

*Lactobacillus farciminis*로부터 미지의 작은 플라스미드의 분리와 염기서열 분석

Isolation and sequence analysis of a small cryptic plasmid from *Lactobacillus farciminis* KCTC3681

이 은 모* 최 신 건**
Lee, Eun-Mo Choi, Shin-Geon

Abstract

From the extensive screening for small cryptic plasmid among about 23 lactic acid bacteria (LAB), 2.4 kb of cryptic plasmid was isolated from *Lactobacillus farciminis* strain KCTC 3681 and named as pLF24. The plasmid pLF24 was a circular molecule of 2,396 base-pairs in length with a G+C content of 38%. Two protein-coding sequences could be predicted. ORF1 and ORF2 showed homologies to plasmids of gram-positive bacteria. The replication protein coded by ORF2 and the plus origin, were similar to replication regions of other gram-positive bacteria as shown in plasmids such as pLH2, pLS141-1 and pLC2. The nucleotide sequence of pLF24 was deposited into Genbank data base with an accession number of EU429343. The newly isolated plasmid can be used for construction of shuttle vector in *Lactobacillus* bacteria.

키워드 : 미지의 플라스미드, pLF24, *Lactobacillus farciminis*, 해독 틀
Keywords : cryptic plasmid, pLF24, *Lactobacillus farciminis*, ORF

1. 서론

유산균은 여러 음식의 가공 시에 관여되는데 특히, 김치 발효에 관여하는 미생물로 가장 잘 알려져 있다. 그리고 많은 종류의 유산균은 하나에서 그 이상의 다양한 크기의 플라스미드를 내부에 지니고 있다. 이러한 플라스미드의 origin을 이용하면 대장균과 유산균의 상호 복제가 가능한 셔틀 벡터의 개발이 가능하다. 따라서 이를 위해서는 우선 플라스미드를 갖고 있는 유산균의 발견과 해당 플라스미드의 분리 및 염기서열 분석이 필수적이다.

이번 논문에서, 우리는 총 23종의 유산균을 분양받아서 각 균주에 존재하는 플라스미드의

Profile을 조사하였으며 소시지 가공 시에 발견되는 *Lactobacillus farciminis* 균주로부터 pLF24라고 명명한 플라스미드를 분리한 후에 염기서열 분석을 통하여 플라스미드의 유전적인 상관관계와 특성을 연구하였다.

2. 연구 방법

2.1 균주 및 보존

본 실험에 사용한 균주는 전체 23종의 유산균으로 목록은 다음과 같다. (Table.1) 이 중 본 실험에 중점적으로 사용한 균주는 Korean Culture Type Collection(KCTC)으로부터 분양받은 *Lactobacillus farciminis* KCTC 3681이다. 모든 유산균은 MRS 한천 배지에서 37°C 조건으로 2~3일 동안 배양 후 4°C에서 보관하였다.

* 강원대학교 대학원 생물공학과 석사과정

** 강원대학교 공과대학 생물공학과 교수, Ph.D.,
교신저자

Table. 1. The list of lactic acid bacteria

No.	균주명	plasmid 유무
1	<i>L. acidophilus</i> KCCM 40265	+
2	<i>L. acidophilus</i> KCTC 3164	-
3	<i>L. amylovorus</i> KCCM 40431	-
4	<i>L. brevis</i> KACC 10553	+
5	<i>L. brevis</i> KCCM 40399	+
6	<i>L. brevis</i> KCTC	-
7	<i>L. buchneri</i> KCCM 40982	-
8	<i>L. casei</i> KACC 12413	-
9	<i>L. casei</i> KCCM 12452	+
10	<i>L. farciminis</i> KCTC 3681	+
11	<i>L. fructivorans</i> KCTC 3543	+
12	<i>L. helveticus</i> KCCM 41823	-
13	<i>L. hilgardii</i> KCTC 3500	+
14	<i>L. lindneri</i> KCTC 5088	+
15	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> KCTC 3510	+
16	<i>L. plantarum</i> KACC 10552	+
17	<i>L. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> KACC 11451	+
18	<i>L. plantarum</i> KCCM 12116	-
19	<i>L. reuteri</i> KCTC 3679	+
20	<i>L. rhamnosus</i> KCTC 3237	+
21	<i>L. sakei</i> KACC 12421	-
22	<i>L. salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i> KACC 10006	-
23	<i>L. suebicus</i> KCTC 3549	-

2.2 배지

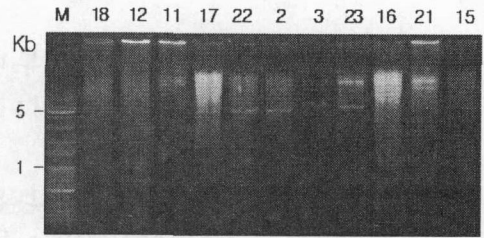
*L. farciminis*의 배양 시 MRS 배지 (MERCK)를 이용하였고, 대장균 배양 시에는 LB 배지 (NaCl 5g/L, Yeast extract 5g/L, Tryptone 10g/L)를 이용하였다. 배지는 121°C에서 15분간 가압 멸균 후 사용하였다.

2.3 유산균 plasmid의 miniprep

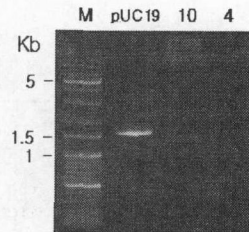
총 23종의 유산균을 각각 10ml의 MRS 배지를 넣은 tube에 접종한 후 정지배양 하였다. 배양 완료 후 alkali lysis를 이용한 miniprep을 실시하였다. 실험에 앞서 먼저 유산균의 단단한 세포벽을 허물기 위해 resuspension buffer에 lysozyme (10mg/ml)을 첨가하여 37°C 하에서 1시간 동안 배양하는 과정을 추가하였다.

2.4 *L. farciminis* KCTC3681로부터 미지의 플라스미드의 분리

(A)



(B)



(C)

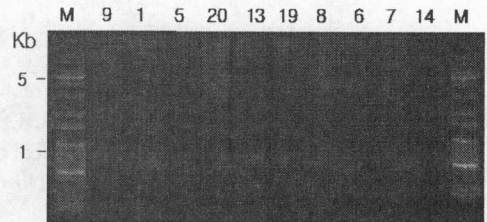


Fig.1. Plasmid profiles of Lactic acid bacteria (LAB). The number correspond to the number appeared in Table 1. Panel (A): large size plasmid group(≥ 5 kbp) Panel (B): small size plasmid group (< 5 kbp) Panel (C): no plasmid group

본 균주가 갖는 플라스미드가 low copy로 존재하기 때문에 대량을 얻기 위해 midiprep을 실시하였다. 방법은 MRS 액체 배지 100mL에 3일간 배양 후 이전과 마찬가지로 alkali lysis를 이용하였다. lysozyme 첨가 과정도 앞과 동일하게 실시하였다. 원하는 미지의 플라스미드만을 얻기 위해 agarose gel 전기영동을 이용한 gel extraction 정제를 하였다.

2.5 Single digestion되는 제한효소 확인

미지의 플라스미드의 identification을 위해 single digestion이 되는 제한효소를 확인하였다. 제한효소 확인은 vector로 사용할 pUC19의 Multiple Cloning Site (MCS)에 존재하는 것들 중 무작위로 선택하여 실시하였다.

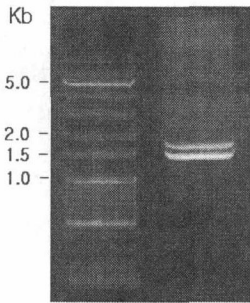


Fig. 2. The plasmid profile of *Lactobacillus farciminis* (KCTC3681)

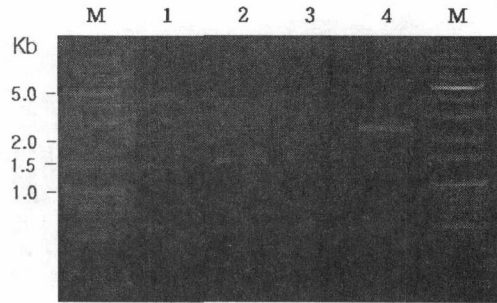


Fig. 3. Restriction digestion analysis of pLF24. pLF24 was digested with *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III and separated on a 0.8% agarose gel. Lane M: size marker, lane 1: pLF24 control, lane 2: *Bam*HI, lane 3: *Eco*RI, lane 4: *Hind*III

2.6 Cloning 및 염기서열 분석

미지의 플라스미드와 pUC19 벡터를 각각 single digestion이 되는 것으로 확인된 제한효소인 *Hind*III를 이용하여 37°C에서 3시간 동안 digestion을 하였다. pUC19 벡터는 별도로 Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)를 처리하여 self ligation되는 것을 방지하였다. 이후 ligation (16°C, overnight)을 한 후, calcium chloride 방법을 이용하여 대장균 competent cell인 XL10-gold로 transformation을 하였다. 이때 pUC19이 ampicillin 저항성을 갖고 있기 때문에 배지는 LB +ampicillin (50mg/L) agar plate를 이용하였고, MCS에 lacZa gene을 갖고 있기 때문에 plate는 균주를 도말하기 30분전 미리 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-gal)와 Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG)를 도말하였다. 이는 pLF24 유전자가 들어가지 않은 colony는 파란색을 띄는 데에 반해 pLF24 유전자가 들어간 colony는 그렇지 않은 차이를 이용한 transformant의 선택 방법이다.

염기서열 분석은 유전자분석 대행업체((주)바이오니아)에 의뢰하여 수행하였다. Primer는 본 회사에서 제공하는 universal primer를 사용하였다. forward primer는 M13F(-20) : 5'-GTAAAA CGACGCCAG-3'를, reverse primer는 M13R : 5'-GAAACAGCTATGACCATG-3'를 사용하였다. 이후에 이미 분석된 염기서열 내에서 재차 primer를 제작, 추가적인 염기서열 분석을 의뢰하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 유산균 내 플라스미드의 유무 확인

List에 있는 모든 유산균을 miniprep하였다. (Fig. 1) 그 결과, 전체 23종의 균주 중에 plasmid가 있는 것은 13종이었고 이 중 비교적 작은 크기의 plasmid가 있는 것은 두 종에 불과했다. 이 중 가장 작은 크기의 플라스미드를 갖고 있는 No. 10인 *Lactobacillus farciminis* (KCTC3681)를 선정하여 플라스미드의 분리 및 분석을 실시하였다.

3.2 pLF24의 분리 및 확인

미지의 플라스미드의 분리 시 대량을 얻기 위해 midiprep을 실시하였다. 그 결과, 그림에서 보는 바와 같이 1.4kb와 1.7kb의 부근에 두 개의 DNA band가 보였다. (Fig. 2) DNA가 초나선구조의 형태로 분리되었기 때문에 정확한 크기를 확인할 수는 없었다. 두 DNA가 같은 것인지 확인하기 위해 각각을 전기영동 후 agarose gel extraction kit (iNtRON)를 이용해 분리 정제한 후 제한효소인 *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III로 digestion 하였다. (Fig. 3) 그 결과 두 DNA는 서로 다른 것으로 판명되었다. 따라서 상대적으로 큰 크기의 플라스미드를 pLF25, 작은 크기의 플라스미드를 pLF24로 명명하였다. 본 논문에서는 작은 크기인 pLF24에 대한 분리 및 염기서열 분석만을 시도하였다.

3.3 Transformant 확인

Transformation을 하고 나서 약 12시간이 지나자 4개의 white colony가 자란 것이 보였다. 4개의 colony 모두를 miniprep하여 확인한 결과, 하나의 colony에서 transformant가 발견되었다. 정확한 확인을 위하여 cloning을 시도할 때 쓰였던 제한효소 *Hind*III를 이용하여 잘라보았다. 그 결과, pUC19 벡터 (2,686bp)와 pLF24 (2,396bp)의 DNA조각이 정확한 크기를 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

3.4 염기서열 분석

위의 결과를 토대로 정확한 염기서열 분석을 위해 sequencing을 의뢰하였다. 그 결과 pLF24의 전체 길이는 2,396bp이고 G+C 함량은 38%인 것으로 확인되었다. (Fig. 4)

AAATCAGGGGGGGGAGGGGAGOGAATTTTGGCACCGTACTA
 CGACCCOCCCTTTAAGTGGCCGAGTGCACAAATCGAAITTT 80
 TCAGGGGCTTAAGCTTACTCTCCCAAGGGATTAGTCACT
 TTGTGTTTGGCGACATTTGAGCGACATTTTGGCGGAAAA
 TGGCATAAATTTGAATGCTTTACTACATCTATGAAATGCT
 TTACTATATCTATGTAATGCTTTATAATGATGCATGAAG 160
 → start ORF1
 CTATTTAAGTTAGGAGTGATTAAGTTATGACTGCTGAAAA
 M T A E K
 AAAAGAAATGCAAAGTGTCACTATCCGTAATTCCTAAAGAT
 K E M Q S V T I R I P K D 320
 TTGATGGCCGAATATAAAAAGCATTATTGGCTCAGGGAA
 L Y A E Y K K A L L A Q G
 AAATTTGTTACTTATGACGTGCGAAAATACATGGCTGAAGT
 K I V T Y D V R N Y M A E V
 end ORF1 →
 TGTCAAAAATCAAGCGAAAAGGGCAGAAATGATGCATAAAA 400
 V K N Q A K G Q K
 AAGAGCGCACCCCGCTGAAAAGTTCGCTCGTTAATTGCTCG
 → start ORF2
 TTCTGATAAGGTAATTTAACATTTATGGCTAAAGATAAGG
 M A K D K
 CAAGTACTTCACTTTTTGCTATATCCAGAAAAGTATCC
 A R Y F T F L L Y P E S I P 560
 AACGGATTGGAAAACGCGGTTAGAAITTAATTTGGTGTTCOG
 T D W K R R L E L I G V P
 ATTGCTATTAGTCCGTTGCATGATAAAGATAAAAGCAATG
 I A I S P L H D K D K S N
 TTGAGGGACAAATATATAAAAAGCCCATATCATGTGGT
 V E G O I Y K K A H Y H V V
 TTATGTGACGAAAAATCCGTTTACATCGGCAGTGTTAGA
 Y V T K N P V T S D S V R 720
 AAGAGAAATCCAAAGAGTTTTAGGTGTTAAAAGTGTACTA
 K R I Q R V L G V K S V T
 AGGTTCAAATAGTTGTTTCAGAGTATGAAAAATATTTAT
 K V O I V V Q S M E N I Y L
 GTATCTGACACATGAATCAAAAGACGCTATTGAAAAGCAT
 Y L T H E S K D A I E K H
 AAGCATAAATATTCAAAGCTGACATTCAGTTGCTGCTGAAT 880
 K E K Y S K A D I T L L N
 ATTTCGATTTGATCGATATGTCACGGTGTGATGTTGAAGA
 N F D I D R Y V T L D V E D
 TAAAGACGATATGTTGAATGVTGCGGATTAATTGAC
 K D M L N D V C L I D
 GATCATAATTAGCAAATATGCGTGAATTAAGGCGCTTTG
 D H N L A N M R E L R R F
 TTAATACATGGGGTTGAATATGGCTTGCCTAGTATGAA 1040
 V K L H G V E Y G L P S M K
 AATTATAAATTCAGTGTGAGAGCTCATACTGGACTGATA
 I I N S V L R A H T G L I
 AGATTATATTTTCGATGCGGTTTATTCAGGAAACGCAAGTATG
 R L Y F D A V Y Q E R K Y
 GCAGAGGTGATATAAACAAAGAGACTGGTGAATACAAGA
 G R G D I N K E T G E I Q D
 → end ORF2
 TTTAATTAATGAATGAAAAATGGGTGCTCGATTTGAGCAC 1200
 CATTITTTGTTGTCGGCTAGCCGACTTCTGATACAGGGAAT
 TTAGCACAAACACCGCAATTTAATTTGGGTGTGAAGT
 GCGCAITGACCTCGTTTTACTCGGTCTGCTGATTCICTTA
 ACTTTAATTCAGTATTTCTTTCTCTCGGGTTC AATAGA
 CTGCATAGTTCCTTAACCTCAGGCCCTTTCACAATCATAGA
 AAGTATAGCTAATGGCTTCTTTTGAGGAATTAATATTCAT
 CACAGACTCGTCAGCTTCATCCAGTTCATCTAGTAACCTTA
 TGCATCAGAACATTAATATCCTTATTTGCTAAAATGATACC
 CATACGTTTCCAGTCAAGGCTCAATGCAATTTGTTTGA
 CGAAAAATATCTAGTATGGTCATCTATAAAGTCAAGTCCCA
 CTATTGACAAAAGCAAATATGTCACGGGAAATCACCGCTA
 ATCCGCTATCGGCAGAAATGAACATCATCTTTCAAGATTGA
 AATTGCATCTAGAATATCTGACTCGGAAATGGCAACCTTA
 CGTGATCGCCGATTAAAGTAAATGTCATTTGGCGGAACAA
 TCAAACACTAGCTACTAACTAGCTACTAAGGAATTA
 TACACTTAAACATAAAATCTACTCCTTCAAATTTTTCAAC
 TTTAAGCCCTACGTTAATAATAAAGCAATTTGCTACTGAA
 TCTATTACGACTCTATTTAAAGACTAAATATGCTTCTCTA
 AGCCCCTTAAGTTTACAGATATACTCTTCAAACATTTT
 TATTGGAATCACTAGATAGAAAATAAGAGCCATATGTGGT
 CTCTTCTTCCGCAACGTCAGTTGGAATCTTCAAAGCCAA
 TAAAGTCCAGTCCGCAACTCCTCAGACTTTATTGGCTTT
 GAAGATTGCTTTAAATGCTCTAATTTGCTCTATAAGCC
 ATTTTGGCTGCTACCCGTTAATTTACTGTCCTGCAACGG
 TAAATCGAAGTGAACCGCTTTAGCCGTTCTAGGAGGCT
 TTAAGGAGTTGACAGACTCACTAGGCCAAGACACTTTTGC
 TGCATGCAAAAAAGCACACCTGCTTTTTTTCCTGCTCA
 CGGCGAGTGCAGGTTGAGTTTGGCGGAGCTCCGCTCA
 TTTATGGGGTCAAGCTGACACAGCTTGCAGGTTTGGGCG
 CGCCATGTTTATTCTGTCGGGATAGAAATTTGG 2396

Fig. 4. DNA sequence analysis of pLF24 and the deduced products of the ORF. Replication origin was indicated as underlined. The start and end codons of the ORF are indicated as a box. The nucleotide sequence of pLF24 was deposited into Genbank data base with an accession number of EU429343.

그람양성 세균 내부의 플라스미드 간에 origin의 유사성이 보고된 바 있는데(7) 이를 토대로 분석해 본 결과, pLF24의 염기서열도 마찬가지로 유사성을 보인다는 것이 밝혀졌다.

이외에도 ORF를 확인하고 분석해 본 결과 (<http://www.ncbi.nlm.gov>), 몇몇 그람양성 세균의 플라스미드와 유사성을 갖는 ORF가 존재한다는 사실을 알게 되었다. 먼저 ORF1은 *Paenibacillus larvae*의 전사 억제자 역할을 하는 Cop 단백질과 약 74% 유사하고, ORF2는 *Lactobacillus sakei*, *L. plantarum*, *L. curvatus* 등의 replication protein과 약 80% 이상 유사한 것으로 확인되었다. 새롭게 분리된 2.4 kb의 pLF24 플라스미드 유전자는 GenBank EU429343으로 등록되었으며 Physical map은 Fig. 5에 나타내었다.

본 실험에서 새롭게 분리된 pLF24의 replication origin은 향후 LAB-*E. coli* shuttle vector를 제조 하는데 이용될 수 있다.

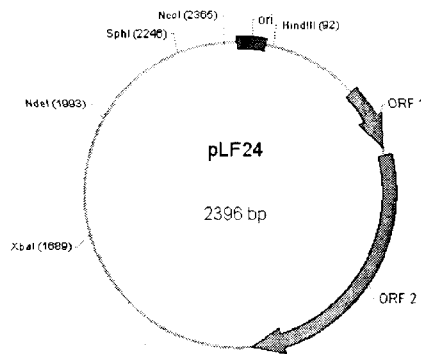


Fig. 5. Map of the *Lactobacillus farciminis* cryptic plasmid pLF24. The 2,396 bp plasmid pLF24 showing the two predicted ORFs and origin of replication.

참 고 문 헌

[1] Posno M, Leer RJ, van Luijk N, van Giezen MJ, Heuvelmans PT, Lokman BC, Pouwels PH, "Incompatibility of *Lactobacillus*

- vectors with replicons derived from small cryptic *Lactobacillus* plasmids and segregational instability of the introduced vectors", *Appl. Environ. Microbiol.*, Jun;57(6):1822-1828, 1991.
- [2] Lee JH, O'Sullivan DJ, "Sequence analysis of two cryptic plasmids from *Bifidobacterium longum* DJO10A and construction of a shuttle cloning vector", *Appl. Environ. Microbiol.*, Jan;72(1):527-35, 2006.
- [3] Bae HS, Baek YJ, Kim YK, Yoo M, Paek MY, "유산균 Plasmid DNA의 신속 간편한 분리방법", *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, 13(3):289-296, 1985.
- [4] Pavlova SI, Kiliç AO, Topisirovic L, Miladinov N, Hatzos C, Tao L, "Characterization of a cryptic plasmid from *Lactobacillus fermentum* KC5b and its use for constructing a stable *Lactobacillus* cloning vector", *Plasmid*, May;47(3):182-92, 2002.
- [5] Park WJ, Lee KH, Lee JM, Lee HJ, Kim JH, Lee JH, Chang HC, Chung DK, "Characterization of pC7 from *Lactobacillus paraplantarum* C7 derived from Kimchi and development of lactic acid bacteria-*Escherichia coli* shuttle vector", *Plasmid*, Sep;52(2):84-8, 2004.
- [6] O'sullivan DJ, Klaenhammer TR, "Rapid Mini-Prep Isolation of High-Quality Plasmid DNA from *Lactococcus* and *Lactobacillus* spp", *Appl. Environ. Microbiol.*, Aug;59(8):2730-2733, 1993.
- [7] Klein JR, Ulrich C, Plapp R, "Characterization and sequence analysis of a small cryptic plasmid from *Lactobacillus curvatus* LTH683 and its use for construction of new *Lactobacillus* cloning vectors", *Plasmid*, 13:3(1):142-9, 1992.
- [8] Tarakanov BV, Iakovleva AA, Nikolicheva TA, Komkova NM, Manukhina AI, Aleshin VV, "Expression vector pLF22 for the lactic acid bacteria", *Mikrobiologiya*, Mar-Apr;73(2):211-7, 2004.