

*Streptomyces bobili*의 R-Plasmid DNA에 의한 *Bacillus subtilis*의 Transformation

金相達 · 都在浩

韓國人蔘煙草研究所

(1983년 5월 9일 수리)

Transformation of *Bacillus Subtilis* by *Streptomyces bobili* R-Plasmid DNA

Sang Dal Kim and Jae Ho Do

Korea Ginseng & Tobacco Research Institute

(Received May 9, 1983)

The penicillin resistant plasmid DNA was prepared from *Streptomyces bobili* YS-40, producing penicillinase, by the phenol extraction method and introduced into *Bacillus subtilis* IAM 12118 by the transformation procedure of Mahler method. The optimal pH and temperature on the transformation was 7.0, 30°C respectively. Above 20 minutes contact of plasmid DNA and recipient cell was shown the high transformation frequency. The transformant of penicillin resistance was proportionally increased as increase of the DNA concentration. The addition of lysine in transformation system increased the transformation frequency about 6-fold and the addition of the chloramphenicol did not affect the transformation frequency.

微生物이 外來의 DNA를 받아들이는 現象은 transduction, transfection, transformation, conjugative transfer 등으로 分類할 수 있는데 최근에는 recombinant DNA를 利用하여 生理活性物質의 生産性を 높이는데 主로 transformation system이 많이 利用되고 있다.

放線菌의 plasmid는 1975年 Schrepf等¹⁾에 의해 *Streptomyces coelicolor* A3(2)로 부터 18×10^6 dalton의 비교적 分子量이 큰 covalently closed circular DNA가 分離된 것을 시작으로 해서 約 20개 정도의 放線菌 plasmid가 分離되어있다. Bacterial plasmid에 의한 transformation에 관한 研究는 *E. coli*의 R-plasmid를 transformation 시킨 Cohen의 報告²⁾를 위시하여 *S. typhimurium*과 *E. coli*의 transformation³⁾, *Staphylococcus* plasmid에 의한 *E. coli*의 transformation⁴⁾ 등이 있고, *B. subtilis*의 plasmid transformation도 *S. aureus*의 plasmid에 의한 *B. subtilis*의 transformation⁵⁾, plasmid構造나 性質에 따른 transformation의 影響⁶⁾, insertion plasmid에 처한

影響⁷⁾等 多數의 報告가 있으나 放線菌 plasmid에 의한 *B. subtilis*에로의 transformation에 관한 研究는 아주 적은 실정이다. 前報⁸⁾에서는 penicillinase 生産菌인 *Streptomyces bobili* YS-40 菌株가 antibiotic resistance plasmid를 가지고 있다는 것을 各種 curing agent로 elimination 시켜 본 結果로서 확인하였다. 本報에서는 다양한 抵抗性, 活性物質生産性, 資化性等⁹⁾으로 利用價值가 큰 放線菌 plasmid를 *B. subtilis*를 recipient cell로 했을때 安定한 vector로서 適用하고자 하였으며 ampicillin resistance mark를 가진 本 *Streptomyces* R-plasmid에 의한 *B. subtilis*의 transformation에 미치는 基本條件을 調査하였다.

材料 및 方法

菌株

本 實驗에 使用된 plasmid提供菌株로는 前報⁸⁾에서 報告한 *Streptomyces bobili*(YS-40) 이며 recipient菌으로는 *B. subtilis* IAM 12118을 使用

했으며 이 菌株들은 glucose-asparagine agar 와 nutrient agar 培地에서 繼代培養하여 4℃에서 保管하면서 使用하였다.

DNA의 分離 및 精製

*Streptomyces bobili*의 DNA를 分離하기 위해서 菌의 培養과 溶菌은 Schrempf 등의 方法⁽¹⁾에 따랐다. 즉 Sucrose-Casamino acids-Glycine 培地の 70時間 培養液 10ml에서 얻은 mycelium을 生理食鹽水로 5回 洗滌한 後 0.01M Tris-HCl buffer (pH8.0)에 溶解한 34% sucrose 溶液 1.0 ml, 0.25M EDTA 溶液 (pH8.0) 0.2ml, 0.01M Tris-HCl buffer (pH8.0)에 溶解한 lysozyme 溶液 (25 mg/ml) 0.2ml를 加하여 30℃에서 5分間 incubation시키고 재빨리 冷却하였다. 여기에 0.2ml의 0.25M EDTA 溶液과 SDS를 最終濃도가 1%가 되게 添加시켜 37℃에서 15分間 溶菌시켰으며 이것을 Saito 등의 phenol extraction 方法⁽¹⁰⁾을 使用하여 DNA를 抽出하였다. 즉 溶菌液과 同量의 phenol-Tris-SDS buffer를 加하고 ice bath에서 20分間 混合한 後 2800rpm에서 30分間 원심 분리하여 그 상등액에 2倍量의 cold ethanol을 加하여 다시 5000rpm에서 10分間 원심분리하여 生成된 침전물을 diluted standard saline citrate 溶液 (15mM NaCl, 1.5mM sodium citrate)으로 溶解시켰다. DNA를 精製시키기 위해서 Marmur의 方法⁽¹¹⁾을 使用하였는데 1/10量의 Acetate-EDTA 溶液 (3 M Sodium acetate, 1mM EDTA, pH7.0)을 加하고 신속히 混合하면서 0.54量의 isopropanol을 천천히 加하였다. 침전된 DNA를 70, 80, 90%로 ethanol의 濃도를 높여가면서 洗滌한 後 5000rpm에서 15分間 원심분리하여 生成된 침전물을 diluted saline-citrate 溶液으로 溶解시키고 1/10量의 concentrated saline-citrate 溶液 (1.5M NaCl 0.15M sodium citrate)을 加하였다. 이것을 몇번 되풀이 하여 isopropanol 침전물로 부터 完全히 精製하였다.

培養

Recipient strain인 *B. subtilis* IAM 12118 菌株를 competent cell로 만들기 위해서 nutrient agar 培地에서 16時間 培養하여 使用하였다. 基本培地로서 使用된 minimal medium의 組成은 Anagnostopoulos의 方法⁽¹²⁾ growth 및 competence medium의 組成은 Mahler의 方法⁽¹³⁾에 따랐으며 그 組成은 Table 1 과 같다.

Competence 및 transformation

Table 1. Compositions of Minimal (M), Growth (G) and Competence medium (C)

	M	G	C
(NH ₄) ₂ SO ₄	2	2	2
K ₂ HPO ₄	14	14	14
KH ₂ PO ₄	6	6	6
Na-citrate	1	1	1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2	0.2	0.2
Glucose	5	5	5
Mn ₂ SO ₄ ·5H ₂ O	-	0.1	-
Casein hydrolyzate	-	0.2	0.1
Yeast extract	-	1	1
CaCl ₂	-	-	0.35
MgCl ₂ ·6H ₂ O	-	-	0.5

Gram per liter of distilled water

Recipient strain의 competent化와 transformation은 Mahler의 方法⁽¹³⁾에 따랐다.

B. subtilis IAM 12118 菌株를 새로운 nutrient agar에서 16時間 培養시킨 後 20 ml (500ml shaking flask)의 growth medium에 接種시켜 (約 10⁸ cells/ml) 30℃에서 3時間동안 210rpm으로 회전진탕배양 시켰다. 培養된 菌을 competent cell로 만들기 위해서 competence medium에 1/10量을 다시 接種시켜 30℃에서 30分 동안 회전진탕하여 competent化하였다.

Transformation은 competent cells 0.2ml와 transforming DNA 溶液 0.1ml (1.5μg에 상당함, O.D.₂₆₀=0.3)를 混合하여 37℃에서 30分間 incubation (진폭 2 cm, 70 stroke/min)시켰으며 ampicillin을 85μg/ml의 濃도가 되게 添加한 後 100μg/ml의 ampicillin이 舍된 nutrient agar 培地에서 전면 도포하여 30℃에서 3日間 培養하여 ampicillin resistant transformant의 colony를 colony counter로 計측하였다.

結果 및 考察

*B. subtilis*의 藥劑耐性

Recipient cell로서 使用할 *B. subtilis* IAM 12118 菌株의 여러 가지 抗生物質에 對한 耐性を 調査한 結果는 Table 2에 나타난 바와 같이 terramycin을 除外한 모든 藥劑에 感受性菌으로 나타났기에 R-plasmid transformation의 recipient cell로서 적합하였다.

Table 2. Resistance Pattern of *B. subtilis* IAM 12118 against various Antibiotics

Antibiotics	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Susceptible or Resistance
Ampicillin	100	S
Cephadrine	100	S
Streptomycin	50	S
Kanamycin	50	S
Chloramphenicol	100	S
Terramycin	100	R

pH의 影響

pH가 transformation에 미치는 影響을 調査하기 위하여 competence medium에서 30分間 incubation시킨 competence cell을 0.2ml를 取하여 3000rpm에서 30分間 원심분리하여 菌体만 회수한 後 competence medium의 pH를 5.0~9.5까지 조절한 溶液 0.2ml와 DNA溶液 0.1ml에 混合하여 transformation시킨 結果는 Fig. 1과 같다.

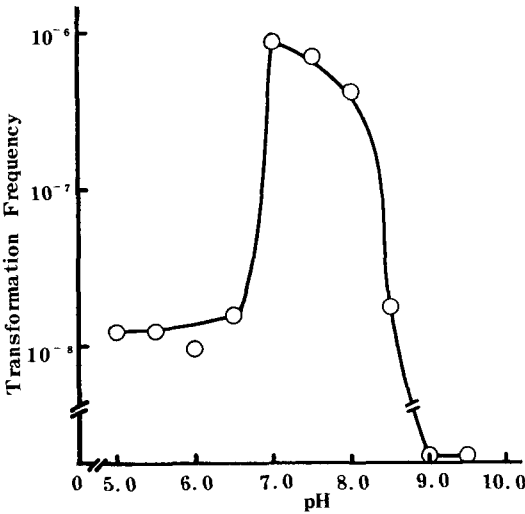


Fig. 1. Effect of pH on Transformation

Donor; *Streptomyces bobili* YS-40 (Am^R , Cm^R , Tr^R , Sm^S , Km^S), Recipient; *Bacillus subtilis* IAM 12118 (Tr^R , Am^S , Cm^S , Km^S , Sm^S)

0.1ml of donor's DNA ($1.5\mu\text{g/ml}$) and 0.2ml of recipient cells (10^8 cells/ml) were incubated at 30°C for 30min with 70 strokes of reciprocal shaking water bath, ampicillin resistant cells were selected on nutrient agar medium containing $100\mu\text{g}$ per ml of ampicillin.

Fig. 1에서 보는 바와 같이 transformation frequency는 pH 7.0에서 最高를 나타내었으며 酸性보다는 알칼리性 pH에서 그 빈도가 급격하게 저하되었다. 이는 *Staphylococcus aureus* 8325의 amino酸 要求變異株를 分離하는 實驗에서 各 pH 別로 transformation시킨 後 직접 원심분리하여 그 빈도를 調査한 結果와 transformation frequent가 낮아졌지만 DNAse를 處理시킨 結果와 유사하였으며⁽¹⁴⁾ R-factor의 transferbility 實驗에서 최적 pH가 7.5였다는 結果와도 유사하게 나타났다.⁽¹⁵⁾

溫度의 影響

Transformation에 미치는 溫度의 影響을 調査하기 위해서 competent cell과 DNA를 各 溫度에서 30分間 transformation시켜 그 빈도를 調査한 結果 Fig. 2에서 보는바와 같이 30°C 에서 transformation frequency가 가장 높게 나타났다. 이 結果 Rudin等의 amino酸 要求變異株의 分離 實驗에서 DNA와 competent cell을 20分間 contact시킨 後 직접 agar培地에 培養한 것 또는 원심분리後 TSB培地로 懸탁시켜 agar培地에 培養한 結果와는 相異하게 나타났으나 plating前에 원심분리後 0.15M NaCl로 懸탁시켜 transformation frequency를 調査한 結果⁽¹⁴⁾와 類似하게 나타났다.

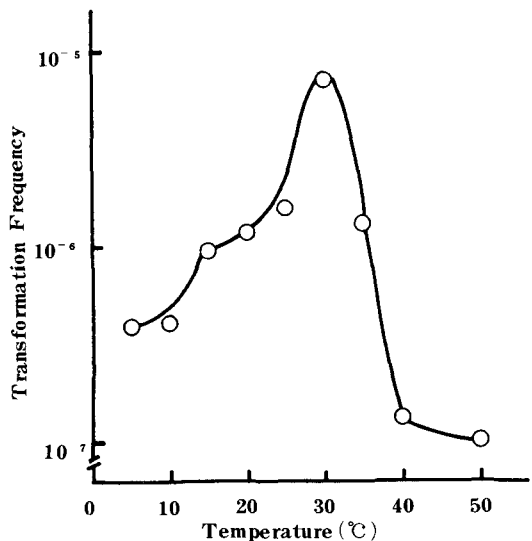


Fig. 2. Effect of Temperature on Transformation

DNA接觸時間의 影響

DNA와 competent cell과의 接觸時間이 transformation frequency에 어떤 影響을 미치는 가를 調査한 結果는 Fig. 3에서 나타난 바와 같이 20

분 이상 접촉시켜야 R-plasmid의 transformation 이 最高에 도달했다. Amino酸 要求變異株를 分離하는 實驗에서 competent cell과 DNA의 接觸時間이 15분일때 그 transformation frequency가 最高에 도달한 結果¹⁴⁾와는 類似하게 나타났으나 bacteria에 있어서 nonchromosomal antibiotic resistance에 의한 *E. coli*의 genetic transformation 實驗에서 60分 以上이 경과되어야만 전환빈도가 最高에 도달한다는 報告¹²⁾와는 差異가 있다.

한편 transformation과 transfection의 相關關係 實驗에서 DNA와 cell과의 接觸時間이 15분만에 전환빈도가 最高에 도달했으나 transfection은 50분이 경과해야 最高에 도달했다. 이러한 差異는 生物學的 活性을 나타내기 위해서 cell內로 들어가는 DNA fragment의 크기에 따라 다르다는 報告¹⁶⁾로 미루어 보아 本 實驗에서 使用된 R-factor DNA도 그다지 크지 않다고 생각된다.

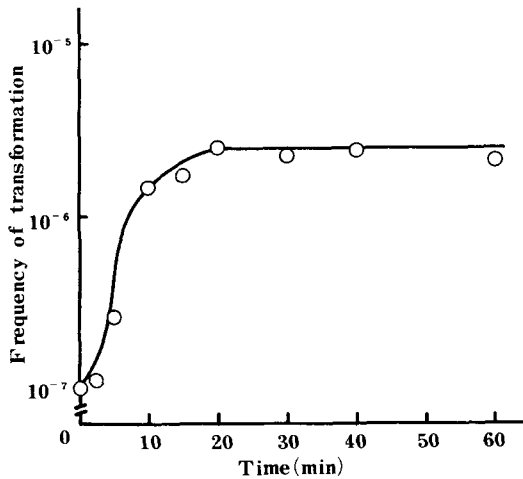


Fig. 3. Effect of DNA exposure time on transformation

DNA濃度の 影響

Competent cell에 DNA를 여러가지 濃度別로 加해서 30°C에서 30分間 incubation시킨 結果 Fig. 4에서 보는바와 같이 DNA의 濃度가 增加할수록 형질전환빈도도 증가했다. 이는 pH 7.0에서 DNA의 濃度를 달리하여 transformation시켰을때 DNA의 濃度가 0.02μg/ml까지는 비례적으로 전환빈도가 增加했으나 그 以上の 濃度에서는 비례하지 않았다는 報告¹⁰⁾와는 相異하나 2 μg/ml까지 거의 비례적으로 전환빈도가 증가한 實驗結果²⁾와 類似하게 나타났다.

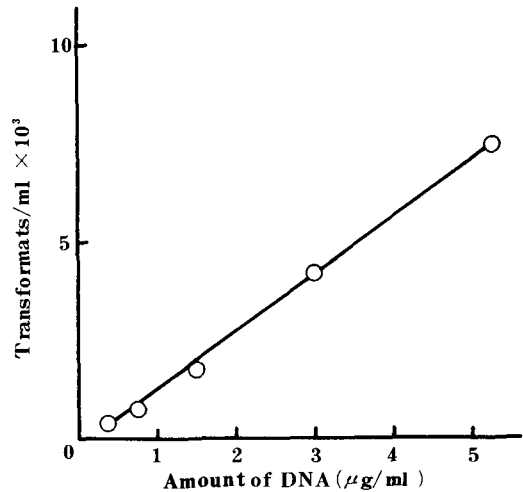


Fig. 4. Effect of concentration of *St. bobili* DNA on transformation
Total viable cell; 2.1 × 10⁸

Surfactant 및 DNase inhibitor의 영향

Drug-resistance의 形質轉換의 頻度를 높이기 위해서 surfactant와 DNase inhibitor를 5 × 10⁻⁴M의 濃度로 competence medium에 加하여 轉換頻度를 調査한 結果는 Table 3과 같이 DNase inhibitor로 使用되는 lysine이 約 6배의 頻度를 높인 것을 除外하고는 거의 影響을 미치지 않았다.

Chloramphenicol의 영향

Chloramphenicol의 存在下에서 peptide bond

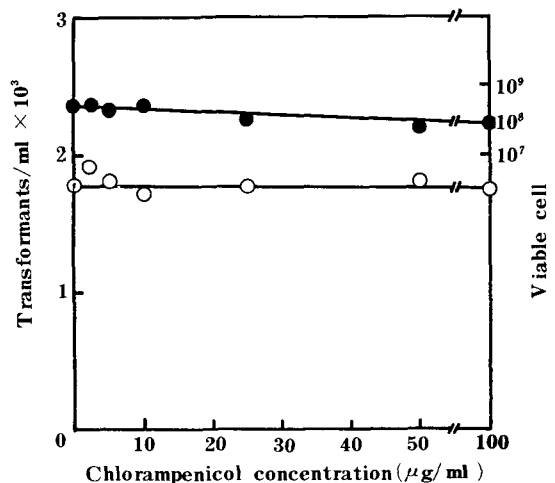


Fig. 5. Effect of chloramphenicol on transformation
●—●; viable cells,
○—○; transformants

Table 3. Effect of Surfactants and DNase Inhibitors on Transformation

	Amp ^R	Total cells	Frequency	Relative frequency
None	7.00×10^3	4.58×10^8	1.53×10^{-5}	1.00
SDS	1.84×10^3	1.28×10^8	1.44×10^{-5}	0.94
Span	3.80×10^3	2.49×10^8	1.53×10^{-5}	1.00
Saponin	1.07×10^4	5.00×10^8	2.14×10^{-5}	1.40
Na ₂ SO ₄	1.15×10^4	7.40×10^8	1.55×10^{-5}	1.01
Lysine	1.11×10^4	1.24×10^8	8.95×10^{-5}	5.85
Na-citrate	1.20×10^4	7.58×10^8	1.58×10^{-5}	1.03
EDTA	5.34×10^3	3.25×10^8	1.64×10^{-5}	1.07
Histamine	6.87×10^3	4.85×10^8	1.42×10^{-5}	0.93
Histidine	1.20×10^4	8.26×10^8	1.45×10^{-5}	0.95

The final concentration of surfactants and DNase inhibitors was 5×10^{-4} M, but saponin was added with the final concentration of 0.05%.

formation이 억제되므로蛋白質合成은 阻害를 받지만 RNA 및 DNA合成은 可能하기 때문에¹⁷ chloramphenicol을 0~100 μ g/ml의 各濃度別로 添加해서 transformation에 미치는 影響을 調査해 본 結果는 Fig. 5와 같다.

低濃度の chloramphenicol (1.4 μ g/ml)은 total protein 이나 growth에는 影響을 주지 않고 inducible enzyme synthesis를 阻害¹⁸ 하는 반면에 10~20 μ g/ml의 濃度는 *B. subtilis*의 viability에는 影響을 주지 않지만 total protein synthesis를 阻害한다고 報告하였다^{19,20}

Felkner 等²¹의 報告에 依하면 0.13 μ g/ml의 濃度에서는 zero time에서 約50배의 transformation을 감소시켰으나 30分 後에는 2배 정도 감소시켰다. 비록 chloramphenicol이 *B. subtilis*의 competence factor (CFbs)의 生産을 阻害한다고 했지만²² 本 實驗에서는 100 μ g/ml의 濃度에서도 transformation frequency가 낮아지지 않았다.

要 約

Penicillinase를 分泌하는 *Streptomyces bobili* YS-40菌株의 plasmid DNA를 phenol方法으로 抽出하여 *Bacillus subtilis* IAM 12118菌株에 形質轉換시켜서 penicillin耐性 plasmid DNA가 表現되게 하였다.

形質轉換에 미치는 最適 pH와 溫度는 各各 7.0, 30 $^{\circ}$ C로 나타났다. DNA와 Competent cell을 20分 以上 接觸시킴으로서 形質轉換이 잘 일어났으며

DNA의 濃度가 增加할수록 transformant의 數도 增加했다. DNA inhibitor로 使用되는 lysine의 添加로 形質轉換의 頻度가 約 6배 程度 상승되었으며 chloramphenicol은 形質轉換의 頻도에 別 影響을 미치지 않았다.

참고문헌

- Schrempf, H., H. Bujard, D. A. Hopwood, and W. Goebel: *J. Bacteriol.*, **121**, 416 (1975)
- Cohen, S. N., A. C. Y. Chang, and L. Hsu: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 2110 (1972)
- Lederberg, E. M., and S. N. Cohen: *J. Bacteriol.*, **119**, 1072 (1974)
- Chang, A. C. Y., and S. N. Cohen: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 1030 (1974)
- Ehrlich, S. D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 1680 (1977)
- Contente, S., and D. Dubnau: *Molec. gen. Genet.* **167**, 251 (1979)
- Canosi, U., A. Iglesias, and T. A. Trautner: *Molec. gen. Genet.*, **181**, 434 (1981)
- Kim, S. D., and J. H. Do: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **10**, 289 (1982)
- 矢野圭司: 発酵と工業, **39**, 2 (1981)
- Saito, H., K. I. Miura: *Biochem. Biophys. Acta*, **72**, 619 (1963)
- Marmur, J.: *J. Mol. Biol.*, **3**, 208 (1961)
- Anagnostopoulos, C., and J. Spizizen: *J. Bacteriol.*, **81**, 741 (1961)
- Mahler, I.: *Methods in Enzymology*, Vol. 12

- part B, p. 846 – 850, ed. by L. Grossman, and K. Moldave, Academic Press, New York (1968)
14. Rudin, L., J. E. Sjöström, M. Lindberg, and L. Philips on: *J. Bacteriol.*, **118**, 155 (1974)
 15. Mitsuhasi, S.: *Gunma J. Med., Sci.*, **14**, 169 (1965)
 16. Riva, S., and M. Polsinelli: *J. Virol.*, **2**, 587 (1978)
 17. Richmond, M. H. : *Data for Biochemical Research*, p. 538, 2nd edition. ed. by R. M. C. Dawson, D. C. Elliott, W. H. Elliott, and K. M. Jones, Oxford University press, Great Britain (1969)
 18. Nester, E. W.: *J. Bacteriol.*, **87**, 867 (1964)
 19. Paigen, K.: *Biochem. Biophys. Acta*, **77**, 318 (1963)
 20. Strauss, N. : *J. Bacteriol.*, **89**, 288 (1965)
 21. Felkner, I. C., and O. Wyss: *Biochem. Biophys Res. Commun.*, **41**, 901 (1970)
 22. Akrigg, A., S. R. Ayad, and G. R. Barker: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **28**, 1062 (1967)