

## *Bacillus subtilis* A157 리파제유전자의 클론화에 대한 연구

김현석, 김주성, 김철호

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《생물공학부문에서는 세포공학과 유전자공학, 미생물공학을 비롯한 현대생물학의 발전에 큰 힘을 넣으며 현대생물학의 성과를 농업과 축산업, 의학과 식료공업에 널리 받아들여 생산성이 높은 농작물과 집짐승의 새 품종을 만들어내며 질 좋은 여러가지 의약품과 식료품을 많이 생산할수 있도록 하여야 합니다.》(《김정일선집》 증보판 제15권 487~488페이지)

리파제(트리아실글리세롤아실히드롤라제, EC 3.1.1.3)는 독특한 효소학적특성을 가지고 있고 그 리용범위가 넓은것으로 하여 세계적으로 널리 연구[1]되고있다. 그중에서도 *Bacillus subtilis*의 리파제는 온도건딜성이 높고 pH안정성범위가 넓은것[2]으로 큰 주목이 돌려지고있다.

우리는 리파제대량발현체계를 구축하기 위하여 *Bacillus subtilis*로부터 리파제유전자를 클론화하였다.

### 재료와 방법

전문기관에 보관된 *Bacillus subtilis*의 5가지 균주에 대하여 리파제활성을 측정하고 그 중 활성이 높은 균주인 *Bacillus subtilis* A157을 선정하여 리파제유전자의 클론화를 위한 원천균주로 리용하였다.

게놈DNA분리 및 플라스미드분리는 세균게놈분리키트(《TIANGEN》)와 플라스미드분리키트(《TIANGEN》)를 리용하여 진행하였다.

리파제유전자의 증폭을 위하여 유전자배렬(GenBank등록번호 EF538417)[4]에 기초하여 프라이머를 다음과 같이 설계하였다.

lipA\_BamHI\_up: 5'-GCGGGATCCATGAAATTTGTAAAAAGAAGGATCATTG-3'

lipA\_HindIII\_down: 5'-CAAAAGCTTTTAATTCGTATTCTGGCCCCCGC-3'

게놈DNA 15ng, 1 000μmol/L dNTP, 0.2μmol/L 프라이머, 1.5mmol/L Mg<sup>2+</sup>, LA Taq DNA 폴리메라제 2.5U로 PCR반응계를 구성하고 94℃ 5min→94℃ 변성 30s, 54℃ 아닐링 30s, 72℃ 연장 1min(35회 순환)→72℃ 연장 10min 조건에서 PCR증폭을 진행하였다. PCR증폭단편을 1% 아가로즈겔전기영동상으로 확인하고 아가로즈겔DNA분리키트(《OMEGA》)를 리용하여 분리하였다.

PCR증폭단편을 T4 DNA리가제(《Promega》)를 리용하여 pGEM<sup>®</sup>-T운반체와 연결시키고 *E. coli* DH5α에 형질전환시켰다. 재조합플라스미드에 대하여 제한효소 BamHI, HindIII(《TAKARA》)으로 제한분해검정을 진행하고 LC Taq DNA폴리메라제(《Fermentas》)로 PCR검정을 진행하였다.

클론화한 리파제유전자의 염기배렬을 전문기관에 의뢰하여 분석하였다. 기타 모든 유전자조작은 선행방법[3]에 준하여 진행하였다.

## 결과 및 논의

### 1) *Bacillus subtilis* A157계놈에서 리파제유전자의 PCR증폭

*Bacillus subtilis* A157을 37°C, 200r/min의 조건에서 하루밤 배양하고 원심분리하여 균집한 다음 게놈DNA를 분리하고 리파제유전자에 대한 PCR증폭을 진행하였다. PCR증폭산물의 아가로즈겔 전기영동상을 그림 1에 보여주었다.

그림 1에서 보는바와 같이 목적하는 리파제유전자의 크기 (639bp)에 해당하는 DNA단편이 정확히 나타났다.

### 2) 리파제유전자와 pGEM®-T운반체와의 연결 및 형질전환

그림 1의 증폭산물을 아가로즈겔분리키트를 리용하여 회수하고 클론화운반체와 연결시켜 *E. coli* DH5α에 형질전환시켰다. LB선택배양판(Amp<sup>r</sup>)에 형성된 균무지들에 대해서 콜로니PCR를 진행하여 양성클론을 선발하고 그것으로부터 분리된 플라스미드에 대한 PCR검정을 진행하였다. 검정PCR산물의 전기영동상은 그림 2와 같다.

그림 2에서 보는바와 같이 해당 단편(639bp)이 정확히 증폭되었다.

다음으로 제한효소 *Bam*HI과 *Hind*III에 의한 제한분해산물검정을 진행하였다. 제한분해산물검정 전기영동상은 그림 3과 같다.

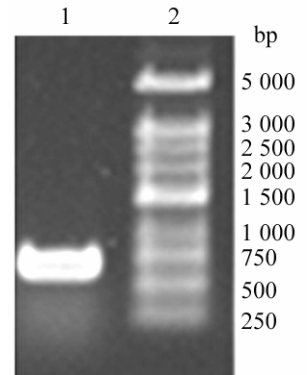


그림 1. PCR증폭산물의 아가로즈겔전기영동상  
1-PCR증폭산물, 2-DNA 분자량표식자

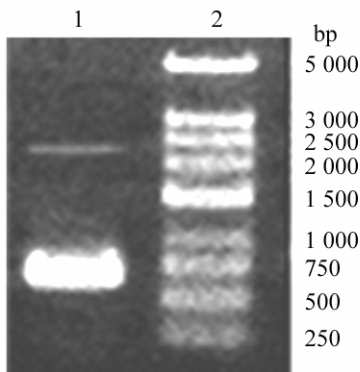


그림 2. 검정PCR산물의 전기영동상  
1-검정PCR산물, 2-DNA분자량표식자

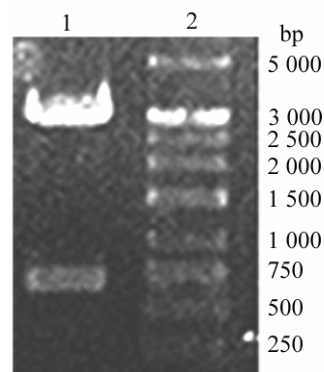


그림 3. 제한분해산물검정 전기영동상  
1-*Bam*HI/*Hind*III 2제한분해산물, 2-DNA분자량표식자

그림 3에서 보는바와 같이 목적하는 단편과 운반체에 해당하는 크기의 띠들(639, 3 000bp)이 정확히 나타났다.

이상의 결과는 lipA단편이 T운반체에 정확히 재조합되었다는것을 보여준다.

### 3) *Bacillus subtilis* 리파제유전자의 염기배열 및 아미노산배열분석

pGEM®-T운반체에 클론화된 lipA단편의 염기배열과 그것에 따르는 추정아미노산배열을 그림 4에 보여주었다.

그림 4에서 보는바와 같이 클론화된 *Bacillus subtilis* A157 리파제유전자 lipA단편의 크기는 639bp이고 213개의 아미노산으로 이루어진 폴리펩티드를 암호화한다. 이론적인 분자

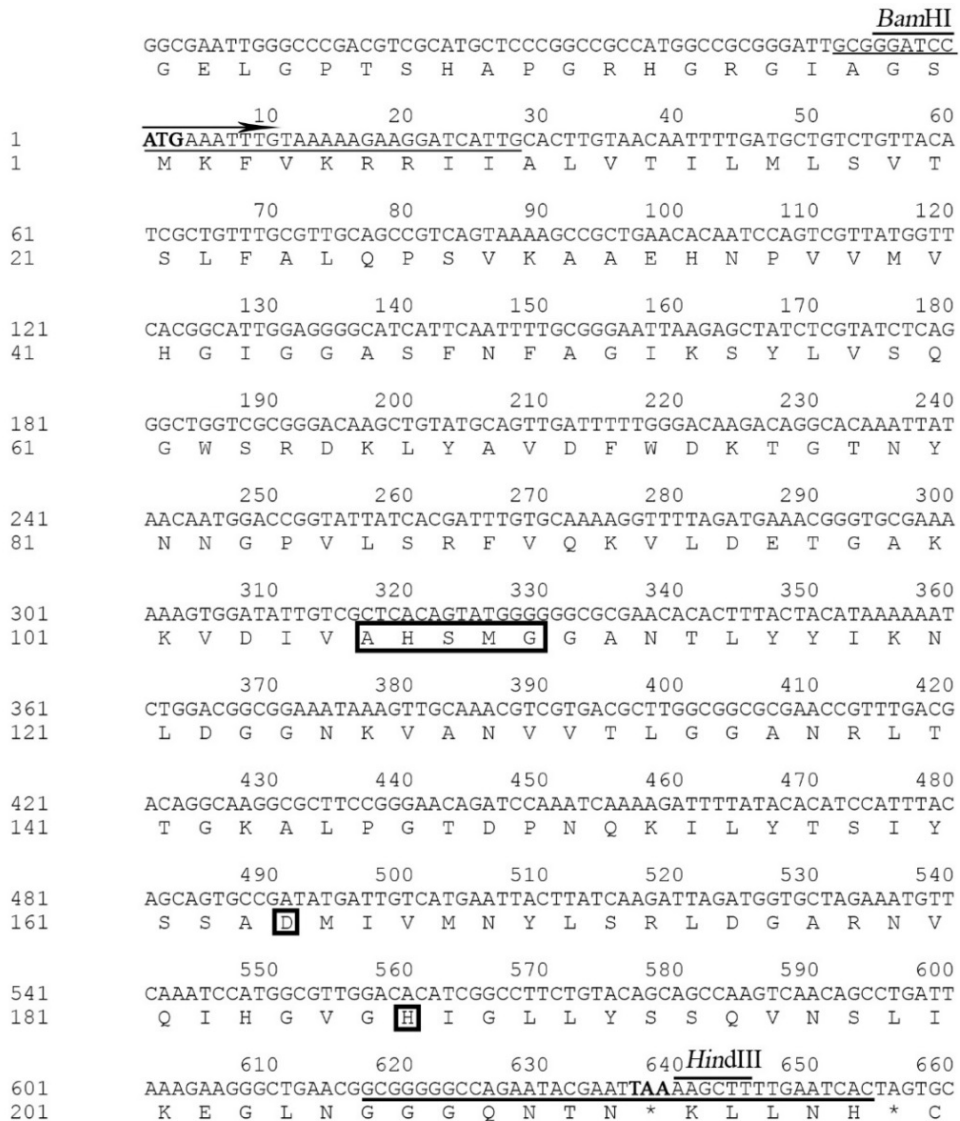


그림 4. lipA단편의 염기배열과 그것에 따르는 추정아미노산배열  
프라이머배열부위는 밑선으로, 제한효소인식배열은 옷선으로 표시하였다.  
AXSXG모티프와 촉매3잔기의 Asp, His를 □으로 표시하였다.

량은 23.4kD이며 등전점은 pI 9.72이다.

GenBank에 등록된 다른 리파제들의 아미노산배열과 다중정렬을 진행한 결과 대단히 높은 상동성을 보여주었다. 즉 *Bacillus subtilis* FS321, FS32b (GenBank등록번호 EF567418, EF541144)와는 완전히 일치(100%)하였으며 M74010과는 2개의 아미노산(V29A, L133V, 상동성 99.06%), DQ250714와는 3개의 아미노산(A49G, Q58H, L131V, 상동성 98.58%), FJ481899와는 4개의 아미노산(V29A, S59P, V127I, Y190M, 상동성 98.11%)이 차이난다.[5-7] 일부 lipA들(*Bacillus subtilis* FS321, FS32b)과는 DNA배열에서 2개 염기가 차이났지만 아미노산배열에서는 완전히 일치하였다. 다중정렬결과 촉매3잔기[1]인 Ser(AXSXG), Asp(D), His(H)는 각각 106~110, 164, 187위치에 보존되어있다는것을 알수 있다.(그림 5)

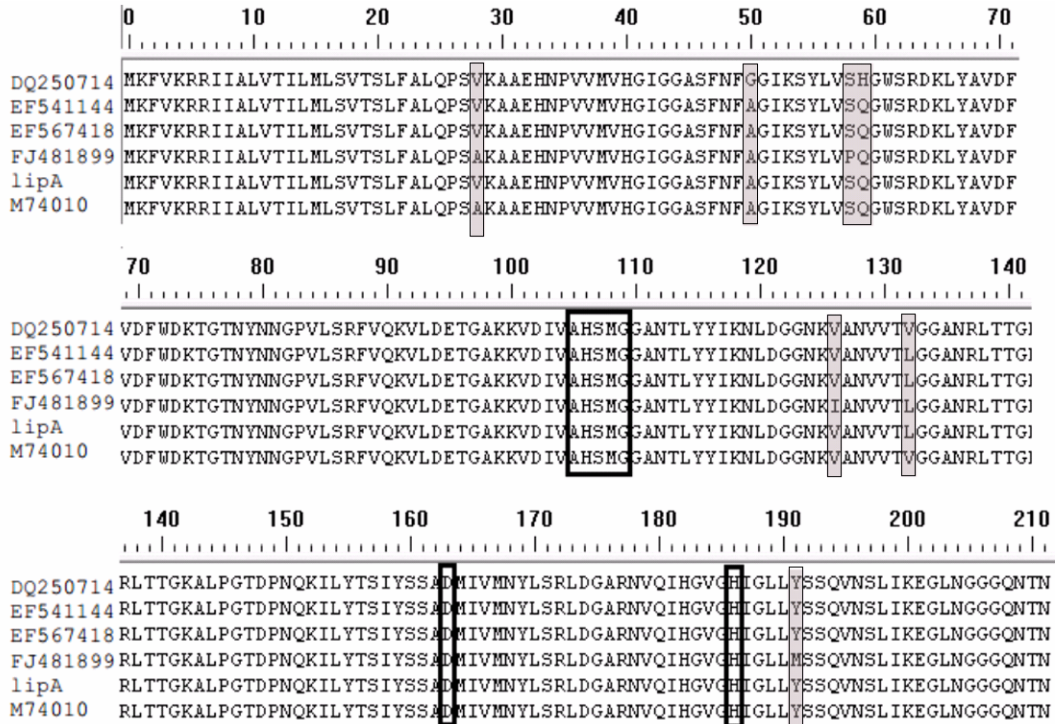


그림 5. lipA의 다중정렬 결과

보존된 펜타펩티드(AXSXG), 촉매3잔기 아스파라긴산(D)과 히스티딘(H)을 굵은 □로, 차이는 잔기들을 얇은 □로 표시하였다. GenBank등록번호는 위의 본문을 참고

이상의 결과로부터 *Bacillus subtilis* A157의 리파제 유전자가 정확히 클론화되었다는 것을 알 수 있다.

## 맺는 말

*Bacillus subtilis* A157로부터 증폭한 리파제 유전자(lipA)는 pGEM®-T 운반체에 클론화되었으며 크기는 639bp이며 213개의 아미노산으로 된 폴리펩티드를 암호화한다. 활성중심을 이론적으로 알려져 있는 AXSXG가 보존되어 있으며 다른 리파제들과 98%이상의 높은 상동성을 가진다.

## 참고 문헌

- [1] G. M. Borrelli et al.; Int. J. Mol. Sci., 16, 20774, 2015.
- [2] Hanlya Mazhar et al.; Afr. J. Biotechnol., 16, 1106, 2017.
- [3] J. Sambrook et al.; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 127~354, 2001.
- [4] Bihong Shi et al.; Ann. Microbiol., 60, 399, 2010.
- [5] Zhong Ni et al.; Mol. Inf., 30, 359, 2011.
- [6] V. Dartois et al.; Biochim. Biophys. Acta., 1131, 3, 253, 1992.
- [7] M. Rabbani et al.; RPS, 4, 1, 25, 2009.

## **Cloning of *Bacillus subtilis* A157 Lipase Gene**

*Kim Hyon Sok, Kim Ju Song and Kim Chol Ho*

A novel lipase gene(lipA) from *Bacillus subtilis* A157 was cloned in pGEM<sup>®</sup>-T vector. The cloned lipA is 639bp in length and encodes a polypeptide of 213 amino acids. The deduced polypeptide contains AXSXG motif. The cloned lipA exhibits a high similarity of more than 98% with other lipases.

Key words: *Bacillus subtilis*, lipase, cloning