

Enterococcus faecalis KBL703 Plasmid p703/5의 Replication Origin의 Cloning

전영욱 · 정세영 · 김영우 · 장효일*
고려대학교 자연자원대학 유전공학과

Cloning of Replication Origin from Enterococcal Plasmid p703/5

Jeon, Young-Wook, Se-Young Jeong, Young-Woo Kim and Hyo-Ihl Chang*

Department of Genetic Engineering, Korea University, Seoul 136-701, Korea

Abstract — *Enterococcus faecalis* KBL703 has three plasmids(p703/9, p703/5 and p703/4). Within p703/5, the specific DNA region that would confer replication function(replication origin) was searched by transformation experiments. In order to use as the recipient of transformation, two plasmid-cured strains were made from this strain. Four recombinant DNA constructs, each containing fragment of p703/5 and CAT(chloramphenicol acetyl transferase) gene were also made. And they were used to transform the plasmid-cured strains. Only one DNA construct containing 3.6 kb Sall fragment was stably maintained as plasmid in these strains. Additional experiment using another *Enterococcus faecalis* strain(ATCC 29212) as a recipient was successfully done and it was confirmed that this newly constructed recombinant plasmid contained the replication origin from p703/5 plasmid.

Enterococcus faecalis(*En. faecalis*)는 *Streptococcaeae*과(科)에 속하며 매우 높은 빈도로 plasmid의 존재를 보이는 균종이다. 이 균종에서 plasmid는 hemolysin 생성(2, 3), bacteriocin 생성(3), conjugation 기능(1, 4), 항생제에 대한 내성(1, 5, 6)등 매우 다양한 기능을 부여하고 있음이 알려져 있다. 특히 이 균종은 conjugation에 의해서 매우 높은 빈도로 같은 종 또는 다른 종, 심지어 다른 속과 다른과의 여러 균종에까지 plasmid의 전이를 이루는 것으로 알려져(7) 최근, 각종 항생제에 대하여 내성을 갖는 병원성균들이 많아지는 것에도 밀접한 관계가 있는 것으로 추측되고 있다.

*En. faecalis*에서의 분자 유전학적 연구는 이 균종에서 안정하게 유지되는 효율적인 vector-숙주체계의 부재 때문에 최근까지도 많은 어려움이 있었다. 그동안 개발되었던 많은 plasmid vector들은 대개 rolling-circle replication(RCR) 방식을 통하여 DNA 복제가 이루어지는 것으로 보고된 바 있는데(8) 이 경우 중간 산물로 생산된 ssDNA(single-stranded DNA)가 replication의 진행을 방해한다고 알려져 있으며(9), 또한 축적된 ssDNA는 illegitimate recombination 비율을 크게 증가시킴으로써 plasmid를 불안정하게

한다는 결과가 보고되어 있다(10). 따라서 RCR방식을 따르지 않는 plasmid를 찾기 위한 노력들이 최근 들어 많이 진행되고 있는 실정이다(11). 본 연구는 *Enterococcus faecalis* KBL 703에서의 plasmid DNA로부터 유용한 plasmid vector의 개발 가능성을 조사하기 위한 목적으로 실행되었다. 이를 위하여 이 균주로부터의 plasmid-cured 변이주들에 p703/5의 각 절편을 transformation 함으로써 이 plasmid의 replication origin을 cloning 하였다.

재료 및 방법

균주 및 Plasmid

En. faecalis KBL 703은 본 연구실에서 원유(原乳)로부터 분리·동정하였다(12). *E. coli*에서의 cloning을 위한 숙주로는 JM 109를 사용하였고, *E. coli*의 cloning vector로는 pUC18과 pUC19의 *AccI* 제한효소 위치에 *Staphylococcus aureus*에서 발견된 plasmid인 pC194를 *TaqI*으로 절단하여 얻은 chloramphenicol acetyl transferase 유전자(13)를 삽입한 pEK104를 사용하였다. *En. faecalis* 형질전환을 위한 숙주로는 *En. faecalis* KBL 703으로부터 얻은 plasmid-cured 변이주(KBL 703C2, KBL 703C3)들과 *En. faecalis*

Key words: *Enterococcus faecalis*, replication origin
*Corresponding author

ATCC 29212를 사용하였다(14).

배지

*En. faecalis*의 일반적 배양에는 M17 배지를 사용하였으며 *En. faecalis*에서의 형질전환균주 선별용 배지로는 5 µg/ml의 chloramphenicol을 포함하는 streptococcal regeneration(SR) plate(15)를 사용하였다.

Plasmid DNA의 분리 및 DNA manipulation

*En. faecalis*에서의 plasmid DNA의 분리는 Anderson과 MacKey(16)의 방법을 따라 시행하였으며 효율적인 lysis를 위하여 2%의 glycine을 첨가한 M17 액체배지를 사용하였다. *E. coli*에서의 cloning 및 재조합 DNA를 구성하는데 필요한 모든 실험방법은 주로 Sambrook 등(17)의 방법을 따랐으며, 제한효소들은 제조회사에서 제시한 방법에 따라 사용하였다.

Plasmid-cured 변이주의 분리

M17 액체배지에서 36°C, 16시간 배양한 *En. faecalis* KBL 703의 배양액을 각각 0, 10, 15, 20, 30 µg/ml의 novobiocin을 포함하는 5 ml의 M17 액체배지에 직선 백금으로 접종한 후 37°C에서 24시간 배양하였다. 생장이 관찰된 가장 높은 농도의 항생물질이 첨가된 배양액을 선택하여 10진 희석하고 희석액 0.1 ml를 lactose indicator agar(18)에 평판도포하여 37°C에서 배양하였다. 생성된 colony를 임의로 선택하여 plasmid DNA 분리 및 agarose gel 전기영동을 통하여 plasmid-cured 변이주임을 확인하였다.

*En. faecalis*의 형질전환

*En. faecalis*의 형질전환은 Cruz-Rodz와 Gilmore의 electroporation 방법(15)에 준하여 시행하였다. Electropotent cell 준비시 균 배양에는 SM17(0.5 M의 sucrose를 첨가한 M17 배지)에 6%의 glycine을 첨가하여 사용하였고 electroporation은 Hoefer사의 PG 240 Bacterial Electrode 와 Progenitor II를 사용하였다(single electric pulse, 12,000 V/cm peak voltage, 4.7 msec, 100 µF). 형질전환된 균주는 5 µg/ml의 chloramphenicol을 첨가한 SR plate에 glass beads를 이용하여 도말한 후 37°C에서 48시간 배양하여 선별하였다.

결과 및 고찰

Plasmid-cured 변이주의 분리

En. faecalis KBL 703으로부터 plasmid DNA를

분리한 후 agarose gel 전기영동을 실시하여 관찰한 결과 5개의 DNA band를 관찰하였다. 이 gel에서 주요 band를 elution하여 agarose gel 전기영동 특성을 비교한 결과 이 균주는 3개의 서로 다른 크기를 갖는 plasmid DNA를 가지고 있음을 알아내었다(실험자료는 생략함). Plasmid curing 확률을 높이기 위하여 novobiocin을 10 µg/ml의 농도로 첨가한 plate에서 배양한 후 임의로 colony를 취하여 plasmid를 분리 전기영동하여 plasmid가 curing된 균주를 선별하였다. 그 결과 p703/5와 p703/9가 상실된 균주(*En. faecalis* KBL 703C2)와 p703/5가 상실된 균주(*En. faecalis* KBL 703C3)를 얻었다(Fig. 1).

*En. faecalis*의 형질전환

재조합 DNA의 구성 : *En. faecalis* KBL 703의 plasmid p703/5의 제한효소 위치를 조사한 결과 제한효소 *SalI*으로 1.1 kb와 3.6 kb의 2개의 DNA 절편으로 절단됨을 0.8% agarose gel에서 전기영동을 통하여 확인할 수 있었다. 또한 제한효소 *KpnI*으로 1.4 kb와 3.3 kb의 두개의 DNA 절편으로 절단됨을 확인하였다. 계속되는 실험을 위하여 이 plasmid DNA 절편들을 각각 *E. coli* vector인 pUC18과 pEK104에 cloning 하였다.

이때 pEK104를 이용하여 얻어진 두 재조합 plasmid DNA들은 그대로 *En. faecalis* KBL 703의 plasmid-cured 변이주들을 형질전환하는데 사용하였고, pUC18을 이용하여 얻은 재조합 plasmid들은 각각 제한효소 *BamHI*과 *PstI*으로 동시에 절단한 후 aga-

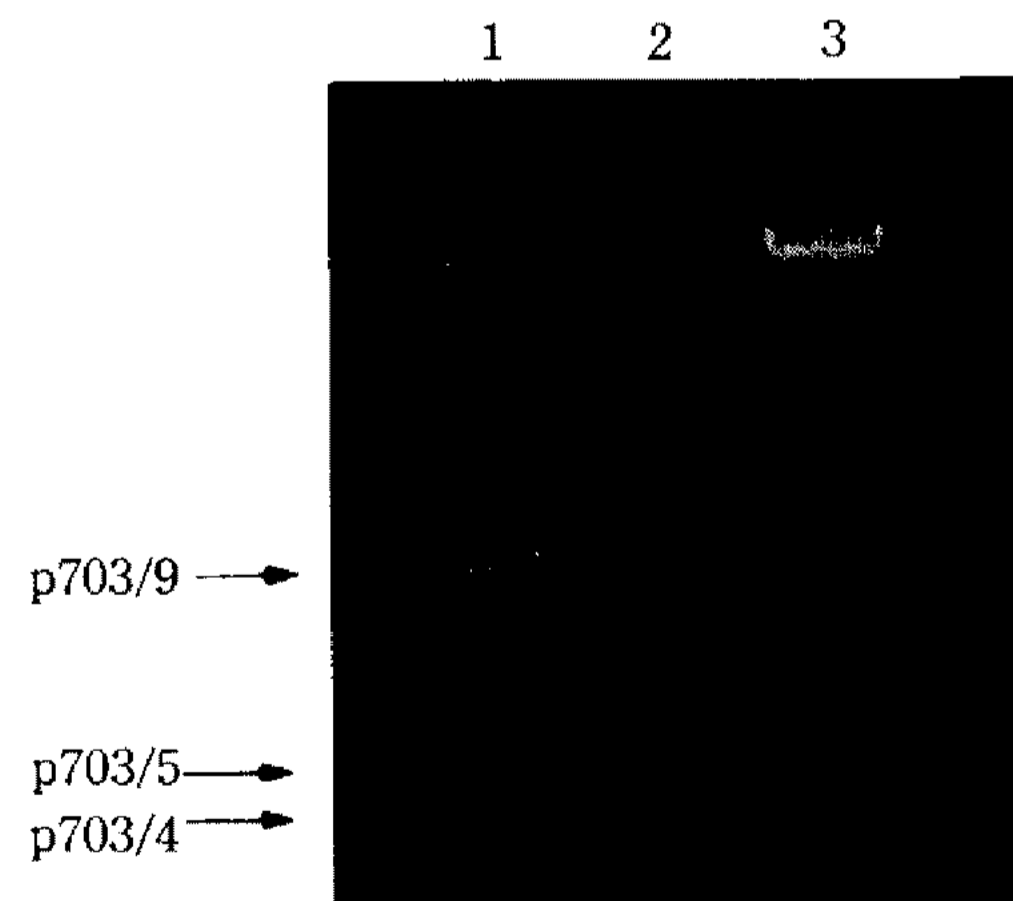


Fig. 1. Agarose (0.8%) gel electrophoresis of the plasmids extracted from *En. faecalis* KBL 703 and the plasmid-cured mutant strains.

lane 1, plasmids extracted from *En. faecalis* KBL 703; lane 2, plasmids extracted from *En. faecalis* KBL 703 C3; lane 3, plasmid extracted from KBL 703C2.

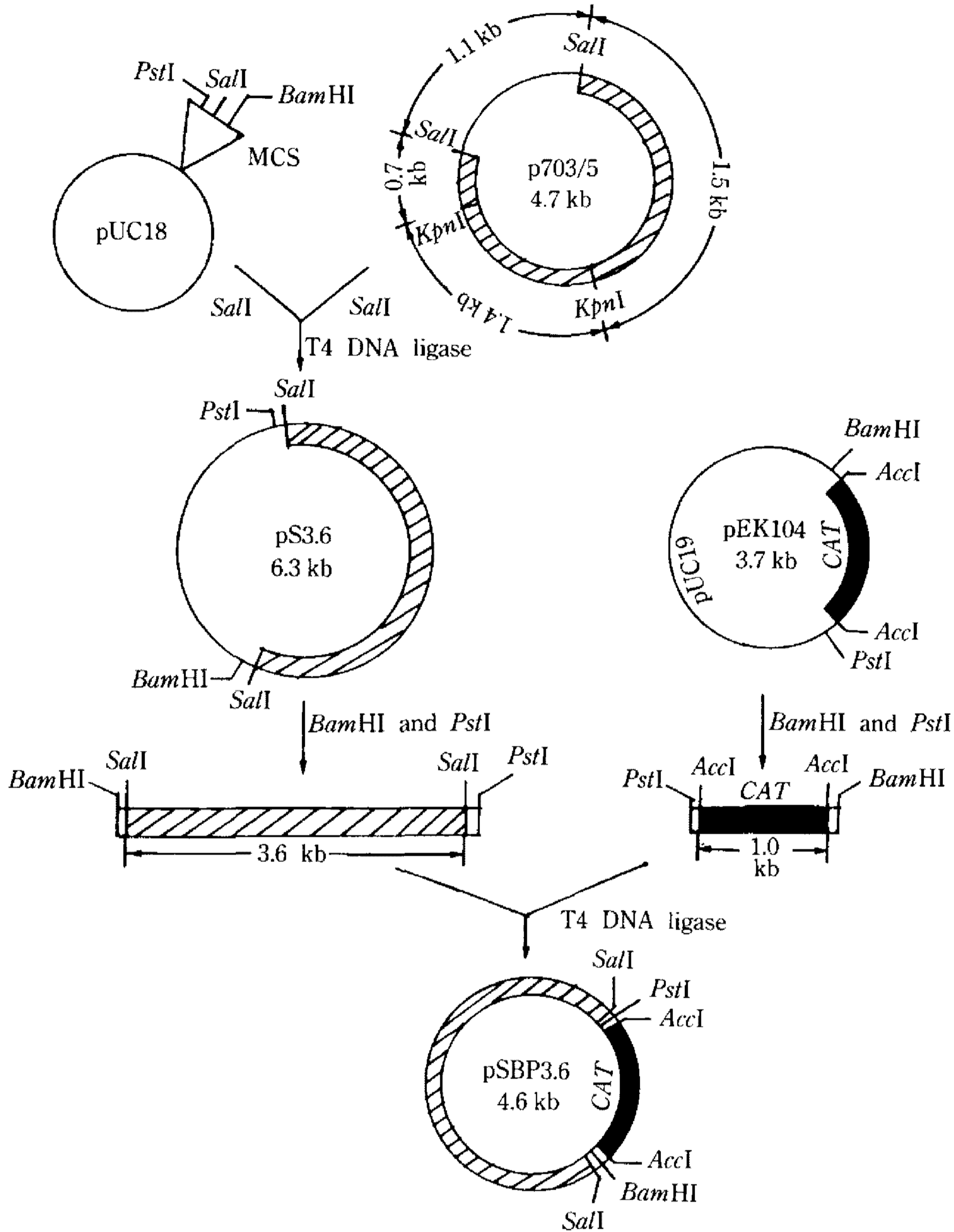


Fig. 2. Construction of recombinant plasmid pSBP3.6 (CAT, Chloramphenicol acetyl transferase).

rose gel 전기영동 과정을 거쳐 p703/5로부터 유래된 DNA 절편을 elution한 후 같은 과정으로 pEK104로부터 분리한 CAT 유전자를 가진 DNA 절편과 ligation시켜 *En. faecalis* 형질전환에 사용하였다(Fig. 2).

plasmid-cured 변이주들의 형질전환 : 앞에서 제조한 네개의 재조합 DNA 구조물들로 *En. faecalis* KBL 703C3와 KBL 703C2을 transformation 하였을 때 pS 3.6 plasmid의 DNA 절편을 가진 DNA 구조물을 사용한 경우에만 24시간 내에 5 µg/ml 농도의 chloramphenicol을 첨가한 SR plates에서 colony가 생성되었다. 이들 colony로부터 plasmid DNA를 분리하여 aga-

rose gel 전기영동으로 관찰한 결과 KBL 703C3 또는 KBL 703C2가 가지고 있던 plasmid DNA의 band 외에 새로운 plasmid DNA(pSBP3.6) band를 볼 수 있었다(Figure 3, lane 2와 lane 5). 이 pSBP3.6를 SalI으로 처리하여 agarose gel 전기영동을 하였을 때 1.0 kb의 DNA 절편과 3.6 kb의 DNA 절편으로 절단 되었으므로(Fig. 3)이 plasmid가 *En. faecalis* 형질전환에 사용했던 DNA로부터 유래된 것임을 확인할 수 있었다.

***En. faecalis* ATCC 29212의 형질전환** : pSBP3.6가 다른 *En. faecalis* 균주에서도 복제될 수 있는 가를

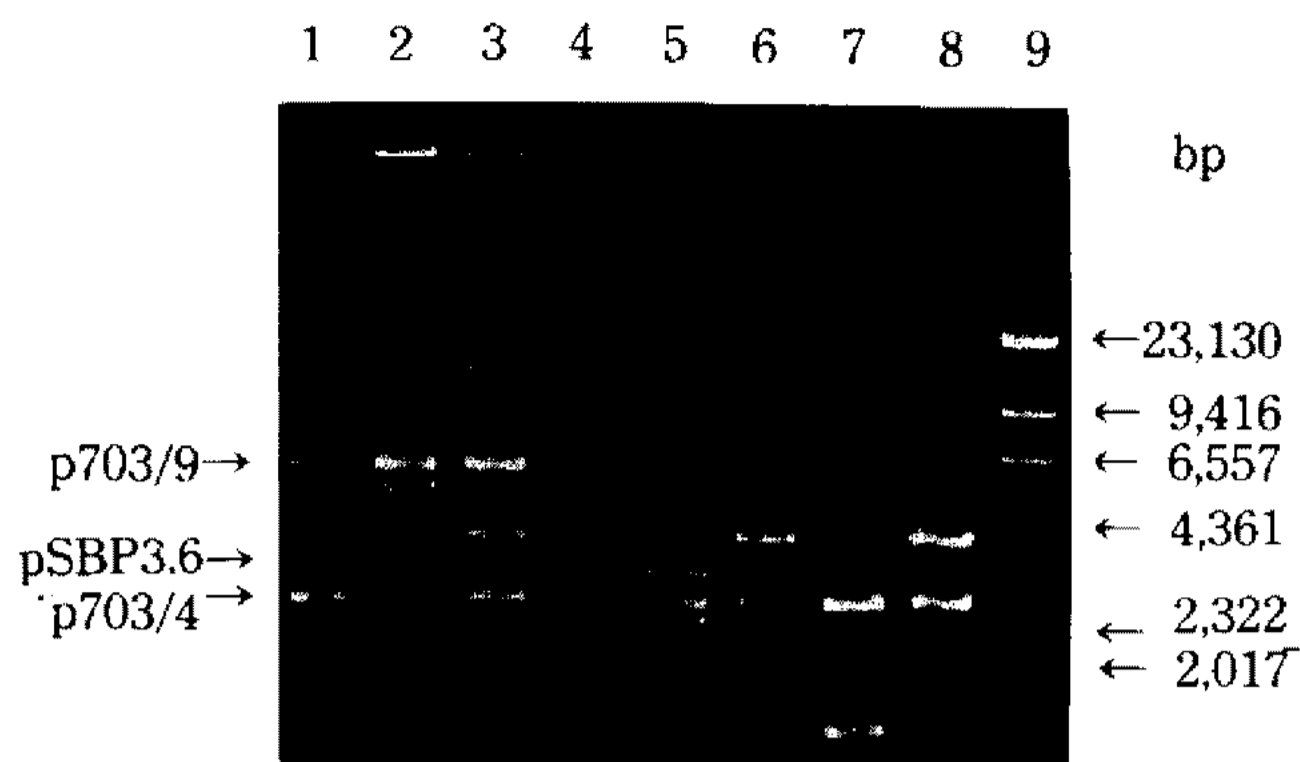


Fig. 3. Agarose (0.8%) gel electrophoretic analysis of plasmid extracted from *Enterococcus faecalis* KBL 703C 2T1 and *En. faecalis* KBL 703C3T1.

lane 1, plasmids extracted from *En. faecalis* KBL 703C 3; lane 2, plasmids extracted from *En. faecalis* KBL 703C3T1; lane 3, *SalI* digests of plasmids extracted from *En. faecalis* KBL 703C3T1; lane 4, plasmid extracted from *En. faecalis* KBL 703C2; lane 5, plasmid extracted from *En. faecalis* KBL 703C2T1; lane 6, *SalI* digests of plasmids extracted from *En. faecalis* KBL 703C2T1; lane 7, pEK104 digested with *BamHI* and *PstI*; lane 8, pS3.6 digested with *SalI*; lane 9, size marker, bacteriophage λ DNA digested with *HindIII*. *En. faecalis* KBL 703C2T1; pSBP3.6 transformant of *En. faecalis* KBL 703C2. *En. faecalis* KBL 703C3T1; pSBP3.6 transformant of *En. faecalis* KBL 703C3.

조사하기 위하여 plasmid DNA가 없고 chloramphenicol에 내성을 갖고 있지 않다고 알려진 *En. faecalis* ATCC 29212 균주를 이 plasmid로 형질전환하였다. 이 결과 pSBP3.6는 다른 *En. faecalis* 균주에서도 복제 가능함을 알 수 있었다(Fig. 4).

요 약

Enterococcus faecalis KBL 703은 서로 다른 크기를 갖는 3개의 plasmid들을 가지고 있다(p703/9, p703/5, p703/4). 이 plasmid 들중 하나인 p703/5로부터 plasmid 복제에 필요한 부위(replication origin)를 분리 하였다. 이를 위한 *En. faecalis* 형질전환실험의 숙주로 사용하기 위하여 두개의 plasmid-cured 변이주를 얻었으며, 각 p703/5의 DNA 절편과 CAT(chloramphenicol acetyl transferase) 유전자를 가진 4개의 DNA 구조물들로 이들을 형질전환시킨 결과 제한효소 *SalI*으로 절단된 p703/5의 3.6 kb DNA 절편을 가진 DNA 구조물만이 이 균주내에서 plasmid로서 안정하게 유지됨을 알 수 있었다. *En. faecalis* ATCC 29212를 형질전환하였을 때에도 이 새로운 재조합 plasmid가 세포내에서 안정하게 유지됨을 알 수 있

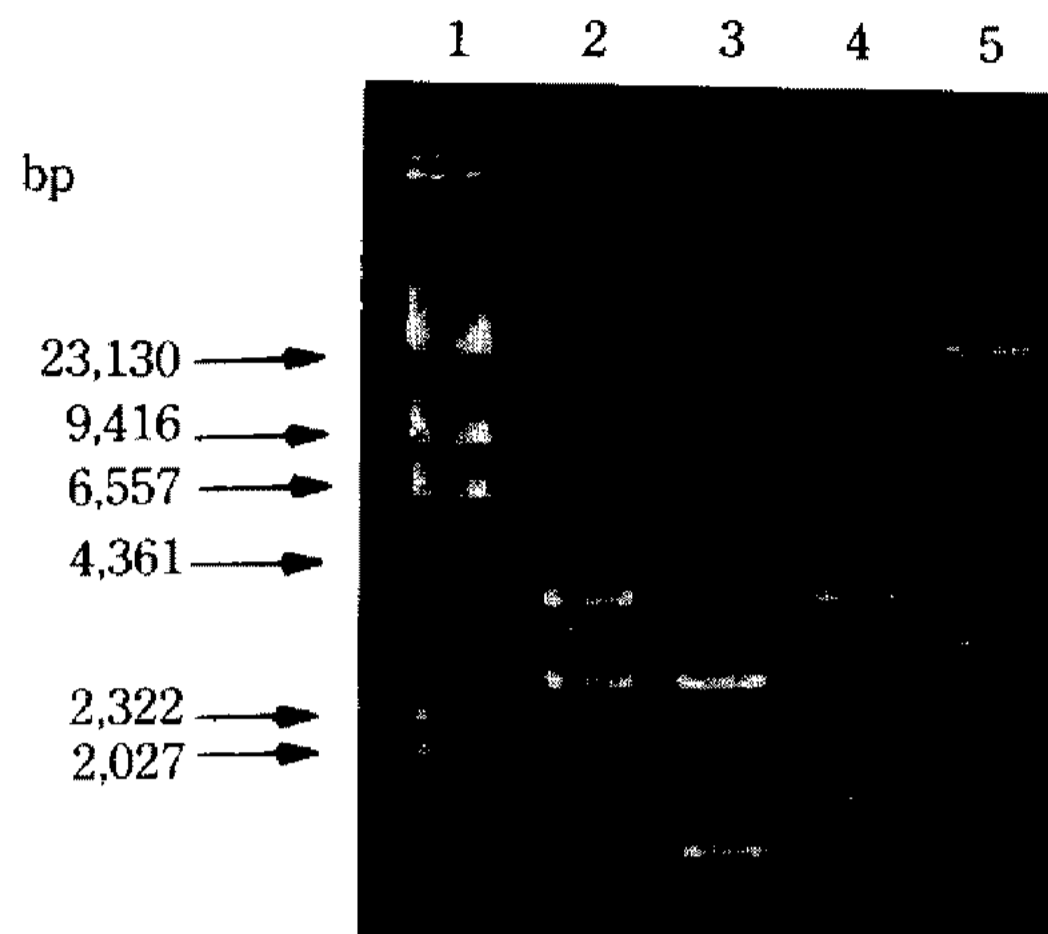


Fig. 4. Agarose (0.8%) gel electrophoretic analysis of pSBP3.6 extracted from *En. faecalis* KBL 701T3.

lane 1, λ phage DNA digested with *HindIII*; lane 2, *SalI* digests of pS3.6 DNA; lane 3, pEK104 digested with *BamHI* and *PstI*; lane 4, *SalI* digests of pSBP3.6 DNA; lane 5, pSBP3.6 extracted from *En. faecalis* KBL 701T3. *En. faecalis* KBL 701T3; pSBP3.6 transformant of *En. faecalis* ATCC 29212.

었다.

참고문헌

1. Clewell, D.B. 1981. Plasmids, drug resistance, and gene transfer in the genus *Streptococcus*. *Microbiol. Reviews* **45**: 409-436.
2. Dunny, G. and D. Clewell. 1975. Transmissible toxin(hemolysin) plasmid in *Streptococcus faecalis* and its mobilization of a noninfectious drug resistance plasmid. *J. Bacteriol.* **124**: 784-790.
3. Oliver, D., B. Brown, and D.B. Clewell. 1977. Characterization of plasmids determining hemolysin and bacteriocin production in *Streptococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* **130**: 948-950.
4. Clewell, D.B. and K.E. Weaver. 1989. Sex pheromones and plasmid transfer in *Enterococcus faecalis*. *Plasmid* **21**: 175-184.
5. Jacob, A.E. and S.J. Hobbs. 1974. Conjugal transfer of plasmid borne multiple antibiotic resistance in *Streptococcus faecalis* var. *zymogenes*. *J. Bacteriol.* **117**: 360-372.
6. Clewell, D.B., Y. Yagi, M. Dunny, and S.K. Schultz. 1974. Characterization of three plasmid DNA molecules in a strain of *Streptococcus faecalis*: identification of a plasmid determining erythromycin resistance. *J. Bacteriol.* **117**: 283-289.
7. Hershfield, V. 1979. Plasmids mediating multiple drug resistance in group B *Streptococcus*: transferability and molecular properties. *Plasmid* **2**: 137-149.

8. Wirth, R., F.Y. An, and D.B. Clewell. 1986. Highly efficient protoplast transformation system for *Streptococcus faecalis* and a new *Escherichia coli*-*S. faecalis* shuttle vector. *J. Bacteriol.* **165**: 831-836.
9. Gruss, A. and S.D. Ehrlich. 1989. The family of highly interrelated single-stranded deoxyribonucleic acid plasmids. *Microbiol. Rev.* **53**: 231-241.
10. Peeters, B.P.H., J.H. Boer, S. Bron, and G. Venema. 1988. Structural plasmid instability in *Bacillus subtilis*: effect of direct and inverted repeats. *Mol. Gen. Genet.* **212**: 450-458.
11. Trieu-Cuot, P., C. Carrier, C. Poyart-Salmeron, and P. Courvalin. 1991. Shuttle vectors containing a multiple cloning site and a lacZ α gene for conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to gram-positive bacteria. *Gene* **102**: 99-104.
12. 김영우. 1992. *Enterococcus faecalis* Lysogenic strain의 분리, 동정 및 Temperate Phage의 특성 연구. 석사학위논문, 고려대학교.
13. Hornouchi, S. and B. Weisblum. 1982. Nucleotide sequence and functional map of pC194, a plasmid that specifies inducible chloramphenicol resistance. *J. Bacteriol.* **150**: 815-825.
14. Code of Federal Regulations, Title 21, Part 460, 1980.
15. Cruz-Rodz, A.L. and M.S. Gilmore. 1990. High efficiency introduction of plasmid DNA into glycine treated *Enterococcus faecalis* by electroporation. *Mol. Gen. Genet.* **224**: 152-154.
16. Anderson, D.G. and L.L. McKay. 1983. Simple and rapid method for isolation large plasmid DNA from *Lactic Streptococci*. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**: 549-552.
17. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989. *Molecular cloning, a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
18. Mackay, L.L., K.A. Baldwin, and E.A. Zottola. 1972. Loss of lactose metabolism in lactic *Streptococci*. *Appl. Env. Microbiol.* **23**: 1090-1096.

(Received November 13, 1993)