

## *E. coli* pRDI에서의 DAP-영양요구성 변이주 분리 및 동정

이 호 자

경희대학교 생물학과

(1984년 11월 30일수리)

### Isolation and Identification of DAP-Auxotrophs from *E. coli* pRDI

Lee, Ho-Sa

Department of Biology Kyung Hee University, Seoul, Korea

(Received November 30, 1984)

#### ABSTRACT

For the utilization as donor cells of conjugation, DAP-Auxotrophs were isolated from *E. coli* cells, carrying plasmid p<sup>RDI</sup> with(a) drug resistance makers from *Pseudomonas* (Km<sup>r</sup>, Carb<sup>r</sup>, Tc<sup>r</sup>) and(b) the nif-gene group from *Klebsiela*. *E. coli* p<sup>RDI</sup> cells were treated with nitrosoguanidine for the mutagenesis and cephalixin for the isolation of DAP-Auxotrophs. The nature of auxotrophs was verified by suitable biochemical test and checking with 6-cyanopurine as a color indicator for the presence of nif-gene.

#### 서 론

최근 몇년동안 *E. coli*를 재료로 하여 제조합 기술과 돌연변이과정을 통해 새로운 균주들이 많이 개발되고 있다. 이 새로 개발된 균주들은 의학, 축산업, 농업, 공업등 여러 산업분야에 기여하는 바가 대단히 크다(Klingmüller, 1979, 1981).

*E. coli*는 다른 음성균 혹은 양성균들이 갖고 있는 세포벽 구성성분과는 차이가 있다. *E. coli*의 세포벽은 peptidoglycan으로 이루어져 있으며 이 peptidoglycan의 구조는 N-acetylglucosamine과 N-acetylmuramic acid의 β-1,4결합과 이 N-acetylmuramic acid에 alanine, glutamic acid, 그리고 Diaminopimelic acid 등의 아미노산이 결합되어 형성되어져 있다. 이중 Diaminopimelic acid(DAP)는 *E. coli*에 있어서 L-aspartate로부터 Lysine 합성의 전구체이며 (Vogel, 1965; Work 1963) 이것은 DAP-decarboxylase에 의해 Lysine을 합성한다(Isabel,

1969; Walter, 1965). DAP는 또한 세개의 이성체를 갖고 있으며 균주에 따라 DAP 대신 그 이성체를 함유하고 있다. DAP 합성에 관여하는 유전자들은 염색체 여러부위에 존재한다. 즉 유전자지도에서 0~2.5 min 부위에 세개의 유전자들과 47 min 과 48 min 사이에 두개의 유전자들이 존재한다. 또한 Bukhari와 그의 연구팀(1971 a,b)은 *E. coli* K-12로부터 DAP-영양요구성 변이주를 분리하는데 성공하였다.

DAP-영양요구성 변이주는 *E. coli*에 있어서 DAP가 필수아미노산이기 때문에 완전배지에서 DAP의 첨가없이 증식이 불가능하다. 본 실험에서는 이러한 변이주의 특성을 conjugation의 Donor cell에 이용하기 위하여 DAP-변이주를 *E. coli* K-12의 제조합 균주인 *E. coli* p<sup>RDI</sup>으로부터 분리 및 동정하여 이 균주가 갖고 있는 nif-gene을 다른 토양세균들에게 전이하는 공여체균주를 개발하여 보다 효율적으로 광범위하게 nif-gene을 전이하는 vector로써 이용하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 재 료

*E. Coli pRDI* 이 균주는 Ray Dixon에 의해 재조합된 균주이다. 이 균주는 plasmid를 갖고 있으며 이 plasmid에는 *Pseudomonas*로부터 세계의 포지네성인자들(Km<sup>r</sup>, Carb<sup>r</sup>, Tc<sup>r</sup>)을 갖고 있으며 *Klebsiella Pneumonia*로부터 얻은 nif-his gene group을 갖고 있다(Dixon *et al.*, 1972, 1976).

### *Enterobacter aerogenes*.

이 균주는 conjugation의 수송체균주로서 사용한 야생균주이다.

## 방 법

### 균주배양

균주의 배양을 위해서는 LB 배지와 Trypton 배지를 사용하였으며 돌연변이원이나 항생제처리를 위해서는 대수기에 있는 균주를 사용하였다.

### 돌연변이원의 처리

돌연변이원으로서 N-metyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine(NG)를 사용하였으며 NG의 활성도를 위하여 Tris-malic acid buffer를 사용하였다. NG의 최종농도는 50 µg/ml이며 37°C에서 15분간 처리하였다(Aldelberg, 1965).

### 교차내성의 확인

이 실험에 사용한 균주는 항생제에 대한 내성인자를 갖고 있기 때문에 DAP-변이주 분리를 위한 항생제처리를 위해 교차내성을 확인하기 위하여 Ampicillin, Oxacillin, Nafcillin, Cephalixin, Cycloserine 등을 사용하였다. 사용한 모든 항생제들의 최종농도는 100 µg/ml이다.

### 항생제 처리

NG 처리후 야생주를 제거하기 위하여 LB Broth에 중간배양을 한 균주를 M-56 최소배지에 옮긴다. 이때 M-56배지에 cephalixin을 첨가하여 37°C에서 90분간 처리한다(Rossi, 1971).

### 변이주동정

항생제로 처리한 균주를 원심분리시킨후 생리 식염수로 두번 세척한 후 희석하여 항생제 및 DAP가 첨가된 TB 한천배지에 37°C에서 48시

간 배양한다. 배양된 평판을 DAP가 첨가되지 않은 TB 한천배지에 replica-method를 사용하여 변이주를 분리하였다.

### 변이주의 Plasmid 확인

DAP-변이후의 plasmid의 내성인자와 nif-gene을 확인하기 위하여 한천배지에 carbenicillin(최종농도 400 µg/ml), Tetracyclin(15 µg/ml), 그리고 kanamycin(20 µg/ml)를 각각 첨가하여 내성인자들을 확인하였다. nif-gene 확인은 NFDM 배지에서 확인하여야 하는데 이 배지는 DAP가 전혀 함유되지 않은 최소배지이기 때문에 DAP-변이주는 배양이 불가능하다. 고로 nif-gene을 확인하기 위하여서 접합과정을 통하여 DAP-변이주로부터 nif-gene이 전이된 *Enterobacter aerogenes*의 전이체를 확인하는 방법을 이용하였다. 접합과정에 사용한 배지는 Trypton 한천배지에다 각 항생제와 DAP를 첨가하였으며 30°C에서 24시간 두 균주를 접합시켰다.

### 전이체의 배양

접합이 끝난후의 균주들은 항생제가 들어있는 M-56최소배지인 선택배지에다 30°C에서 계대 배양을 시킨다. 계대배양한 균주를 희석하여 색지표인 6-cyanopurine이 첨가된 NFDM 배지에 30°C에서 7일간 N<sub>2</sub>-gas를 주입시킨 계승기 속에서 배양한다. 전이체속에 nif-gene이 존재할 때는 균체는 6-cyanopurine 작용으로 짙은 적갈색을 띄게 되어 육안으로 확인할 수 있다(Mac Neil, 1978).

## 결과 및 고찰

### *E. coli p<sup>RD1</sup>*에 대한 교차내성확인

NG 처리후 야생주를 제거하기 위하여서 penicillin을 처리한다. 그러나 *E. coli p<sup>RD1</sup>*은 세계의 내성인자들을 갖고 있기 때문에 항생제 처리를 위하여 이 균주와 교차내성을 확인하였다. Fig. 1에서 보는 바와같이 penicillin의 유도체들인 ampicillin, oxacillin, Nafcillin에 대해서는 교차내성을 나타내고 있다. 이것은 균주가 갖고 있는 내성인자들 중에서 Carbenicillin 내성인자가 penicillin 유도체들에 대해 교차내성을 갖고 있음을 확인하였다. 그러나 Fig. 2에서는 cephalixin, cycloserine 등에 대해서는 대조군과 달리

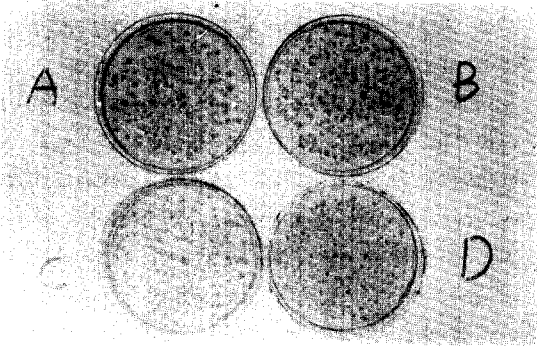


Fig. 1. Cross resistance test on trypton media. A: control strains without antibiotics. B: with ampicillin, C: oxacillin, D: nafcillin.

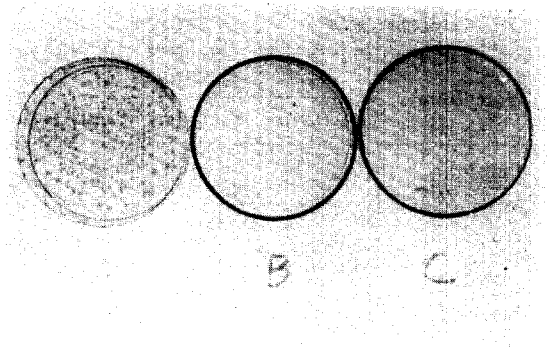


Fig. 2. Cross resistance test on antibiotics containing media. A: control strains without antibiotics, B: with cephalixin, C: cycloserine.



Fig. 3. Isolation of DAP-auxotrophs with replica method on trypton agar media. A: Diaminopimelic acid (end concentration 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), B: without DAP

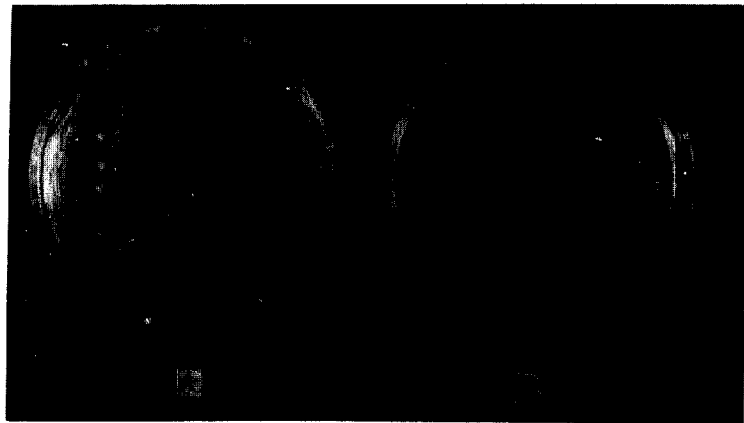


Fig. 4. Identification of R-factors of DAP-auxotrophs on trypton agar broth. A: with DAP and carbenicillin (400  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), kanamycin (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), tetracycline (15  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), tetracycline (15  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). B: without DAP and antibiotics.

Table 1. Characters of donor, recipient and transferant cells

Test Item	Strain		
	Donor	Recipient	Transferant
Indole	+	-	-
M.R	+	-	-
V.P	-	+	+
Citrate	-	+	+
Motility	+	+	+
R-factor	+	-	+
Color indicator*	+	-	+
DAP(-) Medium	-	+	+

\* Color indicator : 6-cyanopurine

교차내성이 나타나지 않음을 관찰할 수가 있었다. Cephalexin이나 cycloserine은 penicillin처럼 세포벽합성을 억제하나 그 구성 성분이 다르기 때문에 교차내성을 갖지 않는다.

#### 변이주의 분리

NG 처리와 cephalaxin 처리후 replica-method에 의해 DAP 균주를 분리하였다(Fig. 3). 즉 완전배지에 DAP가 첨가되지 않았을때 DAP-균주는 증식을 할 수 없는 특이성을 그대로 갖고 있었다.

#### 변이주의 동정

*E. coli* p<sup>RD1</sup>으로 부터 분리된 DAP-변이주가 갖고 있는 plasmid의 안정성을 확인하기 위하여 우선 내성인자들에 대해 확인하였다. Fig. 4에서 보는 바와같이 배지에 각각의 항생제를 첨가하여 배양한 결과 DAP-변이주들의 증식은 아

생주와 같이 잘 증식되었다. nif-gene에 대한 확인은 DAP-변이주가 최소배지인 NFDM배지에서 증식이 불가능하므로 질소를 고정할 수 없는 토양세균인 *Enterobacter aerogenes*와 DAP 변이주를 접한시킴후 Transferant cell로써 확인하였다. 완전배지에다 DAP를 첨가시켜 만든 배지에다 두 균주를 conjugation 시킨후 선택배지를 이용하여 전이체만 배양시킬 수 있기 때문에 DAP-변이주로부터 plasmid를 전이받은 전이체는 nif-gene을 받게된다. 고로 선택배지위에 증식이 가능한 전이체를 분리하여 이 전이체를 6-cyano-purine가 첨가된 NFDM 배지에다 배양하면 nif-gene을 갖고 있는 전이체들은 적갈색을 띠는 colong가 나타나므로 nif-gene의 유무를 확인하였다. Table 1에서 보는 바와 같이 *E. aerogenes*에 대한 생화학적 검정을 하였고 아울러 plasmid에 대한 안정성과 활성도를 확인하였다. 이 결과로써 동정된 DAP-변이주는 NG 처리후에도 plasmid의 내성인자나 nif-gene에의 활성도에는 아무런 영향을 미치지 않았음을 확인하였다. 또한 접합과정에도 DAP-변이주는 어떠한 영향을 받지 않았으며 plasmid가 완전히 recipient cell로 완전히 이동된 것으로 확인할 수가 있었다.

#### 사 사

이 논문실험은 교내 연구비 지원으로 하였습니다.

#### 적 요

*E. coli* p<sup>RD1</sup>에서 DAP-영양요구성 변이주를 분리하였으며 이 변이주가 갖고 있는 plasmid의 안정성과 활성도를 확인하는 실험을 통하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Mutagen인 NG를 처리후 DAP-변이주를 보다 쉽게 분리하기 위하여 항생제처리를 하였다. 이때 사용균주가 갖고 있는 plasmid내의 내성인자들 중에 carb<sup>r</sup> 인자로 인하여 같은 계열에 있는 penicillin 유도체들에 대해서는 교차내성을 갖고 있음이 확인되었다. 그러나 penicillin과 같은 기능을 갖고 있으나 그 구조가 다른 cephalaxin, cycloserine에 대해서는 교차내성을 나타내지 않았으므로 항생제처리로서는 cephalaxin을 사용하였다.

2. 세균 접합을 통하여 DAP-균주의 특성을 동정하였다. 즉 nif-gene의 안정성과 활성도는 DAP-균주로부터 plasmid를 전이받은 전이체에서 6-cyanopurine 첨가로 확인하였다.

참 고 문 헌

- Adelberg, E.A., M. Mandel, G.C.C. Chem, 1965. Optimal condition for mutagenesis by nitrosoguanidine in *E. coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 18:788-795.
- Bukhari, A.I., A.L. Taylor, 1971 a. Genetic analysis of DAP- and Lysine requiring mutants of *E. coli*. *J. Bacteriol.*, 105:844-854.
- \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, 1971 b. Mutants of *E. coli* with a growth requirement Lysineor Pyridoxine. *J. Bacteriol.* 105:988-998.
- Dixon, R.A., J.R. Postgate, 1972. Genetic transfer of nitrogen fixation from *Klebsiella pneumoniae* to *E. coli*. *Nature*, 237:102-103.
- \_\_\_\_\_, F.C. Cannon, A. Kondorosi, 1976. Construction of Plasmid carrying nitrogen gene from *Klebsiella pneumoniae*. *Nature*, 260:268-271.
- Isabel, J.B., B. Amedeo, G. Albert, 1969. Biochemical characterization of Lysine auxotrophs *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, 99:169-174.
- Klingmuller, W., 1979. Genetic engineering for practical application. *Naturwissenschaft*, 66:182-189.
- \_\_\_\_\_, 1981. Möglichkeiten und Grenzen der genetischen Manipulation. *Naturwissenschaft*, 68:120-127.
- Mac Niel, D., W.J. Brill, 1978. 6-cyanopurine, a color useful for isolating mutation in the *nif* (nitrogen fixation) genes of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.*, 36:247-252.
- Rossi, J.J., C.M. Berg, 1971. Differential recovery of auxotrophs after penicillin enrichment in *E. coli*. *J. Bacteriol.*, 106:297-300.
- Vogel, H.J., 1965. Lysine biosynthesis and evolution, *Academic Press*, pp.25-40.
- Walter, F., G. Charles, 1965. The reduction step in DAP biosynthesis. *J. Biochem.*, 240:4717-4722.
- Work, E., 1963.  $\alpha$ - $\beta$ -diaminopimelic acid, *Method in Enzymology*(edited by Colowick and Kaplan), 6:pp.624-634.