

**Streptomyces diastatochromogenes로부터 분리된 SdiI의 특성에 관한 연구**배 무\* · 송은숙 · 황혜연<sup>1</sup> · 임정빈<sup>1</sup>이화여자대학교 자연과학대학 생물학과, <sup>1</sup>서울대학교 자연과학대학 미생물학과

토양분리 방선균 *Streptomyces diastatochromogenes*로부터 분리된 제한효소 SdiI은 넓은 범위의 pH (7.0~12.5)와 온도 (-60°C)에서 활성을 보였으며, 고농도 (-500 mM) NaCl이 있어도 작용하였다. 또한, 20~60°C 온도에서 안정하며, 활성을 갖기 위해서는 MgCl<sub>2</sub>를 필요로 하였다. Lambda DNA에 대한 지도 작성으로부터 XhoI의 isoschizomer로 추정되었으며, DNA 염기서열 분석 결과, 인식, 절단 서열은 다음과 같이 결정되었다.

KEY WORDS □ *Streptomyces diastatochromogenes*, SdiI, XhoI

자연계에 존재하는 많은 종류의 세균으로부터 제한효소와 변형효소의 쌍으로 이루어진 restriction/modification system이 발견되었다(3). 이들 한 쌍의 제한효소와 변형효소는 동일한 DNA 염기배열을 인식하는데, 제한효소는 DNA의 특정한 염기배열을 인식하여 절단하고 변형효소는 세포내의 이와 동일한 염기배열을 변형시켜 자신의 제한효소에 의해 절단되는 것을 방지한다. 제한효소는 type I, II, 및 III로 분류되는데(7), type I은 매우 크고 복잡한 다단위체로서 효소반응에 Mg<sup>2+</sup>, ATP와 S-adenosylmethionine이 cofactor로 요구된다. 이들의 기능은 서로 다른 종간의 유전물질의 교환에 있다(12). Type II는 대부분의 제한효소를 포함하며 Mg<sup>2+</sup>만을 cofactor로 요구한다. 절단 후에는 정확성 말단을 갖는 DNA 단편을 생성하고 인식부위와 절단부위가 동일하여 반응 후의 분석이 용이하므로 유전자 재조합 기술의 필수적인 수단으로 활용될 뿐만 아니라, DNA-단백질 상호작용의 연구에도 중요하게 이용되고 있다(10). Type III는 효소반응시 Mg<sup>2+</sup>와 ATP를 필요로 하고 ATP의 가수분해는 일어나지 않으며(7), 비대칭적인 5~7개의 염기쌍을 인지하여 약 24~26개의 염기쌍 downstream 부위를 절단한다(8).

계속적인 제한효소의 발견으로 서로 다른 개체에서 유래하면서도 DNA 상에서 같은 서열을 인지하고 절단하면서 물리적, 화학적 특성이 기존의 것과 서로 다른 isoschizomer의 필요성은 계속 증대되고 있는 실정이다. 따라서 본 연구는 방선균 *Streptomyces diastatochromogenes*에서 제한효소 SdiI을 분리(1, 2)하여 특성과 그 인식서열을 결정하였다.

**재료 및 방법****사용균주 및 배양**

토양에서 분리한 방선균 30균주 가운데 분리, 선별한 *Streptomyces diastatochromogenes*를 사용하였다(1). Nutrient 0.5%, yeast extract 0.2%, NaCl 0.8%, glucose 0.5% (pH 7.2)배지를 사용하였으며(17), agar slant에서 자란 균체를 위의 배지에서 진탕배양한 종 배양액을 본 배양액에 4%가 되도록 접종하여 30°C에서 48시간 배양하였다.

**효소액의 준비**

효소액은 streptomycin sulfate 침전, ammonium sulfate 침전, hydroxylapatite column chromatography, Sephacryl S-200 HR column chromatography, hydroxylapatite column chromatography의 단계로 정제하여 얻었다(2).

**DNA의 전기영동**

효소반응의 산물은 agarose gel에서 전기 영동하였으며, 1 mg/ml ethidium bromide 용액에서 10분간 염색한 후 자외선 아래서 관찰하였다. 염색한 gel의 사진은 자외선 아래서 polaroid type 667 흑백 film을 이용하여 촬영하였다(13).

**효소의 활성에 미치는 pH의 영향**

효소의 활성에 미치는 pH의 영향을 조사하기 위하여 여러 pH 조건(pH 3.0~4.0, 10 mM citrate-NaOH; pH 5.0~6.0, 10 mM sodium phosphate; pH 7.0~9.0, 10 mM Tris-HCl; pH 10.0~12.5, 10 mM glycine-NaOH)에서 반응시키고 전기영동으로 그 활성을 비교하였다.

**효소의 활성에 미치는 온도의 영향**

6 mM Tris-HCl (pH 7.9)의 완충용액에 효소용액과 기질을 넣은 반응 혼합물을 20~65°C 범위의 각 온도에서 반응시킨 후 활성을 비교하였다.

### 효소의 온도 안정성

정제된 효소를 6 mM Tris-HCl (pH 7.9)에 넣어 20~65°C 범위의 각 온도에서 5분간 두었다가 다시 적정온도(37°C)로 옮겨 기질을 첨가시켜 반응시킨 후 활성을 확인하였다(16).

### 효소의 활성에 미치는 Na<sup>+</sup> 농도의 영향

반응 혼합물에 다양한 농도(0~600 mM)의 NaCl을 첨가하여 37°C에서 반응시킨 후 활성을 비교하였다.

### 효소의 활성에 미치는 Mg<sup>2+</sup> 농도의 영향

반응 혼합물에 다양한 농도(0~50 mM)의 MgCl<sub>2</sub>를 첨가하여 반응시킨 후 활성을 비교하였다.

### 효소의 활성에 미치는 thiol compound 농도의 영향

반응 혼합물에 다양한 농도(0~4 M)의 2-mercaptoethanol을 첨가하여 반응시킨 후 활성을 비교하였다.

### 효소의 활성에 미치는 2가 양이온의 영향

MgCl<sub>2</sub>를 제외한 반응 혼합물에 10 mM의 BaCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>를 첨가하여 반응시킨 후 활성을 비교하였다.

### 제한효소의 지도작성

제한효소의 절단 위치는 lambda DNA를 이용하여 double digestion법과 partial digestion법(6, 13)으로 결정하였다. 제한효소 반응 산물은 0.8% agarose gel에서 전기영동하였다.

### 제한효소의 인식부위결정

정제한 제한효소의 인식서열은 pBluescript SK (+)를 사용하여 Sanger의 dideoxy chain termination 방법으로 결정하였다. DNA를 알칼리로 두 가닥으로 분리한 후 17-base primer를 붙이고, 이 중 일부는 dideoxy chain termination 반응을 하였다. 다른 일부는 dideoxy NTP 없이 합성하여 분리한 효소로 자른 후, 생성되는 말단의 유형을 결정하기 위하여 다시 이 가운데 반은 Klenow enzyme으로 filling-up reaction 시켰다(15, 18).

## 결과 및 고찰

### 효소의 활성에 미치는 pH의 영향

*SdiI*에 대한 pH의 영향을 조사해 본 결과, pH 7.0~12.5의 넓은 범위에서 활성을 유지하였다(Fig. 1). *XhoI*은 pH 7.9에서 그 활성을 보이고 있다(7).

### 효소의 활성에 미치는 온도의 영향

*SdiI*은 20°C부터 60°C의 온도 범위에서 활성을 나타내었다(Fig. 2). 이처럼 높은 온도에서도 작용할 수 있는 제한효소들이 몇 가지 알려져 있는데, *Bacillus stearothermophilus*로부터 분리된 *BstI*503은 25°C부터 75°C의 범위에서 활성을 나타내며(4), *CitI* 등도 높은 온도에서 안정한 것으로 보고된 바 있다(5). *XhoI*은 37°C에서 활성을 나타낸다(7).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

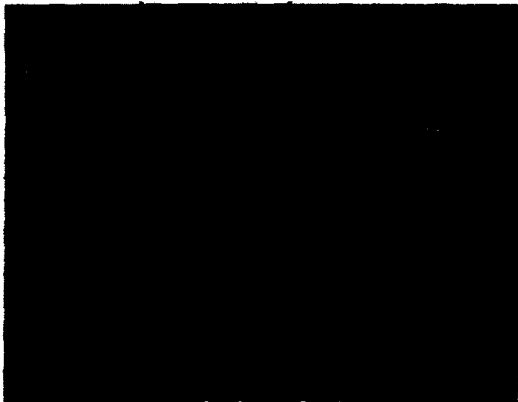


Fig. 1. The effect of pH on *SdiI* activity.

Each reaction mixture containing 10 mM of appropriate buffer, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 150 mM NaCl, 0.3 μg lambda-*HindIII* DNA and 1 μl of enzyme solution was incubated at 37°C for 60 min. Electrophoresis of DNA was performed on 0.8% agarose gel.

Lane 1, marker; Lane 2, pH 3; Lane 3, pH 4; Lane 4, pH 5; Lane 5, pH 6; Lane 6, pH 7; Lane 7, pH 8; Lane 8, pH 9; Lane 9, pH 10; Lane 10, pH 11; Lane 11, pH 12.5.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

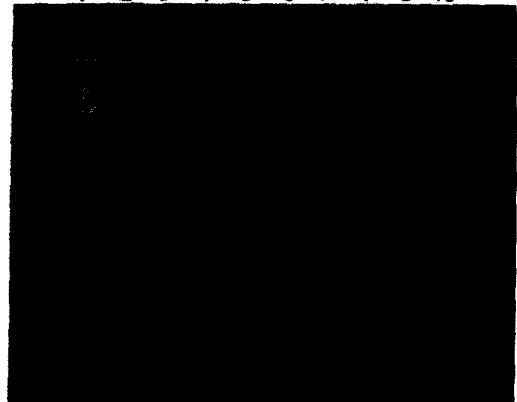
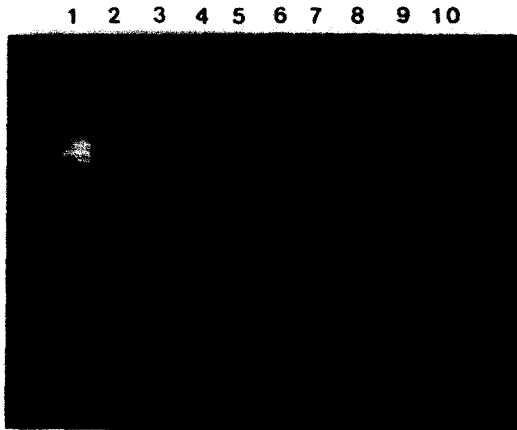
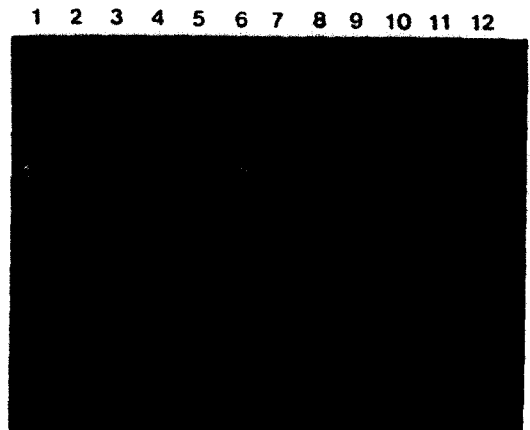


Fig. 2. The effect of temperature on *SdiI* activity.

Each reaction mixture contained 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 150 mM NaCl, 0.3 μg lambda-*HindIII* DNA and 1 μl enzyme solution was incubated at various temperature for 60 min. Electrophoresis was performed on 0.8% agarose gel. Lane 1, marker; Lane 2, 20°C; Lane 3, 30°C; Lane 4, 37°C; Lane 5, 40°C; Lane 6, 45°C; Lane 7, 50°C; Lane 8, 55°C; Lane 9, 60°C; Lane 10, 65°C.



**Fig 3. Thermal stability of *SdiI* activity.**  
*SdiI* was preincubated from 20°C to 65°C for 5 min at 6 mM Tris-HCl (pH 7.9), retained for 12 hours at -20°C and assayed for enzyme activities in the presence of 6 mM Tris-HCl (pH 7.9), 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 150 mM NaCl at 37°C for 60 min. Electrophoresis of DNA was performed on 0.8% agarose gel.  
 Lane 1, marker; Lane 2, 20°C; Lane 3, 30°C; Lane 4, 37°C; Lane 5, 40°C; Lane 6, 45°C; Lane 7, 50°C; Lane 8, 55°C; Lane 9, 60°C; Lane 10, 65°C.



**Fig 4. The effect of NaCl concentration on *SdiI* activity.**  
 Each reaction mixtures contained 6mM Tris-HCl (pH 7.9), 6 mM MgCl<sub>2</sub>, various concentration of NaCl, 0.3µg of lambda-*HindIII* DNA and 1 µl of enzyme solution was incubated at 37°C for 60 min. Electrophoresis of DNA was performed on 0.8% agarose gel.  
 Lane 1, marker; Lane 2, 0 mM; Lane 3, 10 mM; Lane 4, 25 mM; Lane 5, 50 mM; Lane 6, 75 mM; Lane 7, 150 mM; Lane 8, 200 mM; Lane 9, 300 mM; Lane 10, 400 mM; Lane 11, 500 mM; Lane 12, 600 mM.

**효소의 온도 안정성**

*SdiI*을 각각의 온도에 5분간 방치시켰다가 다시 적정온도에서 효소반응을 시켜 본 결과, 20°C부터 65°C까지 안정함을 알 수 있었다 (Fig. 3).

**효소의 활성에 미치는 Na<sup>+</sup> 농도의 영향**

NaCl 농도에 따른 *SdiI*의 활성을 조사한 결과 0~500 mM까지 안정하였다 (Fig. 4). 대부분의 제한효소는 low나 medium salt 범위에서 안정하지만, *EcoRI*, *EcoRII*, *MboI*, *SalI*과 같은 것은 high salt에 안정하여 반응시 150 mM의 NaCl이 첨가된다 (5). 특히 *Halococcus acetofaciens*에서 발견된 *HacI*은 300 mM의 salt에서 최적 활성을 나타낸다고 보고된 바 있다 (9). *XhoI*은 150 mM의 salt 농도에서 그 활성을 나타낸다 (7).

**효소의 활성에 미치는 Mg<sup>2+</sup> 농도의 영향**

다양한 농도의 MgCl<sub>2</sub>를 첨가하여 *SdiI*의 활성에 미치는 영향을 살펴본 결과, 50 mM까지 활성을 나타내었으며, 0 mM에서는 활성을 보이지 않았다 (자료 미제시). 그러므로 *SdiI*은 cofactor로서 Mg<sup>2+</sup>를 필요로 함을 알 수 있었다. Type II 제한효소는 다른 type과 달리 ATP나 S-adenosylmethionine을 요구하지 않는 반면, Mg<sup>2+</sup> ion만을 cofactor로 이용한다 (7). *SdiI*도 Mg<sup>2+</sup> ion이 존재할 때만 작용하므로 type II 제한효소의 특징과 일치하고 있다.

**효소의 활성에 미치는 -thiol compound 농도의 영향**

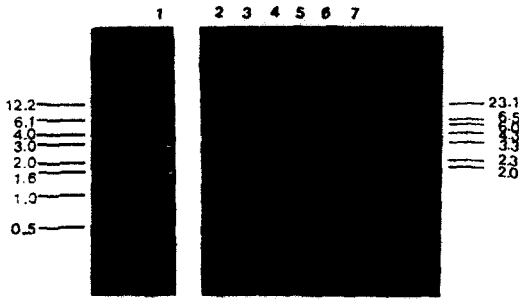
다양한 농도의 2-mercaptoethanol을 첨가하여 *SdiI*의 활성을 측정해 본 결과, 500 mM까지를 농도 증가시켜도 계속 활성을 보였으므로 sulfhydryl compound에 대한 요구성을 알 수 있었다 (자료 미제시). 다른 여러 제한효소에서 thiol group은 매우 중요한 역할을 하며 (14), *EcoRI*의 경우는 cystein 잔기가 염기서열을 인지하는 데 관여한다고 보고되어 있다. 이들은 염기조성에는 차이를 보이나 염기서열 인지와 phosphodiester 결합 절단에 참여하는 데 있어서 유사성을 보인다. 일반적으로는 thiol group을 통하여 단백질 구조를 유지하고 효소의 촉매적 역할에 직접 관여한다고 알려져 있다 (11).

**효소의 활성에 미치는 2가 양이온의 영향**

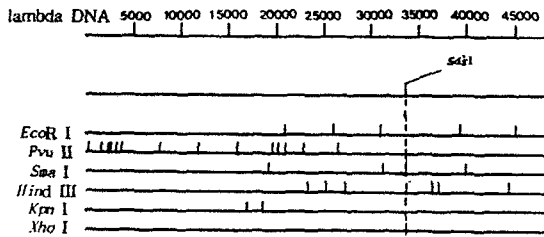
Mg<sup>2+</sup>를 Ba<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> 등의 다른 2가 양이온으로 대체하여 그 효과를 조사하였는데, 이들은 Mg<sup>2+</sup>의 효과를 대체할 수 없는 것으로 나타났다 (자료 미제시).

**제한효소 *SdiI*의 지도 작성**

*SdiI*의 절단부위를 추정하기 위해서 lambda DNA를 *EcoRI*, *PvuII*, *SmaI*, *HindIII*, *KpnI*, *XhoI*으로 처리하고 다시 *SdiI*으로 처리하여 (Fig. 5) semi-log graph에서 크기를 추정하여 지도를 작성하였다 (Fig. 6). Lambda DNA-*EcoRI*을 *SdiI*으로 처리하면 7.42 kb 절편이 둘로 절단된다. Lambda



**Fig 5. Double digestion of lambda DNA.**  
 Lambda DNA was digested with *SdiI* and various other enzymes. Lane 1, 1 kb DNA ladder; lane 2, *EcoRI*; lane 3, *PvuII*; lane 4, *SmaI*; lane 5, *HindIII*; lane 6, *KpnI*; lane 7, *XhoI*.



**Fig 6. The restriction mapping of lambda DNA with *SdiI*.**  
 From the result of double digestion, the recognition sequence of *SdiI* was located on lambda DNA.

DNA-*PvuI*은 21 kb 절편이; lambda DNA-*SmaI*, lambda DNA-*HindIII*, lambda DNA-*KpnI*은 8.2 kb, 9.4 kb, 29.9 kb 절편이 각각 둘로 절단된다. Lambda DNA를 *XhoI*으로 처리하면 33.5 kb와 15 kb 절편이 생기는데 다시 *SdiI*으로 처리하여도 더 이상의 단편이 생기지 않는다. 그러므로 *SdiI*의 지도를 작성한 결과, *SdiI*은 *Xanthomonas holicola*의 제한효소인 *XhoI*의 isoschizomer인 것으로 추정된다. **제한효소 *SdiI*의 인식, 절단부위 결정**

위의 결과를 토대로 Sanger의 dideoxy chain termination sequencing 방법을 이용하여 정확한 작용부위를 결정할 수 있었다. *SdiI*는 DNA상에서 다음과 같은 부위를 인식, 절단하였다 (Fig. 7).



이로써 이 제한효소는 *XhoI*의 isoschizomer임이 확인되었다.



**Fig 7. Determination of *SdiI* restriction site based on DNA sequencing.**  
 Lanes G, A, T, and C are the sequencing ladders through the recognition sequence 5'-C/TCGAG-3' obtained by Sanger's method using pBluescript SK<sup>+</sup>. Identical cleavage specificity of *XhoI* (lanes 1, 2) and *SdiI* (lanes 3, 4) was demonstrated. Half of the cleavage product (lanes 2, 4) was treated with Klenow enzyme.

**감사의 글**

본 연구는 한국과학재단 우수연구센터(서울대학교 분자미생물학 연구센터)의 M. Bae에 대한 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

**참고문헌**

1. 배 무, 서 원나, 송 은숙, 이 계준, 1994. 제한효소인 *SdiI*을 생성하는 *Streptomyces* 분리균주의 수리 동정. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 134-142.
2. Bae, M. and E.-S. Song, 1994. Purification of restriction endonuclease, *SdiI*, from *Streptomyces diastachromogenes*. *Kor. J. Microbiol.* **32**, (submitted).
3. Boyer, H.W., 1971. DNA restriction and modification mechanisms in bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **25**, 153-176.
4. Catterall, J.F. and N.E. Wellker, 1977. Isolation and properties of a thermostable restriction endonuclease (Endo R. Bst 1503). *J. Bacteriol.* **129**, 1110-1120.
5. Choi, K.D. and O.J.Yoo, 1986. Studies on the two

- new restriction endonucleases. *CthI*, *CthII*, from *Clostridium thermocellum*. KAIST thesis.
6. Dillon, J.A.R., A. Nasim, and E.R. Nestman, 1985. Recombinant DNA methodology. John Wiley & Sons, Ltd., New York.
  7. Gingeras, T.R. and P.A. Myers, 1978. A new specific endonuclease present in *Xanthomonas holcicola*, *Xanthomonas papavericola* and *Brevibacterium luteum*. *J. Mol. Biol.* **118**, 113-122.
  8. Hadi, S.M., B. Bachi, S. Iida, and T.A. Bickle, 1983. DNA restriction modification enzymes of phage P1 and plasmid p15B, subunit functions and structural homologies. *J. Mol. Biol.* **165**, 19-34.
  9. Hiraoka, N., K. Kita., H. Nakajima., F. Kimizuka, and A. Obayashi, 1985. Site-specific restriction endonucleases of several non-pathogenic bacteria. *J. Ferment. Technol.* **2**, 151-157.
  10. Kelly, T.J.Jr. and H.O. Smith, 1970. A restriction enzyme from *Haemophilus influenza* II: Basic sequence of the recognition site. *J. Mol. Biol.* **51**, 393-409.
  11. Kwon, S.C., J.M. Cho, J.H. Kang, J.H. Kim, and Y.D. Cho, 1988. Purification and characterization of *XhoII* endonuclease from *Xanthomonas holcicola*. *Kor. Biochem. J.* **21**, 134-140.
  12. Linn, A.S. and W. Arber, 1986. Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*: *in vitro* restriction of phage fd replicative form. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **59**, 1300-1306.
  13. Maniatis, T., F. Fritsh, and J. Sambrook, 1984. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
  14. Nath, K., 1981. Effect of sulfhydryl group inhibitors on restriction endonuclease activities. *Arch. Biochem. Biophys.* **212**, 611-617.
  15. Sanger, F., Nicken, S., and A.R. Coulson, 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 5463-5467.
  16. Sasaki, J. and Y. Yamada, 1984. Purification properties and recognition sequence of site-specific restriction endonuclease from *Acetobacter liquefaciens* AJ 2881. *Agric. Biol. Chem.* **48**, 3027-3034.
  17. Shimotsu, H., H. Takahashi, and H. Saito, 1980. Site-specific endonucleases in *Streptomyces* strains. *Agric. Biol. Chem.* **44**, 1665-1666.
  18. Sun, O.K. and O.J. Yoo, 1988. Purification and characterization of a restriction endonuclease from *Xanthomonas anaerobia*. *Kor. Biochem. J.* **21**, 419-422.

(Received June 3, 1994)

(Accepted July 12, 1994)

---

**ABSTRACT: Characterization of a Restriction Endonuclease, *SdI*, from *Streptomyces diastatochromogenes***

Bae, Moo\*, Eun-Sook Song, Hye-Yeon Hwang<sup>1</sup>, and Jeongbin Yim<sup>1</sup> (Department of Biology, College of Natural Science, Ewha Woman's University, Seoul 120-750, and <sup>1</sup>Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea)

In catalytic properties of the restriction endonuclease, *SdI*, which was purified from *Streptomyces diastatochromogenes*, this enzyme was active at wide range between pH 7.0 and 12.5, and up to 60°C and 500 mM of NaCl concentration. It was stable between 20°C and 60°C, and essentially requires MgCl<sub>2</sub> for endonuclease activity. The restriction map of lambda DNA which was obtained by double digestion with various enzymes suggested *SdI* to be an isoschizomer of *XhoI*. From the determination of restriction site based on DNA sequencing method, recognition and cleavage specificity of *SdI* was concluded as:

