

DNA Probe에 의한 Km^r 유전자의 전이 추적

이성기 · 김치경*

충북대학교 자연대 미생물학과, 서울대학교 분자미생물학연구센터

Tracking of the Km^r Gene in Conjugal Transfer by Using DNA Probe

Lee, Sung-Gie and Chi-Kyung Kim*

Department of Microbiology, College of Natural Sciences,
Chungbuk National University, Cheongju 360-763, Korea

Research Center for Molecular Microbiology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Abstract — In order to understand the transfer behavior of a particular gene in water environments, kanamycin resistance (Km^r) gene was tracked by Southern hybridization with DNA probe in its conjugal transfer. A Km^r natural bacterial isolate and genetically modified microorganisms (GMMs) constructed from the isolate were used as donor for conjugal transfer of the Km^r gene. The transfer frequencies of the Km^r gene from GMM strains were generally 10 to 100 times higher than those from the natural isolate. The conjugants obtained from GMM strains in LB broth had more plasmids newly appeared, and particularly the conjugants in AW and FW waters revealed more rearrangement in their plasmids as a function of conjugation time. When plasmids of the conjugants obtained in LB broth were Southern hybridized with DNA probe of the Km^r gene, the Km^r plasmids in the conjugants were detected at the same position of the plasmids in donor cells, in spite of the fact that the plasmids were highly rearranged in conjugant cells. But the Km^r plasmids in the donor of DK1 and DKC601, and DKC600 were not identified in the conjugants obtained after 50 h conjugation in AW and after 30 h in AW, respectively. The size of the Km^r plasmids showing hybridization signal were a little changed in the conjugants obtained in AW and FW waters. Therefore, the method of Southern hybridization with DNA probe was proved to be very specific and useful for tracking of particular genes in water environments.

자연계에서 발견되는 일반 미생물 또는 유전공학적으로 변형시킨 미생물들(genetically modified microorganisms, GMMs) 사이에서 일어나는 유전자들의 전이는 주로 plasmid나 transposon(Tn)에 의해 이루어지고 있다(1). 어떤 Tn element는 DNA sequence의 상동성과 관계없이 genome의 새로운 위치로 이동할 수 있고, 또 insertion mutation과 재배열의 원인이 될 수 있을 뿐 아니라, Tn 주위의 다른 유전자의 발현도 변경시킨다는 사실이 원핵 및 진핵생물에서 다같이 보고되어 있다(2). 또 유전자들의 전이과정에서 일어나는 plasmid의 재배열 현상에서는 plasmid의 incompatibility(3) 또는 site-specific

integration에 의한 변화(4) 등으로 설명하고 있다. 그러나 유전자들의 전이에 의한 재배열의 기작에 관해서는 아직 정확히 이해하지 못하고 있다.

더욱이 GMM 균주들이 실험적으로나 우연한 기회에 자연환경 속으로 유출되는 기회가 많아지는 점을 고려할 때, 이들 유전자의 전이에 대한 정밀한 환경영향 평가가 요망된다. 그러므로 이들 유전자들의 전이행방에 관하여 올바른 정보를 얻기 위해서는 GMM 균주 및 그 유전자를 정확하게 추적 검색해내는 방법이 요구된다. 최근에는 GMM 균주나 GEDS(genetically engineered DNA sequences)를 검색하기 위하여 특정 유전자에 biotin 또는 ³²P로 표식한 DNA probe를 이용하여 gel상에서 또는 colony 상태로 DNA hybridization을 하는 방법이 활용되고 있다. 그러한 방법으로 자연생태계로부터 항생제 내성유전

Key words: DNA probe, Southern hybridization, Km^r gene, gene transfer, rearrangement

*Corresponding author

자(5) 뿐 아니라 탄화수소 분해유전자(6)나, 특정한 미생물들(7)을 검색하는 연구가 활발하다.

본 연구에서는 kanamycin(Km) 내성세균을 자연 계로부터 분리하여, 그 세균의 Km^r 유전자를 유전자 조작 기법으로 변형시켜 GMM 균주들을 제조하였다. 이들 Km^r 유전자들이 conjugation에 의하여 전이될 때 그들의 전이 행방을 biotin-7dATP로 표식한 DNA probe를 이용하여 추적하였다.

재료 및 방법

실험균주 및 plasmid

본 실험에 사용한 균주와 plasmid는 Table 1에서와 같다. Kim과 Lee(8)에 의하여 공단폐수로부터 분리 동정된 *E. coli* DK1(donor)은 Km^r 유전자를 가진 68 kb의 pDK101과 8.5 kb 이하의 plasmid를 5개 가지고 있으며, 무심천 수계에서 분리 동정된 *Providencia rettseri* MT1(recipient)은 pMT101을 포함하여 7개의 plasmid를 가지고 있었다. 그리고 DK1과 함께 donor로 사용한 GMMs(genetically modified microorganisms) 균주로서 DKC600은 DK1의 R-plasmid인 pDK101을 conjugation에 의하여 *E. coli* C600에 전이시켜 얻었다. 또 DKC601은 Kim과 Lee(9)의 보고에서와 같이 cloning하였다. pDX95 plasmid는 DKC601의 pDT529 plasmid를 Fig. 1에서와 같이 *Hind*III로 절단한 6.5 kb 절편을 pBluescript SK(+)에 cloning하여 *E. coli* XL1Blue에 transformation시켰다. pDX95를 분리하여 다시 *Hind*III를 처리하였을

때 Km^r 유전자는 3.9 kb *Hind*III 절편에 위치하고 있었다. Conjugant에 전이된 donor 균주의 Km^r 유전자를 추적하기 위하여 Km^r 유전자를 포함하는 pDX

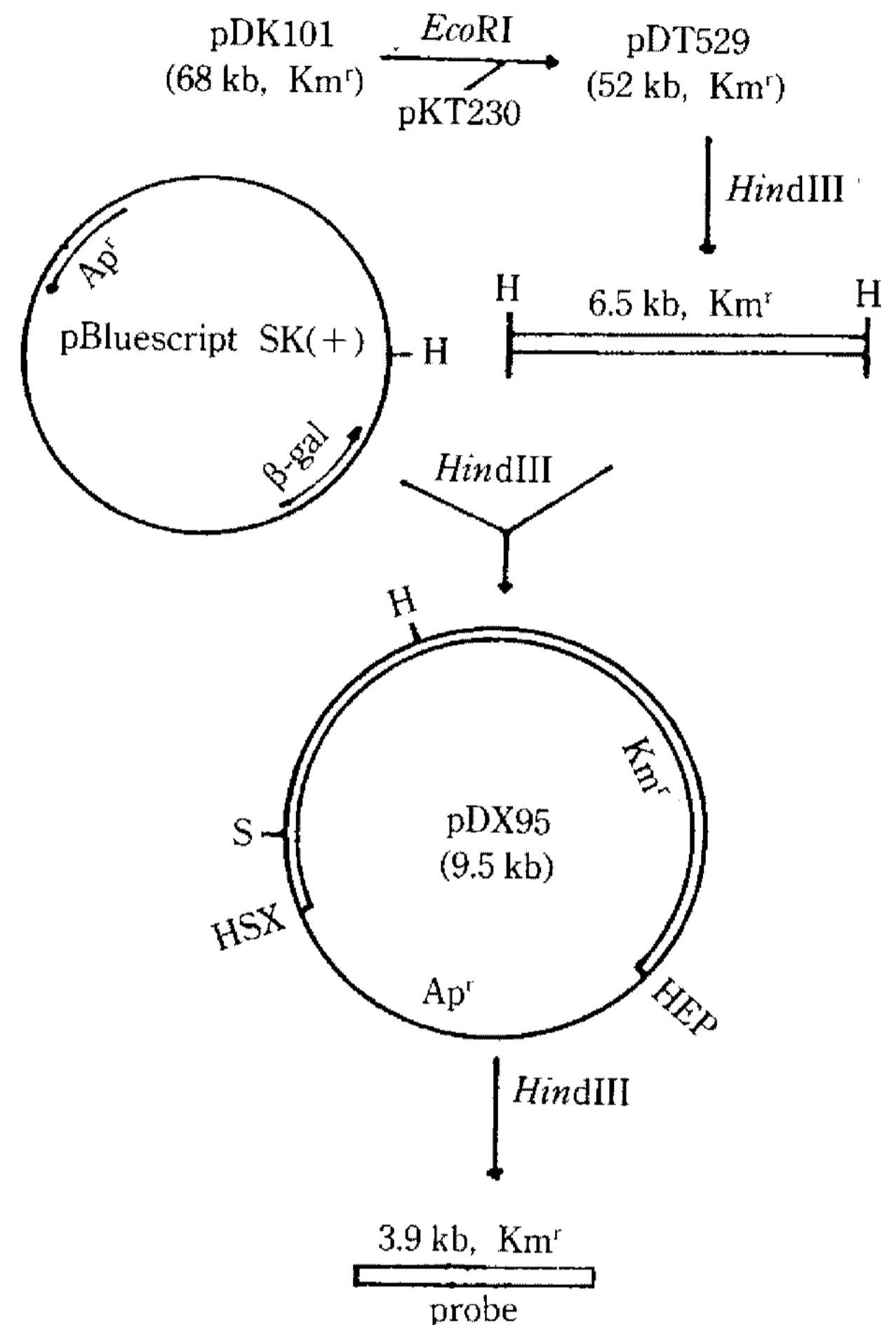


Fig. 1. Construction of DNA probe (Km^r) used for Southern analysis.

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Relevant Characteristics	Remarks	Sources
Bacteria			
<i>E. coli</i> DK1(pDK101)	Km ^r Ap ^r Tc ^r Cm ^r	Natural isolate, donor	(8)
<i>E. coli</i> DKC600(pDK101)	Km ^r Ap ^r Tc ^r Cm ^r	GMM strain, donor	(9)
<i>E. coli</i> DKC601(pDT529)	Km ^r Ap ^r Tc ^r Cm ^r	GMM strain, donor	(9)
<i>Prov. rettseri</i> MT1(pMT101)	Km ^s Ap ^r Tc ^r Cm ^r	Natural isolate, recipient	(8)
<i>E. coli</i> C600	Ap ^r	Host for cloning	Appleyard
<i>E. coli</i> XL1Blue	Tc ^r	Host for subcloning	Stratagene Ltd.
Plasmid			
pDK101	Km(1500) ^a	Plasmid in DK1 and DKC600	(8, 9)
pDT529	Km(1600)	Recombinant plasmid in DKC601	(9)
pBluescript SK(+)	Ap(1000)	Vector for subcloning	Stratagene Ltd.
pDX95	Km(2000), Ap(1000)	Recombinant plasmid in DXL201	This study

^aNumbers in parenthesis represent MIC values (µg/ml).

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

95의 *Hind*III 절편(3.9 kb)을 DNA probe로 사용하여 Southern analysis를 하였다.

전이 실험

자연계 분리균주(DK1) 뿐 아니라 GMM 균주들(DKC600와 DKC601)이 가지고 있는 Km^r 유전자의 전이실험은 MT1 균주를 recipient로 하여 LB(Luria-Bertani broth) 배지와 멸균한 무심천수(autoclaved river water, AW), 그리고 0.22 μ m로 여과한 무심천수(filtered river water, FW)에서 Lee와 Kim(10)의 보고에서와 같이 conjugation 방법으로 실시하였다. 각각의 donor와 recipient 균주들은 $10^4 \sim 10^9$ cells/ml이 되도록 접종하여 20°C에서 74시간 동안 conjugation하였다. 일정한 시간에 따라 0.1 ml씩의 시료를 채취하여 kanamycin(50 μ g/ml), ampicillin(50 μ g/ml), tetracycline(50 μ g/ml)의 항생물질이 첨가된 LB 고체배지에 도말하고 35°C에서 1일간 배양한 다음 conjugant들을 선별하였다. 전이빈도는 Lee와 Kim(10)의 보고에서와 같이 접종한 donor에 대한 conjugant 수에 의하여 계산하였다.

Plasmid의 분리와 probe의 제조

각 균주들의 plasmid DNA는 Sambrook 등(11)의 alkaline lysis 방법을 이용하여 Kim과 Lee(12)의 보고에서와 같이 분리추출하였다. Plasmid DNA에 대한 제한효소 처리는 효소의 제조회사인 Promega사(Madison, WI, USA)의 지침서와 Sambrook 등(11)의 방법에 의거하였다. 이와같이 분리된 plasmid의 시료는 0.7~1% agarose gel에서 Tris-borate buffer를 사용하여 5 V/cm 이하로 전개시켰다.

DNA probe는 Fig. 1에서와 같이 cloning한 pDX95를 분리한 후 *Hind*III로 절단하여 아래와 같이 제조하였다. 이 절편들은 0.8% agarose gel에서 Tris-acetate buffer를 사용하여 3 V/cm 이하로 전개시킨 후, pDX95 plasmid의 3.9 kb 절편을 GENE CLEAN II kit(BIO 101 Inc., La Jolla, CA)으로 elution하였다. 이 DNA 절편에 Multiprime DNA labeling system(RPN 1600Z, Amersham Co., UK)을 이용하여 biotin-7 dATP(BRL Life Technologies, Inc., USA)로 표식하여 DNA probe를 제조하였다.

Southern analysis

Conjugation에 의한 내성유전자의 전이행방을 추적하기 위하여 Sambrook 등(11)의 방법에 따라 gel에

전개된 각 균주의 Km^r 유전자에 대하여 biotin으로 표식한 DNA probe로 Southern hybridization을 하였다. Plasmid DNA를 전개시킨 gel은 0.25 N HCl 용액에 20분간 반응시킨 후, 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 15분간씩 두번 처리하였다. 그리고 plasmid DNA는 20× SSC buffer를 이용하여 nylon membrane(Hybond N, Amersham Co., UK)에 12~40시간 동안 transfer시킨 후, 30분간 공기중에서 건조시키고, 80°C의 dry oven에서 1~2시간 동안 baking하였다. 그리고 10 ml의 prehybridization buffer(50% formamide, 5× SSC, 5× 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, 5× SSC, 1× 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 μ g/ml denatured probe DNA)에 다시 넣어 42°C에서 12시간 이상 반응시켰다. Hybridized plasmid의 band는 BluGENE detection system(BRL Life Technologies, Inc., USA)을 이용하여 발색시켰다.

결과 및 고찰

Km^r 유전자의 전이빈도

DK1과 DKC601, DKC600을 각각 donor로 하고 MT1을 recipient로 하여 20°C의 LB broth, 멸균한 무심천수(AW), 여과한 무심천수(FW)에서 74시간 동안 conjugation했을 때 Km^r 유전자의 전이빈도는 Table 2와 같다. DK1이 donor일 때, LB에서는 18시간에 10^{-4} 의 빈도가 나타났고 50시간 후에는 10^{-2} 로 증가하였다. 그러나 AW와 FW의 매질에서는 10^{-9} 정도의 빈도로 훨씬 낮았다. 또 DKC601이나 DKC600을 donor로 했을 때에는 LB에서 10^{-2} 그리고 AW와 FW에서는 훨씬 낮은 $10^{-7} \sim 10^{-8}$ 의 전이빈도를 얻었다. Km^r 유전자의 전이빈도는 균주에 관계없이 AW와 FW에 비하여 LB에서 더 높게 나타났으나, LB에서도 GMM 균주인 DKC600이나 DKC601의 Km^r 유전자는 DK1 균주보다 18~30시간 동안에는 100배 정도 더 높게 전이되었다. 그러나 AW나 FW에서는 DKC600과 DKC601 균주들의 Km^r 유전자가 DK1 균주보다 10배

Table 2. Conjugal transfer frequency of Km^r gene of GMM strains, and their parental bacteria in different water at 20°C

Mating pairs		Water for mating	pH for mating	Inocula of donor/recipient (cell/ml)	Transfer frequency by conjugation for (h):		
Donor	Recipient				18	30	50
DK1	MT1	LB	7.0	4.0×10 ⁴ /3.7×10 ⁴	2.5×10 ⁻⁴	5.0×10 ⁻⁴	1.3×10 ⁻²
		AW	9.5	1.9×10 ⁹ /1.2×10 ⁹	0	9.0×10 ⁻¹⁰	1.1×10 ⁻⁹
		FW	7.7	1.9×10 ⁹ /1.2×10 ⁹	1.7×10 ⁻⁹	1.3×10 ⁻⁹	0
DKC601	MT1	LB	7.0	2.5×10 ⁴ /3.7×10 ⁴	1.4×10 ⁻²	1.8×10 ⁻²	NT
		AW	9.5	2.4×10 ⁸ /6.2×10 ⁸	4.2×10 ⁻⁸	6.3×10 ⁻⁸	5.2×10 ⁻⁸
		FW	7.7	2.4×10 ⁸ /6.2×10 ⁸	7.3×10 ⁻⁸	2.1×10 ⁻⁸	0
DKC600	MT1	LB	7.0	4.6×10 ⁴ /3.7×10 ⁴	2.4×10 ⁻²	1.4×10 ⁻²	NT
		AW	9.5	1.3×10 ⁹ /6.2×10 ⁸	4.6×10 ⁻⁸	6.9×10 ⁻⁸	3.3×10 ⁻⁸
		FW	7.7	1.3×10 ⁹ /6.2×10 ⁸	1.9×10 ⁻⁷	4.9×10 ⁻⁷	2.0×10 ⁻⁷

LB, Luria Bertani broth; AW, autoclaved river water; FW, filtered river water; NT, not tested

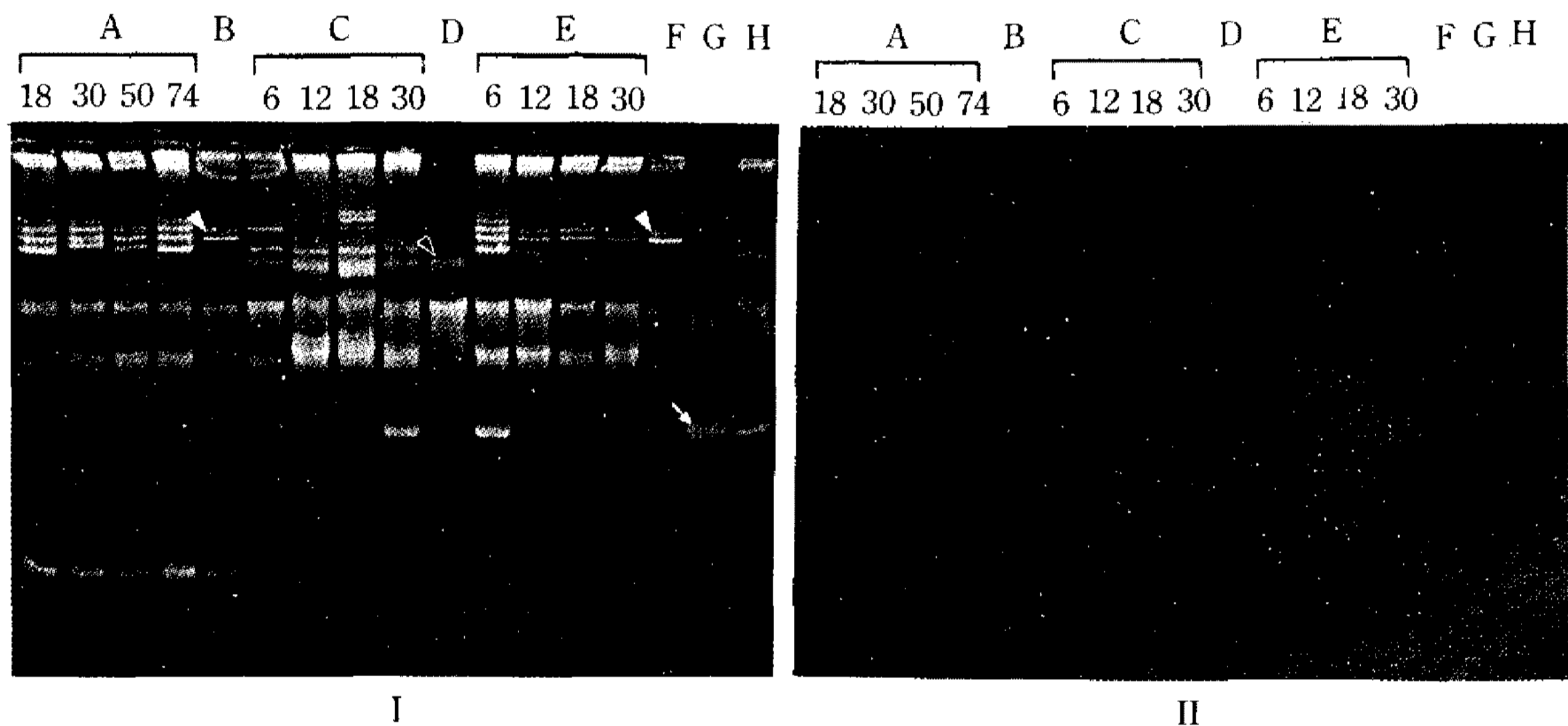


Fig. 2. (I) Plasmid profiles of donors, recipient, and conjugants obtained by conjugation in LB broth. (II) Southern analysis with the DNA probe.

Lanes: A, conjugants of DK1×MT1; B, DK1; C, conjugants of DKC601×MT1; D, DKC601; E, conjugants of DKC600×MT1; F, DKC600; G, DXL201; H, MT1. The numbers on the lanes indicate the mating time (hour). Arrows: pDK101, ▴; pDT529, ▷; pDX95, →.

더 높게 전이되었다. Flannagan과 Clewell(13)은 donor의 종류에 따라 전이빈도가 달라진다고 하였으며, Singleton(14)은 colloidal clay 등에 의한 정전기적 상호작용으로 R plasmid의 전이가 억제되었다고 보고한 바와 같이, 본 실험에서도 colloidal particle이 포함되어 있는 AW에서의 전이빈도가 LB에 비하여 더 낮게 나타난 것은 수질의 turbidity와 전이빈도 사이에 상관성이 있음을 말해준다. 그러나 FW에서 Km^r 유전자의 전이빈도가 AW에서와 거의 비슷하지만, LB에서의 전이빈도에 비하여 훨씬 낮은 것은 매질에 포함되어 있는 영양 성분과도 어떤 관계가 있

다고 판단된다.

전이에 의한 plasmid의 재배열

LB 액체배지에서 6~74시간 동안 DK1, DKC600, 그리고 DKC601의 Km^r 유전자들이 MT1에 전이된 후 conjugant들의 plasmid들을 agarose gel상에서 조사한 결과는 Fig. 2(I)에서와 같다. 이와 같은 plasmid들의 재배열 현상을 분석한 결과는 Table 3과 같다. DK1과 MT1을 18시간 동안 conjugation시켜 얻은 conjugant(lane A-18)는 8개의 plasmid가 나타났으며, 그 중 72 kb의 plasmid가 새로 생성되었다.

Table 3. Analysis of the plasmids rearranged in the conjugants from Fig. 2 (I)

Lanes	Mating pairs and plasmids (No. & size)		No. & size (kb) of plasmids in the conjugants
	Donor	Recipient	
A-18	DK1, 6(68, 8.5, 7.5, 5.5,	MT1, 7(79, 70, 62, 50, 10.5,	8(79, 72, 68, 62, 10.5, 8.5, 4.8, 4.5)
A-30	4.8, 4.5)	3.8, 2.5)	8(79, 72, 68, 66, 10.5, 8.5, 4.8, 4.5)
A-50	〃	〃	9(88, 79, 72, 68, 62, 8.5, 7.5, 4.8, 4.5)
A-74	〃	〃	9(79, 72, 68, 62, 10.5, 8.5, 7.5, 4.8, 4.5)
C-6	DKC601, 1(52)	MT1, 7(79, 70, 62, 50, 10.5,	6(79, 72, 66, 62, 54, 10.5)
C-12	〃	3.8, 2.5)	6(88, 79, 72, 66, 60, 52)
C-18	〃	〃	7(88, 79, 72, 66, 60, 50)
C-30	〃	〃	6(79, 72, 66, 62, 52, 9.5)
E-6	DKC600, 1(68)	MT1, 7(79, 70, 62, 50, 10.5,	6(88, 79, 72, 68, 62, 9.5)
E-12	〃	3.8, 2.5)	3(72, 68, 62)
E-18	〃	〃	3(79, 72, 68)
E-30	〃	〃	5(88, 79, 72, 68, 62)

그리고 30시간(lane A-30)에서는 72 kb와 66 kb의 plasmid가 새로 생성되어 8개, 50시간(lane A-50)에서는 88 kb와 72 kb의 plasmid가 새로 생성되어 9개, 74시간(lane A-74)에서는 72 kb의 plasmid가 새로 생성되어 9개로 재배열되었다. DKC601과 MT1의 conjugant들에서는, 6시간(lane C-6)에서 72, 66, 54 kb의 plasmid들이 새로 생성되어 6개, 12시간(lane C-12)에서는 88, 72, 66, 60 kb의 plasmid들이 새로 생성되어 6개, 그리고 18시간(lane C-18)에서는 88, 72, 66, 60 kb의 plasmid들이 새로 생성되어 7개의 plasmid로 재배열되었으며, 이 경우에는 특히 큰 분자량의 multimer plasmid가 형성된 것이 특징이다. 이는 Dabert 등(15)이 외부 DNA 조각이 insertion 되면 분자량이 큰 linear plasmid multimer가 생성된다고 한 보고와 같은 현상이다. 그리고 DKC600과 MT1의 conjugant들에서도, 6시간(lane E-6)에서 88, 72, 9.5 kb의 plasmid들이 새로 생성되었으며, 12시간(lane E-12)과 18시간(lane E-18)에서는 72 kb의 plasmid가 새로 생성되어 3개, 그리고 30시간(lane E-30)에서는 88 kb와 72 kb의 plasmid들이 새로 생성되어 5개로 재배열되었다.

이와 같이 LB에서 얻어진 conjugant들의 plasmid의 재배열 과정에서 recipient인 MT1의 70, 3.8, 2.5 kb plasmid들은 공통적으로 나타나지 않았으며, donor 균주가 DK1일 때보다 GMM 균주인 DKC600과 DKC601일 때에 plasmid의 재배열 현상이 더 다양하였다. 이와 같은 plasmid의 재배열 현상은 van der Lelie 등(16)이 지적한 바와 같이 plasmid의 incompati-

lity에 의한 결과라고 판단된다.

그리고 AW와 FW에서 DK1과 DKC600, DKC601 균주를 donor로 하고 MT1을 recipient로 하여 얻은 conjugant들의 plasmid들은 Fig. 3(I)과 같이 나타났으며, 이를 분석한 결과는 Table 4에서와 같다. DK1과 MT1의 conjugant들(lane A-30, AW와 lane A-30, FW)에서는 새로 생성된 plasmid가 없이 각각 5개로 나타났다. 그러나 GMM 균주들의 conjugant들(lane C-30, AW; lane C-30, FW; lane E-30, AW; lane E-30, FW; lane E-50, AW; lane E-50, FW)에서는 모두 2~3개의 plasmid만을 관찰할 수 있었다. 결과적으로 AW와 FW에서는 70, 50, 10.5, 3.8, 2.5 kb의 plasmid들이 공통적으로 나타나지 않았으며, LB에서 보다 더 많은 plasmid의 재배열이 일어났다.

Collis와 Hall(17)은 conjugant에서의 plasmid들은 donor 균주의 내성유전자의 위치에 따라 중복과 결실, 그리고 재배열 현상들이 다르게 나타난다고 하였으며, Couturier 등(18)은 그람음성세균에서 plasmid의 conjugal transfer의 다변성은 20가지 이상의 incompatibility 특성에 의해 좌우된다고 하였다. 이와 같이 LB 배지에서는 DK1보다 GMM 균주들(DKC600와 DKC601)의 conjugant에서 88, 72, 66, 60, 54, 9.5 kb와 같이 재배열된 plasmid가 더 많이 나타났던 것은 GMM 균주들에서 Km^r 유전자의 전이빈도가 더 높았던 사실과 연관성이 있다고 생각된다. AW와 FW 수질환경에서는 모든 균주의 Km^r 유전자의 전이빈도가 LB에 비해 낮았으나, conjugant에서 나타난 plasmid의 재배열 정도는 더 다양하였다. 그러므로 inco-

101(lane F)이 그대로 전이되어 hybridization이 일어났으나, 6시간(lane E-6)에서는 10.5 kb plasmid에서도 signal이 나타났었다. Tomcsanyi 등(19)은 IS50와 Tn5의 실험에서 유전자의 결실, 역위 등의 transposition에 의해 재배열이 일어난다고 보고한 바 있고, Romero 등(20)도 IS946에 의하여 heterologous DNA가 chromosome이나 plasmid속으로 integration 되었다고 한 보고를 고찰해 볼 때, 본 연구에서 나타난 plasmid의 재배열도 Km^r 유전자의 전이성 뿐 아니라 Tn과 같은 DNA sequence의 영향 때문이 아닌가 생각된다.

AW와 FW에서 conjugation에 의한 Km^r 유전자의 전이행방을 DNA probe로 탐침한 결과는 Fig. 3(II)에서와 같이 나타났다. DK1과 MT1의 conjugant들(lanes A)은 AW(lane A-30, AW)와 FW(lane A-30, FW)에서 68 kb의 pDK101이 donor(lane B)에서와 같은 위치에 그대로 나타났으나, AW에서 50시간 conjugation했을 때(lane A-50, AW)에는 pDK101 plasmid가 나타나지 않았으며, Km^r 유전자의 행방도 확인되지 않았다. DKC601과 MT1의 conjugant들(lane C)에서는 AW에서 30시간(lane C-30, AW) conjugation했을 때 전이된 pDT529(52 kb)가 donor인 DKC601(lane D)에서 보다 더 커진 56 kb의 plasmid에서, 그리고 FW에서 30시간(lane C-30, FW) conjugation했을 때도 pDT529보다 더 커진 62 kb의 plasmid에서 hybridization signal이 나타났다. 이는 plasmid 사이에서 homologous recombination이 일어난 결과로 해석된다. 그리고 AW에서 50시간의 conjugation에서 얻은 conjugant(lane C-50, AW)는 lane A-50, AW에서와 같이 어떠한 signal도 나타나지 않았다. DKC600과 MT1의 conjugant들(lanes E)에서는 AW나 FW에서 30시간(lane E-30, AW와 lane E-30, FW) conjugation했을 때 68 kb의 pDK101(lane F)과 같은 위치에 hybridization signal이 없었지만, 50시간 동안 conjugation했을 때(lane E-50, AW와 lane E-50, FW)에는 donor의 pDK101과 같은 위치에서 signal이 나타났다. Brom 등(21)은 세균의 종류나 DNA의 구조, 그리고 환경조건에 따라 전이된 plasmid가 chromosome속으로 integration될 수 있다고 했으며, Rauch와 De Vos(22)도 *Lactococcus lactis*의 chromosome에 70 kb의 conjugative transposon(Tn5276)이 선택적으로 insertion된다는 것을 보고한 바 있다.

LB 환경(Fig. 2)에서 얻은 conjugant들은 donor의 Km^r 유전자를 포함하는 plasmid와 같은 위치에서

hybridization signal이 대부분 나타났으나, AW와 FW의 수질환경(Fig. 3)에서는 DK1보다 GMM 균주인 DKC600과 DKC601이 donor일 때에 Km^r 유전자의 전이에 의한 plasmid의 재배열이 더 다양함을 알 수 있었다. Km^r 유전자가 conjugation 의하여 전이되고 또 plasmid의 재배열 현상이 일어나는 그 원인과 기작은 아직 완전히 이해할 수 없지만, 특정 유전자의 전이행방을 추적하는데는 DNA probe에 의한 Southern hybridization이 매우 유용하다고 판단된다.

요 약

수계 환경에서 일어나는 유전자의 전이행방을 이해하기 위하여, conjugation에 의하여 전이되는 kanamycin 내성(Km^r) 유전자에 대하여 DNA probe를 이용하여 Southern hybridization 방법으로 추적하였다. 자연계로부터 분리한 Km^r 세균과 Km^r 유전자를 유전자 조작기법으로 변형시킨 GMM 균주들을 donor로 하여 conjugation을 했을 때, Km^r 유전자는 자연계 분리 균주에서보다 수질환경에 관계없이 10~100배 잘 전이되었다. LB 배지에서 GMM 균주의 Km^r 유전자가 전이된 conjugant에서는 새로 생성되는 plasmid가 많이 나타났고, AW와 FW에서는 conjugation 시간에 따라 plasmid의 재배열 현상이 다양하였다. LB에서 얻은 conjugant들의 plasmid에 대하여 Km^r DNA probe로 Southern analysis를 한 결과, plasmid의 재배열이 다양함에도 불구하고 conjugant들의 Km^r plasmid는 donor에서와 같은 위치에서 hybridization signal이 나타났다. 그러나 AW에서 50시간 conjugation시켰을 때 DK1의 pDK101과 DKC601의 pDT529, 그리고 AW에서 30시간 conjugation시켰을 때 DKC600의 pDK101은 전혀 나타나지 않고 소실되었다. 또 전이된 Km^r plasmid의 크기는 AW와 FW의 수질에 따라 약간 변화되어 나타났다. 그러므로 DNA probe에 의한 Southern hybridization 방법은 수질환경에서 특정 유전자의 전이행방을 추적하는데 매우 유용하다고 판단된다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 우수연구센터(서울대학교 분자미생물학연구센터)의 연구비에 의하여 이루어졌음.

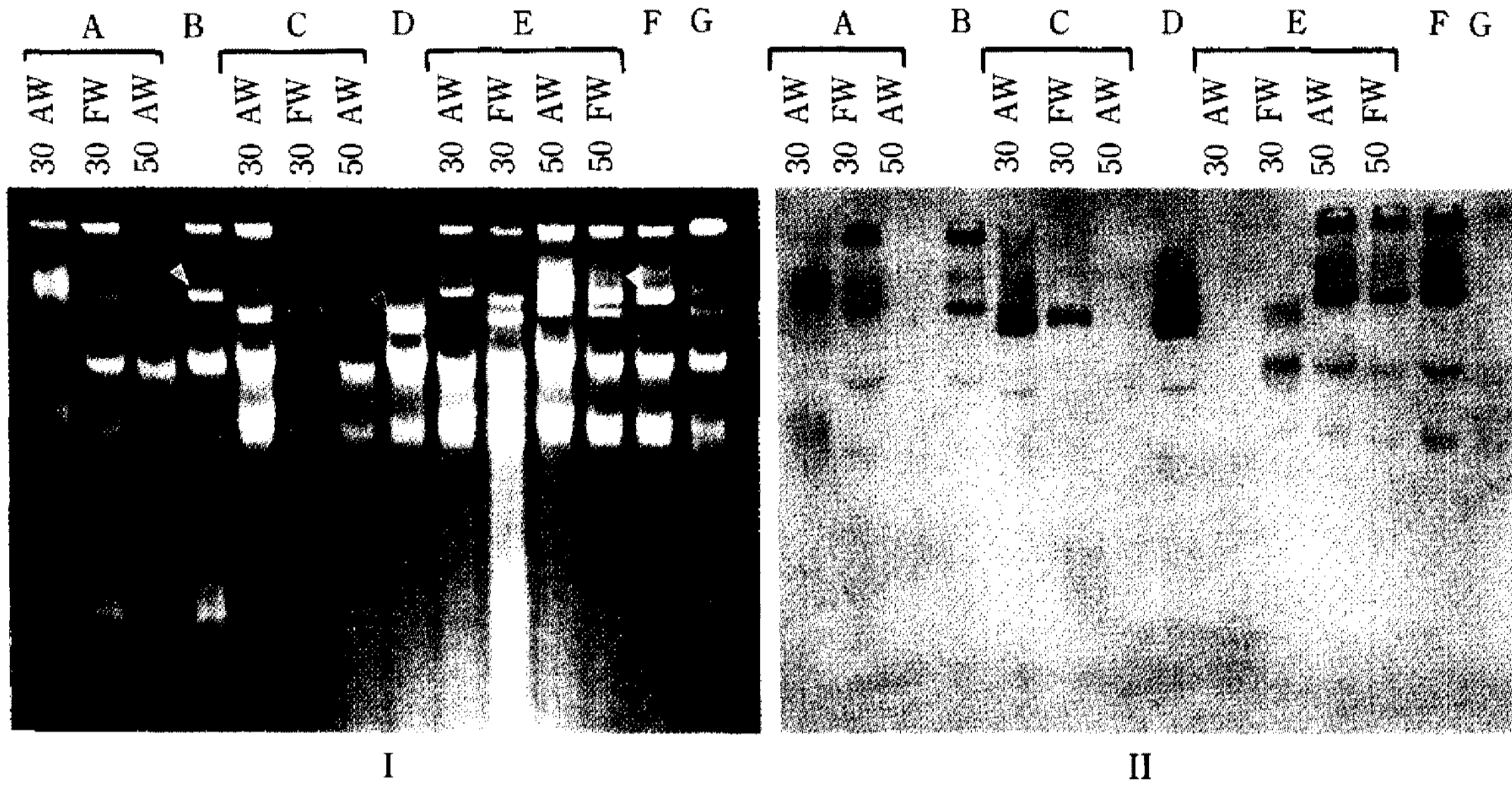


Fig. 3. (I) Plasmid profiles of donors, recipient, and conjugants obtained by conjugation in different waters. (II) Southern analysis with the DNA probe.

Lanes: A, conjugants of DK1×MT1; B, DK1; C, conjugants of DKC601×MT1; D, DKC601; E, conjugants of DKC600×MT1; F, DKC600; G, MT1. The numbers on the lanes indicate the mating time (hour). Abbreviation: AW, autoclaved river water; FW, filtered river water. Arrows: pDK101, ▶; pDT529, ▷.

Table 4. Analysis of the plasmids rearranged in the conjugants from Fig. 3(I)

Lanes	Mating pairs and plasmids (No. & size)		No. & size (kb) of plasmids in the conjugants
	Donor	Recipient	
A-30, AW	DK1, 6(68, 8.5, 7.5, 5.5,	MT1, 7(79, 70, 62, 50, 10.5,	5(79, 68, 62, 5.5, 4.8)
A-30, FW	4.8, 4.5)	3.8, 2.5)	5(68, 62, 5.5, 4.8, 3.0)
A-50, AW	~	~	0
C-30, AW	DKC601, 1(52)	MT1, 7(79, 70, 62, 50, 10.5,	3(72, 62, 56)
C-30, FW	~	3.8, 2.5)	2(79, 62)
C-50, AW	~	~	0
E-30, AW	DKC600, 1(68)	MT1, 7(79, 70, 62, 50, 10.5,	2(79, 72)
E-30, FW	~	3.8, 2.5)	2(68, 56)
E-50, AW	~	~	2(68, 62)
E-50, FW	~	~	2(68, 62)

mpatibility에 의한 plasmid의 재배열 현상은 전이빈도와 상관성이 있는 동시에, 수질환경에 의해서도 영향을 받는다고 할 수 있다.

Southern analysis에 의한 Km^r 유전자의 추적

LB 액체배지에서 Km^r 유전자의 전이행방을 DNA probe로 시간에 따라 탐침한 결과는 Fig. 2(II)에서와 같다. DK1과 MT1의 conjugant(lanes A)는 18~74 시간까지 전이된 pDK101이 모두 donor인 DK1(lane B)에서와 같은 위치에서 나타났으며, 18시간(lane A-18), 30시간(lane A-30), 74시간(lane A-74)의 conju-

gant들에서는 10.5, 8.5, 4.8, 4.5 kb plasmid들도 약간의 hybridization을 나타내었다. 그러나 recipient인 MT1 균주(lane H)의 10.5 kb plasmid에 약한 hybridization signal이 나타난 점으로 보아 이 plasmid의 base sequence도 probe로 사용한 Km^r 유전자와 어느 정도의 상동성이 있는 것으로 판단된다. DKC601과 MT1의 conjugants(lanes C)에서는 6시간(lane C-6)과 30시간(lane C-30)에서 donor의 pDT529(52.9 kb)에서와 같은 위치에서 hybridization signal이 나타나는 동시에, 10.5 kb의 plasmid도 signal을 보여주었다. DKC600과 MT1의 conjugant(lanes E)에서는 pDK

참고문헌

1. Lupski, J.R. 1987. Molecular mechanisms of transposition of drug-resistance genes and other movable genetic elements. *Rev. Infect. Dis.* **9**: 357-368.
2. Berg, D.E., and M.M. Howe(ed). 1989. *Mobile DNA*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
3. Bergquist, P.L. 1989. Incompatibility, pp. 37-78. In K.G. Hardy(ed), *Plasmids-A Practical Approach*. IRL Press, Oxford.
4. Wohlleben, W., W. Arnold, L. Bissonnette, A. Pelletier, A. Tanguay, P.H. Roy, G.C. Gamboa, G.F. Barry, E. Aubert, J. Davies, and S.A. Kagan. 1989. On the evolution of Tn2I-like multiresistance transposons: sequence analysis of the gene (*aaaC*) for gentamicin acetyltransferase-3-1 (AAC(3)-I), another member of the Tn21-based expression cassette. *Mol. Gen. Genet.* **217**: 202-208.
5. Bentjen, S.A., J.K. Fredrickson, P. Van Voris, and S.W. Li. 1989. Intact soil-core microcosms for evaluating the fate and ecological impact of the release of genetically engineered microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 198-202.
6. Sayler, G.S., M.S. Shields, E.T. Tedford, A. Breen, S.W. Hooper, K.M. Sirotkin, and J.W. Davis. 1985. Application of DNA-DNA colony hybridization to the detection of catabolic genotypes in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 1295-1303.
7. Holben, W.E., J.K. Jansson, B.K. Chelm, and J.M. Tiedje. 1988. DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 703-711.
8. Kim, C.K., and S.G. Lee. 1989. Conjugal transfer of antibiotics resistance genes in water environments. *Genet. Eng. Res.* **3**: 23-31.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. Flannagan, S.E., and D.B. Clewell. 1991. Conjugative transfer of Tn916 in *Enterococcus faecalis*: trans activation of homologous transposons. *J. Bacteriol.* **173**: 7136-7141.
14. Singleton, P. 1983. Colloidal clay inhibits conjugal transfer of R-plasmid R1drd-19 in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**: 756-757.
15. Dabert, P., S.D. Ehrlich, and A. Gruss. 1992. High-molecular-weight linear multimer formation by single-stranded DNA plasmids in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**: 173-178.
16. van der Lelie, D., J.M.B.M. van der Vossen, and G. Venema. 1988. Effect of plasmid incompatibility on DNA transfer to *Streptococcus cremcris*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 865-871.
17. 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.
18. Couturier, M., F. Bex, P.L. Bergquist, and W.K. Maas. 1988. Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiol. Rev.* **52**: 375-395.
19. Tomcsanyi, T., C.M. Berg, S.H. Phadnis, and D.E. Berg. 1990. Intramolecular transposition by a synthetic IS50(Tn5) derivative. *J. Bacteriol.* **172**: 6348-6354.
20. Romero, D.A., and T.R. Klaenhammer. 1992. IS 946-mediated integration of heterologous DNA into the genome of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 699-702.
21. Brom, S., A.G. Santos, M.L. Girard, G. Davila, R. Palacios, and D. Romero. 1991. High-frequency rearrangements in *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* plasmids. *J. Bacteriol.* **173**: 1344-1346.
22. Rauch, P.J.G., and W.M. De Vos. 1992. Characterization of the novel nicin-sucrose conjugative transposon Tn5276 and its insertion in *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* **174**: 1280-1287.

(Received July 27, 1992)

정 정 원

한국산업미생물학회 제 20권 제 3호 p. 324~p. 328(1992)에 발표된 남기두 외의 논문 "Pilot Scale Multi-stage CSTR에서 전분질 원료의 연속 메탄올발효" 중 p. 326에서

- i) Fig. 2의 "Feeding rate=1/2 l/h"를 "Feeding rate=2 l/h"로 정정함.
- ii) "공급 mash의 적정 당농도 결정"의 설명중

정정 전

공급 mash의 적정 당농도 결정

Mash 중의 에탄올 농도는 가능한 높을수록 증류시 내알코올성 또는 고온성 균주개발의 연구가 보고되고 있다(2, 9). 본 실험에 사용한 효모의 경우 회분식고 되고 있다. 본 실험에 사용한 효모의 경우 회분식 발효에서 11.5%(v/v)까지는 수율저하없이 발효가 가능하나 당농도, mash의 삼투압(10, 11), 점도에 따라 발효력과 효모증식이 영향을 받으며 주정제조 원료

정정 후

공급 mash의 적정 당농도 결정

Mash 중의 에탄올 농도는 가능한 높을수록 증류시 에탄올을 회수하는 공정에서 원가가 절약되므로 내당, 내알코올성 또는 고온성 균주개발의 연구가 보고되고 있다(2, 9). 본 실험에 사용한 효모의 경우 회분식 발효에서 11.5%(v/v)까지는 수율저하없이 발효가 가능하나 당농도, mash의 삼투압(10, 11), 점도에 따라 발효력과 효모증식이 영향을 받으며 주정제조 원