

Polymerase Chain Reaction 방법에 의한 *Halobacteria gvp* 유전자의 역전사 및 증폭

윤병수* · 이상섭

경기대학교 이과대학 생물학과

*Halobacteria*의 *gvpD*, *gvpE* 유전자는 가스포 형성에 관여하는 유전자로, 이들은 그 transcripts의 분석에 있어 특유의 연약성 때문에 많은 실험상의 문제를 야기시키고 있다. 본 실험은 연약한 mRNA를 reverse transcriptase를 사용, DNA로 바꾸고 이를 다시 PCR(Polymerase Chain Reaction) 방법으로 증폭시킴으로써, 유전자의 연약한 mRNA를 이에 상보적인 안정한 DNA로 대체하여 RNA상의 cloning, RNA sequencing을 용이하게 하였다. 결과는 유전자 *gvpD*에서 거의 전 ORF(Open Reading Frame)의 범위에서 northern hybridization에서 발견치 못한 transcripts를 확인할 수 있었다.

KEY WORDS □ *Halobacterium* sp. GRA, mRNA-PCR, PCR, RNA-sequencing.

*Halobacteria*의 가스포 유전자는 *Halobacterium halobium*에서 가스포의 구조 단백질 유전자 *gvpA*가 cloning, sequencing된 이래(2, 4) 이의 관련 유전자가 계속 보고되어(5, 6, 9) 현재 한개의 큰 유전자군으로 인정되고 있다.

Halobacterium sp. GRA는 그 가스포의 자연돌연변이율이 0.001%로 이 속의 대표균주인 *Halobacterium halobium*의 자연돌연변이율(1%)에 비해 크게 낮게 나타났다. 후자의 높은 돌연변이율의 이유는 insert element에 의한 것으로, 이 상대적인 DNA의 안정성은 후자가 chromosome 그리고 Plasmid에 가스포 유전자를 가지고 있는데 비해, 전자는 단지 chromosome에만 가지고 있다는 단순성과 함께 가스포 유전자 연구에 좋은 재료로 인식되고 있다.

유전자 *gvpD*, *gvpE*는 구조 단백질 유전자 *gvpA*와 마주보고 있는 유전자로서 *Halobacterium halobium* (5)에서 그리고 *Halobacterium* sp. GRA(9)에서 sequencing 되었다.

Sequencing의 결과로써 *gvpD*는 *H. sp. GRA*에서 1,476 bp 그리고 *H. halobium*에서 1,608 bp의 크기의 유전자로 나타났으며 한편 *gvpE*의 경우 그 크기는 546 bp(*H. sp. GRA*)와 573 bp(*H. halobium*)로 나타났다.

이들 유전자의 mRNA의 연구에서는, 먼저 *H. halobium*에서 *gvpD*의 primer extension 실험으로 *gvpD*의 transcription start를 보여주었으나 그 mRNA의 크기를 보여주지는 못하고 *gvpD*와 *gvpE*는 co-transcript를 갖는 polycistronic gene으로 예상하였다(5).

한편 *H. sp. GRA*에서 *gvpD*, *gvpE*의 mRNA는 northern blotting에서 각각 330 base, 420 base의

크기를 보여주고 있으며, *gvpE*의 primer extension 실험에서 그 expression start를 보임으로써 *gvpD*와 *gvpE*는 각기 따로 발현되는 monocistronic gene임을 보여주었다(9).

이러한 유전자의 크기에 대한 DNA와 RNA의 실험상의 차이는 여러가지 의문을 낳게 되는데 먼저 이들 mRNA는 그 구조상 매우 연약하여 일반적인 northern blotting으로는 그 완전한 크기를 측정할수 없는 것이 아닌가 하는 것과 이 Archaeobacteria의 유전자는 전혀 다른 시스템, 즉 진핵생물에서 볼 수 있는 splicing이 존재하지 않는가 하는 것 등이다.

본 실험은 이러한 DNA, RNA 실험에서 나타난 불일치를 해명하고자 불안정한 mRNA를 안정한 상태에서 분석하기 위하여 고안된 것으로 mRNA를 역전사시켜 만든 DNA를 다시 PCR(Polymerase Chain Reaction)로, 분석에 적당한 양으로 증폭시키는 방법을 서술하였다.

재료 및 방법

실험 균주 및 배지

실험에 사용된 균주는 *Halobacterium* sp. GRA(3)이며 그 배지는 다음의 조성을 가진 Halokomplettmedium을 사용하였다.

조성(1 l당, pH 7.0): 250g NaCl, 20g MgSO₄, 3g trisodium citrate, 2g KCl, 10g bactopecton(Oxoid). *Halobacteria*에서의 RNA-Isolation

이 방법은 Chirgwin 등(1)의 방법을 기본으로 *Halobacteria*에 맞게 변형시켰다. 또한 모든 용액은 (Tris-solution 제외) 다음과 같이 DEPC 처리를 하여 RNase의 활성을 억제하였다. 즉 DEPC(Diethyl

pyrocarbonate) 2/1000 Volume을 용액에 넣고 30분간 고속으로 저은 후, 실온에서 12시간 정치하고 이 용액을 autoclave시킨 후 사용하였다. 그 외의 모든 기구는 상기의 DEPC처리 증류수로 잘 씻은 후 autoclave시켜서 사용하였다.

Halobacteria를 1:100 (v/v)로 접종하여 적당한 성장상태까지 키운 후 이중 50 ml의 culture의 균을 수집하였다(8,000 rpm, 5°C, JA-20 Rotor).

이를 각 30 ml/ salt solution(250g NaCl, 20g MgSO₄ 3g trisodium citrate, 2g KCl per liter)으로 두번 washing하고 침전시킨 균을 3.5 ml guanidinium solution(4M guanidium isothiocyanate, 20 mM sodium citrate, 0.1 mM dithiothreitol, 0.5% N-lauryl sarcosine)에 녹였다. 이때 20G의 바늘을 낀 5 ml 주사기로 6~8회 흡입, 배출시키어 DNA 등 거대분자를 파괴시켰다.

SW-50 ultra centrifuge tube에 1.5 ml CsCl용액(CsCl 9g+10 ml/ 증류수)을 넣고, 그 위에 3.5 ml의 맑은 붉은색의 균용해액(guanidium 용액)을 넣은 후 초원심분리를 시켰다(35,000 rpm, 18h, 18°C).

상등의 DNA가 포함된 용액을 조심스럽게 제거하고 약하게 침전된 RNA를 모아 360 µl의 DEPC처리 증류수에 녹인 후, 40 µl 3 M DEPC 처리 sodium acetate과 1 ml 100% alcohol을 넣고 -70°C에서 1시간 정치하여 침전시켰다. 15분의 원심분리 후 1 ml 80% alcohol로 washing하고 침전된 RNA를 100 µl DEPC 처리 증류수에 녹여 -70°C에서 보관하였다.

DNase 처리

상기의 방법으로 순수분리된 RNA는 소량의 DNA에 오염되었을 가능성이 있기에(실제 northern-hybridization이나 primer-extension 실험에서는 DNA의 오염에 따른 이상을 발견할 수는 없었음.) RNase free DNase처리를 하였다.

40 µl RNA 용액에 2 µl 1 M Tris/HCl pH 7.5, 1.5 µl 0.1 M MgSO₄와 4 µl 1 mg/ml RNase free DNase(Worthington Co.)을 넣고 DEPC-증류수로 100 µl를 맞춘 후 조심스럽게 혼합하였다.

25°C, 30분 반응 후 DEPC-증류수 100 µl를 더 넣고 phenol처리(phenol, phenol/chloroform, chloroform)와 ethanol 침전(2.5 vol. ethanol)을 행하였다.

mRNA의 Polymerase Chain Reaction

이는 primer extension 방법으로 mRNA에서 합성한 DNA를 PCR 방법으로 증폭시킨 것이다. Hybrid solution은 50 µl 100% deioned formamid, 4 µl 1 M PIPES, 8 µl 5 M NaCl, 1 µl 0.1 M EDTA pH 8.0으로 만들었고, 20X Taq-Polymerase buffer는 1.0 M Tris/HCl pH 9.0, 0.4 M ammonium sulfate, 0.03 M MgCl₂를 사용하였다. 10X RT-Mix는 3.5 µl 4 mM dNTPs, 2.5 µl 10X RT-buffer, 1.25 µl RNasin, 18 µl deioned H₂O를 사용하였고, 10X RT-buffer는 500 mM Tris/HCl pH 8.0, 50 mM MgCl₂,

50 mM dithiothreitol, 500 mM KCl, 0.5 mg/ml BSA를 사용하였다.

11.1 µl RNA-primer 용액(50 µg RNA+100 µg Primer)에 18.9 µl의 hybrid solution을 넣고 42°C에서 12시간 incubation 시켰다. 여기에 170 µl 0.3 M Na acetate와 500 µl ethanol을 넣어 dry ice/methanol bath에서 15분간 침전시켰다.

15분의 원심분리 후 75% ethanol/25% Na acetate로 washing하고 다시 15분 원심분리로 얻은 침전을 10분간 말렸다. 이 침전된 DNA/RNA hybrid를 25 µl RT-Mix에 녹이고, 이에 1 µl (20 Unit) AMV reverse transcriptase를 넣어 42°C, 90분 incubation 시켰다.

Primer extension시킨 용액(26 µl)에 100 µl 2.5 M ammonium acetate와 125 µl phenol/chloroform/isoamylalcohol(25/24/1)을 넣어 Phenol 처리를 한 후 상등액에 2.5배 Alcohol을 넣어 알콜침전을 시켰다. 이 침전을 85.5 µl 증류수에 녹여 5.0 µl 20X Tag-Polymerase buffer, 각 4 mM dNTP(A, C, G, T)의 5 µl, 1.0 µl 20 µM 5'-Primer(ca. 6 µg/20-mer), 1.0 µl 20 µM 3'-Primer, 2.5 µl (1 Unit/ul) Tag-Polymerase를 넣어 PCR로 증폭시켰다. PCR의 조건은 denaturation, 94°C/2분, hybridization, 55°C/90초, polymerization 72°C/2분, 30회 반복이며, 일차 denaturation의 시간은 2분 연장하였고, 마지막 polymerization의 시간도 5분 연장하였으며 일회 반복 당 모든 반응시간을 1초씩 더 연장시켰다.

결과 및 고찰

Halobacterium sp. GRA의 가스포 유전자 gvpD, gvpE의 구조와 사용된 oligomer의 DNA sequence 상의 위치는 Fig. 1에 나타내었다. 유전자 상의 실선 화살표는 primer extension 실험과 northern hybridization의 결과에 의한 transcription의 방향과 시

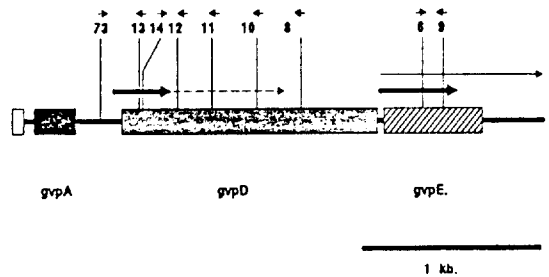


Fig. 1. Structure of gas vesicle genes, gvpD, gvpE and gvpA in *Halobacterium* sp. GRA. A hatched bar indicates a gas vacuole gene. A long arrow represent start point and size of transcript, a small arrow and number indicates direction and position of an oligomer.

Table 1. Sequences of oligomers for Primer of reverse transcription and PCR.

Y-6 : 5'-GTGTTGATCACCGTGCGT-3'	18-mer
Y-8 : 5'-CGGCGTACGTCTCGAAGA-3'	18-mer
Y-9 : 5'-AGCTGCTTGAGGTGTGGG-3'	18-mer
Y-10: 5'-TCGGATCCCCGTGGAGAA-3'	18-mer
Y-11: 5'-CCGTCTCGGACACCAACA-3'	18-mer
Y-12: 5'-GTGCACATCCATGGGCAA-3'	18-mer
Y-13: 5'-TGAAAACCGCCGGATCTCGC- GGG-3'	23-mer
Y-14: 5'-CCGGCGAGCCGGGCCAGA-3'	18-mer
Y-73: 5'-GCTCGTAATAGTTCGCTGATT-3'	21-mer

작점 그리고 그 크기를 표시한 것이다(5, 9).

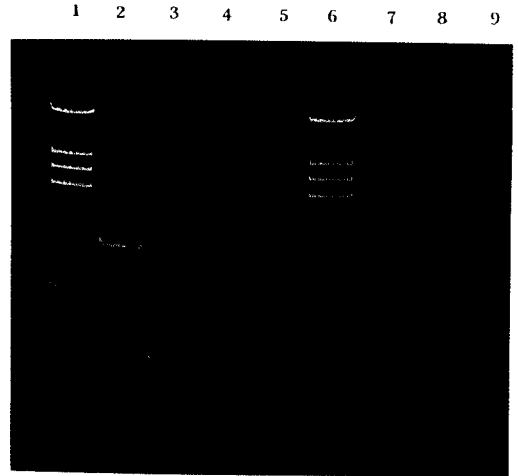
상부의 숫자 및 화살표는 oligomer의 번호 및 방향을 나타낸 것으로 그 서열은 Table 1에 나타내었다.

mRNA의 PCR에 의한 증폭은 Fig. 2의 agarose gel electrophoresis에 의해 분석하였으며 Lane 1과 6은 DNA-marker로 그 크기는 2.9 kb, 1.26 kb, 1.03 kb, 0.34 kb, 0.13 kb이다. Lane 2는 PCR의 기능을 검사한 것으로 100 µg의 total DNA를 template로 사용하여(reverse transcriptase를 사용하지 않고), 다른 것과 같은 조건으로 PCR을 행한 것이다. 사용된 primer는 oligomer Y-73과 Y-12로써 PCR-products는 예상한 504 base로 나타났다. Lane 3은 oligomer Y-12를 reverse transcriptase의 primer로 사용하여 mRNA를 상보 DNA로 만든 후, 이를 oligomer Y-12, Y-13을 사용하여 PCR로 증폭시킨 것으로 그 product는 예상된 크기, 233 base로 나타났다.

한편 Lane 4는 순수 분리된 RNA에 DNA가 오염되어 실험결과를 오도할 가능성을 방지하기 위한 것으로 oligomer Y-12를 reverse transcriptase의 primer로 사용한 후 다시 oligomer Y-12 그리고 Y-73으로 PCR시킨 것이다. 그러나 유전자 *gvpD*에서 mRNA의 start point는 DNA 서열상의 위치가 oligomer Y-73과 Y-12 사이에 있기에, Y-73의 위치 까지는 mRNA가 존재하지 않는다. 따라서 Lane 2의 DNA template의 경우와는 달리 PCR-product는 생산되지 않았다.

Lane 7은 oligomer Y-10과 Y-14를 primer로 사용한 RNA-PCR-product이다. 그 크기는 DNA에서 예상된 크기인 719 base로 나타났다. Lane 8은 RNA-PCR-product로 oligomer Y-11과 Y-14를 사용한 것으로 453 base로 나타났다. Lane 9는 역시 RNA-PCR로써 oligomer Y-8과 Y-14(이 두 oligomer의 DNA상의 거리는 972 base)를 사용한 것이나 product는 만들어지지 않았다. 여기서 product가 만들어지지 않은 이유는 reverse transcriptase의 polymerization 능력이 문제가 아닌가 추론하고 있다.

Northern hybridization에서 확인된 유전자 *gvpD*의 mRNA는 330 base 정도로써 이 mRNA의 start

**Fig. 2.** Agarose gel electrophoresis of mRNA-PCR products.

Lane 1,6: DNA-Marker; size, 2.9, 1.26, 1.03, 0.88, 0.34 kb and 0.13 kb.

Lane 2: Function test of PCR; using 100 µg of total DNA as template (without AMV reverse transcriptase), Primer; Oligomer Y-73 and Y-12; PCR-Product, 504 Base.

Lane 3: mRNA reverse transcribed to complementary DNA using Oligomer Y-12 as the primer of reverse transcriptase, and amplified by PCR using oligomer Y-12 and Y-14. Size, 233 Base.

Lane 4: Oligomer Y-12 used as the primer of reverse transcriptase, and amplified to oligomer Y-12 and Y-73 using PCR, no PCR-Product generated.

Lane 5: empty.

Lane 7: RNA-PCR-Product using oligomer Y-10 and Y-14 as Primer. Size; 719 base.

Lane 8: RNA-PCR-Product using oligomer Y-11 and Y-14. Size; 453 base.

Lane 9. RNA-PCR using oligomer Y-8 and Y-14. No product generated.

point로부터 이 범위내에 위치한 oligomer는 Y-12 까지도이다. Lane 7과 8에서 나타난 RNA-PCR product는 이 유전자가 적어도 이 부분까지는 transcribe됨을 나타내는 것으로 northern hybridization에서 나타난 것은 전체 transcript 중 3'→5'의 exonuclease의 영향으로 손상된 일부임을 시사하고 있다. 이로써 이 유전자 *gvpD*는 전체 ORF에서 transcribe됨이 확실시되며, 이 mRNA의 연약함은 고유특성으로 이 유전자의 발현이 log-Phase에서만 국한됨을 성장단계별 northern hybridization을 통해 보여준 실험(9)과 일치한다. 또한 가스포의 합성에 있어 세포내 전체 가스포의 수 또는 양의 조절이 이 유전자 *gvpD*의 발현 조절 그리고 그 mRNA의 연

약한구조로 설명될 수 있지 않는가 생각된다.

다른 Eubacteria와는 달리 이러한 Archaeobacteria에서는 그 유전자의 분자생물학적 연구가 매우 미약한 상태이다(7). 아직은 부족한 실험결과들 때문에 유전자의 promotor sequence 조차 정립치 못하고 있으며(8, 9) 더욱이 mRNA의 terminator sequence는 몇 가지 제안이 있을 뿐이다(7). 이러한 mRNA의 연구의 상대적인 빈약성은 간단히 이것이 DNA에 비해 상대적으로 연약하여, 쉽게 분해되는 실험상의 난해성 때문이다.

본 실험의 방법론은 그 연약함의 문제를 보완하여 현재 쉽게 사용되는 DNA-cloning, sequencing의 방법을 mRNA에도 적용하려는 시도로써, 직접적인 RNA-sequencing에 상응하는 결과를 mRNA-PCR-Product의 cloning, sequencing으로 보다 쉽게 얻을 수 있으리라 기대한다.

참 고 문 헌

1. Chirgwin, J.J., A.E. Przybyla, R.J. Macdonald and W.J. Rutter, 1979. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochem.* **18**, 5294.
2. DasSarma, S., T. Damerval, J.G. Jones and N. Tandeau de Marsac, 1987. A plasmid-encoded gas vesicle protein gene in a halophilic archaeobacterium. *Mol. Microbiol.* **1**, 365-370.
3. Ebert, K., W. Goebel and F. Pfeifer, 1984. Homologies between extrachromosomal DNA populations of *Halobacterium halobium* and four new halobacterial isolates. *Mol. Gen. Genet.* **194**, 91-97.
4. Horne, M., C. Englert and F. Pfeifer, 1988. Two genes encoding gas vacuole proteins in *Halobacterium halobium*. *Mol. Gen. Genet.* **213**, 459-464.
5. Johnes, J.G., N.R. Hackett, J.T. Halladay, J.S. Douglas, C.F. Yang, W.L. Ng and S. DasSarma, 1989. Analysis of insertion mutants reveals two new genes in the pNRC 100 gas vesicle gene cluster of *Halobacterium halobium*. *Nuc. Aci. Res.* **17**, 7785-7793.
6. Pillay, B., 1989. Characterization of the genes encoding gas vacuole proteins in halobacteria. Dr. rer. nat. Thesis. Universitaet Wuerzburg.
7. Rodriguez Valera, F. (ed.) 1988. Halophilic bacteria vol. III. CRC press Florida. 1-144.
8. Thomm, M., G. Wich, J.W. Brown, G. Frey, B.A. Sherf and G.S. Beckler, 1989. An archaebacterial promotor sequence assigned by RNA polymerase binding experiments. *Can. J. Microbiol.* **35**, 30-50.
9. Yoon, B.S., 1991. Gasvakuolengene in Halobakterien: Gentechnologische Untersuchungen zur Synthese und organisation. Dr. rer. nat. Thesis. Universitaet Wuerzburg.
10. Zillig, W., P. Palm, W. Reiter, F. Gropp, G. Puehler and H. Klenk, 1988. Comparative evolution of gene expression in archaebacteria. *Eur. J. Biochem.* **173**, 473-482.

(Received September 7, 1992)

(Accepted October 26, 1992)

ABSTRACT: Reverse Transcription and Amplification of Halobacterial gvp Genes with Polymerase Chain Reaction Method
Yoon, Byoung Su* and Sang Seob Lee (Department of Biology, College of Natural Sciences, Kyong-gi University)

The genes of Halobacteria, gvpD and gvpE, take part in formation of gas vesicle. These mRNA cause a lot of experimental problems due to its characteristic instability in the analysis of transcripts. This study allowed easy cloning and sequencing of RNA by substituting a stable complementary DNA for the mRNA of the genes for an analysis. The weak mRNA was reverse transcribed to DNA using reverse transcriptase, and was amplified using PCR method. The transcripts confirmed in this study have not been found in the northern hybridization covering almost all ranges of ORF of the gene, gvpD.