

단백질 융합 시스템을 이용한 Bacteriophage Lambda Integrase의 발현 및 정제

이나영 · 유승구*

연세대학교 공과대학 식품생물공학과 및 생물산업소재 연구센터

Expression and Purification of Bacteriophage Lambda Integrase by Fusion Protein System

Na-Young Lee and Seung-Ku Yoo*

Department of Food and Biotechnology, College of Engineering and Bioproducts
Research Center, Yonsei University, Sudaemun-Ku, Seoul 120-749, Korea

Abstract — The lambda Integrase (Int) carries out site-specific recombination between the two partner DNA sequences, attachment P (*attP*) and attachment B (*attB*). In order to study the recombination mechanism, a large quantity of pure integrase is required. Then, we constructed an *int* gene inserted recombinant plasmid (pNYL3) by using the pQE31 HIS-Tag vector, and produced the fusion protein, 6xHIS-Int from the *E. coli* TG1 strain carrying the pNYL3 plasmid. The recombinant protein produced was purified by phosphocellulose and Ni²⁺-NTA affinity column chromatographies. The result of the *in vitro* recombination assay using the standard reaction mixture containing 6xHIS-Int and partially purified integration host factor (IHF) showed that the 6xHIS-Int tagged recombination Integrase had the full recombination activity.

박테리오파이지 λ DNA가 대장균 숙주 안에서 자 리특이적 재조합에 의해 숙주 DNA 안으로 통합될 때에, λ Integrase(Int)는 박테리오파이지 DNA의 attachment P(*attP*) 자리와, 숙주의 attachment B(*attB*) 자리 사이의 재조합을 주도한다(1, 2). *attP*는 Int의 결합 부위인 P arm, P' arm, Core(3) 등과 integration host factor(IHF) 결합부위로 구성되어 있으며(4), *attB*는 단순히 Core 만으로 구성되어 있다(5). λ DNA가 숙주 DNA 안으로 통합되는 과정에서 Int는 *attP*에 결합하여 Int가 갖고 있는 type I topoisomerase 활성으로 *attP* 내의 절단부위를 절단하고 일시적으로 결합체를 이루고, 이 결합체가 *attB* 자리를 인식하여 재조합 과정을 진행시키는 것으로 생각된다(6, 7). 이 과정에서 Int와 IHF는 *attP*의 결합 부위에 결합하여 Int-IHF-*attP*의 단백질-DNA 고차구조인 intasome을 형성하고 이 intasome이 마치 효소가 기질에 대하여 특이성을 보이듯이 *attB*를 특이적으로 인식하여 재조합을 일으킨다는 모델이 제시되었다(8, 9). Intasome은 기존의 효소와는 다른 종류의 효

소로 연구가치가 매우 높다. Int가 두개의 독립적인 DNA 결합부위를 갖고 있으며(10), Int가 단백질 다리를 형성하여 고차구조를 만든다는 보고(11-13)는 있으나 intasome의 작용기작은 아직 잘 알려져 있지 않다. Intasome에 대한 연구를 위해서는 다량의 순수한 Int가 요구되는데 기존의 Nash 등(14)에 의한 Int의 정제과정은 한번의 침전과 세 종류의 칼럼 작업을 거쳐야만 하는 비효율적인 방법이었다.

본 연구에서는 Int 정제과정을 용이하게 하기 위해서 6xHistidine tag를 Int에 붙여 발현시키고 6xHistidine에 친화력이 큰 칼럼을 이용하여 융합 단백질을 순수분리하였고, 6xHistidine tag가 결합된 Int의 recombination 활성을 확인하였다.

λ Int 유전자의 subcloning을 위하여 λ Int의 유전자를 가지고 있는 λ HindIII의 3.6 kb 단편을 template로 하여 1 ng template DNA, 2.5 units Vent_R DNA polymerase(NEB), 100 pmol primers P1, P2, 200 mM dNTPs, 0.01% mineral oil, 1 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM Tris-HCl, pH 8.8, 2 mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100의 존재하에서 Polymerase Chain Reaction(PCR)을 실시하여 Int 유전자를 증폭하였다. PCR로 증폭된 Int 유전자를 대량으로 얻기위해 Int의

Key words: Lambda site-specific recombination, fusion protein, integrase

*Corresponding author

PCR 반응산물 DNA의 5' 말단에 인산기를 첨가하는 kination 반응을 T₄ polynucleotide kinase(Promega), 100 mM ATP, 1 μl 10x kinase 완충액 조건에서 행한 후, SmaI과 CIP로 처리된 pUC19 vector와 ligation을 행하여 *E. coli* JM109에 형질전환(15)시켰다. X-gal plate 상에서 색깔을 통한 선택과 재조합 plasmid의 제한효소분석방법(HindIII, KpnI, BamHI)을 통해 Int를 가진 clone(*E. coli* DH5α(pNYL1))을 선택하였다. Sanger 등의 dideoxy chain termination 방법(16)으로 DNA 염기배열결정실험을 행하여 pUC 19와 PCR 반응산물의 연결부분의 open reading frame(ORF)이 맞는지를 확인하였다.

6xHistidine-Int 융합 유전자는 Int 유전자를 6xHistidine tag에 결합시켜 제조하였다. 6xHistidine vector 중 pQE31를 선택하였고, Int 유전자는 pNYL1로부터 얻어냈다. 두 plasmid 모두를 HindIII과 KpnI으로 절단하여, pQE31 vector는 CIP로 처리하고, pNYL1로부터는 1.1 kb의 Int 단편을 얻어내어 ligation을 행한 후 *E. coli* TG1에 형질전환을 실시하였다. 이 후 형질전환체로부터 plasmid DNA를 분리하고, 제한효소분석을 통하여 clone(*E. coli*(pNYL3))을 확인

하였다. 6xHistidine-Int 융합 유전자의 생성 방법은 Fig. 1에 나타내었다.

6xHistidine-Int의 유전정보를 가진 pNYL3은 tac promoter를 가지고 있으므로 종배양액을 1% 접종한 후 OD_{600nm} 0.4~0.6 사이에 IPTG를 최종농도가 10 mM이 되도록 첨가하여 6시간 이상 단백질 발현을 유도하면 45 kDa 크기의 융합 단백질을 발현시킬 수 있었다(Fig. 2). 융합 단백질이 발현된 *E. coli* TG1 (pNYL3) 균체를 초음파분쇄기로 파쇄시킨 후 원심 분리하여 상등액(soluble protein)을 얻었다. 가용성 분획 부분을 0.05M Tris/HCl, pH 7.4 완충액으로 평형화시킨 phosphocellulose 칼럼(1×3 cm)과 300 mM NaCl, 50 mM Na-phosphate, pH 8.0 완충액으로 평형화시킨 Ni⁺⁺-NTA 칼럼으로 정제하였다.

IHF의 유전정보를 가진 *E. coli* K5746(pP_{hip}.him-A-5)는 cI857과 P_i promoter(17)의 정보를 가지고 있으므로 32°C에서 42°C로 온도를 올려주어 temperature sensitive repressor를 불활성화 시킴으로써 IHF를 발현시켰다. 0.05M Tris hydrochloride, 10% glycerol, pH 7.4 완충액으로 평형화시킨 phosphocellulose 칼럼을 이용한 정제를 실시한 후, 16% SDS-PAGE 전기영동으로 11.2 kDa과 10.58 kDa의 IHF α, β subunits를 확인하였다.

Int의 recombination 활성 측정은 *in vitro* recombination assay를 통하여 실시하였다. attP DNA로서 λ attP 부위를 함유하고 있는 plasmid pSKY11(Yoo, un-

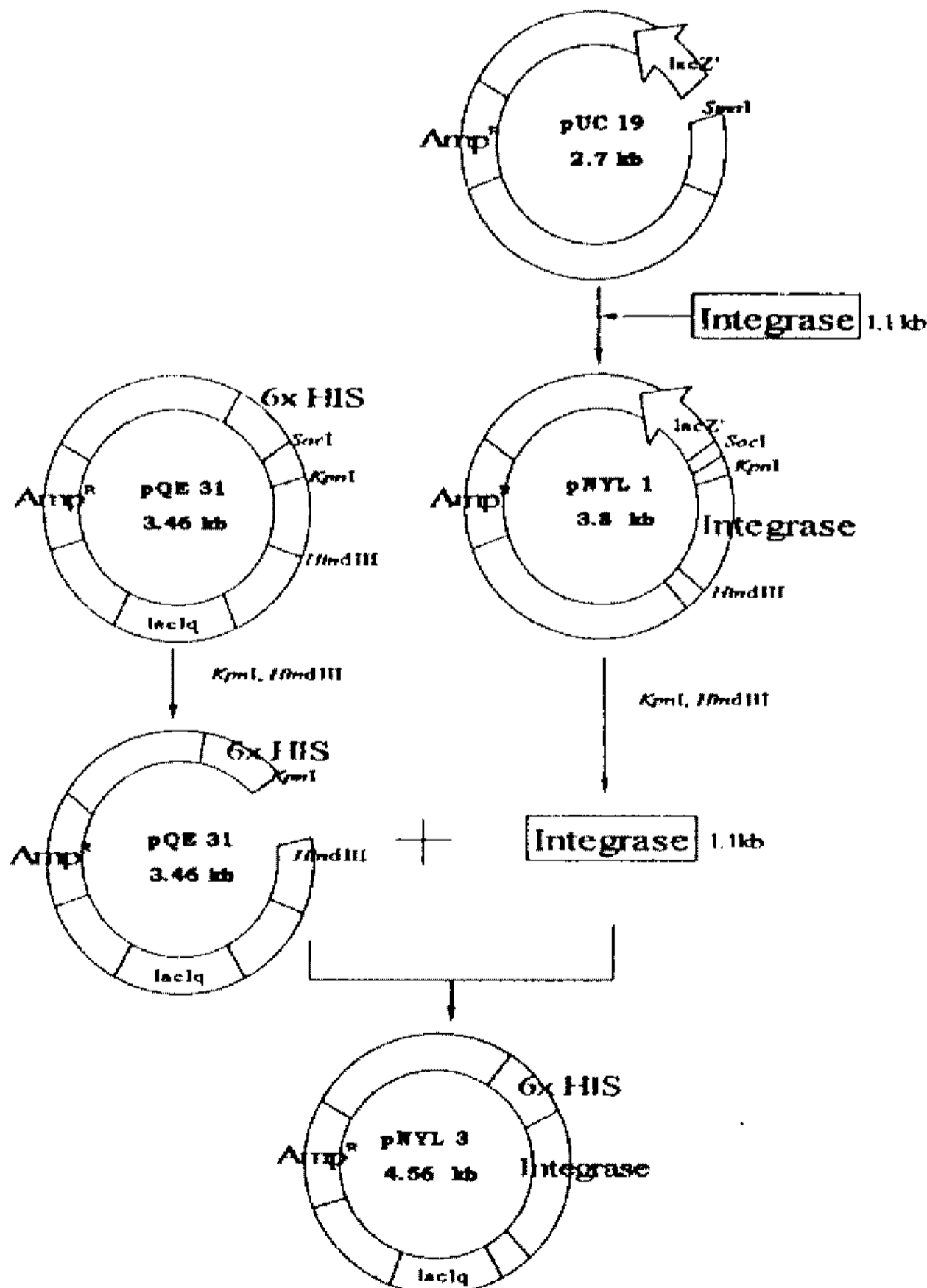


Fig. 1. Recombinant plasmids constructed for expression of 6xHIS-Int.

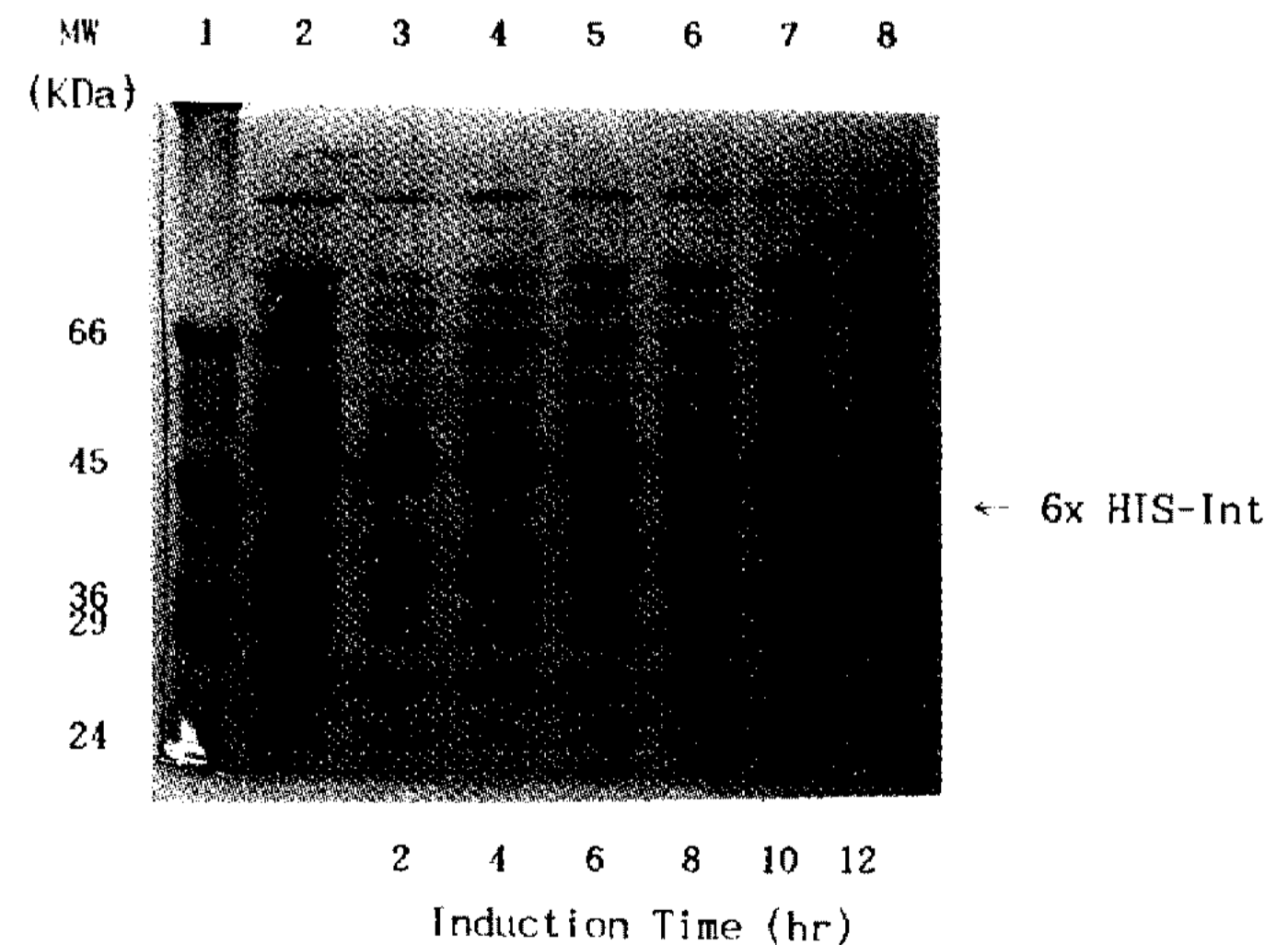


Fig. 2. Expression of 6xHIS-Int fusion protein. Lane 1: standard protein size marker. Lane 2: whole cell lysates of uninduced *E. coli* TG1 (pNYL3). Lane 3~8: whole cell lysates of induced *E. coli* TG1 (pNYL3). Total cellular proteins were analyzed on a 12.5% SDS-PAGE and visualized with commassie blue.

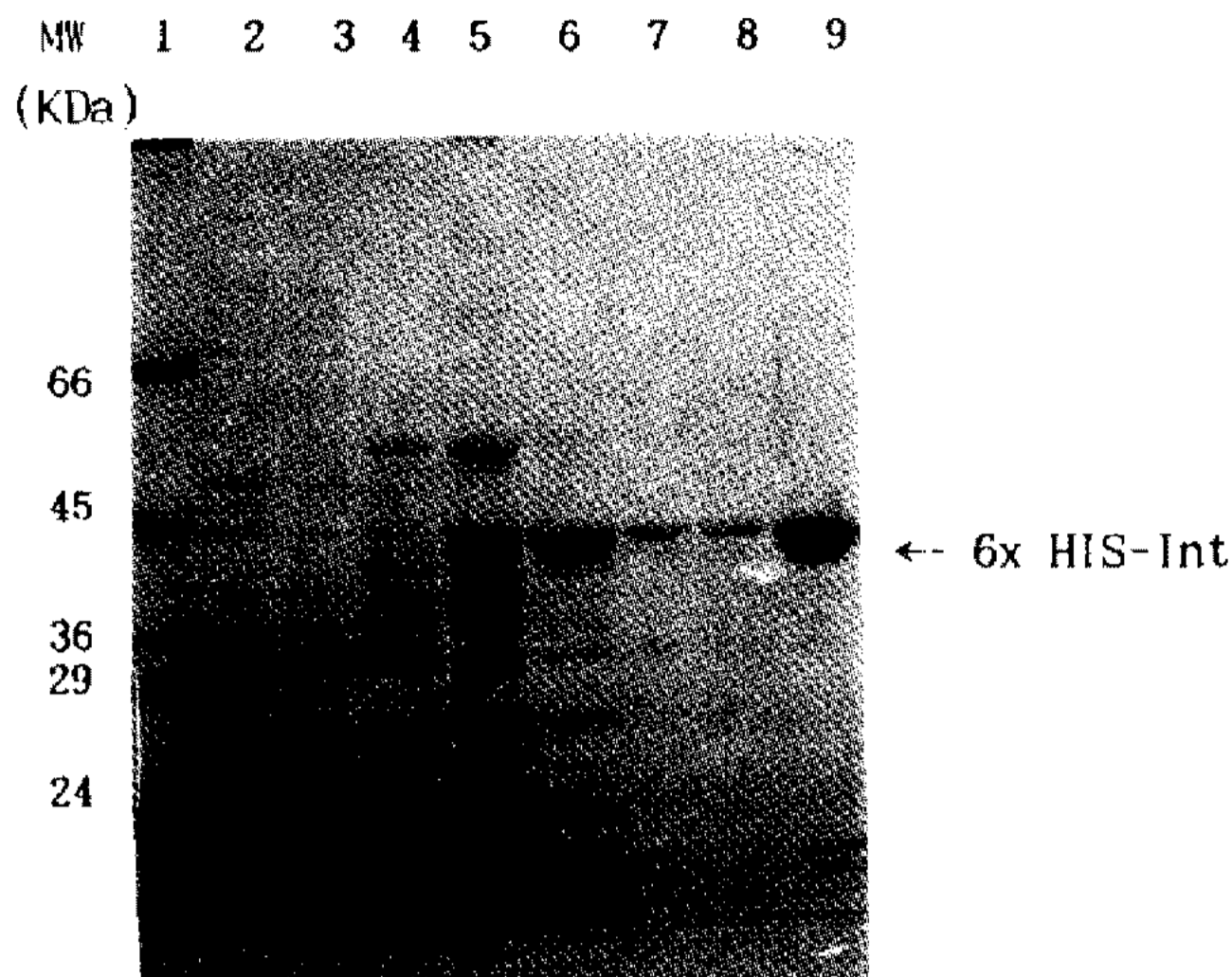


Fig. 3. SDS-PAGE analysis of 6xHIS-Int after phosphocellulose column chromatography.

Lane 1: standard protein size marker

Lane 2~4: 0.6M KCl eluents

Lane 5~8: 0.75M KCl eluents

Lane 9: 0.9M KCl eluents

Proteins were analyzed on an 12.5% SDS-PAGE and visualized with commassie blue.

published data)을 사용하였고 *attB* DNA로서 λ *attB* 부위를 함유하고 있는 plasmid pJT6-2를 사용하였다. *E. coli* HB101(pSKY11)의 배양액과 *E. coli* HB101(pJT6-2)의 배양액으로부터 plasmid pSKY11과 plasmid pJT6-2를 각각 순수 분리하여 recombination 반응에 사용하였다. 표준 recombination assay 용액 (65 mM NaCl, 25 mM MOPS, pH 7.9, 6 mM spermidine, 5 mM dithioerythritol, 0.5 mg/ml의 bovine serum albumin, 0.1 pmol *attP* DNA, 2 pmol *attB* DNA, 2 unit Int, 2 unit IHF) 20 μ l를 사용하여 *in vitro* recombination을 실시하였다. 표준 recombination 용액을 25°C에서 15분 동안 preincubation을 행하고 1시간 동안 반응시킨 후 recombination 반응 산물은 1.2%의 agarose gel 전기영동으로 분석하였다.

가용성 단백질 분획을 phosphocellulose 수지로 정제하여 12.5% SDS-PAGE 전기영동을 실시한 결과 0.9M KCl 분획에서 45 kDa의 융합 단백질 band와 2개 정도의 다른 단백질 band를 확인할 수 있었다 (Fig. 3). 다른 단백질을 제거하기 위하여 0.9M KCl 분획을 Ni⁺⁺-NTA 칼럼을 재 실시하였으며, 250 mM Imidazol의 용출분획에서 45 kDa의 융합 단백질을 주 band로 정제해 낼 수 있었다(Fig. 4). 6xHistidine tag는 Ni⁺⁺과 안정된 배위결합을 이룰 수 있기 때문에 6xHistidine tag를 가지고 있는 단백질은 native 또는 denaturation 조건에서 이 affinity 칼럼을 이용하면

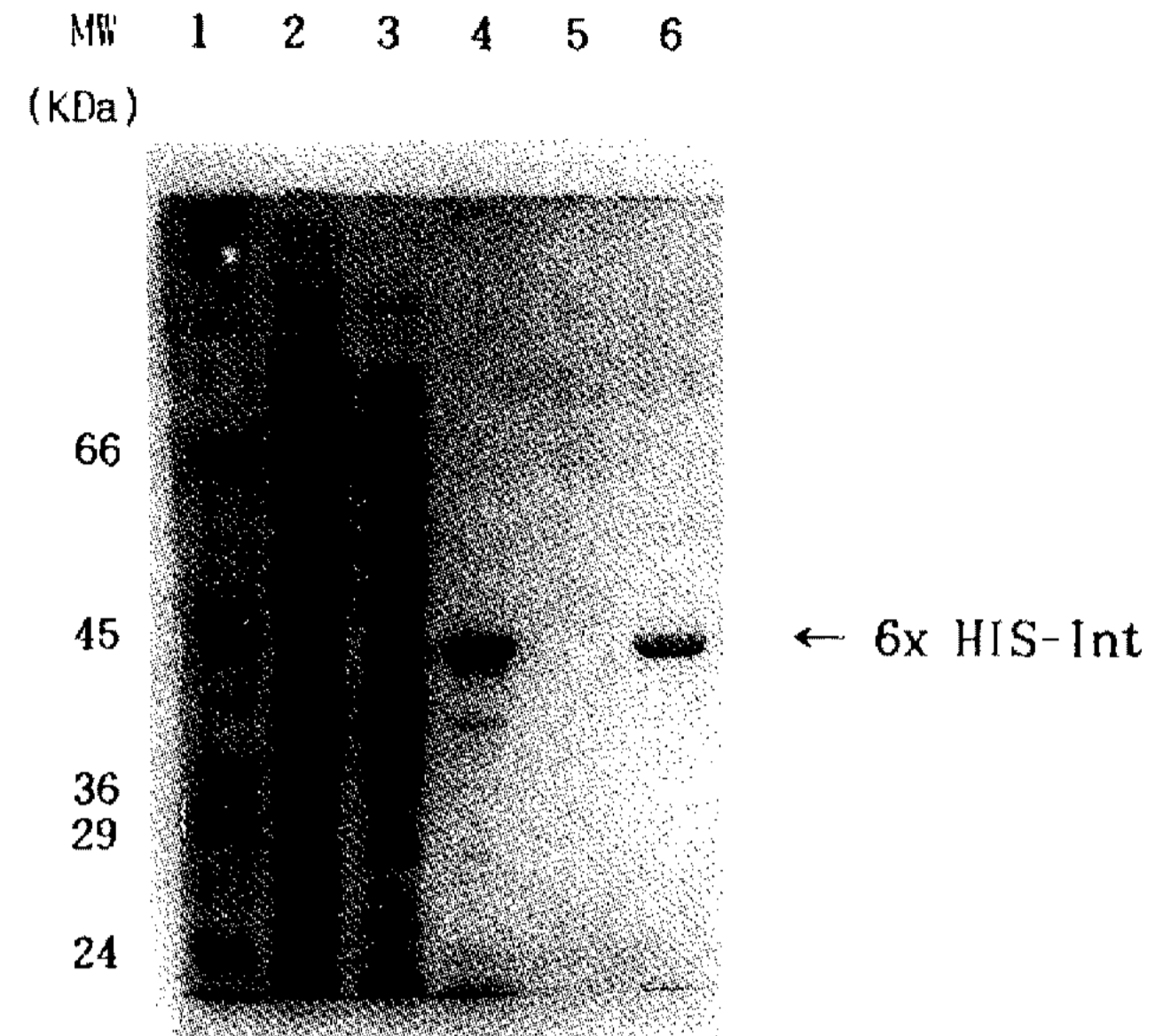


Fig. 4. SDS-PAGE analysis of 6xHIS-Int after Ni⁺⁺-NTA column chromatography.

Lane 1: standard protein size marker

Lane 2: whole cell lysates of uninduced *E. coli* TG1 (pNYL3)

Lane 3: whole cell lysates of induced *E. coli* TG1 (pNYL3)

Lane 4: 0.9M KCl eluents of phosphocellulose column chromatography

Lane 5: washing buffer eluents of Ni⁺⁺-NTA column chromatography

Lane 6: washing buffer containing 250 mM Imidazol eluents of Ni⁺⁺-NTA column chromatography

Proteins were analyzed on an 12.5% SDS-PAGE and visualized with commassie blue.

흡착된 융합단백질의 단백질 분리정제가 가능하고, Imidazol이 Histidine과 구조상으로 유사하기 때문에 이를 이용하면 흡착단백질의 용출이 가능하다(18, 19). 이 6xHistidine tag가 6xHistidine-Int에도 작용하였고 융합 단백질을 Ni⁺⁺-NTA 칼럼을 이용하여 순수하게 분리해 낼 수 있었다.

기존의 Int를 순수하게 분리해 낸 Nash의 방법에 의하면 KCl extract라는 한번의 침전과 Phosphocellulose, Calcium phosphate cellulose, DNA cellulose 등의 세 종류의 칼럼을 사용하는 다단계를 거쳐야만 했는데, 6xHistidine tag를 융합시켜 정제한 경우 phosphocellulose 칼럼과 Ni⁺⁺-NTA 칼럼이라는 단 두 단계만을 통하여 정제가 가능하였다.

In vitro recombination assay를 위해 IHF를 부분 정제하였다. IHF 단백질의 정보를 갖고 있는 균주는 temperature sensitive cI857 repressor와 P_L promoter를 가지고 있으므로 이 단백질은 32°C에서 42°C로의 온도변화에 의해 발현이 가능하였다. 발현된 IHF

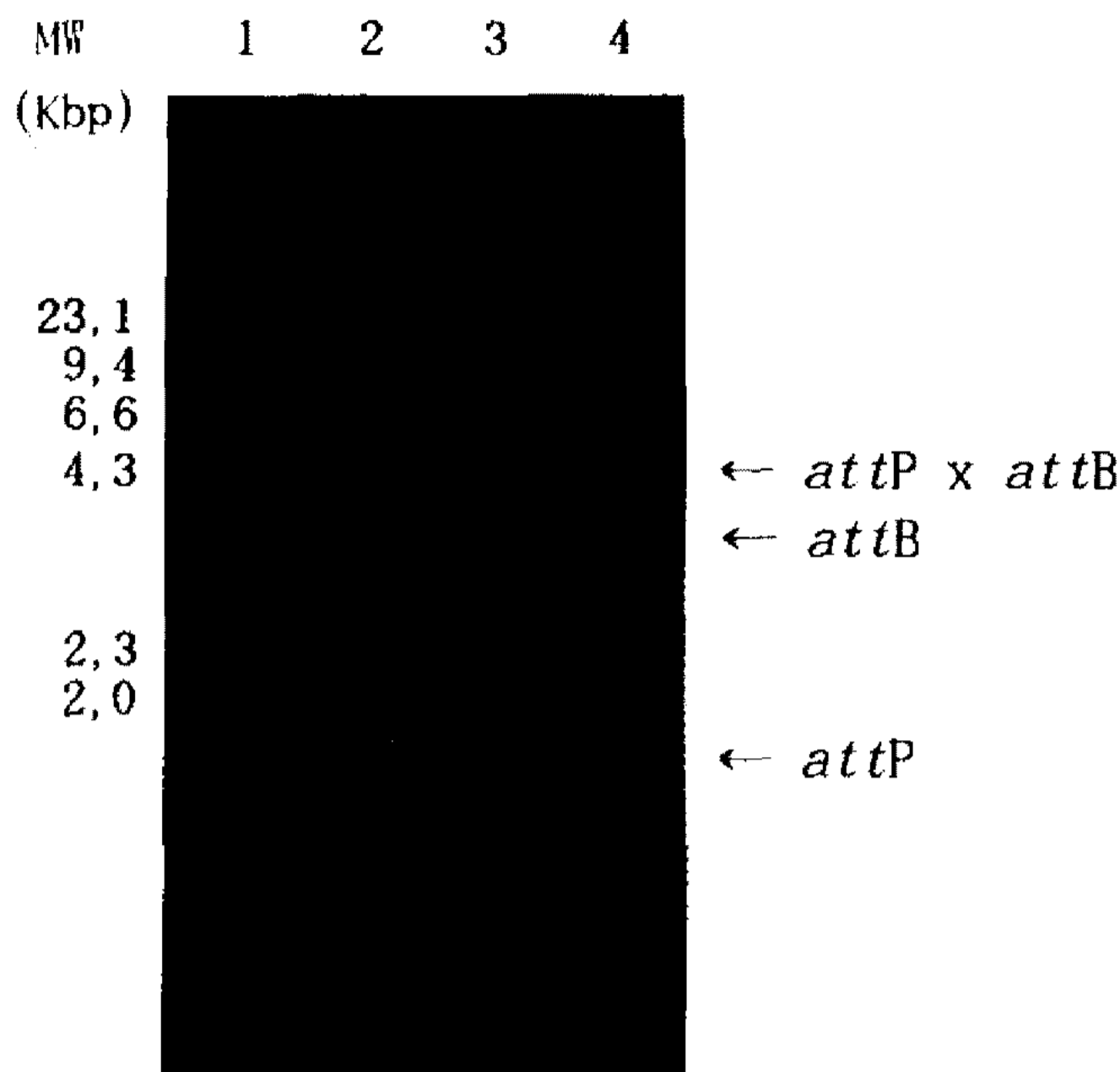


Fig. 5. 6xHIS-Int mediated recombination.
 Lane 1: λ HindIII DNA size marker
 Lane 2: attP and linearized attB
 Lane 3, 4: Recombination products
 Recombination assay was achieved in standard assay solution containing 6xHIS-Int fraction from phosphocellulose column (lane 3), and 6x HIS-Int fraction from Ni⁺⁺-NTA column (lane 4).
 Recombination products were analyzed by 1.2% agarose gel electrophoresis.

를 phosphocellulose 칼럼으로 정제하여 16% SDS-PAGE 전기영동을 실시한 결과 0.45M~0.75M KCl 용출분획에서 11.2 kDa, 10.58 kDa의 IHF α , β subunits band를 확인하였다. 이 분획은 IHF 단백질만을 포함한 순수분획은 아니었으나, 이 부분정제된 IHF를 *in vitro* recombination assay에 사용하였다. 정제한 6xHistidine-Int 융합 단백질과 부분 정제된 IHF를 이용하여 표준용액상에서 *in vitro* recombination를 실시한 결과 기질로 사용한 2.7 kb 크기의 supercoiled attP DNA와 2.3 kb 크기의 linearized attB DNA간의 recombination 결과로 생성된 5.0 kb 크기의 recombination product를 확인할 수 있었다(Fig. 5). Recombination assay 시 phosphocellulose 칼럼만을 실시하여 얻은 융합 단백질과 Ni⁺⁺-NTA affinity 칼럼까지 실시하여 얻은 융합 단백질 두 종류를 사용하였으며, 모두 동일한 5.0 kb band를 1.2% agarose 전기영동 분석에서 보였다(Fig. 5).

이로써, 6xHistidine tag를 포함한 17 amino acid가 N-terminal에 융합된 Int도 융합부분을 가지지 않은 Int와 비슷한 정도의 recombination 활성을 가짐을 알 수 있었다.

감사의 글

본 논문은 한국과학재단지정 연세대학교 생물산업 소재연구센터의 연구비 지원(과제번호 94-02-03-1)에 의해 수행된 결과입니다.

참고문헌

1. Landy, A. 1989. Dynamic, structural, and regulatory aspects of λ site-specific recombination. *Annu. Rev. Biochem.* **58**: 913-949.
2. Nash, H.A. 1981. Integration and excision of bacteriophage lambda: the mechanism of conservative site-specific recombination. *Ann. Rev. Genet.* **15**: 143-167.
3. Hsu, P.L., W. Ross, and A. Landy. 1980. The lambda phage att site: functional limits and interaction with Int protein. *Nature* **285**: 85-91.
4. Ross, W. and A. Landy. 1982. Bacteriophage λ int protein recognizes two classes of sequence in the phage att site: characterization of arm-type sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**: 7724-7728.
5. Mizuuchi, M. and K. Mizuuchi. 1985. The extent of DNA sequence required for a functional bacterial attachment site of phage lambda. *Nucleic Acids Res.* **13**: 1193-1208.
6. Richet, E., P. Abcarin, and H.A. Nash. 1988. Synapsis of Attachment Sites during Lambda Integrative Recombination Involves Capture of a Naked DNA by Protein-DNA Complex. *Cell* **52**: 9-17.
7. Lee, N.Y. and S.K. Yoo. 1995. Analysis of Lambda site-specific recombination intermediates generated by synthetic substrates. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 282-287.
8. Richet, E., P. Abcarian, and H.A. Nash. 1986. The interaction of recombination proteins with supercoiled DNA: defining the role of supercoiling in lambda integrative recombination. *Cell* **46**: 1011-1021.
9. Yoo, S.K. 1995. Preincubation without attB inhibits *In vitro* integrative recombination of P' 1 mutant attP DNA of bacteriophage lambda. *J. Microbiol. Biotechnol.* **5**: 132-137.
10. Moitoso de Vargas, L., N.M. Pargellis, N.M. Hasan, E.W. Bushman and A. Landy. 1988. Autonomous DNA binding domains of λ integrase recognize different sequence families. *Cell* **54**: 923-929.
11. Moitoso De Vargas, L., S. Kim, and A. Landy. 1989. DNA Looping Generated by DNA Bending Protein IHF and Two Domains of Lambda Integrase. *Science* **244**: 1457-1461.
12. Moitoso De Vargas, L. and A. Landy. 1991. A switch in the formation of alternative DNA loops

- modulates λ site-specific recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**: 588-592.
13. Kim, S. and A. Landy. 1992. Lambda Int Protein Bridges Between Higher Order Complexes at Two Distant Chromosomal Loci *attL* and *attR*. *Science* **256**: 198-203.
14. Nash, A. and Kikuchi, Y. 1979. The Bacteriophage λ *int* Gene product. *J. Biol. Chem.* **253**: 7149-7157.
15. Hanahan, D. 1985. Techniques for transformation of *E. coli*. Pp. 121-122. In D.M. Glover (ed.), *DNA cloning A Practical Approach*, Vol. 1. IRL Press.
16. Sanger, F. 1981. Determination of nucleotide sequence in DNA. *Science* **214**: 1205-1210.
17. Nash, H.A., A.C. Rorertson, E. Flamm, A.W. Robert, and H.I. Miller. 1987. Overproduction of *E. coli* integration host factor, a protein with non-identical subunits. *J. Bacteriol.* **169**: 4124-4127.
18. Abate, C., D. Luk, R. Gentz, and F.J. Curran. 1990. Expression and purification of the leucine zipper and DNA-binding domains of Fos and Jun: Both Fos and Jun contact DNA directly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**: 1032-1036.
19. Bush, G.L., A. Tassin, H. Friden, and D.I. Meyer. 1991. Purification of a translocation competent secretory protein precursor using Nickel ion affinity chromatography. *J. Biol. Chem.* **266**: 13811-13814.

(Received 10 August 1995)