

유산균 Plasmid DNA의 신속 간편한 분리방법

裴炯錫 · 白永振 · 金玲基 · 柳 敏 · 朴茂榮*

韓國야쿠르트 研究所 微生物 研究室

*韓國科學院

(1985년 8월 13일 수리)

Rapid and Simple Method for Isolating Plasmid DNA from Lactic acid Bacteria

Hyeong Suk Bae, Young Jin Baek, Young Kee Kim,
Min Yoo and Moo Young Pack*

Lab. of Microbiology, Korea Yakult Institute

*Korea Advanced Institute of Science and Technology

(Received August 13, 1985)

A simple procedure for rapid isolation of plasmid DNA from lactobacillus species and streptococcus species is described. Lactic acid bacteria were cultured in the TCM broth containing 0.5% glycine and plasmid DNA was isolated from cells treated with mutanolysin by alkaline-detergent lysis method. Good results for releasing and isolating plasmid DNA from lactobacillus species were obtained by treatment of cells with 30 μ g of mutanolysin per ml at 37°C for 5 to 10 min. For the streptococcus species, the optimum conditions were slightly different. The procedure could be used for rapid characterization of plasmid DNA in *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Streptococcus lactis*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus faecium*, and *Streptococcus cremoris* strains. Using this procedure, plasmids isolated from 1.5 ml cultures could readily be visualized in agarose gel.

1981년 Davis등⁽¹⁾은 유산균의 plasmid DNA가 유산생성, 단백질 분해 및 항생물질 생산 등의 균체 내 대사과정에 관여한다고 보고하였다. 이러한 사실은 균주개량을 목적으로 유산균의 plasmid DNA를 이용한 분자유전학적 연구를 촉진시켰고 그 결과 유산균의 경우 transformation system과⁽²⁾ Host-Vector System이^(3,4) 개발되었다. 유산균의 경우에는 이와 같은 결과가 아직 보고된 바 없으나 Tomochika등⁽⁵⁾이 처음으로 protoplast를 형성해서 재생시킨 사례가 고무적이다.

유산균의 분자유전학적 연구에서 지금까지 가장 큰 기술적 문제점 중의 하나가 plasmid DNA의 효율적인 분리를 위해서 세포벽을 쉽게 용해 할 수 없다는데 있었다. 현재 유산균에서는 이러한 난관이 많이 개선되었고^(6,7,8) plasmid DNA의 간편하고

효율적인 분리방법들이 속속 개발되어 왔다^(9,10,11). 반면 유산균에서는 chassy등⁽¹²⁾이 plasmid DNA의 분리법을 처음 보고한 이래 Currier등⁽¹³⁾과 Kl-aenhammer⁽¹⁴⁾에 의해 그 방법이 많이 개선되었으나 세포벽을 쉽게 용해시켜서 plasmid DNA를 단시간에 효율적으로 분리하는 데는 아직도 미흡한 상태이다.

본 연구에서는 이와 같은 결점들을 보완하고 유산균 plasmid DNA를 신속, 간편하게 분리하는 방법을 개발하기 위하여, TCM 배지⁽⁵⁾ (Glucose, 0.2%)에 glycine을 첨가하고 유산균을 배양한 다음 lysozyme보다 용균력이 우수한 mutanolysin^(14,15,16)을 적정시간 반응시킨 후, *E. coli*의 plasmid DNA 분리에 사용된 Maniatis⁽²²⁾의 방법의 일부를 적용하였던 바 좋은 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양법

본 실험에 사용한 균주는 Table 1과 같다. 모든 유산균의 증식용 배지는 TCM broth로서 조성은 다음과 같다. 배지 1 l 중에는 Beef extract, 4.5 g; peptone, 7.5g; Yeast extract, 5g; tween 80, 1 ml; K_2HPO_4 , 3 g; KH_2PO_4 , 1.5g; glucose, 2 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1g; $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 0.025g 이 함유되었고, 최종 pH는 6.8로 하였다. Plasmid DNA를 분리할 때는 glycine을 0.5% 되게 첨가한 TCM broth에서 균을 배양했다. 실험균주는 Skim Milk (11%)에서 배양한 후 냉장보관 하였고, 2주마다 그 균주를 TCM broth에 계대배양하여 사용했다. 장기보존용 균주는 SM (11%)에 접종한 후 그대로 냉동고 (-20°C)에 보관하였다. *E. coli* V517은 LB broth에서 배양했다. 유산간균, *S. faecalis* DS 5 및 *E. coli* V517의 배양온도는 37°C로 하였고 다른 유산균들은 30°C에서 배양했다.

효소 반응액의 제조

0.02M KH_2PO_4 용액과 0.02M K_2HPO_4 용액을 51:49의 용적비로 혼합한 용액(20mM인산칼륨 완

충액, pH6.8)에 Sucrose를 1M 되게 녹이고 121°C에서 15분간 멸균한다. 이렇게 만든 용액 1 l 당 따로 멸균한 0.6M $MgCl_2$ 용액과 0.6M $CaCl_2$ 용액을 각각 10ml씩 첨가하여 혼합한 후 24시간 이상 정치한 다음 맑은 상층액만을 채취한다.

세포용해

40ml TCM broth(glycine, 0.5%)에 활력이 좋은 계대균액 ($2 \sim 3 \times 10^8/ml$) 10 μ l 접종하고 37°C에서 15시간 배양한 후 (OD₆₀₀=0.9) 원심분리 (Sorval-SS34 Rotor, 11,000 rpm, 10min)하여 집균한다. 20mM 인산칼륨 완충액 6ml로 2회 세척 중 3ml는 600nm에서 흡광도를 측정하고 나머지 3ml만 집균한다. 효소 반응액 3ml로 현탁하고 즉시 mutanolysin (1.5mg/ml) 60 μ l를 가하여 37°C에서 10분간 반응시킨 후 원심분리 (Sorval SS34 Rotor, 15,000rpm, 7분, 4°C)하여 집균한다. 20mM 인산칼륨 완충액 3ml를 넣어 재현탁하여 osmotic lysis시킨 후 600nm에서 흡광도를 측정했다. 상대적 용해도는 다음과 같이 계산되었다.

$$\text{상대적 용해도 (\%)} = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100$$

A_0 : 20mM 인산칼륨 완충액에 현탁한 균액의 초기 흡광도

A_t : 효소를 처리하고 osmotic lysis시킨 후의 흡광도

plasmid DNA 분리

실험균주를 TCM broth (glycine, 0.5%)에서 15시간 배양하여 600nm에서 흡광도가 0.9로 되었을 때 집균하고 20mM 인산칼륨 완충액으로 2번 세척했다. 그 이후 plasmid DNA 분리방법은 Table 2와 같다. 첫째 칸은 분리단계별 순서에 따라 설명한 것이고 둘째 칸은 첨가해야 할 시약의 용량과 세부적 처리과정을 나타낸 것이다. 모든 처리는 1.5ml Eppendorf Centrifuge tube에서 했고 원심분리는 4°C에서 했다. 균주에 따라 효소를 처리하는 방법만이 약간씩 차이가 있었다. 특히 *S. lactis* IFO는 mutanolysin (1.5mg/ml)을 4 μ l 넣고 20°C에서 5분간 처리했다. 여기에 필요한 시약의 제조는 Maniatis 등⁽²²⁾이 제시한 방법에 준하였다. *E. coli* V517의 plasmid DNA는 Maniatis 등⁽²²⁾이 제시한 방법으로 분리되었다.

전기영동 및 사진촬영

전기영동은 Tris-borate buffer⁽²²⁾에서 하였다. 0.6% agarose gel로 100V (7 V/cm)에 3시간 하였고 ethidium bromide 용액 (0.5 μ g/ml)에서 30분간

Table 1. Bacterial strains.

organisms	Source and reference
<i>Lactobacillus casei</i> YIT 9018	Yakult institute
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 4646	ATCC (17)
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334	ATCC (17)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> IAM 1084	IAM Japan
<i>Lactobacillus acidophilus</i> 3056	Kiel, West Germany
<i>Lactobacillus helveticus</i> CHR. CH 1	Chr. Hansen Lab.
<i>Streptococcus faecalis</i> DS 5	ATCC (18)
<i>Streptococcus lactis</i> ATCC 11454	ATCC (19)
<i>Streptococcus lactis</i> IFO	Osaka, Japan
<i>Streptococcus lactis</i> ML3	Univ. of Tokyo (20)
<i>Streptococcus faecium</i> M	Yakult institute
<i>Streptococcus cremoris</i> ML 4	Univ. of Tokyo
<i>Escherichia coli</i> V517	Macrina, F. L. et al. (21)

Table 2. Procedure for isolating plasmid DNA from Lactic acid bacteria.

Step	Details of following procedure (1.5 or 4.5ml) ^a
Resuspend washed cells in enzyme reaction solution	400 μ l
Add immediately mutanolysin (1.5mg/ml in 20mM potassium phosphate buffer, pH 6.8)	8 μ l (for <i>L. spp.</i>) or 4/ μ l (for <i>S. spp.</i>)
Incubate 5 to 10min at 37°C	10min (for <i>L. spp.</i>) or 5min (for <i>S. spp.</i>)
Centrifuge	7 min
Crush pelleted cells with micropipette tip and add cold 10mM EDTA-25mM Tris·HCl, pH8.0	100 μ l
Add immediately fresh sodium dodecyl sulfate [1% (w/v) in 0.2N NaOH]	200 μ l
Mix gently by inversion and store on ice for 5 min	
Add ice-cold solution of 5 M potassium acetate	150 μ l
Mix gently by inversion and store on ice for 5 min	
Vortex gently for 2 sec.	
Centrifuge	5 min
Transfer the supernatant to a fresh tube	
Add phenol/chloroform	400 μ l
Mix completely by inversion	
Centrifuge	2 min
Transfer the supernatant to a fresh tube	
Add cold ethanol (95%, -20°C)	800 μ l
Mix gently by inversion	
Store at -20°C	> 30min
Centrifuge	10min
Remove all of the supernatant with micropipette tip	
Add DNase free pancreatic RNase (50 μ g/ml in TE buffer, pH 8.0)	20 μ l
Incubate for 3 min at 37°C	
Examine 20 μ l by agarose gel electrophoresis	

^a The culture volume used in the procedure is indicated in parenthesis.

염색하였다. Polaroid MP4 land camera (yellow filter, film type 667) 로 lenz 구경을 f/8로 고정시킨 후 B Shutter에서 4 초간 하였다.

결과 및 고찰

세포용해

Lactobacillus casei YIT 9018의 성장조건, 성장 상태 및 mutanolysin 처리 방법에 따라 용균효과를 검토하였다. 세포벽 형성 억제자인 glycine⁽²³⁾ 을 TCM 배지에 여러가지 농도로 첨가했을 때 glycine 농도가 세포용해와 성장에 미치는 영향은 Fig.1 과 Fig. 2 와 같다. Glycine 첨가 농도가 높을 수록 용균효과는 좋아졌고 성장상태는 반대로 나빠지는 것

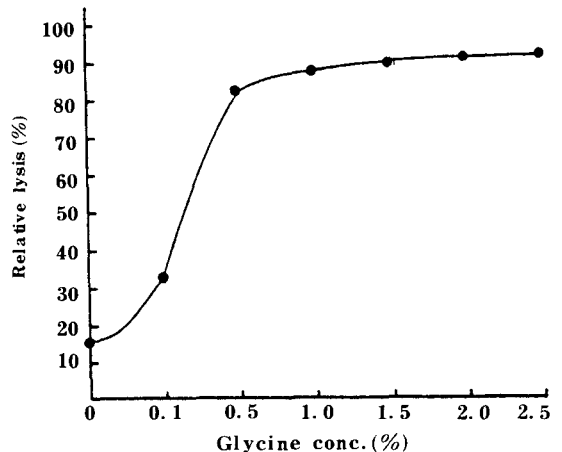


Fig.1. Effect of glycine concentration on the lysis of *Lactobacillus casei* YIT 9018.

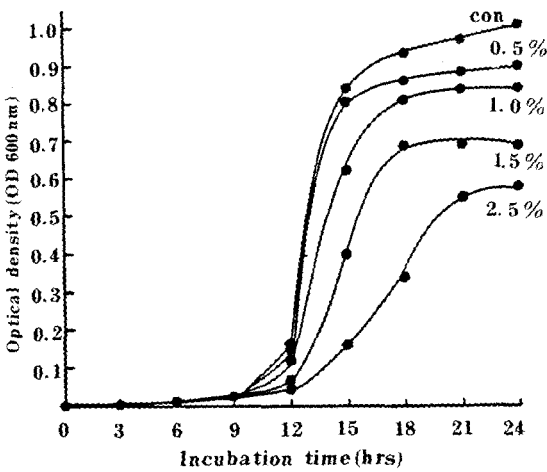


Fig. 2. Effect of glycine concentration on the growth of *L. casei* YIT 9018.

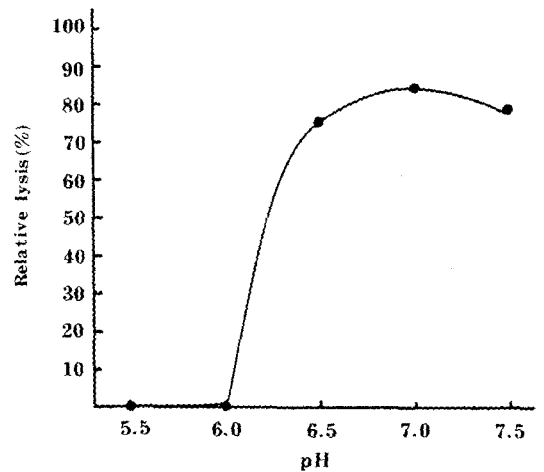


Fig. 4. Effect of pH on the lysis of *L. casei* YIT 9018.

을 볼 수 있다. Mutanolysin을 처리할 때 용균효과도 좋고 성장상태도 양호한 glycine의 최적 농도는 0.5%였다. Glycine을 0.5%로 첨가한 TCM broth에서 균의 성장상태 별로 효소에 대한 감수성을 비교해본 결과 용해도는 대수기 중기 이후부터 정상기까지 별 차이 없었다(Fig. 3). Mutanolysin의 최적 pH는 기질에 따라 조금씩 다르나⁽⁸⁾ 본 균주에서는 pH 7.0 부근이었다(Fig. 4). 세포현탁액에 세포벽 용해효소를 처리할 때 삼투압 조절물질로 Sucrose, Lactose, PEG, NaCl 등을 고농도로 첨가하는 데, 그 첨가되는 물질의 종류, 분자량 및 농도가 세포벽 용해를 촉진시키는 중요한 인자로 작용한다^(5,7,8). 본 실험에서는 효소 반응액에 삼투압 조절물질로 Sucrose를 이용하였고 Sucrose 농도가 상대적 용해도에 미치는 효과는 Fig. 5와 같다. Sucrose 농

도에 따라 용해도 차이가 심하게 나타나는데 최고의 용균효과를 얻는데 1 M Sucrose 농도면 충분하였다. 삼투압 조절물질들이 용해도를 이와 같이 상승시키는 정확한 기전은 아직 알려진 바 없다. 이러한 물질들이 고농도로 첨가되면 세포벽 성분인 peptidoglycan의 peptides 사이에 수소결합이 약화되기 때문에 효소가 세포벽을 쉽게 공격할 수 있게 되는 것으로 추측되고 있다⁽⁸⁾.

효소의 농도와 반응시간에 따른 용균효과는 Fig. 6, Fig. 7과 같다. 최고의 용균효율을 얻기 위한 조건은 효소의 최종농도를 30 μ g/ml로 첨가하고 10분간 처리하면 충분하였다. 이상과 같은 조건으로 mutanolysin을 처리할 때 다른 유산균일 경우 비

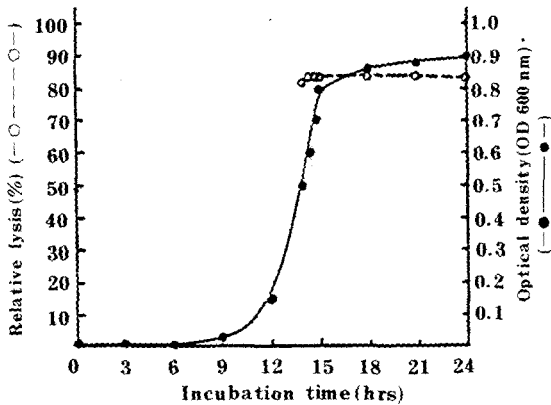


Fig. 3. Effect of growth phase on the lysis of *L. casei* YIT 9018.

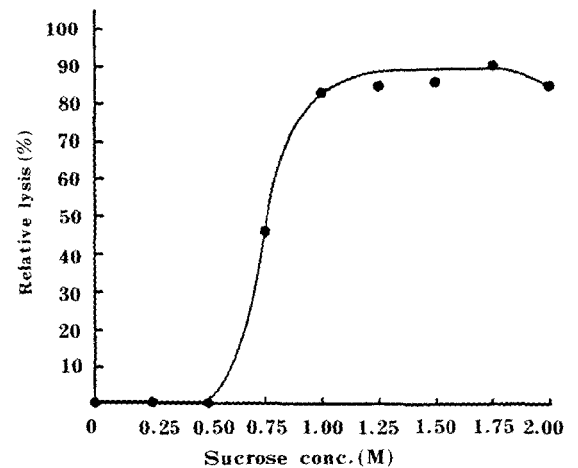


Fig. 5. Effect of sucrose concentration on the lysis of *L. casei* YIT 9018.

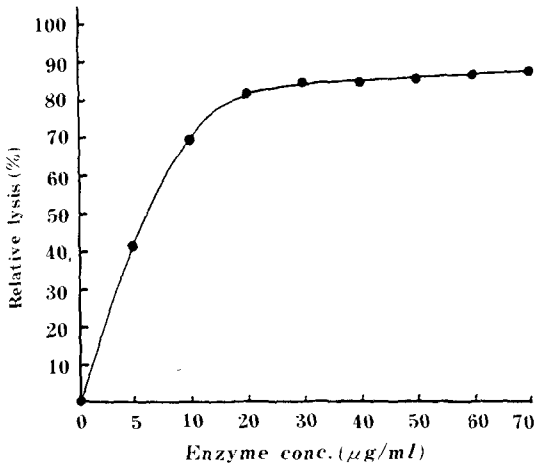


Fig. 6. Effect of enzyme concentration on the lysis of *L. casei* YIT 9018.

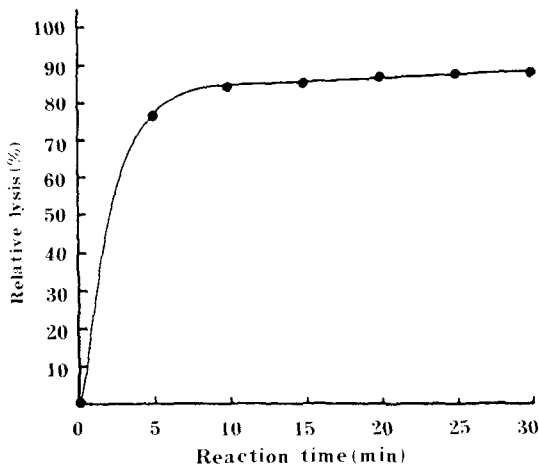


Fig. 7. Effect of reaction time on the lysis of *L. casei* YIT 9018.

숙한 용해도를 나타냈고 유산균일 경우는 더욱 민감하게 용균되었다.

Plasmid DNA 분리

L. casei YIT9018 균주에 대한 배양액을 일정한 양 별로 집균한 후 plasmid DNA를 추출하여 전기영동한 결과는 Fig. 8 과 같다. 배양액 1.5ml로 부터 분리한 plasmid DNA는 gel 상에서 검색이 가능하였고 4.5ml로 부터는 뚜렷한 plasmid DNA band를 얻을 수 있었다. 배양액 4.5ml로 부터 집균한 후 mutanolysin을 처리한 시간 별로 plasmid DNA가 분리되는 효과를 검토해보았다 (Fig. 9). 효소를 처리하지 않으면 plasmid DNA band가 희미하게 나타났고 5~10분간 처리했을 때 plasmid DNA band

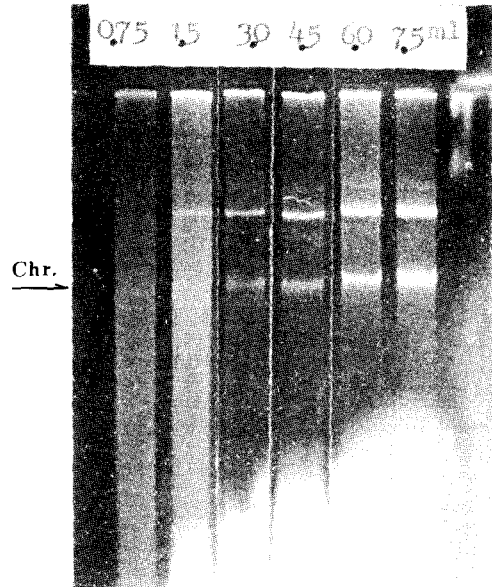


Fig. 8. Electrophoresis of plasmid DNA from different cell culture volume.

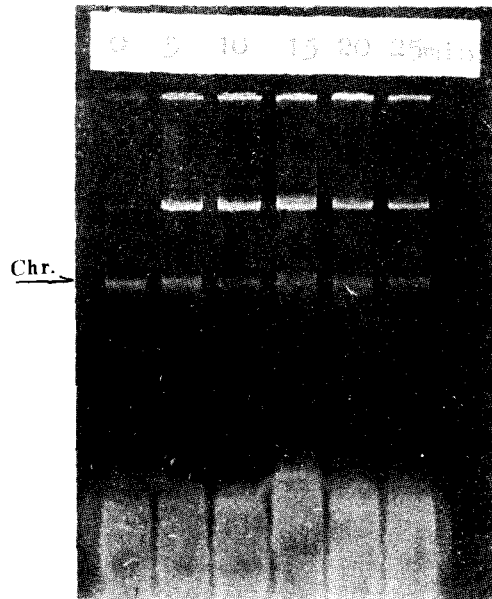


Fig. 9. Electrophoresis of plasmid DNA from different reaction time of mutanolysin.

가 두껍고 뚜렷하게 나타나는 좋은 결과를 얻었다. 그러나 15분 이상 처리할 경우 반응시간이 길어짐에 따라 plasmid DNA추출효율이 점점 더 감소되었다. Mutanolysin을 장시간 처리하여 너무 투명한 용균액을 얻으면 오히려 그 다음의 분리단계에서

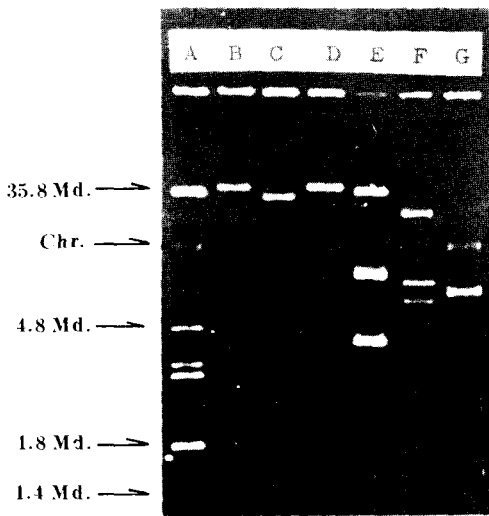


Fig. 10. Electrophoresis of plasmid DNA from *Lactobacillus* species.

A : *Escherichia coli* V 517
 B : *Lactobacillus acidophilus* IAM 1084
 C : *Lactobacillus acidophilus* 3056
 D : *Lactobacillus casei* YIT 9018
 E : *Lactobacillus casei* ATCC 4646
 F : *Lactobacillus casei* ATCC 334
 G : *Lactobacillus helveticus* CHR. CH 1.

plasmid DNA 손실이 많이 생긴다는 것을 보여준다. 이와 같은 plasmid DNA 손실이 생기는 원인은 효소 처리에 의해 용균이 잘 될수록 세포에 내재해 있던 nuclease가 쉽게 노출되어 plasmid DNA에 작용하기 때문일 것으로 추측된다.

L. acidophilus IAM 1084, *L. acidophilus* 3056, *L. casei* YIT 9018, *L. casei* ATCC 4646, *L. casei* ATCC 334, *L. helveticus* CHR. CH 1으로 부터 plasmid DNA를 분리할 때 *L. casei* YIT 9018 균주로부터 plasmid DNA 분리를 위한 최적 조건을 그대로 이용해 본 결과 plasmid DNA 분리가 모두 잘 되었다 (Fig. 10). 그러나 여러종류의 *Streptococcus* spp.에 같은 방법을 적용했을 때 좋은 결과를 얻지 못하였다. 그 중 한 예로서 *S. lactis* ML3는 4 종류의 plasmid DNA를 갖고 있는데 효소의 반응 상태에 따라 plasmid DNA가 분리되는 결과는 Fig. 11과 같았다. *mutanolysin*에 대한 감수성이 유산균보다 유산구균의 경우 훨씬 높기 때문에 *S. lactis* ML3 균주에 효소의 최종 농도를 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 낮게 첨가 하였는데, 20°C에서 5분간 처리했을 때 분자량이 작은 5.5, 2, 1Md의 plasmids DNA는 잘 분리되었으나 33Md의 plasmid DNA는 분리되지

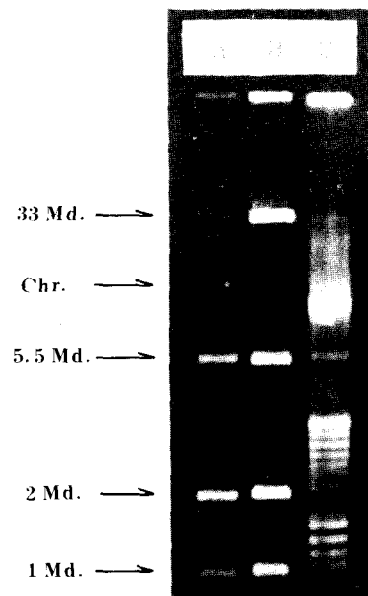


Fig. 11. Electrophoresis of plasmid DNA of *Streptococcus lactis* ML3 showing effect of enzyme reaction conditions.

A : 20°C, 5 min
 B : 37°C, 5 min
 C : 37°C, 10 min

않았다. 37°C에서 5분간 처리하면 4 종류 plasmids DNA 모두가 잘 분리되었다. 그러나 37°C에서 10분간 처리하면 2Md의 plasmid DNA와 1Md의 plasmid DNA가 변형되어 사다리 모양의 bands가 생겼다¹⁴. 이러한 현상은 ccc DNA가 topoisomerase의 작용을 받아 nicking되고 religation되었을 때 생긴 결과와 유사하다²⁴. 앞으로 이와 같은 사다리 모양의 bands가 생기는 원인과 특성을 밝히는 것도 흥미로운 것 같다.

효소 처리시 *mutanolysin*의 최종 농도를 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 첨가하고 *S. lactis* IFO 균주는 20°C에서 5분간, 그의 다른 유산구균들은 모두 37°C에서 5분간 처리되었을 때 plasmid DNA가 잘 분리되었다. 그 결과는 Fig. 12와 같다.

본 실험에 사용된 유산균 중 *L. casei* ATCC 4646과 *L. casei* ATCC 334의 plasmids DNA는 Lee-Wickner 등¹⁷이 보고한 바와 같이 분리되었고 (Fig. 10) *S. lactis* ML3와 *S. faecalis* DS5로부터는 Walsh 등²⁰과 Yagi 등¹⁸이 밝힌대로 plasmids DNA가 전부 분리되었으므로 본 방법은 유산균 plasmid DNA 분리에 적합한 것으로 판단된다.

이상과 같이 유산균으로부터 plasmid DNA를 분

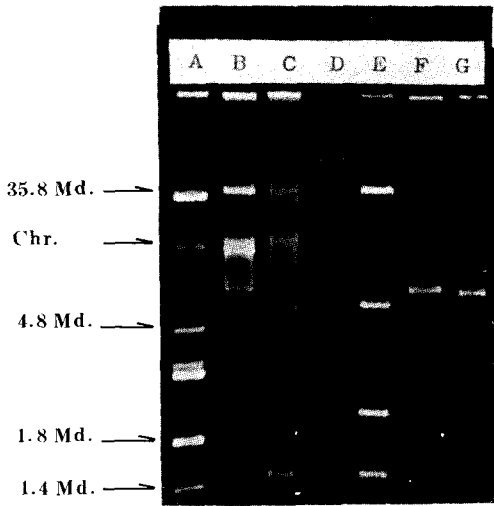


Fig. 12. Electrophoresis of plasmid DNA from *Streptococcus* species.

- A : *Escherichia coli* V 517
- B : *Streptococcus faecalis* DS 5
- C : *Streptococcus lactis* ATCC 11454
- D : *Streptococcus lactis* 1FG
- E : *Streptococcus lactis* ML3
- F : *Streptococcus faecium* M
- G : *Streptococcus cremoris* ML4

리할 때마다 재현성이 있고 plasmid DNA의 손실이 적은 상태에서 잘 분리하기 위해서는 균주에 따라 필요한 cells의 양과 효소 처리 때 mutanolysin의 농도, 반응시간 및 온도를 적당하게 정하는 것이 매우 중요하다고 본다.

지금까지의 결과를 토대로 하여 유산균의 plasmid DNA를 신속 간편하게 분리하는 방법 (Table 1)을 개발하였다. 아울러 본 방법은 유산균의 plasmid DNA 분리에도 동일하게 적용될 수 있었다.

요 약

본 연구는 유산균 및 유산균으로부터 plasmid DNA를 신속하고 간편하게 분리하기 위한 방법에 관한 것이다.

세포벽 형성 억제 인자인 glycine을 0.5% 첨가한 TCM 배지에서 유산균을 배양하였고 plasmid DNA는 mutanolysin을 처리한 cells로부터 alkaline-detergent lysis 법으로 분리되었다.

유산균은 효소 처리 때 mutanolysin의 농도를 30 µg/ml로 하고 37°C에서 5~10분간 반응되었을 때 plasmid DNA가 아주 잘 추출되었다. 유산균

의 경우는 그 최적 조건이 조금 달랐다.

본 방법은 *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. helveticus*, *S. lactis*, *S. faecalis*, *S. faecium*과 *S. cremoris* 균주로부터 plasmid DNA를 신속하게 분리하는 데 사용할 수 있었다.

본 방법을 이용하여 배양액 1.5 ml로부터 분리된 plasmids DNA가 gel상에서 쉽게 확인될 수 있었다.

사 사

本 研究를 爲하여 物心兩面으로 支援하여 주신 尹煥炳 所長님께 깊이 感謝 드림

참고문헌

1. Davies, F.L. and M.J. Gasson: *J. Dairy Res.* **48**, 363-376 (1981).
2. Kondi, J.K. and L.L. McKay: *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 1213-1215 (1982).
3. Leblanc, D.J. and L.N. Lee: *J. Bacteriol.* **157**, 445-453 (1984).
4. Dao, M.L. and J.J. Ferretti: *Appl. Environ. Microbiol.* **49**, 115-119 (1985).
5. Tomochika, K., M. Funabashi, A. Nagata, T. Fuji and Y. Kanemasa: *Japan, J. Bacteriol.* **37**, 777-785 (1982).
6. Klaenhammer, T.R., L.L. McKay and K.A. Baldwin: *Appl. Environ. Microbiol.* **35**, 592-600 (1978).
7. Chassy, B.M. and A. Giuffrida: *Appl. Environ. Microbiol.* **39**, 153-158 (1980).
8. Monsen, T.J., S.E. Holm and L.G. Burman: *FEMS Microbiol. Lett.* **16**, 19-24 (1983).
9. Leblanc, D.J. and L.N. Lee: *J. Bacteriol.* **140**, 1112-1115 (1979).
10. Yu, R.S.T., T.V. Hung. and A.A. Azad: *Australian, J. Dairy Technol. Sept.* **99-103** (1982).
11. Anderson, D.G. and L.L. McKay: *Appl. Environ. Microbiol.* **46**, 549-552 (1983).
12. Chassy, B.M., E. Gibson and A. Giuffrida: *J. Bacteriol.* **127**, 1576-1578 (1976).
13. Currier, T.C. and E.W. Nester: *Anal. Biochem.* **76**, 431-441 (1976).
14. Klaenhammer, T.R.: *Current Microbiol.* **10**, 23-28 (1984).
15. Kondo, J.K. and L.L. McKay: *J. Dairy Sci.* **65**, 1428-1431 (1982).
16. Yokogawa, K.S., S. Kawata, T. Takemura and Y.

- Yoshimura: *Agri. Biol. Chem.* **39**, 1533-1543 (1975).
17. Lee-Wickner, L.J. and B.M. Chassy: *Appl. Environ. Microbiol.* **49** 1154-1161 (1985).
 18. Clewell, D.B., Y. Yagi, G.M. Dunny and S.K. Schultz: *J. Bacteriol.* **117**, 283-289 (1974).
 19. Leblanc, D.J., V.L. Crow, L.N. Lee and C.F. Garan: *J. Bacteriol.* **137**, 878-884 (1979).
 20. Walsh, P.M. and L.L. McKay: *J. Bacteriol.* **146**, 937-944 (1981).
 21. Macrina, F.L., D.J. Kopecko, K.R. Jones, D.J. Ayers and S.M. McCowen: *Plasmid* **1**, 417-420 (1978).
 22. Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook: "Molecular cloning, A Laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory (1982).
 23. Hopwood, D.A.: *Ann. Rev. Microbiol.* **35**, 237-272 (1981).
 24. Depew, R.E. and J.C. Wang: *Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **72**, 4275-4279 (1975).