

## 대장균에서 *Bacillus subtilis* glutamyl-tRNA synthetase의 과발현 및 정제

오종신 · 윤장호 · 홍광원\*

동국대학교 식품공학과

(2002년 7월 19일 접수, 2002년 9월 23일 수리)

*Bacillus subtilis*의 glutamyl-tRNA synthetase(GluRS)는 대장균에서 발현될 때 숙주세포의 tRNA<sub>1<sup>Glu</sup></sub>에 glutamate를 잘못 아실화하여 독성을 나타내는 것으로 추정되고 있다. 이러한 *B. subtilis* GluRS를 대장균에서 과발현 시키기 위하여 *B. subtilis* 168 균주의 chromosomal DNA에서 GluRS의 유전자(*gluX*)를 PCR을 이용하여 증폭하고 T7 promoter에 의해 발현이 조절되는 pET11a expression vector에 클로닝하였다. 이 재조합된 pEBER plasmid DNA로 T7 RNA polymerase를 갖는 대장균 NovaBlue(DE3)에 형질전환하였다. 형질전환된 대장균에 IPTG를 처리하여 과량 생성된 GluRS 단백질은 ammonium sulfate 분별침전 후 FPLC를 이용한 Source Q column anion exchange chromatography, Superdex 200 column gel filtration, Mono Q column anion exchange chromatography로 정제하였다. 정제된 *B. subtilis*의 GluRS 분자량은 약 55 kDa이었으며 효소의 활성도는 조효소액에 비해 18배로 증가하였다.

**Key words:** *Bacillus subtilis*, glutamyl-tRNA synthetase, 과발현, 정제

### 서 론

유용한 효소 또는 단백질을 다량으로 얻기 위해서 일반적으로 해당 유전자를 plasmid에 클로닝하여 적당한 숙주세포에서 대량 발현시킨 후 정제하여 사용한다. 외래 유전자의 발현 정도는 promoter의 세기,<sup>1)</sup> 전사종결 부위, ribosome binding site의 세기,<sup>2)</sup> plasmid의 copy 수, plasmid의 안정성,<sup>3)</sup> 숙주세포 등 여러 가지 요인들에 의해 영향을 받는다. 따라서 특정 유전자의 과발현을 위해서는 이외에도 다른 여러 조건들을 만족시키는 plasmid의 사용이 필수적이며 또한 단백질의 특성에 따라 이를 최대 발현시킬 수 있는 숙주세포를 사용하여야 단백질의 대량생산이 가능하다. 그러나 plasmid에 삽입된 특정 유전자의 발현이 숙주세포의 생육에 저해를 미쳐 숙주세포가 자라지 못하거나 충분히 증식하지 못함으로써 결과적으로 해당 단백질의 수율이 감소되는 경우가 있다. 이러한 문제를 해결하기 위해 숙주세포를 충분히 증식시킨 후 특정 유전자를 과량 발현시킬 수 있는 inducible promoter를 사용함으로써 목적산물을 대량생산하는 host-vector 시스템이 널리 이용되고 있다.<sup>4)</sup> 그 중 대장균에서 재조합된 단백질을 발현할 수 있는 강력한 vector의 하나인 pET vector는 T7 bacteriophage의 promoter를 가지고 있으며 이 T7 promoter는 대장균의 RNA polymerase에 의해서만 인식되지 않고 bacteriophage의 T7 RNA polymerase에 의해서만 인식되어 진다. 그러므로 이러한 pET vector를 이용하기 위해서는 bacteriophage의 T7 RNA polymerase 유전자를 갖고 있는 대장균 숙주세포의 사용이 요구된다.<sup>5)</sup>

Aminoacyl-tRNA synthetase는 ribosome에서 단백질의 생합성 과정에 필요한 aminoacyl-tRNA를 합성하는 효소이며, *B. subtilis*의 glutamyl-tRNA synthetase(GluRS)는 *B. subtilis*에서 tRNA<sub>1<sup>Glu</sup></sub>에 glutamate를 아실화시켜 Glu-tRNA<sub>1<sup>Glu</sup></sub>를 형성한다.<sup>6)</sup> 그러나 이 *B. subtilis* GluRS가 대장균에서 발현될 때는 glutamine이 결합해야 할 tRNA<sub>1<sup>Glu</sup></sub>에 glutamate를 잘못 아실화시켜 Glu-tRNA<sub>1<sup>Glu</sup></sub>를 형성하고, 이 mischarging된 tRNA가 대장균에서 단백질합성에 그대로 이용됨으로써 숙주세포에 치명적인 독성을 나타내는 것으로 추정되어 왔다.<sup>7)</sup> 이러한 독성 때문에 GluRS를 encode하는 *B. subtilis*의 *gluX* 유전자는 대장균에서 단일 DNA 단편으로는 클로닝되어 발현되지 못하다가, 최근  $\sigma^A$  promoter와  $\rho$ -independent terminator를 갖는 *B. subtilis* - *E. coli* shuttle vector에 *gluX* 유전자가 클로닝되어 *B. subtilis*에서 처음으로 과발현 시킨 사례가 보고되었다.<sup>8)</sup> 본 실험에서는 대장균에서 발현시 독성을 나타내는 *B. subtilis*의 GluRS를 대장균에서 과발현시키기 위하여 *B. subtilis* 168 균주에서 chromosomal DNA를 분리한 다음 PCR을 이용하여 *gluX* DNA를 증폭시키고 pET expression vector에 클로닝하였다. 이 재조합된 plasmid DNA로 대장균 NovaBlue(DE3)를 형질전환시키고 대장균에서 *B. subtilis*의 GluRS 단백질을 과발현시켜 분리 정제하였다.

### 재료 및 방법

**균주 및 plasmid.** 본 실험에 사용된 균주는 대장균으로 DH5 $\alpha$ 와 NovaBlue(DE3)를 사용하였으며 NovaBlue(DE3)는 chromosome 내에 bacteriophage의 T7 RNA polymerase 유전자를 갖고 있으며 이 T7 RNA polymerase는 inducer인 isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside(IPTG)가 배지 중에 첨가되

\*연락처

Phone: 82-2-2260-3369; Fax: 82-2-2285-3988

E-mail: hkwon@dongguk.edu

면 그 합성이 유도되어 T7 promoter에 연결된 유전자를 전사시켜 단백질합성이 이루어지게 한다.<sup>9)</sup> 그리고 *Bacillus*는 *B. subtilis* 168을 사용하였으며 plasmid는 ampicillin 내성유전자를 갖는 pET11a DNA를 사용하였다.

**시약 및 기기.** 대장균 배지에 사용된 시약은 Difco사에서 agar는 Junsei 제품을 사용하였고, agarose, 항생제 등은 Sigma 제품을 사용하였다. 제한효소, Vent polymerase 및 T4 DNA ligase 등은 New England Biolab, Takara 등에서 구입하였다. GluRS 효소 활성측정에 사용된 <sup>14</sup>C-glutamate는 Amersham Pharmacia 사에서 구입하였다. Cell growth의 측정 및 단백질 정량을 위해 UV-VIS spectrophotometer는 Shimadzu Co. (Model UV-1201)의 제품을 이용하였으며, Bio-Rad 사의 electroporator gene pulser II를 transformation에 사용하였다. FPLC로 효소를 정제하는데 사용한 Source™ 15Q, Superdex 200(HR 10/30), Mono Q(HR 5/5) column은 Amersham Pharmacia biotech 사의 것을 이용하였다. 효소활성 측정을 위해 사용된 Liquid scintillation counter는 Pharmacia 사의 WALLAC 1410을 사용하였다.

**PCR을 이용한 Glutamyl-tRNA synthetase gene(*gluX*)의 증폭.** *B. subtilis*에서 chromosomal DNA의 분리정제는 Beji 등<sup>10)</sup>의 방법을 이용하였다. chromosomal DNA를 주형으로 하여 *Nde*I restriction site를 갖는 forward primer BSTE-1(5'-GG AAGTATTTGCATATGGGAAACGAAG-3')과 *Bam*HI restriction site를 갖는 reverse primer BSTE-2(5'-AGCTTTATACGGATCC CTGTCAACAAT-3')를 이용하여 *gluX* gene을 증폭시켰다. 0.5 ml PCR tube에 2.5 µg의 chromosomal DNA, 0.5 µl의 primer(50 pmol의 BSTE1, BSTE2), 1 µl의 10 mM dNTP, 5 µl의 ×10 polymerase buffer를 넣고, 최종 부피가 50 µl가 되게 하였다. tube 온도가 95°C일 때 1 U의 Vent polymerase를 넣은 다음 denaturation은 95°C에서 30초간 하였고, annealing은 55°C에서 30초, extension은 72°C에서 2분간 30 cycle을 수행하였다.

**GluRS의 정제.** GluRS의 정제는 Proulx<sup>11)</sup>와 Lapointe 등<sup>12)</sup>의 방법을 참고하였다. IPTG로 유도 배양한 1 L의 cell을 원심 분리하여 cell pellet을 얻었고, buffer A(10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM β-mercaptoethanol, 10% glycerol, 5 mM DTT)로 cell pellet을 부유하였다. 세포를 sonication 한 후 4°C, 15,000 rpm에서 40분간 원심 분리하여 cell free extract를 얻었다. 이 단백질 용액을 40% ammonium sulfate를 처리하여 얻은 상정액에 ammonium sulfate를 첨가하여 80% ammonium sulfate 포화용액에서 침전되는 분획을 buffer A에서 12시간 동안 투석하였다. 투석한 조효소액을 Source Q column을 넣고 buffer B(buffer A/750 mM NH<sub>4</sub>Cl)로 2 ml/min의 용출속도로 elution하였다. 분리된 단백질 분획들의 효소활성을 측정 한 후 효소활성을 나타내는 분획들을 모아 80% ammonium sulfate 포화용액으로 침전 및 농축시킨 후 cellulose membrane으로 투석을 하여 염을 제거하였다. 농축한 소량의 단백질을 Superdex 200(HR 10/30) column에서 buffer 1(10 mM Hepes, pH 7.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 5% glycerol, 150 mM NaCl)으로 0.25 ml/min의 용출속도로 gel

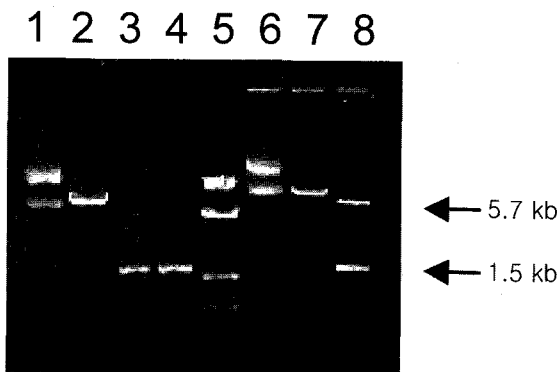
filtration하였다. 활성을 갖는 단백질 분획을 모아서 Mono Q (HR 5/5) column에서 Source Q anion exchange chromatography할 때와 동일한 buffer B로 1 ml/min의 용출속도로 정제하였다. 각 단계마다 Bradford 방법으로 단백질을 정량하고, SDS-polyacrylamide gel 전기영동에 의하여 단백질을 확인하였다.

***B. subtilis* GluRS의 효소활성 측정.** *B. subtilis*의 GluRS가 과발현된 대장균의 cell free extract와 단백질 정제과정 중 얻어진 분획들에서 효소활성의 측정은 Brisson<sup>13)</sup>의 방법을 이용하였다. 60 mM Hepes, pH 7.2, 30 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 5 mM DTT, 4 mM ATP 및 1 µM의 *B. subtilis* total tRNA를 함유한 반응액에 1 µl의 <sup>14</sup>C-glutamate (50 nCi/ml, 250 mCi/mmol)과 일정량의 조효소액(10-50 µl)을 첨가한 총 100 µl의 효소반응액을 37°C에서 1시간 반응시킨 후 10% trichloroacetic acid로 미리 적신 직경 2.5 cm의 3 MM Whatman filter paper에 떨어뜨려 반응을 종료시켰다. 10분간 방치 후 반응하지 않은 free <sup>14</sup>C-glutamate를 제거하기 위하여 filter paper를 beaker에 넣고 300 ml의 5% trichloroacetic acid를 가하여 4°C에서 5분간 서서히 교반한 다음 trichloroacetic acid를 따라버리는 세척과정을 3회 반복하고 마지막으로 70%의 ethanol로 한번 더 세척하였다. filter paper를 65°C의 dry oven에서 30분간 건조시킨 후 vial에 넣고 4 ml의 cocktail을 첨가한 다음 liquid scintillation counter로 <sup>14</sup>C을 측정하였다.

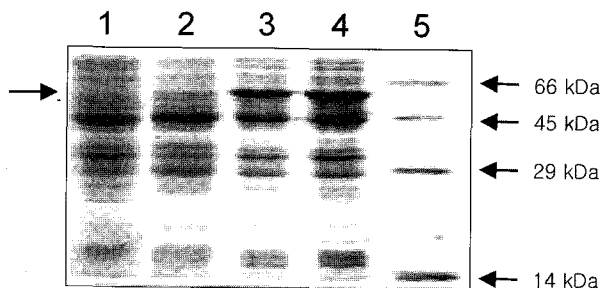
## 결과 및 고찰

**제조합 pET11a-*gluX* plasmid의 구성.** pET11a vector DNA를 ribosome binding site 다음의 cloning site를 절단하는 *Nde*I과 T7 terminator 앞쪽을 절단하는 *Bam*HI으로 절단하여 5.7 kb의 vector DNA 단편을 만들었다. 역시 5'-말단과 3'-말단에 각각 *Nde*I과 *Bam*HI 절단부위를 갖도록 PCR로 증폭한 *B. subtilis gluX* DNA를 *Nde*I과 *Bam*HI으로 절단하여 1.5 kb의 단편을 얻었다. 5.7 kb의 vector DNA 단편과 1.5 kb의 *gluX* 단편을 T4 DNA ligase로 ligation 시킨 후 대장균 DH5α에 형질전환 하였다. ampicillin이 첨가된 LB배지에서 배양한 DH5α의 형질전환체로부터 plasmid DNA를 분리하여 그 크기를 확인한 다음, 제한효소 *Bam*HI과 *Nde*I으로 절단하여 1.5 kb와 5.7 kb의 단편이 생성되는 것을 agarose gel 상에서 확인하였다(Fig. 1). 이 제조합된 7.2 kb의 pET11a-*gluX* plasmid DNA(pEBER)를 이용하여 대장균에서 *B. subtilis* GluRS를 과발현 하는데 사용하였다.

**대장균에서 *B. subtilis* GluRS의 과발현.** T7 promoter에 의한 *B. subtilis gluX*의 과발현을 위해 pEBER plasmid를 염색체 상에 T7 RNA polymerase를 갖고 있는 대장균 NovaBlue (DE3)에 형질전환 하였다. pEBER plasmid DNA로 형질전환된 NovaBlue(DE3)의 transformant를 선별한 다음, ampicillin이 첨가된 LB 배지에 접종하여 배양하면서 OD 값이 0.8~1.0일 때 0.5 mM의 IPTG를 첨가하였다. IPTG 첨가 후 대장균의 증식은 현저히 억제되었으며 그 후 12시간 배양하여 GluRS 단백질을 과발현시켰다. 단백질이 발현된 정도를 확인하기 위하여 각 형

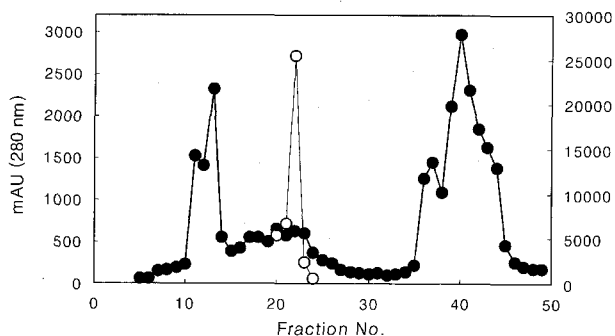


**Fig. 1. Restriction patterns of pEBER plasmid DNA.** Samples were electrophoresed on a 1% agarose gel. Lane 1, intact pET11a plasmid DNA; lane 2, pET11a plasmid DNA digested with *Bam*HI and *Nde*I; lane 3, *gluX* DNA was amplified by PCR; lane 4, *gluX* DNA digested with *Bam*HI and *Nde*I; lane 5, size markers (7.9, 3.6, 1.3, and 0.8 kb); lane 6, intact pEBER plasmid DNA; lane 7, pEBER plasmid DNA digested with *Bam*HI; lane 8, pEBER plasmid DNA digested with *Bam*HI and *Nde*I.

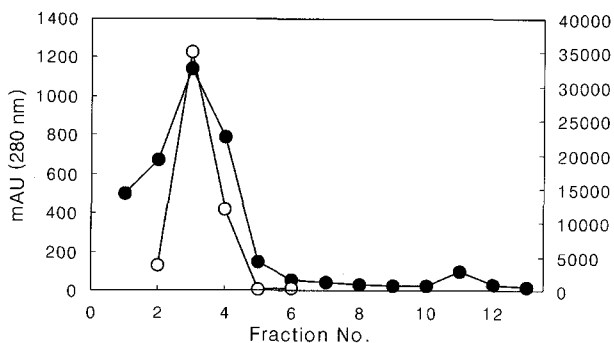


**Fig. 2. Expression of the *B. subtilis* GluRS in *E. coli*.** Total protein extracts of *E. coli* NovaBlue harboring the indicated plasmids were separated by SDS-PAGE on a 12% gel. Lane 1, NovaBlue without plasmid; lane 2, NovaBlue bearing empty vector pET11a; lanes 3 and 4, NovaBlue bearing plasmid pEBER; lane 5, standard protein molecular weight marker (66, 45, 29, and 14 kDa). The arrow indicates the position of a 55 kDa polypeptide.

질 전환체들을 배양 후 5 ml을 원심분리하여 cell pellet을 얻은 후 buffer A로 부유하고 sonicator로 cell을 파괴하여 crude extract를 만들었다. pEBER plasmid가 들어간 형질전환체들의 crude extract와 숙주세포 또는 숙주세포에 empty vector만 들어간 형질전환체의 crude extract를 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis하여 비교하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 *gluX* gene으로 형질전환된 NovaBlue(DE3)/pEBER의 crude



**Fig. 3. Anion exchange chromatography of GluRS on Source column.** The dialyzed ammonium sulfate precipitate was applied 2 ml/min flow rate to a Source Q column and eluted with a linear gradient of 0-750 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Two-ml fractions were collected tested for GluRS activity. The active fractions 20-23 were pooled and concentrated. ●, mAU ( $\times 1/1000$  absorbance unit); ○, GluRS activity (cpm).



**Fig. 4. Gel filtration of GluRS on Superdex 200 (HR 10 column).** The pooled Source Q fractions were applied at a 0.25 ml/r flow rate to a Superdex 200 column and eluted with the same buffer. Two-ml fractions were collected and tested for GluRS activity. Active fractions 2-4 were pooled and concentrated. ●, mAU ( $\times 1/1000$  absorbance unit); ○, GluRS activity (cpm).

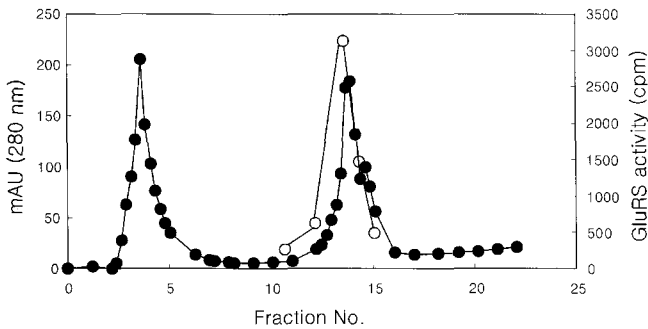
extract(lane 3과 4)와 이 gene이 삽입되지 않은 NobaB (DE3)/pET11a의 crude extract(lane 2)들을 비교하였을 때 pEBER plasmid가 들어간 형질전환체들에서 분자량이 약 55 kDa인 GluRS 단백질<sup>14)</sup>이 과량 생성되었음을 확인하였다.

**B. subtilis GluRS의 정제.** 대장균 NovaBlue/pEBER에 IPTG 첨가로 과량 발현된 *B. subtilis* GluRS는 ammonium sulfate precipitation, Source Q anion exchange chromatography, gel filtration, Mono Q anion exchange chromatography의 과정을 거쳐 정제하였으며 정제과정에서 total protein의 양, tc

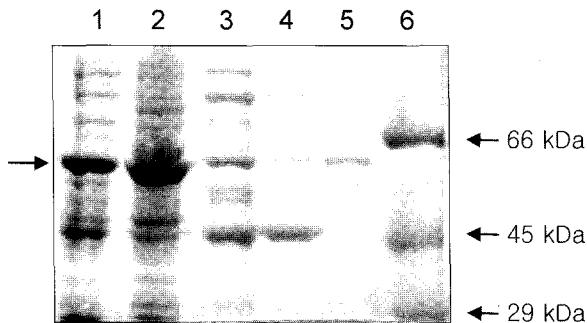
**Table 1. Purification of *B. subtilis* GluRS**

Step	Total protein (mg)	Total activity (units) <sup>a</sup>	Specific activity (units/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Cell extract	89.5	1687	18.8	100	1
Ammonium sulfate (40-80%)	30.2	830	27.5	49	2
Source Q	5.8	424	73.1	25	4
Superdex 200	1.9	182	95.8	11	5
Mono Q	0.1	34	340.0	2	18

<sup>a</sup>One unit of enzyme catalyzes the formation of 1 nmol of glutamyl-tRNA/min at 37°C.



**Fig. 5. Anion exchange chromatography of GluRS on Mono Q (HR 5/5) column.** The pooled Superdex 200 fractions were applied at a 1 ml/min flow rate to a Mono Q column and eluted with a linear gradient of 0-750 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . One-ml fractions were collected and tested for GluRS activity. ●, mAU ( $\times 1/1000$  absorbance unit); ○, GluRS activity (cpm).



**Fig. 6. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the fraction at the different stages of purification.** Lane 1, crude extract from centrifuging the sonically disrupted cells; lane 2, fraction after 40-80% ammonium sulfate saturation precipitation; lane 3, pooled fractions after Source Q column; lane 4, pooled fractions after Superdex 200 gel filtration; lane 5, fraction after Mono Q column; lane 6, standard protein molecular weight marker (66, 45, 29, and 14 kDa). These samples were subjected to 12% SDS-PAGE separation, after electrophoresis, the gel was stained with Coomassie brilliant blue. The arrow indicates the position of a 55 kDa polypeptide.

activity, specific activity, yield 및 purification fold를 Table 1에 나타내었다. 먼저 cell free extract에 ammonium sulfate를 첨가하여 분별 침전시킨 후 효소활성을 측정 한 결과 specific activity는 cell free extract에 비해 2배 증가하였다. Ammonium sulfate의 분별침전물을 투석하여 염을 제거한 다음, Source Q column anion exchange chromatography(Fig. 3)하여 분리된 단백질 분획들의 GluRS 효소활성은 cell free extract에 비해 4배 증가하였다. 활성을 나타내는 분획들을 회수한 다음 80% ammonium sulfate 용액으로 침전시켜 농축하였다. 염을 제거한 후 Superdex 200 column을 이용하여 gel filtration(Fig. 4)하였을 때 specific activity는 cell free extract에 비해 약 5배 증가하였다. Gel filtration에서 효소활성이 높은 분획들을 회수하여 Mono Q column에서 anion exchange chromatography(Fig. 5)를 한 결과 specific activity는 cell free extract에 비해 18배 증가하였으며 GluRS 단백질이 SDS-polyacrylamide gel 상에서 약 55 kDa의 단일 밴드로 정제되었음을 볼 수 있었다(Fig. 6).

*B. subtilis*에서 GluRS는 정제도중 46 kDa의 adenylosuccinate

lyase와 같이 정제되어지며 두 polypeptides의 결합은 GluRS로 하여금 열에 대한 안정성을 갖게 하고 또한 기질인 glutamate와 ATP에 대한 친화도를 10배 정도 증가시키는 것으로 알려져 있다.<sup>15)</sup> 대장균의 경우도 *Bacillus*와 마찬가지로 약 46 kDa의 polypeptide와 같이 정제되어 열 안정성과 기질에 대한 친화성이 증가된다는 보고도 있으나<sup>16)</sup> 이에 대한 일부 반론<sup>17)</sup>도 있어 분명하지는 않다. 본 실험에서 gel filtration 결과 약 46 kDa의 단백질들이 55 kDa의 GluRS와 같이 정제되었으나 위에서 언급한 바와 같이 *B. subtilis*의 GluRS가 대장균의 46 kDa의 polypeptide와 같이 complex를 형성하는지는 알려져 있지 않다. 또한 분자량이 약 55 kDa인 *B. subtilis*의 GluRS를 대장균에서 과발현시켜 정제하였으나 분자량이 약 54 kDa인 대장균의 GluRS가 일부 섞여 있을 가능성을 배제할 수 없으며 *B. subtilis* GluRS의 효소적 특성을 조사하기 위해서라면 다른 정제방법이 필요한 것으로 보인다.

## 감사의 글

본 연구는 동국대학교 논문계제 연구비 지원으로 이루어졌으며 이에 감사 드리는 바입니다.

## 참고문헌

1. Yansura, D. G. and Henner, D. J. (1990) Use of the *Escherichia coli* trp promoter for direct expression of proteins. *Methods Enzymol.* **184**, 54-60.
2. de Boer, H. A. and Hui, A. S. (1990) Sequences within ribosome binding site affecting messenger RNA translatability and method to direct ribosomes to single messenger RNA species. *Methods Enzymol.* **185**, 103-114.
3. Gerdes, K., Helin, K., Christensen, O. W. and Lobner-Olesen, A. (1988) Protein translational control and differential RNA decay are key elements regulating postsegregational expression of the killer protein encoded by the parB locus of plasmid R1. *J. Mol. Biol.* **203**, 119-29.
4. Balbas, P. and Bolivar, F. (1990) Design and construction of expression plasmid vectors in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* **185**, 14-37.
5. Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. and Dubendorff, J. W. (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* **185**, 60-89.
6. Proulx, M., Duplain, L., Lacoste, L., Yaguchi, M. and Lapointe, J. (1983) The monomeric glutamyl-tRNA synthetase from *Bacillus subtilis* 168 and its regulatory factor. *J. Biol. Chem.* **258**, 753-759.
7. Lapointe, J., Duplain, L. and Proulx, M. (1986) A Single Glutamyl-tRNA Synthetase aminoacylates  $\text{tRNA}^{\text{Glu}}$  and  $\text{tRNA}^{\text{Gln}}$  in *Bacillus subtilis* and efficiently misacylates *Escherichia coli*  $\text{tRNA}_1^{\text{Gln}}$  in vitro. *J. Bacteriol.* **165**, 88-93.
8. Pelchat, M., Lacoste, L., Yang, F. and Lapointe, J. (1998) Overproduction of the *Bacillus subtilis* glutamyl-tRNA synthetase in its host and its toxicity to *Escherichia coli*. *J. Microbiol.* **44**, 378-381.
9. Neubauer, P., Hofmann, K., Holst, O., Mattiasson, B. and

- Kruschke, P. (1992) Maximizing the expression of a recombinant gene in *Escherichia coli* by manipulation of induction time using lactose as inducer. *Appl Microbiol Biotechnol.* **36**, 739-744.
10. Beji, A., Izard, D., Gavini, F. and Leclerc, H. (1987) A rapid chemical procedure for isolation and purification of chromosomal DNA from Gram-Negative *Bacilli*. *Analytical Biochem.* **162**, 18-23.
11. Proulx, M. and Lapointe, J. (1985) Purification of Glutamyl-tRNA synthetase from *Bacillus subtilis*. *Methods Enzymol.* **113**, 50-54.
12. Lapointe, J., Levasseur, S. and Kern, D. (1985) Glutamyl-tRNA synthetase from *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* **3**, 42-59.
13. Brisson, A. and Brun, Y. V. (1989) Overproduction and domain structure of the glutamyl-tRNA synthetase of *Escherichia coli*. *Biochem. Cell. Biol.* **67**, 404-410.
14. Breton, R., Watson, D., Yaguchi, M. and Lapointe, J. (1990) Glutamyl-tRNA synthetases of *Bacillus subtilis* 168T and of *Bacillus stearothermophilus*. Cloning and sequencing of the *gltX* genes and comparison with other aminoacyl-tRNA synthetases. *J. Biol. Chem.* **265**, 18248-18255.
15. Gendron, N., Breton, R., Champagne, N. and Lapointe, J. (1992) Adenylosuccinate lyase of *Bacillus subtilis* regulates the activity of the glutamyl-tRNA synthetase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**, 5389-5392.
16. Lapointe, J. and Soll, D. (1972) Glutamyl transfer ribonucleic acid synthetase of *Escherichia coli*. 3. Influence of the 46K protein on the affinity of the 56K glutamyl transfer ribonucleic acid synthetase for its substrates. *J. Biol. Chem.* **247**, 4982-4985.
17. Powers, D. M. and Ginsburg, A. (1978) Monomeric structure of glutamyl-tRNA synthetase in *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* **191**, 673-679.

---

#### Overexpression and Purification of *Bacillus subtilis* Glutamyl-tRNA Synthetase in *Escherichia coli*

JongShin Oh, JangHo Yoon and KwangWon Hong\* (*Department of Food Science and Technology, Dongguk University, Seoul 100-715, Korea*)

**Abstract:** Expression of *Bacillus subtilis* glutamyl-tRNA synthetase (GluRS) in *Escherichia coli* is lethal for the host, probably because this enzyme misaminoacylates tRNA<sub>1<sup>Gln</sup></sub> with glutamate in vivo. In order to overexpress *B. subtilis* GluRS, encoded by the *gltX* gene, in *E. coli*, this gene was amplified from *B. subtilis* 168 chromosomal DNA using PCR method and the entire coding region was cloned into a pET11a expression vector so that it was expressed under the control of the T7 promoter. The resulting recombinant pEBER plasmid was transformed into *E. coli* Novablue (DE3) bearing the T7 RNA polymerase gene for expression. After IPTG treatment, the overproduced enzyme was purified using ammonium sulfate fractionation, Source Q anion exchange chromatography, Superdex-200 gel filtration, and Mono Q anion exchange chromatography. The purified enzyme yielded 18-fold increase in specific activity over the crude cell extract and its molecular weight was approximately 55 kDa on SDS-PAGE.

Key words: *Bacillus subtilis*, glutamyl-tRNA synthetase, overexpression, purification

\*Corresponding author