

간단한 전처리로 식물 DNA를 추출하는 Plant DNA Isolation Reagent

- 분쇄 과정없이 샘플을 동결융해하는 전처리 과정만 필요
- 다검체의 동시 처리에 효과적
- 추출 핵산량을 전기영동으로 확인 가능

Plant DNA Isolation Reagent (TaKaRa Code 9194)는 염화벤질법을 기본으로 한 ready-to-use 식물 DNA 추출 키트이다. 염화벤질은 셀룰로오스 등의 세포벽 성분 중 수산기를 벤질화하여 세포벽을 파괴하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 본 제품은 이런 특성을 이용하여 식물 샘플을 동결융해 후 파이펫 팁의 앞부분으로 몇 차례 튜브벽에 으깨는 것만으로 세포벽을 파괴할 수 있다. 일반적으로 식물에서 핵산 추출시에 필요한 액체질소와 막자사발을 이용한 분쇄 처리를 생략할 수 있기 때문에 막자사발이나 막자를 준비할 필요가 없고, 한번에 다수의 샘플을 처리하는 경우에 매우 편리하다. 또한 시약 조성의 최적화에 의해 열처리 시간이 불과 15분 정도밖에 되지 않아, 수층 회수까지의 소요 시간이 약 30분으로 단축되었다(그림 1).

본 고에서는 본 제품을 사용하여 식물로부터 DNA 추출 예시 및 추출된 DNA를 이용한 PCR 증폭 예를 소개하고자 한다.

■ 제품구성(100 회용)^{1,2}

Extraction Solution 1	40 ml
Extraction Solution 2	8 ml
Extraction Solution 3 (100% Benzyl Chloride)	15 ml

^{1,2}: 본 제품에는 RNase A가 포함되어 있지 않으므로, RNA를 제거해야하는 경우 RNase A를 별도로 처리해야 한다.

■ 실험예 1: 식물 조직으로부터의 DNA 추출

【방법】

애기장대 싹, 토마토 싹 및 시금치 잎을 가위로 3 mm 이하의 크기로 자르고, 각각 20 mg, 50 mg을 마이크로튜브에 넣고, -20 °C로 동결한 후 프로토콜(그림 1)에 따라서 게놈 DNA를 추출했다. 이를 통해 얻은 침전물을 20 µl의 TE Buffer로 용해 후 전기영동 및 흡광도를 측정하였다 (N=2).

■ 실험 플로우

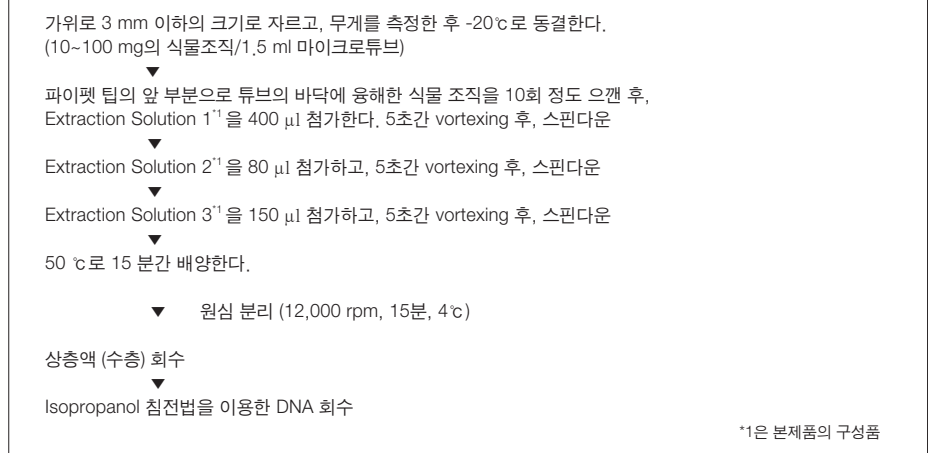
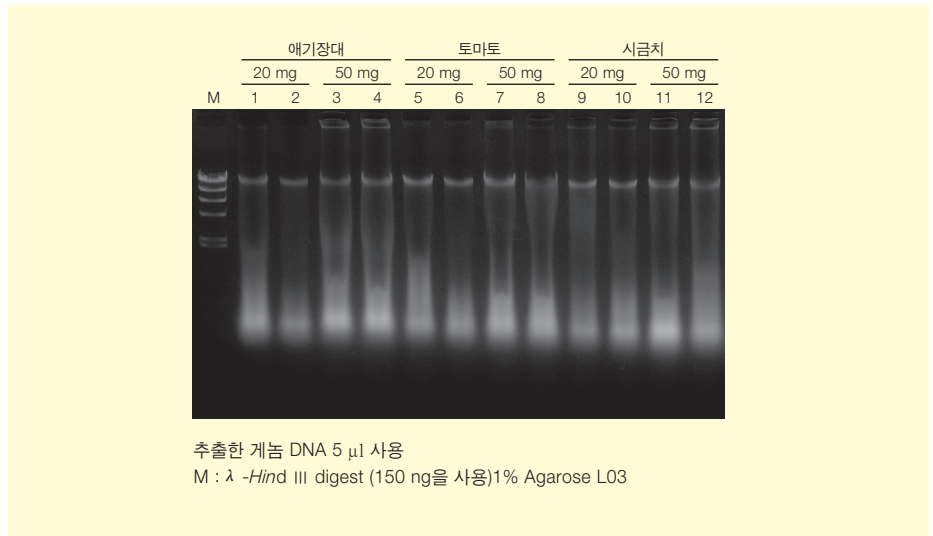


그림 1. 실험방법 (회수한 DNA는 TE Buffer에 용해하여 그대로 PCR이나 제한효소 반응에 사용할 수 있다.)



추출한 게놈 DNA 5 µl 사용
M : λ-Hind III digest (150 ng을 사용) 1% Agarose L03

그림 2. 식물조직에서 추출한 게놈 DNA의 전기영동 결과

【결과】

본 제품을 이용한 간편한 추출조작으로 각각의 샘플에서 전기영동으로 확인할 수 있는 양의 게놈 DNA를 높은 재현성으로 추출할 수 있었다(그림 2).

■ 실험예 2: 담배 BY-2 배양세포로부터의 DNA 추출

【방법】

생체중량 약 50 mg의 담배 BY-2 배양세포를 마이크로튜브에 넣고, PBS 세정 후 -20 °C로 동결했다. 파이펫 팁의 앞 부분으로 세포를 튜브벽에 으깨는 조작을 생략하고, 프로토콜에 따라 게놈 DNA의 추출을 진행했다. 이를 통해 얻은 침전물을 20 µl의 TE buffer로 용해 후 전기영동과 흡광도 측정을 실시했다(N=2).

continued...

【결과】

배양세포에서 추출하는 경우엔 파이펫 팁으로 세포를 으개는 작업을 생략하여 높은 재현성으로 게놈 DNA를 추출할 수 있음을 확인할 수 있었다(그림 3).



그림 3. 담배 BY-2 배양세포로부터 추출한 게놈 DNA의 전기영동 결과

■ 실험예 3 : 추출한 게놈 DNA를 주형으로 한 PCR 증폭

【방법】

실험예 1과 실험예 2에서 얻은 게놈 DNA 용액을 주형으로 PCR 증폭을 수행했다.

【결과】

애기장대 MERI5B 유전자 (약 1.0 kb), 토마토 XET 유전자 (약 0.6 kb), 시금치 cox 유전자 (약 0.5 kb), 담배 EXT 유전자 (약 2.2 kb)를 타겟으로 PCR를 실시해 전기영동을 통해 증폭 밴드를 확인했는데, 어느 것에서도 저해 물질의 영향은 나타나지 않고 양호한 증폭을 확인할 수 있었다(그림 4).

본 실험에서는 *TaKaRa Ex Taq* HS(TaKaRa Code RR006A)에 의한 증폭예를 나타냈지만, crude 샘플에 최적인 신규 PCR 효소 **MightyAmp DNA Polymerase**(TaKaRa Code R070A)를 이용하면, 한층 더 반응성이 높고 안정된 증폭이 가능하다.

■ 참고문헌

- Zhu, H., Qu, F., Zhu, L.H. : Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride. (1993) *Nucleic Acids Research*, 21(22), 5279-5280.

* License Notice : [2]

표 1. 식물 조직에서 추출한 게놈 DNA 순도³⁾

	사용량	샘플 No.	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
애기장대 싹	20 mg	1	2,2	1,4
		2	2,2	1,4
	50 mg	3	2,1	1,7
		4	2,1	1,7
토마토 싹	20 mg	5	2,0	1,4
		6	2,0	1,6
	50 mg	7	1,8	1,4
		8	1,7	1,4
시금치 잎	20 mg	9	2,2	1,6
		10	2,2	1,8
	50 mg	11	2,1	1,8
		12	2,0	1,7

³⁾ : 본 프로토콜로 추출한 게놈 DNA는 RNA를 포함하고 있기 때문에 정확한 게놈 DNA 순도를 반영하지는 않는다.

표 2. 담배 BY-2 배양세포로부터 추출한 게놈 DNA의 순도⁴⁾

	사용량	샘플 No.	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
담배 BY-2 배양세포	50 mg	1	2,2	2,1
		2	2,2	2,2

⁴⁾ : 본 프로토콜로 추출한 게놈 DNA는 RNA를 포함하고 있기 때문에 정확한 게놈 DNA 순도를 반영하지는 않는다.

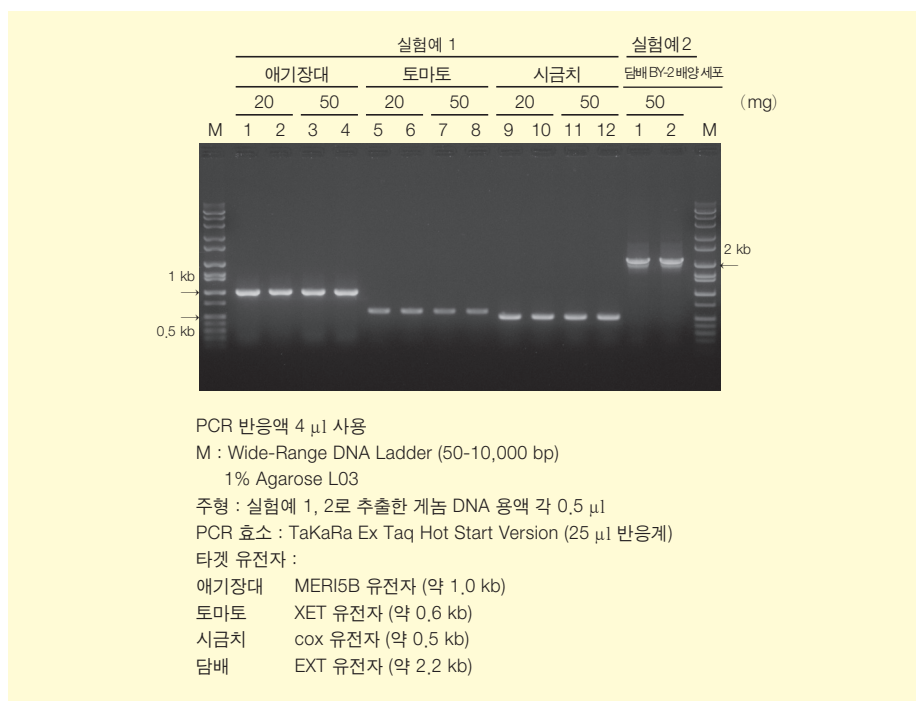


그림 4. 추출한 DNA를 주형으로 한 PCR 증폭

■ 관련 제품

제품명	용량	TaKaRa Code
MightyAmp DNA Polymerase	250 U	R070A
TaKaRa Ex Taq Hot Start Version	250 U	RR006A
Agarose LO3	100 g	5003