

최 종
연구보고서

혈전용해효소 유전자 도입 및 발현에 의한
기능성 상추개발

Functional Lettuce Development by Fibrinolytic
Enzyme Gene Introduction and Expression

연구기관
진주산업대학교

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “혈전용해효소 유전자 도입 및 발현에 의한 기능성 상추개발에 관한 연구”
과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006년 7월 15일

주관연구기관명 : 진주산업대학교

총괄연구책임자 : 갈 상 완

세부연구책임자 : 갈 상 완

연 구 원 : 이 영 훈

연 구 원 : 김 도 형

연 구 원 : 임 미 진

연 구 원 : 문 정 혜

연 구 원 : 성 수 진

연 구 원 : 박 종 기

연 구 원 : 이 정 현

연 구 원 : 김 윤 정

연 구 원 : 이 원 경

연 구 원 : 배 도 희

협동연구기관명 : 경 상 대 학 교

협동연구책임자 : 이 성 호

연 구 원 : 전 주 미

연 구 원 : 안 남 영

연 구 원 : 김 민 경

요 약 문

I. 제 목

혈전용해효소 유전자 도입 및 발현에 의한 기능성 상추 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

최근 식생활의 변화와 함께 혈관장애에 의한 사망자가 급격히 증가하고 있기 때문에 혈관 장애의 주된 원인인 혈전의 치료 및 예방은 매우 중요한 과제로 대두되고 있다. 또한 세계 항 혈전제제의 시장은 '99년에 67억 달러로 추정되었으며 연평균 약 5% 이상의 성장률로 현재 약 93억 달러의 시장을 형성하고 있다. 지난 몇 년 동안 혈전 예방 및 치료제 시장에 상당한 발전이 이루어 졌으나 뇌졸중 분야의 경우 약효가 뚜렷한 치료제가 개발되지 않아 새로운 혈전 분해제 및 항 응고제 개발 수요를 일으키고 있으며 정부의 노력 또한 강화되고 있다.

혈전증은 혈관에 혈전(Fibrin)이 쌓여 혈액의 순환을 방해함으로써 세포의 성장장애 및 기능장애를 유발시키는 등의 원인으로 여러 형태의 성인병을 일으키는 증상을 말한다. 이러한 혈전증의 원인이 되는 혈전은 상처 복구시 생체내의 복잡한 blood clotting cascade mechanism에 의해 활성화된 thrombin에 의해 fibrinogen이 fibrin으로 전환되어 서로 중합체를 형성함으로써 생성된다. 평상시에 생성되는 혈전은 혈관벽에 부착하여 혈관을 좁게 만들어 혈압을 높일 뿐만 아니라 혈전을 형성하는 섬유소 성분은 접착성이 강하여 혈구나 응고된 덩어리를 만들어 혈액 내에 남게 된다. 이렇게 형성된 혈전은 혈액 중에 존재하면서 혈류를 방해하거나 혈관을 따라 이동하면서 뇌혈관과 관계 질환(뇌졸중, 뇌경색), 정맥관계 질환(심부정맥 혈전, 폐경색, 고혈압)과 같은 각종 순환기계의 성인병을 유발하게 된다.

이러한 순환계 질환들을 치료하기 위한 혈전 용해에 관한 연구는 20세기초반부터 활발하게 진행되고 있다. 혈전을 용해시켜 혈액순환을 용이하게 할 수 있는 작용물질로는 혈전을 바로 용해시키는 혈전용해효소(fibrinolytic enzyme)와 혈액중에 plasminogen을 활성화하여 plasmin으로 하여금 혈전을 분해시키도록 하는 plasminogen activator의 두 부류로 나눌 수 있다. 후자의 경우 생체 내 투여했을 때 과량으로 생성된 plasmin에 대한 면역반응으로 항 plasmin물질이 생산되어 혈전용해작용이 감소하게 되는 단점이 있다. 대표적 혈전용해제로

는 urokinase, *Staphylococcus* sp. 유래의 Staphylokinase, *Streptococcus haemolyticus* 유래의 Streptokinase, 악성종양인 melanoma cell 유래의 tissue plasminogen activator(tPA) 등이 있으나, 출혈 등과 같은 부작용이 있으며, 반감기가 짧고 고가인 단점이 있다. 이러한 단점을 보장하고 대량생산을 하기 위한 일환으로 현재 활발한 연구가 진행되고 있다.

상추는 조직배양 시 조작이 쉽고, 절편체로부터 쉽게 재분화 되며, 절편체의 종류와 빛은 상추의 신초형성에 영향을 주는 중요한자이다. 또한 식물 호르몬인 auxin과 cytokinin 역시 중요하다. 특히 빛은 기내 형태형성에 크게 영향을 미친다고 알려져 있다. 최근에는 시험관에서 상추 자엽으로부터 기관 재분화를 조절하는 배양환경, 절편체 나이, 식물호르몬의 상호작용에 관한 연구, 상추의 원형질체 배양 및 융합에 대한 연구 등 상추 육종을 위한 연구가 계속되어 지고 있다. 따라서 본 과제에서는 식물생명공학 기법을 이용한 새로운 기능성 형질전환체 상추 개발을 위한 전단계로서 재분화 능력이 뛰어난 상추 품종을 선발하고 재분화 효율을 극대화 시킬 수 있는 방법을 개발하고자 하며, 또한 원형질체를 이용한 형질전환체 상추 개발을 위해서는 필수적인 과정인 상추 원형질체로부터 완전한 식물체 재분화 조건을 확립하며 또한, *Agrobacterium*을 이용한 형질전환 방법도 확립한다. 최종적으로 이들 기술을 이용하여 Fibrin 특이적 혈전용해효소 유전자를 식생활에서 항상 섭취 가능한 상추식물에 도입 및 발현에 의한 기능성 상추를 개발함으로써 부작용이 없고 가격이 저렴한 Fibrin특이적 혈전용해 효소제제의 개발과 효소제이니 만큼 생으로 그리고 항시 섭취 가능한 식품의 개발, 그리고 원천기술이 있어 국내 수요는 물론 외국으로 수출이 가능한 형태의 제제를 개발하고자 한다.

III. 연구개발내용 및 범위

1. 혈전용해효소 유전자 탐색, 분리, 구조분석, 기능분석 및 제품화

가. 혈전용해효소 생산능이 우수한 미생물의 분리

- 1) fibrin plate assay법에 의한 혈전용해효소 생산능이 우수한 미생물을 분리
- 2) 16s rDNA sequence에 의한 미생물 동정 및 수탁 보존(특허출원)
- 3) Zymography assay법에 의한 혈전용해동위효소의 측정

나. 혈전용해효소 유전자 크로닝

- 1) shot-gun법에 의한 크로닝

2) PCR method에 의한 크로닝

다. 혈전용해효소 유전자 특성규명 및 재조합

- 1) DNA sequencing 및 Gene mapping에 의한 구조 분석
- 2) Gene bank search를 통한 분석
- 3) 혈전용해효소 유전자 deletion mutant 선발

라. 혈전용해효소 유전자의 시험관내 전사 및 번역

- 1) Genelator™ transcription and translation kit를 이용한 혈전용해효소 유전자 *in vitro* translation

마. 혈전용해효소의 대량발현 및 순수분리

- 1) 혈전용해효소 고 발현 벡터에 재조합 DNA 구축
- 2) 혈전용해효소의 대량발현
- 3) FPLC를 통한 혈전용해효소 순수분리
- 4) 항체개발

바. 혈전용해효소의 경구투여에 의한 생체 내 작용

- 1) Rat에 경구 투여 후 생체 내 효과 측정
 - 가) 출혈시간 측정 및 혈액응고시간 측정
 - 나) Serum의 혈전용해력 측정
 - 다) Western blot에 의한 혈액 내 효소의 확인
- 2) Rat를 통한 효소의 단회경구투여 독성검사
 - 가) 일반증상 관찰
 - 나) 중량의 변화 관찰
 - 다) 장기의 이상여부 관찰

사. 천연배지에서의 혈전용해효소 생산

2. 혈전용해효소 유전자의 상추에 도입 및 발현

가. 상추의 재분화 및 형질전환 조건 확립

- 1) 상추종자 발아용 배지의 제조 (MSO 배지)
- 2) 상추종자 표면 살균 및 파종
- 3) MSO 배지 상에서 상추 종자 발아
- 4) 상추 조직 절편체로부터 식물체 재분화 배지 제조 (KN 배지)
- 5) 상추 자엽 절편체들을 식물체 재분화 배지에 치상
- 6) 상추 제1엽 절편체들을 식물체 재분화 배지에 치상
- 7) 재분화 배지에 치상된 상추 자엽 절편체로부터의 식물체 재분화
- 8) 재분화 배지에 치상된 상추 제1엽 절편체로부터의 식물체 재분화
- 9) 상추 자엽과 제1엽으로부터 품종별 식물체 재분화 효율
- 10) 다양한 재분화 배지에 따른 상추의 자엽과 제1엽으로부터 식물체 재분화 효율
- 11) 조직배양에 의해 재분화된 상추로부터 개화된 완전한 식물체로 성장

다. 상추 원형질체로부터 재분화 유도 및 식물체로 성장

- 1) 상추 엽육조직으로부터 원형질체 분리를 위한 시약 제조
- 2) 상추 원형질체 배양을 위한 배지 제조
- 3) 상추 원형질체 분리 및 정제
- 4) 상추 원형질체들을 Agarose-embedding 방법에 의한 배양
- 5) 상추 원형질체들로부터 세포분열 유도
- 6) 상추 원형질체들로부터 microcolony, macrocolony, callus 유도
- 7) 상추 원형질체들로부터 유도된 callus들로부터 식물체 재분화
- 8) 원형질체로부터 재분화된 식물체들의 뿌리 유도 및 순화 후 완전한 식물체로 성장

다. 혈전용해효소 유전자 상추에 도입 및 발현

- 1) 혈전용해효소 유전자의 상추 도입을 위한 vector 구축
- 2) 혈전용해효소 유전자를 함유한 *Agrobacterium*을 상추 조직에 감염
- 3) 혈전용해효소 유전자를 함유한 형질전환체 상추 재분화
- 4) 혈전용해효소 유전자를 함유한 재분화된 형질전환체 상추 shoot의
GUS staining
- 5) 혈전용해효소 유전자를 함유한 형질전환체 상추의 온실에서 완전한 성장
- 6) 혈전용해효소 유전자를 함유한 완전한 형질전환체 상추의 GUS staining
- 7) 형질전환 상추에서 PCR, PCR 및 southern blot을 통한 혈전용해효소 유전자의 검증
- 8) 형질전환체 상추에서 항체에 의한 혈전용해효소의 검정
- 9) R₀ seedling의 Gus staining assay

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구결과

가. 혈전용해효소 유전자 탐색, 분리, 구조분석, 기능분석 및 제품화

1) 혈전용해효소 생산능이 우수한 미생물의 분리

혈전용해효소 생산능이 우수한 미생물을 분리하기 위하여 전통발효방법 중 종균을 접종하지 않은 자연접종방법으로 흑두청국을 제조하여 9종의 혈전용해능을 가지는 미생물을 분리하였으며 그 중 BB-1이 가장 강한 활성으로 대조구인 plasmin 보다 4배 이상의 혈전용해능을 보였다. 혈전용해능이 우수한 미생물의 동정을 위하여 16s rDNA sequence를 실시한 결과 그 유전자 상동성이 *Bacillus subtilis*와 99.0% 유사성을 보여 *Bacillus subtilis* BB-1으로 명명하고 한국미생물보존센터에 수탁 보존하였다(수탁번호 KFCC11344P). *Bacillus subtilis* BB-1의 혈전동위효소를 zymography를 통하여 측정된 결과 70, 45, 30, 25, 19kDa의 5가지로 확인되었으며 본 미생물은 현재 특허출원중이다.

2) 혈전용해효소 유전자 특성규명 및 재조합

혈전용해효소 유전자를 *B. subtilis* BB-1 으로부터 두 종을 분리하였으며, 이 중 하나는 shot gun법에 의해 분리하여 DNA sequence를 실시한 결과 2.5kbp 크기의 유전자로서 NCBI를 통하여 검색한 결과 기존에 알려진 혈전용해효소 유전자와는 전혀 상동성을 전혀 보이지 않아 새로운 혈전용해효소 유전자임을 확인하였으며 본 유전자를 BSF-1으로 명명하였다. 이 유전자는 안정성과 높은 생리활성이 입증된 청국의 고초균에서 분리되었다는 점에서 식품제조 사용 시 위험성을 배제할 수 있으며, 혈전증 및 순환기계통의 성인병에 대한 예방인자로 사용가능하리라 판단된다. BSF-1의 deletion mutation에 의한 효소 활성을 측정된 결과 최초의 ATG와 TAA단편사이의 유전자에서만 활성을 보였으며 기질특이적인 부분에서는 skim milk, casein, gelatin, blood agar plate에서 분해현상은 보이지 않았다. 특히 blood agar plate에서 분해가 일어나지 않은 것은 urokinase나 streptokinase의 혈액 내 부작용에 대한 것을 비교해 볼 때 본 효소는 적혈구 파괴현상이나 혈액 내에서의 부작용에 대한 1차 위험성을 배제할 수 있을 것으로 판단된다. 그리고 본 효소의 최적 pH와 온도는 5.0, 35°C로 각각 나타났다.

또 다른 하나의 유전자는 NCBI에 등록된 *Bacillus* sp. 들로부터 이미 크로닝 된 혈전용해효소 유전자들 중 공통된 연결순서 영역으로부터 primer를 합성하여 1.145bp의 유전자를 얻었다. 이 유전자의 DNA sequence를 바탕으로 유전자를 검토했던 결과 Nattokinase gene과 99.0% 유사성을 보였으며 본 유전자를 BCF-1으로 명명하고 시험관내 전사와 번역 및 *Bacillus-E.coli* shuttle vector인 pEB vector에 재조합하여 대량

발현계를 구축하여 본 연구에 사용하였다.

3) 혈전용해효소 유전자의 PCR method에 의한 크로닝

(in *vitro* transcription and translation)

BCF-1 유전자를 대장균 내에 도입하여 혈전용해능을 조사한 결과 전혀 그 활성을 보이지 않는 것을 확인하여 IntRon사의 genelator™ in *vitro* transcription and translation kit을 이용하여 시험관내에서 발현시켰다. 반응 후 생성된 효소를 fibrin plate에 적당량 loading하여 그 활성을 조사한 결과 혈전용해효소가 생산되고 또한 높은 활성을 갖는 것을 확인하였다. 이 원인을 분석한 결과 혈전분해효소도 일종의 protease로 대장균 내에서 발현됨과 동시에 host의 대사 및 생명에 치명적으로 영향을 미쳐 균이 처음부터 생육하지 못하는 것으로 판단되었다.

4) 혈전용해효소의 대량발현 및 순수분리

혈전용해효소의 대량발현 시스템을 구축하기 위하여 *Bacillus*와 *E. coli*의 shuttle vector에 크로닝된 BCF-1 유전자를 protease 활성이 비교적 적은 *Bacillus* 168 strain을 사용하여 형질전환 시킨 후 대량 발현을 유도하였다. 재조합 균주에서 혈전용해효소는 배양상등액을 회수, 70% ammonium sulfate를 이용한 침전, 투석 그리고 FPLC gel의 4 단계에 의하여 분리 정제한 결과 약 30kDa의 단일 band로 순수 분리되었다. 생산된 혈전용해효소의 최적 활성 pH와 온도는 7.0과 35°C로 확인되었으며 기질에 대한 분해양상을 조사한 결과 skim milk에서만 약한 분해능을 보였으나, blood agar, gelatin, casein에서는 전혀 분해능을 보이지 않았다. 순수 분리된 혈전용해효소를 토끼를 통하여 항체를 제작하여 *B. subtilis* BB-1, 대량발현 벡터에 크로닝된 *B. subtilis* 168 균과 순수분리된 단백질을 western blot을 실시하였을 때 약 30kDa의 band가 모든 실험군에서 동일하게 나타났다.

5) 혈전용해효소의 경구투여에 의한 생체 내 작용

B. subtilis BB-1 (KFCC 11344P) 으로부터 분리된 혈전용해효소 유전자(BCF-1)를 대량발현 벡터인 pEB 벡터에 크로닝하여 *B. subtilis* 168 host에 약 80% 배양한 배양상등액을 rat에 경구 투여하여 출혈시간, 혈액의 응고, serum의 혈전용해능 등에 대한 *in vivo* 실험을 실시하였으며, 혈전용해효소의 단회경구투여에 따른 독성을 검사하였다. 효소의 경구투여에 따른 rat의 출혈시간에서는 대조군에 비하여 모든 경구 투여군에서 출혈시간이 유의적으로 약 1.75배 이상 길게 나타남을 확인하였고(P<0.05) 혈액의 출혈시간 또한 활발히 진행됨을 관찰하였다. 혈액으로부터 분리된 serum의 혈전용해작용

있어서는 경구투여 후 1시간부터 채혈한 혈액 내에서 혈전용해효소의 활성이 검출되기 시작하여 3시간째 까지 높은 활성을 보였으며 4시간째부터 서서히 활성이 감소하는 것을 확인하였고 혈액의 응고 역시 대조군에 비하여 경구 투여군에서 상당히 지연되는 것을 알 수 하였다. Western blot에 의한 효소 검출에서는 경구 투여군에서 30,000 Da 크기의 단일밴드를 확인하였으며, 혈전용해효소의 rat에 대한 단회경구투여 독성실험에서 중량의 변화, 장기의 이상여부, 사망률 등에서 어떠한 이상이나 병변이 발견되지 않았다. 이상의 결과로 동물실험을 통한 혈전용해효소의 경구투여에 의한 작용을 혈액 내에서 확인 할 수 있었으며, 본 효소의 단회 경구투여 시의 독성은 전혀 없음을 확인할 수 있었다.

6) 천연배지에서의 혈전용해효소 생산

대량발현시스템에 의해 재조합된 균주를 전통발효식품 등의 식품에 도입하기 위하여 합성배지가 아닌 식용 가능한 천연배지에서 혈전용해효소 생산능을 확인하기 위하여 여러 가지 곡물가루와 탈지분유를 조합하여 배양용 배지로 사용하였다. 천연배지성분으로는 검은콩가루, 대두가루, 밀가루, 쌀가루, 대두박가루, 조가루, 옥수수가루, 보리가루, 감자전분가루, 엿기름가루, 탈지분유를 사용하였고 천일염을 각 1% 첨가하여 사용하였다. 혈전용해활성의 정도를 측정하기 위하여 대조구로서 합성배지인 LB broth를 사용하였다. 동일한 조건으로 배합된 배지에서 재조합 균주를 배양한 결과 탈지분유 2%, 흑두 2% 그리고 천일염 1%의 배합조건에서 LB broth에서 배양할 때보다 약 1.5배의 혈전용해능을 보였으며 배양 10일째까지 높은 활성을 유지하였다.

나. 혈전용해효소 유전자의 상추에 도입 및 발현

상추 종자 파종 후 6일째와 10일째의 유묘가 자엽과 제1엽 절편체의 실험재료로 사용하기에 적합했으며, 발아율은 청치마 품종에서 가장 높게 나타내었다. 자엽과 제1엽 절편체로부터 식물체 재분화는 치상 후 3주째부터 shoot의 재분화가 되기 시작했고 7주째부터 재분화된 식물체들로부터 뿌리가 유도되었다. 10주째에 재분화 된 식물체들을 순화시켜 화분에 옮겨 완전한 식물체로 성장 시켰다. 식물체 재분화 배지인 KN 배지에서 식물체 재분화율을 품종별 비교 했을 때 자엽에서 정통포기 품종이 91.2%로 가장 높게 나타났다. 제1엽에서도 정통포기 품종이 85.7%로 가장 높게 나타났다. 발아율이 높고 재분화 효율이 가장 낮은 청치마 품종의 재분화 효율을 높이기 위해 다양한 재분화 배지를 사용하여 청치마 품종의 자엽과 제1엽의 식물체 재분화 효율을 비교했다. 자엽에서 재분화 효율은 KI 배지와 SH 배지, NB 배지에서 거의 평균 77%의 높은 재분화 효율을 나

타내었고, MSD3 배지에서는 그 보다 낮은 61%의 효율을 나타내어 모든 배지에서 KN 배지 보다 높게 나타났다. 제1엽에서도 SH 배지에서 85%로 가장 높게 나타났고, KI 배지에서 81%, NB 배지에서 67%, MSD3 배지에서 61%의 효율을 나타내어 KN 배지보다 모두 높게 나타났다. 상추 엽육조직으로부터 원형질체 분리는 1.2% cellulase R-10과 0.3% macerozyme R-10의 효소용액에서 12시간 incubation하여 평균 g 당 8.25×10^6 개의 원형질체들이 분리되었다. KM8P/ KM8 배지에서 ml 당 3.5×10^5 개의 원형질체 농도로 agarose-embedding 방법으로 배양 했을 때, 배양 1주 후에 원형질체 분열이 개시되었고, 배양 4주 후에 microcolony들이 형성 되었고, 배양 3개월이 되었을 때 원형질체 배양체들은 육안으로 뚜렷하게 볼 수 있는 colony들을 형성했다. 각 colony들을 식물체 재분화 배지에 옮겨 준 후 배양 7주 후에 완전한 식물체로 재분화 되었다. 재분화된 각 식물체들로부터 뿌리 유도를 위해 각 식물체들을 식물호르몬이 첨가되지 않은 MSO 배지로 옮겨서 뿌리를 유도했고, 이들을 순화시킨 후 상토가 담긴 화분으로 옮겨서 완전한 식물체로 성장시켰다. 본 실험에서 세포 1개인 원형질체로부터 완전한 식물체로 성장시킴으로써 식물세포들의 전체형성능 (totipotency)을 확인할 수 있었으며, 이들의 기술을 이용하여 원형질체들을 이용한 내병성이나 내한성과 같은 유용유전자들을 도입하여 현재 식물생명공학의 꽃이라고 할 수 있는 형질전환체 기능성 상추를 개발할 수 있는 발판을 마련했다고 본다. 또한, 상추 자엽이나 제1엽의 절편체들로부터 개화된 완전한 식물체들을 성장시킴으로써 이 기술을 이용하여 *Agrobacterium*에 유용유전자를 도입하여 이들 절편체들을 감염 시켜 형질전환체 상추를 개발할 수 있는 기초실험을 확립하였고, 이 기술들을 이용하여 혈전용해효소 유전자를 함유한 *Agrobacterium*을 이용하여 기능성 형질전환체 상추를 개발하였다.

다. 건의사항

본 연구과제는 혈전용해효소 유전자를 상추식물에 도입하여 혈전용해능을 가지는 기능성상추를 개발함이 목적이며, 본 연구팀은 혈전용해효소 유전자를 크로닝하여 생산되는 효소의 특성을 조사하고 대량발현시스템을 구축하여 효소의 최적생산조건을 확립하였으며, 상추에 도입하여 혈전용해효소 유전자 함유 형질전환체 상추를 개발하였다. gus assay와 RT-PCR을 통해 안정된 형질전환체 상추가 개발되었다. 그러나 불행히도 혈전용해효소 유전자 발현은 3개체에서 western blot으로 검출되었으나, 재연성이 없었다. 다만 seedling 후 재확인을 기다리고 있다. 그리고 현재 유전자 변형생물체(GMO)에 대한 법규제도가 국내외적으로 완전하게 체계화 되지 않은 점을 볼 때 상품화에 따른 시간적인 여유가 필요할 것으로 판단된다. 따라서 본 연구의 성과는 앞에서 언급한 내용까지이

며 2년 정도의 기간연장을 주시면 세균과 식물사이의 유전체계의 상이한 점을 고려하여 100% 확신은 못하지만 꼭 혈전분해효소 활성을 갖는 상주를 개발하고 싶다. 물론 지원이 없더라도 개인적으로 연구는 계속할 생각임.

SUMMARY

(영문 요약문)

Functional Lettuce Development by Fibrinolytic Enzyme Gene introduce and Expression

1. Cloning and characterization of a gene for fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis* BB-1 isolated from black bean *chung-kuk*.

A bacterium producing five fibrinolytic isozymes was isolated from black bean *chung kuk*. The bacterium was identified as *Bacillus subtilis* BB-1 by 16s rDNA sequence homology search. A gene out of five fibrinolytic genes in the *Bacillus subtilis* BB-1 was cloned by shot-gun method. A *Cla* I DNA fragment of *B. subtilis* BB-1 chromosome was cloned in to pBluescript II SK(-) and showed the fibrinolytic activity to bacterial cells. The *Cla* I DNA fragment was sequenced and the sequences did not show homology with gene for protease or fibrinolytic enzyme genes in other organisms. The *Cla* I DNA fragment was reduced to 2,146 bp by activity-guided PCR cloning method. The optimum pH and temperature of the enzyme were 5.0 and 37°C, respectively. Substrate specificity of the fibrinolytic enzyme was detected in skim milk, casein, gelatin and blood agar plates. The activity of the enzyme was not detected with these substrates. Taken together, this enzyme is a new fibrinolytic enzyme and may be used to prevent thrombosis and arteriosclerosis.

2. Cloning of a fibrinolytic gene(BCF-1) from *Bacillus subtilis* BB-1 and its *in vitro* translation

A fibrinolytic enzyme gene was isolated from *Bacillus sutilis* BB-1 by PCR method. Primers for PCR cloning were designed according to pre-identified genes for fibrinolytic enzymes from *B. subtilis* strains. The primer sequences are 5'-CGG ATC CGT GAG AGG CAA AAA GGT G-3' and 5'-TGA ATT CTT AAT GTG CTG CTG CTT GTC

C-3' as consensus sequences of the fibrinolytic genes. The PCR product was 1,145bp and the sequence homology was 99% with nattokinase gene isolated from Japanese natto. The cloned fibrinolytic gene was *in vitro* transcribed and translated by using Genelator™ transcription and translation kit. The *in vitro* expressed protein is a monomeric protein and had fibrinolytic

3. High expression of a fibrinolytic gene(BCF-1) from *Bacillus subtilis* BB-1

The cloned fibrinolytic gene was reconstructed in *Bacillus-E. coli* shuttle vector, pEB for bulk-production. The fibrinolytic enzyme was purified by FPLC from the cloned *B. subtilis* 168. The optimum pH and temperature of the enzyme were 7.0 and 37°C, respectively. The fibrinolytic enzyme did not show any activity toward to skim milk, gelatin, casein and blood agar plate. The enzyme specific polyclonal antibody was prepared in rabbit for further assays such as detection of the gene expression in plant cells. This means that the enzyme may be used for health-care such as thrombosis without any harmful effects in the blood vessel.

4. *In vivo* Biological Function of a Fibrinolytic Enzyme after Oral Administration

A fibrinolytic enzyme gene (BCF-1) was subcloned to the pEB vector which is high expression vector in the *Bacillus* host. The enzyme was purified by using FPLC after ammonium sulfate precipitation. The enzyme was oral-administrated to the rat and checked the bleeding time, blood clotting time and fibrinolytic effect of the serum. In the bleeding time retardation test, it was longer about 1.7 fold in the feeding rat than without feeding. The serum of rat fed with the enzyme had the fibrinolytic activity from 1 hour to 3 hours after oral-administration. After 3 hours from feeding, the fibrinolytic activity was decreased gradually. Also blood clotting time after bleeding was longer than that of control rat. The enzyme could be detected at band of 30,000 Da in the blood by western blotting. The enzyme was not harmful to the all internal organs of the rats. Taken together, the enzyme originated from *B. subtilis* BB-1 can be a candidate to develop the drug for thrombosis, arteriosclerosis and myocardial infarction.

5. Functional Lettuce Development by Fibrinolytic Enzyme Gene introduction and Expression

The system for plant regeneration from cotyledon and primary leaf explants of lettuce was established, and highly regenerable lettuce cultivar was screened. Plant regeneration efficiency was shown 91.2% from cotyledon and 85.7% from primary leaf explants in variety 'Jungtongpogi' of lettuce. Plant regeneration efficiency was also estimated with various plant regeneration media in variety 'Chungchima' of lettuce. KI medium showed 78% of regeneration efficiency from cotyledon and 81% from primary leaf explants. Protoplasts of lettuce were isolated from mesophyll tissues with 1.2% cellulase R-10 and 0.3% macerozyme R-10 and cultured on KM8P/KM8 medium using agarose-embedding method. Fertile plants were regenerated from protoplasts of lettuce. The vector was constructed with fibrinolytic enzyme gene for lettuce transformation and transformed to explants of lettuce using *Agrobacterium tumefaciens*. The gene expression of GUS was shown on infected regions of explants. Transformed shoots containing fibrinolytic enzyme gene were regenerated from explants on antibiotic selection medium containing 50 mg/ L hygromycin and expressed GUS gene. The fertile transgenic lettuces were grown in glass house and confirmed fibrinolytic enzyme gene by PCR. The expression of fibrinolytic enzyme was also confirmed by RT-PCR in transgenic lettuces.

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성

1.. 연구개발의 개요

최근 생활수준의 향상과 더불어 건강에 대한 관심이 급속히 높아져 가고 있는 추세이며, 특히 현대 도시 생활자 들은 성인병의 예방과 치료에 대한 관심이 대단히 높다. 성인 병 중에서도 손상된 혈관 내에서 혈액손실을 최소화하기 위한 지혈기능의 이상으로 유래 되는 뇌혈관 질환이나 심장질환은 생명에 치명적이며 후유증 또한 심각하다. 현재 심혈 관계 질환의 경우, 사회의 발달과 인구의 고령화에 따라 급속히 증가하고 있으며, 그 사망률의 합계는 악성종양의 경우를 상회하고 있어 예방 및 치료제에 대한 개발이 매우 시급한 실정이다(Table 1-1).

생체 내에서 혈액은 응고와 용해작용이 항상 균형을 이루고 있으며 정상적으로 순환하고 있는 동안 생성된 혈전은 즉시 분해되어 인체에 영향을 주지 않는다. 그러나 여러 가지 원인으로 균형이 깨지면 생성되는 혈전이 분해되는 혈전보다 많아지고 분해되지 않은 혈전은 혈류를 통하여 혈관을 막게 되므로 혈액의 순환이 방해되어 조직으로의 영양분 및 산소공급이 중단되게 되며 뇌졸중 및 심장질환의 원인이 되기도 한다. 혈전의 생성과 분해되는 두 가지의 기작은 Fig. 1-1과 같다. 이러한 혈전증의 시작은 노화에 따라 진행되는 혈관 벽에서 발생하는 죽상경화의 일종이지만, 혈관중의 혈소판 응집력의 향진에 의한 혈전의 형성이 직접적인 원인이 되기도 한다. 이와 같은 경우 혈전형성을 방지하기 위해 항 혈전제가 필요하고, 이미 형성된 혈전의 경우에는 혈전을 용해하여 혈전을 치료하는 혈전용해제가 필요하다. 혈전의 생성을 방지하고 생성된 혈전을 용해하는 치료제를 개발하기 위해 지금까지 여러 치료법이 연구되어 왔다. 현재, 혈전증의 치료에 널리 사용되고 있는 urokinase, streptokinase, staphylokinase, tPA(tissue plasminogen activator) 등은 가격이 매우 높은 단점이 있으며, urokinase를 제외하고는 경구투여가 불가능한 실정이다. 최근 혈관 주사되는 tPA 이외에 병행요법으로 직접 경구 투여함으로써 혈액내의 혈전용해능을 증가시키는 제제에 대한 관심을 갖기 시작하고 있다. 현재 경구 투여하는 혈전용해제는 지렁이(*Lumbricus lubellus*)로부터 분리된 6가지의 혈전용해효소가 보고되고 있으며, 우리나라에서도 명심, 용심과 같은 제제가 제약화 되어 있다.

Sumi 등의 보고에 의하면 urokinase를 장내에 투입시켜 흡수시키면 혈액내의 혈전용해능이 현저히 증가한다고 하여 관심을 끌었다. 즉, 장에서 흡수된 urokinase가 간에 도달하여 혈전을 용해시키는 효소의 합성을 증진시킴으로써 혈전용해능이 증가하는 것으로 추측된다고 보고함으로써 혈전용해효소의 장내투여 응용성이 가능하다는 점을 시사하고 있다. 또한 일본의 전통 대두 발효식품인 natto로부터 분리된 nattokinase라는 효소를 경구 투여시 생체내의 혈전용해능을 높일 수 있었다는 보고가 있어서 현재 일본에서는 natto가 혈전용해능을 지닌 건강식품으로서 판매량이 급격히 증가하고 있다. 우리나라에서도 일본의 natto와 마찬가지로 콩을 원료로 하여 발효시킨 전통식품인 청국장, 된장, 젓갈, 김치등에서 혈전용해작용이 우수한 것을 보고한 바도 있으며, 특히 Jeong 등은 멸치액젓에서 생체 내 혈전용해작용에 대하여 보고한 바 있다.

상추의 학명은 *Lactuca sativa* L.로 국화과에 속하는 채소로서 대체로 서늘한 기후를 좋아하며, 고온에는 약하고, 저온에는 상당히 잘 견디는 편이다. 상추는 재배역사가 오래되어 기원전 550년경부터 그 기록을 찾아 볼 수 있는데 원산지는 북아프리카, 남부유럽, 서남아시아 등지로 알려져 있고 우리나라에는 고구려시대 때부터 재배되어 온 것으로 추정된다. 우리나라에서는 주로 쌈과 샐러드로 소비되고 있는데 다른 일반 채소류에 비하여 수분(약 90%정도)이 많은 편이며 칼슘과 무기염류가 많이 들어있고 비타민의 함량도 상당히 높다. 또한 상추에는 독특한 쓴맛이 있으며, 그 주성분이 lactucerin, lactucin, lactucic acid 등인데, 이것은 일종의 alkaloid로서 아편과 유사한 성질이 있어, 아편대용으로 최면, 진통제로 사용되기도 하며 상추쌈을 먹으면 졸리어 숙면을 취할 수 있는 것도 이 성분들의 작용 때문이다. 지난 10년간 평균 1인당 1일 소비량은 6.76g이며, 최근 소득증가로 육류소비가 증가하면서, 상추의 소비량도 매년 증가하고 있다. 최근에는 샐러드용으로 많이 소비되기도 하지만 주 소비로는 육류, 생선회에 곁들인 쌈으로 가장 많이 소비되고 있다. 지금까지 상추에 관한 많은 육종 프로그램이 개발되어 왔으나, 습한 온대 지역에서 발생하는 병과 고온에 대한 적응성 문제 때문에 상업적인 생산이 어려운 경우가 많았다. 따라서 상추의 육종은 품종간 교잡에 의한 내서성 또는 병저항성에 초점을 두어왔으나, 종래의 육종방법으로는 해결하기가 쉽지 않다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 최근 원형질체를 이용한 형질전환체 상추 개발이나, 또는 토양 박테리아인 *Agrobacterium*에 의한 형질전환과 같은 유전자 조작기술 등이 새로운 육종방법으로 각광 받게 되었다.

따라서 본 연구는 fibrin 특이적 혈전용해효소의 대량발현 및 특성을 규명하고 그 유전자를 상추식물에 도입하여 기능성 상추를 개발함으로써 부작용이 없고 가격이 저렴한

Fibrin특이적 혈전용해 효소제제의 개발과 효소제이니 만큼 생으로 그리고 항시 섭취 가능한 식품의 개발, 그리고 원천기술이 있어 국내 수요는 물론 외국으로 수출이 가능한 형태의 제제(상추종자 등)를 개발하고자 하였다.

Table 1-1. Annual mortality trends by leading cause of death in korean

Cause	2001	2002	2003	2004	Death rate (%)
All reported deaths	242,730	246,515	245,817	245,771	100
Malignant neoplasma	59,119	62,887	63,685	64,731	26
Cerebrovascular diseases	35,354	37,134	36,495	34,091	16
Heart diseases	16,375	17,889	17,889	17,915	7
Diseases of the liver	10,654	10,572	9,934	9,272	4
Diabetes mellitus	11,403	12,090	12,100	11,768	5

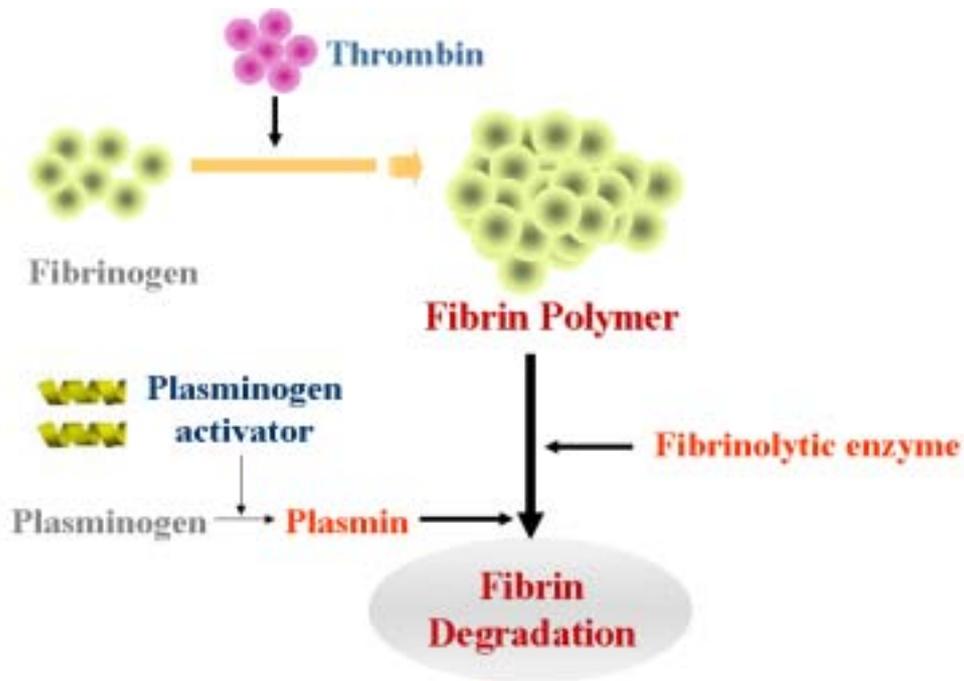


Fig. 1-1. Mechanism of thrombosis and fibrinolysis.

2. 기술적 측면

가. Fibrin(혈전) 특이적 혈전용해효소의 유전자

1) 현재 알려진 혈전용해효소로는 urokinase, streptokinase, lumbrokin -ase 등이 있는데 값이 고가이며 대부분 혈관벽 분해의 역효과도 있음. 따라서 혈전 특이적 혈전용해효소의 생산이 시급함.

2) 약으로만 섭취해야 하기 때문에 규칙적으로 섭취하기가 쉽지 않음.

3) 대량생산이 매우 어려움.

따라서 섭취가 용이하고, 대량생산이 가능하게 혈전용해효소 유전자를 상추식물에 도입·발현시킴으로써 우수한 혈액순환개선제를 개발하고자 함.

나. 항시 섭취 가능하며 값이 저렴한 혈액순환개선제

1) 효소제는 경구용으로 사용이 쉽지 않으나 이미 명심·용심이 두 제약에서 캡슐화되어 시판되고 있음. 그러나 이 제품의 원료는 전량 일본에서 수입되고 있는 실정이며, 고가임.

2) 명심, 용심은 지렁이를 냉동건조하여 가루로 만든 것으로 혈전용해효소는 lumbrokinase이며 fibrin 특이성이 낮아 혈관벽 분해의 부작용이 우려됨.

따라서 항상 생으로 섭취 가능한 상추식물에 fibrin 특이적 혈전용해효소 유전자를 도입·발현시킴으로써 구입이 용이하고 값이 저렴하면서 대량생산이 가능함.

다. 외부 유전자 발현이 우수한 형질전환체 식물이 계속 개발되고 있는 실정임

1) 캐나다 Calgary 대학의 Moloney 교수팀의 혈액응고 방지 단백질인 Hirudin의 유전자를 배추에서 발현을 성공하였음.

2) 역시 같은 그룹에서 β -glucuronidase 유전자 발현역시 성공하여 종자에서 β -glucuronidase를 생산하였음.

3) 따라서 상추식물에 혈전용해효소유전자 발현은 어렵지 않으며 충분히 성공가능성이 있는 연구임을 확신함.

마. 제품화가 용이함.

1) 혈전용해효소 유전자가 발현된 상추 자체를 상품화 할 수 있음.

- 상추쌈, 상추종자

2) 형질전환된 상추로부터 혈전용해효소를 대량순수분리 할 수 있음.

3) 형질전환된 상추를 동결 건조하여 가루를 만든 다음 캡슐화 할 수 있음.

4) 형질전환된 상추자체를 동결건조 후 파우더로 하여 Tea-bag에 넣어 상품화 할 수

있음.

3. 경제·산업적 측면

가. 농민은 부가가치가 높아 경제성이 있고, 소비자에게는 저렴한 가격의 제품개발

1) 순환계 질병환자는 혈전용해제를 꾸준히 계속적으로 복용하여야 하는데 가장 문제가 되는 것은 경제적 문제임.

2) 지금까지 개발된 제제는 아주 고가이며 fibrin특이성이 낮아 2차 발병의 위험성이 있음.

3) Casein이나 skim milk분해력은 낮고 fibrin분해력이 뛰어난 혈전용해효소 유전자를 상추식물에 발현시킴으로써 위의 (1), (2)조건을 충족시킬 수 있음.

나. 순환계질병 환자의 증가로 새로운 혈전용해제 개발이 필요함.

1) 우리나라 국민의 사망원인별 사망자의 43%가 순환계질환에 기인

2) 정상인이 항시 섭취함으로써 순환계 질병을 예방하여 막대한 경제적 이익 창출

다. 수입대체를 위한 국내 생산이 가능한 소재의 개발이 필요함.

1) 현재 시판되고 있는 혈전용해제 명심, 용심은 100% 일본에서 수입되고 있음.

2) 혈전용해효소 유전자를 상추식물에 도입함으로써 수입대체효과

4. 사회·문화적 측면

가. 순환계 질병환자의 급격한 증가로 인한 사회문제가 심각함.

나. 2001년 9월 17일자 중앙일보의 보고에 의하면 우리나라 55세 이상 어른이 겪는 질병 부담률(질병의 빈도, 위중도, 치료비를 종합해 산출한 백분율)은 뇌졸중이 1위(14%)를 차지하였고, 심부전증 등 순환계 질병을 종합해서는 약 30%가 순환계질병 부담률로 나타났음.

다. 1년에 약 40,000명이 순환계 질병으로 사망함.

다. 따라서 항시 섭취함으로써 순환계 질병을 예방할 수 있는 식품개발이 절실히 필요함.

제 2 절 연구개발 목표

1. 연구개발 목표와 내용

가. 최종목표

Fibrin 특이적 혈전용해효소 유전자를 크로닝하여, 혈전용해효소를 대량생산하고 산업적 이용가치를 조사한 다음 이를 상추식물에 도입하여 대량 발현시켜 기능성 상추개발

나. 연구목표와 내용

연구 목표	연구 개발내용 및 범위
<p>■ 혈전용해효소 유전자 확보 및 생화학적 특성조사</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 혈전용해효소 유전자 재조합 확인 (대량발현시스템 구축) • <i>in-vitro</i> translation • 순수분리-항체제작 • 효소의 안전성 조사 • 효소의 안정성 조사 • 경구투여에 의한 생체 내 효과검증
<p>■ 상추식물에 혈전용해효소 유전자 도입 및 발현</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 상추의 형질전환 기법확립 • 상추에 혈전용해효소 유전자 도입 및 발현 • 혈전용해효소 유전자의 차세대 발현 검증 • 혈전용해효소 유전자 함유 상추 개발
<p>■ 산업화</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 혈전용해효소 함유 청국환 개발 • 혈전용해효소 활성 함유 상추분말 개발 • 상추종자개발

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 현 황

1. 순환계질병 환자의 증가

가. 전 세계적으로 순환계질병환자의 증가 추세

나. 국내에도 순환계질병환자의 증가 - 약 500만명으로 추정

- 1) 사망자의 43%가 순환계질병에 기인
- 2) 년 간 약 4만명이 사망함.

2. 혈전용해제 개발

가. 주요 혈전용해제(의약품)로 미국에서 Sobel등이 개발한 것으로 사람 또는 동물의 노에서 정제한 urokinase를 정맥 주사용으로 사용되고 있으나, 가격이 고가임.

나. Fletcher등은 연쇄상 구균으로부터 streptokinase를 정제하였음. 이 효소는 혈전을 직접분해하지 않으며 혈액중의 plasminogen을 활성화하여 plasmin을 생성하게 하여 혈전을 분해시키는 간접적인 효과를 가짐. 그러나 이 효소는 출혈 등의 부작용이 큰 문제로 알려져 있음.

다. 사람의 악성종양인 melanoma 유래의 tissue plasminogen activator (tPA)가 현재 혈전용해제로서 임상에 사용되고 있다. tPA는 혈관 내에서 반감기가 짧고 가격이 고가이기 때문에 경제성이 문제가 된다. 이를 위하여 Genetech사를 비롯한 여러 기업에서 가격이 저렴하고 안정성이 증대된 tPA유도체의 개발을 시도하고 있는 것으로 알려져 있음.

라. 일본의 Mihara등이 지렁이 체 단백질로부터 혈전용해작용이 강한 lumbrokinase (LK)효소를 분리, 정제하여 보고한 바 있음. 그러나 이 효소는 혈전용해작용도 강하지 만 일반 단백질의 분해 작용이 강한 것으로 알려지고 있음.

마. 일본의 Sumi등은 납두(청국장)에서 혈전용해효소(nattokinase)를 분리하여 보고하였음.

바. 신풍제약과 대도제약에서 경구용 혈전용해제 “명심”과 “용심”이라는 상품이 시판되고 있으나 가격이 고가임(100캡슐에 90,000원).

사. 녹십자에서 지네의 체 단백질에서 혈전용해효소를 추출하는 연구를 진행 중에 있으며, 롯데에서도 혈전용해효소를 *Bacillus* 종에서 분리하여 특성을 규명한 보고가 있음.

아. 그 외 많은 대학에서 혈전용해관련 연구를 진행중인 것으로 알려져 있음.

3. 문제점

가. 기존 혈전용해제는 대량생산이 어려워 가격이 고가이며 지속적으로 복용하기 어려움.

나. 부작용이 있음.

1) Fibrin은 단백질로서 fibrin을 분해하는 효소도 protease이다. 100% fibrin만 특이적으로 분해하는 것을 찾기는 쉽지 않으나 가능한 일반단백질(casein, skim milk등)의 분해활성이 적으면서 fibrin만 특이적으로 분해하는 혈전용해효소를 이용해야 한다. 지금까지 앞에서 언급했던 혈전용해효소들은 이러한 면을 충족시키지 못하고 있음.

2) 혈액순환 개선제, 중풍예방 등을 민간요법으로 많이 이용하고 있으나 대부분 과학적인 근거가 부족함.

3) 대부분의 사람들은 효소를 경구용으로 먹었을 때 위에서 분해가 일어나거나 분자량이 너무 커서 장에서 흡수가 되지 않는 것으로 생각함. 그러나 보고된 paper로는 Acta Haematologica(1983. Vol. 70, No 5, P. 289-295)에 Sumi등은 분자량이 31,000의 urokinase heavy chain을 직장으로 투여했을 때 혈관에서 활성을 갖는 것을 확인하였고, 또한 같은 저널(1990. 84. 139-143)에 nattokinase를 입으로 섭취하였을 때 이 효소가 혈관에서 fibrin 분해력이 있는 것을 보고하였음.

4. 문제점의 해결방안

현재의 혈전용해제가 갖고 있는 여러가지 문제점을 해결할 수 있는 방법으로써 청국에서 미생물을 분리한 식용 가능한 미생물에서 일반적인 protein(skim milk, casein, 적혈구 파괴력 등) 분해활성이 낮으면서 fibrin분해활성이 강한 혈전용해효소 유전자를 분리하고 이를 상추식물에 도입하여 대량 발현시킴으로써 위의 모든 문제점을 해결할 수 있을 것이다. 또한 상추식물에 대량 발현된 혈전용해효소는 상추를 경작한 만큼 얻을 수 있으며 대량의 공급으로 가격이 저렴하여 질병예방차원에서 항상 섭취 가능할 수 있다고 판단된다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 혈전용해효소 생산능이 우수한 미생물로부터 혈전용해효소 유전자 크로닝 및 특성규명 (shot-gun 법에 의한 크로닝)

1. 목 적

이 절에서는 혈전용해력이 높은 흑두청국으로부터 혈전용해력이 가장 우수한 미생물을 선별하고 그 미생물이 생산하는 혈전용해효소의 특성을 조사하고, 또한 그 유전자를 크로닝하여 특성을 규명하고 산업적 이용가능성을 조사하였다.

2. 재료 및 방법

가. 청국의 제조

청국제조를 위해 원료인 콩은 재래시장에서 시판중인 한국산 흑두를 구입하여 사용하였다. 연등의 방법을 변형하여 Fig. 3-1-1과 같이 원료 콩 1kg을 흐르는 물에 3회 세척 후 20℃의 멸균생리식염수에서 10시간동안 침지하여 100℃에서 1시간의 조건으로 증자한 후 상온에서 냉각시켰다. 청국의 발효는 starter를 접종하지 않고 자연 상태로 40 ± 1 ℃, 습도는 포화습도를 유지하도록 조절하였으며, 발효시간은 48시간으로 하였다.

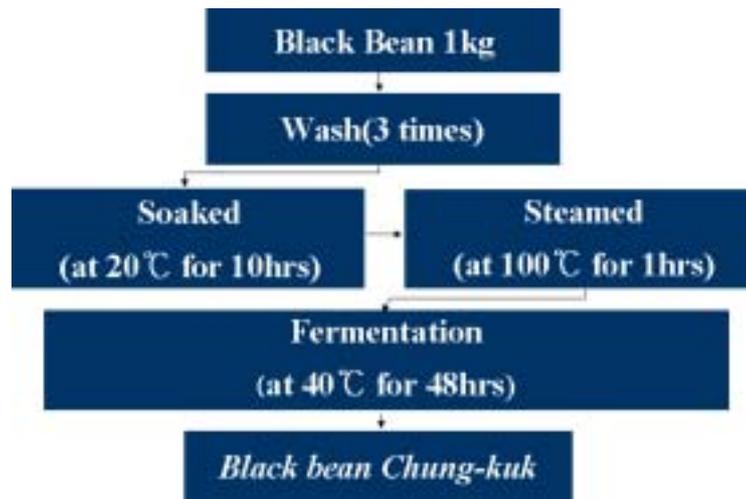


Fig. 3-1-1. Manufacturing process of black bean *chung-kuk*.

나. 혈전용해효소 생산 미생물의 분리 및 동정

제조된 흑두청국으로부터 혈전용해효소 생산능이 우수한 미생물을 선별하기 위하여 청국 1g을 멸균생리식염수에 현탁, 희석하고 이를 LB agar plate (Tryptone 1.0%, Yeast extract 0.5%, NaCl 1.0%, Agar 1.5%. pH 7.2. Difco)에 0.1 ml를 도말한 후 단일 colony를 분리하였다. 분리된 colony를 180×18mm의 시험관에 든 LB broth 5 ml에 접종하여 37℃에서 optical density (OD)가 1.0이 되게 진탕배양한 후 fibrin plate에 20 μ l 씩 점적하여 혈전용해능이 가장 우수한 미생물을 선발하였다. 선발된 미생물의 동정은 한국미생물보존센터 (KCCM)에 의뢰하여 16s rDNA sequence에 의한 유전자간의 상동성비교로 동정하였다.

다. 분리균주의 혈전용해동위효소 측정

SDS-fibrin zymography는 fibrinogen(Sigma, USA) 농도가 0.12% (w/ v)가 되게 polyacrylamide 용액에 혼합한 후 즉시 thrombin (1,000 unit/ ml. Sigma, USA)을 첨가하여 제조한 12% fibrin-polyacrylamide gel에서 수행하였다. 각 lane에 혈전용해능이 우수한 분리균주의 배양 상등액을 적당량 점적한 후 전기영동을 실시한 다음 SDS에 의해 불활성화 된 효소를 재활성화 시키기 위하여 gel을 2.5% Triton X-100을 포함한 Tris-Cl (50 mM, pH 7.4)에 3시간 동안 침적하여 단백질을 활성화시킨 후 Triton X-100을 제거하기 위하여 멸균수로 15분간 2회 세척하였다. 분획된 단백질의 혈전분해 활성은 활성반응 완충용액 (200 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 0.02% NaN₃가 포함된 30 mM Tris-Cl. pH 7.4)에 gel을 침적하여 37℃ 항온기에서 16시간 반응을 시켰다. Fibrin 분해능을 지닌 단백질 분획은 활성염색법에 의해 gel상의 fibrin을 분해하여 Coomassie blue R-250으로 염색결과 투명대로 활성을 확인하였다.

라. 혈전용해 활성 측정

혈전용해 활성의 측정에 있어서는 Astrup와 Hullertz의 방법을 변형하여 사용하였다. 0.4% Fibrinogen (Sigma, USA)을 sodium borate buffer (10 mM sodium borate, 160 mM boric acid, 40 mM NaCl. Merck, Germany)에 녹인 후 직경 87×15 mm petridish 에 10 ml 넣은 후 thrombin (1,000 unit/ ml. Sigma, USA) 20 unit를 첨가하여 실온에 30분간 방치하여 응고시켰다. 응고된 fibrin plate에 각 시료를 적당량 점적하여 6시간 동안 37°C에서 반응시켜 용해된 분해면적을 측정하였으며, 활성의 세기를 측정하기 위하여 plasmin (Sigma, USA)과 비교 후 unit로 환산하여 단위를 정하였다.

마. 사용균주 및 플라스미드

사용된 숙주세포로서는 *Escherichia coli* XL1-blue (*supE⁺ lac⁻ hsdR17 recA1 F proAB⁺ lacI Z ΔMI5*)을 사용하였고 cloning 및 subcloning vector로서 pBluescript II SK(-) [Stratagene®]와 pET-28a(+) [Novagen®] vector를 사용하였다.

바. Chromosomal DNA의 분리

IntRon사의 Genomic DNA Extraction kit를 이용하여 분리하였다. 흑두에서 분리한 미생물을 OD가 1.0이 되게 배양한 후 얻은 균체를 50 μl Pre-buffer (added 20 mg/ ml RNase A)로 현탁시킨 후 100 mg/ ml Lysozyme 3 μl를 첨가, 37°C에서 15분간 반응시켰다. 반응 후 250 μl G-buffer(added 20 mg/ ml RNase A, 20 mg/ ml Protease K)를 첨가, 65°C에서 15분간 반응시켰다 반응이 끝난 후 250 μl Binding buffer를 첨가하여 binding시킨 후 chromosomal DNA 분리용 column을 이용하여 DNA를 분리하였다.

사. 플라스미드 분리 및 형질전환

Plasmid DNA 분리 정제는 rapid alkaline lysis법과 Spin column kit (IntRon, Korea)를 이용하였고, 각종 plasmid를 사용한 형질전환은 Hanahan이 확립한 과정에 따라 실시하였다.

아. Agarose gel electrophoresis 및 분리 DNA 단편의 회수

Gel electrophoresis는 TAE buffer를 사용한 Maniatis 방법에 따랐으며, agarose gel 상에서 분리된 DNA단편은 Gal등의 gel elution 방법을 이용하여 추출 회수하였다.

자. 혈전용해효소 유전자 염기서열의 분석

혈전용해효소 유전자의 염기서열분석은 Sanger의 dideoxy termination method에 따

라 ABI 377A 자동 염기서열 분석기에서 분석하였다.

차. 크로닝된 혈전용해효소유전자의 deletion mutation에 의한 효소 활성 측정

크로닝 된 혈전용해효소 유전자의 정확한 start codon과 stop codon을 확인하기 위하여 deletion mutation을 실시하였다. primer를 Table 3-1-1과 같이 5' 쪽에 ATG가 있는 부위마다 합성하여 PCR에 의해 점차 size를 줄여 6가지의 DNA단편을 얻었으며, 각 DNA단편을 크로닝하여 혈전용해효소 활성을 조사하였다. PCR증폭에 사용된 Perkin Elmer-2400은 조건을 초기 denaturation 단계에서 95℃ 30초를 유지하였으며, 55℃ 30초, 72℃ 30초에서 30 cycle로 증폭한 후 최종 단계인 DNA합성은 72℃에서 10분 동안 실시하였다.

Table 3-1-1. List of primers used in PCR

Number	Sequence(5'-3')	direction
BSF1	cct cag gat gaa gct tga agt gga t	forward
BSF2	cct cag gat gga tgt gcc ggt caa a	forward
BSF3	cct cag gat gga gct gta tat gtc t	forward
BSF4	cct cag gat gca gat cgc caa ttt g	forward
BSF5	cct cag gat gag aga cct cgg gaa c	forward
BSF6	cct cag gat gga aga tcc aaa ctc a	forward
BSR	tga att ctt aag atg tag ctg ttt c	reward

카. 크로닝된 혈전용해효소유전자를 함유한 균주의 혈전용해 활성 측정 및 기질특이성 조사

크로닝된 혈전용해효소 유전자를 함유한 균주의 혈전용해능을 조사하기 위하여 대조구로서 pBluescript II SK(-) vector를 가지고 있는 XL1-blue를 사용하였으며, 재조합 균주 및 대조구를 각각 600 nm에서 OD가 1.0이 되게 배양하여 13,000 rpm에서 30분간 원심분리 후 배양상등액과 균체를 혈전용해 활성 측정에 사용하였으며, 집균된 균체는 멸균생리식염수로 2회 세척한 후, 20 mM Tris-Cl (pH7.2)에 현탁시켜 10°C이하를 유지하면서 초음파 파쇄기(Bandelin Co. Sonopuls GM70, USA)를 사용하여 120Hz의 조건으로 파쇄 시켰다. 파쇄균체는 13,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상등액을 fibrin plate, skim milk, casein, gelatin, blood agar plate에 각각 점적하여 혈전용해 활성 및 기질특이성을 조사하였다.

타. 혈전용해효소생산의 최적 pH 및 온도

혈전용해효소생산의 최적 pH와 온도를 측정하기 위하여 pH는 fibrin plate를 제조함에 있어서 fibrinogen (Sigma, USA)용액의 pH를 각각 5.0부터 9.0까지 조절한 후 thrombin(Sigma, USA) 10 unit를 가하여 생산한 혈전용해효소를 적당량 점적한 후 37°C에서 6시간 반응시켜 용해된 분해면적을 측정하였다. 이때 pH 4.0이하와 10.0이상에서는 강산과 강염기로 인해 fibrin plate가 만들어지지 않았다. 최적 활성온도는 20°C부터 40°C로 온도를 조절 후 6시간동안 반응시켜 용해된 분해면적을 측정하였다.

3. 실험결과 및 고찰

가. 혈전용해 활성이 높은 미생물의 분리 및 동정

국내산 흑두로 제조한 청국에서 혈전용해능이 있는 미생물을 9종 분리 하였으며 (Fig. 3-1-2), 혈전용해능의 크기를 plasmin 1 unit와 비교실험을 실시한 결과 Table 3-1-2와 같이 BB-1 균주가 생성하는 효소가 400%, BB-2는 324%, BB-3, 4는 100%, BB-7은 196%, BB-8은 196%, BB-9는 100%로 BB-1 균주의 활성이 가장 우수하였다. 혈전용해능이 우수한 BB-1의 정확한 동정을 위해서 한국미생물보존센터에 16s rDNA sequence를 의뢰하여 분석 결과 그 유전자의 상동성이 *Bacillus subtilis*와 99.0% 유사성을 가지는 것으로 Fig. 3-1-3, 3-1-4과 같이 동정되었다. 따라서 청국으로부터 분리된 혈전용해력이 우수한 본 미생물을 *Bacillus subtilis* BB-1로 명명하고 한국미생물보존센터(KCCM)에 위탁관리 시켰으며, 관리번호는 KFCC 11344P이다.

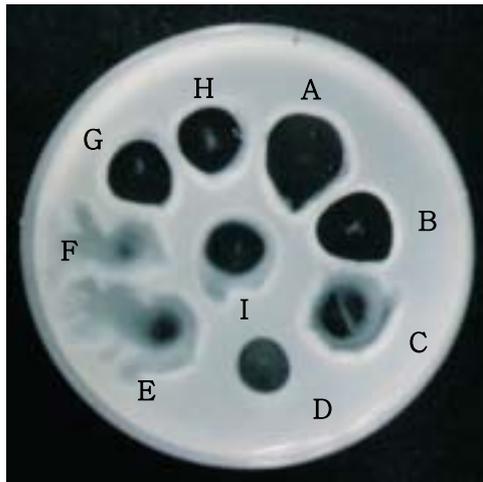


Fig. 3-1-2. Screening of bacteria having a fibrinolytic activity from black bean *chung kuk*.

Fibrinolytic activity was showed by clear zones.

A: BB-1, B: BB-2, C: BB-3, D: BB-4, E: BB-5, F: BB-6, G: BB-7, H: BB-8,
I: BB-9

Table 3-1-2. Fibrinolytic activities of bacteria isolated from black bean *chung kuk*.

Strain	Fibrinolytic activity(%)	Strain	Fibrinolytic activity(%)
BB-1	400	BB-6	10
BB-2	324	BB-7	196
BB-3	100	BB-8	196
BB-4	100	BB-9	100
BB-5	30	Plasmin (1unit)	100

CCTATCATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGG
GTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAAACCGGGGCTA
ATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACT
TACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGA
TGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCC
TACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCG
CGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGT
TCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAG
CAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCG
CAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAA
ACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGT
AGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACGTACCGCTGAGG
AGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATG
AGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCC
GCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGC
GGTGGAGCATGTGGTTAATTGAAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCT
CTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTT
GTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATC
TTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAAACCGGAGGAAG
GTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATG
GACAGAACAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGT
TCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAG
CATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCAAGAGATT
TGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTAGGAGCCAGCCGCGGAAGGTGACA

Fig. 3-1-3. 16s rDNA sequence of the isolated BB-1 strain.

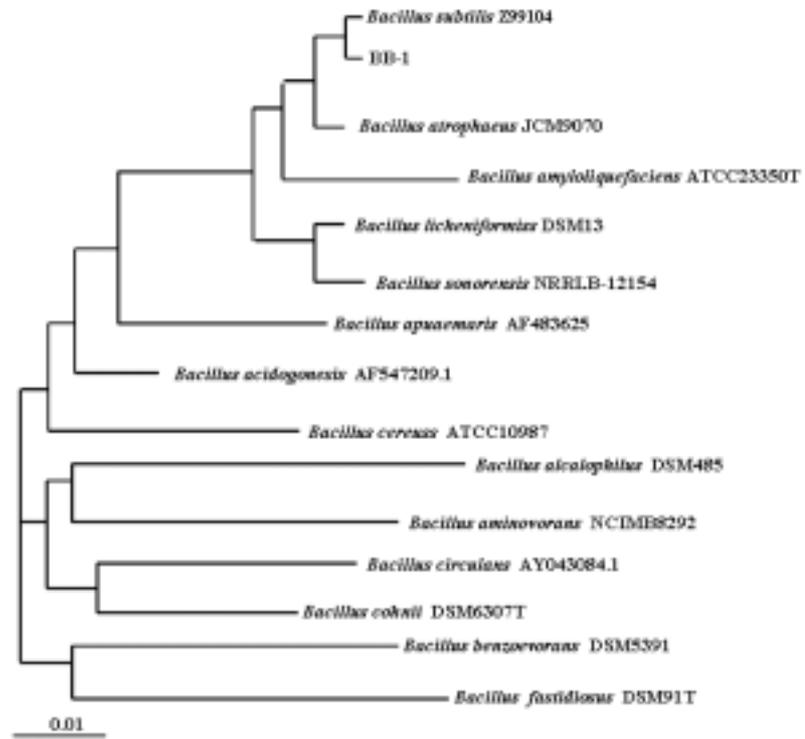


Fig. 3-1-4. Phylogenetic classification of the isolated BB-1 strain.

나. *B. subtilis* BB-1의 혈전용해동위효소 측정

흑두를 이용하여 제조된 청국에서 분리한 *B. subtilis* BB-1의 혈전용해동위효소를 확인하기 위하여 12.5% fibrin-polyacrylamide gel상에서 전기영동을 실시하였다. Fibrin 분해능을 지닌 단백질 분획은 활성염색법에 의해 gel상의 fibrin을 분해하여 Coomassie blue R-250 염색결과 투명대로서 활성을 가지는 5종류의 혈전용해효소 isozyme band를 Fig. 3-1-5와 같이 확인하였으며, 적어도 5가지 이상의 동위효소를 확인하고 대략적인 분자량은 70, 45, 30, 25, 19 kDa이었다.

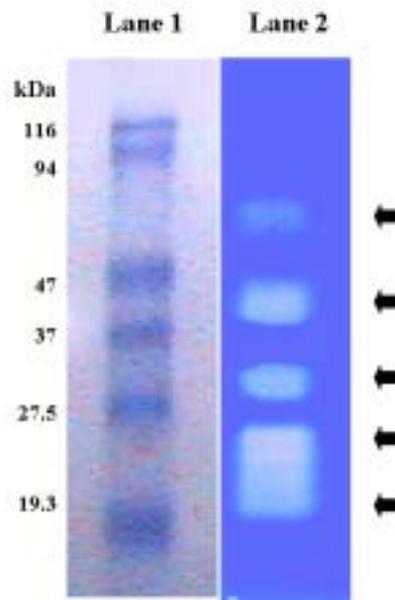


Fig. 3-1-5. Detection of fibrinolytic isozymes by 12% polyacrylamide gel containing 0.12% fibrin. The detection method are described in materials and methods.

lane 1 : standard marker

lane 2 : zymography of fibrinolytic isozymes of *B. subtilis* BB-1

다. 혈전용해효소 유전자의 크로닝 및 염기서열의 결정

혈전용해효소를 세포외로 다량 생산하는 *B. subtilis* BB-1의 genomic DNA를 분리하여 *Cla*I로 무작위 절단한 다음 7.0~3.0 kb의 사이의 DNA단편과 *Cla*I로 절단 후 Calf Intestinal Alkaline phosphatase (CIP) 처리한 pBluescript II SK(-)를 ligation시켜 *E. coli* XL1-blue에 형질전환 시켰다. Ampicillin과 X-gal 그리고 IPTG가 포함된 선별 배지에서 자란 약 1,500여개의 형질전환체 중에서 혈전용해력을 갖는 하나의 clone이 확인 되었다(Fig. 3-1-6). 이 균으로부터 plasmid를 분리하여 insert를 확인하여 본 결과 약 3.0 kb의 insert 단편을 확인하였다. 이때 *Cla*I로 절단시 insert의 size와 vector size가 유사하여 vector의 multi cloning site (MCS)에 있는 *Bam*HI으로 절단한 결과 6.0 kb인 하나의 band를 얻었으며, 염기서열의 결정은 먼저 T7 primer와 T3 primer를 이용하여 양방향으로 염기서열을 확인하고 확인된 후 다시 연속적으로 새로운 primer를 합성하여 확인함으로써 최종적으로 중복되는 연결순서에 의해 전체적인 염기서열을 결정하였다. 염기서열을 토대로 제한효소 지도를 작성한 후 크로닝 한 결과 2,146bp 크기의 DNA 단편 안에 혈전용해효소를 생산하는 유전자가 포함된 클론을 확인하였다(Fig. 3-1-7, 3-1-8). 이 재조합 DNA를 BSF-1으로 명명하였다. BSF-1을 Genbank를 통해 검색한 결과 BSF-1 유전자는 기존에 알려진 혈전용해효소 유전자와는 상동성을 전혀 보이지 않아 새로운 혈전용해효소 유전자임을 확인할 수 있었다. 이 유전자는 전 국민이 상시 섭취하고 있는 안전성과 높은 생리활성이 입증된 청국의 고초균에서 분리되었다는 점을 볼 때 식품제조에 사용 시 1차적인 위험성을 배제할 수 있을 것이며, 혈전증과 같은 순환기계통의 성인병에 대한 예방제로 사용가능하리라 판단된다.

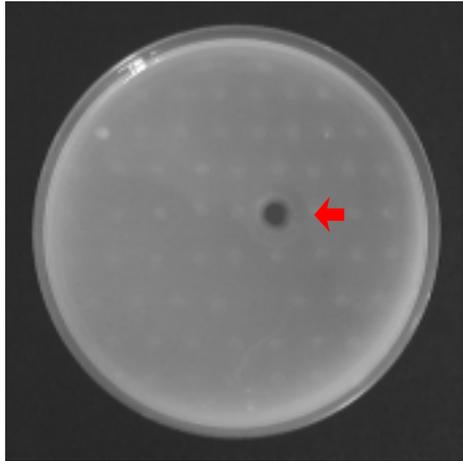


Fig. 3-1-6. Screening of a gene encoding fibrinolytic enzyme from genomic library prepared from *B. subtilis* BB-1.

- The fibrinolytic activity was measured as described in materials and methods.
- Arrow indicates a colony containing fibrinolytic activity.

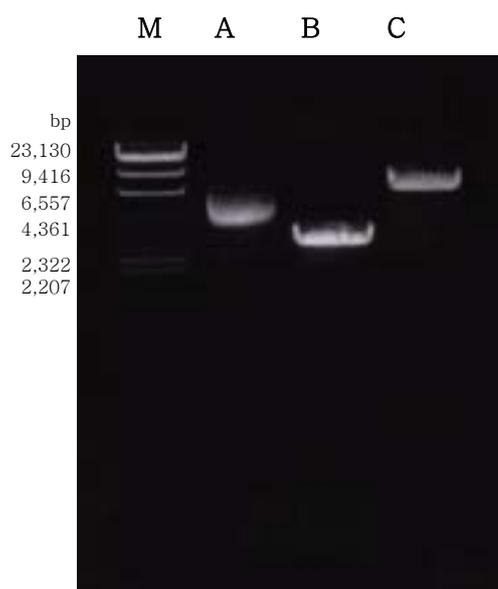


Fig. 3-1-7. Identification of cloned DNA segment containing a fibrinolytic enzyme gene by restriction endonucleases.

M : *Hind*III marker of λ DNA

A : recombinant DNA(pBSK + insert DNA)

B : recombinant DNA digested with *Cla*I

C : recombinant DNA digested with *Bam*HI

Cla I

```

1      GTATCGATGT CATCGGTGAG GAAGAGGTGA TGTTCAGCGA GCATCATGCC TGTCCGCACT
61     GCGGATTTTC AATTGGTGAA CTTGAGCCGC GTCTGTTTTC GTTTAACAGT CCGTTCCGGG
121    CGTGTCCGAC GTGTGACGGT CTGGGAATGA AGCTTGAAGT GGATGCCGAT CTGTGTCATCC
181    CCAATCAAGA TTTGTCAATTG AAGGAGAAATG CCGTCCGCCC TTGGACACCG ATCAGCTCAC
241    AATATTATCC TCAGCTGCTT GAGGCAGTCT GCACCCACTA CCGGATTGAT ATGGAATGTC
301    CCGTCAAGA TTTGCCGAAG CATCAACTGG ATAAAGTGCY GTACGGCAGC GGGGATGGCC
361    TGATTTATTT CCGATATGAA AATGATTTTG GACAAAATCG CGAGGGTGAA ATTCAATTTG
421    AAGCGTATT GGCCAACATT GAAAGACGCT ATAAGGAGAC AGGCTCTGAT TTCATCCGTG
481    AGCAGATGGA GCAGTATATG TCTCAGAAGT CTTGTCCGAC GTGCAAAAGC TATCCGTTAA
541    AGAAGAGGC GCTTGGCGTA CTGATTGACG GCGGCCACAT TGGAAAAATT ACCGAGCTGT
601    CTGTCCCGGA CGCACTTGCC TTCTTTAAAA ACCTTACCCY TTCTGAGAAG GATATGCAGA
661    TCGCCAATTT GATTTTGGC GAAATTGTGG AGCGCTTAAG CTTTCTGGAC AAAGTCCGCC
721    TGATTACCT GACATTGAGC AGGGCAGCGG GTACATTGTC CCGGGGAGAG GCGCAGCGCA
781    TCAGGCTGGC GACTCAAATT GCGTCCGGTT TATCCGGTGT GCTTTATATT TTAGATGAGC
841    CGTCTATCGG TCTGCATCAG CGTGATAACG ACCGCTTGAT CAGCGCTCTG AAAAAATGGA
901    GAGACCTGG GAACACGCTG ATTGTGTGCG AACATGATGA GGACACGATG ATGGCAGCAG
961    ATTATTTAAT AGATATTGGA CCGGGAGCGG GCATTACCGG CCGACAGGTG ATATCTGGCG
1021   GTACCGCGGA AGAAGTGATG GAAGATCCAA ACTCATTAA C GGGCAGCTAT TTATCAGGGA
1081   AAAAGTTTAT CCCATTGCCY CCTGAAAGAA GAAAGCCCGA CGGACGTTAC ATTGAAATTA
1141   AAGGTGCATC AGAAAACAAC CTGAAAAGAG TGAATCCCAA GTTCCCGCTT GGGACGTTTA
1201   CAGCAGTTAC AGGTGTTCC CGTTCAGGAA AGAGTACACT CGTTAATGAA ATTTTGCATA
1261   AGGCGTGGC GCAAAAGCTT CATAAAGCGA AAGCGAAGCC CCGCAGCCAT AAAGAGATTA
1321   AAGGTTTGGG TCATTTAGAT AAAGTCATTG ACATTGACCA GGGCCCAATC GGAAGAAGCC
1381   CGAGATCCAA CCGTGGGACA TACACCGGTG TATTGATGA CATTGCTGAT GTATTCCGGC
1441   AGCAAATGA AGCGAAGTCC CCGGCTATA AAAAAGGCGG TTTCAGCTTC AACGTGAAGC
1501   GCGGACGATG TGAAGCTTGC CCGGGCGAGC GGATTATTA AATTGAAATG CACTTCCCTC
1561   CTGACGTATA CGTTCCATGC GAGGTGTGTC ACGGCAAGC CTATAACCGT GAAACCGTTG
1621   AAGTGACGTA CAAAGGAAA AGCATCTCTG ATGTGCTTGA TATGACGGTT GAAGATGCTC
1681   TTCCCTTCTT TGAAAATATC CCGAAAATCA AAGGCAAGCT CCAAGCCCTT TATGATGTTG
1741   GTTTAGGTTA TATTACGCTC GCGCAGCGG CAGGACCTT GTCAGCGGGA GAAGCGCAGC
1801   GCGTGAAGCT CCGCTCAGAG CTGCACAAC GCTCGACCGG AGGCACGCTC TACATTTTAG
1861   ATGAGCCGAC GACAGGTTTG CATGTGAGC ATATCCCGAG GCTTCTTGTG GTGCTGCAAC
1921   GGTGTGTAGA CAACGGAGAC ACTGTACTGG TTATTGAGCA CAACCTTGAT ATCATTAGA
1981   CCGCCGATTA CATTGTGGAT TTGGCCCGG AAGGGGAGC CCGGGCGGGA ACCATTGCTG
2041   CGTCTGGAAC CGCTGAGGAA ATCACTGAAG TGGAGAATC GTATACAGGC CGTTAATTTGA
2101   AGCCTGTTAT CGAACGTGAC AAAGCAAGCA TGAATCGCT CTTGAAAGCG AAAGAACAG
2161   CTACATCTTA AAACCCCTCG TTAAGAGGGG ACAGCTTGTG AGCAAGTCCA TCCTTGGGCT
2221   TAGCAGGCAA GCTTTTTCTT TACGGCATAA TAGGTTTAGA TTGGTCTTTG GTATAATTTG
2281   TTTGGGAAA TGCCTAAACA TTTACAAATT GCTGTGATA TATGAATTGA AAGGGGATG
2341   ATGATTTCCA AATTAAGCAG ACAAAACCTA TTAAGGGGCT TAAAGGCATC CTTAAGCAAT
2401   AACTGAATCT ACATAGGTTA GAAGCTTTAT TGGAACTGA TAGGCCAGAA ATCAAAGAAA
2461   AGGAAGTCTT TGATTTCAA AACATATACA CATGGAGGTA TTTTTCACAT GAGAAACAAC
2521   CACAATATTG CAGCGTTAA CACATTAAC CGTTTGCTT CAACACACAG TCGGAGCTCA

```

Sac I
.....ATCGAT
Cla I

3000

Fig. 3-1-8. Nucleotide sequence of a gene encoding fibrinolytic enzyme cloned from *B. subtilis* BB-1

- Gray boxes are start codon and stop codon for a fibrinolytic enzyme.
- *Cla* I and *Sac* I sites are underlined.

라. BSF-1의 deletion mutation에 의한 효소 활성측정

BSF-1의 insert를 제작된 primer를 이용하여 PCR에 의해 Fig. 3-1-9 A와 같이 크기를 줄여 다시 크로닝 하였다(Fig. 3-1-9 B). 크로닝된 각 clone의 혈전용해력을 조사하였던바 처음 ATG (BSFF1)와 TAA (BSFR) 사이에서 나온 clone만이 혈전용해력이 있는 것(Fig. 3-1-9 C)으로 나타났으며 나머지 클론들은 활성이 없었다.

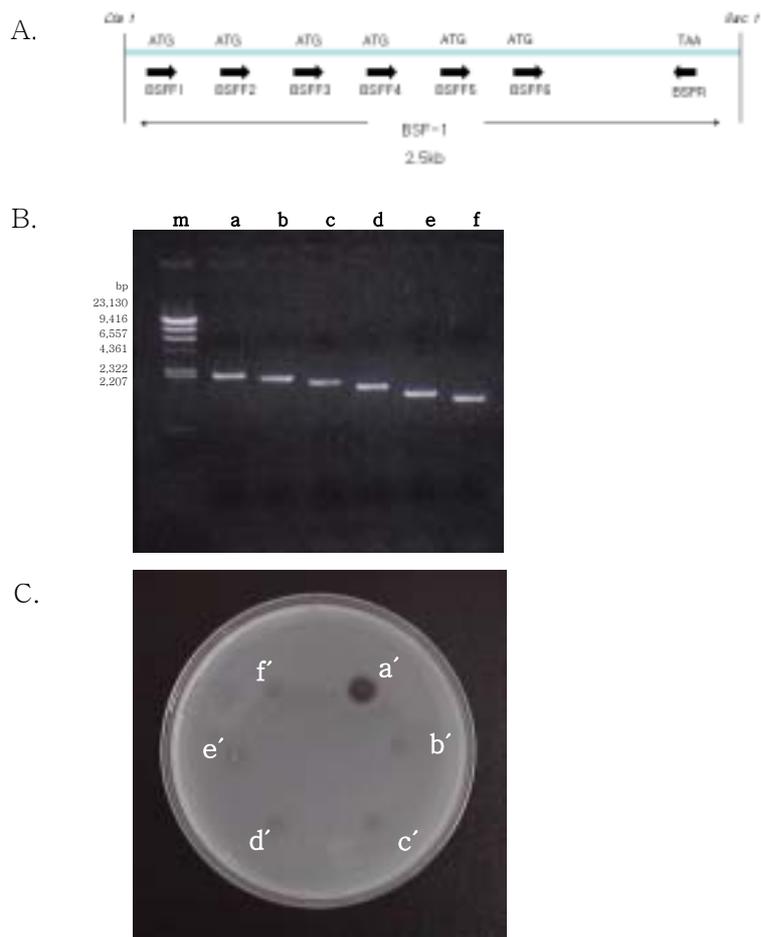


Fig. 3-1-9. Fibrinolytic activity of deletion mutants from BSF-1 gene.

A : deletion map of BSF-1, B : cloning of deletion mutants of BSF-1,

a : PCR product of BSFF1 and BSFR primers b : PCR product of BSFF2 and BSFR primers

c : PCR product of BSFF3 and BSFR primers d : PCR product of BSFF4 and BSFR primers

e : PCR product of BSFF5 and BSFR primers f : PCR product of BSFF6 and BSFR primers

C : detection of fibrinolytic activity of deletion mutants

a' : clon of PCR product of BSFF1 and BSFR primers, b' : clon of PCR product of BSFF2 and BSFR primers, c' : clon of PCR product of BSFF3 and BSFR primers, d' : clon of PCR product of BSFF4 and BSFR primers, e' : clon of PCR product of BSFF5 and BSFR primers f' : clon of PCR product of BSFF6 and BSFR primers

마. BSF-1을 함유한 균주의 혈전용해 활성 측정 및 기질특이성 조사

혈전용해효소 유전자인 BSF-1을 함유한 균주의 혈전용해능을 조사하기 위하여 대조구로서 pBluescript II SK(-) vector를 가지고 있는 XL1-blue를 사용하여 혈전용해 활성과 기질특이성을 각각 조사한 결과 재조합 균주의 배양 상등액(Fig. 3-1-10, A)과 초음파 파쇄된 시료(Fig. 3-1-10, B)에서 혈전용해활성이 관찰되었다. 배양 상등액에서의 혈전용해효소의 활성은 초음파 파쇄된 시료보다 활성은 다소 낮았지만 혈전용해능을 보이는 것을 관찰하였다. 이 결과에 의하여 이 효소는 세포외로 분비되는 *exo*-type enzyme임을 알 수 있었다. 기질특이성조사에서는 skim milk, casein, gelatin, blood agar에서 전혀 분해현상을 보이지 않았다(Fig. 3-1-11). 특히 blood agar plate에서 분해가 일어나지 않은 것을 볼 때 본 효소는 적혈구 파괴현상이나 혈액 내에서의 부작용에 대한 1차적인 위험성을 배제할 수 있을 것으로 판단되며 산업적 및 의약적으로 이용시 가능성이 있음을 확인하였다.

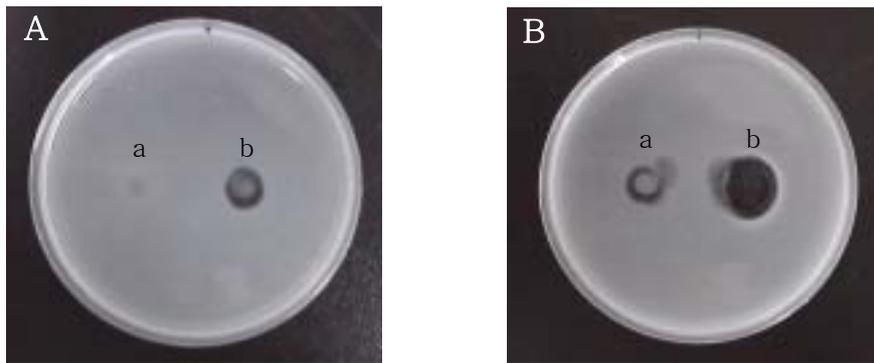


Fig. 3-1-10. Fibrinolytic activity of the cloned gene (BSF-1) from *B. subtilis* BB-1.

A : culture supernatant

B : cell extract

a : XL1-Blue containing pBluescript II SK(-) vector

b : XL1-Blue containing BSF-1

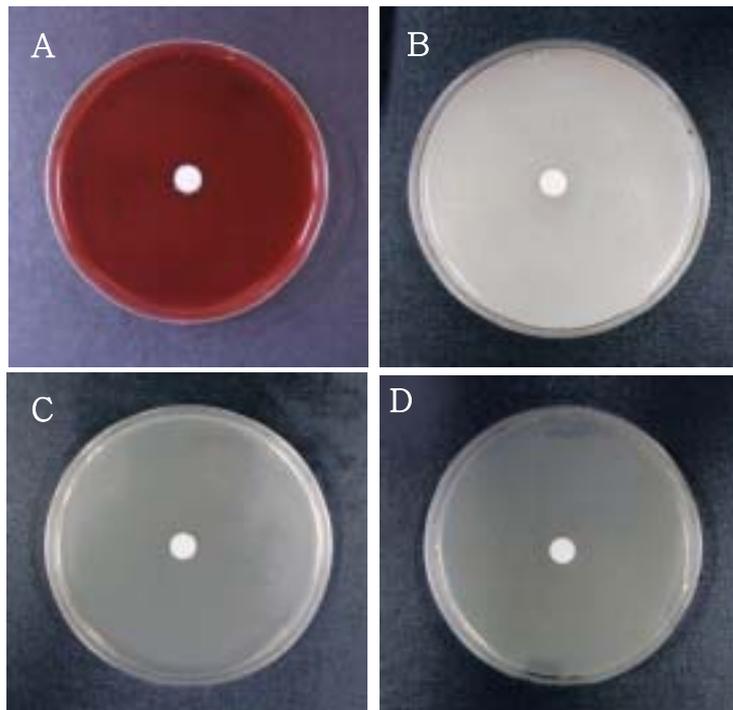


Fig. 3-1-11. Substrate specificity of BSF-1 enzyme in four substrates.

A : blood agar plate B : skim milk plate C : casein plate D : gelatin plate

바. 혈전용해효소생산의 최적 pH 및 온도

BSF-1이 생산하는 혈전용해효소의 최적 pH와 온도를 검토한 결과 Fig. 3-1-12과 같이 pH 5.0에서 활성이 높았고, 온도는 35℃에서 40℃범위까지 활성이 아주 높았다. pH 5.0에서 높은 활성을 나타내는 것으로 보아 본 효소는 산성에 있어서 매우 안정적으로 기능을 하는 것으로 추정되며 요쿠르트나 산성을 띠는 식품등의 개발에 있어서 사용가능성이 높을 것으로 사료된다.

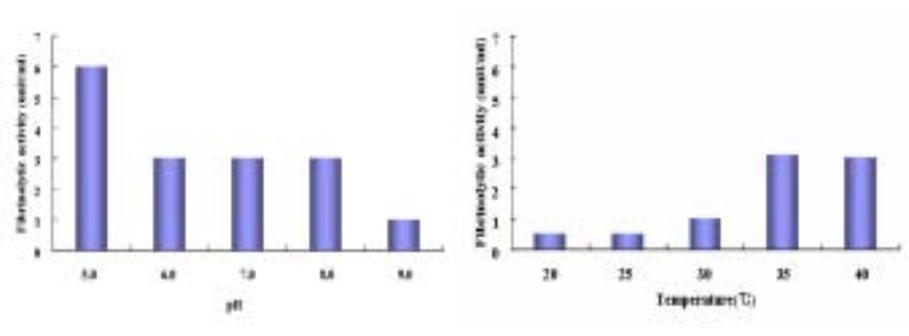


Fig. 3-1-12. Effect of various pH and temperature on the a activity of fibrinolytic enzyme (BSF-1).

4. 요약

혹두로 제조한 청국으로부터 혈전용해력이 우수한 균을 선발하여 동정하였으며, 그를 *Bacillus subtilis* BB-1로 명명하였다. 그리고 본 균주를 특허출원하였으며, 한국미생물보존센터에 수탁보존하였다. 이 균은 혈전용해효소 isozyme을 적어도 5개 이상은 생성하는 균주로 확인되었다. 이 균으로부터 chromosomal DNA를 분리하여 shot gun법으로 혈전용해효소 유전자를 크로닝하였으며, 이 유전자를 BSF-1이라 명명하였다. 이 유전자는 714개의 아미노산을 암호화하고 있으며 기존에 밝혀진 혈전용해효소 유전자와 상동성은 검출되지 않은 새로운 혈전용해효소 유전자였다. BSF-1에 의해 생산된 혈전용해효소의 활성 최적 pH 및 온도는 5.0과 35°C였다. 기질특이성은 적혈구 배지 또는 skim milk, gelatin등에 전혀 분해활성이 없었다. 이는 혈전만을 특이적으로 분해하는 기질특이성을 보였으며, 혈전용해효소로서의 이용가능성이 충분한 것으로 판단된다. 다만 이 유전자로부터 생성된 혈전분해효소는 활성이 일반 plasmin보다 낮아 그 이용가능성이 다소 약하다고 판단되었고 또한 분자량이 가장 큰(5개의 isozyme 중) 70 kDa 정도여서 경구투여시 세포내 흡수가 어려울 것으로 판단하여 다시 5개의 혈전분해효소 isozyme중 다른 하나의 유전자를 크로닝하기 위하여 BB-1의 chromosome을 이용하여 PCR method에 의해 크로닝하였다.

제 2 절 PCR-method에 의한 혈전용해효소 유전자 크로닝.

1. 목 적

본 절에서는 국내산 흑두로 제조된 청국에서 분리한 미생물로부터 5개 이상의 혈전용해효소 isozyme이 확인되었기에 기존에 밝혀진 혈전용해효소 유전자의 공통부분을 이용하여 PCR-method에 의해 크로닝하고 이를 대량 발현시켜 활성을 조사하고, 산업적 이용가능성을 검토하였다.

2. 재료 및 방법

가. Polymerase chain reaction에 의한 DNA증폭

크로닝을 위한 Chromosomal DNA는 제 1절에서 분리한 것을 사용하였고 PCR에 사용된 primer는 현재 *Bacillus subtilis*로부터 크로닝 된 혈전용해효소 유전자들 중 공통된 연결순서 영역으로부터 forward 5'-cgg atc cgt gag agg caa aac ggt g-3'와 reward 5'-tga att ctt gtg ctg ctg ctt gtc c-3'를 각각 25mer를 합성하였고, 이때 PCR 후 크로닝을 위하여 forward primer에 *Bam*H1 그리고 reward primer에 *Eco*R1 제한효소자리를 삽입하였다. 증폭에 사용된 Perkin Elmer-2400의 조건을 초기 denaturation 단계에서 95°C 30초를 유지하였으며, 55°C 30초, 72°C 30초에서 30cycle을 실시한 후 최종 단계는 72°C에서 10분 동안 실시하여 증폭하였다. 이를 크로닝 후 ABI 377A 자동 염기서열 분석기를 이용하여 분석하였다

나. PCR산물의 크로닝

앞의 조건에서 생성된 PCR 산물을 pGEM T-easy(promega, USA) 크로닝 벡터에 크로닝 후 primer 제작시 인위적으로 삽입한 *Bam*H1과 *Eco*R1으로 절단하여 발현을 위해 T7 promotor, RBS(ribosome binding site), initiator ATG site를 포함하고 있는 발현벡터인 pET-28a(+)에 크로닝하였다.

다. 시험관내 전사 및 번역

위에서 크로닝된 혈전용해효소 유전자는 대장균 내에서 활성을 전혀 보이지 않았기에 *in vitro*에서 transcription과 translation을 통한 단백질 생산을 위하여 *E. coli* 세포에서 유래된 ribosome을 기반으로 RNA polymerase, amino acid, chaperome등을 첨가시켜 단백질을 수용성으로 발현가능하게 한 intRon사의 Genelator™ transcription and translation kit를 사용하여 T7 promotor, RBS(ribosome binding site), initiator ATG site가 포함된 pET-28a(+) 발현벡터에 재조합된 DNA 2.0 μ g과 genelator mixture 34 μ l, 1mM IPTG를 첨가시켜 RNase free water로 최종 45 μ l되게 하여 충분히 혼합시켰다. 이를 37 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 반응시켜 단백질의 발현을 fibrin plate 상에서 확인하였다.

라. 혈전용해효소의 확인

In vitro translation된 시료를 Laemmli등의 방법에 따라 각각 0.1% SDS가 포함된 12.5% acryamide농도의 Separating gel과 4% acrylamide 농도의 stacking gel을 사용하여 protein electrophoresis 시킨 후 Bio-image analyzer (FLA-3000, Fuji, Japan)에서 단백질을 확인하였다.

3. 실험결과 및 고찰

가. 혈전용해효소 유전자의 크로닝 및 염기서열의 결정

혈전용해효소를 강력하게 생산하는 *B. subtilis* BB-1 (KFCC 11344P)에서 약 1,1kbp 크기의 유전자를 PCR을 통하여 분리하였으며 이를 BCF-1으로 명명하였다(Fig. 3-2-1). 이 유전자의 시험관내 발현을 위하여 *Bam*H1과 *Eco*R1의 site를 가지는 pET-28a(+)에 재 크로닝 하여 ABI 377A 자동 염기서열 분석기에서 염기서열을 결정 한 결과 Fig. 3-2-2과 같이 1,145bp크기의 유전자로 확인되었다.

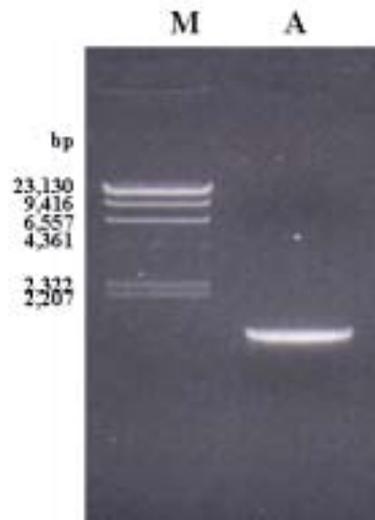


Fig. 3-2-1. PCR product of a fibrinolytic enzyme gene from chromosome of *B. subtilis* BB-1.

M lane : *Hind*III marker of λ DNA

A lane : PCR product of *B. subtilis* BB-1 genomic DNA

```

1      TAGAACTAGT GGATCCATGA GAGGCAAAAA GGTATGGATC AGCTTGTGTG TTGGTTAAC
61     GTTAATCTTT ACGATGGCGT TCAGCAACAT GTCTGGCGAG GCTGCGGGAA AAAGCAGTAC
121    AGAAAAGAAA TACATTGTGG GATTTAAGCA GACAAAGAGT GGCATGAGTT CCGCCAAGAA
181    AAAGGATGTT ATTTCTGAAA AAGGCGGAAA GGTTCAAAAG CAATTTAAGT ATGTTAACGC
241    GCGCGCAGCA ACATTGGATG AAAAAGCTGT AAAAGAATTG AAAAAAGATC CGAGCGTTGC
301    ATATGTGGAA GAAGATCATA TTGCACATGA ATATGGCGAA TCTGTTCCTT ATGGCATTTC
361    TCAAATTAAG GCGCGCGCTC TTCACTCTCA AGGCTACACA GGCTCTAAGG TAAAAGTAGE
421    TGTATCGAC AGCGGAATTG ACTCTTCTCA TCTGACTTCA AACGTCAGAG GCGGAGCAAG
481    CTTCGTTCTT TCTGAAACAA ACCCATACCA GGACGGCAGT TCTCAGGGTA CGCATGTGGC
541    CGGTACGATT GCGGCTCTTA ATAACTCAAT CGGTGTTCTG GCGGTAGGGC CAAGCGCATC
601    ATTATATGCA GTAAAAGTGC TTGATTCACG AGGAAGCGGC CAATATAGCT GGATTATTAA
661    CGGCATTGAG TGGGCCATTT CCAACAATAT GGATGTTATC AACATGAGCC TTGGCGGACC
721    TACTGGTTCT ACAGCGCTGA AAACAGTAGT TGATAAAGCG GTTCCAGCGG GTATCGTGGT
781    TGCTGGCGCA GCGGGAAGCG AAGGTTTCATC CCGAAGCACA AGCAGAGTCG GCTACCCCTG
841    AAAATATCCT TCTACTATTG CAGTAGGTCG GGTAAACAGC AGCAACCAAA GAGCTTCATT
901    CTCACGGCCA GGTCTGAGC TTGATGTAAT GGCTCCTGGC GTGTCCATCC AAAGCACACT
961    TCTTGGAGGC ACTTACGGCG CTTATAACGG AACGTCCATG GCGACTCCTC ACGTTGCGGG
1021   AGGAGGAGCG CTAATTCCTT CTAAGCACCC GACTTGGACA AACGGGCAAG TCGGTGATCG
1081   TTTAGAAAGC ACTGCAACAT ACCTTGGGAG CTCTTTCTAC TATGGAAAAG GGTAAATCAA
1141   CGTACAAGCA GCAGCACATT AAGAATTCGA TATCAAGCTT ATCGATACC

```

EcoRI

Fig. 3-2-2. Nucleotide sequence of the cloned fibrinolytic enzyme gene from *B. subtilis* BB-1.

- Gary boxes are start codon and stop codon of the gene.
- *Bam*H1 and *Eco*R1 sites are indicated.

nattokinase :1322 ca 1323

Fig. 3-2-3. Homology search of the cloned fibrinolytic enzyme gene (BCF-1).

나. 시험관내 전사 및 번역

혈전용해효소 유전자(BCF-1)를 대장균 내에 도입하여 혈전용해능을 조사한 결과 전혀 그 활성을 보이지 않는 것을 확인(data not shown)하여, IntRon사의 Genelator™ *in vitro* transcription and translation kit을 이용하여 시험관내에서 발현시켰다. 반응 후 생성된 효소를 fibrin plate에 적당량 loading하여 그 활성을 조사한 결과 혈전용해효소가 생산되는 것을 Fig. 3-2-4에서 확인하였다. 이 원인을 분석한 결과 혈전용해효소도 일종의 protease로 대장균 내에서 발현됨과 동시에 host의 생명에 치명적으로 영향을 미쳐 균이 처음부터 자라지 못하는 것으로 판단되었다.

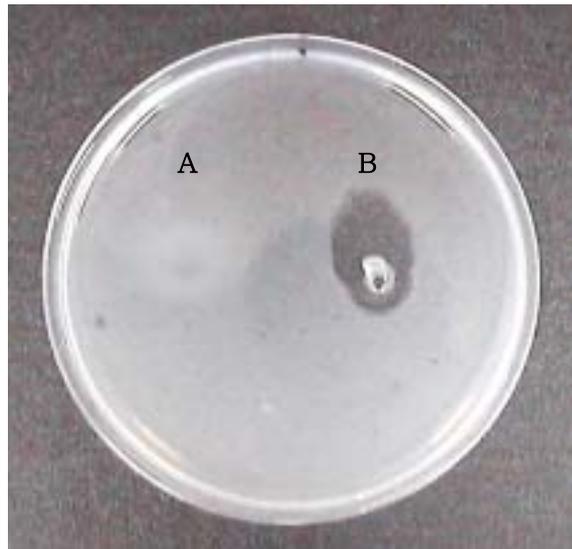


Fig. 3-2-4. Fibrinolytic activity of *in vitro* transcription and translation product of the cloned (BCF-1).

A : Control(GenelatorTM *in vitro* transcription and translation kit)

B : *in vitro* transcription and translation product of the cloned gene (BCF-1)

다. 혈전용해효소의 확인

in vitro transcription and translation에 의해 발현된 혈전용해효소를 12.5% polyacrylamide gel을 이용하여 protein electrophoresis한 후 Bio-image analyzer에서 분석한 결과 약 30kDa 분자량의 단백질을 확인되었다(Fig. 3-2-5).

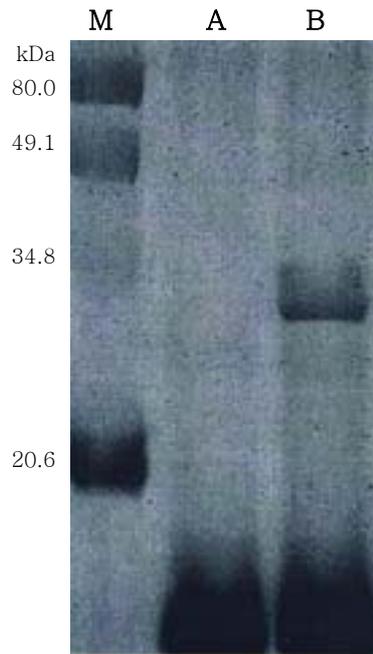


Fig. 3-2-5. SDS-PAGE of *in vitro* transcription and translation product of the cloned gene (BCF-1).

M : protein size markers

A : Control(Genelator™ *in vitro* transcription and translation kit)

B : *in vitro* transcription and translation product of the cloned gene (BCF-1)

4. 요 약

흑두청국에서 분리된 혈전용해력이 우수한 *Bacillus subtilis* BB-1 (KFCC 11344P)로부터 혈전용해효소 유전자를 PCR법에 의해 크로닝하여 유전자의 염기서열을 확인한 결과 1,145bp의 크기를 확인할 수 있었으며, 이를 BCF-1으로 명명하였다. 본 유전자를 대장균에 도입하여 단백질 발현 후 혈전용해 활성을 확인한 결과 전혀 활성이 나타나지 않는 것을 확인한 후 이는 대장균의 대사 및 생육에 영향을 미쳐 효소의 생산이 현저히 억제된 것으로 판단되었다. 따라서 Genelator™ *in vitro* transcription and translation kit를 이용하여 시험관내에서 단백질을 발현시켜 효소활성을 조사한 결과 혈전용해효소가 생산되며 그 활성 또한 우수함을 확인하였다.

제 3 절 혈전용해효소의 대량발현 및 순수분리

1. 목 적

현재까지는 *Bacillus* 유래의 혈전용해효소 유전자를 크로닝 후 대량생산체계가 구축되지 않아 의학적 가치의 상품개발에 성공한 예가 없다. 그 목적의 일환으로 본 연구에서는 혈전용해작용이 우수하며, 혈전만을 특이적으로 분해함으로서 섭취 시 인체나 혈액 내에서 부작용이 없는 혈전용해효소를 *B. subtilis* BB-1 (KFCC11344P)로부터 크로닝하고 그 유전자를 *Bacillus* host에 대량발현 및 순수분리하였다.

2. 재료 및 방법

가. 혈전용해효소 유전자의 대량발현 시스템 구축

BCF-1 유전자를 혈전용해효소 대량 발현을 위해 DNA 단편의 5'-end 에 *Nde*I, 3'-end에 *Bam*HI restriction site를 각각 생성시켜 *Bacillus*와 *E. coli*의 shuttle vector 인 pEB vector (BioLeaders, Korea)의 *Nde*I과 *Bam*HI site에 연결하여 protease 활성이 약한 *B. subtilis* 168에 형질전환 시켜 크로닝 하였다.

나. *B. subtilis* 168의 electro-competent cell 제조

B. subtilis 168을 nutrient agar plate에서 37°C 12시간 배양한 후 생성된 단일 colony를 선별하고 10 ml의 nutrient broth에 접종하여 37°C에서 12시간 동안 배양하였다. 이 중 5 ml를 취하여 500 ml의 액체 배지에 다시 접종한 후 37°C에서 진탕 배양(150 rpm) 하면서 OD가 0.5가 될 때까지 배양하였다. 이 배양액을 30분 동안 얼음에 정치하였고, 4°C, 5,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상등액을 제거하고 침전물에 ice washing buffer (0.5 M sucrose, 0.01 mM MgCl₂·6H₂O, 0.01 mM maleic acid, pH 6.5)을 가하여 수세하였다. 이 과정을 3번 반복하고 마지막 과정에서는 5ml의 ice washing buffer로 침전물을 녹여 40 µl씩 1.5 ml eppendorf tube에 분주하여 -80°C에 보관하면서 사용하였다.

다. Electroporation 방법에 의한 형질전환

pEB 벡터에 혈전용해효소 유전자가 삽입된 plasmid DNA를 *B. subtilis* 168

competent cell에 가하여 얼음에 10분간 방치하였다. electroporator Gene pulser^{□□} II (Bio Rad Co., USA)의 electric field strength (kV/ cm)와 resistance (Ω), capacitance (μF)를 선택한 후 혼합된 cell을 cuvette에 미리 37°C 항온 수조에서 가온한 expression medium(4 X Penassay medium : 2 X washing buffer) 1 ml을 가하고 세포를 부유시켜 회수하였다. 그 후 37°C의 항온수조에서 3시간 동안 배양한 다음 kanamycin (25 μg / ml)이 포함된 LB 배지에 도말하여 37°C에서 24시간 배양하여 형질전환체를 얻었다.

라. 재조합 균주의 배양 및 분비발현

재조합 균주의 배양에 따른 혈전용해효소의 분비발현을 측정하기 위하여 kanamycin (10mg/ ml)이 포함된 10 ml의 Luria-Bertani broth에 접종하여 37°C에서 12시간 동안 배양하였다. 이중 5 ml를 취하여 500 ml의 액체 배지에 다시 접종한 후 37°C에서 진탕 배양(150 rpm)하면서 생육단계인 대수 증식기, 정지기, 사멸기의 배양 상등액을 회수하여 SDS-PAGE의 단백질 전기영동을 실시하여 확인하였다.

마. 혈전용해효소의 정제 및 단백질 확인

1) Ammonium sulfate에 의한 효소의 농축

제조합 균주를 37 °C에서 12시간 배양한 후 배양 상등액을 ammonium sulfate로 70% 포화시킨 후 4°C에서 24시간 동안 침전시키고 원심분리 (13,000 g, 30 min, 4°C) 하여 얻은 침전물을 20 mM sodium acetate buffer (pH 5.2)에 용해하여 동일 buffer로 투석을 실시하였다. 투석 후 다시 원심 분리하여 침전물을 제거한 다음 얻어진 효소 액을 다음 정제단계에 사용하였다.

2) FPLC에 의한 효소의 정제 및 단백질 확인

Ammonium sulfate에 의해 농축된 효소액을 멸균증류수로 4°C에서 여러 번 투석을 행하여 염 등을 제거한 다음 0.15 M NaCl이 포함된 50 mM phosphate buffer (pH 7.0)로 녹인 후 FPLC system에서 0.15 M NaCl이 포함된 동일 buffer로 평형화시킨 superdex 200 HR 10/30 (Amersham pharmacia biotech, UK)을 column을 통하여 분당 0.5 ml 정도의 유속으로 gel filtration하여 분리 정제하였으며, 정제된 단백질은 먼저 혈전용해능을 조사한 뒤 Laemmli등의 방법에 따라 각각 0.1% SDS가 포함된 12.5% acryamide농도의 Separating gel과 4% acryamide 농도의 stacking gel을 사용하여 SDS-PAGE gel 상에서 정제된 단백질을 최종 확인하였다.

바. 항체제조와 Western blot

순수분리 된 혈전용해효소를 수컷의 토끼 피하지방에 한번에 200 µg씩 일주일 간격으로 세 번 주사한 후 마지막 주사 후 3일 뒤 부스탕하고 귀의 혈관을 통하여 혈액을 채취하였다. 혈액은 4°C에 overnight 시킨 후 3,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 혈청을 얻어 polyclonal 항체로 사용하였다. Western blot은 Towbin 등의 방법을 이용하여 전기영동이 끝난 단백질을 nitrocellulose membrane (Millipore, USA)에 250 mA로 1시간 30분간 transfer하였다. 그 후 이 막을 pH 7.4의 phosphate buffer saline (PBS)에 5분씩 5회 세척한 후 1% skim milk가 함유된 PBS buffer에 1시간 30분간 blocking하여 불필요한 비 특이적 단백질의 부착을 억제시켰다. 그 후 1% skim milk를 포함하는 PBS buffer에 1:5,000 (v/v)의 비율로 primary antibody를 희석한 후 blotting 용기에 넣어 rotator를 이용하여 상온에서 16시간동안 흔들면서 반응하였다. 반응이 끝난 후 PBS buffer를 이용하여 15분씩 3회 세척하여 1% skim milk가 포함된 PBS buffer 2차 항체 Anti-Rabbit IgG (Sigma, USA)를 1:2,000 (v/v)를 희석하여 4시간동안 상온에서 rotator를 이용하여 흔들면서 반응시켰다. 이를 PBS buffer로 15분간 3회 세척한 뒤 15 mg 4-chloro-1-naphthol, 45 ml Tris-Cl (pH 7.4), 90 µl H₂O₂로 구성된 발색용액에 10분간 반응시킨 후 증류수로서 세척하고 건조하여 생성된 band를 육안으로 관찰하였다.

사. 혈전분해 양상 조사

제조된 fibrin plate를 80℃에서 30분간 열처리하여 plasminogen을 불활성화 시킨 fibrin plate (plasminogen-free fibrin plate)와 열처리 하지 않은 fibrin plate (plasminogen-rich fibrin plate)에서 FPLC에 의해 순수 분리된 혈전용해효소를 반응시켜 그 분해 양상을 비교, 검토하여 plasminogen activator type인지 fibrin을 직접 분해하는 혈전용해효소인지 검토하였다.

3. 실험결과 및 고찰

가. 혈전용해효소 유전자의 대량발현 시스템 구축

혈전용해효소 유전자(BCF-1)에 의해 발현되는 혈전용해효소의 유도적인 대량발현을 위하여 *Bacillus*와 *E. coli*의 shuttle vector인 pEB vector에 크로닝하여 대량 발현계를 구축하였고(Fig. 3-3-1) *Bacillus* host인 *B. subtilis* 168에 형질전환 결과 Fig. 3-3-2과 같이 높은 혈전용해활성을 보였다.

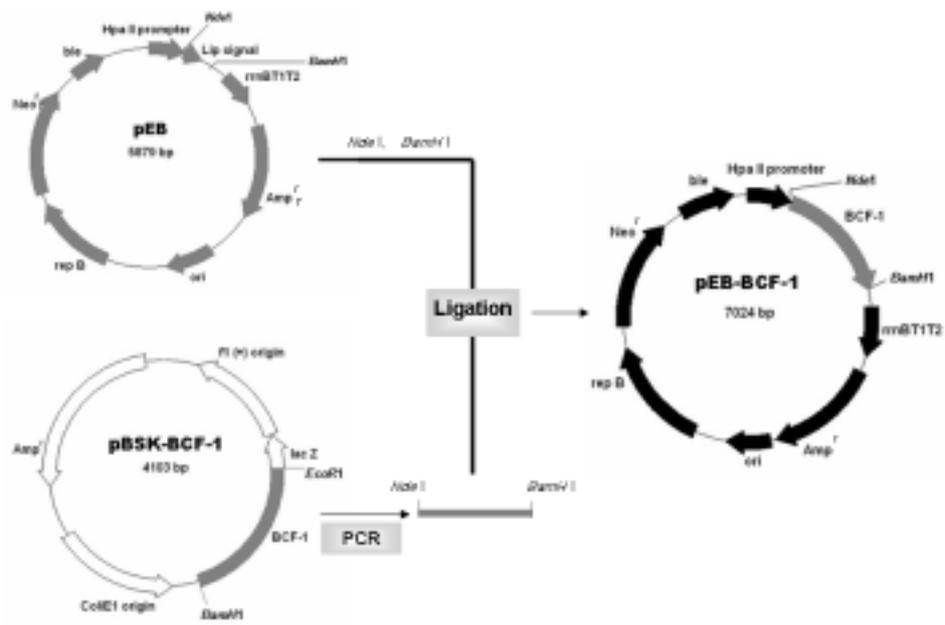


Fig. 3-3-1. Schematic diagram of recombinant plasmid, pEB-BCF-1.

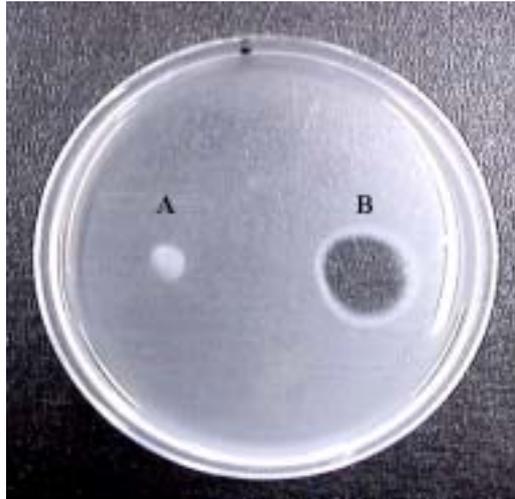


Fig. 3-3-2. Fibrinolytic activity of pEB-BCF-1.

A: Culture broth of *B. subtilis* 168 containing pEB vector

B: Culture broth of *B. subtilis* 168 containing pEB-BCF-1

나. 재조합 균주의 배양 및 분비발현

Bacillus 유래 유전자 발현 host로 168 strain은 protease 활성이 비교적 적은 host로 여기에 앞의 재료 및 방법에서 구축된 pEB-BCF-1을 형질전환 시켰다. Fig. 3-3-3에서 보는 바와 같이 약 30 kDa의 protein이 배양상등액에 주 단백질(약 80%)로 생성됨을 확인 할 수 있었고 특히 배양 8시간 만에 대량으로 발현, 분비됨을 확인할 수가 있었다.

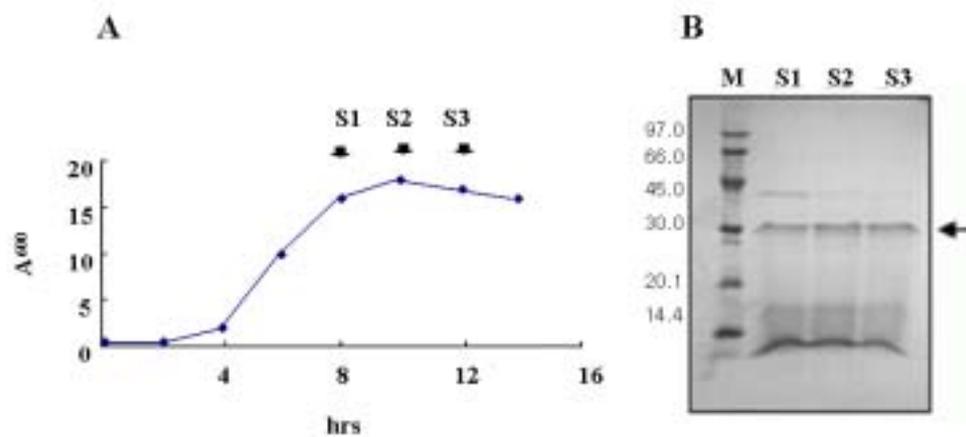


Fig. 3-3-3. Production of BCF-1 enzyme during the growth of *B. subtilis* 168 containing BCF-1 gene.

A: growth curve of *B. subtilis* 168 containing BCF-1 gene

B: electrophoresis analysis of the culture supernatant of *B. subtilis* 168 containing BCF-1 gene

S1: 8 hours culture

S2: 10 hours culture

S3: 12 hours culture

다. 혈전용해효소 순수분리

재조합 균주에서 혈전용해효소는 배양상등액의 회수, 70 % ammonium sulfate를 이용한 침전, 투석 그리고 FPLC gel filtration의 4단계에 의하여 분리 정제하였다. 모든 과정은 가능한 4℃에서 실시하였으며, 12.5%의 SDS-PAGE상에 전기영동을 실시한 결과 약 30 kDa의 단일 band로 순수분리 됨을 Fig. 3-3-4에서 확인 할 수 있었다.

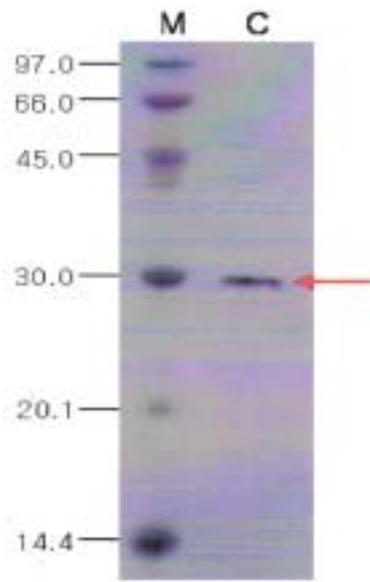


Fig. 3-3-4. SDS-PAGE analysis of the purified fibrinolytic enzyme, BCF-1.

M: protein size markers, C: purified BCF-1 enzyme

라. 항원-항체반응

순수 분리된 혈전용해효소를 토끼를 통하여 항체를 제작하였다. 이 항체를 이용하여 *B. subtilis* BB-1, 대량발현 vector에 크로닝된 *B. subtilis* 168 균과 순수분리된 단백질을 western blotting를 실시하였을 때 Fig. 3-3-5와 같이 약 30kDa의 *B. subtilis* BB-1과 크로닝된 균 그리고 순수 분리된 단백질에서 동일한 band가 확인되었다.

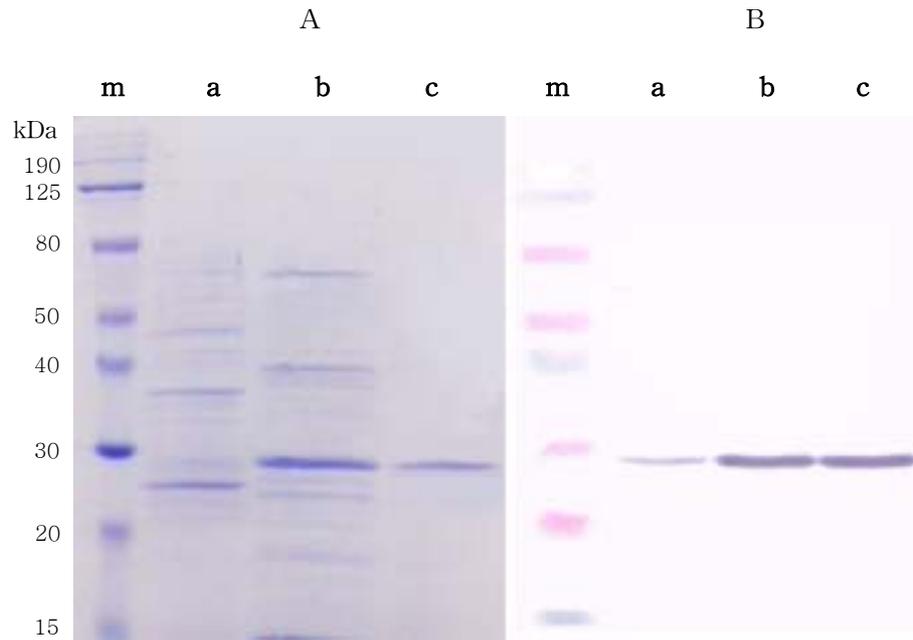


Fig. 3-3-5. Western blot analysis of fibrinolytic enzyme derived from *B. subtilis* BB-1.

A: SDS-PAGE, B : western blot

m: western blot standard markers

a: culture supernatant of *B. subtilis* BB-1

b: culture supernatant of *B. subtilis* 168 containing BCF-1 gene

c: purified BCF-1 enzyme

마. 혈전분해 양상의 조사

크로닝 된 혈전용해효소가 fibrin을 직접적으로 분해하는 형태인 fibrinolytic enzyme 인지 아니면 plasminogen을 plasmin으로 활성화하여 fibrin을 분해하는 plasminogen activator type 인지를 조사한 결과 Fig. 3-3-6과 같이 plasminogen이 있는 상태인 plasminogen-rich fibrin plate와 plasminogen-free fibrin plate에서 동시에 분해되는 것으로 보아 직접적으로 fibrin을 분해하는 fibrinolytic enzyme인 것을 알 수 있으며, 특히 plasminogen이 있을 경우가 없는 경우보다 fibrin의 분해능이 증가된 것을 관찰할 수 있는데 이것은 두 가지 type의 시너지 효과에 의한 것으로 생각된다.

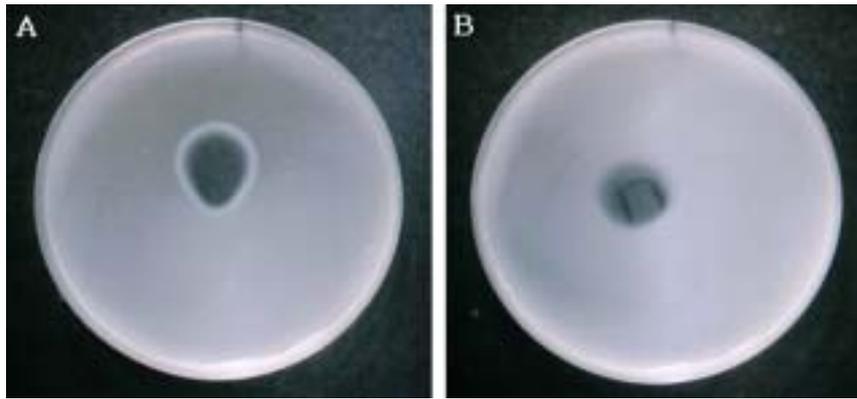


Fig. 3-3-6. Comparison of the fibrinolytic pattern of the fibrinolytic enzyme between plasminogen-rich fibrin plate and plasminogen-free fibrin plate.

A: plasminogen-rich fibrin plate

B: plasminogen-free fibrin plate

4. 요 약

혈전용해효소 유전자의 대량 발현을 위하여 *Bacillus* 발현계인 *Bacillus*-*E. coli*의 shuttle vector인 pEB vector에 크로닝하고 host로서 *B. subtilis* 168에 형질 전환시켜 발현시켰다. 생산된 혈전용해효소의 순수분리를 위하여 배양상등액의 회수, 70% ammonium sulfate를 이용한 침전, 투석 그리고 FPLC gel filtration 단계에 의하여 분리 정제하였다. 12.5%의 SDS-PAGE상에 전기영동을 실시한 결과 약 30 kDa의 단일 band로 순수분리 됨을 확인 할 수 있었다. 순수 분리된 혈전용해효소를 토끼를 통하여 항체를 제작하여 *B. subtilis* BB-1, 대량발현 vector에 크로닝 된 *B. subtilis* 168 균과 순수분리 된 단백질을 western blotting를 실시하였을 때 약 30kDa의 *B. subtilis* BB-1 과 크로닝 된 균 그리고 순수 분리된 단백질에서 동일한 band가 확인 되었다. 크로닝된 혈전용해효소가 fibrin을 직접적으로 분해하는 형태인 fibrinolytic enzyme인지 아니면 plasminogen을 plasmin으로 활성화하여 fibrin을 분해하는 plasminogen activator type 인지를 조사한 결과 plasminogen이 있는 상태인 plasminogen-rich fibrin plate와 plasminogen-free fibrin plate에서 동시에 분해되는 것으로 보아 직접적으로 fibrin을 분해하는 fibrinolytic enzyme인 것을 알 수 있으며, 특히 plasminogen 이 있을 경우가 없는 경우보다 fibrin의 분해능이 증가된 것을 관찰할 수 있는데 이것은 두 가지 type의 시너지 효과에 의한 것으로 생각된다. BCF-1에 의해 발현되는 혈전용해효소를 대량생산하여 임상적이나 산업적으로 적용하였을 때 그 가치는 매우 높을 것으로 사료된다.

제 4 절 혈전용해효소의 경구투여에 의한 생체 내 작용

1. 목 적

이 절에서는 혈전 관련 질환예방 및 혈류개선을 목적으로 *B. subtilis* BB-1 (KFCC 11344P)로부터 분리된 혈전용해효소 유전자 (BCF-1)를 대량발현 벡터인 pEB 벡터에 크로닝하여 순수분리 된 혈전용해효소가 rat에 경구 투여 시 효소가 장내로 흡수됨에 따라 혈액내의 혈전을 분해 시킬 수 있는 효과를 가질 수 있는지를 동물실험을 통하여 검토하였으며, 혈전용해효소 단회경구투여에 따른 rat의 사망률, 장기의 이상여부, 중량 등을 측정하여 효소의 안전성을 확인하였다.

2. 재료 및 방법

가. 혈전용해효소 및 사용시약

본 연구에 사용된 혈전용해효소는 제 2절에서 보고한 *B. subtilis* BB-1 (KFCC 11344P)에서 크로닝하여 얻어진 BCF-1 유전자에 의해 만들어진 정제된 혈전용해효소를 사용하였으며, 본 실험에서 사용된 fibrinogen, thrombin 그리고 plasmin등의 모든 시약은 특급 또는 1급 시약을 사용하였다.

나. 혈전용해활성의 측정

제 1절에서 설명한 것과 같이 Astrup와 Hullertz의 방법을 변형하여 사용하였다.

다. 실험동물

각 실험에 사용한 동물은 체중 160 g 내외(생후 6주령)의 Sprague Dawely Strain 수컷 흰쥐와 암컷 흰쥐를 대한 실험동물센터(주)에서 구입하여 사용하여 각각 대조군과 실험군으로 나누어 실험하였으며 전 실험기간 동안 온도 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 및 습도 $55\pm 1\%$ 로 조정된 항온항습장치 내에서 사육하였고, 물을 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였으며, 1주일간 사육장 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

라 혈전용해효소 경구투여에 의한 rat의 출혈시간 측정

정제된 효소의 경구투여에 따른 출혈시간을 측정하기 위하여 수컷흰쥐 4마리와 암컷 흰쥐 4마리를 사용하였으며 이중 각 2마리씩은 대조군으로 나머지는 실험군으로 하여 정제효소 1 ml 씩을 (1 mg/ml) 경구투여용 카테터를 이용하여 3일간 매일 1회씩 위까지 경구투여한 후 실험종료일에 McDonald 등의 방법으로 출혈시간을 측정하였다. 에틸 에테르로 흰쥐를 마취시킨 후 꼬리 끝부분의 3~5 mm되는 곳을 절단하고 37°C 의 생리식염수 용액에 꼬리 끝부분으로부터 5 cm 되는 부분까지 침지시켜 지혈될 때까지의 시간(sec)을 stop watch로써 측정하였다.

마. Serum에 의한 fibrin 분해효과 및 혈액응고

정제된 효소의 rat에 대한 경구투여효과를 측정하기 위하여 정제효소(1 mg/ml)를 saline에 녹여 시료로 사용하였다. 암수 각 1마리씩은 control로서 효소가 함유되지 않은 saline 1 ml을 경구 투여 하였다. 그리고 나머지 암수 4마리씩은 3일 동안 매일 효소액 1 ml (1 mg/ml)을 경구 투여한 후 마지막 날에 각 시간별(1, 2, 3, 4시간)로 에틸 에테르로 마취하여 심장을 통하여 혈액을 채취하였다. 채취된 혈액은 즉시 원심분리($13,000 \times g$, 15 min, 4°C)하여 상층의 serum 부분을 회수하여 -20°C 에 보관하였다. control군의 혈액과 경구투여 후 각 시간별로 채혈한 군의 혈액으로부터 분리한 serum 100 μl 를 fibrin plate에서 반응시켜 분해정도를 면적으로서 측정하였으며, 각 시간별로 채취된 혈액의 응고시간을 측정하기 위하여 control과 경구투여군의 혈액을 각각 세 방울(약 100 μl)씩 dish에 떨어뜨려 상온에서 혈액의 응고시간과 응고모습을 육안으로 관찰하였다.

바. Western blot

순수 분리된 혈전용해효소를 이용하여 제조된 항체는 제 3절에서 제조한 것을 사용하였으며, Western blot은 Towbin 등의 방법을 이용하여 rat의 혈액에서 채취, 분리한 serum을 전기영동한 후 단백질을 nitrocell -use membrane (Millpore, USA)에 250 mA로 1시간 30분간 transfer하였다. 그 후 이 막을 pH 7.4의 phosphate buffer saline

(PBS)에 5분씩 5회 세척한 후 1% skim milk가 함유된 PBS buffer에 1시간 30분간 blocking하여 불필요한 단백질 부착을 억제시켰다. 그 후 1% skim milk를 포함하는 PBS buffer에 1:5,000 (v/ v)의 비율로 primary antibody를 희석한 후 blotting wells에 넣어 rotator를 이용하여 상온에서 16시간동안 흔들면서 반응하였다. 반응이 끝난 후 PBS buffer를 이용하여 15분씩 3회 세척하여 1% skim milk가 포함된 PBS buffer에 2차 항체 anti-rabbit IgG (Sigma, USA)를 1:2,000 (v/ v)로 희석하여 4시간 동안 상온에서 rotator를 이용하여 흔들면서 반응시켰다. 이를 PBS buffer로 15분간 3회 세척한 뒤 15 mg 4-chloro-1-naphtol, 45 ml Tris-Cl (pH 7.4), 90 μ l H₂O₂로 구성된 발색용액에 10분간 반응시킨 후 증류수로서 세척하고 건조하여 생성된 밴드를 육안으로 관찰하였다.

사. 혈전용해효소의 rat에 대한 단회경구투여 독성시험

단회경구투여 독성시험실험동물인 랫드는 6주령(체중; 수컷 160 \pm 5 g, 암컷 수컷 160 \pm 5 g)을 5마리씩 사용하였으며, 투여용량은 경구투여효과에서 확인된 효소 1 ml (1 mg/ ml)의 용량으로 경구투여용 카테터를 이용하여 강제 경구 투여하였다. 일반증상 및 사망동물은 투여당일 투여 후 1, 3그리고 6시간 간격으로, 투여일로부터 14일까지는 매일 1회 이상씩 일반증상의 변화, 독성증상 및 사망동물의 유무를 대조구와 비교 관찰하였고 중량의 변화는 2일 단위로 측정하였으며, 부검은 투여 후 14일째 에테르 마취 하에서 복대정맥을 통해 채혈하여 안락사 시킨 후 육안으로 모든 장기를 검사 하였다.

3. 실험결과 및 고찰

가. 혈전용해효소 경구투여에 의한 rat의 출혈시간 측정

항 혈전작용중의 생체 내 실험의 하나인 출혈시간을 측정하기 위하여 3일간 매일 1회 정제된 혈전용해효소 1 ml (1 mg/ ml)을 경구투여한 후 조사된 출혈시간은 실험군과 대조군으로 구분 분리하여 실시하였으며, 대조군(116.25 \pm 6.88 sec)에 비하여 모든 실험군 (203.75 \pm 7.46 sec)에서 출혈시간이 유의적으로 약 1.75배 이상 길게 나타남을 확인하였고(P<0.05), 혈액의 출혈 또한 대조군보다 활발히 진행됨을 Fig. 3-4-1과 같이 관찰하였다. 출혈시간의 측정은 혈액응고와 관련한 항 혈전 작용의 연구에 있어서 하나의 측정변수가 되고 있으며 출혈시간이 길어진다는 것은 혈관내의 혈액이 혈전이나 기타 불순물에 의해 흐름이 방해받지 않고 혈류를 따라 원활하게 순환된다는 의미인 동시에 혈

액이 맑고 혈관 내에 불순물이 없는 깨끗함을 의미하는 것을 알 수 있으며 정제된 분
혈전용해효소를 경구투여 하였을 때 혈액 중에서 항 혈전작용 및 기 생성된 혈전의 분
해 작용이 동시에 이루어지는 것으로 판단되었다.

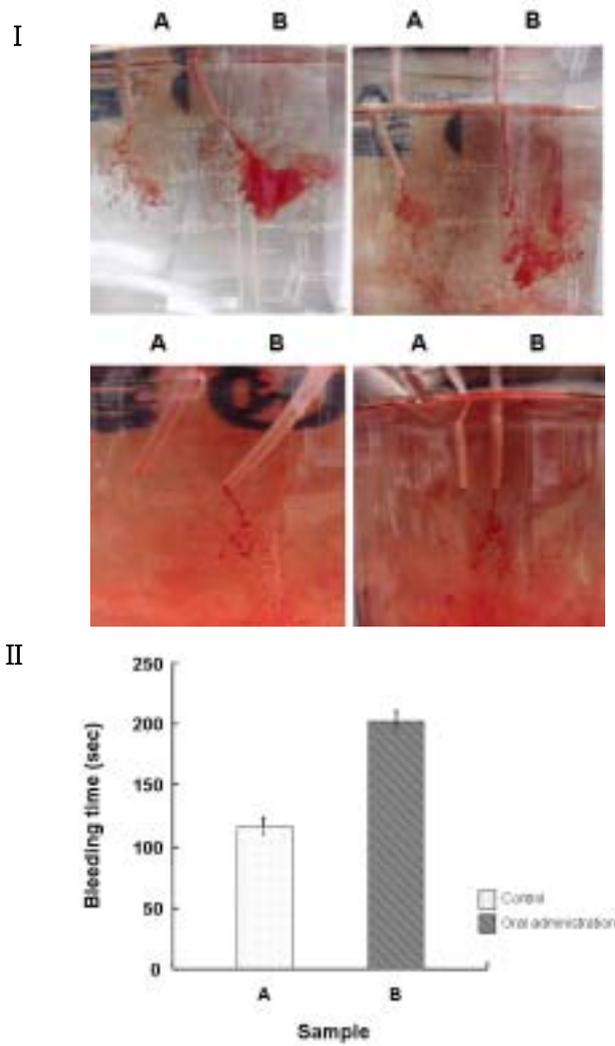


Fig. 3-4-1. Bleeding time of the rats orally administrated with the fibrinolytic enzyme (BCF-1) for 3 days.

Each bar is the mean values \pm standard error ($P < 0.05$).

I: photographs of bleeding in the water

II: graphs of bleeding time

A: control, B: orally administrated

나. Serum의 fibrin 분해효과 및 혈액응고

정제된 혈전용해효소 대신 saline만 투여한 control군의 혈액과 경구투여 후 각 시간별로 채혈한 rat군의 serum 100 μ l를 fibrin plate에서 반응시켜 분해정도를 측정하였다. 측정한 결과는 Fig. 3-4-2에서 보는 바와 같이 경구투여 후 1시간째부터 채혈한 혈액 내에서 혈전용해효소의 활성이 검출되기 시작하여 3시간째 채혈한 혈액까지 높은 활성을 보였다. 이 결과는 Sumi등에 의해 보고된 urokinase를 이용하여 mouse에 실험한 결과와 Jeong등의 멸치액젓에서 분리한 조효소액을 이용한 rat에 시험한 결과와 비교할 때 다소 차이를 보였다. urokinase를 경구 투여하였을 때, 2시간에서 최고활성을 기록하여 3시간째부터 활성저하가 나타났다고 보고하였으며, 멸치액젓에서 분리한 조효소액에서는 1시간부터 활성이 검출되었으나 2시간째에는 급격한 증가의 폭을 보이지 않고 3시간째 가장 높은 활성을 나타내었다. 이것으로 본 연구결과를 비교해 볼 때 본 효소는 1시간째부터 3시간째까지 모두 강한 활성을 나타내었으며 4시간째부터 서서히 활성이 감소하는 것을 알 수 있었다. 따라서 본 효소는 경구투여 후 혈액으로 흡수는 확실히 섭취 후 3시간까지는 활발히 효소활성이 유지됨을 확인하였다. 그리고 혈전용해효소 경구투여에 의한 혈액의 응고를 측정한 결과 Fig. 3-4-3과 같이 1시간째에는 대조군 403.75 \pm 9.43 sec와 실험군 2489.75 \pm 6.89 sec, 2시간째 대조군 502.01 \pm 3.39 sec와 실험군 2484.5 \pm 3.84 sec 그리고 3시간째에는 대조군 499.04 \pm 4.14 sec와 실험군 2485.75 \pm 4.13 sec로 나타났으며 4시간째에는 대조군 499.00 \pm 4.20 sec와 실험군 948.25 \pm 7.45 sec로 각 시간대별로 대조군에 비하여 경구 투여군에서의 유의적으로 혈액응고시간이 상당히 지연되는 것을 나타내었다(P<0.05). 이 결과에서 볼 때 본 혈전용해효소는 혈액 내에서의 상당한 항 혈전작용이 있음을 관찰할 수 있었다.

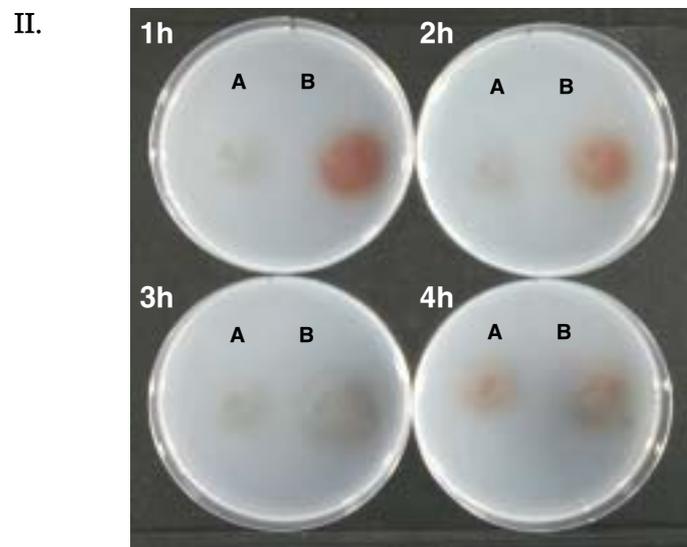
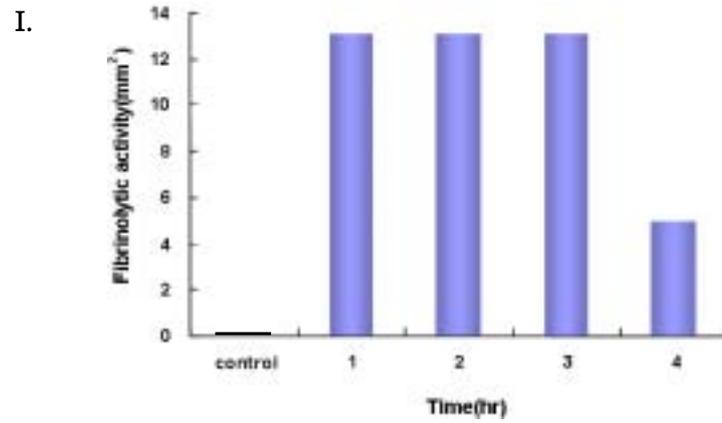


Fig. 3-4-2 Fibrinolytic activities of serum from the rats orally administrated with fibrinolytic enzyme (BCF-1).

I: graphs of fibrinolytic activity

II: photographs of fibrinolytic activity

A: control, B: orally administrated

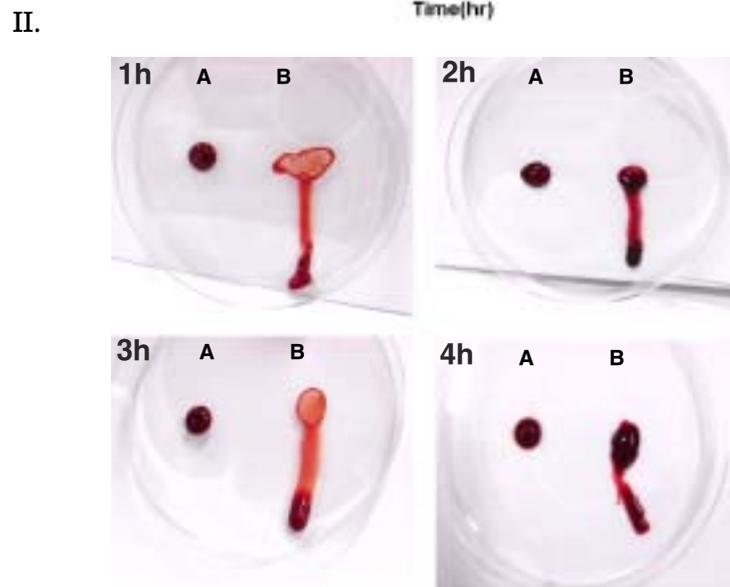
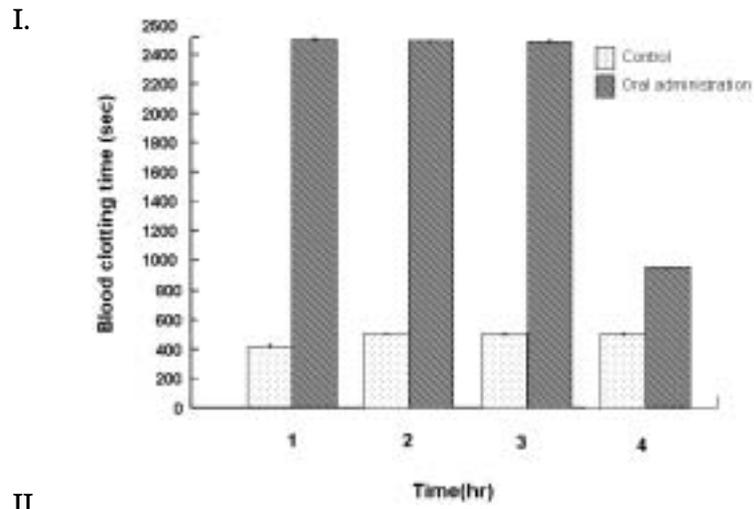


Fig. 3-4-3. Blood clotting time of the rats orally administrated with fibrinolytic enzyme (BCF-1).

Each bar is the mean values \pm standard error ($P < 0.05$).

I: graphs of blood clotting time

II: photographs of blood clotting patterns

A: control, B: orally administrated

다. Western blot에 의한 rat의 혈액에서 혈전용해효소 검출

혈전용해효소 경구투여에 의한 rat의 혈액에서 혈전용해효소 검출 여부를 확인하기 위하여 채취, 분리된 serum 20 μ l를 항원으로 하고 혈전용해효소를 이용하여 토끼를 통해 제작된 항체에 의한 항원항체 반응을 분석한 결과 혈전용해효소를 섭취하지 않은 대조군에서는 아무런 밴드가 관찰되지 않았으며, 경구투여를 실시한 투여군에서는 육안으로 확인 시 30,000 Da에서 아주 약한 밴드가 검출되었다(Fig. 3-4-4).

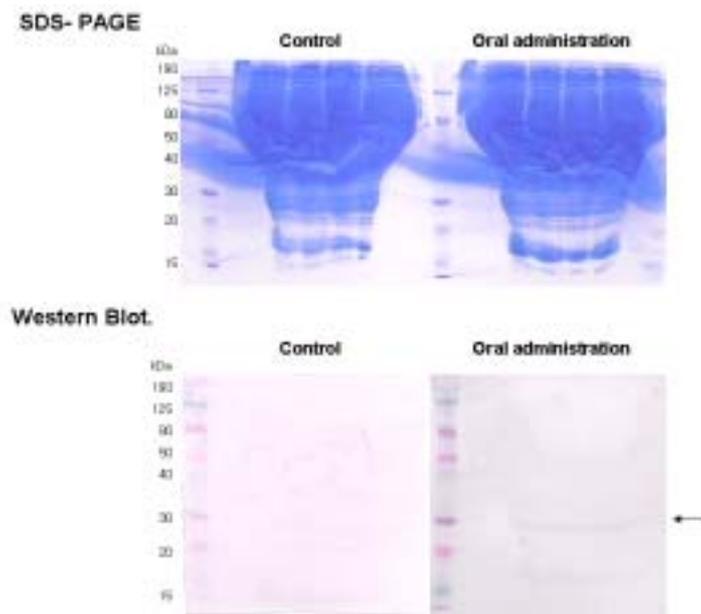


Fig. 3-4-4. Western blot analysis of fibrinolytic enzyme in the blood of rat orally administrated.

라. 혈전용해효소의 rat에 대한 단회경구투여 독성시험

Rat에 대한 단회 경구투여 독성검사에서 암, 수 모두 정제효소 투여군에서 최초 투여 일부터 14일간 사망동물이 관찰되지 않았다. 그리고 암, 수 모두 정제효소 투여군에서 정상적인 체중증가가 관찰되었으며(Fig. 3-4-5), 시험 전 기간 동안 아무런 임상증상이 관찰되지 않았다(Table 3-4-1). 또한 부검시의 암, 수 모두 육안적 이상소견이 Fig. 3-4-6과 같이 확인되지 않았다. Jeong 등이 보고한 항 혈전제인 아스파라톤에서의 생식 독성과 Kauffman과 O'Grady 등의 아스피린의 독성시험에서 위출혈 및 위궤양을 일으키는 부작용으로 인하여 임상에서의 폭넓은 사용이 제한되고 있는 것에 비교해 볼 때 본 혈전용해효소의 경구투여에 대한 rat의 단회경구투여 독성시험에서는 전혀 무해함을 판정할 수 있었으며, 의학적으로 이용 시 1차적인 독성에 대한 문제점은 배제할 수 있으리라 판단되어진다.

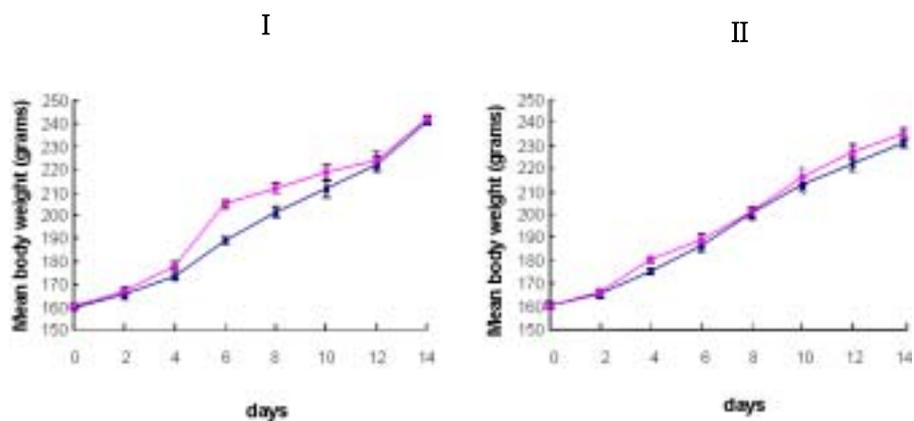


Fig. 3-4-5. Comparison of body weights of male and female rats orally administered with fibrinolytic enzyme, BCF-1.

Each bar is the mean values \pm standard error ($P < 0.05$).

I: male rats, II: female rats

—◆— : Control, —■— : orally administered

Table 3-4-1. Clinical signs of rats orally administered with fibrinolytic enzyme, BCF-1

Signs observed	Control	Oral Administration
Male		
Appears normal	5/5*	5/5*
Weakening	0/5	0/5
Increase of locomotor activity	0/5	0/5
Decrease of locomotor activity	0/5	0/5
Salivation	0/5	0/5
Soiled perineal region	0/5	0/5
Contused wound	0/5	0/5
Death	0/5	0/5
Female		
Appears normal	5/5*	5/5*
Weakening	0/5	0/5
Increase of locomotor activity	0/5	0/5
Decrease of locomotor activity	0/5	0/5
Salivation	0/5	0/5
Soiled perineal region	0/5	0/5
Contused wound	0/5	0/5
Death	0/5	0/5

* No. of animals with the sign/ No. of animals examined

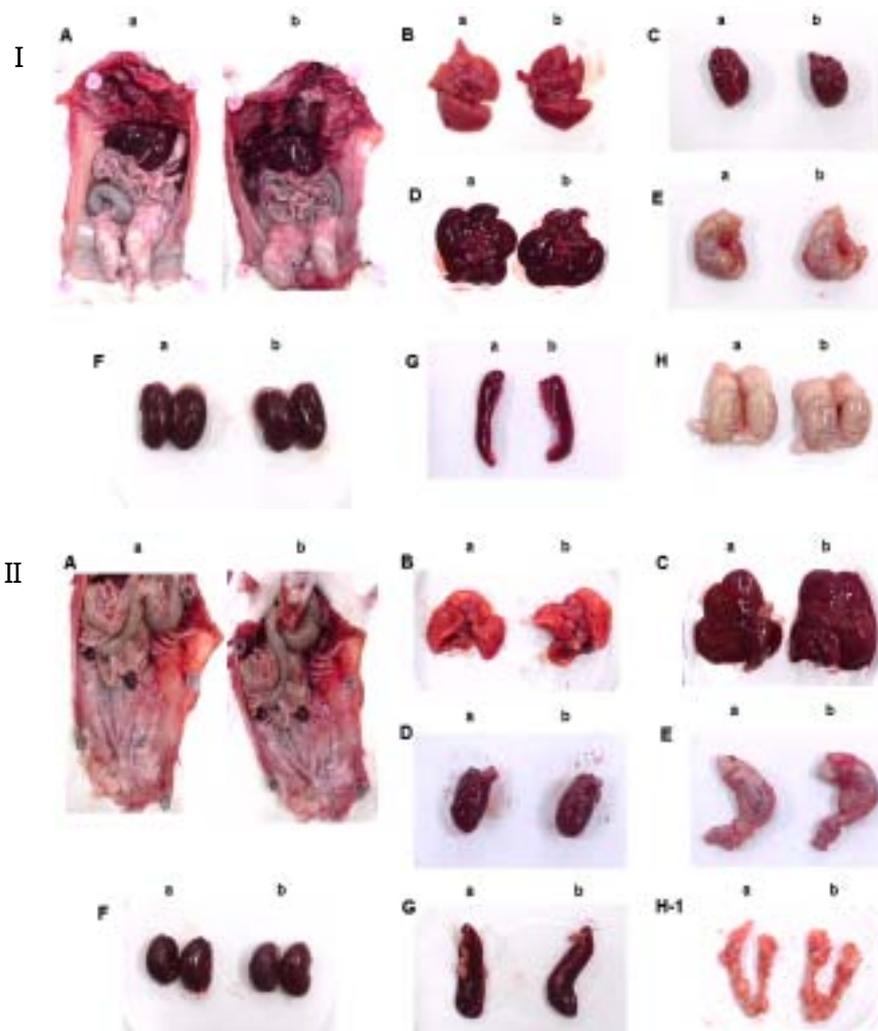


Fig. 3-4-6. Gross findings of necropsy in male and female rats orally administered with fibrinolytic enzyme, BCF-1.

I : Male rats, II : Female rats

a: control, b: administered orally with fibrinolytic enzyme (1 mg/ml)

A: all of necropsy, B: lung, C: liver, D: heart, E: stomach, F: kidney, G: pancreas, H: testis, H-1: ovary

4. 요약

Bacillus subtilis BB-1 (KFCC 11344P) 으로부터 분리된 혈전용해효소 유전자(BCF-1)를 대량발현 벡터인 pEB 벡터에 크로닝하여 순수분리 된 혈전용해효소를 rat에 경구 투여하여 출혈시간, 혈액의 응고, serum의 혈전용해능 등에 대한 *in vivo* 실험을 실시하였으며, 혈전용해효소의 단회경구투여에 따른 독성을 검사하였다. 효소의 경구투여에 따른 rat의 출혈시간에서는 대조군에 비하여 모든 경구 투여군에서 출혈시간이 유의적으로 약 1.75배 이상 길게 나타남을 확인하였고($P < 0.05$) 혈액의 출혈시간 또한 활발히 진행됨을 관찰하였다. 혈액으로부터 분리된 serum의 혈전용해작용 있어서는 경구투여 후 1시간부터 채혈한 혈액 내에서 혈전용해효소의 활성이 검출되기 시작하여 3시간째 까지 높은 활성을 보였으며 4시간째부터 서서히 활성이 감소하는 것을 확인하였고 혈액의 응고 역시 대조군에 비하여 경구 투여군에서 상당히 지연되는 것을 알 수 하였다. Western blot 에 의한 효소 검출에서는 경구 투여군에서 30,000 Da 크기의 단일밴드를 확인하였으며, 혈전용해효소의 rat에 대한 단회경구투여 독성실험에서 중량의 변화, 장기의 이상여부, 사망률 등에서 어떠한 이상이나 병변이 발견되지 않았다. 이상의 결과로 동물실험을 통한 혈전용해효소의 경구투여에 의한 작용을 혈액 내에서 확인 할 수 있었으며, 본 효소의 단회 경구투여 시의 독성은 전혀 없음을 확인할 수 있었다.

제 5 절 천연배지에서의 혈전용해효소 생산

1. 목 적

이 절에서는 앞에서 연구된 BCF-1 혈전용해효소가 임상적으로 상당히 긍정적 결과를 보였기에 이 유전자를 함유한 *Bacillus host*를 식용가능한 곡물배지에서 최대의 활성과 최고의 생성조건을 확립함으로써 식품개발을 위한 기초 자료로 삼고자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 재 료

본 연구에 사용된 천연재료인 조, 쌀, 밀, 대두박, 엿기름, 콩, 흑두, 감자전분, 현미, 옥수수, 보리, 천일염은 진주인근의 재래시장에서 구입하여 분말화하여 사용, 탈지유는 서울우유에서 판매하는 것을 사용하였다. 기타 활성측정 및 분석에 사용된 시약은 특급 및 1급을 사용하였다.

나. 혈전용해활성 및 효소의 확인

제 1절에서 설명한 것과 같이 Astrup와 Hullertz의 변형된 방법과 12.5%의 SDS-PAGE상에 전기영동을 실시하여 효소를 확인하였다.

다. 배합조건 및 배양기간별 효소의 생산능 조사

먼저 각 천연재료를 2%와 천일염 1%씩을 사용하여 제 3절에서 크로닝 된 (pEB-BCF-1 in *B. subtilis* 168)를 1% (O.D 1.0)를 효소의 생산시점인 8시간 동안 37°C, 170 rpm의 조건으로 배양하여 활성이 가장 우수한 천연재료를 선정하였다. 활성이 우수한 천연재료를 각각 2%씩 배합한 후 천일염 1%를 첨가하여 멸균 후 크로닝 된 균주(pEB-BCF-1 in *B. subtilis* 168)를 1% (O.D 1.0)를 접종하여 활성을 확인하고, 선정된 천연배지에서 10일 동안 37°C, 170 rpm의 조건으로 매 24시간마다 시료를 채취하여 -20°C에 보관 후 실험에 사용하였다. 이 때 대조구로서 LB broth를 사용하여 동일한 조건으로 배양한 후 활성을 비교하였다.

3. 실험결과 및 고찰

가. 혈전용해효소 생산능이 우수한 천연배지의 선정

조, 쌀, 밀, 대두박, 콩, 흑두, 엿기름, 감자전분, 현미, 옥수수, 보리, 탈지유 2%씩과 천일염 1%를 첨가하여 배지로 제조하여 크로닝 된 균주(pEB-BCF-1 in *B. subtilis* 168)를 접종, 배양한 결과 Fig. 3-5-1과 같이 탈지유 > 흑두 > 대두박 > 밀 순으로 혈전용해능이 강하게 나타났으며, 나머지 재료들에서는 아주 약한 활성을 나타내었다. 따라서 탈지유, 흑두, 대두박, 밀, 대두, 엿기름분말을 각각 배합하여 다음 실험에 사용하였다.

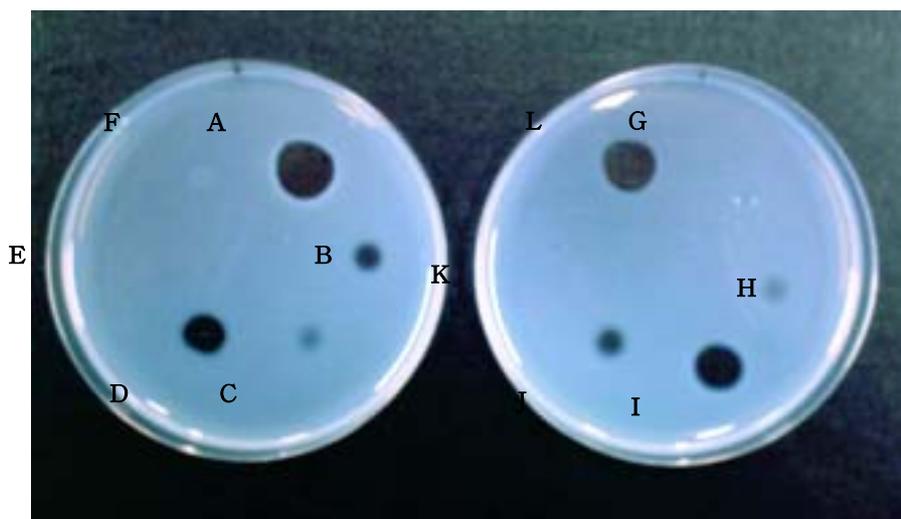


Fig. 3-5-1. Fibrinolytic activities of *B. subtilis* 168 containing pEB-BCF-1 cultured with natural medium.

A: culture supernatant of *B. subtilis* 168 containing pEB-BCF-1 in the 2% Skim milk, B: 2% soy bean, C: 2% barley, D: 2% wheat, E: 2% potato starch, F: 2% brown rice, G: 2% millet, H: 2% corn, I: 2% soybean cake, J: 2% powdered malt, K: 2% rice, L: 2% black bean (all was added with 1% bay salt)

나. 천연배지의 배합에 의한 혈전용해효소 생산능

가 항에서 혈전용해효소 생산능을 나타내었던 탈지유, 흑두, 대두박, 밀을 각각 2%씩 탈지유와 흑두, 탈지유와 대두박, 탈지유와 밀, 흑두와 대두박, 흑두와 밀, 대두박과 밀을 혼합하고 천일염 1%씩을 첨가하여 크로닝 된 균주(pEB-BCF-1 in *B. subtilis* 168)를 접종하여 37℃, 24hrs 배양한 후 혈전용해능을 조사한 결과 탈지유와 흑두를 혼합한 배지에서 혈전용해효소 생산이 가장 우수하였으며 단백질 전기영동 시 약 30 kDa의 가장 뚜렷한 밴드를 나타내었다(Fig. 3-5-2). 이 때 대조구로서 LB broth에서 배양한 크로닝 된(pEB-BCF-1 in *B. subtilis* 168) 균주가 생산하는 혈전용해능 보다 강한 활성을 나타내었다.

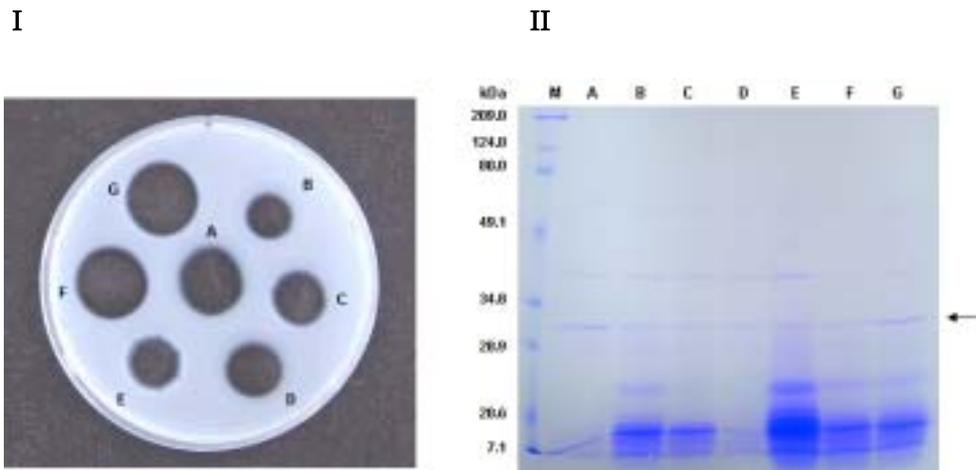


Fig. 3-5-2. Fibrinolytic activities and analysis of SDS-PAGE of production of BCF-1 enzyme in the natural media.

I : Fibrinolytic enzyme activities, II : Analysis of SDS-PAGE of production of BCF-1 enzyme in the natural medium

M: Prestained SDS-PAGE standards markers, A: culture supernatant of pEB-BCF-1 in *B. subtilis* 168 in the LB broth, B: 2% soybean cake and 2% wheat mixture, C: 2% black bean and 2% wheat mixture, D: 2% skim milk and 2% wheat mixture, E: 2% soybean cake and 2% black bean mixture, F: 2% soybean cake and 2% skim milk mixture, G: 2% black bean and 2% skim milk mixture (all added 1% bay salt)

다. 흑두와 탈지유 배합배지에서 배양한 균주의 배양일수별 혈전용해효소 생산능 측정

나 항의 천연배지의 배합에 의한 혈전용해효소 생산능 조사에서 가장 강한 활성을 보인 흑두와 탈지유를 각각 2%씩 혼합한 뒤 천일염 1%를 첨가하여 배양배지를 제조하였다. 제조된 천연배지에 크로닝 된 균주를 접종, 10일간 37℃에서 배양한 결과 배양 7일째 가장 강한 활성을 보였으며, 배양 10일째 까지도 그 활성이 실활 되지 않고 높은 활성이 유지되는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 본 균주를 이용하여 전통발효식품이나 기타가공식품에 도입 시 높은 온도에서도 효소의 실활이 적고 활성이 유지되는 것을 볼 때 효소가 도입된 제품이 저온에서 보관된다면 효소의 안정성 부분에는 문제가 아주 적을 것으로 생각된다. 또한 대조구로서 LB broth에서 배양한 균주가 생산하는 혈전용해효소의 활성보다 높은 활성을 나타내었다(Fig. 3-5-3).

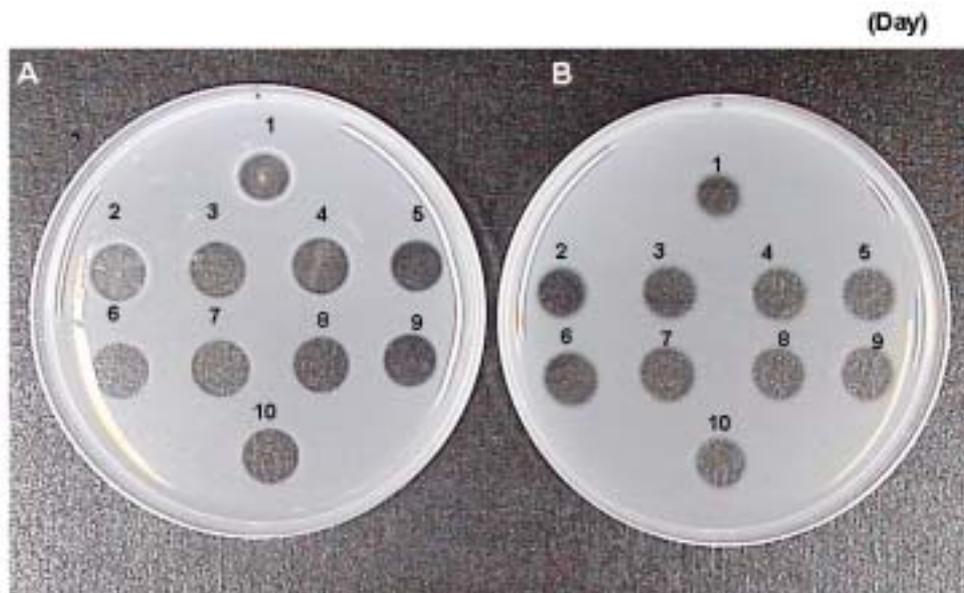


Fig. 3-5-3. Fibrinolytic activities according to culture time of *B. subtilis* 168 containing pEB-BCF-1.

A: 2% skim milk and 2% black bean mixture (added with 1% bay salt)

B: LB broth

제 6 절 혈전용해효소 유전자의 상추에 도입 및 발현

1. 목 적

상추는 조직배양 시 조작이 쉽고, 절편체로부터 쉽게 재분화 되며, 조직배양에 있어서 식물호르몬인 auxin과 cytokinin은 매우 중요하며, 절편체의 종류와 빛은 상추의 신초 형성에 영향을 주는 중요한자이다. 특히 빛은 기내 형태형성에 크게 영향을 미친다고 알려져 있다. 최근에는 시험관에서 상추 자엽으로부터 기관 재분화를 조절하는 배양환경, 절편체 나이, 식물호르몬의 상호작용에 관한 연구, 상추의 원형질체 배양 및 융합에 대한 연구 등 상추 육종을 위한 연구가 계속되어 지고 있다. 따라서 본 과제에서는 식물생명공학 기법을 이용한 새로운 기능성 형질전환체 상추 개발을 위한 전단계로서 재분화 능력이 뛰어난 상추 품종을 선발하고 재분화 효율을 극대화 시킬 수 있는 방법을 개발하고자 하며, 또한 원형질체를 이용한 형질전환체 상추 개발을 위해서는 필수적인 과정인 상추 원형질체로부터 완전한 식물체 재분화 조건을 확립하며 또한, *Agrobacterium*을 이용한 형질전환 방법도 확립한다. 최종적으로 이들 기술을 이용하여 혈전분해 효소 유전자가 도입된 기능성 상추를 개발하고자 한다.

2. 상추의 재분화 및 형질전환 조건 확립

가. 재료 및 방법

1) 상추종자 발아용 배지의 제조 (MSO 배지, Table 3-6-1)

MS salt 조성에 들어가는 각각의 시약들 및 sucrose를 화학저울을 이용하여 정량한 다음, 이들을 2차 증류수 600 ml정도 들어있는 비커에 넣고 자석교반기를 이용해 녹였다. pH meter를 이용하여 pH를 5.7~5.8로 적정하고 (용액의 pH가 5.8이상일 때 HCl로 5.7 이하일 때 NaOH로 맞춘다. pH 5.7~5.8은 식물이 자라기에 적절한 pH이다), 메스실린더를 이용하여 2차 증류수를 부어 1L로 맞춘다. Solid agent인 phytigel 2.5 g을 첨가한 다음, 배지가 들어있는 유리병 뚜껑을 느슨하게 잠근 고 호일로 싼 뒤 labeling 하여 121℃에서 15분 동안 멸균기 (autoclave)에서 멸균하였다. 무균대 (clean bench)에서 배지를 Petri dish에 붓고, 뚜껑을 열어 배지를 굳혔다. 배지가 다 굳으면 뚜껑을 덮고 랩을 씌워 냉장고에 보관하여 사용하였다.

Table 3-6-1. Nutritional components of MSO medium

종류	성분	용량 (mg/ L)
Micro elements	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
	FeNaEDTA	36.70
	H ₃ BO ₃	6.20
	KI	0.83
	MnSO ₄ ·H ₂ O	16.90
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.60
Macro elements	CaCl ₂	332.02
	KH ₂ PO ₄	170.00
	KNO ₃	1900.00
	MgSO ₄	180.54
	NH ₄ NO ₃	1650.00
Vitamins	Glycine	2.00
	myo-Inositol	100.00
	Nicotinic acid	0.50
	Pyridoxine HCl	0.50
	Thiamine HCl	0.10

2) 상추종자 표면 살균 및 파종

70% ethanol이 들어 있는 멸균된 e-tube에 상추종자를 넣고 1분정도 흔들어서 shaking 한 후 ethanol을 버리고, 멸균된 2차 증류수로 1회 washing 하였다. 상추종자가 들어있는 e-tube에 계면활성제인 Triton X-100이 미량 포함된 3% sodium hyperchloride (NaClO)를 적당량 넣고 3~5분정도 shaking한 뒤 용액을 버리고, 멸균한 2차 증류수로 washing을 3~5회 정도 반복하였다. 표면 살균된 상추종자들을 4°C 냉장고에서 약 이틀정도 cold 처리한 후 상추종자 발아 배지인 MSO배지에 표면 살균된 상추종자들을 핀셋으로 Petri dish 당 10개씩 파종하였다. Petri dish를 para film으로 감아 밀봉 시킨 뒤 26°C의 배양실로 옮겨 빛 상태에서 발아 시켰다.

3) MSO 배지 상에서 상추 종자 발아

종자 파종 후 종자로부터 뿌리, 자엽 및 제 1엽등이 성장하는 발아과정을 파종 후 1일째부터 10일 제까지 관찰했다.

4) 상추 조직 절편체로부터 식물체 재분화 배지 제조

(KN 배지, Table 3-6-2)

MS salt와 sucrose를 정량하여 2차 증류수에 자석 교반기를 이용하여 녹이고, cytokinin 계통인 식물호르몬 kinetin (2 mg/ L)과 auxin 계통인 식물호르몬 NAA (0.1 mg/ L)를 배지에 첨가하였다. pH meter를 이용해서 배지를 pH 5.7~5.8로 적정하고, solid agent인 phytigel을 첨가하여 121°C에서 15분 동안 멸균기(autoclave)에서 배지를 멸균 시킨 후, 무균대(clean bench)에서 Petri dish에 배지를 1/ 2 정도 부은 뒤 굳혔다.

Table 3-6-2. Nutritional components of KN medium

종류	성분	용량 (mg/ L)
Micro elements	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
	FeNaEDTA	36.70
	H ₃ BO ₃	6.20
	KI	0.83
	MnSO ₄ .H ₂ O	16.90
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.60
Macro elements	CaCl ₂	332.02
	KH ₂ PO ₄	170.00
	KNO ₃	1900.00
	MgSO ₄	180.54
	NH ₄ NO ₃	1650.00
Vitamins	Glycine	2.00
	myo-Inositol	100.00
	Nicotinic acid	0.50
	Pyridoxine HCl	0.50
	Thiamine HCl	0.10
Phytohormones	Kinetin	2.00
	NAA	0.10

5) 상추 자엽 절편체들을 식물체 재분화 배지에 치상

과종 후 6일째 된 상추의 유묘를 실험 재료로 사용하였다. 자엽을 절취하기 위한 실험 도구들은 무균대(clean bench), 멸균된 건축용 타일, 알콜램프, 살균 증류수, 살균된 여과지(filter paper), 핀셋, 해부용 칼 등이 필요하며, 먼저 무균대 위에 foil로 쌓여 멸균된 건축용 타일을 놓고 그 위에 살균된 여과지를 깔고 멸균 증류수가 여과지에 살며시 젖을 정도로 부었다. 6일째 된 상추 유묘를 핀셋으로 발아용 배지에서

뽑아내어 여과지 위에 올려놓고, 핀셋과 해부용 칼을 이용하여 자엽을 절취하였다. 절취할 때 자엽의 끝부분과 양옆, 그리고 엽병(petiole) 부위로 잘라 사각형 모양이 되게 했으며, 자엽 당 1개의 절편체를 절취하며 핀셋과 해부용 칼은 알코올램프를 이용하여 화염 멸균을 자주하였다. 절취된 자엽 절편체들은 식물체 재분화 배지인 KN 배지가 들어있는 직경 9 cm Petri dish 위에 1개당 10개의 자엽 절편체들을 3-4-3 형태로 치상하였다. Petri dish 뚜껑을 덮고 para film으로 봉해서 16시간 빛 상태와 8시간 암 상태로 조절된 26°C±1 온도로 유지되는 배양실에서 배양하였다.

6) 상추 제1엽 절편체들을 식물체 재분화 배지에 치상

과종 후 10일째 된 상추의 유묘를 실험 재료로 사용하였다. 무균대 위에 foil로 씌워 멸균된 건축용 타일을 놓고 그 위에 살균된 여과지를 깔고 멸균 증류수가 여과지에 살며시 젖을 정도로 부었다. 10일째 된 상추 유묘를 핀셋으로 발아용 배지에서 뽑아내어 여과지 위에 올려놓고, 핀셋과 해부용 칼을 이용하여 제 1엽을 절취했다. 절취할 때 제1엽의 끝부분과 양옆, 그리고 엽병(petiole) 부위로 잘라 사각형 모양이 되게 했다. 제1엽 당 1개의 절편체를 절취하며 핀셋과 해부용 칼은 알코올램프를 이용하여 화염 멸균을 자주하였다. 절취된 제1엽 절편체들은 식물체 재분화 배지인 KN 배지가 들어있는 직경 9cm Petri dish 위에 1개당 10개의 제1엽 절편체들을 3-4-3 형태로 치상하였다. Petri dish 뚜껑을 덮고 para film으로 봉해서 16시간 빛 상태와 8시간 암 상태로 조절된 26°C±1 온도로 유지되는 배양실에서 배양하였다.

7) 재분화 배지에 치상된 상추 자엽과 제1엽 절편체로부터의 식물체 재분화

치상 1주째부터 7주째까지 절편체들의 재분화 과정을 관찰 했으며, 재분화된 식물체들의 뿌리 유도를 위해 MSO 배지가 들어 있는 배양병으로 옮겨 16시간 빛 상태와 8시간 암 상태로 조절된 26°C±1 온도로 유지되는 배양실에서 배양했다.

8) 상추 자엽과 제1엽으로부터 품종별 식물체 재분화 효율

시판되고 있는 상추품종 청치마, 고향뚝적측면, 정통포기의 종자를 MSO 배지에서 발아시켜 자엽과 제1엽 절편체들을 식물체 재분화 배지인 KN 배지에 치상시켜 절편체들로부터 품종 별 식물체 재분화 효율을 비교하였다.

9) 다양한 재분화 배지에 따른 상추의 자엽과 제1엽으로부터 식물체 재분화 효율

과종 후 6일된 청치마 품종의 자엽 절편체와 과종 후 10일된 청치마 품종의 제1엽 절편체들을 다양한 상추 재분화 배지 (Table 3-6-3)에 치상하여 그들의 재분화 효율

을 조사했으며, 기존에 사용한 KN 배지와 비교 분석하여 가장 효율적인 재분화 배지를 선발했다.

Table 3-6-3. Plant growth regulators in various plant regeneration media for lettuce

Media	Plant hormone	mg/ L	mg/ L*
KI	Kinetin	0.50	0.05
	IAA	1.00	0.00
SH	Kinetin	0.50	0.05
	IAA	0.10	0.00
	Zeatin	0.00	0.05
MSD3	BAP	1.00	
	IAA	2.00	
NB	BAP	0.50	
	NAA	0.04	

* KI배지에

서는 절편체들을 먼저 0.50 mg/ L kinetin과 1.0 mg/ L IAA가 첨가된 재분화 배지에서 치상하여 배양 7일 후에 절편체들을 0.05 mg/ L kinetin만 첨가된 배지에 옮겼다. SH배지에서는 절편체들을 먼저 0.50mg/ L kinetin과 0.10 mg/ L IAA가 첨가된 재분화 배지에서 치상하여 배양 12일 후에 0.05 mg/ L kinetin과 0.05 mg/ L zeatin이 첨가된 배지에 옮겼다.

10) 조직배양에 의해 재분화된 상추로부터 개화된 완전한 식물체로 성장

MSO 배지에서 뿌리가 유도된 재분화 식물체들을 배양병에서 3주간 배양 시킨 후, 식물체들을 끄집어내어 뿌리에 붙은 solid agent를 수돗물로 깨끗이 세척한 후 원예상토 (토실이)가 담긴 원에 트레이에 옮겨 순화 시켰고 화분에 옮겨 개화된 완전한 식물체로 성장 시켰다.

나. 실험결과 및 고찰

1) MSO 배지 상에서 상추 종자 발아

상추 3 품종인 청치마, 고향뚝적측면, 정통포기 종자들을 표면 살균하여 MSO 배지에 과종하였다. 과종 후 1일째는 종자에서 뿌리가 나기 시작했고, 2일째는 자엽이 나기 시작했다. 과종 후 3일째는 자엽과 뿌리가 점점 더 성장했고, 4일째는 두 개의 자엽이 뚜렷이 보였다. 과종 후 5일째는 자엽이 거의 다 성장했고 뿌리는 계속해서 성장했다. 과종 후 6일째 된 상추 유묘는 자엽이 다 성장했고, 제1엽이 나올 시점이며 뿌리털과 함께 주근도 계속 성장했으며 측근이 발근하기 시작했다 (Fig 3-6-1a, b). 과종 후 6일째 된 상추의 유묘를 자엽 절편체의 실험 재료로 사용했다. 과종 후 10일째 된 상추 유묘는 자엽과 제1엽이 다 성장했고 뿌리털과 함께 주근도 계속 성장했으며 측근도 발근하여 성장했다. (Fig. 3-6-1c, d). 과종 후 10일째 된 상추의 유묘를 제1엽 절편체의 실험 재료로 사용했다. 과종 10일 후 3 품종에 대한 발아율은 청치마 품종이 가장 높은 97%의 발아율을 보였고, 정통포기 58%, 고향뚝적측면 52%의 발아율이 조사되었다.

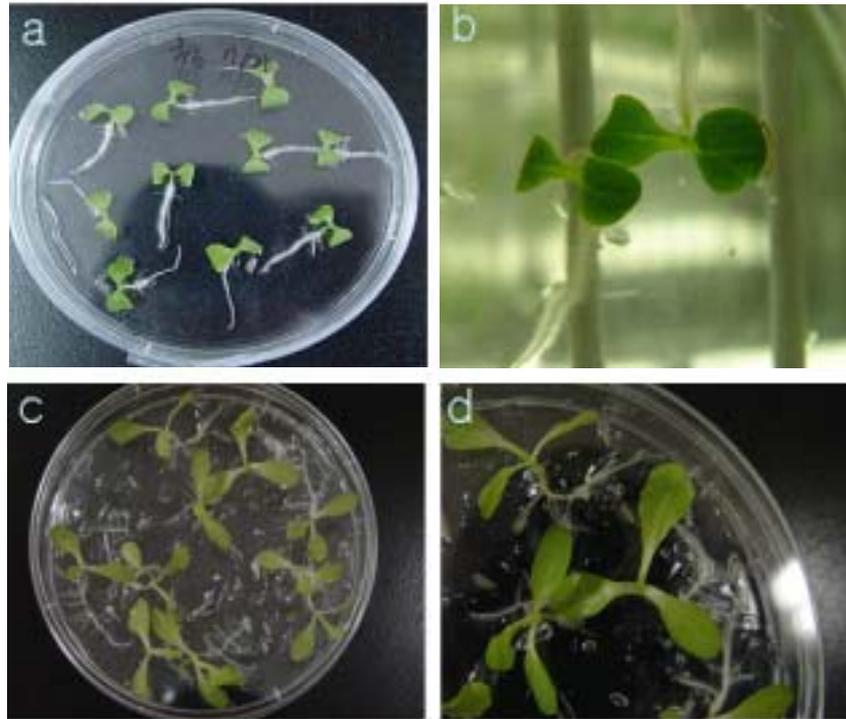


Fig. 3-6-1. Seed germination of lettuce.

- a) lettuce seedling after 6 days of sowing used as experimental material for cotyledon explant
- b) magnification of lettuce seedling after 6 days of sowing used as experimental material for cotyledon explant
- c) lettuce seedling after 10 days of sowing used as experimental material for primary leaf explant
- d) magnification of lettuce seedling after 10 days of sowing used as experimental material for primary leaf explant

2) 상추 자엽과 제1엽 절편체로부터 식물체 재분화

자엽과 제1엽 모두에서 치상 (Fig. 3-6-2a, 3-6-3a)한 후 1주째는 절편체의 크기가 처음에 치상한 크기보다 2배정도 커지면서 휘기 시작했고, 2주째는 절편체의 크기가 3배정도 더 커지고 더 많이 휘어지면서 절단면 주위로 callus가 형성되기 시작했다. 3주째는 절편체의 형체가 모를 정도로 절단면 주위에 많은 callus가 형성 (Fig. 3-6-2b, 3-6-3b)되었고 이들 callus에서 shoot가 재분화 되기 시작했다. 4

주제는 절편체에서 생겨난 재분화된 shoot가 성장하기 시작했고, 5주째는 재분화된 shoot가 일반적인 상추의 잎 모습을 갖추기 시작했다. 6주째는 더 많은 shoot와 잎들이 재분화 되었고(Fig. 3-6-2c, 3-6-3c), 치상한 후 7주째는 뿌리유도를 위해 재분화된 shoot들을 자엽과 제1엽 절편체로부터 분리하여 callus를 제거한 다음 식물호르몬이 첨가되지 않은 MSO배지가 들어 있는 배양병에 옮겨주었다 (Fig. 2d, 3d). MSO 배지에서 3주간 배양 시킨 후, 뿌리가 유도된 재분화 식물체들을 끄집어내어 뿌리에 붙은 solid agent를 수돗물로 깨끗이 세척한 후 원예상토 (토실 이)가 담긴 원예 트레이에 옮겨 순화 시켰고 (Fig. 3-6-2e, 3-6-3e), 화분에 옮겨 개화된 완전한 식물체로 성장 시켰다(Fig. 3-6-2f, 3-6-3f).

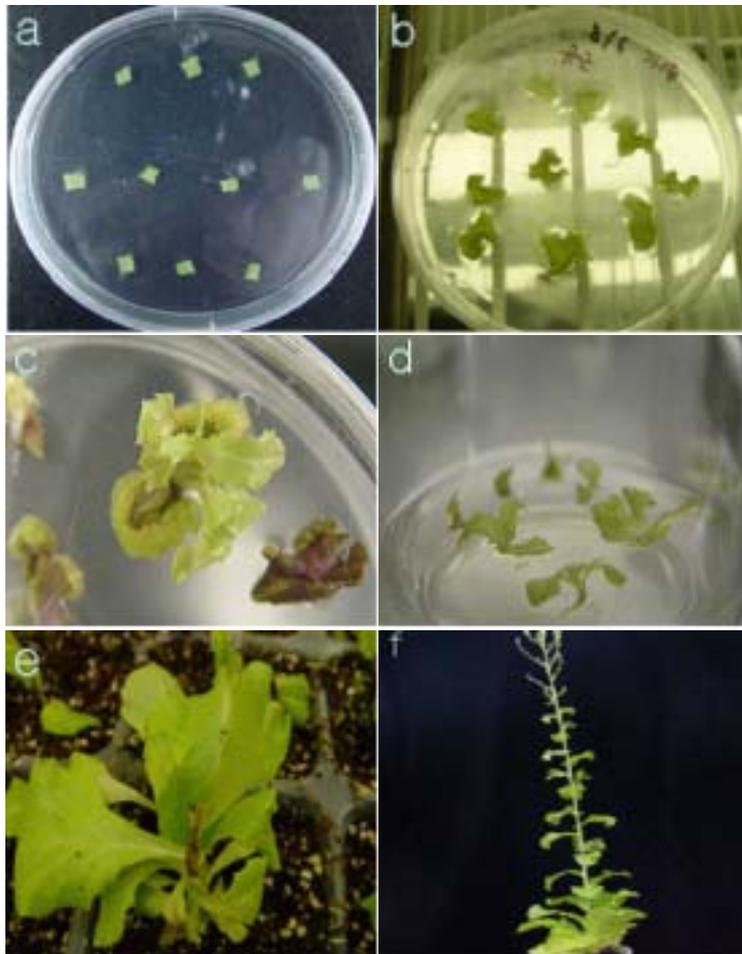


Fig. 3-6-2. Plant regeneration from cotyledonary explants of lettuce (Chungchima variety) on KN medium.

- a) Cotyledonary explants inoculated as 3-4-3 formation on KN medium
- b) Cotyledonary explants after 3 weeks of culture
- c) Plant regeneration from cotyledonary explants after 6 weeks of culture

- d) Shoots regenerated from cotyledonary explants on MSO medium for root induction after 7 weeks of culture
- e) Acclimation of plant regenerated from cotyledonary explant in horticultural soil
- f) Flowering fertile plant in pot, which is regenerated from cotyledonary explant

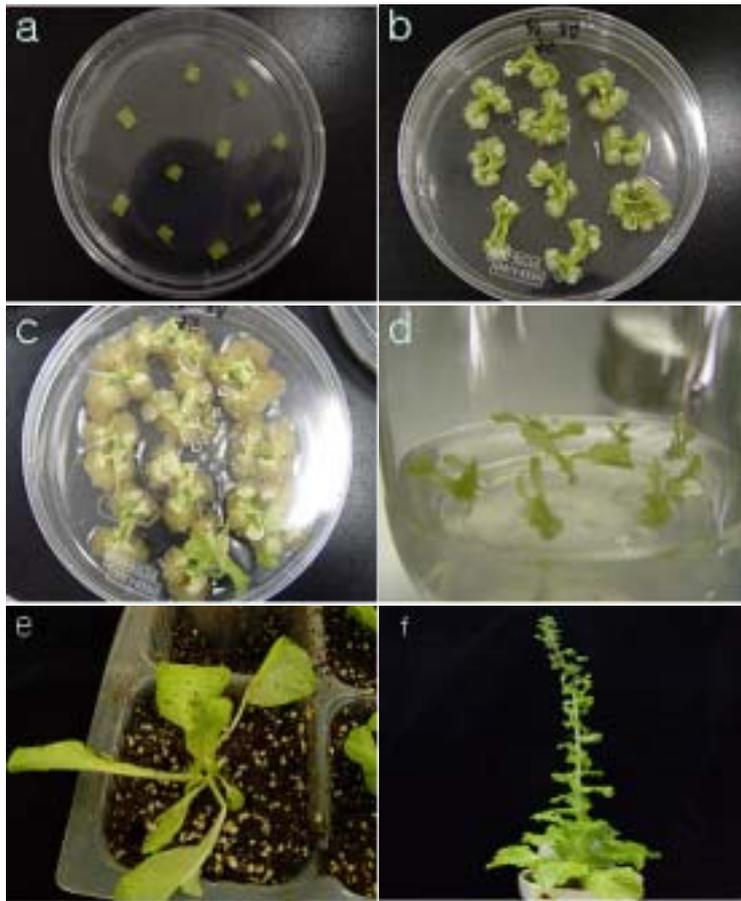


Fig. 3-6-3. Plant regeneration from primary leaf explants of lettuce (Chungchima variety) on KN medium.

- a) Primary leaf explants inoculated as 3-4-3 formation on KN medium
- b) Primary leaf explants after 3 weeks of culture
- c) Plant regeneration from primary leaf explants after 6 weeks of culture
- d) Shoots regenerated from primary leaf explants on MSO medium for root induction after 7 weeks of culture
- e) Acclimation of plant regenerated from primary leaf explant in horticultural soil
- f) Flowering fertile plant in pot, which is regenerated from primary leaf explant

3) 상추 자엽과 제1엽으로부터 품종별 식물체 재분화 효율

상추품종 청치마, 고향뜩적축면, 정통포기의 종자를 MSO 배지에서 발아 후 자엽과 제1엽 절편체들을 식물체 재분화 배지인 KN 배지에 치상시켜 절편체들로부터 품종 별 식물체 재분화 효율을 비교했다 (Fig. 3-6-4). 이 중 정통포기 품종에서 치상한 자엽 절편체수 150개로부터 137개의 절편체에서 재분화되어 91.2%의 높은 재분화 효율을 나타내었고, 제1엽 절편체수 170개로부터 146개의 절편체에서 재분화되어 85.7%의 높은 효율을 나타내었다. 두 번째로 고향뜩적축면 품종으로 자엽에서 52.2%, 제1엽에서 50.8%의 재분화효율을 나타내었고, 청치마품종에서 가장 낮은 효율인 자엽과 제1엽에서 각각 35%, 30.3%의 재분화 효율을 보였다(Table 3-6-4).



Fig. 3-6-4. Plant regeneration from primary leaf explants of lettuce.

a) Plant regeneration from primary leaf explants of lettuce (Jungtongpogi variety)

b) Plant regeneration from primary leaf explants of lettuce (Gohyangdukj-jookmyeon variety)

Table 3-6-4. Plant regeneration efficiency from cotyledon and primary leaf in various varieties of lettuce

품 종	자 엽			제 1엽		
	치상된 절편체 수	재분화된 절편체 수	재분화 효율(%)	치상된 절편체 수	재분화된 절편체 수	재분화 효율(%)
청치마	350	124	35.3	350	106	30.3
고 향 뚝 적측면	300	157	52.2	250	127	50.8
정통포기	150	137	91.2	170	146	85.7

* 숫치는 3회 반복 실험한 전체 개수를 합산하여 나타내었다.

4) 다양한 재분화 배지에 따른 상추의 자엽과 제1엽으로부터 식물체 재분화 효율

발아율이 높고 재분화 효율이 가장 낮은 청치마 품종의 재분화 효율을 높이기 위해 과종 후 6일된 청치마 품종의 자엽 절편체들과 발아 후 10일된 청치마 품종의 제1엽 절편체들을 다양한 식물체 재분화 배지 (Table 3-6-5)에 치상하여 4주 후 각 배지 당 그들의 재분화 효율을 조사했다. Fig 3-6-5와 3-6-6은 각 배지 당 4주 후에 자엽과 제1엽 절편체로부터 식물체 재분화를 나타내는 그림이다. 각 배지 당 식물체 재분화 효율은 2회 반복 실험을 합산하여 Table 3-6-6에 나타내었다. 자엽에서 재분화 효율은 KI 배지와 SH 배지, NB 배지에서 거의 평균 77%의 높은 재분화 효율을 나타내었고, MSD3 배지에서는 그 보다 조금 낮은 61% 효율을 나타내었다. 그러나 기존의 식물체 재분화 배지로 사용된 KN 배지(Table 3-6-6)에서는 청치마 품종 자엽으로 식물체 재분화 효율이 35.3%인데 반하여 사용한 모든 배지에서 KN 배지보다 높게 나타났다. 청치마 품종 제1엽 절편체로부터 재분화 효율은 KI 배지와 SH 배지에서는 각각 81%와 85%의 높은 재분화 효율로 자엽보다도 높게 나타내었고, MSD3 배지와 NB 배지에서는 그 보다 낮은 61%와 67%의 효율을 나타내었다. 제1엽에서도 기존에 식물체 재분화 배지로 사용된 KN 배지에서 제1엽으로부터 식물체 재분화 효율이 30.3%인데 반하여 사용한 모든 배지에서 KN 배지보다 높게 나타났다.

Table 3-6-5. Plant regeneration from cotyledon and primary leaf of lettuce (Chungchima variety) in various plant regeneration media

배 지	자엽			제1엽		
	치상한 절편체 수	재분화 된절편 체 수	재분화 효율(%)	치상한 절편체 수	재분화 된절편 체 수	재분화 효율(%)
KI 배지	190	148	78	197	159	81
SH 배지	190	145	76	200	170	85
MSD 배지	180	110	61	190	116	61
NB 배지	178	138	77	190	128	67

* 숫치는 2회 반복 실험한 전체 개수를 합산하여 나타내었다

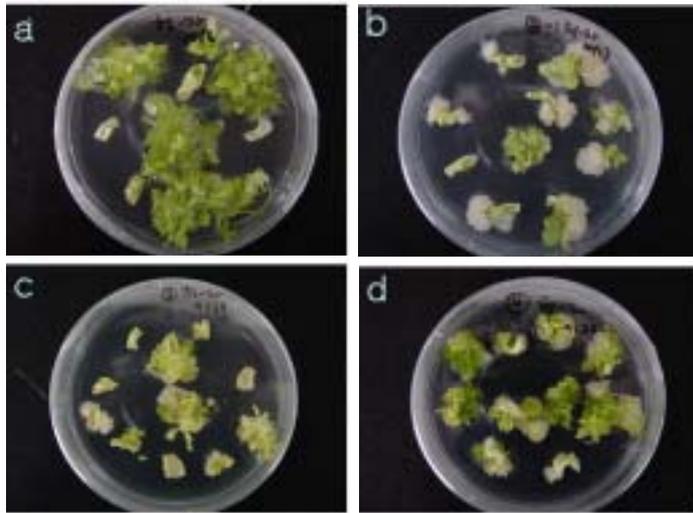


Fig. 3-6-5. Plant regeneration from cotyledonary explants of lettuce (Chungchima variety) on various regeneration media.

- a) Plant regeneration from cotyledonary explants on KI medium
- b) Plant regeneration from cotyledonary explants on SH medium
- c) Plant regeneration from cotyledonary explants on MSD3 medium
- d) Plant regeneration from cotyledonary explants on NB medium

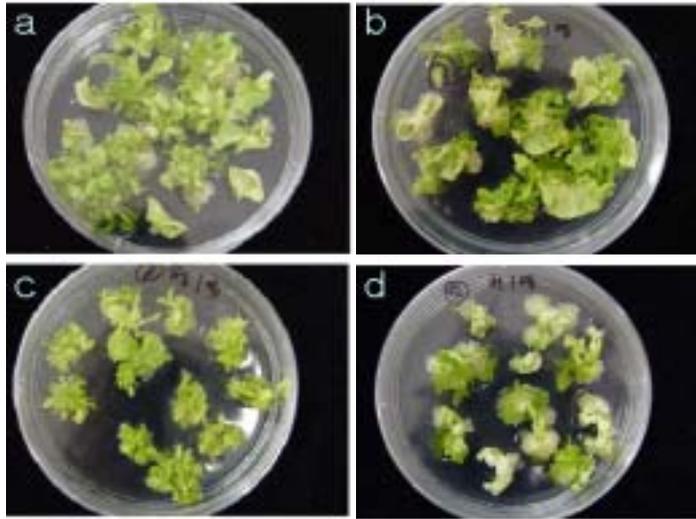


Fig. 3-6-6. Plant regeneration from Primary leaf explants of lettuce (Chungchima variety) on various regeneration media.

- a) Plant regeneration from primary leaf explants on KI medium
- b) Plant regeneration from primary leaf explants on SH medium
- c) Plant regeneration from primary leaf explants on MSD3 medium
- d) Plant regeneration from primary leaf explants on NB medium

3. 상추 원형질체로부터 재분화 유도 및 식물체로 성장

가. 재료 및 방법

1) 상추 엽육조직으로부터 원형질체 분리를 위한 시약 제조

원형질체 삼투 조절을 위해 CPW 13M 용액을 제조했으며, 리터당 첨가된 시약들은 Table 3-6-6에 나타내었다. 원형질체 분리를 위한 효소 용액은 식물 세포벽의 주성분인 cellulose를 용해시키는 1.2% (w/ v) cellulase R-10 (YAKULT HONSHA, Japan)과 세포 간 물질을 제거하는 0.3% (w/ v) macerozyme R-10 (YAKULT HONSHA, Japan), 항산화제로 0.01% PVP를 CPW 13M용액에 녹여 filter 살균하여 초저온 냉동고에 보관했다. 원형질체 정제와 분리를 위해 21% grade I sucrose 용액을 제조했다.

Table 4. Components of CPW 13M solution for protoplast isolation

component parts	per L
KH_2PO_4	27.2 mg
KNO_3	0.101 g
CaCl_2	1.118 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.246 g
KI	0.16 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025 mg
Mannitol	130 g
pH	5.8

2) 상추 원형질체 배양을 위한 시약 제조

상추원형질체 배양배지인 KM8P배지와 KM8 배지의 조성표는 Table 3-6-7에 나타내었으며 원형질체배양 때는 이들 두 배지를 각각 2:1로 섞어서 0.6% (w/ v) seaplaque agarose에 침적시켜 원형질체를 배양했다.

Table 3-6-7. Nutritional components of protoplast culture medium for lettuce

Component parts	KM8P	KM8
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025 mg	0.025 mg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025 mg	0.025 mg
FeNaEDTA	36.70 mg	36.70 mg
H ₃ BO ₃	3.00 mg	3.00 mg
KI	0.75 mg	0.75 mg
MnSO ₄ ·H ₂ O	10.00 mg	10.00 mg
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25 mg	0.25 mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2.00 mg	2.00 mg
CaCl ₂	453.00 mg	453.00 mg
KCl	300.00 mg	300.00 mg
KH ₂ PO ₄	170.00 mg	170.00 mg
KNO ₃	1900.00 mg	1900.00 mg
MgSO ₄	146.86 mg	146.86 mg
NH ₄ NO ₃	600.00 mg	600.00 mg
Organic acid	140 mg	140 mg
KM vitamin solution	10 ml	10 ml
Coconut water	20 ml	20 ml
Fructose	6.25 mg	6.25 mg
Ribose	6.25 mg	6.25 mg
Mannose	6.25 mg	6.25 mg
Rhamnose	6.25 mg	6.25 mg
Cellobiose	6.25 mg	6.25 mg
Sorbitol	6.25 mg	6.25 mg
Mannitol	6.25 mg	6.25 mg
Casein	0.25 mg	0.25 mg
Sucrose	250 mg	20 g
Glucose	100 g	10 g
2,4-D	0.2 mg	0.1 mg
Zeatin	0.5 mg	0.2 mg
NAA	1 mg	1 mg
TDZ	0.1 mg	0.1 mg

3) 상추 원형질체 분리 및 정제

밭아 10일째 된 상추 제 1엽 약 1 g 을 무균대에서 chopping한 후 1.2% cellulase R-10과 0.3% macerozyme R-10이 첨가된 효소용액에 넣고 room temperature에서 암 상태로 12시간 동안 천천히 shaking하면서 incubation 시켰다. Overnight 시킨 효소용액 복합체를 무균대에서 pore size 직경이 100 μm 와 45 μm 인 살균된 sieve를 이용하여 용해되지 않은 잎 조직들을 제거 시켰다. 원형질체 정제를 위해 21% sucrose 용액이 들어있는 test tube에 원형질체 용액을 조심스럽게 mix되지 않게 첨가한 후 원심분리기를 이용하여 700 rpm에서 10분 동안 원심분리 시켰다. 원심분리 후 완전한 원형질체들은 21% sucrose용액과의 경계면에 띠처럼 형성되었다. 이들을 조심스럽게 스포이드를 이용해서 분리시켜 새 test tube에 옮긴 후, CPW13M 용액을 5 ml 첨가하여 650 rpm에서 5분 동안 원심 분리시켜 원형질체를 washing했다. 상층액을 버리고 원형질체 pellet에 10 ml의 CPW 13M 용액을 넣고 hemocytometer를 이용하여 현미경으로 원형질체수를 counting한 후 농도를 ml당 3.5×10^5 개로 맞추었다.

4) 상추 원형질체들을 agarose-embedding 방법에 의한 배양

KM8P/KM8 원형질체 배양배지에 ml당 3.5×10^5 개의 원형질체 농도로 agarose- embedding 시켜 암 상태로 조절된 $26^\circ\text{C} \pm 1$ 온도로 유지되는 배양실에서 배양했다.

5) 상추 원형질체들로부터 세포분열 유도

Agarose에 embedding된 원형질체 배양체에 일주일 간격으로 새로운 KM8P/ KM8 액체배지 1 ml씩 첨가해 주어 상추 원형질체들로부터 세포분열을 유도했다.

- 6) 상추 원형질체들로부터 microcolony, macrocolony, callus 유도
 Agarose에 embedding된 원형질체 배양체에 일주일 간격으로 새로운 KM8P/ KM8 액체배지 1 ml씩 첨가해 주어 상추 원형질체 배양체들로부터 microcolony, macrocolony, 들을 유도한 후, macrocolony 들을 핀셋으로 agarose로부터 집어내어 KN 배지에 옮겨 주어 16시간 빛 상태와 8시간 암 상태로 조절된 26°C±1 온도로 유지되는 배양실에서 배양하여 먼저 callus들을 유도했다.
- 7) 상추 원형질체들로부터 유도된 callus들로부터 식물체 재분화
 상추 원형질체들로부터 유도된 callus들로부터 식물체 재분화 배지인 KN 배지에서 식물체 재분화를 유도했다.
- 8) 원형질체로부터 재분화된 식물체들의 뿌리 유도 및 완전한 식물체로 성장
 원형질체로부터 재분화된 각 식물체들을 식물호르몬이 첨가되지 않은 MSO 배지에서 뿌리를 유도했다. 뿌리가 유도된 재분화 식물체들을 배양병에서 끄집어내어 뿌리에 붙은 solid agent를 수돗물로 깨끗이 세척한 후 원예상토 (토실이)가 담긴 원예 트레이에 옮겨 순화시켰고 화분에 옮겨 완전한 식물체로 성장 시켰다.

나. 실험결과 및 고찰

- 1) 상추 원형질체들로부터 식물체 재분화
 상추 엽육조직 약 1 g을 1.2% (w/ v) cellulase R-10과 0.3% (w/

v) macerozyme R-10이 첨가된 효소용액에 넣고 room temperature 에서 암 상태로 12시간 동안 incubation 시켜 원형질체들을 분리했다 (Fig. 3-6-7a). 분리된 원형질체 수는 3번의 반복 실험에서 평균 g당 8.25×10^6 개의 원형질체들이 분리되었다. 원형질체 배양은 KM8P/KM8 배지에 ml당 3.5×10^5 개의 원형질체 농도로 agarose-embedding 시켜 암 상태로 조절된 $26^\circ\text{C} \pm 1$ 온도에서 배양했다. 배양 1주 후에 원형질체 분열이 개시되었고(Fig. 3-6-7b), 배양 2주 후에 두 번째 분열을 보였다. 배양 4주 후에는 microcolony들을 형성했으며(Fig. 3-6-7c), 일주일 간격으로 새로운 액체 KM8P&KM8 배지 1 ml씩 첨가해 주었다. 시간이 지남에 따라 microcolony가 계속적으로 분열하여 colony로 성장하는 과정을 확인할 수 있었다(Fig. 3-6-7d). 원형질체들을 agarose-embedding 방법으로 배양 후 3개월이 되면 원형질체 배양체들은 육안으로 뚜렷하게 볼 수 있는 colony들을 형성했다 (Fig. 3-6-7e). 각 colony들을 핀셋으로 집어내어 식물체 재분화 배지인 KN 배지(Table 3-6-8)로 옮겨준 후 3~4주가 지나면 colony들이 점차 성장하여 callus를 형성하여 재분화 조짐을 보였고 (Fig. 3-6-7f), 배양 7주 후에는 완전한 식물체로 재분화 되었다(Fig. 3-6-7g). 재분화된 각 식물체들로부터 뿌리 유도를 위해 각 식물체들을 식물호르몬이 첨가되지 않은 MSO 배지로 옮겨서 뿌리를 유도했고(Fig. 3-6-7h), 이들을 순화시킨 후 상토가 담긴 화분으로 옮겨서 (Fig. 3-6-7i) 개화된 완전한 식물체로 성장시켰다(Fig 3-6-8).

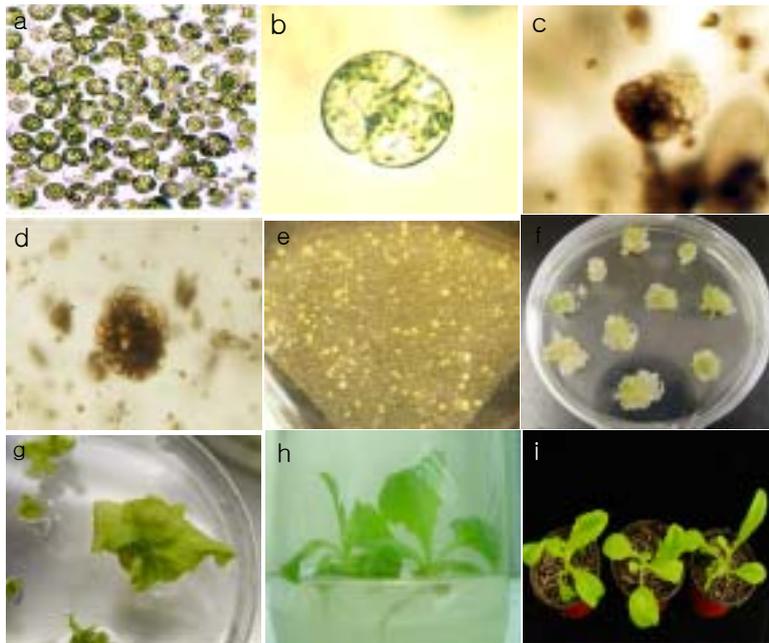


Fig. 3-6-7. Plant regeneration from protoplasts of lettuce.

- a) Protoplasts isolation from mesophyll tissue of lettuce
- b) Protoplast division on KM8P/KM8 protoplast culture medium after 1 week of culture
- c) Microcolony formation from protoplasts after 4 weeks of culture
- d) Colony formation from protoplasts after 8 weeks of culture
- e) Colony formation from protoplasts to see by naked eyes after 3 months of culture
- f) Callus formation from protoplasts
- g) Plant regeneration from protoplasts
- h) Root induction of plants regenerated from protoplasts
- i) whole plants regenerated from protoplasts



Fig. 3-6-8. Flowering fertile plant, which is regenerated from protoplasts.

4. 혈전용해효소 유전자 상추에 도입 및 발현

가. 재료 및 방법

1) 혈전용해효소 유전자의 상추 도입을 위한 vector 구축

CaMV35S promoter는 *Hind*III 와 *Bam*HI enzyme을 이용해 cloning 하였고, CaMV35S polyA terminator는 *Eco*R과 *Kpn*I으로 잘라서 cloning하여 *Bam*H과 *Sac*I으로 혈전용해효소 유전자인 BCF-1 유전자에 ligation 하였다. promoter와 terminator를 가진 BCF-1 유전자를 hygromycin B 저항성 유전자와 GUS 유전자를 가지고 있는 pCAMBIA1301 vector에 삽입시켜 pCAMBIA::35S::BCF::CaMV35S polyA 식물체 발현 vector를 구축하였다. 마찬가지로 방법으로 kanamycin에 저항성을 가지는 pBI121 vector에 CaMV35S promoter-BCF-1-nos terminator를 ligation 시켜 pBI121::35S::BCF::NOS 식물체 발현 vector를 구축하였다.

2) 혈전용해효소 유전자를 함유한 *Agrobacterium*을 상추 조직에 감염

상추종자를 70% ethanol로 1분, 3% sodium hypochlorite로 3~5분간 소독한 후 멸균수로 3~5회 잘 씻어 3일간 cold 처리한 후 배지에 치상하였다. 치상배지는 식물 호르몬이 들어있지 않은 MS 기본 배지(MS salt 4.4 g + sucrose 3%)에 phytigel 0.25%를 첨가하여 pH 5.7~5.8로 조절된 발아용 배지에 멸균된 종자를 10립씩 치상하였다. 치상된 종자는 형광등으로 하루에 16시간 조명하고 온도는 28°C로 유지하며 발아시켰다. 실험 재료는 발아 6일째 된 자엽과 10일째 된 제1엽을 사용하였다. 각각의 자엽과 제 1엽을 0.5~1 mm로 자른 뒤, 절편체를 150 μ M의 acetosyringone이 처리된 *Agrobacter*

-ium에 25분간 infection시킨 후, 항생제가 들어있지 않은 KN배지 (MS salt 4.4 g + sucrose 3% + phytigel 0.25%+ Kinetin 2 mg + NAA 0.1 mg)에 치상한 후 3일간 co-culture한다. *Agrobacterium* strain은 LBA4404를 사용하였다. 3일간 co-culture 후 상추 절편체의 감염 여부를 확인하기 위해 GUS staining 실시했다.

3) 혈전용해효소 유전자를 함유한 형질전환체 상추 재분화

3일간의 co-culture 후, 형질전환 된 상추 선별을 위해 50 mg/ L의 hygromycin과 150 mg/ L의 kanamycin이 각각 첨가된 재분화 배지(2 mg/ L kinetin, 0.1 mg/ L NAA)에 절편체를 치상하고, 2주 후에 절편체들을 동일한 성분의 새 배지로 subculture 하였다.

4) 혈전용해효소 유전자를 함유한 재분화된 형질전환체 상추 shoot 의 GUS staining

Agrobacterium infection 4주 후 shoot가 재분화 되었으며, 이렇게 재분화된 shoot는 BCF 유전자와 함께 reporter 유전자인 GUS 유전자를 이용하여 형질전환 유무를 확인했다. 재분화 된 shoot를 절편체로부터 분리하여 GUS staining solution (25 mg X-GlcA-cyclohexylz-monium salt, 1.38 g sodium phosphate, 0.05% Triton X-100/100 ml)에 담가 36°C에서 12시간이상 incubation 하였다.

5) 혈전용해효소 유전자를 함유한 형질전환체 상추의 온실에서 완전한 성장

재분화된 형질전환체 상추 shoot는 뿌리 유도배지(MS salt 4.4 g + sucrose 3% + phytigel 0.25%+ NAA 0.1 mg)에 옮겨 뿌리를 유도하였고, 이들을 배양병에서 꺼내어 뿌리에 붙은 gelling agent를 깨

곳이 세척한 후 원예 상토에 심어 일주일간 순화시켰다. 순화된 식물체들을 유리 온실로 옮겨 완전한 식물체로 성장시켰다.

6) 혈전용해 효소 유전자를 함유한 완전한 형질전환체 상추의 GUS staining

온실에서 자란 완전한 상추 형질전환체 잎을 punching 하여 나온 leaf disc를 GUS staining 용액에 incubation 하여 GUS 유전자의 발현 여부를 확인하였다.

7) 형질전환 상추에서 PCR, RT-PCR 및 western blot를 통한 혈전용해 효소 유전자의 검정

형질전환 상추의 잎 조직으로부터 도입된 혈전용해효소 유전자의 존재 여부를 PCR과 RT-PCR을 사용하여 확인하였다. 형질전환체 상추와 비 형질전환 control 상추로부터 cetytrimethylammonium bromide (CTAB) 방법으로 genomic DNA를 분리하여 Primer sequence 5'-CGGATCCGTGAGAGGCAAAAAGGTATGG-3'와 5'-TGAATTCTTAATGTGCTGCTGCTGCTTGTAC-3'을 이용하여 PCR을 수행 하였다. PCR 조건은 94℃에서 3분간 pre-heating 한 후, 94℃에서 1분, 55℃에서 1분, 72℃에서 1분으로 하여 35 cycle을 반응시켰으며, 이어서 72℃에서 10분간 heating하고 4℃에서 저장한 후 agarose gel 전기영동으로 유전자를 확인하였다. 또한, 형질전환 된 상추로부터 혈전용해 효소 유전자의 전사여부를 확인하기 위해서 RT-PCR을 수행하였다. 형질전환 상추로부터 Kit (NucleoSpin RNA Plant)를 이용하여 RNA를 분리한 후, genomic DNA PCR에서 사용한 동일한 primer를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. RT-PCR에서 primer는 75℃에서 3분간 denature 시킨 후, 42℃에서 1시간, 75℃에

서 20분 반응시켜 전기영동으로 확인하였다. 그리고 western blot는 세부과제로부터 넘겨받은 항체를 통해 Towbin 등의 방법을 이용하여 전기영동이 끝난 단백질을 nitrocellulose membrane (Millipore, USA)에 250 mA로 1시간 30분간 transfer하였다. 그 후 이 막을 pH 7.8의 phosphate buffer saline (PBS)에 5분씩 5회 세척한 후 1% skim milk가 함유된 PBS buffer에 1시간 30분간 blocking하여 불필요한 단백질의 부착을 억제시켰다. 그 후 1% skim milk를 포함하는 PBS buffer에 1:5,000 (v/ v)의 비율로 primary antibody를 희석한 후 blotting wells에 넣어 rotator를 이용하여 상온에서 16시간동안 흔들면서 반응하였다. 반응이 끝난 후 PBS buffer를 이용하여 15분씩 3회 세척하여 1% skim milk가 포함된 PBS buffer에 Anti-Rabbit IgG (Sigma, USA)를 1:2,000 (v/ v)로 희석하여 4시간동안 상온에서 rotator를 이용하여 흔들면서 반응시켰다. 이를 PBS buffer로 15분간 3회 세척한 뒤 15 mg 4-chloro-1-naphtol, 45 ml Tris-Cl (pH 7.4), 90 μ l H₂O₂로 구성된 발색용액에 10분간 반응시킨 후 증류수로서 세척하고 건조하여 생성된 band를 육안으로 관찰하여 사진 촬영하였다.

나. 실험결과 및 고찰

1) 혈전용해효소 유전자의 상추 도입을 위한 vector 구축

Promoter와 terminator를 가진 BCF-1 유전자를 hygromycin B 저항성 유전자와 GUS 유전자를 가지고 있는 pCAMBIA1301 vector에 삽입시켜 pCAMBIA::35S:: BCF::CaMV35S polyA 식물체 발현 vector를 구축하였다 (Fig. 3-6-9). 구축된 vector를 여러 가지 제한 효소를 사용하여 확인하였다. 먼저 *Hind*III와 *Eco*RI으로 처리 했을

때 약 2 kb 정도의 절편을 확인 했고 (Fig. 3-6-9, lane 1), *HindIII*, *EcoRI*, *XbaI*을 처리 했을 때 약 0.8kb 정도의 CaMV35S promoter size를 확인 했고 (Fig. 3-6-9, lane 2), *BamHI*과 *KpnI*을 처리 했을 때는 BCF-1 유전자 크기인 1kb size의 절편을 확인했다 (Fig. 3-6-9, lane 3). *SacI*과 *EcoRI*에서는 270bp 정도의 CaMV35S polyA size의 절편체를 확인함으로써 (Fig. 3-6-9, lane 4) 정확하게 혈전용 해효소 유전자의 vector가 구축되었음을 확인 했다.

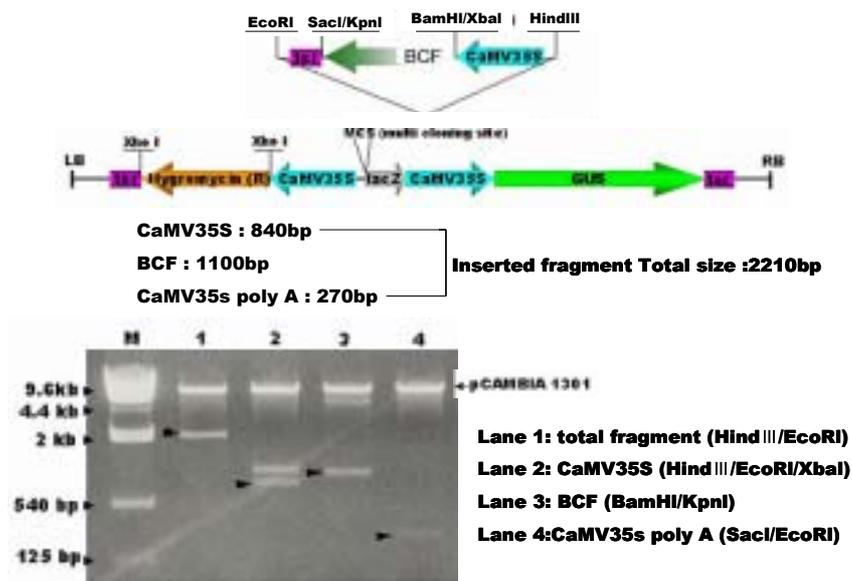


Fig. 3-6-9. Construction of vector pCAMBIA::35S:: BCF-1::CaMV35S polyA containing BCF-1 gene.

2) 혈전용해효소 유전자를 함유한 *Agrobacterium*을 상추 조직에 감염

구축된 혈전용해효소 유전자와 GUS 유전자가 함유된 *Agrobacterium*을 상추 절편체에 감염 시켰다. Co-culture 3일 후에 절편체들의 감염 여부를 확인하기 위해 GUS staining을 한 결과 대부분의 절편체 감염 부위에서 GUS 유전자가 발현되었다(Fig. 3-6-10).

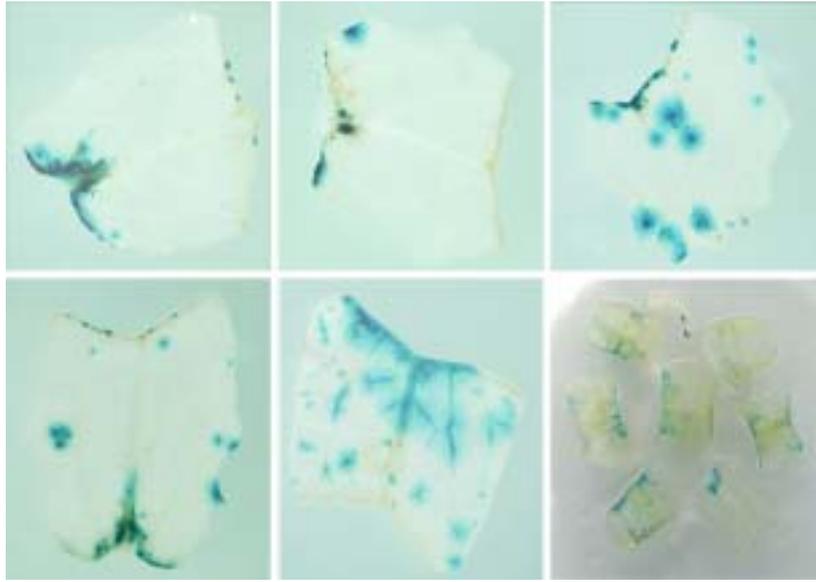


Fig. 3-6-10. GUS gene expression on infection regions of lettuce explants.

3) 혈전용해효소 유전자를 함유한 형질전환체 상추 재분화

항생제를 이용한 형질전환된 상추 선별을 위해 50 mg/ L의 hygromycin과 150 mg/ L의 kanamycin이 각각 첨가된 재분화 배지(2 mg/ L kinetin, 0.1 mg/ L NAA)에 절편체를 치상한 후, 4주째부터 재분화된 shoot가 성장하기 시작했고, 5주째는 재분화된 shoot가 일반적인 상추의 잎 모습을 갖추기 시작했다. 6주째는 더 많은 shoot와 잎들이 재분화 되었다(Fig. 3-6-11).



Fig. 3-6-11. Transformed lettuce regeneration containing BCF-1 gene.

4) 혈전용해효소 유전자를 함유한 재분화된 형질전환체 상추 shoot의 GUS staining

재분화 된 shoot는 BCF-1 유전자와 함께 reporter 유전자인 GUS 유전자를 이용하여 형질전환 유무를 확인했을 때, 대부분의 shoot에서 GUS 유전자의 발현을 확인했다(Fig. 3-6-12).

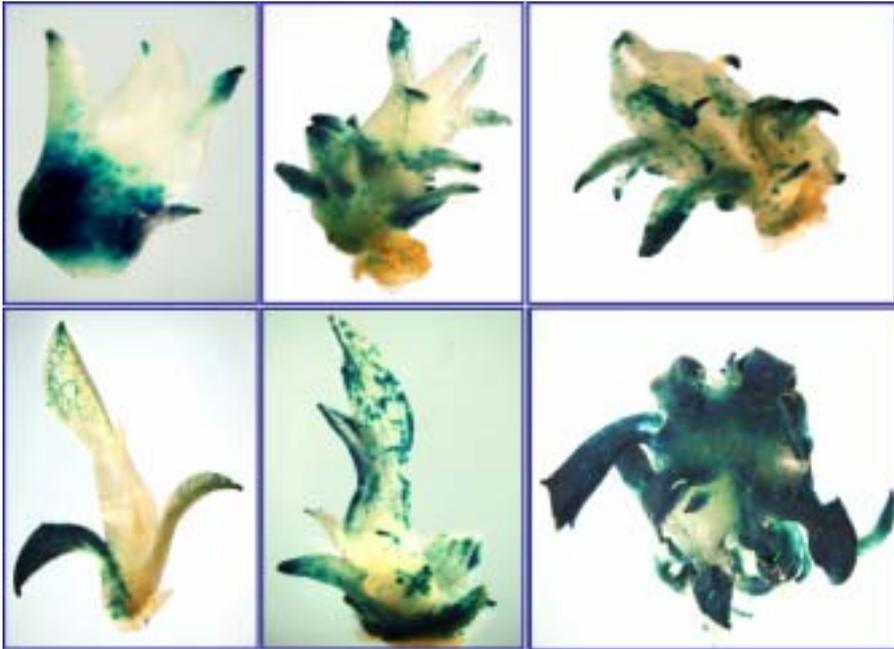


Fig. 3-6-12. GUS gene expression of transformed shoots containing BCF-1 gene.

5) 혈전용해효소 유전자를 함유한 형질전환체 상추의 온실에서 완전한 성장

재분화 된 형질전환체 상추 shoot는 뿌리 유도배지(MS salt 4.4 g + sucrose 3% + phytigel 0.25%+ NAA 0.1 mg)에 옮겨 뿌리를 유도하였고, 이들을 배양병에서 꺼내어 뿌리에 붙은 gelling agent를 깨끗이 세척하여 원예 상토에 옮겨 일주일간 순화시킨 후 유리 온실로 옮겨 완전한 식물체로 성장시켰다(Fig. 3-6-13).



Fig. 3-6-13. Transgenic lettuces containing BCF gene in glass house.

6) 혈전용해효소 유전자를 함유한 완전한 형질전환체 상추의 GUS staining

온실에서 자란 완전한 상추 형질전환체 잎을 punching 하여 나온 leaf disc를 GUS staining 용액에 incubation 하여 GUS 유전자의 발현 여부를 확인하였다 (Fig. 3-6-14).

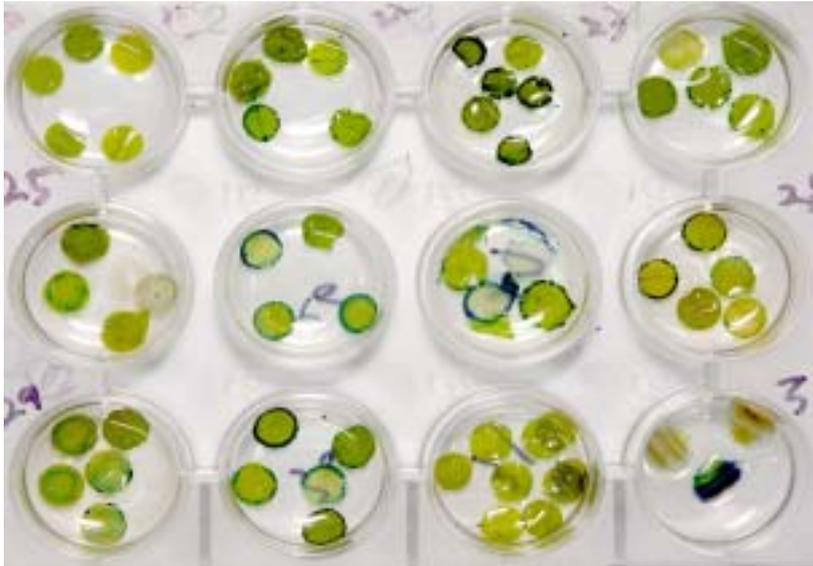


Fig. 3-6-14. Expression of GUS gene on leaf disc of fertile transgenic lettuces grown in glass house.

7) 형질전환 상추에서 PCR 및 RT-PCR을 통한 혈전용해효소 유전자의 검정과 western blot

형질전환 상추의 잎 조직으로부터 도입된 혈전용해효소 유전자의 존재 여부를 PCR, RT-PCR 및 western blot를 사용하여 확인하였다. 8개의 형질전환체 상추 line들에서 positive control에서 확인된 약 1.1kb의 size에서 band를 확인한 반면 비 형질전환체 상추에서는 band가 확인되지 않았다 (Fig. 3-6-15). 또한, 형질전환 된 상추로부터 혈전용해효소 유전자의 전사여부를 확인하기 위해서 RT-PCR을 수행한 결과, 7개의 형질전환체 상추 line들에서 혈전용해효소 유전자가 발현된 것을 확인하였다(Fig. 3-6-16). 그리고 세부과제로부터 넘겨받은 항체를 이용하여 상추잎에 존재하는 혈전용해효소를 western blot에 의해 확인하였다(Fig. 3-6-17).

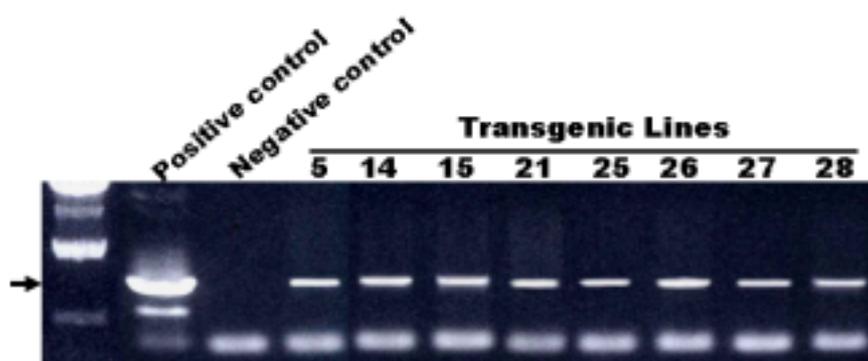


Fig. 3-6-15. Confirmation of BCF-1 gene amplified by PCR in transgenic lettuces.

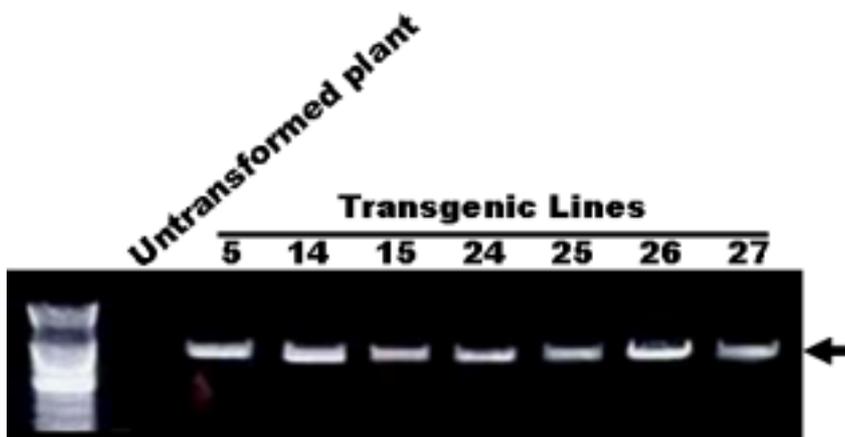


Fig. 3-6-16. BCF-1 gene expression confirmed by RT-PCR in transgenic lettuces.

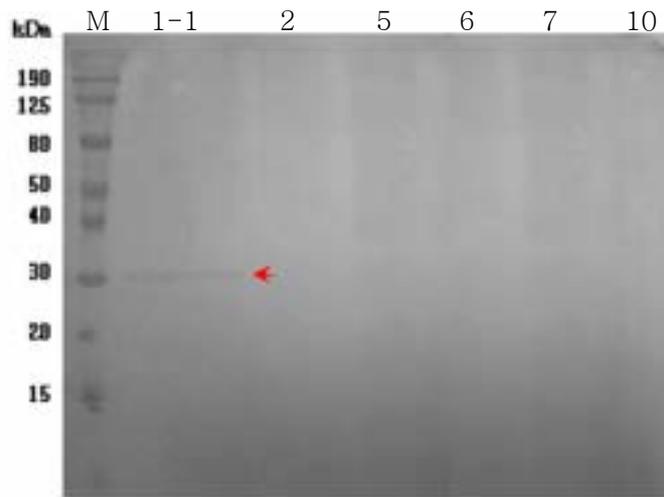


Fig. 3-6-17. Western blot analysis of fibrinolytic enzyme.

5. 요 약

상추 종자 과중 후 6일째와 10일째의 유묘가 자엽과 제1엽 절편체의 실험재료로 사용하기에 적당했으며, 발아율은 청치마 품종에서 가장 높게 나타내었다. 자엽과 제1엽 절편체로부터 식물체 재분화는 치상 후 3주째부터 shoot의 재분화가 되기 시작했고 7주째부터 재분화된 식물체들로부터 뿌리가 유도되었다. 10주째에 재분화된 식물체들을 순화 시켜 화분에 옮겨 완전한 식물체로 성장 시켰다. 식물체 재분화 배지인 KN 배지에서 식물체 재분화율을 품종별 비교 했을 때 자엽에서 정통포기 품종이 91.2%로 가장 높게 나타났고, 고향뜩적축면 품종이 52.2%, 청치마 품종이 35.3%로 가장 낮게 나타났다. 제1엽에서도 정통포기 품종이 85.7%로 가장 높게 나타났고, 고향뜩적축면 품종이 50.8%, 청치마 품종에서 30.3% 효율을 나타내었다. 발아율이 높고 재분화 효율이 가장 낮은 청치마 품종의 재분화 효율을 높이기 위해 다양한 재분화 배지를 사용하여 청치마 품종의 자엽과 제1엽의 식물체 재분화 효율을 비교했다. 자엽에서 재분화 효율은 KI 배지와 SH 배지, NB 배지에서 거의 평균 77%의 높은 재분화 효율을 나타내었고, MSD3 배지에서는 그 보다 낮은 61%의 효율을 나타내어 모든 배지에서 KN 배지 보다 높게 나타났다. 제1엽에서도 SH 배지에서 85%로 가장 높게 나타났고, KI 배지에서 81%, NB 배지에서 67%, MSD3 배지에서 61%의 효율을 나타내어 KN 배지보다 모두 높게 나타났다. 상추 엽육 조직으로부터 원형질체 분리는 1.2% cellulase R-10과 0.3% macerozyme R-10의 효소용액에서 12시간 incubation하여 평균 g 당 8.25×10^6 개의 원형질체들이 분리되었다. KM8P/KM8 배지에서 ml 당 3.5×10^5 개의 원형질체 농도로 agarose-embedding 방법으로 배양 했을 때, 배양 1주 후에 원형질체 분열이 개시되었고, 배양 4주 후에 microcolony들이 형성 되었고, 배양 3개월이 되면 원형질체 배양체들은 육안으로 뚜렷하게 볼 수 있

는 colony들을 형성했다. 각 colony들을 식물체 재분화 배지에 옮겨 준 후 배양 7주 후에 완전한 식물체로 재분화 되었다. 재분화된 각 식물체들로부터 뿌리 유도를 위해 각 식물체들을 식물호르몬이 첨가되지 않은 MSO 배지로 옮겨서 뿌리를 유도했고, 이들을 순화시킨 후 상토가 담긴 화분으로 옮겨서 완전한 식물체로 성장시켰다. 본 실험에서 세포 1개인 원형질체로부터 완전한 식물체로 성장시킴으로써 식물세포들의 전체형성능 (totipotency)을 확인할 수 있었으며, 이들의 기술을 이용하여 원형질체들을 이용한 내병성이나 내한성과 같은 유용유전자들을 도입하여 현재 식물 생명공학의 꽃이라고 할 수 있는 형질전환체 기능성 상추를 개발할 수 있는 발판을 마련했다고 본다. 또한, 상추 자엽이나 제1엽의 절편체들로부터 개화된 완전한 식물체들을 성장시킴으로써 이 기술을 이용하여 *Agrobacterium*에 유용유전자를 도입하여 이들 절편체들을 감염 시켜 형질전환체 상추를 개발할 수 있는 기초실험을 확립하였고, 이 기술들을 이용하여 혈전용해효소 유전자를 함유한 *Agrobacterium*을 이용하여 기능성 형질전환체 상추를 개발하였으며, western blot에 의해 상추 내에 존재하는 혈전용해효소를 확인하였다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야의 기여도

제 1 절 목표달성도

본 연구는 2003년 7월 15일부터 2006년 7월 14일까지 3년간 “혈전용해효소 유전자 도입 및 발현에 의한 기능성 상추개발”이라는 연구목적에 따라 주관기관인 국립진주산업대학교와 협동연구기관인 국립경상대학교에 의하여 다음과 같은 세부항목의 목표 및 연구가 성실하게 진행되었다고 사료되어진다.

1. 혈전용해효소 유전자 탐색, 분리, 구조분석, 기능분석 및 제품화

가. 주관연구기관 국립진주산업대학교

1) 연구개발목표 : 혈전용해효소 유전자 탐색, 분리, 구조분석, 기능분석 및 제품화

2) 연구개발 내용 및 달성도

가) 혈전용해효소 생산능이 우수한 미생물의 분리

혈전용해효소 생산능이 우수한 미생물을 분리하기 위하여 전통발효방법 중 종균을 접종하지 않은 자연접종방법으로 흑두청국을 제조하여 9종의 혈전용해능을 가지는 미생물을 분리하였다. 그 중 활성이 가장 우수한 미생물을 동정한 결과 *Bacillus subtilis* BB-1으로 명명하고 한국미생물보존

센터에 수탁 보존(Fig. 4-1-1)하였다. *B. subtilis* BB-1가 생산하는 혈전동위효소는 60, 45, 30, 25, 19kDa의 5가지로 확인되었으며 이는 혈전증에 대한 예방인자로서의 개발에 많은 도움이 있을 것이라 생각되며 본 미생물은 현재 대한민국 특허청에 특허 출원 중(Fig. 4-1-2)에 있다.



제 23

미생물 수탁증

2005년 7월 19일

감상원 귀하

2005년 2월 18일 시 아 2호로 개원과 보존 기타
관련한 미생물에 대하여 오랜 수탁하고 수탁과 같이 수탁
한 수탁 번호를 통지합니다

- 기 록 -

1. 미생물의 명칭: *Bacillus subtilis* BB-1

2. 미생물 기탁 번호: KRIC 11344P

한국미생물보관센터장



Fig. 4-1-1. A deposit certificate of *B. subtilis* BB-1

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl. ⁷ C12N 1/20	(11) 공개번호 (43) 공개일자	10-2005-0052418 2005년06월02일
(21) 출원번호 (22) 출원일자	10-2005-0020368 2005년02월10일	
(71) 출원인	삼성원 경상남도 진주시 평거동 192-1 동양한보아파트105동 1505호 이성호 경남 진주시 가좌동 경상대학교 생물학과 박기중 경남 진주시 가좌동 경상대학교 생물학과 박기중 경상남도 진주시 초전동825 현대아파트 101동 1402호 이영훈 경남 사천시 동강동 333-3번지	
(72) 발명자	삼성원 경상남도 진주시 평거동 192-1 동양한보아파트105동 1505호 이성호 경남 진주시 가좌동 경상대학교 생물학과 박기중 경상남도 진주시 초전동825 현대아파트 101동 1402호 이영훈 경남 사천시 동강동 333-3번지 진주이 경남 진주시 가좌동 경상대학교 생물학과	

실시예구 : 있음

[54] 혈전용해효소 생산능이 우수한 바실러스 서브틸리스 비버-1

요약

본 발명은 국내산 촉두곰 이종하여 제조된 영국에서 분리된 혈전용해효소 생산능이 우수한 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis* BB-1)(KCC 11244T) 균주로서 기질특이적인 염색 스티인팅(staining)에서 아주 낮은 분해율로 인하여 혈액내의 다른 단백질류(casein, gelatin, blood agar plate)등을 전혀 분해하지 않음으로써, 균질구 파괴 및 부작용을 배제할 수 있으며, 5중류의 강력한 혈전용해효소인 플라스미노겐 활성제인 리코틴(Lysin)분해능이 특이적으로 우수한 이종물에 관한 것이다.

배양도

도형

색상

바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis* BB-1 (KCC 11244T), 혈전용해효소(hemolytic enzyme), 촉두성균, 혈전용해 효소(lytic enzyme)

생체서

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명에 있어서의 촉두곰의 간단한 배양 도형도

도 2는 제조된 염색에서 분리한 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis* BB-1)(KCC 11244T) 균주의 혈전용해능을 나타내는 도면

Fig. 4-1-2. A patent application of *B. subtilis* BB-1.

나) 혈전용해효소 유전자의 탐색, 분리 및 특성규명

혈전용해효소 생산능이 우수한 *B. subtilis* BB-1으로부터 혈전용해효소 유전자 두 종을 분리하였으며, 하나는 shot gun 법으로 분리하였는데, 이는 현재 알려지지 않은 새로운 혈전용해효소 유전자임을 확인하였으며 이 유전자에서 발현되는 혈전용해효소는 fibrin 특이적이며 안정성과 높은 생리활성이 입증된 청국의 고초균에서 분리되었다는 점에서 식품제조 사용시 위험성을 배제할 수 있으며, 혈전증 및 순환기계통의 성인병에 대한 예방인자로 사용가능하리라 판단된다. 다른 한 종의 유전자는 기존의 바실러스 종들로부터 알려진 혈전용해효소의 공통적인 염기서열로부터 primer을 디자인하여 1,145bp 크기의 유전자를 분리하였다. 이 유전자의 DNA sequence를 바탕으로 유전자를 검토한 결과 Nattokinase gene과 99.0% 유사성을 보였으며 본 유전자를 BCF-1으로 명명하고 시험관내 전사와 번역 및 *Bacillus-E.coli* shuttle vector인 pEB vector에 재조합하여 대량 발현계를 구축하여 혈전용해효소 측정된 결과 아주 우수한 활성이 있음을 확인하였고, 또 크로닝 된 균주를 천연배지에 배양하여 높은 혈전용해효소 활성을 확인한 바 식품에 사용시 화학합성배지의 독성을 배제하고 향후 성인병에 대한 의약적 기초자료와 함께 의약품 및 기타 기능성 식품의 하나의 인자로서 사용가능하리라 생각된다. 현재 nattokinase 유전자를 이용한 식품의 개발이 활발히 진행되고는 있으나 대량생산의 어려움이 있는 것과 비교하여 볼 때 본 유전자를 이용한 기능성 상추의 개발은 획기적인 것으로 사료되며, 이를 이용한 기타 식품에 접목하였을 경우에는 그 파급효과가 매우 높을 것으로 사료된다.

* 논문투고

1. Cloning and characterization of a gene for fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis* BB-1 isolated from black bean *chung-kuk*. *Journal of Life Science*.
2. Cloning and high expression of nattokinase gene from *Bacillus subtilis* BB-1. *Journal of Life Science*.

다) 혈전용해효소의 생체 내 작용(한국생물공학회 논문투고 중)

B. subtilis BB-1 (KFCC 11344P) 으로부터 분리된 혈전용해효소 유전자(BCF-1)를 대량발현 벡터에 크로닝하여 순수분리된 혈전용해효소를 rat에 경구 투여하여 출혈시간, 혈액의 응고, serum의 혈전용해능 등에 대한 *in vivo* 실험을 실시하였으며, 혈전용해효소의 단회경구투여에 따른 독성을 검사하였다. 효소의 경구투여에 따른 rat의 출혈시간에서는 대조군에 비하여 모든 경구 투여군에서 출혈시간이 유의적으로 길게 나타남을 확인하였고($P < 0.05$) 혈액의 출혈시간 또한 활발히 진행됨을 관찰하였다. 혈액 으로부터 분리된 serum의 혈전용해작용 있어서는 경구투여 후 1시간부터 채혈한 혈액 내에서 혈전용해효소의 활성이 검출되기 시작하여 3시간째 까지 높은 활성을 보였으며 4시간째부터 서서히 활성이 감소하는 것을 확인하였으며 혈액의 응고 역시 대조군에 비하여 경구 투여군에서 상당히 지연되는 것을 알 수 하였다. 혈전용해효소의 rat에 대한 단회경구투여 독성실험에서 중량의 변화, 장기의 이상여부, 사망률 등에서 어떠한 이상이나 병변이 발견되지 않았다. 이상의 결과로 동물실험을 통한 혈전용해효소의 경구투여에 의한 작용을 혈액 내에서 확인 할 수 있었으며, 본 효소의 단회 경구투여 시의 독성은 전혀 없음을 확인할 수 있었다. 이는 식품으로의 사용 시 기초 독성부분에 대한 어려움을 배제할 수 있으리라 판단된다.

2. 혈전용해효소 유전자의 상추에 도입 및 발현

가. 협동연구기관 국립결상대학교

1) 연구개발목표 : 혈전용해효소 유전자의 상추에 도입 및 발현

2) 연구개발 내용 및 달성도

상추 종자 과중 후 6일째와 10일째의 유묘가 자엽과 제1엽 절편체의 실험재료로 사용하기에 적합했으며, 발아율은 청치마 품종에서 가장 높게 나타내었다. 자엽과 제1엽 절편체로부터 식물체 재분화는 치상 후 3주째부터 shoot의 재분화가 되기 시작했고 7주째부터 재분화된 식물체들로부터 뿌리가 유도되었다. 10주째에 재분화 된 식물체들을 순화 시켜 화분에 옮겨 완전한 식물체로 성장 시켰다. 식물체 재분화 배지인 KN 배지에서 식물체 재분화율을 품종별 비교 했을 때 자엽에서 정통포기 품종이 91.2%로 가장 높게 나타났다. 제1엽에서도 정통포기 품종이 85.7%로 가장 높게 나타났다. 발아율이 높고 재분화 효율이 가장 낮은 청치마 품종의 재분화 효율을 높이기 위해 다양한 재분화 배지를 사용하여 청치마 품종의 자엽과 제1엽의 식물체 재분화 효율을 비교했다. 자엽에서 재분화 효율은 KI 배지와 SH 배지, NB 배지에서 거의 평균 77%의 높은 재분화 효율을 나타내었고, MSD3 배지에서는 그 보다 낮은 61%의 효율을 나타내어 모든 배지에서 KN 배지 보다 높게 나타났다. 제1엽에서도 SH 배지에서 85%로 가장 높게 나타났고, KI 배지에서 81%, NB 배지에서 67%, MSD3 배지에서 61%의 효율을 나타내어 KN 배지보다 모두 높게 나타냈다. 상추 엽육조직으로부터 원형질체 분리는 1.2% cellulase R-10과 0.3% macerozyme R-10의 효소용액에서 12시간 incubation하여 평균 g

당 8.25×10^6 개의 원형질체들이 분리되었다. KM8P/ KM8 배지에서 ml 당 3.5×10^5 개의 원형질체 농도로 agarose-embedding 방법으로 배양 했을 때, 배양 1주 후에 원형질체 분열이 개시되었고, 배양 4주 후에 microcolony들이 형성 되었고, 배양 3개월이 되면 원형질체 배양체들은 육안으로 뚜렷하게 볼 수 있는 colony들을 형성했다. 각 colony들을 식물체 재분화 배지에 옮겨 준 후 배양 7주 후에 완전한 식물체로 재분화 되었다. 재분화된 각 식물체들로부터 뿌리 유도를 위해 각 식물체들을 식물 호르몬이 첨가되지 않은 MSO 배지로 옮겨서 뿌리를 유도했고, 이들을 순화시킨 후 상토가 담긴 화분으로 옮겨서 완전한 식물체로 성장시켰다. 본 실험에서 세포 1개인 원형질체로부터 완전한 식물체로 성장시킴으로써 식물세포들의 전체형성능 (totipotency)을 확인할 수 있었으며, 이들의 기술을 이용하여 원형질체들을 이용한 내병성이나 내한성과 같은 유용유전자들을 도입하여 현재 식물생명공학의 꽃이라고 할 수 있는 형질전환체 기능성 상추를 개발할 수 있는 발판을 마련했다고 본다. 또한, 상추 자엽이나 제1엽의 절편체들로부터 개화된 완전한 식물체들을 성장시킴으로써 이 기술을 이용하여 *Agrobacterium*에 유용유전자를 도입하여 이들 절편체들을 감염 시켜 형질전환체 상추를 개발할 수 있는 기초실험을 확립하였고, 이 기술들을 이용하여 혈전용해효소 유전자를 함유한 *Agrobacterium*을 이용하여 기능성 형질전환체 상추를 개발하였으며 western blot에 의해 단백질을 확인하였다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 제품화 개요

1. 제품화 기술의 중요성(필요성)

혈전증은 혈관에 혈전(Fibrin)이 쌓여 혈액의 순환을 방해함으로써 세포의 성장장애 및 기능장애를 유발시키는 등의 원인으로 여러 형태의 성인병을 일으키는 증상을 말한다. 이러한 혈전증의 원인이 되는 혈전은 상처복구 시 생체내의 복잡한 blood cascade mechanism에 의해 활성화된 thrombin에 의해 fibrinogen이 fibrin으로 전환되어 서로 중합체를 형성함으로써 생성된다. 정상시에 생성되는 혈전은 혈관벽에 부착하여 혈관을 좁게 만들어 혈압을 높일 뿐만 아니라 혈전을 형성하는 섬유소 성분은 접착성이 강하여 혈구나 응고된 덩어리를 만들어 혈액 내에 남게 된다. 이렇게 형성된 혈전은 혈액중에 존재하면서 혈류를 방해하거나 혈관을 따라 이동하면서 뇌혈관과 관계 질환(뇌졸중, 뇌경색), 정맥관계 질환(심부정맥 혈전, 폐경색, 고혈압)과 같은 각종 순환기계의 성인병을 유발하게 된다.

이러한 순환계 질환들을 치료하기 위한 혈전 용해에 관한 연구는 20세기 초반부터 활발하게 진행되고 있다. 혈전을 용해시켜 혈액순환을 용이하게 할 수 있는 작용물질로는 혈전을 바로 용해시키는 혈전용해효소(fibrinolytic enzyme)와 혈액중에 plasminogen을 활성화하여 plasmin으로 하여금 혈전을 분해시키도록 하는 plasminogen activator의 두 부류로 나눌 수 있다. 후자의 경우 생체 내 투여했을 때 과량으로 생성된 plasmin에 대한 면역반응으로 항 plasmin물질이 생산되어 혈전용해작용이 감소하게 되는 단점이 있다. Urokinase, Staphylococcus sp. 유래의 Staphylokinase,

Streptococcus haemolyticus 유래의 Streptokinase, 악성종양인 melanoma cell 유래의 tissue plasminogen activator (tPA)등이 있으나, 출혈 등과 같은 부작용이 있으며, 반감기가 짧고 고가인 단점이 있다. 따라서 체내 혈전형성을 억제시키기 위하여 경구투여가 가능하고, 저렴하고 경제적이며, 부작용을 최소화시킬 수 있는 혈전용해효소제의 개발이 절실히 요구되고 지고 있다.

2. 혈전용해제의 시장규모

세계 항혈전제 시장은 '99년 약 70억 달러로 추산되며 연평균 약 5% 이상의 성장률로 현재는 약 90억 달러정도로 추산되며, 2010년에는 약 150억 달러 이상의 시장을 형성할 것으로 전망되고 있다. 뇌졸중 분야의 경우 약효가 뚜렷한 치료제가 개발되지 않아 새로운 혈전용해제 및 항응고제 개발 수요를 일으키고 있으며 정부의 Deep vein thrombosis 예방을 위한 노력이 강화됨에 따라 전체적으로 항혈전제 시장의 동인이 되고 있다. 전체적으로 성장의 동인을 분석하면, 업계의 연구개발 강화, 노령화 인구 증가 및 정부의 예방 의학 정책등이 맞물려 항혈전제 시장은 지속적으로 높은 성장률을 보일 것으로 분석되고 있다.

3. 제품화 개발 시 예상되는 기대효과

1) 기술적인 측면

현재 알려진 혈전용해효소로는 urokinase, streptokinase, lumbrokinase등이 있는데 값이 고가이며 대부분 혈관벽 분해의 역효과도 있어 혈전 특이적 혈전용해효소의 생산이 시급한 실정에 있으며 식품이 아닌 약으로만 섭취해야 하기 때문에 규칙적으로 섭취하기가 쉽지 않다. 또한

이들 의약품은 대량생산이 매우 어렵다. 따라서 본 연구진의 기술개발로 인한 혈전용해효소 유전자에 의해 섭취가 용이하고, 대량생산이 가능하게 혈전용해효소 유전자를 상추식물에 도입·발현시킴으로써 항상 섭취 가능하며 값이 저렴한 상추식물과 동시에 우수한 혈액순환개선제를 개발할 수 있을 것으로 사료되어짐.

2) 경제·산업적 측면

가) 본 연구개발기술에 의해 농민은 부가가치가 높아 경제성이 있고, 소비자에게는 저렴한 가격의 제품개발이 이루어지며 순환계 질환환자는 혈전용해제를 꾸준히 계속적으로 복용하여야 하는데 가장 문제가 되는 것은 경제적 문제이다. 그러나 지금까지 개발된 제제는 아주 고가이며 fibrin특이성이 낮아 2차 발병의 위험성이 있다. 따라서 Casein이나 skim milk분해력은 낮고 fibrin분해력이 뛰어난 혈전용해효소 유전자를 상추식물에 발현시킴으로써 앞서 설명한 조건을 충족시킬 수 있음.

나) 혈전증 관련 의약품 세계 시장은 약 100억 달러로 추산되어지고 있으며, 항응혈제, 항혈소판 등 혈전증 관련 치료제의 세계 시장은 연평균 약 15% 이상 증가하여 2010년에는 약 150달러 이상에 다다를 것으로 전망되어짐.

다) 수입대체를 위한 국내 생산이 가능한 소재의 개발이 필요함.

현재 시판되고 있는 혈전용해제 명심, 용심은 100% 일본에서 수입되고 있다. 따라서 혈전용해효소 유전자를 상추식물에 도입함으로써 수입대체효과가 예상된다.

제 2 절 제품화 목표 및 내용

1. 제품화 목표

- 1) 혈전용해효소 유전자 도입 및 발현에 의한 기능성 상추의 대량생산 체제 확립
- 2) 대량생산된 상추를 원료로 하여 체내 혈전형성억제효과 유지 및 혈전의 제거효과를 위한 시제품 제작
- 3) 혈전용해효소 대량생산 미생물을 식용 가능한 재료에 접목시켜 기능성 식품개발
- 4) 체내 혈전형성억제 기능성식품 생산을 위한 대량생산시스템 설계 및 생산체계 구축
- 5) 생산된 혈전용해관련 제품의 혈전분해효과에 따른 식품안전성 및 기능성 평가

2. 제품화 내용 및 범위

항 혈액응고작용 및 혈전분해 작용이 우수한 기능성상추를 대량생산하여 상추자체의 이용이나 동결건조 등의 기법으로 가공하여 미세분말을 원료를 생산한다. 생산된 원료를 중심으로 하여 기타 상호보완 할 수 있는 건강식품원료를 첨가하거나 이용하여 기능성제품을 완성한다.

3. 기대효과

가. 상추는 우리나라 국민 뿐아니라 미국 및 유럽의 외국에서도 자주 이용하는 식품중의 하나이다. 이를 기능성이 함유된 제품으로 개발한다면 국내는 물론이며 국외적으로 많은 이익이 창출될 것임.

나. 본 연구개발기술에 의거 초기 제품개발은 혈전형성예방 기능을 체내 혈전형성을 억제시키는 기능성 식품으로 개발하고, 전 임상 실험 및 임상실험을 거쳐 새로운 혈전용해제의 개발이 가능할 것으로 판단됨.

다. 세균유래 유전자의 식물체내에서 대량발현 system 구축으로 인한 높은 학술적 가치.

라. 항상 생으로 섭취 가능한 상추에 혈전용해효소를 대량 생성케 함으로써 이를 늘 섭취함으로 혈전으로 인한 질병 예방.

- 행복한 가정생활 영위

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 1 절 관련기술의 국내외 시장 및 기술현황

1. 현 황

가. 순환계질병 환자의 증가

- 1) 전 세계적으로 순환계질병환자의 증가 추세
- 2) 국내에도 순환계질병환자의 증가 - 약 500만명으로 추정
- 3) 사망자의 43%가 순환계질병에 기인
- 4) 연간 약 4만명이 사망함.

나. 혈전용해제 개발

1) 주요 혈전용해제(의약품)로 미국에서 Sobel등이 개발한 것으로 사람 또는 동물의 뇨에서 정제한 urokinase는 정맥 주사용으로 사용되고 있으나, 가격이 고가임.

2) Fletcher등은 연쇄상 구균으로부터 streptokinase를 정제하였음. 이 효소는 혈전을 직접분해하지 않으며 혈액중의 plasminogen을 활성화하여 plasmin을 생성하게 하여 혈전을 분해시키는 간접적인 효과를 가짐. 그러나 이 효소는 출혈 등의 부작용이 큰 문제로 알려져 있음.

3) 사람의 악성종양인 melanoma 유래의 tissue plasminogen activator (TPA)가 현재 혈전용해제로서 임상에 사용되고 있다. TPA는 혈관 내

에서 반감기가 짧고 가격이 고가이기 때문에 경제성이 문제가 된다. 이를 위하여 Genetech사를 비롯한 여러 기업에서 가격이 저렴하고 안정성이 증대된 TPA유도체의 개발을 시도하고 있는 것으로 알려져 있음.

4) 일본의 Mihara등이 지렁이 체단백질로부터 혈전용해작용이 강한 lumbrokinase (LK)효소를 분리, 정제하여 보고한 바 있음. 그러나 이 효소는 혈전용해작용도 강하지만 일반 단백질의 분해 작용이 그 이상 강한 것으로 알려지고 있음. 따라서 일본에서는 판매가 금지되었으나 우리나라에서는 냉동 건조된 지렁이 가루자체를 수입하여 캡슐에 packing하여 국내의 2개 제약회사 제품으로 100캡슐에 90,000원에 시판되고 있음.

5) 일본의 Sumi등은 납두(청국장)에서 혈전용해효소(nattokinase)를 분리하여 보고하였음.

6) 신평제약과 대도제약에서 경구용 혈전용해제 “명심”과 “용심”이라는 상품이 시판되고 있으나 가격이 고가임(100캡슐에 90,000원).

7) 녹십자에서 지네의 체 단백질에서 혈전용해효소를 추출하는 연구를 진행 중에 있으며, 롯데에서도 혈전용해효소를 Bacillus 종에서 분리하여 특성을 규명한 보고가 있음.

8) 트롬빈은 물론 피브리노겐 결합한 트롬빈의 활성을 억제하기 때문에 강력한 항 혈전 효과를 얻을 수 있으며 현재 임상 평가를 받고 있는 트롬빈 억제제로 히루딘이 있으며 합성 히루딘 유사체인 Bivalirudin, Argatroban, Inogratran 등이 개발되었으나 hirudin과 Bivalirudin의 항 혈전 효과가 가장 우수함.

제 7 장 참고문헌

제 1 절 혈전용해효소 유전자 탐색, 분리, 구조분석 및 제품화

1. Astrup, T and S. Hullertz. 1952. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *The National Danish Society against Rheumatic Disease*. 346-351.
2. Astrup, T. and Stermdorff, I. 1956. The plasminogen activator in animal tissue. *ACTA physiol. scand.*, 363 250.
3. Bok-Nan Kim, Jong-Dai Kim, Seung-shi Ham, Yong-Sorn Choi and Sang-Young Lee. 1995. Effects of spice added natto supplementation on the Lipid Metabolism in Rats. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **24**(1), 121-126.
4. Bradford, M. M. 1976. Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
5. Bullock, W. O., J. M. Fernandez and J. M. Short. 1987. XL1-blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta galactosidase relation. *Bio Techniques* **5**: 376.

6. Birnbion, H. C and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.* **7**: 1513-1523.
7. Chung KH and Kim DS. 1992. Fibrinolytic and cogulation activies of korean Snake Venoms. *Kor Biochem J*, **25**: 696-701.
8. DaKa MD and Semba CP. 1995. Thrombolytic therapy in venous occlusive disease. *J Vasc Interv Radiol*, **6**: 73-77.
9. Fletcher, A. P and Johnson, A. J. 1975. Methods employed for purification of streptokinase., *Por. Soc. Exp. Bial. Med.*, **94**, 233.
10. Fujita, M., Hong, K., Ito, Y., Misawa, S., Takeuchi, N., Kartya, K and Nishimuro, S. 1995. Transport of nattokinase across the rat intestinal tract. *Biol. Pharm Bull.* **18**, 1194-1196.
11. Fujita, M., Nomura, K., Hong, K., Ito, Y., Asada, A and Nishimuro, S. 1993. Purification and characterization of a strong fibrinolytic enzyme(nattokinase) in the vegetable cheese natto, a popular soybean fermented food in Japan. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **197**, 1340-1347.
12. Hanahan, D. 1985. Techniques for transformation of *E. coli*, pp. 109-135. In D. M. Glover(ed.), DNA cloning, vol. I. IRL press, Oxford.

13. Han, Y. N., S. K. Baik, T. H. Kim and B. H. Han. 1987. Assays for antithrombotic activity. *Arch. Pharm. Res.* **10**, 115.
14. Jeong, Y. K., W. S. Yang and B. K. Kim. 1998. Effect of oral Administration of fibrinolytic enzyme from a fermented anchovy, Myulchi *Jeot-Gal*. *Korean J. Life Science* **8(6)**, 737-740.
15. Kim YT, Kim WK and Oh HS. 1996. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK11-4 screened from *chungkookjang*. *Appl Environm Microbiolo.* 2482-2488.
16. Kim SH. 1998. New trends of studying on potential activities of *Doen-jang*. *Korea Soybean digest*, **15(1)**: 8-15.
17. Kim HK, Kim GT, Kim DK, Choi WA, Park SH, Jeong YK and Kang IS. 1997. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Bacillus* sp. KA38 originated from fermenter fish. *J of Ferment and Bioengin*, **84(4)**: 307-312.
18. Kyu-chum Youn, Dong-Ho Kim, Jang-Ok Kim, Byung-Jun Park, Hong-Sun Yook, Jae-Min Cho and Myung-Woo Byun. 2002. Quality characteristics of the chung kook jang fermented by the mixed culture of *Bacillus natto* and *B. licheniformis*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **31(2)**, 204-210.

19. Mihara H, Nakajima N and Sumi H. 1993. Characterization of potent fibrinolytic enzyme in earthworm, *Lumbicus rubellus*. *Biosci. Biotech. Biochem*, **57**(10): 1730.
20. Mihara H, Sumi H, Yonata T, Mizumoto H, Ike da R, Seiki M and Maruyama M. 1991. A novel fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm, *Lumbricus rubellus*. *Jpn J Physiol*, **41**: 461.
21. Maniatis, T., E. F. Fritsch and J. Sambrook. 1989. Molecular cloning A Laboratory Manual. Cold spring Harbor Laboratory, *New York*.
22. McDonald, B, E., J. M. Gerrard, V. M. Bruce and E. J. Corner. 1989. Comparison of the effect of canola oil and sunflower oil on plasma lipids and lipoproteins and *in vivo* thromboxane A₂ and prostacyclin production in healthy young men. *Am. J. Clin. Nutr.* **50**, 1382.
23. Nakajima, N., Taya, N and Sumi, H. 1993. Potent fibrinolytic enzyme from the lysate of *Katsuwonus pelamis* digestive tract (shiokara) : purification and characterization. *Biosci. Biotech, Biochem.* **57**, 1604-1605.
24. Nakamura, T., Yamagata, Y and Ichishima, E. 1992. Nucleotide sequence of the subtilisin NTA gene, aprN, of *Bacillus subtilis* (natto). *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**, 1869-1871.

25. Nack-Shick Choi, Kab-Seog Yoon, Jin-Young Lee, Kyoung-Yoen Han and Seung-Ho Kim. 2001. Comparison of three Substrates(casein, fibrin, and gelatin) in Zymographic Gel. *J. Biochemistry and Molecular Biology*, **34**(6), 531-536.
26. Park YD, Kim JW, Min BG, Seo JW and Jeong JM. 1998. Rapid purification and biochemical characteristics of Lumbrokinase III from earthworm for use as a fibrinolytic agent. *Biotechnol Lett*, **20**(2): 169-172.
27. Plug, J and kieldgarrrd, O. 1957. Urokinase an activator from human urine. I. Isalation and proper ties. *Biochem. Biophys., ACTA.*, **61**, 624.
28. Sambrook , Fritsh , Maniatis. *Molecular cloning* . 3rd ed . p13.1-p13.101, 6.36-p6.38.
29. Sang-Wan Gal, Yong-Un Cho. 1997. "Simple DNA elution from agarose gels. *Korean Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2**, 62-63.
30. Sumi, H., K. Sasaki, N. Toki and K. C. Robbins. 1980. Oral administration of urokinase. *Throm. Res.* **20**, 711-714.
31. Sumi, H., Seiki, M., Morimato, N., Tsushima, H., Maruyama, M and Mihara, H. 1985. Plasma fibrinolysis after intraduodenal administration of urokinase in rats. *Enzyme* **33**, 121-127.

32. Sumi, H., Hamada, H., Tsushima, H., Mihara, H and Muraki, H. 1987. A novel fibrinolytic enzyme(nattokinase) in the vegetable cheese Natto. *a typical and popular soybean food in the japan diet. Experientia.* **43**, 1110-1111.
33. Toki, N., Sumi, H., Sasaki, K., Boreisha, I and Robbins, K. C. 1995. Transport of urokinase across the intestinal tract of normal Uman Subjects with Stimulation of synthesis and release of urokinase-type proteins. *J. clin Invest.*,**75**, 1212
34. Towbin, H., T. Staehelin, J. Gordon. 1979. Electrophoresis transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natn Acad Sci. USA* **76**, 4350-4354.
35. Yong-Kee Jeong, Woong-Suk Yang, Jeong-Ok Kang, In-Soo Kong, Jeong-Ok Kim. 1995. Fibrinolysis of fermented kimchi. *Korean. J. Life Science*, **5**(4), 203-210
36. Yoo CK, Seo WS, Lee CS and Kang SM. 1998. Purification and characterization of fibrinolytic enzyme extracted by *Bacillus subtilis* K-54 isolated from *chunggukgang*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**. 507-514.

제 2 절 혈전용해효소 유전자의 상추에 도입 및 발현

1. Brown, C., J. A. Lucas and J. B. Power. 1987. Plant regeneration from protoplasts of a wild lettuce species (*Lactuca saligna* L.). *Plant Cell Rep.* **6**: 180-182.
2. Chupeau, M. C., C. Bellini, P. Guetche, B. Maisonneve, G. Vastra and Y. Chupeau. 1989. Transgenic plants of lettuce species (*Lactuca sativa* L.) obtained through electroporation of protoplasts. *Bio/Technology* **7**: 505-508.
3. Curtis, I. S., J. B. Power, N. W. Blackhall, A. M. M. de Latt and M. R. Davey. 1994. Genotype independent transformation of lettuce using *Agrobacterium tumefaciens*. *J. of Exp. Bot.* **45**: 1441-1449.
- 4 Enomoto, S. and Y. Ohashi. 1992. Transformation of lettuce. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* **23**: 237-247.
5. Gasser, C. S. and Fraley, R. T. 1989. Genetically engineering plants for crop improvement. *Science* **244**: 1293-1299.
6. Koevary, K., L. Rappaport, L. L. Morris. 1987. Tissue culture propagation of head lettuce. *Hort Science* **13**: 39,41.
7. Lincoln, C.P. 1987. Vegetable crops. John Wiley and Son. Inc.

8. Michelmore, R., E. Marsh, S. Seely and B. Landry. 1987. Transformation of lettuce (*Lactuca sativa*) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep.* **6**: 439-442.
9. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A reversed medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum* **15**: 473-497.
10. Seibert, M. and P. G. Kadkade. 1980. Environmental factors, light. In Plant tissue cultures as a source of biochemicals. Edited by E. J. Staba. *CRC Press, Boca Raton, FL*. pp. 123-141.
11. Webb, D. T. and L. D. Torres. 1984. Interaction of growth regulators, explant age, and culture environment controlling organogenesis from lettuce cotyledon *in vitro*. *Can. J. Bot.* **62**: 586-590.

목 차

제 1장	연구개발과제의 개요 -----	1
제 1절	연구개발의 목적 및 필요성 -----	1
1.	연구개발의 개요 -----	1
제 2절	연구개발 목표 -----	9
1.	연구개발 목표와 내용 -----	9
제 2장	국내외 기술개발 현황 -----	10
제 1절	현 황 -----	10
1.	순환계질병환자의 증가 -----	10
2.	혈전용해제 개발 -----	10
3.	문제점 -----	11
4.	문제점 해결방안 -----	12
제 3장	연구개발 수행 내용 및 결과 -----	13
제 1절	혈전용해효소 생산능이 우수한 미생물로부터 혈전용해효소 유전자 크로닝 및 특성규명 -----	13
1.	목 적 -----	13
2.	재료 및 방법 -----	13
가.	청국의 제조 -----	13
나.	혈전용해효소 생산 미생물의 분리 및 동정 -----	15
다.	분리균주의 혈전용해 동위효소 측정 -----	15
라.	혈전용해활성 측정 -----	16

마. 사용균주 및 플라스미드	-----	16
바. Chromosomal DNA 분리	-----	16
사. 플라스미드 분리 및 형질전환	-----	17
아. Agarose gel electrophoresis 및 분리 DNA 단편의 회수	--	17
자. 혈전용해효소 유전자 염기서열 분석	-----	17
차. 크로닝 된 혈전용해효소유전자의 deletion mutation에 의한 효소활성측정	-----	17
카. 크로닝 된 혈전용해효소 유전자를 함유한 균주의 혈전용해 활성 측정 및 기질특이성 조사	-----	19
타. 혈전용해효소 생산의 최적 pH 및 온도	-----	19
3. 실험결과 및 고찰	-----	19
가. 혈전용해 활성이 높은 미생물의 분리 및 동정	-----	19
나. <i>B. subtilis</i> BB-1의 혈전용해동위효소 측정	-----	25
다. 혈전용해효소 유전자의 크로닝 및 염기서열의 결정	---	27
라. BSF-1의 deletion mutation에 의한 효소활성 측정	----	31
마. BSF-1을 함유한 균주의 혈전용해활성 측정 및 기질특이 성 조사	-----	33
바. 혈전용해효소 생산의 최적 pH 및 온도	-----	36
4. 요약	-----	38
제 2절 PCR-method에 의한 혈전용해효소 유전자 크로닝	----	39
1. 목 적	-----	39
2. 재료 및 방법	-----	39
가. Polymerase chain reaction에 의한 DNA 증폭	-----	39
나. PCR 산물의 크로닝	-----	40
다. 시험관 내 전사 및 번역	-----	40
라. 혈전용해효소의 확인	-----	40

3. 실험결과 및 고찰	41
가. 혈전용해효소 유전자의 크로닝 및 염기서열의 결정	41
나. 시험관내 전사 및 번역	46
4. 요약	50
제 3절 혈전용해효소의 대량발현 및 순수분리	51
1. 목적	51
2. 재료 및 방법	51
가. 혈전용해효소 유전자의 대량발현 시스템 구축	51
나. <i>B. subtilis</i> 168의 electro-competent cell 제조	51
다. Electroporation 방법에 의한 형질전환	52
라. 재조합 균주의 배양 및 분비발현	53
마. 혈전용해효소의 정제 및 단백질 확인	53
바. 항체제조와 western blot.	54
사. 혈전분해 양상조사	55
3. 실험결과 및 고찰	55
가. 혈전용해효소 유전자의 대량발현시스템 구축	55
나. 재조합 균주의 배양 및 분비발현	58
다. 혈전용해효소의 순수분리	60
라. 항원-항체반응	62
마. 혈전분해 양상의 조사	64
4. 요약	66
제 4절 혈전용해효소의 경구투여에 의한 생체 내 작용	67
1. 목적	67
2. 재료 및 방법	67
가. 혈전용해효소 및 사용시약	67
나. 혈전용해활성의 측정	67

다. 실험동물	-----	68
라. 혈전용해효소의 경구투여에 의한 rat의 출혈시간 측정		68
마. Serum에 의한 fibrin 분해효과 및 혈액응고	-----	68
바. Western blot.	-----	69
사. 혈전용해효소의 rat에 대한 단회경구투여 독성시험		69
3. 실험결과 및 고찰	-----	70
가. 혈전용해효소 경구투여에 의한 rat의 출혈시간 측정		70
나. Serum의 fibrin 분해효과 및 혈액응고	-----	72
다. Western blot.에 의한 rat의 혈액에서 혈전용해효소 검출		75
라. 혈전용해효소의 rat에 대한 단회경구투여 독성시험		77
4. 요약	-----	81
제 5절 천연배지에서의 혈전용해효소 생산	-----	82
1. 목 적	-----	82
2. 재료 및 방법	-----	82
가. 재 료	-----	82
나. 혈전용해활성 및 효소의 확인	-----	82
다. 배합조건 및 배양기간별 효소의 생산능 조사	---	82
3. 실험결과 및 고찰	-----	83
가. 혈전용해효소 생산능이 우수한 천연배지의 선정	---	83
나. 천연재료의 배합에 의한 혈전용해효소 생산능	---	85
다. 흑두와 탈지유 배합배지에서 배양한 균주의 배양일 수별 혈전용해 효소 생산능 측정	-----	87
제 6절 혈전용해효소 유전자의 상추에 도입 및 발현	----	89
1. 목 적	-----	89

2. 상추의 재분화 및 형질전환 조건확립 -----	89
가. 재료 및 방법 -----	89
1) 상추종자 발아용 배지의 제조 -----	89
2) 상추종자 표면살균 및 파종 -----	92
3) MSO배지 상에서 상추종자 발아 -----	92
4) 상추조직 절편체로부터 식물체 재분화 배지제조 --	92
5) 상추자엽 절편체들을 식물체 재분화 배지에 착상 --	94
6) 상추 제 1엽 절편체들을 식물체 재분화 배지에 치상	94
7) 재분화배지에 치상된 상추자엽과 제 1엽 절편체로부터 의 식물체 재분화 -----	95
8) 상추자엽과 제 1엽으로부터 품종별 식물체 재분화효율	95
9) 다양한 재분화 배지에 따른 상추의 자엽과 제 1엽으로 부터 식물체 재분화 효율 -----	95
10) 조직배양에 의해 재분화된 상추로부터 개화된 완전환 식물체로 성장 -----	97
나. 실험결과 및 고찰 -----	97
1) MSO배지 상에서 상추종자 발아 -----	97
2) 상추자엽과 제 1엽 절편체로부터 식물체 재분화 -----	99
3) 상추자엽과 제 1엽으로부터 품종별 식물체 재분화 효율	102
4) 다양한 재분화 배지에 따른 상추의 자엽과 제 1엽으로 부터 식물체 재분화 효율 -----	105
3. 상추 원형질체로부터 재분화 유도 및 식물체로 성장 ---	109
가. 재료 및 방법 -----	109
1) 상추 엽조직으로부터 원형질체 분리를 위한 시약 제조	109
2) 상추원형질체 배양을 위한 제조 -----	111
3) 상추원형질체 분리 및 정제 -----	113
4) 상추원형질체들을 agarose-embedding방법에 의한 배양	113

5) 상추원형질체들로부터 세포분열유도 -----	113
6) 상추원형질체들로부터 microcolony, macrocolony, callus 유도	114
7) 상추원형질체들로부터 유도된 callus들로부터 식물체 재분화	114
8) 원형질체들로부터 재분화된 식물체들의 뿌리유도 및 완전한 식물체로 성장 -----	114
나. 실험결과 및 고찰 -----	114
1) 상추원형질체들로부터 식물체 재분화 -----	114
4. 혈전용해효소 유전자 상추에 도입 및 발현 -----	118
가. 재료 및 방법 -----	118
1) 혈전용해효소 유전자의 상추도입을 위한 vector 구축 ----	118
2) 혈전용해효소 유전자를 함유한 <i>Agrobacterium</i> 을 상추조직에 감염	118
3) 혈전용해효소 유전자를 함유한 형질전환체 상추 재분화 ---	119
4) 혈전용해효소 유전자를 함유한 재분화된 형질전환체 상추 shoot의 GUS staining -----	119
5) 혈전용해효소 유전자를 함유한 형질전환체 상추의 온실에서 완전한 성장 -----	119
6) 혈전용해효소 유전자를 함유한 형질전환체 상추의 GUS staining	120
7) 형질전환 상추에서 PCR, RT-PCR 및 western blot.를 통한 혈전용해효소 유전자의 검정 -----	120
나. 실험결과 및 고찰 -----	121
1) 혈전용해효소 유전자의 상추도입을 위한 vector 구축 ----	121
2) 혈전용해효소 유전자를 함유한 <i>Agrobacterium</i> 을 상추조직에 감염	124
3) 혈전용해효소 유전자를 함유한 형질전환체 상추 재분화 --	126
4) 혈전용해효소 유전자를 gadb한 재분화된 형질전환체 상추 shoot의 GUS staining -----	128
5) 혈전용해효소 유전자를 함유한 형질전환체 상추의 온실에서 완전한 성장 -----	130
6) 혈전용해효소 유전자를 함유한 완전한 형질전환체 상추의 GUS staining -----	132

7) 형질전환 상추에서 RT-PCR, PCR 및 western blot.을 통한 혈전용해효소 유전자의 검정 -----	134
5. 요약 -----	138
제 4장 목표달성도 및 관련분야의 기여도 -----	140
제 1절 목표달성도 -----	140
1. 혈전용해효소 유전자 탐색, 분리, 구조분석, 기능분석 및 제품화 -----	140
가. 주관연구기관 진주산업대학교 -----	140
1) 연구개발목표 -----	140
2) 연구개발 내용 및 달성도 -----	140
2. 혈전용해효소 유전자의 상추에 도입 및 발현 -----	146
가. 협동연구기관 경상대학교 -----	146
1) 연구개발목표 -----	146
2) 연구개발 내용 및 달성도 -----	146
제 5장 연구개발결과의 활용계획 -----	148
제 1절 제품화 개요 -----	148
1. 제품화 기술의 중요성(필요성) -----	148
2. 혈전용해제의 시장규모 -----	149
3. 제품화 개발 시 예상되는 기대효과 -----	149
제 2절 제품화 목표 및 내용 -----	151
1. 제품화 목표 -----	151
2. 제품화 내용 및 범위 -----	151
3. 기대효과 -----	152
제 6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학 기술정보 -----	153

제 1절	관련기술의 국내외 시장 및 기술현황	-----	153
1.	현 황	-----	153
제 7장	참고문헌	-----	155
제 1절	혈전용해효소 유전자 탐색, 분리, 구조분석 및 제품화	--	155
제 2절	혈전용해효소 유전자의 상추에 도입 및 발현	-----	161

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.