



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0098204
(43) 공개일자 2010년09월06일

(51) Int. Cl.

C12N 15/52 (2006.01) *C12N 15/63* (2006.01)
C12N 9/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0017254

(22) 출원일자 2009년02월27일
심사청구일자 2009년02월27일

(71) 출원인

세종대학교산학협력단

서울 광진구 군자동 98 세종대학교

(72) 발명자

채영기

서울특별시 광진구 구의3동 현대아파트 202동 401호

(74) 대리인

서형미

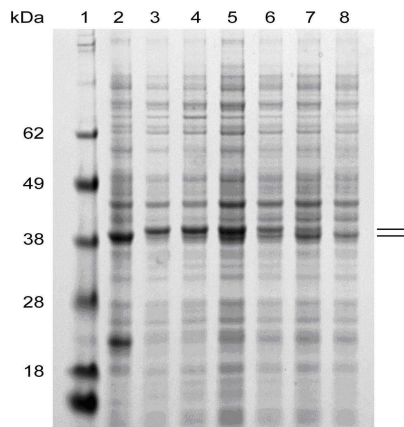
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 제한효소의 생산방법

(57) 요약

본 발명은 대장균에서의 제한효소의 생산방법에 관한 것이다. 본 방법은 회석된 배양배지를 사용하여 대장균에서 고효율로 안정성이 우수한 제한효소를 생산할 수 있다.

대표도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20050401-034-743-176-06-00

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관

연구사업명 RDA 바이오그린 21

연구과제명 벼 흰잎마름병균의 유전체 기능분석으로 유용유전자 대량 개발

기여율

주관기관 세종대학교

연구기간 2005년 6월 ~ 2007년 12월

특허청구의 범위

청구항 1

하기를 포함하는, 대장균에서의 제한효소 생산방법:

제한효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 플라스미드로 대장균을 형질전환하는 단계;

상기 형질전환된 대장균을 표준농도와 비교하여 희석된 배양배지에서 약 12시간 내지 약 20시간 동안 배양하는 단계;

상기 배양배지가 표준농도가 되도록 상기 배양배지에 배양배지 성분을 추가하는 단계;

상기 배양배지에 상기 제한효소의 발현을 유도하는 인두서를 추가하는 단계; 및

상기 배양배지를 추가로 약 2 내지 약 18시간 배양하는 단계.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 대장균은 BL21(DE3)/pLysS, Rosetta(DE3)/pLysS, Rosetta2(DE3)/pLysS, ArcticExpress(DE3), C41(DE3), 또는 C43(DE3)인, 제한효소 생산방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 제한효소는 잔토모나스 균주(Xanthomonas oryzae pv. oryzae, Xoo)로부터 유래한 XorKII인, 제한효소 생산방법.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 상기 XorKII는 도 7의 염기서열로 기재되는, 제한효소 생산방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 플라스미드는 pET28a, pET, pGEX, pQE, pDEST, 또는 pCOLD 계열의 플라스미드인, 제한효소 생산방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 제한효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 플라스미드는 도 1로 표시되는 pET28a/XorKII인, 제한효소 생산방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 배양배지는 Luria-Bertani (LB), SOB (Super Optimal Broth), SOC (포도당을 포함하는 SOB), Minimal 배지, 또는 TB (Terrific Broth)배지인, 제한효소 생산방법.

청구항 8

제 1 항 또는 제 7 항에 있어서, 상기 희석된 배양배지는 표준농도의 약 0.6배 내지 약 0.8배의 배양배지인, 제한효소 생산방법.

청구항 9

제 1 항에 있어서, 상기 인두서는 isopropylthiogalactoside(IPTG), 락토스, 또는 온도전이인, 제한효소 생산 방법.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 상기 IPTG의 최종농도는 약 0.1mM 내지 약 1.0mM인 제한효소 생산방법.

청구항 11

제 1 항에 있어서, 상기 배양배지 성분을 추가하는 단계와 상기 인두서를 추가하는 단계를 동시에 수행하는, 제한효소 생산방법.

청구항 12

제 1 항에 있어서, 상기 형질전환체를 회수하고, 이로부터 제한효소를 분리하는 단계를 추가로 포함하는 제한효소 생산 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 세포에서의 재조합 단백질의 생산에 관한 것으로 구체적으로 대장균에서의 제한효소의 생산에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 제한효소(Restriction endonuclease)는 거의 모든 세균에 존재하며 이는 DNA에 존재하는 특정한 염기서열을 인식하여 인식한 서열부위 또는 그 근처의 특정부위를 절단하는 효소이다. 이러한 제한효소는 원래 세균이 자신의 세포 내로 침입해 들어오는 바이러스와 같은 외부 DNA를 제거하기 위하여 방어기전으로 가지고 있는 것이며 자신의 DNA는 절단부위의 염기(아데닌 또는 사이토신)를 메틸화시켜서 제한효소로부터 보호하고 있다.

[0003] 일반적으로, 제한효소(restriction endonuclease)는 크게 타입 I, II, III 및 IV의 제한효소로 나눌 수 있다. 이 네 타입 중에, 타입 II 제한효소(Type II restriction endonuclease)는 호모다이머 또는 테트라머로 알려져 있으며, 특이한 인지부위 내에 또는 이에 가까운 DNA를 절단하고, 촉매로는 Mg^{2+} 와 같은 2가 이온(divalent ion)을 요구한다. 이러한 이유로, 특히 병원균의 경우 대응수단의 개발을 위해 제한효소의 정확한 이해가 요구되며, 또한 제한효소는 DNA를 절단하는 분자생물학의 주요한 수단으로 사용되는데, 이를 위해서는 순수한 형태로 제한효소의 대량생산이 선행되어야 한다.

발명의 내용

[0004] 본 발명은 대장균에서의 제한효소 생산방법에 관한 것으로, 상기 방법은 제한효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 플라스미드로 대장균을 형질전환하는 단계; 상기 형질전환된 대장균을 회석된 배양배지에서 배양하는 단계; 상기 배양배지가 표준농도가 되도록 상기 배양배지에 배양배지 성분을 추가하는 단계; 상기 배양배지에 상기 제한효소의 발현을 유도하는 인두서를 추가하는 단계; 및 이를 추가로 배양하는 단계를 포함한다.

[0005] 본 발명은 또한 잔토모나스 균주(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, Xoo)로부터 유래한 잔토모나스 균주, X o r KII를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 이를 포함하는 플라즈미드 및 이로 형질전환된 대장균을 제공한다.

[0006] 본 발명은 또한 상기 형질전환된 대장균을 이용한 제한효소의 생산방법을 제공한다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0007] 본 발명은 대장균에서 재조합 제한효소의 생산방법을 제공한다. 상기 방법은 제한효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 플라즈미드로 대장균을 형질전환하는 단계; 상기 형질전환된 대장균을 희석된 농도의 배양배지에서 약 12시간 내지 약 20시간 동안 배양하는 단계; 상기 배양배지가 표준농도가 되도록 상기 배양배지에 배양배지 성분을 추가하는 단계; 상기 배양 배지에 상기 제한효소의 발현을 유도하는 인두서를 추가하는 단계; 및 상기 배양배지에서 형질전환 대장균을 추가로 약 2 내지 약 18시간 배양하는 단계를 포함한다.

[0008] 상기 형질전환에 사용될 수 있는 숙주 대장균 (*Escherichia coli*)은 재조합단백질, 특히 제한효소의 발현에 적합한 유전자 변이/변형을 포함할 수 있으며, 이러한 변이/변형을 포함하는 다양한 대장균이 본 발명에 사용될 수 있다. 상기 유전자 변이는 예를 들면 프로테아제 유전자, 예컨대 lon 및 ompT가 결핍되어 있거나, T7 폴리머라제를 발현하도록 유전자를 추가로 포함하거나, 유전자의 전사조절에 필요한 벡터 예컨대 pLysS 벡터 (T7 RNA 폴리머라제의 억제제인 T7 라이소자임을 코딩)를 추가로 포함하는 것을 들 수 있으나, 이로 제한하는 것은 아니다. 예를 들면 대장균은 Novagen사 (USA)에서 입수가 가능한 BL21(DE3)/pLysS (F, ompT, hsdS_B (r_B, m_B), dcm, gal, λ (DE3), pLysS, Cm^r) (Novagen), Rosetta(DE3)/pLysS, Rosetta2(DE3)/pLysS, StratagenArcticExpress(DE3), Overexpress 사 (France)에서 입수가 가능한 C41(DE3), C43(DE3)를 포함하나 이로 제한하는 것은 아니다. 한 구현예에서, 대장균은 Rosetta2(DE3)/pLysS이다.

[0009] 숙주 대장균에서 존재하며 목적 단백질, 특히 제한효소를 발현할 수 있는 다양한 플라즈미드가 본 방법에 사용될 수 있다. 플라즈미드는 대장균 계능과 독립적으로 존재하며 복제가 가능한 약 2000 내지 10,000 bp(base pair)의 DNA로 항생제 유전자 및 클로닝에 적합한 제한효소 부위를 포함하고 있다. 한 구현예에서 본 발명의 플라즈미드는 인두서에 의해 유도될 수 있는 전사단위체를 포함한다. 상기 전사단위체는 유전자 전사의 조절/촉진에 관여하는 조절부위 및 단백질 코딩부위를 포함한다. 다른 구현예에서 플라즈미드는 단백질 분리정제에 필요한 추가의 아미노산 서열, 예를 들면 Histidine Tag 또는 Glutathione S-Transferase를 코딩하는 염기서열을 포함할 수 있으나 이로 제한하는 것은 아니다. 이러한 플라즈미드는 예를 들면 pET28a(Novagen, USA), pET series, pGEX series (GE Healthcare Life Sciences, USA), pQE series (Qiagen, USA), pDEST series (Invitrogen, USA), pCOLD series (Takara Bio, Japan)를 포함하나, 이로 제한하는 것은 아니다. 한 구현예에서, 플라즈미드는 Histidine Tag를 포함한 pET28a이다.

[0010] 상기 플라즈미드에 제한효소를 코딩하는 다양한 유전자를 클로닝한다. 한 구현예에서, 상기 제한효소는 잔토모나스 균주 유래의 XorKII, XorI 또는 Xor II 제한효소를 포함하나 이로 제한하는 것은 아니다. 다른 구현예에서 상기 제한효소는 도 7의 염기서열로 표시되는 XorKII이다. 또 다른 구현예에서, 본 발명에 사용되는 플라즈미드는 XorKII 유전자를 포함하는 도 1로 표시되는 플라즈미드이다.

[0011] 본 발명의 숙주 대장균은 공지된 다양한 형질전환 방법을 사용하여 제한효소 유전자를 포함하는 다양한 플라즈미드로 형질전환될 수 있다. 다양한 형질전환 방법이 공지되어 있으며, 예를 들면 열 및 CaCl₂를 이용한 방법 또는 전기천공법을 포함하나 이로 제한하는 것은 아니다. 한 구현예에서 제한효소 유전자를 포함하는 다양한 플라즈미드로 형질전환된 대장균은 한국농업미생물자원센터에 기탁된 KACC 95047P이다.

[0012] 본 발명에 사용된 용어 "인두서"는 유전자의 발현을 향상시켜 단백질의 생합성을 촉진/유도하는 분자 또는 수단을 지칭한다. 한 구현예에서 상기 인두서는 IPTG(Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranoside), 락토스, 온도전이 (temperature shift)를 포함하나, 이로 제한하는 것은 아니다. 상기 인두서의 최종농도 및 조건은 사용하는 숙주 대장균의 종류, 생산하고자 하는 단백질의 종류 및 양, 배지의 종류, 및/또는 배양 조건 등에 맞추어 변할 수 있다. 한 구현예에서 상기 인두서는 IPTG이며, 상기 IPTG는 약 0.1mM 내지 약 1.0mM로 사용될 수 있으며, 특히 약 0.5mM의 농도로 최종농도로 사용될 수 있다.

[0013] 본 발명의 방법에 사용되는 배지는 원핵생물, 특히 대장균의 배양에 사용될 수 있는 다양한 배지를 포함한다. 예를 들면 배양배지는 Luria-Bertani (LB) 배지, SOB (Super Optimal Broth) 및 SOC (포도당을 포함하는 SOB),

Minimal 배지, TB (Terrific Broth)를 포함하나 이로 제한하는 것은 아니다. 상기 각 배지를 이루는 성분은 공지되어 있으며 예를 들면 J. Sambrook and David W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 2001에 기재된 것을 참조할 수 있다. 당업자라면 사용하는 구체적인 대장균의 종류에 따라 적절한 배지를 선택할 수 있을 것이다. 본 발명의 한 구현예에서 배양배지는 LB이다.

[0014] 본 발명의 방법에서, 접종 시에는 대장균의 일반적인 배양에 사용되는 표준농도 배지와 비교하여 희석된 배양배지가 사용된다. 표준농도 배지란, "1배 농도 (1x)" 또는 100%의 배지를 일컫는 것이다. 예를 들면 LB 배지의 경우, 표준농도, 100% 또는 1배 농도 배지는 1 중량% Bacto-tryptone (또는 pepton), 0.5 중량% 의 Bacto-yeast extract 및 약 170mM의 NaCl를 포함한다. 대장균의 일반적인 배양에 사용되는 각 배지의 표준농도는 공지되어 있으며 예를 들면 J. Sambrook and David W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 2001에 기재된 것을 참조할 수 있다. 배양배지의 종류, 대장균의 종류, 목적 제한효소의 종류 등에 따라 배지의 희석정도가 결정될 수 있다. 한 구현예에서, 표준농도 배지(100% 배지)와 비교하여 약 0.6배(60%) 내지 약 0.9배(80%) 희석된 배지가 사용될 수 있으며, 다른 구현예에서는 약 0.6배 내지 약 0.8배, 또 다른 구현예에서는 약 0.7 배(70%) 희석된 배지가 사용될 수 있다.

[0015] 희석된 배지에 접종된 형질전환체는 통상 대장균의 배양에 사용되는 온도, 예를 들면 37℃에서, 약 12 내지 약 20시간 배양된다.

[0016] 이 후, 배양배지가 표준농도가 되도록 배지 구성성분을 추가한다. 예를 들면 접종시 0.7배 LB배지가 사용된 경우, 나머지 0.3배에 해당하는 Bacto-tryptone, Bacto-yeast extract 및 NaCl를 추가한다. 한 구현예에서 인두서, 예를 들면 IPTG는 이와 동시에 또는 바로 후에 추가된다. 상기 IPTG 농도는 발현하고자하는 단백질의 양의 맞추어 조절할 수 있으며, 예를 들면 약 0.1 mM 내지 1mM (최종농도)로 사용될 수 있다. 한 구현예에서 0.5mM로 사용된다. 이 후, 상기 배양배지에서 추가로 약 2 내지 18시간 동안 형질전환체를 배양한다. 한 구현예에서는 약 2 내지 8시간 추가 배양된다. 다른 구현예에서는 약 2 내지 6시간 추가 배양된다. 또다른 구현예에서는 약 2 내지 4시간 추가배양된다.

[0017] 상기와 같은 희석된 배지사용은 대장균의 성장을 안정화기(Stationery phase)로 유도한다. 그리고 이후 단계에서의 정상 농도의 배지 및 인두서의 사용으로 대장균의 성장이 촉진되며 동시에 비교적 단기간에 단백질 발현이 고효율로 유도된다. 즉 단백질 발현량은 증대되면서 생산된 단백질의 분해는 최소화되어 대량의 제한효소 생산이 가능하게 되는 것이다.

[0018] 본 방법은 배양된 형질전환체를 회수하고, 이로부터 제한효소를 분리/정제하는 단계를 추가로 포함한다. 형질전환체를 배양한 후 회수하는 방법은 공지되어 있다. 예를 들면, 형질전환체를 원심 분리하여 펠렛을 수득한 후, 이를 완충용액, 예를 들면 10mM Tris-HCl pH 8.0에 현탁하는 것을 포함하나 이로 제한하는 것은 아니다. 현탁 후, 공지된 방법, 예를 들면 이로 제한하는 것은 아니나, 동결-해동의 방법에 의해 세포를 파쇄한 후, 원심분리법 등을 사용하여 수용성 분획을 크로마토그래피법으로 목적 단백질을 분리할 수 있다. 단백질 분리에 사용되는 다양한 크로마토그래피 방법이 공지되어 있다 (Dunnill, P., and Lilly, M.D. 1972. Continuous enzyme isolation. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 3:97; Jacoby, W.B. (ed.) 1984. *Enzyme purification and related techniques*, Meth. Enzymol. 104, Academic Press, New York; Cooper, T.G. 1977. *The Tools of Biochemistry*, John Wiley & Sons, New York.; Scopes, P. 1982. *Protein Purification*. Springer-Verlag, New York). 당업자라면 분리하고자하는 제한효소의 특성에 따라 적절한 크로마토그래피를 선택할 수 있을 것이다. 예를 들면 재조합 제한효소가 히스티딘 태그를 포함하는 경우는 친화성 크로마토그래피 예컨대 고정 금속 친화성 크로마토그래피가 사용될 수 있다. 한 구현예에서, 금속 친화성 크로마토그래피가 사용되며 이를 연속적 농도를 갖는 용출 완충용액, 예를 들면 이미다졸(imidazole)을 완충용액을 약 10 내지 600 mM의 농도로 사용하여 크로마토그래피 컬럼에 결합된 재조합 제한효소를 용출하여 분리/정제할 수 있다.

[0019] 본 발명의 한 구현예에서 본원의 방법은 잔토모나스 균주(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, Xoo) 유래의 XorKII의 발현에 사용된다. Xoo는 프로티오박테리아(Proteobacteria)의 γ -서브-디비전(γ -sub-division)에 속하며, 라이스(rice) 상에 박테리아 사멸을 야기한다. 박테리아 사멸(bacterial blight)은 도관병(vascular disease)이며 엽맥을 따라 백색병변을 초래한다. 심한 체내 침입은 50%의 손실을 야기할 수 있다. 병원균에 대해 더 잘 이해하고 이에 의한 가능한 손실들을 최소화하기 위해, Xoo 계통 프로젝트가 완성되었다. 그러나, KACC10331 스트레인(strain)의 제한/변형(modification) 시스템은 매우 활성화 되어 있는데, 상기 스트레인의 유전적인 분석은 실패하여 왔다. 이러한 어려움을 극복하기 위해, 제한/변형 시스템을 먼저 이해하는 것이 가장 핵심적으로 생각되었다. 종래, XorKII는 직접적으로 Xoo로부터 생산된 것이었고, 단지 아주 소량으로만 정제되었으며, 정제

는 실패하였다 (Wang et al., Two sequence specific endonuclease from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Characterization and unusual properties, Biochim. Biophys. Acta. 606 (1980) 371-385). 이에 따라 보다 상세한 분석은 불가능하였다. 이와 관련하여, 메틸 전이효소에 대한 일부 연구보고를 제외하고는 거의 연구된 바가 없었다.

[0020] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위해서 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐 본 발명이 하기의 실시예로 한정되는 것은 아니다.

[0021] <실시예 1> 제한효소 유전자 클로닝 및 형질전환체의 제조: pET-28a/XorKII 발현벡터 및 이로 형질전환된 대장균

[0022] 잔토모나스속 균주(Xoo)(KACC10331)로부터 게놈 DNA를 분리한 후 (Lee et al., The genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice, Nucleic Acids Res, 33(2005) 577-586)) 이에 존재하는 XorKII 유전자를 PCR 방법으로 증폭하였다 (Moon et al., Recombinant expression, purification, and characterization of XorKII: A restriction endonuclease from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Protein Expression and Purification 62(2008) 230-234). 구체적으로 포워드 프라이머 5'-ggg ccc gga ttc gtg agc ttg cct ccc tac gtc-3') 및 리버스 프라이머 5'-ggg ccc ctc gag tta aac gcc gtg cat caa cgt-3'를 이용하였으며, 이에 DNA 폴리머라제(Pfu polymerase, Omega사)와 상기 추출한 Xoo 게놈 DNA를 첨가한 후 94℃에서 1분 동안 변성시킨 다음, 94℃에서 30초, 55℃에서 30초 및 72℃에서 2분간 35회 반응시키고, 72℃에서 7분간 증폭시켰다. 이때 사용된 각각의 프라이머는 상기 증폭된 XorKII 유전자를 발현벡터 pET-28a(Novagen)의 Bam HI 및 Xho I 부위에 클로닝할 수 있도록 5' 말단에 Bam HI 및 3' 말단에 Xho I의 효소 인식부위를 갖도록 제작하였다. 이어 상기 PCR 산물을 정제한 후 BamHI 및 Xho I 으로 절단한 후, 이를 역시 동일한 효소로 처리된 pET28a 벡터 (Novagen, USA)에 라이게이션 하였으며, 이를 pET-28a/XorKII로 명명하였다 (도 1 참조).

[0023] 이어, 상기과 같은 방법으로 클로닝한 유전자를 형질전환능 세포인 Rosetta2(DE3)/PLysS (Novagen, USA)에 제조자의 지시에 따라 열충격 및 오퍼튜니즘을 이용한 형질전환법을 이용하여 도입하였다. 상기 플라스미드를 포함하는 형질전환체는 2006년 3월 17일 KACC 95047P로 한국농업미생물자원센터에 기탁되었다. 상기 벡터는 목적 단백질인 XorKII의 과발현에 필수적인 T7 프로모터를 이용하기 위하여 게놈에 T7 RNA 폴리머라제 유전자를 포함하고 있으며 대장균이 아닌 다른 박테리아의 단백질을 생산을 위해 코돈 사용빈도(codon usage)를 고려하여 보통의 대장균보다 전달 RNA(transfer RNA, tRNA)를 더 많이 가지고 있으며 T7 RNA 폴리머라제를 보다 잘 제어할 수 있도록 pLysS 플라스미드를 가지고 있다.

[0024] <실시예 2> 제한효소의 발현을 위한 배양배지의 농도 결정

[0025] 실시예 1의 형질전환체에서 XorKII 제조용 유전자가 정상적으로 발현되는지 여부와 최적의 발현에 필요한 LB 농도를 확인하였다. 50 µg/ml의 카나마이신 및 34 µg/ml의 클로람페니콜이 첨가된 3 ml의 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 및 100% LB 배양액(배지)에 상기 실시예 1의 형질전환체를 접종한 후, 37℃에서 하룻밤 진탕 배양하였다. 100% (1배, 1x)의 LB 배양액의 경우 1L에 10g의 Bacto-tryptone, 5g 의 Bacto-yeast extract 및 10g의 NaCl를 포함한다. 다음 날 상기 50%, 60%, 70%, 80%, 90%의 LB 배양액에, 100%가 되도록 각 배양액에 적절한 양의 10x LB (10배 농도의 LB)를 첨가하였으며 동시에 IPTG를 최종농도가 0.5 mM이 되도록 첨가하였다.

[0026] 이어, 상기 세포를 3시간 동안 다시 진탕 배양한 후 4℃, 각 배양액을 원심분리하여 세포(펠렛)을 수득한 후 이를 8M 우레아가 포함된 10mM Tris-HCl pH7.5에 현탁한 후 SDS-PAGE 전기영동 (NuPAGE gel/MES running buffer, Invitrogen, USA)으로 분석하였다. 결과는 도 2에 기재되어 있다.

[0027] 도 2의 레인 5에 나타난 바와 같이 초기 배양에 70% LB를 사용한 것이 가장 높은 농도의 제한효소를 발현함을 알 수 있었다. 이는 처음부터 100% LB를 사용한 것과 비교하여 약 100배 정도 증가된 발현을 나타내었다.

[0028] <실시예 3> 제한효소의 생산

[0029] 실시예 1의 형질전환체 단클론을 50 µg/ml의 카나마이신 및 34 µg/ml의 클로람페니콜이 첨가된 70% LB 1L에 접종한 후 37℃에서 하룻밤 진탕 배양하였다. 다음 날 상기 배양배지가 100%의 LB가 되도록, 3g의 Bacto-tryptone, 1.5g의 yeast extract 및 3g의 NaCl을 상기 배양배지에 직접 추가하여 용해시키고, 이에 IPTG를 최종농도

0.5mM로 추가한 후, 추가로 3시간 배양하였다. 배양 후 4℃, 5000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 세포를 수집하였으며, 이를 50 ml의 Tris-HCL(10 mM, pH 8.0)에 현탁한 후 사용시까지 -20℃에서 보관하거나 즉시 사용하였다.

[0030] 제한효소의 분리 및 정제

[0031] 제한효소의 분리정제는 다음과 같이 수행하였다. 상기 세포현탁액을 동결 및 해동 방법으로 파쇄하였고, 이 파쇄 용액을 4℃, 15,000 rpm으로 20분간 원심 분리하여 상층액을 수득한 다음 이를 Ni^{2+} 로 충전된 HiPrep Chelate 컬럼(5ml, GE Healthcare Life Sciences, USA)에 적재하였다. 에서 상기 컬럼 (AKTA Basic system (GE Healthcare Life Sciences) 사용)에 10mM에서 300mM의 농도구배를 갖는 이미다졸을 추가하여 단백질 분획을 용출하였으며, 정제 분리의 여러 단계 및 정제된 시료를 추출하여 SDS-PAGE 전기영동 (NuPAGE gel/MOPS running buffer)을 수행하였다. 결과는 도 3 및 도 4에 기재되어 있다. 도 3에 나타난 바와 같이 XorKII는 봉입체 (inclusion body, 라인 5)에 포함되어 있으며, 정제된 XorKII는 컬럼에 결합한 분획인 라인 7에 존재하였으며, 결합하지 않은 분획(라인 6)에는 제한효소가 존재하지 않았다. 이로부터 상기 컬럼을 사용한 분리의 효율이 매우 높음을 알 수 있다. 표준농도곡선(Bovine Serum Albumin을 표준물질로 사용하여 Bradford assay (Zor, T. and Selinger, Z Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. Anal. Biochem.(1996) 236:302-8)로 단백질 농도를 결정하여 작성)을 이용하여 결정된 XorKII의 농도는 1L LB 당 3.5mg 이었다. 이는 초기부터 100%의 농도의 배양배지를 사용한 종전의 방법, 예를 들면 Wang et al., *ibid*에 기재된 것과 비교하여 현저히 향상된 것이다. HiPrep Chelate 컬럼을 사용한 경우 XorKII는 최적의 이미다졸 용출농도는 180mM 이었다 (도 4).

[0032] **<실시예 4> 분리된 제한효소의 특성 분석**

[0033] XorKII의 질량 측정

[0034] 실시예 3에서 정제된 XorKII를 Superdex 200 HR 10/30 컬럼 (GE Healthcare Life Sciences)에 적재하고, 1M NaCl 및 150mM NaCl로 용출하였다. 결과는 도 5에 기재되어 있다. 1M NaCl로 용출시 강한 피크가 관찰되었으며 이로부터 추정된 XorKII의 분자량은 95.3KDa이었으며 단량체 XorKII의 분자량이 43.2KDa 임을 감안할 때 XorKII가 이량체로서 존재함을 알 수 있었다. 이는 실제 정확한 XorKII의 분자량과는 약간의 차이가 있는 것으로 이는 단백질이 완전한 구형이 아닌 타원체라는 사실에 기인하는 것이다.

[0035] XorKII 제한효소의 활성 측정

[0036] 실시예 3으로부터 분리 및 정제된 XorKII의 제한효소 활성을 조사하기 위하여, 이 효소와 아이소스키조머 (isoschizomer)인 Pst I의 효소 활성도를 다양한 완충액에서 Yep24 플라스미드를 절단하는 비율로 비교하였다. 각 효소를 사용하여 Yep24 플라스미드를 37℃에서 1시간 절단 후 절단된 단편을 1% 아가로스젤 전기영동을 하였으며 결과는 도 6에 기재되어 있다. DNA 절단에 사용된 완충액은 다음과 같다: 완충액 1(10mM Tris-HCl pH7.0, 10mM $MgCl_2$, 1mM dithiothreitol)- XorKII; 완충액 2 (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH7.9, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM dithiothreitol); 완충액 3 (100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.9, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM dithiothreitol); 완충액 4 (50 mM potassium acetate, 20 mM Tris-acetate pH 7.9, and 10 mM Magnesium Acetate, 1 mM dithiothreitol). 효소는 완충액 1에서 가장 높은 활성 (도 6의 라인 1)을 보였으며, Yep24에 대한 제한효소 XorKII의 절단 양상은 PstI (라인 3)과 매우 유사함을 관찰할 수 있었다. 따라서, 본 발명에서 분리 및 정제한 제한효소 XorKII은 기존의 아이소스키조머와 마찬가지로 활성이 매우 우수한 이를 대체할 수 있는 효소임을 확인하였다.

[0037] 분리 정제된 XorKII 제한효소는 저장완충액 (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, and 0.05% Triton X-100) 중, 37℃에서 24시간 동안 활성을 유지하였으며 65℃에서 5분간의 열처리로 비활성화되었다.

[0038] Xor KII 제한효소의 비활성도 (Specific activity) 측정

[0039] 제한효소의 활성의 단위인 1 Unit은 50 μ l의 반응부피에서 1 μ g의 λ DNA를 37℃에서 적어도 한 번 절단하는 효소의 양으로 측정하였다. 실시예 3의 분리단계에서 분획의 비활성을 측정하였으며 그 결과는 다음 표 1과 같다.

[0040] [표 1] XorKII의 비활성

[0041]

	총 단백질(mg)	총 활성(u)	비활성(specific activity : u/mg)
상등액	105.9	480,000	4530
분액	3.58	112,000	31,300

[0042] 상기 표에서 보는 바와 같이 크로마토그래피된 분획 (bound fraction) 에 포함된 제한효소의 비활성은 31,300U/mg으로 상등액(supernatant)에 포함된 것과 비교하여 약 10배 정도 높은 활성을 나타내었으며, 이는 정제 정도가 매우 향상되었음을 나타내는 것이다. 아울러 종전의 방법을 사용하여 수득한 XorKII의 비활성 116U/mg과 비교하여 (이 경우는 1 μ g의 λ 를 28회 자르는 것으로 정의하였으므로 상기 수치에 28을 곱하면 정확한 비활성도는 3248U/mg임)(Wang et al., *ibid*) 적어도 약 10배의 월등히 높은 비활성도를 나타내었다. 이는 본 방법이 대량의 제한효소를 고효율로 생산할 수 있음을 보여주는 것이다.

[0043]

[0044] 본 발명의 방법을 사용할 경우 제한효소를 고효율로 고농도로 대량생산 할 수 있음은 물론 생산된 효소는 안정하여 높은 효소활성을 유지한다. 상기 실시예는 단지 예시적인 것일뿐 본 발명의 범위는 상기 실시예의 범위로 한정되지 않으며 당업자라면 본 발명의 제한효소의 발현 및 정제방법은 다른 제한효소의 생산에도 적용될 수 있음을 알 것이다.

도면의 간단한 설명

[0045] 도 1은 제한효소 XorKII 유전자를 포함하는 발현벡터의 개열지도이다.

[0046] 도 2는 배지 농도에 따른 제한효소 XorKII 발현 정도를 나타내는 단백질 전기영동 사진이다. 레인1: 단백질 분자량 마커; 레인2: IPTG로 유도되지 않음 100% 배지 사용; 레인3 내지 8은 IPTG로 유도되었으며 각각: 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 및 100%의 LB 배지를 사용.

[0047] 도 3은 발현된 제한효소의 분리과정 중 여러단계에서 추출한 시료의 전기영동 사진이다. 레인 1: 단백질 분자량 마커; 레인 2: 유도전 전세포 파쇄액; 레인 3: 유도후 전세포 파쇄액; 레인 4: 레인 3의 파쇄액을 원심분리하여 수득한 상등액; 레인 5: 레인 3의 불용성 분획; 레인 6: HiPrep Chelate 컬럼에 붙지않고 빠져나온 분획; 레인 7: HiPrep Chelating column에 결합한 분획.

[0048] 도 4는 HiPrep Chelate column의 용출 프로파일이다. 화살표가 XorKII 피크를 나타낸다.

[0049] 도 5는 Superdex 200 HR 컬럼의 용출 프로파일이다. 위쪽 곡선 및 아래 곡선은 각각 1M NaCl 및 150mM NaCl을 사용하였다.

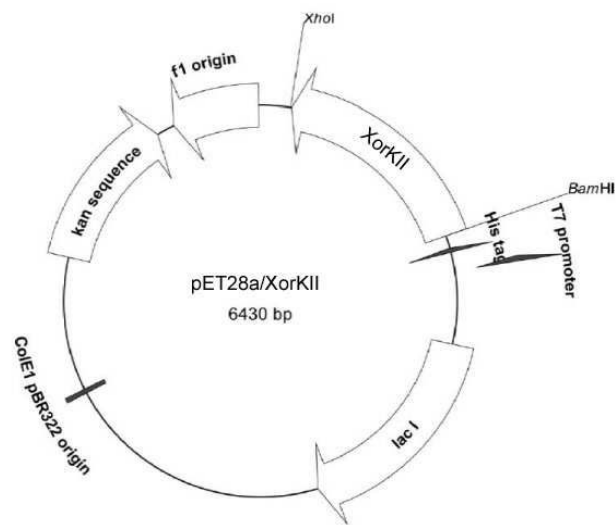
[0050] 도 6은 XorKII의 제한효소로서의 활성을 나타낸 것으로 XorKII로 처리된 Yep24 플라스미드의 전기영동 사진이다. 레인 1: 사이즈마커; 레인 2: XorKII로 처리되지 않은 Yep24; 레인 3: PstI으로 처리된 Yep24; 레인 4 내지 7은 각각 완충용액 1, 2, 3 및 4 중에서 XorKII로 처리된 Yep24.

[0051] 도 7은 XorKII 의 염기서열이다.

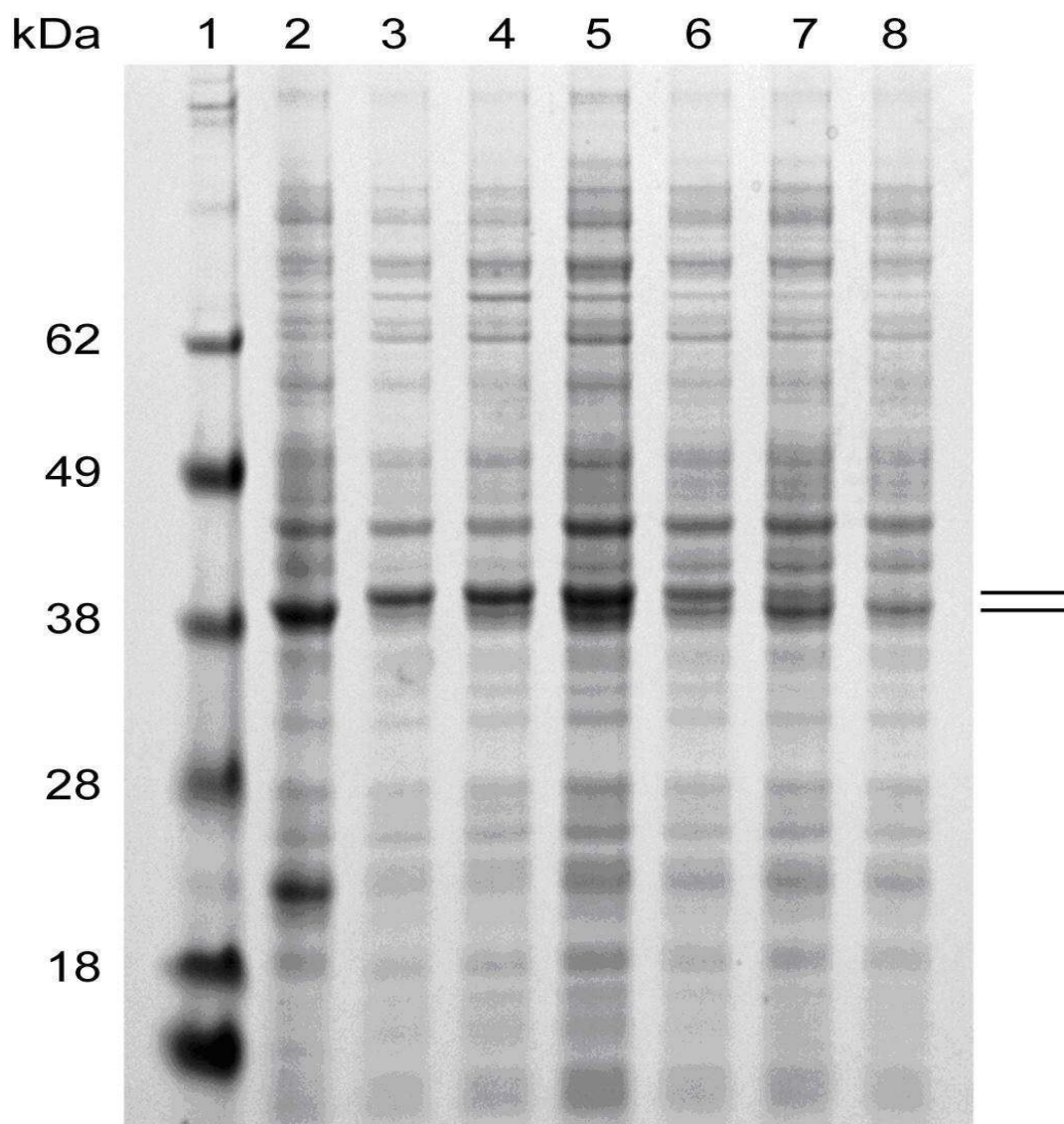
[0052] 도 8은 XorKII의 아미노산 서열이다.

도면

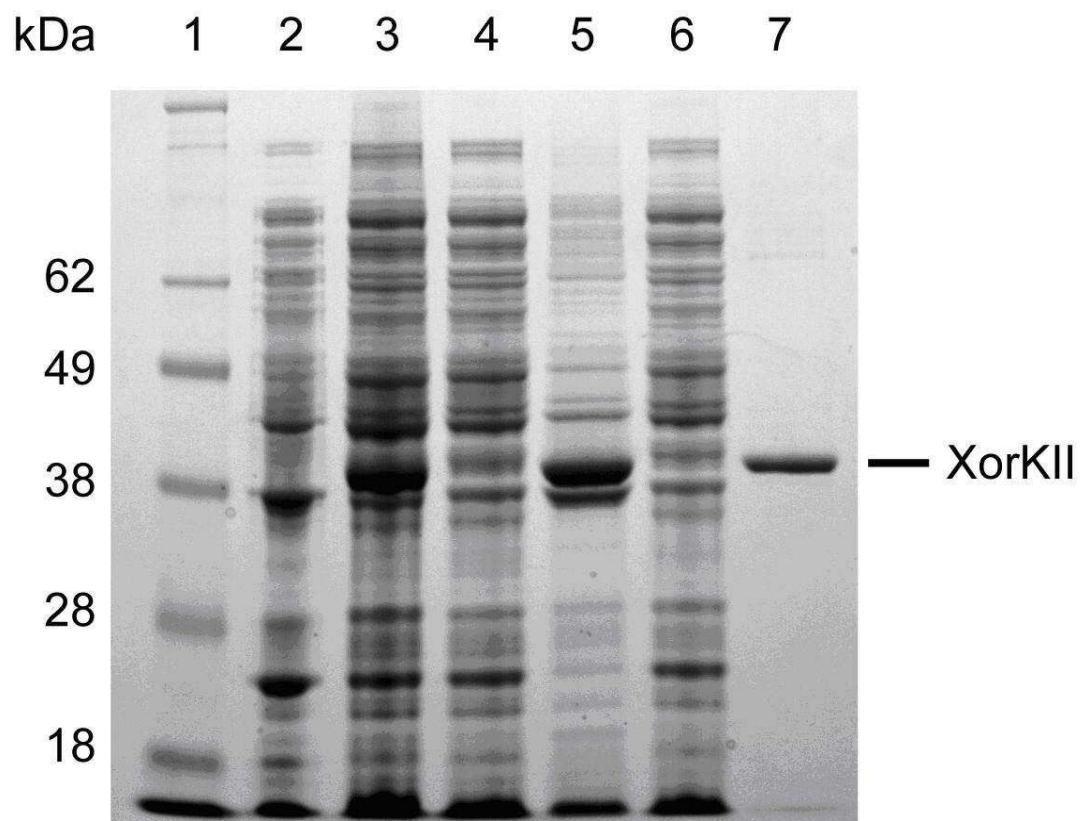
도면1



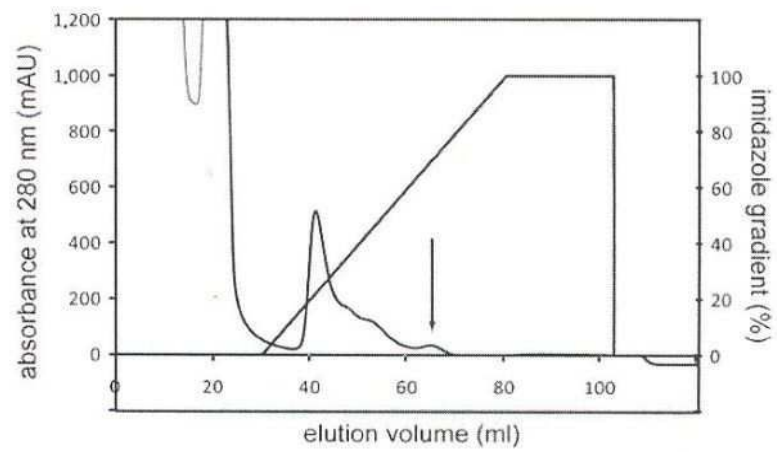
도면2



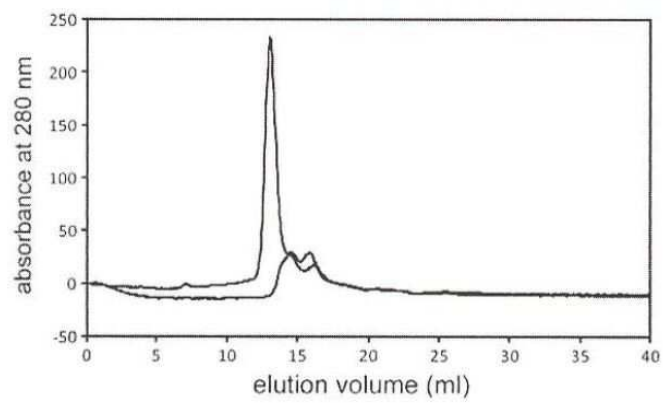
도면3



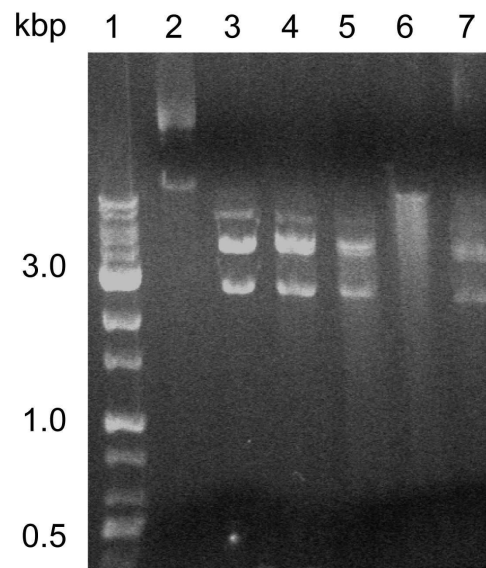
도면4



도면5



도면6



도면7

XorKII DNA 서열

gtgaattgctccctacgtcgaacggctaaccattcaccagcgtctgccctcatcttcaggacggact
 cccaatcgcaactattgcattcgggaatggcgcctcggcgggtgttggatgctatacatcggggagtc
 gaaggacactgaccgatgcttggccgaacatgtgatgctatgacggcgaagaacactgctgagtga
 gatgcagtggagaagctacggcttcgaagcatgaagcgggggtttcagtagctgggaacgttggtac
 gaggaaaacagtcgcgaagcccttcgacgagactttggccaaggatttatcacgaataacgctgtgta
 gaaggggagggttgcacaacacctctggctgccgctatgctcgaagactgacttcgaaggttattt
 gaccctgacttctggagacgactgctgcatccatcactgcttggcaggaagtcaccttccagatcg
 gcgatggcgcgtcgacttgcggcgtggctctgtgacaacaggtgatgatgaatagtgacctttcca
 aaccgggaacggccggatggcaccggccgagtcagtcattcgaagggtcattgaagaatttgc
 gctcgttcctcacgagccagcgttttatgggtgagcgaagcggcgaagtcgtcgtagagacgat
 gaacttgcgaagtcctgaacttaaaattacagccgaccgaacttgcagacatcatcctttagaccta
 ggagggtggcgcaccgggttccttctggtgttcacgaagttgtcgaccgatgggcaatcacgatg
 caacggcaagaagccttcagcagattgaagcgatgccggttcaagcggacacggaagcttcgtgacg
 gcctatctagaccgtccaacgggttcaaaaagacaatagccgagtcgcttggactccttcgttgg
 ttgcttcggagccgagacatcatcgccttcacaacgagcgacctcgcgttcggttgagcaggtt
 atgacggcggttaa

도면8

XorKII 아미노산 서열

VSLPPYVDRLTIHQRLPLIFQDGTNRNYCIREMAASAVFVHLYIGAVEGTDRT

LAPKHVNRMTVEQALLSDDAVREAYGFGAMEPGFRVAGQRWYEENSREPLRDET

LRQGFITNNAVVERAGLPTTSGLPRYALKTDFAALFDPALAGDDLAASITAWQE

AHLSASAMARVALVRRGAVTTGDDVIVTFPNRETRRMAPGPSSVISKGVIEEFA

ARFLTQPAVLWVSESGAKVVARDDDELAKSLNLKITADRNLPDIIILVDLGGGGAP

GFLLVFIEVWATDGPITNQRQEAFMQIAADAGFKPDTVAFVTAYLDRSNAAFKK

TIAELAWHSFAWFASEPEHIIALHNGATSPLPLSTLMHGV