

Wizard Plus Maxipreps Kit[®]를 이용한 Plasmid DNA의 분리법의 응용

계명대학교 의과학연구소

이영재 · 한인숙

Superscale Plasmid DNA Preparation Using Wizard Plus Maxipreps Kit[®]

Young Jae Lee, Ph.D. and In Sook Han, Ph.D.

*Institute for Medical Science, Keimyung University,
Taegu, Korea*

= Abstract =

Since the development of molecular biological techniques, the plasmid DNA became indispensable in the research laboratories. Conventionally, the plasmid DNA was purified using CsCl and over 40 hours of high speed centrifugation. To overcome these problems, several manufactures have developed kits for purifying plasmid DNA based on affinity chromatography, however, the yield of single preparation of plasmid DNA was not sufficient for experiments such as gene therapy, gene delivery using liposome, or cDNA vaccination. In this technical report, by precipitating DNA using ethanol and re-using column, we have developed a simple method for preparing several milligrams of plasmid DNA from 300 ml of over night bacterial culture using Wizard Plus Maxipreps Kit[®].

서 론

Watson과 Crick에 의해 DNA구조가 밝혀진 이래로 생명과학 및 의과학 분야의 연구에 있어서 DNA는 없어서는 안될 물질임에는 의심의 여지가 없다. 특히 plasmid DNA는 이런 연구에 있어서 가장 넓게 사용되며 흔히 cesium chloride (CsCl)를 사용하여 순수 분리 하였다 (Sambrook *et al*, 1989; Ausubel *et al*, 1989). 그러나 이를 이용한 분리법은 비교적 고가인 CsCl와 또한 유해한

ethidium chloride를 사용하였고 무엇보다 40시간이 넘는 고속 원심분리를 통하여야만 한다는 단점을 안고 있다. 그러나 1990년대 들어서 Qiagen등의 회사는 chromatography 법을 이용한 순수 DNA분리법을 개발하였으며 현재 다양한 회사에서 이와 유사한 원리를 이용하여 순수한 plasmid DNA를 분리할 수 있는 kit를 시판하고 있다. 이를 방법은 기존의 CsCl, ethidium bromide, 고속 원심 분리등을 이용하지 않고 3~4시간내에 순수 DNA를 얻을 수 있다는 장점을 갖고 있으나 column의 capacity로 인하여 분리할 수 있는

DNA의 양이 500 μg 내외라는 결점을 갖고 있다. 이러한 양은 일반적으로 실험실에서 행해지는 실험에서는 충분한 양이지만 liposome을 이용한 gene delivery (Mann *et al.*, 1997; Williams *et al.*, 1991; Yang *et al.*, 1990), gene therapy, cDNA vaccination (Tang *et al.*, 1992; Davis *et al.*, 1993; Michel *et al.*, 1995; Hartikka *et al.*, 1996) 등의 실험에서와 같이 보다 많은 양의 DNA가 필요할 때가 빈번히 있다. 대량의 DNA는 여러개의 column을 이용하여 쉽게 얻을 수 있겠지만 완제품으로 수입되며 상당히 고가인 column을 한 가지의 DNA분리를 위해 여러개를 쓴다는 것은 일반적인 연구자에 있어서는 상당히 꺼려지는 일 일것이다.

본 보고서에서는 현재 시판되는 Wizard Plus maxipreps kit를 재사용하는 방법을 고안하여 300 ml 내외의 bacterial culture에서 수 mg의 DNA를 분리하는 방법을 소개하고자 한다.

실험방법 및 결과

본 실험에서는 세가지의 DNA (A, B, C)를 실험대상으로 하였으며 DNA A는 pBR322에 6.8 kb의 insertion이 있고 DNA B는 pBluescript에 1.6 kb의 insertion이 있으며 DNA C는 pBS에 1.6 kb의 insertion이 있는 시료를 사용하였다.

Bacterial culture, lysate의 준비와 DNA의 침전

이들 두 plasmid는 DH5 α 에 transform되었으며 single colony는 2 ml의 LB / Ampicillin (60 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에 접종한 후 6시간 동안 37°C, 225 rpm에서 전배양 (pre-culture)한 후 이의 일부 (1 ml)를 같은 배지 300 ml에 옮겨 같은 조건에서 20시간 동안 배양하였다. 5,000xg에서 10분간 원심분리하여 얻은 pellet은 10 ml

의 cell resuspension solution (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM EDTA, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNase A)으로 부유하고 다시 10 ml의 lysis solution (0.2 M NaOH, 1% SDS)을 첨가하여 lyse한다.

Lysate은 상온에서 10분간 두어 완전히 lyse 되게 한 후 다시 10 ml의 neutralization solution을 첨가하여 중화시킨다. 이는 다시 14,000xg, 실온에서 원심분리하고 plasmid DNA를 함유한 상층액은 여과지를 통하여 찌꺼기를 걸러낸다. 맑은 상층액에 0.5 volume (약 15 ml)의 isopropanol을 첨가하고 다시 14,000xg, 4°C에서 원심분리하여 plasmid DNA를 침전시킨다. 침전된 plasmid는 공기중에서 건조시키고 상층액에는 같은양의 냉동보관한 ethanol (약 45 ml)을 첨가하고 잘 섞은후 다시 10분간 냉동보관한다. Ethanol을 섞은 상층액은 14,000xg, 4°C에서 다시 원심분리한후 상층액은 버리고 재침전된 plasmid DNA는 위와같이 공기건조한다.

Plasmid DNA의 1차 loading 및 elution

건조된 두개의 pellet은 각각 1 ml의 TE에 부유시키고 10 ml의 Wizard Maxipreps DNA purification resin과 섞어 column에 옮겨넣는다. Column은 50 ml conical tube에 넣고 낮은속도 (500xg)에서 5분간 원심하여 1차 loading한다. 원심분리후 column밖으로 나온 용액 (DNA pellet을 resuspend 한 TE와 resin을 suspend하고 있던 용액의 혼합으로 약 12 ml가 됨)은 conical tube에 그대로 두고 column은 vacuum manifold에 장착한다. Resin은 25 ml의 column wash solution (55% ethanol, 80 mM potassium acetate, 8.3 mM Tris-HCl, pH 7.5, 40 μM EDTA)으로 씻어내고 다시 5 ml의 80% ethanol을 통과한 후 1분간 진공상태에서 resin을 말린다. Column은 다시 50 ml conical tube에 넣고 swinging bucket rotor에서 1,300xg로 5분간

원심하여 나머지 물기를 완전히 제거하고 다시 vacuum manifold에서 5분간 전조시킨다. Column에는 1 ml의 따뜻한 (65~70°C) 증류수 혹은 TE (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA)를 넣고 1분간 기다린 후 1,300 xg에서 5분간 원심하여 plasmid DNA를 분리해낸다. 1차 분리가 끝난 column은 다시 vacuum manifold에 장착하고 10 ml의 0.1M acetic acid (pH 3.5)를 통과하여 resin을 씻어내고 다시 20 ml의 TE를 두 번 통과시켜 씻어낸다.

Plasmid DNA의 2차 loading/ elution

세척이 끝난 column에는 1차 loading시 column을 지나온 용액 (DNA pellet을 resuspend한 TE와 resin을 suspend하고 있던 용액의 혼합)을 넣고 pipetting하여 resin을 resuspend한후 2분간 실온에 둔다. Column은

1차 loading시와 같은 방법으로 50 ml conical tube에 넣고 같은 속도로 원심하여 2차 loading한다.

원심후 column밖으로 나온 용액은 conical tube에 그대로 두고 column은 1차 loading시와 같이 column wash solution, 80% ethanol, 진공동을 이용하여 세척, 전조시킨다.

Plasmid DNA의 분리는 1차 loading /elution시와 동일한 방법으로 하지만 2차 loading /elution후에는 0.1 M acetic acid를 사용한 세척은 할 필요가 없다. 이후 이와같은 방법으로 3차 loading /elution한다.

이상의 각 loading /elution의 결과는 Table 1에서 볼 수 있는바와 같이 300 ml의 culture에서 3~7 mg의 DNA를 얻을 수 있었다. 이는 기존의 방법보다 최소한 5~10배 이상의 높은 효율을 나타내고 있다.

Table 1. Concentration of plasmid DNA from each elution ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

| | 1차 | 2차 | 3차 | 총 수확량 |
|-------|------|------|------|---------|
| DNA A | 2.45 | 0.20 | 0.12 | 2.77 mg |
| DNA B | 3.61 | 0.47 | 0.18 | 4.26 mg |
| DNA C | 4.08 | 2.79 | 0.53 | 7.4 mg |

고찰 및 요약

현대에 들어서 recombinant DNA 기술의 발전으로 DNA는 거의 대부분의 생명과학 및 의학의 연구에 쓰여왔고 또한 이를 조작 혹은 처리할 수 있는 다양한 효소와 reagent들이 상업적으로 시판되고 있다. 그러나 대부분의 효소와 reagent들은 사용되는 DNA의 순도가 이들의 성능에 큰 영향을 주고 있다. 순도가 높은 plasmid DNA를 얻기 위해서는, plasmid DNA가 supercoiled 구조를 갖고 있고 ethidium bromide가 이에 끼어 들었을 때 relax되어 있는 선형 (linear) DNA와는

그 밀도가 달라진다는 점을 이용하여 CsCl density gradient와 고속 원심분리를 이용하는 방법이 오래전부터 이용되었다. 그러나 이런 방법은 40시간 이상의 고속 원심분리에 의해서만 가능하였다. 초고속 원심분리기의 개발로 원심분리 시간이 16시간 정도로 단축 되기는 했으나 비교적 고가인 CsCl와 또한 초고속 원심분리기의 구매나 유지비용은 일반 연구자에게는 상당한 부담이 되고 있다. 1990년대에 들어 chromatography법을 이용한 획기적인 방법이 개발되어 CsCl와 고속 원심분리를 이용한 방법을 대체하였으며 Promega사의 Wizard Plus maxiprep kit과 Qiagen사의 Qiagen plasmid maxiprep kit 등

이 이에 해당한다. 이런 chromatography법을 이용한 DNA분리법은 CsCl와 초고속 원심분리를 이용한 DNA 분리법에 비해 조금도 손색이 없는 순수한 DNA를 분리할 수 있고 3~4시간내에 그 처리가 완료될 수 있다는 큰 장점을 갖고 있어서 현재 거의 대부분의 연구자들은 이런 kit를 사용하고 있다. 그러나 이런 kit는 최상의 조건에서 분리할 수 있는 DNA의 양이 500 µg밖에 되지 않는다는 결점을 갖고 있다. 그러나 분자생물학 및 의과학의 연구에 있어서 이보다 많은 양의 DNA가 필요할 때가 빈번히 있다. 그러므로 본 보고서에서는 kit에 포함된 resin과 column을 재활용함으로 같은양의 bacteria 배양액으로서 수 mg의 plasmid DNA를 분리하는 방법을 개발하였다. 또한 본 보고서는 Promega사의 Wizard Plus maxiprep kit를 기준으로 하였는데 이는 타사의 제품보다 Wizard Plus maxiprep kit가 본 방법의 응용에서 가장 효율이 좋게 나타났기 때문이다.

Bacterial lysate의 분리방법은 제조자가 권장하는 대로 행하지만 DNA침전시 isopro-

panol을 이용한 1차 침전후 다시 같은 양의 ethanol을 첨가하여 재차 침전한다.

Isopropanol의 사용은 cell lysate등과 같이 단백질의 함량이 높을 때 DNA만 선택적으로 침전시킬 수 있다는 장점이 있으나 DNA에 대한 침전 효율이 상대적으로 낮아 (Table 2) 이를 이용한 침전에서는 ethanol을 이용한 침전에 비해 70%정도만이 침전된 것을 알수 있다. 그러므로 isopropanol로서 1차 침전후 ethanol로서 2차 침전함으로 lysate에 포함된 대부분의 plasmid DNA를 침전하였다. 2차 침전 시 ethanol에 의해 상당한 양의 단백질 또한 침전될 수 있으나 isopropanol이 포함된 상태 (25%)에서 행해지기 때문에 ethanol만에 의한 침전보다 그 양이 상대적으로 적으며 (Table 3) 또한 이는 1차 loading후 저염용액에 의한 elution으로 DNA만 선택적으로 elution하기 때문에 DNA의 순도에는 큰 지장이 없다. Column에 남아있는 단백질은 acetic acid를 통과하므로써 완전히 씻겨 나오므로 2차 elution후에는 acetic acid를 이용한 세척은 불필요함을 알 수 있다.

Table 2. Efficiencies of DNA precipitation by ethanol or isopropanol ($\mu\text{g}/\text{ml}$)

| | 침전 전 | 침전 후 |
|-------------|-------|-------|
| Ethanol | 12.20 | 11.41 |
| Isopropanol | 12.20 | 8.58 |

Table 3. Efficiencies of BSA precipitation by ethanol or isopropanol (mg/ml)

| | 침전 전 | 침전 후 |
|-------------|------|------|
| Ethanol | 2.22 | 2.12 |
| Isopropanol | 2.22 | 1.70 |

참 고 문 헌

Davis HL, Whalen RG, Demeneix BA: Direct gene transfer into skeletal muscle

in vivo: Factors affecting efficiency of transfer and stability of expression. *Hum Gene Ther* 1993;4:151-159.

Hartikka J, Sawdey M, Cornefert-Jensen F et al: An improved plasmid DNA ex-

- pression vector for direct injection into skeletal muscle. *Hum Gene Ther* 1996; 7:1205-1217.
- Mann MJ, Morishita R, Gibbons GH, Leyen HE, Dzau V: DNA transfer into vascular smooth muscle using fusogenic Sendai virus (HJV)-liposomes. 1997; *Mol Cell Biochem* 172:3-12.
- Michel ML, Davis HL, Schleef M, et al.: DNA-mediated immunization to the hepatitis B surface antigen in mice: Aspects of the humoral response mimic hepatitis B viral infection in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:5307-5311.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: Molecular Cloning: A laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor, New York. 1989.
- Tang DC, DeVit M, Johnston SA: Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 1992;356:152-154.
- Williams R., Johnson SA, Riedy M, et al: Introduction of foreign genes into tissues of living mice by DNA-coated microparticles. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:2726-2730.
- Yang NS, Burkholder J, Roberts B, Martinell B, McCabe D: *In vivo and in vitro* gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proc Natl Acad Sci* 1990;87:9568-9572.