

***Agrobacterium tumefaciens* KU12로부터 Octopine형 Ti 및 잠재 플라스미드의 제거에 의한 숙주 개발**

하운환 · 이용욱 · 문혜연¹ · 심용섭*

고려대학교 이과대학 생물학과 ¹대구대학교 공과대학 생물공학과

Agrobacterium tumefaciens KU12내에 존재하는 240 kb 크기의 octopine형 Ti 플라스미드인 pTiKU12와 45 kb 크기의 잠재 플라스미드인 pTi12를 제거하여 무독성의 *A. tumefaciens* 균주를 제조하였다. Octopine형 Ti 플라스미드인 pTiKU12는 고온(37°C)에서의 배양과 ethidium bromide가 첨가되어 있는 배지에서 배양을 각각 실시하여 제거하였으며, 잠재 플라스미드인 pTi12는 pTi12의 복제기원이 클로닝되어 있는 제조합 플라스미드인 pYWXP와의 비화합성을 이용하여 제거하였다. pYWXP는 ethidium bromide가 첨가되어 있는 배지에서 고온(37°C)으로 배양하여 제거하였다.

KEY WORDS □ *Agrobacterium tumefaciens*, plasmids, avirulent strain

*Agrobacterium tumefaciens*는 Rhizobiaceae과에 속하는 병원성 그람 음성 세균(13)으로 대부분의 쌍자엽식물과 소수의 단자엽 식물의 상처부위가 이들 *Agrobacterium* 균주에 의해 감염되면 crown gall이라는 종양이 유발되며(8, 11), 종양을 유발할 수 있는 *A. tumefaciens*내에는 Tumor-inducing(Ti) 플라스미드라고 부르는 크기가 200~250 kb에 달하는 매우 커다란 플라스미드가 존재한다(18, 20). 현재 이러한 Ti 플라스미드가 제거되어 종양형성능이 없는 균주로서 널리 사용되고 있는 균주로는 *A. tumefaciens* A136이 있다(18). A136은 *A. tumefaciens* C58 균주(4)를 37°C에서 배양하여 균주내에 존재하는 nopaline형 Ti 플라스미드인 pTiC58을 제거한 균주로서 많은 유전적 및 생리적인 실험의 숙주로 널리 사용되고 있다(16, 18).

이처럼 Ti 플라스미드가 제거된 무독성의 균주는 vir 유전자의 발현 및 T-DNA의 전달과정을 조사하는데 이용되어져 왔으며(7), *Agrobacterium*에 의한 종양형성과정의 유전적, 생리적 분석에 유용하게 사용될 수 있다(16, 17). Nopaline형 *Agrobacterium* 균주인 C58은 최적성장온도인 28°C보다 높은 37°C에서의 배양만으로도 쉽게 Ti 플라스미드의 일부 또는 전체가 제거된 무독성의 균주를 제조할 수 있었으나(17), octopine형 *Agrobacterium* 균주의 경우에는 nopaline형 균주와는 달리 Ti 플라스미드의 제거가 매우 어려운 것으로 알려져 있으며(3, 9), 아직 octopine형 Ti 플라스미드가 제거된 균주는 보고된 예가 없다.

따라서 지금까지 *Agrobacterium*에 의한 종양형성 과정의 유전적, 생리적 분석에는 사용되고 있는 Ti 플라스미드의 형에 관계없이 nopaline형 Ti 플라스

미드를 제거하여 얻은 무독성의 숙주를 이용한 실험이 대부분이었다(7). 그러나 nopaline형과 octopine형의 균주는 특성상 차이가 있을 것으로 사료되므로 *Agrobacterium*에 의한 종양형성과정의 연구에 있어 octopine형 Ti 플라스미드가 제거된 무독성 균주의 제조는 반드시 필요하다고 사료되어, 본 연구에서는 octopine형 *Agrobacterium* 균주인 *A. tumefaciens* KU12(5)내에 존재하는 octopine형 Ti 플라스미드인 pTiKU12를 제거하여 무독성의 *Agrobacterium* 균주를 제조함으로써 향후 *Agrobacterium*에 의한 종양형성과정의 유전적, 생리적 분석에 nopaline형 Ti 플라스미드를 제거하여 얻은 *Agrobacterium* 균주와 함께 유용하게 이용하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

본 연구에 사용된 균주는 다음과 같다. *A. tumefaciens* KU12는 국내에서 분리된 균주(5)로서 octopine형 Ti 플라스미드인 240 kb 크기의 pTiKU12와 잠재 플라스미드인 45 kb 크기의 pTi12가 포함되어 있으며(12), *A. tumefaciens* KU911은 플라스미드를 가지고 있지 않은 *A. tumefaciens* A136에 pTiKU12를 형질전환시켜 제조한 균주이다(12). 이들 균주는 MG/L 배지(6)와 AB 최소배지(6)를 사용하여 최적 성장온도인 28°C에서 배양하였다.

플라스미드의 분리

플라스미드의 제거를 확인하기 위한 플라스미드의 소량분리는 Birnboim과 Doly(2)의 방법을 사용하였으며, 대량분리는 Marco 등(14)의 방법을 사용하였다. *A. tumefaciens* KU12의 성장에 미치는 EtBr의 영향

Ethidium bromide(EtBr)가 각각 50, 80, 110, 140, 170, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 포함되어 있는 MG/L 배지에 전배양한 *A. tumefaciens* KU12를 배지 1 ml당 균체수가 100 cfu가 되도록 접종한 다음 최적성장온도인 28°C에서 2일간 진탕배양하였다. 배양한 균주를 MG/L 한천배지에 각각 100 μl 씩 도말하여 28°C에서 배양한 후, 성장된 개체수를 조사하여 균체의 성장에 미치는 EtBr의 영향을 조사하였다.

A. tumefaciens KU12의 성장에 미치는 온도의 영향

전배양한 *A. tumefaciens* KU12를 MG/L 배지 1 ml당 균체수가 100 cfu가 되도록 접종하여 고온인 37°C에서 2일간 진탕배양하였다. 배양한 균주를 다시 EtBr이 각각 80, 110, 140 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 포함되어 있는 MG/L 배지에 다시 각각 균체수가 배지 1 ml당 100 cfu가 되도록 접종하여 28°C에서 2일간 진탕배양한 후, 배양액 100 μl 씩을 MG/L 한천배지에 도말하여 28°C와 37°C에서 각각 배양한 다음 성장된 개체수를 조사하였다.

A. tumefaciens KU12내에 존재하는 pTiKU12의 제거

EtBr이 각각 80, 110, 140 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 포함되어 있는 MG/L 배지에 37°C에서 2일간 전배양한 *A. tumefaciens* KU12를 배지 1 ml당 균체수가 300 cfu가 되도록 접종한 다음 최적성장온도인 28°C에서 2일간 진탕배양하였다. 배양한 균주를 MG/L 한천배지에 각각 100 μl 씩 도말하여 37°C에서 3일간 배양한 후, 성장된 각 균체를 MG/L 한천배지와 질소원으로 octopine(0.01% w/v)이 첨가된 AB 최소배지에 각각 접종하여 octopine이 포함되어있는 AB 최소배지에서 성장하지 못하는 균주를 선별하였다.

A. tumefaciens KU12C1내에 존재하는 pTi12의 제거

pTi12의 복제기원을 pUC19에 결합시켜 제조한 5.14 kb 크기의 플라스미드인 pYWXP(12)를 direct transformation(1) 방법으로 *A. tumefaciens* KU12C1에 형질전환시킨 후 carbenicillin이 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 포함되어 있는 AB 한천배지에 도말하여 pYWXP에 의해 형질전환된 균주를 선별하였다. 선별된 균주를 carbenicillin이 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 포함되어있는 AB 한천배지에서 5회에 걸쳐 계대배양하여 pTi12가 제거된 균주를 선별하였다.

A. tumefaciens KU12C2내에 존재하는 pYWXP의 제거

EtBr이 각각 30, 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 포함되어 있는 MG/L 배지에 37°C에서 1일간 전배양한 *A. tumefaciens* KU12C2를 배지 1 ml당 균체수가 6.0×10^6 cfu가 되도록 접종한 다음 고온인 37°C에서 1일간 진탕배양하였다. 배양한 균주를 MG/L 한천배지에 각각 100 μl 씩 도말하여 최적성장온도인 28°C에서 2일간 배양한 후, 성장된 각 균체를 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 carbenicillin이 포함되어 있는 AB 한천배지와 포함되어 있지 않은 AB 한천배지에 각각 접종하여

carbenicillin이 포함되어 있지 않은 AB 한천배지에서만 성장하는 균주를 선별하였다.

Southern hybridization

A. tumefaciens KU12내에 존재하는 pTiKU12의 제거는 *A. tumefaciens* KU911에서 분리된 pTiKU12를 제한효소로 처리한 다음 nick translation kit (Bethesda Research Laboratories)를 이용하여 ^{32}P 로 표지된 탐침을 사용하여 Southern(15)의 방법에 따라 hybridization을 실시하여 확인하였다.

Direct transformation

A. tumefaciens KU12에서 pTiKU12가 제거된 KU12C1내에 포함되어 있는 pTi12를 비화합성을 이용하여 제거하기 위하여 pTi12의 복제기원이 클로닝되어 있는 재조합 플라스미드인 pYWXP를 An(1)의 방법에 따라 KU12C1에 형질전환시켰다. An의 방법에 따라 제조된 수용체 200 μl 에 1 μg 의 pYWXP 표품을 부가 혼합하여 형질전환시킨 후, carbenicillin이 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 포함되어 있는 MG/L 한천배지에 도말하여 pYWXP에 의해 형질전환된 형질전환체를 선별하였다.

결과 및 고찰

A. tumefaciens KU12내에 존재하는 pTiKU12의 제거

Nopaline형 *A. tumefaciens* C58은 최적성장온도인 28°C가 아닌 고온인 37°C에서 5일간 배양하여 pTiC58이 제거된 균주를 제조할 수 있었으나(17, 18), 이 방법에 의해서는 octopine형 *A. tumefaciens*내의 플라스미드는 제거되지 않는 것으로 알려져 있다(3, 9, 16). 따라서 본 실험에서는 nopaline형 Ti 플라스미드를 제거시키는데 사용된 방법을 변형하여 *A. tumefaciens* KU12내에 존재하는 octopine형 Ti 플라스미드인 pTiKU12를 제거하였다. 일반적으로 플라스미드의 제거에 널리 사용되는 화학물중의 하나인 EtBr을 이용하여 KU12내에 존재하는 플라스미드를 제거하기 위하여 우선 EtBr이 균체의 성장에 미치는 영향을 조사하였으며 그 결과는 Table 1과 같다. 플라스미드의 제거는 접종하는 균의 밀도가 높은 경우보다 낮을 때 보다 더 효과적이라는 보고(3)에 따라 EtBr이 포함되어 있는 MG/L 배지 1 ml 당 균체수가 100 cfu가 되도록 접종하였으며 28°C에서 배양한 후 균체의 증감여부를 조사한 결과, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 EtBr 농도에서는 접종한 균체수에 비해 300~500배나 증가하였으나, 170 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 농도에서는 균체가 전혀 확인되지 않았다. 따라서 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 EtBr이 균체의 성장에 별다른 영향을 주지 못하나 170 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 EtBr 농도에서는 균체가 사멸되는 것으로 사료된다. 이러한 결과에 따라 균체의 성장을 거의 정지시키는 80, 110, 140 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 EtBr 농도에서 KU12를 각각 2일동안 배양한 후, MG/L 한천배지에 도말하여 나타난 균체들을 MG/L 한천배지와 Lec

Table 1. The effect of ethidium bromide(EtBr) on the growth of *A. tumefaciens* KU12.

Concentrations of EtBr ($\mu\text{g/ml}$)					
50	80	110	140	170	200
++++	+++	++	+	-	-

A. tumefaciens KU12 was inoculated in MG/L medium containing 50, 80, 110, 140, 170 and 200 $\mu\text{g/ml}$ of EtBr and cultured at 28°C for 2 days. This cultured strain was spreaded on MG/L agar plate and incubated at 28°C.

-, 0 cfu; +, 1~9 cfu; ++, 10~99 cfu; +++, 100~999 cfu; +++++, 1000~9999 cfu (cfu: the colony forming units on MG/L agar plate).

(12)에서 사용한 질소원으로 NH_4Cl 대신 Ti 플라스미드를 포함하고 있는 균주에 대해서만 이용이 가능한 octopine(0.01% w/v)이 첨가된 AB 최소배지에 각각 접종하여 28°C에서 배양하였으나, MG/L 한천배지에서만 성장이 가능한 Ti 플라스미드가 제거된 균주를 얻지 못하였다. 이처럼 플라스미드의 제거에 이용된 EtBr에 대해서는 KU12 균주내에 포함되어 있는 Ti 플라스미드가 제거되지 않았으므로, nopaline형 *Agrobacterium* 균주에서 Ti 플라스미드를 제거하는데 이용된 고온(37°C)이 octopine형 *Agrobacterium*인 KU12의 성장에는 어떠한 영향을 미치는가를 조사하였으며 그 결과는 Table 2와 같다. 전배양을 최적 성장온도인 28°C가 아닌 37°C에서 실시한 다음 EtBr이 포함되어 있는 배지에 접종하여 최적성장온도인 28°C에서 Table 1과 동일하게 2일간 배양한 후 MG/L 한천배지에 도말하여 28°C에서 배양한 경우(Table 2, A)에는 110 $\mu\text{g/ml}$ 과 140 $\mu\text{g/ml}$ 의 EtBr 농도에서 Table 1의 결과와 달리 균체가 확인되지 않았으며, 80 $\mu\text{g/ml}$ 의 EtBr 농도에서는 균체 수가 약 1/10 정도로 감소되었다. 또 전배양과 MG/L 한천배지에 도말한 다음의 배양을 고온인 37°C에서 실시한 경우에는(Table 2, B), 조건 A와 동일한 양상을 나타내었으나 80 $\mu\text{g/ml}$ 의 EtBr 농도에서는 조건 A보다 균체의 수가 1/10로 더욱 감소하였다. 이러한 결과는 고온인 37°C가 nopaline형 *Agrobacterium* 균주와 동일하게 KU12 균주의 안정성에도 상당한 영향을 미친다는 것을 의미하는 것이다. 그러나 이러한 조건으로 처리하여 얻은 균체를 EtBr만을 처리한 경우와 동일하게 MG/L 한천배지와 질소원으로 octopine이 첨가된 AB 최소배지를 이용하여 Ti 플라스미드가 제거되었는지를 조사하였으나 Ti 플라스미드가 제거된 균주를 얻지는 못하였다. 이와같은 결과는 이미 보고된 것처럼 octopine형 Ti 플라스미드가 매우 안정하여 위와같은 조건하에서는 제거가 되지 않는다는 것을 의미하는 것으로서 균체의 안정성에 보다 큰 영향을 미치는 조건이 필요하다고 사

Table 2. The effect of temperature on the growth of *A. tumefaciens* KU12.

Item	Incubation temperature		Concentrations of EtBr ($\mu\text{g/ml}$)		
	Preculture	Plate	80	110	140
A	37°C	28°C	++	-	-
B	37°C	37°C	+	-	-

The preculture of *A. tumefaciens* KU12 was grown in MG/L medium at 37°C for 2 days. It was inoculated in MG/L medium containing 80, 110 and 140 $\mu\text{g/ml}$ of EtBr and cultured at 28°C for 2 days. This cultured strain was spreaded on MG/L agar plates and they were incubated at 28°C and 37°C respectively.

-, 0 cfu; +, 1~9 cfu; ++, 10~99 cfu.

Table 3. Loss of pTiKU12 by the elevated temperature (37°C) and by the ethidium bromide treatments.

Inoculum concentration of Strain	Concentrations of EtBr ($\mu\text{g/ml}$)		
	80	110	140
KU12 in Mainculture			
10^2 cell/ml	0	0	0
3×10^2 cells/ml	0	1	0

The preculture of *A. tumefaciens* KU12 was grown in MG/L medium at 37°C for 2 days. It was inoculated in MG/L medium containing 80, 110 and 140 $\mu\text{g/ml}$ of EtBr and cultured at 28°C for 2 days. This cultured strain was spreaded on MG/L agar plate and incubated at 37°C for 3 days.

Numbers represent the number of avirulent colony on AB-N+Octopine plate.

료되어, 28°C에서 배양하였을 때 EtBr에 의해 균체의 성장이 거의 정지되고 37°C에서 배양하였을 때는 균체가 확인되지 않은 110 $\mu\text{g/ml}$ 과 140 $\mu\text{g/ml}$ 의 EtBr 농도와 37°C 온도조건에서 플라스미드 제거를 실시하였다(Table 3). 그러나 37°C로 처리한 경우 110 $\mu\text{g/ml}$ 과 140 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 배지 1 ml당 접종하는 균체수가 100 cfu일 때 균체가 확인되지 않았으므로(Table 2), 배지 1 ml당 300 cfu의 균체를 접종하여 Table 2의 조건 B와 동일하게 처리하였다. 그 결과 80 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 36 cfu의 균체를, 110 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 13 cfu의 균체를 그리고 140 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 6 cfu의 균체를 얻을 수 있었으며, 얻어진 각 균체를 MG/L 한천배지와 질소원으로 octopine이 첨가된 AB 최소배지에 각각 접종한 후 배양한 결과, 110 $\mu\text{g/ml}$ 의 EtBr 농도에서 배양하였을 때 얻은 13 cfu의 균체중에서 octopine이 포함되어 있는 AB 배지에서는 성장하지 못하는 Ti 플라스미

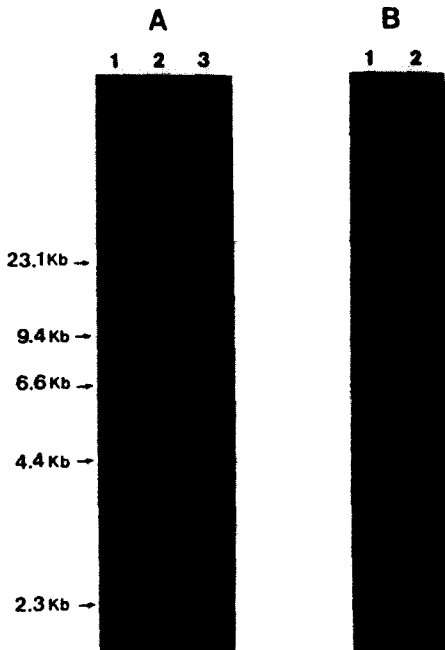


Fig. 1. Identification of curing of octopine type Ti plasmid, pTiKU12, by Southern blot hybridization.

(A) HindIII digested fragments of plasmids isolated from *A. tumefaciens* KU12 (lane 1) and KU12C1 (lane 2); lane 3, λ HindIII digested fragments.

(B) autoradiographs of same fragments probed with 32 P-labelled total pTiKU12 DNA isolated from *A. tumefaciens* KU911.

드인 pTiKU12가 제거된 1개의 균주를 분리하였으며 분리된 균주는 *A. tumefaciens* KU12C1으로 명명하였다.

A. tumefaciens A136에 pTiKU12를 형질전환시켜 제조된 KU911 균주(12)에서 분리한 pTiKU12 플라스미드를 32 P로 표지하여 제조한 탐침을 이용하여, *A. tumefaciens* KU12C1내에 pTiKU12 플라스미드가 완전히 제거되었는가를 Southern(15)의 방법에 따라 hybridization을 실시하여 확인한 결과 pTiKU12 플라스미드를 포함하고 있는 KU12 균주에서 분리된 플라스미드 표본은 탐침과 매우 강한 결합을 나타내었으나(Fig. 1, lane 2), KU12C1 균주에서 분리된 표본내에는 탐침과 동질성을 가진 부분이 존재하지 않았다(Fig. 1, lane 3). 위와 같은 결과는 *A. tumefaciens* KU12내에 존재하는 pTiKU12 플라스미드가 KU12C1 균주내에서는 완전히 제거되어 있음을 의미하는 것으로 사료된다.

A. tumefaciens KU12C1내에 존재하는 pTi12의 제거

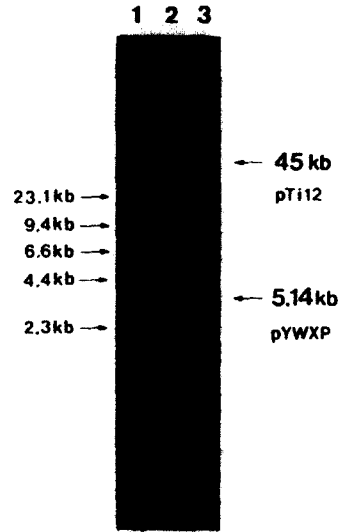


Fig. 2. Plasmid screens of *A. tumefaciens* KU12C1 and KU12C2.

Agarose gel electrophoresis was carried out at 10V/cm on 0.7% agarose gel. lane 1, λ HindIII digested fragments; lane 2, plasmid isolated from *A. tumefaciens* KU12C1; lane 3, plasmid isolated from *A. tumefaciens* KU12C2.

A. tumefaciens KU12C1내에는 잠재 플라스미드인 pTi12가 존재하는데 pTi12의 특성은 현재 명확하게 알려져 있지 않다. pTiKU12를 제거시킨 110 μ g/ml 농도의 EtBr이 포함되어 있는 배지에 37°C에서 전배양한 균체 300 cfu를 접종하여 28°C에서 48시간동안 배양한 조건에서는 pTi12가 제거되지 않았으므로 pTi12의 복제기원의 안정성이 pTiKU12보다 높다는 것을 의미하는 것이며, 현재 pTi12의 특성이 알려져 있지 않기 때문에 선택배지를 이용하여 pTi12가 제거된 균주를 선별하기가 용이하지 않다. 따라서 같은 비화합성 group에 속하는 플라스미드들은 동일한 숙주내에서 함께 공존할 수 없다는 보고(10, 19)에 따라 pTi12의 복제기원이 클로닝되어 있는 재조합 플라스미드를 이용하여 pTi12를 제거하였다. pTi12의 복제기원을 pUC19에 결합시킨 재조합 플라스미드로서 carbenicillin에 대한 저항성을 가지고 있는 5.14 kb 크기의 pYWXP(12)를 *A. tumefaciens* KU12C1에 형질전환시킨 후 carbenicillin이 포함되어 있는 AB한천배지에 도말하여 형질전환된 균주를 선별하였다. 선별된 균주내에는 동일한 복제기원을 가지고 있는 두 개의 플라스미드 즉, pTi12와 pYWXP가 공존하고 있으나 같은 비화합성 group에 속하는 플라스미드들은 동일한 숙주내에서 함께 공존할 수 없으므로(10, 19) carbenicillin이 포함되어 있는 배지에서 계대배양을 실시하여 pTi12는 제거되고 pYWXP만이 포함되어 있는 균주를 선별하였다. 선별된 균주내에 pTi12

Table 4. Loss of pYWXP by the elevated temperature (37°C) and ethidium bromide treatments.

Incubation temperature (preculture)	Inoculum concentration of Strain KU12C2	Concentrations of EtBr (µg/ml)	
		30	60
28°C	6.0×10 ⁸ cells/ml	0	0
37°C	6.0×10 ⁶ cells/ml	3	0

The preculture of *A. tumefaciens* KU12 were grown in MG/L medium at 28°C and 37°C respectively. They were inoculated in MG/L medium containing 30 and 60 µg/ml of EtBr and cultured at 37°C for 1 day. This cultured strain was spreaded on MG/L agar plates and incubated at 28°C for 2 days. Numbers represent the number of colony on AB plate.

가 제거되었는지를 소량분리를 실시하여 intact form을 전기영동한 결과 *A. tumefaciens* KU12C1내에는 pTi12가 존재하나(Fig. 2, lane 2), 선별된 균주 내에는 pYWXP만이 존재하였다(Fig. 2, lane 3). 이것은 pYWXP에 의해 pTi12가 제거되었음을 의미하는 것으로 선별된 균주는 *A. tumefaciens* KU12C2라고 명명하였다.

***A. tumefaciens* KU12C2내에 존재하는 pYWXP의 제거**

A. tumefaciens KU12C2내에 존재하는 pYWXP는 pTiKU12를 제거할 때 처럼 EtBr과 37°C에서 배양하여 제거하였으며 그 결과는 Table 4와 같다. 그러나 pTi12의 제거에서 확인된 것처럼 pTi12는 pTiKU12보다 높은 안정성을 가지고 있으므로, pTi12의 복제기원이 클로닝되어 있는 pYWXP를 제거시키기 위해서는 균체의 안정성에 보다 심한 영향을 미쳐야 할 것으로 생각되어 110 µg/ml 농도의 EtBr이 포함되어 있는 배지에서의 본배양을 pTiKU12를 제거할 때의 28°C가 아닌 37°C에서 실시하였다. 그러나 이와 같은 조건에서 생존하는 균체를 얻을 수 없었으므로 본배양시 처리하는 EtBr의 농도를 낮추고, 배양시간도 48시간에서 24시간으로 감소시켰으며, 37°C에서 전배양한 후 접종하는 균체의 수도 pTiKU12를 제거할 때 보다 20,000배를 증가시킨 6.0×10⁶ cfu의 균체를 사용하였다. 이러한 실험조건에서 전배양시 처리한 배양온도에 따라 균주의 안정성은 커다란 변화를 나타내었는데, 28°C에서 전배양한 균체를 사용한 경우는 37°C에서 전배양하여 접종한 균체수보다 100배나 많은 균체를 접종하였어도 생존하는 균체를 얻을 수 없었다. 이것은 37°C의 온도조건과 동시에 처리된 EtBr에 의해 균주의 생장은 절대적으로 불안정화되기 때문에 전배양시 37°C의 온도조건에서 배양된 균주는 어느 정도의 적응성을 가지고 있으나, 28°C에서 배양된 균주들은 37°C의 온도에 대해 적응성을 갖지 못하기 때문에 사료된다. 이러한 실험과정을 거쳐 30 µg/ml의 농도에서는 18개의 균체를 그리고 60 µg/ml의 농도에서는 17개의 균체를 얻을 수 있었으며, KU12C2내에 포함되어 있는 pYWXP가 제거된 균주는 carbenicillin에 대한 저항능을 상실하므로 위와같은 조건에서 배양하여 얻은 각 균체를 100 µg/ml

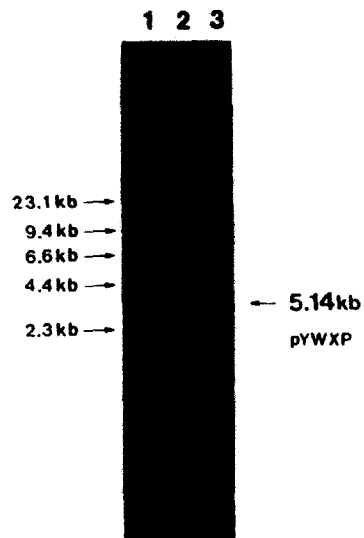


Fig. 3. Plasmid screens of *A. tumefaciens* KU12C2 and KU12C3.

Agarose gel electrophoresis was carried out at 10 V/cm on 0.7% agarose gel. lane 1, λ HindIII digested fragments; lane 2, plasmid isolated from *A. tumefaciens* KU12C2; lane 3, plasmid isolated from *A. tumefaciens* KU12C3.

ml의 carbenicillin이 포함되어 있는 AB 한천배지와 포함되어 있지 않은 AB 한천배지에 각각 접종하여 carbenicillin이 포함되어 있지 않은 AB 한천배지에서만 성장하는 균주를 선별한 결과, 30 µg/ml의 EtBr을 처리한 균체중에서 pYWXP가 제거된 균주를 분리할 수 있었으며 분리된 균주를 *A. tumefaciens* KU12C3라 명명하였다. 소량분리 방법에 따라 intact form을 전기영동하여 KU12C3내에 pYWXP가 제거되었는지를 확인한 결과 *A. tumefaciens* KU12C2내에는 5.14 kb의 pYWXP가 존재하였으나(Fig. 3, lane 2) KU12C3내에는 pYWXP가 존재하지 않았다(Fig. 3, lane 3). 따라서 KU12C3균주는 KU12균주내에 포함되어 있는 octopine형 Ti 플라스미드인 pTiKU12와 잠재 플라스미드인 pTi12가 모두 제거된 균주

임을 확인할 수 있었으며 이들 플라스미드가 제거된 무독성의 octopine형 *Agrobacterium* 균주인 KU12C3를 이용하여 현재 *Agrobacterium*에 의한 종양형성과정의 유전적, 생리적 분석을 실시중에 있다.

감사의 말

본 연구는 과학기술처에서 심웅섭 교수에게 지원된 연구비로 수행되었으며, 과학기술처의 연구비지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- An, G., 1987. Binary Ti vectors for plant transformation and promoter analysis. p. 292-305. In R. Wu and L. Grossman (ed.), Method in enzymology Vol. 153. Academic Press. Inc., New York.
- Birnboim, H. C. and J. Doly, 1979. An alkaline extraction procedure for screening recombinant DNA plasmid. *Nucl. Acids Res.* 7, 1513-1516.
- Bor-Chian, L. and C. I. Kado, 1977. Studies on *Agrobacterium tumefaciens* VII: Avirulence induced by temperature and ethidium bromide. *Can. J. Microbiol.* 23, 1554-1561.
- Casse, F., C. Boucher, J.S. Julliot, M. Michel, and J. Denarie, 1979. Identification and characterization of large plasmids in *Rhizobium meliloti* using agarose gel electrophoresis. *J. Gen. Microbiol.* 113, 229-242.
- Cha, Y.J., J.S. Eum, S.B. Hong, and W.S. Sim, 1983. Possible use of the Ti plasmid for genetic engineering of higher plants. I. Isolation of Ti plasmid from *Agrobacterium tumefaciens* in Korea. *Kor. J. Microbiol.* 21, 238-244.
- Chilton, M.D., T.C. Currier, S.K. Farrand, A.J. Bendich, M.P. Gordon, and E.W. Nester, 1974. *Agrobacterium tumefaciens* DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71, 3672-3676.
- Chilton, M.D., M.H. Drummond, D.J. Merlo, and D. Sciaky, 1978. Highly conserved DNA of Ti plasmids overlaps T-DNA maintained in plant tumors. *Nature* 275, 147-149.
- De Cleene, M., 1985. The susceptibility of monocotyledons to *Agrobacterium tumefaciens*. *Phytopath. Z.* 113, 81-89.
- Farrand, S.K., C.I. Kado, and C.R. Ireland, 1981. Suppression of tumorigenicity by the IncW R plasmid pSa in *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Gen. Genet.* 181, 44-51.
- Grinsted, J. and P.M. Bennett, 1988. Plasmid technology. p. 21. In Methods in microbiology. Vol. 21. Academic Press, New York.
- Hernalsteens, J.P., L. Thia-Toong, J. Schell, and M.V. Montagu, 1984. An *Agrobacterium*-transformed cell culture from the monocot *Asparagus officinalis*. *EMBO J.* 3, 3039-3041.
- Lee, Y.W., 1993. Characterization of plasmids from *Agrobacterium tumefaciens* KU12 isolated in Korea and construction of a new binary vector. Ph. D. thesis. University of Korea.
- Lippincott, J.A., B.B. Lippincott, and M.P. Starr, 1981. The genus *Agrobacterium tumefaciens*. p. 842-855. In M.P. Starr, H. Stoip, H.G. Trupper, A. Balows, and H.G. Schiegel (ed.), The prokaryotes, Vol. 1. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Marco, M.A., R. Chipperfield, and H.C. Birnboim, 1982. A procedure for the large-scale isolation of highly purified plasmid DNA using alkaline extraction and binding to glass powder. *Anal. Biochem.* 121, 382-387.
- Southern, E.M., 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-517.
- Van Larebeke, N., G. Engler, M. Holsters, S. Van Den Elsacker, I. Zaenen, R. A. Schilperoort, and J. Schell, 1974. Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall inducing activity. *Nature* 252, 169-170.
- Van Larebeke, N., C. Genetello, J. Schell, R.A. Schilperoort, A.K. Hermans, J.P. Hernalsteens, and M. Van Montagu, 1975. Acquisition of tumor-inducing ability by non-oncogenic *Agrobacteria* as a result of plasmid transfer. *Nature* 255, 742-743.
- Watson, B., T.C. Currier, M.P. Gordon, M.D. Chilton, and E.W. Nester, 1975. Plasmid required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 123, 255-264.
- Webster, J. and J. Thomson, 1988. Genetic analysis of an *Agrobacterium tumefaciens* strain producing an agrocin active against biotype 3 pathogens. *Mol. Gen. Genet.* 214, 142-147.
- Zaenen, I., N. Van Larebeke, H. Teuchy, M.W. Montagu, and J. Schell, 1974. Supercoiled circular DNA in crown-gall inducing *Agrobacterium* strains. *J. Mol. Biol.* 86, 109-127.

(Received December 21, 1993)

(Accepted January 24, 1994)

ABSTRACT: Host Construction by Curing the Octopine Type Ti and Cryptic Plasmids in *Agrobacterium tumefaciens* KU12

Ha, Un-Hwan, Yong-Woog Lee, Hye-Yeon Moon¹, and Woong-Seop Sim*
(Department of Biology, College of Science, Korea University, Seoul 136-701,
and ¹Department of Biotechnology, College of Engineering, Taegu University,
Taegu 705-714, Korea)

Agrobacterium tumefaciens KU12 contains pTiKU12 (240 kb) of the octopine type Ti plasmid and pTi12 (45 kb) of the cryptic plasmid. To make the avirulent *A. tumefaciens*, the octopine type Ti plasmid, pTiKU12, was cured with elevated temperature (37°C) and ethidium bromide (EtBr), respectively. Also the cryptic plasmid, pTi12, was cured by the introduction of recombinant plasmid, pYWXP, made by pTi12 replication origin and pUC19. pYWXP was cured by elevated temperature (37°C) and EtBr simultaneously.