

제한효소의 인식자리 변화
- *Bam*HI 특이성에 미치는 산도와 소수성의 영향 -

이 강 민

전북대학교 자연과학대학 분자생물학과 효소공학연구소

Alteration of Recognition Sequence by Restriction Endonuclease
- Effect of pH and Hydrophobicity on *Bam*HI -

Kangmin Lee

Lab. of Enzyme Technology, Department of Molecular Biology, College of Natural Science,
Chonbuk National University, Chonju, Chonbuk 560-756, Korea

ABSTRACT

In molecular biology, type-II restriction endonuclease, which specifically recognize and cleave DNA at a limited number of sites, have been exploited as a means of characterizing DNA fragments, DNA mapping for genetic engineering. Type-II restriction endonucleases have been found to modulate their substrate specificity under modified conditions such as extreme pH, ionic strength, high enzyme concentration, substitution of metallic cofactors or addition of organic solvents. This study was initiated to investigate the modification of recognition specificity of *Bam*HI according to the different pH and organic solvent under the given buffer condition. The specificity of *Bam*HI is highly depends on the presence of hydrophobicity (LogP: partition coefficient) and pH of reaction solution. The specificity of *Bam*HI is changed in range of LogP -1.03~-1.35(at pH 7.5), -1.03~-2.5 (at pH 8.0), -0.75~-0.25(at pH 8.5), -0.32~-2.5(at pH 8.9), respectively. Alteration of specificity appears in lower concentration of organic solvent when the reaction occurs in more alkali pH. For example, in DMSO solution, alteration of specificity appears in 20% concentration at pH 7.5 but in 4% concentration at pH 8.9.

서 론

생명현상에서 핵산과 단백질의 상호작용을 이해하는 것은 중요하다. 특정한 염기서열을 정확하게 인식하여 절단하는 제한효소는 단백질과 핵산의 상호작용을 이해할 수 있는 가장 적합한 연구이다. 제한효소는 예측하는 핵산의 자리를 정확하게 인식하여 절단하므로 분자 수준에서 유전정보를 분석하고 재조합할 수 있는 도구로 아주 유용하게 이용되어 왔

다. 최근에 유기용매를 포함한 용액에서의 효소 반응이 연구됨에 따라서 효소의 기질, 자리, 입체특이성들이 용매의 반응조건에 따라 변화될 수 있다는 사실을 알게 되었다(1-3). 분자생물학에서 널리 이용되는 *Bst*I, *Bsu*I, *Bam*HI, *Hind*III, *Eco*RI과 같은 제한효소 역시 유기용매, 산도, 금속이온, 이온세기에 의해서 그의 특이성이 변화될 수 있음이 알려졌다(4, 5). 이와같이 유기용매에 의한 제한효소의 특이성 변화는 알려져 있으나 이러한 특이성 변화가

유기용매의 어떠한 특성에 의존하며 그의 인식 기작이 무엇인지는 아직도 체계적으로 연구되지 않았다. 본 연구는 유전공학에서 가장 널리 이용되고 있는 제한효소중 하나인 *Bam*HI과 이미 염기서열을 알고 있는 pGEM3를 벡터(vector)로 사용하여 유기용매의 소수성과 수용액의 산도와 고유자리를 인식하는 특이성이 어떻게 관련되어 있는가를 연구하였다. 이 연구에 사용한 *Bam*HI은 *Bacillus amyloliquefaciens*로 부터 분리되었으며 분자량은 22kd이며 213개의 아미노산을 가진 두개의 subunit으로 되어있다. 이 효소는 핵산 이중결합의 GGATCC의 두개의 구아닌 사이를 절단하며 그의 특이성 변화자리는 pBR322 DNA를 사용할때 GGATCC, GCTCC, GGGTCC에서 나타날수 있음이 알려져 있다(6, 7).

실험재료 및 방법

효소 및 시약

본 연구에 사용된 *Bam*HI 제한효소는 Promega에서 구입하였으며, 그 외 시약은 대부분 Sigma에서 구입하여 사용하였다. DMSO, alcohol, glycerol, HMPA와 같은 유기용매는 HPLC용 특급 시약을 사용하였다.

균주, 플라스미드

*E. coli*균주들은 HB101, MC1000을 사용하였다. 5'-결실 플라스미드를 제조하기 위하여 M1 RNA 유전자의 -950에서 +1315까지의 DNA sequence를 가지고 있는 pBR322의 유도체인 플라스미드 pLN2의 1.5kb에 해당되는 *Eco*RI/*Kpn*I DNA fragment가 pGEM3에 subcloning된 multicopy vector를 사용하였다.

균주의 배양 및 DNA 정제

박테리아 균주배양과 pGEM3 분리는 이미 발표한 방법을 사용하였다(8). 적은양의 plasmid를 분리정제하는데는 alkaline lysis 방법을 사용하였다(9). 항생제를 포함하고 있는 LB배지에 plasmid를 가지고 있는 *E. coli*를 진탕배양한 후 원심분리하여 페놀 혼합액으로 추출한 후 에탄올로 침전시키고 건조한 DNA를 완충용액에 녹여 사용하였다.

효소반응

Promega에서 구입한 *Bam*HI 제한효소를 3시간 동안 투석하여 글리세롤을 제거한 효소(glycerol free enzyme)를 만든 후 기질로는 pGEM3를 사용하여 표준 완충용액(2mM 2-mercaptoethanol, 100mM NaCl, 5mM MgCl₂, 10mM Tris buffer pH 8.5)과 여러가지 유기용매의 혼합한 매질에서 37°C에서 16시간 동안 반응시킨 후 전기영동으로 분리하였다.

효소의 특이성변화와 활성도 결정

혼합물에서 효소반응을 시킨 후 전기영동으로 생성물을 분리하여 Image processor(Merridian)를 사용하여 band를 분석하였다. 각 조각(fragments)의 density와 종류로 특이성을 결정하였으며 각 조각의 합으로 효소의 활성도를 결정하였다.

전기영동

DNA fragments의 크기를 알기 위해 1%(w/v) 수평젤(horizontal agarose gel)과 5%(w/v), 8%(w/v) 수직젤(vertical polyacrylamide gel)을 사용하여 분리한 후 DNA band는 gel을 ethidium bromide로 염색하여 UV로 확인하였다. 이때 사용한 완충용액은 TAE(0.04M Tris-acetate, 0.001M EDTA)이며, gel loading buffer로는 0.25% bromophenol blue, 40%(w/v) sucrose용액을 사용하였다. 유기용매에서 반응시킨 후 유기용매는 centrifugal evaporator로 건조시킨 후 gel loading buffer에 녹여 전기영동을 하였다.

*Bam*HI에 미치는 유기용매의 효과

*Bam*HI에 미치는 유기용매의 효과를 연구하기 위해 우선 유기용매가 완전히 제외된 표준 완충용액에서 24시간동안 반응을 시켜서 유기용매가 아닌 다른 인자에 의하여 특이성이 변하는가를 실험하였다. 또한 특이성 변화가 유기용매가 *Bam*HI에 미친 유기용매의 영향에 의해 나타나는 것이 아니고 기질 물질인 pGEM3의 구조를 변화시켜 나타날 수 있는가를 알기 위하여 기질 물질인 pGEM3를 30% DMSO를 포함한 표준 완충용액에서 반응(24시간, 37°C)시킨 후 전기영동으로 pGEM3의 변화를 살펴보았다. 확인된 조건에서 유기용매의 농도를 2%부터 30%(v/v)까지 2-5%씩 증가시키면서 활성도와 특이성 변화를 살펴보았다. 본 연구에 사용된 유기용매는 Table 1에서 보는바 와 같이 일반적으로 사

Table 1. Alteration Specificity of BamHI in different organic solvent. Each reaction mixture contained 0.3 μ g pGEM3, 20 units of BamHI in standard buffer.

DMF(N,N-Dimethyl formamide)
HMPA(Hexamethylphosphoramide)
DMSO(Dimethylsulfoxide)

ORGANIC SOLVENT	LogP ¹	SPECIFICITY(%) ²
Formamide	-1,65	N ³
Ethyleneglycol	-1,43	15
Glycerol	-2,50	15
Methanol	-0,74	N
Methylformamide	-1,13	N
1,2-Propandiol	-1,35	15
1,3-Buthandiol	-1,02	15
Ethanol	-0,32	N
DMSO	-1,35	8
DMF	-1,01	N
Acetonitrile	-0,34	N
1-Propanol	0,34	N
Sulfolane	-0,77	N
2-Propanol	0,14	N
1-Buthanol	0,89	N
Acetone	0,24	N
2-Methyl-1-propanol	0,83	N
2-Methyl-2-propanol	0,37	N
2-Buthanol	0,63	N
HMPA	0,28	N
1,4-Dioxane	-0,27	N

1. LogP=Log(S)octanol/ (S)water. P is partition coefficient of cosolvent in H₂O-octanol biphasic system

2. Percents of specificity was determined by the diversity of fragments.

3. N represents the specificity of BamHI is not changed within 30 % organic solvent.

용되는 20여종류의 물과 혼합되는 유기용매들이다. Methanol, ethanol, propanol, butanol와 같은 일차 알콜, isopropanol, 2-butanol, 3-butanol과 같은 2차 알콜, 삼차 알콜로는 2-methyl-2-butanol, 4-methyl-phenol, 2-methyl-2-propanol, 1-penten-2-ol, 1-propyn-1-ol과 DMSO(dimethylsulfoxide), propylene glycol, DMF(dimethylformamide), glycerol, ethyleneglycol, sulfolane, HMPA(hexameth-

xylphosphoramide)등을 조사하였다. 또한 toluene, hexane, decane과 같은 소수성이 큰 유기용매와 PEG와 같은 polymer에 의한 영향을 살펴보았다.

BamHI에 미치는 pH의 효과

pH 6.5, 7.5, 8.0, 8.5, 8.9에서 BamHI의 특이성 변화와 pH의 관계를 살펴 보았다. pH 6.5 완충용액은 2mM 2-mercaptoethanol, 100mM NaCl, 5mM MgCl₂, 10mM phosphate 완충용액을 사용하였으며 pH 7.5~8.9에서는 같은 성분을 포함하고 있는 Tris 완충용액을 사용하였다. 산도만 다른 표준 완충용액을 사용하여 유기용매의 혼합물에서 효소의 특이성이 유기용매의 소수성과 어떤 관계가 있는지를 보았다.

실험결과 및 고찰

자연현상에서 DNA-Protein의 상호작용을 이해하는 것은 생명현상의 이해는 물론 의약품 개발에도 중요한 연구이다. DNA에 선택적으로 결합하여 절단하는 제한효소나 중합효소는 DNA-Protein의 상호작용을 이해하는데 좋은 도구가 될 수 있다. 이러한 DNA-Protein의 상호작용을 연구하는데 반응매질로써 수용액대신 사용된 유기혼합물은 많은 연구의 대상이 되고 있다. 왜냐하면 자연상태(in vivo)에서 단백질은 수용액안에서 존재하지 않고 오히려 많은 물질이 혼합되어 있는 유기혼합물 상태안에서 DNA를 인식하고 상호작용을 하기 때문이다. 그러므로 DNA-Protein의 상호작용을 연구하는데 물과 유기용매의 상호관계 즉, hydrophilic-hydrophobic balance는 매우 중요하다. 그 예로 분자생물학에서 *trp repressor*, *lac repressor*의 기능에서 물의 활성도가 중요함이 알려졌고(10, 11) 뿐만 아니라 단백질인 효소와 기질의 결합, 구조변화, 효소의 안정도, 활성도, 단백질간의 상호작용에서 물의 성질, 물의 활성도가 결정적인 역할을 한다고 알려졌다(12-14). 또한 유기용매 혼합물에서 효소는 수용액에서와는 다른 새로운 자리, 입체, 기질특이성을 갖는다(15, 16). 물이 아닌 유기용매 혼합물에서 항체 단백질은 항원에 대하여 수용액에서와 다른 친화력으로 결합한다(17).

생명과학에서 제한효소, 결합효소, 중합효소를 발견하므로써 실험실에서 원하는 유전자를 sequencing, mapping, recombinant DNA 제조가 가능케

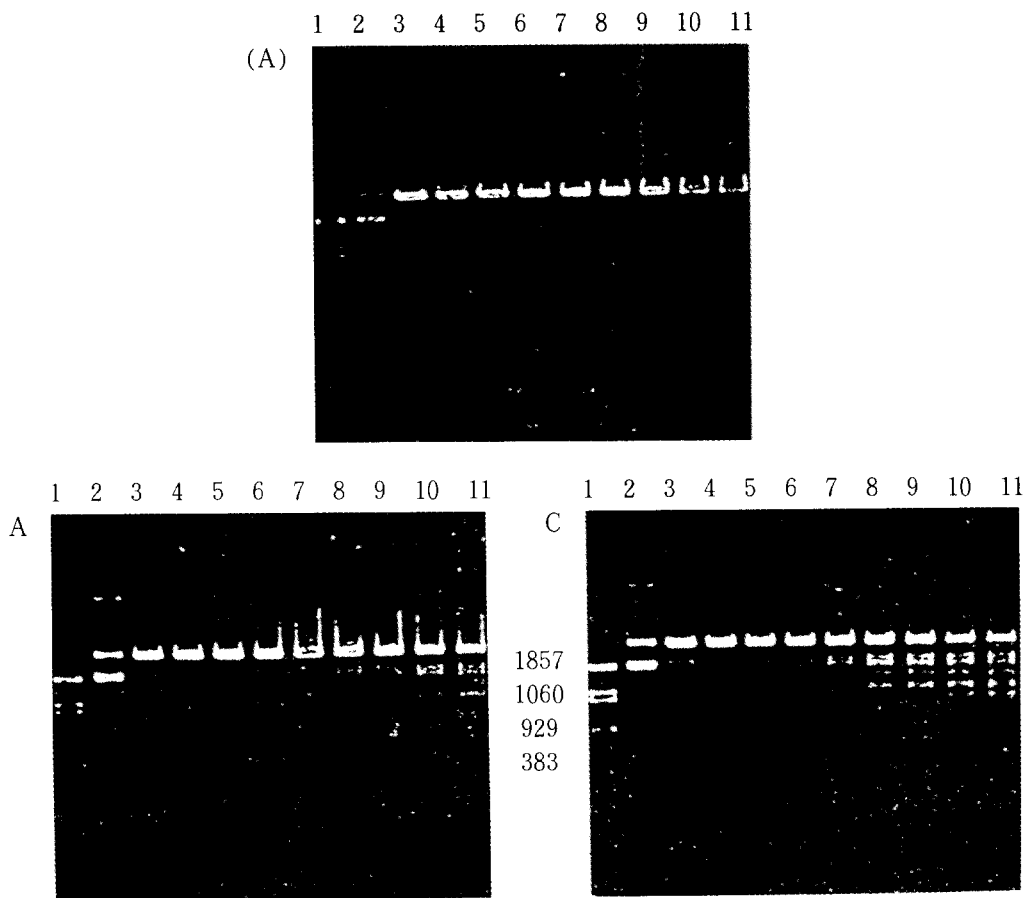


Fig. 1. Effect of pH on *Bam*HI restriction enzyme concentration of its digestion of pGEM3. Each reaction contained 3.3 μ g pGEM3, 20 units of *Bam*HI and DMSO in buffer of which different pH as followed. (A) in pH 8.0 (1) pBR322/BstNI Marker (2) pGEM3 (3) 0% (4) 2% (5) 4% (6) 6% (7) 8% (8) 10% (9) 12% (10) 14% (11) 16% (B) same in pH 8.5 (C) same in pH 8.9.

되었으며, 이들 효소의 활성도와 인식자리 특이성 변화는 DMSO나 에탄올과 같은 유기용매에 크게 영향을 받으며(18) 활성도는 수용액의 수압력(hydrostatic pressure)과 polyamine, polysaccharide에 의하여 억제됨이 알려져 있다. 예를들어 *Eco*RI은 pH7.5에서 glycerol, DMSO, 에탄올에 의하여 *Pvu*II는 ethanol, isopropanol, DMSO에 의하여 그들의 특이성이 변화된다고 보고되어 있다(19). 그러나 이것이 유기용매에서 얼마나 직접적으로 비례하여 변화하는지, 유기용매의 어떠한 성질에 의존하는지는 연구되지 않았다. 일반적으로 유기용매에서 단백질의 관계를 설명할 수 있는 물리화학적 성질은

소수성(hydrophobicity), 용해력(solvating ability), 분자기하(molecular geometry), 변성능력(denaturation capacity), 유전상수(dielectric constant), 삼투압(osmotic pressure), 점도(viscosity) 등으로 연구되어 있다. 여기에서 용해력은 용해자유 에너지이며 분자 기하는 단백질의 표면에 붙어 있는 물의 표면적과 유기용매의 표면적의 비율이다. 변성능력은 유기용매에서 변성도를 표시한 것이다. 소수성(LogP)는 물과 유기용매(옥탄)사이의 분배계수(P)와 관련이 있다(20-22).

제한효소 *Bam*HI의 인식자리 특이성 변화는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 유기혼합물의 유기용매

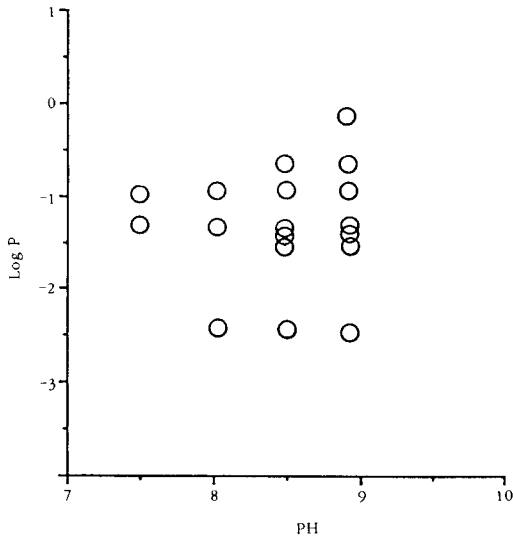


Fig. 2. The value of LogP able to alterate the recognition specificity of *Bam*HI under the given pH. Mark(○) means specificity and activity change within 30% organic solvent. Each reaction mixture contained 0.3 μg pGEM3, 20 units of *Bam*H I in standard buffer.

의 농도 뿐만 아니라 pH와 직접 관계가 있다. 혼합용액에서 완충용액의 산도가 알칼리일수록 낮은 유기용매 농도에서 인식 특이성 변화가 나타난다. 이러한 유기혼합물에서 산도와 효소의 인식 특이성의 변화는 유기용매의 LogP값과 직접적으로 관계가 있다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 산도 7.5에서는 LogP가 -1.03~-1.35, 즉 DMSO(-1.35), 1,2-propandiol(-1.03)에서, 산도 8.0에서는 LogP가 -1.03~-2.5, 즉 1, 2-propandiol(-1.03), DMSO(-1.35), 1,3-butandiol(-1.35), glycerol(-2.5)에서, 산도 8.5에서는 LogP가 -0.75~-2.5, 즉 methanol(-0.75), 1,2-propandiol(-1.03), DMSO(-1.35), 1,3-butandiol(-1.35), ethyleneglycol(-1.45) glycerol(-2.5)에서, 산도 8.9에서는 LogP가 -0.32~-2.5, 즉 ethanol(-0.32) methanol(-0.75), 1,2-propandiol(-1.03), DMSO(-1.35), 1,3-butandiol(-1.35), ethyleneglycol(-1.45) glycerol(-2.5)에서 특이성 변화를 보인다. 다시 말해서 산도가 7.5에서 8.9로 증가할수록 특이성이 나타날 수 있는 LogP의 범위는 증가한다. 산도 8.9에서는 7.5에서

나타나는 -1.03보다 큰 소수성(-0.32)을 가진 유기용매에 의하여도 특이성이 변할 수 있다.

Table 1과 같이 인식 특이성이 LogP과 직접 관련되는 현상은 *Eco*RI, *Pvu*II 제한효소에서도 비슷하게 나타난다. *Eco*RI의 특이성의 변화도 그것의 LogP값이 각각 -2.0~0사이에서 일어난다(23). Ethanol, 1,3-butanediol, DMSO, 1,2-propandiol, ethyleneglycol은 LogP값이 각각 -0.32, -1.02, -1.35, -1.35, -1.43일때 특이성을 변화시킨다. 그러나 DMF와 sulforane은 그 LogP가 -1.01, -0.77로서 위의 값과 거의 비슷하지만 특이성을 변화시키지 못하는데 이것은 쉽게 효소를 비활성화시키는 경향이 있기 때문이라고 생각된다. *Eco*RI 효소의 인식 특이성을 변화시킬 수 있는 에탄올, DMSO, ethyleneglycol, glycerol 혼합물에서 효소는 그 농도가 30%까지도 활성도가 거의 감소되지 않는다. 일반적으로 효소는 유기용매의 농도가 0.5% 이상이 되면 불안정하지만 제한효소, 중합효소와 같은 DNA와 결합하는 효소는 비교적 잔한 유기용매 농도에서도 매우 안정하다.

특이성 변화는 비활성화하지 않는 안정한 유기용매에서 일어난다. *Bam*HI도 *Eco*RI과 마찬가지로 dioxane, acetone, sulfolane은 LogP값이 각각 -0.27, -0.24, -0.77로서 -0.32인 에탄올 부근이지만 이것들은 쉽게 효소를 비활성화시키기 때문에 특이성을 변화시키지 못한다. 이와 같이 소수성이 효소의 활성도나 특이성에 영향을 주는 경우는 제한효소가 아닌 경우에도 알려져 있다. Porcine pancreatic lipase의 에스테르화 초기속도는 유기용매의 LogP >4 일때 가장 빠르며 2 < LogP < 4 일때 중간정도이며 LogP < 2 일때 반응은 천천히 일어난다 (24, 25). *Bam*HI 제한효소는 *Eco*RI과 마찬가지로 toluene, hexane, ethyl acetate와 같이 물과 잘 섞이지 않는 유기용매(water-immiscible organic solvent)에서 그의 특이성이 변하지 않는다. 일반적으로 유기용매의 LogP가 0보다 크면 거의 변하지 않는다. 이것은 특이성 변화는 활성부위에서 단백질과 핵산의 수소결합의 변화에 의하여 일어나는데 용매의 LogP가 커지면 단백질과 결합하지 못하므로 단백질 표면의 물을 떼어내지 못하여 결과적으로 수소결합을 변화시키지 못하기 때문일 수 있다.

*Bam*HI 제한효소에서 유기용매에 의한 인식자리의 변화는 인식절단자리가 GGATCC에서 GGGTCC로 변하면 즉, A자리가 G로 또는 T자리

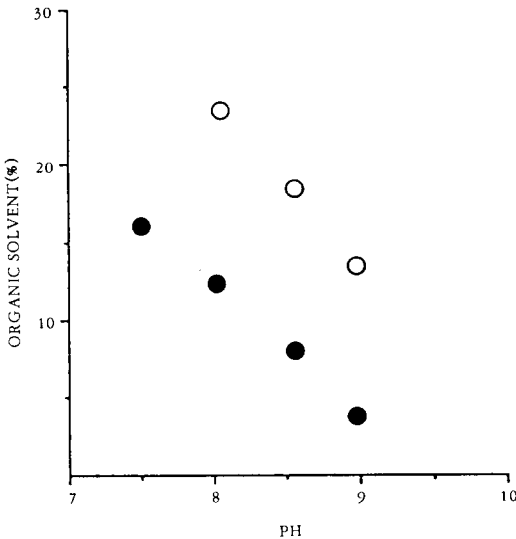


Fig. 3. The low limit of solvent concentration able to alter *Bam*HI specificity under the given pH. Each reaction was carried in standard buffer which contained 0.3 μ g pGEM3, 20 units of *Bam*HI and different concentration of DMSO (●) and glycerol (○).

가 C로 변하면 수소결합이 1개 줄어들고 GGAGCC로 변하면 2개의 수소결합을 잃게 된다(6).

*Eco*RI 제한효소가 GAATTC를 인식하는 데에는 12개의 수소결합을 하는데 이중 arg-200은 G의 9번 질소, 그리고 6번 산소와 2개의 수소결합을 한다. 단백질은 보통 major groove에 결합하며 이 때 minor groove는 유기용매에 노출된다. *Eco*RI은 144-glu, 145-arg, 200-arg에 의하여 12개의 수소결합을 하여 DNA를 인식한다(26). 효소가 인식가능한 다음자리로 GAATTC가 TAATTC로 되면 thymine의 N-7에 메틸이 붙으므로 하나의 수소결합이 줄어들어 11개의 수소결합을 한다. 그러나 G가 C로 바뀌면 arg과 수소결합을 할 수 없으므로 인식하지 못한다. 이와같이 본래의 인식자리중 한자리가 달라도 인식하여 절단하는 것은 유기용매에 의해 효소와 인식 염기서열 사이에 한개 이상의 수소결합이 파괴된 상태에서 반응하기 때문이다. 유기용매는 단백질인 효소의 구조를 변화시키거나 DNA의 비어있는 곳에 물분자를 제거함으로써 DNA와 효소 사이의 상호 작용력을 변화시키므로 특이성을 변화

시킬 수 있다(27). 그러므로 유기용매의 역할은 단백질성분인 효소의 구조를 변화시키거나 DNA의 비어 있는 곳에 물분자를 제거함으로써 DNA와 효소 사이의 상호 작용력을 강화시키는 것이다. 일반적으로 몇가지 제한효소의 활성도와 특이성이 변하는 이유는 기질이나 효소의 공유결합의 변형에 의해서, 칼시노젠, 약, 염색 그리고 항체와 기질을 포함한 리간드의 결합에 의해서, 단백질이거나 DNA의 구조를 변화시킬 수 있는 금속이온이나 더해지는 유기용매 의해서일 수 있다(28).

유기 혼합물에서 효소의 인식특이성은 유기용매의 소수성 뿐 아니라 수용액의 산도에 즉, 수소농도에 의존한다. Fig. 1과 3에서 보는 바와 같이 인식 특이성은 용액의 산도가 알카리일수록 잘 변한다. 이것은 효소의 활성도가 증가하면 인식 특이성 변화가 잘 변하는 현상과는 다르다. *Bam*HI의 최적활성도는 8.5이지만 특이성 변화는 더욱 알카리에서 나타난다. *Pvu*II 역시 최적 산도는 7.4이지만 특이성 변화는 10에서 가장 잘 나타난다(8). Fig. 3에서 보는바와 같이 glycerol과 DMSO의 특이성이 나타나는 유기용매의 농도는 산도와 거의 비례하여 나타난다. 산도 7.5에서는 20% DMSO에서 특이성이 나타나지만 산도가 증가하면 특이성은 더 낮은 DMSO농도에서 나타나며, glycerol은 산도 7.5에서는 나타나지 않지만 8.0이 되면 높은 농도(25%)에서 나타난다. 최근 Sligar교수에 의하여 발표된 결과에 의하면 제한효소의 특이성 활성도는 유기용매의 삼투압(osmotic pressure)에 직접 관련되며 수압(hydrostatic pressure)은 특이성을 유도하지 못한다(29). 제한효소의 특이성은 선택된 유기용매에서 그의 점도(viscosity)나 유전상수(dielectric constant)보다는 삼투압에 직접 관련됨을 주장하였다. 그러나 본 연구 결과에 의하면 제한효소의 특이성 변화가 어떠한 유기용매에서 일어나며 변화되는 유기용매의 기준이 무엇이며 또한 어떠한 물리적 특성과 관련되어 있는지는 설명하지 못하였다.

본 연구에서 *Bam*HI의 활성도와 특이성을 관찰한 결과, 특이성 변화는 유기용매와 물의 상호 관계와 관련되어 있음을 알게 되었다. 즉, 특이성 변화는 유기용매의 소수성과 수용액의 산도와 직접 비례적으로 관련되어 있다. 생물공학적으로 제한효소가 염, 산도, 유기용매에 의하여 다른 자리를 절단할 수 있음은 이미 다른 연구들에 의하여 발표 되었지만 절단자리들이 많아서 실제적으로 원하는 자리를 절단

하는 기술로써 유전공학에 이용되지는 못하였다. 본 연구를 통하여 우리는 반응용액의 산도와 소수성을 변화시킨다면 제한효소의 자신의 고유자리가 없는 벡터의 원하는 다른 한자리를 절단할 수 있을 것이다. 이러한 기술은 실험실에서 유전자를 조작하는데 새로운 기술로써 사용될 수 있으리라 기대된다.

결 론

제한효소 BamHI의 특이성 변화는 유기용매의 소수성과 수용액의 산도에 직접적으로 영향을 받는다. 제한효소의 특이성 변화는 유기용매의 LogP와 수용액의 산도와 관련이 있어 산도 7.5에서는 -1.3~-1.35, 8.0에서 -1.03~-2.5, 8.5에서 -0.75~-2.5, 8.9에서 -0.32~-2.5에서 각각 특이성변화가 나타난다. 동일한 유기용매에서도 산도가 클수록 낮은 농도에서 특이성이 나타난다. DMSO용액에서 산도가 7.5일때 20% 농도에서 나타나지만 산도가 8.9일때는 4%에서 나타난다. 또한 특이성과 활성도는 서로 상반관계가 있어 특이성을 변화시키는 용매에서 그 효소는 안정하며 불안정한 용매에서는 특이성을 변화시키지 못한다.

요 약

DNA를 인식하여 절단하는 제한효소의 발견은 유전자를 연구, 조작할 수 있게 되어 분자생물학 연구에 큰 발전을 가져 왔다. 제한효소의 인식자리는 반응용액의 산도, 유기용매의 소수성에 따라서 달라질 수 있다. 제한 효소 BamHI의 특이성 변화는 유기용매의 소수성(LogP)과 산도에 직접적인 관계가 있다. 제한효소 BamHI의 인식자리의 특이성 변화는 산도 7.5에서 LogP값이 -1.3~-1.35, 8.0에서 -1.03~-2.5, 8.5에서 -0.75~-2.5, 8.9에서 -0.32~-2.5 범위에서 각각 나타난다. 동일한 유기용매 혼합물에서 산도가 알카리일수록 낮은 유기용매 농도에서 특이성의 변화가 나타난다. DMSO용액에서 BamHI의 특이성 변화는 산도가 7.5일때 20% 농도에서 나타나지만 산도가 8.9일때는 4%에서 나타난다.

감 사

본 연구는 교육부지원 학술진흥재단의 학술연구지원비에 의하여 연구되었습니다. 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. J. Krout(1988), *Science*, **242**, 533.
2. R. Sakurai, A. L. Margolin, A. J. Russeland, and A. M. Klivanov(1987), *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 7885.
3. G. Pomp and J. R. Medrano(1991) *Biotechnology*, **10**, 59.
4. C. M. Clark and B. S. Hartley(1977) *Biochem. J*, **177**, 49.
5. K. Heminger, W. Horg, and H. G. Zachau (1977), *Gene*, **1**, 292.
6. R. J. Robert, G. A. Wilson, and F. E. Young (1977), *Nature*, **265**, 82.
7. J. George and J. G. Chirikjian(1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **79**, 2432.
8. H. Kim and K. Lee(1994), *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **9**, 63.
9. H. C. Birnboim and J. Doly(1979), *Nucleic Acids Res.*, **7**, 15133.
10. J. Carey, D. E. A. Lewis, T. A. Lavoie, and J. Yang(1991), *J. Biol. Chem.*, **266**, 24509.
11. C. L. Law and J. Carey(1993), *Nature*, **366**, 178.
12. M. F. Colombo, D. C. Rau, and V. A. Parsegian(1992), *Science*, **256**, 655.
13. R. P. Rand, N. L. Fuller, P. Butko, G. Francis, and P. Nicholls(1993), *Biochemistry*, **32**, 5952.
14. J. A. Kornblatt, M. J. Kornblatt, G. Huibonhoa, and A. G. Mauk(1993), *Biophys. J.*, **65**, 1059.
15. A. Zaks and A. M. Klivanov(1988), *J. Biol. Chem.*, **263**, 3194.
16. G. Bell, J. Todd, J. Blain, J. Patterson, and C. Shaw(1981), *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 1703.
17. A. J. Russell, L. J. Trudel, P. L. Skipper, J. D. Groopmann, S. R. Tannenbaum, and A. M. Klivanov(1989), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **158**, 80.
18. E. Melyguine, P. Vanier, and P. Yot(1980), *Gene*, **8**, 163.
19. J. George, R. W. Blakesley, and J. G. Chirikjian(1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 14,

- 6521.
20. A. Leo, C. Hansch, and D. Elkins(1971), *Chem. Rev.*, **71**, 525.
21. M. J. Kamlt, J. L. Abboud, and R. W. Taff (1981), *Prog. Phys. Org.*, **13**, 485.
22. Y. L. Klmelnitsky, V. V. Marhaev, A. B. Belova, M. V. Sereeva, and K. Martinek (1991), *Eur. J. Biochem.*, **198**, 31.
23. J. Um, C. Park, and K. Lee(1994), *Korean Biochem. J.*, **27**, 401.
25. Y. L. Khmelnitsky, V. V. Mozhaev, A. B. Belova, M. V. Sergeeva, and K. Martinek (1991), *Eur. J. Biochem.*, **198**, 31.
26. J. Heitman,(1992), *BioEssays*, **7**, 445.
27. Y. Kim, J. C. Grable, R. Lave, P. T. Greene, and J. H. Rogenberg(1990), *Science*, **249**, 1307.
28. M. Nasri and D. Thomas(1987), *Nucleic Acids Res.*, **15**, 7677.
29. M. Nasri and D. Thomas(1988), *Annal. N. Y. Acad. Sci.*, 225-265.
29. C. R. Robinson and S. G. Sligar(1995), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 3444.