- 노출 48시간이 지나면, DNA 손상이 심각해져, DNA 수선과 관련된 유전자의 발현이 유도되며, 다양한 단백질들이 손상으로 입어 이들을 분해하기 위해 표지하는 유비퀴티네이션이 증가됨. 또한 발생/분화에 이상이 초래되며, 종양 및 발암이 유도되는 것으로 분석됨
- 노출 시간에 따라 변화되는 차등 발현 유전자들의 기능을 고찰함으로써, Hydar의 생리/대사 변화 양상을 예측할 수 있었음. 따라서 이와 같은 연구방법은 앞으로 환경유해화학물질의 생물독성기전연구는 물론, 각종 질병의 유발 가능성을 예측하는 연구에 적용될 수 있을 것으로 생각됨

바. 지속성유기화합물(persistent organic pollutants, POPs)의 선정

- 과불소화합물 (PFCs: Perfluorinated Compounds)은 새롭게 POPs로 분류되는 물질로써, 환경오염을 유발시키는 신종 오염물질임. 설치류나 원숭이 대상실험에서 발암성이 입증되었음. PFOS(Perfluorooctane sulfonate) 및 PFOA(Perfluorooctanoate) 로 대표되는 과불소화합물 (Perfluorinated compounds, PFCs)은 우수한 발수성, 발유성, 방수성등의 특징으로 인해 표면코팅제, 계면활성제등의 관련물질에 사용되고 있을 뿐 아니라, 발수성 의류, 화장품, 샴푸, 건축자재, 자동차 내장재, 주방용품의 코팅제등 광범위하게 사용되고 있는 물질임
- 본 연구에서는 PFC류중 PFOS를 대상물질로 선정함

(1) 실험농도의 결정

- Hydra를 대상으로 한 PFOS 노출 조건을 확립하기 위해, BaP에 대한 반수치사농도(Lethal concentration 50, LC₅₀)를 결정함(표 2.1.7)

표 2.1.7 Hydra에서의 benzo[a]pyrene 반수치사농도

Exposure time	LC ₅₀ (mg/L, ppm)
24 h	71.0
48 h	27.2
72 h	ND

(2) Hydra의 두부 재생 저해

- PFOS 노출에 의해 Hydra의 두부 재생이 저해됨을 확인함
- 두부 재생은 LC₅₀의 1/100 농도(710 µg/L)에서 50%정도 저해되며, 1/50(1420 µg/L)에서 100% 저해됨을 확인함(그림 2.1.8)



그림 2.1.8 PFOS 노출에 의해 두부 재생이 저해되는 농도

(3) Hydra의 budding 저해

- 두부재생을 저해하는 PFOS 노출 농도에서 Hydra의 무성생식방법인 budding도 저해되는 것을 확인함(그림 2.1.9)

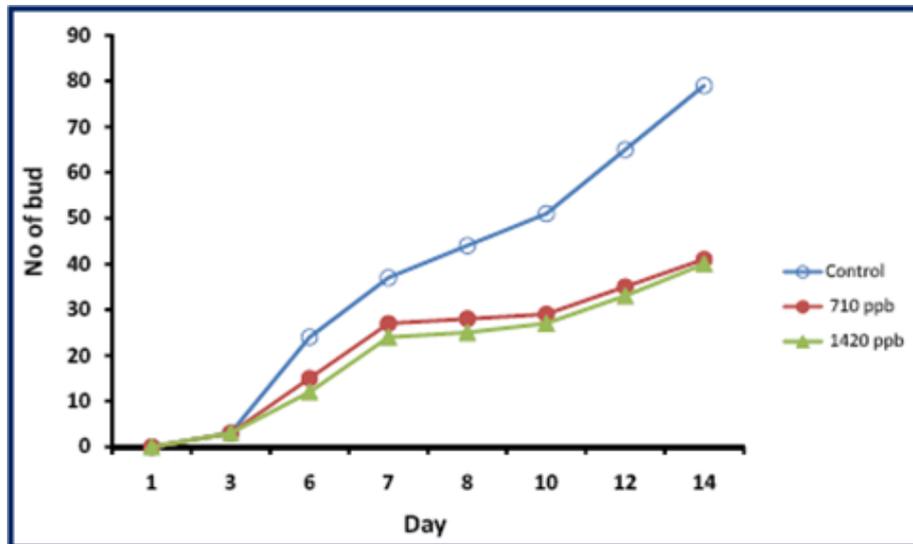


그림 2.1.9 PFOS 노출에 의한 budding 저해

(4) PFOS 노출에 의한 Hydra의 차등 발현 유전자 프로파일링

- PFOS 노출에 의해 발현량이 변화되는 유전자들을 확인하기 위해, 48 h LC₅₀(56.6 mg/L)의 약 1/100에 해당하는 300 µg/L에 Hydra 20 개체를 각각 4 h, 12 h, 24 h, 48 h 동안 노출함
- 각 노출군으로부터 RNA를 추출하고, 이로부터 cDNA를 합성함
- 1차년도에 개발된 17K HEGEM(Hydra Expressed Gene Microarray)를 이용하여 차등 발현 유전자 프로파일링을 수행함(그림 2.1.10). 그 방법은 BaP 노출군의 경우와 같음

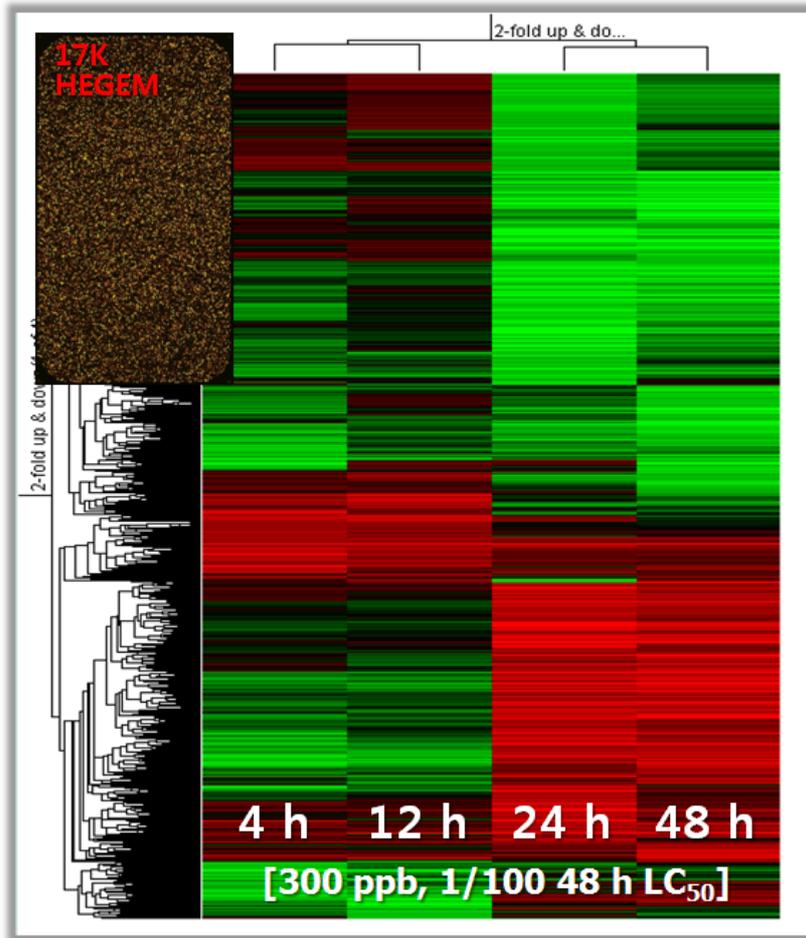


그림 2.1.10 PFOS에 노출한 Hydra의 차등 발현 유전자 프로파일링 Hierachial clustering 결과. 48-h LC₅₀의 약 1/100에 해당하는 300 µg/L(ppb)에 4 h, 12 h, 24 h, 48 h 노출

- 그 결과, 4 h 노출군에서는 204종의 유전자(증가 33종, 감소 171종); 12 h 노출군에서는 100종의 유전자(증가 21종, 감소 79종); 24 h 노출군에서는 832종(증가 425종, 감소 407종); 48 h 노출군에서는 622종(증가 302종, 감소 320종)의 유전자 발현이 변화되는 것으로 분석됨
- 노출 12 시간에서 24시간 사이에 변화되는 유전자의 수가 가장 많음. 이는 이 시간대에 급격한 대사/생리 변화가 일어나는 것으로 예측됨
- 이들 유전자들 중, 24시간 노출군과 48시간 노출군에서 공통적으로 발현량이 변화되는 유전자들을 선별하고, 3배이상 발현량이 변화되는 유전자들을 재선별하였음. 이들중 발현량이 증가되는 유전자들을 표 2.1.8에, 감소되는 유전자들을 표 2.1.9에 나타내었음

표 2.1.8 PFOS 24 시간 및 48 노출군에서 발현량이 4배 이상 증가되는 Hydra 유전자 목록

Gene	Fold Change
8(R)-lipoxygenase	22.18
PPOD2 peroxidase	18.34

chondroitin 4-sulfotransferase	18.28
NIDogen (basement membrane protein family member (nid-1)	12.29
Maltase-glucoamylase, intestinal	10.41
putative sulfate transporter of the SLC26A11 family	9.45
Rh type B glycoprotein-like protein	9.40
hydra Na channel 2	9.32
solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 10	8.83
HyTSR1 protein	7.61
complement component C3-like protein	7.27
hemicentin 1	7.26
Glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase 1	7.21
Transmembrane protein 104	7.19
PPOD2 peroxidase-like mRNA	7.18
bactericidal/permeability-increasing protein	6.31
glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 2	5.97
TIP120 protein	5.78
Hexosaminidase domain-containing protein	5.76
antistasin	5.62
putative peroxidase PPOD1	5.41
EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1	5.10
nucleoporin 214kDa	5.01
plastin 3	4.89
Protein sel-1 homolog 1	4.85
ornithine aminotransferase, mitochondrial	4.82
hippocampus abundant gene transcript 1	4.80
DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC2	4.76
signal recognition particle 54kDa	4.72
solute carrier family 40 (iron-regulated transporter), member 1	4.60
Methionine synthase reductase, mitochondrial	4.47
sp4 protein	4.32
PAPS synthetase	4.26
tubulin, beta, 2	4.26
cathepsin L	4.25
Actin, non-muscle 6.2	4.24
retinol dehydrogenase 12	4.21
Pck2 protein	4.15
peroxidase ppod11	4.13
cathepsin B	4.10
novel EGF domain containing protein	4.01
dynein, cytoplasmic 1, intermediate chain 2	4.00
Sodium/nucleoside cotransporter 2	3.97

carbonic anhydrase 1	3.95
Ring canal kelch protein	3.95
thrombospondin 1	3.93
dipeptidyl-peptidase 7	3.92
ADAM DEC1	3.83
Glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] 2	3.82
thrombospondin type 1 repeat-containing protein 2	3.80
carbonic anhydrase VII	3.79
glycogen phosphorylase	3.70
WntX2	3.70
ATP-binding cassette transporter sub-family A	3.70
Kelch-like protein 3	3.63
out at first protein	3.63
patatin-like phospholipase domain containing 7	3.63
selenium binding protein 1	3.59
alanine-glyoxylate transaminase 1	3.58
chitinase	3.56
hydra Na channel 4 (hynac4)	3.55
THO complex 6 homolog	3.54
MMS19 nucleotide excision repair homolog	3.51
folate hydrolase	3.51
Phenylalanyl-tRNA synthetase beta chain	3.48
Carnitine O-palmitoyltransferase 2, mitochondrial	3.46
Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 23	3.45
Alpha-1,6-mannosylglycoprotein 6-beta-N-acetylglucosaminyltransferase B	3.45
FAH protein	3.43
astacin-like protein-like protein	3.39
Rhesus blood group-associated glycoprotein	3.38
carnitine acetyltransferase	3.37
solute carrier family 39 (metal ion transporter), member 11	3.36
Glycoprotein 3-alpha-L-fucosyltransferase A	3.35
phytochelatin synthase	3.34
beta-N-acetylglucosaminidase	3.32
pancreatic lipase-related protein	3.30
ATPase type 13A3	3.29
solute carrier family 2, (facilitated glucose transporter), member 8	3.28
Oxct1 protein	3.25
urocanase domain containing 1	3.23
beta-1,3-glucanase, basic	3.23
oxysterol binding protein-like 11	3.22

putative ascorbate peroxidase	3.21
Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 13	3.21
tankyrase 1	3.20
cytochrome b-245, beta polypeptide	3.19
SET and MYND domain containing 4	3.10
HrES-AP	3.08
phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class S	3.06
Myotubularin-related protein 5	3.04
Homeobox protein PKNOX2	3.04
strumpellin	3.03
dihydropyrimidinase	3.02
Zinc metalloproteinase nas-15	3.02
DAZ associated protein 1	3.00

표 2.1.9 PFOS 24 시간 및 48 노출군에서 발현량이 4배 이상 감소되는 Hydra 유전자 목록

Gene	Fold Change
AHNAK nucleoprotein	-13.11
ADAM metalloproteinase domain 22 isoform 5 preproprotein	-9.94
novel EGF domain containing protein	-7.83
Uromodulin	-7.79
viral A-type inclusion protein	-7.21
Transmembrane cell adhesion receptor mua-3	-6.77
Latrophilin-2	-6.08
Mucin-12	-5.70
235 kDa rhoptry protein	-5.60
thymidylate kinase family protein	-5.50
thrombospondin type 1 repeat-containing protein 2	-5.33
egf-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like sequence 1	-5.33
endozepine	-5.27
6-phosphogluconate dehydrogenase	-5.25
ankyrin 2,3/unc44	-5.24
ankyrin repeat protein	-5.21
Ks1 protein	-5.01
cyclin B	-4.94
KSI	-4.74
interferon regulatory factor 1	-4.64
tyrosine kinase receptor	-4.52
tuftelin interacting protein 11	-4.51
DNA recombination/repair protein	-4.51

NOP14 nucleolar protein homolog	-4.49
utrophin	-4.30
Ks1-3 protein	-4.21
TNF receptor-associated factor 3 interacting protein 1	-4.19
contactin 5	-4.19
Protein FAM151A, transcript variant 1	-4.16
carnitine acetyltransferase	-4.11
Stretchin-Mlck	-4.10
RAB18B, member RAS oncogene family	-4.06
GTPase-activating protein 69C CG4237-PA	-3.93
Protein FAM151A, transcript variant 2	-3.91
spermidine/spermine N1-acetyltransferase family member 2	-3.88
UDP-glucose pyrophosphorylase 2	-3.88
Pericentriolar material 1 protein	-3.80
tropomyosin 3	-3.78
mutated in colorectal cancers	-3.77
tetratricopeptide repeat domain 25	-3.76
Kinesin-Like Protein family member (klp-6)	-3.74
Nob1p-prov protein	-3.67
ADP-ribosylation factor-like 11	-3.61
NLR family, pyrin domain containing 4A	-3.52
Deoxyribonuclease-2-beta	-3.50
variable membrane protein	-3.49
SET domain and mariner transposase fusion	-3.49
P2X-like receptor	-3.47
Autocrine motility factor receptor	-3.40
PAK5 protein	-3.37
serine/threonine kinase 33	-3.34
coiled-coil domain containing 40	-3.32
eukaryotic translation termination factor 1	-3.31
Probable tubulin polyglutamylase TTLL9	-3.29
cubilin (intrinsic factor-cobalamin receptor)	-3.27
budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog, beta	-3.25
swiprosin	-3.23
Lipoxygenase homology domain-containing protein 1	-3.23
Lamb1-1 protein	-3.22
Protein yippee-like 1	-3.19
asparagine-rich antigen	-3.14
structural maintenance of chromosomes protein	-3.11
putative transaldolase	-3.11
collagen	-3.10

WHiTe (Drosophila) related ABC transport family member (wht-8)	-3.07
protein-tyrosine kinase	-3.07
receptor for egg jelly 6	-3.06
Ion peptidase 1, mitochondrial	-3.05
IAP-associated factor Viaf1, transcript variant 1	-3.05
cell cycle associated protein 1	-3.05
Ninein-like protein	-3.04
leucine rich repeat containing 50	-3.01

사. BaP 및 PFOS 노출에 의한 Hydra의 DNA methylation 분석

- DNA methylation이란, 유전물질인 DNA의 구성단위인 cytosine의 5번 탄소의 메틸화를 뜻하는 것으로, 가장 일반적인 후성유전학적 변이임
- 포유동물에서 이러한 변화는 CpG dinucleotide에서만 일어남. 특히 CpG dinucleotide가 풍부한 지역을 CpG island (CGI)라고 표현을 하는데, 유전자의 프로모터 부위에 주로 존재함
- 특정 환경 하에서 프로모터 CGI의 과메틸화(hypermethylation)는 해당 유전자의 발현 억제를 유도하고, 저/비메틸화 (hypomethylation)는 과발현을 유도함
- 이러한 메틸화 변화 현상을 '후성유전적 변이'라고 하며, 암을 포함한 다양한 질병의 원인으로 알려져 있음
- 이에 본 연구에서는 BaP 및 PFOS 노출에 의한 Hydra의 메틸화 표적을 발굴하여, 후성유전적 변이를 분석하고자, methylated DNA isolation assay 및 methylation 프로파일링을 계획하였음
- 즉, BaP 및 PFOS 노출 차등유전자 발현 프로파일링을 수행한 동일한 조건의 BaP 및 PFOS 노출군에 대해, 1차년도에 개발된 ENVIHaz-HymMet Array를 이용하여, DNA methylation을 분석함(그림 12)
- Hydra에서의 메틸화 표적 발굴 및 표적 후보의 선별을 위해 다음과 같은 과정을 수행하였으며, 그 과정을 도식화하면 그림 13과 같음

(1) Hydra 메틸화 표적 발굴

- 각 노출군(4 h, 12 h, 24 h, 48 h) 및 노출하지 않은 대조군에서 DNA를 추출함
- 초음파 분쇄 (~500 bp 이하)된 처리군과 대조군 genomic DNA 각 500 ng을 2.0 ug의 MBD2bt과 4°C에서 4시간 동안 incubation하여 메틸화 DNA와 MBD2bt 단백질과의 결합반응을 유도하였음
- 비특이적으로 결합되거나 결합하지 않은 DNA를 제거하기 위하여 washing buffer를 이용하여 2회 세척하였음
- MBD2bt에 결합된 메틸화 DNA를 분리하기 위하여 Qiagen PCR purification kit를 사용하여 처리군과 대조군으로부터 메틸화 DNA를 분리하였음
- 분리된 DNA들을 whole genome amplification kit (Sigma)를 사용하여 증폭하였음
- 증폭된 DNA를 대조군은 Cy3 그리고 처리군은 Cy5로 표지한 후 15K ENVIHaz-HymMet Array(히드라 CpG microarray)에 65°C에서 16시간 동안 혼성화 시켰음

- 혼성화가 끝난 후 비특이적 혼성화 그리고 혼성화되지 않은 DNA를 일련의 세척과정을 거쳐서 제거한 후 Agilent DNA microarray scanner를 사용하여 혼성화 image를 작성하고, Feature Extraction software v. 9.3을 사용하여 각 프로브의 signal intensity를 계산하였음

·Hydra 메틸화 표적 후보 선별

- 처리군과 대조군 사이에 차별적으로 메틸화된 표적 유전자를 선별하기 위하여 GeneSpring GX 7.3 프로그램 (Agilent)을 사용하여 data normalization을 수행하고, 대조군과 처리군 간의 상대적인 메틸화 정도를 분석하였음

- 메틸화 표적 후보유전자를 선별하기 위하여 대조군과 처리군 간의 상대적인 메틸화 차이가 4.0배 이상인 CpG 프로브들을 선별하였음

- 이로부터 보다 유의성 높은 표적을 다시 선별하기 위하여 500 bp 이내 거리에서 2개 이상의 CpG 프로브가 메틸화 양성 또는 음성을 나타내는 표적을 최종 후보군으로 선별하였음. 대략적인 실험방법을 그림 2.1.11에 나타내었음

Control vs. Treat

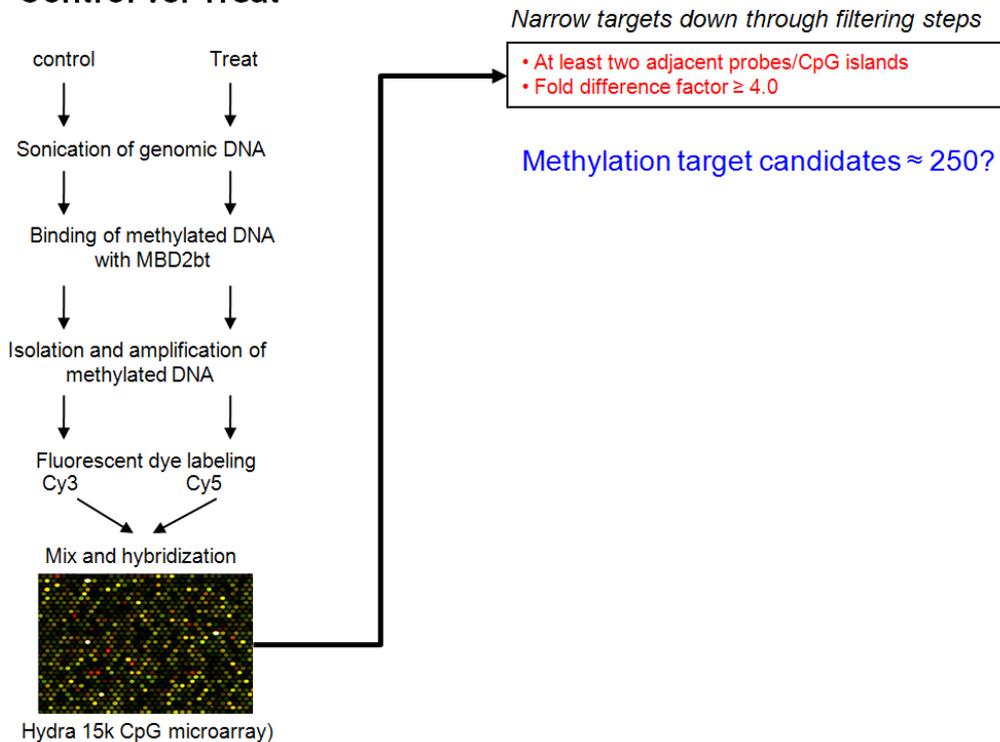


그림 2.1.11 Hydra 메틸화 표적 선별 과정

(2) BaP 노출군

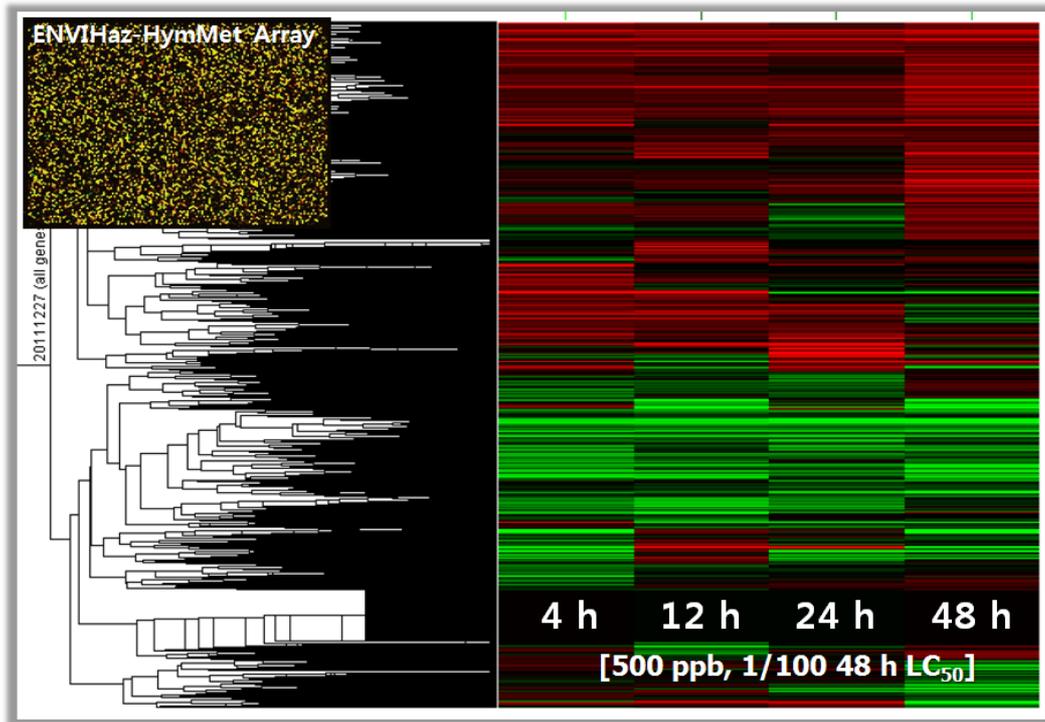


그림 2.1.12 BaP 노출에 의한 Hydra DNA methylation 분석. Hierarchical clustering 결과. 48-h LC₅₀의 약 1/50에 해당하는 500 µg/L(ppb)에 4 h, 12 h, 24 h, 48 h 노출

- 각 노출군(4 h, 12 h, 24 h, 48 h)에서 공통적으로 hypermethylation 및 hypomethylation이 일어난 부위를 확인함
- Hypermethylated되는 probe 65종(표 2.1.10), hypomethylated 되는 probe 171종(표 2.1.11)이 확인되었음

표 2.1.10 Benzo[a]pyrene 노출에 의해 모든 노출군에서 hypermethylated되는 probe.

	B(a)P 4h	B(a)P 12h	B(a)P 24h	B(a)P 48h
Hydra194990177.00-07182	3.90	2.24	4.61	2.07
Hydra94803015.00-00364	4.51	12.77	6.25	13.27
Hydra94843262.00-00136	2.08	2.94	2.88	4.16
Hydra94879904.00-02239	18.92	13.26	20.94	54.85
Hydra94895638.00-00043	11.36	9.15	2.89	15.10
Hydra94975139.00-00294	3.79	2.02	3.22	11.75
Hydra94975139.00-00296	4.04	2.30	3.61	17.69
Hydra94975139.00-00299	3.92	2.34	3.86	15.24
Hydra94992363.00-00492	63.44	7.44	11.56	40.68
Hydra94992363.00-00493	32.97	4.23	12.17	44.10
Hydra94992363.00-00494	46.42	4.24	14.65	44.07

Hydra94992363.00-00495	53.77	4.47	11.57	43.08
Hydra94992363.00-00496	41.02	5.05	7.00	40.76
Hydra94992363.00-00497	45.42	5.17	7.99	38.61
Hydra94992363.00-00498	38.51	5.24	8.81	37.40
Hydra94992363.00-00499	35.78	5.16	15.42	54.04
Hydra94992363.00-00500	32.02	5.76	15.93	46.61
Hydra94992363.00-00501	39.32	6.08	14.03	51.02
Hydra95000983.00-00114	5.51	3.78	2.41	6.58
Hydra95000983.00-00116	5.17	3.70	2.45	7.14
Hydra95000983.00-00118	6.07	3.71	2.36	7.02
Hydra95000983.00-00119	5.56	3.45	2.48	7.98
Hydra95000983.00-00120	4.90	3.42	2.36	7.25
Hydra95000983.00-00121	5.35	3.51	2.27	7.72
Hydra95000983.00-00122	4.59	3.41	2.33	7.48
Hydra95000983.00-00123	5.41	3.58	2.09	8.00
Hydra95000983.00-00124	5.51	3.48	2.37	7.88
Hydra95009602.00-00365	4.62	4.75	4.44	6.24
Hydra95009602.00-00366	4.31	4.03	4.61	6.13
Hydra95009602.00-00367	4.13	3.66	4.06	5.90
Hydra95009602.00-00368	3.53	3.09	3.80	4.94
Hydra95009602.00-00369	3.48	2.71	3.60	4.46
Hydra95009602.00-00370	3.63	2.58	2.88	4.08
Hydra95009602.00-00371	3.07	2.15	2.98	3.98
Hydra95010188.00-00531	2.39	2.24	2.15	2.69
Hydra95010188.00-00532	2.47	2.19	2.10	2.89
Hydra95010188.00-00534	2.33	2.13	2.06	2.71
Hydra95010188.00-00539	2.14	2.15	2.10	2.20
Hydra95010188.00-00540	2.12	2.11	2.14	2.21
Hydra95010188.00-00541	2.14	2.17	2.18	2.27
Hydra95010852.00-00221	5.33	3.33	3.25	3.86
Hydra95010852.00-00222	5.13	2.73	3.24	3.84
Hydra95010852.00-00223	4.63	2.78	2.39	3.44
Hydra95010852.00-00224	4.49	2.25	2.91	3.35
Hydra95010852.00-00225	4.32	2.16	2.80	3.44
Hydra95011010.00-00410	2.17	2.52	2.57	2.41
Hydra95011010.00-00411	2.63	2.44	2.58	2.78
Hydra95011010.00-00412	2.04	2.37	2.76	2.86
Hydra95011423.00-00439	6.12	10.88	5.48	3.56
Hydra95022926.00-00034	2.49	6.98	7.39	11.60
Hydra95025205.00-00365	3.01	5.84	3.65	32.02
Hydra95026730.00-00161	6.66	3.20	3.95	11.77

Hydra95026730.00-00162	6.46	2.89	3.90	12.09
Hydra95047394.00-00283	2.55	3.04	2.34	3.72
Hydra95047394.00-00327	2.01	2.66	2.24	2.83
Hydra95047518.00-00311	2.56	2.42	2.31	2.67
Hydra95049772.00-00492	4.06	2.21	5.95	2.45
Hydra95051238.00-00013	7.46	3.99	3.22	12.43
Hydra95051238.00-00014	7.37	3.31	3.71	10.54
Hydra95051238.00-00015	7.30	4.46	4.03	12.18
Hydra95051238.00-00016	8.38	5.65	2.72	12.66
Hydra95051811.00-00444	18.93	6.16	2.18	13.02
Hydra95069477.00-00072	14.76	3.25	13.92	43.49
Hydra95091244.00-00614	9.43	2.83	6.95	24.73
Hydra95091244.00-00672	4.58	3.62	5.05	11.28

표 2.1.11 Benzo[a]pyrene 노출에 의해 모든 노출군에서 hypomethylated되는 probe.

	B(a)P 4h	B(a)P 12h	B(a)P 24h	B(a)P 48h
Hydra94797358.00-00327	0.35	0.43	0.49	0.32
Hydra94797358.00-00328	0.28	0.37	0.47	0.29
Hydra94797358.00-00329	0.26	0.34	0.43	0.28
Hydra94797358.00-00330	0.25	0.32	0.47	0.25
Hydra94797358.00-00331	0.28	0.31	0.47	0.24
Hydra94804734.00-07802	0.41	0.47	0.26	0.46
Hydra94804963.00-00312	0.42	0.40	0.49	0.28
Hydra94831512.00-03623	0.47	0.50	0.40	0.47
Hydra94848266.00-00063	0.07	0.17	0.41	0.05
Hydra94848266.00-00064	0.05	0.16	0.45	0.04
Hydra94848266.00-00065	0.06	0.18	0.46	0.06
Hydra94848266.00-00067	0.06	0.19	0.47	0.06
Hydra94849358.00-01897	0.40	0.34	0.18	0.26
Hydra94849358.00-01898	0.34	0.31	0.28	0.42
Hydra94849358.00-01899	0.26	0.30	0.17	0.25
Hydra94849358.00-01900	0.33	0.26	0.21	0.27
Hydra94849358.00-01901	0.30	0.34	0.18	0.25
Hydra94849358.00-01902	0.32	0.36	0.30	0.37
Hydra94849358.00-01903	0.36	0.33	0.32	0.46
Hydra94849358.00-01904	0.34	0.33	0.19	0.28
Hydra94861052.00-01180	0.20	0.27	0.24	0.37
Hydra94861052.00-01715	0.22	0.18	0.20	0.23
Hydra94861052.00-01735	0.23	0.39	0.28	0.25
Hydra94861052.00-01755	0.17	0.19	0.19	0.21

Hydra94897384.00-01981	0.20	0.15	0.26	0.17
Hydra94898509.00-08514	0.19	0.21	0.19	0.34
Hydra94898535.00-11690	0.37	0.24	0.23	0.37
Hydra94898535.00-11692	0.47	0.38	0.31	0.27
Hydra94898535.00-11693	0.31	0.36	0.26	0.45
Hydra94898535.00-11694	0.43	0.46	0.33	0.32
Hydra94898535.00-11695	0.44	0.44	0.37	0.42
Hydra94905937.00-00689	0.17	0.16	0.16	0.17
Hydra94915618.00-03306	0.07	0.49	0.06	0.07
Hydra94915662.00-04465	0.34	0.35	0.24	0.24
Hydra94915805.00-08067	0.20	0.23	0.22	0.32
Hydra94918725 -00978	0.25	0.25	0.25	0.31
Hydra94926548.00-21539	0.28	0.34	0.27	0.35
Hydra94926548.00-21544	0.27	0.27	0.22	0.29
Hydra94926548.00-21545	0.24	0.22	0.27	0.27
Hydra94926548.00-21546	0.22	0.28	0.21	0.32
Hydra94927332.00-00320	0.42	0.40	0.50	0.28
Hydra94932455.00-00037	0.42	0.46	0.37	0.38
Hydra94936914.00-08231	0.31	0.32	0.31	0.47
Hydra94936914.00-08291	0.19	0.19	0.17	0.25
Hydra94936949.00-14467	0.23	0.22	0.25	0.26
Hydra94941618.00-01081	0.41	0.45	0.33	0.36
Hydra94941618.00-01082	0.39	0.44	0.35	0.32
Hydra94947238.00-03485	0.13	0.17	0.14	0.19
Hydra94957180.00-02340	0.26	0.26	0.20	0.18
Hydra94964906.00-01030	0.15	0.15	0.21	0.21
Hydra94969035.00-00480	0.25	0.19	0.22	0.37
Hydra94969035.00-00481	0.19	0.20	0.13	0.30
Hydra94969035.00-00482	0.23	0.16	0.16	0.39
Hydra94969035.00-00483	0.22	0.18	0.18	0.30
Hydra94969035.00-00484	0.24	0.19	0.17	0.24
Hydra94969035.00-00485	0.20	0.14	0.16	0.30
Hydra94972172.00-00123	0.23	0.28	0.26	0.35
Hydra94974850.00-00450	0.13	0.10	0.11	0.10
Hydra94974850.00-00451	0.14	0.11	0.14	0.13
Hydra94974850.00-00452	0.12	0.22	0.11	0.09
Hydra94974850.00-00453	0.13	0.10	0.09	0.09
Hydra94974850.00-00454	0.11	0.08	0.09	0.08
Hydra94974850.00-00455	0.09	0.09	0.08	0.09
Hydra94974850.00-00456	0.10	0.09	0.09	0.07
Hydra94974850.00-00457	0.11	0.08	0.10	0.08

Hydra94974850.00-00458	0.09	0.08	0.07	0.07
Hydra94974850.00-00459	0.09	0.06	0.10	0.06
Hydra94977440.00-00492	0.36	0.33	0.38	0.13
Hydra94977440.00-00493	0.32	0.30	0.40	0.10
Hydra94977440.00-00494	0.31	0.32	0.42	0.12
Hydra94977440.00-00495	0.32	0.30	0.43	0.11
Hydra94977440.00-00496	0.32	0.32	0.44	0.13
Hydra94977440.00-00497	0.30	0.32	0.45	0.13
Hydra94977440.00-00498	0.30	0.32	0.43	0.14
Hydra94977440.00-00499	0.27	0.32	0.45	0.13
Hydra94977440.00-00500	0.30	0.31	0.45	0.13
Hydra94981138.00-11583	0.47	0.31	0.32	0.38
Hydra94981189.00-11016	0.15	0.13	0.20	0.16
Hydra94981189.00-11017	0.15	0.16	0.19	0.18
Hydra94981189.00-11018	0.17	0.15	0.21	0.15
Hydra94981189.00-11019	0.17	0.18	0.21	0.20
Hydra94981189.00-11020	0.19	0.18	0.21	0.20
Hydra94981189.00-11021	0.15	0.15	0.25	0.16
Hydra94981189.00-11022	0.16	0.16	0.21	0.19
Hydra94981189.00-11023	0.19	0.16	0.20	0.20
Hydra94981189.00-11024	0.17	0.16	0.20	0.20
Hydra94981189.00-11025	0.18	0.18	0.21	0.22
Hydra94981971.01-00055	0.37	0.31	0.18	0.06
Hydra94991765.00-13661	0.24	0.26	0.16	0.17
Hydra94992741.02-18422	0.28	0.37	0.39	0.35
Hydra94992741.02-18423	0.21	0.30	0.22	0.24
Hydra94992741.02-18429	0.38	0.35	0.29	0.21
Hydra94992741.02-18430	0.40	0.40	0.41	0.47
Hydra94992741.02-18431	0.38	0.48	0.36	0.49
Hydra94992741.02-18433	0.28	0.39	0.37	0.32
Hydra94992741.02-18434	0.24	0.30	0.22	0.30
Hydra94992741.02-18435	0.28	0.34	0.28	0.40
Hydra94993161.01-00077	0.10	0.10	0.42	0.49
Hydra94993161.01-00097	0.06	0.07	0.33	0.31
Hydra94993161.01-00117	0.07	0.08	0.37	0.26
Hydra94993161.01-00137	0.06	0.05	0.41	0.10
Hydra94993161.01-00483	0.50	0.16	0.03	0.02
Hydra94993161.01-00582	0.18	0.16	0.14	0.19
Hydra94993161.01-00602	0.18	0.18	0.16	0.20
Hydra94993161.02-00296	0.14	0.13	0.15	0.18
Hydra94993161.02-00297	0.14	0.13	0.12	0.13

Hydra94993161.02-00298	0.14	0.15	0.16	0.15
Hydra94993161.02-00299	0.15	0.14	0.15	0.14
Hydra94993161.02-00300	0.14	0.14	0.13	0.13
Hydra94993161.02-00301	0.15	0.14	0.17	0.15
Hydra94993161.02-00302	0.13	0.12	0.14	0.13
Hydra94993161.02-00303	0.15	0.11	0.13	0.14
Hydra94993161.02-00304	0.13	0.13	0.13	0.16
Hydra94993161.02-00305	0.12	0.12	0.12	0.13
Hydra94993331.00-39795	0.22	0.34	0.25	0.39
Hydra95000318.00-00684	0.36	0.33	0.29	0.43
Hydra95000318.00-00685	0.26	0.26	0.19	0.23
Hydra95000318.00-00686	0.20	0.18	0.16	0.19
Hydra95000318.00-00687	0.20	0.14	0.15	0.16
Hydra95000318.00-00688	0.14	0.13	0.13	0.14
Hydra95025324.01-00478	0.48	0.49	0.16	0.23
Hydra95025324.01-00479	0.42	0.43	0.14	0.23
Hydra95025324.01-00480	0.47	0.47	0.16	0.22
Hydra95025324.01-00481	0.43	0.45	0.16	0.28
Hydra95025324.01-00482	0.48	0.44	0.11	0.17
Hydra95025324.02-00644	0.16	0.33	0.20	0.14
Hydra95026264.00-00122	0.07	0.07	0.34	0.43
Hydra95026264.00-00153	0.06	0.06	0.39	0.12
Hydra95026264.00-00623	0.13	0.10	0.11	0.14
Hydra95026264.00-00680	0.09	0.16	0.26	0.08
Hydra95026264.00-00710	0.10	0.14	0.33	0.11
Hydra95045201.00-06992	0.08	0.08	0.13	0.10
Hydra95046351.02-04795	0.11	0.11	0.13	0.12
Hydra95048964.00-00077	0.33	0.20	0.39	0.10
Hydra95049817.00-17353	0.44	0.34	0.28	0.36
Hydra95057010.00-00909	0.22	0.32	0.27	0.30
Hydra95064893.00-00648	0.31	0.19	0.36	0.43
Hydra95069477.00-00434	0.11	0.09	0.13	0.48
Hydra95078547.00-00446	0.43	0.46	0.10	0.23
Hydra95078899.00-00002	0.18	0.27	0.27	0.13
Hydra95079859.00-00609	0.23	0.15	0.10	0.19
Hydra95079859.00-00610	0.23	0.17	0.10	0.20
Hydra95079859.00-00611	0.27	0.18	0.11	0.20
Hydra95079859.00-00612	0.28	0.19	0.11	0.21
Hydra95079859.00-00613	0.25	0.20	0.10	0.18
Hydra95079859.00-00614	0.24	0.19	0.10	0.16
Hydra95079859.00-00615	0.24	0.23	0.11	0.19

Hydra95079859.00-00616	0.22	0.21	0.11	0.17
Hydra95079859.00-00617	0.23	0.25	0.10	0.20
Hydra95079859.00-00618	0.22	0.25	0.13	0.19
Hydra95084222.01-00022	0.39	0.46	0.39	0.48
Hydra95084222.01-00100	0.48	0.32	0.28	0.30
Hydra95084222.01-00516	0.20	0.22	0.48	0.31
Hydra95084222.02-00223	0.25	0.29	0.31	0.37
Hydra95085837.01-03156	0.06	0.19	0.03	0.04
Hydra95087354.00-00440	0.22	0.22	0.20	0.16
Hydra95087354.00-00441	0.26	0.23	0.21	0.22
Hydra95087354.00-00442	0.32	0.24	0.23	0.22
Hydra95087354.00-00443	0.36	0.26	0.25	0.24
Hydra95087354.00-00444	0.50	0.24	0.36	0.35
Hydra95087354.00-00446	0.49	0.33	0.37	0.29
Hydra95088728.00-00265	0.11	0.14	0.30	0.13
Hydra95088728.00-00266	0.11	0.13	0.30	0.13
Hydra95088728.00-00267	0.12	0.14	0.35	0.17
Hydra95088728.00-00358	0.12	0.13	0.10	0.11
Hydra95088728.00-00359	0.14	0.14	0.11	0.12
Hydra95088728.00-00360	0.13	0.20	0.13	0.12
Hydra95088728.00-00361	0.12	0.15	0.10	0.13
Hydra95088728.00-00362	0.13	0.14	0.10	0.11
Hydra95091244.00-00105	0.23	0.28	0.42	0.39
Hydra95091244.00-00224	0.26	0.47	0.23	0.31

(3) PFOS 노출군

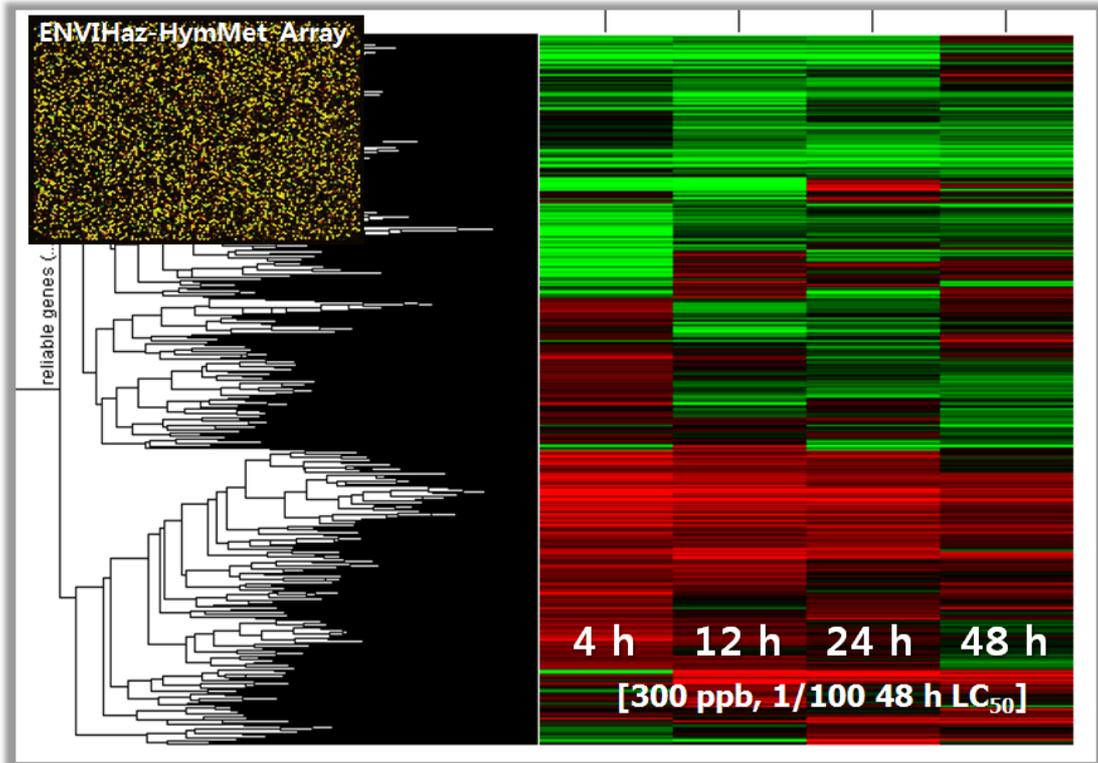


그림 2.1.13 PFOS 노출에 의한 Hydra DNA methylation 분석. Hierarchical clustering 결과. 48-h LC₅₀의 약 1/50에 해당하는 300 µg/L(ppb)에 4 h, 12 h, 24 h, 48 h 노출

- 각 노출군(4 h, 12 h, 24 h, 48 h)에서 공통적으로 hypermethylation 및 hypomethylation이 일어난 부위를 확인함(그림 2.1.13)
- Hypermethylated되는 probe 138종(표 2.1.12), hypomethylated 되는 probe 112종(표 2.1.13)이 확인되었음

표 2.1.12 PFOS 노출에 의해 모든 노출군에서 hypermethylated되는 probe

	PFOS 4h	PFOS 12h	PFOS 24h	PFOS 48h
Hydra94803015.00-00121	4.02	8.01	4.54	4.08
Hydra94803015.00-00181	6.64	3.56	5.47	3.47
Hydra94803015.00-00201	9.25	5.11	5.89	4.33
Hydra94843262.00-00116	5.55	5.70	3.57	2.32
Hydra94843262.00-00136	6.96	5.06	3.13	2.26
Hydra94843262.00-00179	4.59	5.04	2.96	2.10
Hydra94843262.00-00205	5.05	4.31	3.15	2.23
Hydra94880643.00-07671	3.16	3.66	7.65	4.09
Hydra94895638.00-00377	8.81	3.56	2.73	2.95
Hydra94895638.00-00397	8.95	3.88	3.05	3.29
Hydra94895638.00-00417	16.92	6.77	5.42	6.63

Hydra94896091.00-00251	8.14	4.64	3.02	2.72
Hydra94896091.00-00255	7.41	4.74	3.03	3.02
Hydra94896091.00-00256	7.14	4.73	3.09	3.01
Hydra94896091.00-00257	7.60	4.68	3.05	3.05
Hydra94896091.00-00258	7.72	4.85	2.80	3.10
Hydra94896091.00-00259	7.40	4.43	2.69	2.66
Hydra94915686.00-04267	5.08	4.04	3.70	2.36
Hydra94921061.00-00553	9.18	5.44	7.58	2.88
Hydra94921061.00-00554	10.55	8.72	6.19	2.80
Hydra94921061.00-00555	10.83	6.47	6.79	2.99
Hydra94921061.00-00556	7.35	4.53	6.78	2.13
Hydra94921061.00-00557	7.77	5.33	5.18	2.34
Hydra94927468.00-00362	3.57	2.79	2.24	2.00
Hydra94927468.00-00363	3.76	2.96	2.38	2.09
Hydra94931798.00-00652	8.81	4.41	6.42	7.11
Hydra94934750.00-00346	4.83	4.63	2.99	2.15
Hydra94934750.00-00347	4.91	4.59	3.08	2.51
Hydra94934750.00-00348	4.59	4.39	2.60	2.24
Hydra94934750.00-00349	4.56	4.71	2.91	2.19
Hydra94934750.00-00350	4.73	4.51	3.00	2.17
Hydra94934750.00-00351	4.83	4.97	3.23	2.61
Hydra94934750.00-00352	4.76	4.80	2.78	2.30
Hydra94934750.00-00353	5.23	5.09	3.28	2.66
Hydra94934750.00-00355	4.98	5.38	3.32	2.35
Hydra94936911.00-00533	7.06	4.65	3.45	2.02
Hydra94964906.00-01186	3.32	4.24	4.37	3.12
Hydra94972228.00-00565	8.22	4.75	4.53	2.09
Hydra94972228.00-00568	6.90	4.31	3.47	2.04
Hydra94972228.00-00569	5.52	3.94	4.06	2.49
Hydra94973197.00-00517	8.16	4.26	4.54	2.40
Hydra94982205.00-00520	7.46	4.69	3.89	2.09
Hydra94982205.00-00521	7.35	4.32	3.73	2.13
Hydra94982205.00-00522	7.18	4.08	3.20	2.04
Hydra94982205.00-00523	8.10	4.05	3.65	2.03
Hydra95009647.00-00618	3.24	2.22	2.12	2.30
Hydra95010852.00-00221	2.18	6.03	4.50	3.71
Hydra95011370.00-00436	15.76	8.57	9.77	2.13
Hydra95011370.00-00437	13.47	9.25	9.44	2.08
Hydra95011370.00-00438	13.40	7.26	7.99	2.20
Hydra95011370.00-00439	14.67	7.92	9.41	2.05
Hydra95011370.00-00440	13.46	8.25	9.14	2.06

Hydra95011370.00-00441	19.18	9.85	10.45	2.32
Hydra95011370.00-00442	16.33	8.52	9.83	2.20
Hydra95023576.00-00478	6.40	6.94	7.44	10.65
Hydra95023576.00-00479	8.04	5.76	7.47	8.45
Hydra95023576.00-00484	8.08	6.53	7.72	9.39
Hydra95023576.00-00485	8.57	6.54	6.28	7.20
Hydra95023576.00-00486	10.91	5.47	7.53	9.22
Hydra95023576.00-00487	9.82	8.40	7.53	8.42
Hydra95023576.00-00488	9.85	6.26	7.85	9.87
Hydra95023576.00-00526	2.45	11.96	13.62	8.87
Hydra95023576.00-00527	3.33	11.55	9.10	6.24
Hydra95025114.01-00479	9.62	2.12	2.92	4.65
Hydra95025114.01-00482	14.88	2.02	4.67	5.26
Hydra95025324.02-00168	2.19	2.67	8.24	11.51
Hydra95025336.00-00565	12.70	10.71	9.69	3.72
Hydra95025336.00-00566	10.20	6.84	7.05	3.09
Hydra95025336.00-00567	11.02	5.10	7.57	2.62
Hydra95025336.00-00568	9.34	5.97	6.44	2.50
Hydra95025336.00-00569	7.89	6.60	5.26	2.24
Hydra95042104.00-00394	2.05	2.46	3.55	2.09
Hydra95047394.00-00263	5.67	4.51	2.72	2.63
Hydra95047394.00-00283	7.54	3.62	2.61	2.15
Hydra95047394.00-00303	11.63	3.62	2.62	2.50
Hydra95047394.00-00327	4.50	3.30	2.41	2.12
Hydra95047394.00-00348	5.15	4.88	3.32	2.58
Hydra95049772.00-00133	128.18	72.33	28.85	5.84
Hydra95050389.01-05039	2.45	5.95	5.16	8.06
Hydra95051811.00-00050	2.84	8.38	5.64	7.43
Hydra95051811.00-00070	4.93	12.48	9.18	12.50
Hydra95051811.00-00090	4.67	8.37	4.66	5.62
Hydra95051811.00-00110	5.89	6.25	2.85	4.72
Hydra95051811.00-00130	6.42	3.89	2.62	2.38
Hydra95052239.00-00156	5.22	23.17	12.25	13.34
Hydra95052296.00-00542	9.55	4.89	4.81	2.44
Hydra95052296.00-00543	9.00	4.65	5.62	2.12
Hydra95052296.00-00544	3.25	5.46	3.48	2.22
Hydra95052479.00-00264	6.59	3.66	4.73	2.63
Hydra95052479.00-00471	4.24	4.22	3.95	2.31
Hydra95052479.00-00491	4.63	3.31	2.49	2.10
Hydra95052485.00-00401	4.85	3.32	2.92	2.75
Hydra95052578.00-00376	62.05	22.12	33.10	18.74

Hydra95052578.00-00377	65.25	15.94	38.90	17.48
Hydra95052578.00-00378	70.74	7.37	21.90	27.43
Hydra95052578.00-00379	53.49	17.11	29.69	25.49
Hydra95052578.00-00380	47.14	16.17	30.54	28.58
Hydra95052578.00-00381	54.87	17.34	29.20	22.13
Hydra95052578.00-00382	55.23	16.67	26.94	19.28
Hydra95052578.00-00383	44.37	20.74	27.29	18.99
Hydra95052578.00-00384	49.05	27.01	29.13	22.44
Hydra95052578.00-00385	51.72	21.05	25.56	24.40
Hydra95062564.00-00557	7.05	5.74	4.17	2.45
Hydra95062564.00-00558	8.13	4.46	4.29	2.15
Hydra95062564.00-00559	7.18	4.81	3.47	2.05
Hydra95063726.00-00462	4.82	2.48	2.97	3.12
Hydra95063726.00-00463	4.05	2.82	2.02	2.37
Hydra95063726.00-00464	4.34	2.74	2.31	2.55
Hydra95063726.00-00465	3.54	2.69	2.25	2.57
Hydra95068298.00-00179	2.94	9.21	4.02	4.51
Hydra95068298.00-00199	3.62	5.23	3.28	2.88
Hydra95068553.00-00131	4.15	8.13	4.94	6.66
Hydra95068553.00-00164	4.56	8.23	5.22	6.47
Hydra95068553.00-00197	4.27	8.31	5.34	7.01
Hydra95068553.00-00230	4.22	8.22	5.07	6.80
Hydra95068553.00-00260	3.68	7.29	4.87	6.69
Hydra95068553.00-00293	4.30	7.97	5.32	6.97
Hydra95068553.00-00329	4.39	8.52	5.06	6.80
Hydra95068553.00-00359	3.95	6.91	4.70	5.91
Hydra95068553.00-00391	3.51	6.63	4.37	6.28
Hydra95068553.00-00434	4.14	8.36	4.79	6.50
Hydra95073437.00-00528	8.94	5.68	4.16	2.26
Hydra95073437.00-00529	7.38	5.08	4.16	2.18
Hydra95073437.00-00532	6.31	3.74	3.98	2.13
Hydra95079615.00-00299	5.22	12.79	4.20	4.89
Hydra95080336.00-00490	4.16	2.40	2.15	2.50
Hydra95080336.00-00491	3.65	2.58	2.46	2.72
Hydra95080336.00-00492	3.65	2.70	2.09	2.28
Hydra95080336.00-00493	3.91	2.92	2.51	2.88
Hydra95084077.00-00452	2.47	3.34	2.47	2.65
Hydra95085636.00-00293	4.90	3.05	2.16	2.62
Hydra95090984.00-00259	14.51	5.18	6.88	2.26
Hydra95090984.00-00260	15.23	5.02	5.87	2.48
Hydra95090984.00-00261	15.47	5.22	6.65	2.57

Hydra95090984.00-00262	16.74	5.22	5.77	2.70
Hydra95090984.00-00265	16.27	5.89	6.66	2.65
Hydra95090984.00-00266	16.80	6.11	6.27	2.79
Hydra95090984.00-00267	14.50	5.92	7.01	2.85

표 2.1.13 PFOS 노출에 의해 모든 노출군에서 hypomethylated되는 probe

	PFOS 4h	PFOS 12h	PFOS 24h	PFOS 48h
Hydra194929243.00-00326	0.20	0.24	0.35	0.29
Hydra94790354.00-00312	0.48	0.33	0.28	0.17
Hydra94797358.00-00331	0.22	0.34	0.43	0.31
Hydra94797358.00-00332	0.19	0.33	0.45	0.35
Hydra94797358.00-00333	0.18	0.34	0.42	0.37
Hydra94797358.00-00334	0.17	0.37	0.46	0.44
Hydra94804963.00-00312	0.21	0.25	0.34	0.26
Hydra94808907.00-00576	0.17	0.40	0.10	0.49
Hydra94808907.00-00577	0.17	0.30	0.10	0.41
Hydra94808907.00-00578	0.17	0.31	0.20	0.47
Hydra94808907.00-00579	0.13	0.28	0.17	0.47
Hydra94810921.00-00320	0.19	0.23	0.34	0.27
Hydra94817097.00-00316	0.21	0.25	0.35	0.28
Hydra94837382.00-00704	0.40	0.10	0.39	0.44
Hydra94844524.00-00748	0.40	0.13	0.45	0.49
Hydra94845096.00-00312	0.20	0.24	0.34	0.28
Hydra94848266.00-00072	0.09	0.08	0.07	0.33
Hydra94866629.00-00926	0.38	0.30	0.30	0.45
Hydra94868846.00-00549	0.46	0.22	0.46	0.49
Hydra94870782.00-00320	0.21	0.25	0.35	0.28
Hydra94877474.00-00227	0.42	0.09	0.41	0.39
Hydra94879773.00-00133	0.19	0.10	0.30	0.27
Hydra94889712.00-00024	0.04	0.17	0.46	0.32
Hydra94890847.00-00125	0.34	0.12	0.44	0.43
Hydra94892640.00-00310	0.21	0.27	0.38	0.31
Hydra94892899.00-00135	0.40	0.08	0.41	0.41
Hydra94895435.00-01497	0.38	0.13	0.43	0.48
Hydra94897271.00-01568	0.40	0.13	0.43	0.48
Hydra94898545.00-17463	0.45	0.33	0.28	0.41
Hydra94902664.00-00213	0.20	0.30	0.41	0.36
Hydra94904247.00-00320	0.21	0.24	0.35	0.28
Hydra94907079.00-01010	0.38	0.13	0.43	0.49
Hydra94910471.00-01016	0.37	0.13	0.43	0.49

Hydra94927332.00-00320	0.20	0.23	0.34	0.27
Hydra94931920.00-00323	0.20	0.25	0.35	0.30
Hydra94932455.00-00108	0.21	0.30	0.39	0.38
Hydra94933364.00-00820	0.19	0.18	0.13	0.25
Hydra94935762.00-00927	0.42	0.47	0.31	0.42
Hydra94936955.00-17533	0.48	0.31	0.27	0.46
Hydra94950456.00-00240	0.40	0.45	0.47	0.47
Hydra94957400.00-05844	0.14	0.06	0.21	0.35
Hydra94957435.00-00533	0.20	0.17	0.24	0.43
Hydra94957435.00-00534	0.22	0.17	0.20	0.29
Hydra94957435.00-00535	0.25	0.17	0.19	0.26
Hydra94957435.00-00536	0.24	0.20	0.18	0.26
Hydra94957435.00-00537	0.25	0.21	0.23	0.21
Hydra94974686.00-00253	0.12	0.08	0.06	0.06
Hydra94981189.00-11016	0.12	0.08	0.05	0.05
Hydra94981189.00-11017	0.15	0.08	0.03	0.08
Hydra94981189.00-11018	0.13	0.07	0.08	0.05
Hydra94981189.00-11019	0.14	0.10	0.07	0.07
Hydra94981189.00-11020	0.09	0.06	0.09	0.04
Hydra94981189.00-11021	0.11	0.03	0.06	0.05
Hydra94981189.00-11023	0.09	0.06	0.05	0.08
Hydra94981971.02-00152	0.07	0.07	0.02	0.40
Hydra94981971.02-00181	0.03	0.03	0.02	0.18
Hydra94981971.02-00221	0.05	0.07	0.21	0.03
Hydra94982993.02-00385	0.36	0.48	0.44	0.50
Hydra94993161.01-00097	0.08	0.05	0.08	0.15
Hydra94993161.01-00117	0.06	0.08	0.07	0.18
Hydra95000979.00-00062	0.05	0.04	0.03	0.47
Hydra95009259.00-00445	0.10	0.49	0.31	0.35
Hydra95022540.00-00543	0.31	0.27	0.40	0.31
Hydra95022540.00-00618	0.11	0.08	0.10	0.40
Hydra95023028.00-00576	0.09	0.07	0.08	0.43
Hydra95023028.00-00577	0.08	0.07	0.05	0.32
Hydra95023028.00-00578	0.07	0.06	0.10	0.35
Hydra95023028.00-00579	0.19	0.12	0.06	0.31
Hydra95023028.00-00580	0.24	0.12	0.08	0.33
Hydra95023028.00-00581	0.08	0.18	0.06	0.25
Hydra95025114.02-00171	0.49	0.10	0.37	0.41
Hydra95025324.02-00077	0.08	0.05	0.05	0.04
Hydra95025324.02-00572	0.06	0.05	0.04	0.05
Hydra95025324.02-00606	0.05	0.03	0.02	0.31

Hydra95026264.00-00122	0.06	0.07	0.04	0.28
Hydra95026264.00-00153	0.06	0.03	0.31	0.22
Hydra95045201.00-07126	0.37	0.35	0.37	0.48
Hydra95049772.00-00492	0.15	0.11	0.11	0.10
Hydra95049772.00-00529	0.04	0.15	0.06	0.02
Hydra95061603.00-04931	0.49	0.37	0.26	0.36
Hydra95061603.00-04933	0.42	0.38	0.27	0.39
Hydra95061603.00-04934	0.42	0.35	0.28	0.36
Hydra95061603.00-04935	0.43	0.32	0.30	0.37
Hydra95061603.00-04936	0.39	0.34	0.27	0.34
Hydra95061603.00-04937	0.40	0.35	0.27	0.35
Hydra95061603.00-04938	0.41	0.34	0.26	0.37
Hydra95064893.00-00329	0.09	0.06	0.04	0.08
Hydra95064893.00-00372	0.05	0.07	0.07	0.04
Hydra95066343.00-00274	0.07	0.26	0.19	0.36
Hydra95066343.00-00815	0.20	0.14	0.15	0.09
Hydra95066343.00-00845	0.08	0.12	0.06	0.05
Hydra95068178.04-14906	0.48	0.37	0.31	0.44
Hydra95068228.00-00438	0.04	0.03	0.39	0.03
Hydra95069336.01-00103	0.12	0.10	0.11	0.09
Hydra95069336.01-00134	0.06	0.06	0.05	0.46
Hydra95069336.01-00168	0.21	0.13	0.08	0.17
Hydra95069487.00-00407	0.31	0.06	0.04	0.07
Hydra95069487.00-00408	0.34	0.07	0.04	0.06
Hydra95069487.00-00409	0.18	0.05	0.04	0.04
Hydra95069487.00-00410	0.15	0.03	0.03	0.03
Hydra95069487.00-00411	0.13	0.03	0.04	0.03
Hydra95069487.00-00412	0.10	0.04	0.03	0.03
Hydra95078375.00-00386	0.15	0.12	0.08	0.48
Hydra95078375.00-00387	0.20	0.11	0.11	0.47
Hydra95078375.00-00388	0.08	0.08	0.10	0.41
Hydra95078899.00-00374	0.29	0.37	0.33	0.11
Hydra95084222.01-00022	0.14	0.12	0.09	0.15
Hydra95084222.02-00078	0.17	0.20	0.22	0.42
Hydra95084222.02-00223	0.15	0.11	0.15	0.14
Hydra95084222.02-00506	0.48	0.19	0.21	0.47
Hydra95084222.02-00562	0.10	0.05	0.07	0.33
Hydra95089757.00-00854	0.36	0.11	0.39	0.41

(아) DNA methylation 부위의 재확인

- 유해화학물질 노출 이후 확인된 hypermethylated 및 hypomethylated DNA 부위를 선별하여

이들의 methylation 변화를 재확인하였음

- 재확인은 MeDIA-PCR assay법을 통해 수행되었음(그림 2.1.14). 즉, 추출된 DNA를 분절화하고, methylated DNA binding domain(MBD2bt)와 혼합하여, methylated DNA와의 결합을 유도함
- 자석을 이용하여 methylated DNA 부위를 잡아당겨, enriched methylated DNA 시료를 확보함
- 확보된 시료를 주형으로, 선별된 methylated DNA target을 대상으로 디자인된 primer set을 이용하여 PCR을 수행함. PCR 조건은 95°C에서 10분간 변성화하고, 95°C에서 20초, primer에 최적화된 온도로 20초간 annealing, 72°C에서 20초간 extension 반응을 35-40 cycles 반응하였음. 이후 72°C에서 5분간 extension 반응이후 4°C에서 보존하였음

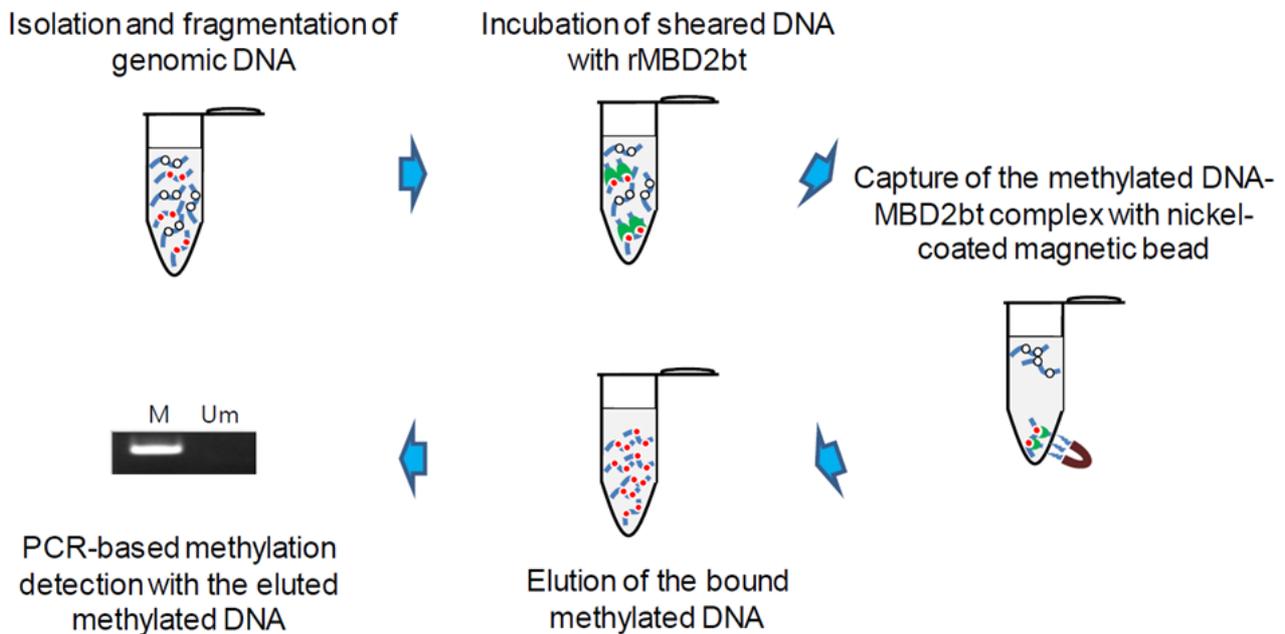


그림 2.1.14 유해화학물질 노출에 의한 DNA methylation의 변화 확인을 위한 MeDIA-PCR assay 모식도

- BaP 노출군에서 확인된 hypermethylated target 중, 94803015, 94889712, 95010852, 95069477 등 4종이 선별되었으며, hypomethylated targetd, 중, 94993161, 95084077, 95091244, 95091274 등 4종이 선별되었음
- 이들을 대상으로 진행된 MeDIA-PCR assay 결과를 그림 2.1.15에 나타내었음
- 그 결과 노출하지 않은 대조군(C)에 비해 노출한 실험군(B)의 경우, 증폭량이 많거나 (hypermethylated target), 증폭량이 적은 것(hypomethylated target)으로 확인되었음. 일반 DNA와 enriched methylate DNA에서의 결과를 비교해 본 결과, 후자의 경우가 뚜렷한 차이를 보이는 것으로 확인되었음

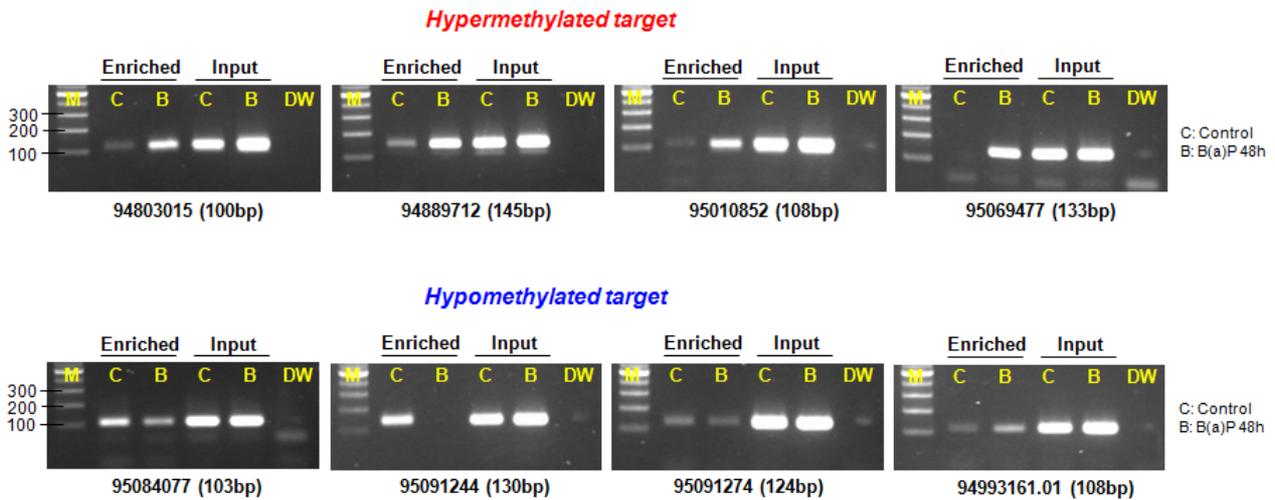


그림 2.1.15 선별된 methylation 변화 부위에 대한 MeDIA-PCR assay 결과

(자) Hydra 유전체 자료의 통합

- 다양한 생물학분야의 모델동물로 활용되고 있는 Hydra는 현재 유전체, EST, transcriptome 등에 대한 데이터가 생산되어 축적되어 있음. 미국의 National Center for Biological Information에는 785.56 M base의 유전체 정보 및 20,914 contig의 유전자 정보; 독일의 Compagen에는 HMGA T-CDS 19,845 유전자 정보가 확보되어 있음
- 본 연구에서도 환경화학물질 노출에 대한 유전자의 발현변화 데이터를 생산하였으며, DNA methylation 변화에 대한 데이터도 생산하였음
- 이러한 방대한 양의 빅데이터들은 각각 개별적으로 관리되고 있는바, 이들 자료의 원화한 활용을 위해서는 이들의 통합이 필수적임. 따라서 본 연구에서는 이들 자료의 통합을 시도하였음 (그림 2.1.16)

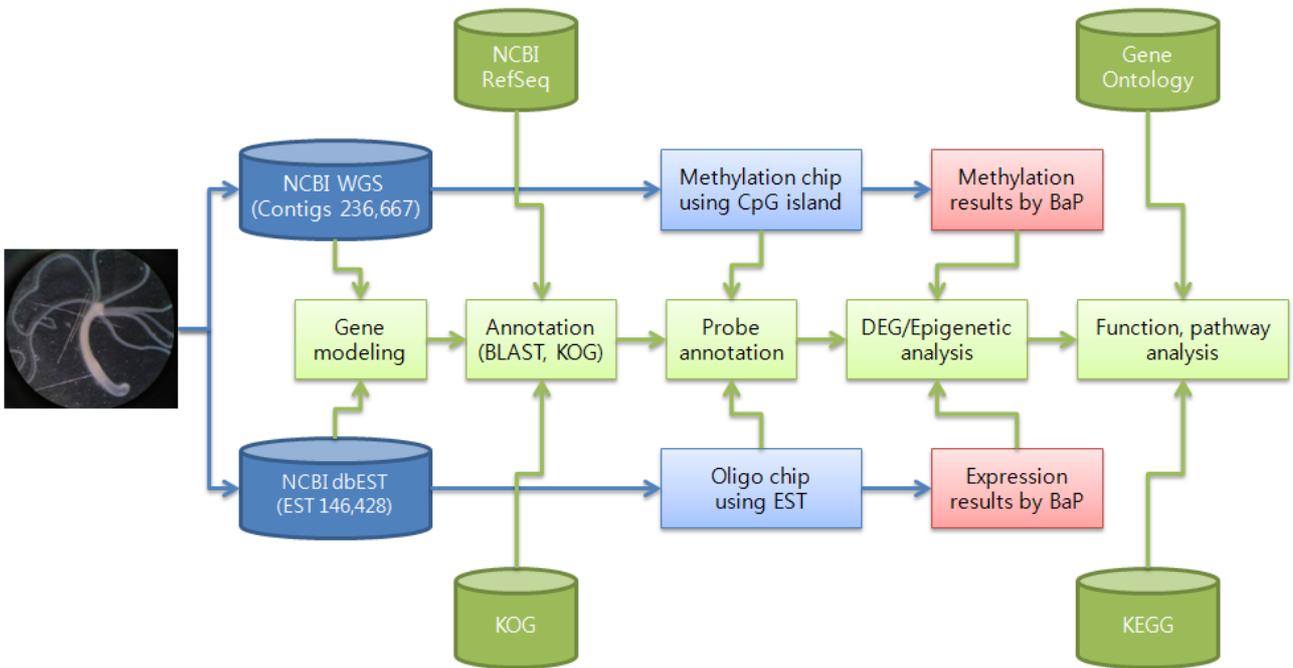


그림 2.1.16 Hydra 유전체 데이터 통합을 위한 자료분석 흐름도

- 그 결과는 Hydra Genome Database(hydra.labkn.net)에 수록되어 있음. JBrowse를 이용하여 그림 2.1.17과 같이 각각의 결과들을 한 화면에서 볼 수 있도록 데이터를 연동시키고 통합하였

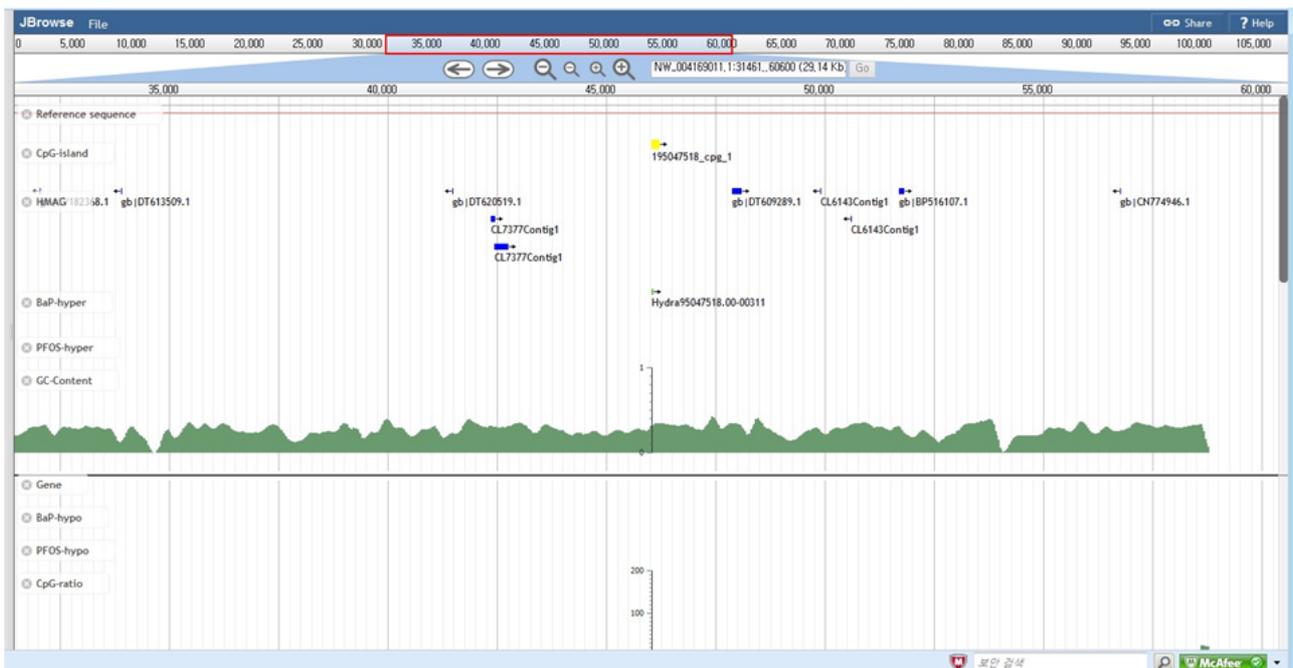


그림 2.1.17 통합 Hydra 유전체 정보 자료 화면

2. 내분비계 장애물질 Bisphenol A (BPA) 대응 qPCR Array Kit의 개발

- 내분비계 장애물질의 일종인 BPA는 1950년대부터 플라스틱 제품 제조에 널리 사용돼 온 화학물질로, 플라스틱뿐 아니라 콤팩트 디스크, 식품저장용 캔 내부 등을 만들 때 사용되고 있음
- 생활용품에 포함되어 생태계 및 인간에게 노출되는 확률이 점점 더 증가하면서 BPA의 독성 영향에 관한 연구들이 보고되고 있음
- 미 워싱턴포스트 (WP)는 "BPA의 암 유발 가능성에 대해 5등급 중 3등급인 '다소 우려 (some concern)'로 평가했으며 플라스틱 제품에 함유된 BPA는 암이나 심각한 장애를 일으킬 수 있음을 처음으로 제시하였음
- BPA는 에스트로겐과 유사한 작용을 하는 화학물질로 내분비 교란작용을 나타낼 가능성이 있는 물질로 분류되어 있으며, 지금까지 발표된 BPA에 의한 이상현상은 암세포 성장 자극, 주의력결핍과잉행동장애 (ADHD), 기형아, 유전자변형가능성 등이 있는 것으로 예측되고 있음
- 또한 전립선과 유선에서의 종양발생 및 생식기관 기형, 정자수 감소 등의 생식과 관련된 문제도 야기할 가능성 있는데, 이러한 생식능력의 약화는 점차 개체 수의 감소를 유도하여 장기적으로 생태계의 교란을 유발할 수도 있음
- 즉, BPA는 인간뿐만 아니라 생태계 생물체들에게까지 영향을 미쳐 생태계 교란을 일으킬 수 있다고 알려져 있으며, 특히, 폐기물과 같이 버려지는 생활용품들의 부식과정을 통해 수계로 흘러들어가 장기간에 걸쳐 수생태계를 파괴할 수 있는 잠재력을 가지고 있는 환경호르몬이라고 판단됨
- 이에 본 연구에서는 수생태계에서의 BPA 위해성 예측을 위해, 물벼룩 및 자바송사리 모델을 대상으로 qPCR Array Kit의 개발을 시도하였음

가. 물벼룩 모델의 BPA 대응 qPCR Array Kit의 개발

- (1) BPA 처리에 따른 유영저해율 (고농도, short-term exposure) EC50 농도 설정
- OECD Guideline의 물벼룩 모델을 이용한 물질처리 방법·순서에 따라, 우선 BPA의 최고농도를 100ppm으로 하여 물벼룩의 유영저해율을 관찰함. 이에 따라 100% 죽지 않는 적절한 EC (Effective Concentration) 농도를 설정하기 위해, BPA 농도 1.25, 2.5, 5, 10 및 20 ppm에 대한 노출 실험을 수행함
- Separation factor 2를 적용해 대조군을 포함한 6개의 그룹을 정하였음. 각 그룹 당 20마리의 물벼룩에 각각의 BPA 농도로 48시간 (short-term exposure)을 처리하였으며, 실험은 네 번 반복하였음
- Total value를 통해 물벼룩이 움직이는 능력이 50% 감소한 EC50 값은 10.9 ppm으로 결정되었음 (그림 2.1.18). 이 유영저해율 EC50 값은 BPA에 의한 물벼룩 내 유전자 발현 패턴 변화 및 독성 영향을 확인하는 microarray 실험을 위한 RNA sample을 추출하기 위해 물벼룩에 처리되는 농도로 이용되었음

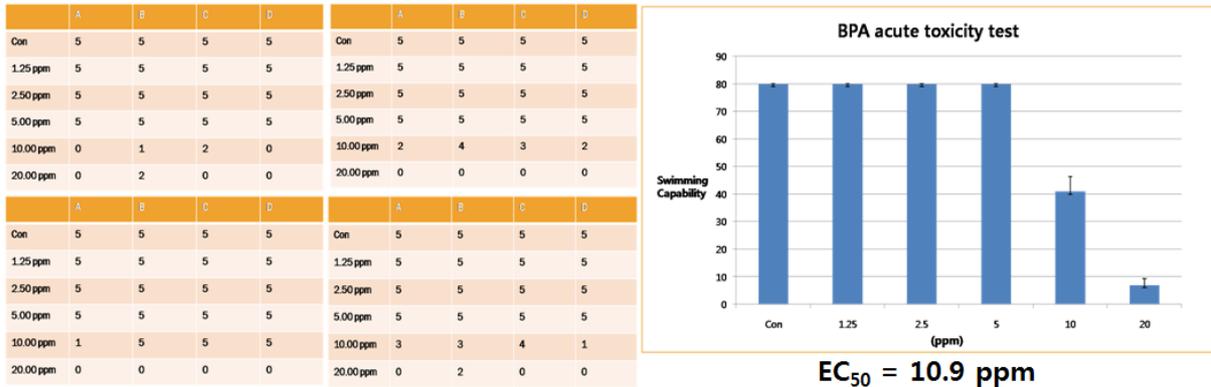


그림 2.1.18 BPA 처리에 의한 물벼룩의 유영저해율 EC50 값 설정

(2) BPA 처리에 따른 생식능 저해율 (저농도, long-term exposure) EC50 농도 설정

- BPA는 소량이라도 체내에 축적되는 특성이 있어 장기적으로 노출될 경우, 인간뿐만 아니라 생태계 구성원들의 체내에 축적되어 유해성을 나타낼 수 있음. 환경호르몬 물질이 최종적으로 수생태계로 흘러들어 축적된다는 점을 고려하여, BPA가 저농도로 수생물체에 장시간 노출되었을 때 어떠한 생식능력에 변화를 보이는지를 관찰하고자 OECD (경제협력개발기구), EPA (미국 환경보호청), ASTM (미국표준시험협회) 및 캐나다 환경부 등에서 수생독성평가를 위한 테스트 가이드라인 공식 생물종으로 추천된 물벼룩 (*Daphnia magna*) 모델을 이용하여 BPA 처리에 의한 물벼룩의 생식능저해율을 확인하였음
- BPA의 장기간 노출에 의한 생식능저해율을 측정하기 위해 유영저해율 결과를 바탕으로 죽지 않는 최고농도를 10 ppm으로 설정하고, separation factor 1.5를 적용하여 control 및 BPA 물질의 vehicle인 EtOH 그룹을 포함, 7개의 그룹을 설정하였음
- 각 그룹 당 10마리의 물벼룩이 사용되었으며, BPA 처리 후 한 마리 당 낳는 자식의 개체 수를 3주간 (long-term exposure) 매일 측정하여 평균값을 계산하였음. 아래의 왼쪽 표에 그 결과를 나타내었음(그림 2.1.19)
- 빈칸은 3주 동안 살아남지 못한 물벼룩을 나타냄. 본 실험을 통해, vehicle 물질은 물벼룩의 생식능력에 영향을 주지 않으며, 생식능을 50% 감소시키는 BPA의 농도 9.393 ppm을 얻었음
- 이 생식능저해율 EC50 값 역시 BPA 처리에 따른 물벼룩 내 생식 기능 저해와 관련된 유전체 발현변화를 분석하기 위한 microarray 실험의 노출 농도로 이용되었음

	Control	EtOH	1.97ppm	2.96ppm	4.44ppm	6.67ppm	10ppm
1	126	108	148	142	126	116	59
2	117	163	119	135	129	123	89
3	131	153	126	135	130	119	66
4	118	168	127	145	130	121	93
5	132	157	155	133	135	120	19
6	136	147	168	143	149	103	90
7	129	149	149	157	108	124	61
8	137	155	111	143	112	119	68
9	128				150	130	43
10							36

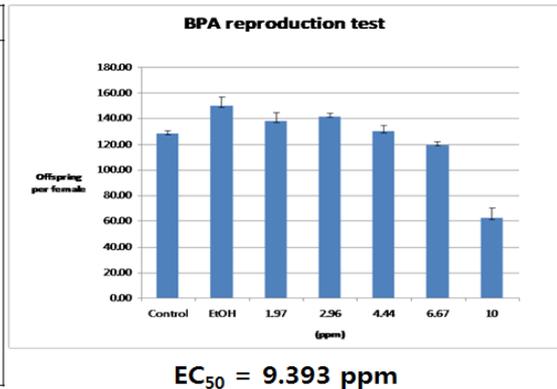


그림 2.1.19 BPA 처리에 의한 물벼룩의 생식능저해율 EC50 값 설정

(3) BPA 특이 유전체 발굴을 위한 Microarray 수행 및 분석

- 유해화학물질 BPA에 의한 민물 수생태종 물벼룩 내 유전자 발현 패턴 변화를 확인하여 BPA 특이 분자 독성 지표를 발굴하고자 microarray 실험을 수행하였음. 이를 위해, Agilent사의 4×44K의 크기의 chip을 사용하여, 한 시료 당 44000개의 유전자 발현 패턴을 관찰하였음
- Microarray 실험을 위한 시료는 control (EtOH), 유영저해율 EC50 및 생식능저해율 EC50 농도에 노출한 실험군으로부터 추출된 RNA를 사용하였으며(표 2.1.14), 1-color system을 이용하여 hybridization 과정을 수행하였고, 데이터의 분석에는 Subio program을 사용하였음
- 생식능력 평가 실험에서 얻어진 RNA sample을 이용한 microarray 결과에서는 2배 이상 과발현된 유전자가 897개, 2배 이하로 저발현된 유전자는 539개로 나타났음
- 급성 노출시 물벼룩의 움직임을 평가한 실험에서는 2배 이상 과발현된 유전자가 1343개, 2배 이하 저발현된 유전자가 1861개로 나타났으며, BPA 노출에 따라 많은 수의 물벼룩 유전자들이 발현변화가 유도되는 것을 확인하였음(표. 2.1.15 및 표 2.1.16)

표 2.1.14 유영저해율 및 생식능저해율 EC50 농도의 BPA 처리에 의해 추출된 물벼룩의 RNA 농도 결과

RNA 농도	ng/ul	260/280	260/230
Con 1	535.8	1.8	1.38
Con 2	365.3	1.84	1.71
Con 3	387.2	1.85	1.31
유영저해율EC50 1	113.2	2.01	2.21
EC50 2	129.8	2.05	2.27
EC50 3	95.2	2.05	2.21
생식능저해율EC50 1	345.5	1.78	0.67
EC50 2	420.5	1.78	0.97
EC50 3	344.6	1.73	0.76

표 2.1.15 생식능 평가 시료에서 2배 이상 과발현된 주요 유전자 목록

measurement ID	Fold Change	P-Value	EST
DM02776_1	4.893633	1.14E-05	ref NP_647796.1 CG14959CG14959-PA,isoformA
DM04737_1	3.930469	7.36E-05	ref YP_745284.1 undecaprenyl-phosphomannose: proteinmannosyltransferase
DM02776_2	5.570642	6.29E-05	ref NP_647796.1 CG14959CG14959-PA,isoformA
DM04737_2	3.297771	2.10E-04	ref YP_745284.1 undecaprenyl-phosphomannose: proteinmannosyltransferase
DMAG0001S00000013	6.615903	4.68E-04	#N/A
DMAG0001S000003200	2.728827	0.007848	Gallus gallus Rad54b (RAD54B) mRNA, complete cds.
DMAG0001S000007588	14.54328	2.44E-05	[AY119122]gi:21430608RE24790p[Drosophilamelanogaster]
DM01693_1	2.915701	7.42E-04	gb ABR92405.1 heatshockprotein70
DMAG0001S000002016	11.09037	1.31E-04	Drosophila melanogaster half pint mRNA, complete cds.
CU13619	3.194162	3.55E-04	TIGR(Not annotated)
DM01934_1	160.4162	3.54E-06	ref XP_975369.1 PREDICTED:similar to CG4702-PA
DM07197_2	8.108626	4.23E-05	gb AAK54282.1 AF081955_1 fatty acid 9-hydroperoxide lyase
DMAG0001S000004086	421.1792	2.29E-05	#N/A
DMAG0001S000002187	9.595828	8.18E-05	#N/A
DMAG0001S000008760	5.259269	7.84E-05	[AE003803]gi:7302804CG10939-PA[Drosophilamelanogaster]>gp:AY047533_1[AY047533]gi:15010434GH04176p[Drosophilame
DMAG0001S000003812	2.475925	0.006563	Oryzasativa(japonicacultivar-group)genomicDNA ,chromosome6,PACclone:P0513E02.>gb:AP005458_1852194Oryzasativa(
DMAG0001S000005061	7.547881	1.82E-05	Homo sapiens cDNA FLJ32731 fis, clone TESTI2001134.
DMAG0001S000009338	33.13485	1.93E-05	[AF428097]gi:16226511larvalcuticleproteinprecursor[Aprionagermari]

* 이들 유전자 외에 800여개 유전자가 과발현 되었음

표 2.1.16 생식능 평가 시료에서 2배 이하 저발현된 주요 유전자 목록

measurement ID	Fold Change	P-Value	EST
DM06426_1	0.111705	4.28E-05	ref XP_966720.1 PREDICTED:s imilartoCG6305-PA
DM07040_2	0.044923	2.67E-04	ref NP_779780.1 hypothetical proteinPD1587
DM06426_2	0.04476	2.41E-05	ref XP_966720.1 PREDICTED:s imilartoCG6305-PA
DM12727_2	0.319803	0.012267	0
DM00594_3	0.202477	5.59E-04	ref XP_624968.1 PREDICTED:s imilartoCG32795-PB,isoform B
DM02368_2	0.473196	0.002001	ref XP_779933.2 PREDICTED: hypotheticalproteinisoform1
DMAG0001S00001692	0.175347	0.003936	#N/A
DM05884_1	0.125053	4.83E-04	ref XP_001651376.1 hypotheticalproteinAaeL_AAEL015289
DMAG0001S00002980	0.439874	8.95E-05	Musmusculus16daysembryo headcDNA,RIKENfull-lengthenrichedlibrary,clone:C130093 E02product:CTL2PROTEINhomolog
DMAG0001S00007583	0.168744	3.98E-05	[A E 0 0 3 7 5 9] gi:23180013CG6134-PG [D r o s o p h i l a melanogaster]>gpu:AE003759_16 [AE003759] gi:23180013 CG6134-PG, isoform G
DM12571_1	0.261573	0.003302	0
DMAG0001S00001994	0.105239	6.39E-04	Drosophila melanogaster LP05062 full length cDNA.
DM00594_2	0.220555	0.00252	ref XP_624968.1 PREDICTED:s imilartoCG32795-PB,isoform B
DM01561_3	0.2105	3.00E-04	g b A A C 4 7 5 4 4 . 1 hemoglobin
DM00594_1	0.174842	5.60E-04	ref XP_624968.1 PREDICTED:s imilartoCG32795-PB,isoform B
DM01561_2	0.354474	0.001224	g b A A C 4 7 5 4 4 . 1 hemoglobin
DMAG0001S00005146	0.168951	3.69E-04	Drosophilamelanogasterchromosome2R,completesequence.>gb:AE003822_1226256Drosophilamelanogasterchromosome2R,sec

* 이들 유전자 외에 500여개 유전자가 저발현 되었음

(4) 선별된 과-저발현 유전자를 이용한 BPA focused array chip 설계 및 개발

- Microarray를 통해 확인된, 생식능력 평가 시료의 과발현 유전자 897개, 저발현 유전자 539개 및 유영능력 평가 시료의 과발현 유전자 1343개, 저발현 유전자가 1861개를 대상으로 BPA의 독성 분석에 최적화된 focused array chip을 설계하고 제작하였음
- 이때 사용된 과-저발현 유전자는 2배 이상 혹은 이하로 발현된 유전자들 중 물벼룩의 독성과 관련있는 유전자들만 선별하여 총 4000여개의 유전자를 3번 반복되도록 설계하고 8x15K의 크기로 제작하였음 (그림 2.1.20)
- 이러한 BPA-focused chip은 실제 BPA의 독성 연구에 유용하게 이용될 것으로 판단되며, 앞으로 qPCR Array Kit 제작에 있어 기본이 되는 DNA chip이라고 생각됨

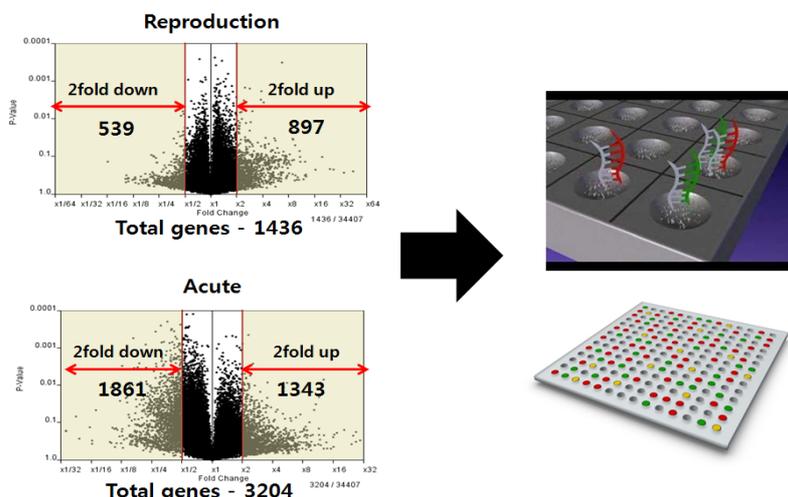


그림 2.1.20 Microarray를 통해 선별된 유전자를 이용한 BPA-focused array chip 제작

(5) BPA 반복 노출을 통한 BPA-focused array chip 검증

- 특정 유해화학물질에 focused array chip은 간편하면서도 정확하게 유해화학물질 특이적인 유전자 발현 패턴 변화를 확인할 수 있기 때문에 특정 유해화학물질의 오염정도를 손쉽게 판단할 수 있다는 장점을 가지고 있음
- 하지만 이러한 focused array chip은 충분한 반복 실험을 통해 신뢰성 있는 결과가 도출 되었을 때 그 가치를 인정받게 됨. 이에 BPA focused array chip의 신뢰성을 확인하고자 BPA 반복 노출을 통해 나타나는 유전자 발현 패턴 결과를 확인하였음
- BPA 반복노출은 BPA의 EC50 농도에 물벼룩을 노출 시킨 후 RNA를 추출하여 focused array chip 실험을 수행하였음. 그 결과, 탑재된 4000여개의 유전자 중 50%인 2000여개의 유전자들의 발현량이 2배 변화되는 것을 확인하였음
- 이러한 결과들을 통해 본 연구에서 제작된 BPA-focused array chip이 재현성 및 신뢰성이 높은 것으로 확인되었음 (그림 2.1.21)

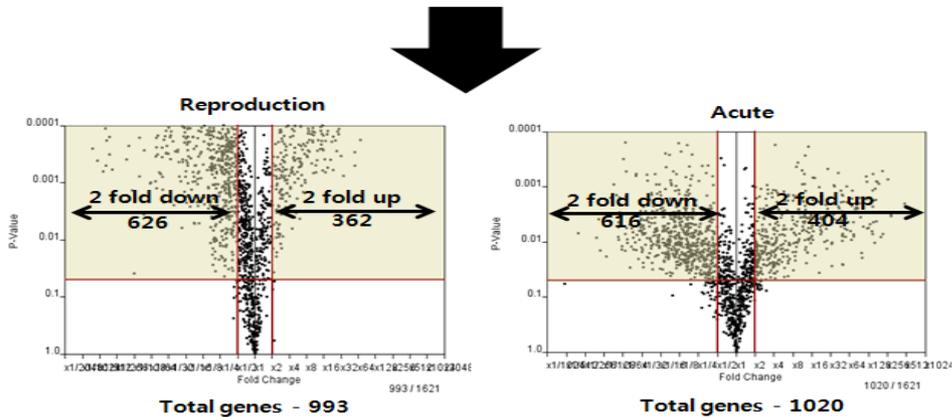
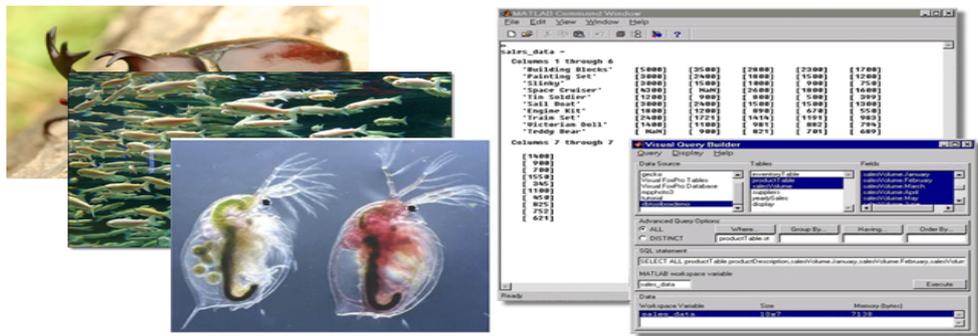


그림 2.1.21 BPA 반복 노출실험을 통해 제작한 BPA-focused array chip 검증

- 또한, BPA 특이 바이오 마커 발굴하는데 있어 microarray 분석에서 과-저발현된 유전자들이 수 생태계종 물벼룩 뿐만 아니라 다른 종에서도 얼마만큼 유전자 유사성을 가지는지 확인하는 것은 바이오 마커 후보를 선정하는데 중요하다고 판단하여 인간 (*Homo sapiens*) 유전자와의 유사성을 확인하였음
- 그 결과, 가장 많이 과-저 발현된 유전자 80여개의 유전자들 중에 실제 인간의 유전자와 유사성을 나타내는 물벼룩 유전자는 15개로 확인되었음
- 이러한 유전자들은 BPA 특이 바이오 마커로써 이용될 수 있으며, qPCR Array Kit 제작의 구성원으로 사용될 수 있을 것으로 판단됨

표 2.1.17 Sequence alignment를 통해 인간 유전자와 유사성을 가지는 유전자들

measurement ID	F o l d Change	P-Value	EST	Sequence alignment (homo sapiens)
DM03349_3	7.587016	0.001003	ref XP_001354528.1 GA12987-PA	Homo sapiens hydroxysteroid dehydrogenase like 1 (HSDL1), transcript variant 2, mRNA
DM06936_1	2.895585	6.75E-05	ref ZP_02249515.1 virulencefactorfamilyprotein	Homo sapiens collagen, type II, alpha 1 (COL2A1), transcript variant 1, mRNA

DM03658_2	10.39442	2.31E-05	ref XP_392038.3 PREDICTED:similar to CG4998-PA	Homo sapiens transmembrane protease, serine 6 (TMPRSS6), mRNA
DM13179_1	6.094955	0.004291	PREDICTED: hypothetical protein [Nasonia vitripennis]	Homo sapiens chromosome 14 genomic contig, GRCh37.p10 Primary Assembly
DM09010_1	19.953	8.02E-06	#N/A	Homo sapiens chromosome 13 genomic scaffold, alternate assembly CHM1_1.0
DM07020_2	6.799643	7.98E-05	ref XP_001643422.1 hypothetical protein Kpol_1042p25	Homo sapiens chromosome 16 genomic scaffold, alternate assembly CHM1_1.0
DM07936_1	15.4357	1.53E-06	#N/A	Homo sapiens chromosome 6 genomic scaffold, alternate assembly HuRef SCAF_1103279188350
DM06691_2	0.061366	2.85E-05	#N/A	Homo sapiens ribosomal protein, large, P2 (RPLP2), mRNA
DM04535_1	0.056909	1.55E-04	ref XP_753075.1 FYVE domain protein, putative	Homo sapiens chromosome 2 genomic scaffold, alternate assembly HuRef SCAF_1103279188347:1-5351923
DMAG0001S0002685	0.001457	2.53E-04	Drosophila melanogaster chromosome 2R, complete sequence. >gb:AE003796_1224926 Drosophila melanogaster chromosome 2R, sec	Homo sapiens ribosomal protein L11 (RPL11), transcript variant 2, mRNA
DM06687_2	0.030696	3.12E-04	ref NP_001075434.1 receptor for egg jelly protein	Homo sapiens family with sequence similarity 48, member B1 (FAM48B1), mRNA
DM01876_1	0.295257	5.95E-04	ref XP_968597.1 PREDICTED:similar to CG8560-PA	Homo sapiens carboxypeptidase A2 (pancreatic) (CPA2), mRNA
DM02274_2	0.04473	5.85E-05	ref XP_001659464.1 cuticle protein, putative	Homo sapiens chromosome 4 genomic scaffold, alternate assembly HuRef SCAF_1103279188096
DM04265_1	0.033033	1.60E-04	ref XP_001514905.1 PREDICTED:similar to alpha 2(I) collagen preproprotein	Homo sapiens collagen, type I, alpha 1 (COL1A1), mRNA
DM02979_1	0.065164	2.15E-04	ref XP_001656600.1 pupal cuticle protein 78E, putative	Homo sapiens chromosome 1 genomic scaffold, alternate assembly CHM1_1.0

(6) Pathway 분석을 통한 BPA 특이 독성관련 바이오 마커 발굴

- Microarray와 같은 독성유전체 기법을 통하여 도출된 유전자의 생체 내 메카니즘을 이해하는 것은 바이오 마커 발굴을 하는데 있어 매우 중요함. 이를 위해서는 기존의 문헌들을 조사하고 검색하여 기존의 결과들과의 상호연관 관계의 재정립이 필요하다고 생각됨
- 현재 물벼룩 모델에 대해서는 pathway DB가 확립되어 있지 않으므로, 본 연구에서는 기존의 인간을 대상으로 한 연구결과를 토대로 하여, 선별된 물벼룩 유전자들의 상호 연관성을 알아보고자 pathway 분석을 수행하였음. 본 분석은 pathway studio program이 사용되었음
- 선별된 물벼룩 유전자 중 인간 유전자와 유사성을 가지는 15개 putative 유전자의 인간내 pathway를 분석하였음
- 그 결과, cell process와 disease 관련 pathway로 나누어 보았을 때 많은 유전자들이 다양한 cell process와 disease pathway에 관여하고 있을 것이라 추정 할 수 있었음. Cell process 관련 pathway에서는 선별된 homo sapiens의 putative 유전자들이 cell migration, contraction, cell proliferation에 관여하고 있음을 확인할 수 있었음(그림 2.1.22)
- 또한, disease pathway에서는 선별된 유전자들이 ischemia, cancer, atherosclerosis와 관련되어 있음을 확인할 수 있었음. 이와 같이 cell process와 disease pathway와 관련된 인간 유전

자는 11개의 유전자들이 크게 관여하고 있음을 확인할 수 있었음(그림 2.1.22). 이러한 유전자 후보군들은 ENVIHaz-Daphnia qPCR Array Kit제작을 위한 유전자 선별과정에서 중요한 참고 자료로 이용되었음

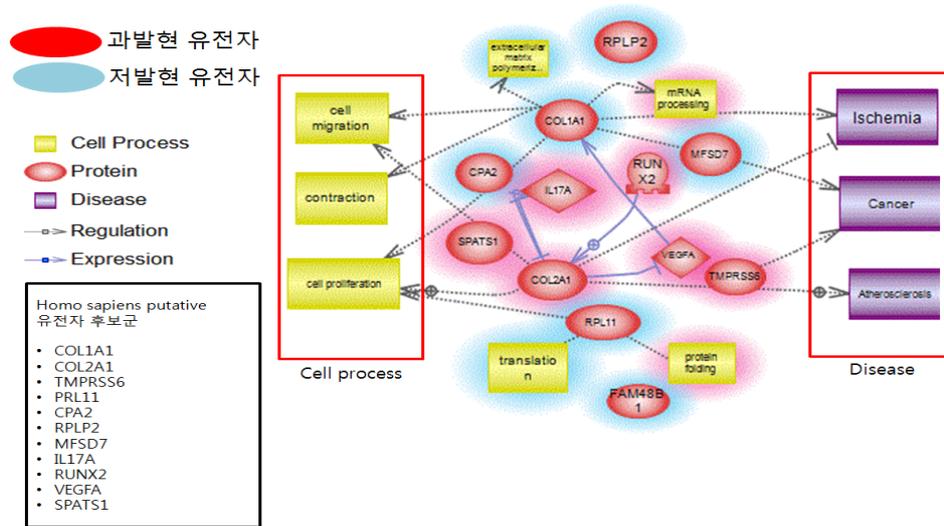


그림 2.1.22 물벼룩과 유사 염기서열 가지는 인간 유전자들의 cell process 와 disease 관련 pathway

- BPA는 내분비계 교란물질 중 하나로써, 인간뿐만 아니라 생태계 내의 생물에게 내분비계 장애를 유발하는 것으로 알려져 있음. 따라서 본 연구에서는 앞서 선별된 BPA 일반 독성에 관여하는 유전자와 내분비계 관련 질병에 크게 관여하는 물벼룩 상동 유전자들이 내분비계 관련 질병과의 연관 여부를 확인하였음
- 그 결과, 과발현된 유전자 중 2개의 특이 유전자후보 (COL2A1, TMPRSS6)가 내분비계 관련 질병 pathway와 관련이 있는 것으로 확인되었음. 그 중 COL2A1는 type2 collagen 형성에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있음. 본 pathway 분석을 통해 Insulin, PRL, IGF1 pathway를 매개로 하여 endocrine 밀접한 관련이 있음을 확인하였음
- 저발현된 유전자후보 중 3종 (COL1A1, RPL11, CPA2)이 내분비계 질병과 관련되어있는 것으로 확인되었음. 특히, COL1A1는 PTH, GH1, POMC pathway를 매개로 하여 내분비계 질병 pathway와 관련되어져 있음을 확인할 수 있었음 (그림 2.1.23)
- 이처럼 내분비계 관련 질병 pathway에 관여하는 유전자들은 BPA의 독성 연구에 있어 중요한 바이오 마커 후보가 될 것으로 판단되며 ENVIHaz-Daphnia qPCR Array Kit 제작을 위한 유전자 선별에 있어 신빙성 있는 근거 자료로 이용될 것임

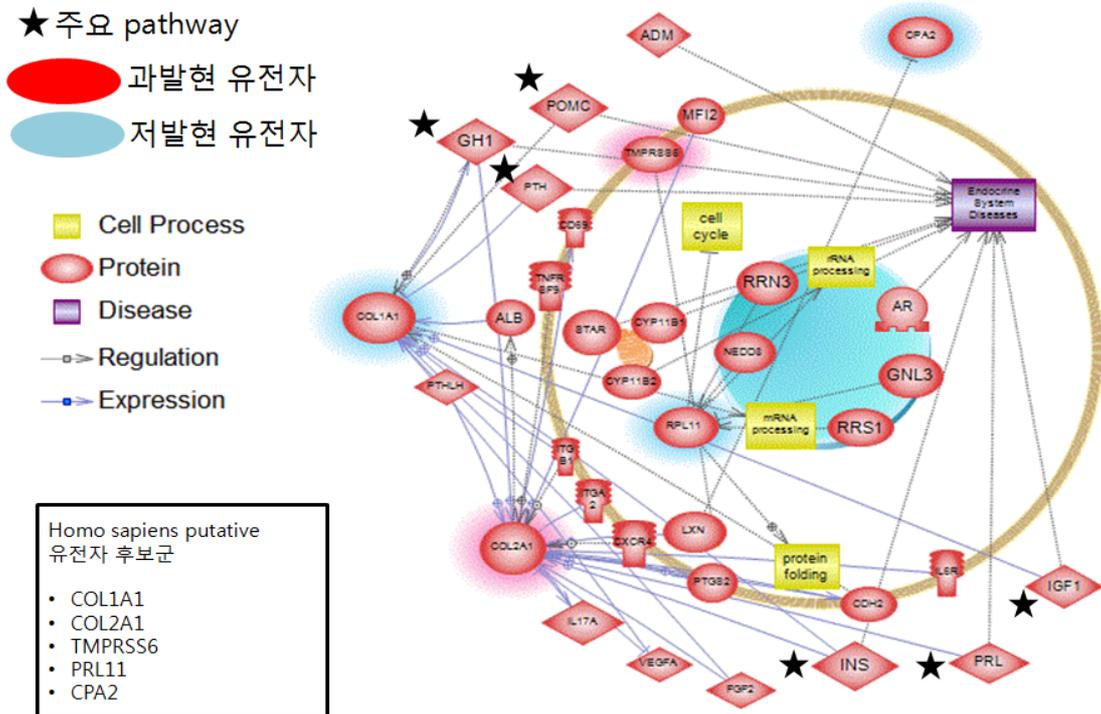


그림 2.1.23 내분비계 질병 pathway와 관련된 물벼룩 유사염기서열을 가진 homo sapiens putative 유전자 후보군

(7) ENVIHaz-Daphnia qPCR Array Kit 제작을 위한 선별된 물벼룩 유전자들의 primer validation

- 물벼룩은 수서 생태계를 대표하는 독성 평가 시험 모델로써, OECD에서도 독성 물질을 평가하기 위한 공식 수서 생태종 모델로 제시하고 있으며 실제로 많은 수서 생태계 독성 연구에 많이 이용되고 있음. 그러나 최근까지 이루어지고 있는 연구들은 대부분 독성 물질의 처리 시 나타나는 생태독성에만 국한되어져 있으며 아직까지 물벼룩의 분자 메커니즘에 대한 연구는 거의 없음. 그 이유는 아직까지 물벼룩의 유전자 정보가 제대로 구축되어져 있지 않기 때문임
- 본 연구에서는 벼룩을 대상으로 한 신뢰성 있는 qPCR Array Kit 제작을 위해 물벼룩 유전자의 primer validation을 진행하였음
- BAP 노출에 의해 발현량이 변화된 40종의 물벼룩 유전자에 대해 PCR primer design하고, 그 primer set의 유용성을 확인하였음
- 그 결과 40종의 유전자에 대한 primer set 중, 28종의 primer set 만이 agarose gel 상에서 목적 유전자를 특이적으로 증폭하는 것으로 확인되었음 (그림 2.1.24). 이는 증폭 커브에서도 확인할 수 있었음 (표 2.1.18 및 표 2.1.19)
- 또한, 물벼룩의 reference 유전자로는 최근에 나온 물벼룩의 house keeping gene의 qRT-PCR을 수행한 논문을 바탕으로 유전자를 선별하고 validation 연구를 진행하였음
- 이상과 같이 BPA 특이 물벼룩 유전자들의 primer를 세계 최초로 validation 하였으며, 이들은 BPA

의 분자 독성 연구에 널리 이용 될 것으로 생각됨. 이들 유전자의 primer들은 ENVIHaz-Daphnia qPCR Array Kit제작에 사용되었음

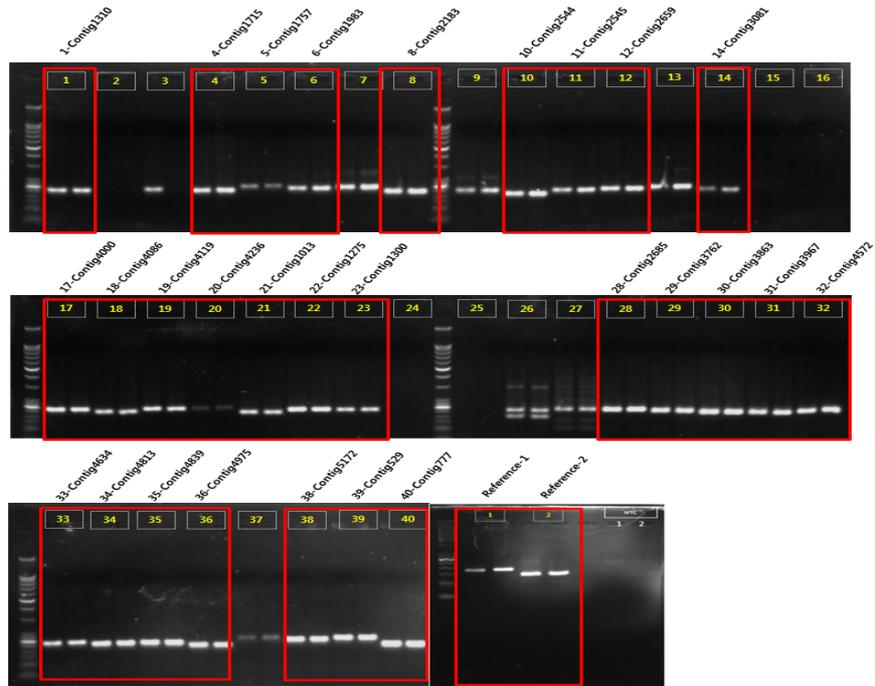


그림 2.1.24 Agarose gel 상에서 선별된 물벼룩 유전자들의 primer가 타겟 유전자만 증폭 여부 확인

표 2.1.18 선별된 물벼룩 유전자 primer의 타겟 유전자 증폭 커브 확인

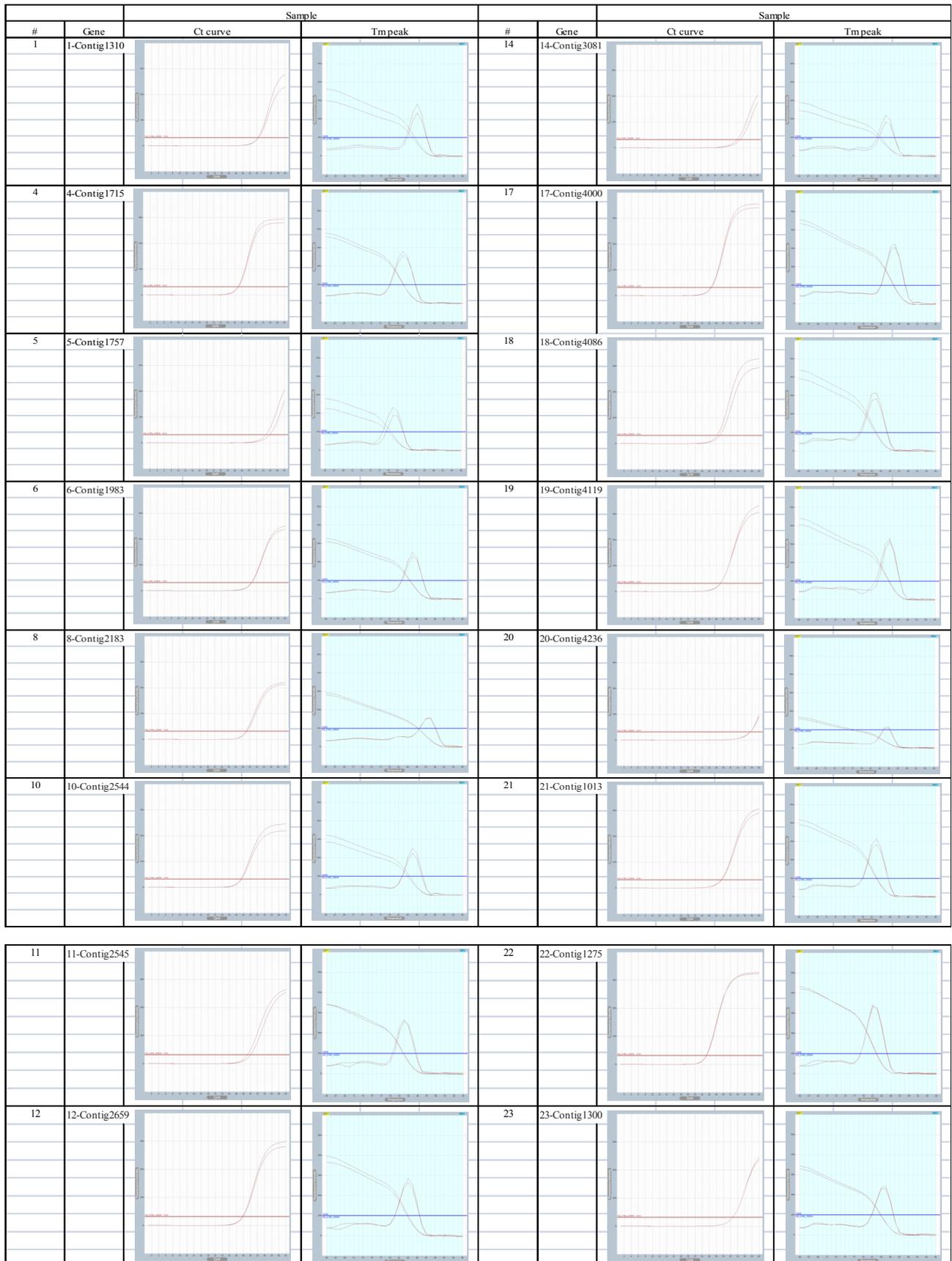
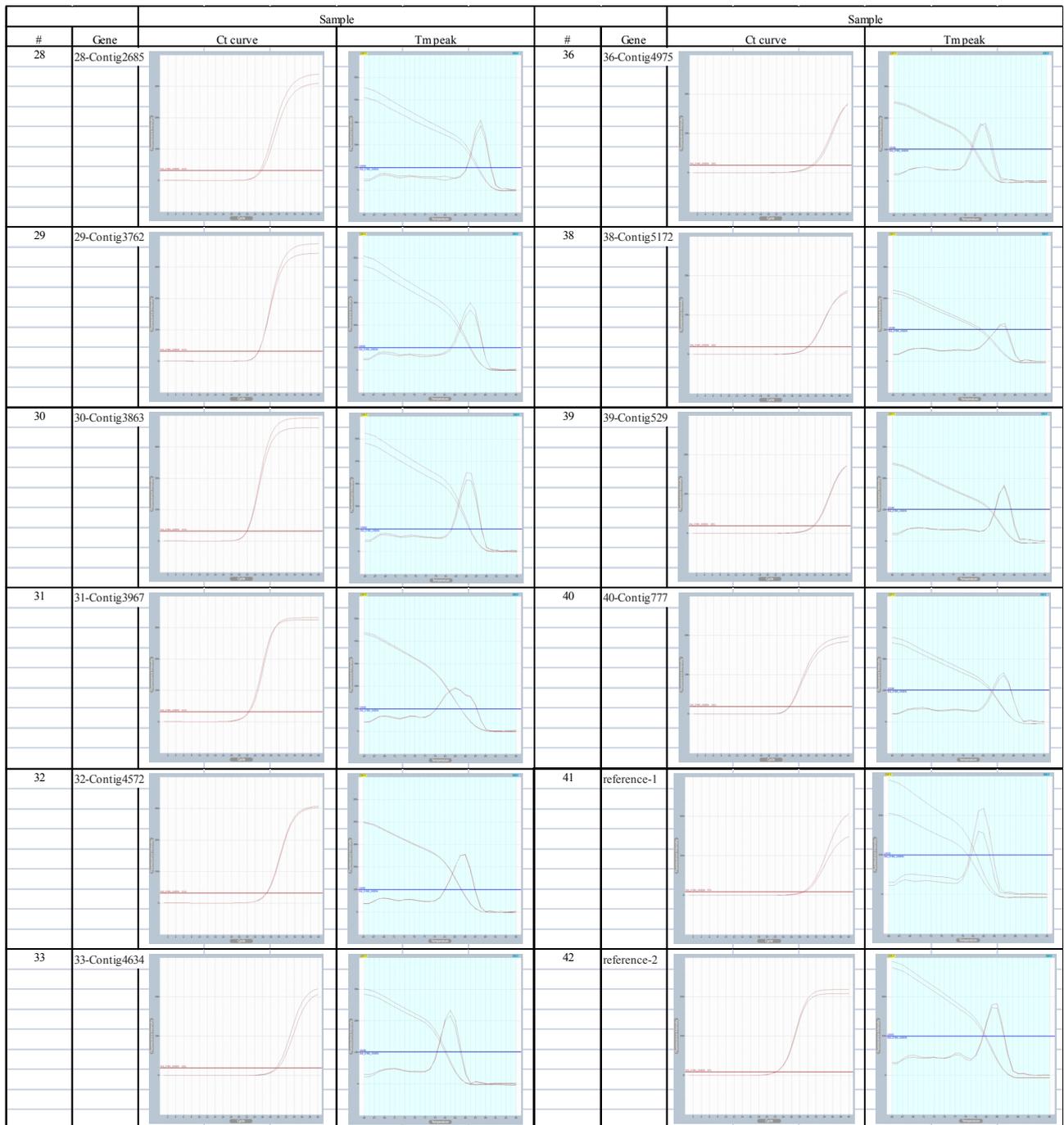


표 2.1.19 선별된 물벼룩 primer의 타겟 유전자 증폭 커브 확인



(8) qPCR 분석을 통한 유전자 최종 선별 및 ENVIHaz-Daphnia qPCR Array Kit 제작

- 유해화학물질들이 환경 특히, 수질을 오염시키고 있어 수계 생태계 오염을 조기에 예측, 평가하고 체계적으로 관리하기 위해서는 정량화된 기술이 필요함
- 특히, BPA는 인간의 생활용품에 많이 함유 되어있고 쉽게 버려짐으로써 수계 생태계를 위협하는 내분비계장애 물질 중 하나임. 그러나 현재 국내에서는 수계 생태계의 오염을 조기에 예측하고 평가하는 기술이 부족함
- 이러한 수서 생태계 독성을 예측, 평가 가능한 정량화된 기술 개발을 위해서는 특정 유해화학물질에 특이적으로 발현되는 수서 생태종의 유전자들을 선별하다는 것은 매우 중요함
- 본 연구에서는 BPA 특이적으로 발현 되는 유전자를 qRT-PCR를 통해 선별하고자 하였음
- 최종 유전자 선별에 앞서, primer 검증을 통해 통과된 28종의 유전자들이 BPA-focused microarray 실험 결과와 동일한 발현 변화를 보이는지 확인하기 위해 qRT-PCR을 수행하였음
- 그 결과, 28개의 유전자들 중에서 15개의 유전자가 microarray 실험 결과와 동일한 발현 패턴을 보여주었음. 이 중 발현량이 증가되는 유전자는 10개, 발현량이 감소되는 유전자는 5개로 확인되었음(그림 2.1.25)
- 최종 선별된 15개의 유전자 중에서 5개의 유전자 (contig-1983, 1715, 1757, 3761, 529)는 pathway 분석에서 내분비계 질병과 관련되어 있음
- 최종 선별된 유전자들은 pathway 분석을 통한 바이오 마커 발굴, primer 검증 연구, qRT-PCR를 통한 발현패턴 검증을 전반적으로 충족시킨 유전자들이며, 이들을 최종 ENVIHaz-Daphnia qPCR Array Kit에 탑재하였음

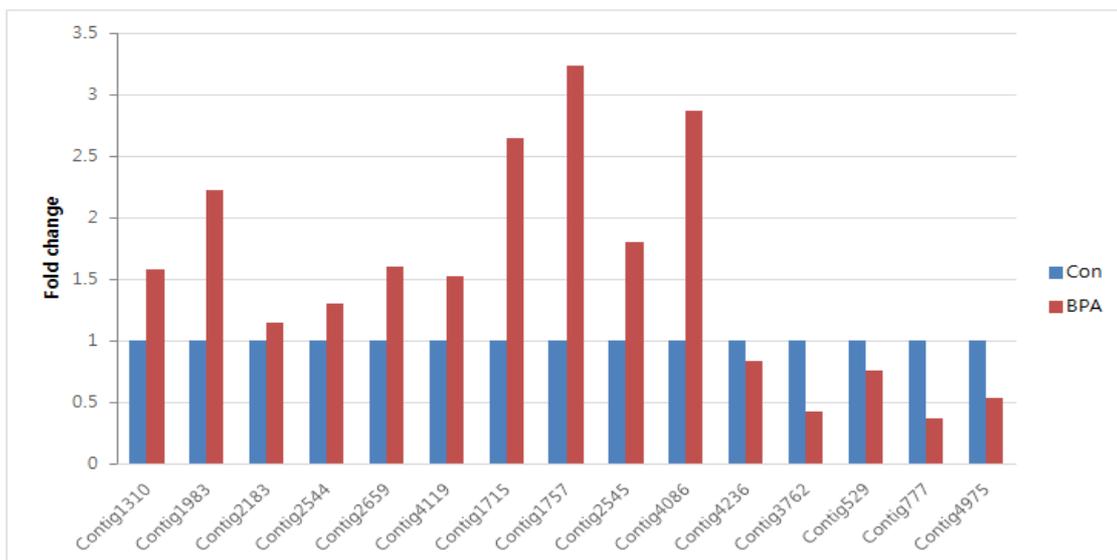


그림 2.1.25 qRT-PCR를 통해 microarray 결과와 동일하게 발현 패턴을 보이는 유전자들 확인

- 본 연구에서 개발하고자 하는 qPCR Array Kit는 96-well plate에 유해화학물질-focused array chip을 이용하여 얻어진 유전자들을 primer validation, pathway 분석, qRT-PCR 로 발현 변화

가 검증된 유전자들을 선별하여 이를 증폭시킬 수 있는 primer를 미리 점적해 놓는 방식의 Kit임

- 정량 PCR과 같은 원리로 유해화학물질에 노출된 물벼룩의 RNA를 추출하여 reverse transcription에 의해 cDNA로 합성, Master Mix와 함께 96-well plate에 sample을 넣어 PCR 반응을 진행시킴으로써, 유전자의 발현량이 변화된 양상을 분석할 수 있음
- 이러한 Kit의 장점은 적은양의 sample (민감성, Sensitivity)로도 높은 특이성 (Specificity)과 정확성을 가지는 데이터를 얻을 수 있으며, 96-well plate를 이용하여 어느 실험실에서 누구나 쉽게 사용 가능하기 때문에 접근성이 용이함. 또 시험방법이 매우 간단하고 투자하는 시간이 절약되기 때문에 단 시간 내에 반복적인 시험을 통해 일정한 결과 (재현성, Reproducibility)를 얻을 수 있고, 오염물질의 정성 및 정량을 동시에 분석할 수 있다는 장점이 있음
- 본 연구에서 개발된 시제품은 아래의 물벼룩 유전자 16종에 대한 primer set이 점적되어져 있어 정량 PCR을 통해 16개의 유전자들을 손쉽게 분석할 수 있는 96 well plate 형식이며, 2개의 샘플을 3번 반복 할 수 있도록 설계 되었음(그림 2.1.26)
- 본 연구를 통해 제작된 ENVIHaz-Daphnia qPCR Array Kit은 BPA의 노출에 따른 수서 생태계 오염을 조기에 예측하고 평가할 수 있는 제품으로 유용하게 이용될 수 있을 것이라 생각되며, 나아가 다른 유해화학물질의 조기 예측 및 평가할 수 있는 제품 개발에 있어 초석이 되는 연구 결과물이라 할 수 있음

검증된 물벼룩 유전자들의 primer sequence

#	Gene Symbol	Product size	Forward primer sequence	Reverse primer sequence
1.	Contig1310	128	CGACGATAAAGCTGCTTAG	GCTTCGTGTCACTCTAAC
2.	Contig1983	136	CTCTCCGACACATAAA	CGAAACCCACAAGGAATC
3.	Contig2183	118	CCTGTTCCGGATGTAGA	GCGAATTGGCATGGATTAG
4.	Contig2544	110	CGACCTCTCCGATACTT	CGTAGTAGGTGACATCGT
5.	Contig2659	132	CCAACAGAACCCGAGAAA	GGTAAACAGGCCGAATA
6.	Contig4119	134	CTGAGACCAACGAAATAGC	GACTCCAGAATCAGCTTTG
7.	Contig1715	126	GACCAACACACCAACATC	GCTCGTGAATAGAAACCC
8.	Contig1757	143	GAGGTTAACTTGCAATGTC	TGCATTGCCTAGTGGATA
9.	Contig2545	126	ACTCCACCTGCTAACTTC	CAGCTCAGGTATCCCTT
10.	Contig4086	121	TGACCTCAACTGGGTTAC	GCTTCGGCATAAGGATTG
11.	Contig4236	126	TACTTGCAACACAGATTGG	GTAGCTTGAAACCACTGAAG
12.	Contig3762	125	CCGTTCAITGTGCTGTTA	AGCAGGGAAGCTATACTC
13.	Contig529	147	TGTTGGATTACGCTGATTG	CATCGAAGTTGCGGTTAG
14.	Contig777	117	CGGAGTCGTTCTCTCT	GTGCTCTGGATGATCTT
15.	Contig4975	116	GAAACCAACCTGGCTTAC	GACCTCGAIGTTGATTAAG
16.	Reference	71	CCACACTGTCCCAITTAIGAA	CGCGACCAGCCAAATCC

96 well plate 형식의 qPCR panel kit 제작

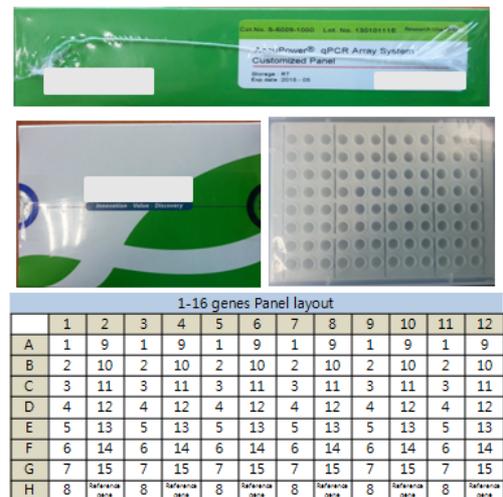


그림 2.1.26 검증된 primer를 이용한 96 well plate 형식의 qPCR pannel kit 제작

나. 자바송사리 모델의 BPA 대응 qPCR Array Kit의 개발

(1) BPA 노출 실험

- 소형어류의 LC₅₀ (*Oryzias latipes*, 7.6 ppm)를 고려하여, 이의 1/100 인 76 ppb로 노출 농도를 결정함
- 자바송사리 모델의 장점을 활용하기 위하여, 노출은 해수의 조건과 담수의 조건에서 동시에 실시함. 그 방법은 아래와 같음
- 비이커 (3 L)에 해수와 담수를 각각 2 L씩 넣고, 부화된 지 6개월에서 1년 된 수컷 자바송사리 3개체를 넣어 48시간 동안 순치함. BPA를 해당 농도에 맞도록 첨가하여 자바송사리를 노출 시킴. BPA를 첨가하지 않은 해수와 담수에서 배양한 자바송사리를 대조군으로 이용함

(2) RNA 적출 및 cDNA 합성

- 노출 48시간 후, 4 그룹의 자바송사리로부터 간을 적출하여 RNA를 추출, 정제함 (그림 2.1.27)
- 정제된 RNA를 주형으로 cDNA를 합성함

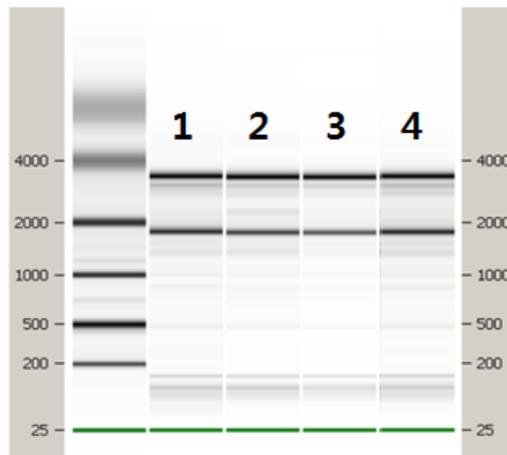


그림 2.1.27 간으로부터 추출 및 정제한 자바송사리 RNA. 1, 해수 대조군; 2, 해수 노출군; 3, 담수 대조군; 담수 노출군

(3) Microarray 실험 결과 및 차등발현 프로파일링

- 해수와 담수 조건에서 BPA에 노출한 어류의 간을 적출하여 microarray 실험을 수행함(그림 17). Microarray 실험에는 연구자에 의해 개발된 HazChem Fish Array ver. 02를 이용하였음. HazChem Fish Array ver. 02는 차세대환경기술개발사업의 결과로 개발된 자바송사리 간 기원의 유전자들을 탑재한 cDNA microarray로써, 총 2458개의 유전자를 탑재하고 있으며, 이들 유전자들을 Eukaryotic Orthologous Group(KOG)에 의해 기능별로 분류하면 표 2.1.20과 같음

표 2.1.20 HazChem Fish Array ver. 02에 탑재되어있는 유전자들의 기능적 분류

	Code	Description	NO.
Information storage	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	188

and processing	A	RNA processing and modification	56
	K	Transcription	44
	L	Replication, recombination and repair	8
	B	Chromatin structure and dynamics	9
Cellular processes and signaling	D	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	50
	V	Defense mechanisms	68
	T	Signal transduction mechanisms	269
	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	10
	N	Cell motility	4
	Z	Cytoskeleton	68
	W	Extracellular structures	14
	U	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	44
Metabolism	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	213
	C	Energy production and conversion	135
	G	Carbohydrate transport and metabolism	98
	E	Amino acid transport and metabolism	84
	F	Nucleotide transport and metabolism	36
	H	Coenzyme transport and metabolism	7
	I	Lipid transport and metabolism	136
	P	Inorganic ion transport and metabolism	78
Poorly characterized	Q	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	99
	R	General function prediction only	187
	S	Function unknown	553
TOTAL			2458

* **Information storage and processing:** **J**, Translation, ribosomal structure and biogenesis; **A**, RNA processing and modification; **K**, Transcription; **L**, Replication, recombination and repair; **B**, Chromatin structure and dynamics

Cellular processes and signaling: **D**, Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning; **Y**, Nuclear structure; **V**, Defense mechanisms; **T**, Signal transduction mechanisms; **M**, Cell wall/membrane/envelope biogenesis; **N**, Cell motility; **Z**, Cytoskeleton; **W**, Extracellular structures; **U**, Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport

Metabolism: **C**, Energy production and conversion; **G**, Carbohydrate transport and metabolism; **E**, Amino acid transport and metabolism; **F**, Nucleotide transport and metabolism; **H**, Coenzyme transport and metabolism; **I**, Lipid transport and metabolism; **P**, Inorganic ion transport and metabolism; **Q**, Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism

Poorly characterized: **R**, General function prediction only; **S**, Function unknown

- 해수 조건에서 BPA 노출에 의한 유전자 발현량 변화를 2배 설정한 결과, 총 175종의 유전자 발현이 변화되었으며(그림 2.1.28), 이중 98종의 유전자 발현이 증가되었고(표 2.1.21), 77종의 유전자의 발현량이 감소(표 2.1.22)되는 것으로 나타남

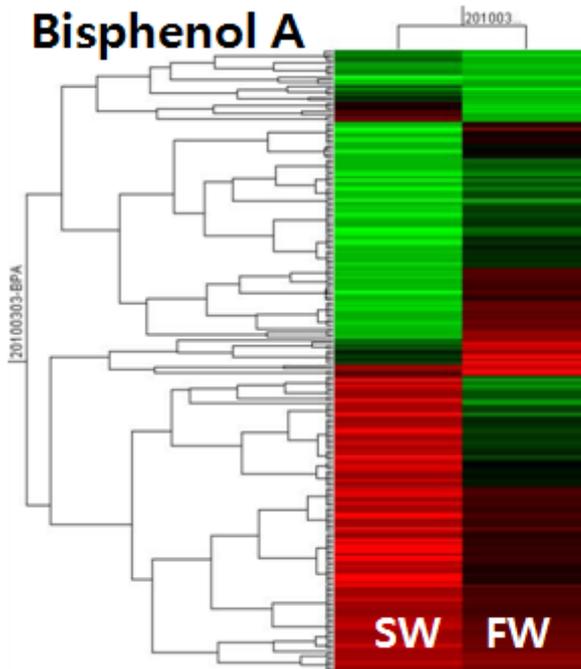


그림 2.1.28 해수와 담수 조건에서 BPA에 노출한 간을 이용하여 수행한 차등유전자 발현 프로파일. SW, 해수; FW 담수

- 해수 조건에서 유전자 발현량이 증가하는 98종의 유전자는 Information storage and processing 13종 (13%), Cellular processes and signaling 25종 (26%), Metabolism 19종 (19%), 나머지 41종은 Poorly characterized (42%)로 구분됨 (그림 2.1.29)
- 또한 발현량이 감소하는 77종의 유전자는 Information storage and processing 4종 (5%), Cellular processes and signaling 17종 (22%), Metabolism 30종 (38%), 나머지 26종은 Poorly characterized (27%)로 구분됨 (그림 2.1.30)

표 2.1.21 해수 조건에서 BPA 노출에 의해 발현량이 증가된 유전자 목록

KOG code	Description	Fold change
Information storage and processing		
J	60S acidic ribosomal protein P1	2.06
J	60S ribosomal protein L30	2.21
J	Anoplopoma fimbria clone afim-evh-011-096 60S acidic ribosomal protein P0 putative mRNA, complete cds	3.00
J	Anoplopoma fimbria clone afim-evh-512-370 40S ribosomal protein S20 putative mRNA, complete cds	2.96
J	Anoplopoma fimbria clone afim-evh-530-251 40S ribosomal protein S18 putative mRNA, complete cds	3.56
J	Oryzias latipes Gb mRNA for adult alpha-type globin, complete cds	2.41
J	Oryzias latipes Gb mRNA for adult beta-type globin, complete cds	2.71
J	Monodelphis domestica similar to eukaryotic translation initiation	2.12

	factor 4 gamma, 1, (LOC100031723), mRNA	
J	ribosomal protein L34b	2.36
J	ribosomal protein L5	2.04
J	ribosomal protein S3	2.18
J	Salmo salar clone HM6_0617 ribosomal protein L13a (rpl13a) mRNA, partial cds	2.23
K	Osmerus mordax clone omor-eva-507-075 Transcription initiation factor IIA gamma chain putative mRNA, complete cds	2.06
Cellular processes and signaling		
D	Oryzias latipes translationally-controlled tumor protein mRNA, complete cds	2.14
V	Paralichthys olivaceus mRNA for elastase 2 precursor, partial cds	2.05
T	Calcium binding protein P22	2.83
T	Danio rerio GTPase activating protein (SH3 domain) binding protein 1, mRNA (cDNA clone MGC:77195 IMAGE:6961904), complete cds	2.18
T	Danio rerio si:dkey-233p4.1 (si:dkey-233p4.1), mRNA	2.39
T	Danio rerio suppressor of ypt1, mRNA (cDNA clone IMAGE:5604350)	2.31
T	Danio rerio transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 7 (trpm7), mRNA	2.25
T	Lates calcarifer leukocyte cell-derived chemotaxin 2 mRNA, complete cds	4.03
T	Oryzias latipes ZPC domain containing protein 1 mRNA, complete cds	2.74
T	Pseudosciaena crocea mRNA for chemotaxin (lect2 gene)	5.84
T	Salmo salar Iron-responsive element-binding protein 1 (ireb1), mRNA	2.30
Z	Danio rerio plastin 3 (T isoform) (pls3), mRNA	2.21
Z	Lytechinus pictus cytoskeletal actin mRNA, complete cds	6.67
Z	Scleronephthya gracillimum beta-actin mRNA, complete cds	4.39
O	Antrodia camphorata partial mnsod gene for manganese superoxide dismutase, exons 1-3, strain B85	2.41
O	Danio rerio inter-alpha (globulin) inhibitor H2 (itih2), mRNA	2.95
O	Danio rerio inter-alpha (globulin) inhibitor H2, mRNA (cDNA clone MGC:56119 IMAGE:5411593), complete cds	2.18
O	Homo sapiens ring finger protein 141, mRNA (cDNA clone MGC:8715 IMAGE:3883540), complete cds	2.39
O	Oryzias dancena PSMB8 gene for proteasome subunit, beta type 8, mature proteasome subunit, beta type 8, complete cds, isolate: Odan-11	2.09
O	Oryzias latipes Orla C3-1 mRNA, complete cds	2.01
O	Oryzias latipes wap65 gene for warm-temperature-acclimation-related-65, complete cds, clone:BAC 182O24	2.04
O	Oryzias latipes warm-temperature-acclimation-related-65 kDa-protein-like-protein (wap65-like), mRNA >gi 21321105 dbj AB075199.1 Oryzias latipes wap65 mRNA for warm-temperature-acclimation-related-65 kDa-protein-like-protein, complete cds	2.47
O	Solea senegalensis GSTR mRNA for glutathione S transferase Rho-class, complete cds	8.20
O	warm-temperature-acclimation-related-65 kDa-protein	2.50
O	warm-temperature-acclimation-related-65 kDa-protein-like-protein	2.21

Metabolism		
C	Danio rerio ATPase, H+ transporting, V1 subunit F (atp6v1f), mRNA	2.09
C	Oryzias latipes mitochondrial DNA, complete genome, isolate: SOK	2.27
G	P.platessa mRNA for alpha-microglobulin/HI-30 precursor	2.29
G	Salmo salar Eukaryotic peptide chain release factor GTP-binding subunit ERF3B (erf3b), mRNA	2.45
E	Paralichthys olivaceus ornithine decarboxylase antizyme large isoform ORF1 and ornithine decarboxylase antizyme large isoform mRNA, complete cds	4.06
E	PREDICTED: Danio rerio similar to proline rich 12 (LOC557848), mRNA	2.26
F	Salmo salar clone ssal-rgf-502-142 Integrin beta-2 putative mRNA, complete cds	2.66
I	C1q-like adipose specific protein	2.19
I	Danio rerio succinate-CoA ligase, GDP-forming, alpha subunit, mRNA (cDNA clone MGC:92738 IMAGE:7079596), complete cds	2.51
I	Dicentrarchus labrax HMG-CoA reductase mRNA, complete cds	3.32
I	Oryzias latipes HMG CoA-reductase (HMG-CoA) mRNA, partial cds	2.82
I	Platichthys flesus mRNA for apolipoprotein AI precursor (apoa1 gene), clone PflL002d09	2.00
I	Salvelinus fontinalis C1q-like adipose specific protein mRNA, complete cds	2.24
P	Oryzias latipes transferrin (LOC100144362), mRNA	2.30
Q	ceruloplasmin	2.87
Q	ceruloplasmin [EC:1.16.3.1]; K00522 ferroxidase	2.85
Q	Danio rerio choline kinase alpha (chka), mRNA	2.25
Q	Fundulus heteroclitus TBT-binding protein mRNA, partial cds	2.27
Q	Homo sapiens CCR4 carbon catabolite repression 4-like (S. cerevisiae) (CCR4L), mRNA	2.23
Poorly characterized		
R	alanine-glyoxylate aminotransferase 2-like 1	2.90
R	Homo sapiens RNA binding motif protein 16, mRNA (cDNA clone IMAGE:5532382), partial cds	2.17
R	Larimichthys crocea complement factor B/C2-B mRNA, partial cds	8.92
R	Liver hepcidin propeptide	22.13
R	Oryzias javanicus choriogenin L mRNA, complete cds	2.56
R	Oryzias latipes c-type lysozyme mRNA, complete cds	2.27
R	Oryzias latipes vitellogenin 1 (ol-vit1), mRNA	3.18
R	Oryzias latipes vitellogenin II (vit-6), mRNA	2.04
R	Pagrus major hepcidin-like precursor, mRNA, complete cds	3.23
R	Salmo salar Transmembrane protein 85 (tmm85), mRNA	5.53
S	A 09	2.24
S	A05-1	2.21
S	D10-1	3.17
S	F08-2	2.00
S	F12-1	2.19
S	G04-2	2.24

S	Gallus gallus KIAA0776 (KIAA0776), mRNA	2.96
S	Gasterosteus aculeatus clone CGX09-H04 mRNA sequence	2.09
S	Gasterosteus aculeatus clone CNB93-A10 mRNA sequence	5.82
S	Homo sapiens oculospanin (OCSP) mRNA, complete cds	2.41
S	Lithognathus mormyrus clone lmos2p05g07 mRNA sequence	4.68
S	Oncorhynchus mykiss clone B32 VHSV-induced protein mRNA, completecds	2.01
S	Oryzias latipes suppressor of cytokine signaling 5 (socs5), mRNA	2.06
S	PREDICTED: Danio rerio hypothetical protein LOC792028 (LOC792028),mRNA	2.30
S	PREDICTED: Danio rerio similar to centaurin, gamma 2 (LOC100148154), mRNA	2.55
S	PREDICTED: Danio rerio similar to GRAM domain containing 3 (LOC100151109), mRNA	4.39
S	PREDICTED: Macaca mulatta similar to TRAF-binding protein (LOC697541), mRNA	3.07
S	PREDICTED: Taeniopygia guttata hypothetical protein LOC100223246 (LOC100223246), partial mRNA	2.25
S	Sparus aurata contig 33 unknown mRNA	2.19
S	Tetraodon nigroviridis full-length cDNA	2.03
S	Tetraodon nigroviridis full-length cDNA	2.03
S	Tetraodon nigroviridis full-length cDNA	2.08
S	Tetraodon nigroviridis full-length cDNA	2.14
S	Tetraodon nigroviridis full-length cDNA	2.41
S	Tetraodon nigroviridis full-length cDNA	2.44
S	Tetraodon nigroviridis full-length cDNA	2.48
S	Tetraodon nigroviridis full-length cDNA	3.02
S	Tetraodon nigroviridis full-length cDNA	3.20
S	Tetraodon nigroviridis full-length cDNA	4.37
S	Tetraodon nigroviridis full-length cDNA	5.14
S	Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-109C12 in linkage group 7, complete sequence	3.95

* **Information storage and processing:** **J**, Translation, ribosomal structure and biogenesis; **A**, RNA processing and modification; **K**, Transcription; **L**, Replication, recombination and repair; **B**, Chromatin structure and dynamics

Cellular processes and signaling: **D**, Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning; **Y**, Nuclear structure; **V**, Defense mechanisms; **T**, Signal transduction mechanisms; **M**, Cell wall/membrane/envelope biogenesis; **N**, Cell motility; **Z**, Cytoskeleton; **W**, Extracellular structures; **U**, Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport

Metabolism: **C**, Energy production and conversion; **G**, Carbohydrate transport and metabolism; **E**, Amino acid transport and metabolism; **F**, Nucleotide transport and metabolism; **H**, Coenzyme transport and metabolism; **I**, Lipid transport and metabolism; **P**, Inorganic ion transport and metabolism; **Q**, Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism

Poorly characterized: **R**, General function prediction only; **S**, Function unknown

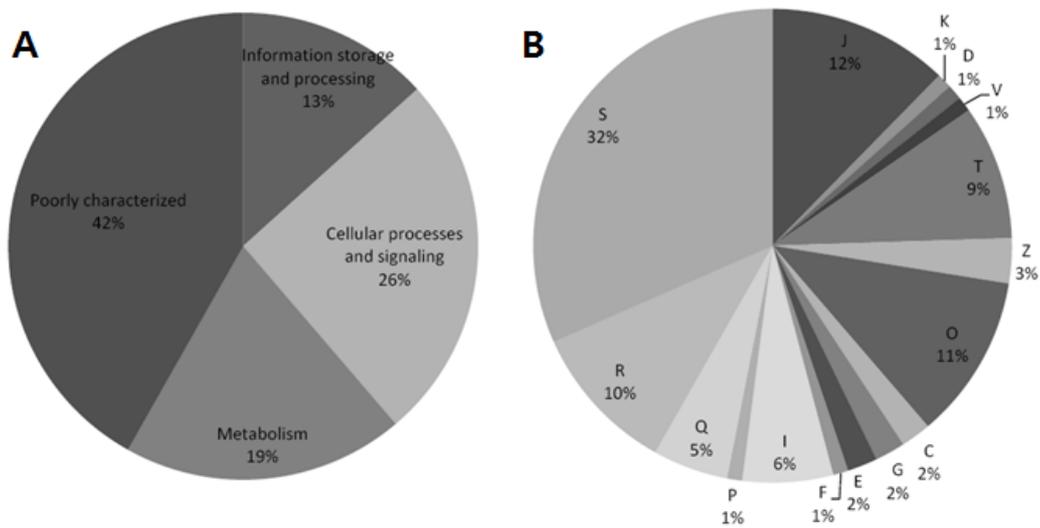


그림 2.1.29 해수 조건에서 BPA에 노출 이후 발현량이 증가한 98종의 유전자에 대한 기능별 분류. A, 대분류; B, 세분류

표 2.1.22 해수 조건에서 BPA 노출에 의해 발현량이 감소된 유전자 목록

KOG code	Description	Fold change
Information storage and processing		
J	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 6 interacting protein	0.48
J	rpL14 protein	0.45
J	Siniperca chuatsi clone C457 60S ribosomal protein L30 mRNA, complete cds	0.45
L	synovial sarcoma translocation	0.23
Cellular processes and signaling		
D	basigin	0.43
V	Danio rerio macrophage stimulating 1 (hepatocyte growth factor-like) (mst1), mRNA	0.46
V	Oncorhynchus mykiss genes, MHC class I b region, complete cds	0.47
V	Oncorhynchus mykiss leukocyte elastase inhibitor (LOC100136251), mRNA	0.24
V	Paralichthys olivaceus mRNA for complement component C8 beta, complete cds	0.40
T	Oryzias dancena retinoid X receptor beta (RXRB) gene, partial cds	0.43
T	Oryzias latipes OIPGRMC1 mRNA for progesterin receptor membrane component 1, partial cds	0.43
T	Oryzias latipes plasminogen (plg), mRNA	0.47
T	Salmo salar T-complex protein 1 subunit gamma (tcpg), mRNA	0.49
Z	Oncorhynchus mykiss simple type II keratin K8b (S2) (krt79), mRNA	0.48
Z	Pongo abelii tropomyosin 3 (TPM3), mRNA	0.46
Z	Salmo salar Actin-related protein 8 (arp8), mRNA	0.48
O	Danio rerio nardilysin (N-arginine dibasic convertase) (nrd1),	0.21

	mRNA	
O	glutathione S-transferase	0.41
O	lon peptidase 2, peroxisomal (lonp2)	0.43
O	Perca flavescens alpha-2-macroglobulin mRNA, partial cds	0.48
O	similar to complement C3 precursor alpha chain	0.41
Metabolism		
C	atp6v1e1; ATPase, H+ transporting, lysosomal, V1 subunit E isoform 1	0.47
C	Cytochrome oxidase subunit I	0.32
C	Danio rerio butyrobetaine (gamma), 2-oxoglutarate dioxygenase 1 (gamma-butyrobetaine hydroxylase) (bbox1), mRNA	0.40
C	glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH)	0.44
C	Monotaxis grandoculis mitochondrial DNA, complete and partial sequence	0.48
C	Osmerus mordax clone omor-rgc-511-315 Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, cytoplasmic putative mRNA, complete cds	0.17
G	phosphoglucomutase 1	0.45
G	PREDICTED: Danio rerio novel protein similar to glutaminase (gls) (LOC100006303), mRNA	0.37
E	chymotrypsinogen 2-like protein	0.24
E	Danio rerio dimethylglycine dehydrogenase, mRNA (cDNA clone IMAGE:8776474), partial cds	0.49
E	Danio rerio tryptophan 2,3-dioxygenase, mRNA (cDNA clone MGC:171678 IMAGE:7898617), complete cds	0.48
E	glutamate dehydrogenase 1b	0.50
E	glutamate oxaloacetate transaminase 2	0.46
E	phenylalanine hydroxylase	0.47
E	Takifugu rubripes phenylalanine hydroxylase (PAH), mRNA	0.47
E	Xenopus tropicalis hpd protein (hpd), mRNA	0.45
I	lipoprotein lipase	0.49
I	Morone saxatilis clone apoa1_3 apolipoprotein A-I (ApoA1) mRNA, partial cds	0.43
I	Oreochromis mossambicus 14 kDa apolipoprotein-like mRNA, partial sequence	0.45
I	PREDICTED: Danio rerio similar to C1q-like adipose specific protein (LOC793037), mRNA	0.22
I	Rachycentron canadum delta-6 fatty acyl desaturase (fad6) mRNA, complete cds	0.22
I	retinol binding protein 4	0.37
I	SEC14L2; SEC14-like 2	0.26
P	catalase	0.41
P	Oplegnathus fasciatus catalase mRNA, complete cds	0.47
Q	Chaetodon mertensii cytochrome P450 CYP2N (CYP) mRNA, complete cds	0.37
Q	cytochrome P450 2P3	0.30
Q	cytochrome P450 3A	0.47
Q	Oryzias latipes cytochrome P450 1A (CYP1A) mRNA, complete cds	0.42
Q	Oryzias latipes cytochrome P450 2P3 mRNA, complete cds	0.31

Poorly characterized		
R	arylamine N-acetyl transferase	0.42
R	Danio rerio hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate (hgs),	0.34
R	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 2	0.19
R	Micropterus dolomieu hepcidin-1 (hep-1) mRNA, complete cds	0.45
R	Mugil cephalus VgC mRNA for phosphovitellogenin, complete cds	0.49
R	Oryzias javanicus choriogenin H mRNA, complete cds	0.33
R	Oryzias latipes cytoglobin-1 (cygb-1), mRNA	0.43
R	progesterone receptor membrane component 1	0.49
R	Salmo salar clone ssal-evd-573-328 N-acetyltransferase putative mRNA, complete cds NAT13	0.47
S	B04-1	0.47
S	Danio rerio similar to Iduronate 2-sulfatase precursor (ids), mRNA	0.01
S	G04-1	0.50
S	Gasterosteus aculeatus clone CFW80-B01 mRNA sequence	0.48
S	Mouse DNA sequence from clone RP23-405D18 on chromosome X, complete sequence	0.47
S	PREDICTED: Danio rerio similar to Temporarily Assigned Gene name family member (tag-229) (LOC569751), mRNA	0.39
S	Salmo salar AP-2 complex subunit mu-1 (ap2m1), mRNA	0.47
S	selenoprotein W2a	0.45
S	Sus scrofa mRNA, clone:PBL010101H02, expressed in peripheral blood mononuclear cell	0.31
S	Tetraodon nigroviridis full-length cDNA	0.28
S	Tetraodon nigroviridis full-length cDNA	0.36
S	Tetraodon nigroviridis full-length cDNA	0.44
S	Tetraodon nigroviridis full-length cDNA	0.46
S	Tetraodon nigroviridis full-length cDNA	0.48
S	ubiquitin specific protease 25	0.42
S	Xenopus laevis MGC81913 protein (MGC81913), mRNA	0.40
S	Zea mays hypothetical protein LOC100217038 (LOC100217038), mRNA	0.33

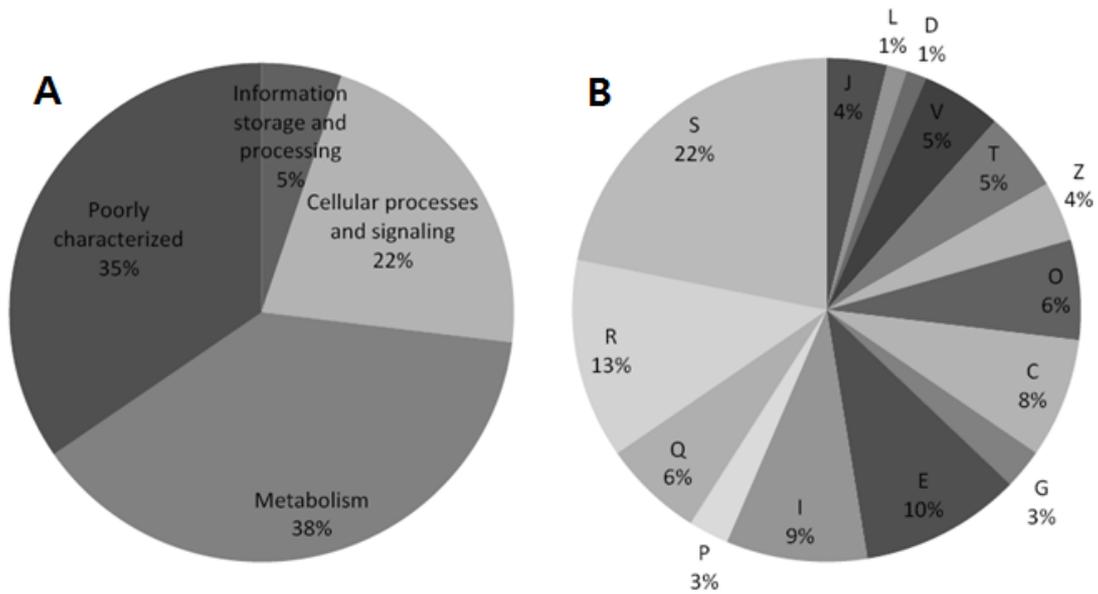


그림 2.1.30 해수 조건에서 BPA에 노출 이후 발현량이 감소한 77종의 유전자에 대한 기능별 분류. A, 대분류; B, 세분류

(4) qPCR에 의한 유전자 발현변화 재확인

- Microarray 실험에 의해 해수 조건에서 차등발현이 확인된 유전자 중 11종을 선별하여, 각각에 대한 PCR 프라이머를 디자인하고, 합성하였음
- 합성된 프라이머를 이용한 qPCR 방법으로 유전자의 발현량 변화를 재확인 함 (그림 2.1.31)

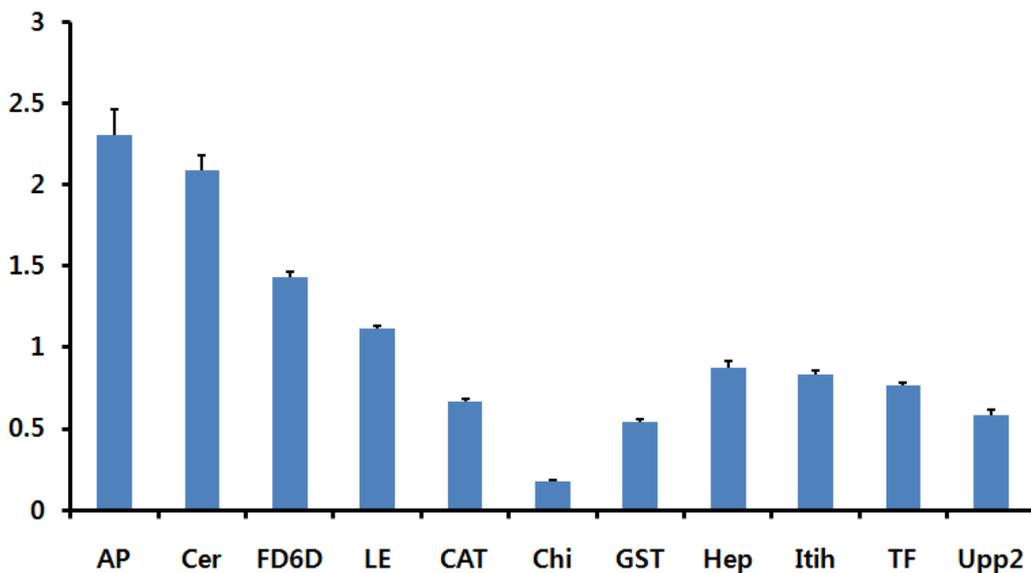


그림 2.1.31 qPCR 기법에 의한 유전자 발현 변화 검증

(5) 내분비계장애물질(Bisphenol A, BPA)의 qPCR Array Kit의 개발

- 2.5K HazChem Fish Array를 이용하여 해수 조건에서 발현량이 1.5배 이상 변화된 BPA 차등

발현 유전자 533종중에서 중요 유전자 50여종을 선별하여 정량PCR 기법에 의해 유전자 발현량의 변화를 재확인하였음

① BPA 노출에 의한 자바송사리 차등 발현 유전자들의 기능 분류

- 분석된 533종의 차등 발현 유전자들을 Clusters of Orthologous Groups(COG)법에 의해, 각 유전자들의 기능에 의해 분류하였고, 그 결과를 표 2.1.23에 나타내었음

- 그 결과, Information storage and processing에 해당되는 유전자들이 15%, Cellular processes and signaling에 해당되는 유전자들이 34%, metabolism에 해당되는 유전자들이 28%, 기능이 잘 알려져 있지 않은 유전자들이 23%로 파악되었음

표 2.1.23 Clusters of Orthologous Groups(COG)에 의한 차등 발현 유전자들의 기능별 분류.

*COG groups	Description	SW	
		Gene count	(%)
Information storage and processing	Translation, ribosomal structure and biogenesis	56	15
	RNA processing and modification	11	
	Transcription	8	
	Replication, recombination and repair	3	
	Chromatin structure and dynamics	1	
Cellular processes and signaling	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	14	34
	Defense mechanisms	19	
	Signal transduction mechanisms	69	
	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	2	
	Cell motility	0	
	Cytoskeleton	14	
	Extracellular structures	3	
	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	12	
	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	46	
Metabolism	Energy production and conversion	35	28
	Carbohydrate transport and metabolism	11	
	Amino acid transport and metabolism	25	
	Nucleotide transport and metabolism	7	
	Coenzyme transport and metabolism	0	
	Lipid transport and metabolism	38	
	Inorganic ion transport and metabolism	9	
	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	22	
Poorly characterized	General function prediction only	20	23
	Function unknown	108	
Total		533	100

② 선별된 바다송사리 BPA 차등 발현 유전자들의 선별 및 정량 PCR

- Microarray 실험을 통해서 발현량의 변화가 확인된 유전자들 중, 기능을 고려하여, 정량 PCR을 위한 유전자 50종을 선별함
- 이들에 대해 PCR primer를 디자인하고, 합성하여, primer의 적용성을 확인하였고, 그 결과는 그림 2.1.32와 같이 단일 band로 나타는 것을 확인할 수 있었음
- 적용성이 확인된 유전자들에 대해서는 정량 PCR을 수행함

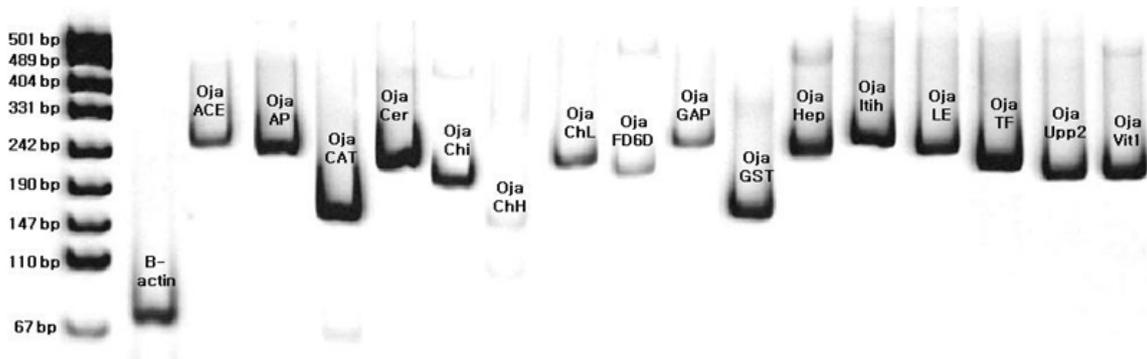


그림 2.1.32 정량 PCR을 위해 선별된 유전자들의 PCR primer 적용성 확인

- 정량 PCR은 384-well plate를 이용하여, Applied Biosystems Prism 7900 Sequence Detection System(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)로 수행되었으며, 3회 반복 실시함
- 대조유전자로서는 세포내 골격 유전자의 일종인 β -actin 및 KDEL endoplasmic reticulum protein retention receptor를 이용하였음
- 7.6 $\mu\text{g/L}$ 및 76 $\mu\text{g/L}$ 에서 노출된 바다송사리의 간 기원 RNA를 대상으로 대상 유전자들의 발현량 변화를 정량적으로 확인한 결과는 그림 2.1.33과 같음
- 대상으로 한 대부분의 유전자에서 microarray와 동일한 결과를 얻었으나, TBT-binding protein and uridine phosphorylase 2 등의 두 유전자의 경우에는 정량 PCR 분석에서 유의한 변화를 보이지 않았음
- Arylamine N-acetyl transferase, C1q-like adipose specific protein, calcium binding protein P22, choriogenin L, plasminogen, ring finger protein 141, vitellogenin 1 and warm temperature acclimation related 65 kDa protein 유전자 등은 낮은 농도(7.6 $\mu\text{g/L}$)의 BPA 노출에서는 그들의 발현량이 증가되는 것으로 확인되었으나, 높은 농도(76 $\mu\text{g/L}$)의 BPA 노출에서는 반대로 발현량이 감소되는 것으로 나타났음
- Apolipoprotein E1, catalase, ceruloplasmin, chitinase, delta-6 fatty acyl desaturase, delta 6-desaturase, glutathione S-transferase, leukocyte elastase inhibitor, lipoprotein lipase, N-acetyltransferase, retinol binding protein 4 and transferrin genes 등의 유전자들의 경우에는 낮은 농도(7.6 $\mu\text{g/L}$)에서는 발현량이 감소되었으며, 높은 농도(76 $\mu\text{g/L}$)에서는 발현량이 증가되는 것으로 파악되었음

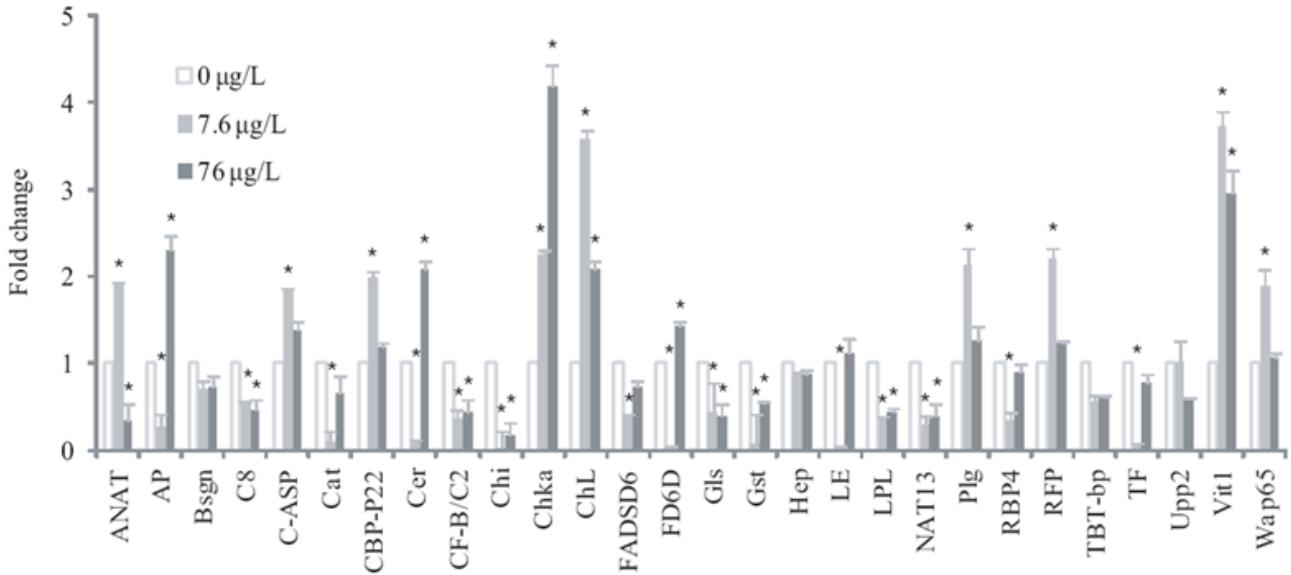


그림 2.1.33 정량 PCR에 의한 유전자 발현변화 재검증

- 정량 PCR을 위한 primer의 성능을 확인하여, 42종의 유전자들을 선별하였으며, 이들에 대해서 qPCR Array Kit을 1차 제작하였음. 이들에 대한 유전자명, primer명 및 염기서열을 표 2.1.24에 나타내었음

표 2.1.24 정량 PCR을 위해 선별된 유전자, 그들의 primer 및 증폭 크기

	Primer		Seq.	Size
1	ANAT	For	CATTCAGTGTGGTGAGAGGA	256
		Rev	TCCAAAGCTCACGTCTGTAA	
2	AP	For	GGATCCATACTTCTCTCAGGT	273
		Rev	GTCTGAACATGTTTCCATGAG	
3	BHg	For	ATGGAGACTGGCTGAAGAAG	258
		Rev	GCAGATAGCCAATCCTGTCT	
4	Bsgn	For	ATCCTCGTGACCATCATCTT	217
		Rev	AGGAACTTTGCAGAAAGCAC	
5	C8	For	GTGCACTATAACCCCGACTT	246
		Rev	AGTGACCTCACAGTCCTTC	
6	C-ASP	For	CTGTTGACGTTGTTGCTTTG	219
		Rev	AAAACTACTGGGGTTCGTG	
7	CAT	For	GCGGTACAACAGCGCCGATGAA	185
		Rev	GGATGGACGGCCTTCAAGTTCT	
8	CBP-P22	For	CCACAGTCAGATCACTCGAC	281
		Rev	CAAAGTGCAGCTTGTTTCATC	
9	Cer	For	GTCAGTTTGAAGTGGTCTCTG	253
		Rev	GAACCTATGAATCCTCCTTGT	
10	CF-B/C2	For	CGTGGACATATGTGACCCTA	221

		Rev	TGTCCAAATCTGTTGGAATG	
11	Che	For	ACAGCTCTGTCAAGGAAACC	244
		Rev	CTTGAAGCACAGACCCTCTC	
12	Chi	For	GATGCAGGATAGAGAGAGGTT	208
		Rev	AGATCCATGGAAGTCATAGGT	
13	ChKa	For	CCAGAAGTACCCCTCAAAGA	261
		Rev	TTCTTCTGCTGGAAGTAGGC	
14	ChL	For	TGCAACACCAGGAAACTATG	217
		Rev	TTTTCGGCTCATACCAATAC	
15	C-Lszm	For	ACAACAGGGACAGGTCAACT	243
		Rev	ATCCGCTGATGTAGGAACTC	
16	DD	For	CTTTCCCTCTGCTGAACAT	278
		Rev	GGATGATCAAACCCAATCAT	
17	FADSD6	For	TGGACAATGACTTTCCTGTG	213
		Rev	CCTGAAGATATTGGGTTTG	
18	FD6D	For	TCTCGTGTGATTAGCCACTAT	201
		Rev	ATTCTTCTCTGCCTGAACTCT	
19	Gb	For	TCAAGAACATGGACGACATC	227
		Rev	CCGCTGGTTCTAGTGGTACT	
20	Gls	For	TGAGTCAGGAAGTGTCATGG	258
		Rev	TTACCAAGGCGATCTAAAGG	
21	GOT	For	TCAAAGGAGCTCTTGAGGAT	254
		Rev	CTGTGACAGGACGATGTTGT	
22	GPDH	For	TGAAAATGTGGGTGTTTGAG	236
		Rev	CAGGGCGTCACTTTTAATCT	
23	GSTR	For	AACACCATGGGTTTGTGACT	216
		Rev	AAGGCAGAAAGTGCTCTGG	
24	Hep	For	AACTGCTGCAAGAACTACAAG	209
		Rev	CCAACAGCCTTTATCTGTTT	
25	HPD	For	CACCTGATCAAACATGGAGA	271
		Rev	GAAGTTTGGGTAGCAGAGGA	
26	IDS	For	GGCCAAATACTCAAACCTCG	277
		Rev	ACTCTTCCCCTCCACACATA	
27	IonP2	For	GGAGCAGTACACAACATCCA	244
		Rev	ACTCACTGCATCGAGAACCT	
28	Itih	For	GAAACCTTCAAGACAGAGGTC	263
		Rev	ACGATGTGAGCCTTATCTGTA	
29	LE	For	GTTTGATGCAAAGGAAACTC	247
		Rev	CATGAAGTTCTCGTAGGTCAG	
30	LL	For	TTCACTGTTTGGAACTCACG	273
		Rev	ACCAGATCAGCAAACCTCTCC	

31	NAT13	For	TCGAGATCATCGAGACAAAA	287
		Rev	GCAGAAATTGCCTTTGAAAC	
32	NRD1	For	GAGGGGAAAAAGAAGAGAGG	299
		Rev	AGAGGGCAGATGAAGAACTG	
33	PAH	For	AACAAGGCTGGAGTGATTC	269
		Rev	GGAAGTGTGCCTTCTGCTT	
34	Plg	For	TGCTGAGCAGATCTCAACAT	22
		Rev	AATGTAAGCGAAGGATTTGC	
35	RBP4	For	AGAACCAGGTATGCAGGTGT	228
		Rev	ACCCCAGTATTTTCATCCTGA	
36	RFP	For	TCTGCACCAAGATCAACAAG	290
		Rev	TTTGTGCATGCATTTCTGAC	
37	TBT-BP	For	CCATCAATGTTAGCCACAAA	207
		Rev	CGTAATGTATTCGGGTTCT	
38	TF	For	TCACACAGACTCCTTCCTCTA	167
		Rev	TCAGTCACAGATCAGATCCTC	
39	TRPM7	For	CTTATTCACCGAGGTTCTG	275
		Rev	GGATCCCTTCTCTCCACTCT	
40	Upp2	For	GACATTCTGTACCACTTCAGC	208
		Rev	CCACTTTGTACATGGAGTAGC	
41	Vit1	For	ACAAAAGGTTCCACTCTCAGC	207
		Rev	CCAACCTTAAACCTCCATCTCC	
42	WTAR65	For	CGACAAGGGTCAAACCTTTT	255
		Rev	TTTGGATAGCCTTCCTCAAG	

ANAT, arylamine N-acetyl transferase; AP, apolipoprotein E1; BHg, butyrobetaine (gamma), 2-oxoglutarate dioxygenase 1; Bsgn, basigin; C8, complement component C8 beta; C-ASP, C1q-like adipose specific protein; CAT, catalase; CBP-P22, calcium binding protein P22; Cer, ceruloplasmin; CF-B/C2, complement factor B/C2-B; Che, chemotaxin; Chi, chitinase; ChKa, choline kinase alpha; ChL, choriogenin L; C-Lszm, c-type lysozyme; DD, dimethylglycine dehydrogenase; FADSD6, delta-6 fatty acyl desaturase (fadsd6); FD6D, delta 6-desaturase (FD6D); Gb, adult beta-type globin; Gls, glutaminase; GOT, glutamate oxaloacetate transaminase 2; GPDH, Glycerol-3-phosphate dehydrogenase; GSTR, glutathione S transferase Rho-class; Hep, hepcidin propeptide; HPD, 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase; IDS, Iduronate 2-sulfatase precursor; IonP2, Ion peptidase 2; Itih, inter-alpha (globulin) inhibitor H2; LE, leukocyte elastase inhibitor; LL, lipoprotein lipase; NAT13, N-acetyltransferase; NRDI, nardilysin; PH, phenylalanine hydroxylase; Plg, plasminogen; RBP4, retinol binding protein 4; RFP, ring finger protein 141; TBT-BP, TBT-binding protein; TF, transferrin; TRPM7, transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 7; Upp2, uridine phosphorylase 2; Vit1, vitellogenin 1; WTAR65, warm-temperature-acclimation-related-65 kDa-protein-like-protein

- 이들 42종의 유전자에 대해서는 정량 PCR Kit 인 qPCR Array Kit을 제작하였고, ENVIHaz-Fish Array Kit ver. 01이라 명명하였음(그림 2.1.34)



그림 2.1.34 BPA 노출에 대해 발현량이 변화되는 유전자 42종에 대한 PCR primer set을 탑재한 ENVIHaz-Fish qPCR Array Kit ver. 01

- ③ 선별된 42종의 유전자들에 대한 검증 및 ENVIHaz-Fish qPCR Array Kit ver. 02의 개발
- 1차 선별된 42종의 유전자들에 대한 성능 검증은 추가 Microarray 실험 3회, 그리고 정량 PCR 2회에 걸쳐 수행되었음. 정량 PCR 실험은 앞서 개발, 제작된 ENVIHaz-Fish qPCR Array Kit ver. 01을 이용하였으며, microarray 및 정량 PCR 실험방법은 앞에서 기술한 것과 같음
 - 추가 실험에 의해 검증한 결과, 총 42종의 유전자 후보 가운데, 18종이 선별되었으며, 그 결과는 표 2.1.25와 같음

표 2.1.25 BPA 특이 유전자 선별을 위한 microarray 및 정량 PCR 실험 결과

Primer	Microarray 1	Microarray 2	Microarray 3	qPCR 1	qPCR 2	Suitability
ANAT	0.42	0.55	0.53	0.67	0.23	O
AP	1.58	2.04	1.00	3.41	2.07	O
BAS	0.43	0.21	0.94	0.13	0.37	O
BHg	0.41	1.53	0.87	1.08	1.38	X
C8B	0.40	1.67	1.02	1.50	1.19	X
C-ASP	2.24	4.21	1.96	1.22	2.48	O
CAT	0.41	2.16	1.13	0.90	0.97	X
CBP-P22	2.83	4.02	2.57	3.01	2.02	O
Cer	2.87	1.91	3.05	4.11	2.86	O

CF-B/C2	8.91	2.12	1.86	3.59	3.01	O
Che	5.84	0.95	1.48	0.88	1.06	X
Chi	0.94	1.57	2.32	1.03	1.27	X
CHKA	2.24	0.89	0.95	0.78	0.94	X
ChL	2.56	2.12	4.03	10.49	35.53	O
C-Lszm	2.27	0.46	0.92	1.15	ND	X
DD	0.48	0.32	0.22	0.27	0.43	O
FADSD6	0.21	1.31	1.10	1.15	1.08	X
FD6D	0.57	2.00	2.27	1.07	0.44	X
Gb	1.60	2.60	1.19	1.02	1.39	X
Gls	0.37	1.15	1.00	0.89	1.35	X
GOT2	0.46	0.64	1.07	0.85	1.40	X
GPDH	0.57	0.33	1.10	ND	1.55	X
GSTR	8.20	6.90	3.34	4.12	3.41	O
Hep	22.10	10.77	5.46	3.18	3.66	O
HPD	0.45	0.22	0.42	0.78	0.25	O
IDS	0.31	1.06	1.39	1.40	ND	X
IonP2	0.43	0.75	1.36	1.15	ND	X
Itith	2.95	1.73	1.02	1.07	1.14	X
LE	0.24	0.88	0.84	1.42	1.33	X
LL	0.49	0.44	0.25	0.76	0.10	O
NAT13	0.47	1.11	1.14	1.22	1.01	X
NRD1	0.21	0.53	0.80	1.39	1.27	X
PAH	0.47	0.33	0.37	0.97	0.92	X
Plg	0.48	1.97	0.86	1.23	1.44	X
RBP4	0.37	0.25	0.33	0.86	0.14	O
RFP	2.34	1.01	2.06	1.00	1.02	X
TBT_BP	4.24	2.02	2.55	3.86	4.14	O
TF	2.27	1.52	3.21	2.66	2.04	O
TRPM7	2.25	0.54	0.99	0.96	0.86	X
Upp2	0.31	0.27	1.16	ND	1.13	X
Vit1	3.18	4.15	3.21	6.29	50.53	O
WTAR	2.50	5.87	1.12	3.18	4.66	O

- 검증 결과, 독립적인 3회의 microarray 실험 및 2회의 qPCR Array 실험을 통해 매회 동일한 유전자 발현량 변화 양상을 보인 ANAT, arylamine N-acetyl transferase; AP, apolipoprotein E1; BAS, basigin; C-ASP, C1q-like adipose specific protein; CBP-P22, calcium binding protein P22; Cer, ceruloplasmin; CF-B/C2, complement factor B/C2-B; ChL, choriogenin L; DD, dimethylglycine dehydrogenase; GSTR, glutathione S transferase Rho-class; Hep, hepcidin propeptide; HPD, 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase; LL, lipoprotein lipase; NAT13, RBP4, retinol binding protein 4; TBT-BP, TBT-binding protein; TF, transferrin; Vit1, vitellogenin 1; WTAR65, warm-temperature-acclimation-related-65 kDa-protein-like-protein 등 18종의 유전자들이 최종 선별되었음

- 이들을 탑재한 ENVIHaz-Fish qPCR Array Kit ver. 02 시제품을 제작하였음 (그림 2.1.35). 이

시제품은 한국해양과학기술원에서 보유하고 있는 정량 PCR 기기 (Rotor-Gene Q, Qiagen, Germany, 그림 2.1.36)에 최적화되어 있음

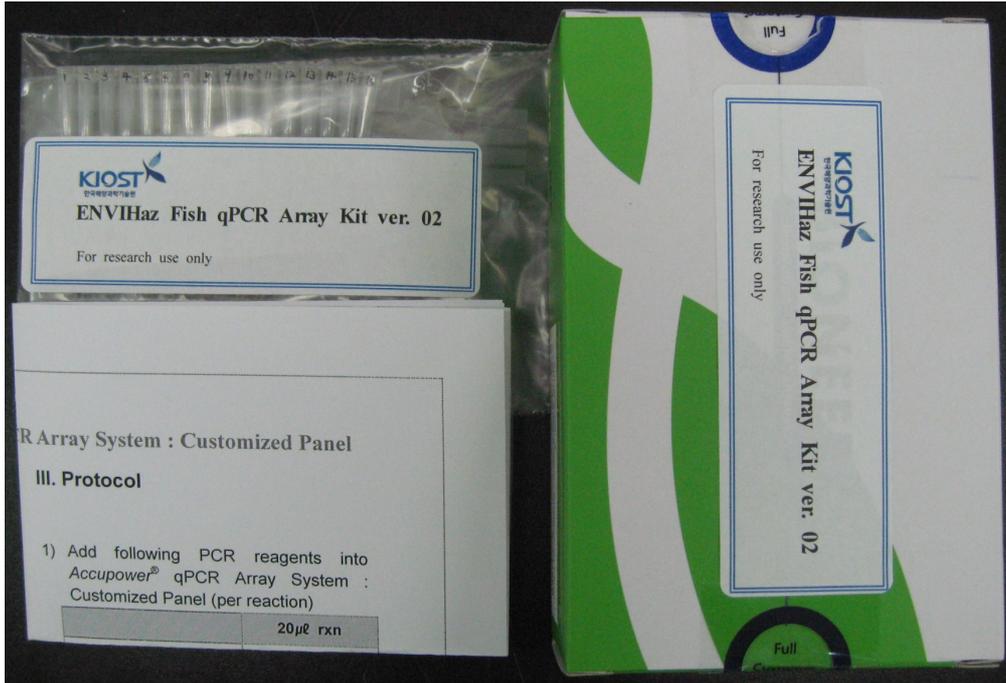


그림 2.1.35 ENVIHaz-Fish qPCR Array Kit ver. 02 시제품



그림 2.1.36 정량 PCR 기기, Qiagen사의 Rotor-Gene Q

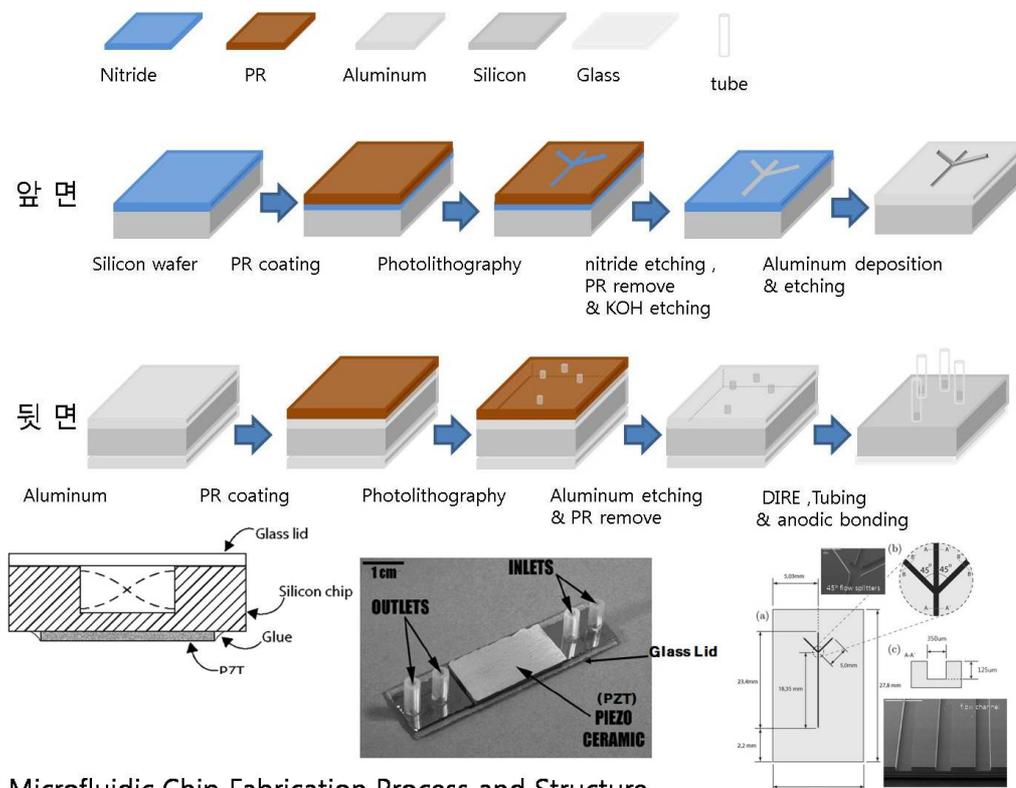
3. Benzo[a]pyrene 검출 랩칩 개발

- PAH류 중, Benzo[a]pyrene(BaP)에 대한 항체 프로브 제작하고, 항체 복합체에 반응한 Benzo-pyrene을 검출 및 분리가 가능한 미세패턴 구조체를 개발하였음

- 제작된 Microfluidic chip의 BaP 항체가 결합된 단백질 센서(항체 프로브) 를 도입함으로써 수계 시료로부터 Bap결합, 제거 처리 능력 확인 분석하였음

가. 미세유로 구조체 제작 및 마이크로비드 분리 확인

- 미세유로 구조체를 제작하는데 있어, 미세유로칩의 크기(Width, Height, length), 패턴의 정확도와 상하 기판접착도, 각 구조간 열라인먼트, 구동 중 유체 내 기포 생성 정도, 피에조 기판의 크기 및 전력 인가 조건, 유량 및 유동(포커싱 % 정도) 가장 먼저 고려될 사항을 파악하고, 이와 같은 사항들이 고려된 분리 칩을 제작하였고 제작된 chip의 BaP 항체 프로브 수계 시료로부터 Bap결합, 제거 처리 능력 확인 분석하였음. 그 과정은 그림 2.1.37과 같음



Microfluidic Chip Fabrication Process and Structure

그림 2.1.37 Microfluidic chip fabrication 과정

- 실리콘 하단부에 부착된 피에조 기판(Piezoceramic transducer)(22-32 mm, PZ26, Ferroperm Piezoceramics, Kvistgard, Denmark)으로 부터 전달된 음파웨이브가 적절히 전달되고 형성되기에 알맞은 채널의 크기, 깊이 길이를 결정하였음

- 기본적인 분리칩의 구조는 위 그림에서 보여지는 것과 같이 Silicon chip 영역에 식각에 의해 형성된 channel, 상단의 Glass lid, 하단의 Piezoceramic transducer(PZT)로 구성되며, 시료도입부, 반출부를 연결한 Tubing 부분으로 나누어 볼 수 있음

- 칩 구조(그림 2.1.38, 왼쪽): 채널 구조는 350 μ m Width, 125 μ m Height 으로 최적화되었음. 이 구조는 transducer로 부터 전달된 acoustic wave force가 채널 내부에 형성이 되어 유체에 존재하는 분자 물질(particles)을 분리하는 적절한 구조였다. 분리과정 중 채널 막힘 현상이 일어나는 것을 피하기 위해 Splitter는 45°각도로 정하고, 제작되는 모든 전처리 과정은 분리 칩

의 조건을 이에 맞추어 제작 되도록 하였음

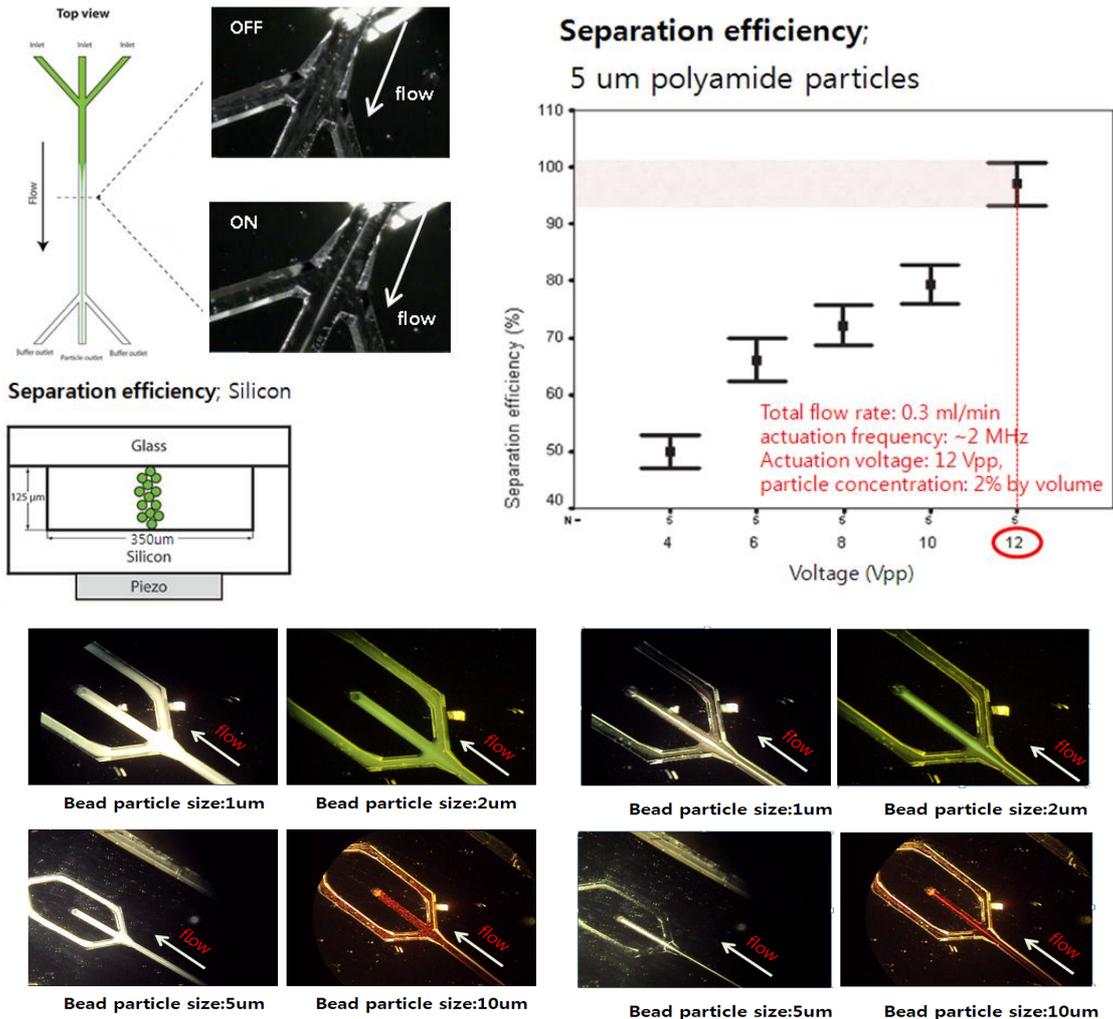


그림 2.1.38 Microfluidic chip의 구조 및 적용 전압에 따른 분해능

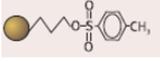
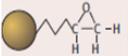
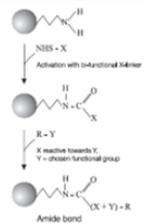
- 실제 제작된 분리칩의 비드 분리 정도를 알아보기 위해, 마이크로 비드(5 µm polyamide particles)가 PBS 버퍼 상에서 인가된 전력 조건, 공진주파수(frequency)에 따라 비드가 standing wave node에 일렬로 나열(focusing)되는 정도를 달리함을 확인하고, 공진 주파수, 인가 전력을 달리하면, 여러 크기의 물질 분리가 하나의 칩에서 가능함을 확인하였음. 오른쪽 그래프에서 5 µm 비드를 45°각도로 디자인된 미세유로 칩에 ~2MHz의 공진주파수를 인가한 뒤 다양한 전력 인가 조건에서 분리정도 확인 할 수 있음. 결과에서 350 µm width, 125 µm depth, 45° 각도의 splitter, ~2MHz 의 공진 주파수를 인가 하였을 때 5 µm 비드가 미세유로 내에서 100% 가까이 분리되는 조건은 12 Voltage이며(그림 2.1.38, 오른쪽), 이는 이와 같은 실험 조건은 Oscilloscope 장치를 통해 인가된 전력조건 영역대의 모니터링이 수반되었음. 또한, 다양한 크기의 마이크로 비드를 제작된 미세 유로칩에 도입하여 적절한 전력 인가 조건을 최적화 하였음

나. Benzo[a]pyrene 항체 프로브 제작 및 미세유로칩 작용 확인

- BaP antibody coupling to microbead-binding condition study

현재 판매중인 Dynabead는 다양한 반응기를 가지고 있어 단백질이나 peptide 또한 small molecule를 쉽게 부착할 수 있도록 되어 있음. Bead functional group 따라서 항체 부착 조건이나 부착된 항체의 최대 효율을 위해 적절한 bead종류의 선별과 반응 최적화 조건을 확립(표 2.1.26). 화학반응의 조건이 항체의 특이성 있는지 조사하여 이에 대한 반응조건 구축함

표 2.1.26 Bead functional group에 따른 항체 부착조건

Functional group	Dynabead	Reaction condition	Binding capacity
Tosylactivated		0.1 M phosphate buffer pH 7.4-8.0. 0.1 M borate buffer pH 7.6-9.5	5 µg antibody per 25 µl (1 x 10 ⁷) Dynabeads.
Carboxylic Acid		MES buffer 	ligand (60 µg) in 25mM MES, pH 5 (60 µl) to activated Dynabeads
Epoxy		0.1 M borate buffer pH 7.6-9.5 0.1 M phosphate buffer at pH 7.4-8.0.	5 µg antibody per 25 µl (1 x 10 ⁷) Dynabeads.
Amine		Dissolve the aldehyde containing ligand to a concentration of 1–10 mg/ml in an appropriate buffer (e.g. 0.1 M sodium phosphate buffer with 0.15 M NaCl, pH 7.4, or 0.1 M sodium borate pH 9.5 or 0.1 M sodium citrate pH 9.5).	
Streptavidin-biotin		Suggest B&W buffer 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) 1 mM EDTA 2.0M NaCl	Binds up to 5-10 µg biotinylated antibodies per mg.

다. 항체의 biotinylation 및 microbead와의 결합

- BaP 항체의 특정 영역만을 비오틴화시키기 위하여, 단백질의 라이신 잔기 또는 N-말단의 일차 아민기(-NH)을 비오틴화 시켰음. 스트렙타비딘이 코팅된 microbead에 단클론 BaP항체를 고정하기 위해 항체를 EZ-link sulfo-NHS-LC-Biotinylation Kit를 사용하여 비오틴화 시켰음. 항체를 비오틴화 시킨 다음, 반응하지 않은 Free-biotin 제거하기 위하여 비오틴화된 BaP항체를 Zeba spin desalting column에 통과였음(그림 2.1.39)

[구체적인 실험 방법]

- 1) Biotinylated BaP항체가 스트렙타아비딘bead에 고정: 50µl bead에 biotinylated 항체 (20µg) 넣은 후 상온에서 2시간 교반 하면서 반응시킴
- 2) Non-specific binding 을 제거하기 위해 MPC 로 상층액을 제거하고 1XPBS buffer (pH 7.4) 로 3 번 씻어줌
- 3) 마지막으로 60 µl의PBS buffer 에 bead 를 저장하였고 4C에 보관

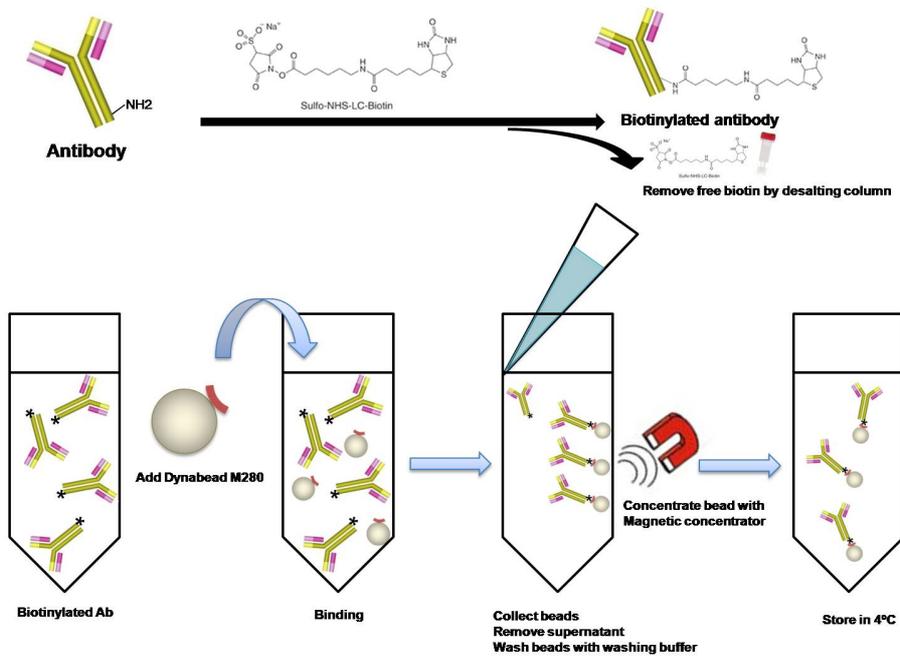


그림 2.1.39 항체 바오티화반응원리 및 microbead부착 실험 방법

-Microchip-based separation procedure

[구체적인 실험 방법]

BAP-AB는 Benzo[a]pyrenyl-1-butyric acid 와 BSA 복합물에 대한 특정 항체로서 benzoapyrene 를 노출된 세포 DNA와 다양한 종류의 조직에 단백질 대사물인 대한 친화력을 가지고 있음. Bap 항체 부착된 microbead와 항원의 반응 시킨후 미세유로 칩에 ~2MHz의 공진주파수를 인가한 뒤 12 Voltage 조건에서 미세유로내에서 100% 가까이 분리되는 결과가 얻었음. 이는 이와 같은 실험 조건은 Oscilloscope 장치를 통해 인가된 전력조건 영역대의 모니터링이 수반되었음(그림 2.1.40)

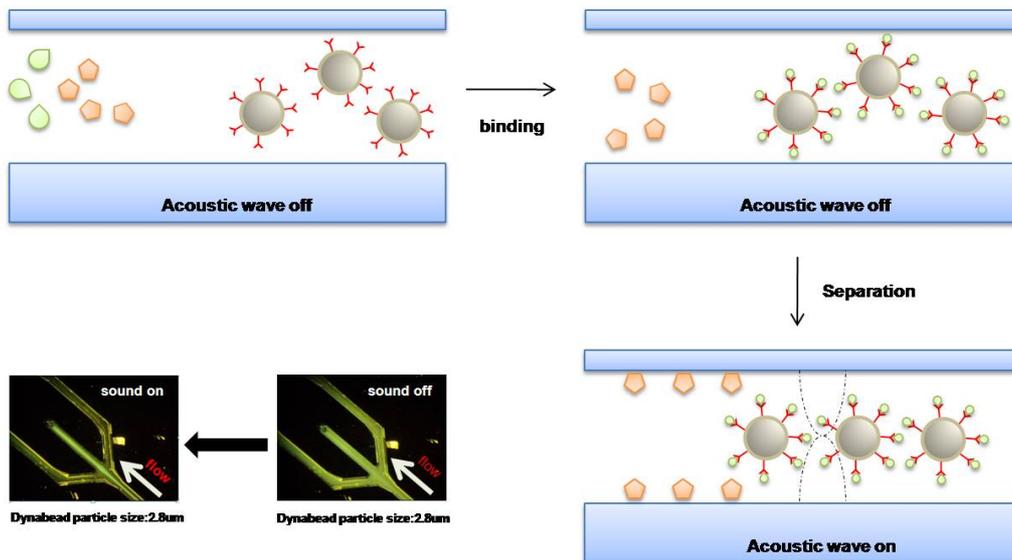


그림 2.1.40 미세유로 칩 분리원리 및 분리결과

라. OCTET을 이용한 칩 분해능 검증

- Octet에서 이용되는 detection 기술은 Biolayer Interferometry(BLI) 를 기초로 두고 있음. Bio-layer interferometry(BLI)는 fluidics-free환경에서 protein간의 결합을 분석하기 위해 실시간으로 데이터를 표시할 수 있도록 하는 label-free biosensor기술임(그림 2.1.40)
- BLI는 Sensor 표면의 Optical layer 상에서 Protein : Protein 결합이 일어나면 Sensor 표면의 두께 변화가 일어나고 이 두께 변화는 Sensor 표면을 관통하여 반사되는 White Light의 Wave pattern 변화로 표시되어 Protein 간의 결합을 측정하는 기술임

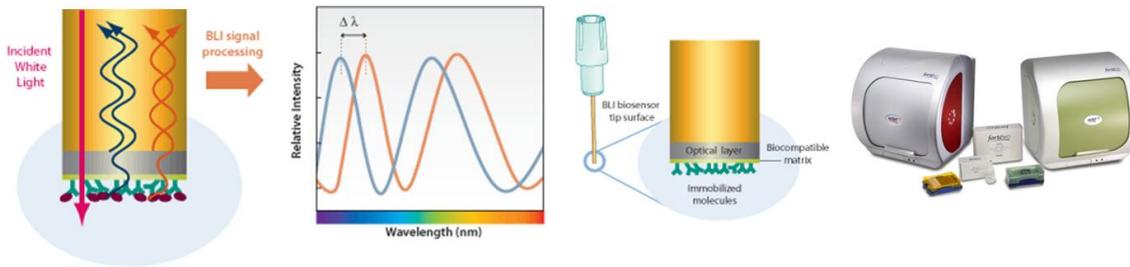


그림 2.1.41 Octet 기기의 작동 원리.

- Bead 와 항체 결합 여부와 항원과 항체 결합을 하는지를 확인하기 위해 BLI (Biolayer Interferometry) 기술을 이용하여 realtime 측정을 확인 하였음
- BaP 항체가 부착 된 microbeads 복합체와 BaP 샘플 시료를 반응시킨 후 미세유로칩으로 반응한 Microbead를 분리를 시켰음. 분리 전후 샘플을 OCTET 기계를 이용하여 분석한 결과 미세유체칩을 이용한 BaP 반응 및 분리 효과를 확인 하였음
- Background signal 을 알아보기 위해 BaP와 작용하지 않은 microbead의 outlet sample도 함께 분석하였음. Raw data는 Data Analysis 6.4 software (Fortebio)을 이용하여 얻었음
- 아래의 그림 6 step에 BaP 항체 부착 된 microbeads 복합체는 결합 하기전후 signal 차이를 보임. BaP 항원과 작용 되지 않은 microbead 복합체(그림 2.1.42 중 negative control)는 association signal이 관찰 되지 않았음

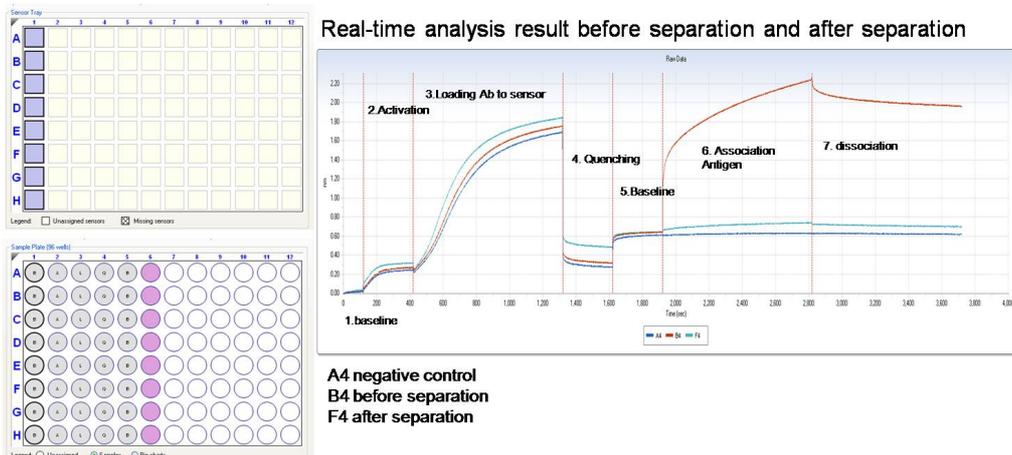


그림 2.1.42 실시간 칩 분리 효과 및 결과확인

- 마이크로유체칩 제작 기술을 이용한 단백질 결합 프로브 물질 분리 칩으로서 기 수행된 연구 결과물과 그 특징을 아래의 이미지로 요약 하여 보여줄 수 있을 것임(그림 2.1.43). 본 연구팀은 랩온어칩 적용 가능한 음파영동 분리 칩을 개발함으로써 PAH 류 Benzo-pyrene 분리 및 검출을 위해, 다수-다량 시료 처리 시 부가되었던 시간 및 노력을 최소화 하고자 하였음
- 음파 영동이 가능하도록, 실리콘 기판위에 미세유로를 제작하고, 시료의 분리가 용이한 splitter 조건을 찾음으로써 다양한 크기의 마이크로비드의 분리 조건을 최적화하였음. 음파영동에 의한 분리방법이 마이크로비드 상에서 구현됨에 따라 본격적으로 단백질 프로브 연계된 비드를 사용하여, 수계 유해물질 검출을 위한 방법을 모색하고자 하였음

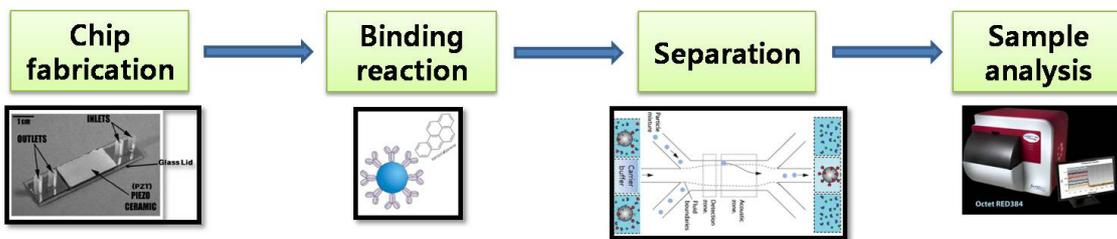


그림 2.1.43 PAH 검출용 단백질 센서 구성도

- PAH류 중, Benzo[a]pyrene에 대한 항체 프로브 (microbead와 항체 복합체) 제작하고, 항체프로브에 반응한 Benzo-pyrene을 검출 및 분리가 가능한 미세패턴 구조체를 개발하였음. 제작된 미세패턴 칩에 BaP 항체 프로브를 인가하여, 수계 시료로부터 BaP 결합, 제거 처리 능력 확인 분석하였음(그림 2.1.44)

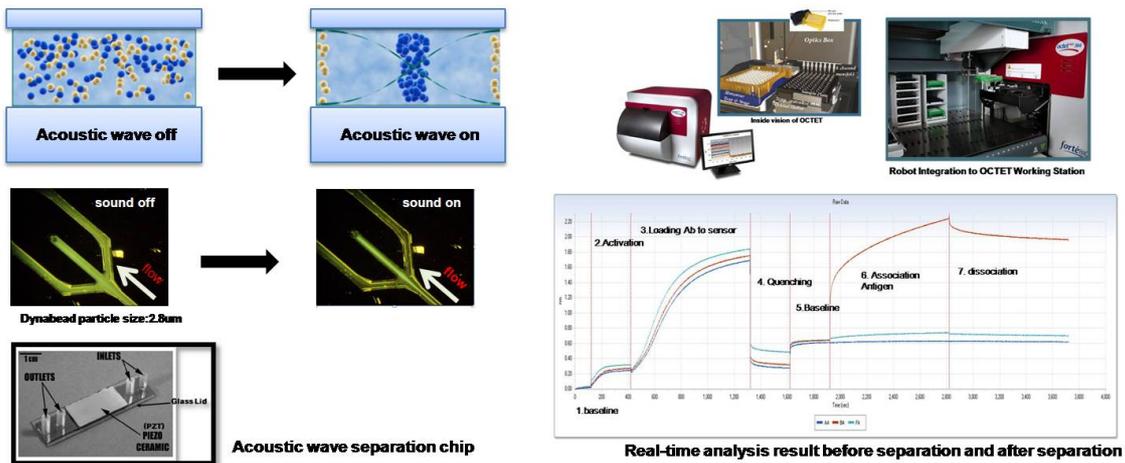


그림 2.1.44. 미세유체 칩에서 microbead 분리과정 및 실시간 분리결과확인

마. 미세유로 칩 제작 및 화학물질 분리 확인 시스템 구조

- BaP 항체가 부착 된 microbeads 복합체와 BaP 샘플 시료를 반응시킨 후, 완성된 미세유로 칩을 이용해서 반응한 Microbead를 분리 시켰음. 분리 전후의 샘플을 OCTET-work station 기계를 이용하여 미세유로 칩 분리효율, 민감도, 검출한계 등의 결과를 확인하였음(그림 2.1.45)

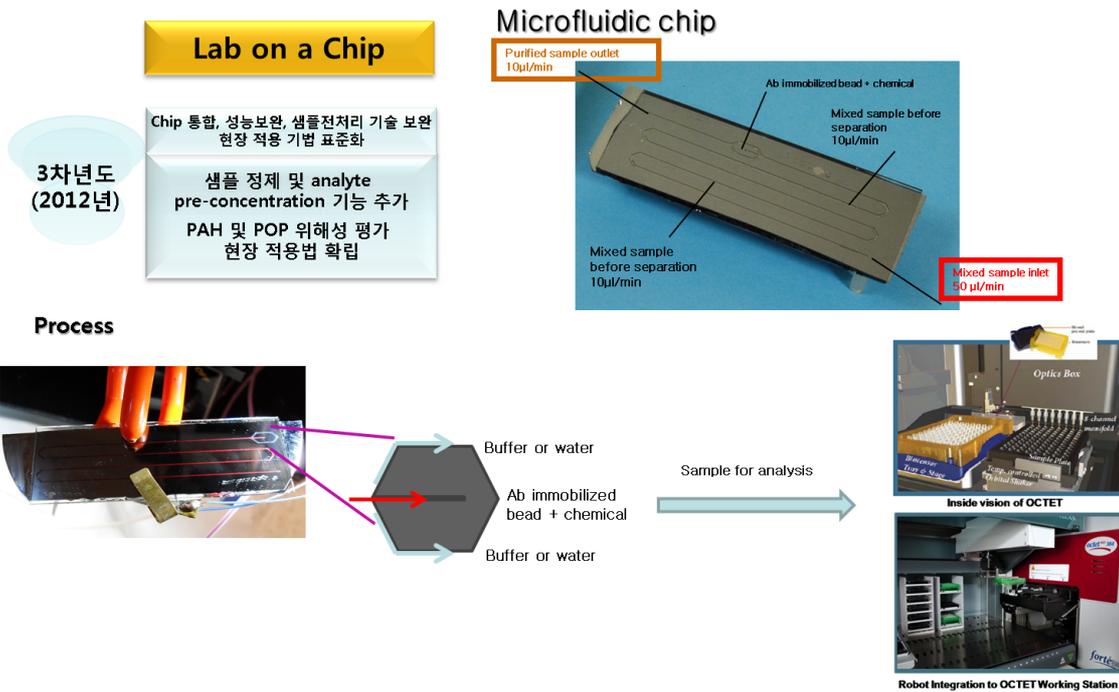


그림 2.1.45 미세유체 칩에서 microbead 분리과정 및 실시간 분리결과확인 원리

바. BLI (bio-layer Interferometry)를 이용한 항체 와 유해물질이 결합을 확인

(1) OCTET 이용한 항원 항체 결합반응 측정방법 개발

- Octet에서 이용되는 detection 기술은 Biolayer Interferometry (BLI) 를 기초로 두고 있음. Bio-layer interferometry(BLI)는 fluidics-free환경에서 단백질이나 small molecule 간의 결합을 분석하기 위해 실시간으로 데이터를 표시할 수 있도록 하는 label-free biosensor기술임
- BLI는 Sensor 표면의 Optical layer 상에서 Protein : Protein/small molecule 결합이 일어나면 Sensor 표면의 두께 변화가 일어나고 이 두께 변화는 Sensor 표면을 관통하여 반사되는 White Light의 Wave pattern 변화로 표시되어 Protein 간의 결합을 측정하는 기술임
- BaP항체 와 BaP 결합력을 확인하기 위해 BLI (Biolayer Interferometry) 기술을 이용하여 실시간 측정하여 확인하고 SSA sensor 표면에 biotinylated BaP monoclonal antibody 반응을 시킨 후 다양한 농도의 BaP를 적용하였음. Background signal 을 알아보기 위해 biotinylated antibody 작용하지 않은 sensor의 nonspecific signal 도 함께 분석하였음. Raw data는 Data Analysis 6.4 software(Fortebio)을 이용하여 얻었음(그림 2.1.46)

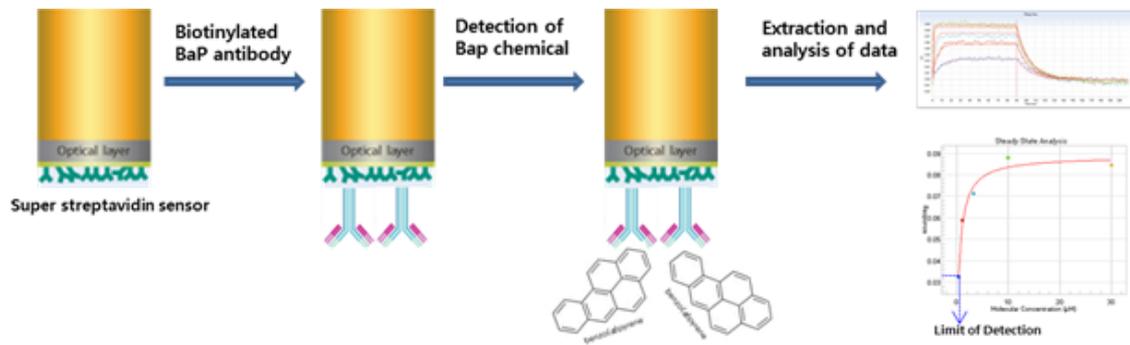


그림 2.1.46 항원 항체 결합 반응 측정 과정

(2) OCTET 이용한 항원 항체 결합 affinity 확인

- 아래 그림은 octet을 이용한 항원 항체 affinity 결과임. Chemical 농도에 대한 반응은 plot되고, data points는 software에 의해 non-linear한 분석으로 fit 됨. Monoclonal antibody는 BaP에 대한 550 nM steady state affinity 가 detection 됨(그림 2.1.47)

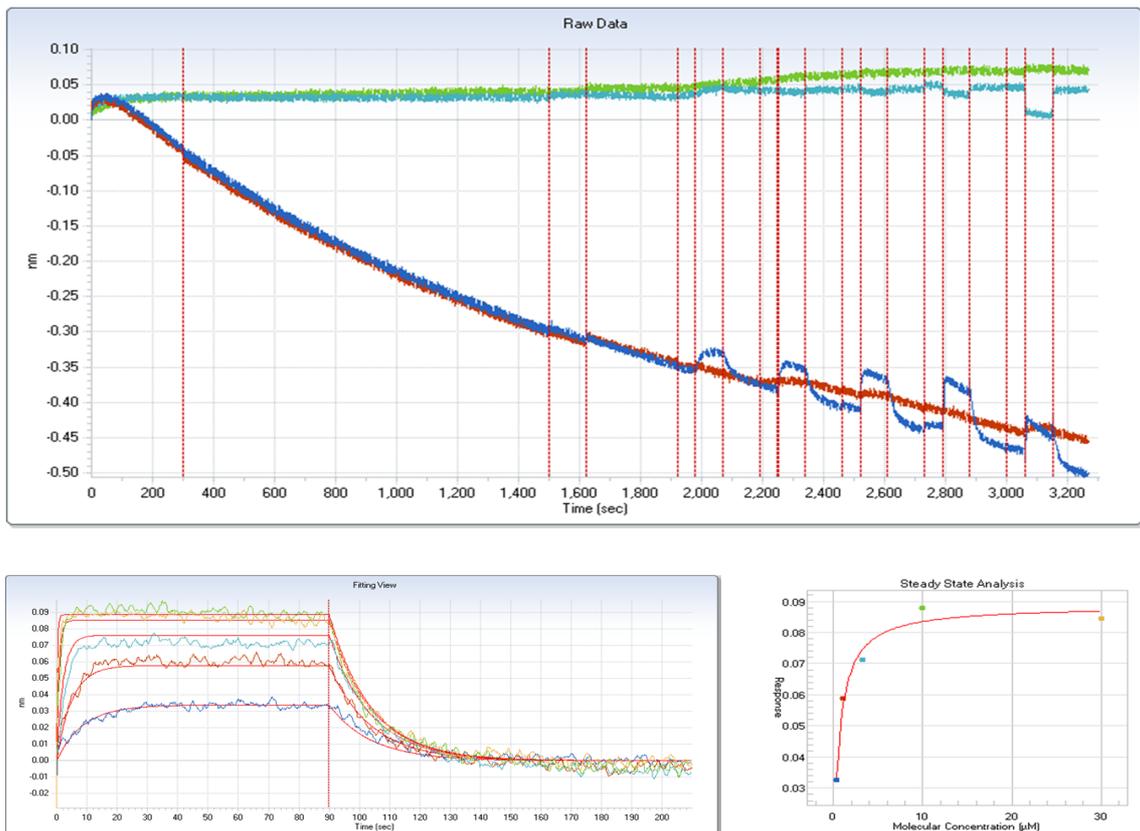


그림 2.1.47 Octet을 이용한 항원 항체 affinity 확인 결과

(3) 칩 검출 시스템 민감도 및 검출한계

- 항원항체 결합 친화성 기준으로(0.1 μM ~3 μM) 화학물질을 BLI system을 통해 항체 코팅된 sensor를 이용해서 확인함. 검출한계는 25 ppb로 측정됨. 0.996의 직선성 얻음(그림 2.1.48)

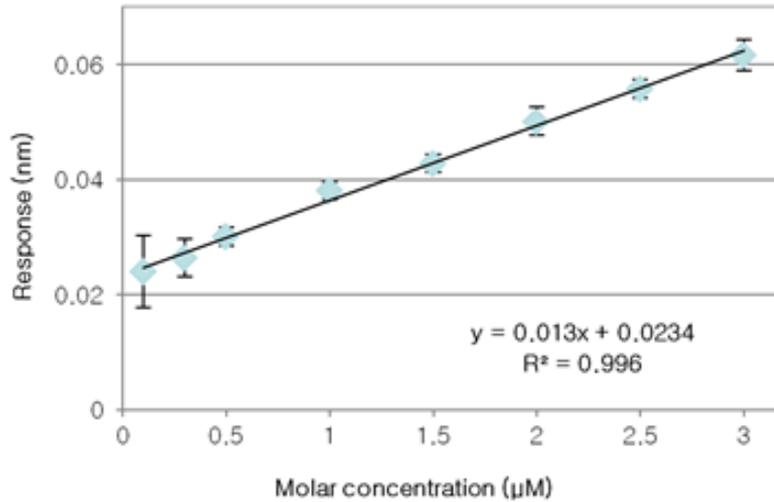


그림 2.1.48 Octet을 이용한 검출한계 및 직선성 확인 결과

(4) 칩 검출 시스템 검출 signal 증폭 방법 연구

- 적분자 물질의 경우 분자량이 작기 때문에 BLI signal 단백질보다 작게나옴. 낮은 농도를 검출하기 위해 2차 항체이나 gold nanoparticle conjugate를 이용하여 검진system 개발이 필요함
- 아래는 두 가지 signal 증폭 system 임. 항체를 이용하여 SPR sensor 와같이 chemical 검출 system detection limit 0.14 ppb 수준까지 측정이 가능하며, 기준에 있던 HPLC 혹은 ELISA방법 보다 100배로 높은 민감도를 확인됨(그림 2.1.49)

Competition assay using bio-BPA-Ab-SA sensor probe to increase detection limit

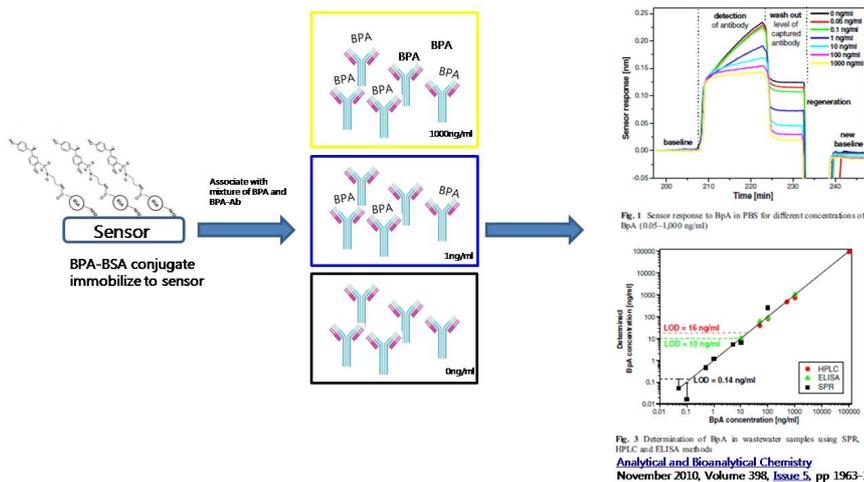
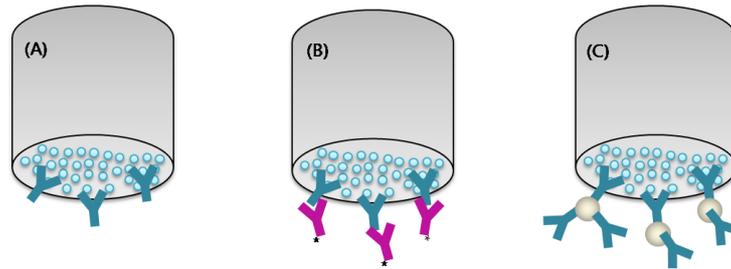


그림 2.1.49 SPR 이용한 bisphenol A 검출 system (적용 예)

- 또 다른 방법은 colloidal gold 이용한 deoxynivalenol 검출 system. gold nanoparticle 이용한 BLI 검출 system은 2차 항체만 이용한 system보다 7.5배 높은 signal 증폭함(그림 2.1.50)

Signal amplification using colloidal gold



Food Additives and Contaminants
Vol. 29, No. 7, July 2012, 1108–1117

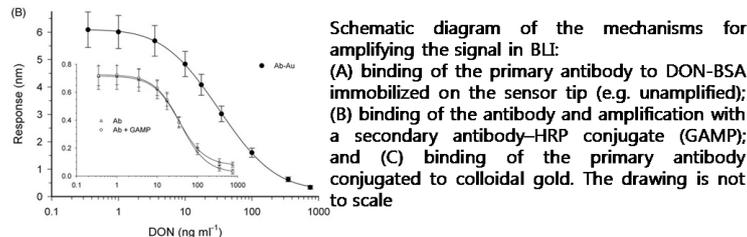


그림 2.1.50 Colloidal gold 이용한 deoxynivalenol 검출 system

사. 연구결과 및 고찰

- 마이크로유체칩 제작 기술을 이용한 단백질 결합 프로브 물질 분리 칩으로서 기 수행된 연구 결과물과 그 특징을 요약 하였고, 랩온어칩 적용 가능한 음파영동 분리 칩을 개발함으로써 PAH류인 Benzo[a]pyrene 분리 및 검출을 위해, 다수-다량 시료 처리 시 부가되었던 시간 및 노력을 최소화 하고자 하였음
- PAH류 중, benzo[a]pyrene에 대한 항체 프로브(microbead와 항체 복합체)를 제작하고, 항체 프로브에 반응한 Benzo-pyrene을 검출 및 분리가 가능한 미세패턴 구조체를 개발함
- 제작된 미세패턴 칩에 BaP 항체 프로브를 인가하여, 수계 시료로부터 Bap결합, 미세유로 칩을 이용해서 반응한 Microbead를 분리시키고 분리 후의 샘플을 OCTET-work station을 이용하여 미세유로 칩 분리효율, 민감도, 검출한계 등의 결과를 확인하였음
- 항원항체 결합 친화성으로(0.1 uM ~3 uM) 화학물질을 BLI system을 통해 항체 코팅된 sensor를 이용해서 확인결과 검출한계는 25 ppb로 측정되었고 0.996의 직선성을 얻을 수 있었음
- 표적분자 물질의 경우 분자량이 작기 때문에 BLI signal 단백질보다 작게나옴. 보다 낮은 농도의 BaP를 검출하기 위해서는 2차 항체나 gold nanoparticle conjugate를 이용하여 검진 system 개발이 필요할 것으로 생각됨

제2절 연구개발 결과 요약

1. Hydra 모델 BaP 대응 DNA methylation Array 개발

- Hydra genome 정보를 바탕으로 17,000 여개의 유전자를 추출하고, 이들을 탑재한 Hydra Expressed Gene Microarray (HEGEM) 제작
- PAH류인 BaP 및 POPs에 속하는 PFOS에 대한 LC₅₀ 결정

- HEGEM을 이용하여 PAH류인 BaP 및 POPs에 속하는 PFOS 노출에 의한 차등발현 유전자 프로파일링 수행함으로써, 이들 유해화학물질에 대한 생물의 대사/생리변화를 예측할 수 있는 바이오마커를 발굴
- CLC Main Workbench 프로그램을 활용하여 Hydra genome 내의 CpG 부위를 추출하고, 이들을 탑재한 ENVIHaz-HymMet Array를 제작
- PAH류인 BaP 및 POPs에 속하는 PFOS 노출에 의한 DNA methylation 변화양상을 파악하고, 검증함
- 유전자 DB에 축적되어 있는 유전자 정보를 통합함으로써, 새로운 지식을 창출에 극대화를 꾀함

2. 내분비계 장애물질 BPA 대응 qPCR Array Kit의 개발

○ 물벼룩 모델

- 유영능 및 생식능에 대한 EC₅₀ 농도를 결정하고, 이 농도의 노출에 의한 유전자 발현 프로파일링 수행하고, BPA focused array chip을 개발함
- 개발된 BPA focused array chip을 이용하여, BPA 특이 물벼룩 유전자 발굴
- Pathway 분석 및 정량 PCR 분석을 통해 BPA 특이 물벼룩 바이오마커 확정
- BPA 특이 물벼룩 바이오마커의 PCR primer set을 탑재한 ENVIHaz-Daphnia qPCR Array Kit 개발

○ 자바송사리 모델

- 소형어류의 BPA LC₅₀ 농도(*Oryzias latipes*, 7.6 ppm)의 1/100인 76 ppb로 노출농도 결정
- HazChem Fish Array ver.02를 이용하여 BAP 노출 유전자 발현변화 프로파일링 수행하여 특이 유전자 후보 발굴
- 정량 PCR 분석을 통해 1차 특이 유전자 선별하고, 이들의 PCR primer를 탑재한 ENVIHaz-Fish Array Kit ver. 01 제작
- Microarray 및 정량 PCR 반복 실험을 통해, 특이 유전자 최종 선별하고, 이들의 PCR primer를 탑재한 ENVIHaz-Fish Array Kit ver. 02 개발

3. Benzo[a]pyrene 검출 랩칩 개발

- PAH류 중, benzo[a]pyrene에 대한 항체 프로브(microbead와 항체 복합체)를 제작
- 항체프로브에 반응한 benzo-pyrene을 검출 및 분리가 가능한 미세패턴 구조체를 개발
- OCTET-work station을 이용하여 미세유로 칩 분리효율, 민감도, 검출한계 등을 확인
- BLI system을 통해 항체 코팅된 sensor를 이용해서 확인결과 제작된 미세유로칩의 검출한계는 25 ppb로 측정되었음. 보다 낮은 농도의 BaP를 검출하기 위해서는 2차 항체나 gold nanoparticle conjugate를 이용한 system 개발이 필요할 것으로 생각됨

제 3 장 목표 달성도 및 관련분야 기여도

제1절 연도별 연구개발목표의 달성도

구분	연구개발의 목표	연구개발의 내용	달성도
1차년도	○ 수계 유해화학물질 검출을 위한 음파 영동 장치 결합 microfluidic chip 설계 및 제작	▶ 특정 저분자 화학물질의 감지 및 결합을 유도하는 단백질 센서 (결합프로브) 물질 조사 및 제작 ▶ 특정 물질 집적, 제거를 위한 microfluidic chip fabrication 방법 선정 및 제작	100
	○ Hydra 모델의 ecoepigenomics 연구 기반 확립	▶ Hydra 유전체정보 및 ESTs 정보에 기초한 promoter prediction ▶ ENVIHaz-HymMet array 제작	100
	○ 자바송사리 모델의 유해화학물질군(EDCs) 독성유전체 지표의 특성 해석 및 생물대사변동 예측	▶ Bisphenol A(BPA) 노출 실험 ▶ 특이 유전자 probe 기능별 그룹핑 및 대표 유전자 probe 선별	100
	○ 독성유전체 기법을 이용한 환경유해화학물질 EDCs의 민물 수서생태계 유해성 평가를 위한 지표 발굴	▶ 물벼룩 모델에서 EDCs 유해물질(BPA) 노출을 위한 적정 농도 설정 ▶ 물벼룩 모델에서 microarray를 이용한 BPA 특이 유전체 지표 탐색	100
2차년도	○ 수계 유해화학물질(PAHs) 검출을 위한 microfluidic chip 설계 및 제작	▶ Benzo[a]pyrene 결합을 위한 단백질 결합 프로브 물질 제작 ▶ 제작된 microfluidic chip의 표준 시료로부터 BaP 결합, 제거, 처리 능력 확인 및 검증	100
	○ Hydra 모델 유해화학물질군(PAHs)의 후성유전학적 영향 해석	▶ BaP 노출 실험 ▶ ENVIHaz-HymMet Array 실험에 의한 DNA methylation 분석	100
	○ 자바송사리 모델의 EDCs 대응-Focused Array Chip 개발	▶ 선별 유전자 probe의 발현량 변화 정량 분석 ▶ 재선별된 유전자 probe를 탑재한 Focused Array Chip 설계 및 개발	100
	○ 환경유해화학물질 EDCs 노출에 따른 민물 수서생태계 유해성 평가를 위해 발굴된 지표 검증 및 유해물질-Focused Array Chip 개발	▶ Real-time PCR과 network 분석을 통해 물벼룩 민물 수서동물 모델에서 EDCs 유해물질 노출에 의해 발굴된 지표의 검증 ▶ 검증을 통해 선별된 유전자를 이용하여 EDCs 유해물질의 독성평가에 최적화된 Focused Array Chip 설계 및 개발	100

3차년도	○ Microfluidic chip의 통합, 성능보완 및 on-chip 샘플전처리 기술 보완과 현장적용기법 표준화	▶ Microfluidic chip에 샘플 정제 및 analyte pre-concentration 기능 추가 ▶ Microfluidic chip을 이용한 PAHs 위해성평가 현장 적용법 확립	100
	○ Hydra 모델 유해화학물질군(POPs)의 후성유전학적 영향 해석	▶ PFOS 노출 실험 ▶ ENVIHaz-HymMet Array 실험에 의한 DNA methylation 분석	100
	○ 자바송사리 EDCs 위해성 예측 도구 검증	▶ 현장 시료 (또는 혼합시료) 노출 실험 ▶ ENVIHaz-Fish qPCR Array Kit 개발 및 검증	100
	○ 환경유해화학물질 EDCs 특이 위해도 정량 분석 키트 개발 및 검증	▶ EDCs 유해물질-Focused Array Chip을 이용해 검증된 유전자를 최종 선별하여 위해도의 정량이 가능한 분석 키트: ENVIHaz-Daphnia (EDCs) qPCR Array Kit 개발 및 검증	100

제2절 관련분야의 기술발전 기여도(환경적 성과 포함)

독성유전체학(Toxicogenomics)은 독성에 따른 생체 내의 대사/생리변화 현상을 유전체 및 단백질 수준에서 해석하는 연구 분야이다. 현대사회에서 다양한 매체와 경로로 노출될 수 있는 유해화학물질이 인체 및 환경에 미치는 유해성을 평가하기 위한 연구로서 최근 그 적용 범위가 넓어지고 있다. 본 연구방법은 화학물질의 독성을 세포 및 개체 수준에서 유전자 발현 변화로부터 유해성 예측을 가능케 한다는 장점을 가지고 있으며 독성유전체기법으로 사용되는 유전자 칩 또는 microarray는 수 만개의 유전자 발현패턴을 동시에 포괄적으로 조사할 수 있는 고효율 기술로서, 단시간에 많은 수의 유전자 발현 패턴을 분석하여 분자독성 기전을 규명하고 유해성 평가를 위한 지표를 발굴함에 있어 매우 유용한 분석 도구이다.

본 연구에서는 자포동물 모델인 히드라(*Hydra magnipapillata*)를 대상으로 Eco-epigenomics 연구의 기반을 확립하고, PAHs 및 POPs에 속하는 유해화학물질인, BaP 및 PFOS의 후성유전학적 영향을 해석을 통해, ENVIHaz-HymMet Array의 콘텐츠를 확보하고 개발하였으며, 전사체 정보를 탑재한 히드라 마이크로어레이인 HEGEM을 제작하고, BaP 및 PFOS 노출에 대한 특이 발현 유전자들을 발굴하였다. 이를 통해 후성유전학 연구의 생태 위해성연구로의 도입 가능성을 확인하였으며, 이는 생태 위해성연구에 오믹스 기법에 의한 위해성 연구의 수준을 한 단계 높은 성과라고 생각된다.

내분비계 교란물질(EDCs) 후보인 Bisphenol A에 대해서는 절지동물 모델인 물벼룩(*Daphnia magna*) 및 척추동물인 자바송사리(*Oryzias javanicus*) 모델 특이 독성유전체 지표를 발굴하고, 이들을 이용한 real-time quantitative polymerase chain reaction(qRT-PCR) 분석 kit인 ENVIHaz-Daphnia 및 ENVIHaz-Fish qPCR Array Kit을 개발하였다. 이들의 개발과정을 통해 DNA microarray를 이용한

특이 유전자 대량 발굴, 정량 PCR 분석에 의한 검증, pathway 분석을 통한 유전자들간의 네트워크 해석 등의 방법론을 확고히 하였다.

제 4 장 연구개발결과의 활용계획 등

제1절 연구개발 결과의 활용계획

현대사회는 산업 활동에서 뿐만 아니라 일상생활에서도 유해화학물질들이 빈번하게 노출되고 있으며 이러한 물질들은 자연환경에 그대로 노출되어 오염을 일으킨다. 특히, PAHs, POPs 및 EDCs는 수질 환경에 유입되어 잔류하며, 적은 농도로도 장기간 축적되어 결국은 인간의 건강까지 위협하고 있는 실정이다. 따라서 이러한 유해물질이 수질 환경에 노출되어 오염을 유발하는 정도를 예측하고 측정하여 체계적으로 관리할 수 있는 유해성 평가 시스템의 개발이 절실히 필요하다.

하지만, 지금까지 개발된 수계 환경 유해성 평가 시스템들을 살펴보면 수질에 특정 유해화학물질들이 포함되어 있는지만을 평가하는 정성 분석 기술이거나, 수계 생물종에 유해화학물질을 노출시켜 유해성을 확인하고자 한 연구에서도 유영저해 및 산란과정 저해와 같은 물리적 행동 변화에 초점을 두거나 단순히 microarray를 이용한 유전자 발현 변화 양상을 분석한 연구가 대부분이다. 그러나 수서 생태계에서 유해화학물질에 의한 유해성 평가에 있어, 특정 유해화학물질이 실제 수서 생물체에 노출되었을 때, 어떠한 유전자 발현이 변화하며, 그 유전자와 관련되어 어떠한 pathway 및 독성 기작을 나타내는지 명확히 밝혀내는 근본적인 독성 기전 연구가 중요하다.

이에 본 연구진은 환경유해화학물질 환경 유해화학물질군(PAHs, EDCs 및 POPs)에 노출되었을 경우 발생하는 DNA methylation 및 유전자 발현 패턴 및 network를 분석하여 후보 바이오마커를 발굴하고, 이 유전자들을 이용해 유해화학물질군 대응 focused array chip을 개발하여 향후 손쉽게 화학물질 특이적인 지표를 발굴하고 생체 내 독성 작용 기작을 이해, 예측하는데 이용하고자 한다. 뿐만 아니라, focused array chip을 이용해 좀 더 명확하게 추려낸 EDC 및 PAH 특이 변화 유전자들을 중심으로 real-time PCR의 원리는 이용하여 정성 분석에 더하여 유해물질이 얼마만큼의 농도로 노출되었는지의 정량 분석까지 가능한 ENVIHaz-Daphnia 및 Fish qPCR Array Kit를 개발하여 보다 간편하고 빠른 시간 내에 유해화학물질에 의한 수계 유해성 평가에 새로운 지평을 열고자 하였다.

본 연구에서는 오믹스 연구 기법을 도입하여, 수생태계 위해성 예측도구 및 수계의 PAH류, 보다 정확히는, BaP를 검출할 수 있는 미세유체역학 기반의 랩칩을 개발하였다. 수생태계 위해성 예측도구의 개발과 관련하여 첫째, 최근 주목받고 있는 후성유전학 연구를 도입한 ENVIHaz HymMet Array를 개발하였다. 이는 Hydra의 유전체 정보로부터 methylation 부위로 알려져 있는 CpG 부위를 추출하고, 이를 탑재한 chip으로써, DNA methylation 변화 분석 가능한 DNA microarray이다. 이 DNA chip를 사용할 경우 300-500 ppb 수준의 BaP 및 PFOS에 의한 DNA methylation 변화의 감지가 가능하다. 또한 이 DNA microarray는 환경유해화학물질에 의한 유전자 발현변화의 후성유전학적 조절 연구에 적용하여, 수생태계 위해성 사전 예측 및 조기 진단을 실현할 수 있다.

둘째, ENVIHaz Daphnia 및 Fish qPCR Array Kit를 개발하였다. 이 정량 PCR 키트는 수생태계 모델인 물벼룩 및 자바송사리 기원의 BPA 특이 유전자를 발굴한 후, 이들 유전자들에 대한 정량 PCR primer set을 탑재한 qPCR Array Kit이다. 이 키트는 수계의 BPA 오염 여부를 비치사수준(물벼룩:

10 ppm 수준; 자바송사리: 80 ppb 수준)에서 판단 가능하도록 디자인되어 있으므로, BPA를 포함한 내분비계 장애물질에 의한 수생생물의 대사/생리 변화 예측에 적용가능하다. 또한 적용 범위를 넓힐 경우, 신규 화학물질의 내분비계 장애 유발 여부를 신속하고 정확히 예측 가능하다. 본 연구에서는 생체지표의 발굴에 중점을 두어 한 세대에서의 급성노출에 대한 환경유해화학물질의 생물 위해성 연구에 국한하였다. 이 연구결과를 기초로하여 앞으로는 장기적인 만성노출에 대한 세대간의 변화에 대한 생체지표 변동 및 표현형 변화에 대한 연구로 확대할 필요가 있다고 생각된다.

셋째, ENVIHaz AquaChip을 개발하였다. 이는 PAH류에 속하는 BaP를 검출할 목적으로 개발되었다. 이는 미세유체역학 기반의 랩칩으로써, 25 ppb 수준의 BaP를 검출할 수 있어서, 수계의 BaP 신속 검출 키트로 활용 가능하다. 궁극적으로는 랩칩을 이용한 수생태계 내 유해화학물질(PAHs) 검출 POCT 구현이 가능하도록 노력할 것이다.

제2절 연구개발과정에서 수집한 해외 과학기술정보

해당사항 없음

제3절 연구개발결과의 보안등급

해당사항 없음

제4절 NTIS에 등록된 연구시설·장비현황

해당사항 없음

제 5 장 참고문헌

- 3M (2001). Hydrolysis REactions of Perfluorooctanoic Acid (PFOA).
- Arvizu F, Aguilera A, Salgado LM. (2006) Activities of the protein kinases STK, PI3K, MEK, and ERK are required for the development of the head organizer in *Hydra magnipapillata* Differentiation 74: 305–312.
- Augustin R, Franke A, Khalturin K, Kiko R, Siebert S, Hemmrich G, Bosch TGC. (2006) Dickkopf related genes are components of the positional value gradient in *Hydra*. Developmental Biology 296: 62–70.
- Auroux, P. A. I., D. Reyes, D. R. Manz, A. (2002). "Micro total analysis systems. 2. Analytical standard operations and applications." Anal Chem 74(12): 2637-2652.
- Bode HR. (2003) Head Regeneration in *Hydra*. Develop Dyn 226: 225–236.
- Calafat, A. M. W., L. Y. Kuklennyik, Z. Reidy, J. A. Needham, L. L. (2007). "Polyfluoroalkyl chemicals in the U.S. population: data from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2003-2004 and comparisons with NHANES 1999-2000." Environ Health Perspect 115(11): 1596-1602.
- Chapman, J. A., E. F. Kirkness, et al. (2010). "The dynamic genome of *Hydra*." Nature 464(7288): 592-596.
- Christiansen, L. B. P., K. L. Korsgaard, B. Bjerregaard P. (1998). "Estrogenicity of xenobiotics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using in vivo synthesis of vitellogenin as a biomarker." Marine Environmental Research 46(1-5): 137–140.
- Erickson, D. L., X. Krull, U. Li, D. (2004). "Electrokinetically controlled DNA hybridization microfluidic chip enabling rapid target analysis." Anal Chem 76(24): 7269-7277.
- Fujisawa T. (2003) *Hydra* regeneration and epithelipeptides. Develop Dyn 226: 182–189.
- Gilliland, F. D. M., J. S. (1996). "Serum perfluorooctanoic acid and hepatic enzymes, lipoproteins, and cholesterol: a study of occupationally exposed men." Am J Ind Med 29(5): 560-568.
- Hobmayer B, Rentzsch F, Kuhn K, Happel CM, von Laue CC, Snyder P, Rothba U, Holstein TW. (2000) WNT signalling molecules act in axis formation in the diploblastic metazoan *Hydra*. Nature 407: 186–189.
- Holstein TW, Hobmayer E, Technau U. (2003) Cnidarians: An evolutionarily conserved model system for regeneration? Develop Dyn 226: 257–267.
- Kaesbauer T, Towb P, Alexandrova O, David CN, Dall'Armi E, Staudigl A, Stiening B, Böttger A. (2007) The Notch signaling pathway in the cnidarian *Hydra*. Developmental Biology 303: 376–390.
- Karrman, A. L., I. van Bavel, B. Lindstrom, G. Oehme, M. (2007). "Identification and pattern of perfluorooctane sulfonate (PFOS) isomers in human serum and plasma." Environ Int 33(6): 782-788.

- Kudo, N. K., Y. (2003). "Toxicity and toxicokinetics of perfluorooctanoic acid in humans and animals." *J Toxicol Sci* 28(2): 49-57.
- Lion, N. G., J. O. Jensen, H. Girault, H. H. (2003). "On-chip protein sample desalting and preparation for direct coupling with electrospray ionization mass spectrometry." *J Chromatogr A* 1003(1-2): 11-19.
- Na, O. S. B., Hea Ja. Lee, Young Don. Oh, Seong Rip. Kim, Hyung Bae (2000). "Effects of Bisphenol A on the Hatching of fertilized Eggs and Spawning of Adult Fish in Songsari, *Oryzias latipes*." *한국수산과학회지* 33(5): 378~382.
- Nakayama, S. H., K. Inoue, K. Sasaki, K. Seery, B. Saito, N. Koizumi, A. (2005). "Distributions of perfluorooctanoic acid (PFOA) and perfluorooctane sulfonate (PFOS) in Japan and their toxicities." *Environ Sci* 12(6): 293-313.
- Oda, S. T., N. Watanabe, H. Morita, M. Iguchi, T. (2005). "Production of male neonates in *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea) exposed to juvenile hormones and their analogs." *Chemosphere* 61(8): 1168-1174.
- Oda, S. T., N. Watanabe, H. Morita, M. Iguchi, T. (2006). "Genetic differences in the production of male neonates in *Daphnia magna* exposed to juvenile hormone analogs." *Chemosphere* 63(9): 1477-1484.
- Ohira, S. T., K. Ikebe, S. Dasgupta, P. (2002). "Hybrid Microfabricated Device for Field Measurement of Atmospheric Sulfur Dioxide." *Analytical Chemistry* 74 (22): 5890-2002.
- Philipp I, Holstein TW, Hobmayer B. (2005) HvJNK, a Hydra member of the c-Jun NH2-terminal kinase gene family, is expressed during nematocyte differentiation. *Gene Expression Patterns* 5: 397-402
- Prest , J. E. B., Sara J. Fielden, Peter R. Goddard, Nicholas J. Treves Brown, Bernard J. (2005). "Inorganic Arsenic and Selenium Determination Using Miniaturised Isotachopheresis." *Microchimica Acta* 151(3-4): 223-230.
- Rainboth, W. J. (1996). *Fishes of the Cambodian Mekong*.
- Reyes, D. R. G., M. M. Whitesides, G. M. Manz, A. (2002). "Glow discharge in microfluidic chips for visible analog computing." *Lab Chip* 2(2): 113-116.
- Roberts, T. R. (1997). "Systematic observations on tropical Asian medakas or ricefishes of the genus *Oryzias*, with descriptions of four new species." *Ichthyological Research* 45(3): 213-224.
- Seegers, L. (1997). *Killifishes of the world*.
- Smeets, J. M. v. H., I. Giesy, J. P. Seinen, W. van den Berg, M. (1999). "Estrogenic potencies of several environmental pollutants, as determined by vitellogenin induction in a carp hepatocyte assay." *Toxicol Sci* 50(2): 206-213.
- Tatarazako, N. O., S. (2007). "The water flea *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera) as a test species for screening and evaluation of chemicals with endocrine disrupting effects on crustaceans." *Ecotoxicology* 16(1): 197-203.
- Thomsen S, Till A, Wittlieb J, Beetz C, Khalturin K, Bosch, TGC, (2004) Control of foot

differentiation in Hydra: in vitro evidence that the NK-2 homeobox factor CnNK-2 autoregulates its own expression and uses pedibin as target gene. *Mech. Develop* 121: 195-204

- Ueno, K. K., F. Kim, H. B. Tokunaga, T. Matsuo, S. Misawa, H. Kitamura, N. (2000). "Fabrication and Characteristic Responses of Integrated Microelectrodes in Polymer Channel Chip." *Chemistry Letters* 29(8): 858-859
- Vilkner, T. J., D. Manz, A. (2004). "Micro total analysis systems. Recent developments." *Anal Chem* 76(12): 3373-3385.
- Yamashita, N. K., K. Taniyasu, S. Horii, Y. Petrick, G. Gamo, T. (2005). "A global survey of perfluorinated acids in oceans." *Mar Pollut Bull* 51(8-12): 658-668.
- Yokota, H. T., Y. Maeda, M. Oshima, Y. Tadokoro, H. Nakazono, A. Honjo, T. Kobayashi, K. (2009). "Effect of bisphenol a on the early life stage in Japanese medaka (*Oryzias latipes*)." *Environmental Toxicology and Chemistry* 19(7): 1925-1930.
- You, Y.-S. K., Jwa-Kwan. Cho, Hyeon-Seo (2009). "Pollution Characteristics and Loading Flux of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons(PAHs) in Riverine Waters of Jinhae Bay, Korea." *Journal of the Korean Society of Marine Environment and Safety* 15(4): 275-282.

성과활용 계획서

사업명	환경융합신기술개발사업			과제번호	
과제명	생체정보를 이용한 수생태계 주요 유해화학물질 위해성 예측 도구 및 PAH류 검출 랩칩 개발			기술단계	(기초, 응용, 개발)
최종성과 기술	기술개발 후 실용화된 제품명 또는 공정명			참여기업	
연구기관명	한국해양과학기술원	연구책임자	염승식	총 연구기간	2010. 6. 1 - 2013. 5. 31
성과활용 담당자(*)	성과활용 책임자			성과활용 실무자	
성 명	염승식				
소속기관/직위	한국해양과학기술원/책임연구원				
이메일	syum@kiost.ac				
연락처	055.639.8540				

환경기술개발사업 운영규정 제31조제2항에 의하여 성과활용계획서를 제출합니다.

2013 년 6 월 일

주관연구기관명 : 한국해양과학기술원

주관연구기관장 : 강 정 극 (직인)

한국환경산업기술원장 귀하

□ 연구성과 목표치

구 분		목표치		실적치		
		3년이내	5년이내			
1. 경제사회적 성과	(4)고용창출 성과		(명)	(명)	(명)	
	(5)비용절감 효과		(건)	(건)	(건)	
			(백만원)	(백만원)	(백만원)	
	(6)기술이전(실시계약 체결)		(건)	(건)	(건)	
			(백만원)	(백만원)	(백만원)	
	(7)매출(공사수주/제품판매)	국내	(건)	(건)	(건)	
			(백만원)	(백만원)	(백만원)	
		국외	(건)	(건)	(건)	
(백만원)			(백만원)	(백만원)		
2. 과학기술적 성과	(9)지식재산권	특허	출원	3 (건)	(건)	4 (건)
			등록	(건)	(건)	1 (건)
		실용신안	출원	(건)	(건)	(건)
			등록	(건)	(건)	(건)
		의장	출원	(건)	(건)	(건)
			등록	(건)	(건)	(건)
		기타	출원	(건)	(건)	(건)
			등록	(건)	(건)	(건)
	(10)인증		(건)	(건)	(건)	
	(11)학술지 게재	SCI(E)학술지	6 (건)	(건)	10 (건)	
		일반학술지	(건)	(건)	2 (건)	
	(12)국내외 학술회의 발표		(건)	(건)	16 (건)	
	3. 국제협력	(13)기술무역 성과		(건)	(건)	(건)

구 분		목표치		실적치	
		3년 이내	5년 이내		
성과			(백만원)	(백만원)	(백만원)
	(14)인력교류 성과	외국연구자유치	(명)	(명)	(명)
		해외파견	(명)	(명)	(명)
	(15)국제협력 기반	MOU체결	(건)	(건)	(건)
		수요조사	(건)	(건)	(건)
		공동연구	(건)	(건)	(건)
	(16)국제학술회의 개최		(건)	(건)	(건)
4. 인력 활용/양성 성과	(17)인력지원	학사	2 (명)	(명)	(명)
		석사	3 (명)	(명)	(명)
		박사	2 (명)	(명)	(명)
		기타	(명)	(명)	(명)
	(18)장단기연수 지원	장기	(명)	(명)	(명)
		단기	(명)	(명)	(명)
	(19)산업기술인력양성 성과		(명)	(명)	(명)
5. 공공적 성과	(20)법·정책·지침 활용 성과		(건)	(건)	(건)
	(21)기타 공공성과		(건)	(건)	(건)
	(22)산업지원 성과		(건)	(건)	(건)
6. 환경적 성과	(23)환경적 성과		(건)	(건)	(건)

1. 성과활용 개요

- 최종목표
- 생체정보를 이용한 수생태계 위해성 예측 도구 개발
 - ENVIHaz HymMet Array (PAHs 및 POPs 대응)
 - ENVIHaz Daphnia qPCR Array Kit (EDCs, Bisphenol A 대응)
 - ENVIHaz Fish qPCR Array Kit (EDCs, Bisphenol A 대응)
- 수생태계 내 유해화학물질 (PAHs) 검출 랩온어칩 개발을 통해 POCT 실현
 - ENVIHaz AquaChip (PAH류 Benzo[a]pyrene 검출)

- 개발내용 및 결과
- 1. Hydra 모델 BaP 대응 DNA methylation Array 개발
 - Hydra genome 정보를 바탕으로 17,000 여개의 유전자를 추출하고, 이들을 탑재한 Hydra Expressed Gene Microarray (HEGEM) 제작
 - PAH류인 BaP 및 POPs에 속하는 PFOS에 대한 LC₅₀ 결정
 - HEGEM을 이용하여 PAH류인 BaP 및 POPs에 속하는 PFOS 노출에 의한 차등발현 유전자 프로파일링 수행함으로써, 이들 유해화학물질에 대한 생물의 대사/생리변화를 예측할 수 있는 바이오마커를 발굴
 - CLC Main Workbench 프로그램을 활용하여 Hydra genome 내의 CpG 부위를 추출하고, 이들을 탑재한 ENVIHaz-HymMet Array를 제작
 - PAH류인 BaP 및 POPs에 속하는 PFOS 노출에 의한 DNA methylation 변화양상을 파악하고, 검증함
 - 유전자 DB에 축적되어 있는 유전자 정보를 통합함으로써, 새로운 지식을 창출에 극대화를 꾀함
- 2. 내분비계 장애물질 BPA 대응 qPCR Array Kit의 개발
 - 물벼룩 모델
 - 유영능 및 생식능에 대한 EC₅₀ 농도를 결정하고, 이 농도의 노출에 의한 유전자 발현 프로파일링 수행하고, BPA focused array chip을 개발함
 - 개발된 BPA focused array chip을 이용하여, BPA 특이 물벼룩 유전자 발굴
 - Pathway 분석 및 정량 PCR 분석을 통해 BPA 특이 물벼룩 바이오마커 확정
 - BPA 특이 물벼룩 바이오마커의 PCR primer set을 탑재한 ENVIHaz-Daphnia qPCR Array Kit 개발
 - 자바송사리 모델
 - 소형어류의 BPA LC₅₀ 농도(*Oryzias latipes*, 7.6 ppm)의 1/100인 76 ppb로 노출농도 결정
 - HazChem Fish Array ver.02를 이용하여 BAP 노출 유전자 발현변화 프로파일링 수행하여 특이 유전자 후보 발굴
 - 정량 PCR 분석을 통해 1차 특이 유전자 선별하고, 이들의 PCR primer를 탑재한 ENVIHaz Fish Array Kit ver. 01 제작
 - Microarray 및 정량 PCR 반복 실험을 통해, 특이 유전자 최종 선별하고, 이들의 PCR primer

를 탑재한 ENVIHaz Fish Array Kit ver. 02 개발

3. Benzo[a]pyrene 검출 랩칩 개발

- PAH류 중, benzo[a]pyrene에 대한 항체 프로브(microbead와 항체 복합체)를 제작
- 항체프로브에 반응한 benzo-pyrene을 검출 및 분리가 가능한 미세패턴 구조체를 개발
- OCTET-work station을 이용하여 미세유로 칩 분리효율, 민감도, 검출한계 등을 확인
- BLI system을 통해 항체 코팅된 sensor를 이용해서 확인결과 제작된 미세유로칩의 검출한계는 25 ppb로 측정되었음. 보다 낮은 농도의 BaP를 검출하기 위해서는 2차 항체나 gold nanoparticle conjugate를 이용한 system 개발이 필요할 것으로 생각됨

◦ 연구성과 활용계획

- ENVIHaz HymMet Array (PAHs 및 POPs 대응)
 - Hydra의 DNA methylation 변화 분석 가능한 DNA microarray
 - BaP 및 PFOS의 경우, 300-500 ppb 수준에서의 변화 감지 가능
 - 환경유해화학물질에 의한 유전자 발현변화의 후성유전학적 조절 연구에 적용
 - 수생태계 위해성 사전 예측 및 조기 진단
- ENVIHaz Daphnia qPCR Array Kit (EDCs, Bisphenol A 대응)
- ENVIHaz Fish qPCR Array Kit (EDCs, Bisphenol A 대응)
 - 수생태계 모델인 물벼룩 및 자바송사리 기원의 BPA 특이 유전자를 활용한 qPCR Array Kit
 - 수계의 BPA 오염 여부를 비치사수준(물벼룩: 10 ppm 수준; 자바송사리: 80 ppb 수준)에서 판단 가능
 - BPA를 포함한 내분비계 장애물질에 의한 수생생물의 대사/생리 변화 예측
 - 신규 화학물질의 내분비계 장애 유발 여부를 신속하고 정확히 예측 가능
- ENVIHaz AquaChip (PAH류 Benzo[a]pyrene 검출)
 - 미세유체역학 기반의 랩칩으로써, BaP 25 ppb 수준에서 검출 가능
 - 수생태계 내 유해화학물질 (PAHs) 검출 랩칩 개발을 통해 POCT 실현
 - 수계의 BaP 신속 검출 키트로 활용

※ 구체적 성과물의 명칭, 성능, 용도, 수요처 등에 대해 6차 원칙에 따라 활용방법 및 계획을 구체적으로 기술(참여기업이 있는 경우 기술이전 및 사업화 계획 포함)

2. 경제사회적 성과달성 계획

◦ 사업화 추진 형태

항목	기존제품 개선	신제품 개발	기존공정 개선	신공정 개발
성과물 명칭		○		

주) 성과물이 여러 건인 경우 모든 성과물을 해당 항목에 각각 기재

- 예) 신공정 개발 : 열호스를 이용한 증기경화방식 개발
- 신제품개발 : 종래 시장에 없었던 제품 (새로운 시장을 개척)
 - 기존제품개선 : 기존 제품의 성능과 기능을 향상시킴
 - 신공정개발 : 새로운 제조방법, 프로세스의 개발
 - 기존공정개선 : 기존 프로세스의 혁신 (생산비용 절감 등)

□ 사업화 추진계획

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	해당사항 없음			
	소요예산(백만원)				
	예상 매출규모(억원)	현재까지	3년이내	5년이내	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년이내	5년이내
		국내			
국외					
	향후 관련기술 제품을 응용한 타 모델 제품 개발계획				
무역수지 개선효과	(단위 : 억원)	현재	3년이내	5년이내	
	수입대체(내수)				
	수 출				

□ 고용창출 계획

항 목	세부 항목	성 과		
		현재까지	3년이내	5년이내
고용효과	연구인력(명)	해당사항 없음		
	생산인력(명)	해당사항 없음		

※ 고용 창출 : 개발된 기술을 사업화 하는 과정에서 신규로 고용한 인력

- 기술개발 및 사업화를 위한 연구팀이나 생산부서의 신규 생성 및 확대, 창업 등을 통한 예상 고용창출 인원을 기재
- 기업 전체 인력 변동이 아닌 해당기술의 사업화와 관련된 인력으로 범위 제한

□ 비용절감 계획

항 목	세부 항목	성 과		
		현재까지	3년이내	5년이내
비용절감 효과	총비용절감액 (백만원)	해당사항 없음		

주) 비용절감 효과 : 개발된 기술로 공정의 효율성을 개선시켜 공사비, 유지관리비, 부품·재료비, 인건비 및 기타비용을 절감한 경우 예상되는 절감비용 기재
 예) 기존 대비 원가절감 %, 에너지 절감%, 생산성향상 % 및 기타 등
 [기술개발 이전 생산비(3억원) - 기술개발 이후 생산비(2억원)] = 1억원

□ 기술이전(실시계약 체결) 계획

항 목	세부 항목	성 과		
		현재까지	3년이내	5년이내
기술이전	총계약액(백만원)	해당사항 없음		

※ 기술이전 : 국가연구개발사업을 통해서 확보한 기술을 기업체에 이전하는 것 등
 ※ 기술료 계약, 징수, 사용 실적에 대해 전문기관에 문서로 보고된 경우에 인정

□ 매출 추진계획

(단위 : 백만원)

구분		성 과		
		현재까지	3년이내	5년이내
공사수주	국내	해당사항 없음		
	수출			
	수입대체			
	소계			
제품판매	국내	해당사항 없음		
	수출			
	수입대체			
	소계			

2. 과학기술적 성과달성 계획

□ 지식재산권

항 목	세부 항목	성 과		
		현재까지	3년 이내	5년 이내
특허	출 원(건)	4		
	등 록(건)	1	3	

- ※ 지식재산권 출원인은 개인명으로 출원 불가하며, 주관연구기관명의로만 가능
 - 다만, 별도의 계약이 있을 경우에만 참여기업이나 위탁연구기관과 공동명의 가능
 - 개인명으로 출원·등록된 성과는 즉시 기관명의로 환원하지 않을 경우 제재조치 가능
- ※ 특허출원 증빙자료로 과제별 고유번호, 환경부 지원사실, 연구과제명 등을 기재한 특허출원서 제출
 - '11년 시범적용 및 '12년부터는 국가연구개발사업 지원사항 미기재시 실적 불인정
- ※ 운영규정에 따라 특허성과 보고기일 엄수
 - 특허출원 및 등록하는 경우 6개월 이내에 시스템에 성과등록
 - 국외특허등록시 등록공보 발간후 3개월 이내에 시스템에 성과등록

□ 인증내역

항 목	세부 항목	성 과		
		현재까지	3년 이내	5년 이내
인증	인증 종류	해당사항 없음		
	등 록(건)			

- 주) 국내외 신기술, 신제품 등 관련 인증
 - 신기술인증(환경신기술, 건설신기술 등)
 - 신제품인증
 - 녹색기술인증, 환경표지인증 등
- ※ 기타 소프트웨어(S/W), 상표, 서비스 등 기재
- ※ 인증내역 중 '연장'의 경우에는 실적으로 불인정(성과로 등록하지 말것)

□ 국내외 전문학술지(논문) 게재

항 목	세부 항목	성 과		
		현재까지	3년 이내	5년 이내
논문	SCI(E) 논문(건)	10		
	일반 논문(건)	2		

- ※ 'Vol.(No.)&페이지'가 없는 출간예정, 게재예정, 등록예정인 논문의 경우 실적 불인정
- ※ 동일 R&D사업 내에서 1개 논문을 중복 입력하지 말 것
 - 2개 과제 연구자가 공동으로 논문을 게재한 경우라 하더라도 논문작성 기여도 등에 따라 협의하여 1개 논문만 입력
- ※ 논문 증빙자료로 저자, abstract, acknowledgement를 확인할 수 있는 사본 제출
 - 특히 사사에 "환경부 xx연구사업명" 등의 지원사실 미기재시 실적 불인정

□ 국내외 학술회의(세미나) 발표

항 목	세부 항목	성 과		
		현재까지	3년이내	5년이내
학술회의	발표(건)	16		

※ 학술회의 발표 증빙자료로 학술회의명 및 발표연도를 확인할 수 있는 논문 사본 제출

3. 국제협력 계획

□ 기술무역

항 목	세부 항목	성 과		
		현재까지	3년이내	5년이내
기술무역	총계약액(백만원)	해당사항 없음		

□ 인력교류

항 목	세부 항목	성 과		
		현재까지	3년이내	5년이내
인력교류	외국 연구자 유치(명)	해당사항 없음		
	해외 파견(명)			

□ 국제협력 기반

항 목	세부 항목	성 과		
		현재까지	3년이내	5년이내
국제협력	MOU 체결(건)	해당사항 없음		
	수요조사(건)			
	공동연구(건)			

□ 국제학술회의 개최

항 목	세부 항목	성 과		
		현재까지	3년이내	5년이내
국제학술회의	개최(건)	해당사항 없음		

4. 인력활용·양성 계획

□ 과학기술인력 양성 및 활용

항 목	세부 항목		성 과		
			현재까지	3년 이내	5년 이내
인력양성/활용	인력 지원(명)	박사	2		
		석사	3		
		학사	2		
		기타			
	장단기 연수 지원(명)	학술연수			
		기술연수			

※ 인력지원 성과는 해당 연구개발과제에 참여하여 학사, 석사, 박사 학위 등을 취득한 인력 배출 성과를 의미(석사, 박사 학위논문 표지 사본 제출)
 ※ 학술연구 또는 산업기술(예, 소각기술 등) 습득을 목적으로 국내외 연수에 지원한 실적을 기재 하되, 단순 학회참석 등은 제외

□ 산업기술인력 양성 계획

항 목	세부 항목	성 과		
		현재까지	3년 이내	5년 이내
산업기술인력양성 프로그램	교육개최(건)	해당사항 없음		

5. 공공적 성과달성 계획

□ 법·정책·지침 활용 계획

항 목	세부 항목	성 과		
		현재까지	3년 이내	5년 이내
공공성과 계획	법 제정/개정(건)	해당사항 없음		
	정책 제안/채택(건)			
	지침 제안/반영(건)			

※ 공공기술 활용자/활용기관이 기술성과를 법, 정책 또는 지침에 제안, 반영 또는 채택
 예) 지침 : 토종여우복원 지침, 천연기념물 어름치와 다슬기류 관리지침(안) 등
 ※ 환경부 정책과 무관한 연구결과로, 보고서로만 제시된 제안일 경우 불인정
 ※ 환경분야 설계·시공업체의 자체적인 기준/지침인 경우 불인정

□ 저작권, 책자 등 등록 계획

항 목	세부 항목	성 과		
저작권 등 등록	등록/발간 종류	해당사항 없음		
	등 록(건)	현재까지	3년 이내	5년 이내

예) 프로그램 : 도시·산단지역의 통합환경관리를 위한 위해성 평가 및 분석 프로그램
절차서 : Annoyance의 정량적 평가 방법(Long-term exposure)

□ 기타 공공성과달성 계획

항목	데이터베이스	매뉴얼	S/W	공공서비스...
성과물 명칭	해당사항 없음			

주) 성과물이 여러 건인 경우 모든 성과물을 해당 항목에 각각 기재

예) 데이터베이스 : 주요 산업별 HAPs 인벤토리 DB 구축 등

※ 공공기술의 경우 실적을 증빙할 수 있는 데이터베이스, 매뉴얼, S/W, 기법, 실험기준, 공공서비스 등의 구체적인 성과물을 증빙자료로 제출

□ 산업지원 계획

항 목	세부 항목	성 과		
		현재까지	3년 이내	5년 이내
산업지원	기술지도(지원)(건)	해당사항 없음		
	기술이전(건)			
	기술평가(건)			

주1) 기술지도(지원) : 연구원 파견 등을 통해 산업현장의 애로 사항을 해소해 주는 것 등

2) 기술이전 : 국가연구개발사업을 통해서 확보한 기술을 기업체에 이전하는 것 등

3) 기술평가 : 기술자체의 우수성 평가 뿐 아니라 기술의 시장성 등 다양한 평가를 포함

6. 환경적 성과달성 계획

항 목	세부 항목	성 과
환경적 성과	환경부하 감소효과	<ul style="list-style-type: none"> - 유해화학물질의 신속 검출 및 환경시료에 대한 신속한 생태/환경 위해성 평가 구현을 통해 상시 환경 감시체제 구축에 일조
	환경질 개선 효과	<ul style="list-style-type: none"> - 지속적인 감시와 유해화학물질의 생물학적 영향 파악을 통해 수생태계의 오염도 완화에 기여
	환경영향 (사람 및 자연에 대한 영향) 개선효과	<ul style="list-style-type: none"> - 미량의 화학물질의 생물학적 영향을 유전자 생체지표 수준에서 이해하고, 유전자 발현의 변화에 의해 유도되는 표현형적 변화를 이해함으로써 환경유해화학물질의 환경/생태 위해성을 정확히 파악하여 대체물질의 개발을 유도하고, - 신규 화학물질의 환경/생태 위해성을 사전에 예측하고, 생물에 대한 영향을 정확히 진단하여, 시장 진입을 차단함으로써 장기적인 수생태계 보전을 실현

- ※ 개발된 기술의 활용에 따른 환경개선 파급효과를 구체적으로 기술(정량적/정성적으로 작성)
- ※ 동 기술개발로 얻어진 환경부하감소(단기), 환경질개선(중기), 환경영향최소화(장기) 효과 등을 기재
- ※ 동 기술개발 최종목표와 연계하여 작성하되, 추정된 산정방식 기재

주 의

1. 이 보고서는 환경부에서 시행한 환경기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 환경부에서 시행한 환경기술개발사업의 연구개발 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.