

## 역전장 전기영동장치를 이용한 대형 DNA 분리에 관한 연구

朱二石\*·Thomas A Casey\*\*·尹用德\*\*\*  
畜産試驗場·美國聯邦 家畜衛生研究所\*\*  
家畜衛生研究所\*\*\*  
(1992년 8월 20일 접수)

### Separation of large DNA molecules by pulsed field gel electrophoresis

Yi-seok Joo\*, Thomas A Casey\*\*, Yong-dhuk Yoon\*\*\*  
Livestock Experiment Station(LES)RDA, Suwon, Korea\*·National Animal Disease Center(NADC) ARS,  
Ames, Iowa 50010,\*\*  
Veterinary Research Institute(VRI) RDA, Anyang, Korea\*\*\*  
(Received Apr 20, 1992)

**Abstract** : Gel electrophoresis has proven to be one of the most useful of DNA separation and purification. The new technique of pulsed field gel electrophoresis (PFGE) is high resolution separation of large size DNA molecules. Conventional continuous gel electrophoresis can not be separation of large DNA fragments(20~50 k base). Field inversion gel electrophoresis (FIGE) is very useful for large DNA molecules. We have found that a pulse ratio ; 2 : 1, time ; 24hrs., volts ;  $10^{\text{volts/cm}}$ , start ; 0.45sec, end ; 1sec, is most effectively resolves DNA fragment in the 6~50k base.

**Key words** : lage DNA, electrophoresis,  $\lambda$  DNA, PEGE, FIGE.

### 서 론

전기영동장치는 핵산과 단백질의 크기, 전기전하, type에 따라서 전기적인 힘으로 이런 molecule들을 분석하는데 가장 많이 사용되고 있으며, Conventional Electrophoresis 방법은 한쪽에서만 전하를 주어서 분석하고자 하는 물질을 끌어 당겨 분리를 시도하고 있다.<sup>2,20</sup> 그러나 이런 기존의 방법으로는 핵산의 경우 20K base 이하의 염기쌍들은 분리가 잘 이루어지지만 그 이상의 핵산을 분석하는데는 많은 제약을 받고 있다. 그 이유는 비교적 적은 크기의 DNA는 비교적 일직선상으로 빠르게 빠져나가는 반면에 약간 큰 DNA는 충분히 큰 구멍을 찾아 꾸불꾸불 움직여 천천히 빠져 나간다. 30K base 이상의 염기쌍들은 DNA가 수용액 속에서 코일 형태로 존재하며 그 크기가 직경 1 $\mu\text{m}$ 이고 1% agarose gel의

구멍크기는 0.2 $\mu\text{m}$ 이며, 여기에 전하를 걸면 DNA가 길쭉하게 변형되어 구멍을 빠져나가게 되므로 그 이상 크기의 핵산들은 그 크기에 따라 분리되지 않고 똑같이 움직인다.<sup>4,9,10,15</sup>

이에 최근 agarose gel를 이용한 큰 크기의 DNA 분리능력을 향상시켜 수만 염기쌍보다 큰 핵산을 크기별로 분리할 수 있는 pulsed field gel electrophoresis(PFGE) 방법이 개발되었다. 이 방법은 1983년 David Schwartz 등에 의하여 개발된 이래 Snell 등은 사람에 감염된 *Candida albican*에 대한 Whole chromosomal DNA를 분석하였다.<sup>7,21</sup> Carle 등은 *Saccharomyces cerevisiae*의 핵산을 분석하였고, Giannini 등은 *Leishmania*를 Karyotyping하는데 이용하였고, Smith 등은 *Escherichia coli* K12에 대한 Genomic DNA를 분석하여 Physical map을 만들었다.<sup>3,11,12,19,21,22</sup> 또한 Bernard 등은 *Trypanosoma brucei*의 Wh-

ole chromosomal DNA를 분석하여 진단에 이용하였다.<sup>1,18</sup> 이들의 방법은 전기장의 변화에 따라 DNA의 형태를 변화시켜 큰 DNA는 천천히 이동시키고 작은 DNA들은 빨리 변형 이동시켜 그 크기별로 DNA 분자들을 분리시킨다.

본 연구는 신기술인 pulsed field gel electrophoresis (PEGE) 방법중 field inversion gel electrophoresis(FIGE) 방법을 이용하여  $\lambda$  DNA를 각 제한효소로 절단하여 크기별로 DNA를 분석하였다.

### 재료 및 방법

**DNA preparation :**  $\lambda$  DNA, generously provided by R.A. Schneider was prepared from bacteriophage  $\lambda$  by modification of large scale preparation technique described by T.Maniatis etc.

Plating the phage and making a plate lysate



To remove bacterial debris, centrifuge at 8,000 rpm (7700g) for 10 min at 4°C



Transfer the supernatant to a clean tube and add 50  $\mu$ l of 100  $\mu$ g/ml

RNase+DNase. Mix and incubate at 37°C for 30 minutes



Add 5ml of 20% polyethylene glycol, 2M NaCl in SM buffer\*. Mix and store on ice for at least 1 hour to precipitate the phage



Centrifuge at 10,000rpm (12,000g) at 4°C for 20 min.

Resuspend the pellet in 0.5ml of SM buffer



Add 5ml of 10% SDS and 5  $\mu$ l of 0.5M EDTA.

Incubate at 68°C for 15 min.



Treated of SS-phenol



Alcohol precipitate



Dry the pellet in vaccum



Resuspend the pellet in TE buffer, store DNA at -20°C

\* SM buffer(per liter) :

5.8g of NaCl

2.0g of  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

50ml of 1M Tris-HCl(pH 7.5)

5ml of 2% gelatin

**Agarose gel :** 1% Agarose (Marine Colloids, FMC) 수직형 전기영동장치를 이용하였고, FIGE 방법으로 running 시킬 때는 TBE buffer (Tris base : 108g, Boric acid : 55g, 0.5 M EDTA ; 4ml, pH 8.0 : 10\* stock solution ; 1 liter)를 사용하였고, Loading buffer로는 50% (w/v) Sucrose, 25mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  (pH 8.0), 0.1% Bromphenol blue를 이용 DNA를 혼합후 각 Well에 주입시켜 각 condition별로 전기영동을 실시 하였다.<sup>20</sup> DNA 확인을 위한 염색은 Ethidium bromide stock solution을 100  $\mu$ l 로 30분간 염색하여 UV light에서 DNA band를 확인 사진 촬영하였다.

**제한효소를 이용  $\lambda$  DNA 절단 :** 순수 분리된  $\lambda$  DNA를 각각의 제한 효소를 이용하여 크기별로 절단 하였다. 이용된 제한효소는 Xho I, Xba I, Hind III, EcoR I 그리고 Sam I 이었고, 37°C에서 30분간 작용시켜  $\lambda$  DNA를 절단하였다.

**Pulse field gel electrophoresis :** FIGE 방법은 기존의 vertical type의 gel plate를 이용하였고, 전기장 조절장치는 P.S Biochemicals사의 side winder를 사용하여 양극과 음극을 조절하고, 전기공급장치는 Bio Rad사 모델 3000xi를 공시하였다. electrophoretic condition은 1% agarose gel, 10 volts/cm, 양극과 음극의 전기 전하율은 2:1, 시작되는 시간은 0.45초, 끝나는 때의 시간은 1초 혹은 3초 등을 주었고, Running time 약 24시간을 주었다.<sup>3,10,17</sup>

### 결 과

기존의 전기영동방법으로  $\lambda$  DNA를 분석하게 되면 Fig 1에서와 같이 48.5 Kbase부근에 여러 크기의 DNA 밴드들이 모여있다. 제한효소중 Xho I 로 절단한 경우 33.4Kb는 전혀 분리되지 않았고, 15 Kb의 밴드만 약간 더 이동되었으며 Xba I 으로 절단한 DNA는 24.5 Kb와 Hind III로 절단한 23.1 Kb 등은 거의 움직이지 않고, 48.5 Kb 크기와 비슷한 결과를 보였다. 그러나 9.4 Kb 에서는 0.85cm, 6,6 Kb에서는 1,3cm의 성적을 얻을 수 있었다.

앞서 기술한 바와 같이 기존의 전기영동장치를 이용할 경우 50Kb에서 약 20Kb까지의 DNA들이 코일 형태로 존재하여 agarose gel에서 그 크기별로 분리가 쉽지 않아 Fig 2에서와 같이 FIGE의 Electrophoretic condition은 Running time은 24시간, 전하는  $10^{\text{volts/cm}}$ , 양극과 음극의 시간율은 2:1, 처음시작은 0.45초 끝날 때는 1초를 주었고, gel은 1% agarose를 사용하였다. 그 결과

Xho I 으로 절단한 33.4Kb의 밴드가 기존의 48.5Kb에서부터 1cm이상의 분리를 보였고, 24.5Kb는 2.0cm 21.2Kb에서는 2.2cm, Sam I 으로 절단된 19.3Kb에서는 2.3cm, 15Kb에서는 2.5cm, 9.4Kb는 무려 3.2cm의 큰 차이로 분리됨을 볼 수 있었다. 약 50Kb에서는 6.6Kb까지 분포한 DNA를 분명하게 분석이 가능하였다.

FIGE의 Electrophoretic condition 을 약간 변경하여 50Kb 이상 크기의 DNA를 분석할 수 있는가를 시험한 결과 Fig 3에서와 같이 Running time은 24시간, 전하는 10volts/cm (150 volts), 양극과 음극율은 2:1, 시작시간은 0.45초, 끝나는 시간을 3초로 유지한 결과 기존의 λ DNA인 48.5Kb에서 33.4Kb까지는 0.45cm, 24.5Kb까지는 0.75cm, 15Kb까지는 1.1cm, 9.4Kb까지는 1.55cm, 6.6Kb까지는 2.2cm의 각각 분리를 보였다. PRC 347의 DNA에서 48.5Kb보다 큰 크기의 DNA들의 밴드가 보였다. 이는 이 방법으로 전기영동을 실시할 경우 50Kb 이상의 밴드들이 분리될 수 있다 하겠다.

### 고 찰

핵산이나 단백질을 분석하는데 전기영동장치는 연구자들에게 가장 좋은 기구로서 사용되고 있다. 특히 Agarose gel를 이용한 핵산분석으로 사람의 염색체 구성과 각 질병을 일으키는 원인 미생물들의 정밀진단에 이용되어 지고 있다.<sup>6,20</sup> 그러나 기존의 방법으로는 핵산분석에 있어서 많은 제약을 받고 있다. 이에 최근 신기술

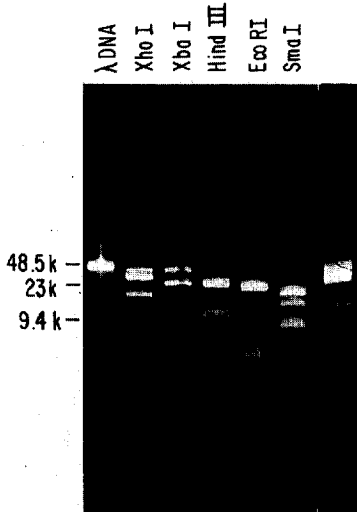


Fig 1. Separation of DNA fragments(9.4~48.5kb) using conventional electrophoretic conditions (time ; 4hrs, 6.5 volts/cm).

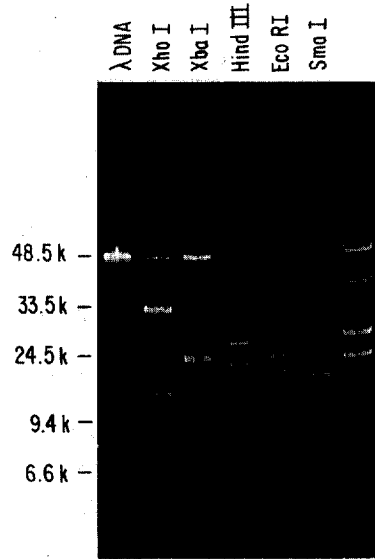


Fig 2. Separation of DNA fragments(6.6~48.5kb) using optimal pulsed field gel electrophoresis conditions(Pulse ratio ; 2 : 1, start ; 0.45 sec, end ; 1sec, time ; 24hrs and volts ; 10 volts/cm).

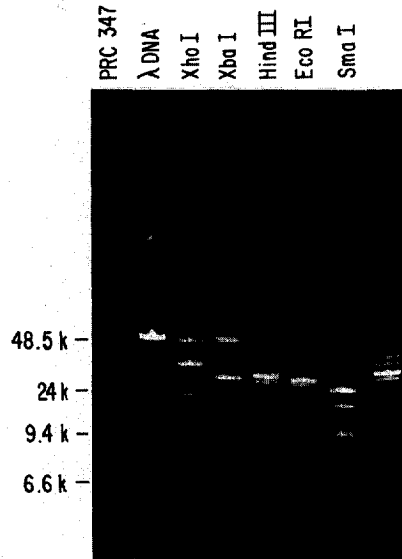


Fig 3. Separation of DNA fragments(over 48.5kb) using Pulsed field gel electrophoresis conditions(Pulse ratio ; 2 : 1, start ; 0.45 sec, end ; 3sec, time ; 24hrs and volts ; 10 volts/cm).

**Table 1.** Separation distance from 48.4 K base of  $\lambda$  DNA to each size of cutted  $\lambda$  DNA by restriction enzyme

Electrophoresis condition	Size of $\lambda$ DNA band					
	33.4Kb <sup>1)</sup>	24.5Kb	21.2Kb	15Kb	9.4Kb	6.6Kb
I *	-	0.2 <sup>2)</sup>	0.2	0.5	0.85	1.3
II **	1.0	2.0	2.2	2.5	3.2	3.7
III ***	1.5	0.75	0.85	1.05	1.55	2.2

\* : Conventional electrophoresis(Fig 1)    1) : K base  
 \*\* : FIGE(Fig 2)    2) cm  
 \*\*\* : FIGE(Fig 3)

인 PFGE방법이 개발되어 보다 큰 크기의 DNA를 분석 가능케하여 사람의 염색체 연구에도 많은 시간을 단축할 수 있게 하였다.<sup>5,8,13,14</sup> Figs 1,2,3과 Table 1에서 보는 바와 같이 기존의 방법으로는 50Kb이상 크기의 핵산은 물론 20~50Kb 부근에 분포하는 크기의 DNA 밴드도 그 크기에 따라서 분석하기가 매우 힘들었다. 그러나 본 시험결과 FIGE에서 Electrophoresis condition을 양극과 음극의 비율을 2 : 1, 처음 시작때는 빨리 변화하도록 0.45초를 끝나는 시작에도 비교적 빠른 변화를 주는 1초를 주고, 기존의 방법보다 긴 24시간을 Running time으로 주었을 때 가장 좋은 결과로 20~50Kb사이 핵산들이 분명하게 분석가능하였다. 이는 J. Larson 등의 시험에서 단지 앞쪽으로 0.4초, 뒷쪽으로 0.2초를 시간의 변화없이 줄때와 비슷하였지만 시간의 변화를 줄 때 더욱 DNA 밴드가 날렵하게 나타났다.<sup>16,17</sup>

Fig 3에서는 Fig 2와 비교해 볼때 50Kb 보다 작은 밴드들이 서로의 거리가 적게 분리된 것을 볼 수 있다. 이는 FIGE의 Condition에 따라 내가 원하는 크기의 밴드를 추정하여 그 부근에 분포한 DNA들을 정밀하게 분석할 수 있는 가능성을 보여준다. 왜냐하면 50Kb이하의 밴드는 가까워졌지만 50Kb이상의 밴드들이 Fig 3에서 PRC 347가 몇개의 밴드로 나타났으며 Whole  $\lambda$  DNA에서도 50Kb이상의 밴드가 출현하여 본 방법을 이용하면 그이상 크기의 핵산분석이 가능하였다. 이는 Carle 등의 성적과는 약간의 차이가 있으나 FIGE condition의 차이를 주면 핵산의 크기별로 분석이 가능하다는 이론은 같은 결과를 얻었다.<sup>10,14,23</sup> 그리고 FIGE 방법은 밴드가 가늘고 핵산분석이 매우 용이하게 이용되지만 핵산의 크기가 1000K base 이하의 경우에 많이 적용되며 가장 먼저 개발된 OFAGE 방법은 매우 큰 크기의 밴드를 분석할 수 있으나 밴드가 구부러지고 퍼지게 나타난다. 이를 보완하기 위하여 CHEF, RPFGE 혹은 TAFE 등이 개발되었다.<sup>14</sup> 이들은 각 기계상의 특징에 따라 약간씩 차이가 있으나 그 원리는 거의 동일하며 큰 크기의 Whole Chromosomal DNA를 물리적인 힘으로 절단시키지 않은 상태에서 분석하는데 사용되고 있다.

본 PFGE 방법을 이용하면 보다 큰 크기의 DNA 등을 분석하는데 또한 단백질 등을 연구하는데 많은 도움을 줄 것으로 사려되고 가축의 질병을 일으키는 원인체들에 대한 핵산을 분석하여 질병 정밀진단에 이용이 가능할 것으로 사료된다.

## 결론

DNA 분석을 위한 전기영동법중 신기술인 pulsed field gel electrophoresis중 Field inversion gel electrophoresis를 실시한 결과는 다음과 같다.

1. 기존의 전기영동방법으로는  $\lambda$  DNA를 각각 제한 효소로 절단하여 전기영동한 결과 20~50K base 사이에 위치한 DNA band가 거의 분리되지 않았다.
2. FIGE 방법을 이용한 양극과 음극의 시간을 2 : 1, 전하는 10<sup>volts/cm</sup>, 시작은 0.45초, 끝나는 시간은 1초, running time은 24시간을 주었을 때 20~50K base 사이의 DNA band가 명확하게 분석되었다.
3. 50 K base 이상의 DNA band를 분석하려면 FIGE condition을 변경하면 가능하였다.

## 참고 문헌

1. Andre Bernards, Jan M, Kooter, Paul Michels AM, et al. Pulsed field gradient electrophoresis of DNA digested in agarose allows the sizing of the large duplication unit of a surface antigen gene in trypanosomes. *Gene* 1986 ; 42 : 313~322.
2. Cassandra L, Smith, Charles R. Cantor. Purification, specific fragmentaion, and separation of large DNA molecules. *Methods In Emzymology* 1987 ; 155 : 449 ~ 467.
3. Cassandra L, Smith, Jason G, Econome, Andrew Schutt, et al. A physical map of the *Escherichia coli* K12 genome. *Science* 1987 ; 236 : 1448~1453.
4. Cassandra L, Smith, Peter E, Warburton, Andras Gaal, et al. Analysis of genome organization and rearrangements by pulsed field gradient gel elec-

- trophoresis. *Genetic Engineering* 1986 ; 8 : 45~69.
5. Cassandra L, Smith, Tomohiro Matsumoto, Osami Niwa, et al. An electrophoretic karyotype for *Schizosaccharomyces pombe* by pulsed field gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research* 1987 ; 15 : 4481~4489.
  6. Daniels DL, Blattner FR. Mapping using gene encyclopaedias. *Nature* 1987 ; 325 : 831~832.
  7. David C, Schwartz, Charles R. Cantor. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 1984 ; 37 : 67~75.
  8. Ehrlich SD, Noirot PH, Petit MA, et al. Structural instability of *Bacillus subtilis* plasmids. *Genetic Engineering* 1986 ; 8 : 71.
  9. Ellis THN, Cleary WG, Burcham KWG, et al. Ramped field inversion gel electrophoresis : a cautionary note. *Nucleic Acids Research* 1987 ; 15 : 5499.
  10. Georges F, Carle, Maynard V. Olson. Orthogonal-field-alternation gel electrophoresis. *Methods In Enzymology* 1987 ; 155 : 468~482.
  11. Georges F, Carle, Maynard V. Olson. Separation of chromosomal DNA molecules from yeast by orthogonal-field-alternation gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research* 1984 ; 12 : 5647~5664.
  12. Georges F, Carle, Maynard V. Olson. An electrophoretic karyotype for yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985 ; 82 : 3756~3760.
  13. Georges F, Carle, Mark Frank, Maynard V. Olson. Electrophoretic separations of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field. *Science* 1986 ; 232 : 65~232.
  14. Gilbert Chu, Douglas Vollrath, Ronald W. Davis. Swparation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. *Science* 1986 ; 234 : 1582~1585.
  15. Holzwarth G, Chad B, McKee, Susan Steiger, et al. Transient orientation of linear DNA molecules during pulsed-field gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research* 1987 ; 15 : 10031~10043.
  16. Joan Overhauser, Marko Z. Radic. Encapsulation of cells in agarose beads for use with pulsed-field gel electrophoresis.
  17. Larson JJ, Nicholson AW, Siegel A. Field inversion of large DNA fragments using an inexpensive unit. *BioTechniques* 1987 ; 5(3) : 228~231.
  18. Lex HT, Van der Ploeg, David C, et al. Antigenic variation in *Trypanosoma brucei* analysed by electrophoretic separation of chromosome-sized DNA molecules. *Cell* 1984 ; 37 : 77~84.
  19. Lex HT, Van der Ploeg, Mari Smirs, Thivi Ponnudurai et al. Chromosome-sized DNA molecules of *Plasmodium falciparum*. *Science* 1985 ; 229 : 658~660.
  20. Samkrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning . 2nd. 1989 ; 1 : 260~281.
  21. Snell RG, Wilkins RJ. Separation of chromosomal DNA molecules from *C albicans* by pulsed field gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research* 1986 ; 14 : 4401~4406.
  22. Suzanne Holmes Giannini, Mario Schittini, Keithly Jan S. et al. Karyotype analysis of *Leishmania* species and its use in classification and clinical diagnosis. *Science* 1986 ; 232 : 762~765.
  23. Waterbury P, Greg, Michael J. Lane. Generation of lambda phage concatemers for use as pulsed field electrophoresis size makers. *Nucleic Acids Research* 1987 ; 15 : 3930.