

IX. 세균 분류에 사용되는 분자생물학적 방법

서울대학교 농업생명과학대학교
허 성 기

최근 많은 분자 생물학적 방법들이 세균의 분류에 이용되고 있다. 가장 일반적이고 오래된 분류 방법은 세균의 chromosomal DNA의 GC ratio를 재는 것으로 species level의 분류에 보편적으로 쓰이고 있다. 최근, ribosomal RNA를 이용한 DNA:rRNA hybridization 방법이 많이 쓰이고 있으며, 특히 16S rRNA를 이용한 새로운 grouping에 의하여 많은 세균의 재분류가 진행되고 있다. 특히 *Pseudomonas*의 경우 많은 non-fluorescent group *Pseudomonas*가 16S rRNA에 의한 분류 방법에 의하여 여러 개의 새로운 genus로 바뀌게 되었다. 이러한 새로운 분자생물학적 방법의 도입은 현존하는 세균 분류의 문제점을 해결하는데 크게 도움이 될 수 있다. 그러나 이러한 분자생물학적 방법은 세균 분류의 한 방법일 뿐이며 다른 생리, 생화학적 방법, 또는 형태학적 방법 등과 함께 하여야만 세균의 분류에 크게 기여할 수 있게 된다.

1. Total DNA extraction procedure

- ① 5 ml overnight culture를 100 ml LB broth에 접종하여 overnight시킨다.
- ② 50 ml oakridge tubes에 30ml씩을 넣고 4°C, 12000rpm에서 3분간 원심분리한다.
- ③ 1 M NaCl 10 ml을 넣어 씻는다. vortexing하고 상온에서 30분 정도 방치한다.
- ④ pellet을 6.6 ml GTE solution*에 현탁한후, 2 mg/ml lysozyme을 처리한다.
- ⑤ Room Temperature에서 30분간 방치한다.
- ⑥ 10% SDS를 334 μ l를 처리하고, 50°C에서 10분간 배양한다. [SDS disrupts membrane]
- ⑦ 10 mg/ml RNase A를 200 μ l 처리하고, 37°C에서 1-2시간 정도 배양한다. [Degrades RNA]
- ⑧ 0.5 M EDTA를 340 μ l를 처리하고, 50°C에서 10분간 배양한다. [Stops nuclease activity]
- ⑨ 10 mg/ml proteinase K를 50 μ l를 처리하고, 37°C에서 6시간 이상 배양한다.
[Degrades proteins]
- ⑩ 동일부피 (7.5 ml정도)의 phenol**로 1-2번 extraction한다.
(4°C, 12000rpm에서 10분간 원심분리), [Junk가 많으면 다시 한번, Transfer시 Junk에 신경]
- ⑪ 동일부피의 PCI***로 1-2번 extraction한다. [Phenol/chloroform extract proteins, lipids etc.]
- ⑫ 동일부피의 PCI로 1번 extraction한다. [Chloroform extracts phenol; It is important to remove trace of phenol because phenol inhibits endonuclease]
- ⑬ 3 M Ammonium acetate (pH 7.0) 0.1부피와 95% EtOH 2부피를 넣어서 DNA를 precipitation시킨다.
- ⑭ 가는 유리막대를 가지고 DNA를 말아서 spool-out한다.

[DNA가 유리막대에 붙는 성질을 이용한 것이다.

⑮ 적당량의 TE buffer (pH 8.0)에 녹인다.

★ GTE buffer: 50 mM glucose, 25 mM Tris-Cl (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0)

★★ Phenol: TE (pH 8.0) saturated phenol.

★★★ PCI: TE saturated phenol : chloroform : isoamyl alcohol = 25 : 24 : 1

2. 세균의 GC 분석법

여러 종류의 GC분석법이 쓰여지고 있으나 그중 2가지 방법이 정확성을 가지고 가장 널리 쓰이고 있다. 1) Thermal denaturation, 2) HPLC (High Performance Liquid Chromatography). 그러나 이러한 방법은 모두 세균의 chromosomal DNA의 분류가 우선되어야 한다.

현재 거의 모든 새로운 세균의 분류에 GC ratio가 하나의 지표로 쓰여지고 있다. 현재까지 7,000종 이상의 세균의 GC ratio가 밝혀져 있으며, 그러한 방대한 정보를 토대로 다음과 같은 결론을 유도할 수 있다.

- ① Mol % GC 값이 25에서 75 사이여야만 정확성이 인정된다.
- ② 같은 species에 속하는 세균의 base composition은 거의 비슷하여 그 차이가 $\pm 1\%$ 에 든다.
- ③ 생리·생화학적 방법에 의하여 같은 genus에 속한 species들의 GC ratio는 크게 다르지 않다. 대부분의 경우 같은 genus에 속하는 species들은 GC ratio의 차이가 10% 이내에 든다.
- ④ GC 값의 차이가 15% 이상인 genera는 분류상 순수한 같은 genus의 모임이라 하기 힘들다. 이런 경우 대부분 다른 2-3개의 genus로 재분류가 된다. 가장 좋은 예가 *Corynebacterium*과 *Pseudomonas*의 경우가 된다.
- ⑤ 매우 밀접한 두 bacterial strain의 GC 값은 거의 같다. 그러나 그 역은 성립되지 않는다. 만일 어떤 genus나 species에 속해있는 bacterial strain의 GC 값이 다른 균들과 크게 다르다면 그 bacterial strain은 그 genus나 species에 속할 수 없다.

***** Thermal Melting Point *****

Marmur와 Doty는 처음으로 온도의 상승에 따른 DNA의 denaturation을 이용하여 GC content 측정 방법을 개발하였다. 그후 많은 사람들이 그의 방법을 이용하고 또 새롭게 바꾸었으나 대부분의 방법이 그들의 방법과 크게 다르지 않다. 이 방법은 온도 상승에 따라 DNA의 double stranded가 갈라질 때 그 midpoint (T_m) 를 이용한 것이다. 그 T_m 값은 사용된 buffer의 이온 강도와 매우 밀접한 관계가 있으며, 모든 DNA에 같은 영향을 준다. 그러므로 항상 control로 참고로 하는 DNA와 같은 buffer를 사용하여야만 한다.

■ Procedure

1. 2 - 4 liter의 0.5 X SSC★ (pH 7.0) buffer를 준비한다. 그중 약 500ml의 buffer는 DNA의 회석과 cuvette의 세척을 위하여 따로 두고, 나머지는 step 3에서의 두번의 투석 (dialysis)를 위하여 2개의 용기에 따로 둔다.
2. 사용할 cuvette의 크기에 따라 1 - 5 ml의 DNA sample을 50 μ g/ml의 농도로 0.5 X SSC buffer에 준비한다. control로 사용할 reference DNA는 5 - 10 ml정도 준비하여 각각의 sample을 측정 할 때마다 참고로 사용할 수 있게 한다. 참고로할 DNA는 *E. coli* strain b와 같이 널리 사용되고 있으며, melting point, GC mol% 등이 많이 연구되어져 있는 것을 택한다.
3. 모든 시료들은 1. 에서 준비한 0.5 X SSC buffer에 넣어 투석시킨다. 투석시 처음 3-4 시간이 지난 후 다른 buffer로 바꾸어 밤새 투석시킨다. 투석이 끝나면 DNA sample을 다시 뚜껑이 있는 tube에 보관한다.

*** 만일 앞에서 설명된 방법에 의하여 DNA가 분리되었다면, 마지막 단계에 잔재된 염이 거의 없고 또 DNA도 0.1 X SSC buffer에 보관 되게 되므로 3의 투석은 빼도 된다.

4. 전기 가열 장치가 있는 cuvette에 DNA sample을 넣고 자동 spectrophotometer를 작동한다. 처음 시작은 60 $^{\circ}$ C로 하고, 1분당 0.5나 1 $^{\circ}$ C 씩 증가시키며 melting profile을 만든다.
5. Figure에서와 같이 T_m 값을 정한다.
6. 다음의 수식을 사용하여 sample DNA의 GC contents를 계산한다.

$$\text{MOL \% G+C} = \frac{\{T_m + [90.5 - T_{m(\text{ref})}]\} - 69.3}{0.41}$$

★ 1 X SSC (standard saline citrate): 0.15 M NaCl, 0.015 M trisodium citrate (pH 7.0)

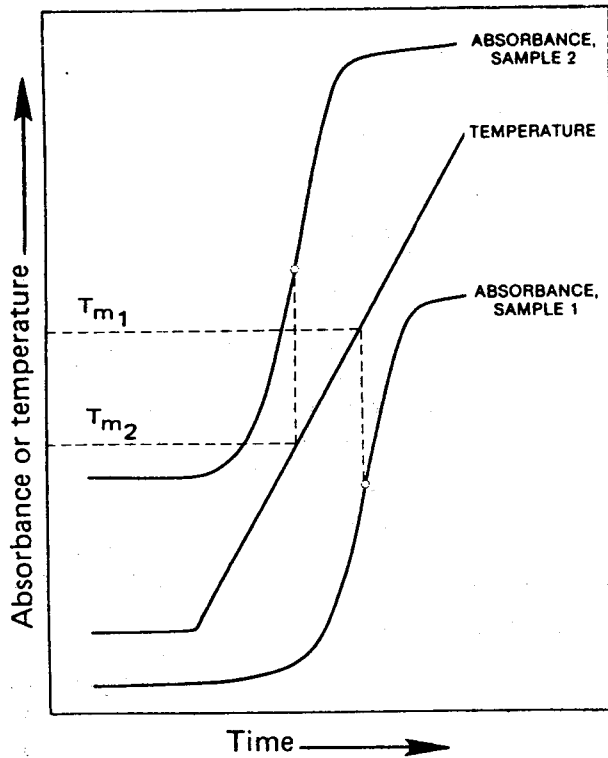


FIG. Hyperchromic shift tracings for two samples of DNA in an automatic recording spectrophotometer. The points at which any vertical line crosses the absorbance and temperature curves give values for these two parameters at a given time. The inflection points are estimated at one-half of the hyperchromic shift, and the temperature at that time is the melting temperature (T_m).

3. The DNA-DNA hybridization

모든 세균의 DNA는 double helix로 되어 있다. 이러한 double helix DNA를 고온이나 강알칼리로 처리하면 두 가닥의 single strand로 분리가 된다. 이러한 single strand를 다시 온도를 낮추고 조건을 잡아주면 complementary base (G:C, A:T)를 찾아 다시 붙게된다. 이것을 reassociation이라 한다. 이러한 DNA의 성질을 이용하여 다른 세균의 DNA의 유사성을 측정할 수 있다.

먼저 reference DNA를 denature시켜 single DNA를 만든 뒤 ^{32}P 등의 방사성 동위원소를 이용하거나 형광물질 등을 이용하여 labelling시킨다. 그 labelled된 DNA를 다른 균의 single stranded DNA와 섞어준뒤 hybridization solution에서 incubation 시킨다. 그 뒤 hydroxyapatite column을 통과시키거나 S1 nuclease를 처리하여 DNA-DNA 결합된 hybrid만 분리하여 그 정도를 측정한다.

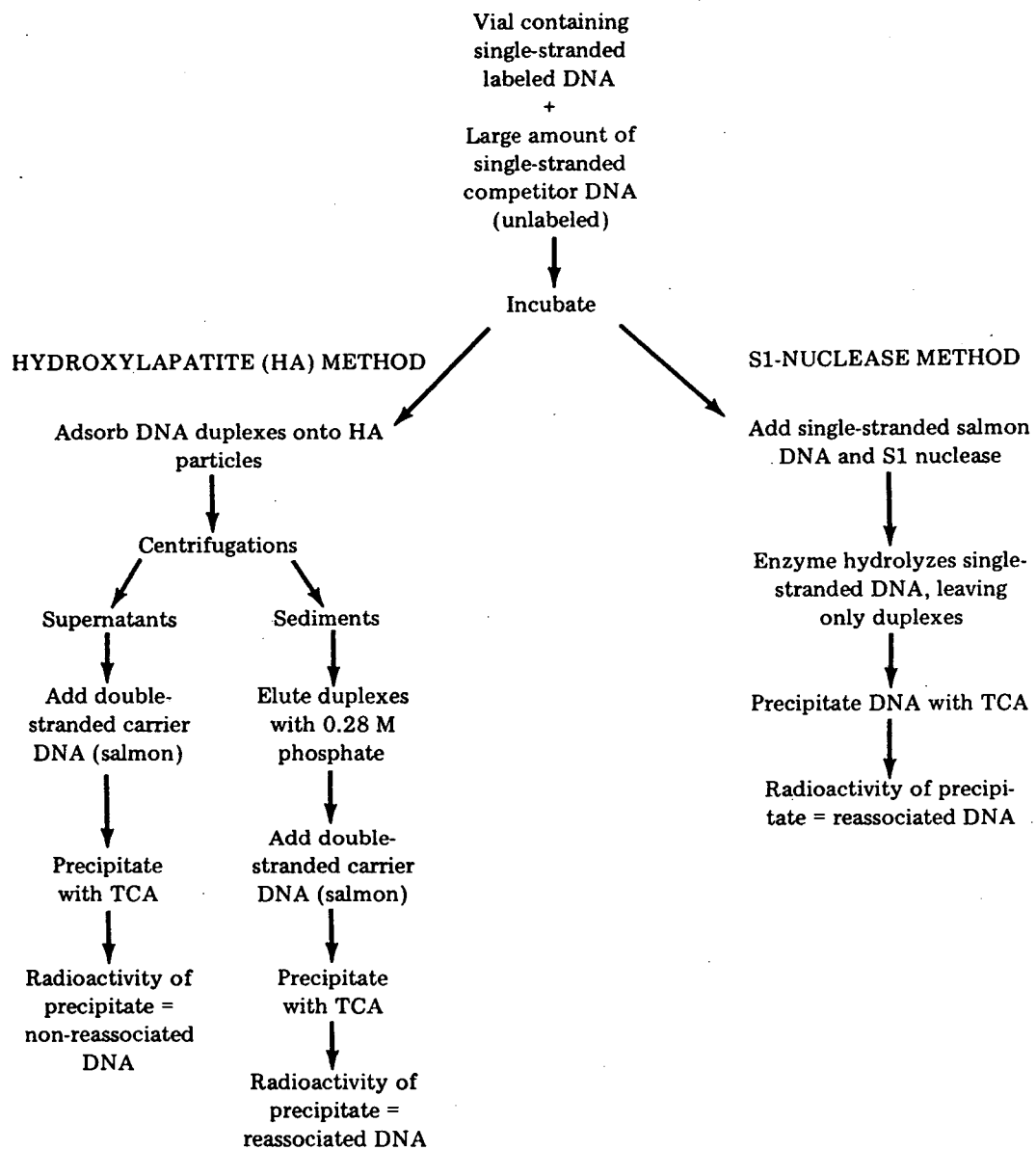


Figure. Scheme for performing free-solution DNA reassociation experiments, assayed by either the hydroxyapatite or S1 nuclease procedure TCA, trichloroacetic acid.

4. DNA-rRNA hybridization

이 방법은 DNA-DNA hybridization과 원리는 거의 같으나 test할 균의 single stranded DNA에 labelled된 ribosomal RNA를 붙이는 방법이다. 이 방법은 genus나 family level의 분류에 매우 좋은 방법이다. 이것은 진화 과정에서 rRNA를 만드는 유전자가 크게 변화하지 않았기 때문이다. 세균은 여러 종류의 RNA를 만든다. 그중 mRNA는 대부분의 유전자가 mRNA로 되기 때문에 mRNA를 DNA-RNA hybridization에 이용하면 그 결과는 DNA-DNA hybridization과 비슷하다. 반면, ribosomal RNA (rRNA)나 transfer RNA (tRNA)는 유전자의 일부분에 의하여 만들어지므로 이 두 type의 RNA를 이용한 hybridization은 극히 일부 유전자의 비교가 된다. 현재까지 연구된 모든 세균의 경우 rRNA나 tRNA를 만드는 DNA의 염기서열은 다른 부위의 염기서열과 달리 서서히 진화되어 변화가 적으므로 DNA-rRNA hybridization은 관계가 밀접하지 않은 균들의 유사성 측정에 유용하게 이용될 수 있다. 반면 DNA-DNA hybridization은 밀접한 관계의 균들 사이에서의 유사성 측정에 이용된다.

DNA-rRNA hybridization에는 보통 16S rRNA가 사용된다. 초기에는 5S rRNA가 크기가 작아 sequencing에 이용되기도 했으나 요즘엔 거의 사용되지 않고, 23S rRNA는 크기가 16S rRNA보다 커 덜 사용되었으나 점점 그 사용 빈도가 느는 추세에 있다.

Table PCR and sequencing primers for 16S rRNA and rRNA genes

Name	Sequence ^a
PCR primers	
27f	5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG>
27fB	5'-Biotin-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG>
1522r	5'-AAG GAG GTG ATC CA(AG) CCG CA>
1522rB	5'-Biotin-AAG GAG GTG ATC CA(AG) CCG CA>
1522rN	5'-CAT GCG GCC GCA AGG AGG TGA TCC A(AG)C CGC A>
<i>NotI</i> -T7-PC5 ^b (1492r)	5'-GGG CGG CCG CAA TTT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GAT ACC TTG TTA CGA CTT>
<i>NotI</i> -T7-P3mod ^b (787f)	5'-GGG CGG CCG CGC GCA ATT AAC CCT CAC TAA AGG GAA ATT AGA TAC CCT (ATG)GT AGT CC>
Forward-sequencing primers	
27f	5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG>
123f	5'-ACG GGT GAG TAA (CT)G(CT) GT>
357f	5'-CTC CTA CGG GAG GCA GCA G>
530f	5'-GTG CCA GCA GCC GCG G>
704f	5'-GTA GCG GTG AAA TGC GTA GA>
926f	5'-AAA CTC AAA GGA ATT GAC GG>
1114f	5'-GCA ACG AGC GCA ACC C>
1242f	5'-CAC ACG TGC TAC AAT GG>
1406f	5'-TGT ACA CAC CTC CCG TG>
Reverse-sequencing primers	
109r	5'-AC(AG) C(AG)T TAC TCA CCC GT>
321r	5'-AGT CTG GAC CGT GTC TCA GT>
519r	5'-G(AT)A TTA CCG CGG C(GT)G CTG>
685r	5'-TCT ACG CAT TTC ACC GCT AC>
907r	5'-CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT>
1069r	5'-CCA ACA T(TC)T CAC A(AG)C ACG AG>
1100r	5'-GGG TTG CGC TCG TTG>
1220r	5'-TTG TAG CAC GTG TGT AGC CC>
1392r	5'-ACG GGC GGT GTG T(AG)C>
1522r	5'-AAG GAG GTG ATC CA(AG) CCG CA>

^aMixtures, e.g., (AG), are equimolar.

^bFrom reference 17. Underlined portions represent 16S rRNA gene sequences.

5. 참고문헌

1. De Ley, J. 1970. Reexamination of the association between melting point, buoyant density, and chemical base composition of deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* 101:738-754.
2. De Parasis, J., and Roth, D. A. 1990. Nucleic acid probes for identification of Phytopathogenic bacteria : identification of genus-specific 16S rRNA sequences. *Phytopathology* 80:618-621.
3. De Vos, P., Goor, M., Gilis, M., and De ley, J. 1985. Ribosomal ribonucleic acid cistron similarities of phytopathogenic *Pseudomonas* species. *Int. J Syst. Bacteriol.* 35:169-184.
4. Gardan, L., Bollet, C., AbuGhorrah, M., Grimont, F., and Grimont, P. A. D. 1992. DNA relatedness among the pathovar strains of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* Janes (1982) and proposal of *Pseudomonas savastanoi savastanoi* sp nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42:606-612
5. Johnson, J. L. 1994. Similarity analysis of DNAs, p. 655-682. In P. Gerhardt (ed) *Methods for general and molecular bacteriology*. ASM.
6. Johnson, J. L. 1994. Similarity analysis of rRNAs, p. 683-700. In P. Gerhardt (ed) *Methods for general and molecular bacteriology*. ASM.
7. Olsen, J. G. 1988. Phylogenetic analysis using ribosomal RNA. *Methods Enzymol.* 164:793-812.