

Pseudomonas sp. DJ-12 *pcbAB* 유전자의 *Escherichia coli*에서의 클로닝 및 발현

한재진 · 성태경 · 김치경*

충북대학교 자연대 미생물학과 서울대학교 분자미생물학 연구센터

4-Chlorobiphenyl(4CB)과 biphenyl을 분해하는 *Pseudomonas* sp. DJ-12의 *pcbAB*는 분해 초기 단계에 작용하는 4-chlorobiphenyl dioxygenase와 dihydrodiol dehydrogenase 효소를 생산하는 유전자들이다. 이 유전자를 *E. coli* XL1-Blue에 클로닝하여 CU101 형질전환체를 얻었다. CU101의 pCU101 재조합 plasmid에 클로닝된 *pcbAB* 유전자는 크기가 약 2.2 kb이고 3개의 *Hind*III 제한효소 위치가 있었으며, 독자적인 promoter를 가지고 있었다. CU101에 대하여 biphenyl을 기질로 하여 생성된 대사산물을 resting cell assay를 한 결과 2,3-dihydroxybiphenyl이 검출되어 *pcbAB* 유전자들이 *E. coli*에서 잘 발현된다는 것을 의미하였다. 그러나 dechlorination 작용은 *pcbAB* 유전자와 관계없이 4CB의 개환과정 후 생성된 4-chlorobenzoate에서 일어나는 것으로 해석된다.

KEY WORDS □ *pcbAB*, *pcbABCD*, cloning and expression, biodegradation of 4CB/BP

근래 자연계에는 살충제, 제초제, 그리고 각종 염소화 유기용제를 포함하여, 다양하면서 무수히 많은 종류의 xenobiotic 물질들이 오염되고 있다. 그 중 현대 산업제품에 폭넓게 사용되고 있는 polychlorinated biphenyls(PCBs)는 자연계로의 방출량이 증가되는 동시에, 분해가 잘 되지 않기 때문에 생태계에 축적되고 있다. PCBs는 인간을 비롯한 고등생물에게 오염될 때 치명적인 영향을 주기 때문에, 자연계로부터 이를 분해 제거하는 일은 생태학적으로 그리고 환경보건학적으로 매우 중요한 과제이다. PCBs에 대한 미생물의 분해 정도는 biphenyl에 치환되어 있는 염소의 수와 위치에 따라 다양하며, 염소의 수가 많을수록 난분해 특성을 나타낸다고 알려져 있다(3). 그러나 biphenyl의 한 쪽 benzene 고리에 염소가 붙어있지 않는 PCBs는 그 고리에서 미생물에 의한 ring fission이 보다 쉽게 일어나 생분해성이 높다고 한다(13). 이러한 이유 때문에 미생물에 의한 PCBs의 분해 연구는 monochlorobiphenyl인 4-chlorobiphenyl(4CB)을 재료로 많은 연구가 진행되고 있다.

미생물에 의한 4CB의 분해과정에는 4가지의 효소가 관여하여 중간 대사물질인 4-chloro-2,3-dihydroxybiphenyl을 거쳐 4-chlorobenzoate(4CBA)로 변환된다(14). 4CBA는 dechlorination이 일어난 후 계속적으로 분해되어 protocatechuate나 catechol로 변환되는 과정과 ring fission이 먼저 진행되어 4-chlorocatechol로 변환된 후 chlonine이 떨어지면서 β-ketoadipate pathway를 따라 완전히 분해되는 과정이 알려져 있다.

이와 같은 4CB의 분해과정에는 우선 4-chlorobi-

phenyl dioxygenase(*cbpA*)와 dihydrodiol dehydrogenase(*cbpB*)가 작용하여 4-chloro-2,3-dihydroxybiphenyl을 생성한다. Walia 등(14)은 *cbpAB*를 *Pseudomonas putida*에서 클로닝하였고, Mondello (11)와 Furukawa 등(4)은 각각 *Pseudomonas* sp. LB 400과 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707에서 *bphAB* 유전자를 클로닝하였다. 또 Ahmad 등(1)은 *Pseudomonas testosteroni* B-356에서 cloning한 *bphA* 유전자에 dechlorination activity도 연관되어 있다고 보고한 바 있다.

cbpAB 및 *bphAB*는 4CB와 biphenyl의 분해에서 구조적 특성 및 발현 등이 필수적으로 이해되어야 하는 유전자들이다. 본 연구실에서 분리한 4CB 및 biphenyl의 분해균주인 *Pseudomonas* sp. DJ-12도 이들 유전자를 가지고 있으나, 그 염기서열이 Furukawa와 Miyazaki(5)의 *bphAB*와 Walia 등(14)의 *cbpAB*와 상이하다는 것이 발견되었다(15). 그러므로 본 논문에서는 *Pseudomonas* sp. DJ-12로부터 4CB의 초기 분해 유전자인 *pcbAB*를 *E. coli*에 클로닝하고 이 유전자의 구조와 발현을 연구하였다.

재료 및 방법

4CB 분해균주 및 배양

본 실험에 사용한 균주 및 plasmids는 Table 1과 같다. 4CB 분해균주인 *Pseudomonas* sp. DJ-12는 Kim 등(9)에 의해 분리되었다. *Pseudomonas* sp. DJ-12 뿐만 아니라 clone cells들은 Kiyohara 등(10)의 방법으로 MM2 최소배지에 4CB 또는 BP를 단일탄

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study.

Bacteria and plasmids	Relevant marker(s)	Sources
Bacteria		
<i>Pseudomonas</i> sp. DJ-12	4CB ⁺ , BP ⁺ , 4CBA ⁺ , Ap ^r	Kim <i>et al</i> (9)
<i>E. coli</i> CU1	<i>E. coli</i> XL1-Blue containing pCU1	This study
<i>E. coli</i> CU101	<i>E. coli</i> XL1-Blue containing pCU101	This study
<i>E. coli</i> CU102	<i>E. coli</i> XL1-Blue containing pCU102	This study
<i>E. coli</i> CU103	<i>E. coli</i> XL1-blue containing pCU103	This study
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 thi</i> F'[<i>proAB</i> ⁺ <i>lacI</i> ^s <i>lacZ</i> ΔM15 Tn10(<i>ter</i> ^r)]	Stratagene Ltd.
Plasmids		
pCU1	<i>pcbABCD</i> , Ap ^r , 6.4 kb <i>EcoRI</i> fragment of <i>Pseudomonas</i> sp. DJ-12 cloned in pBluescript SK(+)	This study
pCU101	<i>pcbAB</i> , Ap ^r , 2.2 kb <i>EcoRI</i> , <i>Sall</i> fragment of <i>Pseudomonas</i> sp. DJ-12 cloned in pBluescript SK(+)	This study
pCU102	Ap ^r , 1.2 kb <i>Sall</i> fragment of <i>Pseudomonas</i> sp. DJ-12	This study
pCU103	<i>pcbCD</i> , Ap ^r , 3 kb <i>Sall</i> , <i>EcoRI</i> fragment of <i>Pseudomonas</i> sp. DJ-12 cloned in pBluescript SK(+)	This study
pBluescript SK(+)	Ap ^r , contains <i>lacZ</i> promoter for fusion protein induction	Stratagene Ltd.

Abbreviation: 4CB, 4-chlorobiphenyl; BP, biphenyl; 4CBA, 4-chlorobenzoate; Ap, ampicillin.

소원으로 첨가하여 배양하였다. 완전배지로는 Luria-Bertani(LB) 배지(Bacto tryptone, 10 g/l; Bacto yeast extract, 5 g/l; NaCl, 5 g/l, pH 7.0)를 사용하였고, 고체배지의 경우에는 한천을 1.5%로 첨가하였다.

4CB 및 biphenyl의 분해능 검정

실험에 사용한 방향족 탄화수소들 중 4CB와 biphenyl(BP)은 동경화성으로부터, 2,3-dihydroxybiphenyl(2,3-DHBP)은 Wako Chemical Ind., Ltd.로부터 구입하였다. 4-chlorobenzoate(4CBA)는 Sigma Chemical Co.로부터 구입하였고, MCP(meta-cleavage compounds)는 본 연구실에서 Ahmad(1)의 방법으로 제조하여 사용하였다.

4CB 및 BP에 대한 세균의 분해능은 Kiyohara 등(10)의 방법에 의해 diethyl ether에 1%의 비율로 녹인 4CB 또는 BP를 MM2 최소배지나 LB 고체배지의 표면에 살포한 후, 균주의 집락주위에 분해환이 형성되는 것으로 검정하였다.

DNA의 효소처리 및 전기영동

Plasmid를 포함하여 chromosomal DNA를 분리할 때에는 Ausubel 등(2)의 방법을 사용하였고, plasmid DNA는 Sambrook 등(12)의 방법을 사용하여 분리하였다.

T₄ DNA ligase와 제한효소들은 모두 Promega Co.로부터 구입하였으며, 반응조건은 구입회사의 사용지침에 따랐다. 전기영동은 horizontal electrophoresis system을 이용하여 0.7~1.0%의 agarose

gel에서 실시하였다. 전기영동에는 TAE buffer(40 mM Tris-acetate; 1 mM EDTA) 또는 TBE buffer(45 mM Tris-borate; 1 mM EDTA)를 사용하여 5 V/cm 이하로 전개시켰다. 전기영동 후 gel은 0.5 μg/ml의 ethidium bromide 용액에서 40분간 염색한 후 UV-transilluminater(305 nm)로 관찰하였고, 사진은 UV DNA SLII camera system(Seolin)을 이용하여 촬영하였다.

pcbAB 유전자의 cloning

4CB의 ring cleavage에 관여하는 *pcbABCD*의 유전자군을 우선 cloning하기 위하여, *Pseudomonas* sp. DJ-12의 total DNA를 *EcoRI*으로 절단한 절편들과 *EcoRI*으로 처리한 pBluescript SK(+) vector를 3 : 1의 비율로 혼합하여 T₄ DNA ligase를 이용하여 16 °C에서 16시간 ligation시켰다. 반응이 끝난 시료는 Sambrook 등(12)의 방법에 따라 *E. coli* XL1-Blue에 형질전환시켰다. 형질전환체의 선발은 100 μg/ml의 ampicillin과 15 μg/ml의 tetracycline, 그리고 40 μl의 X-gal(20 mg/ml)과 4 μl의 isopropylthio-β-D-galactoside(IPTG; 200 mg/ml)를 첨가한 LB 한천배지에서 흰색을 띄는 집락들을 1차로 선발하였다. 선발된 형질전환 집락에 0.1%의 2,3-DHBP 용액을 분무하여 노란색의 meta-cleavage compounds(MCPs)를 생성하는 균주를 선발하였고, *pcbABCD*의 재조합 plasmid를 pCU1이라 명명하였다.

pCU1의 제한효소 지도에 따라 pCU1의 *EcoRI-Sall* 절편들(2.2 kb와 3.0 kb)을 상기의 방법과 동일

하게 *EcoRI-SalI*으로 처리한 pBluescript SK(+) vector에 삽입시키고 *E. coli* XL1-Blue에 형질전환시켜 clone cell들로 CU101, CU102, CU103을 얻었다. *E. coli* CU101에서 *pcbAB* 유전자의 발현을 검정하고, 재조합 plasmid인 pCU101에서 *pcbAB* 유전자의 제한효소지도를 밝혔다.

pcbAB 유전자의 발현검정

4CB 분해균주에 의한 분해산물의 검정은 UV-spectrophotometry로 검정하였으며, 재조합 plasmid에 존재하는 *pcbAB* 분해유전자의 발현은 Khan과 Walia(6)의 방법을 일부 변형하여 gas chromatography(GC)를 이용하여 resting cell assay로 검정하였다. 4CB 분해균주 및 *pcbAB* 유전자의 cloned cell을 LB 액체배지에서 10^9 /ml이 될 때까지 배양한 다음, 원심분리하여 phosphate buffer(pH 7.0)로 세척하여 resting cell을 준비하였다. 이 균체를 4CB 또는 BP가 0.1 mM씩 포함된 MM2 액체배지에 접종하여 37°C에서 반응시켰다. 일정 시간에 따라 반응배지를 채취하여 $4,000 \times g$ 로 10분간 원심분리하여 균체를 제거한 후, 동일량의 diethyl ether로 분해산물을 추출하고 진공 건조시킨 다음 알콜에 녹였다. 위의 방법으로 얻은 시료를 Varian Model 3700 (Hewlett-Packard Co., Palo Alto, Calif)으로 gas chromatography 분석을 하였다. 이때 사용한 column은 silicon OV17(3% on chromosorb W, mesh 80~100)을 사용하였다. GC 조건으로는 injection

온도를 230°C, column 온도를 250°C 그리고 검출기 온도는 250°C로 하였고, 질소 가스는 45 ml/min으로 주입하였으며 flame ionization detector로 대사물질들을 검정하였다.

결 과

실험균주의 분해특성

Pseudomonas sp. DJ-12는 자연계로부터 분리한 다른 균주들과 함께, 4CB 또는 BP로 분무한 MM2 한천배지에서 Fig. 1과 같이 이들 방향족 탄화수소를 단일 탄소원으로 이용하여 성장하였으며, 집락주위에 분해환을 형성하였다. 그러나 *pcbABCD* 유전자를 클로닝하는데 이용한 host 균주인 *E. coli*는 4CB 및 BP로 성장하지 못하였고 분해환도 형성하지 못하였다. *Pseudomonas* sp. DJ-12는 100 µg/ml의 ampicillin에 내성을 나타냈으며, 5 µg/ml 이상의 tetracycline과 kanamycin 농도에서는 성장하지 못하였다.

*pcbAB*의 cloning

Pseudomonas sp. DJ-12의 total genomic DNA와 pBluescript SK(+) DNA를 *EcoRI*으로 처리한 후 ligation하여 *E. coli* XL1-Blue에 형질전환하였다. 이들 형질전환 균주 중 1%의 2,3-DHBP 용액을 분무하여 노란색을 나타내는 CU1 형질전환 균주를 얻었다. *E. coli* CU1은 4CB 및 BP를 분해하는 *pcbABCD*가 있는 재조합 plasmid인 pCU1을 가지고

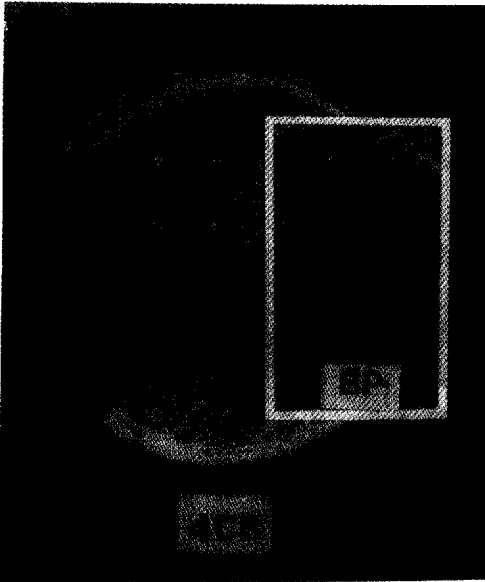


Fig. 1. Growth of the isolates on 4-chlorobiphenyl (4CB) and biphenyl(BP).

Clear zones were produced around the colonies by catabolizing 4CB and BP.

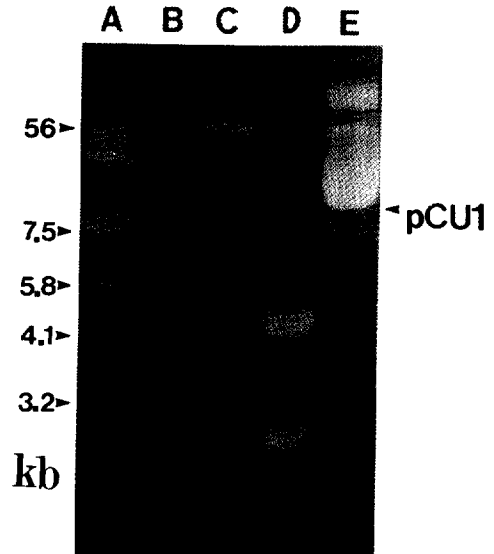


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of pCU1.

Lane A, *E. coli* V517; B, *EcoRI* digests of total genomic DNA of DJ-12; C, *E. coli* XL1-Blue; D, pBluescript SK(+); E, *E. coli* CU1.

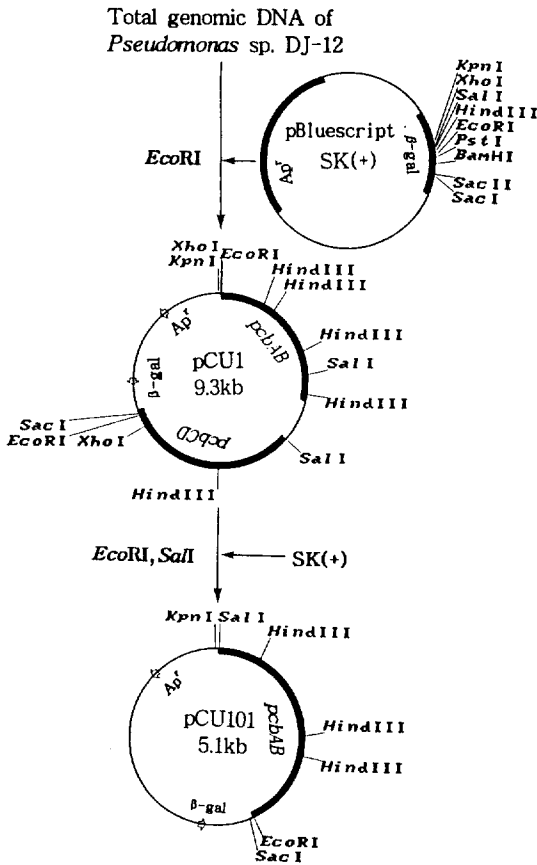


Fig. 3. Construction strategy for hybrid plasmids pCU1 and pCU101.

있음을 Fig. 2에서와 같이 확인하였다. pCU1은 Fig. 3에서와 같이 *pcbABCD*를 포함하는 약 6.4 kb의 *EcoRI*절편이 약 3 kb의 pBluescript SK(+)와 재조합된 plasmid임을 알 수 있었으며, 그 크기는 약 9.4 kb가 되었으며 이 plasmid DNA를 분리하여 *EcoRI*, *SalI*, *HindIII* 등의 효소로 단일 또는 이중 절단하여 그 절편들을 전기영동한 결과는 Fig. 4와 같다. 이와 같은 결과로부터 *pcbABCD* 유전자의 제한효소 지도를 Fig. 3에서와 같이 작성하였다.

그 다음 pCU1으로부터 subcloning을 하여 pCU101을 제조한 과정은 Fig. 3과 같다. pCU1 plasmid를 *EcoRI-SalI*으로 이중 절단하여 2.2 kb 정도의 절편을 pBluescript SK(+) vector에 삽입하여 Fig. 3에서와 같이 pCU101을 만들었다. pCU101의 insert DNA에는 Fig. 5에서와 같이 *pcbAB* 유전자를 포함하고 있었으며, 그 위에는 3개의 *HindIII* 위치가 존재하는 것을 확인하였다.

pcbAB의 발현

Pseudomonas sp. DJ-12를 포함하여 각 clone들의 4CB 분해능을 검증하기 위하여 resting cell assay를

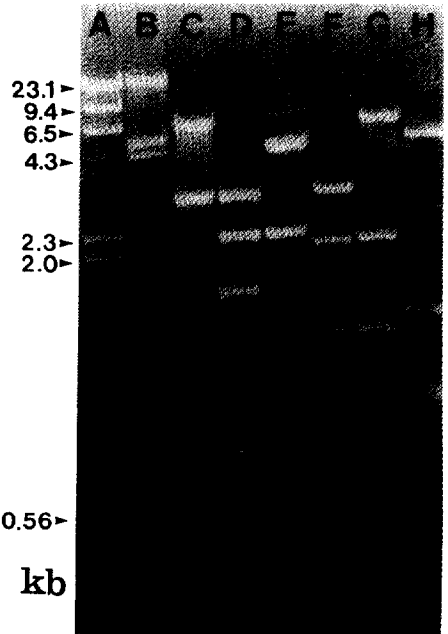


Fig. 4. Restriction analysis of recombinant plasmid pCU1. Lane A, λ -*HindIII*; B, λ -*EcoRI-HindIII*; C, *EcoRI*; D, *EcoRI-HindIII*; E, *HindIII*; F, *EcoRI-SalI*; G, *SalI*; H, *HindIII-SalI*.

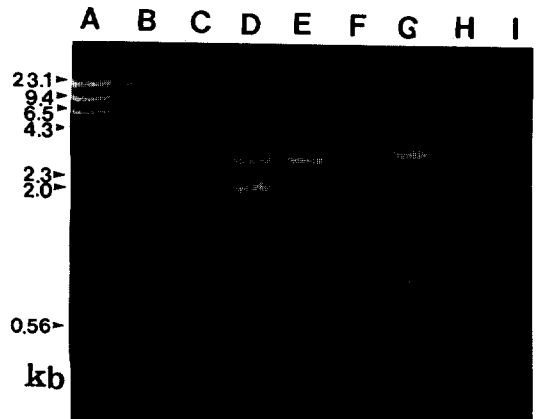


Fig. 5. Restriction analysis of recombinant plasmid pCU101. Lane A, λ -*HindIII*; B, λ -*EcoRI-HindIII*; C, *EcoRI*; D, *EcoRI-SalI*; E, *EcoRI-HindIII-SalI*; F, *HindIII*; G, *EcoRI-HindIII*; H, *SalI*; I, *HindIII-SalI*.

하였다. 그 결과 *Pseudomonas* sp. DJ-12와 CU1 균주에 대한 GC spectra는 Fig. 6과 같다. *E. coli* CU1은 *Pseudomonas* sp. DJ-12와 같이 BP를 기질로 했을

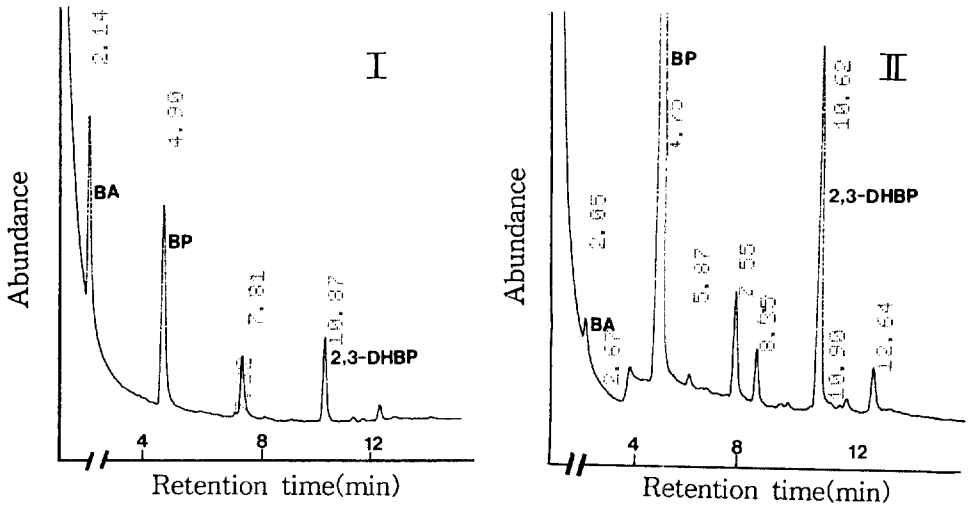


Fig. 6. GC spectra of metabolites produced from BP by DJ-12(I) and CU1(II). The metabolites were extracted from an 60 h old culture with diethyl ether.

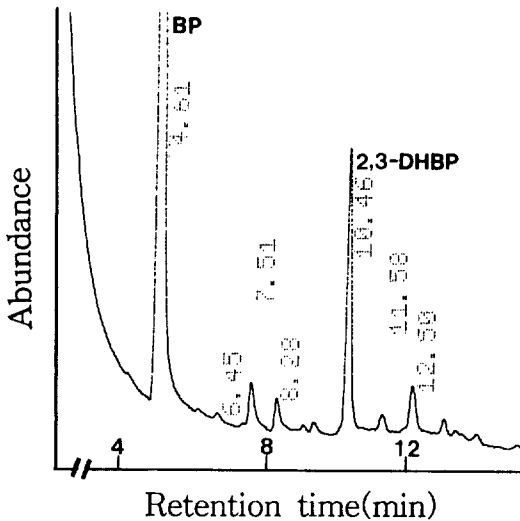


Fig. 7. GC spectra of metabolites produced from BP by CU101. The metabolites were extracted from an 60 h old culture with diethyl ether.

때, *pcbAB*의 산물인 4-chlorobiphenyl dioxygenase와 dihydrodiol dehydrogenase들에 의해 BP가 분해되어 2,3-DHBP(retention time; RT, 10.62~10.87)가 생성되었고, 2,3-DHBP는 계속 분해되어 benzoic acid(RT, 2.05~2.14)가 생성되었다. 그러므로 pCU1의 6.4 kb 절편에 *pcbABCD* 유전자가 있는 것을 확인하였으며, 이 유전자들은 *E. coli*에서도 정상적으로 발현된다는 것을 알 수 있었다.

또 *pcbAB*를 가지고 있는 *E. coli* CU101의 bi-

phenyl 분해능을 resting cell assay한 결과는 Fig. 7과 같다. BP는 *pcbAB*의 산물 효소에 의하여 분해되어 2,3-DHBP (RT, 10.46)가 생성되었으나, benzoic acid는 생성되지 않았다. 이는 pCU101에 *pcbAB*만이 존재한다는 것을 입증하는 것이다.

고찰

본 실험에 사용한 *Pseudomonas* sp. DJ-12는 4 CB와 BP를 모두 분해할 수 있었으며, 그 분해 과정은 Khan과 Walia(7) 그리고 Ahmad 등(1) 이 보고한 것과 같이 meta-cleavage 분해경로를 통하여 이루어진다는 것을 전보에 이미 기술하였다(15). 염화방향족 탄화수소에 대한 미생물의 분해유전자가 chromosome에 위치하는 것으로 보고한 Furukawa와 Miyazaki(5)와 Khan과 Walia(8)의 논문에서와 같이, 본 실험에 사용한 *Pseudomonas* sp. DJ-12는 60 kb의 plasmid(pDJ121)를 가지고 있었지만, *pcbABCD*의 유전자군은 chromosome에 위치하고 있었다. 이 *pcb* 유전자는 전보(15)에서 표시했던 *chp* 유전자의 이름을 바꾼 것이다. 그러나 본 연구에서 밝힌 *Pseudomonas* sp. DJ-12의 *pcbABCD*는 Furukawa와 Miyazaki(5)의 *bphABCD*와 Khan과 Walia(6)의 *chpABCD*의 염기서열과 비교하여 그들의 유연관계를 밝혀볼 의미가 있다고 생각한다.

본 연구에서 얻은 결과를 종합하여 볼 때, 4CB의 분해과정과 그에 상응하는 *pcbABCD*의 제한효소 지도와 유전자의 위치는 Fig. 8과 같다. Khan과 Walia(6)는 *Pseudomonas putida* OU83에서 클로닝한 *cbp* 유전자군에서 *cbpA*와 *cbpBCD*가 3 kb 정도 떨어져 있다고 보고하였다. 본 실험에서의 *Pseudomonas* sp. DJ-12의 *pcb* 유전자군은 *pcbAB* 유전자를 포함하는

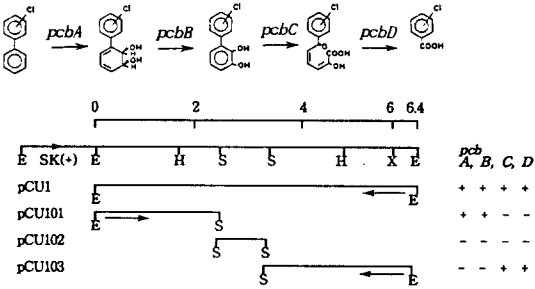


Fig. 8. Catabolic pathway of PCBs to PCBAs and physical map of the recombinant plasmids of pCU1, pCU101, and pCU103. The direction of transcription of *LacZ* promoter is indicated by arrows heads. Abbreviation: E, *EcoRI*; H, *HindIII*; S, *Sall*; X, *XhoI*; +, express; -, not express; SK(+), pBluescript SK(+) vector.

절편(2.2 kb)과 *pcbCD* 유전자를 포함하는 절편(2.8 kb) 사이에 약 1.2 kb의 간격이 존재하였다. 또 Furukawa와 Miyazaki(5)는 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707의 *bphABCD*가 하나의 promoter만을 갖는 것으로 보고하였지만, Walia(8)는 *P. putida* OU83에서 *cbpA* 유전자와는 별도로 *cbpBCD* 유전자에도 독립된 promoter가 존재한다는 것을 promoter probe vector인 pKK232-8을 사용하여 확인하였다. 본 연구에서의 *pcbAB* 유전자는 vector인 pBluescript SK(+)의 *LacZ* promoter와 반대방향으로 위치한 pCU1에서도 잘 발현되었기 때문에 독립된 promoter를 갖고 있는 것으로 해석된다.

Biphenyl에 염소가 여러개 붙어있는 PCBs의 분해에 있어서는 dechlorination 도 ring cleavage 만큼 관심의 대상이 된다. Walia 등(14)은 *cbpABCD* 유전자를 포함하는 pAW6194가 dechlorination 활성을 가지고 있다고 보고하였으며, Ahmad 등(1)도 *bphA* 유전자에서 dechlorination 활성을 확인하였다. *Pseudomonas* sp. DJ-12의 4CB 분해 유전자군은 상기의 *cbpABCD*와 *bphABCD* 분해유전자군과 일반적인 특징은 비슷하였다. 그러나 *Pseudomonas* sp. DJ-12에 의한 4CB의 분해 대사과정을 UV-spectrophotometer로 분석한 결과 dechlorination 기능이 Fig. 9에서와 같이 확인되었으나, 이는 4CBA로부터 protocatechuate(PCA)가 생성되는 과정에서 dechlorination이 일어났던 것으로 해석된다. 이와 같은 결과는 4CBA를 축적하는 다른 균주들(15)에 비하여, *Pseudomonas* sp. DJ-12는 4CB로부터 4CBA를 생성한 후 dechlorination에 의하여 완전 분해시킬 수 있다는 점에서 우수한 균주라고 생각된다. 그러므로 4CB의 ring cleavage에 관여하는 *pcbABCD* 유전자뿐 아니라, dechlorination, 그리고 이들 전 과정에 관여하는 유전자와 효소들에 대해서도 분자생물학적

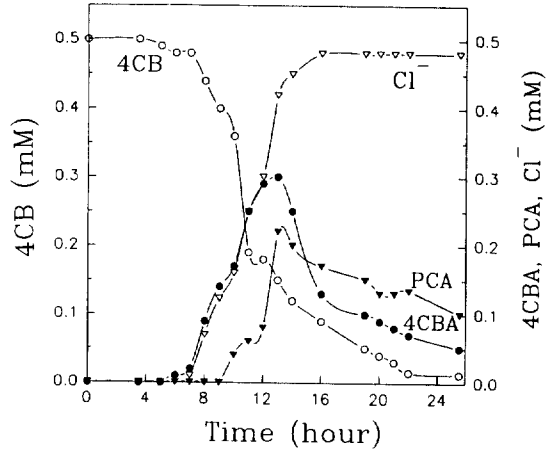


Fig. 9. The metabolites produced from degradation of 4-chlorobiphenyl by *Pseudomonas* sp. DJ-12. Abbreviation: 4CB, 4-chlorobiphenyl; 4CBA, 4-chlorobenzoate; PCA, protocatechuate; Cl⁻, chlorine ion.

특성이 더 자세히 밝혀져야 4CB를 완전히 분해할 수 있는 새롭고 강력한 균주의 개발도 가능해질 것이다.

사 사

본 연구는 한국과학재단 우수연구센터(서울대학교 분자미생물학 연구센터)의 연구과제로 수행되었으며, 한국과학재단의 연구비 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Ahmad, D., M. Sylvestre, M. Sondossi, and R. Masse, 1991. Bioconversion of 2-hydroxy-6-oxo-6-(4'-chlorophenyl)hexa-2,4-dienoic acid, the meta-cleavage product of 4-chlorobiphenyl. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 1375-1385.
- Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, and K. Struhl, 1987. Current protocols in molecular biology. John Wiley Sons, Inc., New York.
- Bedard, D.L., R.E. Wagner, M.J. Brennan, M.L. Haberl, and J.F. Brown, Jr., 1987. Extensive degradation of Aroclors and environmentally transformed polychlorinated biphenyls by *Alcaligenes eutrophus* H850. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 1094-1102.
- Furukawa, K., N. Hayase, K. Taira, and N. Tomizuka, 1989. Molecular relationship of chromosomal genes encoding biphenyl/polychlorinated biphenyl catabolism: Some soil bacteria possess a highly conserved bph operon. *J. Bacteriol.* **171**, 5467-5472.

5. Furukawa K. and T. Miyazaki, 1986. Cloning of gene cluster encoding biphenyl and chlorobiphenyl degradation in *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *J. Bacteriol.* **166**, 392-398.
6. Kahn, A. and S. Walia, 1989. Cloning of bacterial genes specifying degradation of 4-chlorobiphenyl from *Pseudomonas putida* OU83. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 798-805.
7. Khan, A. and S. Walia, 1990. Identification and localization of 3-phenylcatechol dioxygenase and 2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoate hydrolase genes of *Pseudomonas putida* and expression in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 956-962.
8. Khan, A. and S. Walia, 1991. Expression, localization, and functional analysis of polychlorinated biphenyl degradation genes *cbpABCD* of *Pseudomonas putida*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 1325-1332.
9. 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.
10. Kiyohara, H., K. Nagao, and K. Yana, 1982. Rapid screen for bacteria degrading water-insoluble, solid hydrocarbons on the agar plate. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 454-457.
11. Mondello, F.J., 1989. Cloning and expression in *Escherichia coli* of *Pseudomonas* strain LB400 genes encoding polychlorinated biphenyl degradation. *J. Bacteriol.* **171**, 1725-1732.
12. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989. Molecular cloning, 2nd ed. Cold Spring Harbor, New York.
13. Tucker, E.S., V.W. Saeger, and O. Hicks, 1975. Activated sludge primary biodegradation of polychlorinated biphenyls. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **14**, 705-713.
14. Walia, S., A. Khan, and N. Rosenthal, 1990. Construction and applications of DNA probes for detection of polychlorinated biphenyl-degrading genotypes in toxic organic-contaminated soil environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 254-259.
15. Yun, D.J., J.J. Han, C.K. Kim, and Y.S. Kim, 1992. Divergence of the *cbp* genes in 4CB catabolizing bacteria. *Kor. J. Microbiol.* **30**, 53-59.

(Received February 12, 1993)

(Accepted February 22, 1993)

ABSTRACT: Cloning and Expression of *pcbAB* Genes from *Pseudomonas* sp. DJ-12 in *Escherichia coli*

Han, Jae-Jin, Tae-Kyung Sung, and Chi-Kyung Kim* (Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Chungbuk National University, Cheongju 360-763, and Research Center for Molecular Microbiology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea)

The *pcbAB* genes of *Pseudomonas* sp. DJ-12 produce the enzymes of 4-chlorobiphenyl (4CB) dioxygenase and dihydrodiol dehydrogenase which act on the first and second steps in degradation of 4CB and biphenyl. The genes were cloned in *E. coli* XL1-Blue. The *pcbAB* genes of about 2.2 kb in size were contained in the pCU101 hybrid plasmid in the cloned cell of CU101. The genes were found to have their own promoter and three restriction sites for *Hind*III. 2,3-dihydroxybiphenyl was detected by the resting cell assay, as the metabolite transformed from biphenyl by the cloned cell of CU101. This means that the *pcbAB* genes are well expressed in *E. coli*. But dechlorination was unlikely involved in the *pcbAB* gene expression but was believed to occur by functioning on 4CBA produced after ring-cleavage of 4CB.