

상온보관이 가능한 건조체 형태의 DNA size marker

강석원·서정원·이규식·조유진·¹박종구·*전복환
대구광역시 달서구 대천동 739 (주)제일생명공학서비스 세포공학연구소
¹대구광역시 중구 동산동 계명대학교 동산의료원 일반외과/의과학연구소
(접수 : 2002. 1. 11., 게재승인 : 2002. 2. 21.)

Development of the Method Allowing DNA Size Markers to be Ambient Storage with Lyophilized Type

Kang, Sek-Won, Jung-Won Suh, Kyu-Shik Lee, Yoo-Jin Cho, Jong-Gu Park¹, and Bok-Hwan Chun^{*}
Cell Technology Institute, Jeil Biotechservices Inc., 739 Daechandong, Dalseogu, Daegu 704-330, Korea,
¹Department of General Surgery/Institute for Medical Science, Keymyung University, School of Medicine,
Donsandong, Gunggu, Daegu 700-310, Korea
(Received : 2002. 1. 11., Accepted : 2002. 2. 21.)

Gel electrophoresis of DNA is a well known technique in molecular biology. This technique is simple, rapid to perform, and capable of adequately separating fragments of DNA. A number of mixtures of DNA fragments ("DNA size markers") are frequently employed in a purpose of extrapolating the sizes or the amount of DNA molecules during gel electrophoresis. DNA size markers are constructed by digesting plasmid DNA, bacteriophage DNA, or recombinant DNA molecules with one or more restriction enzymes. However, liquid suspension containing DNA size marker needs to be kept at a low temperature during storage and shipping. In an attempt to maintain the DNA samples at room temperature for extended period of time, lyophilization of DNA with addition of nuclease inhibitor was studied. Gel loading buffer was also added to the lyophilized DNA to provide additional convenience such that DNA size marker was the "ready-to-use" followed by simply reconstituting with distilled water.

Key Words : DNA size marker, lyophilized DNA, gel loading buffer, ambient storage.

서론

생명과학 중 분자의과학 분야는 광범위한 연구분야를 가지며 기초 학문으로서의 가치뿐만 아니라 생물산업영역으로서도 가장 핵심적 분야의 하나로 활발한 연구가 진행되고 있다 (1). 그러나 국내에서는 분자의과학 및 생명공학 연구에 필요한 기초 연구소재에 관한 산업기반 인프라가 취약한 실정으로 대부분 외국회사 제품을 사용하고 있다. DNA size marker는 원하는 DNA 시료의 크기와 양을 신속, 정확하게 측정할 수 있게 해 주는 실험용 소재로서 분자생물학적 실험에 가장 빈번히 사용되는 소재 중의 하나이며, 이 또한 대부분 수입에 의존하고 있다. 시중에 판매되고 있는 DNA size marker는 사용하기 전 지시제인 bromophenol blue, 비중상승제, 그리고 안정제 등으로 조성된 loading buffer로 제조

성해야 하는 불편함을 가질 뿐만아니라 보관과 운송이 냉동 상태 하에서 이루어져야 하므로 물류비용이 높은 단점도 가지고 있다.

한편 Fermentas AB (Vilnius 2028, Lithuania) 그리고 Gibco BRL (Gaithersburg, MD, U.S.A.) 등과 같은 회사에서는 DNA size marker를 사용할 때 loading buffer와 혼합해야 하는 번거로움을 제거하기 위해 DNA size marker를 loading buffer와 혼합한 "ready-to-use" 형태의 제품을 판매하고 있으며, 특히 Gibco BRL사에서 판매하고 있는 READY-LOAD™ λ DNA/HindIII Fragments 제품의 경우 용액 상태이며 상온 보관이 가능하다 (2-4). Bacteriophage λ DNA의 HindIII 절단체 (λ/HindIII)는 600 base pairs이하의 저분자량 DNA와 23 kilobase pairs 이상의 고분자량 DNA를 모두 포함하고 있어 일반적으로 가장 많이 사용되는 DNA size marker이다 (2). 본 연구는 상업적 측면에서 λ/HindIII를 대상으로 하여, DNA size marker의 gel loading에 필요한 모든 성분들을 혼합한 후, 이를 진공건조체로 제작할 수 있는지 여부와 이 건조체가 상기 기술한 상온 불안정성과 사용상 불편함을 극복할 수 있는지에 관한 연구를 실시하였다. 다양한 종류의

*Corresponding Author : Jeil Biotechservices Inc., 739, Daechundong, Dalseogu, Daegu 704-330, Korea
Tel : +82-53-581-7700, Fax : +82-53-581-3666
E-mail : jeilbio@korea.com

DNA storage buffer와 loading buffer 중 본 실험의 목적인 건조체 제작에 적합한 DNA storage buffer를 선정하였으며, 건조체 제작에 다양한 성분과 농도로 구성된 여러 종류의 6X loading buffer들을 적용하여, λ /HindIII 건조체를 제작하는데 가장 적합한 6X loading buffer의 성분과 조성을 찾았다. 그리고 λ /HindIII 용액을 6X loading buffer와 함께 혼합하여 완전한 건조체로 만든 후에, 이 건조체에 초순수물만을 첨가하였을 때, 쉽게 재조성되고 실험에 편리성을 부여하는지 여부와 이 건조체가 상온 유통 및 보관이 가능할 정도로 안정성을 유지하는지 여부를 확인하였다.

재료 및 방법

균주와 배지

Bacteriophage λ ci⁸⁵⁷ Sam7 (λ phage)의 숙주로 대장균 VCS (Stratagene, USA)와 XL1-Blue MRF' (Stratagene, USA)를 사용하였으며, NZCYM 액상배지 {Jeil Biotechservices Inc., Korea, 1% (w/v) NZ amine; 0.5% (w/v) NaCl; 0.1% (w/v) Casamino acids; 0.5% (w/v) Bacto-yeast extract; 0.2% (w/v) MgSO₄ · 7H₂O}와 LB broth 배지 {Luria-Bertani Broth, Jeil Biotechservices Inc., Korea, 0.5% (w/v) Bacto-yeast extract; 1% (w/v) Bacto-tryptone; 1% (w/v) NaCl}를 사용하였다.

Bacteriophage λ phage의 배양 및 DNA 분리

λ phage의 배양 및 DNA의 분리는 Sambrook 등(5)이 기술한 방법을 사용하였다. XL1-Blue MRF' 균주를 NZCYM 배지에서 16시간 배양한 후, 배양액을 LB 배지를 사용하여 600 nm에서의 흡광도(OD₆₀₀) 값이 1 (10¹⁰ cells/mL)이 되도록 희석하였다. 희석한 배양액 중 1 mL을 취한 후 3,000 rpm으로 1분간 원심하여 세포를 농축하였고, 이를 3 mL의 SM 완충액 {0.58% (w/v) NaCl; 0.22% (w/v) MgSO₄·7H₂O; 50 mM Tris-HCl (pH 7.5); 0.01% (w/v) gelatin}으로 현탁한 후, 5×10⁷개의 λ phage를 첨가하여 37°C에서 20분 동안 감염시켰다. 이를 500 mL의 NZCYM 배지에 접종하여 37°C에서 9~12시간 동안 진탕배양 하였다. 이 배양액으로부터 λ phage DNA의 분리장치는 Lambda Maxi Kit (Qiagen, Germany)을 사용하였으며, 분리방법은 제조사가 기술한 방법을 따랐다.

Size marker의 제조 및 6X loading buffer가 함유된 건조체 제작

분리한 1 mg의 λ phage DNA를 제한효소 HindIII (Roche Molecular Biochemicals, Germany)로 절단하였다. 그 결과 얻은 DNA 용액을 phenol 처리로 정제 및 농축한 후, TEN 완충액 {10 mM Tris-HCl, pH 7.8; 10 mM NaCl; 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), pH 8.0} 또는 TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA, pH 8.0) 완충액을 사용하여 0.25 mg/mL의 농도가 되도록 용해하였다. Ficoll (15%~25%), EDTA (50 mM~120 mM) 그리고 0.05% bromophenol blue로 조성된 9 종류의 6X loading buffer 100 μ L를 DNA 용액 200 μ L와 각각 혼합한 후, 최종적으로

0.083 mg/mL의 농도가 되도록 TE 완충액(pH 8.0) 또는 TEN 완충액(pH 8.0)으로 충전하였다. 이렇게 제조된 18 종류의 용액을 진공건조기(HANIL Spin Vac, Korea)로 3시간 동안 건조시켜 λ /HindIII 건조체를 제작하였다.

DNA size marker의 안정성 확인

λ /HindIII 건조체를 상온에서 빛 노출, 상온에서 빛 차단, 그리고 4°C에서 빛 차단의 3가지 조건에서 각각 60일간 보관한 후 재조성용 초순수물(Ultra Pure Water, Jeil Biotechservices Inc., Korea)을 각각의 실험군에 600 μ L씩 첨가하여 용해하였다. 1 μ g (12 μ L)의 λ /HindIII 용액을 1 μ g (12 μ L)의 DNA Molecular Weight Marker II (Roche Molecular Biochemicals, Germany)와 함께 ethidium bromide가 포함된 0.7% agarose gel에서 전기영동한 후 자외선 조사에 의해 나타나는 DNA의 염색 양상을 통해 정성과 정량을 하였으며 이것으로 상온보관한 λ /HindIII 건조체의 안정성을 확인하였다.

결과 및 고찰

현재 DNA size marker들을 agarose gel electrophoresis에 적용하는데는 다양한 종류의 DNA storage buffer들과 loading buffer들이 사용되고 있다(Table 1). λ /HindIII 건조체를 제작하는데 가장 적합한 6X loading buffer의 조성을 찾기 위해 DNase 저해제 역할을 하는 EDTA, DNA의 비중을 상승시켜 well에 가라앉히는 역할을 하는 ficoll 그리고 전기영동 시 지시제 역할을 하는 bromophenol blue를 농도 별로 혼합한 9개의 조합을 실험에 적용하였다(Figure 1). 상업적으로 판매되고 있는 DNA size marker는 일반적으로 50 μ g의 양으로 판매되므로 각 실험군은 50 μ g의 λ /HindIII 용액을 사용하였으며, glycerol은 상온보관에 적합하지 않아 제외되었다. 또한 상온안정성을 위해 50 mM 이상의 EDTA 농도에 대해 조사하였으며, 지시제는 선명한 DNA 단편 확인과 DNA 정제의 용이성을 위해 bromophenol blue만을 사용하였다. 각각의 6X loading buffer들을 사용하여 제작한 λ /HindIII 건조체를 상온에서 60일간 보관하였다. 초순수물로 건조전의 양과 동일하도록 재조성한 후, agarose gel electrophoresis를 통해 DNA 단편들의 염색 양상을 비교하였다. 이 결과 6X loading buffer에 첨가된 EDTA와 ficoll의 농도가 높아질수록 DNA 단편들의 염색 양상은 상하좌우로 확산되면서 희미해지는 것을 확인할 수 있었고, 특히 562 bp 단편은 희미해져 구분이 어려웠다. 완충액의 종류로는 TE 완충액을 사용했을 때가 TEN 완충액을 사용했을 때 보다 선명하고 DNA 단편의 확산이 적게 관찰되었다(Figure 1). 즉, λ /HindIII 용액의 제조에는 TE 완충액 (pH 8.0)을 사용하고 6X loading buffer는 15% ficoll, 50 mM EDTA 그리고 0.05% bromophenol blue의 조성을 가진 조합을 사용하는 것이 가장 선명한 전기영동 양상을 나타내는 것을 알 수 있었다.

λ /HindIII 건조체를 상온에서 빛 노출, 상온에서 빛 차단, 그리고 4°C에서 빛 차단의 3가지 조건에서 각각 60일간 보관하였을 때, 보관한지 일주일을 전후해서 빛을 차단하지 않은 실험군에서는 bromophenol blue가 푸른색에서 옅은 노

Table 1. Various DNA storage buffers and loading buffers. A) Compositions of DNA storage buffers and loading buffers of traditional type DNA size markers. B) Compositions of DNA storage buffers of ready-to-use type DNA size markers

A)			
Companies	DNA storage buffers	Loading buffers	Ref.
Promega	10 mM Tris-HCl (pH 7.8), 10 mM NaCl, 1 mM EDTA		6
BM	10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA		7
MBI Fementas	10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 1 mM EDTA	60% glycerol, 60 mM EDTA, 0.2% bromophenol Blue, 0.2% xylene cyanol FF	3
Sigma-Aldrich	10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA		8
TaKaRa	10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA	30% glycerol, 30 mM EDTA, 0.03% bromophenol Blue, 0.03% xylene cyanol FF	9
Gibco BRL	10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM NaCl, 0.1 mM EDTA		4
		40% sucrose, 0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol FF	10
		15% ficoll, 0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol FF	10
		30% glycerol, 0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol FF	10
		40% sucrose, 0.25% bromophenol blue	10
B)			
Companies	DNA storage buffers	Storage temperature	Ref.
MBI Fementas	10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 10 mM EDTA, 0.03% bromophenol Blue, 0.03% xylene cyanol FF, 10% glycerol	-20°C	3
Gibco BRL	10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA, 0.05% bromophenol Blue, 5% glycerol	RT	4
JB1	10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 8.33 mM EDTA, 0.0083% bromophenol blue, 2.5% ficoll	RT	In this study

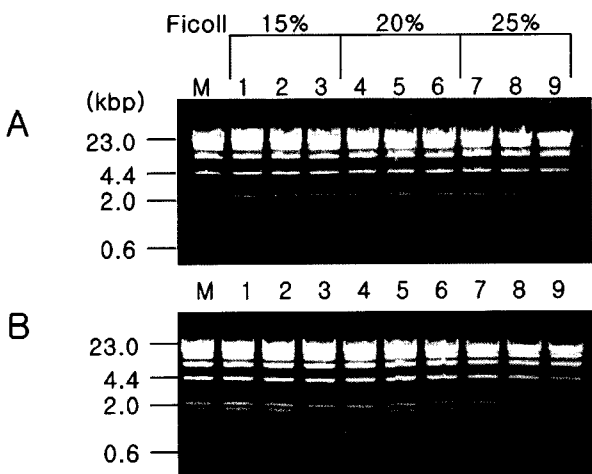


Figure 1. Electrophoretic band patterns of λ phage DNA digested with *Hind*III. DNA size markers were run on 0.7% agarose gels at a concentration of 1 μ g/12 μ L per well. DNA samples were run on the gel after lyophilized storage for 60 days. A) DNA samples were buffered with TE. B) DNA samples were buffered with TEN. M; commercially available size marker, lanes 1, 4 and 7; 50 mM EDTA, lanes 2, 5, and 8; 90 mM EDTA, lanes 3, 6 and 9; 120 mM EDTA. Lanes 1, 2, and 3; 15% ficoll, lanes 4, 5, and 6; 20% ficoll, lanes 7, 8, and 9; 25% ficoll.

란색으로 변색이 되었으나, 빛을 차단한 조건에서는 상온 보관과 4°C 보관 실험군 모두 bromophenol blue 원래의 색을 유지하고 있었다 (결과 생략). 60일이 경과한 후, 초순수물로 이 건조체를 재조성하였으며, 초순수물을 첨가한 후 tube 를 수 차례 툭툭 치는 작업에 의해 1분내로 완전한 현탁이 이루어 졌다. 이렇게 재조성된 λ /HindIII 용액을 건조 전의 λ /HindIII 용액과 상업적인 λ /HindIII 용액을 함께 agarose gel electrophoresis를 통해 비교했을 때 질과 양에서의 차이는 관찰할 수 없었다. 이렇게 재조성된 λ /HindIII 용액을 실내에 있는 실험대 위에서 92 일 동안 (5월 - 7월) 상온 방치하였으나 이 경우에도 건조 전의 λ /HindIII 용액과 상업적인 λ /HindIII 용액과 함께 비교했을 때 질과 양에서의 차이는 관찰할 수 없었다 (Figure 2).

이러한 결과는 λ /HindIII뿐만 아니라 다른 종류의 DNA size marker들의 경우에도 상온에서 장기간 보관이 진공건조체로서 가능하며 실제 완충액, 비중상승제, 지시제, 그리고 DNA 안정제 등을 모두 포함한 상태로 진공건조하여도 DNA size marker들의 안정성에 영향을 미치지 않음을 알 수 있다. 이러한 DNA size marker들의 상온 안정화 방법을 상업적으로 적용한다면 국내에서 DNA size marker들을 외국회사들에 비해 경쟁력있는 가격으로 생산 및 공급할 수 있을 것으로 기대된다.

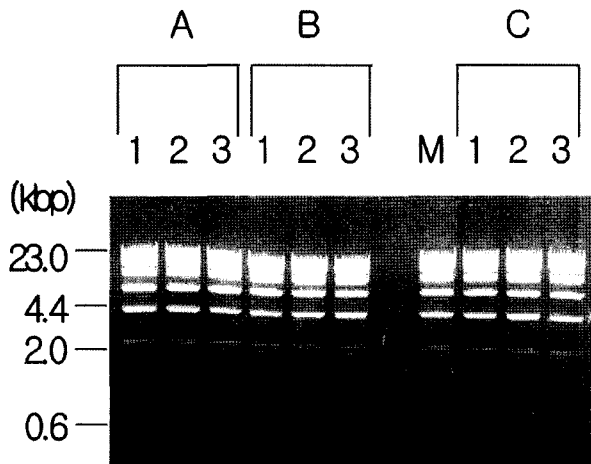


Figure 2. Electrophoretic band patterns after lyophilizing DNA size marker. DNA size markers were loaded on 0.7% agarose gels at a concentration of 1 $\mu\text{g}/12 \mu\text{L}$ per well. A) Before lyophilization, B) after lyophilization, C) 90 days after DNA resuspension in distilled water, M; commercially available DNA size marker. Lane 1; stored at room temperature (RT) with light, lane 2; stored at RT without light, lane 3; stored at 4°C without light.

요 약

기존의 DNA size marker들은 보관과 운송이 -20°C 이하의 냉동상태 하에서 이루어져야 하는 온도안정성이 떨어지는 단점을 갖고 있다. 이러한 단점을 극복하기 위하여 온도안정성이 떨어지는 물질의 경우 건조상태를 유지할 때 높은 안정성을 유지한다는 점에 착안해 연구를 시작하였다. DNA는 비교적 안정한 물질이므로 그 가능성은 더욱 높을 것으로 가정하였다. TE 완충액에 녹아있는 $\lambda/\text{HindIII}$ 용액을 가장 선명한 건조체 제작에 가장 유리하다고 판단된 6X loading buffer (15% ficoll, 50 mM EDTA 그리고 0.05% bromophenol blue)와 함께 혼합한 다음 진공건조를 시도해 보았다. 이 건조체를 상온에서의 빛 노출, 상온에서의 빛 차단 그리고 4°C에서의 빛 차단의 세 조건하에서 60일간 방치한 후, 건조 전 전체부피와 같은 양의 초순수를 사용하

여 건조체를 용해하여 상업적으로 판매되는 DNA size marker와 전기영동 양상을 비교한 결과 DNA size marker 자체의 양과 질에서 변화가 없었다. 그러나 건조체에 포함되어 있는 bromophenol blue의 푸른색은 빛에 노출된 조건으로 방치한 경우 자체의 푸른색을 상실하였다. 즉, 건조체는 빛이 차단된 상온에서는 양과 질의 변화없이 장기간 보관이 가능하였다. 그리고 이 건조체를 초순수로 재조성한 후 상온에서 92일 동안 보관하였으나 이 경우에도 $\lambda/\text{HindIII}$ 절단체의 양과 질의 차이는 관찰할 수 없었다.

감사의 글

본 연구는 중소기업 기술혁신 개발사업 연구비에 의해 지원되었음.

REFERENCES

- Han, M. H., H. K. Lee, and M. H. Sung (1996), *Biotechnology - Present and future*, 1-588, KRIBB, Daejeon.
- Sanger, F., A. R. Coulson, G. F. Hong, D. F. Hill, and G. B. Petersen (1982), Nucleotide sequence of bacteriophage lambda DNA. *J. Mol. Biol.* 162, 729-773.
- MBI Fermentas Catalog (1998), *Molecular Biology Catalogue & Product Application Guide*, pp184.
- Life Technologies Catalogue (1997). *Gibco BRL Products & Reference Guide*, pp16.7-8
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis (1989), *Molecular Cloning*, 2th ed., 1, p. 2.3-2.107, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Promega Catalog (2000), *Life Science Catalog 2000*, pp4.6.
- Roche Diagnostics Catalog (2001), *Roche Molecular Biochemicals 2001 Biochemicals Catalog*, pp200.
- Sigma-Aldrich Catalog (2001), *Biochemicals and Reagents for Life Science Research*, pp1589.
- TaKaRa Catalog (2000), *2000/2001 TaKaRa Biotechnology Products Guide*, Bohanbiomedical Co., ppF562.
- Sambrook, J., and D. W. Russell (2001), *Molecular Cloning*, 3th ed., 3, pp A1.19, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.