

유전공학적으로 변형시킨 4CB 분해세균 및 그 유전자 DNA에 대한 수계에서의 분자생태학적 안정성

박상호 · 곽명자 · 김지영 · 이성기 · 김처경

충북대학교 자연과학대학 미생물학과

Molecular Ecological Stabilities of Genetically Modified 4CB-Degrading Bacteria and Their Gene DNAs in Water Environments

Park, Sang-Ho, Myong-Ja Kwak, Ji-Young Kim,
Sung-Gie Lee and Chi-Kyung Kim

Department of Microbiology, College of Natural Sciences,

Chungbuk National University

ABSTRACT

As the genetically modified microorganisms (GMMs) and their recombinant plasmid DNAs could be released into natural environments, their stabilities and impacts to indigenous microorganisms have become very important research subjects concerning with environmental and ecological aspects. In this study, the genetically modified *E. coli* CU103 and its recombinant pCU103 plasmid DNA, in which *pcbCD* genes involving in degradation of biphenyl and 4-chlorobiphenyl were cloned, were studied for their survival and stability in several different waters established under laboratory conditions. *E. coli* CU103 and its host *E. coli* XL1-Blue survived longer in sterile distilled water (SDW) and filtered autoclaved river water (FAW) than in filtered river water (FW). A lot of extracellular DNAs were released from *E. coli* CU103 by lytic action of phages in FW and the released DNAs were degraded by DNase dissolved in the water. Such effects of the factors in FW on stability of the recombinant pCU103 plasmid were also observed in the results of gel electrophoresis, quantitative analysis with bisbenzimidazole, and transformation assay. Therefore, the recombinant plasmids of pCU103 were found to be readily liberated from the genetically modified *E. coli* CU103 into waters by normal metabolic processes and lysis of cells. And the plasmid DNAs were quite stable in waters, but their stabilities could be affected by physicochemical and biological factors in non-sterile natural waters.

Key words: DNA stability, Extracellular DNA, GMM, Survival, Transformation

서론

유전공학적으로 변형시킨 미생물들 (genetically modified microorganisms, GMMs)이 자연 생태계에 노출될 때, 그들의 생존과 동태 그리고 그 유전자 DNA의 안정성에 관한 연구는 환경 및 분자생태학적 측면에서 중요한 연구과제로 취급되고 있다. 생태계에서 발휘되는 재조합 균주의 기능은 숙주세포의 종류, 재조합된 유전자의 안정성, 박터의 특성 등에 따라 크게 다르기 때문에, 이들의 최적 조건을 찾으려는 연구와 함께 재조합 유전자의 발현이 잘 되는 field-application vectors (FAVs)를 개발함으로써 유용한 GEM 균주를 자연계에 적용시키려는 연구가 시도되고 있다 (Sobecky *et al.* 1992). 또한 이들 재조합 균주들과 자연생태계에 존재하고 있는 토착 미생물들과의 사이에 일어나는 상호작용 뿐 아니라 재조합 유전자들의 전이성 및 안정성 문제도 우선 연구해야 할 과제이다.

Paul과 Myers(1982)와 DeFlaun 등(1986)은 유전공학적으로 변형된 미생물을 하구의 자연환경에 노출시킨 후, 그들의 사멸과 함께 용균에 의한 세포의 DNA의 생성을 측정하였고, 세포의 DNA의 유출에 미치는 환경요소의 영향과 세포의 DNA의 유전정보가 토착세균 집단으로 전이 되는 가능성을 평가한 바 있다. 또 해양이나 담수의 수계환경에서 세균으로부터 유출되는 세포의 DNA의 검출 방법과 형질전환에 의한 전이는 여러가지 세균을 실험재료로 하여 시도되었다 (Kim *et al.* 1987, Paul and David 1989). DeFlaun 등(1986)과 Somerville 등(1989)은 수계에 용해되어 있는 free DNA를 에탄올 침전법과 Hoechst 33258방법을 이용하여 농축, 검정함으로써 그들의 분포 상황과 기능을 연구하였다.

최근에는 DNA probe에 의한 nucleic acid hybridization방법으로 자연생태계에서 항생물질 내성 미생물이나 catabolic genotype 균주를 검색하기도 했다 (Barkay *et al.* 1985, Simonet *et al.* 1988). 또 이러한 방법은 자연계에서 유전공학적으로 변형된 미생물을 추적하고 동정하는 데에도 활용하고 있다 (Atals and Saylor 1988). Walia 등(1990)은 4-chlorobiphenyl (4CB) 분해유전자를 DNA probe로 이용하여 자연환경으로부터 polychlorinated biphenyls (PCBs)의 분해균주를 검출하였다. Kloos 등(1994)은 용균성 유전자를 도입시킨 GEM 균주를 실험실의 배양액에서 접종배양하는 동안, 균주의 용균에 의하여 유출된 세포의 DNA의 안정성을 전기영동에 의한 agarose gel에서 측정하고 그들의 형질전환 능력을 연구하였다.

그러므로 본 연구에서는 biphenyl과 4-chlorobiphenyl의 분해 과정에서 benzene고리를 개환하는 *pcbCD*유전자를 pBluescript SK(+)를 이용하여 *E. coli* XL1-Blue에 클로닝하여 제조한 재조합 균주인 *E. coli* CU103 (Kim *et al.* 1994)을 몇 가지 수계환경에 현탁시켜 30℃의 실험실 환경에 노출시킴으로써, 그 생존율과 세포의 DNA의 유출을 비교 연구하였다. 또 이와 같이 재조합된 plasmid인 pCU103을 수계환경에 노출시켜 DNA의 안정성을 전기영동 및 bisbenzimidazole 형광법으로 측정하고 형질전환 능력의 안정성을 연구하였다.

재료 및 방법

실험 균주 및 plasmid

본 연구에서는 Kim 등(1987)에 의해서 공단폐수로부터 분리된 biphenyl 및 4-chlorobiphenyl (4CB)의 분해균주인 *Pseudomonas* sp. DJ-12와 그로부터 *pcbCD*유전자를 Fig. 1에서와

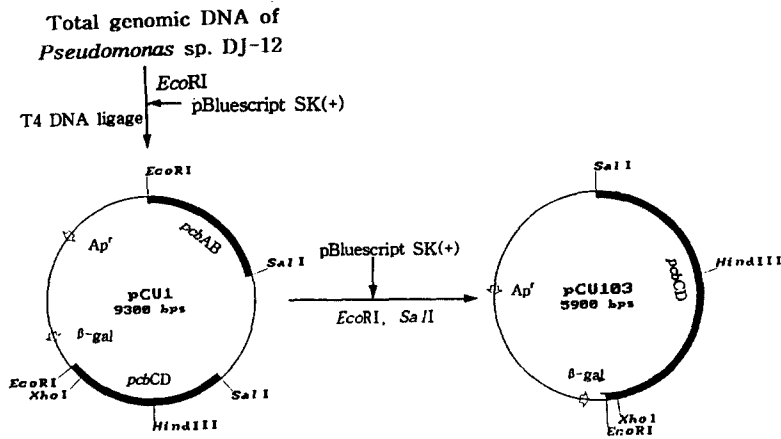


Fig. 1. Construction strategy for hybrid plasmids of pCU1, pCU101, and pCU103.

같이 클로닝한 재조합 균주인 *E. coli* CU103 (Kim *et al.* 1994)과 숙주 세포로서 사용한 *E. coli* XL1-Blue을 실험세균으로 사용하였다. 또한 *pcbCD*유전자의 재조합 plasmid인 pCU103 DNA를 수계에 노출시켜 그 안정성을 전기영동 및 bisbenzimid 형광법 (Paul and Myers 1982)으로 조사하였다.

재조합 균주의 생존율 측정

유전공학적 변형세균의 생존율은 증류수를 멸균한 SDW (sterilized distilled water)와 함께 무심천수를 채취하여 0.2 μ m pore size의 Nuclepore membrane filter로 여과한 FW (filtered water)와 이를 다시 멸균한 FAW (filtered autoclaved water)의 수계에서 실험하였다. 50 ml 석의 SDW, FW 및 FAW에 각 실험 균주를 $10^5 \sim 10^7$ /ml로 현탁시켜 30 $^{\circ}$ C에 노출시키면서, 일정 시간별로 100 μ l를 취하여 Standard Plate Count (SPC) 고체배지에 도말하여 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양하였다. 배지에 형성된 집락수를 계수하여 생존세균수 (CFU/ml)로 환산하였다. 또 일정 시간별로 채취한 시료를 spectrophotometer (Spectronic-20, Milton Roy Co., San Francisco, CA, U.S.A.)로 600 nm에서의 흡광도를 측정하여 세균 현탁액의 혼탁도를 조사하였다.

세포외 DNA의 농축 및 정량

각 수계에 노출시킨 실험균주로부터 유출되는 세포외 DNA는 Paul 등 (1989), 그리고 Somerville 등(1989)의 방법을 병용하여 농축하였다. SDW, FW, FAW의 각 매질 300 ml에 균수가 약 10^6 CFU/ml이 되도록 현탁시킨 후 30 $^{\circ}$ C에 노출시키면서, 1일의 간격으로 세균현탁액을 10 ml~20 ml을 취하여 2,000 \times g에서 20분간 원심분리하고, 상층액만을 회수하여 0.2 μ m pore size의 Nuclepore membrane filter로 여과하였다. 그 여과액에 0.31 M NaCl 와 1.35×10^{-2} M MgSO₄를 첨가하고, 다시 에탄올을 2배로 첨가하여 -20 $^{\circ}$ C에서 48시간 방치한 후, 16,000 \times g에서 30분간 원심분리하여 세포외 DNA를 농축하였다. 농축된 세포외 DNA는 Paul 과 Myers (1982)의 보고에서와 같이 bisbenzimid 형광법으로 정량하였다. 2 ml의 bisbenzimid dye (Hoechst 33258, La Jolla, CA, U.S.A)에 20 μ l의 DNA시료를 첨가하여 DNA의 minor groove에 존재하는 A-T 염기 부위와 결합시킴으로써 365 nm의 자외광선으로 발광되는 DNA의 형광을

TKO100 Fluorometer (Hoefer, San Francisco, CA, U.S.A.)로 측정하였다.

Southern hybridization

재조합 plasmid인 pCU103을 검색하기 위하여 pCU103 plasmid DNA의 *Xho* I-*Hind* III 절편 (2.8 kb)을 DNA probe로 사용하여 DNA hybridization을 시행하였다. *pcbCD* 유전자를 포함하는 이 절편은 agarose gel로부터 GeneClean II kit (BIO 101 Co., La Jolla, CA, U.S.A.)를 사용하여 회수하였다. DNA probe의 labeling은 nick translation system (Promega Co., Madison, WI, U.S.A.)과 biotin-14-dATP (BRL, Gaithersburg, MD., U.S.A.)를 사용하여 제품 회사의 사용지침에 따라 수행하였다.

각 제품 세균으로부터 수계에 유출된 세포의 DNA 또는 재조합 DNA의 현탁액을 전기 영동한 후 Koetsier 등(1993)의 방법에 따라 Southern hybridization을 수행하였다. 전기영동을 한 gel은 0.25 M HCl에 20분간 반응시킨 후 denaturation 용액 (1.5 M NaCl, 0.5 N NaOH)에서 10분간 변성시키고, neutralization buffer (1 M Tris (pH 7.4), 1.5 M NaCl)에서 5분간 중화시켰다. 그 후 1 N NaOH를 이용하여 2시간 동안 nylon membrane (Hybond-N, Amersham International plc., Amersham, UK)으로 DNA를 이동시켰다. 그 다음 $2 \times$ SSC에 10분간 침적시킨 후 실온에서 30분간 건조시키고, 80°C의 건열기에서 2~4시간 동안 고정하였다. 이 여과막은 *pcbCD* 유전자가 포함되어 있는 2.8 kb의 *Xho* I-*Hind* III 절편으로 제조한 DNA probe를 포함하는 hybridization 용액 ($6 \times$ SSC; 0.5% SDS, 40% formamide, 5% dextran sulfate, 100 μ g/ml herring sperm DNA)에서 18시간 동안 hybridization을 실시하였다. Hybridization이 된 DNA의 확인은 BluGENE nonradioactive nucleic acid detection system (BRL, Gaithersburg, MD, U.S.A.)을 사용하여 회사의 사용지침에 따라 시행하였다.

재조합 DNA의 검정

일정량의 재조합 플라스미드 DNA를 각각 현탁시킨 4 ml의 SDW, FW, AW를 30°C에서 40여일간 노출시키면서 그 안정성을 Kloos 등(1994)의 방법에 따라 검토하였다. 일정한 시간 간격으로 10 μ l의 시료를 취하여 horizontal electrophoresis system을 이용하여 0.8% agarose gel에서 전기영동을 실시하였다. 전기영동은 TAE buffer 또는 TBE buffer를 사용하여 5 V/cm로 실시하였다. 그 후 gel은 0.5 μ l/ml의 ethidium bromide 용액으로 40분간 염색하여 305 nm에서 UV-transilluminator (Spectronics Co., Westbury, N.Y., U.S.A.)로 관찰하였고, UV SLII camera system (Seolin, Korea)을 이용하여 사진촬영하였다. 또 재조합 DNA의 구조적 안정성을 확인하기 위하여 전기영동한 agarose gel의 DNA에 대하여 pCU103의 *pcbCD* 유전자를 DNA probe로 하여 상기의 방법에 따라 Southern hybridization을 하였다.

재조합 DNA의 형질전환

pcbCD 유전자를 클로닝한 재조합 플라스미드인 pCU103 DNA를 현탁시킨 각 수계로부터 일정시간에 따라 20 ng의 DNA를 취하여 200 μ l의 *E. coli* XL1-Blue의 competent cell이 들어 있는 Eppendorf tube에 혼합하고, dimethyl sulfoxide를 3 μ l 첨가시킨 후, 30분간 냉장 처리하였다. 그 다음, Williams 등(1992)의 방법에 따라 42°C에서 1~2분간 열처리하고 1분간 다시 냉장 처리하였다. 여기에 800 μ l의 LB broth를 첨가하여 37°C의 shaking incubator에서 1시간 동안 배양하였다. 배양한 세포액 100 μ l를 100 μ g/ml의 ampicillin과 15 μ g/ml의 tetracycline이 포

함되어 있는 LB 고체배지에 도말하여 37℃에서 하룻밤 동안 배양시킨 후 colony를 얻었다. 이들 colony는 다시 LB 고체배지에 점접종하여 하루동안 배양한 다음, 0.1%의 2,3-dihydroxybiphenyl를 분무하여 황색을 띠는 colony만을 계수함으로써 *pcbCD* 유전자가 포함되어 있는 pCU103 DNA의 형질전화 능력을 측정하였다.

결과 및 고찰

제조합 균주의 생존율

Biphenyl 및 4-chlorobiphenyl (4CB)를 분해하는 *Pseudomonas* sp. DJ-12의 *pcbCD* 유전자를 *E. coli* XLI-Blue에 유전공학적으로 제조합시켜 제조한 GEM 균주인 *E. coli* CU103을 몇 가지 수계에 노출시켜 11일 동안 보관하면서 그들의 생존율을 조사하였다. 멸균한 증류수인 SDW (Fig. 2A)에서는 거의 비슷한 세포수를 유지하였으나, 여과 멸균한 하천수인 FAW (Fig. 2B)에서는 노출 후 5일까지 세포수가 약 1 log정도 증가한 후 접종시의 세포수로 완만하게 감소하였

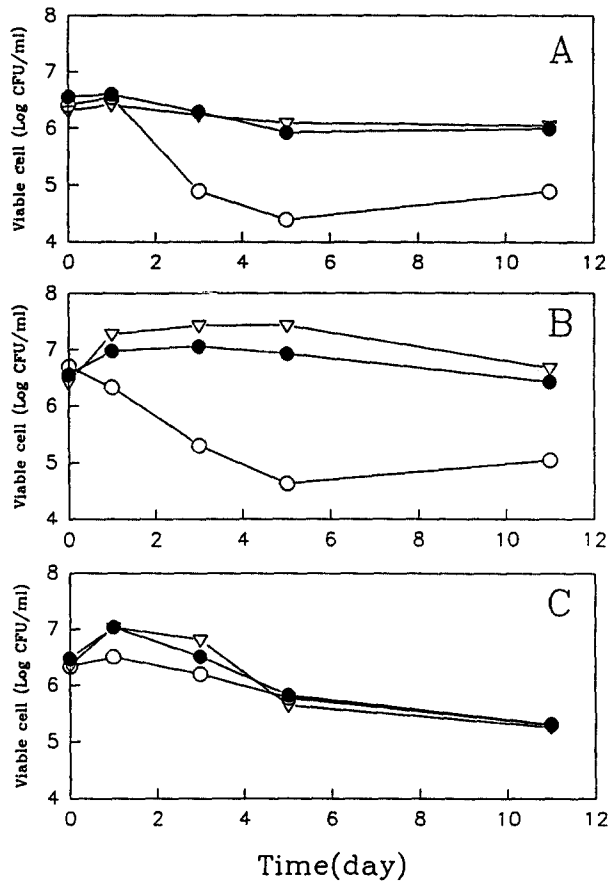


Fig. 2. Survival of *Pseudomonas* sp. DJ-12, *E. coli* XLI-Blue and *E. coli* CU103 in different waters at 30 °C. A, sterilized distilled water (SDW); B, filtered autoclaved water (FAW); C, filtered water (FW). Symbols: ○—○, *Pseudomonas* sp. DJ-12; ●—●, *E. coli* XLI-Blue; ▽—▽, *E. coli* CU103.

다. 그러나 여과한 하천수인 FW (Fig. 2C)에서는 3일까지 1 log정도 증가한 후 계속 감소하여 11일에는 접종시의 세균수보다 약 1 log정도 낮아졌다. 이와 같이 재조합 균주인 *E. coli* CU103의 생존율은 host 균주인 *E. coli* XL1-Blue와 큰 차이가 없었다. *E. coli* 균주들의 생존율이 SDW나 FAW에서보다 멸균하지 않은 FW에서 낮았던 것은 Wellington 등(1990)의 연구 결과에서와 같이 FW에 존재하는 bacteriophage와 같은 생물학적 요소의 영향에 의한 것이라고 설명할 수 있다. 그러나 *Pseudomonas* sp. DJ-12는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 SDW와 FAW에서는 접종 후 5일까지 약 2 log가 급격히 감소하였다. *E. coli*와는 반대로 자연계 분리균주인 *Pseudomonas* sp. DJ-12가 SDW와 FAW에서 보다 FW에서 더 안정하였던 것은 Sobecky 등(1992)이 지적한 바와 같이 균주의 생리학적 적응 능력의 차이라고 볼 수 있다.

재조합 균주로부터 유출되는 세포의 DNA

재조합 균주인 *E. coli* CU103을 30°C의 LB 액체배지에서 7일 동안 배양하면서 그들의 생장곡선과 유출되는 세포의 DNA의 양을 조사한 결과는 Fig. 3과 같다. 배양 시작 1일 후에는 정지기에 이르렀으며, 4일 후에는 사멸기가 시작되었다. 세포의 DNA의 유출은 제 3일까지 급속히 증가하여 약 200 ng/ml의 양이 계속 유지되었다. 이 기간에 유출된 세포의 DNA를 전기영동으로 확인한 결과 Fig. 4A와 같이, 제1일부터 세포의 DNA가 유출되었으나, 제 2일 후에는 다량의 세포의 DNA가 검출되었다. 이와 같이 전기영동한 gel에서 검출되는 세포의 DNA에 대하여 *pcbCD* 유전자를 probe로 하여 Southern hybridization을 한 결과는 Fig. 4B와 같다. *pcbCD* 플라스미드 (lane P)에서와 같이, 제 2일 이후의 DNA시료 (lane 1~7)에서 25 kb와 10 kb의 DNA가 hybridization band를 나타냈다. *E. coli* CU103으로부터 유출된 세포의 DNA를 *Xho*I 과 *Hind*III로 처리하여 전기영동을 했을 경우에도 Fig. 5A와 같이 제 2일부터 7일까지의 시료에서 *pcbCD*

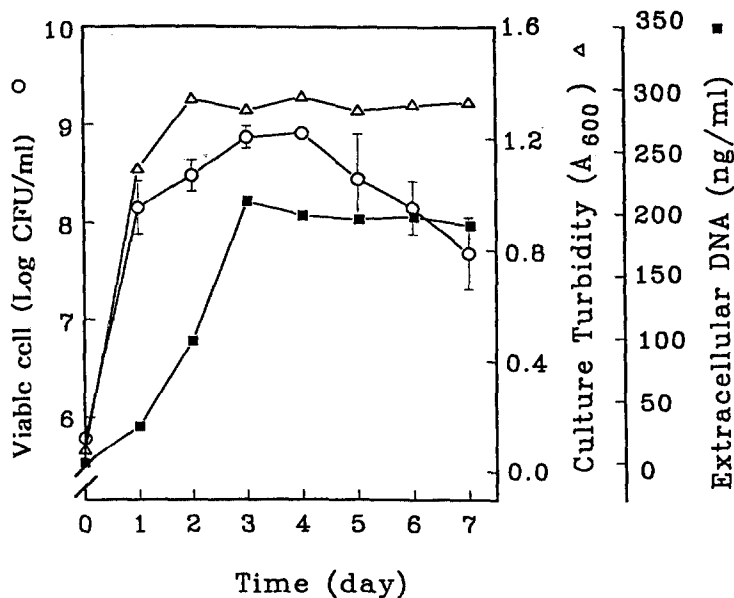


Fig. 3. Growth of *E. coli* CU103 and release of extracellular DNA in Luria-Bertani (LB) broth at 30°C.

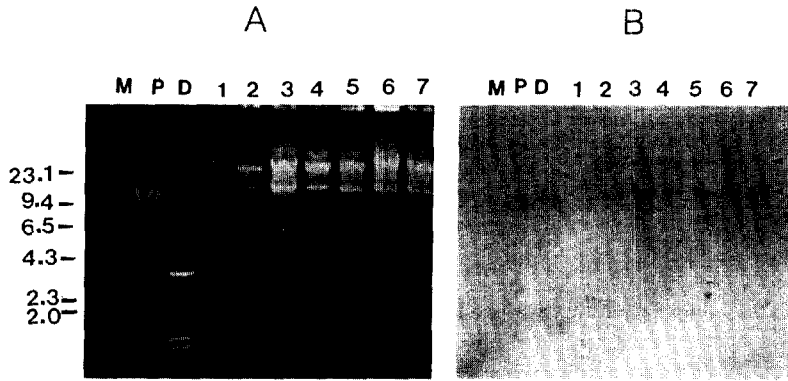


Fig. 4. Gel electrophoresis (A) and Southern hybridization (B) of extracellular DNA released from *E. coli* CU103. M, Marker, *Hind*III-digested lambda DNA; P, pCU103 plasmid DNA; D, *Xho*I-*Hind*III digested pCU103 DNA; Lanes: 1 to 7, extracellular DNAs isolated from 1 to 7-day suspensions. The arrows indicate *pcbCD* genes of pCU103.

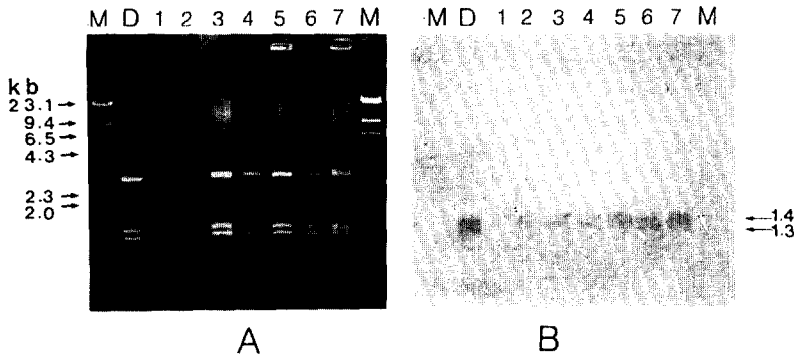


Fig. 5. Gel electrophoresis (A) and Southern hybridization (B) of the *Xho*I *Hind*III digested extracellular DNA released from *E. coli* CU103. The lanes are the same as in the legend of Fig. 4.

플라스미드 (lane D)에서와 같이 3개의 DNA band가 나타났으며, 이를 Southern hybridization 했을 때 1.3 kb와 1.4 kb로 잘라진 *pcbCD* 유전자에서만 hybridization signal이 나타났다 (Fig. 5B). 그러므로 hybridization signal이 나타나지 않은 제 1일의 세포외 DNA는 *E. coli* CU103로부터 유출된 염색체 DNA이고, 제 2일 내지 7일의 세포외 DNA는 주로 pCU103 플라스미드 DNA임을 알 수 있었다. 이와 같은 결과는 정상적인 생리작용을 하는 대수증식기의 세포로부터 염색체 DNA가 유출된다는 Paul과 David(1989)의 보고와 일치되는 것이다.

세포외 DNA 유출에 미치는 수질의 영향

E. coli CU103을 각각의 수계에 현탁시킨 후 7일 동안 그들의 생존율과 함께 유출되는 세포외 DNA의 양을 SDW, FW, FAW에서 비교실험하였다. SDW (Fig. 6A)에서는 7일 동안 약 4 log 그리고 FAW (Fig. 6B)에서는 약 1 log의 세균수가 서서히 감소한 반면, FW (Fig. 6C)에서는

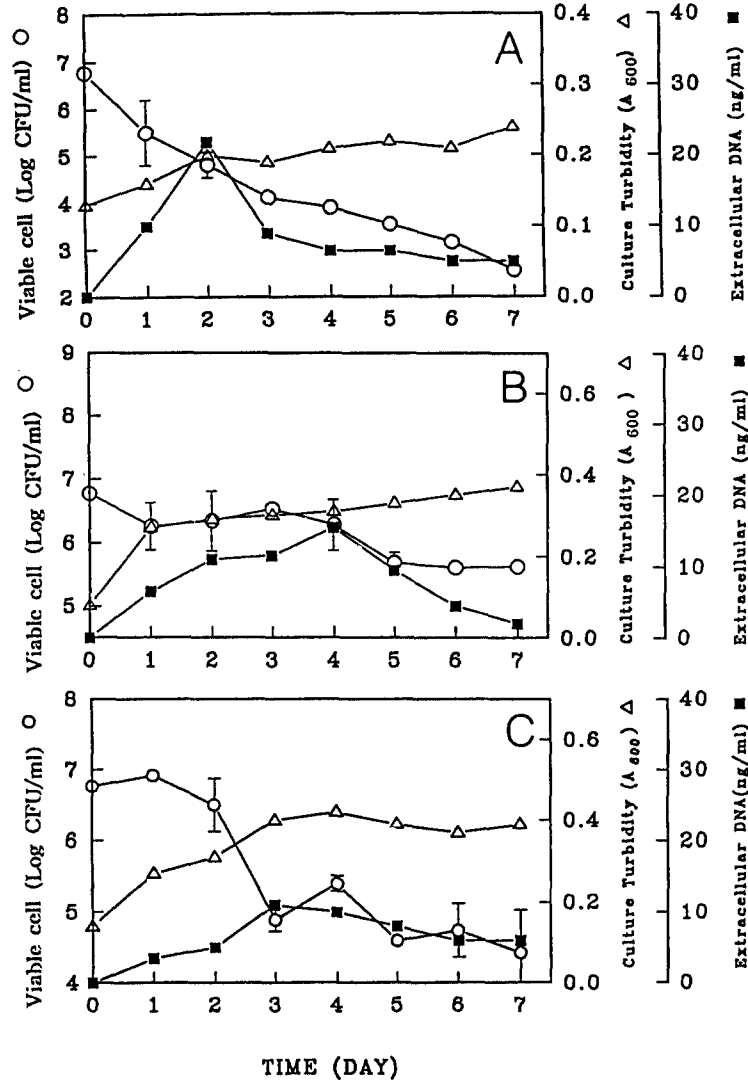


Fig. 6. Growth of *E. coli* CU103 and release of its extracellular DNA in different waters at 30°C. A, SDW; B, FAW; C, FW.

제 2일과 3일 사이에 급격히 감소하였다. 세포의 DNA의 양은 SDW에서는 2일까지 약 20 ng/ml로 급격히 증가한 후 감소하였고 FAW에서는 4일까지 약 15 ng/ml로 증가한 후 감소하였다. 그러나 FW에서는 3일까지 10 ng/ml 정도까지 증가한 후 서서히 감소하였다. SDW와 FAW에서 세균의 생존율이 서서히 감소하고 탁도가 서서히 증가한 사실로 보아, 다량의 세포의 DNA가 유출된 것은 생존 세균들의 대사과정 중에서도 세포의 DNA가 유출된다는 것을 의미한다. 이와 같은 결과는 세균의 성장 과정에서 세포의 DNA가 유출된다고 보고한 Paul과 David (1989)과 Lorenz 등(1991)의 연구 결과와 일치하는 것이다. 그러나 FW에서는 생존 세균이 급

격히 감소한 제 2~3일의 기간에 세포외 DNA의 양이 서서히 증가한 것은, 멸균하지 않은 FW에서 phage의 존재가 실험적으로 확인되었기 때문에 phage의 용균효과와 함께 유출된 세포외 DNA는 DNase의 작용에 의하여 파괴된 것이라고 해석할 수 있다. 자연의 수계 생태계에 유출되어 있는 DNA는 DNase에 의한 파괴작용을 많이 받는다는 점은 Romanowski 등(1991; 1992)과 Kloos 등(1994)도 보고한 바 있다.

재조합 플라스미드 DNA의 안정성

SDW, FW, FAW의 각 수계에 노출시킨 재조합 플라스미드인 pCU103 DNA의 안정성을 agarose gel 전기영동방법으로 조사했을 때, Fig. 7-I의 SDW와 FAW에서는 20일 이상까지도 파괴되지 않은 DNA의 구조가 관찰되었다. 그러나 Fig. 7-I의 FW에서는 제 1일 이후에는 모두 분해되어 검정되지 않았다. 이와 같이 전기영동으로 검정되는 pCU103 DNA에 대하여 *pcbCD* 유전자를 Southern hybridization을 한 결과는 Fig. 7-II와 같다. SDW와 FAW에서는 20일까지의 시료에서, 그리고 FW에서는 0일의 시료에서만 hybridization signal이 나타났다. 또 각 수계에 현탁시킨 재조합 플라스미드인 pCU103 DNA의 양을 bisbenzimidazole 형광법으로 측정 한 결과는 Fig. 8과 같다. SDW와 FAW에서는 20일째까지 집중량의 약 반인 1~1.5 ng/ml의 세포외 DNA가 검정되었으나, FW에서는 3일 이후부터 1.0 ng/ml 미만이 검정되었다. 또 pCU103의 형질전환 능력을 측정함으로써 *pcbCD* 유전자의 생물학적 활성능력을 조사한 결과는 Fig. 9에서 보는 바와 같다. SDW와 FAW에서는 제 20일째에도 약 10² CFU/ml의 형질전환체를 얻을 수 있을 만큼 생물학적 활성 능력을 유지하였으나, FW에서는 제 3일째에 형질전환 능력을 거의 상실하였다.

Romanowski 등(1992)은 linear duplex DNA를 멸균하지 않은 토양환경에 노출시켰을 때 제 10일까지도 안정하게 존재하였으나, intact한 플라스미드 DNA를 하구의 수질환경에 노출시켰을 경우에는 8시간 이후에 모두 파괴되었다고 보고하였다. 또 Bruns 등 (1992), Parget 등 (1992)과 Romanowski 등(1991)은 자연의 수계나 토양계에 유출되어 존재하는 DNA는 무기물질과 흡착하여 DNase로부터 보호된다고 보고한 바 있다. 그러므로 FW에서보다 SDW와

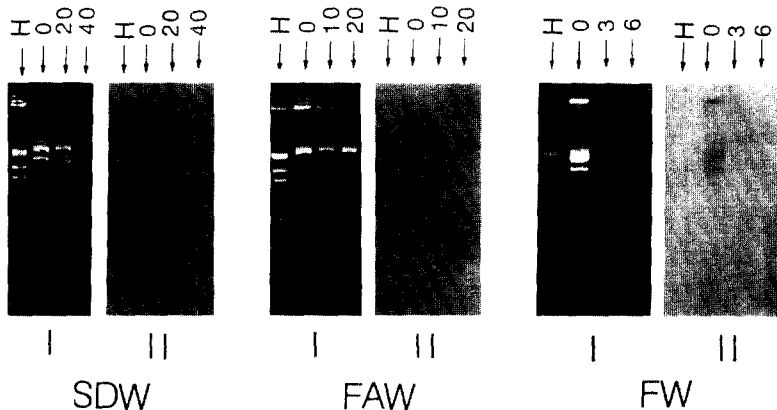


Fig. 7. Electrophoresis (I) of pCU103 in different waters during incubation for various period of time at 30°C and Southern hybridization (II) of the gel with DNA probe of *pcbCD* gene. H, λ -Hind III size marker; A, SDW; B, FAW; C, FW. The numbers indicate the period of incubation time (days) in waters.

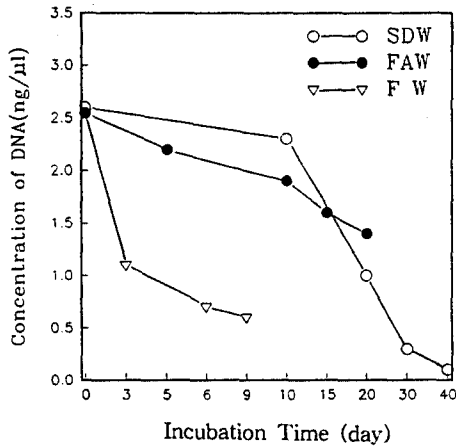


Fig. 8. Quantitative changes of pCU103 recombinant plasmid DNA in different waters at 30°C.

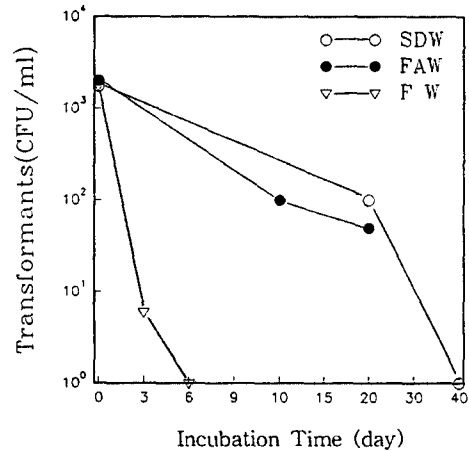


Fig. 9. Transformation activity of pCU103 recombinant plasmid DNA dissolved in different waters at 30°C.

FAW에 노출시킨 pCU103 DNA가 훨씬 안정하였던 본 연구의 결과는 Astorga 등 (1992), Williams 등(1992)과 Lorenza와 Wakernagel(1994)의 보고에서와 같이 멸균하지 않은 FW에 DNA가 흡착할 수 있는 입자가 적을 뿐만 아니라, DNase와 같은 분해효소의 작용이 컸기 때문이었다고 판단된다. 이는 유전공학적으로 변형된 세균으로부터 세포의 DNA가 수계로 유출될 수 있을 뿐더러 이들 재조합 플라스미드 DNA는 수계환경에서 비교적 오랫동안 안정하게 존재하면서 competent cell에 형질전환이 일어나지만, 수계의 물리화학 및 생물학적 요인에 의하여 크게 영향을 받는다는 것을 의미하는 것이다.

적 요

유전공학적으로 변형시킨 미생물이나 그 유전자 DNA가 자연생태계에 유출될 때 그들의 안정성 뿐 아니라 토착미생물들에게 미치는 영향은 환경생태학적으로 중요한 연구과제이다. 본 연구에서는 biphenyl 및 4-chlorobiphenyl의 분해유전자인 *pcbCD*를 클로닝한 재조합 플라스미드인 pCU103 DNA와 그 변형세균을 실험실의 몇 가지 수계에 노출시켜 그들의 안정성에 대하여 분자생태학적으로 연구하였다. *E. coli* CU103 변형세균의 생존율은 숙주세포로 사용한 *E. coli* XL1-Blue와 함께, 멸균한 증류수 (SDW)와 멸균 여과한 하천수 (FAW)에서 생존율이 높았으나, 여과하천수 (FW)에서는 낮았다. 멸균하지 않은 FW에서는 phage에 의한 용균작용으로 *E. coli* CU103으로부터 유출되는 세포의 DNA의 양도 많았으며, 유출된 세포의 DNA에 대한 DNase의 파괴작용도 컸었다. 각 수계에서 재조합 플라스미드인 pCU103의 구조적 안정성 뿐 아니라 형질전환에 의한 생물학적 활성을 전기영동, bisbenimide 형광법, 형질전환 방법으로 측정 한 결과에서도 SDW나 FAW에서는 약 20일 이상 안정하였지만, FW에서는 3일 이후에는 거의 소실되어 버렸다. 그러므로 유전공학적으로 변형시킨 *E. coli* CU103 균주로부터 세포의 DNA의 유출은 세포의 대사과정 뿐 아니라 용균작용에 의하여 일어나고, 재조합 plasmid DNA의 구조 및 형질전환 능력은 상당기간 안정하게 유지되지만, 수계의 물리화학 및 생물학적 요인에 의하

여 크게 영향을 받는다는 사실이 확인되었다.

인용문헌

- Atals, R.M. and G.S. Saylor. 1988. Tracking microorganisms and genes in the environments. In G. Omenn (ed.), Environmental biotechnology: reducing risks from environmental chemicals through biotechnology. Vol. 46. Plenum Publishing Corp., N.Y. pp. 31-46.
- Astorga, A.F., A. Muela, R. Cisterina, J. Iriberry and L. Barcina. 1992. Biotic and abiotic factors affecting plasmid transfer in *Escherichia coli* strains. Appl. Environ. Microbiol. 58:392-398.
- Barkay, T., D.L. Fouts and B.H. Olson. 1985. Preparation of a DNA gene probe for detection of mercury resistance in gram-negative bacterial communities. Appl. Environ. Microbiol. 49:686-692.
- Bruns, S., K. Reipschlager, M.G. Lorenz and W. Wackernagel. 1992. Characterization of natural transformation of the soil bacteria *Pseudomonas stutzeri* and *Acinetobacter calcoaceticus* by chromosomal and plasmid DNA. In M.F. Gauthier (ed.), Gene transfers and environment. Springer-Verlag, Berlin. pp. 115-126.
- DeFlaun, M.F., J.H. Paul and D. Davis. 1986. Simplified method for dissolved DNA determination in aquatic environments. Appl. Environ. Microbiol. 52:654-659.
- Kim, C.K., J.W. Kim and Y.C. Kim. 1987. Isolation and characterization of bacteria degrading chlorinated aromatic hydrocarbons. Kor. J. Microbiol. 25:122-128.
- Kim, C.K., T.K. Sung, J.H. Nam and Y.C. Kim. 1994. Cloning and expression of *pcbCD* genes in *Escherichia coli* from *Pseudomonas* sp. DJ-12. Kor. J. Microbiol. 32:40-46.
- Kloos, D.U., M. Strätz, A. Gütter, R.J. Steffan and K.N. Timmis. 1994. Inducible cell lysis system for the study of natural transformation and environmental fate of DNA released by cell death. J. Bacteriol. 176:7352-7361.
- Koetsier, P.A., J. Schorr and W. Doerfler. 1993. A rapid optimized protocol for downward alkaline southern blotting of DNA. Biotechniques 15:260-262.
- Lorenz, M.G., D. Gerjets and W. Wackernagel. 1991. Release of transforming plasmid and chromosomal DNA from two cultured soil bacteria. Arch Microbiol. 156:319-326.
- Lorenz, M.G. and W. Wackernagel. 1994. Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. Microbiol. Rev. 58:563-602.
- Parget, E., L.J. Monrozier and P. Simonet. 1992. Adsorption of DNA on clay mineral: protection against DNase I and influence on gene transfer. FEMS Microbiol. Letters. 97:31-40.
- Paul, J.H. and A.W. David. 1989. Production of extracellular nucleic acids by genetically altered bacteria in aquatic-environment microcosms. Appl. Environ. Microbiol. 55:1865-1869.
- Paul, J.H. and B. Myers. 1982. Fluorometric determination of DNA in aquatic

- microorganisms by use of Hoechst 33258. *Appl. Environ. Microbiol.* 43:1393-1399.
- Romanowski, G., M.G. Lorenz, G. Sayler and W. Wackernagel. 1991. Adsorption of plasmid DNA to mineral surfaces and protection against DNase I. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1057-1061.
- Romanowski, G., M.G. Lorenz, G. Sayler and W. Wackernagel. 1992. Persistence of free plasmid DNA in soil monitored by various methods, including a transformation assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:3012-3019.
- Simonet, P., N.T. Le, E.T.D. Cros and R. Bardin. 1988. Identification of *Frankia* strains by direct DNA hybridization of crushed nodules. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:2500-2503.
- Sobecky, P.A., M.A. Schell, M.A. Moran and R.E. Hodson. 1992. Adaptation of model genetically engineered microorganisms to lake water: Growth rate enhancements and plasmid loss. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:3630-3637.
- Somerville, C.C., I.T. Knight, W.L. Straube and R.R. Colwell. 1989. Simple, rapid method for direct isolation of nucleic acid from aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:548-554.
- Walia, S., H. Khan and N. Rosenthal. 1990. Construction and applications of DNA probe for detection of polychlorinated biphenyl-degrading genotypes in toxic organic-contaminated soil environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:254-259.
- Wellington, E.M.H., N. Cresswell and V.A. Saunders. 1990. Growth and survival of streptomycetes inoculants and extent of plasmid transfer in sterile and nonsterile soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1413-1419.
- Williams, H.G., M.J. Day and J.C. Fry. 1992. Natural transformation on agar and in river epilithon. In M.J. Gauthier (ed.), *Gene transfer and environment*. Springer-Verlag, Berlin.

(1995년 1월 13일 접수)