

소량의 *Bifidobacterium* 배양액에서 genomic DNA 추출을 위한 신속/간단한 방법

제갈수 · 박희경 · 송지은 · 허태련 · 소재성*
인하대학교 생물공학과

A Micromethod for Rapid and Simple Isolation of Genomic DNA from Small Scale Culture of *Bifidobacterium*

Soo Jeakal, Hee-Kyung Park, Ji-Eun Song, Tae-Ryeon Heo and Jae-Seong So*

Department of Biotechnology, Inha University, Incheon 402-751, Korea

Abstract — A method is described for the rapid and simple isolation of genomic DNA from 3 ml culture of *Bifidobacterium*. The method is expected to be used in gene manipulation of *Bifidobacterium* spp. The isolated DNA using this method is shown to be an excellent substrate for restriction endonuclease digestion and ligation with T4 DNA ligase.

Bifidobacterium spp.는 인간, 특히 유아의 장내에 많이 존재하며, 영양학적으로 매우 유익한 균이다. 현재 많은 나라에서 *Bifidobacterium*을 이용한 유제품이나 요거트를 생산하는데 많은 관심을 기울이고 있다(1, 4). 이 균은 편성 혐기성균이며 그람양성, 무포아성 간균으로서(1), 장내의 pH를 조절하여 병원성균의 생육을 억제시키고, 소화작용을 촉진시켜 주는 등 장내에서 유용한 기능을 하는 균주이다(1, 2). 그러나 대사능력이 불안정하고, 항생물질이나 산(acid), 산소등의 주위환경에 대한 내성이 약하여 장내에서의 생존과 기능이 문제시되고 있다(1, 4). 이러한 단점들을 개선하고 식품, 의약품등 산업적으로 유용하게 이용하기 위해서는 균의 동정 및 유전자 기술을 이용한 균주 개량과 같은 유전공학적인 연구가 절실히 요구된다. 또한, 다양한 주위환경에 대하여 내성을 갖게 하고 균의 안정성을 증가시켜 장내에서의 기능을 최적화 시킬 필요성이 있다. 이러한 목적을 달성하기 위해서는 광범위한 유전자 조작방법이 필요한데 그 중에서 가장 기본이 되는 것이 genomic DNA를 추출해 내는 것이다. *Bifidobacterium*는 배양조건이 매우 까다로울 뿐 아니라, 배양시간이 오래 걸리며, 오염의 가능성이 높다(1, 2). 또한, 기존의 그람양성균의 genomic DNA 추출방법(7, 8)은 이러한 *Bifidobacterium*에는 적당하지 못하다. 따라서 적은 양의 배양액으로

부터 짧은 시간에 DNA를 쉽게 추출하는 방법의 필요성이 절실히 요구되고 있다. 본 연구에서는 *Bifidobacterium* sp.를 3 ml MRS 배양액(ammonium citrate 2 g/l, L-cysteine hydrochloride 0.3 g/l, lactose 10 g/l, FeSO₄ 35 mg/l, MgSO₄ 575 mg/l, MnSO₄, KH₂PO₄ 3 g/l, trypticase 10 g/l, tween-80 1 g/l, yeast extract 5 g/l, pH 7.0)에서 약 24~36시간 배양한 후, 1.5 ml microtube에 수거하여 DNA를 추출하는 방법을 확립하였다. 추출에 소요되는 시간도 약 4~5시간 정도로 기존의 방법보다 신속하였으며, 적은 양의 시약으로 좁은 공간에서도 쉽게 수행할 수 있었다(Fig. 1). 본 실험에서 사용한 균주는 *Bifidobacterium longum* ATCC 15707이며 3 ml MRS 배양액에 접종하여 37°C에서 24~36시간 배양한 후(4), 1.5 ml microtube에서 2번 원심분리로 수거한다. TEN buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 0.1M NaCl) 600 µl로 배지 성분을 제거시킨 후, 400 µl TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA)에 cell pellet을 현탁시킨다. 세포벽의 분해를 위하여 lysozyme (12 mg/ml) 100 µl를 넣고 혼합시켜 준 후에 37°C에서 30분간 정치시킨 후, 0.5M EDTA(140 µl), 0.2 mg/ml Proteinase K(10 µl), 10% SDS(40 µl)를 차례로 첨가한 혼합액을 37°C에서 1시간 연장 정치하였다. 같은 부피의 phenol : chloroform : isoamylalcohol(25 : 24 : 1) 혼합용액으로 mixing한 후, 원심분리에 의해 층분리를 하고 상등액을 조심스럽게 Eppendorf tube에 옮겼다. RNase(10 mg/ml) 10 µl를 첨가한 후 37°C에서

Key words: *Bifidobacterium*, DNA isolation, micro-method

*Corresponding author

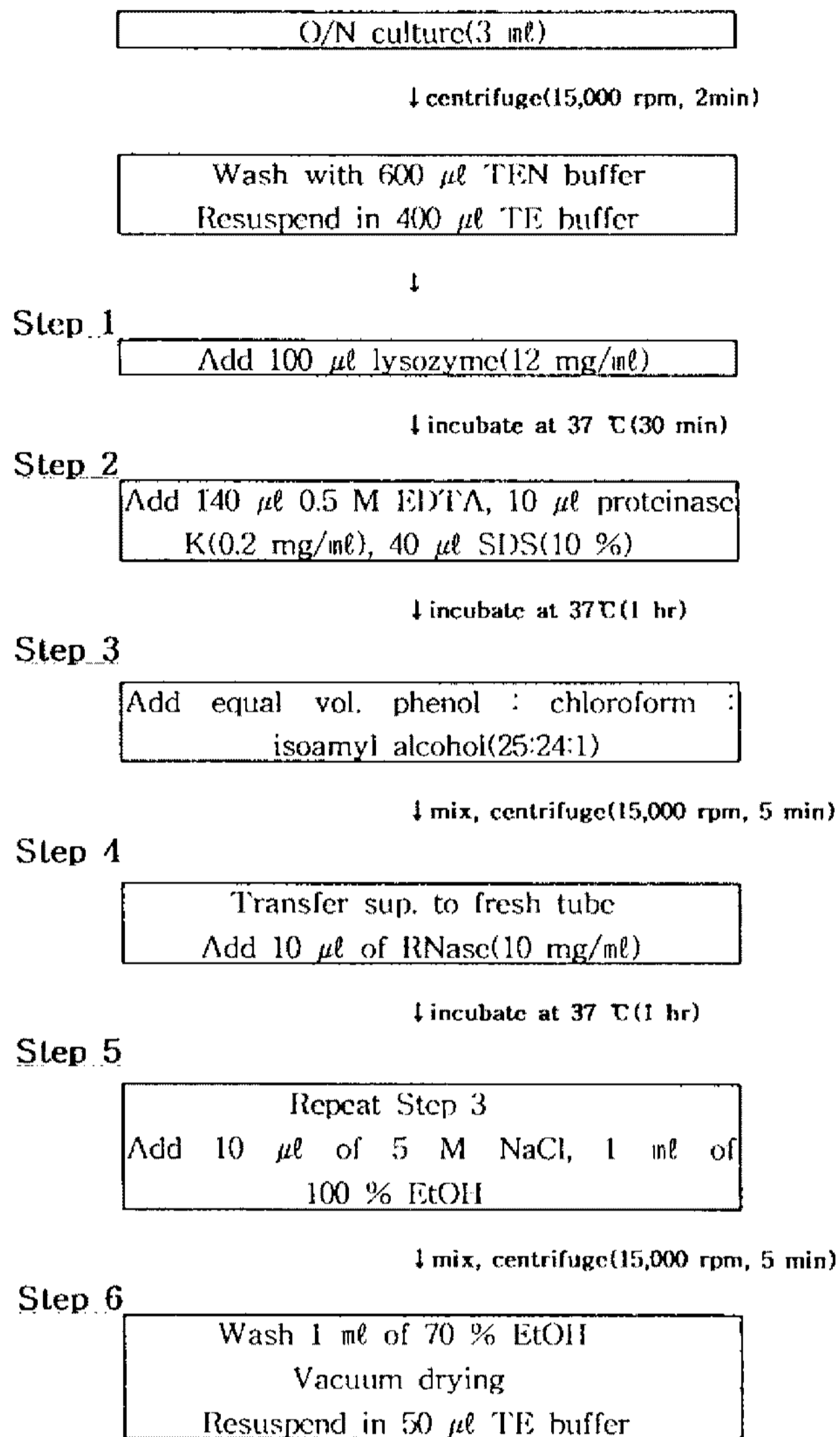


Fig. 1. Miniprep procedure for genomic DNA isolation from *Bifidobacterium*.

1시간 정치하고, 다시 phenol : chloroform : isoamylalcohol(25 : 24 : 1) 혼합용액을 사용하여 RNase를 제거시켰다. DNA를 침전시키기 위하여 5M NaCl 과 두 배 부피의 EtOH(1 ml)를 첨가한 후, 원심분리(15,000 rpm)하여 얻은 DNA를 진공건조기에서 건조시킨 다음 50 μ l TE buffer에 녹인 후 4 $^{\circ}$ C에 보관하였다(3, 5, 6). DNA 수율을 확인하기 위해 OD₂₆₀를 측정 결과, 다른 그램양성균 DNA 추출방법의 DNA 수율이 약 2~6 μ g/3 ml인데 반하여(7, 8) 본 실험에서는 약 20 μ g/3 ml of culture이었다. 또한 A₂₆₀/A₂₈₀의 값은 1.7로 기존의 방법과 비슷한 순도를 나타냈다. 지금까지의 실험에서 순수하게 genomic DNA만을 추출하는데 소요된 시간은 약 4시간 정도로 다른 방법(6시간 이상 소요)(7, 8)보다 훨씬 빠르게 할 수 있었다. 추출한 DNA를 유전자 조작에 필요한 여러종류의 효소로 처리되는 정도를 0.7% agarose gel에서 전기



Fig. 2. Restriction pattern of genomic DNA isolated from *B. longum* in agarose gel.
M, lambda *Hind*III size marker
lane 1; undigested DNA
lane 2; DNA digested with *Bam*HI
lane 3, 6; DNA digested with *Eco*RI
lane 4; DNA digested with *Pst*I
lane 5; *Bam*HI digested DNA was ligated with T4 DNA ligase

영동(80~100 V, 25~50 mA)에 의해 확인한 결과(Fig. 2), *Bam*HI(lane 2), *Eco*RI(lane 3, 6), *Pst*I(lane 4) 등의 제한효소로 10 U/ μ g DNA의 조건으로 반응시켜서 절단되는 것을 확인할 수 있었고, 또한 절단된 DNA 조각들은 다시 T4 DNA ligase에 의하여 성공적으로 self-ligation되었다(lane 5, Fig. 2). 다른 추출방법에 비하여 절단형태나 self-ligation이 더 좋은 양상을 나타냈다. 이상의 *Bifidobacterium*의 genomic DNA 추출방법은 유전자 은행 확립, genomic Southern blot hybridization과 유용 유전자 분리 및 분석등의 유전공학실험에 기초가 될 것이며, 다른 유산균과 그램양성균들의 genomic DNA 추출에도 폭 넓게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

본 연구에서는 *Bifidobacterium* spp.의 genomic DNA를 빠르고, 간단하게 3 ml 배양액에서부터 추출하는 방법을 확립하였다. 배양조건이 까다롭고, 세포벽이 단단한 *Bifidobacterium* spp.의 genomic DNA의 신속한 추출방법은 이 균주의 유전공학연구에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다. 이 방법을

이용하여 *B. longum*으로 부터 total genomic DNA를 분리한 후, 제한효소와 T4 DNA ligase로 처리하여 전기영동으로 확인하였다.

감사의 말

본 연구는 인하대 교내연구비(1995)지원에 의해 수행되었음.

참고문헌

1. Rasic J. and J. Kurman. 1983. Bifidobacteria and their role. p. 4-26.
2. Marie-Line Desjardins and Densi Roy. 1990. Growth of Bifidobacteria and their enzyme profiles. *J. Dairy Sci.* **73**: 299-307.
3. T.A. Brown. 1990. Gene Cloning An Introduction. Pp. 27-47. Chapman and Hall, London.
4. E.B. Collins and B.J. Hall. 1984. Growth of bifido-

bacteria in milk and preparation of *Bifidobacterium infantis* for a dietary adjunct. *J. Dairy Sci.* **67**: 1376-1380.

5. Daniel J.O' Sullivan and Todd R. Klaenhammer. 1993. Rapid Mini-Prep Isolation of High-Quality Plasmid DNA from *Lactococcus* and *Lactobacillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 2730-2733.
6. Sambrook J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular Clong. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
7. J.B. Velazquez, J. Cansado, C. Sieiro, P. Calo, E. Longo and T.G. Villa. 1993. Improved lysis of wine lactobacilli for high yield isolation and characterization of chromosomal DNA. *J. of Microbiol. Methods* **17**: 247-253.
8. Patricia G. Hempstead. 1990. An improved method for rapid isolation of chromosomal DNA from *Mycoplasma* spp. *Can. J. Microbiol.* **36**: 59-61.

(Received 10 August 1995)