

토양으로부터 genomic DNA의 효과적인 분리

강주형 · 김보혜 · 이선이 · 김영진 · 이준원² · 박영민¹ · 안순철*

부산대학교 의과대학 미생물학 및 면역학 교실, ¹부산대학교 의과대학 미생물학 및 면역학 교실 국가지정 수지상세포 분화 조절 연구실, ²전남대학교 의과대학 유전자제어 의과학연구소

Received October 17, 2005 / Accepted November 7, 2005

Improved Genomic DNA Isolation from Soil. Ju-Hyung Kang, Bo-Hye Kim, Sun-Yi Lee, Yeong-Jin Kim, Ju-Won Lee², Young-Min Park¹ and Soon-Cheol Ahn*. *Department of Microbiology and Immunology, College of Medicine, Pusan National University, ¹National Research Laboratory of Dendritic Cell Differentiation and Regulation, Department of Microbiology and Immunology, College of Medicine, Pusan National University, ²Medical Research Center for Gene Regulation, Medical School, Chonnam National University* – Although valuable microbes have been isolated from the soil for the various productions of useful components, the microbes which can be cultivated in the laboratory are only 0.1~1% of all microbes. To solve this problem, the study has recently been tried for making the valuable components from the environment by directly separating unculturable microbial DNA in the soil. But it is known that humic acid originated from the soil interrupts various restriction enzymes and molecular biological process. Thus, in order to prevent these problems, this study modified the method separated soil DNA with phenol, CTAB and PEG. In order to compare the degree of purity for each DNA and the molecular biological application process, A_{260}/A_{280} ratio, restriction enzymes, and PCR were performed. In case of DNA by the modified method, total yield of DNA was lower but A_{260}/A_{280} ratio was higher than the previously reported methods. It was confirmed that the degree of purity is improved by the modified method. But it was not cut off by all kinds of tested restriction enzymes because of the operation of a very small amount of interrupting substances. When PCR was operated with each diluted DNA in different concentrations and GAPDH primer, the DNA by the modified method could be processed for PCR in the concentration of 100 times higher than by the previously reported separation method. Therefore, this experiment can find out the possibility of utilization for the unknown substances by effectively removing the harmful materials including humic acid and help establishing metagenomic DNA library from the soil DNA having the high degree of purity.

Key words – Soil microbes, genomic DNA, purification, metagenome.

미생물은 지구상에 존재하는 생물 중 약 60%를 차지하고 있는 것으로 알려져 있으며, 지구 생태계를 유지하는데 없어서는 안 될 중요한 역할을 담당하고 있다. 미생물은 또한 고부가가치 생물자원으로서 생명공학 산업의 핵심소재 중의 하나로 널리 이용되고 있기 때문에 현재 이용 가능한 미생물뿐만 아니라 자연계에 존재하는 미지의 신규 유용 미생물 자원은 생명공학 분야의 혁신적 발전의 기틀을 마련하는데 크게 기여할 수 있을 것이다. 그러나 자연계로부터 새로운 미생물을 분리, 배양 및 탐색하는 기술이 꾸준히 개발되고 있음에도 불구하고 새로운 생리활성물질의 발견 빈도는 해마다 점점 감소하고 있다[12,14]. 이는 토양으로부터 미생물을 분리, 배양하고 그 배양액에서 생리활성물질을 분리, 정제하여 구조를 동정하는 기존의 방법이 이미 발표된 생리활성물질에 대한 재발견율이 높기 때문이며 이로 인해 신규 생리활성물질 개발에 대한 막대한 시간과 자금이 요구되고 있는 실정이다.

더욱이 현재 다양한 미생물 종들이 발견되어 이용되고 있지만, 기술적인 한계로 인해 지금까지 알려진 것은 지구상에 존재하는 전체 미생물 중 극히 일부분인 1% 미만에 지나지 않으며 나머지 약 99%의 미생물은 아직까지 미 발견 상태인 채로 자연계에 존재하는 것으로 추정되고 있다[7,11].

이에 토양, 해수, 갯벌, 하천, 대기 그리고 가축의 대장 등 다양한 환경 속에 존재하는 이들 미 발견 미생물들은 대부분 실험실에서 분리, 배양하기가 어려운 난 배양성 미생물이지만 유용물질로의 이용 가능성이 많으므로 이미 1990년대 초부터 항생물질을 생산하는 미생물의 유전체 정보를 활용한 생합성 기작 연구를 통한 새로운 생리활성물질의 개발이 시도되어 왔다[1,2,5,8,10]. 최근에는 항생물질과 2차 대사산물의 다양성을 난 배양성 미생물 DNA의 분리를 통하여 유도하고, 토양에서 분리한 DNA로부터 metagenome library를 구축하여 기존에 알려지지 않은 새로운 화합물을 항생제 및 생리활성물질로 개발하는 연구가 계속 진행되고 있다[3,4,6,9]. 이는 토양에서 분리한 metagenome 내에 포함되어 있는 새로운 효소나 항생제를 생산할 수 있는 유전자를 screening

***Corresponding author**

Tel : +82-51-240-7735, Fax : +82-51-243-2259

E-mail : ahnsc@pusan.ac.kr

하면, 미생물을 직접 분리 배양하지 않거나 배양 불가능한 미생물의 유전자로부터 새로운 효소나 항생제를 찾을 수 있기 때문이다. 그러나 humic acid와 같은 저해물질이 제거되어야만 제한효소나 *Taq* polymerase 등의 처리를 통해 여러 가지 분자생물학적 조절이 가능하기 때문에 이를 위해서 현재 일반적으로 low-melting agarose에 전기영동한 뒤 추출하는 방법, phenol 추출법, CsCl-EtBr 농도 구배 원심분리법과 함께 cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB)와 polyethylene glycol (PEG, M.W 8,000)를 사용하여 제거하는 방법[13,15] 등이 사용되고 있지만, 그 과정이 복잡하고 분리하는데 비용이 많이 드는 단점이 있다.

따라서 본 연구에서는 기존의 토양으로부터 DNA를 분리하는 방법들을 개선하여 각 방법에 의해 분리된 DNA의 농도와 정제도 및 humic acid의 제거 정도를 비교하여 토양 DNA의 손상을 최소화하면서 효율적인 방법으로 분리할 수 있는 기술을 확립하고자 하였다.

실험재료 및 실험방법

토양시료의 채취

토양으로부터 total genomic DNA를 분리하기 위하여 2003년 12월에 금정산에서 각각 다른 장소의 인적이 드문 큰 바위 밑, 오래된 나무뿌리 근처 등 지표에서 30~50 cm 아래로부터 2개의 토양시료를 채취하여 건조시키지 않고 거즈에 걸러서 사용하였고, 2004년 3월에는 금정산의 4곳의 다른 장소에서 동일한 방법으로 토양시료를 채취하여 그늘지고 통풍이 잘 되는 곳에서 하루 건조시킨 후, 거즈로 작은 돌과 나무뿌리, 나뭇잎 등의 이물질을 제거하여 사용하였다.

Tiedje 등의 방법에 의한 토양 genomic DNA의 분리 (15) (Method I)

5 g의 토양시료를 extraction buffer (100 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1.5 M NaCl, 100 mM sodium EDTA [pH 8.0], 1% CTAB, 100 mM sodium phosphate [pH 8.0]) 13.5 ml와 50 μ l proteinase K (10 mg/ml)로 현탁한 후, 30분 동안 37°C에서 교반하여 혼합해 주고, 10% SDS 3 ml을 첨가하여 65°C에서 2시간 반응시켰다. 원심분리(4,000 rpm, 10 min, 4°C) 후, 상등액에 동량의 chloroform/isoamylalcohol (24/1)을 넣고 vortex한 후, 수용액층에 2배량의 70% ethanol을 첨가하여 침전시켰다. 원심분리 후 침전물을 상온에서 10분간 건조시킨 다음, 증류수 500 μ l에 녹여 DNA의 농도를 측정하였다.

Yeates 등에 의한 토양 genomic DNA의 분리(13) (Method II)

5 g의 토양시료를 extraction buffer (100 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1.5 M NaCl, 100 mM sodium EDTA [pH 8.0]) 10

ml와 10% SDS 1 ml를 넣고 현탁한 후, 65°C에서 1시간동안 반응시켰다. 원심분리(4,000 rpm, 10 min, 4°C) 후, humic acid를 제거하기 위해 30% PEG 8,000을 포함한 1.6 M NaCl 용액을 전체 양의 절반만큼 넣고 상온에서 2시간 반응시켰다. 원심분리하여 침전물을 TE buffer 1 ml에 현탁하고 3 M potassium acetate 200 μ l를 넣어 5분 동안 얼음 위에 두었다. 원심분리 후, 상등액에 대해 동량의 phenol/chloroform/isoamylalcohol (25/24/1)를 넣고 vortex 한 뒤, 원심분리하여 상등액에 대해 0.6 volume의 isopropanol을 넣고 상온에서 2시간동안 침전시킨다. 원심분리 후, 증류수 500 μ l에 녹이고 DNA의 농도를 측정하였다.

변형된 방법에 의한 토양 genomic DNA의 분리 (Method III)

5 g의 토양시료를 extraction buffer (100 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1.5 M NaCl, 100 mM sodium EDTA [pH 8.0], 1% CTAB, 100 mM sodium phosphate [pH 8.0]) 13.5 ml과 50 μ l proteinase K (10 mg/ml)로 현탁한 후, 30분 동안 37°C에서 교반하여 혼합해 주고, 10% SDS 3 ml을 넣고 65°C에서 2시간 반응시켰다. 원심분리 (4,000 rpm, 10 min, 4°C) 후, humic acid를 제거하기 위해서 30% PEG 8,000이 포함된 1.6 M NaCl 용액을 전체 양의 1/2만큼 넣고 상온에서 2시간 반응시켰다. 원심분리 후 TE buffer 1 ml로 현탁하고 3 M potassium acetate 200 μ l를 넣어 얼음 안에서 5분 동안 정치하였다. 원심분리 후, 동량의 phenol/chloroform/isoamylalcohol (25/24/1)를 넣고 vortex 한 뒤, 원심분리하여 상등액에 대해 0.6 volume의 isopropanol을 넣고 상온에서 2시간동안 침전시킨다. 원심분리 후, 침전물을 증류수 500 μ l에 녹이고 DNA의 농도를 측정하였다.

토양 genomic DNA의 농도 측정

각 방법을 통해 분리된 토양 DNA의 농도를 확인하기 위해 각 시료에 대해 증류수로 20배 희석한 다음, UV-VIS spectrophotometer (Shimadzu UV-1201)를 사용하여 230 nm, 260 nm, 280 nm에서 각각 흡광도를 측정하였으며, 특히 방법 I에 의해 분리된 토양 DNA는 농도를 고려하여 10²배 혹은 10³배까지 희석하여 측정하였다.

또한 토양에서 분리한 DNA 시료의 농도와 humic acid 제거 및 물리적 손상도를 측정하기 위하여 0.8% agarose gel에서 전기영동을 실시하였다(Fig. 1). 대조구로서 pWHM3 vector 500 ng을 1/3씩 희석하여 사용하였고 방법 I, II, III으로 각각 분리한 토양 DNA를 역시 증류수로 1/3씩 희석하여 확인하였다.

제한효소 처리

각 분리방법에서 분리한 genomic DNA를 여러 가지 제한효소로 처리하여 분자생물학적 기술의 적용 가능성을 검토하

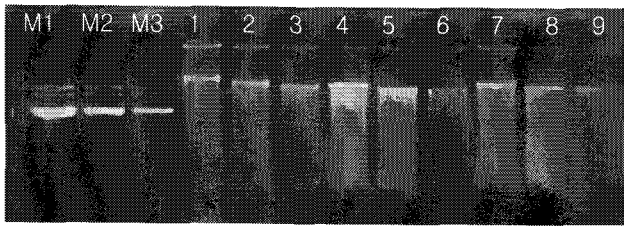


Fig. 1. The separated results to 0.8% agarose gel electrophoresis of the soil DNA isolated by the different methods.
 Lane M1, M2, M3 : pWHM3 100 ng, 30 ng, 10 ng.
 Lane 1, 2, 3 : 10 µl of original, 3⁻¹, 3⁻² diluted DNA by Method I.
 Lane 4, 5, 6 : 10 µl of original, 3⁻¹, 3⁻² diluted DNA by Method II.
 Lane 7, 8, 9 : 10 µl of original, 3⁻¹, 3⁻² diluted DNA by Method III.

였다. 각각의 DNA를 *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III 등의 제한효소를 처리하여 37°C에서 1시간 동안 반응하여 절단되는 지 여부를 0.8% agarose gel에서 전기영동을 실시하여 확인하였다.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

각 분리방법에서 분리한 토양 DNA의 PCR 적용 여부를 확인하기 위하여 토양에 존재하는 다양한 미생물의 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 유전자를 기초로 하여 primer를 디자인 하였다 (Table 1). PCR은 각각의 토양 DNA를 10⁻²~10⁻⁵의 농도로 1/10씩 희석하여 94°C에서 1분, 57°C에서 30초, 72°C에서 1분의 조건으로 30 cycle을 수행하였으며, 각 product를 2% agarose gel에서 전기영동을 실시하여 product를 확인하였다.

결 과

토양시료의 채취

채취한 토양시료의 pH를 확인하기 위해 토양 5 g을 증류

수 10 ml에 현탁하여 원심분리하고 그 상등액의 pH를 측정하였다. 토양의 표층으로부터 30~50 cm 깊이의 토양을 채취했음에도 불구하고 채취한 토양의 pH가 3.75~4.71로서 산성 토양임을 보여 주고 있다(Table 2).

토양 DNA 분리법의 비교

2003년도에 채집한 토양 시료 1과 2를 대상으로 각각의 분리 방법을 적용한 결과, DNA 회수율과 정제도는 큰 차이를 나타내었다(Table 3과 4). 방법 I은 CTAB를 첨가하여 humic acid와 같은 화합물 제거를 시도한 방법으로서 DNA 회수율은 토양 5 g당 5080 µg과 5875 µg으로서 상당히 높은 편이었으나 정제도(A₂₆₀/A₂₈₀)는 1.214와 1.218로 대체로 낮은 편이었다. 방법 II는 PEG와 NaCl 및 potassium acetate 침전을 실시하여 정제도의 향상을 기대했으나, 예상과 달리 방법 I에 비해 DNA 회수율도 278 µg과 532 µg으로 낮으면서 정제도도 1.173과 1.197로서 더 낮았다. 그리고 방법 III의 경우, DNA 회수율은 521 µg과 1028 µg으로서 방법 I에 비해 10~20% 정도로 낮은 편이었으나 정제도는 1.359와 1.375로 3

Table 2. The pH values of the soil samples collected at Gumjeong mountain

Year	2003			2004		
Soil	Soil 1	Soil 2	Soil 3	Soil 4	Soil 5	Soil 6
pH	4.71	4.21	4.50	3.75	4.25	4.42

Table 3. Isolation results of genomic DNA from Soil 1 collected at Gumjeong mountain

Method	O.D			Ratio		DNA yield (per 5 g)
	A ₂₃₀	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	
I	0.203	0.203	0.168	1.000	1.214	5080 µg
II	0.527	0.555	0.473	1.053	1.173	278 µg
III	0.861	1.041	0.766	1.209	1.359	521 µg

Method I, method of Tiedje *et al.*; II, method of Yeates *et al.*; III: our modified method.

Table 1. Diagrams of GAPDH primers for PCR of soil DNA

<i>Escherichia coli</i> :	TCCTTTCCAAACGCTTCCTTCACCAACCAACTGTT
<i>Zymomonas mobilis</i> :	TCCTTTCCAAACGCTTCCTTCACCAACCAACTGTT
<i>Kluyveromyces sp.</i> :	TCCTTTCCAAACGCTTCCTTCACCAACCAACTGTT
<i>Streptomyces sp.</i> :	TCCTTTCCAAACGCTTCCTTCACCAACCAACTGCG
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> :	TCCTTTCCAAACGCTTCCTTCACCAACCAACTGTT
<i>Bacillus sp.</i> :	TCCTTTCCAAACGCTTCCTTCACCAACCAACTGCC
Forward primer :	5'-TTTCCAAACGCTTCCTTCACCAACCAACTG-3'
<i>Escherichia coli</i> :	ACCGGTTTTCGTGTGTGTACCAGGAAAC
<i>Zymomonas mobilis</i> :	ACCGGTTTTCGTGTGTGTACCAGGAAAC
<i>Kluyveromyces sp.</i> :	ACCGGTTTTCGTGTGTGTACCAGGAAAC
<i>Streptomyces sp.</i> :	ACCGAATTCGTGTGTGTACCAGGAAAC
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> :	ACCGAATTCGTGTGTGTACCAGGAAAC
<i>Bacillus sp.</i> :	ACCGAATTCGTGTGTGTACCAGGAAAC
Reverse primer :	5'-TTCGTTGTGTGTACCAGGAAAC-3'

Table 4. Isolation results of genomic DNA from Soil 2 collected at Gumjeong mountain

Method	O.D			Ratio		DNA yield (per 5 g)
	A ₂₃₀	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	
I	0.215	0.235	0.193	1.093	1.218	5875 µg
II	0.949	1.064	0.889	1.121	1.197	532 µg
III	0.311	0.411	0.299	1.322	1.375	1028 µg

Method I, method of Tiedje *et al.*; II, method of Yeates *et al.*; III: our modified method.

가지 방법 중 가장 높게 나타났다. 한편 agarose gel 전기영동을 통해 각 시료를 비교한 결과, 분리방법에 따른 DNA 간의 농도 차이는 보이지 않았는데, 이는 가장 높은 회수율을 보인 방법 I로 분리한 DNA의 경우, 저분자 부분에 다량 존재하는 RNA나 humic acid로 추정되는 이물질이 흡광도에 영향을 주었기 때문이다. 이상의 결과를 토대로 본 연구진에서 확립한 방법 III이 기존의 방법들에 비해 더 효율적인 것으로 판단하였다.

변형된 방법에 의한 토양 DNA의 분리

클로닝이 가능한 genomic DNA를 토양으로부터 분리하기 위하여 상기의 결과에서 선정된 방법 III을 이용하여 2004년도에 채집한 토양 시료 3~6을 대상으로 genomic DNA 분리를 실시하였다. 분리된 DNA의 회수율은 토양 5 g당 463~785 µg이었고, 정제도는 1.528~1.655 정도로 각각 확인되었는데(Table 5), 이는 전 단계 실험에 비해서 회수율은 유사하였지만, 정제도가 월등히 높게 나타난 것으로서 2003년도 시료는 거즈로 단순히 거르기만 한 것에 비해 2004년도 시료는 그늘지고 통풍이 잘 되는 곳에서 하루 건조시킨 후, 거즈로 작은 돌과 나무뿌리, 나뭇잎 등의 이물질을 제거하는 등 전처리를 충분히 해 준 것도 일부 요인으로 작용했을 것으로 판단되었다.

분리된 토양 DNA의 분자생물학적 검증

우선 각 시료에 대한 PCR 적용 여부를 확인한 결과, Fig. 2에서와 같이 방법 III으로 분리한 genomic DNA를 10⁻³~10⁻⁶의 농도로 희석했을 때에만 약 350 bp 크기의 product를 확인할 수 있었는데 이는 DNA 시료의 희석과정을 통해 humic acid와 같은 저해물질들 역시 충분히 희석되어 PCR 만

Table 5. Isolation results of the soil genomic DNA with our modified Method III

Method	O.D			Ratio		DNA yield (per 5 g)
	A ₂₃₀	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	
Soil 5	0.520	0.925	0.559	1.779	1.655	463 µg
Soil 6	0.911	1.381	0.874	1.516	1.580	785 µg
Soil 7	0.824	1.215	0.795	1.475	1.528	691 µg
Soil 8	1.128	1.160	0.732	1.028	1.585	608 µg

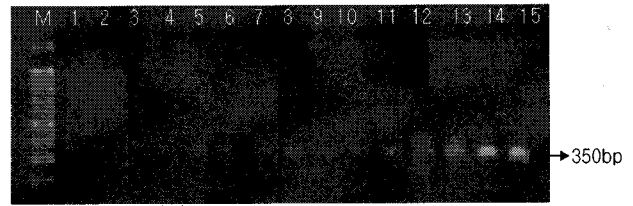


Fig. 2. PCR results of the soil genomic DNA with GAPDH primer.

Lane M: 100 bp size marker.

Lane 1, 2, 3, 4, 5: 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ diluted DNA by Method I.

Lane 6, 7, 8, 9, 10: 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ diluted DNA by Method II.

Lane 11, 12, 13, 14, 15: 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ diluted DNA by method III.

Table 6. Results of restriction digestions of the soil DNA isolated by the different methods

Method	EcoRI	HindIII	XhoI	Sall	SacI	Sau3AI	KpnI	BamHI
I	-	-	-	-	-	-	-	-
II	-	-	-	-	-	-	-	-
III	-	-	-	-	-	-	-	-

응을 저해시키지 못한 것으로 판단되었다. 그러나 토양 DNA를 클로닝 하는데 필요한 6 bp를 인식하는 BamHI, EcoRI, HindIII, KpnI, SacI, Sall, XhoI 등의 제한효소와 4 bp를 인식하는 Sau3AI 등의 제한효소를 처리한 결과, 각 분리방법에 의해 분리된 토양 DNA는 본 연구에서 사용된 모든 제한효소에 의해 절단되지 않았다 (Table 6).

상기의 결과들을 통해 토양에 미량 존재하는 humic acid와 같은 물질들이 상당한 저해 작용을 하는 것으로 확인되었으므로 토양 DNA를 분자생물학적 기술에 적용하기 위해서는 반드시 정제과정을 통해 저해물질의 제거가 필요할 것으로 사료된다.

고 찰

본 연구에서는 토양으로부터 클로닝이 가능한 genomic DNA를 분리하기 위하여 제한효소 단편 DNA 제작에 저해 작용을 하는 humic acid 등의 저해 물질 제거와 함께 토양 무게 당 획득물을 최적화하기 위한 여러 가지 분리 방법들이 시도되었다. 우선 토양에서 genomic DNA를 분리하는 방법으로서 기존에 널리 이용되고 있는 방법 I은 1%의 CTAB와 2% SDS가 포함된 DNA extraction buffer를 사용하여 미생물의 세포벽과 세포막을 용해하여 DNA를 추출하는 것으로서 DNA 회수율이 높은 것으로, 방법 II는 PEG와 NaCl 및 potassium acetate 침전을 실시함으로써 DNA의 정제도가 높은 것으로 각각 알려져 있다. 본 연구진에서는 이를 토대

로 토양 DNA를 분리하는데 있어 좀더 효율적으로 DNA 회수율과 정제도를 높이고, humic acid와 같은 저해물질을 제거하는 방법 III을 시도하였다. 이를 타 방법들과 비교하기 위하여 금정산에서 채취한 토양 1과 토양 2에 대해 각 분리 방법을 이용하여 genomic DNA를 분리한 후, spectrophotometer와 agarose gel 전기영동을 이용하여 분리된 DNA의 회수율, 정제도 및 저해 물질의 제거 정도를 비교하였다. 방법 I은 CTAB를 사용하여 humic acid와 같은 화합물을 제거한 방법으로 DNA 회수율은 높았으나 정제도가 낮은 것으로 보아 실질적으로 RNA나 humic acid로 추정되는 이물질이 흡광도를 증대시켜 DNA 양이 높은 것처럼 보이는 것으로 판단되었고, 방법 II는 PEG와 NaCl 및 potassium acetate 침전을 사용하여 분리한 결과로서, DNA 회수율과 정제도가 다른 분리방법에 비해 낮게 나타났다. 그에 비해 방법 III의 경우, DNA 회수율은 타 분리방법과 유사하였으나 정제도는 더 높은 것으로 나타났는데 이는 CTAB, PEG, phenol/chloroform/isoamyl alcohol 처리를 통해 humic acid와 같은 화합물의 제거가 잘 된 것으로 판단되며, 아울러 토양을 그늘지고 통풍이 잘 되는 곳에서 하루 건조시킨 후, 거즈로 작은 돌과 나무뿌리, 나뭇잎 등의 이물질을 제거하는 등의 전처리를 충분히 해 줄 경우 정제도가 더 높은 DNA를 얻을 수 있었다. 따라서 이상의 결과를 통해 본 연구진에서 확립한 분리 방법 III이 기존의 분리 방법에 비해 상당히 효율적임을 확인할 수 있었다.

한편, 각 방법에 의해 분리된 genomic DNA에 대해 분자생물학적인 적용 가능성을 검토하기 위해 먼저 PCR을 수행한 결과에서는 방법 III에 의해 분리된 DNA만 낮은 농도에서 product를 확인할 수 있었을 뿐, 나머지는 전혀 반응을 확인할 수 없었고, 제한효소를 처리한 경우, 모든 시료에서 반응을 전혀 확인할 수 없었는데 이는 토양 내에 미량 존재하는 humic acid와 같은 저해 물질들이 그 원인으로 판단되므로 반드시 이들 저해 물질의 제거가 필수적임을 알 수 있었다.

따라서 본 연구에서 확립된 분리방법 III에 대해 humic acid를 포함한 저해물질을 효과적으로 제거할 수 있는 방법을 도입하여 DNA의 손상을 최소화하면서 정제도가 높은 토양 DNA를 분리한다면 이를 이용하여 metagenomic DNA library를 구축하고 *E. coli* 와 방선균 등의 다양한 숙주세포를 형질전환시켜서 이후 생산되는 각종 항생제와 2차 대사산물 등을 항암제 및 면역조절 물질 등의 개발에 적극 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 한국학술진흥재단의 2003년도 신진교수 연구과제지원(과제번호: 2003-003-F00004)의 일환으로 수행된 연구 과제이며, 이의 지원에 감사드립니다.

참고 문헌

1. Allsop, A., and R. Illingworth. 2002. The impact of genomics and related technologies on the search for new antibiotics. *J. Appl. Microbiol.* **92**(1), 7-12.
2. Allsop, A. E. 1998. New antibiotic discovery, novel screens, novel targets and impact of microbial genomics. *Curr. Opin. Microbiol.* **1**(5), 530-534.
3. Brady, S. F., and J. Clardy. 2000. Long-chain N-acyl amino acid antibiotics isolated from heterologously expressed environmental DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 12903-12904.
4. Brambilla, E., H. Hippe, A. Hagelstein, B. J. Tindall, and E. Stackebrandt. 2001. 16S rDNA diversity of cultured and uncultured prokaryotes of a mat sample from Lake Fryxell, McMurdo Dry Valleys, Antarctica. *Extremophiles* **5**, 23-33.
5. Handelsman, J., M. R. Rondon, S. F. Brady, J. Clardy, and R. M. Goodman. 1998. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem. Biol.* **5**, R245-249.
6. Henne, A., R. Daniel, R. A. Schmitz, and G. Gottschalk. 1999. Construction of environmental DNA libraries in *Escherichia coli* and screening for the presence of genes conferring utilization of 4-hydroxybutyrate. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3901-3907.
7. Hugenholtz, P., and N. R. Pace. 1996. Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. *Trends Biotechnol.* **14**, 190-197.
8. Kaeberlein, T., K. Lewis, and S. S. Epstein. 2002. Isolating "Uncultivable" microorganism in pure culture in a simulated natural environment. *Science* **296**, 1127-1129.
9. MacNeil, I. A., C. L. Tiong, C. Minor, P. R. August, T. H. Grossman, K. A. Loiacono, B. A. Lynch, T. Phillips, S. Narula, R. Sundaramoorthi, A. Tyler, T. Aldredge, H. Long, M. Gilman, D. Holt, and M. S. Osburne. 2001. Expression and isolation of antimicrobial small molecules from soil DNA libraries. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**(2), 301-308.
10. Rondon, M. R., P. R. August, A. D. Bettermann, S. F. Brady, T. H. Grossman, M. R. Liles, K. A. Loiacono, B. A. Lynch, I. A. MacNeil, C. Minor, C. L. Tiong, M. Gilman, M. S. Osburne, J. Clardy, J. Handelsman, and R. M. Goodman. 2000. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**(6), 2541-2547.
11. Torsvik, V., J. Goksoyr, and F. L. Daae. 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 782-787.
12. Torsvik, V., J. Goksoyr, F. L. Daae, R. Sorheim, J. Michalsen, and K. Salte. 1990. Use of DNA analysis to determine the diversity of microbial communities, p.39-48. In K.E. Giller (ed), *Beyond the biomass*. John Wiley and Sons, Chichester, United Kingdom.
13. Yeates, C., M. R. Gillings, A. D. Davison, N. Altavilla, and D. A. Veal. 1998. Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification. *Biol. Proced. Online*. May

- 14, 140-147.
14. Zaehner, H., and H. P. Fiedler. 1995. The need for new antibiotics: possible ways forward, p.67-84. In N.J.Russell (ed), Fifty years of antimicrobials: past perspectives and future trends. Cambridge University Press, Cambridge, England.
15. Zhou, J., M. A. Bruns, and J. M. Tiedje. 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl. Environ. Microbiol.* **62(2)**, 316-322.