

# 다양한 *Lactobacillus* 균주에 대한 electrotransformation 최적 조건 탐색

이유원 · 임성훈 · 신춘봉 · 소재성\*

인하대학교 공과대학 해양과학 생물공학과

## Determination of Optimal Electrotransformation Conditions for Various *Lactobacillus* spp.

Yoo-Won Lee, Sung-Hoon Im, Chun-Feng Xin, and Jae-Seong So\*

Department of Marine Science and Biotechnology, Inha University, Incheon 402-751, Korea.

**Abstract** *Lactobacillus* spp., primary members of probiotics, have significant benefits for health and well-being of human. In this study *Lactobacillus* strains representing six species (*L. paracasei* KLB58, *L. fermentum* MS79 and KLB282, *L. plantarum* KLB213, *L. gasseri* KLB238, and *L. reuteri* KLB270) isolated from Korean adults were electrotransformed with plasmid pNCKH104. To determine optimal electrotransformation conditions, various conditions including cell wall weakening agent, electroporation buffer, electric field strength and time constant were tested for each strain. Overall, high transformation efficiency of approximately  $2.5 \times 10^3 \sim 5.5 \times 10^4$  CFU/ $\mu$ g DNA was obtained where conditions of 0.5 M sucrose electroporation buffer, 1.8 kV pulse voltage and 5 ms time constant were applied. The common conditions developed in this study will make transformation of various *Lactobacillus* spp. easier than previous procedures.

**Keywords:** *Lactobacillus* spp. electrotransformation, optimal conditions

### 서 론

유산균 (Lactic acid bacteria)은 그 산업적인 중요성뿐만 아니라 항균력 등 다양한 특성으로 인해 인간의 건강과 밀접한 관련을 가진 만큼, 그 기작에 대한 분자적 수준에서의 연구가 더욱 요구된다고 할 수 있다. 분자생물학에서의 많은 연구가 외래 유전자 또는 단백질의 숙주로의 도입을 필요로 하며, 그 중 하나인 electroporation의 원리는 외부로부터의 전기적인 교란에 의해 인지질 이중층의 소수성/친수성 상호작용이 약화되는 점과 이후 자발적으로 이를 재구성하려는 성질을 이용하는 것이다(1). 초기 유산균에 대한 분자생물학적 연구는 주로 유산구균 (*Lactococcus*)에 집중되었고 형질전환은 대장균 수준까지 발전하였다. 유산간균 (*Lactobacillus*)에 대한 연구도 활발히 진행되어 *Lactobacillus helveticus*(2), *casei*(3), *acidophilus*(4), *sake*(5),

*delbrueckii subsp. lactis*(6)등 다양한 균종의 형질전환 보고가 이루어지고 있다.

형질전환을 위한 유산균의 세포벽 약화를 위해 3가지 처리 방법을 시도하였다. Glycine은 electroporation전의 세포벽 처리제로 널리 쓰이며 다양한 박테리아의 성장배지 첨가 시, electrocompetence를 자극하는 것으로 알려져 왔고, 박테리아의 세포벽 펩타이드간 L-과 D-alanine을 포함하는 연결다리로 쉽게 들어가 세포벽의 합성을 저지한다고 알려져 있다. 세균의 세포벽은 세균의 정상적인 성장에 필수적인데 penicillin은 이러한 세포벽의 기본 구성물질인 peptidoglycan 형성의 마지막 단계에 관여하는 효소인 transpeptidase의 작용을 억제함으로써 세포벽합성의 최종 단계를 봉쇄하고, 세포 내막의 penicillin-binding protein과 결합하여 그 작용을 억제하는데, 이로 인해 자가 용해효소가 활성화되어 세포벽의 용해를 촉진시키는 것으로 알려져 있다. 그리고 lysozyme은 세포벽의 N-acetylglucosamine (NAG)과 N-acetylmuramate (NAM)의  $\beta$  (1  $\rightarrow$  4) glycosidic bonds를 가수분해하여 세포벽을 용해시키는 것으로 알려져 있다(7, 8).

### \*Corresponding author

Tel: +82-32-860-7516, Fax: +82-32-872-4046

e-mail: sjaeseon@inha.ac.kr

이전 연구에서 건강한 한국인으로부터 분리한 *Lactobacilli* 중 항균력 및 스트레스 내성이 뛰어난 몇 개의 균주를 선별하였으며(9), 본 연구에서는 이 중 6개의 *Lactobacillus* spp.에 대해 electrotransformation을 수행하여 각각의 형질 전환에 최고효율을 갖는 최적 조건을 찾고, 다양한 유산균에 간편하게 적용할 수 있는 공통의 조건을 결정하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 배양 조건

본 실험에서는 인체 내에서 정상 세균총으로 분리된 *Lactobacilli* 중, 다양한 외부 환경 스트레스에 우수한 내성을 보이는 6개의 균주 (*L. paracasei* KLB58, *L. fermentum* MS79, *L. fermentum* KLB282, *L. plantarum* KLB213, *L. gasseri* KLB238과 *L. reuteri* KLB270)가 이용되었다(9). 모두 MRS (de Man Rogosa Sharped)배지에서 정치 배양하고 배양온도는 37°C였다. 플라스미드 벡터의 호스트 균주로는 *Escherichia coli* DH5a를 이용하였으며, erythromycin (50 µg/ml)이 포함된 LB 배지에서 37°C로 교반 배양하였다. 형질전환을 위한 벡터 플라스미드로서 *Escherichia coli* - *L. reuteri* shuttle vector인 pNCKH104를 사용하였다(10). 이 플라스미드의 크기는 5.7 Kb이고 erythromycin 내성 유전자를 항생제 marker로써 가진다.

### Competent cell의 제작

세포생장은 분광광도계 (Phamacia. Biotech, ultrospec. 2000)를 이용해 탁도를 측정하여 관찰하였다(OD<sub>600</sub>). 정치기 (16-18 h)의 균주를 10 µl MRS broth에 2% 접종, 37°C에서 정치배양 한 후, 초기의 지수생장기 (OD<sub>600</sub> = 0.2~0.3, 약 3시간)일 때 원심분리 (6000 × g, 5분, 4°C)하여 얼음에 정치해 둔 washing buffer (5 mM sodium phosphate, pH 7.4, 1 mM MgCl<sub>2</sub>)로 2회 세척하였다. 이 방법 (Untreatment)을 대조군으로 하고 추가적으로 세포벽을 약화시키기 위해 Wei 등(8)에 의한 다음의 3가지 방법, 즉 i) 16-18시간 배양한 균주를 10 ml MRS broth에 2% 접종하여 37°C에서 2시간 배양하고 (OD<sub>600</sub> = 0.1 - 0.2), Penicillin을 최종 농도 10 µg/ml가 되도록 첨가한 후 1시간 추가 배양 (OD<sub>600</sub> = 0.2 - 0.3)하여 대조군과 같은 방법으로 세척한 Penicillin treatment, ii) 16-18시간 배양한 균주를 1% glycine (w/v)이 첨가된 10 ml MRS broth에 2% 접종하여 3시간 배양 (OD<sub>600</sub> = 0.2 - 0.3)하고 세척한 Glycine treatment, iii) MRS broth에 대조군과 같이 배양하고 회수한 세포를 세척 후 Egg white lysozyme을 최종 농도 10µg/ml가 되도록 첨가, 37°C에서 30분 추가배양하고 ice washing buffer로 1회 세척한 Lysozyme treatment 중에 하나를 처리하였다.

## Electroporation

형질전환 실험을 위해 정제된 pNCKH104플라스미드 DNA (50 µg/ml) 1 µl를 50 µl의 미리 얼음에 10분 이상 정치시킨 세포 현탁액 (4가지 조성, Table 1)과 함께 0.2cm gap Gene Pulser disposable cuvette (Bio-Rad)에 넣고 Gene Pulser (Bio-Rad)를 이용해 1.2, 1.8, 2.5 kV의 전압으로 electric pulse를 가하였다 (전기장 세기[E]는 각각 12, 18, 25 kV/cm). 각각의 전압에서 time constant를 default (약 5 ms)와 2.0ms로 설정하여 수행하였다. Electroporation 후 200 µl의 MRS배지를 더하고 37°C에서 2시간 정치배양 한 후 5 µg/ml의 erythromycin을 함유한 MRS agar plate에 도말하였다. MRS agar plate를 37°C에서 2~3일 배양 후에 콜로니 개수를 확인하였다.

Table 1. Composition of electroporation buffers

No	Electroporation buffer (EB)
1	0.5 M sucrose
2	0.3 M sucrose + 1 mM magnesium chloride
3	0.3 M sucrose + 1 mM magnesium chloride + 5 mM sodium phosphate
4	3 × concentrated buffer 2

### 형질전환의 확인

형질전환의 확인을 위해 대표적으로 *L. paracasei* KLB58 형질전환체를 Anderson and Mckay(11)의 방법으로 분리하고 전기영동 하였다. 형질전환 수율을 높이기 위해 필요에 따라 배양액의 양을 10배까지 높여 고농도로 분리하였다.

## 결과 및 고찰

### 형질전환 효율

전처리에 따른 각 균주의 형질전환 효율을 Table 2에서 Table 5까지 나타내었다. *L. gasseri* KLB238은 lysozyme 처리 시 형질전환 효율이 높았으며, 전위차가 클수록, time constant값이 작을수록 효율이 증가하는 것으로 나타났다. *L. fermentum* KLB282와 *L. fermentum* MS79는 같은 종의 균으로서, 비슷하게 glycine처리 후 electroporation buffer No.1에서 최적의 효율을 나타내었으나, lysozyme 처리 시에 *L. fermentum* KLB282는 다른 전처리에 비해 다소 떨어지고 *L. fermentum* MS79는 거의 형질전환이 되지 않는 두드러진 차이를 보였다. 또한 두 균주 모두 전기장의 전위차가 커질수록, time constant값이 작아질수록 형질전환 효율이 떨어지며 그 정도가 MS79에서 보다 뚜렷하게 나타나는 것을 관찰하였다. *L. plantarum* KLB213의 경우는 penicillin을 제외한 다른 전처리 후 전압이 낮

은 경우에서 높은 효율을 얻을 수 있었다. *L. paracasei* KLB58은 실험에 사용한 모든 균주 중에 가장 높은 효율을 나타냈다( $8.8 \times 10^4$  CFU/ $\mu$ g DNA). 하지만 이와 같은 효율은 전처리 하지 않은 electroporation buffer No.1에서만 관찰 되었고, penicillin이나 lysozyme처리 시에는 급격히 감소하는 것을 확인하였다. glycine처리 조건에서는 다른 strain과 비슷한 효율을 보였고, 전위차는 높을수록 다소 효율이 좋았다. *L. reuteri* KLB270의 경우 전체적으로 다른 균주에 비해 낮은 형질전환 효율을 보였으나, lysozyme 처리 후 electroporation buffer No. 3에 현탁하였을 때 특이적인 고 효율성을 나타냈다. 하지만 buffer와 전위차등 다른 조건에서는 거의 차이를 보이지 않았다.

### 최고효율 형질전환 조건

각 균주의 최고 형질전환 효율을 보인 조건을 표로 나타내었다(Table 2). 균종에 따라 상이한 조건에서 각각 최대 효율을 보였고 *L. fermentum*으로 같은 종인 MS79와 KLB282는 비슷한 특성을 나타냈다. *L. plantarum* KLB213의 경우는 electroporation buffer에 상관없이 결과가 같았다.

### 최대영향 형질전환 조건

각 균주에 대해 어떠한 조건이 형질전환효율에 큰 폭의 변화를 주는가 알아보기 위해 각 조건별 결과 값의 표준편차를 구하여 비교하였다(data not shown). 그중 표준편차가 가장 높은, 즉 가장 큰 영향을 주는 조건을 균주별로 제시하였다(Table 3). 최고효율 형질전환 조건과 마찬가지로 균종에 따라 크게 영향을 받는 조건이 달랐으며 같은 *L. fermentum*인 MS79와 KLB282도 MS79는 전처리에, KLB282는 전기장의 세기에 각각 가장 민감한 반응을 보였다.

*L. paracasei* KLB58이 가장 높은 편차를 나타낸 조건인 electroporation buffer No. 1, pulse voltage 2.5 kV, time constant 5 ms에서 4가지 전처리 방식에 따른 각 균주의 형질전환효율을 비교하였다(Fig. 1). KLB58은 세포벽 전처리를 하지 않았을 때 (untreatment) 87,500 CFU/ $\mu$ g DNA, penicillin 처리시 320 CFU/ $\mu$ g DNA 등 270배 이상의 큰 차이를 보였고 다른 대부분의 균주도 각각의 전처리에 따라 그 효율이 다르고 그 차이 또한 크게 나타났다. 같은 균종인 MS79와 KLB282의 형질전환특성 또한 매우

Table 2. Transformation efficiencies of each strain on untreated

EB#	Pulse voltage (kV)	Time constant (ms)	Efficiency ( $10^3$ CFU/ $\mu$ g DNA)					
			<i>L. gasseri</i> KLB238	<i>L. fermentum</i> MS79	<i>L. fermentum</i> KLB282	<i>L. plantarum</i> KLB213	<i>L. paracasei</i> KLB58	<i>L. reuteri</i> KLB270
1	1.2	2	10	2	2.5	7.5	NT	2
		5	12.5	3.5	2.5	7.5	1.5	2.5
	1.8	2	10	1.5	3	5	NT	2.5
		5	12.5	5	3	6	55	2.5
	2.5	2	10	2	2.5	4	NT	2.5
		5	12.5	1	4	5	87.5	2.5
2	1.2	2	7.5	2.5	3.5	7.5	NT	2
		5	10	2.5	4	7.5	0	2.5
	1.8	2	10	2	3.5	4	NT	2
		5	10	3	4	4	17.5	2.5
	2.5	2	10	2	3.5	4	NT	2.5
		5	12.5	2	2.5	5	1.2	2.5
3	1.2	2	10	3.5	2.5	3.5	NT	2
		5	10	3.5	4	7.5	0.06	2
	1.8	2	10	2	ND	ND	NT	2
		5	12.5	3	3.5	6	22.5	2
	2.5	2	12.5	2	4	7.5	NT	4
		5	12.5	2	1	3.5	17.5	1
4	1.2	2	7.5	4	3.5	5	NT	2
		5	6	5	3.5	7.5	0	2.5
	1.8	2	6.5	2	4	ND	NT	2.5
		5	6	2.5	3	5	0	2.5
	2.5	2	7.5	5	1	1.5	NT	2.5
		5	12.5	1.5	1.5	3.5	0.1	3

EB#, electroporation buffer number; ND, not detected; NT, not test.

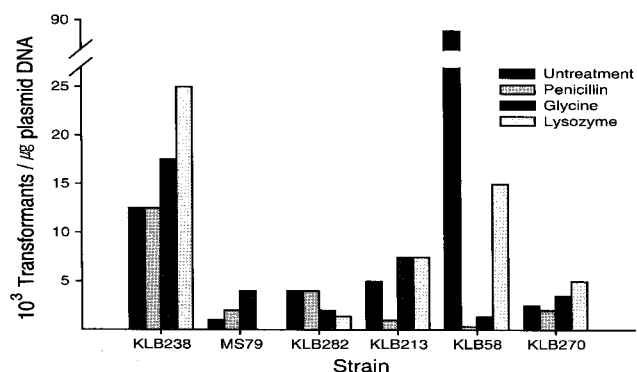
**Table 3.** Transformation efficiencies of each strain on penicillin pre-treatment

EB#	Pulse voltage (kV)	Time constant (ms)	Efficiency (10 <sup>3</sup> CFU/μg DNA)					
			<i>L. gasseri</i> KLB238	<i>L. fermentum</i> MS79	<i>L. fermentum</i> KLB282	<i>L. plantarum</i> KLB213	<i>L. paracasei</i> KLB58	<i>L. reuteri</i> KLB270
1	1.2	2	10	3.5	2	3.5	NT	1.5
		5	7.5	5	3.5	0.08	2	
	1.8	2	12.5	2	5	1.5	NT	1.5
		5	10	2.5	4	1	0.1	2
	2.5	2	10	1	5	1	NT	2.5
		5	12.5	2	4	1	0.32	2
2	1.2	2	10	4	5	3.5	NT	2
		5	10	5	5	1	0.08	2
	1.8	2	12.5	2.5	5	4	NT	2
		5	10	4	4	4	0.06	2
	2.5	2	10	1	4	1	NT	2.5
		5	12.5	1.5	4	2.5	0	2.5
3	1.2	2	10	3.5	2.5	2.5	NT	2
		5	12.5	3.5	3.5	2.5	0	2
	1.8	2	12.5	1	5	1.5	NT	2
		5	12.5	4	5	3.5	0.9	2
	2.5	2	10	0.6	5	1.5	NT	2
		5	12.5	1.5	4	2.5	0.12	0.16
4	1.2	2	10	3	5	1	NT	2
		5	12.5	5	5	5	0	2.5
	1.8	2	12.5	3.5	4	1.5	NT	2
		5	12.5	3	5	4	0.02	2
	2.5	2	10	2	3.5	1	NT	2.5
		5	12.5	1.5	4	1.5	0	2.5

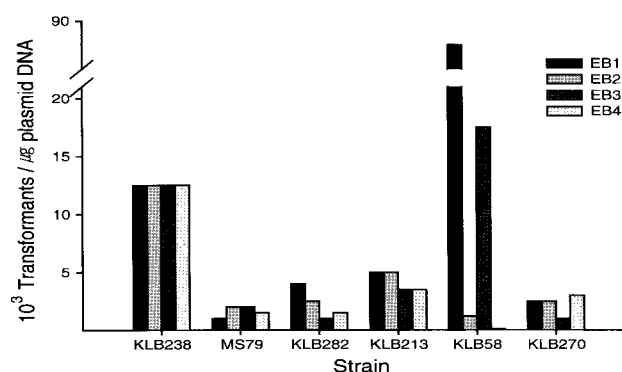
EB#, electroporation buffer number; NT, not test.

달라 MS79는 glycine treatment에서 높은 효율, untreated에서 낮은 효율을 보인 반면에 KLB282는 untreated 또는 penicillin treatment에서 높은 효율, glycine treatment에서는 낮은 효율을 보였다. 또한 MS79는 lysozyme treatment에서 거의 형질전환이 되지 않아 다른 균주들과 대조적이었다. 따라서 유산균의 electroporation에서 세포벽을 전처리하는 방식이 형질전환 효율에 현저한 영향을 주는 것으로 판단하였다.

각 균주의 electroporation buffer에 따른 형질전환 효율을 비교하기 위해 untreated, pulse voltage 2.5 kV, time constant 5 ms로 나머지 변수를 고정하였다(Fig. 2). KLB58의 경우 세포벽 전처리와 마찬가지로 electroporation buffer에 따라서도 형질전환 효율이 크게 차이가 나는 것을 보여주었다. 그에 반해 KLB238은 electroporation buffer에 대한 영향이 전혀 없는 것으로 나타났으며 MS79와 KLB213도 낮은 영향을 보였다.



**Fig. 1.** Effect of pre-treatment on the electrotransformation (black bars, untreated; gray bars, penicillin; dark-gray bars, glycine; light-gray bars, lysozyme).

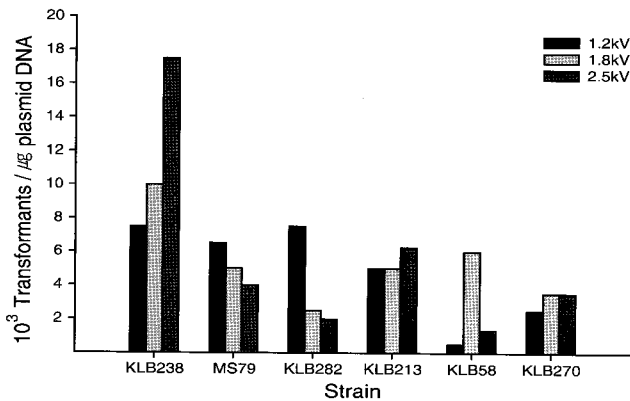


**Fig. 2.** Effect of electroporation buffer (EB) on the electrotransformation (black bars, EB No. 1; gray bars, EB No. 2; dark-gray bars, EB No. 3; light-gray bars, EB No. 4).

**Table 4.** Transformation efficiencies of each strain on glycine pre-treatment

EB#	Pulse voltage (kV)	Time constant (ms)	Efficiency ( $10^3$ CFU/ $\mu$ g DNA)					
			<i>L. gasseri</i> KLB238	<i>L. fermentum</i> MS79	<i>L. fermentum</i> KLB282	<i>L. plantarum</i> KLB213	<i>L. paracasei</i> KLB58	<i>L. reuteri</i> KLB270
1	1.2	2	15	7.5	5	3.5	NT	2.5
		5	7.5	6.5	7.5	5	0.52	2.5
	1.8	2	15	5	5	5	NT	2.5
		5	10	5	2.5	5	6	3.5
	2.5	2	25	1	2	3.5	NT	2.5
		5	17.5	4	2	ND	1.34	3.5
2	1.2	2	10	5	2.5	ND	NT	2.5
		5	10	2.5	5	4	0	1.5
	1.8	2	10	3.5	1.4	2.5	NT	2.5
		5	10	4	1.4	4	0.02	2.5
	2.5	2	15	1	2	3.5	NT	ND
		5	17.5	0.2	0	5	0.04	3.5
3	1.2	2	15	2.5	2.5	1.5	NT	2.5
		5	10	2.5	5	4	0.14	2
	1.8	2	10	2.5	4	1.5	NT	4
		5	10	2	1.6	4	0	2.5
	2.5	2	15	0.2	2	3.5	NT	ND
		5	10	0.1	2	5	0.04	1.5
4	1.2	2	12.5	3	2.5	3.5	NT	2.5
		5	10	2.5	4	1.5	0	2.5
	1.8	2	15	2.5	4	2.5	NT	4
		5	7.5	2.5	4	2.5	0	2.5
	2.5	2	10	0.6	2	3.5	NT	2.5
		5	7.5	0.6	2	5	0	3.5

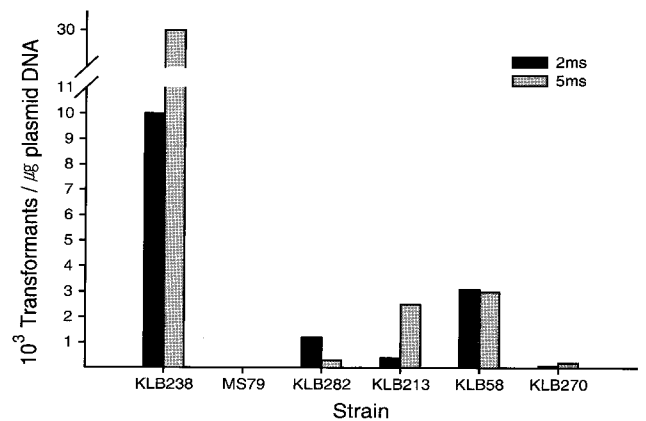
EB#, electroporation buffer number; ND, not detected; NT, not test.



**Fig. 3.** Effect of pulse voltage on the electrotransformation (black bars, 1.2 kV; gray bars, 1.8 kV; dark-gray bars, 2.5 kV).

*L. fermentum* KLB282가 가장 높은 편차를 보인 glycine treatment, electroporation buffer No. 1, time constant 5 ms의 조건에서 pulse voltage에 따른 각 균주의 형질전환 효율을 비교하였다(Fig. 3). 같은 *L. fermentum* 균종인 KLB282와 MS79가 1.2 kV에서 가장 높은 효율을 보이고 pulse voltage가 높아질수록 효율이 떨어지는 같은 양

상을 보였지만 KLB282가 MS79보다 급한 효율 감소를 보여 pulse voltage에 의한 영향이 더욱 큰 것을 알 수 있었다. 나머지 균주들은 효율이 높은 pulse voltage가 각각 달라 2.5 kV에서 가장 높은 효율을 보인 균주는 KLB238, KLB213, KLB270이었고, KLB58은 중간 세기인 1.8 kV에서 가장 높은 효율을 보였다.



**Fig. 4.** Effect of time constant on the electrotransformation (black bars, 2 ms; gray bars, 5 ms).

**Table 5.** Transformation efficiencies of each strain on lysozyme pre-treatment

EB#	Pulse voltage (kV)	Time constant (ms)	Efficiency (10 <sup>3</sup> CFU/μg DNA)					
			<i>L. gasseri</i> KLB238	<i>L. fermentum</i> MS79	<i>L. fermentum</i> KLB282	<i>L. plantarum</i> KLB213	<i>L. paracasei</i> KLB58	<i>L. reuteri</i> KLB270
1	1.2	2	12.5	0	2	6	NT	4
		5	10	0.08	2	7.5	0.34	2.5
	1.8	2	17.5	0	2	5	NT	4
		5	10	0	1.3	5	10	3.5
	2.5	2	30	0.04	0.72	3.5	NT	2.5
		5	25	0.02	1.4	7.5	15	5
2	1.2	2	17.5	0.1	2	5	NT	3.5
		5	10	0	2	4	0.02	3.5
	1.8	2	12.5	0	1.3	5	NT	3
		5	10	0	2	3.5	1.16	3.5
	2.5	2	30	0	0.2	3.5	NT	5
		5	25	0	1.4	5	6	1
3	1.2	2	12.5	0.02	1	5	NT	15
		5	10	0.02	4	5	0.08	6
	1.8	2	7.5	0	2	5	NT	3
		5	7.5	0	2	5	1.8	3.5
	2.5	2	30	0	0.3	2.5	NT	0.2
		5	10	0	1.2	0.4	3	0.08
4	1.2	2	10	0.02	1.6	6	NT	1
		5	6.5	0	2	7.5	0	0.6
	1.8	2	5	0	2	5	NT	1.4
		5	10	0	2	4	0.04	0.6
	2.5	2	7.5	0	1	3.5	NT	0.6
		5	6	0	1.2	4	0	0.2

EB#, electroporation buffer number; NT, not test.

*L. gasseri* KLB238의 표준편차가 가장 높게 나온 time constant 비교에서는 KLB238만 두드러진 형질전환 차이를 보였다(Fig. 4). 나머지 조건은 lysozyme treatment, electroporation buffer No. 3, pulse voltage 2.5 kV 였다. lysozyme treatment에서 효율이 현저히 떨어지는 MS79는 형질전환체를 전혀 얻을 수 없었고 KLB270도 극히 낮은 효율을 보였다. KLB282는 2 ms에서 효율이 4배 높았던 반면에 KLB213은 5 ms에서 6배 이상 효율이 높게 나타났다으며, KLB58은 큰 차이를 보이지 않았다.

**공통 형질전환 조건**

*Lactobacillus* spp.에 공통적으로 적용할 수 있는 최적의 형질전환 조건을 찾기 위해 6 균주에 대한 각 조건에서의 효율을 비교하였다. 그중 가장 높은 최소값이 나타난 조건의 조합은 I) untreated, electroporation buffer No. 1, pulse voltage 1.8 kV, time constant 5 ms, ii) untreated, electroporation buffer No. 2, pulse voltage 1.8 kV, time constant 5 ms, iii) glycine treatment, electroporation buffer No. 1, pulse voltage 1.8 kV, time constant 5 ms의 3가지였으며 이중 i)의 평균효율이 가장 높았다.

**Table 6.** Maximum transformation efficiencies

Strain	Pre-treatment	EB#	Pulse voltage (kV)	Time constant (ms)	Efficiency (CFU/μg DNA)
<i>L. gasseri</i> KLB238	Lysozyme	1	2.5	2	30,000
<i>L. fermentum</i> MS79	Glycine	1	1.2	2	7,500
<i>L. fermentum</i> KLB282	Glycine	1	1.2	5	7,500
<i>L. plantarum</i> KLB213	Untreatment	1~4	1.2	5	7,500
<i>L. paracasei</i> KLB58	Untreatment	1	2.5	5	87,500
<i>L. reuteri</i> KLB270	Lysozyme	3	1.2	2	15,000

EB# : electroporation buffer number.

**Table 7.** Most significant transformation conditions

Strain	Most significant condition	Mean (CFU/μg DNA)	Standard deviation (CFU/μg DNA)	Other conditions
<i>L. gasseri</i> KLB238	Time constant	20,000	10,000	Lysozyme/EB3/2.5 kV
<i>L. fermentum</i> MS79	Pre-treatment	3,260	2,760	EB1/1.2 kV/2 ms
<i>L. fermentum</i> KLB282	Pulse voltage	4,000	2,480	Glycine/EB1/5 ms
<i>L. plantarum</i> KLB213	Pre-treatment	5,260	2,660	EB1/2.5 kV/5 ms
<i>L. paracasei</i> KLB58	Pre-treatment	26,040	35,960	EB1/2.5 kV/5 ms
<i>L. reuteri</i> KLB270	Pulse voltage	6,060	6,420	Lysozyme/EB3/2 ms

EB : Electroporation buffer.

## 형질전환의 확인

Electrotransformation 후 pNCKH104 벡터 플라스미드의 *L. paracasei* KLB58에 대한 도입을 확인하기 위해 전기영동을 수행하였다(Fig. 1). 전기영동은 1.0% 아가로스 젤을 이용하였고 1 kb DNA ladder로 크기를 추측하였다(5.7 Kb).

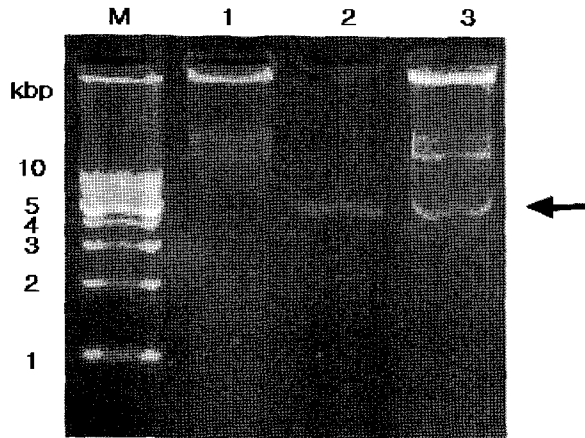


Fig. 5. Confirmation of *L. paracasei* transformant (M lane, 1 kb DNA ladder; lane 1, *L. paracasei*; 2, pNCKH104; 3, *L. paracasei* transformant). Arrow indicates pNCKH104 plasmid band (5.7 kb).

## 요약

*Lactobacillus* 균주는 대표적인 probiotics로서 인체의 건강유지에 좋은 영향을 준다고 알려져 있다. 본 연구에서는 건강한 한국인 체내에서 분리하고 선별된 6개의 *Lactobacillus* 균주 (*L. paracasei* KLB58, *L. fermentum* MS79 and KLB282, *L. plantarum* KLB213, *L. gasseri* KLB238, and *L. reuteri* KLB270)를 플라스미드 pNCKH104로 electrotransformation 하였다. 최적 조건을 찾기 위해 pulse voltage, time constant, 세포벽 처리방법, 세포현탁액을 다양하게 변화시켰으며, 그 결과 각각의 균주에 대해 최적의 형질전환 조건을 결정하였다. 대체로 인체에서 분리한 *Lactobacillus* 균주는 전처리 없이 0.5 M sucrose buffer로 현탁하여 1.8 kV의 pulse voltage와 5 ms의 time constant로 electrotransformation을 수행하였을 때 약  $2.5 \times 10^3 \sim 5.5 \times 10^4$  CFU/ $\mu$ g DNA의 형질전환 효율을 보였는데, 기존의 *Lactobacillus* 균주를 이용한 형질전환 실험들에 비해 월등히 높은 결과는 아니지만, *Lactobacillus* 균속 내의 다양한 종에 적용되는 공통의 조건을 찾음으로써 보다 간편한 형질전환 실험을 기대할 수 있다. 이는 앞으로 산업적, 임상적으로 중요한 *Lactobacillus* 균주의 형질전환을 손쉽게 하여 항균 펩타이드를 삽입한 벡터의 cell surface display발현 및 분석, 유용유전자 탐색을 위한 knock-out mutant등의 제작에 기여할 수 있으리라 본다.

## 감사

본 연구는 인하대학교 연구비 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

접수 : 2009년 2월 18일, 게재승인 : 2009년 4월 23일

## REFERENCES

1. Purves, W. K., D. Sadava, G. H. Orians, and H. C. Heller (2001), Life: the science of biology, 6th ed., pp316-317, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.
2. Bhowmik, T. and J. L. Steele (1993), Development of an electroporation procedure for gene disruption in *Lactobacillus helveticus* CNRZ 32, *J. Gen. Microbiol.* **139**, 1433-1439.
3. Chassy, B. M. and J. L. Flickinger (1987), Transformation of *Lactobacillus casei* by electroporation, *FEMS Microbiol. Lett.* **44**, 173-177.
4. Walker, D. C., K. Aoyama, and T. R. Klaenhammer (2004), Electroporation of *Lactobacillus acidophilus* group A1, *FEMS. Microbiol. Lett.* **138**, 233-237.
5. Berthier, F., M. Zagorec, M. Champomier-Verges, S. D. Ehrlich, and F. Morel-Deville (1996), Efficient transformation of *Lactobacillus sake* by electroporation, *Microbiology* **142**, 1273-1279.
6. Serror, P., T. Sasaki, S. D. Ehrlich, and E. Maguin (2002), Electrotransformation of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* and *L. delbrueckii subsp. lactis* with various plasmids, *Appl. Environ. Microbiol.* **68**(1), 46-52.
7. Ito, M. and M. Nagane (2001), Improvement of the electro-transformation efficiency of facultatively alkaliphilic *Bacillus pseudofirmus* OF4 by high osmolarity and glycine treatment, *Biosci. Biotech. Bioch.* **65**(12), 2773-2775.
8. Wei, M., C. M. Rush, J. M. Norman, L. M. Hafner, R. J. Epping, and P. Timms (1995), An improved method for the transformation of *Lactobacillus* strains using electroporation, *J. Microbiol. Meth.* **21**, 97-109.
9. Chang, C. E., S. I. Pavlova, L. Tao, E. K. Kim, S. C. Kim, H. S. Yun, and J. S. So (2002), Molecular identification of vaginal *Lactobacillus* spp. isolated from Korean women, *J. Microbiol. Biotenol.* **12**(2), 312-317.
10. Heng, N. C., H. F. Jenkinson, and G. W. Tannock (1997), Cloning and expression of an endo-1,3-1, 4-beta-glucanase gene from *Bacillus macerans* in *Lactobacillus reuteri*, *Appl. Environ. Microbiol.* **63**(8), 3336-3340.
11. Anderson, D. G. and L. L. McKay (1983), A simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from Lactic streptococci, *Appl. Environ. Microbiol.* **46**(3), 549-552.