

## *Escherichia coli*의 pBR322 DNA 형질전환에 관여하는 인자에 관한 연구

유 한 상·마 점 술  
서울대학교 수의과대학  
(1984.3.5 접수)

### Studies on the Factors Influencing the Transformation in *Escherichia coli* with pBR322 DNA

Han-sang Yoo and Jum-sool Mah  
College of Veterinary Medicine, Seoul National University  
(Received March 5, 1984)

**Abstract:** To investigate the factors influencing the artificial transformation in *Escherichia coli*, *E. coli* C600 was transformed by pBR322 DNA with tetracycline and ampicillin resistant gene purified by CsCl-Etbr equilibrium density gradient centrifugation from *E. coli* HB 101.

The influencing factors in the transformation such as concentration of calcium chloride, time of ice incubation, temperature and time of heat shock, time of gene expression, effects of plasmid DNA concentration and adding time were examined in these experiments.

The results obtained were as follows;

1. The highest transformation frequency was observed in the treatments of 100 mM CaCl<sub>2</sub> before heat shock and the treatment of CaCl<sub>2</sub> was essential step in the process of *E. coli* transformation.
2. The highest transformation frequency was observed in the treatment of heat shock at 42°C for 4 min. or 37°C for 6 min., but the prolonged heat shock resulted a decreased transformation frequency.
3. Treatments of ice incubation at 0°C for 45 min. before heat shock, or at 0°C for 30 min. after heat shock resulted an increased transformation frequency.
4. There was a linear relationship between DNA concentration and transformation frequency at the concentration of  $8 \times 10^3$  recipient cells. The highest transformation frequency reached in case of 7 mcg of donor DNA, but above 1 mcg of DNA concentration, transformation frequency was not remarkably increased. Addition of donor DNA just after the treatment of CaCl<sub>2</sub> was the best.
5. The best condition of gene expression at 37°C were 40min. for TC-resistant gene and 100min. for AP-resistant gene. TC-resistant gene was higher in the transformation frequency and faster in the gene expression time than AP-resistant gene.

In these results, the best conditions for the transformation of *E. coli* C 600 with pBR322 DNA were: treatment with 100mM CaCl<sub>2</sub>, ice incubation at 0°C for 45 min, heat shock at 42°C for 4 min., 30 min. of ice incubation and incubation at 37°C for 100 min. for gene expression in that order.

## 서 론

*Escherichia coli*의 plasmid는 염색체외에 존재하는 환상의 2중나선 구조로된 DNA로서 세균의 일부유전을 지배한다<sup>5,25</sup>. plasmid는 donor 세균으로부터 conjugation, transformation, transduction 등의 방법에 의해 recipient 세균으로 전달된다<sup>1,13,17</sup>.

최근 분자생물학이 발전함에 따라 bacterial transformation에 관한 많은 연구가 이루어졌다. 그러나 transformation 기법이 분자생물학 분야에서 가장 큰 공헌을 한 것은 유전자 재조합기술을 발전시킨 일이다. Cohen 등<sup>6</sup>이 시험관내에서 recombinant DNA를 만든 이래 recombinant DNA를 이용하는 기술은 DNA의 유전적구조를 탐험<sup>7</sup>과 유전적으로 변이된 물질을 생성하는 것 등에 이용되었다<sup>4,10,12</sup>. 한편 유전자 재조합술은 제한효소의 발전<sup>8</sup>과 Vector의 개발 등<sup>2,3,8</sup>으로 유전자 전달에 관한 연구는 많이 발전되었다. recombinant DNA는 transformation에 의해서만 recipient cell내로 삽입되며 이때 recipient cell을 competent state로 유도해야 한다.

competent state는 *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus faecalis* 같은 gram 양성세균과 *haemophilus*, *neisseria*, *moraxella*, *acinetobacter*, *Pasteurella novicida*, *Pseudomonas spp.* 같은 gram 음성세균은 자연적으로 증식과정에서 유도된다<sup>19,20,21</sup>. 그러나 *E. coli*는 증식과정에서 자연적으로는 competent state로 되지 않기 때문에 *E. coli*를 recipient로 사용할 경우에는 인위적으로 competent state로 유도해야만 transformation이 이루어진다. Mandel 등<sup>14</sup>은 *E. coli*에서 처음으로 log phase에 있는 세균을 0°C에서 CaCl<sub>2</sub> 처리를 한 후 37°C에서 heat shock를 주어 인위적으로 competent state로 유도함으로써 λ phage DNA를 transformation할 수 있었다. *E. coli*의 transformation은 37°C 혹은 42°C에서 heat shock 처리로 가능하나 이들의 처리방법에 따른 transformation 효과에 관한 보고는 거의 없으며, 연구자에 따라 transformation 방법도 다양하다. 본 실험에서는 *E. coli*의 transformation 과정에서 CaCl<sub>2</sub>, heat shock 및 ice incubation 등의 처리방법을 변화시켜, transformation frequency가 가장 높은 조건을 찾아 transformation의 효과적인 방법을 모색하고 이들 요인의 역할을 밝히는 실험을 하였다.

## 재료 및 방법

공시 균주: 1. *E. coli* HB101은 pBR322 plasmid를 가지고, AP와 TC에 저항성을 나타내는 세균을

plasmid donor로 사용하였으며, 녹십자 중앙연구소에서 분양 받았다.

2. *E. coli* C 600은 AP와 TC에 감수성이 있는 균주로서 transformation의 recipient로 사용하였으며, 서울 대학교 자연과학대학 미생물학과에서 분양 받았다.

공시 배지: *E. coli*의 plasmid를 얻기 위하여, 배지는 M-9 glucose medium 및 Luria-Bertani(LB) broth를 사용하였다.

plasmid 분리 및 검정: *E. coli* HB 101을 TC 10 mcg/ml와 AP 20mcg/ml를 첨가한 LB-broth에 접종하여 37°C에서 배양한 다음 그 배양액을 M-9 glucose medium에 10ml/1로 접종하여 O.D.가 600nm에서 0.4가 될 때까지 37°C의 항온 수조에서 진탕배양하였다. 여기에 chloramphenicol을 최종농도가 170mcg/ml이 되도록 첨가하여 O.D.가 600nm에서 0.5가 될 때까지 다시 배양하여 plasmid를 amplification 시켰다. 이 배양액 1l를 0°C로 급냉시킨 후 원심집균하여 sucrose액 (25% sucrose, 50mM EDTA, 50mM Tris-HCl, pH 8.5) 13ml를 가하여 균부유액을 만들고 여기에 lysozyme액 (10mg/ml in 50mM Tris-HCl pH 8.5) 5ml를 가한 후 0°C ice bath에서 15분간 정지한 다음 detergent액 (0.2% Triton X-100, 50mM EDTA, 50mM Tris-HCl, pH 8.5) 15ml를 가하고 다시 0°C에서 15분간 정지하였다. 이와같이 처리한 것을 4°C에서 1,900G로 1시간 원심분리하여 세균잔해물과 세균의 chromosomal DNA를 침전시키고 plasmid를 함유한 상층액을 clear lysate로 사용하였다. clear lysate 5ml당 CsCl 4.75g을 첨가하여 잘 용해시킨 후 clear lysate 10ml당 Etbr 용액 (10mg/ml in 50mM Tris-HCl pH 8.5) 0.2ml를 넣었다. 이것을 20°C에서 190,000G로 44시간 원심분리한 후 UV lamp로 관찰하여 DNA band를 21 gauge 주사침으로 채취하였다. Etbr을 제거하기 위하여 n-butanol을 plasmid DNA 용액의 두 배양으로 첨가하여 잘 혼합하고 1,500G로 10분간 원심분리한 후 아래층의 수용액을 취하는 과정을 5회 반복 실시하여 Etbr을 제거하였다. 이때에 잔여의 n-butanol CsCl은 투석액 (0.1mM EDTA, 5mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH 7.0)을 두 번 교환해 주면서 4°C에서 12시간 동안 투석하여 제거한 후 원심분리에 의해서 plasmid를 모았다. 분리한 plasmid는 4°C에 보관하면서 실험에 사용하였으며, plasmid의 검정은 agarose gel 전기영동법<sup>24</sup>으로 하였다.

## 형질 전환 실험

형질 전환 실험과정: 형질 전환 실험은 Mandel 등<sup>14</sup>과 Cohen 등<sup>7</sup>의 방법을 병용한 변형으로 하였으며, recipi-

ent인 *E. coli* C 600을 LB-broth에서 18~24시간 배양한 후 500ml 삼각 플라스크를 사용하여 그 배양액에 신선한 LB-broth로 1:100이 되게 희석한 것을 cell의 농도가  $4 \times 10^8$  cells/ml이 될 때까지 37°C 항온수조에서 진탕배양 하였다. 이 배양액을 0°C ice bath에서 20분간 정지하여 냉각시킨 후 30ml를 취하여 4,500 rpm에서 10분간 원심침전 하였다. 이것을 0~4°C의  $\text{CaCl}_2$  용액에 부유시켜 0°C ice bath에서 20분간 정지시킨 후 원심분리로 세균을 모았으며, 이와같이  $\text{CaCl}_2$  용액으로 처리하는 방법을 2회 반복 하였다. 침전세균은 원배양의 1/20 양에 해당하는  $\text{CaCl}_2$ 액에 부유시켜 그 0.2ml에 plasmid DNA 0.1ml를 가하여 reaction mixture로 하였다. 이 reaction mixture를 0°C ice bath에 일정시간 정지 후 37°C 혹은 42°C에서 heat shock를 준 다음 다시 0°C의 ice bath에서 일정시간 정지하였다. 이와같이 처리한 reaction mixture는 gene expression을 시킬 목적으로 신선한 LB-broth 2.7ml를 가하여 37°C에서 일정시간 정지 하였다. gene expression 시킨 후 그 0.1ml를 취하여 TC 10mcg/ml, 및 AP 20mcg/ml 함유 선택배지에 평판도말하여 24~36시간 배양 후 증식한 집락수를 계산하여 transformation frequency를 계산하였다.

**recipient cell의  $\text{CaCl}_2$  농도를 달리한 처리 :** recipient cell을  $\text{CaCl}_2$ 로 처리하는 과정에서  $\text{CaCl}_2$  농도를 0, 25, 50, 75, 100, 150, 200 및 250mM의 각 농도로 달리하여 5mM Tris-HCl 완충액 (pH 7.0)에 용해하여 사용하였다.

**heat shock처리 :** reaction mixture의 heat shock는 온도를 42°C와 37°C로 달리하고 각 온도별 작용시간을 0, 2, 4, 6, 8 및 10분으로 처리하였다.

**ice incubation:** heat shock 전과 후에 ice incubation의 시간을 각 0, 15, 30, 45 및 60분으로 달리하여 실험하였다.

**gene expression time의 변화 :** transformation의 마지막 처리과정인 gene expression에 요하는 시간을 보기 위하여 LB-broth를 가한 후 37°C에서 0, 20, 40, 60, 80, 100 및 120분으로 incubation시간을 달리하여 반응시킨 다음 TC(20mcg/ml) 및 AP(30mcg/ml)를 각 함유한 선택배지에 평판도말하여 배양하였다.

**plasmid DNA 농도의 변화 :** plasmid DNA 첨가농도를  $1 \times 10^{-4}$ ,  $1 \times 10^{-3}$ ,  $1 \times 10^{-2}$ ,  $1 \times 10^{-1}$ , 1 및 7mcg으로 달리하고 recipient의 양은  $4 \times 10^8$  cells/ml로 고정하여 reaction mixture를 만들어 transformation 실험을 하였다.

**$\text{CaCl}_2$  처리 점의 변화 :** transformation 과정에서  $\text{CaCl}_2$  처리를 다음과 같이 다르게 하여 transformation

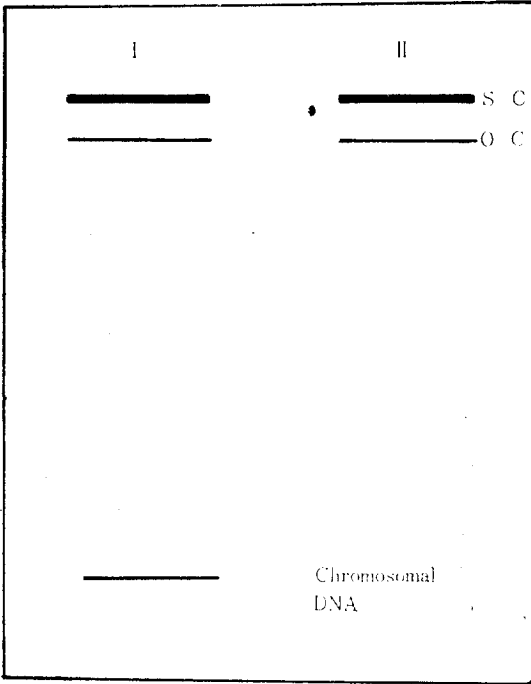
실험을 하였다. recipient cell을  $\text{CaCl}_2$  대신 5mM Tris-HCl (pH 7.0)로 처리한 후 원심분리하여 모은 recipient cell을 원배양의 1/40이 되도록 5mM Tris-HCl (pH 7.0)에 부유시켜 그 0.2ml와 donor DNA용액 0.1 ml ( $1 \times 10^{-3}$  mcg)를 혼합하여 reaction mixture를 만들었다. 이 reaction mixture를 200mM  $\text{CaCl}_2$  용액으로 ice incubation전 (0°C에서 45분), heat shock전 (42°C에서 4분), second ice incubation (0°C에서 30분) 전과 후, 선택배지에 배양하기 전으로 각각 달리하여 각 단계에서 처리하였다. 이때  $\text{CaCl}_2$ 의 최종농도가 100mM 이 되도록 조정하였다.

**donor DNA와 recipient cell의 혼합방법 :** transformation 과정에서  $\text{CaCl}_2$ 와 heat shock가 recipient와 donor DNA에 미치는 영향을 알아보기 위하여 donor DNA를 recipient cell에 혼합하는 시기를 ice incubation전 (0°C에서 45분), heat shock (42°C에서 4분) 전과 후, second ice incubation (0°C에서 30분) 후, 선택배지에 배양하기 전으로 각각 달리하였다.

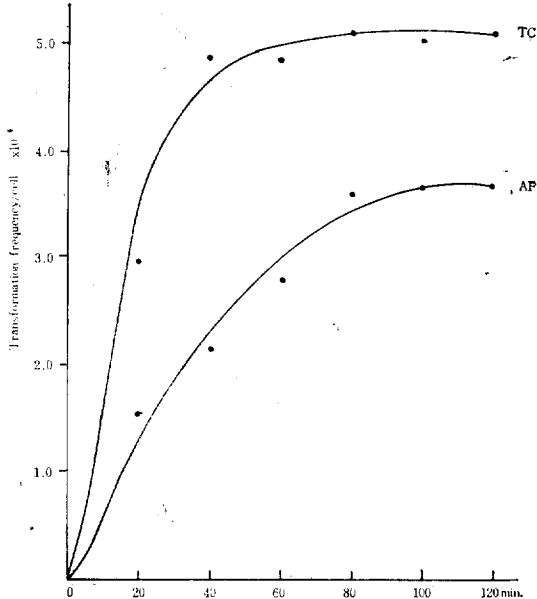
**$\text{CaCl}_2$ 와 다른 2가 양이온 물질의 비교 :** recipient cell의 처리에서  $\text{CaCl}_2$  이외의 다른 2가 양이온 물질 ( $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{BaCl}_2$ )이 transformation에 미치는 영향을  $\text{CaCl}_2$ 와 비교하였다. 즉  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{BaCl}_2$ 의 농도를 각각 0, 50, 100, 150 및 200mM로 달리하여 recipient cell을 처리하여 transformation 실험을 하였다.

## 결 과

***E. coli* HB101로 부터 pBR 322DNA의 분리 :** *E. coli* HB 101을 M-9 glucose medium에서 진탕배양하여 원심침전한 후 clear lysate를 만들고 이 clear lysate를 cesium chloride-ethidium bromide equilibrium density gradient centrifugation에 의해서 plasmid DNA를 순수분리한 결과 세균배양액 11당 순수분리한 plasmid DNA는 150mcg이었다. plasmid의 확인과 순도 검사는 agarose gel 전기영동법<sup>24)</sup>으로 실시하였으며, 그 결과는 fig.1에서 처럼 UV lamp 하에서 clear lysate는 양극쪽에 폭이 넓은 band와 그 바로 아래쪽에 인접하여 폭이 좁은 형광대가 나타나고, 음극쪽에서도 또 하나의 폭이 좁은 형광대가 관찰되었다. 그러나 순수분리한 plasmid에서는 양극쪽에서만 폭이 넓은 band와 그 아래쪽에 인접하여 비교적 폭이 좁은 band가 관찰되었다. 이때 양극쪽에 폭이 넓은 band는 supercoiled plasmid DNA이고 아래쪽에 인접한 비교적 폭이 좁은 band는 open circular plasmid DNA이며, 음극쪽의 폭이 좁은 band는 chromosomal DNA 또는 linear DNA fragment로 추정되었다.



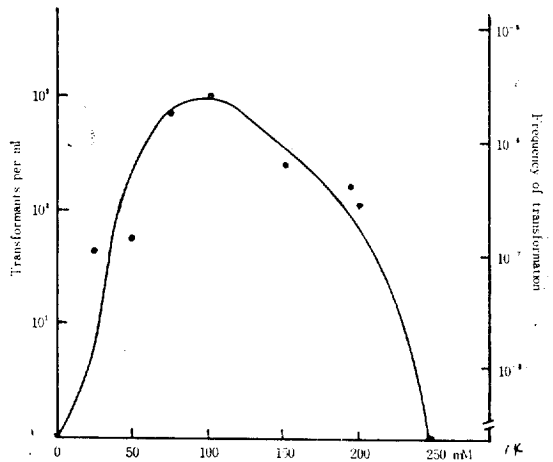
**Fig. 1.** Electrophoretic pattern of clear lysate (I) and purified plasmid (II) on 0.75% agarose gel. SC : Supercoiled plasmid DNA. OC : Open circular plasmid DNA.



**Fig. 2.** Kinetics of gene expression in transformed *E. coli* C 600 with pBR 322 DNA respect to incubation at 37°C. AP : Ampicillin resistant gene TC : Tetracycline-resistant gene.

**pBR322 DNA의 gene expression time:** pBR DNA의 gene expression에 요하는 시간을 변화시켜 실험한 결과 TC 저항성은 AP 저항성보다 빨리 발현되고 transformation frequency도 높았다. 즉 TC 저항성은 비교적 빨리 발현되어서 약 40분경에 완전히 발현되었고, AP 저항성은 TC 저항성보다 늦은 속도로 발현되어 약 100분경에 최고에 이르렀다. 형질전환발현시간을 주지 않았을 때에는 TC저항성, AP저항성 모두 transformation이 되지 않았다(fig. 2).

**calcium chloride의 농도가 형질전환에 미치는 영향:** recipient cell의 CaCl<sub>2</sub> 처리에서 CaCl<sub>2</sub> 농도를 달리하여 처리한 결과 fig. 3에서와 같이 CaCl<sub>2</sub> 농도가 25mM에서 50 mM까지는 매우 적은 수의 transformant를 나타내었고, 75mM까지는 급격히 상승하여 100 mM에서 최고수준을 나타내어 이때에 transformation의 정도는 25~50mM에 비하여 약 25~50배가 증가하였으나 100 mM 이상에서 부터는 급격히 감소하는 경향을 보였다. CaCl<sub>2</sub>의 농도가 0 mM과 250 mM에서는 transformation이 되지 않았다.



**Fig. 3.** Effect of calcium chloride concentration in the transformation of *E. coli* C600 with pBR 322 DNA.

**heat shock의 온도와 시간이 형질전환에 미치는 영향:** heat shock의 온도를 42°C와 37°C로 달리하고 각 온도별 시간을 2~10분동안 각각 정제한 다음 transformation frequency를 조사한 결과 fig. 4에서와 같이 42°C에서는 4분까지는 급격히 증가하여 최고에 달하였으나 4분부터 6분까지는 급격히 감소하였으며, 6분이후부터는 완만하게 감소하였다. 37°C에서는 6분까지는 점

차적으로 증가하였으며 6분 이후 부터는 서서히 감소하는 경향이였다. heat shock를 주지 않았을 때는 모두 transformation이 되지 않았으며, 42°C에서는 4분, 37°C에서는 6분에 거의 같은 수준으로 최고의 transformation frequency를 나타내었다.

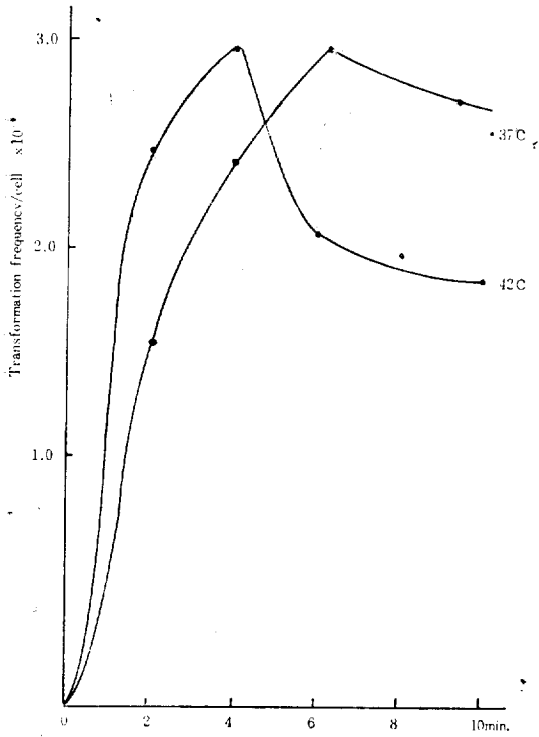


Fig. 4. Effects of heat shock at 42°C and 37°C in the transformation of *E. coli* C600 with pBR322 DNA.

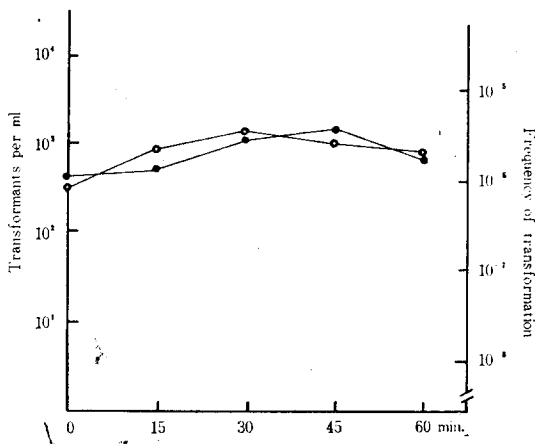


Fig. 5. Effect of ice incubation in the transformation of *E. coli* C 600 with pBR 322 DNA.  
 ●—● : Before heat shock.  
 ○—○ : After heat shock.

**ice incubation의 변화에 따른 영향** : reaction mixture의 ice incubation 처리를 heat shock 전과후로 나누어 0°C에서 각 0, 15, 30, 45 및 60분간씩 처리하였다. fig. 5에서 보는 바와 같이 heat shock 전의 ice incubation에서는 45분까지는 점차적으로 시간경과에 따라 증가하는 경향을 보였으나 그 이후에는 감소하였다. heat shock를 가한 후에 ice incubation한 것은 30분까지 비교적 빨리 증가하여 최고에 이르고 30분 이후부터 점차 감소하였다. 이와같이 heat shock 전과후의 ice incubation 처리에서 최고의 transformation frequency는 거의 같은 수준이었으며, ice incubation 처리를 하지 않은 대조보다는 transformation frequency가 3~4배 증가한 결과이었다.

**plasmid DNA의 농도가 transformation에 미치는 영향** : plasmid DNA 농도를 달리하고 recipient의 농도를  $8 \times 10^8$  cells로 하여 transformation의 정도를 본 결과 fig. 6에서와 같이 plasmid DNA의 양이 증가할수록 transformation frequency도 비례적으로 증가하였으며, 1mcg 이상에서 거의 최고치에 이르고 그 이상의 양에서는 크게 변하지 않았다.

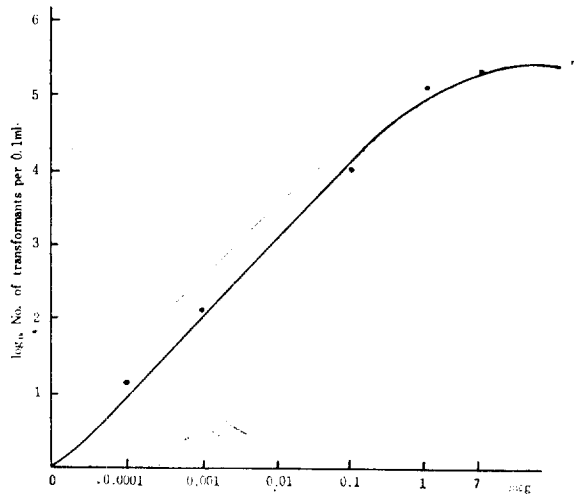


Fig. 6. Effects of the concentration of plasmid DNA in the transformation of *E. coli* C 600 with pBR322 DNA.

**calcium chloride 처리단계의 변화에 따른 영향** : transformation의 과정에서 recipient cell의 CaCl<sub>2</sub> 처리 시기를 달리함으로써 transformation의 효과가 어떻게 달라지는가를 본결과 table I에서 처럼 대조군을 100%로 하여 비교한 결과 0°C에서 첫번째 ice incubation을 하기전에 부가한 것은 86.5%, heat shock 주기전에 부가한 것은 73.0%로서 높은 비율로 나타났

**Table 1.** Transformation frequency respect to the  $\text{CaCl}_2$  treatments at the varied stages in the transformation of *E. coli* C600 with pBR322 DNA

Treatment	Transformation frequency $\times 10^{-8}$ (%)	
1. before first ice incubation	318	(86.5)
2. before heat shock	268	(73.0)
3. after heat shock	24	(6.4)
4. after second ice incubation	5	(1.4)
5. just prior to plating	0	(0)
6. control	367	(100)

**Table 2.** Transformation frequency respect to the adding time plasmid DNA in the transformation of *E. coli* C 600 with pBR322 DNA

Addition of plasmid DNA	Transformation frequency $\times 10^{-8}$ (%)	
1. before first ice incubation (control)	375	(100)
2. before heat shock	167	(44.5)
3. after heat shock	56	(15)
4. after second ice incubation	3	(0.8)
5. just prior to plating	0	(0)

나, heat shock를 가한 후에 부가한 것은 급격히 감소하여 6.4%, 두번째 ice incubation 후에 부가한 것은 1.4%의 transformation frequency를 나타내었으며, 선택배지에 배양하기 직전에  $\text{CaCl}_2$ 를 부가한 것은 transformation이 되지 않았다.

**plasmid DNA의 혼합방법에 따른 변화:** donor DNA를 recipient cell이 uptake하는 과정에서  $\text{CaCl}_2$ 와 heat shock 처리 효과를 알아 보기 위하여 DNA 부가시기를 달리한 결과 table 2에서와 같이 ice incubation 전에 plasmid DNA를 첨가한 경우를 대조로 하여 비교한 결과 ice incubation후 heat shock 전에 plasmid DNA를 첨가한 것은 44.5%, heat shock 후에 첨가한 것은 15%, 두번째 ice incubation 후에 첨가한 것은 0.8%의 비율로 transformation frequency를 나타내었으며, recipient cell을 transformation의 모든 처리과정을 거친다음 선택배지에 배양하기 직전에 plasmid DNA를 첨가한 것은 transformation 되지 않았다.

**2가 양이온 물질이 transformation에 미치는 영향:** recipient cell를 competent state로 유도하기 위하여  $\text{CaCl}_2$ 로써 처리하였을 때와  $\text{CaCl}_2$  대신 다른 2가 양이온 물질인  $\text{MgCl}_2$  및  $\text{BaCl}_2$ 로 처리하면 transformation frequency에 어떠한 차이가 있는가를 보기 위하여 이들 물질의 농도를 달리하여 처리한 다음 transformation 시킨 결과 table 3에서와 같이  $\text{CaCl}_2$ 를 처리한

것만이 transformation 되었다. 다른 2개 양이온인  $\text{BaCl}_2$  및  $\text{MgCl}_2$  및 처리에서는 transformation 되지 않았다.

**Table 3.** Effects of divalent cationic salts for inducing competent state of recipient cell in the transformation of *E. coli* C 600 with pBR322 DNA

Concentrations Divalent cationic salts	Transformation frequency/cell $\times 10^{-7}$				
	0 mM	50 mM	150 mM	200 mM	
$\text{BaCl}_2$	0	0	0	0	0
$\text{CaCl}_2$	0	1.25	25.25	6.25	3.25
$\text{MgCl}_2$	0	0	0	0	0

**plasmid DNA의 형질전환확인:** *E. coli*의 pBR 322 DNA를 recipient인 *E. coli* C600에 형질전환실험을 실시한 다음, pBR 322 DNA가 본래 가지고 있던 내성인자인 TC 및 AP에 대한 저항성 gene이 형질전환 되었는지를 확인하고 또 다른 항생제에 대하여 감수성을 검사한 결과는 table 4와 같다. 즉 recipient인 *E. coli* C 600은 AP, TC, GM 및 CM에 대한 MIC는 모두 6.25mcg/ml이하이고, KM 및 PC는 12.5mcg/ml이었다. plasmid donor 균으로 사용한 *E. coli* HB 101은

TC, AP 및 PC에 대한 MIC가 100mcg/ml 이상이었으며, KM, GM 및 CM에 대하여서는 6.25mcg/ml 이하이었다. donor DNA로 형질전환된 *E. coli* C 600의 MIC는 AP 및 PC에 대하여 100mcg/ml 이상이었고, KM, GM 및 CM에 대하여는 12.5mcg/ml 이하이었다. 이상의 결과로 보아 donor균 *E. coli* HB 101로부터 순수 분리한 plasmid DNA는 TC 및 AP 감수성인 recipient 균인 *E. coli* C 600에 transformation된 것이 확인되었다. 본래 donor균이 가지고 있었던 TC 및 AP내성의 plasmid는 형질전환된 이후에도 그 MIC가 100mcg/ml 이상으로 나타남으로써 내성의 정도에도 변화가 없었다. 또 AP내성인자가 형질 전환됨으로써 유사한 계통의 PC에 대한 내성도 동시에 발현되었음을 알 수 있다.

**Table 4.** Susceptibility of transformed *E. coli* C 600 with pBR322 DNA to antibiotics

Antibiotics Bacterial strains	Minimal inhibitory concentrations (mcg/ml)					
	AP	TC	KM	GM	PC	CM
<i>E. coli</i> C 600 (transformed cell)	100	100	12.5	6.25	100	6.25
<i>E. coli</i> C 600 (recipient control)	6.25	6.25	12.5	6.25	12.5	6.25
<i>E. coli</i> HB 101 (donor control)	100	100	6.25	6.25	100	6.25

## 고 찰

*Escherichia coli*의 plasmid가 지니고 있는 형질이 transformation, conjugation, transduction 등에 의하여 전달된다는 사실이<sup>1,13,17</sup> 알려진 이래 이에 관련된 많은 연구보고가 있다. 특히 시험관내에서 recombinant DNA의 형성이<sup>6</sup> 가능하여 짐으로써 recombinant DNA를 세균에 효율적으로 transformation 시키는 방법의 개발이 필요하게 되었다. 이에 본 실험에서는 *E. coli* HB 101로부터 CsCl-Etbr equilibrium density gradient centrifugation에 의하여 순수 분리한 pBR 322 DNA를 recipient인 *E. coli* C600에 transformation 시키는 과정에서 영향을 주는 각종요인에 관하여 실험을 하였다.

형질전환된 DNA가 유전형질을 발현하는데 필요한 시간을 알기 위하여 transformation의 마지막 처리과정에서 LB-broth를 가한후 37°C에서 incubation 시킨결과 TC 저항성은 약 40분, AP저항성은 100분에 최고로 발현되었고, TC저항성이 AP저항성보다 시간적으로 빠

르고 또 보다 높은 빈도로 발현되었다. Cohen 등<sup>22</sup>은 nonchromosomal antibiotics resistance factor에 관한 transformation 실험에서 kanamycin 저항성은 donor DNA가 recipient cell에 흡수된후 약 60분경에 최고로 발현 되었다고 하였다. 이 결과와 비교하면 본 실험에서의 형질발현 소요시간이 TC저항성은 이보다 다소 빠르고 AP저항성은 늦은 것으로서 이는 gene map상의 위치가 서로 다른 까닭으로 생각되며, TC저항성이 먼저 발현된 것도 이와같은 이유라고 생각된다.

*E. coli*의 transformation에 있어서 CaCl<sub>2</sub>의 최적농도를 알기 위하여 CaCl<sub>2</sub>의 농도를 달리하여 recipient인 *E. coli* C600을 처리한 결과 CaCl<sub>2</sub> 농도는 100 mM에서 가장 높은 transformation frequency를 나타내었고 100 mM 이상에서는 급격히 감소하여 250 mM에서는 transformation이 되지 않았다. Weston 등<sup>23</sup>은 *E. coli* C 600을 recipient로 하여 3중수소(<sup>3</sup>H)로 결합시킨 NTP16 DNA를 transformation 시켰을 때 CaCl<sub>2</sub>의 최적농도가 75~100 mM이었다. 그는 그 이유를 100 mM까지의 높은 Ca<sup>++</sup>ion은 DNA와 complex를 만들고 그것이 세포질내로 흡수되는 것을 촉진하지만 100 mM이상의 Ca<sup>++</sup>ion 농도에서는 recipient cell과 결합하는 DNase-resistant DNA의 급격한 감소로 인하여 transformation frequency가 저하된다고 하였다.

heat shock는 42°C에서 4분처리 하거나, 혹은 37°C에서 6분간 처리한 것이 최고의 transformation frequency를 보였다. Mandel 등<sup>4</sup>은 heat shock는 Ca<sup>++</sup>ion이 고농도로 존재할때 *E. coli*로 하여금 DNA를 uptake할 수 있는 competent state로 유도하고, 세포외막에 결합된 DNA는 heat shock로 인하여 DNase에 resistance한 상태로 전환된다고 하였다.

그러나 Nichol 등<sup>15</sup>은 heat shock에 의하여 donor DNA가 DNase에 resistance한 형태로 전환되는 것 보다는 *E. coli*의 세포외막의 지질이 고체상에서 액체상으로 변화되어 competent state로 됨으로써 donor DNA의 uptake가 용이하여 진다고 하였다. 즉 heat shock는 recipient cell이 Ca<sup>++</sup>ion 존재하에서 phase transition에 의하여 donor DNA를 uptake할 수 있는 준비상태로 변화시키는 것으로 생각된다. 42°C에서 heat shock 처리시 4분이후에 transformation frequency가 급격히 감소하는 것은 온도가 37°C 이상으로 상승하면 세포막의 지질이 고정화(immobilization) 되거나, 세포외막의 gel-phase lipid의 양이 온도의 영향을 받아 세포막에 함유한 전체 phospholipid의 3%이하로 감소하여<sup>15</sup> 세포융해가 일어났기 때문이라고 생각된다. heat shock 전과후에 각각 45분 및 30분 ice incubation한

것은 ice incubation 하지 않은 대조군에 비하여 transformation frequency가 3~4배 증가 하였는데 이는 Cohen 등<sup>7)</sup>이 reaction mixture를 0°C에서 60분간 ice incubation 함으로써 nonchromosomal antibiotics resistance factor의 transformation frequency를 3~4배로 증가시킬 수 있었다는 결과와 유사하였다. 그러나 ice incubation을 하지 않아도 transformation 이 가능했던 것으로 보아 ice incubation은 필수적인 과정은 아니라고 생각된다.

DNA의 농도에 따른 transformation frequency를 보기 위하여 첨가하는 DNA양을 10배씩 증량하여 recipient  $8 \times 10^8$  cells에 transformation 시킨결과 DNA의 양이 증가함에 따라  $1 \times 10^{-4}$  mcg부터 1 mcg까지는 transformation frequency도 약 10배씩 증가하였으나 1 mcg 이상의 DNA 농도에서는 transformation frequency가 거의 증가하지 않았다. Jones 등<sup>8)</sup>은 *E. coli* W 5445를 recipient로 하여 pBR322 DNA로 transformation 시킨 결과, 2.5mcg/ml에서 최대의 transformation frequency를 나타내어  $5 \times 10^{-3}$  transformants per cell이었으며, Cohen 등<sup>9)</sup>은 2mcg/ml까지 DNA농도와 transformation frequency가 비례적으로 증가하였다고 했다. 이는 본실험의 결과와 유사한 것으로 생각된다.  $Ca^{++}$ 이 *E. coli* transformation에서 recipient cell과 donor DNA에 미치는 영향을 조사하기 위하여  $CaCl_2$  처리 단계와 donor DNA 혼합시기를 달리하였다. heat shock 후에  $CaCl_2$ 를 처리한 것은 heat shock전에 처리한 것에 비하여 매우 낮은 transformation frequency를 나타내었고, donor DNA는 heat shock 후에 첨가하는 것이 heat shock 전에 혼합하는 것에 비하여 낮은 transformation frequency를 나타내었다. 또 donor DNA 혼합시기 변화에서 ice incubation 한후 heat shock 전에 donor DNA를 혼합한 것은 ice incubation 전에 부가한 것에 비하여 transformation frequency가 반감하였다.  $CaCl_2$ 는 heat shock를 줌으로써 recipient cell membrane에서 lipid phase transition으로 recipient cell을 competent state로 유도하는 작용을 하며, 부가하여  $Ca^{++}$ -DNA complex를 형성하여 donor DNA를 recipient cell membrane을 통과하기 쉬운 상태로 되게하는 효과도 있다고 생각된다. transformation에서  $CaCl_2$ 의 역할은 donor DNA가 intact duplex 형태로서 recipient cell membrane에 흡착할 수 있도록 하며, recipient cell이 없는 경우에는 DNA분자간의 clump를 형성하게 하는 작용을 하는 것으로 알려져 있다. cell membrane level에서 구조적으로  $CaCl_2$ 의 작용을 억제하는 물질들은 DNA가 recipient 내로 uptake

되는 것을 방해하며 적당한 농도의  $Ca^{++}$ 이 작용함으로써 nigericin, valinomycin 등과 같은 inhibitor도 투과할 수 있다고 하였다<sup>10)</sup>.

$CaCl_2$  이외의 다른 2가 양이온 물질들이 transformation에 미치는 영향을 조사하기 위하여  $BaCl_2$  및  $MgCl_2$ 로 처리한 것은 transformation이 되지 않았다. Weston 등<sup>23)</sup>은 세포외막에서 단백질성의 integrity가 donor DNA의 결합에 필수적이며, 순수분리된 membrane fraction에 2가 양이온들은 donor DNA를 결합 시킬 수는 있으나 다른 ion보다  $Ca^{++}$ 이 가장 효과적이라고 하였다. Van alphen 등<sup>22)</sup>은  $Ca^{++}$ 이 *E. coli*에서 LPS와 단백질의 응결체로 되어 있는 세포외막 입자의 생성을 촉진시키며, 이와같은 성분으로 구성된 친수성 세포공으로 작용한다고 하였고,  $Mg^{++}$ 은 세포외막 입자의 생성정도가  $Ca^{++}$ 에 비하여 매우 낮다고 하였다. 형질전환에서 recipient로 사용한 *E. coli* C 600은 pBR 322 DNA를 전달받기전의 각종 항생제에 대한 MIC는 AP, TC, PC, CM, GM 및 KM에 대하여 모두 12.5 mcg/ml이었으나 pBR 322 DNA를 형질전환 받은 후에는 TC, AP 및 PC의 MIC는 100 mcg/ml 이상으로 높은 MIC치를 나타내어 상승하였으나, 다른 항생제에 대한 MIC는 12.5mcg/ml 이하로 변동이 없었다.

이와같이 donor군이 보유하고 있던 TC 및 AP에 대한 저항성인자는 확실하게 transformation 되었음을 알 수 있다. 여기서 PC내성이 동시에 증가한 것은 AP내성인자가 전달됨으로 인하여  $\beta$ -lactamase를 생성하여 그 작용으로 PC, AP의 공통구조인  $\beta$ -lactam ring을 파괴함으로써 나타나는 현상으로 추정된다<sup>9)</sup>.

## 결 론

유전자를 인공적으로 형질전환 시키는 과정에서 형질전환에 영향을 미치는 인자에 관하여 검토하고자, *E. coli* HB 101로부터 TC 및 AP에 저항성을 가진 pBR 322 DNA를 순수분리하여 recipient인 *E. coli* C 600에 형질 전환실험을 하였다.

형질전환에 관하여는 인자인  $CaCl_2$ , heat shock의 온도와 시간, ice incubation 시간, donor DNA의 양적관계, gene expression 시간 등을 달리하여 transformation frequency를 실험한 결과 다음과 같은 성적을 얻었다.

1.  $CaCl_2$  처리는 recipient cell을 heat shock 주기에  $CaCl_2$  100 mM로써 리하는 것이 transformation frequency가 가장 높았으며, recipient cell을  $CaCl_2$  처리하지 않은 것은 transformation이 되지 않았다.
2. heat shock는  $CaCl_2$  처리후 42°C에서 4분 혹은



37°C에서 6분간 처리한 것이 최고의 transformation frequency를 나타내었으며, 그 이후 부터는 시간의 경과에 따라 감소하는 경향이였다. heat shock를 주지 않았을 때는 transformation이 되지 않았다.

3. ice incubation은 0°C에서 heat shock 처리전에 45분, 후에 30분간 하는 것이 각 최고의 transformation frequency를 나타내었으며, ice incubation을 하지 않은 것보다 3~4배의 높은 빈도로 나타났다.

4. donor DNA의 양은 recipient  $8 \times 10^8$  cells에 대하여  $1 \times 10^{-4}$ mcg부터 1 mcg까지는 비례적으로 증가하여, 7mcg에서 가장높은 transformation frequency를 나타내었다. 그러나 1 mcg이상에서는 증량하여도 뚜렷한 증가는 없었다. donor DNA의 첨가는 recipient cell을  $\text{CaCl}_2$ 로 처리한 다음 바로 혼합하는 것이 가장 좋았다.

5. pBR322 DNA의 TC 및 AP저항성 gene의 gene expression은 37°C에서, TC저항성 gene은 40분간, AP저항성 gene은 100분간 정지함으로써 완전히 expression되었다.

TC저항성 gene은 AP저항성 gene보다 높은 transformation frequency를 나타내었다.

이상과 같이 transformation의 최적조건은 recipient cell을  $\text{CaCl}_2$  100 mM로써 처리한 다음 donor DNA를 혼합하고, 0°C에서 45분간 ice incubation, heat shock는 42°C에서 4분간, 다시 ice incubation을 0°C에서 30분간 한 후, gene expression을 위하여 37°C에서 100분간 정지하는 순으로 처리한 것이 가장 높은 transformation frequency를 나타내었다.

## 참 고 문 헌

1. Achtman, M., G. Morell, and S. Schwuchow: Cell-cell interactions in conjugating *Escherichia coli*; Role of F pili and fate of mating aggregates. J. Bacteriol., (1978) 135 : 1053.
2. Blattner, F.R., B.G. Williams. A.E. Blechl. K.D. Thompson, H.E. Faber, L.A. Furlong, D.J. Grundwald, D.O. Kiefer, D.D. Moore, J.W. Schumm, E.L. Sheldon, O. Smithies: Charon phages; Safer derivatives of bacteriophage Lamda for DNA cloning. Science, (1977) 196 : 161.
3. Boliver, F., R.L. Rodriguez, P.J. Greene, M.C. Betlach, H.L. Heyneker, H.W. Boyer, J.H. Crosa, and S. Falkow: Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. Gene. (1977) 2 : 95.
4. Burrell, C.J., P. Mackay, P.J. Greenaway, P.H. Hofschneider, and K. Murray: Expression in *Escherichia coli* of hepatitis B virus DNA sequence cloned in plasmid pBR 322. Nature (1979) 279 : 43.
5. Clowes, R.: Molecular structure of bacterial plasmids. Bacteriol. Rev., (1972) 36 : 361.
6. Cohen, S.N., A.C.Y. Chang., H.W. Boyer, and R.B. Helling: Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. Proc. Nat. Acad. USA., (1973) 70( : 3240.
7. Cohen, S.N., A.C.Y. Chang, and L. Hsu: Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria; Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, (1972) 69 : 2110.
8. Hershfield, V. H.W. Boyer, C. Yanofsky, M.A. Lovett, and D.R. Helinski: Plasmid Col EI as a molecular vehicle for cloning and amplification of DNA. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, (1974) 71(9) : 3455.
9. Higuchi, R., G.V. Paddock, R. Wall, and W. Salser: A general method for cloning eukaryotic structural gene sequence. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, (197) 73 : 3146.
10. Itakura, K., T. Hirose, R. Crea, A.D. Riggs, H.L. Heyneker, F. Boliver, and H.W. Boyer: Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. Science, (1977) 198 : 1056.
11. Jones, I.M., S.B. Primrose, A. Robinson, and D.C. Ellwood: Effect of growth rate and nutrient limitation on the transformability of *Escherichia coli* with plasmid deoxyribonucleic acid. J. Bacteriol., (1981) 146 : 841.
12. Lindahl, L. and J.M. Zengel.: Operon-specific regulation of ribosomal protein synthesis in *Escherichia coli*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, (1979) 76 : 6542.
13. Low, K.B. and D.D. Porter: Modes of gene transfer and recombination in bacteria. Ann. Rev. Genet., (1978) 12 : 249.
14. Mandel, M. and A. Higa: Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. J. Mol. Biol.,

- (1970) 53 : 159.
15. Nichol, C.P., J.H. Davis, G. Weeks, and M. Bloom: Quantitative study of the fluidity of *Escherichia coli* membranes using deuterium magnetic resonance. *Biochemistry*, (1980)19 : 451.
  16. Roberts, R.J. : \*Directory of restriction endonucleases. *Methods in Enzymology*, (1979) 68 : 27.
  17. Roe, E., R.J. Jones, and E.J.L. Lowbury. : Transfer of antibiotic resistance between *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and other gram-negative bacilli in burns. *Lancet*, (1971) 23 : 7691.
  18. Sabelnikov, A.G. and I.V. Domaradsky: Effect of metabolic inhibitor on entry of exogenous deoxyribonucleic acid into Ca<sup>2</sup> treated *Escherichia coli* cells. *J. Bacteriol.*, (1981) 146 : 435.
  19. Shin, S.G. : The mechanism of action of  $\beta$ -lactams. *J. Korean Soc. Chemother.*, (1983) 1 : 173.
  20. Smith, H.O. and D.B. Danner: Genetic transformation. *Ann. Rev. Biochem.*, (1981) 50 : 41.
  21. Tomasz, A. : Some aspects of the competent state in genetic transformation. *Ann. Rev. Genet.* (1969) 3 : 217.
  22. Van Alphen, L., A. Verkleij, L. B. Jose, and B. Lugtenberg: Architecture of the outer membrane of *Escherichia coli*, III. Protein-lipopolysaccharide complexes in intramembraneous particles. *J. Bacteriol.*, (1978) 134 : 1089.
  23. Weston, A., M.G.M. Brown, H.R. Perkins, J.R. Saunders, and G.O. Humphreys: Transformation of *Escherichia coli* with plasmid deoxyribonucleic acid; Calcium-induced binding of deoxyribonucleic acid to whole cells and to isolated membrane fractions. *J. Bacteriol.* (1981) 145 : 780.
  24. Willshaw, G.A., H.R. Smith, and E.S. Anderson: Application of agarose gel electrophoresis to the characterization of plasmid DNA in drug-resistant enterobacteria. *J. Gen. Microbiol.*, (1979) 114 : 15.
  25. Zeuthen, J., E. Morzow, and M.L. Pato: Pattern of replication of a colicin factor during the cell cycle of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, (1972) 112(3) : 1425.
-