

내재형 Plasmid pBL1이 제거된 *Brevibacterium lactofermentum* 개발과 형질전환

이규남 · 민본홍¹ · 윤기홍*

한국과학기술연구원 생명공학연구소, ¹건국대학교 생화학과

Construction and Transformation of an Endogenous Plasmid pBL1-free *Brevibacterium lactofermentum*

Kyu-Nam Lee, Bon-Hong Min¹ and Ki-Hong Yoon*

Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KIST, P.O. Box 115, Yusong 305-600

¹Department of Biochemistry, Kon-Kuk University, Choongju-City, 380-701, KOREA

Abstract — An endogenous cryptic plasmid, pBL1, which has been used to construct plasmid vectors for coryneform bacteria producing amino acids, was eliminated from *Brevibacterium lactofermentum*. The pBL1 was partially digested with *Sau3AI* and the resulting DNA fragments were subcloned into a suicide vector pEM1 which contains a kanamycin-resistant (*km*^r) gene. *Km*^r *B. lactofermentum* transconjugants were obtained by conjugal transfer of the pEM1 derivatives containing pBL1 DNA fragments from *Escherichia coli* into *B. lactofermentum*. A *km*^r transconjugant was analyzed to contain a plasmid pEB14, which occurred *in vivo* by homologous recombination between pBL1 and the conjugal-transferred plasmid. The pEB14 including the pEM1-derived *km*^r gene was found to be lost concomitantly with *km*^r phenotype, resulting in the construction of a pBL1-free strain of *B. lactofermentum*. Based on transformation efficiencies and plasmid stability, the resultant pBL1-free strain is more useful than wild strain as a host cell for genetic manipulation. It could be concluded that foreign plasmid DNAs are efficiently isolated and analyzed from the pBL1-free strain because of the absence of endogenous pBL1 plasmid.

아미노산 생산균으로써 산업적으로 널리 사용되고 있는 *Brevibacterium lactofermentum*이 지니고 있는 내재형 plasmid pBL1(12)은 그 크기가 4.4 kb이며 분리된 균주에 따라 그 이름이 다르게 보고되어 있으나(8) 염기배열로 보아 동일한 plasmid이다(6, 17). pBL1은 *Corynebacterium glutamicum*에서 분리된 cryptic plasmid pSR1(18)과 더불어 여러 종류의 유전자 운반체 개발에 사용되어 *Corynebacterium*과 *Brevibacterium* 속에 속하는 아미노산 생산균주의 유전자 조작에 이용되고 있다(7, 11). pBL1을 사용하여 제조된 유전자 운반체는 pBL1이 존재하는 숙주균에서 pBL1과 경쟁관계에 있으므로 그 안정성이 떨어질 가능성이 있다. 실제 pBL1의 replication origin 부분을 이용하여 제조한 plasmid vectors는 *B. lactofermentum*에서 보다 *C. glutamicum*과 같은 다른 coryneform 아미

노산 발효균에서 주로 사용되고 있다. 그러나 *B. lactofermentum*이 아닌 다른 숙주균에서는 segregational instability를 보이는 것으로 보고되었다(10). 그러므로 *B. lactofermentum*에서 pBL1으로 만들어진 plasmid vectors를 효율적으로 이용하기 위해서는 pBL1이 제거된 숙주균의 개발이 요구된다.

일반적으로 세균에 존재하는 plasmid를 제거하기 위해서는 배양 온도의 상승(5), 원형질 세포의 유도(9)와 sodium dodecyl sulfate 처리 등에 의한 세포막의 부분적 손상(16) 및 plasmid의 복제를 저해하는 acridine orange, ethidium bromide 등을 이용한 방법들이 사용되고 있다(3). 그러나 naturally occurring plasmid는 복제와 분배기작이 잘 조절되어 숙주균에서 안정하게 유지되므로 숙주균으로 부터 제거되는 효율이 낮으며 더구나 pBL1의 경우는 그 기능이 알려진 유전자를 지니고 있지 않으므로 pBL1이 제거된 균주를 찾는 것이 용이하지 않다.

그러므로 본 연구에서는 숙주균내에서 상동성 재

Key words: *Brevibacterium lactofermentum*, plasmid pBL1, plasmid curing, pBL1-free strain

*Corresponding author

조합을 유도하여 pBL1으로 항생제 내성 유전자를 도입시킨 후 항생제 내성 표현형질을 선별인자로 이용함으로써 pBL1을 제거시킨 *B. lactofermentum*을 제조하고 plasmid vectors에 의한 형질전환 효율과 형질전환체에서의 plasmids 안정성을 원래 균주의 것과 비교 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주와 배지

Plasmid pBL1의 제공원 및 제거 대상균으로 *B. lactofermentum* ATCC 13869가 사용되었으며 유전자 조작을 위한 숙주균으로는 *E. coli* JM83 (ara, Δ(*lac proA,B*), *rspL*, φ80, *lacZ*ΔM15(*r_k'*, *m_k'*))이 사용되었으며 *E. coli* S17-1(15)은 conjugation에 의해 *B. lactofermentum*으로 plasmid를 전달시킬 공여균주로 사용되었다. 실험에 사용된 모든 균의 배양을 위해 LB 배지(5 g yeast extract, 10 g bacto-tryptone, 5 g NaCl per liter)가 사용되었으며 형질전환체를 선별하기 위해 km(50 μg/ml)을 사용하였다.

Plasmid DNA 분리와 분석

*E. coli*로부터 plasmid DNA를 분리하기 위해 Birnboim과 Doly 방법(1)을 이용하였으며 *B. lactofermentum*의 plasmid는 Santamaria 등(12)에 의해 행해진 방법으로 분리하였다. 재조합 plasmids는 *E. coli*를 숙주균으로 하여 제조하였으며 plasmid DNA와 이들을 제한효소로 절단한 DNA 조각은 그 크기에 따라 agarose gel과 polyacrylamide gel 전기영동으로 분석하였다.

*B. lactofermentum*으로 plasmid DNA 전달

Schafer 등이 보고한 방법에 의해 *E. coli* S17-1로부터 plasmid를 *B. lactofermentum*으로 conjugal transfer 시켰으며(13) *B. lactofermentum* transconjugant를 선별하기 위해 배지에 kanamycin(km)과 함께 plasmid의 공여균주인 *E. coli*의 성장을 저지하면서 수용균주인 *B. lactofermentum*의 성장에는 영향을 미치지 않는 nalidixic acid(50 μg/ml)을 첨가하였다. 그리고 electroporation 방법을 이용하여 plasmid를 직접 *B. lactofermentum*을 형질전환 시켰으며(2) 이때는 형질전환체를 선별하기 위해 km 만을 사용하였다.

결과 및 고찰

상동성 재조합에 의한 pBL1으로 kanamycin 내성 유전자 도입

*B. lactofermentum*으로부터 cryptic plasmid pBL1을 제거하기 위해서는 플라스미드가 제거된 균주를 선별하는 방법이 필요하므로 우선적으로 세포내에서 상동성 재조합을 유발하여 km 내성유전자를 pBL1으로 도입시키기 위해 pEM1(14)을 이용하여 재조합 플라스미드를 제조하였다. Plasmid pEM1은 대장균에서는 복제가 가능하지만 *B. lactofermentum*에서는 복제가 되지 않는 suicide vector인데 이를 *Bam*HI으로 절단한 후 *Sau*3AI으로 pBL1을 부분 절단하여 얻은 DNA 조각을 subcloning 하였다. *E. coli*에서 제조된 pBL1의 DNA fragment를 함유한 여러 종류의 pEM1 유도체들 중에서 Fig. 1에서 보인 pEB1를 conjugation에 의해 *B. lactofermentum*으로 conjugation 시켰을 때 km에 대해 내성을 갖는 *B. lactofermentum* transconjugant를 얻었다. Transconjugant로부터 분리된 plasmid DNA를 제한효소를 처리하지 않고 plasmid pBL1 및 pEB1과 함께 전기영동을 통해 분석한 결과 Fig. 2에서와 같이 transconjugant에서 분리된 plasmid DNA에는 pBL1이 존재하지 않고 pEB1 보다 큰 plasmid가 발견되었으며 이를 pEB14로 명명하였다(Fig. 1). Plasmid pEB14을 pBL1 및 conjugation에 사용한 pEB1과 비교하기 위해 여러가지 제한효소를

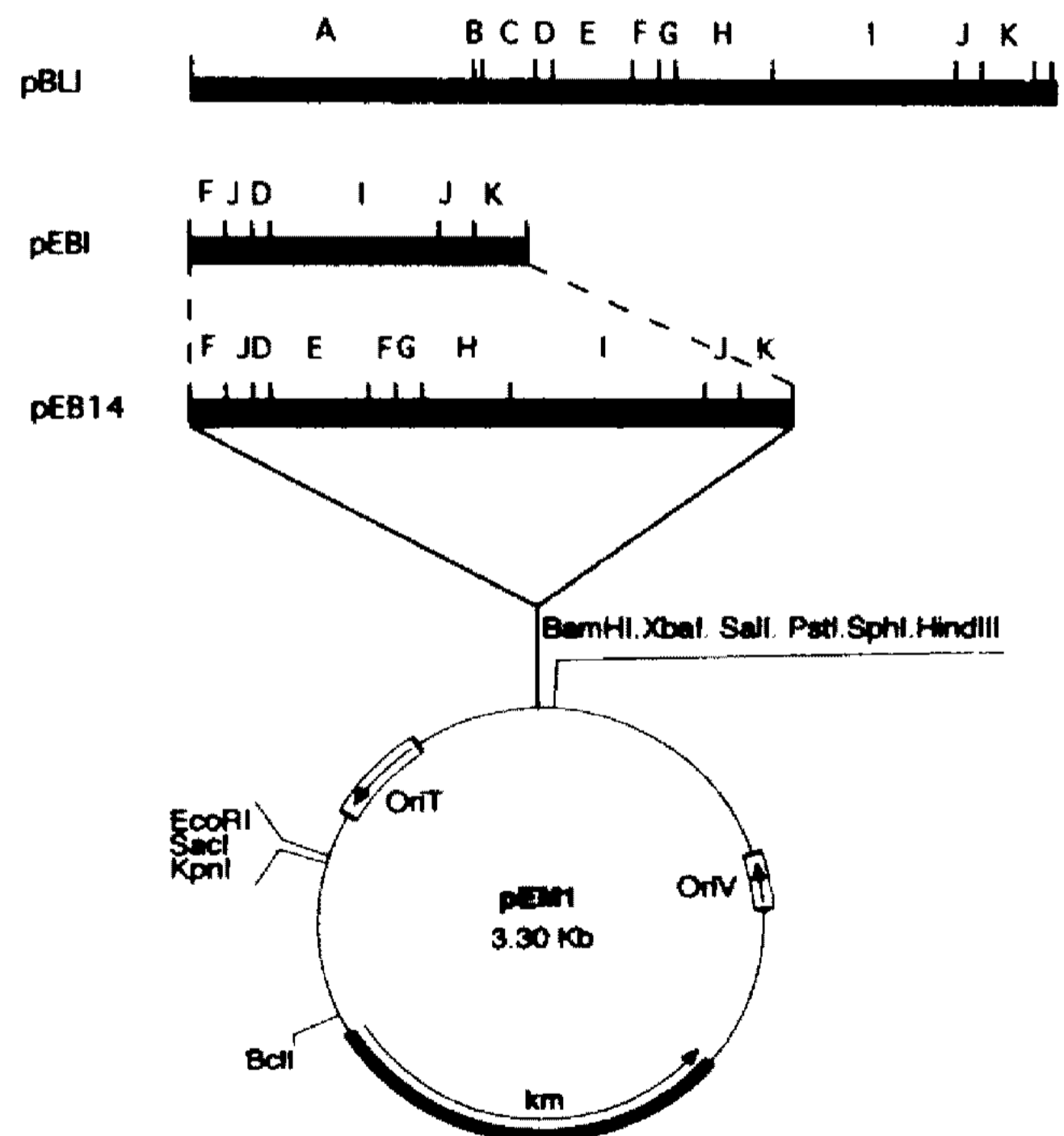


Fig. 1. DNA fragments of pBL1 derivatives, pEB1 and pEB14, based on *Sau*3AI cleavage sites. The bold black bars indicate the DNA fragments of pBL1 with *Sau*3AI cleavage sites (vertical lines). At the both ends of plasmid pBL1, vertical lines indicate cleavage sites for *Hind*III. Capital letters represent the *Sau*3AI-generated DNA fragments of pBL1.

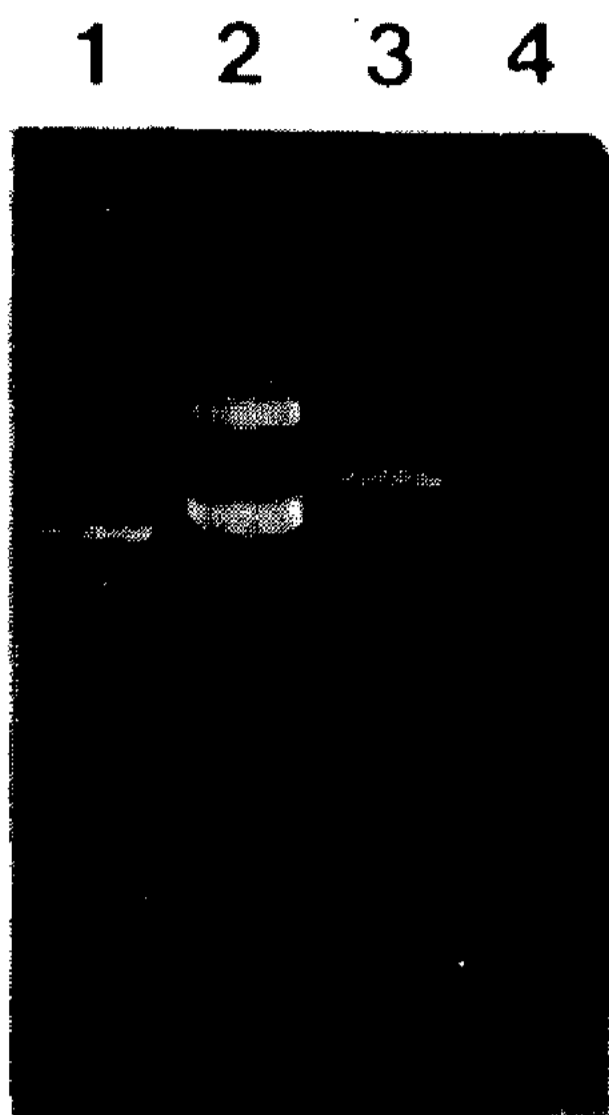


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of plasmid DNA. Lane 1, pBL1 isolated from *B. lactofermentum* ATCC 13869; lane 2, pEB1 prepared from *E. coli*; lane 3, pEB14 prepared from km^r *B. lactofermentum* transconjugant; lane 4, DNA prepared from *B. lactofermentum* PF1.

처리하여 전기영동한 결과(data not shown) Fig. 1에서 보인 바와 같이 pEB14는 pBL1이나 pEB1과는 다른 것으로 나타났는데 이는 *E. coli*로부터 *B. lactofermentum*으로 conjugal transfer 된 pEB1과 *B. lactofermentum*에 존재하고 있던 pBL1간에 상동성 재조합이 일어나 pEB14가 생겨난 것으로 판단된다. pEB14는 km^r 유전자와 함께 pEM1을 모두 지니고 있으며 pEB1과는 달리 *E. coli* 뿐만 아니라 *B. lactofermentum*에서 모두 복제 유지될 수 있어 pEB14를 이용하여 *B. lactofermentum*을 electro-transformation 방법으로 형질전환 시켰을 때 km에 대해 내성을 갖는 다수의 형질전환체가 얻어졌다. 그러나 conjugation 방법을 이용하였을 때와는 달리 transformation 방법에 의해서 pEB1은 *B. lactofermentum*를 형질전환시키지 못하였다. 이는 pEB1이 비록 pBL1으로부터 유래된 DNA는 가지고 있지만 복제에 필요한 부분이 결여되어 있으며 또한 *B. lactofermentum*으로 전달되는 방법에 따라 pBL1과 상동성 재조합을 일으킬 수 있는 확률이 차이가 있기 때문으로 판단된다.

***B. lactofermentum* transconjugant로부터 plasmid pEB14의 제거**

pBL1이 없어지고 pEB14 만을 함유한 *B. lactofermentum* transconjugant로부터 pEB14를 제거하기 위해 km이 함유되지 않은 LB 배지를 사용하여 배양한 후 이를 LB 한천배지에 도말하여 얻은 colony를

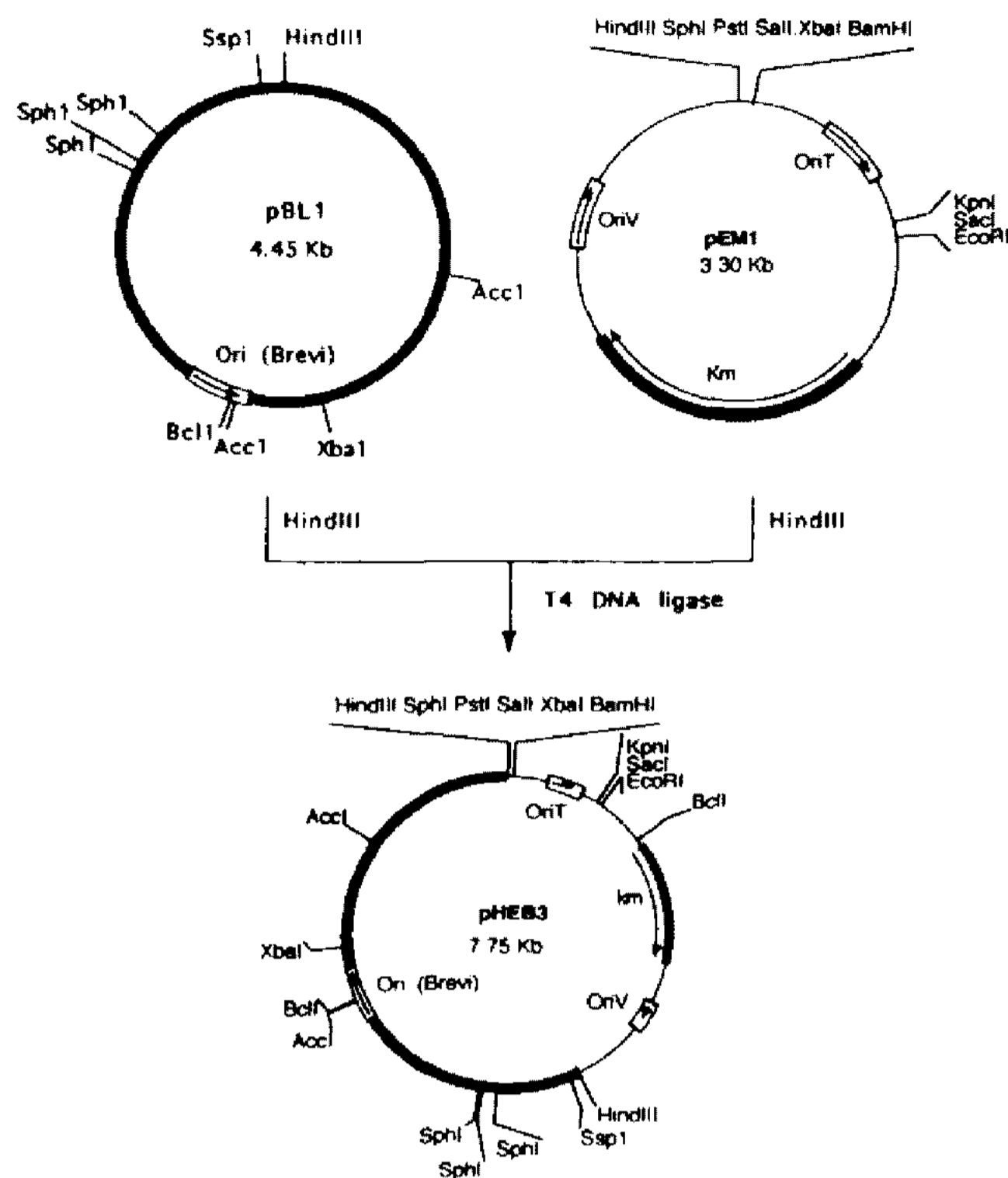


Fig. 3. Construction of a hybrid plasmid pHEB3 between pBL1 and pEM1.

km을 첨가한 LB 한천배지로 옮김으로써 km에 대한 내성을 상실한 균을 쉽게 얻을 수 있었다. 이들로부터 plasmid DNA를 분리한 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 모두 pEB14가 상실된 상태임이 확인되었으며 pBL1도 물론 존재하지 않았다. 이로써 내재형 plasmid pBL1이 완전히 상실된 *B. lactofermentum*을 제조하였으며 이러한 균주를 PF1으로 명명하였다.

Plasmid DNA에 의한 *B. lactofermentum* wild strain과 PF1 strain의 형질전환

pBL1이 제거된 균주와 제거되지 않은 원래의 균주를 각각 숙주균으로 사용하여 plasmid DNA에 의한 형질전환 효율과 형질전환체에서 plasmid DNA 상태를 비교 조사하기 위해 최 등(4)이 *C. glutamicum*의 cryptic plasmid pSR1에 km^r 유전자를 도입하여 제조한 크기가 7.5 kb인 pCE1301과 Fig. 3에서와 같이 pCE1301과 그 크기가 유사하도록 pBL1과 pEM1을 이용하여 제조한 pHEB3(7.7 kb)를 사용하여 *B. lactofermentum* wild strain과 PF1 strain을 각각 형질전환시켰다. 형질전환 빈도를 조사한 결과 Table 1에 나타낸 바와 같이 *B. lactofermentum*에 pBL1의 존재 유무에 관계없이 사용한 plasmid DNAs의 분리원에 따라 형질전환 효율이 큰 차이가 있는데 *E. coli*에서 분리된 것보다는 *B. lactofermentum*에서 분리된 plas-

Table 1. Transformation efficiencies of *B. lactofermentum* wild strain and PF1 strain with plasmid DNAs.

| Plasmids | Plasmid sources | Transformation frequency of <i>B. lactofermentum</i> (transformants/ μ g DNA) | |
|----------|------------------------------|---|-------------------|
| | | wild strain | PF1 strain |
| pCE1301 | <i>E. coli</i> | 5.5×10^3 | 6.4×10^3 |
| pCE1301 | <i>B. lactofermentum</i> PF1 | 3.2×10^3 | 4.5×10^3 |
| pHEB3 | <i>E. coli</i> | 2.5×10^2 | 7.5×10^2 |
| pHEB3 | <i>B. lactofermentum</i> PF1 | 7.5×10^3 | 1.8×10^4 |

mid DNA를 사용하였을 때 형질전환 빈도가 훨씬 높았다. 이러한 현상은 *B. lactofermentum*이 외래 DNA에 대해 restriction system을 지니고 있기 때문인 것으로 판단되는데 Bonnassie 등(2)에 의해서도 이와 유사한 결과가 보고되었다. PF1 strain의 형질전환 빈도를 wild strain의 것과 비교한 결과 pSR1의 replication origin을 함유한 pCE1301을 사용하였을 때보다는 pHEB3를 사용하였을 때 두 균주간의 형질전환 빈도의 차이가 크며 PF1 균주의 형질전환 효율이 높았다. 이러한 현상은 pBL1의 replication origin을 지니고 있는 pHEB3는 wild strain에 존재하는 pBL1과 경쟁적인 관계에 있기 때문으로 생각되어진다. 또한 km에 내성을 보이는 형질전환체 colony가 형성되는 시기도 차이를 보여 pHEB3에 의한 wild strain의 형질전환체가 다른 것들보다 늦게 생겨난다.

한편 plasmids pHEB3, pCE1301과 pEB14에 의한 형질전환체로부터 plasmid DNAs를 분리하여 분석한 결과 Fig. 4에 보인 것처럼 wild strain의 형질전환체는 도입된 plasmid와 더불어 pBL1을 지니고 있는 반면에 PF1 strain은 도입된 plasmid 만을 지니고 있다. 그러므로 PF1을 숙주균으로 사용하여 재조합 DNA를 도입시킬 경우 pBL1이 없으므로 도입된 plasmid DNA의 분리와 분석이 용이하다.

B. lactofermentum 형질전환체에서 plasmids 안정성 비교

형질전환에 사용한 각 plasmid DNA를 함유하고 있는 *B. lactofermentum* wild strain과 PF1 strain의 형질전환체에서 plasmid의 안정성을 조사하기 위해 km^r 형질전환체를 km이 첨가되지 않은 배지에서 일

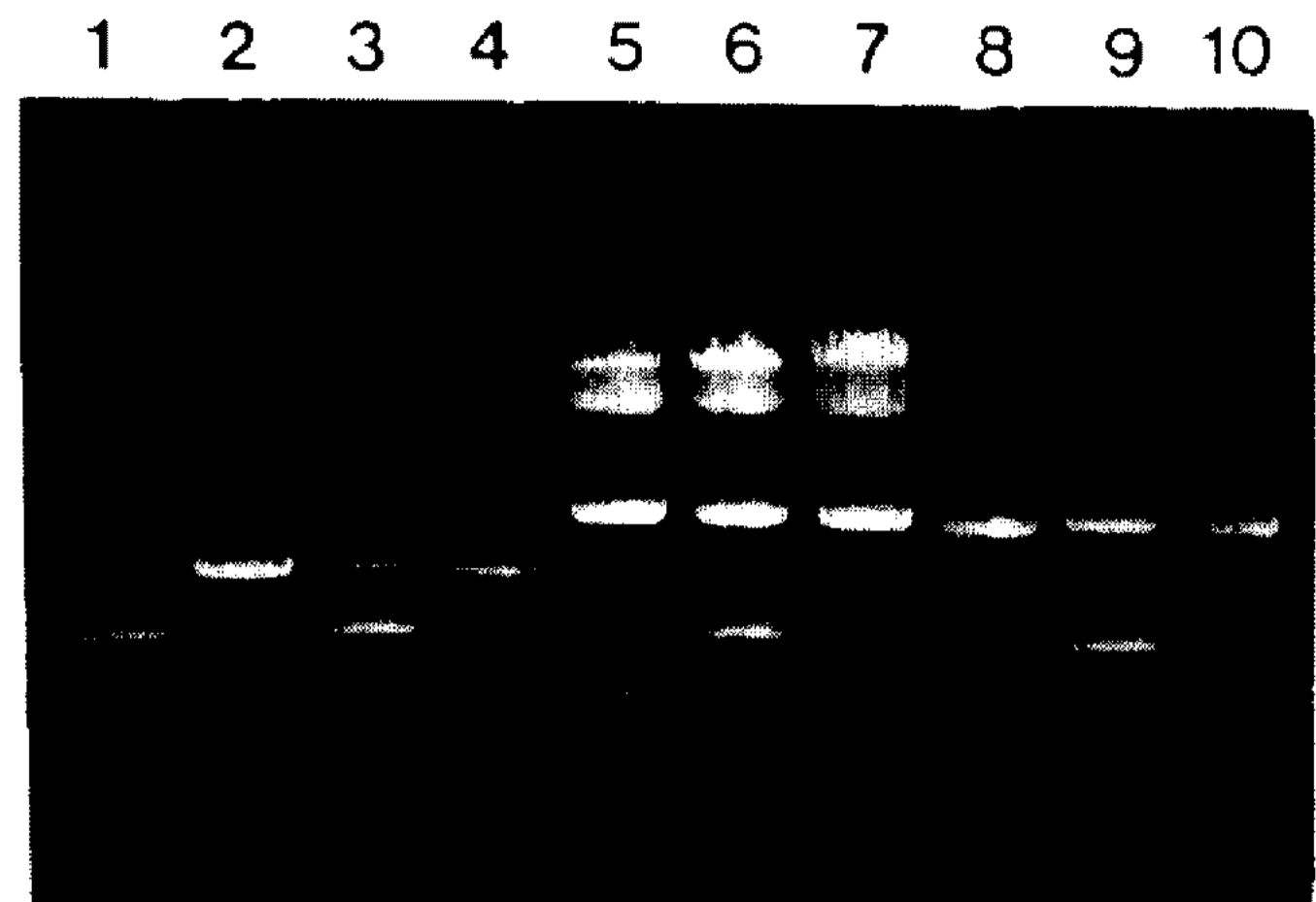


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of plasmid DNA. Plasmid pEB14 (lane 2), pHEB3 (lane 5) and pCE1301 (lane 8) were isolated from *E. coli*, and pBL1 (lane 1) was isolated from *B. lactofermentum*. Plasmid DNAs were prepared from; lane 3, *B. lactofermentum* (pEB14); lane 4, PF1 strain (pEB14); lane 6, *B. lactofermentum* (pHEB3); lane 7, PF1 strain (pHEB3); lane 9, *B. lactofermentum* (pCE1301); lane 10, PF1 strain (pCE1301).

Table 2. Plasmid stability in *B. lactofermentum* wild strain and PF1 strain.

| Plasmids | <i>B. lactofermentum</i> | Plasmid stability ^a (%) in repeated subcultures ^b at daily intervals | | |
|----------|--------------------------|--|---------------------|---------------------|
| | | 1 st day | 2 nd day | 3 rd day |
| pEB14 | wild strain | 58 | 39 | 38 |
| pEB14 | PF1 strain | 66 | 50 | 49 |
| pHEB3 | wild strain | 73 | 54 | 54 |
| pHEB3 | PF1 strain | 98 | 94 | 94 |
| pCE1301 | wild strain | 100 | 100 | 99 |
| pCE1301 | PF1 strain | 100 | 100 | 99 |

^aEach value represents the average of three determinants.

^b*B. lactofermentum* cells was grown for 24 h and in LB medium without antibiotic supplement, and then transferred into fresh media.

정시간 배양한 후 이를 한천배지에 도말하여 생긴 colonies를 km이 첨가된 한천배지로 옮김으로써 km에 대한 내성을 조사하고 km에 대한 내성을 상실한 colonies로부터 plasmid를 분리한 결과 형질전환에 사용되었던 plasmids가 상실된 것을 확인하였다. 그리하여 Table 2에서 보인 것과 같이 pCE1301은 wild strain이나 PF1 strain에서 안정적으로 유지되고 있으나 pHEB3와 pEB14는 wild strain보다는 pBL1이

존재하지 않는 PF1에서 안정적으로 유지되고 있다. 그런데 pEB14의 안정성이 pHEB3의 것보다 훨씬 떨어지는데 이는 pHEB3는 pBL1을 모두 가지고 있는데 비해 pEB14에서는 pBL1의 일부가 존재하지 않아 plasmid 안정성에 영향을 미치는 것으로 생각된다.

그러므로 본 연구에서 얻은 plasmid pBL1-free *B. lactofermentum* PF1은 plasmid에 의한 형질전환 효율성과 형질전환체에서의 plasmid 안정성 향상 및 도입된 plasmid의 분리와 분석이 용이하다는 측면에서 pBL1을 지니고 있는 wild strain보다 유전자 조작을 위해 효과적인 숙주균으로 사용될 수 있을 것이다.

요 약

코리네형 아미노산 생산균을 위한 plasmid vectors의 개발에 이용되어 온 내재형 cryptic plasmid pBL1을 *Brevibacterium lactofermentum*으로부터 제거하였다. *B. lactofermentum*에서는 복제할 수 없으나 km^r 유전자를 지니고 있는 plasmid pEM1으로 제한 효소 *Sau3AI*에 의해 절단된 pBL1의 DNA fragments를 도입시킨 pEM1 유도체를 제조한 후 이를 *Escherichia coli*로부터 *B. lactofermentum*으로 conjugal transfer 시킴으로써 km에 대해 내성을 갖는 *B. lactofermentum* transconjugant를 얻었다. km^r transconjugant에는 pBL1과 pEM1 유도체간에 상동성 재조합으로 생겨난 plasmid pEB14가 존재하였으며 이것은 pEM1으로부터 유래된 km^r 유전자를 지니고 있는 것으로 확인되었다. *B. lactofermentum* transconjugant의 km^r 표현형질을 선별인자로 이용하여 km에 대한 내성과 함께 pEB14이 동시에 상실된 균주를 선별함으로써 최종적으로 pBL1-free *B. lactofermentum* 균주가 제조되었다. Plasmid pBL1이 존재하는 균과 상실된 균을 숙주균으로 사용하여 plasmid DNA에 의한 형질전환 효율과 형질전환체에서 plasmid 안정성을 비교한 결과 pBL1-free strain이 원래의 균주보다 유전자조작을 위한 숙주균으로서 우수하였다. 또한 pBL1이 존재하지 않으므로 pBL1-free strain에서 외래 plasmid DNAs가 간편하게 분리 및 분석될 수 있다.

참고문헌

1. Birnboim, H.C. and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure of screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.* 7: 1513-1523.
2. Bonnassie, S., J.-F. Burini, J. Oreglia, A. Trautwetter, J.-C. Patte, and A.M. Sicard. 1990. Transfer of plasmid DNA to *Brevibacterium lactofermentum* by electrotransformation. *J. Gen. Microbiol.* 136: 2107-2112.
3. Bouanchaud, D.H., M.R. Scavizzi, and Y.A. Chabbert. 1968. Elimination by ethidium bromide of antibiotic resistance in enterobacter and staphylococci. *J. Gen. Microbiol.* 54: 417-425.
4. Choi, S.-G., J.-H. Park, and H.-K. Shin. 1991. Construction of a *Corynebacterium glutamicum*-*Escherichia coli* shuttle vector and cloning the homoserine dehydrogenase gene from *C. glutamicum*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 19: 31-36.
5. Crosa, J., L. Hedges, and M. Schiewe. 1980. Curing of a plasmid is correlated with an attenuation of virulence in the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Infect. Immun.* 27: 897-902.
6. Martin, J.F., R. Santamaria, H. Sandoval, G. del Real, L.M. Mateos, J.A. Gil, and A. Aguilar. 1987. Cloning systems in amino acid-producing corynebacteria. *Bio/Technol.* 5: 137-146.
7. Miwa, K., K. Matsui, M. Terabe, K. Ito, M. Ishida, H. Takagi, S. Nakamori, and K. Sano. 1985. Construction of novel shuttle vectors and a cosmid vector for the glutamic acid-producing bacteria *Brevibacterium lactofermentum* and *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* 39: 281-286.
8. Miwa, K., H. Matsui, M. Terabe, S. Nakamori, K. Sano, and H. Momose. 1984. Cryptic plasmids in glutamic acid-producing bacteria. *Agric. Biol. Chem.* 48: 2901-2903.
9. Novick, R., A. Gruss, and I. Edelman. 1979. Plasmid curing during the formation and regeneration of protoplast in *Staphylococcus aureus*. Pp. 303-312. In C. Stutterd and K.R. Rozee (eds.), *Plasmids and Transposons*. Academic Press, New York.
10. Reyes, O., A. Guyonvarch, V. Salti, F. David, and G. Leblon. 1991. Integron-bearing vectors: a method suitable for stable chromosomal integration in highly restrictive corynebacteria. *Gene* 107: 61-68.
11. Santamaria, R.I., J.A. Gil, and J.F. Martin. 1985. High-frequency transformation of *Brevibacterium lactofermentum* by plasmid DNA. *J. Bacteriol.* 162: 463-467.
12. Santamaria, R.I., J.A. Gil, J.M. Mesas, and J.F. Martin. 1984. Characterization of an endogenous plasmid and a transformation system in *Brevibacterium lactofermentum*. *J. Gen. Microbiol.* 130: 2237-2246.
13. Schafer, A., J. Kalinowski, R. Simon, A.-H. Seep-Feldhaus, and A. Puhler. 1990. High-frequency

1. Birnboim, H.C. and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure of screening recombi-

- conjugal plasmid transfer from Gram-negative *Escherichia coli* to various Gram-positive coryneform bacteria. *J. Bacteriol.* **172**: 1663-1666.
14. Schrupf, B., A. Schwarzer, J. Kalinowski, A. Puhler, L. Eggeling, and H. Sahm. 1991. A functionally split pathway for lysine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **173**: 4510-4516.
15. Simon, R., U. Priefer, and A. Puhler. 1983. A broad host range mobilisation system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *Bio/Technol.* **1**: 784-791.
16. Sonstein, S.A. and J.N. Baldwin. 1972. Loss of the penicillinase plasmid after treatment of *Staphylococcus aureus* with sodium dodecyl sulfate. *J. Bacteriol.* **109**: 262-265.
17. Yamaguchi, R., M. Terabe, K. Miwa, M. Tsuchiya, H. Takagi, Y. Morinaga, S. Nakamori, K. Sano, H. Momose, and A. Yamazaki, 1986. Determination of the complete nucleotide sequence of *Brevibacterium lactofermentum* plasmid pAM 330 and analysis of its genetic information. *Agric. Biol. Chem.* **50**: 2771-2778.
18. Yoshihama, M., K. Higashiro, E.A. Rao, M. Akedo, W.G. Shanabruch, M.T. Follettis, G.C. Walker, and A.J. Sinskey. 1985. Cloning vector system for *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **162**: 591-597.

(Received 25 January 1995)