

- 총 설 -

미생물의 DNA 염기조성과 분류학적 의의

신용국 · 이정숙 · 김홍중 · 주우홍* · 이재동** · 박용하†

한국과학기술연구원 생명공학연구소 유전자은행

*창원대학교 자연과학대학 생물학과

**부산대학교 자연과학대학 미생물학과

Microbial DNA Base Composition(G+C mol%) and Its Taxonomic Implications

Yong-Kook Shin, Jung-Sook Lee, Hong-Joong Kim, Woo-Hong Joo*, Jae-Dong Lee**, and Yong-Ha Park†

*Korean Collection for Type Cultures, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology,
Korea Institute of Science and Technology, P.O. Box 115, Taejeon, 305-600*

**Department of Biology, College of Natural Science, Changwon National University, Changwon, 641-773*

***Department of Microbiology, College of Natural Science, Pusan National University, Pusan, 609-735, Korea*

서 론

Watson과 Crick가 1953년 deoxyribonucleic acid (DNA)의 이중 나선구조를 해명한¹⁾ 이후, 유전정보를 갖고 있는 DNA에 관한 연구는 더욱 더 활발하게 진행되어 오고 있다. 이러한 DNA의 유전정보는 adenine(A), cytosine(C), guanine(G), thymine(T)의 4종의 염기의 서열에 의해 기록되어져 있다. 이러한 4개의 염기의 조성비는 유전 정보 그 자체는 아니지만, DNA profile으로써는 유익한 정보 중의 하나이다. DNA는 A 하고 T, C 하고 G의 수소결합에 의해 이중나선을 형성하고 있기 때문에 A 하고 T, C 하고 G는 각각 같은 mole이 존재하게 된다. 따라서, 염기 조성은 G+C 혹은 A+T 어느 한쪽을 표시할 수가 있으며, 통상적으로 G+C로 표시하며 이것을 GC함량(mol% G+C)이라 부른다. 이러한 염색체 DNA는 생물에 고유의 염기조성을 가지고 있으며, 이것으로 생물을 분류학적으로 특정 지을 수가 있다. DNA 염기조성은 Marmur와 Doty가 1962년에 간편한 측정법²⁾을 발표하고 난 후, 미생물 분류에 주요한 요소의 하나로서 널리 이용되고 있으며, 미생물

의 경우 25-75%의 폭넓은 G+C분포를 나타내고 있지만, 참고로 고등동물의 GC함량은 42% 전후에 집중되고 있다. 분리 미생물 균주들을 동정하고자 할 경우, 참고서적으로 널리 이용되고 있는 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 1.³⁾ 및 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th.⁴⁾에는 대부분의 종의 표준균주(Type strain)에 대한 GC함량을 표시하고 있으며, GC함량이 서로 차이를 나타내는 균주들은 같은 염기서열로 구성되어 있다고 가정할 수 없으므로 같은 종(Species)으로 간주하기 어렵다. 이와 같이 미생물의 폭 넓은 GC함량분포는 미생물의 분류·동정을 위한 중요한 지표로서 사용될 수 있다.

DNA의 분리·정제

일반적으로 Marmur의 방법⁵⁾을 이용하거나, 이를 약간 응용한 방법^{6, 7)} 등을 이용하여 DNA를 분리·정제하고 있다. 세균의 경우, 일반적으로 Gram(-)균의 DNA는 Gram(+)에 비해 용이하게 분리되지만, 활성슬러지에서 분리되는 Gram(-)의 *Zoogloea*속 세균은 특이하게 DNA의 분리

† Corresponding author

가 매우 어렵다. *Zoogloea*속 세균은 세포 밖으로 polysaccharide를 분비하여 아주 특이한 finger-like flocc을 형성⁸⁾ 하며, 이러한 flocc이 단백질 변성을 위해 사용되는 chloroform/isoamyl alcohol(24 : 1, v/v), phenol⁹⁾, 그 외의 여러 가지 효소의 활동을 방해하여 순수한 DNA의 분리·정제를 어렵게 하고 있다. 이러한 경우, 세포에 0.1N

NaOH처리¹⁰⁾를 하여 flocc을 제거한 후, Marmur의 방법⁵⁾을 이용하면 간단하게 DNA를 분리·정제 할 수 있다. 그 방법을 Fig. 1에 표시하였다. 또한, DNA의 분리가 어려운 곰팡이·방선균의 일부 균주·식물 등의 경우, benzyl chloride를 사용¹¹⁾하는 것도 아주 유용한 방법 중의 하나이다.

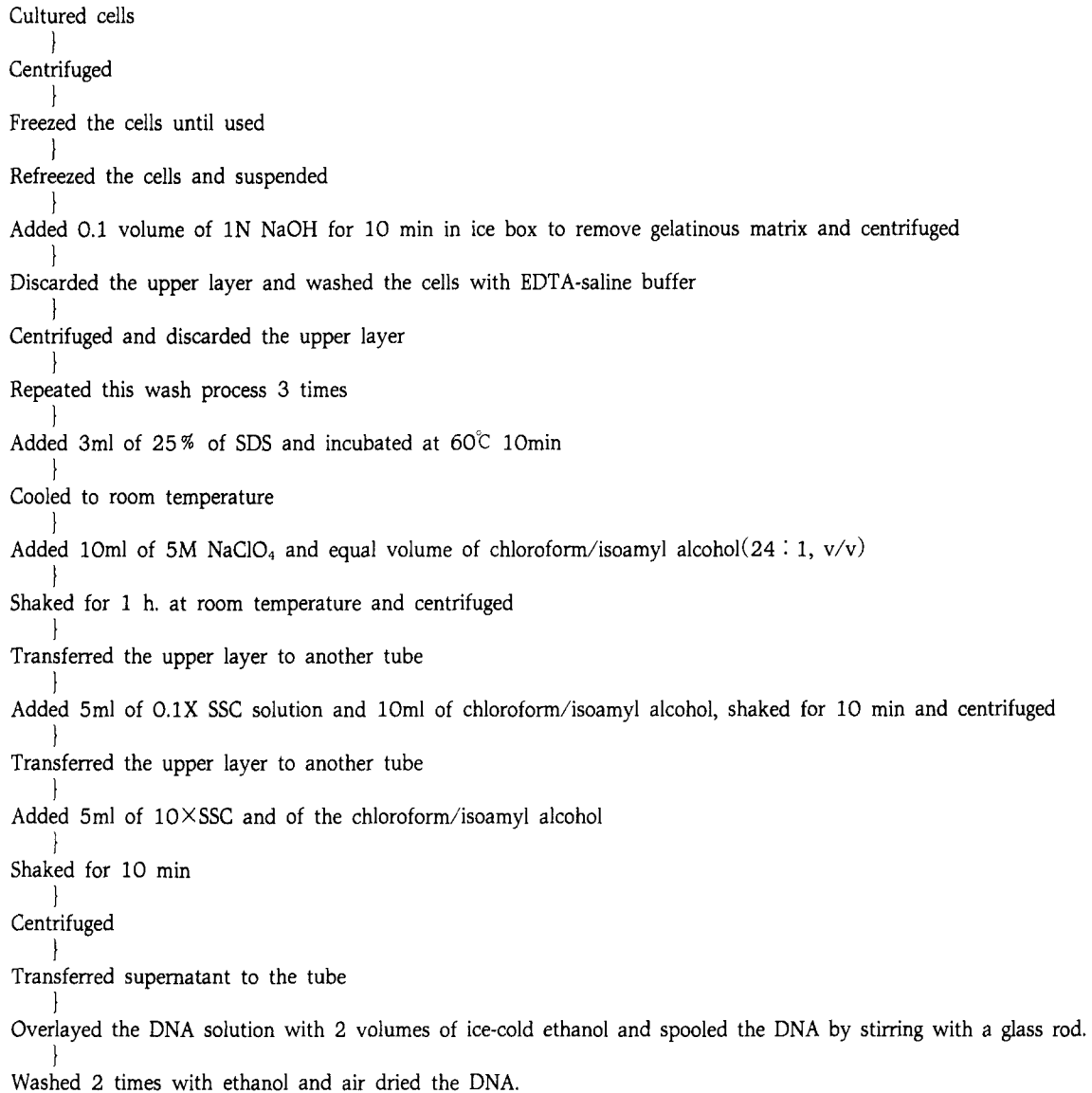


Fig. 1. Flow diagram of the DNA isolation procedure for bacterial genus *Zoogloea*.

DNA 염기조성의 측정방법

RNA 및 단백질 등의 불순물이 섞여 있지 않는 순수 DNA가 얻어지면, 이를 이용하여 DNA의 염기조성을 측정한다. 측정방법에는 DNA의 염기조성을 간접적으로 측정하는 Tm법²⁾과 Bd법¹²⁾, 그리고 직접적으로 측정하는 HPLC법^{13, 14)}으로 크게 3가지로 대별된다.

가. Tm법 (Temperature of melting method; 용해온도법); 용액 속에 용해되어 있는 double strand의 DNA는 용액의 온도가 올라가면 수소결합이 끊어지면서 single strand로 되어 자외선의 흡수가 급격히 증대한다. 이러한 흡광도 변화의 중간치의 온도를 DNA의 용점으로 정의하고, 이를 Tm(°C)으로 표시한다. 이러한 Tm을 측정하여 GC함량으로 환산하는 방법이 Tm법이다.

나. Bd법 (Buoyant density method; 부유밀도법); DNA는 GC함량에 비례한 부유밀도를 나타내는 것으로 표시하였으며, 기존의 DNA를 control로하여 CsCl밀도균배원심에 의하여 염기조성을 구하는 방법이다. 시간적으로 장

시간의 초원심분리가 필요하지만, 일반적으로 Tm법보다는 정밀도가 높다고 한다.

그러나, 간접적인 GC함량 측정법인 Tm법 및 Bd법은 다음과 같은 결점을 가지고 있다. 첫째, DNA에 methyl-기 등으로 수식되어진 염기가 존재하면, 그 수식 염기를 포함한 GC함량의 측정이 어렵다. 둘째, 측정치로부터 GC함량을 계산하는 계산식이 한 개의 식만 존재하는 것이 아니므로, 동일한 균주를 가지고 다른 연구자가 똑같은 실험을 행하여도 동일한 GC함량 측정값을 산출하기가 거의 어렵다. 예를 들면, *Escherichia coli* K-12 균주의 DNA의 GC함량은 50.1%²⁾ 혹은 51.0%¹⁵⁾로 보고되고 있다.

다. HPLC법 (High performance liquid chromatography method; 고속액체 chromatography법); DNA를 효소분해해서, 각각의 염기를 nucleoside로 만든 후, HPLC로 분리정량하는 방법이다. 분리된 DNA(1mg/ml)를 eppendorf tube에서 녹인 후, eppendorf tube를 100°C의 끓는 물에 5분간 넣어 DNA를 변성시킨다. 새로운 eppendorf tube에 열 변성된 DNA를 10µl분주한 후, 기에 nuclease P1(0.1

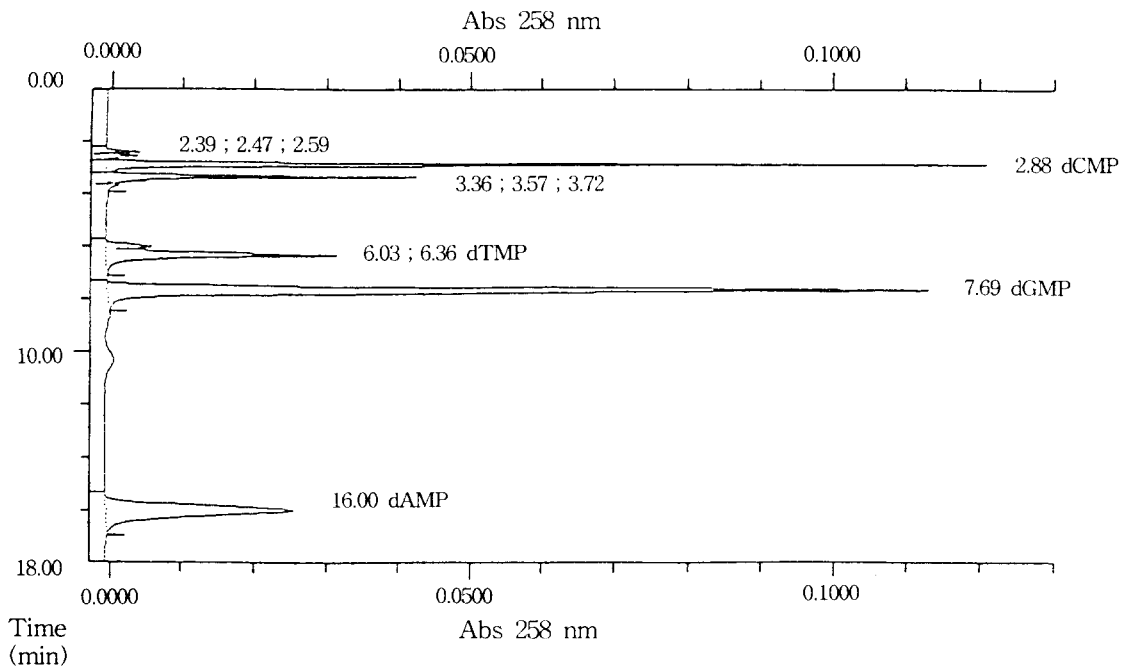


Fig. 2. HPLC chromatogram in determining DNA base composition of *Zoogloea ramigera* IAM 12136^T.

mg/ml in 40 mM Na-acetate + 2mM ZnSO₄ solution, pH 5.3)을 10μl를 첨가하여 60°C에서 30분간 반응시켜¹³⁾ deoxyribonucleotide상태로 만든다. 이 상태에서 HPLC분석을 행할 수도 있지만, 이 deoxyribonucleotide에 10μl의 alkaline phosphatase solution(2.4 units/ml in 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 8.1)를 첨가하여 37°C에서 60분간 반응시켜¹⁴⁾ nucleoside로 만든 후, HPLC분석을 행한다. 일반적으로 nucleoside로써 분석을 행할 경우, deoxyribonucleotide상태로 분석할 경우 보다 안정된 결과가 얻어진다. HPLC분석 조건¹⁰⁾을 참고로 Table 1에 표시하였다. *Zoogloea ramigera* IAM 12136⁷⁾의 HPLC분석한 chart를 Fig. 2에 나타내었다.

Table 1. Conditions of HPLC for analysis of DNA base composition

Column ; Beckman ULTRASPHERE ODS (4.6 i.d. X 250mm)
Column temperature ; 30°C
Mobile phase ; 30 mM KH ₂ PO ₄ (pH 2.8)
Flow rate ; 1.0 ml/min
Detector ; Beckman Programmable Dectector Module 166
Data analyzer ; Beckman

결 론

1962년 Marmur와 Doty가 GC함량 측정법²⁾을 발표한 이후, 미생물의 GC함량은 Tm법 내지 Bd법이 주로 이용되어 왔다. 최근에는 HPLC법이 확립되어 널리 이용되고 있지만, Tm법, Bd법 또한 미생물의 DNA GC함량 측정을 위해 아직도 사용되고 있다. 따라서, GC함량을 측정 후 그 측정치를 보고·기록 할 경우에는 그 측정방법을 반드시 명시하여야 한다. 그리고, GC함량을 측정하고자 할 경우, 측정값의 정확도 및 재현성을 높이기 위해서는 무엇보다도 DNA의 순도가 중요하다. 특히, RNA의 혼입은 HPLC분석 시 DNA의 peak와 RNA의 peak가 겹쳐질 수가 있기 때문에, DNA를 정제할 때 신중히 RNase를 처리하여야 하며, 혹은 다른 종류의 RNase를 처리하는 것도 좋은 방법 중의 하나이다.

Gram(-)세균의 일부 속의 GC함량범위를 Fig. 3에 참

고로 제시하였다. 미생물의 경우, 같은 속이면 GC함량 범위가 10% 이내, 같은 종이면 3% 이내의 범위에 분포하여야 한다고 일반적으로 말하여지고 있지만, 구성 균주의 수가 많을 경우 이러한 조건을 충분히 만족시키지 못하고 있는 실정이다. 그러나, 최근에 새롭게 만들어지는 속들을 보면 이러한 경향을 준수하고자 하며¹⁶⁾, DNA-DNA hybridization의 결과(현재 70% 이상의 homology치를 나타내면 동일한 종으로 간주)도 GC함량 결과를 지지하고 있다.

참 고 문 헌

1. Watson, J. D., and Crick, F. H. C. : Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature* 171, 964-967(1953).
2. Marmur, J., and Doty, P. : Determination of the base composition of DNA from its thermal denaturation temperature. *J. Mol. Biol.* 5, 109-118(1962).
3. Krieg, N. R., and Holt, J. G. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 1 Eds., Williams and Wilkins, Baltimore (1984).
4. Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., and Williams, S. T. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th Eds., Williams and Wilkins, Baltimore (1994).
5. Marmur, J. : A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *J. Mol. Biol.* 3, 208-218(1961).
6. Cashion, P., Holder-Franklin, M. A., McCully, J., and Franklin, M. : A rapid method for the base ratio determination of bacterial DNA. *Anal. Biochem.* 81, 461-466(1977).
7. Price, C. W., Fuson, G. B., and Phaff, H. J. : Genomic comparison in yeast systematics : delimitation of species within the genera *Schwanniomyces*, *Saccharomyces*, *Debaryomyces* and *Pichia*. *Microbiol. Rev.* 42, 161-193(1978).
8. Unz, R. F. In *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 1., Krieg, N. R., and Holt, J. G. (Eds), pp. 214-219, Williams and Wilkins, Baltimore (1984).
9. Saito, H., and Miura, K. : Preparation of transforming deoxyribonucleic acid by phenol treatment. *Biochim. Biophys. Acta* 72, 619-629(1963).
10. Shin, Y. K., Hiraishi, A., and Sugiyama, J. : Molecular systematics of the genus *Zoogloea* and emendation of the genus. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43, 826-

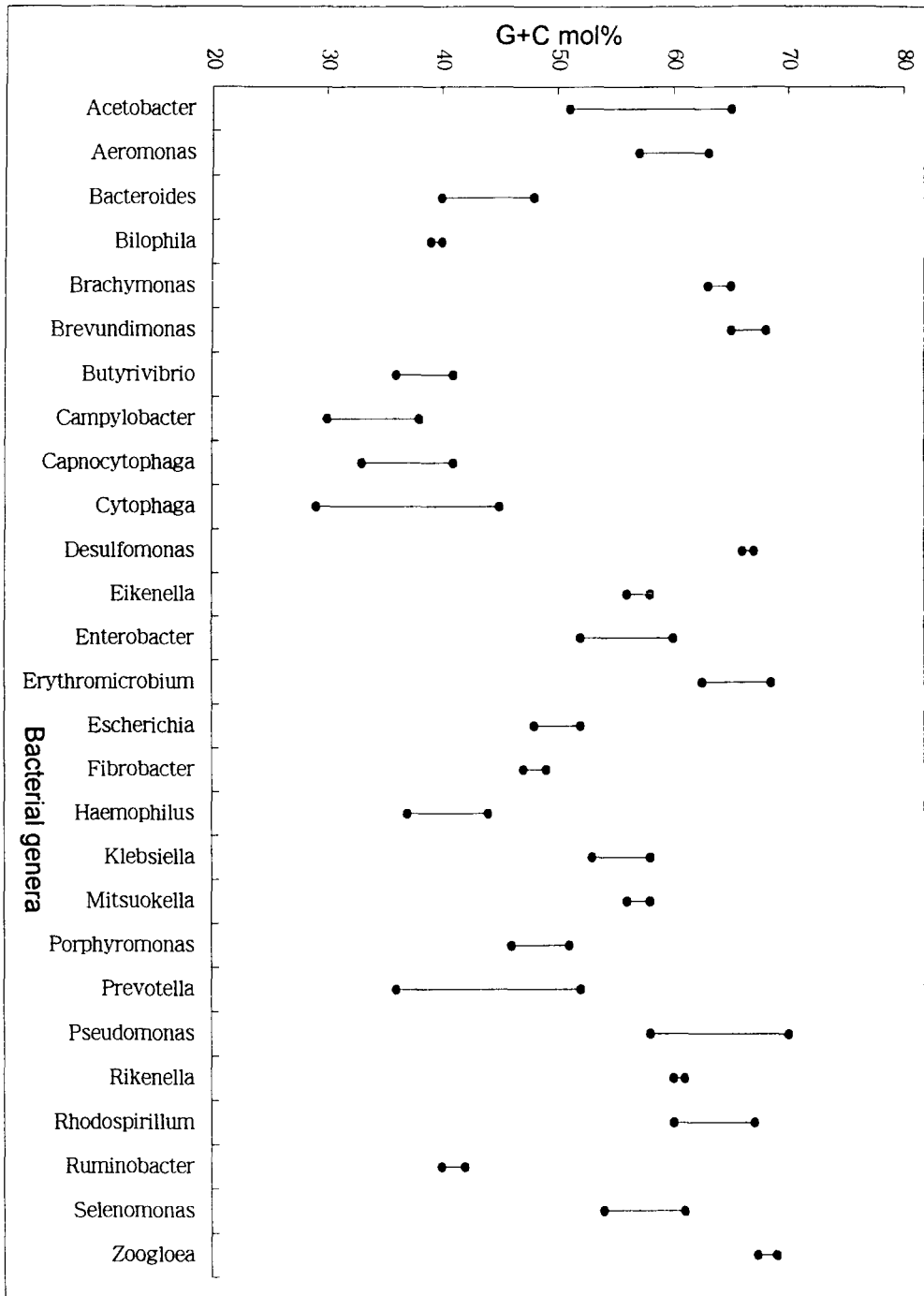


Fig. 3. DNA base compositions of some common gram negative bacterial genera.

- 831(1993).
11. Zhu, H., Qu, F., and Zhu, L.-H. : Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride. *Nucleic Acid Res.* 21, 5279-5280 (1993).
 12. Schildkraut, C. L., Marmur, J., and Doty, P. : Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its buoyant density in CsCl. *J. Mol. Biol.* 4, 430-443(1962).
 13. Katayama-Fujimura, Y., Komatsu, Y., Kuraishi, H., and Kaneko, T. : Estimation of DNA base composition by high performance liquid chromatography of its nuclease P1 hydrolysate. *Agric. Biol. Chem.* 48, 3169-3172(1984).
 14. Tamaoka, J., and Komagata, K. : Determination of DNA base composition by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *FEMS Microbiol. Lett.* 25, 125-128(1984).
 15. Snell, J. J. S., and Laage, S. P. : Transfer of some saccharolytic *Moraxella* species to *Kingella* Henriksen and Bovre 1976, with description of *Kingella indologenes* sp. nov. and *Kingella denitrificans* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 26, 451-458(1976).
 16. Hiraishi, A., Shin, Y. K., and Sugiyama, J. : *Brachymonas denitrificans* gen. nov., sp. nov., an aerobic chemoorganotrophic bacterium which contains rhodoquinones, and evolutionary relationships of rhodoquinone producers to bacterial species with various quinone classes. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 41, 99-117(1995).