Journal of the Korean Chemical Society
Vol. 35, No. 1, 1991
Printed in the Republic of Korea

Bacteria 및 Organelle을 이용한 Cytidine Biosensor

印權植[†] · 金貞淑 · 全泳國 · 金峯元
계명대학교 자연과학대학 화학과
(1990. 8. 11 접수)

Cytidine Biosensor Using Bacteria and Organelle

Gwon Shik Ihn[†], Jeong-Suk Kim, Young Guk Jeon, and Bong Weon Kim
Department of Chemistry, College of Natural Science,
Keimyung University, Taegu 704-701, Korea
(Received August 11, 1990)

요 약. *Proteus mirabilis*균과 organelle를 NH_3 기체감응전극에 고정시켜 cytidine에 대한 바이오센서를 제조하였다. 박테리아 센서에 대한 pH, 온도, 완충용액, 균량 및 방해물질의 영향과 수명을 조사하였다. 그 결과 0.1 *M* phosphate 완충용액에서 pH 7.8, 온도 30℃, 균량 3 mg이었을 때, $5.0\times10^{-4}M \sim 1.0\times10^{-2}M$ cytidine 직선범위 내에서 56 mV/decade의 감응기울기를 나타내었다. 이 박테리아 전극의 감응특성을 organelle 전극의 경우와 비교하였다.

ABSTRACT. The cytidine bio-sensors have been constructed by immobilizing the bacterium *Proteus mirabilis* and organelle on an ammonia gas sensor. The bacterial sensor was investigated for the effects of pH, temperature, buffer solution, bacterial amounts, interferences and lifetime. The bacterial sensor had linearity in the range of $5.0\times10^{-4}M \sim 1.0\times10^{-2}M$ cytidine with a slope of 56 mV/decade at pH 7.8, 30℃ and 3 mg in 0.1 *M* phosphate buffer solution. This bacterial sensor was compared with it's organelle sensor.

서 론

최근 아미노산이나 핵산 등 생체유기물의 직접 정량을 위하여 측정대상에 대한 선택성이 탁월하고 감도가 예민한 바이오센서에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.

최초의 바이오센서인 효소전극[1~5]을 비롯하여 박테리아전극[6~10], 임상화학 분야에 응용하는 면역센서[11~15], 동식물의 조직을 이용한 조직센서[16~19], 그 외에 미토콘드리아[20], 미크로솜[21,22]을 이용한 organelle센서 및 ISFET를 이용한 바이오센서[23~26]가 보고되고 있다.

한편, 모든 생물의 세포에 존재하며 단백질의 합성을 지배하는 핵산은 유전정보를 전달하는 중요한 생체 물질이다.

특히 pyrimidine nucleoside의 일종인 cytidine은 cytidine deaminase에 의해 uridine이 되며, 유도체인 cytidine-5′-triphosphate(CTP)는 동물조직에서 인지질의 생합성에 이용된다.

Cytidine의 정량에 관한 연구는 polarography법에 의한 연구가 보고된 바 있으며[27,28] 바이오센서를 이용한 cytosine에 대한 연구는 보고되었으나[29], cytidine 정량법은 보고된 바 없다.

따라서 본 연구에서는 cytidine을 정량하기 위해 아직까지 보고된 바 없는 *Proteus mirabilis*균을 이용한 박테리아 전극을 제조하고, 이 박테리아 전극을 사용하여 cytidine을 정량함에 있어서 분석의 최적 조건을 찾고자 한다. 또한 *Proteus mirabilis*균을 파쇄하고, organelle을 추출하여 organelle 전극을 조

립하고 상호비교 검토하고자 한다.

실 험

시약 및 기기

시약. Cytidine은 Sigma제 완충용액으로 사용한 Na_2HPO_4와 NaH_2PO_4 및 tris(hydroxymethyl) aminomethane은 Sigma제 특급시약을 각각 사용하였다. 균 배양을 위해 사용한 nutrient agar는 Key Scientific제, 균의 확인을 위한 Triple Sugar Iron(T.S.I.) agar는 Difco제, Analytical Profile Index(A.P.I) 20 E는 Analytab(France) 제품을 사용하였다.

균. 실험에서 사용한 균은 계명대학교 의과대학 미생물학 교실에서 배양, 확인한 *Proteus mirabilis*를 분양받아 매 실험시 확인하여 사용하였다[30].

기기. Ammonia gas sensor는 Orion Research Model 95-12를 전위 및 pH 측정은 Orion Research Digital pH/millivolt meter 611과 Beckman Model 76 Century SS pH meter를 각각 사용하였다. 균 배양과 멸균을 위한 incubator와 autoclave는 Hyun Dai Scientific Model D-27B와 Dong Yang Scientific Model 0540을, water bath는 Forma Scientific Model 2067을 사용하였다.

Organelle 추출에 쓰인 centrifuge는 Hitachi 70 P-72, Beckman Model J2-21, Hettich Universal D-7200을 사용하였고, 균의 파쇄는 Labline 9100 ultrasonic system을 사용하였다.

기체투과막은 Orion-951204(Teflon)을 사용하였으며, 투석막은 pore size 0.22 μm인 Millipore 제품을 사용하였다.

실험균주 배양 및 확인

실험균주 배양. 증류수 200 ml에 nutrient agar 4.6g을 용해시킨 후, 이 용액을 고압멸균기로 15 Lb/inch^2(121℃)에서 15분간 멸균시켜서 고체배지를 만든다. 여기에 *Proteus mirabilis*균을 백금니로 1 loop씩 접종시켜서 incubator에서 균의 활성이 가장 좋은 35℃로 유지시키면서 18~24시간 동안 평면배양시킨다.

실험균주 확인. *Proteus mirabilis*균의 확인은 T.S.I. agar method[31]와 A.P.I. 20E method[32]를 사용하였으며, 매 실험마다 배지에 나타난 성상을 확인하였다.

T.S.I. agar[31]에 나타난 확인결과는 acid/acid, H_2S였으며, A.P.I. 20E[32]를 이용한 생화학적 확인결과는 아래와 같다. 여기서 (+)는 해당물질과 반응하여 분해함을 나타내며, (−)는 반응하지 않음을 나타낸다.

ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H_2S	URE
(−)	(−)	(−)	(+)	(−)	(+)	(+)
TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO
(+)	(−)	(−)	(+)	(+)	(−)	(−)
SOR	RHA	SAG	MEL	AMY	ARA	OX
(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)
NO_2						
(+)						

A.P.I. 20E에 의한 확인에서 나타낸 약어는 다음과 같다.

ONPG : ortho nitrophenol galactosidase, ADH : arginine dehydrolase, LDC : lysine decarboxylase, ODC : ornithine decarboxylase, CIT : citrate, H_2S : H_2S gas, URE : urea, TDA : Tryptophane deaminase, IND : indole, VP : Voges-Proskauer, GEL : gelatine, GLU : glucose, MAN : mannose, INO : inositol, SOR ; sorbitol, RHA : rhamnose, SAC : sucrose, MEL : melibiose, AMY : amygdalin, ARA : arabinose

Organelle 추출

박테리아 전극과 organelle 전극의 성능을 비교하기 위해서 박테리아 속의 organelle을 다음의 방법에 따라 배양 및 추출하였다.

실험균주의 배양. Nutrient broth 8g을 증류수 1l에 용해시키고 shaking flask에 250 ml씩 분주한 다음, 고압멸균기로 멸균시킨다. 백금니로써 *Proteus mirabilis*균을 멸균 용액에 1 loop씩 접종시켜 shaking incubator에서 35℃로 유지시키면서 20~24시간 액체배양시킨다.

추출. Organelle의 추출과정은 다음의 방법에 따라 수행하였다[33~35]. 먼저 액체배양된 균을 900× g에서 30분간 원심분리하였으며, 이 때 g값[33]($1.12 \times rn^2 \times 10^{-5}$)은 원심력장에서의 중력가속도이다. 여기에서 r은 반지름(원심분리기의 회전축과 원심분리관 속의 액체중심점간의 거리)이며, n은 매 분마

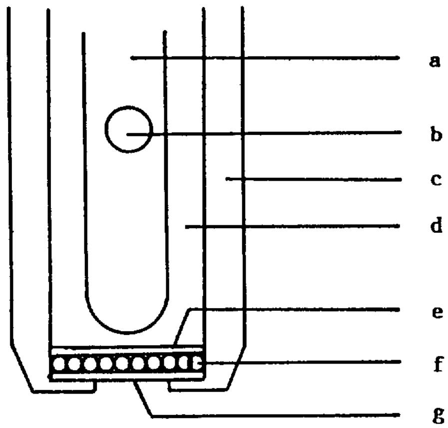


Fig. 1. Schematic diagram of the bacterial electrode for cytidine : a) inner body, b) reference element (Ag/AgCl), c) outer body, d) internal filling solution, e) gas-permeable membrane, f) bacterial layer, g) dialysis membrane

다의 회전수(rpm)이다. 이렇게 해서 모은 균에 완충용액[33]($10\ mM$ Tris-HCl, pH 7.4, $10\ mM$ $MgCl_2$, $60\ mM$ NH_4Cl, $60\ mM$ β-mercaptoethanol)을 넣고 초음파 파쇄를 하여 30,000×g에서 30분간 원심분리하면 침전물과 상층액으로 분리된다. 이 때 침전물은 깨어지지 않은 균이나 균의 껍질이다. 상층액을 다시 150,000×g에서 2.5시간 원심분리하여 얻은 침전물을 두번 반복하여 씻어준다. 이렇게 하여 추출한 세포내 소기관인 organelle층을 전극에 조립하여 organelle 전극을 제조하였다. 이 층은 박테리아를 파쇄하여 얻었으므로 박테리아보다 효소가 집합되어 있으리라 생각된다.

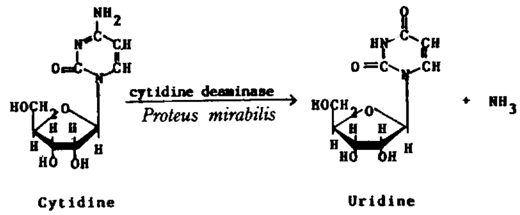
전극의 조립. *Proteus mirabilis*균을 pore size가 0.22 μm인 투석막과 기체투과막 사이에 고정시켜 기존의 NH_3 gas sensor(φ 7 mm)의 하단부에 부착시켜서 *Fig.* 1과 같은 박테리아 전극을 조립하였다. 또한, *Fig.* 1에서 박테리아 대신 organelle을 고정시킨 전극도 같은 방법으로 조립하였다.

이렇게 조립한 전극을 시료용액 50 ml에 담그고, 용액을 자석젓개로 저어가면서 기전력을 기록하였다.

결과 및 고찰

박테리아 전극에 의한 cytidine의 검정선

투석막을 통하여 균층에 들어간 cytidine은 *Proteus mirabilis*균이 갖고 있는 효소에 의해 분해되어 NH_3 gas와 uridine이 된다.



이 때 균층 위에 있는 기체투과막에 의해 NH_3 gas는 전극 내부로 확산되어 들어가고 uridine은 투석막을 통해 용액으로 빠져나온다.

$$NH_3+H_2O \rightleftharpoons NH_4^+ + OH^- \tag{1}$$

내부용액으로 들어온 NH_3 gas는 다음과 같이 평형을 이루며 반응이 진행된다.

$$\frac{[NH_4^+][OH^-]}{[NH_3]}=K \tag{2}$$

$$[NH_4^+][OH^-]=K.[NH_3] \tag{3}$$

식 (3)에서 $[NH_4^+]$ 항은 내부용액 NH_4Cl에 의해 일정하게 유지되므로 상수로 간주하여 다음의 식 (4)로 나타낼 수 있다.

$$[OH^-]=\frac{K}{[NH_4^+]}\cdot[NH_3]=K'[NH_3] \tag{4}$$

$[OH^-]$는 전극 내부의 pH를 변화시키며, $[NH_3]$에 의존한다. 따라서 내부 유리전극의 전위는 Nernst 식에 의하여 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$E=E_0-S\ \log[OH^-] \tag{5}$$

여기에서 S는 전극의 감응기울기이며, $[OH^-]$가 NH_3의 농도에 직접적으로 비례하므로 다음의 식이 된다.

$$E=E_1-S\ \log[NH_3] \tag{6}$$

따라서 전위는 NH_3 농도에 비례하게 되며, cytidine의 농도에 따라 NH_3가 생성되므로 전위값은 cytidine 농도에 비례하게 된다.

Cytidine을 정량하기 위하여 최적조건은 pH 7.8,

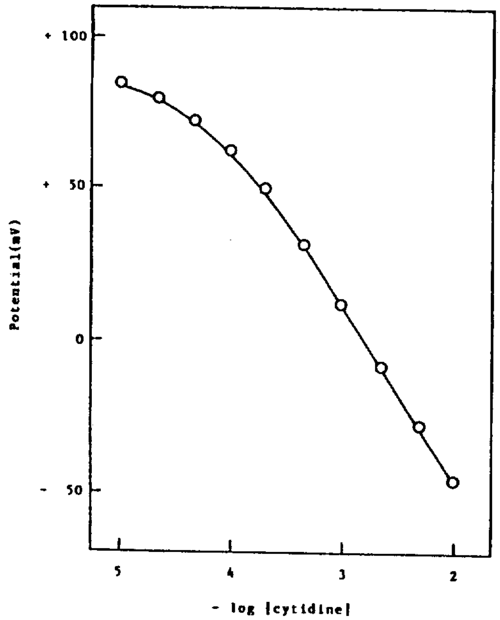


Fig. 2. Calibration curve on optimum conditions for cytidine.

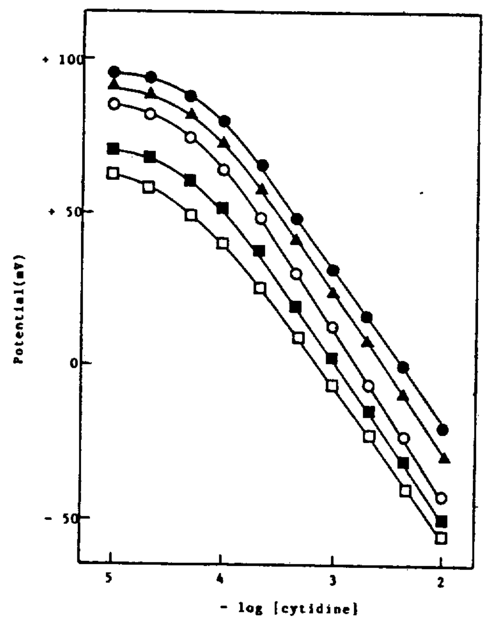


Fig. 3. Effect of pH in 0.1 M phosphate buffer solution at 30℃ ; pH 7.4(● - ●), pH 7.6(▲ - ▲), pH 7.8(○ - ○), pH 8.0(■ - ■), pH 8.2(□ - □).

온도 30℃, 균량 3 mg, 0.1 M phosphate 완충용액으로 이 전극의 감응특성을 측정하여 구한 검정선을 rel. error 1.8%로 *Fig.* 2에 나타내었다.

Fig. 2로부터 알 수 있듯이 cytidine의 농도가 $5.0\times10^{-4}\sim1.0\times10^{-2}$ M내에서 검정선이 직선이었다. 또한, 감응기울기는 56 mV/decade였으며, 감응시간은 8~10분이었다.

박테리아 전극의 최적조건 조사

pH의 영향. Cytidine을 정량할 때의 박테리아 활성이 가장 좋은 pH를 찾기 위하여 박테리아 전극에 대한 pH의 영향을 다음과 같이 조사하였다.

온도 30℃, 균량 3 mg, 0.1 M phosphate 완충용액의 pH를 7.4에서 8.2까지 변화시켜서 측정한 박테리아 전극의 감응특성을 *Fig.* 3에 나타내었다.

Fig. 3으로부터 알 수 있듯이 가장 좋은 감응을 나타낸 pH 7.8의 경우는 cytidine의 농도가 $5.0\times10^{-4}\sim1.0\times10^{-2}$ M 범위내에서 직선이었고, 56 mV/decade의 감응기울기를 나타내었다. 또한, 이 때의 감응시간은 8~10분이었다. pH가 7.4, 7.6, 8.0 및 8.2일 때는 $6.0\times10^{-4}\sim1.0\times10^{-2}$ M 범위내에서 모두 같이 직선이었다. 그러나 감응기울기는 pH 7.6과 8.0은 54 mV/decade, pH 7.4와 8.2는 각각 51 mV/decade, 50 mV/decade로서 pH 7.8보다 떨어진 값이었다. 감응시간은 측정한 모든 pH에 8~10분으로서 나타났다.

따라서 본 박테리아 전극을 사용할 때 pH는 7.8로 정하였다.

온도의 영향. 박테리아 전극으로 cytidine을 정량할 때에 가장 좋은 활성을 나타내는 온도를 알기 위해 측정용액의 온도를 변화시켜서 각 전극의 감응특성을 다음과 같이 조사하였다.

pH를 7.8, 완충용액 및 균량은 0.1 M phosphate, 3 mg으로 각각 고정시키고, 용액의 온도를 25℃에서 35℃까지 변화시켜서 측정한 감응특성을 *Table* 1에 나타내었다.

Table 1로부터 알 수 있는 것처럼 가장 좋은 감응을 나타낸 30℃일 때는 cytidine의 농도가 $5.0\times10^{-4}\sim1.0\times10^{-2}$ 범위내에서 직선이었고, 감응기울기는 56 mV/decade, 감응시간은 8~10분이었다. 25℃일 때는 cytidine의 농도가 $6.0\times10^{-4}\sim1.0\times10^{-2}$ M 범위내에서 직선이었고, 감응기울기는 52 mV/decade였다. 또한, 35℃일 때는 cytidine의 농도가 $7.0\times10^{-4}\sim1.0\times10^{-2}$ M 범위내에서 직선이었고, 감응기

Table 1. Effect of temperature in 0.1 *M* phosphate buffer solution at pH 7.8

Temp. (℃)	Linear range (*M*)	Response slope (mV/decade) (negative slope)	Response time (mins)
25	6.0×10^{-4} $\sim1.0\times10^{-2}$	52	8~10
30	5.0×10^{-4} $\sim1.0\times10^{-2}$	56	8~10
35	7.0×10^{-4} $\sim1.0\times10^{-2}$	53	8~10

Table 2. Effect of buffer solution at pH 3.8, 30℃

Buffer	Linear range (*M*)	Response slope (mV/decade) (negative slope)	Response time (mins)
0.05 *M* phosphate	6.0×10^{-4} $\sim1.0\times10^{-2}$	52	12~15
0.1 *M* phosphate	5.0×10^{-4} $\sim1.0\times10^{-2}$	56	8~10
0.2 *M* phosphate	7.0×10^{-4} $\sim1.0\times10^{-2}$	51	8~10
0.1 *M* Tris-HCl	9.0×10^{-4} $\sim1.0\times10^{-2}$	43	13~16

울기는 53 mV/decade였다.

따라서 본 박테리아 전극을 사용할 때에 용액의 온도는 30℃로 정하였다.

완충용액의 영향. Cytidine을 정량할 때에 최적 감응을 나타내는 완충용액을 찾기 위해, 박테리아 전극의 완충용액의 영향을 다음과 같이 조사하였다.

pH를 7.8, 온도 및 균량은 각각 30℃, 3 mg으로 고정시키고, phosphate 완충용액의 몰농도를 0.05, 0.1, 0.2 *M*로 변화시켰으며, 아울러 Tris-HCl 완충용액에 대하여 측정한 이 박테리아 전극의 감응특성을 *Table* 2에 나타내었다.

Table 2로부터 알 수 있는 것처럼 0.1 *M* phosphate 완충용액일 때 직선 농도범위가 $5.0\times10^{-4}\sim1.0\times10^{-2}$ *M* cytidine으로 가장 길며 감응기울기도 56 mV/decade로서 가장 좋은 값을 나타내었다. 0.05 *M* phosphate 완충용액의 경우는 감응시간이 12~15분으로 다소 많이 소요되었으며, 0.1 *M* Tris-HCl 완충용액의 경우는 직선범위와 감응기울기 면에서 모두 phosphate 완충용액보다 떨어진 값을 나타내었다.

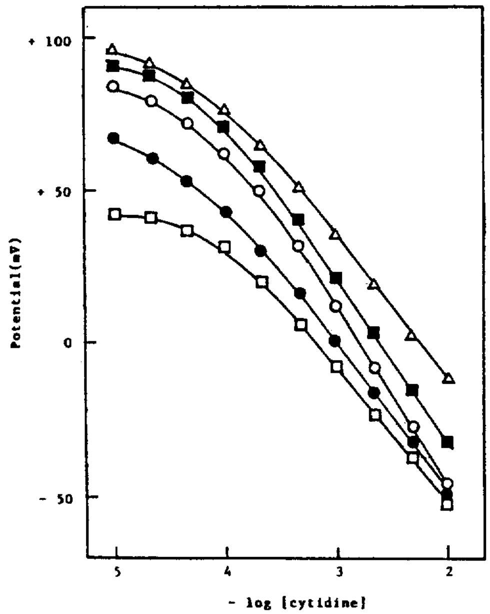


Fig. 4. Effect of bacterial amounts in 0.1 *M* phosphate buffer solution at pH 7.8, 30℃ ; 1 mg(△－△), 2 mg (■－■), 3 mg(○－○), 4 mg(●－●), 5 mg(□－□).

따라서 0.1 *M* phosphate 완충용액이 최적 완충용액임을 알 수 있었다.

균량의 영향. 박테리아 전극으로 cytidine을 정량할 때의 최적 균량을 알아보기 위하여 균량에 따른 전극의 감응특성을 다음과 같이 조사하였다.

pH를 7.8, 온도 및 완충용액을 각각 30℃, 0.1 *M* phosphate로 고정시키고, *Proteus mirabilis* 균량을 1 mg에서 5 mg으로 변화시켜서 측정한 결과를 *Fig.* 4에 나타내었다.

Fig. 4를 보면 알 수 있는 것처럼 균량이 1, 2 및 5 mg일 때는 cytidine의 농도와 같이 $6.0\times10^{-4}\sim1.0\times10^{-2}$ *M* 범위내에서 직선이었으며, 감응기울기는 각각 47, 54, 45 mV/decade로 나타났다. 또한, 4 mg일 때는 cytidine의 농도가 $7.0\times10^{-4}\sim1.0\times10^{-2}$ *M* 범위내에서 직선이었고, 감응기울기는 50 mV/decade였다. 균량이 3 mg일 때는 $5.0\times10^{-4}\sim1.0\times10^{-2}$ *M* cytidine의 농도범위에서 직선이었고, 감응기울기는 56 mV/decade로 가장 좋은 감응을 나타내었다.

Table 3. Effect of the necleic acids in 0.1 M phosphate buffer solution at pH 7.8, 30℃

Nucleic acids	Response (mV)	ΔmV
adenine	−6	−17
cytosine	+8	−3
adenosine	−2	−13
2′-deoxycytidine	−2	−13
2′-deoxyguanosine	+11	0
2′-deoxyadenosine	+2	−9
none*	+11	0

*pure $1.0\times10^{-3}M$ cytidine.

Table 4. Effect of the amino acids in 0.1 M phosphate buffer solution at pH 7.8, 30℃

Amino acids	Response(mV)	ΔmV
L-tryptophane	+11	0
L-leucine	+7	−4
L-lysine	+11	0
DL-phenylalanine	+8	−3
L-threonine	+6	−5
L-histidine	+11	0
L-methionine	+7	−4
none*	+11	0

*pure $1.0\times10^{-3}M$ cytidine.

Table 5. Effect of the inorganic salts in 0.1 M phosphate buffer solution at pH 7.8, 30℃

Inorganic salts	Response(mV)	ΔmV
$MgSO_4$	+12	+1
Na_2SO_4	+11	0
$NaNO_3$	+11	0
$NaHCO_3$	+13	+2
KCl	+14	+3
$K_4Fe(CN)_6$	+11	0
Na_2WO_4	+12	+1
none*	+11	0

*pure $1.0\times10^{-3}M$ cytidine.

Table 6. Comparison for response characteristics of bacterial sensor and organelle sensor

	Bacterial sensor	Organelle sensor
Linear range (M)	5.0×10^{-4} ~1.0×10^{-2}	9.0×10^{-5} ~1.0×10^{-3}
Response slope (mV/decade)	56	30
Response time (min)	8~10	5~6

감응시간은 균량이 적어짐에 따라 단축되어 나타났고 균량이 많을수록 시간이 많이 소요되었다.

따라서 본 박테리아 전극의 최적 균량은 3 mg 정도임을 알 수 있었다.

방해물질의 영향. Cytidine을 박테리아 전극으로 정량할 때에 이 전극의 감응에 방해를 하는 방해물질을 알아보기 위하여 핵산, 아미노산 및 무기염류가 기전력에 미치는 영향을 다음과 같이 조사하였다.

$1.0\times10^{-3}M$ cytidine 수용액에 각종의 핵산, 아미노산 및 무기염류 등을 같은 농도가 되도록 첨가시켰을 때 방해하는 기전력의 변화 정도를 ΔmV로 나타내어 *Table* 3, 4 및 *Table* 5에 나타내었다.

Table 3과 4에서 알 수 있듯이 adenine, adenosine 및 2′-deoxycytidine 등이 전극감응을 방해하였고, L-leucine, L-threonine, L-methionine 등이 방해하였으나, 아미노산의 방해 정도는 다소 적은 것으로 나타났다.

또한 *Table* 5에서 처럼 대부분의 무기염류 등은 큰 영향을 미치지는 않았으며 약간의 감응억제물질로 작용하였다.

박테리아 전극과 Organelle 전극의 감응특성 비교

다양한 기능이 집약되어 있는 분자집합체인 organelle를 *Proteus mirabilis*균 속에서 추출하여 organelle 전극을 조립한 다음 이 전극의 성능을 박테리아 전극과 상호 비교하였다.

Proteus mirabilis 박테리아 전극의 성능이 가장 좋은 조건에서 측정한 결과와 organelle 전극의 감응특성을 비교하여 *Table* 6에 나타내었다.

Table 6으로 알 수 있는 것처럼 박테리아 전극은 최적조건에서 측정하였을 때 5.0×10^{-4}~1.0×10^{-2} M 범위내에서 직선이었고, 감응기울기는 56 mV/decade이었다.

한편 organelle 전극으로 cytidine을 정량할 때의 직선 농도범위는 9.0×10^{-5}~$1.0\times10^{-3}M$ cytidine

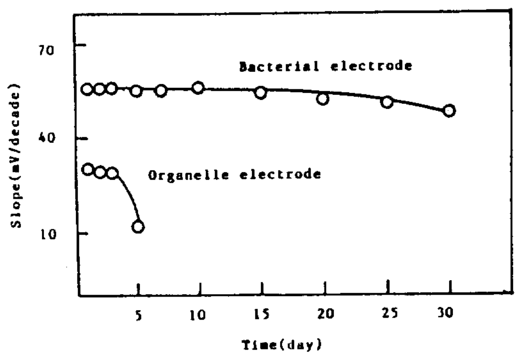


Fig. 5. Lifetime for cytidine.

으로서 박테리아 전극보다 저농도에서 직선이었고, 이 때 감응기울기는 30 mV/decade, 감응시간은 5~6분이었다.

Organelle 전극의 경우, 박테리아 전극에 비해 감응기울기는 다소 떨어졌으나 직선범위가 저농도에서 나타났으며, 감응시간도 훨씬 단축되었으므로 cytidine 정량에는 박테리아 전극과 더불어 유용하게 사용할 수 있다고 생각한다.

전극의 수명 비교. Cytidine을 정량할 때에 본 연구에서 개발한 박테리아 전극의 경우 30일, organelle 전극의 경우 5일 동안 4℃에서 보관하면서 각 전극의 감응기울기를 조사하여 *Fig*. 5에 나타내었다.

Fig. 5을 보면 알 수 있는 것처럼 박테리아 전극의 경우 감응기울기는 1일에서 20일까지는 56~52 mV/decade로 거의 변화가 없었으며, 직선 농도범위도 $5.0\times10^{-4}\sim1.0\times10^{-2}\,M$ cytidine로 변화가 없었다. 또한, 30일에는 감응기울기가 다소 떨어진 48 mV/decade를 나타냈으며, 감응시간은 시간이 지남에 따라 다소 길어졌다.

한편, Organelle 전극을 만든 그 날에는 감응기울기가 30 mV/decade였으며, cytidine의 농도가 $9.0\sim10^{-5}\sim1.0\times10^{-3}\,M$ 범위에서 직선이었다. 2일과 3일에는 감응기울기가 29 mV/decade로서 첫 날과 비슷하였으며, cytidine의 농도가 $1.0\times10^{-4}\sim1.0\times10^{-3}\,M$ 범위에서 직선이었다. 5일에는 감응기울기가 12 mV/decade로서 활성이 현저히 감소되었으며, 그 이후에는 거의 감응이 되지 않았다.

Cytidine을 정량할 때에 organelle 전극은 박테리아 전극보다 수명이 짧은 단점이 있었다.

결 론

본 연구에서는 *Proteus mirabilis*균을 이용한 박테리아 전극 및 organelle 전극을 개발하고, 수용액 속의 cytidine을 정량할 때의 최적 실험조건을 조사하였다.

박테리아 전극의 경우, 0.1 *M* phosphate 완충용액에서 pH 7.8, 온도 30℃, 균량 3 mg이었을 때가 최적 조건이었다. 이 때 정량 가능한 직선 범위는 $5.0\times10^{-4}\sim1.0\times10^{-2}\,M$으로, 이 영역에서 감응기울기는 56 mV/decade로 나타났고, 감응시간은 8~10분이었다.

Organelle 전극은 0.1 *M* phosphate 완충용액에서 pH 7.8, 온도 30℃, organelle량 3 mg이었을 때가 최적 조건이었다. 이 때 정량 가능한 직선 범위는 $9.0\times10^{-5}\sim1.0\times10^{-3}\,M$, 감응기울기는 30 mV/decade로 나타났고, 감응시간은 5~6분이었다.

Adenine, adenosine, 2′-deoxycytidine의 핵산 등이 주요 방해물질로 작용하였고, 각종의 무기염류 등은 감응억제물질로 작용하였다. 그 외에 아미노산의 방해 정도는 다소 적었다.

전극의 수명은 박테리아 전극이 organelle 전극보다 훨씬 길었으며, 박테리아 전극은 20일까지 좋은 감응특성을 보였으나, organelle 전극은 5일 이후 거의 감응이 되지 않았다.

한편, organelle 전극은 저농도에서 감응이 좋고, 감응시간이 단축되어 빠른 시간내에 cytidine을 정량하기에 유용하지만, 박테리아 전극에 비해 감응기울기는 다소 떨어지고 장시간 사용할 수 없는 단점이 있었다.

본 연구는 계명대학교 비사학술연구비 지원에 의하여 이루어졌으므로 이에 감사를 드린다.

인 용 문 헌

1. L. C. Clark, and C. Lyons, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **102**, 29(1962).
2. G. G. Guilbault and E. Hrabankova, *Anal. Chim. Acta*, **56**, 285(1971).
3. G. Nagy, L. H. Von. Strap, and G. G. Guilbault, *ibid*, **66**, 442(1973).
4. G. G. Guilbault, G. Nagy, and S. S. Kuan, *ibid*,

67, 195(1973).
5. F. Lazaro, M. D. L. Castro, and M. Valcarcel, *Anal. Chem.*, **59**, 1859(1987).
6. C. Divies, *Ann. Microbiol.*, **126A**, 175(1975).
7. G. A. Rechnitz, R. K. Kobos, S. J. Riechel, and C. R. Gebauer, *Anal. Chim. Acta*, **94**, 357(1977).
8. T. L. Riechel and G. A. Rechnitz, *J. Membr. Sci.*, **4**, 243(1978).
9. C. L. Dipaolantonio, M. A. Arnold, and G. A. Rechnitz, *Anal. Chim. Acta*, **128**, 121(1981).
10. I. Karube, Y. Wang, E. Tamiya, and M. Kawarai, *ibid.*, **199**, 93(1987).
11. I. Satoh, I. Karube, and S. Suzuki, *Biotechnol. Bioeng.*, **18**, 269(1976).
12. M. Aizawa, A. Morioka, S. Suzuki, and Y. Nagamura, *Anal. Biochem.*, **94**, 22(1979).
13. D. Monroe, *Anal. Chem.*, **56**, 920A(1980).
14. A. S. Attiyat and G. D. Christian, *Analyst.*, **105**, 154(1980).
15. D. L. Bush and G. A. Rechnitz, *Anal. Lett.*, **20**(11), 1781(1987).
16. G. A. Rechnitz, M. A. Arnold, and M. E. Meyerhoff, *Nature*, **278**, 466(1979).
17. M. A. Arnold and G. A. Rechnitz, *Anal. Chim. Acta*, **113**, 351(1980).
18. Y. L. Ma and G. A. Rechnitz, *Anal. Lett.*, **18**(B13), 1635(1985).
19. S. Kuriyama and G. A. Rechnitz, *Anal. Chim. Acta.*, **131**, 91(1981).
20. M. A. Arnold and G. A. Rechnitz, *Anal. Chem.*, **52**, 1170(1980).
21. I. Karube, S. Sogabe, T. Matsumaga, and S. Suzuki, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **17**, 216 (1983).
22. T. Matsumaga, J. Suzuki, and R. Tomoda, *Enzyme Microb. Technol.*, **6**, 355(1984).
23. T. Murakami, S. Nakamoto, J. Kimura, T. Kuriyama, and I. Karbe, *Anal. Lett.*, **19**(19&20), 973 (1986).
24. I. Kubo, I. Karube, and T. Moriizumi, *ibid.*, **19**(5&6), 97(1986).
25. M. Gotoh, E. Tamiya, M. Momoi, Y. Kagawa, and I. Karube, *ibid.*, **20**(6), 857(1987).
26. Y. Kitagawa, E. Tamiya, and I. Karube, *ibid.*, **20** (1), 81(1987).
27. Y. M. Temerk and P. Valenta, *J. Electroanal. Chem. Interfacial. Electrochem.*, **214**, 391(1986).
28. Y. H. Temerk, P. Valenta, and H. W. Numbernberg, *ibid.*, **109**, 289(1980).
29. G. S. Ihn and B. W. Kim, *J. Kor. Chem. Soc.*, **32** (4), 333(1988).
30. Willian H. Ewing, "Edward and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae", 4th. ed., Elsevier, p. 345, 1986.
31. J. E. Mafaddin, "Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria", U.S.A, p. 108, 1976.
32. "Analytical Profile Index for Some Day Identification of Enterobacteriaceae", Analytab Product Inc., Paris, 1970.
33. Moldave, "RNA and Protein Synthesis", Academic Press, 1981.
34. 김봉원, 박사학위논문, 계명대학교, 1989.
35. G. S. Ihn, B. W. Kim, and Y. G. Jeon, *J. Kor. Soc. Anal. Sci.*, **1**(2), 161(1988).