

Electroporation에 의한 *Bacillus subtilis* 168의 최적 형질전환 조건

김지숙 · 홍광원
동국대학교 식품공학과

Optimum Conditions for Electrotransformation of *Bacillus subtilis* 168

Ji-Sook Kim and Kwang-Won Hong

Department of Food Science and Technology, Dongguk University

Abstract

Optimum conditions for gene transfer in *B. subtilis* 168 by electroporation were studied. For competent cell preparation, mid-log phase cell cultures freshly grown in LB broth were harvested and resuspended with washing buffer. Competent cells were transformed with either supercoiled DNA of plasmid pUB110 or pRB373 by electroporation. Optimum conditions for electrotransformation of *B. subtilis* 168 with pUB110 were the electric field strength of 10 kV/cm, the resistance of 100 Ω and the capacitance of 25 μ F, and resulted in an efficiency of 3.8×10^3 transformants/ μ g DNA. In the case of pRB373, the maximum efficiency of 1.5×10^3 transformants/ μ g DNA was obtained at the same condition as in pUB110 except the electric field strength of 20 kV/cm.

Key words: *Bacillus subtilis*, electroporation, pUB110, pRB373

서 론

*Bacillus*속은 산업적 이용가치가 높은 그람양성균의 일종이며 그 중 *Bacillus subtilis*는 유전 및 생리학적 연구가 가장 많이 이루어진 대표적인 균이다. *B. subtilis*는 간단한 배지에서도 잘 자라고 생육속도도 빠르며 다량의 가수분해효소들을 합성하여 분비하는 특성이 있으며 일반적으로 안전하다고 간주되는 균으로서 (GRAS) 오래 전부터 아미노산이나 purine nucleosides와 같은 정미성 물질의 생산(Sauer, et al., 1998)에 이용되어 왔다. 또한 특정 생리적 조건 하에서 배지로부터 외래 DNA를 받아들여 유전적으로 형질전환 되어 짐으로서 이러한 특성들을 이용하여 의약품 단백질과 같은 여러 종류의 외래 단백질을 생산하는 등 생물공학 분야에서 널리 이용되고 있다(Bron et al., 1998).

일반적으로 유전자재조합기술을 이용한 그람양성균의 응용가능성에 제한을 주는 요소 중의 하나로 외래 DNA를 세포 내로 도입할 때의 효율이 낮은 경우를

들 수 있다. 그람양성균에 외래 DNA를 도입하는 형질전환 방법에는 protoplast를 이용하는 방법(Chang와 Cohen, 1979)과 짧은 시간 동안 고전압펄스를 주어 세포막의 투과성을 일시적으로 변형시켜 도입하는 electroporation 방법(Shivarova, et al., 1983; Kusaoke, et al., 1989; Masson, et al., 1989) 등이 알려져 있다. protoplast를 이용하는 형질전환 방법은 시간이 오래 걸리고 복잡한 재생배지가 필요하며 protoplast의 재생효율이 낮은 반면 electroporation 방법은 간단하고 시간이 적게들며 형질전환 효율도 protoplast를 이용하는 것보다 비교적 높은 것으로 알려져 널리 이용되고 있다. 그러나 숙주 세포와 plasmid DNA의 종류, 순도, 크기, 농도 등에 따라 electroporation에 의해 세포 내로 DNA가 도입되는 정도가 각기 다르며 또한 transformation에 사용된 electric field strength, capacitance, resistance, electroporator에 따른 펄스의 시간, 형태 등과 같은 여러 복잡한 요인들이 형질 전환 효율에 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다(Vehmaanpera, 1989; Ohse, et al., 1997; Woods, et al., 1998). *Bacillus*속의 형질전환 효율(형질전환체의 수/ μ g DNA)을 보면 *B. brevis*의 경우 대략 10^7 - 10^8 (Okamoto, et

Corresponding author: Kwang-Won Hong, Department of Food Science and Technology, Dongguk University, Seoul 100-715, Korea

al., 1997), *B. amyloliquefaciens*는 10^5 (Vehmaanpera, 1989), 그리고 *B. subtilis*는 10^3 - 10^4 (Kusaoko, et al., 1989; Brigidi, et al., 1990; McDonard, et al., 1995; Ohse, et al., 1995)으로서 *B. subtilis*의 경우 낮은 효율로 인하여 좀 더 나은 형질 전환 방법이나 최적 조건의 검토가 필요하다. 본 연구에서는 그람양성균인 *B. subtilis* 168을 숙주 세포로 사용하여 electroporation 방법에 의해 pUB110 plasmid DNA와 대장균과 *B. subtilis* 사이의 shuttle vector인 pRB373 plasmid DNA를 도입시키기 위한 최적 형질전환 조건과 전환 효율을 검토하였다.

재료 및 방법

균주와 plasmids

본 실험에 사용된 균주는 *Bacillus subtilis* 168 (*trpC2*)이며 plasmids는 가나마이신에 내성을 갖는 pUB110(4.5 kb)과 암피실린과 가나마이신에 내성을 갖는 pRB373(5.8 kb) DNA를 이용하였다.

시약 및 기기

배지에 사용된 시약은 Difco Lab.에서 agar는 Junsei 제품을 사용하였고, DNA 분리에는 Aetna genetech사의 Atena spin kit을 구입하여 사용하였다. Agarose, 항생제 등은 Sigma. Chem. Co. 에서 구입하였으며 그 외 시약은 일급 이상의 시약을 사용하였다. plasmid DNA를 절단하는 제한효소는 New England Biolab 제품을 사용하였다. Electro-competent cell을 만들기 위해 측정된 UV-VIS spectrophotometer는 Shimadzu Co. (Model UV-1201)의 제품을 이용하였으며 transformation에 사용된 electroporator Gene pulser®II는 Bio-Rad사의 것을 사용하였다. Agarose 전기 영동에 사용된 mupid-21은 Cosmo bio.사 것을, 사진 촬영에 사용한 polaroid film은 Kodak 제품을 사용하였다.

B. subtilis 168의 electro-competent cell 제조

*B. subtilis*를 Penassay 고체 배지(Difco antibiotic medium No. 3)에서 37°C 12시간 배양한 후 생성된 단일 콜로니를 선별하고 10 mL의 Penassay 액체 배지에 접종하여 37°C에서 12시간 배양을 하였다. 이중 5 mL를 취하여 500 mL의 액체 배지에 다시 접종한 후 37°C에서 진탕 배양(150 rpm) 하면서 대수기 증반($A_{660}=0.4\sim 0.5$)이 될 때까지 배양하였다. 이 배양액을 30분 동안 차가운 얼음에 정치하였고 4°C, 5,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 제거하고 침전물

에 차가운 washing buffer (0.5 M Sucrose, 0.01 mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.01 mM Maleic acid, pH 6.5)을 가하여 수세하였다. 이 과정을 3번 반복하고 마지막 과정에서는 5 mL의 washing buffer로 침전물을 녹여 40 μ l 씩 1.5 mL-Eppendorf tube에 분주하여 -80°C에 보관하고 사용하였다.

Electroporation 방법에 의한 형질전환

40 μ l 씩 분주한 competent cell을 -80°C deep freezer에서 꺼내어 얼음에 보관하여 녹이고 멸균된 cuvette도 얼음에 보관하였다. plasmid DNA를 cell에 가하여 얼음에 10분간 정치하였다. Gene pulser®II의 electric field strength (kV/cm)와 resistance (Ω), capacitance (μ F)를 선택한 후 혼합된 cell을 cuvette에 담고 pulse를 가한 다음 cuvette에 미리 37°C 항온 수조에서 가온한 expression medium (4×Penassay medium : 2×washing buffer = 1) 1 mL을 가하고 세포를 부유시켜 회수하였다. 그 후 37°C의 항온 수조에서 3시간 동안 배양한 다음 가나마이신(25 μ g/mL)이 포함된 LB 배지에 도말하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 배지에서 자란 콜로니의 수를 측정하여 형질전환 효율(형질전환체의 수/ μ g DNA)을 계산하였다.

Plasmid의 분리정제 및 전기영동

형질전환을 확인하기 위하여 형질전환체로부터 plasmid DNA의 추출은 일반적인 alkali lysis 방법(Maniatis, et al., 1989)을 사용하였다.

정제된 pUB110, pRB373 DNA를 적절한 제한효소로 절단한 후 size marker와 함께 1% agarose gel에서 전기 영동을 하여 숙주세포에 도입된 plasmid DNA의 크기를 확인하였다.

결과 및 고찰

B. subtilis 168의 형질 전환

형질전환 효율에 영향을 미치는 전기적 변수들은 electric field strength, resistance, capacitance, pulse time 등이 있으며 pulse time은 resistance와 capacitance의 곱으로 나타난다. pUB110 plasmid DNA의 최적 형질전환 조건을 찾기 위해 상기 변수들과 DNA의 농도(μ g/mL)와 같은 인자를 변형시키면서 형질전환을 시도하였다. 형질전환 조건으로 먼저 resistance를 100 Ω , capacitance를 25 μ F, DNA 농도를 0.2 μ g으로 고정하고 electric field strength를 7 kV/cm에서 12 kV/cm까지 1 kV 씩 점진적으로 증가시켜 고전압 펄스를

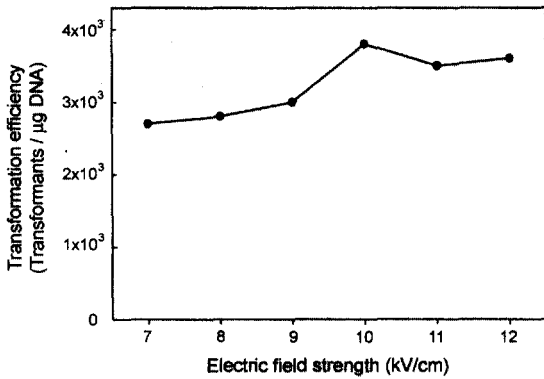


Fig. 1. Effect of electric field strength on transformation efficiency of *B. subtilis* 168 with pUB110. Electroporation conditions: resistance, 100 Ω; capacitance, 25 μF; DNA concentration, 0.2 μg.

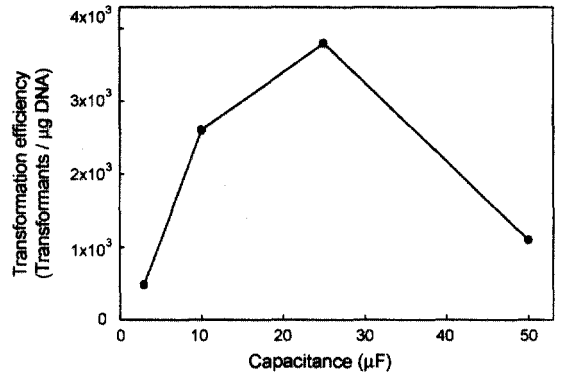


Fig. 3. Effect of capacitance on transformation efficiency of *B. subtilis* 168 with pUB110. Electroporation conditions: electric field strength, 10 kV/cm; resistance, 100 Ω; DNA concentration, 0.2 μg.

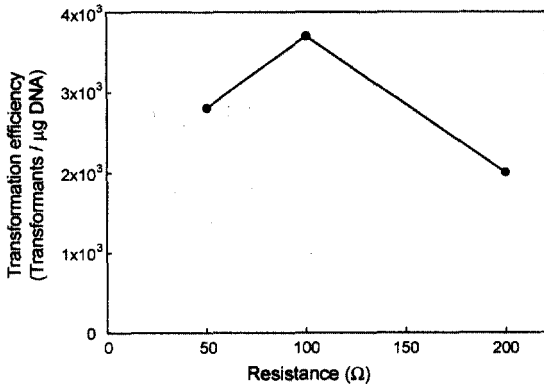


Fig. 2. Effect of resistance on transformation efficiency of *B. subtilis* 168 with pUB110. Electroporation conditions: electric field strength, 10 kV/cm; capacitance, 25 μF; DNA concentration, 0.2 μg.

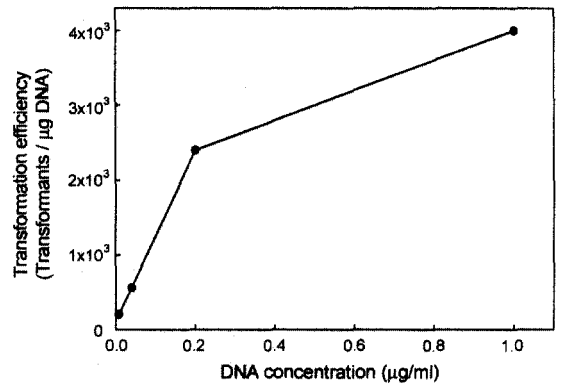


Fig. 4. Effect of DNA concentration on transformation efficiency of *B. subtilis* 168 with pUB110. Electroporation conditions: electric field strength, 10 kV/cm; resistance, 100 Ω; capacitance, 25 μF.

가한 결과 10 kV/cm에서 형질전환효율이 3.8×10^3 으로 가장 높았다(Fig. 1). 상기 조건에서 electric field strength를 10 kV/cm로 고정하고 resistance를 50에서 200 Ω까지 변화시켜 가며 펄스를 가한 결과 resistance가 100 Ω일때 형질전환 효율이 가장 우수하였다(Fig. 2). 최적 capacitance를 구하기 위해 electric field strength를 10 kV/cm, resistance를 100 Ω, DNA 농도를 0.2 μg으로 고정한 상태에서 capacitance를 3, 10, 25, 50 μF으로 달리하며 펄스를 가한 결과 25 μF에서 가장 높은 형질전환 효율을 보였다(Fig. 3). 한편 DNA 농도가 형질전환 효율에 미치는 영향을 조사하기 위해 electric field strength를 10 kV/cm, resistance를 100 Ω, capacitance를 25 μF으로 고정하고 DNA 농도를 0.01, 0.05, 0.2, 1 μg씩 달리하여 실험하였을 때 DNA 농도가 증가할수록 형질전환체의 수는 증가하였

다(Fig. 4). 상기 조건들에서 얻어진 형질전환 효율은 최대 3.8×10^3 으로, 동일 균주와 plasmid를 사용하였으나 형질전환에 사용된 electroporator가 다르고 electric field strength가 16 kV/cm, 펄스 시간이 400 μsec 인 조건 하에서 얻어진 Kusaoke et al. (1989)의 결과와 비교해볼 때 약 2.5 배 높게 나타났다.

pRB373 plasmid는 그람음성균인 *E. coli*와 그람양성균인 *B. subtilis*에서 증폭이 가능한 shuttle vector로 유전자 조작이 용이한 *E. coli*에서 재조합 plasmid를 구성 후, 재조합된 유전자를 *B. subtilis*에 도입시킬 수 있는 유용한 plasmid이다(Bruckner, 1992). pRB373 plasmid의 형질전환 조건을 설정하기 위해 pUB110 plasmid의 최적 형질전환 조건을 참고하여 electroporation을 시도하였다. 형질전환 조건으로 resistance를 100 Ω, capacitance를 25 μF, DNA 농도를 0.2 μg

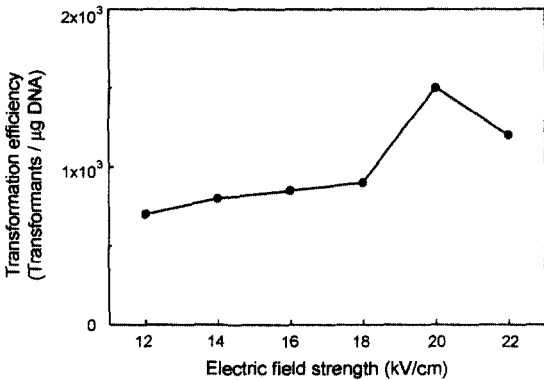


Fig. 5. Effect of electric field strength on transformation efficiency of *B. subtilis* 168 with pRB373. Electroporation conditions: resistance, 100 Ω ; capacitance, 25 μ F; DNA concentration, 0.2 μ g.

1 2 3 4 5 6 7 8 9



Fig. 6. Agarose gel electrophoresis of plasmid DNAs isolated from transformants of *B. subtilis* 168. Lane 1, authentic plasmid pUB110; lane 2, lane 1 plasmid pUB110 digested with *Bam*HI; lane 3, DNA isolated from pUB110-transferred transformant; lane 4, lane 3 plasmid pUB110 digested with *Bam*HI; lane 5, size marker (6.0, 4.0, and 2.0 kb); lane 6, authentic plasmid pRB373; lane 7, lane 6 plasmid pRB373 digested with *Eco*RI; lane 8, DNA isolated from pRB373-transferred transformant, lane 9, lane 8 plasmid pRB373 digested with *Eco*RI.

로 고정하고 electric field strength를 12 kV/cm에서 22 kV/cm까지 2 kV 씩 점진적으로 증가시켜 고전압 펄스를 가한 결과 20 kV/cm에서 가장 높은 1.5×10^3 의 형질전환 효율을 얻을 수 있었다(Fig. 5). 이 형질전환 조건 하에서 pRB373 plasmid는 pUB110 plasmid의 경우보다 형질전환 효율이 낮았고 또한 높은 electric field strength를 필요로 하였다. 이 결과는 pRB373 plasmid의 크기가 5.8 kb로 4.5 kb인 pUB110 plasmid보다 크기가 크며 일반적으로 plasmid의 크기가 클 경우 형질전환 효율이 감소하는 경향(Brigidi, et al., 1989)과 일치한다고 볼 수 있다.

그러나 *B. subtilis*에서 supercoiled 형태 plasmid의

형질전환 효율이 10^4 이하로는 클로닝이나 homologous recombination 등과 같은 유전자재조합기술을 응용하기에 충분치 못한 것으로 생각된다. 형질전환 효율을 증가시키기 위한 하나의 시도로 Matsuno et al. (1992)는 *B. subtilis* NB22 균주를 pUB110과 pC194 plasmid로 형질전환시킬때 pulsation buffer로 25% polyethyleneglycol과 0.1 M mannitol 수용액을 사용하여 각각 10^6 및 10^7 의 형질전환 효율을 얻은 것으로 보고하였다. *B. subtilis* 168 균주를 이용한 본 실험과 *B. subtilis* ISW1214 균주를 이용한 Ohse et al. (1995)의 실험 모두 같은 pUB110 plasmid를 동일한 pulsation buffer를 사용하여 형질전환을 시도하여 보았으나 상기와 같은 높은 형질전환 효율을 얻지 못하였다. 따라서 형질전환 효율을 높이기 위해서는 개개의 균주 및 plasmid들에 대하여 형질전환에 영향을 미치는 가능한 인자들에 대한 지속적인 연구가 이루어져야 할 것으로 보인다.

형질전환체에 도입된 plasmid DNA의 확인

Electroporation을 이용하여 plasmid DNA를 *B. subtilis*에 도입 후 도입된 plasmid를 확인하기 위하여 항생제가 들어 있는 배지에서 자란 각각의 형질전환체들로부터 plasmid DNA를 분리 정제하였다. 분리된 plasmid들은 authentic plasmid DNA들과 agarose gel 상에서 같은 이동도를 나타내었다(Fig. 6). 도입된 plasmid들은 deletion이나 segregation과 같은 plasmid의 변형은 일어나지 않은 것으로 보이며 분리 정제된 pUB110과 pRB373 plasmid DNA를 각각 제한효소 *Bam*HI과 *Eco*RI으로 단일 절단하여 agarose gel 상에서 그 크기를 역시 단일 절단된 authentic plasmid DNA들과 비교한 결과(Fig. 6), 형질전환체들에 각각의 동일한 plasmid DNA가 도입되었음을 확인하였다.

요 약

그램양성균인 *Bacillus subtilis* 168에서 electroporation 방법에 의한 plasmid DNA들의 최적 형질전환 조건을 조사하였다. competent cell은 LB broth에서 배양한 대수기 중반의 cell을 완충용액(0.5M sucrose, 0.01 mM MgCl₂, 0.01 mM maleic acid)으로 현탁하여 사용하였고, plasmid DNA는 pUB110(4.5 kb)과 shuttle vector인 pRB373(5.8 kb)를 이용하였다. plasmid pUB110의 최적 형질전환 효율(3.8×10^3 transformants/ μ g DNA)은 10 kV/cm electric field strength, 100 Ω resistance, 25 μ F capacitance 조건 하에서, 그리고 pRB373의 최적 형질전환 효율(1.5×10^3 transformants/

μg DNA)은 electric field strength가 20 kV/cm 인 조건에서 얻어졌으며 이때 사용한 DNA의 농도는 각각 0.2 μg이었다.

감사의 글

본 연구는 동국대학교 논문게제 연구비 지원으로 이루어 졌으며 이에 감사드립니다.

문헌

- Brigidi, P., E.D. Rossi, M.L. Bertarini, G. Riccardi, and D. Matteuzzi. 1990. Genetic transformation of intact cells of *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Letters* **67**: 135-138
- Bron, S., A. Bolhuis, H. Tjalsma, S. Holsappel, G. Venema, and J.M. Dijk. 1998. Protein secretion and possible roles for multiple signal peptidases for precursor processing in *Bacilli*. *J. of Biotechnology* **64**: 3-13
- Bruckner, R. 1992. A series of shuttle vectors for *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Gene* **122**: 187-192
- Chang, S. and S.N. Cohen. 1979. High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplasts. by plasmid DNA. *Molec. Gen. Genet.* **168**: 111-115
- Kusaoke, H., Y. Hayashi, Y. Kadowaki and H. Kimoto. 1989. Optimum conditions for electric pulse-mediated gene transfer to *Bacillus subtilis* cells. *Agric. Biol. Chem.* **53**: 2441-2446
- Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Lab. N.Y. pp88-95
- Masson, L., G. Prefontaine, and R. Brousseau. 1989. Transformation of *Bacillus thuringiensis* vegetative cells by electroporation. *FEMS Microbiology Letters* **60**: 273-278
- Matsuno, Y., T. Ano, M. Shoda. 1992. High-efficiency transformation of *Bacillus subtilis* NB22, an antifungal antibiotic iturin producer, by electroporation. *J. Ferment. Bioeng.* **73**: 261-264
- McDonald, I.R., P.W. Riley, R.J. Sharp and A.J. McCarthy. 1995. Factors affecting the electroporation of *Bacillus subtilis*. *J. of Applied Bacteriology* **79**: 213-218
- Ohse, M. K. Kawade, and H. Kusaoke. 1997. Effects of DNA Topology on Transformation Efficiency of *Bacillus subtilis* ISW1214 by electroporation. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry* **61**: 1019-102
- Ohse, M., K. Takahashi, Y. Kadowaki, and H. Kusaoke. 1995. Effects of Plasmid DNA Size and Several Other Factors on Transformation of *Bacillus subtilis* ISW1214 with Plasmid DNA by electroporation. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry* **59**: 1433-1437
- Okamoto A., A. Kosugi, Y. Koizumi, F. Yanagida, and S. Uda. 1997. High efficiency transformation of *Bacillus brevis*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **61**: 202-203
- Sauer, U. D.C. Cameron, and J.E. Bailey. 1998. Metabolic capacity of *Bacillus subtilis* for the production of purine nucleotides, riboflavin, and folic acid. *Biotechnology and Bioengineering* **59**: 227-238
- Shivarova, N., W. Forster, H. E. Jacob, and R. Grigorova. 1983. Stimulation of plasmid transformation of *Bacillus cereus* protoplasts by electric field pulses. *Zeitschrift fur Allgemeine Microbiologie* **23**: 595-599
- Vehmaanpera, J. 1989 Transformation of *Bacillus amyloliquefaciens* by electroporation. *FEMS Microbiology Letters* **61**: 165-170
- Woods, J.P., E.L. Heinecke, and W.E. Goldman. 1998. Electrotransformation and expression of bacterial genes encoding hygromycin phosphotransferase and β-galactosidase in the pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum*. *Infection and immunity* **66**: 1697-1707