

생물방제균 *Pseudomonas stutzeri* YPL-1의 형질전환 조건

김용수 · 김상달*

영남대학교 응용미생물학과

Transformation of Antagonistic *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 against Root Rotting Fungi *Fusarium solani* by Plasmid DNA

Kim, Yong-Su and Sang-Dal Kim*

Department of Applied Microbiology, Yeungnam University
Gyongsan 713-749, Korea

For the genetic multipurpose of antagonistic abilities of *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 against *Fusarium solani* causing root rot of many important crops by genetic engineering, optimal conditions for transformation of *P. stutzeri* YPL-1 by pKT230 were investigated. Maximum frequency of the transformation was achieved when cells were harvested at early exponential growth phase. The highest transformation efficiency was obtained when the competent cells were exposed to chilled transformation buffer containing 20 mM RbCl, 100 mM CaCl₂ and added 1 μg/ml of plasmid DNA. The pH optimum for transformation was 6.5. When the bacterial cells that were incubated during 60 minutes for the competence were brought in contact with plasmid DNA, the transformations were obtained in the best frequency. It was formed that transformation frequency was $2 \sim 6 \times 10^{-6}$ under the optimal conditions.

최근 생태계파괴, 공해문제 등의 심각한 환경문제를 유발하는 유기합성농약의 남용을 대처하기 위해 식물병원균의 생물학적 방제연구가 점증되고 있다(1-5). 본 연구진에서도 식물근부병 방제를 위해서 강력한 생물방제균 한 균주를 저병해 인삼경작지 토양으로부터 분리하였으며, 이를 동정한 결과 *Pseudomonas stutzeri* 라는 것을 알았다(6). 아울러 그 생물학적 방제기작은 선발된 균주가 식물근부균 *Fusarium solani* 의 외막성분을 파괴할 수 있는 chitinase 등의 가수분해효소에 의한 것으로 규명되었다(6). 그러나 보다 더 강력하고 효과적인 생물방제균으로 개발하기 위해서는 항생물질 생산능(7-9), siderophore 생산능(10-12) 등의 다른 방제기작을 부가하여 다기능적인 방제균으로 육종할 수 있는 유전공학적 기법이 필연적이라고 사료된다.

Pseudomonas 속을 대상으로 하는 외부유전자에 의한 형질전환연구는 *Pseudomonas aeruginosa* (13-20), *Ps-*

eudomonas putida (14,21,22), *Pseudomonas phaseolicola* (23), *Pseudomonas savastanoi* (24) 등 몇몇 보고들이 있으나 일반적으로 *Pseudomonas* 속의 transformation과 cloning system은 *E. coli* 등의 타 미생물에 비해 효율성에 많은 문제점을 안고 있다. 따라서, 본 연구는 생물방제균으로 선발된 *Pseudomonas stutzeri* YPL-1을 host로 해서 broad host range vector인 pKT230(25)에 내재되어 있는 drug-resistance gene을 형질전환하고자 하였으며 이 때 필요한 여러 가지 조건 등을 조사함으로써 유전자 조작기법에 의한 생물방제균의 유전공학적 육종에 기초를 마련하고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 plasmid

본 실험에 사용된 균주는 식물근부균 *F. solani* 의 생육을 강력히 억제하는 생물방제균 *Pseudomonas stutzeri* YPL-1(6)을 host로 사용하였으며 transformation할 plasmid는 *Pseudomonas putida* 에 내재되어 있는

Key words: Biocontrol, pKT230, Transformation, *Fusarium solani*, *Pseudomonas stutzeri*

*Corresponding author

broad host range vector 인 pKT230(Km^R, Sm^R, 11.9 kb)을 사용하였다.

배지 및 배양조건

Plasmid 정제를 위한 *Pseudomonas putida* (pKT 230)의 배양에는 kanamycin sulfate를 최종농도가 100 µg/ml 되게 첨가한 LB broth에서 30°C, 160 rpm으로 15시간 진탕배양했으며, 생물방제균 *Pseudomonas stutzeri* YPL-1의 형질전환에는 LBG (LB broth supplemented with 20 mM glucose, pH 7.2)를 사용하여 종배양액을 1% (v/v) 접종하여 30°C에서 160 rpm으로 진탕배양하였다. Transformants 선별배지로는 100 µg/ml의 kanamycin sulfate를 함유한 LB agar plate를 사용하였으며 30°C에서 2일간 배양한 후 성장하는 colony를 선별하였다.

Plasmid의 분리 및 정제

Plasmid 공여균주인 *Pseudomonas putida*로부터 pKT230의 분리는 Kado 등의 방법(21)으로 plasmid DNA lysates를 제조하였고 PEG(4000) precipitation에 의해 정제하였다(22, 23).

Plasmid DNA 농도는 spectrophotometric assay에 의해 측정했다(29). Transformants로부터 plasmid 분리는 Birnboim 등의 방법(30)에 준하여 분리하였으며 0.8% horizontal agarose gel 상에서 5V/cm로 약 3시간 분리한 후 ethidium bromide (1 µg/ml)로 염색하여 UV transilluminator 상에서 관측했다.

Transformation

근부길항균 *Pseudomonas stutzeri* YPL-1의 형질전환은 Bagdasarian과 Timmis의 방법(18)을 약간 변형하여 행하였다. 즉, 30°C에서 진탕배양한 균체를 4°C에서 원심분리하여 수확한 후 배양액에 1/2 vol.의 ice-cold MRM solution (10 mM MOPS, pH 7.0, 10 mM RbCl, 100 mM MgCl₂)으로 씻어주고, 원심분리한 후 동일량의 ice-cold MRC solution (100 mM MOPS, pH 6.5, 10 mM RbCl, 100 mM CaCl₂)에 현탁하여 0°C에서 45분간 방치하였다.

Cell을 4°C에서 원침수거하고 1/10량의 cold MRC solution에 재분산시켜 0.2 ml을 취한 다음 정제된 plasmid DNA를 150~300 mg 첨가하여 0°C에서 60분간 처리하였다. 이 mixture를 42.5°C에서 90초 동안 열처리하고 나서 10배의 LB broth를 첨가하여 30°C에서 120분간 배양한 후 selective medium으로 transfor-

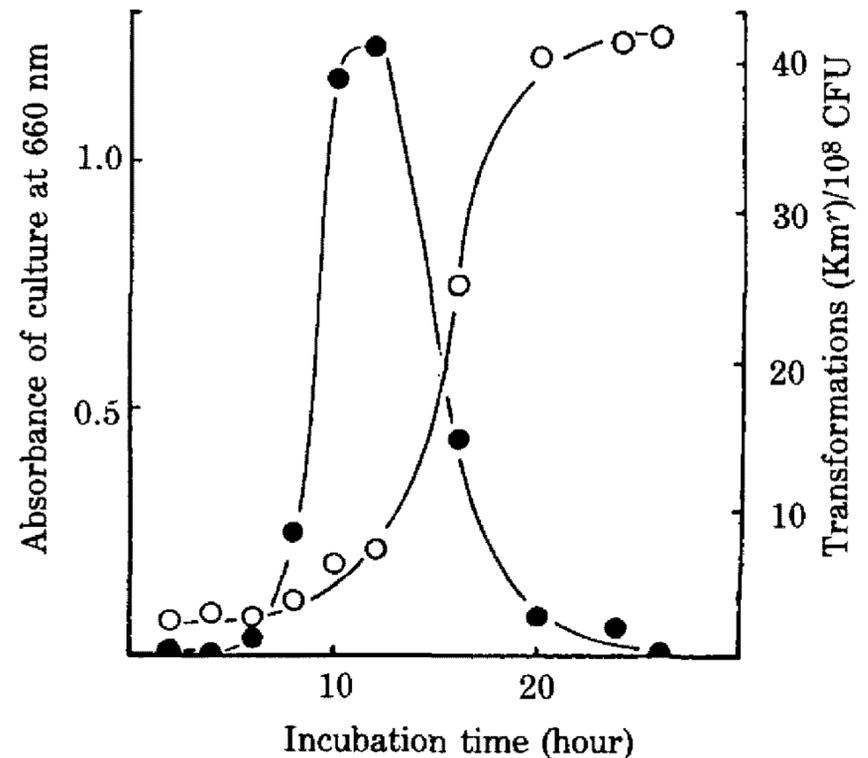


Fig. 1. Development of competence for *P. stutzeri* YPL-1 in LB broth.

Growth was started at an OD₆₆₀ = 0.02, corresponding 7 × 10⁵ CFU/ml.

○-○; Growth of *P. stutzeri* YPL-1

●-●; Number of kanamycin sulfate-resistant transformants per 10⁸ CFU of the recipients

ments를 선별했다.

결과 및 고찰

생육시기의 영향

Host인 생물방제균 *Pseudomonas stutzeri* YPL-1의 생육시기가 형질전환율에 어떠한 영향을 미치는가를 알아보기 위해서 LB broth에 종배양액을 O.D. (660 nm)가 0.02 되게 접종하여 30°C에서 160 rpm으로 진탕배양하면서 각 배양시간별로 균을 수확하여 Bagdasarian 등의 방법으로 형질전환시켜 본 결과 Fig. 1에서 보는 것과 같이 근부길항균 *Pseudomonas stutzeri* YPL-1의 형질전환에는 대수증식기 초기의 균체가 가장 적절하다는 것을 알 수 있었다. 이 결과는 대수증식기 후반기의 균을 형질전환에 사용한 *Pseudomonas aeruginosa* (13)나 대수증식기 끝부분에 형질전환 빈도가 최대를 보인 *Azotobacter* sp. (27)의 경우와는 상이하나 대수증식기 초반 또는 중반기의 균을 형질전환에 이용한 *E. coli* 형질전환 실험들(28-30)과 early exponential phase에서 maximum transformants을 얻은 *Staphylococcus aureus* (31)의 결과와는 유사하였다.

Plasmid DNA 접촉시간의 영향

Plasmid DNA와 *P. stutzeri* YPL-1의 competent

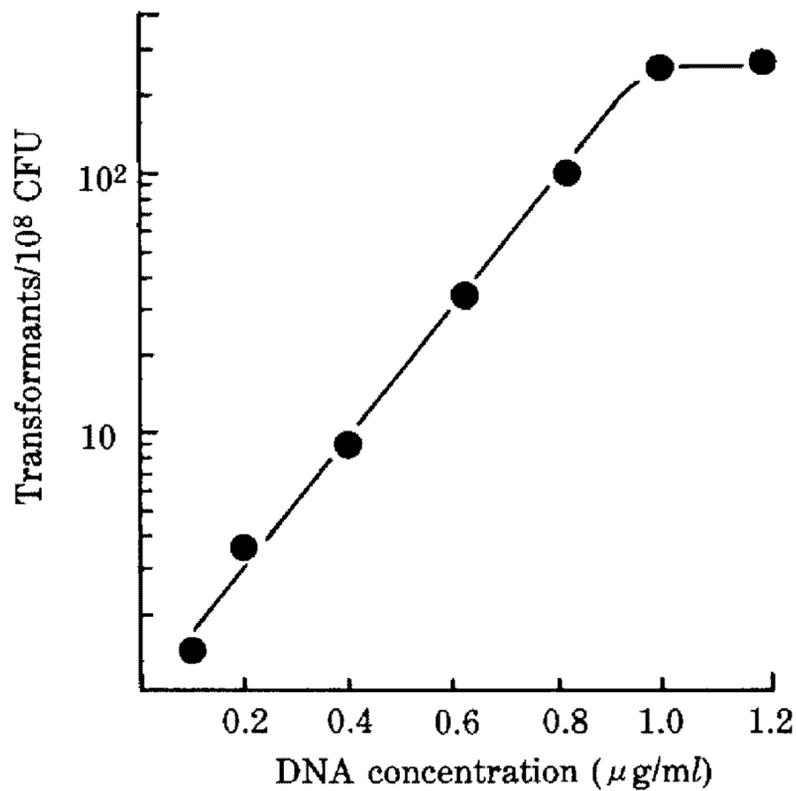


Fig. 2. Effect of DNA concentration on the transformation of *P. stutzeri* YPL-1.

Various concentrations of pKT230 isolated from *P. putida* (pKT230) were added to competence population of *P. stutzeri* YPL-1 and incubated for 60 minutes at 0°C

cell 과의 접촉시간이 형질전환 빈도에 미치는 영향을 조사하기 위해 0.2 ml의 competent cell suspension에 300 ng의 DNA를 첨가하여 0°C에서 각 시간별로 접촉시켰다. 그 결과 Fig. 2에 나타난 것과 같이 60분 이상 접촉시켜야만 형질전환율이 가장 높았다. *Hemophilus influenzae*의 25~30분(32), *Staphylococcus aureus*의 20분(31)과 *Bacillus* sp.의 15분(33) 후에 최고의 형질전환율을 나타냈다는 보고들과는 상이하지만, 형질전환시 contact time을 60분 동안 사용한 *Pseudomonas aeruginosa*(13)와 R-factor DNA에 의한 *E. coli*의 형질전환 실험에서 60분 동안의 contact time으로 최대의 형질전환체를 얻었다는 보고(34)와는 일치하였다. 이 결과들을 미루어 보면 *Pseudomonas*속의 경우가 다른 속의 세균보다는 DNA uptake에 필요한 시간이 길다고 사료된다.

Plasmid DNA 농도에 따른 영향

근부길항균 *P. stutzeri* YPL-1의 competent cell에 첨가될 plasmid DNA의 농도가 형질전환에 미치는 영향을 조사하기 위해 competent cell suspension 0.2 ml(약 1×10^8 /ml)에 정제된 plasmid DNA를 각 농도별로 첨가하여 형질전환시켜 보았다. 그 결과 Fig. 3에서 보는 것과 같이 1 μg/ml까지의 plasmid DNA를 첨가하였을 때는 형질전환 빈도가 농도와 비례해서 증가하였으나, 그 이상의 농도에서는 증가율이 감소되었다. 이 결과는

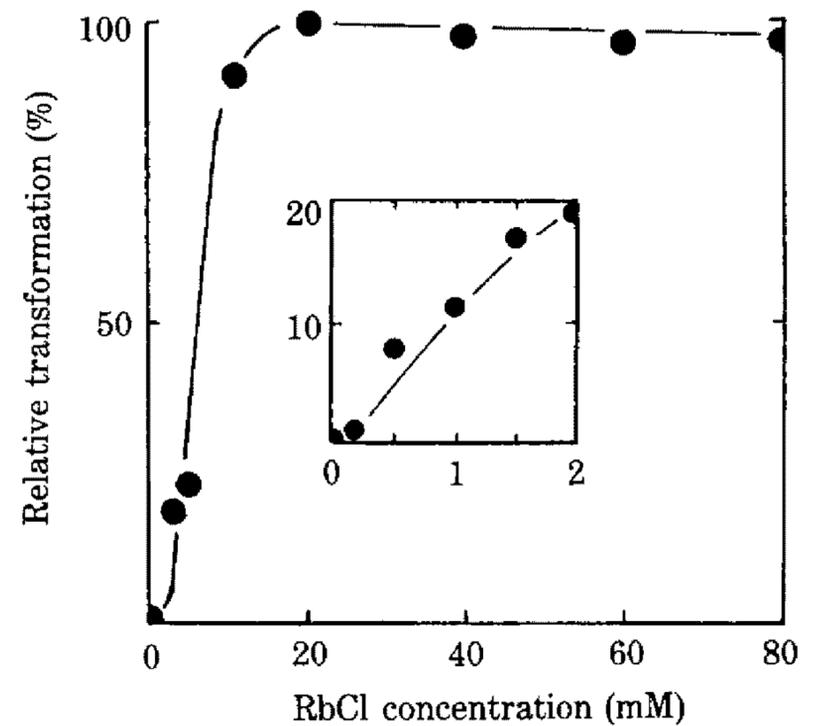


Fig. 3. Dependence of transformation upon RbCl concentration.

Cells of *P. stutzeri* YPL-1 were treated with different concentrations of RbCl, and samples were incubated at 0°C for 60 minutes. Inset, Results obtained when very low concentrations of RbCl were used are shown on a different scale

plasmid-rinked drug resistance factor DNA에 의한 *Pseudomonas putida*의 형질전환 실험(18)과 plasmid DNA에 의한 *Pseudomonas aeruginosa*의 형질전환 실험(13)의 2~3 μg/ml이나 5 μg/ml까지 비례적으로 증가했다는 보고보다는 적은 양이었지만 *Pseudomonas stutzeri* JM302을 대상으로한 wild type DNA의 형질전환 실험(35)의 결과와 *Bacillus subtilis*을 host로 사용한 형질전환 실험결과(44)와는 유사하게 나타났다. 이로 미루어 보아 생물방제균 *Pseudomonas stutzeri* YPL-1의 형질전환실험에서는 1 μg/ml 농도의 plasmid DNA를 사용하는 것이 가장 적합하다고 사료된다.

Rubidium chloride(RbCl) 농도의 영향

생물방제균 *Pseudomonas stutzeri* YPL-1의 형질전환 과정 중 plasmid DNA가 competent cell내로 uptake하는 과정에서 rubidium chloride 농도가 형질전환율에 어떠한 영향을 미치는가를 조사하기 위해서 100 mM MOPS(pH 6.5)와 100 mM CaCl₂를 함유한 chilled buffer에 RbCl를 각 농도별로 첨가하여 형질전환에 사용해 본 결과 Fig. 4에 나타난 것과 같이 20 mM 이상의 농도에서 최적의 형질전환 빈도를 나타내었다. 또한 본 실험에 사용된 생물방제균 *P. stutzeri* YPL-1의 형질전환에는 RbCl가 requirement element로 필수적이란 사실 또한 알았다.

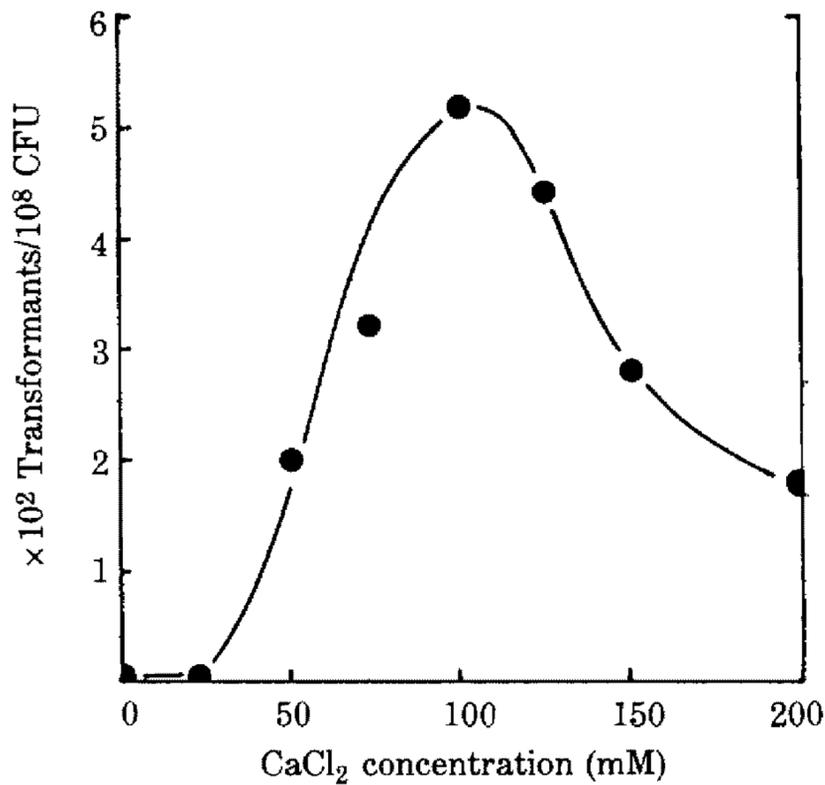


Fig. 4. Effect of the concentration of CaCl₂ on the transformation of *P.stutzeri* YPL-1.

Competent cells (*P.stutzeri* YPL-1) were suspended in cold transformation buffer (100 mM MOPS, 10 mM RbCl) containing different concentrations of CaCl₂ before pKT230 was added

Calcium chloride 농도의 영향

DNA uptake 을 촉진하는 Ca²⁺의 명확한 역할은 분명 하지 않으나 divalent cation 은 거의 대부분의 형질전환 실험에서 사용되고 있다(13-22, 31-35). 특히, 형질전환 과정에서 Ca²⁺의 역할이 gram negative bacteria 의 outer membrane 의 lipopolysaccharide 와 protein 의 dramatic rearrangements 을 야기시켜 DNA molecules 의 binding 과 inward transport 을 한다는 보고(40)와 DNA binding protein 을 노출시켜서 cytoplasm 으로 DNA 을 transport 하는 필수인자라는 보고(41, 42)에 따라 생물방제균 *P. stutzeri* YPL-1 의 형질전환에도 Ca²⁺의 농도가 어떠한 영향을 미치는가를 조사하기 위해 transformation buffer (100 mM MOPS, 10 mM RbCl)에 CaCl₂를 농도별로 첨가하여 형질전환시켜 본 결과 Fig.5 에서 나타난 것과 같이 *P. stutzeri* YPL-1 의 형질전환에는 0.1M CaCl₂가 가장 효과적인 plasmid DNA uptake 을 야기시키는 것 같았다.

이 결과는 *P. aeruginosa* 의 형질전환 실험에서의 CaCl₂의 농도가 0.05M에서 최적을 보인 Mercer 등의 보고(16)와 30mM의 CaCl₂을 형질전환에 사용한 Sano 등의 실험(13)과는 약간의 차이를 보여주었으나, 0.1M의 CaCl₂을 사용한 *P. savastanoi* 형질전환 실험(24)과 *P. putida* 형질전환 실험에서 0.1M CaCl₂에서 최대의 형질전환 빈도를 나타낸 Chakrabarty 등의 보고

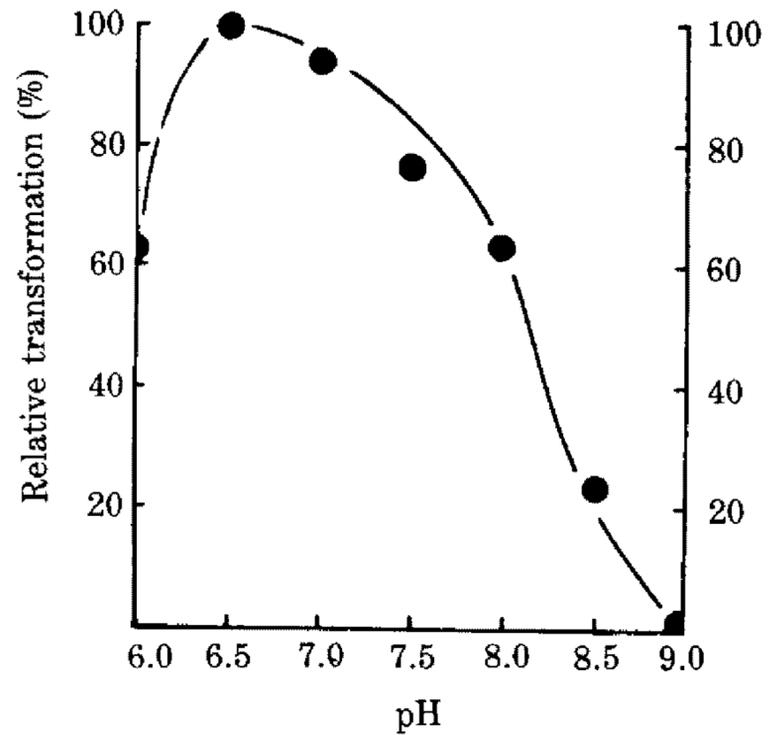


Fig. 5. Effect of pH on the transformation of *P.stutzeri* YPL-1.

The competent cells were mixed with pKT230 at different pH in transformation buffer containing 100 mM MOPS, 10 mM RbCl and 100 mM CaCl₂

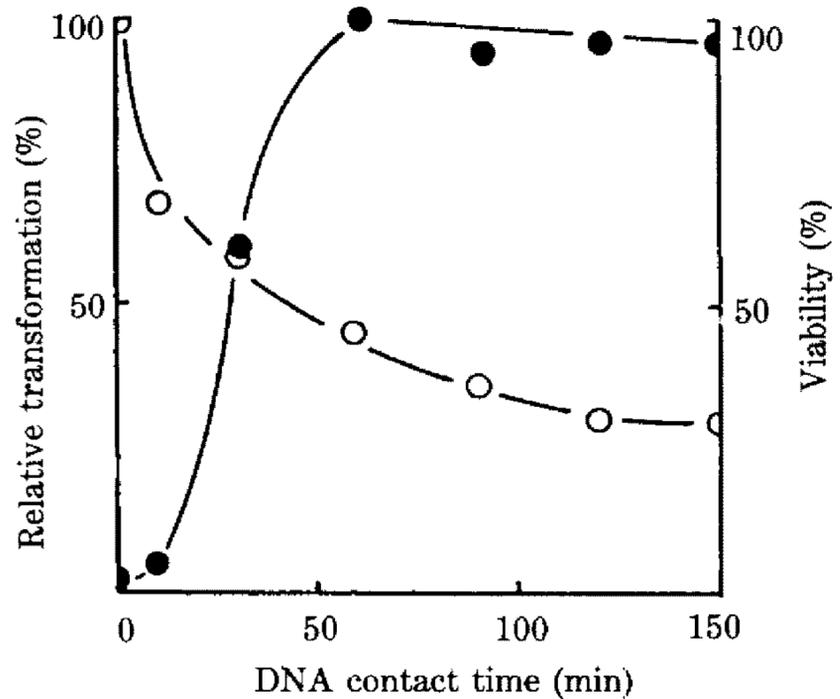


Fig. 6. Kinetic of DNA uptake.

A competent population of *P.stutzeri* YPL-1 was incubated at 0°C with pKT230 (0.3 μg/ml) for various intervals of time

○—○; Viability ●—●; Relative transformation

(21)와는 동일한 결과였다.

pH의 영향

생물방제균 *P. stutzeri* YPL-1 의 형질전환에 미치는 pH의 영향을 조사해 보기 위해 transformation buffer (100 mM MOPS, 10 mM RbCl, 100 mM CaCl₂)의 pH를 0.1N NaOH로 조정하여 각 pH별로 형질전환시켜 보았다. 그 결과 Fig.6에 나타난 것과 같이 pH6.5에서 최대의 형질전환빈도를 나타내었으며 이후 증가된 pH에

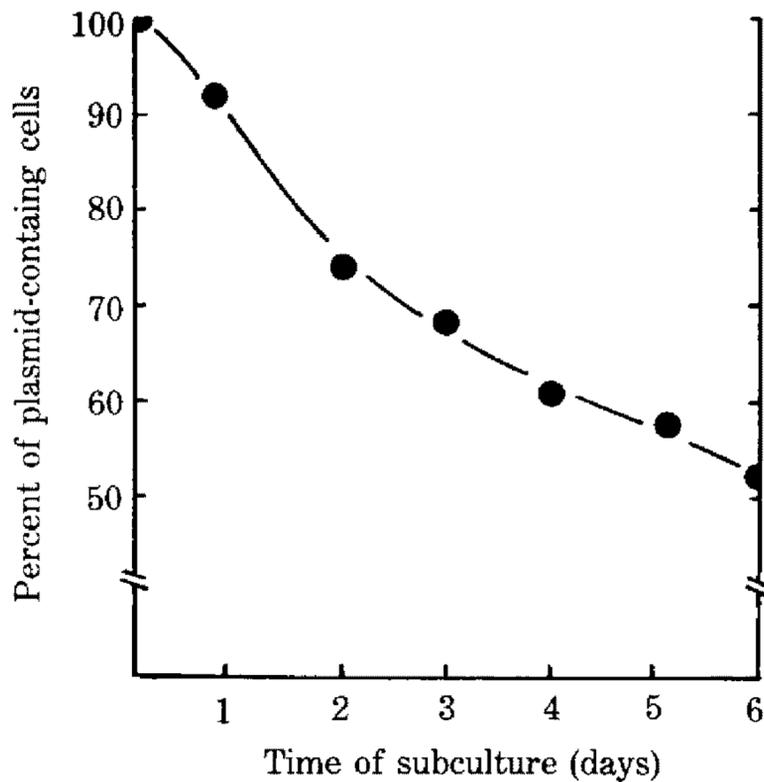


Fig. 7. Stability of pKT230.

P. stutzeri YPL-1 carrying pKT230 was subcultured on LB agar plates with kanamycin sulfate (100 μ g/ml) and without

$$\text{Stability} = \frac{\text{colony number on selective medium}}{\text{colony number on non-selective medium}} \times 100$$

서는 형질전환율이 급격히 감소되어 pH 8.5 이상에서는 약 80% 이상 감소되어 pH 9.0에서는 transformants가 나타나지 않았다. 이는 *Bacillus subtilis*의 형질전환 실험 (43)과 *Staphylococcus aureus* (35)에서의 중성부근에서 최고의 형질전환율을 나타냈으며 pH 7.5 이상에서는 형질전환율이 급격히 감소되었다는 결과와는 약간의 차이가 있었으나 약산성부근 (pH 6.4~6.8)에서 형질전환이 최대의 peak에 도달한다는 Chung 등의 보고 (34)와는 아주 유사한 결과였다. 이는 세균의 생육에 가장 적합한 중성부근의 pH 영역이 외래 DNA uptake 능력도 가장 활발하다는 것으로 추정할 수 있었다.

Plasmid의 안정성 및 확인

일단 plasmid에 의해 transformation된 transformants 내에서의 pKT230의 안정성을 조사하기 위해 항생제가 함유되지 않은 비선택배지에서 생육시키면서 항생제 내성형질을 상실하는 빈도를 비선택배지인 LB agar plate 상에 나타난 colony 수를 백분율로 해서 조사해 본 결과 Fig. 7에서 보는 것과 같이 6일 경과하여도 50% 이상의 내성형질을 유지하였다.

이상의 실험결과에서 얻어진 형질전환의 최적조건으로 transformation을 행하여 얻은 transformants에서 완전한 pKT230의 존재를 확인하기 위해 selective medium에서 얻은 colony를 분리하여 alkaline lysis

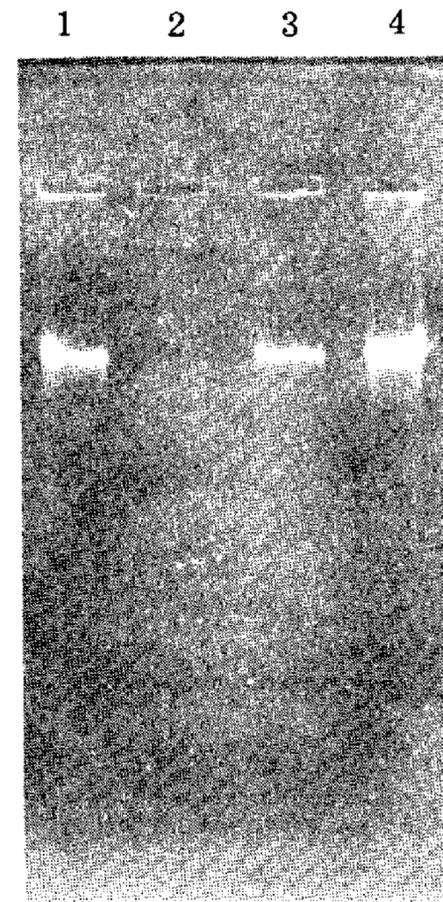


Fig. 8. Agarose gel electrophoresis of pKT230 plasmid DNA obtained from the transformant of *P. stutzeri* YPL-1.

Lane 1; Standard pKT230, 2; *P. stutzeri* YPL-1, 3; Transformant of pKT230, 4; *P. putida* (pKT230)

method로 그 plasmid의 존재유무를 확인한 결과 Fig. 8에 나타난 것과 같이 정제된 pKT230과 같은 위치에 band가 확인된 것으로 보아 크기의 변화없이 transformant인 *P. stutzeri* YPL-1 내에서 안전하게 복제됨을 알 수 있었다. 한편, 최적조건하에서의 형질전환 빈도는 $2.0 \sim 6.0 \times 10^{-6}$ 정도로 나타났다.

요 약

식물근부균 *Fusarium solani*의 생육을 강력히 길항하는 생물방제균 *Pseudomonas stutzeri* YPL-1에 외부유전자 도입을 통한 유전공학적 육종방법의 기초를 확립하고자 하였다. 이를 위해 plasmid pKT230을 vector로 하여 형질전환의 가능성을 조사하였으며 이 때, 형질전환에 필요한 최적조건을 조사한 결과 *P. stutzeri* YPL-1의 형질전환에는 대수증식기 초기의 균체가 가장 적합하였고, 20 mM RbCl과 100 mM CaCl₂를 함유한 냉각용액에 1 μ g/ml의 plasmid DNA를 첨가하였을 때 최대의 형질전환 빈도를 나타내었다. 또한 plasmid DNA와 competent cell을 혼합한 후 0°C에서 60분간 처리하는 것이 가장 효과적이었으며 이와 같은 조건에서 형질전환 빈도는 $2 \sim 6 \times 10^{-6}$ 으로 나타났다.

참고문헌

1. Papavizas, G.C. and R.D. Lumsden: *Ann. Rev. Phytopathol.*, **18**, 389 (1980).
2. Blakeman, J.P. and N.J. Fokkema: *Ann. Rev. Phytopathol.*, **20**, 167 (1982).
3. Cook, R.J.: *Phytopathol.* **75**, 25 (1985).
4. Baker, R.: Biological control of plant pathogens, Biological control in agricultures IMP systems, Academic Press, Inc., p.25 (1985).
5. Henis, Y. and I. Chet: *Adv. Appl. Microbiol.* **19**, 85 (1975).
6. Lim, H.S. and S.D. Kim: *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.* **18**, 81 (1990).
7. Xu, G.W. and D.C. Gross: *Phytopathol.* **76**, 414 (1985).
8. Rothrock, C.S. and D. Gottlieb: *Can. J. Microbiol.* **30**, 1440 (1984).
9. Thomashow, L.S. and D.M. Weller: *J. Bacteriol.* **170**, 3499 (1988).
10. Elad, Y. and R. Baker: *Phytopathol.* **75**, 1047 (1985).
11. Leong, J.: *Ann. Rev. Phytopathol.*, **24**, 187 (1986).
12. Becker, J.O. and R.J. Cook: *Ecology and Epidemiology*, **78**, 778 (1988).
13. Sano, Y. and M. Kageyama: *J. Gen. Appl. Microbiology*, **23**, 183 (1977).
14. Nagahai, K. and K. Sakaguchi: *J. Bacteriol.* **134**, 1527 (1978).
15. Sinclair, M.I. and A.F. Morgan: *Aust. J. Biol. Sci.* **31**, 679 (1978).
16. Mercer, A.A. and J.S. Loutit: *J. Bacteriol.* **140**, 37 (1979).
17. Haque, H.: *Mol. Gen. Genet.* **171**, 107 (1979).
18. Bagdasarian, M. and K.N. Timmis: *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **96**, 47 (1981).
19. Olsen, R.H., G. Debusschen and W.R. McCombie: *J. Bacteriol.* **150**, 60 (1982).
20. Potter, A.A. and J.S. Loutit: *J. Bacteriol.* **151**, 1204 (1982).
21. Chakrabarty, A.M., D.E. Mylroie, D.A. Friello and J.G. Vacca: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 3647 (1975).
22. Johnston, J.B. and I.C. Gunsalus: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **75**, 13 (1977).
23. Gantotti, B.V., S.S. Patill and M. Mandel: *Mol. Gen. Genet.* **174**, 101 (1979).
24. Comai, L. and T. Kosuge: *J. Bacteriol.* **143**, 950 (1980).
25. Bagdasarian, M., R. Lurz, B. Ruckert, F.C.H. Franklin, M.M. Bagdasarian, J. Frey and K.N. Timmis: *Gene*, **16**, 237 (1982).
26. Kado, C.I. and S.T. Liu: *J. Bacteriol.* **145**, 1365 (1981).
27. Lis, J.T.: *Methods Enzymol.* **65**, 347 (1980).
28. Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, **1**, 40 (1989).
29. Iykind, J.W. and S.I. Bernstein: *Recombinant DNA Laboratory Manual*, Academic Press, Inc., p.17 (1989).
30. Birnboim, H.C. and J. Doly: *Nucleic Acids Res.*, **7**, 1513 (1979).
31. Page, W.J. and H.L. Sadoff: *J. Bacteriol.* **125**, 1080 (1976).
32. Norgard, M.V., K. Keem and J.J. Monaham: *Gens.* **3**, 279 (1978).
33. Dagert, M. and S.D. Ehrlich: *Gene*, **6**, 23 (1979).
34. Chung, C.T., S.L. Neimela and R. H. Miller: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 2172 (1989).
35. Rudin, L., J. Sjostrom, M. Lindberg and L. Philipson: *J. Bacteriol.* **118**, 155 (1974).
36. Goodgar, S.H.: *J. Gen. Physiol.* **45**, 205 (1961).
37. Riva, S. and M. Polsinelli: *J. Virol.* **2**, 587 (1968).
38. Cohen, S.N., A.C.Y. Chang and L. Hsu: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 2110 (1972).
39. Carlson, C.A., L.S. Pierson, J.J. Rosen and J.L. Ingraham: *J. Bacteriol.* **153**, 93 (1983).
40. van Alphen, L., A. Verkleij, J. Leunissen-Bijvelt and B. Lugtenberg: *J. Bacteriol.* **134**, 1089 (1978).
41. Overath, P., M. Brenner, T. Gulik-Krzywicki, E. Sheckter and L. Letellier: *Biochem. Biophys. Acta*, **389**, 358 (1975).
42. Sabelnikov, A.G. and I.V. Domaradsky: *Mole. Gen. Genet.*, **172**, 313 (1979).
43. Yong, F.E. and J. Spinzzen: *J. Bacteriol.*, **86**, 392 (1963).
44. Anagnostopoulos, C. and J. Spizzen: *J. Bacteriol.*, **81**, 741 (1961).

(Received June 27, 1990)