

YRp 7 vector를 이용한 *Bacillus amyloliquefaciens* amylase gene의 cloning

I. *Escherichia coli*에서의 發現

서정훈 · 김영호 · 전도연 · 홍순덕 · 조윤래

경북대학교 자연과학대학 미생물학과
(1986년 1월 30일 수리)

Cloning of *Bacillus amyloliquefaciens* amylase gene using YRp 7 as a vector

I. Expression of cloned amylase gene in *Escherichia coli*

Jung Hwn Seu, Young Ho Kim, Do Youn Jun,
Soon Duck Hong and Youl Lae Jo

Department of Microbiology, Kyungpook National University, Taegu, Korea

(Received January 30, 1986)

A 1.95Kb Sau3AI fragment coding for α -amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* was isolated by the shotgun method using *Escherichia coli* as a host. The genome of *Bacillus amyloliquefaciens* was partially digested with the restriction endonuclease Sau3AI and joined to plasmid YRp7 cleaved with the restriction endonuclease BamHI. The α -amylase gene present in a 1.95Kb insert was stably maintained and expressed in *Escherichia coli*. The amount of α -amylase activity produced by *Escherichia coli* containing the hybrid plasmid pEA24 was about 65% of the activity produced by the donor *Bacillus amyloliquefaciens* strain. The properties of α -amylase produced by *Escherichia coli* were very similar to those produced by *Bacillus amyloliquefaciens* as based on optimum temperature, pH, and effect of CaCl₂ concentration. About 70% of the α -amylase produced by *Escherichia coli* was localized in the periplasmic space, whereas the remaining enzyme was localized in the inner part of the cell.

1979년 Struhl⁽¹⁾ 등이 yeast cloning vector로서 chromosomal integrating 성인 YIp와 yeast ars sequence를 가지는 YRp계를 보고한 이 후로 특히 *Saccharomyces cerevisiae*를 host organism으로 하여 eucaryotic gene의 cloning이 많이 시도되었다.

이 들 vector의 특징은 *E. coli* 내에서 형질발현이 되는 부분과 *S. cerevisiae* 내에서 형질발현이 되는 gene marker를 동시에 가지는 shuttle vector인 것으로, *S. cerevisiae* 형질전환에 있어 plasmid DNA 1 μ g당 1~10개의 transformant를 얻는데 반해 *E. coli*에서는 10⁴~10⁵개의 형질전환체를 얻을 수 있으므로 clone체를 확보하는데 보다 유리할 뿐 아니라 cloning된 recombinant DNA도 대량으로 단 시간내에 얻을 수 있으므로 이들 vector로서 먼저

*E. coli*를 host로 하여 cloning시킨 다음 선별된 recombinant DNA를 진핵세포인 효모로 재형질도입을 할 수 있다.

본 연구는 glucose로부터 알코올발효능이 강한 *S. cerevisiae*에 전분 분해능을 도입하여 전분에서의 알코올생성을 유도하고자 yeast ars sequence를 가지는 YRp 7을 vector로 하여 *B. amyloliquefaciens*의 α -amylase gene을 *E. coli* HB101를 수용체로 하여 cloning한 다음 조합체 DNA를 *S. cerevisiae*에 재도입하는데 목적을 두고 있다. 본 보에서는 *B. amyloliquefaciens*의 α -amylase gene을 YRp 7 내에 있는 unique BamHI부위에 cloning한 후 *E. coli* HB101을 수용체로 하여 형질전환하는 데 있어서의 조건, cloning된 α -amylase gene의 *E. coli* 내에서의 형질발현 및 recombinant DNA인 pEA24

의 physical map에 대해 기술하고자 한다.

재료 및 방법

균주 및 효소

본 실험에 사용한 vector plasmid는 *E. coli* C600에 들어있는 YRp7을, 수용체로는 *E. coli* HB101를 각각 사용하였다. α -amylase gene공여체로는 *B. amyloliquefaciens* 야생균주를 사용하였으며 phage lambda DNA는 *E. coli* C600에 들어있는 λ CI857 Sam7을 사용하였다.

Endorestriction enzyme (*Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Bgl*II, *Sau*3AI, 및 *Cla*I)과 T₄ DNA ligase, D-Nase, RNase 및 protease는 TAKARA SHUZO CO., LTD 것을 사용하였다.

배지

E. coli 배양배지로는 LB (Luria-Bertarri) 배지를 사용하였으며 고체배지 필요시에는 *Bacto*-agar (Difco)를 1.8% 첨가하여 사용하였다. Ap^r 또는 Tc^r 형질전환체를 선별하기 위해서는 배지내에 Ampicillin과 Tetracycline을 각각 50 μ g/ml와 20 μ g/ml로 넣었다.

DNA분리 및 정제

Bacteriophage λ DNA

λ CI857 Sam7이 들어있는 *E. coli* C600을 200 ml의 LB 배지에 키워 (A_{650} =0.3) 43°C에서 30분간의 heat shock를 주고 다시 37°C에서 배양한 *E. coli* cell을 T. Maniatis의 방법⁽²⁾에 따라 λ DNA를 분리하였으며, 추출한 crude DNA용액을 buffer saturated phenol, chloroform(chloroform:isoamylalcohol = 24:1) 및 water saturated ether로 각 3 회씩 단계별로 추출하여 냉 에탄올로 회수하고 다시 TE buffer에 녹여 본 실험의 size marker DNA로 사용하였다.

Plasmid DNA

Plasmid YRp7 DNA는 Birnboim과 Doly의 alkaline SDS 방법⁽³⁾으로 cleared lysate를 얻은 후 hydroxyapatite로서 Colman의 방법⁽⁴⁾으로 농축 분리하였으며, ccc YRp7 DNA는 다시 agarose electroelution으로 정제하였다.

*B. amyloliquefaciens*의 chromosomal DNA

Saito와 Miura의 방법⁽⁵⁾에 따라 추출한 후 TE buffer (10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) and 1 mM EDTA)에 녹이고 chloroform 1~2 방울 가하여 4°C에서 보관하면서 사용하였다.

Cloning procedures

YRp7 DNA는 *Bam*HI으로 절단하였으며, *B.*

*amyloliquefaciens*로 부터 분리한 chromosomal DNA는 *Sau*3AI으로 partial digestion하여 사용하였다.

각각의 digestion된 YRp7 plasmid DNA 0.5 μ g과 chromosomal DNA 1.5 μ g을 Tris-HCl 500mM, MgCl₂ 100mM, DTT 200mM, ATP 10mM 조성의 ligation buffer 100 μ l에서 T₄ DNA ligase로 4°C에서 18시간 반응시켰다. ligation된 DNA용액을 *E. coli* HB101로 형질전환시켰다.

E. coli cell의 competence 및 형질전환

E. coli cell의 competence 및 형질전환 방법은 Dager와 Erlich 방법⁽⁶⁾에 따라 냉 CaCl₂ 용액상에서 대수증식기의 *E. coli* cell을 competence화한 후 이 competent cell 100 μ l에 transforming DNA 50 μ l를 넣고 CaCl₂를 ml당 50mM 되게 가하여 형질전환시켰으며 이들의 cell을 LB 배지와 항생제를 첨가한 LB 배지에 각각 도말하여 transformant를 얻었다.

Agarose gel 전기영동

Agarose gel 전기영동은 Greene 등의 방법⁽⁷⁾에 따라 0.8%, 또는 1% agarose (Sigma Co., LTD)를 사용하였으며, buffer로는 Tris-borate (pH 8.0)를 사용하였다. 이때 *Hind*III로 digestion시킨 phage λ DNA를 linear DNA 단편의 size marker로 하여 gel 1 cm당 4 volts로 전기영동하였다.

Enzyme localization 및 enzyme assay

*B. amyloliquefaciens*의 α -amylase gene이 cloning된 plasmid를 형질전환시킨 *E. coli*와 *B. amyloliquefaciens*의 enzyme localization 방법은 Tsukagashi 방법⁽⁸⁾에 준하였다. 즉 각 bacterial cell을 LB 배지상에서 키운 후 10 ml 취해 바로 3 회, 3 분씩 Sonication하여 total enzyme 양으로 하고, 배양액 10 ml을 다시 취해 원심분리한 상등액을 extracellular type으로, 집균한 cell을 10 ml의 0.5 M sucrose 용액 (in 10 mM Tris-HCl, pH 7.5) 상에서 protoplast화한 후 원심분리하여 상등액을 periplasmic enzyme type으로, 집균한 protoplast를 원 volume의 Tris-EDTA buffer에 현탁하여 lysis시킨 다음 cellular enzyme으로 하여 효소활성도를 비교하였다. 이때 대조구로서는 수용체로 사용한 *E. coli* HB101을 같은 방법으로 처리하여 사용하였다. Amylase assay는 Somogyi-Nelson 방법으로 직접 환원당을 측정하여 O. D 540 nm치로 비교하였다. 효소역가 1 unit는 반응 1시간 동안에 효소반응액 1 ml 중 1 μ g의 glucose을 생성하는 효소양으로 정하였다.

결 과

Hydroxyapatite chromatography에 의한 YRp7 plasmid DNA의 회수

Cleared lysate DNA 용액을 hydroxyapatite (Bio rad)에 loading한 후 0.24 M 인산 buffer, 8 M urea (in 0.24 M 인산 buffer), 0.01 M 인산 buffer (pH 6.8)로 여러가지 단백질성 물질을 제거한 후 0.3 M 인산 buffer (pH 6.8)로 YRp7 plasmid DNA을 용출시켰다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 fraction 110~130 사이의 용액을 모아 TE buffer 상에서 하룻밤 투석한 후 에탄올로서 plasmid DNA을 회수하여 전기영동해 본 바 chromosomal DNA가 소량 혼재되어 있었으므로 agarose gel electroelution 방법으로 ccc YRp7 만을 분리, 정제하였다. 이때 plasmid DNA의 농도는 1 ml당 1 mg이었다.

YRp7 plasmid DNA에 의한 *E. coli* HB101의 형질전환조건

E. coli HB 101에 대한 YRp7 plasmid DNA의 형질전환 조건을 조사하였다. 형질전환에 대한 competence 시간의 영향을 조사해 본 바 Fig. 2에서와

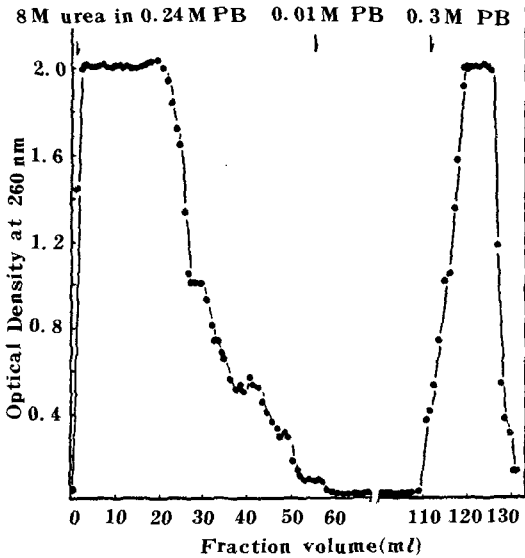


Fig. 1. Recovery of YRp7 plasmid DNA by hydroxyapatite chromatography.

The curde DNA mixture was loaded on to hydroxyapatite (5 g) and washed in succession with 8 M urea, 0.24 M phosphate buffer, 0.01 M phosphate buffer before the plasmid DNA was eluted with 0.3 M phosphate buffer. The fraction volumes between 110 and 130 were collected and the plasmid DNA was precipitated 2 volumes cold ethanol. The column size was 3.3 cm×4.5 cm.

*PB: phosphate buffer, pH 6.8.

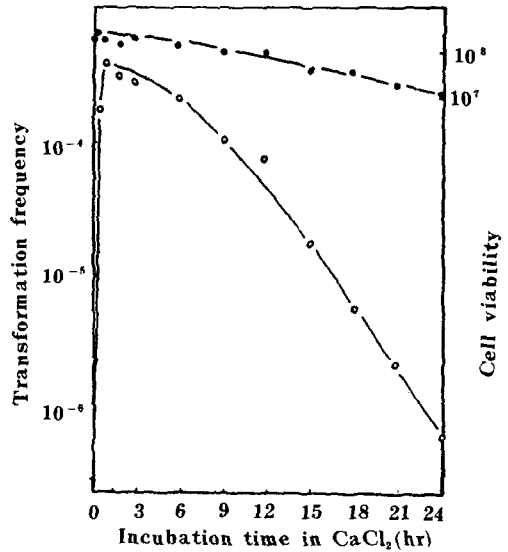


Fig. 2. Effect of incubation time in $CaCl_2$ solution on competence development of *E. coli* HB101.

The solution of recipient cells (10^8 cells/ml) containing 50 mM $CaCl_2$ was incubated at 4 C for various intervals. And then 0.5 ml of competent cells were mixed with 1 μ g of donor YRp7 DNA and transformed at 4 C for 30 min. Symbols: ●-●, No. of viable cells; ○-○, No. of transformants.

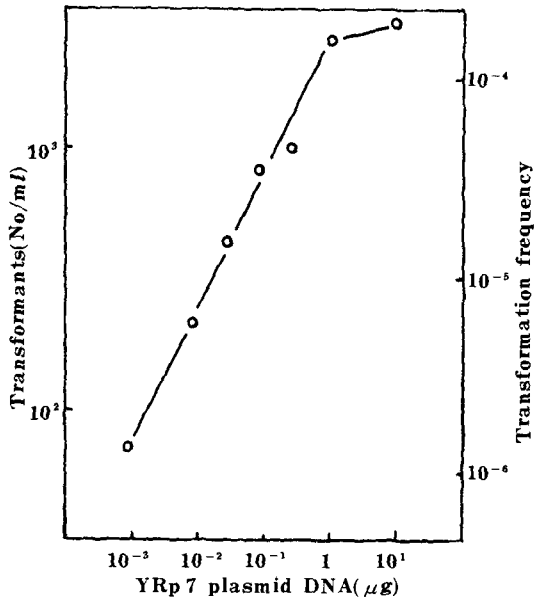


Fig. 3. Effect of concentration of YRp7 DNA on transformation frequency of *E. coli* HB101.

0.5 ml of recipient cells (10^8 cells/ml) and 0.1 ml of donor DNA of various concentrations were incubated at 4 C for 30 min, and ampicillin resistant cells were selected on nutrient agar plate containing 50 μ g per ml of ampicillin.

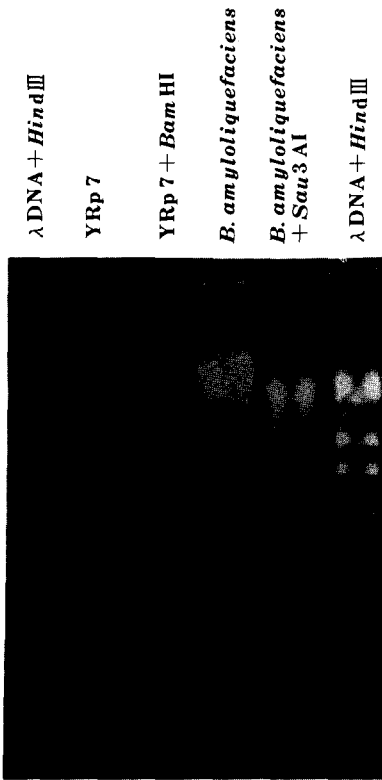


Fig. 4. Electrophoretic patterns of YRp7 plasmid DNA digested with Bam HI(A) and *B. amyloliquefaciens* chromosomal DNA digested with Sau 3 AI (B).

또한 plasmid DNA 농도에 따른 형질 전환 빈도를 조사한 바 YRp7 1 μg 당 5.59×10^3 의 형질 전환체를 얻어 비교적 형질 전환이 용이하게 일어남을 알았다(Fig. 3).

α-amylase gene cloning

*B. amyloliquefaciens*의 chromosomal DNA를 Sau 3 AI으로 처리하여 얻은 DNA 단편을 Bam HI으로 절단한 YRp7에 재로 및 방법에 따라 ligation시켰다. 이때 insert와 vector DNA의 몰비를 1:1과 1:3으로 하여 비교해 보았다.

Sau 3 AI으로 자른 chromosomal DNA 단편과 Bam HI으로 처리한 YRp7 vector는 Fig. 4와 같으며 Table 1에서는 insert와 vector DNA 몰비에 따른 형질 전환 빈도를 나타낸다.

YRp7의 Bam HI부위는 Tc^r에 관여하는 gene 부분이므로 먼저 ALB 배지상에서 형질 전환체를 얻고 이 형질 전환체를 다시 TLB와 ALB 배지상에 replica하여 Ap^r·Tc^s인 형질 전환체를 선별하였다. Ta-

Table 1. Effect of vector: insert ratio on the efficiency of transformation and insertion.

Vector:Insert (μg:μg)	Transformants on ALB (50 μg/ml)	Transformation frequency	Insertion ratio (%)
1 : 1	3.4×10^2	6.4×10^{-5}	5.1
1 : 3	2.6×10^2	4.4×10^{-5}	8.5
YRp7	2.9×10^3	2.7×10^{-3}	

0.5 ml of recipient cells (10^8 cells/ml) and 0.1 ml of donor DNA were incubated at 4 C for 30 min and ampicillin resistant cells were selected on nutrient agar plate containing 50 μg per ml of ampicillin.

ble 1에서 보는 바와 같이 Ap^r·Tc^s clone체는 Ap^r형질 전환체의 5~8% 정도였다.

이상의 실험으로 얻은 insertional inactivation 형질 전환체를 cracking 방법으로 plasmid DNA을 분리하고 전기영동하여 그 크기를 조사함과 동시에 50 μg/ml농도의 Ampicillin을 함유한 10 ml의 LB배지에서 각 transformant를 36시간 동안 배양한 후 균체를 모아 0.1M citrate-phosphate buffer (pH 6.5) 2ml에 현탁하여 sonication하였으며, 이를 원심분리하여 그 상등액의 α-amylase 활성을 측정하여 최종적으로 *E. coli* E 24 균주를 선별하였다.

cloned α-amylase gene의 characterization

α-amylase 생성균주인 형질 전환체 *E. coli* E24로 부터 추출한 pEA24의 크기와 삽입된 단편의 크기를 알아보기 위해 먼저 Bam HI으로 작용시켰으나 ligation될 때의 문제로 전혀 작용받지 못하였다. 따라서 YRp7중 yeast ars sequence내에 존재하는 Bgl II로서 작용시킨 후 Hind III cleaved λDNA 단편을

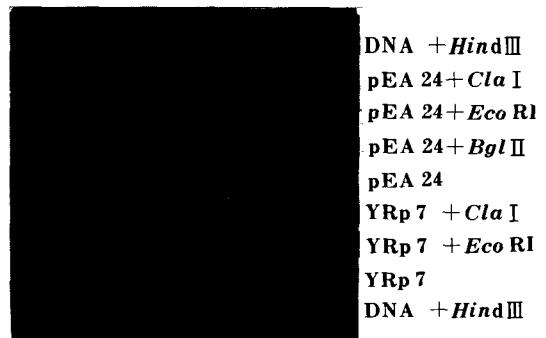


Fig. 5. Restriction pattern of the recombinant plasmid pEA 24 carrying the amylase gene of *B. amyloliquefaciens*.

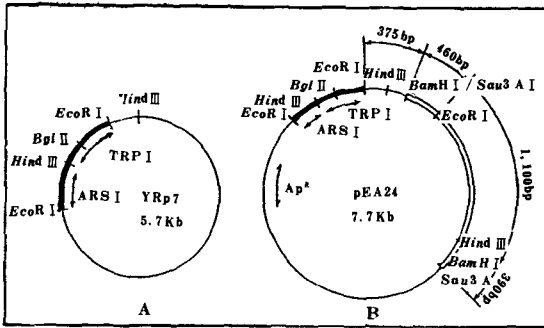


Fig. 6. Physical maps of vector plasmid YRp 7 (A) and recombinant plasmid pEA 24(B).

size marker로 하여 전기영동한 결과 약 7.7 kb 크기로 된 YRp7 (5.7 kb)에 약 2.0 kb 단편이 cloning 되었음을 알았다. *B. amyloliquefaciens*의 α -amylase gene 부분에 대해서 Palva⁽⁹⁻¹¹⁾ 등이 Hind III, Eco RI, Cla I의 작용부위를 가지는 2.3 kb임을 이미 보고하였기에 본 실험에서 얻은 pEA 24의 α -amylase gene 부위를 재확인하기 위해 Cla I, Eco RI, 및 Bgl II를 작용시켰다(Fig. 5).

이때 Eco RI의 작용으로 부분 분해되었을 경우 0.835, 1.4, 2.235, 5.465, 6.3, 6.835, 및 7.7 kb의 단편을 얻을 수 있으나 본 실험에서는 1.4, 2.235, 5.465와 6.3 kb의 단편을 얻었으며 Cla I과 Bgl II에 의해서는 linear DNA를 얻었다. 이상

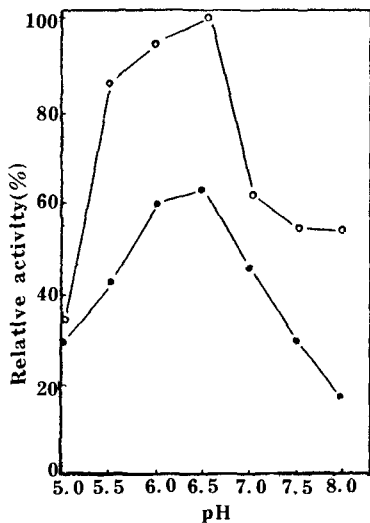


Fig. 7. Effect of pH on the α -amylase activity of *E. coli* E24 (●) and *B. amyloliquefaciens*(○). The reaction mixture contained 0.5 ml of 0.1 M phosphate buffer of various pH, 0.5 ml of 1.0% soluble starch, and 0.5 ml of enzyme solution. The enzyme reaction was carried out at 40 C for 1hr.

Table 2. Amounts and localization of the α -amylase produced by *E. coli* E24 and *B. amyloliquefaciens*

Strains	Extra-cellular	Peri-plasmic	Cellular	Total
<i>E. coli</i> HB101	-	-	-	-
<i>E. coli</i> E24	-	432	184	760
<i>B. amyloliquefaciens</i>	969	80	496	1168

The localization of the α -amylase in *E. coli* was carried out as described in materials and methods. The values represent units of α -amylase activity.

의 restriction pattern으로 본 pEA 24는 7.7 kb 이며 삽입된 amylase gene은 약 2.0 kb로 산출되었다. 이상의 실험결과로부터 pEA 24의 physical map을 Fig. 6의 B와 같이 작성하였으며 YRp7 vector는 Fig. 6의 A와 같다.

***E. coli*에서의 α -amylase활성 및 Localization**

E. coli E 24 균주의 α -amylase 활성을 *B. amyloliquefaciens*와 비교해 본 바 약 70% 정도만 발현되었다. 이들 효소의 localization을 재료 및 방법에 따라 조사해 본 바 *B. amyloliquefaciens*의 경우 대부분의 효소가 세포 바깥으로 분비되어 extra type으로 존재하는데 반해 *E. coli*의 경우 periplasmic과 cellular type으로 존재하였다. 이들의 localization

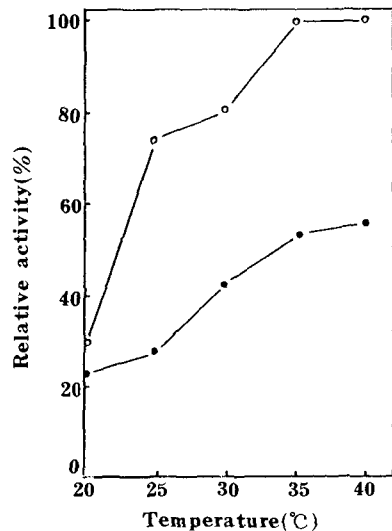


Fig. 8. Effect of temperature on the α -amylase activity of *E. coli* E24 (●) and *B. amyloliquefaciens* (○).

The enzyme reaction was carried out for 1 hr at each temperature and the enzyme activity was determined by Somogyi-Nelson method.

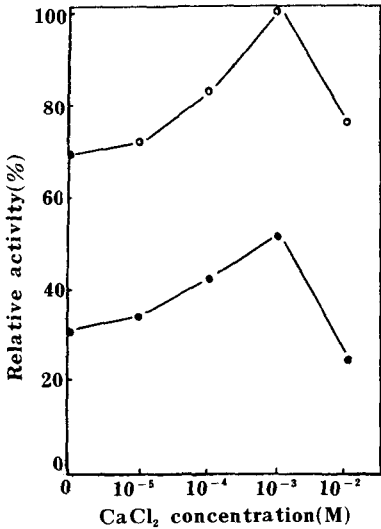


Fig. 9. Effect of CaCl₂ concentration on the α -amylase activity of *E. coli* E24 (●) and *B. amyloliquefaciens* (○).

The enzyme reaction was carried out at 40°C for 1 hr in various concentrations of CaCl₂ solution. The enzyme activity was determined by Somogyi-Nelson method.

에 따른 효소역가는 Table 2와 같다.

***E. coli*가 분비하는 α -amylase의 성질**

E. coli E 24와 *B. amyloliquefaciens*에 의해 생성된 α -amylase의 성질을 작용 최적 pH, 온도, 와 CaCl₂의 영향등을 비교 조사하였다. Fig. 7에서 보는 바와 같이 amylase의 작용에 있어서 pH 6.5가 최적으로 나타났다.

α -amylase 작용에 대한 온도의 영향을 조사한 결과 두 균주의 효소가 동일한 경향을 나타내었으며, 또 α -amylase 작용에 대한 Ca⁺⁺이온의 영향을 조사해 본 바 E 24 균주와 *B. amyloliquefaciens*의 효소가 다같이 Ca⁺⁺에 대하여 같은 영향을 받고 있었다.

이상의 결과로부터 *E. coli* 형질전환체에 의해 생성되는 α -amylase의 성질은 *B. amyloliquefaciens*에 의해 생성되는 효소와 거의 동일하였다.

***E. coli* E 24 균주의 amylase 생성**

E. coli E 24의 α -amylase 생성시기를 glucose 대신 1% Soluble starch을 첨가한 LB 배지상에서 배양하여 조사하였다. Fig. 10에서 보는 바와 같이 균 생육은 배양 10시간만에 정지기에 도달한데 반해 α -amylase 생성은 26시간 이후 최대가 되었으며 48시간 이상의 배양으로 효소활성이 급격히 떨어짐을 알았다.

*B. amyloliquefaciens*와 *E. coli* E 24의 α -amylase 활성을 CaCl₂ 10 mM, Soluble starch 0.5%와 한

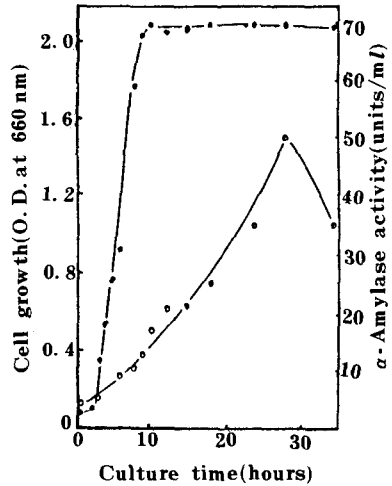
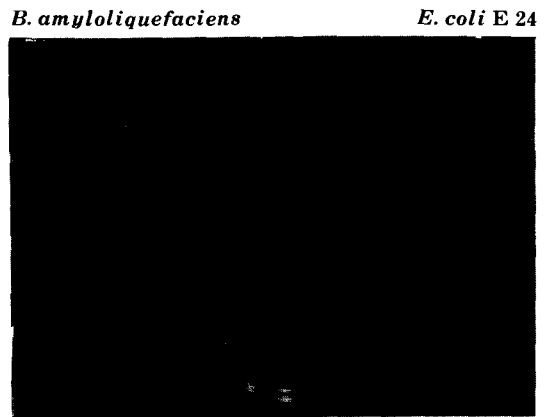


Fig. 10. Time course of α -amylase production in culture of *E. coli* E 24.

Cells were grown at 30°C in 100 ml L-broth containing 50 μ g/ml ampicillin. The enzyme reaction carried out at 40°C for 1 hr. Symbols: ○—○, enzyme production; ●—●, cell viability.

친 0.8%를 함유한 0.1 M citrate phosphate buffer (pH 6.5) plate 위에 각각 균주의 효소액을 0.1 ml씩 가하여 40°C에서 3시간 반응하고 I₂-KI 용액으로 발색해 본 바 Fig. 11과 같다. 이때 *B. amyloliquefaciens*의 효소액은 배양원액을 사용하였으며, *E. coli* E 24와 대조구인 *E. coli* HB 101의 경우는 배양액 10 ml을 취해 원심분리하여 얻은 균체를 2 ml



***E. coli* HB 101**

Fig. 11. Identification of the amylase activity on starch agar plate.

The strains were cultured in 10 ml L-broth for 24 hr at 30°C with shaking. 50 μ l of the culture fluid of each strain was loaded on to starch agar plate by cup method and incubated 40°C for 3 hr. The α -amylase activity was detected by I₂-KI staining method.

의 0.1M citrate phosphate buffer (pH 6.5)에 현탁하고 sonication하여 원심분리한 후 그 상등액을 효소액으로 하였다.

고 찰

Bacillus gene의 *E. coli*에서의 형질발현에 대한 보고는 1978년 Nagahari 등⁽¹²⁾이 *B. subtilis*의 leu A, B, C gene을 RSF 2124 plasmid를 vector로 하여 cloning한 후 *E. coli* C 600에 형질전환시켜 leu A, B, C gene의 발현을 보고한 것이다. 이후 *Bacillus* sp.의 secretory gene product인 alkaline phosphatase⁽¹³⁾, glutamine synthetase⁽¹⁴⁾, cell wall protein⁽¹⁵⁾ 및 *Bacillus* sp.^(16,17,19)의 α -amylase의 *E. coli*내에서 형질발현등이 보고 되었다.

본 실험에서는 *B. amyloliquefaciens*의 α -amylase gene을 최종적으로 eucaryotic cell인 yeast에 도입하고자 yeast-bacteria shuttle vector인 YRp7을 vector로 하여 *B. amyloliquefaciens*의 α -amylase gene을 cloning한 후 *E. coli* HB 101을 recipient로 하여 Clone체를 분리하였다. 따라서 *Sau* 3 AI으로 partial digestion한 *B. amyloliquefaciens* chromosomal DNA와 *Bam* HI으로 digestion한 YRp7 DNA를 1:3 또는 1:1로 ligation시킨 후 vector plasmid의 insertional inactivation으로써 Clone체를 분리하였다. 이때 insert와 vector DNA의 비율은 cloning상 별 영향을 미치지 않았으나 Palla 등⁽¹⁸⁾의 cloning에 있어 insertional inactivation율이 16~18%로 비교적 높았으나 본 실험에서는 약 6.5%만이 Ap^r Tc^s로서 insertional inactivation을 나타내었다. 이중 α -amylase positive인 *E. coli* E 24를 선별하여 recombinant plasmid를 *Cla* I, *Eco* RI 및 *Bgl* II로 digestion하고 그 restriction pattern을 조사해 본 바 약 2.0 kb 크기의 DNA 단편이 cloning되었음을 알았다. *B. amyloliquefaciens*의 α -amylase gene에 대한 palva 등의 보고⁽⁹⁻¹¹⁾에 따르면 약 DNA 2.3kb 단편내에 ATG 개시 codon을 포함해 1542 base pair로 되어 있으며 아미노말단 부위에 31개의 아미노산으로 구성된 signal peptide 부위도 밝혀져 있다.

본 실험의 결과 pEA 24의 경우 Palva 등이 cloning한 2.3 kb의 단편중 카아복실기말단 부위로부터 약 350 base pair가 *Sau* 3 AI의 작용으로 떨어져 나갔음을 알았다.

*B. amyloliquefaciens*와 *E. coli* E 24의 α -amylase 성질을 조사해 본 바 최적 pH (Fig. 9), 온도 (Fig. 10) 및 Ca⁺⁺에 의한 영향 (Fig. 11)은 거의 동

일한 경향을 보였다. 그러나 Palva의 경우⁽¹⁰⁾ pUB 110을 vector로 하여 *B. amyloliquefaciens*의 α -amylase을 *B. subtilis*로 cloning했을 때 효소역가가 본래의 친주보다 2,500배의 증가를 보였고, Tsukagashi의 보고⁽¹⁷⁾에 따르면 *B. stearotherophilus*의 α -amylase gene 역시 *E. coli* 내에서 매우 안정하고 효소의 역가가 높은 것으로 보고되었는데 반해 본 실험에서 얻은 *E. coli* E 24의 α -amylase 효소역가는 *B. amyloliquefaciens*와 비교해 최대 60%만이 발현되었다. 이는 Cornelis (1982)⁽¹⁶⁾와 Yang (1983)⁽¹⁹⁾등이 각각 *B. coagulans*와 *B. subtilis*의 α -amylase gene을 *E. coli* cell 내로 pBR 322를 vector로 하여 cloning했을 때, *E. coli* 내에서 Hybrid plasmid가 매우 불안정할 뿐만 아니라 효소생성력 또한 parent에 비해 떨어진다는 보고와는 비교적 일치하였다.

요 약

E. coli-*S. cerevisiae* shuttle vector인 plasmid YRp7을 이용하여 *B. amyloliquefaciens*의 α -amylase gene을 *E. coli* 내에 cloning하였다. 이때 제한 효소 *Sau* 3 AI에 의해 얻어진 α -amylase gene의 크기는 약 1.95 kb 정도였으며 *E. coli* 내에서 비교적 안정하게 유지되고 발현되었다. 재조합 plasmid pEA 24를 함유한 *E. coli*는 *B. amyloliquefaciens*의 약 65% 정도의 α -amylase를 생성하였으며, 최적 온도, pH, CaCl₂의 영향등 α -amylase의 효소학적인 성질을 비교 조사해 본 결과 *B. amyloliquefaciens*의 α -amylase와 동일하였다. 또한 *E. coli*에서 생성된 α -amylase로 70% 정도가 periplasmic space에 존재하였으며 나머지는 세포 내부에 존재함을 알았다.

사 사

본 연구는 1984년도 한국과학재단 차관연구비 (amylase 유전자를 cloning한 효모분비 vector의 개발 및 응용)에 의해서 수행된 연구의 일부이며 관계하신 여러분께 깊은 감사를 드리는 바입니다.

참고문헌

1. Struhl, K., D.T. Stinchcomb, S. Scherer and R.W. Davis: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **76**, 1035 (1979)
2. Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook: *Molecular Cloning—A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor

- Laboratory, New York (1982)
3. Birnboim, H.C. and J. Doly: *Nucleic Acids Res.*, **7**, 1513 (1979)
 4. Colman, A., M.J. Byers, S.B. Primrose and A. Lyons: *Eur. J. Biochem.*, **91**, 303 (1978)
 5. Saito, H. and K. Miura: *Biochim. Biophys. Acta.*, **72**, 619 (1963)
 6. Dagert, M. and S.D. Ehrlich: *Gene*, **6**, 23 (1979)
 7. Greene, P.J., M.C. Betlach, H.M. Goodman and H.W. Boyer: *Methods in Molecular Biology—DNA Replication and Biosynthesis* (Wickner, R.B., ed.), Vol. 7, 87 (1974)
 8. Tsukagoshi, N., Ihara, H. Yamagata and S. Udaka: *Mol. Gen. Genet.*, **193**, 58 (1984)
 9. Palva, I., R.F. Petterson, N. Kalkkinen, P. Lehtovaara, M. Savas, H. Soderlund, K. Takkinen and L. Kääriäinen: *Gene*, **15**, 43 (1981)
 10. Palva, I.: *Gene*, **19**, 81 (1982)
 11. Takkinen, K., R.F. Petterson, N. Kalkkinen, I. Palva, H. Söderlund and L. Kääriäinen: *J. Biol. Chem.*, **258**, 1007, (1983)
 12. Nagahari, K. and K. Sakaguchi: *Mol. Gen. Genet.*, **158**, 967 (1984)
 13. Hulett, F.M.: *J. Bacteriol.*, **158** 978 (1984)
 14. Gardner, A.L. and A. Aronson: *J. Bacteriol.*, **158**, 967 (1984)
 15. Tsukagoshi, N., R. Tomokaitakemura, H. Yamata and S. Udaka: *J. Bacteriol.*, **158**, 1054 (1974)
 16. Cornelis, P., C. Digneffe and K. Willemot: *Mol. Gen. Genet.*, **178**, 217 (1982)
 17. Tsukagoshi, N., H. Ihara, H. Yamagata and S. Udaka: *Mol. Gen. Genet.*, **193**, 58 (1984)
 18. Palla, E., B. Michel, B. Niaudet and S.D. Ehrlich: *Gene*, **12**, 147 (1980)
 19. Yang, M., A. Galizzi and D. Henner: *Nucleic Acids Res.*, **11**, 237 (1983)