

대청호로부터 제작한 메타지놈 라이브러리에서 1,2-dichloroethane의 분해에 관여하는 *dhIA* 유전자의 분리

강철희 · 문미숙 · 송지숙 · 이상만¹ · 김치경*

(충북대학교 미생물학, ¹청주대학교 생명과학과)

Isolation of *dhIA* Gene Responsible for Degradation of 1, 2-dichloroethane from Metagenomic Library Derived from Daechong Reservoir. Kang, Cheol-Hee, Mi-Sook Moon, Ji-Sook Song, Sang-Mhan Lee¹ and Chi-Kyung Kim* (Department of Microbiology, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea; ¹Department of Life Science, Chongju University, Cheongju 360-764, Korea)

Traditional screening techniques have missed up to 99% of microbial resources existing in the nature. Strategies of direct cloning of environmental DNAs comprising the genetic blueprints of entire microbial metagenomes provide vastly more genetic information than is contained in the culturable. Therefore, one way to screening the useful gene in a variety of environments is the construction of metagenomic DNA library. In this study, the water samples were collected from Daechong Reservoir in the mid Korea, and analyzed by T-RFLP to examine the diversity of the microbial communities. The crude DNAs were extracted by SDS-based freezing-thawing method and then further purified using an UltraClean™ kit (MoBio, USA). The metagenomic libraries were constructed with the DNAs partially digested with *EcoRI*, *BamHI*, and *SacII* in *Escherichia coli* DH10B using the pBACe3.6 vector. About 14.0 Mb of metagenomic libraries were obtained with average inserts 13~15 kb in size. The genes responsible for degradation of 1, 2-dichloroethane (1, 2-DCE) via hydrolytic dehalogenation were identified from the metagenomic libraries by colony hybridization. The 1, 2-dichloroethane dehalogenase gene (*dhIA*) was cloned and its nucleotide sequence was analyzed. The activity of the 1, 2-DCE dehalogenase was highly expressed to the substrate. These results indicated that the *dhIA* gene identified from the metagenomes derived from Daechong Reservoir might be useful to develop a potent strain for degradation of 1, 2-DCE.

Key words : metagenomic libraries, *dhIA*, 1, 2-dichloroethane dehalogenase, T-RFLP

서 론

지구상에 존재하는 미생물은 지구 생태계의 전 생물 종의 약 60%를 차지하고 있는 것으로 알려져 있으며, 이

러한 미생물은 지구 생태계를 유지하는데 없어서는 안될 중요한 역할을 담당하고 있다. 그들의 종과 기능의 다양성은 지구 생태계 내에서 생산자와 소비자로서 이어지는 물질흐름에 있어서 분해자의 역할을 수행함으로써 물질의 순환을 극대화 시킬 뿐만 아니라 생태계 내의 한정적인

* Corresponding author: Tel) 043) 261-2300, Fax: 043) 264-9600, E-mail: environ@chungbuk.ac.kr

Table 1. Culturability determined as a percentage of culturable bacteria in comparison with total cell counts.

Habitat	Culturability (%) ^a	References
Seawater	0.001~0.1	Kogure <i>et al.</i> (1979; 1980), Ferguson <i>et al.</i> (1984)
Freshwater	0.25	Jones (1977)
Sediments	0.25	Jones (1977)
Soil	0.30	Tosvik <i>et al.</i> (1990)
Mesotrophic lake	0.1~1	Staley and Konopka (1985)
Unpolluted estuarine waters	1~3	Ferguson <i>et al.</i> (1984)
Activated sludge	1~15	Wagner <i>et al.</i> (1993; 1994)

^aCulturable bacteria are measured as CFU formation.

자원을 이용하거나 새로운 유기물질을 합성하는데 있어서도 아주 중요한 역할을 한다 (Weisse, 1992; Pernthaler *et al.*, 1998). 또한 상이한 환경 조건에서 적응하여 살아가는 수많은 종류의 미생물들은 서로 다른 다양한 유용한 유전자를 지닌다고 보고되어 있다 (Lee, 2002).

최근까지 미생물을 다양한 자연 환경으로부터 순수 분리하여 배양하거나 배양된 균체로부터 유용한 각종 물질을 추출하는 연구가 진행되었다. 그러나 자연 생태계에 존재하는 모든 미생물을 순수 분리하여 배양하는 것은 불가능하다. 현재 다양한 미생물 종이 발견되거나 이용되고 있으나, 많은 학자들은 지금까지 알려진 자연 생태계에 존재할 것으로 예상되는 미생물 중에 대하여 Amann *et al.* (1995)이 보고한 바에 의하면 Table 1과 같이 전통적인 방법으로 배양 가능한 미생물은 1% 미만이며, 99% 이상은 배양하기 어려우며, 또는 배양할 수 없다고 보고되었다.

최근에는 미지의 유용한 미생물 자원을 이용하기 위한 방법으로 다양한 환경에 분포되어 있는 상당수의 미생물을 체계적으로 이용하고자 하는 연구가 본격적으로 이루어지고 있는데, 그 중의 하나가 배양이 어렵거나, 배양할 수 없는 이들의 유전체를 직접 추출하여 벡터에 삽입하여 클로닝하는 방법으로 메타게놈 연구가 활발하게 진행되고 있다. 이때 사용하는 벡터는 큰 크기의 유전자 또는 유전자 클러스터를 클로닝할 수 있는 BAC (Bacterial Artificial Chromosome), YAC (Yeast Artificial Chromosome), Fosmid, 그리고 Cosmid가 많이 사용되고 있다. 이와 같이 메타지놈 라이브러리를 제작하여 신규 유용 유전자를 탐색하고자 하는 연구가 선진국을 중심으로 활발히 진행되고 있다 (Kim *et al.*, 1992; Bintrim *et al.*,

1997; Rondon *et al.*, 2000; Moon *et al.*, 2004).

Halogenated hydrocarbons는 유기용매, 농약과 제조제의 성분 그리고 여러 유기화학 합성 원료물질로 널리 사용되어 왔다. 특히, Trichloroethylene (TCE)와 Perchloroethylene (PCE), 그리고 그들의 분해 중간 대사 산물인 1, 2-dichloroethane (1, 2-DCE)은 세척제 및 탈지제로 쓰이거나 다른 화학합성의 원료물질로 쓰이고 있다. 이 물질들은 토양계나 수계환경에 노출되면 독성과 발암성이 있기 때문에 생명체에 유해하고, 특히 사람의 건강을 위협하는 요인이 되어 환경부에서 그 사용을 제한하고 있다. 따라서 이러한 환경오염 물질들을 분해할 수 있는 미생물의 분리 및 분해에 관여하는 효소, 유전자 그리고 분해경로 등에 관한 많은 연구들이 진행되고 있다 (Fetzner and Lingens, 1994; Janssen *et al.*, 2001).

미생물들이 halogenated hydrocarbons를 분해하는 과정 가운데 가장 중요한 단계는 dehalogenation으로 탄소와 할로겐의 강한 공유결합(C-H)이 dehalogenase의 작용으로 끊어지게 된다. Janssen *et al.* (2001)은 dehalogenation이 일어남으로서 halogenated hydrocarbons의 독성이 약해진다고 보고하였다.

Haloalkane의 분해에 관여하는 haloalkane dehalogenase 중 hydrolytic haloalkane dehalogenase로는 *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 (Janssen *et al.*, 1989)와 *Xanthobacter flavus* UE15 (Song *et al.*, 2004)의 hydrolytic 1, 2-DCE dehalogenase (*dhIA*)이며, *Mycobacterium* sp. GP1 (Poelarends *et al.*, 1999)와 *Pseudomonas pavonaceae* (Poelarends *et al.*, 2000), 그리고 *Rhodococcus rhodochrous* (Kulakova *et al.*, 1979)에서 보고된 hydrolytic 1, 2-dibromoethane dehalogenase (*dhaA*)가 대표적인데, 이 두 효소는 아미노산 서열에 있어서 30% 정도의 낮은 유사성을 보이지만 효소의 전체적인 구조는 매우 유사하고 효소활성 부위에 보존적인 아미노산이 존재한다는 것이 특징이다 (Newman *et al.*, 1999).

1, 2-DCE은 *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 (Janssen *et al.*, 1989)와 *Xanthobacter flavus* UE15 (Song *et al.*, 2004)의 haloalkane dehalogenase인 *dhIA*와 haloacid dehalogenase인 *dhIB*에 의하여 염소이온 두 개가 순차적으로 떨어지며 분해된다고 보고되었다.

본 연구에서는 대청호 시료로부터 핵산을 추출하여 BAC벡터를 이용한 메타지놈 라이브러리를 구축하였고, 그 중에서 hydrolytic dehalogenation 작용으로 1, 2-dichloroethane (1, 2-DCE)를 분해하는 pDC20을 분리하였다. 메타지놈 라이브러리로부터 분리한 pDC20로부터 haloalkane dehalogenase gene, *dhIA*을 클로닝하고, 염기

서열을 분석하였으며, 또한 효소 활성을 다른 미생물과 비교 검토하였다.

재료 및 방법

1. 시료 채취 및 핵산 추출

국내 중부권에 위치한 대청호로부터 시료 채취와 동시에 수온 및 pH를 현장에서 측정하였으며, 그 외에 측정 항목에 따라 전처리를 실시한 후 4°C 상태로 실험실로 운반하여 분석하였다.

대청호 시료로부터 핵산을 추출하기 위하여 Rhochelle *et al.* (1992)의 방법을 변형하여 사용하였다. 대청호의 시료를 원심분리기 (14,000 × g, 15분, 4°C)를 사용하여 농축하였으며, 농축된 균이 들어있는 tube에 lysozyme buffer (0.15 M NaCl, 0.1 M EDTA, pH 8.0, lysozyme 15 mg mL⁻¹) 300 μL를 넣고, 37°C 항온 중탕기 속에서 1시간 방치하는 동안에 15분마다 혼합액을 섞어 주었다. SDS solution (0.1 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl, pH 8.0, SDS 4%) 300 μL를 첨가하여 65°C에서 15분 동안 반응시킨 후, -70°C에서 얼리고, 65°C에서 녹이는 과정을 3회 반복한 후에 동량의 phenol (Tris-buffered, pH 7.4)을 처리한 후, phenol: chloroform: isoamylalcohol (25 : 24 : 1)의 혼합액과 chloroform: isoamylalcohol (24 : 1)의 혼합액을 순서대로 각 1회씩 처리하였다. 상층액을 취하여 동량의 냉 isopropanol과 sodium acetate (최종 농도 0.3 M)를 첨가하고 -20°C에서 12시간 이상 방치하여 핵산을 침전시켰다. 원심분리 (14,000 × g, 30분, 4°C)한 후, 에탄올로 세척하고, 건조시켜 DNA pellet을 얻었다. 추출된 핵산은 UltraClean™ DNA Purification kit (Mo Bio, Solana Beach, USA)로 정제하였다. 정제된 핵산은 TE 완충용액 (100 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)으로 녹인 후 -20°C에서 보관하였다.

2. 16S rDNA T-RFLP 분석

16S rDNA의 증폭에 이용된 eubacterial primer는 27F (*E. coli* numbering 8-27 : 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')와 785R (*E. coli* numbering 785-804 : 5'-ACTACCRGGGTATCTAATCC-3')을 사용하였다. T-RF 분리를 위하여 27F는 biotinylated primer (27FB)를 사용하였다 (Lee *et al.*, 2000). PCR 반응물의 조성은 1 × 반응용액 (100 mM Tris-HCl, 400 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 500 μg mL⁻¹ BSA, pH 8.3), 160 μM dNTPs, 0.3 μM pri-

mer, 정제된 DNA (10~15 ng μL⁻¹)와 1.5 unit의 Taq DNA polymerase를 첨가하여 총 50 μL의 혼합물을 만들었다. PCR 반응조건은 95°C에서 3분간 열 처리한 후, 95°C에서 30초, 58°C에서 30초, 72°C에서 1분씩 30회 반복하고, 마지막에는 72°C에서 10분간 처리한 후 반응을 중단시켰다. PCR product는 0.8% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였으며, UltraClean™ kit (MO BIO)로 정제 후 -20°C에서 보관하였다.

PCR 산물에 제한 효소 *Hae*III (TaKaRa, Otsu, Shiga, Japan) 5 unit을 첨가하여 37°C에서 5시간 동안 반응시켰다. 제한 효소에 의해 절단된 DNA에 0.5 × SSC 완충용액 (75 mM NaCl, 7.5 mM sodium citrate, pH 7.3)으로 3회 세척한 후 streptavidin paramagnetic particle (Promega, Madison, Wisconsin, USA)과 1 × SSC를 첨가하여 실온에서 10분 동안 반응시켰다. Magnetic stand로 분리된 streptavidin paramagnetic particle은 0.1 × SSC 완충용액으로 4회 세척 후, 0.2 N NaOH를 첨가하여 5분간 반응시키고, 다시 0.2 N NaOH를 첨가하여 2분간 반응시킴으로써 biotin이 붙은 single-stranded DNA (ssDNA) T-RF만을 회수하였다. 25% NH₄OH를 넣고 65°C에서 10분간 반응시켜서 streptavidin으로부터 DNA를 분리시켰다. 원심분리 (14,000 × g, 4분, 4°C)하여 상층액만 취한 후, 20분 동안 진공 건조하여 암모니아를 제거하였다.

T-RF profile은 6% polyacrylamide gel (acrylamide: bisacrylamide = 19 : 1, 0.7 M urea, 1 × TBE)에서 전기영동하여 확인하였다. 시료 3 μL와 loading dye buffer (95% formamide, 10 mM NaOH, 20 mM EDTA, 0.02% bromophenol blue, 0.02% xylene cyanol FF) 1.5 μL를 섞어 3분 동안 95°C에서 변성시킨 후, 얼음에 식혔다. 1 × TBE 완충용액 (90 mM Tris-borate, 2 mM EDTA, pH 8.0)으로 완충된 6% denaturing acrylamide gel에서 1900 V, 50 W에서 3시간 전기영동 하였다. silver staining 방법은 제조 회사 지침서에 따라 염색하였다 (Bionner, Daejeon, Korea).

3. 메타지놈 라이브러리 구축

플라스미드 pBACe3.6와 *E. coli* DH10B를 벡터와 숙주균으로 사용하였다. 대청호 시료와 벡터로부터 추출된 DNA에 제한효소 *Eco*RI, *Bam*HI와 *Sac*II를 처리하였으며, 제한효소 처리된 DNA를 16°C에서 16시간 ligation 시켰다. CaCl₂로 처리한 숙주균 *E. coli* DH10B에 열 충격으로 형질전환 (Sambrook *et al.*, 1989)을 시켜 얻은 재조합 균주들을 TSA-Cm (Trtpicase Soy Agar plates)에

Table 2. One set of PCR primer for *dhIA* gene studied in this work.

Primer	Sequence (5'-3')	A.T. (°C)	Amplified sequence
562F	GATTGCCAGTACTCCCTGA	54	haloalkane dehalogenase gene
2171R	GCAAATACCGACATCAAGCA	54	(<i>dhIA</i> full-covering region)

A.T., annealing temperature; primer sequences are originated from *Xanthobacter autotrophicus* GJ10

12.5 µg mL⁻¹ chloramphenicol과 5% sucrose를 첨가)배지에서 단일 재조합 균주로 분리하여 배양시켰다. 얻어진 재조합 균주들을 보존하기 위하여 TSA-Cm 액체 배지에 37°C에서 18시간 배양 시킨 후 glycerol를 첨가하여 -80°C에 보존하였다.

4. *dhIA* 유전자의 검색

Table 2에서 보는 바와 같이, *Xanthobacter autotrophicus* GJ10의 *dhIA* 유전자 서열로부터 전체 서열을 증폭할 수 있도록 562F와 2171R primer 쌍을 제작하였다 (Song *et al.*, 2004).

PCR 반응물의 조성은 1× 반응용액 (100 mM Tris-HCl, 400 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 500 µg mL⁻¹ BSA, pH 8.3), 200 µM dNTP, 0.2 µM primer, 정제된 DNA (10~15 ng µL⁻¹)와 2.5 unit *Taq* DNA polymerase를 첨가하여 총 50 µL의 혼합물을 만들었다. PCR 반응조건은 95°C에서 2분간 초기 열 처리한 후, 95°C에서 30초, 54°C에서 30초, 72°C에서 1분씩 30회 반복하고, 마지막에는 72°C에서 10분간 처리한 후 반응을 중단시켰다. Colony hybridization의 수행하기 위하여, 재조합 균주들을 chloramphenicol 12.5 µg mL⁻¹이 포함된 LB 고체배지 (LB-Cm)에 37°C에서 하루 동안 배양하여 집락이 형성되면, 멸균한 nylon membrane (HybondTM-N+, Amersham Biosciences, UK)을 올려놓고 균 집락을 흡착시킨다. 균 집락이 흡착된 nylon membrane를 0.5 N NaOH 용액으로 충분히 적신 2겹의 Whatman 3MM paper 위에 놓고 5분간 용균한 후 paper towel 위에 올려놓아 수분을 제거, 이 과정을 2회 반복한다. 1 M Tris-HCl (pH 7.6)와 1 M Tris-HCl (pH 7.6)/1.5 M NaCl을 순서대로 같은 방법으로 각 1회씩 처리하였다 (Hanahan and Meselson, 1980). 혼성화 반응은 ECL (Enhanced chemiluminescence, Amersham Biosciences, UK) kit를 제조회사에 지침서에 따라 수행하였다.

5. 1,2-DCE의 dehalogenation 작용의 활성 분석

호기적 환경에서 메타지놈 라이브러리에서 분리한 재조합 균주와 *E. coli*는 37°C에서 16시간, *X. autotroph-*

cus GJ10는 30°C에서 18시간을 배양하고, 10 mM potassium phosphate buffer로 2회 세척한 후, 기질이 0.5 mM 농도로 포함된 50 mM potassium phosphate buffer에 접종하여 30°C에서 24시간 동안 배양한다. 배양액을 원심분리 하여 얻은 상등액 1 mL에 Hg(SCN)₂ (0.69 g L⁻¹, 0.5 mL)을 0.5 mL 섞어주고 상온에 방치한다. 15분 후 4.86 N HNO₃에 녹아있는 0.25 M ferric ammonium sulfate를 0.5 mL 넣고 섞어준 후 15분 동안 반응시킨다. 유리되는 염소이온의 양을 Bergman and Sanik (1957)에서와 같이 453 nm 파장에서 spectrophotometer (LKB4046, Pharmacia, England)로 scanning 한다. 실험결과 dehalogenation 활성은 Song *et al.* (2004)에서와 같이 미생물이 들어있지 않은 대조군과 비교하여 분석하였다.

6. 데이터 분석

염기서열 결정은 ThermoSequenase kit (Part number: US78500, Amersham Life Science, USA)와 LongReaIR 4200 sequencer를 사용하여 dideoxy-chain termination (Sanger *et al.*, 1977) 방법으로 하였다. GenBank database에서의 염기서열 검색을 NCBI (National Center for Biotechnology Information; www.ncbi.nlm.nih.gov) 서버를 통해 BLAST 프로그램으로 수행하였다. 염기서열의 정렬 및 다중서열 정렬은 Clustal W package (Thompson *et al.*, 1994)와 Clustal X (Thompson *et al.*, 1997) 프로그램을 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 대청호의 미생물 군집

대청호로부터 시료 채취와 동시에 수온 및 pH를 현장에서 측정하였으며, 그 외에 측정항목은 실험실로 운반하여 분석한 결과를 Table 3에 나타내었다.

대청호 시료에서 미생물 군집 구조의 양상을 알아보고자 T-RFLP 분석법을 적용하였다 (Marsh, 1999). T-RFLP 분석한 결과 Fig. 1에서 보는 것과 같이 대청호 시료 *Hae*III T-RF profile에서 150~350 bp 범위에서 T-

Table 3. Environmental conditions of Daecheong Reservoir studied in this work.

Parameter	Daecheong Reservoir
Location	Cheongju, Chungbuk
Surface area (km ²)	72.8
Depth (m)	72.0
Temperature (°C)	24.7
pH	7.43
Chlorophyll- <i>a</i> (mg L ⁻¹)	5.97
Total nitrogen (mg L ⁻¹)	2.342
Total phosphate (mg L ⁻¹)	1.230
BOD (mg L ⁻¹)	2.4

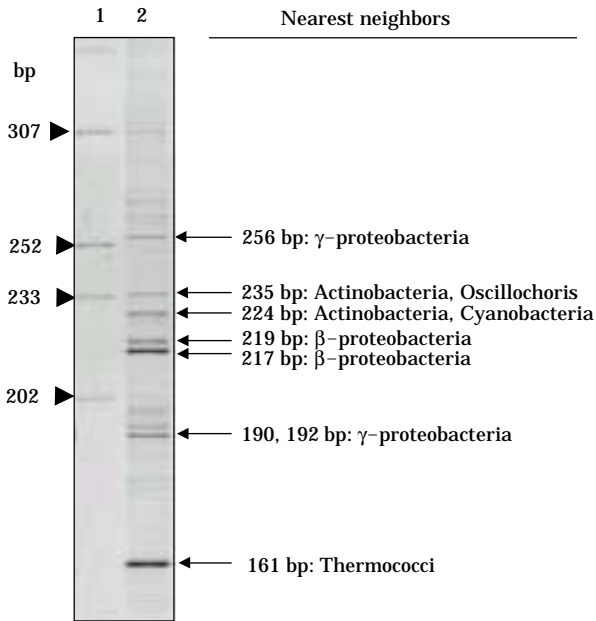


Fig. 1. *Hae* III T-RF profiles of 16S rDNA amplified from the lake samples. Lane: 1, Size marker; 2, Daecheong

RF band가 30여개 존재하는 것을 확인하였다. 그 중에서 161, 190, 192, 217, 219, 224, 235 bp 그리고 256 bp 크기의 T-RF band가 우점을 보였다. 특히, simulation 실험을 통해 얻은 database를 바탕으로 *Hae*III T-RF band 중에서 217 bp와 219 bp의 band는 β-proteobacteria에 해당하며, 190 bp와 192 bp, 그리고 256 bp band의 γ-proteobacteria에 해당하는, 224 bp band의 Cyanobacteria 해당되는 독특한 크기임을 확인하였다.

T-RFLP 방법으로 대청호의 미생물의 군집 구조를 분석해 본 결과 미생물 군집 구조가 다양하지 않음을 확인할 수 있었다. 이것은 시료 수집 기간이 수온이 상승하기

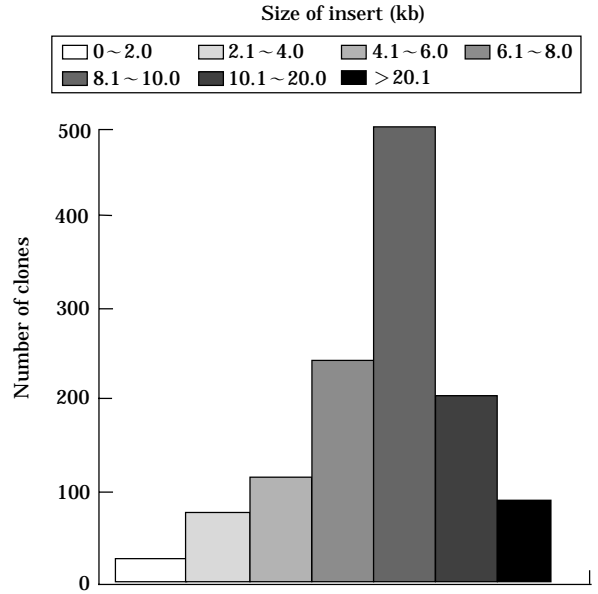


Fig. 2. Size distribution of the inserts included in the metagenomic DNA library.

시작하는 7월초이었기 때문에 녹조 현상과 관련된 일부 Cyanobacteria가 우점한 것으로 보여지며, 또한 γ-proteobacteria 우점하였는데, 이는 Wagner *et al.* (2002)에 의하여 γ-proteobacteria은 유기물이 풍부한 곳에 선택적으로 우점한다고 보고된 바 대청호 시료 안에 유기물이 풍부함을 간접적으로 보여주는 결과였다.

2. 메타지놈 라이브러리 구축

UltraClean™ kit (MoBio, USA)로 정제된 DNA를 *Eco*RI, *Bam*HI, 그리고 *Sac*I 등의 제한효소로 partial digestion하였고, pBACe3.6 vector도 같은 제한효소로 절단하였다. 절단된 호수 시료 DNA와 벡터 DNA를 ligation시켜 *E. coli* DH10B에 열 충격(heat-shock)으로 형질전환 시킨 결과 1,250개의 클론을 얻었다. 그 클론들을 가지고 insert의 size를 확인하기 위해서 제한효소 처리를 해본 결과 최소 2 kb에서 최대 30 kb까지 다양한 size의 insert가 들어간 것을 확인할 수 있었고, 이들의 평균 insert size는 약 13~15 kb이었다. Fig. 2에서와 같이 insert size를 분석해 본 결과 최대 14 Mb 정도의 메타지놈 라이브러리를 확보하였다.

3. *dhIA* 유전자의 검색 및 dehalogenation의 활성

1, 2-DCE를 dehalogenation에 관여하는 *dhIA* 유전자를 메타지놈 라이브러리 클론들 중에서 분리하기 위하

여, 대청호 시료로부터 구축된 메타지놈 라이브러리의 클론들을 TSA-Cm 고체배지에 picking하였고, 562F와

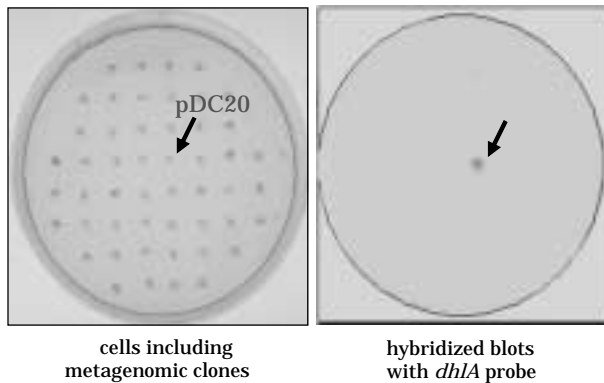


Fig. 3. Detection of *dhla* gene including in the metagenomic clones, pDC20.

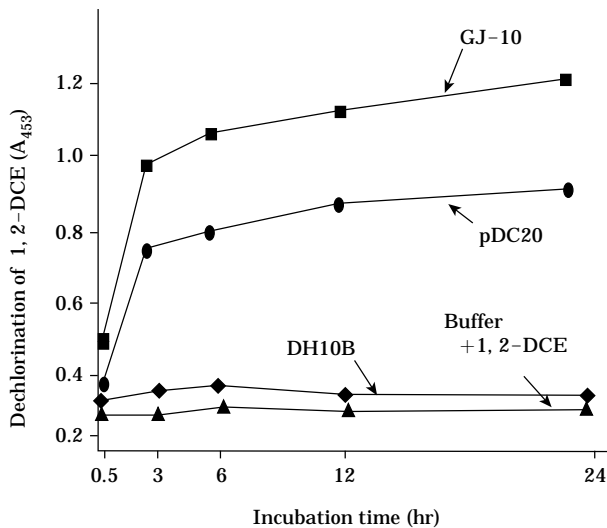


Fig. 4. Dehalogenation of 1, 2-DCE to produce 2-chloroethane by the transformant *E. coli* cells, including the metagenomic clones, pDC20.

2171R primers로 증폭한 1.6 kb의 PCR 산물을 probe로 하여 colony hybridization을 실시하였다 (Hanahan and Meselson, 1980). Colony hybridization을 수행한 결과 Fig. 3에서와 같이 구축된 메타지놈 라이브러리 pDC20에서 positive 결과를 얻었다. 분리된 pDC20을 가지고 1, 2-dichloroethane dehalogenation의 활성을 분석한 결과 Fig. 4를 보면, *dhla* 유전자를 가진 pDC20은 wild type인 *Xanthobacter autotrophicus* GJ10보다는 약간 낮지만, negative control인 *E. coli* DH10B와 비교하였을 때에는, 1, 2-DCE에 매우 높은 dehalogenation 활성을 나타냈었다.

4. *dhla* 유전자 염기서열

대청호 시료로부터 구축된 메타지놈 라이브러리에서 분리한 pDC20에서 *dhla* 유전자를 염기서열 분석을 위하여, 562F와 2171R primers를 수행하여 1.6 kb의 PCR product를 얻었다. 1.6 kb의 PCR product를 pGEM-T vector (Promega, USA)에 삽입하여 재조합 균주 pDH1를 만들고 삽입된 PCR 산물의 염기서열을 결정하였다.

Sequencing 결과, 562F와 2171R을 사용하여 증폭한 1.6 kb PCR product 내에는 *dhla* 유전자는 933 bp의 염기와 310개의 아미노산으로 구성이 되어 있었고, GC composition은 54.5%, terminal codon은 TAG, ribosome 결합 부위는 GAGG (-5 ~ -8)였다.

재조합 균주 pDH1의 haloalkane dehalogenase 효소는 Table 4에서 보는 보와 같이, *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 (Janssen et al., 1989)와 *Xanthobacter flavus* UE15 (Song et al., 2004)의 haloalkane dehalogenase (*dhla*)와 99%의 높은 유사성을 보였으나, *Mycobacterium* sp. GP1 (Poelarends et al., 1999)와 *Pseudomonas pavonaceae* (Poelarends et al., 2000), 그리고 *Rhodococcus rhodochrous* (Kulakova et al., 1997)의 haloalkane dehalogenase (*dhaA*)와 27%에서 29% 정도로 낮은 유사성을 보였다. 이는 haloalkane dehalogenase (*dhla*) 효소와

Table 4. Characteristics of *dhla* gene from metagenomic clones and their identity with haloalkane dehalogenase genes.

Gene	No. of nucleotide (bp)	No. of amino acid	Terminal codon	G+C (%)	Source organism	Identity (%) of sequence	
						Nucleotide	Amino acid
<i>dhla</i>	933	310	TAG	54.5	Metagenomic clone (pDC20)	100	100
<i>dhla</i>	933	310	TAG	54.5	<i>Xanthobacter autotrophicus</i> GJ10	99.9	99.9
<i>dhla</i>	933	310	TAG	54.5	<i>Xanthobacter flavus</i> UE15	99.9	99.9
<i>dhla</i>	924	307	TAG	59.6	<i>Mycobacterium</i> sp. GP1	49.4	28.6
<i>dhla</i>	882	293	TAG	59.4	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	48.2	27.0
<i>dhla</i>	882	293	TGA	59.4	<i>Pseudomonas pavonaceae</i>	48.6	27.0

haloalkan dehalogenase (*dhaA*) 효소는 아미노산 서열상에 유사성이 낮지만, haloalkane의 분해에 관여하는 haloalkane dehalogenase 중 hydrolytic haloalkane dehalogenase으로써 전체적인 구조는 매우 유사하고 효소활성 부위에 보존적인 아미노산이 존재한다고 보고 되었다 (Newman *et al.*, 1999).

적 요

전통적인 스크린 방법으로는 자연계에 존재하는 99% 이상의 미생물 자원을 확보하지 못했다. 자연생태계의 핵산을 직접 클로닝하는 전략은 배양 가능한 미생물의 유전적인 정보보다 더 광범위한 유전적인 정보를 전체의 미생물 메타지놈에서 확보하기 위한 계획을 세웠다. 그 결과 유용한 유전자를 탐색하는 한 방법으로 다양한 환경에서 메타지놈 DNA 라이브러리를 구축하는 방법이였다. 본 연구는 국내 중부권에 위치한 대청호로부터 시료를 수집하였고, T-RFLP 방법을 사용하여 미생물 군집의 다양성을 분석하였다. 핵산의 추출은 SDS를 사용한 freeing-thawing 방법을 사용하였으며, 추출한 핵산은 UltraClean™ kit (MoBio, USA)을 사용하여 정제하였다. 메타지놈 라이브러리는 제작은 정제한 DNA와 pBACe3.6 vector를 *EcoRI*, *BamHI*, 그리고 *SacI* 등의 제한효소로 partial digestion하였고, 이들을 ligation한 다음 *Escherichia coli* DH10B에 형질전환 시켜 제작하였다. 메타지놈 라이브러리는 14 Mb 정도 확보하였는데, 평균 insert size는 약 13~15 kb이었다. Colony hybridization으로 메타지놈 라이브러리로부터 1, 2-dichloroethane (1, 2-DCE) hydrolytic dehalogenation의 분해에 관련된 유전자를 확인하였다. 1, 2-DCE dehalogenase 효소는 기질에 대한 높은 활성을 나타내었다. 1, 2-dichloroethane dehalogenase 유전자의 클론을 만들었고, 염기서열을 분석하였다. 이들 결과로 보아 대청호로부터 제작한 메타지놈에서 *dhlA* 유전자를 확인한 균주는 1, 2-DCE 분해에 탁월한 능력을 나타내었다.

사 사

본 연구는 21세기 프론티어연구개발사업인 미생물유전체 활용 기술개발사업단의 연구비 지원 (과제번호: M102KK010002-04K1101-00231)에 의하여 이루어졌음. 또 과학기술부의 국제공동연구사업인 한-이태리 방

문연구(과제번호: M60407000003-04A0100-04510)에 따라 본 논문 내용을 적극적으로 토의해 준 이태리 University of Firenze의 Bazzicalupo 교수님께 감사드린다.

인 용 문 헌

- Amann, R.I., W. Ludwig and K.-H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**: 143-169.
- Bergman, J.G. and J. Sanik. 1957. Determination of trace amounts of chloride in naphtha. *Anal. Chem.* **29**: 241-243.
- Bintrim S.B., T.J. Donohue, J. Handelsman, G.P. Roberts and R.M. Goodman. 1997. Molecular phylogeny of Archaea from soil. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **94**: 277-282.
- Ferguson, R.L., E.N. Buckley and A.V. Palumbo. 1984. Response of marine bacterioplankton to differential filtration and confinement. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 49-55.
- Fetzner, S. and F. Lingens. 1994. Bacterial dehalogenase: biochemistry, genetics, and biotechnological applications. *Microbiol. Rev.* **58**: 641-685.
- Hanahan, D. and M. Meselson. 1980. Plasmid screening at high colony density. *Gene* **10**: 63-67.
- Janssen, D.B., A. Scheper, L. Dijkhuizen and B. Witholt. 1985. Degradation of halogenated aliphatic compounds by *Xanthobacter autotrophicus* GJ10. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 673-677.
- Janssen, D.B., F. Pries, J. Van Der Ploeg, B. Kazemier, P. Terpstra and B. Witholt. 1989. Cloning of 1, 2-dichloroethane degradation genes of *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 and expression and sequencing of the *dhlA* gene. *J. Bacteriol.* **171**: 6791-6799.
- Janssen, D.B., J.E. Oppentocht and G.J. Poelarends. 2001. Microbial dehalogenation. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**: 254-258.
- Jones, J.G. 1977. The effect of environmental factors on estimated viable and total populations of planktonic bacteria in lakes and experimental enclosures. *Freshwater Biol.* **7**: 67-91.
- Kim, U.J., H. Shizuya, P.J. de Jong, B. Birren and M.I. Simon. 1992. Stable propagation of cosmid sized human DNA inserts in an F factor based vector. *Nucleic Acids Res.* **20**: 1083-1085.
- Kogure, K., U. Simidu and N. Taga. 1979. A tentative

- direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Can. J. Microbiol.* **25**: 415–420.
- Kogure, K., U. Simidu and N. Taga. 1980. Distribution of viable marine bacteria in neritic seawater around Japan. *Can. J. Microbiol.* **26**: 318–323.
- Kulakova, A.N., M.J. Larkin and L.A. Kulakov. 1997. The plasmid-located haloalkane dehalogenase gene from *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13064. *Microbiology* **143**: 109–115.
- Lee, D.H., S.A. Noh and C.K. Kim. 2000. Development of molecular biological methods to analyze bacterial species diversity in freshwater and soil ecosystems. *J. Microbiol.* **38**: 11–17.
- Lee, M.S. 2002. Molecular biological analysis of bacterial community and metagenome library construction from suncheon bay. M. S. thesis, Chungbuk National University.
- Marsh, T.L. 1999. Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP); an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**: 323–327.
- Moon, M.S., D.H. Lee and C.K. Kim. 2004. Identification of the *bphC* gene for *meta-cleavage* of aromatic pollutants from a metagenomic library derived from lake waters. *Biotechnol. Bioprocess. Eng.* **9**: 393–399.
- Newman, J., T.S. Peat, R. Richard, L. Kan, P.E. Swanson, J.A. Affholter, I.H. Holmes, J.F. Schindler, C.J. Unkefer and T.C. Terwilliger. 1999. Haloalkane dehalogenases: structure of a *Rhodococcus* enzyme. *Biochem.* **38**: 16105–16114.
- Pernthaler, J., F.O. Glockner, S. Unterholzner, A. Alfreider, R. Psenner and R. Amann. 1998. Seasonal community and population dynamics of pelagic bacteria and archaea in a high mountain lake. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 4299–4306.
- Poelarends, G.J., J.E. van Hylckama Vlieg, M.J. Larkin and L.M. Freitas Dos Santos and D.B. Janssen. 1999. Degradation of 1, 2-dibromoethane by *Mycobacterium* sp. Strain GP1. *J. Bacteriol.* **181**: 2050–8.
- Poelarends, G.J., L.A. Kulakov, M.J. Larkin, J.E. van Hylckama Vlieg, and D.B. Janssen. 2000. Roles of horizontal gene transfer and gene integration in evolution of 1,3-dichloropropene- and 1, 2-dibromoethane-degradative pathways. *J. Bacteriol.* **182**: 2191–2199.
- Rhocelle, P.A., J.C. Fry, R.J. Parkes and A.J. Weightman. 1992. DNA extraction for 16S rRNA gene analysis to determine genetic diversity in deep sediment communities. *FEMS. Microbiol. Lett.* **79**: 59–65.
- Rondon, M.R., P.R. August, A.D. Bettermann, S.F. Brady, T.H. Grossman, M.R. Liles, K.A. Loiacono, B.A. Lynch, I.A. MacNeil, C. Minor, C.L. Tiong, M. Gilman, M.S. Osburne, J. Clardy, J. Handelsman and R.M. Goodman. 2000. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 2541–2547.
- Sambrook, J., E. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Sanger, F., S. Nicklen and A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463–5467.
- Song, J.S., D.H. Lee, K. Lee and C.K. Kim. 2004. Genetic organization of the *dhlA* gene encoding 1, 2-dichloroethane dechlorinase from *Xanthobacter flavus* UE15. *J. Microbiol.* **42**: 188–193.
- Staley, J.T. and A. Konopka. 1985. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu. Rev. Microbiol.* **39**: 321–346.
- Thompson, J.D., D.G. Higgins and T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* **22**: 4673–4680.
- Thompson, J.D., T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin and D.G. Higgins. 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Acids Res.* **24**: 4876–4882.
- Tosvik, V., J. Goksoyr and F.L. Daae. 1990. High diversity of DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 782–787.
- Wagner, M., R. Amann, H. Lemmer and K.H. Schleifer. 1993. Probing activated sludge with proteobacteria-specific oligonucleotides: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1520–1525.
- Wagner, M., R. Erhart, W. Manz, R. Amann, H. Lemmer, D. Wedi and K.H. Schleifer. 1994. Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus *Acinetobacter* and its application for in situ monitoring in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 792–800.
- Wagner, M. and A. Loy. 2002. Bacterial community composition and function in sewage treatment systems.

Curr. Opin. Biotechnol. **13**: 218-227.

337.

Weisse, T. 1992. The microbial food web and its sensitivity to eutrophication and contaminant enrichment; a cross-system overview. *Int. Rev. ges. Hydrobiol.* **76**: 327-

(Manuscript received 3 January 2005,
Revision accepted 18 May 2005)