

## YRp7 vector를 이용한 *Bacillus amyloliquefaciens* amylase gene의 cloning

### II. *Saccharomyces cerevisiae*에서의 發現

서정훈 · 김영호 · 전도연 · 배영석 · 홍순덕 · 이종태

경북대학교 자연과학대학 미생물학과  
(1986년 1월 30일 수리)

## Cloning of *Bacillus amyloliquefaciens* amylase gene using YRp7 as a vector

### II. Expression of cloned amylase gene in *Saccharomyces cerevisiae*

Jung Hwn Seu, Young Ho Kim, Do Youn Jun, Young Seuk Bae,  
Soon Duck Hong and Jong Tae Lee

Department of Microbiology, Kyungpook National University, Taegu, Korea  
(Received January 30, 1986)

Hybrid plasmid pEA24, shuttle vector YRp7 carrying amylase gene of *Bacillus amyloliquefaciens*, was transformed to yeast *Saccharomyces cerevisiae*, and the expression of *B. amyloliquefaciens* amylase gene in yeast was investigated. The frequency of transformation to *S. cerevisiae* DBY747 with YRp7 was increased by treatment of 40% polyethylene glycol (MW 4,000), pH 7.0, at 30°C, and by regeneration used 2% top agar. The amount of cellular amylase activity produced by *S. cerevisiae* containing pEA24 was 2% of that secreted from *B. amyloliquefaciens*, but in case of *S. cerevisiae* transformant, the amylase secreted was not detected. A comparison of genetic stability of pEA24 and YRp7 plasmids in yeast was carried out by cultivation of transformants in tryptophan-supplement-medium. The pEA24 plasmid was more unstable than YRp7 in *S. cerevisiae*. The size of pEA24 extracted from *S. cerevisiae* transformants was found to be identical with that from *E. coli* transformants by agarose gel electrophoresis.

*E. coli*와 *S. cerevisiae*의 shuttle vector로는 YIp, YEp, YRp의 세가지 형태가 있으며<sup>(1,2)</sup>, 이들 모두 *E. coli*와 *S. cerevisiae* 양쪽에서 형질발현이 가능하다. 본 실험의 vector로 사용한 YRp7은 pBR 322 plasmid에 *S. cerevisiae*의 *ars 1*과 *trp 1* 유전자를 hybrid시켜 놓은 것으로서, *E. coli*에서는 항생물질내성(Ap<sup>r</sup>, Tc<sup>r</sup>)을 *S. cerevisiae*내에서는 영양요구보완성(Trp<sup>+</sup>)을 각각 gene marker로 사용할 수 있을 뿐만 아니라, 제한효소 BamHI의 절단 위치가 하나이기 때문에 이 자리에 외부의 유전자

가 삽입되면 Tc<sup>r</sup>로 되어 외부 유전자의 삽입 여부를 쉽게 알 수 있다.

지금까지 효모에 형질전환시키는 방법으로는 효모를 spheroplast로 만든 후 polyethylene glycol을 사용하는 방법<sup>(3)</sup>과 1가 양이온이나 2가 양이온의 금속염을 처리한 intact 세포를 사용하는 방법<sup>(4,5)</sup>이 알려져 있다.

본 실험에서는 YRp7 vector에 *B. amyloliquefaciens*의  $\alpha$ -amylase 유전자를 cloning하여 조작한 pEA 24<sup>(6)</sup>를 Spheroplast법<sup>(3)</sup>으로 *S. cerevisiae*에

**Table 1. List of strains and vector plasmids used.**

Strain	Genotype
<i>S. cerevisiae</i> DBY747	a, his3, leu2, ura3, trp1
<i>S. cerevisiae</i> D13-1A	a, his3, trp1, gal2
<i>E. coli</i> C600	F <sup>-</sup> , thi-1, thr-1, leuB6, lac-Y1, ton A21, supE44, λ <sup>-</sup>
Plasmid	
YRp 7	Ap <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup> , trp 1
pEA 24	Ap <sup>r</sup> , trp 1, amy <sup>+</sup>

형질전환시켜 *S. cerevisiae* 내에서 amylase 유전자의 발현성과 plasmid의 안정성을 조사함과 아울러 형질전환 조건을 검토하였기에 보고하는 바이다.

**재료 및 방법**

**공시균주 및 plasmid**

Plasmid 受容酵母는 *Saccharomyces cerevisiae* DBY 747과 *S. cerevisiae* D13-1A를 사용 하였고, plasmid는 YRp 7 과 pEA 24 (YRp 7 에 *Bacillus amyloliquefaciens*의 amylase 유전자를 cloning시킨 plasmid, 제 I 보 참고)를 각각 *E. coli* C 600 및 *E. coli* HB 101로 부터 추출하여 사용하였으며, 이들 각각의 gene marker는 Table 1 과 같다.

**배지**

Plasmid를 가지는 *E. coli* C 600은 ampicillin이 50 μg/ml 함유된 LB 배지<sup>(7)</sup>에서 배양하였다. *S. cerevisiae*의 spheroplast 생성을 위해서는 YED 배지<sup>(8)</sup>를, DNA 추출을 위해서는 SD 배지<sup>(9)</sup>에 tryptophan의 필요한 영양요구물질을 첨가한 배지에서, 형질전환체를 분리하기 위한 선택배지로서는 SD 배지에 1 M sorbitol 을 첨가하여, 그리고 amylase 생성을 위해서는 YPS (yeast extract 0.5%, polypeptone 0.5%, 가용성 전분 1%, 증류수) 배지를 사용하였다.

**DNA 추출 및 정제**

*E. coli* C 600으로 부터 plasmid YRp 7 과 pEA 24의 추출은 Birnboim등 (1979)<sup>(10)</sup>의 방법에 따라, 그리고 *S. cerevisiae*로 부터 plasmid DNA의 추출은 Devenish등 (1982)<sup>(11)</sup>의 방법에 따라 행하였다.

***S. cerevisiae*의 형질전환**

*S. cerevisiae*의 형질전환은 Himmen등 (1978)<sup>(3)</sup>의 방법을 수정하여 사용하였으며, 이때 형질전환빈도는 선택배지상에 나타나는 colony 수의 완전 배지에 나타나는 colony 수에 대한 비로써 나타내었다.

**Amylase 효소 용액의 조제**

pEA 24가 형질전환된 *S. cerevisiae*를 50ml의 SD 배지에서 3 일 동안 배양하여 균체를 회수하고 이를 10 mM CaCl<sub>2</sub>가 함유된 0.1M citrate phosphate 완충액 (pH 6.5)으로 2 회 씻은 후 동일완충액 10 ml에 현탁하였다. 이를 sonication하여 세포를 파쇄시킨 다음 10,000 rpm에서 원심분리한 후 상등액을 효소용액으로 사용하였다. *B. amyloliquefaciens*의 amylase는 가용성 전분을 1% 첨가한 LB 배지<sup>(7)</sup>에서 3 일 동안 배양한 배양의액을 효소용액으로 사용하였다.

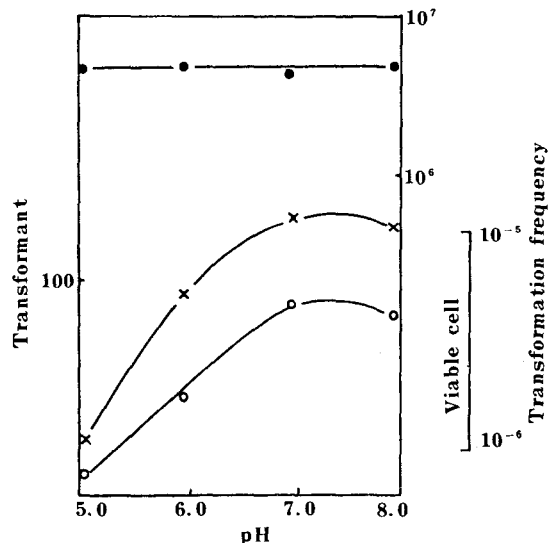
**Amylase의 활성도 측정**

생성된 amylase의 활성도는 CaCl<sub>2</sub> 10 mM을 함유한 0.1M citrate phosphate 완충액 (pH 6.5) 0.5 ml, 1% 전분용액 0.5 ml, 효소용액 0.5 ml를 각각 혼합한 반응액을 37°C에서 1 시간 반응시킨 다음 100°C 열탕에서 보정하고 10분간 열처리하여 효소반응을 정지시켰으며, 반응액 0.5 ml를 취하여 Somogyi-Nelson법<sup>(12)</sup>으로 측정하여 1 시간 동안에 효소반응액 1 ml당 1 μg의 환원당을 생성하는 효소량을 1 unit로 표시하였다.

**결 과**

**형질전환의 조건**

pEA 24를 *S. cerevisiae*에 형질전환시키기 위해서, 먼저 YRp 7을 이용한 *S. cerevisiae* DBY 747의 형질전환 최적조건을 검토하였다. 형질전환에



**Fig. 1. Optimal pH on the transformation of *S. cerevisiae* DBY 747 with YRp 7.**

○—○; Transformant ●—●; Viable cell  
×—×; Transformation frequency

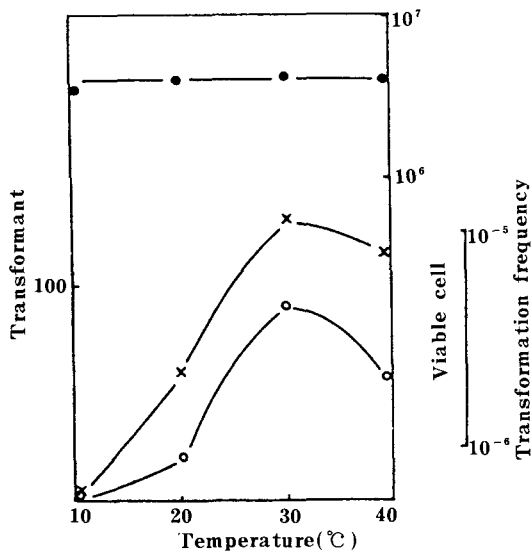


Fig. 2. Optimal temperature on the transformation of *S. cerevisiae* DBY 747 with YRp 7.

○—○; Transformant ●—●; Viable cell  
×—×; Transformation frequency

대한 최적 pH와 온도는 Fig. 1 과 Fig. 2 에서 보듯  
바와 같이 pH 7~8과 30°C였다. 분자량 4,000의  
PEG 를 사용하여 최적농도를 조사하여 본 바 PEG  
40%에서 형질전환 빈도가 최고로 나타났고(Fig. 3),  
중증도말시 사용하는 top agar의 최적농도를 조사

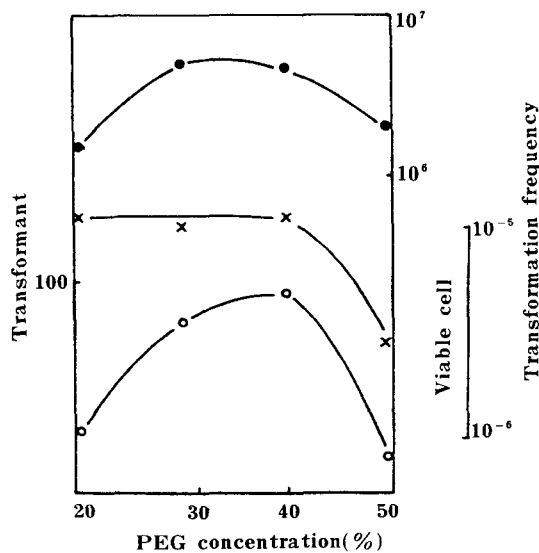


Fig. 3. Optimal concentration of polyethylene glycol on the transformation of *S. cerevisiae* DBY 747 with YRp 7.

○—○; Transformant ●—●; Viable cell  
×—×; Transformation frequency

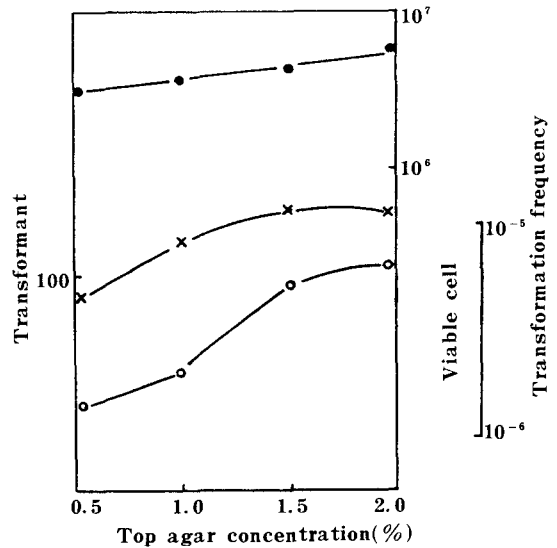


Fig. 4. Optimal concentration of top agar on the transformation of *S. cerevisiae* DBY 747 with YRp 7.

○—○; Transformant ●—●; Viable cell  
×—×; Transformation frequency

하여 본 결과 2% 농도까지는 agar의 농도가 높을  
수록 형질전환빈도가 높게 나타났다(Fig. 4).

*S. cerevisiae* 에서의 amylase생성

pEA 24 plasmid가 형질전환된 *S. cerevisiae* D-  
BY 747과 D13-1A로 부터 생성된 amylase를 Som-  
ogyi-Nelson법으로 측정하였다. Sonication으로 추  
출한 세포내효소의 amylase활성을 측정해본 결  
과, Table 2 에서 보는 바와 같이 YRp7 이 들어  
있는 형질전환주에서는 amylase의 활성이 없었으  
나 pEA 24의 형질전환주에서는 약간의 amylase 환  
성을 나타내었으며, 이때 *B. amyloliquefaciens* 의  
amylase활성은 2,800 unit 이었다. 그리고 이들 형질  
전환주의 배양외액으로 부터는 amylase활성을 검출  
할 수 없었다(data 생략).

또한 이들의 amylase활성을 starch plate상에서

Table 2. Amylase production by *S. cerevisiae* transformants.

<i>S. cerevisiae</i> DBY 747 (YRp 7)	— (Unit)
DBY 747-1 (pEA 24)	.65.6
DBY 747-5 (pEA 24)	19.2
D 13-1A-11 (pEA 24)	12.0
D 13-1A-12 (pEA 24)	.18.4

1 unit is amount of enzyme which releases 1 μg  
/ml of reducing sugar per hour.

**Table 3. Plasmid stability in *S. cerevisiae* transformants.**

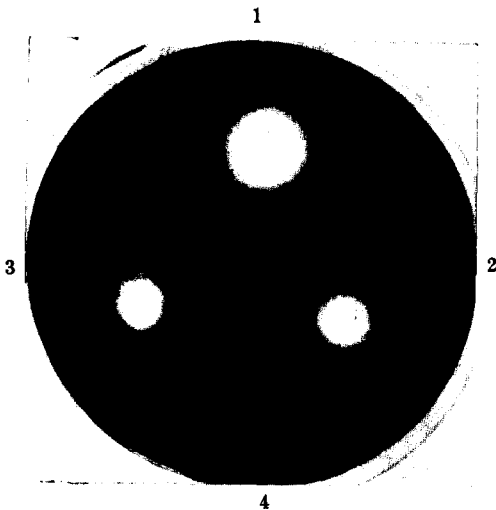
Strain	Time of transfer culture		
	1	2	3
<i>S. cerevisiae</i>			*
DBY 747 (YRp 7)	96.2	90.7	79.3
DBY 747-1 (pEA 24)	91.6	85.3	64.8
DBY 747-5 (pEA 24)	90.8	81.8	70.2
D 13-1A (YRp 7)	97.5	90.3	83.8
D 13-1A-11 (pEA 24)	60.2	55.6	37.9
D 13-1A-12 (pEA 24)	45.5	22.4	8.5

\*  $\frac{\text{Colony number on selective medium}}{\text{Colony number on complete medium}} \times 100 (\%)$

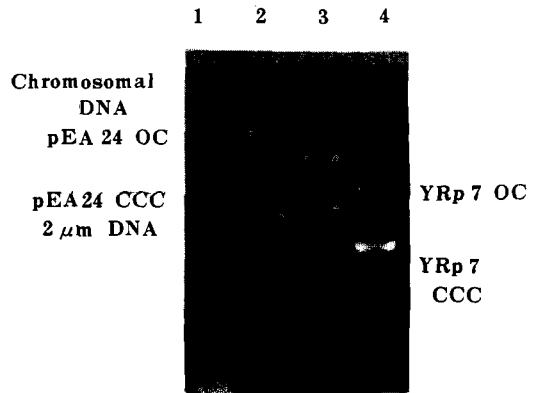
iodine 으로서 확인하였다. 즉 10mM CaCl<sub>2</sub> 가 함유된 0.1M citrate phosphate 완충액 (pH 6.5) 에 0.5% 가용성 전분과 0.8% agar 를 용해시켜 agar plate 를 만든 후, 그 위에 조제한 효소용액을 0.1ml 씩 증충시켰다. 이들을 37°C 에서 2 시간 반응시킨 다음 iodine 용액 으로서 발색을 시켜본 결과, Fig. 5 에서 보는 바와 같이 pEA 24 의 형질전환주에서는 amylase 활성이 나타났다.

***S. cerevisiae* 내에서 plasmid 의 안정성**

pEA 24 와 YRp 7 의 형질전환주를 완전배지에 이틀 간격으로 계대배양하면서 그때마다 tryptophan



**Fig. 5. The zones of starch hydrolysis by amylase produced by 1, *B. amyloliquefaciens*; 2, *S. cerevisiae* D13-1A-12(pEA 24); 3, *S. cerevisiae* DBY747-1(pEA 24); 4, *S. cerevisiae* DBY747(YRp 7).**



**Fig. 6. Electrophoretic pattern of pEA24 and YRp7.**

Samples were separated in 0.7% agarose: 1, *S. cerevisiae* DBY747; 2, *S. cerevisiae* DBY747-1 (pEA 24); 3, pEA 24 from *E. coli*; 4, YRp7 from *E. coli*.

을 함유한 완전배지와 tryptophan 을 함유하지 않은 선택배지에 일정량씩 도말한 후 생육하는 colony 수의 비로써 plasmid 의 안정성을 조사하였다. 완전배지에 생육하는 세포수에 대한 선택배지에 생육하는 세포수의 백분율을 비교하여 본 결과 Table 3 에서 보는 바와 같이 pEA 24 가 YRp 7 보다 더 불안정하였으며, 계대배양 회수가 많아질수록 plasmid 의 소실이 많았다. 또한 pEA 24 는 *S. cerevisiae* D13-1A 균주 보다는 *S. cerevisiae* DBY747 균주 내에서 더 안정하게 유지됨을 알았다.

**Plasmid DNA 의 전기영동**

YRp 7 에 *B. amyloliquefaciens* amylase 유전자를 cloning 하여 얻은 hybrid plasmid pEA 24 를 *S. cerevisiae* DBY 747 에 형질전환시켜 얻은 형질전환주 중 가장 amylase 활성이 높은 *S. cerevisiae* DBY 747-1 에서 추출한 plasmid DNA 를 0.7% agarose gel 상에서 전기영동하여 그 band 를 관찰하였으며, 이때 완충액은 TBE 완충액 (pH 8.2) 을 사용하였다. Fig. 6 에서 보는 바와 같이 *S. cerevisiae* 에서도 *E. coli* 에서와 동일 위치에 pEA 24 DNA band 를 관찰할 수 있었으며, *S. cerevisiae* DBY 747 에서는 chromosomal DNA 의 2 μm plasmid 가 확인되었다.

**고 찰**

*B. amyloliquefaciens* 의 α-amylase 유전자의 *S.*

*S. cerevisiae* 내에서 발현을 조사하기 위하여 *amylase gene hybride plasmid*인 pEA 24를 *S. cerevisiae*에 형질전환시켰다. 이때 YRp7으로서 *S. cerevisiae*의 형질전환 최적 조건을 검토하였다. 보고된 바에 의하면 plasmid vector의 종류에 따라서 DNA  $\mu\text{g}$ 당 YIp형은  $10^{-7}$ , YEp형은  $10^{-8}$ , YRp형은  $10^{-6}$  빈도로 형질전환주가 나타난다고<sup>(13)</sup> 하며, Johnston J. 등(1981)<sup>(14)</sup>에 의하면 수용체에 따라서도 형질전환빈도의 변화가 심하여 같은 조건에서도  $10^2$ 배 정도의 차이가 생길 수 있다고 한다. 본 실험에서는 Hinnen<sup>(8)</sup> 등의 방법에 따라 형질전환시켰으며 최적 조건에서 DNA  $\mu\text{g}$ 당 100개 정도의 형질전환주를 얻었으며 이때 형질전환빈도는  $10^{-8}$ 이었다. 형질전환율이 다른 보고에 비해 낮은 이유는 실험조작상 top agar의 농도를 2%까지 밖에 높일 수 없었으며, Hinnen 등,<sup>9</sup> 이 사용한 3% agar를 첨가한 YPD 재배지는 선택배지로 사용될 수 없었기 때문인 것으로 추측된다.

*E. coli*에서  $\alpha$ -amylase 유전자가 들어 있음이 확인된 pEA 24의 *S. cerevisiae* 형질전환주로 부터 amylase 생성여부를 조사해본 결과 아주 약하지만 그 활성을 검출할 수 있었으나 *B. amyloliquefaciens*의 amylase 활성에 비해 최고 약 2% 정도였다. Beburow 등(1983)<sup>(15)</sup>이 YEp 13에 *B. amyloliquefaciens*의 amylase 유전자를 cloning 했을 때도 정량적인 활성측정은 하지 않았으나 약간의 amylase 활성을 검출할 수 있었다고 보고하고 있는데, 이렇게 amylase 생성이 약한 것은 *S. cerevisiae* 내에서  $\alpha$ -amylase 유전자의 형질발현이 어렵거나, 생성된 amylase가 *S. cerevisiae* 내의 proteinase들에 의해 분해되기 때문이 아닌가 추측된다.

*S. cerevisiae* 내에서 벡터 plasmid의 안정성에 대해서 이미 보고된 바에 의하면, 비선택배지에서 15세대 생육시킨 후 YIp 형은 1%<sup>(11)</sup>, YEp 형은 97%<sup>(11)</sup>, YRp 형은 80~90%<sup>(13)</sup>가 형질전환주로 부터 소실된다고 하였다. 이때 YRp 형은 선택배지에서도 50~70%<sup>(13)</sup>가 소실되어 ars 제 벡터의 단점으로 지적되고 있다. 본 실험에서 형질전환주를 비선택배지상에서 이를 간격으로 계대배양하여 pEA 24의 안정성을 조사한 결과 3회 계대배양하였을 경우 최고 91% 정도 plasmid가 소실되는 것도 있었으나, 대체적으로 YRp 7과 비교하였을 때 불안정하였다. 이것은 더 많은 외부의 유전자를 지닌 pEA 24의 replication 속도가 숙주보다 늦어서 숙주의 세포분열시 함께 분리되기 힘들거나, 외부 유전자에 대한 숙주의 방어기작 때문이 아닌가 추측된다. 이상의 실험 결과로 보아 원핵생물의 유전자도 진핵세포 내에서

비록 미약하긴 하지만 형질발현 됨을 알 수 있으며, 그 안정성 및 발현을 높이기 위해서는 *S. cerevisiae* 내에서 안정하게 유지되면서도 복제수가 많은 벡터의 개발과 함께 발현시키려는 유전자 앞 부분에 숙주세포의 promoter 유전자를 연결하는 방법들이 고려되어야 할 것이라고 생각한다.

## 요 약

*B. amyloliquefaciens*의  $\alpha$ -amylase 유전자가 *S. cerevisiae* 내에서 형질발현하는 가를 조사하기 위하여 본 연구에서 YRp 7 plasmid에 *B. amyloliquefaciens* amylase 유전자를 cloning하여 만든 pEA 24를 형질전환시켰다. 먼저 YRp 7 plasmid를 이용하여 형질전환 최적 조건을 검토하여 본 바, pH 7과 8 사이, 반응온도 30°C에서 40%의 polyethylene glycol(MW 4,000)을 처리한 후 2%의 agar를 함유한 재배지에 증충도말 하였을 때 형질전환율이 가장 높았다.

형질전환주로 부터 생성된 amylase의 활성을 측정 한 결과, *S. cerevisiae*에서 약간의 amylase 활성을 나타내어 최고 *B. amyloliquefaciens*의 2% 정도였고, 세포외효소는 검출되지 않았다. 이들 형질전환주가 가지고 있는 pEA 24 plasmid의 안정성을 조사한 결과 YRp 7보다 불안정하였으며, 추출한 DNA를 전기영동하여 그 band를 확인하였다.

## 사 사

본 연구는 1984년도 한국과학재단 차관연구비(amylase 유전자를 cloning한 효모분비 vector의 개발 및 응용)에 의해서 수행된 연구의 일부이며 관계하신 여러분께 깊은 감사사를 드리는 바입니다.

## 참고문헌

1. Struhl, K., D. T. Stinchcomb, S. Scherer and R. W. Davis: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **76**, 1035 (1979).
2. Scott, J. F.: *Basic Life Sciences*, (Hollaender, A., ed.) Plenum, New York, Vol. 19, 75 (1982).
3. Hinnen, A., J. B. Hicks and G. R. Fink: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **75** (4), 1929 (1978).
4. Imura, Y., K. Gotoh, K. Ouchi and T. Nishiyama: *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 857 (1983).
5. 伊藤久生, 村田幸作, 木村光: *化学と生物*, Vol. 21, 53 (1983)
6. Seu, J. H., Y. H. Kim, D. Y. Jun, S. D. Hong and Y. L. Jo:

- Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, in Press (1986).
7. Maniatis, T., E. F. Fritsch and J. Sambrook: *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1st ed., (1982).
  8. Ratzkin, B. and J. Carbon: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **74** (2), 487 (1977).
  9. Sherman, F., G. R. Fink and J. B. Hicks: *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1st ed., (1982).
  10. Birnboim, H. C. and J. Doly: *Nucleic Acids Res.*, **7**, 1513 (1979).
  11. Devenish, R. J. and C. S. Newlon: *Gene*, **18**, 277 (1982).
  12. Ando, E., H. Terayama, K. Nishizawa and T. Yamakawa: *Biochemical Research Method*, Asakura press, Tokyo, Vol. 1, 126 (1967).
  13. Beggs, J. D.: *Genetic Engineering*, (Williamson, R., ed.) Academic Press, London, Vol. 2, 175 (1981).
  14. Johnston, J., F. Hilger and R. Mortimer: *Gene* **16**, 325 (1981).
  15. Beburow, M. Yu., T. F. Gorozhankina. A. V. Sorokin and A. I. Stepanov: *Protoplasts 1983 Poster Proceedings* (Potrykus, I., C. T. Harms, A. Hinnen, R. Hütter, P. J. King and R. D. Shillito), Birkhauser Verlag Basel, Basel, 354 (1983).