

*Streptococcus faecalis*의 pAM β_1 을 *Lactobacillus casei*로의 전이에 영향을 미치는 요인

허정원 · 강성훈

전남대학교 농과대학

Factors Affecting Transfer Frequency of pAM β_1 from *Streptococcus faecalis* to *Lactobacillus casei*

Huh, Jeong Weon and Sung Hoon, Kang

College of Agriculture, Chonnam National University Kwangju, 500-757, Korea

ABSTRACT: The streptococcal plasmid pAM β_1 (erythromycin resistance) was transferred via conjugation from *Streptococcus faecalis* DS 5 to *Lactobacillus casei* YIT 9018 by a filter mating method. The transfer frequency depended greatly on the type, pore size and side(front or back) of membrane filter. Water passing through a membrane under reduced pressure induced very tight contact between the cells, increased the transconjugation frequency about 1.3 to 37-fold when Millipore membrane filter (0.45 μ m, front side up) was used.

KEY WORDS □ Plasmid pAM β_1 , conjugation, membrane filter.

효과적인 형질전환방법이 확립되어 있지 않은 경우 plasmid의 접합에 의한 도입은 유전자 표지나 replicone의 발현을 증진하기 위한 직접적인 방법을 제공하여 준다. 그리고 염색체 내에서 독립적으로 복제하거나 혹은 염색체상에 안정하게 intergrate 할 수 있도록 만들어진 plasmid vector에 특정 유전자를 cloning 할 수 있다. 또한 형질전환할 수 있는 숙주에서 먼저 재조합 plasmid를 만든 다음 이 재조합된 plasmid를 형질전환할 수 없는 목적 균주에 접합에 의해 전이할 수 있다.

Vescovo 등(1983)과 Shrago 등(1986)이 *L. plantarum*과 *L. acidophilus*에 *S. faecalis*가 접합됨을 보고하였는데, 그들은 *L. plantarum* transconjugant들로부터 높은 수율의 *S. faecalis*의 plasmid pAM β_1 을 분리하였으며 이 접합체 *L. plantarum*으로부터 분리한 plasmid pAM β_1 DNA를 *S. sanguis*에 형질전환하였다. 그러나 이들 gene transfer system이 확실하게 알려져 있지 않으며 streptococci로부터 lactobacilli에 pAM β_1 의 전이율이 일반적으로 매우 낮다.

따라서 본 실험은 *S. faecalis* DS 5의 pAM β_1 plas-

mid를 *L. casei* YIT 9018로의 전이에 영향을 미치는 요인을 검토하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

본 실험에 사용한 균주는 *S. faecalis* DS 5(pAM β_1)와 curing agent(acridine orange, ethidium bromide, acriflavin)를 사용하여 *L. casei* YIT 9018로부터 분리한 lac⁻ 변이주인 *L. casei* M-3(lac⁻, Em^S) 균주를 사용하였다.

실험균주는 11% skimmik(w/v)에 배양한 후 냉장보관하였고 2주마다 TCM broth(Tomochika 등, 1982)에 계대배양하여 사용하였다. 또한 transconjugant의 선별배지로는 100 μ g/ml를 함유한 LBS agar medium(BBL Microbiology System)과 lactose indicator medium으로 TCM 배지에서 glucose 대신 lactose를 첨가하고 indicator dye로 bromo cresol purple을 0.004% 첨가하여 사용하였다.

Conjugation

L. casei M-3와 *S. faecalis* DS 5의 접합은 Vescovo

Table 1. Transfer frequency of pAM β_1 with various membrane filters

Filter*	pore size (μm)	Side	No. of cells (10^8 CFU/membrane)		No. of conjugant (CFU/memb.)	Transfer frequency ^{a)}
			Donor	Recipient		
Millipore	0.45	Front	72	6.1	421	6.9×10^{-7}
	0.45	Back	58	5.6	34	6.1×10^{-8}
MFS	0.45	Front	63	5.9	128	2.2×10^{-7}
	0.45	Back	42	4.8	8	1.7×10^{-8}
Toyo	0.20	Front	63	5.9	0	0
	0.20	Back	75	6.9	0	0
Toyo	0.80	Front	61	5.2	11	2.1×10^{-8}
	0.80	Back	61	5.2	7	1.3×10^{-8}

a) Frequency of pAM β_1 transfer is shown as the number of transconjugants per recipient

* Millipore: Millipore, U.S.A.

MFS: Membrane filter system, Japan

Toyo: Toyo Roshi Inc. Japan

등(1983)의 방법에 따라 다음과 같이 실시하였다.

공여주(*S. faecalis* DS 5)와 수용주(*L. casei* M-3) 세포수를 약 10 : 1로 혼합한 후 접합에 사용하였다. 공여주와 수용주혼합액을 20 mM potassium phosphate buffer(pH 6.8)로 2회 세정하였다(수용주세포수, $3 \sim 5 \times 10^8$: 공여주세포수, $4 \sim 5 \times 10^9$). 공여주와 수용주세포 혼합액 0.2 ml를 membrane filter (25 mm diameter)에 진공펌프를 사용하여 trapping한 후 TCM agar plate에 filter를 올려놓고 37 °C에서 24시간 배양하였다. 배양 후 filter를 생리식염수(0.85%, NaCl) 2 ml가 들어 있는 시험관에 넣고 vortex mixer(Philip Harris, England)를 사용하여 잔류된 세포를 씻어낸 후 선택배지인 LBS agar medium(erythromycin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에 도말하여 나타난 transconjugant는 toothpicking에 의하여 lactose indicator medium에서 재차 확인하였다.

접합율은 접합체로 나타난 집락수를 접합 plate에서 나타난 수용주의 수로 나누어 계산하였다.

결과 및 고찰

유당발효능 유전자를 도입하기 위하여 *S. faecalis* DS 5(pAM β_1 , erythromycin resistance)를 공여주로 하고 유당발효능결손 변이주(lac⁻)인 *L. casei* M-3를 수용주로 하여 membrane filter mating 방법을 이용하여 conjugation을 실시하였다. 따라서 이 방법의 1 차적인 역할을 담당하고 있는 membrane filter의 pore size의 영향과 주사형전자현미경(JEOL, JSM-35C, Japan)에 의해 filter의 전면과 후면의 조직에 차이점이 있어 이에 대한 접합 빈

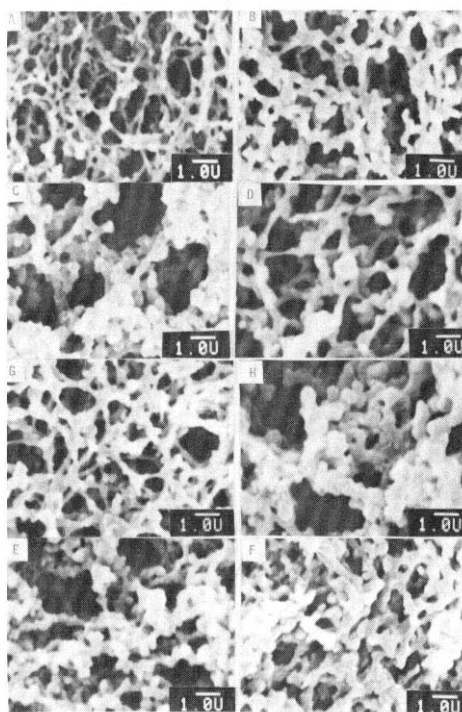


Fig. 1. Scanning electron micrographs of membrane filter surface.

Photographs were taken at a magnification of X7,500 in all cases. (A, E) Toyo, 0.2 μm pore size(TM-1), front and back side; (B, F) Millipore, 0.45 μm pore size(HAWP), front and back side; (C, G) MFS, 0.45 μm pore size, front and back side; (D, H) Toyo, 0.8 μm pore size (TM-4), front and back side.

Table 2. Effect of water passing through the membrane filter on transfer frequency of plasmid pAM β_1

Water (m)	Transfer frequency ^{a)} (fold increase)
0	5.1×10^{-7} (1.0)
0.2	6.4×10^{-7} (1.3)
0.2	1.4×10^{-6} (2.7)
10	7.2×10^{-6} (14.1)
20	8.2×10^{-6} (16.1)
100	1.9×10^{-5} (37.3)

^{a)} Transfer frequency is expressed as the number of transjugants per recipient.

도에 미치는 영향을 조사하였는데 Millipore membrane filter(Millipore, U. S. A.), MFS membrane filter(Membrane filter system, Japan) 및 Toyo membrane filter(Toyo Roshi Inc, Japan)를 사용한 결과 Table 1에 나타난 바와 같이 0.45 μ m membrane filter를 사용할 때 최고 약 $10^{-6} \sim 10^{-7}$ 당 하나의 접합체가 검출되었으나 후면(shining, glossy side)을 사용하였을 때는 $10^{-7} \sim 10^{-8}$ 로 저조하였다. 또한 0.2 μ m로 pore size가 작은 것을 사용하였을 때 접합체를 확인하지 못하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 각 membrane 표면을 주사형 전자현미경으로 관찰한 결과 각 membrane의 표면구조가 다를 수 있었다. 즉, Millipore membrane filter(0.45 μ m)는 sponge와 같은 구조를 하고 있었으며 MFS membrane filter(0.45 μ m)는 Millipore membrane filter(0.45 μ m)와 비슷한 구조를 하고 있었으며 전이효율 역시 비슷한 양상을 보였으나 membrane pore size가 균일하지 못하고 large circular pore를 갖는 차이점이 있었다. 그리고 Toyo membrane filter에 있어서 0.2 μ m와 0.8 μ m의 경우 pore size의 차이를 제외하고 망상구조를 갖고 있었다.

이상의 모든 membrane에서 0.2~0.8 μ m 보다 큰 입자가 포착되는 동일한 기능을 갖고 있다. 그러나 유전자의 전이빈도와 membrane 간의 구조적 차이점을 가지고 있었다. 특히 Millipore membrane filter(0.45 μ m)의 전이효율이 낮은 후면부는 전면부에 비해 매우 조밀하고 smooth한 구조를 가지고 있었다. 따라서 이러한 집합에 의한 유전자전이 빈도 결과는 한천평판배지로 부터 영양소의 신속한 섭취에 대한 차이 혹은 어떤 화학적 기질이 membrane과의 회합에 의해 영향받지 않음을 시사해 주고 있다. 반면에 membrane filter의 표면구조가 이 집합에 의한 유전자전이 체계에 일정한 역할을 행하는 것이라 생각된다. 한편 Sasaki 등(1988)은 집합에 의한 전이 효율의 증진을 위해 membrane filter에 cell을 포착시킨 후 멸균수나 phosphate buffer를 흘려보냄으로써 유전자 전이효율이 향상된다고 보고하였다. 따라서 cell이 포착된 membrane filter에 멸균증류수의 통과가 집합율에 미치는 영향을 조사하기 위하여 공여주와 수용주세포를 membrane filter에 포착시킨 후 진공펌프를 이용 멸균증류수를 흘려보낸 결과 Table 2에 나타난 바와 같이 처리하지 않은 경우에 비해 그 전이효율이 1.9×10^{-5} 로 37배 정도 증가하였다. 이 효과는 흘려보낸 멸균수의 양에 의존하고 있었으며 전자현미경(Fig. 1)에 보는 바와 같이 공여주와 수용주가 기공이 적은 경우 들어갈 수 없으나 기공이 큰 경우 표면과 기공 내에 밀착되어진다. 따라서 Millipore나 MFS membrane filter(0.45 μ m)에 있어서 세포가 보다 더 표면에 밀착되거나 기공 내로 들어가게 되어 외부에서 감압 하에 멸균수를 흘려보낼 경우, 보다 더 견고하게 접촉 됨으로써 membrane pore에 포착되어지며 한천평판배지에 올려 배양함으로써 2 차적인 요인이 작용하여 유전자전이 빈도를 증대시킬 수 있기 때문에 전이효율 증진을 위한 방법으로 매우 유용하리라 생각된다.

적 요

본 실험은 streptococcal plasmid pAM β_1 (erythromycin resistance)을 *Lactobacillus casei* YIT 9018 균주에 filter mating 방법에 의하여 conjugation을 실시한 결과 전이율은 membrane filter의 type, pore size 별과 전후면의 차이에 따라 영향을 받고 있음을 알 수 있었으며, Millipore membrane filter(0.45 μ m, front side)의 경우 6.9×10^{-7} 의 전이율을 나타냈으며 전이효율을 증진을 위해 진공펌프를 이용 멸균증류수를 통과시켰을 때 1.3~37 배의 집합 전이효율이 증가되었다.

참고문헌

1. Sasaki, Y., N. Taketome and T. Sasaki, 1988. Factors affecting transfer frequency of pAM β_1 from *Streptococcus faecalis* to *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* 170, 5937-5942.
2. Shrago, A.W., B.M. Chassy and W.J. Dobrogosz, 1986. Conjugal plasmid transfer (pAM β_1) in *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 52,

- 574-576.
3. Tomochika, K., M. Funabshi, A. Nagata, T. Fuji and Y. Kanemasa, 1982. Protoplast formation of *Lactobacillus casei* induced by endo-N-acetyl-muramidase. *Japan J. Bacteriol.* **37**, 777-785.
4. Vescovo, M., L. Morelli, V. Bottazzi and M.J. Gasson, 1983. Conjugal transfer of broad-host-range plasmid pAM₁ into enteric species of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 753-755.

(Received March 12, 1990)

(Accepted August 30, 1990)