

RP4::Mu cts의 *E. coli*로 부터 *Rhizobium leguminosarum*으로의 전달

이인렬 · 허연주 · 이영록

고려대학교 생물학과

Transfer of RP4::Mu cts from *E. coli* to *Rhizobium leguminosarum*

Lee, In-Youl, Youn Ju-Huh and Yung-Nok Lee

Department of Biology Korea University

In order to use for recipient strains of RP4::Mu cts, 5 strains of *Rhizobium* were selected among 32 strains, which were isolated and identified in this study. Hybrid plasmid RP4::Mu cts, which is temperature sensitive and confers resistance to ampicillin, kanamycin and tetracycline was transferred by conjugation from *E. coli* to other strains of *E. coli* and the symbiotic nitrogen fixer, *Rhizobium leguminosarum*. Transfer frequencies of RP4::Mu cts plasmid from *E. coli* to *Rhizobium* were about $10^{-8} - 10^{-7}$ in LB agar and YMA media. The transconjugants were confirmed by demonstrating that the drug-resistant and temperature-sensitive clones isolated were drug-resistant and temperature-sensitive clones isolated were capable of releasing phage and forming plaques. The plaque-forming units of transconjugants were about 10^2 to 10^3 . Stability test of RP4::Mu cts in *Rhizobium* represented that most of the transconjugants had drug resistance and produce phage Mu cts.

박테리오파아지에 의해서 *E. coli*의 돌연변이가 유발된다는 것이 1963년 Talor에 의해 처음 보고된 이래, 박테리오파아지의 연구가 활발히 전개되고 있으며, 그 중에서 파아지 Mu는 transposon처럼 작용하여 아주 중요한 유전학적 도구로 활용되고 있다. Talor(1963); Bukhari와 Zipser(1972) 등은 파아지 Mu가 그 숙주 DNA의 여러 비특정 부위에 자유롭게 삽입된다는 연구결과를 보고하였다. 이러한 Mu의 삽입은 용균 회로를 거치면서 숙주 DNA의 불활성화, 역위, 전위, 결실 등을 일으켜 돌연변이를 유발시킨다(Boram and Abelson, 1971; Bukhari and Zipser, 1972; Faelen and Toussaint, 1980; Howe and Bade, 1975). 파아지 Mu는 용균을 일으켜서 숙주의 DNA를 다른 세균으로 이동시킬 수 있으므로 in vivo 유전공학에서 아주 유용한 도구로 쓰일 수 있으나(Faelen and

Toussaint, 1976) 그 숙주 영역은 *E. coli*, *Shigella dysenteriae*, *Citrobacter freundii* 및 *Klebsiella pneumoniae* 등 몇몇 상내 세균과에만 국한되어 있다(De Graff et al., 1973; Rao, 1976).

한편, RP4는 그람 음성균에서 넓은 숙주 영역을 가지고 있을 뿐만 아니라, 선별 지표를 가지는 접합성 플라스미드이다(Datta and Hedges; 1972). Datta et al., (1971)는 *Pseudomonas aeruginosa* S 8 에서 이 R인자를 처음으로 분리하였고, Dunican과 Tierney(1973)는 이를 *Pseudomonas*에서 *Rhizobium*으로, 또 O' Gara와 Dunican(1973)은 *E. coli*에서 *Rhizobium*으로 형질전환시킨바 있다. Beringer(1974)는 R인자가 *R. leguminosarum*에서 접합에 의해 전달되는 것을 보고하였고, Dunican과 Tierney(1974)는 R인자를 이용하여 질소고정 유전자를

*R. trifolii*에서 *K. aerogenes*로 옮겨 발현 시킨 바 있다. 그러므로 Beacham과 Garrett (1981); Dénarié *et al.*, (1976); Coplin (1979) 등은 RP4::Mu와 RK2::Mu 등의 hybrid plasmid를 제조하여 파아지 Mu를 여러 그람 음성균으로 도입시켜 Mu의 제한된 숙주 영역을 넓힐 수 있었다. R인자에 Mu가 삽입된 RP4::Mu cts는 42°C에서 용균을 일으키는 온도 감수성 돌연변이주이고, 암피실린과 카나마이신, 테트라사이클린 등에 강한 내성을 나타내며 숙주 영역이 넓다. 이러한 플라스미드는 숙주세포의 염색체에 통합되어 Hfr 형태를 하거나 R' 플라스미드 형성을 증진시켜서 염색체 유전자를 다른 수용 세포로 전달할 수 있다. Boucher *et al.*, (1977); Dénarié *et al.*, (1977); Coplin (1979) 등은 여러가지 R인자를 이용하여 Mu를 *E. coli*에서 *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Rhizobium* 등 다른 그람 음성균으로 이동시켰고, Gijsegem and Toussaint (1982) 등은 접합에 의해 RP4::Mu cts를 *Salmonella typhimurium*과 *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* 등에 전달한 다음, 이들을 다시 *E. coli*와 접합시켜 *E. coli*에서 R' 세포를 높은 빈도로 발현시켰다. 또한 Murooka *et al.*, (1981)은 RP4::Mu cts를 백

터로 사용하여 *E. coli*와 *Klebsiella aerogenes* 사이에서 arylsulfatase 유전자를 전달시켰고, Takizawa (1983)는 *Klebsiella aerogenes*와 *E. coli* 사이에서 pullulanase 유전자등을 옮겨 유전자 재조합체를 만들었다.

본 연구에서는 *Rhizobium*의 질소고정 유전자를 *E. coli*나 *Klebsiella*의 돌연변이주등 질소고정능이 결여된 다른 균주에 전달시키기 위한 기초 작업으로서, 우리나라 자연 환경으로부터 분리 동정한 *Rhizobium* 균주들 중에서 항생제 내성 돌연변이주를 선별한 후 접합에 의해 RP4::Mu cts를 *E. coli*로부터 이들 *Rhizobium* 균주들에 전달시켜 이를 확인하고 새로운 숙주 내에서의 RP4::Mu cts의 안정성을 조사한 결과를 보고한다.

재료 및 방법

사용 균주와 파아지

E. coli 균주들은 동경대학의 Uosumi 교수로부터 분양받은 균주들이고, *Rhizobium* 균주들은 본 연구실에서 분리 동정한 균주들중에서 그들의 항생제 내성에 따라 선별한 균주들이다 (Table 1).

사용배지

*E. coli*는 L Broth와 M9 최소배지를 사용하였고, *Rhizobium*은 L Broth와 YMA배지 (Vincent, 1970)를 사용하였다. 보충배지로는 RP4 플라스미드를 확인하기 위한 LBAKT배지와 Mu cts를 확인하기 위한 LBCM 배지를 사용하였고, Penassay 한천배지는 세균의 접합과정에 사용하였다.

항생제 내성 균주의 선별

항생제 내성 돌연변이주는 각 균주들을 L-Broth에서 대수기까지 배양한 다음, 그 0.1ml을 취하여 암피실린, 카나마이신, 테트라사이클린, 클로람페니콜, 리팜피신 등 여러가지 항생제를 각각 함유한 LB 한천배지 위에 접종하여 30°C에서 48시간 배양하였다. 여기서 생성된 콜로니를 순수 분리하여 수차례 계대 배양한 후, 생존한 균주들을 선별하였다. 선별한 균주들은 그 항생제에 대한 내성을 유전적 지표로하여 접합

Table 1. List of bacterial strains and their characteristics

Strains	Markers ¹⁾
<i>Escherichia coli</i>	
JC 5466	trp ⁻ , his ⁻ , recA 56 Ap, Tc, Km (RP4::Mu cts 62)
K-12	wild type
CSH 1	thi ⁻ , bio ⁻ , trp ⁻ ,
<i>Rhizobium</i>	
<i>R. trifolii</i> K6	Cm, Sm, Gm
<i>Rhizobium</i> K10	Cm, Sm, Gm
<i>R. leguminosarum</i> K12	Cm
<i>R. japonicum</i> K15	Cm
<i>R. trifolii</i> K20	Cm

¹⁾ Ap, Ampicillin resistance; Tc, Tetracycline resistance; Km, Kanamycin resistance; Cm, Chloramphenicol resistance.

Table 2. Susceptibility of the isolates for various antibiotics

Antibiotics ($\mu\text{g/ml}$) Strains	Ap		Tc			Km			Sm			Cm			Gm		Rif	
	50	100	20	50	100	10	20	50	20	50	75	20	50	100	20	30	20	30
<i>E. coli</i> JC 5466	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> CSH 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> K-12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>R. japonicum</i>	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	15	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+
	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>R. leguminosarum</i>	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	12	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
	22	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	23	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>R. phaseoli</i>	26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>R. trifolii</i>	6	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	20	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>R. meliloti</i>	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
unidentified fast growing group	1	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
	2	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	4	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	10	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	13	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
unidentified slow growing group	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

1) Ap, Ampicillin resistance; Tc, Tetracycline resistance; Km, Kanamycin resistance; Sm, Streptomycin resistance; Cm, Chloramphenicol resistance; Gm, Gentamycin resistance; Rif, Rifampicin resistance

실험에서 수용세포로 사용하였다.

세균의 접합

세균의 접합은 De Graff *et al.*, (1973)의 방법으로 다음과 같이 하였다. 공여세포와 수용세포를 각각 대수기까지 배양하여 동량을 혼합한 후, membrane filter (0.45 μm pore size, 25mm diameter, Gelman Science, INC.)로 여과하였다. 여과한 membrane은 Penassay 한천배지 위에 놓아둔 후 30°C에서 5시간 방치하고, 1ml의 식염수에 현탁시켜서 적당히 희석한 후 선택배지 위에 접종하였다. 공여세포는 요구성 영양분을 제거하여 역선택하였고, 대조 실험으로는 공여세포와 수용세포 각각을 이와같은 조건으로 여과한 후 선택배지에 접종하여 배양하였을 때 전혀 자라지 않는 것을 확인하였다. 공여세포와 수용세포, 접합체의 숫자는 3개의 plate를 평균해서 얻었으며, 공여세포당의 전달빈도를 산출하였다.

열 유발에 의한 파이지 Mu의 생성

파이지 lysate의 조제; Razzaki와 Bukhari (1975); Boucher *et al.*, (1977)의 방법을 약간 변형하여 Mu cts lysates를 조제하였다. 세균을 LBAKT배지에 접종하여 30°C에서 하룻밤 배양한 후 LBCM배지에 1:100으로 희석하여 세포밀도가 10^8 cell/ml 될때까지 진탕 배양한 다음, 43°C에서 30분간 아주 빠르게 진탕 배양한 후, 37°C에서 진탕배양하여 용균현상을 관찰하였다. 용균 현상이 일어난 배양액 10ml에 클로로포름 1ml을 첨가한 후, 1분간 교반시켜 실온에 15분간 방치한 다음, 5,000g에서 10분간 원심분리하여 세포 조각을 제거하였다. 다시 상등액을 5,000g에서 20분간 원심분리하여 파이지는 클로로포름 몇 방울을 떨어뜨린 후 4°C에서 보관하였다.

파이지 Mu의 적정; 파이지 Mu의 적정은 Murooka *et al.*, (1981)의 방법으로 다음과 같이 하였다. Indicator 균주로 *E. coli* C 600을 LBCM배지에 1 콜로니 접종하여 하룻밤 배양한 후, 적당히 희석한 lysate와 1:2로 혼합하여 30°C에서 30분간 배양하여 파이지가 박테리아에 흡수되게 하였다. 이 혼합액 0.1ml에 top 한천배지 3ml을 첨가한 후 LBC한천배지에 부어

완전히 굳힌 후 41°C에서 16시간 배양하였다.

접합체에서의 RP4::Mu cts의 안정성 조사

각 접합체들을 LB한천배지에 옮겨서 15°C에서 3주간 방치한 후, RP4::Mu cts의 안정성을 조사하였다. 각 콜로니들을 L Broth에 접종하여 진탕배양한 후, LB한천배지 상에서 분리한 콜로니를 2개의 LB한천배지와 LBAKT 한천배지 상에 각각 복제하고, LB한천배지 1개와 LBAKT 한천배지는 30°C에서, 다른 1개의 LB한천배지는 41°C에서 각각 배양하여, 이들의 생존여부로 접합체에 있어서 RP4::Mu cts의 안정성을 조사하였다.

결과 및 고찰

항생제 내성 균주의 선별

Table 2에서 보는 바와 같이 공여세포인 *E. coli* JC5466은 암피실린(100 $\mu\text{g/ml}$), 카나마이신(50 $\mu\text{g/ml}$), 테트라사이클린(100 $\mu\text{g/ml}$) 등에 강한 내성을 나타내었고, *E. coli* CSH 1 및 *E. coli* K12는 조사한 모든 항생제에 대해 전혀 내성을 가지고 있지 아니하였다. 그러나 분리한 *Rhizobium* 균주들은 항생제에 대한 강한 내성을 가지고 있는 것이 상당수 있었다. 균주번호 1, 2, 4, 9 등은 테트라사이클린에 대한 내성이 공여세포와 거의 같은 수준이었고, 균주번호 6, 10, 12, 15, 20 등은 조금 낮은 내성을 나타내었으나, 이들 9 균주는 *E. coli* JC5466 과는 달리 클로람페니콜(50 $\mu\text{g/ml}$)에 강한 내성을 나타내었다. 본 실험에서는 접합 실험에 사용하고 저 테트라사이클린과 카나마이신에는 공여세포보다 예민하고, 클로람페니콜과 젠타 마이신에는 강한 내성을 갖는 5 균주의 *Rhizobium* (균주번호 6, 10, 12, 15, 20)을 선별하였다.

RP4::Mu cts의 *Rhizobium*으로의 도입

*E. coli*에 들어있는 RP4::Mu cts를 접합에 의해 다른 균주의 *E. coli*에 전달한 결과를 Table 3에 표시하였다. 공여세포에서 야생균주인 *E. coli* K12 및 *E. coli* CSH 1으로 RP4::Mu cts가 전달되는 빈도는 4.7×10^{-6} 및 4.4×10^{-4} 을 나타내었다. Table 4에서와 같이 *E. coli*로부터 과가 다른 *Rhizobium leguminosarum*

Table 3. Transfer of RP4::Mu cts in the crosses between *E. coli* strains.

Donor ²⁾ strains	Recipient ³⁾ strains	Selected ¹⁾ marker	Transfer frequency
<i>E. coli</i> JC 5466	<i>E. coli</i> K-12 (wild type)	Ap, Tc, Km	4.7×10^{-6}
(RP4::Mu cts 62)	<i>E. coli</i> CSH 1	Ap, Tc, Km	4.4×10^{-4}

¹⁾ The media used were M9 minimal media.

^{2), 3)} About 5×10^9 donor strain bacteria and recipient bacteria per ml were used and performed on membrane filters for 5hrs at 30°C.

Table 4. Transfer of RP4::Mu cts in the crosses between *E. coli* and *Rhizobium*.

Donor strains	Recipient strains	Selected marker	Transfer frequency in LB agar	Transfer frequency in YMA
<i>E. coli</i>	<i>R. trifolii</i> K6	Ap Tc Km Cm	8.8×10^{-7}	-
JC 5466	<i>Rhizobium</i> K10	Ap Tc Km Cm	5.4×10^{-7}	1.2×10^{-7}
(RP4::Mu cts)	<i>R. leguminosarum</i> K12	Ap Tc Km Cm	5.8×10^{-7}	1.2×10^{-7}
	<i>R. japonicum</i> K15	Ap Tc Km Cm	6.6×10^{-8}	1.5×10^{-7}
	<i>R. trifolii</i> K20	Ap Tc Km Cm	7.4×10^{-7}	1.1×10^{-7}

Table 5. Comparison of Transfer frequency with and without heat treatment.

Donor strains	Recipient strains	Transfer frequency without heat treatment	Transfer frequency with heat treatment
<i>E. coli</i> JC 5466	<i>Rhizobium</i> K10	5.4×10^{-7}	3.2×10^{-5}
	<i>R. leguminosarum</i> K12	5.8×10^{-7}	1.3×10^{-5}
(RP4::Mu cts)	<i>R. japonicum</i> K15	6.6×10^{-8}	2.0×10^{-6}
	<i>R. trifolii</i> K20	7.4×10^{-7}	4.3×10^{-7}

Table 6. Transfer frequencies RP4::Mu cts and RP4 in the crosses between *E. coli* and *Rhizobium*.

Donor strains	Recipient strains	Selected marker	Transfer frequency of RP4::Mu cts	Transfer frequency of RP4
<i>E. coli</i> JC 5466	<i>Rhizobium</i> K10	Ap Tc Km Cm	5.4×10^{-7}	3.2×10^{-5}
(RP4::Mu cts)	<i>R. leguminosarum</i> K12	Ap Tc Km Cm	5.8×10^{-7}	1.3×10^{-5}
<i>E. coli</i> C600 (RP4)	<i>R. japonicum</i> K15	Ap Tc Km Cm	6.6×10^{-8}	2.1×10^{-5}
	<i>R. trifolii</i> K20	Ap Tc Km Cm	7.4×10^{-7}	4.3×10^{-6}

으로의 전달빈도는 5.8×10^{-7} 이었으며, *R. japonicum*, *R. trifolii* 등에서도 $10^{-7} \sim 10^{-8}$ 의 낮은 빈도를 나타내었는데 이는 Murooka *et al.*, (1981)의 결과와 비슷하다. 또한 과거 다른 세균간의 접합실험에 영향을 미치는 요인으로 접합시간, 온도 및 배지의 영향등을 조사한 결과 접합시간은 5시간이 가장 적합하였고, 온도는 30°C 나 37°C에서 별차이가 없었다. 그러나 서로

다른 배지상에서의 접합체 생성율을 비교하여 보면 YMA 한천배지에서는 LB 한천배지에서 보다는 다소 높았으나 거의 비슷한 빈도를 나타내었다 (Table 4). 한편 접합과정 바로 직전에 수용세포를 55°C에서 6분간 열처리하면 그 빈도는 $10^{-5} \sim 10^{-7}$ 으로 증가하였다 (Table 5). 이는 열처리로 인하여 수용세포의 restriction system이 감소되어 $10^1 \sim 10^2$ 배의 증가율을 나

Table 7. *Mu* phage yield by thermal induction of *E. coli* and *Rhizobium* carrying RP4::Mu

Bacterial strain	Plaque-forming units/ml
<i>E. coli</i> JC5466	2.3×10^9
<i>Rhizobium</i> K10	7.5×10^3
<i>R. leguminosarum</i> K12	9.0×10^2
<i>R. japonicum</i> K15	3.1×10^3
<i>R. trifolii</i> K20	2.4×10^3

Table 8. Stability of RP4::Mu cts in *Rhizobium*.¹⁾

Strains	No. of colonies			Mu cts
	Ap ⁺	Tc ⁺	Km ⁺	
<i>Rhizobium</i> K10 (RP4::Mu cts)	50	50	50	50
<i>R. leguminosarum</i> K12 (RP4::Mu cts)	49	49	49	49
<i>R. japonicum</i> K15 (RP4::Mu cts)	50	50	50	50
<i>R. trifolii</i> K20 (RP4::Mu cts)	50	50	50	50

¹⁾ The stability of lysogens of various *Rhizobium* stocked in LB agar for 3-4 weeks at 15°C. Single colonies isolated on LB plates were replicated onto LB plate and LB plates containing Ap, Km, Tc. LB plate and LBACT plates are incubated at 30°C and 41°C, respectively.

타내는 것으로 추측된다. 또한 RP4::Mu cts와 RP4 플라스미드의 전달빈도를 비교하여 보

면 RP4의 전달빈도는 $10^{-5} \sim 10^{-6}$ 으로 RP4::Mu cts의 전달빈도 $10^{-7} \sim 10^{-8}$ 보다는 약간 높은 값을 나타내었다 (Table 6).

접합체가 *E. coli*가 아닌 *Rhizobium* 이라는 것은 접합체를 시험관의 LB 한천배지에 백균침으로 깊숙히 접종하여 혐기성상태하에서의 생장이 없음을 보고 *Rhizobium* R⁺ 접합체임을 확인하였다. 또한 R인자를 받은 *Rhizobium* 접합체들은 대체로 작은 콜로니를 형성하고 있었다.

접합체들에 의한 파이지 Mu의 생산

접합체들은 항생제에 대한 내성과 플라크를 형성하는 온도감수성콜로니들로 RP4::Mu cts의 전달을 확인할 수 있다. 파이지 Mu cts의 용균은 억제유전자 C에 돌연변이가 일어났기 때문에 온도에 의해 유도할 수 있다. 접합체들을 열유발시켜 p. f. u. 를 조사한 결과 *E. coli*는 10^9 *Rhizobium*은 $10^2 \sim 10^3$ 이었다 (Table 7).

*Rhizobium*에 도입된 RP4::Mu cts의 안정성

Table 8에서와 같이 *Rhizobium*에 도입된 RP4::Mu cts는 4주 후에도 원래의 항생제 내성과 Mu cts를 거의 유지하고 있었다. 따라서 이들 *Rhizobium* 균주를 이용하여 Mu cts를 부분 유발시켜 RP4::Mu cts를 접합체의 염색체에 통합시키고, 이 Mu가 삽입된 환상의 DNA로부터 *Rhizobium*의 질소고정 유전자를 *E. coli*나 질소고정능을 상실한 *Klebsiella*의 돌연변이주등 질소고정능이 없는 다른 세균에 전달, 발현시킬 수 있을 것이라고 생각된다.

摘 要

우리나라 자연환경으로부터 분리한 *Rhizobium* 32균주로부터 카나마이신, 테트라사이클린 등에는 예민하고, 콜로람페니콜, 젠타마이신 등에는 강한 내성을 나타내는 5균주를 선별하고, 이를 수용체포로하여 RP4::Mu cts를 접합에 의해 *E. coli*로부터 *Rhizobium leguminosarum*으로 전달시켰다. 그 전달빈도는 5.8×10^{-7} 의 빈도를 나타내었다. 접합체에서의 RP4::Mu cts 플라스미드의 존재는 암피실린과 카나마이신, 테트라사이클린에 대한 내성과 42°C에서의 플라크 형성으로 확인하였다. 접합체들은 $10^2 \sim 10^3$ 단위로 플라크를 형성하였고, 안정성을 조사한 결과 4주 후에도 대부분이 RP4::Mu cts의 성질을 유지하고 있는 것으로 나타났다.

REFERENCES

1. Beacham, I.R., and S. Garrett. 1981. Transfer of RP4::Mu to *Salmonella typhimurium*. *J. Gen. Microbiol.* 124:225-228.
2. Beringer, J.E. 1974. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* 84:188-198.

3. Boram, W., and J. Abelson. 1971. Bacteriophage Mu integration: On the mechanism of Mu-induced mutations. *J. Mol. Biol.* **62**: 171-178.
4. Boucher, C., B. Bergeron, M.B. de Bertalmio, and J. Denarie. 1977. Introduction of bacteriophage Mu into *Pseudomonas solanacearum* and *Rhizobium meliloti* using the R factor RP4. *J. Gen. Microbiol.* **98**: 253-263.
5. Bukhari, A.I., and D. Zipser. 1972. Random insertion of Mu-1 DNA within a single gene. *Nature (London) New Biol.* **236**:240-243.
6. Coplin, D.L. 1979. Introduction to bacteriophage Mu into *Erwinia stewartii* by use of an RK2::Mu hybrid plasmid. *J. Gen. Microbiol.* **113**:181-184.
7. Datta, N., R.W. Hedges, E.J. Shaw, R.B. Sykes, and M.H. Richmond. 1971. Properties of an R factor from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **108**:1244-1249
8. Datta, N., and R.W. Hedges. 1972. Host ranges of R factors. *J. Gen. Microbiol.* **70**: 453-460.
9. Denarie, J., C. Rosenberg, B. Bergeron, C. Boucher, M. Michel, and M. Barate de Bertalmio. 1976. RP4::Mu plasmids: obtention, transfer by conjugation into *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas solanacearum*, and *R. meliloti* and evaluation of potentials as a tool for in vivo genetic engineering of gram negative bacteria. In DNA insertion elements plasmid, and episomes A.I. Bukhari, J. Shaprio, and S. Adhya (ed.), New York: Cold Spring Habor Laboratory.
10. Denarie, J., C. Rosenberg, B. Bergeron, C. Boucher, M. Michel, and M. Barate de Bertalmio. 1977. Potential of RP4::Mu plasmids for in vivo genetic engineering of gram-negative bacteria. In DNA insertion elements, plasmid, and episomes. A.I. Bukhari, J.A. Shapirio, and S.L. Adhya (ed.), 507-520. New York; Cold spring Harbor Laboratory.
11. Dunican, L.K., and A.B., Tierney. 1973. Transformation of an R factor from *Pseudomonas aeruginosa* into *Rhizobium trifolii*. *Mol. Gen. Genet.* **126**:187-190.
12. Dunican, L.K., and A.B. Tierney. 1974. Genetic transfer of nitrogen fixation from *Rhizobium trifolii* to *Klebsiella aerogens*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **57**:62-72.
13. Faelen, M., and A. Taussaint. 1980. Inversion induced by temperate Bacteriophage Mu-1 in the chromosome of *Escherichia coli* K12. *J. Bacteriol* **142**:391-399.
14. Faelen, M., and S. Toussaint. 1976. Bacteriophage Mu-1: a tool to transpose and localize bacterial genes. *J. Mol. Biol.* **104**: 525-539.
15. Gijsegem, F. and S. Toussaint. 1982. Chromosome transfer and R-prime formation by an RP4::Mini-Mu derivative in *E. coli*, *S. typhimurium*, *K. pneumonia*, and *P. mirabilis*. *Plasmid.* **7**:30-44.
16. Graff, J. de P.C. Kreuning, and P. van de Putte. 1973. Host controlled restriction and modification of bacteriophage Mu and Mu-prompted chromosome mobilization in *Citrobacter freundii*. *Mol. and Gen. Genet.* **123**: 283-288.
17. Howe, M.M., and E.G. Bade. 1975. Molecular Biology of bacteriophage Mu. *Science* **190**:624-632.
18. Murooka, Y., N. Takizawa, and T. Harada. 1981. Introduction of bacteriophage Mu into bacteria of various genera and intergeneric gene transfer by RP4::Mu. *J. Bacteriol.* **145**: 358-368.
19. O'Gara, F. and L.K. Dunican. 1937. Transformation and physical properties of R factor RP4 transferred from *E. coli* to *Rhizobium trifolii*. *J. Bacteriol.* **116**:1177-1180.
20. O'Gara, F. and L.K. Dunican. 1937. Transformation and physical properties of R factor RP4 transferred from *E. coli* to *Rhizobium trifolii*. *J. Bacteriol.* **116**:1177-1180.
21. Rao, R.N. 1976. Mutational alternation of a nitrogen-fixing bacterium to sensitivity to infection by bacteriophage Mu: isolation of nif mutation of *Klebsiella pneumoniae* M5a1 induced by Mu. *J. Bacteriol.* **128**: 356-362.

22. Razzaki, T., and A.I. Bukhari. 1975. Events following prophage Mu induction. *J. Bacteriol.* **122**:437-442.
23. Takizawa, N. 1983. Intergeneric transfer of pullulanase gene between *Klebsiella aerogenes* and *E. coli* by RP4:Mu. unpublished.
24. Taylor, A.I. 1963. Bacteriophage induced mutation in *E. coli*. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **50**:1043-1051.
25. Vincent, J.M. 1970. A manual for the practical study of root nodule bacteria. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
26. Zeldis, H.B., A.I. Bukhari, and D. Zipser. 1973. Orientation of prophage Mu. *Virology*, **55**:289-294.

(Received April 1, 1985)