

Bacillus subtilis A1731 피타제유전자의 클론화

김철호, 김주성, 리현광

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《어떻게 해서든지 첨가제문제를 우리 식으로 풀어야 합니다.》(《김정일선집》 증보판 제 20권 294페이지)

피타제는 알곡작물속의 기본항영양인자의 하나인 피린질을 분해하여 린 및 광물질영양을 개선하고 전반적인 소화흡수율을 높이는 작용을 한다. 그러므로 피타제는 먹이첨가제로 리용되는 효소들가운데서 가장 기본적인 효소로 되고있으며 활성과 안정성이 보다 높은 피타제에 대한 요구가 계속 높아지고있다.

우리 나라에서 *Aspergillus niger*[1]나 *Penicillium notatum*[2]을 비롯한 몇가지 곰팡이유래의 피타제에 대한 연구가 진행되었지만 열안정성 및 프로테아제안정성이 보다 높은 세균유래의 피타제에 대한 연구자료는 아직 제기된것이 없다.

우리는 곰팡이피타제에 비하여 안정성이 높은것으로 인정되고있는 *Bacillus subtilis* 피타제의 개발을 목적으로 이 균의 게놈에서 피타제유전자를 클론화하기 위한 연구를 하였다.

재료 및 방법

재료 피타제유전자의 원천균주로는 전문연구소에 보관되어있는 10종의 *Bacillus subtilis* 균주(A34, A157, A179, A1572, A1731, P169, P171, P270, P365, P1718)를 리용하였다.

피타제활성측정 균배양액의 피타제활성은 선행방법[3]으로 측정하였다. 해당한 조건에서 1min동안에 1 μ mol의 무기린을 생성하는 효소량을 효소활성 1U로 정하였다.

유전자조작 균체로부터 게놈DNA와 플라스미드의 분리는 각각 세균게놈분리키트(《TIANGEN》)와 플라스미드분리키트(《TIANGEN》)를 리용하여 진행하였다. 게놈으로부터 피타제유전자의 증폭에는 LA Taq폴리메라제(《TaKaRa》)를 리용하고 검정PCR에는 LC Taq폴리메라제(《Fermentas》)를 리용하였다.

PCR증폭조건은 예비변성 95 $^{\circ}$ C 5min→변성 95 $^{\circ}$ C 30s, 아닐링 56 $^{\circ}$ C 30s, 연장 72 $^{\circ}$ C 90s, 30회 순환→최종연장 72 $^{\circ}$ C 10min이며 반응계구성은 지도서에 준하였다.

피타제 구조유전자의 클론화를 위한 프라이머(phy_상류, phy_하류)와 검정을 위한 프라이머(check_상류, check_하류)를 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에 등록된 *Bacillus subtilis* 피타제유전자들의 배열에 기초하여 다음과 같이 설계하였다.(프라이머에 삽입시킨 제한부위를 밑줄을 그어 표시하였다.)

phy_상류프라이머	5'-GGAGGATCCATGAATCATTCAAAAACACTTT-3'
phy_하류프라이머	5'-TTTAAGCTTTTATTTTCCGCTTCTGTCGGTC-3'

check_상류프라이머 5'-CGGTTTCAGCTTGTACCACAGTCA-3'
check_하상류프라이머 5'-CAGCAGCGTAGTAAATCGTCAGTC-3'

PCR증폭산물을 아가로스겔DNA분리키트(《OMEGA bio-tek》)를 리용하여 분리하고 pGEM[®]-T easy vector (《Promega》)에 클론화하여 CaCl₂법으로 *E. coli* DH5α에 형질전환시켰다. 재조합효소로는 T4 DNA리가제(《Promega》)를, 제한분해검정에는 *Bam*H I와 *Hind* III, *Eco*R I(《TaKaRa》)를 리용하였다. 클론화한 피타제유전자의 염기배열을 전문기관에 의뢰하여 해석하였으며 DNAMAN프로그램을 리용하여 NCBI에 등록된 유전자들과 비교분석하였다. 기타 모든 유전자조작은 표준조작[4]에 준하였다.

결과 및 논의

B. subtilis 게놈에서 피타제유전자의 PCR증폭 10가지 *B. subtilis*균주에 대하여 1% 쌀겨를 포함한 LB배지에서 하루밤 배양하고(37℃, 200r/min) 배양상청액을 수집하여 피타제활성을 측정하였다. 활성이 제일 높은 *Bacillus subtilis* A1731(0.12U/mL)을 선택하여 LB배지에서 하루밤 배양하였다. 배양액을 원심분리하여(4℃, 3 000r/min, 10min) 균집하고 게놈을 분리하여 피타제유전자에 대한 PCR증폭을 진행하였다. PCR산물의 아가로스겔전기영동상은 그림 1과 같다.

그림 1에서 보는바와 같이 *B. subtilis* A 1731의 게놈으로부터 목적하는 피타제유전자의 크기(1.2kb)에 해당하는 명확한 DNA증폭토막이 나타났다.

피타제유전자의 pGEM[®]-T easy vector클론화와 검정 아가로스겔상에서 증폭토막을 분리하여 pGEM[®]-T easy vector에 재조합하고 *E. coli* DH5α에 형질전환시켰다. LB평판(Amp⁺)상의 균무지들에 대하여 콜로니PCR를 진행하여 양성클론을 선발하였다. 선발된 양성클론을 LB배지(Amp 100μg/mL)에서 하루밤 배양하고(37℃, 200r/min) 이로부터 플라스미드를 분리하여 다시 전체 길이의 피타제유전자와 유전자내부 300bp토막에 해당하는 검정PCR를 진행하였다.(그림 2)

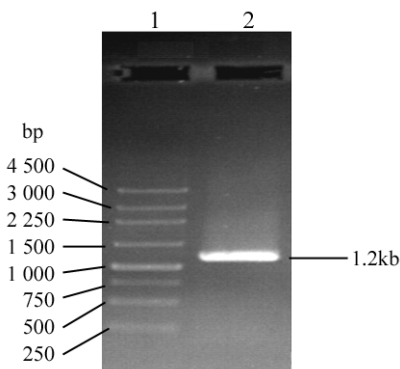


그림 1. *Bacillus subtilis* A1731게놈에서 피타제유전자의 PCR증폭
1-분자량표시자(250bp DNA Ladder Marker, 《TaKaRa》), 2-PCR산물

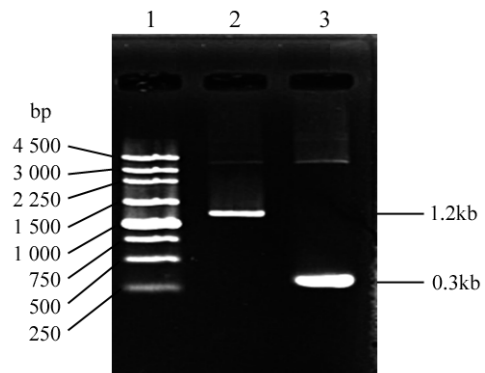


그림 2. pGEM[®]-T easy vector에 클론화한 피타제유전자에 대한 PCR검정
1-분자량표시자(250bp DNA Ladder Marker, 《TaKaRa》), 2-전길이 피타제유전자, 3-내부 300bp토막

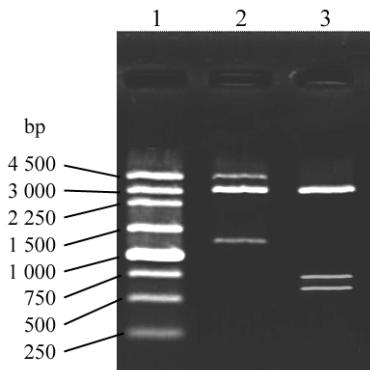


그림 3. pGEM®-T easy vector에 클론화한 피타제유전자에 대한 제한분해검정
1- 분자량표식자(250bp DNA Ladder Marker, 《TaKaRa》), 2- *Bam*H I + *Hind* III 제한분해, 3- *Eco*R I 제한분해

그림 2에서 보는바와 같이 재조합플라스미드로부터 전길이의 피타제유전자와 내부의 300bp토막이 정확히 증폭되었다.

NCBI상에 등록된 *Bacillus subtilis* 피타제유전자들의 배열을 분석해보면 내부에 모두 *Eco*R I 절단점(650bp부근)을 가지고있다. 우리는 재조합플라스미드에 대해 *Bam*H I + *Hind* III의 2중제한분해와 *Eco*R I의 단일제한분해를 진행하였는데 그 결과는 그림 3과 같다.

그림 3에서 보는바와 같이 프라이머에 삽입된 제한부위로 하여 *Bam*H I + *Hind* III 제한분해로 피타제유전자의 전길이에 해당하는 제한토막이 생성되며 피타제유전자내부의 *Eco*R I 제한부위로 하여 약 650bp의 토막과 550bp의 토막이 정확히 생성된다는것을 알수 있다.

클론화된 피타제유전자의 염기배열해석 *Bacillus subtilis* A1731에서 클론화된 피타제의 유전자배열은 그림 4, 그로부터 추정되는 아미노산배열은 그림 5와 같다. *Bacillus subtilis*

A1731 피타제유전자는 1 152bp(383개의 아미노산)의 열린읽기틀을 가지며 620bp근방에 그림 3의 제한분해검정에서 확인된 *Eco*R I 제한부위를 가지고있다. 다른 *Bacillus*속 기원의 피타제들과 마찬가지로 산성피타제들에 잘 보존된 RHGXRXR 헵타펩티드나 HD모티프를 가지고있지 않다. 이론적인 분자량은 41.9kD, 등전점은 4.97이다.

1	CATGGCGGCC	GCGGGAATTC	GATTGGAGGA	TCCATGAATC	ATTCAAAAAC	ACTTTTGTTA
		<i>Eco</i> R I	<i>Bam</i> H I			
61	ACCGCGGCGG	CCGGACTGAT	GCTCACATGC	GGTGC GG TGT	CTTCCCAGGC	AAAGCATAAG
121	CTGTCCGATC	CTTATCATTT	TACCGTGAAT	GCAGCGGCGG	AAACGGAACC	GGTTGATACG
181	GCCGGTGACG	CGGCTGATGA	TCCTGCGATT	TGGCTGGACC	CCAAGACTCC	TCAGAACAGC
241	AAATTGATTA	CGACCAATAA	AAAATCAGGT	TTAGTCGTTT	ACAGCCTTGA	TGGTAAGATG
301	CTTCATTCCCT	ATAATACCGG	GAAGCTGAAC	AATGTCGATA	TCCGTTATGA	TTTTCCGTTG
361	AACGGCAAAA	AAGTCGATAT	CGCGGCAGCA	TCCAATCGGT	CTGAAGGAAA	AAATACCATT
421	GAGATTTACG	CTATTGATGG	AAAAACGGC	ACATTACAAA	GCATGACAGA	TCCAGACCAT
481	CCGATTGCAA	CAGCAATTAA	TGAGGTATAC	GGTTTTACCT	TATACCACAG	TCAAAAAACA
541	GGAAAATATT	ACGCGATGGT	GACAGGAAAA	GAGGGTGAAT	TTGAACAATA	CGAATTAAAG
601	GCGGACAAAA	ATGGATACAT	ATCCGGCAAA	AAGGTACGGG	CGTTTAAAT	GAATTCCCAG
					<i>Eco</i> R I	
661	ACGGAAGGGA	TGGCAGCAGA	CGATGAATAC	GGCAGGCTTT	ATATCGCAGA	AGAAGATGAG
721	GCCATTTTGA	AGTTCAGCGC	CGAGCCGGAG	GGCGGCAGTA	ACGGAACGGT	TATCGACCGT
781	GCCGACGGCA	GGCATTTAAC	TCGTGATATT	GAAGGATTGA	CGATTTACTA	CGCTGCTGAC
841	GGGAAAAGGCT	ATCTGATGGC	ATCAAGCCAG	GGAAACAGCA	GCTACGCCAT	TTATGACAGA
901	CAAGGAAAGA	ACAAATATGT	TGCGGATTTT	CGCATAACAG	ACGGTCTTGA	AACAGACGGG
961	ACAAGCGATA	CAGACGGAAT	TGACGTTCTG	GGTTTCGGAC	TGGGGCCTGA	ATATCCGTTT
1021	GGTATTTTTG	TCGCACAGGA	CGGTGAAAAT	ATAGATCACG	GCCAAAAGGC	CAATCAAAAT
1081	TTTAAAATCG	TGCCATGGGA	AAGAATTGCT	GATCAAATCG	GTTTCCGCCC	GCTGGCAAAT
1141	GAACAGTTTG	ACCCGAGAAA	ACTGACCGAC	AGAAGCGGAA	AAATAAAGCT	TAAAAATCAC
					<i>Hind</i> III	
1201	TAGTGAATTC	GCGGCCGCCT	GCAGGTCGAC	CATATGGGAG	AGCTCCCAAC	GCGTA
	<i>Eco</i> R I					

그림 4. T easy vector에 클론화한 *Bacillus subtilis* A1731 피타제유전자의 염기배열 구조유전자의 시작코돈(ATG)과 종결코돈(TAA)을 강조체로 표시하였다. T easy vector의 다중클론화부위(MCS)에 있는 *Eco*R I 제한부위와 상류, 하류프라이머에 삽입한 *Bam*H I 및 *Hind* III 제한부위, 그리고 구조유전자내부의 *Eco*R I 제한부위를 밑줄을 그어 표시하였다.

1	MNHSKTLTLLT	AAAGLMLTCG	AVSSQAKHKL	SDPYHFTVNA	AAETEPVDTA
51	GDAADDPAIW	LDPKTPQNSK	LITTNKKSGL	VVYSLDGKML	HSYNTGKLNN
101	VDIRYDFPLN	GKKVDIAAAS	NRSEGKNTIE	IYAIDGKNGT	LQSMTDPDHP
151	IATAINEVYG	FTLYHSQKTG	KYYAMVTGKE	GEFEQYELKA	DKNGYISGKK
201	VRAFKNMSQT	EGMAADDEYG	RLYIAEEDDA	IWKFSAPDGA	GSNGTVIDRA
251	DGRHLTRDIE	GLTIYYAADG	KGYLMASSQG	NSSYAIYDRQ	GKNKYVADFR
301	ITDGPETDGT	SDTDGIDVLG	FGLGPEYFPG	IFVAQDGENI	DHGQKANQNF
351	KIVPWERIAD	QIGFRPLANE	QVDPKRLTDR	SGK-	

그림 5. *Bacillus subtilis* A1731 피타제의 아미노산배열

Bacillus subtilis A1731 피타제의 아미노산배열은 *Bacillus*속 피타제들과 높은 상동성을 나타낸다. 대표적으로 *B. subtilis* US417 피타제[5](GeneBank등록번호: AM501550)와 비교해보면 단 1개의 아미노산(257번 Pro이 *B. subtilis* A1731피타제에서 Arg으로 치환되었다.)만이 차이난다.(상동성 99.7%) 그것도 누클레오티드배열상에서 보면 CDS영역의 770번 C가 G로 치환된 결과이다. 한편 *B. subtilis* IDCC 1102 피타제(DQ346197)와는 94.3%, *B. subtilis* E20 피타제(FJ541287)와는 94.0%, *Bacillus* sp. DS11 피타제(U85968)와는 93.5%, *B. amyloliquefaciens* DSM1061 피타제(HM747163)와는 98.7%의 상동성을 가졌다.

이상의 결과를 종합하여보면 피타제유전자를 정확히 클론화하였다는것을 알수 있다.

맺 는 말

Bacillus subtilis A1731의 게놈에서 피타제유전자를 클론화하였다.

클론화된 피타제유전자는 1 152bp의 열린읽기틀을 가지고 383개의 아미노산으로 구성된 효소단백질을 암호화한다.

B. subtilis A1731의 피타제는 *Bacillus*속기원의 다른 피타제들과 90%이상의 높은 상동성을 가진다.

참 고 문 헌

- [1] 최정길 등; 생물학, 1, 38, 주체94(2005).
- [2] 한광혁; 생물학, 4, 29, 주체100(2011).
- [3] T. T. Thi et al.; J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 37, 279, 2010.
- [4] J. Sambrook et al.; Molecular Cloning: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [5] F. Ameny et al.; Mol. Biotechnol., 40, 127, 2008.

주체104(2015)년 1월 5일 원고접수

Cloning of *Bacillus subtilis* A1731 Phytase Gene

Kim Chol Ho, Kim Ju Song and Ri Hyon Gwang

A novel phytase gene was cloned from the genome of *Bacillus subtilis* A1731 using PCR. The cloned gene of phytase has an open reading frame of 1 152bp length, and it codes phytase protein consisted of 383 amino acids. The phytase gene has a high similarity of more than 90% with other phytase genes originated from other strains of *Bacillus* genus.

Key words: phytase, *Bacillus subtilis*, gene cloning