

Enterobacter agglomerans 의 질소고정유전자 Cloning

정건섭¹ · 이정기¹ · 민태익² · 변유량¹ · 유주현^{1*}

¹연세대학교 식품공학과 ²한국과학기술원 유전공학센터

Cloning of *nif* genes from *Enterobacter agglomerans* in *Escherichia coli*.

Chung Kun Sub¹, Jung Kee Lee¹, Tae Ick Mheen², Yu Ryang Pyun¹ and Ju Hyun Yu¹

¹Dept. of Food Eng., Yonsei University, Seoul 120, Korea

²Genetic Eng. Center, KAIST, Seoul 131, Korea

In order to cloning of the *nif* genes of *Enterobacter agglomerans* NFB-264, the digested total DNA of the strain was ligated to pBR 322 and transformed into *E. coli*. Through the negative selection and colony hybridization, the transformants were obtained. The recombinant plasmids, pNEL 10 and pNES 20 were extracted from these transformants. It was known from Southern hybridization that pNEL 10 contained the 12 Mdal foreign DNA fragment hybridized with *nif* Q-X probe and pNES 20 included the 5 Mdal foreign DNA fragment hybridized with *nif* NE and *nif* YK probe.

질소고정유전자(*nif* gene)에 대한 연구는 주로 *Klebsiella pneumoniae* 를 사용하여 1970년대부터 활발히 진행되어 왔으며 현재까지 밝혀진 바로는 *K. pneumoniae* 의 *nif* gene 은 연속된 17개의 유전자가 8개의 operon 으로 이루어져 *his* gene 에 연결되어 있는 것으로 보고되어 있다(1~3). 또한 *K. pneumoniae* 의 *nif* gene cloning 에 대하여 1976년 Dixon 등(4)이 *in vivo* 에서 *nif* gene 을 갖는 P-group 의 plasmid 인 pRD1을 만들었으며, Cannon 등(5)은 1977년 *in vitro* 에서 pMB9를 vector 로 사용하여 *nif* gene 을 부분적으로 cloning 하여 pCRA 37을 만들었다. 그 후 Puhler 등(6)이 pRD1 으로부터 전체 *nif* gene 을 함유하는 pWK120을 cloning 하였으며 최근에는 Wang 등(7)이 *K. oxytoca* 의 전체 *nif* gene 을 cloning 하였다. 본 논문에서는 국내 논의를 통해서 분리한 질소고정미생물 중(8) 질소고정활성이 비교적 높은 *Enterobacter agglomerans* 의 *nif* gene 의 특성을 연구할 목적으로 이 *nif* gene 을 *E. coli* 내에 cloning 하였기에 보고한다.

재료 및 방법

사용미생물 및 plasmid

실험에 사용한 미생물과 plasmid 들은 Table 1에 나타냈으며, *E. coli* 배양에는 L-broth(0.5% yeast ext., 1% tryptone, 1% NaCl, 0.08% glucose)를 사용하였으며, *K. pneumoniae* 및 *E. agglomerans* 배양에는 NY배지(0.8% nutrient broth, 0.5% yeast ext.)를 사용하여 각각 37°C, 30°C에서 배양하였다.

DNA 의 분리

Plasmid DNA 의 대량분리는 Tanaka 등의 방법(9)에 따라 CsCl-EtBr 평형밀도구배초원심분리로 행하였고, plasmid DNA 의 소량분리는 Birnboim 등의 방법(10)으로 행하였다. Total DNA 는 Saito 등의 방법(11)으로 분리하였다.

DNA 절단 및 연결

DNA 절단을 위한 제한효소의 처리는 Davis 등의 방법(12)에 준해 행하였으며, DNA 연결은 T4-ligase 를 사용하여 15°C에서 4 시간 반응시킨 후 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켜 행하였다.

Table 1. List of bacterial strains and plasmids.

strain/plasmid	genetic marker
<i>E. coli</i> K060	wild (strain C)
<i>K. pneumoniae</i> M5a1	<i>nif</i> ⁺
<i>E. agglomerans</i> NFB264	<i>nif</i> ⁺
pBR322	Ap ^r , Tc ^r
pSA30	Tc ^r , <i>nif</i> KDH
pCM-1	<i>his</i> DG, <i>nif</i> Q-K

형질전환

형질전환 실험은 Nogard 등의 방법(13)에 따라 *E. coli* K060의 competent cell을 제조하였으며, competent cell과 DNA를 혼합하여 0°C에서 1시간 방치하고 신선한 L-broth를 첨가하여 37°C에서 90분간 형질발현시킨 후 항생물질이 첨가된 L-broth 한천배지에 도말하여 배양하였다.

Hybridization

① **Colony hybridization:** Colony hybridization 실험에서 filter 상에 colony를 형성시키고 colony를 분해시켜 filter에 DNA를 고정시키는 방법은 Grunstein 등의 방법(14)에 따라 행하였고, hybridization은 Denhardt의 방법(15)에 따라 행하였다.

② **Southern hybridization:** Southern hybridization 실험에서 DNA blotting 및 hybridization은 Southern의 방법(16)에 따라 행하였다.

③ **Probe DNA 조제:** Probe로 사용할 DNA 단편을 pSA30 및 pCM1으로부터 얻어 Nick Translation Kit(Amersham PB5025)를 사용하여 Rigby 등의 방법(17)으로 nick translation시켜 조제하였다.

④ **Autoradiography:** Autoradiography는 X-ray film(Kodak X-Omat) 위에 건조시킨 hybridized nitrocellulose filter를 덮어 놓고 -45°C에서 수일간 방치한 후 현상하여 행하였다.

결과 및 고찰

*E. agglomerans*의 *nif* gene에 대한 연구보고가 없으므로, 이 *nif* gene의 특성을 연구할 목적으로 국내 논토양에서 분리한 *E. agglomerans* NFB-264의 *nif* gene을 cloning 하였다. 이때 cloning 과정

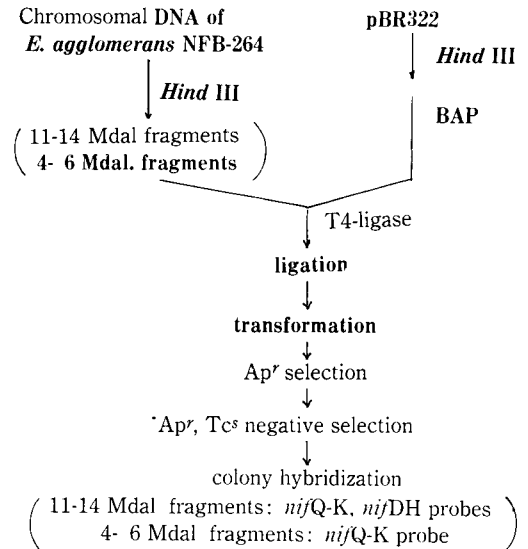


Fig. 1. The cloning scheme for plasmids containing *nif* fragments from *agglomerans* NFB-264

은 Fig.1과 같았다.

형질전환미생물 선별

전보(8)에 보고한 *E. agglomerans* NFB-264의 total DNA를 *Hind* III로 절단하여 hybridization시켰을 때 *nif* Q~K probe DNA와 homology를 나타낸 단편이 11.5 및 5.5 Mdal이었으며, *nif* DH probe와 homology를 나타낸 단편이 13.0 Mdal이었다. 따라서 cloning 실험에서는 *E. agglomerans* NFB-264의 total DNA를 *Hind* III로 절단한 후 11~14 Mdal DNA 분획과 4~6 Mdal DNA 분획을 *Hind* III로 절단한 pBR 322에 각각 연결시켜 *E. coli* K060에 도입시켜 ampicillin(Ap) 내성 colony를 선별하고, 다시 Ap 내성 균주로부터 tetracycline(Tc) 감수성 균주만을 선별하였다. 이중 실제 *nif* gene을 함유하는 recombinants를 찾기 위해 11~14 Mdal (large fragment) 분획에서 선별된 952주의 Ap^r, Tc^s colony는 *nif* Q~K 및 *nif* DH probe DNA와 각각 colony hybridization을 시켰으며, 4~6 Mdal (small fragment) 분획에서 선별된 586주의 Ap^r, Tc^s colony는 *nif* Q~K probe DNA와 colony hybridization시켰다. 그 결과 952주의 colony중 *nif* Q~K probe DNA와 hybridization된 colony 2주, *nif* DH probe와 hybridization된 colony 6주, 586주의 colony중 *nif* Q~K probe와 hybridization된 colony 3주

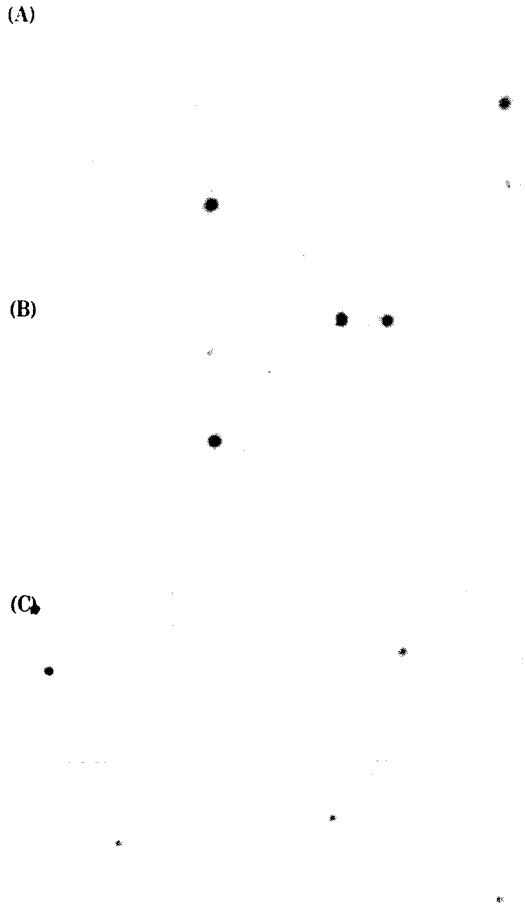


Fig. 2. Colony hybridization of the recombinant colonies.

(A); recombinants from large fragments, *nifQ*-K probe
 (B); recombinants from small fragments, *nifQ*-K probe
 (C); recombinants from large fragments, *nifDH* probe

를 각각 선별하였다(Fig.2).

Recombinant plasmid DNA 의 제한효소절단분석

Colony hybridization에서 선별된 균주의 recombinant plasmid 들의 삽입외래 DNA 를 분석하였다. Large fragment 를 함유하고 *nif Q*~K probe DNA 와 hybridization 된 2 개의 plasmid 는 pNEL 10a, pNEL 10b로, small fragment 를 함유하고 *nif Q*~K probe DNA 와 hybridization 된 3 개의 plasmid 는 pNES 20a, pNES 20b 및 pNES 20c 로, large fragment 를 함유하고 *nif DH* probe DNA 와 hybridization 된 6개의 plasmid 는 pNEL

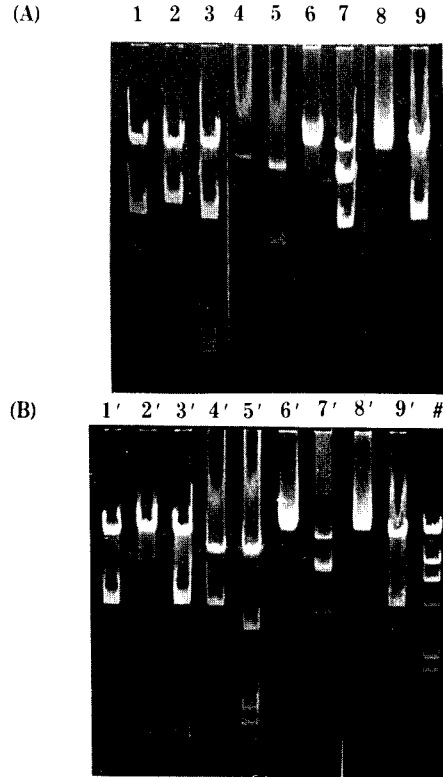


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of the digested recombinant plasmids containing large fragment hybridized with *nifQ*-K probe.

(A); pNEL 10a, (B); pNEL 10b
 lane 1,1'; *Hind* III digestion, lane 2,2'; *Eco*RI
 lane 3,3'; *Hind* III & *Eco*RI lane 4,4'; *Bam*RI
 lane 5,5'; *Hind* III & *Bam*HI, lane 6,6'; *Bgl*II
 lane 7,7'; *Hind* III & *Bgl*II lane 8,8'; *Xho*I
 lane 9,9'; *Hind* III & *Xho*I, lane #; λ-*Hind*III

30a, pNEL 30b, pNEL 30c, pNEL 30d, pNEL 30e 및 pNEL 30f 로 각각 명명하였다.

① **Recombinant plasmid pNEL 10** : pNEL 10의 2 종류 plasmid 분석을 위해 제한효소로 절단하여 전기영동한 결과는 Fig.3과 같다. 이들 plasmid 를 cloning 시에 사용한 제한효소인 *Hind* III로 절단한 결과를 비교해 보면 삽입된 외래 DNA 는 약 12 Mdal 정도로 동일하였으며, *Hind* III와 그 밖의 제한효소들(*Eco* RI, *Bam* HI, *Bgl* II, *Xho* I)로 2 종류의 plasmid 를 이중절단하였을 때도 band 의 위치와 숫자가 동일하였다. 그러나 이들을 *Eco* RI 및 *Bam* HI 단일절단시의 결과는 서로 상이하였다. 이상의 결과로부터 두 recombinant plasmid 는 12 Mdal 분자량의 동일한 외래 DNA 가 삽입방향만이

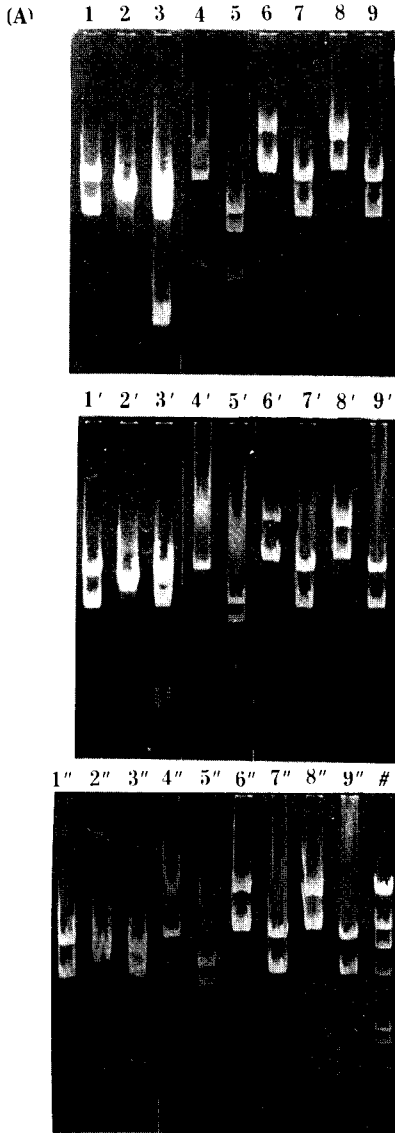


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of the digested recombinant plasmids containing small fragment hybridized with *nifQ-K* probe.

(A); pNES 20a, (B); pNES 20b, (C); pNES 20c lane 1,1', 1"; *Hind* III lane 2,2', 2"; *Eco*RI lane 3,3', 3"; *Hind* III & *Eco*RI lane 4,4', 4"; *Bam*HI lane 5,5', 5"; *Hind* III & *Bam*HI lane 6,6', 6"; *Bgl*II lane 7,7', 7"; *Hind* III & *Bgl* II lane 8,8', 8"; *Xho* I lane 9,9', 9"; *Hind* III & *Xho*I lane #; λ -*Hind* III

서로 반대로 들어가 있는 plasmid 들로 생각되었다.

② **Recombinant plasmid pNES 20** : pNES 20의 3 종류 plasmid DNA 분석결과는 Fig.4와 같다. 이들을 cloning 시에 사용한 제한효소인 *Hind* III로 절단

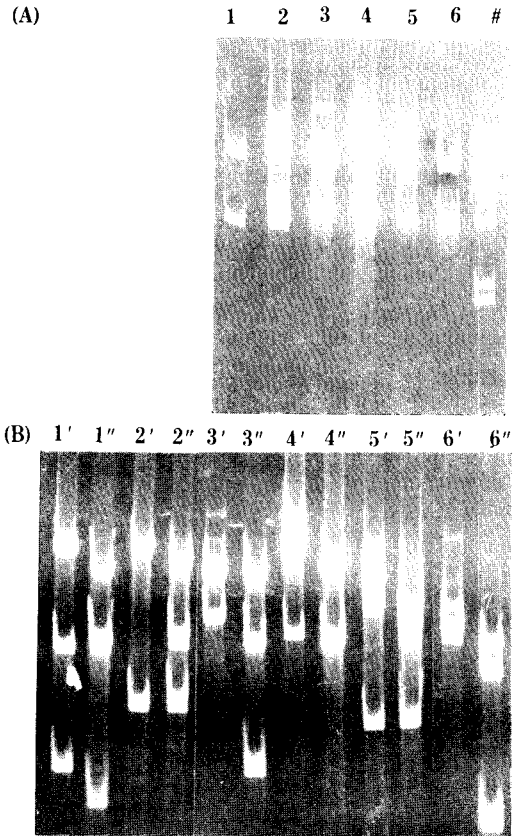


Fig. 5. Agarose gel electrophoresis of the digested recombinant plasmids containing large fragment hybridized with *nifDH* probe.

(A); *Hind* III digestion, (B); *Bam*HI and *Hind* III & *Bam*HI digestion lane 1,1', 1"; pNEL 30a, lane 2,2', 2"; pNEL 30b lane 3,3', 3"; pNEL 30c, lane 4,4', 4"; pNEL 30d lane 5,5', 5"; pNEL 30e, lane 6,6', 6"; pNEL 30f lane #; λ -*Hind* III

하였을 때 삽입된 외래 DNA 단편은 약 5 Mdal 정도로 동일하였다. 또한 *Eco* RI, *Bam* HI, *Bgl* II 및 *Xho* I 단일절단과 이들 제한효소 및 *Hind* III의 이중절단의 경우에도 band 들의 양상이 동일하였다. 이상의 결과로부터 pNES 20의 3 종류 plasmid 들은 삽입외래 DNA 단편이 분자량 5 Mdal의 동일한 단편을 함유한 동일 plasmid 임을 알 수 있었다.

③ **Recombinant plasmid pNEL30** : pNEL30의 6 종류 plasmid DNA 분석결과는 Fig.5와 같다. 이들을 cloning 시에 사용한 제한효소인 *Hind* III로 절단하여 비교한 결과 pBR 322에 해당하는 band와 삽입외래 DNA band로 2 개씩의 band 를 보이고 있으나 삽입외래 DNA 단편들의 분자량의 10.5~13.0

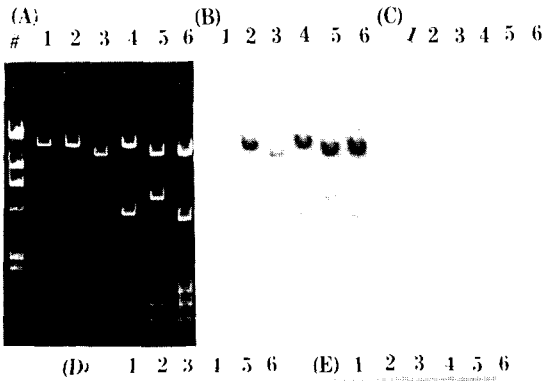


Fig. 6. Southern hybridization of the digested plasmid pNEL 10a, b with *nif* probes.

(A); agarose gel electrophoresis of pNEL10a, b (B); *nif*Q-X, (C); *nif*NE, (D); *nif*YK, (E); *nif*DH probe lane 1; pNEL 10a-*Hind* III, lane 2; pNEL 10a-*Bam*HI lane 3; pNEL 10a-*Hind* III & *Bam*HI lane 4; pNEL 10b-*Hind* III, lane 5; pNEL 10b-*Bam*HI lane 6; pNEL 10b-*Hind* III & *Bam*HI, lane #; λ -*Hind* III

Mdal 정도로 서로 상이하였다. 또한 pNEL 30의 plasmid 들을 *Bam* HI 단일절단 및 *Bam* HI와 *Hind* III 이중절단 하였을 때 band 양상이 서로 상이함을 보인 결과로부터 *nif* DH probe와 colony hybridization 된 colony 6 주는 이들의 total DNA와 *nif* DH probe DNA와의 비특이적 hybridization에 의한 것으로 생각되었다. 이 사실은 이들 6종의 recombinant plasmid pNEL30을 *nif* DH probe와 Southern hybridization 시켰을 때 hybridized band가 나타나지 않은 점으로 확인되었다.

Recombinant plasmid의 삽입외래 DNA의 *nif* gene 영역확인

pNEL 10 plasmid의 삽입외래 DNA 단편은 Fig. 6에 나타난 바와 같이 *nif* Q~X probe DNA에서만 hybridization 되고 나머지 *nif* NE, *nif* YK 및 *nif* DH probe DNA와는 hybridization 되지 않았

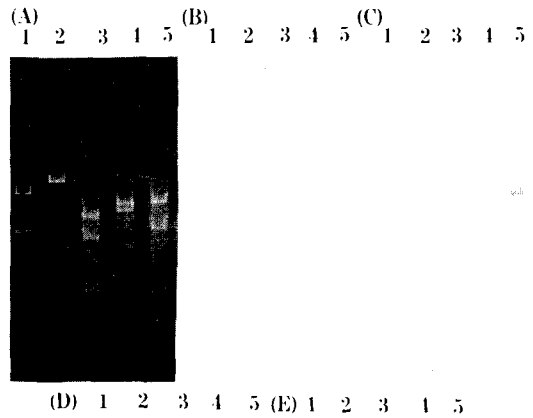


Fig. 7. Southern hybridization of the digested plasmid pNES 20 with *nif* probes.

(A); agarose gel electrophoresis of pNES20 (B); *nif*Q-X, (C); *nif*NE, (D); *nif*YK, (E); *nif*DH probe lane 1; pNES 20-*Hind* III, lane 2; pNES 20-*Bam*HI lane 3; pNES 20-*Hind* III & *Bam*HI lane 4; pNES 20-*Eco*R I lane 5; pNES 20-*Hind* III & *Eco*RI lane #; λ -*Hind*

다. 따라서 pNEL 10 recombinant plasmid는 *nif* gene 중 Q~X 영역을 함유하거나 적어도 *nif* gene의 일부분을 함유하는 것으로 생각되었다.

pNES 20 plasmid의 삽입외래 DNA 단편은 Fig. 7에 나타난 바와 같이 *nif* NE 및 *nif* YK probe DNA에서만 hybridization 되었으므로 pNES 20 recombinant plasmid는 *nif* gene 중 N~K 영역을 함유하는 것으로 생각되었다.

요 약

*Enterobacter agglomerans*의 질소고정유전자에 대한 연구가 보고된 바가 없으므로 이 질소고정유전자의 특성을 연구할 목적으로 국내 논의 흙에서 분리한 질소고정활성을 갖는 *E. agglomerans* NFB-264의 질소고정유전자를 cloning 하였다. *E.*

agglomerans NFB-264의 total DNA 를 *Hind* III로 절단하여 부분적으로 pBR 322에 연결하여 *Escherichia coli* K060에 도입한 후 negative selection 및 colony hybridization 방법으로 형질전환미생물을 선별하였다. 형질전환미생물로부터 recombinant plasmid인 pNEL 10과 pNES 20을 얻었다. pNEL 10은 *nif* Q~X probe DNA 와 hybridization 되는 12 Mdal 의 삽입외래 DNA 를 함유하였으며, pNES 20은 *nif* NE 와 *nif* YK probe DNA 와 hybridization 되는 5 Mdal 의 외래 DNA 가 삽입되어 있었다.

참고문헌

1. Streicher, S., E. Gurney and R.C. Valentine: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 1174 (1971)
2. Dixon, R.A. and J.R. Postgate: *Nature* (London), **234**, 47 (1971)
3. Ausubel, F.M., S.E. Brown, F.J. de Bruijn, D.W. Ow, G.E. Riedel, G.B. Ruvukun and V. Sundaresan: *Genetic Engineering*, Vol. 4, Plenum Press, New York and London, pp. 169-198, 1982
4. Dixon, R., F. Cannon and A. Kondorosi: *Nature* (London), **260**, 268 (1976)
5. Cannon, F.C., G.E. Riedel and F.M. Ausubel: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 2963 (1977)
6. Puhler, A., H.J. Burkardt and W. Klipp: *Mol. Gen. Genet.*, **176**, 17 (1979)
7. Wang, P.L., S.K. Koh, K.S. Chung, T. Uozumi and T. Beppu: *Agr. Biol. Chem.*, **49**, 1469 (1985)
8. 정건섭, 민태익, 변유량, 유주현: 한국산업미생물학회지, **13**, 251(1985)
9. Tanaka, T. and B. Weisblum: *J. Bacteriol.*, **121**, 354 (1975)
10. Birnboim, H.C. and J. Doly: *Nucleic Acids Research*, **7**, 1513 (1979)
11. Saito, H. and K.I. Miura: *Biochim. Biophys. Acta*, **72**, 619 (1963)
12. Davis, R.W.D. Botstein and J.R. Roth: *Advanced Bacterial Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp. 228-230, 1980
13. Norgard, M.V., K. Keem and J. Monahan: *Gene*, **3**, 279 (1978)
14. Grunstein, M. and D.S. Hogness: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 3961 (1975)
15. Denhart, D.T.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **23**, 641 (1966)
16. Southern, E.M.: *J. Mol. Biol.*, **98**, 503 (1975)
17. Rigby, P.W.J., M. Dieckmann, C. Rhodes and P. Berg: *J. Mol. Biol.*, **113**, 237 (1977)

(Received March 3, 1987)