

Bacillus licheniformis 알카리성프로테아제 유전자의 클론화에 대한 연구

리일민, 리호남

경애하는 최고령도자 김정은동지께서는 다음과 같이 말씀하시였다.

《정보기술, 나노기술, 생물공학을 비롯한 핵심기초기술과 새 재료기술, 새 에너지기기술, 우주기술, 핵기술과 같은 중심적이고 견인력이 강한 과학기술분야를 주력방향으로 정하고 힘을 집중하여야 합니다.》(《조선로동당 제7차대회에서 한 중앙위원회사업총화보고》 단행본 39페이지)

프로테아제는 현재 공업적으로 리용되고있는 효소들중에서 가장 큰 몫을 차지하고있다. 그중에서도 알카리성프로테아제는 세척제공업과 식료공업, 폐기물처리, 가죽이김공업 등 여러 분야에서 광범히 리용되고있다.[1-3] 특히 *Bacillus*속의 균들이 분비하는 알카리성프로테아제들은 그 최적pH가 세척제작용환경에 적합한것으로 하여 이러한 알카리성프로테아제를 공업적으로 다량생산하기 위한 연구가 광범히 진행되고있다.

우리는 알카리성프로테아제대량발현체계를 구축하기 위하여 *Bacillus licheniformis* 830으로부터 알카리성프로테아제유전자를 클론화하기 위한 연구를 하였다.

재료와 방법

알카리성프로테아제유전자의 원천균주로서 세척제용프로테아제로 적합한 알카리성프로테아제를 생성하는 균주인 *Bacillus licheniformis* 830을 선정하였다. 게놈DNA와 플라스미드는 세균계놈DNA분리키트(《TIANGEN》)와 플라스미드분리키트(《TIANGEN》)를 각각 리용하여 분리하였다.

*Bacillus licheniformis*가 분비하는 알카리성프로테아제인 수브틸리신 칼스베르그유전자 배열(NCBI6816)에 기초하여 알카리성프로테아제유전자(*apr830*)의 증폭을 위한 클론화용프라이머(*apr830_up*, *apr830_down*)를 아래와 같이 설계하였다.

apr830_up (*Bam*HI) 5'-CTGGATCCGATGAGGAAAAAGAGTTTTTGGCTTGGG-3'

apr830_down(*Xho*I) 5'-AGCTCGAGTTGAGCGGCAGCTTCGACATTGATCAG-3'

유전자클론화를 위한 PCR증폭은 LA *Taq* DNA폴리메라제(《TAKARA》)를 리용하여 94°C 2min(초기변성)→94°C 변성 30s, 63°C 아닐링 30s, 72°C 연장 1min 30s(35회 순환)→72°C 마감연장 10min조건에서 진행하였다. 반응계구성은 사용지도서에 준하였다. PCR증폭단편을 1% 아가로즈겔전기영동상으로 확인하고 아가로즈겔DNA분리키트(《OMEGA》)를 리용하여 분리하였다.

PCR증폭단편을 T4 DNA리가제(《Biolab》)를 리용하여 pGEM®-T easy vector(《Promega》)와 연결시키고 *E. coli* DH5α에 형질전환시켰다. 재조합플라스미드에 대하여 제한효소 *Bam*HI, *Xho*I(《TAKARA》)로 제한분해검정을 진행하고 PCR Master Mix(《Biolab》)로 PCR검정을 진행하였다.

클론화한 알카리성 프로테아제유전자의 염기배열을 전문기관에 의뢰하여 결정하였다. 기타 모든 유전자조작은 선행방법[4]에 준하여 진행하였다.

결과 및 논의

1) *Bacillus licheniformis* 830계놈에서 알카리성프로테아제유전자의 PCR증폭

Bacillus licheniformis 830균주를 LB배지에서 12h동안 배양(37°C, 200r/min)하고 원심분리(4°C, 3 000r/min, 10min)하여 균집한 다음 계놈DNA를 분리하고 이것을 주형으로 *apr830*에 대한 PCR증폭을 진행하였다. PCR증폭산물의 아가로스겔전기영동상은 그림 1과 같다.

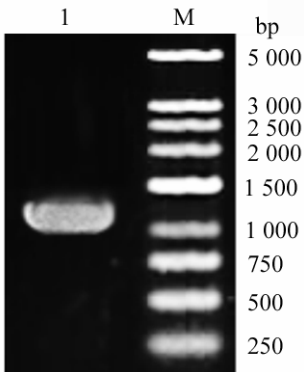


그림 1. PCR증폭산물의 아가로스겔전기영동상
1—PCR증폭산물, M—DNA 분자량표식자

그림 1에서 보는바와 같이 목적하는 알카리성프로테아제유전자의 크기(1.2kbp)에 해당하는 DNA단편이 정확히 나타났다.

2) 알카리성프로테아제유전자와 pGEM®-T easy vector의 연결 및 형질전환

Bacillus licheniformis 830계놈으로부터 증폭된 단편을 회수하고 T4 DNA리가제를 리용하여 pGEM®-T easy vector (3.0kbp)와 연결시키고 *E. coli* DH5α에 형질전환시켰다.

LB평판(Amp⁺, 100μg/mL)에 형성된 균무지를 LB배지(Amp⁺, 100μg/mL)에서 하루밤동안 배양(37°C, 200r/min)하고 플라스미드 분리를 진행한 다음 재조합플라스미드를 주형으로 하여 PCR검정을 진행하였다. 검정PCR증폭산물의 아가로스겔전기영동상은 그림 2와 같다.

그림 2에서 보는바와 같이 크기가 약 1.2kb인 단편이 정확히 증폭되었다. 그우의 띠는 주형으로 넣어준 재조합플라스미드이다.

다음으로 제한효소 *Bam*HI와 *Xho*I에 의한 2중제한분해, *Bam*HI에 의한 단일제한분해를 진행하였다. 제한분해산물에 대한 아가로스겔전기영동상은 그림 3과 같다.

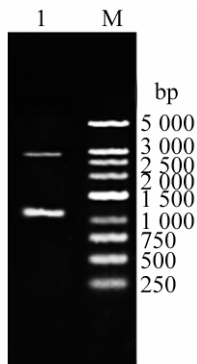


그림 2. 검정PCR증폭산물의 아가로스겔전기영동상
1—PCR증폭산물, M—DNA 분자량표식자

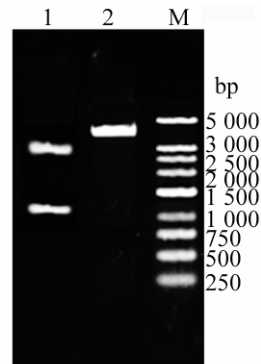


그림 3. 제한분해산물에 대한 아가로스겔전기영동상
1—*Bam*HI/*Xho*I에 의한 2중제한분해산물, 2—*Bam*HI에 의한 단일제한분해산물, M—DNA 분자량표식자

그림 3에서 보는바와 같이 2중제한분해산물에서 목적하는 1.2kb단편과 운반체에 해당하는 3.0kb단편이 정확히 얻어졌으며 단일제한분해산물로부터도 선형화된 재조합플라스미드에 해당하는 4.2kb단편이 얻어졌다.

이상의 결과는 *apr830*이 pGEM®-T easy vector에 정확히 클론화되었다는 것을 보여준다.

3) *B. licheniformis* 830 알카리성 프로테아제 유전자의 염기배열 및 추정아미노산배열
pGEM®-T easy vector에 클론화된 *apr830*의 염기배열과 그것에 따르는 추정아미노산배열을 그림 4에 보여주었다.

*Bam*HI
GGA TCC

AC TCA AGA GTG CTG CTC CGG CGC CAT GGC TCG ATT ACT

1 ATG AGG AAA AAG AGT TTT TGG CTT GGG ATG CTG ACG GCC TTC ATG CTC GTG TTC ACG ATG
pre M R K K S F W L G M L T A F M L V F T M 20
61 GCA TTC AGC GAT TCC GCT TCT GCT GCT CAA CCG GCG AAA AAT GTT GAA AAG GAT TAT ATT
A F S D S A S A pro A Q P A K N V E K D Y I 40
121 GTC GGA TTT AAG TCA GGA GTG AAA ACC GCA TCT GTC AAA AAG GAC ATC AAA GAG AGC
V G F K S G V K T A S V K K D I I K E S 60
181 GGC GGA AAA GTG GAC AAG CAG TTT AGA ATC ATC AAC GCG GCA AAA GCG AAG CTA GAC AAA
G G K V D K Q F R I I N A A K A K L D K 80
241 GAA GCG CTT AAG GAA GTC AAA AAT GAT CCG GAT GTC GCT TAT GTG GAA GAG GAT CAT GTG
E A L K E V K N D P D V A Y V E E D H V 100
301 GCC CAT GCC TTG GCG CAA ACC GTT CCT TAC GGC ATT CCT CTC ATT AAA GCG GAC AAA GTG
A H A L mature A Q T V P Y G I P L I K A D K V 120
361 CAG GCT CAA GGC TTT AAG GGA GCG AAT GTA AAA GTA GCC GTC CTG GAT ACA GGA ATC CAA
Q A Q G F K G A N V K V A V L D T G I Q 140
421 GCT TCT CAT CCG GAC TTG AAC GTA GTC GGC GGA GCA AGC TTT GTG GCT GGC GAA GCT TAT
A S H P D L N V V G G A S F V A G E A Y 160
481 AAC ACC GAC GGC AAC GGA CAC GGC ACA CAT GTT GCC GGT ACA GTA GCT GCG CTT GAC AAT
N T D G N G H G T H V A G T V A L D N 180
541 ACA ACG GGT GTA TTA GGC GTT GCG CCA AGC GTA TCC TTG TAC GCG GTT AAA GTA CTG AAT
T T G V L G V A P S V S L Y A V K V L N 200
601 TCA AGC GGA AGC GGA ACT TAC AGC GGC ATT GTA AGC GGA ATC GAG TGG GCG ACG ACA AAC
S S G S G T Y S G I V S G I E W A T T N 220
661 GGC ATG GAT GTT ATC AAC ATG AGC CTT GGA GGA CCA TCA GGC TCA ACA GCG ATG AAA CAG
G M D V I N M S L G G P S G S T A M K Q 240
721 GCG GTT GAC AAT GCA TAT GCA AGA GGG GTT GTC GTT GTG GCG GCT GCT GGG AAC AGC GGA
A V D N A Y A R G V V V V A A A G N S G 260
781 TCT TCA GGA AAC ACG AAT ACA ATC GGC TAT CCT GCG AAA TAC GAC TCT GTC ATC GCA GTT
S S G N T N T I G Y P A K Y D S V I A V 280
841 GGC GCG GTA GAC TCT AAC AGC AAC AGA GCT TCA TTT TCC AGC GTC GGA GCA GAG CTT GAA
G A V D S N S N R A A S F S S V G A E L E 300
901 GTC ATG GCT CCT GGC GCA GGC GTG TAC AGC ACT TAC CCA ACC AGC ACT TAT GCA ACA TTG
V M A P G A G V Y S T Y P T S T Y A T L 320
961 AAC GGA ACG TCA ATG GCT TCT CCT CAT GTA GCG GGA GCA GCA GCT TTG ATC TTG TCA AAA
N G T S M A S P H V A G A A A L I L S K 340
1021 CAT CCG AAC CTT TCA GCT TCA CAA GTC CGC AAC CGT CTC TCC AGT ACG GCG ACT TAT TTG
H P N L S A S Q V R N R L S S T A T Y L 360
1081 GGA AGC TCC TTC TAC TAT GGA AAA GGT CTG ATC AAT GTC GAA GCT GCC GCT CAA TAA
G S S F Y Y G K G L I N V E A A A Q 379
GAG CTC GAA AGA AAT CAC TAG TGA ATT CGC GGC CGC CTG CAG GTC GAC CAT ATG GGA GAG
XhoI
CTC CCA ACG CGT GAG CT

그림 4. *apr830*의 염기배열과 그것에 따르는 추정아미노산배열
시작코돈(ATG)과 종결코돈(TAA)은 강조체로, 프라이머배열은 밑선으로 표시하였다.

클론화된 *B. licheniformis* 830 알카리성 프로테아제 유전자 *apr830*의 크기는 1 137bp이고 379개의 아미노산으로 이루어진 폴리펩티드를 암호화한다. 클론화한 알카리성 프로테아제 유전자의 배열을 Gene Bank에 등록된 *Bacillus licheniformis*가 생성하는 수브틸리신 칼스베르 그호소의 유전자배열(NCBI6816)과 비교한 결과 두 배열이 완전히 일치하였다.

이 폴리펩티드는 29개 아미노산으로 이루어진 신호펩티드와 76개 아미노산으로 이루어진 프로펩티드, 274개의 아미노산으로 이루어진 성숙펩티드로 구성되어있다.[5] 이로부터

클론화한 알카리성프로테아제유전자 *apr830*으로부터 얻어지는 성숙된 효소단백질의 이론적인 분자량은 27.2kD이며 등전점은 pI 6.57인것으로 추정된다.

이상의 결과들을 통하여 정확한 읽기틀을 가진 *apr830*이 pGEM[®]-T easy vector에 클론화되었다는것을 알수 있다.

맺는말

Bacillus licheniformis 830계놈으로부터 알카리성프로테아제유전자 *apr830*을 PCR증폭하고 T easy vector에 재조합하여 목적하는 유전자가 클론화된 재조합운반체인 *apr830*-T easy vector를 얻었다.

클론화한 알카리성프로테아제유전자(*apr830*)의 염기배열을 분석한 결과 *Bacillus licheniformis*가 분비하는 수브틸리신 칼스베르그효소의 유전자배열과 완전히 일치하며 길이는 1 137bp이고 379개의 아미노산으로 된 폴리펩티드를 암호화한다.

참고문헌

- [1] K. Saeki et al.; Journal of Bioscience and Bioengineering, 103, 2, 501, 2007.
- [2] L. A. Mesrati et al.; FEMS Microbiol. Lett., 244, 353, 2005.
- [3] L. Songyi; Journal of Bioscience and Bioengineering, 119, 3, 284, 2015.
- [4] J. Sambrook et al.; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 127~354, 2001.
- [5] R. Agrebi et al.; J. Enzyme Microb. Technol., 40, 515, 2007.

주체107(2018)년 7월 5일 원고접수

Cloning of *Bacillus licheniformis* Alkaline Protease Gene

Ri Il Min, Ri Ho Nam

The alkaline protease gene(*apr830*) cloned from *B. licheniformis* 830 is 1 137 bp in length, and encodes a polypeptide with 379 amino acids. The cloned *apr830* has the same sequence as subtilisin Carlsberg from *B. licheniformis* strain.

Key words: alkaline protease, subtilisin, *Bacillus licheniformis*, protease