

## 효율적인 Metagenomic Library의 제작 방법 탐구

임동빈\*

승실대학교 자연과학대학 생명정보학과

자연계에 존재하는 미생물의 대부분이 배양이 불가능하다는 것이 밝혀진 이후, 자연계의 시료로부터 직접 유전자를 클로닝하여 유용유전자를 발굴하는 메타제놈(metagenome) 이용 방법이 주목을 받게 되었다. 그러나 실제로 오염이 심한 환경시료로부터 DNA를 추출하여 유용한 메타제놈 라이브러리(metagenomic library)를 제작할 때 기술적 문제점에 대한 해결 방법을 탐구하였다. 메타제놈 라이브러리 제작에는 fosmid vector가 가장 편리하였으며, 성공적인 라이브러리 제작에는 fosmid vector에 클로닝이 가능한 40 kbp 크기의 DNA 조각을 얻는 과정이 중요함을 알았다. 여러 실험 조건을 종합적으로 검사한 후 메타제놈 라이브러리 제작에 대한 최적 방법을 제시하였다.

**Key words** □ metagenome, metagenomic library, environmental DNA, fosmid

전통적인 유용유전자 발굴 방법은 자연 환경으로부터 세균을 분리하여 배양한 후, 배양한 미생물이 원하는 단백질을 생산하는지 검사하고, 마지막으로 원하는 활성을 보이는 미생물로부터 목표 유전자를 클로닝하는 방식으로 진행된다. 그러나 실험실에서 배양이 가능한 미생물은 전체의 일부분에 지나지 않음이 밝혀졌다. 따라서 배양을 거치는 유전자 발굴 방법은 자연계에 존재하는 유전자중 지극히 일부분만 검사하게 되며, 지구에 존재하는 대부분의 유전자 자원은 검사 대상이 되지 않음을 깨닫게 됐다. 이러한 전통적인 유전자 발굴 방법의 단점을 극복하고자 Rondon 등은 미생물의 배양 과정 없이 자연계에 존재하는 시료로부터 직접 DNA를 클로닝하여 유용한 유전자를 찾는 방법을 개발하였는데(1), 이 방법은 다양한 시료에 적용되면서 유용 유전자 발굴의 대표적인 방법이 되었다(2-6).

DNA library란 어떤 시료 내에 존재하는 전체 DNA를 포함하는 클론들의 총합을 말하는데, 이에는 genomic library와 cDNA library가 있다. 반면에 다양한 미생물이 섞여있는 자연계 시료로부터 직접 DNA를 추출하여 제작한 DNA library는 metagenomic library라 한다(1). 환경에 존재하는 DNA에서 미생물 배양을 우회하여 직접 유용 유전자를 발굴하기 위해서는 우선적으로 자연에서 얻은 시료내에 존재하는 모든 DNA를 포함하는 metagenomic library를 제작하여야 한다.

환경으로부터 직접 채취한 시료 내에는 다양한 미생물이 포함돼 있으므로 시료 내에 존재하는 DNA의 복잡성(complexity)은 매우 크다. 이처럼 복잡한 metagenomic DNA를 모두 망라하는 라이브러리를 제작하는 것은 매우 어렵다. 일반적으로 복잡한 DNA를 커버하는 library를 제작하기 위해서는 하나의 클론이 많

은 양의 DNA를 가질수록, 즉 삽입된 DNA 조각의 크기가 클수록 편리하다. 그러나 삽입된 DNA 크기의 증가에 비례하여 클론의 안정성은 감소하는데, 유전적 안정성과 크기라는 두 요소를 충족시키도록 개발한 벡터로 BAC vector가 있다(7). BAC library는 보통 시료 DNA를 *Sau3AI*로 부분 분해한 다음 약 100 kbp 되는 DNA를 얻어 벡터의 *BamHI* 자리에 삽입하여 제작하는데, 양 끝이 모두 *Sau3AI*로 절단된 100 kbp 크기의 DNA 조각을 얻기 위해서는 시료 DNA의 크기가 적어도 300 kbp 이상은 되어야 한다. 그러나 불순물이 오염되어있는 환경 시료로부터 이렇게 큰 DNA를 정제하기는 매우 어렵고, 따라서 BAC vector에 metagenomic library를 제작하는 것은 숙련된 기술과 많은 시간을 필요로 한다(1).

BAC vector의 단점을 보완하여 제작된 벡터 중에 fosmid vector가 있다(8). Fosmid는 F plasmid의 복제개시 인자에 의하여 복제가 조절되기 때문에 세포당 카피수가 최소로 존재하여 안정성은 BAC vector와 동일하다. 또 일반적인 cosmid vector (9)와 같이 박테리오파지 랍다의 *cos* site를 가지고 있어 *in vitro* packaging과 infection이 가능하므로 클로닝 효율성을 높다(8). 삽입되는 DNA의 크기는 다른 cosmid vector와 마찬가지로 BAC vector의 1/2 수준인 40 kbp 정도이나, 오염된 환경시료로부터 얻게 되는 DNA의 크기를 생각하면 40 kbp 정도의 삽입 DNA 크기는 단점보다는 장점으로 간주될 수도 있다.

Fosmid vector가 도입되면서 genomic DNA library의 제조가 비교적 용이해졌으나 효율적인 metagenomic library 제조를 위해서는 아직도 많은 경험과 기술을 필요로 한다. 본 연구에서는 fosmid vector를 이용하여 실제로 metagenomic library 제작할 때 만나게 되는 여러 가지 문제점에 대한 해결 방법을 제시하고 metagenomic library 제작 방법의 최적화를 추구하였다.

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 02-820-0452, Fax: 02-824-4383.  
E-mail: dblim@ssu.ac.kr

## 재료 및 방법

### 토양 시료로부터 DNA정제

야산으로부터 채취한 토양으로부터 다음과 같이 DNA를 추출하였다 (10). 흙 10 g을 20 ml의 DNA 추출용 완충용액(100 mM Tris-HCl[pH8.0], 100mM EDTA [pH8.0], 1.5M NaCl, 1% CTAB [hexadecylmethylammonium bromide])에 현탁시킨 후 4겹의 가제로 걸러 남아있는 덩어리와 식물의 뿌리 등은 제거하였다. 200  $\mu$ l의 proteinase K (10 mg/ml)을 넣고 37°C에서 1시간 반응시킨 다음 6% SDS 용액 10 ml(최종 2%)을 첨가하여 잘 섞은 후 65°C에서 2시간 반응시켰다(이 때 가끔 앞뒤로 뒤집으면서 섞어 줌). 6,000  $\times$  g로 20분간 원심 분리 후 상등액을 모아 동일부피의 chloroform-isoamyl alcohol (24:1, vol/vol)을 가하여 흔들어 준 후 원심분리했다. 수용액 층을 chloroform-isoamyl alcohol로 두 번 더 추출한 후 수용층을 얻어 0.6 vol의 isopropanol을 첨가하여 핵산을 침전시켰다. 침전된 핵산은 15,000  $\times$  g로 20분 원심 분리하여 모은 후 70% ethanol로 세척하였다. 세척 후 핵산은 10  $\mu$ g의 RNase A가 포함된 0.3 ml의 멸균수에 녹인 후 0.4% agarose gel에 걸쳐 추출된 DNA의 농도와 크기를 결정하였다. DNA가 불순물에 오염된 경우 동일 부피의 PEG 용액(1.5 M NaCl 용액에 polyethylene glycol 8000을 30%(wt/vol) 되게 넣어 만듦)을 첨가하고 얼음에 10분간 방치한 후 원심분리하여 DNA를 정제하였다.

### 0.4% agarose gel 전기영동

40 kbp 이상되는 DNA를 분리하기 위해서는 0.4% 이하의 agarose gel을 사용하여야 하며 다음과 같이 하였다. 우선 젤 판에 1% agarose gel을 얇게 부었다. 이 gel은 0.4% gel을 지지하기 위한 것이므로 comb은 콧지 않았다. 1% gel이 완전히 굳으면 1% gel을 건드릴 정도 깊이로 comb을 콧은 후 0.4% gel을 부었다. 전기영동 완충용액으로는 TBE를 사용하며 클로닝을 위한 DNA 분리용 prep gel인 경우 0.4% gel은 low melting temperature gel을 사용하였다. DNA 크기를 추정하기 위한 표준으로 완전한 lambda DNA와 HindIII 처리된  $\lambda$  DNA를 함께 사용하였다.

### DNA 말단 수선 및 DNA size selection

Size selection gel을 걸기 전에 T4 DNA polymerase와 dNTP를 사용하여 DNA말단을 blunt end로 수선하였다. 이 때 상용 DNA end-repair 효소 혼합액(Epicentre, Madison, USA)을 구입하여 공급자의 지시대로 사용하면 편리하다. T4 DNA polymerase로 끝이 다듬어진 DNA는 위에 기술된 0.4% low melting temperature (LMT) gel을 사용하여 size fractionation을 하였다. Preparatory 0.4% LMT gel도 앞의 방법처럼 1% 지지용 젤 위에 0.4% LMT 젤을 부어 만들었다. 다만 DNA를 정제하기 위한 젤은 약 100ul의 시료가 들어갈 수 있도록 well의 크기와 높이를 조절하였다. Size marker로는  $\lambda$  DNA와  $\lambda$  HindIII DNA를 섞어서 사용하였는데, 시료를 올린 well의 양 옆 두 well에 표준 시료를 올렸다. 전기영동은 40V 정도로 하여 밤새 걸어 푸른 염료(xylene cyanol)가 젤의 끝에 오면 전기영동을 중지하였다. 젤 양

옆에 건 size marker 부분을 잘라 ethidium bromide로 염색한 후 UV로 관찰하면서 intact  $\lambda$  DNA와  $\lambda$  HindIII 제일 큰 조각이 well에서부터 몇 cm 떨어져 있나 기록하였다. 시료 DNA가 분리된 젤로 돌아가  $\lambda$  DNA의 약간 윗 부분에 해당하는 곳에서부터  $\lambda$  HindIII 제일 큰 조각 부분까지의 젤을 2 mm 간격으로 잘게 썬 후 각각의 조각으로부터 DNA를 정제하여 10  $\mu$ l의 TE (10 mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA) buffer에 녹였다. 이 시료의 2  $\mu$ l를 0.4% 젤에 걸어 각각의 젤조각이 함유하고 있는 DNA의 크기를 확인하였다.

### Vector의 준비

Plasmid pCC1fos (Epicentre, Wisconsin, USA)를 15  $\mu$ g/ml의 chloramphenicol이 첨가된 LB broth에 접종하여 밤새 배양하였다. 다음날 배양액 500  $\mu$ l를 4.5 ml의 증폭용 배지(LB broth+15  $\mu$ g/ml chloramphenicol+0.02% arabinose)에 접종하여 37°C에서 5시간 세계 흔들면서 배양한 후 다음과 같이 플라스미드를 분리하였다. Eppendorf tube로 1.5 ml씩 두 번 원심분리하여 배양액 3 ml로부터 세포를 회수하고, 100  $\mu$ l의 Solution 1 (50 mM glucose, 10 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0)으로 세포를 현탁시킨 후 200  $\mu$ l의 Solution 2 (0.2 N NaOH, 1% SDS)를 가하여 섞은 후 5분간 방치하였다. 150  $\mu$ l의 7.5 M ammonium acetate를 넣은 뒤 다시 150  $\mu$ l의 chloroform를 첨가하고 위아래로 흔들어 섞은 다음 얼음에 10분간 박아두었다. 이를 원심분리 (Eppendorf, 12,000 rpm, 4°C, 10 min)하면 위층과 아래층으로 분리한 후 경계층을 건드리지 않고 위층만 새 튜브에 옮겼다. 200  $\mu$ l의 30% PEG 용액 (1.5 M NaCl 용액에 polyethylene glycol 8000을 30% (wt/vol) 되게 넣어 만듦)을 넣고 위아래로 흔들어 섞었다. 이때 허영게 불투명해지면 4번 과정에서 밀층의 chloroform이 따라 온 것이니 조심해야 한다. 어둠에 15분간 박아 둔 후 원심분리 (12,000 rpm, 4°C, 10 min)하여 침전물을 모은 후 70% EtOH로 세척하고 말린 후 50  $\mu$ l의 멸균증류수에 녹였다. 이렇게 뽑은 DNA 20  $\mu$ l를 제한효소 PmlI으로 절단한 후 alkaline phosphatase를 처리하여 dephosphorylated된 blunt end의 벡터를 제조하였다.

### Ligation과 packaging

Size selection하여 정제한 DNA 10  $\mu$ l 중 크기 확인을 하고 남은 8  $\mu$ l와 PmlI으로 절단되고 dephosphorylated pCC1fos DNA 1  $\mu$ g, 그리고 1  $\mu$ l의 10X ligation buffer를 섞은 후 실온에서 ligation하였다. Ligation된 DNA 10  $\mu$ l에  $\lambda$  packaging extract (Epicentre, Madison, USA) 25  $\mu$ l를 넣고 거품이 안 나도록 조심하면서 섞은 후 Eppendorf로 잠깐 돌려 액체를 모으고 30°C에서 90분간 반응시킨 후 다시 25  $\mu$ l의 packaging extract를 넣고 역시 30°C 90분간 반응시켰다. 가볍게 vortex후 chloroform 1-2 방울 넣고 섞어 미생물의 번식을 막은 후 4°C에 보관하였다.

### Infection과 plating

우선 파지의 숙주로 사용할 *E. coli* EPI 300 single colony를 packaging하기 전날 LB broth에 접종하여 밤새 기른후, 아침에

최종 농도가 10 mM MgSO<sub>4</sub>와 0.2% maltose가 되도록 첨가된 LB broth에 다시 접종하여 37°C에서 진탕 배양하였다. 6시간쯤 기른 EPI300 host cell을 E-tube에 200 µl씩 분주한 후, 각 튜브에 패키징한 파지 20 µl 씩 첨가하여 37°C 45분간 실온에서 가만히 방치하였다. Infected bacteria는 미리 준비해 둔 항생제 함유 배지(LB plate + 15 µg/ml chloramphenicol)에 200 µl씩 깔아 37°C에서 colony들이 충분히 자랄 때까지 약 30-40시간 키웠다.

### Library 평가

평판배지에 자란 콜로니 10개를 선택하여 15 µg/ml chloramphenicol이 첨가된 LB broth에 접종하여 밤새 배양하였다. 다음 날 배양액 500 µl를 4.5 ml의 증폭배지(LB broth + 15 µg/ml chloramphenicol + 0.02% arabinose)에 접종하여 37°C에서 5시간 세계 흔들면서 배양한 후 벡터제조사에 기술한 방법과 같이 플라스미드를 분리하였다. 배양액 3 ml로부터 추출한 plasmid는 50 µl의 멸균증류수에 녹여 보관하고, 이 중에서 15 µl를 취하여 EcoRI과 BamHI로 각각 처리하여 삽입된 DNA의 크기와 다양성을 확인하였다.

## 결과 및 고찰

### 벡터의 선택 및 준비

BAC vector는 insert size가 100 kbp 정도로 크다는 장점이 있으나, 제한효소를 사용한 partial digestion 후 vector와 ligation이 될 수 있는 품질의 DNA를 얻는 데에는 숙련된 기술을 필요로 한다는 단점이 있다. 반면에 cosmid는 insert size가 45 kbp 정도로 박테리오파지 λ의 cos site를 가지고 있어 *in vitro* packaging에 의한 infection을 이용하면 소량의 DNA 시료로부터도 높은 효율의 라이브러리를 제작할 수 있는 장점이 있으나 세포당 copy number가 많아 clone이 불안정하다는 단점을 가진다. 이 두 벡터의 장점만을 살린 벡터가 김웅진 박사가 개발한 fosmid다(8). 본 실험에 사용된 pCC1fos vector는 Fosmid vector의 copy number를 control할 수 있도록 개선된 벡터이다(11).

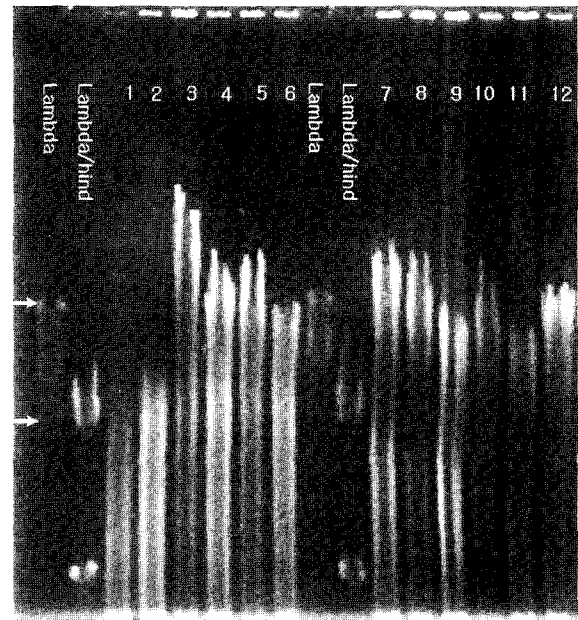
Plasmid pCC1fos는 F plasmid 유래의 복제개시인자 Ori2(12)와 RK2 plasmid 유래의 OriV(13)를 가지고 있는데 RK2의 rep protein 발현은 chromosome에 삽입되어 있으며 arabinose에 의하여 엄격한 제어를 받도록 조작되어 있다(11). 일반적으로 라이브러리의 제작과 보존 시에는 Ori2를 이용하여 복제 되도록 하나, plasmid의 분리와 분석을 위해서는 배지에 arabinose를 넣어 OriV를 활성화시켜 플라스미드를 증폭한다. 본 실험에서도 Arabinose를 첨가할 경우 벡터의 copy number가 세포당 20개 정도 증가함을 발견하였으며, 이 때 배지에 첨가할 arabinose는 0.02% 이상이면 충분하였다. Plasmid pCC1fos는 재료 및 방법에 제시한 방법으로 정제하여 제한효소 PmlI으로 절단하고 alkaline phosphatase를 처리하여 준비하였다.

### 시료 DNA의 준비

우리가 사용할 pCC1fos는 cosmid vector로 크기가 약 8 kbp

정도이고 lambda head에 packaging되는 DNA의 크기는 50 kbp 정도이므로 insert DNA의 크기는 40-42 kbp이어야 한다. 또한 vector가 blunt end로 준비되었으므로 insert DNA 역시 blunt end로 만들어야 한다. 우리가 토양 등에서 추출한 DNA 크기는 대략 20-100 kbp가 되었는데 이 시료를 절단하여 cosmid에 클로닝할 수 있는 40 kbp DNA를 얻는 것 보다 DNA를 추출할 때 얻어진 여러 크기의 혼합물에서 40 kbp 정도 되는 DNA를 분리하여 사용하는 것이 훨씬 편리하였다. Fig. 1은 토양 등으로부터 분리한 서로 다른 6 종류의 DNA를 0.4% agarose gel에 걸어 시료 DNA의 크기를 알아본 결과이다. 이때 완전한 λ DNA를 함께 걸어 크기를 비교하면 편리하였다. Fig. 1의 1, 2, 11 번의 시료는 정제 중에 손상을 많이 입어 대부분 24 kbp이하임을 알 수 있고, 따라서 1, 2, 11 번의 DNA는 library 제작에 적합하지 않았다. 이 경우 시료로부터 DNA를 다시 정제하였다. 이들 세 개를 제외한 시료에는 40 kbp 정도의 DNA가 충분히 존재하므로 이를 정제하여 사용할 수 있다.

토양과 같이 오염물이 많은 자연계 시료로부터 추출한 DNA는 추출과정 중에 다양한 손상을 입었을 것으로 추정되므로 vector와 연결하기 전에 DNA를 수선하는 것이 필요하였다 (end repair). 이에 따라 크기를 확인한 DNA는 T4 DNA polymerase를 처리하여 양 말단을 클로닝이 가능한 blunt end로 만들었다. End-repair 반응 후 size fraction을 하였는데, 이때 젤에 거는 양



**Fig. 1.** Size test of sample DNA. Before the construction of metagenomic library, the sizes of DNA extracted from various soil samples were tested by 0.4% agarose gel electrophoresis. Intact λ DNA and λ HindIII were used as size markers. For the construction of metagenomic library in the fosmid vector pCC1fos, the size of DNA should be about 40 kbp. Since samples 1, 2, and 11 do not have this size of DNA, they were discarded. Arrows indicate positions of 23 kbp and 48 kbp DNA.

이 100  $\mu$ l 정도이므로 End-repair할 때 부피를 80  $\mu$ l로 맞춰 주면 편리하였다. 말단을 수선한 DNA 조각은 0.4% LMT agarose gel에 전기영동하여 library 제작에 사용될 40 kbp 정도 되는 DNA 조각을 정제하였다. EtBr 염색후 UV를 쬐어주면 DNA가 손상을 입고 클로닝 효율이 떨어지므로 전기영동이 끝나면 시료 DNA가 포함된 부분은 그대로 두고 젤의 양쪽 size marker부분만을 오려내어 EtBr로 염색하여  $\lambda$  DNA와  $\lambda$  HindIII의 제일 큰 조각의 위치를 기록하였다. Size marker의 위치를 안다 해도 우리가 필요로 하는 40 kbp의 DNA의 위치는 알기는 거의 불가능하였으므로 size marker의 위치를 참조하여 40 kbp 정도의 DNA를 포함한다고 여겨지는 부분을 2mm 정도씩 썰어 DNA를 정제하였다. 이렇게 정제한 DNA를 다시 젤에 걸어 어느 조각이 40 kbp 정도의 DNA를 함유하는지 확인하였다. Fig. 2는 시료를 여섯 조각으로 나눈 후 정제한 DNA의 크기를 확인하기 위하여 건 젤을 보여준다. 이 실험의 경우 40 kbp 정도의 DNA는 1번 조각에 포함돼 있음을 알 수 있으며, 따라서 다른 조각의 DNA는 버리고 1번 조각의 DNA를 사용하여 library 제작을 진행하였다.

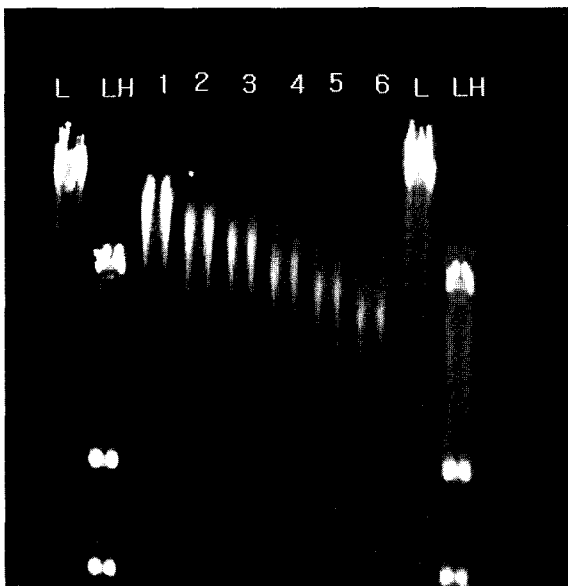
### Library 제작

End-repair후 size fraction하여 정제한 DNA는 blunt end를 함유하므로 blunt end로 준비된 vector와 재료와 방법에 기술한 조건에서 ligation 반응을 시켰다. Ligation 한 DNA는 *in vitro* packaging할 것이므로 concatemer를 형성하도록 DNA의 농도가 높게 반응시켰다. 보통 size fractionation gel에서 정제하여 얻은

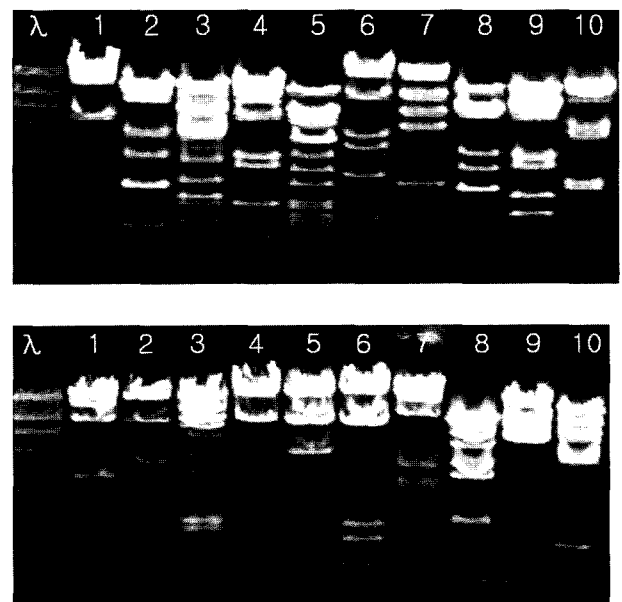
10  $\mu$ l의 DNA 시료중 크기 확인을 하고 남은 8  $\mu$ l에, vector 1  $\mu$ l (1  $\mu$ g/ $\mu$ l)를 넣고 ligation 반응을 시키면 편리하였다. Ligation한 DNA는 Lambda Packaging Extract를 사용하여 *in vitro* packaging한 후 phage dilution buffer를 final volume 1 ml이 되게끔 넣어 보관하였다. Packaging 한 phage solution 20  $\mu$ l를 *E. coli* EPI300에 감염시킨 후 chloramphenicol이 함유된 선택배지에 깔아 콜로니 수를 확인하였다. Packaging한 용액 20  $\mu$ l로부터 대략 500-2,000개 정도 나오면 성공적으로 판단하였다. 한 점시에 5-10개 정도의 콜로니가 나오는 경우도 있었는데, 이들 콜로니로부터 plasmid를 뽑아 분석해 보니 거의 모두 insert가 없이 벡터만 있는 콜로니였다.

### Library의 품질 검사

Packaging extract로부터 얻은 chloramphenicol 저항성 콜로니로부터 plasmid를 뽑아 제한효소로 분석하여 insert DNA의 함유 여부와 제작한 library의 품질을 알아 보았다. 플라스미드 추출은 재료와 방법에 기술한 대로 abinose를 배지에 첨가하여 plasmid의 copy number를 증폭시킨 후 수행하였다. 3 ml의 배양액으로부터 추출한 DNA는 50  $\mu$ l의 증류수에 녹이면 분석하기에 적합하였으며, 이 중에서 15  $\mu$ l를 취하여 20  $\mu$ l로 제한효소 반응을 시키면 편리하였다. 제한효소는 AT-rich DNA를 자주 자르는 *EcoRI*과 GC-rich DNA를 자주 자르는 *BamHI*을 동시에 사용하였다. Fig. 3은 우리가 제작한 metagenomic library로부터 추출한 plasmid를 *EcoRI*과 *BamHI*으로 절단하여 agarose gel에 건 결과이다. 10개의 클론이 서로 각기 다른 제한 효소 절단 패턴을 보이므로 각 콜로니가 함유한 insert는 서로 다를 수 있다. 이



**Fig. 2.** DNA extracted from size selection gel. DNA extracted from a soil sample (sample # 4) was run on a preparative 0.4% agarose gel and the region between 23 kbp and 48 kbp markers was cut and sliced into 6 pieces. DNA in each piece was extracted and analyzed on a 0.4% agarose gel. Number 1 sample contained DNA fragment with 40 kbp and was used for library construction. L,  $\lambda$  DNA. LH, *HindIII*-treated  $\lambda$  DNA.



**Fig. 3.** Restriction analysis of plasmids from a metagenomic library. Plasmids were purified from randomly chosen 10 colonies and digested with *EcoRI* (upper panel) and *BamHI* (lower panel). Restriction fragments were analyzed on a 1% agarose gel.  $\lambda$  *HindIII* was used as a size marker.

처럼 제한 효소 패턴이 다양하게 나와야 제대로 만들어진 라이브러리라 할 수 있다. 총 콜로니 수, insert을 함유한 비율, insert DNA의 평균적인 크기로부터 대략적이거나 insert 내의 총 DNA량을 계산할 수 있다. 우리가 토양 시료로부터 DNA를 얻어 제작한 라이브러리에는 총 콜로니 개수는 대략 25,000개 였으며, 평균 insert size를 40 kbp로 잡을 경우 이는 대략 1,000 Mbp 정도의 metagenome을 커버한다고 말할 수 있다.

## 결 론

본 연구에서는 토양 등의 시료로부터 추출한 DNA로부터 metagenomic library를 효과적으로 제작하는 방법을 탐구하였다. 주변의 다양한 environmental sample로부터 추출한 DNA는 크기가 대략 20-100 kbp 정도였으며 따라서 BAC vector보다는 fosmid vector를 사용하여 library를 제작하였다. 성공적인 library 제작을 위해서는 fosmid vector의 insert size인 40 kbp 정도의 DNA를 효과적으로 정제하는 것이 중요하였으며, 이런 크기의 DNA를 얻기 위하여 preparatory 0.4% LMT gel electrophoresis 방법을 고안하였다. 토양 시료로부터 DNA를 추출하여 제작한 library에는 서로 다른 콜로니가 25,000개 정도 이었으며 이는 대략 1,000 Mbp의 metagenomic DNA를 함유한다 추측할 수 있었다.

## 감사의 글

본 연구는 숭실대학교 교내 연구비 지원으로 이루어 졌음

## 참고문헌

1. 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,

- 2541-2547.
2. Voget S., C. Leggewie, A. Uesbeck, C. Raasch, K.E Jaeger, W.R. Streit. 2003. Prospecting for novel biocatalysts in a soil metagenome. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 6235-6242.
3. Streit W.R. and R.A. Schmitz, 2004. Metagenomics-the key to the uncultured microbes. *Curr. Opin. Microbiol.* 7, 492-498.
4. Gabor E.M., W.B. Alkema, and D.B. Janssen. 2004. Quantifying the accessibility of the metagenome by random expression cloning techniques. *Environ. Microbiol.* 6, 879-886.
5. Streit W.R., R. Daniel, and K.E. Jaeger. 2004. Prospecting for biocatalysts and drugs in the genomes of non-cultured microorganisms. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15, 285-290.
6. Daniel R. 2004. The soil metagenome-a rich resource for the discovery of novel natural products. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15, 199-204.
7. Shizuya H, B. Birren, U.J. Kim, V. Mancino, T. Slepak, Y. Tachiri, and M. Simon. 1992. Cloning and stable maintenance of 300 kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, 8794-8797.
8. Kim U.J., H. Shizuya, P.J. de Jong, B. Birren, and M.I Simon. 1992. Stable propagation of cosmid sized human DNA inserts in an F factor based vector. *Nucleic Acids Res.* 20, 1083-1085.
9. Collins J, and H.J. Bruning. 1978. Plasmids useable as gene-cloning vectors in an in vitro packaging by coliphage  $\lambda$ : "cosmids". *Gene* 4, 85-107.
10. Zhou J., M.A. Bruns, and J. M. Tiedje. 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 316-322.
11. Wild J. and W. Szybalski. 2004. Copy-control tightly regulated expression vectors based on pBAC/oriV. *Methods Mol. Biol.* 267, 155-167.
12. Murotsu T., H. Tsutsui, and K. Matsubara. 1984. Identification of the minimal essential region for the replication origin of miniF plasmid. *Mol. Gen. Genet.* 196, 373-378.
13. Thomas C.M. and A.A. Hussain. 1984. The *korB* gene of broad host range plasmid RK2 is a major copy number control element which may act together with *trfB* by limiting *trfA* expression. *EMBO J.* 3, 1513-1519.

(Received November 22, 2004/Accepted December 5, 2004)

### ABSTRACT : Development of an Efficient Procedure for the Construction of Metagenomic Library from Environment Samples

**Dongbin Lim** (Department of Bioinformatics and Life Science, Soongsil University, Sang-dong, Dongjak, Seoul 156-743, Korea)

I investigated an effective way to generate a metagenomic library from DNA prepared from environmental samples. The sizes of DNA extracted from environmental samples were usually in the range of 10 to 100 kbp as estimated from 0.4% agarose gel electrophoresis. Because of this small size, a fosmid, rather than BAC, was chosen as a vector. It was found that, for the successful generation of metagenomic library, the selection of DNA with the size of about 40 kbp was critical and, therefore, a simple agarose gel electrophoresis system was developed to select this size of DNA. By the procedure described in this report, I obtained metagenomic libraries containing 25,000 fosmid clones, which corresponded to 1,000 Mb of metagenomic DNA.