

Salmonella typhi KNIH100으로부터 aroD 유전자의 클로닝과 염기서열 분석

길영식 · 전형규 · 신희정 · 김영창*

충북대학교 자연과학대학 생명과학부, *충북대학교 유전공학연구소

장티푸스는 *Salmonella typhi*에 의해 유발되는 장감염성 질환으로 사람과 동물에 공통되는 질병이다. 본 연구에서는 기 보고된 *S. typhi* KNIH100의 염색체 DNA로부터 방향족 아미노산의 생합성에 관여하는 효소인 3-dehydroquinate hydratase(3-dehydroquinase)를 암호화하는 *aroD* 유전자를 포함하는 약 3.2 kb의 *Sal I* 절편을 pBluescriptII SK(+) vector와 *aroD* 돌연변이주인 *E. coli* CGSC2848을 이용하여 클로닝하였다. 그리고 이 클론을 pSAL62이라 명명하였다. 클로닝된 재조합 plasmid인 pSAL62에는 ATG 개시코돈과 TGA 종결코돈을 포함하는 759 염기로 구성된 *aroD* 유전자가 위치하고 있었다. 또한 *S. typhi* Ty2, *Shigella dysenteriae*, 그리고 *Escherichia coli* 등 다른 장내세균의 *aroD* 유전자와 상동성을 비교하여 본 결과 각각 98%, 72.7% 그리고 73%의 상동성을 나타내었다.

Key words □ *aroD* gene, complementation, *Salmonella typhi* KNIH100.

장 감염성 질환 중 살모넬라증은 장티푸스와 파라티푸스 같은 장열, 폐혈증, 위장염을 일으키며 이중 가장 중요시되는 임상 증상은 장열이다. 장티푸스는 전세계적으로 매년 3,300만 명 정도의 감염자가 발생하여 약 50만 명 정도가 사망하고(7), 우리나라에서도 매년 발생하는 공중 위생학적으로 중요한 세균성 질환이다. 대부분의 장 감염성 질환은 오염된 음식이나 물을 통해 감염되며 예방으로는 수질 관리 및 환경위생 개선 등 오염원 관리와 감염 환자 및 보균자 관리 등의 감염원 관리가 있으나 다양한 보유 숙주와 보균자의 발견 및 항생제 남용에 의한 내성균주의 발생으로 인해 아직도 높은 발병률을 나타내고 있다. 따라서 장감염성 질환 예방의 효과적인 방법으로 예방 접종이 필요하게 되었으며, 현재 사용되고 있는 백신보다 안전하고 면역 효과가 우수한 백신 개발이 요구되고 있다.

장티푸스의 예방 백신으로는 Chuttani(5)에 의해 세가지 다른 경구용 사균 백신이 인도에서 시험되고, Wong등(25)에 의해 Vi capsular polysaccharide 항원 백신이 사용되었다. 그러나 면역 효과가 낮고 발열 등의 부작용이 나타나며 Vi polysaccharide 단독으로는 Vi 항체가를 증가시키지 못한다고 보고되었다. 이러한 단점을 보완하기 위해 Suz 등(23)은 Vi polysaccharide의 항체가를 증가시키기 위해 콜레라 독소나 디프테리아 외독소를 접합시킨 백신을 사용하여 Vi 항체의 역가를 증가시키는 연구를 수행하였으나, 생체 방어 효능이 낮아 1950년대부터 약독화 경구용 생백신 개발이 시작되었다. Denich 등(6)은 *Salmonella*의 방향족 화합물 합성을 암호화하는 유전자를 이용하여 약독화 백신 연구를

실험동물에서 시행하였으며 숙주에서 높은 방어율을 보였다. *S. typhi*에서는 Stocker(21)에 의해 *aro* 돌연변이를 이용한 약독화 경구용 백신이 처음으로 제안되었다. 최근에는 유전공학 기술을 이용하여 접합 백신과 재조합 백신이 개발되어 실용화 단계에 있으며 현재 우리나라에서 사용하는 경구용 장티푸스 백신으로는 Germanier와 Furer(11)에 의해 *galE* 유전자를 돌연변이시킨 *S. typhi* Ty21a 균주를 사용하고 있으나 면역 효과를 획득하기 위해서는 여러 번의 투여와 백신 제조상의 저 효율성 및 비특이적 화학 물질에 의한 돌연변이 균주의 생성 등의 문제점이 있어 유전적으로 안정하고 약독화율이 높은 새로운 *S. typhi* 백신 후보주 개발이 필요하게 되었다.

따라서 본 연구에서는 이러한 문제점을 최소화하기 위하여 국내에서 분리된 장티푸스균에 대한 영양요구성 백신 후보주를 제조하기 위하여 방향족 아미노산 생합성 과정에 관여하는 유전자(*aro*)를 대상으로 연구를 진행하였다. 방향족 아미노산의 생합성 과정에는 3-dehydroquinate dehydratase를 암호화하는 *aroD*, 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthetase를 암호화하는 *aroA* 그리고 chorismate synthetase를 암호화하는 *aroC* 등 최소한 9 종류의 유전자가 관여한다(16)(Fig 1). 본 연구에서는 *S. typhi* KNIH100(1, 2)으로부터 3-dehydroshikimate 합성에 관여하는 3-dehydroquinate를 생산하는 *aroD* 유전자를 클로닝하고 그 염기서열을 분석하였기에 보고하는 바이다

재료 및 방법

사용균주

본 실험에 사용한 균주는 기 보고된(1) *S. typhi* KNIH100을, 클로닝을 위한 숙주균주로는 Yale 대학(*E. coli* Genetic Stock

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 043-261-2302; Fax: 043-268-2538
E-mail: youngkim@cbucc.chungbuk.ac.kr

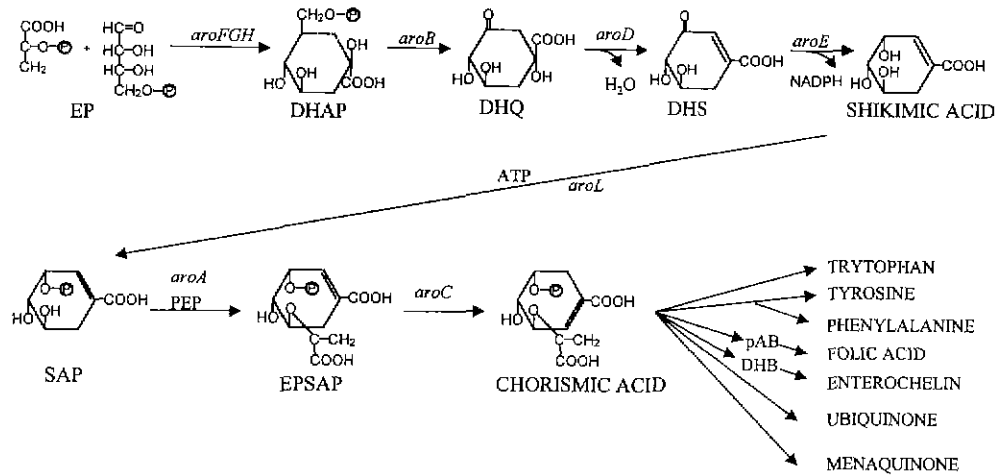


Fig. 1. Aromatic amino acid biosynthesis pathway. pAB, p-aminobenzoic acid; DHB, 2,3-dihydroxybenzoic acid; PEP, phosphoenolpyruvate; EP, D-erythrose 4-phosphate; DAHP, 3-deoxyarabinoheptulosonic acid-7-phosphate; DHQ, 5-dehydroquinate; DHS, 3-dehydroshikimate; SAP, shikimate acid 3-phosphate; EPSAP, 3-enolpyruvyl-shikimate-5-phosphate.

Centre)으로부터 *aroD* 유전자의 돌연변이주인 *E. coli* CGSC2848(17)을 분양받아 사용하였으며, 기타 본 연구에 사용된 균주 및 플라스미드의 특징은 Table 1과 같다.

시약

본 실험에 사용된 bacto-tryptone, bacto-yeast extract, agar 등 배지 성분은 Difco사로부터 구입하였으며 Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NaCl, NH_4Cl , $CaCl_2$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, vitamine B1(thiamine hydrochloride), glucose, phenylalanine(Phe), tyrosine(Tyr), tryptophan (Trp), shikimate acid 등은 Sigma사로부터 구입하여 사용하였다. DNA 조작에 필요한 T4-DNA ligase 및 각종 제한 효소는 KOSCO(남도 과학), 바이오니아(주) 등으로부터 구입하여 사용하였다.

영양 배지와 최소 배지

영양 배지는 LB(Luria-Bertani)배지로 증류수 1 L에 bacto-trypton 10 g, bacto-yeast extract 5 g 그리고 NaCl 5 g 되게 첨

가하였고, 고체 배지는 agar를 1.5%되게 첨가한 후 사용하였다. 그리고 최소 배지는 M9 salt(Na_2HPO_4 6 g, KH_2PO_4 3 g, NaCl 0.5 g, NH_4Cl 1 g/L)와 $CaCl_2$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, Vitamine B1 (thiamine hydrochloride)을 각각 0.1 mM, 1 mM, 0.0005%(w/v) 그리고 glucose를 0.2%(w/v)되게 첨가한 M9 최소 배지를 사용하였으며(13), *aroD* 유전자의 클로닝을 위한 확인용으로는 M9 최소 배지에 Phe, Tyr, Trp, shikimate acid를 각각 10^{-6} M되게 첨가한 M9 최소 선택 배지를 사용하였다.

염색체 DNA 및 플라스미드의 추출

염색체 DNA는 Murray(15)의 방법에 의하여 추출하였다. 즉, 5 ml의 LB 액체 배지에 균체를 배양 후 원심 분리하여 균체를 회수하고 TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 완충 용액 567 μ l에 현탁 후 SDS와 proteinase K의 농도가 각각 0.5% 및 100 g/ml되게 첨가하여 37°C에서 1 시간 반응시켰다. 그리고 5 M NaCl을 100 μ l 첨가하여 잘 혼합한 후 hexadecyltrimethylammonium bromide(CTAB)/NaCl(10% CTAB, 0.7 M NaCl) 용액 80 μ l를 첨가하여 65°C에서 10분간 반응시켰다. 반응 용액에 동량의 phenol/chloroform을 섞은 후 원심 분리하여 상층액을 회수하였다. 회수한 용액에 0.6 배의 이소프로판올을 첨가하여 염색체 DNA를 회수하였다. 회수된 염색체 DNA는 70% 에탄올을 이용하여 1 회 세척 후 TE(pH 8.0) 완충 용액을 적당량 넣어 녹였다. 그리고 플라스미드 DNA는 Sambrook등(18)의 방법에 의하여 추출하였다.

Primer의 합성 및 Polymerase Chain Reaction(PCR)

S. typhi KNIH100으로부터 *aroD* 유전자를 클로닝하기 위하여 이미 밝혀진 대장균과 *S. typhi* Ty2(19)의 *aroD* 유전자 염기서열로부터 ClustalV 프로그램을 이용한 multiple alignment를 실시하여 비교적 상동성이 높은 부위를 대상으로 서로 상보적인 방향에서 약 680 bp의 거리를 두고 primer AD1 5'-GACACGC-ATGAAAACCCT-3'와 primer AD3 5'-TGCCAGA-CGTGAAA-

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Bacterial strain and plasmid	Relevant characteristics	Source or Ref
Strains		
<i>S. typhi</i> KNIH100	Sm ^r , Tc ^r , Ap ^r , Km ^r	(1)
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac⁻ F'[proAB+lacF lacZ ΔM15 Tn10(ter)]</i>	Stratagene Co.
<i>E. coli</i> CGSC2848	<i>aroD352, λ⁻, glnV42(AS)</i>	Yale Univ.
Plasmids		
pBluescriptII SK(+)	Ap ^r , multiple cloning site in <i>lacZ α</i> ; Stratagene obtained from Stratagene Cloning Co. Systems	
pSAL62	3.2-kb <i>SaI</i> fragment from <i>S. typhi</i> This study KNIH100 inserted into SKII(+)	

TGAC-3'를 합성 하였다

PCR을 실행하기 위하여 먼저 균액을 3 ml 배양 후 1 ml를 취하여 균체를 회수하고 멸균수 300 μ l에 현탁하여 끓는 물에서 10분간 증탕 후 원심 분리하여 상층액 10 μ l를 주형 유전자로 사용하여 총 100 μ l의 반응액으로 제조하였다. PCR은 우선 94°C에서 3분간 변성시키고 이어서 94°C에서 1분 동안 변성하고, 50°C에서 1분 동안 재결합, 그리고 72°C에서 1분 동안 신장시키는 방법으로 30회 반복하였으며, 최종적으로 72°C에서 3분 동안 반응시켜 충분한 신장을 유도하였다. PCR 반응이 완료되면 반응액 5 μ l를 취하여 전기 영동한 후 반응 산물을 확인하였다

Southern Hybridization

Southern hybridization은 나일론 막과 ECL(enhanced chemiluminescence, Amersham) kit를 사용하여 수행하였다. 탐침 자료는 primer SS5와 SS6을 이용하여 얻은 PCR 생성물을 회수하여 kit에 동봉된 DNA 표지 용액과 glutaraldehyde 용액을 이용하여 37°C에서 30분간 반응시켜 사용하였으며, probe 제조 및 반응조건 등은 제조사의 처방을 따랐다. Hybridization 용액은 labelling kit내에 상품화된 hybridization 완충용액에 blocking agent와 NaCl을 각각 5%(w/v) 및 0.5 M 되게 첨가하였고, hybridization 조건은 42°C에서 16-20 시간 행하였다. 세척은 1차 세척 완충 용액 (0.4% SDS, 0.5 \times SSC)을 55°C에서 20분간 2회 반복한 후, 2차 세척 완충 용액 (2 \times SSC)을 상온에서 5분간 2회 반복하였다. 검출은 검출 용액 I과 검출 용액 II를 동량 섞어 준 후 상온에서 나일론 막 위에 정확히 1분간 반응시킨 후 사린랩으로 나일론 막을 감싸고 Hyperfilm-ECL을 이용하여 1분간 노출시킨 후 현상액과 고정액을 이용하여 필름을 현상하였다

형질 전환

Sambrook등의 방법(18)에 의한 열 충격 방법을 이용하였으며, 클로닝을 위한 벡터로는 pBluescriptII SK(+), 숙주 세포로는 *E. coli* CGSC2848, 그리고 유전자 조작과 염기 서열 분석을 위한 숙주 세포로는 *E. coli* XL1-Blue를 이용하여 형질 전환하였다.

***aroD* 유전자의 염기 서열 결정 및 대장균과의 비교**

클로닝된 유전자의 염기 서열은 충북대학교 공동실험실습관에 설치되어 있는 Pharmacia 사의 자동염기서열분석기(Cy5™ AutoRead Sequencer, Pharmacia Biotech)를 이용하여 수행하였다. 그리고 이미 보고된 대장균 등의 유전자와의 비교 분석은 GenBank 및 BLAST 등의 데이터베이스와 DNASIS, PROSIS 등의 소프트웨어를 이용하여 결정된 염기 서열을 분석하였다

결과 및 고찰

***S. typhi* KNIH100으로부터 *aroD* 유전자의 클로닝**

aro 유전자중 3-dehydroquinate dehydratase를 생산하는 *aroD* 유전자를 클로닝하기 위하여 이미 보고된 세균의 *aroD* 유전자 염기 서열의 상동성을 조사하였다. 그 중 상동성이 비교적 높은

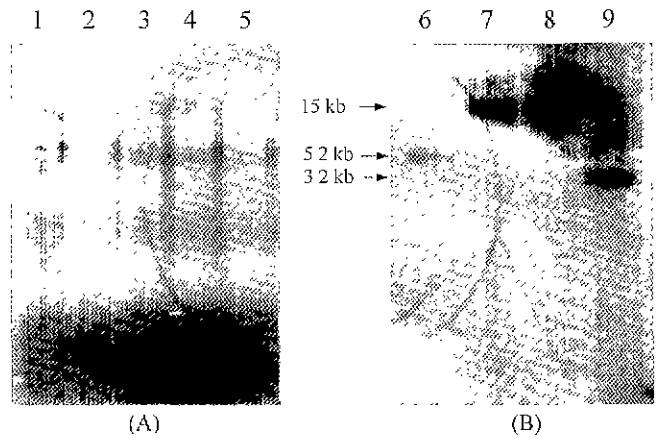


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of *S. typhi* KNIH100 genomic DNA digested with various enzymes(A). Southern hybridization of *S. typhi* KNIH100 genomic DNA hybridized with PCR product of *aroD* gene(B). Lane1, size marker- λ BstEII; 2, 6, *S. typhi* KNIH100-*EcoRI*; 3, 7, *S. typhi* KNIH100-*KpnI*; 4, 8, *S. typhi* KNIH100-*PstI*; 5, 9, *S. typhi* KNIH100-*SalI*. The signal was detected in 3.2-kb chromosomal DNA of *S. typhi* KNIH100 digested with *SalI*

Table 2. Complementation test of *E. coli* CGSC2848

Plasmid	Media	
	M9 minimal media	M9- <i>aroD</i> media ^a
No plasmid	-	+
pSAL62	+	+

^aMinimal media supplemented with tryptophan, tyrosine, phenylalanine, shikmic acid at final concentration of 10⁻⁶ M.

개시 코돈을 포함하는 18 bp(primer AD1)와 개시 코돈으로부터 680 bp 떨어진 곳의 18 bp(primer AD3)를 대상으로 primer를 합성하였다. 합성한 primer를 이용하여 *aroD* 유전자의 일부분으로 예상되는 680 bp의 PCR 생성물을 얻었고, 이 산물을 클로닝을 위한 probe로 사용하였다. *S. typhi* KNIH100으로부터 *aroD* 유전자를 클로닝하기 위하여 염색체 DNA를 여러 가지 제한효소로 절단한 후 전기영동하고 Southern hybridization을 실시한 결과, *SalI*로 절단한 염색체 DNA 약 3.2 kb의 위치에서 신호가 감지되었다.(Fig. 2). 따라서 *SalI*로 절단한 염색체 DNA 약 3.2 kb내에 *aroD* 유전자가 포함되어 있을 것으로 추측되어, GeneCleanII kit(Bio 101)를 이용하여 절단된 3.2 kb의 *SalI*절편을 회수 후 SK(+) 벡터에 재결합하였다. 또한 *aroD* 유전자를 클로닝하기 위하여 재결합 유전자는 *E. coli* CGSC2848를 숙주 세포로 이용하여 형질 전환하였다. 즉 *E. coli* CGSC2848은 *aroD* 유전자 부위가 돌연변이된 균주이기 때문에 shikmic acid 등이 첨가된 M9 최소 선택 배지에서는 생장할 수 있지만 M9 최소 배지에서는 생장하지 못한다. 따라서 *aroD* 유전자를 포함하는 유전자 절편이 숙주 세포인 *E. coli* CGSC2848에 형질 전환되어 *aroD* 유전자가 발현되면 complementation(Table 2)이 일어나서 M9 최소 배지에서 생장할 수 있는 특징을 이용하여 M9 최소 배지에 도말 후 생장하는 균주를 선별하였다. M9 최소 배지에서

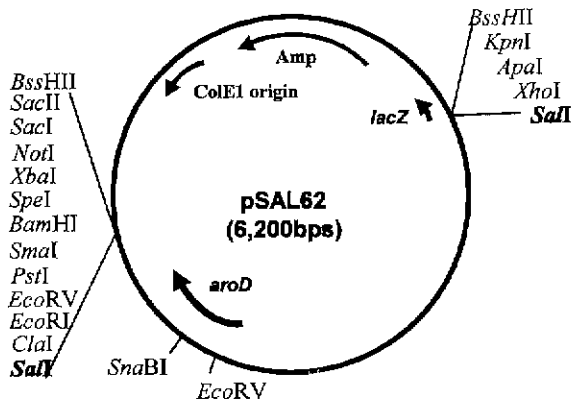


Fig. 3. Restriction enzyme map of the cloned recombinant plasmid pSAL62.

```

5'TCAAGGGGCCACGCTCAACCGTTCATCATTTGGGAGAGGAAAGAAAACCTGACAGGACAGCC 60
ATGAA4AOCGTCAACGTAAGAAATCTTATCATTTGGGAGAGGAAAGAAAACCTGACAGGACAGCC 120
M K T V T V K N L I I G E G M P K I I V
aroD
TGGTTGATGGGAAG4GACATCAATAGCGTGAAGCGGAGGCGCTGGCCACCGGAAAGCT 180
S L M G R D I N S V K A E A L A Y R E A
ACATTCGATATTTGGAGTGGCGGTGGATCACTTTATGGATATCCCATCGACTCAATGC 240
T F D I L E R R V D H F M D I A S T Q S
GTTCTTACCGCTGGCGGTGTTATTCGGGATGGATGGCTGACATTCGGTTACTGTTTACT 300
V L T A A R V I R D A M P D I P L L F T
TTCCGACGGCCAAAGAAGGGGGGAGGACAGCAATAACCACTCAGCATTATCTCAGCGCT 360
F R S A K E G G E Q T I T T Q H Y L T L
AATGTTGGCCAAATCGACAGCGGCTGGTGGATAAGATGATGATCTTTGAGCTATTTACCGGT 420
N R A A I D S G L V D M I D L E L F T G
GATGCTGACGTTAAAGCCACTGTTGATTTATGCCCATGGCCATAAGTTTATGTTGCTGATG 480
D A D V K A T V D Y A H A H N V Y V Y M
TCTAACCCAGATTITTCACCAAGCCGGTGGCAGAGAAATGGTTCTGGCGCTACGTT44A 540
S N H D F H Q T P S A E E M V L R L R K
ATGCAAGCACTCGCGCGATATTTCCCAAGATTTGGCGTTATGGCGCAAGCAAGCATGAT 600
M Q A L G A D I P K I A V M P Q S K H D
GTATTACGCTTACTCTACTGCGACCGTGGAGATGCGACACATTAAGCGCGACCGTGGGTA 660
V L T L L T A T L E M R Q H Y A D R P V
ATTACTATGTCATGGCAAGAGGGTGTCTATTTCCGTTGGCAGGGGAAATGTTTGGC 720
I T M S M A K E G V I S R L A G E V F G
TCTGGCCACGTTTGGCGGTGAAGCAGGCTTTCAGCGCCGGGCAAAATGGCGTAAAT 780
S A A T F G A V K Q A S A P G Q I A V K
GATCTACCGATGTTATTAATGATTTCCGCAAGCCCTGATCCACAGGACGGGTGCTGGT 840
D L R S V L M I L H N A *
GCATGATGGCTAGTGGAT4GTGGCATGCCAAGTAGC 3' 879
    
```

Fig. 4. Nucleotide and deduced amino acid sequences of *aroD* gene in *S. typhi* KNIH100.

생장하는 균주로부터 제조할 유전자를 추출하고 pSAL62라 명명 하였으며, 각종 제한 효소를 이용하여 제한 효소 지도를 작성하였다(Fig. 3).

aroD 유전자의 염기 배열 결정

S. typhi KNIH100으로부터 클로닝한 *aroD* 유전자의 염기 서열을 결정(Fig. 4)한 결과 759개의 염기로 이루어진 open reading frame(ORF)을 구성하고 있었으며, 개시코돈 상류부위 50에서 60번째 염기 서열 위치에 AGGA 리보솜 결합부위가 존재 하였다. 밝혀진 염기 서열을 근거로 이 ORF(*aroD*)가 암호화하고 있는 폴리펩타이드는 약 28 kDa일 것으로 추정된다.

장내세균의 aroD 유전자들과 비교 분석

밝혀진 염기서열을 근거로 DNASIS, PROSIS 및 Blast검색을

E. coli	MKTVTVKDLVIGTGAPKIIIVSLMAKDIAVKSEALAYREADFDILEWRVDFADLSMVES 60
S. dysenteriae	MKTVTVKDLVIGAGAPKIIIVSLMAKDIAVKSEALAYRETFDILEWRVDFADLSMVES 60
S. typhi KNIH100	MKTVTVKNLIIIGGMPKIIIVSLMGRDINSWKAEALAYREATFDILEWRVDFHMDIASTQS 60
S. typhi Ty2	MKTVTVKNLIIIGGMPKIIIVSLMGRDINSWKAEALAYREATFDILEWRVDFHMDIASTQS 60
	***** ** * ***** ** * ***** ***** ** *
E. coli	VMAAKILRETMPEKPLITFRSAKEGGEQAISTEAYIALNRAAIDSGLVDMIDLELFTG 120
S. dysenteriae	VMAAKILRETMPEKPLITFRSAKEGGEQAISTEAYIALNRAAIDSGLVDMIDLELFTG 120
S. typhi KNIH100	VLTAARVIRDAMPDIPLLTFRSAKEGGEQITTOHYLTLNRAAIDSGLVDMIDLELFTG 120
S. typhi Ty2	VLTAARVIRDAMPDIPLLTFRSAKEGGEQITTOHYLTLNRAAIDSGLVDMIDLELFTG 120
	* ** * ** * ***** ** * ** * ***** ***** ***** ** *
E. coli	DDQVKETVYAHAHNDKVVMSNHDHFHTPEAEI IARLEKMQSFDAIDPKIALMPQSTSD 180
S. dysenteriae	DDQVKETVYAHAHNDKVVMSNHDHFHTPEAEI IARLEKMQSFDAIDPKIALMPQSTSD 180
S. typhi KNIH100	DADVKATVDYAHAHNVVMSNHDHFHTPEAEEMVLRLEKMQALGADIPKIALMPQSKPD 180
S. typhi Ty2	DADVKATVDYAHAHNVVMSNHDHFHTPEAEEMVLRLEKMQALGADIPKIALMPQSKPD 180
	? ** * ***** ** * ***** ** * ***** ***** ***** ** *
E. coli	VLTLAATLEMQEQYADRPITMSMAKTGVISRLAGEVFGSAATFGAVKASAPGQISVN 240
S. dysenteriae	VLTLAATLEMQEQYADRPITMSMAKTGVISRLAGEVFGSAATFGAVKASAPGQISVN 240
S. typhi KNIH100	VLTLAATLEMQEQYADRPITMSMAKEGVISRLAGEVFGSAATFGAVKASAPGQIAVN 240
S. typhi Ty2	VLTLAATLEMQEQYADRPITMSMAKEGVISRLAGEVFGSAATFGAVKASAPGQIAVN 240
	** ** * * ** * ***** ** * ***** ***** ***** ***** ***** ** *
E. coli	DLRTVLTLIHLQA 252
S. dysenteriae	DLRILLTLIHLQA 252
S. typhi KNIH100	DLRSVLMILHNA 252
S. typhi Ty2	DLRSVLMILHNA 252
	** * ** * *

Fig. 5. Alignment of four AroD amino acid sequences as obtained by Clustal X. Asterisks indicate the amino acids identical in all proteins.

통해 이미 보고된 다른 장내세균들과 염기 배열의 상동성을 비교해 본 결과 *S. typhi* Ty2(19), *E. coli*(10) 그리고 *S. dysenteriae* Type I(24)과 각각 98%, 73% 그리고 72.7%의 상동성을 나타냈으며, *S. typhi* Ty2와는 개시 코돈으로부터 466, 467 등의 2부위를 제외한 모든 위치에서는 염기 서열이 동일함을 확인하였다. 또한 염기서열을 근거로 아미노산 잔기의 상동성을 비교(Fig 5)한 결과 *S. typhi* Ty2, *E. coli*, 그리고 *S. dysenteriae* Type I과 각각 99%, 77% 그리고 76.2% 상동성을 보였으며, *S. typhi* Ty2와는 아미노산 잔기 156번째 아미노산인 serine이 leucine으로 치환되어 존재하였다 이것은 *S. typhi* KNIH100과 *S. typhi* Ty2는 같은 종임에도 불구하고 두 곳에서 *aroD* 유전자 염기서열 차이를 보인다. 이는 *S. typhi* KNIH100이 국내 환자에서 분리된 임상 분리주이므로 환경에 적응하여 일부분에 돌연변이가 발생되어 외국에서 기 보고된 균주의 것과 차이를 나타낼 수 있을 것으로 추측된다

감사 말씀

본 연구는 1999년도 보건 의료기술 연구개발사업(HMP-99-V-B-0002) 및 한국과학재단 특정기초연구(1999-2-3-3-006-3)의 지원으로 수행되었음.

참고문헌

1. 김영식, 신희정, 김영창. 2000. *Salmonella typhi* KNIH100으로부터 *aroA* 유전자의 클로닝과 염기서열 분석. 미생물학 회지, 36, 46-51.
2. 주영란, 정하용, 이영희, 이광준, 박강수, 황규잠, 강영화, 박용춘, 최문찬, 임제윤, 대용수, 김영창. 1997. 국내에서 분리한 *Salmonella typhi*로부터 백신 후보주의 선발. 대한미생물

- 학회지. 32, 175-182
3. Charles, I. G., H. Lamb, D. Pickard, G. Dougan, and A. R. Hawkins. 1990 Isolation, characterization and nucleotide sequences of the *aroC* genes encoding chorismate synthase from *Salmonella typhi* and *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 136, 353-358.
 4. Chatfield, S. N., N. Fairweather, I. Charles, D. Pickard, M. Levine, D. Hone, M. Posada, R. A. Strugnell, and G. Dougan. 1992 Construction of a genetically defined *Salmonella typhi* Ty2 *aroA*, *aroC* mutant for the engineering a candidate oral typhoid-tetanus vaccine. *Vaccine* 10, 53-60.
 5. Chuttani, C. S. 1976 Controlled field trials of three different oral killed typhoid vaccines in India. *Dev. Biol. Stand.* 33, 98-101.
 6. Denich, K., P. Brim, P. O. O'hanley, M. Hward, and A. W. Heath. 1993. Expression of the murine interleukin-4 gene in an attenuated *aroA* strain of *Salmonella typhimurium*: Persistence and immune response in BALB/c mice and susceptibility to macrophage killing. *Infect. Immun.* 61, 4818-4827.
 7. Dlawer, A. A. A. and E. H. Carlos. 1992. Molecular and clinical aspects of bacterial vaccine development. p. 119-178. John Wiley & Sons Ltd., West Sussex, England.
 8. Dougan, G., S. Chatfield, D. Pickard, J. Bester, D. O'Callaghan, and D. Maskell. 1988 Construction and characterization of vaccine strains of *Salmonella* harboring mutations in two different *aro* genes. *J. Infect. Dis.* 158, 1329-1335.
 9. Dragunsky, E. M., E. Rivera, H. D. Hochstein, and I. S. Levenbook. 1990. *In vitro* characterization of *Salmonella typhi* mutant strains for live oral vaccines. *Vaccine* 8, 263-268.
 10. Duncan, K., S. Chaudhuri, M. S. Campbell, and J. R. Coggins. 1986. The over-expression and complete amino acid sequence of *Escherichia coli* 3-dehydroquinase. *Biochem. J.* 238, 475-483
 11. Germanier R. and E. Frer. 1975. Isolation and characterization of *Gal E* mutant Ty21a of *Salmonella typhi*: A candidate strain for a live oral typhoid vaccine. *J. Infect. Dis.* 131, 553-558.
 12. Hone, D. M., A. M. Harris, S. Chatfield, G. Dougan, and M. M. Levine. 1991. Construction of genetically defined double *aro* mutants of *Salmonella typhi*. *Vaccine* 9, 810-816.
 13. Jeffrey, H. M. 1992 A short course in bacterial genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
 14. Kinghorn, J. R. and A. R. Hawkins. 1982. Cloning and expression in *Escherichia coli* K12 of the biosynthetic dehydroquinase function of AROM cluster gene from the eukaryote *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* 186, 145-152
 15. Murray, M. G. and W. F. Thompson. 1980 Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA. *Nucl. Acid Res.* 8, 4321-4325
 16. Pittard, A. J. 1987. Biosynthesis of the aromatic amino acid. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and Molecular Biology. 1st ed. p. 368-395. Washington, DC: American Society for Microbiology.
 17. Pittard, J. and Wallace, B. J. 1966. Distribution and function of genes concerned with aromatic biosynthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 91, 1494-1508.
 18. Sambrook, J., T. Manniatis, and E. F. Fritsch. 1989. Molecular cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
 19. Servos, S., S. Chatfield, D. Hone, M. Levine, G. Dimitriadis, D. Pickard, G. Dougan, N. Fairweather, and I. Charles. 1991. Molecular cloning and characterization of the *aroD* gene encoding 3-dehydroquinase from *Salmonella typhi*. *J. Gen. Microbiol.* 137, 147-152.
 20. Stalker, D. M., W. R. Hiatt, and L. Comai. 1985. A single amino acid substitution in the enzyme 5'-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase confers resistance to the herbicide glyphosate. *J. Biol. Chem.* 260, 4724-4728.
 21. Stocker, B. A. D. 1989. Auxotrophic *Salmonella typhi* as live vaccine. *Vaccine* 6, 141-145.
 22. Susan, K. H. and B. A. D. Stocker. 1985. Genes *aroA* and *serC* of *Salmonella typhimurium* constitute an operon. *J. Bacteriol.* 163, 355-361.
 23. Suz, S. C., A. L. Stone, M. M. Levine, and J. D. Robbins. 1987 Preparation and characterization of conjugates against typhoid fever. *Vaccine* 6, 307-308.
 24. Walker, J. C. and N. K. Verma. 1997 Cloning and characterization of the *aroA* and *aroD* genes of *Shigella dysenteriae* type I. *Microbiol. Immunol.* 41, 809-813.
 25. Wong, K. H., J. C. Feeley, R. S. Northrup, and M. E. Forlines. 1974. Vi antigen from *Salmonella typhosa* and immunity against typhoid fever. I. Isolation and immunologic properties in animals. *Infect. Immun.* 9, 348-353

(Received July 18, 2000/Accepted August 30, 2000)

ABSTRACT: Cloning and Nucleotide Sequence Analysis of the *aroD* Gene from *Salmonella typhi* KNIH100

Young-Sig Gil, Hyung-Kyu Jeon, Hee-Jung Shin, and Young-Chang Kim^{1*}(School of Life Sciences, Chungbuk National University, ¹Research Institute of Genetic Engineering, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea)

Salmonella typhi is one of important causes of human enteric infections. *S. typhi* KNIH100 was isolated from a patient of typhoid fever in Korea. We cloned a 3.2 kb *SalI* fragment containing the *aroD* gene encoding a 3-dehydroquinase (3-dehydroquinase) from chromosomal DNA of this strain. This recombinant plasmid was named pSAL62. *E. coli* CGSC2848, an *aroD* mutant, was not grown on the M9 minimal medium but *E. coli* CGSC2848 (pSAL62) was grown on the M9 minimal medium. The *aroD* gene was composed of 759 base pairs with ATG initiation codon and TGA termination codon. Sequence comparison of the *aroD* gene exhibited 98%, 72.7%, and 73 % identity with those of *S. typhi* Ty2, *S. dysenteriae*, and *E. coli*, respectively.