

## 상온보관이 가능하며 사용이 편리한 DNA Size-Marker와 저분자량의 DNA 계측을 위한 Size Marker용 플라스미드 개발

계명대학교 의과학연구소

박종구

### Developments of Ready-Made DNA Size Markers and a Novel Plasmid for a Low Molecular Weight Size Marker.

Jong Gu Park, Ph.D.

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

= Abstract =

Molecular biotechnology is a broad research and development principle encompassing basic research as well as applied industrial developments. Biotechnology is expected to become one of the most important research and development sectors in the next century, but the domestic support industry for the field is severely underdeveloped and at best in its infancy. DNA size marker is frequently employed during research in a purpose of extrapolating the relative size of a DNA fragment or measuring the amount of DNA loaded a sample. However, DNA size marker is not developed for commercialization domestically. Further, liquid suspension containing DNA size marker needs to be kept at a low temperature during storage and shipping. In an attempt to maintain the DNA samples at room temperature for extended period of time, lyophilization of DNA with addition of a nuclease inhibitor was studied. *Hae* III digest of  $\phi$ X174 phage DNA has been a useful size marker for low molecular weight DNA molecules, but the double strand RF form of the phage DNA requires laborious procedures for cell culture and purification. A new plasmid was constructed to generate band patterns which can substitute the *Hae* III digest of  $\phi$ X174 phage DNA for a comparable purpose. Gel staining dye was also added to the lyophilized DNA to provide additional convenience such that DNA size marker was ready for use by simple reconstitution of distilled water. DNA size marker appears to be advantageous for development as one can judge the quality of the product by direct observation.

서론

재료 및 방법

분자의과학 분야는 광범위한 연구분야이며 기초 학문으로서의 가치뿐만 아니라 산업영역으로서도 차세기에는 가장 핵심적 분야로 발전할 것으로 기대되고 있다 (한문희 외, 1996). 그러나 불행히도 국내에서는 분자의과학 및 생명공학 연구에 필요한 기초 연구소체에 관한 산업기반의 형성이 대단히 취약한 실정이다. DNA size markers는 분자의과학 연구에 사용되는 소재중에서 가장 빈번히 이용되지만 국내에서 개발되어 있지 않으면서 보관과 운송시에 저온이 유지되어야 하는 불편함이 있다. 그러나 이러한 문제점에 대한 해결이 지금까지 이루어지지 않았고 더불어 구입한 size marker를 포함하는 용액을 실제 사용을 위해서는 염색물질인 bromophenol blue (BPB)등을 포함해서 재조성을 하여야 하는 불편함을 갖고 있어 개선이 필요하였다. DNA size markers는 국내에서 산업화할 경우 품질이 가지적으로 판단될 수 있으므로 국내 제작용에 대한 객관적인 품질의 평가가 용이한 장점을 갖고 있다.

본 연구에서는 상기한 불편을 개선하여 DNA size markers의 보관과 운송을 상온에서 할 수 있고 증류수만을 첨가함으로써 재조성이 가능한지를 조사하였다. 한편 상업적으로 구입할 수 있는 DNA size markers 중에서  $\phi$ X174 phage DNA의 *Hae*III 절단체를 대체할 수 있는 새로운 플라스미드를 개발하였다. RF form의  $\phi$ X174 이중나선 DNA를 대량배양하는 것은 기술적으로 까다로울 뿐아니라 단일가닥 DNA의 완전한 분리도 쉽지않은 단점이었다. 개발된 플라스미드는 기존의 high copy 플라스미드인 pUC19에 1000 bp 그리고 800 bp 절편을 증폭한후 클로닝에 의해 용이하게 제작되었다. 제작된 DNA size markers는 실제 실험에서 사용하여 편의성과 안정성을 검증하였다.

1. 배지, 균주 그리고 플라스미드

Bacteriophage  $\lambda$  cl857 Sam7 (이하  $\lambda$  phage)의 숙주로 대장균 VCS (Stratagene, USA)와 XL1 Blue MRF' (Stratagene, USA)를 사용하였으며, NZCYM (1% NZ amine, 0.5% NaCl, 0.1% casimino acids, 0.5% bacto-yeast extract, 그리고 0.2%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )과 Luria broth (이하 LB) 배지를 사용하였다. 형질전환에는 대장균 XL1 Blue를 competent cells로 사용하였으며, LB 배지를 사용하여 배양하였다. 재 조합 플라스미드를 제조하는데는 pUC19과  $\lambda$  phage를 주형으로 하여 PCR로 얻은 DNA 단편을 사용하였다.

2.  $\lambda$  phage의 배양 및 DNA의 분리

$\lambda$  phage의 배양 및 DNA의 분리는 Sambrook *et al* (1989)이 기술한 방법을 사용하였다. 간략히, XL1 Blue MRF' 균주를 NZCYM 배지에 16시간 배양한 후 OD<sub>600</sub>=1이 되는 양을 원심분리하여 농축하였다 ( $10^{10}$  cells). 3 ml의 SM 완충액에 현탁한 후,  $5 \times 10^7$ 개의  $\lambda$  phage 입자를 첨가하여 37°C에서 20분간 감염시켰다. 이를 500 ml의 NZCYM 배지에 첨가하여 37°C에서 9-12시간 동안 진탕배양하였다.  $\lambda$  용균액으로부터 DNA의 분리는 column chromatography (Qiagen, Germany)를 사용하였다.

3. 제한효소 처리 및 건조

$\lambda$  phage DNA 1 mg을 *Hind*III로 처리하여 각각의 실험군에 50  $\mu$ g씩의 DNA를 분주하였다. 완충액 (Tris-HCl), EDTA, 염색제 (BPB, Xylene cyanol), 그리고 비중강화제 (ficoll, glycerol 등)를 농도별로 각각 다르게 첨가한 후, 2-3시간 동결건조 시켰다.

pUC19에 1000 bp와 800 bp 크기의 단편을 삽입하여 제작한 pWON 플라스미드는 *Eco*RI과 *Hin*fI까지 처리하였다. 동결건조는  $\lambda$  phage

DNA의 경우와 동일하였다.

4. DNA size markers의 조성과 안정도 검증

절단된  $\lambda$  phage DNA는 50  $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ 의 농도가 되도록 TE (pH 8.0) 완충액과 TEN 완충액 (10 mM Tris-HCl, pH 7.8, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA)에 각각 용해하였다. 그 후 다양하게 조성된 6 $\times$ gel loading 염색제를 100  $\mu\text{l}$  첨가한 후 최종적으로 50  $\mu\text{g}/600 \mu\text{l}$ 의 농도가 되도록 TE 와 TEN 완충액을 첨가하였다. 실험군마다 다른 농도의 완충액, 염색제, 비중강화제를 첨가하고 건조한 후, 각각 상온에서 빛 노출, 상온에서 빛 차단, 그리고 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 빛 차단의 3 가지 조

건에서 보관하였다. 보관 60일 후 건조전 부피의 증류수를 각각의 실험군에 첨가하여 제조성하였다. 제조성된 DNA size markers는 전기영동 후 젤상 ethidium bromide 염색 양상을 통해 정량과 정성을 하였다.

결 과

1. 상온 보존 및 운송용 DNA size marker 동결건조체 제작

XLI Blue MRF<sup>+</sup>를  $\lambda$  phage의 숙주로서 사용했을 때에 약 1 mg/liter 의 phage DNA 생산을 관찰했다. 분리한  $\lambda$  phage DNA를 제한효

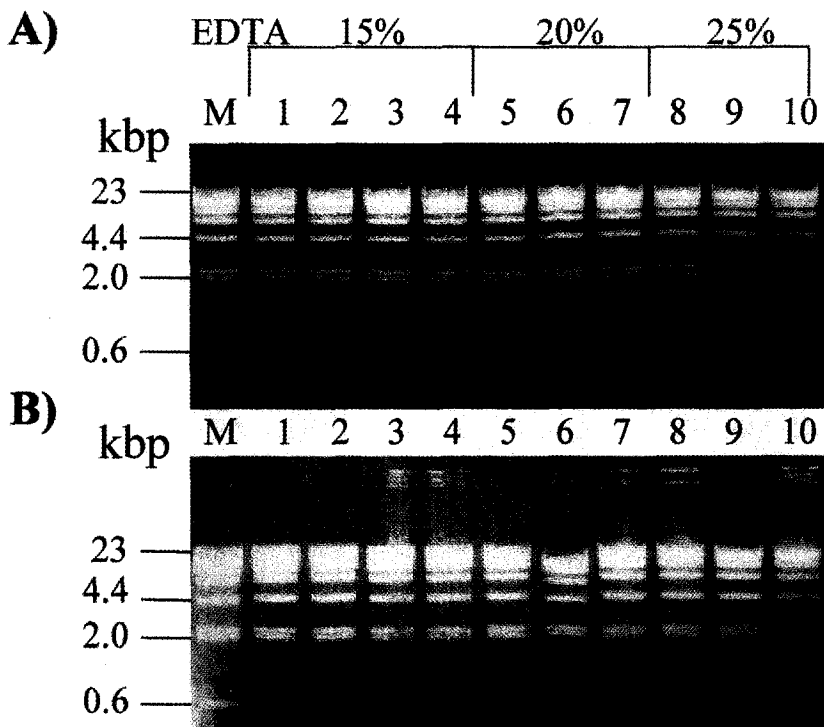


Figure 1. Band patterns of  $\lambda$  DNA digested with *Hind*III. Size marker DNA was run on 1% agarose gels at a concentration of 1  $\mu\text{g}/12 \mu\text{l}$  per well. DNA samples were run on the gel prior to lyophilization. A) DNA was buffered with TE. B) DNA was buffered with TEN. M: commercially available size marker, lane 1: 50 mM EDTA, lanes 2, 5 and 8: 60 mM EDTA, lanes 3, 6 and 9: 90 mM EDTA, lanes 4, 7 and 8: 120 mM EDTA. Lanes 1, 2, 3 and 4: 15% ficoll, lanes 5, 6, and 7: 20% ficoll, lanes 8, 9 and 10: 25% ficoll.

소인 *Hind*III를 사용 대량 절단한 후 DNA만을 회수하였다. 절단된 phage DNA는 50 µg/200 µl의 농도가 되도록 TE 완충액과 TEN 완충액에 각각 용해한 후 다양하게 조성된 gel loading 염색제를 첨가하여 최종적으로 50 µg/600 µl의 농도가 되도록 하였다. 제작된 size marker의 전기영동 후 첨가제인 EDTA와 ficoll의 농도가 높아질수록 DNA 단편이 넓게 퍼지는 것을 확인할 수 있었고, 특히 562 bp 단편은 희미해져 구분이 어려웠다. TE 완충액을 사용했을 때가 TEN 완충액을 사용했을 때 보다 선명하고 DNA 절편의 확산이 적게 관찰되었다 (Figure 1). 산화 방지제인 DTT (dithiothreitol)가 해상도에 미치는 영향은 거의 없었으며, ficoll대신 glycerol을 첨가했을 경우는 건조 시 완전한 건조가 이루어지지 않았다. 종합해서 15% ficoll과 50 mM

EDTA를 함유하는 gel loading 염색제와 TE 완충액을 사용하는 것이 가장 유리하였다.

장기간 보존시의 안정도를 확인하기 위해서 위의 실험에서 가장 유리한 조건으로 확인된 15% ficoll과 50 mM EDTA를 함유하는 gel loading 염색제와 TE 완충액을 사용하였다. 원심 진공건조기에 3시간 건조한 후 상온, 상온에서 빛 차단, 그리고 4°C에서 빛 차단의 3 가지 조건으로 60일간 방치하였다. 60일이 경과한 후 이들을 각각 600 µl의 살균된 증류수에 용해하였다. 보관 일 주일을 전후해서 빛을 차단하지 않은 실험군에서는 BPB가 푸른색에서 옅은 노란색으로 변색이 되었으나, 빛을 차단한 조건에서는 상온과 4°C 모두 BPB 원래의 색을 유지하고 있었다 (관찰결과 생략). 동결건조된 DNA size marker를 증류수로 재조성한 후 동결 건조전의 DNA size

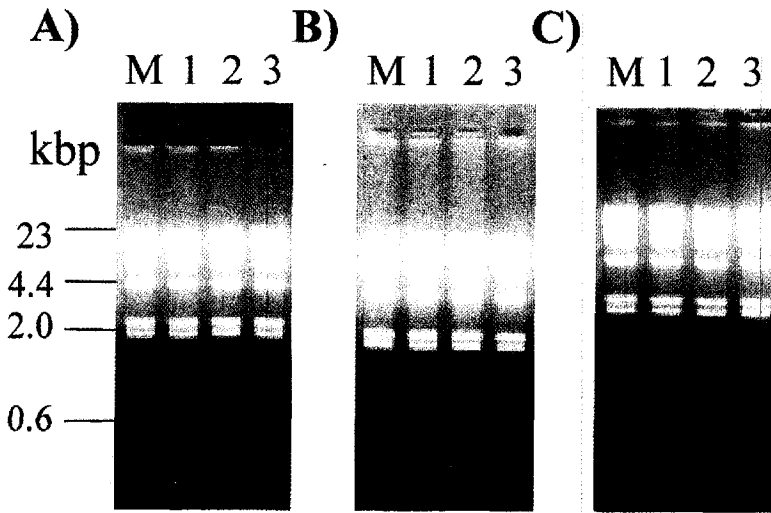


Figure 2. Electrophoretic band patterns after lyophilizing size marker DNA. Size marker DNA was loaded on an agarose gel 1 µg/12 µl per well. A) before lyophilization. B) after lyophilization. C) 60 days after DNA resuspension in distilled water. M: commercially available size marker, lane 1: maintained at room temperature (RT) with light, lane 2: maintained at RT without light, lane 3: maintained at 4°C without light.

marker와 비교했을 때 질과 양에서의 차이는 관찰할 수 없었다. 더 나아가 동결건조된 DNA size marker를 증류수로 재조성한 후 (15% ficoll과 50 mM EDTA를 함유하는 gel loading 염색제와 TE 완충액 사용) 상온에 60 일동안 보관하였으나 이경우에도 DNA size marker에서 양과 질의 차이는 관찰되지 않았다 (Figure 2).

이러한 결과는 DNA size marker의 장기간 상온 보관이 동결 건조체로서 가능하며 실제 buffer, 비중상승제, 염색제 그리고 DNA 분해 억제제등을 동결 건조체에 포함할 수 있음을 관찰했다.

2. 저분자 DNA의 size marking을 위한 새로운 플라스미드 제작

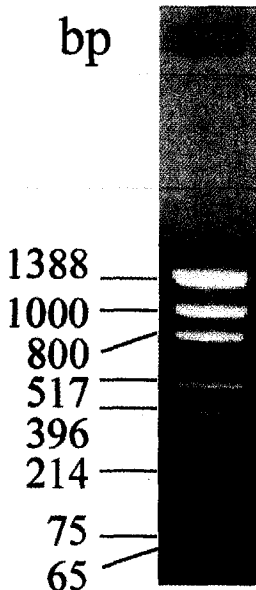


Figure 3. Electrophoretic band patterns of pWON size marker after digestion with *EcoRI* and *HinfI*. DNA was run on an 1.7% agarose gel for 40 minutes in the TAE buffer.

$\phi$ X174 phage DNA의 *HaeIII* 절단체는 저분자 DNA 절편의 정성 및 정량에 편리하게 이용되어 왔으나  $\phi$ X174 phage는 세포내 증식이 불편한 단점을 갖고있다. 더불어 이중나선인 RF형 virus DNA를 column chromatography로 분리하기가 용이하지 않다. 본 연구에서는 이러한 단점을 보완할 저분자량 DNA size marker 개발의 필요성에서  $\phi$ X174 phage DNA의 *HaeIII* 절단체를 대체할 수 있는 플라스미드의 개발을 시도하였다.

개발된 플라스미드는 기존의 high copy 플라스미드인 pUC19에 1000 bp와 800 bp 절편을 클로닝하여 증폭한 후 제한효소의 절단에 의해 용이하게 제작되었다. 1000 bp와 800 bp 크기의 단편은,  $\lambda$  phage DNA를 주형으로 하고 *EcoRI* linker를 포함하는 PCR primers를 사용하여 증폭하였다. 1000 bp 단편은 *EcoRI* 자리에 삽입하고 800 bp 단편은 partial digestion을 이용하여 pUC19에 삽입하였다. 이렇게 제작된 pWON 플라스미드는 전향에 기술된 것과 동일한 방법으로 실제 실험에서 사용하여 편의성과 안정성이 조사되었다. pWON size marker를 제한 효소로 절단한 후 agarose 겔에서 전기영동한 결과 예상된 절편 형성을 관찰했다 (Figure 3). pWON 플라스미드 절편은 실제 실험에서  $\phi$ X174 phage DNA의 *HaeIII* 절단체와 큰 차이가 없었으며 제작과 분리과정이 월등히 편리하였다.

고 찰

본 연구는 국내에서 개발이 취약한 분자 생명과학 연구소재 중에서 DNA size markers의 개발을 목표로 했다. 기존의 DNA size markers는 전량 수입되며 dry ice packing하에서 운송과 보관이 되어 구매 비용이 높다. 더불어 저분자의 DNA 분자를 조사하기 위해 사용하는  $\phi$ X174 *HaeIII* 절편은 제작과정이 복잡하고 고가인 단점들이 있었다. 이러한 단점을 보완한

상은 보관용 λ phage 및 플라스미드 DNA size markers의 개발을 시도했다. DNA size markers는 전기영동 후 직접적인 관찰이 가능하므로 초기단계의 품질관리가 용이한 장점도 있다.

DNA size markers는 불필요한 운송비용등의 부가로 실제 최종 사용자는 높은 가격을 지불해야한다. 이러한 문제점을 개선하여 장기간 상온 보관이 용이하고 더불어 전기영동에 필요한 모든 요소가 포함된 복합물을 건조하여 사용상의 편의성을 개선할 수 있을것으로 사료되었다. 사용 편의성의 개선은 건조된 DNA pellet에 일정량의 증류수만을 첨가 함으로써 즉시 사용할 수 있도록 시도했다. 일반적으로 핵산을 전기영동젤의 well에 가라앉히기 위한 비중강하제로는 glucose, glycerol 그리고 ficoll등이 사용된다. 이 중에서 핵산과 혼합했을때 ficoll은 상온에서 보관을 가능하게 하기 때문에 첨가제로 사용되었다. Glycerol은 건조 시 완전건조가 이루어지지 않았서 동결건조체의 제작에서 제외되었다. 동결건조후 건조된 DNA pellet은 BPB의 청색을 띄고 있으나 빛에 장기간 노출이 될 경우 청색을 상실했다 (결과 생략). 상실된 BPB 청색은 증류수로 재조성한 후에도 회복되지 않는 특성을 갖고 있었다. 이러한 문제점은 건조된 DNA pellet을 빛이 차단된 용기에 보관함으로써 해결할 수 있었으며 60일 후에 그 특성의 변형이 관찰되지 않았다. 실제 6개월 후 증류수를 사용한 재조성이 이루어졌을 때 전기영동 젤에서 변형이 없는 size marker 양상을 나타내었다.

저분자의 DNA 절편을 조사할 때 사용하는  $\phi$  X174 HaeIII 절단체는 대장균에 감염하는 bacteriophage인  $\phi$  X174의 이중나선 RF형을 사용하여 제작된다. 그러나  $\phi$  X174는 대량배양에 많은 노력을 필요로 하고 배양 후 초고속원심분리기에서 CsCl gradient를 이용하여 분리하여야 한다. 이러한 문제점을 근본적으로 해결하기 위해 기존의 플라스미드를 변조하여 제한효소 처리후  $\phi$  X174 HaeIII 절단체와 유사한

DNA 절편의 분리를 나타내도록 하였다. 개발된 새로운 플라스미드는 column chromatography를 사용하여 분리한 후 제한효소에 의해 효과적으로 절단되었다.

상기한 새로운 보관방법과 플라스미드의 개발은 국내에서 양질의 DNA size markers를 적정한 원가로서 개발할 수 있음을 나타낸다. 본 연구에 의해 분자 의과학연구에 필수적 기초소재인 DNA size markers가 국내에서 적정가격에 생산 공급되어 연구 및 개발활동이 촉진될 수 있을 것으로 기대된다.

### 감사의 글

본 연구는 중소기업 기술혁신 개발사업 연구비에 의해 지원되었음. 본 연구를 수행하는데 있어 많은 기여를 한 강석원 연구원에 감사를 포함.

### 요 약

기존의 수입된 핵산 size markers는 dry ice에 넣어져서 운반되므로 매우 고가이다. 따라서 상온에서 보관될 수 있는 방법을 모색하던 중, 많은 물질의 경우 건조상태를 유지할 때 높은 안정성을 유지한다는 점에 착안했다. DNA는 매우 안정한 물질이므로 그 가능성은 더욱 높다고 가정했다. DNA size markers에 첨가되는 요소를 모두 혼합한 다음 동결건조를 시도해 보았다. 상온과 빛, 상온과 빛 차단 그리고 4℃와 빛 차단의 조건으로 60일간 방치한 후 건조 전 부피의 증류수로 건조체를 용해하여 전기영동 양상을 비교한 결과 DNA size marker의 양 및 질에서 큰 변화가 없었다.

$\phi$  X174 phage DNA는 double strand로 분리가 쉽지 않으며 phage의 대량배양도 용이하지 않다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 기존의 플라스미드를 변조하여  $\phi$  X174 HaeIII 절단체와 유사한 DNA 분리 양상을 나타내도록 하였다. 개발된 새로운 플라스미드는 column chro-

matography를 사용하여 분리한 후 제한효소에 의해 효과적으로 절단되었다. 종합하면, 새로운 보관방법과 플라스미드의 개발은 국내에서 양질의 DNA size markers를 적정한 원가로서 개발할 수 있음을 나타낸다.

### 참 고 문 헌

- 한문희, 이형규, 성문희 외: 생명공학기술 현재와 미래. KIST 생명공학연구소, pp 1-588. 1996.
- Bolivar F, Rodriguez RL, Greene PJ *et al*: Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 1997;2:95-113.
- Kohler SW, Provost GS, Kretz PL *et al*: Development of a short-term, in vivo mutagenesis assay: the effects of methylation on the recovery of a lambda phage shuttle vector from transgenic mice. *Nucleic Acids Res* 1990;18:3007-3013.
- Kretz PL, Kohler SW, Short JM: Identification and characterization of a gene responsible for inhibiting propagation of methylated DNA sequences in mcrA mcrB1 Escherichia coli strains. *J Bacteriol* 1991;173:4707-4716.
- Kretz PL, Reid CH, Greener A *et al*: Effect of lambda packaging extract mcr restriction activity on DNA cloning. *Nucleic Acids Res* 1989;17:5409.
- Messing J: New M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol* 1983;101:20-78.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular Cloning*: 1989.
- Sanger F, Coulson AR, Hong GF, Nucleotide sequence of bacteriophage lambda DNA. *J Mol Biol* 1982;162:729-773.
- Sutcliffe JG: Complete nucleotide sequence of the Escherichia coli plasmid pBR322. *Cold Spring Harbor Sym* 1979; 43:77-90.
- Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J: Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 1985;33:103-119.