

## 방사무늬 김의 cDNA Library 제조 및 분석

서수분 · 이은경 · 김영진<sup>†</sup>

부산대학교 자연과학대학 분자생물학과

### Construction and Analysis of cDNA Library from *Porphyra yezoensis*

Soo-Boon Seo, Eun-Kyoung Lee and Yung-Jin Kim<sup>†</sup>

Department of Molecular Biology, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

#### Abstract

As an attempt to preserve genetic resources in marine biological organisms, we first constructed a cDNA library from the red alga *Porphyra yezoensis*. The library construction method from *P. yezoensis* consists of three steps; those include protoplast preparation, RNA isolation, and phage library construction. Protoplast was prepared in order to remove much of the carbohydrate compounds which are characteristics of algal cell walls. Carbohydrate contamination in the purified RNA may inhibit further enzyme reactions, those carbohydrates should be removed. RNA samples prepared from protoplast still seemed to contain residual amount of carbohydrate because mRNA isolation with conventional method failed. We therefore developed a method with PolyATtract mRNA isolation system. The constructed phage library was tested by analyzing cDNA insert in phage vector from randomly picked ten independent white plaques. All of the phages contained cDNA inserts with sizes ranging 0.5 kb and 2.0 kb.

**Key words** – *Porphyra yezoensis*, Protoplast, cDNA library

#### 서 론

홍조류에 속하는 김 (*Porphyra sp.*)은 한국을 비롯한 아시아 지역의 얇은 해안 지역에서 널리 양식되고 있으며, 육상생물에서는 발견하기 어려운 특수한 다당류, 아미노산, 효소 등을 함유하고 있어 [1], 유용신물질로서의 개발과 이들 물질들의 해양 환경에서의 분비역할 등으로 경제 가치가 매우 큰 양식해산식물이다.

또한 김은 건조에 상당히 강한 저항성을 보인다. 김은 주로 바닷가의 바위에 부착하여 생활하는 특성상 조수간

만에 의하여 공기 중에 완전히 노출되었다가 다시 해수에 잠긴다. 공기 중에 노출되었을 때에 상당한 건조 스트레스를 받게 될 것이므로, 김에는 육상생물에는 없는 건조 스트레스 적응 시스템이 존재할 것으로 추정된다. 이러한 건조 스트레스에 의한 생리적 변화는 고염도에 의해 야기되는 삼투 스트레스에 의해서 일어나는 생리적 변화와 유사하다. 따라서 건조 스트레스에 반응하여 발현되는 유전자들은 삼투 스트레스에 의해서도 발현이 될 것이다. 김으로부터 이러한 유전자들을 분리할 수 있으면 이의 활용은 학술적, 산업적으로 상당한 영향을 미칠 것이다.

<sup>†</sup> Corresponding author

그러나 김은 해조류 특유의 carbohydrate와 polyphenol compound를 함유하고 있어, RNA, DNA와 같은 핵산의 분리가 매우 어려워 유용유전자를 분리하는데 큰 장애가 되고 있다. 본 연구에서는 김으로부터 순수한 RNA를 분리하는 방법을 개발하여 이를 이용하여 cDNA library를 제조하고 분석하였다.

### 재료 및 방법

#### 원형질체의 분리

원형질체의 분리를 위하여 Polne와 Giber의 실험방법 [11]을 변형하여 사용하였다. 1g의 abalone-gut acetone-powder (Sigma, A7514)를 0.6M sorbitol, 50mM Mes, pH 6.0의 해수 200mL에 넣고 4°C에서 1시간동안 shaking한 후, 원심분리 (480×g, 10min)하여 갈색의 깨끗한 용액 (0.5% abalone)을 얻었다. 김의 마른 조직 0.2g을 해수에 넣고 3시간 정도 순화시킨 뒤, 2% papain과 같은 가수분해효소를 1시간 처리하였다. 깨끗한 해수로 두세 번 씻고 나서 잘게 잘라 위에서 준비한 0.5% abalone 용액 5mL에 넣고 약 16시간정도 분당 70회의 속도로 부드럽게 흔들어준 다음, 원형질체를 함유한 용액을 cheese cloth로 거른 후, 3분 동안 원심분리 (30×g)하여 원형질체를 분리하였다.

#### RNA의 분리

Total RNA추출은 TRIzol reagent (GIBCO BRL, Lot No.1008278)를 원형질체에서 분리하는 특성에 맞게 그 방법을 조금 변형하여 이용하였다. 얻어진 원형질체 pellet에 TRIzol 5mL을 첨가하여 잘 섞은 다음 상온에서 5분간 반응시킨 후, chloroform 1mL을 첨가하여 강하게 혼합했다. 5분간 상온에 두었다가 4°C에서 10분간 원심분리 (12,000×g)하고 상층액을 새 tube로 옮겼다. High-salt precipitation 용액 (0.8M sodium citrate and 1.2M NaCl) 1.25mL을 첨가하고 다시 isopropanol 1.25mL을 첨가하여 맑아진 액체를 확인하고 상온에 10분간 두었다. 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 total RNA pellet을 모은 다음, 75% 에탄올을 사용하여 pellet에 묻은 salt를 제거한 후, 실온에서 건조시키고 최종적으로 50μL의 0.1% DEPC처리된 순수물에 녹였다. total RNA의 정량은 260nm에서의 흡광도로 측정하였다. 분리한 total RNA의 순수도는 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>

과 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>의 값을 측정하여 결정하였다.

#### mRNA의 분리

Total RNA로부터 mRNA의 분리는 PolyATtract<sup>®</sup> mRNA Isolation Systems (Promega, Z5310)를 이용하였다. SA-PMPs를 130μL의 total RNA (약 511μg)에 순수물로 채워 총 부피가 500μL 되게 맞추고 65°C에서 10분간 반응시켰다. 반응물에 Biotinylate-Oligo (dT) probe 3μL와 20X SSC 13μL를 첨가하여 완전히 식을 때까지 상온에 두고 SA-PMPs를 0.5X SSC로 세 번 씻어 100μL의 0.5X SSC에 최종적으로 녹였다. 반응물과 SA-PMPs를 혼합한 후, magnetic stand에 꽂은 다음, 30초간 그대로 방치하면 침전물과 상층액이 구분되며, 이 때 상층액을 따서 버리고 0.1X SSC로 네 번 씻었다. 100μL의 RNase-free water로 mRNA를 1차 elution하고, 다시 150μL로 2차 elution하여 총 부피의 0.1배에 해당하는 3M sodium acetate (pH4.8)와 동량의 isopropanol을 첨가하여 -20°C에서 침전시켰다. 14,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 mRNA pellet을 75% 에탄올로 씻은 후, 상온에서 건조시켰다. 순수물 20μL를 첨가한 다음, EtBr이 포함된 1% agarose gel에 standard RNA와 함께 0.5μL씩 spot하여 mRNA를 정량하였다.

#### cDNA의 합성 및 library의 제조

순수한 mRNA로부터 cDNA 합성이후의 과정은 다른 동식물 sample과 마찬가지로 방법으로 진행하여 cDNA library를 제조하였다. mRNA에 first-strand methyl nucleotide mixture와 liker-primer 등을 혼합하여 상온에서 10분간 annealing반응을 유도하고 reverse transcriptase를 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 1차 가닥의 합성이 일어난 이 반응물에 second-strand methyl nucleotide mixture와 RNase H, 그리고 DNA polymerase I을 넣고 16°C에서 16시간 이상 반응시켜 2차 가닥의 합성을 종결하였다. 합성된 cDNA 말단을 blunting dNTP혼합물과 Pfu DNA polymerase로 72°C에서 30분간 blunting하고 EcoRI adaptor, rATP, 그리고 T4 DNA ligase를 차례로 섞은 뒤, 4°C에서 이틀간 반응시켜 EcoRI adaptor를 ligation하였다. 70°C에서 30분간 열처리하여 ligase를 불활성화 시킨 다음, T4 polynucleotide kinase를 넣은 후 37°C에서 30분간 반응시켜 EcoRI말단을 인산화 하였다. 마지막으로 XhoI을 첨

가한 뒤, 37°C에서 한시간 반 동안 반응시켜 완전한 cDNA 합성을 종료하였다. 반응하는 동안 첨가되었던 여러 작은 단편들을 제거하고 적절한 크기의 cDNA를 얻기 위하여 sephacryl S-500 column을 이용한 size-fractionation을 실시하였고, cDNA가 포함된 여과액에 0.1배 부피에 해당하는 3M sodium acetate와 2배 부피의 에탄올을 첨가하여 -20°C에서 침전시키는 방법으로 cDNA의 양을 농축시켰다.

EcoRI과 XhoI을 양 말단으로 갖는 순도 높은 cDNA 50ng을 Uni-ZAP XR vector 1μg과 혼합하여 4°C에서 이틀간 ligation시켰다. Packaging extract에 ligation 혼합물을 즉시 첨가하여 상온에서 1시간 45분간 반응시킨 후, 500μl의 SM buffer와 20μl의 chloroform을 넣어 4°C에서 보관하였다. 완성된 cDNA library의 primary efficiency는  $2.3 \times 10^5$  pfu (white : blue = 40 : 1)이었고, 즉시 이 library를 amplify한 다음의 efficiency는  $1.5 \times 10^9$  pfu/ml (white : blue = 20 : 1)이었다.

*in vivo* Excision

OD<sub>600</sub>의 값이 1이 되도록 조절된 200μl의 host bacteria cell (XL1-Blue MRF')에 250μl의 phage와 1μl의 ExAssist helper phage를 혼합하여 37°C에서 15분간 반응시킨 후, 3ml LB를 첨가하여 3시간 동안 진탕 배양하였다. 배양액을 68°C에서 20분간 열처리 한 후, 1000×g에서 15분간 원심분리하여 상층액을 취해 4°C에 보관하였다. 이 phage stock 10μl를 OD<sub>600</sub> 값이 1로 조절된 200μl의 SOLR cell과 혼합하여 37°C에서 15분간 반응시킨 뒤, ampicillin이 포함된 LB plate에 도말하여 16시간 이상 배양하였다. 다음날 ampicillin 저항성 colony들을 ampicillin이 포함된 LB배지에 접종하여 16시간 가량 배양시켰다.

Plasmid DNA의 분리

Bacteria culture로부터의 plasmid분리는 boiling 방법을 이용하였다 [5]. 먼저 ampicillin이 포함된 LB배양액에서 하루동안 자란 cell들을 13,000 rpm에서 1분간 원심분리하여 cell pellet을 만든 후, 350μl의 STET buffer에 cell을 잘 혼합하고, 25μl의 lysozyme (10mg/ml)을 첨가하여 100°C에서 3분간 끓였다. 13,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후, pellet을 제거하고, 동량의 isopropanol을 첨가하여 -70°C에서 10분간 두었다. 다시 10분간 원심분리하여 상층액을 버

리고 0.3M NaCl에 pellet을 녹인 다음, 2배 부피의 에탄올을 넣고 -70°C에서 10분간 반응시킨 후, 10분 동안 원심분리하여 pellet을 상온에서 건조시켰다. Plasmid내의 insert cDNA크기는 분리한 plasmid를 EcoRI과 XhoI으로 자른 다음 0.8% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다.

결과 및 고찰

방사무늬 김의 cDNA library 제조의 전반적인 과정은 Fig. 1에 요약한 것과 같이 김의 protoplast 제조, RNA 분리와 cDNA의 합성, library 제조, 제조된 library의 확인으로 크게 나누어질 수 있다. 순수한 핵산의 분리를 위하여

Preparation of *P.yezoensis* protoplast

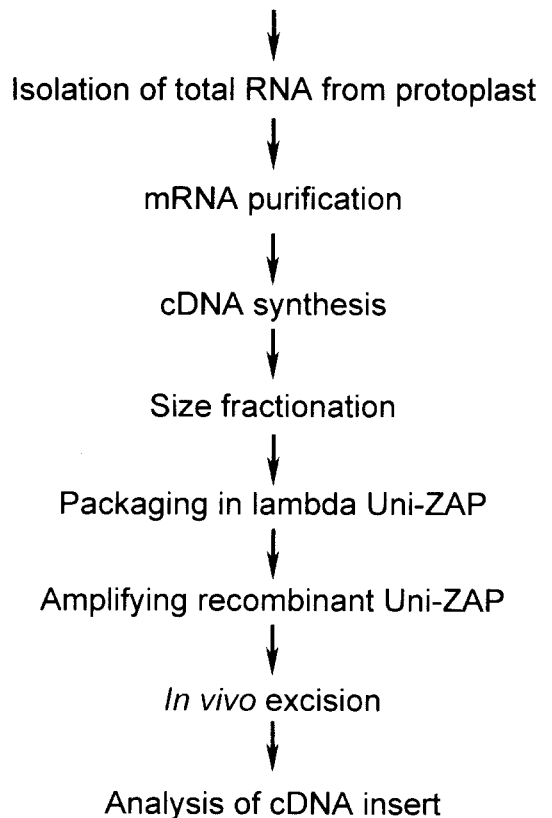


Fig. 1. Schematic diagram for the construction of *P. yezoensis* cDNA library.

먼저 원형질체의 분리를 시도하였다. 해조류에서의 원형질체 분리는 처음에는 고등식물계에서 이용되는 효소류를 사용하여 녹조류에서 원형질체를 분리하였다 [8]. 그러나 갈조류와 홍조류에서는 세포벽 성분으로 알긴산, 아가로스 등과 같은 해조류 특유의 다당류를 포함하고 있기 때문에 종래의 시판효소로는 원형질체의 분리가 곤란하였다. 대개 갈조류나 홍조류의 원형질체 분리에는 해양조류를 섭취하는 초식동물이나 해조류를 분해하는 세균유래의 효소가 이용되고 있으며, 본 실험에서는 다시마 등과 같은 해조류를 주성으로 하는 전복의 소화효소를 이용하여 원형질체를 분리하였다. Fig. 2B에서 보는 것과 같이 전복의 소화효소를 처리한 표본에서는 세포벽의 분해에 의해 각

각의 원형질체들이 분리되었음을 확인하였다.

해조류에서의 종 보존 및 유전자원을 개발하기 위한 유전자 조작기술 즉, cDNA library 제조, Northern hybridization, *in vitro* hybrid selection 등의 방법에 필수적인 것이 효율적이고 순수한 RNA의 분리이다. 그러나 해조류에서는 일반적인 동물세포나 식물세포에서 보다 훨씬 많은 양의 carbohydrate와 polyphenol compound 등의 불순물이 발견된다 [9]. 특히 RNA의 분리, 밀도 및 염 결합성질이 RNA와 비슷한 산성 다당류 때문에, 다른 식물에 비해 까다롭다. 일반적으로 이러한 당을 제거하기 위한 방법으로 ethanol-potassium 혼합액을 사용하거나 [2,3,4], 2-butoxy ethanol을 사용하여 differential precipitation으로 당을 제거하는 방법 [6] 등을 사용하여 왔으나, 불순물들을 완전히 제거하기 힘들고 sample양이 충분하지 않을 때에는 이로부터 순수한 핵산의 분리가 용이하지 않다. 이러한 문제점들을 해결하기 위하여 본 실험에서는 해조류에서 대부분의 불순물들이 함유되어 있는 세포벽을 제거하여 원형질체를 만들었고 이로부터 순도 높은 RNA를 분리할 수 있었다. 일반적으로 total RNA는 OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub>과 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>의 값이 1.8이상이 되어야 비교적 순수하여 library 제작에 사용할 수 있다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 원형질체로부터 분리한 total RNA의 OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub>과 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>의 값은 각각 2.1, 1.9이다. 대개의 경우 total RNA의 순도가 좋으면 cellulose를 사용하여 그리 어렵지 않게 mRNA를 분리할 수 있다. 그러나, 김에서 추출한 total RNA에는 OD값 (230nm and 280nm)에서 측정되지 않는 불순물들

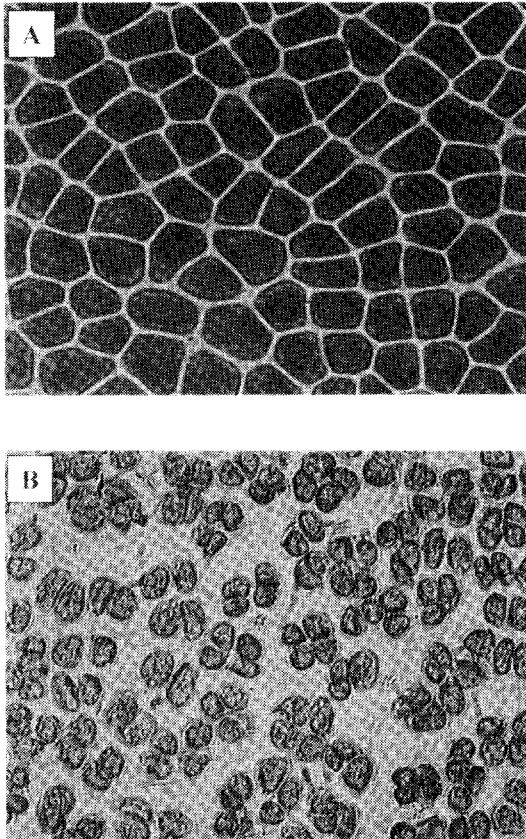


Fig. 2. Microscopic observation of *P. yezoensis* protoplast. A: before abalone enzyme treatment, B: after abalone enzyme treatment.

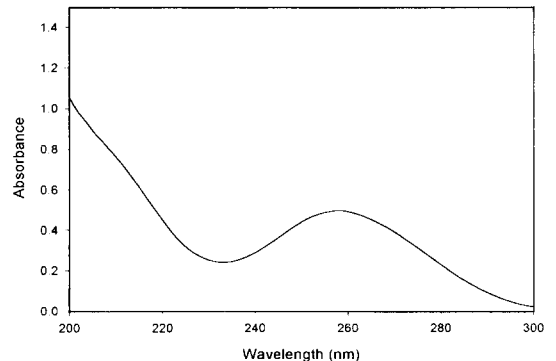


Fig. 3. Spectroscopic profile of total RNA extracted from protoplast of *P. yezoensis*.

이 많이 들어 있다 [7,10]. 실제로 OD값에서 좋은 순도를 나타내는 김의 total RNA로부터 cellulose를 이용하여 mRNA를 분리하고자 했으나 실패하였다. 그 이유는 아마도 여러 당 성분들이 cellulose와 엉켜 붙어서 그럴 것이라는 추측하고 있다. 본 실험에서는 PolyAtract<sup>®</sup> mRNA Isolation Systems (Promega, Z5310)를 이용하여 mRNA분리에 성공하였다.

분리한 mRNA를 이용하여 cDNA library를 만드는 작업은 Stratagene사의 방법을 따랐다. 완성된 cDNA primary library의 plating efficiency는  $2.3 \times 10^5$  pfu (white : blue = 40 : 1)이었고, 이 primary library를 즉시 amplify한 다음의 titer는  $1.5 \times 10^9$  pfu/ml (white : blue = 20 : 1)이었다. 완성된 cDNA library에서 cDNA insert의 평균적인 크기를 확인하기 위하여 무작위적으로 10개의 white plaque로부터 *in vivo* excision하여 excision된 plasmid에서 cDNA insert를 확인하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 10개 white plaque 모두 insert가 있으며 insert cDNA의 크기는 0.5 kb에서 약 2.0 kb 정도이다. 따라서 제조된 방사무늬 김의 cDNA library는 양호한 것으로 추정된다.

지구생태계에서 가장 많은 비율을 차지하고 있는 해양생물은 무한한 산업적 활용가능성을 가지고 있다. 삼면이 바다인 지리적 여건으로 각종 해양생물자원이 풍부하였던 우리 나라는 최근 환경오염과 해양생물의 남획으로 해양생물자원이 고갈되고, 유용해양생물의 유전적 퇴화로 일부 좋은 멸종 위기를 맞고 있어 앞으로 해양생물자원이

외국에 예측될 우려가 높아지고 있다. 따라서 해양생물에 대한 기초 분자생물학적 연구와 계통연구를 수행하고 국내 고유 해양생물 종의 유전자를 탐색하여 이를 보존하며, 또한 이를 이용하여 어류, 해조류 등의 유전육종 기술을 개발하여야 할 것이다. 이를 위한 기초작업으로 본 연구에서는 방사무늬 김으로부터 순수한 RNA를 분리하는 방법을 개발하고 cDNA library를 제작하였다. 본 연구에서 사용한 방법들은 다른 해조류로부터의 핵산분리 및 분자생물학적 연구에 응용할 수 있을 것이다.

## 요 약

해양생물의 유전자원을 보존하고 유용 유전자를 확보하기 위한 시도로써 홍조류에 속하는 방사무늬 김 (*P. yezoensis*)으로부터 cDNA library를 제조하였다. 방사무늬 김으로부터 cDNA library 제조방법은 protoplast 분리, RNA 분리, library 제조의 3단계로 구성되어 있다. 분리한 RNA 속에 오염되어 있는 탄수화물은 다음 단계의 효소반응을 저해하므로, 본 실험에서는 조류세포벽에 많이 함유되어 있는 탄수화물을 제거하기 위해 protoplast로부터 RNA를 분리하였다. protoplast로부터 분리한 RNA에서 mRNA 분리를 시도하였으나 실패하였다. 이는 RNA에 미량의 탄수화물이 섞여있었기 때문으로 추정하고, 기존의 PolyAtract mRNA분리방법을 사용하여 순수한 mRNA를 분리하였다. 제조한 cDNA library를 확인하기 위하여 무작위적으로 10개의 white plaque로부터 phage DNA를 분리하여 cDNA의 삽입여부와 크기를 조사하였다. 10개의 white plaque 모두 insert를 가지고 있었으며, 그 크기는 0.5 kb에서 2.0 kb 정도였다.

## 감사의 글

본 연구는 농림부에서 시행한 농림수산특정연구사업 조성비의 지원에 의해 수행되었습니다.

## 참 고 문 헌

1. Aaronson, S., B. de Angelis, O. Frank, and H. Baker, 1971. Secretion of vitamins and amino acids into the environment by *Ochromonas danica*. *J. Phycol.* 7,

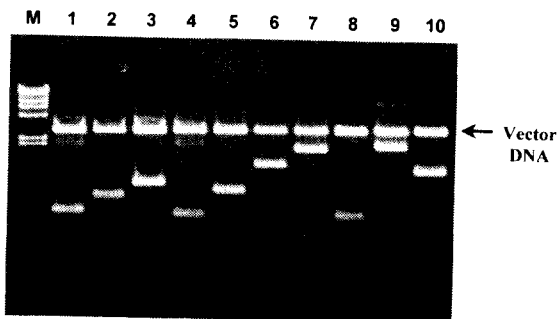


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of excised plasmid from white plaques.

Each excised plasmid DNA was digested with *Eco*RI and *Xho*I, which liberated the cDNA insert. M: molecular marker DNA ( $\lambda$  DNA cut by *Hind*III), Lane 1 - 10: independent plasmid clones.

- 215-224.
2. Biel, S. W. and F. W. Parrish, 1986. Isolation of DNA from fungi mycelia and sclerotia without use of density gradient ultracentrifugation. *Anal. Biochem.*, **154**, 21-27.
  3. Goff, L. J. and A. W. Coleman, 1988. The use of plasmid DNA restriction endonuclease elineating red algal species and population, *J. Phycol.* **24**, 357-364.
  4. Goff, L. J. and A. W. Coleman, 1991. Red algal plasmids. *Curr. Genet.* **18**, 557-565.
  5. Holmes, D. S. and M. Quigley. 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**, 193-197.
  6. Hong, Y., D.A. Coury, M. Polne-Fuller and A. Gibor. 1992. Lithium chloride extraction of DNA from the seaweed *Porphyra perforata* (Rhodophyta), *J. Phycol.* **28**, 717-723.
  7. Manning, K. 1991. Isolation of nucleic acids from plants by different solvent preparation, *Anal. Biochem.*, **195**, 45-51.
  8. Miller, P., M. Callow and L. Evans. 1979. Preparation of protoplasts from the green alga *Enteromorpha intestinalis*, *Planta* (Berl.) **14**, 174-180.
  9. Nakano, T., M. Watanabe, M. Sato, 1995. Characterization of catalase from the seaweed *Porphyra yezoensis*, *Plant Sci.*, **104**, 127-139.
  10. Newbury, H. J. and V. J. Possingham, 1997. Factors affecting extraction of intact ribonucleic acid from plant tissues containing interfering phenolic compounds, *Plant physiol.*, **60**, 543-556.
  11. Polne-Fuller, M., and A. Gibor, 1984. Developmental studies in Porphyra. I. Blade differentiation in *Porphyra perforata* as expressed by morphology, enzymatic digestion and protoplast regeneration, *J. Phycol.* **20**, 609-620.