

## Bacillus 속 분리균 2종의 내재형 Plasmids 특성분석

윤 기 홍\*  
우송대학교 식품생명공학부

**Characterization of Endogeneous Plasmids from Two *Bacillus* Isolates.** Yoon, Ki-Hong\*. School of Food Biotechnology, Woosong University, San 7-6, Jayang-dong, Dong-ku, Taejon 300-100, Korea - In order to obtain the suitable plasmids for constructing plasmid vectors of *Bacillus* species, endogeneous plasmid DNAs were screened from thermo-tolerant soil bacteria. Based on agarose gel electrophoresis patterns of the isolated plasmid DNAs, two strains harboring small-size plasmids were selected. The isolates were identified to belong to the genus *Bacillus* on the basis of their morphological and biochemical properties, and named *Bacillus* sp. 3-3 and 77-8, respectively. The restriction endonuclease maps were determined for four plasmids including two plasmids from each *Bacillus* isolates. It is interesting that *Bacillus* sp. 3-3 and 77-8 have an identical plasmid according to the restriction maps. The three kinds of hybrid plasmids constructed by introducing each plasmid of two isolates into a *Escherichia coli* plasmid vector, pUCCm18 containing chloramphenicol resistance gene active in *Bacillus* strains, could be replicated in *B. subtilis* and *B. licheniformis*. These plasmids are very stable in *B. subtilis*, suggesting that the *Bacillus* plasmids identified in this work would be useful for development of new cloning vectors for *Bacillus* strains.

**Key words :** *Bacillus* isolates, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, plasmids, replication, stability

*Bacillus subtilis*와 *B. licheniformis*를 포함한 여러종류의 *Bacillus* 속 균주들은 유용물질의 산업적 생산을 위한 유전자 재조합 숙주균으로 활발히 이용되고 있다. 재조합 유전자를 *Bacillus*에서 안정하게 발현시키기 위해서 널리 사용되고 있는 유전자 운반체로는 *Staphylococcus aureus*에서 유래한 항생제 내성 plasmids로부터 개발된 것들이 많으며 대표적인 것들로 pUB110[15], pC194[11], pE194[5]가 있다. 이러한 *S. aureus*의 plasmids 외에도 *Corynebacterium xerosis*에서 분리된 pTZ12[1], *Lactococcus lactis*의 plasmid인 pWV01[14]도 항생제내성 유전자를 도입하여 *B. subtilis*의 유전자 운반체로 개발되었다.

숙주균에서 plasmid vector가 안정하게 유지되기 위해서는 숙주균에서 plasmid의 복제와 분배가 정확하게 이루어져야 하는데 이종의 균주에서 유래된 plasmids의 경우에는 *Bacillus*속 균주에서 복제와 분배가 알맞게 일어나지 않아 plasmids의 불안정성의 원인이 되기도 한다[13]. 따라서 좀 더 안정한 유전자운반체를 개발하기 위한 노력의 일환으로 *Bacillus* 속 균주로부터 내재형 플라스미드인 pTA1060[4], pLS11[6], pBAA1[7], pLS32[20], pBC16[2]과 pSTK1[17] 등을 이용한 shuttle vectors의 개발이 시도되었다. 또한 고온성 *Bacillus*에서 분리된 pTB19를 이용하여 만들어진 pTB913은 고온배양시에도 *B. subtilis* 숙주균에서 안정하게 유지되는 것으로 밝혀졌는데[18], *Bacillus* 속 균주에

는 고온성 산업균주가 많다는 측면에서 그 의의가 있다고 하겠다. 그런데 *Bacillus* 속 균주에서 plasmid vectors의 안정성은 그들의 복제형태에 의해 많이 좌우되어 *Bacillus*에서 유래된 내재형 플라스미드라 할지라도 rolling-circle replicating plasmids 보다는 theta replicating plasmids가 더 안정하게 숙주균에서 유지되는 것으로 알려져 있다[12]. 또한 *Enterococcus faecalis*의 플라스미드인 pAMβ1과 같이 다른 균주에서 분리된 플라스미드도 theta 복제형 플라스미드가 *B. subtilis*에서 훨씬 안정하게 유지되는 것으로 확인되었는데[16], 이러한 현상은 그람양성균에서 플라스미드의 복제형태와 안정성간에 일반적인 관계이다.

유전자 재조합 플라스미드를 함유한 *Bacillus* 속 균주를 대규모로 배양할 때 현재까지도 플라스미드의 안정성은 큰 문제점으로 대두되고 있는 형편이므로 본 연구에서는 자연계 토양에서 분리된 *Bacillus* 속 균주들로부터 플라스미드를 탐색하여 *Bacillus* 속 분리균 2종으로부터 분리된 플라스미드로 재조합 플라스미드를 제조하고 이를 *B. subtilis*와 *B. licheniformis*에 각각 도입하여 그 안정성을 조사함으로써 분리된 플라스미드가 *Bacillus* 속 균주의 유전자 운반체로 개발될 수 있는지의 가능성을 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### 미생물 균주와 플라스미드

*Bacillus* sp. 3-3과 77-8은 토양에서 분리된 균이며 *Bacillus plasmids*의 제공원으로 사용되었고 유전자조작을

\*Corresponding author  
Tel. 82-42-630-9742, Fax. 82-42-636-2676  
E-mail:ykh@lion.woosong.ac.kr

위한 숙주균으로는 *E. coli* JM83 (*ara*,  $\Delta$ (*lac proA,B*), *rspL*,  $\phi$ 80, *lacZ* $\Delta$ M15( $r_k^-$ ,  $m_k^+$ ))이 사용되었다. 또한 *B. subtilis* 168와 *B. licheniformis* ATCC 27811은 재조합 plasmids의 안정성을 조사할 숙주균으로 사용하였다. Plasmid pUC19는 고온성 분리균 *Bacillus* sp.의 plasmids를 증폭시키기 위한 vector로 이용되었으며, *Bacillus* 속 균주에서 발현될 수 있는 pC194의 chloram-phenicol(Cm) 내성 유전자를 pUC18에 도입하여 제조된 pUCCm18은 분리균의 plasmids와 함께 *B. subtilis*와 *E. coli* 간의 shuttle vector를 제조하기 위해 사용되었다. 또한 pHSP9[9]은 플라스미드의 안정성을 비교하기 위한 대상으로 사용되었다.

### 배지

토양으로부터 미생물을 분리하기 위해서 복합 한천배지 (yeast extract, 5 g; bacto-tryptone, 5 g; polypeptone, 5 g; beef extract, 5 g; NaCl, 2 g;  $K_2HPO_4$ , 1 g;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.2 g; agar, 22 g; water, 1 liter; pH 7.0)를 사용하였으며, *E. coli*, *B. subtilis*와 *B. licheniformis*의 일반배양에는 LB 배지(5 g yeast extract, 10 g bacto-tryptone, 5 g NaCl per liter)가 사용되었다. 형질전환을 위한 주 배양 액체배지로 *E. coli*에는 SOB 배지(2% bacto-tryptone, 0.5% yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM  $MgCl_2$ , 10 mM  $MgSO_4$ ), *B. subtilis*에는 Spizizen 배지(0.5% glucose, 0.02% casein hydrolysate, 0.1% yeast extract, 50  $\mu$ g/ml tryptophan, 2.25 mM  $MgCl_2$ )와 *B. licheniformis*에는 0.25 M sucrose를 첨가한 Brain Heart infusion (BHI) 배지가 각각 사용되었다. 형질전환주를 선발하기 위해서는 chloramphenicol(20  $\mu$ g/ml for *E. coli*, 5  $\mu$ g/ml for *B. subtilis*, 40  $\mu$ g/ml for *B. licheniformis*), ampicillin (50  $\mu$ g/ml for *E. coli*)을 첨가한 평판배지를 사용하였다.

### Plasmid DNA 분리와 재조합 plasmid의 제조

분리균과 형질전환주로부터 plasmid DNA를 분리하기 위해 Birnboim과 Doly 방법[3]과 Qiaprep kit(Qiagen)을 이용하였으며, 고온성 *Bacillus* sp. 균주들로부터 분리한 plasmids의 제한효소 지도를 작성하기 위해 plasmids를 여러가지 제한 효소로 처리하고 이를 agarose gel 전기영동하여 절단된 DNA 조각의 크기를 결정하였다. 또한 분리균으로부터 분리된 cryptic plasmids의 양을 증폭시키기 위해 plasmid pUC19와 hybrid plasmids를 제조하여 많은 양의 plasmids를 얻어 제한효소 절단 위치를 확인하였다. 실험에 사용된 제한효소, T4 DNA ligase와 alkaline phosphatase는 Boehringer Mannheim과 Promega에서 구입하여 최적 조건에서 사용하였으며 agarose gel에서 DNA 조각을 추출하기 위해서는 Qiaex II Gel Extraction kit(Qiagen)를 사용하였다.

### 형질전환

*E. coli*는 Hanahan 방법에 의해 제조된 competent cells을 형질전환에 이용하였다[10]. *B. subtilis*는 Spizizen 배지에서 하룻밤 배양한 후 균 배양액을 동일배지에 1%가 되도록 접종하고 37°C에서 약 5.5시간 진탕배양함으로써 competent cells을 제조하였다[8]. 배양액의 일부를 취해 plasmid DNA를 혼합한 후 37°C에서 30분간 방치하고 SOC 배지를 적당량 첨가하였다. 동일 조건에서 1시간 동안 진탕배양한 후 항생제가 첨가된 LB 배지에 도말하고 37°C에서 하룻밤 배양하였다. *B. licheniformis*는 electroporation 방법에 의해 다음과 같이 형질전환 하였다. 0.25 M sucrose를 첨가한 BHI에 접종하여 37°C에서 하룻밤 배양한 후 이를 동일 배지에 1%가 되도록 접종하고 초기 대수기 ( $OD_{600}$  0.4)가 되었을 때 배양액을 얼음에서 약 20분간 정지하였다. 4°C에서 원심분리하여 균체를 회수하고 이를 얼음에 방치한 차가운 SM 용액(0.25 M sucrose, 1 mM  $MgCl_2$ )으로 세척한 후 동일 용액에 균체를 현탁하여 형질전환용 균체로 사용하였다. 균체 현탁액과 plasmid DNA를 적당량 혼합하여 Gene pulser(Bio-Rad)를 이용하여 6 kV/cm 전기장세기의 전기충격을 가한 후 즉시 1 ml의 0.25 M sucrose를 함유한 BHI 배지로 희석하여 37°C에서 1시간 동안 진탕배양 하였다. 이를 항생제를 첨가한 BHI 한천배지에 도말하고 37°C에서 배양하였다.

### Plasmid의 안정성 분석

*B. subtilis*와 *B. licheniformis*의 형질전환주에서 plasmid DNA의 안정성을 분석하기 위해서 형질전환주 콜로니를 항생제를 첨가한 BHI 배지에 접종하고 하룻밤 배양한 후 이를 항생제가 첨가되지 않은 동일배지에 1%가 되도록 접종하고 진탕배양 하였다. 배양시간을 12시간으로 하여 세대 배양하면서 일정량을 취해 항생제를 첨가하지 않은 BHI 한천배지에 도말하고 하룻밤 배양하여 자란 콜로니를 각각 항생제를 첨가한 BHI 한천배지로 옮겨 하룻밤 배양하여 성장한 콜로니의 수를 측정하였다. 또한 이로부터 plasmid DNA를 분리하여 agarose gel 전기영동을 실시하여 그 크기를 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### 토양 분리균의 plasmid DNA 탐색과 분리균의 동정

토양에 존재하는 미생물 중 *Bacillus* 속 균주를 선발하기 위해 토양시료를 생리식염수에 현탁하여 65°C에서 30분간 열처리한 후 복합배지에 도말하고 55°C에서 하룻밤 배양함으로써 모양이 다른 colonies를 선발하였다. 이들을 액체배지에서 배양하여 얻은 균체로부터 plasmid DNAs를 분리하여 agarose gel 전기영동함으로써 plasmid의 존재 유무와 양을 확인하였다. 그 결과 내열성 분리균 150 주로부터 플

**Table 1. Morphological and biochemical properties of *Bacillus* isolates**

Characteristics	<i>Bacillus</i> sp. 3-3	<i>Bacillus</i> sp. 77-8
Gram staining	+	+
Motility	+	+
Cell form	Rod	Rod
Spore formation	+	+
Catalase	+	+
Voges-Proskauer	+	+
Acid from glucose	-	-
$\beta$ -Galactosidase	+	+
Arginine dihydrolase	+	+
$\beta$ -Glucosidase	+	+
Urease	-	-
Indole production	-	-
Nitrate reduction	+	+
Gelatin hydrolysis	+	+
Citrate utilization	+	-
Arbutin utilization	+	+
D-Tagarose utilization	+	-
Oxidase	-	-

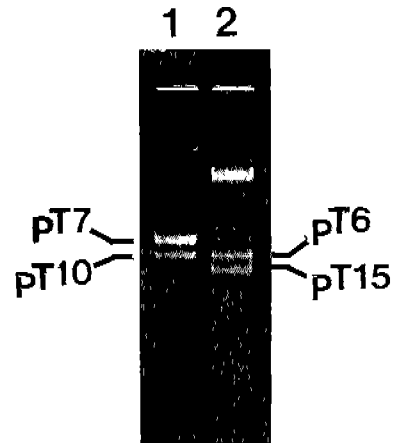
+, Positive; -, Negative

라스미드를 지니고 있는 균은 28 균주였으며 이들에는 한 개 이상의 plasmids가 존재하는 것으로 확인되었다. Agarose gel 전기영동을 통하여 관찰된 plasmids 중 비교적 많은 양 존재하면서 그 크기가 작은 plasmids를 지니는 두 균주를 선별하였다.

이 균주들은 호기성 그람양성 간균으로 포자를 형성하며 생화학적 특성을 조사한 결과(Table 1) *Bacillus* 속 균주로 판명되어 이들을 각각 *Bacillus* sp. 3-3과 77-8로 명명하였다. 또한 API 50 CHB 균 동정 kit(bioMerieux Vitek, Inc.)를 이용하여 *B. subtilis*와 비교한 결과 50종류의 탄수화물에 대한 조사항목 중 분리균 3-3은 8항목, 분리균 77-8은 9항목이 차이가 있는 것으로 나타났다. 그리고 이들 균은 37°C 뿐만 아니라 55°C에서도 정상적인 성장을 하는 것으로 나타났는데 이들 균이 지니고 있는 plasmids를 이용하여 *Bacillus* 속 균주에 사용할 수 있는 plasmid vector로 개발하기 위해 분리균 3-3과 77-8의 plasmid DNAs를 분석하였다.

#### 분리균의 내재형 plasmid

분리균 3-3과 77-8는 각각 최소한 2개 이상의 plasmids를 지니고 있는 것으로 밝혀졌는데 크기가 작고 그 양이 많은 것으로 나타난 4 종류 plasmids의 제한 효소지도를 작성하기 위해 분리된 plasmid DNAs를 전기영동 하고 이들을 agarose gel에서 각각 elution 하였다. *Bacillus* sp. 3-3으로부터 분리된 두 plasmids 중 큰 것은 pT7, 작은 것은 pT10 그리고 *Bacillus* sp. 77-8에서 분리된 plasmids 중

**Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of the plasmids from *Bacillus* sp. 3-3 (lane 1) and 77-8 (lane 2).**

Plasmid DNAs are indicated by their names.

큰 것은 pT6, 작은 것은 pT15로 각각 명명하였다(Fig. 1).

이들 plasmids를 제한효소 *EcoRI*, *HindIII*, *PstI*, *BamHI*, *XhoI*, *BglIII*, *KpnI*, *SmaI*으로 각각 절단하여 전기영동을 행한 결과 분리균 3-3에서 분리된 plasmid pT10과 77-8에서 분리된 plasmid pT6은 *EcoRI*에 의해 한 조각으로 절단되었으며 그 크기는 약 4.9 kb로 동일하였고 *HindIII*와 *PstI*에 의해서도 각각 동일한 크기의 두 조각으로 절단되었다. 실제 이들은 제한 효소로 절단되지 않았을 때도 agarose gel 전기영동시 동일한 이동도를 보이고 있어 pT6과 pT10은 동일한 plasmid로 판단된다. 분리균주 3-3과 77-8에서 각각 분리된 또 다른 plasmids pT7과 pT15는 그 크기가 각각 5.6 kb와 4.1 kb로 서로 동일하지 않으며, Table 1에서 보인 바와 같이 서로 다른 성질을 지니고 있는 토양 유래의 *Bacillus* 속 두 균주가 한가지 종류의 동일한 plasmid를 공유하고 있다는 것은 매우 흥미로운 사실이라 할 수 있다. 그런데 이들 분리균들로부터 분리된 plasmids의 양이 적으므로 제한효소 지도를 정확히 작성하기 위해 많은 양을 얻을 필요가 있다. 따라서 이들 plasmids를 제한 효소를 이용하여 한 조각으로 절단한 후 pUC19와 hybrid plasmid를 제조하였다. Plasmid pT7은 *BamHI*으로, pT10과 pT6은 *EcoRI*으로, pT15는 *PstI*으로 각각 절단하여 동일한 효소로 절단된 pUC19와 각각 ligation하여 대장균으로 도입함으로써 각각 제조된 4 종류의 hybrid plasmids를 대장균 형질전환체에서 분리하고 여러가지 제한효소로 절단하여 전기영동으로 분석함으로써 최종적으로 plasmids pT6, pT7, pT10, pT15의 제한효소 지도를 작성하였는데 pT6는 pT10와 완전히 동일한 것으로 확인되어 나타내지 않았다(Fig. 2).

*B. subtilis*와 *B. licheniformis*에서 분리된 plasmids의 복제

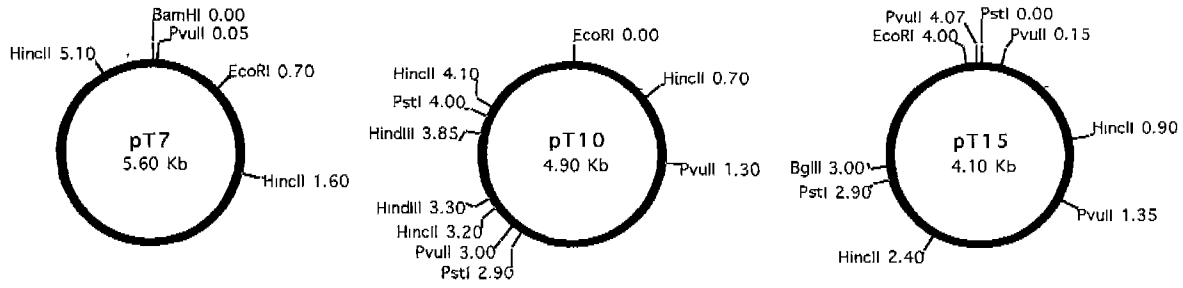


Fig. 2. Restriction endonuclease maps of plasmids pT7, pT10, and pT15. The numbers show kilobase pairs (kb).

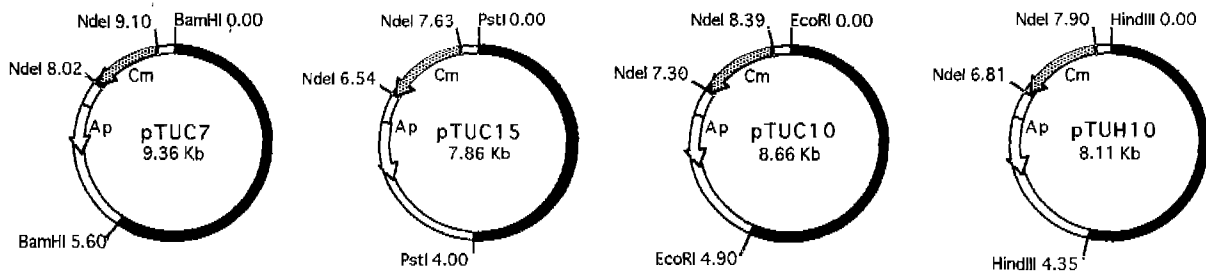


Fig. 3. Hybrid plasmids pTUC7, pTUC10, pTUC15, and pTUH10.

The closed bars indicate the plasmids of *Bacillus* isolates. The open bars correspond to the pUC18 and the dotted bars to Cm-resistant gene of pC194. Ap is an ampicillin resistant gene. The only restriction sites shown were used to construct hybrid plasmids. The numbers show kilobase pairs (kb).

분리균의 plasmids pT7, pT10과 pT15가 *B. subtilis*와 *B. licheniformis*에서 replication 될 수 있는지를 알기위해서 우선 이들 plasmids에 *Bacillus* 속 균주에서 발현될 수 있는 선별인자 유전자의 도입이 필요하다. 따라서 *S. aureus*의 플라스미드인 pC194로부터 Cm 내성유전자 부분을 pUC18에 도입한 pUCCm18을 이용하여 분리균의 플라스미드와 hybrid plasmids를 제조하였다(Fig. 3). Plasmids pT7은 *Bam*HI, pT10은 *Eco*RI, pT15은 *Pst*I으로 각각 절단하여 이들을 동일한 제한효소로 절단한 pUCCm18에 도입함으로써 pTUC7, pTUC10과 pTUC15를 각각 제조하였다. 이들 plasmids를 이용하여 *B. subtilis*의 competent cells을 형질전환 시킨 결과 *B. subtilis*는 plasmid pTUC7과 pTUC15에 의해 각각 형질전환 되었으며, 각 형질전환주에서 이들 플라스미드와 동일한 크기의 플라스미드가 발견되었다. 이로써 고온성 분리균의 plasmids pT7과 pT15는 *B. subtilis*에서 유지될 수 있는 replication origin을 지니고 있다는 것이 확인되었다. 그러나 plasmid pTUC10로는 *B. subtilis*가 형질전환되지 않았는데 이로 보아 hybrid plasmid 제조시 사용하였던 *Eco*RI에 의해 plasmid pT10의 replication origin이 파괴 되었을 가능성이 있으므로 plasmid pT10을 다른 위치에서 절단하는 *Hind*III를 사용하여 hybrid plasmid pTUH10을 제조하였다. 제조된 plasmid pTUH10을 이용하여 *B. subtilis*를 형질전환 시킨 결과 Cm에 내성을 갖는 형질전환주가 얻어졌으며 이로써 pT10도

*B. subtilis*에서 복제된다는 것을 알 수 있다.

pC194에서 유래된 동일한 Cm 내성유전자를 가지고 있으며 *Bacillus* 속 균주에서 안정하게 유지되는 것으로 알려진 plasmid vector인 pHSP9와 앞에서 제조된 plasmids를 각각 함유한 *B. subtilis*의 항생제 내성정도를 조사한 결과 분리균의 내재형 plasmids로 제조된 pTUC7, pTUC15, pTUH10를 함유한 *B. subtilis* 형질전환주가 pHSP9를 함유한 형질전환주 보다 높은 Cm 농도(50~70 µg/ml)에서도 생육에 지장을 받지 않는 것으로 나타났는데 이는 Cm 내성유전자가 동일하다는 것을 감안해 보면 plasmid 사본수에 의한 영향으로 추측된다.

또한 제조된 3 종류의 plasmids가 *B. subtilis*와 함께 산업적 유용성이 높은 것으로 *B. licheniformis*에서도 복제될 수 있는가를 확인하기 위해 *B. subtilis* 형질전환주로부터 각각의 plasmids를 분리하여 *B. licheniformis*를 형질전환 하였다. 그 결과 pHSP9 뿐만 아니라 pTUC7, pTUC15와 pTUH10에 의해서 각각 Cm에 내성을 보이는 *B. licheniformis* 형질전환주가 얻어져 *B. licheniformis*에서도 분리균의 plasmids가 복제됨이 확인되었다.

**Plasmids의 안정성**

*B. subtilis*와 *B. licheniformis* 형질전환주에서 plasmids pTUC7, pTUH10과 pTUC15의 분배적 안정성을 조사하기 위해 항생제를 첨가하지 않은 BHI 액체배지에서 12시간과

Table 2. Plasmid stability in *B. subtilis* and *B. licheniformis*

Plasmids	Plasmid stability (%) in repeated subcultures of <i>B. subtilis</i> at 12 h intervals				Plasmid stability (%) in repeated subcultures of <i>B. licheniformis</i> at 12 h intervals			
	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>
pHSP9	92	85	79	70	98	98	97	93
pTUC7	100	100	99	97	96	92	90	85
pTUC15	99	98	97	97	95	92	91	90
pTUH10	100	100	100	99.3	92	90	88	85

<sup>a</sup>Numbers of repeated subcultures.

다 계대배양 하면서 형질전환주의 항생제 내성의 상실 정도를 분석하였다. 37°C에서 12시간 진탕배양된 균배양액을 항생제가 첨가되지 않은 한천배지에 도말하여 얻은 콜로니를 Cm을 함유한 배지로 각 형질전환주 종류당 200 균주씩 옮겨 하룻밤 배양하여 형성된 콜로니 수를 측정하였다. Table 2에 보인 바와 같이 *Bacillus* 속 균주에서 안정한 유전자 운반체로 알려진 플라스미드 pHSP9와 안정성을 비교한 결과 *B. subtilis*에서 pTUC7, pTUC15, pTUH10은 안정성이 높은 것으로 나타났으나 *B. licheniformis*에서는 그 안정성이 pHSP9에 비해서는 낮았다. pHSP9의 replication origin도 *B. subtilis*의 내재형 plasmid pTA1060으로부터 유래되었는데 이들 hybrid plasmids의 안정성의 차이는 *Bacillus* 속주군의 종류에 따른 것으로 판단된다. 실제 *B. stearothermophilus*에 속하는 균주들간에서도 동일한 plasmid의 안정성이 다르다는 것이 보고된 바가 있다[19].

한편 각 형질전환주의 배양 균체로 부터 plasmids를 분리하여 전기영동한 결과 배지내에 항생제 첨가 여부에 관계없이 균체에서 분리된 각각의 plasmids 양이 유사한 것으로 확인 되었으며 또한 그 크기에 도 변함이 없는 것으로 나타났다(data not shown). 따라서 *Bacillus* 속 균주로부터 얻은 plasmids pT7, pT10, pT15가 그 안정성에는 차이가 있지만 *B. subtilis*와 *B. licheniformis*에서 모두 비교적 안정하게 복제된다는 사실이 확인 되었으므로 이들 plasmids는 *Bacillus* 속 균주의 plasmid vector 개발에 쓰일 수 있을 것으로 판단된다. 실제 다수의 plasmid vectors가 개발되어 있음에도 불구하고 재조합 *Bacillus* 균주에서 재조합 plasmid의 구조적 불안정성과 분배적 불안정성의 문제가 일어나는 경우가 많다는 면에서 볼 때 *Bacillus* sp. 3-3과 77-8에서 유래된 plasmids는 유전자원으로서 의의가 있다고 하겠다.

## 요 약

*Bacillus* 속 균주의 유전자 운반체를 개발하는데 사용되기 적당한 plasmid를 탐색하기 위해 토양에서 분리된 포자형성균들로부터 plasmid DNAs를 분리하였다. 이들을 agarose gel 전기영동을 통해 분석함으로써 유전자운반체로

개발하기에 적당한 크기와 양을 지니고 있는 plasmids를 함유한 2 종류의 균주를 선별하였다. 이들 분리균을 형태적 특성과 생화학적 특성을 조사하여 동정한 결과 *Bacillus* 속 균주로 확인되었다. 분리균 *Bacillus* sp. 3-3과 77-8에서 각각 2 종류의 plasmids를 분리하여 제한효소 지도를 작성하였는데 두 균주가 크기가 4.9 kb의 동일한 plasmid를 지니고 있다는 사실이 확인되었다. 이들 균주에서 분리된 서로 다른 3 종류의 plasmids에 chloramphenicol 내성유전자를 도입하여 제조한 hybrid plasmids로 *Bacillus subtilis*와 *B. licheniformis*를 각각 형질전환 시킴으로써 분리균의 3 종류 plasmids가 모두 복제된다는 사실이 확인되었다. 또한 항생제가 없는 배지에서도 *B. subtilis*와 *B. licheniformis* 형질전환주에서 *Bacillus* 분리균의 plasmids가 그 안정성을 유지하는 것으로 나타나 *Bacillus* 속 균주의 안정한 유전자 운반체의 개발에 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

## REFERENCES

- Aoki, T., N. Noguchi, M. Sasatsu, and M. Kono. 1987. Complete nucleotide sequence of pTZ12, a chloramphenicol-resistance plasmid of *Bacillus subtilis*. *Gene* **51**: 107-111.
- Bernhard, K., H. Schrempf, and W. Goebel. 1978. Bacteriocin and antibiotic resistance plasmids in *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **133**: 897-903.
- Birnboim, H. C. and J. Doly. 1982. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513-1523.
- Bron, S., P. Bosma, M. van Belkum, and E. Luxen. 1987. Stability function in the *Bacillus subtilis* plasmid pTA1060. *Plasmid* **18**: 8-15.
- Byeon, W. and B. Weisblum. 1990. Replication genes of plasmid pE194, *cop* and *repF*: Transcripts and encoded proteins. *J. Bacteriol.* **172**: 5892-5900.
- Chang, S., S.-Y. Chang, and O. Gray. 1987. Structural and genetic analyses of a *par* locus that regulates plasmid partition in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **169**: 3952-3962.
- Devine, K. M., S. T. Hogan, D. G. Higgins, and D. J. McConnell. 1989. Replication and segregational stability of the *Bacillus* plasmid pBAA1. *J. Bacteriol.* **171**: 1166-1172.
- Dubnau, D. and R. Davidoff-Abelson. 1971. Fate of trans-

- forming DNA following uptake by competent *Bacillus subtilis*. 1. Formation and properties of the donor-recipient complex. *J. Mol. Biol.* **56**: 209–221.
9. Haima P., D. van Sinderen, H. Schotting, S. Bron, and G. Venema. 1990. Development of a  $\beta$ -galactosidase  $\alpha$ -complementation system for molecular cloning in *Bacillus subtilis*. *Gene* **86**: 63–69.
  10. Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557–580.
  11. Iordanescu, S. 1975. Recombinant plasmid obtained from two different, compatible staphylococcal plasmids. *J. Bacteriol.* **124**: 597–601.
  12. Janniere, L., C. Bruand, and S. D. Ehrlich. 1990. Structurally stable *Bacillus subtilis* cloning vectors. *Gene* **87**: 53–61.
  13. Janniere, L., A. Gruss, and S. D. Ehrlich. 1993. Plasmids, pp. 625–644. In A. L. Sonenshein and *et al*s (eds.), *Bacillus subtilis and Other Gram-positive Bacteria: Biochemistry, Physiology, and Molecular Genetics*. Am. Soc. Microbiol., Washington DC.
  14. Kok, J., J. M. B. van der Vossen, and G. Venema. 1984. Construction of plasmid cloning vectors for lactic streptococci which also replicate in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 726–731.
  15. Lacey, R. W. and I. Chopra. 1974. Genetic studies of a multi-resistant strain of *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.* **7**: 285–297.
  16. Leblanc, D. J. and L. N. Lee. 1984. Physical and genetic analyses of streptococcal plasmid pAM $\beta$ 1 and cloning of its replication region. *J. Bacteriol.* **157**: 445–53.
  17. Narumi, I., N. Nakayama, S. Nakamoto, and H. Kihara. 1995. *Bacillus stearothermophilus* plasmid pSTK1 replicon is functional in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* **17**: 475–480.
  18. Oskam, L., G. Venema, and S. Bron. 1992. Plasmid pTB913 derivatives are segregationally stable in *Bacillus subtilis* at elevated temperatures. *Plasmid* **28**: 70–79.
  19. Oskam, L., G. Venema, and S. Bron. 1992. Plasmid maintenance in *Bacillus stearothermophilus* is strain-dependent. *FEMS Microbiol. Lett.* **93**: 203–208.
  20. Tanaka, T. and M. Ogura. 1998. A novel *Bacillus natto* plasmid pLS32 capable of replication in *Bacillus subtilis*. *FEBS Lett.* **422**: 243–246.

(Received August 13, 1999)