

R-plasmid pSBK 203의 *ori* 부위 재조합 및 이를 이용한 *E. coli*와 *B. subtilis* 간의 Shuttle-Vector 구성

권동현·*석종성·변우현

강원대학교 미생물학과

*서울대학교 병원 임상검사과

Cloning of *ori* region of R-plasmid pSBK203 and construction of new shuttle-vectors for *E. coli* & *B. subtilis* using cloned fragments

Kwon, Dong Hyeon, *Jong Sung Suk, and Woo-Hyeon Byeon

Dept. of microbiology, College of Natural Sciences, Kang Weon National University

*Laboratory of Clinical Pathology, Seoul National University Hospital

ABSTRACT: The replication region of the chloramphenicol resistance plasmid pSBK203 of *Staphylococcus aureus* was cloned using pBR322 and pBD9 as vectors.

Cloned replication region and chloramphenicol resistance gene were recombined to pBR322. The re-constructed vector behaved as a shuttle vector for *E. coli* and *B. subtilis*.

KEY WORDS □ replication region, cloning, *S. aureus*, shuttle vector

유전자 조작법에 의한 분자유전학적 연구는 대부분 *E. coli*를 숙주균주로 사용하여 왔지만 (Cohen 등, 1973), Ehrlich(1977)에 의하여 *Staphylococcus aureus*로 부터 분리된 항생물질 저항성을 갖는 plasmid가 *Bacillus subtilis* 내에서 복제될 수 있다는 보고 이후 *B. subtilis*를 숙주로 한 분자유전학적 연구도 여러 실험실에서 활발히 진행되어 왔다(Gryczan 등, 1978; Kiggins 등, 1978; Niaudet 등, 1979; Gryczan 등, 1980). 특히 *S. aureus*에서 분리한 chloramphenicol (Cm) 저항성을 갖는 plasmid인 pC194, erythromycin(Em) 저항성을 갖는 plasmid인 pE194, kanamycin(Km) 저항성을 갖는 plasmid인 pUB110 등이 가장 잘 알려져 있으며 이 중 pC194 및 pE194는 그 염기서열이 완전히 밝혀져 pUB110과 함께 그람양성균내에서의 유전자 조작실험을 위한 vector로 널리 쓰여지고 있다(Horinouchi 등, 1982; Gryczan 등, 1978). 그러나 현재까지

보고되어진 *B. subtilis*의 host-vector system이 갖는 몇가지 불리한 점, 즉 몇몇 경우를 제외하고는 숙주세포내에서 plasmid가 불안정할 뿐만 아니라 plasmid내로 외부 DNA가 cloning 되었다고 할지라도 숙주세포내에서 안정성을 갖는 경우가 드물며(Gryczan 등, 1978; Clewell 등, 1979; Uhlen 등, 1981; Kleft 등, 1983; Ostroff 등, 1984), 또한 *B. subtilis*의 competent cell내로 재조합 plasmid DNA의 형질전환 빈도가 *E. coli*의 경우와 비교하였을 때 현저히 낮다는 점 등 (Cohen 등, 1972) 때문에 여러 실험실에서 *E. coli*와 *B. subtilis*내에서 모두 복제가 가능한 shuttle-vector의 개발이 이루어지고 있다(Hiromi 등, 1984; Mart 등, 1984; Ehrlich, 1978). 특히 Ehrlich(1978)에 의하여 *B. subtilis*내에서만 복제가 가능한 pC194와 *E. coli* vector인 pBR322를 결합하여 *B. subtilis* 및 *E. coli* 모두에서 복제하며 각각 Cm^r, Cm^rAp^r의 표식인자를 갖

본 연구는 1986년도 문교부 기초과학 육성연구비의 지원에 의한 것임

는 shuttle vector가 만들어졌으며 또한 Primrose 등(1981)은 이때 만들어진 shuttle vector를 사용하여 *B. subtilis* 내에서 plasmid 복제 개시 기능을 갖는 부위(ori)가 결실된 새로운 plasmid를 분리하였고 이를 그림양성균으로부터 유래된 또 다른 plasmid의 복제 개시 기능을 갖는 부위의 cloning을 위한 도구로 사용하였다(Niaudet 등, 1979).

Plasmid 복제 기능을 갖는 DNA 절편의 확인 및 cloning에 관한 연구는 *E. coli* plasmid인 F'lac과 R6-5를 대상으로 한 Timmis 등(1975)의 연구와 *B. subtilis* plasmid인 pC194, pE194 (Horinouchi 등, 1982) 상에 존재하는 plasmid 복제 개시 부위의 cloning 등이 있다. *E. coli* plasmid인 pSC101 상의 복제 개시 인자를 포함하는 *Hpa* II 절편을 pC194 상의 *Hpa* II 단일절편상에 결합시켜 만든 재조합 DNA가 *E. coli* 내에서만 복제 가능함을 보임으로써 pC194 상의 *Hpa* II 위치에 pC194의 복제 개시의 결정적인 요인이 존재함을 보여주었고 또한 pC194의 *Hpa* II 단일절편에 pE194의 *Taq* I 절편을 삽입시켜 *B. subtilis* 내에서 복제 가능한 재조합 plasmid를 만듦으로써 pE194 상의 복제 개시 부위를 결정하였다.

본 논문에서는 Byeon 등(1985)에 의하여 *S.*

*aureus*에서 분리된 유발성 Cm저항성 인자를 갖는 plasmid pSBK203(3.7 kb)을 대상으로 하여 plasmid 복제 개시 부위를 cloning하였으며 나아가 이를 이용한 *E. coli* 및 *B. subtilis* 내에서 모두 복제 가능한 shuttle vector의 구성을 시도하였다.

재료 및 방법

균주와 plasmid

실험에 사용한 균주 및 plasmid는 Table 1에 나타난 바와 같다.

제한효소 및 시약

재조합 DNA 구성과 이들의 확인을 위한 제한효소 T-4 DNA ligase 등은 New England Bio. Labs.에서 구입하여 사용하였고 calf intestinal alkaline phosphatase(CIP)는 Pharmacia Molecular Biology Division에서 구입하였다. DNA 분리와 정제 및 완충용액에 사용된 시약과 항생제, lysozyme, RNase 등은 Sigma Chemical Co. (st. Lewis, Mo. USA)에서, 배지에 사용한 시약은 Difco Laboratories(Detroit, Michigan USA)에서 구입하여 사용하였다.

Table 1. Bacterial strains and plasmids

Strain or plasmid	Relevant genotype or phenotype	Reference or source
<i>S. aureus</i> D-H-1	Cm-r Em-r Km-r Tc-r Ap-r	Byeon <i>et al.</i> (1985)
<i>B. subtilis</i> BD170	<i>thr trp</i>	B. Weisblum
<i>E. coli</i> HB101	F-minus <i>recA13 ara14 proA2 galK2</i>	G. Cooper
Plasmids		
pBD9	Km-r Em-r	
pBR322	Tc-r Ap-r	
pSBK203	Cm-r	Byeon <i>et al.</i> (1985)
pBK41	Em-r Ap-r	present study
pBK424	Em-r Ap-r	present study
pHW27	Cm-r Ap-r	present study
pHW33	Cm-r Ap-r	present study
pHW20	Tc-r Cm-r	Kwon <i>et al.</i> (1986)
pHW21	Tc-r Cm-r Ap-r	present study
pHW23	Cm-r Ap-r	present study
pHW25	Cm-r	present study

배 지

본 실험에 사용한 배지는 *E. coli*를 위한 LB배지(bacto-tryptone 10g, yeast-extract 5g, NaCl 10g, pH=7.6, distilled water 1l)와 *S. aureus*, *B. subtilis*를 위한 staph 배지(bacto-tryptone 5g, yeast-extract 5g, 10% K₂HPO₄ 10ml, 50% glucose 4ml, distilled water 1l)가 사용되었으며 재조합 plasmid 및 운반체 plasmid의 포식인자 선별에 사용된 ampicillin(Am; 30 µg/ml), tetracycline(Tc; 30 µg/ml), kanamycin(Km; 20 µg/ml), chloramphenicol(Cm; 20 µg/ml), erythromycin(Em; 20 µg/ml)은 필요시 LB배지 및 staph 배지에 첨가하여 사용하였다.

Agarose gel 전기영동 및 DNA 단편의 추출

1%~1.5%가 되도록 agarose(Sigma, type I)를 Tris-acetate 완충용액에 녹이고 Et-Br을 최종 농도가 0.5 µg/ml되게 첨가한 후 gel을 만들었으며 전기영동도 0.5 µg/ml의 농도로 Et-Br이 포함된 Tris-acetate 완충용액에서 100V로 1~2시간 동안 전개하였다. 제한효소 절편의 분자량 측정에는 λDNA 및 pBR 322를 각각 *Hind* III, *Hinf* I으로 절단하여 사용하였다. Agarose gel로부터 DNA 단편의 추출은 International Biotechnologies, INC로부터 구입한 analytical electroeluter를 사용하여 실시하였으며 추출방법은 제조회사의 방법에 따랐다.

Plasmid의 분리 및 정제

Plasmid의 분리는 Guerry 등(1973)의 SDS-NaCl 방법에 의한 Et-Br CsCl 초원심분리 방법과 Maniatis 등(1982)에 의한 alkaline-lysis method에 의해서 분리정제하였으며 Rodriguez 등(1983)의 방법에 따라 260 nm에서 DNA 흡광도를 측정하여 DNA 농도를 결정하였다.

B. subtilis 및 *E. coli*의 형질전환

*B. subtilis*의 형질전환은 competent cell을 이용한 Dubnau 등(1971)의 방법과 원형질체 세포를 이용한 Chang and Cohen(1979)의 방법을, *E. coli* 형질전환은 Norgard 등(1978)의 방법을 사용하였다.

항생제에 대한 최소 저해농도(minimal inhibitory concentration, MIC)의 측정

지수성장기 중반의 균 현탁액을 100-200배 희석 후 농도별로 항생제를 처리한 새로운 액체배지에 접종하여 37°C에서 18시간 동안 정치 배양하여 균이 자라지 않는 최소농도를 최소저해농도로 결정하였다.

결 과

pSBK 203 상에 위치하는 plasmid 복제 개시 부위의 cloning

1) pHW 27 및 pHW 33의 구성

*S. aureus*로부터 분리되어 *B. subtilis*내로 형질전환, 유지시키고 있는 pSBK 203(Kwon 등, 1986) 상에 존재하는 plasmid 복제 개시 부위를 cloning 하기 위하여 pSBK 203이 갖는 포식인자인 Cm 저항성을 불활성시키지 않는 *Hind* III(2.72 kb, 0.63 kb, 0.35 kb)들을 얻기 위해 DNA µg 당 0.5 units의 *Hind* III를 10분, 20분, 30분간 작용시켜 부분 가수분해한 후 *E. coli* 운반체인 pBR 322의 *Hind* III 단일절편에 삽입하여 두개의 재조합 plasmid pHW 27과 pHW 33을 얻었다(Fig. 1). 이때 얻어진 재조합 plasmid중 pHW 27은 *B. subtilis*내에서 뿐만 아니라 *E. coli*내에서도 복제가 가능하였으나 pHW 33은 *E. coli*내에서만 복제가 가능하였고 pSBK 203으로부터 유래한 pHW 27 및 pHW 33상의 Cm 저항성 인자는 *B. subtilis*와 *E. coli* 모두에서 발현하였으나 pBR 322로부터 유래한 pHW 27 및 pHW 33상의 Ap 저항성 인자는 *E. coli*내에서만 발현하였다. 또한, 얻어진 재조합 plasmid pHW 27과 pHW 33이 pSBK 203의 *Hind* III 절편 중 어느 것을 포함하고 있는지를 알아보기 위하여 각각의 형질전환체로부터 분리한 plasmid DNA를 *Hind* III로 절단한 후 pBR 322 *Hind* III 단일절편 및 pSBK 203 *Hind* III 절편과 비교하였다. 이때 pHW 27은 pSBK 203의 2.72 kb 절편과 0.35 kb 절편이 함께 결합한 채로 삽입되어 있었으며 pHW 33은 pSBK 203의 2.72 kb *Hind* III 절편만 삽입되어 있었다(Fig. 2).

2) pBK 424의 구성

Primrose 등(1981)과 Niaudet 등(1979)의 방법을 다소 수정한 방법으로 재조합 plasmid pBK

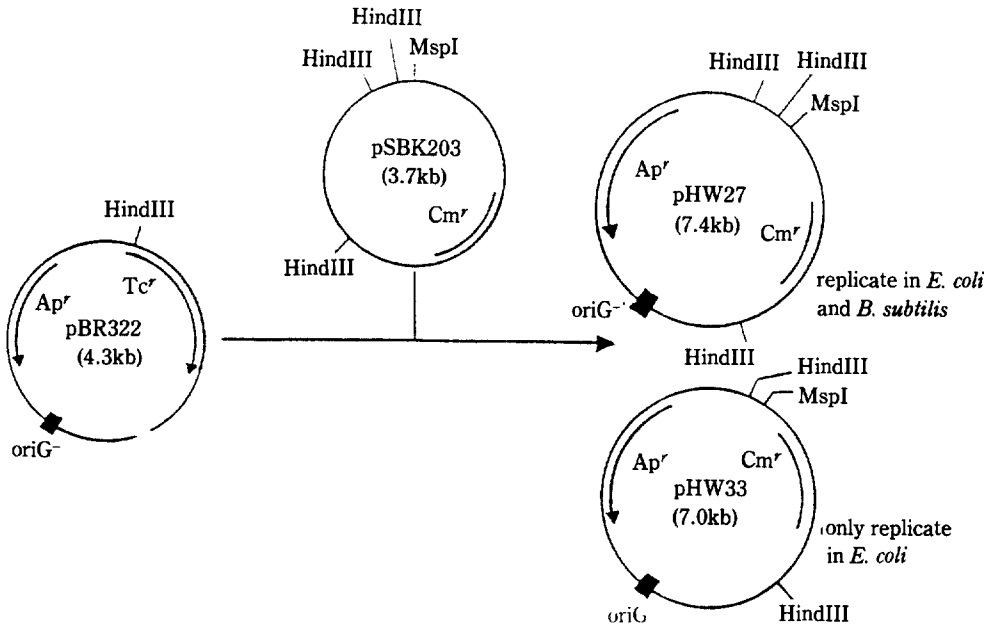


Fig. 1. Construction of recombinant plasmids pHW27 and pHW33 from *E. coli* plasmid pBR322 and *S. aureus* plasmid pSBK203.

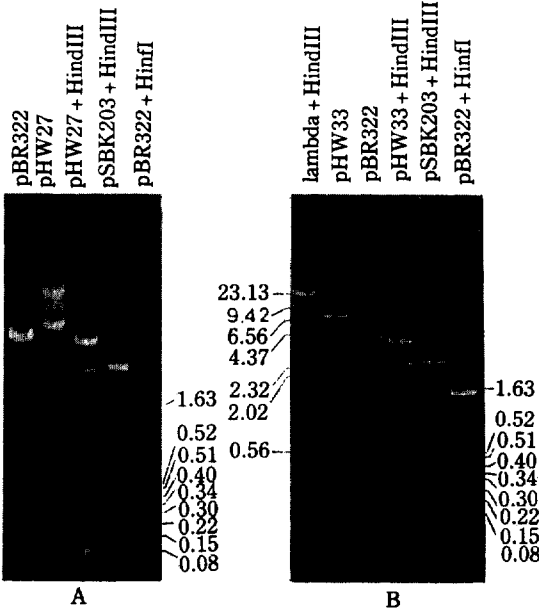


Fig. 2. Restriction endonuclease analysis of pHW27 (A) and pHW33 (B).

41을 구성하였다(Fig. 3). 즉 *E. coli* 운반체 plasmid인 pBR 322를 *Cla*I과 *Bam*HI으로 절단한 후 여기에 *B. subtilis* 운반체 plasmid인 pBD 9

상의 Em 저항성 인자가 포함되도록 *Cla*I과 *Bam*HI으로 절단하여 pBR 322상의 Tc 저항성 인자 위치에 삽입하였다. 이렇게 만들어진 pBK 41은 *E. coli* 내에서만 복제가 가능하며 Ap에 대한 저항성만을 확인할 수 있었다. 그러나 pBD9에서 유래되어 pBK 41 상으로 cloning된 Em 저항성 인자가 본 실험에서 사용한 *E. coli* HB 101 내에서 발현하는지의 여부는 *E. coli* HB 101 자체가 갖는 비교적 강한 Em에 대한 저항성 때문에 확인할 수가 없었다. 따라서 이때 만들어진 제조합 plasmid pBK 41이 pBD9로부터 유래한 Em 저항성인자를 갖는 *Cla*I 및 *Bam*HI 절편을 포함하고 있는지의 여부를 가리기 위하여 pBK 41을 갖고 있는 형질전환체를 선별하여 Maniatis 등(1982)에 의한 alkaline-lysis-method에 의하여 plasmid를 분리 정제한 후 *Cla*I과 *Bam*HI으로 동시 절단하여 확인하였다(Fig. 4, A). 한편 여기서 얻어진 제조합 plasmid pBK 41을 Fig. 3에서 보는 바와 같이 *Bam*HI으로 단일절편을 만든 후 여기에 pSBK 203 *Mbo*I 완전가수분해 절편을 T-4 DNA 접합효소로 접합시킨 후 Em이 10 µg/ml 첨가된 staph 고체배지상에서 *B. subtilis*를 형질전환시켰다. 이

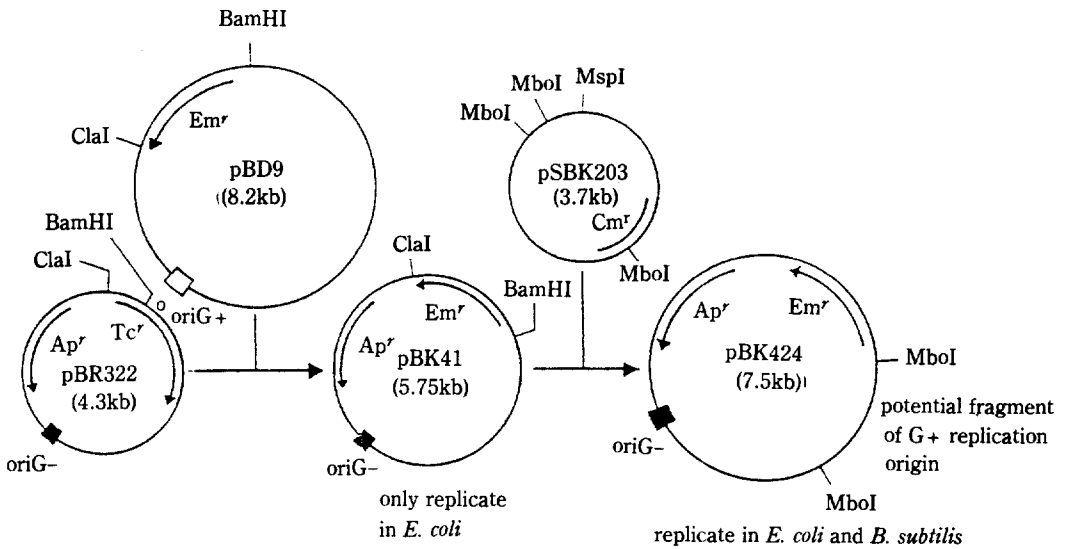


Fig. 3. Construction of recombinant plasmids pBK41 and pBK424 from *E. coli* plasmid pBR322, *B. subtilis* plasmid pBD9, and *S. aureus* plasmid pSBK203.

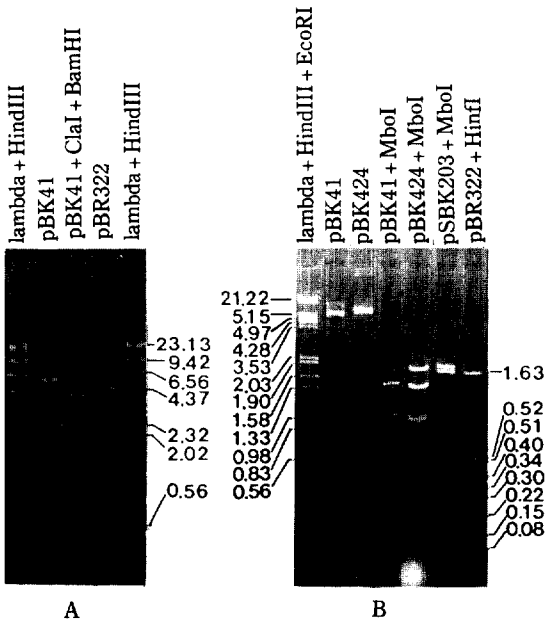


Fig. 4. Restriction endonuclease analysis of pBK41 (A) and pBK424 (B).

때 성장하는 형질전환체를 선별하여 plasmid를 분리한 결과 pBK 41 *Bam*HI 인식부위에 pSBK 203의 1.85 kb, 1.6 kb, 0.25 kb *Mbo*I 절편 (Kwon 등, 1986)중 1.85 kb 절편이 삽입되어 있었으며 (Fig. 4, B), 이 재조합 plasmid pBK 424는 *B. subtilis*내에서 뿐만 아니라 *E. coli*내에서도 복

제가 가능하였고 *B. subtilis*내에서는 Em(10 μ g/ml) 저항성으로, *E. coli*내에서는 Ap(20 μ g/ml) 저항성으로 각각 형질전환체를 선별할 수 있었다.

3) pHW 23 및 pHW 25의 구성

Fig. 1과 Fig. 3의 결과에 의하면 pSBK 203의 복제 개시 부위는 *Hind*III 절편 중 0.35 kb 절편 내에 존재할 가능성이 있으므로 agarose gel 전기영동한 후 이것에 해당하는 band를 잘라내어 electroeluter를 사용하여 추출한 후 다음과 같이 복제 개시 기능의 존재여부를 판정하였다. 즉, Fig. 3의 pBK 41을 구성할 때와 유사한 방법을 사용하여, *B. subtilis*내에서 발현하는 pSBK 203 상의 Cm 저항성 인자를 *Rsa*I으로 (Kwon 등, 1986) 절단하여 *E. coli* 운반체 plasmid인 pBR 322의 Ap 저항성을 불활성시키는 *Sca*I 인식부위에 삽입함으로써 *E. coli*내에서만 복제 가능하며, pBR 322 자체의 Tc 저항성과 *E. coli*와 *B. subtilis* 양쪽 모두에서 발현 가능한 Cm 저항성 인자를 동시에 갖는 재조합 plasmid pHW 20을 구성하였다 (Fig. 5). 재조합 plasmid pHW 20은 그람양성균 plasmid인 pSBK 203으로부터 유래한 Cm 저항성 인자를 포함한 채로 *E. coli*내에서만 복제할 수 있으므로 이를 이용하여 그람양성균인

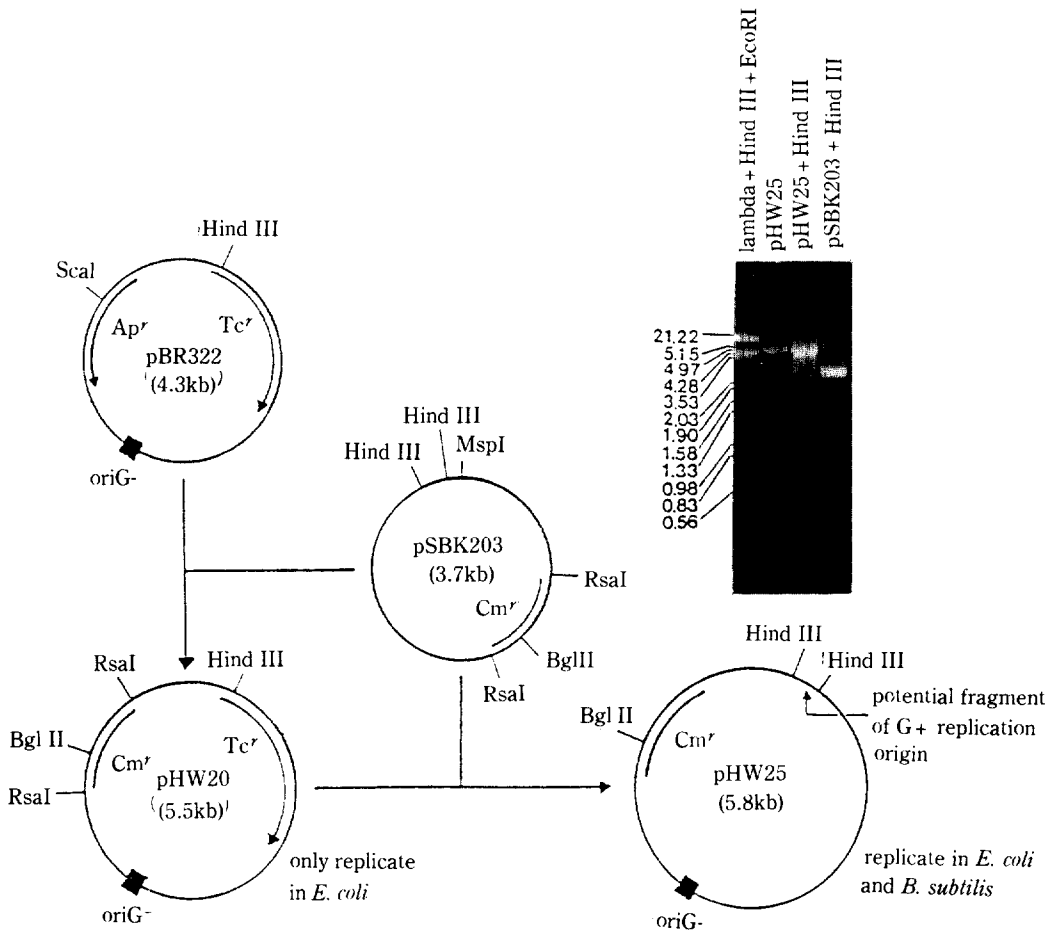


Fig. 5. Construction scheme and agarose gel electrophoresis profiles of restriction endonuclease digests of pHW20 and pHW25.

B. subtilis 내에서의 복제 개시 부위의 cloning을 시도하였다. pHW 20을 *Hind* III로 단일절편을 만든 후 여기에 electroeluter를 사용하여 분리 추출한 pSBK 203의 *Hind* III 절편중 0.35 kb 절편을 섞은 다음 T-4 DNA 접합효소로 접합을 시켰다. 이때 얻어진 재조합 plasmid를 pHW 25라고 명명하였으며 (Fig. 5), 이 재조합 plasmid pHW 25는 *E. coli* 내에서 복제가 가능하였을 뿐만 아니라 *B. subtilis* 내에서도 복제를 하였다. 또한 *B. subtilis* 내에서도 복제가 가능한 재조합 plasmid pHW 25내에 pSBK 203으로 부터 유래한 0.35 kb *Hind* III 절편이 존재하는지의 여부를 확인하기 위하여 pHW 25에 의한 형질전환체로 부터 분리한 plasmid를 *Hind* III로 절단하여 pSBK 203 *Hind* III 절편과 비교하였다 (Fig. 5). 한편, pHW 20을 구

성하는 방법과 유사한 방법으로 pBR 322의 Ap 저항성 인자 및 Tc 저항성 인자를 불활성시키지 않도록 *Pvu* II로 절단한 후 여기에 pSBK 203의 Cm 저항성 인자를 삽입시켜 pHW 21을 구성하고, 다시 여기에 pHW 25를 구성할 때와 동일하게 pSBK 203의 0.35 kb *Hind* III 절편을 삽입시켜 pHW 23을 구성하였다 (Fig. 6).

재조합 plasmid의 형질전환 빈도 및 형질전환체 내에서의 안정성

재조합 plasmid가 숙주세포를 형질전환 시키는 빈도는 Table 2에 나타나 있다. Guerry 등 (1973)의 방법에 의한 CsCl 초원심분리법으로 DNA를 분리하여 Rodriguez 등 (1983)의 방법에 따라 DNA 농도를 결정하고 Dubnau 등 (1971)에 의하여 실시된 competent cell 방법으로 숙주세포를

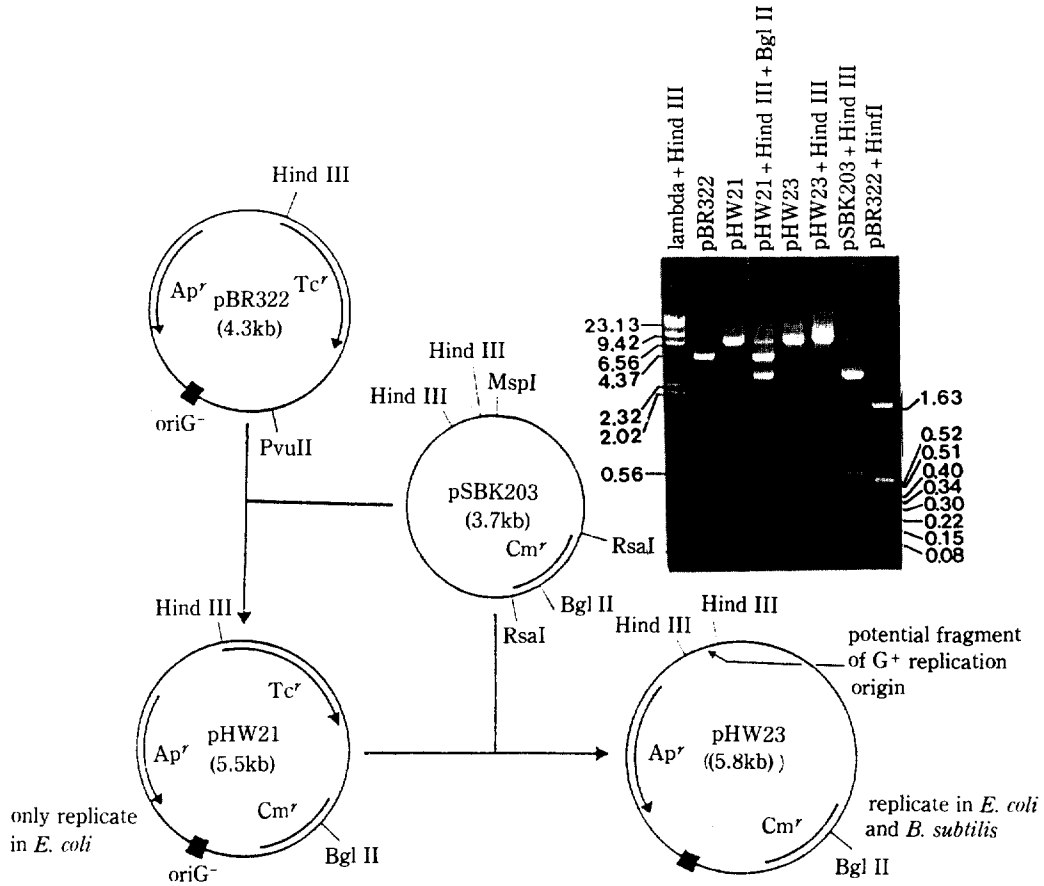


Fig. 6. Construction scheme and agarose gel electrophoresis profiles of restriction endonuclease digests of pHW21 and pHW23.

Table 2. The frequency of *E. coli* and *B. subtilis* transformation by various recombinant plasmids

Plasmid	Frequency of transformation per μg of DNA	
	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>
pBR322	1.6×10	—
pEL94	—	5.4×10
pBK41	2.5×10	—
pBK424	1.4×10	2.4×10
pHW27	1.4×10	2.4×10
pHW33	1.3×10	—
pHW23	1.3×10	2.0×10
pHW25	2.0×10	2.4×10

형질전환 시킨 후 DNA 1 μg 당 형질전환체를 계산하여 그 빈도를 구하였다. 형질전환 빈도값을 비교 고찰하기 위하여 대조구로 *B. subtilis*의 경

우는 pE 194(Horiuouchi 등, 1982)를, *E. coli*의 경우는 pBR 322를 각각 동시에 형질전환 시켰다. 또한 형질전환체내에서의 재조합 plasmid의 안정성을 조사하기 위하여 항생제가 첨가되지 않은 LB 액체배지에 각각의 재조합 plasmid를 가진 세균을 50세대 이상 배양 후 각각의 재조합 plasmid가 갖는 항생제 저항성 표식인자에 해당하는 항생제가 첨가된 고체배지상으로 옮겨 각 세균이 나타내는 저항성의 발현 여부로 plasmid의 안정성을 조사하였는데 pBK 424(80%)를 제외한 나머지 모든 재조합 plasmid들은 pE 194나 pBR 322와 동일한 정도의 안정성(95%~100%)을 나타내었다(자료를 제시하지는 않았음).

재조합 plasmid가 갖는 항생제 저항성 표식인자의 MIC값 측정

Tube Dilution Test Method(Malke and Holm,

Table 3. Minimal inhibitory concentrations (MICs) of antibiotics against host strains and the recombinant plasmids harbouring strains

Strain and plasmid	MICs (in $\mu\text{g/ml}$)			
	Ap	Tc	Em	Cm
<i>E. coli</i> HB101	< 5	< 5	< 5	< 1
<i>B. subtilis</i> BD170	< 5	< 5	< 5	< 5
Plasmids				
pBK41	> 400	—	> 400	—
pBK424	> 400	—	> 400	—
pHW27	> 400	—	—	100
pHW33	> 400	—	—	100
pHW20	—	> 400	—	100
pHW21	> 400	> 400	—	100
pHW23	> 400	—	—	100
pHW25	—	—	—	100

1981)에 의한 *E. coli* 및 *B. subtilis* 내에서의 재조합 plasmid의 항생제에 대한 MIC 값은 Table 3 과 같다. 대조구로는 재조합 plasmid를 갖지 않는 숙주균인 *E. coli*와 *B. subtilis*를 사용하였으며 이들은 모두 Ap, Tc, Em, Cm에 대하여 $5 \mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서는 전혀 자라지 않았다. 반면, *E. coli*가 갖는 재조합 plasmid 상의 Cm 저항성 인자($100 \mu\text{g/ml}$)를 제외한 나머지 저항성 인자의 *E. coli* 및 *B. subtilis* 내에서의 MIC 값은 모두 $400 \mu\text{g/ml}$ 이상의 값을 나타내었다.

고 찰

Primrose (1981)는 pC 194-pBR 322 shuttle vector 중 *B. subtilis* 내에서 복제 기능이 결실된 새로운 plasmid를 분리하였고 Niaudet 등 (1979)은 이를 이용하여 *B. subtilis* plasmid인 cryptic plasmid pHV 400의 복제 개시 부위를 cloning 하였다. 본 논문은 이들의 방법을 다소 수정하여 pSBK 203 상의 plasmid 복제 개시 부위를 결정하였다. pSBK 203 상의 Cm 저항성 인자는 *B. subtilis* 뿐만 아니라 *E. coli* 내에서도 발현이 가능하므로 (Kwon 등, 1986) *E. coli* plasmid인 pBR 322를 vector로 하여 pSBK 203 상의 Cm 저항성 인자만이 포함되도록 pHW 20과 pHW 21을

구성하였고, 또한 pBR 322 상에 *B. subtilis* plasmid인 pBD 9 상의 Em 저항성 인자만이 포함되도록 pBK 41을 구성하였다. 이들 재조합 plasmid pHW 20, pHW 21, pBK 41은 모두 *E. coli* 내에서만 복제가 가능하며, 또한 *B. subtilis* 내에서 복제가 가능할 경우 발현할 수 있는 저항성 인자를 각각 포함하고 있어서 이들 재조합 plasmid들은 Primrose 등이 분리한 *B. subtilis* 내에서 복제 기능 결실 plasmid인 pHW 32와 동일한 기능을 갖는 plasmid이다. 이들 중 pBK 41 상에 pSBK 203 *Mbo* I 절편들을 삽입하였을 때 pSBK 203 상의 *Msp* I (0%) 인식부위를 포함하는 89%~43% 내에 위치하는 *Mbo* I 절편이 삽입된 재조합 plasmid만이 *B. subtilis* 내에서 복제를 하였으며 pBD 9 으로부터 온 Em 저항성 인자를 발현시켰다 (Fig. 7, Table 4). 이때의 *Mbo* I 절편은 pSBK 203 상에서 0.35 kb 및 2.75 kb *Hind* III 절편 내에 존재하고 또 이 절편 내에 pSBK 203의 Cm 저항성 인자가 포함되어 있으므로 pSBK 203의 *Hind* III 부분절편을 직접 pBR 322 *Hind* III 단일절

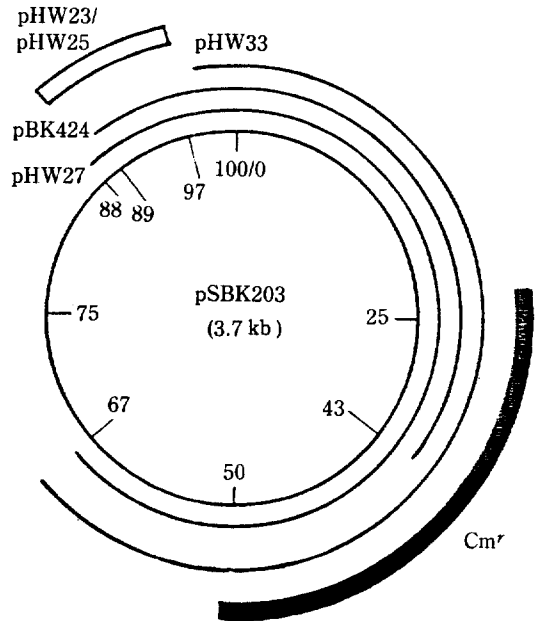


Fig. 7. Identification of replication ability region in pSBK203. The region of between *Mbo*I site (89%) and *Hind*III site (97%) is capable of replication initiation of pSBK203. In each recombinant plasmid indicated part of pSBK203 is inserted.

Table 4. Replication ability and expression of resistance determinants of various plasmids in *E. coli* and *Bacillus subtilis*

Plasmid	Size (kb)	Replication in		Phenotype in	
		<i>B. sub.</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. sub.</i>	<i>E. coli</i>
pBK41	5.75	-	+	-	Ap-r
pBK424	7.5	+	+	Em-r	Ap-r
pHW27	7.4	+	+	Cm-r	Cm-r Ap-r
pHW33	7.0	-	+	-	Cm-r Ap-r
pHW20	5.5	-	+	-	Cm-r Tc-r
pHW21	5.5	-	+	-	Cm-r Tc-r Ap-r
pHW23	5.8	+	+	Cm-r	Cm-r Ap-r
pHW25	5.8	+	+	Cm-r	Cm-r

편에 삽입하여 *E. coli* 및 *B. subtilis* 내에서 발현시켜 보았다. 이때 얻어진 재조합 plasmid pHW 27, pHW 33중 0.35 kb *Hind* III 절편을 포함하는 재조합 plasmid pHW 27만이 *E. coli*와 *B. subtilis* 모두에서 복제를 할 수 있는 것으로 보아 pSBK 203상의 0.35 kb *Hind* III 절편상에 pSBK 203의 복제 개시 부위가 있을 것으로 추측이 되어 pHW 20 및 pHW 21에 pSBK 203상의 0.35 kb *Hind* III 절편만을 삽입시켰으며, 여기서 구성된 pHW 23, pHW 25는 모두 *E. coli*와 *B. subtilis* 내에서 복제를 하였다(Fig. 7, Table 4). 따라서 pSBK 203상의 plasmid 복제 개시 부위는 pBK 424의 89% 위치의 *Mbo* I에서부터 97% 위치의 *Hind* III에 걸쳐있는 0.3 kb 이내에 존재할 것으로 생각된다. 이 결과는 Horinouchi 등(1982)에 의하여 보고된 pC 194 및 pE 194의 복제 개시 인자가 각각 200 bp, 280 bp에 위치한다는 보고와 비교하면 pSBK 203상의 plasmid 복제 개시 인자의 최소단위에 해당할 것으로 믿어진다. 위의 결과에서 확인된 pSBK 203상의 복제 개시 부위는 약 0.35 kb *Hind* III 절편상에 존재하므로 이를 이용하여 그람양성균 및 그람음성균내에서의 유전자 조작실험을 위한 새로운 shuttle-vector를 개발할 수 있을 것으로 기대된다. 한편, pSBK 203상의 복제 개시 부위의 cloning 과정에서 구성된 pBK 424, pHW 23, pHW 25, pHW 27은 모두 *E. coli*와 *B. subtilis* 내에서 발현할 수 있는 저항성 인자가 있으므로(Table 4) shuttle vector로 쓰여질 가능성이 있으며 또한 *E. coli* 내에서만 복제가

되며 *B. subtilis* plasmid에서 유래한 저항성 인자를 갖는 재조합 plasmid인 pBK 41, pHW 20, pHW 21, pHW 33은 모두 *B. subtilis* 및 *S. aureus*로 부터 유래한 cryptic plasmid들의 복제 개시 부위를 확인하는 도구로 쓰여질 가능성이 있다. 따라서, 이들 재조합 plasmid들이 갖는 포식 인자에 대한 최소 저해농도(Table 3), 숙주에 따른 형질전환 빈도(Table 2)를 조사하였으며 아울러 숙주에 따른 복제 능력과 저항성 인자의 발현양상을 조사하였다(Table 4). 최소 저해농도는 *E. coli* plasmid인 pBR 322로 부터 유래한 Ap 및 Tc가 각각 숙주균주에 비하여 80배 이상의 저항성을 나타내었으며 *B. subtilis* plasmid인 pSBK 203으로 부터 유래한 Cm의 경우는 *E. coli* 및 *B. subtilis*에서 숙주균주에 비하여 각각 100배, 20배의 저항성을, Em의 경우는 *B. subtilis* 내에서 80배 이상의 저항성을 나타내어 어느 경우나 10~20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 항생제가 첨가된 선별배지에서 형질전환체인지의 여부를 판별할 수 있었다. 분리된 재조합 plasmid들의 형질전환 빈도는 *E. coli* 내에서 shuttle vector를 포함한 모든 재조합 plasmid들이 대조실험으로 사용한 pBR 322에 비하여 더 높거나 거의 같은 정도로 형질전환 되었으며 *B. subtilis* 내에서도 대조실험에 사용한 pE 194보다 오히려 더 높은 형질전환 빈도를 보여주고 있다(Table 2). 또한 이들 재조합 plasmid들의 형질전환체내에서 안정성 역시 pBK 424에 의하여 형질전환된 *B. subtilis* (80%)를 제외한 모든 형질전환체들이 90%~100%의 안정성을 보여주어 대조실험으로 사용한 pBR 322 및 pE 194와 거의 동일한 안정성을 나타내어 *B. subtilis*의 host-vector system이 갖는 몇가지 불리한 점들, 즉 숙주세포내에서의 plasmid 안정성(Gryczan 등, 1978; Clewell 등, 1979; Uhlen 등, 1981; Kreft 등, 1983; Ostroff 등, 1984)과 숙주세포의 형질전환 빈도(Cohen 등, 1972)를 보완하여 줄 수 있을 것으로 생각된다. 결과적으로 본 실험에서 얻어진 재조합 plasmid pHW 20, pHW 21, pBK 41, pHW 33(Fig. 8)은 *B. subtilis*를 숙주균으로 cloning할 수 있는 도구로 사용될 수 있을 뿐만 아니라 함께 구성된 pHW 21, pHW 25, pHW 27, pBK 424(Fig. 9)의 경우는 *E. coli* 및 *B.*

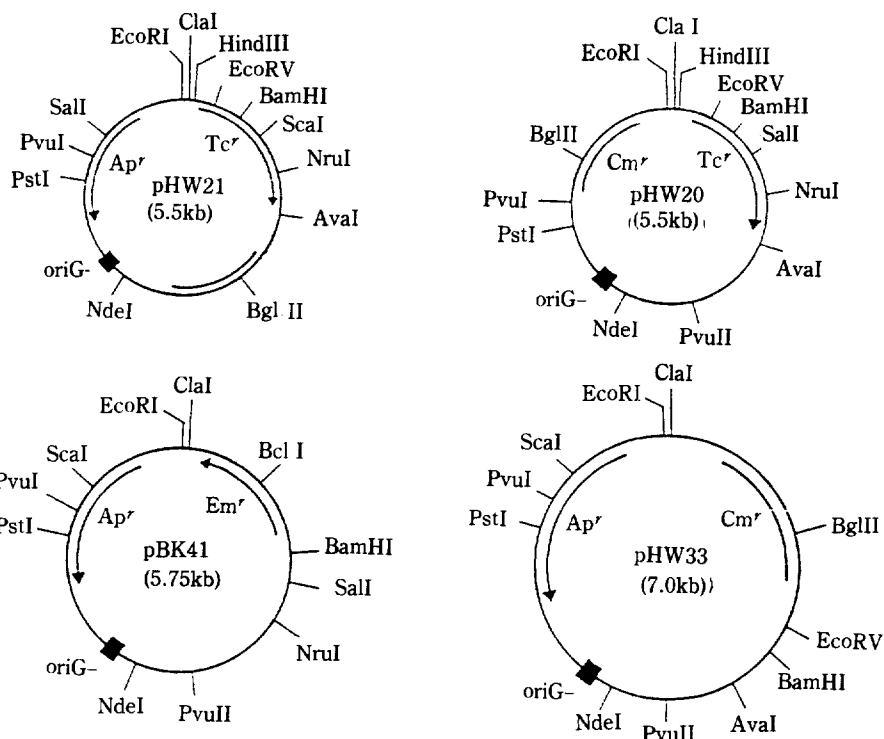


Fig. 8. Schematic representation of four hybrid plasmids replicated only in *E. coli*. For construction details see results.

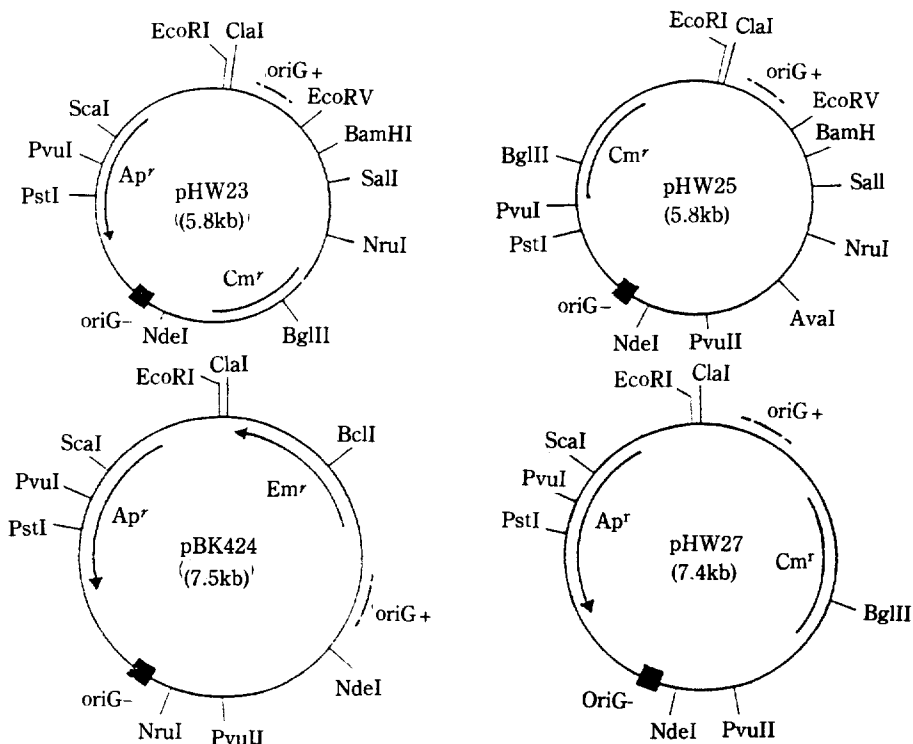


Fig. 9. Schematic representation of four hybrid plasmids replicated both in *E. coli* and *B. subtilis*. For construction details see results.

*subtilis*를 숙주균으로 하는 유전자 조작실험에 유용하게 쓰여질 수 있을 것으로 기대된다. 또한 pSBK 203으로 부터 분리한 plasmid 복제 개시 부위는 염기서열 결정 등에 의한 상세한 분석이 필요

하며 아울러 이미 보고된 바 있는 pC194와 pE194의 plasmid 복제 기작과 비교연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

적 요

pBR 322와 pBD 9을 이용하여 *Staphylococcus aureus*에서 분리된 chloramphenicol 저항성(Cm^r) plasmid인 pSBK 203상의 *ori* 부위를 cloning하였다. 또한 *E. coli*내에서도 발현하는 pSBK 203상의 Cm 저항성 부위 및 cloning된 *ori* 부위를 pBR 322에 재조합시켜 *E. coli*와 그람양성균인 *Bacillus subtilis* 양쪽 모두에서 복제되고 또 항생물질에 대한 저항성도 각각 발현되는 shuttle vector 구성을 시도하였다.

REFERENCES

1. Byeon, W. -H., Y.S. Kim, E.H. Cho, D.H. Kwon, H.Z. Lea, and S.J. Hong, 1985. R-plasmids in *Staphylococcus aureus*. *Kor. J. Microbiol.* **23**, 282-290.
2. Clewell, D.B., Y. Yaggi, and P. Tomich, 1979. Amplification of drug resistance in relation to pAM_aI in *Streptococcus faecalis*. In *Microbial drug resistance, Vol. 2* (ed. S. Mitsuhasi), p. 23. University Park Press, Baltimore.
3. Cohen, S.N., A. C.Y. Chang, H.W. Boyer, and R.B. Helling, 1973. Construction of biologically functional bacterial plasmid *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 3240-3244.
4. Cohen, S.N., A.C.Y. Chang, and L. Hsu, 1972. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *E. coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 2110-2114.
5. Dubnau, D., and R. Davidorff-Abelson, 1971. Fate of transforming DNA following uptake by competent *Bacillus subtilis*. I. Formation and properties of the donor-recipient complex. *J. Mol. Biol.* **56**, 209-221.
6. Ehrlich, S.D., 1978. DNA cloning in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 1433-1436.
7. Gryczan, T., A.G. Shivarkumar, and D. Dubnau, 1980. Characterization of chimeric plasmid cloning vehicles in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **141**, 246-253.
8. Gryczan, T.J., S. Contente, and D. Dubnau, 1978. Characterization of *Staphylococcus aureus* plasmids introduced by transformation into *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **134**, 318-329.
9. Gryczan, T.J., and D. Dubnau, 1978. Construction and properties of chimeric plasmids in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 1428-1432.
10. Guerry, P., D.J. LeBlanc, and S. Folkow, 1973. General method for the isolation of plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* **116**, 1064-1066.
11. Ishiwa, H., and N. Tsuehida, 1984. New shuttle vectors for *E. coli* and *Bacillus subtilis*: I. Construction and characterization of plasmid pHY460 with twelve unique cloning sites. *Gene* **32**, 129-134.
12. Kiggins, K.M., P.S. Lovett, E.J. Duvall, 1978. Molecular cloning of genetically active fragments of *Bacillus* DNA in *B. subtilis* and properties of the vector plasmid pUB110. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 1428-1423.
13. Kleff, J., K.J. Bruger, and W. Gobel, 1983. Expression of antibiotics resistance genes from *E. coli* in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* **193**, 384-389.
14. Kwon, D.H., Y.S. Kim, W.-H. Byeon, 1986. Studies on antibiotics resistance gene in *Staphylococcus aureus* plasmid: Cloning of chloramphenicol resistance determinant. *Kor. Jour. Microbiol.* **24**, 341-351.
15. Malke, H., and S.E. Holm, 1981. Expression

- of streptococcal plasmid-determined resistance to erythromycin and lincomycin in *E. coli*. *Mol. Gen. Genet.* **184**, 283-295.
16. Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook, 1982. Rapid isolation of plasmid or bacteriophage lambda DNA. In *Molecular cloning, A laboratory manual*, p. 368. Cold Spring Harbour Lab.
 17. Niaudet, B., and S.D. Ehrlich, 1979. *In vitro* genetic labelling of *B. subtilis* cryptic plasmid pHV400. *Plasmid* **2**, 48-58.
 18. Norgard, M.V., K. Keem, and J.J. Monahan, 1978. Factors affecting the transformation of *Escherichia coli* strain lambda 1176 by pBR322 plasmid DNA. *Gene* **3**, 279-292.
 19. Ostroff, G.R., and J.J. Pene, 1984. Molecular cloning with bifunctional plasmid vectors in *Bacillus subtilis*: II. Transfer of sequences propagated in *E. coli* to *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* **193**, 306-311.
 20. Primrose, S.B., and S.D. Ehrlich, 1981. Isolation of plasmid detection mutants and a study of their instability. *Plasmid* **6**, 193-201.
 21. Rodriguez, R.L., R.C. Tait, 1983. Spectrophotometric assay of DNA concentration and purity. In *Recombinant DNA techniques, an introduction*, p. 42. Addison-Wesley Publishing Company.
 22. Sullivan, M.A., R.E. Yasbin, and F.E. Young, 1984. New shuttle vector for *B. subtilis* and *E. coli* which allow rapid detection of inserted fragments. *Gene* **29**, 21-29.
 23. Timmis, K., F. Catello, and S.N. Cohen, 1975. Cloning, isolation and characterization of replication regions of complex plasmid genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 2242-2246.
 24. Uhlen, M., J.-I. Flock, and L. Philipson, 1981. RecE independent deletions of recombinant plasmids in *Bacillus subtilis*. *Plasmid* **5**, 161-169.

(Received Oct. 19, 1987)