

유전공학기법으로 변형시킨 내성유전자에 대한 수질환경에서의 전이동태

이성기 · 김치경*

충북대학교 자연대 미생물학과

수질환경에서 일어나는 GMM 균주의 항생물질 내성유전자의 전이동태를 연구하기 위하여, Km^r plasmid의 conjugation을 실시하였다. 그 결과 conjugant들에 나타나는 plasmid의 재배열을 agarose gel에서 비교 분석하였고, DNA probe를 이용하여 Km^r 유전자의 행방을 추궁하였다. GMM 균주들(DKC600과 DKC601)의 Km^r 유전자는 자연계 분리균주(DK1) 보다 더 높은 전이율이 나타났으나, recipient에 따라 다소 차이가 있었다. Conjugant들에서 나타나는 plasmid의 재배열도 donor가 GMM 균주일때 더 다양하였다. 그리고 AW와 FW의 수질환경에서 Km^r 유전자의 전이는 균주에 관계없이 LB에서 보다 훨씬 낮았으며, GMM 균주에서 전이된 plasmid들은 특이하게 그 분자량이 커졌다. LB에서 수온이 10°C 보다는 25°C 이상 그리고 pH가 9에서 5에 가까울수록 Km^r 유전자는 더 많이 전이되었으나, FW에서는 수온과 pH에 의한 영향이 거의 없었다. 또 FW에서는 GMM 균주의 conjugant들에서 chromosome 이외에 plasmid가 거의 발견되지 않았다. 이와 같이 plasmid들이 다양하게 재배열된 conjugant들에서 Southern analysis에 의하여 Km^r 유전자의 행방을 알아본 결과, LB에서는 DK1 뿐아니라 GMM 균주들의 Km^r plasmid가 전이된후 그대로 존재하였다. 그러나 FW의 수질환경에서는 donor의 Km^r plasmid는 없애지고, chromosome에서 hybridization signal이 나타났다. 또 FW에서 donor가 DK1일 경우 pDK101은 수온과 pH의 영향없이 pDK101이 그대로 전이되었지만, DKC600이 donor일 경우에는 Km^r plasmid인 pDK101이 모두 chromosome에 integration 되었다. 그러므로 LB나 AW에서는 DK1 뿐아니라 GMM 균주들의 Km^r plasmid가 전이된후 conjugant에 그대로 존재하였고 기타의 plasmid들이 다양하게 재배열되었지만, FW 수질환경에서는 DKC600의 Km^r 유전자가 수온이나 pH에 상관없이 chromosome에 integration되었다.

KEY WORDS □ R gene, GMMs, transfer and behavior, plasmid rearrangement, Southern analysis

최근 수계 및 토양의 자연 생태계에서 유전자의 전이문제는 환경영향 평가의 차원에서 새로운 관심사가 되고 있다. Conjugative plasmid는 자연환경에서 세균들 사이에 chromosomal gene뿐아니라 IS (insertion sequences)나 Tn(transposon)을 전이시켜 항생물질 내성과 같은 특성유전자가 전파되고 있으며 (14), 그 중에서도 Tn은 세균의 chromosome이나 plasmid 및 virus genome 속의 다양한 위치로 insert될 수 있다(15). 그리고 plasmid의 복제와 분리조절기능에 연관되어 있는 incompatibility 현상은 plasmid의 재배열과 전이 행방에도 영향을 줄 수 있다. 자연계에서 DNA sequences의 다양한 재배열 현상은 repeated sequences 사이의 homologous recombination, site-specific recombination, Tn element의 이동, 그리고 여러가지 불규칙적인 재조합 과정에서 일어날 수 있고 또 어떤 경우에는 특수환경이나 생리적인 signal에 따라 재배열이 촉진될 수도

있고, DNA 복제상의 결합 또는 회복기구에 의하여 나타날 수 있다(1)는 점에서 유전자의 전이의 의미를 더욱 심각하게 해준다.

Salmonella에서 ³²P로 표식된 DNA probe로 하구로 부터 특정한 Salmonella를 직접 검출(11)하거나 β-hemolysin 유전자를 probe로 한 Listeria 균주의 선발(4)과 Pseudomonas에 감염되는 phage를 phage DNA probe를 이용하여 자연생태계에서 분석한 연구(17)와 같이 DNA probe를 이용하는 colony hybridization. 그리고 Southern analysis 방법이 활용되고 있다. 특히 polymerase chain reaction(PCR) 방법으로 증폭시킨 DNA에 의한 표적 유전자의 추적 및 탐색 방법은 자연계로 방출되는 genetically modified microorganisms(GMMs) 균주들의 변형 유전자가 환경에 주는 영향과 그들의 행방을 평가하는데 큰 도움을 주고 있다.

그러므로 본 연구에서는 자연계로 부터 항생물질 내성균주를 분리하고, 그로부터 유전공학 기법으로 kanamycin(Km) 내성유전자를 변형시킨 GMM 균

*Corresponding author

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study.

Bacteria and plasmids	Relevant Characteristics	Remarks	Sources
Bacteria			
<i>E. coli</i> DK1(pDK101)	Km ^r Ap ^r Tc ^r Cm ^r Sm ^r	Natural isolate, donor	(7)
<i>E. coli</i> DKC600(pDK101)	Km ^r Ap ^r Tc ^r Cm ^r Sm ^r	GMM strain, donor	(8)
<i>E. coli</i> DKC601(pDT529)	Km ^r Ap ^r Tc ^r Cm ^r Sm ^r	" donor	(8)
<i>E. coli</i> DXL201(pDX95)	Km ^r Ap ^r Tc ^r Cm ^r Sm ^r	" donor	This study
<i>Prov. rettseri</i> MT1(pMT101)	Km ^r Ap ^r Tc ^r Cm ^r Sm ^r	Natural isolate, recipient	(7)
<i>E. coli</i> MT2(pMT201)	Km ^r Ap ^r Tc ^r Cm ^r Sm ^r	" recipient	(7)
<i>E. coli</i> HB101(pBR322)	Km ^r Ap ^r Tc ^r Sm ^r	Laboratory strain, recipient	(10)
<i>E. coli</i> XL1Blue	Tc ^r	Host for subcloning	Stratagene Ltd.
Plasmid			
pDK101	Km(1500) ^r	Plasmid in DK1 and DKC600	(7,8)
pDT529	Km(1600)	Recombinant plasmid in DKC601	(8)
pDX95	Km(2000)	Recombinant plasmid in DXL201	This study
pBluescript SK(+)	Ap(1000)	Vector for subcloning	Stratagene Ltd.

^aNumber in parenthesis represent MIC($\mu\text{g/ml}$)

Km, kanamycin; Ap, ampicillin; Tc, tetracycline; Cm, chloramphenicol; Sm, streptomycin

주를 제조하여 그들 유전자의 전이동태를 수계환경에서 conjugation 방법으로 연구 하였다. 그리고 그 결과 얻어진 conjugant에서 plasmid의 재배열을 분석하였고, Km^r 유전자의 전이빈도와 재배열에 미치는 균주, 수질, 수온 및 pH의 영향을 비교 연구하였다. 또 Km^r 유전자의 행방을 추적하기 위하여 DNA probe에 의한 Southern analysis를 하였다.

재료 및 방법

GMM 균주와 plasmids

본 실험에 사용된 균주와 plasmid는 Table 1과 같다. *E. coli* DK1과 *Providencia rettseri* MT1, 그리고 *E. coli* MT2의 특성은 Kim과 Lec(7)의 보고에서 기술한 바와 같다. GMM 균주인 DKC600과 DKC601은 Kim과 Lee(8)의 보고에서와 같이 *E. coli* DK1으로부터 제조한 균주이다. 그리고 pDX95를 포함한 DXL201은 Fig. 1에서와 같이 DKC601 균주가 가지고 있는 pDT529를 분리하여 HindIII로 처리한 6.5 kb의 절편을 pBluescript SK(+)에 cloning하여 *E. coli* XL1Blue에서 발현시켰다.

전이실험

각 실험조건에서 GMM 균주들과 함께 DK1 균주가 가지고 있는 Km^r 유전자의 전이실험은 Kim과 Lee(9), 그리고 Lee와 Kim(12)의 보고에서와 같이 conjugation방법으로 실시하였다. 균주에 따른 전이동태를 연구하기 위하여 GMM 균주인 DKC600, DKC601, DXL201과 함께 자연계 분리균주인 DK1을 donor로 사용하였고, recipient로 자연계 분리균주인 MT1과 MT2 그리고 실험실 균주인 *E. coli* HB101를 사용하였다. 기본적으로 pH 7의 LB 액체배지에 10⁸~10⁸ cell/ml이 되도록 접종하여 20°C와 30°C에서 18시간 동안 conjugation 시켰다. Kanamy-

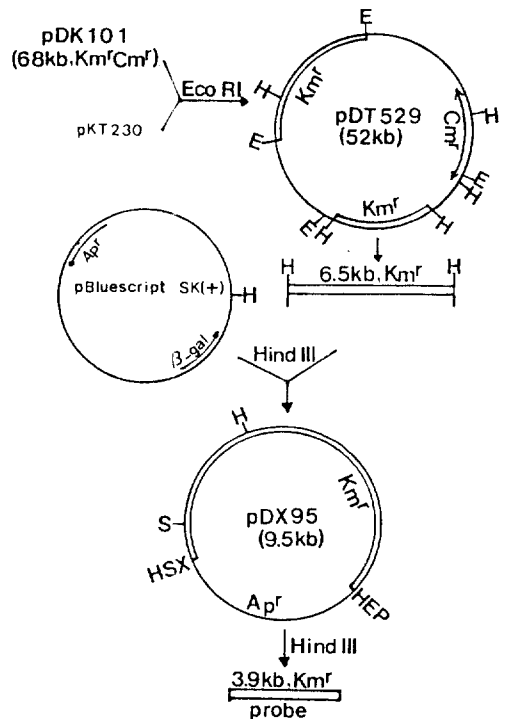


Fig. 1. Construction of DNA probe(Km^r) used for Southern analysis.

cin(Km)에 대한 내성 conjugant들을 선별하기 위하여 DXL201이 donor인 실험에서는 kanamycin (50 $\mu\text{g/ml}$)과 streptomycin(50 $\mu\text{g/ml}$)이 첨가된 LB 고체배지에, 그리고 그 외의 경우에는 kanamycin(50 $\mu\text{g/ml}$), ampicillin(50 $\mu\text{g/ml}$), tetracycline(50 $\mu\text{g/ml}$)

의 항생물질이 첨가된 LB 고체배지에 0.1 ml씩의 시료를 도말하여 35°C에서 1일 배양하였다. 전이빈도는 접종한 donor에 대하여 얻어진 conjugant의 수적 비로 계산하였다.

수질환경으로서는 LB 액체배지와 멸균한 무심천수 (autoclaved river water, AW) 그리고 0.22 µm membrane filter로 여과한 무심천수(filtered river water, FW)를 사용하였으며, 수온과 pH에 따른 Km^r 유전자의 전이동태는 10°, 20°~25°, 30°~35°C의 수온 그리고 pH 5, 7, 9에서 각각 위와 같은 요령으로 실험하였다.

Plasmid의 분석

실험균주들의 plasmid DNA는 Sambrook 등(18)의 alkaline lysis 방법을 이용하여 Kim과 Lee(9)의 보고에서와 같이 분리 추출하였다. Plasmid DNA에 대한 제한효소 처리와 반응조건은 Sambrook 등(18)의 방법과 제조회사인 Promega Co. (Madison, WI, USA)의 실험지침에 의거하였다. Plasmid의 전기영동은 0.7~1% agarose gel에서 5 V/cm이하로 전개시켰다.

DNA probe의 제조

Fig. 1에서와 같이 제조한 pDX95 plasmid를 분리하여 *Hind*III로 절단한 후 Tris-acetate buffer를 사용하여 0.8% agarose gel에서 2 V/cm이하로 전개시켰다. 310 nm의 자외선으로 *Hind*III 절편을 확인한 후, 3.9 kb 절편을 GeneClean II Kit(Biol101, Inc., La Jolla, CA, USA)으로 elution하여 multiprime DNA labeling system(RPN 1600Z, Amersham Co., UK)으로 biotin-7dATP(BRL Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, USA)를 표식하므로써 DNA probe를 제조하였다.

Southern analysis

Conjugation에 의하여 전이된 Km^r 유전자의 행방은 Sambrook 등(18)의 방법으로 conjugant들로

부터 분리한 plasmid들에 대하여 Amersham Co. (Amersham, Buckinghamshire, UK)의 Southern hybridization 실험지침에 따라 추적하였다. Plasmid DNA가 전개된 gel은 0.25 N HCl용액에서 20분간 반응시키고 denaturation buffer(1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH)에서 다시 45분간 반응시켰다. 이어서 neutralization buffer(1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl, pH 7.3)에서 15분간 2회 중화시켰다. 그리고 gel의 DNA는 20X SSC buffer에서 nylon membrane (Hybond N, Amersham Co., UK)에 12~40시간 동안 transfer시킨 다음, 30분간 실온에서 건조 후, 80°C의 dry oven에서 1~2시간 동안 baking하였다. 그리고 10 ml의 prehybridization buffer(50% formamide, 5X SSC, 5X Denhart's solution, 25 mM sodium phosphate, pH 6.5, 0.5 mg/ml denatured herring sperm DNA 또는 salmon sperm DNA)에 넣어 42°C에서 2~4시간 동안 반응시켰다. 그리고 10 ml의 hybridization buffer(45% formamide, 5X SSC, 1X Denhart's solution, 20 mM sodium phosphate, pH 6.5, 0.2 mg/ml denatured herring sperm DNA, 5% Dextran sulfate, 0.1~0.5 µg/ml denatured probe DNA)에 다시 넣어 42°C에서 12시간 이상 반응시켰다. Hybridization band의 검색은 BluGENE detection system(BRL Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD, USA)을 이용하여 발색시켰다.

결과 및 고찰

Km^r 유전자의 전이

유전공학적으로 변형시킨 GMM 균주들(DKC600, DKC601, DXL201)과 DK1 등 균주에 따른 Km^r 유전자의 전이빈도는 Table 2와 같다. Donor로 사용한 GMM 균주들의 변형된 Km^r 유전자의 전이빈

Table 2. Conjugal transfer frequency of Km^r gene of GMMs and their parental bacteria, depending on the mating pairs.

Mating pairs		Media for mating	Temp. for mating (°C)	pH for mating	Inocula of donor/recipient (cells/ml)	Transfer frequency by conjugation for 18 h
Donor	Recipient					
DK1	MT1	LB	20	7.0	3.4×10 ⁴ /3.6×10 ⁴	1.8×10 ⁻³
DKC600					4.6×10 ⁴ /3.6×10 ⁴	1.5×10 ⁻²
DKC601					2.5×10 ⁴ /3.6×10 ⁴	1.8×10 ⁻²
DXL201					5.7×10 ³ /3.6×10 ⁴	3.2×10 ⁻²
DK1	MT2	LB	20	7.0	3.4×10 ⁴ /3.9×10 ⁴	5.2×10 ⁻⁴
DKC600					4.6×10 ⁴ /3.9×10 ⁴	2.3×10 ⁻¹
DKC601					2.5×10 ⁴ /3.9×10 ⁴	2.6×10 ⁻³
DXL201					5.7×10 ³ /3.9×10 ⁴	7.0×10 ⁻³
DK1	HB101	LB	30	7.0	6.2×10 ⁸ /4.0×10 ⁸	1.0×10 ⁻⁴
DKC600					8.3×10 ⁸ /4.0×10 ⁸	9.7×10 ⁻⁵
DKC601					8.3×10 ⁸ /4.0×10 ⁸	1.1×10 ⁻⁷
DXL201					4.7×10 ⁸ /4.0×10 ⁸	1.4×10 ⁻⁵

Table 3. Conjugal transfer frequency of *Km^r* gene of GMMs and their parental bacteria in different waters.

Mating pairs		Media for mating	Temp. for mating (°C)	pH for mating	Inocula of donor/recipient (cells/ml)	Transfer frequency by conjugation for 18 h
Donor	Recipient					
DK1	MT1	LB	20	7.0	$4.0 \times 10^4 / 3.7 \times 10^4$	2.5×10^{-4}
		AW		9.5	$5.0 \times 10^8 / 4.6 \times 10^{12}$	5.6×10^{-8}
		FW		7.7	$1.9 \times 10^9 / 1.2 \times 10^9$	1.7×10^{-9}
DKC601	MT1	LB	20	7.0	$2.5 \times 10^4 / 3.7 \times 10^4$	1.4×10^{-2}
		AW		9.5	$2.4 \times 10^8 / 6.2 \times 10^8$	4.2×10^{-8}
		FW		7.7	$2.4 \times 10^8 / 6.2 \times 10^8$	7.3×10^{-8}
DKC600	MT1	LB	20	7.0	$4.6 \times 10^4 / 3.7 \times 10^4$	2.4×10^{-2}
		AW		9.5	$1.3 \times 10^9 / 6.2 \times 10^8$	4.6×10^{-8}
		FW		7.7	$1.3 \times 10^9 / 6.2 \times 10^8$	1.9×10^{-7}

LB, Luria Bertani broth; AW, autoclaved river water; FW, filtered river water

Table 4. Conjugal transfer frequency of *Km^r* gene of GMMs and their parental bacteria at different temperatures.

Mating pairs		Media for mating	Temp. for mating (°C)	pH for mating	Inocula of donor/recipient (cells/ml)	Transfer frequency by conjugation for 18 h
Donor	Recipient					
DK1	HB101	LB	10	7.0	$4.2 \times 10^9 / 3.6 \times 10^7$	1.0×10^{-9}
			25			1.5×10^{-4}
			35			1.4×10^{-4}
DKC600	HB101	LB	10	7.0	$1.3 \times 10^9 / 3.6 \times 10^7$	6.8×10^{-9}
			25			7.3×10^{-6}
			35			2.7×10^{-5}
DK1	MT1	FW	10	7.7	$2.0 \times 10^9 / 3.3 \times 10^9$	1.8×10^{-8}
			20			5.5×10^{-8}
			30			1.3×10^{-7}
DKC600	MT1	FW	10	7.7	$1.3 \times 10^9 / 3.3 \times 10^9$	3.3×10^{-8}
			20			2.9×10^{-8}
			30			1.2×10^{-8}

도는 recipient가 MT1이나 MT2일때 각각 10^{-2} 그리고 10^{-3} 으로 나타나 자연계 분리균주(DK1)보다 10배정도 더 높았으며, GMM 균주 사이에는 비슷한 전이빈도를 나타내었다. 그러나 recipient가 실험실 균주인 *E. coli* HB101 일때에는 GMM 균주들(DKC600, DKC601, DXL201)의 *Km^r* 유전자의 전이빈도는 DK1보다 오히려 낮았다.

Recipient를 MT1으로 하여 각 donor 균주들의 *Km^r* 유전자의 전이를 상이한 수질환경에서 실험한 결과는 Table 3과 같다. 어느 경우에도 LB에서 보다 AW나 FW에서 훨씬 낮은 전이빈도를 나타내어 donor의 균주 보다는 수질환경의 영향이 더 크다는 것을 알 수 있었다. Fernandez-Astorga 등(5)은 증류수의 매질에서 cell density가 10^8 cell/ml 이상일 때에만 conjugant가 검출되었다고 보고하였다. LB와 하천수의 본 실험에서 사용한 균주의 접종량의 차이나 멸균한 하천수의 pH 값이 9.5로 높아진 차이에서 오는 영향은 분명하지 않다. 이는 Singleton(19)이 colloidal clay는 세포 외부의 pH를 안정화 시킴으

로서 세포의 호흡을 자극하게 되고, clay표면과 세포 사이의 정전기적 인력 때문에 R plasmid의 전이가 억제될 수 있다고 한 보고와 연관성이 있다.

수온에 의한 전이빈도의 차이는 Table 4에서와 같이 나타났다. LB 배지에서 *E. coli* HB101을 recipient로 했을때 10°C 보다는 25°C 이상에서 높은 빈도가 나타났으나, 25°C 와 35°C 사이에서 DKC600의 *Km^r* 유전자의 전이빈도는 DK1에서 보다 10배 이상 낮았다. 그러나 FW에서 recipient가 MT1인 경우에는 *Km^r* 유전자의 전이빈도는 수온에 따라 별다른 차이가 없었다. 또 pH에 따른 전이빈도(Table 5)에 있어서는, FW의 수질에서 균주나 pH에 따라 큰 차이가 없었으나, LB에서는 DKC600의 전이빈도가 DK1보다 조금 높았으며 pH 9보다 pH 7에서 그리고 pH 7보다 pH 5에서 더 높은 경향을 보여주었다. Fernandez-Astorga 등(5)이 Triptone Soya Broth에서 실시한 실험에서 수온이 7.7°C 에서 37°C 로 갈수록 전이빈도가 높아졌다는 보고는 본 연구의 결과와 일치하였으나, pH의 값이 6에서 8.5로 갈수록

Table 5. Conjugal transfer frequency of *Km^r* gene of GMM and their parental bacterial isolate at different pH values.

Mating pairs		Media for mating	Temp. for mating (°C)	pH for mating	Inocula of donor/recipient (cells/ml)	Transfer frequency by conjugation for 18 h
Donor	Recipient					
DK1	MT1	LB	30	5.0	2.3×10 ⁸ /2.1×10 ⁸	2.6×10 ⁻⁷
				7.0		1.7×10 ⁻⁷
				9.0		0
DKC600	MT1	LB	30	5.0	2.7×10 ⁸ /2.1×10 ⁸	2.4×10 ⁻⁵
				7.0		7.1×10 ⁻⁶
				9.0		3.9×10 ⁻⁷
DK1	MT1	FW	20	5.0	1.5×10 ⁹ /5.0×10 ⁹	3.2×10 ⁻⁸
				7.0		4.2×10 ⁻⁸
				9.0		3.0×10 ⁻⁸
DKC600	MT1	FW	20	5.0	1.0×10 ⁹ /5.0×10 ⁹	5.8×10 ⁻⁸
				7.0		2.9×10 ⁻⁷
				9.0		7.3×10 ⁻⁸

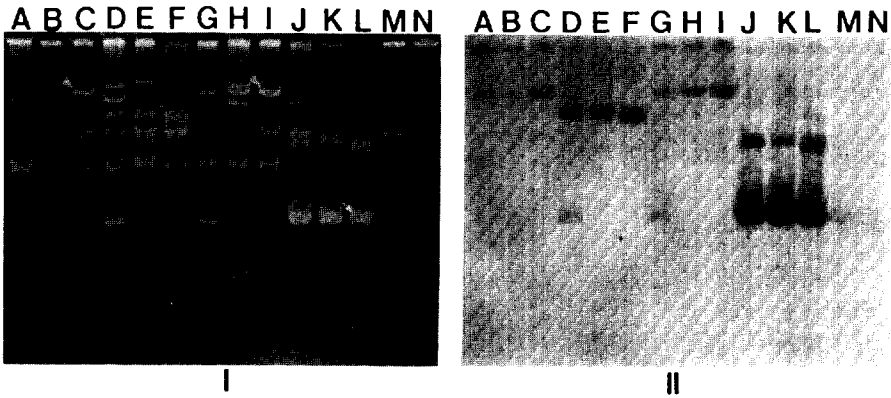


Fig. 2. (I) Plasmid profiles of donors, recipient, and conjugants obtained by conjugation in LB broth for 18 h. (II) Southern analysis with the DNA probe.

Lanes: A, conjugant of DK1XMT1; B, conjugant of DK1XMT2; C, DK1; D, conjugant of DKC601XMT1; E, conjugant of DKC601XMT2; F, DKC601; G, conjugant of DKC600XMT1; H, conjugant of DKC600XMT2; I, DKC600; J, conjugant of DXL201XMT1; K, conjugant of DXL201XMT2; L, DXL201; M, MT1; N, MT2. Arrows: pDK101, ▶: pDT529, □: pDX95, →.

전이빈도의 전반적인 차이가 없었다는 보고는 본 실험의 FW에서의 결과와 유사하다.

Plasmid의 재배열

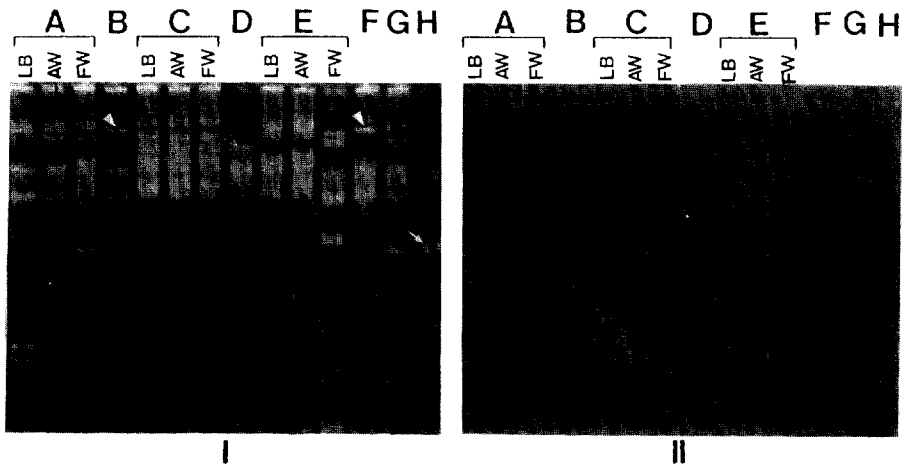
여러가지 조건의 본 실험에서 얻어진 conjugant들은 환경조건에 따라 plasmid의 재배열이 다양하게 나타났다. LB 액체배지에서 균주에 따라 얻어진 conjugant들의 plasmid profile은 Fig. 2(I)와 같으며, 이를 분석한 결과는 Table 6에서와 같다. DK1을 donor로 했을 경우에는 *Km^r* 유전자가 포함되어 있는 68 kb의 plasmid는 그대로 전이되어 발견되었으나, recipient가 MT1일 때(lane A)에는 58 kb의 plasmid가, 그리고 MT2일 때(lane B)에는 77 kb plasmid가 새로 생성되어 8개의 plasmid가 각각 나타났다. 또 GMM 균주를 donor로 사용했을 때(lane

D~K)에도 donor의 *Km^r* 유전자를 포함하고 있는 plasmid는 그대로 conjugant들에서 발견되면서 크기가 다른 새로운 plasmid들이 나타났다. Donor가 DK1인 경우보다 GMM 균주인 경우에 새로 생성된 plasmid의 수와 크기는 좀더 다양하였으며, recipient에 따라서도 차이가 있었다. 특히 donor가 GMM 균주인 경우 conjugant에서 나타난 plasmid의 수는 recipient에 의하여 크게 감소하였다. 이와 같이 conjugation에 의하여 recipient가 가지고 있던 plasmid의 소멸은 결실과 중복, 또는 재배열이 DNA의 integrase에 의해 일어난다는 Collis와 Hall (3)의 결과와 부합된다.

Plasmid의 재배열에 미치는 수질의 영향은 Fig. 3(I)에서와 같으며, 이를 분석한 결과는 Table 7과

Table 6. Analysis of the plasmids rearranged in the conjugants from Fig. 2(I).

Lane	Mating pairs and plasmids (No. & size in kb)		No. & size(kb) of plasmids in the conjugants
	Donor	Recipient	
A	DK1, 6(68, 8.5, 7.5, 5.5, 4.8, 4.5)	MT1, 7(79, 70, 62, 50, 10.5, 3.8, 2.5)	8(79, 68, 62, 58, 8.5, 5.5, 4.8, 4.5)
B	DK1, 6(68, 8.5, 7.5, 5.5, 4.8, 4.5)	MT2, 6(82, 79, 63, 9.0, 5.6, 2.5)	8(77, 68, 63, 9.5, 8.5, 5.5, 4.8, 4.5)
D	DKC601, 1(52)	MT1, 7(79, 70, 62, 50, 10.5, 3.8, 2.5)	5(79, 62, 52, 14, 10.5)
E	DKC601, 1(52)	MT2, 6(82, 79, 63, 9.0, 5.6, 2.5)	4(88, 79, 62, 52)
G	DKC600, 1(68)	MT1, 7(79, 70, 62, 50, 10.5, 3.8, 2.5)	6(88, 79, 68, 62, 15, 10.5)
H	DKC600, 1(68)	MT2, 6(82, 79, 63, 9.0, 5.6, 2.5)	5(79, 68, 62, 7.0, 5.6)
J	DXL201, 1(9.5)	MT1, 7(79, 70, 62, 50, 10.5, 3.8, 2.5)	2(62, 9.5)
K	DXL201, 1(9.5)	MT2, 6(82, 79, 63, 9.0, 5.6, 2.5)	3(62, 9.5, 5.6)

**Fig. 3.** (I) Plasmid profiles of donors, recipient, and conjugants obtained by conjugation in different waters for 18 h. (II) Southern analysis with the DNA probe.

Lanes: A, conjugants of DK1XMT1; B, DK1; C, conjugants of DKC601XMT1; D, DKC601; E, conjugants of DKC600XMT1; F, DKC600; G, MT1; H, DXL201. Abbreviation: LB, Luria-Bertani broth; AW, autoclaved river water; FW, filtered river water. Arrows: pDK101, \blacktriangleright : pDT529, \triangleright : pDX95, \rightarrow .

Table 7. Analysis of the plasmids rearranged in the conjugants from Fig. 3(I).

Lane	Mating pairs and plasmids (No. & size in kb)		No. & size(kb) of plasmids in the conjugants
	Donor	Recipient	
A-LB	DK1, 6(68, 8.5, 7.5, 5.5, 4.8, 4.5)	MT1, 7(79, 70, 62, 50, 10.5, 3.8, 2.5)	6(88, 79, 66, 62, 4.8, 4.5)
A-AW	"	"	8(79, 68, 62, 50, 10.5, 4.8, 2.0, 1.8)
A-FW	"	"	6(79, 72, 62, 50, 10.5, 1.8)
C-LB	DK601, 1(52)	MT1, 7(79, 70, 62, 50, 10.5, 3.8, 2.5)	4(88, 79, 62, 52)
C-AW	"	"	4(88, 79, 62, 52)
C-FW	"	"	4(88, 79, 62, 52)
E-LB	DKC600, 1(68)	MT1, 7(79, 70, 62, 50, 10.5, 3.8, 2.5)	3(72, 68, 66)
E-AW	"	"	5(95, 88, 79, 68, 66)
E-FW	"	"	6(67, 62, 50, 14, 1.8, 1.0)

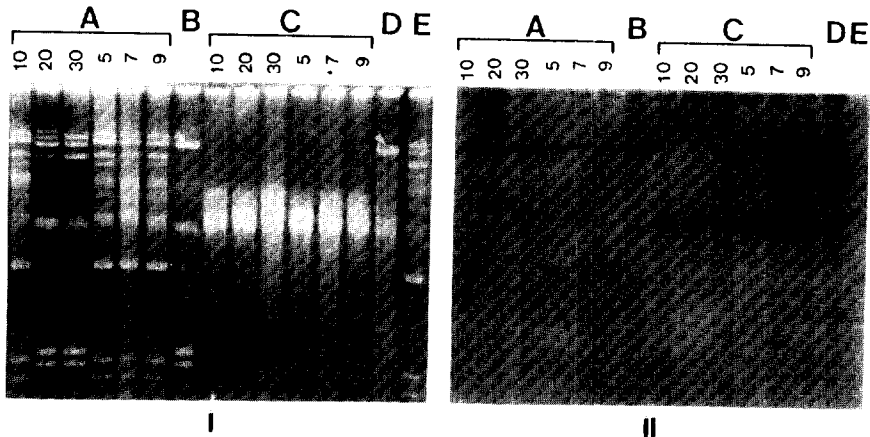


Fig. 4. (I) Plasmid profiles of donors, recipient, and conjugants obtained by conjugation in the filtered river water for 18 h. (II) Southern analysis with the DNA probe.

Lanes: A, conjugants of DK1XMT1; B, DK1; C, conjugants of DKC600XMT1; D, DKC600; E, MT1. The numbers on the lanes indicate the temperatures(10, 20, and 30°C) and pH(5, 7, and 9). Arrow: pDK101, ►.

Table 8. Analysis of the plasmids rearranged in the conjugants from Fig. 4(I).

Mating pairs and plasmids (No. & size in kb)			No. & size(kb) of plasmids in the conjugants
Lane	Donor	Recipient	
A-10	DK1, 6(68, 8.5, 7.5, 5.5, 4.8, 4.5)	MT1, 7(79, 70, 62, 50, 10.5, 3.8, 2.5)	8(79, 72, 65, 62, 50, 10.5, 4.6, 3.0)
A-20	"	"	8(84, 76, 68, 64, 8.5, 7.5, 4.8, 4.5)
A-30	"	"	7(76, 68, 64, 8.5, 7.5, 4.8, 4.5)
C-10	DKC600, 1(68)	MT1, 7(79, 70, 62, 50, 10.5, 3.8, 2.5)	2(62, 43)
C-20	"	"	1(43)
C-30	"	"	1(43)
A-5	DK1, 6(68, 8.5, 7.5, 5.5, 4.8, 4.5)	MT1, 7(79, 70, 62, 50, 10.5, 3.8, 2.5)	9(79, 72, 65, 62, 50, 38, 10.5, 4.6, 3.0)
A-7	"	"	9(79, 72, 65, 62, 50, 38, 10.5, 4.6, 3.0)
A-9	"	"	9(79, 72, 65, 62, 50, 38, 10.5, 4.6, 3.0)
C-5	DKC600, 1(68)	MT1, 7(79, 70, 62, 50, 10.5, 3.8, 2.5)	1(43)
C-7	"	"	1(43)
C-9	"	"	1(43)

같다. DK1과 MT1의 conjugation(lane A)에서 donor의 68 kb plasmid는 그대로 전이되어 나타났으나, conjugant에서 재배열된 plasmid의 양상은 LB(lane A-LB)에서 보다 AW와 FW의 수질(lane A-AW와 A-FW)에서 더욱 다양하였다. 특히 AW와 FW에서 50 kb plasmid가 공히 생성되었지만, FW에서 4.8 그리고 2.0 kb의 plasmid는 나타나지 않았다. 그러나 donor가 DKC601인 경우(lane C)에는 어느 수질에서나 모두 88 kb의 plasmid가 새로 생성되었지만 다른 차이는 없었고 recipient의 작은 plasmid들이 모두 소멸되었다. 그리고 donor가 DKC600인 경우에는 LB(lane E-LB)와 AW(lane E-AW)에서는 공히 65 kb 이하의 plasmid들이 전혀 나타나지 않았으며,

FW(lane E-FW)에서는 67 kb와 14 kb의 plasmid가 독특하게 생성되었다.

Plasmid의 재배열 현상이 AW나 LB에서 보다 FW에서 다양했던 점을 감안하여, DK1과 DKC600 균주를 donor로 하여 plasmid의 재배열에 미치는 수온과 pH의 영향을 조사하였다. 그 결과는 Fig. 4(I)과 같으며, 이를 분석한 결과는 Table 8과 같다. DK1이 donor인 경우 10°C의 conjugant(lane A-10)에서는 donor와 recipient의 plasmid가 그대로 나타났으나, 20°C와 30°C의 conjugant들(lane A-20과 A-30)에서는 recipient의 작은 plasmid들이 거의 나타나지 않았다. 그러나 DKC600을 donor로 했을 때(lane C-10, C-20, C-30)에는 수온에 관계없이 43

kb의 plasmid만이 나타났고, lane C-20에는 62 kb의 plasmid도 보였다. pH의 영향에 있어서 donor가 DK1(lane A-5, A-7, A-9)인 경우에는 pH에 관계없이 68 kb의 Km^r plasmid와 recipient의 대부분의 plasmid들이 나타났다. 그러나 DKC600이 donor인 경우(lane C-5, C-7, C-9)에도 pH에 관계없이 43 kb의 plasmid 이외에는 어떠한 plasmid도 나타나지 않았다. 이와 같이 수온과 pH는 plasmid의 재배열에 크게 영향을 미치지 않았으나, donor의 차이는 큰 영향을 주었다. 특히 donor가 DKC600인 경우 43 kb의 plasmid 외에 어떤 plasmid도 나타나지 않았던 점은 특이한 결과였다.

수질환경에 따라 plasmid의 재배열 현상은 전보(9, 10)에서도 지적하였지만, 자연계 분리균주 보다 GMM 균주를 donor로 했을 때에 plasmid의 재배열 현상이 특별히 다양하였으며 수온과 pH보다는 균주와 수질환경이 plasmid의 재배열에 더 큰 영향을 주었다는 본 실험의 결과는 유의할만한 것이다. Lessel 등(13)은 IncP(RP4)의 conjugative plasmid의 전이에서 transfer 개시(Tra1)와 conjugation 과정(Tra2)의 복합작용에 의하여 재배열이 일어나며, Birch 등(2)도 chromosomal DNA의 결실등에 의하여 재배열이 일어난다고 보고한 바와 같이, 자연계 균주 보다 GMM 균주들의 plasmid의 전이 행방이 더욱 독특한 것은 변형된 유전자들의 incompatibility의 차이뿐 아니라 자연환경에 대한 순응력의 차이 때문이라 해석된다.

Km^r 유전자의 전이동태

유전 공학적으로 변형시킨 GMM 균주들의 Km^r 유전자가 conjugation에 의하여 전이되는 율과 conjugant에서 나타나는 plasmid의 재배열이 자연계 균주 보다 독특한 동시에, 수질환경에 따라 다양하게 나타나는 점에서 Km^r 유전자의 행방을 정확하게 추구해볼 필요가 절실했다. 그러므로 Km^r 유전자를 포함하는 3.9 kb의 DNA를 probe로 사용하여 각 conjugant들의 plasmid에 대하여 Southern analysis를 한 결과는 Fig. 2(II), 3(II) 그리고 4(II)와 같다. LB 배지 [Fig. 2(II)]에서 DK1(lane C)을 donor로 하고 MT1(lane M)과 MT2(lane N)를 각각 recipient로 했을 때, pDK101(68 kb)은 전이되어 donor와 같은 위치에 존재하고 있었다. 그러나 GMM 균주인 DKC601과 DKC600을 donor로 했을 때(lane F와 I)에는 52 kb와 68 kb의 Km^r plasmid들이 각각 hybridization 되었으며, MT1의 conjugant들(lane D와 G)에서는 그 외에 10.5 kb의 plasmid도 hybridization signal이 나타났다. Recipient인 MT1(lane M)의 10.5 kb의 plasmid에서 약한 signal이 나타난 점으로 보아 이들은 probe DNA의 base sequence와 어느정도 상동성이 있는 recipient의 plasmid인 것으로 해석된다. 그러나 DXL201을 donor로 한 경우의 conjugant에서는

recipient가 MT1(lane J)이나 MT2(lane K)에 관계 없이 donor에서와 같은 위치에 hybridization이 일어났다. 그러므로 자연계 균주나 GMM 균주의 Km^r 유전자는 20°C의 LB에서 18시간 conjugation 시켰을 경우 Km^r plasmid 자체에는 변화가 없었음을 알 수 있었다.

수질환경을 다르게 했을 경우 [Fig. 3(II)], donor가 DK1일 때의 conjugant들이 AW와 FW에서는 Km^r plasmid인 pDK101이 그대로 전이되어 hybridization이 일어났지만, LB(lane A-LB)에서는 10.5 kb plasmid가 나타나지 않았다. Donor가 DKC601인 경우(lane C)에는 수질에 의한 차이가 전혀 없이 52 kb의 pDT529가 그대로 존재하였다. 그러나 donor가 DKC600인 경우에는 LB(lane E-LB)와 AW(lane E-AW)에서는 68 kb의 pDK101만이 hybridization signal을 보였으며, FW(lane E-FW)에서는 68 kb의 Km^r plasmid는 없어지고 chromosome에서 hybridization signal이 나타났다. 이는 Km^r 유전자를 포함하고 있는 pDK101에 결실이 일어났거나 또는 chromosome에 integration된 결과라고 해석된다. 이와 같은 사실은 RP4 plasmid가 Tn에 의하여 chromosome에 integration 되었다고 한 Willets 등(20)의 보고나, 앞에서 지적한 Birch 등(2)의 결과로부터 유추할 수 있다.

또 상이한 수온과 pH에서 얻은 conjugant들 [Fig. 4(II)]에서 보면, DK1을 donor로 했을 때(lane A), Km^r plasmid인 pDK101(68kb)과 비슷한 위치에서 hybridization이 일어났지만, 20°C(lane A-20)와 30°C(lane A-30)에서는 recipient의 10.5 kb plasmid와 같은 위치에서 hybridization signal이 나타나지 않았다. 그러나 donor가 DKC600인 경우의 conjugant들(lane C)에서는 수온과 pH에 관계없이 donor의 Km^r plasmid인 pDK101(68kb)이 전혀 발견되지도 않았으며 hybridization signal도 chromosome에서만 나타났다. 이는 Km^r 유전자가 모두 chromosome에 integration된 결과라고 해석된다. 이와 같은 현상은 Tn과 IS의 transposition에 의하여 conjugative plasmid가 chromosome에 integration 되었다는 Francois 등(6)과 Norgren와 Scott(16)의 보고와 동일하지만, Km^r 유전자의 base sequence가 밝혀질 때까지는 Tn과의 연관성을 알 수 없다. Conjugation에 의하여 균주와 수질환경에 따라 plasmid들이 다양하게 재배열 되었지만, 특히 GMM 균주 중 DKC600을 donor로 했을 때(lane C) 수온이나 pH에 상관없이 Km^r 유전자가 모두 chromosome에 integration된 점과, 또 Fig. 3의 lane E-FW에서와 같이 FW에서는 Km^r plasmid의 결실에 의한 크기의 변화가 일어났던 점은 Km^r 유전자를 DNA probe로 이용하여 Southern analysis를 함으로써 알 수 있었던 결과이다.

감사의 말

이 논문은 1991년도 교육부지원 한국학술진흥재단의 자유공모(지방대학육성)과제 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

참 고 문 헌

1. Berg, D.E., 1990. Genomic rearrangements in prokaryotes, p.1-50. In B.D. Hames and D.M. Glover(ed.), Gene rearrangement. IRL press, Oxford.
2. Birch, A., A. Hausler, C. Ruttener, and R. Hutter, 1991. Chromosomal deletion and rearrangement in *Streptomyces glaucescens*. *J. Bacteriol.*, **173**, 3531-3538.
3. Collis, C.M. and R.M. Hall, 1992. Site-specific deletion and rearrangement of integron insert genes catalyzed by the integron DNA integrase. *J. Bacteriol.*, **174**, 1574-1585.
4. Datta, A.R., B.A. Wentz, and W.E. Hill, 1987. Detection of hemolytic *Listeria monocytogenes* by using DNA colony hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 2256-2259.
5. Fernandez-Astorga, A., A. Muela, R. Cisterna, J. Iriberry, and I. Barcina, 1992. Biotic and abiotic factors affecting plasmid transfer in *Escherichia coli* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 392-398.
6. Francois, V., A. Conter, and J-M Louarn, 1990. Properties of new *Escherichia coli* Hfr strains constructed by integration of pSC101-derived conjugative plasmids. *J. Bacteriol.*, **172**, 1436-1440.
7. Kim, C.K., and S.G. Lee, 1989. Conjugal transfer of antibiotics resistance genes in water environments. *Genet. Eng. Res.*, **3**, 23-31.
8. Kim, C.K., and S.G. Lee, 1989. Transfer of R plasmids of bacterial isolates and their cloned R genes in natural wastewater environments(I)-Cloning of Km^rCm^r Gene. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **17**, 447-453.
9. Kim, C.K., and S.G. Lee, 1990. Conjugal transfer and fate of the genetically engineered Km^r gene in freshwater environments. *Kor. J. Microbiol.*, **28**, 219-228.
10. Kim, H.T., S.G. Lee, and C.K. Kim, 1992. Effect of mating strain and pH on conjugal transfer of genetically modified R-plasmids. *Kor. J. Microbiol.*, **30**, 88-95.
11. Knight, I.T., S. Shults, C.W. Kaspar, and R.R. Colwell, 1990. Direct detection of *Salmonella* spp. in estuaries by using a DNA probe. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 1059-1066.
12. Lee, S.G., and C.K. Kim, 1989. Transfer of R plasmids of bacterial isolates and their cloned R genes in natural wastewater environments(II)-Comparison of transfer frequency. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **17**, 454-460.
13. Lessel, M., D. Balzer, R. Lurz, V.L. Waters, D.G. Guiney, and E. Lanka, 1992. Dissection of Inc P conjugative plasmid transfer: Definition of the transfer region Tra2 by mobilization of the Tra1 region in trans. *J. Bacteriol.*, **174**, 2493-2500.
14. Levy, S.B., 1986. Ecology of antibiotic resistance determinants. p. 17-30. In S.B. Levy and R.P. Novick(ed.), Antibiotic resistance genes: ecology, transfer, and expression(Banbury report 24). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
15. Mendiola, M.V., Y. Jubete, and F. De la Cruz, 1992. DNA sequence of IS91 and identification of the transposase gene. *J. Bacteriol.*, **174**, 1345-1351.
16. Norgren, M., and J.R. Scott, 1991. The presence of conjugative transposon Tn916 in the recipient strain does not impede transfer of a second copy of the element. *J. Bacteriol.*, **173**, 319-324.
17. Ögünseitan, O.A., G.S. Saylor, and R.V. Miller, 1992. Application of DNA probes to analysis of bacteriophage distribution patterns in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 2046-2052.
18. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989. Molecular cloning, a laboratory manual 2nd(ed.). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
19. Singleton, P., 1983. Colloidal clay inhibit conjugal transfer of R-plasmid R1 *drd*-19 in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 756-757.
20. Willets, N.S., C. Crowther, and B.W. Holloway, 1981. The insertion sequence IS21 of R68.45 and the molecular basis for mobilization of the bacterial chromosome. *Plasmid.*, **6**, 30-52.

(Received July 31, 1992)

(Accepted August 10, 1992)

ABSTRACT: Transfer and Behavior of the Genetically Modified R gene in Water Environments

Lee, Sung-Gie and Chi-Kyung Kim* (Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Chungbuk National University, Cheongju 360-763, Korea)

In order to understand the transfer and behavior of R gene in water environments, the Km^r gene in the genetically modified microorganisms(GMMs) was studied by conjugation. The plasmid variously rearranged in the conjugants were comparatively analyzed by agarose gel electrophoresis and the specific Km^r genes in the gel were detected with DNA probe. The Km^r genes of the GMM strains(DKC600 and DKC601) were transferred at higher rate than those of natural isolate(DK1), but the rate was a little different depending upon the recipient strains. Rearrangement of the plasmids appeared more drastic in GMM strains than in DK1 as donor. The transfer frequencies of the Km^r genes in LB broth were remarkably higher than in the water of AW and FW without regards to the strains. In LB broth, the frequencies of Km^r genes were higher at 25°C~30°C than at 10°C and at pH 5~7 than pH 9, but temperature and pH of the FW did not affect to the frequency. And the conjugants from GMM strains in FW did not showed any plasmids, except for 43 kb plasmid. As results of Southern analysis of the plasmids variously rearranged in conjugant cells obtained in LB broth, the Km^r genes were detected at the same position of Km^r plasmids of the donor cell(DK1 and GMM strains). But Km^r plasmid disappeared in the conjugants obtained in FW and their chromosomes showed strong signal of hybridization. The Km^r plasmid of DK1 in the conjugants obtained in FW water was transferred and maintained its size, but the Km^r plasmids of the GMM strains were all integrated into chromosome. Therefore, the Km^r plasmids of DK1 and GMM strains in LB were intactly transferred and other plasmids were variously rearranged, but Km^r gene of DKC600 in FW water was integrated into the chromosome without regards to the temperature and pH of the water.