

## 홍조류인 한국산 김종에서의 염색체 DNA 분리방법

최학선 · 최경희 · 이춘환\* · 류태형<sup>†</sup>

부산대학교 생물학과

\*부산대학교 분자생물학과

### Rapid and Efficient Purification of Nucleic Acids from the Macroalga *Porphyra*(Rhodophyta)

Hack-Sun Choi, Kyong-Hee Choi, Choon-Hwan Lee\* and Tae-Hyoung Rhew<sup>†</sup>

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

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

#### Abstract

A method for the isolation and purification of DNA from a red algae, *Porphyra* was innovated. The innovation of the method consists mainly of three steps that include sodium acetate treatment, chloroform extraction, and 0.2 volume isopropanol precipitation step. The sodium acetate treatment was designed to remove polysaccharide contamination, and the isopropanol step to remove proteins and salts contaminants. Genomic DNA's of several species(for example, *P. tenera*, *P. yezoensis*, *P. seriata*, and *P. pseudolinearis*) was successfully isolated by the innovated method. The amount of DNA purified from one g of sample material with the innovated method was 53 $\mu$ g in average. The resulting DNA was characterized to include high molecular weight and showed no nuclease activity. The DNA was pure enough to be digested directly by various restriction enzymes without any difficulties. *Porphyra* DNA was pure enough and adequate for amplification reaction through the polymerase chain reaction (small nuclear rDNA PCR amplification).

**Key words:** polysaccharide, nuclease, polymerase chain reaction

#### 서론

한국과 아시아를 비롯해서 전세계적으로 홍조류, 녹조류 및 갈조류에 속한 500여종의 해조류가 식품 및 가공산업의 원료로서 이용되어 왔다. 그 중에서 홍조류에 속하는 김속은(*Porphyra* sp.) 한국을 비롯한 아시아 지역의 얇은 해안지역에서 널리 양식되어지고 있으며, 특히 우리나라에서는 그 생산고가 연간 약 2억 1천 4백만 달러로 전체 해양 양식 생산고의 28%를 차지하여서 가장 경제가치가 큰 양식해산식품이다. 이러한 김속에 대해서 그 생활사나 양식방법에 대한 연구는 비교적 잘 되어 있으나, 품종개량이나 우량종자 개발에 대한 연구는 극히 초보적이어서, 기후 및 환경변화에 대항하여 안정된 생산량을 보장할 수 있는 품종 개발이 시급한 실정인데 이러한 김종자 개발을 위한 우선적인 대책으로는 유전자조작(genetic engineering)기술을 김에 도

입하는 것이 상책이다. 이런 유전자 조작기술에 포함되 어야하는 과정으로는 김의 핵산 분리 및 정제, 김세포 내 유전자도입, 김에 적합한 클로닝 벡터의 개발 그리고 김의 형질전환체 선별 및 조직배양 등을 지적할 수 있다. 그중 우선적으로 해결해야할 문제는 순수한 핵산 분리 및 정제를 위한 protocol을 만드는 것이다. 그러나 전형적인 해조류 세포는 화학적으로 순수하고, 완전한 DNA를 추출할 수 있는 이상적인 세포는 아니어서 아직 까지 실험과정에서 문제를 일으키지 않을 정도의 순수한 DNA를 정제하는 정립된 방법이 없었다. 그래서 어떤 경우에는 해조류 염색체를 분리할 때, 성장하고 있는 조류에서 핵산을 분리하는 방법을 개발하였으며, 다른 경우에는 해조류의 원형질체를 만든후에 분리하는 방법이 개발되었다(1). 이제까지 해조류 염색체 DNA를 분리하는 방법중 보편적으로 가장 많이 사용되어왔던 방법은 phenol추출과 ethanol침전방법(2-6)들이다. 그

<sup>†</sup>To whom all correspondence should be addressed

러나 이런 방법으로 해조류로부터 핵산을 추출할 때에는 상당히 어려움이 많고, 추출산물인 DNA의 순도도 좋지 못하다는 결함이 계속 남아 있었다. 그 이유는 해조류가 포함하고 있는 많은 당[건조체의 40%이고 주성분은 sulfated polysaccharides(eg., porphyran, agar, carrageenan, and fucan), carboxylic polysaccharides(e.g., alginic acid)](1) 성분이 제거되지 못한채로 DNA에 불순물로 포함되어 남기 때문이다. 그리고 이들 당은 육상식물의 중성당보다 물에 잘용해되는 특징이 있을 뿐만 아니라, 개체의 점성이 다른 육상식물보다 상당히 높아서 액체 질소로 해조류를 갈 때부터 심각한 문제를 야기하는 것이다. 그뿐만 아니라, 해조류에 존재하는 다량의 polyphenol들을 제거되지 못했을 때 핵산과 결합하여 전사를 억제하든가, 핵산정량시에 UV 흡광 측정에도 방해할 일으킨다(7). 김에서 핵산을 정제할 때에는 이와같이 여러가지 불순물이 제거되지 못한채 남기 때문에 이런방법으로 정제한 핵산을 이용하는 다음 과정의 분자생물학적 실험과정에서 많은 문제를 일으키게 된다. 해조류 가운데에서도 홍조류가 녹조류보다 훨씬 불순물이 많고, 그 홍조류중에서도 김은 특히 불순물이 많아서 핵산정제시에 더욱 어려움을 겪고 있어서, 김에 대한 분자생물학 연구논문 생산은 극히 저조한 편이다. 특히 북미산 김중보다도 아시아지역에 분포하는 참김이나, 방사무늬김의 경우에 분자생물학적 연구가 더욱 미진한 상태이다. 이러한 불순물 문제를 해결하기 위하여 그후에 개발되어온 방법들로 cesium chloride/ethidium bromide density gradient ultracentrifuge(3,8), agarose gel electrophoresis(9), hydroxyapatite column chromatography(10), cationic detergent cetyltrimethyl ammonium bromide(CTAB)(4,11), lithium chloride(12) 등이 있었으나, 이 방법들도 각 방법이 가지고 있는 한계성들(각종 제한효소처리 불능이라든가, Southern blot이 불가능하든가, 많은 시간 소요라든가, 많은 경비가 든다든가)의 문제를 아직도 내포하고 있었다.

본 실험실에서는 이러한 한계성들을 제거하고 모든 핵산작업에 사용 가능한 순수한 핵산추출 방법을 개발하기 위해서 노력하는 과정에서 원래 *Gelidium*으로부터 DNA 추출방법으로 Alberto(13,14)가 개발했던 방법을 김에 적용할 수 있는가 시험해 보았지만 만족할만한 결과가 나오지는 않았었다. 그러나 기존의 다른방법들보다는 효과적이고 우수한 DNA를 뽑는 방법임이 입증되어서, 이 방법을 모델로 하여 김으로부터 핵산을 정제하는 방법을 개발하게 되었다. 즉 추출용액 및 여러 단계과정을 응용 변화시킨 결과, 마침내 김으로부터

순수한 핵산을 분리해 낼 수 있었고, 이 DNA를 사용하여 PCR, 제한효소분석, Southern분석 등을 실시해 본 결과 모든 protocol에 문제를 일으키지 않는 순수한 DNA를 분리하는 방법을 개발하는데 성공하게 되었다.

## 재료 및 방법

### 재료

김엽체를 동절기에 동해안 및 서해안 조간대 지역에서 채취하여서, 일단 깨끗한 해수로 김을 수세하고, 저온보관하면서 실험실로 이동하여, 김을 분리 동정한 후, 각종 김을 풍건하여 건조하였다. 건조한 상태로  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였으며, 필요할때 마다 꺼내어 핵산 추출에 사용하였다. 대략 신선한 김엽체 0.6g은 건조한 김엽체 0.1g에 해당하는 양이다. 실험에 사용한 김종류로는 참김(*P. tenera*), 방사무늬김(*P. yezoensis*), 긴잎돌김(*P. pseudolinearis*), 모무늬돌김(*P. serita*) 등을 사용하였다.

### 핵산추출

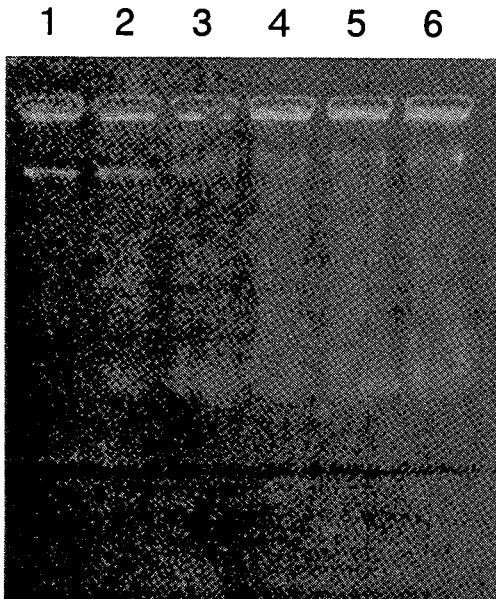
건조된 김 0.05g을 액체질소가 든 막자사발에서 파쇄하고, 여기에 추출용액(200mM Tris-HCl, pH 8.5, 250 mM NaCl, 25mM EDTA, 0.5% SDS, 1% PVP-40) 600  $\mu\text{l}$ 와  $\beta$ -mercaptoethanol 30 $\mu\text{l}$ 를 첨가하여 완전히 혼탁한 다음, 암실에서 15분간 방치하였다. 이 반응용액에 3M sodium acetate(pH 5.2) 315 $\mu\text{l}$ 를 첨가하여 완전히 혼탁하였다. 그리고 이 용액을  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 20분간 방치한후 녹여서 19,000 $\times\text{g}$ 로 10분간 원심분리하여 불순물을 제거하였다. 회수한 상등액에 동량의 chloroform/isoamylalcohol(24:1)을 첨가한 다음 원심분리하여 상등액을 회수하였다. 회수한 용액에 0.2volume의 isopropanol을 첨가하여  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 20분간 방치한후 녹여서 19,000 $\times\text{g}$ 로 20분간 원심분리하여 상등액을 버리고, 침전물을 70% ethanol로 수세하여 진공건조기에서 건조하였다(Fig. 1). 건조된 DNA에 100 $\mu\text{l}$  TE용액을 첨가하여 DNA를 용해시킨 후, 10 $\mu\text{l}$ 분액을 사용하여 전기영동으로 확인하였다(Fig. 2).

### DNA 정제

RNA를 제거하기 위해서 2 $\mu\text{l}$  RNase(10mg  $\cdot\text{ml}^{-1}$ , DNase-free grade)를 핵산추출용액에 첨가한 다음  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 반응시켰다. 반응용액에 동일 용량의 phenol/chloroform/isoamylalcohol(25:24:1)을 첨가하여 부드럽게 혼든 다음 19,000 $\times\text{g}$ 에서 5분간 원심분리를 하

	1	2	3	4	5	6
Volume of extraction solution	400μl	400μl	400μl	400μl	400μl	400μl
Volume of isopropanol added	80μl	120μl	160μl	200μl	320μl	400μl
Isopropanol volume	0.2vol	0.3vol	0.4vol	0.5vol	0.8vol	1.0vol

↓ -70°C for 20 min



**Fig. 1. Determination of optimal isopropanol concentration for genomic DNA precipitation**  
 Lane 1, 0.2 volume isopropanol added; Lane 2, 0.3 volume isopropanol added; lane 3, 0.4 volume isopropanol added; lane 4, 0.5 volume isopropanol added; lane 5, 0.8 volume isopropanol added; lane 6, 1.0 volume isopropanol added.

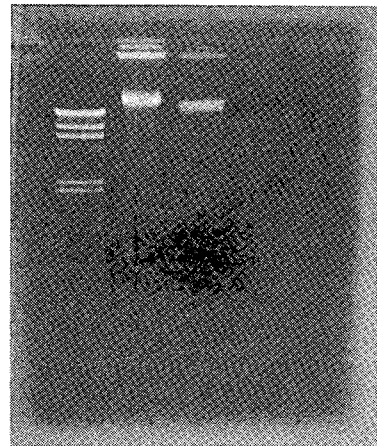
였다. 그리고 나서 상등액을 회수하고 이 반응용액에 0.1 volume 3M sodium acetate와 1volume isopropanol를 첨가한 후 4°C에서 19,000×g로 20분간 원심분리하여 상등액을 제거하고 침전물을 회수하였다. 이 반응용액에 70% ethanol 1ml을 첨가하여 수세한 후에, 진공 건조기로 건조시켰다. 건조시킨 침전물에 TE(Tris-EDTA)용액 100μl를 첨가하여 37°C에서 용해시킨 후, 4°C에서 보관하면서 사용하였다(핵산을 정제할 때 모든 tip의 끝은 절단하여 사용하였다)(Fig. 3).

**핵산정량**

DNA 정량은 Shimazu spectrophotometer(UV-2100S)

*Porphyra*(0.05g dry sample)  
 ↓ grinding in liquid nitrogen  
 600μl Extraction buffer  
 30μl β-mercaptoethanol  
 ↓ mix well  
 Room temperature in dark(15min)  
 ↓  
 315μl of 3M sodium acetate(pH 5.2)  
 ↓ agitation of a short period  
 -70°C for 20min  
 ↓ thaw and centrifuge(15,000rpm, 10min)  
 Supernatant  
 ↓  
 Chloroform/Isoamylalcohol extraction  
 ↓ centrifuge(14,000rpm, 10min)  
 0.2 vol isopropanol addition  
 ↓ -70°C for 20min  
 Centrifuge at 15,000rpm for 20min  
 ↓ 70% Ethanol treatment and dry  
 Genomic DNA solution

**Fig. 2. Flowchart of innovated isolation and purification protocol for genomic DNA from *Porphyra*.**



**Fig. 3. Photograph of genomic DNA in *Porphyra*.**  
 Lane 1, Molecular marker(λ/HindIII); lane 2, *Porphyra yezoensis*; lane 3, *Porphyra tenera*.

를 사용하여 260nm에서 측정된 후에, 1.0 OD당 50μg/ml의 환산계수를 기준으로하여 정량하였다(Table 1).

**탄수화물정량**

전체 탄수화물 오염 함량은 Phenol-sulfuric acid(15)

**Table 1. Purity of nucleic acids precipitated by 0.2 volume isopropanol in *Porphyra yezoensis***

<i>Porphyra yezoensis</i> tissue	
DNA( $\mu\text{g/g DW}$ )	53 <sup>1)</sup>
Carbohydrate(mg/g DW)	0.108 <sup>1)</sup>
A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub>	1.60 <sup>1)</sup>
A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	1.89 <sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Each value is the mean of independent preparations.

법으로 측정하였다. 즉 시료 200 $\mu\text{l}$ 에 5% phenol 200 $\mu\text{l}$ 를 첨가하고, 신속하게 혼합한 후에 황산용액 1000 $\mu\text{l}$ 를 다시 첨가하여 혼합하였다. 그런후에 상온에서 30분간 방치한 다음, 490nm에서 흡광도를(Shimazu spectrophotometer(UV-2100S)) 측정하여 총 당함량을 측정하였다. 표준곡선은 위 방법을 사용하여 포도당을 표준물질로 하여 0에서 50 $\mu\text{g}$ 까지 작성하였다(Table 1).

**단백질과 페놀화합물의 오염도 확인**

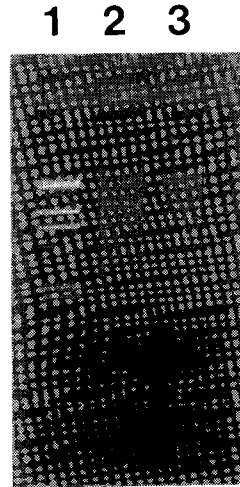
단백질 불순물 함량은 260/280nm 흡수파장을 비교함으로써 검색하였고(9), polyphenol화합물 불순물 함량은 260/230nm 흡수파장을 비교함으로써 평가하였다(16)(Table 1).

**제한효소처리**

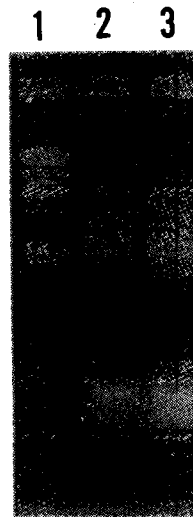
정제된 염색체 DNA(1 $\mu\text{g}$ )에 다양한 제한효소를 테스트해 본 결과후에(data 생략), 선택된 제한효소, PstI, KpnI(10unit, promega제품)를 사용하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 반응시킨 다음, 절단된 부분을 1% agarose gel로 전기영동하여 EtBr용액에 20분간 염색하여 확인하였다(Fig. 4).

**PCR증폭반응**

PCR증폭반응은 DNA Thermal Cycler 480(Perkin-Elmer Corp.)을 사용하여 실시하였다. 즉 1X PCR buffer(10mM Tris-Hcl, pH 8.3, 50mM KCl, 1.5mM Mg-Cl<sub>2</sub>, 0.01% BSA)에, dNTP 농도는 200 $\mu\text{M}$ , primer 농도는 20 $\mu\text{M}$ , Template DNA는 100ng으로 하여, 2.5 unit의 Taq polymerase로 PCR반응을 시켰다. 94 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1분간 열변성, 55 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1분간 annealing, 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2분간 primer extension조건으로 30회 반복으로 반응시켜서 DNA를 PCR증폭시켰다. 김의 nuclear small rDNA를 증폭하기 위해서는 upper primer로 5'-AA-CCTGGTTGATCCTGCCAGT-3', down primer로는 5'-TGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC-3'을 사용하여 PCR반응시켰다(Fig. 5)(17).



**Fig. 4. Restriction digestion of total DNA from *Porphyra yezoensis*.**  
Lane 1, Molecular marker( $\lambda$ /HindIII); Lane 2, total DNA/PstI; lane 3, total DNA/KpnI.



**Fig. 5. PCR amplification of a nuclear small rDNA from *Porphyra*.**  
Lane 1, Molecular marker( $\lambda$ /HindIII); Lane 2, Amplified nuclear small rDNA of *Porphyra tenera*; lane 3, Amplified nuclear small rDNA of *Porphyra tenera*

**Agarose gel 전기영동**

핵산시료 10 $\mu\text{l}$ 에 loading dye buffer 2 $\mu\text{l}$ 를 첨가하여 0.5X TAE buffer에 담겨진 0.8% agarose gel에 loading하여 전기영동(50V)을 한 후에, ETBr(1 $\mu\text{g/ml}$  농도)로 20분간 염색하여 DNA를 확인하였다. PCR products DNA는 1.5% agarose gel 전기영동을 실시하여 확인하였다.

## 결과 및 고찰

### Isopropanol농도 결정 및 procedure의 개선

본 실험에 사용했던 완충액은 기존의 다른 방법과는 달리 고농도의 sodium acetate(최종 농도 1.5M)를 사용하기 때문에 염처리 이후 발생할 염 불순물 오염을 처음부터 예상하였다. 따라서 핵산 침전시의 유기용매(isopropanol)의 농도가 순수한 핵산추출에 결정적인 요소일 것으로 이해하고 그 대책으로 유기용매의 농도를 조절하였다. 이 sodium acetate는 김으로부터 DNA추출시 항상 문제를 일으키는 다당류를 제거하기 위해서 도입된 과정이다. 그러나 이 염 처리후에 잔존오염문제를 일으키게 되는 것이다. 이러한 염오염을 제거하는 방법으로 isopropanol의 농도조절을 시험하였던 것이다. 문헌(13)에 따라서 1.0volume 농도의 isopropanol을 처리하였을 때에는 PCR 증폭에서는 좋은 결과를 가져왔지만, polyphenol 또는 염의 오염은 여전히 문제로 남아 있었다. 따라서 이 문제를 해결하기 위해서 추출 완충액에 1% PVP-40을 첨가하여 polyphenol 오염문제를 해결한 후에, isopropanol 농도를 변화시켜 가면서 시험해 본 결과, 핵산의 yield 및 당오염도, polyphenol 오염 제거에서 뚜렷한 개선을 가져온다는 사실을 발견하였다. 즉 시험해 본 농도중 0.2volume isopropanol 농도가 가장 효과적인 DNA yield와 순수 정제기능을 보여주었다(Table 1, Fig. 1).

Isopropanol 농도 조절외에, 순수한 핵산정제 방법을 만드는 과정에서 *Gelidium*이 아닌 김에 적용하는 protocol로 확립하기 위해서 모델 protocol로부터  $\beta$ -mercaptoethanol 첨가량을 변화적용시켰고(Fig. 2), 김으로부터의 핵산 추출 protocol들에서는 사용되지 않았던 chloroform/isoamylalcohol 처리과정을 도입하였고, 완충액의 조성을 바꾸었고, 또 염의 성분을 새로 구성하였다. 특히 sodium acetate처리는 다른 protocol에서는 핵산의 침전을 위한 시약으로 사용한 것이었으나, 본 protocol에서는 다당류 불순물 제거 목적으로 처리하였다는 것이 기존의 방법들과 그 의미가 다르다. 또 isopropanol 처리후  $-70^{\circ}\text{C}$  incubation으로 온도 처리를 변화시켰다(Fig. 2).

### 핵산의 수율(yield)과 순수도

이 방법을 사용하여 *P. tenera*, *P. yezoensis*의 염체로부터 total DNA 추출을 시험하였다. 25kb정도의 길이를 가진 핵산을 계속적으로 분리해 낼 수 있었으며(Fig. 3), 평균 수율은 건조염체 53 $\mu\text{g}$  내외였다. 이 DNA수율은 DNA를 사용하는 작업시 충분한 양으

로서 기존의 DNA분리 방법들(4,12)과 비교할 때 높은 수율로 나타났다. 단백질 오염제거에 있어서도 오염도 지표인  $A_{260}/A_{280}$ 값이 평균 1.89정도로 나타나서 기존의 방법들(4,12)과 비교할 때 개선되었다(Table 1). 또 polyphenol 오염제거에 있어서도 오염도 지표인  $A_{260}/A_{230}$ 값이 기존의 방법들과 비교할 때 뚜렷이 개선되었다(Table 1). 그러나 해조류 핵산 분리시 가장 큰 문제는 점액성 당오염의 문제인데 본 실험에 앞서 기존의 정제 방법(Phenol사용, CTAB사용, 2-butoxyethanol사용)을 시험해 본 결과 점액성 당오염 문제를 해결할 수 없었으나, 본 실험의 방법을 사용하였을 때 효과적으로 해결되었고, 기존의 방법들과 비교해 볼 때 뚜렷이 전체 당 함량이 감소되었다(1.0mg/1g 건조중량 vs. 0.108mg/1g 건조중량)(7).

### 제한효소처리

본 방법으로 추출된 DNA를 이용하여 여러가지 제한효소로 처리해 한 후, 제한효소(PstI, KpnI)로 처리한 결과 염색체가 효과적으로 절단되었다(Fig. 4). 김에서는 염색체 분리 및 partial digestion이 힘들기 때문에 김에서는 아직 genomic library를 작성되지 못하고 있다. 그러나 최근 일본의 Saga group(12)이 초고속 원심 분리방법과 CTAB방법을 혼용하여 genomic library작성 작업을 할 수 있을 정도의 순수한 염색체 DNA를 뽑는데 성공하였다는 보고가 있었으나, 아직도 이 방법이 가지고 있는 결점, 즉 시간 및 경비가 많이 소요된다는 점과 DNA의 손실이 크다는 점이다. 그것에 비교할 때에도 본 핵산 추출방법은 아주 적은 시간과 비용으로 효과적으로 염색체를 분리할 수 있도록 개선되었다(Fig. 3).

### PCR 증폭반응

완성한 핵산분리방법을 사용해서 김으로부터 DNA를 분리 정제한 후, 18S rRNA gene을 증폭했을 때(Fig. 5) *P. tenera*에서는 그분자 크기가 2.3kb 정도이었다. 통상 크기는 1.8kb 정도이나(18), *P. tenera*의 18S rDNA가 크게 다른 이유는 rDNA부분에 하나의 intron이 존재하기 때문이었다는 것을 문헌에서 밝혀낼 수 있었다(19). 이들 intron은 주로 group I intron으로서 길이가 500bp 정도가 되며, self-splicing을 행하는 intron이다.

다른 문헌에 의하면(19) 김이 생산되는 지리적 분포에 따라서 김에 존재하는 intron의 길이가 달라진다고 하는 보고가 있다. 그러나 한국산 김에 대한 rDNA 연구는 되어있지 않아서 앞으로 rDNA분석을 계속 추진

하여 완성했을 때 이러한 접근이 김의 분류에 있어서 새롭고 정확한 분자분류의 방법으로 확립될것이다.

이미 효모나 식물을 분류할 때에는 rDNA부분을 증폭하여 염기서열을 결정하여 분자수준에서 분류하는 방법이 시도되어 왔다. 그 배경이 될 수 있는 이유로는 rDNA의 염기서열이 종에 따라서 또는 종내에서도 다양한 변이율을 나타내는 부분이 있다는 점이다. 동시에 그 염기수도 충분히 풍부하여 분류 지표로의 충분한 정보량을 확보할 수 있는 장점을 지니고있기 때문이다. 그러나 김에서는 rDNA를 증폭하여 염기서열을 결정한 자료는 지극히 한정되어 있고, 한국산 김종에 대한 연구 즉 rDNA분석에 의한 분자수준의 정확한 분류는 전무한 상태이다. 따라서 본 실험실에서는 18S rDNA부분을 PCR증폭하는데 성공하였으므로, 이렇게 증폭된 PCR product를 sequencing하여 염기 서열변이에 대한 정보량을 얻은 다음에 김의 분류에 적용하려한다(17,20,21). 그렇게 한다면 한국산 김종의 분자 분류에 앞으로 중요한 자료가 되리라 확신한다.

다수종 김에의 적용시험

이 방법을 사용해서 김속중 불순물 문제가 특히 심한, 방사무늬김의 DNA추출에 시험해 본 결과 순수한 핵산 분리가 성공되었으며(Fig. 3). 동시에 일반적으로 김으로부터 DNA를 정제할 때마다 문제를 일으키는 nuclease들의 영향도 제거되어 안정된 DNA를 얻을 수가 있었다. 또한 DNA작업에 유용한 size인 25kb 정도의 고분자 핵산 분리가 가능하였다(Fig. 3).

이어서 다양한 김의 종류에서 이 방법의 DNA 순수 분리 가능성을 확인하여 보았다. 그 결과를 볼 때 기존의 방법인 CTAB방법과 비교할 때 순수도 및 DNA 안정성에서 크게 개선되었음이 입증되었다(Fig. 6). 즉 CTAB방법과 비교했을 때 기존의 방법에서는 각종 불순물의 오염을 나타냈었고, 그 중에서도 모무늬돌김과 긴잎돌김에서 가장 큰 불순물 오염문제를 나타낸데에 비교할 때, 본 방법은 모무늬돌김, 긴잎돌김에서도 월등히 개선된 순수한 DNA 분리능을 보여주었다(Fig. 6). 따라서 핵산을 정제하기 위하여 새로 개발한 이 protocol은 앞으로 점액성 다당류 문제와 polyphenol 불순물 오염문제가 큰 세포들 특히 김속의 세포로 핵산을 분리하는데 유용한 방법이다. 이 protocol을 다양한 김속외에도 같은 불순물 오염 문제를 가지고 있는 여타의 해조류들로부터 핵산을 추출하는데도 유용한 방법이 될 것이다.

이 protocol은 기존의 방법들에 비교할 때 핵산의 순수정제도가 크고, 소요시간이 단축되고(소요시간 3시

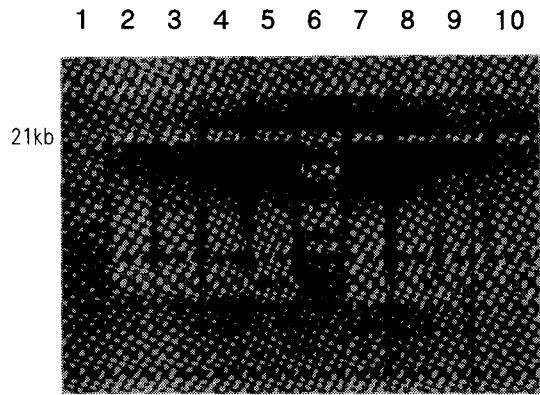


Fig. 6. Photography of genomic DNA in *Porphyra*. Lane 1, 6, Marker( $\lambda$  DNA/EcoRI + Hind III); Lane 2, 3, *Porphyra tenera* genomic DNA; lane 4, 5, *Porphyra yezoensis* Genomic DNA; lane 7, 8, *Porphyra seriata* Genomic DNA; lane 9, 10, *Porphyra pseudolinearis* Genomic DNA.

간), 경제적이어서, 앞으로는 이제까지 어려움을 안고 있던 해조류 핵산 분리 및 정제에 기여할 수 있다고 기대한다. 아직 방사무늬돌김의 genomic DNA library는 국내외에 있어서 미완성 단계에 있으므로, 앞으로 본 실험실에서는 이 정제 방법을 이용하여 순수한 RNA를 분리한후에 cDNA library작성을 추진 중에 있다.

요 약

순수한 핵산 분리가 어려운 김종에서 염색체를 정제하는 효과적이고 시간이 적게 소요되는 방법을 개발하였다. Isopropanol 농도를 조절하고 각 step의 protocol을 새로 작성한 결과 정제된 핵산의 총 당오염도가 유의성있게 줄었고(탄수화물 : 1.0mg/1g 건조중량(7) vs. 0.108mg/1g), 단백질 오염도도 개선되었으며( $A_{260}/A_{280}$ : 1.89), polyphenol화합물 오염도도 크게 개선( $A_{260}/A_{230}$ : 1.60)할 수 있었다. 또 이 방법으로 정제한 DNA를 사용했을 때, 일반적으로 분자분류에 사용하는 small nuclear DNA를 증폭하기 위해 기존의 상동성있는 primer를 사용하여 PCR 증폭한 결과 약 500bp의 intron을 갖는(18) 2.3kb정도의 PCR product를 얻었다. 김에서 핵산을 정제할 때에는 불순물 오염정도(다당류오염, polyphenol화합물 오염, 이차 대사산물 오염 등)가 김엽체부위, 성장시기 등에 따라서 상이하므로 건조된 염체중장기간(1년 이상) 보관된 염체를 무작위적으로 섞어서 시료로 사용하면서 이 DNA정제방법이 모든 김종류에 유용하게 쓰여질 수 있는지 확인하기 위해서 다양한 종류의 김으로부터 DNA를 정제해 보았을 때 특히 가장

불순물 오염도가 크고, 핵산정제가 어려운 긴잎돌김, 모뫼늬돌김에서도 시험한 결과 순수한 DNA를 정제할 수 있었다(Fig. 6).

### 감사의 글

본 논문은 농림부에서 시행한 농림특정연구사업의 연구결과입니다. 이에 깊이 감사드립니다.

### 문헌

- Bold, H. C. and Wynne, M. J. : Introduction to the algae. Structure and Reproduction. Prentice-Hall, New Jersey, p.454(1978)
- Chung, C. H., Kwon, O. C., Lee, Y. M. and Lee, S. Y. : An improved method for isolating high quality polysaccharide-free RNA from tenacious plant tissue. *Mol. Cells*, **6**, 108(1996)
- Coleman, A. W. and Goff, L. J. : DNA analysis of eukaryotic algae species. *J. Phycol.*, **27**, 463(1991)
- Kitade, Y., Yamazaki, S. and Saga, N. : A method for extraction of high molecular weight DNA from the macroalga *Porphyra yezoensis*(Rhodophyta). *J. Phycol.*, **32**, 496(1996)
- Mayes, C., Saunders, G. W., Tan, I. H. and Druhl, L. D. : DNA extraction methods for Kelp(Laminariales) tissue. *J. Phycol.*, **28**, 712(1992)
- Saunders, G. W. : Gel purification of red algal genomic DNA : an inexpensive and rapid method for the isolation of polymerase chain reaction-friendly DNA. *J. Phycol.*, **29**, 251(1993)
- Manning, K. : Isolation of nucleic acids from plants by differential solvent preparation. *Anal. Biochem.*, **195**, 45(1991)
- 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)
- 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)
- Parson, T. J., Maggs, C. A. and Douglas, S. E. : Plastid DNA restriction analysis links the heteromorphic phases of an apomitic red algal life history. *J. Phycol.*, **26**, 495(1990)
- 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)
- Hong, Y., Coury, D. A., Polne-Fulmer, M. and Gibor, A. : Lithium chloride extraction of DNA from the seaweed *Porphyra perforata*(Rhodophyta). *J. Phycol.*, **28**, 717(1992)
- Alberto, F., Santos, R. and Leitao, J. M. : DNA extraction and RAPD markers to assess the genetic similarity among *Gelidium sesquipedale*(Rhodophyta) populations. *J. Phycol.*, **33**, 766(1997)
- Cenis, J. L. : Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Res.*, **20**, 2380(1992)
- Kochert, G. : Carbohydrate determination by the phenol-sulfuric acid method. In "Handbook of phycological methods. Vol. II. Phycological and biochemical methods" Hellebust, J. A. and Craigie, J. S.(eds), Cambridge University Press, Cambridge, p.95(1978)
- Su, X. and Gibor, A. : A method for RNA isolation from marine macro-algae. *Anal. Biochem.*, **174**, 650(1988)
- Innis, A. M., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. and White, T. J. : PCR Protocols, A guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, p.307(1990)
- Stiller, J. W. and Waaland, J. R. : Molecular analysis reveals cryptic diversity in *Porphyra*(Rhodophyta). *J. Phycol.*, **29**, 506(1993)
- Oliveira, M. C. and Ragan, M. A. : Variant forms of a group I Intron in nuclear small-subunit rRNA genes of the marine red alga *Porphyra spiralis* var. *amplifolia*. *Mol. Biol. Evol.*, **11**, 195(1994)
- Patway, M. and Van der Meer, J. P. : Application of RAPD markers in examination of heterosis in *Gelidium vagum*(Rhodophyta). *J. Phycol.*, **30**, 919(1994)
- 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)

(1998년 8월 19일 접수)