

## *Lactobacillus casei*의 Phospho- $\beta$ -galactosidase 유전자의 지도작성과 *Escherichia coli* 내에서의 발현

박정희 · 문경희 · 민경희\*

숙명여자대학교 이과대학 생물학과, 서울대학교 분자미생물학 연구센터

*Lactobacillus casei* SM-M1의 플라스미드로부터 phospho- $\beta$ -galactosidase gene을 갖는 DNA를 *E. coli*에 클로닝한 pPLac15(13 kb)의 재조합 플라스미드를 제조하였다(15). pPLac15 DNA를 분리하여 제한효소로 처리하여 제한효소 지도를 작성하였다. Phospho- $\beta$ -galactosidase 유전자의 발현을 높이기 위하여 *lac* promoter를 가진 pUC18의 *Pst*I 위치에 클로닝하여 pPLac18을 제조하였으며, 이것을 다시 *Eco*RI으로 절단하여 pUC18에 클로닝하여 얻은 pPLac23(7.6 kb)를 얻었다. Phospho- $\beta$ -galactosidase 효소활성은 pPLac23의 형질전환주인 *E. coli* SW-23에서는 pPLac15를 가진 형질전환주인 *E. coli* SW-15보다 약 1.8배의 효소의 활성을 나타내었으며 pPLac18을 가진 *E. coli* SW-18보다는 약간 높은 활성을 나타내었다.

KEY WORDS □ Phospho- $\beta$ -galactosidase gene, mapping and expression

유당을 이용할 수 있는 대부분의 세균에서 유당은 lactose permease에 의하여 능동 수송된 다음,  $\beta$ -galactosidase에 의하여 glucose와 galactose로 분해된다(6, 8). 그러나 *Staphylococcus*와 *Streptococcus*의 일부 균주들은 유당의 수송은 phosphoenol-pyruvate (PEP)-dependent lactose-phospho-transferase system(lactose-PTS)에 의하여 group translocation 되며, 세포막 통과시 유당은 lactose-6-phosphate로 전환되어 phospho- $\beta$ -galactosidase에 의하여 glucose와 galactose-6-phosphate로 분해된다(12, 16). 이어서 galactose-6-phosphate는 EMP pathway를 거치게 된다(3).

한편 lactic acid bacteria로부터 유당을 이용할 수 있는 플라스미드를 분리할 수 있었으며, phospho- $\beta$ -galactosidase의 유전자가 이 플라스미드상에 있는 것으로 확인되었다(2, 9, 13, 14).

본 저자들은 유산균인 *Lactobacillus casei*으로부터 플라스미드(60 Kb)를 분리하였으며, phospho- $\beta$ -galactosidase 유전자가 이 플라스미드상에 있음을 확인하였다. 이 플라스미드 DNA를 *Pst*I으로 절단하여 pBR322에 클론한 결과, *Pst*I 인식부위를 갖는 재조합 플라스미드에서 phospho- $\beta$ -galactosidase 활성을 나타냈으며, 이 재조합 플라스미드를 pPLac15(13 kb)라 하고, 이것을 갖는 균주를 *E. coli* SW15라고 명명하였다(15).

본 실험에서는 형질전환된 *E. coli*로부터 phospho- $\beta$ -galactosidase 유전자가 포함된 재조합 플라스미드인 pPLac15를 분리한 후, 여러가지 제한효소를 이용하여 제한효소 지도를 만들고, pPLac15로부터 *Pst*I

절편을 분리하여 pUC18에 재클로닝시켰다. 그리고 이미 알려진 제한효소 지도에 따라 적당한 효소를 선택하여 써브클로닝 함으로서 불필요한 부분을 제거하고 순수한 phospho- $\beta$ -galactosidase gene의 최소한의 크기에 접근하도록 시도하였다. 한편 이 유전자가 강력한 *lac* promoter를 가지는 pUC18 vector내에 클로닝 되었을 때 *E. coli* 세포내에서의 이 유전자의 발현을 검토하였다.

### 재료 및 방법

#### 균주 및 플라스미드

본 실험에서 사용한 *Escherichia coli* SW-15은 *Lactobacillus casei*의 phospho- $\beta$ -galactosidase 유전자가 포함된 재조합 플라스미드 pPLac15를 갖는 형질전환주이다. 그 외에 본 실험에서 사용한 균주와 플라스미드 DNA의 종류 및 특성은 Table 1에서 보여주는 바와 같다.

#### 배지 및 시약

*E. coli*와 형질전환주들의 특성 연구에 사용한 배지는 Luria-Bertani(LB/LA) 배지, M9 배지, LA에 X-GAL(5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside)이 포함된 X-GAL 배지를 사용하였고, phospho- $\beta$ -galactosidase의 활성측정을 위한 배지로는 LL 배지(LB+1% lactose)를 이용하였다. *o*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside-6-phosphate(ONPG-6-P)는 Sigma Chemical Co., 그리고 calf intestinal alkaline phosphatase(CIP), restriction endonucleases 와 T4 DNA ligase 등은 Bethesda Research Labo-

**Table 1.** Bacterial strains and plasmids

Strains and plasmids	Relevant genotype	Sources and refernces
<i>Lactobacillus casei</i>		
SW-M1	pPLac(Lac <sup>+</sup> )	14
<i>Escherichia coli</i>		
JM83	<i>ara(lac-pro AB), rspL(=strA), ø80, lacZΔM15</i>	Department of Microbiology, Seoul National university
SW-15	pPLac15(13 kb)	14
SW-18	pPLac18	This experiment
SW-23	pPLac23	This experiment
Plasmids		
pPLac	Lac <sup>+</sup> (60 kb)	14
pPLac15	Lac <sup>+</sup> , Tc <sup>r</sup> (13 kb)	14
pPLac18	Lac <sup>+</sup> (11.4 kb)	This experiment
pPLac23	Lac <sup>+</sup> (7.6 kb)	This experiment
pBR322	Ap <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>	
pUC18	Ap <sup>r</sup>	

ratories Inc.로부터 구입하였다.

**DNA 분리와 정제**

플라스미드는 Maniatis 등(11)과 Birnboim과 Doly(1979)의 방법에 따라 분리하였으며, 정제는 Maniatis(11)와 Klenhammer와 Sutherland(7)의 방법에 따랐다.

**pPLac15의 제한효소 지도 작성**

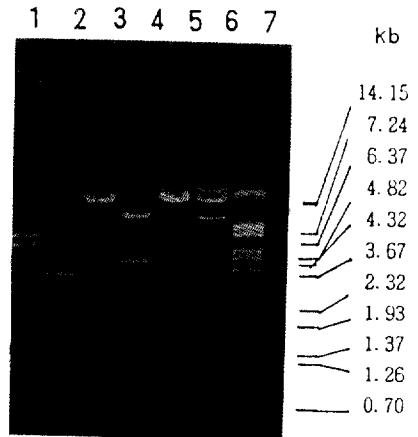
사용한 제한효소는 *Bcl*I, *Bgl*III, *Cla*I, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hind*III, *Hin*I, *Kpn*I, *Pst*I, *Sal*I, *Sau*3A, and *Xba*I이며, DNA의 농도는 전체 용량 15 µl 내에 0.5 µg 되게 하여 반응시켰으며 *Bcl*I의 경우는 60°C, 그 외의 모든 제한효소는 37°C에서 2시간 반응시켰다. 단일 소화된 절편을 전기영동하여 gel상의 DNA 이동거리를 측정하여 DNA 표준절편(λ/*Bst*EII, λ/*Hind*III)과 비교 분석하여 각 절편들의 크기를 추정하였으며, 단일 소화로 결정하기 어려운 절편은 효소 상호간의 이중 절단을 통하여 그 크기를 추정하여 제한효소 지도를 작성하였다.

**Phospho-β-galactosidase 유전자의 써브클로닝**

pPLac18을 제한효소로 소화하고 별도로 pUC18을 동일한 효소로 처리하여 CIP로 처리한 다음, pUC18 DNA와 ligation 시켰다. 수용세포인 *E. coli* JM83의 제조와 형질전환은 Maniatis(11) 등의 방법에 따랐다. 형질전환주들은 ampicillin이 포함되어있는 X-GAL 배지나 LA 배지에 심어서 외부 DNA가 들어간 클론만을 선별하였다.

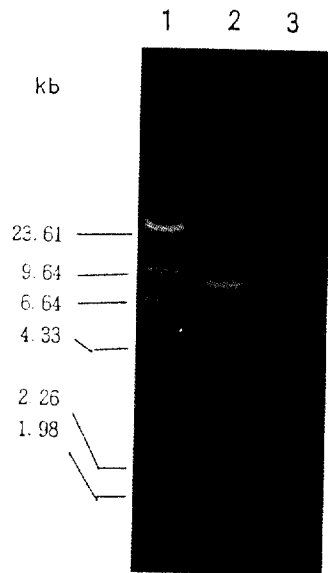
**Phospho-β-galactosidase의 효소역가 측정**

Phospho-β-galactosidase의 효소역가를 측정하기 위한 무세포 추출액은 Jimeno 등(5)의 방법에 의하여 제조하였다. Specific activity는 단백질 mg당 1분간에 방출된 ONP(*o*-Nitrophenyl-β-D-galactopyranoside)의 양으로 나타내었다.



**Fig. 1.** Restriction pattern of pPLac15 by various restriction endonucleases.

Lane 1: pPLac15/*Eco*RI. Lane 2: pPLac15/*Hind*III. Lane 3: pPLac15/*Kpn*I. Lane 4: pPLac15/*Pst*I. Lane 5: pPLac15/*Sal*I. Lane 6: pPLac15/*Xba*I. Lane 7: Size marker λ/*Bst*EII



**Fig. 2.** Restriction pattern of pPLac15 by various restriction endonucleases.

Lane 1: Size marker λ/*Hind*III. Lane 2: pPLac15/*Cla*I. Lane 3: pPLac15/*Eco*RV

**단백질 정량**

단백질 정량은 Lowry 등(10)의 방법에 의하여 측정하였다.

**결과 및 고찰**

**pPLac15의 제한효소 지도 작성**

**Table 2.** Molecular sizes of fragments generated from pLac15 plasmid DNA (13 kb) by various restriction endonucleases

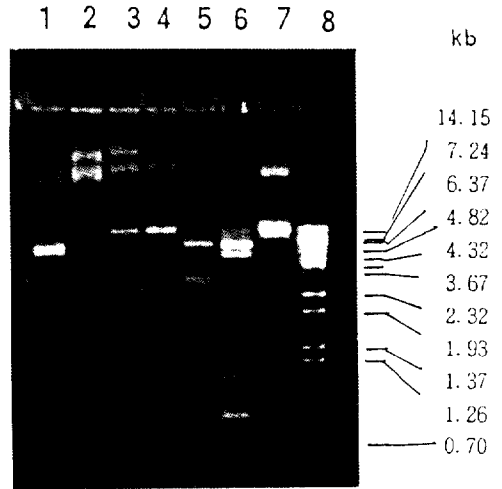
Restriction endonucleases	Sizes of fragments (kb)					
<i>ClaI</i>	8.07	3.66	1.27			
<i>ClaI/EcoRI</i>	4.9	3.66	1.27	1.0	0.9	0.27
<i>ClaI/PstI</i>	7.3	3.53	1.27	0.77	0.13	
<i>EcoRI</i>	6.2	4.9	1.0	0.9		
<i>EcoRI/PstI</i>	4.9	3.7	2.5	1.0	0.66	0.24
<i>EcoRV</i>	6.0	3.78	2.22	1.0		
<i>EcoRV/EcoRI</i>	4.9	3.78	1.2	1.0	1.0	
<i>EcoRV/PstI</i>	5.17	3.55	2.22	1.0	0.83	0.23
<i>KpnI</i>	13					
<i>KpnI/EcoRI</i>	6.2	2.55	2.35	1.0	0.9	
<i>HindIII</i>	3.7	2.8	1.65	1.2	1.1	0.85 0.8 0.7 0.2
<i>PstI</i>	8.7	4.3				
<i>XbaI</i>	13					
<i>XbaI/EcoRI</i>	6.2	4.9	1.0	0.75	0.15	

pLac15 재조합 DNA는 전체의 크기가 13 kb이며 외래 DNA만은 8.7 kb로 되어 있다. 이 pLac15의 제한효소 작성을 위하여 이 재조합 DNA를 순수 분리하여 한 가지 종류의 제한 효소로 절단한 결과, *BclI*, *BglII*와 *SalI*의 인식 부위는 없었으며, *ClaI*은 3개의 절편, *EcoRI*은 4개의 절편, *EcoRV*는 4개(Fig. 1, 2, Table 2), 그러나 *HindIII*는 9개, *HinII*은 7개, *Sau3A*는 10개의 절편을 생성하였으므로 본 연구에서는 제외시켰다.

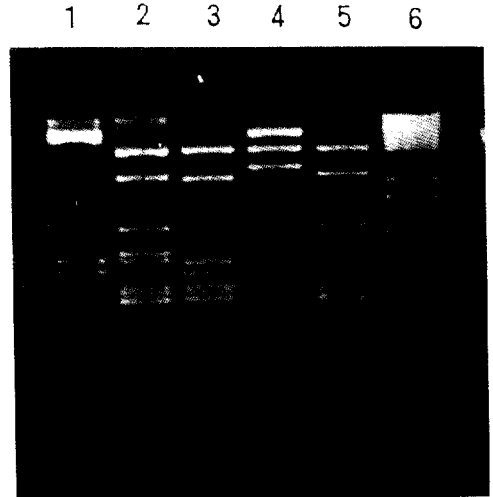
*XbaI*과 *KpnI*의 경우, pBR322에 인식 부위가 없으므로 절단여부를 알 수 없으므로, *KpnI/EcoRI*, *XbaI/EcoRI*, *XbaI/HindIII*으로 이중 절단하였다(Fig. 3). *EcoRI*의 위치를 결정하기 위해, *PstI*과 이중 절단하였으며(Fig. 4, Table 2). *ClaI*과 *EcoRI*의 인식 부위도 이중 절단하여 결정하였다(Fig. 5, Table 2). *HindIII*는 인식부위가 너무 많아 그 위치를 결정하기가 매우 어려웠다. pLac15를 *EcoRV*로 절단한 경우 항상 2가지 양상을 나타내었는데(Fig. 5의 B, C), Fig. 5의 C가 정확한 결과라고 생각된다.

이상의 절단 양상을 가지고 *λBstEII*나 *λ/HindIII* 절편의 DNA 이동거리를 측정하여 표준곡선을 만들고 각 절편들의 정확한 크기를 추정하였다. Fig. 1, 2, 3과 Table 2에 의하여 전체적인 재조합 플라스미드 pLac15의 잠정적인 제한효소 지도는 Fig. 6에서 보여주는 바와 같다.

Lec 등(9)은 *Lactobacillus casei*로부터 분리한 플라스미드에서 클로닝하여 7.9 kb *PstI* 절편을 얻었으며, phospho-β-galactosidase 유전자를 갖는 이 DNA 절편의 제한효소 지도를 작성하였다. *PstI* 절편의 크기는 7.9 kb로 보고되었으나 본 연구의 결과 pLac15의 *PstI* 절편의 크기는 8.7 kb로 다른 결과를 보여주었다. 또한 Lee 등(19)의 제한효소 지도를 살

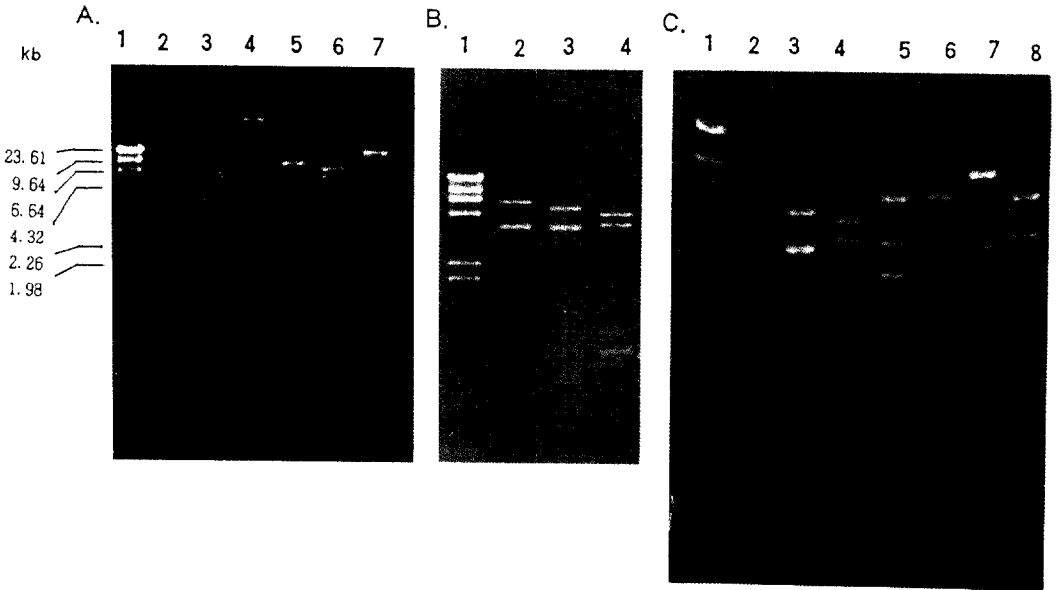


**Fig. 3.** Analysis of restriction enzyme recognition sites of pLac15 by double digestion  
Lane 1: *EcoRI*, Lane 2: *HindIII*, Lane 3: *KpnI*, Lane 4: *XbaI*, Lane 5: *KpnI/EcoRI*, Lane 6: *XbaI/EcoRI*, Lane 7: *XbaI/HindIII*, Lane 8: Size marker *λBstEII*

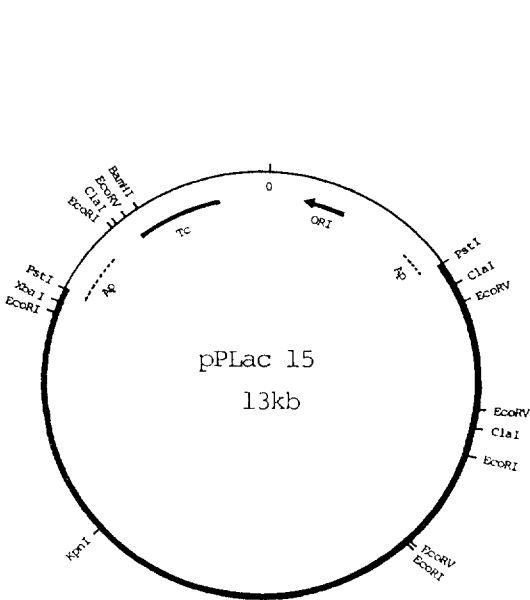


**Fig. 4.** Analysis of restriction enzyme recognition sites of pLac15 by double digestion.  
Lane 1: *EcoRI*, Lane 2: *HindIII*, Lane 3: *EcoRI/HindIII*, Lane 4: *PstI/EcoRI*, Lane 5: *PstI/HindIII*, Lane 6: Size marker *λBstEII*

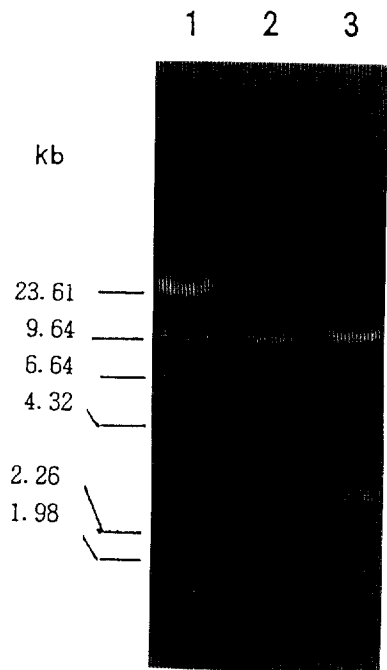
펴보면 *PstI* 절편 내에 *ClaI*과 *EcoRI* 절단부위가 하나이고, *KpnI* 절단부위는 2개로 나타났으나, 본 연구에서는 *ClaI*이 2부위, *EcoRI*은 3부위, *KpnI*은 1부위로 확인되었다. 따라서 본 연구의 *PstI* 절편의 제한효소 지도는 Lec 등(9)의 결과와 완전히 다른



**Fig. 5.** Analysis of restriction enzyme recognition sites of pPLac15 by double digestion.  
 A. Lane 1: Size marker  $\lambda$ HindIII. Lane 2: EcoRI/EcoRV. Lane 3: EcoRI/ClaI. Lane 4: PstI/EcoRV. Lane 5: PstI/ClaI. Lane 6: EcoRI. Lane 7: PstI  
 B. Lane 1: Size marker  $\lambda$ HindIII. Lane 2: EcoRV. Lane 3: PstI/EcoRV. Lane 4: EcoRI/EcoRV  
 C. Lane 1: Size marker  $\lambda$ HindIII. Lane 3: PstI/EcoRV. Lane 4: EcoRI/EcoRV. Lane 6: EcoRV. Lane 7: PstI/ClaI. Lane 8: EcoRI/ClaI



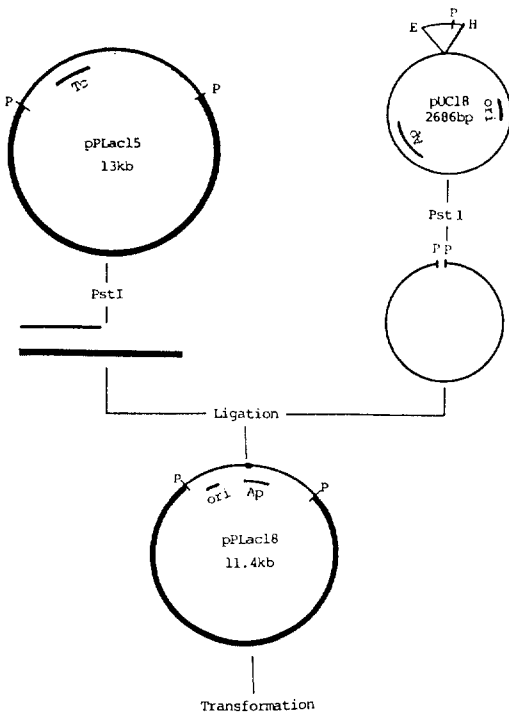
**Fig. 6.** Restriction map of the recombinant plasmid pPLac15. The PstI fragment(8.7 kb) of pPLac15 is indicated by the heavy line and the vector plasmid pBR322 by the thin line.



**Fig. 7.** Restriction pattern of pPLac15 and pPLac18 DNA by PstI. Lane 1: Size marker  $\lambda$ HindIII. Lane 2: pPLac15/PstI. Lane 3: pPLac18/PstI

**Table 3.** Specific activity of phospho-β-galactosidase in transformants

Transformants	Specific activity of phospho-β-galactosidase (μmole × 10 <sup>-1</sup> /min/mg protein)
<i>E. coli</i> JM83	0.00
<i>E. coli</i> SW-15	
(pPLac15/ <i>E. coli</i> JM83)	2.98
<i>E. coli</i> SW-18	
(pPLac18/ <i>E. coli</i> JM83)	4.95
<i>E. coli</i> SW-23	
(pPLac23/ <i>E. coli</i> JM83)	5.32



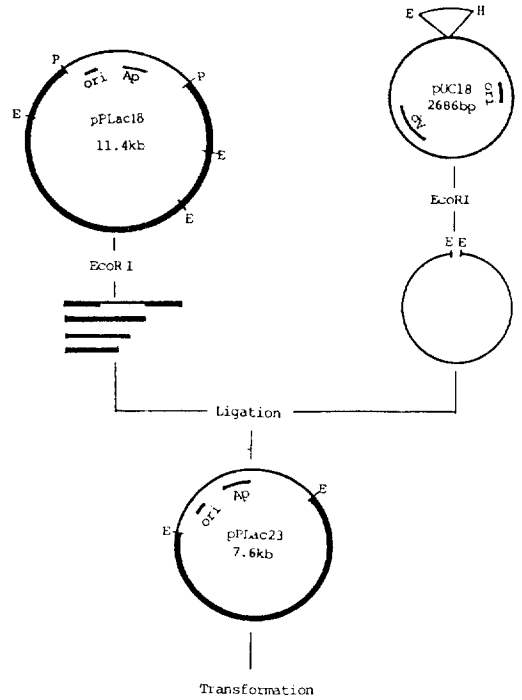
**Fig. 8.** Construction of recombinant plasmid pPLac18.

결과를 보여주고 있다.

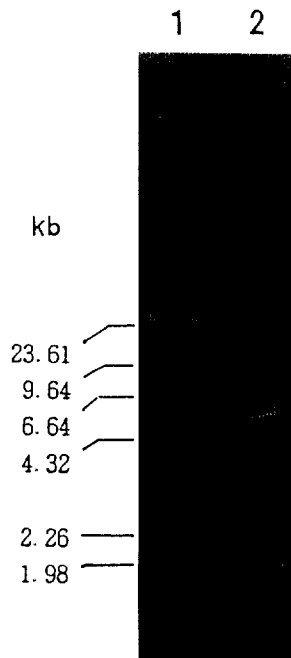
pPLac15의 phospho-β-galactosidase 유전자의 pUC18에로의 클로닝

pPLac15와 pUC18을 Pst I로 함께 절단한 뒤 random ligation 시킨 결과, 11.4 kb의 재조합 플라스미드를 만들었으며, 이 경우 외래 DNA는 역시 8.7 kb이며 이를 pPLac18로 명명하였다(Fig. 7). pPLac18을 가지는 *E. coli* SW-18의 무세포 추출액의 효소역가를 측정된 결과는 Table 3과 같으며, pPLac15를 가지는 *E. coli* SW-15보다 약 1.7배 정도 효소역가가 증가되었다.

pPLac18의 서브클로닝



**Fig. 9.** Construction of recombinant plasmid pPLac23.



**Fig. 10.** Restriction pattern of pPLac23 DNA by EcoRI. Lane 1; Size marker λ/HindIII, Lane 2; pPLac23/EcoRI

Fig. 6의 제한효소 지도에 따라 *ClaI*과 *EcoRI*을 선택하여 pPLac18을 절단하였으며, CIP로 처리된 pUC18과 ligation시켜 형질전환하였다. Ligation시 외부 DNA와 vector DNA를 함께 섞어 절단한 뒤 ligation 시킨 경우가, 각각의 DNA를 절단하여 ligation 시킨 경우보다 그 효율이 훨씬 더 높았다.

DNA를 *ClaI*으로 절단하여 형질전환한 경우, 첫 번째 *ClaI* 절단 절편(8.08 kb)는 크기가 크기 때문 인지는 몰라도 쉽게 ligation되지 않았으며, 그 외의 작은 절편들은 쉽게 ligation되었다. 이들을 다시 LA와 tetracycline, LA와 ampicillin plate에 심어서 ampicillin에 감수성인 클론만을 선별하였다.

DNA를 *EcoRI*으로 절단한 경우는 *E. coli* JM83에 형질전환시켰는데, 이들 중 ampicillin에 내성을 가지며 X-GAL 배지에서 푸른색을 내지 않는 클론만을 선별하여 이를 효소활성을 측정하여 pPLac23 DNA를 갖는 클론만을 선별할 수 있었다. 이 플라 스미드 pPLac23의 크기는 7.6 kb로 들어간 외래 DNA 크기는 4.9 kb이었으므로, 하나의 *EcoRI* 부위는 pBR322내에 있고, 외래 DNA 중의 *EcoRI* 절단부 위는 중간에 위치한 것으로 사료된다. 따라서 실제 phospho- $\beta$ -galactosidase가 포함된 외래 DNA는 4.9 kb보다도 작은 것으로 추측된다.

#### Phospho- $\beta$ -galactosidase의 효소 활성

Phospho- $\beta$ -galactosidase 유전자를 갖는 외래 DNA가 들어간 형질전환주인 *E. coli* SW-15(pPLac 15/*E. coli* JM83), *E. coli* SW-18(pPLac18/*E. coli* JM 83), 그리고 *E. coli* SW-23(pPLac23/*E. coli* JM83)의 무세포 추출액을 만든 다음, phospho- $\beta$ -galactosidase의 활성을 측정한 결과, pPLac23가 들어있는 *E. coli* SW-23에서 가장 높은 효소활성을 나타내었는데, 이 재조합 플라스미드는 두번째 *EcoRI* 절단절편(4.9 kb)를 갖는 것으로 나타났다.

Table 3에서 보는 것과 같이, pPLac23를 갖는 형질전환주 *E. coli* SW-23의 효소활성은 5.32 units  $\times$  10<sup>-1</sup>/min/mg protein으로 나타났으며, 이 결과는 최초의 pPLac15를 가진 *E. coli* SW-15보다 약 1.8배의 높은 효소활성을 보여주었다.

#### 참 고 문 헌

1. Birnboim, H.C. and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-1523.
2. Chassy, B.M., E.M. Gibson and A. Giuffrida. 1978. Evidence for plasmid-associated lactose metabolism in *Lactobacillus casei* subsp. *Curr. Microbiol.* 1. 141-144.

3. Dills, S.S., A. Apperson, M.R. Schmidt, and M.H. Saier, JR. 1980. Carbohydrate transport in bacteria. *Microbiol. Rev.* 44. 385-418.
4. Frederick, B. and G.C. Stexart. 1986. Cloning and expression of phospho- $\beta$ -galactosidase gene of *Staphylococcus* in *E. coli*. *J. Bacteriol.* 166. 1061-1066.
5. Jimeno, J., M. Casey, and F. Hofer. 1984. The occurrence of  $\beta$ -phospho-galactosidase in *Lactobacillus casei* strains. *FEMS Microbiol. Letters.* 25. 275-278.
6. Kennedy, E.P. 1970. The lactose permease system of *E. coli* in J.R. Beckwith and D. Zipper(ed), The lactose operon. Cold Spring Harbor Lab. New York.
7. Klaenhammer, T.R., and S.M. Sutherland. 1980. Detection of plasmid deoxyribonucleic acid in an isolate of *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Env. Microbiol.* 39. 671-674.
8. Lawrence, R.C., T.D. Thomas, and B.E. Terzaghi. 1976. Reviews of the progress of dairy science: cheese starters. *J. Dairy Res.* 43. 141-193.
9. Lee, Y.J., J.B. Hansen, E.K. Jagustyn, and B.M. Chassy. 1982. Cloning and expression of the  $\beta$ -D-phosphogalactoside galactohydrolase gene of *Lactobacillus casei* in *E. coli* K-12. *J. Bacteriol.* 152. 1138-1146.
10. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193. 269-275.
11. Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. Molecular cloning. CSH.
12. Mckay, L.L., L.A. Alter, W.E. Sandine, and P.R. Elliker. 1969. Involvement of phosphoenolpyruvate in lactose utilization by group N *Streptococci*. *J. Bacteriol.* 99. 603-610.
13. Mckay, L.L., K.A. Baldwin, and E.A. Zottola. 1972. Loss of lactose metabolism in *Lactic streptococci*. *Appl. Microbiol.* 23. 1090-1096.
14. Min, K.H., K.H. Moon, C.H. Park, T.H. Kim, and K.H. Min. 1989. Phospho- $\beta$ -galactosidase gene located on plasmid in *Lactobacillus casei*. *Kor. J. Microbiol.* 27. 181-187.
15. Moon, K.H., C.H. Park, S.Y. Choi, Y.M. Lee, T. H. Kim, and K.H. Min. 1989. Molecular cloning of phospho- $\beta$ -galactosidase gene of *Lactobacillus casei* in *E. coli*. *Kor. J. Microbiol.* 27. 188-193.
16. Morse, M.L., K.L. Hill, J.B. Egan, and W. Hengstenberg. 1968. Metabolism of lactose in *Staphylococcus aureus* and its genetic basis. *J. Bacteriol.* 95. 2270-2274.

(Received November 23, 1992)

(Accepted December 9, 1992)

---

**ABSTRACT: Mapping of Gene Encoding Phospho- $\beta$ -galactosidase from *Lactobacillus casei* and its Expression in *Escherichia coli***

**Chung-Hee Park, Kyung-Hee Moon and Kyung-Hee Min\*** (Department of Biology, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, and Research Center for Molecular Microbiology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea)

Recombinant plasmid pPLac15 determined both phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase uptake of lactose and phospho- $\beta$ -galactosidase (Moon *et al.*, 1989). A restriction mapping of the pPLac15 was compiled with several restriction enzymes and a series of subclones into pUC18 was constructed. From an analysis of the proteins produced by *Escherichia coli* cells of transformants containing each of the recombinant subclone plasmids, it was found that the gene for phospho- $\beta$ -galactosidase in pUC18 was expressed about 1.8-folds in *E. coli*.