공학석사 학위논문

*Vibrio furnissii*로부터 LPS 생합성에 관여하는 phosphomannomutase 유전자의 클로닝과 Suicide vector를 이용한 돌연변이 균주의 제작

2002년 2월

부경대학교 대학원

생물공학과

김 남 현

공학석사 학위논문

*Vibrio furnissii*로부터 LPS 생합성에 관여하는 phosphomannomutase 유전자의 클로닝과 Suicide vector를 이용한 돌연변이 균주의 제작

지도교수 공 인 수

이 논문을 공학석사 학위논문으로 제출함

2002년 2월

부경대학교 대학원

생물공학과

김 남 현

김남현의 공학석사 학위논문을 인준함

2001年 12 月

주 심 이학박사 홍 용 기 (인)

위 원 공학박사 이 형 호 (인)

위 원 공학박사 김 성 구 (인)

목 차

Cloning of phosphomannomutase gene from *Vibrio furnissii* involved in biosynthesis of LPS and Production of knock out mutant using suicide vector

Nam hyun Kim

Department of Biotechnology and Bioengineering, Pukyong National University

Abstract

We cloned a part of phosphomannomutase(PMM) gene from *Vibrio furnissii* which one of the cause of disease gram negative bacteria *Vibrio* sp. and found out the entire open reading frame(ORF) as to carry out inverse PCR.

0.5kb fragment of the *pmm* was cloned in suicide vector and transformed into the *V. furnissii*, that could make knock out mutant to homologous recombination.

To make sure that the mutant make change to gene and biosynthesis of Lipopolysaccharide(LPS), we served southern blot hybridization and SDS-PAGE /Silver staining.

This study was explained to be clear that relationship of *pmm* and LPS biosynthesis. For the more, considered that many function of LPS which has known as antigene and protection to several bacteria from comparing wild-type with mutant

Ⅰ. 서론

*Vibrio furnissii*는 *Vibrio fluvialis*와 함께 심한 설사증상을 일으키는 *Vibrio* sp.중 하나로 알려져 있으며 이는 종종 seafood와 raw shellfish 등을 섭취하였을 때 사람에게 감염되어 나타나는 것으로 알려져 있다. *V.furnissii*는 처음에 *V. fluvialis*와 같은 종으로 구분하였다가 나중에 그 유전적인 분석을 통해 또 다른 종류로 분류되어 나왔다[1,7] 특히 *Vibrio furnissii*는 estuarine environment(강의 하구)에서 종종 발견되고 있으며 몇몇 사람에게 설사를 일으키는 경우에서 발견된 보고가 있지만 그 완전한 pathogene에 대해선 아직 연구 중에 있다.[2]

PMM(phosphomannomutase)는 PGM(phophoglucomutase)와 함께 여러 미생물 종에 있어 당 섭취 과정 중에 관여하며 Mannose-6-phosphate를 Mannose-1-phosphate로 변환시켜주는 역할을 하는 것으로 이는 결국 alginate 나 LPS(Lipopolysaccharide)의 생합성에 관여하는 것으로 몇몇 연구에서 보고된 바 있다(Fig.1)[3,6,8,10].

지금까지 LPS에 관련된 많은 연구가 행해졌으며 이는 이미 여러 병원성 미생물에 있어 항원 및 미생물 자체의 보호막으로 작용한다고 보고되어 왔다[11]. 우리는 *V.furnissii*의 Gene library과정 중 우연히 PMM 유전자의 일부분을 발견하였으며 다시 Southern hybridization 및 Inverse PCR과정을 통해 그 완전한 유전자 염기서열 및 염색체 지도를 작성하였다. 또한 이 유전자의 ORF 중 일부분을 Suicide vector를 이용하여 knock out시킨 돌연변이 균주를 제작하였고 이 균주로부터 LPS를 분리하여 wild-type 균주와 비교분석을 통해 사라진 LPS를 SDS-PAGE와 silver staining을 통해 육안으로 확인할 수 있었다.

본 연구를 통해 아직 밝혀진바 없는 *V.furnissii*의 PMM의 유전자를 밝혀내고 그 기능의 결과물인 LPS 합성과의 관계를 명백하게 증명하는데 그

의의를 찾을 수 있을 것이다.

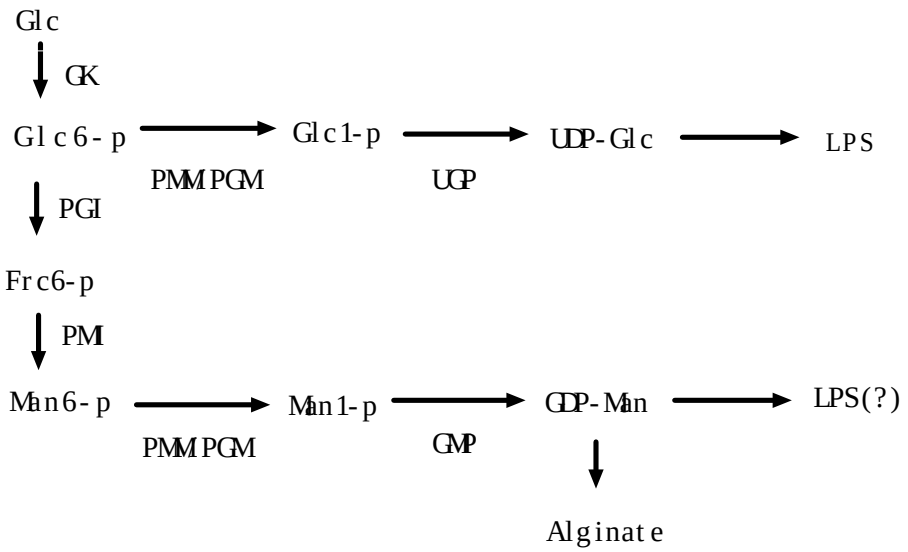

figure 1. Proposed roles of PMM/PGM in the biosynthesis of alginate and LPS.

Abbreviations:Glc, glucose; GK, glucose kinase; Glc6-p, G6P; Glc1-P G1P; UDP-Glc, UDP-glucose; UGP, UDP-glucose pyrophosphorylase; PG, phosphoglucose isomerase; Frc6-P, fructose6-phosphate; Man6-P, M6P; Man1-P, M1P; GDP-man, GDP-manose; GMP, GDP-mannose pyrophosphorylase.[3]

II. 재료 및 방법

본 실험재료 및 방법을 요약하면 다음과 같다.

1. strains, plasmids, culture condition

이번 실험에서 사용한 균주는 *Vibrio furnissii*로서 KCTC 2731 균주를 사용하였고 cloning host 및 knock out mutation 시키기 위한 host cell로서 *DH5α*, *JM83*, *SM10λpir*[9]를 사용하였다. 또한 wild-type의 *Vibrio furnissii* 와 *Vibrio furnissii* PMM Mut를 사용하였다. 실험에 사용된 플라스미드는 cloning vector로서 pGEM4Z, pGEM5Z을 사용하였고 knock out mutant를 만들기 위해 suicide vector인 pNQ705를 사용하였다.(Table 1)

배양조건은 *V.furnissii*인 경우 BHI배지에 접종하여 150-200 rpm으로 25℃-37℃에서 overnight 배양하였다.

*E.coli*는 LB(Luria-Bertani)배지에 접종하여 150-200rpm 에 37℃에서 배양하였다.

*SM10λ-pir*는 LB배지에 Kanamycin 항생제를 100μg/㎖ 첨가하여 위의 *E.coli*와 동일한 방법으로 배양하였다.

실험에 사용된 시약은 Difco(USA), Sigma(USA) 또는 Junsei(Japan)로부터 구입하여 사용하였으며, restriction enzyme은 Promega(USA)로부터 구입하여 사용하였다.

Table 1. Bacterial strains and Plasmids used in this study

Abbreviations for antibiotics: Am, ampicillin; Cm, chloramphenicol; Km, kanamycin;

Strains/ Plasmids	Relevant properties	Source or Ref.
V.fumissii	wild-type hemolysin, Phospholipase, gelatin activity	KCTC 2731
V.furnissii pmm mut	Knock out mutant of *V.fumissii pmm*	This study
DH5α	Cloning host strain	Life Technologies, Inc.
JM83	Cloning host strain	
SM10λpir	Donor strain for conjugation Km^r	Chen-Nam Univ.
pGEM4Z	Cloning vector Am^r	Promega Biotech
pBluescript	Cloning vector Am^r	Strata gene
Topo TA cloning vector	Cloning vector for Tag pol PCR	Strata gene
pNQ705	Suicide vector Cm^r Mob. Ori R	Chen-Nam Univ.
pVFNM72	7.2kb partial *pmm* fragment from *V.fumissii* cloned in pGEM4Z using HindIII	This study
pVFRMBI	1.5kb inverse PCR fragment in Topo TA cloning vector	This study
pNQ705pmm	0.5kb knock out fragment from *v.fumissii pmm* cloned in pNQ705	This study

2. *V.furnissii* 의 독소활성 test

Wild-type의 *V.furnissii*를 Blood, Egg york, gelatin plate상에서 각각 백금이로 배열하여 38℃에서 1일간 배양한 후 자라난 균주 주위로 생겨나는 halo를 관찰하였다. Blood plate는 BBL Stacker plate(Becton Dickinson USA)를 사용하였으며 Egg york plate는 계란에서 egg-york를 무균적으로 분리한 다음 멸균된 phosphate buffer saline과 1:1의 부피비로 혼합한 후 이 용액을 1.2% agar 가 녹아있는 BHI배지에 섞어 굳힌 후 사용하였다. Gelatin plate는 1%의 Gelatin powder를 BHI agar 배지에 혼합하여 굳힌 후 사용하였다.

3. DNA manipulation, Transformation

플라스미드 DNA는 *E. coli*를 배양하여 alkaline lysis과정[4]을 통해 분리 하거나 QIAprep spin plasmid kit(Qiagen, Santa Clarita, Calif.)를 사용하여 분리 추출 후 사용하였다. DNA를 *E.coli*에 전이시키는 과정은 standard transformation 과정이나 electrotransformation[5]의 방법으로 수행하였다.

4. Agarose gel electrophoresis, DNA gel isolation

이 과정은 이미 밝혀진 protocol에 따라 수행하였다[5]. 전기영동에 사용한 완충용액으로는 TAE 완충용액(40 mM Tris-acetate, pH 8.0, 1 mM EDTA)를 사용하였으며 0.8 - 2.0%의 agarose 수평 gel을 사용하여 시료의 1/4배량의 4×gel loading buffer를 가한 DNA용액을 100 V에서 전기영동 하였다. Agarose gel로부터 DNA 단편의 회수는 Gel extraction kit(Quiagen, Germany)를 사용하였다.

5. Southern blot hybridization

Chromosomal DNA를 제한효소로 각각 절단하여 0.8% agarose gel에서 전기영동을 행하고 southern의 방법에 따라 DNA blotting을 행하였다. Agarose gel을 변성 완충액(0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl)에 30분간 첨가하여 DNA를 변성시키고 증류수로 2회 세척한 후, 중성 완충액(0.5 M Tris-HCl, pH 7.0, 3 M NaCl)으로 30분간 처리하였다. Blotting은 Whatman 3M filter paper를 길게 잘라서 양쪽 끝이 20×SSC 용액(0.3 M sodium citrate pH 7.0, 3 M NaCl)에 잠기도록 놓고 Whatmam 3M paper를 부가한 다음 gel을 놓고 gel과 같은 크기의 nylon membrane을 놓았다. 그 위에 동일 크기의 2장의 whatman paper와 paper towel을 차례로 올려 놓은 후 약 500 - 800 g의 무게를 가해주면서 실온에서 20시간동안 DNA를 membrane에 blotting하는 capillary transfer방법을 이용하였다. Transfer 끝난 gel을 ethidium bromide로 염색하여 DNA가 이동된 것을 확인한 후 DNA가 tranfer된 nylon membrane을 D.W.로 가볍게 씻은 후 UV illuminator하에서 3분 정도 조사하여 DNA를 고정하였다.

probe DNA의 labeling, hybridization, Detection은 DIG DNA Labeling and Detection Kit(BOEHRINGE MANNHEIM사 Germany)와 그 protocol에 따라 수행하였다.

6. Polymerase chain reaction (PCR)

내열성 DNA 중합효소인 Tag polymerase와 primer를 이용하여 automated thermal cycler (DNA thermal cycler 9700, Perkin Elmer cetus, USA)로 PCR amplification을 수행하였다. PCR은 50 ㎕의 부피를 기준으로 하였으며 dNTP (dATP. dCTP, dGTP, dTTP, 100 μM)와 Tag polymerase를 250 ㎕ tube에 넣고 여기에 template DNA와 primer를 가하여 반응 액의 부피를 50 ㎕로 조정한 다음, 98℃에서 7분간 가열시키고, thermal cycle에서 DNA의 amplification을 시행하였다. 이때 증폭 cycle의 횟수는 25 cycle로 매 cycle당 94℃에서 30초, 55℃에서 30초, 72℃에서 1분 30초를 반복 수행하였다. 그리고 마지막 extension시간을 72℃에서 10분간 연장하여 반응하였다. 전기영동으로 증폭된 DNA 단편을 확인하고, Gel extraction kit (Quiagen, Germany)를 사용하여 agarose gel로부터 회수

하였다.

7. Crude LPS의 분리

LPS의 분리는 'Methods in Enzymology' Vol.235의 Modified Phenol-Water Technique을 따랐다. BHI 100ml에 *V.furnissii* wild-type과 Mutant를 각각 접종하여 overnight culture 한 후 원심 분리하여 cell을 회수하여 50mM Sodium Phosphate, pH7.0, containing 5mM EDTA에 suspension한다. 이것을3-5min간 vortex한 후 Hen egg lysozyme(100mg)을 첨가하고 vortex한 후 4℃에서 overnight incubation(2-3회 vortex를 해준다)

이것을 37℃에서 20분간 incubation, vortex for 3min, 20mM $MgCl_2$를 첨가한다. 여기에 RNase, DNase를 final concentration 1μg/ml 되도록 첨가한다. Suspension을 37℃에서 2시간 incubation한 후 60℃에서 60min동안 incubation(1-2회 vortex)한다 다시 70℃ water bath에 위치시키고 같은 volume의 90% phenol(미리 70℃에서 incubation하여 놓는다)을 첨가하여 완전히 섞어준 뒤 ice-water bath에서 급히 냉각시킨다(15min 이상)

위 sample를 4℃ 12000rpm에서 원심 분리하여 aqueous layer를 회수하고 이를 phenol 냄새가 나지 않을 때까지 D.W.로 투석하여 crude LPS를 분리해낸다.

8. Silver staining

분리한 crude LPS를 SDS-PAGE를 통해 전기영동한 후 'Protein methods'(Daniel M. Bollag, Stuart J. Edelstein, 1991) 의 protocol에 따라 silver staining을 하였다.

III. 결과

1. *V.furnissii*의 hemolytic, phospholipase, gelatin activity 확인

*V.furnissii*가 각각의 활성 test에서 plate상에 자라난 균주 주위로 모두 halo가 관찰되어 위의 Enzyme 활성을 가지는 것으로 확인되었다. 이와 같은 *V.furnissii*의 활성은 conjugation 과정 이후 혼합된 균체로 부터 이 균주의 screening에 선택 signal로 사용 가능함을 알 수 있다. (Fig.2)

2. *V.furnissii pmm*의 cloning과 sequence analysis

V.furnissii 균주를 BHI에 접종하여 overnight culture한 후 chromosomal DNA를 분리하여 HindIII로 partial digestion하였다. 이를 pGEM4Z에 ligation하여 DH5α에 transformation하였다.

Transformant를 LA평판배지에 X-gal, IPTG 와 함께 도말하여 배양된 blue 와 white colony들 중 white colony를 선별하였다. 이렇게 선별된 균주를 각각 배양하여 플라스미드 분리 및 확인 작업을 통해 이들 중 약 7kb 정도의 재조합 플라스미드가 cloning된 균주를 universal primer(UP)와 reverse primer(RP)를 사용하여 DNA sequencing을 수행하였다.

위의 과정을 통해 밝혀낸 insert의 7.2kb의 염기서열을 NCBI(National Center for Biotechnology Information)에서 BLAST network service 통해 Gene Bank 데이터와의 비교분석을 함으로서 이 유전자중의 일부가 Phosphomannomutase와 유사한 sequence를 지정하고 있음을 알아내었다.(Fig. 3) 우리는 이 플라스미드를 pVFNMP2라고 명명하였다.

Hemolysin activity

Phospholipase activity

Gelatinase activity

Figure 2. Pathogenic factors of *Vibrio furnissii*

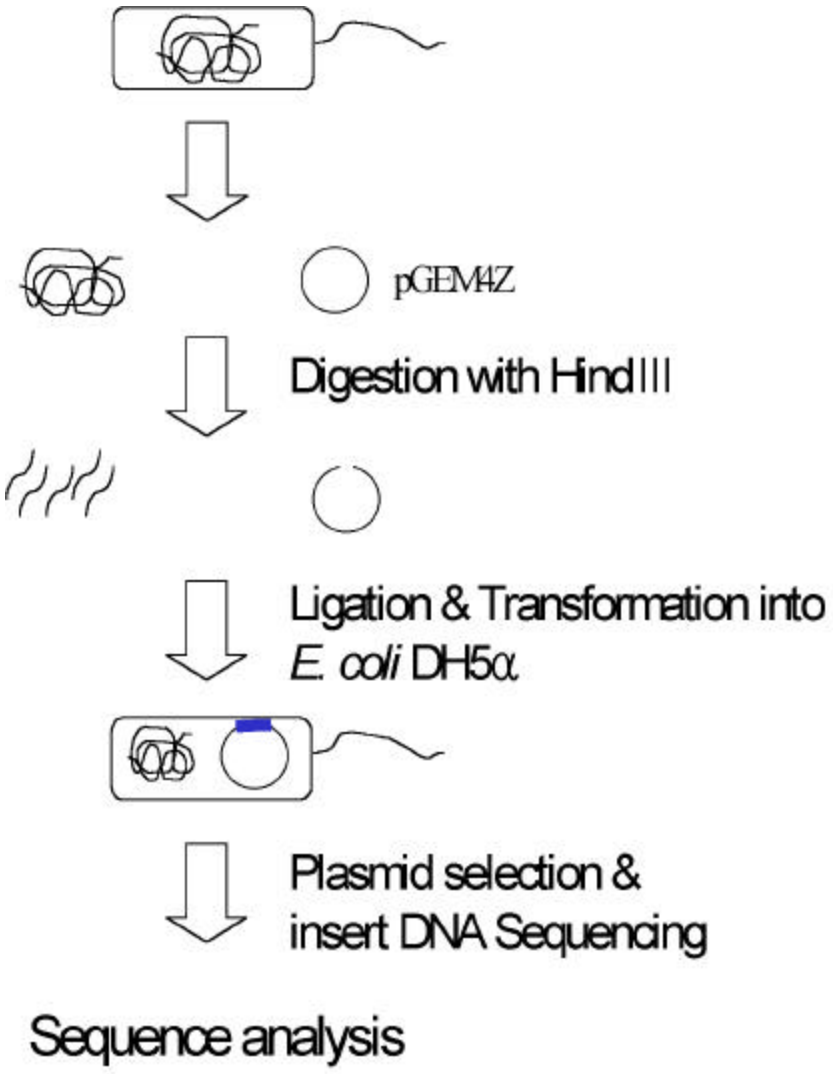

Figure 3. Procedure of *pmm* gene cloning from *Vibrio furnissii*

3. Southern blot hybridization 과 inverse PCR을 이용한 *pmm*의 전체 ORF의 판독

잘려진 *pmm*의 5'부분의 염기서열을 밝히기 위해 Southern blot hybridization 및 Inverse PCR방법을 사용하였다. *V.furnissii*의 chromosome을 각각 BamHI, SacI, SalI, HindIII로 절단하여 agarose gel 상에서 전기영동 한 뒤 pVFNM72에서 약 0.5kb의 PMM gene을 probe로 사용한 southern blotting에서 다음의 결과를 얻었다.(Fig.4)

따라서 *V.furnissii*의 chromosome을 위의 각 enzyme으로 digestion하여 이것을 다시 self-ligation한 후 이를 template로 사용하여 Inverse PCR을 실시하였다. 여기서 primer는 pVFNM72의 *pmm* 부분에서 각각 5'과 3' 방향으로 20 mer를 작성하여 InbioNet으로부터 제작주문한 것을 사용하였다.(Fig. 5).

위 실험결과 BamHI으로 digestion 후 다시 self-ligation한 template로부터 1.5kb 의 PCR product를 얻어내었고 이들을 sequencing하여 잘려진 *pmm*의 5'방향의 염기서열을 알아 낼 수 있었다. 이렇게 하여 알아낸 염기서열을 pVFNH72의 insert염기서열과 연결하여 완전한 *pmm* ORF를 찾아내었다. 이 유전자는 1434bp로서 477개의 아미노산 잔기로 이루어져있다.(Data not shown)

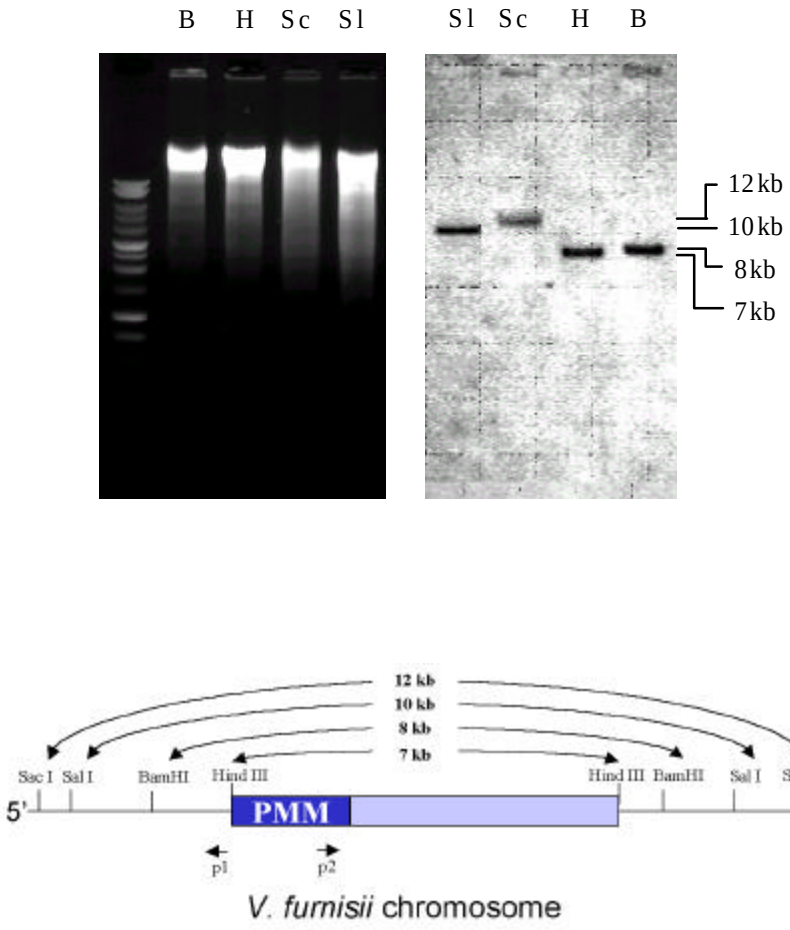

Figure 4. Southern hybridization and Mapping of *Vibrio furnissii pmm*

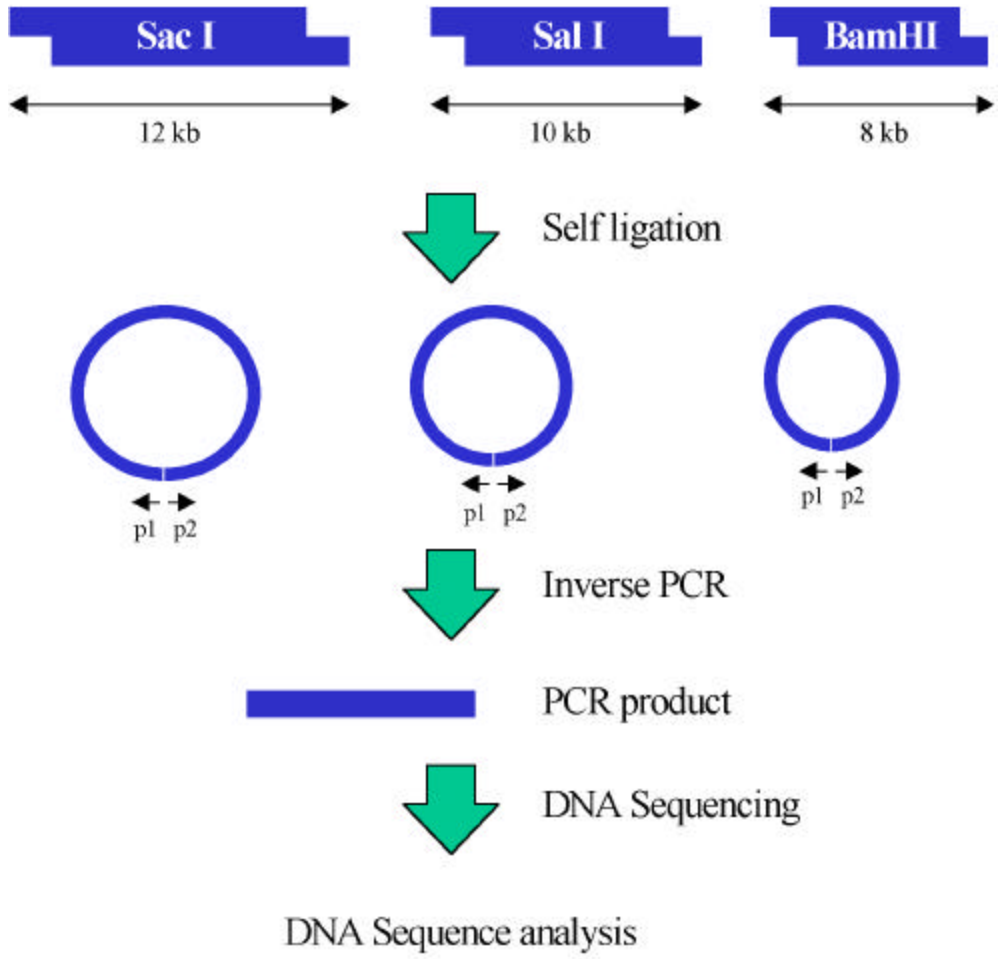

Figure 5. Procedure of Inverse PCR

4. Homologous recombination 에 의한 knock out mutant의 제작 및 Southern hybridization을 통한 유전자 mutation확인

(1) pNQ705*pmm*의 제작

pVFNM72로부터 *pmm* 의 0.5 kb를 HindIII 와 EcoRI 으로 잘라낸 후 이 조각을 Gel isolation하여 같은 Enzyme으로 잘라낸 pBluescript에 연결하였다. 이것을 다시 SalI, SacI 으로 잘라내어 같은 Enzyme으로 제한된 pNQ705에 연결하였다. 이렇게 제작된 plasmid를 pNQ705*pmm*이라 명명하였다(Fig.6).

(2) *SM10 λpir*에 transformation

위에서 제작한 pNQ705*pmm*을 *SM10 λpir*에 transformation 하기 위하여 다음의 과정을 실시하였다.

우선 *SM10 λpir*의 competent cell로 만들기 위해 Km을 첨가한 LB 배지에서 37℃ 200rpm으로 OD_{600}에서 0.5까지 배양한 후 원심 분리하여 cell을 회수한 후 4℃의 FSB(frozen storage buffer: 100 mM KCl, 50 mM $CaCl_2$, 10% Glycerol, 10 mM KCO_2CH_3)에 pellet을 녹여 20분간 ice에서 incubation한다. 여기에 pNQ705*pmm*을 transformatin하였다.

(3) *SM10 λpir* transformant와 wild-type *V.furnissii*의 conjugation

우선, *SM10λpir*(pNQ705 recombinant의 transformant)와 *V.furnissii* wild-type을 BHI plate에서 각각 배양한 다음 두 균주를 각각 멸균된 면봉으로 긁어내어 BHI plate상에서 넓게 펴서 고르게 문질러 혼합시켜준 후 이것을 38℃에서 8-10시간 동안 incubation 하였다.

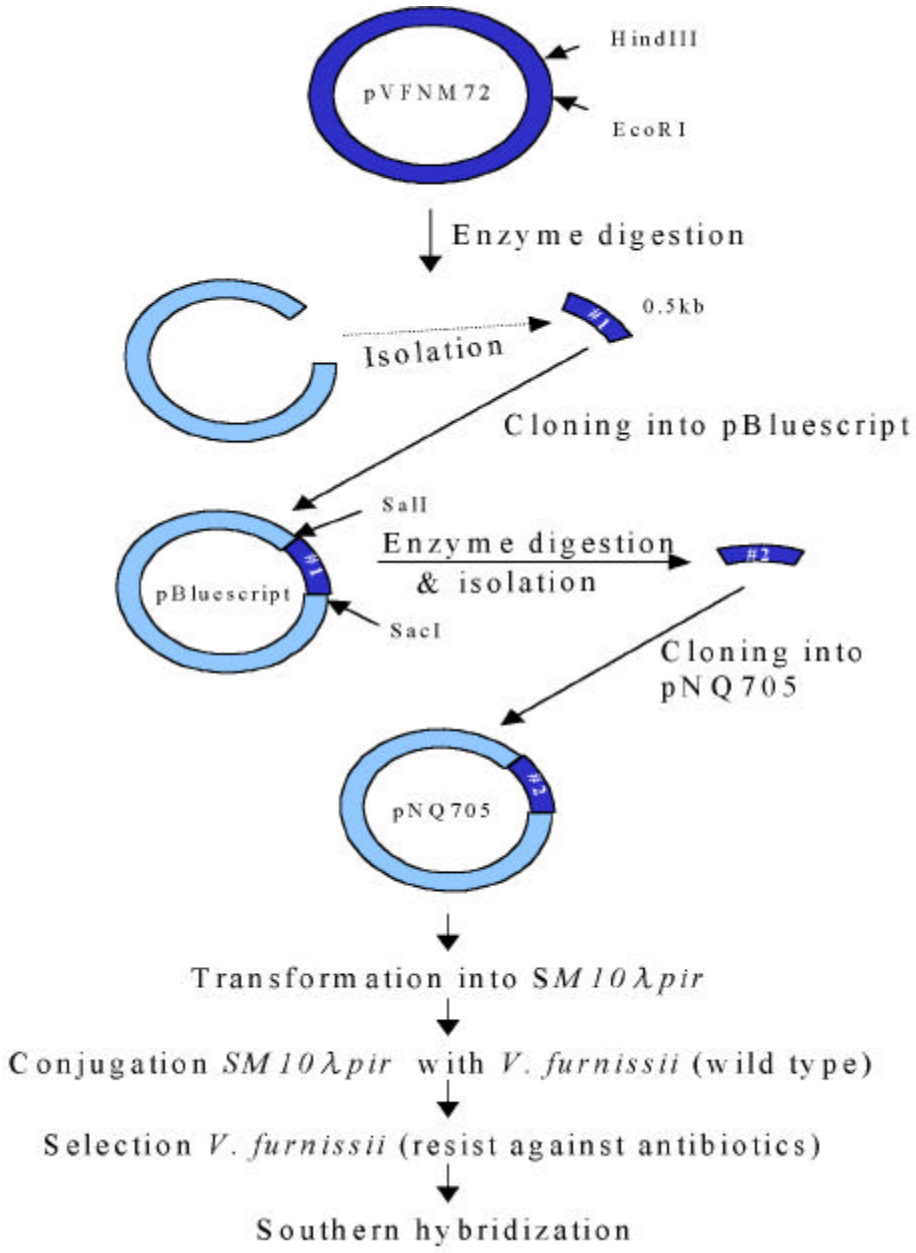

Figure 6. Preparation of recombinant suicide vector for knock out mutation

(4) *V.furnissii* mutant의 selection

멸균된 백금이로 혼합된 균주를 긁어서 Chloramphenicol(Cm)이 함유된 Blood agar plate(60㎍Cm/plate)에 striking하였다.

이 plate를 다시 38℃ incubator에서 overnight culture한 후 hemolytic activity(Halo)를 나타내는 colony를 선별하였다. 이 균주는 위의 phospholipase, 및 gelatin activity도 나타내는 것으로 확인되었으나 wild-type의 *V.furnissii*와 달리 Cm의 내성을 가지게 된 것을 확인하였다.

(5) Southern hybridization을 통한 mutation 확인

얻어진 colony가 *pmm* mutant인지 확인하기 위하여 두 번에 걸쳐 다음의 southern blot hybridization을 실시하였다.

① Southern blot hybridization I

V.furnissii wild-type과 Mutant의 chromosome을 분리하여 HindIII로 digestion하여 전기영동 한 후 southern blotting을 실시하였다. 이때 probe는 *pmm* knock out 부분인 0.5kb를 pVFNM72로부터 digestion하여 Gel isolation한 것을 사용하였다.(Fig.7)

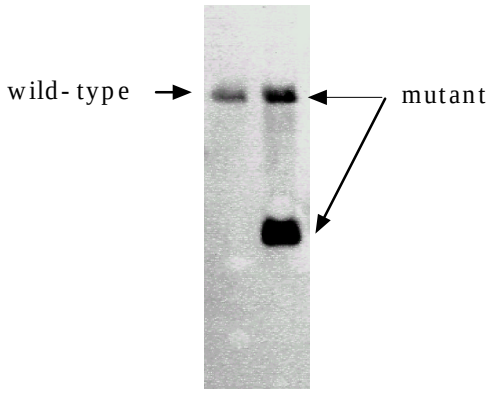

Figure 7. Southern hybridization of wild-type and mutant to be used *pmm* knock out gene as probe

② Southern blot hybridization II

Knock out되지 않은 *pmm* 의 일부를 pVFNM72로부터 Gel isolation 하여 이것을 probe사용하여 다시 southern blotting을 실행하였다.

pVFNM72를 HpaI으로 digestion하여 2.5kb의 fragment를 Gel isolation 하였다. 이것을 probe로 사용하고 *V.furnissii* wild-type과 Mutant를 각각 HindIII로 digestion하여 전기 영동을 한 후 두 번째 southern blotting을 실시하였다. 이 실험에서는 두 균주가 같은 signal을 보였다 (data not shown).위의 결과를 Fig. 8에서 설명하였다.

5. *V.furnissii* wild-type과 mutant로부터 각각의 LPS의 분리 및 silver staining을 통한 비교

*V.furnissii*의 wild-type과 mutant로부터 각각의 LPS를 분리한 후 SDS-PAGE 및 silver staining 결과 다음의 결과를 얻었다(Fig. 9).

그림에서 화살표 부분은 wild-type에 존재하는 LPS이며 mutant 에서는 이것이 사라진 것을 알 수 있다. 이것은 *pmm*이 knock out 됨에 따라 그 기능을 상실한 PMM으로 인해 mutant에서는 LPS가 생성되지 않았음을 알 수 있다.

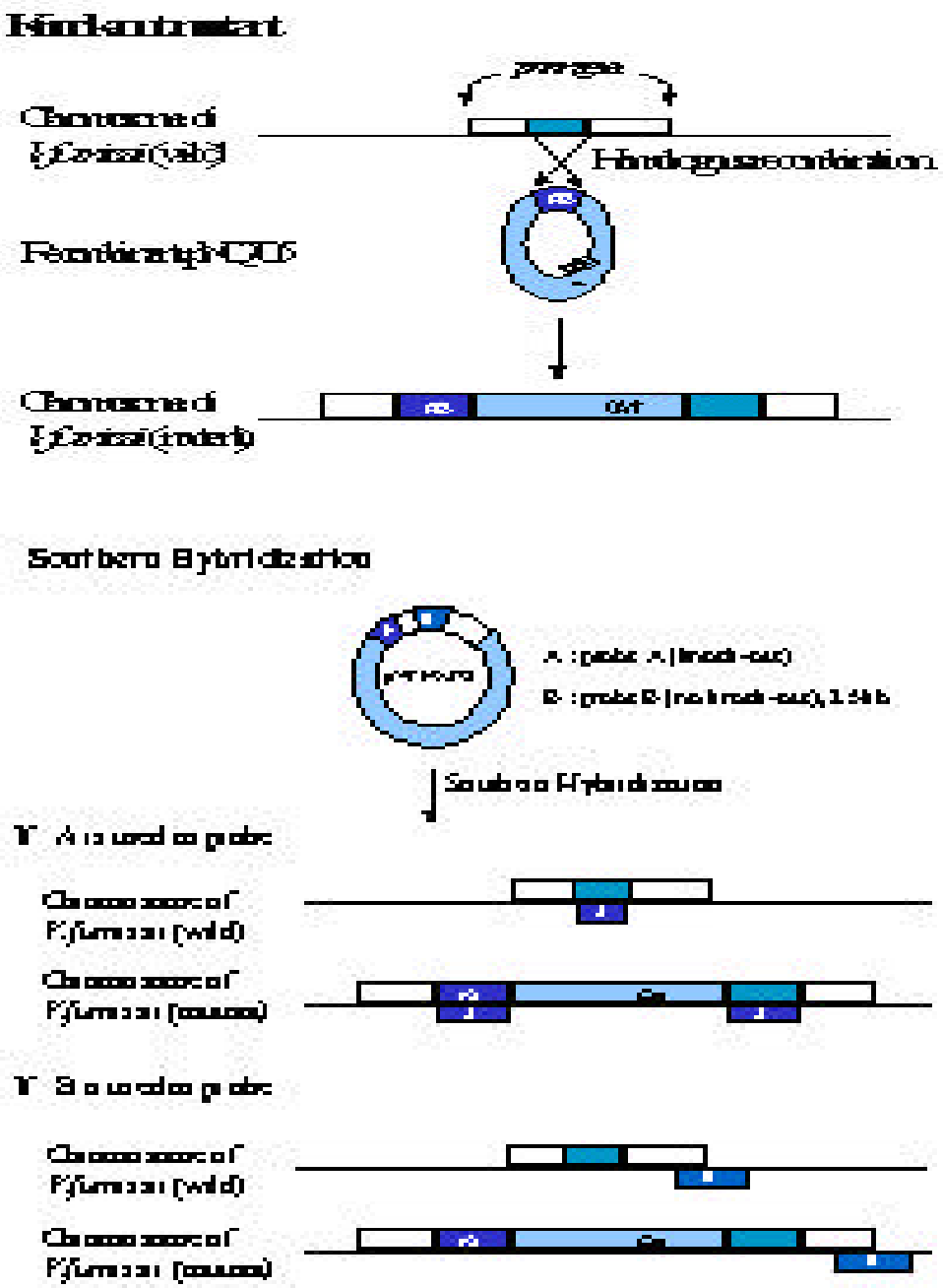

Figure 8. Certification of knock out mutant by southern hybridization

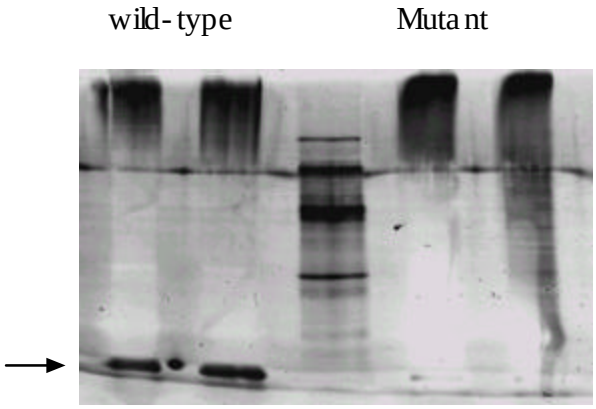

Figure 9. SDS-PAGE and Silver staining of LPS to be isolated from wild-type and mutant

IV. 고찰

*V.furnissii*는 *V.fluvialis*와 함께 병원성 세균으로 알려진 *Vibrio* sp.의 일종으로 알려져 있으며 이는 그 종이 가진 여러 가지 pathogene에 의해 유래하는 것이다. 현재까지 PMM gene에 대해 여러 가지 연구가 진행중인 바 아직까지 *Vibrio* sp. 에 대해선 알려진 바가 별로 없다. 우리는 *V.furnissii*의 PMM gene의 cloning을 통해 *pmm*의 서열을 규명하여 유전자 지도를 작성하였고 knock out mutation을 통해 LPS 합성에 관여하는 PMM 의 기능을 확인하였다. 위의 연구 결과로 *V.furnissii*에서 PMM Gene과 LPS 생합성과의 의 관계를 명확히 제시하였으며 또한 항원으로 작용하는 LPS의 기능 또한 Mutant의 비교실험을 통해 수행할 수 있는 가능성을 제시하였다. 앞으로 보다 많은 실험을 통해 PMM 및 LPS의 기능이 보다 자세하게 이루어질 수 있을 것이며 이는 본 연구실에서 계속 수행해 나가고 있는 바이다.

V. 요약

병원성 세균으로 알려져있는 비브리오 종의 하나인 *Vibrio furnissii* 균주로부터 phosphomannomutase(PMM) gene의 일부분을 클로닝하였고 Inverse PCR을 수행하여 통해 완전한 ORF를 찾아내어 그 염기서열을 분석하였다.

Suicide vector에 PMM 유전자의 일부분을 Cloning하여 이를 다시 *V. furnissii*에 주입하여 동일 유전자 재조합(homologous recombination)에 의한 Knock out mutant를 제작하는데 성공하였다. 이렇게 제작한 돌연변이 균주가 Lipopolysaccharide(LPS) 합성과정상에 어떤 변화를 일으켰는지를 SDS-PAGE 및 Silver staining 과정을 통하여 확인하였다. 이러한 연구과정을 통해 아직까지 명확하게 알려지지 않은 PMM과 LPS 생합성 사이의 관계를 보다 명백하게 설명할 수 있으며 knock out mutation 과정을 통해 제작된 돌연변이 균주를 이용하여 항원, 혹은 세균자체의 보호막 역할을 하는 것으로 널리 알려진 LPS의 다양한 기능을 wild-type과의 비교연구를 통해 분석할 수 있으리라 여겨진다.

VI. 참고문헌

1. Brenner, D.J., Hickman-Brenner, F.W., Lee,J.V., Steigerwalt, R.E., Joseph, S.W. and Seidler, R.J.(1983): *Vibrio furnissii*(Formerly aerogenic biogroup of *Vibrio fluvialis*), a new species isolated from human feces and the environment. J. Clin, Microbiol., 18, 816-824.

2. Tison, D. L. (1999): *Vibrio*. P.497-506. In P.R. Murray et al. (eds.), Manual of Clinical Microbiology. 7th ed. ASM Press, Washington, D.C.

3. Pick. W.Ye, Nicolette A. Zielinski and A.M. Chakrabarty (1994):Purigicat ion and characterizat ion of phosphomannomut ase/ phosphoglucomut ase from *Pseudomonas aeruginosa* involed in biosynthesis of both alginate and lipopolysaccharide J.Bacteriol. 176: 4851-4857

4. Birnboim, H. C., and J. Doly. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 7:1513-1523.

5. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. (1989): Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Saboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

6. Paula A. Videira, Suisa L. Cortes, Arsenio M Fialho, and Isabel Sa-correia (2000): Identificstion of the pgm G Gene, Encoding a Bifunctional protein with phosphoglucomutase and phosphomannomutase activities, in the Gellan Gum-producing Strain Sphingomonas paucimobilis ATCC31461 Appl. Environ. Microbiol. 66:2252-2258

7. Toshio Shimada, Eiji Arakawa, Tadayuki Okitsu, Shiro Yamai, Shigeru Matsushita, Yasuo kudoh and Noboru Okamura. (1999): Additional O Antigens of Vibrio fluvialis and Vibrio furnissii. Jpn. J. Infect. Dis. 52:124-126

8. Padgett. P. J., and P.V. Phibbs, Jr.(1986): Phosphomannomutase activity in wild-type and alginate-producing strains of Psudomonas aeruginosa. Curr. Microbiol. 14: 187-192

9. Ronald K. Taylor, Colin Manoil, and John J. Mekalanos.(1989): Broad-host-range vectors for Delivery of TnphoA: Use in Genetic Analysis of secreted virulence determinants of Vibrio cholerae. J. Bacteriol. 171:1870-1878

10. Antonio D. Uttaro, Gerard A. Cangelose, Roberto A. geremia, Eugene W. Nester, and Rodolfo A. Ugalde. (1990): Biochemical characterization of avirulent *exo*C mutants of *Agrobacterium tumefaciens*. J. Bacteriol. 172: 1640-1646

11. Eric T. Harvill, Andrew preston, Peggy A. Cotter, Andrew G. Allen Duncan J. Maskell, and Jeff F. Miller.(2000): Multiple roles for Bordetella Lipopolysaccharide Molecules during respiratory tract Infection. 68: 6720-6728

VII. 감사의 글

대학원 면접시험 때 '무엇 하러 대학원에 들어오려 하는가?'하는 면접관의 질문에 '전공을 살려서 취직하려고 합니다'라고 대답했던 것이 기억이 납니다. 짧은 대답이었지만 그때까지만 해도 생물공학분야에 대한 막연한 기대와 장미 빛 미래를 꿈꾸고 있었던 것이 솔직한 제 마음이었습니다. 어느덧 그 꿈이 현실로 다가온 지금, 저는 미비하나마 이 논문한편으로 짧은 2년의 시간을 마감하려 합니다. 생물공학 전공을 살려 취직하려는 제 소망은 이루었지만 연구에 쏟고자 했던 열정과 노력들을 다 채우지 못하고 졸업하는 지금이 다소 씁쓸하기도 합니다.

비록 쉽지 않은 연구실 생활이었지만 주위에서 돌보아주시는 고마운 시선들이 있었기에 당시 지친 몸과 마음을 추스를 수 않았나 하는 생각을 해보면서 고마운 분들을 떠올려 봅니다. 우선 학문에 대한 열정과 도전정신을 몸소 가르쳐 주신 저의 지도교수 공인수 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 아울러 생물공학에 대한 젊은 학도의 꿈을 이끌어주신 공재열교수님, 홍용기교수님, 이형호교수님, 김중균교수님, 박남규교수님, 김성구교수님과 늘 가까운 곳에서 지켜보며 도움을 주신 선배 종희형, 상봉이형, 승렬이형, 선영누나, 철호형, 형섭이형, 정화누나, 동기 정현, 윤혁, 일형이와 후배 제현, 민래, 선희, 선회, 은미 그리고 밤늦게 귀가하는 막내아들을 너그럽게 지켜봐 주신 부모님과 여자친구 귀화에게 마음 깊은 감사를 드립니다.