

***Klebsiella pneumonia*로부터 제한효소 *Kpn I*의 분리**

이상철 · 이대실 · 유명희

한국과학기술원 유전공학센터

Isolation of *Kpn I* restriction endonuclease from *Klebsiella pneumonia*

Lee, S.C., D.S. Lee, and M.H. Yu

Genetic Engineering Research Center, Korea Advanced Institute
of Science and Technology

ABSTRACT: A restriction endonuclease, *Kpn I* has been isolated from *Klebsiella pneumonia*. Cells were broken by sonication. After ultracentrifugation the supernatant containing *Kpn I* activity was further purified by Sepharose-6B gel filtration, DEAE-Cellulose, Heparin-Agarose, and Aminohexyl-Agarose column chromatography. Final enzyme preparation was essentially free of contaminating exonuclease and phosphatase, as judged by ligation-recut test. Total activity of the enzyme recovered from 10 grams of cells was 4.7×10^5 units.

KEY WORDS □ *Kpn I*, restriction endonuclease, ligation-recut test.

1970년 Smith에 의해 처음 제한효소가 발견된 이래 지금까지 여러종류의 박테리아균주에서 500여종 이상의 제한효소가 발견되었다(Roberts, 1980). 유전자 조작의 필수적인 기본도구로써 유전자분리, 재조합, DNA 서열분석 및 유전자의 구조와 기능연구에 이용되는 제한효소는(Wu 등, 1983) 근래에 와서는 DNA와 단백질간의 상호작용을 연구하는 모델 system으로써의 관심도 모아지고 있다(McClarin 등, 1986). *Kpn I* 제한효소는 활성이 *Klebsiella pneumonia*에 존재하며(Smith 등, 1970), 그 인식 염기서열과 절단부위는 5'GGTACC3'인 Type II 제한효소이다(Tomassini 등, 1978). Phage λ DNA에 *Kpn I* 제한효소를 반응시키면 두 군데가 절단되어 약 29.5Kb, 17Kb, 1.5Kb의 세개의 절편이 생성된다. 동물 바이러스 SV40DNA는 한 군데 절단부위가 있고 플라스미드 pBR322에는 절단부위가 전혀 없다. 따라서 *Kpn I*은 다른 종류의 6개 base

를 인식하는 제한효소들과 마찬가지로 DNA 재조합에 유용하게 사용될 수 있다. *Kpn I* 제한효소는 지금까지 분리정제 방법에 대한 연구보고가 없다. 따라서 본 연구에서는 이 제한효소의 정제를 시도하였으며, 특히 다른 nuclease나 phosphatase의 오염을 제거하여 DNA 조작에 실제 이용될 수 있도록 하였다.

재료 및 방법**재료**

사용한 균주는 *Klebsiella pneumonia* OK8(Smith 등, 1976)이며 R.J. Roberts로부터 분양 받았다. Brain Heart Infusion은 Difco로부터 potassium phosphate, sodium chloride와 glycerol 등은 Junsei Chemical Co.(Japan)으로부터 구입하였다. EDTA, Trisma base, SDS, ethidium bromide, 2-mercaptoethanol, Se-

pharose-6B, ω -Aminohexyl-Agarose 등은 Sigma Co.로부터 구입하였으며 DEAE-Cellulose는 Whatmann Co.로부터 구입하였다. Heparin-Agarose는 한국과학기술원 유육준 박사로부터 제공받았다. Acrylamide, bis-acrylamide, ammonium persulfate, Bromophenol Blue, Commassie Brilliant Blue(R-250) 등은 Bio-Rad에서 구입하였다. 그외의 모든 시약들은 시장에서 판매되는 특급을 사용하였다.

세포배양

*K. pneumoniae*는 2 liter 배양하였다. 사용한 배지는 liter 당 37g의 Brain Heart Infusion을 포함하였다. 최적 pH는 7.4이며 최적 온도는 37°C이었다. 배양한 미생물은 stationary phase에서 수거하여 원심분리로 세포를 모았다. 1 liter 배양액에서 5g(wet weight)의 세포를 얻었으며, 수거한 세포는 -20°C에 보관하였다.

λ DNA의 분리

제한효소반응의 기질로는 phage λ DNA를 사용하였다. 사용한 λ strain은 cI857tsSam7으로 Maniatis 등(1982)의 방법에 의해 DNA를 분리하였다.

효소활성의 측정

효소의 활성을 확인하기 위해 10 mM Tris-Cl(pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol과 기질로 0.5 μ g λ DNA가 포함된 반응혼합물에 1 μ l의 효소용액을 첨가하여 최종부피를 20 μ l로 하였다. 이때 반응혼합물의 salt 농도를 일정하게 해주기 위하여 정제단계의 각 분획을 투석한 후 1 μ l를 취하였다. 반응혼합물을 37°C에서 30분동안 반응시킨 후 0.7% agarose gel 상에서 전기영동을 수행한다. 전기영동이 끝난 gel을 ethidium bromide 용액으로 염색하여 UV transilluminator 상에서 잘려진 DNA band를 비교 관찰함으로써 효소의 활성을 확인하였다. 이때 control로 사용한 효소 *Kpn*I은 New England Biolabs Inc.으로부터 구입하였다.

Specific activity의 결정

*Kpn*I 제한효소의 1 unit는 다음과 같이 결정하였다. 1 μ g의 λ DNA를 포함하는 50 μ l의 반응혼합물을 37°C에서 1시간 반응했을 때 λ DNA를 완전히 절단할 수 있는 효소의 양을 1

unit로 정하였다.

단백질의 정량

단백질의 농도는 Bradford(1976)에 의한 단백질-dye binding 방법으로 결정하였다. Standard 단백질로는 bovine serum albumin을 사용하였다.

*Kpn*I 제한효소의 정제

모든 정제과정은 0-4°C에서 수행하였으며, 정제과정중 사용된 완충용액은 다음과 같다. 완충용액 A, 10 mM Tris-Cl(pH 7.5), 10 mM 2-mercaptoethanol; 완충용액 B, 1.0 M NaCl, 10 mM Tris-Cl(pH 7.5), 10 mM 2-mercaptoethanol; 완충용액 C, 10% glycerol, 10 mM KPO₄(pH 7.4), 10 mM 2-mercaptoethanol, 10 mM EDTA. *K. pneumoniae* 10g을 20 ml의 완충용액에 녹여 현탁시킨 후, sonication(20×30 sec)하여 세포를 분쇄했다. 100,000g에서 90분간 초원심분리하여 상층액을 모아 NaCl 농도가 1 M이 되게 조절하였다(용액 I). 용액 I을 10 ml로 농축한 후 완충용액 B로 평형된 Sepharose-6B column(2.6×80 cm)에 15 ml/hr의 속도로 가하였다. 완충용액 B를 같은 속도로 흘려서 5 ml씩 100분획을 모아서 각각의 효소활성을 확인하였다. Nuclease의 활성을 나타내는 분획을 모아 완충용액 C에 투석하였다(용액 II). 용액 II를 완충용액 C로 평형된 DEAE-Cellulose column(2.6×20 cm)에 20 ml/hr의 속도로 가하였다. 800 ml의 같은 완충용액으로 세척하여 UV 280 nm에서 O.D.값이 0이 됨을 확인하고 완충용액 C의 200 ml NaCl linear gradient(0-1.0 M)로 용출하였다. *Kpn*I 제한효소의 활성을 강하게 나타내는 분획을 모아 완충용액 C로 투석하였다(용액 III). 용액 III를 완충용액 C로 평형된 Heparin-agarose column(2×10 cm)에 15 ml/hr의 속도로 가하였다. 완충용액 C 500 ml로 세척하여 UV 280 nm에서 O.D.값이 0이 됨을 확인한 후, 완충용액 C의 200 ml NaCl linear gradient(0-0.8 M)로 용출하였다. 각 분획의 용량은 5 ml로 하였으며 *Kpn*I 제한효소의 활성이 나타내는 분획들을 모아 완충용액 C로 투석하였다(용액 IV) 용액 IV를 완충용액 C로 평형된 Aminohexyl-agarose column(1.5×5 cm)에 20 ml/hr의 속도로 가한 후 300 ml의 같은 완충용액으로 세척했다. 세척한

용액이 UV 280 nm 에서 O.D.값이 0이 됨을 확인한 후 원충용액 C의 100 m/KCl linear gradient (0-0.8 M)로 용출하였다. *Kpn I* 제한효소의 활성을 나타내는 부분을 확인하고, 각 분획을 각각 원충용액 C에 투석하였다.

Ligation-Recut 실험

10 µg의 λDNA 를 정제한 최종 효소용액으로 37°C에서 24시간 반응시켜 완전히 절단한 후, 반응혼합물을 phenol 과 chloroform 으로 추출하여 DNA 분획단을 분리하여 ethanol로 침전시켰다. 이렇게 얻은 λ DNA 단편들을 T₄ DNA ligase 로 10°C에서 16시간 ligation 하고 그 ligation 형태를 같은 agarose gel 상에서 확인하였다. 재결합된 DNA 를 다시 정제한 *Kpn I* 제한효소로 37°C에서 24시간 반응시켜 봄으로써 exonuclease 및 phosphatase 존재 여부를 확인하였다.

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

단백질의 전기영동은 Laemmli(1970) 방법으로 수행하였다. Stacking gel 과 separating gel 의 acrylamide 농도는 각각 3%(w/v), 12%(w/v)이었다. 전기영동시료들은 trichloroacetic acid 를 가하여 10%(w/v)로 한 후 4°C에서 2 시간 이상 방치하였다. 단백질 침전물은 12,000g 에서 1-2분간 원심분리하여 얻은 후 SDS sample 용액을 가하고 100°C물 중탕에서 5 분간 가열하였다.

결 과

***Kpn I* 제한효소의 활성 측정**

λ DNA 를 기질로 사용하고 정제과정 중의 각 분획을 효소용액으로 하여 반응시킨 후 0.7% agarose gel 상에서 전기영동하여 잘려진 λ DNA

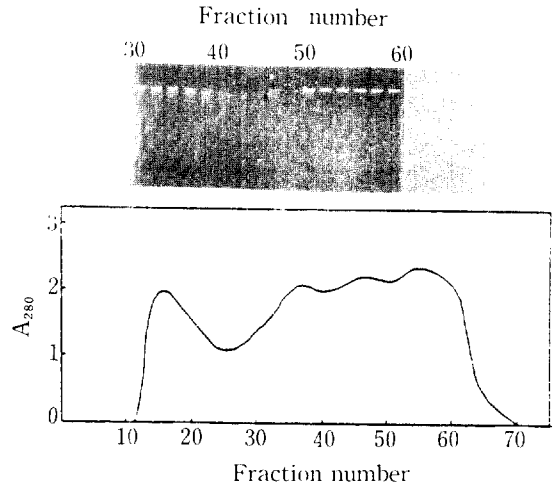


Fig.1. Sepharose-6B gel filtration chromatography

Each reaction mixture contained 10 mM Tris-Cl(pH 7.5) 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, 0.5 µg of λ DNA and 1 µl of each fraction in a total volume of 20 µl, and was incubated at 37°C for 30 minute. Electrophoresis was performed on 0.7% agarose gel.

의 형태를 살펴보면 29.5 kb 와 17 kb 의 단편은 확인이 잘 되지만 1.5 kb 의 단편은 exonuclease 가 많이 포함되어 있는 전단계의 정제과정중에서는 거의 볼 수 없었다(Fig.1). 또한 정제과정이 진행된 후에도 29.5 kb 와 17 kb 의 구분을 확실하게 하기 위해 전기영동을 오래하면 1.5 kb 의 단편이 희미하게 나타나거나 하여 사진으로는 잘 구분이 되지 않았다. 그러나 *Kpn I* 제한효소의 활성을 확인하는데는 큰 지장이 없었다. 10g 의 *K. pneumoniae* 로부터 *Kpn I* 제한효소의 정제과정중 각 단계의 제반 결과들은 Table 1에 정리되어 있다. 전체적으로 약 153배 정제되었으며 최종 효소의

Table I. Purification of *Kpn I* endonuclease from *K. pneumoniae*

	Total protein (mg)	Total unit	Specific activity	Purification fold
Crude extract	812	7.42 × 10 ⁶	9.13 × 10 ³	
Gel-filtration	185.2	7.02 × 10 ⁶	3.79 × 10 ⁴	4.0
DEAE-cellulose	40.8	4.59 × 10 ⁶	1.12 × 10 ⁵	12.2
Heparin-agarose	2.015	9.2 × 10 ⁵	4.5 × 10 ⁵	49.2
Aminohexyl-agarose	0.34	4.7 × 10 ⁵	1.4 × 10 ⁶	153.3

Protein concentrations were determined by the method of Bradford.(1976).

수율은 약 6.3%이었다.

Sepharose-6B gel filtration

정제 첫 단계로서는 세포추출액(용액 I)을 완충용액 B로 평형된 Sepharose-6B column (2.6×80 cm)에서 분리시켰다. 각 분획의 상대적인 단백질의 농도를 280 nm의 광흡수도에 따라 표시하고, *KpnI* 제한효소의 활성을 agarose gel 상태에서 나타낸 것이 Fig.1이다. 34번 분획에서부터 *KpnI* 제한효소 활성이 나타났으며, nuclease의 활성이 함께 검출되었다. 34-42번까지 분획을 취하여 완충용액에 투석한 후 다음 단계로 진행하였다.

DEAE-Cellulose column chromatography

분리된 단백질들은 완충용액 C로 평형된 DEAE-cellulose column (2.6×20 cm)에서 NaCl linear gradient (0-1.0 M)에 의해 더 분리시켰다. *KpnI* 제한효소는 0.5-0.65 M NaCl 농도에서 용출되었는데, 이때 nuclease도 강한 활성을 보이며 함께 용출되었다(Fig.2). *KpnI* 제한효소의 활성을 강하게 나타내는 22-24번 분획만을 모아 완충용액에 투석하여 NaCl을 제거한 후, 다음 단계로 진행하였다.

Heparin-Agarose column chromatography

앞에서 분리된 단백질 용액은 완충용액 C로 평

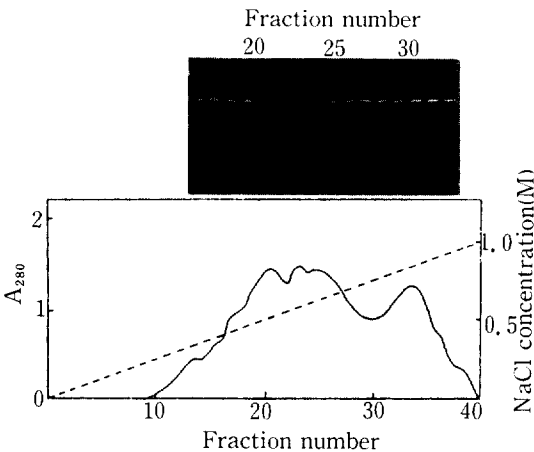


Fig.2. DEAE-Cellulose column chromatography.

Each reaction mixture contained 10 mM Tris-Cl(pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, 0.5 μg of λDNA and 1 μl of each fraction in a total volume of 20 μl, and was incubated at 37°C for 30 minute. Electrophoresis was performed on 0.7% agarose gel.

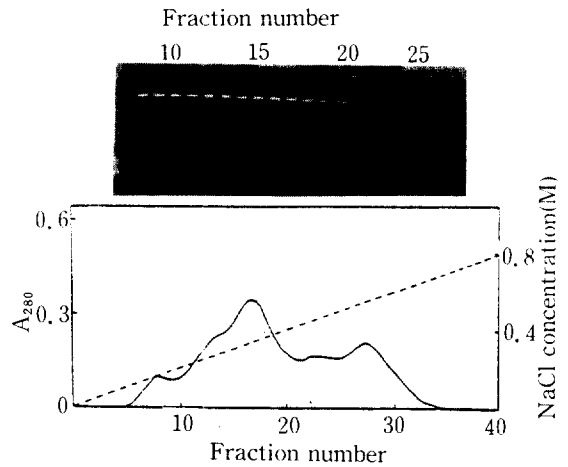


Fig.3. Heparin-Agarose column chromatography.

Each reaction mixture contained 10 mM Tris-Cl(pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, 0.5 μg of λDNA and 1 μl of each fraction in a total volume of 20 μl, and was incubated at 37°C for 30 minute. Electrophoresis was performed on 0.7% agarose gel.

형된 Heparin-Agarose column (2×10 cm)에서 NaCl linear gradient (0-0.8 M)에 의해 더 분리시켰다. *KpnI* 제한효소의 활성은 0.4-0.5 M NaCl 농도에서 용출되었다(Fig.3). 이 분획들을 모아 완충용액에 투석한 후 다음 단계로 진행하였다.

Aminohexyl-Agarose column chromatography

*KpnI*의 최종단계 정제는 완충용액 C로 평형된 Aminohexyl-Agarose column에서 KCl linear gradient (0-0.8 M)로 분리시켰다. *KpnI* 제한효소의 활성은 0.4-0.6 M KCl 농도에서 용출되었다(Fig.4). 이 단계에서 nuclease의 활성을 나타내는 분획이 앞부분에서 용출되면서 *KpnI* 제한효소의 활성을 가장 강하게 나타내는 분획과 완전히 분리되었다. *KpnI* 제한효소의 활성만을 나타내는 분획을 최종 효소용액으로 사용하여, 50% glycerol을 포함하는 완충용액 C에 다시 투석한 후, -20°C에 보관하고 제한효소로써 이용도를 점검하였다.

분리된 *KpnI*의 순수도 측정

Ligation-Recut 실험: 분리된 효소용액내에

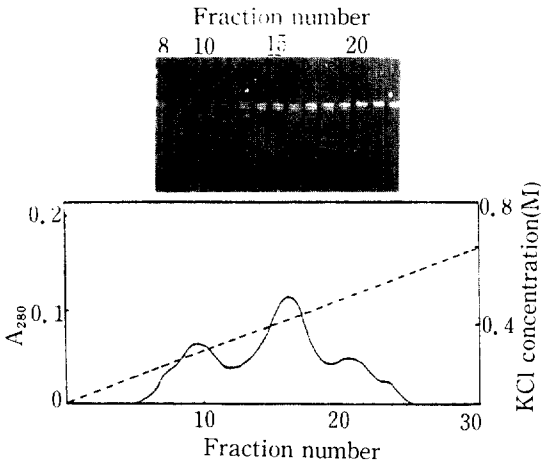


Fig.4. Aminohexyl-Agarose column chromatography.

Each reaction mixture contained 10 mM Tris Cl(pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, 0.5 μg of λDNA and 1 μl of each fraction in a total volume of 20 μl, and was incubated at 37°C for 30 minute. Electrophoresis was performed on 0.7% agarose gel.

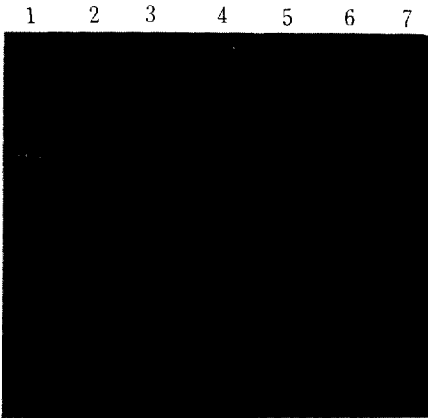


Fig.5. Ligation-Recut experiment.

Lane 1; Digestion of λDNA with purified *Kpn I* enzyme.
 Lane 2; Ligation of 1, with T₄ DNA ligase.
 Lane 3; Digestion of λDNA with commercial *Kpn I*(from New England Biolabs Inc.).
 Lane 4; Ligation of 3, with T₄ DNA ligase.
 Lane 5; λ DNA.
 Lane 6; Recut of 2, with purified *Kpn I* enzyme.
 Lane 7; Recut of 4, with commercial *Kpn I*.

exonuclease 나 phosphatase 의 존재를 확실히 규명하기 위해 ligation-recut 실험을 수행하였다. λ DNA 를 최종 효소용액과 24시간 반응시킨 후, 다시 ligation 한 결과 Fig.5의 lane 2에서와 같이 약 95% 이상이 ligation 되었다. 이것을 다시 같은 양의 효소용액으로 반응시킨 결과 lane 6에서와 같이 완전히 절단되어 처음 반응의 절단형태와 동일하게 나타났다. 이때 상품으로 구입한 *Kpn I* 제한효소(New England Biolabs, Inc.)에 대해서도 비교 실험을 하였는데 같은 결과를 얻었다(lane 4와 lane 7).

SDS-polyacrylamide gel 전기이동

Kpn I 제한효소의 정제과정중 각 단계에서 분리된 단백질의 순수도를 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis로 분석하여 나타낸 것이 Fig.6이다. 제일 오른쪽 lane 의 세포추출액으로부터 시작하여 각 lane 은 각각의 column 을 통과한 분획을 나타내고 있으며, 번호로 표시된 것은 마지막

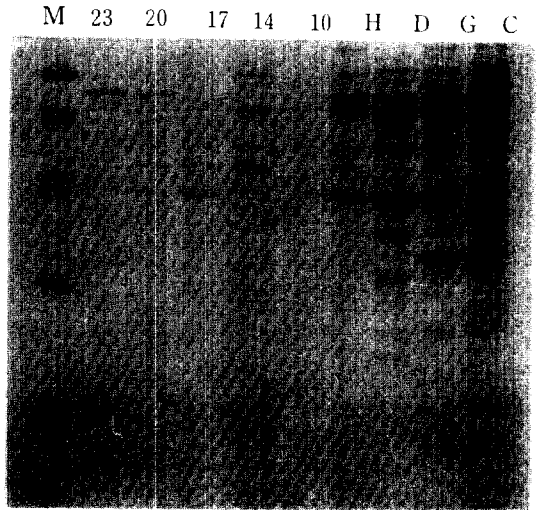


Fig.6. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of purified *Kpn I*.

Lane M; Molecular weight standards (phosphorylase B, 92.5k; BSA, 67k; ovalbumin, 45k; carbonic anhydrase, 31k; soybean trypsin inhibitor, 21.5k; lysozyme, 14.4k).
 Lane 10, 14, 17, 20, 23; fraction number of aminohexyl-agarose column.
 Lane H; Heparin-agarose column fraction.
 Lane D; DEAE-cellulose column fraction.
 Lane G; Gel-filtration fraction.
 Lane C; Total crude extract.

column인 Aminoheyl-Agarose column에서 분리된 *KpnI* 활성을 강하게 나타내는 분획몇개를 나타내고 있다. *KpnI* 활성이 가장 강한 17번 분획의 경우 분자량 43K와 56K 위치에서 두 개의 강한 폴리펩타이드 띠가 나타났으며, 이외에도 3개의 희미한 띠가 존재하였다.

고 찰

전체적인 정제과정에서 여러가지 column chromatography 방법을 이용하였는데, 대부분의 경우 *KpnI* 제한효소와 nuclease가 거의 함께 분리되었다. 이러한 사실로부터 *K. pneumonia*에 존재하는 nuclease는 *KpnI* 효소와 분자적 성질이 상당히 유사한 것을 추측할 수 있다. Type II 제한효소들의 대부분이 그 분자적 구조가 밝혀지지 않았지만 몇개의 밝혀진 것들을 보면 대부분이 두 개의 동일한 subunit로 구성되어 있다(Wu 등, 1983). 마지막 정제 단계인 Aminoheyl-Agarose column 분획중 *KpnI* 활성이 가장 강한 17번 분획의 경우 SDS-polyacrylamide gel 상에서 전기영동 결과 두 개의 폴리펩타이드가 존재함을 알 수 있는데(Fig.6) 이중 56K 띠는 14번 분획에서 가장 많이 존재하는 것으로 보아 *KpnI* 효소에 특이한 것이 아님을 알 수 있다. 반면에 43K 띠는 그 양이 효소 활성도에 동시에 17번 분획에서 정점을 이루는 것으로 미루어 보아 *KpnI* 효소에 해당하는 폴리펩타이드일 것으로 추측된다. 각 정제단계에 있어서 단백질 순수도를 살펴 보면(Fig.6) Heparin-Agarose column 단계에서

상당히 많은 종류의 다른 단백질들이 제거되었음을 알 수 있었다. Heparin은 DNA와 마찬가지로(-)전하를 띠고 있는데 이 단계에서 대부분의 DNA binding 단백질들이 특이하게 분리된 것 같다. 따라서 제한효소의 일반적인 정제방법으로는 Heparin-Agarose나 phosphocellulase column을 처음 단계에서 적용하는 것이 바람직 할 것 같다(Pirrotta and Bickle, 1980).

효소용액에 exonuclease가 포함되어 있다면, DNA 조작을 위한 제한효소로써의 이용이 불가능하다. 최종적으로 정제한 효소용액의 양을 각각 달리 해가면서 DNA와 37°C에서 24시간 반응시켰을 때 DNA의 절단 형태가 항상 같게 나타났다. 즉 3개의 단편이 그대로 존재하며 agarose gel 상에서 같은 크기로 나타났다. 이것은 *KpnI* 제한효소 이외에 exonuclease나 다른 endonuclease가 존재하지 않음을 시사한 것이다. 이때 상품으로 구입한 *KpnI* 제한효소(New England Biolabs, Inc.)와 함께 비교 실험한 결과 같은 양상을 나타냈다. 또한 exonuclease나 phosphatase의 존재를 확실히 규명하기 위해 ligation-recut 시험을 한 결과 역시 두 효소가 존재하지 않음을 나타냈다(Fig.6). 결론적으로 본 연구에서 얻어진 *KpnI* 제한효소는 비록 완전히 순수하게 정제되지는 않았지만 DNA 조작과정에서 사용하기에는 충분한 정도로 정제되었다. *KpnI* 제한효소는 아직 분자수준에서 연구된 보고가 없다. 개발된 정제방법을 바탕으로 좀더 연구가 진행된다면 순수한 *KpnI* 효소를 얻을 수 있고, 그 분자적 연구가 가능할 것이다.

적 요

Klebsiella pneumonia 세포로부터 *KpnI* 제한효소를 분리하였다. 세포로부터 세포액을 추출하여 초원심분리한 *KpnI* 효소 활성이 있는 상등액을 얻었다. Sepharose-6B gel filtration, DEAE-cellulose, Heparin-Agarose, 및 Aminoheyl-Agarose column chromatography를 거쳐서 분리된 *KpnI* 효소 용액은 ligation-recut 시험결과 다른 exonuclease나 phosphatase의 오염이 없음이 확인되었다. 10 gram의 세포에서부터 분리된 정제된 효소의 총 활성도는 4.7×10^5 unit 이었다.

사 사

본 연구는 1986년도 한국과학기술처 해외협력과

제 연구비의 지원에 의한 것입니다. 본 연구에서 사용한 Heparin-Agarose를 제공한 한국과학기술원의 유옥준 박사께 감사드립니다.

REFERENCE

1. 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.
2. Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
3. McClarin, J.A., C.A. Frederick, B.-C. Wang, P. Greene, H.W. Boyer, J. Grable, J.M. Rosenberg, 1986. Structure of the DNA-EcoRI endonuclease recognition complex at 3Å resolution. *Science* **234**, 1526-1541.
4. Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook, 1982. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 365-373.
5. Pirrotta, V., and T.A. Bickle, 1980. General purification schemes for Restriction Endonuclease. *Methods in Enzymology*, vol. **65**, 89-95.
6. Roberts, R.J., 1980. Restriction and modification enzymes and their recognition sequences. *Nucleic Acids Res.* **8**, 163-174.
7. Smith, D.L., F.R. Blattner, and J. Davies, 1976. The isolation and partial characterization of a new restriction endonuclease from *Providencia stuartii*. *Nucleic Acids Res.* **3**, 343-353.
8. Smith, H.O., and K.W. Wilcox, 1970. A restriction Enzyme from *Hemophilus influenzae*. *J. Mol. Biol.* **51**, 379-391.
9. Tomassini, J., R. Roychoudhury, R. Wu, and R.J. Roberts, 1978. Recognition sequence of restriction endonuclease Kpn I from *Klebsiella pneumoniae*. *Nucleic Acids Res.* **5**, 4055-4064.
10. Wu, R, L. Grossman, and K. Moldave, 1983. *Methods in Enzymology vol. 100*, Recombinant DNA Part B, Academic Press, New York.

(Received Feb. 25, 1987)