

환경일반-P2 Gene Cloning and Partial Sequencing of *Pseudomonas aeruginosa* EMS1 and KH7 rhamnolipid gene

이근희*, 손명화, 차미선, 이상준
 부산대학교 미생물학과

1. 서론

계면활성제(surfactant)란 동일 분자 내에 친수성기와 소수성기를 동시에 갖는 양친매성 물질로 계면에 흡착되어 계면의 자유에너지를 낮춤으로서 계면의 성질을 현저하게 변화시키는 물질을 말한다.

계면활성제는 섬유, 제지, 사진, 도료, 화장품, 의약품, 농약, 금속, 토목, 건축, 윤활유, 식품, 전자산업 등 여러 분야에서 유화제, 분산제, 습윤제, 기포제, 소포제, 세정제, 대전방지제, 응집제, 살균제, 보존제 등의 용도로 널리 사용되고 있다. 현재 사용되고 있는 계면활성제의 대부분은 석유화학공업을 이용하거나 일부는 동·식물의 지질을 이용하여 화학적 합성으로 생산되어 왔다.

그러나 이러한 화학합성 계면활성제는 제조 과정이 복잡하고 자연 생태계에 미치는 독성이 매우 강할 뿐만 아니라 난분해성이거나 생물학적 분해가 가능한 물질이라도 대사 중간 산물이 더욱 독성을 야기하고, 대개의 폐수 처리공정이나 상수 처리공정에서도 제거가 되지 않아 심각한 환경오염 문제를 야기하고 있다. 이에 따라 계면활성제 산업에서는 이러한 문제점을 해결할 수 있는 대체 계면활성제, 환경과 조화를 이루는 계면활성제, 특히 미생물이 생산하는 환경친화적인 생물 계면활성제의 개발이 필요하게 되었다.

Pseudomonas aeruginosa rhamnolipid의 regulatory gene 인 rhIR과 autoinducer synthetase와 binding 되어 활성화 되어 rhamnosyltransferase를 encoding 하는 rhIAB로 Gene Cloning 과 Partial Sequencing을 수행하였다.

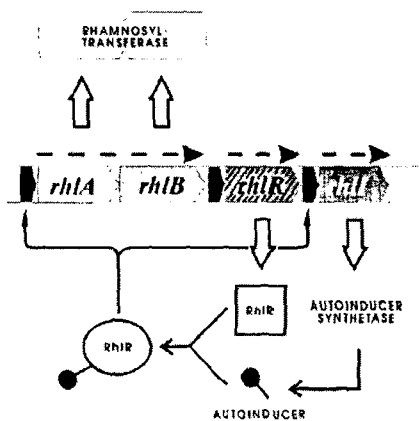


Fig. Gene involved in the synthesis and regulation of rhamnolipid in *Pseudomonas aeruginosa*.

2. 재료 및 실험 방법

rhlR, *rhlA*, *rhlB*로 primer를 아래와 같이 작성하여 predenaturation 5 min at 94°C, (denaturation 94°C, 1min 30 sec; annealing 50°C, 1min 30 sec; extension 72°C, 1min 30 sec; and final extension 72°C 7 min) 30 cycles 조건으로 PCR (Polymerase chain reaction)을 수행하였다. PCR한 product를 elution 하여 pGEM®- T Easy Vector cloning을 (Ligation, trasformation , plasmid prep)수행한다.

Table. Nucleotide sequence of the oligonucleotides used in this study

Primer		Sequence (5' → 3')
<i>rhlR</i>	sense	<i>GCA ATG AGG AAT GAC GG</i>
	antisense	<i>GCT TCA GAT GAG GCC GAG</i>
<i>rhlA</i>	sense	<i>GAA ATG CGG CGC GAA ATG CTG TT</i>
	antisense	<i>GTT CAG GCG TAG CCG ATG GC</i>
<i>rhlB</i>	sense	<i>CCA TGC ACG CCA TCC TCA</i>
	antisense	<i>CGT TCA GGA CGC AGC CTT</i>

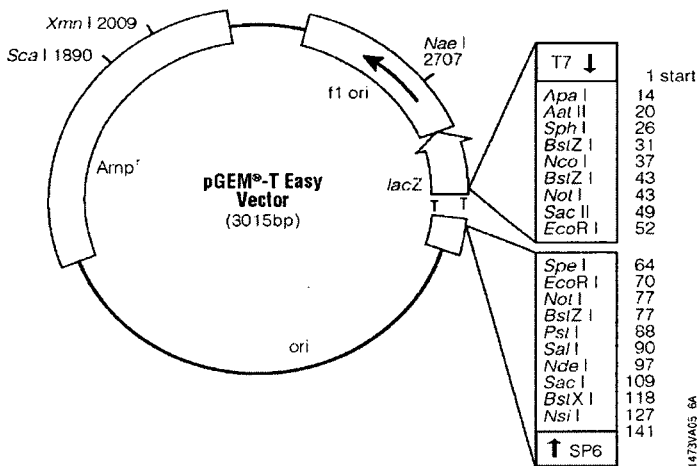


Fig. Plasmid map of pGEM®- T Easy Vector

3. 결과 및 고찰

3-1. PCR amplification of *rhlR* gene

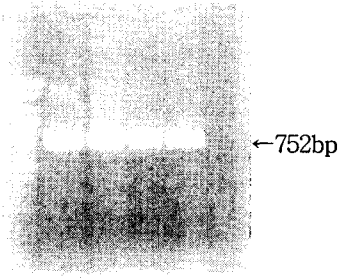


Fig. Agarose gel electrophoresis of the PCR products amplified using *rhlR* gene in *P. aeruginosa* EMS1 and KH7

Lane 1 : Size marker (100bp ladder)

Lane 2,3 : *rhlR* gene of *P. aeruginosa* EMS1

Lane 4,5 : *rhlR* gene of *P. aeruginosa* KH7

3-2. PCR amplification of *rhlA* gene

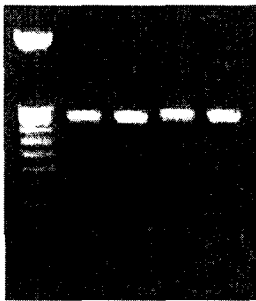


Fig. Agarose gel electrophoresis of the PCR products amplified using *rhlA* gene in *P. aeruginosa* EMS1 and KH7

Lane 1 : Size marker (100bp ladder)

Lane 2,3 : *rhlA* gene of *P. aeruginosa* EMS1

Lane 4,5 : *rhlA* gene of *P. aeruginosa* KH7

4. 요약

본 연구는 환경친화적인 biosurfactant를 생산하는 *Pseudomonas aeruginosa* EMS1 and KH7를 rhamnolipid의 *rhlR*, *rhlA*, *rhlB*를 기초로한 primer를 이용하여 752bp, 802bp, 1280bp pcr을 수행하였으며 pGEM[®]- T Easy Vector gene cloning 하여 *Pseudomonas aeruginosa* EMS1 and KH7의 Partial Sequencing를 서로 비교하였다. 이들 실험을 통하여 *Pseudomonas aeruginosa*의 유전적 구조 및 특성을 비교하여 유전적 조작을 위한 기초적인 자료가 되도록 한다.

참고 문헌

- I. M. Banat, R. S. Makkar, S. S. Cameotra, 2000, Potential commercial applications of microbial surfactants, Appl. Microbiol. Biotechnol. 53, 495±508
- Elise R Sullivan, 1998, Molecular genetics of biosurfactant production, Current Opinion in Biotechnology, 9, 263 269