

## Lactobacillus spp.로부터 Genomic DNA 추출을 위한 신속/간단한 방법

이 석 용 · 장 정 은 · 김 승 철 · 윤 현 식 · 소 재 성  
인하대학교 생물공학과, <sup>1</sup>이화의대 산부인과학교실.  
(접수 : 2000. 7. 21., 게재승인 : 2000. 8. 21.)

### A Rapid Small Scale Method for Extraction of Genomic DNA from *Lactobacillus* spp.

Suk-Yong Lee, Chung Eun Chang, <sup>1</sup>Seung-Cheol Kim, Hyun Shik Yun, and Jae-Seong So†  
Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea

<sup>1</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Ehwa Womans University, Seoul 158-710, Korea  
(Received : 2000. 7. 21., Accepted : 2000. 8. 21.)

A method is described for the rapid and simple isolation of genomic DNA from 3 mL culture of *Lactobacillus crispatus* KLB46. The isolated DNA using this method was shown to be an excellent substrate for restriction endonuclease digestion and PCR. The method is expected to be used in genetic manipulation of *L. crispatus* KLB46.

**Key Words :** *Lactobacillus crispatus* KLB46, DNA isolation, PCR, restriction digestion

#### 서 론

건강한 여성의 질내에 자연적으로 존재하는 균주들 중에서 분리 확보하였으며, 분리균주중 한 균주에 대해서는 16S rRNA 유전자의 염기서열 결정에 포함된 균주동정 실험 결과 *Lactobacillus crispatus*로 동정하였으며 KLB46으로 명명하였다(2). 유산균의 유전공학적 개량을 위해 가장 기본이 되는 것은 genomic DNA를 추출해 내는 것이다. 그러나 기존의 그램 양성균의 genomic DNA 추출방법은 *L. crispatus* KLB46의 genomic DNA 추출에 알맞지 않다. 따라서 적은 양의 배양액으로부터 짧은 시간에 DNA를 쉽게 추출하는 방법이 매우 필요하다.

건강한 여성의 질내에 자연적으로 존재하는 균주들 중에서 분리 확보하였으며, 분리균주중 한 균주에 대해서는 16S rRNA 유전자의 염기서열 결정에 포함된 균주동정 실험 결과 *Lactobacillus crispatus*로 동정하였으며 KLB46으로 명명하였다(2). 유산균의 유전공학적 개량을 위해 가장 기본이 되는 것은 genomic DNA를 추출해 내는 것이다. 그러나 기존의 그램 양성균의 genomic DNA 추출방법은 *L. crispatus* KLB46의 genomic DNA 추출에 알맞지 않다. 따라서 적은 양의 배양액으로부터 짧은 시간에 DNA를 쉽게 추출하는 방법이 매우 필요하다.

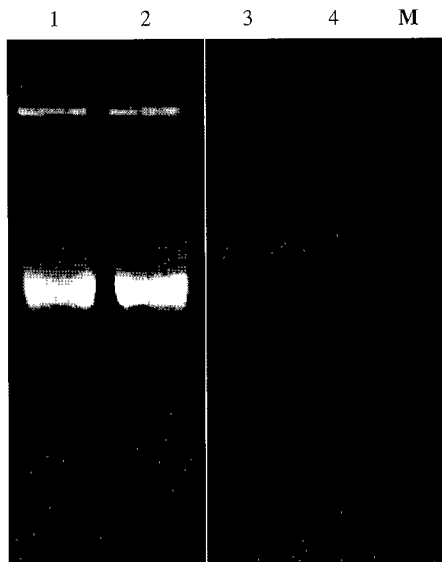
†Corresponding Author : Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea  
Tel : 82-32-860-7516, Fax : 82-32-875-0827.  
E-mail : sjaeseon@inha.ac.kr.

성인여성의 질내에 자연적으로 존재하는 균주들 중에서 분리 확보하였으며, 분리균주중 한 균주에 대해서는 16S rRNA 유전자의 염기서열 결정에 포함된 균주동정 실험 결과 *Lactobacillus crispatus*로 동정하였으며 KLB46으로 명명하였다(2). 유산균의 유전공학적 개량을 위해 가장 기본이 되는 것은 genomic DNA를 추출해 내는 것이다. 그러나 기존의 그램 양성균의 genomic DNA 추출방법은 *L. crispatus* KLB46의 genomic DNA 추출에 알맞지 않다. 따라서 적은 양의 배양액으로부터 짧은 시간에 DNA를 쉽게 추출하는 방법이 매우 필요하다.

#### 재료 및 방법

본 연구에서는 *L. crispatus* KLB46를 3mL MRS 배양액 (ammonium citrate 2 g/l, L-cysteine hydrochloride 0.3 g/l, lactose 10 g/l, FeSO<sub>4</sub> 35 mg/l, MgSO<sub>4</sub> 575 mg/l, MnSO<sub>4</sub> 120 mg/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3g/l, tryptose 10 g/l, Tween-80 1 g/l, yeast extract 5 g/l, pH 7.0)(3)에서 약 10~12시간 배양한 후 1.5 mL microtube에 수거하여 DNA를 추출하는 방법을 확립하였다. 추출에 소요되는 시간도 4~5시간 정도로 기존의 방법(4, 5)보다 신속하였으며, 적은 양의 시약으로 특별한 장비 없이 쉽게 수행할 수 있었다.

*L. crispatus* KLB46를 3 mL MRS 배양액에 접종하여 3 7°C에서 10~12시간 배양한 후, 1.5 mL microtube에서 2번 원심분리하여 수거한다. TEN (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 0.1 M NaCl) buffer 600 µL로 배지 성분을 제



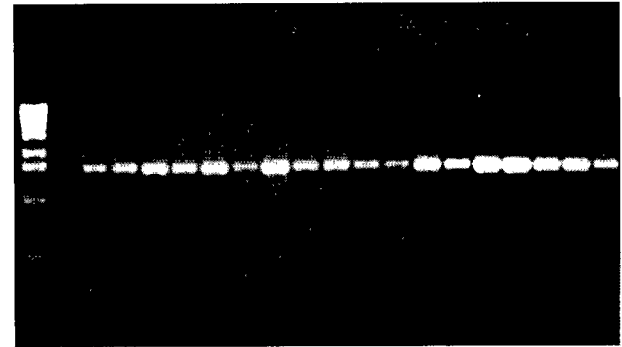
**Figure 1.** Agarose gel picture of DNA samples (lanes 1 and 2, undigested genomic DNA; lanes 3 and 4, *Pst*I digested genomic DNA; M,  $\lambda$ /*Hind*III size marker).

거시된 후, 400  $\mu$ L TE buffer (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA)에 cell pellet을 현탁시킨다. 세포벽의 분해를 위하여 lysozyme (50 mg/mL) 40  $\mu$ L를 넣고 혼합시킨 후에 37°C에서 40분간 정치시키고, 0.5 M EDTA(60  $\mu$ L), 2 mg/mL Proteinase K (7  $\mu$ L), 10% (w/v) SDS (30  $\mu$ L)를 차례로 첨가한 혼합액을 37°C에서 1시간 연장 정치하였다. 같은 부피의 phenol : chloroform : isoamylalcohol (25:24:1) 혼합용액으로 mixing한 후, 원심분리에 의해 층분리를 하고 상등액을 조심스럽게 Eppendorf tube에 옮겼다. RNase (10 mg/mL) 10  $\mu$ L 과 5N NaCl 15  $\mu$ L (1/20 volume)를 첨가한 후 37°C에서 30분 정치하고, 다시 phenol : chloroform : isoamylalcohol (25:24:1) 혼합용액을 사용하여 RNase를 제거하였다. DNA를 침전시키기 위하여 두배부피의 ethanol(1 mL)을 첨가한 후, 상온에서 5분동안 정치하고 원심분리 (15,000 rpm)하여 얻은 DNA를 진공건조기에서 건조시킨 다음 200  $\mu$ L TE buffer에 녹인 후 4°C에 보관하였다.

분리된 DNA는 제한효소 처리 및 PCR (Polymerase Chain Reaction) 실험에 사용되었다. PCR 조건은 genomic DNA 2  $\mu$ L, 10 $\times$ buffer 5  $\mu$ L, dNTP 3  $\mu$ L (2.5mM), primer DNA (0.1  $\mu$ M), Taq polymerase 0.25  $\mu$ L (1.25U)의 총 50  $\mu$ L의 혼합액을 사용하여 preheating 95°C (5 min), denaturation 94°C (1 min), primer annealing 60°C (1 min), polymerase extension 72°C (2 min), final elongation 72°C (8 min)의 조건에서 35 cycle의 반응을 수행하였다.

### 결과 및 고찰

DNA 수율을 확인하기 위해 OD<sub>260</sub>를 측정한 결과 다른 그램양성균 DNA 추출방법의 DNA수율이 약 2~6  $\mu$ g/3 mL인데 반하여 본실험에서는 약 20  $\mu$ g/3 mL 이었다. 또한 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>의 값은 1.7로 기존의 방법과 비슷한 순도를 나타냈다(Figure 1). 지금까지의 실험에서 순수하게 genomic DNA만



**Figure 2.** Agarose gel picture of 16S rDNA gene amplified by PCR.

을 추출하는데 소요된 시간은 약 4시간 정도로 다른 방법(6시간 이상 소요)보다 훨씬 빠르게 할 수 있었다. 추출한 DNA를 유전자 조작에 필요한 *Pst*I 효소로 처리되는 정도를 0.7% agarose gel에서 전기 영동에 의해 확인한 결과 10 U/ $\mu$ g DNA의 조건으로 반응시켜서 절단되는 것을 확인할 수 있었다(Figure 1). 이상의 *L. crispatus* KLB46의 genomic DNA 추출방법은 유전자 은행 확립, genomic Southern blot hybridization과 유용 유전자 분리 및 분석 등의 유전공학실험에 기초가 될 것이며, 나아가 다른 유산균과 그램양성균들의 genomic DNA 추출에도 폭 넓게 사용될 수 있을 것으로 기대된다. 추출한 genomic DNA를 template로 하여 PCR을 수행한 결과 Figure 2 에서와 같이 증폭됨을 알 수 있었으며 이렇게 분리된 genomic DNA를 PCR-RFLP의 방법에 사용하여 *Lactobacillus* spp.의 분류 및 동정에 이용할 수 있다. *Lactobacillus* spp.의 16S rDNA를 증폭하기 위해서 PCR방법을 사용하였고, 여기에 사용된 primer로는 fd1(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')과 rd1(5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3')을 이용하였다. 이 primer는 많은 미생물에서 16S rDNA의 보존적인 부분에 상보적인 서열을 가지고 있어 거의 모든 bacteria의 16S rDNA의 증폭이 가능하다(6).

### 요 약

본 연구에서는 *Lactobacillus crispatus* KLB46의 genomic DNA를 빠르고, 간단하게 소량 (3 mL)의 배양액에서부터 추출하는 방법을 확립하였다. 이 방법을 이용하여 *L. crispatus* KLB46로부터 total genomic DNA를 분리한후 PCR과 제한효소처리를 하여 전기영동으로 확인하였다. 질의 정상세균총을 이루고 병원성균의 증식을 억제하는 그램양성균인 *L. crispatus* KLB46의 genomic DNA의 신속한 추출방법은 이 균주의 유전공학연구에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

### 감사의 말

본 논문은 1997년 교육부의 학술연구조성비 지원사업·생물화학공학 (1997-020-E00067)에 의하여 지원되었음.

### REFERENCES

1. Bruce, A. W. and G. Reid (1988), Intravaginal instillation

- of lactobacilli for prevention of recurrent urinary tract infections, *Can. J. Microbiol.* **34**, 339-343.
2. Chang, C. E. (2000), Isolation and characterization of *Lactobacillus* spp. from human vagina for the ecological treatment of bacterial vaginosis. M. S. Thesis, Dept. of Biological Engineering, Inha University, Incheon.
  3. De Man, J. C., M. Rogosa, and M. S. Sharpe (1960), A medium for the cultivation of lactobacilli, *J. Appl. Bacteriol.* **23**, 130-135.
  4. Velazquez, J. B., J. Cansado, C. Sieiro, P. Calo. E. Longo, and T. G. Villa (1993), Improved lysis of wine lactobacilli for high yield isolation and characterization of chromosomal DNA, *J. Microbiol. Methods* **17**, 247-253.
  5. Hempstead, P. G. (1990), An improved method for rapid isolation of chromosomal DNA from *Mycoplasma* spp., *Can. J. Microbiol.* **36**, 59-61.
  6. 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.