

아르기닌데이미나제의 Asp357변이체 제작

김정복, 한금성, 한경애

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《암성질환에 대한 예방치료사업에 큰 힘을 넣어야 하겠습니다.》(《김정일선집》 증보판 제17권 57페이지)

유용한 유전자들을 적극 개발하여 병치료에 리용하는것은 인민들의 건강을 증진시키고 각종 질병을 치료하는데서 중요한 의의를 가진다.

아르기닌데이미나제(Arginine deiminase: ADI, EC 3.5.3.6)는 간암과 흑색종, 백혈병, 전위선암과 같은 아르기닌영양요구형종양세포들에서 아르기닌을 결핍시킴으로써 암세포들을 선택적으로 죽이는 항암약물로 리용되고있다.[1-3]

우리는 ADI의 기질결합물질새를 연구하기 위하여 부위지정변이기술을 리용하여 PaADI(*Pseudomonas aeruginosa*기원의 ADI)의 기질결합부위에서 중요한 작용을 하는 아미노산인 Asp357을 다른 몇가지 아미노산들로 변이시켜 ADI변이체를 제작하였다.

재료 및 방법

ADI의 유전자는 *Pseudomonas aeruginosa*의 게놈으로부터 분리하였고 재조합에 리용된 운반체는 pET-28a이며 균배양은 LB배지를 리용하여 진행하였다.

게놈과 플라스미드의 분리, 아가로스겔회수는 키트(《TAKARA》)들을 리용하여 사용설명서에 준하여 진행하였다. 폴리메라제연쇄반응(PCR)에 리용된 효소는 pfu DNA폴리메라제(《Fermentas》)이며 제한효소반응에는 *EcoRI*(《Fermentas》), *NotI*(《Fermentas》), T4 DNA 리가제(《TAKARA》) 등을 리용하였다.

ADI유전자토막의 PCR증폭은 각각 *EcoRI*과 *NotI* 제한효소절단부위를 가진 한쌍의 프라이머(상류프라이머 5'-GATATGAATTCATGAGCACGGAAAAAACC AAA-3'와 하류프라이머 5'-GATATGCGGCCGCGGTTGTCTGTCTAGTAGTCGAT-3')를 리용하여 진행하였다. PCR 조건은 95°C 5min→95°C 30s, 55°C 1min, 72°C 2min, 30회 순환→72°C 5min이다.

변이에 리용한 모든 프라이머들은 중첩연장PCR의 원리와 프라이머설계원칙에 따라 전용프로그램 Primer Premier 5.0을 리용하여 설계하였다.

유전자감작변이도입은 야생형ADI유전자재조합플라스미드에 기초하여 선행연구[5]방법에 준하여 중첩연장PCR법으로 진행하였다.

변이형재조합플라스미드의 제작은 *EcoRI*과 *NotI*, T4 DNA리가제를 리용하여 중첩연장PCR에서 얻은 변이부위를 포함하고있는 ADI유전자토막과 운반체 pET-28a에 대한 절단 및 연결을 진행하여 제작하였다.

재조합체의 검증은 균무지PCR과 두효소절단방법, 배렬결정방법으로 진행하였으며 NCBI의 Align Sequences Nucleotide BLAST기능을 리용하여 배렬비교를 진행하였다.

결과 및 고찰

PaADI에 대한 결정구조연구에 의하면 PaADI는 Cys406-His278-Glu224 촉매3잔기구조를 가지고 있다.[4] Cys406과 Glu224는 PaADI의 촉매3잔기구조에 있는 중요한 잔기들이며 Asp357은 공간적으로 효소통로의 중요잔기 Arg401과 매우 가까이에 있다. Asp357의 변화가 효소활성과 기질결합에 미치는 영향을 연구하기 위하여 증첩연장PCR를 리용하여 다음과 같은 변이를 도입하였다.

야생형ADI유전자재조합플라즈미드에 기초하여 Cys406잔기를 Ala로 변이시킨것을 M32(C406A)로 하고 M32에 기초하여 Asp357잔기를 각각 Asn, Glu, Ala, Trp로 변이시킨것을 각각 M33(C406A/D357N), M34(C406A/D357E), M35(C406A/D357A), M36(C406A/D357W)으로 하였다.

표에 변이에 리용된 상류프라이머와 하류프라이머를 보여주었다.

표. ADI의 변이에 리용된 프라이머들

변이체 이름	변이부위	프라이머	염기배열
M32	C406A	M32-forward	5'-CGCGGCGGCGGCCACGGCATGACCTGCCCCGATCC-3'
		M32-reverse	5'-CCCGTCCAGTACCGCACCGGCGGCGGCGCTGG-3'
M33	C406A/D357N	M33-forward	5'-CGCGAGCAATGGGACAACGGTAACAACGTGG-3'
		M33-reverse	5'-CCACGTTGTTACCGTTGTCCCATTTGCTCGCG-3'
M34	C406A/D357E	M34-forward	5'-GCGAGCAATGGGACGAGGGTAACAACGTG-3'
		M34-reverse	5'-CACGTTGTTACCCCTCGTCCCATTGCTCGC-3'
M35	C406A/D357A	M35-forward	5'-CGAGCAATGGGACGCCGGTAACAACGTGG-3'
		M35-reverse	5'-CCACGTTGTTACCGGCGTCCCATTGCTCG-3'
M36	C406A/D357W	M36-forward	5'-AGCGCGAGCAATGGGACTGGGGTAACAACGTGGTCTG-3'
		M36-reverse	5'-CAGACCACGTTGTTACCCCAGTCCCATTGCTCGCGCT-3'

M-forward는 목적하는 변이가 포함되도록 설계한 상류프라이머, M-reverse는 목적하는 변이가 포함되도록 설계한 하류프라이머이다.

먼저 증첩연장PCR법에 따라 야생형재조합플라즈미드를 주형으로 하고 전길이증폭프라이머와 변이프라이머를 리용하여 1회전의 PCR를 각각 진행하였다. 다음 2개의 증폭토막을 서로 섞고 전길이증폭프라이머를 리용하여 2회전의 PCR를 진행하여 ADI변이체의 전길이토막을 증폭하였다.

야생형ADI의 Cys406잔기를 Ala로 변이시킨 M32(C406A)를 주형으로 하고 그것에 해당하는 변이프라이머를 리용하여 2회전의 PCR를 진행하여 Asp357잔기를 각각 Asn, Glu, Ala, Trp로 변이시킨 M33(C406A/D357N), M34(C406A/D357E), M35(C406A/D357A), M36(C406A/D357W)등의 ADI변이체를 제작하였다.

ADI변이체유전자는 제한효소 *EcoRI*과 *NotI*로 절단하여 pET-28a에 연결하였다.

변이가 도입된 재조합플라즈미드는 균무지PCR와 제한효소절단검정, 배렬결정을 통하여 그 정확성을 확인하였다.

그림 1에 중첩연장PCR에 의한 ADI변이체 제작과정의 매 산물들에 대한 아가로스겔전기영동상을 보여주었다.

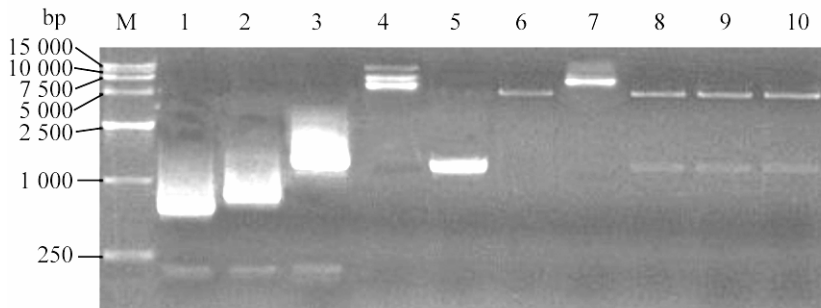


그림 1. 중첩연장PCR법에 의한 변이체 제작과정의 매 산물들에 대한 아가로스겔전기영동상

M은 DNA크기표식자(DL15000)이다. 1은 1회전 PCR의 M-forward와 DP를 프라이머로 하여 증폭한 토막으로서 길이는 약 500bp정도이다. 2는 1회전 PCR에서 M-reverse와 UP를 프라이머로 하여 증폭한 토막으로서 길이는 약 800bp이다. 3은 2회전 PCR에서 증폭하여 얻은 토막으로서 길이는 약 1 300bp이다. 4는 pET-28a운반체의 플라스미드토막으로서 길이는 약 5 600bp이다. 3개의 띠가 나타나는 원인은 플라스미드의 초라선화와 선형화때문이다. 5는 2회전 PCR 산물을 *NotI*과 *EcoRI*로 두효소절단하여 얻은 토막으로서 길이는 약 1 200bp정도이다. 6은 운반체 pET-28a를 *NotI*와 *EcoRI*로 두효소절단하여 얻은 토막으로서 길이는 약 5 500bp정도이다. 7은 제작한 재조합플라스미드 pET-28a-ADI로서 길이는 약 6 700bp이다. 8-10은 변이체플라스미드에 대한 효소절단의 결과인데 위의 띠는 운반체로서 길이는 약 5 500bp이고 아래의 띠는 목적ADI유전자로서 길이는 약 1 200bp이다.

```

wt. seq      CCGCCGAGCGCGAGCAATGGGACGACGGTAACAACGTGGTCTGCCTGGAGCCGGGCGTGG
33. seq      CCGCCGAGCGCGAGCAATGGGACAAAGGTAACAACGTGGTCTGCCTGGAGCCGGGCGTGG
34. seq      CCGCCGAGCGCGAGCAATGGGACGAGGGTAACAACGTGGTCTGCCTGGAGCCGGGCGTGG
35. seq      CCGCCGAGCGCGAGCAATGGGACGCCGGTAACAACGTGGTCTGCCTGGAGCCGGGCGTGG
36. seq      CCGCCGAGCGCGAGCAATGGGACTGGGGTAACAACGTGGTCTGCCTGGAGCCGGGCGTGG
*****

wt. seq      TGGTCGGCTACGACCGCAACACCTACACCAACACCCTGCTGCGCAAGGCCGGCGTCGAGG
33. seq      TGGTCGGCTACGACCGCAACACCTACACCAACACCCTGCTGCGCAAGGCCGGCGTCGAGG
34. seq      TGGTCGGCTACGACCGCAACACCTACACCAACACCCTGCTGCGCAAGGCCGGCGTCGAGG
35. seq      TGGTCGGCTACGACCGCAACACCTACACCAACACCCTGCTGCGCAAGGCCGGCGTCGAGG
36. seq      TGGTCGGCTACGACCGCAACACCTACACCAACACCCTGCTGCGCAAGGCCGGCGTCGAGG
*****

wt. seq      TCATCACCATCAGCGCCAGCGAACTGGGTCGCGGTGCGGGCGGCGGCCACTGCATGACCT
33. seq      TCATCACCATCAGCGCCAGCGAACTGGGTCGCGGTGCGGGCGGCGGCCACGCCATGACCT
34. seq      TCATCACCATCAGCGCCAGCGAACTGGGTCGCGGTGCGGGCGGCGGCCACGCCATGACCT
35. seq      TCATCACCATCAGCGCCAGCGAACTGGGTCGCGGTGCGGGCGGCGGCCACGCCATGACCT
36. seq      TCATCACCATCAGCGCCAGCGAACTGGGTCGCGGTGCGGGCGGCGGCCACGCCATGACCT
*****

wt. seq      GCCCGATCGTCCGCGACCCGATCGACTACTGA-----
33. seq      GCCCGATCGTCCGCGACCCGATCGACTACTGACAGACAACCGCGGCCGCACTCGAGCACC
34. seq      GCCCGATCGTCCGCGACCCGATCGACTACTGACAGACAACCGCGGCCGCACTCGAGCACC
35. seq      GCCCGATCGTCCGCGACCCGATCGACTACTGACAGACAACCGCGGCCGCACTCGAGCACC
36. seq      GCCCGATCGTCCGCGACCCGATCGACTACTGACAGACAACCGCGGCCGCACTCGAGCACC
*****

wt. seq      -----
33. seq      ACCACCACCACCACTGAGATCCGGCTGCTAACAAGCCCGAAAGGA-
34. seq      ACCACCACCACCACTGAGATCCGGCTGCTAACAAGCCCGAAAGGAA
35. seq      ACCACCACCACCACTGAGATCCGGCTGCTAACAAGCCCGAAAGGAA
36. seq      ACCACCACCACCACTGAGATCCGGCTGCTAACAAGCCCGAAA-----
    
```

그림 2. PaADI, M33, M34, M35, M36의 다중정렬결과

그림 1의 영동결과를 통하여 중첩연장PCR에 의하여 ADI의 유전자토막들이 정확히 증폭되었다는 것과 재조합체의 정확성도 확인되었다.

C406A/Asp357변이체들과 야생형PaADI에 대한 다중정렬결과를 그림 2에 보여주었다. 다중정렬결과를 분석하면 M33, M34, M35, M36의 변이가 정확하다는 것을 알 수 있다.

맺는 말

중첩연장PCR를 리용하여 야생형ADI의 Asp357잔기를 다른 몇가지 아미노산으로 변이시켜 변이형ADI재조합플라스미드를 제작하였으며 다중정렬결과분석을 통하여 모든 변이들이 정확히 도입되었다는 것을 확인하였다.

참고 문헌

- [1] K. L. Heckman et al.; Nature Protocols, 2, 4, 924, 2007.
- [2] Y. Ni et al.; Cancer Letters, 261, 1, 1, 2008.
- [3] J. K. Yoon et al.; Clinical Pharmacology, 5, 11, 2013.
- [4] Y. Ni et al.; Applied Microbiology and Biotechnology, 90, 1, 193, 2011.
- [5] 李利锋 等; 生物工程学报, 28, 4, 508, 2012.

주체105(2016)년 12월 5일 원고접수

Construction of the Arginine Deiminase Asp357 Mutants

Kim Chong Bok, Han Kum Song and Han Kyong Ae

The recombinant plasmid of the ADI mutants was made through the replacement Asp357 residue of the wild ADI with various amino acids by using overlap extension PCR and we determined that genes were exactly changed through the multiple sequence comparison analysis.

Key words: arginine deiminase, overlap extension PCR, mutant