

## Plasmid pSL100의 curing, segregation 및 segregants 들의

### 재조합에 관한 연구

백형석 · 김국찬 · 이세영

(고려대학교 농과대학 농화학과)

## Curing and segregation of pSL100 and recombination of its segregants

BAIK, Hyung Suk, Kuk Chan KIM, and Se Yong LEE

(Dept. of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, Korea University)

### ABSTRACT

A study was undertaken to examine the effect of curing agents on the stability, curing and segregation of R plasmid pSL100. And also the stability, transfer frequency, and recombination of its segregants obtained from curing agent treatment were studied. Ethidium bromide, acridine orange, and mitomycin-C were used as curing agent.

The results obtained were as follows:

1. The curing agent ethidium bromide, acridine orange, and mitomycin-C were not effective for curing the multiple antibiotic resistant determinant of pSL100 in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. However, they induced plasmid segregation with high frequency in *S. typhimurium* LT-2 strains. TcApSmCm, TcSmCmKm, TcApCm, TcAp, TcKm, Tc segregants were obtained.
2. The resistant markers of the segregants were transferred to *S. typhimurium* LT-2 strains with high frequencies whereas they were transferred to *E. coli* K-12 only with low frequencies.
3. The transconjugants obtained from conjugation between two different *S. typhimurium* segregants were similar to the phenotype of the original R factor pSL100 and the resistant markers were transferred to the *S. typhimurium* LT-2 or *E. coli* strain with equal frequencies, indicating that they are recombinants.
4. The transconjugants obtained from conjugation between pSL100 segregants and pKM101, or pBR322 possessed the resistant markers of the two parental plasmids and they were transferred to both *S. typhimurium* and *E. coli* K-12 strains with the same frequencies and maintained stably, suggesting that they are also recombinants.
5. The recombinant pSL100 could be also obtained in *rec A*-strains of *E. coli*, suggesting that the gene function of *rec A* is not required for the recombination of pSL100 segregants in *E. coli*.

緒 論

Bacteria에 기생하는 plasmid는 독립적으로 복제하는 replicon으로 숙주내에서의 이들의 안정성은 replication과 recombination에 의해서 좌우된다. 큰 plasmid 들에서는 deletion과 transposition이 빈번히 관찰되며 숙주 chromosome과도 recombination이 일어날 수 있다. (Cohen, *et al.*, 1980). DNA가 숙주 DNA에 특이적으로 insertion되거나 deletion 될 때, 또는 plasmid 간의 recombination이 이루어질때 숙주 chromosome과 plasmid상의 많은 유전인자가 관여한다고 알려져 있으며 이들 유전인자들 중에는 돌연변이 유발원에 의한 DNA의 손상복구나 돌연변이에 관여하는 유전인자들과 공통적인 것들도 많다고 추측되고 있다(Siccardi, 1969; Mortelmans, 1975). 그리고 plasmid가 가끔 자발적으로 혹은 화학물질 처리에 의하여 그 일부분이 삭제되는 수가 있는데 이것도 일종의 genetic recombination에 의하여 일어난다고 생각되며 deletion에

화학물질에 의하여 일어나는 것으로 알려져 있다(Hahn, *et al.*, 1974).

본 실험에서는 하수로부터 분리한 항생제 다저항성을 가진 R plasmid pSL100에 plasmid를 curing시키는 물질로 알려진 ethidium bromide, acridine orange, mitomycin-C를 처리하여 숙주에 다른 pSL100의 curing과 segregation(deletion)을 조사하였고 segregant 들을 *recA*<sup>-</sup> 균주에서 recombination시켰다. 또한 pSL100에서 얻어진 segregant들과 다른 plasmid들 (pKM101, pBR322)간의 recombination도 시도하였다.

材料 및 方法

1. 균 주

본 실험에 사용된 균주는 다음과 같다(Table 1).  
 2. 하수로부터 분리한 균주에서 R plasmid의 분리  
 보존천으로부터 채취한 시료를 적당히 희석하여 아래와 같은 series로 항생제를 첨가한 MacConkey-Lactose agar plate에 접종하였다.

(1) Cm+Km+Tc

Table 1. List of bacterial strains used

Strain designation	Phenotype	Genotype chromosome/plasmid	Derivation Source
JH1	Ap <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup> *	/pHK100	from sewage
JH2	Ap <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>	/pSL100	from sewage
JH3	Ap <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>	/pHK200	from sewage
CSH52	Ara <sup>-</sup> Pro <sup>-</sup> Str <sup>-</sup> Bl <sup>-</sup>	<i>ara</i> Δ ( <i>lacpro</i> ) <i>strA</i> <i>thi</i> ( <i>φ80 dlac</i> <sup>+</sup> ) <i>recA</i>	
NG30	Arg <sup>-</sup>	<i>argHamb recA tonB phr</i>	
CSH56		<i>ara</i> Δ ( <i>lacpro</i> ) <i>supD nalA thi</i>	<i>E. coli</i> K-12
G46	His <sup>-</sup>	<i>his</i> (base substitute)	<i>S. typhimurium</i>
TA100	His <sup>-</sup>	<i>hisG46 uvrBrfa</i> /pKM101	B.N. Ames
CP18	His <sup>-</sup> Ap <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>	<i>hisG46</i> /pSL100	conjugation CP21/G46
CP21	CSH56 Ap <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>	CSH56/pSL100	conjugation JH2/CSH56
HB294	Thr <sup>-</sup> Leu <sup>-</sup> Thi <sup>-</sup> R <sup>-</sup> M <sup>-</sup> Phe <sup>-</sup>	/pBR322	

\*The abbreviations Ap<sup>r</sup>, Cm<sup>r</sup>, Km<sup>r</sup>, Sm<sup>r</sup>, and Tc<sup>r</sup> represent resistance marker to ampicillin, chloramphenicol, kanamycin, streptomycin, and tetracycline, respectively.

의한 돌연 변이 유발과 같은 기작으로 일어난다고 생각되고 있다(Cohen, 1976; Cohen, *et al.*, 1980). Plasmid를 전부 잃거나(curing) 또는 부분적으로 잃는 (segregation) 또 하나의 기작은 plasmid 복제가 저해를 받는 것인데 여러가지

(2) Ap+Km+Sm

(3) Cm+Km--Sm+Tc

(4) Ap+Cm+Km+Sm+Tc

각 series에서 항생제의 농도는 각각 12.5μg/ml였으며 series(4)에서 자란 두 균주 JH1과 JH2

및 series (3)의 JH3균주를 분리하여 *E. coli* K-12 CSH56을 recipient로 하여 conjugation 시켜 transconjugant를 얻었는데 이들 중 JH2가 가지고 있는 plasmid를 pSL100으로 명명하였다.

**3. 배지 및 시약**

배지로부터 분리한 coliform bacteria 중 여러 가지 유전표시의 R plasmid를 지닌 균주를 분리하기 위하여 Difco제 MacConkey-Lactose agar를 사용하였으며 항생제 내성을 지니는 donor와 내성을 지니지 않는 recipient를 conjugation시켜 donor의 내성 marker가 전달된 conjugant를 선택적으로 분리하기 위하여 지시배지로 tetrazolium galactose 배지를 사용하였고 (Lederberg, 1948) minimal medium으로는 영양요구 물질이 첨가되는 Vogel-Bonner citrate medium을 사용하였다(Vogel, *et al.*, 1956).

**4. R plasmid의 curing agent에 의한 curing 검정방법**

실험과정은 Hirota (1960)의 방법을 보완한 Watanabe(1961b)의 방법에 따랐다. 우선 curing agent에 대한 최소저해농도(minimal inhibitory concentration)를 결정하여 curing이 최대로 되는 sublethal concentration을 정한다음 R plasmid를 지닌 박테리아를 Ap, Cm, Km, Sm, Tc (각각 12.5 $\mu$ g/ml)이 들어있는 nutrient agar에 streak하여 37°C에서 overnight culture 한후 single colony를 백금이로 따서 nutrient broth에 시험하고자하는 농도의 curing agent가 첨가된 시험관에 약 10<sup>4</sup> cell을 지니는 박테리아 배양액 0.1 ml를 접종하였다. 이 접종된 배양액을 생리식염수로 희석하여 0.1ml를 nutrient agar에 plating 하고 37°C에서 하루밤 배양한 후 colony를 세어 50~100개 정도의 colony 수를 나타내는 plate를 master plate로 하여 Ap, Cm, Km, Sm, Tc를 함유한 nutrient agar에 replica를 찍어 배양시킨뒤 replica를 찍어 자라지 않은 colony를 항생제를 각각 넣은 nutrient agar에서의 성장여부를 조사하여 curing 및 segregation pattern을 조사하였다.

**5. R factor의 전달 및 안정성 검토**

(1) R factor의 전달 및 conjugant의 식별

항생제 내성을 나타내는 R plasmid를 지니는 균주를 donor로 항생제 내성을 지니지 않는 균

주를 recipient로 하여 각각의 유전적 marker를 확인하여 broth culture한 배양액을 donor는 0.1 ml를 recipient는 1ml를 nutrient broth 9ml에 섞어 37°C에서 24시간 정치 배양 시킨후 이 혼합배양액을 conjugant만 자랄 수 있도록 조제한 선택배지에 접종하였다(Watanabe, 1961a). *S. typhimurium* LT-2 균주사이에서의 R factor가 전달된 균주를 선택적으로 분리하기 위하여 donor와 conjugant가 육안으로 식별될 수 있는 tetrazolium galactose 배지를 사용하였다. 이 배지에서는 Gal<sup>-</sup> 균주가 암적색으로 보이며 Gal<sup>+</sup> 균주는 백색의 papillae로 나타나므로 이 지시배지에 donor가 내성을 지니는 항생제를 첨가하여 donor의 marker가 전달된 conjugant를 분리하였다. 이 이외에도 agar plate 상에서 R factor의 전달이 일어날 수 있는 spot mating (Miller, 1972) 및 replica mating (Lederberg, 1952) 방법으로도 일부 시도하였다.

(2) 전달된 R plasmid의 안정성 검토

전달된 R plasmid가 어느 정도의 안정성을 지니는가를 관찰하기 위하여 앞의 4항에서 열거한 curing 방법과 마찬가지로 화학물질을 첨가하지 않은 조건에서 유전적 안정성을 조사하였다.

**結果 및 考察**

**1. Ethidium bromide에 의한 pSL100의 curing 및 segregation**

Intercalating agent인 ethidium bromide는 acridine dye와 함께 plasmid curing agent로 알려져 있으며, plasmid의 유전인자를 확인하는데 널리 이용되어 왔다(Tomchick, *et al.*, 1964; Bouanchaud, *et al.*, 1969).

Cunirg의 기작은 아직 정확히 알려져 있지 않지만 supercoil의 conformation을 갖는 plasmid에 더 잘 결합한다는 점으로 보아 DNA 3차구조와 관련이 있을 것으로 생각되며 plasmid에 결합하여 plasmid DNA 복제에 어떠한 영향을 미치고 그 중에서도 initiation과 밀접하게 연관되어 있을 가능성이 크다(Rowbury, 1978).

그런데 ethidium bromide는 plasmid의 종류에 따라 작용을 미치지 않거나 그렇지 않은 경우도 있

고 또 미미한 정도의 효과만을 나타내기도 하고, 때로는 어느 특정한 표현형만 높은 빈도로 제거하는 경우도 있다(Hahn, *et al.*, 1974).

본 실험에서 intercalating agent 중에서 특히 ethidium bromide (phenanthridine 유도체)가 선택된 것은 ethidium bromide가 DNA에 결합하는 정도가 DNA의 3차구조에 따라 달라져서 DNA가 선상(linear form)일때가 환상(circular form)일 때보다 더 많이 결합하며, 저농도에서는 supercoil 구조를 가진 환상의 DNA에 supercoil 구조를 가지지 않는 선상의 DNA에 대해서 보다 더 많이 결합한다는 사실이 보고되고 있어(Hudson, *et al.*, 1967) 이는 plasmid 복제시에 frameshift형 돌연변이때 처럼 DNA 염기의 절가 혹은 결실이 일어날 것이라고 생각되기 때문이다.

*S. typhimurium* LT-2 G46에 있어서 pSL100의 curing과 segregation pattern을 보기 위하여 CP18 균주를 ethidium bromide로 처리하여 Table 2.에서 보는 바와 같은 결과를 얻었다.

pKM101과는 달리(Lee, *et al.*, 1980) pSL100은 *S. typhimurium*에서 curing이 잘 일어나지 않았으며 대신에 pSL100 plasmid의 여러 segregant가 일어났다. 마찬가지로 방법으로 *E. coli* K-12 CSH56에 있어서 pSL100의 curing과 segregation을 보기 위하여 CP21 균주에 ethidium bromide를 처리하여 Table 3.과 같은 결과를 얻었는데 *E. coli* K-12에서도 마찬가지로 ethidium bromide에 의한 curing이 일어나지 않았으며 *S. typhimurium* LT-2에서와는 달리 segregant도 거의 관찰되지 않았다.

이러한 결과는 plasmid의 curing과 segregation에 있어서 curing agent뿐만 아니라 plasmid

**Table 2.** Curing and segregation of pSL100 in *Salmonella typhimurium* LT-2 G46 by ethidium bromide

Conc. of EB (M)	Survivors (cells/ml)	No. of colonies tested	Cured colonies	Segregated colonies
0	$5.66 \times 10^8$	464	0	14
$2 \times 10^{-4}$	$1.39 \times 10^7$	538	0	49
$5 \times 10^{-4}$	$5.0 \times 10^6$	607	0	41
$10^{-3}$	$1.98 \times 10^2$	79	0	3

의 종류와 숙주도 큰 영향을 미친다는 사실을 입증하는 것이다.

**Table 3.** Curing and segregation of pSL100 in *E. coli* K-12 CSH56 by ethidium bromide

Conc. of EB (M)	Survivors (cells/ml)	No. of colonies tested	Cured colonies	Segregated colonies
0	$2.87 \times 10^8$	297	3	0
$2 \times 10^{-4}$	$5.84 \times 10^6$	200	0	0
$5 \times 10^{-4}$	$4.84 \times 10^4$	268	0	1*
$10^{-3}$	N.G.	—	—	—

\*Tc<sup>r</sup> segregant

N.G.: no growth

## 2. 다른 curing agent들에 의한 pSL100의 curing과 segregation

Ethidium bromide에 의해서 pSL100의 curing이 일어나지 않았으므로 다른 curing agent들에 의한 효과를 조사하였다.

Curing agent로는 acridine dye들(acridine orange, 9-aminoacridine, 5-aminoacridine 등), mitomycin-C, sodium dodecyl sulfate, penicillin marcarbomycin, flavomycin, ultraviolet, nalidixic acid, phenethyl alcohol, trimethoprim 등이 보고되어 있는데(Hahn, *et al.*, 1974) 본 실험에서는 DNA strand사이에 crosslinking을 일으키는 mitomycin-C와 DNA염기쌍 사이에 삽입되어 frameshift 돌연변이를 일으키는 acridine orange를 사용하였다. Table 4.와 Table 5.는 각각 *S. typhimurium* LT-2 G46과 *E. coli* K-12 CSH56에 있어서 pSL100 plasmid의 mitomycin-C에 의한 curing과 segregation을 관찰한 실험결과인데 여기에서도 ethidium bromide의 경우와 마찬가지로 두 균주에서 모두 curing이 일어나지 않았고 segregation은 *E. coli* K-12에서 보다 *S. typhimurium*에서 훨씬 많이 일어났다. 이들 *S. typhimurium* LT-2 CP18의 segregant들은 거의가 단독 저항성을 갖고 있었다.

Acridine orange로서도 ethidium bromide나 mitomycin-C의 경우와 거의 비슷한 결과를 얻었다(Table 6., Table 7.).

Plasmid R100(NR1)이나 R6, ColEI 등도 acridine dye에 의해서 curing이 되지 않는다는 보고들이 있다(Tomoeda, *et al.*, 1968; Rowbury,

1978).

**Table 4.** Curing and segregation of pSL100 in *Salmonella typhimurium* LT-2 G46 by mitomycin-C

Conc. of MT-C(M)	Survivors (cells/ml)	No. of colonies tested	Cured colonies	Segregated colonies
0	$5.72 \times 10^8$	184	0	7
$1.25 \times 10^{-7}$	$1.24 \times 10^8$	248	0	11
$2.5 \times 10^{-7}$	$2.77 \times 10^7$	166	0	19
$5 \times 10^{-7}$	$1.07 \times 10^7$	159	0	25

**Table 5.** Curing and segregation of pSL100 in *E. coli* K-12 CSH56 by mitomycin-C

Conc. of MT-C(M)	Survivors (cells/ml)	No. of colonies tested	Cured colonies	Segregated colonies
0	$3.89 \times 10^8$	389	0	0
$1.25 \times 10^{-7}$	$9.13 \times 10^7$	279	0	6
$2.5 \times 10^{-7}$	$7.52 \times 10^7$	273	0	3
$5 \times 10^{-7}$	$3.57 \times 10^7$	357	0	0

**Table 6.** Curing and segregation of pSL100 in *Salmonella typhimurium* LT-2 G46 by acridine orange

Conc. of AO ( $\mu\text{g/ml}$ )	Survivors (cells/ml)	No. of colonies tested	Cured colonies	Segregated colonies
0	$2.7 \times 10^8$	248	0	8
2.5	$2.5 \times 10^8$	162	0	8
5	$1.92 \times 10^8$	192	0	5
10	$1.29 \times 10^8$	517	0	8
20	$1.86 \times 10^8$	437	0	6

**Table 8.** List of CP18 segregants obtained from curing agents

Strain designation	Drug resistance marker	Genotype chromosome/plasmid	Derivation	Source
CP181	ApCmSmTc	<i>hisG46/pSL101</i>	Spontaneous segregation	CP18
CP182	ApCmSmTc	<i>hisG46/pSL102</i>	EB curing	CP18
CP183	ApCmSmTc	<i>hisG46/pSL103</i>	EB curing	CP18
CP184	ApCmSmTc	<i>hisG46/pSL104</i>	AO curing	CP18
CP185	ApCmSmTc	<i>hisG46/pSL105</i>	AO curing	CP18
CP186	KmTc	<i>hisG46/pSL106</i>	Spontaneous segregation	CP18

**Table 7.** Curing and segregation of pSL100 in *E. coli* K-12 CSH56 by acridine orange

Conc. of AO ( $\mu\text{g/ml}$ )	Survivors (cells/ml)	No. of colonies tested	Cured colonies	Segregated colonies
0	$3.5 \times 10^8$	172	0	0
2.5	$3.3 \times 10^8$	198	1	0
5	$2.15 \times 10^8$	430	0	0
10	$9.83 \times 10^7$	393	0	1*
40	$2.91 \times 10^6$	541	0	0

\*Tc<sup>r</sup> segregant

**3. pSL100 및 curing agent 처리에 의해 얻어진 segregant들의 안정성 및 전달성**

R factor를 지닌 각 균주의 항생제의 내성 정도는 통상 Cm, Tc는  $25 \mu\text{g/ml}$ 의 농도로 사용하지만 본 실험실에서는 Tc는  $50 \mu\text{g/ml}$  정도로 사용하여야 분간이 명확하였으며, Ap는  $50 \mu\text{g/ml}$  까지 생장에 별 영향이 없었으나 Sm은  $30 \mu\text{g/ml}$  에서도 약간의 저해를 받았다. 하수로부터 분리한 pSL100 plasmid의 spontaneous segregant가 *S. typhimurium*에서 빈번히 관찰되었고 segregation pattern을 보면 Table 8.에서 보는 바와 같이 대부분의 Tc segregant 이외에 ApCmSmTc marker를 가진 segregant와 KmTc marker를 가진 두 가지 유형의 segregant가 얻어졌다. 이러한 결과는 Su, Sm, Cm factor는 가장 빈번히 상실되고 Tc의 상실은 잘 일어나지 않으며 R factor의 전부 상실 즉 curing은 아주 낮은 빈도로 일어난다는 Watanabe. *et al.*, (1962)의 보고와도 거의 일치하였다.

본 논문에서는 pSL100의 curing agent 처리시

얻어진 segregant들의 안정성 및 남아있는 resistance marker의 *S. typhimurium* LT-2 및 *E. coli* K-12에로의 transfer frequency 및 stability 등을 관찰한 바 Table 9, Table 10에서 보는 바와 같이 *S. typhimurium* LT-2에서 ApCmSmTc marker를 가진 segregant들의 경우에는 1.1~2.5%의 spontaneous segregation frequency를 나타내었으나 KmTc나 KmSmTc marker를 지닌 segregant들의 경우에는 spontaneous segregation 이 일어나지 않았으며, Table 11과 Table 12에서 보는 바와 같이 CP18 segregant들의 내성 marker는 *S. typhimurium* LT-2에로는 높은 빈도로 전달된데 반하여 *E. coli* K-12에로는 낮은 빈도로 전달되었다.

한편 2가지 유형으로 나타난 분리개체 즉 KmSmTc marker를 지니는 segregant와 ApCmSmTc marker를 지니는 segregant들을 conjugation 시킨 결과 원래의 pSL100이 지니는 resistance marker (ApCmKmSmTc)를 나타내었다(Table 13).

또한 TcKmCmSm marker를 지니는 CP18 균주와 Ap에 저항성을 가진 plasmid pKM101이 들어있는 *S. typhimurium* TA100균주를 conjugation

**Table 9.** Spontaneous segregation of CP18 segregants obtained from curing agents

Strain designation	Survivors (cells/ml)	No. of tested colonies	Tc <sup>r</sup> segregant	Segregation frequency(%)
CP181	$3.61 \times 10^8$	532	6	1.13
CP182	$2.83 \times 10^8$	424	5	1.18
CP183	$3.02 \times 10^8$	302	4	1.32
CP184	$3.35 \times 10^8$	335	4	1.19
CP185	$3.07 \times 10^8$	307	4	1.30
CP186	$2.82 \times 10^8$	568	0	0

**Table 10.** Spontaneous segregation of transconjugants

Transconjugant	No. of trans conjugant (cells/ml)	No. of colonies tested	Tc segregants	Segregation frequency(%)
CP101	$1.66 \times 10^8$	572	8	1.4
CP102	$1.38 \times 10^8$	1,162	24	2.1
CP103	$1.68 \times 10^8$	566	6	1.1
CP104	$1.56 \times 10^8$	530	9	1.7
CP105	$1.57 \times 10^8$	536	14	2.6
CP106	$1.19 \times 10^8$	434	11	2.5
CP107	$1.18 \times 10^8$	324	0	0

**Table 11.** Transfer of resistance factors from CP18 segregants to CP10

Donor	Recipient	Transfer frequency	Counter selection marker	Strain designation of transconjugant
CP180	CP10	$1.35 \times 10^{-1}$	ApCmSmTcGal <sup>-</sup>	CP101
CP181	CP10	$2.15 \times 10^{-2}$	ApCmSmTcGal <sup>-</sup>	CP102
CP182	CP10	$7.46 \times 10^{-3}$	ApCmSmTcGal <sup>-</sup>	CP103
CP183	CP10	$4.69 \times 10^{-3}$	ApCmSmTcGal <sup>-</sup>	CP104
CP184	CP10	$1.89 \times 10^{-2}$	ApCmSmTcGal <sup>-</sup>	CP105
CP185	CP10	$9.67 \times 10^{-3}$	ApCmSmTcGal <sup>-</sup>	CP106
CP186	CP10	$5.47 \times 10^{-2}$	KmSmTcGal <sup>-</sup>	CP107

**Table 12.** Transfer of resistance factors from CP18 segregants to *E. coli* K-12

Donor	Recipient	Transfer frequency	Counter selection marker	Strain designation of transconjugant
CP181	CSH56	$<10^{-7}$	ApCmSmTcPro <sup>-</sup>	CP211
CP182	CSH56	$<10^{-7}$	ApCmSmTcPro <sup>-</sup>	CP212
CP183	CSH56	$<10^{-7}$	ApCmSmTcPro <sup>-</sup>	CP213
CP184	CSH56	$<10^{-7}$	ApCmSmTcPro <sup>-</sup>	CP214
CP185	CSH56	$<10^{-7}$	ApCmSmTcPro <sup>-</sup>	CP215
CP186	CSH1	$<10^{-2}$	KmSmTc	CP216

**Table 13.** Transfer of resistance factor from CP186 to other segregants

Donor	Recipient	Transfer frequency	Counter selection marker	Strain designation of transconjugant
CP186	CP181	$<10^{-7}$	ApCmSmKmHis <sup>-</sup>	CP1801
CP186	CP182	$<10^{-7}$	ApCmSmKmHis <sup>-</sup>	CP1802
CP186	CP183	$<10^{-7}$	ApCmSmKmHis <sup>-</sup>	CP1803
CP186	CP184	$<10^{-7}$	ApCmSmKmHis <sup>-</sup>	CP1804
CP186	CP185	$<10^{-7}$	ApCmSmKmHis <sup>-</sup>	CP1805

시킨 결과 ApKmCmSmTc marker를 지닌 *S. typhimurium* 균주를 selection할 수 있었으며 Tc KmCmSm marker를 지니는 CP18 segregant와 Ap와 Tc에 저항성을 가진 plasmid pBR322가 들어있는 HB294 균주를 conjugation시킨 결과 Ap KmCmSm marker를 지닌 *E. coli* 균주를 selection할 수 있었다(Table 14).

**Table 14.** Transfer of resistance factors from CP18 segregant(TcKmCmSm) to HB 294, TA100

Donor	Recipient	Transfer frequency	Counter selection marker
CP18	HB294	$2 \times 10^{-8}$	ApKmCmSmTc
CP18	TA100	$5 \times 10^{-7}$	ApKmCmSmTc

한편 segregant들의 conjugation에 의해 원래의 pSL100이 지니는 resistant marker (ApCm KmSmTc)를 나타내는 균주를 selection하여 이들을 *E. coli* K-12균주인 CSH52로 transfer시켜 transfer frequency와 segregation pattern을 원래의 pSL100과 비교하였다(Table 15). CP21균주의 plasmid pSL100을 *E. coli* K-12균주인 CSH52균주에 transfer시킬때의 transfer frequency는  $3.3 \times 10^{-1}$ 로 대단히 높은 편이었으나 CP2101~CP2105균주의 plasmid를 CSH52균주에 transfer시킬때의 transfer frequency는 1/10이하로 낮아졌다. 그리고 각 plasmid들을 CSH52균주에 도입시킬때에 원래의 segregant로도 전혀 관찰되지 않았다. 즉 CP2101~CP2105 균주들의 plasmid는 2개의 각기 다른 plasmid의 도입으로 형성되어진 것이었는데 이들이 만약 독립적으로 host내에 공존한다면 KmSmTc에 저항성을 가진 plasmid와 ApCmSmTc에 저항성을 가지는 plasmid가 서로 다른 transfer frequency로 transfer

될 것이며 원래의 segregant로의 segregation도 관찰될 것으로 기대되었으나 결과가 전혀 그렇지 않은 것으로 보아 CP2101~CP2105균주에 존재하는 plasmid들은 원래의 segregant KmSmTc<sup>r</sup>와 ApCmSmTc<sup>r</sup>의 recombinant라고 생각할 수 있으며 *E. coli* BH294균주와 *S. typhimurium* TA 100균주에서도 같은 결과를 얻었으므로 recombinant라는 것을 더욱 확실하게 나타내는 것이라 생각할 수 있었다.

**Table 15.** Transfer of resistance factor from CSH56 to CSH52

Donor	Recipient	Transfer frequency	Phenotype of transconjugant
CP21	CSH52	$3.3 \times 10^{-1}$	ApCmKmSmTc
CP2101	CSH52	$5.6 \times 10^{-2}$	ApCmKmSmTc
CP2102	CSH52	$1.7 \times 10^{-2}$	ApCmKmSmTc
CP2103	CSH52	$1.1 \times 10^{-2}$	ApCmKmSmTc
CP2104	CSH52	$1.4 \times 10^{-2}$	ApCmKmSmTc
CP2105	CSH52	$5.8 \times 10^{-3}$	ApCmKmSmTc

*recA* 유전인자가 이들 plasmid의 transfer와 recombination에 미치는 영향을 조사하기 위하여 *recA*<sup>-</sup>균주인 CSH52와 NG30에 CP186균주의 resistance marker인 KmTc를 conjugation에 의하여 전달시킬 때의 빈도는 Table 16. 과 같았다. 이때 얻어진 CSH52균주에 KmTc marker가 도입된 균주(CP5206), 그리고 NG30균주에 KmTc marker가 도입된(CP3006) 균주에 각각 CP181~CP185(ApCmSmTc) 균주를 conjugation시켜 ApKmCmSmTc의 marker를 가진 conjugant를 selection할때의 빈도는 Table 17, Table 18과 같았다. 그리고 CSH52와 NG30균주에 KmTc marker가 conjugation으로 전달될 때의 빈도는 각각  $3.5 \times 10^{-3}$ ,  $3.9 \times 10^{-4}$ 이었으나, CSH52균주

**Table 16.** Transfer of resistance factor from CP186 to CSH52 and NG30

Donor	Recipient	Transfer frequency	Counter selection marker	Strain designation
CP186	CSH52	$3.5 \times 10^{-3}$	KmTcPro <sup>-</sup>	CP5206
CP186	NG30	$3.9 \times 10^{-4}$	KmTcArg <sup>-</sup>	CP3006

**Table 17.** Transfer of resistance factors from CP18 segregants to CP5206

Donor	Recipient	Transfer frequency	Counter selection marker	Strain designation
CP181	CP5206	$4 \times 10^{-7}$	ApKmCmSmTcPro <sup>-</sup>	CP5201
CP182	CP5206	$4 \times 10^{-7}$	ApKmCmSmTcPro <sup>-</sup>	CP5202
CP183	CP5206	$1 \times 10^{-6}$	ApKmCmSmTcPro <sup>-</sup>	CP5203
CP184	CP5206	$7 \times 10^{-8}$	ApKmCmSmTcPro <sup>-</sup>	CP5204
CP185	CP5206	$4 \times 10^{-7}$	ApKmCmSmTcPro <sup>-</sup>	CP5205

**Table 18.** Transfer of resistance factors from CP18 segregants to CP3006

Donor	Recipient	Transfer frequency	Counter selection marker	Strain designation
CP181	CP3006	$7 \times 10^{-8}$	ApKmCmSmTc Arg <sup>-</sup>	CP3001
CP182	CP3006	$1 \times 10^{-7}$	ApKmCmSmTc Arg <sup>-</sup>	CP3002
CP183	CP3006	$8 \times 10^{-8}$	ApKmCmSmTc Arg <sup>-</sup>	CP3003
CP184	CP3006	$1 \times 10^{-8}$	ApKmCmSmTc Arg <sup>-</sup>	CP3004
CP185	CP3006	$1 \times 10^{-7}$	ApKmCmSmTc Arg <sup>-</sup>	CP3005

와 NG30 균주에 ApCmSmTc marker를 전달할 때의 빈도는 상당히 낮았다. 이는 CP186과 CP181~CP185의 conjugation에 의한 재조합의 경우와 비슷하였다. CSH52와 NG30에서 얻어진 원래의 pSL100이 지니는 resistance phenotype(ApCmKmSmTc)와 같은 균주를 conjugation으로 CSH56(*recA*<sup>+</sup>)으로 전달할 때의 빈도는 Table 19. 와 같았다.

**Table 19.** Transfer of resistance factor from CSH52 transconjugant to CSH56

Donor	Recipient	Transfer frequency	Phenotype of transconjugant
CP5201	CSH56	$2.8 \times 10^{-5}$	ApCmKmSmTc
CP5202	CSH56	$2.1 \times 10^{-3}$	ApCmKmSmTc
CP5203	CSH56	$2.5 \times 10^{-3}$	ApCmKmSmTc
CP5204	CSH56	$1.5 \times 10^{-3}$	ApCmKmSmTc
CP5205	CSH56	$1.1 \times 10^{-5}$	ApCmKmSmTc

이런 결과로 미루어보아 이들 plasmid간의 recombination과 transfer에는 *recA*의 기능이 요구되지 않는다고 해석할 수 있다.

지금까지 알려진 R plasmid에 대한 보고에 의하면 전혀 별개의 지역에서 분리된 여러종의 plasmid가 상당히 유사한 결정인자(r-determinant)로 구성되어 있는 것으로 알려졌다. 보통 Tc<sup>r</sup> 결정인자는 RTF(resistance transfer factor)에 transposon으로 존재하고 있는 Sm<sup>r</sup>과 Su<sup>r</sup>이 연결되어 Tn4(TnS)로 Ap<sup>r</sup> transposon(TnA-Tn3)이 그중에 insertion되어 있고 Cm<sup>r</sup>과 Km<sup>r</sup>/Cm<sup>r</sup> 결정인자가 아타도 transposon으로 인접해 있으며 이들은 IS(insertion sequence)나 inverted repeat 또는 direct repeat 등으로 정제지워 있으며 *recA*-independent site specific recombination hot spot이므로 segregation과도 어떤 연관이 있을 것으로 생각된다(Kopecko, 1976; Kopecko, 1978).

따라서 본 논문에서 대부분의 Tc<sup>r</sup> segregant가 segregant인 이유도 pSL100에서 Tc<sup>r</sup> 결정인자는 RTF에 transposon으로 존재하고 그밖에 항생제 내성결정인자는 위에서 언급한 것과 비슷한 배열을 하고 있기 때문이라고 생각된다.

자연에 존재하는 R factor는 두 가지 유형 즉



*E. coli* K-12의 sex factor의 기능을 억제시키지 않느냐에 따라  $f^+$ 와  $f^-$ 로 구분되는데 이들은 서로 다른 RTF를 지니는 episome이다(Watanabe, et al., 1964; Watanabe, et al., 1962; Helinski, 1973).  $f^+$  R factor는 *S. typhimurium* LT-2에 불안정하여 높은 빈도로 상실되지만  $rec^-$  mutant에서는 비교적 안정한 편이며, *E. coli* K-12에서도 또한 안정성이 있다. 한편  $f^-$  R factor

는 *S. typhimurium* LT-2에서나 *E. coli* K-12양 strain에 모두 안정성이 있다(Watanabe et al., 1970).

따라서 본 논문에서 수행한 R plasmid pSL-100은 *S. typhimurium* LT-2에서는 spontaneous segregation이 빈번히 일어나는데 반하여, *E. coli* K-12에서는 비교적 안정한 곳으로 보아  $f^+$  R factor인것으로 생각된다.

### 摘 要

Curing agent에 대한 R plasmid pSL100의 안정성, curing, segregation에 관한 영향을 조사하였으며 curing agent처리에 의해서 얻어진 segregant들의 안정성, 전달빈도, recombination 등을 조사하였다. Curing agent로는 ethidium bromide, acridine orange, mitomycin-C 등을 사용하였다.

이때 얻어진 결과는 다음과 같았다.

1. Ethidium bromide, acridine orange, mitomycin-C 등의 curing agent는 *Samonella typhimurium*과 *Escherichia coli*내의 항생제 다저항성 R plasmid인 pSL100에는 curing효과가 없었으나 *S. typhimurium* LT-2 균주에 대해서는 높은 빈도로 plasmid pSL100을 segregation시켰다. 이때 얻어진 segregant는 TcApSmCm, TcSmCmKm, TcApCm, TcAp, TcKm, Tc 등이었다.
2. Segregant들의 resistant marker는 모두 *S. typhimurium* LT-2균주들에 높은 빈도로 전달되었으나 *E. coli* K-12균주들로는 아주 낮은 빈도로 전달되었다.
3. 2개의 서로 다른 *S. typhimurium* segregant들간의 conjugation으로 얻어진 transconjugant들은 원래의 pSL100과 같은 phenotype을 가지고 있었고 이 resistant marker는 *S. typhimurium* LT-2균주와 *E. coli*균주에 같은 빈도로 전달되었는데 이는 segregant에 의해서 형성된 recombinant라고 생각할 수 있었다.
4. pSL100 segregant들과 pKM101, pBR322간의 conjugation에 의해 얻어진 transconjugant들은 두 모체 plasmid들이 가지고 있는 resistant marker를 가지고 있었으며 *S. typhimurium*과 *E. coli*균주에 같은 빈도로 전달되었고 두 균주내에서 안정하였으므로 이것들도 역시 recombinant라고 생각할 수 있었다.
5. 이 pSL100 recombinant들은 *E. coli recA^-* 균주에서도 얻어졌으므로 *E. coli*에서 plasmid pSL100의 재조합에는  $recA$  gene의 기능이 필수적이 아니라고 결론지을 수 있었다.

### 감사의 말씀

이 연구에 소요된 경비의 일부는 한국과학기술 연구 사업비로 충당되었기에 이에 감사드리는 바입니다.

### 引用文獻

1. Bouanchaud, D.H., Scavizzi, M.R., and Chabbert, Y.A., 1969. Elimination by ethidium bromide of antibiotic resistance in *Enterobacteria* and *Staphylococci*. *J. Gen. Microbiol.* **51**, 417.
2. Cohen, S.N., 1976. Transposable genetic elements and plasmid evolution. *Nature.* **263**, 731.
3. Cohen, S.N., Shapiro, J.A., 1980. Transposable genetic elements. *Scientific American*, Feb. **36**.
4. Hahn, F.E., Ciak, J., 1974. Drug-inactivating enzymes and antibiotic resistance. Ed. S. Mitsuhashi, Medical Press, Prague. 235.
5. Helinski, D.R., 1973. Plasmid determined resistance to antibiotics. *Ann. Rev. Microbiol.* **27**, 437.
6. Hirota, Y., 1960. The effect of acridine dyes on mating type factors in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **46**, 57.
7. Hudson, B., and Vinograd, J., 1967. Catenated circular DNA molecules in HeLa cell mitochondria. *Nature.* **216**, 647.

8. Kopecko, D.J., 1978. Microbiology, Ed. D. Schlessinger, American Society for Microbiology. 25.
9. Kopecko, D.J., Brevet, J., and Cohen, S.N., 1976. Involvement of multiple translocating DNA segments and recombinational hotspots in the structural evolution of bacterial plasmids. *J. Mol. Biol.* **108**, 333.
10. Lederberg, J., 1948. Detection of fermentative variants with tetrazolium. *J. Bacteriol.* **56**, 695.
11. Lederberg, J., and Lederberg, E.M., 1952. Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *J. Bacteriol.* **63**, 399.
12. Lee, S.Y., Byeon, W.H., and Baik, H.S., 1979. Function of genes related to mutagenesis, recombination and DNA repair. Korea Science and Engineering Foundation report. 61.
13. Miller, H., 1972. Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, U.S. A. 82.
14. Mortelmans, K.E., 1975. Ph. D. Dissertation, Stanford University. 13.
15. Rowbury, R.J., 1978. The replication of bacterial plasmids. *Sci. Prog. Oxf.* **65**, 231.
16. Siccardi, A.G., 1969. Effect of R factors and other plasmid on ultraviolet susceptibility and host cell reactivation property of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **100**, 337.
17. Vogel, H.J., and Bonner, D.M., 1956. Acetylornithinase of *Escherichia coli*: Partial purification and some properties *J. Biol. Chem.* **218**, 97.
18. Tomchick, T., and Mandel, H.G., 1964. Bicchemical effects of ethidium bromide in microorganisms. *J. Gen. Microbil.* **36**, 225.
19. Tomoeda, M., Inzuka, M., Kubo, N., and Nakamura, S., 1968. Effective elimination of drug resistance and sex factors in *E. coli* by sodium dodecyl sulfate. *J. Bacteriol.* **95**, 1078.
20. Watanabe, T., and Fukasawa, T., 1961a. Episome-mediated transfer of drug resistance in *Enterobacteriaceae*. I. Transfer of resistance in *Enterobacteriaceae*. *J. Bacteriol.* **81**, 669.
21. Watanabe, T., and Fukasawa, T., 1961b. Episome-mediated transfer of drug resistance in *Enterobacteriaceae*. II. Elimination of resistance factors with acridine dyes. *J. Bacteriol.* **81**, 679.
22. Watanabe, T., and Fukasawa, T., 1962. Episome-mediated transfer of drug resistance in *Enterobacteriaceae*. III. Interaction between resistance transfer factor and F factor in *E. coli* K-12. *J. Bacteriol.* **83**, 727.
23. Watanabe, T., and Fukasawa, T., 1964. Episome-mediated transfer of drug resistance in *Enterobacteriaceae*. IV. Two types of naturally occurring R factor. *J. Bacteriol.* **88**, 716.
24. Watanabe, T., and Ogata, Y., 1970. Genetic stability of various resistance factors in *E. coli* and *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **102**, 363.