

Salmonella typhi KNIH100으로부터 aroA 유전자의 클로닝과 염기서열 분석

김영식 · 신희정 · 김영창^{1*}

충북대학교 자연과학대학 생명과학부, ¹충북대학교 유전공학연구소

장티푸스는 *Salmonella typhi*에 의해 유발되는 장감염성 질환으로 사람과 동물에 공통되는 질병이다. 본 연구에서는 국립보건원과 공동연구를 수행하여 한국형 장티푸스 유발균인 *S. typhi* KNIH100을 분리하였다. 분리된 *S. typhi* KNIH100의 염색체 DNA로부터 방향족 아미노산의 생합성에 관여하는 효소인 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthetase를 암호화하는 *aroA* 유전자를 포함하는 약 5.0 kb의 *SalI* 절편을 pBluescriptII SK(+) vector와 *aroA* 돌연변이주인 *E. coli* CGSC2829를 이용하여 클로닝하였다. 그리고 이 클론을 pSAL80이라 명명하였다. 클로닝된 재조합 plasmid인 pSAL80에는 ATG 개시코돈과 TGA 종결코돈을 포함하는 1,284 염기로 구성된 *aroA* 유전자가 위치하고 있었으며, 다른 장내세균과 마찬가지로 *serC*와 하나의 오페론을 구성하고 있음을 밝혔다. 또한 *S. typhi* Ty2, *S. typhimurium*, 그리고 *E. coli* 등 다른 장내세균의 *aroA* 유전자와 상동성을 비교하여 본 결과 각각 99%, 98%, 77%의 상동성을 나타내었다.

Key words □ *aroA* gene, complementation, *Salmonella typhi* KNIH100

장티푸스를 비롯한 장감염성 질환은 범세계적으로 해결해야 할 중요한 보건학적인 과제로 남아 있으며 발병 기작과 질병 치료 방법에 대해 많은 연구가 진행되고 있다(4,5,13). 대부분의 장감염성 질환은 오염된 음식이나 물을 통해 전염되는 것으로 비위생적인 환경과 밀접한 관련이 있다. 이중 장티푸스는 전세계적으로 매년 3,300만건 정도가 발생하며 이 중 약 50만명 정도가 사망하고 있으며(7), 주로 후진국이나 개발도상국에서 빈번하게 발병하고 있다. 우리 나라도 최근 환경위생의 상당한 개선에도 불구하고 여전히 발병이 높은 지역으로 남아있다. 그 이유는 보건관리의 발전 및 관리가 제대로 이루어지지 않고 있으며, 항생제 남용에 따른 내성 균주가 다양하게 발생되어 이의 퇴치가 어려운 실정이다. 장티푸스의 예방은 수질관리, 환경위생 개선 및 보건관리를 철저히 하여 감염원을 차단하고 효과적인 예방접종을 실시하여 숙주의 방어능을 향상시키는 것이다. 최근 분자생물학 분야의 획기적인 발전으로 이러한 질환의 퇴치를 위해 면역원 물질의 확인 및 분리에 주력하고 있으며, 이는 현재 사용되고 있는 백신보다 안전하고 편리한 백신을 개발하는데 궁극적인 목적이 있다(17,22).

장티푸스 예방을 위한 백신은 1896년에 독일의 Pfeiffer와 Kolle에 의해 열처리하여 불활화시킨 사균 백신이 최초로 개발되어 사용되었으며 우리 나라도 1960년경부터 주사용 사균 백신을 사용하여 왔으나, 면역 및 방어효과가 낮고 균체의 lipopolysaccharide(LPS)가 함유되어 있어 30~50% 정도의 심한

부작용을 초래하여 현재에는 거의 사용하고 있지 않다. 따라서 면역 및 방어효과가 뛰어나고 부작용이 적은 백신의 개발이 꾸준히 요구되어 왔다(6). 그 결과 1975년 Germanier와 Furer에 의해 *galE* 유전자에 돌연변이를 유발시킨 *Salmonella typhi* Ty21a를 이용한 약독화 경구용 생백신이 개발되었다. 장티푸스는 전파가 경구로 이루어지기 때문에 면역획득을 위해서는 장관내에서 이루어지는 분비형 IgA에 의한 국소면역이 가장 효과적인 것으로 알려져 있으므로 이러한 경구용 백신은 백신으로서의 타당성이 인정되어 왔다(9). 최근에는 장티푸스 균체의 Vi-capsular-polysaccharide를 분리 정제한 단위체 백신이 개발되었다(20). Vi 항원은 장티푸스의 발병에 관여하고 나아가 병증을 더욱 심화시키는 데 필수적이며, 또한 대식세포의 식균작용에 대한 방어기능을 가짐으로써 발병 및 병독성에 중요한 역할을 한다는 사실이 밝혀졌다. 또한 혈청내 Vi 항원에 대한 항체의 존재여부가 보체의 활성화에 관여함으로써 숙주의 방어작용을 증진시키며 장티푸스에 대한 면역 형성에 기여할 것이라는 의견이 제시된 바 있다(15). 현재 우리 나라에는 위에서 언급한 경구용 장티푸스 백신들이 시판되고 있으나 대부분 수입에 의존하고 있으므로 한국형 장티푸스 백신의 개발이 시급히 요구되고 있다.

p-Aminobenzoate, tyrosine(Tyr), tryptophan(Trp), 2,3-dihydroxybenzoate, phenylalanine(Phe) 등 방향족 화합물은 phosphoenolpyruvate와 D-erythrose-4-phosphate로부터 5-dehydro-quinolate, shikimate, 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate 및 chorismate의 단계를 경유하여 생합성된다. 이 과정에는 5-dehydro-quinolate dehydratase를 암호화하는 *aroD*, 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthetase를 암호화하는 *aroA* 그리고 chorismate synthetase를 암호화하는 *aroC* 등 최소한 9 종류의 유전자가 관여하

*To whom correspondence should be addressed
Tel: 0431) 261-2302; Fax: 0431) 268-2538
Email: youngkim@cbucc.chungbuk.ac.kr

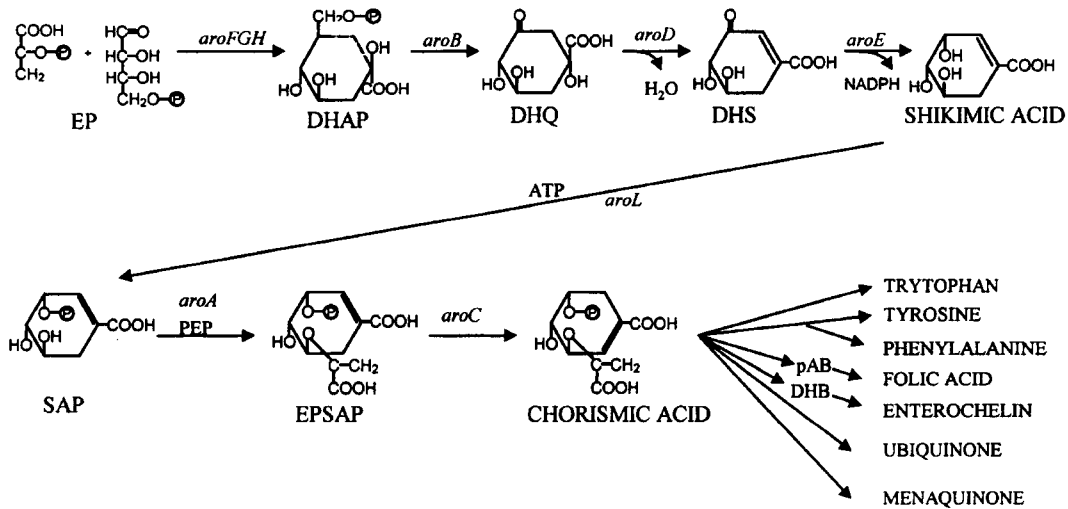


Fig. 1. Aromatic amino acid biosynthesis pathway. pAB, *p*-aminobenzoic acid; DHB, 2,3-dihydroxybenzoic acid; PEP, phosphoenolpyruvate; EP, D-erythrose 4-phosphate; DAHP, 3-deoxyarabino-heptulosonate-7-phosphate; DHQ, 5-dehydroquinate; DHS, 3-dehydroshikimate; SAP, shikimate 3-phosphate; EPSAP, 5-enol-pyruvyl-shikimate-3-phosphate.

며(12)(Fig 1), 이 유전자들에 대하여 많은 연구가 보고되었다 (8, 19, 21). 또 이러한 생합성 과정은 세균의 생장에 매우 중요하며 박테리아, 효모 그리고 식물 세포에서만 존재하고 포유동물 세포에서는 존재하지 않는다고 알려져 있다(7). 이에 본 연구팀은 국내에서 분리된 장티푸스균에 대한 영양요구성 백신 후보주를 제조하기 위하여 방향족 아미노산의 생합성 과정에 관여하는 유전자(*aro*)를 대상으로 연구를 진행하였으며, 이러한 방향족 아미노산의 생합성에 관여하는 유전자 중에서 *aroA* 유전자를 클로닝하고 그 염기서열을 밝혔기에 이를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

사용균주

본 실험에 사용한 균주는 국립보건원에서 분리한(2, 3) *Salmonella typhi* KNIH100을 이용하였으며, 클로닝을 위한 숙주 균주로는 Yale 대학(*E. coli* Genetic Stock Center)으로부터 *aroA* 유전자의 돌연변이주인 *E. coli* CGSC2829를 분양 받아 이용하였다. 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 Na₂HPO₄, KH₂PO₄, NaCl, NH₄Cl, CaCl₂, MgSO₄·7H₂O, vitamine B₁ (thiamine hydrochloride), glucose, Phe, Tyr, Trp, 2,3-dihydroxybenzoic acid, 4-aminobenzoic acid, 4-hydroxybenzoic acid 등은 Sigma사로부터 구입하여 사용하였다. DNA 조작에 필요한 *Taq* DNA polymerase, T4-DNA ligase 및 각종 제한 효소는 POSCOCHEM(납도 과학), 바이오니아(주) 등으로부터 구입하여 사용하였다.

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

| Bacterial strains and plasmids | Relevant characteristics | Source or Ref. |
|--------------------------------|--|----------------|
| Strains | | |
| <i>S. typhi</i> KNIH100 | Sm ^s , Tc ^s , Ap ^s , Km ^s | 1, 2. |
| <i>E. coli</i> XL1-Blue | <i>supE44hsdR17recA1endA1gyrA46thirelA1lac⁻F[proAB⁺lacIqlacZΔM15Tn10(tet)]</i> | Stratagene Co. |
| <i>E. coli</i> CGSC2829 | <i>aroA354, λ⁻, glnV42(AS)</i> | Yale Univ. |
| Plasmids | | |
| pBluescriptII SK(+) | Ap ^r , multiple cloning site in <i>lacZα</i> ; obtained from Stratagene Cloning Systems | Stratagene Co. |
| pSAL80 | 5.0-kb <i>SalI</i> fragment from <i>S. typhi</i> KNIH100 inserted into SK II(+) | This study |

영양 배지와 최소 배지

영양 배지는 LB (Luria-Bertani)배지로 증류수 1 l에 Bacto-tryptone 10 g, Bacto-yeast extract 5 g, NaCl 5 g 되게 첨가하였고, 고체 배지는 한천을 1.5%(w/v)되게 첨가한 후 사용하였다. 그리고 최소 배지는 기본적으로 M9 salt(Na₂HPO₄ 6 g, KH₂PO₄ 3 g, NaCl 0.5 g, NH₄Cl 1 g in 1 l)와 CaCl₂, MgSO₄·7H₂O, Vit. B₁ (thiamine hydrochloride) 및 glucose를 각각 0.1 mM, 1 mM, 0.0005%(w/v) 및 0.2%(w/v)되게 첨가한 M9 최소배지를 사용하였으며(11), *aroA* 유전자의 클로닝을 위한 확인용으로는 M9 최소 배지에 Phe, Tyr, Trp, 4-aminobenzoic acid, 4-hydroxybenzoic acid, 2,3-dihydroxybenzoic acid를 각각 10⁻⁶ M되게 첨가한 M9 최소 선택 배지를 사용하였다.

염색체 DNA 및 플라스미드의 추출

염색체 DNA는 기본적으로 Murray(14)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 μ g/ml되게 첨가하여 37°C에서 1시간 반응시켰다. 그리고 5 M NaCl을 100 μ l 첨가하여 잘 혼합한 후 CTAB/NaCl (10% CTAB, 0.7 M NaCl) 용액 80 μ l를 첨가하여 65°C에서 10분간 반응시켰다. 반응 용액에 동량의 chloroform을 넣고 섞은 후 원심 분리하여 상층액을 회수한 다음 phenol/chloroform을 동량 넣어 섞어주고 원심 분리하여 상층액을 회수하였다. 회수한 용액에 0.6 배의 이소프로판올을 첨가하여 잘 섞어 준 후 끝이 잘린 blue-tip 등을 이용하여 염색체 DNA가 손상되지 않도록 주의하여 회수하였다. 회수된 염색체 DNA는 70% 에탄올을 이용하여 1회 세척 후 증류수 또는 TE (pH 8.0) 완충 용액을 적당량 넣어 녹였다. 그리고 플라스미드 DNA는 Sambrook 등의 alkali lysis 방법(16)에 의하여 추출하였다.

Primer의 합성 및 Polymerase Chain Reaction(PCR) 조건

S. typhi KNIH100으로부터 *aroA* 유전자를 증폭시키기 위하여 이미 보고된(1) primer SS5와 primer SS6를 이용하였다.

PCR을 실행하기 위하여 먼저 균액을 3 ml 배양 후 1 ml를 취하여 균체를 회수하고 멸균수 300 μ l에 현탁하여 끓는 물에서 10분간 중탕한 다음 원심 분리하여 상층액 10 μ l를 주형 유전자로 사용하였으며 총 100 μ l의 반응액으로 조제하였다. 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 전기영동한 후 반응산물을 확인하였다. 유전자 검출을 위한 탐침자는 PCR이 완료된 후 반응액에 동량의 chloroform을 첨가하여 추출한 다음 사용하였다.

Southern Hybridization

Southern hybridization은 나일론 막과 ECL(enhanced chemiluminescence, Amersham) kit를 사용하여 수행하였다. 탐침자로는 primer SS5와 SS6를 이용하여 얻은 PCR 생성물을 회수하여 kit에 동봉된 DNA 표지 용액과 glutaraldehyde 용액을 이용하여 37°C에서 30분간 반응시켜 사용하였으며, probe 제조 및 반응조건 등은 제조회사의 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 수행하였다. 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 사란 랩으로 나일론 막을 감싸고 Hyperfilm-ECL을 이용하여 1분간 노출시킨 후 현상액과 고정액을 이용하여 필름을 현상하였다.

형질 전환

기본적으로 Sambrook 등의 방법(16)에 의한 열 충격 방법을 이용하였으며, 클로닝을 위한 벡터로는 pBluescriptII SK(+)를, 숙주 세포로는 *E. coli* CGSC2829, 그리고 유전자 조작과 염기 서열 분석을 위한 숙주 세포로는 *E. coli* XL1-Blue를 이용하여 형질 전환하였다.

aroA 유전자의 염기 서열 결정 및 대장균과의 비교

클로닝된 유전자의 염기 서열은 충북대학교 공동실험실습관에 설치되어 있는 Pharmacia 사의 자동염기서열분석기(Cy5TM AutoRead Sequencer, Pharmacia Biotech)를 이용하여 수행하였다. 그리고 이미 보고된 대장균 및 장내세균 등의 유전자와의 비교 분석은 GenBank 및 BLAST 등의 데이터베이스와 DNASIS, PROSIS 등의 소프트웨어를 이용하여 결정된 염기 서열을 분석하였다.

결과 및 고찰

S. typhi KNIH100으로부터 *aroA* 유전자의 클로닝

S. typhi KNIH100의 염색체에 존재하는 *aroA* 유전자의 위치를 알아보기 위해 먼저 기 제작된 primer를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 결과 생성된 약 940 bp의 산물은 여러 가지 제한 효소를 처리한 *S. typhi* KNIH100의 염색체 DNA에 대한 Southern hybridization의 probe로 이용되었다. Southern hybridization을 실시한 결과, 각각 *EcoRI*, *KpnI*, *PstI* 및 *Sall*으로 절단한 염색체 DNA의 약 5.7 kb, 7.2 kb, 5.0 kb, 5.0 kb 위치에서 신호가 감지됨을 확인하였다(Fig. 2). 이 결과는 다른 장내 세균인 *S. typhimurium*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*의 경우와

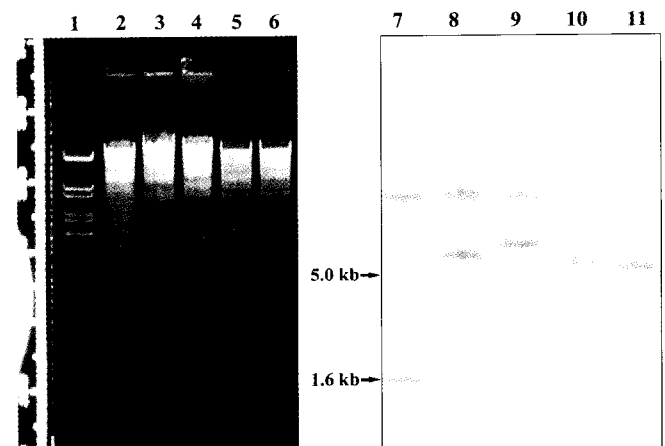


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of *S. typhi* KNIH100 genomic DNA digested with various enzymes (A). Southern hybridization of *S. typhi* KNIH100 genomic DNA hybridized with PCR product of *aroA* gene(B). Lane 1, size marker λ -BstEII, lane 2, 7; *S. typhi* KNIH100 genomic DNA-*ClaI*, lane 3, 8; *S. typhi* KNIH100-*EcoRI*, lane 4, 9; *S. typhi* KNIH100-*KpnI*, lane 5, 10; *S. typhi* KNIH100-*PstI*, lane 6, 11; *S. typhi* KNIH100-*Sall*. The signal was detected in 5.0 kb chromosomal DNA of *S. typhi* KNIH100 digested with *Sall*.

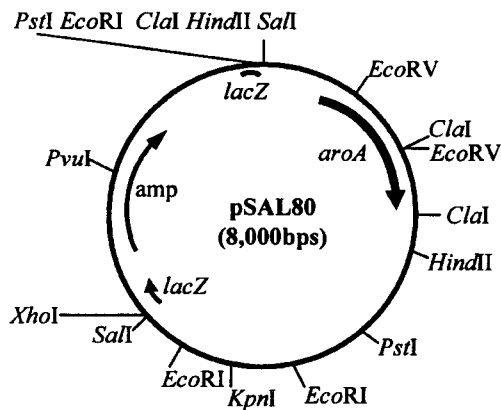


Fig. 3. Restriction enzyme map of the cloned recombinant plasmid pSAL80.

는 약간 다른 양상을 나타내었다. 따라서 본 연구에서는 *Sall*로 절단한 *S. typhi* KNIH100의 염색체 DNA 약 5.0 kb의 *Sall* 절편을 회수하여 pBluescriptII SK(+) 벡터에 재결합하였다. 재결합된 유전자는 *E. coli* CGSC2829를 숙주 세포로 이용하여 형질 전환하였으며 약 48시간동안 배양한 후 성장한 균주를 선별하였다. 즉, *E. coli* CGSC2829는 *aroA* 유전자 부위가 돌연변이된 균주이기 때문에 4-aminobenzoic acid, 4-hydroxybenzoic acid, 2,3-dihydroxybenzoic acid 등이 첨가된 M9 최소 선택 배지에서는 성장할 수 있지만 M9 최소 배지에서는 성장하지 못한다. 따라서 *aroA* 유전자를 포함하는 유전자 절편이 숙주 세포인 *E. coli* CGSC2829에 형질 전환되어 *aroA* 유전자가 발현되면 complementation이 일어나서 M9 최소 배지에서 성장할 수 있는 특징을 이용하여 M9 최소 배지에 도말 후 성장하는 균주를 선별하였다. M9 최소 배지에서 성장하는 균주로부터 재조합 유전자를 추출하고 pSAL80이라 명명하였으며, 각종 제한 효소를 이용하여 제한 효소 지도를 작성하였다(Fig. 3).

aroA 유전자의 염기 배열 결정

S. typhi KNIH100으로부터 클로닝한 *aroA* 유전자의 염기 서열을 결정하기 위하여 pSAL80의 제한효소 지도를 바탕으로 *aroA*를 포함하는 subclone을 제조하였다. 이들 subclone을 이용하여 염기서열을 결정한 결과 *aroA* 유전자는 개시코돈과 종결코돈을 포함한 1,284개의 염기로 이루어진 open reading frame (ORF)을 구성하고 있었으며, 이 ORF (*aroA*)가 암호화하고 있는 폴리펩티드는 약 46.12 kDa일 것으로 추정되었다. 또한 이 유전자의 상류부분에는 이미 밝혀져 있는 *S. typhi* Ty2, *S. typhimurium*, *S. pallinarium*(10), *E. coli*의 경우에서처럼 *S. typhi* KNIH100에서도 *serC*와 *aroA* 유전자는 하나의 오픈론으로 구성되어 있음을 알 수 있었다(Fig. 4).

aroA 유전자의 비교 분석

밝혀진 염기 서열을 근거로 DNASIS, PROSIS 등의 소프트웨어를 사용하여 아미노산 서열을 분석한 결과 *S. typhi* Ty2는 281번째 아미노산이 histidine인데 반하여 본 연구에서 사용된 균주

| | | |
|----|---|-------------|
| 5' | TTCATGATCGATTTTGAGCCCGCCACGGCTAATACGTTTCTTTTTTCATCCCGAGGCC | 60 |
| | <i>serC</i> | |
| | GTCTGTGGGGTTTTTATTCTGTTTTTTGAGAGTTGAGTTTCATGGAATCCCTGACGTTA | 120 |
| | | M E S L T L |
| | CAADCCATCGCGGGTGGATGGCGCATTAATTAACCTGGCTCAAAAAGTGTTCAAAC | 180 |
| | <i>aroA</i> | |
| | Q P I A R V D G A I N L P G S K S V S N | |
| | CGTCTTTCCTCTGGCGGCTTAGCTTGTGTAAAACCGTTCGACGAATCTGCTGGAT | 240 |
| | R A L L L A A L A C G K T V L T N L L D | |
| | AGCGATGACGTCGCCATATGCTCAATGCCTGAGCGGTTGGGGATCAATTACACCTT | 300 |
| | S D D V R H M L N L A L S A L G I N Y T L | |
| | TCTGCCGATCGCAACCGCTGTGATATCACGGGTAATGGCGCCCAATACGGCGTCAGGC | 360 |
| | S A D R T R C D I T G N G G P L R A S G | |
| | ACTCTGGAACGTTTCTCGGTAATGCGGAAACCGGATGGTCCGTTAGCGGCAGCGCTA | 420 |
| | T L E L F L G N A G T A M R P L A A A L | |
| | TGTCTGGGCAAAATGAGATAGTGTAAACCGGCAACCGGATGAAAGAGGGTCCGATA | 480 |
| | C L G Q N E I V L T G E P R M K E R P I | |
| | GGCCATCTGGTCGATTCTGCGTCAGGGTGGGGCAATATTGATTACCTGGAGCAGGAA | 540 |
| | G H L V D S L R Q G G A N I D Y L E Q E | |
| | AACTATCCGCCCTGCGTCTGCGCGGGTTTTTTCGCGCGGACATTGAGGTTGATGGT | 600 |
| | N Y P P L R L R G G F I G G D I E V D G | |
| | AGCGTTTCCAGCAGTTCTGACCGCTCTGCTGATGACGGGCGCGCTGGCGCTGAAGAC | 660 |
| | S V S S Q F L T A L L M T A P L A P E D | |
| | ACAATTATTCGGTTAAAGGCGAATGATCAAAACCTTACATCGATATCACGCTAAAT | 720 |
| | T I I R V K G E L V S K P Y I D I T L N | |
| | TAAATGAAAACCTTGGCGTGGAGATAGGAAACCATCACTACCAACAATTTGCTGTGAAG | 780 |
| | L M K T F G V E I A N H H Y Q Q F V V K | |
| | GGCGTCAACAGTATCACTCTCCAGTCCGATCTGCTGAGGGGCGATCCCTCGTCAGCG | 840 |
| | G G Q Q Y H S P G R Y L V E G D A S S A | |
| | TCCTATTTCTCGCGCTGGGGCGATAAAAAGGCGGCAACGTAAGTACCGGGATTGGC | 900 |
| | S Y F L A A G A I K G G T V K V T G I G | |
| | GGCAAAAGTATGACGGGCGATATCGTTTTCGCCGATGCTGGAGAAAATGGCGCGACC | 960 |
| | G K S M Q G D I R F A D V L E K M G A T | |
| | ATTACTGGGGCGATTTTTATTGCTGCACCGCGCGGAAITGCGCCGATAGATG | 1020 |
| | I T W G D D F I A C T R Y L E H A I D M | |
| | GATATGAACCATATTCGGATGCGGCGATGACGATTGCCAACCAGCGGTTGTTTGGCAA | 1080 |
| | D M N H I P D A A M T I A T T A L F A K | |
| | GGAACCAACGATGCGCAATATTTATACTGGCGAGTGAAGAAACCGATCGCCTGTTTC | 1140 |
| | G T T T L R N I Y N W R V K E T D R L F | |
| | GCGATGGGACCGAGCTACGTAAGTGGCGCTGAAGTGCAGGAGGCGGACTATATT | 1200 |
| | A M A T E L R K V G A E V E E G H D Y I | |
| | CGTATCACCGCGCGGAAAGCTCAACACGCGGATATTGCCAGCTACAACGCCACCGT | 1260 |
| | R I T P P A K L Q H A D I G T Y N D H R | |
| | ATGGGATGTTTCTCACTGGTCCGATGCGGATACCGCAGTCACGATCTGGACCT | 1320 |
| | M A M C F S L V A L S D T P V T I L D P | |
| | AAATGTAACGCAAAAACGTTCCCTGATTATTTCGAACTGCGCGGATGAGTACGCT | 1380 |
| | K C T A K T F P D Y F E Q L A R M S T P | |
| | GCCTAATCTGTGCGCAGTCGAGGATATCGAT 3' | 1413 |
| | A * | |

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

인 *S. typhi* KNIH100은 glutamic acid를 암호화하고 있었다. 또 이미 보고되어 있거나 데이터베이스에 수록되어 있는 *S. typhi* Ty2, *S. typhimurium*, *E. coli*, *K. pneumoniae*(18)의 *aroA* 유전자와 염기 배열을 비교 분석한 결과 각각 약 99%, 98%, 77%, 78% 정도의 상동성을 보였다. 즉 *Salmonella*속에 속한 균주들간의 상동성은 매우 높았으나 대장균이나 *Klebsiella*속 등에 속한 균주들과는 비교적 낮은 상동성을 나타냄을 알 수 있었다. 이러한 결과는 형질전환균주 선발시 *S. typhi* KNIH100의 *aroA* 유전자가 형질 전환된 *E. coli* CGSC2829가 M9 최소배지에서 매우 느린 성장능을 나타내었는데, 이는 유전자의 상동성이 낮아 원활

한 complementation이 이루어지지 않기 때문인 것으로 추측되었다. 또 *S. typhi* KNIH100과 *S. typhi* Ty2는 같은 종임에도 불구하고 1%의 *aroA* 유전자 염기서열 차이를 보인다. 이는 *S. typhi* KNIH100이 국내 환자에게서 분리된 임상 분리주이므로 환경에 적응하여 일부분에 돌연변이가 발생되어 외국에서 이미 보고된 균주의 것과 차이를 나타낼 수 있을 것으로 생각된다.

감사 말씀

본 연구는 1999년도 보건 의료 기술 연구 개발 사업의 지원 (HMP-99-V-B-0002)에 의하여 이루어진 것임에 감사드립니다.

참고문헌

1. 박용춘, 신희정, 홍순갑, 황순영, 박기덕, 주영란, 이광준, 김영창. 1997. *Shigella sonnei* KNIH104S로부터 *aroA* 유전자의 클로닝과 염기서열. 대한미생물학회지 32, 151-159.
2. 배용수, 조성기, 이광준, 주영란, 임재윤, 김영창. 1997. 국내 장감염 환자에게서 분리된 S-352 *Salmonella* 독성균주의 항원 분석 및 Macrophage 저항성연구. 대한미생물학회지 31, 35-43.
3. 주영란, 정하용, 이영희, 이광준, 박강수, 황규잠, 강영화, 박용춘, 최문찬, 임재윤, 배용수, 김영창. 1997. 국내에서 분리한 *Salmonella typhi*로부터 백신 후보주의 선별. 대한미생물학회지 32, 175-182.
4. Alf, A.L. and P. Tibor. 1993. Strategies for development of potential candidate *Shigella* vaccines. *Vaccine* 11, 168-178.
5. Blaser, M.J., R.A. Pollard, and R.A. Feldman. 1983. *Shigella* infections in the United States, 1974-1980. *J. Infect. Dis.* 147, 771-775.
6. 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.
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. Duncan, K. and J.R. Coggins. 1986. The *serC-aroA* operon of *Escherichia coli*. A mixed function operon encoding enzymes from two different amino acid biosynthetic pathways. *Biochem. J.* 234, 49-57.
9. Germanier, R. 1984. Typhoid fever. In *Bacterial vaccines* 1st ed. Academic Press, London.
10. Griffin, H.G. and A.M. Griffin. 1991. Cloning and DNA sequence analysis of the *serC-aroA* operon from *Salmonella gallinarum*; evolutionary relationships between the prokaryotic and eukaryotic *aroA*-encoded enzymes. *J. Gen. Microbiol.* 137, 113-121.
11. Jeffrey, H.M. 1992. A short course in bacterial genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
12. Karnell, A., B.A.D. Stocker, S. Katakura, H. Sweiha, F.P. Reinhold, P.D. Cam, D. Trach, and A.A. Lindberg. 1991. An auxotrophic live oral *Shigella flexneri* vaccine: Development and testing. *Rev. Infect. Dis.* 13, 357-361.
13. Levine, M.M., W.E. Woodward, S.B. Former, P. Gemski, H.L. DuPont, R.B. Hornick, and M.J. Snyder. 1977. Studies with a new generation of oral attenuated *Shigella* vaccine: *Escherichia coli* bearing surface antigens of *Shigella flexneri*. *J. Infect. Dis.* 136, 577-582.
14. Murray, M.G. and W.F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA. *Nucl. Acid Res.* 8, 4321-4325.
15. Robbins, J.B., R. Schneerson, I.L. Acharya, C.U. Lowe, S.C. Szu, E. Daniels, Y. Yang, and B. Trollfors. 1988. Protective roles of mucosal and serum immunity against typhoid fever. *Monogr. Allergy* 24, 315-316.
16. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1990. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory.
17. Schultz, C.L., B. Kaufman, D. Hamilton, A. Hartman, M. Ruiz, C. Powell, and S. Berman. 1990. Cell wall structures which may be important for successful immunization with *Salmonella-Shigella* hybrid vaccines. *Vaccines* 8, 115-121.
18. Sost, D. and N. Amrhein. 1990. Substitution of Gly-96 to Ala in the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase of *Klebsiella pneumoniae* results in a greatly reduced affinity for the herbicide glyphosate. *Arch. Biochem. Biophys.* 282, 433-436.
19. Susan, K.H. and B.A.D. Stocker. 1985. Genes *aroA* and *serC* of *Salmonella typhimurium* constitute an operon. *J. Bacteriol.* 163, 355-361.
20. Tacket, C.O., C. Ferreccio, J.B. Robins, C.M. Tsai, D. Schulz, M. Cadoz, U.A. Goudea, and M.M. Levine. 1986. Safety and immunogenicity of two *Salmonella typhi* Vi capsular polysaccharide vaccines. *J. Infect. Dis.* 154, 342-343.
21. Tacket, C.O., D. Hone, R. Curtiss, S.M. Kelly, G. Losonsky, L. Guers, A.M. Harris, R. Edelman, and M.M. Levine. 1992. Comparison of the safety and immunogenicity of Δ *aroC* Δ *aroD* and Δ *cya* Δ *crp* *Salmonella typhi* strains in adult volunteers. *Infect. Immun.* 60, 536-541.
22. Yoshida, Y., N. Okamura, J. Kato, and H. Watanabe. 1991. Molecular cloning and characterization of form I antigen genes of *Shigella sonnei*. *J. Gene. Microbiol.* 137, 867-874.

(Received January 10, 2000/Accepted February 24, 2000)

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

Young-Sig Gil, 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 5.0 kb *SalI* fragment containing the aroA gene encoding a 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthetase from chromosomal DNA of this strain. This recombinant plasmid was named pSAL80. *E. coli* CGSC2829, an aroA⁻ mutant, was not grown on the M9 minimal medium but *E. coli* CGSC2829 (pSAL80) was grown on the M9 minimal medium. The aroA gene was composed of 1,284 base pairs with ATG initiation codon and TAA termination codon. Sequence comparison of the aroA gene exhibited 99%, 98%, and 77% identity with those of *S. typhi* Ty2, *S. typhimurium*, and *E. coli* respectively. As in the cases of *Shigella sonnei* and *E. coli*, the *serC* and aroA genes lie in a single operonic structure.