

대장균(*Escherichia coli*)에서 리보솜단백질 S13의 C-말단에서의 변이를 위한 재조합에 관한 연구

김창일, 한경애

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《세계선진과학기술을 받아들여 우리의 과학기술을 높은 수준으로 발전시켜야 우리 나라 혁명과 건설에서 나서는 과학기술적문제들을 성과적으로 풀어나갈수 있으며 자력갱생의 원칙도 더 잘 관철할수 있습니다.》(《김정일선집》 증보판 제15권 500페이지)

리보솜은 세포내에서 단백질합성을 진행하는 거대생물분자복합체로서 생물의 성장과 물질생산에서 중요한 역할을 수행한다. 리보솜을 이루는 때 구성성분들의 기능을 밝혀내기 위한 연구의 한 고리로 우리는 리보솜단백질 S13의 C-말단영역의 기능을 밝혀내기 위하여 이 배렬에서 변이된 네가지 종류의 재조합균주를 얻어내기 위한 연구를 하였다.

재료 및 방법

균주 및 플라스미드 대장균으로 *Escherichia coli* JE28을 리용하였다.

플라스미드로서 pND707과 람다레드재조합을 위한 플라스미드 pSIM5를 리용하였다.[1]

균배양 및 플라스미드형질전환방법(폴리에틸렌글리콜법: PEG법) 대장균을 37°C LB배지(10mL)에서 하루밤 배양하였다. 배양된 대장균을 멸균한 LB배지로 100배 희석한 다음 다시 OD₆₀₀값이 0.5정도로 되도록 37°C에서 1h 40min동안 배양하였다. 균배양액을 얼음속에 2min 동안 방치시켜 팽각시킨 다음 원심분리관에 옮기고 4°C, 4 000 r/min에서 15min간 원심분리하였다.(원심분리기 《Eppendorf 5417C》) 상등액은 버리고 침전된 대장균을 팽각시킨 5 mL

의 TSB완충용액(PEG 4 000 10%, 디메틸설폭시드 DMSO(《Sigma》) 5%, MgCl₂ 10mmol/L, MgSO₄ 10mmol/L을 LB배지에 푼 용액)에 다시 용해시킨 다음 얼음속에 10min간 넣어두었다. 이때 대장균은 형질전환감수성세포로 되었다.

20ng의 pSIM5플라스미드(그림 1, 클로람페니콜저항성유전자(*cat*)를 선발표식자로 가지고있으며 람다레드재조합에 필요한 효소들인 Gam, Beta, Exo의 유전자들을 가지고있다.)를 10 μ L의 KCM완충용액(0.1mol/L KCl, 30mmol/L CaCl₂, 50mmol/L MgCl₂)에 풀고 얼음속에서 팽각시킨 다음 여기에 감수성세포 100 μ L를 넣고 섞은 다음 얼음속에 20min동안 방치해두었다. 다음

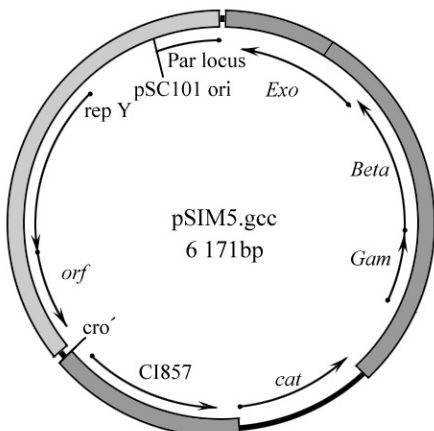


그림 1. pSIM5플라스미드의 구조

여기에 1mL의 LB배양액을 넣은 다음 37°C에서 1h동안 진탕배양하고 원심분리하여 대장균을 모은 다음 적은량의 LB액체배지에 다시 풀고 선발용LB고체배지(클로람페니콜 50 µg/mL)에서 선발하였다. 대조구는 플라스미드를 넣지 않고 같은 형질전환과정을 거치도록 하였다. 얻어진 대장균은 램다레드재조합에 필요한 효소들을 발현시킬수 있는 pSIM5플라스미드를 가지고있다.[2]

삽입DNA토막의 합성 및 분리 삽입DNA토막은 램다레드재조합기술에 의하여 대장균 리보솜단백질 S13유전자(*rpsM*)의 종결코돈(TAA)의 앞에 끼여들어갈수 있도록 랑끝말단에 상동배열을 가지도록 설계하였다. 서로 다른 네가지 C-말단을 가진 균주를 재조합하기 위해 서로 다른 4개의 삽입DNA토막을 선행방법[4]대로 합성하였다.

삽입DNA토막은 pND707의 암피실린저항성유전자(*bla*)을 주형으로 하여 표 1에 있는 네가지 서로 다른 정방향프라이머와 1개의 공통인 역방향프라이머를 리용하여 증폭하였다. 표에 있는 프라이머배열에서 강조체(정체)로 표시한것은 암피실린저항성유전자와 상동인 배열이며 두 밑줄로 표시된 배열은 S13단백질의 변화시키려는 C-말단을 암호화하는 염기배열이며 한밑줄로 표시된 배열은 Shine-Dalgarno배열로서 리보솜이 인식하여 단백질합성을 시작하도록 하는 배열이며 강조체(사체)로 표시한것(TAA)은 종결코돈이다.

표 1. PCR증폭을 위하여 리용한 프라이머들의 배열

프라이머이름	배열(5'-3')	프라이머길이
S13a F	ACCAAGACCAACGCACGTACCCGTAAGGGTCCGCGCAAA TAAT GAAAAAGGA GAGT ATGAGTATTCAACATTTC	75
S13b F	GACCAACGCACGTACCCGTAAGGGTCCGCGCAAA ACGGTGGCGGGCAAGAAG AAGTAAT GAAAAAGGAGAGT ATGAGTATTCAACATTTC	91
S13c F	AACGCACGTACCCGTAAGGGTCCGCGCAAA ACGGTGGCGGGCAAGAAGAAG CCCCGAGGAAGTAAT GAAAAAGGAGAGT ATGAGTATTCAACATTTC	99
S13d F	CACGTACCCGTAAGGGTCCGCGCAAA CCGATCAAGAAATAAT GAAAAAGGAG AGTATGAGTATTCAACATTTC	74
S13 R	CGTGCACGAATTGGTGCCTTTGCCATTATTCAATCACCCG ATTACCAATGC TTAATCAGTG	62

증폭한 삽입DNA토막을 1% 아가로즈겔전기영동방법으로 분리하고 겔로부터 DNA를 겔 분리키트(《Qiagen》)를 리용하여 분리정제하였다. 얻어진 목적DNA카세트를 배열분석하여 정확히 증폭되었는지를 확인하였다.

람다레드재조합기술에 의한 대장균에서의 재조합방법 pSIM5형질전환된 대장균주를 30°C 50 µg/mL 클로람페니콜이 들어있는 LB배지에서 하루밤 배양한다. 배양액을 다음날 70배로 희석한 다음 OD₆₀₀값이 0.5정도가 되도록 30°C에서 2h 20min동안 진탕배양한다. OD₆₀₀값이 0.5정도에 이르면 플라스크를 42°C 수욕조에 옮기고 15min동안 천천히 흔들어준다. 이것을 다시 얼음속에서 급격히 랭각시키고 10min동안 방치해둔 다음 4°C의 10% 글리세린용액으로 2~3번정도 씻어 용액속에 들어있는 염을 완전히 제거한다. 다음 4°C, 4 000 r/min에서 15min 동안 원심분리하여 균을 침전시킨 다음 300 µL 정도의 찬 증류수에 용해시켜 형질전환가능성세포를 얻는다.[3]

형질전환감수성세포 40 µL에 끼워넣으려는 선형DNA를 300~500ng정도 섞고 얼음속에 5min이상 놓아둔다. 이 섞은 용액을 미리 랭각시킨 전기천공큐벳에 넣고 2.5kV, 200 Ω, 25 µF에서 전기천공을 진행한다. 전기천공후 인차 1mL의 LB를 넣고 30°C에서 5h정도 진

탕배양한 다음 선발배지(50 $\mu\text{g/mL}$ 암피실린이 든 LB고체배지)에서 선발한다.

선발후 DNA토막이 정확히 끼워들어갔는가를 콜로니PCR와 배열분석방법으로 확인한다. 아가로스겔전기영동상으로부터 DNA를 겔분리키트를 리용하여 분리하고 프라이머(5'-GTTGCCAAATTTGTCGTTGA-3')를 리용하여 썬거법으로 염기배열을 분석하였다.

결과 및 논의

1) 삽입DNA토막의 합성 및 특성

PCR반응을 통하여 네가지 종류의 삽입DNA토막들(S13a, S13b, s13c, S13d)을 합성하여

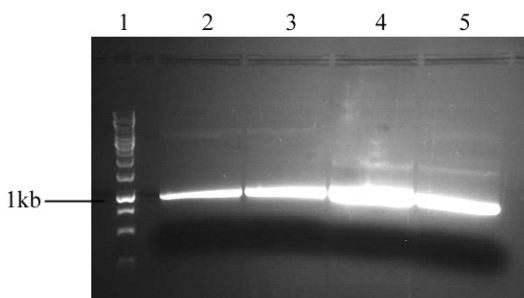


그림 2. PCR를 리용하여 합성한 삽입DNA토막들

1-분자량표식자, 2-S13 a, 3-S13 b, 4-S13 c, 5-S13 d

아가로스겔전기영동으로 확인한 결과는 그림 2와 같다.

그림 2에서 보는바와 같이 목적DNA토막들의 길이는 거의 1kb로서 그 차이는 거의 없으나 재조합으로 끼여들어가 *rpsM*유전자의 3'-배열에서 변화시키는 염기배열은 서로 다르다.

아가로스겔로부터 분리한 삽입DNA토막들의 특성은 표 2와 같다.

표 2에서 보는바와 같이 얻어진 DNA토막들의 농도는 200~300ng/ μL 정도이고 A_{260}/A_{280} 은 1.8정도로써 분리순도가 높았다.

삽입DNA토막들은 암피실린저항성유전자를 표식유전자로 가지고있으며 이 유전자의 발현을 위한 SD배열과 함께 랑끝에는 상동배열들을 가지고있다. DNA토막들마다 5'-말단부분의 상동배열위의 염기배열은 차이나는데 이

배열에 의하여 *rpsM*유전자의 염기배열에서 변이가 일어나게 되며 결과 리보솜단백질 S13의 C말단영역이 차이나는 재조합균주들이 얻어지게 된다.(그림 3)

표 2. 아가로스겔로부터 분리한 DNA카세트들의 특성

목적DNA	길이 /bp	A_{230}	A_{260}	A_{280}	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	농도 /(ng· μL^{-1})
S13 a	959	14.46	3.78	2.03	1.86	0.26	189.2
S13 b	975	14.77	4.98	2.69	1.85	0.34	249.1
S13 c	983	13.71	5.09	2.76	1.85	0.37	254.7
S13 d	958	13.06	5.89	3.16	1.86	0.45	269.4

S13 a	ACCAAGACCAACGCACGTACCCGTAAGGGTCCGCGCAAA TAA TGAAAAAGGAGAGT----- 암피실린저항성 유전자 <i>Bla</i> -----TCGGGGTGATTGAATAATGGCAAAGGCACCAATTCGTGCACG
S13 b	GACCAACGCACGTACCCGTAAGGGTCCGCGCAAAACGGTGGCGGGCAAGAAGAAG TAA TGAAAAAGGAGAGT----- 암피실린저항성유전자 <i>Bla</i> -----TCGGGGTGATTGAATAATGGCAAAGGCACCAATTCGTGCACG
S13 c	AACGCACGTACCCGTAAGGGTCCGCGCAAAACGGTGGCGGGCAAGAAGAAGGCCCGAGGAAG TAA TGAAAAAGGAGAGT----- 암피실린저항성유전자 <i>Bla</i> -----TCGGGGTGATTGAATAATGGCAAAGGCACCAATTCGTGCACG
S13 d	CACGTACCCGTAAGGGTCCGCGCAAAACCGATCAAGA TAA TGAAAAAGGAGAGT----- 암피실린저항성 유전자 <i>Bla</i> -----TCGGGGTGATTGAATAATGGCAAAGGCACCAATTCGTGCACG

그림 3. 유전자증폭하여 얻은 네가지 종류의 DNA카세트들의 배열정보 밑줄로 표시한것은 *rpsM*유전자의 3'-말단에서 변화시키려는 배열, 사체로 표시한것은 SD배열, 네모칸으로 표시한것은 pND707플라스미드에 있던 암피실린저항성유전자의 배열(861bp)이고 강조체로 표시한것(**TAA**)은 종결코돈임

2) 람다레드재조합이 진행된 균주의 선발

4종류의 DNA카세트를 재조합시켜 선발배지에서 얻은 새로운 균주들을 각각 CIK1655a, CIK1655b, CIK1655c, CIK1655d라고 이름지었다.(표 3)

표 3. 새로 재조합된 균들의 이름과 특성

출발균주	재조합된 균주이름	암피실린저항성	S13단백질의 아미노산수/개
<i>Escherichia coli</i> JE28	<i>Escherichia coli</i> CIK28a	+	114
"	" CIK28b	+	121
"	" CIK28c	+	125
"	" CIK28d	+	118

표 3에서 보는바와 같이 재조합이 일어난 균들은 암피실린저항성을 가지며 선발배지에서 잘 자란다. 네가지 재조합균들의 *rpsM*유전자의 길이는 서로 각이하며 이로부터 발현되는 S13단백질의 아미노산수가 차이나게 된다.

선발된 재조합균들을 콜로니PCR를 리용하여 재조합유무를 확인하였다. PCR를 통하여 증폭된 DNA들을 아가로즈겔에서 전기영동한 결과 그림 4에서 보는바와 같이 삽입DNA토막이 재조합된 네가지 균에서는 대조에 비해 1kb정도 더 긴 DNA토막이 증폭되었다. 겔로부터 DNA를 분리하여 배렬분석한 결과 삽입DNA토막이 *rpsM* 유전자의 3'-말단에 정확히 삽입되었다는것을 검증하였다.

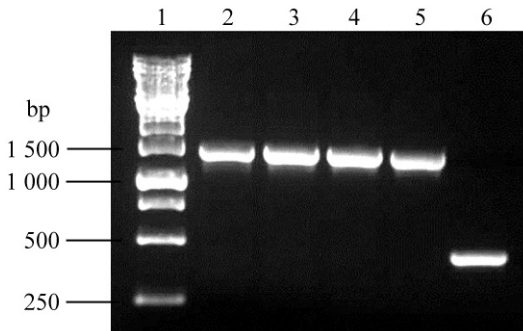


그림 4. 콜로니PCR를 리용한 재조합의 분자적검증을 보여주는 아가로즈 겔전기영동상

1-분자량표식자, 2-CIK28a, 3-CIK28b, 4-CIK28c, 5-CIK28d, 6-JE28

맺 는 말

1) 람다레드재조합을 리용하여 네가지 종류의 목적DNA카세트를 대장균계놈의 *rpsM* 유전자마감령역에 정확히 삽입하였다.

2) 람다레드재조합기술을 리용하여 대장균리보솜단백질 S13의 C-말단배열을 변화시킨 새로운 균주를 만들어냈다.

참 고 문 헌

- [1] S. K. Sharan et al.; Nature Protocols, 4, 2, 206, 2009.
- [2] C. R. Hillyar; Biosciencehorizen, 5, 1, 2012.
- [3] Y. Zhang et al.; Nature Genetics, 20, 123, 1998.
- [4] A. R. Cukras et al.; Journal of Molecular Biology, 349, 47, 2005.

주체103(2014)년 8월 5일 원고접수

A Study on Recombination for Variance of C-terminal Tail of the Ribosomal Protein S13 in *Escherichia coli* using λ -Red Recombineering

Kim Chang Il, Han Kyong Ae

In this study, we engineered new strains which have different C-terminal tail of the ribosomal protein S13 in *Escherichia coli*. In order to utilize the λ -red recombineering, pSIM5 plasmid was transformed into *E. coli*; firstly. Four different DNA cassettes were amplified from pND707 plasmid and transformed into *E. coli* cells by electroporation. Recombined cells were selected on the ampicillin plate. Selected recombined cells were then confirmed by the colony PCR and sequencing. 4 different DNA cassettes were inserted in the correct site of the 3' end of the *rpsM*.

The new strains will be used for further research.

Key word: ribosomal protein S13