

대장균 β -D-글루쿠로니다제유전자(*uidA*)의 클론화

정순임, 김주성, 김철호

경애하는 김정은동지께서는 다음과 같이 말씀하시였다.

《국가적으로 체육과학연구사업에 필요한 자료들과 첨단설비, 측정기재, 시약들을 비롯하여 연구조건을 원만히 보장해주기 위한 사업에 깊은 관심을 돌려야 합니다.》

대장균의 β -D-글루쿠로니다제(GUS)는 그 연구력사가 오래며 물질전환 및 분석, *Escherichia coli*의 검출 등에 널리 이용되고있다.[1, 2, 7] 특히 단백동화호르몬이나 모르핀과 같은 도핑물질의 분석에서 LC-MS 또는 GC-MS분석을 위한 시료의 전처리에 필수적으로 이용되고있다. 대장균 β -D-글루쿠로니다제유전자(*uidA*)를 클론화하는것은 뇨중도핑물질분석을 위한 효소원천을 확보[4, 6]하고 그것에 대한 기초연구를 진행하는데서 중요한 의의를 가진다.

재료 및 방법

10여종의 대장균에 대해 β -D-글루쿠로니다제활성을 측정하고 활성이 제일 높은 *E. coli* 418(약 200U/mL)을 선택하여 유전자클론화를 위한 원천균주로 이용하였다. β -D-글루쿠로니다제활성은 선행방법[7]에 준하여 측정하였다.

제놈DNA와 플라스미드의 분리는 각각 세균제놈DNA분리키트(《TIANGEN》)와 플라스미드분리키트(《TIANGEN》)를 이용하여 진행하였다.

*uidA*배열 (GenBank등록번호 NC000913)에 기초하여 β -D-글루쿠로니다제유전자의 증폭을 위한 클론화용프라이머 (*uidA*_up, *uidA*_down)와 내부의 569bp를 증폭하는 검정용프라이머 (*uidA*_check_up, *uidA*_check_down)를 아래와 같이 설계하였다. 클론화용상류프라이머 (*uidA*_up)를 설계하는데서 *Nco* I제한효소절단점을 넣을 때 읽기틀이 이동하는것을 고려하여 CDS영역의 5'-말단에 GGA코드(Gly)를 삽입시켰다.

*uidA*_up(*Nco* I) 5'-TATCCATGGGATTACGTCCTGTAGAAACCCC

Nco I

*uidA*_down(*Hind* III) 5'-GATAAGCTTTCATTGTTTGCCTCCCTGCTG

Hind III

*uidA*_check_up 5'-GCGTCTGTTGACTGGCAGGTGGTG

*uidA*_check_down 5'-AAGTGCCTTGCTGAGTTTCCCCG

클론화를 위한 PCR증폭은 LA Taq pol(《TaKaRa》)를 이용하여 94°C 변성 2min →94°C 변성 30s, 58°C 아닐링 30s, 72°C 연장 2min 15s, 35회 순환→72°C 연장 10min의 조건에서 진행하였다. 반응계구성은 사용지도에 준하였다. PCR증폭토막을 1% 아가로스겔전기영동상으로 확인하고 아가로스겔DNA분리키트(《OMEGA bio-tek》)를 이용하여 분리하였다.

T4 DNA 리가제(《Promega》)를 리용하여 PCR증폭토막을 pGEM[®]-T easy운반체(《Promega》)와 련결시키고 *E. coli* DH5 α 에 형질전환시켰다. 재조합플라즈미드에 대하여 제한효소 *Nco* I, *Hind* III(《TaKaRa》)으로 제한분해검정을 진행하고 LC Taq폴리메라제(《Fermentas》)로 PCR검정을 진행하였다.

클론화한 β -D-글루쿠로니다제유전자의 염기배열을 전문기관에 의뢰하여 결정하였다. 기타 모든 유전자조작은 표준조작[5]에 준하여 진행하였다.

결과 및 논의

1) 대장균계놈에서 β -D-글루쿠로니다제유전자의 PCR증폭

E. coli 418을 LB배지에 접종하여 37°C, 200r/min의 조건에서 하루밤 배양한 배양액을 원심분리(4°C, 3 000r/min, 10min)하여 균집한 다음 계놈DNA를 분리하고 이것을 주형으로 *uidA*에 대한 PCR증폭을 진행하였다. PCR산물의 아가로즈겔전기영동상은 그림 1과 같다.

그림 1에서 보는바와 같이 목적하는 β -D-글루쿠로니다제유전자의 크기(1.8kb)에 해당하는 DNA토막이 정확히 나타났다.

2) β -D-글루쿠로니다제유전자의 pGEM[®]-T easy운반체로의 클론화

E. coli 418의 계놈의 PCR증폭산물로부터 증폭된 토막을 회수하고 T4 DNA리가제를 리용하여 pGEM[®]-T easy운반체(3.0kb)와 련결시킨 다음 *E. coli* DH5 α 에 형질전환시켰다.

LB선발평판배지(Amp, 100 μ g/mL)에 형성된 균무지를 LB배지(Amp, 100 μ g/mL)에 접종하여 하루밤동안 배양(37°C, 200r/min)하고 플라즈미드를 분리한 다음 재조합플라즈미드를 주형으로 하여 검정용프라이머와 클론화용프라이머를 리용한 PCR검정을 진행하였다.(그림 2)

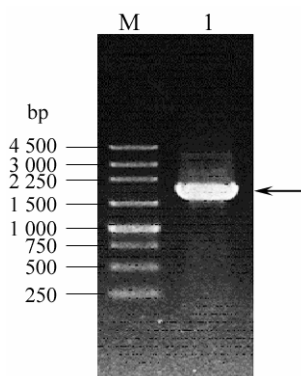


그림 1. *E. coli* 418의 계놈으로부터 β -D-글루쿠로니다제유전자의 PCR증폭결과
M-분자량표식자, 1-PCR산물

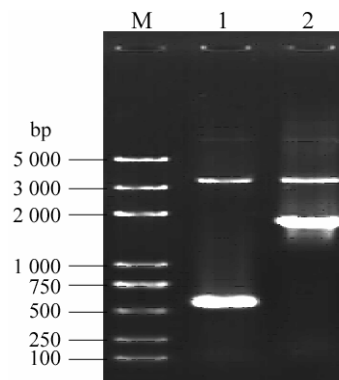


그림 2. *uidA*-T easy운반체의 검정PCR결과
M-분자량표식자, 1-검정PCR산물, 2-전길이PCR산물

그림 2에서 보는바와 같이 약 1.8kb와 0.6kb 크기의 토막들이 정확히 증폭되었다.

또한 제한효소 *Nco* I와 *Hind* III에 의한 2중제한분해, *Hind* III에 의한 단일제한분해를 진행하였다.(그림 3)

그림 3의 2중제한분해상에서 목적하는 1.8kb의 토막과 운반체에 해당하는 3.0kb 토막이 정확히 분해되어 얻어졌으며 단일제한분해상으로부터 선형화된 재조합플라즈미드의 길이가 약 4.8kb 정도라는 것을 알 수 있다. 이상의 결과는 *uidA*_418이 pGEM[®]-T easy 운반체에 정확히 클론화되었다는 것을 보여준다.

3) 대장균 β -D-글루쿠로니다제유전자의 염기배열분석

pGEM[®]-T easy 운반체에 클론화된 유전자의 염기배열과 그에 따르는 추정아미노산배열을 그림 4에 보여주었다. 그림에서 시작코돈(ATG)과 종결코돈(TGA)은 강조체로, 프라이머배열은 밑선체로 표시하였으며 해당하는 제한효소인식배열을 밝혀주었다.

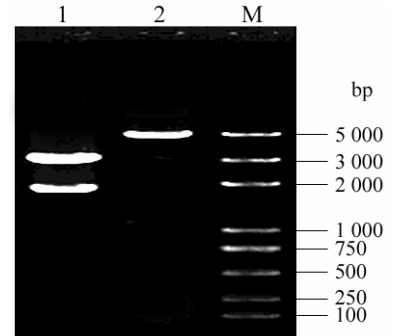


그림 3. *uidA*-T easy 운반체의 제한분해검정
M-분자량표식자, 1-Nco I+Hind III 2중제한분해, 2-Hind III 단일 제한분해

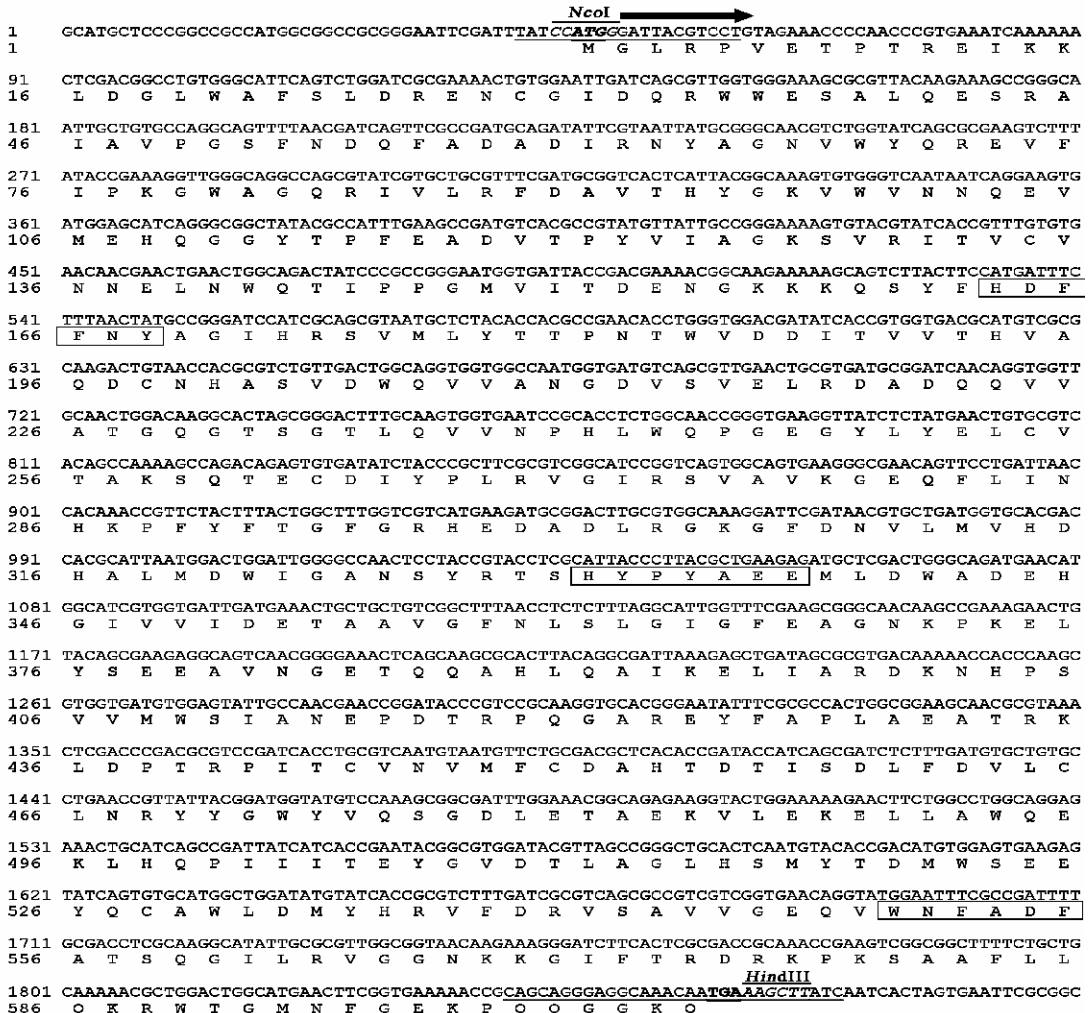


그림 4. *uidA*_418의 염기배열과 그에 따르는 추정아미노산배열

클론화된 대장균 β -D-글루쿠로니다제 유전자 uidA_418의 크기는 1 815bp이고 604개의 아미노산으로 이루어진 폴리펩티드를 암호화한다. 이론적인 분자량은 68.5kD이며 등전점은 pI 5.12이다. 클론화된 배렬에서 Nco I 인식배렬을 리용하기 위하여 시작Met잔기 바로 다음에 도입된 Gly암호배렬(GGA)을 제외한 부분은 이미 등록된 uidA배렬(GenBank 등록번호 NC000913)과 완전히 일치하였다. 또한 아미노산배렬에 다른 세균유래의 β -D-글루쿠로니다제 유전자들과 공통인 3개의 영역(그림에서 테두리선으로 표시함)[3]이 포함되어있었다.

이상의 염기배렬결정결과를 통하여 정확한 읽기틀을 가진 uidA_418이 pGEM[®]-T easy 운반체에 클론화되었다는 것을 알 수 있다.

맺는 말

대장균 *E. coli* 418로부터 클론화한 β -D-글루쿠로니다제 유전자(uidA)는 1 815bp의 길이를 가지고 604개의 아미노산으로 된 폴리펩티드를 암호화한다. 클론화된 유전자배렬은 uidA배렬(GenBank 등록번호 NC000913)과 일치하며 말단에 재조합에 리용할 수 있는 Nco I, Hind III 제한효소인식배렬을 가지고 있다.

참고 문헌

- [1] 김일성 종합대학학보(자연과학), 50, 12, 89, 주체93(2004).
- [2] A. D. Samarajeewa et al.; Letters in Applied Microbiology, 50, 457, 2010.
- [3] Diane Beaud et al.; Microbiology, 151, 2323, 2005.
- [4] 《Neogen》; β -Glucuronidase Reagent Pack, <http://www.neogen.com/Toxicology>, 2012.
- [5] J. Sambrook et al.; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 31~118, 2001.
- [6] 《Sigma Aldrich》; Beta-Glucuronidase from *E. coli* Product Information, Sigma Aldrich Web Site, <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma>, 2012.
- [7] 《Sigma Aldrich》; Enzymatic Assay of β -Glucuronidase(EC 3.2.1.31) from *E. coli*, <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/enzymatic-assay-of-b-glucuronidase-from-ecoli.html>, 2012.

주체105(2016)년 5월 5일 원고접수

Cloning of β -D-Glucuronidase Gene(uidA) from *Escherichia coli*

Jong Sun Im, Kim Ju Song and Kim Chol Ho

A β -D-glucuronidase gene(uidA) cloned from *E. coli* 418 has a length of 1 815bp, encoding a polypeptide of 604 amino acids. The DNA sequence of cloned gene is identical with that of uidA(GeneBank Accession number NC000913), and it contains restriction sites of Nco I and Hind III, which are useful for further recombination.

Key words: *E. coli*, β -glucuronidase gene, uidA