

溫度感受性 大腸菌의 形質轉換條件 및 Ampicillin 耐性の 表現

陳 德 姬·洪 龍 基*
釜山水產大學 資源生物學科·*生物工學科
(1986년 9월 31일 수리)

Transformation Conditions and Ampicillin-resistant Expression of *E. coli* Ts-mutant

Deuk Hee JIN and Yong Ki HONG*

Department of Marine Biology, National Fisheries University of Pusan, Nam-gu, Pusan 608, Korea

*Department of Biological Science and Technology, National Fisheries University of Pusan, Nam-gu, Pusan 608, Korea

(Received September 31, 1986)

The transformational conditions of plasmids pPL-λ and pAS 1 are as follows in *E. coli* Ts-mutant M 5248 strain at 30°C.

When the culture time was 2.5 hours of mid logarithmic phase, the cell concentration was 4.5×10^7 cells/ml, the optical density was equal to 0.45 at 590 nm wave length, the transformational frequencies of plasmid pPL-λ and pAS 1 had the highest values as 2×10^{-6} and 1.5×10^{-6} respectively.

For 9×10^6 competent cells in 200μl, the transformational frequency was as high as 4.4×10^{-6} at 510 ng plasmid concentration. The competent cells treated with the mixture of calcium chloride and thymidine twice rates of transformation than those treated with calcium chloride.

The ampicillin resistance of transformants was expressed in LB broth after 2 hours at 30°C.

緒 論

形質轉換이란 일반적으로 순수하게 抽出分離된 遺傳子에 의하여 藥劑 및 중금속 耐性, 抗原性, 毒素生成, 탄소원 이용능력 등의 유전형질이 다른세포로 전환되는 것을 말하며 이러한 형질전환은 宿主細胞의 遺傳生理的 性質에 따라 좌우된다¹⁾.

이때 使用하는 유전자는 plasmid DNA에 의하여 이들을 매개체로 하여 種이 다른 生物體의 유전자를 이들 plasmid에 挿入시켜 함께 형질전환 시킬 수 있다. 현재까지 주로 사용하고 있는 宿主細胞로서의 大腸菌에 대하여 외부의 유전자를 최대로 表現시키

고자 하려면 強力한 promoter와 적당한 ribosomal binding site의 構造가 있어야만 한다.

이와같은 條件을 갖춘 promoter로서는 lac-UV5, trp, tac I, tac II, λPL, lpp, lac, gal 등이 알려져 있으며 이 중 가장 많은 生成物을 만드는 plasmid는 λphage의 PL promoter를 가진 pPL-λ(lambda)와 pAS 1으로 알려져 있다. 이들은 培養溫度를 42°C로 하면 repressor의 活性이 없어져서 많은 量의 生成物을 合成하도록 誘導시킬 수 있다²⁾.

따라서 위와같은 plasmid를 가진 大腸菌은 溫度感受性 變異菌株를 使用하여야 하므로 일반적인 大腸菌과는 그 培養條件을 달리해야 한다.

本 研究에서는 溫度感受性 大腸菌 M 5248을 使用한 形質轉換時 그 最適條件과 ampicillin 耐性的의 表現時間을 調査하였다.

材料 및 方法

1. 使用菌株 및 plasmid

本 實驗에 使用한 온도감수성 대장균은 미국 University of California-Berkeley, Department of Chemistry, S.H. Kim 교수 연구실로 부터 分讓받은 M5248(λ bio 275 cl 857 Δ H1; Δ H1 deletes λ genes Cro-R-A-J-b2) 菌株³⁾를 宿主細胞로 使用하였으며 plasmid 는 pPL- λ 와 pAS 1을 使用하였다.

2. Plasmid 의 分離

Plasmid 는 대장균 N99cI⁺로 부터 alkaline SDS 法에 의하여 분리⁴⁾하였으며 抽出된 plasmid 를 眞空 dessicator 에서 乾燥시킨 다음 TE 완충용액(10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 80 μ g/ml 濃度로 懸탁하여 使用하였다.

3. 形質轉換方法

Mandel 과 Higa 에 의해 알려진 方法⁵⁾으로서 대장균 M 5248 菌株을 하룻밤 동안 LB 培地(10% Tryptone, 5% Yeast extract, 10% NaCl, pH 7.5)에서 培養시킨 후 이를 10 ml LB 培地에 0.2 ml 씩 接種하여 Cecil CE 599 比色計의 波長 590 nm 에서 吸光度 0.5가 될 때까지 30°C 에서 진탕배양 시킨 다음 4,000 \times g 로 5分間 원심분리 시켜서 菌體를 모은다. 이 菌體를 calcium chloride-thymidine 溶液 (50 mM Calcium chloride, Thymidine 50 μ g/ml, 10 mM Tris, pH 8.0) 2 ml 에 懸탁하여 ice 에서 5분간 둔 다음 원심분리하여 0.4 ml 로 되게 再懸濁하여 ice 에서 5분간 반응시켜 competent 細胞로 使用하였다.

形質轉換은 이들 細胞懸濁液 200 μ l (9×10^6 cell)와 plasmid DNA 510 ng (6.4 μ g/ml)를 混合하여 30°C 에서 5분간 반응시켰다. 여기에 LB 培地 1.8 ml 를 첨가하여 2時間 동안 ampicillin 耐性形質을 表現시켰으며 이것을 LB 한천배지에 塗抹하여 30°C 에서 하루 동안 培養시킨 다음 나타난 colony 를 測定하여 형질전환된 細胞率을 調査하였다.

4. 形質轉換된 細胞의 選別

Ampicillin (40 μ g/ml—DMSO)을 첨가한 LB 培地

上에 형질전환된 細胞懸濁液을 0.2 ml 및 0.3 ml 씩 塗抹하여 30°C 에서 하루 동안 培養하였다.

Ampicillin 이 첨가된 培地에서 자라는 colony 를 형질전환된 세포로 계산하였고 대조구는 ampicillin 을 첨가하지 않은 LB 한천배지에 도말하여 비교하였다.

5. Agarose gel 電氣泳動

Helling *et al.*의 方法⁶⁾에 따라 0.7%의 agarose 를 使用한 minigel 을 tris·borate 완충용액(89 mM Tris, 89 mM Boric acid, 2 mM EDTA, pH 8.0)속에서 70 volt 로 45分동안 전기영동을 한 다음 gel 은 ethidium bromide 용액(0.5 μ g/ml) 속에 30分間 담가 두었다가 자외선 下에서 plasmid band 를 확인하였다.

結果 및 考察

1. 菌體成長度에 따른 效果

하룻밤 동안 培養한 菌體를 새로운 LB 培地에 接種하여 30°C 에서 진탕배양 하면서 그 培養時間을 달리 하여 菌體성장도에 따른 形質轉換率을 調査한 비 Fig. 1과 같이 나타났다.

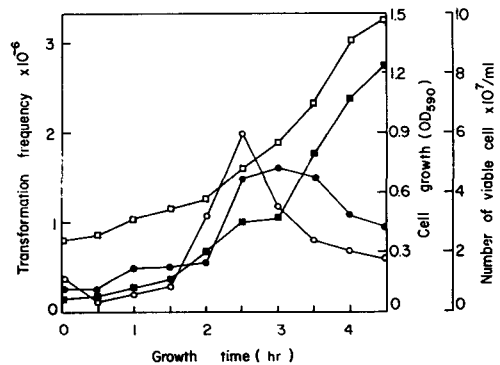


Fig. 1. Effect of the incubation time and cell concentration of competent cell on transformation frequency. M5248 cells in LB broth were incubated at 30°C with shaking.

Symbol: ●—●, transformation frequency of plasmid pAS 1; ○—○, transformation frequency of plasmid pPL- λ ; ■—■, cell growth; □—□, viable cell count.

이때 plasmid pPL- λ 의 경우는 cell數가 3.5×10^7 cells/ml 일때 형질전환이 일어나기 시작해서 120分 배양했을 때 부터는 급격히 증가하여 150分間 배양

시켰을 때 배양액의 吸光度는 0.45였고 cell 數는 4.7×10^7 cells/ml 였으며 형질전환된 細胞數는 94個로서 그 率은 2.0×10^{-6} 頻度로서 가장 높게 나타났으며 그 이상의 成長에 있어서는 형질전환율이 차츰 감소하며 240分 배양 이후에는 cell 數가 9.0×10^7 cells/ml 로 증가하지만 형질전환되는 頻度は 7.0×10^{-7} 정도로 떨어진다.

그리고 plasmid pAS 1은 150分에서 210分 동안 배양 하였을 때, 즉 세포의 濃도가 4.7×10^7 cells/ml 에서 7×10^7 cells/ml 로 될 동안 형질전환된 細胞數는 71個에서 105個로 나타났으므로 그 形質轉換 頻도가 가장 높았다.

이와같이 온도감수성 변이균주에 있어서도 細菌^{7,8)}, 酵母⁹⁾ 등에서의 마찬가지로 細胞의 增殖이 가장 왕성하게 일어나는 對數增殖期에서 형질전환이 가장 잘 일어난다.

2. Plasmid DNA 量에 따른 效果

形質轉換時 最適 plasmid DNA 의 量을 測定하기 위하여 $6.4 \mu\text{g/ml}$ 농도까지 5단계로 나누어 實驗한 바 그 結果는 Fig.2와 같이 나타났다.

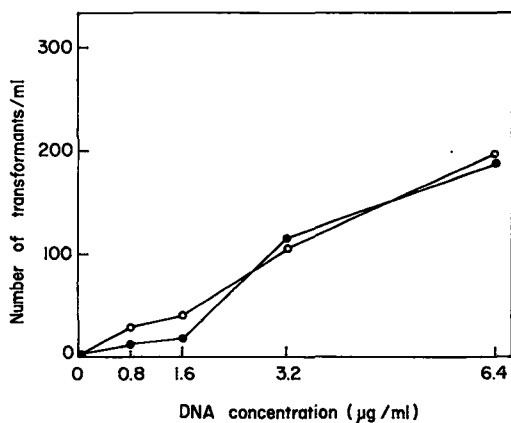


Fig. 2. Effect of DNA concentration on transformation. M5248 cells (4.5×10^7 cells/ml) were incubated for 150 min at 30°C with shaking. Symbol: ●—●, transformants of plasmid pAS 1; ○—○, transformants of plasmid pPL-λ.

Plasmid pPL-λ 및 pAS 1은 $6.4 \mu\text{g/ml}$ 의 DNA 농도 일때 형질전환 懸濁液 1 ml 당 200個 및 190個로서 가장 높은 形質轉換 頻度を 나타내었는데 다른 일반 세균^{8,10-13)}에서는 plasmid 量이 $1 \mu\text{g/ml}$ 까지는 증가하나 그 이상의 농도에서는 변화가 없었다.

3. Competent cell 의 誘導

菌體培養液을 원심분리 시켜서 모든 細胞를 calcium chloride-thymidine 용액, calcium chloride 용액, thymidine 용액, 그리고 대조구로서 tris buffer (10 mM , pH 8.0)를 각각 처리하여 competent cell 로 誘導시켜서 형질전환 시킨 結果를 Fig.3과 같이 나타내었다.

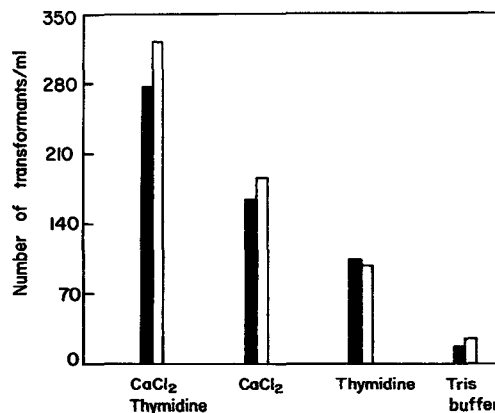


Fig. 3. Induction of competent cell by calcium chloride and thymidine. M5248 cells (4.5×10^7 cells/ml) were treated with 0.05 M calcium chloride and $50 \mu\text{g}$ of thymidine per ml. Symbol: ■, transformants of plasmid pAS 1; □, transformants of plasmid pPL-λ.

Calcium chloride 용액만으로 處理했을 경우는 形質轉換率이 3.9×10^{-6} 으로 나타났으며 thymidine 이 함께 첨가된 용액으로 處理했을 때는 plasmid pPL-λ 와 pAS1에서 각각 7.6×10^{-6} 과 6.1×10^{-6} 의 형질전환율을 나타내어 calcium chloride 용액만으로 처리한 경우에서 보다 형질전환이 2배나 더 높게 일어났다. 또한 thymidine 만으로 처리한 경우에서는 2.3×10^{-6} 의 頻度を 나타내었는데 이것은 calcium chloride · thymidine 용액에서 나타난 形質轉換率의 1/3정도였다.

그리고 대조구로서 tris buffer 를 처리한 경우에는 형질전환이 거의 일어나지 않았다.

이와같이 plasmid 를 받아들이기 쉬운 상태인 competent cell 을 誘導하기 위하여 calcium 2가 이온으로 處理¹⁴⁻¹⁸⁾하였을 때 많은 transformant 가 生成되는 것으로 보아 calcium 2가 이온이 細胞膜의 透過性을 좋게하여 plasmid 를 잘 吸收하는 것으로 추측할 수 있으며 이때 thymidine 은 이의 촉진효과¹⁹⁾를 갖는 것으로 나타났다.

4. 形質轉換에 대한 PEG의 效果

形質을 轉換시킬 때 磷脂質에 영향을 주는^{10,20} polyethyleneglycol (PEG)添加效果를 조사해 보기 위하여 30°C에서 5分 동안 plasmid와 competent cell을 접촉시키고 난 후 35%의 PEG 각 分子量別로 1時間 동안 처리한 바 Fig.4와 같은 結果를 얻었다.

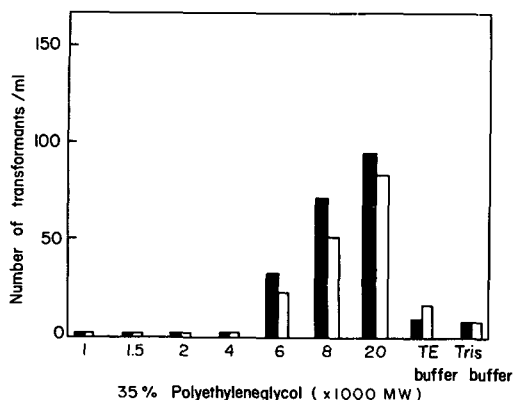


Fig. 4. Effect of PEG on transformation. Equal volume of 70% PEG was added to the transformation mixture after 5 min contact, and incubated 1 hour at 30°C.

Symbol : ■, transformants of plasmid pAS 1; □, transformants of plasmid pPL-λ.

이 中 PEG 20,000의 경우는 2.0×10^{-6} 의 形質轉換率을 나타냈지만 이는 PEG 處理過程이 없는 경우의 형질 전환율 7.0×10^{-6} 에 비하면 1/3정도로서 오히려 더 적게 나타났다.

5. Ampicillin 耐性遺傳子의 表現

Plasmid에 의해 形質轉換된 후 ampicillin 耐性遺傳子의 표현을 위하여 LB 培地를 添加하였다. 그 結果 Fig.5와 같이 LB 배지 및 LB배지에 포도당이 첨가된 경우에 형질 전환율이 약 6×10^{-6} 으로 가장 높게 나타났다.

그러나 이들 培地 構成 성분들 각각 만으로서는 ampicillin 내성 유전자가 거의 표현되지 않았다.

또한 LB 배지를 사용하여 ampicillin 내성 유전자의 表現時間을 조사한 바 그 결과는 Fig.6과 같이 30°C에서 2時間 정도 培養했을 때 7.0×10^{-6} 頻度로 形質表現이 이루어졌으므로 이와같은 溫度感受性 菌의 형질 전환에 있어서 ampicillin 耐性遺傳子 表現을 위하여서는 30°C에서 2時間 培養이 必要하였다.

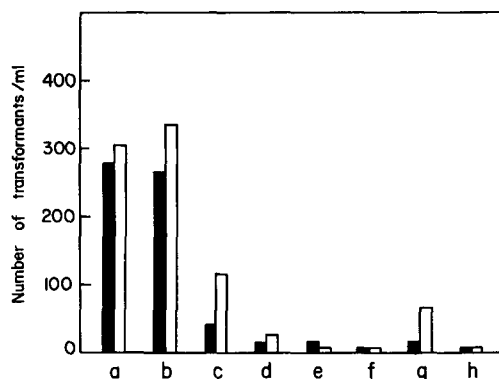


Fig. 5. Effect of LB broth for the expression of ampicillin resistance. The expression was done at 30°C for 2 hours.

a, LB broth; b, LB broth and 1% glucose; c, 1% tryptone and 0.5% yeast extract; d, 1% tryptone; e, 0.5% yeast extract; f, 1% sodium chloride; g, 1% glucose; h, LB broth was added after 2 hours. Symbol : ■, transformants of plasmid pAS 1; □, transformants of plasmid pPL-λ.

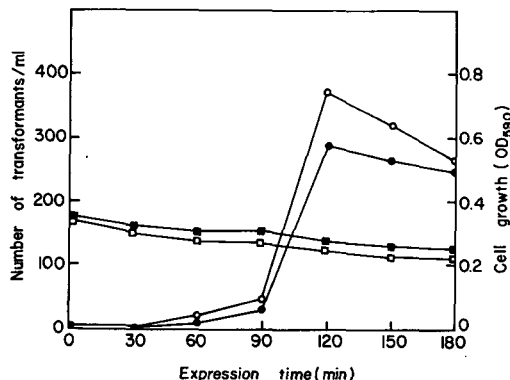


Fig. 6. Expression time for the ampicillin resistance in LB broth.

Symbol : ●—●, transformants of plasmid pAS 1; ○—○, transformants of plasmid pPL-λ; cell growth of pAS 1 transformants; □—□, cell growth of pPL-λ transformants.

6. 形質轉換細胞의 plasmid 確認

Ampicillin 첨가 배지에서 자라는 형질 전환된 세포의 plasmid가 원래의 plasmid와 그 分子量 크기가 同一한 것인지의 여부를 알아보기 위하여 0.7% agarose gel을 사용한 電氣泳動方法으로 조사한 바

溫度感受性 大腸菌의 形質轉換條件 및 Ampicillin 耐性的 表現

Fig. 7과 같이 plasmid pPL-λ는 분자량 5,200 bp, pAS 1은 분자량 5,800 bp로서 同一하게 確認되었다.

L1 L2 L3 L4 L5 L6 L7 L8



Fig. 7. Electrophoresis pattern of plasmid pAS 1 and pPL-λ. Electrophoresis was performed in 0.7% agarose gel at 70V for 45min and stained with ethidium bromide. Lane 1, Molecular marker pGU 66(18.1 Kb); Lane 2, Molecular marker pBR 322 (4.3 Kb); Lane 3, Plasmid pAS 1(5.8 Kb); Lane 4, Plasmid pAS 1 from transformant; Lane 5, Plasmid pPL-λ(5.2 Kb); Lane 6, Plasmid pPL-λ from transformant; Lane 7, Molecular marker pUC 9(2.7 Kb); Lane 8, Molecular marker YEP 13 (10.7 Kb).

要 約

溫度感受性 大腸菌 M 5248 菌株에 있어서의 plasmid pPL-λ와 pAS 1을 30°C에서 형질전환 시킬 때의 條件을 조사한 바 培養時間에 있어서는 균주의 對數 增殖期 中盤인 2時間 30分 培養時, 즉 cell 농도는 4.5×10^7 cells/ml이며 파장 590 nm에서의 吸光度가 0.45 일때 plasmid pPL-λ와 pAS 1 모두 형질전환율은 2×10^{-6} 과 1.5×10^{-6} 로서 가장 높았다.

그리고 competent cell $200 \mu\text{l} (9 \times 10^{-6} \text{ cell})$ 에 대하여 plasmid 농도가 $6.4 \mu\text{g/ml}$ 일때 形質轉換率이 4.4×10^{-6} 로서 높게 나타났으며 이때 calcium chlo-

ride 만으로 處理한 것 보다 calcium chloride와 thymidine을 혼합하여 처리했을 때 2배 정도 더 많은 transformant를 유도하였다.

Ampicillin 내성유전자는 LB 배지를 添加하여 30°C에서 2時間 동안 培養했을 때 그 形質이 表現되었다.

文 獻

1. 鄭東孝. 1984. 食品微生物學. 先進文化社. 569—571.
2. De Boer, H. A. and H. M. Shepared. 1983. Strategies for optimizing foreign gene expression in *Escherichia coli*. Horizons in Biochemistry and Biophysics, Ed. by E. Quagliariello and F. Palmieri, 7, 205—248.
3. Remaut, E., P. Stanssens and W. Fiers. 1981. Plasmid vectors for high-efficiency expression controlled by the pL promoter of coliphage lambda. *Gene*, 15, 81—93.
4. Maniatis, T., E. F. Fritsch and J. Sambrook. 1982. Molecular cloning. Cold spring harbor laboratory, p. 88, pp. 368—369.
5. Maniatis, T., E. F. Fritsch and J. Sambrook. 1982. Molecular cloning. Cold spring harbor laboratory, pp. 249—251.
6. Maniatis, T., E. F. Fritsch and J. Sambrook. 1982. Molecular cloning. Cold spring harbor laboratory, pp. 150—163.
7. Rudin, L., J. E. Sjostrom, M. Lindberg and L. Philipson. 1974. Factors affecting competence for transformation in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, 118, 155—164.
8. Hong, Y. K. 1981. Transformation of *Bacillus subtilis* by *Streptomyces rimosus* plasmid DNA. Doctoral thesis, Kyungpook National University.
9. Ito, H., Y. Fukuda, K. Murata and A. Kimura. 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.*, 153, 163—168.
10. Fornari, C. S. and S. Kaplan. 1982. Genetic transformation of *Rhodospseudomonas sphaeroides* by plasmid DNA. *J. Bacteriol.*, 152, 89—97.
11. Graves, J. F., G. D. Biswas and P. F. Sparling. 1982. Sequence-specific DNA uptake in transformation of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Bacte-*

- riol.*, 152, 1071—1077.
12. Takahashi, W., H. Yamagata, K. Yamaguchi, N. Tsukagoshi and S. Udaka. 1983. Genetic transformation of *Bacillus brevis* 47, a protein-secreting bacterium by plasmid DNA. *J. Bacteriol.*, 156, 1130—1134.
 13. Bullerjahn, G. S. and R. H. Benzinger. 1982. Genetic transformation of *Rhizobium leguminosarum* by plasmid DNA. *J. Bacteriol.*, 150, 421—424.
 14. Mercer, A. A. and J. S. Loutit. 1979. Transformation and transfection of *Pseudomonas aeruginosa*: Effects of metal ions. *J. Bacteriol.*, 140, 37—42.
 15. Maclachlan, P. R. and K. E. Sanderson. 1985. Transformation of *Salmonella typhimurium* with plasmid DNA: Differences between rough and smooth strains. *J. Bacteriol.*, 161, 442—445.
 16. Santamaria, R. I., J. A. Gil and J. F. Martin. 1985. High frequency transformation of *Brevibacterium lactofermentum* protoplasts by plasmid DNA. *J. Bacteriol.*, 162, 463—467.
 17. Strike, P., G. O. Humphreys and R. J. Roberts. 1979. Nature of transforming deoxyribonucleic acid in calcium-treated *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 138, 1033—1035.
 18. David, M., M. Tronchet and J. Denaric. 1980. Transformation of *Azotobacter vinelandii* with plasmids RP4(IncP-1 Group) and RSP 1010(IncQ Group). *J. Bacteriol.*, 146, 1154—1157.
 19. Nieuqenhoven, M. H., K. J. Hellingwerf, G. Venema and W. N. Konings. 1982. Role of proton motive force in genetic transformation of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 151, 771—776.
 20. Kondo, J. K. and L. L. McKay. 1984. Plasmid transformation of *Streptococcus lactis* protoplasts: Optimization and use in molecular cloning. *Appl. Environ. Microbiol.*, 48, 252—259.