

양식 참김(*Porphyra tenera*)에서 분리한 Circular Plasmid DNA

최학선 · 최경희 · 이춘환* · 류태형[†]

부산대학교 생물학과

*부산대학교 분자생물학과

Circular Plasmid DNA from a Red Algae, *Porphyra tenera*

Hack-Sun Choi, Kyong-Hee Choi, Choon-Hwan Lee* and Tae-Hyoung Rhew[†]

Dept. of Biology, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

*Dept. of Molecular Biology, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

Abstract

When total cellular DNA was isolated from *Porphyra tenera* by ultracentrifugation on Hoechst dye/CsCl gradients method, plasmid-like DNA's were concentrated at the upper band which were characterized with a A+T rich organelle DNA's in the CsCl gradients. Based on their electrophoretic migration in different concentration of agarose gel, buffer system, and electric power etc. and the results of restriction digestion, the plasmid-like DNA's were concluded to have circular conformation. This is the first report of putative circular plasmid DNA from the *P. tenera*, which is a autonomously replicating plasmid existing with a high copy number plasmid in the cell. The minimum size of this plasmid estimated by restriction endonuclease digestion was appeared to be 2.5kb in size.

Key words: Hoechst dye, plasmid, organelle DNA, restriction digestion

서 론

Plasmid라는 용어는 1952년 Lederberg라는 유전학자가 처음으로 모든 "extrachromosomal hereditary determinants(DNA and RNA)"라는 개념을 사용한 이래로, 최근에 이 용어는 자율증폭할 수 있는 이중나선의 구상 또는 선상 DNA분자로 한정지어 사용하게 되었다. 이중 나선의 plasmid DNA분자는 원핵과 진핵생물 모두에 존재하는데, 진핵생물의 경우에는 엽록체, 핵, 또는 미토콘드리아에 존재한다고 주장되고 있다(1). 이제까지 밝혀진 바로는 대부분의 경우 이들 plasmid의 염기서열은 핵, 엽록체, 그리고 미토콘드리아 핵산 염기서열과 상동성이 없는 것으로 보고되어 있다(2). 보통 이들의 크기는 50kb보다 작으며, 표준 계면활성제나, phenol 추출방법을 사용하여 세포로부터 total DNA를 추출할 때 함께 나타나기도 한다. 이 total 핵산을 분리한 후 전기영동을 하게 되면 핵, 엽록체, 그리고 미토콘드리아 DNA와는 다른 제삼의 불연속 band로 나타나는 것을 볼 수 있었다(3). 일부의 보고에서는 홍조류의

엽록체 DNA를 분리할 때 AT염기배열이 풍부한 이중나선의 1.6~8.8 kilo base정도의 DNA인 extrachromosomal DNA가 발견되었는데(2-4) 아직 많은 진핵생물의 plasmid처럼 이들의 정확한 생리학적 기능은 알려진 경우가 없고, 이 plasmid의 표현형도 밝혀져 있지 않다. 또한 plasmid copy number가 엄격한 조절기작을 통하여 유지되고 있어서 염색체 DNA와 동일한 비율로 존재하며, 이들 홍조류 plasmid들은 각각 전사체(transcripts)를 만들고 있다고 알려져 있다(2,4). 따라서 이 plasmid들은 상업적으로 이용 가능한 해조의 형질전환 유전인자로의 잠재력을 가지고 있다고 해조류 분자생물학자들이 생각하고 있다. 그러므로 초기 plasmid 연구는 주로 경제적으로 중요한 한천생산 홍조류 *Gracilaria*에 집중되었는데(2,4), 이들의 plasmid는 크기가 다양할 뿐만 아니라, 종마다 각각의 다른 형태의 plasmid를 가지고 있었다. 그 후에 이들 홍조류외에 김에서도 plasmid의 발견이 보고되기 시작하였다(3,5). 그러나 김으로부터의 plasmid 분리에 대해서는 두세편의 논문에서 보고되었지만(3,5,6), 아직 이들 plasmid DNA

[†]To whom all correspondence should be addressed

가 형질 전환용 벡터로 적합한 고리형인지 아니면 선형 구조를 갖는지도 보고된 바 없었고, plasmid의 정확한 size도 밝혀져 있지 않다. 그러므로 이런 김 유래의 plasmid를 이용한 형질전환 벡터작성에 대한 연구는 아직 시작단계에 머물러 있는 상태이다. 최근의 한 보고서(7)에서는 종 구분이 되지 않은 김종으로부터 선형 plasmid의 분리를 보고하였는데, 이들은 크기가 2.7kb, 3.6kb인 두종류인 것으로 보고되었다. 이들 plasmid들은 미토콘드리아성 선형(linear) plasmid로서, open reading frame이 DNA polymerase염기 배열과 매우 유사한 것들이었다. 그러나 아직 양식김으로부터는 유전자조작 및 형질전환에 유용한 고리형 plasmid분리에 대한 연구는 아직 전혀 찾아볼 수가 없다. 그리고 이러한 고리형 plasmid를 이용한 해조류의 형질전환에 대한 벡터로서의 가능성을 시험한 논문이 전혀 없으므로, 김으로부터 분리해낸 plasmid를 이용해서 형질전환벡터로 개발한다는 것은 이제까지 없었던 해조류 형질전환벡터의 개발이라는 점에서 큰 의의가 있다고 생각된다. 이러한 목적에서 국내산 양식김으로 가장 대표적인 참김에서 plasmid를 분리해내고 그것의 형질전환벡터로서의 가능성을 검색하였다.

재료 및 방법

재료

동절기에 동해안 및 서해안 조간대지역에서 채취한 김엽체를 깨끗한 해수로 수세한 다음, 저온보관하면서 분리 동정한 후 각종 김을 풍건하여, 건조한 상태로 -70°C 에서 보관하였다. 이것을 시료로 필요할 때마다 꺼내어 핵산 추출에 사용하였다. 핵산분리시 대략 신선한 김엽체 0.6g은 건조한 김엽체 0.1g에 해당하는 양이다. Plasmid분리에 사용한 김종류는 참김(*P. tenera*)이었다.

핵산추출

건조된 김 1g를 액체질소가 든 막자사발에서 파쇄하고, 여기에 추출용액(200mM Tris-HCl, pH 8.5, 250mM NaCl, 25mM EDTA, 0.5% SDS, 1% PVP-40) 12ml와 β -mercaptoethanol 600 μ l을 첨가하여 완전히 혼탁한 후, 암실에서 15분간 방치하였다. 이 용액에 3M sodium acetate(pH 5.4) 6.3ml를 첨가하여 다시 완전히 혼합하였다. 이 용액을 -70°C 에서 20분간 방치한 후 해동하여 19,000 \times g로 10분간 원심분리하여 불순물을 제거하였다. 회수한 상등액에 동량의 chloroform/isoamylalcohol(24:1)을 첨가한 후, 원심분리하여 상등액을 회수하

였다. 회수한 상등액에 0.2volume의 isopropanol을 첨가하여 -70°C 에서 20분간 방치한 후 해동하여 19,000 \times g로 20분간 원심분리한 다음 상등액을 버리고, 침전물을 70% ethanol로 수세하여 진공건조기에서 건조하였다. 건조된 DNA에 1ml TE(Tris-EDTA pH 8.0)용액을 첨가하여 DNA를 용해시킨 후, 10 μ l용액을 사용하여 전기영동으로 DNA량을 확인하였다.

Plasmid 분리

1.60밀도(0.87g/ml)의 CsCl, Hoechst dye no.33258을 40 μ g/ml의 농도로 DNA(200~500 μ g)용액에 첨가하여 균질화 후, Beckman 70.1 Ti rotor에서 275,000 \times g에서 40시간 동안 초고속원심분리를 하였다(8). 원심분리 후 암실에서 UV하에 15게이지 바늘로 상층부분(미토콘드리아, 염색체 DNA, 그리고 plasmid DNA)과 하층부분(4)을 따로 분리해낸 다음 소금에 포화된 물에 평형화시킨 isopropanol을 사용하여 3회 반복 추출하여 Hoechst dye를 제거했다. 그런 다음 CsCl를 제거하기 위해서 추출된 용액을 물로 3배 희석하여 1volume의 isopropanol과 0.1volume의 3M sodium acetate를 첨가하여 섞은 다음 -70°C 에서 20분간 방치한 후, 19,000 \times g로 30분간 원심분리한 후 상등액을 버리고, 침전물을 70% ethanol로 수세하여 진공건조기에서 건조하였다. 건조된 DNA에 100 μ l TE용액을 첨가하여 DNA를 용해시킨 후, 10 μ l용액을 사용하여 전기영동하여 DNA량을 확인하였다.

Plasmid DNA의 gel elution

Agarose gel로부터 plasmid를 추출하기 위하여, 전기영동하여 분리된 *Porphyra* plasmid를 QIAquick gel extraction kit(QIAGEN, USA)를 사용하여 manual에 따라 추출하였다. 먼저 gel 조각의 무게를 측정하여 gel 100mg당 buffer QG 300 μ l를 첨가한 다음 50°C 에서 10분간 incubation하여 agarose를 완전히 녹였다. 잘 녹게 하기 위해 3분 간격으로 vortexing하였다. QIAquick Gel spin column에 위의 용액을 넣고 19,000 \times g에서 1분간 원심분리한 후 buffer QG용액 500 μ l를 첨가하여 1분간 원심분리하였다. 그런다음 washing buffer PE 용액 750 μ l를 첨가하여 2분간 방치하고난 다음 1분간 원심분리하여, 반응액이 들어있는 spin coulumn에 10 mM Tris-HCl(pH 8.5) 50 μ l를 첨가한 후 1분간 19,000 \times g에서 원심분리하여 plasmid용액을 회수하였다. Plasmid량을 충분히 수집하기 위해서 여러 번 위의 과정을 반복하여 speedvac(한국생공제품)으로 농축하여

최종량을 10 μ l로 농축했다. 이중 2 μ l을 사용해서 전기영동하여 회수된 plasmid량을 확인하고, 나머지 DNA 용액은 각종 제한효소 처리 및 molecular cloning에 사용하였다.

제한효소처리

정제된 plasmid DNA에 각종 제한효소를 시험한 후에, EcoRI, SacI, Sall, PstI, BglII(10 unit, promega제품)을 사용하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켜서 절단한 다음, 절단된 부분을 1% agarose gel로 전기영동하여 EtBr용액(1 μ g/ml 농도)에 20분간 염색하여 DNA의 양과 크기를 확인하였다(9).

Agarose gel 전기영동

DNA시료 10 μ l에 loading dye buffer 2 μ l을 첨가하여 0.5X TAE, TBE buffer에 담겨진 1.2%, 0.8% agarose gel에 loading한 다음 전기영동(50Volt)을 하여 DNA를 확인하였다(10).

결과 및 고찰

홍조류 김에서 plasmid DNA분자의 분리

*P. tenera*에서 plasmid-like DNA의 존재를 확인하고, 김에서 세포소기관(Plastid, Mitochondria)의 DNA를 따로 분리하기 위해 Hoechst dye/CsCl gradient 초고속원심분리(Fig. 1)를 실시한 후에 Hoechst dye로 확인한 결과 두개의 명백한 band가 분리되었다. Hoechst dye는 핵산 염기중 AT가 풍부한 배열에서만 선택적으로 결합하는 시약으로써 Hoechst dye/CsCl gradient 초고속원심분리를 했을 때 두개의 band가 나타나게 되는데 상부 band는 세포소기관(엽록체, 미토콘드리아) DNA, plasmid들이 나타나게 되는데, 하부band는 chromosome DNA가 농축되는 것이다(4). 하부 band는 주로 nuclear DNA이고, 상부 band는 Plastid, mitochondria, 그리고 작은(2-8kb) circular plasmid 등으로 이루어져 있다고 밝혀져있다. 실제로 초고속원심분리 후, 상부 band와 하부 band DNA를 agarose gel에 전기영동으로 분석해 본 결과, 상부band에서 추출한 핵산에서 plastid, mitochondria DNA와 plasmid-like DNA분자가(크기가 약 1.8kb정도) 관찰되었고(Fig. 2, lane 2) 하부band에서 추출한 핵산에서는 nuclear DNA만 존재하는것이 확인되었다(Fig. 2 lane 3). 전체 DNA량의 분포를 분석해 본 결과 이 plasmid의 함량이 세포 전체 핵산 함량의 1% 이상을 차지하는 것으로 보아서(Fig. 2 lane

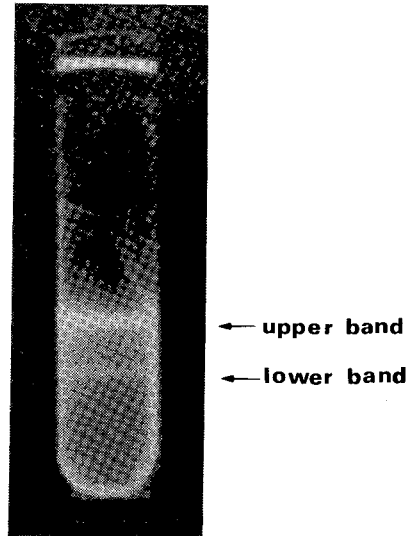


Fig. 1. Photograph of bisbenzamide-CsCl ultracentrifugation.

Upper band, mitochondrial, chloroplast, and plasmid DNA. Lower band, chromosomal DNA.

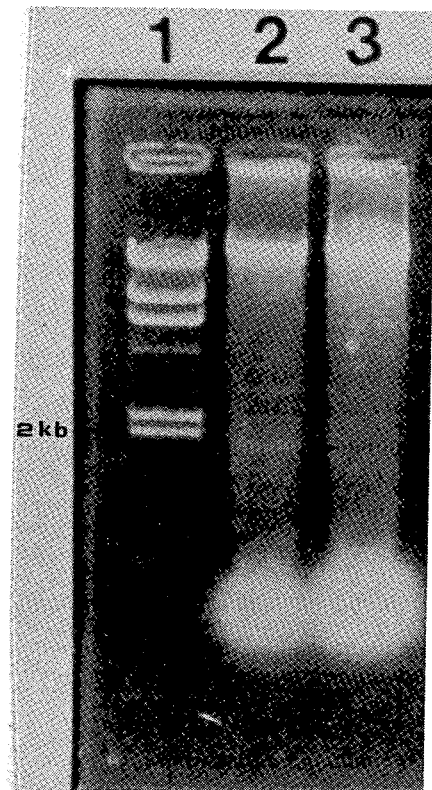


Fig. 2. Plasmid of *Porphyra tenera*.

Lane 1, λ /HindIII. Lane 2, chloroplast, mitochondria and plasmid DNA. Lane 3, nuclear DNA.

2), plasmid copy number가 매우 높은 것으로 추산할 수 있었다. 그리고 이 plasmid는 엽록체나 미토콘드리아가 분리되는 영역에서 분리되었으므로, 엽록체나 미토콘드리아의 안에 존재하는 가능성도 매우 클 것으로 유추할 수 있다. 이 plasmid분리는 다른 홍조류나 북미산의 김종류보다 특히 핵산분리가 힘들고, 농축이 어려운 한국산 양식김에서(참김)으로부터 분리 성공한 plasmid며 동시에 처음으로 분리된 plasmid라는 점에서 의의가 크다하겠다.

구상(Circular) plasmid DNA

일반적으로 구상(circular) plasmid는 선상(linear) plasmid와 달리 전기영동시 분자의 이동 거리가 전기영동의 조건, 즉 agarose 농도, running buffer의 이온강도, 전기영동에 적용된 전하량 등에 따라서 달라진다(2). 본 실험에서 분리한 plasmid like DNA를 0.8% agarose 겔, TBE(Tris-borate EDTA) 전기영동 완충액으로 전기영동하였을 때와(Fig. 3A), 1.2% agarose 겔, TAE(Tris-acetic acid EDTA) 전기영동 완충액으로 전기영동한 결과(Fig. 3B), 0.8% gel에서는 1.8kb 정도의 크기로 영동되었고, 1.2% gel에서는 2.0kb 정도의 크기로 전기영동되었다. 따라서 이 플라스미드 DNA는 전기영동 조건에 따라 크기가 변화함으로써 linear가 아니고 circular plasmid라고 판정되었다. 그리고 소량의 시료(0.05g)으로부터 비교적 다량의 plasmid를(0.5 ug/1g 건조시료) 분리할 수 있었던 것으로 볼 때 이 plasmid는 high copy number plasmid라고 추산할 수

있었다.

이 plasmid의 제한효소반응을 보기위해 agarose gel로부터 plasmid band부분을 칼로 절단하여 gel elution을 실시한 후에, 다양한 제한효소를 처리해 본 다음 그 중에서 unique한 제한효소들만 선택하여 절단반응을 시켜 본 결과 EcoRI, SacI, SalI의 처리에서는 2.5kb 정도의 크기로 나타났으며, PstI과 BglII을 혼합 처리한 결과에서는 2.2kb크기로 판정되었다(Fig. 4). 따라서 이상의 분석결과를 종합해 볼 때 이 plasmid는 최소 2.5kb 이상 크기를 가진 고리형 plasmid라고 결론 지을 수 있었다.

기존의 홍조류 circular plasmid DNA와 김 plasmid DNA

초기의 홍조류 plasmid연구는 주로 경제적으로 중요한 한천생산 홍조류(*Gracilaria*)에 집중되었는데, 이들이 가지고 있는 plasmid는 종마다 그 크기와 형태가 다양하게 다르게 나타났다. 그러다가 Villemur(2)가 1990년 홍조류인 *Gracilaria chilensis*에서 세계 최초로 circular plasmid를 cloning하였는데, 그 plasmid 3.4, 3.8kb 정도의 것들이었고 하나의 ORF(open reading frame, 1233bp)을 가지며(정확한 기능은 아직 모른다), 효모의 2 μ plasmid와 유사한 autonomous replicating sequence(ARS)을 가지고 있다고 보고하였다(11). 같은 시기(1990년)에 Goff와 Coleman(3)은 *Gracilaria lemaneiformis*

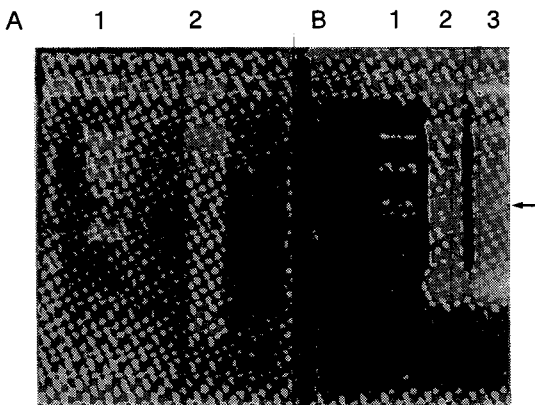


Fig. 3. Identification of plasmid DNA in *Porphyra tenera*. Undigested organellar DNA's were subjected to agarose gel electrophoresis and stained with ethidium bromide. (A) Gel 0.8% agarose gel in TBE buffer or-(B) 1.2% agarose in TAE buffer. Panel A; lane1, λ /HindIII, lane 2, *Porphyra tenera* Panel B; λ /EcorR-I+HindIII, lane 2, 3, *Porphyra tenera*.

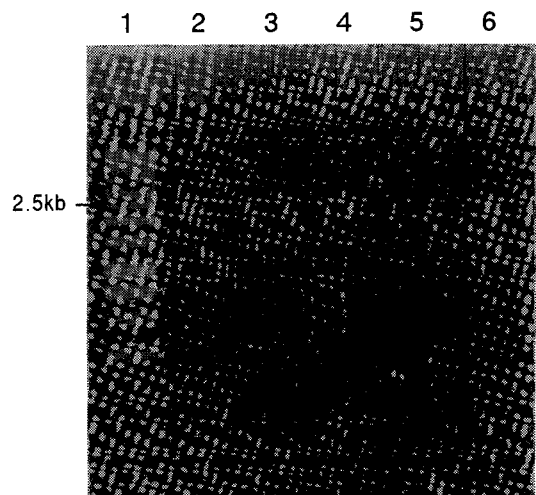


Fig. 4. Restriction analysis of *Porphyra tenera* plasmid DNA.

Lane 1: 1kb ladder, lane 2: EcoRI treatment, lane: 3, SacI-treatment, lane 4: SalI treatment, lane 5: and 6: PstI+Bgl-I treatment.

Table 1. Circular plasmids of Rhodophytes from references

Species	Plasmid				
	Circular	Linear	Size	Function	
<i>Gracilaria chilensis</i>	0		3.4, 3.8kb	unknown	1990년, Villemur
<i>Gracilaria lemaneiformis</i>	0		3.5, 4.4kb	"	1990년, Goff and Coleman
<i>Porphyra spp</i>		0	2.7, 3.6kb	DNA polymerase	1995년, Lee and Russell
<i>Porphyra tenera</i>	0		unknown	unknown	in this paper

*eiformis*에서 3.5kb, 4.4kb의 circular plasmid을 cloning 하였는데, 이 plasmid들은 두개의 open reading frame (ORF#1: 698bp, ORF#2: 336bp)을 가지고 있었고, 그리고 효모의 2 μ plasmid와 유사한 ARS도 가지고 있었다. 그 후 1995년에는 Lee와 Russel(7)이 종 구분이 되지 않은 김종으로부터 마침내 선형(linear) plasmid를 찾았음을 보고하였는데, 이것이 김으로부터 plasmid를 분리해낸 최초의 논문이다. 이 plasmid들은 크기가 2.7kb와 3.6kb인 두 종류의 것이었다. 이들 plasmid들은 미토콘드리아성 linear plasmid로서, ORF가 DNA polymerase의 염기 배열과 매우 유사한 것들이었다. 그리고 저자는 이 선형 plasmid를 식물노화에 관련이 있는 DNA일 것이라고 생각하였다. 본 실험에서 분리한 참김 plasmid는 김으로부터 찾아낸 것으로서 최초의 circular plasmid의 발견이며, 그 크기가 벡터작성에 유리한, 비교적 적은 2.5kb 이하의 것들로서 양식김인 참김에서 분리한 plasmid이므로 유전자 벡터로서 보다 효용성이 높을 것이라 생각된다. 실제로 본 실험실에서는 이 참김 plasmid를 이용해서 양식김의 형질전환벡터를 개발하는 실험을 실시하는 도중에 있는데 이 실험이 완성될 때에는 이 형질전환벡터(12)가 김 혹은 해조류전반의 형질전환에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대한다 (Table 1).

요 약

참김(*P. tenera*)의 total DNA를 Hoechst dye/CsCl 농도구배 초고속 원심분리로 분리하였을 때, 두개의 band가 분리되었다. Hoechst dye는 핵산염기서열중 AT가 풍부한 배열에서만 결합하는 염색시약으로서 상부band는 세포소기관(엽록체, 미토콘드리아) 핵산 및 plasmid 부분이 염색되고, 하부band는 chromosome의 핵산을 나타내는 부분이다. 이 plasmid는 엽록체나 미토콘드리아와 함께 분리되었으므로 엽록체나 미토콘드리아 유래의 plasmid일 가능성이 매우 높다. 이 plasmid는 다른 홍조류나 북미산의 김종류보다 핵산분리가 힘들고, 또 DNA의 농축이 어려운 한국산 양식김에서(참김)에서 처음으로 분리된 plasmid DNA이었다. 이 plasmid

가 선형(linear) conformation인지 구형(circular) conformation인지 확인하기 위해 0.8% agarose 젤 + TBE 완충액과 1.2% agarose 젤 + TAE(Tris-acetic acid EDTA) 전기영동 완충액으로 따로 전기영동해 본 결과 각각의 전기영동 시스템에서 서로 다른 결과를 가져왔다. 0.8% gel에서는 1.8kb의 marker 자리로 그리고, 1.2% gel에서는 2.0kb marker의 자리로 영동되었다. 따라서 이 plasmid는 전기영동 조건에 따라 영동거리가 변화함으로써 linear가 아닌, circular plasmid로 확인되었다. 그리고 소량의 김(0.05g)으로 plasmid를 분리한 결과 상당량의 plasmid를 분리할 수 있었던 것으로 보아 본 plasmid는 high copy plasmid로 추산되었다. 이 plasmid의 제한효소 mapping을 하기 위해 agarose gel의 plasmid band부분을 칼로 절단하여 gel elution을 실시한 후에 선택된 여러 가지 제한효소를 처리하여 본 후 unique한 제한효소를 선택하여 절단 반응시켜 본 결과 EcoRI, SacI, SalI의 처리에서는 2.5kb 정도의 크기로 나타났으며, PstI과 BglII을 혼합 처리한 결과에서는 2.2 kb 크기로 판정되었다. 따라서 이 plasmid는 최소 2.5kb 이상 크기를 가진 고리형 plasmid라 결론지었다(Fig. 4). 이 플라스미드를 이용해서 김형질전환벡터작성이 진행중이다.

문 헌

- Esser, K., Lang-Hinrichs, C., Lemke, P., Osiewacz, H. D., Stahl, U. and Tudzynski, P.: Plasmids of eucaryotes. Fundamentals and applications. Springer, Berlin Heidelberg, New York, p.354(1986)
- Villemur, R.: Circular plasmid DNAs from the red alga *Gracilaria chilensis*. *Curr. Genet.*, **18**, 251(1990)
- Goff, L. J. and Coleman, A. W.: The use of plastid DNA restriction endonuclease elineating red algal species and population. *J. Phycol.*, **24**, 357(1988)
- Goff, L. J. and Coleman, A. W.: Red algal plasmids. *Curr Genet.*, **18**, 557(1990)
- Araki, S., Sakurai, T., Oosua, T. and Sato, N.: Comparative restriction endonuclease analysis of Rhodoplast DNA from different species of *Porphyra*(Bangiales, Rhodophyta). *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58**, 477(1992)
- Shivji, M. S., Rogers, S. O. and Stanhope, M. J.: Rapid

- isolation of high molecular weight DNA from marine algae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **84**, 197(1992)
7. Lee, M. A. and Russel, D. W. : Analysis of two mitochondrially-associated linear plasmids from the red alga *Porphyra* spp.(*Bangiiales, Rhodophyceare*). *Plant Science*, **106**, 99(1995)
 8. Glick, B. R. and Thompson, J. E. : *Method in plant molecular biology and biotechnology*. CRC Press, London, p.37(1993)
 9. Ausubel, F. B., Kingston, R. E., Moore, D. D., Smith, J. A., Seidman, J. G. and Struhl, K. : *Current protocols in molecular biology*. John Wiley and Sons, New York, p.2.9(1989)
 10. Sambrook, J., Frith, E. F. and Maniatis, T. : *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, Vol. 2, p.128(1989)
 11. Villemur, R. : The DNA sequence and structural organization of the the GC2 plasmid from the red alga *Gracilaria chilensis*. *Plant. Mol. Biol.*, **15**, 237(1990)
 12. Murphy, T. M. and Thompson, W. F. : *Plant molecular development*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, USA, p.45(1988)

(1998년 8월 19일 접수)