

Electroporation을 이용한 그람 양성 세균의 형질전환

오태권 · 김병각 · 최웅철*

서울대학교 약학대학

(Received September 20, 1995)

Transformation of Gram-Positive Bacteria by Electroporation

Tae Gwon Oh, Byung Kak Kim and Eung Chil Choi*

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Abstract—Gram-positive bacteria, *Bacillus subtilis* BR151 and *Staphylococcus aureus* RN4220 were transformed with high efficiency by electroporation. The cells were incubated until late log phase, washed three times with 10% glycerol, 1 mM HEPES, 12% sucrose and resuspended to 10^{10} ~ 10^{11} cfu/ml, then stored at -70°C . Transformation efficiency of *B. subtilis* BR151 was 1.03×10^7 cfu/ μg with cells washed with 10% glycerol and electroporated by 15 KV/cm, 0.7 msec pulse with pUB110. Transformation efficiency of *S. aureus* RN4220 was 4×10^6 cfu/ μg with cells washed with 1 mM HEPES + 10% glycerol and electroporated by 15 KV/cm, 2.5 msec pulse. The number of total transformants was 1000 when *B. subtilis* BR151 was transformed with 100 ng pUB110 DNA and the number of total transformants was 9000 when *S. aureus* RN4220 was transformed with 10 ng pUB110 DNA

Keywords □ Electroporation, *Bacillus subtilis* BR151, *Staphylococcus aureus* RN4220, pUB110.

최근의 electroporation, electroporabilization 기술은 세포에 짧은 강한 전기파를 가해 DNA에 대해 투과성을 갖도록 만드는 방법¹⁻⁶⁾으로 세균의 형질전환 방법에 큰 변화를 주었다. 이 기술은 빠르고 간단하며 재현성이 있고 높은 빈도를 나타내어 전에는 형질전환 할수 없다고 생각되던 많은 종류의 세균에도 적용할수 있다.

세균중에서 *Bacillus cereus*⁷⁾를 처음으로 electroporation을 이용하여 형질전환하였으나 원형질체로 만들어 사용해야했으므로 큰 장점은 없었다. *Lactococcus lactis*는 원형질체로 만들지않고, 자연적인 상태의 세포를 electroporation을 이용하여 최초로 형질전환⁸⁾한 균주이며 그후 *Streptomyces lividans*⁹⁾, *Lactobacillus casei*¹⁰⁾, *Streptococcus lactis*¹¹⁾, *Campylobacter jejuni*¹²⁾ 등

을 electroporation을 이용하여 형질전환하는데 성공 하였다.

electroporation의 효율을 결정하는 가장 주된 인자는 전압과 time constant이다. 각 세균은 각기 고유한 최적 전압을 가지며 이 전압은 세포막의 조성, 세포의 크기, 세포벽 조성 등에 의해 결정된다. 또 다른 인자로, 전기파를 가한후에 살아남는 세포의 수도 중요하며 electroporation buffer의 성분도 효율에 큰 영향을 미친다. 각 균주마다 다양한 전압과 time constant을 적용하며 형질전환 효율을 관찰하여 적절한 조건을 찾아야 하며, buffer내 ion의 종류, buffer의 pH, conductivity, dielectric constant, concentration 등을 변화시키며 최적의 조건을 찾아야 한다.

*Staphylococcus aureus*¹³⁾로부터 MLS계 항생물질에 대해 유도내성을 보이는 유전자를 클로닝하기위하여 일반적으로 *E. coli*와 *B. subtilis*를 협동 숙주로 이용하고 *E. coli*와 *B. subtilis*에서 복제가능한 shuttle vector를 사용하나 shuttle vector자체가 불안정하며 형질전환

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-880-7874 (팩스) 02-886-5802
e-mail : ecchoi @ plaza. snu. ac. kr

효율이 매우 낮다. 또한 그람양성균인 *Bacillus subtilis* 나, *Staphylococcus aureus*를 단독 숙주로 이용하는 형질전환법도 더욱 그 효율이 낮다.¹⁴⁾ 그밖에 원형질체 형질전환법¹⁵⁾이 있으나 역시 효율이 낮다. 그래서 본 연구에서는 새로운 방법인 electroporation을 MLS계 항생물질에 내성을 나타내는 유전자를 클로닝하는데 적용하기 위한 기초연구로 *Bacillus subtilis* BR151, *Staphylococcus aureus* RN4220를 natural plasmid와 recombinant plasmid로 형질전환 시키는 최적조건을 검토하였다.

실험방법

균주 및 plasmid - 형질전환 host로 *Bacillus subtilis* BR151 (*trpC2*, *lys3*, *metB10*)과 *Staphylococcus aureus* RN4220을 사용하였고 plasmid는 pUB110(KM^R)을 사용하였다.

시약 및 기기 - Bacto-tryptone과 yeast-extract 등 배지는 Difco사에서 구입하였으며 kanamycin(KM) 과 Trizma base, EDTA, SDS, sucrose, HEPES 등은 Sigma 사의 제품을 사용하였고 전기영동 시약 및 cesium chloride, glycerol 등은 BRL사의 ultrapure 제품을 사용하였다. T4 DNA ligase와 *Bam*HI, *Sau*3AI 제한효소는 Promega 사의 제품을 사용했으며 lysozyme, RNase등은 Sigma 사의 제품을 사용하였다. Electroporation 기기로는 BioRad 사의 Gene Pulser와 pulse controller를 사용하였다.

Electrocompetent cell의 제조 - *B. subtilis* BR151 을 plate에 접종하여 37°C에서 하룻밤 배양한 다음 다시 SOB-Mg broth 10 ml에 접종하여 37°C에서 12시간정도 진탕배양했다. 다시 100 ml의 SOB-Mg broth에 1%가 되도록 접종하고 흡광도(600 nm)가 0.6~0.8이 될때까지 37°C에서 진탕배양하고 균체를 수확하였다. 상등액을 완전히 제거한후 100 ml의 washing 용액에 현탁시킨 다음 0°C에서 10분간 방치하였다. 균체를 수확하고 50 ml의 washing 용액에 현탁시킨후 0°C에서 10분간 방치한 다음 원심분리하여 균체를 수확하고 10 ml의 washing 용액에 현탁하여 0°C에서 10분간 방치하였다. 다시 원심분리하고 상등액을 완전히 제거한후 400 μ l의 washing 용액에 현탁하고 40 μ l씩 분취하여 -70°C에 보관하였다. *S. aureus* RN4220 competent cell도 *B. subtilis* BR151의 competent cell 제조과정과

동일한 방법으로 제조하였다.

세균의 형질전환 - -70°C에 보관한 competent cell을 실온에서 녹인후 ice bath에 방치한 다음, pUB110 1 μ l (10 pg)을 가하여 잘 섞은후 ice bath상의 electroporation cuvette으로 옮긴 다음 전기장을 가했다. 즉시 2 ml의 SOC배지로 현탁하여 50 ml flask에 옮기고 37°C에서 1시간동안 진탕배양한 후 균체를 수확하여 소량의 SOC배지에 현탁시켜 kanamycin (10 μ g/ml)를 포함한 배지에 spreading한후 24시간 후에 균의 성장을 관찰하였다.

Ligation mixture의 제조 - pUB110 DNA를 *Bam*HI 제한효소로 절단한 뒤 다시 정제하여 T4 DNA ligase로 15°C에서 하룻밤 ligation반응을 실시하였다. 그 반응액을 dH₂O로 10배 희석하고 65°C에 10분간 방치하였다가 ice bath상에서 냉각시켰다. vector로 사용할 pUB110 DNA를 *Bam*HI으로 절단하고 Calf Intestinal Phosphatase로 dephosphorylation시킨후 정제하였다. *Staphylococcus aureus* 507¹³⁾ 균주로부터 total DNA를 분리하여 *Sau*3AI 제한효소로 partial digestion하고 그 중 4~10 kb에 해당하는 DNA를 electroelution하였다. 위의 pUB110 vector와 DNA 조각을 T4 DNA ligase로 ligation하고 그 반응액을 dH₂O로 10배 희석한후 65°C에 10분간 방치하였다가 ice bath상에서 냉각시켰다.

형질전환의 최적 조건 결정 - 전기장의 세기와 지속 시간을 변화시키며 *B. subtilis* BR151과 *S. aureus* RN4220를 형질전환한후 균액을 희석하여 LB배지에 spreading 한후 37°C에서 하룻밤 배양하여 colony 수를 세고 전기장을 가하지 않은 대조군과 비교하여 생존율을 측정하였다. 전기장의 세기와 지속시간을 변화시키며 형질전환을 실시한후 균액을 kanamycin (10 μ g/ml)을 포함하는 LB배지에 spreading했다. 하룻밤 배양후 생성된 colony수를 세고 형질전환 효율을 측정하여 최적조건을 결정하였다. 12% sucrose, 1 mM HEPES, 10% glycerol 용액을 각각 washing용액으로 사용하고 time constant 를 변화시키며 최적조건에서 형질전환을 실시하고 그 효율을 측정하여 그 영향을 조사하였다. pUB110 DNA의 양을 1 pg, 10 pg, 100 pg, 1 ng, 10 ng, 100 ng, 1 μ g 으로 변화시키며 최적 조건에서 형질전환을 실시하여 형질전환 효율을 측정하고 그 영향을 조사하였다. 두가지 ligation mixture로 두 균주를 형질전환하고 그 효율을 측정하였다.

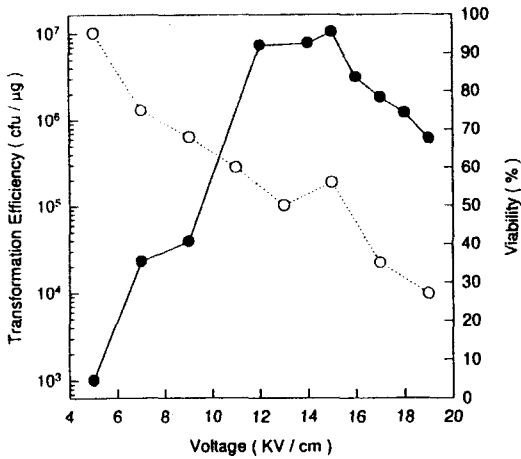


Fig. 1—The effect of field strength on transformation efficiency(●) and bacterial viability(○).
B. subtilis BR151 was transformed by 0.7 msec pulse.

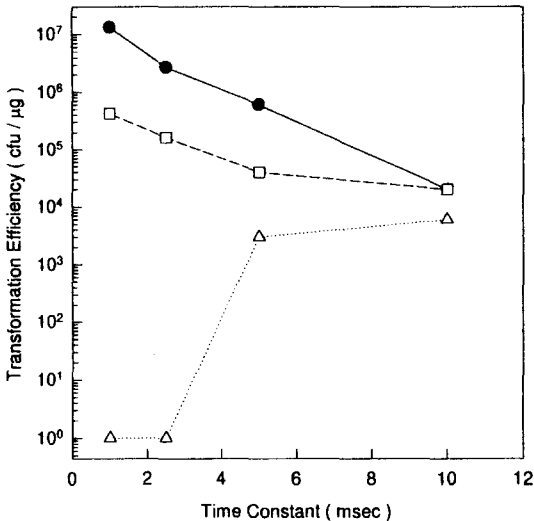


Fig. 2—The effect of various electroporation buffer on transformation efficiency.
B. subtilis BR151 was transformed at 15 KV.(●)
10% glycerol. (□) 1 mM HEPES+10% glycerol.
(△) 12% sucrose.

결 과

***Bacillus subtilis* BR151 형질전환의 최적조건** - Time constant가 0.7 msec일때 가해진 전기장의 범위중 대부분에서 *Bacillus subtilis* BR151의 생존율은 50%를 넘었다. 전기장의 세기와 time constant를 변화시키며 형질전환 효율을 측정된 결과 15 KV/cm의 세기로 0.7 msec 동안 전기장을 가했을때 1.03×10^7

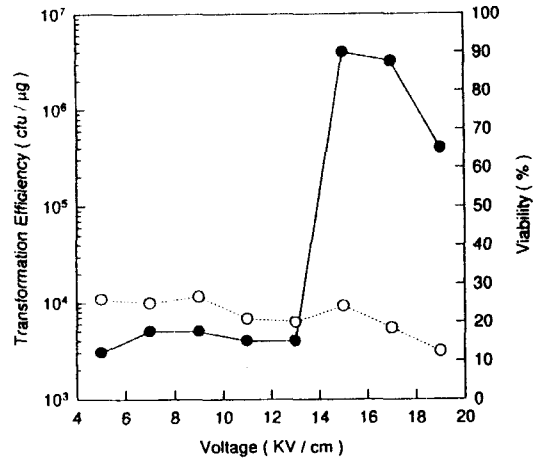


Fig. 3—The effect of field strength on transformation efficiency(●) and bacterial viability(○).
S. aureus RN4220 was transformed by 2.5 msec pulse.

cfu/μg의 효율을 얻었으므로 이를 최적조건으로 결정하고 생존율과의 관계를 Fig. 1에 나타내었다. 각 electroporation buffer 용액을 사용하여, 결정된 최적조건에서 형질전환을 실시한후 형질전환 효율을 비교하여 그 관계를 Fig. 2에 나타내었다. 10% glycerol을 사용했을때 최고 1.03×10^7 cfu/μg의 효율을 보여 가장 적당하였다.

Staphylococcus aureus RN4220 형질전환의 최적조건

- 가해진 전기장의 범위에서 1, 2.5, 5, 10 msec 모두 *Staphylococcus aureus* RN4220의 생존율은 50%에 미치지 못하였다(data not shown). 전기장의 세기와 time constant를 변화시키며 형질전환 효율을 측정된 결과 15 KV/cm의 세기로 2.5 msec동안 전기장을 가했을때 4×10^6 cfu/μg의 효율을 얻었으므로 이를 최적조건으로 결정하고 생존율과의 관계를 Fig. 3에 나타내었다. 각 electroporation buffer 용액을 사용하여 형질전환을 실시한후 형질전환 효율을 비교하여 그 관계를 Fig. 4에 나타내었다. 1 mM HEPES+10% glycerol 사용시 최고 4×10^6 cfu/μg의 효율을 보였고, 10% glycerol을 사용했을때 효율은 최고 2.5×10^6 cfu/μg였으며 12% sucrose를 이용했을때는 최고 2.5×10^6 cfu/μg으로 나타나 1 mM HEPES+10% glycerol이 가장 적당하였다.

Natural plasmid DNA 양의 변화에 따른 형질전환 효율의 변화

- *B. subtilis* BR151의 형질전환효율은 DNA의 양이 많아지면서 감소하여 DNA가 100 ng일

때 1×10^4 cfu/ μ g로 떨어졌으나 전체 형질전환체의 수는 DNA가 100 ng일때 103개로 늘어나는것으로 관찰되었다. 그리고 *S. aureus* RN4220의 형질전환 효율도 DNA의 양이 많아지면서 감소하여 DNA가 100 ng일때 8×10^4 cfu/ μ g로 떨어졌으며 전체 형질전환체의 수는 DNA가 100 ng일때 8×10^3 개로 가장 많았다 (Table I).

Ligation mixture의 형질전환효율 - *B. subtilis* BR151을 self-ligated pUB110으로 형질전환했을때의 효율은 5×10^6 cfu/ μ g였고 외부 DNA조각과 pUB110의 ligation반응액으로 형질전환했을때의 효율은 1×10^6 cfu/ μ g였다. 그리고 *S. aureus* RN4220를 self-li-

gated pUB110으로 형질전환했을때의 효율은 1×10^6 cfu/ μ g였고 외부 DNA조각과 pUB110의 ligation반응액으로 형질전환했을때의 효율은 3×10^5 cfu/ μ g이었다. (Table II)

고 찰

B. subtilis BR151의 형질전환효율은 Fig. 1에 나타났듯이 생존율이 55%일때 최고의 효율을 보였으며 전기장의 세기가 15 KV/cm보다 커지면 생존율은 50% 미만으로 감소하고 형질전환효율도 감소하였다. 이 사실로 보아 높은 전기장 세기에서는 살아 남은 세포수 자체가 적기때문에 효율도 감소한다고 생각된다. 하지만 *S. aureus* RN4220의 생존율을 살펴보면 큰 변화없이 대부분 20~30%를 유지하였다. 이는 electroporation buffer 용액으로 사용한 1 mM HEPES+10% glycerol 용액의 전기적 충격에 대한 완충작용때문인 것으로 생각되지만, Fig. 3에서 이러한 완충작용도 전기장의 세기가 17 KV/cm이상이면 한계에 도달하여 그 이상에서는 생존율과 형질전환효율이 모두 감소하는것을 알수있었다. Electroporation buffer 용액으로

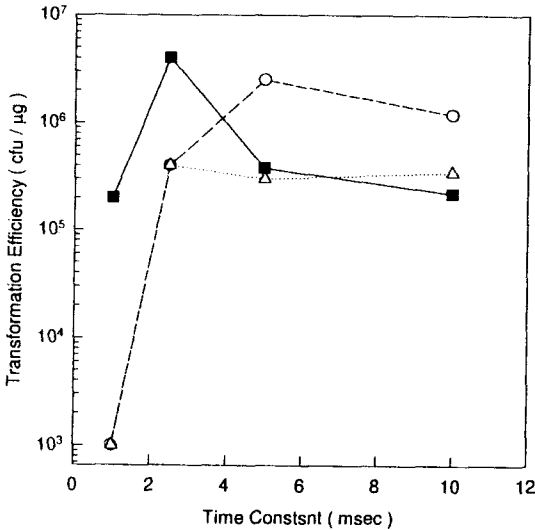


Fig. 4—The effect of various electroporation buffer on transformation efficiency. *S. aureus* RN4220 was transformed at 15 KV. (○) 10% glycerol, (■) 1 mM HEPES+10% glycerol, (△) 12% sucrose

Table II—Transformation efficiency of ligation mixtures

	Transformation Efficiency (cfu/ μ g)		
	Natural Plasmid	Self-ligated Plasmid ^a	Recombinant Plasmid ^b
<i>B. subtilis</i>	1.03×10^7	5.0×10^6	1.0×10^6
<i>S. aureus</i>	4.0×10^6	1.0×10^6	3.0×10^5

B. subtilis BR151 was transformed by 15 KV, 0.7 msec and *S. aureus* RN4220 was transformed by 15 KV, 2.5 mec. ^a: cut by *Bam*HI and ligated. ^b: cut by *Bam*HI and ligated with foreign DNA fragment.

Table I—The effect of natural plasmid DNA concentration on the efficiency of transformation and on the number of transformants

pUB110 DNA	Number of Transformants		Transformation Efficiency (cfu/ μ g)	
	<i>B. subtilis</i> ^a	<i>S. aureus</i> ^b	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>
1 pg	8	3	8.0×10^6	3.0×10^6
10 pg	103	9	1.03×10^7	9.0×10^5
100 pg	268	30	2.68×10^6	3.0×10^5
1 ng	370	4000	3.7×10^5	4.0×10^6
10 ng	800	9000	8.0×10^4	9.0×10^5
100 ng	1000	8000	1.0×10^4	8.0×10^4
1 μ g	100	8000	1.0×10^2	8.0×10^3

^a: *B. subtilis* BR151 was transformed by 15 KV, 0.7 msec pulse.
^b: *S. aureus* RN4220 was transformed by 15 KV, 2.5 msec pulse.

12% sucrose를 사용했을때에는 time constant가 길어지더라도 형질전환효율은 그대로 유지되거나 오히려 높아졌는데 이는 12% sucrose의 완충작용이 가장 강하기 때문이라 생각된다. 그러므로 ligation mixture와 같이 형질전환의 최적조건을 만족시키지 못할 경우에는 오히려 12% sucrose를 사용하면 보다 재현성있는 결과를 얻을수 있을 것이다.

Natural plasmid DNA의 양이 100 ng일때 *B. subtilis* BR151 형질전환체의 수는 1000개였고, *S. aureus* RN4220 형질전환체의 수는 natural plasmid DNA의 양이 10 ng일때 9000개이므로 형질전환체의 수가 많아야하는 cDNA나 genomic DNA의 library construction에는 *S. aureus* RN4220을 이용하는것이 더 유리할것이다. DNA의 양이 늘어남에따라 형질전환체의 수가 줄어든 것은 전체 세포중 electrocompetent 세포의 비율이 작기 때문이라 생각된다. 그러므로 형질전환체의 수를 늘리기 위해서는 적당한 양의 DNA를 사용하여야하며 전체 세포중 electrocompetent 세포의 수를 증가시켜야 한다는 사실도 간과해서는 안될 것이다.

Ligaton mixture중 T4 DNA ligase를 불활성화하기 위해 65°C에서 10분간 방치하였고, 회석하여 염류의 영향을 줄이고자 하였다. 이러한 방법에 의해 형질전환 효율을 높였다는 보고^{16, 17)}가 있으나 본 연구에서는 그렇게 큰 효율의 증가는 없었고, genomic library construction에 이용하기 위해서는 전체 형질전환체의 수가 더 중요하므로 ligation mixture 중 DNA의 농도를 높이는것이 더 중요하다 생각된다.

앞으로 이 형질전환법을 실제로 그람양성세균의 유전자 클로닝하는데 이용하기 위해서는 natural plasmid로 형질전환했을때의 효율과 ligation mixture로 형질전환했을때의 효율의 차이를 줄이는것이 관건이며, 이 문제가 어느 정도 극복이 된다면, 그람양성세균의 유전자 클로닝시 *E. coli*를 숙주로하여 genomic library를 만들고, 그 library로 다시 *B. subtilis*를 형질전환하여 재조합 균주를 선발했던 기존의 비효율적인 방법을 충분히 대체할수 있을것이다.

결 론

B. subtilis BR151를 형질전환할때는 10% glycerol로 세포를 washing한후 10% glycerol을 electroporat-

ion buffer로 사용하고 15 KV/cm, 0.7 msec의 전기장을 가할때 최고 1.03×10^7 cfu/ μ g의 효율을 얻을수 있었고, *S. aureus* RN4220를 형질전환할때는 1 mM HEPES로 세포를 washing한후 10% glycerol을 포함하는 1 mM HEPES를 electroporation buffer로 사용하고 15 KV/cm, 2.5 msec의 전기장으로 형질전환할때 최고 4×10^6 cfu/ μ g의 효율을 얻을수 있었다.

감사의 말씀

본 연구는 서울대학교 신의약품 개발연구센터(한국 과학재단)의 지원에 의해 수행된 것으로, 지원에 감사드립니다.

문 헌

- 1) Chassy, B. M., Mercenier, A. and Flickinger, J.: Transformation of Bacteria by Electroporation. *Trends Biotechnol.* **6**, 303 (1988).
- 2) Neumann, E. and Rosenheck, K.: Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes. *J. Membr. Biol.* **10**, 279 (1972).
- 3) Zimmermann, U., Schultz, J. and Pilwat, G.: Transcellular ion flow in *Escherichia coli* B and electrical sizing of bacteria. *Biophys. J.* **13**, 1005 (1973).
- 4) Benz, R., Beckers, F. and Zimmermann, U.: Reversible electrical breakdown of lipid bilayer membranes: A charge-pulse relaxation study. *J. Membr. Biol.* **48**, 181 (1979).
- 5) Knight, D. E. and Scrutton, M. C.: Gaining Access to the Cytosol-The Technique and Some Applications of Electroporation. *Biochem. J.* **234**, 497 (1986).
- 6) Teissie, J. and Tsong, T. Y.: Electric field induced transient pores in phospholipid bilayer. *Biochemistry* **20**, 1548 (1981).
- 7) Shivarova, N., Forster, W., Jacob, H-E. and Grogorova, R.: Microbiological Implications of Plasmid Transformation of *Bacillus cereus* Protoplasts by Electric Field Pulses. *Z. Allg. Mikrobiol.* **23**, 595 (1983).
- 8) Harlander, S. K. In: Streptococcal Genetics, edited by Ferretti, J.J. and Curtiss, R.C. Wash-

- ington DC: ASM publications, p. 229 (1986).
- 9) MacNeil, D. J.: Introduction of Plasmid DNA into *Streptomyces lividans* by Electroporation. *FEMS Microbiol. Lett.* **44**, 239 (1987).
 - 10) Chassy, B. M. and Flickinger, J. L.: Transformation of *Lactobacillus casei* by Electroporation. *FEMS Microbiol. Lett.* **44**, 173 (1987).
 - 11) Powell, I. B., Achen, M. G., Hillier, A. J. and Davidson, B. E.: A simple and Rapid Method for Genetic-Transformation of Lactic Streptococci by electroporation. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 655 (1988).
 - 12) Miller, J. F., Dower, W. J. and Tompkins, L. S.: High-voltage Electroporation of Bacteria-Genetic Transformation of *Campylobacter jejuni* with Plasmid DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 856 (1988).
 - 13) Kwon, A. R., Choi, S. S., Kim, S. S., Chung, Y. J., Choi, E. C., Kim, B. K.: Screening of Inducible Resistance Genes to Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B(MLS) Antibiotics. *Yakhak Hoeji* **38**, 293 (1994).
 - 14) Lindberg, M. and Novick, R.: Plasmid-Specific Transformation in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **115**, 139 (1973).
 - 15) Gotz, F., Ahme, S. and Lindberg, M.: Plasmid Transfer and Genetic Recombination by Protoplast Fusion in Staphylococci. *J. Bacteriol.* **145**, 74 (1981).
 - 16) Ymer, S.: Heat inactivation of DNA ligase prior to electroporation increases transformation efficiency. *Nucleic Acids Res.* **19**, 6960 (1991).
 - 17) Willson, T. and Gough, N.: High voltage *E. coli* electrotransformation with DNA following ligation. *Nucleic Acids Res.* **16**, 11820 (1988).