

## 제한효소 생성능을 지닌 알칼리성 *Bacillus* sp. 8-13 균주로부터 알칼리성 제한효소의 정제

배 무\* · 이지은 · 박경숙 · 이강만<sup>1</sup>

이화여자대학교 자연과학대학 생물학과, <sup>1</sup>약학대학 제약학과

### Purification of Alkaline Restriction Endonuclease from Alkalophilic *Bacillus* sp. 8-13

Bae, Moo\*, Jee-Eun Lee, Kyoung-Sook Park, Kang-Man Lee<sup>1</sup>

Department of Biology, <sup>1</sup>Department of Industrial Pharmacy, College of Pharmacy,  
Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

**Abstract** — Twenty-four bacterial strains among alkalophilic bacteria isolated from soil samples were examined for the presence of type II restriction endonuclease in aerobic culture. One strain was found to contain specific enzyme to cleave lambda DNA. The characteristics of this microorganism is the ability to grow well in alkalophilic and high temperature condition, that is at pH 10.3 and 50°C. This strain was tentatively identified to *Bacillus alkalophilus* subsp. *halodurans* when morphological, physiological and biochemical characteristics were examined. The enzyme was purified from crude extract by streptomycin sulfate, ammonium sulfate precipitation, which was followed by DEAE-cellulose and phosphocellulose ion exchange column chromatography, and the subunit molecular weight was about, 32,000 daltons by polyacrylamide gel electrophoresis containing 0.1% SDS.

자연계에 존재하는 많은 종류의 세균으로부터 제한효소와 변형 효소의 쌍으로 이루어진 restriction/modification system이 발견되었다(1). 세균에 제한 효소 작용이 있다는 사실은 1950년대 행하여진 몇 가지 실험에서 예견되었으며(2), 1968년 *Escherichia coli* B와 *E. coli* K에서 최초로 제한 효소가 발견되었다(3). 지금까지 발견된 제한 효소는 type I, II, III 3가지 형태가 있는데(4), 이 중 type II 효소는 조인자로 Mg<sup>2+</sup>만을 필요로 하며, 절단 부위와 인식 부위가 일치한다. 이 특성에 의하여 type II 제한 효소는 반응 후의 분석이 용이하므로 유전자의 분석, DNA sequencing, gene cloning 등 유전자 재조합 기술의 필수적인 수단으로 이용되고 있을 뿐만 아니라 DNA-단백질 상호작용을 연구하는 데에도 매우 중요하게 이

용되고 있다. 그러므로 현재까지 수백여 종의 세균으로부터 580여 가지의 제한효소가 발견되었음에도 불구하고 최근에도 계속하여 새로운 DNA 염기 서열을 인식하는 제한효소를 찾고자 하는 노력이 기울여지고 있다.

따라서 본 연구에서는 분리된 알칼리성 세균 24가지의 균주를 조사하여, 고온 알칼리성 세균 *Bacillus* sp. 8-13에 제한효소 활성이 있음을 밝히고 이 효소를 정제하였다.

### 재료 및 방법

#### 균주 및 배양

여러 곳의 퇴비에서 채취한 고온 알칼리성 세균 24 균주를 사용하여 분리 선별한 alkalophilic *Bacillus* sp. 8-13 균주를 사용하였다. 이 고온 알칼리성 세균의 배양은 Horikoshi와 Teruhiko(5)의 알칼리 배지로 50°C에서 10시간 배양하였다.

**Key words:** Alkaline restriction endonuclease, alkalophilic *Bacillus* sp.

\*Corresponding author

### 제한효소 생성 균주의 선별과 조효소액의 준비

세균을 20 ml의 알칼리 배지에서 대수증식기까지 증배양한 후, 증배양액을 200 ml의 같은 배지에 4% 접종하여 50°C에서 10시간 동안 배양하였다. 배양액의 균체를 10,000×g에서 20분간 원심분리하여 회수한 다음, 10 mM phosphate buffer(pH 7.5) 용액으로 세척하였다. 균체는 초음파 분쇄기로 300 W에서 30초 동안씩 6번 시행하여 균체를 마쇄하고 100,000×g로 30분간 원심분리하였다. 마쇄시 효소액이 10°C를 넘지 않도록 하였으며 얼음 위에서 시행하였다. 상등액에 최종 농도가 2% 되도록 10% streptomycin sulfate를 가한 후 20,000×g에서 원심분리하여 상등액을 취하고 다시 ammonium sulfate를 90%까지 침전시켜 20,000×g에서 원심분리하였다. 상등액을 제거하고 용출된 단백질을 Buffer A(10 mM potassium phosphate, pH 7.5, 10 mM 2-mercaptoethanol, 5% glycerol)에 용해시킨 다음 투석막을 이용해서 Buffer A에 대하여 2시간 투석하였다. 효소액의 제한효소 활성을 검색하기 위하여 10 mM Tris-HCl(pH 8.0), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 µg lambda DNA와 1 µl 효소액을 첨가한 뒤, 37°C에서 20분간 반응시킨 후 10 mM EDTA로 반응을 종결시켰다. 반응액은 0.8% agarose gel에서 80 V로 2시간 진행시켜 ethidium bromide로 염색하여 자외선하에서 관찰하였다.

### 효소 활성의 측정

제한효소의 활성 측정은 각 정제 단계마다 시행하였는데, 10 mM Tris-HCl(pH 8.0), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM 2-mercaptoethanol과 1 µg의 lambda DNA를 포함하는 반응 혼합물(50 µl)에 각 효소액을 첨가하여 37°C에서 반응하였다. 0.1 M EDTA를 포함하는 loading buffer(0.25 mM bromophenol blue, 1.25% xylene cyanol, 40% glycerol)에 의하여 반응을 완전히 정지시켰다. 반응액의 전기영동은 '제한효소의 생성 균주의 선별과 조효소액의 준비' 과정과 동일하게 시행하였으며 Polaroid type 667 흑백 필름으로 사진 촬영하여 관찰하였다.

제한효소의 1 unit는 37°C에서 1시간 동안 반응하여 1 µg의 lambda DNA를 완전히 절단할 수 있는 효소의 양으로 하였다.

### 효소의 정제

상기 조효소액의 준비 단계에서 초원심분리 후 얻은 조효소액을 streptomycin sulfate 분획, ammonium

sulfate 분획, DEAE-cellulose column chromatography, phosphocellulose column chromatography 단계로 정제하였다.

**Streptomycin sulfate에 의한 침전** : 4 liter 배양액에서 회수한 40g(wet weight)의 균체를 초음파 마쇄기로 마쇄하여 얻은 효소액에 streptomycin sulfate를 최종 농도 2%까지 가하고 20,000×g에서 원심분리하여 DNA와 ribosome 등을 제거한다.

**Ammonium sulfate에 의한 침전** : streptomycin sulfate 처리가 끝난 시료에 85%까지 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 첨가하고 3시간 동안 교반하여 단백질을 침전시켜 12 ml의 Buffer A에 녹였다. 이 용액을 투석막을 이용하여 16시간 동안 투석한다.

**DEAE-cellulose column chromatography** : Buffer A로 평형시킨 DEAE-cellulose ion exchange column(4×8 cm)에 적용하여 0~1 M의 NaCl로 용출시킨다. 용출속도는 20 ml/hr로 하였고 각 분획마다 3 ml씩 받아 단백질 양을 조사한다.

**Phosphocellulose column chromatography** : 첫 번째 ion exchange chromatography에서 분획된 효소액을 Buffer A로 투석한 후 농축하고 phosphocellulose column(4×8 cm)에 적용하여 0~1.2 M NaCl로 용출한다. 용출 조건은 DEAE-cellulose column chromatography와 동일하다.

### 효소 분자량의 측정

효소 분자량은 정제한 효소액을 0.1% SDS가 포함된 7.5%의 acrylamide(Tris-glycine buffer, pH 8.3 0.192 M glycine, 0.025 M Tris base)을 사용하여 polyacrylamide gel electrophoresis로써 측정하였다(6). 효소의 분자량 측정은 표준 물질의 이동도를 이용하여 만든 표준 물질 분자량의 표준 곡선으로부터 새로운 효소의 분자량을 측정하였다.

### 단백질의 정량

효소의 정제 과정 중 단백질의 농도는 spectrophotometer(Hitachi V-2000)로 280 nm에서 흡광도를 측정하였고, 그 외의 단백질 농도는 bovine serum albumin을 표준 단백질로 하여 Lowry 등의 방법(7)에 따라 측정하였다.

## 결과 및 고찰

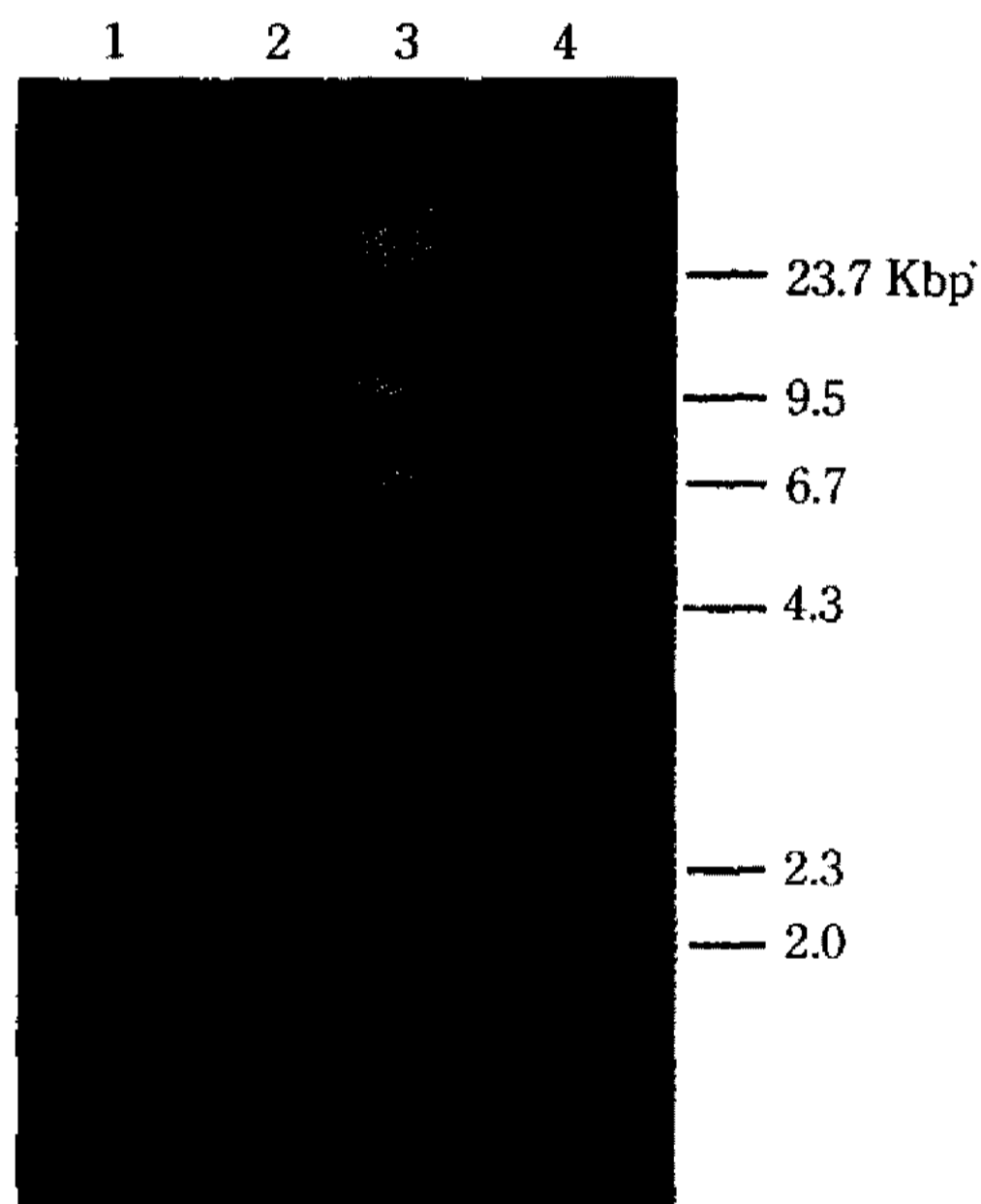
### 제한효소 생성 균주의 선별 및 동정

토양에서 분리한 여러 알칼리성 세균을 대상으로 제한효소의 유무를 조사한 결과, 분리균 8-13에서 제한효소의 활성이 나타났으며 이를 전기영동으로 확인하였다(Fig. 1). 또한 본 균주의 특성을 조사한 결과는 Table 1에 제시되었으며, 잠정적으로 *Bacillus alkalophilus* subsp. *halodurans*로 동정되었다(8).

본 논문에서는 본 균을 alkalophilic *Bacillus* sp. 8-13으로 표시하였다.

**제한효소의 정제**

균체에 Buffer A를 가하여 현탁액으로 만들어 40분 동안 초음파 분쇄기로 마쇄하고 원심분리하여 얻은



**Fig. 1. The lambda DNA patterns digested with *Bacillus* sp. 8-13 crude extract.**

Lane 1; lambda DNA cut by *Bacillus* sp 8-13 crude extract, lane 2; lambda DNA undigested, lane 3; lambda DNA digested with *Hind*III, lane 4; lambda DNA digested with *Hind*III and *Bacillus* sp. 8-13 crude extract

효소액을 streptomycin sulfate 분획, ammonium sulfate 분획, DEAE-cellulose column chromatography,

**Table 1. Characteristics of *Bacillus* sp. 8-13 strain**

| Characteristics                      | Strain 8-13 | Type strain |
|--------------------------------------|-------------|-------------|
| <b>Morphological characteristics</b> |             |             |
| Shape                                | rod         | rod         |
| Size width                           | 0.4~0.6 μm  | 0.5~0.6 μm  |
| length                               | 2.0~5.0 μm  | 2.0~4.0 μm  |
| Mobility                             | motile      | motile      |
| Gram stain                           | +           | +           |
| Endospore                            | terminal    | terminal    |
| <b>Cultural characteristics</b>      |             |             |
| Nutrient broth pH 7                  | +, -        | +, -        |
| pH 10                                | +           | +           |
| Nutrient agar pH 7                   | +, -        | +, -        |
| pH 10                                | +           | +           |
| Glucose-nutrient pH 7                | +, -        | +, -        |
| broth pH 10                          | +           | +           |
| Glucose-nutrient pH 7                | +, -        | +, -        |
| agar pH 10                           | +           | +           |
| Glucose-nitrate                      |             |             |
| agar pH 10                           | +           | +           |
| Medium+ 5% NaCl pH 10                | +           | +           |
| 15% NaCl pH 10                       | +           | +           |
| <b>Physiological characteristics</b> |             |             |
| Catalase production                  | +           | +           |
| Hydrolysis of gelatin                | +           | +           |
| starch                               | +           | +           |
| casein                               | +           | +           |
| Reduction of nitrate                 | +           | +           |
| methylene blue                       | +           | +           |
| Voges-Prokauer test                  | -           | -           |
| Production of indole                 | -           | -           |
| Utilization of citrate               | +           | +           |

Type strain; *Bacillus alkalophilus* subsp. *halodurans*. ATCC 21591

+: positive, -: negative.

**Table 2. Purification of a restriction endonuclease from 40g of *Bacillus* sp. 8-13**

|  | Total protein (mg) <sup>a</sup> | Total unit <sup>f</sup> | Specific activity (U/mg) | Purification fold | Yield (%) |
|--|---------------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------|-----------|
| Crude extract  | 8.7 × 10 <sup>3</sup>           | N.D. <sup>b</sup>       | N.D. <sup>b</sup>        | -                 | -         |
| Streptomycin sulfate supernatant                           | 8.0 × 10 <sup>3</sup>           | 3.9 × 10 <sup>4</sup>   | 4.8                      | 1                 | 100       |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> saturation | 3.17 × 10 <sup>2</sup>          | 2.4 × 10 <sup>4</sup>   | 75.6                     | 15.8              | 63        |
| DEAE-cellulose column                                      | 5.58 × 10 <sup>0</sup>          | 9.0 × 10 <sup>3</sup>   | 1613                     | 336               | 23        |
| Phosphocellulose P11 column                                | 1.5 × 10 <sup>-1</sup>          | 4.6 × 10 <sup>3</sup>   | 30667                    | 6389              | 12        |

<sup>a</sup>Protein concentration determined by the method of Lowry *et al.* <sup>b</sup>Not determined. <sup>c</sup>1 unit of enzyme is determined as 1 μg DNA completely digested in 1 hr at 37°C.

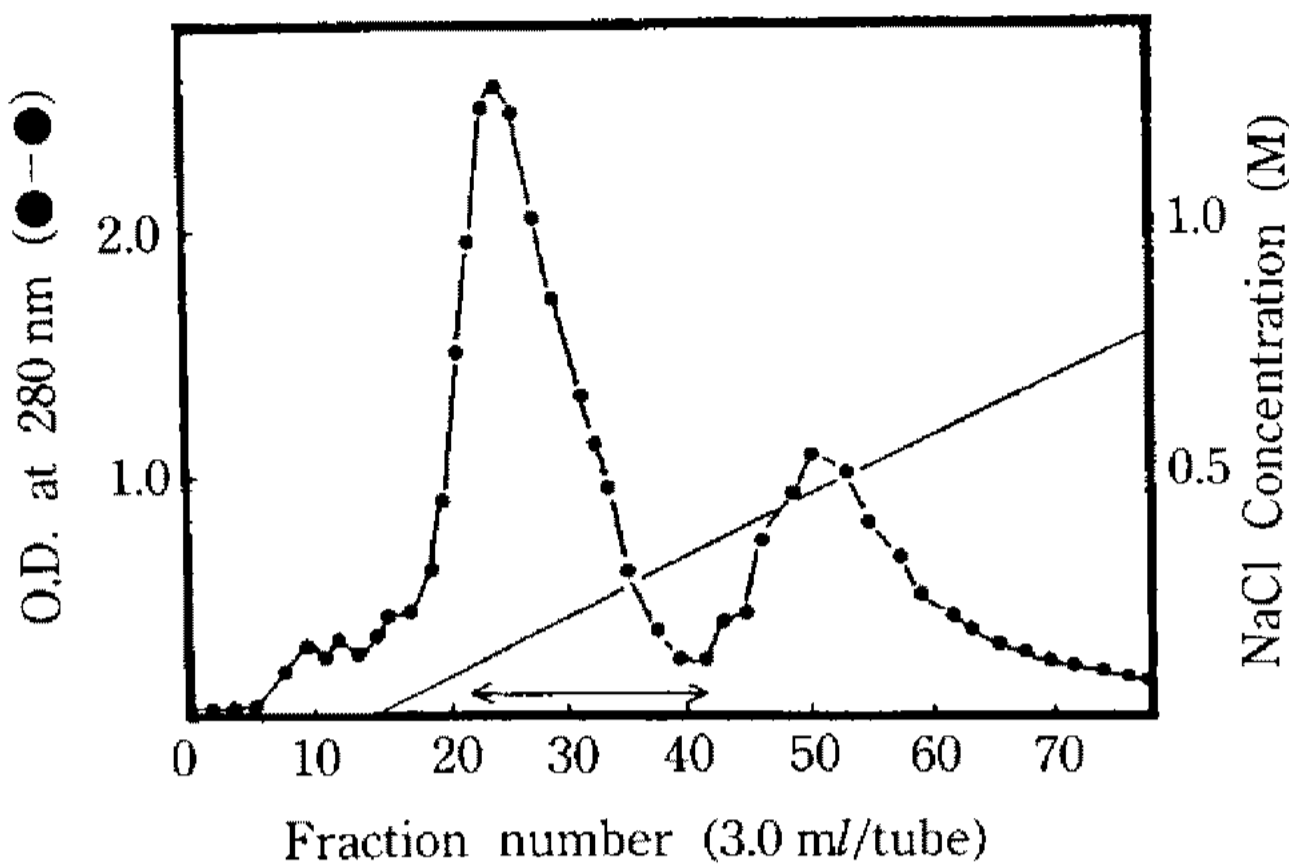


Fig. 2. Restriction endonuclease purification using a DEAE-cellulose column chromatography.

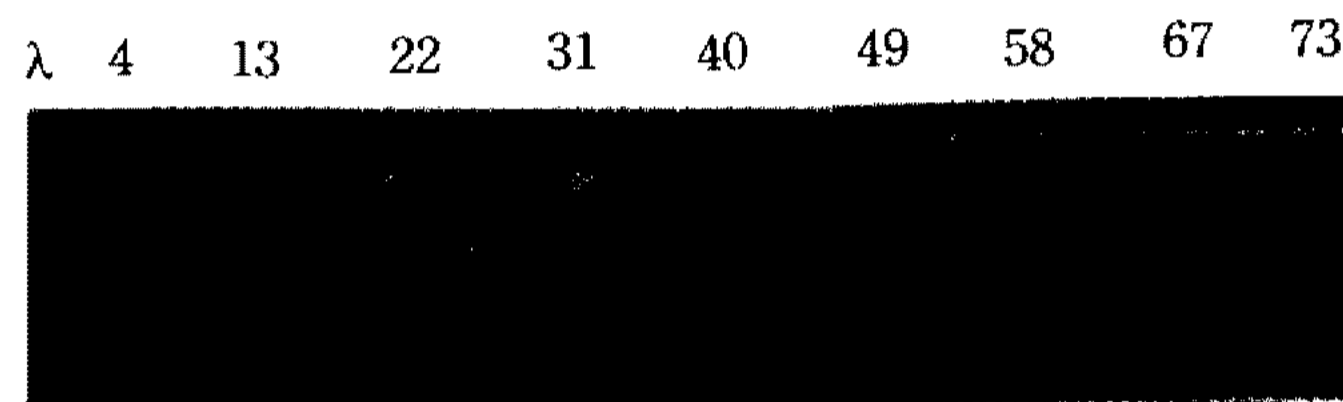


Fig. 3. Assay of restriction endonuclease activity from the DEAE-cellulose column chromatography.

Each reaction mixture contained 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM 2-mercaptoethanol, 1 μg lambda DNA and 1 μl of each fraction was incubated at 37°C for 30 min. Electrophoresis of DNA was performed on 1% agarose gel. Lane λ; lambda DNA marker, lane 4~73; 4 to 73 of fractions

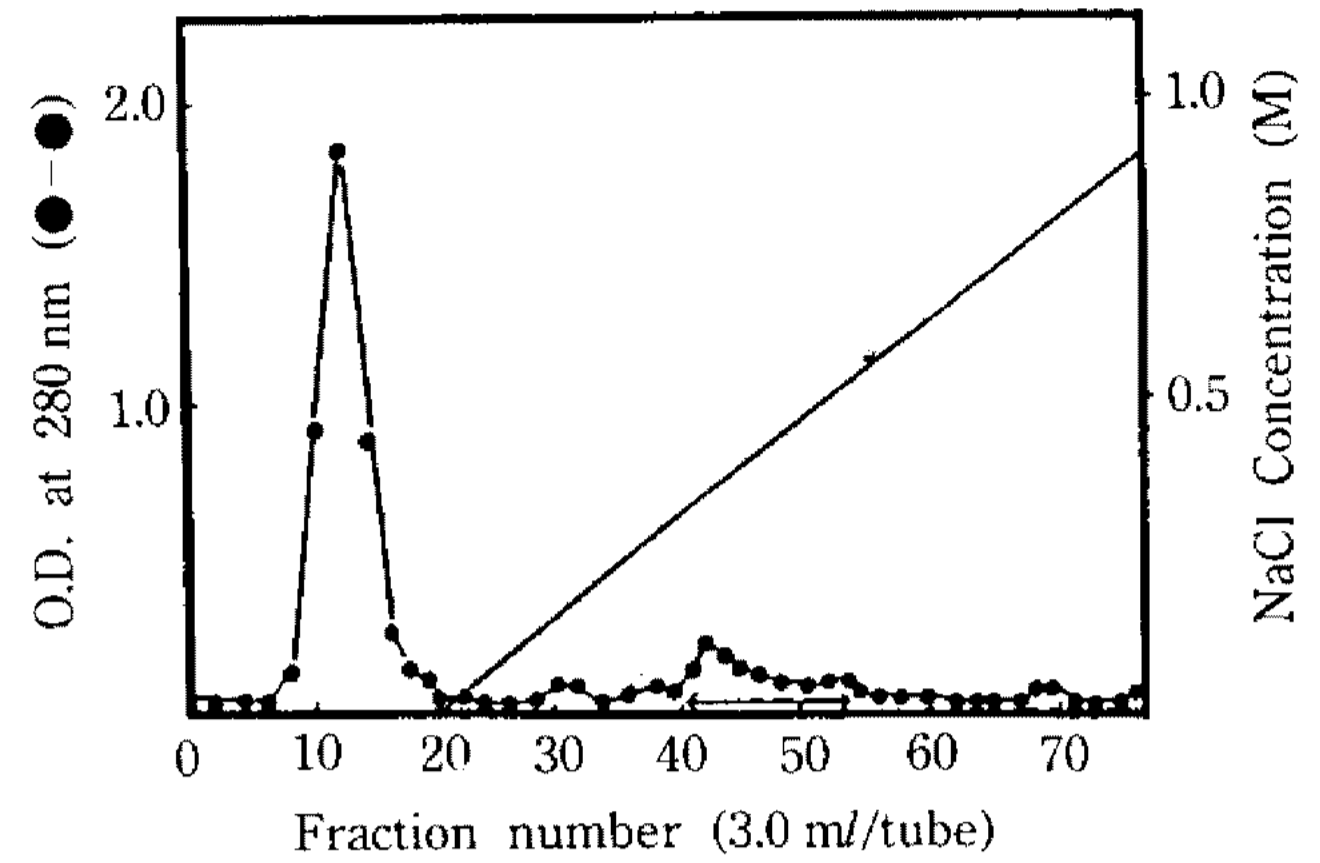


Fig. 4. Restriction endonuclease purification using a phosphocellulose column chromatography.

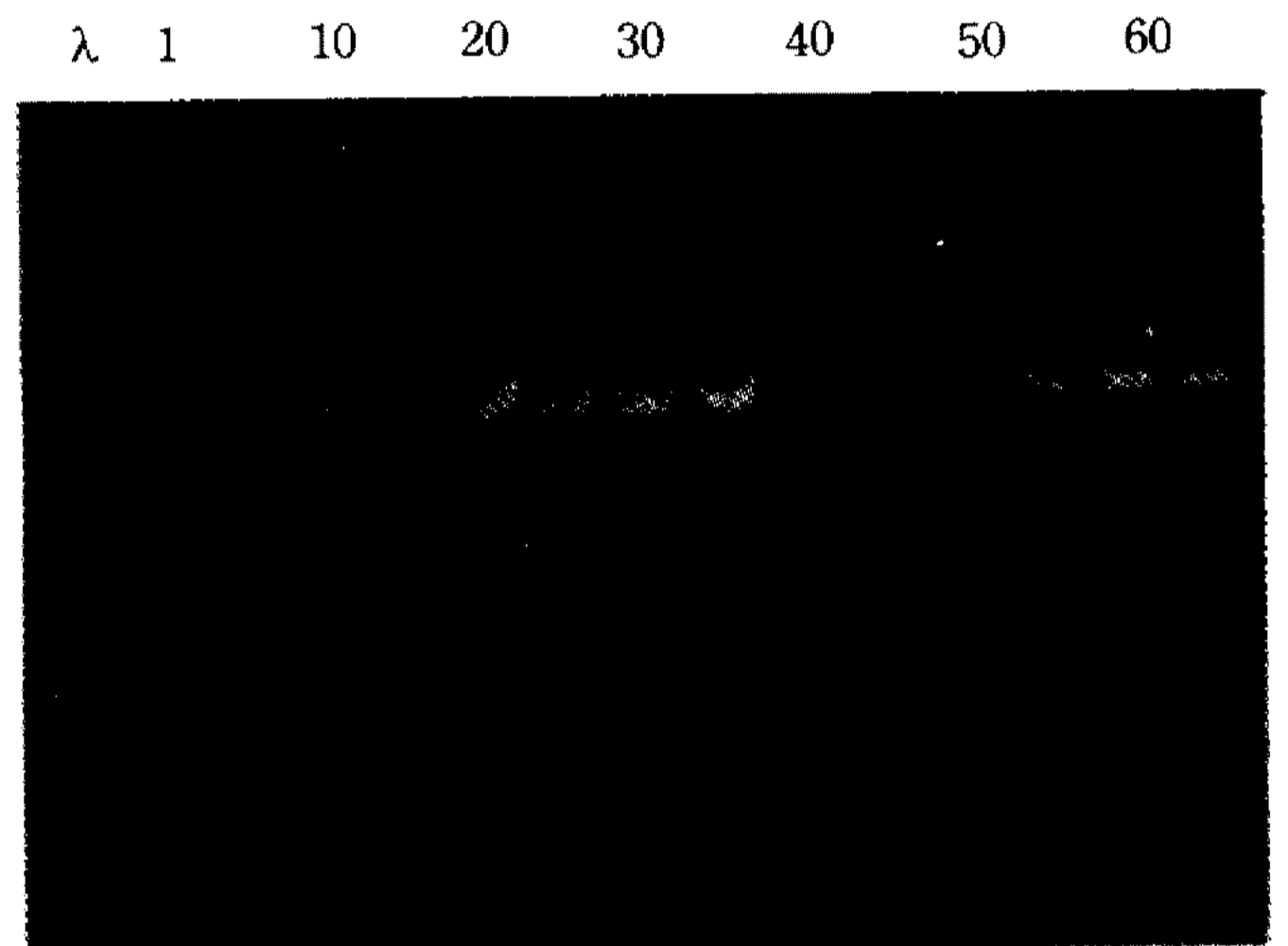


Fig. 5. Assay of restriction endonuclease activity from the phosphocellulose column chromatography.

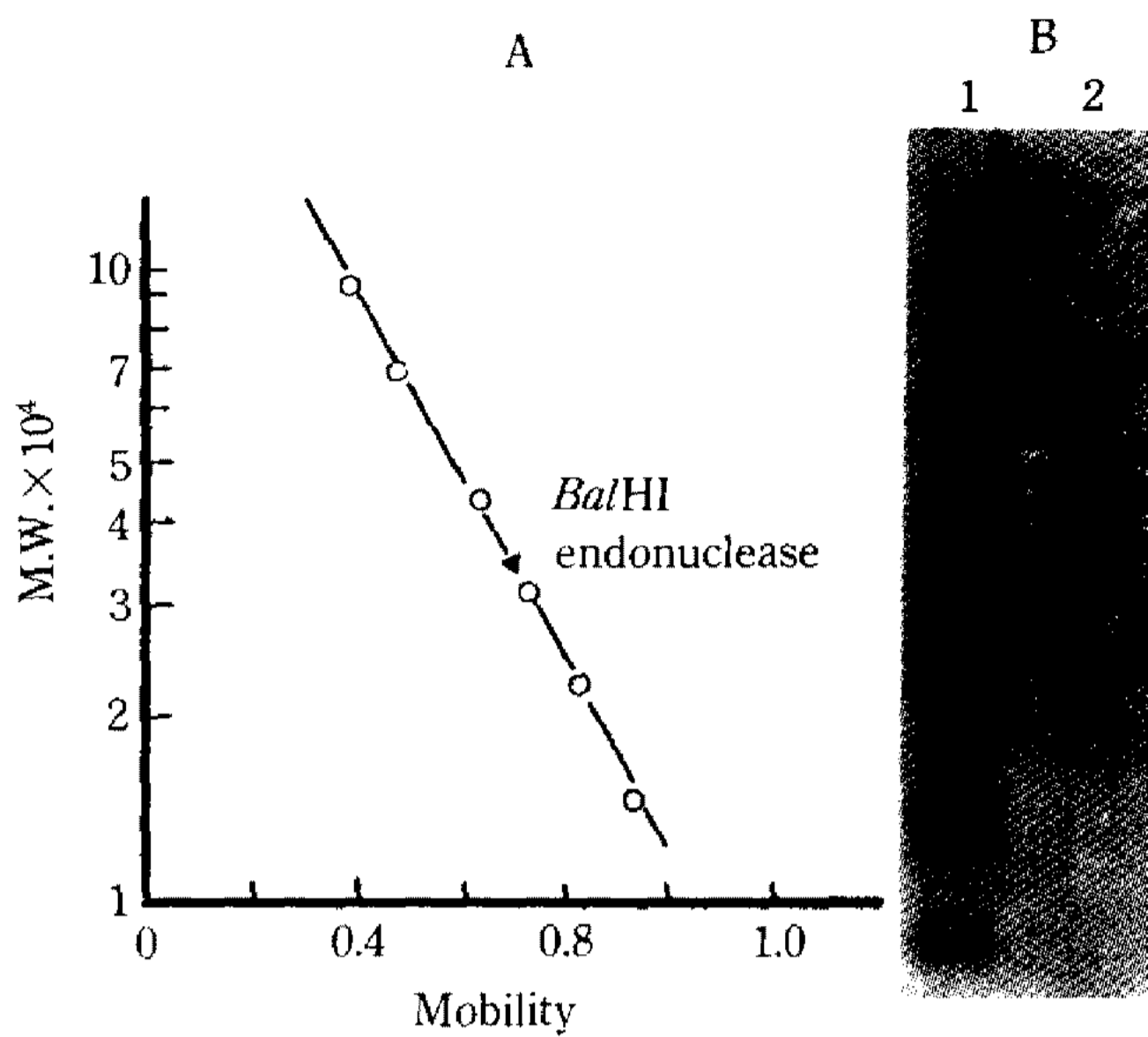
Each reaction mixture contained 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM 2-mercaptoethanol, 1 μg lambda DNA and 1 μl of each fraction was incubated at 37°C for 30 min. Electrophoresis of DNA was performed on 1% agarose gel. Lane λ; lambda DNA marker, lane 1~65; 1 to 65 of fractions

그리고 본 효소의 특성은 다음에 상세히 보고하겠으나 알칼리성 영역에서 활성 최적 조건을 나타낸다는 것이 기존의 제한효소와 다른 특성이라 할 수 있다.

효소의 분자량

정제한 제한효소를 0.1% SDS이 포함된 7.5% acrylamide gel에서 전기영동을 한 결과, 약 32,000 dalton으로 나타났다(Fig. 6). Type II 제한효소는 type I 제한효소에 비하여 작은 분자량을 갖고 있는데(10), 특히 type I의 EcoK와 EcoB 등은 각각 400,000과 40,000 dalton이라 알려졌으며(11, 12), endoenzyme인 EcoPI은 3개의 subunit으로 되어 있으며 그 분자

phosphocellulose column chromatography로 정제하고 polyacrylamide gel electrophoresis로 정제도를 확인하였다. Table 2에서 보는 바와 같이 효소는 전체 정제 과정을 통하여 비활성이 30,667 unit가 되었고 yield는 12%이었다. Streptomycin sulfate를 처리한 뒤, 원심분리하여 얻은 상층액에 ammonium sulfate 분획을 시행했을 때 37% 정도 역가가 상실되었고 비활성은 75.6 unit이었다. DEAE-cellulose column chromatography 결과(Fig. 2), 2개의 단백질 peak가 분획되었으며 첫번째 단백질 peak 중 0.17~0.3 M NaCl 범위에서 용출된 22-42번 분획에서 효소 활성이 나타났으며(Fig. 3), 336배 정제된 효소를 얻을 수 있었다. 또한 phosphocellulose column chromatography (Fig. 4)에 의해 0.31~0.52 M NaCl 사이의 40번부터 53번까지의 분획에서 제한효소의 활성이 있음이 전기영동으로 확인되었으며(Fig. 5), 이 과정에서 6389 배 정제된 제한효소를 얻었는데 이 제한효소는 Smith와 Nathans의 명명법에 따라 BalHI으로 명명하였다.



**Fig. 6. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of *Bal*HI endonuclease and standard proteins.**

A; The subunit molecular weight of *Bal*HI, B; lane 1; standard proteins (phosphatase b; 94,000, BSA; 67,000, ovalbumin; 43,000, carbonic anhydrase; 30,000, trypsin inhibitor; 20,100,  $\alpha$ -lactalbumin; 14,000), lane 2; *Bal*HI endonuclease (*Bal*HI; restriction endonuclease from *Bacillus* sp. 8-13).

량은 90,000, 62,000, 49,000이다(11). 그러나 type II의 제한효소는 같은 크기의 두 개의 subunit으로 구성되어 있는데(9), *Hind*III는 분자량이 67,000~92,000 정도(12)이며, *Hpa*I(13)과 *Hpa*II(13)는 65,000과 13,370이고, *Eco*RI의 그 분자량이 59,000으로서 subunit의 분자량은 29,000이라 보고되고 있다(14). 또한 국내에서 발견된 *Zan*I(15)과 *Stu*I(16)은 각각 subunit의 분자량이  $30,000 \pm 1,000$ 과  $34,000 \pm 1,000$  dalton으로 밝혀져 보고된 바 있다.

### 요 약

토양에서 분리한 여러 알칼리성 세균을 대상으로 제한효소의 유무를 조사하여 *Bacillus* sp. 8-13으로부터 제한효소의 활성을 발견할 수 있었다. 이 균주의 제한효소는 streptomycin sulfate 침전, ammonium sulfate 침전, DEAD-cellulose와 phosphocellulose ion exchange column chromatography 과정을 통하여 정제하였고 0.1% SDS를 포함하는 7.5% polyacrylamide gel electrophoresis로 subunit의 분자량을 조사한 결과 약 32,000 dalton이었다. 또 특히 이 균주는 형태적, 배양학적 특성이 *Bacillus alkalophilus* subsp. *halodu-*

*rans*와 매우 유사하며, 최적 생육 pH는 10.3이었고, 최적 증식온도는 50°C이었다.

### 감사의 말

본 연구는 교육부 유전공학 연구비(1990년도)의 지원에 의하여 수행되었으며 이에 대하여 관계자 여러분에게 감사드립니다.

### 참고문헌

1. Bolyer, H.W. 1971. DNA restriction and modification mechanisms in bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **25**: 153-176.
2. Bertani, G. and J.J. Weigle. 1953. Host controlled variation in bacterial viruses. *J. Bacteriol.* **65**: 113-121.
3. Linn, A.S. and W. Arber. 1968. Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli* X. In vitro restriction of phage fd replicative form. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **59**: 1300-1306.
4. Yuan, R. 1981. Structure and mechanism of multifractional restriction endonuclease. *Ann. Rev. Biochem.* **50**: 285-315.
5. Horikoshi, K. and A. Teruhiko. 1982. *Alkalophilic microorganism: A new microbial world*, Japan Scientific Societies Press, Tokyo.
6. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
7. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Faw, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
8. Holt, J.G. 1977. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. The Willim and Wilkins Company, Baltimore.
9. Catterall, J.F. and N.E. Welker. 1977. Isolation and properties of a thermostable restriction endonuclease (Endo R. Bst 103). *J. Bacteriol.* **129**: 1110-1120.
10. Haberman, A., J. Heywood, and M. Meselson. 1972. DNA modification activity of *Escherichia coli* restriction endonuclease K and P1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **69**: 3138-3141.
11. Lautenberger, J.A. and S. Linn. 1972. The deoxyribonucleic acid modification and restriction enzymes of *Escherichia coli* B. I. Purification, subunit structure, and catalytic properties of the modification methylase. *J. Biol. Chem.* **247**: 6176-6182.
12. Old, R., K. Murray, and G. Roizes. 1975. Recog-

- niton sequence of restriction endonuclease III from *Haemophilus influenzae*. *J. Mol. Biol.* **92**: 331-339.
13. Sharp, P.A., B. Sugden, and J. Sambrook. 1973. Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenza* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* **2**: 3055-3063.
14. Hedgpeth, J., H.M. Goodman, and H.W. Boyer. 1972. DNA nucleotide sequence restricted by the *EcoRI* endonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**: 3448-3452.
15. Sun, D.K. and O.J. Yoo. 1988. Purification and characterization of a restriction endonuclease from *Xanthomonas anaerobia*. *Kor. Biochem. J.* **21**: 419-422.
16. Kim, K.T., M.Y. Jung, and O.J. Yoo. 1987. Purification and characterization of *StuI* endonuclease from *Streptomyces tubecidicus*. *Kor. J. Microbiol.* **2** (3): 180-183.

(Received January 10, 1992)