KOR. JOUR. MICROBIOL. Vol.18, No.1, 29~34 1980

돌연변이율을 증가시키는 기능이 결여된 플라스미드 pKM101의 분리 및 그 특성에 관한 연구

박 찬 규·하 지 홍·이 세 영

(고려대 농대)

Isolation and Characterization of plasmid pKM 101 Mutants Deficient in Their Ability to Enhance Mutagenesis

Park, Chan Kyu, Ha Ji Hong and Se Yong Lee

(Korea University)

ABSTRACT

As preliminaries for the study of Plasmid pKM101 functions and their interaction with the host DNA repair genes, seven mutants of pKM101, visualized on tetrazolium-galactose plates, deficient in their abitity to enhance mutagenesis were isolated and partially characterized. They all have altered functions not only for mutagenesis against MMS and 4-NQO but for the spontaneous reversion of host cell.

서 론

돌연변이, DNA복제, 재조합 및 세포분열 등 생명체가 갖는 중추적 유전현상과 밀접하게 연관된(Satta., G. *et al.*, 1978) DNA손상복구 기능을 비롯하여 염색체외 유전물질인 플라스미스의 유전자 기능 및 염색체 유전자와의 상호작용을 연구하기위한 모델 시스템으로서 플라스미드 pKM101을 선택하였다. pKM101은 플라스미드 R46로부터 유도되었는데 R46은 처음 분리될 당시 몇몇 항생제에 대해 내성을 가지고 있는 것으로 밝혀졌으며 그후 자외선 처리시 숙조세포의 치사율을 감소시키는 성질이 발견됨(Drabble, and Stocker. 1968)에 이어 DNA손상복구 기능의 일종으로 볼 수 있는, 자외선 또는 특정화학물질에 의한 숙주의 돌연변이율 그리고 숙주의 자연돌연변이율을 증가시키는 기능도 아울러 보고되었다(Mortelmans, 1975; Mortelmans, 1976). 뿐만 아니라 이는 *Salmonella typhimurium* LT-2 (McCann, J. *et al.*, 1975)나 *E. coli* K12 (Walch and Stocker, 1979)가 지닌 error-prone repair기능과 관련된 유전자들 즉 *rec A*나 *lex A*와도 상호작용을 한다고 알려져 있다.

우선 pKM101의 DNA손상복구 기능에 관여하는 유전인자를 유전학적으로 연구하기 위하여 이 기능이 결여된 플라스미드 돌연변이체의 분리를 시도하였다. 이러한 돌연변이체를 효과적으로 분리하기 위하여 항생제 내성과 갈락토오스(galactose)를 탄소원으로 이용하지 못하는 돌연변이

를 도입하였으며 테트라졸리움(tetrazolium)이 포함된 지시배지(indicator plate)에서 플라스미드 돌연변이체를 선별하였다. 이와 같이 분리된 몇몇 돌연변이체의 특성을 확인하기 위하여 자연돌연변이율 및 여러 화학적 돌연변이원에의한 돌연변이율을 B.N. Ames (1975)의 방법에 의거하여 조사한 뒤 DNA 손상복구능 결여 돌연변이체임을 확인하였다.

재료 및 방법

1. 플라스미드 돌연변이체의 분리 방법

G C. Walker(1978a)가 사용한 방법을 변형하여 도입하였으며 전 과정을 요약하면 Fig. 1에서 보는 바와 같다. 이는 MNNG를 사용하여 pKM 101에 돌연변이를 유발시킨 뒤 갈락토오스를 탄소원으로 사용하지 못하는 Gal^- 돌연변이주에 전달시킨후 이로부터 얻은 콜로니(colony)를 MMS가 포함된 배지에 복제접종(replica plating) 할 때, MMS에 의한 돌연변이를 증가시키는 기능이 결여된 플라스미스 즉 pKM 101돌연변이체를 받은 균주에서는 Gal^+(갈락토오스를 탄소원으로 이용할 수 있는 형질)로의 복귀 돌연변이 빈도가 감소하는 성질을 이용하는 것이다. 이와 같은 성질은 지시배지를 사용하여 야생형의 표현형과 쉽게 육안으로 분간할 수 있다[Fig. 1].

1) 스테렙토마이신 내성표식인자의 도입

B.N. Ames로부터 분양받은 *Salmonella typhimurium* LT-2 G46주를 pKM 101 돌연변이체를 분리하기 위한 균주로 사용하기 위하여 우선 스트렙토마이신 내성표식인자를 도입(Miller, 1979)하여 CP1로 명명하였다(Table 4). 이 표식인자는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 pKM101 돌연변이체를 CP10으로 전달시킬 때 transconjugant를 선택적으로 분리하기 위한 counterselection marker로 사용된다. 먼저 G46균주를 40~50ml nutrient broth에 접종하여 하룻밤 배양한 뒤 원심분리하여 약 1ml정도로 농축한다. 그 0.1ml을 스테렙토마이신이 100μg/ml로 첨가된 nutrient agar배지에 접종하여 이틀간 배양한 뒤 형성된 콜로니로부터 CP1균주를 얻는다.

2) 데옥시갈락토오스(deoxygalactose)를 이용한 Gal^- 돌연변이주의 분리

탄소원이 결핍된 Vogel-Bonnel 최소배지(Vogel, and Bonner, 1956)(Table 1)에 40% glycerol 0.2ml 및 100mM histidine 0.06ml, 40% 2-deoxygalactose 0.1ml, 4% galactose 30μl를 가한 뒤 nutrient broth에서 배양한 CP1주 0.1ml을 접종하여 37°C에서 배양한다. 2일 후 2-deoxygalactose에 내성을 가진 콜로니를 분리하여 갈락토오스를 유일한 탄소원으로 넣은 최소배지에서 키워 *gal* 표식인자를 확인한다. 그리하여 3개의 돌연변이주를 분리한 뒤 CP10~CP12로 명명하였다. 이들이 가진 *gal* 돌연변이는 갈락토오스를 유일한 탄소원으로 준 경우에 약간의 생장을 보인 것으로 보아 leaky한 것 같다.

Table 1. Composition of Vogel-Bonner minimal medium

40% glucose	50ml
50x salt	20ml
Agar	15g
Distilled water	1 litre
50x salt	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	10g
Citric acid·H_2O	100g
K_2HPO_4	500g
$NaNH_4HPO_4 \cdot 4H_2O$	175g
Warm distilled water	670ml

3) 돌연변이체 선별을 위한 pKM101의 전달및 MMS 처리량의 결정

MMS에 의한 돌연변이를 증가시키는 기능이 결여된 pKM101 돌연변이체를 지닌 균주의 Gal^+ 복귀 돌연변이율은 pKM101을 갖지 않는 균주에서의 경우와 비슷한 것이다. 따라서 CP10주와 CP12주에 야생형 pKM101을 도입하여 복귀 돌연변이율의 차이가 지시배지에서 분간이 되도록 MMS의 처리량을 결정하고 적합한 선별균주를 결정하였다.

전달과정은 pKM101을 가진 CP14주와 CP10 및 CP12주를 nutrient broth에서 하룻밤 정치 배양한 뒤 nutrient broth 9ml에 CP14를 각각 0.1 ml 접종하고 CP10 및 CP12를 각각 1ml씩 추가

하여 Ampicillin (50μg/ml)과 Streptomycin(100 μg/ml)을 포함한 선택배지에 streaking한다. 여기서 하룻밤 배양한 뒤 transconjugant을 얻어 CP15 및 CP16으로 명명한 뒤 CP10, CP12와 함께 MMS의 처리량을 10μl 및 20μl로 변화시키 각각을 지시배지인 tetrazolium galactose 배지 (Table 2)에 복제 접종한다.

Table 2. Composition of tetrazolium-galactose medium

Nutrient broth	8 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
2, 3, 5-Tetrazolium chloride	50 mg
Distilled water	950 ml

After autoclave, add 50 ml of a 20% galactose soln.

Table 3. Composition of citrate buffer

Na citrate (M.W. 258.07)	0.1 M
Citric acid	10.5 g
NaOH	4.4 g
Distilled water	500 ml

Adjust to pH 5.5 with 2N NaOH

희석한다. 이기에 DMSO에 녹인, 농도 10mg/ml의 MNNG용액 100μl를 가하고 실온에서 30분 처리한 후 원심분리하여 동일한 완충용액으로 세척한 뒤 nutrient broth 10ml로 재현탁시킨다. 이를 37°C에서 9시간 배양시킨 후 그 0.1ml을 100μg/ml의 스트렙토마이신을 포함한 nutrient agar에 접종한다. 이러한 조건하에서 스트렙토마이신에 대한 내성 돌연변이가 일어난 균은 plate당 100개 정도이었다.

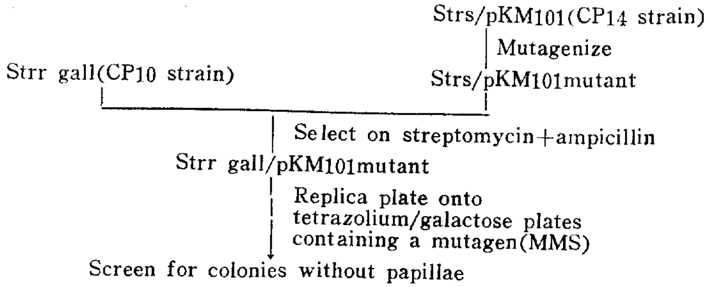

Fig. 1 Outine of procedure for isolation of mutants pf plasmid pKM101 deficient in their ability to enhance mutagenesis

이들을 2～3일간 배양한 뒤, pKM101의 유무에 따라 Gal⁺ 배지 돌연변이주의 갯수가 현저히 다른 CP10과 CP15를 돌연변이체를 선별하기 위한 균주로, MMS의 농도 10μl를 선별조건으로 채택하였다.

4) pKM101 돌연변이체의 분리

gal 1 돌연변이를 지닌 CP10주의 경우 야생형 pKM101을 가진 CP15주에 비해 지시배지에 있어서의 papillae의 갯수가 현저히 감소했으므로 이를 선택하여 사용하였다. 한편 pKM101을 가진 균주로서 스트렙토마이신에 대해 감수성을 가진 CP14주에 돌연변이원을 처리한 뒤, CP10과 접합시키는데 있어 donor로 사용하였다(Fig. 1).

가. MNNG에 의한 pKM101의 돌연변이 유발

Nutrient broth 1ml에 CP14주를 접종하여 하룻밤 배양한 뒤 citrate buffer (Table 3) 9ml에

나. CP10균주로의 전달

한편 돌연변이가 일어난 pKM101플라스미드를 CP10으로 전달시키기 위해서 위에서 얻은 배양액 0.1ml과 nutrient broth에서 배양한 CP10주 1ml을 nutrient broth 10ml에 섞어 37°C에서 30시간 정치배양한다. 이 혼합배양액을 plate당 100～200개의 콜로니가 생기도록 적당히 희석하여 Ampicillin (50μg/ml)과 Streptomycin (100μg/ml)이 첨가된 nutrient agar에 접종한다.

다. 지시배지에 있어서 돌연변이체의 식별

위에서 얻은 콜로니들에는 야생형 또는 변이가 일어난 여러 종류의 pKM101들이 CP10에 전달되어 있을 것이므로 그 중에서 후자를 선택적으로 분리하기 위하여 야생형과 변이형이 육안으로 식별될 수 있는 tetrazolium-galactose 배지를 사용하였다. 이 지시배지에서는 Gal⁻ 균주가

암적색으로 보이며 Gal^+복귀 돌연변이주는 백색의 papillae로 나타나므로 후자의 유발 빈도는 papillae의 갯수로 비교될 수 있다. 그리하여 위에서 콜로니가 형성된 plate를 master plate로 하고, Ampicillin 240μg과 10% MMS (DMSO 내의) 10μl를 함유하고 있는 top agar (0.8%) 2ml을 overlay한 tetrazolium-galactose 배지에 이를 복제 접종한 뒤 37°C에서 2~4일간 배양한 결과 pKM101변이체를 분리할 수 있었다.

2. 복귀돌연변이율의 측정 방법(Ames, *et al.*, 1975)

건열멸균된 시험관을 45°C의 항온수조에서 예열한 뒤 준비된 상면배지(top agar)를 2ml씩 나누어 담는다. 여기에 돌연변이원 MMS 또는 4-NQD 0.1ml을 더해 잘 섞고 24시간 배양한 균주 CP10-1~CP10-7의 균현탁액을 각각 0.1ml씩 가한 뒤 준비된 Vogel-Bonnel agar 배지 (Table 1)상에 붓고 굳기 전에 여러 방향으로 기울여 배지상에 고로 퍼지도록 한다. 접종한 배지는 agar가 굳은 뒤 37°C에서 48시간 배양한 후 콜로니의 갯수를 센다.

결과 및 고찰

1. pKM101 돌연변이체의 선별

야생형의 pKM101을 가진 Gal^- 돌연변이 주는 tetrazolium-galactore 배지에서 무수한 papillae를 가지는 반면 돌연변이가 일어난 pKM의 경우는 아주 없거나 있는 경우라도 몇개 되지않기 때문에 쉽게 구별이 가능하였다. MNNG를 처리한 단일회분으로부터 여러단계를 거쳐 얻어진 약 2500여 콜로니를 tetrazolium-galactose배지에 복제 접종하여 pKM101 변이체를 가진 것으로 보이는 7개의 clone을 master plate에서 분리하였다.

분리된 균주가 가진 플라스미드 돌연변이체를 Table 4에서 보는 바와 같이 각각 pSL21~pSL 27로 명명하였다. 이들은 pKM101의 존재에 의하여 그 돌연변이율이 크게 좌우되는 배지 즉 MMS가 첨가된 지시배지에서 분리하였으므로 MMS에 의한 돌연변이를 증가시키는 기능이 결여된 pKM101 돌연변이체도 생각된다. pKM101이 derepressed된 전달능을 가지므로(Walker, 1978)분리된 돌연변이체들이 같은 clone일 가능

Table 4. List of *Salmonella typhimurium* LT-2 strains used

Strain designation	Phenotype	Genotype Chrom./Plasmid	Derivation	Source
G46	His^-	hisG46		B.N. Ames
CP1	$His^-S_m^r$	hisG46 strA	spontaneous	G46
CP10	$His^-S_m^rGal^-$	hisG46strAgal1	UV	CP1
CP10-1		CP10/pSL21	conjugation	CP14 containing pKM 101 mutant/CP10
CP10-2		CP10/pSL22	〃	〃
CP10-3		CP10/pSL23	〃	〃
CP10-4		CP10/pSL24	〃	〃
CP10-5		CP10/pSL25	〃	〃
CP10-6		CP10/pSL26	〃	〃
CP10-7		CP10/pSL27	〃	〃
CP11	$His^-S_m^rGal^-$	hisG46strAga12	UV	CP1
CP12	〃	hisG46strAga13	UV	CP1
CP14	$His^-A_p^r$	hisG46/pKM101	conjugation	
CP15	$Apr His^-S_m^r Gal^-$	CP10/pKM101	〃	CP14/CP10
CP16	〃	CP12/pKM101	〃	CP14/CP12

성은 매우 작기는 하지만 변이된 표현형의 차이가 명확한 것에 한하여서만 서로 다른 clone임을 확신할 수 있을 것 같다.

한편 본 실험에서 채택한 분리 방법은 플라스미드의 DNA 손상복구 기능과 더불어 플라이드의 또 다른 유전자 기능, 예를 들어 항생제 내성이나 전달능, 복제가능 등이 함께 결여된 Pleiotropic 돌연변이체를 얻을 수 없다는 단점을 가지고 있다. 현재 pKM101이 가진 DNA 손상복구능력이 확실히 밝혀져 있지 않지만 플라스미드의 다른 유전자 기능과 중복되어 있을 가능성도 충분히 있기 때문이다. 실제로 G.C. Walker 1978a)는 DNA 손상복구능력이 결여된 pKM101 돌연변이체에서 전달능력이나 자연큐어링빈도에 이상이 생긴 것도 분리하고 있다. 따라서 중복기능을 가지고 있는 경우에는 그 기능이 결여된 돌연변이체를 분리할 수 있는 방법, 예를 들면 선별하기 위해 선택한 균주로의 전달과정을 생략하고 이 균주내에서 직접 돌연변이를 유발시킨다거나 온도감수성 돌연변이체를 얻는 방법을 검토하여야 할 것이다.

2. 숙주의 화학적 돌연변이원에 의한 돌연변이및 자연돌연변이에 미치는 pKM101 돌연변이체의 영향

분리된 7개의 돌연변이체에 대하여 히스티딘 영양요구성 돌연변이의 자연복귀돌연변이율 및 MMS, 4-NQO에 의한 복귀돌연변이율의 변화를 조사하였다. Table 5에서 보는 바와 같이 야생형 pKM101을 지닌 CP15에 비해 7개의 돌연변이체 모두 자연적인 복귀돌연변이율이 약 25~50%로 감소하고 있으나 pKM101을 가지지 않는 CP10주에 비하면 아직도 상당히 증가하고 있는 것을 볼 수 있다. 본래 MMS에 의한 돌연변이 능력이 결여된 돌연변이체로 분리하였으나 이것이 자연돌연변이율에도 영향을 미치고 있는 것으로 보이는 실험결과는 단일 cistron에 이 두 기능이 관련되어 있을 가능성을 시사한다. 특히 MMS처리시 복귀돌연변이에 미치는 영향이, 다른 pKM101 돌연변이체에 비해 현저히 낮은 pSL 21, 24, 27의 경우, 자연돌연변이율도 상대적으로 감소되고 있는 것이다. MMS나 4-NQO에 의한 돌연변이율의 변화는 대강 세가지 유형으로 나누어 볼 수 있을 것 같다. pSL21이나 pSL24의 경우 돌연변이율을 증가시키는 능력이 MMS에 대해서는 상당히 감소한 것 같으나 4-NQO에 대한 것은 미미하게 보인다. 그러나 pSL22나 pSL23의 경우는 그와 상반되는 특징을 보이고 있으며 pSL27의 경우는 양쪽 능력이 비슷한 정도로 결여된 것 같다. 한편 pSL25나 pSL26은 자연적인 복귀돌연변이율의 경우와는 달리 MMS나 4-NQO의 돌연변이율에 대한 효과는 야생형과 비슷한 것으로 보인다.

Table 5. Reversion of the *his* missense mutation in CP10 series by MMS and 4-NQO; Effects of pKM101 and pKM101 mutants

Strain	Spontaneous revertants/plate	Revertants/plate containing	
		0.5μg of MMS	10μg of 4-NQO
CP10	3	29	0
CP15	117	1088	500
CP10-1	32	430	536
CP10-2	46	1289	232
CP10-3	56	780	175
CP10-4	28	540	460
CP10-5	52	922	526
CP10-6	60	943	521
CP10-7	29	705	303

상기 실험결과는 염기치환(base-substitution)형의 돌연변이인 his G46에 대한 것이나 pKM101은 frame-shift형의 돌연변이에도 영향을 미친다고 알려져 있으므로 pKM101 돌연변이체에 대해서도 이와 같은 성질을 확인하여야 할 것이다. 또 숙주의 염색체 DNA상에 위치하는 *recA*나 *lexA*등, DNA손상복구에 관여하는 유전자와의 상호작용 및 pKM101의 유전자기능을 밝히기 위한 유전학적 방법으로서 pKM101 돌연변이체를 여러 종류의 DNA손상복구능 결여 돌연변이주에 전달시켜 자연돌연변이율, 화학적 돌연변이원 그리고 자외선 등에 대한 돌연변이율에 미치는 역할도 아울러 조사하여야 할 것이다.

3. pKM101 돌연변이체에 의한 항생제 내성의 변화

DNA손상복구능력이 결여된 pKM101돌연변이체 가운데 Table 6에서 보는 바와 같이 항생제 Ampicillin의 내성 범위가 변화된 것이 관찰되

었다. 내성능력이 증가된 것은 대부분의 경우 돌연변이체 분리시 항생제 내성균을 선택적으로 사료된다. 실험을 더 진행한 후에야 확신할 수 있는 결론을 얻을 수 있겠지만 현 상태에서는 돌연변이가 일어난 pKM101의 유전자가 DNA손상 복구기능 뿐만 아니라 다른 기능 즉 Ampicillin의 내성에 관여하는 유전자의 갯수에 영향을 미치는 기능과도 연관되어 있거나 또는 플라스미드에 빈번히 일어나며 독특한 DNA염기서열에 의해 수행되는 DNA재조합(Cohen, S., 1976)이 이 pKM101에 일어나 플라스미드의 기능에 영향을 미쳤을 가능성도 추측되고 있다. 혹은 플라스미드 유전자의 발현 조절기능에 변화가 생긴 결과일 수도 있다. 여하튼 실험적으로는 항생제 내성에 관여하는 플라스미드 유전자의 핵산 생화학적 연구나 산물의 효소학적 연구가 가능할 것으로 생각된다.

4. 기타 pKM101 돌연변이체의 유전자 기능

분리된 pKM101 돌연변이체를 지닌 숙주세포의 생장속도는 야생형과 별 다름 없는 것으로 보이나 pSL27의 경우 특정 조건에서 액체 배지상에 막을 형성하며 자라는 것으로 보아 pSL27에 일어난 돌연변이가 숙주세포의 세포분열에 영향을 미치는 플라스미드 유전자 기능과 연관되어 있을 가능성도 배제할 수는 없을 것이다.

Table 6. Resistance to the various concentration of ampicillin in *Salmonella typhimurium* containing pKM101 and pKM101 mutants

Strain \ μg/ml	0	4	12	40	120
CP15	++	++	++	+	−
CP10	++	−	−	−	−
CP10-1	++	++	++	++	++
CP10-2	++	++	++	++	++
CP10-3	++	++	++	++	++
CP10-4	++	++	++	++	++
CP10-5	++	++	++	+	±
CP10-6	++	++	++	+	−
CP10-7	++	++	++	++	++

그밖에 pKM101 돌연변이체에 대해 보고된 성질들, 예를 들어 자외선의 치사율 및 파아지의 reactivation에 미치는 영향이나 자발적인 큐어링 빈도, 전달능(Walker, 1978b), ATP-indepe-ndent single and double-stranded endonuclease의 존재(Lackey, *et al.*, 1977), prophage induction, Hfr conjugation에 의한 DNA재조합에 미치는 영향(Hudson, and Vinograd, 1967)등을 조사하는 것이 남겨진 연구과제일 것이다.

적 요

플라스미드 pKM101을 가지고 있는 *Salmonella typhimurium*에 MNNG를 처리하여 숙주세포의 돌연변이 유발기능에 관련된 변이체 7주를 베트라졸리움이 포함된 지시배지를 사용하여 분리한 뒤 그 특성을 조사하였다.

이들은 MMS나 4-NQO로써 숙주에 돌연변이를 유발시켰을 때 야생형 pKM101보다 낮은 정도로 돌연변이율을 증가시켰다. 뿐만 아니라 이들은 pKM101이 지닌 숙주의 자연적 돌연변이율의 증가기능도 아울러 결여되고 있음이 관찰되었다.

인 용 문 헌

1. Ames, B.N., J. McCann, and E. Yamasaki, 1975. *Mutation Res.* **31** : 347−364.
2. Drabble, W.T. and B.A.D. Stocker, 1968. *J. Gen. Microbiol.* **53**, 109−123.
3. Cohen, S., 1976 *Nature* **263**, 731−738.
4. Hudson, B. and J. Vinograd, 1967, *Nature* **216**, 647.
5. Lackey, D.L. *et al.*, 1977., *J. Bacteriol.* **131**, 538.
6. McCann, J. *et al.*, 1975., *Proc. Nat. Acad. Sci*, U.S.A. **72**, 979∼983.
7. Miller, J.H. 1979. Experiments in Molecular Genetics (ed. J.H. Miller) p.76. Cold Spring Harbor Lab.
8. Mortelmans, K.E., 1975. Ph. D. Dessertation Stanford University
9. Mortelmans, K.E. and B.A.D. Stocker, 1976. *J. Bacteriol.* **123**, 271−282.
10. Satta, G. and A.B. Pardee, 1978. *J. Bacterial.* **133**, 1492.
11. Vogel, H.J. and D.M. Bonner, 1956. *J. Biol Chem.* **213**, 97.
12. Walch, N.S. and B.A.D. Stocker, 1979. *J. Bacteriol.* **37**, 830∼838.
13. Walker. G.C., 1978a. *J. Bacterial.* **133**, 1203−1211.
14. Walker, G.C. 1978b. *J. Gen. Microbiol.* **108**, 321−323.