

PCR증폭산물을 PCR산물정제키트(《OMEGA》)를 리용하여 정제하고 pGEM®-T easy vector(《Promega》)와 재조합하여 *E. coli* DH5α에 형질전환시켰다. 재조합효소로는 T4 DNA 리가제(《Promega》)를, 제한분해검정에는 *EcoRI*와 *NotI*(《TaKaRa》)를 리용하였다. pGEM®-T easy vector에 클론화한 피브린분해효소의 프로펩티드와 성숙펩티드 암호화령역(proNK)의 염기배열을 결정하고 DNAMAN 5.2.2프로그램을 리용하여 Genbank에 등록된 피브린분해효소 유전자들과 비교분석하였다.

결과 및 논의

1) proNK유전자의 증폭

Bacillus subtilis natto-89균주를 LB배지에서 하루밤동안 배양(37°C, 200r/min)한 다음 원심분리(4°C, 5 000r/min, 10min)하여 균집하고 게놈DNA를 분리하여 유전자증폭을 위한 주형으로 리용하였다. PCR증폭산물의 전기영동상은 그림 1과 같다.

그림 1에서 보는바와 같이 예상되는 크기(1.08kb)에 해당하는 DNA 증폭단편이 나타났다.

2) proNK유전자의 pGEM[®]-T easy vector와의 재조합과 검정

PCR증폭산물을 정제하여 pGEM[®]-T easy vector에 재조합시키고 *E. coli* DH5 α 에 형질전환시켰다. LB평판(100 μ g/mL Amp⁺)에서 5개의 균무지를 선택하여 검정PCR를 진행하고 양성클론을 선발하였다. PCR검정결과는 그림 2와 같다.

그림 2에서 보는바와 같이 선택한 5개의 균무지에 대하여 예상되는 크기(1.08Kb)의 단편이 정확히 증폭되었다.

그림 1. PCR증폭산물의 전기영동상
1—표식자, 2—증폭산물

선발된 양성클론을 LB배지(100 μ g/mL Amp⁺)에서 하루밤 진탕배양(37°C, 200r/min)하고 균체로부터 플라스미드를 분리하여 *Eco*RI와 *Not*I의 단일제한분해검정을 진행하였다. 단일제한분해검정결과는 그림 3과 같다.

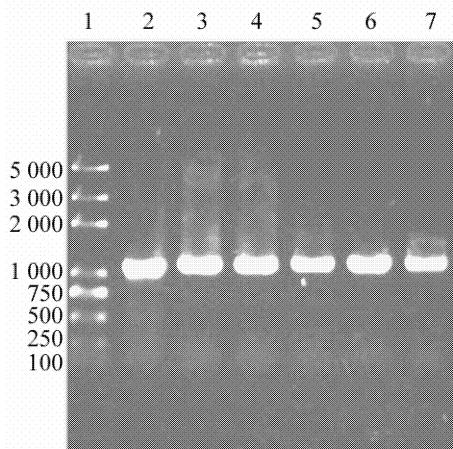


그림 2. PCR검정결과
1—표식자, 2—게놈DNA주형,
3—7은 5개 주형

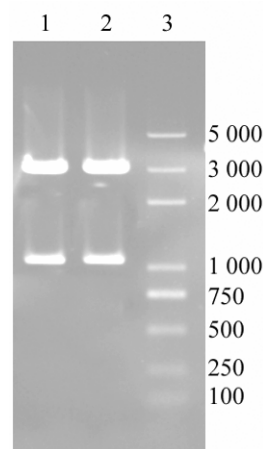


그림 3. 단일제한분해검정결과
1—*Eco*RI단일제한분해, 2—*Not*I단일
제한분해, 3—표식자

그림 3에서 보는바와 같이 두가지 효소에 의한 단일제한분해에서 다같이 proNK유전자 단편(1.08Kb)과 운반체(3.01Kb)의 크기에 해당하는 띠가 나타났다. 이것은 pGEM[®]-T easy vector에 있는 다클론화영역의 양쪽에 *Eco*RI와 *Not*I의 인식배열이 존재하는것과 관련된다.

3) 클론화된 proNK유전자의 염기배열분석

클론화된 proNK유전자의 배열과 예견되는 아미노산배열을 그림 4에 보여주었다.

```

1   TCGGAATTCGCCGGAAAAAGCAGTACAGAAAAAGAAATACATTGTCGGATTTAAGCAGACA
1   EcoRI  A G K S S T E K K Y I V G F K Q T
61  ATGAGTGCCATGAGTTCGCCAAGAAAAAGGATGTTATTTCTGAAAAAGCGGAAAGGTT
18  M S A M S S A K K K D V I S E K G G K V
121 CAAAAGCAATTTAAGTATGTTAACGCGGCCGAGCAACATTGGATGAAAAAGCTGTAAAA
38  Q K Q F K Y V N A A A A T L D E K A V K
181 GAATTGAAAAAAGATCCGAGCGTTCATATGTGGAAGAAGATCATATTGCACATGAATAT
58  E L K K D P S V A Y V E E D H I A H E Y
241 GCGCAATCTGTTTCCTTATGGCATTCTCAAATTAAGCGCCGGCTCTTCACTCTCAAGGC
78  A Q S V P Y G I S Q I K A P A L H S Q G
301 TACACAGGCTCTAACGTAAAAGTAGCTGTTATCGACAGCGGAATTGACTCTTCTCATCCT
98  Y T G S N V K V A V I D S G I D S S H P
361 GACTTAAACGTAGAGGCGGAGCAAGCTTCGTTTCCTTCTGAAACAAACCCATACCAGGAC
118 D L N V R G G A S F V P S E T N P Y Q D
421 GGCAGTTCTCACGGTACGCATGTGCGCGGTACGATTGCCGCTCTTAATAACTCAATCGGT
138 G S S H G T H V A G T I A A L N N S I G
481 GTTCTGGGCGTAGCGCCAAGCGCATCATTATATGCAGTAAAAGTGCTTGATTCAACAGGA
158 V L G V A P S A S L Y A V K V L D S T G
541 AGCGGCCAATATAGCTGGATTATTAACGGCATTGAGTGGGCCATTTCACAACATATGGAT
178 S G Q Y S W I I N G I E W A I S N N M D
601 GTTATCAACATGAGCCTTGGCGGACCTACTGGTTCTACAGCGCTGAAAACAGTAGTTGAT
198 V I N M S L G G P T G S T A L K T V V D
661 AAAGCGGTTTCAGCGGTATCGTTCGTTGCTGCCGAGCCGGAACGAAGGTTTCATCCGGA
218 K A V S S G I V V A A A A G N E G S S G
721 AGCACAAGCACAGTCGGCTACCCTGCAAAATATCCTTCTACTATTGCAGTAGGTGCGGTA
238 S T S T V G Y P A K Y P S T I A V G A V
781 AACAGCAGCAACCAAGAGCTTCATTCTCCAGCGTAGGTTCTGAGCTTGATGTAATGGCT
258 N S S N Q R A S F S S V G S E L D V M A
841 CCTGGCGTGTCCATCCAAAGCACACTTCCTGGAGGCACTTACGGCGCTTATAACGGAACG
278 P G V S I Q S T L P G G T Y G A Y N G T
901 TCCATGGCGACTCCTCACGTTGCCGGAGCAGCAGCGCTAATCTTTCTAAGCACCCGACT
298 S M A T P H V A G A A A L I L S K H P T
961 TGGACAAACGCGCAAGTCCGTGATCGTTTAGAAAGCACTGCAACATATCTTGAAACTCT
318 W T N A Q V R D R L E S T A T Y L G N S
1021 TTCTACTATGAAAAAGGGTTAATCAACGTACAAGCAGCTGCACAATAAGCGGCGCGCATTC
338 F Y Y G K G L I N V Q A A A Q * NotI
1081 TTATT

```

그림 4. 클론화된 proNK 유전자의 배열과 예견되는 아미노산배열
프라이머부분을 밑줄로 표시함

클론화된 유전자의 크기는 1 083bp이고 효모발현운반체 pPIC9K에 재조합시키기 위한 *EcoRI*, *NotI* 제한효소인식배열이 유전자의 양끝에 각각 도입되었다. 클론화된 유전자단편은 352개의 아미노산으로 구성되는 폴리펩티드를 암호화하며 폴리펩티드의 이론적인 분자량은 36.2kD, 등전점은 8.94이다.

Bacillus subtilis natto-89의 proNK유전자는 *Bacillus*속 피브린분해효소의 유전자들과 높은 상동성을 나타낸다. Genbank에 등록되어있는 피브린분해효소유전자들과의 다중정렬을 진행한 결과 *Bacillus subtilis*기원의 유전자들(FJ374767, S51909, AF368283, AY219901, AY895162, AY940167, D25319, EF061456, EF474344, FJ376817, FJ407060, K01988)[3]과의 상동성은 98% 이상, *Bacillus amyloliquefaciens*기원의 유전자들(K02496, X00165)[4, 5]과의 상동성은 93% 이상이다. 실례로 AY219901로 등록된 *Bacillus subtilis* YF38기원의 피브린분해효소유전자와는 4개의 염기만이 차이이며 상동성은 99.62%이다. 아미노산배열은 336번 위치에서 1개의 아미노산만이 차이이며 상동성은 99.72%이다. 이상의 다중정렬결과로부터 피브린분해효소의 유전자를 정확히 클론화하였다는것을 알수 있다. 클론화된 유전자는 aprN유전자계열의 알카리성프로테아제유전자였다.

맺는 말

청곡키나제생산균주로 리용되고있는 *Bacillus subtilis* natto-89의 계놈으로부터 청곡키나제유전자인 수브틸리신 BRC의 프로펩티드와 성숙펩티드 암호화영역(proNK)을 증폭하고 클론화하였다. 클론화된 유전자는 1 083bp의 크기를 가지고 *Bacillus subtilis*기원의 피브린분해효소유전자들과 98%이상, *Bacillus amyloliquefaciens*기원의 피브린분해효소유전자들과 93% 이상의 상동성을 가진다.

참고 문헌

- [1] 윤은희 등; 전국과학토론회 논문집(생명과학), 김일성종합대학출판사, 137~138, 주체100(2011).
- [2] Shi-Hua Wang et al.; Annuals of Microbiology, 58, 1, 95, 2008.
- [3] Thao Thi Nguyen et al.; Microbial Cell Factories, 12, 79, 2013.
- [4] N. Vasantha et al.; J. Bacteriol., 159, 3, 811, 1984.
- [5] J. A. Wells et al.; Nucleic Acids Res., 11, 22, 7911, 1983.

주체106(2017)년 6월 5일 원고접수

Cloning of a Gene Encoding Fibrinolytic Enzyme from *Bacillus subtilis* natto-89

Ri Un Song, Hyon Chol

Pro- and mature peptide coding region of a Chonggok-kinase gene(proNK) was synthesized and cloned from the genome of *Bacillus subtilis* natto-89 by using PCR. The cloned gene has 1 083 bp of length and the expected peptide is composed of 352 amino acids. The proNK gene has a high similarity of over 98 % with nattokinase genes from *Bacillus subtilis* species and of over 93% with nattokinase genes from *Bacillus amyloliquefaciens*.

Key words: fibrinolytic enzyme, *Bacillus subtilis* natto, propeptide