

Bacillus sp. J105 유래 β -lactamase 유전자의 cloning 및 *E. coli* 내에서의 발현 분석

강원대 · 임학섭 · 서민정 · 김민정 · 이혜현 · 조경순¹ · 강병원² · 서권일³ · 최영현⁴ · 정영기*

동아대학교 생명공학과, ¹부산광역시 보건환경연구원, ²동아대학교 BK21 실버바이오 사업단, ³순천대학교 식품영양학과
⁴동의대학교 한의과대학 생화학교실

Received October 21, 2008 / Accepted November 20, 2008

Cloning of the β -Lactamase Gene from *Bacillus* sp. J105 and Analysis of Its Expression in *E. coli* Cells. Won Dae Kang, Hak Seob Lim, Min Jeong Seo, Min Jeong Kim, Hye Hyeon Lee, Kyeong Soon Cho¹, Byoung Won Kang², Kwon Il Seo³, Yung Hyun Choi⁴ and Yong Kee Jeong*. Department of Biotechnology, Dong-A University, Busan 604-714, Korea, ¹Public Health and Environment Institute of Busan, Busan 613-104, Korea, ²BK21 Center for Silver-Bio industrialization Project, Dong-A University, Busan 604-714, Korea, ³Department of Food and Nutrition, Sunchon National University, Suncheon 540-742, Korea, ⁴Department of Biochemistry, College of Oriental Medicine, Dong-eui University, Busan 614-052, Korea. - The β -lactamase gene was cloned into *E. coli* DH5 α from *Bacillus* sp. J105 with strong resistance against β -lactam antibiotics. The chromosomal DNA was partially digested with *Sau3AI* and ligated to *Bam*HI digested pLAFR3. β -Lactamase positive clones were obtained by using *in vitro* packaging kit. The pKL11- Δ 4.6 with β -lactamase activity was obtained by subcloning of the recombinant plasmid (β -lac +). The 6.5 kb fragment in the subcloned plasmid was sequenced. The DNA fragment that contains the β -lactamase gene encodes 309 amino acids. The 0.17 kb upstream region was similar to those of *B. thuringiensis* and *B. cereus* with 97% identity. The deduced amino acids sequence was also similar to those of β -lactamase from *B. thuringiensis* and *B. cereus* with 97% and 94% identity, respectively. The phylogenetic tree also showed the relationships of the β -lactamase gene of *Bacillus* sp. J105 to genetically related that of other *Bacillus* strains. Analysis of expression pattern of the pKL11- Δ 4.6 in *E. coli*, revealed that the secretion efficiency of β -lactamase was 4~5% and the molecular weight was as same as that of original β -lactamase (31 kDa) from *Bacillus* sp. J105.

Key words : *Bacillus* strains, gene cloning, β -lactam antibiotics, β -lactamase, recombinant plasmid

서 론

β -Lactamase는 Gram 양성균, 음성균, 항산성균, 혐기성균, 방선균, 효모 등 넓은 범위의 미생물에서 생산되어지고 있으며 생산균의 분류에 따라 Gram양성균과 Gram음성균 유래의 효소로 나눌 수 있다[4]. Gram양성균 유래의 β -lactamase를 예로 보면 *Staphylococcus aureus*와 *S. epidermidis*의 β -lactamase를 들 수 있는데, 이들 효소의 유전자는 plasmid상에 존재하며 균체 외로 분비되는 유도효소이다[7]. Gram양성균의 β -lactamase생산은 일부는 세포막에 결합하여 존재하고 거의 대부분이 균체 외로 배출한다. 따라서 Gram양성균의 세포질 막에 존재하는 penicillin binding protein (PBP)에 β -lactam계 약제가 결합하기 전에 약제를 분해할 수 있는 것이 Gram양성균의 β -lactamase라 할 수 있다. Gram음성균의 β -lactamase는 세포의 periplasm에 국재하기 때문에 β -lactam계 약제가 세포외막 내로 침투하면 분해하여 내성을 갖는다. Gram음성균의 외막은 음성균 특유의 세포표층구조를 가지는데 peptidoglycan층 외부에 외층이 있고 인지질, 막단백질, lipopolysaccharide

(LPS)로서 구성되어 있으며, 소수성 물질이나 고분자 물질에 대하여 투과 장벽으로서 역할을 하고 있다. 반면에 당, 아미노산 등의 저분자 영양물질이나 친수성 항균제는 막 단백질이 형성하는 1.2 nm전후의 투과공에 의하여 외막을 통과할 수 있다. β -Lactam계 항생물질, 특히 cephalosporin은 이 투과공을 주된 외막투과 경로로 하고 있는 물질이다[26]. 녹농균이나 혐기성균은 감염 초기에 β -lactamase에 낮은 감수성을 보이는 주요 원인은 이들 균의 투과공이 대장균에 비하여 작고 약제의 외막투과성이 매우 낮기 때문이다[27]. 미생물이 β -lactam계 항생물질에 대하여 내성을 일으키는 중요한 역할을 하는 PBP와 β -lactamase는 여러 가지의 β -lactam계 항생물질에 대하여 유도되고 있다는 사실이 보고되고 있다[1,10,12,14,17-19]. β -Lactam계 항생물질의 β -lactamase에 대한 유도기구는 아직 명확히 밝혀지지는 않았으나 이들 효소의 구조 유전자와 조절 유전자를 규명함으로써 가능할 것이다. *Bacillus licheniformis*가 생산하는 penicillinase의 조절기구는 대장균의 β -galactosidase의 제어기구와 유사하다고 한다. 즉 구조 유전자인 *pen P*에 조절유전자인 *pen I*에 의해 만들어진 repressor에 의하여 효소 유도가 조절되고 있으며 *S. aureus*의 penicillinase 생산조절 기작은 plasmid에 존재하는 조절유전자의 산물에 의하여 염색체상의 β -lactamase 유전자가 조절된다는 보고[5,13,28]가

*Corresponding author

Tel : +82-51-200-7557, Fax : +82-51-206-0848

E-mail : ykj9912@dau.ac.kr

있다. 아울러 최근에는 β -lactamase 구조유전자가 밝혀지면서 전 유전자의 염기배열이 보고되고 있다[22,24,25]. 이전 연구에서 부산 일대의 토양에서 분리한 *Bacillus* sp. J105균주로부터 세포의 β -lactamase를 정제하여 효소의 특성을 연구하였다[4]. 본 연구에서는 *Bacillus* sp. J105 유래의 β -lactamase 유전자를 클로닝하여 유전자의 특성을 분석하고 *E. coli* 내에서 발현 양상을 분석하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 plasmid

본 연구에 사용된 균주와 plasmid는 Table 1에 나타내었다. *Bacillus* sp. J105균주는 부산 일대의 토양에서 분리하였으며 β -lactamase의 단백질 분리 및 유전자의 클로닝에 이용하였다. *E. coli* DH5 α 는 β -lactamase유전자의 cloning에, *E. coli* HB101균주는 β -lactamase유전자의 subcloning에 각각 사용하였다. Plasmid pLAFR3은 tetracycline 내성유전자(Tc^r)와 multi cloning site (MCS)를 가지고 있는 22 kb의 cosmid vector이며 *Bacillus* sp. J105균주의 genomic library의 제작에 사용하였다. Plasmid pACYC184는 4.2 kb의 크기를 가지며 cloning한 β -lactamase 유전자의 subcloning vector로 사용하였다.

배양 배지

β -Lactamase 유전자 cloning을 위한 *E. coli* DH5 α 균주는 X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indoly- β -D-galactopyranoside), IPTG (Isopropyl-thiogalactoside), 그리고 ampicillin (2 mg/ml)이 포함된 LB (1% bacto trypton, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl) agar 배지를 사용하였다. *Bacillus* sp. J105 균주와 *E. coli* HB101 (pKCB89/pKL11/pKL11- Δ B/pKL11- Δ 4.6)의 배양

에는 LB배지에 ampicillin (2 mg/ml)을 첨가하여 배양하였고 *E. coli* HB101 (pACYC184)의 배양에는 LB배지에 tetracycline (30 μ g/ml)을 첨가하여 배양하였다.

Chromosomal DNA 분리

Bacillus sp. J105균주의 chromosomal DNA 분리는 Murray와 Thompson [15]의 방법을 변형하여 다음과 같은 방법으로 분리하였다. Ampicillin (2 mg/ml)을 함유한 LB배지 100 ml에 *Bacillus* sp. J105균주를 접종하여 37°C에서 18시간 진탕 배양하여 배양액을 50 ml 원심관에 옮겨 원심분리(15,000 \times g, 5 min, 4°C)로 균체를 회수하였다. 얻어진 균체에 TE buffer 9.5 ml와 10% SDS 0.5 ml, 그리고 proteinase K 50 ml를 넣은 후 37°C에서 1시간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 5 M NaCl 1.8 ml와 CTAB/NaCl 1.5 ml를 넣고 65°C에서 20분간 반응시킨 후 동량의 chloroform/iso-amylalcohol (v/v, 24:1)을 첨가하여 조심스럽게 섞은 다음 원심분리(15,000 \times g, 10 min, room temp.)하여 상층액을 새 원심관에 회수하였다. 이 과정을 2회 반복하여 이행 하였다. Phenol추출 후 용액에 0.6배 용량의 isopropanol을 잘 섞은 다음 -80°C에서 20분간 방치 후 원심분리(20,000 \times g, 15 min, 4°C)하여 DNA를 침전시킨 후, 70% ethanol로 침전물을 세척한 후 진공 건조하였다. 침전물에 TE buffer 4.0 ml와 CsCl 4.3 g을 넣은 후 잘 녹이고 ethidium bromide (EtBr) 0.1 ml를 첨가하여 150,000 \times g로 15°C에서 4시간 초원심분리하여 UV 하에서 chromosomal DNA band를 회수하였다. 회수한 DNA용액을 water-saturated buthanol로 EtBr을 제거한 후 TE buffer로 4°C에서 24시간 동안 투석하여 CsCl을 제거하였다. DNA농도는 260 nm에서의 흡광도로 측정하였다. 분리한 chromosomal DNA는 -80°C에서 보관하여 β -lactamase 유전자 클로닝에 이용하였다.

Plasmid DNA의 분리

Plasmid DNA는 Birnbiom과 Doly의 alkali 추출법[2]을 변형하여 아래와 같이 분리하였다. Ampicillin (2 mg/ml) 또는 tetracycline (30 μ g/ml)이 포함된 LB배지 7 ml에서 37°C, 18시간 배양한 *E. coli* DH5 α 또는 HB101 배양액을 1.5 ml tube에 옮겨 원심분리(17,000 \times g, 5min)하여 균체를 회수하였다. 회수한 균체에 solution I (50 mM Glucose, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA, lysozyme (5 mg/ml))용액 100 ml를 가하여 현탁하고 37°C에서 20분간 정치하였다. solution II (0.2 N NaOH, 0.1% SDS)용액 200 μ l를 가하여 혼합 후 0°C에서 5분간 둔 다음, solution III (3 M Potassium acetate, 11.5% glacial acetic acid)용액 150 μ l를 첨가하여 0°C에서 15분간 정치한 후 20,000 \times g에서 5분간 원심분리 하여 상층액을 새로운 1.5 ml tube에 옮겼다. 동량의 phenol/chloroform/isoamyl alcohol (v/v/v, 25:2:1)로 상층액 추출하고, 추출액 동량의 chloroform/isoamyl alcohol (v/v, 24:1)을 혼합하여 상층액을 추출

Table 1. Bacterial strains and plasmids

Strain	Relevant characteristics	Source or reference
<i>Bacillus</i> sp. J105	β -lactamase ⁺	This study
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>supE44</i> , <i>ΔlacU169 (ϕ80lacΔM15)</i> , <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> ,	[8]
<i>E. coli</i> HB101	<i>supE44</i> , <i>hsdS20 (r_B-m_B-)</i> , <i>recA13</i> , <i>ara-14</i> , <i>proA2</i> , <i>lacY1</i> , <i>galK2</i> , <i>rpsL20</i> , <i>xyl-5</i> , <i>mtl-1</i> , <i>leuB6</i> , <i>thi-1</i>	[11]
Plasmid	Relevant characteristics	Source or reference
pLAFR3 (cosmid vector)	22 Kb, pLAFR1 containing HaeII fragment of pUC8, Tc ^r , cos	[9]
pACYC184	4.2 Kb, Tc ^r , Cm ^r	[3]

하였다. 에탄올 침전방법으로 최종 DNA를 침전시키고 TE 완충액에 녹여 -20°C에 보관하였다.

Bacillus sp. J105균주의 genomic library의 제작

Genomic library 제작에 필요한 chromosomal DNA의 조제 방법은 *Bacillus* sp. J105균주의 chromosomal DNA를 분리하여 약 50~70 µg의 DNA를 *Sau3AI*으로 부분 분해하여 sucrose용액으로 원심관에 5~20%까지 밀도를 형성시켜 50,000× g에서 16시간 동안 슈크로즈 밀도 원심분리(sucrose density ultracentrifugation)를 행하였다. 원심분리 후 크기별로 분리된 chromosome DNA 단편이 포함된 용액을 0.5 ml씩 분취하여 0.5% agarose 전기영동을 통하여 DNA 크기를 측정하여, 20~30 kb 크기의 DNA단편을 모아 TE buffer에 24시간 동안 투석하여 sucrose를 제거한 후 -20°C 보관하였다. 준비된 cosmid vector arms 1 µg과 20~30 kb chromosomal DNA 단편 3 µg을 *T₄* ligase (Promega, USA)로 18°C에서 6시간동안 ligation하였다. Ligation 후 *in vitro* packaging Kit (Stratagene Co., USA)를 사용하여 λ phage 입자를 만들어 *E. coli* DH5α에 형질도입한 후 LB agar배지(X-gal/IPTG, ampicillin 2 mg/ml)에 도말하여 37°C에서 18시간 배양하였다.

*E. coli*의 형질전환

*E. coli*의 형질전환은 Cohen 과 Chang의 방법[6]을 변형한 방법으로, 5 ml의 LB배지에서 37°C, 18시간 전배양한 배양액 0.2 ml를 LB배지 20 ml에 접종하고 660 nm에서 O.D.값이 0.4가 될 때까지 진탕 배양하였다. 배양액을 15,000× g에서 10분간 원심분리하고 얻어진 균체를 50 mM CaCl₂ (pH 8.0) 용액 2 ml에 현탁하여 0°C에 15분간 방치한 후, 15,000× g에서 10분간 원심분리하고 50 mM CaCl₂ (pH 8.0), 15% glycerol 혼합용액 1.5 ml에 다시 현탁하여 competent cell을 얻었다. Competent *E. coli* cells 0.2 ml와 DNA 0.5~1.0 µg을 혼합하고 0°C에서 30분간 정지한 다음 42°C에서 2분간 열처리하였다. 열처리 후 0°C에서 5분간 정지한 다음 LB배지 1 ml을 가하여 37°C에서 1시간동안 정지배양 후 배양액을 ampicillin (2 mg/ml)이 포함된 LB agar배지에 도말하여 37°C에서 18시간 배양하여 β-lactamase 재조합 clone을 선별하였다.

β-Lactamase 유전자의 subcloning 및 염기서열 분석

β-Lactamase gene이 cloning된 재조합 plasmid DNA를 분리하여 다양한 제한효소를 처리하여 최종 β-lactamase 유전자가 포함된 6.4 kb DNA 단편을 얻었다. 이 단편을 염기서열 분석에 이용하였다. DNA 염기서열 분석은 dideoxynucleotide method [20]로 이행하였으며 기질로 plasmid DNA를 사용하였다. 염기서열 분석은 DNASIS (Hitachi Software Engineering America, Ltd., San Bruno, Calif) program과 NIH BLASTA program을 이용하였다.

E. coli 에서 발현된 β-lactamase의 세포 내외 존재 비율 분석

*E. coli*에서 β-lactamase의 균체 내외의 존재 시험은 Neu[16]의 방법을 변형하여 실험하였다. Ampicillin (2 mg/ml)를 함유한 50 ml LB배지에 균을 접종하여 37°C에서 18시간 진탕배양 후 원심분리(15,000× g, 10 min, 4°C)하여 균체를 집균하고 상층액은 따로 보관하였다. 균체를 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 10 ml로 1회 세척한 후 상기 조건으로 원심분리하여 상층액을 앞의 상층액과 합하여 균체의 효소액으로 하였다. 균체는 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 0.1% (w/v) lysozyme 혼합용액 5 ml에 현탁하여 37°C에서 30분간 방치 후 -80°C에서 1시간 냉동하였다. 이것을 37°C에서 20분간 급속해동 시킨 후 냉동과 해동의 과정을 2회 반복한 후 원심분리(25,000× g, 20 min, 4°C)로 상층액을 회수하여 세포 내 효소액으로 하였다.

조효소액의 조제

β-Lactamase 유전자를 보유한 *E. coli* HB101 (pBK11-Δ4.6)을 LB 배지(ampicillin 2 mg/ml)에 접종하여 37°C에서 18시간 배양하고 원심분리(20,000× g, 10 min, 4°C)하여 균체를 회수하였다. 회수한 균체를 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 10 ml로 1회 세척한 후 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 0.1% (w/v) lysozyme 혼합용액 5 ml에 현탁하여 37°C에서 30분간 방치 후 -80°C에서 1시간 냉동하였다. 37°C에서 20분간 급속해동 시킨 후 냉동과 해동의 과정을 2회 반복한 후 원심분리(25,000× g, 20 min, 4°C)로 상층액을 회수하여 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) buffer로 2일간 충분히 투석 후 조효소액으로 사용하였다.

β-Lactamase 활성 측정

β-Lactamase 활성 측정은 Micro-iodometric assay 방법[21]을 이용하였다. 효소액 1 ml와 10 mM acetic acid buffer (pH 5.0) 1 ml를 혼합하여 30°C에서 5분간 가온하여 효소를 활성화시켰다. 동일 완충용액에 용해한 0.4%의 ampicillin용액 1 ml를 첨가하여 반응을 시작하였다. 30°C에서 각각 시간별로 반응시킨 후 요오드 용액(0.16 M iodine, 1.2 M potassium iodine)을 pH 4.0의 acetic acid buffer로서 50배 희석한 요오드 용액 5 ml를 첨가하여 반응을 정지시킨 다음 실온에서 10분간 방치 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 요오드 용액으로 반응을 정지시킨 후 동량의 효소액을 첨가하였다. 측정된 흡광도로 효소활성의 unit 계산에는 다음의 수식을 이용하였다.

$$U = \text{가수분해된 기질의 농도} \times 1/T \times 1/V$$

- T: 효소반응 시간(분)
- V: 반응액에 첨가된 효소용액의 부피(ml)
- U: 효소 단위(unit)

β -Lactamase 활성의 1 unit은 1분 동안 1 μ mol의 ampicillin을 가수분해하는 효소량으로 정의하였다.

*E. coli*에서 발현된 β -lactamase의 정제

Bacillus sp. J105 균주가 생산하는 세포 외 β -lactamase와 형질 전환된 *E. coli* HB101에서 생산되는 β -lactamase 간의 동일성 비교를 위해 조효소액을 조제한 후 아래와 같은 방법에 의하여 정제를 하였다. β -lactamase 유전자를 포함하고 있는 *E. coli* HB101 (pKL11- Δ 4.6)을 배양한 후 세포를 회수하여 세포분해 효소인 lysozyme (5 mg/ml)을 이용하여 세포를 파쇄한 후 원심분리하여 상층액을 취하였다. 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)로 투석한 조효소액을 DEAE Sephadex A-50 column chromatography와 Sephadex G-75 gel filtration을 이용하여 β -lactamase 활성 분획을 얻은 다음, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 이행하여 단백질을 확인하였다.

결과 및 고찰

Bacillus sp. J105로부터 β -lactamase 유전자의 cloning

이전연구에서 *Bacillus* sp. J105의 배양액에서 β -lactamase 활성을 확인 하였으며 이 효소를 분리하여 그 특성을 연구 하였다[4]. 따라서 본 연구에서는 이들의 유전자를 클로닝하여 유전자 조절에 대한 연구를 위해 β -lactamase 유전자 cloning을 이행하였다.

먼저 *Bacillus* sp. J105균주의 plasmid 존재 유무를 파악하기 위해서 alkaline lysis 방법[2]을 변형하여 plasmid 분리실험 결과, plasmid가 존재하지 않는다는 것을 확인하였다(data not shown). 따라서 *Bacillus* sp. J105균주의 세포의 β -lactamase의 유전자는 chromosomal DNA 상에 존재하고 있는 것으로 판단되어 본 균주의 chromosomal DNA를 Murray와 Thompson [15]의 변형된 방법으로 분리하였고 분리한 chromosomal DNA를 *Sau*3AI으로 부분 분해하여 sucrose density ultracentrifugation을 행한 후 20~30 kb 단편만을 모았다. 이 단편과 cosmid vector의 양쪽 arm과 ligation하여 *in vitro* packaging을 거쳐 λ phage의 형질도입방법으로 *E. coli* DH5 α 에 재조합 plasmid를 형질도입 하였다. 형질이 도입된 *E. coli* DH5 α 균주를 X-gal과 IPTG가 함유된 LB agar배지에 ampicillin을 2 mg/ml 첨가하여 spreading 하였다. 37°C에서 18시간 배양 후 white colony이면서 ampicillin에 내성을 보이는 β -lactamase 양성 clone주(β -Lac⁺)를 선별하였다. β -Lactamase 양성 clone주를 alkaline lysis 법으로 plasmid 분리하여, 확인 후 *E. coli* DH5 α 에 다시 형질 전환시켰다. 전체적인 β -lactamase 유전자 클로닝 과정을 Fig. 1에 나타내었다. 형질전환된 균주를 50개 선별하여 재조합 plasmid를 확인하였고 *Sal*I으로 처리하여 agarose gel 전기영동으로 확인한 결과, 4개의 단편

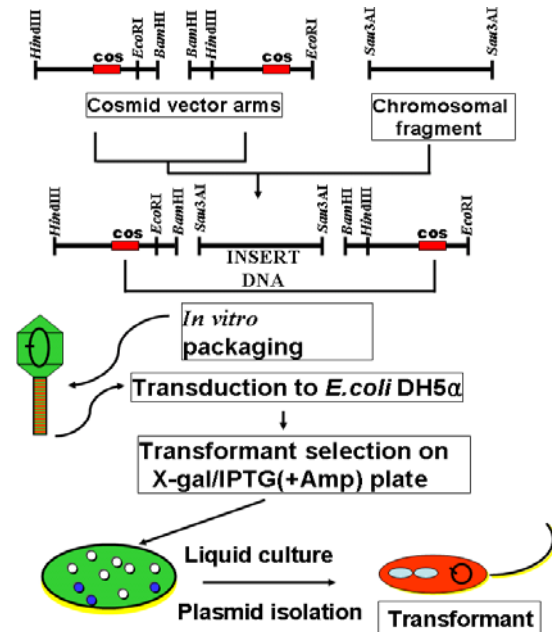


Fig. 1. Cloning strategy of β -lactamase gene from *Bacillus* sp. J105.

이 모든 재조합 plasmid에서 발견되었다. 따라서 모든 재조합 plasmid가 동일한 것으로 판단되었고 β -lactamase의 유전자는 recombinant plasmid 상에 존재하며 이 plasmid는 숙주균 내에서 안정하게 유지되고 있음을 알았다. 이 recombinant plasmid를 pKB89라 명명하였고 여러 가지 제한효소를 처리하여 그 분해 형태를 조사한 결과, pKB89의 전체적인 크기는 분자량 marker와 λ phage의 packaging size를 고려해 볼 때 40 kb 이상 될 것으로 추정되었다(data not shown).

β -Lactamase 유전자의 subcloning

클로닝된 단편의 크기가 40 kb 이상으로 다루기 힘들기 때문에 β -lactamase 유전자의 subcloning을 위해 *E. coli* DH5 α (pKB89)를 100 ml LB 배지에서 37°C, 18시간 배양 후 alkaline lysis 방법으로 pKB89를 대량조제 하였다. pKB89 (Tc^r, β -Lac⁺) 3 μ g을 *Sau*3AI 0.3 unit로 5분간 부분분해 시킨 후 *Bam*HI으로 처리한 pACYC184와 ligation시켰다(Fig. 2). 그 후 *E. coli* HB101에 형질전환 시켜 LB agar배지에 도말하였고 37°C에서 18시간 배양하여 ampicillin에 내성을 보이는 β -lactamase 양성 subclone주를 선별하였다. 획득한 subclone주의 recombinant plasmid를 분리하여 제한효소를 처리하여 확인한 후 *E. coli* HB101에 다시 형질전환 시켜 plasmid의 안정성을 검토하였다. Subclone된 β -lactamase 유전자가 포함된 plasmid는 숙주균에서 안정하게 유지되었으며 이 plasmid를 pKL11로 명명하였다. pKL11 3 μ g을 3 unit의 *Bam*HI으로 2시간동안 반응시키고 0.8% agarose gel 전기영동을 행한 결과, 15.2 kb 단편과 1.7 kb 단편을 확인하였다. 전기영동 후 15.2 kb 단편의 위치를 확인한 뒤 면도칼로 잘라내었고 Sephaglas BandPrep Kit

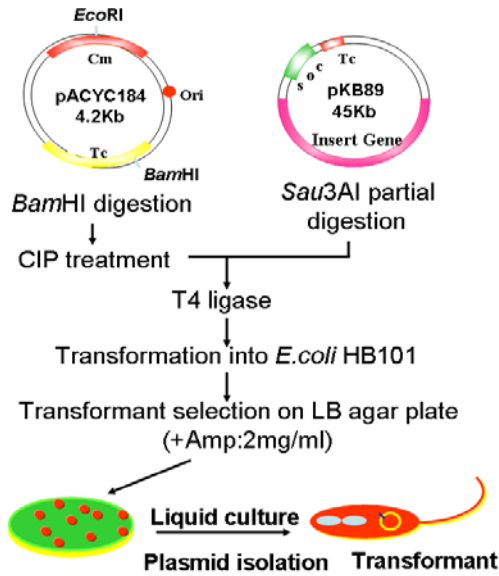


Fig. 2. Subcloning strategy of pKB89 containing the β -lactamase gene.

(Pharmacia Co., USA)를 사용하여 DNA band를 회수한 뒤 T₄ ligase를 사용하여 16°C에서 self ligation시켰다. Self ligation을 시킨 15.5 kb BamHI 단편을 E. coli HB101에 형질전환 시켜서 LB agar (ampicillin 2 mg/ml)에 spreading 한 후 37°C에서 18시간 배양함으로써 ampicillin 내성 균주를 얻었다. 1.7 kb BamHI 단편을 제거시켜 얻은 plasmid를 pKL11- Δ B라 명명하였다. pKL11- Δ B 3 μ g을 BamHI과 BgIII를 각각 3 unit씩 2시간 동안 반응시키고 0.8% agarose gel 전기영동을 행하였다. 전기영동에서 10.6 kb 단편의 위치를 확인한 뒤 면도칼로 잘라내었고 Sephaglas BandPrep Kit (Pharmacia Co., USA)를 사용하여 DNA band를 회수한 뒤 T₄ ligase를 사용하여 16°C에서 self ligation 시켰다. Self ligation을 시킨 10.6 kb BamHI-BgIII 단편을 E. coli HB101에 형질전환 시켜서 LB agar (ampicillin 2 mg/ml)에 spreading 한 뒤 37°C에서 18시간 배양함으로써 ampicillin 내성 균주를 얻었다. E. coli HB101 균주에 다시 형질전환시켜 숙주균에서의 안정성을 검토하여 4.6 kb BamHI-BgIII 단편을 제거시켜 얻은 plasmid를 pKL11- Δ 4.6이라 명명하였다(Fig 3).

DNA 염기서열 분석

최종적으로 subcloning된 프라스미드 pKL11- Δ 4.6을 분리하여 β -lactamase의 염기서열을 결정하였다. 약 6.4 kb 단편 내에 309개의 아미노산을 코딩하는 927 bp의 유전자를 포함하고 있었다(Fig. 4). 클로닝된 β -lactamase 유전자의 upstream을 포함하는 170 bp의 염기서열을 분석한 결과, B. thuringiensis와 B. cereus 유래의 β -lactamase 유전자의 upstream 부위와 97%의 일치율을 보였다(data not shown). 이 upstream 부위에서 13 bp의 inverted repeated sequences가 존재 하였는

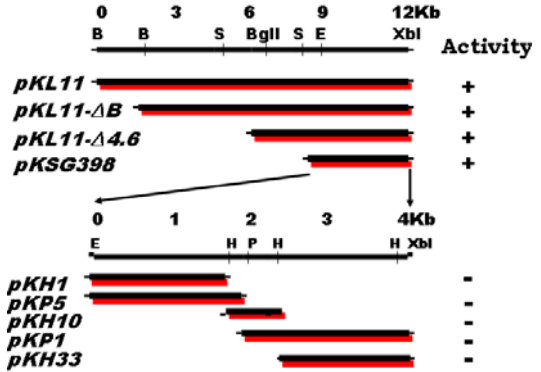


Fig. 3. Physical maps of recombinant plasmids containing β -lactamase gene. B, BamHI; BgII, BgIII; E, EcoRI; H, HindIII; P, PstI; S, Sall; Xbl, XbaI.

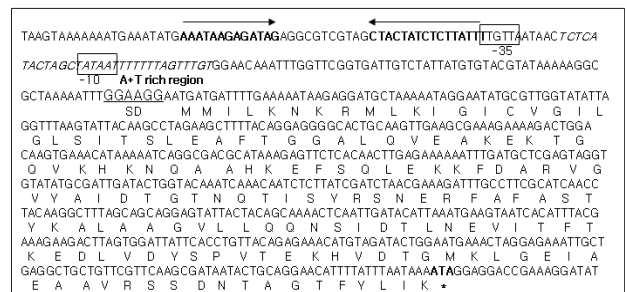


Fig. 4. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the insert of pKL11- Δ 4.6 containing the β -lactamase coding regions. The deduced amino acid sequences are designated in single-letter code. The putative promoter sequences, represented by -35 and -10 are boxed. Inverted repeat sequences are indicated by arrows. A+T rich regions are presented by italic letters. Shine-Dalgarno sequences are presented by SD. The stop codon presented by the star are underlined.

데, 이 서열은 hairpin loop 구조를 이룰 수 있다. 일반적으로 promoter 부위에 A+T rich 부위가 존재하는데, 이들은 두 가닥 DNA가 한 가닥으로 쉽게 분리되는 것을 도와주어 전사가 잘 일어나도록 한다[23]. 본 연구 결과에서도 29 bp로 이루어진 A+T rich 부위를 확인 할 수 있었다(Fig. 4). 본 연구에서 클로닝된 β -lactamase의 아미노산을 서열을 NCBI BLAST program을 이용하여 분석해 본 결과 B. thuringiensis와 B. cereus의 β -lactamase와 각각 97%와 94%의 일치율을 보였다(Fig. 5). 또한 Fig. 6 에 나타낸 바와 같이 계통도 분석결과 역시 본 연구에서 클로닝된 β -lactamase의 아미노산을 서열은 B. thuringiensis와 B. cereus와 유전학적으로 아주 밀접한 관계를 보여주고 있다.

E. coli HB101에서 β -lactamase 유전자 발현 및 세포 내의 존재 비율 분석

E. coli에서 재조합 β -lactamase (pKL11/ pKL11- Δ B/

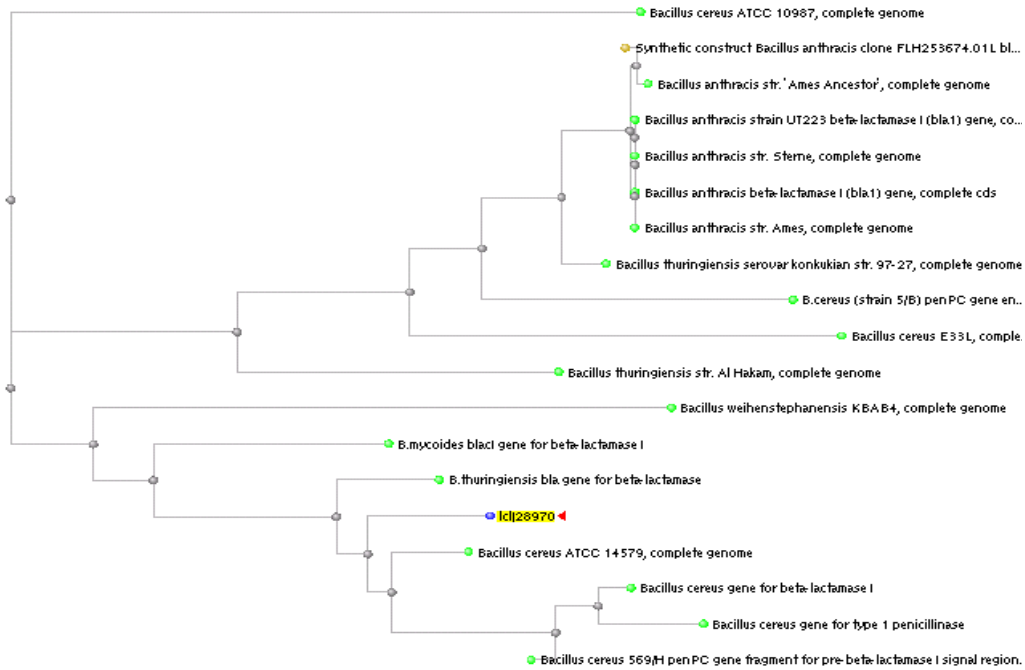


Fig. 5. Phylogenetic tree showing the relationships of the β -lactamase gene (lcll28970) of *Bacillus* sp. J105 to related that of other *Bacillus* strains. Name and accession number are given as sited in the GeneBank database.



Fig. 6. Multiple alignment of the amino acid sequences of β -lactamase of *Bacillus* sp. J105 19824, *B. thuringiensis* Q45726, *B. mycoides* P28018, *B. cereus* P00809, *B. cereus* P10424.

pKL11- Δ 4.6)의 발현 확인과 세포 내외 존재 비율을 분석하였다. 존재 비율 분석은 Neu [16]의 방법을 변형하여 실험하였고 재조합 plasmid를 보유한 *E. coli* HB101균주를 LB 배지에서 18시간 배양한 뒤 세포외와 세포 내에서의 활성을 비교하여 *Bacillus*유래의 유전자가 *E. coli*에서의 발현될 때 세포 내외에 있어서 존재비율을 비교하여 Table 2에 나타내었다. 모

Table 2. Location of β -lactamase activity in recombinant *E. coli* cells harboring pKL11 or pKL11- Δ B or pKL11- Δ 4.6

Plasmid	β -Lactamase (unit/ml)		Secretion efficiency (%)
	Extracellular	Cytoplasm	
pACYC184	0	0	0
pKL11	710	18,900	3.6
pKL11- Δ B	805	17,889	4.3
pKL11- Δ 4.6	815	18,331	4.2

든 recombinant plasmid (pKL11, pKL11- Δ B, pKL11- Δ 4.6)가 *E. coli*에서 β -lactamase를 발현시켰으며 대부분의 β -lactamase가 cytoplasm에 존재하였고 약 4~5% 만이 분비되어 세포외에 존재하는 것으로 밝혀졌다. *Bacillus*유래의 단백질이 *E. coli*에서 분비될 때의 분비경로의 차이 혹은 signal peptide의 인식부위 차이에 의해서 대부분의 재조합 β -lactamase가 *E. coli* 세포내에 존재하는 것으로 생각된다. 그리고 *E. coli*에서 β -lactamase (pKL11, pKL11- Δ B, pKL11- Δ 4.6)의 발현 확인은 먼저 재조합 plasmid를 보유한 *E. coli* HB101 균주를 LB 배지에서 37°C, 18시간 배양한 뒤 Neu [16]의 방법으로 세포를 파쇄한 뒤 세포내 단백질을 SDS-PAGE를 통하여 재조합 β -lactamase 단백질의 발현을 조사하였으며 Fig. 7에서 나타내었다. 전기영동 사진에서 재조합 β -lactamase 유전자를 포함하고 있는 pKL11, pKL11- Δ B, pKL11- Δ 4.6 모두 *Bacillus* sp. J105균주에서 생산되는 β -lactamase [4]와 동일한 31 kDa의 위치에서 β -lactamase가 발현되고 있음을 확인하였다(Fig. 7).

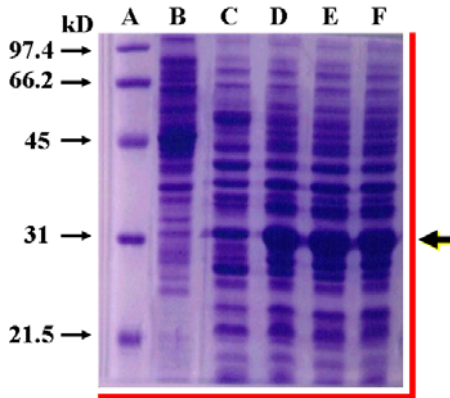


Fig. 7. SDS-PAGE of cytoplasmic protein in *E. coli* HB101 and recombinant plasmid including *E. coli* HB101 (pKL11, pKL11-ΔB, pKL11-Δ4.6). Lane A: Low molecular marker, lane B: *E. coli* HB101, lane C: *E. coli* HB101 (pACYC184), lane D: *E. coli* HB101 (pKL11), lane E: *E. coli* HB101 (pKL11-ΔB), lane F: *E. coli* HB101 (pKL11-Δ4.6).

*E. coli*에서 발현된 β-lactamase의 정제

*E. coli*에서 발현된 β-lactamase의 정제 과정의 요약은 Table 3에 나타내었다. 조제한 조효소액을 20 mM Tris buffer (pH 8.0)로서 충분히 투석한 후 동일 buffer로 평형화 시킨 DEAE Sephadex A-50 column에 흡착시켰다. 비흡착 단백질을 상기의 buffer로 충분히 세척 후 0.1 M과 0.5 M의 NaCl이 함유된 Tris-HCl buffer (pH 8.0)로 단백질을 용출 시켰으며 활성부분은 0.1 M NaCl에서 용출되었다. 활성이 강한 분획만을 모아 20 mM Tris buffer (pH 8.0)로서 투석 후 동결 건조하여 농축하였다. 농축되어진 활성부분을 0.15 M의 NaCl이 함유된 상기의 buffer로 평형화 시킨 Sephadex G-75가 충전된 column (1.6×140cm)을 사용하여 gel filtration을 행하였다. 최종 gel filtration 후 수율은 세포추출물 비례 44.7% 이었으며, 이때의 활성은 133%를 나타내었다(Table 3). 최종 정제된 활성부분을 12% SDS-PAGE로 확인한 결과 분자량은 31 kDa로 이는 *Bacillus sp.* J105균주 유래의 세포의 β-lactamase의 분자량[4]과 일치하였다(Fig. 8).

Table 3. Purification summary of β-lactamase from cytoplasmic protein of *E. coli* HB101 (pKL11-Δ4.6)

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (Unit/ml)	Specific activity (Unit/mg)	Fold	Yield (%)
Cell extract	775	129,000	167	1	100
DEAE-A50 column	27	98,870	3,662	22	76.6
Sephadex G-75 gel filtration	2.6	57,600	22,154	133	44.7

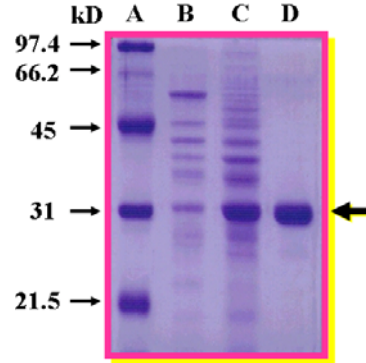


Fig. 8. SDS-PAGE of purified β-lactamase from cytoplasmic protein of *E. coli* HB101 (pKL11-Δ4.6). Lane A: Low molecular marker, lane B: Cytoplasmic protein of *E. coli* HB101 (pACYC184), lane C: Cytoplasmic protein of *E. coli* HB101 (pKL11-Δ4.6), lane D: Purified β-lactamase.

요 약

β-Lactam계 항생물질에 강한 내성을 가지는 균주 *Bacillus sp.* J105가 생산하는 β-lactamase의 유전자를 *E. coli* DH5α에 cloning하였다. Cosmid vector pLAFR3를 이용하여, *Sau*3AI으로 부분 분해한 chromosomal DNA와 *Bam*HI으로 처리한 pLAFR3를 ligation하였다. *In vitro* packaging kit를 사용하여 *E. coli*에 형질도입 하였으며 β-lactamase양성 clone주를 획득하였다. 이 recombinant plasmid (β-lac⁺)를 pACYC184 (4.2 kb) vector를 사용하여 subcloning 하여 최종 β-lactamase의 활성이 있는 6.4 kb 단편이 포함된 pKL11-Δ4.6을 제작하였다. 이 단편을 DNA 염기서열을 분석한 결과 309개의 아미노산으로 구성된 β-lactamase를 코딩하는 927 bp를 포함하고 있었다. 클로닝된 β-lactamase 유전자의 upstream을 포함하는 170 bp의 염기서열을 분석한 결과, *B. thuringiensis*와 *B. cereus* 유래의 β-lactamase 유전자의 upstream 부위와 97%의 일치율을 보였다. 본 연구에서 클로닝된 β-lactamase의 아미노산을 서열을 NCBI BLAST program을 이용하여 분석해 본 결과 *B. thuringiensis*와 *B. cereus*의 β-lactamase와 각각 97%와 94%의 일치율을 보였다. 또한 계통도 분석 결과 역시 본 연구에서 클로닝된 β-lactamase의 아미노산 서열은 *B. thuringiensis*와 *B. cereus*와 유전학적으로 아주 밀접한 관계를 보여주었다.

이 pKL11-Δ4.6를 *E. coli*에서 형질전환 시켜 발현 양상을 조사해 본 결과 β-lactamase의 secretion efficiency는 약 4~5%였다. *E. coli*의 세포 내 단백질로부터 β-lactamase를 정제하여 분자량을 확인한 결과 31 kDa로 wild type의 분자량과 일치함을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 2006년 동아대학교 학술연구지원에 의해 수행되

었으며 이에 감사합니다.

References

1. Beckwith, D. G. and J. A. Jahre. 1980. Role of cefoxitin-inducible beta-lactamase in case of breakthrough bacteria. *J. Clin. Microbiol.* **12**, 517-520.
2. Birnbiom, H. C. and J. Doly. 1979. Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523.
3. Chang, A. C. Y. and S. N. Cohen. 1978. Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J. Bacteriol.* **134**, 1141-1156.
4. Cho, K. S., B. W. Kang, M. J. Seo, Y. C. Lee, J. H. Lee, W. H. Joo, Y. H. Choi, H. S. Lim, J. I. Kim, K. I. Seo and Y. K. Jeong. 2008. Purification and characterization of β -lactamase secreted Bacillus sp. J105 strain having β -lactam antibiotic resistance. *Kor. J. Life Sci.* **18**, 845-851.
5. Cohen, S. and H. M. Sweeney. 1968. Constitutive penicillinase formation in *Staphylococcus aureus* owing to a mutation unlinked to the penicillinase plasmid. *J. Bacteriol.* **95**, 1368-1374.
6. Cohen, S. N., A. C. Y. Chang and L. Hsu. 1972. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **69**, 2110-2114.
7. Dyke, K. G. H. 1979. β -lactamase of *Staphylococcus aureus* in β -lactamase. pp. 219. Chamilton Miller, J. M. T., J. T. Smith (eds.), Academic Press Inc., London.
8. Fleckenstein, J. M., D. J. Kopecko, R. L. Warren and E. A. Elsinghorst. 1996. Molecular characterization of the tia invasion locus from enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* **64**, 2256-2265.
9. Friedman, A. M., S. R. Long, S. E. Brown, W. J. Buikema and F. M. Ausubel. 1982. Construction of a broad host range cosmid cloning vector and its use in the genetic analysis of Rhizobium mutants. *Gene* **18**, 289-296.
10. Fu, K. P. and H. C. Neu. 1981. The role of inducible β -lactamase in the antagonism seen with certain cephalosporin combinations. *J. Antimicrob. Chemother.* **7**, 104-107.
11. Hanaham, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.
12. Hennessey, T. D. 1967. Inducible β -lactamase in *Enterobacter*. *J. Gen. Microbiol.* **49**, 277-285.
13. Imsande, J., J. W. Zyskind and I. Mile. 1972. Regulation of *Staphylococcal* penicillinase synthesis. *J. Bacteriol.* **109**, 122-133.
14. Lampe, M. F., B. J. Allan, B. H. Minshew and J. C. Sherris. 1982. Mutational enzymatic resistance of *Enterobacter* species to beta-lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **21**, 655-660.
15. Murray, M. G. and W. F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA. *Nucleic Acid Res.* **8**, 4321-4325.
16. Neu, H. C. and L. A. Heppel. 1965. The release of enzymes from *E. coli* by osmotic shock and during formation of spheroplasts. *J. Biol. Chem.* **240**, 3685-3692.
17. Nordström, K. and R. B. Sydes. 1974. Induction kinetics of β -lactamase biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **6**, 734-740.
18. Rosselet, A. and W. Zimmermann. 1973. Mutants of *Pseudomonas aeruginosa* with impaired beta-lactamase inducibility and increased sensitivity to beta-lactam antibiotics. *J. Gen. Microbiol.* **7**, 455-457.
19. Sanders, M. G. and W. E. Sanders, Jr. 1979. Spelling of resistance to cefamandole: Possible role of cefoxitin-inducible beta-lactamases. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **15**, 792-797.
20. Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**, 5463-5467.
21. Sawai, T., I. Takahashi and S. Yamagishi. 1970. Iodometric assay method for beta-lactamase with various beta-lactam antibiotics as substrates. *J. Bacteriol.* **13**, 910-913.
22. Sloma, A. and M. Gross. 1983. Molecular cloning and nucleotide sequence of the type I β -lactamase gene from *Bacillus cereus*. *Nucleic Acid Res.* **11**, 4997-5004.
23. Tang, G. O., R. P. Bandwar and S. S. Patel. 2005. Extended upstream A-T sequence increase T7 promoter strength. *J. Biol. Chem.* **280**, 40707-40713.
24. Wang, P. Z. and R. P. Novick. 1987. Nucleotide sequence and expression of the β -lactamase gene from *Staphylococcus aureus* plasmid p1 258 in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **169**, 1763-1766.
25. Wang, W., S. F. Mezes, Y. Q. Peter, W. Yang, B. Russell and J. O. Lampen. 1985. Cloning and sequencing of the β -lactamase I gene of *Bacillus cereus* 51B and its expression in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **163**, 487-492.
26. Yamaguchi, A. 1985. Difference in pathway of *Escherichia coli* outer membrane permeation between penicillins and cephalosporines. *FEBS Lett.* **181**, 143-148.
27. Yoshihara, E. 1988. *In vitro* demonstration by the rate assay of the presence of small pore in the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **156**, 470-476.
28. Zyskind, J. W. and J. Imiande. 1972. Regulation of penicillinase synthesis a mutation in *Staphylococcus aureus* unlinked to the penicillinase plasmid that reduces penicillinase inducibility. *J. Bacteriol.* **109**, 116-121.