GOVP1200819868

T00262-09

저서성 요각류 *Tigriopus japonicus*를 이용한 중금속 및 환경오염물질의 분자환경생물학 및 분자환경분석학적 독성영향평가

Toxicological assessment of heavy metals and environmental pollutants in water using copepod *Tigriopus japonicus*

한양대학교 SG 연구사업단

해양 수산부

제 출 문

해양수산부 장관 귀하

본 보고서를 **"저서성 요각류 *Tigriopus japonicus*를 이용한 중금속 및 환경 오염물질의 분자환경생물학 및 분자환경분석학적 독성영향평가에 관한 연구"** 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007년 12월 31일

주관연구기관명 : 한양대학교
주관연구책임자 : 이 재 성
참 여 교 수 : 윤 태 현
연 구 원 : 김 도 현
연 구 원 : 김 종 윤
연 구 원 : 이 재 성

연구개발보고서 초록

<table>
<tr><td rowspan="2">과 제 명</td><td colspan="5">(국문) 저서성 요각류 Tigriopus japonicus를 이용한 중금속 및 환경오염물질의 분자환경생물학 및 분자환경분석학적 독성영향평가</td></tr>
<tr><td colspan="5">(영문)Toxicological assessment of heavy metals and environmental pollutants in water using copepod Tigriopus japonicus</td></tr>
<tr><td>주관연구기관</td><td colspan="2">한양대학교 SG연구사업단</td><td rowspan="2">총괄연구책임자</td><td colspan="2">(소속) 한양대학교 화학과</td></tr>
<tr><td>참 여 기 업</td><td colspan="2">·</td><td colspan="2">(성명) 이 재 성</td></tr>
<tr><td rowspan="4">총연구개발비
(42,430천 원)</td><td>계</td><td>42,430 천원</td><td>총연구기간</td><td colspan="2">2006. 12. ~ 2007. 12</td></tr>
<tr><td>정부출연금</td><td>42,430 천원</td><td rowspan="3">총참여연구원수</td><td>총 인 원</td><td>6명</td></tr>
<tr><td>기업부담금</td><td></td><td>내부인원</td><td>6명</td></tr>
<tr><td>연구기관부담금</td><td></td><td>외부인원</td><td>·</td></tr>
<tr><td rowspan="2">국제공동연구</td><td>공동연구과제명</td><td colspan="4"></td></tr>
<tr><td>공동연구기간</td><td></td><td colspan="2">상대국연구기관명
(상대국연구책임자)</td><td></td></tr>
<tr><td>위탁연구</td><td>연구기관명</td><td colspan="2"></td><td>연구책임자</td><td></td></tr>
</table>

○ 연구개발 목표 및 내용(개조식)

- 요각류 *Tigriopus japonicus*에 미치는 중금속이온의 분자독성학적 기작을 해석한다.
- 요각류 *Tigriopus japonicus*에서 대상화합물에 민감하게 반응하는 biomarker gene의 클로닝 및 중금속 노출에 따른 gene 발현양상을 분석한다.
- 요각류 Tigriopus japonicus의 분자영상기법을 통한 분석

○ 연구결과

- 요각류 *Tigriopus japonicus*에 미치는 중금속(Cu, As)의 영향에 대한 독성학적 기작을 규명
- 요각류 *Tigriopus japonicus*에 미치는 중금속(Cu, As)의 노출에 따른 up- 또는 down-regulation 되는 유전자의 클로닝 및 염기서열 분석을 통한 biomarker gene으로 응용
- 요각류 Tigriopus japonicus의 분자영상기법을 통한 분석 기법 확보

○ 연구성과 활용실적 및 계획

- 요각류를 환경독성학적 실험동물로 개발할 수 있어, 우리나라에 서식하는 생물을 이용한 한국형 환경오염 및 독성 연구모델을 수립할 수 있다.
- 수중생물의 먹이연쇄에 매우 중요한 역할을 하는 요각류는 간독성 해독작용에 관여하는 glutathione S-transferase가 관련 chemicals의 노출에 따라 그 유전체의 발현이 유도되어 이를 독성 연구의 민감한 biomarker로서 활용 가능하다.
- 양자점을 탐침으로 활용한 요각류 생물체의 in-vivo imaging 연구를 통하여 이온성 중금속 나노물질이 요각류를 비롯한 다양한 지시생명체의 생체내에 어떻게 흡수 분포 관련된 다양한 연구에 활용될 수 있다.

색인어	한글	요각류	중금속,	환경오염물질	독성영향평가
	영어	copepod	heavy metals	environmental pollutants	Toxicological assessment

요 약 문

Ⅰ. 제 목 : 저서성 요각류 *Tigriopus japonicus*를 이용한 중금속 및 환경오염물질의 분자환경생물학 및 분자환경분석학적 독성영향평가에 관한 연구

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

○ 요각류 *Tigriopus japonicus*에 미치는 중금속이온의 분자독성학적 기작을 해석하고 요각류 *Tigriopus japonicus*에서 대상화합물에 민감하게 반응하는 biomarker gene의 클로닝과 함께 이들의 단백질을 in vitro 수준에서 만들어 항체를 이용한 분자환경생물학적 연구 및 분광분석법을 이용한 분자이미징기법 연구분야의 학제간 연구의 틀을 만드는데 그 목적이 있다.

○ 본 연구의 수행은 환경지표생물체로서 1) 요각류 *Tigriopus japonicus*에 관한 환경독성학적분야에 새로운 연구방법론을 개발할 수 있으며, 2) 환경독성물질과 요각류 *Tigriopus japonicus*와 같은 생명체간의 상호작용에 관한 보다 근본적인 이해를 얻을 수 있고, 3) 따라서 보다 나은 문제해결방법을 도출해 내는데 큰 기여를 할 수 있을 것으로 기대된다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

○ 요각류에 미치는 중금속(Cu, As)의 영향에 대한 독성 검사
○ 요각류에 미치는 중금속(Cu, As)의 노출에 따른 up- 또는 down-regulation되는 유전자의 클로닝 및 염기서열 분석
○ 환경오염물질에 노출되지 않은 요각류 생물체 시료의 고분해능 전자현미경(TEM) 및 연 X-선 분광현미경용 시편제작 및 이미지 관찰
○ 다양한 농도와 시간동안 중금속 환경오염물질(구리(Cu) 와 비소(As))에 노출된 요각류 생물체 시료의 고 분해능 전자현미경(TEM) 및 연 X-선 분광현미경을 이용한 분석
○ 경 X-선 현미경의 좋은 투과력을 이용한 요각류 생물체의 *in-vivo* 실험방법 고안

Ⅳ. 연구개발 결과

○ 요각류에 미치는 중금속(Cu, As)의 영향에 대한 독성 검사
본 실험에서 중금속 중, 구리 (Cu)가 가장 높은 독성을 보였으며 이때 48h 및 96h 독성실험의 NOEC 값은 각각 2.0, and 1.0 mg/L였다. 다음으로 비소Ⅲ (As Ⅲ)이 48h 및 96 독성실험에서 비소Ⅴ(AⅤ) 보다 높은 독성을 보였다.

○ 요각류에 미치는 중금속(Cu, As)의 노출에 따른 up- 또는 down-regulation되는 유전자의 클로닝 및 염기서열 분석
중금속 (Cu, As) 의한 metallothionein family (MT-F), glutathione reductase (GR), superoxide dismutase (Cu/Zn-SOD, Mn-SOD), catalase (CAT), glutathion peroxidase (GPx, Se-GPx) 그리고 glutathione S-transferase (GST-σ, GST-ω) 유전자의 발현 변화를 조사한 결과 GR, Mn-SOD, Se-GPx, GST-σ 유전자가 대조구에 비해 유의하게 높은 발현양상을 보였으며 특히 GST-σ 유전자는 중금속에 반응하

는 유전자에 대한 biomarker gene으로써 그 활용도가 높을 것으로 사료된다.

○ 요각류 *Tigriopus japonicus*의 분자영상기법을 통한 분석
본 연구에서는 요각류에서 중금속 (나노입자) 이온의 흡수/분포/대사/배설 등의 거동을 in-vivo 상태에서 관찰할 수 있는 분석방법으로서 다양한 형태로 표면개질된 양자점 나노입자와 (공초점) 형광 이미징 및 분광 분석법을 결합한 방법을 제시하고 요각류의 연구에 활용하였다. 이러한 연구과정을 통하여 중금속 이온 및 나노입자의 요각류내 물리적/화학적 거동 연구에 향후 다양하게 활용될 수 있는 분석 기법이 개발 되었으며 추후 다양한 중금속 오염물질 또는 나노물질에 노출된 요각류의 오염물질 체내축적 및 그 방어기작을 규명하는데 도움이 될 것이다.

V. 연구개발 결과의 활용계획

○ 요각류를 환경독성학적 실험동물로 개발할 수 있어, 우리나라에 서식하는 생물을 이용한 한국형 환경오염 및 독성 연구모델을 수립할 수 있다.

○ 수중생물의 먹이연쇄에 매우 중요한 역할을 하는 요각류는 간독성 해독작용에 관여하는 glutathione S-transferase가 관련 chemicals의 노출에 따라 그 유전체의 발현이 유도되어 이를 독성 연구의 민감한 biomarker로서 활용 가능하다.

○ 수서환경오염 연구에 중요한 모델종의 확립에 기여하여 어류 등을 이용한 기존 연구에 상승적인 역할을 수행하여 보다 신속하고 민감한 결과를 제시될 것으로 기대된다.

○ 본 연구과정을 통하여 구축한 형광 분광현미경 시스템은 향후 다양한 활용분야가 있다. 특히 요각류와 같은 지시생명체에서 형광 probe가 부착된 독성 물질의 흡수/분포/대사/배설 과정에 관한 toxicokinetics 연구에 유용한 정보를 줄 수 있을 것으로 생각되며, 향후 laser source를 활용한 단파장 여기(excitation)와 optical sectioning 등의 기능을 추가할 경우 요각류 시료의 독성메카니즘에 관한 보다 깊이 있는 정보를 얻을 수 있을 것이다. 또한 양자점을 탐침으로 활용한 요각류 생물체의 in-vivo imaging 연구를 통하여 이온성 중금속 나노물질이 요각류를 비롯한 다양한 지시생명체의 생체내에 어떻게 흡수 분포 관련된 다양한 연구에 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

SUMMARY

Ⅰ. Title

Toxicological assessment of heavy metals and environmental pollutants in water using copepod *Tigriopus japonicus*

Ⅱ. Objects and importance

○ This study was performed to investigate the mechanism of molecular toxicity and expression of sensitive biomarker genes by heavy metal ionsin the copepod, *T. japonicus*, and also to find out the optimum in-vivo imaging tool for the study of that organism.

○ The outcome of this study would be expected to contribute 1) to develop an improved methodology of study on environmental toxicology in copepod, *T. japonicus*, 2) to understand the interaction of *T. japonicus* and environmental toxic chemicals, 3) to solve the the environmental pollution problem using *T. japonicus* as the standard environmental organism

Ⅲ. Contents and scopes

○ Acute toxicity test in *T. japonicus*on the heavy metals (Cu, As)

○Expression patterns of genes with up- and down-regulation by heavy metals (Cu, As) in the copepod, *T. japonicus*

○ Optimum in-vivo imaging tool for the study of *T. japonicus*

Ⅳ. Results

○ Acute toxicity test for *T. japonicus*on the heavy metals (Cu, As) :

Copper was most toxic chemical amongst all heavy metals (48h NOEC 2.0 mg/L, 96h NOEC 1.0 mg/L), followed by arsenite (AsⅢ 48 NOEC 5 mg/L, 96 NOEC 4 mg/L) and arsenate (AsⅤ 48 NOEC 12.5 mg/L, 96 NOEC 6.3 mg/L).

○ Expression patterns of genes with up- and down-regulation by heavy metals (Cu, As) in the copepod, *T. japonicus* :

Expression patterns of metallothionein family (MT-F), glutathione reductase (GR), superoxide dismutase (Cu/Zn-SOD, Mn-SOD), catalase (CAT), glutathion peroxidase (GPx, Se-GPx) and glutathione S-transferase (GST-σ, GST-ω) genes by heavy metals (Cu, As) in the copepod, T. japonicus were investigated. GR, Mn-SOD, Se-GPx, GST-σ genes in metal treatment groups up-regulated compared with the controls. Especially, GST-σ showed a strong response of upregulation and it suggested that it could be used suitably as biomarker gene against heavy metal exposure.

○ Optimum in-vivo imaging tool for the study of *T. japonicus* :

In this study, various imaging techniques, including high resolution TEM, hard x-raymicroscopy and fluorescence microscopy, have been applied for the study of T. japonicus.As a result, fluorescence microscopy system combined with spectroscopic analysis capability was identified to be a suitable tool for imaging studies on T. japonicus.

V. **Device for practical use**

○ The development of copepod, *T. japonicus* for the test in environmental toxicology could be able to establish the model organism for environmental toxicology which is suitable for not only Korea but also western pacific coastal regions.

○ Expression of biomarker genes such as glutathione S-transferase (GST-σ) in *T. japonicus* could used as sensitive molecular device for study in environmental toxicology

○ It could be possible to make fast and sensitive results for the study on aquatic environmental pollution as a result of establishment of the new model species (*T. japonicus*) with fish.

○ In addition, a quantum dot nanoparticles with various surface modifications were prepared, characterized and used as a fluorescence probe for the in-vivo imaging study of *T. japonicus*, which can be used in various applications, such as toxicokinetics and mechanistic study of ionic heavy metals as well as their nanoparticles.

CONTENTS

Chapter 1.	Research outline	----------	8
Chapter 2.	International and local background	----------	10
Chapter 3.	Contents and results	----------	12
Chapter 4.	Research contribution	----------	48
Chapter 5.	Further application of research results	----------	51
Chapter 6.	References	----------	52

Appendix 1. Written opinion of self-estimation

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 ---------- 8

제 2 장 국내외 기술개발 현황 및 과학기술정보 ---------- 10

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 ---------- 12

제 4 장 연구개발 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 ---------- 48

제 5 장 연구개발결과의 활용계획 ---------- 51

제 6 장 참고문헌 ---------- 52

별 침 자체평가의견서

제 1 장 연구개발과제의 개요

1절. 연구의 목적 및 필요성

1. 연구의 목적

가. 요각류 *Tigriopus japonicus*에 미치는 환경오염물질 (중금속이온)의 분자독성학적 기작을 해석한다.

나. 요각류 *Tigriopus japonicus*에서 대상화합물에 민감하게 반응하는 biomarker gene의 클로닝과 함께 이들의 단백질을 in vitro 수준에서 만들어 항체를 이용한 분자환경생물학적 연구 및 나아가서는 분광분석법을 이용한 분자이미징 기법 연구분야의 학제간 연구의 틀을 만든다.

다. 고분해능 투과전자현미경을 이용하여 다양한 형태의 중금속 독성물질들이 요각류 *Tigriopus japonicus*에 미치는 영향에 대한 환경독성학적인 지식을 축적한다.

라. 경 X-선 분광현미경과 공초점현미경을 이용하여 요각류의 in-vivo 이미징 방법을 개발하고 이들 방법을 환경 독성학적 응용법을 개발한다.

마. 위의 x-선 및 전자현미경적인 방법들을 이용하여 다양한 중금속 오염물질에 노출된 요각류 *Tigriopus japonicus*의 오염물질 체내축적 및 그 방어기작을 규명한다.

2. 연구의 필요성

가. 과학기술의 발달과 생활양식의 급격한 변화로 인해 등장한 다양한 종류의 새로운 화학물질은 인류 및 생태계에 극심한 환경오염문제를 야기시키고 있으며 자연환경의 자정능력 이상으로 유입된 이러한 오염물질들에 의해 자연환경의 파괴가 광범위하게 그리고 급속도로 진행되고 있다.

나. 다양한 환경 분야 중에서 특히, 수 환경의 오염은 환경오염물질들이 생산자나 1차소비자에 해당되는 생물군의 체내에 축적되고 먹이사슬을 통해 상위소비자의 체내에 농축됨으로서 더 큰 독성영향을 나타낼 것으로 시사된 바 있다.

다. 이러한 환경오염 연구를 위하여는 해양 및 육상의 수환경 생태계내에서 외부 환경에 민감히 반응하여 계절적으로 생산량 변동이 큰 생산자와 소비자 사이에 에너지 흐름을 연결해줄 생물군에 대한 연구가 필요하며, 그 연구 대상으로 요각류 *Tigriopus japonicus*가 유용한 지시생물체로서의 역할을 할수 있다.

라. 요각류 *Tigriopus japonicus*는 연안 및 담수역에 서식하는 우점종으로, 수서생태계에서 식물플랑크톤을 섭식하여 식물플랑크톤의 생체량을 조절하고, 어류의 자치어 및 다양한 상위 단계 포식자의 가장 중요한 먹이원 되며, 생태계의 생산자와 상위 소비자를 연결해 주는 1차 소비자로서 생태계에서 매우 중요한 위치에 있다.

마. 이들 요각류 *Tigriopus japonicus*는 크기가 작고 생활사의 주기도 매우 짧으며 주위의 환경변화에 민감하게 반응을 하기 때문에 해양환경의 모니터링에 주로 사용되는 대형저서생물에 비해서 오염에 대한 반응이 매우 빠르고 즉각적이며, 상대적으로 시료의 채집이 매우 용이하고 간단하여 환경오염을 감시하는데 적합한 생물로 알려져 있다.

바. 비록 요각류 *Tigriopus japonicus*와 같은 수환경 지표(indicator) 생물체에 대한 분자생물학적, 그리고 분자영상기법을 이용한 연구는 아직 이루어지지 않았다.

사. 향후 연구가 수행될 경우 환경지표생물체로서 1) 요각류 *Tigriopus japonicus*에 관한 환경독성학적분야에 새로운 연구방법론을 개발할 수 있으며, 2) 환경독성물질과 요각류 *Tigriopus japonicus*와 같은 생명체간의 상호작용에 관한 보다 근본적인 이해를 얻을 수 있고, 3) 따라서 보다 나은 문제해결방법을 도출해 내는데 큰 기여를 할 수 있을 것으로 기대된다.

아. 이에 더하여 본 연구에서 제시하고 있는 수환경지표 생물체에 대하여 분자생물학적인 방법과 전자현미경 및 X선 현미경을 이용한 분자영상기법등의 다양한 접근방법의 사용과 그 결과의 종합적인 해석은 요각류 *Tigriopus japonicus*뿐만 아니라 앞으로 계속되어야 할 여러 환경지시생물에 들의 연구에 중요한 기술적인 Protocol로서 자리 잡을 수 있을 것이다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황 및 과학기술정보

1절. 과제관련 국내외 동향

1. 산업수요 측면

가. 사회 경제적으로 커다란 이슈가 되고 있는 환경오염 문제에 효율적으로 대처하기 위한 노력중의 일환으로 중금속 등 환경오염물질의 저서 요각류 *Tigriopus japonicus*에 미치는 독성학적인 영향을 분자영상기법 및 분자생물학적인 방법을 이용한 새로운 과학적 접근방법을 통해 연구하고 그 원인 및 파생 가능한 결과를 근원적인 수준에서 정확히 규명하여 보다 효과적인 환경오염문제 해결대책을 확보하는 것이 매우 중요하다.

2. 연구수행 측면

가. 특히 최근 미국등지의 해외에서는 NSF, DOE 등에서 지원하는 환경분자과학연구소 (Environmental Molecular Science Institute, EMSI)가 여러 명문대학 (Stanford, UC Irvine, Ohio State U. etc.) 들과 국립연구소들(PNNL, LBNL, ORNL)을 중심으로 하여 설립되었고 이러한 EMSI들에서 화학, 생물학, 분광학, 환경과학 및 공학 그리고 지구과학등의 다양한 분야 전문가들이 모여 학제간의 공동연구를 통하여 분자수준에서의 환경문제를 연구하고 그 근본적인 해결책을 개발하는 분야가 커다란 연구의 한 흐름을 형성하고 있다.

나. 그러나 전 세계적으로 저서생물체 중 중요한 지표생물종인 요각류 *Tigriopus japonicus*에 대하여 이러한 분자환경과학적인 접근법을 이용한 연구는 거의 전무하다. 특히, 기존 본 연구그룹의 분자생물학적인 지식에 새로운 첨단 분석기술인 연/경 X선 분광현미경과 같은 분자영상기법이나, 질량분석법의 도입하여 중금속오염이나 환경잔류의약품등의 분석을 하는 연구는 기존의 다른 연구그룹에 의하여 전혀 시도된 바 없다.

다. 국내에서의 해양환경 및 수환경 독성 연구는 주로 어류 및 패류를 중심으로 평가되고 있고 저서성 요각류 *Tigriopus japonicus*를 이용한 연구는 전무한 상태이다. 이는 요각류 *Tigriopus japonicus*를 이용한 연구가 어렵다기 보다 이들의 사육 및 독성평가의 protocol이 국내에 아직 공식적으로 정해진 것이 없는 것도 큰 이유 중의 하나이다. 그러나, 무엇보다도 요각류 *Tigriopus japonicus*의 연구가 단지 분류 및 생태쪽에 치우쳐 요각류 *Tigriopus japonicus*의 분자생물학적 접근이 국내 및 세계적으로도 거의 없다는 데 큰 이유가 있다.

라. 이러한 유용실험생물인 요각류 *Tigriopus japonicus*를 이용한 연구는 국내는

물론 국외에서도 주로 in vivo 상태에서 화학물질을 노출하는 수준의 실험이 주를 이룬다. 일본 나가사끼 대학교의 Prof. A. Hagiwara 연구실도 저서성 요각류 *Tigriopus japonicus*를 가지고 유사한 실험을 하지만, 아직 in vivo 수준에서 벗어나지 못하고 있다. 미국에서는 Dr. Snell이 유사한 연구를 하고 있지만, 이들 그룹도 역시 in vivo 수준에 그치고 있다. 현재까지 이들 요각류 *Tigriopus japonicus*를 이용한 연구는 in vivo 수준의 생태학적 연구에 국한되고 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

1절. 연구개발 과정 및 실험방법

1. 요각류에 미치는 중금속(Cu, As)의 영향에 대한 독성 검사

가. 실험에 사용된 중금속은 구리 (Cu : CuSO45H2O, Sigma, USA, 99+% pure), 비소 Ⅲ (AsⅢ : NaAsO2, Sigma, USA, 94% pure) 및 비소Ⅴ (AsⅤ : NaHAsO4·7H2O, Sigma, USA, 98% pure) 이였으며 각 chemical의 농도처리를 위해 deionized water에 녹여 stock solution을 제조하였다. 다시 이 stock solution은 0.2 μm fiber filter를 통과한 여과해수로 적정량 희석하여 각각의 실험용액을 제조하였다. 실험 copepod는 해수산 harpacticoid copepod인 *Tigriopus japonicus* 성체를 사용하였고 12 well culture plate (Nunc, Inc., USA; working volume, 4ml)에 각 hole당 10 마리를 수용하여 32‰, 20℃에서 각각 48 및 96시간 방치 후 생존율을 조사하였다. 각 독성물질의 실험농도는, 48시간 독성검사의 경우, 구리는 0(control), 0.5, 1, 2, 4, 8, 16 mg/L, AsⅢ는 0(control), 5, 10, 15, 25, 35mg/L, AsⅤ는 0(control), 6.25, 12.5, 25, 50, 100 mg/L로 설정하였고, 96시간 독성검사의 경우, 구리는 0(control), 1, 2, 4, 8, 16 mg/L, AsⅢ는 0(control), 2, 4, 6, 8, 10 mg/L, AsⅤ는 0(control), 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50 mg/L로 설정하였다. *T. japonicus*의 생존유무는 Kwok and Leung (2005)의 방법에 의해 입체현미경 하에서 결정하였으며 실험결과는 probit 분석법 (Finney, 1989)에 의해 LC10 및 LC50을 얻었고 Dunnett's test에 의해 NOEC (no oberved effect concentration)를 계산하였다.

2. 요각류에 미치는 중금속(Cu, As)의 노출에 따른 up- 또는 down-regulation되는 유전자의 클로닝 및 염기서열 분석

가. 요각류에 미치는 중금속의 영향을 분자수준에서 보기위해 앞의 선행연구에서 보여준 바와 같이 SeeGene사의 differential display에 의한 방법과 이들 중금속 특이 반응 유전자를 degenerative RT-PCR primer를 Clustal W를 이용하여 design하고 이들 2가지 방법을 토대로 요각류에서 중금속에 반응하는 유전자를 클로닝하였다. 이의 클로닝을 통해 염기서열 분석을 하였다.

나. 얻어진 염기서열을 이용하여 real-time PCR primer를 design하고 여러 시간에 따른 유전자 발현 변화를 조사하였다. Cu 및 As Ⅲ에 대한 *T. japonicus*의 유전자 발현을 조사하기 위해 각 중금속의 96h NOEC (Cu : 1 mg/L, As : 4 mg/L)를 기준농도로 하여 0 - 96h 동안 32 ppt, 20℃에서 처리하였다. 실험구

당 약 200개체의 성체로 50 ml tube에서 실시하였고 실험기간 동안은 먹이를 공급하지 않았으며 48h 마다 같은 처리농도로 환수해 주었다. 모든 실험구는 노출시킨 다음 수확하여 total RNA를 추출하였다.

다. Total RNA 추출 and First-stand cDNA의 합성.

우선 시료로부터 TRIZOL을 이용하여 제조자의 방법에 따라 total RNA를 추출하였고 추출된 RNA은 역전사 효소를 이용하여 first-strand cDNA의 합성을 위해 사용되었다. 역전사는 1.5 시간 동안 42℃에서 최종 반응액 총량 20 $\mu\ell$로 하여 실시하였으며 이때 반응액은 정제된 RNA 3μg, 5× 반응 완충용액 (Promega, Madison, WI, USA) 4$\mu\ell$, dNTP (각각 2mM) 5$\mu\ell$, 10μM dT-ACP1 (5'-CTGTGAATGCTGCGACTACGAT -IIIIIT(18)-3') 2$\mu\ell$, RNasin® RNase Inhibitor (40 U/ $\mu\ell$; Promega) 0.5$\mu\ell$, Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (200 U/ $\mu\ell$; Promega) 1 $\mu\ell$로 제조되었다. First-strand cDNA는 GeneFishingTM PCR을 위해 80$\mu\ell$의 3차 증류수로 희석한 다음, 사용 전까지 -20℃에 보관하였다.

라. ACP-based GeneFishing^{TM} PCR

DEG (differentially expressed gene)는 GeneFishingTM DEG kits (Seegene, Seoul, South Korea)를 사용하여 ACP-based PCR방법(Kim et al., 2004)으로 screen 되었다. Second-strand cDNA 합성은 반응액 총량 20$\mu\ell$로 하여 first-stage PCR의 한 주기 동안 50℃에서 수행되었다. 이때 반응액은 희석된 first-strand cDNA 3-5$\mu\ell$(약 50ng), dT-ACP2 (10μM) 1 $\mu\ell$, 10μM arbitrary ACP 1$\mu\ell$, Master Mix (Seegene) 10$\mu\ell$로 제조하였다. Second-strand 합성을 위한 PCR 절차는 94℃에서 1분, 50℃에서 3분, 72℃에서 1분으로 실시하였다. Second-strand DNA 합성 후, second-stage PCR 증폭 절차는 94℃에서 40초를 40회 주기로 한 다음 65℃에서 49초, 72℃에서 40초, 마지막으로 72℃에서 5분으로 하였다. 증폭된 PCR 산물은 ethidium bromide로 염색된 2% agarose gel에서 전기영동 하였다.

마. 유용 유전자의 증폭

GenBank로부터 이미 알려진 유전자서열 정보를 얻은 후 Clustal X를 이용하여 alignment 한 후 각 유전자의 conserved region으로부터 primer를 합성한 후, first-stand cDNA 로부터 polymerase chain reaction을 이용하여 증폭하였다. PCR 절차는 98℃에서 25 sec, 50℃에서 40 sec, 72℃에서 90 sec의 조건으로 40 cycle 실시하였다. 증폭된 PCR 산물은 1.4% agarose gel에서 전기영동 하였다.

바. Cloning 및 sequencing

Gel 상에서 확인 된 band로부터 DNA를 회수하여 제조자의 방법에 따라 TA-vector (invitrogen)에 삽입한 후, E. coli로 형질 전환하였다. 형질 전환 된 E. coli는 IPTG와 X-gal이 있는 평판배지에 도말한 후 37℃에서 하룻밤 도치 배양 하였다. Positive clone을 3ml LB 배지에서 배양한 후, plasmid prep kit (Promega)를 이용하여 plasmid DNA를 회수한 다음, commercial primer (M13R and T7P)를 이용하여 염기서열을 분석하였다. 밝혀진 염기서열은 GenBank Database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)을 통하여 동정하였다.

사. Rapid amplification of 3′ and 5′- cDNA end (RACE)

위로부터 얻은 유전자의 3′과 5′ 쪽의 유전자 서열 정보를 알기 위하여 RACE-PCR (Invitrogen)을 제조자의 방법에 따라 수행하였다.

Table 1. Primers used for real time PCR in this study

Gene target	Oligo	Primer DNA Sequence
MnSOD	F	5′-GGTGGATCCGGTGAACCTGAAG-3′
	R	5′-CCGGCAGCCTTATTATAACCCAAC-3′
CuZnSOD	F	5′-ACTTTGGAACCTGGTCGCGAGAAC-3′
	R	5′-CCAATCGTGAGCCTGCGTTTC-3′
GPx	F	5′-TTTATGAGGCACGACTGTCCG-3′
	R	5′-AAATTGGTTGCTCGGGAAAGC-3′
Se-GPx	F	5′-CCAACGCCACCGAGATTC-3′
	R	5′-GGGAACTTGGGTTCATAAGGATAC-3′
CAT	F	5′-CACTGAGACCGGAAACCACG-3′
	R	5′-TCGTCTCTGGTCAAATCGTCG-3′
GR	F	5′-CCATGACGGACAGAAAGCAGATGAC-3′
	R	5′-CTCCCATCTTGATGGCAACTCC-3′
GSTσ	F	5′-TTGGGTAGGCGAAGAGATTGGAC-3′
	R	5′-ATTTCGAAGAGCTTCGTTGGCAG-3′
GSTω	F	5′-CGGTCCATTGCATGGTTTGATG-3′
	R	5′-CGTTCAAACCATGGCCAAATAG-3′
β-actin	F	5′-GTGCTGTCCCTGTATGCCTCTG-3′
	R	5′-TCCAGACGGAGGATGGCATG-3′

아. Real-time RT-PCR

중금속 (Cu, As) 의한 Metallothionein family (MT-F), glutathione reductase, Superoxide dismutase (Cu/Zn-SOD, Mn-SOD), Catalase (CAT), Glutathion peroxidase (GPx, Se-GPx) 그리고 glutathione S-transferase (GST-σ, GST-ω) 유전자의 발현 변화를 측정하기 위하여 각 유전자의 primer를 사용하여(Table 1) real-time RT-PCR을 수행하였다. 이를 위하여 우선적으로 각 시간대별 및 농도별로 total RNA를 추출하였으며, total RNA 2 ug로 부터 cDNA를 합성하였다. Real time PCR은 iCycler (Bio-rad)에서 수행되었으며, MyiQ를 통하여 형광 염료인 SYBR green 양의 증가를 실시간 detection 하였다. Internal control로서 Tigriopus β-actin을 이용하였으며, 3회 반복 실험하였다. 도출된 결과로부터 unpaired Student's t-test를 이용하여 유의성을 조사하였다.

자. 이를 토대로 중금속에 반응하는 유전자에 대한 biomarker gene의 선발과 함께 차후 다른 중금속의 노출에 따른 요각류의 반응에 대한 기본 자료로 활용하였다.

3. 다양한 농도와 시간동안 중금속 환경오염물질[구리(Cu) 와 비소(As)]에 노출된 요각류 생물체 시료의 중금속물질 축적 총량의 정량적인 규명

가. ICP-AES를 이용 요각류에 의해 축적된 구리(Cu) 와 비소(As) 등 환경오염물질 총량의 정량적인 분석.

나. 기타 서식환경조건의 변화(예, 염분농도, 수온, 영양분 공급정도)에 따른 요각류의 구리(Cu) 와 비소(As) 축적 총량의 변화 분석.

다. 서로 다른 산화상태의 중금속오염물질(예, As(V) 와 As(III))에 노출된 요각류의 경우 체내에 축적된 비소총량의 정량적인 분석 및 상호 비교.

4. 환경오염물질에 노출되지 않은 요각류 생물체 시료의 고분해능 전자현미경(TEM) 및 연 X-선 분광현미경용 시편제작 및 이미지 관찰.

가. 요각류 생물체의 최적 고정화 조건 선정 및 Ultramicrotome을 이용한 초박편 시료 제작.

나. TEM 및 EELS을 이용한 요각류 초박편시료의 고분해능 이미지분석 및 기본 구성원소들의 분포분석

5. 다양한 농도와 시간동안 중금속 환경오염물질(구리(Cu) 와 비소(As))에 노출된 요각류 생물체 시료의 고 분해능 전자현미경(TEM) 및 연 X-선 분광현미경을 이용한 분석.

가. 요각류 생물체의 고정화 및 Ultramicrotome을 이용한 초 박편 시료 제작.

나. TEM을 이용한 구리(Cu) 와 비소(As) 의 요각류에서의 분포분석 및 고농도로 농축되어 있는 부분에서의 고체상(phase)의 분석

다. 서로 다른 산화상태의 중금속오염물질(예, As(V) 와 As(III))에 노출된 요각류 시편에서 각 산화상태 오염물질의 체내 분포변화 와 축적정도의 차이 규명.

라. 기타 서식환경조건(예, 염분농도 등)의 변화에 따른 요각류의 구리(Cu) 와 비소(As)등 오염물질의 체내 축적정도 차이를 관찰

6. 경 X-선 현미경의 좋은 투과력을 이용한 요각류 생물체의 in-vivo 실험 방법 고안.

가. 샌드위치된 SiN 박막을 이용하여 경 X-선 현미경용 in-vivo cell 제작.

나. 다양한 오염물질의 농도 및 노출시간에 따른 요각류 생체내에서의 구리(Cu) 와 비소(As) 등 오염물질의 축적과정 및 비독성화 과정을 각 원소의 형광 또는 흡수도의 차이를 이용하여 모니터링하고 이들 결과와 유전학적인 연구결과 와의 상호연관관계 규명 .

다. 기타 서식환경조건(예, 염분농도 등)의 변화에 따른 요각류의 구리(Cu) 와 비소(As)등 오염물질의 체내 축적정도 차이를 관찰하고 이들 결과와 유전학적인 연구결과 와의 상호관계 규명.

2절. 결 과

1. 요각류에 미치는 중금속(Cu, As)의 영향에 대한 독성 검사

시간에 따른 *T. japonicus*에 미치는 중금속(Cu, As)의 영향에 대한 독성검사에서 48시간 후의 급성독성이 96시간 후의 급성독성보다 전체적으로 낮게 나타났다. 따라서 *T. japonicus*는 독성지속시간에 따라 중금속의 독성이 누적되는 것으로 판단된다. 실험에 사용된 중금속 중, 구리 (Cu)가 가장 높은 독성을 보였으며 이 때 48h 및 96h 독성실험의 NOEC 값은 각각 2.0, and 1.0 mg/L였다. 다음으로 비소Ⅲ (AsⅢ)이 48h 및 96 독성실험에서 비소V(AV) 보다 높은 독성을 보였다 (Table 1; Fig. 1). 이것은 일반적으로 AsⅢ가 AV보다 생물체에 있어 보다 독성이 강하다는 연구결과(Del Razo et al., 2001; Schlenk et al., 1997)와 일치하는 결과이다. 따라서 이들 중금속에 대한 *T. japonicus*의 유전자 발현실험에서는 Cu와 AsV보다 독성이 강한 AsⅢ를 사용하였다.

Table 1. LC_{10}, LC_{50}, 95% confidence intervals (CI) and no observed effect concentration (NOEC) for *Tigriopus japonicus* adult stage exposed to heavy metals during 48 and 96 hours

	Arsenic	NOEC*(mg/L)	LC_{10}(95% CI; mg/L)	LC_{50}(95% CI; mg/L)
48 h	Copper	2.0	4.0 (2.1-5.5)	7.7 (5.5-13.0)
	Arsenic Ⅲ	5.0	9.1 (6.67-12.33)	13.1 (10.16-16.94)
	Arsenic V	12.5	20.0 (13.39-29.97)	35.6 (23.43-54.00)
96 h	Copper	1.0	2.2 (1.33-3.49)	3.9 (2.60-5.87)
	Arsenic Ⅲ	4.0	5.6 (3.85-8.20)	9.7 (5.57-16.92)
	Arsenic V	6.3	9.9 (6.72-14.63)	17.2 (11.57-25.67)

*NOEC was calculated by Dunnett's test.

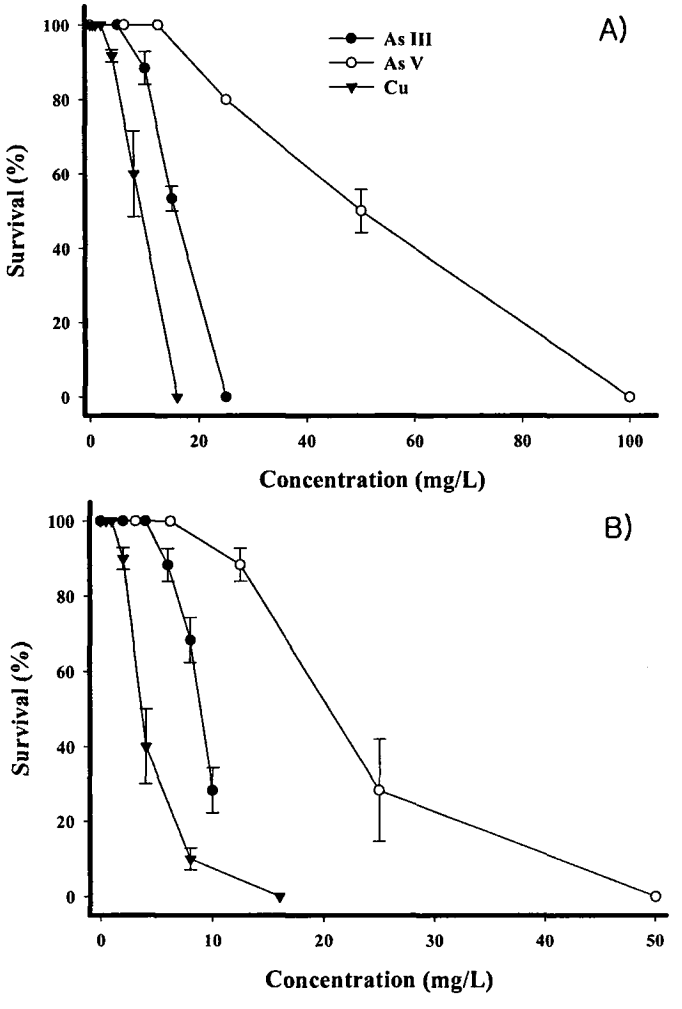

Fig. 1. The curve of acute toxicity tests in adult *Tigriopus japonicus* after 48 (A) and 96 (B) hours of exposure to various chemicals at 20℃ and 32‰.

2. 요각류에 미치는 중금속(Cu, As)의 노출에 따른 up- 또는 down-regulation되는 유전자의 클로닝 및 염기서열 분석

가. 요각류 *T. japonicus*에서 DEGs 발굴

T. japonicus total RNA를 이용한 differential display 수행에 의한 full-screening 결과, 중금속 (Cu) 노출에 대해 발현양이 증가하는 유전자는 13개, 감소하는 유전자는 10개로 총 23개의 differential expressed gene을 발견하였다. 이 중 Blast search를 통해 확인된 유전자는 3개였고 나머지는 unknown으로 나타났다. 확인 된 유전자 중 nitrile hydratase와 aldehyde dehydrogenase는 발현이 증가하였으며, 반면 glutamate dehydrogenase는 발현이 감소하는 양상을 보였다 (Fig. 2).

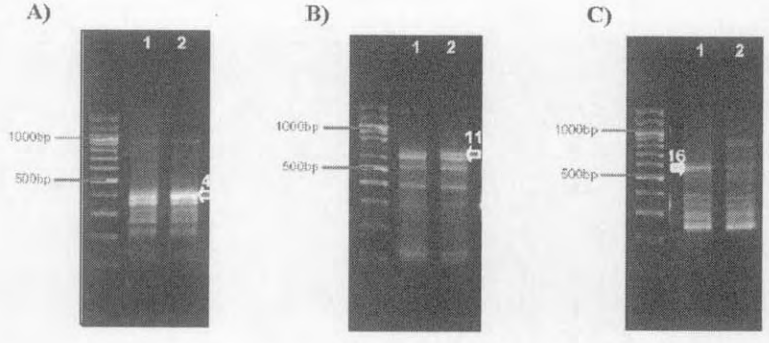

Fig. 2. DEGs after 1 mg/L Cu exposure for 96h. (A) nitrile hydratase, (B) aldehyde dehydrogenase, (C) glutatmate dehydrogenase. Lane 1, control; Lane2, Cu -treated.

나. Cu 및 As에 대한 *T. japonicus*의 유전자 발현

1) Metallothionein family (MT-F)

Metallothionein은 중금속 (Cu, Zn, Cd, Hg 등)에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질로 낮은 분자량과 높은 cysteine (-SH group)함량을 가지고 있으며 열에 비교적 안정적이다(Barka et al., 2001). 본 연구에서는 Tigriopus MT-F에 대한 중금속 스트레스에 대한 효과를 조사하기 위하여 Cu와 As를 처리한 후 real time RT-PCR을 이용하여 분석하였다. 분석결과, Cu 및 As의 처리에 대한 Tigriopus MT-F의 발현에 있어 어떤 특정한 경향을 찾을 수 없었다 (Fig. 3). 따라서 이 유전자는 중금속 특히 Cu 및 As에 의해 특이적으로 발현하지 않을 수 있거나 본 실험에서 실시한 실험기간 보다 다양한 시간과 처리농도에서 추가실험이 필요한 것으로 판단된다

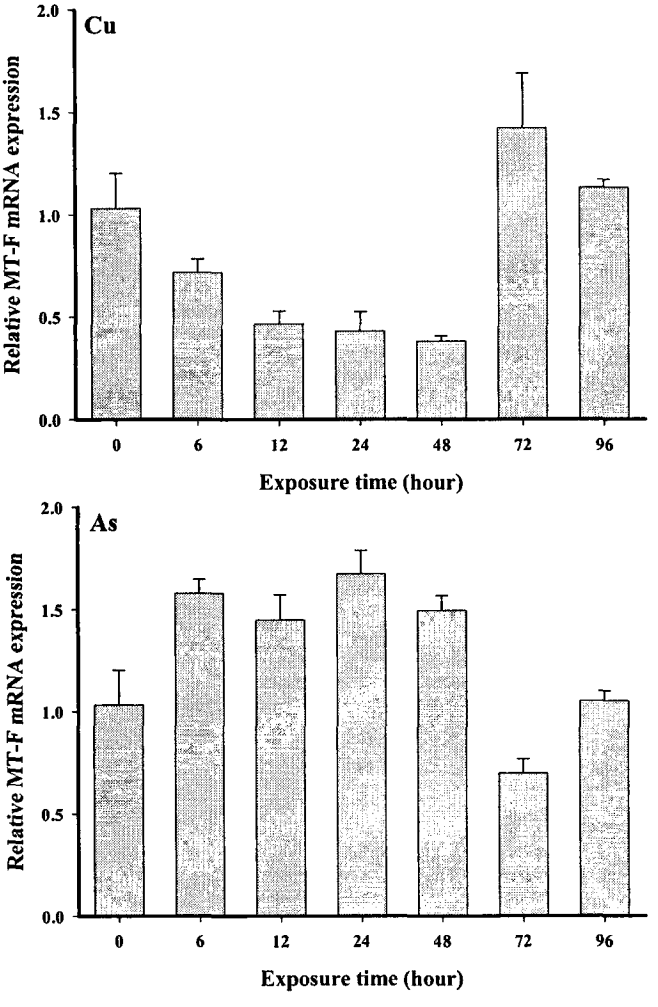

Fig. 3. Expression profiles of *T. japonicus* **Metallothionein family** gene after exposure to Cu (NOEC: 1 mg/L) and As (NOEC: 4 mg/L).

2) Glutathione reductase (GR)

Tigriopus GR에 대한 중금속 스트레스에 대한 효과를 조사하기 위하여 Cu와 As를처리한 후 real time RT-PCR을 이용하여 분석하였다. 그 결과 Cu에 대하여 6-96h 동안의 Tigriopus GR의 발현은 대조구에 비해 높게 나타났지만 시간의 경과에 따른 증감의 경향은 보이지 않았다. 그러나 As를 처리한 실험구에서의 Tigriopus GR의 발현은 6-96h 동안 시간 의존적으로 유의한 발현 증가 양상을 확인 할 수 있었으며 96시간에서 가장 높게 발현되었다 (Fig. 4). 따라서 Tigriopus의 GR은 중금속에 의한 산화적 스트레스에 대해서 세포 방어 기작에 관여할 것으로 사료된다. 그러나 이러한 결과를 비교하기에 적합한 다른 종에 대한 GR의 기능적 특성에 대한 정보가 부족하다. 따라서 보다 다양한 시간과 농도에서의 추가 실험이 요구된다.

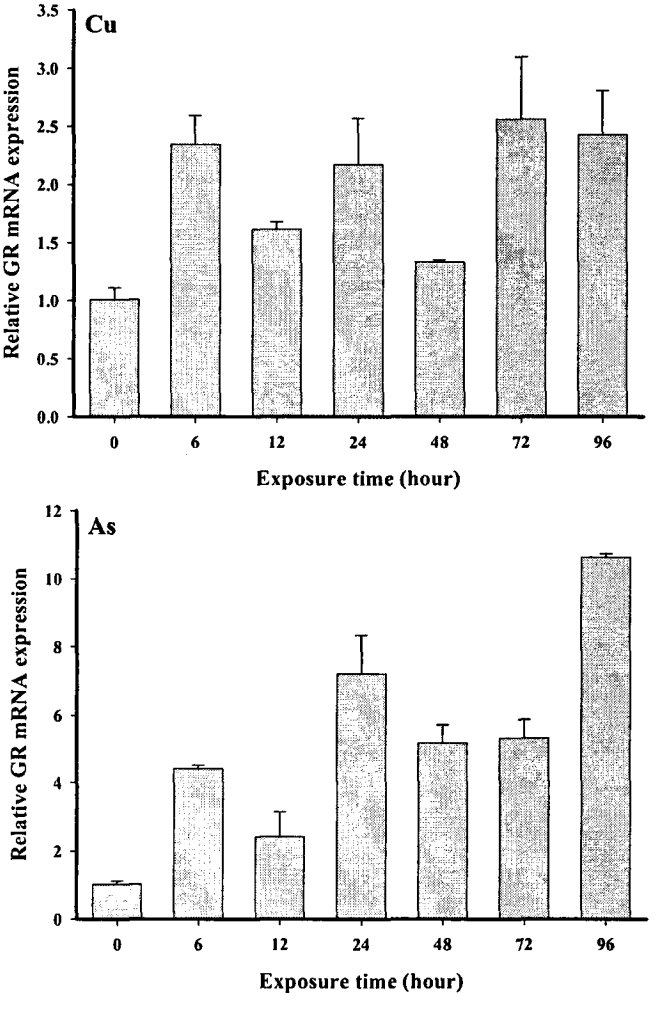

Fig. 4. Expression profiles of *T. japonicus* **GR** gene after exposure to Cu (NOEC: 1 mg/L) and As (NOEC: 4 mg/L).

3) Superoxide dismutase (SOD)

Tigriopus SOD에 대한 중금속 스트레스에 대한 효과를 조사하기 위하여 Cu와 As를 처리한 후 real time RT-PCR을 이용하여 분석하였다. Superoxide dismutase (Cu/Zn-SOD와 Mn-SOD)는 생체내에서 대사 과정 중에 생성되는 superoxide 등을 산화 혹은 환원시킴으로서 활성산소에 의한 독성 효과를 제거하는데 관여하는 antioxidant enzyme의 하나이며 (Burodon, 1999), 각종 중금속은 oxidative stress를 일으키는 것으로 알려져 있다(Hansen et al., 2006). 결과에서 Cu와 As를 처리하였을 때 와 Mn-SOD는 대조구에 비해 비교적 높은 발현양상을 보였다. Cu 처리구의 경우, 처리 24시간째부터 증가하기 시작하여 96시간째에 가장 높게 발현하였다. As 처리구는 처리 6시간부터 96시간까지 서서히 증가하는 경향을 보였다(Fig. 5). 그러나 Cu/Zn-SOD는 Cu 및 As처리구 모두 어떠한 경향을 보이지 않았다(Fig. 6). Cu는 oxidase 와 oxygenase를 포함하는 많은 효소의 cofactor로서 작용함에도 불구하고 Haber-Weiss 반응을 통해 ROS (reactive oxygen species)를 생성하는 촉매제로 작용하는 것으로 알려져 있다 (Stohs 와 Bagchi, 1995). 그러나 본 연구에서 Cu와 As 처리 후 Cu/Zn-SOD 유전자의 발현 감소는 Cu/Zn-SOD가 방어 기작 초기에 관여하는 항산화 효소임을 감안할 때 metal의 처리 후 초기에 발현이 증가할 것으로 추측된다. 따라서 이후에 보다 이전 시간의 Cu/Zn-SOD 유전자의 발현 양상을 추가로 조사할 필요가 있을 것으로 사료된다.

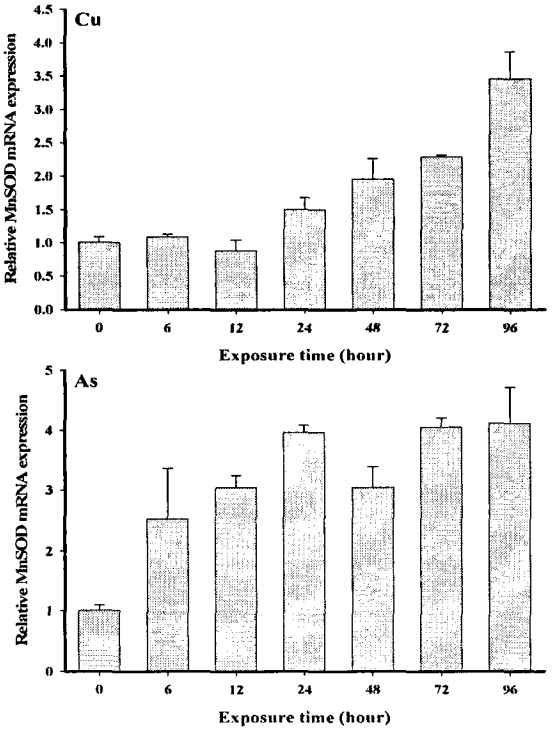

Fig. 5. Expression profiles of *T. japonicus* **MnSOD** gene after exposure to Cu (NOEC: 1 mg/L) and As (NOEC: 4 mg/L).

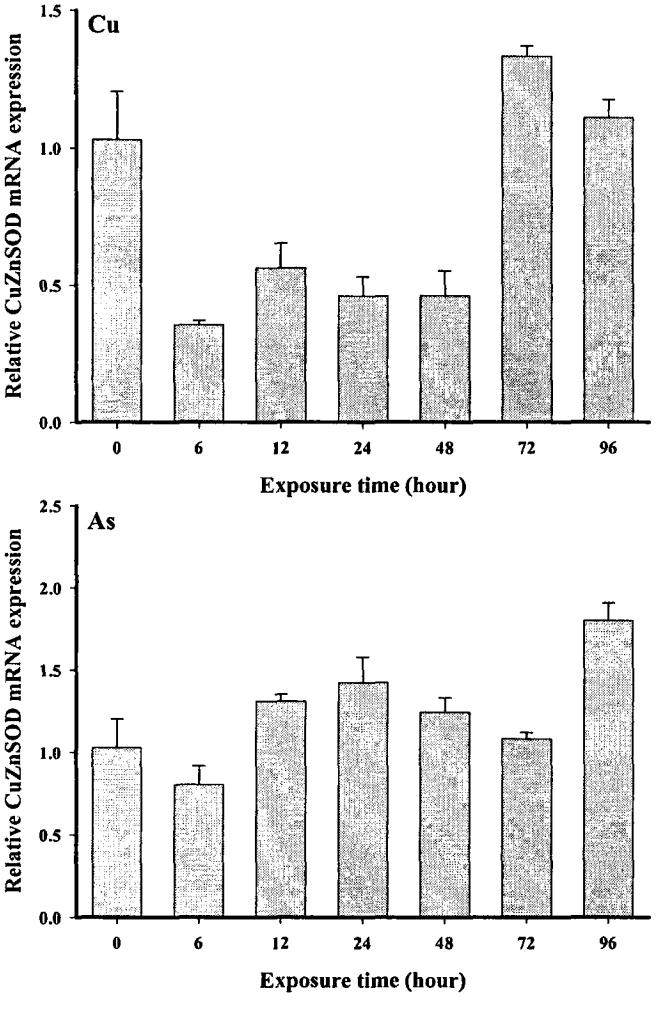

Fig. 6. Expression profiles of *T. japonicus* **CuZnSOD** gene after exposure to Cu (NOEC: 1 mg/L) and As (NOEC: 4 mg/L).

4) Catalase (CAT)

Catalase는 산화적 스트레스를 받는 동안에 생성된 과산화수소 H_2O_2를 광범위하게 물 (H_2O)과 산소(O_2)로 분해시키는 역할을 한다(Halliwell and Gutteridge, 1999). 본 실험에서 Tigriopus catalase에 대한 중금속 스트레스에 대한 효과를 조사하기 위하여 Cu와 As를 처리한 후 real time RT-PCR을 이용하여 분석하였다. 실험 결과, Cu 및 As의 처리에 대한 Tigriopus catalase의 발현에 있어 어떤 특정한 경향을 찾을 수 없었다(Fig. 7). 화학적 스트레스를 받은 동물에서 catalase의 증감은 독성물질의 종류와 노출시간 및 농도에 의해 다양하게 나타나는 것으로 알려져 있다(Jemec et al., 2008). 따라서 차후에 보다 이전 시간의 catalase 유전자의 발현 양상을 추가 조사할 필요가 있을 것으로 판단된다.

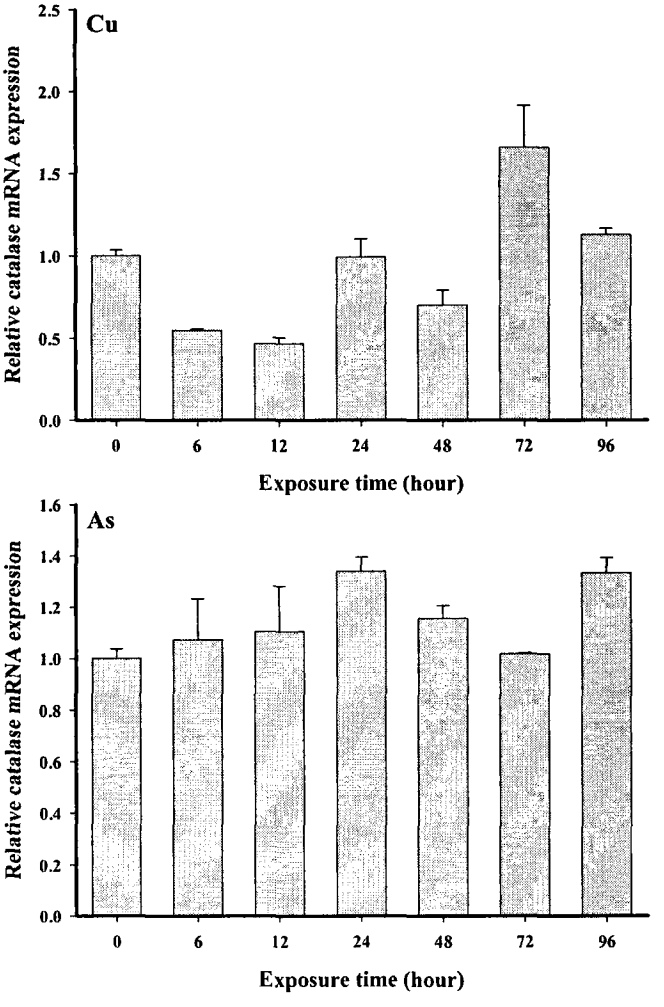

Fig. 7. Expression profiles of *T. japonicus* **catalase** gene after exposure to Cu (NOEC: 1 mg/L) and As (NOEC: 4 mg/L).

5) Glutathion peroxidase (GPx, Se-GPx)

GPx는 활성산소와 과산화수소를 억제하기위한 항산화효소 중 가장 일선에 있는 효소중의 하나이다. 이것은 selenium-dependent GPx (Se-GPx)와 selenium-independent GPx (GPx)로 나뉜다 (Doyen et al., 2008). 본 실험에서 Tigriopus catalase에 대한 중금속 스트레스에 대한 효과를 조사하기 위하여 Cu와 As를 처리한 후 real time RT-PCR을 이용하여 분석하였다. 실험 결과, GPx는 Cu처리구에서 시간이 지남에 따라 감소하였다가 서서히 증가하는 발현양상을 보였으나 유의적이지는 않았으며 As처리구 또한 대조구에 비해 증감하는 경향을 보이지 않았다(Fig. 8). 그러나 Se-GPx는 Cu 및 As처리구 모두 모든 시간 구간에서 대조구에 비해 높은 발현양상을 보였지만 시간에 따른 뚜렷한 증감의 경향은 보이지 않았다(Fig. 9). Se-GPx는 무기 및 유기 과산화물 (peroxide), GPx는 유기 과산화물의 환원을 촉매하는 것으로 알려져 있다(Doyen et al., 2008). 본 실험 결과로 미루어보면 중금속 (Cu 및 As)에 의해 생성되는 과산화물은 무기산화물로 판단되며 따라서 GPx의 발현결과도 유의적이지 않았던 것으로 사료된다.

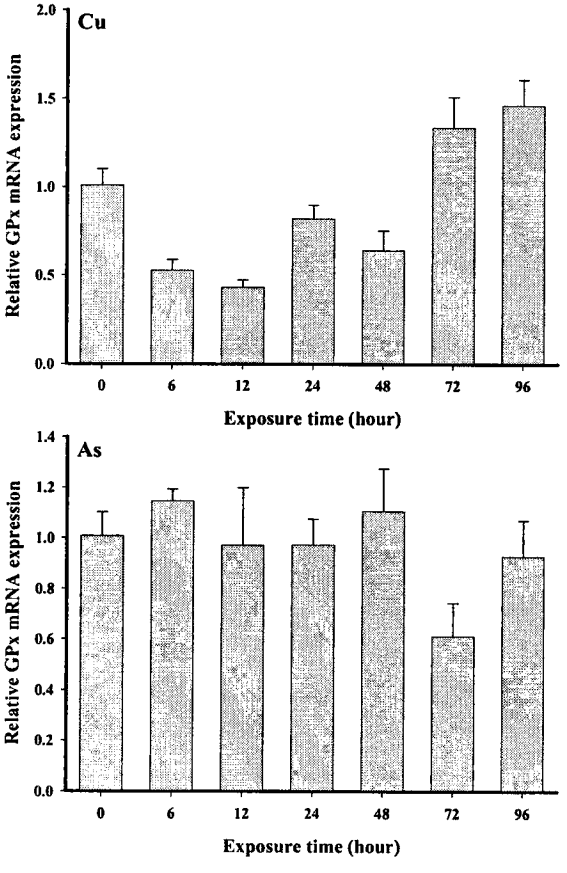

Fig. 8. Expression profiles of *T. japonicus* **GPx** gene after exposure to Cu (NOEC: 1 mg/L) and As (NOEC: 4 mg/L).

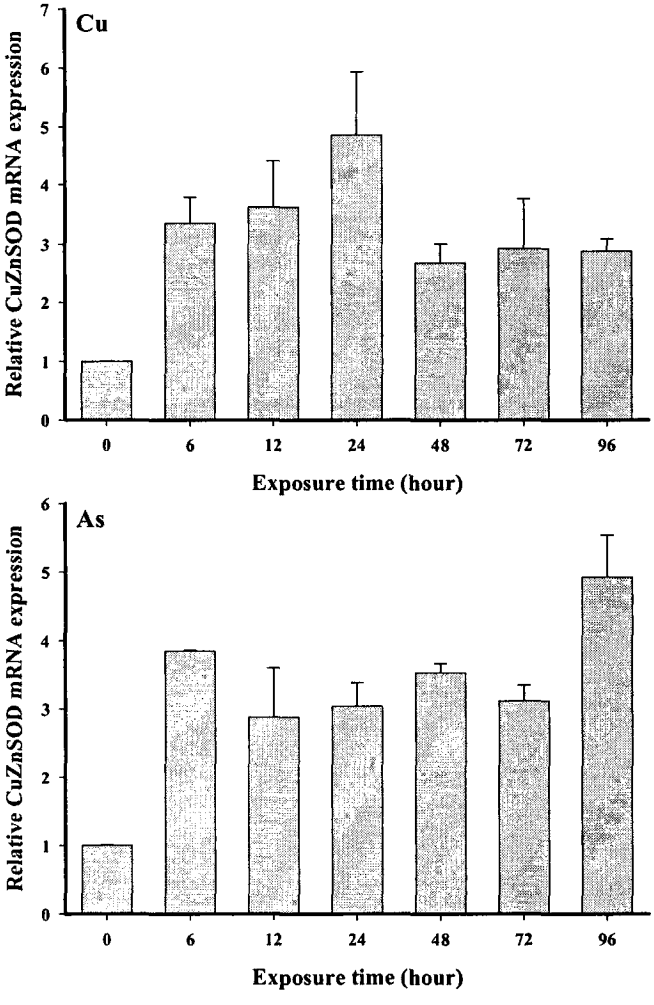

Fig. 9. Expression profiles of *T. japonicus* **SeGPx** gene after exposure to Cu (NOEC: 1 mg/L) and As (NOEC: 4 mg/L).

6) Glutathione S-transferase (GST)

Tigriopus GST (GST-σ, GST-ω)에 대한 중금속 스트레스에 대한 효과를 조사하기 위하여 Cu와 As를 처리한 후 real time RT-PCR을 이용하여 분석하였다. Glutathione S-transferase와 Glutathione peroxidase와 같은 효소는 생물체 내에서 정상적인 대사과정을 통해 발생하는 reactive oxygen species (ROS)가 macromolecules와의 상호작용을 통해 생성하는 2차 대사산물을 detoxification 하는데 관여하는 phase II 효소로서 세포내의 방어기작에 관여하는 것으로 알려져 있다 (Armstron, 1997). 본 실험에서 Tigriopus GST-σ는 Cu를 처리한 경우, 처리 12시간까지는 down-regulation되다가 24시간부터 증가하기 시작하여 실험종료시간인 96시간째에는 대조구에 비해 약 60배 이상으로 급격히 증가하였다. As처리구는 모든 실험구가 대조구에 비해 높게 발현되었으며 시간의 경과에따라 급격히 증가하여 96시간째에는 대조구의 약 700배까지 증가하였다 (Fig. 10). 한편 Tigriopus GST-ω는 처리 중금속에 따라 특정한 발현 경향을 보이지 않았다 (Fig. 11). 따라서 Tigriopus GST 중, GST-σ 유전자는 Cu와 As 같은 중금속에 의한 산화적 스트레스로부터 세포의 방어기작에 강하게 관여하는 것으로 판단된다. 더하여 GST-σ 유전자는 중금속에 반응하는 유전자에 대한 biomarker gene으로써 그 활용도가 높을 것으로 사료된다.

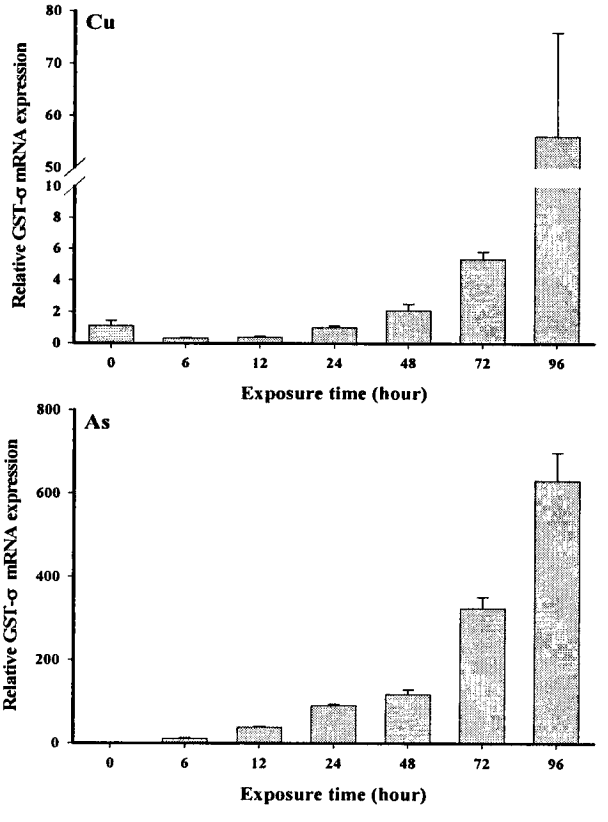

Fig. 10. Expression profiles of *T. japonicus* **GST-σ** gene after exposure to Cu (NOEC: 1 mg/L) and As (NOEC: 4 mg/L).

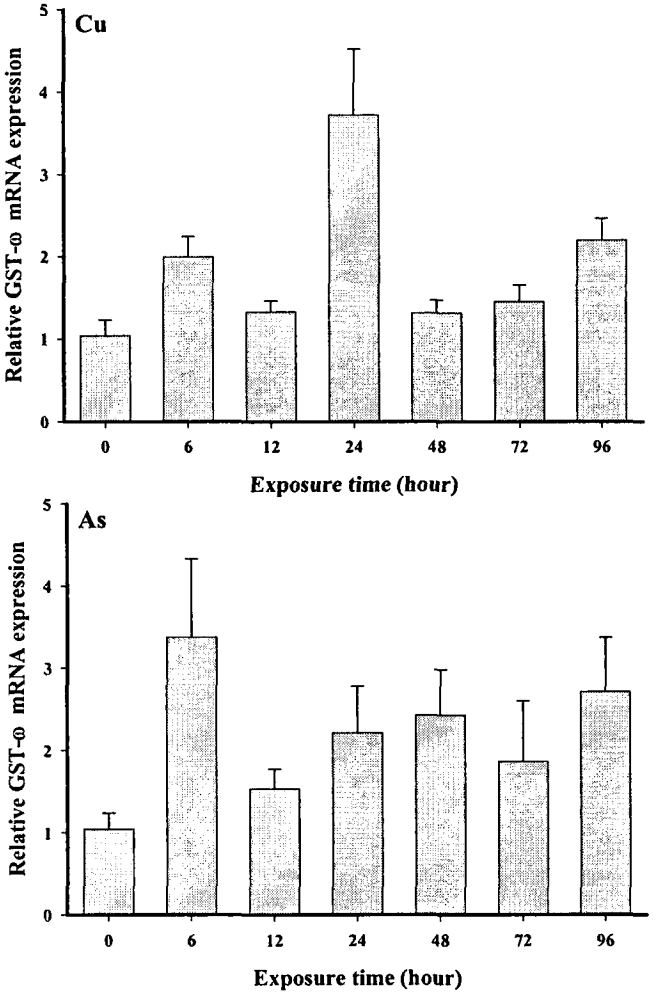

Fig. 11. Expression profiles of *T. japonicus* **GST-ω** gene after exposure to Cu (NOEC: 1 mg/L) and As (NOEC: 4 mg/L).

3. 요각류 *Tigriopus japonicus*의 분자영상기법을 통한 분석

본 연구에서는 고 분해능 투과전자현미경, 경 X-선 분광현미경 그리고 공초점 형광현미경 등 다양한 영상기법을 활용하여 다양한 형태의 중금속 독성물질들이 요각류 (*Tigriopus japonicus*)의 in-vivo 이미징 방법을 개발하고 이들 방법을 이용하여 다양한 중금속 오염물질에 노출된 요각류의 오염물질 체내축적 및 그 방어기작을 규명하고자 하였다. 이러한 연구 목적의 달성을 위하여 고분해능 투과전자현미경(HR-TEM), 경 X-선 분광 현미경 그리고 형광현미경등을 연구 초기단계에 활용하였으며 이러한 다양한 영상기법중에서 (공초점) 형광현미경적인 접근이 필요한 공간분해능 (수~수십 mm), in-vivo 분석 능력 그리고 영상data acquisition속도 등의 관점에서 본 연구의 목적을 수행하기에 가장 적절하였기에 형광 현미경을 중심으로 활용하여 연구를 수행하였다. 그리고 형광현미경을 활용한 이미지 분석에 형광 spectrum을 추가적으로 얻을 수 있는 시스템을 구축하여 형광 이미지뿐만 아니라 시료에서 발생하는 다양한 형광 신호들을 파장별로 분석하여 중금속 오염물질의 화학적 종 변화들에 관한 정보를 분광학적으로 얻을 수 있도록 하였다.

또한 초기 연구 계획단계에서 제안된 Cu(중금속 양이온), As(중금속 음이온) 등의 특정 원소에 대한 실험에 비하여 보다 일반적인 결과를 도출할 수 있도록, 최근 의학, 생물학등의 분야에서 각종 탐침(probe) 물질로서 활용되고 있는 **중금속 나노입자물질(즉, 양자점(QD, CdSe))을 도입하여 활용**하였다. 이 실험에서는 본래 중성을 띄고 있는 양자점의 표면을 양전하와 음전하를 지니도록 표면개질하여 용액상에서 안정된 상태로 존재하는 나노콜로이드의 상태로 제조하여 이들 중금속 나노물질들이 요각류 체내에 흡수(Absorption), 분포(Distribution) 그리고 대사(Metabolism)되는 과정을 형광 이미지와 spectra를 이용하여 분석하였다.

가. 분자영상기법 실험방법 고찰

1) 수용성 양자점의 준비

본연구에 사용한 다양한 중금속 양자점 나노 입자들을 제조하기 위한 원료 물질들은 서울 대학교 공대 내에 소재한 창업 벤처 업체인 나노 스퀘어 (Nanosquare Inc.) 와의 양자점 합성 및 특성규명을 위한 협력연구를 통하여 제공받았다.12특히 본 연구에서는 TOPO-capped CdSe/ZnSe 표면 상태의 양자점 (Quantum Dot, lem=584nm) 을 시작물질로서 활용하여 아래에 언급된 연구를 단계적으로 수행 하였다.

2) 양자점의 표면 개질

시작물질로서 사용된 양자점의 표면은 TOPO (Trioctylphosphine oxide)로 안정화 되어있다. 이 물질은 표면에 알킬 사슬기 때문에 헥산과 같은 비극성 용매에만 분산되는 성질이 있다. 이 물질을 물과 같은 극성 용매에 분산시키기 위해서는 알킬 체인을 가지는 나노 결정의 표면에 보다 극성을 가지는 유기 분자를 도입 하는 것이 필요하다. TOPOQDs의 표면을 MAA (Mercaptoacetic acid, Aldrich 98%) 분 자로 리간드 치환 (ligand exchange) 하기 위해서는 다음과 같은 과정의 반응이 필 요하다. 톨루엔에 녹아있는 TOPOQDs 용액에 약 동량의 MAA를 첨가한 후 어두 운 곳에서 110°C 이상의 온도로 약 4시간 가량 stirring bar와 함께 환류 과정을 해준다. 반응 후 위의 용액을 약 10분 동안 5000rpm으로 원심분리하고 상층액을 제거해준다. 상층액을 제거 한 뒤 남아 있는 양자점에 클 로로포름을 넣어 준 후 소니케이터를 이용하여 분산시킨다. 이 용액을 또 다시 약 10분 동안 5000rpm으로 원심분리 한 후 상층액을 제거 해준다. 이것 은 반응하지 않은 양자점과 리간드 치환을 위해 첨가한 free MAA 이온을 클로로 포름에 녹여 제거 하기 위한 과정으로 위의 과정을 약5회 가량 반복 하면서 양 자점 용액과 섞여 있는 불순물들을 깨끗하게 제거 할 수 있다. 제거 과정이 끝나면 마지막으로 PBS 완충 용액에 녹인다. 양자점이 녹아 있는 PBS 완충 용액은 200 nm주사기 필터를(Syringe Filter) 통해 사이즈가 큰 입자들은 제거된다. 유사한 방법들을 사용하여 MPAQD 그리고 CTABQD 도 준비하였다.

3) 자외선-가시광선(UV-Vis) 분광법

양자점의 사이즈와 농도는 UV-Vis 흡광도를 이용하여 알 수 있다. 모든 무기결정은 밴드갭과 같은 본래의 고유한 특성을 갖고 있지만 결정의 크기가 작아 짐에 따라서 그 특성이 변화하게 된다. 따라서 지난 수십 년간, 이러한 결정들 이 1~100nm 수준의 결정을 형성할 때 변화하는 물질의 화학적 물리적 특성을 규명하기 위해 많은 연구가 이루어져 왔다. 양자점의 경우는 반도체 결정이 구 의 형태를 띠는 0차원(Zero-Dimension)의 경우로 3차원의 전 방향에 걸쳐 양자 제한 효과가 발생하는데 여기자(exciton)이 양자점에 공간적으로 제한되어 전기적 광학적인 특성이 크게 변화한다.13사이즈에 따라 밴드 갭 차이로 인하여 파장에 따른 흡수 영역이 달라지기 때문에 UV-Vis흡광도의 흡수 파장을 통하여 양자점 의 크기를 알 수 있다.

정제 된 양자점을 용매에 분산시킨 후 UV-Vis 스펙트럼 을(Mecasys Optizen 2120 UV) 얻는다. UV-Vis 스펙트럼을 이용해 얻은 양자점 용액의 흡수 값은 입자의 흡광 계수를 얻기 위한 계산에 이용된다. 양자제한 효과는 반도체 양자점의 사이즈 의존성을 결정하는데 중요한 역할을 한다.

일반적으로 양자 제한과 관련하여 두 가지의 주요 효과가 있다. 첫 번째로 이미 실험과 이론적으로 잘 알려져 있는 나노결정이 가진 밴드 갭으로 인한 사 이즈 의존성이다. 이것은 반도체 나노결정이 방출 하는 색이 사이즈에 따라 달라 지는 직접적인 원인이 된다. 두 번째 효과는 흡광 계수(extinction coefficient)의 사 이즈 의존성이다. 흡광 계수에 따른 농도 결정은 편리하고 정확한 방법이다. 양 자점은 독특한 광학적 특성 으로 인하여 LEDs,14~16 레이저,17 태양전지,18 및 바 이오 메디컬 라벨링과19~21같은 다양한 응용에 연구되고 있다. 이러한 이유로 용 액상 혹은 주어진 매개체 안에서 양자점의 실제 농도를 결정 하는 것은 매우 중 요한 일이다. 만약 양자점의 흡광 계수를 안다면 샘플의 간단한 흡수 스펙트럼 을 통하여 양자점의 농도를 쉽게 얻을 수 있다. 기존의 유 무기 화학물질과 다 르게 콜로이드상의 양자점의 농도를 중량에 의한 방식으로 (gravimetric methods) 측정하는 것은 어렵다. 그 이유는 양자점의 표면의 많은 리간드를 확인하기가 꽤 어려울 뿐만 아니라 다른 조건 아래에 충분히 변화할 수 있기 때문이다.

이와 같 은 방법으로 리간드가 코팅 된 나노 결정을 측정하는 것은 오직 나노 결정과 리 간드 사이의 상호 작용이 정제 과정을 견딜 수 있을 정도로 충분히 강할 경우 에만 해당된다.22 따라서 대부분의 경우에는 흡수 스펙트럼으로 측정하는 것이 입자의 농도를 결정하는 실질적이면서도 편리한 방법이다. 반도체 양자점의 첫 번째 흡광 흡수 피크를 이용한 흡광 계수의 실험적 결정은 이미 많은 논문에서 기록된 값을 인용한다.26 양자점의 사이즈는 TEM 이미지를 이용한 직접적인 측 정과 각각의 사이즈에 따른 첫 번째 흡수 피크의 위치를 통한 사이즈 커브 (Sizing Curve) 그래프로 결정된다.

CdSe 양자점의 경우 이미 여러 연구 팀들의 실험적 자료를 통하여 사이즈 커브를 얻을 수 있으며 이것으로 CdSe의 흡수 파장의 위치를 측정함으로써 간단하게 코 어(core)사이즈에 대한 정보를 얻을 수 있다.23~25사이즈 커브 그래프를 다항식으 로(Polynomial fitting) 수식화 하면 다음과 같은 식이 나타난다.26

$$\text{CdSe:}\quad D = (1.6122 \times 10^{-9})\, l^4 - (2.6575 \times 10^{-6})\, l^3 + (1.6242 \times 10^{-3})\, l^2 - (0.4277)\, l + (41.57) \qquad (1)$$

위의 식(1)에서 D(nm)는 양자점 사이즈이며 l (nm)는 첫 번째 흡수 피크의 파장 을 나타낸다. 입자의 흡광 계수는 Lambert-Beer's law에 의해 그 입자의 흡광도 값 으로 정해진다. 흡광도를 이용하여 얻어진 흡광 계수의 값은 양자점 용액의 농 도를 결정하는데 중요한 역할을 한다. 다음의 식(2) Lambert-Beer's law 에서 A는준비된 CdSe 용액의 흡광도를 의미하며 e는 식(3)으로부터 얻어진 CdSe의 흡광 계수를 뜻한다. L은 빛이 매질을 지나는 거리 (cm)이다.

$$A = eCL \qquad (2)$$

Lambert-Beer's law을 이용하여 흡광 계수의 값을 얻는 것은 양자점 스톡 용액을 희석시켜 일련의 서로 다른 농도의 양자점 용액을 만든 후 실험적으로 측정 하 였다. 이렇게 실험적으로 얻어진 자료를 수식화 하면 다음과 같은 식(3)이 얻어 진다.26

$$\text{For CdSe: } e = 5857\ (D)^{2.65} \qquad (3)$$

결과적으로 우리는 위의 식(3)을 통하여 입자의 크기(D)로 흡광 계수의 값을 얻을 수 있다. 식(3)에 의해 얻어 진 CdSe의흡광 계수와 실험적으로 측정된 흡 광도 값으로 Lambert-Beer's law에 따라 CdSe의 농도를 구할 수 있다.

$$N_{Cd/QD} = 4 / 3\ pa^3\ 2 / V_{unit} \qquad (4)$$

CdSe의 농도와 양자점의(QDs) 농도를 측정한다는 것은 명확하게 다른 의미를 뜻 하며 큰차이점을 가지고 있다. 예를들어 약3nm 크기의 CdSe 입자 하나는 셀수없이 많은 Cd원자와 Se원자로 구성되어 있다. 즉 수 많은 CdSe 분자들이 모여서 3nm 크기의 입자 하나를 만드는 것이다. 만약에 우리가 CdSe의 농도를 측정할 것이라고 이야기 한다면 그것은 3nm 크기를 가진 하나의 CdSe 입자에 대한 농도를 의미하는 것이 아닌 CdSe 입자를 구성 하고 있는 수많은 분자들 가운데 하나인 CdSe 분자의 농도를 측정 한다는 것을 의미한다. 물론 Cd원자와 Se의 원자가 각각 하나씩 결합하여 하나의 CdSe분자를 만든다는 것은 단지 이론적인 개념일 뿐이다. 따라서 양자점의 농도를 측정한다는 것은 이와 다르게 3nm 크기 를 가진

하나의 CdSe 입자에 대한 농도를 측정한다는 것을 의미한다. 양자점 이라고 하는 것은 최소 단위의 CdSe 분자를 일컫는 것이 아닌 이러한 분자들이 모 인 하나의 집합체, 나노 크기의 하나의 작은 입자를 의미하는 것이다. 우리는 양 자점의 농도를 정확히 측정하기 위해서는 이러한 차이점들을 이해할 필요가 있 다. 양자점의 농도를 측정하기 위해서는 식(4)를 이용하는데 이것은 CdSe의입자 하나의 구 부피를 측정하여Cd 원자 하나의 부피 단위로 나눔으로써 입자 당 포 함되어있는Cd 원자의 수를 구할 수 있다. 즉 이것은 하나의 CdSe 입자에 들어 있는 Cd원자의 수를 가리킨다. 식(2)를 통해 이미 얻어진 CdSe의농도에서 입자 하나 당 포함하는 Cd 원자의 수를 나누어 줌으로써 우리는 최종적으로 양자점, 즉 하나의 CdSe 입자의 농도를 알 수있다. a는 입자의 지름을 뜻하며 Vunit은 Cd 원자의 부피를 의미한다.

$$[QD] = [CdSe] / N_{Cd/QD} \quad (5)$$

4) 적외선 분광법

양자점의 표면 개질은 적외선 분광법을(Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR) 이용하여 확인한다. 준비된 샘플은 CaF2 윈도우 위에 dropping 하는 방법으로 적외선 분광계의 (ABB Bomem Inc.) 400-4000 cm-1 파장 범위와 4cm-1 해상도 (resolution) 의 조건 에서 128 scan으로 측정되며 DTGS 검출기 (detector)로 기록된다.

SiPOP 방법으로 합성된 CdSe/ZnSe양자점은TOPO (Trioctylphosphine oxide)로 된 유기층이 존재하게 된다. (이러한 상태를 흔히 TOPO-capped CdSe/ZnSe양자점 이라고 부른다.) 이 유기층의 존재로 말미암아 양자점이 헥산과 같은 비극성 용매에 분산이 되며 양자점의 표면을 산화 반응으로부터 보호하는 역할을 하기 도 한다. 이 유기층은 양자점 표면에 영구적으로 고정되어 있는 것이 아니라 끊 임없이 표면에 붙었다 떨어졌다 하는 행동을 보이는 것으로 알려져 있다. TOPO와 같은 유기 표면을 개질 하여 물을 포함한 다양한 용매에 분산이 가능한 나노 결정을 만들 수 있다. 본 연구에서는 MAA리간드 치환을 통하여PBS 완충 용액에 용해화 되도록 표면 상태를 변화시켰다.

^{TOPO}QDs 는 TOPO를MAA로 리간드 치환을 통하여 친수성을 띄는 말단기를 가질 수 있다. MAA리간드 치환을 통한 양자점 표면의 친수성화는 앞으로 세포 배양 시 사용되는 배지에서 양자점의 분산을 용이하게 도와준다. 양자점의 TOPO 가 제거 된 후 MAA의 thiol group (S-H)은 양자점의 표면과 dithiol (S-S) 결합을 한다. 위 연구에서는 FT-IR 장비를 이용하여 thiol group과 양자점의 표면 결합, MAA의 말단기 (COOH) 그리고 결합

하지 않은 free MAA 이온을 확인 할 수 있 다. 양자점의 세포 독성 영향 평가를 위해서는 가급적으로 양자점을 제외한 TOPO, free MAA 이온과 같은 물질은 깨끗이 제거 할 필요가 있다. 이와 같은 불순물은 여러 번의 정제 과정을 통하여 제거시키고 마지막으로 FT-IR을 통하여 확인한다.

나. 분자영상기법을 이용한 연구결과

1) 입자 크기와 흡광 계수

양자점의 크기를 결정하기 위해서는 TEM 이미지를 이용한 직접적인 측정 방법과 양자점의 첫 번째 흡수 피크 위치로 얻어진 사이즈 커브 그래프를 이용 하는 방법이 있다.(Fig. 11) 에서 보여지는 사이즈 커브는 이미 다른 연구 팀들에 의해 측정된 실험적 결과로 얻어진 수식으로부터 나왔다.26 우리는 이러한 실험적 자료들을 통해 실험에 사용될 양자점의 크기를 알 수 있었다. 준비된 양자점 스톡 용액은UV-Vis를 이용하여 흡광도를 측정한다.(Fig. 12) 559nm에서 0.40의 흡광도를 가지는 양자 점은 앞서 언급했던 식(1)을 이용하여 CdSe의 코어는 3.24nm 크기를 가진다는 것을 알 수 있다.

(Fig. 12)는CdSe의 크기에 따른 흡광 계수의 값을 나타낸다. 흡광 계수의 값은 마찬가지로 많은 실험적 결과로 얻어진 식(3)을 이용하여 1.51X105의 값을 갖는 다는 것을 알 수 있었다. 즉 우리가 양자점의 흡광도를 통해 양자점의 크기를 측 정할 수 있으며 양자점의 크기는 흡광 계수를 알 수 있게 해준다. 이렇게 얻어진 흡광 계수의 값은 흡광도와 함께 CdSe의 농도와 더 나아가 양자점의 농도를 측 정하기 위한 필수적인 요인이다.

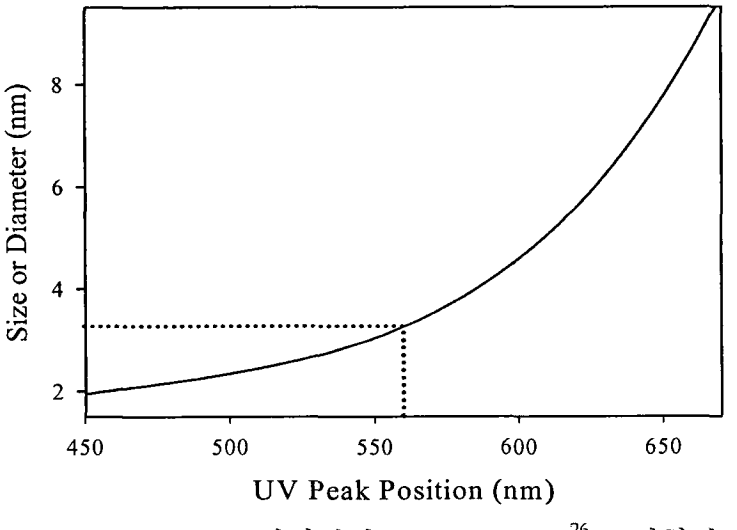

Fig. 11. CdSe 양자점의 Sizing Curve[26] - 실험적 결과로 얻어진 양자점의 첫 번째 흡 수 피크에 따른 입자 크기를 나타내는 그래프는 흡광도 측정을 통해 양자점의 코어 크기를 알 수 있게 해준다.

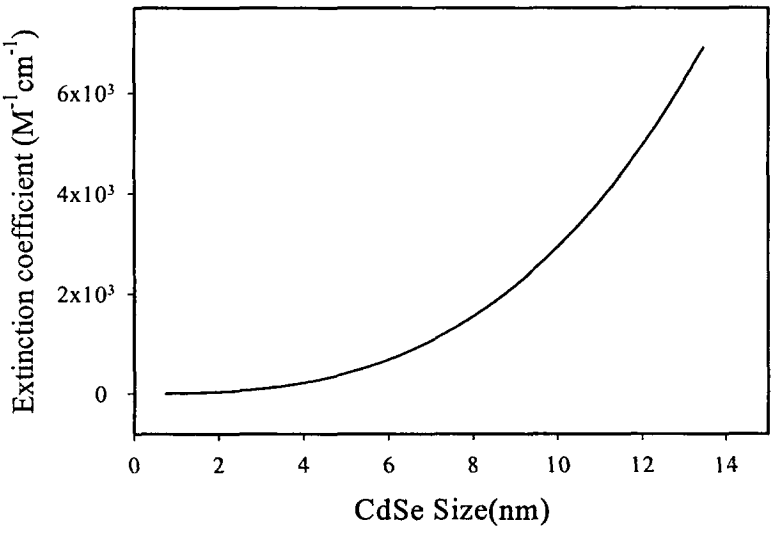

Fig 12. CdSe 양자점의 흡광 계수[26]- 양자점의 크기에 따른 흡광 계수를 나타내는 그래프로 이것은 양자점의 농도를 결정하는 과정에 중요한 역할을 한다.

2) 농도 결정

CdSe의 흡광 계수1.51X105와 흡광도0.40에 대한 정보는 식(2)를 통하여 CdSe의 농도가4.01X10-6M임을 알 수 있다. 식(4)을 통하여 우리는 3.41nm CdSe입자 하나 당 Cd 원자의 수가316. 17임을 알 수 있다. CdSe의 농도 4.01X10-6M 에서 입자 하나 당 포함 하는Cd 원자의 수 316.17를 나눔으로써 우리는 최종적으로 양자점의 농도가 1.08X10-8M임을 알 수 있었다.

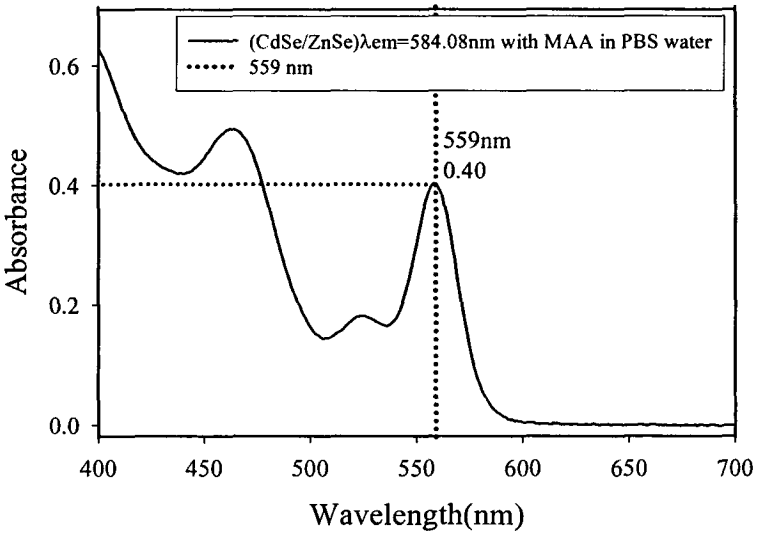

Fig 13. ^{MAA}QDs의 흡광도 측정 - 실제로 본 연구에서 사용하는 양자점의 흡광도를 측정한 결과 559nm 파장에서 0.40의 값을 갖는다. 이것으로 양자점의 코어 크기는 3.24 nm , 농도는 4.01X10^{-8}M라는 것을 알 수 있다.

3) 양자점의 표면 개질 분석

SiPOP 방법으로 최종적으로 합성된 양자점은 표면에 TOPO로된 유기층으로 안정화 되어있다. 이 유기층의 존재로 인해 양자점은 비극성 용매에 분산이 되며 양자점의 표면이 산화되는 것을 막는다. 양자점의 세포 독성 영향 평가에 대한 실험을 하기 위해서는 세포 배양 시 사용하는 배지에 잘 분산될 수 있도록 양자점의 표면 개질이 필수적이다. 세포 배양에 사용되는 배지는 수용액으로서 극성 용매이기 때문에 TOPO의 유기층을 MAA로 리간드 치환 과정을 통해 분 산 시킨다. TOPO이외에도 유기층으로 쌓여있는 양자점의 표면을 다른 물질로 리 간드 치환하는 것은 다양한 용매에 분산이 가능한 나노 결정을 만들 수 있으 므로 매우 중요한 과정이다.

양자점의 표면 개질과 수용액 상에 용해되는 과정 동안 TOPO리간드와 MAA 분자의 치환을 FT-IR스펙트라를 이용하여 관찰 할 수 있다. TOPO와 MAA 분자 사이의 IR 스펙트라의 특징이 다르다는 것을 (Fig 14)의 (d)와 (e)를 통해 서 명확하게 확인할 수 있다. MAA 에 의한 TOPO분자의 리간드 치환은 P=O스트레칭 (TOPO로부터 1377 cm-1) 피크의 사라짐과 C=O 스트레칭 (MAA로부터1713cm-1, 1296cm-1) 피크가 나타남으로써 쉽게 확인 할 수 있다. 양자점 표면의 TOPO 분자는 MAA로 리간드 치환을 통하여 제거 된다. 하지만 이러한 제거 과정 후 에도MAAQDs 양자점을 얻기 위해서는 TOPO리간드 치환 시 과량으로 들어 갔던 free MAA이온을 제거 할 필요가 있다. (Fig7)의 (a)와 (b)는 클로로포름을 이용하여 free MAA이온의 제거 전과 제거 후의 MAAQDs의 스펙트라를 보여준다. MAA이온이 제거되기 전에는 1713cm-1과 1296cm-1 의 위치에서 카복실산 (Carbo- xyl acid) C=O 스트레칭 피크와 (Fig 14)의 2570cm-1주변의 위치에서 S-H 스트레칭 피크의 존재로 free MAA 분자가 남아 있음을 확인 할 수 있다. 그러나 여러 번의 제거 과정을 거친 후에는 (Fig. 14)의 (a)에서 보여지는 카복실 산의deprotonation 피크와 (1589cm-1,1390cm-1) (Fig 14)의 (b) 에서 보여지는 2570 cm-1 피크가 (a)에서 사라졌음을 확인함으로써 잔여의MAA의thiol group 이 제거 되었음을 확인 할 수 있다.

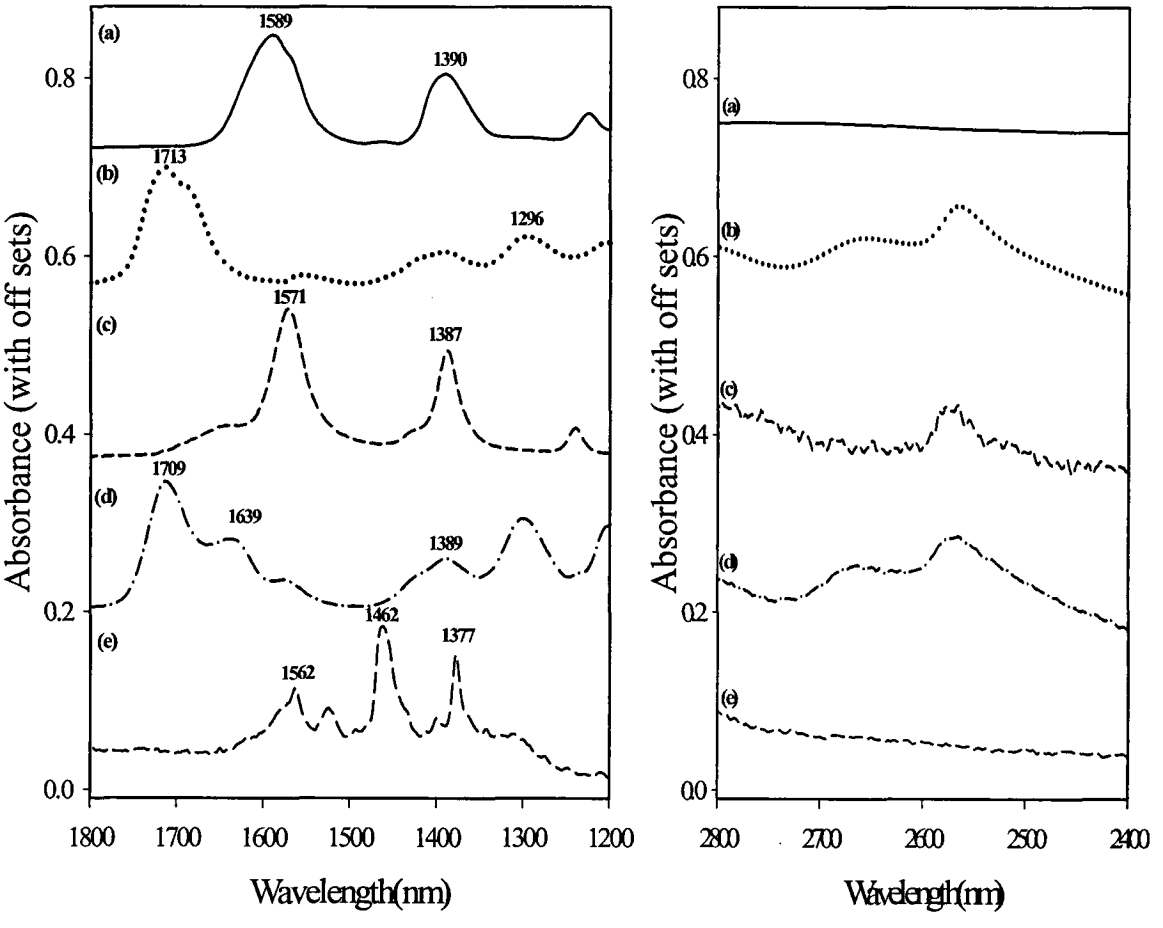

Fig 14. 적외선 분광법을 이용한 ^{MAA}QDs의 표면 개질 분석

(a) ^{MAA} QDs (Washed 5 times in Chloroform)

(b) ^{MAA} QDs (Washed 0 times in Toluene)

(c) pH 6.05 의 MAA 용액 (d) pH 2.02 의MAA 용액

(e) ^{TOPO}QDs (in Chloroform)

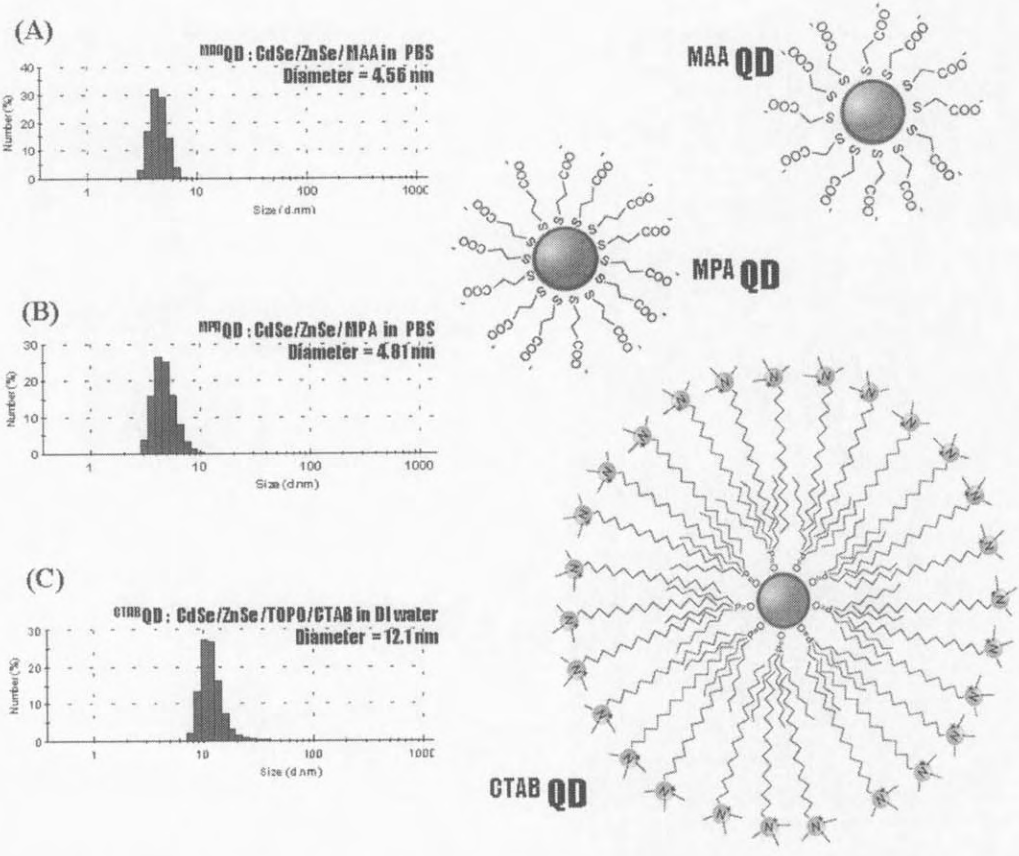

Fig 15. 표면개질과 정제 과정을 거쳐 준비된 양자점 나노입자들의 구조 및 용액상 입도분석결과.
(a) ^{MAA}QDs (b) ^{MPA}QDs (c) ^{CTAB}QDs

4) 요각류(*Tigriopus japonicus*)내에서의 양자점의 거동 분석

앞의 과정에서 준비된 여러 종류의 표면 전하를 띈 양자점 입자(음전하: ^{MAA}QD & ^{MPA}QD, 양전하: ^{CTAB}QD)를 본 연구의 대상 생물체인 요각류(*Tigriopus japonicus*)의 배양액에 투여한 후 양자점 입자의 거동을 형광 현미경 이미지 및 형광 spectra의 분석을 통하여 관찰하였다. Fig 16 에서 관찰할 수 있듯이 양자점 나노입자를 투여하지 않은 요각류의 경우에도 자체적인 형광현상이 관찰되며, 이러한 자체형광(autofluorescence)현상의 대부분의 요각류에서 유사한 파장영역대에서 비슷한 크기로 관찰되었다. 이러한 요각류에서의 자체형광이 양자점에서 관찰되는 형광과 유사한 파장대역이므로 자체형광의 spectra를 향후 관찰되는 형광 spectra들의 background spectra로서 보정하여준 후 양자점의 형광 spectra를 분석하였다.

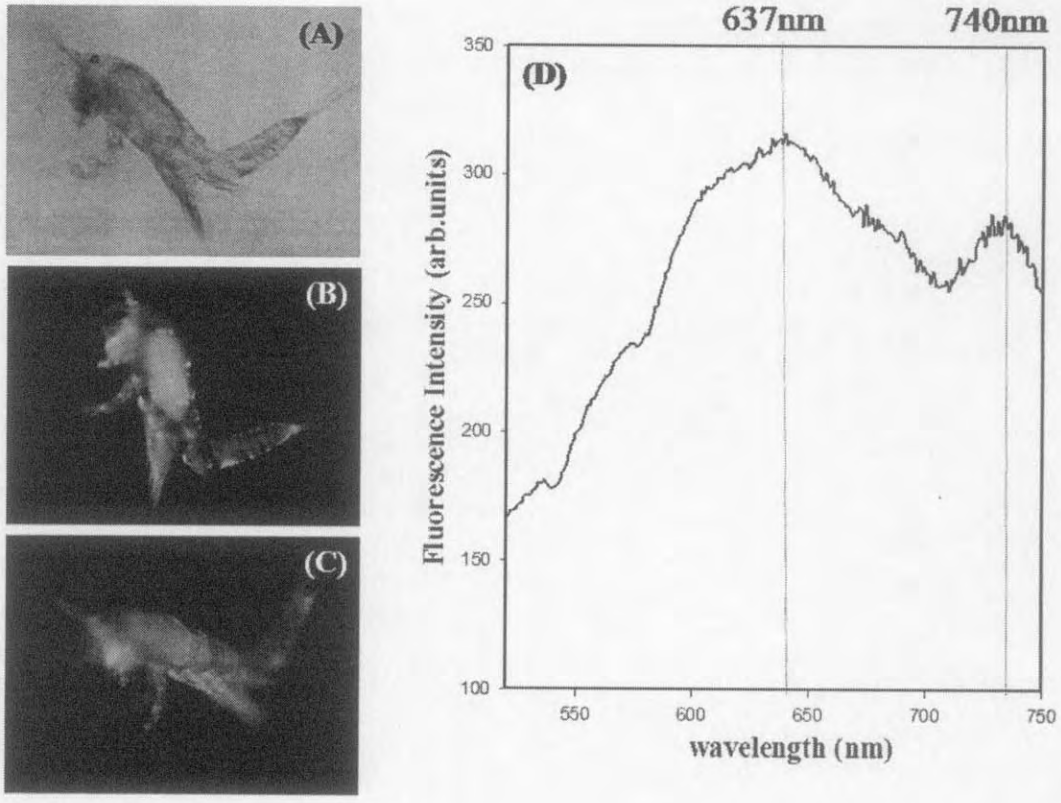

Fig 16. 요각류 *Tigriopus japonicus* 광학 및 형광 이미지 (A) 전체 모습의 광학 이미지.(B) 형광 500nm 파장의 빛으로 여기된 형광 이미지 (C) 형광 400nm 파장의 빛으로 여기된 형광 이미지 (D) 형광 500nm 파장의 빛으로 여기된 *Tigriopus japonicus* 자체형광(Autofluorescence) spectra.

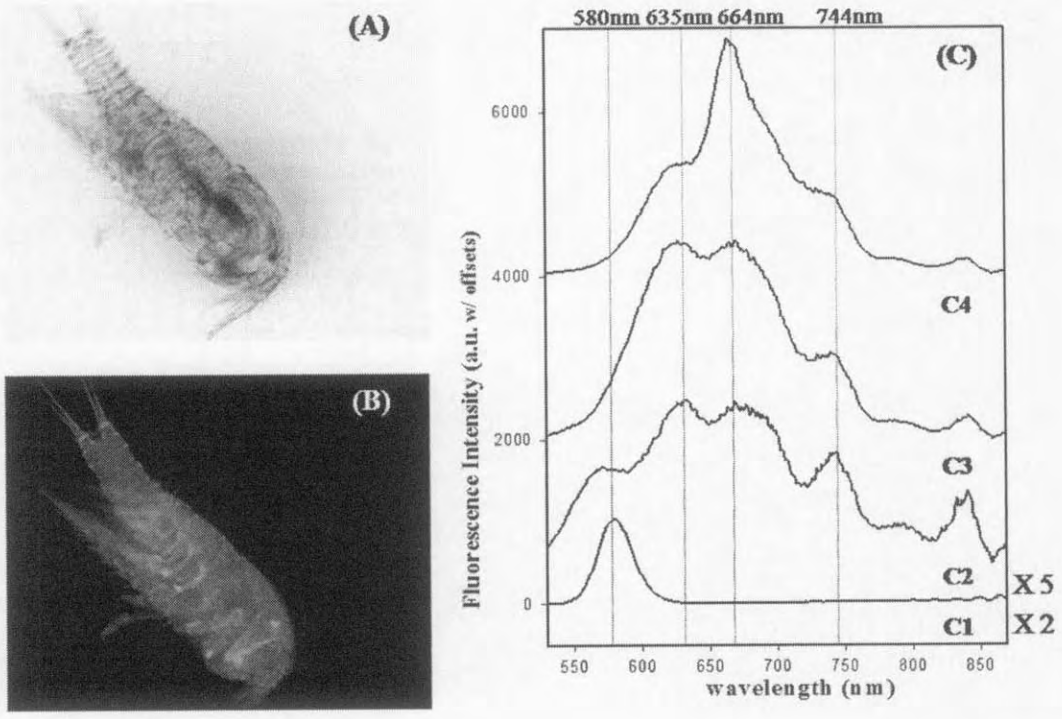

Fig 17. 해수에 5배 희석된 ^{CTAB}QDs에 48시간 배양된 요각류 *Tigriopus japonicus* 광학 및 형광 이미지. (A) 전체 모습의 광학 이미지. (B) 500nm 파장의 빛으로 여기된 형광 이미지. (C) 형광 500nm 파장의 빛으로 여기된 형광 spectra. C1. ^{CTAB}QDs 형광 spectrum. (fluorescence intensity X2) C2. 해수에 2배 희석된 ^{CTAB}QDs에 배양된 *Tigriopus japonicus* 형광 spectra에서 *Tigriopus japonicus* Autofluorescence spectrum 차감한 형광 spectrum.(fluorescence intensity X5) C3. 해수에 5배 희석된 ^{CTAB}QDs에 배양된 *Tigriopus japonicus* 형광 spectrum에서 *Tigriopus japonicus* Autofluorescence spectrum 차감한 형광 spectra. C4. 해수에 10배 희석된 ^{CTAB}QDs에 배양된 *Tigriopus japonicus* 형광 spectrum에서 *Tigriopus japonicus* Autofluorescence spectrum 차감한 형광 spectrum.

Fig 17 에서는 요각류에 표면 양전하를 띄고 있는 ^{CTAB}QD를 투여하여 준 후 얻은 요각류의 광학, 형광 이미지들과 이들 시료로부터 얻은 형광 spectra를 보여주고 있다. Fig 17(a)에서 볼 수 있듯이 광학이미지로 관찰된 요각류의 이미지는 이전의 양자점이 투여되지 않은 요각류와 매우 유사한 형태를 보였으나, 흥미롭게도 500nm 파장의 빛으로 여기시킨 형광 이미지에서는 요각류 전체적으로 붉은 색을 띄고 있는것을 관찰할 수 있었다. 이러한 붉은 색 영역에서의 형광현상은 요각류의 체내에 흡수된 중금속 나노입자인 양자점에서 발생되는것으로서 여겨지며, 배양액에 투여 후 48시간 이내에 이미 많은 양의 ^{CTAB}QD가 요각류 체내로 흡수되었음을 의미한다. 또한 붉은색의 형광이 요각류의 내장기관 등 일부조직에만 분포하지 않고 요각류 개체 내부에 전체적으로 고르게 분포하는 것으로부터 ^{CTAB}QD 가 요각류의 체내로 단순히 흡수된 것 뿐만 아니라 체내의 다양한 기관 및 조직으로 흡수/분포 및 대사가 되고 있음을 추측할 수 있다.

이러한 가정을 검증하기 위하여는 흡수된 ^{CTAB}QD 로부터 발생한 형광 spectra의 관찰이 필요하므로, Fig 17 의 (C)에는 이러한 형광 spectra들이 비교되어 있다. Fig 17(C)의 C1은 배양액에 투여하기 전 ^{CTAB}QD 용액의 형광 spectra이다. 앞에서 언급된 바와 같이 ^{CTAB}QD는 약 580 nm에서 하나의 형광 peak을 보여주고 있으며 이러한 형광 peak의 위치는 앞의 Fig 11 에서 언급된 UV-vis spectra에서의 peak 위치와 유사하게 ^{CTAB}QD 의 core size와 밀접한 관련을 가지고 있다. 즉 peak 위치가 장파장 쪽으로 이동하는 경우(Red shift) 엔 입자들간의 aggregration 또는 oswald ripening 등으로 인하여 core size가 증가하는 것을 의미하고, 단파장쪽으로 이동하는것(blue shift)은 입자의 dissolution등의 과정에 의하여 입자의 core size가 감소하고 있음을 의미한다. 이러한 양자점 입자의 흡수 및 형광 특성에 기반을 두고 요각류에 흡수된 ^{CTAB}QD의 요각류 체내에서의 변화 과정을 추론할 수 있다.

우선 Fig 17(C)의 C2는 요각류의 배양액인 해수에 2배 희석된 ^{CTAB}QDs에 배양된 *Tigriopus japonicus*로부터 관찰된 형광 spectra인데 C1에 제시되어 있는 ^{CTAB}QD만의 spectra와 비교하여 보았을 때 훨씬 다양한 형광 peak들이 관찰되고 있음을 알 수 있다. 일단 처음에 투여된 ^{CTAB}QD의 peak 위치인 580 nm근처의 peak을 제외 하고서도 최소 4개 최대 6개의 새로운 peak들이 가시광선과 적외선 영역에 걸쳐서 관찰되고 있다. 이러한 장파장 영역에서의 Red Shift된 새로운 peak들의 관찰은 초기에 흡수된 ^{CTAB}QD가 요각류 체내에서의 다양한 흡수/분포 및 대사 과정을 거치면서 aggregation 혹은 ripening과정을 거쳐 초기보다 증가된 크기의 QD입자들을 만들고 있다는 것을 의미한다. 그리고 관찰된 새로운 peak 위치들의 규

칙적인 배열로부터도 새로운 사실을 추론해 낼수 있다. Fig 17의 (C)에 일부 표시되어 있듯이 C1 spectra에서 관찰된 peak들은 573 nm, 635 nm, 664 nm, 695nm, 744nm 790 nm 그리고 842 nm 에 위치하고 있다. 이들 형광 파장들을 수식 (1) 과 Fig 11에 제시되어 있는 관계식을 이용하여 입자 core size를 추측해 보면 3.6 nm, 6.6 nm, 9.1 nm, 12.9 nm, 22.0 nm, 35.0 nm 그리고 56.9 nm 이다. 즉 양자점의 크기가 초기 투여된 입자의 크기로부터 정수배 혹은 그보다 약간 작은 값으로 규칙성 있게 증가하고 있다. 우선 C1 spectra에서 첫 번째 형광 peak의 위치가 단파장방향으로 약간 이동한 것은 (580 nm → 573 nm : Blue shift) 양자점 나노입자가 dissolution과정을 격으면서 core size가 감소하였음을 의미한다. 그리고, 그 이후의 규칙성 있는 양자점 크기 증가는 요각류 체내에서 이들 입자들이 다시 aggregation 되면서 core size가 정수배로 증가하는것임을 의미한다. 즉 요각류 체내에서 이들 음전하를 띈 중금속 나노입자들이 dissolution 이나 oswald ripening과 같은 과정도 물론 거치지만, 입자들간의 aggregation에의한 입자크기의 증가가 주요한 과정으로서 요각류 체내에서 나노입자의 흡수 후 재분포 과정에서 중요한 역할을 하고 있다.

Fig 17(C)의 C3 와 C4은 각각 해수에 5배 그리고 10배 희석된 ^{CTAB}QDs에서 같은 시간동안 배양된 요각류의 형광 spectra이다. 흥미롭게도 C2 spectrum 에서 관찰되던 peak들이 580 nm의 peak을 제외하고는 대부분 C3와 C4에서도 관찰되고 있다. 이러한 관찰은 서로 다른 농도에서도 ^{CTAB}QDs는 앞에서 제시된 것처럼 QD 간의 aggregation에 의한 입자크기의 증가가 요각류 생체내에서 일어나고 있음을 확인해주며, C3 시료에서는 6.6 nm와 9.1 nm 그리고 C4시료에서는 9.1 nm의 양자점 입자가 주 성분을 이루고 있음을 보여주고 있다.

Fig 18 ~ 20 에는 표면에 음전하를 띄고 있는 ^{MPA}QDs 와 ^{MAA}QDs 에 대하여 Fig 17의 ^{CTAB}QD와 유사한 실험을 수행한 결과들이 제시되어 있다. 앞의 ^{CTAB}QD의 경우와는 상이하게 ^{MPA}QDs에 48시간동안 노출된 요각류의 경우에는 약한 형광신호가 요각류의 일부분에서만 관찰이 되었다.
Fig 18(A-D)에는 ^{MPA}QD 로 추측되는 물질이 요각류의 꼬리부분에 방울 모양으로 축적되어 있는것이 관찰되었으며 Fig 19(A-D)에는 붉은 색의 물질들이 요각류의 알 부위에 축적되어 있는것을 관찰할 수 있었다.

비슷한 농도의 양자점이 투여 되었음에도 이렇게 전혀 다른 흡수율을 보이는것은 ^{CTAB}QD와 ^{MPA}QDs 또는 ^{MAA}QDs 간의 콜로이드로서의 다른 특성에 기인하는 것으로 생각된다. ^{CTAB}QD는 양전하로 표면이 처리되어 있을 뿐 아니라 표면을 구성하는 계면활성물질인 CTAB의 영향으로 미셀(micelle) 을 형성하고 높은 이온강도를 지니는 해수(sea water) 용액상에서도 침전이 거의 관찰되지 않으며 안정된 콜로이드 상태로 존재한다. 이에 비하여 ^{MPA}QDs 또는 ^{MAA}QDs는 음전하를 띄고 있는 표면의 카복실 이온이 높은 이온강도를 지니는 해수(sea water) 용액상에서 Na+등의 양이온들과 결합하여 쉽게 침전을 일으키는 것이 관찰되었다. 그러므로 ^{MPA}QDs 또는 ^{MAA}QDs의 실험시에는 요각류가 노출되어있는 해수 용액중에 상대적으로 적은 농도의 QD가 존재하고 이에따라 흡수되는 QD의 양이 절대적으로 적으므로 요각류 체내의 극히 일부분(특히 내장기관 및 알 부위)에만 흡수된 QD가 선택적으로 축적되고 있는 것이다. 비록 관찰된 형광의 크기는 상대적으로 작지만 Fig 18(E)와 19(E)의 형광 spectra들은 앞의 Fig 17(C)에서 관찰된 바와 유사한 경향들을 보여주고 있다.

Fig 203은 ^{MAA}QDs에 168시간 노출된 요각류의 형광 이미지들과 spectum을 보여주고 있다. 이 경우엔 ^{CTAB}QD 에 노출된 경우 보단 약한 형광을 보이지만 ^{MPA}QDs 에 노출된 경우 보단 훨씬 강한 형광이 관찰되고 있다. 이는 양자점 나노물질 자체의 특성에 기인하기 보다는 장기간의 노출 시간에 기인한 것으로 생각된다. 400 nm (Fig 20(A))와 500 nm (Fig 20(B)) 파장의 빛으로 여기하여 관찰한 형광 이미지들에서도 붉은색을 띄고 있는 입자들이 요각류 체내에 광범위하게 퍼져 있는 것을 볼수 있었으며, 형광 spectrum(Fig 20(C1))에서는 초기 투여된 크기의 ^{MAA}QDs는 거의 존재하지 않으며 대부분의 QD가 ~ 20 nm (733 nm 형광 peak) 와 ~ 60 nm (840 nm의 형광 peak)등의 커다란 입자상태로 뭉쳐진 상태로 존재하고 있음을 확인 할 수 있었다.

본 연구에서는 요각류에서 중금속 (나노입자) 이온의 흡수/분포/대사/배설 등의 거동을 in-vivo 상태에서 관찰할 수 있는 분석방법으로서 다양한 형태로 표면개질된 양자점 나노입자와 (공초점) 형광 이미징 및 분광분석법을 결합한 방법을 제시하고 요각류의 연구에 활용하였다. 이러한 연구과정을 통하여 중금속 이온 및 나노입자의 요각류내 물리적/화학적 거동 연구에 향후 다양하게 활용될 수 있는 분석 기법이 개발 되었으며 추후 다양한 중금속 오염물질 또는 나노물질에 노출된 요각류의 오염물질 체내 축적 및 그 방어기작을 규명하는데 도움이 될 것이다.

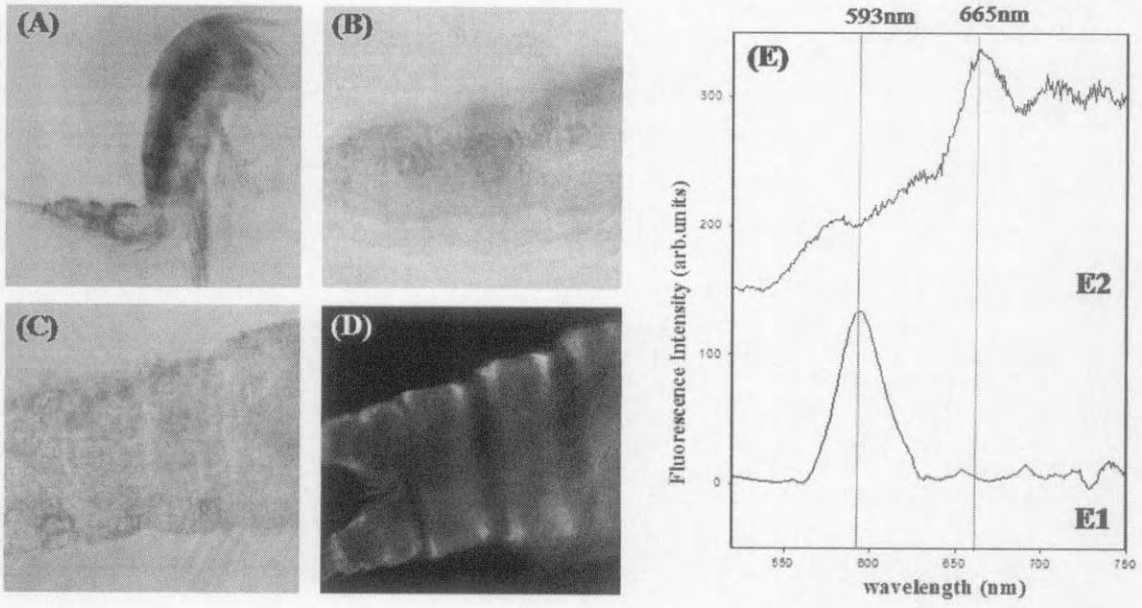

Fig 18. 1.35X10^{-9}M ^{MPA}QDs 에서 48시간 배양된 요각류 *Tigriopus japonicus* 광학 및 형광 이미지.

(A) 전체 모습의 광학 이미지. (배율 X100)

(B) 꼬리에 초점을 맞춘 광학이미지. (배율 X100)

(C) 배율 X400하여 꼬리에 초점을 맞춘 광학이미지.

(D) 알부분을 형광 500nm 파장의 빛으로 여기된 형광 이미지.

(E) 형광 500nm 파장의 빛으로 여기된 fluorescence spectra.

E1. ^{MPA}QDs fluorescence spectra.

E2. ^{MPA}QDs에 배양된 *Tigriopus japonicus* fluorescence spectra에서 *Tigriopus japonicus* Autofluorescence spectra 차감한 fluorescence spectra.

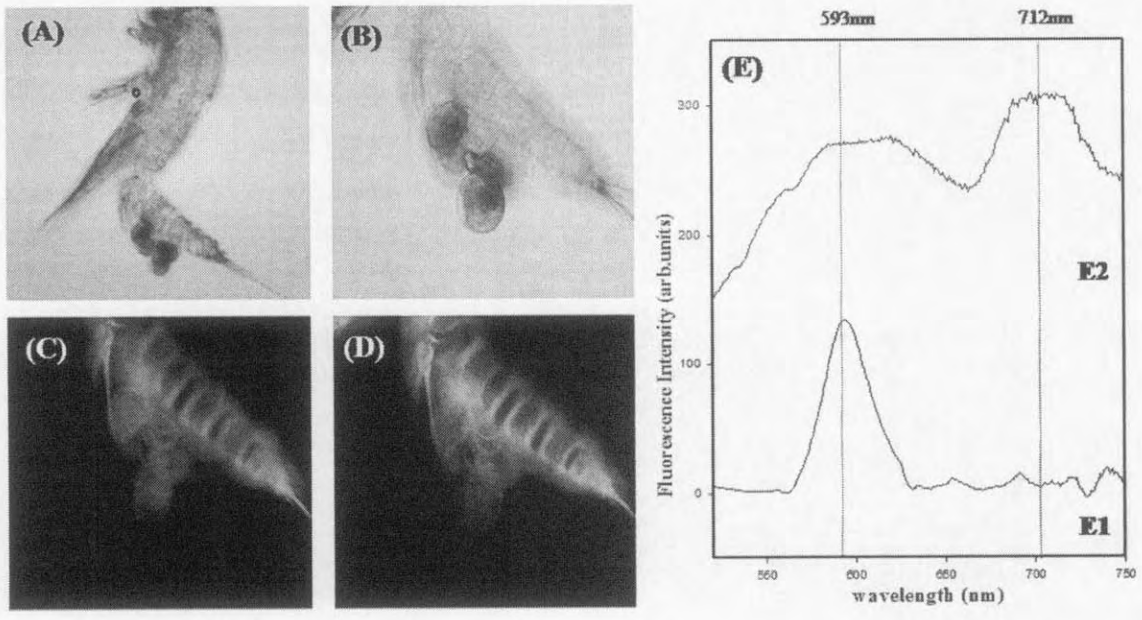

Fig 19. 2.7X10^{-10}M ^{MPA}QDs에서 48시간 배양된 요각류 *Tigriopus japonicus* 광학 및 형광 이미지.

(A) 전체 모습의 광학 이미지.

(B) 알부분에 초점을 맞춘 광학이미지.

(C) 알부분을 형광 500nm 파장의 빛으로 여기된 형광 이미지.

(D) 알부분을 형광 400nm 파장의 빛으로 여기된 형광 이미지.

(E) 형광 500nm 파장의 빛으로 여기된 형광 spectra.

E1. ^{MPA}QDs 형광 spectrum.

E2. ^{MPA}QDs에 배양된 *Tigriopus japonicus* 형광 spectrum에서 autofluorescence spectra 차감한 형광 spectrum.

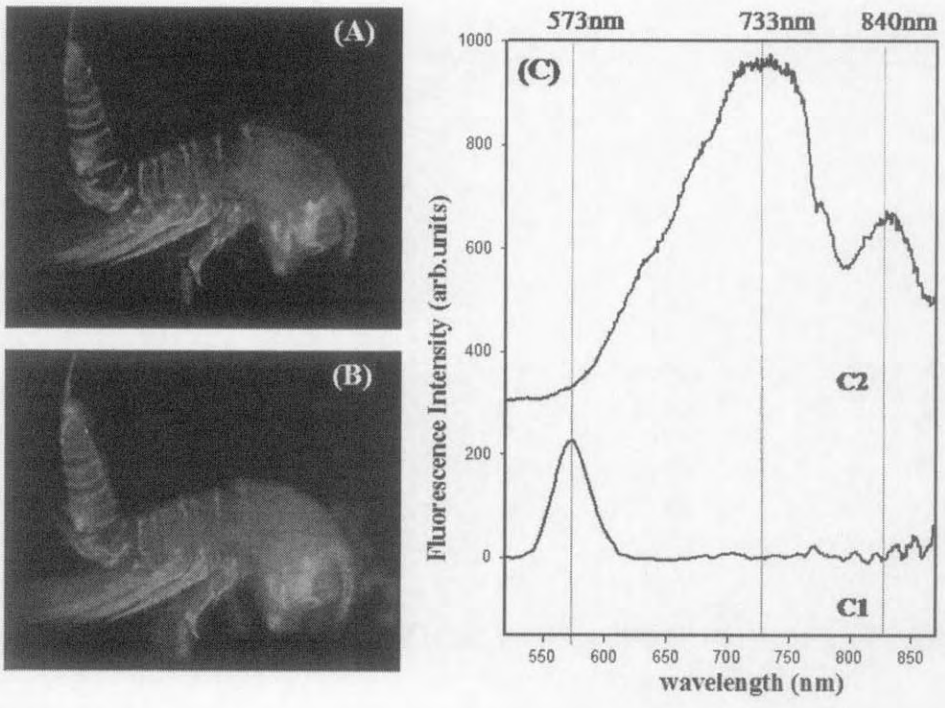

Fig 20. 7.10X10^{-9}M ^{MAA}QDs 에서 168시간 배양된 요각류 *Tigriopus japonicus* 형광 이미지. (배율 X100)

(A) 형광 400nm 파장의 빛으로 여기된 형광 이미지.

(B) 형광 500nm 파장의 빛으로 여기된 형광 이미지.

(C) 형광 500nm 파장의 빛으로 여기된 형광 spectra.

C1. ^{MAA}QDs 형광 spectra.

C2. ^{MAA}QDs에 배양된 *Tigriopus japonicus* 형광 spectra에서 *Tigriopus japonicus* Autofluorescence spectra 차감한 형광 spectra.

제 4 장 연구개발 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1절. 목표달성도

1. 요각류 *Tigriopus japonicus*에 미치는 중금속(Cu, As)의 영향에 대한 독성학적 기작을 규명

환경오염 연구를 위하여는 해양 및 육상의 수환경 생태계내에서 외부 환경에 민감히 반응하여 계절적으로 생산량 변동이 큰 **생산자와 소비자 사이에 에너지 흐름을 연결해줄 생물군에 대한 연구가 필요**하며, 그 연구 대상으로 요각류 *Tigriopus japonicus*가 유용한 지시생물체로서의 역할을 할수 있다.

요각류 *Tigriopus japonicus*는 연안 및 담수역에 서식하는 우점종으로, 수서생태계에서 식물플랑크톤을 섭식하여 식물플랑크톤의 생체량을 조절하고, 어류의 자치어 및 다양한 상위 단계 포식자의 가장 중요한 먹이원 되며, 생태계의 생산자와 상위 소비자를 연결해 주는 1차 소비자로서 생태계에서 매우 중요한 위치에 있다.

이러한 요각류의 체내에 농축되는 중금속(Cu, As)의 영향에 대한 독성학적 기작을 규명하기 위해 각 농도별로 48 및 96시간 독성검사를 실시, 분석함으로써 요각류 *Tigriopus japonicus*의 LC10 및 LC50을 얻었다. 또한 Dunnett's test에 의해 NOEC (no oberved effect concentration)를 계산하여 얻었다.

2. 요각류 *Tigriopus japonicus*에 미치는 중금속(Cu, As)의 노출에 따른 up- 또는 down-regulation 되는 유전자의 클로닝 및 염기서열 분석을 통한 biomarker gene으로 응용

요각류에 미치는 중금속의 영향을 분자수준에서 보기 위해 앞의 선행연구에서 보여준 바와 같이 SeeGene 사의 differential display 방법을 이용하여, 23개의 differential expressed gene을 발견하였다. 그리고 이들 중금속 특이 반응 유전자를 degenerative RT-PCR primer를 디자인하여 요각류에서 중금속에 반응하는 8종류의 유전자 (Metallothionein family(MT-F), Glutathione reductase(GR), Superoxide dimutase(SOD), Catalase(CAT), Glutathione peroxidase(GPx, Se-GPx), Glutathione S-transferase(GST))를 클로닝 하였다.

이들 유전자의 발현 변화를 측정하기위하여 Real-time RT-PCR 방법을 이용하여, 중금속 Cu, As의 NOEC 농도에서의 시간별로 유전자의 발현양상을 규명하였다. 또한 이들 유전자중 Glutathione S-transferase(GST)는 발현양이 최고 700배까지 증가함을 확인할 수 있었다. 그러므로 GST-σ 유전자는 Cu와 As 같은 중금속에 의한 산화적 스트레스로부터 세포의 방어기작에 강하게 관여하는 것으로

판단된다. 이후 민감하게 반응하는 이러한 유전자들을 biomarker gene으로 응용할수 있을 거라 판단된다.

3. 요각류 *Tigriopus japonicus*의 분자영상기법을 통한 분석

본 연구에서는 고 분해능 투과전자현미경, 경 X-선 분광현미경 그리고 공초점 형광현미경 등 다양한 영상기법을 활용하여 요각류 (*Tigriopus japonicus*)에서의 in-vivo 이미징 방법을 개발하고, 양자점을 이용하여 다양한 형태의 이온성 중금속 독성 물질들에 대한 탐침을 개발하고자 하였다. 요각류 생물체 시료의 고분해능 전자현미경 (TEM), X-선 분광현미경 그리고 형광 현미경용 시편제작 및 이미지 관찰 실험을 수행하였으며, 이러한 과정을 통하여 요각류 생물체의 최적 고정화 조건 선정 및 Ultramicrotome을 이용한 초박편 시료 제작법 등에 관한 Knowhow가 축적되었다. 이러한 연구 목적의 달성을 위하여 시도되었던 다양한 분석 방법중에서 형광현미경을 주로 활용하였으며 이러한 형광 이미지 분석 기능에 형광 spectrum을 추가적으로 얻을 수 있는 시스템을 구축하여 형광 이미지뿐만 아니라 시료에서 발생하는 다양한 형광 신호들을 파장별로 분석하여 중금속 오염물질의 화학적 종 변화들에 관한 정보를 분광학적으로 얻을 수 있는 분광 현미경적인 시스템을 구축하였다. 또한 양자점을 탐침으로 활용한 요각류 생물체의 in-vivo imaging 연구를 통하여 이온성 중금속 나노물질이 요각류의 생체내에 어떻게 흡수 분포 되는지에 관한 유용한 분석기법을 확보하였으며 이는 요각류에 관련된 다양한 연구에 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

2절. 기대효과

1. 경제적 측면 (성과의 산업계 이전 및 산업화를 통한 기대효과)

가. 요각류 *Tigriopus japonicus*를 이용한 중금속 등의 환경오염물질이 생물체에 미치는 영향을 분석할 수 있는 glutathione S-transferase assay system이 구축될 수 있고, 이를 이용한 수환경에서 1차적으로 영향을 받는 생물을 지표생물로 이용, 수질경보 시스템구축으로 활용가능하다.

나. 지표생물로서의 활용성이 확립되면, 본 assay를 수처리 시스템 등에 도입하여 현장에서의 수질개선여부 확인 혹은 환경기초시설운용의 적정성 등을 신속히 점검할 수 있는 계기를 마련할 것이다.

2. 학술적 측면 (성과의 타 산업 및 학문에 미치는 효과 등)

가. 요각류 *Tigriopus japonicus*를 이용하여 중금속 등의 환경오염물질이 생물체에 미치는 영향에 대한 분자독성학적 및 환경분석화학적 연구가 이루어져 이 분야에서 국제적인 leading 연구그룹이 될 수 있다.

나. 요각류를 환경독성학적 실험동물로 개발할 수 있어, 우리나라에 서식하는 생물을 이용한 한국형 환경오염 및 독성 연구모델을 수립할 수 있다.

다. 수중생물의 먹이연쇄에 매우 중요한 역할을 하는 요각류는 간독성 해독작용에 관여하는 glutathione S-transferase가 관련 chemicals의 노출에 따라 그 유전체의 발현이 유도되어 이를 독성 연구의 민감한 biomarker로서 활용 가능하다.

라. 수서환경오염 연구에 중요한 모델종의 확립에 기여하여 어류 등을 이용한 기존 연구에 상승적인 역할을 수행하여 보다 신속하고 민감한 결과를 제시될 것으로 기대된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

○ 요각류를 환경독성학적 실험동물로 개발할 수 있어, 우리나라에 서식하는 생물을 이용한 한국형 환경오염 및 독성 연구모델을 수립할 수 있다.

○ 수중생물의 먹이연쇄에 매우 중요한 역할을 하는 요각류는 간독성 해독작용에 관여하는 glutathione S-transferase가 관련 chemicals의 노출에 따라 그 유전체의 발현이 유도되어 이를 독성 연구의 민감한 biomarker로서 활용 가능하다.

○ 수서환경오염 연구에 중요한 모델종의 확립에 기여하여 어류 등을 이용한 기존 연구에 상승적인 역할을 수행하여 보다 신속하고 민감한 결과를 제시될 것으로 기대된다.

○ 본 연구과정을 통하여 구축한 형광 분광현미경 시스템은 향후 다양한 활용분야가 있다. 특히 요각류와 같은 지시생명체에서 형광 probe가 부착된 독성 물질의 흡수/분포/대사/배설 과정에 관한 toxicokinetics 연구에 유용한 정보를 줄 수 있을 것으로 생각되며, 향후 laser source를 활용한 단파장 여기(excitation)와 optical sectioning 등의 기능을 추가할 경우 요각류 시료의 독성메카니즘에 관한 보다 깊이 있는 정보를 얻을 수 있을 것이다. 또한 양자점을 탐침으로 활용한 요각류 생물체의 in-vivo imaging 연구를 통하여 이온성 중금속 나노물질이 요각류를 비롯한 다양한 지시생명체의 생체내에 어떻게 흡수 분포 관련된 다양한 연구에 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

제 6 장 참고문헌

1. Kim, J. I. Lee, J. K. *Adv. Funct. Mater.* **2006**, 16, 2077.
2. 주 진, 현택환, "반도체 나노결정입자" *NICE.* **2005**, 제23권, 제2호.
3. Schlamp, M. C. Peng, X. G.; Alivisatos, A. P. *J. Appl. Phys.***1997**, 82, 5837.
4. Mattoussi, H.; Radzilowski, L. H.; Dabbousi, B. O.; Thomas, E. L.; Bawendi, M. G.; Rubner, M. F. *J. Appl. Phys.***1998**, 83, 7965.
5. Tesster, N.; Medvedev, V.; Kazes, M.; Kan, S.; Banin, U. *Science* **2002**, 295, 1506.
6. Klimov, V. I.; Mikhailovsky, A. A.; Xu, S.; Malko, A.; Hollingsworth, J. A.; Leatherdale, C. A.; Eisler, H. J.; Bawendi, M. G. *Science* **2000**, 290, 314.
7. Greenham, N. C.; Peng, X. G.; Alivisatos, A. P. *Phys. Rev. B* **1996**, 54, 17628.
8. Bruchez, M.; Moronne, M.; Gin, P.; Weiss, S.; Alivisatos, A. P. *Science* **1998**, 281, 2013.
9. Chan, W.C.W.; Nie, S. M. *Science* **1998**, 281, 2016.
10. Han, M.; Gao, X.; Su, J.Z.; Nie, S. *Nat. Biotechnol.* **2001**, 19, 631.
11. Striolo, A.; Ward, J.; Prausnitz, J. M.; Parak,W. J.; Zanchet, D.; Gerion, D.; Milliron, D.; Alivisatos, A. P. *J. Phys. Chem.* B **2002**, 106, 5500.
12. Peng, X.; Wickham, J.; Alivisatos, A. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 5343.
13. Murray, C. B.; Norris, D. J.; Bawendi, M. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 8706.
14. Soloviev, V. N.; Eichhofer, A.; Fenske, D.; Banin, U. *J. Am.Chem.Soc.***2000**,122, 2673.
15. Yu, W. W.; Qu, L.; Guo, W.; Peng, X. *Chem. Mater.* **2003**, 15, 2854.
16. Del Razo, L.M., Quintanilla-Vega, B., Brambila-Colombres, E., Calderon-Aranda, E.S., anno, M., Albores, A., 2001. Stress proteins induced by arsenic. Toxicol. Appl. Pharm. 177, 132-148.
17. Schlenk, D.,Wolford, L., Chelius, M., Steevens, J., Chan, K.M., 1997. Effect of arsenite, arsenate, and the herbicide monosodium methyl arsonate (MSMA) on hepatic metallothionein expression and lipid peroxidation in channel catfish. Comp. Biochem. Physiol. C 118, 177-183.
18. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1999. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press, New York, USA.
19. Jemec, A., Tišler, T., Drobne, D., Sepčić, K., Jamnik, P., Roš, M., 2008. Biochemical biomarkers in chronically metal-stressed daphnids. Comp. Biochem. Physiol. C 147 61-68.
20. Doyen, P., Bigot, A., Vasseur, P., Rodius, F., 2005. Molecular cloning and expression study of pi-class glutathione -transferase (pi-GST) and selenium-dependent lutathione peroxidase (Se-GPx) transcripts in the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. Comp. Biochem. Physiol. C 147 69-77.