

Lactobacillus spp.로부터 RNA 추출을 위한 신속/간단한 방법

오은택·최민지·윤현식·*소재성
인하대학교 생물공학과, 초정밀 생물분리기술연구소
(접수 : 2002. 3. 28., 게재승인 : 2002. 5. 27.)

Simple/Rapid Method for RNA Preparation from *Lactobacillus* spp.

Eun Taex Oh, Min Ji Choi, Hyun Shik Yun, and Jae-Seong So*

Department of Biological Engineering and Center for Advanced Bioseparation Technology, Inha University, Incheon 402-751, Korea

(Received : 2002. 3. 28., Accepted : 2002. 5. 27.)

Lactobacillus spp. are Gram-positive bacteria playing important roles in human health. In this study, we successfully isolated the total RNA from the cells broken by glass beads using hot phenol method. Moreover, we were able to omit lysozyme and proteinase K treatment by using glass beads to break cell more efficiently. This method was more rapid and simple when compared to the previous one. Prepared RNA can be used for the transcriptional analysis of *Lactobacillus* spp.

Key Words : *Lactobacillus* spp., RNA preparation

서론

Lactobacillus spp.는 건강한 여성의 질내에 정상 세균총으로 존재하며 여러 병원성 미생물의 성장을 억제하는 물질을 생산하는 것으로 알려져 있다. 이러한 항균물질에는 과산화수소(H₂O₂)와 글리코젠의 발효에 의해 생산된 산이 있다. 이로써 *Lactobacillus* spp.는 질내부를 산성화하면서(pH>5.0) 우점균으로 존재하여 기회성 감염을 억제하게 된다(1).

본 연구팀에서는 질염치료용 생균제 개발을 목적으로 지난 수년간 *Lactobacillus* spp.를 건강한 여성의 질 내에서 분리하였다(2). 나아가 분리균주 중 하나를 16S rRNA 분석에 의해 *L. crispatus*를 동정하였으며 KLB46으로 명명하였다. 균주동정을 위한 16S rRNA의 분석을 위해 genomic DNA의 분리는 필수적이다. 이전 연구에서 본 연구팀은 *Lactobacillus* spp.의 genomic DNA 분리에 관하여 보고한 바 있다(3). 그러나 시료의 수량이 많을 경우는 이 방법은 적당치 않다. 따라서 보다 간단하고 단시간에 경제적으로 DNA의 분리가 필요하다. 또한 *Lactobacillus* spp.의 RNA의 분석을 위해 신속/간단한 RNA 분리방법이 필요하다. 본 연구에서는 세포벽이 상대적으로 견고한 *L. crispatus* KLB46을 대상으로 glass bead

를 이용한 세포파괴 방법을 통하여 lysozyme과 proteinase K 처리방법을 배제함과 동시에 핵산(DNA, RNA)을 보다 경제적으로 빠른 시간 안에 분리하는 방법을 확립하였다.

재료 및 방법

DNA 분리를 위해 *L. crispatus* KLB46을 50 mL MRS 배지(ammonium citrate 2 g/L, L-cystein hydrochloride 0.3 g/L, lactose 10 g/L, FeSO₄ 35 mg/L, MgSO₄ 575 mg/L, MnSO₄ 120 mg/L, KH₂PO₄ 3 g/L, tryptose 10 g/L, Tween-80 1 g/L, yeast extract 5 g/L, pH 7.0)(4)에서 8시간 동안 배양 후 각 5 mL씩 원심분리(15,000 rpm, 5 min)에 의해 세포를 수거하였다. 수거한 세포는 800 μL의 TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA)에 현탁한 후 1.5 mL의 microtube로 옮겼다. 세포벽을 분해하기 위하여 glass bead (425~600 μm, Sigma Chemical Co., USA) 0.4와 0.8 g을 각각 세포 현탁액에 첨가하여 시간간격(1, 3, 그리고 5분)을 두고 vortex하여 세포벽의 파괴에 따른 DNA 분리의 최적화를 수행하였다. 파괴된 세포현탁액은 상온에서 원심분리(15,000 rpm, 5 min)하였다. 원심분리한 시료들의 상등액 600 μL을 취하여 같은 부피의 phenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1) (Sigma) 혼합한 후 원심분리하였다(15,000 rpm, 5 min). 층분리가 이루어진 시료들의 상층부를 550 μL 취하여 같은 부피의 chloroform을 첨가하여 혼합한 후 원심분리하였다(15,000 rpm, 5 min). 층분리가 이루어진 시료들의 상층부를 500 μL 취한 후 3 M sodium acetate 50 μL(1/10 vol.)와 두 배 부피의 100% etha-

* Corresponding Author : Department of Biological Engineering and Center for Advanced Bioseparation Technology, Inha University, Incheon 402-751, Korea
Tel : +82-32-860-7516, Fax : +82-32-875-0827.
E-mail : sjaseon@inha.ac.kr

anol을 첨가하여 -20°C 에서 10분간 DNA를 침전시켰다. 각 시료를 원심분리한 후(15,000 rpm, 10 min) DNA를 진공건조기에서 건조시킨 다음 $10\ \mu\text{L}$ 의 RNase (10 mg/mL stock solution)와 $50\ \mu\text{L}$ TE buffer에 현탁하였다. 각 시료는 37°C 에서 1 시간 보관 후 4°C 에서 보관하였다.

분리된 DNA를 이전 연구방법(3)으로 분리한 DNA시료와 비교하여 제한효소에 의한 소화 그리고 PCR에 문제가 없는지 실험을 수행하였다. PCR을 위해 16S rDNA의 universal primer인 UNI1 (5'-CCC AAG CTT AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')과 UNI2 (5'-ACG CGT CGA CAA GGA GGT GAT CCA GCC -3')를 이용하였다. 이 primer는 대부분의 미생물에서 16S rDNA의 보편적인 부분에 상보적인 sequence를 가지고 있어 거의 모든 bacteria의 16S rDNA의 증폭에 이용 가능하다(5). PCR은 preheating 94°C (5 min), denaturation 94°C (1 min), primer annealing 56°C (30 sec), polymerase extension 72°C (2 min), final elongation 72°C (5 min)의 조건에서 35 cycles의 반응을 수행하였다.

RNA 분리를 위해서 5 mL의 세포배양액을 원심분리(15,000 rpm, 5 min) 후 lysis solution $800\ \mu\text{L}$ (2.7 g/L sodium acetate, 5 g/L SDS, 0.34 g/L EDTA, pH 5.5)에 현탁 후 세포벽 파괴를 위해 glass bead 0.4, 0.8 g을 첨가 후 3분간 vortex하였다. 각 시료들을 원심분리 후 상등액 $500\ \mu\text{L}$ 를 취하여 같은 부피의 68°C 에 보관되어 있는 saturated phenol (pH 5.5)과 혼합한 후 68°C 를 유지하며 5분간 천천히 섞어 주었다. 각 시료들을 원심분리 후(15,000 rpm, 5 min) 상등액 $450\ \mu\text{L}$ 를 취하여 같은 부피의 chloroform을 혼합한 후 20초간 vortex하고 원심분리하였다. 층분리된 각 시료의 상층부를 $400\ \mu\text{L}$ 취하여 DNA 분리와 같은 방법으로 침전시킨 후 진공건조기에서 건조시켰다. 건조시킨 RNA는 dH_2O $5.5\ \mu\text{L}$ 에 현탁 후 RNA denaturation mixture ($50\ \mu\text{L}$ $10\times\text{MOPS}$ [3-N-Morpholino propanesulfonic acid] [0.2 M MOPS, 50 mM sodium acetate, and 10 mM EDTA], $250\ \mu\text{L}$ formamide, $90\ \mu\text{L}$ formaldehyde) (Sigma) $19.5\ \mu\text{L}$ 과 혼합하여 4°C 에 보관하였다. RNA 분리를 위한 모든 용액은 DEPC (Diethyl pyrocarbonate) (Sigma)처리를 하여 RNase의 활성을 제거하였다. 분리된 RNA는 agarose/formaldehyde gel에서 전기영동하였다. Agarose/formaldehyde gel의 준비는 1.5 g의 agarose를 108 mL dH_2O 에 녹인 후 15 mL $10\times\text{MOPS}$ 용액과 27 mL formaldehyde와 혼합하였다. 이 혼합액은 적당량 gel cast에서 준비 후 $1\times\text{MOPS}$ ($10\times\text{MOPS}$ 를 dH_2O 로 희석)를 runnig buffer로 하여 전기영동하였다.

결과 및 고찰

본 연구는 Gram-positive bacteria에서 핵산을 보다 간단하고 빠른시간안에 효율적으로 분리하는데 목적을 두고 있다. 같은 volume의 세포 배양액에서 glass bead의 양과 vortex의 시간을 다르게 하여 DNA를 분리하였을 경우 이전방법으로 분리한 시료에 비하여 0.8 g glass bead 첨가, 3분 이상 vortex한 시료가 gel photography 비교시 우위를 나타내었다(결과 미제시). 그러나 glass bead를 이용한 방법은 gel photography

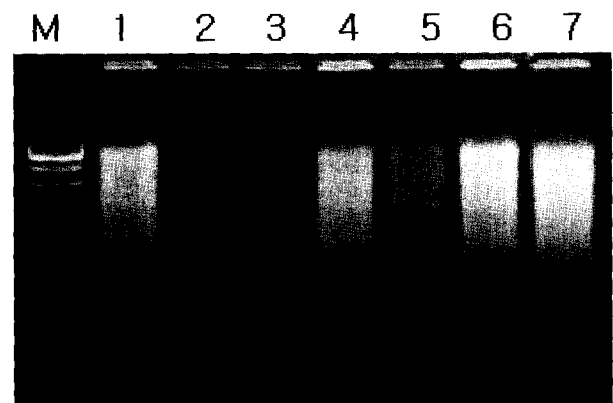


Figure 1. Agarose gel picture of *Pst* I digested genomic DNA; lane 1 is control, lanes from 2 to 4 were added with 0.4 g glass bead, lanes from 5 to 7 were added with 0.8 g glass bead, lane 2 and lane 5 were vortexed for 1 min, lane 3 and lane 6 were vortexed for 3 min, lane 4 and lane 7 were vortexed for 5 min, M lane is size marker $\lambda/\text{Hind III}$.

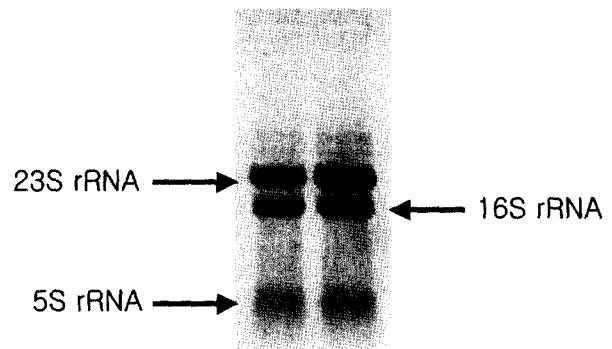


Figure 2. Agarose/formaldehyde gel picture of RNA samples; left lane was vortexed for 1 min, right lane was vortexed for 3 min.

림 현상을 확인할 수 있었다(결과 미제시). 분리된 genomic DNA를 이전 방법에서 분리된 genomic DNA와 비교해 유전자 조작(PCR과 제한효소처리)에 차이가 있는지를 확인하였다. 16S rDNA를 증폭하기 위한 PCR의 정도는 크게 차이가 없음을 확인하였다(결과 미제시). 또한 제한효소 *Pst*I을 처리하여 확인한 결과 문제가 없음을 확인하였다(Figure 1). 시료의 순도(A_{260}/A_{280})는 약 1.75로써(이전 연구방법에 의한 시료는 약 1.7이다.) 크게 떨어지지 않는 것으로 확인하였다. 시료의 순도를 높이기 위해선 실험 절차의 마지막 부분에서 처리한 RNase의 제거로 가능하다. Glass bead를 이용한 방법은 약 2 시간 정도로 수행 가능하며, 지난 연구에서 발표한 방법에서 이용되는 proteinase K와 lysozyme의 처리과정을 배제하여 시간적, 경제적인 면에서 유용한 방법임을 확인할 수 있었다. RNA 분리 과정은 hot phenol RNA 분리방법(6)을 응용한 것이다. Hot phenol method로는 Gram-positive 균주인 *L. crispatus* KLB46가 파괴되지 않았다. 따라서 *Lactobacillus*에는 유용하지 않은 방법임을 확인하였다(결과 미제시). Glass bead를 이용하여 세포벽의 파괴를 확보하고 lysis solution(pH 5.5)에서 DNA의 분해를 유도하여 RNA만 완벽히 분리 가능 하였다(Figure 2). Figure 3에서 gram-positive bacteria에 과하

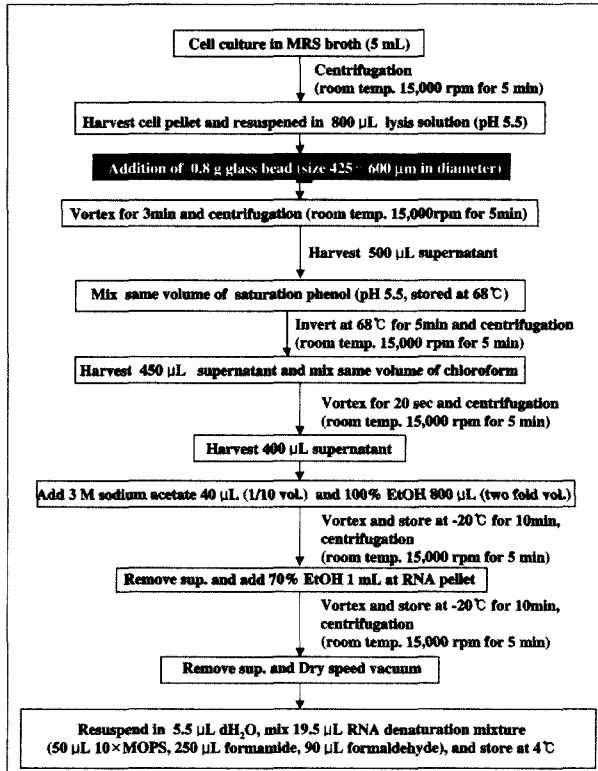


Figure 3. The scheme of rapid RNA preparation method from *Lactobacillus* spp.

RNA 분리방법의 전체적인 수행절차를 요약하였다.

요 약

L. crispatus KLB46는 Gram-positive bacteria로써 인간의 건강에 중요한 역할을 한다. 본 연구에서는 glass bead를 이

용하여 세포벽을 파괴하고 hot phenol RNA 분리방법을 이용하여 RNA를 성공적으로 분리하였다. 또한 lysozyme과 proteinase K 처리과정을 배제하여 시간적, 경제적인 면에서 유용한 방법임을 확인할 수 있었다. Gram-positive bacteria에서 glass bead를 이용한 RNA 분리는 특수한 조건에 의해 전사 되거나 반감기가 짧은 mRNA의 연구에 유용한 방법이라 사료된다.

감 사

본 연구는 인하대학교 생명공학 특성화 사업단과 초정밀 생물분리연구센터의 지원아래 수행되었습니다.

REFERENCES

1. Bruce, A. W. and G. Reid (1998), Intravaginal Instillation of lactobacilli for Prevention of Recurrent Urinary Tract Infections, *Can. J. Microbiol.* **34**, 339-343.
2. Chang, C. E., S. I. Pavlova, L. Tao, E. K. Kim, and J.-S. So (2002), Molecular Identification of Vaginal *Lactobacillus* spp. Isolated from Korean Women, *J. Microbiol. Biotechnol.* **12**, 312-317.
3. Suk-Yong Lee, C. E. Chang, S.-C. Kim, H. S. Yun, and J.-S. So (2000), A Rapid Small Scale Method for Extraction of Genomic DNA from *Lactobacillus* spp., *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **15**, 411-413.
4. De Man, J. C., M. Rogosa, and M. S. Sharpe (1960), A Medium for the Cultivation of lactobacilli, *J. Appl. Bacteriol.* **23**, 130-135.
5. Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier, and D. J. Lane (1991), 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study, *J. Bacteriol.* **173**, 697-703.
6. Laodie, B. M. and A. Ullmann (1990), Virulence Dependent and Independent Regulation of *Bordetella pertussis cya* Operon, *EMBO J.* **9**, 999-1005.