

## 대량의 쌀 시료 분석을 위한 DNA 추출법

최영덕 · 이해광 · 이윤숙 · 윤정희 · 김수정 · 박성환<sup>†</sup>

다카라코리아바이오메디칼(주) 연구개발센터

### High-Throughput DNA Extraction Method for Marker Analysis in Rice Grain

Young-Deok Choi, Hae-Kwang Lee, Yun-Suk Lee, Jeong-Hee Yun, Su-Jeong Kim, and Seong-Whan Park<sup>†</sup>

Division of R&D Center, TakaraKoreaBiomedical Inc., 66-2, Sangdaewon-dong, Jungwon-Gu, Seongnam 462-120, Korea

**ABSTRACT** The study of molecular markers to improve crops largely depends on the availability of rapid and efficient DNA extraction methods. Here we developed a cheap and convenient method to isolate genomic DNA from rice grains suitable for large-scale microsatellite analysis. We confirmed that the isolated rice DNA is suitable for PCR analysis with STS marker and SNP marker, as well as microsatellite marker. Further, we established high-throughput DNA extraction system in a 96-well plate format which make it possible high-throughput analysis of microsatellite markers with rice grains. This implies that the new method could be a useful tool for other types of marker analysis in large scale.

**Keywords** : rice, DNA extraction, high-throughput system, microsatellite, PCR

쌀은 한국에서 주식으로 이용하는 곡물로서 매우 중요시 여겨지는 식량자원이다(Kwak *et al.*, 2004). 또한 대내외 환경으로 인해 고도의 양질벼 육종과 관리의 중요성이 커지고 있으며 이에 유용하게 사용될 수 있는 map-based cloning이나 marker-assisted selection(MAS) 등의 분자생물학적 기술의 활용도가 높아지고 있다(Stein *et al.*, 2001). 하지만 이러한 연구는 대량의 식물 개체를 분석해야 하는 특성을 지니고 있으며, 많은 시간과 비용을 소비할 수밖에 없다. 특히 DNA 추출은 노동집약적인 단계로 많은 시간과 비용을 허비하게 하는 원인이 된다. 이전부터 주로 사용되어 온 phenol-chloroform 추출방법은 매우 장황하며 시간 소모적인 방법으로, 대량의 시료를 대상으로 수행할 경우 환경적으로 해로운 영향을 미칠 수 있다(Karakousis & Langridge, 2003). 특히 식물조직은

동물세포와 다르게 단단한 세포벽으로 둘러 쌓여있으므로 부득이하게 물리적으로 세포를 분쇄시킴으로서 DNA를 용출시키는 방법이 주로 사용되고 있다. 따라서 집단유전학, 종간 구분, 생물학적 다양성 연구, 선택적 스크리닝, 식품 분석, 식물 생명기술 등의 식물분자연구에서 PCR에 필요한 genomic DNA를 준비하는 일은 매우 어려움이 따른다(Manen *et al.*, 2005). 이로 인해 여러 가지 기계와 키트들이 개발되어 비교적 유해성이 적으며, 부분적 또는 전체적으로 자동화되어 신속한 DNA 추출이 가능해졌다. 하지만 대규모의 연구 수행에 있어 이러한 도구를 장기적으로 사용하기에는 높은 비용이 요구되는 단점이 있으며, 빠르고 정확하며 동시에 저렴한 비용을 필요로 하는 DNA 추출법이 요구된다(Karakousis & Langridge, 2003).

정확성과 재현성이 요구되는 PCR 수행시 단백질, 폴리페놀류 그리고 polysaccharide 등은 중합효소 반응을 저해할 수 있기 때문에 고순도의 DNA 정제 과정을 필요로 한다(Angeles *et al.*, 2005). 일반적으로 DNA 추출은 세포 분해를 통한 DNA 용출, 세포질 제거, DNA 침전 및 해리 과정을 거친다. DNA 용출에는 일반적으로 sodium dodecyl sulfate(SDS)와 proteinase K를 포함한 혼합 용액이 사용되며, 단백질 제거를 위해 phenol과 같은 단백질 변형제를 사용한다. 단백질은 두개 이상의 polypeptide들로 구성되어 있는데 guanidine-hydrochloride는 polypeptide 간의 disulfide bond를 분리시켜 단백질을 작은 펩타이드들로 분해하는 작용을 함으로서 단백질을 변성시키지만 phenol에 비해 유해 정도가 상당히 낮다(Jeremy *et al.*, 2002). 따라서 본 연구에서는 phenol 대신 5M guanidine을 단백질 변형제로서 사용하였으며, 회수율을 높이기 위해 acetic acid와 potassium acetate를 DNA 침전에 이용하였다(Wong *et al.*, 1990). 또한 한 번에 192개의 쌀 시료를 1분 안에 분쇄시킬 수 있는 기기를 이용하고, 전 추출 과정을 96-well plate 단위로 진행하여 소요시간 및 노동을 대폭 단축하였다.

<sup>†</sup>Corresponding author: (Phone) +82-31-739-3343  
(E-mail) parksw@takara.co.kr

이는 이미 보고된 방법을 토대로 쌀 DNA 추출 방법을 재설계한 것이며, 앞서 언급한 단점들을 극복하여 대량의 DNA 추출시 신속하고 유해성이 적으며 비용 측면에서 매우 유리할 것으로 생각한다.

### 재료 및 방법

DNA 추출에 사용된 쌀 시료는 작물과학원과 다카라바이오(일본)로부터 제공받은 품종 시료를 이용하였다. 우선 도정된 정도에 따라 벼씨, 현미, 백미로 구분하였으며, 벼씨는 백진주쌀, 현미는 히토메보레, 백미는 추청쌀을 이용하였다. 추출 효과를 검증하기 위해 대조군으로 국외의 P사 제품(Promega, USA)과 국내 S사(Solgent) 제품을 사용하여 벼씨, 현미, 백미에서 동시에 DNA 추출을 진행하였다.

쌀 1~2알과 6 mm 직경의 metal bead 1알을 microtube 또는 Deep well plate의 각 well에 넣고, 자동 분쇄기 TissueLyser (Qiagen, GER)를 이용해 3000 rpm에서 1분간 분쇄하였으며, 분쇄 후 metal bead는 제거하였다. 분쇄된 시료가 들어있는 microtube에 DNA extraction buffer(10 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% SDS) 400  $\mu$ l씩을 넣어준 뒤, 5M guanidine-HCl 40  $\mu$ l와 proteinase K(10mg/ml) 5  $\mu$ l씩을 각 시료에 넣고 세게 흔들어 섞은 뒤 58°C에서 1시간동안 배양하였다. 배양이 끝난 시료는 실온이 될 때까지 방치한 후 3M potassium acetate-11.5% acetic acid 혼합용액을 200  $\mu$ l씩 첨가하여 잘 섞어준 뒤 최대속도로 10분간 원심분리 하였다. 상등액 300-400  $\mu$ l을 새 tube에 옮기고 600  $\mu$ l의 isopropanol을 첨가하여 잘 섞어준 뒤 최대속도로 30분간 원심분리 하였다. 상등액을 모두 버린 후에, 70% ethanol 600  $\mu$ l를 넣고 잘 섞어준 뒤 5분간 원심분리 하고 상등액을 모두 버렸다. DNA가 침착된 tube는 ethanol 성분이 완전히 제거될 때까지 공기 중에 방치했으며, 수분이 없어진 것을 확인하고 250 ng/ml의 RNase A가 들어있는 TE buffer를 50  $\mu$ l씩 넣어 37°C에서 20분간 반응시켜 침착된 DNA를 해리시켰다. 추출된 DNA 용액은 아가로스젤 전기영동과 UV-흡광도 측정으로 농도와 순도를 확인하였다.

PCR 반응에 사용된 프라이머는 본 실험실에서 벼 게놈연구에 사용하는 STS marker와 microsatellite marker, SNP marker에 해당하는 프라이머를 임의로 선별하여 사용하였다. PCR 반응은 총 20  $\mu$ l부피에 다음과 같이 각 용액을 첨가하였다; 10X PCR buffer 2  $\mu$ l, dNTPs(2.5 mM) 1.6  $\mu$ l, primer(10  $\mu$ M) 1  $\mu$ l, rice genomic DNA 2  $\mu$ l, TaKaRa rTaq(5 unit/ $\mu$ l) 0.2  $\mu$ l. PCR 과정은 다음과 같이 수행하였다; 94°C 1 min, 30 cycles

of 94°C 30 sec/55°C 30 sec/72°C 30 sec, and 72°C 7 min for final extension.

### 결과 및 고찰

새로 제시된 방법의 DNA 추출 성능을 시험하기 위해 벼씨(seed rice), 현미(brown rice), 백미(white rice)의 시료로부터 DNA를 추출하였고, 대조군으로 유사한 방식의 상용제품인 P사와 S사의 plant genomic DNA extraction kit 제품의 방법을 이용하여 같은 시료에서 DNA를 추출하였다. 추출한 DNA를 1% 아가로스젤에 전기영동하여 DNA의 농도를 확인하였다(Fig. 1).

그 결과, 새로 제시된 방법이 상용제품에 비해 전반적으로 DNA 농도가 높고, 시료간의 변이가 적음을 확인할 수 있었다. P사(Method B)와 S사(Method C)의 방법은 백미로부터 DNA 추출이 잘 되지 않았으나, 새로 제시된 방법(Method A)은 모든 시료에서 DNA 추출이 비교적 잘 이루어지는 것으로서 새로운 방법이 DNA 양적인 측면에서 우수하다는 것을 알 수 있었다. 분자생물학 연구에서 고도로 정교하며 민감한 실험을 수행하는 데에는 DNA의 높은 순도가 요구된다. 특히 중합효소나 제한효소 같은 활성 단백질은 다른 단백질이나 지질, 다당류 등에 영향을 받을 수 있기 때문에 순도가 낮은 DNA를 이용할 경우 결과의 신뢰성이 떨어질 수밖에 없다.

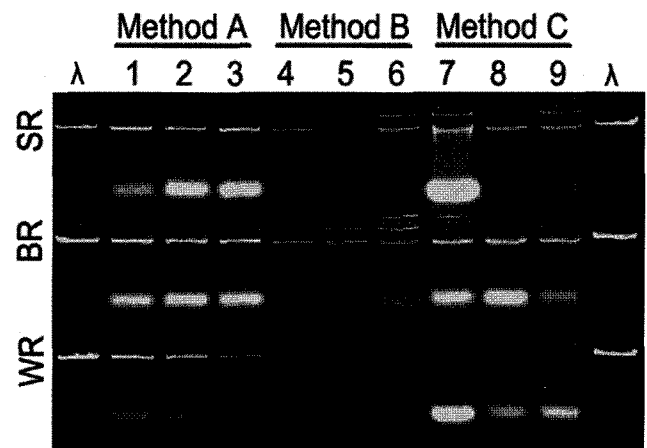


Fig. 1. The results of rice DNA extraction following the three methods. Lane 1, 2, and 3 indicate the results of method A, lane 4, 5, and 6 indicate the method B, lane 7, 8 and 9 indicate the method C, respectively. Five microliters of DNA was loaded on each lane. SR, BR, and WR indicate seed rice, brown rice and white rice, respectively. Lane  $\lambda$  indicates 25 ng/ $\mu$ l of  $\lambda$  DNA as a marker.

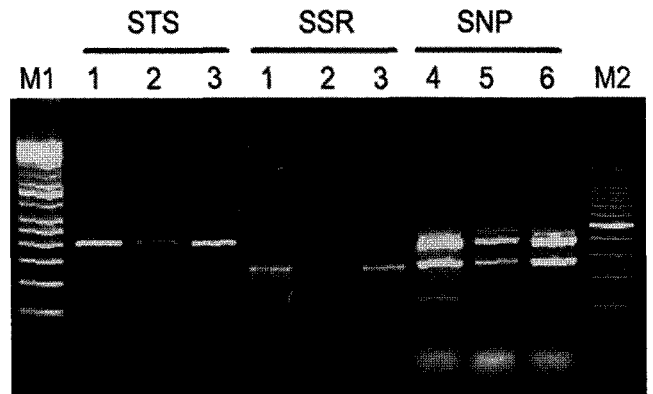
**Table 1.** The quantities and qualities of the DNA extracted following the three methods.

Method	Seed rice		Brown rice		White rice	
	Conc.* (ug/ml)	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	Conc. (ug/ml)	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	Conc. (ug/ml)	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>
<b>Method A</b>						
I	830	1.84	600	1.97	354	1.99
II	872	1.85	574	1.94	375	1.99
III	733	1.89	469	1.93	239	2.02
Average	812	1.86	548	1.94	323	2.00
<b>Method B</b>						
I	359	1.66	384	1.84	343	1.97
II	79	1.71	369	1.86	247	2.05
III	615	1.60	483	1.83	350	2.00
Average	351	1.66	412	1.85	313	2.01
<b>Method C</b>						
I	1048	1.63	385	1.69	352	1.78
II	674	1.78	526	1.85	264	1.73
III	729	1.78	376	1.67	382	1.84
Average	817	1.73	429	1.74	332	1.78

\*Conc. : Value of the DNA concentrations measured as A<sub>260</sub> using UV-spectrophotometer.

따라서 DNA의 순도를 확인하기 위해 UV 흡광도를 측정하여 각 방법으로 추출한 DNA의 흡광도를 비교하였다 (Table 1). A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>의 값을 비교한 결과, 방법 A는 벼씨, 현미, 백미 세 가지 형태로부터 얻어진 DNA에 대한 평균값이 각각 1.86, 1.94, 2.00으로 나타났으며, 방법 B는 1.66, 1.85, 2.01로, 방법 C는 1.73, 1.74, 1.78로 나타났다. UV 흡광도 측정법은 단백질과 같은 불순물의 흡광도(A<sub>280</sub>)에 대한 DNA의 흡광도(A<sub>260</sub>)로서 순도를 나타낸다. 방법 A의 DNA는 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 값이 다른 방법에 비해 상대적으로 높게 나타난 것으로 볼 때, 방법 A가 다른 방법에 비해 단백질 등의 불순물을 더 잘 제거하는 것으로 생각된다. 또한, 아가로스 젤상에서 확인한 것과 동일하게, 방법 A에 의해 추출된 DNA가 상대적으로 높은 흡광도를 나타냈으며, 같은 조건 내의 반복된 결과 간에 편차도 가장 적었다. 이로서 새로 제시된 방법이 백미, 현미, 벼씨 등의 시료에서 양질의 DNA를 추출하는데 유용하게 이용할 수 있음을 확인할 수 있었다.

식물은 폴리페놀등 효소활성을 저해하는 2차 대사산물을 많이 함유하고 있기 때문에, 식물조직으로부터 추출한 DNA는 그러한 불순물로 인해 PCR과 같은 효소 반응이 잘 이루어지지 않는 경우가 많다. 새로 제시된 방법으로 추출한 DNA가 일반적인 PCR 분석에 이용할 수 있는지를 확인하기 위해, 분



**Fig. 2.** The results of PCR using STS, microsatellite and SNP marker. Lanes 1, 2 and 3 indicate the template DNA extracted following method A, B and C. Lanes M1 and M2 indicate wide-range DNA ladder (TaKaRa) and 100 bp DNA ladder (TaKaRa).

자유전학과 육종학 등의 연구에 널리 쓰이는 여러 가지 분자표지들 중 가장 빈번하게 활용되는 STS marker, microsatellite marker, SNP marker를 이용해 PCR을 수행하였다(Fig. 2).

그 결과, 방법 A로 추출한 백미 DNA로부터 PCR 반응이 정상적으로 일어남을 확인할 수 있었으며, 방법 B의 DNA도 비슷한 결과를 보였다. 반면에 방법 B로 추출한 DNA는 상대

적으로 낮은 증폭율을 보였는데, 이는 Fig. 1에서 확인할 수 있듯이 추출된 DNA의 양이 적기 때문인 것으로 생각된다. 결론적으로, 새로 제시된 DNA 추출 방법을 이용하여 쌀 1알로부터 PCR 분석에 충분한 양질의 DNA를 얻을 수 있었다.

지금까지의 결과들로 볼 때, 쌀알로부터 DNA를 추출하는데 있어서 새로 제시된 DNA 추출법이 기존에 제품화되어 상용하고 있는 방법들보다 우수한 것으로 나타났다. 또한 실험 절차도 보다 단순하며 DNA 추출 시간도 보다 빠르기 때문에, 다량의 시료를 처리해야 하는 high-throughput system에 적합한 것으로 입증되었다. 이에 따라, 새로 제시된 방법을 이용하여 다량의 쌀 genotyping을 위한 high-throughput 시스템을 구축하였다.

먼저 96-well Deep well plate에서 96개 시료를 한번에 처리하는 방법을 적용하였다. 시료의 분쇄는 자동분쇄기인 TissueLyser (Qiagen)를 사용하여 수행하였는데, 막자사발을 이용하여 분쇄한 결과와 비교해 볼 때 별반 차이가 없었다. 막자사발을 이용하여 많은 시료를 분쇄하는 데에는 상당한 시간과 노력이 필요하나, 자동분쇄기를 사용하였을 때는 192개의 시료를 단 1-2분에 완전 분쇄가 가능하였다. 시료 분쇄 이후 전 과정을 96-well plate상에서 새로 제시된 방법으로 DNA 추출을 진행하였고, 이렇게 plate 단위로 추출한 DNA는 tube에서 추출한 DNA와 동등한 양과 순도를 나타내었다. Fig. 3에서 보듯

이 전체 well에서 DNA가 제대로 추출됨을 확인하였고, DNA 양에 있어서 well간에 변이가 적어 이후 분석에서 신뢰성 있는 결과를 기대할 수 있었다. 이렇게 추출한 96 well DNA는 벼 품종의 genotyping 분석에 적용하였다. 6종의 microsatellite 마커를 한번에 증폭하는 multiplex PCR kit(자체 제작)을 이용하여 PCR한 후에, 자동 염기서열분석장치(MegaBACE1000, GE healthcare)로 capillary electrophoresis를 수행하였고, Fragment profiler v1.2 software로 genotyping 결과를 분석하였다. 그림 4는 96개 쌀 시료로부터 추출한 DNA의 genotyping 결과를 gel view로 보여주는데, 96개 well에서 6종의 마커 밴드가 모두 분석 가능함을 알 수 있었다. 즉, multiplex PCR 분석에도 신뢰성 있는 결과를 보여준다는 사실은 새로 제시된 방법이 쌀알로부터 DNA 추출하는데 매우 효과적이라는 점을 입증하는 것이다.

그뿐 아니라 본 방법을 통하여 DNA 추출에 걸리는 시간과 노동을 대폭 절감하여 고가의 자동화 장비 없이도 다량의 시료를 신속하고, 저렴하게 분석할 수 있다. 예를 들면 위의 high-throughput system으로 DNA 추출부터 genotyping 분석까지 이틀간에 384개 이상의 쌀 시료를 처리할 수 있다. 본 연구에서는 백미, 현미 등의 쌀알만을 이용한 DNA 추출에 국한하였으나, 새로 제시된 방법은 쌀 뿐만이 아니라 다른 종류의 작물연구에도 유용하게 이용될 수 있을 것

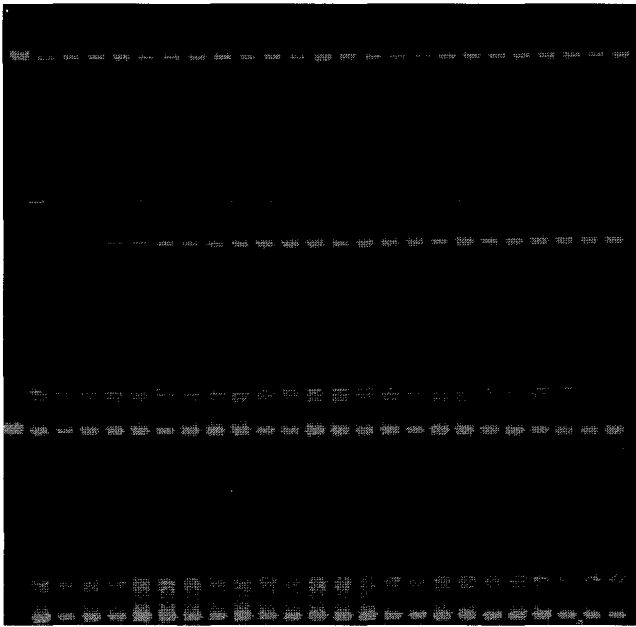


Fig. 3. The result of high-throughput DNA extraction of rice grains. Five microliters of DNA was loaded on each lane.

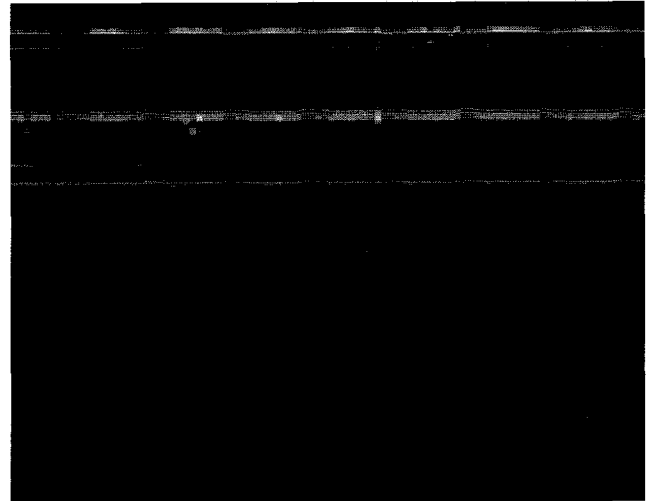


Fig. 4. The result of multiplex PCR with 6 microsatellite markers. PCR products were analyzed using an automatic sequencer MegaBACE1000 (GE healthcare, USA). Each lane displays 6 marker bands which can be distinguished each other by size and kinds of labeled fluorescence. Red fluorescence indicates the bands of ET-550 size marker (GE Healthcare).

으로 기대된다. 특히, RAPD, AFLP, SNP typing, microsatellite typing 등 다량의 DNA 분석이 요구되는 분자마커 연구 분야에 있어서 본 방법이 비용과 시간 및 노동을 절감할 수 있는 안정적이고 효율적인 방법으로 활용될 수 있을 것이다.

## 사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21 사업의 지원에 의해 이루어진 것임.

## 인용문헌

- Angeles, J. G. C., C. L. Antonio, M. T. and Evelyn. 2005. Extraction of genomic DNA from the lipid-, polysaccharide-, and polyphenol-rich coconut (*Cocos nucifera* L.). *Plant Mol Biol Rep.* 23 : 297a-297i.
- Bao, J. S., H. Corke, and M. Sun. 2006. Microsatellite, single nucleotide polymorphism and a sequence tagged site in starch-synthesizing genes in relation to starch physicochemical properties in non waxy rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet.* Sep 9 : Epub ahead of print.
- Jeremy, B., J. Tymoczko, and L. Stryer L. 2002. *Biochemistry.* Freeman and Company. New York.
- Kang, H. W., Y. G. Cho, U. H. Yoon, and M. Y. Eun. 1998. A rapid DNA extraction method for RFLP and PCR analysis from a single dry seed. *Plant Mol Biol Rep.* 16 : 1-9.
- Kang, H. W., D. S. Park, S. J. Go, and M. Y. Eun. 2001. Fingerprinting of diverse genomes using PCR with universal rice primers generated from repetitive sequence of Korean weedy rice. *Mol Cells.* 13(2) : 281-287.
- Karakousis, A. and Peter L. A high-throughput plant DNA extraction method for marker analysis. 2003. *Plant Mol Biol Rep* 21 : 95a-95f.
- Kwak, T. S., J. H. Yeo, M. Y. Eun, and Y. S. Cha. 2004. QTL for Quality properties in the Milyang23 X Gyhobyeo recombinant inbred lines by different locations. *Korean J Crop Sci.* 49(6) : 539-545.
- Manen, J. F., Olga S., Lorene A., Alexander V M., and Arkady S. 2005. A fully automatable enzymatic method for DNA extraction from plant tissue. *BMC Plant Biol.* 5 : 23.
- Mazur, B. J. and S. V. Tingey. 1995. Genetic mapping and introgression of genes of agronomic importance *Curr Opin Biotech* 6 : 175-182.
- Monera, O. D., C. M. Kay, and R. S. Hodges. 1994. Protein denaturation with guanidine hydrochloride or urea provides a different estimate of stability depending on the contributions of electrostatic interactions. *Prot Sci.* 3 : 1984-1991.
- Stein N., G. Herren, and B. Keller. 2001. A new DNA extraction method for high-throughput marker analysis in a large-genome species such as *Triticum aestivum*. *Plant Breeding* 120 : 354-356.
- Wong, W. M., D. M. Y. Au, V. M. S. Lam, J. W. O. Tam, and L. Y. L. Cheng. 1990. A simplified and improved method for the efficient double-stranded sequencing of mini-prep plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 18(18) : 5573.