

## 중첩연장PCR에 의한 아르기닌데이미나제의 Asp43부위지정변이에 대한 연구

김청복, 최은경, 김성곤

경애하는 최고령도자 김정은동지께서는 다음과 같이 말씀하시였다.

《대학에서는 사회주의강국건설에서 나서는 리론실천적, 과학기술적문제들을 원만히 해결하며 기초과학부문을 발전시키고 첨단과학기술분야를 개척하는데 중심을 두고 과학연구 사업을 진행하여야 합니다.》

중첩연장PCR(Overlap Extension PCR)는 DNA배열우의 임의의 누클레오티드에 대하여 목적의식적으로 치환, 삽입, 결실을 일으켜 단백질의 개별적인 아미노산을 변이시키는 부위 지정변이의 한가지 방법으로서 단백질의 구조와 기능사이관계를 연구하고 그 기능을 개변하는 분자생물학의 유력한 수단이다.[1, 2]

최근에 간암과 백혈병과 같은 아르기닌영양요구형종양세포들의 성장을 억제하는 항종양약물로서 아르기닌데이미나제(EC 3.5.3.6. 락칭 ADI)에 대한 연구[3-5]가 광범히 진행되고있다. 또한 병원성미생물의 생장에 필요한 ATP합성경로의 주요효소인 아르기닌데이미나제의 활성을 억제하여 병원성미생물이나 기생충을 죽이는 새로운 농약을 개발하기 위하여 이 효소와 기질사이의 결합물림새를 정확히 해명하려는 연구들[4, 5]도 진행되고있다.

우리는 *Pseudomonas aeruginosa*기원의 ADI유전자를 클론화한데 기초하여 효소의 활성 중심과 기질결합부위에서 중요한 작용을 하는 아미노산들을 확인하며 효소-기질결합물림새를 밝히기 위하여 중첩연장PCR법으로 ADI의 Asp43변이체를 제작하였다.

### 재료 및 방법

변이에 리용한 모든 프라이머들은 중첩연장PCR의 원리와 프라이머설계원칙에 근거하여 프로그램 Primer Premier 5.0을 리용하여 설계하였으며 유전자변이는 야생형재조합플라즈미드 pET-28a-ADI에 기초하여 중첩연장PCR법으로 진행하였다.(표 1)

먼저 1회전PCR에서는 PCR조건을 95℃ 5min→95℃ 30s, 55℃ 1min, 72℃ 2min, 30회 반복→72℃ 5min으로 설정하였으며 얻어진 PCR산물들은 아가로즈겔전기영동을 진행하여 회수하였다. 2회전PCR에서는 1회전PCR의 2개 단편을 주형으로 하여 변이가 포함된 전체 길이의 목적유전자를 합성하였다. 2회전PCR의 조건은 1회전PCR와 같은 조건에서 진행하였으며 2회전PCR산물은 아가로즈겔전기영동을 진행하여 회수한 다음 배열을 결정하였다. 얻어진 유전자배열은 프로그램 Vector NTI를 리용하여 비교하는 방법으로 변이부위를 확정하였다.

폴리메라제연쇄반응(PCR)에는 pfu DNA폴리메라제(《Fermentas》)를 리용하였으며 아가로즈겔로부터 목적DNA단편의 회수는 시약키트(《TaKaRa》)를 리용하여 사용설명서에 따라 진행하였다.

ADI야생형 및 변이형재조합플라스미드(pET-28-ADI)의 제작에 리용된 프라이머는 표 1과 같다.

표. 제작에 리용된 프라이머들

| 표시  | 변이형태       | 프라이머이름      | 배열  |
|-----|------------|-------------|---|
| Wt. | PaADI      | UP          | 5'-GATATGAATTCATGAGCACGGAAAAAACCAAA-3'        |
|     |            | DP          | 5'-GATATGCGGCCGCGGTTGTCTGTCAGTAGTCGAT-3'      |
| M40 | C406A/D43A | M40-forward | 5'-CGAGTTGCTGTTTCGCCGACGTGATCTGGG-3'          |
|     |            | M40-reverse | 5'-CCCAGATCACGTCCGCGAACAGCAACTCG-3'           |
| M41 | C406A/D43E | M41-forward | 5'-CGAGTTGCTGTTTCGAGGACGTGATCTGGGTG-3'        |
|     |            | M41-reverse | 5'-CACCCAGATCACGTCCCTCGAACAGCAACTCG-3'        |
| M42 | C406A/D43W | M42-forward | 5'-TGCGACGAGTTGCTGTTCTGGGACGTGATCTGGGTGAAC-3' |
|     |            | M42-reverse | 5'-GTTTACCCAGATCACGTCCAGAACAGCAACTCGTCGCA-3'  |

## 결과 및 논의

중첩연장PCR에 의한 부위지정변이원리는 두회전PCR를 리용하여 변이된 염기를 목적하는 유전자속에 끼워넣는것이다. 그림 1에 중첩연장PCR과정을 간단히 보여주었다. 그림 1

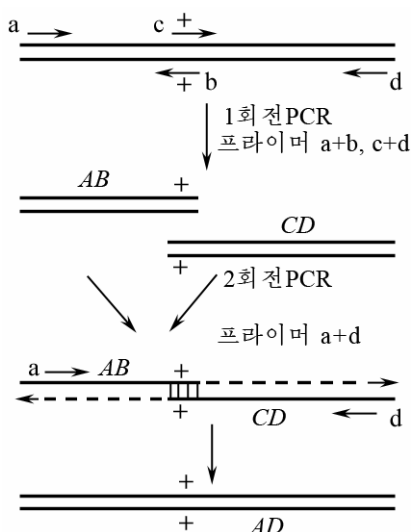


그림 1. 중첩연장PCR과정  
《+》기호는 변이위치를 나타낸다.

에서 a와 d는 한쌍의 측면프라이머로서 각각 하나의 제한효소절단점을 가지고있으며 완전길이의 목적유전자단편증폭에 리용할수 있다. b와 c는 한쌍의 완전히 상보적인 프라이머로서 b, c우에는 이미 변이염기가 들어있다. 1회전PCR에서는 야생형재조합플라스미드를 주형으로 하고 두쌍의 프라이머(그림에서 a와 b, c와 d)를 리용하여 각각 증폭한다.(AB와 CD) 2회전PCR에서는 1회전PCR의 2개의 단편 AB와 CD를 주형으로 하여 진행하며 AB와 CD의 한쪽에 있는 작은 배열들이 서로 상보적으로 결합되어 완전길이의 단편으로 연결된다. 이 단편을 주형으로 하고 측면프라이머 a와 d를 프라이머로 하여 PCR를 진행하면 변이를 포함한 전체 길이의 AD유전자단편 AD를 얻는다.

PaADI에 대한 구조연구결과에 의하면 PaADI는 Cys406-His278-Glu224 축매3잔기조구조를 가지고있다. Cys406잔기와 Glu224는 PaADI의 축매3잔기조에 있는 중요잔기들이며 Asp357, Asp43은 공간적으로 효소통로의 중요잔기 Arg401과 매우 가까이 있다.[6-8]

야생형재조합플라스미드 pET-28a-ADI에 기초하여 Cys406잔기를 Ala로 변이시킨것을 M32(C406A)로 하고 M32에 기초하여 Asp43을 Ala와 Glu, Trp로 변이시킨것을 M40(C406A/D43A), M41(C406A/D43E), M42(C406A/D43W)로 하였다.

Asp43변이체들과 야생형PaADI의 유전자배열의 다중정렬결과는 그림 2와 같다.

Cys406과 Asp43잔기가 동시에 변이된 M40, M41, M42변이형유전자들에서는 Asp43잔기가 각각 Ala와 Glu, Trp로 정확히 변이되었다.

```

wt.seq -----
40.seq CATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGGCTAGCATGACT
41.seq CATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGGCTAGCATGACT
42.seq CATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGGCTAGCATGACT

wt.seq -----ATGAGCACGGAAAAAACCAAACCTTGGC
40.seq GGTGGACAGCAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCATGAGCACGGAAAAAACCAAACCTTGGC
41.seq GGTGGACAGCAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCATGAGCACGGAAAAAACCAAACCTTGGC
42.seq GGTGGACAGCAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCATGAGCACGGAAAAAACCAAACCTTGGC
*****

wt.seq GTCCACTCCGAAGCCGGCAAACCTGCGCAAAGTGATGGTCTGCTCGCCCGGACTCGCCAC
40.seq GTCCACTCCGAAGCCGGCAAACCTGCGCAAAGTGATGGTCTGCTCGCCCGGACTCGCCAC
41.seq GTCCACTCCGAAGCCGGCAAACCTGCGCAAAGTGATGGTCTGCTCGCCCGGACTCGCCAC
42.seq GTCCACTCCGAAGCCGGCAAACCTGCGCAAAGTGATGGTCTGCTCGCCCGGACTCGCCAC
*****

wt.seq CAGCGCCTGACCCCTAGCAACTGCGACGAGTTGCTGTTCTGACGACGTGATCTGGGTGAAC
40.seq CAGCGCCTGACCCCTAGCAACTGCGACGAGTTGCTGTTCTGACGACGTGATCTGGGTGAAC
41.seq CAGCGCCTGACCCCTAGCAACTGCGACGAGTTGCTGTTCTGACGACGTGATCTGGGTGAAC
42.seq CAGCGCCTGACCCCTAGCAACTGCGACGAGTTGCTGTTCTGACGACGTGATCTGGGTGAAC
*****

wt.seq CAGGCCAAGCGCGACCACTTCGACTTCGTACCAAGATGCGCGAGCGCGGCATCGACGTC
40.seq CAGGCCAAGCGCGACCACTTCGACTTCGTACCAAGATGCGCGAGCGCGGCATCGACGTC
41.seq CAGGCCAAGCGCGACCACTTCGACTTCGTACCAAGATGCGCGAGCGCGGCATCGACGTC
42.seq CAGGCCAAGCGCGACCACTTCGACTTCGTACCAAGATGCGCGAGCGCGGCATCGACGTC
*****
    
```

그림 2. PaADI야생형 유전자와 M40, M41, M42변이형 유전자배열의 다중정렬결과(부분)

## 맺 는 말

중첩연장PCR에 의하여 야생형 PaADI 유전자의 Asp43 잔기를 다른 몇 가지 아미노산으로 변이시킨 변이형 ADI 재조합 플라스미드를 제작하였으며 다중정렬 분석을 통하여 모든 변이들이 정확히 도입되었다는 것을 확인하였다.

## 참 고 문 헌

- [1] L. K. Heckman et al.; Nature Protocols, 2, 4, 924, 2007.
- [2] Y. Ni et al.; Cancer Lett., 261, 1, 1, 2008.
- [3] X. Li et al.; Int. J. Mol. Sci., 17, 363, 2016.
- [4] F. Qiu et al.; Cancer Lett., 364, 1, 2015.
- [5] M. M. Phillips et al.; Cancer Res. Treat, 45, 251, 2013.
- [6] L. Xiong et al.; Environ. Microbiol., 17, 4469, 2015.
- [7] C. A. Changou et al.; Proc. Natl. Acad. Sci., 111, 14147, 2014.
- [8] L. Li et al.; Biochemistry, 45, 4, 1162, 2006.

## **On the Site Directed Mutagenesis of Asp43 in ADI by Overlap Extension PCR**

*Kim Chong Bok, Choe Un Gyong and Kim Song Gon*

By using overlap extension PCR, we exchange Asp43 residue of PaADI gene into some other amino acid residues in order to construct mutant ADI recombinant plasmid, and confirm the correct introduction of all these mutagenesis by multiple alignment analysis.

Key words: overlap extension PCR, ADI