

***Brevibacterium divaricatum*의 제한효소 Bdi I 특성**

김용석 · 노현모

서울대학교 자연과학대학 동물학과

Characterization of the Restriction Endonuclease Bdi I from *Brevibacterium divaricatum*

Kim, Yong-Sok and Hyune-Mo Rho

Department of Zoology, Seoul National University, Seoul 151, Korea.

A new type II restriction endonuclease, Bdi I, has been isolated from *Brevibacterium divaricatum* FERM 5948 by procedures of ammonium sulfate fractionation, DEAE-cellulose chromatography and heparin agarose chromatography. The purified Bdi I restriction endonuclease had the same cleavage patterns of Cla I whose recognition sequence is 5' ATCGAT 3'. From the result that λ -Cla I DNA fragment could be cloned in pBR 322 digested with Bdi I, it has been proven that Bdi I cuts between T and C (5' AT / CGAT 3') within the recognition sequence and produces 5' pCG cohesive end. The optimal temperature for the Bdi I restriction endonuclease activity was 37°C, and optimal salt (NaCl) concentration was 50-100 mM.

거의 모든 미생물은 restriction - modification (R/M) 체계를 가진다 (Roberts, 1985). 이 R/M 체계는 DNA 상의 특정 염기서열을 인지하여 자르는 제한효소 (restriction endonuclease) 와 그 제한효소가 인지하는 염기서열 내의 특정 염기를 수정하여 제한효소로부터 DNA가 방호받게 하는 methylase 로 구성되는데 미생물 자체의 유전자를 보존하고 외부로부터 다른 DNA가 박테리아 내로 들어오는 것을 방지하는데 중요한 역할을 한다 (Arber, 1965). 그러므로 어떤 미생물 내에서의 원활한 유전자 조작용 위해서는 그 미생물의 R/M 체계를 잘 살피는 것이 중요하다.

본 실험에서는 산업적으로 유용한 미생물인 *Brevibacteria* 와 *Corynebacteria* 내에서의 유

전자조작을 위한 숙주-유전자운반체 체계 연구의 일환으로 여러 균주의 R/M 체계를 조사하던 중 숙주내에 플라스미드를 가지지 않는 *Brevibacterium divaricatum* FERM 5948 균주를 선정하여 이 균주가 유전자재조합시 숙주로서의 사용가능성을 검토하기 위하여 R/M 체계 중의 하나인 Bdi I 제한효소를 분리하여 그 특성을 연구하였다. 분리한 Bdi I 제한효소는 5' ATCGAT 3' 을 인지하여 T와 C 사이를 자르는 Cla I 제한효소와 isoschizomer 로 밝혀졌다. 이 Bdi I 제한효소는 처음으로 보고되는 것으로 숙주-벡터체계연구 뿐 아니라 이미 밝혀진 다른 제한효소 처럼 유전자재조합에 유용하게 사용되리라 생각된다.

재료 및 방법

시약

DEAE-cellulose (DE-52)는 Whatman 에서 구입하였고 heparin agarose는 Bickle 등(1978)의 방법을 참고로하여 CNBr-activated Sepharose 4B (Pharmacia Fine Chemicals)를 이용하여 만들었다. agarose를 비롯한 다른 시약들은 주로 Sigma 제품을 이용했다.

균주 및 배지

Bdi I 제한효소를 분리하기 위한 *Brevibacterium divaricatum* FERM 5948은 고영희박사(한국과학기술원)로부터 분양받았고 균주는 BY배지 (Bactotryptone 10g, Beef extract 5g, NaCl 5g per liter)로 30°C에서 late log phase까지 진탕배양한 뒤 수확하여 사용하였다. 형질전환용으로는 *E. coli* HB 101(F⁻, r⁻, m⁻, recA13)을 LB배지에 키워 사용하였다.

DNA와 효소

pBR 322 플라스미드는 *E. coli* HB101에 pBR 322가 들어있는 균주로부터 알칼리법(Birnboim and Doly, 1979)으로 추출한 뒤 CsCl-ethidium bromide 초원심분리법(Clewell, 1972)으로 추출하였고 λ DNA는 *E. coli* W3110을 이용하여 열유도 후 표준방법(Maniatis et al., 1982)으로 추출하였다. φX174 RF DNA는 Bethesda Research Laboratories(BRL)에서 구입하여 사용하였다. 사용한 제한효소와 T₄ DNA ligase는 BRL이나 New England Biolab에서 구입하였다. 효소반응에 필요한 완충용액이나 반응방법은 달리 지시하지 않는 한 Maniatis 등(1982)의 방법을 따랐다.

Bdi I 제한효소의 활성측정

Column분획의 Bdi I 제한효소의 활성은 20 μl의 반응용액(90mM Tris-HCl, pH 7.4, 10mM MgCl₂, 0.2 μg of pBR 322 DNA)에 효소분획 1 μl를 넣고 37°C에서 20분간 반응시킨 후 4 μl의 stopping buffer (0.9mM EDTA, 0.01% bromophenol blue, 40% sucrose)를 넣은 뒤 0.8% agarose gel로 전기 영동하여 측정하였다. 효소 1 unit는 λ DNA 1 μg을 50 μl의 반응용액에서 1 시간내에 완전히 자르는

것으로 하였다. 분리한 Bdi I 제한효소의 NaCl 농도에 따른 활성의 정도는 많이 사용하는 표준완충용액(10mM Tris-HCl, pH 7.5, 10mM MgCl₂, 1mM dithiothreitol)을 기준으로 하여 NaCl을 첨가하여 농도가 50mM, 100mM, 150mM, 200mM 되제한 후 각 반응용액 20 μl에 λ DNA (0.7 μg) 또는 pBR 322 DNA (0.2 μg)을 넣고 1 unit의 Bdi I 제한효소로 37°C에서 30분간 반응시켰다.

Bdi I 제한효소의 인지부위 (recognition site) 결정

Bdi I 제한효소의 인지부위는 pBR 322DNA를 여러가지 제한효소(EcoRI, BamHI, PstI, SphI, AvaI, HpaII)와 Bdi I으로 codigestion 또는 3가지 효소를 동시에 처리하여 1.5% agarose gel로 전기 영동하여 pBR 322 내에 Bdi I 제한효소가 자르는 위치를 mapping한 후 최종적으로 λ DNA를 이용하여 결정하였다. 반응용액은 common digestion buffer (33mM Tris-HCl, pH 7.0, 66mM potassium acetate, 10mM magnesium acetate, 0.5mM dithiothreitol) 20 μl에 pBR 322 (0.3 μg)을 넣고 사용한 각 효소를 1 unit씩 넣어 37°C에서 1시간 반응시켰다 (λ DNA의 경우는 0.7 μg 사용). Bdi I 제한효소의 cleavage mode 결정은 pBR 322 (0.3 μg)을 Bdi I 제한효소(1 unit)로 자른 것을 벡터로 하여 λ DNA (0.5 μg)를 Sal I, Cla I, 그리고 Hinc II로 각각 자른 DNA를 넣어주고 T₄ DNA ligase (0.2 unit)로 ligation시킨 후 *E. coli* HB101에 형질전환시켜 나온 클론을 분석하였다. 재조합 플라스미드의 분리는 알칼리법으로 추출하였고 반응용액이나 클로닝 과정은 Maniatis 등(1982)의 방법을 이용하였다.

결과 및 고찰

Bdi I 제한효소의 분리

수확한 10g의 균체를 잘 세척한 뒤 20ml의 sonication buffer (50mM Tris-HCl, pH 8.0, 10mM β-mercaptoethanol, 1mM EDTA)에 잘 섞어 0°C에서 파쇄시킨 뒤 위 완충용액을 더 넣어 40ml로 만든다음 100,000 × g에서 1

시간 초원심분리하여 상층액을 얻었다 (crude extract: 40 ml). 이 효소용액의 적은양을 이용하여 몇 퍼센트의 ammonium sulfate 용액에서 Bdi I 제한효소의 침전이 일어나는가를 알아 본 결과 35~50% 사이에서 침전이 일어났다(data not shown). 그래서 이 효소용액에 분말 ammonium sulfate를 서서히 가하여 (최종 30%) 필요없는 부분을 침전시키고 12,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액을 얻고 여기에 분말 ammonium sulfate를 더 넣어 (최종 50%) Bdi I 제한효소를 침전시켰다. 여기서 얻은 침전물을 DEAE-cellulose (DE-52) column buffer (Buffer A; 20 mM sodium phosphate, pH 7.4, 0.1 mM EDTA, 5 mM β -mercaptoethanol, 5% glycerol)에 잘 녹여 4°C에서 동일 완충용액으로 12시간 투석시켰다. 투석이 끝난 효소용액은 DE-52 column (1.5 × 20 cm)에 붙이고 Buffer A로 잘 씻어 준 뒤 200 ml의 salt gradient (0-0.5 M NaCl)로 시간당 10 ml씩 용출시키고 각 2 ml 짜리 100개의 분획을 받아 Bdi I 제한효소 활성을 조사하였다(Fig. 1). Bdi I 제한효소는 약 0.15 M 정도에서 용출되었고 활성이 높은 분획만 모아(20 ml) Buffer B(Buffer A+0.05 M NaCl)로 충분히 투석시킨 뒤 heparin agarose column(1 × 7 cm)에 부착시켰다. 100 ml의 salt

gradient (0.05 M-0.6 M NaCl)로 용출시켜 (flow rate: 5 ml/hr) 각 1 ml씩 100개의 분획을 받아 효소활성을 조사하여(Fig. 2) 활성이 높은 부분만 모아(10 ml) 50% glycerol이 들어 있는 Buffer A로 투석시켜 농축시킨 뒤 효소의 특성연구에 사용하였다. Bdi I 제한효소는 세포 g당 3,000 unit의 효소를 얻었고 18개월이 지나도 효소활성이 90% 이상 유지되었다. 또한 column분획의 다른 부분에서는 효소활성이 나타나지 않는 것으로 보아 *Brevibacterium divaricatum* FERM 5948 균주에는 Bdi I 한 종류의 제한효소만 존재하는 것으로 추측된다.

Bdi I 제한효소의 인지부위(recognition site) 결정

Brevibacterium divaricatum FERM 5948 균주로부터 제한효소의 분리는 처음으로 보고되는 것이기 때문에 Bdi I 제한효소의 인지부위와 자르는 법(cleavage mode)을 알아보는 것이 중요하다.

우선 여러 DNA를 Bdi I으로 잘라 보았는데 pBR 322는 한군데만, λ DNA는 열군데 이상 잘랐고, $\phi \times 174$ RF DNA는 한군데도 자르지 않았다(Fig. 3). Bdi I 제한효소가 현재까지 밝혀진 제한효소의 isoschizomer일 가능성이 많으므로 한군데만 자르는 pBR 322를 이용하여 플라스미드 상의 자르는 부위를 mapping 하였다. pBR 322를 Bdi I으로 자른 뒤 이것



Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of pBR 322 DNA digested with enzyme fractions obtained from DEAE-cellulose column. The reaction conditions were described in Materials and Methods. Fraction numbers are indicated on the top of the gel. S, supercoiled form; OC, open circular form; L, linear form.

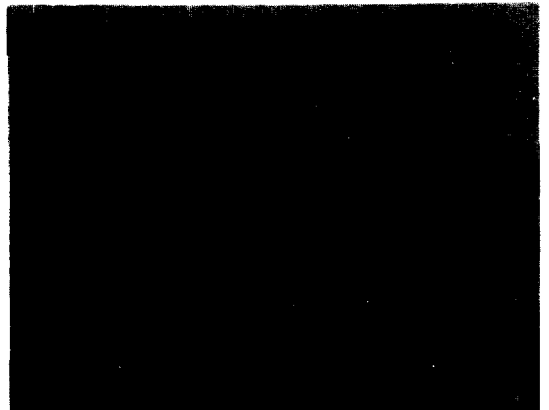


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of pBR 322 DNA digested with enzyme fractions obtained from heparin agarose column.

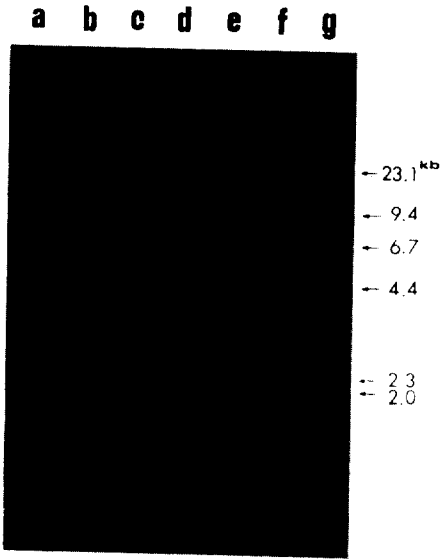


Fig. 3. *Bdi I* cleavage pattern of substrate DNA.
lane a, pBR 322; b, pBR 322 + *Bdi I*; c, ϕ x174 RF DNA d, ϕ x174 RF DNA + *Bdi I*; e, λ DNA; f, λ DNA + *Bdi I*; G, λ DNA + Hind III.

을 다시 *EcoR I*, *BamH I*, *Pst I*, 그리고 *Ava I* 으로 잘라보면 *EcoR I* 위치에서 떨어질 수록 큰 DNA 조각이 생기는 것으로 보아 *Bdi I* 위치가 *EcoR I* 위치에 가깝게 있음을 알 수 있었다 (data not shown). 그래서 *EcoR I* 위치로 부터 ampicilin 내성 유전자 (Ap^r) 쪽인지 tetracycline 내성 유전자 (Tc^r) 쪽인지 좀더 자세히 알아보기 위하여 (Fig. 4) pBR 322 DNA를 *EcoR I* 과 *Sph I* (lane b), *EcoR I* 과 *Pst I* (lane d)로 codigestion 시키고 각각을 *Bdi I* 으로 다시 잘라 본 결과 *Pst I* 쪽으로 자른 것은 변화가 없고 (lane e) *Sph I* 쪽으로 자른 것은 조금 더 작은 DNA 조각이 생기는 것으로 보아 (lane c) *Bdi I* 위치가 Tc^r 유전자 쪽으로 위치함을 알 수 있었다. 또한 pBR 322를 *Hpa II* 와 *Bdi I* 으로 codigestion 시키면 (lane g) 622 bp 짜리가 없어지고 529 bp보다 조금 작은 새로운 band가 생기는 것으로 보아 (화살표) *EcoR I* 위치로 부터 35 ± 10 bp 정도에 위치함을 알 수 있었다. pBR 322 DNA를 한군데만 자르고 위와 같은 위치에 있는 제한 효소로는 *Cla I* 과 *Hind III* 가 있는데 λ -*Bdi I* 의 pattern이 λ -*Hind III* 의 pattern과 틀리므로 (Fig. 3) λ

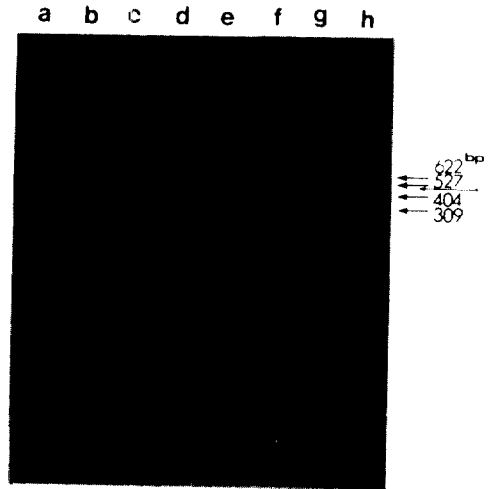


Fig. 4. Determination of *Bdi I* cleavage site on pBR 322 DNA. Details are described in the text.
lane a, pBR 322 + *EcoR I*; b, pBR 322 + *EcoR I* + *Sph I*; c, pBR 322 + *EcoR I* + *Bdi I*; d, pBR 322 + *EcoR I* + *Pst I*; e, pBR 322 + *EcoR I* + *Pst I* + *Bdi I*; f, pBR 322 + *Hpa II*; g, pBR 322 + *Hpa II* + *Bdi I*; h, λ DNA + *Bdi I*.

-*Cla I* 의 pattern과 서로 비교해 보았다. Fig. 5에서 보듯이 λ -*Cla I* (lane d)과 λ -*Cla I* + *Bdi I* (lane e), λ -*Bdi I* (lane f)의 자르는 pattern이 일치하는 것으로 보아 *Bdi I* 제한효

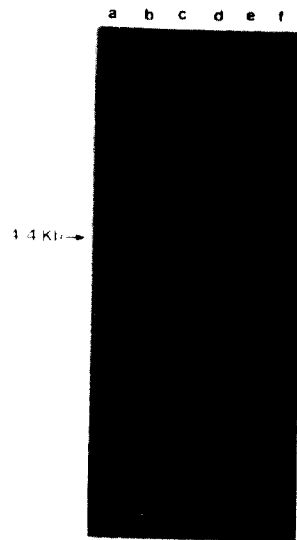


Fig. 5. Comparison of cleavage pattern of pBR 322 and λ DNA digested with *Cla I* and *Bdi I* restriction endonucleases.
lane a, pBR 322 + *Cla I*; b, pBR 322 + *Cla I* + *Bdi I*; c, pBR 322 + *Bdi I*; d, λ DNA + *Cla I*; e, λ DNA + *Bdi I*; f, λ DNA + *Bdi I*.

소의 인지부위는 Cla I 과 같은 5' ATCGAT3' 임을 알 수 있었다. Cla I 의 isoschizomer 로서는 Bdi I 제한효소가 처음으로 보고되는 것이다.

Bdi I 제한효소의 절단부위 결정

Bdi I 제한효소가 인지부위인 5' ATCGAT 3' 을 어떻게 자르는 지를 알아보기 위하여 다음과 같은 방법을 채택하였다. 만약 Bdi I 이 A와 T사이를 자른다면(5' A' TCGAT 3') cohesive end 부분이 Sal I 으로 자른것과(5' G' TCGAC 3') 같을 것이고 T와 C사이를 자른다면(5' AT' CGAT 3') Cla I 으로 자른 것과 cohesive end 부분이 같을 것이다. 또한 서로 ligation 시키면 일치하는 cohesive end끼리 ligation 이 일어날 것이다. 만약 C와 G 사이를 자른다면(5' ATC' GAT 3') 즉 blunt end 를 만든다면 blunt end로 자르는 제한효소 (Hinc II, Sma I)로 자른 DNA와 서로 ligation 이 일어날 것이다. 그래서 pBR 322를 Bdi I 으로 자른 것을 벡터로 하여 λ-Sal I, λ-Cla I, 그리고 λ-Hinc II 로 자른 것을 클로닝하여 보았다. 나온 클론을 cracking 하여 본 결과 Sal I 이나 Hinc II 로 자른 것으로 클로닝 시킨 것은 insert DNA가 들어간 것이 없었고 λ- Cla

I 과 클로닝한 것에만 insert DNA가 들어간 것이 나왔다. 이 콜로니에서 플라스미드를 뽑아 Bdi I 으로 잘라보면 insert DNA가 λ- Cla I 의 DNA 조각과 정확히 일치함을 알 수 있었다(Fig. 6). 이것으로 볼 때 Bdi I 은 T와 C 사이를 잘라(5' AT'CGAT 3') 5' pCG의 cohesive end 를 만든다는 것을 알 수 있다.

Bdi I 제한효소의 작용조건

Bdi I 제한효소의 효율적인 활용을 위하여 적정 온도, 적정 pH, 그리고 NaCl 농도의 영향을 살펴보았다. 온도는 37°C 에서 가장 활성이 높았고 65°C에서 10분만 가열하여도 활성을 잃는 것으로 나타났다. pH는 다른 제한 효소와 마찬가지로 pH 7.5 정도에서 충분히 활성을 나타내었다(data not shown). NaCl 농도의 영향을 살펴보면(Fig. 7) 50-100mM NaCl 농도에서는 활성이 비슷하였고(lane h, i) 150 mM 농도 부터는 활성이 저해되었다(lane j, k).

이상으로 본 실험에서는 *Brevibacterium*

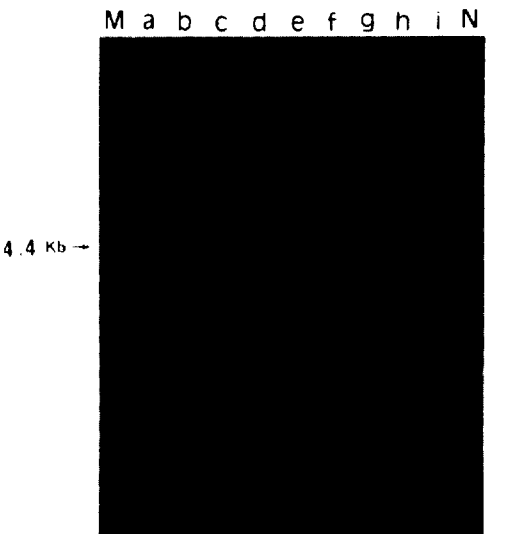


Fig. 6. Electrophoresis of recombinant plasmids after digestion with Bdi I restriction endonuclease. lane M, pBR 322 + Bdi I; a-i, recombinant plasmid + Bdi I; N, λ DNA + Bdi I.

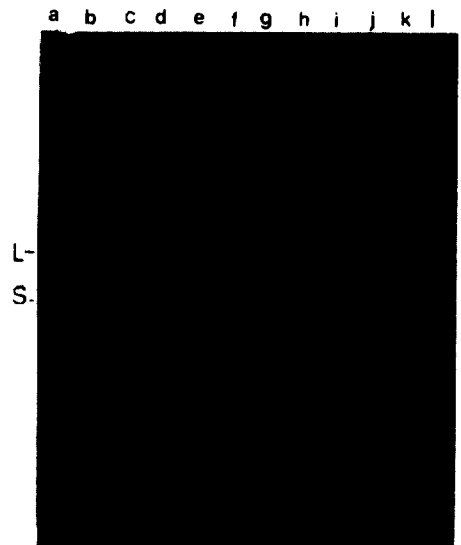


Fig. 7. Effect of NaCl on Bdi I restriction endonuclease activity. pBR 322 (lane b-f) and λ DNA (lane g-k) were digested with Bdi I under various salt conditions (lane b and g, 0 mM NaCl; c and h, 50 mM NaCl; d and i, 1,00 mM NaCl; e and j, 150 mM NaCl; f and k, 200 mM NaCl) and analyzed with 0.8% agarose gel electrophoresis. S, supercoiled form of pBR 322; L, linear form of pBR 322; lane 1, λ DNA STD.

divaricatum FERM 5948 균주로부터 Bdi I 제한효소를 분리하여 그 특성을 조사하였다. 우리가 분리한 Bdi I 제한효소는 처음으로 보고 되는 것으로서 이 박테리아 내에서의 유전자재조합시 본 실험에서 밝혀진 사항들이 유용하게 사용될 것으로 생각된다. 앞에서의 분리과정으로 얻은 Bdi I 제한효소는 ligation test 결과 exonuclease가 거의 없는 것으로 보이며 (data not shown) 클로닝실험에 충분히 사용될 수 있는 것으로 나타났다. 또한 Bdi I 제한효소는 5' AT·CGAT 3'을 인지하여 T와 C사이클을 잘

라 5' pCC를 가지는 cohesive end로 만드므로 Cla I으로 자른 DNA는 물론이고 Taq I (5' T·CGA 3')이나 Hpa II (5' C·CGG 3')로 자른 DNA의 클로닝등 유전자재조합에 많이 사용될 수 있을 것으로 사료된다. 특히 우리가 분리한 Bdi I은 Cla I의 isoschizomer로는 첫번째 보고인데 Cla I의 경우 세포배양시 어려움이 있는 반면에 (Mayer *et al.*, 1981) 똑같은 염기서열을 인지하여 동일한 pattern으로 자르는 Bdi I 제한효소는 BY배지로 세포 배양을 쉬게할 수 있는 장점도 있다.

적 요

Brevibacterium divaricatum FERM 5948 균주로부터 Bdi I 제한효소를 ammonium sulfate분취, DEAE-cellulose chromatography 그리고 heparin agarose chromatography 방법을 거쳐 부분정제하여 그 효소적 특성을 관찰하였다. 분리한 Bdi I 제한효소는 pBR 322와 λ DNA를 이용하여 인지부위를 알아본 결과 5' ATCGAT 3'을 인지하는 Cla I과 isoschizomer였다. 또한 Cla I으로 자른 λ DNA가 Bdi I으로 자른 pBR 322에 클로닝됨으로 보아 Bdi I 제한효소는 T와 C사이클을 잘라(5' AT·CGAT 3') 5' pCC를 가지는 cohesive end로 만듦을 알 수 있었다. 이 효소의 최적활성온도는 37°C였고 50-100 mM의 NaCl 농도에서 활성이 높았으며 150 mM 이상의 농도에서는 활성이 저해되었다.

사 사

본 연구는 과학재단 연구지원으로 수행된 것임.

REFERENCES

1. Arber, W. 1965. Host controlled modification of bacteriophage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **59**: 1300-1306.
2. Bickle, T.A., V. Pirrota, and R. Imber, 1978. A simple, general procedure for purifying restriction endonucleases. *Nucleic Acids Res.* **4**: 2561-2572.
3. Birnboim, H.C., and J. Doly, 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513-1523.
4. Clewell, D.B. 1972. Nature of ColE1 plasmid replication in *Escherichia coli* in the presence of chloramphenicol. *J. Bacteriol.* **110**: 667-676.
5. Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook, 1982. *Molecular Cloning. A laboratory manual.* New York, Cold Spring Harbor.
6. Mayer, H., R. Grosschedl, H. Schutte, and G. Hobom, 1981. Cla I, a new restriction endonuclease from *Caryophanon latum* L. *Nucleic Acids Res.* **9**: 4833-4845.
7. Roberts, R.J. 1985. Restriction and modification enzymes and their recognition sequences. *Nucleic Acids Res.* **13**: suppl. 165-200

(Received Jan. 17, 1986)