

## Gene fusion of GFP with cytochrome c-552 gene of *Hydrogenobacter thermophilus*

김민경<sup>1</sup>, 성소현<sup>2</sup>, 진기덕<sup>2</sup>, 이한수<sup>2</sup>, 이원홍<sup>3</sup>, 최정우<sup>3</sup>, 안동준<sup>4</sup>, 홍억기<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>생명과학부, <sup>2</sup>강원대학교 환경·생물공학부, <sup>3</sup>서강대학교 화학공학과,  
<sup>4</sup>고려대학교 화학공학과

전화 (033) 250-6275, FAX (033) 243-6350

### Abstract

A cytochrome c-552 from a thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium, *Hydrogenobacter thermophilus*, was amplified using PCR. The cytochrome c-552 gene was cloned into *E. coli* vector pAlter-1 and transferred to JM109. Glutamine of cytochrome c-552 protein was changed to cysteine through point mutation.

### 서 론

생물체내에는 생체에너지 생산 전자전달체계를 갖고 있는데 여러 종류의 cytochrome과 NAD, FAD, ubiquinone 등의 물질이 에너지 생산에 관여한다<sup>1)</sup>. 그 중 많은 역할을 담당하는 cytochrome은 식물세포와 동물세포 외에 미생물에서도 발견되고 특히 *Hydrogenobacter thermophilus*라는 고온성 (70°C 이상) 박테리아에서는 세포막에 존재하면서 전자전달로 인한 막전위차를 형성하여 생체에너지를 합성한다. 이 때의 전자 전달방식은 한 방향으로 방향성을 갖으며 전달된다<sup>2)</sup>.

Cytochrome은 포함하는 heme의 형태에 따라 a, b, c, d, o, f 등으로 분류되며 그 종류에 따라 각기 다른 차이를 보이거나 대부분 열에 약한 편이다. 그 중 cytochrome c의 연구는 여러 방면으로 진행되어 cytochrome c의 구조와 기능은 많이 알려져 있다<sup>3)</sup>. Heme c를 갖는 cytochrome c의 크기는 작은 편이고 단일 단백질로 구성되어 있다. Cytochrome c 중에도 흡광도에 따라 550, 551, 552 등으로 나누어 진다.

*Hydrogenobacter thermophilus*는 고온성 균주로서 70°C 이상에서 자란다. 이 균주가 생산하는 cytochrome c-552 단백질의 유전자 지도와 흡광도는 이미 밝혀져 있으며 그 크기가 8kda으로 작은 편이고, 고온에서 안정한 단백질이라고 알려져 있다. 그리고 대부분이  $\alpha$ -helix 구조로 이루어진 3차 구조를 가지며 monomer form으로 대체로 안정한 구조를 이룬다<sup>4)</sup>. 특히 *Hydrogenobacter thermophilus*가 가지는 cytochrome c-552는 sulfur를 함유하는 한 개의 quinone을 포함한다<sup>5)</sup>.

Cytochrome c-551의 경우 구성하고 있는 아미노산의 특이 부위를 다른 아미노산으로 바꾸므로써 열에 대한 안정성을 높인 연구결과들이 있다. 따라서 cytochrome c의 특정 아미노산을 변이시켜 다른 아미노산으로 대체할 경우, 열에 대한 안정성 뿐만 아니라 전자전달속도 그리고 감광 단백질과 융합할 수 있는 linker를 만들 수 있게 된다.

본 실험에서는 cytochrome c-552 유전자의 증폭을 위한 primer 제작과 *E. coli*에 cloning하여 이를 mutation 시키므로써 생물전자 소자에 응용될 수 있는 융합 단백질의 생산에 필요한 기초자료를 마련하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### Cytochrome c-552 유전자의 증폭

*Hydrogenobacter thermophilus* cell을 95°C로 heat block (10min)하고, 원심분리하여 STET buffer와 lysozyme을 첨가한 다음 sonication을 2초간, 10회 반복적으로 행하여 세포추출물을 얻었다. PCR을 이용하여 chromosomal DNA로부터 cytochrome c-552 gene을 증폭하였다. 증폭에 이용한 primer (primer I: 5' -A GAA TTC ATG AAT GAA CAG CTT GCC AAG C-3', primer II: 3' - GAG AGG TAT TTC ATT CCT AGG CCCCCG-5')는 이미 보고된 cytochrome c-552 cDNA 염기서열에 근거하여 DNA합성기로 합성하였으며, cloning에 이용하기 위해 *EcoR* I (primer I)과 *BamH* I (primer II) 제한효소 인지부위를 삽입하였다(밑줄친 부분). PCR 반응후 cytochrome c-552 유전자의 증폭을 확인하기 위해 PCR 산물을 특정 제한효소로 처리한 후 2.5% agarose gel에서 확인하였다.

### Cytochrome c-552 유전자의 cloning

Cytochrome c-552 유전자를 cloning하기 위하여 PCR 산물을 *EcoR* I 과 *BamH* I 제한효소로 처리한 후 pAlter-1 벡터에 삽입하여 *E. coli* 균주 (JM109)에 형질전환시켰다. 형질전환된 균주를 1 ml의 LB 배지에서 37°C로 1시간 동안 배양한 후 100 $\mu$ l의 배양액을 tetracycline이 함유된 LB plate에 50  $\mu$ l X-gal과 20  $\mu$ l IPTG와 함께 도말한 후 하루밤 동안 37°C에서 배양하였다. 푸른색 colony를 선별하여 실험에 사용하였다.

### Cytochrome c-552 유전자의 변이

합성된 mutagenic oligonucleotide(5' - CA AAA CAG CTG GCC TGC TGG ATA CTC - 3')를 A280에서 측정하여 정량한 후 -20°C에서 보관하였다. 멸균증류수 18 $\mu$ l에 1  $\mu$ l의 mutagenic oligonucleotide (100 pmol), 2.5  $\mu$ l의 10 x T4 polynucleotide kinase buffer (0.5 M Tris-HCl, pH 7.6 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM 2-mercaptoethanol), 2.5  $\mu$ l의 10 mM ATP, 그리고 1  $\mu$ l의 T4 polynucleotide kinase (5 units)를 가하여 37°C에서 30분간 5'-말단을 인산화시킨 후 70°C에서 10분간 두어 반응을 중지시켰다. 이 반응산물을 Altered sites II *in vitro* mutagenesis systems (Promega)로 돌연변이시켰다.

## 결과 및 고찰

### PCR에 의한 cytochrome c-552 cDNA의 증폭과 분리

Cytochrome c-552 유전자의 5'-말단에 해당하는 primer I 과 3'-말단에 해당하는 primer II를 사용하여 PCR 증폭을 하였을 때 266bp의 단일 band가 나타났다. 증폭된 DNA가 cytochrome c-552를 확인하기 위해 PCR 산물을 *Sau3A* I으로 처리하였을 때 기대한 바

와 같이 각각 200bp, 60bp 정도의 절편이 나타났다 (Fig.1).

### Cytochrome c-552 유전자의 cloning 확인

Primer에 삽입해 놓은 *EcoR* I 과 *BamH* I 의 절단부위를 이용해 PCR 산물을 각각의 효소로 절단하고, 동시에 cloning vector로 사용된 pAlter-1의 multicloning site (MCS)에 존재하는 *EcoR* I 과 *BamH* I site를 각각 절단하여 연결하였다. 벡터내에 존재하는 *lacZ* gene을 이용하여 colony를 선별하고 특정 제한효소를 이용하여 cytochrome c-552 유전자를 확인하였다.

### Point Mutagenesis에 의한 cytochrome c-552 변이 유전자들의 제조

Mutagenic primer들을 사용하여 Promega사의 Altered Sites II *in vitro* Mutagenesis Systems에 따라 cytochrome c-552 단백질의 75번 잔기인 glutamine(CAG)을 cysteine(TGC)으로 point mutation시켜 mutagenic oligonucleotide에 포함된 *Pvu*II 제한효소로 분석하여 확인하였다(Fig.2). Mutagenesis 부분이 3개의 base를 모두 변형시키는 것이므로 안정성을 위해 mutagenic oligonucleotide를 약간 더 길게 제작하였고 GC content는 50%정도로 하였다. 또한 cytochrome c-552 유전자는 double strand로 되어 있으므로 phage를 이용해 single strand로 만들어 변이과정을 수행하였다. 이 경우 변이 효율이 double strand의 경우보다 좋았음을 알 수 있었다.

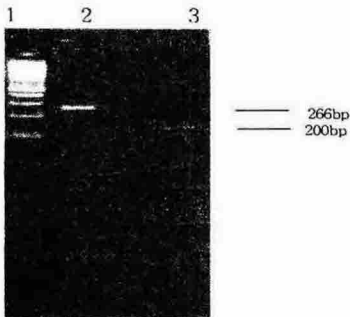


Fig.1. Agarose gel electrophoresis of PCR product of cytochrome c-552

lane1 : marker (100bp Ladder)

lane2 : PCR product of cytochrome c-552

lane3 : cytochrome c-552 PCR product (*Sau*3A I digest)

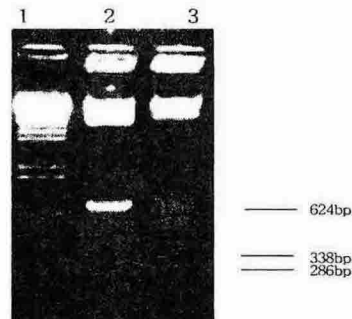


Fig.2 . Agarose gel electrophoresis of mutagenesis (Glu75 → Cys75)

lane1 : marker ( $\lambda$  DNA: *Hind*III+*EcoR* I digest)

lane2 : wt-cytochrome c-552 (*Pvu*II digest)

lane3 : mt-cytochrome c-552 (*Pvu*II digest)

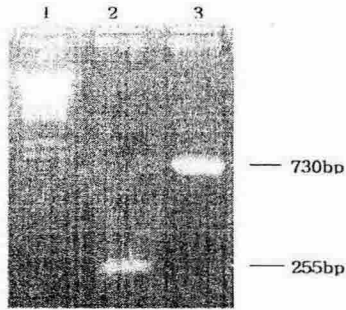


Fig.3. Agarose gel electrophoresis of GFP PCR product  
 lane1 : marker ( $\lambda$  DNA: *Hind* III + *Eco*R I digest)  
 lane2 : PCR product of cytochrome c-552  
 lane3 : PCR product of GFP

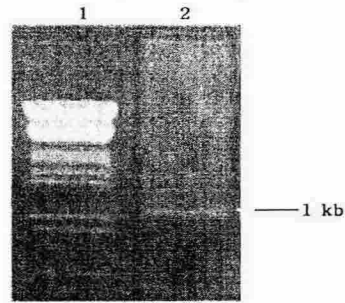


Fig.4. Agarose gel electrophoresis of ligation mixture  
 lane1 : marker ( $\lambda$  DNA: *Hind* III + *Eco*R I digest)  
 lane2 : Ligation mixture (GFP/cytochrome c-552)

## 요 약

고온성 박테리아인 *Hydrogenobacter thermophilus*가 생산하는 cytochrome c-552 유전자에 대한 primer를 제작하여 PCR을 통해 증폭한 후 *E. coli*에 cloning하였다. 또한 point mutagenesis를 통해 fusion protein을 만들기 위한 기초자료를 마련하였다. 앞으로 cytochrome c-552가 *E. coli*에서 mutant type으로 발현되기 위한 발현벡터의 개발과 이를 정제하는 기술을 개발하는 것이 필요할 것이다.

## 참고문헌

1. Wada, O., S. Suwuki, S. Ueyama, H. Kawakubo, and S. Isoda. "Fibrous structure in a favinmonolayer observed by dark-field electron microscopy"(1991), *Langmuir*, 7, 152-156.
2. Azzone, G. F., I. Schmehl, M. Canton, and S. Luvisetto, "The effect of the protonmotive force on the redox state of mitochondrial cytochromes"(1994), *BBA*, 1187, 140-144.
3. Nording, M., S. Young, B. G. Karlsson, and L. G. Lundberg, "The structural gene f of cytochrome c-551 from *Pseudomonas aeruginosa*"(1990), *FEBS*, 259, 230-232.