

Enterobacter agglomerans CBNU45로부터 분리된 제한효소 EagBI의 특성

최영주¹ · 김성재¹ · 황혜연² · 임정빈^{2,3} · 김영창^{1,3*}

¹충북대학교 자연과학대학 미생물학과 ²서울대학교 자연과학대학 미생물학과

³서울대학교 분자미생물학 연구센터

토양에서 분리된 *Enterobacter agglomerans* CBNU45는 type II 제한효소인 EagBI을 생산하고 있음을 발견하였다. EagBI을 DEAE-cellulose, phosphocellulose P11, hydroxylapatite column chromatography를 거쳐 부분 정제하여 그 특성을 알아보았다. EagBI은 여섯개의 염기배열 5'-CGAT↓CG-3'을 인식하고 T와 C 사이를 절단하여 두개의 염기가 3'-말단쪽으로 돌출된 cohesive end를 형성하였다. EagBI의 반응 최적조건은 10 mM Tris-HCl(pH 7.8), 6~10 mM MgCl₂, 37 °C이었으며 NaCl이 없는 반응 완충용액에서 가장 좋은 활성을 보였다. EagBI은 dam⁻와 dam⁺ 메틸화 DNA도 절단할 수 있으며 65°C에서 10분 동안 열처리하였을 때 효소의 활성을 상실하였다. 따라서 EagBI은 PvuI의 isoschizomer이나 NaCl 요구성과 열안정성에서 PvuI보다 편리한 제한효소로 확인되었다.

KEY WORDS □ Type II restriction endonuclease, EagBI, isoschizomer, PvuI, cleavage site

Type II 제한효소는 1970년에 Smith와 Wilcox(7)가 *Haemophilus influenza*로부터 *Hind*II를 처음 발견한 이래 지금까지 새로운 염기배열을 인식하는 prototype의 제한효소들, 인식부위는 같으나 절단위치가 다른 neoschizomer들, 그리고 인식부위와 절단위치가 같은 isoschizomer들을 포함하여 지금까지 2,400여개(REBASE ver. 312, 93년 12월)의 제한효소들이 발견되었다(5). 그러나 아직도 많은 palindromic 염기배열들을 인식하여 절단하는 제한효소들이 발견되지 않았기 때문에 이들을 절단하는 새로운 제한효소들을 찾고자 하는 연구가 계속 진행 중이다. Type II 제한효소는 DNA 분자의 일정 부위를 인식하여 절단할 수 있는 특성 때문에 유전자 재조합과 유전자 지도 작성 등에 없어서는 안될 중요한 효소이다. 따라서 새로운 염기배열을 인식하여 절단하는 제한효소들의 발견은 중요하며, 이와 더불어 생산균의 배양과 제한효소의 분리가 쉽고 기존에 발견된 제한효소보다 촉매적 특성이 유리하거나 절단후 생성되는 말단이 중합반응에 유리한 neoschizomer와 isoschizomer의 발견도 중요한 의미를 가지고 있다. 또한 neoschizomer나 isoschizomer는 제한효소를 생산하는 균은 다르지만 같은 염기배열을 인식하기 때문에 단백질 진화에 대한 연구에도 이용될 수 있을 것이다.

그러므로 본 연구에서는 새로운 제한효소를 찾아내기 위하여 자연계에서 분리 동정한 제한효소 생산 균으로부터 제한효소를 부분정제하여 그 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

제한효소 생산균주의 선별 및 동정

충북대학교 교정에서 채취한 토양을 0.85% 생리식염수에 희석하고 그 상층액을 Luria-Bertani(LB) 한천배지에 도말하여 30°C에서 하룻밤 동안 배양하였다. 생성된 colony를 5 ml의 LB broth에 접종하고 하룻밤 동안 진탕배양하여 균체를 모은 다음, 완충용액(10 mM potassium phosphate, pH 7.0, 7 mM β-mercaptoethanol, 1 mM EDTA)에 현탁하여 초음파 분쇄기로 세포를 분쇄하였다. 이때 온도상승을 막기 위해 얼음물로 중탕하면서 1분 간격으로 20초 동안 10회에서 15회 정도 sonication하였다. 이를 4°C에서 12,000×g로 30분간 원심분리하여(Hanil HMR-150IV) cell debris를 제거하고 상층액을 얻었다. 이 상층액을 0.3 μg의 λ DNA와 반응시켜 제한효소 활성의 유무를 확인하였다. 이러한 방법으로 선별한 제한효소 생산균주 CBNU45를 Biolog GN kit(Biolog, Inc.)와 API 20E (Analytab Products Inc.)의 균주 동정법에 따라 동정한 결과 이 균은 *Enterobacter agglomerans*로 판명되었다(논문 투고 준비중). 따라서 CBNU45가 생산하는 제한효소를 Smith와 Nathan의 제안(8)에 따라 속명의 'E'와 종명의 'ag'에 'CBNU45'에서의 'B'을 붙여 EagBI이라 명명하였다.

균주 배양 및 보관

자연계의 토양으로부터 분리한 CBNU45를 종균

배양하여 LB broth에서 16시간 배양하고 6,000 rpm에서 15분간 원심분리하여(Hanil HMR-210V) 균체를 모아 10 mM potassium phosphate(pH 7.0)로 세척하고, 사용 전까지 -70°C 에 보관하였다.

시 약

제한효소를 분리하는데 이용한 DEAE cellulose는 Sigma, phosphocellulose P11은 Whatman, hydroxylapatite HTP는 Bio-Rad의 제품을 이용하였으며, acrylamide는 BRL, bis-acrylamide, tetramethylethylenediamide(TEMED)는 Sigma에서, lambda DNA (bacteriophage lambda *cl857Sam7*) 및 제한효소와 T4 DNA polymerase는 KOSCO와 Boehringer Mannheim 등에서 구입하였다.

제한효소 분리

-70°C 에 보관하고 있던 균체를 4배의 완충용액(10 mM potassium phosphate, pH 7.0, 7 mM β -mercaptoethanol, 1 mM EDTA, 0.1 mM PMSF, 10% glycerol)에 현탁한 후, 초음파 분쇄기로 세포를 분쇄하였다. 이를 4°C 에서 한시간 동안 $100,000\times g$ 로 초고속 원심분리하여(Kontron, T-1180) 상층액을 얻었다.

제한효소는 일반적으로 사용되는 방법(4)을 참고하여 분리하였다. DEAE-cellulose column(2.4×12 cm, 50 ml)에 조효소액을 흡착시키고 완충용액으로 세척한 뒤, NaCl의 농도 기울기를 0~0.9 M이 되게 하여 20 ml/hr의 유속으로 흘러주며 분획하였다. 제한효소 EagBI의 활성을 보인 NaCl 농도 0.25~0.3 M 사이의 분획을 모아 4시간 동안 완충용액을 두번 바꿔주며 투석하였다. 이 효소액을 phosphocellulose P11 column(1.2×15 cm, 20 ml)에 흡착시키고 완충용액으로 세척한 다음, 0.1~1.0 M의 NaCl 농도 기울기를 주며 18 ml/hr의 유속으로 분획하였다. 제한효소의 활성을 보인 NaCl 농도 0.4~0.6 M 사이의 분획을 모아 ultrafiltrator (TCF 10/TCF 10A)로 Amicon PM 10 ($>10,000$ M.W.) membrane을 이용하여 농축하였다. 농축한 효소액을 hydroxylapatite column (1.2×12 cm, 13 ml)에 5 ml/hr의 유속으로 흡착시켜 완충용액으로 세척하고, potassium phosphate 완충용액 130 ml/을 0.01~1.0 M의 potassium phosphate 농도 기울기를 주면서 8 ml/hr의 유속으로 분리하였다. Potassium phosphate 0.35~0.4 M 사이의 농도에서 분리된 효소를 다시 50% glycerol이 함유된 완충용액에서 투석한 후, -20°C 에 보관하고 이를 실험에 사용하였다.

제한효소의 활성 측정

제한효소 EagBI의 분리과정에서 효소 활성의 측정은 0.3 μg 의 DNA와 1.0 μl 의 효소액을 10 μl 의 제한효소 반응 완충용액(10 mM Tris-HCl, pH 7.8, 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol)에 넣어 37°C 에서 30분간 반응시키고 sample loading buffer(0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol FF, 15% Ficoll)를 더하여 0.7% agarose gel에 TAE 완충용액

(40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA)으로 전기영동하여 알아보았다. 제한효소의 1 unit은 1 μg 의 λ DNA를 37°C 에서 한 시간 동안 완전히 절단할 수 있는 효소의 양으로 정하였다.

제한효소의 인식부위 결정

제한효소의 인식부위를 알아보기 위해 사용한 기질은 lambda, pBluescript SK(+)(Stratagene), pBR 322, pSL1180(Pharmacia), pUC18 등이었다. 분리한 EagBI으로 DNA를 단일 또는 이중처리하여 생성된 절편들의 크기를 0.7% agarose gel에 전기 영동하여 측정하고 제한효소 지도를 작성하였다. 이를 바탕으로 이 위치를 절단하는 기존의 제한효소가 있는지를 각종 DNA의 제한효소 지도와 비교하여 알아보았다.

제한효소의 절단위치 결정

제한효소 EagBI의 절단위치는 polycloning site에 5'-CGATCG-3'의 염기배열이 클로닝되어 있는 pES 615 DNA를 기질로 하여 Brown과 Smith의 방법(1)과 Jutta 등의 방법(3)으로 결정하였다. Sequencing ladder는 Sequenase ver. 2.0 kit(U.S.B.)를 사용하여 Sanger의 dideoxy-mediated chain termination 반응으로 만들었다(6). 제한효소 EagBI의 절단위치를 결정하기 위하여 위의 sequencing 반응 혼합액에서 ddNTP를 넣지 않고 반응시킨 후, EagBI으로 37°C 에서 한시간 절단하였다. 이를 반으로 나눠 한쪽에는 stop solution을 넣어 절단위치를 확인하기 위한 시료로 사용하였다. 나머지 반응액은 70°C 에서 5분간 열처리하여 EagBI을 불활성화시킨 후, T4 DNA polymerase와 dNTP를 넣어 37°C 에서 30분 동안 반응시키고 stop solution을 넣어 80°C 에서 2분간 denaturation시켰다. 이 시료는 상보적 가닥의 절단 위치를 확인하는데 사용하였다. 이들 시료들을 6% polyacrylamide gel에 나란히 전기영동하여 절단 위치를 결정하였다.

결과 및 고찰

제한효소 EagBI의 인식부위

Type II 제한효소는 인식부위의 내부 또는 인접한 곳을 절단하기 때문에 염기배열이 알려진 여러 종류의 DNA들을 EagBI으로 단일, 또는 이중절단하여 분석함으로써 EagBI의 인식부위를 알아보았다. 우선 λ DNA를 EagBI으로 절단한 다음, *ApaI*, *KpnI*, *NheI*, *SacI*, *XhoI* 등의 제한효소들을 각각 첨가하여 반응시킨 후, 전기영동하여 절단양상을 관찰하고 절편들의 크기를 측정하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 λ DNA의 10,086 bp의 위치를 절단하는 *ApaI*과 EagBI을 이중처리한 경우(lane 1)는 절편들의 크기가 14.0, 12.5, 10.0, 9.0 kbp이었고, 17,053 bp와 18,556 bp의 두 부분을 절단하는 *KpnI*과 EagBI을 이중처리한 경우(lane 2)는 절편들의 크기가 12.5, 11.5, 9.0, 7.0, 5.0 kbp이었으며, λ DNA의 34,657 bp의 위치를 절단하는 *NheI*과 EagBI을 이중처리한 경우(lane 3)는



Fig. 1. Double-digestions of *lambda-cI857Sam7* DNA with *EagBI* and additional restriction enzymes. Lane 1, *lambda-ApaI*; lane 2, *lambda-KpnI*; lane 3, *lambda-NheI*; lane 4, *lambda-SacI*; lane 5, *lambda-XhoI*; lane 6, *lambda-EagBI-ApaI*; lane 7, *lambda-EagBI-KpnI*; lane 8, *lambda-EagBI-NheI*; lane 9, *lambda-EagBI-SacI*; lane 10, *lambda-EagBI-XhoI*; lane M, *lambda-HindIII*.

절편들의 크기가 14.0, 11.5, 12.5, 8.0 kbp이었다. 그리고 24.772 bp와 25.877 bp 위치를 절단하는 *SacI*과 *EagBI*을 이중처리한 경우(lane 4)는 12.5, 11.8, 9.5 kbp 크기의 절편들이, 33.498 bp의 위치를 절단하는 *XhoI*과 *EagBI*을 이중처리한 경우(lane 5)에는 14.0, 12.5, 11.5, 7.0 kbp 크기의 절편들이 관찰되었다. 따라서 *EagBI*은 대략 λ DNA의 11.9, 26.0, 35.8 kbp의 위치들을 절단하고 있음을 알 수 있었다. 이미 발견된

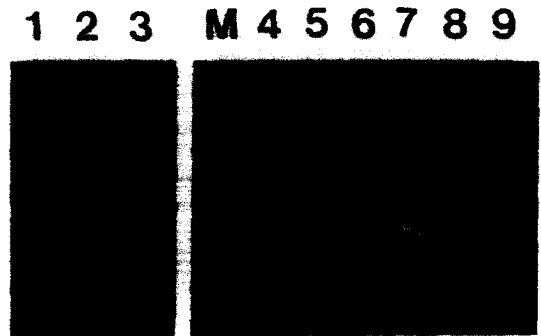


Fig. 2. Digestion of *lambda*, *pBluescript SK(+)* and *pBR322* DNAs with *EagBI* and *PvuI* endonucleases.

Lane 1, *lambda* DNA; lane 2, *lambda* DNA-*PvuI*; lane 3, *lambda* DNA-*EagBI*; lane 4, *pBluescript SK(+)* DNA; lane 5, *pBluescript SK(+)* DNA-*PvuI*; lane 6, *pBluescript SK(+)* DNA-*EagBI*; lane 7, *pBR322* DNA; lane 8, *pBR322* DNA-*PvuI*; lane 9, *pBR322* DNA-*EagBI*; lane M, *lambda-HindIII*.

제한효소들 중에서 이 위치를 인식하는 것은 *PvuI*이었다(Table 1). 그러므로 *EagBI*의 인식부위가 *PvuI*의 인식부위와 동일한지를 알아보았다. Fig. 2의 lane 1, 2, 3에서 보는 바와 같이 λ DNA를 *EagBI*과 *PvuI*으로 단일처리한 시료의 절편크기들이 동일하였다. 그리고 *EagBI*의 인식부위가 *PvuI*의 인식부위와 같다는 것을 좀더 확인하기 위하여 *PvuI*의 인식부위 주위의 염기 배열이 전혀 다른 *pBluescript SK(+)*와, *pBR322* DNA를 *EagBI*과 *PvuI*으로 각각 반응시켜, 절단양상을 비교한 결과, 모두 동일하였다(Fig. 2, lane 4~6). 또한 *pUC18*과 *pSL1180* DNA를 기질로 사용한 경우에도 두 제한효소의 절단양상이 동일함을 확인하였다(자료 미제시). 이상의 결과에서 보듯 *EagBI*의 절단양상이 *PvuI*의 절단양상과 모두 동일하기 때문에 *EagBI*이 *PvuI*과 마찬가지로 5'-CGATCG-3'를 인식하고 있음을 알 수 있었다.

Table 1. Mapping of the *EagBI* recognition sequence on *lambda* DNA by double-digestions with additional enzymes.

Second enzyme	Position(s) of recognition site	Experimentally observed fragment sizes of double-digestions (kbp)	Computer derived fragment sizes of double-digestions (kbp)
<i>ApaI</i>	10086	14.0, 12.5, 10.0, 9.0	14.3, 12.7, 10.0, 9.5, 1.8
<i>KpnI</i>	17053 18556	12.5, 11.5, 9.0, 7.0, 5.0	12.7, 11.9, 9.5, 7.6, 5.1, 1.5
<i>NheI</i>	34679	14.0, 11.5, 12.5, 8.0	14.3, 12.7, 11.9, 8.4
<i>SacI</i>	24772 25877	12.5, 11.8, 9.5	12.8, 12.7, 11.9, 9.5, 1.1, 0.3
<i>XhoI</i>	33498	14.0, 12.5, 11.5, 7.0	14.3, 11.9, 7.2, 2.2

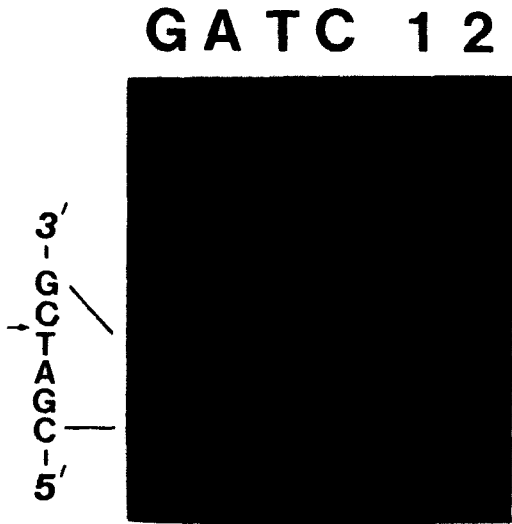
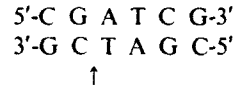


Fig. 3. Determination of *EagBI* cleavage site. Lanes G, A, T, and C represent the four base-specific sequencing reactions. Lane 1 represents the respective *EagBI*-treated sample. Lane 2 represents the sample which is treated with *EagBI*, and incubated with T4 DNA polymerase and all four dNTPs. Arrow indicates the cleavage site of *EagBI*.

제한효소 *EagBI*의 절단위치

*EagBI*이 인식하는 여섯개의 염기배열 5'-CGATCG-3'를 polycloning site에 가지고 있는 pES615 DNA를 기질로 사용하여 *EagBI*의 절단위치를 알아 보았다. 우선 sequencing 반응 혼합액에 ddNTP를 넣지 않고 반응시켜 [α -³⁵S]dATP에 의해 표지된 DNA를 합성시킨 후, *EagBI*으로 절단하였다. 이 시료를 Fig. 3의 lane 1에서 보는 바와 같이 sequencing 반응 시료와 나란히 전기영동하였을 때, (+)가닥에서 절단된 절편의 위치는 5'-CGATCG-3'에서 네번째 염기인 thymine의 위치와 일치하였다. 이것은 *EagBI*이 (+)가닥에서 thymine과 cytosine 염기 사이를 절단한다는 것을 의미한다. 그리고 *EagBI*의 상보적 (-)가닥의 절단위치를 확인하기 위해서 위 시료를 T4 DNA polymerase와 dNTP를 첨가하여 반응시켰다. 이 경우(Fig. 3의 lane 2) 반응산물의 위치는

lane 1보다 2 nt만큼 아래쪽에 위치하고 있었다. 이는 T4 DNA polymerase가 3'-말단이 돌출된 DNA의 단일가닥에는 exonuclease로 작용하여 *EagBI*에 의해 형성된 3'-말단에 돌출된 두개의 염기를 제거하였기 때문인 것으로 해석된다. 즉 *EagBI*의 절단위치는 다음과 같다.



따라서 *EagBI*은 인식부위 및 절단위치가 같은 *PvuI*의 isoschizomer임을 알 수 있었다. 현재까지 *Enterobacter agglomerans* 균주들에서 발견된 제한효소에는 *XmaIII*의 isoschizomer인 *EagI*, *EcoRII*의 isoschizomer인 *EagKI*, *AvaII*의 isoschizomer인 *EagMI*의 새 종류가 있는데(REBASE ver. 312, 93년 12월), CBNU45는 이들과는 다른 새로운 제한효소 *EagBI*을 생산하였다.

효소의 촉매적 특성

제한효소 *EagBI*의 촉매적 특성을 알아보았다. Table 2에서 보는 바와 같이 *EagBI*의 최적 반응 온도는 37°C였으며 완충용액 Tris-HCl의 최적 pH는 7.8이었다. *EagBI*은 MgCl₂를 반드시 필요로 하며 6 mM에서 10 mM 농도에서 가장 좋은 활성을 보였다. *EagBI*은 NaCl이 없는 완충용액에서 가장 좋은 활성을 보였으며 NaCl의 농도가 50 mM 이상이 되면 효소의 활성이 저하되다가 200 mM의 농도에서는 효소의 활성이 완전히 억제되었다. 또한 *EagBI*의 활성이 낮거나 적은 양인 경우에 BSA를 1 mg/ml의 농도로 반응액에 넣어주면 좋은 활성을 보였으며 ATP나 sulfhydryl기를 필요로 하지 않았다. *EagBI*의 열에 대한 안정성을 실험한 결과 65°C 이상의 온도에서는 10분 안에 활성을 완전히 잃었다. *EagBI*이 인식하는 5'-CGATCG-3'에는 *dam* methylation이 일어나는 'GATC'가 포함되어 있으므로 *dam* methylation이 일어난 DNA에 작용할 수 있는지를 알아보았다. *EagBI*으로 *dam* 와 *dam*' λ DNA를 절단하였을 때 절단양상이 같았다(자료 미제시).

이상에서 살펴본 *EagBI*의 촉매적 특성을 *PvuI*과 비교해 보면, Table 2에서 보는 바와 같이 최적 온도, pH, MgCl₂의 농도, 메틸화된 DNA의 절단능 등은 같거나 비슷하지만, NaCl의 요구성과 열안정성에 있

Table 2. Restriction conditions for *EagBI* with the specific reference to *PvuI* (2)

Enzyme	Temperature (°C)	pH	MgCl ₂ (mM)	NaCl (mM)	Heat inactivation ^a
<i>EagBI</i>	37	7.8	6-10	0	Yes
<i>PvuI</i>	37	7.9	10	100-150	No

^a Heat inactivation at 65°C for 10 min.

어서는 커다란 차이를 나타냈다. *EagBI*은 NaCl이 없는 완충용액에서 가장 좋은 활성을 보이기 때문에 사용에 편리하다. 그러나 *PvuI*은 NaCl의 농도가 50 mM 이하에서는 활성이 저하되고 100 mM과 150 mM 사이에서 활성이 가장 좋다 (2). 따라서 *PvuI*을 다른 제한효소와 이중처리할 때 염의 농도를 줄여야 하는 불편한 경우가 있다. 또한 *PvuI*은 65°C에서 10분 동안 열처리하여도 효소의 활성을 잃지 않기 때문에 반응후 polymerase나 ligase 등의 효소를 처리하고자 할 때는, phenol 추출 등의 번거로운 과정을 거쳐야 되는데, *EagBI*은 열처리만으로도 쉽게 불활성화시킬 수 있는 장점이 있다. 이러한 관점에서 *EagBI*은 *PvuI*을 대체할 수 있는 좋은 특성을 지닌 효소로 판단된다.

감사의 말

본 연구는 한국과학재단 우수연구센터(서울대학교 분자미생물학연구소)의 연구비로 수행되었음.

참 고 문 헌

1. Brown, N.L. and M. Smith, 1980. A general method for defining restriction enzyme cleavage and recognition sites. *Methods Enzymol.* 65. 391-404.

2. Gingeras, T.R., L. Greenough, I. Schildkraut, and R.J. Roberts, 1981. Two new restriction endonuclease from *Proteus vulgaris*. *Nucl. Acids Res.* 9. 4525-4536.

3. Jutta, B.K., U. Reichl, G.S. Schmitz, K. Kaluza, M. Jarsch, and C. Kessler, 1990. *McrI*: A novel class-II restriction endonuclease from *Micrococcus cryophilus* recognizing 5'-CGRY/CG-3'. *FEBS Lett.* 264. 218-222.

4. Pirrotta, V. and T.A. Bickle, 1980. General purification scheme for restriction endonucleases. *Methods Enzymol.* 65. 89-95.

5. Roberts, R.J. and D. Macelis, 1992. Restriction enzymes and their isoschizomers. *Nucl. Acids Res.* 20. 2167-2180.

6. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74. 5463-5467.

7. Smith, J.O. and K.W. Wilcox, 1970. A restriction enzyme from *Haemophilus influenzae* I: Purification and general properties. *J. Mol. Biol.* 51. 379-391.

8. Smith, H.O. and D. Nathans, 1973. A suggested nomenclature for bacterial host modification restriction systems and their enzymes. *J. Mol. Biol.* 81. 419-423.

(Received December 16, 1993)

(Accepted December 29, 1993)

ABSTRACT: Characterizations of Restriction Endonuclease *EagBI* from *Enterobacter agglomerans* CBNU45

Choi, Young-Ju¹, Seong-Jae Kim¹, Hye-Yeon Hwang², Jeongbin Yim^{2,3}, Young-Chang Kim^{1,3*} (¹Department of Microbiology, Chungbuk National University, Cheongju 360-763, and ²Department of Microbiology, Seoul National University, and ³Research Center for Molecular Microbiology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea)

EagBI is a type II restriction endonuclease from *Enterobacter agglomerans* strain CBNU45 isolated from soil. *EagBI* was partially purified by DEAE-cellulose, phosphocellulose P11 and hydroxylapatite column chromatography. *EagBI* recognizes and cleaves the sequence 5'-CGAT↓CG-3' and generates 2-base 3'-protruding cohesive ends. The optimal reaction conditions of *EagBI* are 10 mM Tris-HCl (pH 7.8), 6~10 mM MgCl₂, at 37°C. The enzyme is maximally active in the absence of NaCl, able to cleave both *dam*⁻ and *dam*⁺ DNAs, and sensitive to heat treatment (at 65°C for 10 min). Therefore, although *EagBI* is an isoschizomer of *PvuI*, it is more useful than *PvuI* in respect of the NaCl requirement and heat-stability.