

Carboxydobacteria를 위한 재조합 Plasmid 벡터와 형질전환방법 개발

김진욱 · 송택선¹ · 김영민*

연세대학교 생물학과 한국과학기술원 생물공학과¹

Carboxydobacteria의 일산화탄소 산화에 대한 유전학적 연구를 위해 *Pseudomonas carboxydovorans*에 존재하는 pYK100 plasmid와 pBR322를 이용하여 pYK322 (7.2 kb, Ap^r, Tc^r)와 pYK324 (7.2 kb, Ap^r, Tc^r) 등 두가지 재조합 plasmid shuttle 벡터를 만들고, pYK100와 pACYC184를 이용하여 pYK210 (5.2 kb, Cm^r), pYK220 (5.2 kb, Cm^r), pYK230 (5.2 kb, Cm^r), pYK232 (5.2 kb, Cm^r) 등 네가지 shuttle 벡터를 만들었다. 재조합된 벡터들은 모두 대장균에서 안정되게 복제되었다. pYK322와 pYK220을 이용한 carboxydobacteria의 형질전환 실험에서 Bagdasarian과 Timmis의 방법 (Curr. Top. Microbiol. Immunol., 96:47-67, 1982)을 변형하여 0.2% succinate가 포함된 무기염류배지에서 지수성장 중기까지 배양한 세균을 이용하고, 형질전환용액의 10 mM RbCl을 100 mM KCl로 대체하며, 형질전환용액 처리후 4°C에서의 방치시간을 12시간으로 하고, DNA첨가후 45°C에서 3분간 heat shock을 준 경우에 높은 형질전환이 일어났다. 형질전환된 세균으로부터 형질전환에 사용한 plasmid를 발견할 수 없었는데, 이는 도입된 plasmid가 염색체 DNA에 결합되었기 때문인 것으로 추측된다.

KEY WORDS □ Carbon monoxide, Carboxydobacteria, Plasmid, Recombinant vector, Trans-formation

일산화탄소 (CO)는 연료의 불완전 연소 등 여러가지 요인에 의해 발생하는 가장 흔한 대기 오염 물질 중의 하나인데, 이것이 대기속에 계속 축적되는 것이 아니라 여러가지 생물 또는 무생물의 활동에 의해 다른 물질로 전환됨으로써 대기중에는 거의 일정한 농도의 CO가 존재하는 것으로 보고 되었으나 (11, 32, 33, 36), 한 보고에 의하면 대기속의 CO농도가 매년 약 6%씩 증가하고 있어 인간의 활동에 의해 생성되는 CO의 양이 자연계에서 다른 물질로 전환될 수 있는 한계를 넘어서고 있음을 말해준다 (13).

토양이나 물속에 살고있는 미생물 중에는 CO를 다른 물질로 전환시켜 줄 수 있는 것들이 많이 있는데, 특히 CO를 에너지 및 탄소원으로 이용하여 성장할 수 있는 호기성 CO산화세균들 (carboxydobacteria)은 강한 독성을 나타내는 CO만으로도 성장할 수 있다는 점과 공기중으로 배출되는 폐기가스내의 CO를 이용하여 이 세균을 배양하면 단세포단백질을 얻을 수 있음은 물론, CO로 인한 대기오염도 줄일 수 있다는 점에서 관심을 모으고 있다 (17, 30, 31).

Carboxydobacteria에 대한 현재까지의 연구는 이들 세균의 생물학적 특징과 CO산화기작, CO산화를 위한 전자전달계 및 CO를 에너지원으로 이용하여 성장하기 위해 꼭 필요한 CO산화 효소 (CO dehydrogenase, CO-DH)의 물리화학적 특징에 대해 많은 해답을 주고 있지만 (14-21, 29-31), 이 세균의

CO산화에 대한 분자수준 연구는 carboxydobacteria의 하나인 *Pseudomonas carboxydovorans*의 small plasmid에 이 세균의 CO-DH 소단위 세가지 중 한가지를 변형시키는 단백질 가수분해효소의 유전자가 존재하고 있음을 밝힌 것과 (25, 26) 이 small plasmid의 제한효소지도 작성결과 (22) 및 몇가지 carboxydobacteria의 CO-DH 유전자가 plasmid에 존재할 것이라는 보고 (23)와 내열성 carboxydobacteria의 CO-DH유전자를 클로닝한 것 (5)에 불과하다.

따라서 본 연구에서는 carboxydobacteria의 CO산화 현상에 대한 분자유전학적인 연구에 꼭 필요한 genetic system의 개발을 위한 첫 단계로 대장균과 carboxydobacteria에서 복제될 수 있는 다양한 plasmid 벡터를 개발하는 한편, 이 벡터들을 carboxydobacteria내로 도입하기 위한 효과적인 방법에 대해 연구하였다.

재료 및 방법

세균 배양

P. carboxydovorans, *P. carboxydovorans* OM5, *Pseudomonas carboxydohydrogena*, *Pseudomonas carboxydoflava*, *Pseudomonas gazotropha*, *Acinetobacter* sp. strain JC1 등은 실험목적에 따라 고체 또는 액체 무기염류배지 (15) 나 LB배지를 이용하여 30°C에서 배양하고, 대장균 DH5α와 TB1은 액체 또는 고체

*Corresponding author.

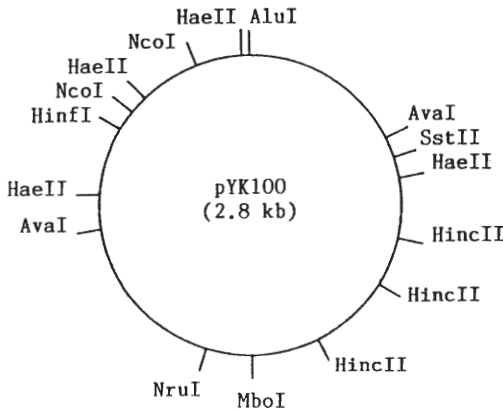


Fig. 1. Restriction map of pYK100 in *P. carboxydovorans*.

LB배지를 이용하여 37°C에서 배양하였다.

항생제 감수성 조사

여러가지 항생제 disc를 이용하여 각 항생제에 대한 *carboxydobacteria*의 감수성을 먼저 파악하고, 이를 확인하기 위해 적절한 농도의 항생제가 포함된 고체 배지에 접종시켜 관찰하였다.

Plasmid 추출

실험에서 사용할 plasmid들을 대량으로 준비하기 위해서 alkaline extraction방법 (4)으로 plasmid DNA를 추출한 후 CsCl/ethidium bromide 방법 (28)으로 순화하였다. 그리고 세균내에 존재하는 plasmid의 확인을 위하여 rapid alkaline lysis 방법 (28)으로 plasmid를 추출한 다음 agarose gel 전 기영동을 실시하여 각 plasmid의 존재를 확인하였다.

재조합 벡터 제조

*P. carboxydovorans*의 small plasmid (pYK100)의 제한효소지도 (Fig. 1)를 바탕으로, 선택된 *carboxydobacteria*가 내성을 나타내지 못하는 항생제의 유전자를 가진 여러종류의 donor plasmid를 적절한 제한효소로 절단하여 전기영동한 다음, 원하는 DNA조각을 추출, 순 화하여 small plasmid와 결합시켰는데 (28), 이때 대장균에서 복제 및 증폭을 가

능케 하기위해 ColE1 replicon도 함께 재조합 시켰다.

대장균으로의 도입 및 선별

재조합 벡터는 CaCl_2 를 이용한 형질전환방법 (27)으로 대장균 DH5 α 에 도입하고 적절한 항생제를 이용하여 선별한 다음, 그 벡터를 증폭, 분리, 순화한 후 (28) 제한효소를 이용하여 항생제 내성 marker를 가진 DNA의 삽입방향등 전체적인 구조를 파악하였다.

*Carboxydobacteria*의 형질전환방법 개발

이미 알려진 몇가지 형질전환 방법 (1, 24, 27)과 Bagdasarjan과 Timmis (1)의 방법을 변형하여 시도하였다. 변형된 방법은 예비실험결과 ("결과 및 고찰" 참조)를 바탕으로 0.2% sodium succinate가 포함된 무기염류배지에서 지수성장중기까지 진탕배양한 세균을 10 mM RbCl 대신 100 mM KCl이 첨가된 형질전환용액으로 처리하고 4°C 에서 12시간 방치하였다. DNA 처리 후 열처리하는 45°C에서 3분간 하였으며 세포벽 재생을 위해 1 ml의 0.2% succinate가 있는 액체 무기염류배지에 넣어주고 90 분간 진탕배양한 후 succinate와 적절한 항생제가 포함된 고체 무기염류배지에 도말하여 30°C에서 48-72시간 배양후 형질전환된 개체를 확인 하였다. 그리고 1 ml 당 10^8 마리의 세균이 있는 배지에 1 μg 의 DNA를 첨가하여 형질전환하였을 때 얻을 수 있는 개체 수를 형질전환율 (transformability)이라 하였다.

결과 및 고찰

항생제에 대한 감수성

*P. gazotropha*와 *P. carboxydovorans*는 조사한 다섯가지 항생제에 모두 내성을 나타냈고, *P. carboxydoxiflava*는 조사한 모든 항생제에 감수성을 나타냈으며, *P. carboxydovorans* OM5는 ampicillin, tetracycline, kanamycin 및 chloramphenicol에 감수성을 나타내었다. 또한 *P. carboxydohydrogena*는 kanamycin에 감수성을 나타냈으며, *Acinetobacter* sp. JCI는 tetracycline과 chloramphenicol에 감수성을 나타냈다 (Table 1).

Table 1. Sensitivity of *carboxydobacteria* to several antibiotics

Antibiotics ^a	<i>P. carboxydovorans</i> OM5	<i>P. carboxydohydrogena</i>	<i>P. carboxydoxiflava</i>	<i>P. carboxydovorans</i>	<i>P. gazotropha</i>	<i>Acinetobacter</i> sp. JCI
Ampicillin	—	+ ^b	— ^c	+	+	±
Tetracycline	—	+	—	+	+	—
Kanamycin	—	—	—	+	+	±
Streptomycin	±	±	—	+	+	±
Chloramphenicol	—	+	—	+	+	—

^a Antibiotics concentration; ampicillin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), tetracycline (12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), streptomycin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), kanamycin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), chloramphenicol (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

^b Resistant.

^c Sensitive.

재조합 plasmid 벡터

*P. carboxydovorans*에 존재하는 2.8 kb의 pYK100 (22)를 pBR322 및 pACYC184 plasmid중에서 *tet* 유전자의 일부를 제거한 pTS11 등과 적절한 효소를 사용하여 ampicillin 과 tetracycline에 내성을 가진 재조합 벡터 pYK322 (7.2 kb), pYK324 (7.2 kb) 와 chloramphenicol에 내성을 나타내는 pYK210 (5.2 kb), pYK220 (5.2 kb), pYK230 (5.2 kb), pYK232 (5.2 kb) 등을 만들었으며 (Fig. 2와 3), 이들은 모두 대장균 DH5 α 에서 안정되게 복제 되었다 (Fig. 4). 형질전환실험은 *P. carboxydoxflava*, *P. carboxydovorans* OM5, *Acinetobacter* sp. strain JC1을 대상으로 pYK220과 pYK322를 사용하여 실시하였다.

Carboxydobacteria의 형질전환

Carboxydobacteria의 형질전환방법을 개발하기 위한 예비실험에서 대장균에서 주로 사용 하고 있는 CaCl₂방법 (27)과 MOPS와 dimethyl sulfoxide 를 이용한 방법 (24) 및 *Pseudomonas* 속의 세균과 몇 가지 토양세균에서 사용하는 방법 (1)을 시도한 결과 Bagdasarian 과 Timmis (1)의 방법을 사용한 경우에 형질전환율이 상대적으로 높게 나타났다. 따라서 이 방법을 변형하여 더 높은 형질전환율을 얻기위해 Bagdasarian 과 Timmis (1)가 사용한 배지의 종류, 세균수확시기, 형질전환 용액내의 1가 양이온의 종류 및 농도, competent cell을 만들기 위해 형질전환용액 처리 후 4°C에서 방치하는 시간, competent cell에 첨가하는 DNA양 및 열처리 온도와 시간 등을 달리 하면서 형질전환율을 조사하였다. 그 결과 복합배지 보다 0.2% succinate가 첨가된 무기염류배지를 이용하여 지수성장 중기까지 세균을 배양하고, 형질전환 용액 내의 1가 양이온을 10 mM RbCl대신 100 mM KCl로 대체하며, 형질전환용액 처리 후 4°C에 12-16 시간 동안 방치 후 0.2 ml/의 competent cell이 포함된 용액에 1.0 μ g의 DNA를 넣어준 후 45-46°C에서 3 분간 열 충격을 주었을 때 형질전환율이 가장 높게 나타났다.

각 세균을 대상으로 기존의 세가지 형질전환 방법과 Bagdasarian과 Timmis (1)의 방법을 위와 같이 변형한 방법을 이용하여 형질전환을 시도한 결과 Bagdasariasn과 Timmis(1)의 방법중 일부를 변형한 방법이 가장 높은 형질전환율을 나타내었다 (Table 2).

형질전환 실험과정에서 DNA를 주지않고 실험한 대조군에서 복합배지를 이용한 경우 0.2% succinate 가 들어있는 액체 무기염류배지를 이용했을 때 보다 항생제에 대한 저항성 획득 개체가 더 많이 나타났다. 이러한 현상은 competency를 높이기 위하여 최소배지에서 배양한 균을 항생제가 포함된 복합배지와 최소배지에 도말하여 배양시킨 결과를 비교하여 확인한 것으로, 이는 아마도 복합배지내에 존재하는 유기물이 세균의 세포막에서 항생제 이동을 억제하는 등의 특이한 작용을 나타내기 때문이라 생각된다 (6). 그리고

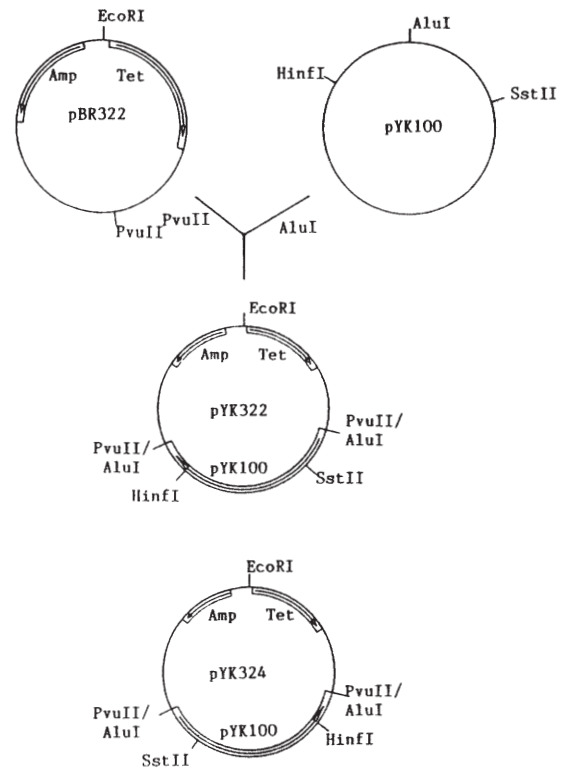


Fig. 2. Construction of recombinant plasmid vectors with pYK100 and pBR322.

항생제 내성 유전자가 있는 plasmid에 의해 형질전환된 개체를 다른 항생제가 들어있는 배지에 도말하였을 때 나타난 저항성 획득 개체는 대조군의 저항성 획득율인 10^{-8} - 10^{-9} 정도로 나타났는데, 이는 본 실험에서 사용한 형질전환방법 자체가 실험에 사용한 carboxydobacteria의 저항성을 유발시키지 않았고 또한 형질전환 실험 과정에서 plasmid DNA가 세균내로 도입되었을 때 그 자극에 의해 다른 항생제에 대한 저항성이 획득되지도 않았음을 입증해준다.

형질전환된 개체에서의 재조합벡터 검증

형질전환된 세균을 대상으로 도입된 plasmid의 존재를 확인하기위해 rapid alkaline lysis 방법 (28) 등을 사용하였으나 plasmid를 발현할 수 없었다.

이와같은 현상은 몇가지 토양 세균을 대상으로한 형질전환실험에서 밝혀진 결과들을 토대로 다음과 같이 그 원인을 추측할 수 있다. 첫째, plasmid DNA 전체가 세균내에서 염색체 DNA내로 결합되는 경우 (2), 둘째, 형질전환에 사용한 세균의 염색체 DNA의 일부 염기서열과 동일한 염기서열을 가진 plasmid를 이용하여 형질전환하였을 때 염색체 DNA와 plasmid의 일부가 cross-exchange를 일으켜 필요한 유전자는 염색체 DNA내로 들어가고 나머지 부위는 세균내의 restriction/modification계에 의해 소멸되

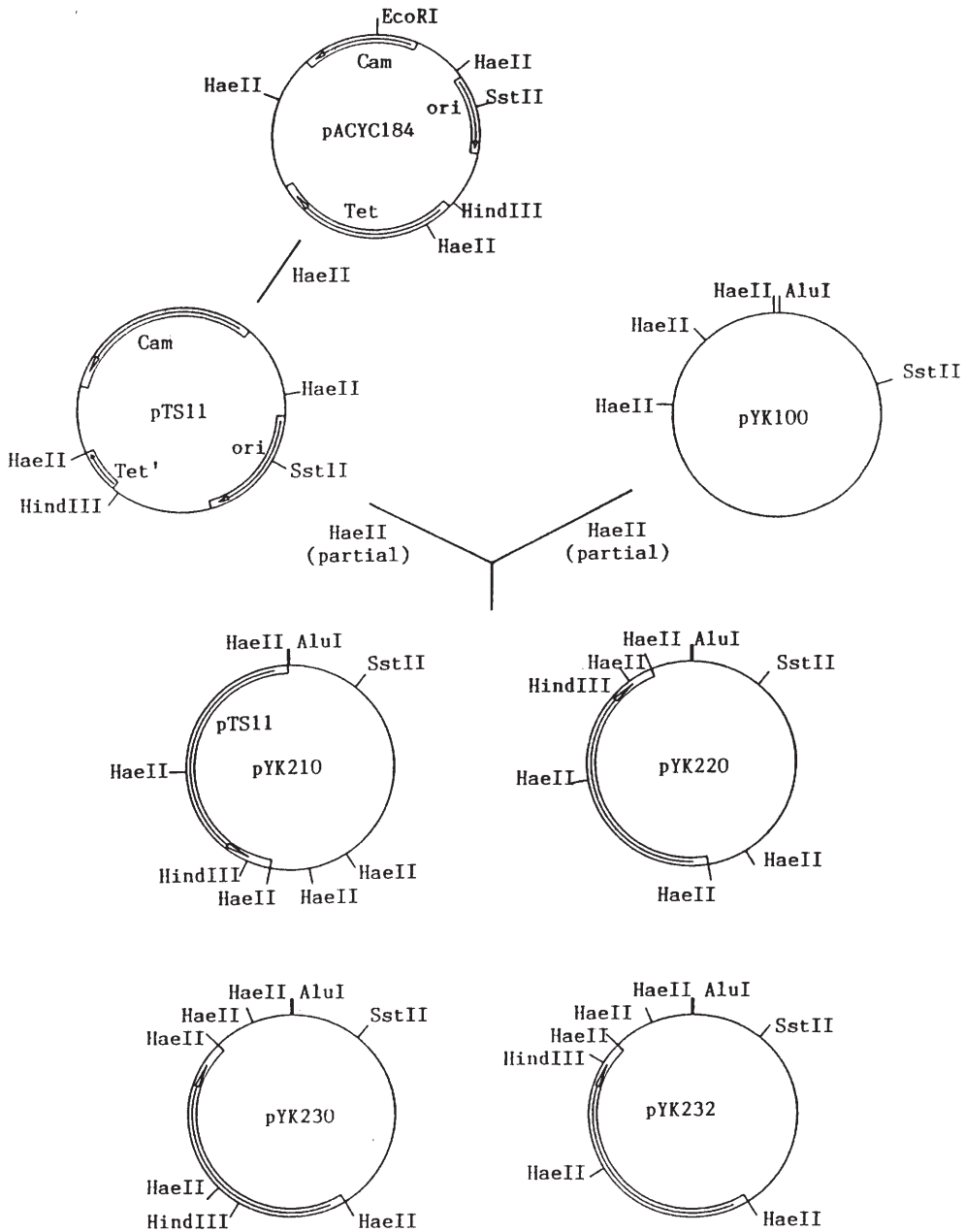


Fig. 3. Construction of recombinant plasmid vectors with pYK100 and pACYC184.

는 경우 (3, 7, 8, 10, 34, 35, 37), 세균, 유입되는 plasmid는 세균내의 restriction/modification계에 의해 소멸되지만 그 plasmid가 유입될 때의 자극으로 염색체 DNA의 pseudogene이 발현되는 경우 (12) 등이다. 본 연구에서 형질전환된 개체를 도입된 plasmid상에 있는 항생제 내성 유전자와는 별개의 항생제가 포함되어 있는 최소배지에 도달한 경우 나

타난 저항성 획득율이 대조군과 비슷하게 나타난 것으로 보아 세번째 가설은 배제할 수 있다. 그리고 본 실험에 사용한 carboxydobacteria들은 형질전환된 세균들을 찾아 내기 위해 사용한 항생제에 대해 내성을 나타내지 못하기 때문에 각 세균의 염색체 DNA에 해당 항생제에 내성을 부여하는 유전자가 존재할 가능성은 없다. 물론 해당 유전자의 돌연변이

Table 2. Transformability of carboxydobacteria with recombinant plasmid vectors under different conditions^a

Plasmid ^b	Selective marker	Recipient	Transformation condition ^c			
			A	B	C	D
None	Ap ^r , Cm ^r	<i>P. carboxydoflava</i>	4.5	8	5.1	2
		<i>P. carboxydovorans</i> OM5	36	21	18	5
		<i>Acinetobacter</i> sp. JC1	12	24	11	6
pYK220	Cm ^r	<i>P. carboxydoflava</i>	30	55	67	136.9
		<i>P. carboxydovorans</i> OM5	NT ^d	85	150	167
		<i>Acinetobacter</i> sp. JC1	NT	43	54	74
pYK322	Ap ^r	<i>P. carboxydoflava</i>	47	26	59	108.8
		<i>P. carboxydovorans</i> OM5	NT	75	165	232
		<i>Acinetobacter</i> sp. JC1	NT	39	51	66

^a Transformability represents number of transformant per 10⁸ cells per μ g of DNA added. Transformability in the absence of added DNA is an average of transformabilities obtained under ampicillin and chloramphenicol selection conditions.

^b All plasmids were purified from *E. coli* TB1.

^c A, Mandel and Higa (1970); B, Kushner (1978); C, Bagdasarian and Timmis (1982); D, modified method of Bagdasarian and Timmis (1982).

^d Not tested.



Fig. 4. Restriction enzyme digestion patterns of pYK324. The recombinant plasmid was prepared from *E. coli* DH5 α . pYK324 digested with *AluI* (a), *SstII* (b), and *AvaI* (c).

가능성은 생각해 볼 수 있겠으나 실험에 사용한 모든 세균에서 해당 유전자가 돌연변이 되었다고 가정하는 것은 무리이다. 따라서 형질전환된 세균에서 재조합 plasmid가 발견되지 않은 것은 도입된 plasmid의 전부가 염색체 DNA와 결합되었기 때문일 것임을 추측할 수 있다.

일반적으로 *Azotobacter*나 *Aspergillus*의 형질전환시에는 도입된 plasmid에 염색체 DNA의 일부 염기서열이 존재하거나 염색체 DNA와 유사성을 나타내는 부위가 있는 경우에만 DNA사이의 결합이 이루어지는 것으로 알려져 있으나 (3, 35), *Dictyostelium*이나 돌연변이된 어떤 대장균 (*E. coli* D345)의 경우에는 광범위 숙주 plasmid 벡터를 사용하였을 때에도 도입된 plasmid가 염색체 DNA와 결합한다는 보고도 있다 (9, 34).

Carboxydobacteria들은 토양에 살고 있는 세균이기 때문에 본 연구에서 재조합 벡터를 만 드는데 사용한 pBR322나 pACYC184와 동일 또는 유사한 염기서열이 이 세균들의 염색체 DNA에 존재할 가능성은 적다. 그러나 pYK100은 carboxydobacteria의 한 종류에서 유래된 것이기 때문에 이 plasmid의 염기서열중 일부가 carboxydobacteria들의 염색체 DNA의 일부 염기서열과 동일 또는 유사할 가능성이 많아 이들 간의 교차에 의해 재조합된 벡터가 염색체 DNA에 결합되었을 가능성이 높다.

세균내로 도입된 벡터가 염색체 DNA에 삽입되어 버린다면 carboxydobacteria의 CO 산화에 대한 유전자적인 연구는 큰 어려움을 겪지 않을 수 없다. 따라서 본 연구자들은 이와같은 어려움을 타개하고 carboxydobacteria의 유전자적인 연구의 돌파구를 마련하기 위해 몇 가지 carboxydobacteria를 대상으로 DNA 재조합 능력이 상실된 *recA*⁻ 돌연변이체를 만들기 위한 연구를 진행중에 있다.

감사의 글

본 연구는 1990년 교육부 유전공학연구비에 의해 수행되었습니다.

참 고 문 헌

1. Bagdasarian, M., and K.N. Timmis, 1982. Host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **96**, 47-67.
2. Barry, G.F., 1988. A broad-host-range shuttle system for gene insertion into the chromosome of Gram-negative bacteria. *Gene* **71**, 75-84.
3. Bingle, W.H., 1988. Transformation of *Azotobacter vinelandii* OP with a broad host range plasmid containing a cloned chromosomal *nif*-DNA marker. *Plasmid*, **19**, 242-250.
4. Birnboim, H.C., and J. Doly, 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.*, **7**, 1513-1523.
5. Black, G.W., C.M. Lyons, E. Williams, J. Colby, M. Kehoe, and C. O'Reilly, 1990. Cloning and expression of the carbon monoxide dehydrogenase genes from *Pseudomonas thermocarboxydovorans* strain C2. *FEMS Microbiol. Letts.*, **70**, 249-254.
6. Bron, S., and G. Venema, 1972. Ultraviolet inactivation and excision repair in *Bacillus subtilis*. I. Construction and characterization of ultraviolet-sensitive derivatives. *Mut. Res.*, **15**, 1-10.
7. Carney, B.F., L. Krockel, J.V. Leary, and D.D. Focht, 1989. Identification of *Pseudomonas alcaligenes* chromosomal DNA on the plasmid DNA of the chlorobenzene-degrading recombinant *Pseudomonas putida* strain CB1-P. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 1037-1039.
8. Carramolino, L., M. Lozano, A. Perez-Aranda, V. Rubio, and F. Sanches, 1989. Transformation of *Penicillium chrysogenum* to sulfonamide resistance. *Gene*, **77**, 31-38.
9. Cole, R.A., and K.L. Williams, 1988. Insertion of transformation vector DNA into different chromosomal site of *Dictyostelium discoideum* as determined by pulse field electrophoresis. *Nucl. Acids Res.*, **16**, 4891-4902.
10. Doran, J.L., W.H. Bingle, K.L. Roy, and W.J. Page, 1987. Plasmid transformation of *Azotobacter vinelandii* OP. *J. Gen. Microbiol.*, **133**, 2059-2072.
11. Ehhalt, D.H., 1975. In "Microbial production and utilization of gases" (H.G. Schlegel, et al., eds.), p. 23-33. E. Goltze KG, Göttingen.
12. Glick, B.R., H.E. Brooks, and J.J. Pasternak, 1986. Physiological effects of plasmid DNA transformation on *Azotobacter vinelandii*. *Can. J. Microbiol.*, **32**, 145-148.
13. Khalil, M.A.K., and K.A. Rasmussen, 1984. Carbon monoxide in earth's atmosphere: increasing trend. *Science*, **224**, 54-56.
14. Kim, Y.J., and Y.M. Kim, 1989. Induction of carbon monoxide dehydrogenase during heterotrophic growth of *Acinetobacter* sp. strain JC1 DSM 3803 in the presence of carbon monoxide. *FEMS Microbiol.*, **59**, 207-210.
15. Kim, Y.M., and G.D. Hegeman, 1981. Purification and some properties of carbon monoxide dehydrogenase from *Pseudomonas carboxydohydrogena*. *J. Bacteriol.*, **148**, 904-911.
16. Kim, Y.M., and G.D. Hegeman, 1981. Electron transport system of an aerobic carbon monoxide oxidizing bacterium. *J. Bacteriol.*, **148**, 991-994.
17. Kim, Y.M., and G.D. Hegeman, 1983. Oxidation of carbon monoxide by bacteria. *Intl. Rev. Cytol.*, **81**, 1-32.
18. Kim, Y.M., and G.D. Hegeman, 1983. Carbon monoxide as a substrate for the growth of *Pseudomonas carboxydohydrogena*. *Biodeterioration.*, **5**, 207-211.
19. Kim, Y.M., and G.D. Hegeman, 1983. Oxidation of carbon monoxide by *Pseudomonas carboxydohydrogena*. *Kor. J. Microbiol.*, **21**, 27-35.
20. Kim, K.S., Y.T. Ro, and Y.M. Kim, 1989. Purification and some properties of carbon monoxide dehydrogenase from *Acinetobacter* sp. strain JC1 DSM 3803. *J. Bacteriol.*, **171**, 958-964.
21. Kim, Y.M., S. Kirconnell, and G.D. Hegeman, 1982. Immunological relationships among carbon monoxide dehydrogenases of carboxydobacteria. *FEMS Microbiol. Letts.*, **13**, 219-223.
22. Kim, Y.M., and T.S. Song, 1989. Restriction map of a small plasmid in *Pseudomonas carboxydovorans*. *Kor. Biochem. J.*, **22**, 110-112.
23. Kraut, M., I. Hugendieck, H.I. Herwig, and O. Meyer, 1989. Homology and distribution of carbon monoxide dehydrogenase structural genes in carboxydophilic bacteria. *Arch. Microbiol.*, **151**, 335-341.
24. Kushner, S.R., 1978. An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColEI-derived plasmids. In Genetic engineering (H.B. Boyer, and S. Nicosia, eds.), p. 17. Elsevier/North-Holland, Amsterdam.
25. Kwon, M.O., I.K. Chung, and Y.M. Kim, 1986. Role of a small plasmid in the modification of carbon monoxide dehydrogenase in *Pseudomonas carboxydovorans*. *FEMS Microbiol. Letts.*, **37**, 113-116.
26. Kwon, M.O., and Y.M. Kim, 1985. Relationship between carbon monoxide dehydrogenase and a small plasmid in *Pseudomonas carboxydovorans*. *FEMS Microbiol. Letts.*, **29**, 155-159.
27. Mandel, M., and A. Higa, 1970. Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.*, **53**, 154-164.
28. Maniatis, T., F. Fritsch, and J. Sambrook, 1982. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
29. Meyer, O., 1982. Chemical and spectral properties of carbon monoxide:methylene blue oxidoreductase. *J. Biol. Chem.*, **257**, 1333-1341.
30. Meyer, O., and H. G. Schlegel, 1983. Biology of aerobic carbon monoxide oxidizing bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, **37**, 277-310.

31. Meyer, O., S. Jacobitz, and B. Krüger, 1986. Biochemistry and physiology of aerobic carbon monoxide utilizing bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, **39**, 161-179.
32. Robbins, R.C., K.M. Borg, and E. Robinson, 1968. Carbon monoxide in the atmosphere. *J. Air Pollut. Control Assn.*, **18**, 106-111.
33. Robinson, E., and R.C. Robbins, 1970. Gaseous atmospheric pollutants from urban and natural sources. In "Global effects of environmental pollution" (S.F. Singer, ed.), p. 50-64. Springer-Verlag, New York.
34. Russel, C.B., and F.W. Dahlquist, 1989. Exchange of chromosomal DNA and plasmid alleles in *Escherichia coli* by selection for loss of a dominant antibiotic-sensitive marker. *J. Bacteriol.*, **171**, 2614-2618.
35. Unkles, S.E., E.I. Campbell, D.C. Carrez, C. Grieve, R. Contreras, W. Fiers, C.A.M.J.J. Vanden Hondel, and J.R. Kinghorn, 1989. Transformation of *Aspergillus niger* with the homologous nitrate reductase gene. *Gene*, **78**, 157-166.
36. Warneck, P., 1976. The role of chemical reactions in the cycle of atmospheric trace gases, especially CH₄. In "Microbial production and utilization of gases" (H. G. Schlegel *et al.*, eds.), p. 53-62. E. Goltze KG, Göttingen.
37. Worrell, V.E., D.P. Nagle Jr., D. McCarthy, and A. Eisenbraun, 1988. Genetic transformation system in the archaeobacterium *Methanobacterium thermoautotrophicum* Marburg. *J. Bacteriol.*, **170**, 653-656.

(Received May 10, 1992)

(Accepted May 25, 1992)

ABSTRACT: Development of Recombinant Plasmid Vectors and Transformation Method for Carboxydobacteria

Jin Wook Kim, Taek Sun Song¹ and Young Min Kim (Department of Biology, Yonsei University, Seoul 120-749, and Department of Biological Science, ¹Korea Advanced Institute of Science and Technology, Taejeon 305-701, Korea)

Recombinant plasmid shuttle vectors were constructed for genetic studies on the oxidation of carbon monoxide by carboxydobacteria. Two vectors, pYK322 (7.2 kb, Ap^r, Tc^r) and pYK324 (7.2 kb, Ap^r, Tc^r), were constructed using pBR322 and pYK100, a small plasmid in *Pseudomonas carboxydovorans*. Four plasmids, pYK210 (5.2 kb, Cm^r), pYK220 (5.2 kb, Cm^r), pYK230 (5.2 kb, Cm^r), and pYK232 (5.2 kb, Cm^r), were constructed using pACYC184 and pYK100. Transformation of several carboxydobacteria with pYK322 and pYK220 was found to be efficient when the cells were transformed by the method of Bagdasarian and Timmis (Curr. Top. Microbiol. Immunol. **96:47-67**, 1982) with several modifications; cells growing on 0.2% succinate were harvested at the mid-exponential phase, 10 mM RbCl in transformation solution was substituted with 100 mM KCl, cells in transformation solution were incubated for 12 h at 4°C before addition of DNA, and heat shock was carried out for 3 min at 45°C. Plasmid vectors used for transformation, however, were not detected from antibiotics-resistant transformants, suggesting that the vectors may be integrated into the chromosomal DNA.