

제한효소에 대한 용매의 영향 : 소수성 용매에 의한 *PvuII* 특이성 변화

김희정·이강민
전북대학교 자연과학대학
분자생물학과 효소공학연구실

Solvent Effect on Restriction Endonuclease: Alteration of Specificity of Restriction Endonuclease *PvuII* in Hydrophobic Solution

Heejung Kim and Kangmin Lee

Lab. Enzyme Technology, Department of Molecular Biology,
College of Natural Science, Chonbuk National University, Chonju 560-756, Korea

ABSTRACT

During the last decade enzyme reaction in organic solvent has been studied to show that specificity in buffer is different from that in organic solvent. The specificity of restriction enzyme was effected by various factors such as ionic strength, salt, organic solvent and temperature. In this study, restriction enzyme *PvuII* which is used most frequently in genetic engineering and the substrate was vector pGEM3 whose sequence was already known were used. As a result the recognition sequence site was changed in the presence of organic solvents whose Log P are $-1.5 \sim 0$. Their specificities were contrast with activities were contrasted. Specificities were not changed in organic solvent easily in inactivating enzyme. We think that the enzyme recognition site was not changed randomly but by preferential order. A recombinant vector which does not contain typical cleavage site CAG↓CTG was cleaved in 20% ethanol solution. This result might show that restriction enzyme could be used to cleave at unusual sites by changing the reaction conditions.

서 론

생물공학에서 새로운 효소의 발견은 실험실 조작의 혁신을 가져왔다. 제한효소와 접합효소의 발견으로 실험실에서 유전자의 연구, 조작이 가능하게 되었으며 중합효소의 발견으로 실험실에서 DNA를 복사할 수 있어 sequencing, mapping은 물론 병의 진단에까지 널리 이용되고 있다. 특히 DNA의 원하는 부분을 특이하게 절단할 수 있는 새로운 기능을 가진 제한효소의 개발은 단백질 합성을 정지시키는 유전자 발현 억제물질(gene expression inhibitor)

로서의 중요한 도구임은 물론 mapping, 재조합 유전자(recombinant genomes)의 제조에 필요한 중요한 연구이다.

DNA의 원하는 부분을 특이하게 절단하기 위하여 많은 방법들이 연구되어 왔다. 소중합 뉴클레오티드(oligonucleotide)에 Fe-EDTA, Cu-phenanthroline과 같은 금속 킬레이트(metal chelate)를 붙여서 소중합 뉴클레오티드가 인식한 DNA를 금속이 절단하든지, oligonucleotide-nuclease hybrid, DNA-Drug hybrid 방법과 같은 연구들이 최근에 알려져 있다(1-5). 또한 제한효소의 내적인 변화 즉, 변이

체를 유전공학적으로 제조하여 활성자리를 변화시켜 새로운 자리를 인식하게 할 수 있으며, 효소의 외적인 반응조건을 바꾸어 새로운 자리를 인식하게 할 수 있다.

최근에 유기용매에서의 효소반응이 연구됨에 따라서 효소의 여러 가지 특이성이 유기용매에 의하여 변화될 수 있음이 알려졌다(6, 7, 8). 특히 제한효소와 같은 DNA 결합 단백질은 유기용매에 의하여 그의 인식자리가 달라질 수 있다. 분자생물학에서 널리 이용되는 *Bst* I, *Bsu* I, *Bam*HI, *Hind*III, *Eco*RI와 같은 제한효소 역시 유기용매에 의해서 그의 특이성이 변화됨이 알려져 있다(9, 10). 이와 같이 유기용매에 의한 제한효소의 특이성 변화는 알려져 있으나 이러한 특이성 변화가 유기용매의 어떠한 특성에 의존하며 그의 인식기작이 어떻게 되는가는 아직 체계적으로 연구되지 않았다.

본 연구는 유전공학에서 가장 널리 이용되고 있는 제한효소 중 하나인 *Pvu*II와 이미 염기서열을 알고 있는 pGEM3를 벡터(vector)로 사용하여 여러 가지 유기용매에 의하여 특이성과 인식단계가 어떻게 변하는가를 연구하였다. 또한 위의 결과를 실제적으로 생명공학에 이용할 수 있는 방법을 연구하였다.

실험재료 및 방법

효소 및 시약

본 연구에 사용된 화학물질은 대부분 Sigma에서 구입하였으며 *Pvu*II 제한효소는 Promega에서 구입하였다. DMSO, Alcohol, glycerol 등과 같은 유기용매는 분석용 특급시약으로 Merck에서 구입하였다.

벡터로는 pGEM3를 분리 정제하여 사용하였으며(11), 재조합 벡터는 pUC19과 pRMG103 AB/*Hinc*II를 이용하였다(12). 표준 완충용액으로는 6mM Tris-HCl(pH 7.4), 6mM MgCl₂, 50mM NaCl, 6mM 2-mercaptoethanol을 사용하였다.

pGEM3의 분리 정제

LB배지에서 플라스미드를 가지고 있는 *E. coli*를 stationary phase까지 16시간 동안 배양한 후 미량 원심분리하여 수확한 후 10mM EDTA Tris 완충용액(pH 8.0)으로 suspension하고 0.2N NaOH, 1% SDS 용액을 가한 후 5M potassium acetate를 가하여 원심분리한다. 상층액을 폐놀로 추출한 후 상층액에 에탄올을 넣어 pGEM3를 침전시킨 후 세척,

건조 후 완충용액에 녹여 사용한다.

*Pvu*II의 효소반응

Promega로부터 구입한 *Pvu*II를 3시간 투석(dialysis)하여 glycerol free enzyme을 만든 후 기질로는 pGEM3, 또는 재조합 벡터를 사용하여 반응시킨다. 이때의 0.5ug벡터에 15unit *Pvu*II를 사용하여 표준 완충용액과 여러 가지 유기용매 혼합용액에서 37°C에서 18시간 반응시켰다.

전기영동

DNA fragments의 크기를 알기 위해 1%(w/v) 수평젤(horizontal slab agarose gel)과 5%(w/v), 8%(w/v) 수직젤(vertical polyacrylamide gel)을 사용하여 분리한 후 DNA band는 gel을 ethidium bromide로 염색하여 UV로 확인하였다. 유기용매에서 반응시킨 후 유기용매는 centrifugal evaporator로 건조시킨 후 표준 완충용액에 녹여 전기영동을 한다. Control로 50% ethanol용액에 단지 pGEM3만을 넣고 실험한 결과 실험과정에서 DNA는 유기용매에 의하여 변형되지 않았다.

*Pvu*II에 미치는 유기용매의 효과

*Pvu*II에 미치는 유기용매의 효과를 연구하기 위해 우선 전혀 유기용매가 없는 표준 완충용액에서 24시간까지 반응을 시켜서 유기용매가 아닌 다른 인자에 의하여 특이성이 변하는가를 실험하였다. 또한 특이성 변화가 유기용매가 *Pvu*II에 영향을 주어 나타나는 것이 아니고 pGEM3의 구조를 변화시켜 나타나는 것인가를 알기 위하여 pGEM3를 50% ethanol을 포함한 표준 완충용액에 24시간 37°C에서 incubation한 후 전기영동으로 pGEM3의 변화를 보았다. 확인된 조건에서 유기용매의 농도를 5%부터 30%(v/v)까지 5%씩 증가시키면서 활성도와 특이성 변화를 살펴 보았다. 활성도와 특이성 변화는 전기영동으로 분리된 DNA 조각들의 농도와 조각들의 종류로 각각 결정하였다.

*Pvu*II에 미치는 pH, 반응온도, 반응시간의 효과

pH 6.0, 7.4, 8.9, 10.0에서 pH 효과를 보았다. pH 6.0에서는 6mM phosphate buffer, 6mM MgCl₂, 50mM NaCl, 6mM 2-mercaptoethanol, 20% ethanol 용액을 사용하였으며, pH 7.4, 8.9에서는 같은 성분을 포함한 Tris-HCl buffer를, pH 10.0에서는 glycine-NaOH buffer를 사용하였다. *Pvu*II 반응에

미치는 온도 효과를 보기 위하여 20% 에탄올을 포함한 완충용액에서 10°C, 20°C, 30°C, 37°C, 42°C로 온도를 변화시키면서 18시간 반응시킨 후 효소의 활성도와 특이성 변화를 보았다. 반응시간이 *Pvu*II 반응에 미치는 효과는 20% 에탄올을 포함한 표준 완충용액에서 5분에서 24시간까지 반응시켜서 조사하였다.

*Pvu*II의 절단자리 결정

제한효소의 절단자리를 결정하는 방법에는 직접 sequencing하는 방법과 다른 제한효소를 사용하는 double digestion방법이 있다. 이미 어느 정도 절단자리를 추정할 수 있는 경우는 두번째 방법이 이용되고 있다. *pGEM3*는 1개의 *Bam*HI를 가지므로 우선 *Bam*HI으로 37번 자리를 절단한 후 전기영동한 후 elution하여 linear *pGEM3*를 얻는다. 얻은 linear *pGEM3*를 20% ethanol을 포함한 표준용액에서 반응시킨 후 분리된 DNA 조각을 8% polyacrylamide gel로 분리하였다.

*Pvu*II 인식자리가 제거된 재조합 벡터 제조

Fig. 5처럼 5' CAG'CTG3'를 절단하는 *Pvu*II의 인식자리가 없는 벡터를 제조하기 위하여 *pUC19*에 있는 *Pvu*II 자리를 digestion한 후 얻은 fragment와 *Pvu*II 자리가 없는 cII fragment(*pRMG 103 AB/Hinc II*)를 접합하여 재조합 벡터 *pUCL-1*를 만들어 이용하였다. 자신의 고유 인식자리가 없는 벡터를 *Pvu*II를 가지고 다른 자리를 절단하기 위하여 에탄올 농도를 증가시키면서 절단되는 부위를 살펴 보았다.

실험 결과

*Pvu*II에 미치는 유기용매의 효과

*Pvu*II에 미치는 유기용매 효과는 Table 1과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 이미 그 물리적 성질을 알고 있는 20여 가지의 유기용매에서 제한효소의 특이성 변화에 미치는 유기용매의 특성을 알기 위하여 실험하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 에탄올과 isopropanol의 양이 증가함에 따라서 특이성은 변한다. *pGEM3*는 supercoil과 nick으로 2band(lane 2)를 가지나 반응함에 따라서 linear가 만들어지며 이것은 유기용매의 농도가 증가함에 따라서 다른 조각으로 절단된다. 제한효소 *Pvu*II는 에탄올 isopropanol의 5% 정도의 낮은 농도에서 특이성이 변화하였으

Table 1. Characteristics of organic solvents used in this study.

| Solvent character | log P ¹ | E _r (30) ² | n ³ | DC ⁴ | Specificity % ⁵ | Activity % |
|---------------------|--------------------|----------------------------------|----------------|-----------------|----------------------------|------------|
| Formamide | -1.65 | 237 | 0.444 | 0.0 | N ⁵ | 30 |
| Ethylene glycol | -1.43 | 236 | 0.264 | 18.7 | N | 20 |
| Glycerol | -2.50 | 238 | 0.194 | 20.2 | 25 | 30 |
| Methanol | -0.74 | 232 | 0.414 | 30.5 | 20 | 30 |
| N-Methylformamide | -1.13 | 226 | 0.314 | 32.4 | N | 40 |
| 1, 2-Propandiol | -1.35 | 226 | 0.213 | 38.8 | 15 | 30 |
| 1, 3-Butanediol | -1.02 | 221 | 0.178 | 49.1 | 20 | 20 |
| Ethanol | -0.32 | 213 | 0.301 | 54.4 | 5 | 40 |
| Dimethyl sulfoxide | -1.35 | 188 | 0.199 | 60.3 | 20 | 30 |
| DMF | -1.01 | 183 | 0.244 | 63.3 | N | 20 |
| Acetonitrile | -0.34 | 192 | 0.344 | 64.3 | N | 30 |
| 1-Propanol | 0.34 | 212 | 0.231 | 69.2 | N | 30 |
| Sulforane | -0.77 | 184 | 0.199 | 69.3 | N | 5 |
| 2-Propanol | 0.14 | 203 | 0.237 | 70.2 | 5 | 30 |
| 1-Butanol | 0.89 | 210 | 0.194 | 77.2 | N | 25 |
| Acetone | -0.24 | 177 | 0.254 | 78.2 | N | 30 |
| 2-Methyl-1-propanol | 0.83 | 205 | 0.194 | 79.2 | N | 5 |
| 2-Butanol | 0.61 | 197 | 0.194 | 80.4 | N | 10 |
| HMPA | 0.28 | 171 | 0.199 | 90.1 | N | 10 |
| 1, 4-Dioxane | -0.27 | 151 | 0.240 | 92.1 | N | 5 |
| 2-Methyl-2-propanol | 0.37 | 184 | 0.190 | 92.2 | N | 5 |

DMF; N, N-Dimethyl formamide, HMPA; Hexamethylphosphoramide, DMSO; Dimethylsuloxide

1. $\log P = \log(S)_{\text{octanol}} / (S)_{\text{water}}$, P is partition coefficient of cosolvent in H₂O-octanol biphasic system(22)
2. $E_r(30)$ is Dimroth-Reichardt parameter which is directly related to the free energy of the solvation.(27, 28)
3. $n = A_w / A_{\text{org}}$, A_w and A_{org} are molecular area of water and organic solvent respectively(29)
4. D. C. is denaturation capacity(23)
5. N represents no-change of activity and specificity in the organic solvents
6. Percents of specificity and activity were determined by the intensity and diversity of fragments respectively

며 DMSO, 1, 2-propanediol, glycerol에서는 20% 이상의 농도에서 변화였다(Table 1). 특이성을 변화시키는 유기용매에서 제한효소는 매우 안정하였다. 그러나 Sulforane, acetone, 2-methyl-2 propanol, dioxane, 2-methyl-1 propanol과 같은 유기용매는 제한효소를 쉽게 비활성화시키며 이와 같이 쉽게 비활성화시키는 유기용매는 특이성을 변화시키지 못한

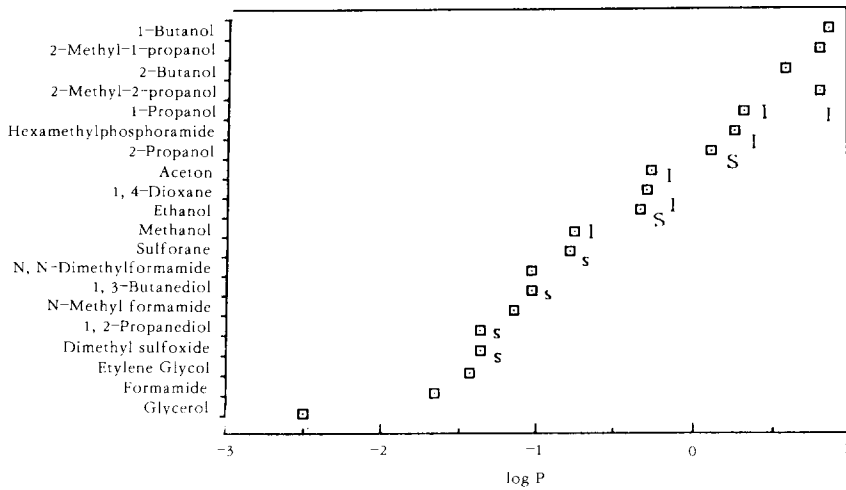


Fig 1. Correlation between LogP of solvent and specificity and activity of *PvuII* restriction enzyme. Capital letter means specificity and activity change within 10% of organic solvent. Small letter means their change within 25%.



Fig 2. Ethanol and iso-propanol effect on *PvuII* restriction enzyme; Each reaction mixture contained 0.5ug pGEM3 DNA, 15units of *PvuII* enzyme and following concentration of alcohol:(1) marker(PBR322/BstI), (2) pGEM3 DNA; Ethanol (3) 0%, (4) 5%, (5) 10%, (6) 15%, (7) 20%, (8) 25%, (9) 30%; iso-propanol (10) 5%, (11) 10%, (12) 15%, (13) 20%, (14) 25%, (15) 30%.

다. 특이성에 미치는 유기용매의 농도는 유기용매에 따라서 다르지만 절단되는 자리는 그의 절단되는 조각들의 크기와 패턴으로 추정하면 거의 같은 자리를 절단하는 것으로 생각된다.

유기용매에서 특이성에 미치는 pH, 온도, 반응시간의 효과

20%의 에탄올을 포함한 pH 6.0, 7.4, 8.9, 10.0의 용액에서의 효소의 활성도를 조사하였다. Fig 3에서 보는 바와 같이 pH가 증가할수록 활성도, 특이성은 증가되나 pH 10.0에서는 효소의 활성도를 잃어버린다. 위와 동일한 용액에서 온도를 10℃, 20℃, 30℃, 37℃, 42℃로 증가시키면서 특이성 변화를 보았다. 제한효소의 특이성에 미치는 온도의 효과는 37℃까지는 온도가 올라갈수록 특이성이 변하여 더욱 많은 자리를 절단하지만 42℃에서는 열적 불활성화(thermal inactivation)되어 활성도가 떨어진다 (Fig. 3). 여기에서 효소의 활성도와 특이성 변화는 서로 밀접히 관계있다는 것을 알 수 있다. 효소의 활성도가 증가되는 조건에서는 효소의 특이성도 증가된다. 효소의 양을 증가하면 할수록 특이성도 더욱 쉽게 변화하였다. 특이성 변화가 반응시간에 따라서 어떻게 일어나는가를 알기 위하여 동일한 용액에서 *PvuII*를 24시간 반응하였다. 효소는 반응시간에 따라서 3시간까지는 그 인식자리인 pGEM3의 104번 CAG¹CTG를 잘라 하나의 조각이 생기나 3시간이 지나면 특이성이 변하여 다른 자리를 자르기 시작하여 다른 조각들이 만들어진다.

유기용매에서 *PvuII*의 절단자리 결정
특이성 변화 조건에서 제한효소가 자르는 확실한

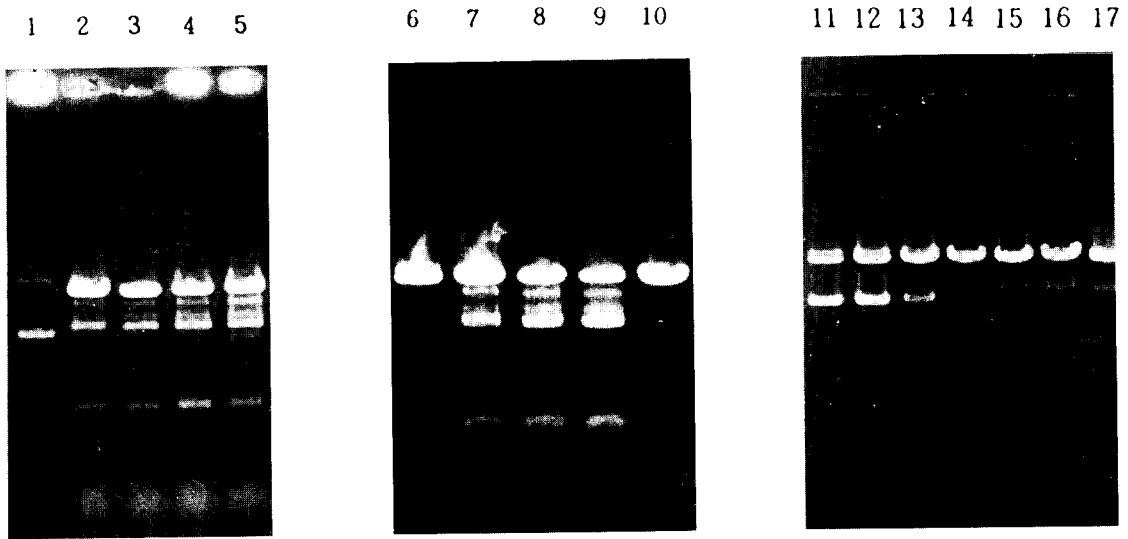


Fig. 3. Time, temperature and pH effect on *PvuII* restriction enzyme. The reaction analysed by electrophoresis in 1% agarose. Each reaction mixture contained 0.5ug pGEM3 DNA, 15units of *PvuII* enzyme in standard condition containing 20% ethanol without following (1). pGEM3(substrate) DNA (2) pH 6.0 (3) pH 7.4 (4) pH 8.9 (5) pH 10.0 (6) Temperature 10°C (7) 20°C (8) 30°C (9) 37°C (10) 42°C (11) reaction time 5min (12) 15min (13) 30min (14) 1hour (15) 3hours (16) 6 hours (17) 12 hours.

자리를 알기 위해 *Bam*HI으로 한 번 자른 pGEM3를 20% 에탄올 용액에서 *Pvu*II로 반응시켜서 band 크기를 확인했다. *Pvu*II와 *Bam*HI은 같이 medium salt에서 반응하며 각각 1개씩의(37번 *Bam*HI 자리와 104번 *Pvu*II 자리) 절단자리를 갖는다. 절단된 조각으로부터 이미 서열을 알고 있으므로 절단자리를 추정하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 두 개의 효소로 절단한 결과 104번 *Pvu*II와 37번 *Bam*HI의 사이인 67bp와 690번과 894에 존재하는 CAGCAG와 104번 *Pvu*II 자리로부터 만들어질 수 있는 795bp와 586bp의 조각이 생성되었다. 이러한 자기 고유의 자리가 아닌 다른 자리를 실험 조건을 변화시켜 절단하는 방법이 실제적으로 유전 공학에 이용될 수 있음을 보이기 위하여 *Pvu*II 자리를 제거한 pUC19과 cII fragment를 접합하여 만든 벡터 pUCL-1을 제조하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 이 벡터는 *Pvu*II 자리인 CAGCTG가 없으므로 순수 완충용액에서는 절단된 조각이 없으나 20% 에탄올을 넣었을 때는 Fig. 5처럼 다음 인식자리(next preferential site)를 절단하게 되어 다른 조각이 나타난다. 에탄올이 없을 때는 아무 자리도 절단

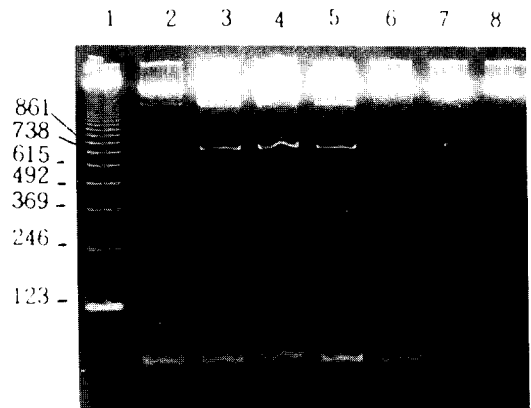


Fig. 4. *Bam*HI and *Pvu*II digests of pGEM3 DNA. The digest analysed by electrophoresis in a 8% polyacrylamide gel. After *Bam*HI reaction we used 15 unit of *Pvu*II in standard condition containing 20% ethanol to following reaction time(1) ladder marker(123 b. p.) (2) 18hours (3) 8hours (4) 5hours (5) 1hours (6) 15min (7) *Pvu*II digestion without ethanol (8) before *Pvu*II digestion.

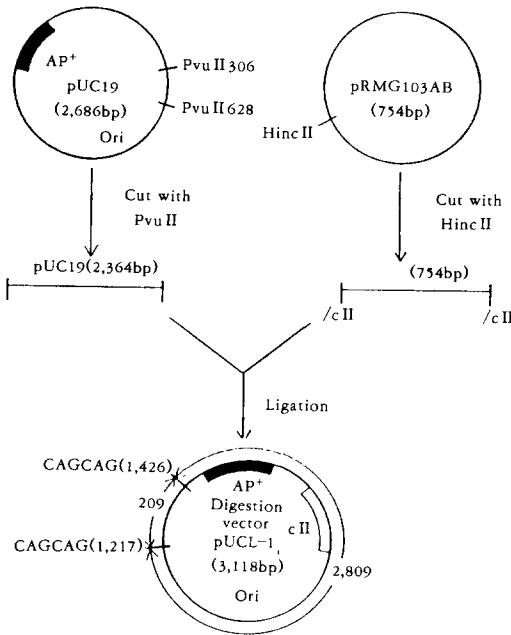


Fig 5. The construction of recombinant vector.

할 수 없으나 5%가 되면 1426번과 1217번의 CAGCAG 2자리 중 1426을 절단하여 linear 조각이 나타나지만, 15%가 되면 1217을 절단하여 209bp가 잘려 나가고 280bp DNA가 생기게 된다.

고찰

최근 수용액 대신 유기용매에서의 효소반응은 많은 관심의 대상이 되고 있다. 유기용매에서 효소는 수용액에서와는 다르게 여러 가지 새로운 성질을 갖는다. 유기용매에서 효소는 새로운 자리, 입체, 기질 특이성을 갖는다. 또한 항체 단백질은 항원에 대하여 수용액에서와는 다른 친화력으로 결합한다. 생명과학에서 제한효소, 결합효소, 중합효소의 발견을 통하여 실험실에서 원하는 유전자를 sequencing, mapping, recombinant DNA 제조를 가능하게 하며, 이들 효소들의 활성도와 특이성은 DMSO나 에탄올과 같은 organic solvent에 크게 영향을 받는다(9, 24, 15-18). 또한 제한효소는 압력과 polyamine, polysaccharide 등에 의하여 억제됨이 알려져 있다(19-21). BamHI은 pH 8.5에서 glycerol, DMSO, ethyleneglycol, 에탄올, dioxane에서 특이성이 변하

며, Eco RI은 pH 7.5에서 glycerol, DMSO, 에탄올에 의하여 특이성 변화가 보고되어 있다(22, 23). 그러나 이것이 유기용매의 어느 농도에서 변하는지, 특이성 변화가 유기용매의 어떠한 특성에 의존하는지는 연구되지 않았다.

Table 1과 Fig. 1에서 볼 수 있는 바와 같이 특이성의 변화는 그것의 Log P값에 밀접히 관련되어 있음을 알 수 있다. Log P는 octanol-물의 bi-phase에서 용매의 분배계수(partition coefficient)이다. 다시 말하면 용매의 소수성(hydrophobicity)이다. 특이성변화는 Log P값이 -1.5~0 부근에서 나타나며 비활성화는 -0.5~1 사이에서 일어난다. Fig. 1에서 볼 수 있는 바와 같이 특이성의 변화는 비활성화를 시키지 않는 유기용매에서 일어난다. Dioxane, acetone, sulforan 등은 Log P 값이 각각 -0.27, -0.24, -0.77로서 -0.32인 에탄올 부근이지만 이들은 쉽게 효소를 비활성화시키기 때문에 특이성을 변화시키지 못한다. 다른 효소의 경우 활성도, 반응속도가 Log P에 관계된다는 보고가 있다. Porcine pancreatic lipase의 에스테르화 초기속도는 유기용매의 Log P와 polarizability와 밀접한 관계가 있으며 일반적으로 효소들의 최적 유기용매는 Log P>4 일 때 가장 빠르며 2<Log P<4일 때 중간 정도이며, Log P<2일 때 반응은 천천히 일어난다(25, 26). 그러나 제한효소에서는 Log P가 2보다 크면 물에 잘 섞이지 않으며 이 경우 특이성은 거의 변하지 않는다. 특이성의 변화는 활성부위에서 단백질과 핵산의 수소결합의 변화에 의하여 일어나는데 용매의 Log P가 커지면 수소결합을 변화시키지 못한다. 많은 효소들은 물과 혼합할 수 있는 유기용매(water-miscible organic solvent)에서는 불안정하다. 일반적으로 0.5% 이상이 되면 불안정하지만 제한효소, 중합효소 같은 핵산 결합효소는 에탄올, DMSO, isopropanol, glycerol에서 보는 바와 같이 30%까지 거의 활성도를 잃어버리지 않는다.

제한효소의 특이성 변화는 어떠한 기작에 의하여 일어나는가를 이해하기 위하여 특이성 변화가 반응 조건에 따라서 달라짐을 연구하였다. 제한효소의 특이성 변화를 생명공학에 이용하기 위하여 이 변화는 순서적으로 예측할 수 있게, 질서있게 일어나야 한다. Proteus vulgaris로부터 분리된 Pvu II 제한효소는 CAG¹CTG 자리를 절단하는데 에탄올과 isopropanol이 10% 이상이 되면 특이성이 변화하여 다른 자리를 자르게 된다. 유기용매의 농도가 더 진해지면 더욱 무작위로 자르게 되어 6자리 중 5개의 자리

가 일치하면 자르게 된다. 이러한 변화가 불순물로 포함된 다른 제한효소에 의하여 생기는 것이 아님을 알기 위하여 전혀 에탄올이나 isopropanol이 없는 상태에서 반응을 시킨 결과 *Pvu*II는 단지 pGEM3의 자신의 1개의 고유 자리인 104번의 CAG¹CTG만 절단하였다(Fig. 2).

두번째 절단되는 자리를 알기 위하여 다른 제한효소인 *Bam*HI으로 처리한 후 *Pvu*II 제한효소로 절단하여 그의 절단조각의 크기로 볼 때 절단되는 다음 우선자리(Second preferential site)가 CAG¹CAG로 생각된다. CAG¹CAG의 절단을 확인하기 위하여 *Pvu*II의 고유자리인 CAG¹CAG 자리가 없는 벡터를 Fig. 5와 같이 제조하였다. Fig. 6처럼 이 벡터는 순수한 완충용액에서 *Pvu*II에 의하여 절단되지 않았으나 에탄올이 증가함에 따라서 벡터의 다른 자리를 절단하여 다른 조각을 만들을 볼 수 있다. 에탄올 5%에서는 Fig. 6에서 보는 바와 같이 2개의 CAGCAG 자리 중 하나를 절단하며 15%가 되면 2개의 자리를 모두 절단하여 209bp가 절단된 약간 작아진 다른 DNA 조각이 보인다. 에탄올 용액에서 에탄올에 의해 *Pvu*II의 특이성의 변화가 처음부터 일어나는가 아니면 무질서하게 되는 것인가를 연구하기 위해 반응시간에 따라서 특이성의 변화를 살펴 보았다. 제한효소는 반응 초기에는 *Pvu*II의 고유자리인 CAG¹CAG를 절단하나 얼마의 시간이 지난 후, 본 실험조건에서 3시간이 지난 후 CAG¹CAG를 절단하였으며 반응시간이 지날수록 다른 자리를 무질서하게 절단하였다. 그러므로 특이성의 변화는 반응시간에 따른 우선순위에 의하여 절단된다고 생각한다. *Pvu*II는 에탄올 용액에서 온도에 따라서 그것의 특이성이 변한다. Protein-DNA 상호작용은 낮은 온도에서보다 높은 온도에서 더욱 fluctuation되며 protein과 DNA의 강한 상호작용을 할 수 없으므로 *Pvu*II가 인식자리를 인식하지 못할 수 있다. 그리고 37°C에서 가장 큰 활성도를 가지며 그 이상 온도에서는 비활성화된다. *Pvu*II 제한효소는 fructose, maltose, mannose, lactose, saccharose 등의 sugar와 같은 일반적으로 단백질을 안정화하는 물질에 대하여 안정하며 그것이 특이성을 변화시키는 않았다(32).

많은 제한효소는 높은 pH값, 낮은 이온힘, 높은 제한효소의 농도, 금속 보조인자의 치환이나 더해진 유기용매에 의해 기질 특이성이 나타난다. 효소 활성도의 적당한 pH는 이의 상호작용력에 의존하므로 낮은 이온힘에서는 pH가 염기성쪽으로 옮겨진다.

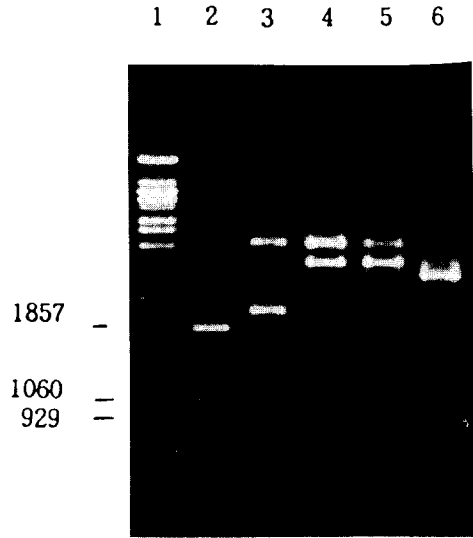


Fig. 6. Ethanol effect on *Pvu*II cleavage of recombinant vector under standard condition. *Pvu*II digest of pGEM L-1 analysed by electrophoresis in 1% agarose. Each reaction mixture contained 0.5ug recombinant vector DNA, 15units of *Pvu*II restriction enzyme and following concentration ethanol 1) marker(Ladder marker), 2) marker (PBR322/BstNI); ethanol 3) 0%, 4) 5%, 5) 10%, 6) 15%.

*Bam*HI의 경우 위의 20여 가지 유기용매에서 조사한 결과 pH 8.0일 때는 3가지의 유기용매에서 나타나며 8.5일 때에는 5가지의 유기용매에서 나타난다. 또한 pH 8.0에서는 DMSO의 15%부터 특이성 변화가 나타나지만 8.5일 때는 5%의 낮은 농도에서부터 나타난다(34).

제한효소가 어떠한 기작에 의하여 DNA를 인식하고 절단하는가는 이미 구조가 알려진 *Eco*RI의 경우 잘 알려져 있다. *Eco*RI는 GAATTC를 인식한다. 두 개의 helices가 큰홈(major groove)에서 purine과 수소결합을 한다. Arg²⁰⁰은 G와 glu¹⁴⁴, arg⁴⁵는 A와 수소결합을 하여 12개의 수소결합을 한다. 이중 하나가 다른 것으로 치환되면 1, 2개의 수소결합이 파괴되어 인식 자리가 달라질 수 있다.

에탄올이나 이소프로판올이 포함된 반응조건에서 *Pvu*II는 CAG¹CAG를 절단하게 되는데, 이때 CAG CTG의 T가 A로 바뀐 자리를 에탄올이나 이소프로판올이 포함된 용액에서 효소는 인식한다. 큰

홈에서 티민의 O4 그리고 아데닌의 N6가 염기쌍을 이루고 작은홈(minor groove)에서 티민의 O2와 아데닌의 N3가 염기쌍을 이룬다. 여기서 작은 홈의 수소결합은 A: T와 T: A 염기쌍에서 매우 비슷하다. 큰홈에서 주는 그룹과 받는 그룹은 완전히 다르므로 T: A 염기쌍이 A: T로 치환될 때 큰홈의 수소결합 접촉은 비어 있는 상태가 된다. 그래서 *Pvu* II의 경우 큰홈의 6개의 인식자리 중 5번 위치에 접촉은 효소가 DNA 자리를 인식하는데 중요하다. 또한 아데닌의 N6와 티민의 O4는 효소 활성도에 필수적이다(31). 여섯 자리 중 다섯 자리만 같아도 잘라지는 것은 유기용매에 의해 효소와 인식 염기서열 사이에 한 개 이상의 수소결합이 파괴된 상태에서 반응하기 때문이다. 유기용매는 단백질 성분인 효소의 구조를 변화시키거나 DNA의 비어 있는 곳에 물 분자를 제거함으로써 DNA와 효소 사이의 상호작용력을 변화시키므로 특이성을 변화시킬 수 있다(18).

일반적으로 제한효소의 활성도와 특이성이 변하는 이유는 기질이나 효소의 공유결합의 변형(covalent modification)에 의해서, 칼시노젠(carcinogens), 약(drug), 염료(dye) 등의 리간드의 결합에 의해서, 또는 단백질뿐만 아니라 DNA 구조변화에 의해서 일어날 수 있다(33). 유기용매에서의 *Pvu* II의 활성도와 특이성을 관찰한 결과 에탄올과 이소프로판올에서 많은 특이성이 나타났으며 이는 유기용매가 단백질 성분인 효소의 4차 구조를 변화시키므로 효소가 다른 자리를 인식하여 효소의 작용기와 DNA 사이에 상호작용력을 잃어버림으로써 나타날 수 있다.

지금까지 제한효소가 염, 산도, 유기용매에 의하여 다른 자리를 절단할 수 있음은 이미 다른 연구들에 의하여 발표되었지만 절단자리들이 많아서 실제적으로 원하는 자리를 절단하는 기술로써 유전공학에 이용되지는 못하였다. 본 연구를 통하여 우리는 제한효소 *Pvu* II를 가지고 자신의 고유의 자리가 없는 벡터의 다른 한 자리를 절단할 수 있음을 보일 수 있었다. 이러한 기술은 실험실에서 유전자를 조작하는 데 새로운 기술로써 사용될 수 있으리라 기대된다.

결 론

본 연구에서 조사한 제한효소 *Pvu* II의 특이성 변화는 에탄올과 isopropanol에 의하여 이루어지며 알카리 pH, 온도가 높고 반응시간이 길수록 벡터를 무

작위하게 절단한다. 제한효소의 특이성 변화는 유기용매의 Log P에 관련이 있으며 특이성과 활성도는 서로 상반관계가 있다. 특이성을 변화시키는 용매에서 그 효소는 안정하며 불안정한 용매에서는 특이성을 변화시키지 못한다. *Pvu* II는 절단 자리 CAGCTG가 없는 새로 제조된 벡터와 완충용액에서는 반응하지 않으나 에탄올 용액에서는 반응하여 다음 우선자리를 절단한다. 그러므로 이 연구의 결과, 제한효소를 이용하여 자신의 고유의 자리가 아닌 다른 자리를 반응조건을 조절하면 자를 수가 있으므로 이러한 기술을 유전자 조작에 이용할 수 있다.

감 사

본 연구는 1990년 교육부 지원 한국학술진흥재단의 학술연구 지원비에 의하여 연구되었습니다. 이에 대단히 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. J. C. Francois, T. Saison-Behm Oaras and T. Chassignol(1988), *Biochemistry*, **27**, 2272.
2. C. H. B. Chen and D. S. Sigman(1988), *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 6570.
3. C. H. B. Chen and D. S. Sigman(1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **83**, 7147.
4. T. Le Doen, L. Perrouault and D. Prasouth(1987), *Nucleic Acid Res.*, **15**, 8643.
5. T. Le Doen, L. Perouault, M. Chassingnol, N. T. Thong and C. Helene(1986), *Biochemistry*, **25**, 6736.
6. J. Krout(1988), *Science*, **242**, 533, 1988.
7. R. Sakurai, A. L. Margolin, A. J. Russel and A. M. Klivanov(1987), *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 7885.
8. G. Pomp and J. R. Medrano(1991), *Biotechnique.*, **10**, 59.
9. C. M. Clark and B. S. Hartley(1977), *Biochem. J.*, **177**, 49.
10. K. Heminger, W. Hong and H. G. Zachau(1977), *Gene*, **1**, 292.
11. H. C. Birnboim and J. Doly(1979), *Nucleic Acid Res.*, **7**, 1513.
12. H. R. Goodmann and R. J. Mcdonald(1979), *Method in Enzymology*, **68**, 75.

13. B. Polisky, P. Greene, D. Garfin, B. Maccarthy, H. Goodman and H. Boyer(1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **72**, 3310.
14. J. George, R. Blakesley and J. Chirikjian (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 6521.
15. J. George and J. Chirikjian(1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **76**, 2432.
16. L. Smith and J. Chirjian(1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 1003.
17. M. Nasri and D. Thomas(1986), *Nucleic Acid Res.*, **14**, 811.
18. M. Nasri and D. Thomas(1987), *Nucleic Acid Res.*, **15**, 7677.
19. M. T. Hsu and P. Berg(1978), *Biochemistry*, **17**, 131.
20. E. Melyguine, P. Vanier and P. Yot(1980), *Gene*, **8**, 163.
21. G. B. Macgregor(1990), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **170**, 775.
22. H. Kirino, R. Kuwahara, N. Hamasaki and T. Oshima(1990), *J. Biochem.*, **109**, 661.
23. K. Oishi, S. Aoi, Y. Otsuka, K. Shimamura, Y. Higuchi and N. Nomoto(1990), *J. Ferment. Bioeng.*, **69**, 360.
24. A. Leo, C. Hansch and D. Elkins(1971), *Chem. Rev.*, **71**, 525.
25. Y. L. Khmel'nitsky, V. V. Mozhaev, A. B. Belova, M. V. Sergeeva and K. Martinek (1991), *Eur. J. Biochem.*, **198**, 31.
26. J. Heitman, (1992), *Bioessays*, **7**, 445.
27. R. H. Valivety, G. A. Johnston, C. J. Suckling and P. J. Halling(1991), *Biotechnol. Bioeng.*, **38**, 1137.
28. C. Lanne, S. Boeren, K. Vos and C. Veeger (1987), *Biotechnol. Bioeng.*, **30**, 81.
29. C. Reichart(1979), *Solvent Effect in Organic Solvent*, Verlag Chemie, Weinheim.
30. M. Kamlet, J. Abboud and R. Taft(1981), *Prog. Phys. Org. Chem.*, **13**, 485.
31. T. Ooi, M. Obatake, G. Nemethy and H. Scheraga(1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **84**, 3086.
32. T. R. Gringeras, L. Greenough, I. Schildkrout and R. J. Robert(1981), *Nucleic Acid Res.*, **99**, 4525.
33. M. Nasri and D. Thomas(1988), *Annal. N. Y. Acad. Sci.*, 225-265.
34. J. Yum and K. Lee, Unpublished Data.
35. A. Pingond, C. Urbanke, J. Alves, E. Hans-Jurgen, M. Zabeau and C. Gualerizi(1984), *Biochemistry*, **23**, 5697.