

공학석사 학위논문

*Vibrio fluvialis*로부터 phospholipase B
유전자분리 및 생화학적 특성



2003년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

생 물 공 학 과

안 선 희

안선회의 공학석사 학위논문을 인준함

2003년 1월 8일

주	심	공학박사	김성구	(인)
부	심	공학박사	김중균	(인)
위	원	공학박사	공인수	(인)

목 차

Abstract	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	6
1. Reagents	6
2. Bacterial strains, plasmids and culture condition	6
3. Cloning of phospholipase gene from <i>V. fluvialis</i>	9
4. Construction of the expression system	9
5. Overexpression and purification of phospholipase(rVFP58)	9
6. Thin layer chromatography(TLC)	
and gas chromatography-mass spectrometry	10
7. Measurement of phospholipase activity	12
8. Cytotoxicity assay of the VFP58 on CHSE-214 cell line	13
III. 결과 및 고찰	15
1. Cloning of phospholipase gene from <i>V. fluvialis</i>	15
2. Purification of phospholipase (VFP58)	17
3. TLC and GC-MS	20
4. Measurement of phospholipase activity	24
5. Assay of cytotoxicity on CHSE-214 cell line	27
IV. 요약	30

V. 감사의 글 -----31

VI. 참고문헌 ----- 32

***Vibrio fluvialis*로부터 phospholipase B 유전자 분리 및 생화학적 특성**

Sun-Hee Ahn

Department of Biotechnology and Bioengineering, Graduate School

Pukyong National University

Abstract

Vibrio fluvialis, an enteropathogenic *Vibrio*, produces and secretes a phospholipase which is thought to be important factor in the pathogenesis of disease. In this study, the phospholipase gene (*vfp58*) was identified from *V. fluvialis* (ATCC 33809) and sequenced. The entire open reading frame (ORF) was composed of 1690 nucleotides and 563 amino acids. The recombinant protein produced from the *vfp58* gene was expressed in *Escherichia coli* as his-tag fused protein. This protein was solubilized with 6M Urea and

purified by Ni-NTA affinity column. When the action mode was determined by TLC and GC-MS, the purified VFP58 protein showed a phospholipase B activity, which had phospholipase A and lysophospholipase activities. However, it did not show phospholipase C and sphingomyelinase activities. The VFP58 showed maximum activity at pH around 9~10 and temperature of about 40°C. The cytotoxicity of VFP58 was evaluated on a fish cell line, CHSE-214. The purified VFP58 caused significant cell death after 14h exposure to 250µg.

I. 서론

*Vibrio*는 통성 혐기성 그람음성간균으로서 바다나 하구에 존재하며 담수, 강, 연못, 호수에서도 분리된다. *Vibrio* 속에는 30 균종 이상이 속해 있으며 이 중 12 균종이 사람에게 감염을 일으킨다. 인체에 병원성을 나타내는 *Vibrio* 균은 질병의 종류에 따라 장관 감염증을 일으키는 *Vibrio*와 패혈증 및 창상 감염을 일으키는 *Vibrio*로 구분되어진다. 인간의 '장내 또는 다른 장기에 감염된 *Vibrio*는 독소, hemolysin, 각종 protease와 phospholipase등을 생산하여 질병을 유발시킨다. 이러한 감염을 일으키게 되는 경로는 대부분이 음식의 직접적인 섭취에 의해서이며, 이 외에 *V. carchariae*, *V. damsela*는 상처를 통해서 감염되는 것으로 알려졌다고 *V. metschnikovii*, *V. cincinnatiensis*의 감염 경로는 아직까지도 밝혀져 있지 않다. 현재까지 인간에게 감염되는 12종의 *Vibrio* 가운데 설사를 동반하는 *Vibrio*는 *V. cholerae*에 의한 cholera증상이 가장 대표적인 것이며 패혈증은 *V. vulnificus*에 의해 위장염, 식중독은 *V. parahaemolyticus*, *V. mimicus*, *V. hollisae*, *V. fluvialis* 등에 의해서 일어난다. 병원성 *Vibrio* 균이 생성하는 많은 독소는 인체 및 수해양 서식 어패류에 질병을 일으키는 중요한 원인 물질로 알려져 있으며 그 종류 또한 다양하다.

*V. fluvialis*는 극성편모를 가지며 호염성 환경에서 살아가는 미생물로 그 생화학적 특성(Lee et al. 1981)이 *Aeromonas* sp.와

비슷한 것으로 알려져 있다. 이 균이 인간에게 감염될 경우 설사와 같은 장관계통의 질병을 일으키게 되며 Lockwood et al.에 따르면 유소 mouse의 경우 이 균의 직접적인 섭취에 의해 사망한 결과가 보고되어 있다. 또한 이 균이 유아에게 감염될 경우 구토를 동반한 설사 (97%), 장의 통증 (75%), 탈수증 (67%), 열 (35%)을 유발시키는 원인균으로 알려져 있으나 정확한 발병 기작은 확실하게 알려져 있지 않다. 이러한 pathogenicity는 어떠한 한가지만의 factor에 의해서 일어나고 있는 것이 아니라 여러 복합적인 병원성 인자들이 상호 작용하여 치명적인 것으로 나타나고 있는 것으로 알려져 있는데, hemolysin 또는 cytolysin과 같은 enterotoxin이나 enterotoxin like molecule, protease, urease, lipase, phospholipase등이 그 병원성 인자들이다. 특히 병원성 미생물이 생산하는 protease나 phospholipase의 경우는 병원성 미생물이 숙주의 cell내로 침투해 들어가는 초기 단계에 매우 중요하게 작용하는 효소들이다. 이것은 숙주의 세포막의 주된 성분이 protein과 phospholipid로 구성되어 있는 것에 기인한 것이다. 따라서 병원성 미생물의 phospholipase는 초기 host cell로의 infection시 병원성 기작을 밝히는 연구의 대상이라 할수 있다..

본 연구에서는 *V. fluvialis*로부터 phospholipase 유전자를 cloning하여 *E. coli* 내에서 발현시키고 효소의 생화학적 특성에 대하여

조사하였으며 또한 cell에 미치는 pathogenicity를 확인하기 위하여 cell에 처리하여 방출되는 LDH량을 측정하여 cytotoxicity를 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. Reagents

DNA 제한 효소들은 Promega Co. (USA)에서 구입하였으며 균주의 배양에 사용한 배지들은 Difco Co. (USA)로부터 구입하여 사용하였다. L- α -phosphatidylcholine (PC, P-5394), L- α -lysophosphatidylcholine (LPC, L-4129), 1-palmitoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (P-9648), 1-O-hexadecyl-2-[(cis)-9-octadecanoyl]-rac-glycero-3-phosphocholine- (P 6159), 4-nitro-3(octanoyloxy) benzoic acid (N-1646), *p*-nitrophenylphosphorylcholine (NPPC, N-5879) 그리고 *Clostridium perfringens* PLC는 Sigma Co. (USA)에서 구입하여 사용하였다. Silica Gel-60 TLC plates와 유기용매들은 Merck Co. (Germany)에서 구입하였다. 그외 다른 시약들은 Sigma Co. (USA)에서 고순도로 정제된 것을 구입하여 사용하였다.

2. Bacterial strains, plasmids and culture condition

본 실험에서 사용한 *V. fluvialis*(ATCC 33809)는 KCTC(Korean Collection for Type Cultures)로부터 구입하여 사용하였으며, cloning에 사용한 host 및 vector는 Table 1에 나타내었다. *V.*

*fluvialis*는 brain heart infusion (BHI) 배지를 사용하여 37℃에서 배양하였으며 *E. coli* 배양시는 Luria Bertani(LB)배지를 사용하였다.

Table 1 Bacterial strains and plasmids used

Bacterial strains / plasmids	Genotype or relevant characteristics	Reference or source
Strains		
<i>V. fluvialis</i>	Wild-type strain isolated from human feces in Bangladesh	ATCC33809
XLI-Blue	<i>RecA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F' proAB lacI^fZΔM15 Tn10(Tet^r)]</i>	Stratagene
BL21(DE3)	<i>F⁻ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (DE3)	Novagen co.
Plasmids		
pGEM-4Z	Cloning vector; Amp ^r	Promaga co.
pET-22b(+)	His tag fusion expression vector; Amp ^r , T7 promoter, six His-tag coding sequence	Novagen co.

3. Cloning of phospholipase gene from *V. fluvialis*

*V. fluvialis*의 chromosomal DNA를 분리하여 pGEM-4Z vector를 이용하여 DNA library를 제작, *E. coli* XL1-blue에 transformation하여 yolk 배지상에서 phospholipase activity를 가지는 colony를 선별한 후 plasmid를 분리하여 sequencing한 결과 pVFP580을 얻었다.

4. Construction of the expression system

pVFP580로부터 specific primer들을 이용하여 PCR을 수행한 후 phospholipase 유전자를 coding하고 있는 open reading frame을 증폭시켰다. 이때 사용한 specific primer들은 각각의 말단에 *NdeI*과 *HindIII*를 가지도록 design하여 사용하였다 (vfp58up-ggcccatatgagtagccccgc, vfp58rp-ggccaagcttatcgagctcaggtttaa). 증폭시킨 유전자를 제한효소인 *NdeI*과 *HindIII*로 digestion하여 미리 같은 enzyme으로 digestion 시켜둔 T7 promoter를 가지는 overexpression vector인 pET-22b(+)에 ligation시킨다. 재조합된 plasmid를 pVFP58이라 명명하고 overexpression host인 BL21(DE3)에 transformation시킨다.

5. Overexpression and purification of phospholipase(rVFP58)

pVFP58이 transformation된 BL21(DE3) one colony를

ampicillin(1mg/1L)가 첨가된 LB배지 1ml에 inoculation하여 37℃에서 overnight culture후 ampicillin(100mg/L)이 첨가된 LB배지 1L에 재접종한다. Cell이 OD₆₀₀=0.6이 될때까지 배양하여 IPTG(Isopropyl-β-D-Thiogalactose)를 1mM되게 첨가하여 4시간정도 더 배양한후 4℃에서 5,000 × g로 15분간 원심분리하여 cell을 모은다. 모은 cell을 50ml의 20mM Tris-HCl buffer(pH9.0)에 suspension시켜 4℃에서 sonicator(sonifier 250, Branson Co.)를 이용하여 약 5분 동안 cell을 파쇄시킨 후 10,000 × g에서 20분간 원심분리하여 inclusion body를 축적하였다. 얻어진 inclusion body는 activity가 없으므로 20mM Tris-HCl buffer(pH9.0) containing 6M urea에 완전히 녹인후 20mM Tris-HCl buffer(pH8.0)에 dialysis하여 activity를 가지게 한다. 그런다음 Ni-NTA resin을 이용하여 순수한 rVFP58단백질만을 정제한다. 정제한 단백질은 Bradford method에 의해 정량하였고 standard curve는 Bovine Serum Albumin(BSA)를 사용하여 결정하였다. 모든 정제과정은 4℃에서 수행하였으며 SDS-PAGE를 통하여 정제된 단백질을 확인하였다.

6. Thin layer chromatography(TLC) and gas chromatography-mass spectrometry

*V. fluvialis*의 phospholipase, VFP58 enzyme이 phospholipid의 어느

부위를 절단하는지를 조사하기 위하여 여러가지 기질을 이용하여 TLC와 GC-MS를 수행하여 결정하였다. L- α -PC, 1-palmitoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, 1-O-hexadecyl-2-[(cis)-9-octadecanoyl]-rac-glycero-3-phosphocholine and L- α -LPC를 기질들을 각각 ethanol에 10mg/ml로 stock하여 이 substrate solution 20 μ l를 VFP58 enzyme이 1mg 함유된 reaction buffer(10mM Tris-HCl, pH9.0; 2.7mM sodium deoxycholate, 10mM CaCl₂) 100 μ l에 섞어준 다음 35℃에서 14시간 동안 incubation 시켜준다. 반응물은 chloroform-methanol solution (2:1, v/v)으로 반응을 중지시키고, 원심분리하여 chloroform층을 extraction한 후 vaccum에서 증발시킨다. 남은 잔여물을 다시 chloroform 20 μ l에 녹이고 Silica Gel-60 plate에 spotting하여 chloroform-methanol-acetic acid-water (55:17:6.5:2.5, v/v/v/v)상에서 전개하여 PC 또는 LPC를 확인한다. 또한 hexane-diethyl ether-acetic acid (85:15:1, v/v/v)상에서 전개하여 free fatty acid 를 확인한다. 전개된 spot들의 확인은 50% sulfuric acid를 뿌려서 115℃에서 30분동안 구워서 확인하였다(Kishimura et al., Hayashi et al.).

또한 phospholipase A의 phospholipid의 fatty acid를 유리시키는 위치특이성을 조사하기 위하여 1-palmitoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine stock solution을 1mg의 VFP58 enzyme이 함유된

reaction buffer에 섞어서 37℃에서 14시간 동안 incubation시킨다. 반응물을 hexane-diethyl ether-acetic acid (85:15:1, v/v/v)를 전개용매로 하여 TLC상에서 전개한 후 free fatty acid spot 부근만을 긁어내어 Ohta et al.에 따라 methylation 시켰다. Methylation된 product를 nitrogen gas로 농축하여 gas chromatography-mass spectrometry를 수행하였다. GC-MS는 Shimadzu QP-5050A (Shimadzu, Japan)로 polydimethylsiloxane capillary column HP-5MS (30 m × 0.32 mm I.D., 0.25 µm film thickness)을 이용하여 분석하였다. 이때 carrier gas는 helium (24.4 kPa)을 사용하였고 column flow rate는 10 ml/min로 하였다. Column temperature program은 다음과 같이 설정하였다. Injector 온도는 250℃로 하였고, column은 1min동안 80℃에서 유지한 다음 10℃/min의 속도로 180℃에 이를때까지 heating한 후 다시 260℃까지 5℃/min의 속도로 heating하였다. Interface 온도는 260℃를 유지하였고, Electron energy는 70 eV로 하였다.

7. Measurement of phospholipase activity

VFP58의 phospholipase activity는 Schmie et al., Cho et al.에 의하여 다음과 같은 방법으로 수행하였다.

3ml의 reaction buffer (10mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 10mM CaCl₂ ;

pH9.0)에 50 μ l의 substrate stock solution (4-nitro-3-(octanoyloxy)benzoic acid, 3,1mM in acetonitrile)을 섞고 VFP58 enzyme solution을 혼합하여 vortex한후 35℃에서 1시간 동안 반응시킨다. 반응이 끝나면 재빨리 ice에 5분간 처리한후 spectrophotometer로 OD₄₁₀ 에서 측정한다. 이때 enzyme activity는 반응초기에 OD₄₁₀ 에서 측정한 값과 1시간 반응후 변화한 값을 환산하여 결정하며, 기질 4-nitro-3-(octanoyloxy)benzoic acid 155nmole이 모두 분해되면 AU는 0.2이다. 각 반응은 다른 범위의 온도와 pH에서 assay를 수행하여 optimal condition과 stability를 측정하였다.

8. Cytotoxicity assay of the VFP58 on CHSE-214 cell line

VFP58 enzyme의 cytotoxicity는 CHSE-cell line에 enzyme을 처리하여 cell로부터 방출되는 lactate dehydrogenase(LDH)양을 측정하여 결정하였다. Chinook salmon embryo cells (CHSE-214 cell line)을 48-well plate에 penicillin G와 streptomycin이 함유된 MEM-medium를 각각 1ml씩 분주하여 17℃에서 24시간 동안 culture하였다. 그리고나서 100 μ l의 enzyme solution을 첨가하여 계속해서 같은 온도에서 14시간 동안 culture하였다. Cell은 enzyme을 처리하기전과 처리후에 나타나는 변화를 광학도립현미경(Olympus

IX70)으로 100배 배율에서 관찰하였다.

Cytotoxicity는 CytoTox96 assay (Promega)를 이용하여 medium에서 방출되는 LDH activity를 측정하여 결정하였다. Cell culture한 plate의 각 well에서 50 μ l의 cell culture medium을 새로운 microtiter plate에 옮긴다음 50 μ l의 substrate mixture를 각 well에 첨가한다. Plate를 암소에서 room temperature로 30분 동안 incubation시킨다음 50 μ l의 reaction stop buffer를 각각의 well에 넣고 반응을 중지시킨다. 마지막으로 microplate reader를 사용하여 490nm에서 red reaction product의 OD를 측정한다. Cytotoxicity의 계산은 다음과 같이 수행하였다. % cytotoxicity = $100 \times (A_{\text{sample}} - A_{\text{spontaneous}}) / (A_{\text{total}} - A_{\text{spontaneous}})$, A_{sample} 은 enzyme을 처리한 cell의 optical density (OD)이고, $A_{\text{spontaneous}}$ 은 enzyme을 처리하지 않은 cell의 OD이다. 그리고 A_{total} 은 cell에 Triton X-100을 처리하여 LDH 방출을 최대로 하여 얻은 OD이다. 각각의 OD는 medium만을 blank control로하여 측정하였다(Lee et al. 2002)

III. 결과 및 고찰

1. Cloning of phospholipase gene from *V. fluvialis*

*V. fluvialis*로부터 phospholipase 유전자 VFP58을 cloning하여 sequencing한 결과는 Fig. 1에서 나타내었다. Vfp58 유전자는 1690개의 염기로 구성되어 있으며 563개의 amino acid로 이루어져 있다.

2. Purification of phospholipase (VFP58)

VFP58을 overexpression하기 위하여 ORF를 pET-22b(+)에 cloning하여 overexpression host인 BL21(DE3)에 transformation한 균주를 ampicillin(100mg/L)이 첨가된 LB배지에 배양하여 IPTG를 이용하여 과발현시켰다. VFP58이 과발현된 cell을 파쇄하여 얻은 활성이 없는 inclusion body를 Urea로 renaturation시킨후 20mM Tris-HCl buffer(pH9.0)에서 dialysis하여 refolding하였다. 그리고나서 phospholipase activity를 가지는지 yolk agar에서 확인한 후 재조합된 protein 말단에 fusion된 His-tag이 Ni^{2+} 에 affinity를 가지는 특성을 이용하여 Ni-NTA resin에 protein sample을 apply하여 1M imidazole로 elution하였다. 정제과정 중 각 단계에서의 protein은 Laemmli법에 따라 SDS-PAGE를 수행하여 65kDa의 크기로 overexpression된 것을 확인하였고(Fig. 2), 또한 각 단계에서의 activity 및 yield는 Schmiel et al.에 따라 PLA의 activity를 측정함으로써 결정하였다 (Table2).

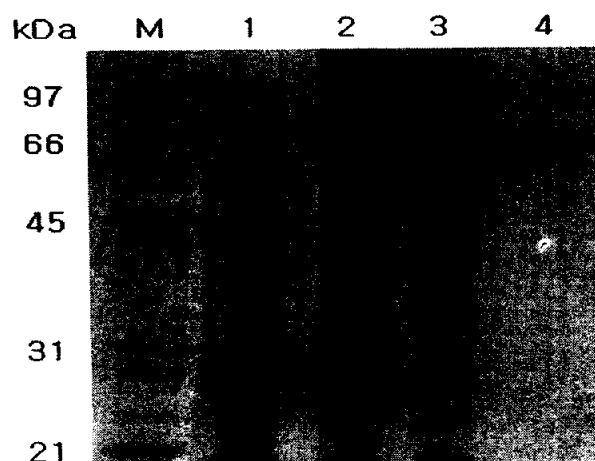


Fig. 2. SDS-PAGE of VFP58 during purification steps.

M; molecular weight marker, lane 1; Crude extract of cells transfected with pET-22b(+) vector, lane2; Cell harboring of pVFP580 4hr cultured after induction, lane 3; Inclusion body, lane4; His-tag column elution fraction

Table 2 Purification steps of VFP58 from recombinant *E. coli*

Purification step	Total protein (mg)	Specific activity*	Total activity	Yield (%)	Purification Fold
Cell homogenate	83	2.9	244.8	100.0	1.0
Refolded Inclusion body	10	7.5	75.0	30.6	2.5
Ni-NTA affinity chromatography	4	8.9	34.9	14.2	3.0

*nmoles product/min/mg protein

3. TLC and GC-MS

VFP58 enzyme의 phospholipase type을 결정하기 위하여 우선 *p*-NPPC를 이용하여 phospholipase C (PLC) activity를 측정해 보았다. 이때 control로 *C. perfringens*의 PLC를 사용하였다. 그결과 VFP58은 PLC activity를 확인할 수 없었다. 이에 PC와 enzyme을 반응시켜 반응 산물로 TLC를 수행한 결과 PC가 분해되어 양이 감소되는 것을 관찰할수 있었고, LPC spot은 확인되지 않았다. 또한 반응 생성물에서 free fatty acid가 유리되는 것(R_f 0.25)을 확인할수 있었다(Fig. 3A). 이에 VFP58이 phospholipase A(PLA)로서 phospholipid에 작용하는 active site를 조사하기 위하여 1-palmitoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine을 기질로 하여 enzyme과 반응시켜 product를 free fatty acid만을 분리하여 methylation 하여 GC-MS를 수행한 결과 retention time 18분에서 palmitic acid, 22분에서 linoleic acid peak를 확인하였다(Fig. 4). Peak의 분자량은 270과 294로 각각 palmitic acid와 linoleic acid 분자량에 methyl기의 분자량의 합산된 것과 일치함을 알수 있었다. 이것으로써 VFP58 enzyme은 phospholipid의 sn-1 site와 sn-2 site의 fatty acid를 모두 유리시키는 기능을 하는 것을 알수 있었다. 그러나 sn-2 site의 fatty acid는 acyl기의 spontaneously transition에 의한 것일 가능성도 고려하여 sn-1 site에 ester 결합이 아닌 ether 결합인 기질 1-O-hexadecyl-2-[(cis)-9-

octadecanoyl]-rac-glycero-3-PC를 이용하여 반응시켜 본 결과 fatty acid 유리를 확인할수 있었다(Fig. 3b) 또한 VFP58이 L- α -LPC의 분해능이 있는지를 확인해본 결과 Fig. 3B에서 보이듯이 activity가 있음을 확인하였다. 이로써 VFP58은 PLA와 LysoPLase activity 를 둘 다 가지는 phospholipase B(PLB)임을 알수 있었다. 또한 이러한 phospholipase가 erythrocytes를 lysis 시키는 hemolytic activity를 가지는지를 조사한 결과 hemolytic activity는 없는 것으로 나타났다(data not shown). 이 결과는 VFP58 phospholipase B가 PLA activity 보다 Lysophospholipase activity가 강하다는 것을 예측하게 해주는 결과이다(Shinoda et al.).

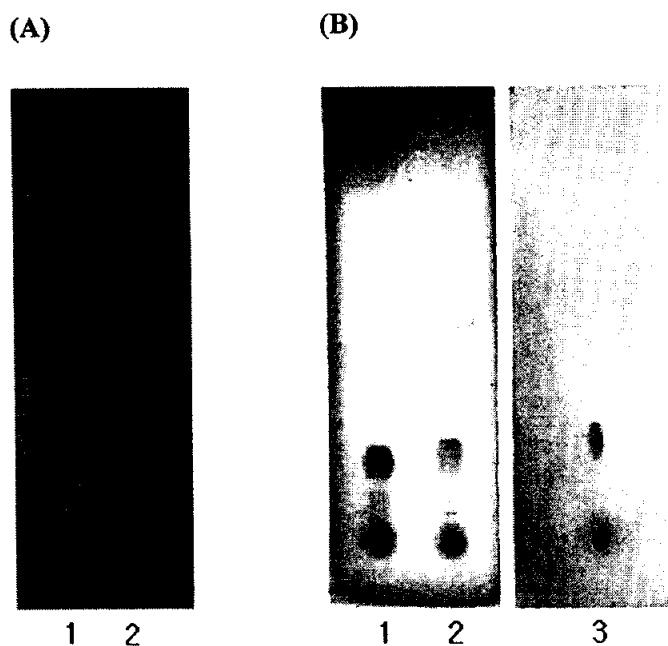


Fig. 3. Thin-layer chromatogram.

The reaction products, after 14 h incubation of various substrates with 1 mg VFP58, were eluted in the chloroform. Each was separated on TLC and sprayed with 50% sulfuric acid followed by heating at 115 °C for 30 min.

(A) The reaction products of PC without (control) or with the VFP58. Lane 1 : PC, Lane 2 : PC with the VFP58. The R_f of PC was 0.57.

(B) Products of the enzymatic hydrolysis with the VFP58 and synthetic phospholipids.

Lane 1: 1- Palmitoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine hydrolysis product

Lane 2: L- α -LPC hydrolysis products

Lane 3: 1-O-hexadecyl-2-[(cis)-9-octadecenoyl]-rac-glycero-3-phosphocholine hydrolysis products

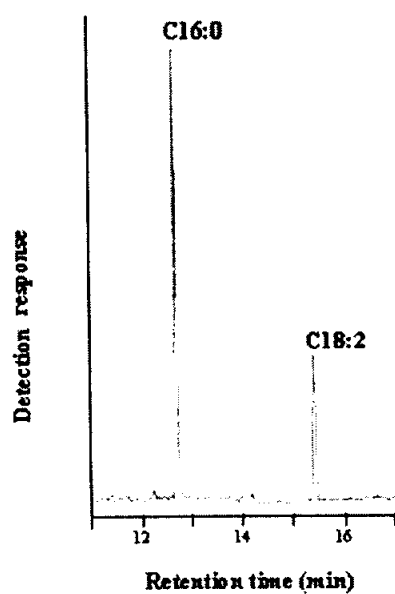


Fig. 4. GC-MS analysis.

Reaction product of 1-palmitoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine with 1 mg VFP58 was separated on TLC plate. It was scraped out and methylated then analyzed with GC-MS. Palmitic acid peak, C16:0; Linoleic acid peak, C18:2

4. Measurement of phospholipase activity

pH stability를 알아보기 위하여 pH6.0에서 pH12.0까지 각각의 pH에 enzyme을 2시간 동안 preincubation시킨후 pH9.0에서 assay를 수행하였다. 그결과 pH8~10부근에서 비교적 안정한 활성을 나타내었다(Fig. 5). 따라서 VFP58은 alkali-philic한 enzyme이라는 것을 알수 있다. VFP58는 35℃, pH9.0에서 최고의 활성을 나타내었으며(Fig. 6), thermo stability를 조사하기 위하여 VFP58 enzyme을 20℃에서 60℃범위에서 2시간 동안 preincubation 시킨후 35℃에서 assay를 수행한 결과 50℃이후로 activity가 급격히 감소하는 경향을 나타내었다.

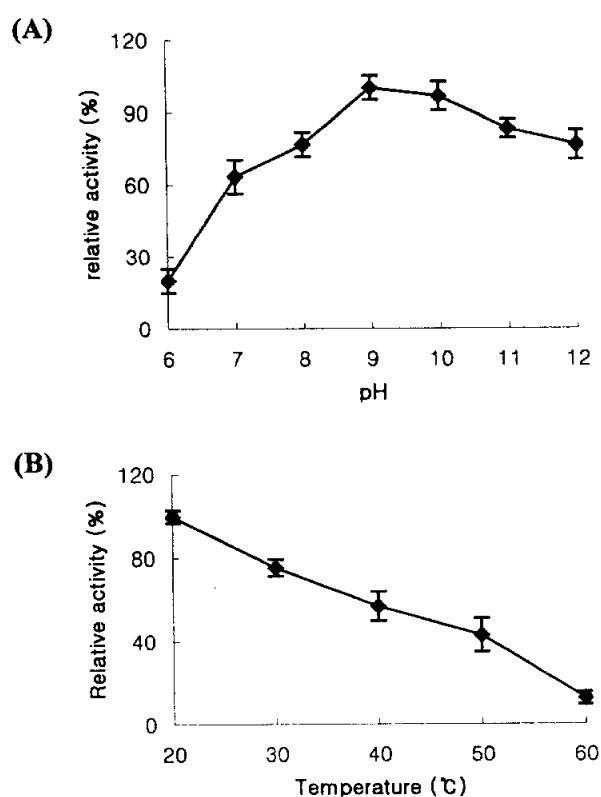


Fig. 5. pH stability and thermostability of the VFP58 activity.

To investigate the pH stability of the VFP58, the VFP58 was preincubated in the different pHs at 37°C for 2 h and then residual activity was measured under standard condition. To determine the thermostability of the VFP58, the VFP58 was preincubated at the temperatures of from 20 to 60°C for 2 h and assayed residual activity under standard condition.

(A) pH stability

(B) thermostability

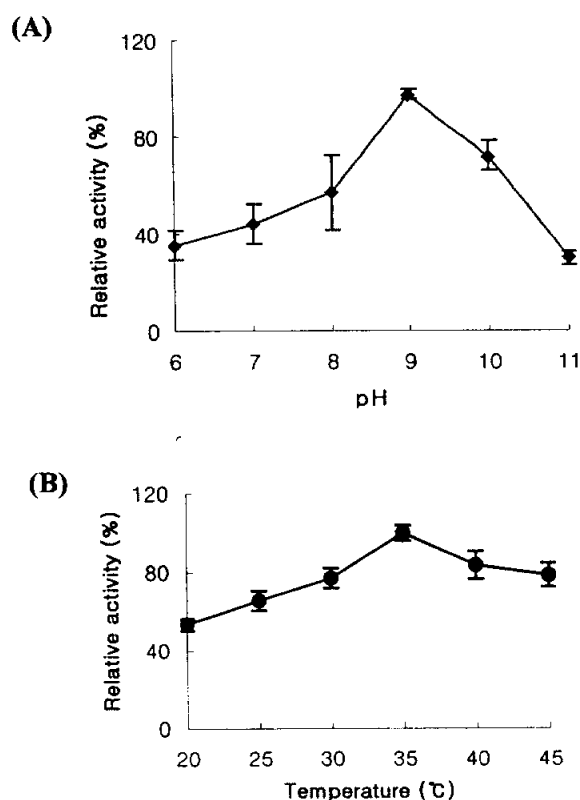


Fig. 6. Optimal pH and temperature on the VFP58 activity.

The optimal pH for the VFP58 activity was determined using different pHs from 6 to 11. The buffers used were 10 mM citric acid- sodium citrate from pH 6, 10 mM Tris-HCl from pH 7 to 9, and 10mM sodium carbonate-NaOH from pH 10 to 11. The optimal temperature of the VFP58 activity was assayed under various temperatures for 1 h.

(A) Optimal pH

(B) Optimal temperature

5. Assay of cytotoxicity on CHSE-214 cell line

Chinook salmon embryo cells (CHSE-214 cell line)에 VFP58 enzyme을 처리한 결과 cell의 morphology가 변하는 것을 관찰하였다(Fig. 7). 또한 VFP58의 enzyme 첨가량에 따른 cell의 cytotoxicity를 측정한 결과 200 μ g이 첨가될 경우 80%까지 증가되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 8).

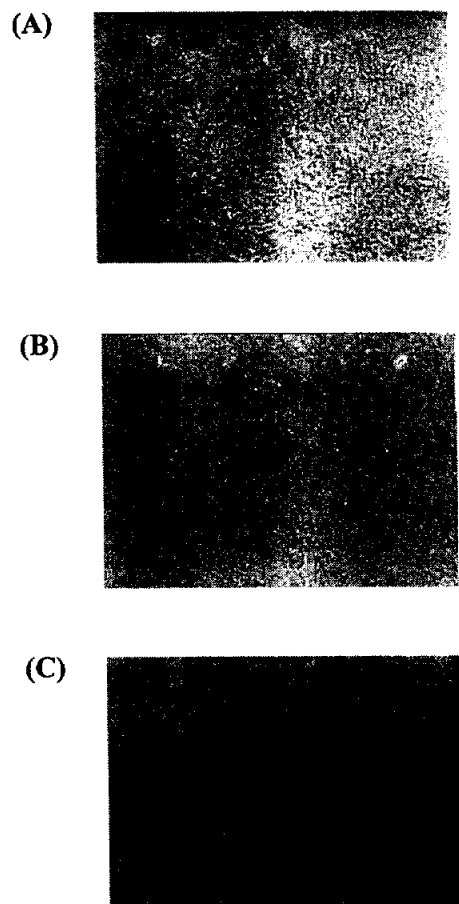


Fig. 7. Morphological changes of CHSE-214 cells after treatment with VFP58.

(A) Morphology of normal CHSE-cells (magnification, $\times 100$).

(B) Morphology of treated with 50 μ g VFP58 CHSE-214 cells.

(C) Morphology of treated with 100 μ g VFP58 CHSE-214 cells.

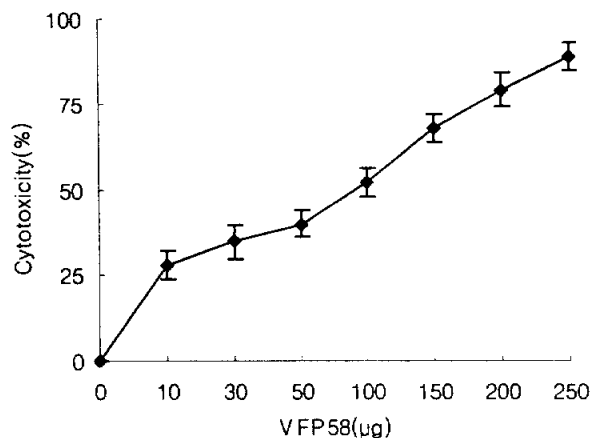


Fig. 8. Cytotoxicity on CHSE-214 cells of the VFP58.

Cells were cultured as described in Materials and Methods and cytotoxicity of CHSE-214 cell line was assayed by measuring the LDH amount released from the lysed cells. The released LDH was measured using the CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay kit. Results represent the means $\pm$ standard deviations of triplicates. Cytotoxicity at each concentration of the VFP58 (0 to 250 μ g) on CHSE-214.

IV. 요약

*Vibrio fluvialis*는 장의 질환을 일으키는 *Vibrio*로서 질병을 일으키는데 중요한 인자의 하나라고 생각되는 phospholipase를 생산해낸다. 본 연구에서는 *V. fluvialis* (ATCC 33809)로부터 phospholipase 유전자 (*vfp58*)를 찾고 염기서열을 분석하였다. *vfp58* 유전자의 Open Reading Frame (ORF)는 1690개의 nucleotide와 563개의 아미노산으로 구성되어 있었다. 이 유전자를 *Escherichia coli*내에서 His-tag이 달린 단백질로 발현될수 있도록 재조합하였다. *E. coli*내에서 발현된 재조합 단백질은 6M Urea에 녹여 투석한후 Ni-NTA affinity column을 이용하여 순수한 단백질로 정제하였다. 정제된 VFP58 단백질의 phospholipase 활성을 알아보기 위하여 TLC와 GC-MS 분석을 수행하여 phospholipaseA 활성과 Lysophospholipase 활성 두가지 모두를 가지고 있는 phospholipaseB임을 알수 있었다. VFP58의 활성은 pH 9~10 그리고 35℃에서 최고활성을 보였다. 또한 VFP58의 CHSE-214에 대한 cytotoxicity를 측정한 결과 단백질 250μg을 처리하였을 때 14시간 후에 cell이 사멸하는 것을 확인할수 있었다.

VI. 감사의 글

본 논문이 완성되기까지 부족한 저에게 언제나 애정어린 마음으로 이끌어주신 공인수 교수님께 머리숙여 감사드립니다. 또한 학문에의 길로 이끌어 주시고 관심을 아끼지 않으셨던 김성구 교수님, 김중균 교수님, 홍용기 교수님, 이형호 교수님, 박남규 교수님, 공재열 교수님께 감사드립니다.

그 동안의 연구실 생활에서 부족한 후배를 아껴주시고 많은 도움을 주신 윤수철, 하정철, 김구택, 김영옥, 박기재, 김대경, 이종희, 김현국, 최선영, 이상봉, 강정화, 진철호, 신승렬, 김남현, 한정현, 최윤혁, 박제현 선배님들께 진심으로 감사드립니다. 그리고 옆에서 많은 도움을 주었던 동기 선희 그리고 항상 싫은 내색없이 묵묵히 실험실일을 도와주신 후배님들인 은미, 윤희연니, 지현이, 나영이에게도 진심으로 고마운 마음을 전합니다.

또한 주위에서 많은 격려와 도움을 주신 생물공학과 대학원 선배님들과 후배님들에게도 감사드립니다.

언제나 변함없는 사랑과 믿음으로 저를 지지해 주시는 아버지, 어머니께 이 논문을 바칩니다. 정말로 감사합니다.

VI. 참고문헌

- D.E.Lockwood, A.S.Kreger, S.H.Richardson, 1982, Infect. Immun., 35, 702-708
- J.V.Lee, P.Shread, L.Furmiss and T.N.Bryant, 1981, J. Appl. Bacteriol., 50, 73-94
- D.H.Schmiel, E.Wager, L.Karamanou, D.Weeks, V.L.Miller, 1998, Infect. Immun., 66, 3941-3951
- W.Cho, F.J.Kezdy, 1991, Methods Enzymol., 197, 75-79
- S.H.Lee, S.Kim, S.C.Park, M.J.Kim, 2002, Infect. Immun., 70, 315-322
- M.M.Bradford, 1976, Anal. Biochem., 72, 248-254
- U.K.Laemmle, 1970, Nature, 227, 680-685
- H.Kishimura, K.Hayashi, 1999, Comp. Biochem. Physiol. PartB, 124, 483-488
- K.Hayashi, H.Kishimura, 1996, Fisheries Sci., 62, 842-843

H.Kishimura, K.Hayashi, 1998, Nippon Suisan Gakkaishi, 64, 264-269

A.Ohta, M.C.Mayo, N.Kramer, W.E.Lands, 1990, Lipids, 25, 742-747

D.Tsikas, S.Rossa, D.O.Stichtenoth, M.Raida, F.M.Gutzki, J.C.Frolich, 1996,
Biochem. Biophys. Res. Commun., 220, 939-944

F.Cappitelli, T.Learner, O.J.Chiantore, 2002, J. Anal. Appl. Pyrolysis, 63, 339-
348

S.Shinoda, H.Matsuoka, T.Tsuchie, S.I.Miyoshi, S.Yamamoto, H.Taniguchi and
Y.Mizuguchi, 1991, J. Gen. Microbiol., 137, 2705-2711