

# 13. 진핵생물 *Brassica juncea* 의 $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase 유전자 과발현이 원핵생물 *Escherichia coli* 의 산화적 스트레스에 미치는 영향

## - I. $\gamma$ -ECS 유전자의 cloning -

김혜기 · 신재천 · 이인애 · 허인경 · Nagib Ahsan · 조진기  
(경북대학교 농업생명과학대학 동물공학과)

## Overexpression of a Eukaryotic $\gamma$ -glutamylcysteine Synthetase Gene from *Brassica juncea* Improved Resistance to Oxidative Stress in *Escherichia coli*

Hye-Gi Kim, Jae-Cheon Shin, In-Ae Lee, In-Kyung Heo, Nagib Ahsan and Jinki Jo  
(Department of Animal Science and Biotechnology, Kyungpook National University, Daegu 702-701)

Key words : *Brassica juncea*,  $\gamma$ -ECS, BcECS gene, EcECS gene.

### <목 적>

세포 내에서는 미토콘드리아, 세포질 및 원형질막 등에 존재하는 전자전달계와 산화-환원 반응과 관련된 여러 효소들의 작용 부산물로서 superoxide anion radical이 생성되고 이로부터  $H_2O_2$ , hydroxyl radical 등의 각종 활성산소종(ROS)이 생성된다. Glutathione은 대부분의 식물세포에서 대표적인 저분자량 thiol compound로서, 식물의 산화적 방에서 중요한 antibiotics 이며, protein disulfide reductant, sulfur transport, xenobiotic의 해독 및 유전자 발현 조절 등의 기능을 가지는 필수대사산물이다. 또한 GSH는 bacteria에서 필수 대사산물은 아니지만 다양한 xenobiotics 및 oxidative agent에 대한 내성을 증가시킨다. GSH는 두 단계를 경유하여 합성되어 지는데, 첫 번째 단계는  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase( $\gamma$ -ECS)에 의해 촉매 되어지고 두 번째 단계는 glutathione synthetase (GS)에 의해 촉매 되어진다. 세포 내에서  $\gamma$ -ECS gene의 overexpression은 GSH의 생합성을 증진 시킬 수 있다. 이 연구에서 우리는 대장균 내에서 배추  $\gamma$ -ECS gene을 도입하고, 비교 분석을 위해 *E. coli*로부터 분리한  $\gamma$ -ECS gene을 sense와 antisense 방향으로 도입하였다.

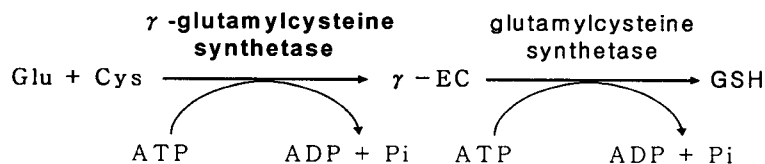


Fig. 1. Schematic diagram showing the two-step synthesis of glutathione from constituent amino acids.

### <재료 및 방법>

- 식물재료 - *Brassica juncea*
- - *Escherichia coli* : JM 109, BL21 (DE3)
- 형질전환에 이용할 발현 vector : pGEM-T easy, pET

• 실험방법

*Brassica juncea*로부터 mRNA를 분리 하여 RT-PCR을 통해  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetas ( $\gamma$ -ECS)를 암호화 하는 cDNA를 증폭시켰다. RT-PCR에 사용된 primer는 forward 5'-CAC GGG ATC CAG GAA ACA CAC CAT GG-3', reverse 5'-TTT TTT TTT GAG CTC AAT GGG TAA-3'이며, cloning을 위해 forward primer에서 4개의 염기를 BamH I site에 맞게 치환하고 reverse primer에서 5개의 염기를 Sac I site에 맞게 치환하였다. 비교 분석을 위해 *Escherichia coli*의 genomic DNA를 분리하여 PCR을 통해  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetas를 암호화 하는 유전자를 증폭시켰다. PCR에 사용되어진 primer는 forward 5'-GCT AAT GAA TTC GAT TTT GAC AGG-3', reverse 5'-CCT GAA TTC CTA GAA ATT TTG-3'이며, forward primer에서 4개의 염기를 BamH I site에 맞게 치환하고 reverse primer에서 2개의 염기를 BamH I site에 맞게 치환하였다. 각각의 PCR product는 pGEM-T easy vector 에 cloning하여 *E. coli* (JM109)에 transformation 하였고, *B. juncea*의  $\gamma$ -ECS는 sequencing을 통하여 gene의 sequence를 확인하였다. Sequence가 확인된 *B. juncea*의  $\gamma$ -ECS는 protein 발현 vector인 pET 28a에 cloning 하여 Fig. 1의 (A)에서와 같이 gene construct를 구축하였고, *E. coli* (BL 21)에 transformation 하였다.

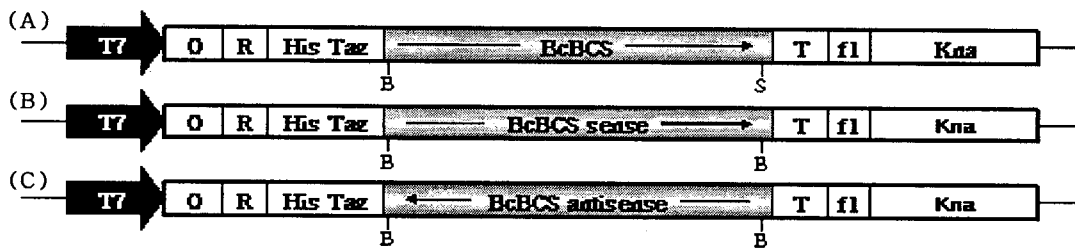


Fig. 1. Schematic diagram of the gene constructs will use to overexpress in *E. coli* cell Part of the recombinant plasmids containing (A) *Brassica juncea*  $\gamma$ -ECS (B) *Escherichia coli*  $\gamma$ -ECS sense (C) *Escherichia coli*  $\gamma$ -ECS antisense are shown. Arrows indicate the direction of transcription. T7, T7 promoter; O, lac operator; R, ribosomal binding site; T, T7 terminator; f1, origin of viral replication; and Kna, kanamycin resistant gene.

<앞으로의 계획>

앞으로 우리는 *B. juncea*의  $\gamma$ -ECS gene(BECS)과 같이 *E. coli*의  $\gamma$ -ECS gene(EcECS)을 sequencing을 통해 확인할 것이고 Fig. 1의 (B)와 (C)의 recombinant construct를 구축할 예정이다. 또한 EcECS sense로 형질 전환되어진 *E. coli*(BL 21)의 competent cell을 만들고 pET에 cloning 되어진 *E. coli*의 GS gene (EcGS) sense를 도입하여 EcECS sense와 EcGS sense를 가진 *E. coli* strain을 만들고, 같은 방법으로 EcECS antisense와 EcGS antisense를 가진 *E. coli* strain을 만들 것이다. 이 5개의 strain(BECS, EcECS sense, EcECS antisense, EcECS sense + EcGS sense, EcECS antisense + EcGS antisense)를 Northern blot 분석을 통해 유전자의 overexpression을 확인하고, Western blot 분석을 통해 protein의 overproduction을 확인할 것이다. Overexpression 및 overproduction이 확인된 *E. coli* strain은 다양한 oxidative stress를 처리하여 그 생존률과 성장률을 확인할 것이다.