

Transposon Tn 5 및 Reverse Field Electrophoresis 를 이용한 *Caulobacter crescentus* 의 유전자 분석 연구

구본성^{1*} · 버트 일리

¹농촌진흥청 농업기술연구소 유전공학과 ²남부 캐롤라이나대학 생물학과

Genetic Analysis of *Caulobacter crescentus* by Using Transposon Tn5 and Reverse Field Electrophoresis

Koo, Bon-Sung^{1*} and Bert Ely²

¹Genetic Engineering Div. Agricultural Sciences Institute, RDA, Suweon, Korea

²Department of Biology, University of South Carolina, Columbia, SC 29208, USA

The bacteriophage Mu and transposon Tn5 containing plasmid pJB4JI-transferred transposon Tn5 to *Caulobacter crescentus*. When several thousand of transposon Tn5 insertion mutants were examined, we found auxotrophic and motility mutants at frequencies of 2% and 3%, respectively. Transposition of transposon Tn5 was analyzed by the reverse field electrophoresis and Southern hybridization. The results indicated that transposon Tn5 was randomly inserted to *Caulobacter crescentus* chromosome but the plasmid vector, pJB4JI, was not maintained.

Caulobacter 는 습기있는 곳이나 부패된 자연 환경에서 많이 서식하고 있으며 cell cycle 중의 1/3 은 motile swarmer cell 로 존재하고 나머지 2/3 는 non-motile stalked cell 형태로 존재한다. Motile swarmer cell 은 미성숙 cell 로 DNA 복제를 하지 못하며 한개의 filament, hook, rod 및 5 개의 base ring 으로 구성된 single polar flagellum 을 가지고 있는 것이 특징이다(1,2). 이 motile swarmer cell 이 성숙하면 flagellum, base ring 등이 배양 배지속으로 떨어져 나오게 되며 편모 모양의 pole 을 가지는 stalked cell 이 형성된다. 이 새로 만들어진 non motile stalked cell 은 DNA 복제 및 신장을 시작하며 결국 stalk 의 반대쪽에 flagellum 이 생성되어 새로운 swarmer cell 과 stalked cell 의 2 가지 형태로 분열하게 되는데(3) 이러한 *Caulobacter* 의 유전자 구조나 일시적으로 발현되는 유전자 조절기능을 밝힘으로써 진핵 세포와 같이 복잡 다양한 조절 기능을 이해하는데 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다

(4,5). 본 연구는 *Caulobacter crescentus* 의 유전자를 Tn 5 및 reverse field electrophoresis 로 분석하여 몇가지 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

사용균주

본 실험에 사용한 균주는 *Caulobacter crescentus* 의 wild type 인 CB-15 및 Tn 5 와 Mu phage 를 가지고 있는 suicide vector, pJB4JI 을 사용하였다.

배양배지 및 조건

Caulobacter crescentus 는 PYE(Bacto peptone 2g, Yeast Extract 1g, 0.5M MgSO₄ 1.5ml, 0.5M CaCl₂ 1ml/l), *E. coli* 는 LB(Bacto tryptone 10g, Yeast Extract 5g, NaCl 10g/l) 배지로 증식시켰으며 motility 검정은 semi-solid PYE, 영양 요구성 검정은 LO-PO₄ 최소배지(10×Immidazole 200 ml,

Key words: Transposon Tn5, transposition, reverse field electrophoresis, pJB4JI, swarmer cell, stalked cell

*Corresponding author

FeSO₄ · EDTA 20 ml/l 에 0.5 M Mg-SO₄ 2 ml, 0.5 M CaCl₂ 2 ml, 30% sucrose 20 ml, 1 M Glutamate 20 ml, PO₄ buffer 4 ml/2l 를 혼합한 용액)를 사용하여 고 배양 온도는 33°C에서 수행하였다.

전자현미경 검경

10 ml 의 PYE broth 에 *C. crescentus* 를 log phase 로 배양한 다음 원심분리하여 얻은 침전물을 0.5 ml 의 PYE broth 에 다시 조심스럽게 현탁하였다. 여기에 동량의 1~2% phosphotungstic acid (pH 7.0)을 혼합한 다음 400 mesh 의 grid 에 코팅하여 20 초간 건조하고 Semans Elmiskop Model IA 로 관찰하였다.

Tn 5 mutagenesis

0.5 ml 의 pJB4JI(6)을 donor 로, 동량의 *C. crescentus* 를 recipient 로 사용하여 0.45 μm membrane filter 에서 mating 시킨 다음 33°C에서 3 시간 항온한 후 kanamycin (50 μg/ml), streptomycin (200 μg/ml)이 함유된 PYE 배지에 0.1 ml 씩 도말한 후 하룻밤 배양하여 자라는 colony 들을 선별하였다.

Reverse field electrophoresis

선발된 변이주들을 1.5×10⁸ cells/ml 이 되게 배양한 다음 chloramphenical 을 첨가하여 1.5 배에 해당하는 시간 동안 cell 의 성장을 정지시키면서 DNA 만 복제되게 하였다. 배양된 변이주들을 원심분리하여 2 ml 의 Pett IV buffer (1 M Tris-HCl (pH 7.6) 1 ml, 5 M NaCl 20 ml/100 ml)에 현탁시켰다. 이 현탁액을 6000 rpm 에서 5 분 동안 원심분리하여 1/10 volume 의 Pett IV buffer 에 다시 현탁하고 37°C에서 pre-warming 시켰다. 동량의 1% agarose 와 pre-warming 된 현탁액을 65°C에서 혼합한 후 mold 를 이용하여 작은 단편으로 만들고 이 단편들을 plastic cap tube 에 넣고 2 ml 의 lysis buffer (6 mM Tris-HCl (pH 7.6), 1 M NaCl, 100 mM EDTA, 0.5% Brij-58, 0.2% Deoxycholate, 0.5% Sarkosyl, Lysozyme 1 mg/ml, RNase 20 μg/ml)를 가하여 37°C, hot block 에서 하룻밤 배양한 다음 protein 과 nuclease 를 제거하기 위해서 2 ml 의 ESP buffer (0.5 M EDTA, 1 g Sarkosyl/100 ml)을 멸균한 후 2 mg/ml 의 proteinase K 를 첨가)를 첨가하여 다시 50°C에서 2 일 동안 배양하였다. 실온에서 2 ml 의 TE buffer (0.1 M PMSF 30 μl 함유)로 2 시간씩 두 번 세척한 다음 마지막으로 2 ml 의 TE buffer 로 다시

24 시간 세척하여 제한효소 Dra I 으로 37°C에서 1 시간 동안 반응시켰다. 이렇게 처리된 bacteria 가 함유된 agarose 단편을 전기영동할 agarose well 의 크기와 같이 자르고 그대로 삽입시켜서 Reverse Field Electrophoresis 장치를 이용하여 4°C에서 13 시간 동안 230V로 buffer 를 순환시키면서 전기영동하였다.

Tn 5 probe 제조

pRZ 102 (colE1 :: Tn 5) (16)를 대량 증식한 후 CsCl-EtBr 초고속 원심분리 방법으로 정제된 DNA 를 얻은 후 Nick Translation 방법 (20)으로 probe 를 만들었다. α-³⁵S dCTP 3 μl, 10 mM DTT 3 μl, NT buffer 3 μl, dNTP (minus dCTP) 3 μl, DNA 10 μl (1 μg DNA), polymerase 1 μl, DNase (1 mg/ml 을 1/50,000 희석) 1 μl, H₂O 6 μl 를 혼합하여 14°C에서 2 시간 반응한 후 0.25 M EDTA 1 μl, proteinase K (1 mg/ml) 2 μl, 2% SDS 3 μl 를 혼합하여 65°C에서 30 분 동안 반응을 정지시켰다. 반응정지된 혼합액에 10 mM spermine (final conc.)를 첨가하여 4°C에서 24 시간 방치한 후 원심분리하여 상등액을 모아두고 pellet 에 extraction buffer [75% EtOH, 0.3 M NaOAc, 0.01 M Mg (OAc)₂] 1 ml 을 첨가하여 얼음에서 1 시간 동안 반응시키면서 20 분마다 vortexing 시켰다. 이것을 원심분리하여 침전물을 75% EtOH 로 세척한 다음 20 μl 의 0.2% SDS, 1×TE buffer 에 녹혀 따로 모아둔 상등액과 침전물을 녹인 용액을 각각 3 ml 의 scintillation cocktail 용액에 1 μl 씩 가하여 liquid scintillation counter 에서 CPM 을 측정하고 incorporation 비율을 비교한 다음 probe 로 사용하였다.

Southern blotting 및 hybridization

Reverse Field 전기영동으로 DNA band 의 변이가 확인된 agarose gel 을 약 30 분 동안 destaining 시킨 다음 ~500 ml 의 0.5 N NaOH, 1.5 M NaCl 로 15 분 간씩 2 번 변성시키고 ~500 ml 의 0.5 M Tris-HCl (pH 7.5), 1.5 M NaCl 로 30 분간 중화하여 nitran filter 에 blotting 시켰다. Blotting 된 filter 를 plastic seal-bag 에 넣고 20×SSPE 3 ml, 10% SDS 0.5 ml, 50×Denhardt's soln 1 ml, formamide 5 ml, Carrier DNA (100 μg/ml deratured salmon testes DNA) 0.5 ml 을 혼합한 용액으로 42°C에서 약 2 시간 동안 prehybridization 시킨 후 ³⁵S 로 라벨된 Tn 5 probe 를 첨가하여 약 20 시간 동안 hybridization 시켰다. 필름의 현상은 X-OMAT M20 Processor (Kodac Co.)를 사용하였다.

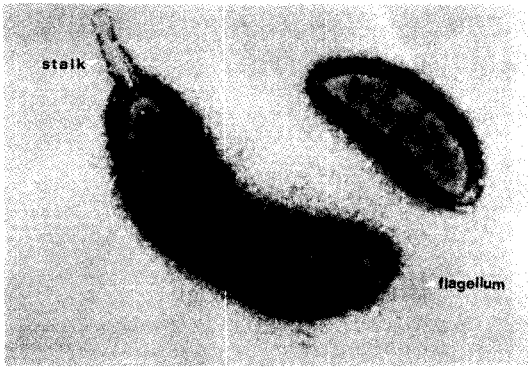


Fig. 1. Electron micrograph of *C. crescentus* wild type.

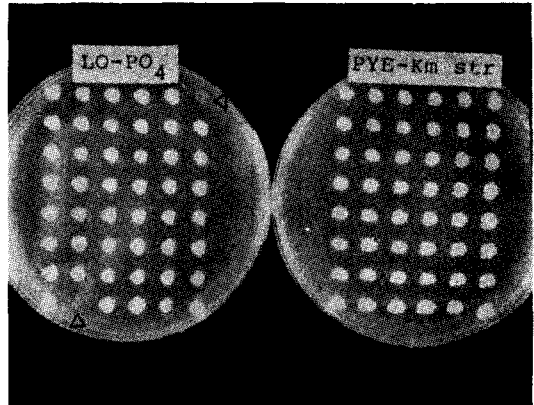


Fig. 2. Different growth patterns of auxotrophic mutants derived from transposition of Tn5.

결과 및 고찰

Flagellum 과 stalk 관찰

Caulobacter crescentus 를 전자 현미경으로 관찰한 결과는 Fig.1 과 같다. Motile swarmer cell 일 때는 상당히 긴 1 개의 flagellum 을 가지고 있으며 flagellum 이 떨어져 나간 자리에 cell wall 과 membrane 의 성장에 의해 생긴 것으로 추정되는 편모 모양의 pole 을 가진 stalked cell 도 관찰할 수 있었다. 이 stalked cell 이 완전히 성숙하여 분열하게 되면 Fig.1 에서 본 것과 같은 flagellum 을 가지고 있는 swarmer cell 과 non-motile stalked cell 의 두가지 형태로 분열하게 되는데 이 stalked cell 은 DNA 복제를 시작해서 두 종류의 cell type 을 만들게 되며 swarmer cell 은 flagellum 이 없어지고 stalked cell 이 된 다음 같은 cycle 을 반복하게 된다.

Tn 5 mutagenesis 에 의한 변이주 선발

pJB4JI(7)을 donor 로 사용하고 streptomycin 에 저항성이 있는 *C. crescentus* 의 wild type 인 CB-15 를 recipient 로 사용하여 재료 및 방법란에서 기술한 것과 같이 선택 배지에서 자라는 colony 들을 선발하여 master plate 를 만들고 완전 배지인 PYE 및 최소 배지인 LO-PO₄에 replica 했을 때의 결과는 Fig.2 에서와 같이 최소 배지에서 자라지 않는 영양 요구성 균주의 출현률이 약 2% 정도로 나타났고 semi-solid PYE 배지에서 motility 를 검정한 결과는 Fig.3 에서와 같이 운동성이 없는 변이주들을 약 3% 수준으로 선발할 수가 있었다. 이와 같은 결과는 Victor(8) 등이 *Pseudomonas solanacearum* 에 pJB4JI 을 사용하여 10⁻⁹ 빈도로 영양 요구성 변이주가 나타났다고 보고한 것과 Christian(9) 등이 5×

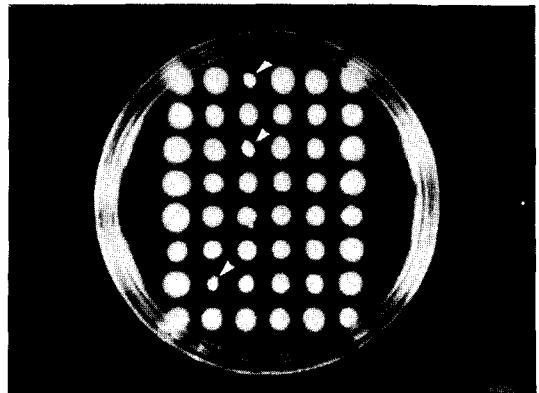


Fig. 3. Assay of non-motile mutants on semi-solid PYE medium.

10⁻⁶ 빈도로 Tn 5 가 전이되었으며 1% 의 영양 요구성 변이주를 얻었다는 보고 및 Ausubel(10) 등이 *Rhizobium meliloti* 에서 0.3% 의 영양 요구성 변이주를 얻었다는 보고 등과 비교해 볼 때 상당히 높은 빈도로 변이가 일어났으나 일반적으로 Mu phage 를 가지고 있는 vector 를 사용하면 Mu 에 민감한 recipient 들을 죽여 버리거나 plasmid 의 전이 혹은 복제가 안되는 경우도 많이 보고되고 있다(7, 11).

Tn 5 가 삽입된 변이주들의 RFE 분석

일반적으로 많이 사용하고 있는 agarose gel 전기영동 방법(12, 13)은 일정한 전기장을 사용하여 gel matrix 의 sieving 효과에 의해 DNA 를 크기에 따라 분리할 수 있지만 DNA 분자가 gel 의 기공보다 크면 sieving 효과가 적어서 뚜렷한 분리 효과를 볼 수 없다. 이러한 단점을 보완한 것이 reverse field

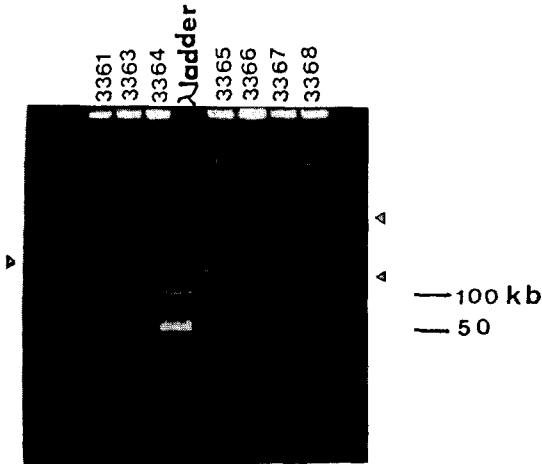


Fig. 4. Reverse field electrophoresis patterns of the DraI-generated genomic DNA of *C. crescentus* auxotrophic mutants derived from transposition of Tn5.

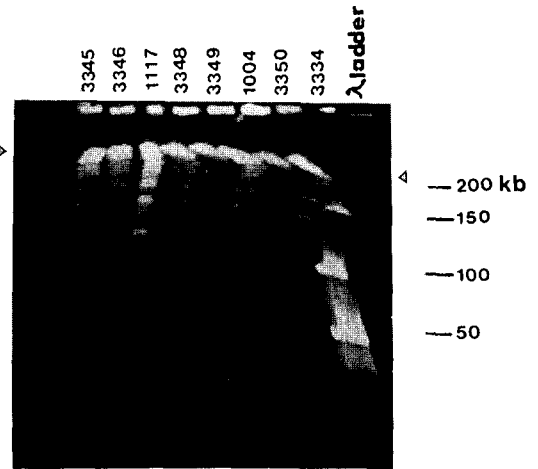


Fig. 5. Reverse field electrophoresis patterns of the DraI-generated genomic DNA of *C. crescentus* Fla- mutants derived from transposition of Tn5.

electrophoresis 방법(14-17)인데 이는 1983년 미국 Columbia 대학의 C. Cantor 교수팀에 의해서 개발된 기술로 거대분자 DNA 들이 gel matrix 안에서 형태를 변화시키는 속도에 따라 분리하는 방법이다. 전기장의 변화에 따라 큰 분자들은 그 형태를 천천히 변화시키고 작은 분자들은 빨리 변화시키는데 착안하여 개발한 방법으로 그 기본 골격은 gel 상자의 네 모서리에 양극 음극을 교차로 설치하고 가운데에 사각형의 gel을 45° 각도로 놓은 다음 전기장을 동서나 혹은 남북으로 전극을 교차로 걸어주게 되면 DNA 분자들이 지그재그 형태로 진행하게 되는데 전기장을 교차로 걸어주는 시간 간격이 일정하므로 비교적 일직선상으로 움직이는 효과를 가져오게 된다. 이 방법에 의해 Cantor 등은 *E. coli*의 정확한 유전자 지도를 작성한 바 있다(18). 이와 같은 방법을 이용하여 Tn 5 삽입에 의해서 생긴 변이주들의 chromosome을 재료 및 방법에서 기술한 것과 같이 Dra I 제한효소로 절단한 다음 전기 영동 패턴을 비교한 결과는 Fig.4 및 Fig.5와 같다. 이들 그림의 ▲ 표시에서 나타난 것처럼 Tn 5가 삽입된 단편들은 그 크기가 다른 band들에 비해서 약 5.7kb 정도 더 크기 때문에 DNA 이동거리에 차이가 나타나게 되어 Tn 5가 삽입된 위치 및 수를 확인할 수가 있었다. 이 방법으로 전기장 교차시간 간격에 차이를 두게 되면 DNA 분자들의 크기에 따라 Southern blotting을 하지 않고도 더 많은 정보를 얻게 되리라 생각된다.

Southern hybridization에 의한 Tn 5 삽입 위치 확인
reverse field electrophoresis 장치로 전기 영동한

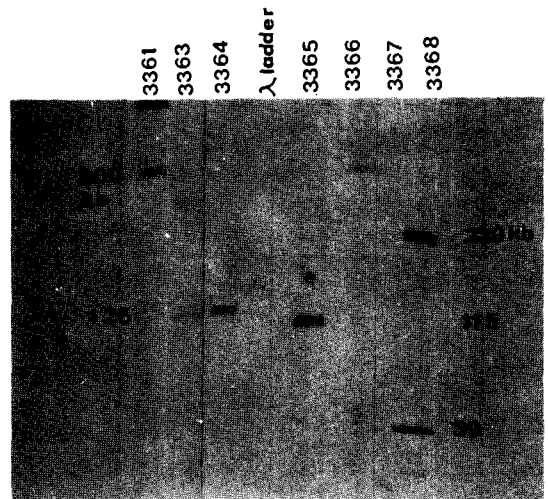


Fig. 6. Detection of Tn5 sequence in the DraI-generated genomic DNA of *C. crescentus* auxotrophic mutants by Southern hybridization.

gel을 nitran filter에 blotting(19, 20)한 다음 hybridization한 결과는 Fig.6 및 Fig.7과 같다. 영양 요구성 변이주들의 Tn 5 삽입 위치는 Fig.6에서와 같이 상당히 다양한 패턴을 나타낸 반면에 motility에 변화를 가진 변이주들은 거의 대부분 비슷한 위치에 삽입된 것을 확인할 수 있었다(Fig.7). Finnerty(21) 등은 pJB4JI을 이용하여 *Acinetobacter*에 Tn 5를 전이시킨 후 Southern hybridization으로 확인해 본 결과 한 위치에만 삽입된 것을 알 수 있었고 Dirk(22) 등은 *Pseudomonas syringae*에 Tn 5를 삽입시킨 후 선발한 영양 요구성 균주들

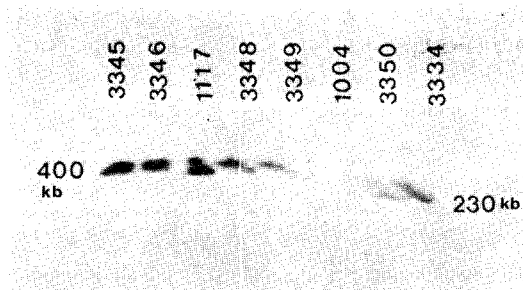


Fig. 7. Detection of Tn5 sequence in the DraI-generated genomic dna of *C. crescentus* Fla⁻ mutants by Southern hybridization.

을 분석한 결과 여러 위치에 Tn 5가 삽입된 것을 보고하는 등 상반된 보고(23,24)들이 많이 있으나 본 실험에서는 Tn 5가 무작위로 *C. crescentus*의 염색체내로 삽입되는 것으로 나타났다.

요 약

일반적으로 Mu phage를 가지고 있는 plasmid를 장내 세균에 삽입시키면 대부분의 Mu에 민감한 세균들은 zygotic induction이 일어나서 recipient cell들이 살아남지 못하게 된다. 그러나 Mu 저항성 세균을 사용하면 cell이 죽지않고 recipient내에 삽입되는데 그 정확한 현상은 아직 밝혀지지 않았으나 Mu의 복제에 필요한 host의 기능이 결여된 것으로 추정되고 있다. 또한 reverse field electrophoresis를 사용하여 insertion mutant나 deletion mutant들의 염색체 및 거대 분자 DNA의 변이를 쉽게 비교 분석할 수가 있다. 본 실험에서는 Mu phage 저항성 *C. crescentus*를 사용하여 Tn 5에 의한 영향 요구성 돌연변이주 출현률 및 운동성 돌연변이주 출현률을 조사한 결과 2%~3% 수준으로 돌연변이가 일어났으며 이들 변이주들의 염색체를 Dra I 제한효소로 절단한 다음 reverse field electrophoresis로 분석한 결과 영양 요구성 돌연변이 균주들은 Tn 5가 여러 위치에, 운동성에 돌연변이를 일으킨 균주들은 유사한 위치에 Tn 5가 삽입된 것을 확인할 수 있었으나 hybridization 방법으로 확인한 것처럼 동시에 여러 위치를 확인할 수는 없었다. 그러나 이와 같은 문제들은 전기장의 교차시간 간격을 조절함으로써 더 정확하게 확인할 수 있을 것으로 사료된다.

Reference

1. Shapiro, L.: *Ann. Rev. Microbiol.* **30**, 377-407 (1976)
2. Johnson, R. and B. Ely: *J. Bacteriol.* **137**, 627-634 (1976)

3. Degnan, S.T. and A.L. Newton.: *J. Mol. Biol.* **64**, 671-680 (1972)
4. Barrett, J.T., C.S. Rhodes, D.M. Ferber, B. Jenkins S.A. Kuhl and B. Ely: *J. Bacteriol.* **149**, 889-896 (1982)
5. Ely, B., C.J. Gerardot, D.L. Fleming, S.L. Gomes, P. Frederike and L. Shapiro: *Genetics* **114**, 717-730 (1986)
6. Zink, R.T., R.J. Kemble and A.K. Chatterjee: *J. Bacteriol.* **157**, 809-8114 (1984)
7. Ely, B. and R.H. Croft.: *J. Bacteriol.* **149**, 620-625 (1982)
8. Morales, V.M. and L. Sequira.: *J. Bacteriol.* **163**, 1263-1264 (1985)
9. Boucher, C., B. Message, D. Debieu and C. Zischek: *Phytopathol.* **71**, 639-642 (1981)
10. Meade, H.M., S.R. Long, G.B. Ruvkun, S.E. Brown and F.M. Ausubel: *J. Bacteriol.* **149**, 114-122 (1982)
11. Hom, S.S.M., S.L. Uratsu and F. Hoang.: *J. Bacteriol.* **159**, 335-340 (1984)
12. Meyers, J.A., D. Sanchez, L.P. Elwell and S. Falkow: *J. Bacteriol.* **127**, 1529-1537 (1984)
13. Johnson, P.H. and L.I. Grossman: *Biochem.* **16**, 4217-4224 (1977)
14. Smith, C.L. and C.R. Cantor: *Method in Enzymol.* Vol. 156 449-467
15. Schwartz, D.C. and C.R. Cantor: *Cell*, **37**, 67-75 (1984)
16. Lex H.T., V. Ploeg, D.C. Schwartz, C.R. Cantor and P. Borst: *Cell* **37**, 77-84 (1984)
17. Gemmill, R.G., J.F. Coylee-Morris, F.D. Mcpeck, L.F. Waree-Urbe and F. Hecht: *Gene Anal. Technol.* **4**, 119-131 (1987)
18. Smith, C.L. and C.R. Cantor: *Science* **236**, 1448 (1987)
19. Gatti, R.A., P. Concannon and W. Salser: *Biotechnol. May/June*, 148-155 (1984)
20. Berent, S.L., M. Mahmoudi, R.M. Torczynski, P.W. Bragy and A.P. Bollon: *Biotechnol. May/June*, 208-220 (1985)
21. Singer, J.T. and W.R. Finnerty: *J. Bacteriol.* **157**, 607-611 (1984)
22. Anderson, D.M. and D. Mills: *Phytopathol.* **75**, 104-108 (1985)
23. Turner P. and B. Dnaiels: *Mol Gen. Genet.* **195**, 101-107 (1984)
24. Mittur N.J. and A.A. Szalay: *Mol. Gen. Genet.* **196**, 290-300 (1984)

(Received March 6, 1989)