

대장균피타제발현운반체의 제작과 대장균에서의 발현

최연아, 김주성, 김철호

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《과학연구사업을 더욱 강화하여 세포공학과 유전자공학, 초고압물리학, 극저온물리학을 발전시키며 레이자와 플라즈마기술, 원자에너지와 태양에너지를 개발하여 인민경제에 받아들이는데서 나서는 과학기술적문제를 적극 풀어나가야 하겠습니다.》(《김정일선집》증보판 제11권 139페이지)

피틴태린의 리용률을 높여주는 피타제를 축산분야에 광범히 리용하기 위해서는 유전자공학적인 방법으로 대량생산을 실현하기 위한 재조합발현체계를 구축하여야 한다.

우리는 대장균피타제유전자를 클론화[1]한데 이어 대장균에서의 대량발현을 위한 발현체계를 구축하고 재조합피타제의 생성량을 검토하기 위한 연구를 진행하였다.

재료 및 방법

유전자조작 모든 유전자조작은 표준조작[2]에 준하여 진행하였다.

피타제유전자원천으로 pGEM[®]-T easy vector에 클론화한 *appA*[1]를 리용하였다. 발현운반체로는 pET-28a(+)(《Novagen》)를, 발현숙주로는 *E. coli* BL21(《Novagen》)를 리용하였다.

피타제유전자의 증폭을 위한 프라이머는 이미 클론화된 *E. coli* 38 *appA*에 기초하여 다음과 같이 설계하였다.

*appA*상류프라이머 5'-ATAGGATCCAAAGCGATCTTAATCCCATT-3'
BamH I

*appA*하류프라이머 5'-TCTAAGCTTTTACAAACTGCACGCCGGTAT-3'
Hind III

PCR증폭은 KOD plus Neo(《Toyobo》)를 리용하여 94°C 2min→변성 98°C 10s, 어닐링 58°C 30s, 연장 68°C 1min 30s, 30회 순환→최종연장 72°C 7min 조건에서 진행하였다. 반응계구성은 지도서에 준하였다.

제한효소로는 BamH I와 Hind III(《TaKaRa》)를, 리가제는 T4 DNA리가제(《Promega》)를 리용하였다.

재조합피타제의 유도발현 하루밤 배양한 종균을 1%의 접종률로 LB(50μg/mL Km)배지에 접종하고 초기배양(37°C, 200r/min)을 진행하고 유도제(젓당 또는 IPTG)를 넣어 유도배양(25°C, 200r/min)을 진행한다. 배양액을 원심분리(4°C, 3 000r/min, 10min)하여 균집하고 0.9% NaCl 용액으로 두번 세척한 다음 용균완충액 (20mmol/L 트리스-HCl, pH 8.0, 50mmol/L NaCl, 1mmol/L EDTA)을 넣고 얼음욕에서 초음파처리한다. 이것을 원심분리(4 000r/min, 10min)하여 세포내가용성분획시료를 얻어 활성을 측정한다.

피타제활성측정 피타제활성은 선행방법[4]을 변경시켜 다음과 같이 측정하였다.

0.4mL의 6.25mmol/L 피틴산나트륨용액(0.1mol/L 초산완충액, pH 4.5에 푼것)에 적당히 희석한 효소용액 0.1mL를 첨가하고 10min동안 효소반응을 시킨 후 5% 삼염화초산(TCA) 0.5mL를 넣어 반응을 정지시켰다. 대조는 기질용액에 TCA를 먼저 넣고 효소를 넣었다. 다음 여기에 발색시약(1.5% 몰리브덴산암모니움 : 2.5% 류산철=4 : 1이 되도록 실험직전에 섞은 용액)을 1mL 넣고 20min동안 발색시킨 다음 분광광도계로 700nm에서의 흡광도를 측정하였다. 피타제효소활성 1U는 우와 같은 실험조건에서 1min동안에 1 μ mol의 무기린을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

SDS-PAGE는 선행방법[3]에 준하여 12% 겔에서 진행하였다.

결과 및 논의

1) 대장균피타제유전자의 재조합발현계 구축

재조합플라스미드 *appA*-T easy vector[1]를 주형으로 *appA*에 대한 PCR증폭을 진행하였다.(그림 1) 다음 증폭로막과 pET-28a(+)-를 각각 제한분해하고(*Bam*H I/*Hind* III) 두 분해산물을 T4 DNA리가제를 리용하여 연결시켰다.

재조합발현플라스미드를 CaCl_2 법[2]으로 *E. coli* BL21에 형질전환시킨 다음 양성클론을 선발하고 선발된 양성클론에 대하여 플라스미드를 분리하여 PCR검정 및 제한분해검정을 진행하였다.(그림 2)

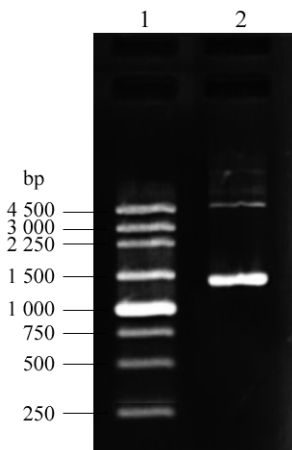


그림 1. *appA*의
PCR증폭

1—분자량표식자, 2—*appA*

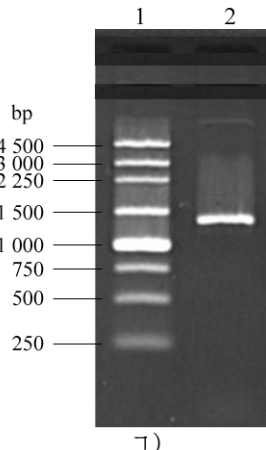


그림 2. 재조합플라스미드 pET-28a-*appA*의
PCR검정 및 제한분해검정

1) PCR검정, 2) 제한분해검정

1—분자량표식자, 2—pET-28a-*appA*

검정결과로부터 *appA*가 정확히 발현운반체 pET-28a(+)에 재조합되었다는것을 알수 있다.

다음 재조합발현플라스미드에 대한 염기배열을 분석하였는데 피타제유전자배열은 선행연구의 결과[1]와 일치하였다.

재조합균 *E. coli* BL21(pET-28a-appA)에 대한 젖당유도실험을 진행하고 세포질가용성 분획에 대한 SDS-PAGE분석을 진행하였다.(그림 3)

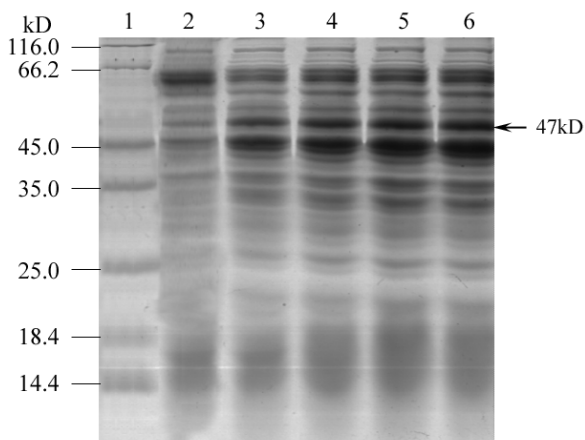


그림 3. 재조합균 *E. coli* BL21(pET-28a-appA)의 젖당유도실험에 대한 SDS-PAGE
1-유도전, 2-유도 8h, 3-유도 10h,
4-유도 12h, 5-유도 14h

그림 3에서 보는바와 같이 유도구에서 목적하는 크기(약 47kD)의 폴리펩티드가 발현되었다.

이로부터 *E. coli* BL21(pET-28a-appA)에서 재조합피타제가 정확히 발현된다는 것을 알 수 있다.

2) 피타제발현조건

E. coli BL21(pET-appA)에 대하여 배양액체적당 피타제활성을 높이기 위한 조건들을 보았다.

피타제활성에 미치는 유도제의 종류의 영향을 보기 위하여 4h동안 초기배양한 다음 유도제로 각각 0.4mmol/L IPTG와 1.5mmol/L 젖당을 리용하여 8h동안 유도배양하여 가용성

효소의 활성변화를 본 결과는 그림 4와 같다.

그림 4에서 보는바와 같이 유도제로는 젖당을 리용하는것이 더 합리적이라는 것을 알 수 있다.

재조합피타제의 발현에 미치는 유도배양온도의 영향을 검토하였다. 4h동안 초기배양을 진행한 다음 유도제로 1.5mmol/L 젖당을 넣어 각각 16, 25, 30°C에서 유도배양을 진행하면서 시간에 따라 가용성효소의 활성을 측정하였는데 25°C에서 활성이 가장 높았다.(그림 5)

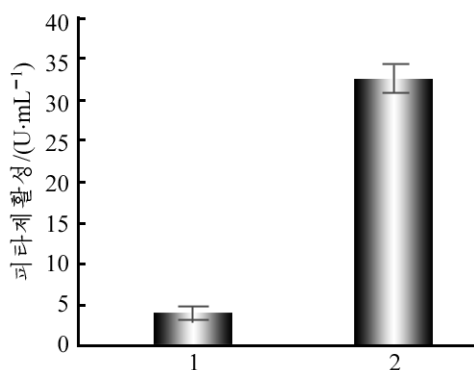


그림 4. 유도제종류에 따르는 피타제활성
1-0.4mmol/L IPTG, 2-1.5mmol/L 젖당

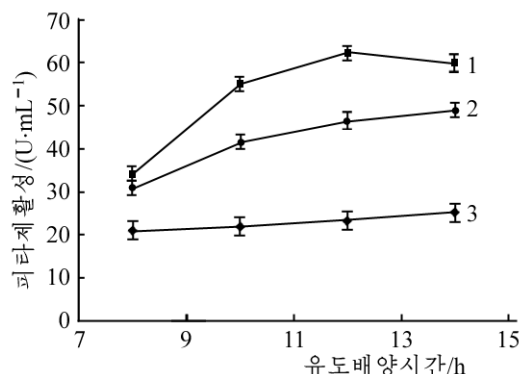


그림 5. 유도온도에 따르는 피타제활성
1-25°C, 2-30°C, 3-16°C

유도배양시간에 따르는 피타제활성변화를 보기 위하여 2h동안 초기배양을 진행한 다음 유도배양을 진행하면서 각이한 시간마다 시료를 취하여 활성을 측정하였는데 유도 12h 근방에서 활성이 가장 높았다.(그림 6)

초기배양시간에 따르는 피타제활성변화를 보았다. 초기배양을 2~7h동안 진행한 유도 배양을 10, 14h동안 진행하였을 때 가용성효소의 활성을 측정하였는데 그 결과는 그림 7 과 같다.

그림 7에서 보는바와 같이 대수적성장기에 있는 초기배양 2~4h에 대해서는 균체량증가에 따라 활성도 비례하여 높아졌으며 특히 대수적성장기 말기에 이른 다음 (초기배양 4h에 해당) 유도제를 넣은 시료가 활성이 가장 높았다. 반대로 균이 정상기에 들어선 다음 유도배양을 시작한 시료들은(5~7h시료) 점차 활성이 낮아졌는데 이것은 균이 로화되는것과 관련된다. 이로부터 초기배양시간은 4h로 정하는것이 합당하다고 보았다.

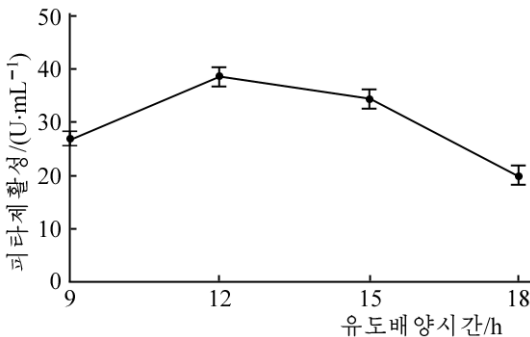


그림 6. 유도배양시간에 따르는 피타제 활성

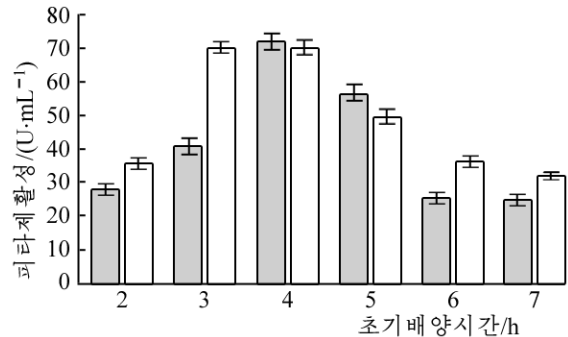


그림 7. 초기배양시간에 따르는 피타제 활성
■ 유도 10h, □ 유도 14h

재조합피타제의 발현에 미치는 유도제의 농도의 영향을 보기 위하여 4h동안 초기배양을 진행한 다음 유도제로 젖당을 1~10mmol/L 되게 첨가한 각이한 구들에서 유도배양을 진행하여 10h 및 14h만에 시료를 취하여 활성을 측정하였다.(그림 8)

그림 8에서 보는바와 같이 젖당농도가 증가함에 따라 피타제활성이 증가하였으며 8mmol/L에서는 더 증가하지 않았다.

이상의 실험결과를 통하여 피타제유도발현 조건을 초기배양(37°C, 200r/min) 4h, 유도제로 8mmol/L 젖당, 유도배양(25°C, 200r/min) 12h으로 정할수 있다. 즉 하루밤동안 LB(50μg/mL Km) 배지에서 배양한(37°C, 200r/min) 종균을 LB배지에 1% 접종하고 37°C, 200r/min에서 초기배양을 4h동안 진행한 다음 25°C, 200r/min에서 유도제로 8mmol/L 젖당을 리용하여 유도배양을 12h 진행하였을 때 피타제활성은 106.5U/mL였다. 이것은 원균 *E. coli* 38의 활성(0.33U/mL)의 300배이상에 해당하는 높은 값이다.

선행한 재조합대장균의 피타제발현수준은 40~60U/mL이다.(표) 우리가 얻은 재조합균주의 피타제발현활성은 *appA*를 *Pichia pastoris*에서 발현시킨것과 대등한 값으로서 높은 수준이라고 할수 있다. 이것이 운반체의 차이에 기인되는것인지 혹은 재조합효소의 비활성차이에 의한것인지 앞으로 연구가 더 심화되어야 한다.

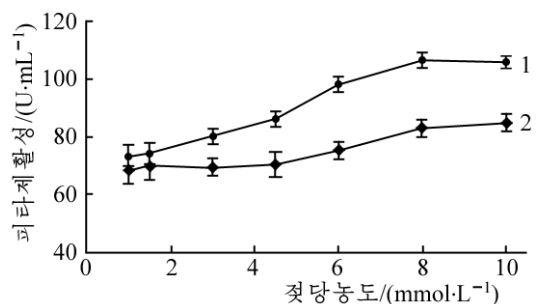


그림 8. 유도제 농도에 따르는 재조합피타제의 발현
1-유도 10h, 2-유도 14h

표. 재조합피타제의 발현특성 비교

유전 자원천	발현 운반체	발현 숙주	배지	피타제 활성	참고문헌
<i>E. coli</i> 38	pET28a(+)	<i>E. coli</i> BL21	LB	106.5U/mL	
<i>E. coli</i> (ATCC33965)	pET21a(+)	<i>E. coli</i> BL21	LB	60U/mL	[5]
<i>E. coli</i> (ATCC33965)	pET20b	<i>E. coli</i> BL21	TB	45U/mL	[4]
<i>E. coli</i>	pPICZaA	<i>Pichia pastoris</i> X33	GMGY/GMMY	18~114U/mL	[6]
<i>Buttiauxella</i> sp. GC21	pET22b(+)	<i>E. coli</i> BL21	LB	55.8U/mL	[7]

맺 는 말

우리는 *E. coli* 38의 피타제 유전자를 발현시키기 위한 발현체계를 구축하고 재조합균주 *E. coli* BL21(pET-28a-appA)의 유도발현조건을 확립하였다.

하루밤동안 배양한 종균을 접종률 1%로 LB배지에 접종하고 37°C, 200r/min에서 4h동안(OD₆₀₀≈1.5가 될 때까지) 초기배양을 진행한 다음 8mmol/L 젖당으로 25°C, 200r/min에서 약 12h동안 유도배양을 진행하였을 때 세포내가용성분획의 피타제활성은 106.5U/mL에 이른다.

참 고 문 헌

- [1] 최연아 등: 조선민주주의인민공화국 과학원통보, 2, 45, 주체104(2015).
- [2] J. Sambrook et al.; Molecular Cloning: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1~300, 2001.
- [3] U. K. Laemmli et al.; Nature, 227, 680, 1970.
- [4] G. Miksch et al.; Appl. Microbiol. Biotechnol., 59, 685, 2002.
- [5] S. Golovan et al.; Can. J. Microbiol., 46, 59, 2000.
- [6] X. G. Lei et al.; Biochem. Biophys., 257, 117, 1999.
- [7] P. Shi et al.; Aquaculture, 275, 70, 2008.

주체103(2014)년 12월 5일 원고접수

Construction of Expression Plasmid of *Escherichia coli* Phytase Gene and Its Expression in *E. coli*

Choe Yon A, Kim Ju Song and Kim Chol Ho

We have constructed the expression system of *Escherichia coli* 38 phytase gene (*appA*) and established the induction condition.

The cytoplasmic phytase activity was 106.5U/mL, when the recombinant strain was inoculated to LB medium (Km 50μg/mL) 1%, initially cultivated for 4h (OD₆₀₀≈1.5) at 37°C, 200r/min, and induced for 12h by 8mmol/L of lactose at 25°C, 200r/min.

Key words: phytase, *Escherichia coli*, *appA*