

Shigella sonnei KNIH104S로부터 asd 유전자의 클로닝 및 염기서열 분석

박용춘 · 신희정 · 김영창*

충북대학교 생명과학부

*Shigella sonnei*는 인체의 장내감염을 일으키는 병원균의 일종이며, 본 연구에 사용된 *S. sonnei* KNIH104S는 국내에서 쉬겔라증을 나타내는 환자로부터 분리하였다. *S. sonnei* KNIH104S의 염색체로부터 aspartate β -semialdehyde dehydrogenase를 암호화하는 *asd* 유전자를 포함하는 1.7 kb *Bam*HI 절편을 pBluescript SK(+) 벡터를 이용하여 클로닝하였으며 pSAB17이라 명명하였다. *asd* 결실돌연변이주인 *E. coli* χ 6097은 세포벽을 구성하는 중요한 성분인 DL- α , ϵ -diaminopimelic acid가 없는 Luria-Bertani 배지에서는 생장하지 못하지만 *E. coli* χ 6097 (pSAB17)은 DL- α , ϵ -diaminopimelic acid가 없는 Luria-Bertani 배지에서 생장함을 확인하였다. 클로닝된 *asd* 유전자의 염기서열 분석결과 ATG 개시코돈 및 TAA 종결코돈을 지니는 1,104 bp로 이루어져 있으며 여기서 유추한 아미노산은 367개로 분자량 40.0 kDa의 폴리펩타이드를 만들어내고 있다. 염기서열은 대장균의 *asd* 유전자와 한 부위에서 다르게 나타났지만 (99.9% 상동성) 아미노산의 서열은 동일함을 알 수 있었다. 그리고 pBluescript SK(+) 벡터와 본 연구에서 클로닝된 *asd* 유전자를 이용하여 balanced-lethal 벡터인 pSKA47 및 pSKA47A를 제조하였다.

KEY WORDS □ *asd* gene, balanced-lethal vector, *Shigella sonnei* KNIH104S

점액성 설사, 이질, 장티푸스, 콜레라 등 장감염성 질환은 범세계적으로 중요한 보건학적인 과제로 남아 있으며, 발병 기작과 질병 치료 방법에 대하여 많은 연구가 진행되고 있다(1-3, 5, 8, 11, 12, 19-21). 장감염성 세균들에 의한 질환은 분자 생물학 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(8, 12, 18, 21).

다가 백신의 개발방법에는 각종 병원성 세균으로부터 분리한 항원관련 유전자를 염색체 내로 도입시키거나 플라스미드 상태로 백신후보주 내로 도입시키는 방법이 주로 이용된다(3). 따라서 항원관련 유전자를 벡터와 결합하여 플라스미드 상태로 도입시키는 경우에 세포내에서 플라스미드가 소실되지 않고 안정하게 유지되는 것은 다가 백신주를 제조하는데 매우 중요하다(10). 플라스미드의 안정성을 유지하기 위하여 벡터내에 항생제 내성 유전자를 도입시키는 경우 실험실 조건에서는 장점이 있지만 생체 조건에서는 환자에게 항생제 내성 세균의 출현 등 단점으로 실질적으로 이용하기 어려우며 FDA(Food and Drug Administration, USA)에서도 법적으로 규정하고 있는 실정이다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 Nakayama 등(10)은 진핵세포와는 무관하지만 원핵세포에는 생장에 필수적인 유전자를 이용한 balanced-lethal system을 개발하였다.

그람음성 세균의 경우 세포벽을 이루는 peptidoglycan의

기본적인 구성성분은 DL- α , ϵ -diaminopimelic acid(DAP)이다. 즉, DAP의 생합성 과정에 관여(4, 17)하는 aspartate β -semialdehyde dehydrogenase(EC 1.2.1.11)를 암호화하는 유전자인 *asd* 유전자를 이용하였다(6, 7, 15). 즉, 백신주의 염색체상에 존재하는 *asd* 유전자를 결실시키고 항원관련 유전자를 지니는 벡터에 *asd* 유전자를 삽입함으로써 벡터는 세포내에서 안정성을 유지할 수 있으며 백신주는 생존할 수 있다(10). 그러나 벡터가 소실되면 DAP을 합성할 수 없기 때문에 정상적인 세포벽을 합성할 수 없으므로 자연적으로 세포는 죽는다(4, 17).

본 연구에서는 국내 분리주인 *S. sonnei* KNIH104S(11)를 다가 백신주의 숙주균으로 이용하기 위하여 일차적으로 *S. sonnei* KNIH104S의 염색체로부터 *asd* 유전자를 클로닝하였으며 염기서열을 분석하였다. 그리고 balanced-lethal system을 개발하기 위하여 pBluescript SK(+) 벡터에 존재하는 β -lactamase를 암호화하는 유전자 내에 *asd* 유전자를 삽입함으로써 ampicillin에 대한 항생제 내성을 제거한 balanced-lethal 벡터를 제조하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

균주, 플라스미드 및 배지

본 실험에 사용한 균주는 이미 보고(11)한 바 있는 *S. sonnei* KNIH104S와 클로닝을 위한 숙주 균주로는 Washington 대학의 Dr. Roy Curtiss III로(10)부터 *E. coli* χ 6097을 분양 받아 이용하였으며, 클로닝을 위한 벡터로는 pBluescript SK(+) phagemid(Stratagene)를 사용하였다. 기타 본 연

*To whom correspondence should be addressed
Tel: 0431-261-2302, Fax: 0431-268-2538
E-mail: youngkim@cubucc.chungbuk.ac.kr

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

| Bacterial strain | Relevant characteristics | Source or Ref. |
|---------------------------|---|----------------|
| Strains | | |
| <i>S. sonnei</i> KNIH104S | Sm ^r , Tc ^r | Ref. 11 |
| <i>E. coli</i> XL1-Blue | <i>supE44hsdR17recA1endA1gyrA46thirelA1lac⁻ F'[proAB⁺lacF⁺lacZΔM15Tn10(tet)]</i> | Stratagene Co. |
| <i>E. coli</i> χ6097 | Δ <i>asd</i> | Ref. 10 |
| Plasmids | | |
| pBluescript SK(+) | Ap ^r , multiple cloning site in <i>lacZα</i> ; obtained from Stratagen Cloning Systems | Stratagene Co. |
| pSAE70 | 7.0 kb <i>Eco</i> RI fragment from <i>S. sonnei</i> KNIH104S inserted into SK(+) | This study |
| pSAB17 | 1.7 kb <i>Bam</i> HI fragment from <i>S. sonnei</i> KNIH104S inserted into SK(+) | This study |
| pSAB1701A | 0.5 kb <i>Eco</i> RV fragment from pSAB17 inserted into SK(+) | This study |
| pSAB1702 | 0.4 kb <i>Eco</i> RV fragment from pSAB17 inserted into SK(+) | This study |
| pSAB1703 | Self-ligated large fragment of pSAB17 digested with <i>Eco</i> RV | This study |
| pSAB1704 | 0.3 kb <i>Sac</i> II fragment from pSAB1703 inserted into SK(+) | This study |
| pSAB1705 | Self-ligated large fragment of pSAB1703 digested with <i>Sac</i> II | This study |
| pSKA47 | 1.7 kb <i>Bam</i> HI fragment from pSAB17 inserted into SK(+) | This study |
| pSKA47A | 1.7 kb <i>Bam</i> HI fragment from pSAB17 inserted into SK(+) | This study |

구에 사용된 균주 및 플라스미드의 특징은 Table 1과 같다. 완전배지로는 Luria-Bertani(LB) 배지를 사용하였으며, 특별한 경우에는 균주의 배양시 LB배지에 DAP를 ml당 50 µg 되게 첨가한 선택배지를 이용하였다(7, 10).

DNA 추출 및 조작

염색체 DNA는 기본적으로 Murray(13)의 방법에 의하여, 플라스미드는 Sambrook 등(16)의 방법에 의하여 추출하였다. 그리고 DNA 조작에 필요한 T4-DNA ligase 및 각종 제한효소는 POSCOCHEM (남도 과학)으로부터 구입하여 사용하였으며, 반응조건은 제조회사의 처방에 따랐다.

형질 전환

기본적으로 Sambrook 등(16)의 방법에 의한 열 충격 방법을 이용하였으며, 클로닝을 위한 숙주 세포로는 *E. coli* χ6097(10), 그리고 유전자 조작과 염기 서열 분석을 위한 숙주 세포로는 *E. coli* XL1-Blue를 이용하여 형질전환하였다.

Balanced lethal 벡터의 제조

본 연구에서 클로닝된 pSAB17(Fig. 2)로부터 *asd* 유전자를 포함하는 부위를 얻기 위하여 pSAB17을 *Bam*HI로 절단 후, 1.7 kb를 회수하여 Klenow fragment를 처리 후 양쪽 말단을 blunt end로 만들었다. 그리고 *Sca*I로 절단한 pBluescript SK(+) 벡터와 결합하여 *E. coli* χ6097로 형질전환 후, LB 배지에서 생장하는 균주를 선발하였다.

asd 유전자의 염기 서열 결정 및 대장균과의 비교

ALFwin(Pharmacia Biotech. Inc., V1.00)을 사용하여 염기 배열을 결정하였다. 염기배열결정에 사용한 subclone들은 Table 1과 같고, plasmid DNA는 GFX™ Micro Plasmid Prep Kit(Pharmacia Biotech Inc.)를 사용하여 추출하였다. 염기서열과 아미노산서열은 DNASIS/PROSIS(Hitachi V7.06)를 사용하여 분석하였으며 multiple alignment는 기본적으로 CLU-

STAL X algorithm을(22) 이용하였고 수작업으로 다시 정렬하였다.

결과 및 고찰

S. sonnei KNIH104S로부터 *asd* 유전자의 클로닝

Shigella는 대장균의 염색체와 유전자의 배열 및 제한효소의 위치가 매우 비슷한 것에 착안하여 기존에 밝혀진 *E. coli* K-12의 Kohara 유전자 지도(9)를 바탕으로 연구를 진행하였다. 즉, *E. coli* K-12의 경우 *asd* 유전자는 염색체의 76.9분에 위치하며 *Bam*HI 및 *Eco*RI로 절단하면 각각 1.7 kb 및 7.0 kb의 유전자 절편에 *asd* 유전자가 존재한다고 밝혀져있다(9). 따라서 *S. sonnei* KNIH104S의 염색체를 추출 후 *Bam*HI 및 *Eco*RI로 절단 후 각각 1.7 kb 및 7.0 kb의 유전자 절편을 회수하였다. 그리고 동일 제한효소로 절단한 pBluescript SK(+) 벡터와 결합시킨 후 *E. coli* χ6097에 형질전환하고 LB 배지에 도말하여 생장하는 균주를 선발하였다(Table 2). 즉, *asd* 결실돌연변이주인 *E. coli* χ6097은 DAP가 없는 배지에서는 생장할 수 없지만 DAP를 합성할 수 있는 aspartate β-semialdehyde dehydrogenase를 암호화하는 *asd* 유전자를 지니는 *E. coli* χ6097은 DAP가 없는 배지에서 생장할 수 있다.

선발된 균주로부터 플라스미드를 추출 후 조사한 결과 예

Table 2. Growth patterns of *E. coli* χ6097

| plasmid | media | Growth patterns of <i>E. coli</i> χ6097 on | |
|------------|-------|--|---------------------------|
| | | LB | LB-DAP media ¹ |
| No plasmid | | - | + |
| pSAB17 | | + | + |
| pSAE70 | | + | + |

¹LB media supplemented with DL-α, ε-diaminopimelic acid (50 µg/ml)

```

5'GGATCCATAATCAGGATCAATAAACTGCTGCAGAAATGATGCTATCACTCAAAATT 60
CCTGTAATATTCGCGGACTTCTGCTGCTAAACAAGCAGGATAGTGCATTACTGGA 120
TGCGTTCGCTATCATGATTAAATTTCACTGCGACTTTGGCTGCTTTTGTATGGTGAAA 180
GATGTGCCAAGAGGACGCGCACATTTATACAGACACATCTTTCAGGAAAGCGCT 240

TATGAAAAATTTGGTTTATCGGCTGGCGGGTATGGTCGGCTCCGTTCTCATGCAAG 300
asd: M K N V G F I G W R G M V G S V L M Q R

CATGTTTGAAGAGCGGACTTCGAGCCATTGGCGTCTCTTTCTCTCTCTCTCAGCT 360
M V E E R D F D A I R P V F F S T S Q L

TGCCAGGCTGCGCGCTTTTGGCGGAACCATGCGACACTCAGGATGCGCTTGTATCT 420
G Q A A P S F G G T T G T L Q D A F D L

GGAGGCGCTAAAGCCCTCGATATCATTTGTGACCTGTGAGGCGGCGGATATACCAAGA 480
E A L K A L D I I V T C Q G G D Y T N E

AATCTATCAAAAGCTTCGTGAAGCGGATGGCAAGTTACTGATTACGCGACGATCGTC 540
I Y P K L R E S G W Q G Y W I D A A S S

TCTGCGCATGAAGATGACGCCATCATCTTGAACCCGCTCAATCAGGACGCTATTAC 600
L R M K D D A I I I L D P V N D V I T

CGACGCGCTAAATATGGCATCAGGACTTTTGGCGCTAACGTACCGTACGCTGAT 660
D G L N N G I R T F V G G N C T V S L M

GTGATGTCGTTGGTGGTTTATTCGCAATGATCTTGTGATTGGGTGCGCTTGCAAC 720
L M S L G G L F A N D L V D W V S V A T

CTACAGGCGCGCTTCGCGCGGTGGTGGCGCATATGCGTGAGTTATTAACCCAGATGG 780
Y Q A A S G G G A R H M R E L L T Q M G

CCATCTGTATGCGCATGTCGAGATGACCTGGACCCGCTCTGCTATTCGATAT 840
H L Y G H V A D E L A T P S A I L D I

CGAAGCGCAAGTCACAACTTAAACCGTACGCGGTGCGGTCGCGGATACCTTGGCT 900
E R K V T T L T R S G E L P V D N F G V

GCGGCTGGGCGGTAGCGTATCCGTGATGCGCAACAGCTCGATACCGTCAGAGCG 960
P L A G S L I P W I D K Q L D N G Q S R

CGAAGATGGAAGGCGAGCGGAAACCAAGATCTCAACACATCTTCGTAATTCC 1020
E E W K G Q A E T N K I L N T S S V I P

GGTAGGCTGTTTATGTTGCGGTGTCGGGCAATTGCGCTGCCACAGCGAGGATTCATAT 1080
V D G L C V R V G A L R C H S Q A F T I

TAAATGAAAAAGATGTGTTCTATTCGACCGTCGAGAACTGCTGGCTGCGCACAATCC 1140
K L K K D V S I P T V E E L L A A H N P

GTGGCGAAGGCTGTCGGAACGATCGGGAATCACTATGCGTGAGCTAACCCAGCTGC 1200
W A K V V P N D R E I T M R E L T P A A

CGTTACGCGACGCTGACCAACGCGGTAGCGCGCTGCGTAAGCTGAATATGGGACAGA 1260
V T G T L T T P V G R L R K L N M G P E

GTTCCTGTCAAGCTTACCGTGGCGGACGAGCTGCTGCGGCGCGCGGAGCGCGTGG 1320
F L S A F T V G D Q L L W G A A E P L R

TGGGATGCTTGTCAACTGGCGTAATCTTTATCAATTAATCTGGGCGCGATGCCGCC 1380
R M L R Q L A *

CTGTGATGCGTAATACAGGAGTAAGCGCAGATGTTT 3' 1417

```

Fig. 1. Nucleotide sequences of *asd* gene encoding aspartate β -semialdehyde dehydrogenase of *S. sonnei* KNIH104S (GenBank accession number AF101226). The amino acid sequences deduced from the nucleotide sequence are shown in one-letter code, and asterisk indicates stop codon.

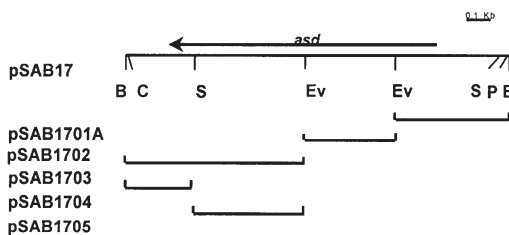


Fig. 2. Physical and genetic map of recombinant plasmid pSAB17 and its derivatives. Abbreviations: B, *Bam*HI; C, *Cla*I; Ev, *Eco*RV; S, *Sac*II; P, *Pst*I.

상대로 제한효소인 *Bam*HI로 조작한 경우는 약 1.7 kb, *Eco*RI로 조작한 경우는 약 7.0 kb의 삽입된 유전자를 지니고 있는 것으로 확인되었으며, 각각을 pSAB17 및 pSAE70

으로 명명하였다. 그리고 pSAB17 및 pSAE70의 각종 제한효소지도(Fig. 2)를 작성하고 분석한 결과 pSAE70은 pSAB17 내에 존재하는 약 1.7 kb의 *Bam*HI 유전자 절편을 포함하는 것으로 확인되었다.

asd 유전자의 염기 배열 결정

S. sonnei KNIH104S로부터 클로닝된 *asd* 유전자의 염기서열을 결정(Fig. 1)한 결과 ATG 개시코돈 및 TAA 종결코돈을 지니며, 1,104 bp의 염기로 이루어진 open reading frame (ORF)을 구성하고 있었으며, 이 *asd*의 G+C 함량은 54.2%로 이미 보고한 바 있는 *S. sonnei* KNIH104S의 *aroA* 유전자(50.8%, GenBank accession number AF101225)와 유사하였다(14). 그리고 *asd* 유전자로부터 유추한 폴리펩티드는 367개의 아미노산으로 이루어져 있었고 계산된 분자량은 40.0 kDa이었다

Enterobacteriaceae의 asd 유전자들과 비교 분석

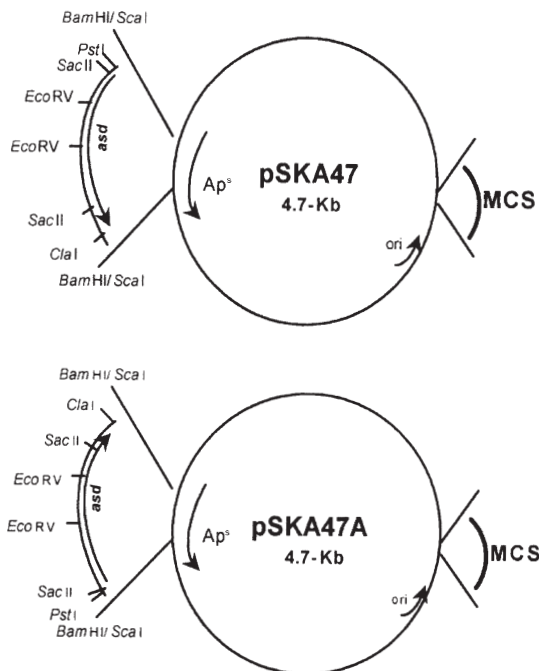
본 연구에서 클로닝된 재조합 플라스미드인 pSAB17로부터 *asd* 유전자를 포함하는 상류 및 하류 부위인 1,417 bp의 염기서열을 결정하였다. 그리고 이미 보고되어 있는 대장균(6)의 동일부위와(GenBank accession number V00262) 염기서열을 분석한 결과 1,417 bp 중 3 부위에서 염기배열이 상이함을 확인하였다. 그리고 ASD를 암호화하는 부위만을 비교 분석한 결과 *S. sonnei* KNIH104S의 경우 873번째의 염기는 cytosine이지만 대장균은 guanine로 나타났다. 그러나 아미노산은 모두 valine으로 해독됨을 확인하였다. 즉, 유전자의 상동성은 99.9%이지만 아미노산의 상동성은 100%임을 알 수 있었다. 그리고 *Salmonella typhimurium*(7), *Vibrio cholerae*[unpublished(GenBank accession number Y15281)], *Campylobacter jejuni*(15)에서 밝혀진 *asd* 유전자와는 각각 85.3, 46.4 그리고 45.4%의 상동성을 나타내었다.

asd 유전자를 이용한 balanced-lethal 벡터의 제조

세포내에서 플라스미드가 소실되면 숙주세포가 더 이상 성장하지 못하고 죽는 벡터 체계인 balanced-lethal 벡터를 제조하기 위하여 본 연구에서 클로닝된 *asd* 유전자를 이용하기로 하였다. 일차적으로 pBluescript SK(+) 벡터의 β -lactamase를 암호화하는 유전자 내에 존재하는 제한효소인 *Sca*I를 이용하여 벡터를 절단하였다. 이차적으로 본 연구에서 클로닝된 pSAB17로부터 *asd* 유전자를 포함하는 부위를 *Bam*HI로 절단하여 약 1.7 kb의 유전자를 회수 후 Klenow fragment를 처리하여 blunt end로 만들었다. 그리고 위에서 제조된 유전자 절편을 결합한 후 *E. coli* χ 6097에 형질전환하여 DAP가 없는 LB 배지에서 성장하는 균체를 선별하였다. 선별된 균주로부터 플라스미드를 추출 후 확인한 결과 삽입된 *asd* 유전자는 벡터 내에서 서로 다른 방향으로 삽입되더라도 *asd* 유전자가 발현됨을 확인하였다(Table 3). 따라서 삽입된 유전자 내에는 발현에 관여하는 프로모터를 자체적으로 지니는 것으로 사료된다. 이 재조합 플라스미드는 벡터 내에서 삽입된 *asd* 유전자의 방향에 따라서 각각 pSKA47 및 pSKA47A라 명명하였으며 각종 제한효소에 대한 유전자 지도를 작성하였다(Fig. 3). 그리고 pSKA47 및

Table 3. Growth patterns of *E. coli* χ 6097 using the constructed balanced-lethal vector on medium

| plasmid | media | Growth patterns of <i>E. coli</i> χ 6097 on | | | |
|-------------------|-------|--|--------------------|------------------------------|---------------------------------|
| | | LB | LB-Ap ¹ | LB-DAP media ² | LB-Ap-DAP media ³ |
| No plasmid | | - | - | + | - |
| pBluescript SK(+) | | - | - | + | + |
| pSKA47 | | + | - | + | - |
| pSKA47A | | + | - | + | - |

¹LB media containing ampicillin (100 μ g/ml)²LB media supplemented with DL- α , ϵ -diaminopimelic acid (50 μ g/ml)³LB media containing ampicillin (100 μ g/ml) and DL- α , ϵ -diaminopimelic acid (50 μ g/ml)**Fig. 3.** Balanced-lethal vector (pSKA47 and pSKA47A) constructed by using an *asd* gene and pBluescript SK(+). Abbreviations: MCS, multiple cloning site; Ap^r, inactivated ampicillin resistance gene; ori, ColE1 ori.

pSKA47A는 ampicillin에 대한 내성이 없는 것을 최종 확인 하였다(Table 3). 따라서 본 연구에서 제조된 재조합 플라스미드인 pSKA47 및 pSKA47A는 ampicillin에 대한 항생제 내성이 없고 *asd* 유전자를 지니며, 자체적으로 복제가 가능함으로 숙주세포가 *asd* 돌연변이주인 경우 생균 백신주에 대한 balanced-lethal 벡터로서의 이용이 매우 유용하리라 생각된다.

그리고 본 연구의 목표인 *S. sonnei* KNIH104S를 다가백신을 위한 숙주세포로 이용하기 위하여 야생주의 *asd* 결실 돌연변이체를 제조중에 있다.

감사의 말

이 연구는 1997년도 보건 의료기술 연구 개발 사업의 지원(HMP-96-D-1-0021)의 연구비에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

1. Alf A. Lindberg and Tibor Pal. 1993. Strategies for development of potential candidate *Shigella* vaccines. *Vaccine* 11, 168-178.
2. 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.
3. Formal, S.B., L.S. Baron, D.J. Kopecko, C. Powell and C.A. Life. 1981. Construction of a potent bivalent vaccine strain: Introduction of *Shigella sonnei* form I antigen genes into the *galE* *S. typhi* Ty21a typhoid vaccine strain. *Infect. Immun.* 34, 746-750.
4. Gottschalk, G. 1986. Bacterial metabolism(2nd edition). p. 43-49. Springer-Verlag. New York.
5. Griffin, H.G. and Griffin, A.M. 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.
6. Haziza, C., P. Stragier, and J.C. Patte. 1982. Nucleotide sequence of the *asd* gene of *Escherichia coli*: absence of a typical attenuation signal. *EMBO. J.* 1, 379-384.
7. Jorge, E.G., N. Koji, and R. Curtiss III. 1990. Cloning and characteristics of the *asd* gene of *Salmonella typhimurium*: Use in stable maintenance of recombinant plasmids in *Salmonella* vaccine strains. *Gene* 94, 29-35.
8. 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.
9. Kohara, Y., K. Akiyama, and G. Isono. 1987. The physical map of the whole *Escherichia coli* chromosome: Application of a new strategy for rapid analysis and sorting of a large genomic library. *Cell* 50, 495-508.
10. Koji, N., S.M. Kelly, and R. Curtiss III. 1988. Construction of *asd*⁺ expression-cloning vector: Stable maintenance and high level expression of cloned genes in a *Salmonella* vaccine strain. *Bio/Technology* 6, 693-697.
11. Lee, K.U., Y.R. Ju, Y.M.A. Park, K.J. Lee, Y.J. Lee, C. K. Kim, S.G. Hong, Y.C. Park, S.Y. Hwang, J.Y. Lim, and Y.C. Kim. 1996. Construction of allelic exchanged mutants for a gene replacement of *Shigella sonnei*. *J. Kor. Soc. Microbiol.* 31, 35-43.
12. Levine, M.M., W.E. Woodward, S.B. Former, P. Gernski, 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.
13. Murray, M.G. and Thompson, W.F. 1980. Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA. *Nucleic Acid Res.*

- 8, 4321-4325.
14. Park, Y.C., H.J. Shin, S.G. Hong, S.Y. Hwang, G.D. Park, Y.R. Ju, K.J. Lee, and Y.C. Kim. 1997. Cloning and nucleotide sequence of the *araA* gene from *Shigella sonnei* KNIH104S. *J. Kor. Soc. Microbiol.* **32**, 151-159.
15. Paxelec, D. and E. Jagusztyn-Krynicka. 1996. Complete nucleotide sequence of the *Campylobacter jejuni* 72Dz *asd* gene. *Acta Microbiol. Pol.* **45**, 299-304.
16. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory.
17. Schleifer, K.H. and O. Kandler. 1972. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.* **36**, 407-477.
18. 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.
19. Stevenson, G. and P.A. Manning. 1985. Galactose epimeraseless(*galE*) mutant G30 of *Salmonella typhimurium* is a good potential live oral vaccine carrier for fimbrial antigens. *FEMS Microbiol. Lett.* **28**, 317-321.
20. Susan, K.H. and B.A.D. Stocker. 1985. Genes *araA* and *serC* of *Salmonella typhimurium* constitute an operon. *J. Bacteriol.* **163**, 355-361.
21. Tacket, C.O., D. Hone, R. Curtiss, S.M. Kelly, G. Lonsky, 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. Thompson, J.D., T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D.G. Higgins. 1997. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**, 4876-4882.

(Received November 6, 1998/Accepted February 25, 1999)

ABSTRACT: Cloning and Nucleotide Sequence Analysis of the *asd* Gene from *Shigella sonnei* KNIH104S

Yong-Chjun Park, Hee-Jung Shin, and Young-Chang Kim* (School of Life Sciences, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea)

Shigella sonnei is important causes of human enteric infections. *S. sonnei* KNIH104S was isolated from patient of shigellosis in Korea and previously reported. We cloned 1.7 kb *Bam*HI fragment containing the *asd* gene encoding an aspartate β -semialdehyde dehydrogenase from chromosomal DNA of *S. sonnei* KNIH104S. This recombinant plasmid was named as pSAB17. *E. coli* χ 6097, an *asd*⁻ mutant, cannot grow on the LB medium without DL- α , ϵ -diaminopimelic acid (50 μ g/ml) but *E. coli* χ 6097(pSAB17) can grow on the same medium. We sequenced the *asd* gene of *Shigella* for the first time. The *asd* gene was composed of 1,104 base pairs with ATG initiation codon and TAA termination codon. Sequence comparison of the *asd* gene exhibited 99.9% nucleotide sequence homology with that of *E. coli*. Also, We constructed the balanced-lethal vector using pBluescrip SK(+) and *asd* gene of *S. sonnei* KNIH104S.