

## *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*로부터 제한효소의 분리정제 및 특성

배무\* · 이은영

이화여자대학교 생물학과

### Purification and Characterization of a Restriction Endonuclease from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*

Bae, Moo\* and Eun-Young Lee

Department of Biological Science, Ewha Woman's University, Seoul 120-750, Korea

**Abstract** — A restriction endonuclease, *PsyI*, has been isolated from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, and its catalytic properties have been studied. This enzyme was purified through streptomycin sulfate and ammonium sulfate fractionation, phosphocellulose P11, DEAE-cellulose, hydroxyapatite and Sephadex G-100 column chromatography. Its molecular weight was about 50,000 dalton as determined by 7.5% polyacrylamide gel electrophoresis containing 0.1% SDS. In catalytic properties, *PsyI* shows stable at wide ranges of pH between 7.0 and 10.0, of temperature between 30°C and 37°C, and its thermal stability is between 25°C and 45°C at the presence of 10 mM MgCl<sub>2</sub>. *PsyI* essentially require Na salt for enzyme reaction, is rather inhibited in the high Na salt concentration. The presence of 2-mercaptoethanol is absolutely required for the enzyme activity. This endonuclease, *PsyI* was determined to be an isoschizomer of *SalI* from the results of the restriction mapping and DNA sequencing.

분자생물학의 발전, 특히 재조합 DNA 기술의 발전은 제한 효소의 한 종류가 발견됨으로서 큰 발전을 하게 되었다(1). Type II 제한효소의 서열 특이적 인식 및 절단 능력은 효소 반응 후 분석을 용이하게 해줌으로서 분자생물학 분야에서 가장 중요한 효소가 된 것인데, 현재 *in vitro* 상에서 DNA를 조작하는 많은 방법을 개발하기 위하여 새로운 서열을 인지하는 효소나 혹은 그 isoschizomer와 효소적 성질이 특이한 효소를 찾고자 하는 노력이 진행중에 있다.

이러한 목적에 따라 제한효소를 검색하던 중 식물 병원균이며 고조병을 일으키는 *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*에서 제한효소를 발견하고 그 효소를 *PsyI*로 명명하고 그 효소를 정제하여 성질을 조사하였다.

#### 재료 및 방법

##### 균주

**Key words:** Restriction endonuclease *SalI*, *Pseudomonas syringae*, *PsyI*

\*Corresponding author

일본 Shizuoka 대학 Masao Goto로부터 분양받은 *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* Kudzu strain (이하 *P. syringae*)을 사용하였다.

##### 시약 및 효소

Phosphocellulose P11, Sephadex G-100은 Whatman, DEAE-cellulose는 Sigma, hydroxyapatite HTP는 Bio-rad에서 그 밖의 실험에 이용되는 모든 시약은 Sigma에서 구입하였다. Lambda DNA 및 제한효소 *Hind* III는 KOSCO에서 구입하였다.

##### 제한효소의 활성측정

각 정제단계마다 시행하였는데, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM MgCl<sub>2</sub>를 포함한 완충액에 1 µg의 lambda DNA와 각 효소액을 첨가하여 37°C에서 반응시키고, 반응정지는 65°C에서 5분간 열처리 후 얼음으로 옮겨서 10X 염색시약을 첨가시켰다.

제한효소 1 unit는 37°C에서 1시간 동안 1 µg의 DNA를 완전히 절단하는데 필요한 효소의 양으로 정하였다.

### PsyI 효소의 정제

30°C에서 12시간 동안 배양된 배양액을 원심분리하여 균체를 회수 후 buffer A(10 mM potassium phosphate(pH 7.5), 10 mM 2-mercaptoethanol, 5%(v/v) glycerol)에 현탁 후 냉동시켰다. 약 70 g의 균체를 다시 녹인 후 초음파 분쇄기(Braun Sonic 1510)로 300 Watt에서 2분간 5번 수행하여 균체를 파쇄하고, 파쇄되지 않은 균체 및 그 잔해들은 ultracentrifuge(Beckman, L5-50)에서 100,000×g(Ti 75 rotor)로 제거하여 그 상등액을 효소액으로 취하였다. 이어 10% streptomycin sulfate를 최종농도가 2%가 되도록 천천히 섞어준 후 1시간 동안 4°C에서 교반하여 핵산을 침전시킨 뒤 원심분리(Hanil H50A-6)하여 그 상등액을 취하였다(2). 이어 ammonium sulfate 30~75%까지 침전시켜 3시간 동안 4°C에서 교반하여 단백질을 침전시킨 뒤 원심분리하여 상등액을 제거시키고 용출된 단백질에 buffer A를 첨가 현탁 후 투석막을 이용하여 buffer A(2l)에서 16시간 동안 투석하였다. 투석된 용액을 microconcentrator로 농축(Amicon concentrator)하여 buffer A로 미리 평형을 맞춘 phosphocellulose P11 column(2.2×40 cm)에 가한 후 0~1.5 M NaCl로 용출시켰다. 각 분획은 단백질 양을 정량하고, 제한효소의 활성을 확인 후 활성이 있는 분획을 모아 다시 buffer A로 투석한 후 농축하여 buffer A와 미리 평형을 맞춘 DEAE-cellulose column(2.2×18 cm)에 가한 후 0~1 M NaCl로 용출시켰다. 이중 활성 보이는 분획을 모아 buffer A로 투석 후 농축하여 hydroxyapatite column(1.5×15 cm)에 가한 후 0~1 M potassium phosphate로 용출하였다. 이중 효소활성을 보이는 분획을 모아 buffer A로 투석 후 농축하여 buffer A로 미리 평형을 맞춘 Sephadex G-100 column(1.5×90 cm)에 가한 후 buffer A로 용출시켰다. 활성이 있는 분획을 모아서 -20°C에 보관하기 전에 buffer B(10 mM potassium phosphate

(pH 7.5), 10 mM 2-mercaptoethanol, 50%(v/v) glycerol)에 투석하여 농축하였다.

### PsyI 효소의 촉매적 특성

효소의 활성에 미치는 pH 및 온도, 여러종류의 염농도, 그리고 2가 양이온 영향을 살펴보고자 기질 DNA와 각 반응물을 반응시킨 후 전기영동하여 그 활성을 확인하였다. 기질 DNA는 lamda DNA를 Hind III 효소로 절단시켜 놓은 것을 이용하였다.

### 분자량 결정

효소의 subunit의 분자량을 결정하기 위해서 0.1%의 SDS가 포함된 7.5% polyacrylamide gel에서 standard protein marker와 함께 Laemmli의 방법(3)을 변형하여 수행하였다.

### PsyI의 DNA 염기 인식 및 절단서열

정제한 효소의 인식서열을 M<sub>13mp</sub> 19 DNA를 사용하여 Sanger의 dideoxy chain termination 방법(8)을 사용하여 결정하였다.

M13 17-base sequencing primer(6 ng)을 ss.M13 mp DNA(1 µg) 및 10xR buffer(70 mM Tris-DNA, pH 7.5, 70 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 mM NaCl) 1.5 µl와 혼합 후 증류수로 18.6 µl로 채운다. 이 혼합액은 Ependorf tube에서 95°C, 5분간 가열한 후 실온에서 냉각하고 그 다음에 4.5 ml [α-<sup>35</sup>S]dATP와 1.5 µl의 0.1 mM DDT 및 Klenow enzyme을 혼합액에 첨가한 후 혼합액을 4등분하여 그 중 하나 (I)는 제한효소 절단시험 다른 하나(II)는 주형 DNA 가닥의 반응액으로 사용하였다.

## 결과 및 고찰

### Psy 제한 효소의 정제

Table 1. Purification of restriction endonuclease from 70 g of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*

	Total Protein (mg)*	Total Unit**	Specific activity***	Purification fold	Yield (%)
Crude extract	2.21×10 <sup>3</sup>				
Ammonium sulfate saturation	5.60×10 <sup>2</sup>				
Phosphocellulose (p11) column	2.09×10 <sup>2</sup>	3.63×10 <sup>4</sup>	1.73×10 <sup>2</sup>	1	100
DEAE-Cellulose column	2.00×10 <sup>1</sup>	2.42×10 <sup>4</sup>	1.21×10 <sup>3</sup>	6.79	66
Hydroxyapatite column	2.93	1.81×10 <sup>4</sup>	6.14×10 <sup>3</sup>	35.37	49
Sepadex G-100 column	0.70	7.27×10 <sup>3</sup>	1.03×10 <sup>4</sup>	59.79	20

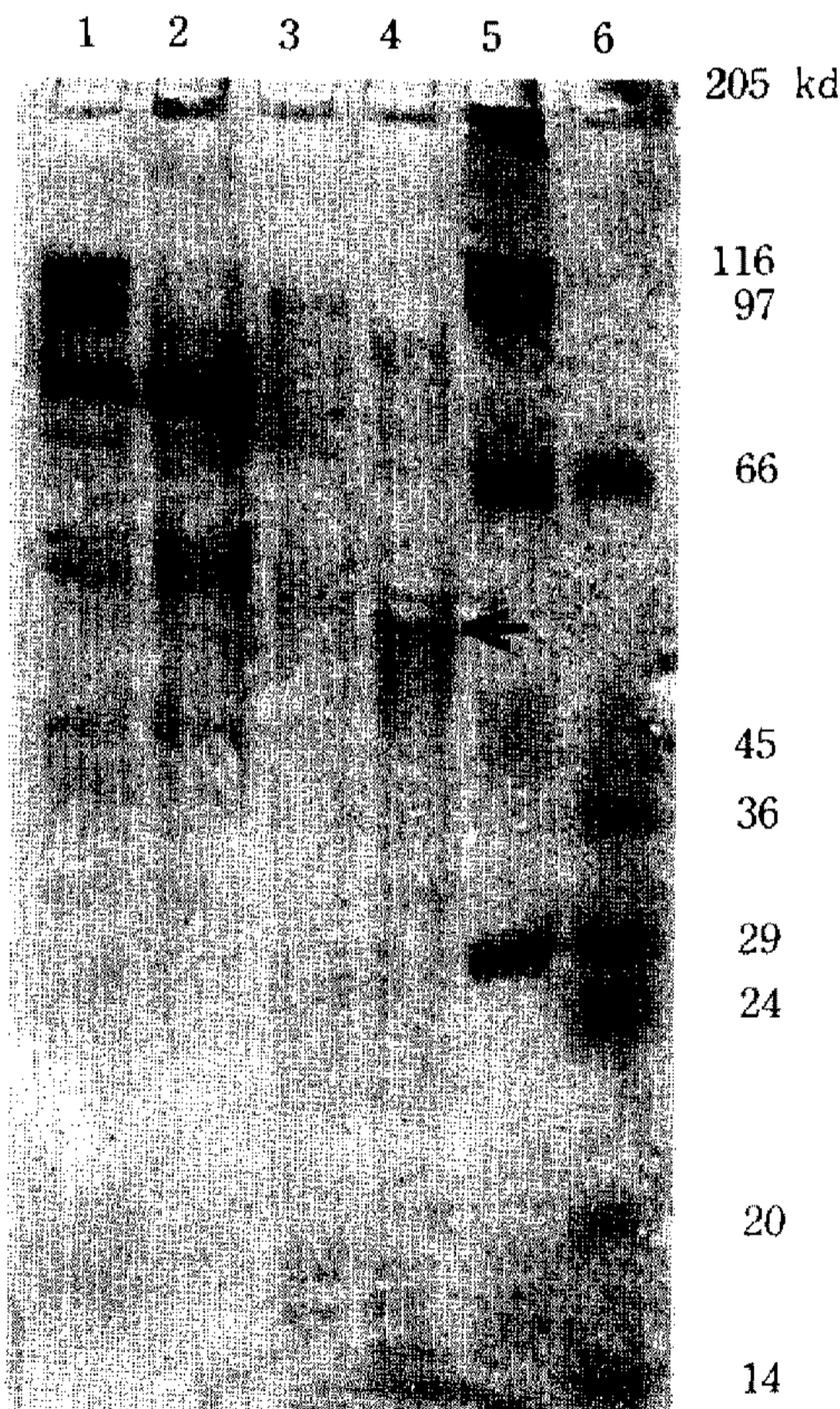
\*Protein concentration determined by the method of Lowry *et al.*, \*\*One unit of enzyme is determined as 1 µg DNA completely digested in 1 hr at 37°C, \*\*\*Unit/mg Protein

*P. syringae* 균체 70 g로부터 *PsyI*의 정제과정을 Table 1에 요약하였다.

Sephadex G-100 column chromatography를 수행한 후 10,000 U/mg의 비활성을 보였다. 0.1% SDS가 함유된 7.5% polyacrylamide gel에서 전기영동을 수행한 결과, subunit의 분자량이 약 50,000 dalton으로 나타났다(Fig. 1). 효소는  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 보관시 최소한 6개월간은 안정하였다.

***PsyI*의 특성**

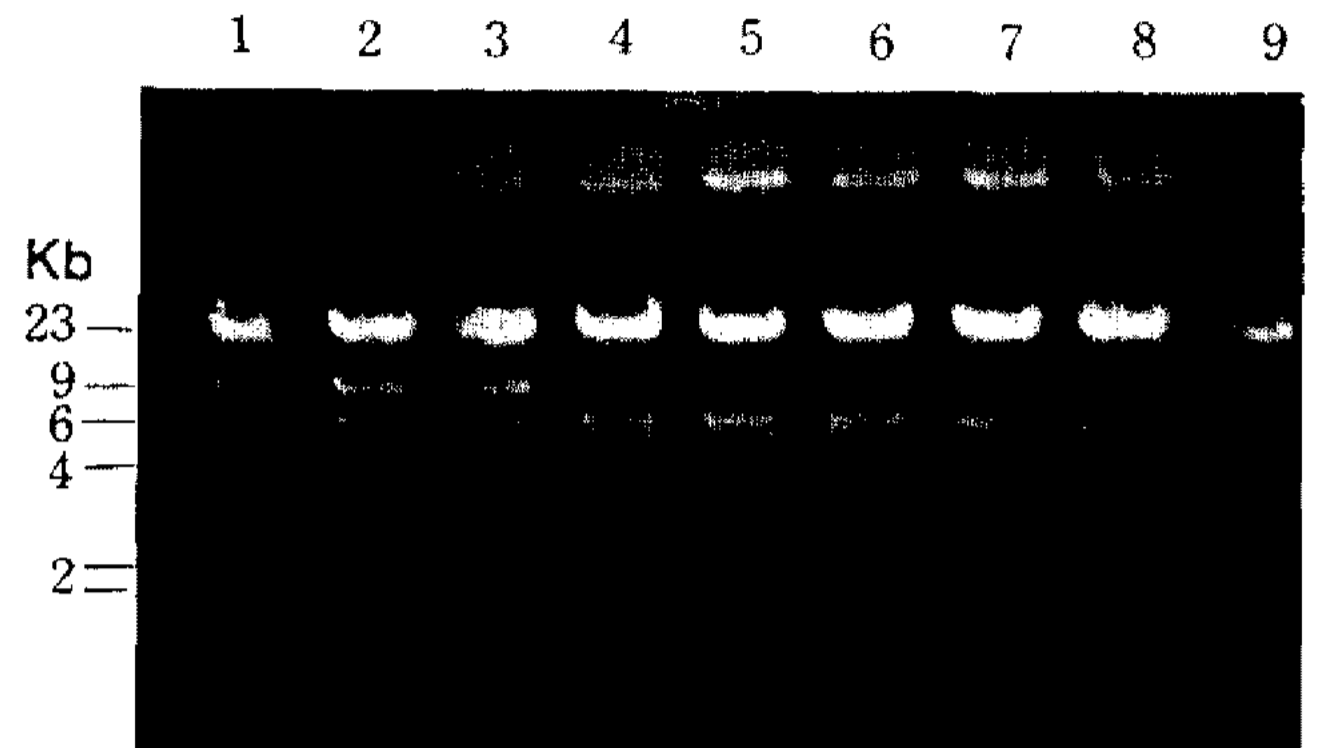
*PsyI* 제한효소의 최적의 효소활성을 위한 여러 종류의 반응조건을 검사하였다. 그 결과 넓은 범위의 pH 영역에서 안정하였고(Fig. 2),  $30^{\circ}\text{C}$ 에서  $37^{\circ}\text{C}$  사이에서 높은 활성을 보였다(Fig. 7). NaCl의 농도에 따른 영향을 조사한 결과, 10 mM NaCl 농도에서는 효소반응이 잘 일어났으나 25 mM 이상에서는 활성이



**Fig. 1. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis for the determination of subunit molecular weight and homogeneity of *PsyI*.**

lane 1; Protein from Phosphocellulose P11 column chromatography, lane 2; Protein from DEAE-cellulose column chromatography, lane 3; Protein from Hydroxyapatite column chromatography, lane 4; Protein from Sephadex G-100 column chromatography, lane 5; High molecular weight standard protein, lane 6; Low molecular weight standard protein

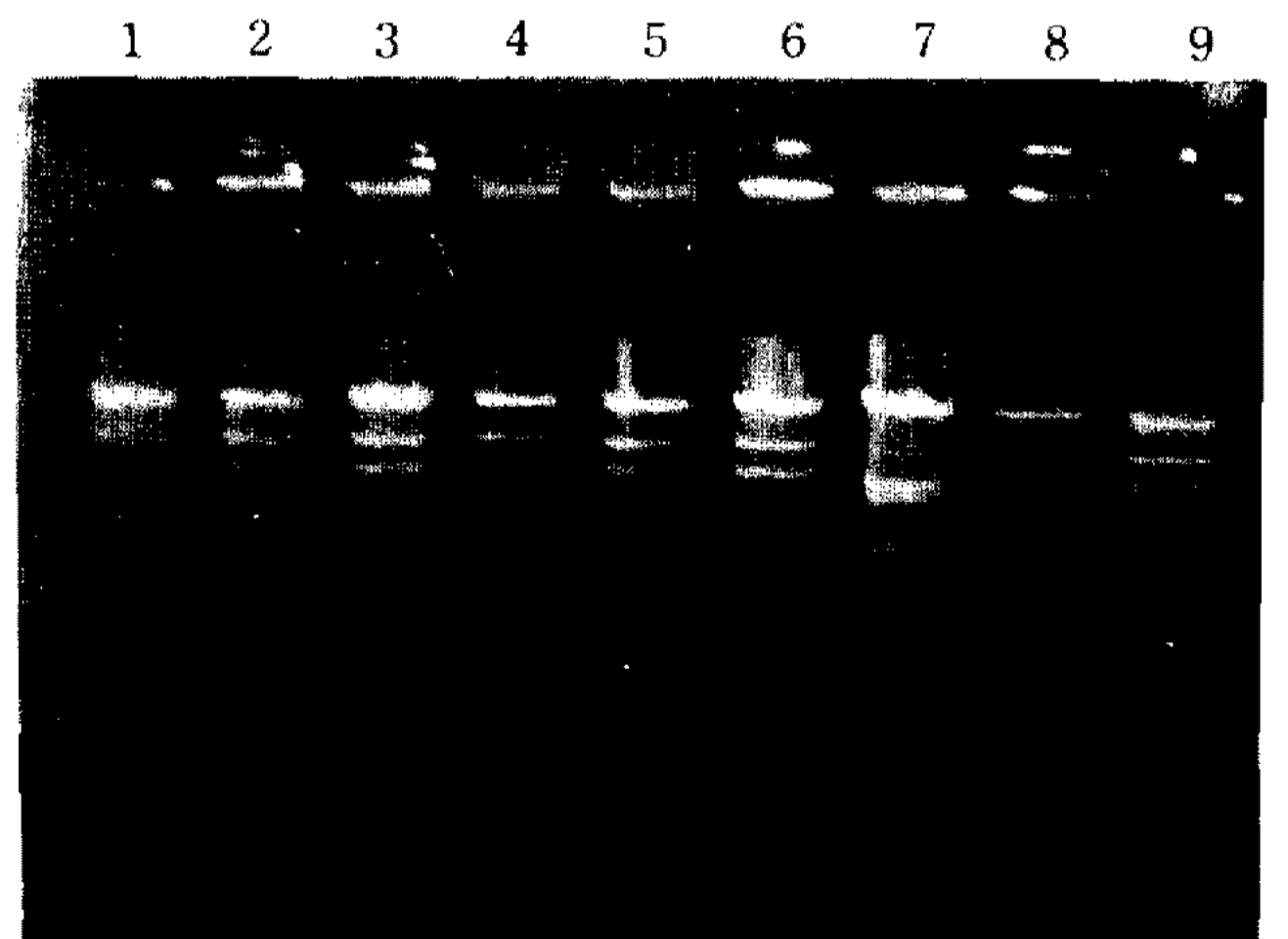
저해되었다(Fig. 3).  $\text{Mg}^{2+}$ 은 cofactor로 요구되었고, 20 mM 이상의 농도에선 활성이 저해되었다(Fig. 4). 다양한 농도의 2-mercaptoethanol을 첨가하여 효소의 활성을 측정해 본 결과 400 mM까지 농도가 증가할



**Fig. 2. The effect of pH on restriction endonuclease from *P. syringae*.**

10 mM Citric acid-NaOH (pH 3.0-4.0), 10 mM Sodium phosphate (pH 5.0-6.0), 10 mM Tris-HCl (pH 7.0-9.0), 10 mM Glycine-NaOH (pH 10.0-11.0) buffer were used. Each reaction mixture contained one of the buffers, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.3  $\mu\text{g}$  lambda-Hind III DNA and 1  $\mu\text{g}$  of enzyme solution was incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  for 20 minutes. Electrophoresis of DNA was performed on 0.7% agarose gel.

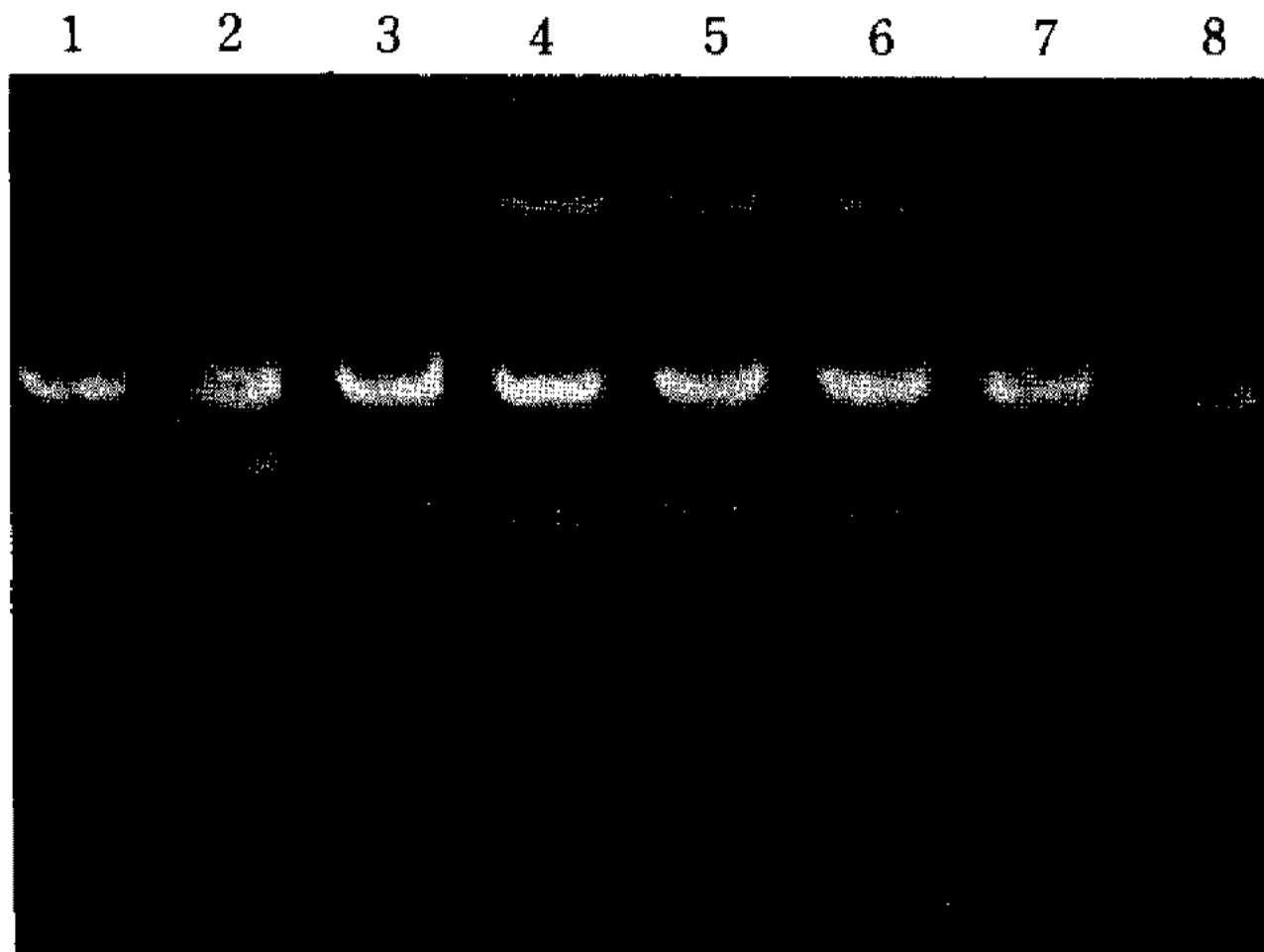
lane 1; pH 3.0, lane 2; pH 4.0, lane 3; pH 5.0, lane 4; pH 6.0, lane 5; pH 7.0, lane 6; pH 7.5, lane 7; pH 8.0, lane 8; pH 9.0, lane 9; pH 10.0



**Fig. 3. The effect of NaCl concentration on restriction endonuclease from *P. syringae*.**

Each reaction mixture contained 10mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , various concentration of NaCl, 0.3  $\mu\text{g}$  of lambda-Hind DNA and 1  $\mu\text{l}$  of enzyme solution was incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  for 20 minutes.

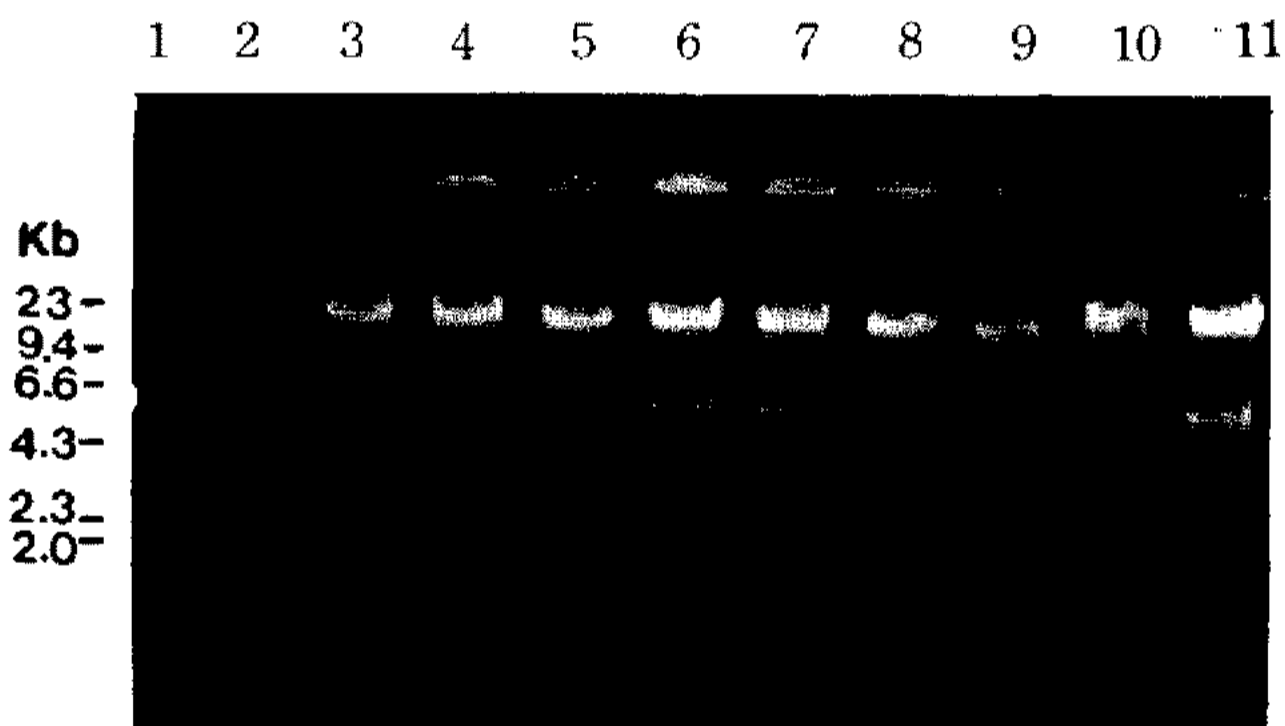
lane 1: 250 mM NaCl, lane 2: 200 mM NaCl, lane 3: 100 mM NaCl, lane 4: 75 mM NaCl, lane 5: 50 mM NaCl, lane 6: 25 mM NaCl, lane 7: 10 mM NaCl, lane 8: 0 mM NaCl, lane 9: lambda-Hind III DNA



**Fig. 4. The effect of  $Mg^{2+}$  concentration on restriction endonuclease from *P. syringae*.**

Each reaction mixture contained 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM NaCl, various concentration of  $MgCl_2$ , 0.3  $\mu$ g of lamda-Hind III DNA and 1  $\mu$ l of enzyme solution was incubated at 37°C for 20 minutes.

lane 1: Lamda-Hind III DNA, lane 2: 0 mM  $MgCl_2$ , lane 3: 1 mM  $MgCl_2$ , lane 4: 2 mM  $MgCl_2$ , lane 5: 5 mM  $MgCl_2$ , lane 6: 10 mM  $MgCl_2$ , lane 7: 15 mM  $MgCl_2$ , lane 8: 20 mM  $MgCl_2$



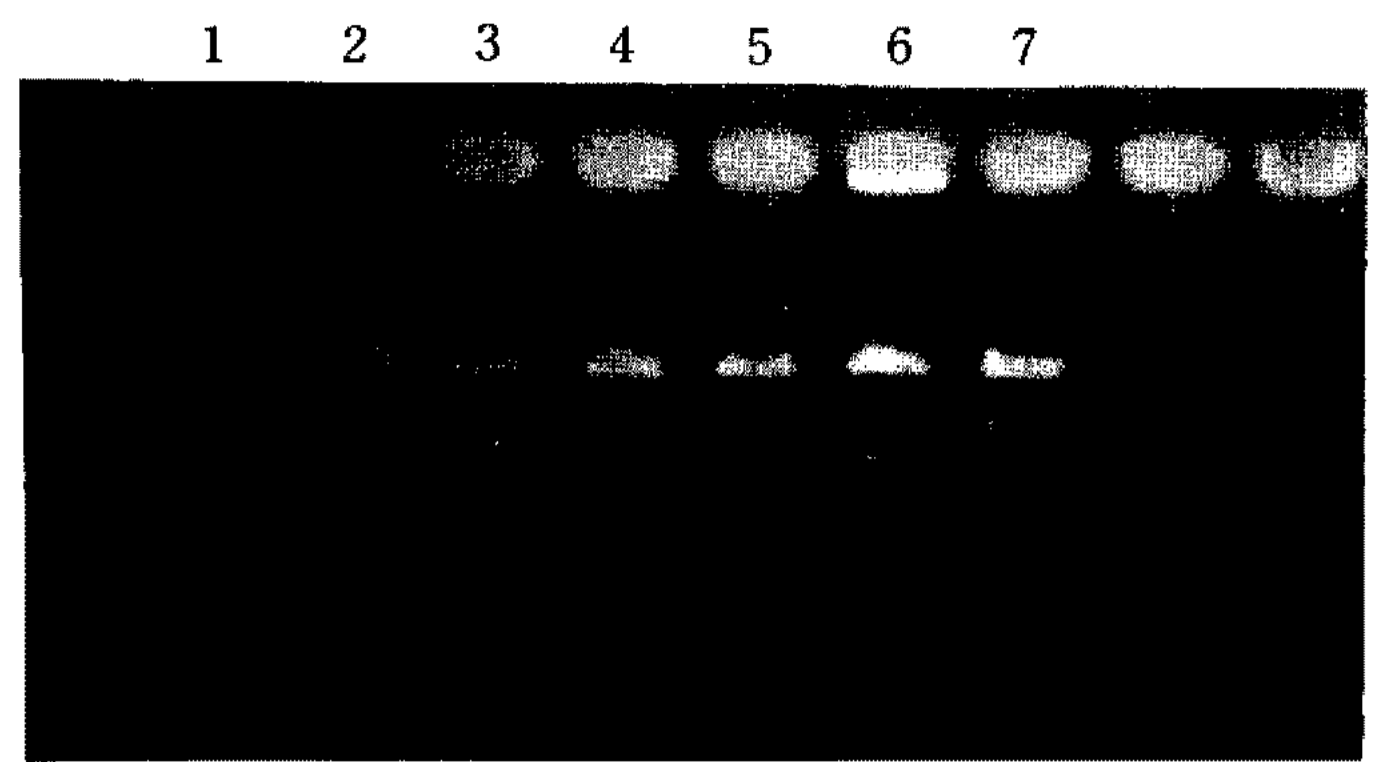
**Fig. 5. The effect of mercaptoethanol concentration on restriction endonuclease from *P. syringae*.**

Each reaction mixture contained 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM  $MgCl_2$ , 10 mM NaCl, various concentration of 2-Mercaptoethanol, 0.3  $\mu$ g of lamda-Hind III DNA and 1  $\mu$ l of enzyme solution was incubated at 37°C for 20 minutes.

lane 1: Hind III cut lamda DNA marker, lane 2: 0 mM-SH, lane 3: 1 mM-SH, lane 4: 2 mM-SH, lane 5: 5 mM-SH, lane 6: 10 mM-SH, lane 7: 25 mM-SH, lane 8: 50 mM-SH, lane 9: 100 mM-SH, lane 10: 200 mM-SH, lane 11: 400 mM-SH

때까지 계속 활성을 보였다(Fig. 5). 이 thiol group은 매우 중요한 역할을 하며(4), EcoRI의 경우 cystein residue가 target 서열을 인지하는데 관여한다고 보고되어 있다(5).

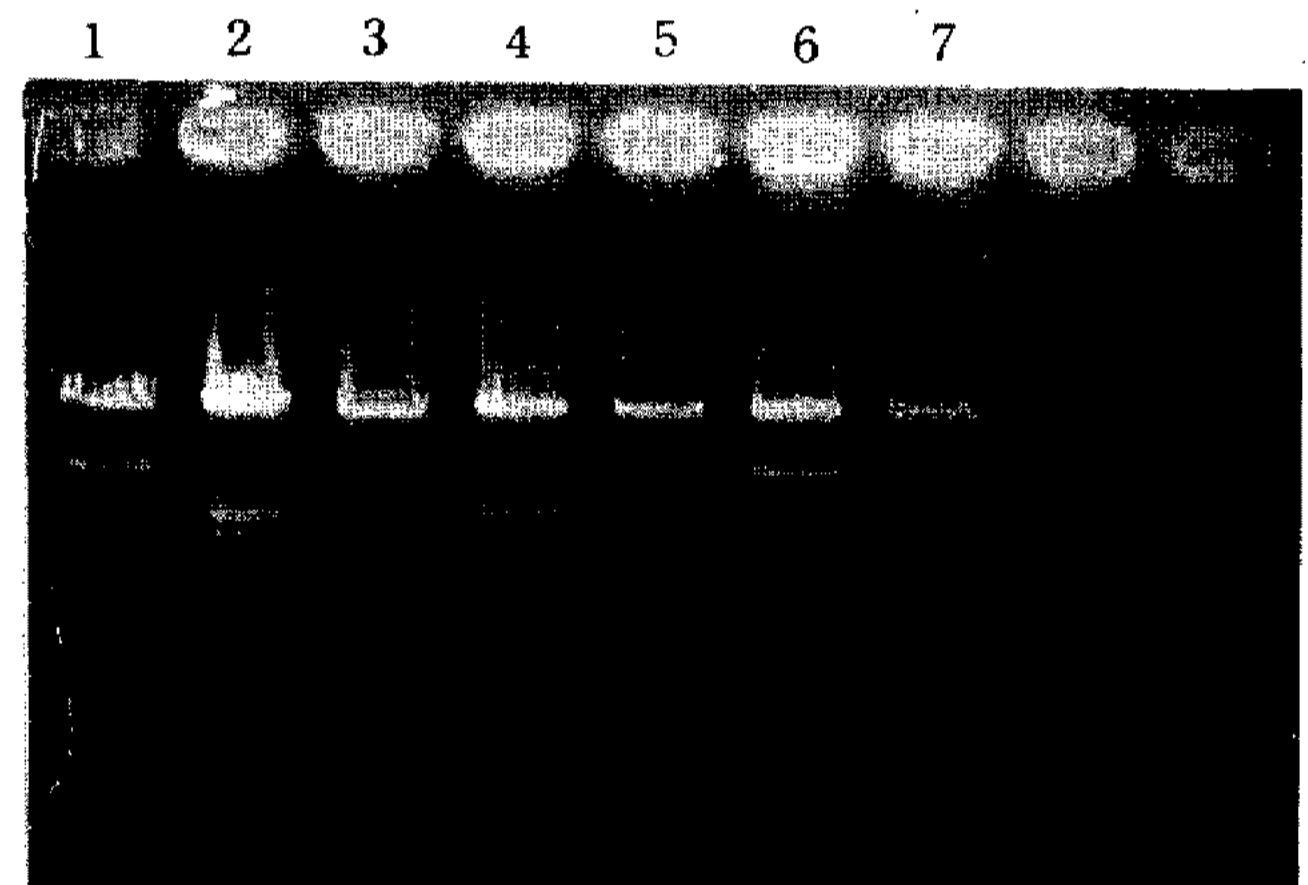
일반적으로는 sulfhydryl group의 활성을 통하여



**Fig. 6. The effect of divalent ion on restriction endonuclease from *P. syringae*.**

Each reaction mixture contained 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM 2-Mercaptoethanol, 10 mM NaCl, 10 mM various metal ion, 0.3  $\mu$ g of lamda-Hind III DNA and 1  $\mu$ l of enzyme solution was incubated at 37°C for 20 minutes.

lane 1: Hind III cut lamda DNA marker, lane 2:  $BaCl_2$ , lane 3:  $CaCl_2$ , lane 4:  $CoCl_2$ , lane 5:  $MnCl_2$ , lane 6:  $MgCl_2$ , lane 7:  $ZnCl_2$



**Fig. 7. The effect of temperature on restriction endonuclease from *P. syringae*.**

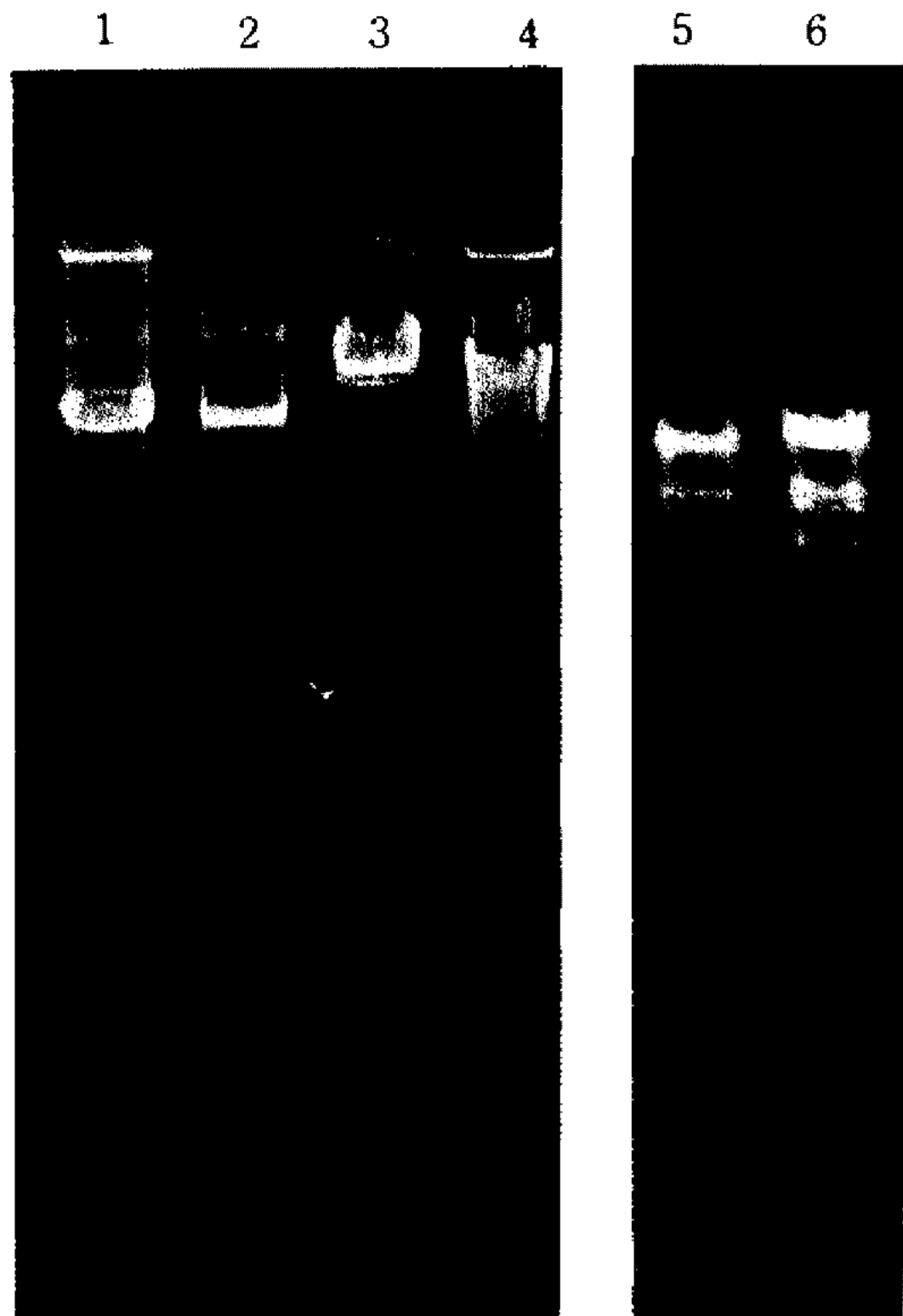
Each reaction mixture contained 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM  $MgCl_2$ , 0.3  $\mu$ g lamda-Hind III DNA and 1  $\mu$ l of enzyme solution was incubated at various temperature for 20 minutes.

lane 1: Hind III cut lamda DNA marker, lane 2: 25°C, lane 3: 30°C, lane 4: 37°C, lane 5: 45°C, lane 6: 55°C, lane 7: 65°C

그들이 단백질 구조를 유지하고, 효소의 촉매적 역할에 직접 관여한다고 알려져 있다(6). Ammonium sulfate는 10 mM만 첨가되어도 효소활성을 억제함을 볼 수 있었다. 10 mM의  $MnCl_2$ ,  $CoCl_2$ ,  $CaCl_2$ ,  $ZnCl_2$ 을 첨가해 보았으나 이중 어떤 것도  $Mg^{2+}$ 의 효과를 대체할 수 없음을 알 수 있었다(Fig. 6).

제한효소 *Psyl*의 DNA 염기서열의 인식부위





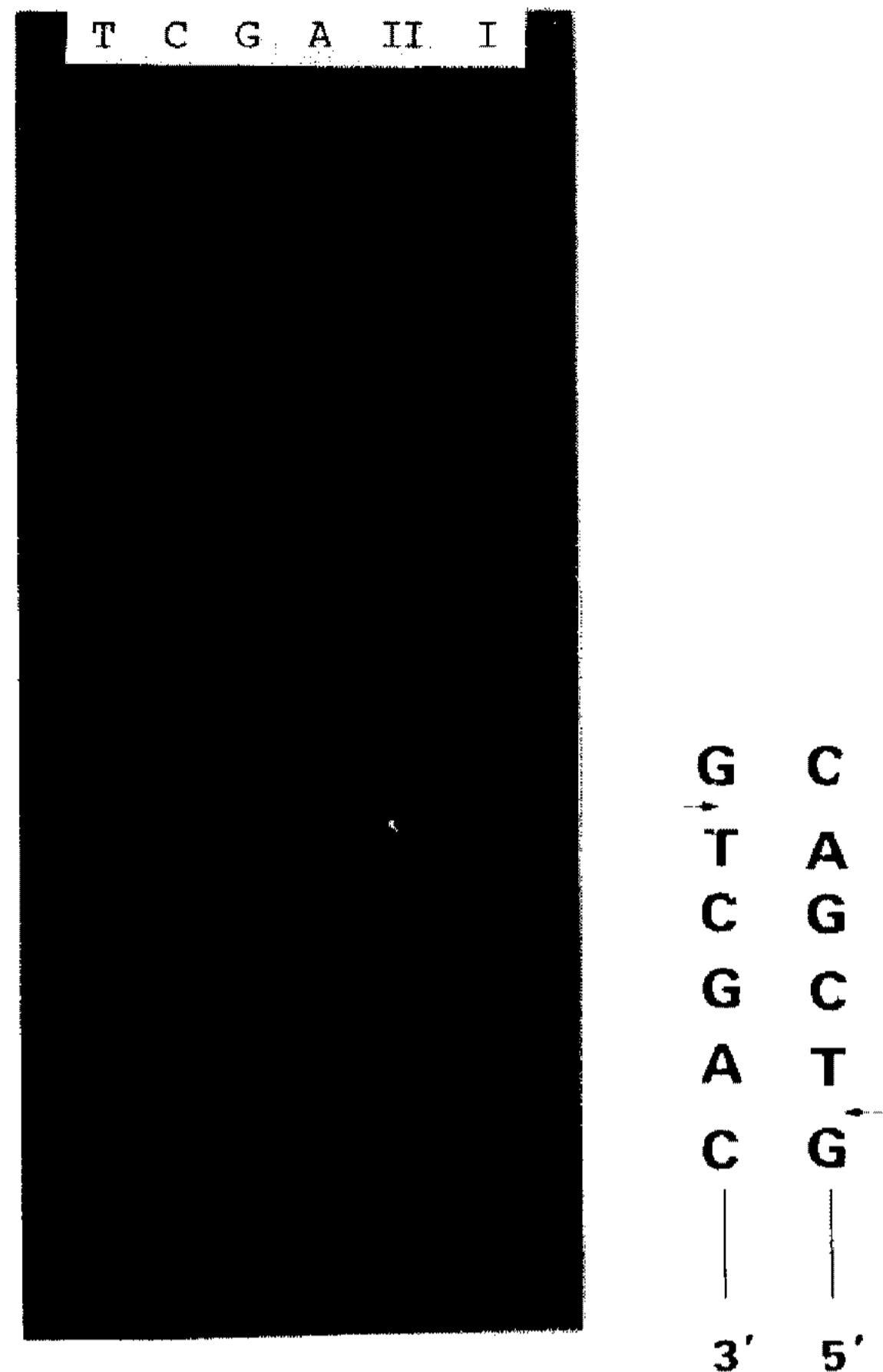
**Fig. 8. Gel electrophoresis separation of the product of digestion of various DNA with *PsyI* and *SalI*.**  
 lane 1: M13mp19 DNA+*SalI*, lane 2: M13mp19 DNA+*PsyI*, lane 3: lamda DNA+*SalI*, lane 4: lamda DNA+*PsyI*, lane 5: lamda DNA+Hind III+*SalI*, lane 6: lamda DNA+Hind III+*PsyI*

본 제한효소의 DNA 염기인식 자리에 대해서는 λDNA를 두곳에서 pBR322 및 M13mp 19DNA를 각각 1곳에서 절단한 *Sal I*의 isoschizomer로 추정되었다. M13mp 19DNA 및 DNA를 기질로 *PsyI*와 *SalI*으로 절단시킨 단편의 상태는 Fig. 8에 나타나 있다. 이 결과로부터 *SalI*의 isoschizomer로 인정되나(7) 이 결과를 확인하기 위하여 *Psy I*의 DNA 염기인식 서열을 조사하였다(Fig. 9).

실험에는 시판의 17mer sequencing primer와 M13 mp 19DNA를 사요하여 수행되었고 염기분석결과는 Fig. 9와 같다. 즉 염기인식 및 절단서열은 5'-G↓TCGA C-3'인 것으로 분석되었다. 이 염기서열을 인식하는 제한효소는 *SalI*이 알려지고 있으므로(7) 본 효소는 *SalI*의 isochizomer인 것이 확인되었다.

**요 약**

*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*로부터 새로운 제한효소 *PsyI*을 분리하여 그 촉매적 특성에 관하여 조사하였다. 효소의 정제를 위하여 70 g의 균체를 이용하였고, 300 watt에서 6분간(2분간 3번씩) 열



**Fig. 9. Determination of *PsyI* restriction site based on DNA sequencing.**

T, C, G, A: four lane reactions of dideoxy chain termination, I: (<sup>35</sup>S)-internally labeled M13mp19 DNA+*PsyI*, II: Klenow fragment and dNTP were add to reaction mixture I for carrying out filling up reaction and incubate at 37°C for 5 min.

음 위에서 초음파 마쇄하였다. 이것을 streptomycin sulfate 침전, ammonium sulfate 침전, phosphocellulose p11, DEAE-cellulose, hydroxyapatite, Sephadex G-100 column chromatography를 통해 정제하여 순수한 단백질을 얻었다. 그 단백질 subunit의 분자량은 0.1%의 SDS를 포함하는 polyacrylamide gel에서 전기 영동한 결과를 토대로 분석한 결과 약 50,000 dalton으로 추정된다.

이 효소의 촉매적 성질은 pH 7에서 pH 10 사이의 광범위한 pH 영역에서 안정하였고, 적정반응온도는 30°C 에서 37°C 였으며, 그 온도 안전성은 25°C 에서 45°C 사이로 나타났다.

이 효소는 20 mM 이상의 MgCl<sub>2</sub>, 25 mM 이상의 NaCl에서 활성이 저해되었으며, 2-mercaptoethanol 400 mM까지 첨가시 계속 활성을 보였고, 플라스미드인 pBR 322와 pUC 18, 그리고 pBS 등을 절단할 수 있었다. Lamda DNA를 여러 종류의 제한효소로

절단하여 제한효소 지도를 작성한 결과 *SalI*의 isochizomer로 확인되었고 염기서열의 조사 결과로도 확인하였다.

### 감사의 말

본 연구는 교육부 유전공학 연구비(1991년도)의 지원에 의하여 수행되었으며 이에 대하여 관계자 여러분에게 감사드립니다. 한편 DNA염기 서열 결정에 협력한 대학원생 박경숙씨의 협력에도 사의를 표합니다.

### 참고문헌

1. Kelly, T.J.Jr. and H.O. Smith. 1970. A Restriction Enzyme from *Haemophilus influenzae*. II. basic sequence of the recognition site. *J. Mol. Biol.* **51**: 393.
2. Sun, O.K. and O.J. Yoo. 1988. Purification and characterization of a restriction endonuclease from *Xanthomonas anaerobia*. *Kor. Biochem. J.* **21**: 419.
3. Laemmli, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680.
4. Nath, K. 1981. Effect of sulfhydryl group inhibitors on restriction endonuclease activities. *Arch. Biochem. Biophys.* **212**: 611.
5. Boyer, H.W., J. Grable, J.M.A. McClarin, C.A. Frederick, B.C. Wang, P. Greene, and J.M. Rosenberg. 1986. Structure of the DNA-EcoRI endonuclease recognition complex at 3A resolution. *Science* **234**: 1526.
6. Kwon, S.C., J.M. Cho, J.H. Kang, J.H. Kim, and Y.D. Cho. 1988. Purification and characterization of Xho II endonuclease from *Xanthomonas hodgsonii*. *Kor. Biochem. J.* **21**: 134.
7. Arrand, J.R. and R.J. Robert. 1978. A new restriction endonuclease from streptomyces albus G. *J. Mol. Biol.* **118**: 127-135.
8. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with terminating inhibitors. *PNAS* **77**: 5463-5467.

(Received March 22, 1994)