

박테리오파아지 P2-P4 시스템을 위한 tetracyclin resistance marker 함유 P4 유도체 벡터 플라스미드 조성

김경진

선문대학교 응용생물과학부 응용분자생물학전공

바이러스조립 과정 기작 연구를 위한 좋은 재료인 박테리오파아지 P2-P4 시스템에 이용될 벡터 플라스미드를 개발하기 위하여, P4 *ash8 sid71*을 출발 물질로 삼아 새로운 P4 유도체 벡터를 조성하였다. 유전자 재조합 기법을 써서 쉽게 선택 가능한 tetracyclin 내성 유전자(*tetR*)를 도입하고 플라스미드 P4의 크기를 조절하였다. 이를 통해 얻어진 P4 *ash8(sid71) tetR*은 12.09 kb의 크기를 가지며, 필요할 때 P2로 induction하면 생물학적 활성을 가지는 박테리오파아지로 전환 가능하였다. 전환된 파아지의 burst size를 결정하고, CsCl 부양균등밀도 편차실험을 수행하였다. 균등밀도 실험 분포도에서 P2 크기 파아지 머리의 packaging 상한을 추정할 수 있었다.

Key words □ bacteriophage P2-P4, *Escherichia coli*, packaging, plasmid

박테리오파아지 P4는 숙주세포 내에서 플라스미드 상태로 증식하는 중, 박테리오파아지 P2와 같은 helper phage가 감염되면 helper phage의 머리와 꼬리 단백질을 이용하여 박테리오파아지로 증식하는 독특한 생활상을 보인다(3). 이러한 종류의 파아지를 위성파아지(satellite phage)라고 부르며, 이들은 머리와 꼬리를 encoding하는 유전자들을 갖고 있지 않기 때문에 helper phage를 필요로 하는 것이다. 실제로 박테리오파아지 P4는 머리와 꼬리를 위한 유전자들은 갖고 있지 않고, P2의 머리 생성 단백질을 써서 자신의 genomic DNA만을 packaging 할 수 있게 작은 크기의 머리를 조립하도록 하는 *sid*(size determination) 유전자를 가진다(11).

P4의 helper phage인 박테리오파아지 P2는 *Escherichia coli*를 숙주세포로 하는 coliphage로, *cos*-cleavage 기작에 의해 정확히 33.5 kb 크기의 genome을 정이십면체(icosahedron) 머리 속에 packaging 하여 증식한다. 분류상 lambda 계열의 파아지에 속하지만, lambda와는 달리 환형 DNA 증식방법으로 genome을 복제하며, 자외선 조사(UV irradiation)에 의해 용원소(lysogen) 상태에서 유도(induction)되지 않는다(3).

박테리오파아지 P2와 P4는 helper와 satellite phage의 관계로 자연계에 존재하며 P4의 존재 여부에 따라 P2 파아지가 생성한 같은 단백질 재료로 크기가 다른 머리가 조립되므로, 바이러스의 capsid 조립과정을 연구하는 데 좋은 실험 재료가 된다. 최근의 연구 결과, P4의 *sid* 유전자의 생성물이 capsid 조립과정 중 외부 지지 단백질(outer-scaffolding protein)인 것으로 밝혀졌다(7). 한편 최종 capsid 조립체의 전 단계인 prohead가 파아지 genome

이 packaging되는 과정에 영향을 미친다는 간접적인 증거가 제시되고 있다(5). 이러한 연구의 계속적인 수행을 위하여 유전적으로 쉽게 선별 될 수 있는 표식인자(marker)를 함유하는 파아지 유전체의 변형체를 생성하는 것이 필요하다.

본 연구에서는, 박테리오파아지 P2-P4 시스템의 연구를 위한 변형체 P4인 플라스미드 상태의 P4 *ash8(sid71) tetR*을 *in vitro*에서 생성하고 이를 미생물학적 방법으로 생물학적 활성을 갖는 파아지로 얻어낸 다음 이에 대한 생물학적 연구를 수행하였다. 이렇게 얻어진 변형체 P4는 박테리오파아지 P2-P4 시스템을 이용한 packaging 연구에 유용한 연구 수단으로 쓰일 것이다.

재료 및 방법

균주, 박테리오파아지, 플라스미드

플라스미드 P4의 숙주세포로는 *Escherichia coli* C1a(type strain of *E. coli* C strain)가 쓰였고(10), 박테리오파아지 P4의 숙주세포로는 P2를 prophage로 갖고 있는 C strain인 C295와 C353이 사용되었다(12, 13). 한편 *E. coli* C8은 박테리오파아지 P2 검출을 위한 지시숙주세포 및 transduction 실험에 사용되었다(2).

새로운 벡터 플라스미드 개발을 위한 출발 물질은 P4 *ash8*, P4 *ash8 sid71*이 쓰였다(11). P2 *vir1*은 P4 변이체 파아지의 induction을 위해 쓰여 졌다(3).

pBR322 플라스미드가 tetracyclin resistance 유전자의 공급원이었으며(14), pUC19이 일반적인 cloning 실험을 위한 벡터 플라스미드로 사용되었다(15).

DNA 조작 시약 및 recombinant DNA technique

여러 종류의 제한효소, Klenow fragment, T4 DNA ligase등은

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 041-530-2273, Fax: 041-530-2917
E-mail: kjkim@sunmoon.ac.kr

Gibco-BRL, NEB사 제품을 구입하여 생산자가 권고하는 조건에 맞추어 사용하였다. 본 실험에 사용된 일반적인 유전자 재조합 기법은 Sambrook 등이 저술한 실험서에 따라 행하였다(9).

P4 *ash8(sid71)* *tetR*의 조성과정

*PvuII*로 절단된 출발물질 P4 *ash8(sid71)*을 P4 DNA의 염기배열번호 220에 있는 *EcoRI* 부위에서만 자르기 위해 *EcoRI*의 부분 절단반응(partial digestion)을 시행하였다. 반응시간과 효소 양을 달리하여 반응시킨 산물을 agarose gel 상에서 분석하여 원하는 10.67 kb, 0.96 kb 두 개의 단편이 나타나는 조건을 찾아 내었다. 그 조건은 1 µg P4 DNA 당 0.4 units의 *EcoRI* 효소를 가하고 37°C에서 45분간 반응시키는 것으로, 이를 통해 원하는 부분 절단을 얻었다.

Tetracyclin 내성 유전자를 얻기 위하여 pBR322를 우선 *AvaI*로 절단하여 선형화한 후, Klenow fragment를 처리하여 양 말단을 blunt-end로 만들었다. 이것을 *EcoRI*으로 완전 절단하여 1.42 kb의 *tetR*(tetracyclin resistance) 유전자를 분리 하였다. 이렇게 얻어진 *tetR* 함유 단편은 *EcoRI* 말단과 blunt-end 말단을 가지게 되고, 이를 P4 *ash8 sid71*에서 얻어진 *PvuII*와 *EcoRI*으로 부분 절단된 10.67 kb 단편과 ligation 하였다. Ligation 혼합물을 *E. coli* C1a에 형질 전환시켜 tetracyclin에 내성을 가지는 형질 전환체를 얻었다.

박테리오파이지 stock 준비

P4 *ash8(sid71)* *tetR*을 플라스미드 상태로 함유하고 있는 *E. coli* C1a의 lawn을 만들고, P2 *vir1* 파이지 용액을 그 위에 떨어뜨린 후 배양하여 용해지역(lysis area)을 얻었다. 용해지역의 agar plug를 멸균된 파스퇴르피펫으로 1 ml의 LB 배양액에 옮기고 5분 간 방치하여 agar plug와 함께 옮겨진 파이지가 용출되도록 하였다. 이 용출액을 P4 지시숙주세포에 plating하여 단일 플라크를 얻었다.

단일 플라크(single plaque)를 25 ml 숙주세포 배양액으로 옮긴 후 37°C에서 계속 진탕배양하며 흡광도를 측정하였다. 흡광도가 감소하는 시점에서 최종농도가 0.05 M 되게 EDTA를 가하여 더 이상 파이지가 숙주세포에 붙지 못하게 하였다. 흡광도의 감소가 멈출 때까지 배양한 후 배양액을 원심 분리하여 균체를 제거하였다. 파이지가 떠있는 상층액을 취하여 Beckman사의 L3-40 초고속 원심분리기로 47,000 g(type 35 rotor 사용)로 2시간 원심 분리하여 파이지 침전물을 얻었다. 이 침전물에 0.075 M $MgCl_2$ 를 1 ml 가한 후 4°C에서 2일 정도 방치하여 파이지가 서서히 완충용액에 용해되도록 하였다(1).

Transduction 실험

박테리오파이지나 플라스미드를 갖고 있지 않은 *E. coli* C1a의 lawn을 tetracyclin 함유 평판배지에 만들었다. 실험하고자 하는 P4 변이체 파이지용액을 한 방울 떨어뜨려 37°C에서 배양하면, *tetR* 유전자를 가진 P4 변이체가 감염된 박테리아는 tetracyclin에 내성을 나타내어 그 부위에서 colony를 형성하고 transductant로

얻어진다.

1단계 생장실험(One-step growth experiments)

박테리오파이지의 burst size를 결정하기 위하여 1단계 생장실험을 행하였다. 숙주세포를 2×10^8 cells/ml의 농도까지 배양한 후 이를 원심분리 하여 칼슘이 5 mM 함유된 LB 배지에 녹였다. M.O.I. (multiplicity of infection) 값이 3정도 되도록 실험하고자 하는 박테리오파이지를 파이지 stock으로부터 가해주고 7분간 흡착하도록 하였다. LB 배양액으로 100배 희석하여 37°C에서 배양하며, 원래 배양액의 흡광도 측정을 통해 파이지에 의한 완전 용해가 일어날 때까지 배양을 계속하였다. 완전 용해된 배양액의 plaque assay를 통해 얻은 후손 파이지의 역가를, 처음 감염된 숙주세포의 수로 나누어 burst size로 삼았다.

CsCl 부양 균등밀도 편차실험(CsCl buoyant equilibrium density gradient)

박테리오파이지 P4 stock의 머리 크기 분포를 알아보기 위해 파이지 stock의 일부(0.1 ml 이하)를, 평균 밀도가 1.38 g/ml로 맞추어진 CsCl 용액이 함유된 원심분리 튜브에 가하였다. 이 튜브를 Beckman L3-40 초고속 원심분리기를 사용하여 4°C에서 55,000 g(SW41.1 rotor 사용)로 60시간 동안 원심분리 하였다. 원심 분리 후 튜브의 밑에 구멍을 내어 8방울을 한 분획(fraction)으로 하여 모았다. 각 분획의 박테리오파이지 역가를 P4 지시숙주세포를 상대로 plaque assay를 통해 결정하여 밀도 변화에 따른 파이지 분포도(density gradient profile)를 구하였다.

결과 및 고찰

P4 *ash8(sid71)* *tetR* 플라스미드 조성

항상 숙주세포내에서 플라스미드로 존재할 수 있는 P4 *ash8*을 시작 물질로 삼아, 항생제 내성 유전자를 도입하고 도입 후 생물학적으로 완전한 파이지가 생성되도록 전체 P4 genome의 크기를 조정하여 P4 플라스미드 유도체를 조성하였다. 이러한 유도체는 플라스미드 상태로 유지되며 항생제 내성 유전자의 도입으로 쉽게 선택될 수 있는 이점이 있다. P4 크기의 머리(small head)에만 들어갈 수 있는 P4 *ash8*과 P2 크기의 머리(large head)에 들어갈 수 있는 P4 *ash8 sid71*에서 각 각 똑같은 방법으로 새로운 플라스미드를 조성하여, 두 가지 다른 크기의 파이지 머리 내에 packaging 되는 P4 유도체를 얻었다. 편의상, *sid71*을 팔호 안에 표기하여 두 가지 종류의 조성 및 반응이 일어난 것을 나타내었다.

P4가 파이지로 증식하는 데에 영향을 끼치지 않는 것으로 알려진 P4 genome의 전반부에 위치하는 유전자 *gop*과 *beta*(Fig. 1) 부위를 tetracyclin 내성 유전자로 치환하기로 하였다. 재료 및 방법에 서술한 과정을 거쳐 tetracyclin 내성을 가지는 형질 전환체를 얻고 형질 전환체 플라스미드 DNA의 제한효소 단편 분석을 통해 계획대로 조성된 P4 플라스미드 유도체인 P4 *ash8(sid71)* *tetR*을 확인하였다.

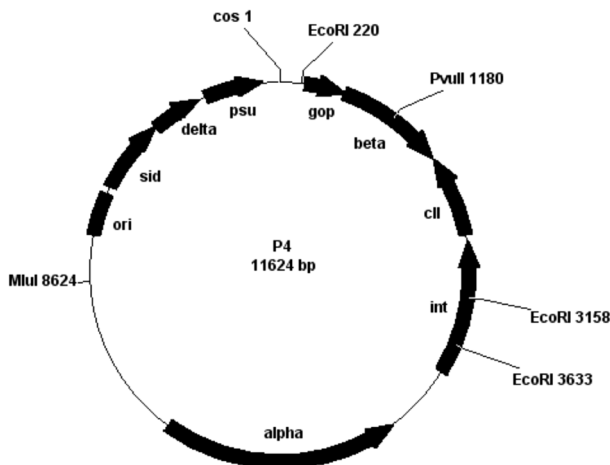


Fig. 1. Circular genetic map of P4. The enzyme sites used in this study are shown. The positions of restriction sites are given in bp according to the P4 sequence (GenBank accession number X51522). Some genes and *ori* of P4 are also shown.

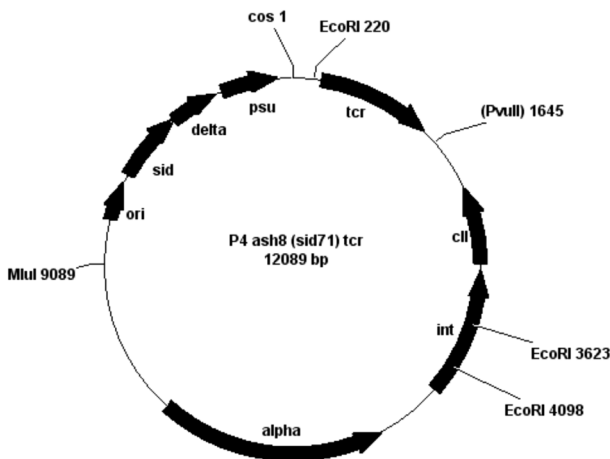


Fig. 2. Circular genetic map of P4 *ash8(sid71) tetR*. The fragment from *EcoRI* at 220 to *PvuII* at 1180 of P4 DNA sequence (refer to Fig. 1) was swapped with *tetR* of pBR322. The *PvuII* site was destroyed during construction, so the position of ligation is shown as (*PvuII*) at 1645 of P4 *ash8(sid71) tetR* DNA. As the *sid71* mutation is the point mutation in *sid* gene (A at the position of 9682 of P4 DNA changed to C), the size of P4 *ash8(sid71) tetR* is as same as that of P4 *ash8 tetR*.

이것의 최종적인 제한효소 절단부위 지도는 Fig. 2에 나타내었다. P4 *ash8(sid71) tetR*의 전체 genome의 크기는, 이미 알고 있는 P4 및 tetracyclin 내성 유전자 함유 단편의 크기로부터 12.089 kb로 계산되어졌다. 이것은 출발물질인 P4 *ash8 sid71*의 11.624 kb 보다 약 460 bp 정도 큰 것이었다. 플라스미드 P4 *ash8(sid71) tetR*을 함유하는 숙주세포는 50 µg/ml의 tetracyclin 함유 배지에서 선택적으로 자랄 수 있었다.

박테리오파아지 P4 *ash8(sid71) tetR* 분리 및 동정

조성된 P4 플라스미드 유도체는 박테리오파아지 P4의 복제 시

Table 1. Burst size of P4 and P4 derivatives

Phage	Burst size ^{a)}
P4 <i>ash8</i>	111±4
P4 <i>ash8 tetR</i>	74±4
P4 <i>ash8 sid71</i>	41±2
P4 <i>ash8(sid71) tetR</i>	63±3

^{a)}All Burst size data is the mean±standard deviation of more than two independent experiments.

작 단편(origin of replication)을 갖고 있으므로, 도움파아지(helper phage)인 P2 genome이 존재하면 박테리오파아지로 전환이 가능하다. P4 *ash8(sid71) tetR*이 박테리오파아지 형태로 증식할 수 있는지 여부를 보이기 위하여, 플라스미드 P4 *ash8(sid71) tetR*을 함유하는 *E. coli* C1a의 lawn에 도움 파아지인 P2 *vir1*을 감염시켜 파아지용액을 얻었다. 얻어진 파아지용액을 P2와 P4를 구분할 수 있는 지시숙주세포(indicator strain)에 각각 plating한 결과, 파아지용액은 P4 지시숙주세포에서만 plaque를 형성하였으므로, 용출되어 나온 박테리오파아지가 P4 *ash8(sid71) tetR* 인 것으로 확인하였다(자료 미제시).

Transduction 실험을 수행하여 이를 입증하였는데, 우선 파아지용액을 *E. coli* Cla lawn에 spot하여 tetracyclin에 내성을 보이는 transductant를 얻고 여기에서 다시 플라스미드를 추출하여 제한효소 절단실험을 거쳐, 플라스미드가 P4 *ash8(sid71) tetR*임을 agarose gel 상에서 확인 할 수 있었다(자료 미제시).

단일 플라크로부터 얻은 P4 *ash8(sid71) tetR*의 파아지 stock을 가지고 1단계 성장실험을 수행하여 burst size를 구하였다(Table 1). Table 1에서 보듯이, 유전자 재조합 과정을 통해 얻어진 P4의 유도체 파아지인 P4 *ash8(sid71) tetR*도 원형인 P4 *ash8(sid71)*과 같이 활발히 박테리오파아지로 증식하였다. 그러므로 tetracyclin 내성 유전자 함유 단편과 교환되어 제거된 P4의 유전자 *gop*과 *beta*는 P4가 박테리오파아지 상태로 증식하는 데 전혀 영향을 끼치지 않는다는 것이 재확인 되었다(4). P4 *ash8 tetR*의 burst size가 출발물질인 P4 *ash8* 보다 적게 얻어진 것은, P4 *ash8* 보다 460 bp 큰 P4 *ash8 tetR*의 genome이 P4 크기의 파아지 머리에 보다 덜 효율적으로 packaging되기 때문인 것으로 추정된다. P4 *ash8(sid71) tetR*의 경우, P4 *ash8 sid71* 보다 효율적으로 P2 크기의 파아지 머리에 packaging되는 것으로 나타났다. 이에 대한 분석은 CsCl 부양 균등밀도 편차실험 결과와 같이 수행되어야 하므로 아래에서 논의 하겠다.

박테리오파아지 P4 *ash8(sid71) tetR*의 packaging

P4 크기의 작은 머리 생성을 결정하는 유전자인 *sid*에 변이가 생긴 P4 *ash8 sid71*과 그 유도체들은 P2 크기의 큰머리에 2개 또는 3개의 genome을 packaging하여 P4 박테리오파아지로 생존한다(1, 11). P4 *ash8 tetR*의 경우 tetracyclin 내성 유전자 함유 단편의 삽입으로 약 460 bp 정도 genome 크기가 늘어나게 되고, P4 *ash8(sid71) tetR*의 경우에는 2개 또는 3개의 genome이 함께 P2 크기의 파아지 머리에 들어가게 되므로 각각 920 bp,

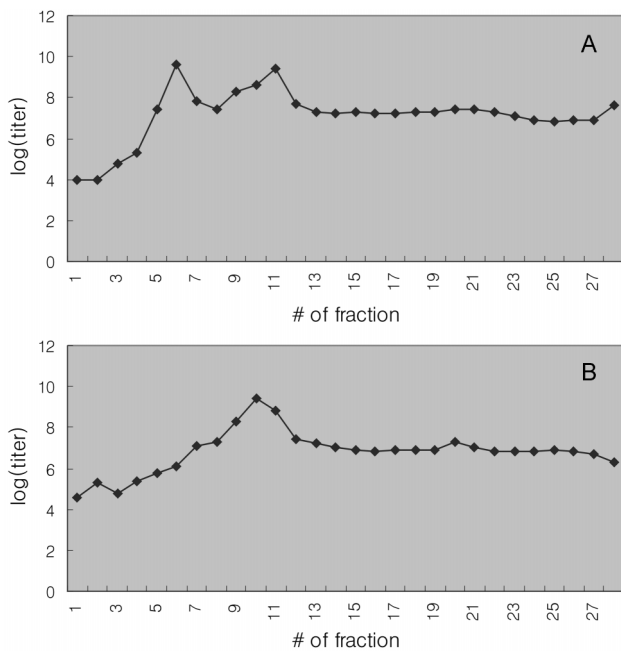


Fig. 3. CsCl buoyant equilibrium density gradient profiles of P4 *ash8(sid71)* (panel A) and P4 *ash8(sid71) tetR* (panel B).

1,380 bp 씩 genome이 증가하게 된다. P4 *ash8(sid71) tetR* 파아지의 CsCl 부양 균등밀도 편차실험을 통해 이러한 genome의 증가가 어떻게 packaging에 영향을 끼치는지를 살펴보았다.

P4 *ash8 sid71*을 분석하여 얻은 분포도는 Fig. 3-A이며, 두 개의 거의 같은 높이를 가진 정점을 볼 수 있다. 그러나 P4 *ash8(sid71) tetR*을 분석하여 얻은 분포도인 Fig. 3-B에서는 오직 하나의 정점만이 나타났다. 정점은 P4 *ash8 sid71*의 정점 중 2개의 P4 genome이 들어있는 파아지 머리의 밀도에 해당하는 분획 (Fig. 3-A 참조)보다 밀도가 조금 큰 분획에서 나타났다(Fig. 3-A의 11번 분획과 Fig. 3-B의 10번 분획을 비교 참조). 이것은 P4 *ash8(sid71) tetR*의 경우, 두 개의 genome이 파아지 머리에 들어가면서 DNA 양이 P4 *ash8 sid71*의 경우 보다 920 bp 늘어나므로 밀도가 증가된 것으로 설명될 수 있다. 반면에 3개의 genome이 하나의 큰 파아지 머리에 들어가게 되면 1,380 bp가 늘어나게 되고, 이러한 genome의 증대로 인해 이미 P2 파아지 머리의 packaging 한계를 초과하게 되므로 그것에 해당하는 정점이 나타나지 않은 것으로 추정된다. 즉 큰(P2 크기) 파아지 머리는 33.5 kb의 P2 genome을 packaging 하도록 생성 되었으므로(2), 정상적인 P4 3개의 genome 크기인 34.9 kb 까지는 수용할 수 있으나 그것보다 1.38 kb 큰 P4 *ash8(sid71) tetR*의 3개의 genome들은 더 이상 packaging 되지 않는 것이다. P4 보다 300 bp 정도 크게 구성된 P4 *ash8(sid71) kmr*의 경우, CsCl 균등밀도 분포 실험에서 3개의 genome을 함유한 정점이 2개의 genome을 함유한 정정보다 약 100배 낮은 파아지 역가를 가지지만 나타나는 것이 보고 되었다(1).

CsCl 균등밀도 분포 실험을 통해 P4 *ash8(sid71) tetR*은 2개의 genome이 P2 크기의 파아지 머리에 packaging되고, P4 *ash8*

*sid71*은 2개 또는 3개의 genome이 P2 크기의 파아지 머리에 packaging되는 것을 알게 되었다. P2 크기의 파아지 머리에는 2개의 P4 genome 크기 DNA(23.25 kb)부터 P4 유도체인 P4 *ash8(sid71) kmr*의 3개의 genome 크기 DNA(35.7 kb)까지 packaging될 수 있으나, 36.25 kb인 P4 *ash8(sid71) tetR*의 3개의 genome은 packaging되지 않았다. 이상을 통해 볼 때, P2 크기 파아지 머리의 packaging 상한은 약 35.7 kb 일 것이라고 추정할 수 있다.

Burst size 결정시 얻어진 후손 파아지(progeny)의 분포는 CsCl 균등밀도 분포 실험에서 얻어진 분포와 동일할 것으로 추정되므로, P4 *ash8(sid71) tetR*의 burst size는 P4 *ash8(sid71) tetR* 2개의 genome(24.2 kb)이 P2 크기 파아지 머리에 packaging된 파아지들이 증식되어 얻어진 것이다. 한편 P4 *ash8 sid71*의 burst size는 P4 *ash8 sid71* genome 2개(23.2 kb) 또는 3개(34.9 kb)가 P2 크기 파아지 머리에 packaging된 2종류의 파아지들이 동일한 비율로 증식되어 얻어진 것이다. P4 *ash8(sid71) tetR*의 burst size가 P4 *ash8 sid71*의 burst size 보다 크게 측정되었는데(Table 1 참조), 이를 통해 2개의 P4 또는 P4 유도체의 genome이 P2 크기의 머리에 packaging될 때 3개의 P4 genome 보다 더 효율적으로 packaging 되는 것을 알 수 있다.

참고문헌

1. 김정진. 1998. 박테리오파지 P2-P4 시스템을 위한 벡터 플라스미드 개발과 안정성. 미생물학회지 34, 236-242.
2. Bertani, G. and E.W. Six. 1958. Inheritance of prophage P2 in bacterial crosses. *Virology* 6, 357-381.
3. Bertani, L.E. and E.W. Six. 1988. The P2-like phages and their parasite, P4, vol. 2. p. 73-143. In R. Calendar (ed.), *The Bacteriophages*. Plenum Press, New York.
4. Ghisotti, D., S. Finkel, C. Halling, G. Deho, G. Sironi, and R. Calendar. 1990. Nonessential region of bacteriophage P4: DNA sequence, transcription, gene products and functions. *J. Virol.* 64, 24-36.
5. Kim, K.-J., M.G. Sunshine, B.H. Lindqvist, and E.W. Six. 2001. Capsid size determination in the P2-P4 bacteriophage system: suppression of *sir* mutations in P2's capsid gene *N* by supersid mutations in P4's external scaffold gene *sid*. *Virology* 283, 49-58.
6. Linderth, N.A., G. Christie, and E. Haggard-Ljungquist. 1994. Bacteriophage P2: physical, genetic and restriction map, vol. 1, p. 62-69. In S.J. O'Brien (ed.), *Genetic map*, 6th ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
7. Marvik, O.J., T. Dokland, R. Nokling, E. Jacobson, T. Larsen, and B.H. Lindqvist. 1995. The capsid size-determining protein Sid forms an external scaffold on phage P4 procapsids. *J. Mol. Biol.* 251, 59-75.
8. Nilssen, O., E.W. Six, M.G. Sunshine, and B.H. Lindqvist. 1996. Mutational analysis of the bacteriophage P4 capsid-size-determining gene. *Virology* 219, 432-442.
9. Sambrook, J. and D.W. Russell. 2001. *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
10. Sasaki, I. and G. Bertani. 1965. Growth abnormalities in Hfr deriv-

- atives of *Escherichia coli* strain C. *J. Gen. Microbiol.* 40, 365-376.
11. Shore, D., G. Deho, J. Tsipis, and R. Goldstein. 1978. Determination of capsid size by satellite bacteriophage P4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75, 400-404.
 12. Six, E.W. and C.A.C. Klug. 1973. Bacteriophage P4: A satellite virus depending on a helper such as prophage P2. *Virology* 51, 327-344.
 13. Six, E.W., M.G. Sunshine, J. Williams, E. Haggard-Ljungquist, and B.H. Lindqvist. 1991. Morphoietic switch mutations of bacteriophage P2. *Virology* 182, 34-46.
 14. Sutcliffe, J.G. 1979. Complete nucleotide sequence of the *E. coli* plasmid pBR322. *Cold Spring Harbor Symposium* 43, 77-90.
 15. Yanisch-Perron, C., C.J. Viera, and J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103-119.

(Received May 6, 2003/Accepted June 9, 2003)

ABSTRACT: Construction of New P4-Derived Vector Plasmid Containing Tetracyclin Resistance Marker for the Bacteriophage P2-P4 System

Kyoung-Jin Kim (Department of Applied Molecular Biology, Division of Applied Biology, Sunmoon University, Asan 336-708, Korea)

To develop vector plasmid for the bacteriophage P2-P4 system which is a useful experimental tool for the study of viral capsid assembly, we constructed a new P4-derived vector plasmid starting from P4 *ash8 sid71*. With recombinant DNA technology, a portion of P4 genome was deleted and tetracyclin resistance gene (*tetR*) was introduced into P4 genome to give P4 selectivity. Resulting P4 *ash8(sid71) tetR* was 12.09 kb long and could be converted to a viable bacteriophage with P2 infection. The burst size of induced bacteriophage form of P4 *ash8(sid71) tetR* was determined. The CsCl buoyant equilibrium density gradient experiment of new P4 derivative suggested the upper limit of packaging capacity in P2-size head.