

α -N-아세틸갈락토자미니다제유전자를 발현하는 재조합효모균그루의 제작

김영남, 리예진, 한충일, 림고근

메타놀동화효모는 고밀도배양이 가능하고 유전자조작이 간편하며 발현수준이 높고 번역후수식을 할수 있는 등의 우점으로 하여 외래단백질의 대량생산에 널리 이용되고있다.[1]

우리는 닭간기원 α -N-아세틸갈락토자미니다제(α -NAGA)의 발현카세트를 제작하고 메타놀동화효모를 형질전환하여 높은 α -NAGA분비능력을 가진 형질전환체를 선발하였다.

재료 및 방법

닭간기원 α -NAGA유전자를 가진 재조합플라스미드의 보유균그루로 *E. coli* TOP10 (pGEMT-*naga*)을, 형질전환용숙주대장균그루로 *E. coli* DH5 α 를 그리고 대장균-효모왕복운반체플라스미드보유균그루로 *E. coli* DH5 α (pPIC9K)를 이용하였다. 메타놀동화효모로 *Pichia pastoris* GS115(His⁺, Mut⁺)를, 표현형검토를 위한 대조로 *P. pastoris* KM71(*arg4 his4 aox1::ARG4*, Mut^S, Arg⁺), *P. pastoris* GS115 Albumin(His⁺, Mut^S), *P. pastoris* GS115 β -Gal(His⁺, Mut⁺)들을 이용하였다.

폴리메라제연쇄반응에 이용된 프라이머들의 배열은 다음과 같다.

정방향프라이머: ATGAATTCCTGGAGAACGGGCTGGCG

역방향프라이머: ATGAATTCTCACAGAAGGGGCAGGCG

대장균에서 플라스미드분리와 대장균형질전환, 제한효소절단과 리가제반응은 선행방법 [2]에 준하여 진행하였다. 메타놀동화효모형질전환은 전기천공법[1]으로 진행하였으며 히스티딘요구성, 메타놀동화능, G418저항성판정은 선행연구[1, 3]에 준하여 진행하였다. 효소활성은 *p*-니트로페닐-N-아세틸갈락토자미니드를 기질로 이용하여 선행방법[3]에 준하여 분석하였다.

결과 및 고찰

1) 효모발현운반체제작

닭간기원 α -NAGA유전자보유균그루로부터 재조합플라스미드 pGEMT-*naga*를 분리하고 유전자에 대한 확인실험을 진행하였다. 분리한 플라스미드를 주형으로 NAGA성숙단백질유전자의 배열특이프라이머들을 이용하여 PCR법으로 증폭한 결과 예상되는 크기인 1.2kb의 유전자증폭산물이 얻어졌으며 *Pst*I과 *Nco*I로 제한효소절단분석을 진행하였을 때 예상크기를 가진 523, 383, 174와 1 005, 197bp 근방띠들이 검출되었다.(그림 1)

E. coli TOP10(pGEMT-*naga*)와 *E. coli* DH5 α (pPIC9K)로부터 플라스미드를 분리하고 *Eco*RI를 이용하여 효소반응으로 선형화하였다. 아가로즈겔전기영동(0.8%)을 진행하고 겔로부터

선형화된 pPIC9K와 NAGA유전자부분을 따내어 결정제한 다음(그림 2) T4 DNA리가제를 이용한 연결반응을 진행하였다.

연결반응산물로 *E. coli* DH5 α 를 형질전환한 다음 암피실린첨가평판배지(LB)에서 자란 14개의 형질전환체들을 선발하였다. 이 콜로니들에 대하여 플라스미드를 분리하고 아가로스겔(0.8%)전기영동상에서 목적하는 유전자가 삽입되었다고 인정되는 1개의 형질전환체를 선발하였다.(그림 3의 3번주로)

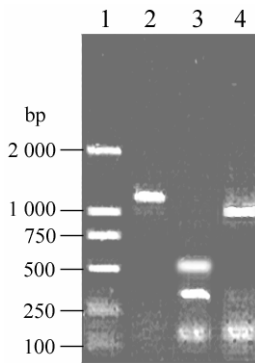


그림 1. NAGA유전자의 PCR 산물에 대한 제한효소절단분석 산물의 아가로스겔전기영동상

1-분자크기표식자(DL2000),
2-PCR산물, 3-PCR산물/*Pst*I,
4-PCR산물/*Nco*I

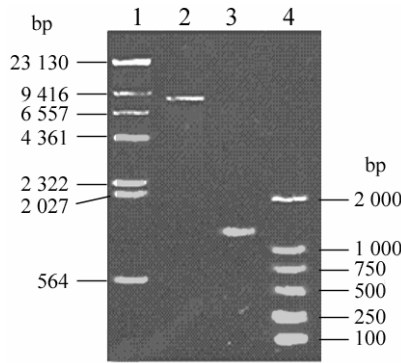


그림 2. pPIC9K/*Eco*RI과 pGEMT-naga/*Eco*RI 단편정제산물의 아가로스겔 전기영동상

1- λ DNA/*Hind*III, 2-pPIC9K/*Eco*RI,
3-pGEMT-naga/*Eco*RI, 4-분자크기
표식자(DL2000)

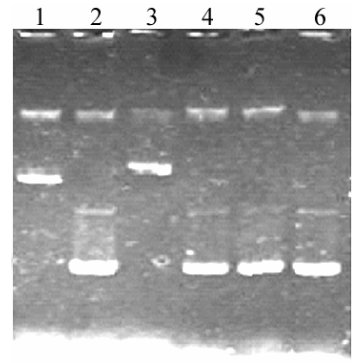


그림 3. 형질전환체들에 대한 플라스미드속성분리산물의 아가로스겔전기영동상

1-pPIC9K플라스미드의 형질
전환체, 2-6-재조합산물의
형질전환체

얻어진 재조합핵산을 *Eco*RI로 절단한 결과 운반체크기인 9 276bp와 유전자크기인 1 228bp근방의 띠들이 정확히 검출되었다.(그림 4의 2번주로) 즉 얻어진 재조합핵산은 운반체와 유전자의 재조합산물로 볼수 있다. 운반체에 삽입된 유전자의 방향성검토를 위해 제한효소 *Bam*HI과 *Sma*I로 절단반응을 진행하였다. 재조합핵산에 대한 *Bam*HI과 *Sma*I절단반응산물의 아가로스겔(1%)전기영동상을 그림 4의 3번, 4번주로에 보여주었는데 *Bam*HI로 분해한 경우 유전자가 정방향으로 삽입된 9 301bp와 1 203bp 근방크기의 DNA단편들이 얻어졌고 *Sma*I로 분해한 경우에도 유전자가 정방향으로 삽입된 5 317bp와 5 187bp 근방크기의 DNA단편들이 검출되었다.

제한효소절단분석을 통해 우리는 얻어진 재조합체가 대장균-효모왕복운반체 pPIC9K에 NAGA유전자가 정방향으로 결합된 산물이라고 결론하였다.

2) 전기천공법에 의한 효모형질전환

E. coli DH5 α (pPIC9K-naga)에서 플라스미드를 분리하고 메타놀동화효모 *P. pastoris*의 his4 위치에 삽입시키기 위하여 *Sal*I 효소로 선형화하였다.(그림 5)

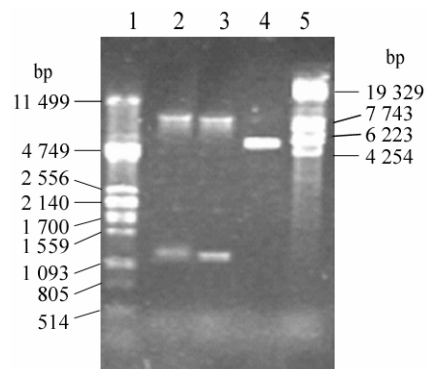


그림 4. 재조합핵산에 대한 제한효소 분해산물들의 아가로스겔전기영동상

1- λ DNA/*Pst*I, 2-pPIC9K-naga/*Eco*RI,
3-pPIC9K-naga/*Bam*HI, 4-pPIC9K-naga/*Sma*I, 5- λ DNA/*Eco*RI

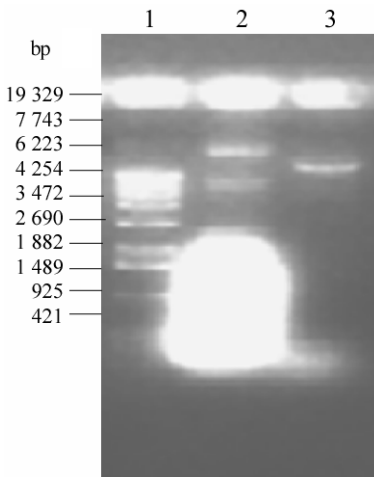


그림 5. pPIC9K-*naga*/Sal I의 아가로스겔전기영동상

1-λDNA/*Eco*RI, 2-pPIC9K-*naga*, 3-pPIC9K-*naga*/Sal I

숙주의 정확성을 확인하기 위하여 여러 균그루들을 대상으로 하여 MD, MDH, MM, MMH배지에서 표현형을 검토하였다. 결과 리용하려는 숙주의 표현형이 His⁺, Mut⁺로서 그 정확성이 확인되었다. 검토된 숙주를 YPD배지에서 OD₆₀₀이 1.3정도 되게 자래우고 1mol/L 소르비톨을 처리한 후(이때 HEPES를 처리한것과 처리하지 않은것을 구분하였다.) 선행화한 핵산과 혼합하여 전기충격을 주고(배양액 40 μL, 선행핵산 약 5 μg, 큐베트간격 2mm, 전압 1 500V, 전기용량 25 μF, 저항 200Ω, 임펄스길이 5ms) MD평판에 도말하였다. 2일간 정치배양한 결과 수백개의 His⁺형질전환체들이 얻어졌다.(표 1)

표 1. 효모형질전환결과

지표	반응구	
	HEPES비처리	HEPES처리
접수체균세포수	2.4×10 ⁸	2.4×10 ⁸
His ⁺ 형질전환체수	3	205
형질전환률/%	0.13×10 ⁻⁵	8.5×10 ⁻⁵

MM배지와 MD평판을 리용하여 208개의 His⁺형질전환체들에 대하여 메타놀동화능을 판정한 결과 모두 Mut⁺형질전환체들이었다. 4mg/mL 수준의 G418이 포함된 YPD배지에서의 저항성판정을 통하여 16개의 다코피형질전환체들을 선발하였다.

다음 계놈핵산을 분리하고 NAGA유전자에 특이적인 프라이머쌍을 리용하여 PCR분석을 진행하였다. 결과 대부분의 형질전환체들에서 유전자 크기인 1.2kb근방에서 띠들이 검출되었다.(그림 6)

PCR검정된 다코피형질전환체들을 BMGY배지에서 증식배양하고 BMM배지에서 메타놀유도배양을 진행한 후 배양물상청에 대한 효소활성분석을 선행방법[1, 3]에 준하여 진행하였다.(표 2)

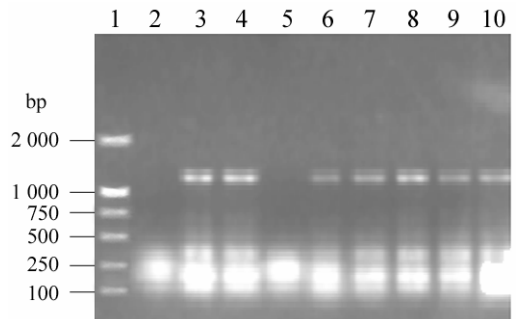


그림 6. 형질전환체계놈에 대한 PCR 산물들의 아가로스겔전기영동상

1-분자크기표식자(DL2000), 2-숙주 계놈PCR산물, 3-제조합핵산PCR산물

표 2. 효소발현분석결과

균그루	Gal	1	2	3	4	5	12	13
활성/(U·mL ⁻¹)	2.40	0.03	0.54	0.54	0.36	0.44	0.64	0.30

표 2에서 보는바와 같이 12번균그루의 NAGA분비량이 제일 많았다. 12번균그루의 유도배양물을 Macro Prep High S담체를 리용하여 조정제하고 PEG 및 TCA농축하여 폴아겔 전기영동분석을 진행하였다.(그림 7) 폴아겔전기영동상을 덴시터메터로 분석한 결과 발현산물의 분자량은 약 49 500Da으로서 선행자료(50kDa)와 일치하였다. 이로부터 우리는 정확한 NAGA를 분비하는 다코피형질전환효모를 제작하였다는 결론을 내렸다.

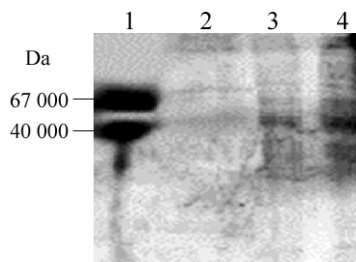


그림 7. NAGA조정제산물의
풀아겔 전기영동상

1-분자량표식자, 2-비유도
배양물, 3, 4-조정제산물

맺는 말

1) 대장균-효모왕복운반체 pPIC9K에 NAGA 유전자가 정
방향으로 삽입된 재조합플라스미드 pPIC9K-*naga*를 얻었다.

2) 전기천공법으로 His⁺, Mut⁺이면서 G418 4mg/mL에서 저
항성인 다코피형질전환효모들을 얻었다.

3) *p*-니트로페닐-*N*-아세틸갈락토자미니드에 대한 반
응성이 높은 균그룹을 생산균그룹으로 선발하였으며 이 균그룹
은 예상크기의 발현산물을 분비하였다.

참고 문헌

- [1] H. K. David et al.; Journal of the American Chemical Society, 137, 5695, 2015.
- [2] J. Sambrook et al.; Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 210~225, 2000.
- [3] Alex Zhu et al.; Protein Expression and Purification, 8, 456, 1996.

주제108(2019)년 1월 5일 원고접수

Manufacturing Recombinant Yeast Strain producing α -N-Acetylgalactosaminidase

Kim Yong Nam, Ri Ye Jin, Han Chung Il and Rim Ko Gun

His⁺, Mut⁺, multi-copy *Pichia* transformants with NAGA gene have been obtained by electroporation. The transformant had a high activity of α -N-acetylgalactosaminidase and its molecular mass was approximately 50kD.

Key words: recombinant α -N-acetylgalactosaminidase, *Pichia pastoris*