

## Nar promoter를 inducible promoter로 이용하기 위한 특성연구

이진태<sup>1</sup>, 조무환<sup>1</sup>, 홍역기<sup>2</sup>, 김광수<sup>2</sup>, 이종원<sup>3</sup>

1 영남대학교 화학공학과, 2 강원대학교 발효공학과

3 대구 카톨릭대학교 의대 생화학교실

### A study of nar promoter for the use of inducible promoter

Jintae Lee<sup>1</sup>, Moohwan Cho<sup>1</sup>, Eock-kee Hong<sup>2</sup>, Kwang-soo Kim<sup>2</sup>, Jongwon Lee<sup>3</sup>

1 Department of Chemical Engineering, Yeungnam University

2 Department of Fermentation Engineering, Kangwon National University

3 Department of Biochemistry, School of Medicine,  
Taegu Catholic University

#### 서론

의약품으로 쓰이는 단백질들이 재조합 DNA 기술을 이용하여 *E. coli*로부터 대량으로 생산되고 있다. 이때 expression vector로 이용되는 이상적인 plasmid는 다음의 점들을 만족시켜야 한다. 첫째, plasmid들이 *E. coli* 안에서 안정적으로 유지 되어야 하며, 두번 째로 생산되는 단백질이 원하는 시점에 발현되도록 하는 것이 중요하다. 이 원하는 시점에 발현되게 하기 위해서 inducible promoter를 많이 이용한다. 적당한 inducible promoter가 되기 위해서는 첫째, 그 promoter가 강해야 하며, 두번 째로 induction이 되지 않을때는 발현이 되지 않아야 하며, 마지막으로 induction이 값싸고 쉬워야 한다. 현재 *E. coli*에서 많이 이용되고 있는 inducible promoter들로는 Lac, TrpA, 그리고  $\lambda$ PL 등이 있다 (1). 이러한 promoter들은 inducible promoter로서 앞의 두 조건을 만족시키나, induction과정에서 문제점들이 존재한다. Lac promoter인 경우에는 induction에 사용되는 IPTG의 가격이 비싸고, TrpA promoter인 경우에는 세포의 성장에 최적이지 못한 배지를 써야 한다는 단점이 있으며,  $\lambda$ PL인 경우에는 induction시키기 위해서 온도를 높여야 하는데 이 것 때문에 생산되는 단백질이 denaturation되는 경우가 있다. 이러한 문제점들을 해결하기 위해 본 연구에서는 *E. coli*에 있는 nar operon의 promoter를 inducible promoter로 쓸 수 있는지를 실험하였다.

#### 이론

Nar operon은 Fig.1에서 보는 바와 같이 promoter와 structural gene들로 이루어져 있다. promoter는 다시 regulatory protein들인 NARL과 FNR의 binding site들과 RNA polymerase binding site로 나누어진다. Structural gene들은 narG, narH, 및 narI gene들로 나누어지는데 이들은 각각 nitrate reductase의 subunit를 이루는 NARG, NARH, 및 NARI protein들을 만든다. 혐기조건 하에서 FNR이 activation되어 Nar promoter의 binding site에 붙고 배지속에 nitrate가 존재하면 NARL이 promoter에 있는 NARL자신의 binding site에 동시에 붙을 때에

nitrate reductase가 최대로 발현된다(2). 본 실험에 사용한 Plasmid pXR8971은 nar operon에서 nitrate reductase를 발현하는 structural gene을 끊어내고 assay를 쉽게하기 위해 beta galactosidase를 발현하는 lacZ gene이 cloning되었다. 이 plasmid는 chromosome상에 있는 nar operon이 wild type 균주인 *E. coli* Mv1190( $\Delta$ (lac-proAB), thi, supE,  $\Delta$ (srl-recA) 306:Tn10 (tet)<sup>r</sup>[F':tra36, proAB, lacIq, Z $\Delta$ M15])에 들어 있다. Nar promoter를 최대로 induction시키기 위해서는 nitrate이온의 존재하에서 anaerobic상태를 유지하면 된다. 따라서 실제 operation중 induction시키기 원할 때는 공기의 공급을 끊고 값싼 NaNO<sub>3</sub>를 넣기만 하면 된다.

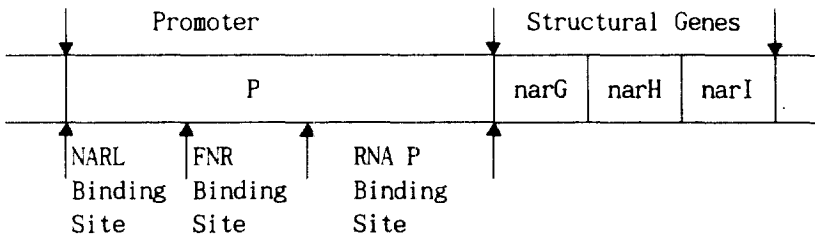


Fig.1 Nar operon의 개략도

실험방법

실험은 1.6ml eppendorf tube를 이용하여 최대발현을 위해 넣어야 할 nitrate, molybdate농도를 찾고, 250ml flask를 이용하여 nitrate를 넣어야 할 시점과 최적의 induction time, 및 세포주기에 따른 발현정도를 비교 관찰하여 최적의 induction시점을 찾았다. 그리고 DO probe가 장착 된 5L fermenter(B.E. MRUBISH)를 이용하여 배지내의 용존산소(DO)농도에 따른 발현율을 조사하였다. 배양된 *E. coli*농도는 spectrophotometer(SHIMADZU UV-160)를 이용하여 600nm에서 흡광도로 측정하였으며, 용존산소(DO)농도는 DO probe(MRUBISH DY-160)를 사용하여 측정하였다. 배양온도는 37°C, 교반속도는 0-500rpm으로 조정하였으며, 완전 혐기상태를 만들기 위해 질소가스를 불어 넣었다. 발현조건에 따라 nar promoter에 의해 발현 되는  $\beta$ -galactosidase의 assay는 Miller의 방법(3)을 따랐고, *E. coli*로부터 발현되는 단백질 양은 SDS-PAGE로 확인 하였으며, 이를 위해서 Sambrook et at.(4)의 방법을 따랐다.

결과

Nar promoter가 최대로 발현되는 조건은 NaNO<sub>3</sub>농도 1%(w/v)일때 세포성장을 저해하지 않고  $\beta$ -galactosidase가 최대로 발현되었고, molybdate는 nar promoter 발현에 별 영향을 미치지 않았다. NaNO<sub>3</sub>는 induction시에 첨가 하므로써 background발현을 작게 할 수 있었고, induction후 약 6시간 후  $\beta$ -galactosidase가 최대로 발현되었으며 세포성장에 따른 nar promoter의 발현을 조사한결과, middle log phase인 OD<sub>600</sub>=1.7에서 induction시켰을 때 한 batch당 발현된 전체  $\beta$ -galactosidase의 activity가 최대로 되었다. Fermenter실험에서 배지내에 용존산소 농도(DO)를 50% 이상 유지 했을 때 induction전에  $\beta$ -galactosidase specific activity가 30 units으로 거의 발현되지 않았고, 배양초기인 OD<sub>600</sub>=0.3에서 1% NaNO<sub>3</sub>를 첨가하고 완전 혐기상태를 만들기 위해 공기

를 끊고 질소가스를 불어 넣어므로써 최대 발현치(10,000 units)를 얻었다. 실제로, 세포농도  $OD_{600}=1.7$  에서 1%  $NaNO_3$ 를 첨가하고 질소가스를 불어 넣은 경우 효소활성이 7,600 units으로 단위 fermenter당 생산성에 있어서 최대였다.

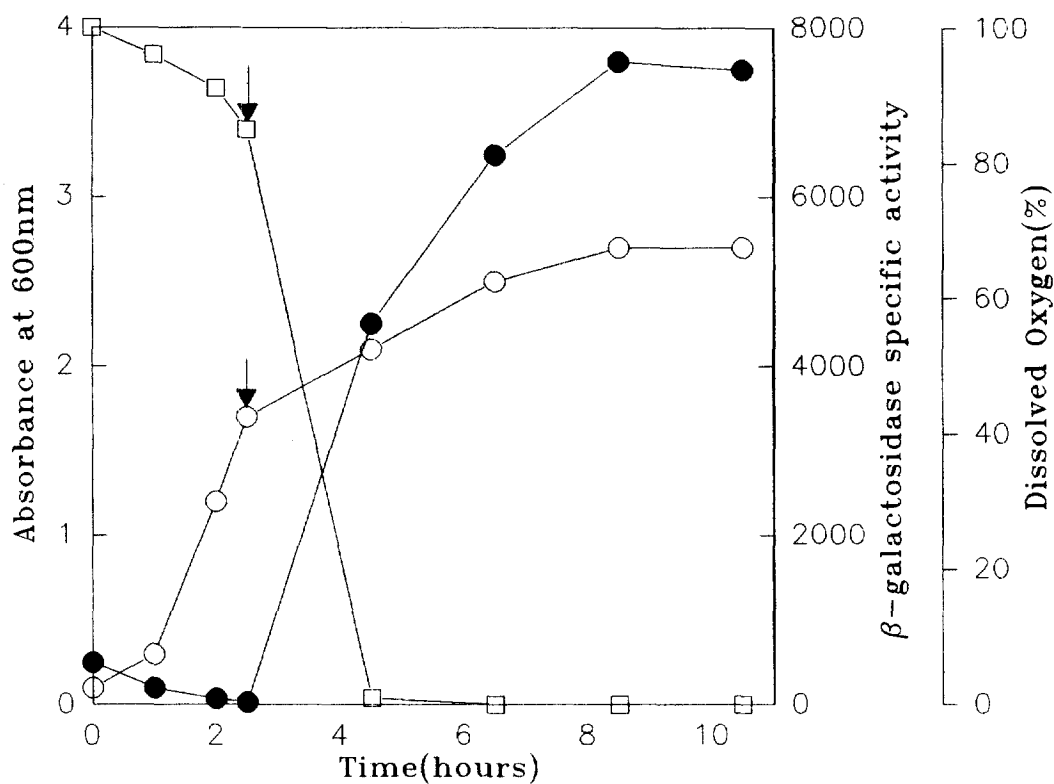


Fig.2 Induction of nar operon by  $NaNO_3$  and  $N_2$  gas

- - ○ : Absorbance at 600nm
- - □ : Dissolved Oxygen(%)
- - ● :  $\beta$ -galactosidase specific activity  
(Miller Units)
- ↓ : Sparging  $N_2$  gas + 1%  $NaNO_3$

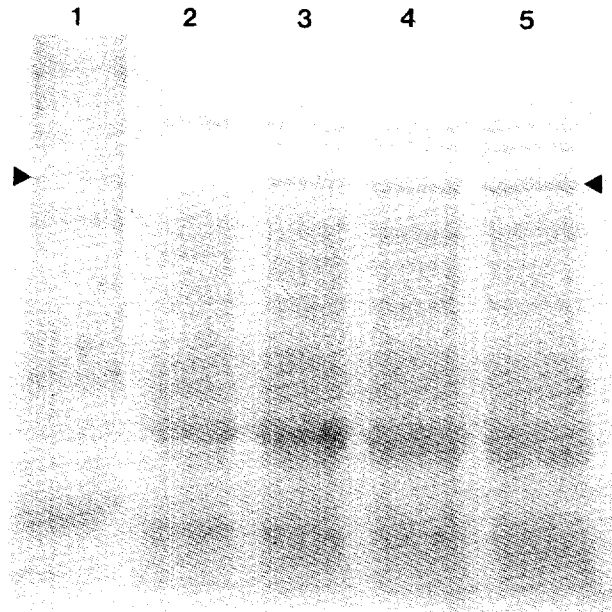


Fig.3 Induction profile of Lac Z gene on 8% SDS-polyacrylamide gel

▶ :  $\beta$ -galactosidase(116Kd)

Lane) 1 : Protein marker(Promega MW)

2 : Before induction(30 Units)

3 : 2 hours induction(4500 Units)

4 : 4 hours induction(6500 Units)

5 : 6 hours induction(7600 Units)

#### 참고 문헌

1. Goeddel et al. Nature 278,411-416, 1980
2. Li, S. F. and J. A. Demoss. J. Biol. Chem. 263, 13700-13705, 1988
3. Miller, J. H. Experiments in Molecular Genetics, 352-355, 1972
4. Sambrook, j., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. Molecular Cloning, 1989