

*Saccharomyces cerevisiae*와 *Mycobacterium phlei*에서  
DNA抽出에 따른 細胞壁의 電子顯微鏡的 考察

李吉洙 · \*趙世勳 · 金銀壽 · \*柳駿

(延世大學校 理工大學 生物學科 · \*延世大學校 醫科大學 微生物學教室)

Electron Microscopy of Cell Walls of *Saccharomces cerevisiae* and  
*Mycobacterium phlei* in the process of DNA extraction

LEE Kil Soo, \*Seh Hoon CHO, Woon Soo KIM, and \*Joon LEW

(Dept. of Biology, College of Science & Engineering, Yonsei University.

\*Dept. of Microbiology, College of Medicine, Yonsei University)

ABSTRACT

DNA's were extracted from *Saccharomyces cerevisiae* and *Mycobacterium phlei* and the damaging cell walls of these microorganisms were examined under an electron microscope in the extraction process in which a number of physico-chemical treatments of cells was involved.

While the DNA was easily extracted from *S. cerevisiae* using conventional methods of isolation, the DNA of *M. phlei* was extremely difficult to isolate and yielded very little DNA, applying various methods of isolation published earlier.

When the cell walls of *S. cerevisiae* were examined with the electron microscope, they were not yet damaged even after the cells were treated with sodium lauryl sulfate(SLS) and ethylene diamine tetraacetic acid(EDTA), but they were completely destroyed by the treatment of sodium perchlorate followed by the addition of chloroform and a vigorous agitation. Oozing cytoplasm through the broken cell walls was also observed.

In the extraction of DNA from *M. phlei*, the pronase was not effective at the aerobic environment of the sample.

When phenol was applied at the last step of DNA isolation, an extreme damage of cell walls was observed but the cytoplasm was shrunk into an electron-dense mass yielding little DNA into the solution.

Unlike the cells of *S. cerevisiae*, *M. phlei* cells showed a tendency of aggregation, thus the destruction of cell walls by sodium hydroxide was seen only on the walls of peripheral cells in the aggregated mass, leaving the walls of the inner cells undamaged.

緒 論

各種 微生物에서, 特別 細菌細胞로부터의 核酸抽出은 Marmur(1963)등에 의하여 많

은 研究가 進展된 바 있다. *Saccharomyces cerevisiae*의 DNA抽出은 Smith와 Halvorson(1968) 및 Bhargava와 Halvorson(1971)에 의하여 시도되었고, 그 細胞壁에 關한 研

究는 Northcote(1952) 및 Agar와 Douglas (1957)가 報告한 바 있다. 그러나 이들은單純히 細胞壁의 構造와 그 化學的 組成에 關하여 研究하였을 뿐이다. Marmur(1963), Wayne과 Gross(1968)들은 *Mycobacterium phlei*로부터 核酸을 抽出, 純化하였으며 그 細胞壁의 構造에 關해서는 Takeya와 Hisatsune(1963) 및 Draper(1971)의 報告가 있었다. 이들은 *M. phlei*로부터 DNA를 抽出, 純化하여 鹽基의 化學的 分析과 同時에 DNA의 生合成에 利用하였으며, 細胞壁에 關한 研究도 細胞壁만을 分離하여 몇가지의 藥劑處理로서 細胞壁의 崩壞狀態를 研究하였을 뿐 全細胞狀態(whole cell)에서 特히 DNA를 損傷치 않고서 細胞壁을 崩壞시키기 爲한 研究는 追試한 바 없었다.

따라서 *S. cerevisiae*와 *M. phlei*의 DNA 抽出 또는 細胞壁의 構造에 關한 研究는 各 各 單獨의 으로는 되었으나, DNA 抽出過程에서 일어나는 細胞壁의 構造의 變化를 電子顯微鏡上에서 觀察한 바는 없었다. 또한 著者 等은 몇 차례의 豫備實驗의 結果로서 *M. phlei*에서의 DNA抽出은 極少量의 收量을 가져왔으므로 이의 證明이 必要하였다. 그러므로 本 研究는 核酸抽出過程에서 細胞를 融解(lysis)시키는 方法과 DNA抽出을 爲하여 몇가지의 藥劑를 處理하였을때 惹起되는 細胞壁의 變化를 *M. phlei*와 *S. cerevisiae*에서 電子顯微鏡으로 追跡, 觀察하므로서 核酸抽出에 있어서 效果的이며 簡單한 方法을 摸索하고자 本實驗에 着手하였다.

## 材料 및 方法

### 1. 材料의 處理와 培養

*S. cerevisiae*는 市販用(天一穀產 株式會社 製)을 使用하였으며, *M. phlei*(KFCC 1201)는 延世大學校 醫科大學 微生物學教室에서 繼代培養하고 있는 菌株을 使用하였다. *S. cerevisiae*는 3회에 걸쳐서 洗滌한 것을 本實驗에 使用하였다. *M. phlei*는 Okawa 培地에 接種, 37°C에서 繼代培養하였고 菌接種 15日後에 大量培養을 爲하여 Sauton液體

培地와 固體培地(1.5% agar)의 二相性培養法(biphasic culture system) (Wayne, 1968)을 導入하였다. *M. phlei*는 菌膜을 形成하므로 液體培地上에 浮遊된 狀態로 培養시켰으며, 37°C, 3日後 logarithmic phase에 到達하므로 이때에 細胞를 收獲하여 使用하였다.

### 2. 核酸의 抽出과 吸光度測定

*S. cerevisiae*의 DNA 抽出은 Smith와 Halvorson(1968)의 方法을 若干 修正한 便法을 利用하였다. 試料 50gm.(wet weight)를 -25°C에서 冷凍시킨 후, 冷凍融法(freeze thawing method)에 따라 3회에 걸쳐서 急速冷凍融法시키므로서 細胞를 融解시켰고, Noll과 Stutz (1968)의 方法에 따라 sodium lauryl sulfate(SLS)를 saline-EDTA(0.15M NaCl + 1M EDTA, pH 8.0)에 2%로 溶解시켜서 얻은 細胞浮遊液을 室温, 3000×g에서 遠心分離, 沈澱된 細胞를 -25°C에서 24時間동안 冷凍시킨 後 室温狀態로 녹였다. 細胞溶液에 3倍量의 2% SLS-saline-EDTA를 添加하고 45°C에서 4時間 放置한 後 繼續해서 60°C에서 10時間 處理한 다음, sodium perchlorate(Lerman, 1957)로서 全體溶液의 濃도가 1M로 되게 하여 數分間 뒤섞었다. 여기에 다시 同量의 CHCl<sub>3</sub>-isoamyl alcohol(24:1)을 添加하고 室温에서 30分間 진탕시켰다. 이 狀態에서 細胞溶液은 乳濁液化되었다. 이것을 4°C, 4000×g에서 25分間 遠心分離하여 상등액을 取한 後 Smith(1967), Kirby(1963), Sarfert(1968) 等의 方法에 따라 飽和 phenol을 添加하고 室温에서 30分間 진탕하였다. phenol을 除去하기 爲하여 溶液全量의 1/4量의 ether을 添加한 後 室温에서 5分間 진탕시킨 다음 分離깔대기(separate funnel)에서 核酸水溶液과 phenol, ether 溶液을 分離, 核酸水溶液만을 4°C, 5000×g에서 40分間 遠心分離하였다. 여기서 얻은 상등액에 4°C의 95% ethyl alcohol을 서서히 加하여 約 2倍量이 될때에 DNA는 유리봉에 收獲되었다.

이 DNA를 saline-citrate(0.015M NaCl + 0.0015M trisodium citrate)에 녹인 後 Beckman DB-G spectrophotometer로서 U.V. 220nm에서 300nm까지의 吸光度를 測定하였다. 標準試料로서는 calf thymus DNA (type I, Sigma)를 使用하였다.

*M. phlei*의 DNA抽出은 Wayne과 Gross (1968)의 方法을 使用하였다. 大量培養에서 收穫한 試料 24gm.(wet weight)를 3次 水洗하여 蒸溜水에 浮遊시키고 1N NaOH로서 pH3.4를 pH7.5로 換 後 37°C에서 72時間 stirring하였다. 여기에 0.2倍量의 0.5M sodium-EDTA를 添加하여 37°C에서 18時間 stirring한후 DNA의 變性を 抑制시키고 蛋白質의 除去를 爲하여 pronase(calbiochem)를 ml당 1mg을 處理한 後 즉시 無氣狀態(anaerobic)에서 37°C로 24時間 處理하였다. 여기에 0.1倍量의 5% sodium deoxycholate를 添加하고, pH를 다시 7.5로 適正한 後 65°C에서 60分間 서서히 stirring하였다. 그 후 이 細胞溶液을 室溫으로 冷却시켜서 4°C의 飽和 phenol 同量을 넣고 2~3分間 진탕시킨 다음 4°C, 5000×g에서 遠心, 상등액을 取하였다. 이때 phenol 處理後 ether은 添加하지 않고 바로 遠心分離하였다. 이 상등액에 4°C의 95% ethyl alcohol을 서서히 加하여 沈澱된 DNA를 取하였다. 吸光度 測定은 *S. cerevisiae*에서와 同一하게 實施하였다.

### 3. 細胞의 電子顯微鏡 觀察

*S. cerevisiae*, *M. phlei* 모두 各試藥處理段階別로 細胞를 收穫하여 電子顯微鏡觀察을 하였다. 對照區 및 各實驗區는 細胞를 3次 水洗하여 Keilenberger固定液으로 固定, ethanol系列에 脫水시킨 후 Epon 812에 包埋하였다. 標本의 微細切片은 Poster Blum MT-2 ultramicrotome으로 作成하여 uranyl acetate와 lead nitrate 二重染色하고, *M. phlei*는 Hitachi HU-11E, *S. cerevisiae*는 Hitachi HS-7S 電子顯微鏡으로 各各 觀察하였다.

## 結果 및 考察

### 1. 核酸의 紫外線吸光度

各實驗으로부터 抽出된 DNA를 calf thymus DNA(Sigma)와 比較하여 그 濃度를 測定하였으며, *S. cerevisiae*에서는 DNA가 抽出되었으나 *M. phlei*에서는 極少數이거나 거의 抽出되지 않았다. 標準試料로 使用된 DNA의 saline-citrate 溶液에서의 最大吸光度는 260nm에서 0.538, 最小吸光度는 235nm에서 0.201 즉, R=2.7이었다. *S. cerevisiae*로부터 얻은 DNA는 218.88mg/50g, R=2.1이었고 *M. phlei*에서는 82μg/24g, R=1.3이었다. 以上の 結果로 보아서 *S. cerevisiae*에서는 最終의 상등액을 phenol(Kirby, 1968; Sarfert, 1968)로 간단히 處理하므로써 DNA의 量的損失도 없었고, R值(2.1)도 理想的이었다. 그러므로 純度面에서는 Smith와 Halvorson(1968)의 酵素處理 方法이 Kirby(1968)의 phenol 處理法 보다는 理想的이라 할 수 있으나, DNA의 收穫量과 純度の 兩面的으로 볼 때는 飽和 phenol 處理 方法이 效果의이라고 생각된다. *M. phlei*에서는 極少數의 DNA가 抽出되었을 뿐이다. 그러므로 本實驗에서는 藥劑處理後의 細胞의 狀態를 다음과 같이 電子顯微鏡으로 觀察하여, 各試藥의 作用程度와 效果를 追跡, 觀察하였다.

### 2. 細胞의 電子顯微鏡 觀察

*M. phlei* 細胞壁의 두께는 10~23nm로서 Takeya(1963)에 따르면 三層 즉, slime層, 外層, 內層(basal layer)로 區分한다. *S. cerevisiae* 細胞壁에 관한 Northcote(1952)의 報告에 依하면 細胞壁은 二層으로서, 그 중 한개의 層은 glucan 成分이라고 한다. Fig. 1은 *S. cerevisiae*의 藥劑處理前의 細胞로서 比較的 完全한 細胞壁을 볼 수 있다. Fig. 2에서는 洗劑(detergent) sodium lauryl sulfate(SLS)와 chelating agent로서 EDTA를 處理하였으나, 細胞壁의 異常은 볼 수 없었다. 그러나 Ca<sup>++</sup>와 같은 陽ion을 遊離시켜서 細胞壁이 약간은 柔軟해

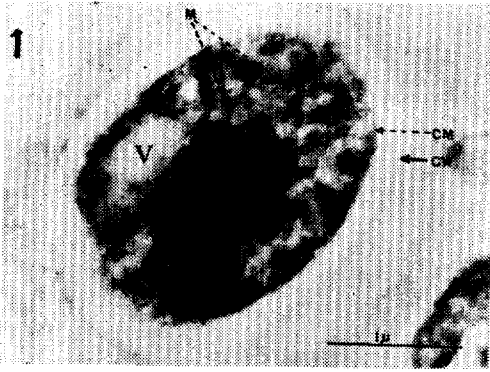


Fig. 1. An electron micrograph of ultrathin section of an untreated *Saccharomyces cerevisiae* cell, x34,000. CM; cell membrane, CW; cell wall, M; mitochondria, N; nucleus, S.G.; storage granule, V; vacuole.

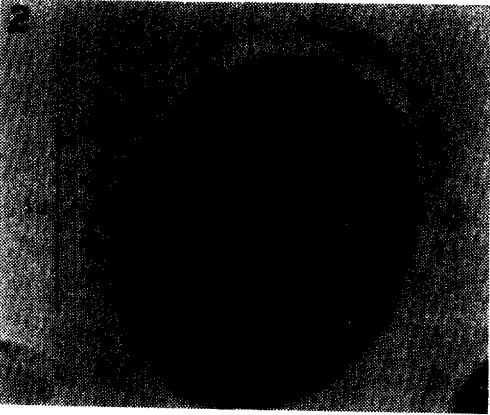


Fig. 2. *Saccharomyces cerevisiae* cell treated with 2% SLS-saline EDTA, x42,000. The outer-layer of cell wall was slightly altered.

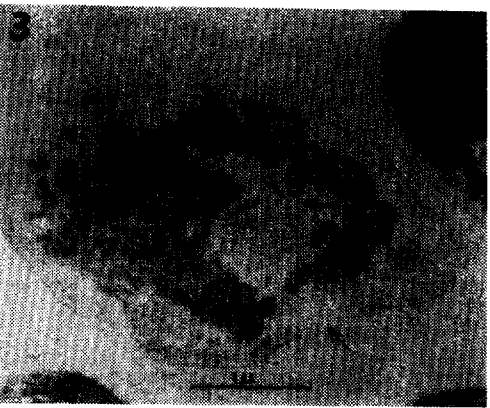


Fig. 3. *Saccharomyces cerevisiae* cells treated with NaClO<sub>4</sub> to 1M of cell suspension, x 23,000. The cell wall(→) was disintegrated partially and the cytoplasm was dispersed.



Fig. 4. *Saccharomyces cerevisiae* cells shaken with CHCl<sub>3</sub>-isoamyl alcohol mixture, x30,500. The cell wall was degraded and the cytoplasm leaked through the disintegrated site of the cell wall.

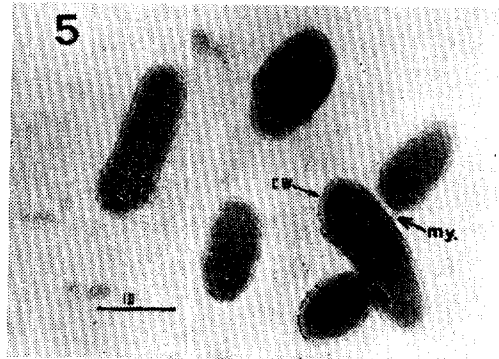


Fig. 5. An electron micrograph of the unsectioned *Mycobacterium phlei* cells, x20,000. CW; cell wall, My; mycelium.

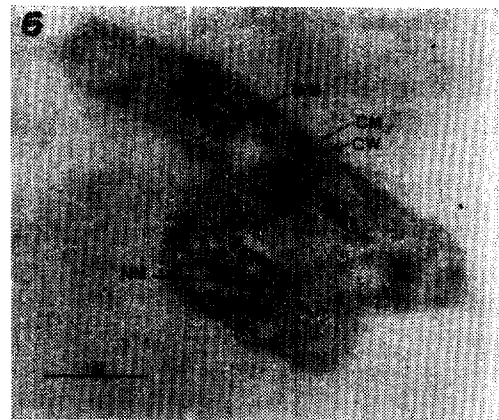


Fig. 6. An ultrathin sectioned *Mycobacterium phlei* untreated, x20,000. CM; cell membrane, CW; cell wall, NM; nuclear material. The nuclear material in the upper cell was spread longitudinally.

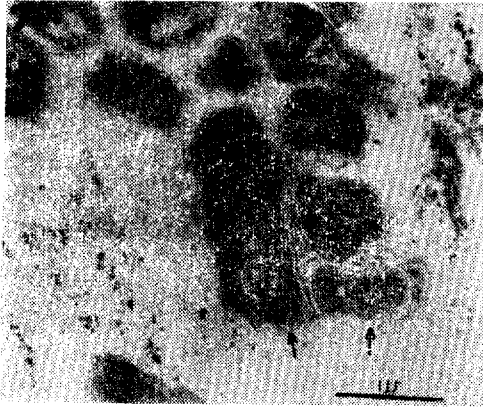


Fig. 7. pH of *Mycobacterium phlei* cell suspension was adjusted to 7.5 with 1N NaOH, x22,000. The cell walls(→) were degraded but the cytoplasm was not altered.



Fig. 9. *Mycobacterium phlei* cells treated with 5% sodium deoxycholate, x 26,000. The cytoplasm(↔) was agglomerated in the opposite side of the site of cell wall disintegrated(→).

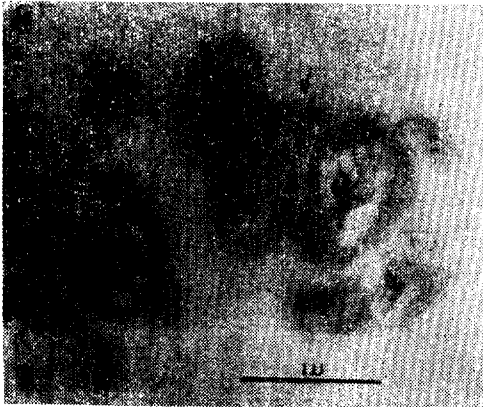


Fig. 8. *Mycobacterium phlei* cells treated with 0.5M EDTA and 1mg of pronase per ml of cell suspension, x 29,000. The cytoplasm does not leak through the disintegrated site(→) of cell wall but was condensed into a mass.

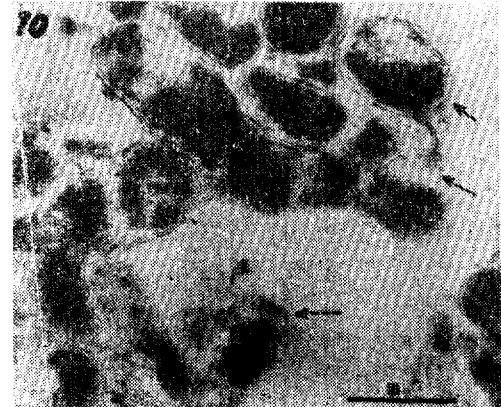


Fig. 10. *Mycobacterium phlei* cells, shaken with saturated phenol, x 21,000. The disintegration rate of cell wall was increased to some degree and in a certain cell, the cytoplasm(↔) was flowed out.

진 것으로 생각된다. Fig. 2 상태에서 Halvorson(1968)에 의하면 세포의 90%가融解된다고報告하였으나本實驗에서는 거의 모두가完全하였다. Fig. 3에서는細胞壁의崩壞와細胞質의分散이 일어났고, 이現象은 sodium perchlorate의處理下에前處置된 SLS 및 EDTA의作用이活潑해지므로서 일어난 것이다. Fig. 4에서는 CHCl<sub>3</sub>를添加, 濃濕시키므로서,細胞壁이崩壞된部位로細胞質의大部分이流出,細胞外에는微細糸狀物質(microfibrils)이觀察되며 이때에核酸이抽出되는 것으로 생각된다. Fig. 5

는 *M. phlei*의切片되지 않은全細胞로서 mycelium을形成하고 있고,細胞壁도完全하였다. Fig. 6에서는試藥處理前의細胞로서核物質이觀察된다. Takeya(1963)는 *M. phlei*細胞壁이組成은脂質 60%,還元糖 30%이고脂質은 주로 glycolipid, phospholipid이며, Goren(1972)에 의하면 wax D가存在한다고 하였다. Fig. 7에서는 1N NaOH로서 pH 3.4를 pH 7.5로上昇시켜주므로서細胞壁成分인 polysaccharide가分解되어細胞壁은 약간의屈曲이 생겼으며, 심한 경우엔細胞壁이崩壞되기도 하였다.

Fig. 8은 EDTA 및 pronase를 處理한 細胞로서 細胞壁은 대부분이 崩壞되었으나 細胞質은 流出되지 않았다. Fig. 9에서도 細胞는 서로 密集되어 있는 狀態이지만 sodium deoxycholate의 添加로 因하여 細胞內의 核物質이 凝縮되어 細胞의 內部로 밀리는 傾向이 있다. 이것은 sodium deoxycholate의 電氣陰性和 核酸의 phosphate가 갖는 電氣陰性이 서로 反撥하므로서 생기는 現象이라고 생각하며, 最終의 飽和 phenol 處理後에는 Fig. 10에서와 같이 대부분의 細胞物質이 細胞內에 그대로 存在하여 DNA는 細胞內에 殘留되어 있는 것이다. Takeya(1963)는 0.4% sodium deoxycholate 添加로서 또는 pronase를 加하므로서 細胞壁의 變化는 觀察할 수 없다고 하였으나,  $\text{CHCl}_3$  혹은 KOH로서는 많은 細胞壁의 崩壞를 볼 수 있다고 하였다. 本實驗에서는 NaOH, EDTA 處理後에 以上の 藥劑를 添加하므로서 細胞壁이 崩壞된 것이다. Draper(1971)는 phenol로서는 細胞壁의 主成分은 遊離시킬 수 없고 細胞壁의 脂質은  $\text{CHCl}_3$ -methanol

(1:1) mixture로서 除去된다고 報告한 바 있다. Takeya (1963)의 報告에 의하면  $\text{CHCl}_3$ -lysozyme 處理로서 *Mycobacteria*의 細胞壁을 崩壞시켰으며 이로서  $\text{CHCl}_3$ 는 植物性細胞壁 뿐만 아니라 抗酸性菌의 細胞壁에 對해서도 效果的인 崩壞藥劑가 된다고 생각한다. 또한 *M. phlei* 細胞에서 DNA抽出이 困難한 理由는 細胞壁에 wax, lipid 등의 成分이 存在하여 細胞는 서로 密集된 狀態이므로, 本實驗에서는 Wayne과 Gross의 方法에 따라 72時間동안 심하게 stirring 하였으나, 細胞는 그대로 密集되어 있으므로 이 狀態에서 細胞를 分離시켜야 할 必要가 있다. 그러므로 *M. phlei* 細胞培養時 細胞를 均等, 擴散 培養하기 爲하여 細胞의 表面張力を 低下시키는 Tween 80이나 WR 1339를 培地에 添加하든지 혹은 細胞를 이 藥劑로서 洗滌하는 것이 必要할 것이라고 생각된다. 또한 sodium deoxycholate와 같은 陰 ion의 洗劑를 使用하는 것 보다는 陽 ion의 洗劑를 使用하는 것이 核酸의 抽出에 보다 더 效果的인 方法이라고 思慮된다.

## 摘 要

*Saccharomyces cerevisiae*와 *Mycobacterium phlei*에서 DNA抽出에 따른 細胞壁의 崩壞狀態를 電子顯微鏡으로 觀察하였던 바,

1. *S. cerevisiae*의 電子顯微鏡觀察에서는 sodium lauryl sulfate-EDTA 處理만으로는 細胞壁의 崩壞는 볼 수 없었고 sodium perchlorate 處理後의 chloroform을 添加하여 震盪시키므로서 細胞壁은 完全히 崩壞되었다. 이때에 細胞質의 流出도 볼 수 있었다. DNA抽出에서는 RNase, pronase 등의 酵素를 處理하는 것보다는 最終의 遠心分離로부터 얻은 상동액을 phenol과 ether로 處理하는 方法이 核酸의 收穫量과 純度の 면에서 볼 때 더 效果的이었다.

2. *M. phlei*細胞의 電子顯微鏡觀察에서는 1N NaOH 處理만으로도 細胞壁은 崩壞되었으나 細胞는 매우 密集되어 있으므로 密集內部的 細胞壁은 崩壞되지 않았다. EDTA와 pronase를 處理하므로서 細胞壁의 崩壞程度는 增加되었다. DNA 抽出에서는 核酸은 거의 抽出되지 않았으며, 最終으로 飽和 phenol 處理後에도 細胞壁의 崩壞는 볼 수 있으나, 細胞質은 凝縮되어서 細胞外로 流出되지 않았다. Sodium deoxycholate는 細胞壁에 심한 傷害를 주긴 하였으나 細胞質을 細胞의 內部로 밀어넣어 凝縮시켰으며, 이러한 細胞質의 凝縮現象은 藥劑處理의 最終段階에서도 分散되지 않았다.

## 謝 辭

本 論文을 完成함에 있어 적극 指導하여 주신 崔大卿교수님, 試料 및 文獻資料 수집에 힘써주신 崔泰周교수님과 電子顯微鏡觀察을 爲하여 수고하여 주신 滕永健선생님, 鄭尙眞선생님께 감사드리며 特別 本實驗을 爲해서 도움을 아끼지 않으신 醫科大學 微生物學敎室 여러분에게 衷心으로 謝意를 표하는 바입니다.

## 引用文獻

1. Agar, H.D., and H.C. Douglas, 1957. Studies on the cytological structure of yeast electron microscopy of thin section. *J. Bacteriol.* **73**, 365-375.
2. Bhargava, M.M., and H.O. Halvorson, 1971. Isolation of nuclei from yeast. *J. Cell Biol.* **49**, 423-429.
3. Draper, P., 1971. The walls of *Mycobacterium leprae*. Chemistry and ultrastructure. *J. Gen. Microbiol.* **69**, 313-324.
4. Goren, M.B., 1972. Mycobacterial lipids: Selected topics. *Bacteriol. Rev.* **36**, 33-64.
5. Kirby, K.S., 1968. Isolation of nucleic acids with phenolic solvents. *Methods in Enzymology* **12(B)**, 87-98.
6. Lerman, L.S., and L.J. Tolmach, 1957. Genetic transformation. I. Cellular incorporation of deoxyribonucleic acid accompanying transformation in *Pneumococcus*. *Biochim. Biophys. Acta* **26**, 63-82.
7. Marmur, J., 1963. Procedure for the isolation of DNA from microorganisms. *Methods in Enzymology* **6**, 726-738.
8. Noll, H., and E. Stutz, 1968. The use of sodium and lithium dodecyl sulfate in nucleic acid isolation. *Methods in Enzymology* **12(B)**, 129-133.
9. Northcote, D.H., 1952. The chemical composition and structure of the yeast cell wall. *Biochem. J.* **51**, 232-238.
10. Sarfert, E., and H. Venner, 1968. DNA from bacteria by phenol extraction. *Methods in Enzymology* **12(B)**, 92-93.
11. Smith, D., and H.O. Halvorson, 1968. The isolation of DNA from yeast. *Methods in Enzymology* **12(A)**, 533-541.
12. Smith, M.G., 1967. Isolation of high molecular weight DNA from normal and phage-infected *Escherichia coli*. *Methods in Enzymology* **12(A)**, 545-550.
13. Takeya, K., and K. Hisatsune, 1963. Mycobacterial cell walls. I. Methods of preparation and treatment with various chemicals. *J. Bacteriol.* **85**, 16-23.
14. Takeya, K., K. Hisatsune, and Y. Inoue, 1963. Mycobacterial cell walls, II. Chemical composition of the "Basal Layer". *J. Bacteriol.* **85**, 24-30.
15. Wayne, L.G., and W.M. Gross, 1968. Isolation of deoxyribonucleic acid from Mycobacteria. *J. Bacteriol.* **95**, 1481-1482.