

Haloarcular sp. EH-1에 의한 bacteriophage의 분리

정 명 주

경성대학교 교양과정부

Isolation of Bacteriophage from *Haloarcular* sp. EH-1

Myung-Ju Jung

School of Liberal Arts, Kyungsoong University, Busan 608-736, Korea

Abstract

The extremely halophilic archaeobacterium *Haloarcular* sp. EH-1 was isolated from solar salts. Halophages found in *Haloarcular* sp. EH-1 were isolated from fermented anchovy sauce. Halophages were isolated from fermented anchovy sauce using *Haloarcular* sp. EH-1 as a host bacterium. The isolated halophage produced 0.5~1.0 mm in diameter clear plaques. The halophage consists of an symmetrical head, measuring 68 nm in diameter, and a contractile tail, 100 nm long and base plates were observed. Total size of phage DNA genome obtained 20 Kbp and its sequence homology was 52.87% with *H. Salinarium*.

Key words – extremely halophilic bacteria, *Haloarcular* sp., bacteriophage, halophage

서 론

호염성균은 소금호수나 염전과 같은 천연환경이나 염장 어류와 피혁과 같은 인위적으로 염도를 높인 환경[2,16]과 같이 고염수(>15%, w/v, NaCl)에서 우점미생물 집단을 형성하며[11], 성장을 위해 요구되는 호염도에 따라 내염성(0~0.3M), 중호염성(0.2~2.0M), 고호염성(3.0~5.0M)으로 분류하고 있다[10]. 최근 고호염성균은 극지 미생물의 연구의 중요한 과제가 될 뿐만 아니라, 염류폐수처리, 중금속회수, polymer 및 고호염성 효소를 이용한 젓갈 숙성등 산업적 이용면의 연구가 활발해지고 있다[9,12,18,26,28]. 그러나 우리나라에서는 고호염성균의 기초연구뿐 아니라 산업적

응용에 관한 연구도 부족하며, 특히 고호염성균에서 분리된 박테리오파아지(파아지)에 대한 보고는 매우 드물다. Wais 등[31]은 *H. halobium* 및 *H. cutirubrum*에 감염되는 파아지를 분리하였으며, Torsvik와 Dundas[29,30]는 *H. salinarium*에서, Pauling[22]은 *H. halobium*에서 각각 파아지를 분리하였다는 보고가 있을 뿐이다. 최근 고호염성균이 유전연구의 과제로서 점차 많이 다루어지면서, 이미 알려진 진정세균의 유전자 전달구조에 대한 연구는 고세균의 유전자 전달과정에도 많은 연구 재료를 제공하였다[5,8, 11,15,20]. Dyall-Smith 및 Schalkwyk는 진정세균의 유전자 모델과의 차이점 및 유사성을 제시하였고[8,25], Daniels 등은 고호염성 파아지를 이용하여 숙주의 바이러스 제한 및 변형 메카니즘이 고세균에서 작동된다고 하는 사실을 증명하였으며[7], 그리고 Clines 등은 초기 형질도입 과정 실험에 고호염성 파아지 DNA를 이용하였다[6]. 이러한 발

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 051-620-4648, Fax : 051-627-4115
E-mail : nah25@star.ks.ac.kr

전에도 불구하고 고호염성 파아지에 대한 보고는 여전히 기초 바이러스학 수준에 머무르고 있다.

본 연구에서는 고호염성균 *Haloarcular* sp. EH-1을 이용하여 멸치젓갈에서 파아지를 분리하여 고세균 영역의 고호염성균의 유전적 연구의 기초를 제공하고자 본 파아지의 DNA를 분리하여 DNA 서열을 분석하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 파아지 분리 재료

호염성 파아지 분리에 사용한 균주는 천일염으로부터 분리 동정된 *Haloarcular* sp. EH-1[21]을 사용하였으며, 일반가정에서 담근 멸치 젓갈을 파아지 분리 재료로 사용하였다.

사용배지

중균 및 파아지 액체배지는 Sehgal and Gibbons 복합배지[26]를 사용하였으며, 용균반 형성을 위해서 1.5% agar가 첨가된 Sehgal and Gibbons 평판배지와 0.5% agar가 첨가된 중층배지를 사용하였다. 전자현미경 관찰을 위한 파아지 현탁액으로는 25% NaCl과 0.08 M MgSO₄가 포함된 용액을 사용하였다.

파아지의 분리 및 정량

파아지의 분리를 위해 Pauling[22]의 방법에 따라 숙주 균을 중층배지에서 대수증식기까지 진탕배양한 다음 여과한 멸치 젓갈을 균배양액에 혼합하고 37°C에서 48~72시간 진탕배양하였다. 배양액을 원심분리(12,000 rpm, 10분)하여 상등액을 중층법으로 준비된 평판위에 한방울 떨어뜨려서 플라스틱 용기에 넣어 37°C에서 5~7일간 배양하고 용균부위를 관찰하여 파아지의 존재유무를 확인하였다. 반점 시험으로 배양 상등액의 파아지액을 중층법으로 용균반 형성을 확인한 후, 한 용균반을 선택하여 2회 이상 단일 용균반을 분리하여 파아지를 순수분리하였다.

전자현미경에 의한 파아지 형태 관찰

200 메시의 구리 그리드에 콜로디온 지지막을 입히고 탄소를 증착시킨 후 농축 정제된 파아지액 3 μ l를 묻혀 1시간 정도 건조시키고 1% glutaraldehyde - 0.1 M sodium

cacodylate 완충액(pH 7.4)에서 2시간 동안 고정시킨 후 4% uranyl acetate 용액으로 30~60초 동안 염색을 하고 3회 수세하여 건조시킨 후 전자현미경(JEM 122 EX-II, JEOL, Japan)으로 80 kV하에서 형태를 관찰하였다[4,27].

Isolation of halophage DNA

Halophage DNA 분리를 위해 먼저 정제된 파아지액에 동량의 20% PEG 6000이 녹아있는 2.5 M NaCl액을 첨가하여 4°C에서 하룻밤 방치한 후 원심분리(12,000 rpm, 10분)하여 모은 침전물을 TE 완충액(1 mM EDTA, 10 mM Tris-Cl, pH 7.5) 500 μ l로 현탁하였다. 이 현탁액에 동일한 양의 페놀을 첨가하고 10분간 vortex하여 방치한 후 4°C에서 원심분리(12,000 rpm, 5분)한 다음 상등액을 분리하고 동일한 양의 페놀/클로로포름을 첨가해서 잘 혼합한 후 원심분리(12,000 rpm, 5분)하여 분리한 상등액에 다시 동일한 양의 클로로포름을 넣고 원심분리(12,000 rpm, 5분)하여 상등액을 회수하였다. 이 상등액에 1/10의 3 M sodium acetate(pH 5.2)와 2배의 100% 에탄올(-20°C)을 넣어 반응액을 -20°C에서 하룻밤 보관한 후 원심분리(12,000 rpm, 10분)한 다음, 계속해서 70% 에탄올로 수세하였다. 모아진 침전물은 건조시키고 1 ml의 TE 완충액으로 녹인 다음 -20°C에 보관하였다.

DNA cloning

준비된 Halophage DNA와 pTZ 18R plasmid vector를 각각 Eco RI와 Hind III로 digestion한 다음 T4 DNA ligase를 이용하여 ligation시켰다. 재조합된 plasmid는 Maniatis 등의 방법[17,24]에 따라 *E. coli* DH5a에 대해 transformation 시켰는데 50 μ g/ml ampicilline과 1 mM isopropyl-D-thiogalactopyranoside(IPTG), 그리고 2% 5-bromo-4-chloro-3-indoylgalactoside(X-gal)이 포함되어 있는 LB 평판배지에 도말하여 37°C에서 16~24시간 배양하여 white colony를 형질전환체로 선별하였다. 다수의 재조합 플라스미드는 alkaline lysis 방법[17,24]에 따라 분리하였으며, 삽입된 DNA 단편에 대해서는 Eco RI와 Hind III로 digestion하여 1% agarose gel상에서 확인하였다.

DNA sequencing

BigDye terminator cycle sequencing ready reaction과

ABI PRISM 377 automated sequencer(Perkin-Elmer)를 이용하여 halophage DNA 염기서열 분석을 실시하였다. 즉 8 μ l terminator ready reaction mix, 1.5 μ l temperate DNA(0.2 μ g/ μ l) 및 3.2 pmole M13-20 universal primer를 최종 부피가 20 μ l가 되도록 혼합한 시료를 96°C에서 10초, 50°C에서 5초, 60°C에서 4분간 25회 반복하여 증폭한 후 에탄올로 침전시켜 얻은 침전물을 loading용 완충액(formamide to EDTA/blue dextran 5:1) 6 μ l에 현탁하여 잘 혼합하고 90°C에서 2분간 변성시켜 automated sequencer에 주입하여 염기서열을 결정하였다. DNA 염기서열의 분석은 FASTA database 프로그램을 사용하였으며, Gene bank/EMBL database에 저장된 유전자 염기서열들을 활용하여 유사성을 조사하였다[23].

결과 및 고찰

파아지의 분리

순수분리한 파아지의 플라그 형태와 크기는 Fig. 1에 나타내었다. 분리된 파아지의 플라그는 대체로 작고 선명한 편 형태로써 크기는 직경 0.5~1.0 mm이었다. 이러한 결과

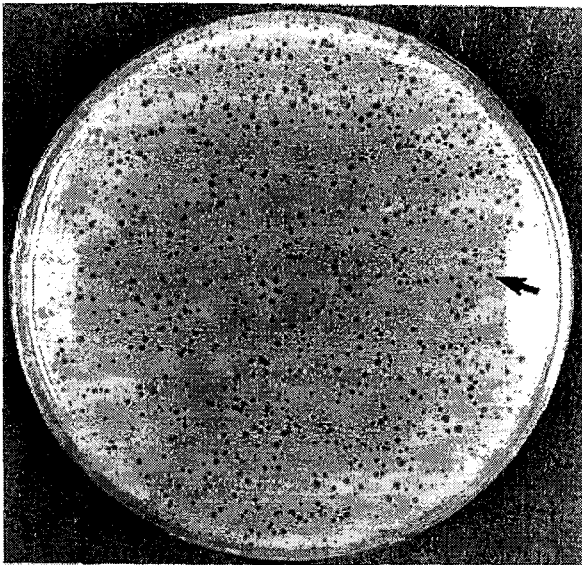


Fig. 1. Plaques of halophage isolated from *Haloarcular* sp. EH-1 on SGC agar plate.

SGC agar plate contained 0.75% casamino acid, 1.0% yeast extract, 25% sodium chloride, 0.3% sodium citrate, 0.2% potassium chloride, 2.0% magnesium sulphate, 0.0023% ferric sulphate, 2% agar(pH 7.4).

는 직경 0.5~1.0 mm의 작고 투명한 플라그를 나타내는 *Haloferax* Aa 2.2[14]의 파아지와 크기가 유사하였으나, 직경 2.5~3.0 mm의 비교적 크고 투명한 플라그를 나타내는 고염성균인 Ch2[19]에 비하면 매우 작은 플라그를 나타내었다.

파아지의 전자현미경적 관찰

순수 분리한 파아지를 농축하여 음성염색으로 그 형태를 관찰한 결과 Fig. 2에 나타낸 바와 같이, tap pol 형태로 지름 68 nm의 대칭형 두부와 길이 100 nm의 contractile 미부를 가지고 있었으며 base plate가 관찰되었다. 이러한 결과는 58 nm 지름의 icosahedral 두부와 94 nm 길이의 contractile 미부를 가지는 Bradley group의 A1 유형에 속하며[3,4,20], base plate가 관찰된 *H. salinarium* 파아지 HF 1 및 HF 2의 형태와 유사하였으며, 64 nm 지름의 icosahedral 두부와 170 nm 길이의 contractile 미부를 가지는 *H. halobium*의 Φ H 파아지[13]에 비해 미부의 길이가 짧았으나, 일반적인 호염성 파아지의 형태가 λ 와 같은 세균성 파아지와 구조적으로 유사한 형태를 나타낸다고 하는 Nuttall의 보고[19]와 일치하였다.

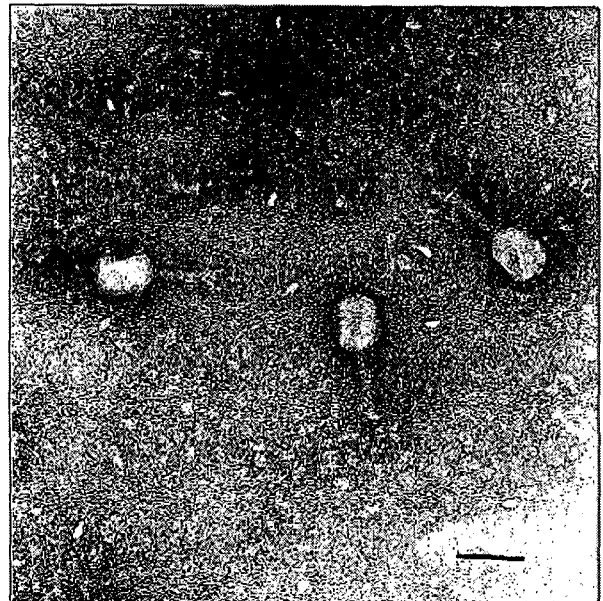


Fig. 2. Electron micrograph of halophage on *Haloarcular* sp. EH-1.

Negative staining was carried out with 4% uranyl acetate(Bar; 100 nm).

해 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Akhmanova, A.S., V.K. Kagramanova and A.S. Mankin. 1993. Heterogeneity of small plasmids from halophilic archaea. *J. Bacteriol.* **175**, 1081-1086.
2. Anderson, H. 1954. The reddening of salted hides and fish. *Appl. Microbiol.* **2**, 64-69.
3. Ausubel, F.M., R.Brent, R.E. Kingston, O.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith and K. Struhl. 1989. *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley, New York.
4. Bradley, D.E. 1967. Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. *Bacteriol. Rev.* **31**, 230-314.
5. Clines, S.W., W.L. Lam, R.L. Charlebois, L.C. Schalkwyk and W.F. Doolittle. 1989. Transformation methods for halophilic archaeobacteria. *Can. J. Microbiol.* **35**, 145-152.
6. Clines, S.W. and W.F. Doolittle. 1987. Efficient transfection of the archaeobacterium *Halobacterium halobium*. *J. Bacteriol.* **169**, 1343-1344.
7. Daniels, L.L. and A.C. Wais. 1987. Restriction and modification of halophage S 45 in *Halobacterium halobium*. *J. Bacteriol.* **169**, 1343-1344.
8. Dyall-Smith, M.L. and W.F. Doolittle. 1994. Construction of composite transposons for halophilic archaeobacteria. *Can. J. Microbiol.* **40**, 922-929.
9. Fernandez-castillo, R., F. Rodriguez-valera, J. Gonzalez-ramos and F. Ruiz-berraquero. 1986. Accumulation of poly(β -hydroxybutyrate) by Halobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 214-216.
10. Gilmour, D. 1990. Halotolerant and halophilic microorganism. pp. 147-177, In C. Edwards(eds.), *Microbiology of Extreme Environments*, McGraw-Hill, New York.
11. Glauert, A.M. 1974. *Practical methods in electron microscopy*. Vol. 3, North-Holland Publishing Company, Amsterdam.
12. Gochner, M.B. and D.J. Kushner. 1969. Growth and nutrition of extremely halophilic bacteria. *Can. J. Microbiol.* **15**, 1157-1165.
13. Gropp, F., P. Palm and W. Zillig. 1989. Expression and regulation of *Halobacterium halobium* phage Φ H genes. *Can. J. Microbiol.* **35**, 182-188.
14. Holmes, M.L. and M.L. Dyall-Smith. 1990. A plasmid vector with a selectable marker for halophilic archaeobacteria. *J. Bacteriol.* **172**, 756-761.
15. Lam, W.L. and W.F. Doolittle. 1993. Shuttle vectors for the archaeobacterium *Halobacterium volcanii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**, 5472-5482.
16. Lochhead, A.G. 1934. Bacteriological studies on the red discoloration of salted hides. *Can. J. Res.* **10**, 275-286.
17. Maniatis, T., E.F. Fritsh and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory.
18. Norberg, P. and B.V. Hofsten. 1969. Proteolytic enzymes from extremely halophilic bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **55**, 251-256.
19. Nuttall, S.D. and M.L. Dyall-Smith, M. 1993. HF 1 and HF 2: novel bacteriophage of halophilic archaea. *Virology* **197**, 678-684.
20. Nuttall, S.D. and M.L. Dyall-Smith. 1995. Halophage HF2: Genome organization and replication strategy. *J. Virol.* **69**, 2322-2327.
21. Park, H.S. and M.J. Jeong. 1996. Isolation and identification of an extremely halophilic bacterium from solar salts. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 671-677.
22. Pauling, C. 1982. Bacteriophages of *Halobacterium halobium*: isolation from fermented fish sauce and primary characterization. *Can. J. Microbiol.* **28**, 916-921.
23. Pearson, W.R. and D.J. Lipman. 1988. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 2444-2448.
24. Sambrook, J., E.F. Fritsh and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual 2/e*, Cold Spring Harbor Laboratory.
25. Schalkwyk, L.C. 1993. Halobacterial genes and genomes. pp. 467-496, In Kates, M., D. Kushner and A. Matheson(ed.), *Biochemistry of Archaea*, Vol. **26**, Elsevier, New York.
26. Sehgal, S.N. and N.E. Gibbons. 1960. Effect of some metal ions growth of *Halobacterium cutirubrum*. *Can. J. Microbiol.* **6**, 165-169.
27. Sommerville, J. and U. Scheer. 1987. *Electron Microscopy in molecular biology-Practical approach*, IRL Press, Oxford.
28. Tindall, B.J. 1992. The family Halobacteriaceae. pp. 768-808, In Balows, A., H.G. Truper, M. Dworkin, W. Harder and K.H. Schleifer(eds.), *The prokaryotes*, Springer-Verlag.

정 명 주

29. Torsvik, T. and I.D. Dundas. 1974. Bacteriophage of *Halobacterium salinarium*. *Nature(London)* **248**, 680-681.
30. Torsvik, T. and I.D. Dundas. 1980. Persisting phage infection in *Halobacterium salinarium* str. 1. *J. Gen. Virol.* **47**, 29-36.
31. Wais, A.C., M. Kon, R.E. MacDonald and B.D. Stollar. 1975. Salt-dependent bacteriophage infecting *Halobacterium cutirubrum* and *H. halobium*. *Nature (London)* **256**, 314-315.

(Received April 15, 2003; Accepted August 13, 2003)