

## *Streptomyces diastatochromogenes*로부터 제한효소 *SdiI*의 분리정제

배 무\* · 송은숙

이화여자대학교 자연과학대학 생물학과, 서울대학교 분자미생물학연구소

토양에서 분리한 방선균에서 제한효소 활성을 조사하여 그 가운데 *Streptomyces diastatochromogenes*로부터 제한효소 활성을 확인하였다. 이 균주의 제한효소 *SdiI*을 균체 15 g으로부터 streptomycin sulfate 침전, ammonium sulfate 침전, hydroxylapatite column chromatography, Sephacryl S-200 HR column chromatography, hydroxylapatite column chromatography의 단계를 거쳐 분리하였고, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis에 의하면 소단위체 분자량은 약 35,000 Da으로 추정되었다.

KEY WORDS □ *Streptomyces diastatochromogenes*, restriction endonuclease, *SdiI*, purification

지금까지 수백여 종의 세균으로부터 제한효소가 발견되어 왔고 isoschizomer를 포함하여 약 2,000여 종류가 알려져 있으며, 최근에도 계속 새로운 제한효소가 발견되고 있다 (5). 제한효소는 type I, II, 및 III로 분류되는데 (13), type I에 속하는 *EcoB*와 *EcoK*가 최초로 발견된 제한효소이다. Type II는 대부분의 제한효소를 포함하며, 절단부위와 인식부위가 일치하여 반응 후의 분석이 용이하므로 유전자의 분석, DNA sequencing, gene cloning 등 유전자 재조합 기술의 필수적인 수단으로 이용되고 있을 뿐만 아니라, DNA-단백질 상호작용을 연구하는 데에도 매우 중요하게 이용되고 있다. 현재까지 대부분의 제한효소가 국외에서 발견되고 제품화되어 시판이 되고 있는 반면, 아직까지 국내에서는 학술적, 경제적으로 유용성있는 제한효소에 대한 연구가 활발하지 못한 형편이다. 따라서 본 연구에서는 토양에서 분리된 방선균을 대상으로 제한효소의 유무를 살핀 후, 그 제한효소를 분리하였다.

### 재료 및 방법

#### 사용균주 및 배양

여러 곳의 토양에서 분리된 방선균 약 30주를 대상으로 제한효소의 유무를 조사한 결과, *Streptomyces diastatochromogenes* (1)에서 제한효소 활성이 확인되어 이 균주를 선정하였다. 배지의 조성은 nutrient 0.5%, yeast extract 0.2%, NaCl 0.8%, glucose 0.5% (pH 7.2) (11)이며, agar slant에서 자란 균체를 위의 배지에서 진탕배양한 종 배양액을 본 배양액에서 4%가 되도록 접종하여 30°C에서 48시간 배양하였다.

#### 제한효소의 활성 측정

제한효소의 활성 측정은 각 정제단계마다 시행하였는데, 6 mM Tris-HCl (pH 7.9), 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 150 mM NaCl, 1 mM 2-mercaptoethanol을 포함한 완충액에 *HindIII*로 처리한 0.3 µg의 lambda DNA와 효소액을 첨가하여 37°C에서 1시간 반응시켰다. 65°C에서 5분간 열처리한 후 얼음 냉각하면서 loading buffer (0.25% bromophenol blue, 1.25% xylene cyanol, 40% glycerol) (8)를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 이를 120 volts에서 1시간 동안 0.7% agarose gel electrophoresis하여 ethidium bromide로 염색하고 자외선 아래에서 관찰하였다. 제한효소의 1 unit는 37°C에서 1시간 반응하여 1 µg의 DNA를 완전히 절단하는 데 필요한 양으로 정의하였다.

#### 조효소액의 제조

배양액을 filter paper (Whatman No. 2)로 걸러내어 균체를 회수하였다. 1.5 l 배양액에서 회수한 15 g (wet weight)의 균체를 bead beater (Biospec Products Cat. No. 6080-1)로 세포를 파쇄하고 25,000×g에서 90분 원심분리하여 조효소액을 얻었다.

#### Streptomycin sulfate에 의한 침전

얻어진 조효소액에 10% streptomycin sulfate를 최종농도 2%가 되도록 넣고 핵산을 침전시킨 후, 20,000×g에서 원심분리하여 그 상층액을 취하였다.

#### Ammonium sulfate 침전

Ammonium sulfate를 90%까지 침전시켜 2시간 동안 4°C에서 교반하여 단백질을 침전시킨 후, 25,000×g에서 원심분리하고 buffer A [10 mM potassium phosphate (pH 7.4), 10 mM 2-mercaptoethanol, 5% (v/v) glycerol]를 첨가하여 녹였다. 이 용액을 투석막을 이용하여 buffer A에 대하여

**Table 1.** Purification of *SdII* from *Streptomyces diastatochromogenes*.

	Total protein (mg)	Total activity (unit* × 10 <sup>-1</sup> )	Specific activity (unit/mg × 10 <sup>-1</sup> )	Purification fold	Yield (%)
Crude extract	154.9	—	—	—	—
Streptomycin sulfate precipitation	149.9	—	—	—	—
Ammonium sulfate precipitation	70.5	—	—	—	—
Hydroxylapatite chromatography	50.3	4.5210	8.995	1	100
Sephacryl S-200 HR chromatography	8.5	4.0840	47.878	5.3	90
Hydroxylapatite chromatography	0.6	1.4325	23.4836	26	32

\* One unit is defined as the amount of the enzyme required for complete digestion of 1 µg of lambda DNA in 1 hr at 37°C.

16시간 투석하였다.

#### Hydroxylapatite column chromatography

위의 용액을 buffer A로 미리 평형시킨 Bio-gel HT column (3.5 × 6.1 cm)에 가한 후, 10 mM~0.5 M potassium phosphate로 용출시켰다. 24 ml/hr의 용출 속도로, 각 분획마다 4 ml씩 받아 단백질량과 효소활성을 측정하였다.

#### Sephacryl S-200 HR column chromatography

Hydroxylapatite column chromatography 분획 중 효소활성을 나타내는 분획을 모아 buffer A에 1 M의 NaCl을 포함한 buffer로 투석시키고 PEG 6000으로 농축하여, 미리 평형을 맞춘 Sephacryl S-200 HR column (1.9 × 135 cm)에 얹은 후, 같은 buffer로 용출시켰다. 6 ml/hr의 용출속도로 각 분획마다 2 ml씩 받아 단백질량과 효소활성을 측정하였다.

#### Hydroxylapatite column chromatography

효소활성을 나타내는 분획을 모아 buffer A로 투석시킨 후 PEG 6000으로 농축하여, buffer A로 미리 평형을 맞춘 Bio-gel HT column (3.5 × 4.0 cm)에 얹고 10 mM~0.5 M potassium phosphate로 용출시켰다. 18 ml/hr의 용출속도로 각 분획마다 3 ml씩 받아 단백질량과 효소활성을 측정하였다.

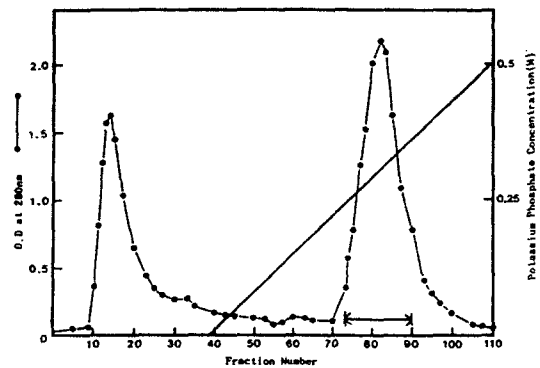
#### 단백질의 정량

효소의 정제과정 중 단백질의 농도는 spectrophotometer (Hitach V-2000)로 280 nm에서 흡광도를 측정하였고 그 외에는 Bradford의 방법 (2)에 따라 Bio-Rad protein assay solution으로 측정하였으며, bovine serum albumin을 표준으로 사용하였다.

#### 효소분자량의 측정

분자량은 정제한 효소액을 0.1% SDS를 포함하는 10% polyacrylamide gel electrophoresis하여 측정하였다 (6). 표준 단백질의 이동도로부터 얻어진 표준곡선을 이용하여 새로운 효소의 분자량을 측정하였다.

### 결과 및 고찰



**Fig. 1.** Purification of the ammonium sulfate precipitates by hydroxylapatite column chromatography.

#### 제한효소 *SdII*의 정제

약 15 g (wet weight)의 균체를 bead beater로 파쇄하여 얻은 효소용액에 streptomycin sulfate 침전, ammonium sulfate 침전, hydroxylapatite column chromatography, Sephacryl S-200 HR column chromatography와 second hydroxylapatite column chromatography를 거쳐 정제하였고 polyacrylamide gel electrophoresis로 정제도를 확인하였다 (Table 1). 전체 정제 과정을 통하여 효소의 비활성은 26배 증가하였고 회수율은 32%이었다. Streptomycin sulfate와 ammonium sulfate를 처리한 후에는 *exo*-enzyme이 많아서 효소의 비활성을 측정할 수 없었으며, hydroxylapatite column chromatography 결과 (Fig. 1), 제한효소 활성이 0.25~0.37 M potassium phosphate 농도인 72~90 분획에서 나타났으며, 비활성은 899.5 unit/mg protein이었다. Sephacryl S-200 HR column chromatography (Fig. 2)를 거쳐 효소활성이 120~128번 분획에서 확인되었으며, 이 때 비활성은 478.78 unit였다. 마지막으로 second hydroxylapatite

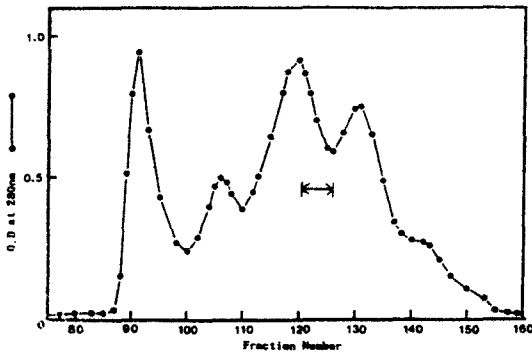


Fig. 2. Purification of eluate from hydroxylapatite column by sephacryl S-200 HR column chromatography.

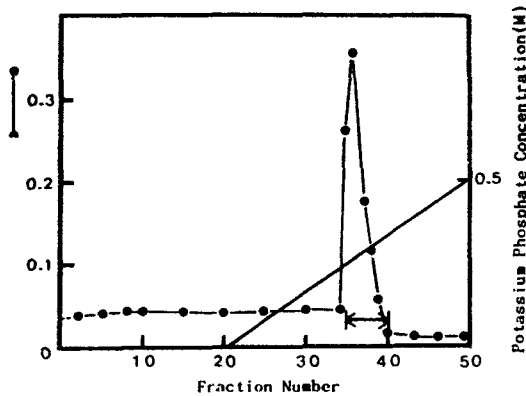


Fig. 3. Purification of eluate from sephacryl S-200 HR column by hydroxylapatite column chromatography.

column chromatography 결과 (Fig. 3), 효소의 활성은 0.25~0.3 M potassium phosphate 농도인 35~40번 분획에서 확인되었으며 효소의 비활성은 23483.6 unit였다. 넓은 범위의 pH 영역에서 안정하였으며 60°C에서도 그 활성을 보인 것이 기존의 제한효소와 다른 특성이라 할 수 있다.

**제한효소 *SdII*의 분자량**

0.1% SDS를 포함하는 10% acrylamide gel에서 전기영동으로 분자량을 조사한 결과 소단위체의 분자량이 약 35,000 Da으로 나타났다 (Fig. 4). TypeII 제한효소는 다른 type에 비하여 작은 분자량을 갖고 있는데 (4), 특히 typeI의 *EcoK*와 *EcoB*의 분자량은 각각 400,000, 450,000 Da이라 알려져 있으며 (7, 9). *EcoPI*은 분자량 90,000, 62,000, 49,000 Da인 3개의 소단위체로 되어 있다 (7). 그러나 typeII 제한효소는 동일한 두 개의 소단위체로 구성되며, *HindIII*는

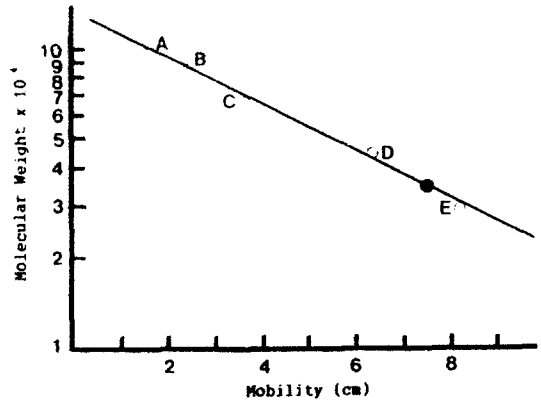


Fig. 4. Estimation of subunit molecular weight of *SdII* by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. A.  $\beta$ -galactosidase (116,000 Da); B. phosphorylase b (97,400 Da); C. albumin, bovine (66,000 Da); D. albumin, egg (45,000 Da); E. carbonic anhydrase (29,000 Da).

67,000 Da에서 92,000 Da 정도 (9). *HpaI*과 *HpaII*는 각각 65,000 Da과 13,370 Da (10)의 분자량을 가진다. *EcoRI*은 그 분자량이 59,000 Da으로 소단위체의 분자량은 29,500 Da이라 보고되어 있다 (3). 또한 국내에서 발견된 *ZanI* (12)과 *StuI* (5)은 소단위체의 분자량이 각각  $30,000 \pm 1,000$ 과  $34,000 \pm 1,000$  Da으로 보고된 바 있다. 이와 비교해 볼 때, *SdII*도 이와 비슷한 수준을 나타내고 있다.

**감사의 글**

본 연구는 한국과학재단 우수연구센터 (서울대학교 분자미생물학 연구센터)의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

**참 고 문 헌**

1. 배 무, 서 원나, 송 은숙, 이 계준, 1994. 제한효소인 *SdII*를 생성하는 *Streptomyces* 분리균주의 수리 동정. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 134-142.
2. Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
3. Catterall, J.F. and N.E. Welker, 1977. Isolation and properties of a thermostable restriction endonuclease (Endo R. Bst 103). *J. Bacteriol.* **129**, 1110-1120.
4. Haberman, A., J. Heywood, and M. Meselson, 1972. DNA modification activity of *Escherichia coli* restriction endonuclease K and P1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 3138-3141.

5. Kim, K.T., M.Y. Jung, and O.J. Yoo, 1987. Purification and characterization of *StuI* endonuclease from *Streptomyces tubecidicus*. *Kor. Jour. Microbiol.* **25**, 180-183.
6. Laemmli, U., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
7. Lautenberger, J.A. and S. Linn, 1972. The deoxyribonucleic acid modification and restriction enzymes of *Escherichia coli* B: I. Purification, subunit structure, and catalytic properties of the modification methylase. *J. Biol. Chem.* **247**, 6176-6182.
8. Maniatis, T., F. Fritsh, and J. Sambrook, 1984. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
9. Old, R., K. Murray, and G. Roizes, 1975. Recognition sequence of restriction endonuclease III from *Haemophilus influenza*. *J. Mol. Biol.* **92**, 331-339.
10. Sharp, P.A., B. Sugden, and J. Sambrook, 1973. Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenza* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* **2**, 3055-3063.
11. Shimotsu, H., H. Takahashi, and H. Saito, 1980. Site-specific endonuclease in *Streptomyces* strains. *Agric. Biol. Chem.* **44**, 1665-1666.
12. Sun, D.K. and O.J. Yoo, 1988. Purification and characterization of a restriction endonuclease *ZanI* from *Zymomonas anaerobia*. *Kor. Jour. Microbiol.* **21**, 419-422.
13. Yuan, R., 1981. Structure and mechanisms of multifractional restriction endonuclease. *Ann. Rev. Biochem.* **50**, 285-315.

(Received June 3, 1994)

(Accepted July 12, 1994)

---

**ABSTRACT: Purification of Restriction Endonuclease, *SdiI*, from *Streptomyces diastatochromogenes***

Bae, Moo\* and Eun-Sook Song (Department of Biological Science, College of Natural Science, Ewha Woman's University, Seoul 120-750, Korea)

About thirty bacterial strains of actinomycete isolated from the soil were examined for the presence of restriction endonuclease activity. *Streptomyces diastatochromogenes*, which was identified previously, was found to contain restriction endonuclease activity. The purification of this enzyme, *SdiI*, was carried out via streptomycin sulfate precipitation and ammonium sulfate fractionation followed by hydroxylapatite column chromatography, Sephacryl S-200 HR column chromatography and second hydroxylapatite column chromatography. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the active protein (purified from various column chromatography) resulted in 35,000 Da protein.