

Zoogloea ramigera 115의 Zooglan Gene Cloning

†이 기 영 · *전 순 배 · **김 동 운 · 류 강 · 유 영 산
전남대학교 생물화학공학과, *미생물학과, **광양전문대학 석유화학과

Zooglan Gene Cloning of *Zoogloea ramigera* 115

Ki-Young Lee[†], Soon-Bai Chun*, Dong-Woon Kim**, Kang Ryu and Young-San You

Dept. of Biochemical Eng., *Dept of Microbiology, Chonnam National University,
Kwangju 500-757, Korea

**Dept. of Petrochemistry, Kwangyang College, Kwangyang 545-800, Korea

ABSTRACT

Two kinds of mutants were isolated to clone a cluster of genes essential for zooglan biosynthesis. *Zoogloea ramigera* 115 strains produce capsular polysaccharide. To achieve conjugation in strain 115 and to facilitate recovery of product, a capsule non-forming strain was isolated via successive centrifugation and screening. The other kind of mutants devoid of or producing altered exopolysaccharides were obtained using classical transposon(Tn5) technique and screened for altered colony morphology and cellulose binding properties. Complementation of these mutants was achieved with *Z. ramigera* 115 slime gene library constructed in a broad host range cosmid vector and helper plasmid by triparental conjugation.

서 론

Zoogloea ramigera 115(ATCC 25935)는 1968년 Friedman과 Dugan(1)이 하수로부터 최초로 분리한 그람음성, 의무적 호기성 박테리아로 중금속 흡착분야에서 탁월한 능력을 보이는 세포외다당(zooglan)을 생산한다.

박테리아 유래의 세포외다당 생산은 유전공학 기술의 적용을 통해 개선된 생산물이 나올 가능성이 기대되는 분야이다. 그람음성 호기성 다당생산 균주인 *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Rhizobium*에 대한 유전연구가 보고되고 있다.

Barrere(2), Harding(3), Thorne(4)에 의한 연

구는 xanthan gum 합성에 필요한 gene들의 대부분이 뭉치(cluster)로 되어 있음을 설명했다. 이 cluster로부터 떨어져 있는 genome의 작은 부분도 xanthan 합성에 필요하다. plasmid pCHC3에 있는 13.5kb 지역은 적어도 5개의 상보 group을 갖고 있어 야생형 *X. campestris*에 clone될 때 xanthan 생산이 10% 증가한다. 이것은 염색체의 추가 복제에 의해 code된 효소들 중 하나가 야생형 미생물에서는 속도제한 효소임을 제시한다. pCHC3은 pyruvate 없는 xanthan gum을 생산하는 변이주에 pyruvyl기를 회복시킬 수 있고 야생형에 clone되면 xanthan pyruvate 함량을 45%만큼 증가시킨다(3).

*Pseudomonas aeruginosa*의 알긴산 합성을 제어하는 gene들은 낭포섬유환자에 있는 미생물의 폐감염 때문에 광범위하게 연구되었다. Goldberg와 Ohman

† Corresponding Author

Table 1. Bacterial strains and plasmids.

Strain and plasmids	Relevant characteristics	Source
<i>Zoogloea ramigera</i>		
115	wild type, ATCC(25935)	
115 slime	115, slime forming(spontaneous)	This study
115 slime ^r	115 slime, Rif ^r (spontaneous)	This study
mutant A, B, c	altered celluloflour reaction	
<i>E. coli</i> HB101	Cm ^r , Km ^r :: Tn5	KCTC
Transposon	pBR325 Tet ^r Cm ^r , Km ^r :: Tn5-mob	
pGS9		Selvaraj(1983)
pSUP5011	Tcr ^r , cosmid vector	Simon(1983)
Plasmids	Km ^r , Nm ^r , helper plasmid	
pLAFR3		Staskawicz(1987)
pRK2013		ATCC

Abbreviation : Ap, Ampicillin ; Cm, Chloramphenicol ; Rif, Rifampicin ; Km, Kanamycin

(5)와 Chakrabarty 등(6)은 *P. aeruginosa* 안에서 알긴산 생산에 관련된 gene의 cloning과 발현을 보고했다.

알긴산합성 gene들은 alg R이란 상보 group를 빼고는 큰 뭉치로 되어 있다(7-8). alg R gene은 GDP-mannose dehydrogenase gene인 algD의 전사를 긍정적으로 제어한다. 이 gene은 중간물이 알긴산 생합성경로로 들어가는 것을 조절한다(9).

Finan(10), Leigh(11)은 *Rhizobium meliloti*로부터 다당합성 gene을 분리하였다고 보고하였다. Exopolysaccharide(EPS) 생합성과 관련된 gene을 포함한 6개의 상보 group이 확인되는데 이들 중 적어도 3개는 유전학적으로 연결된다(11).

위에 설명된 *X. campestris*, *P. aeruginosa*, *R. meliloti*는 많이 연구된 EPS 생산 그람음성 호기성 균주들이다. EPS 생산 그람음성 호기성균주의 공통 특징은 범용숙주범위 cloning계와 Tn5 돌연변이가 사용될 수 있고 EPS gene이 분리되는데 보통 cluster의 형태로 존재한다는 것이다.

다행히 *Zoogloea*는 *Pseudomonas* 및 *Xanthomonas*와 같은 과(family)에 속해 있고 밀접하게 관련되어 있어 다당생산 유전학에서의 유사성이 기대된다. *Z. ramigera*의 다당생산 관련 유전학을 취급한 유일한 보고는 Easson(12)에 의해 제출되었다. 이들 유전학적 기술들은 *Z. ramigera* 특히 I-16-M에서 성공적이었고 EPS 생합성의 유전학적 분석은 이들 관련된 미생물 사이에 유사성이 있음을 나타냈다(12).

Z. ramigera I-16-M(협막을 형성않는 균주)은 115(협막형성 균주)와는 전혀 다른 다당을 생산한

다. 야생형 115의 협막은 외래 DNA의 도입을 막는 장벽으로 작용한다. I-16-M 균주는 접합을 통해 균주안에 외래 DNA를 도입하는 것이 가능하지만 115 균주에는 이것이 불가능하고 협막형성 불가능 변이주(cap⁻)에서만 가능하다. 협막형 다당합성 능력을 상실한 115 변이균주들은 115 야생형(cap⁺) gene 도서관으로의 보상에 의해 cap⁺로 변환된다. *X. campestris* pyruvyl transferase gene이 *Z. ramigera* 115 안에서 상동적인 대응 부분을 갖는다는 것을 제안한다.

본 연구는 *Zoogloea ramigera* 115(ATCC 25935)의 gene cloning을 위해 2종류의 변이주를 분리한 것과 zooglan 합성 유전자를 cloning시킨 것을 주요 내용으로 한 것이다.

재료 및 방법

박테리아 균주와 plasmid

본 실험에서 사용한 균주 및 plasmid들은 Table 1과 같다.

배지와 배양 조건

균주 은행으로부터 분양받은 *Zoogloea ramigera* 115(ATCC 25935)의 활성을 계속 유지시키기 위하여 lactose semi-defined medium(LSM)이 포함된 고체 배지에 2주일 간격으로 계대 배양하였다. 플라스크 및 생물 반응기에서 배양하기 위한 LSM 배지의 조성은 Cameron 등(13)이 최적화한 것으로 Kim 등(14)의 실험에 적용되었다. *E. coli*는 Luria-

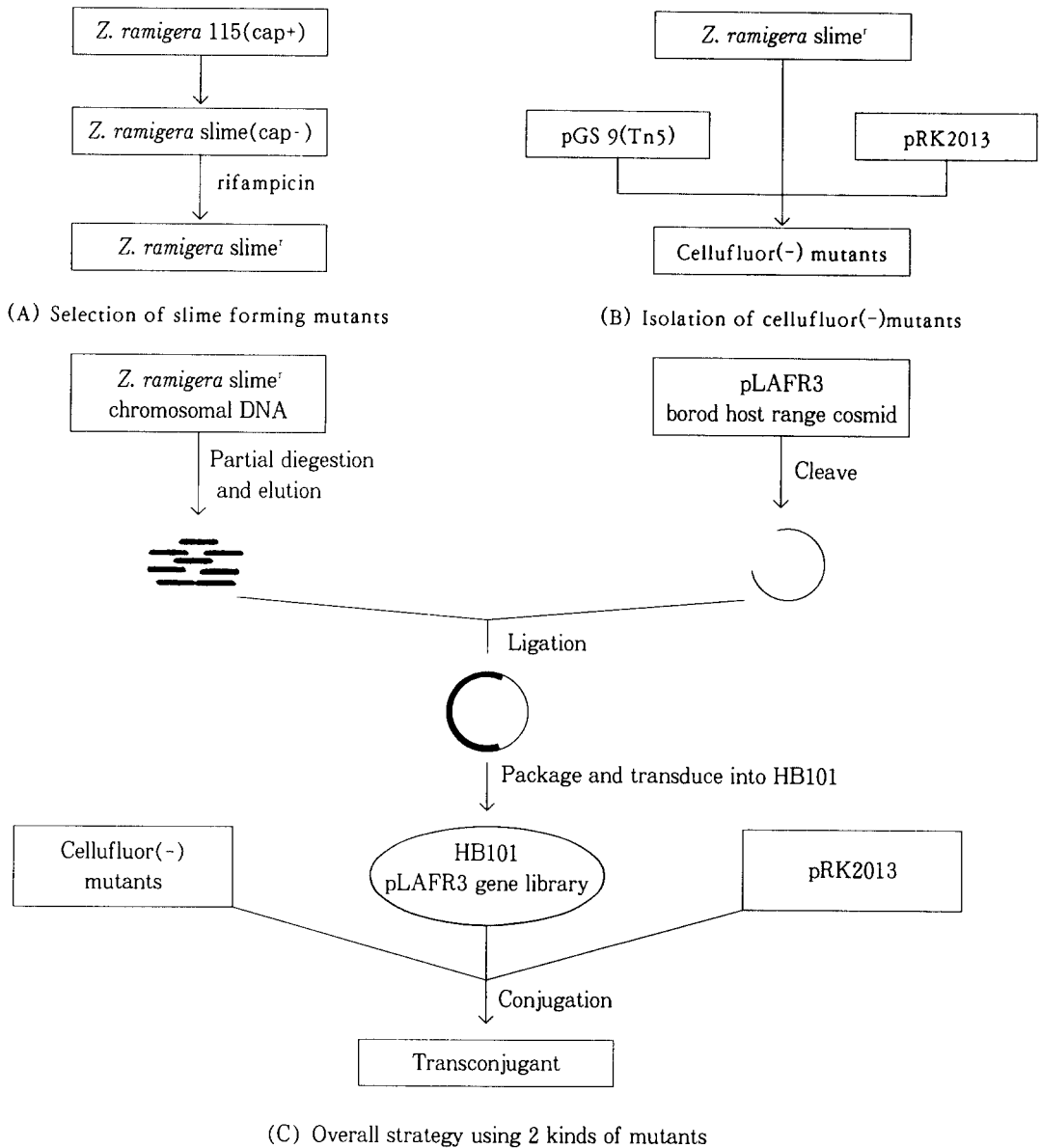


Fig. 1. Strategy for the cloning of *Z. ramigera* polysaccharide genes.

Bertani 배지를 사용하여 37°C에서 배양하였다.

제한효소와 시약

배양시에 사용한 배지들은 모두 Difco, Sigma사의 제품을 사용하였다. 실험에 사용한 제한효소들은 Promega, Boehringer Mannheim, 포스코켄 등의 제품을 이용하였고 T4 DNA ligase는 Boehringer

Manheim사의 제품을 사용하였고 Nick translation kit와 방사성 동위원소는 Amersham사 제품을 사용하였고, *in vitro* packaging kit는 Stratagene, calf intestinal alkaline phosphatase는 Promega사, 기타 시약들은 Sigma사 제품을 사용하였다. Zooglan 생합성능력이 결여된 변이주 선발은 cellulfluor (Polysciences사 제품)를 사용하였다.

Zoogloea ramigera 다당합성 gene의 cloning 방안
다당 합성을 code하는 gene을 조작하여 다당구조를 조절하기 위한 연구의 일환으로 *Xanthomonas campestris*나 *Zoogloea ramigera* I-16-M의 gene cluster를 cloning하는 연구에 성공적으로 적용된 기법을 본 실험에 사용하였다(Fig. 1). Fig. 1(A)의 방법으로 얻은 slime 균주와 Fig. 1(B)에서의 cellulose(-)균주를 이용하여 다당합성 gene의 cloning과 complementation이 이루어졌다.

Zoogloea ramigera 115(ATCC 25935)로부터 slime형의 선발

Z. ramigera 115(ATCC 25935, cap⁺)는 배양이 진행됨에 따라 서로 무리를 이루며 세포의 다당으로 구성된 협막으로 둘러 싸인다. 이와 같이 세포를 둘러싼 capsule형 다당의 생성은 유전물질의 세포간 전달을 방해할 뿐만 아니라 생성된 다당의 분리도 어렵게 만든다. 이 문제를 해결하기 위하여 협막을 만들지 않고 slime 형태로 다당을 배출하는 변이주를 지속적인 원심분리와 선발에 의하여 분리하였다. 이어 slime형으로부터 rifampicin에 저항성을 갖는 slimer을 분리하였다.

다당 생합성이 결여된 변이주의 선발

다당 생합성이 결여된 변이주를 얻기 위해 다당 관련 유전연구에 일반적으로 사용되어온 transposon Tn5 삽입방법(15)을 사용하였다. Tn5를 갖고 있는 *E. coli*(pGS9), helper plasmid인 pRK2013이 들어있는 *E. coli*와 수용세포(*Z. ramigera* 115slime⁻)를 대수 말기까지 배양하여 세포수가 동수가 되도록 한 다음 혼합하였다. 혼합물을 membrane filter(0.45 μ l)를 이용하여 filter에 흡착시킨 후, LSM 평판배지에서 12시간 mating하고, 이 filter를 0.1M 인산 완충용액(pH 7.0) 1ml에 현탁하여 항생제(25 μ g/ml kanamycin, 50 μ g/ml rifampicin)가 함유된 LSM 평판배지에 도말하고 27 $^{\circ}$ C에서 약 24시간 동안 배양하여 Tn5가 삽입된 집락을 선별하였다.

cellulose는 β (1-3)와 β (1-4) glycosyl 연결에 특이적으로 결합하고 UV선에 노출되었을 때 형광을 발하는 형광성 염료이다. Leigh(11)는 박테리아 유래 세포의 β (1-3) glycan과 β (1-4) glycan의 존재를 검출하기 위한 평판 분석에 형광 염료인 cellulose를 사용하였고 Eason(12)과 Kim(14)은 cellulose를 zooglan 생산확인 실험에 적용하였다.

돌연변이 균주의 선발은 Tn5가 삽입된 집락을 LSM 배지로 tooth pick한 다음 10%(v/v) cellulose를 생성된 colony 위에 한 방울씩 떨어뜨린 다음, 5분 후 UV상에서 형광성을 형성하지 못하는 집락(cellulose⁻)을 선별하여 실험에 사용하였다.

Southern hybridization에 의한 Tn5 삽입 확인

Probe로 사용할 plasmid는 pGS9이 복제수가 낮고 분리가 어려우므로 Tn5가 삽입되어 있으며 복제수가 높고 분리가 쉬운 pSUP5011로 대체하여 Maniatis 등(16)의 방법으로 분리 정제하였으며 hybridization은 Nick translation kit를 사용하였다. 다당 생산 돌연변이주(cellulose⁻)의 genomic DNA는 Wen-ping Chen과 Tsong-tech Kuo의 방법(17)을 변형하여 분리하였다. 분리된 115 돌연변이주의 chromosomal DNA를 각각 *EcoRI*으로 절단하여 0.8% agarose gel 전기영동으로 절단 여부를 확인하였고 DNA 염색시에 사용되었던 EtBr를 제거하기 위하여 증류수로 30분간 탈색시켰다. EtBr가 제거된 agarose gel상의 DNA를 Nytran membrane(Amersham사)에 blotting시키기 위해 변성액(1.5M NaCl, 0.5N NaOH)에 15분간 2번 변성시키고 환원액(1.5M NaCl, 0.5M Tris-HCl, pH 7.5)에 30분간 3번 처리한 후 pH paper로 gel이 중화되었는지 확인하였다. 이렇게 처리된 agarose gel상의 DNA는 Southern(18), Maniatis 등(16)의 방법을 이용하여 Nytran에 blotting시켰으며 blotting이 끝난 Nytran을 2X SSC(300mM NaCl, 30mM Na-citrate, pH 7.0)에 씻은 후 UV cross linker에서 700J로 baking한 후 α -³²P-dCTP로 표지된 probe(pSUP5011)로 hybridization시켰다. Hybridization 반응 후 2X SSC로 15분간 3회 세척하고 high stringency 세척액(2X SSC, 0.1% SDS)으로 30분간 세척하고 low stringency 세척액(0.1X SSC, 0.1% SDS)으로 세척한 후 film에 부착시켜 -70 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 방치한 다음 현상하였다.

Zoogloea ramigera 115slime⁻의 genomic DNA의 분리 및 partial digestion

Genomic library 제조에 사용할 chromosomal DNA는 Wen-ping Chen과 Tsong-tech Kuo(17)의 방법을 변형하여 분리하였다. 분리한 염색체 DNA를 제한 효소 *Sau3AI* 반응 완충액과 멸균수를 이용하여 135 μ l로 적정하고 이를 잘 섞은 후 1번 튜브에만 30 μ l를 분주하고 2번 튜브부터 7번 튜브

는 15 μ l 씩 분주한 다음 Sau3AI lunit를 1번 튜브에 넣어 잘 혼합한 후 그 혼합액 15 μ l 를 옮기는 방식으로 Sau3AI의 농도를 연속적으로 2배씩 희석하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응시킨 후 0.8% agarose gel에 전기영동으로 확인하여 15~30kb의 단편이 나올 수 있는 농도로 조정하였다.

Gel elutor에 의한 DNA 회수

Partial digestion 된 chromosomal DNA 단편들 중 15~30kb 크기의 DNA 단편들을 회수하기 위하여 GE200 sixpac gel elutor(Hoefer사)를 이용하였다. DNA의 nick을 방지하기 위하여 EtBr에 신속히 염색하고 UV상에서 15~30kb의 DNA를 포함하고 있는 gel을 절단한 다음 알루미늄 elution block에 옮기고 300 μ l 의 Tris-borate(0.52M Tris, 0.142M boric acid) 완충액을 주입하였다. 자른 gel을 Tris-borate가 채워진 inner tube(0.5ml)에 깨지지 않도록 주의하여 주입한 다음 공기 방울이 생기지 않도록 packing하였다. Packing된 0.5ml inner tube 끝을 자른 다음 elution을 실시하였다.

pLAFR3의 제한효소 처리 및 탈인산화

In vitro packaging에 사용할 cosmid vector pLAFR3은 Birnboim과 Doly(19), Maniatis 등(16)의 방법에 준하여 분리하였다. 분리한 pLAFR3 DNA를 20 μ g씩 취하여 제한효소 *Eco*RI(25unit)과 *Hind*III(25unit)로 37에서 1시간 동안 각각 반응시킨 후 65 $^{\circ}$ C에서 15분 반응을 정지시켜 phenol과 chloroform/isoamylalcohol(24:1)로 제한효소를 제거한 후 sodium acetate(최종농도 0.25M)와 2배의 에탄올을 첨가하여 DNA를 침전시켜 TE완충액에 녹인 후 CIP 처리하여 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시켰다. 이 반응액을 10X TNE(100mM Tris-HCl, pH 8.0, 1M NaCl, 10mM EDTA) 10 μ l 와 10% SDS 5 μ l 를 첨가하고 멸균수를 이용하여 총 양을 100 μ l 로 적정하여 65 $^{\circ}$ C에서 15분간의 열처리로 반응을 정지시킨 후 DNA를 회수하였고 이를 다시 *Bam*HI로 처리한 후 DNA 단편들을 회수하여 TE에 녹인 다음 사용하였고 이들 각 과정마다 0.8% agarose gel 전기영동으로 확인하였다.

Ligation과 *in vitro* packaging

vector DNA 각각 1 μ g, CIP 처리된 15~30kb 크기의 Sau3AI 단편 DNA 1.5 μ g에 10X ligation buffer 1 μ l 와 T4 DNA ligase 3 μ l 를 첨가하여 멸

균수로 총량을 10 μ l 로 맞추고 22 $^{\circ}$ C에서 16시간 반응시켰다. 그 반응액 1 μ l 를 취하여 0.5% agarose gel로 점합 여부를 확인하고 Gigapack II packaging extract(Stratagene사)로 *in vitro* packaging을 실시하였다.

E. coli HB 101로의 transfection

E. coli HB 101을 maltose(0.2%)와 MgSO₄(10mM)가 보충된 TB 액체배지(5g/l NaCl, 10g/l bacto tryptone, pH 7.4) 10ml에서 6시간(OD600 = 1.0) 정도 배양하여 원심분리한 후 10mM MgSO₄ 수용액에 현탁시켰다. 현탁된 *E. coli* HB 101 200 μ l 와 100 μ l phage ligate를 혼합하여 실온에서 30분 동안 배양한 후 2X LB 액체배지 0.7ml를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 배양한 다음 80 μ l 를 취하여 tetracycline(12.5 μ g/ml)이 함유된 LB agar 배지에 smear하였다. 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 하룻밤 배양한 뒤 자란 콜로니들을 4 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

다당 생합성 결여 변이주와 genomic library와의 complementation

Zooglan 생합성이 결여된 변이주와 genomic library와의 complementation은 Polissi 등(20)이 채용한 triparental conjugation system을 이용하여 실시하였다. 수용세포인 zooglan 생합성이 결여된 변이주(*celluloflour*⁻)들은 LSM 평판배지에 picking하여 27 $^{\circ}$ C에서 진탕배양한 뒤, helper plasmid인 pRK2013을 포함한 *E. coli*를 50 μ g/ml의 kanamycin이 함유된 5ml의 LB 배지에 접종하여 37 $^{\circ}$ C에서 하루 진탕 배양하였다. 동시에 공여세포(genomic library를 갖는 각각의 *E. coli* HB101)를 12.5 μ g/ml의 tetracycline이 함유된 5ml의 LB 배지에 접종하여 37 $^{\circ}$ C에서 하루 진탕배양하였다. 배양된 helper plasmid pRK2013과 공여세포를 0.75ml씩 각각 취하여 하나의 microfuge tube에 모은 다음 5,000rpm에서 10분간 원심분리하여 세포들을 침전시켰다. 이와 같은 방법으로 3번 반복한 다음 침전된 세포들을 새로운 LB 액체배지 1ml을 첨가하여 현탁한 다음 재 원심분리하여 300 μ l 의 LB 액체배지로 재 현탁하였다. Km, Rif(50 μ g/ml)이 함유된 LSM 평판배지에서 배양된 변이주들에 현탁액 10 μ l 씩을 떨어뜨려 27 $^{\circ}$ C에서 하루 배양한 후에 형성된 colony를 *celluloflour*반응시켜 형광성을 나타내는 집락을 선발하였다.

재 조합된 cosmid DNA의 분리 및 제한효소 처리 Complementation이 이루어진 재조합 cosmid DNA는 Birnboim과 Doly(19), Maniatis 등(16)의 방법에 준하여 분리되었다. 분리된 재조합 cosmid DNA를 제한효소 *EcoRI*, *HindIII*로 절단한 뒤 0.7% agarose gel 전기영동으로 확인하였다.

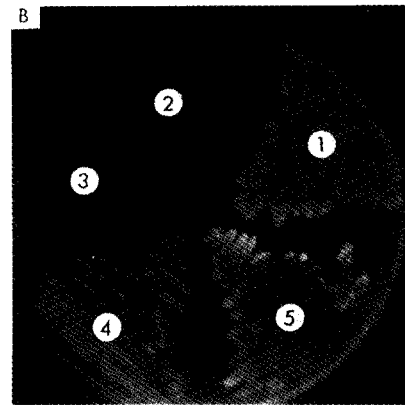
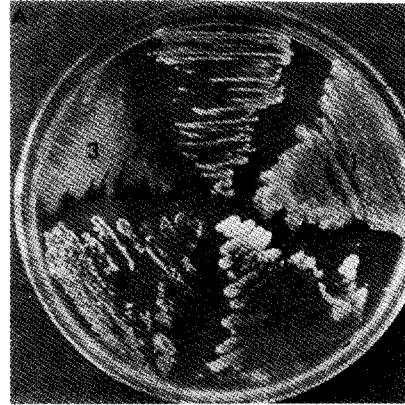
결과 및 고찰

Zoogloea ramigera 115로부터 115slime'의 분리 및 특성

Zoogloea ramigera 115의 세포들은 서로 무리를 이루고 세포외다당으로 구성된 협막에 의해 둘러 쌓인다. 야생형 콜로니들은 불규칙적인 형태와 거칠고 울퉁불퉁한 표면모양을 보인다. 지속적인 원심 분리와 계대배양을 통해 협막형 균주로부터 분리된 115slime 콜로니는 원형이며 매끄러운 표면을 갖고 반짝이는 광택과 고점성을 보인다(Fig. 2A①). 색깔 면에서도 협막형 균주의 경우 약간 ivory색을 띄는 반면 slime형의 경우는 노란색을 띄고 접종 백금을 접촉시켜 위로 잡아 올리면 slime형 균주의 콜로니는 평판에서 쉽게 풀어 지지 않고 길게 늘어져 따라 나온다. 이 변이주는 협막을 만들지 못하고 floc도 만들지 않는 균주로서 세포에 둘러쌓이지 않고 배양액에 유리되는 세포외 다당류를 만든다. 이 균주를 Easson이 NTG를 이용하여 분리한 *Zoogloea ramigera* 115SL(12)과 구별하여 *Zoogloea ramigera* 115slime이라 명명하였다. Selecting marker로 이용하기 위하여 자발적인 rifampicin 저항 균주가 115slime으로부터 유도되고 115slime'이라 명명되었는데 진한 노란색을 보였다(Fig. 2A①).

Cellulour에 대한 반응이 다른 변이주의 분리

cellulour는 $\beta(1-3)$ 와 $\beta(1-4)$ glycosyl 연결에 특이적으로 결합하고 UV선에 노출되었을 때 형광을 발하는 형광성 염료이다. cellulour에 대한 반응이 달라진 여러 가지 변이주들은 전통적인 transposon (Tn5)삽입법을 사용하여 얻을 수 있었고 cellulour 반응성, X-gal 반응성, colony morphology(크기, 색깔, 점성) 따라 3가지(A type 7, B type 7, C type 4)로 분류된다(Table 2). 변이주 중 A type은 cellulour에는 반응하지 않고 X-gal에 반응하는 것으로 colony의 크기가 크지 않고 이후의 보상실험에 사용되었으며(Fig. 2B③), B type 역시 cellulour에는 반응하지 않고 X-gal에는 반응하였지만 고체



(B)

Fig. 2. A ; Photograph of colonies on agar plate. B ; Visualization of cellulfluor fluorescencing strains under the UV illuminator.

- ① *Z. ramigera* slime type (slime).
- ② *Z. ramigera* capsule type (ATCC 25935).
- ③ cellulour⁻ mutant (A type of inserted Tn5).
- ④ transconjugant (complemented cellulour⁻ mutant by pZS 101).
- ⑤ cellulour⁺⁺ mutant (C type of inserted Tn5).

배지상에서 외부로 투명한 생성물을 다량 분비하여 전체 colony의 크기가 상당히 컸다. 다음 반응을 촉매하는 효소작용에 이상이 있으므로 중간생성물이 다량 축적된 것으로 생각된다. 나머지 C type은 cellulour에는 과도 응답하지만 X-gal에는 반응하지 않는 변이주(Fig. 2B⑤)이다. 본 연구와는 별도

Table 2. Properties of *Zoogloea ramigera* 115 slime, mutants and transconjugants.

Strain	Cellulflour	X-gal	Viscosity	Morphology
115 slime ^f	+	+	high	yellow
Mutant A	-	+	low	light yellow
Mutant B	-	+	medium	light yellow & large colony
Mutant C	++	-	low	white
Transconjugant	+	+	medium	light yellow or white

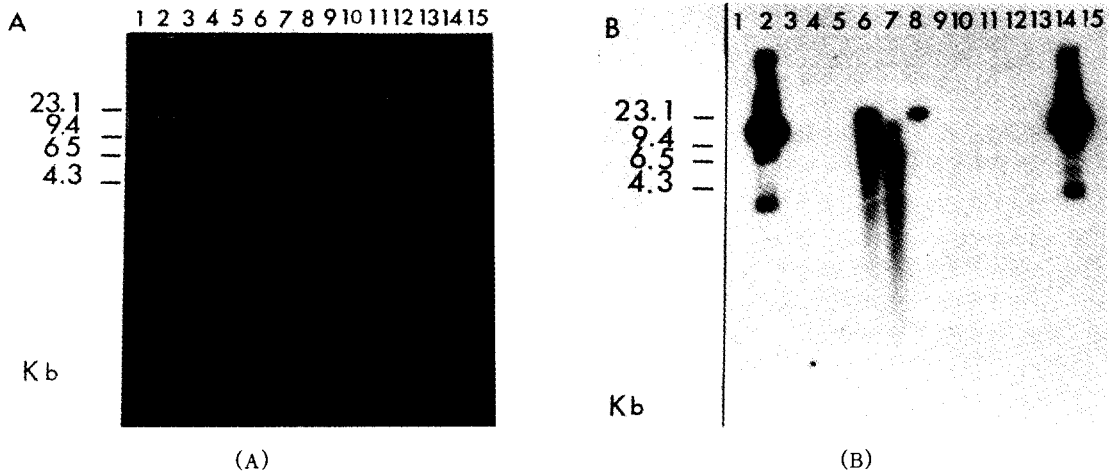


Fig. 3. A ; Electrophoresis (on the 0.7% agarose gel for 6hr with 55V). B ; Autoradiogram of ³²P-labelled Tn5 DNA hybridized to a southern blot of *Eco*RI digested chromosomal DNA from mutants. lane 1, 15 : λ /*Hind*III size marker. lane 2, 14 : probe(pSUP 5011). lane 3 : *Z. ramigera* wild type. lane 4-13 : Tn5 inserted mutants.

로 zooglan 생합성 경로와 관련하여 B, C type 변이 주가 만든 생성물에 대한 특성 규명이 필요하다.

Southern blotting of Tn5

정상적인 *Zoogloea ramigera* 115slime에 Tn5가 들어가 cellulflour에 음성을 띄는 변이주로 바뀌었음을 증명하기 위해 pSUP5011을 probe로 삼아 Southern blotting을 실행하였다. Fig. 3은 그 결과로서 A type 변이주(A1, A2, A3)안에 Tn5가 들어 있음을 확인하였고 이에 따라 Tn5가 들어가서 cellulflour 양성균주(Fig. 2B①)를 cellulflour 음성균주(Fig. 2B③)로 변화시켰음을 알 수 있었다. 이후의 complementation실험은 A type 변이주를 이용하여 수행하였다.

Zoogloea ramigera 115slimer의 genomic DNA의 분리

Wen-ping Chen과 Tsong-tech Kuo의 방법(17)을 변형, 적용하여 얻은 chromosomal DNA를 *Sau* 3AI으로 부분 소화시킨 후 0.8% agarose gel에 전기영동시켜 15~30kb 단편을 선택 분리하였다(Fig. 4).

다당생합성 결여 변이주와 genomic library와의 complementation

이들 변이주의 보상은 Fig. 1(c)에 따라 범용숙주 범위 cosmid vector인 pLAFR3안에 건설된 *Zoogloea ramigera* 115slime gene library로 이루어지고 접합에 의해 115 변이주안에 도입되었다. pLAFR3/115 gene library는 비 형광성 변이주(Fig. 2B③)안에 도입되었고 결과적인 transconjugant들은 cellulflour을 포함하는 한천평판 위에서 형광성의 회복을 통해 선별된다(Fig. 2B④).

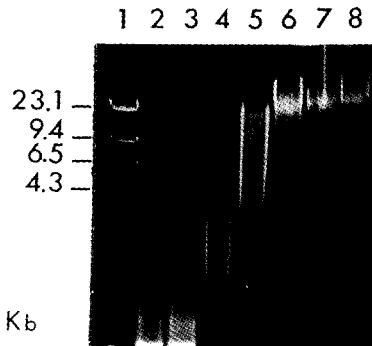


Fig. 4. Partial digestion patterns of the *Z. ramigera* chromosomal DNA with various concentration *Sau3AI* (on the 0.65% agarose gel, loading for 1hr with 105V). lane 1: λ /*Hind* III size marker. lane 2-8: reacted at 37°C for 15min with various conc. *Sau3AI* (20U, 5U, 1.25U, 0.313U, 0.078U, 0.02U).

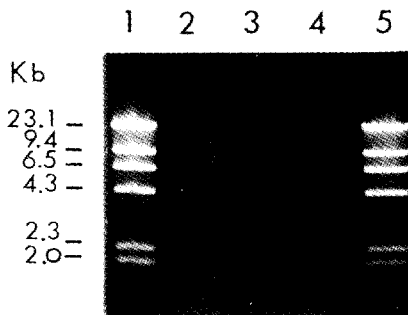


Fig. 5. Restriction enzyme digestion patterns of complemented plasmids. (on the 0.7% agarose gel for 1.5hr with 85V) lane 1, 5: λ /*Hind* III size marker. lane 2: pZS101. lane 3: pZS102. lane 4: pZS103.

재조합된 cosmid DNA의 분리 및 제한효소 처리 complementation이 이루어진 재조합 cosmid DNA (pZS101, pZS102, pZS103)가 포함된 transconjugant DNA를 분리하여 제한효소 *EcoRI*, *Hind* III로 절단한 뒤 0.7% agarose gel 전기영동으로 확인하였는데 *EcoRI*에서는 여러 개의 단편이 보였지만 *Hind* III에서는 band를 확인하지 못했다. *EcoRI* 처리에서는 재조합 cosmid pZS101, 102, 103을 포

함한 transconjugant들 모두가 22.8, 12.2, 7.9, kb의 진한 단편을 갖고 있었고 2~5kb의 희미한 단편이 확인되었다 (Fig. 5). 삽입된 pLAFR3의 크기가 22.8kb인 것을 고려하면 12.2, 7.9kb의 공통적인 *EcoRI* site가 있음을 알 수 있다.

요 약

zooglan 생합성에 필수적인 gene cluster를 clone 하기 위해 2종류의 변이주가 분리되었다. *Zoogloea ramigera* 115는 협막형 다당(주로 zooglan)을 생산한다. 115 균주로 접합시키고 생산물을 용이하게 분리하기 위하여 반복된 원심분리와 선별을 통해 협막을 만들지 않는 slime형 생산균주를 분리하였다. 세포의 다당 생산 능력이 결여된 변이주를 전통적인 transposon (Tn5) 기술을 사용하여 얻었고 달라진 colony 형태와 cellufLOUR 결합 성질에 의해 선별하였다. 이들 변이주들은 범용숙주범위 cosmid vector 안에 전설된 *Z. ramigera* 115slime gene library와 helper plasmid로의 3양친 접합에 의해 보상되었다.

감 사

본 연구는 1994년 교육부 학술연구조성비(유전공학)에 의하여 수행되었으며 이에 깊이 감사 드립니다. 아울러 조선대 박 열 교수연구실 김호상 선생의 조언에 감사드립니다.

참고문헌

1. B. A. Friedman and P. R. Dugan(1988), *Dev. Ind. Microbiol.*, **9**, 381.
2. G. C. Barrere, C. E. Barber, M. J. Daniel (1986), *Int. J. Biol. Macromol.*, **8**, 372.
3. N. E. Harding, J. M. Cleary, D. K. Cabanas, I. G. Rosen and K. S. Kang(1987), *J. Bacteriol.*, **169**, 2854.
4. L. Thorne, I. Tansey and T. J. Pollock(1987), *J. Bacteriol.*, **169**, 3593.
5. J. B. Goldberg and D. E. Ohman(1984), *J. Bacteriol.*, **158**, 1115.
6. A. Darzins and A. M. Chakrabarty(1984), *J. Bacteriol.*, **159**, 9.
7. A. Darzins, Nixon, L. L., Vanags, R. I., and A. M. Chakrabarty(1985), *J. Bacteriol.*, **161**,

- 249.
8. I. Sa-Correia, A. Darzins and S. K. Wang, A. Berry and A. M. Chakrabarty(1987), *Gene*, **169**, 3224.
 9. V. Derectic, J. F. Gill and A. M. Chakrabarty (1987), *J. Bacteriol.*, **169**, 351.
 10. T. M. Finan, B. Kunkel, G. F. Devos and E. R. Singer(1986), *J. Bacteriol.*, **167**, 66.
 11. J. A. Leigh, E. R. Signer, and G. C. Walker (1985), *PNAS USA*, **82**, 6231.
 12. D. D. Easson, A. J. Sinskey, O. P. Peoples (1987), *J. Bacteriol.*, **169**, 4518.
 13. J. H. Flatt, R. S. Hardin, J. M. Gonzalez, D. E. Dogger, E. N. Lightfoot and D. C. Cameron(1992), *Biotechnol. Prog.*, **8**, 327.
 14. D. W. Kim, J. C. Lee, K. Y. Lee, H. W. Ryu and J. H. Kim(1995), *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **10**, 221.
 15. R. Simon, U. Priefer and Puhler(1983), *Bio/Technology*, **1**, 784.
 16. T. Maniatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook (1989), *Molecular Cloning A Laboratory Handbook*, Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y.
 17. Wen-Ping Chen and Tsong-Tech Kuo(1993), *Nucleic Acid Research*, **21**, 9.
 18. E. M. Southern(1975), *Journal of Mol. Biol.*, **127**, 502.
 19. H. C. Birnboim and Doly J.(1979), *Nucleic Acids Research*, **7**, 1513.
 20. A. Polissi, G. Bestetti, E. Galli, G. Bertoni and G. Deho(1990), *J. Bacteriol.*, **172**, 6355.