

Low Molecular Weight(LMW) RNA Profiles에 의한 젖산균의 동정

차 원 섭

상주산업대학 식품공학과

Identification of Lactic Acid Bacteria from Meat by Low Molecular Weight (LMW) RNA Profiles

Woen-Suep Cha

Dept. of Food Science and Technology, Sangju National Polytechnic University, Sangju 742-170, Korea

Abstract

Low molecular weight RNA (LMW RNA : 5S rRNA and tRNAs, <150 nucleotides) profiles of several bacteriocin production lactic acid bacteria from pig meats and reference lactic acid bacteria were generated on 10% denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. Data evaluation including three molecular weight markers enabled the calculation of relative nucleotide units (RNU) for every band. Gels profiles and RNU evaluations were effective for identification of lactic acid bacteria species. LMW RNA profiles of lactic acid bacteria showed no variation in dependence on APT (All Purpose Tryptone Broth), TSB (Tryptic Soy Broth), MRS (Lactobacilli MRS Broth) different cultural medium.

Key words : 5S rRNA, tRNA, low molecular weight RNA profiles, chemotaxonomy

서 론

각종 박테리아 균종의 동정은 미생물의 기본적인 연구나 응용연구에 있어서 아주 중요한 사항이다¹⁾. 그 중 고기나 육가공 제품에서 분리한 젖산균 동정에는 전통적인 형태학 및 생리적 특성과 생화학적 특징에 의한 동정법²⁻⁵⁾에 덧붙여 최근에는 박테리아 세포의 중요 고분자 구성물질인 DNA 염기 구성이나 전체 용해성 단백질의 특성을 이용하는 분자 동정법이 큰 발전을 나타내고 있다⁶⁾. 즉 DNA의 G+C 함량의 Mol %나 genome의 분자량의 차이⁷⁾ 및 지방 또는 세포벽 성분 같은 여러 가지 세포 구성물질들이 동정에 이용되어 왔다⁸⁾.

근래 ribosomal RNA(주로 16S 와 5S rRNA)의 구조와 sequence 분석이 진핵세포의 동정에 이용 되었으며¹⁰⁾, 그 중 특히 5S rRNA 가 많이 사용 되었다¹¹⁾. 근래에 새로운 화학 동정법으로 Höfle은 eubacteria 동정을 위하여 저분

자량 RNA (Low Molecular Weight RNA : LMW RNA) 중 에 5S RNA 와 tRNA의 1차 겔 전기영동한 profiles이 유용하게 이용할 수 있음을 밝혔고⁷⁾, *Listeria* spp의 동정과 다른 gram 양성 박테리아와의 관계가 밀접함을 LMW RNA profiles 비교로 가능하다는 보고가 있다¹²⁾.

따라서 본연구에서는 이미 전통적인 방법으로 동정되어있는 젖산균 수 종과 돼지고기에서 분리한 bacteriocin 생성능이 강한 젖산균 동정에 LMW RNA profiles의 이용 가능성을 검토하여 얻은 결과를 보고 하고자 한다.

재료 및 방법

배양 방법

조사대상 균주의 배양은 50ml APT broth(Difco) 배지에서 25°C로 18~24 시간 배양한 후 15000×g로 10

분간 원심분리 하여 cell을 분리하고, 살균수로서 2번 세척한 다음 1.5ml Eppendorf 튜브에 넣어 -70°C 에 저장 하면서 실험 하였다.

RNA 추출

사용하는 모든 유리기구 및 물은 RNase를 파괴하기 위하여 미리 0.5% diethylpyrocarbonate (DEPC)용액에 12시간 동안 담근 후 121°C 에서 20분간 가열 하였다

전체 RNA 추출은 Höfle⁷⁾의 SDS-Hot-Phenol법을 변형 시켜 사용 하였다.

즉 용액은 1) buffer ; 50mM sodium acetate, 10mM EDTA, pH 5.1 2)Phenol 용액 ; 60°C 에서 액화시킨 50 mg 8-hydroxyquioneline을 함유한 50ml phenol, buffer로 1 주야 동안 포화 시킴 3)추출 용액; 1% SDS buffer 용액 4)침전 용액 ; ethanol, 2M sodium acetate, 1M magnesium chloride를 100 : 10 : 1 (v/v)로 혼합한 것이 사용되었고 이상의 모든 용액은 SDS를 제외하고 사용전 가압살균 하였다. 냉동 건조한 pellet을 $750\mu\text{l}$ 의 추출용액에 녹이고 천천히 교반한 후 $750\mu\text{l}$ phenol (60°C)을 첨가한 다음 세게 교반하고 60°C 에 10분간 가열 하였다. 얼음 냉각수에서 10분간 식힌 후 2°C 에서 5분간 원심분리하고 분리된 윗부분을 새 튜브에 옮긴 다음 phenol과 chloroform을 4 : 1로 혼합한 용액 $750\mu\text{l}$ 을 첨가하고 60°C 에서 5분간 방치한 다음 위와 같은 방법으로 처리 하였다.

$70\mu\text{l}$ 2M sodium acetate와 $700\mu\text{l}$ chloroform을 혼합, 교반, 원심분리 하고 윗부분을 새 튜브에 옮기고 $700\mu\text{l}$ 의 chloroform으로 재차 처리하여 phenol을 제거 하였다. 상층액을 두 부분 (약 $350\mu\text{l}$)으로 나눈 다음 각각 1ml씩의 침전용액을 넣고 -20°C 에서 1 주야 동안 RNA를 침전 시켰다.

Polyacrylamide gel electrophoresis

전체 RNA의 분리는 denaturing high-power polyacrylamide gel electrophoresis법¹⁶⁾으로 실시 하였다. 장전개 유리판 ($610 \times 200\text{mm}$)은 겔과 유리 분리가 쉽도록 2% dimethyldichlorosilane 용액을 미리 처리 하고, 단, 전개 유리판 ($550 \times 200\text{mm}$)은 유리에 겔 부착을 돕기, 위하여 silane (100ml 0.5% 3-trimethoxysilylpropylmethacrylate, 95% ethanol) 처리를 하였다¹³⁾.

Polyacrylamide 겔 용액은 38g의 acrylamide와 2g의 N, N-methylene bisacrylamide를 물로 100ml 되게 용해

하여 만들었고, 10 % 겔은 15ml acrylamide용액, 6ml $10 \times \text{TBE}$ buffer (121.1g Tris, 62.8g boric acid, 7.44g EDTA를 물로 1 리터 되게 용해), 30g 요소를 물로 60ml 되게 용해 시킨다음 $200\mu\text{l}$ 의 20% ammonium persulfate용액을 첨가한 후 $15\mu\text{l}$ TEMED로써 겔화 시켰다.

전체 ethanol 침전 RNA 추출물은 2°C 에서 $15000 \times \text{g}$ 로 10분간 원심분리 후 ethanol을 완전히 제거하고 $10\mu\text{l}$ 순수한 물에 녹인다음 다시 같은 물로 25배 희석 하였다. $1\mu\text{l}$ 의 희석 RNA와 1.5ml loading buffer ($950\mu\text{l}$ formamide, $40\mu\text{l}$ 0.2% xylene cyanol, $40\mu\text{l}$ 0.2% bromo phenol, $10\mu\text{l}$ 0.5M EDTA)를 혼합하고 미리 $1 \times \text{TBE}$ 에서 60 W로 10 분간 예비 영동시킨 겔에 loading 한 뒤 60 W에서 염료가 겔의 끝부분에 거이 닿을 때까지 5 시간 동안 전개시켰다.

Silver 염색

겔의 silver 염색은 Koldny 법¹⁴⁾을 변형시켜 사용 하였다.

먼저 겔에서 요소를 제거하기 위하여 1M acetic acid 에 15분간 담가 두었다가, methylene blue염색액(0.2% methylene blue, 0.4M sodium acetate, 0.4M 빙초산)에 45분간 염색하고, 탈이온수로 밴드가 보일 때까지 여러 번 행군 다음 50% methanol로 1시간 동안 안정 시켰다.

물로 세척한 겔을 silver 염색용액 (80ml 20% silver nitrate, 420ml 0.36% sodium hydroxide, 28ml 14.7M hydroxide 를 물로 2L로 만듦)에서 15분간 염색 후 물로 15분간 염색액을 세척한 다음, 현상용액(10ml 1% acetic acid, 1ml 37% formaldehyde를 물로 2 L로 만듦)으로 밴드가 나타날 때까지 약 7분간 현상하고, 물세척 후 50% methanol로 안정 시켜 다시 물세척 한 뒤 어둡고 먼지없는 장소에서 건조 시켰다.

건조가 끝난 겔은 Kodak Polaroid film(545, 4×5)으로 형광빛 상자를 이용하여 사진 촬영 하였다.

분자량 markers

RNA 분자량 marker를 만들기 위하여 시판 PSP 72 plasmid DNA (Promega Co.)를 구입하여 *E. coli* MV-1193 competent cell에 transform 시킨뒤, 500ml로 증량 배양 후 PSP 72 plasmid를 SDS-lysis 법¹⁵⁾으로 세포로부터 얻고, CsCl-ethidium bromide gradients 법¹⁶⁾을 사용하여 정제하고, Pvu II 제한효소(Biochem Co.)로 digest 한 뒤, 이를 주형(89 RNU)으로 하여 T7

합성효소로 transcript 하여 사용하였다. 동시에 시판 *E. coli*로부터 얻은 5S rRNA(120RNU)와 tRNA(70RNU)(Boehringer Co.)을 분자량 markers로 이용하였다.

결과 및 고찰

LMW RNA profiles의 일반양상

이미 동정되어 보관 하고 있던 5종의 젖산균과 새로 돼지고기에서 분리한 10종의 bacteriocin 생성능이 강한 젖산균을 APT 배지에서 배양한 뒤 얻은 균세포의 전체 저분자량(LMW) RNA profiles의 일반양상은 Höfle²⁾이나 Thompson¹²⁾의 결과와 같이 크게 5S rRNA, 첫번째 tRNA, 두번째 tRNA로 세부분으로 나누어 졌다(Fig. 1). 이들 5S rRNA부분은 약 120개 내외의 핵산으로 구성되었고, 첫번째 tRNA부분은 85개~95개, 두번째 tRNA부분은 65개~75개 핵산으로 구성 되어있었다²⁾.

5S rRNA는 모든 세균종에서 단일 밴드로 나타났다는 보고¹²⁾와는 달리 1~3개의 밴드를 보였다. 이와 같이 작은 차이를 보이는 것은 RNA 추출과정이나 전기

영동 실험중에 RNA의 일부가 구성 핵산 수 한개 내지 여섯개 정도의 차이를 가진 RNA로 부서질 수도 있음을 보인 현상이라고 할 수 있겠다²⁾. 첫번째 tRNA 부분은 3개에서 10개의 밴드를, 두번째 tRNA 부분은 2개에서 9개의 밴드로 분리 되어 있어서 균에 따른 차이가 현저 하므로 이부분이 균동정에 이용될 가장 좋은 자료로 생각된다. Fig. 1에 나타난 새로 분리한 젖산균의 profiles은 사용한 참고균의 profiles와 모두 다르므로 참고균과는 다른 새로운 균종이라고 생각 된다.

전기영동에 사용된 유리판의 길이가 비교적 짧은 경우(140×160mm) profiles상에 분리 밴드수가 5~6개로 적었으나¹²⁾, 본 연구에서 전계 유리판이 보다 긴 경우(610×200mm) 밴드수가 15~25개 정도로 비교적 양이 적은 저분자 RNA도 모두 분리되기 때문에 profiles 양상의 비교가 보다 정확하였다. 다른 균 동정법에 비하여 LMW RNA profiles을 이용하는 것은 소요시간이 36~48h 정도로 아주 짧은 점과 많은 노력이 절감되는 가치있는 기술이라고 생각되나, 이를 위해서는 미리 많은수의 균 LMW RNA profiles을 준비 하여야만 될 것으로 사료된다.

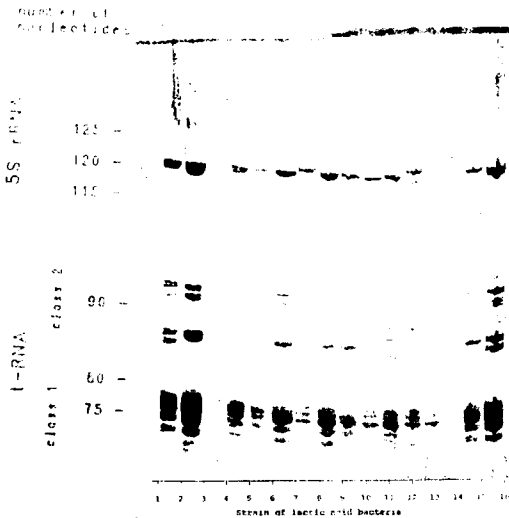


Fig. 1. LMW RNA profiles of different lactic acid bacterial species grown on APT medium at 25° C.

Lane 1-10 ; unknown species (lane 1, 260 ; lane 2, 263 ; lane 3, marker(t-RNA, 89 RNU and 5S-RNA) ; lane 4, 264 lane 5, 266 ; lane 6, 267 ; lane 7, 268 ; lane 8, 271 ; lane 9, 272 ; lane 10, 273) ; lane 11~16 ; reference species (lane 11, *L. sake* lane 12, *C. picicola* ; lane 13, *C. debergens* ; lane 14, marker(t-RNA, 89 RNU and 5S-RNA) ; lane 15, *Leuconostoc gelidium*, lane 16, *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 23368).

배지를 달리한 배양에 의한 영향

이미 동정되어 있는 두가지 종류의 젖산균(*C. picicola* LV17, *Leuconostoc rindescens* ATCC 12706)을 All Purpose Tryptone Broth (APT, Difco), Tryptic Soy Broth (TSB, Difco), Lactobacilli MRS Broth (MRS, Difco) 세가지의 다른 배지에서 배양하여 LMW RNA profiles 에 미치는 영향을 조사 하였다. 이들 배지는 모두 액체 배지로 만들었고 대수증식기에 상기의 방법으로 RNA 를 추출 하고 전기영동을 실시하였다.

이 결과 같은 젖산균은 배지가 다르더라도 밴드의 양상이 거의 동일하였다(Fig. 4).

이는 Höfle²⁾이 nutrient broth(NB), casein pepton starch(CPS), glucose mineral medium (KAZ), nutrient agar (NA)와 4가지 다른 배지에서 실험한 결과²⁾와 Thompson¹²⁾이 *Listria* spp를 APT, brain heart infusion broth(BHI), tryptic soy broth + 0.6% yeast extract (TS-BYE)의 3가지 다른 배지에서 배양 후 조사한 LMW RNA profiles 상의 밴드양상이 동일 하다는 것²⁾과 같았다. 이는 젖산균 세포의 tRNA와 5S RNA의 구성이 배양조건의 변화에 별로 영향을 받지 않고 거의 일정하다는 사실을 나타내므로 정밀한 배양조건을 표준화하

지 않으면 큰 차이를 보이는 단백질 구성 profiles 이나 지방산 구성 양상^{18, 19)}과 비교할 때 LMW RNA profiles 을 균동정에 이용할 수 있는 가능성을 한층 높여 준다고 생각된다.

자료 분석 및 구성 핵산수(RNU)의 계산

각기 달리 겔에 전개시켜 얻은 LMW RNA 밴드를 사진으로 위치와 갯수를 비교하는 것은 어려운 일이므로 각 밴드를 구성하는 핵산의 수(또는 분자량)를 계산하여 상대적인 핵산의 갯수단위(relative nucleotide unit; RNU)에 따른 도표를 만드는 것이 필요할 것이다⁷⁾.

먼저 표준곡선을 얻기위한 표준물질로는 *E. coli*로부터 추출한 5S ribosomal RNA(121 RNU)와 tRNA(60 RNU) 및 시판 plasmid PSP 72를 제한효소 Pvu II 로써 절단하고, T7 polymerase를 사용하여 transcript 한 것(89 RNU)⁶⁾을 같은 조건으로 전기영동시켜 전개한 거리를 측정하여 표준곡선을 얻었다(Fig. 2). 각기 겔에 전개된 밴드의 이동거리를 계산하고 표준곡선을 이용하여 RNU로 환산하여 Fig. 3과 같이 각각의 밴드를 표시한 도표를 얻었다(Fig. 1). 사진(Fig. 1)상에서는 확인이 불가능할 정도로 작은 밴드도 이 도표에서는 모두 확인할 수 있었고, 매 실험마다 겔상의 전개거리 차이에 따른 밴드위치를 비교하는데 어

려움도 극복할 수 있기 때문에 profiles를 도표화 하는것이 동정을 위한 profiles의 이용을 훨씬 용이하게 하였다.

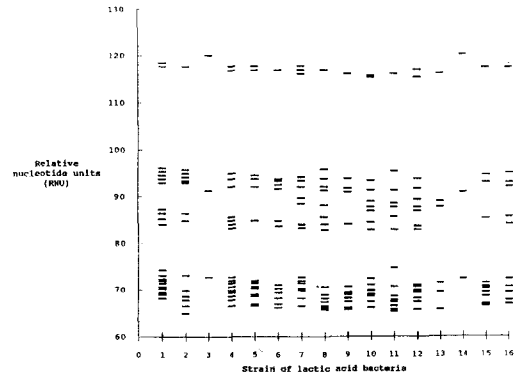


Fig. 3. Relative nucleotide units (RNU) of the bands of different lactic acid bacterial species and reference species. Lane 1~10; unknown species(lane 1, 260 ; lane 2, 263 ; lane 3, marker (t-RNA, 89 RNU and 5S-RNA) ; lane 4, 64; lane 5, 266 ; lane 6, 267 ; lane 7, 268 ; lane 8, 271 ; lane 9, 272 ; lane 10, 273) ; lane 11~16 reference species (lane 11, *L. sake* lane 12, *C. picicola* ; lane 13, *C. divergens* lane 14, marker (t-RNA, 89 RNU and 5S-RNA) ; lane 15, *Leuconostoc gelidium*, lane 16, *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 23368).

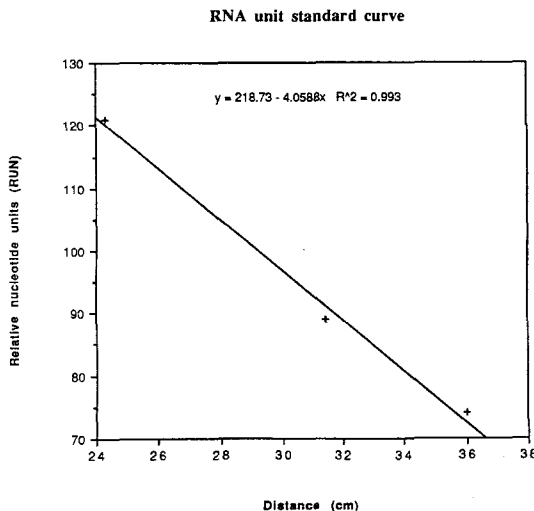


Fig. 2. The calibration curve for relative nucleotide units (RNU) by polyacrylamide gel electrophoresis. t-RNA(70 RNU), 89-RNU and 5S RNA (120 RNU) were used as markers.

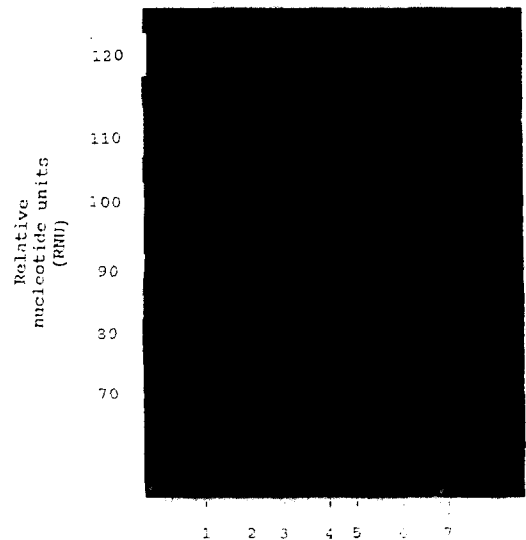


Fig. 4. LMW RNA profiles of two different bacterial species grown on different media. lane1~3 ; *C. picicola* LV17, lane 4 ; marker, Lane 5~7 ; *Leuconostoc rindescerns* ATCC 12706, lane 1, 5 ; APT medium, lane 2, 6 ; TSB medium, lane 3, 7 ; MRS medium

요 약

돼지고기에서 분리한 bacterocin 생성능이 우수한 젓산균을 동정하기 위하여 이미 알려진 몇가지 젓산균을 참고균으로 하여 10% denaturing polyacrylamide gel에 전기영동으로 전개한 5S rRNA와 tRNA 등 150개 이하의 핵산으로 구성된 저분자량 RNA(Low Molecular Weight RNA : LMW RNA) profiles에 나타난 15~25개의 밴드 양상이 균에 따라 차이점을 보여 동정에 효과적으로 이용할 수 있었다. 새로 분리한 젓산균은 참고균과는 다른 균종이었다. APT, TSB, MRS의 3종류 다른 배지에서 배양하여도 LMW RNA profiles에는 차이가 없었으며, 겔상의 밴드 전개거리를 3개의 표준 분자량 물질을 이용하여 만든 표준곡선을 사용하여 상대핵산단위(relative nucleotide units : RNU)로 나타낸 밴드의 양상을 도표화 하는 것이 profiles를 서로 비교 하는데 편리하였다.

감사의 글

이 연구에 몰심양면으로 협조하여 준 캐나다 Alberta 대학 Dr. Micheal E. Stiles(Dept. of Food Science)와 Dr. Ken Roy(Dept. of Microbiology)에게 심심한 감사를 드립니다.

문 헌

1. Betzl, D., Ludwig, W. and Schleifer, K. H. : Identification of *Lactococci* and *Enterococci* by colony hybridization with 23S RNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 2927 (1990)
2. Schillinger, U. and Friedrich-Karl Luche: Identification of *Lactobacilli* meat and meat products. *Food Microbiology*, **4**, 199 (1987)
3. Shaw, B. G. and Harding, C. D. : *Leuconostoc gelidum* sp. nov. and *Leuconostoc carnosum* sp. nov. from chill-stored meats. *International J. Systematic Bacteriology*, **39**, 217 (1989)
4. Ahn, C. and Stiles, M. E. : Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged meats. *J. Applied Bacteriology*, **69**, 302 (1990)
5. Hastings, J. W. and Stiles, M. E. : Antibiosis of *Leuconostoc gelidum* isolated from meat. *J. Applied Bacteriology*, **70**, 127 (1991)
6. Dike, L. M. T., Van Vuuren, H. J. J. and Dellaglio, F. : Taxonomy of *Leuconostoc* species, particularly *Leuconostoc oenos*, as revealed by numerical analysis of total soluble cell protein patterns, DNA base composition, and DNA-DNA hybridizations. *International J. Syst. Bacteriology*, **40**, 83 (1990)
7. Höfle, M. G. : Identification of bacteria by low molecular weight RNA profiles ; a new chemotaxonomic approach. *J. Microbiological Methods*, **8**, 235 (1988)
8. Krieg, N. R. and Holt, J. G. : *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 1, Williams and Wikins, Baltimore (1984)
9. Komagata, K. and Suzuki, K. : Lipid and cell-wall analysis in bacterial systematics. *Methods Microbiol.*, **19**, 161 (1987)
10. Woese, C. R. : Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.*, **51**, 221 (1987)
11. Stahl, D. A., Lane, D. J., Olsen, G. J. and Pace, N. R. : Analysis of hydrothermal vent-associated symbionts by ribosomal RNA sequences. *Science*, **224**, 409 (1984)
12. Slade, P. J. and Collins-Thompson, D. L. : Differentiation of the genus *Listeria* from other gram-positive species based on low molecular weight (LMW) RNA profiles. *J. Applied Bacteriology*, **70**, 355 (1991)
13. Garoff, H. and Ansoerge, W. : Improvements of DNA sequencing gels. *Analytical Biochemistry*, **115**, 450 (1981)
14. Kolodny, G. M. : An improved method for increasing the resolution and sensitivity of silver staining of nucleic acid bands in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, **138**, 66 (1984)
15. Anderson, D. G. and Mckay, L. L. : Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from *Lactic streptococci*. *Applied Environ. Microbiol.*, **46**, 549 (1983)
16. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. : *Molecular cloning. A laboratory manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Lab. Press, p.21 (1989)
17. Ingraham, J. L., Maaloe, O. and Neidhardt, F. C. : *Growth of the bacterial cell*. Sinauer Associatea Inc., Sunderland (1983)
18. Jackman, P. J. : Microbial systematics based on electrophoretic whole-cell protein patterns. *Methods Microbiol.*, **19**, 209 (1987)
19. Selander, R. K., Caugant, D. A., Dchman, H., Musser, J. M., Gilmour, M. N. and Whittam, T. S. : Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl. Environ. Microbiol.*, **51**, 873 (1986)

(1992년 7월 20일 접수)