

## 유전공학적으로 변형시킨 R-Plasmid들의 전이에 미치는 균주와 pH의 영향

김희태 · 이성기 · 김치경

충북대학교 자연과학대학 미생물학과  
서울대학교 분자미생물학 연구센터

유전공학 기법으로 변형시킨  $Km^r$  plasmid들의 전이를 30°C의 Luria-Bertani broth에서 실시하였으며, 그 전이 빈도에 대한 donor와 recipient의 균주와 함께 pH의 영향을 연구하였다. GEM 균주들과 NI 균주의  $Km^r$  plasmid의 전이빈도는 recipient가 MT1 일 경우 pH 7에서 약  $10^{-6}$ 로 비슷하였으나 CS 균주인 DKC601에서는  $Km^r$  plasmid의 전이 빈도가  $2.2 \times 10^{-7}$ 로 훨씬 떨어졌다. 그리고 recipient가 lab. strain(*E. coli* HB101)인 경우에도  $Km^r$  plasmid의 전이 경향은 GEM 균주들과 NI 균주 사이에 큰 차이가 없었다. 또 어느 균주의 경우이나 pH 7일 때의 전이 빈도가  $10^{-6}$  정도로 가장 높게 나타났으며, pH 5와 pH 9에서는 그보다 조금 떨어졌다. 그러나 *E. coli* C600을 host로 하여 제조한 CS 균주(DKC601)에서는  $Km^r$  plasmid의 전이 빈도가 다른 GEM 균주들에 비하여  $10^2 \sim 10^3$ 배 낮았으며, pH 4와 9에서 6 시간의 conjugation 후에도 전이가 전혀 일어나지 않았다. Conjugant에서의 plasmid의 재배열은 lab. strain을 recipient로 했을 경우에는 별로 없었지만, NI 균주를 recipient로 했을 경우에 많이 나타났으며, 특히 donor가 NI 균주보다 GEM 균주인 경우에 더욱 다양하였다. 그러나 pH에 따른 차이는 그렇게 크지 않았다.

**KEY WORDS** □ Conjugal transfer, R-plasmids, pH effects, Genetically engineered microorganisms.

미생물들 사이에 유전정보가 교환되는 거대한 유전자 풀(gene pool)이라고 할 수 있는 수질이나 토양 환경 등의 자연 생태계에서, 항생물질 내성 유전자의 전이는 conjugation, transformation, transduction에 의하여 연속적으로 그리고 무수히 일어나고 있다. 특히 conjugation에 의한 항생물질 내성 유전자의 전이는 높은 빈도로 이루어 지고 있음이 Buchanan-Wollaston 등(7), Brisson-Noel 등(5)과 Tricu-Cuot 등(26)에 의하여 보고된 바 있다. 또한 O'Morchoe 등(19)은 *Pseudomonas* spp. 의 항생제 내성 plasmid의 전이빈도와 환경 요소의 영향에 대하여 자연 수질 환경에서 연구 보고하였으며, 실험실 환경에서도 Amaro 등(2)은 *Vibrio cholerae*와 *E. coli* 사이에  $1.2 \times 10^{-3} \sim 2.0 \times 10^{-8}$ 의 빈도로, Alcaide와 Garay(1)는 *Salmonella* spp.와 *E. coli* 사이에서  $3 \times 10^{-3} \sim 2 \times 10^{-7}$ 의 빈도로 항생물질 내성 유전자가 전이되었음을 보고한 바 있다.

근래에는 유전공학 기법이 보편화 됨에 따라 식품과 농업 생산의 증대, 해충과 질병의 생물학적인 방제(10), 금속과 광물의 채련(11), 환경 정화 및 하폐수의 처리(13) 등 에 관여하는 미생물에 응용하려는 연구가 진행되고 있어서, 실험적인 목적의 genetically engineered microorganisms(GEMs)이 자연 환경에 노출되는 사례가 점점 증가되고 있다(4). 이 때문에

자연 생태계에서 그 재조합 미생물 뿐아니라 그들이 가지고 있는 유전자의 전이 동태에 대한 관심이 매우 커지게 되었다. Van Elsas 등(27)은 토양 환경에서 그리고 Amy와 Hiatt(3)는 수계 환경에서 GEM 균주들의 도입 및 회수에 따르는 그들의 생존성에 관하여 보고한 바 있다. 또 Scanferlato 등(22)은 이들 재조합 미생물이 자연계로 방출될 때, 그들이 가지고 있던 유전 정보가 토착 미생물 집단으로 어떻게 전이되며 어떠한 영향을 주는지에 관하여 연구하였다. 그리고 McClure 등(17)은 activated sludge unit에서, Awong 등(4)은 자연 수계에서 각 각 인위적으로 변형시킨 genetic element나 genetically enineered DNA sequences(GEDS)가 얼마나 안정성을 유지하며 순환되는지에 관하여 연구 보고한 바 있다.

또한 GEM 균주에 관한 환경 및 생태학적 측면에서의 연구가 활발히 진행되어서, Richaume 등(21)은 *E. coli*의 GEM 균주를 토양 환경에서 *Rhizobium*과 conjugation시켰을 때 그 전이 빈도가 더욱 높아짐을 관찰하였다. Trevors 등(25)은 *Pseudomonas*의 GEM 균주를 토양의 microcosm에 접종시켰을 때 변형된 plasmid가 매우 안정된 상태로 검출되었다고 보고하였으나, Brom 등 (6)은 selective pressure가 있는 환경 조건에서 *Rhizobium*의 plasmid가 높은 빈도로 재배열(rearrangement)현상

이 일어남을 보고하였다.

그러나 유전자 조작기법으로 변형시킨 항생물질 내성 유전자의 전이에 대한 물리, 화학적 환경 요소들의 영향에 관하여 체계적인 연구는 아직 미흡한 실정이다. 그러므로 본 연구에서는 자연계로부터 분리한 kanamycin(Km) 내성 균주의 R-plasmid를 conjugation과 molecular cloning등 유전공학적으로 변형시킨 GEM 균주들을 제조하여 이들의 Km<sup>r</sup> plasmid의 전이를 conjugation 방법으로 실험하면서, 전이에 미치는 각 균주와 pH의 영향을 비교 분석하였다. 또한 conjugation의 결과 나타나는 plasmid의 재배열 현상을 비교 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 실험 균주

본 실험에 사용된 균주는 청주 공단의 폐수 및 무심천의 하천수로부터 분리한 *E. coli* DK1 균주(14)와 함께, 그로부터 conjugation 방법으로 변형시킨 DKC600, DXL101(transconjugated strain, TS) 그리고 molecular cloning 방법으로 변형시킨 DKC601과 DXL201(cloned strain, CS)을 donor로 사용하였다. 이 균주들이 가지고 있는 Km<sup>r</sup> plasmid의 전이 실험에 사용한 recipient는 Kim과 Lee(14)가 자연계로부터 분리한 *Providencia rettseri* MT1과 실험실에 적응되어 온 *E. coli* HB101을 사용하였다. 이들의 특성은 Table 1과 같다.

DKC600은 Kim과 Lee(14)가 제조한 균주이며, DXL101은 Gealt(9)와 Singleton과 Anson(24)의 방법에 따라 DK1의 pDK101 plasmid를 conjugation에 의하여 *E. coli* XL1-Blue에 전이시켜 선발하였다. DKC601 균주는 Fig. 1에서와 같이 DKC600에서 분리한 pDK101 plasmid(Km<sup>r</sup> Cm<sup>r</sup>)를 *Pseudomonas putida* KT2440에서 분리한 pKT230(Km<sup>r</sup>Sm<sup>r</sup>Cm<sup>r</sup>)을

vector로 사용하여, Kawamura 등(12)과 Kim과 Lee(15)의 방법에 따라 cloning하였다. 또한 DKC601의 pDT529와 pBLUE-SCRIPT SK<sup>+</sup>의 vector plasmid(Km<sup>r</sup>Cm<sup>r</sup>Ap<sup>r</sup>Tc<sup>r</sup>)를 Maniatis 등(16)과 Perbal(20)의 방법에 따라 순수 분리하여 *Hind*III로 digestion한 후 T4 DNA ligase로 ligation시키고, Silhavy 등(23)의 방법에 따라 Fig. 1에서와 같이 *E. coli* XL1-Blue competent cell에 transformation하여 pDX95를 포

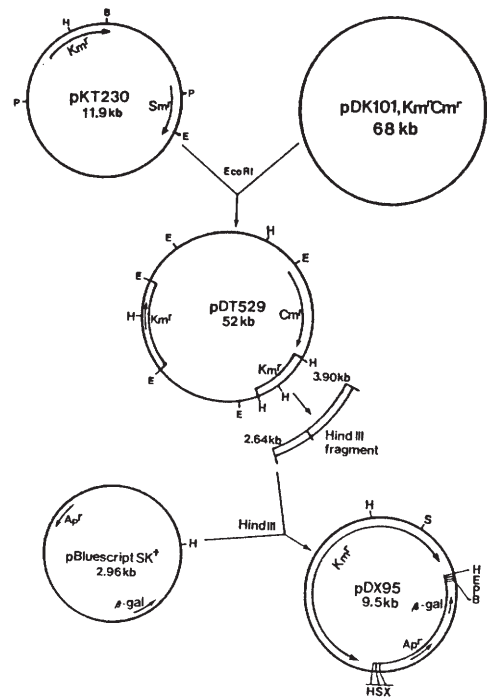


Fig. 1. Strategy for construction of the hybrid plasmids of pDT529 and pDX95.

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strains	Plasmids	Antibiotic resistance Markers ( $\mu\text{g/ml}$ )	Descriptions	Source
<i>E. coli</i> DK1	pDK101 & 3 others	Km(1500)	Natural isolate, donor	(14)
<i>E. coli</i> DC600 <sup>a</sup>	pDK101	Km(500)	Transconjugated, donor	(14)
<i>E. coli</i> DXL101 <sup>b</sup>	pDK101	Km(1500), Tc(400)	Transconjugated, donor	This study
<i>E. coli</i> DKC600 <sup>c</sup>	pDT529	Km(1600)	Cloned strain, donor	(14)
<i>E. coli</i> DXL201 <sup>d</sup>	pDX95	Km(2000), Ap(1000), Tc(500)	Cloned strain, donor	This study
<i>Prov. rettseri</i> MT1	pMT101 & 4 others	Ap(2500), Tc(200), Sm(400)	Natural isolate, recipient	(14)
<i>E. coli</i> HB101	pBR322	Ap(1000), Tc(500), Sm(120)	Lab. strain, recipient	Bolivar & Backman

<sup>a</sup>Made by conjugation of DK1 with *E. coli* C600, <sup>b</sup>Made by conjugation of DK1 with *E. coli* XL1-Blue, <sup>c</sup>Made by transformation of the recombinant plasmid of pDT529 into *E. coli* C600, <sup>d</sup>Made by transformation of the recombinant plasmid of pDX95 into *E. coli* XL1-Blue, Km, kanamycin; Ap, ampicillin; Tc, tetracycline; Cm, chloramphenicol; Sm, streptomycin

합하는 DXL201를 선발하였다.

#### R-plasmid의 분리 및 분석

각 실험 균주들의 plasmid DNA는 Silhavy 등(23)과 Maniatis 등(16)의 alkaline lysis 방법을 병용하여 분리하였다. 더욱 순수한 plasmid DNA의 추출을 위해서는 Silhavy 등(23)의 CsCl-EtBr density gradient 방법을 병행하여 사용하였으며, plasmid DNA에 대한 제한효소 처리는 기본적으로 Maniatis 등(16)의 방법을 사용하였다. 제한효소 및 T4 DNA ligase 등은 Promega사 (Madison, WI, U.S.A.)로부터 구입하였으며, 반응 조건은 제조 회사의 처방에 따라서 DNA의 농도, 효소의 역가 등이 최적이 되도록 조절하였다. 제한효소 처리 후 각 절편들의 분자량을 측정하기 위하여 DNA를 *EcoRI*, *HindIII*, *EcoRI-HindIII* 등의 제한효소로 처리하여 얻은 절편들을 사용하였다. 이와 같이 분리한 plasmid의 시료는 0.7~1.0 %의 agarose gel과 Tris-borate buffer에서 40~100V의 전압으로 3~8시간 동안 전기영동하였다.

#### 생장에 미치는 pH의 영향

실험 균주의 증식에 미치는 pH의 영향을 검토하기 위하여 pH 4, 5, 7, 9의 Luria-Bertani(LB) broth에  $10^5$  cell/ml이 되도록 각 균주를 접종하여 10시간 동안 배양하면서, 매 시간별로 채취한 시료 0.1 ml을 0.85% NaCl solution에 희석한 후 LB agar plate에 도말하였다. 그리고 35°C에서 1일간 배양한 후 colony를 계수하여 성장곡선을 얻었으며, 각 배양액의 pH 변화를 측정하였다.

#### 전이실험 및 전이빈도의 측정

Conjugation 방법으로 변형시킨 균주 및 molecular cloning 방법으로 변형시킨 균주와 함께, natural isolate(NI) 균주가 가지고 있는  $Km^r$  plasmid의 conjugation에 의한 전이는 Gealt(9)와 Singleton 등(24)의 방법을 기준으로 아래와 같이 변형하여 실시하였다.

Donor cell 로는 NI 균주인 DK1과 GEM 균주인 DKC600, DXL101, DKC601, DXL201 등을 사용하였고, recipient cell로는 NI 균주인 MT1과 laboratory strain인 *E. coli* HB101을 사용하였다. 각각의 mating pair를 선정하여 log phase까지 배양한 donor cell과 recipient cell을 pH 4, pH 5, pH 7, pH 9의 LB broth에 각 각  $10^8$  cell/ml이 되도록 접종하여 3시간 그리고 6시간 동안 conjugation시킨 후 DXL201의 전이 실험에서는 kanamycin( $50 \mu\text{g/ml}$ )과 streptomycin( $50 \mu\text{g/ml}$ )이 첨가된 LB 고체 배지에, 그리고 그 외의 전이 실험에서는 kanamycin( $50 \mu\text{g/ml}$ ), ampicillin( $50 \mu\text{g/ml}$ ), tetracycline( $30 \mu\text{g/ml}$ )의 항생물질이 첨가된 LB 고체 배지에 0.1 ml 씩을 채취하여 도말 배양한 후 conjugant를 선발하였다. 전이빈도는 Singleton 등(24)의 방법에 따라 접종한 donor cell수에 대한 conjugants의 cell수로 계산하였다.

## 결과 및 고찰

#### 실험균주 및 R-plasmid의 특성

각 실험 균주들의 항생물질에 대한 내성은 Table 1에서와 같다. Donor로 사용한 NI 균주인 DK1은 kanamycin(Km)에 대하여  $1,500 \mu\text{g/ml}$ 의 강한 내성과  $15 \mu\text{g/ml}$  이하의 chloramphenicol(Cm)에 대한 감수성을 나타내었으며, DK1으로부터 제조한 GEM 균주들 중 DKC600은 Km에 대하여  $500 \mu\text{g/ml}$ , 그 외의 균주들은 모두  $1,500 \mu\text{g/ml}$  이상의 높은 내성을 나타내었다. 또한 *E. coli* C600을 host로 사용하여 선발한 DKC600과 DKC601 균주들은  $25 \mu\text{g/ml}$  이하의 ampicillin(Ap)에 대한 감수성을 그대로 가지고 있었으며, DXL101 균주는 tetracycline(Tc)에 대하여  $400 \mu\text{g/ml}$ , DXL201 균주는 Ap와 Tc에 대하여  $1000 \mu\text{g/ml}$ 과  $500 \mu\text{g/ml}$ 의 내성을 동시에 나타내었다. 이는 host 균주인 *E. coli* XL1-Blue가 가지고 있는 Tc에 대한 내성을 그대로 나타낸 것이며, vector plasmid가 지니고 있던 Ap에 대한 내성도 함께 발현되었음을 의미한다. Recipient로 사용된 MT1은 Ap, Tc, Sm에 대하여 각 각  $2500 \mu\text{g/ml}$ ,  $200 \mu\text{g/ml}$ ,  $400 \mu\text{g/ml}$ 의 MIC 값을 나타내었으며, pBR322를 지니고 있는 *E. coli* HB101은 Ap, Tc, Sm에 대하여 각 각  $1000 \mu\text{g/ml}$ ,  $500 \mu\text{g/ml}$ ,  $120 \mu\text{g/ml}$ 의 MIC값을 나타내었고, Km에 대하여는 모두  $3 \mu\text{g/ml}$  이하의 감수성을 나타내었다.

Donor로 사용한 균주들이 가지고 있는  $Km^r$  plasmid들은 Fig. 2에서와 같이 확인되었다. *E. coli* DK1은 lane B에서와 같이, Km과 Cm에 대한 내성 유전자를 내포하고 있는 conjugative R-plasmid인

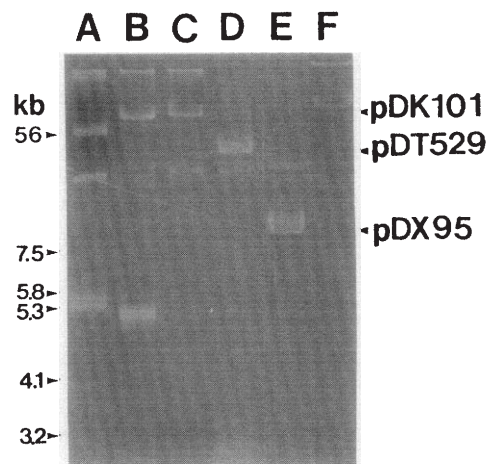


Fig. 2. Agarose gel electrophoretogram of plasmids isolated from natural isolate and GEM strains. Lanes; A, *E. coli* V517; B, DK1; C, DKC600; D, DKC601; E, DXL201; F, DXL101.

pDK101(68 kb) 외에 3개의 plasmid를 가지고 있었다. DKC600과 DXL101에 전이된 pDK101 plasmid는 lane C와 lane F에서와 같이 확인할 수 있었고, cloned strain인 DKC601의 pDT529(52.9 kb)와 subcloned strain인 DXL201의 pDX95(9.5 kb)도 lane D와 lane E에서 확인되었다. Subcloned plasmid인 pDX95는 Fig. 1에서와 같이 pDT529의 3.90 kb와 2.64 kb의 2개 fragment가 pBLUESCRIPT SK<sup>+</sup>와 ligation된 것임을 알 수 있었으며, DXL201은 Cm(3 µg/ml)의 LB에서는 생장되지 않았기 때문에 pDT529의 Km<sup>r</sup>Cm<sup>r</sup> 유전자 중 Cm<sup>r</sup> 유전자는 subcloning과정에서 cloning되지 않고 Km<sup>r</sup> 유전자만이 cloning된 것을 확인하였다.

각 pH 조건에서 DK1과 MT1 균주는 Fig. 3에서와 같이, pH 5, pH 7, pH 9에서는 약 10<sup>5</sup> cell/ml의 cell을 접종하여 배양한 후 3~4시간 이내에 log phase에 이르렀으나, pH 4에서는 균주의 생장이 전혀 없었다. 이와 같은 결과는 다른 실험 균주에서도 유사하게 나타났다. 균주의 증식이 왕성하게 일어난 pH 5, pH 7, pH 9의 배지에서는 10시간 후에 측정된 배양액의 pH가 중성 범위로 조절되었다. 그러므로 conjugation 시간을 3시간과 6시간으로 정하여 실험함으로써 conjugation에 미치는 각 pH의 영향을 구분할 수 있었다.

#### R-plasmid의 전이에 미치는 균주와 pH의 영향

Transconjugated strain(TS)인 DKC600과 DXL101, cloned strain(CS)인 DKC601과 DXL201, 그리고 자연계 분리균주(NI)인 DK1을 각각 donor로 하고, NI 균주인 MT1과 laboratory strain인 *E. coli* HB101을 recipient로 사용하여 30°C의 LB broth에서 각 pH 조건에 따라 conjugation을 실시한 결과, Km<sup>r</sup> plasmid의 전이 빈도는 Table 2에서와 같다.

각 GEM 균주들의 변형된 Km<sup>r</sup> plasmid의 전이 빈도는 recipient가 MT1일 경우 pH 7에서 약 10<sup>-5</sup>로 나타나 NI 균주(DK1)에 비하여 큰 차이가 없었으며, TS 균주(DKC600과 DXL101)와 CS 균주(DXL201) 사이에서도 그 빈도는 비슷하였다. 그러나 CS 균주인 DKC601에서는 Km<sup>r</sup> plasmid의 전이 빈도가 2.2×10<sup>-7</sup>로 훨씬 떨어졌다. 그리고 recipient가 lab. strain(*E. coli* HB101)인 경우에는 그 전이 빈도가 NI 균주에 비하여 대체로 약 10배 낮게 나타나서, McPherson 등(18)이 non-self transmissible plasmid인 pBR325의 전이실험에서 얻은 결과와 일치하였다. 그러나 Km<sup>r</sup> plasmid의 전이 경향은 GEM 균주들과 NI 균주 사이에 큰 차이가 없이 유사하였다. 특히 recipient가 어떤 균주이던 간에, donor로 사용한 TS 균주들(DKC600과 DXL101) 사이에는 Km<sup>r</sup> plasmid의 전이 빈도에 차이가 별로 없었지만, *E. coli* C600을 host로 하여 제조한 CS 균주(DKC601)에서는 Km<sup>r</sup> plasmid의 전이 빈도가 *E. coli* XL1-Blue를 host로 하여 cloning한 CS 균주(DXL201)에 비하여 10<sup>2</sup>~10<sup>3</sup>배 낮았다. 이와 같은 Km<sup>r</sup> plasmid의 전이 특성은 conjugation 시간이 3 시간이나 6 시간 일

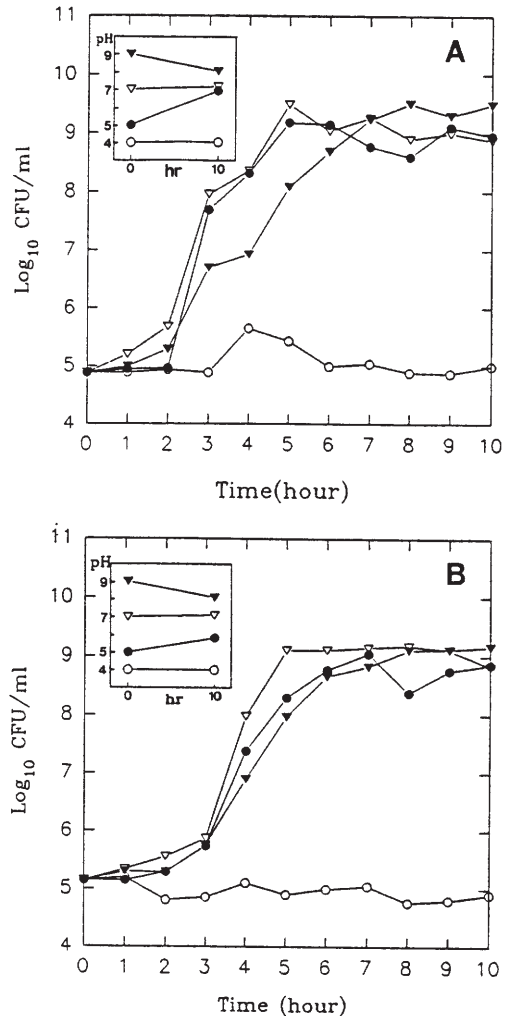


Fig. 3. Growth curves of the bacterial isolate of DK1 (A) and MT1(B) at several pH values in Luria-Bertani broth.

pH 4 (○); pH 5 (●); pH 7 (▽); pH 9 (▼).

때에도 모두 동일하였다. O'Morchoe 등(19)은 *Pseudomonas aeruginosa* 사이에서 R68.45와 F95 plasmid들을 conjugation에 의하여 전이시켰을 때, 매질의 온도와 세균 밀도에 따른 전이 빈도의 차이는 없었으나 매질의 종류와 donor/recipient 비율에 따라 큰 차이가 나서, donor보다 recipient의 수가 2~50배 많을 때 100배 정도 높은 전이빈도를 얻었다고 보고하였다.

GEM 균주들의 변형된 Km<sup>r</sup> plasmid의 전이에 미치는 pH의 영향을 보면, 어느 균주의 경우이나 pH 7일 때의 전이 빈도가 10<sup>-5</sup> 정도로 가장 높게 나타났으며, pH 5와 pH 9에서는 그보다 조금 떨어졌다. 이는 *E. coli* 균주들 사이에서 pH 6.9일 때 전이빈도가 가장 높게 나타났다는 Singleton 등(24)의 보고와



**Table 2.** Conjugal transfer of *Km<sup>r</sup>* plasmid of GEMs and their parental bacterial isolate in the Luria-Bertani broth at 30°C.

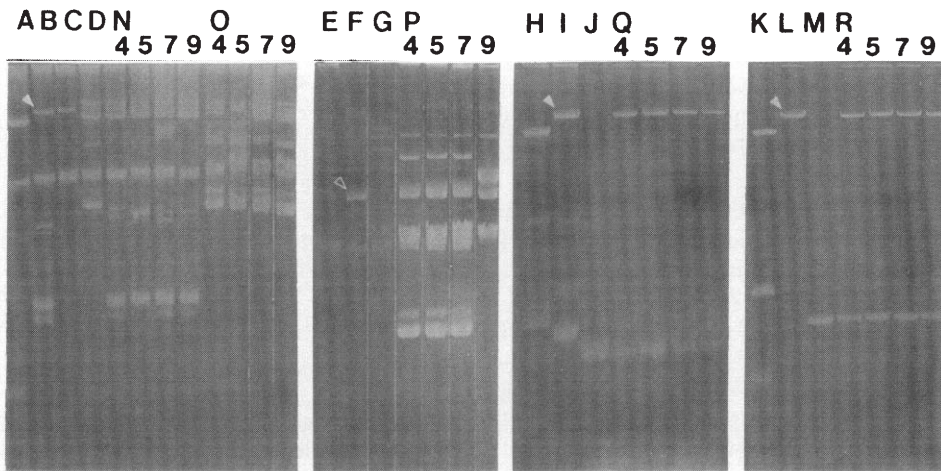
Mating pairs		pH for mating	Inocula of donor/recipient (cells/ml)	Transfer frequency by conjugation for(h):	
Donor	Recipient			3	6
DK1	MT1	4	$6.2 \times 10^8 / 5.0 \times 10^8$	$8.5 \times 10^{-8}$	$2.4 \times 10^{-7}$
		5		$2.3 \times 10^{-5}$	$2.0 \times 10^{-5}$
		7		$5.1 \times 10^{-5}$	$3.9 \times 10^{-5}$
		9		$7.7 \times 10^{-7}$	$2.4 \times 10^{-6}$
DKC600	MT1	4	$5.3 \times 10^8 / 5.0 \times 10^8$	0	$7.5 \times 10^{-8}$
		5		$1.0 \times 10^{-8}$	$1.9 \times 10^{-7}$
		7		$5.2 \times 10^{-5}$	$6.6 \times 10^{-5}$
		9		$7.4 \times 10^{-7}$	$1.3 \times 10^{-6}$
DXL101	MT1	4	$2.4 \times 10^8 / 3.5 \times 10^8$	$1.8 \times 10^{-7}$	$5.7 \times 10^{-6}$
		5		$8.4 \times 10^{-5}$	$1.2 \times 10^{-4}$
		7		$4.1 \times 10^{-4}$	$3.3 \times 10^{-4}$
		9		$5.3 \times 10^{-5}$	$1.3 \times 10^{-4}$
DKC601	MT1	4	$4.5 \times 10^8 / 5.0 \times 10^8$	0	0
		5		$6.7 \times 10^{-8}$	$4.4 \times 10^{-7}$
		7		$2.2 \times 10^{-7}$	$1.8 \times 10^{-6}$
		9		0	0
DXL201	MT1	4	$4.7 \times 10^8 / 5.2 \times 10^8$	$1.1 \times 10^{-7}$	$4.3 \times 10^{-7}$
		5		$9.5 \times 10^{-6}$	$8.1 \times 10^{-5}$
		7		$5.9 \times 10^{-5}$	$2.5 \times 10^{-4}$
		9		$1.4 \times 10^{-6}$	$9.6 \times 10^{-6}$
DK1	HB101	4	$6.2 \times 10^8 / 4.0 \times 10^8$	$5.3 \times 10^{-8}$	$1.1 \times 10^{-6}$
		5		$3.7 \times 10^{-6}$	$8.2 \times 10^{-6}$
		7		$5.8 \times 10^{-5}$	$1.0 \times 10^{-4}$
		9		$7.4 \times 10^{-6}$	$1.0 \times 10^{-5}$
DKC600	HB101	4	$8.3 \times 10^8 / 4.0 \times 10^8$	$8.3 \times 10^{-8}$	$2.3 \times 10^{-7}$
		5		$8.5 \times 10^{-5}$	$9.1 \times 10^{-5}$
		7		$8.0 \times 10^{-5}$	$9.7 \times 10^{-5}$
		9		$1.3 \times 10^{-5}$	$4.5 \times 10^{-5}$
DXL101	HB101	4	$6.2 \times 10^8 / 1.5 \times 10^8$	$9.5 \times 10^{-7}$	$8.1 \times 10^{-6}$
		5		$1.4 \times 10^{-6}$	$7.5 \times 10^{-6}$
		7		$7.8 \times 10^{-6}$	$2.0 \times 10^{-5}$
		9		$5.0 \times 10^{-6}$	$8.5 \times 10^{-6}$
DKC601	HB101	4	$8.3 \times 10^{-8} / 4.0 \times 10^{-8}$	0	0
		5		0	$1.4 \times 10^{-8}$
		7		$4.3 \times 10^{-8}$	$1.1 \times 10^{-7}$
		9		0	0
DXL201	HB101	4	$4.7 \times 10^{-8} / 2.9 \times 10^{-8}$	0	$9.0 \times 10^{-7}$
		5		$1.4 \times 10^{-5}$	$7.8 \times 10^{-5}$
		7		$1.1 \times 10^{-5}$	$1.4 \times 10^{-5}$
		9		$8.6 \times 10^{-6}$	$9.5 \times 10^{-6}$

일치하였다. 따라서 각 실험균주들의 생장과 전이를 위한 적정 pH 범위는 서로 동일하다는 것을 알 수 있었다. 또한 pH 4의 경우에는 DKC601을 제외한 GEM 균주들이나 NI 균주(DK1)에서 모두 그 전이 빈도가 훨씬 낮았지만, 적지 않은 빈도로 나타난 것은 Foster와 Hall(8)이 언급한 균주의 acid tolerance의 결과로 생각된다. *Km<sup>r</sup>* plasmid의 이와 같은 전이 경향은 conjugation의 시간(3 또는 6 시간)이나 recipient의 종류(NI 또는 lab. strain)에 관계없이 동일하였다. 그러나 특히 CS 균주 중에서도 *E. coli*

C600을 host로 하여 cloning한 DKC601 균주의 *Km<sup>r</sup>* plasmid는 pH 4에서 뿐 아니라 pH 9에서 6 시간의 conjugation 후에도 전혀 전이되지 않은 것으로 보아, GEM 균주의 제조에 사용된 host와 vector plasmid의 특성에 따라 stress 환경에서의 전이빈도가 크게 달라진다는 것을 알 수 있었다.

#### Conjugants에서 나타나는 R-plasmid의 재배열

Conjugation에 의하여 얻은 각 conjugant들의 *Km<sup>r</sup>* plasmid와 그외 plasmid들은 Fig. 4와 Table 3에서와 같이 donor와 recipient로 사용한 균주의



**Fig. 4.** Plasmid profiles of donors, recipients and conjugants obtained by conjugation.

Lanes; A, E, H and K, *E. coli* V517; B and I, DK1; C and L, DKC600; D and G, MT1; F, DKC601; J and M, *E. coli* HB101; N, conjugants of DK1 x MT1 ; O ,conjugants of DKC600 x MT1; P, conjugants of DKC601 x MT1; Q, conjugants of DK1 x *E. coli* HB101; R, conjugants of DKC600 x *E. coli* HB101; The numbers mean the pH of medium at which conjugation was conducted. The arrows indicate the plasmids of pDK101 (↖) and pDT529 (↗).

**Table 3.** Analysis of the plasmids in Fig. 4 rearranged in the conjugants obtained by conjugation at different pH

Lane	Mating strains & plasmids		pH for mating	No. & size(kb) of plasmids in the conjugants
	Donor	Recipient		
N	DK1 4(68, 8.5, 4.8, 4.5)	MT1 5(79, 70, 62, 50, 12.5)	4	7(79, 70, 62, 12.5, 11.9, 4.8, 4.5)
			5	7(79, 70, 62, 45, 11.9, 9.5, 4.8)
			7	9(79, 70, 62, 50, 12.5, 11.9, 9.5, 4.8, 4.5)
			9	8(79, 70, 62, 12.5, 11.9, 9.5, 4.8, 4.5)
O	DKC600 1(68)	MT1 5(79, 70, 62, 50, 12.5)	4	7(79, 70, 62, 50, 45, 15, 12.5)
			5	6(75, 65, 54, 42, 15, 12.5)
			7	7(81, 79, 70, 62, 45, 15, 12.5)
			9	7(79, 70, 62, 58, 45, 15, 12.5)
P	DKC601 1(52)	MT1 5(79, 70, 62, 50, 12.5)	4	5(79, 62, 52, 13.3, 12.5)
			5	5(79, 62, 52, 13.3, 12.5)
			7	6(79, 62, 52, 45, 13.3, 12.5)
			9	3(79, 55, 52)
Q	DK1 4(68, 8.5, 4.8, 4.5)	HB101 1(4.3)	4	3(68, 4.8, 4.3)
			5	3(68, 4.8, 4.3)
			7	3(68, 4.8, 4.3)
			9	2(68, 4.3)
R	DKC600 1(68)	HB101 1(4.3)	4	2(68, 4.3)
			5	2(68, 4.3)
			7	2(68, 4.3)
			9	2(68, 4.3)

종류에 따라 재배열 현상이 크게 다르게 나타났다. DK1, DKC600 그리고 DKC601을 각 각 donor로 하고 NI 균주인 *E. coli* MT1을 recipient로 하여 얻은 conjugants의 plasmid들은 각 각 lanes N, O, P에서와 같이 donor 균주의 종류에 따라 차이가 많았다. DK1을 donor로 하였을 경우(lane N)에도 각 pH

조건에 따라 선별된 conjugant들에서는 recipient가 가지고 있는 5개의 plasmid와 68 kb의 Km<sup>r</sup> plasmid 외에 1~3개 plasmid들이 나타났으며, DKC600을 donor로 하였을 경우(lane O)에는 pH 5를 제외한 모든 pH 조건에서 1개의 plasmid가 더 나타났다. 또 DKC601을 donor로 했을 때(lane P)에도 52kb의

pDT529가 전이됨과 함께 plasmid의 재배열을 관찰할 수 있었으며, 특히 pH 9에서 재배열 현상이 상이하였다. 이는 O'Morchoe 등(19)의 보고에서와 같이 cloned strains의 genetically engineered DNA sequence의 stability가 전이에 의하여 감소된다는 사실과 관계있다고 판단된다.

그 반면에 lab. strain인 *E. coli* HB101을 recipient로 하였을 경우에는 lane Q와 lane R에서와 같이 모든 pH 조건에서 donor의 Km<sup>r</sup> plasmid가 전이되면서 재배열 현상이 거의 일어나지 않았다. 그러나 donor가 DK1인 경우(lane Q)에는 4.8kb의 작은 plasmid가 pDK101과 함께 나타났다. 이 작은 크기의 plasmid는 recipient에 1개의 plasmid 밖에 없었기 때문에, DK1으로부터 pDK101 plasmid와 함께 전이된 것으로 판단된다. 이와 같이 conjugation에 의해서 얻은 conjugants에서 나타나는 plasmid의 재배열 현상은 NI 균주를 recipient로 하였을 경우에는 매우 다양하게 나타났으나, lab. strain을 recipient로 하였을 경우에는 거의 나타나지 않았다. 이는 lab. strain인 *E. coli* HB101이 실험실에서 *rec<sup>-</sup>*로 개발된 균주이기 때문이라 해석된다. NI균주를 recipient로 하였을 경우에도 donor가 NI 균주일 때보다 GEM 균주일 경우에 재배열 현상은 다양하게 나타났으며, GEM 균주 중에서도 TS 균주(DKC600, DXL101)의 경우보다 CS 균주(DKC601, DXL201)를 donor로 하였을 경우에 더욱 다양하게 나타났다.

O'Morchoe 등(19)은 이러한 재배열 현상이 실험실에서보다 자연 환경의 여러가지 stress때문에 in situ 실험에서 더 많이 나타난다고 하였으며, Brom 등(6)은 selective pressure가 없는 환경에서도 sequence amplification, deletion, cointegration 또는 소실에 의하여 plasmid의 재배열이 일어난다고 보고하였다. 또 McPherson과 Gealt(18)는 항생제 내성 유전자가 transposon을 이루어 대부분 conjugative plasmid에 위치하기 때문에 conjugation에 의하여 높은 빈도로 전이될 뿐 아니라 transposition이나 recombination에 의한 재배열 현상이 활발히 일어날 수 있다고 언급하였다. 이와 같은 보고들을 고찰하여 볼 때, DXL201의 pDX95 plasmid를 DNA probe로 활용하면 실험실 뿐 아니라 자연계에서도 conjugation에 의한 R-plasmid의 전이 특성과 그들의 행방을 추적 할 수 있을 것이다.

### 감사의 글

본 연구는 한국 과학재단 우수연구센터(서울대학교 분자미생물학 연구센터)의 연구비에 의하여 이루어졌음.

### 참 고 문 헌

- Alcaide, E. and E. Garay. 1984. R plasmid transfer in *Salmonella* spp. isolated from wastewater and sewage-contaminated surface water. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 435-438.
- Amaro, C., R. Aznar, E. Garay and E. Alcaide. 1988. R plasmids in environmental *Vibrio cholerae* Non-01 strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 2771-2776.
- Amy, P. S. and H. D. Hiatt. 1989. Survival and detection of bacteria in an aquatic environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 788-793.
- Awong, J., G. Bitton and G. R. Chaudhry. 1990. Microcosm for assessing survival of genetically engineered microorganisms in aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 977-983.
- Brisson-Noel, A., M. Arthur and P. Courvalin. 1988. Evidence for natural gene transfer from gram-positive cocci to *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **170**, 1739-1745.
- 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.
- Buchanan-Wollaston, V., J. E. Passiatore and F. Cannon. 1987. The mob and oriT mobilization functions of a bacterial plasmid promote its transfer to plant. *Nature* **328**, 172-175.
- Foster, J. W. and H. K. Hall. 1991. Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **173**, 5129-5135.
- Gealt, M. A. 1985. Transfer of plasmids pBR322 and pBR325 in wastewater from laboratory strains of *Escherichia coli* to bacteria indigenous to the waste disposal system. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**, 836-841.
- Gillett, J. W., A. M. Stern, S. A. Levin, M. A. Harwell, D. A. Andow and M. Alexander. 1985. Potential impacts of environmental release of biotechnology products: assessment, regulation and research needs. Ecosystem Research Center, Cornell University, Ithaca, N. Y.
- Halvorson, H. O., D. Pramer and M. Rogul. 1985. Engineered organisms in the environment: scientific issues. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Kawamura, M., M. Takagi and K. Yano. 1983. Cloning of a LEU gene and an ARS site of *Candida maltosa*. *Gene* **24**, 157-162.
- Keeler, K. H. 1988. Can we guarantee the safety of genetically engineered organisms in the environments. *Crit. Rev. Biotechnol.* **8**, 85-97.
- 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<sup>r</sup>Cmr gene. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **17**, 447-453.
- Kim, C. K. and S. G. Lee. 1990. Conjugal transfer and fate of the genetically engineered Km<sup>r</sup> gene in freshwater environments. *Kor. J. Microbiol.* **28**,

- 219-228.
16. Maniatis, T., E. F. Fritsch and J. Sambrook. 1990. Molecular cloning, A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
  17. McClure, N. C., A. J. Weightman and J. C. Fry. 1989. Survival of *Pseudomonas putida* UWC1 containing cloned catabolic genes in a model activated-sludge unit. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 2627-2634.
  18. McPherson, P. and M. A. Gealt, 1986. Isolation of indigenous wastewater bacterial strain capable of mobilizing plasmid pBR325. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 904-909.
  19. O'Morchoe, S. B., O. Ogunseitan, G. S. Saylor and R. V. Miller, 1988. Conjugal transfer of R68. 45 and FP5 between *Pseudomonas aeruginosa* strains in a freshwater environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 1923-1929.
  20. Perbal, B., 1989. A practical guide to molecular cloning. John Wiley & Sons, Inc., New York.
  21. Richaume, A., J. C. Angle and M. J. Sadowsky, 1989. Influence of soil variables on *in situ* plasmid transfer from *Escherichia coli* to *Rhizobium fredii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 1730-1734.
  22. Scanferlato, V. S., D. R. Orvos, J. Cairns, Jr. and G. H. Lacy, 1989. Genetically engineered *Erwinia carotovora* in aquatic microcosms: survival and effects on functional groups of indigenous bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 1477-1482.
  23. Silhavy, T. T., M. L. Berman and L. W. Enquist. 1984. Experiments with gene fusions. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
  24. Singleton, P. and A. E. Anson. 1983. Effect of pH on conjugal transfer at low temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**, 291-292.
  25. Trevors J. T., J. D. Van Elsas, L. S. Van Overbeek and M. E. Starodub. 1990. Transport of a genetically engineered *Pseudomonas fluorescens* strain through a soil microcosm. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 401-408.
  26. Trieu-Cuot, P., C. Carlier, P. Martin and P. Courvalin. 1987. Plasmid transfer by conjugation from *Escherichia coli* to gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **48**, 289-294.
  27. Van Elsas, J. D., J. T. Trevors, L. S. Van Overbeek and M. E. Starodub. 1989. Survival of *Pseudomonas fluorescens* containing plasmids RP4 or pRK2501 and plasmid stability after introduction into two soils of different texture. *Can. J. Microbiol.* **35**, 951-959.

(Received February 1, 1992)

(Accepted February 28, 1992)

#### ABSTRACT: Effects of Mating Strain and pH on Conjugal Transfer of Genetically Modified R-Plasmids

Kim, Hee Tae, Sung-Gie Lee and Chi-Kyung Kim (Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Chungbuk National University, Cheongju 360-763, and Research Center for Molecular Microbiology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea)

The genetically engineered microorganisms (GEMs) could be released accidentally or for experimental purposes, as the genetic engineering technique has become very popular in any laboratories of biological sciences. But there have been little informations on transfer behavior of the genetically modified genes in the natural environments. In this study, antibiotic resistant bacteria were isolated from natural waters, and then GEM strains were constructed from the natural isolate (NI) by modification of the  $Km^r$  plasmid. The transferability of the plasmids in the GEM and NI strains were examined by conjugation in Luria-Bertani broth at 30°C. Also the effects of mating strain and pH on their transfer frequency and rearrangement of the plasmids in the conjugants were comparatively studied. The transfer frequency of  $Km^r$  plasmid in donor of GEM and NI strains was similar as about  $10^{-5}$  when conjugation was conducted with MT1 strain as recipient at pH 7, but that of DKC601 was lowered to  $2.2 \times 10^{-7}$ . And when the lab. strain was used as recipient, the transfer tendency of the plasmid was about same in both GEM and NI strains used as donor. All the donor strains, except for DKC601, showed the highest frequency of about  $10^{-5}$  at pH 7 and the frequencies were lowered at both pH 5 and 9. But the modified  $Km^r$  plasmid in the cloned strain of DKC601 was transferred by very low frequency of  $10^{-8}$  at pH 5 and 7 comparing to other GEM strains, especially any conjugants were not obtained at pH 4 and 9 even after conjugation for 6 hours. Rearrangement of the plasmids transferred into the lab. strain was not found in the conjugants, but a lot of rearrangement was observed when they were transferred into the NI strain. Such a rearrangement was more severe when donor was GEM strain rather than NI strain. But such a phenomenon was less affected by pH values.