

## pEA 9 :: Tn5-Mob에 의한 nif-plasmid pEA 9의 transfer 성질

민병환·이호자

경희대학교 문리과대학 생물학과

## Transfer properties of nif-plasmid pEA 9 by pEA 9::Tn5-Mob

Min, Byung Whan and Ho-Sa Lee

Department of Biology, College of Liberal arts and Sciences, Kyung Hee University Seoul, Korea

**ABSTRACT:** Using a Tn5-Mob system, pEA9 was characterized as a self-transmissible plasmid carrying a kanamycin resistance marker. The self-transfer frequencies of pEA9 varied greatly depending on pH values. The transfer frequency was about  $4 \times 10^{-5}$  at pH 5, that was 10 times higher than one at pH 6.5.

With a helper plasmid, transfer frequencies were increased about  $10^4$  times than the frequencies obtained without it.

**KEY WORD** □ pEA 9, RP4-mobilising system, conjugation frequency, pBM 339

흔히 사용되고 있는 *Escherichia coli*의 vector plasmids 즉 pBR 325(Bolivar 등, 1977)나 pACYC 184(Chang과 Cohen, 1978) 등은 스스로 전이할 수 없을 뿐만 아니라 효과적으로 mobilization될 수 없다. 이러한 종류의 vector plasmids를 mobilization 시키기 위하여 광범위한 숙주범위를 가진 plasmid RP 4의 *ori* T 부위를 shot gun cloning을 통해 vector plasmid에 삽입시키고 RP 4의 *tra*-gene의 존재하에 vector plasmid의 효과적인 전이능력을 갖게하는 RP 4-mobilising system의 개발은 현대유전학의 매우 유용한 방법의 하나로 관심을 모으고 있다.

이러한 방법을 통해 Mob-site를 가진 다양한 vector plasmids가 만들어 졌으며(Simon, 1984) 그 중 특히 vector plasmid pSUP 5011은 transposon Tn 5의 *Bam* HI-site에 Mob-site가 존재함으로써 이 vector plasmid를 이용한 transposon mutagenesis를 통해 자신의 *tra*-gene의 부재에 의해 전이능력을 갖고 있지않은

plasmid의 전이를 가능케 했으며 나아가서는 스스로의 *tra*-gene에만 의존하여 전이율이 매우 낮은 plasmid 역시 이 system을 통해 높은 전이율을 기대할 수 있게 되었다. 또 근대에 와서는 이 system에 의한 chromosome DNA의 mobilization 가능성도 소개되고 있다(Simon, 1984). 본 실험에서는 밀의 뿌리에서 분리한 질소고정능력을 가지고 있는 *Enterobacter agglomerans* 339(Kleeberger 등, 1983)의 *nif*-plasmid인 pEA 9이 self-transmissible 인지를 증명하기 위하여 RP 4-mobilising system과 transposon mutagenesis에 의해 Tn 5-Mob이 질소고정유전자에 삽입됨으로써 질소고정능력을 상실한 *nif*<sup>-</sup> mutant(민과이, 1988)로 부터 Kanamycin을 선택-marker로 사용하여 pEA 9의 self-transmissibility를 확인 했으며 더 나아가 이 plasmid의 transfer 성질과 RP 4-mobilising system을 통한 전이율의 변화에 관한 몇가지 새로운 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

## 균주 및 plasmids

사용균주 및 plasmids는 Table 1 및 2와 같다.

## 방 법

실험방법은 민과이(1988)가 수행한 방법과 같다.

Table 1. Bacterial strains

Strain	Relevant characteristics	References
<i>Escherichia coli</i>		
HB101	F, <i>hsdS</i> 20( $r_B^-$ , $m_B^-$ ), <i>supE</i> 44, <i>ara</i> -14, <i>galK</i> -2, <i>lacY</i> -1, <i>proA</i> 2, <i>rpsL</i> 2 <sup>c</sup> ( <i>str</i> <sup>r</sup> ), <i>xyl</i> -5, <i>mtl</i> -1, <i>recA</i> 13	Boyer and Dussieux, 1969
DH-1	F <sup>-</sup> , <i>recA</i> 1, <i>endA</i> 1, <i>gyrA</i> 96, <i>hsdR</i> 17 ( $r_K^-$ , $m_K^+$ ), <i>supE</i> 44, <i>relA</i> 1,	Hanahan, 1983
C-2110	<i>polA</i> 1, <i>his</i> , <i>rha</i> ,	Kahn and Helinski, 1978
<i>Enterobacter agglomerans</i>		
339, 333	wildtype, prototroph, Nif <sup>+</sup>	Kleeberger et al., 1983
339/22-1	prototroph, Nif <sup>-</sup>	Singh et al., 1983

Table 2. Plasmids

Plasmids	Relevant characteristics	References
pEA9	Nif <sup>+</sup> ,	Singh et al., 1983
pEA3	Nif <sup>+</sup> , <i>tra</i> <sup>-</sup>	
pPHIJI	<i>tra</i> <sup>+</sup> , <i>incP</i> , Cm <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> , Sm <sup>r</sup> , Sp <sup>r</sup> ,	Hirsch et al., 1984
pSA30	<i>nif</i> -HDK,	Cannon et al., 1979
RP4	<i>tra</i> <sup>+</sup> , <i>incP</i> , Km <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup> , Am <sup>r</sup> ,	Thomas, 1981

Cm : Chloramphenicol  
Gm : Gentamycin  
Sm : Streptomycin  
Sp : Spectinomycin  
Km : Kanamycin  
Tc : Tetracycline  
Am : Ampiciline

## 결과 및 고찰

## Conjugation을 통한 self-transmissibility의 증명

*Enterobacter agglomerans* 339의 *nif*-plasmid인 pEA 9의 self-transmissibility를 증명하기 위하여 민과이(1988)가 분리동정한 *nif*<sup>-</sup>-mutant (pEA 9 :: Tn5-Mob)를 공여체로 하고 고온처리 에 의해 자신의 plasmid pEA 9이 curing되고 streptomycin에 내성을 가진 *Enterobacter agglomerans* 339/22-1Sm<sup>r</sup>을 수용체로 하여 conjugation한 후 kanamycin과 streptomycin을 포함한 LB-고체배지에서 transconjugants를 분리하였다. 이 transconjugants는 Kado와 Liu(1981)의 DNA-isolation 방법과 agarose gel electrophoresis에 의해 확인되었다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 공여체인 *nif*<sup>-</sup>-mutant는 transconjugants와 비교하여 vector plasmid pSUP 202를 갖고 있는 것으로써 쉽게 구별할 수가 있었다.

## Southern-Hybridization을 통한 self-transmissibility의 증명

공여체와 transconjugants 사이의 homology를 Southern-Hybridization을 통해 확인함으로써

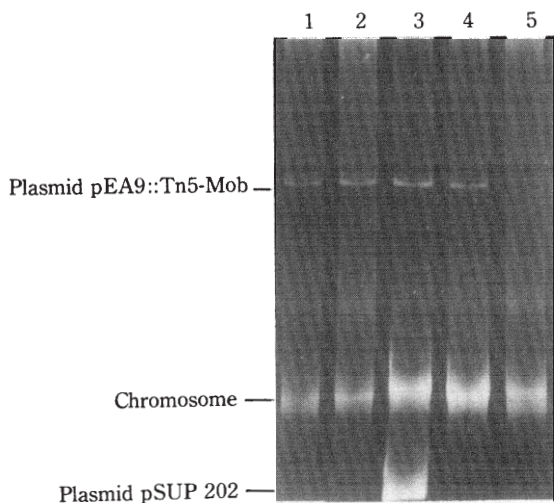


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis

1. transconjugant
2. transconjugant
3. donor strain *Enterobacter agglomerans* 339 Nif<sup>-</sup>
4. transconjugant
5. recipient strain *Enterobacter agglomerans* 339/22-1Sm<sup>r</sup>

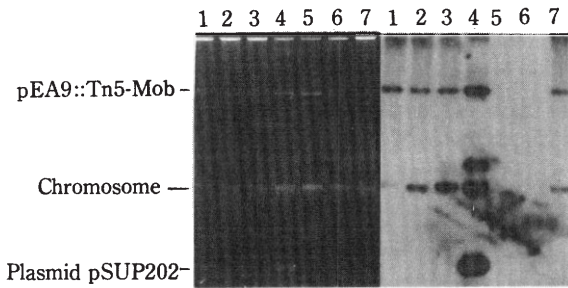


Fig. 2. Hybridization of P-labeled Tn5-Mob to plasmid pEA9::Tn5-Mob

- 1-3. transconjugants
4. donor strain *Enterobacter agglomerans* 339 Nif<sup>-</sup>
5. control *Enterobacter agglomerans* 339 wild type
6. recipient strain *Enterobacter agglomerans* 339/22-1Sm<sup>r</sup>
7. transconjugant

pEA 9 :: Tn 5-Mob의 self-transmissibility를 증명하고자 했다. 이 방법 역시 Kado와 Liu(1981)의 DNA-isolation방법과 agarose gel electrophoresis를 통해 vector plasmid pSUP 5011의 4.6 kb *Hind* III band를 elution하여 prove로 사용하였다. 그 결과 Fig.2에서 보는 바와 같이 pEA 9 :: Tn 5-Mob 부위가 매우 강하게 homology를 나타냈으며 chromosome 부위의 hybridization은 160 kb의 비교적 큰 plasmid인 pEA 9 :: Tn 5-Mob의 DNA-isolation 과정 중 절단된 fragment들이 그 부위에 나타난 것이며 pSUP 202 부위의 hybridization은 prove로 사용한 Tn 5-Mob의 Mob-gene이 pSUP 202의 Mob과 homology인 것에 기인한 것이다. 이러한 signal은 control로 사용한 *Enterobacter agglomerans* 339 wildtype과 수용체인 *Enterobacter agglomerans* 339/22-1 Sm<sup>r</sup>와 비교할 때 명확히 구별되어 진다.

#### pEA 9 :: Tn 5-Mob 전이율의 측정

앞에서 pEA 9은 자신의 *tra*-gene에 의해 스스로 전이됨이 확인되었으므로 이 plasmid의 전이율을 측정해 보았다. 이 측정은 effendorf-conjugation 방법(singh과 klingmüller, 1986b)에 의해 행하여 졌으며 control로써 선택배지에 공여체와 수용체를 각각 도말하여 colony 유무를 관찰하였고, 그 결과 전이율은  $5.8 \times 10^{-6}$ 으로 나타났다.

또한 이 *Enterobacter agglomerans* 339의 숙주

범위를 알기 위하여 다른 gramnegative bacteria 즉 *Enterobacter cloacae* MF 10과 *Escherichia coli* HB 101과의 conjugation을 시도했으나 transconjugants를 얻지 못했다.

#### pH-농도에 따른 전이율의 변화

최적의 conjugation 조건을 설정하기 위해 서로 다른 pH-농도하에서 conjugation을 시도하여 그 전이율을 비교해 보았다.

이 실험은 역시 *Enterobacter agglomerans* 339/22-1 Sm<sup>r</sup>과의 conjugation을 각각 7군의 서로 다른 pH-조건 하에서 effendorf-conjugation(singh과 klingmüller, 1986b) 방법에 의하여 pH-농도에 따른 transfer율의 변화를 측정 관찰하였다. 그 결과 pH5에서 최대값을 나타내었고(Table 3) 이것은 일반적인 LB배지의 pH-농도가 6.5인 것과 비교하면 10배 정도 높은 전이율을 나타내었다.

pH3과 pH8.5에서는 전혀 성장을 보이지 않았는데 이 pH-농도가 *Enterobacter agglomerans* 339의 생존경계점이 아닌가 사료된다. 이 결과는 Dittrich(Diplomarbeit, 1985)가 보고한 바와 같이 *Azospirillum brasilense*에 있어서는 서로 다른 pH-조건하에서 전혀 전이율의 변화가 일어나지 않은 것과 비교하면 매우 대조적인 결과이다.

이 실험의 결과로부터 *Enterobacter agglomerans* 339를 pH5.0에서 *Enterobacter cloacae* MF 10이나 *Escherichia coli* HB 101으로의 conjugation을 시도하여 pH-농도변화에 의해 conjugation의 성공을 기대해 보았으나 역시 transconjugants를 얻지 못했다.

Table 3. Conjugation frequencies under different pH-conditions

pH	Titer		Conjugant	Conjugation Frequency
	Donor	Recipient		
3		no growth		
4	$8.2 \times 10^8$	$3.1 \times 10^8$	$4.85 \times 10^3$	$1.56 \times 10^{-5}$
5	$1.2 \times 10^9$	$4.2 \times 10^8$	$1.75 \times 10^4$	$4.17 \times 10^{-5}$
5.5	$2.3 \times 10^9$	$4.4 \times 10^8$	$8.24 \times 10^3$	$1.87 \times 10^{-5}$
6.5	$9.8 \times 10^8$	$5.0 \times 10^8$	$3.02 \times 10^3$	$6.04 \times 10^{-6}$
7.5	$8.7 \times 10^8$	$4.8 \times 10^8$	$1.10 \times 10^2$	$2.29 \times 10^{-7}$
8.5		no growth		

### mobilization에 의한 전이율의 변화

앞에서 밝힌 바와 같이 *nif*<sup>-</sup>-mutant는 자신의 *tra*-gene에 의해 스스로 전이할 수 있다. 또한 이 *nif*<sup>-</sup>-mutant는 민과이(1988)가 밝힌 바와 같이 transposon mutagenesis에 의해 Tn5-Mob가 pEA 9에 존재하기 때문에 다른 plasmid에 의해 역시 mobilization될 수 있다. 이 실험은 먼저 Beringer 등(1978)에 의해 *Rhizobium*과 *Agrobacterium*의 transposon mutagenesis에 사용한 plasmid pPH1JI와 유사한 크기의 광범위한 숙주 범위를 가진 plasmid RP4를 *nif*<sup>-</sup>-mutant내로 전이시킨 후(Fig. 3) 이것을 공여체로 *Enterobacter agglomerans* 333/22-1 Sm<sup>r</sup>과의 conjugation을 통해 전이율의 변화를 비교하였다.

Table 4에서 보는 바와 같이 스스로의 *tra*-gene에 의한 전이율은  $6.0 \times 10^{-6}$ 인데 반해 pPH1JI를 통한 mobilization은  $6.0 \times 10^{-4}$ 으로  $10^2$ 배 높게 나타났다. RP4를 통해서만 무려  $9.59 \times 10^{-2}$ 로  $10^4$ 배 이상의 높은 전이율을 보였다.

pPH1JI보다 RP4에 의한 mobilization에서 높은 전이율을 나타낸 것은 *nif*<sup>-</sup>-mutant에 존재하는 Tn5-Mob의 Mob-site가 RP4로부터 유래된 것에 기인한다고 사료된다. 이 결과로부터 mobilization을 통해 높은 전이율을 얻을 수 있으며 나아가 자신의 *tra*-gene의 부재에 의해 스스로 전이될 수 없는 plasmid의 전이를 기대할 수 있는 가능성을 보여줌으로써 이 방법은 앞으로의 plasmid전이에 관한 연구에 큰 역할을 할 것이라 사료된다.

이러한 mobilization에 의한 전이율의 상승에 기

**Table 4.** Change of conjugation frequencies through mobilization

Methods	Conjugation Frequency
Self-transmissibility	$6.0 \times 10^{-6}$
Mobilization through pPH1JI	$6.0 \times 10^{-4}$
Mobilization through RP4	$9.59 \times 10^{-2}$

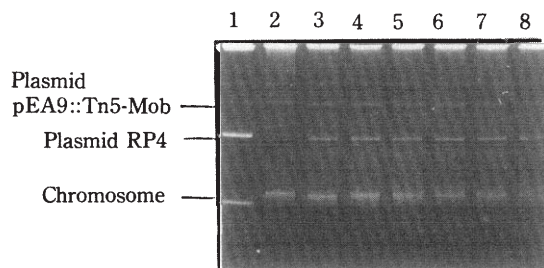
인하여 이것을 통해 *Enterobacter cloacae* MF 10과 *Escherichia coli* HB 101에로의 conjugation을 기대해 보았으나 전혀 transconjugants를 얻지 못했다. 이것으로 미루어 *Enterobacter agglomerans* 339의 pEA 9은 일반적인 gramnegative 균주와는 달리 매우 좋은 숙주범위를 갖고 있는 것으로 추측된다.

### Transformation을 통한 plasmid pEA 9 :: Tn 5-Mob의 전이

앞에서 밝힌 바와 같이 pEA 9 :: Tn5-Mob의 *Enterobacter cloacae* MF 10이나 *Escherichia coli* HB 101에로의 conjugation에 의한 전이는 불가능 하였으므로 *Escherichia coli* DH 1(Hanahan, 1983)과의 transformation을 통해 plasmid의 전이를 시도해 보았다. 160 kb의 큰 plasmid-DNA-isolation을 위해 Humphreys 등(1975)의 방법을 변형하여 사용했으며 kanamycin을 선택-marker로 transformants를 분리하였다.

그 결과 4개의 transformants를 얻었으나 agarose gel electrophoresis를 통해 관찰해 본 결과 기대했던 pEA 9 :: Tn5-Mob은 보이지 않았고 다만 이 transformants들은 20 kb 크기의 작은 plasmid(pBM 339로 명명함)를 갖고 있음을 발견했다. 이 작은 plasmid pBM 339를 CsCl-gradient 방법에 의해 DNA-isolation 하여 *Hind* III와 *Eco* RI으로 처리해 본 결과 각각 3개의 서로 다른 크기의 band를 나타내었다(Fig. 4).

이 pBM 339의 replicon이 *Enterobacter agglomerans* 339로부터 유래되었는지 여부를 알아보기 위해 pBM 339를 *Escherichia coli* C2110 polA<sup>-</sup> (Kahn과 Helinski, 1978)에 transformation시켜 본 결과 많은 transformants를 얻었다. 이 결과로 미루어 pBM 339의 replication은 *Escherichia coli*와는 달리 DNA-Polymerase I에 독립적이며 이것으로 pBM 339의 replicon이



**Fig. 3.** Transfer of plasmid RP4 in *Enterobacter agglomerans* 339 Nif<sup>-</sup>

1. control plasmid RP4
2. *Enterobacter agglomerans* 339 Nif
- 3-8. *Enterobacter agglomerans* 339 Nif (RP4)

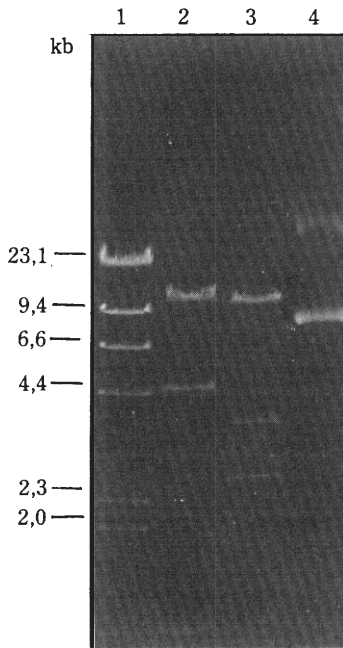


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of pBM339 digested fragments

1. Lambda/Hind III
2. pBM339/Hind III
3. pBM339/EcoR I
4. pBM339/undigested

plasmid pEA 9으로 부터 유래되었다는 가능성을 추측하게 되었다. 160 kb 크기의 plasmid로 부터 20 kb에로의 축소는 Akroyd 등(1984)이 밝힌 바와 같이 PEA 9 :: Tn5-Mob의 DNA-isolation 과정 중 끊어진 plasmid의 일부가 매우 낮은 transformation율을 나타내며 *Escherichia coli* DH 1내로 transformation된 후 ligation된 것이라 추측할 수 있으며 또 일반적으로 크기가 큰 plasmid의 다른 숙주세포내로의 transformation에 있어서의 어려움도 생각할 수 있다(Warnes와 Stephenson, 1986).

Singh과 Klingmüller(1986a)의 보고에 의하면 *Enterobacter agglomerans* 333에 있어서 plasmid pEA 3의 *ori* V-gene은 질소고정구조유전자 군인 *nif*-HDK와 매우 근접하여 위치하고 있음이

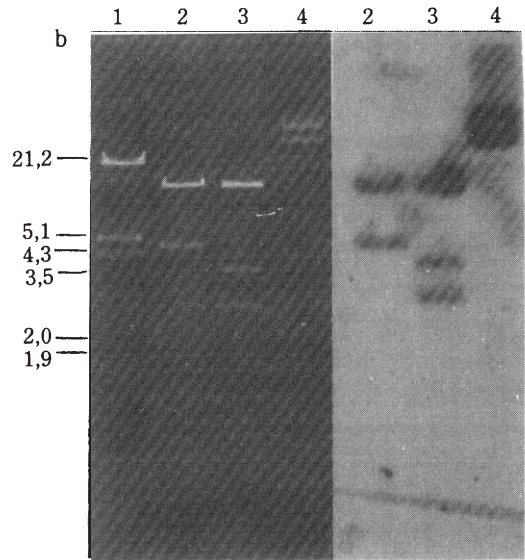


Fig. 5. Hybridization with EcoR I-fragment of plasmid pSA30

1. Lambda/Hind III and EcoR I
2. pBM339/Hind III
3. pBM339/EcoR I
4. Positive control pMK212Kan

밝혔으며 그러한 사실을 토대로 하여 생각해 볼때 pBM 339는 pEA 9의 *ori* V와 *nif*-HDK 유전자를 포함하는 부위가 끊어져 *Escherichia coli* DH 1으로 전이된 후 replication 되었을 가능성이 크다고 사료된다.

이러한 가능성을 확인하기 위해 *klebsiella pneumoniae*의 *nif*-HDK 유전자를 포함하는 vector plasmid pSA 30(Cannon 등, 1979)를 probe로 Southern-Hybridization을 수행한 결과 Fig. 5에서 보는 바와 같이 두 *nif*-유전자군은 매우 강한 homology를 나타냈으며 pBM 339 내에는 *nif*-HDK 유전자들이 존재함을 확인하였다.

이 plasmid pBM 339는 앞으로 pEA 9의 질소고정유전자 연구에 매우 중요한 plasmid로 사용될 수 있으며 민과이(1988)가 시도했던 site-directed-mutagenesis를 위해 기여할 수 있는 plasmid라고 사료된다.

## 적 요

Tn5-Mob system을 이용해 *nif*-plasmid pEA 9의 self-transmissibility를 확인하였다. pH 값의 영향에 의한 접합율의 변화를 알아본 결과 pH 5에서  $4.17 \times 10^{-5}$ 으로 pH 6.5에서 보다 10배 높게 나타났으며 한편, helper-plasmid로 RP4-Mobilising system을 이용한 경우에는 접합율이 self-transfer를 시켰을 때 보다 약 10배 높게 나타났다.

## 사 사

본 연구를 위해 많은 협조를 해주신 서독 Max-Franken-Institut의 Dr. Singh께 무한한 감사를 드리는 바이다.

## REFERENCES

1. Akroyd, J., Barton, B., Lund, P., Maynard Smith, S., Sultana, K., Symonds, N., 1984, Mapping and Properties of the *gam* and *sot* Genes of Phage Mu: Their Possible Roles in Recombination. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology **49**: 261-266.
2. Beringer, J.E., Beynon, J.V., Buchanan-Wollaston, A.V., Johnston, A.W.B., 1978, Transfer of the drug-resistance transposon Tn5 to *Rhizobium*. *Nature*, **276**: 633-634.
3. Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L., Boyer, H.W., Crosa, J., Falkow, S., 1977, Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multi-purpose cloning system. *Gene* **2**: 95-113.
4. Boyer, H.W., Rouillard-Dussieux, D., 1969, Complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **41**: 459-472.
5. Cannon, F.C., Riedel, G.E., Ausubel, F.M., 1979, Overlapping sequence of *Klebsiella pneumoniae nif* DNA cloned and characterized. *Mol. Gen. Genet.* **174**: 59-66.
6. Chang, A.C.Y., Cohen, S.N., 1978, Construction and characterization of amplifiable multi-copy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J. Bacteriol.* **134**: 1141-1156.
7. Dittrich, U., 1985, Versuche zur Transposonmutagenese bei *Azospirillum brasilense*. Diplomarbeit, Lehrstuhl für Genetik Universität Bayreuth
8. Hanahan, D., 1983, Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.
9. Hirsch, P.R., Beringer, J.E., 1984, A physical map of pHlJI and pJBjI. *Plasmid* **12**: 139-141.
10. Humphreys, G.O., Willshaw, G.R., Anderson, E.S., 1975, A simple method for the preparation of large quantities of pure plasmid DNA. *Biochemica et Biophysica Acta* **383**: 457-463.
11. Kado, C.I., Liu, S.-T., 1981, Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* **145**: 1365-1373.
12. Kahn, M., Helinski, D.R., 1978, Construction of a novel plasmid-phage hybrid: Use of the hybrid to demonstrate ColEI DNA replication *in vivo* in the absence of a ColEI-specified protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **75**: 2200-2204.
13. Kleeberger, A., Castorph, H., Klingmüller, W., 1983, The rhizosphere microflora of wheat and barley with special regard to the gram-negative bacteria. *Arch. Microbiol.* **136**: 306-311.
14. Min, B.W., H.S. Lee, 1988, Isolation of *nif* mutants through transposon mutagenesis in *Enterobacter agglomerans* 339. *Kor. J. Microbiol.* **26**, 21-26.
15. Simon, R., 1984, High frequency mobilization of gram-negative bacterial replicons by the *in vitro* constructed Tn5-Mob transposon. *Mol. Gen. Genet.* **196**: 413-420.
16. Singh, M., Kleeberger, A., Klingmüller, W., 1983, Location of nitrogen fixation (*nif*) genes on indigenous plasmids of *Enterobacter agglomerans*. *Mol. Gen. Genet.* **190**: 373-378.
17. Singh, M., Klingmüller, W., 1986a, Cloning of pEA3, a large plasmid of *Enterobacter agglomerans* containing nitrogenase structural genes. *Plant and Soil* **90**: 235-242.
18. Singh, M., Klingmüller, W., 1986b, Transposon mutagenesis in *Azospirillum brasilense*: Isolation of auxotrophic and *nif*-mutants and molecular cloning of the mutagenized *nif* DNA. *Mol. Gen. Genet.* **202**: 136-142.
19. Southern, E.M., 1975, Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**:

- 503-517.
20. Thomas, T.M., 1981, Molecular genetics of broad host range plasmid RK2. *Plasmid* 5: 10-19.
21. Warnes, A., Stephenson, R., 1986, The insertion of large piece of foreign genetic material reduces the stability of bacterial plasmids. *Plasmid* 16: 116-123.

(Received April 20, 1988)