

(19)대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>  
C12N 15/00

(45) 공고일자 2005년05월03일  
(11) 등록번호 10-0486179  
(24) 등록일자 2005년04월21일

(21) 출원번호 10-2004-0014023  
(22) 출원일자 2004년03월02일

(65) 공개번호  
(43) 공개일자

(73) 특허권자 피경태  
경기도 용인시 수지읍 성원2차아파트 112-1402

(72) 발명자 피경태  
경기도 용인시 수지읍 성원2차아파트 112-1402

(74) 대리인 정진상  
박종혁

심사관 : 김재현

(54) 핵산을 분리하고 정제하기 위한 세포 용해 조성물, 방법 및 키트

요약

2M 내지 6M의 구아니딘 HCl, 구아니딘 SCN 및 NaCl로 구성된 균으로부터 선택되는 캐오토티픽(chaotropic) 염; 0.5 중량% 내지 10 중량%의 비이온성 계면활성제; 10mM 내지 50mM의 PIPES; 0.1mM 내지 5mM의 EDTA; 및 0.2% 내지 5% 소듐 라우릴 살코실레이트를 포함하는 세포용해 조성물, 이를 사용한 핵산 분리 및 정제방법, 및 이를 포함하는 키트를 제공한다.

대표도

도 1

색인어

핵산 분리, 플라스미드 DNA, 미니 프랩

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명의 방법(A) 및 종래 방법(B)에 따른 플라스미드 DNA 추출 방법을 비교한 흐름도이다.

도 2 본 발명의 키트 및 종래의 시증구입가능한 키트를 사용하여 분리 및 정제된 플라스미드 DNA의 비교 아가로스 겔 사진이다.

도 3은 본 발명의 방법을 사용하여 분리 및 정제된 플라스미드 DNA의 제한효소 절단 결과를 나타낸 아가로스 겔 사진이다.

도 4는 본 발명의 키트 및 종래의 시증구입가능한 키트를 사용하여 수행한 DNA 염기서열 분석실험 결과의 비교 사진이다.

발명의 상세한 설명

**발명의 목적**

**발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술**

(기술분야)

본 발명은 세포내에 존재하는 핵산을 분리하기 위한 세포 용해 조성물, 방법 및 키트에 관한 것이다. 이에 한정하려는 의도는 아니지만, 더 구체적으로 본 발명은 DNA를 함유하는 세포의 배양물로부터 세포를 용해하고 DNA를 분리하고 정제하기 위한 세포용해 조성물, 방법 및 키트에 관한 것이다. 본 발명은 특히 DNA, 더 자세하게는 개선된 세포용해 완충액을 사용하여 플라스미드 DNA를 미생물 세포로부터 분리하고 정제하기 위한 개선된 세포용해 조성물, 방법 및 키트에 관한 것이다.

(배경기술)

현재 생명공학 분야에서 수행되는 기술에 있어서, 핵산 단편은 일상적으로 원핵 또는 진핵 생물이나 바이러스 배양물로부터 분리되고 정제된다. 분리된 이들 단편은 이후 재조합 조작, 서열결정이나 진단 프로브 등 다른 연구 분석 및 그 단편이 속하는 전체 단백질이나 펩티드의 유전자 구성 등 다방면의 산업적 응용에 사용될 수 있다. 전통적으로 핵산은 소듐 도데실 설페이트 같은 계면활성제 및 아세트산칼륨 같은 염 수용액의 존재하에서 용균한 후 페놀이나 클로로포름 또는 그 혼합물로 추출함에 의하여 단백질 기타 세포내 물질로부터 분리 및 정제되어 왔다.

재조합 DNA 기술에 있어서, DNA 분자는 일반적으로 박테리아 세포 배양물이나 박테리오파지 배양물로부터 분리된다. 예를 들어, 이중가닥 플라스미드 DNA는 액체 영양 육즙 배지에서 배양되는 에스케리키아 콜라이 (*Escherichia coli*) 같은 박테리아 세포내에서 생산하여 분리한다.

박테리아 배양물로부터 플라스미드 DNA의 분리에 일반적으로 사용되는 방법은 H. C. Birnboim 및 J. Doly, "A Rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA", *Nucleic Acids Res.*, 7: 1513-1523 (1979)에 상세하게 기재되어 있다.

미니프렙(miniprep)으로 더 잘 알려져 있는 플라스미드 DNA를 분리하기 위한 소규모의 실험방법은 분자생물학 실험에서 일상적으로 사용된다. Ausubel, F. M. 등 (1989), *Current protocols in Molecular Biology*, Vol. 2, John Wiley & Sons, NY 참조.

이 방법은 단시간 내에 다수 샘플로부터 플라스미드 DNA를 준비할 수 있다는 장점이 있으나, CsCl 구배를 통한 초원심분리 방법을 비롯한 보다 대규모의 플라스미드 DNA 정제방법에 비하여 일반적으로 순도가 낮아서 낮은 정도의 순도를 요구하는 몇몇 제한된 응용에서만 사용될 수 있고, 후속 실험에서 더 순도 높은 플라스미드 DNA의 생산을 요하는 경우 재차 정제의 필요성이 있다는 단점을 갖는다.

이에, 세포의 회석, 파쇄 및 중화로 대표되는 세가지 완충액을 사용한 후 에탄올 침전 방법(Lis 및 Schleif, *Nucleic Acids Res.*, 2:383-389(1975))에 의하여 플라스미드 DNA를 분리 및 정제하는 전통적인 소규모의 플라스미드 DNA 분리 방법보다 시간 및 목적 DNA의 순도 면에서 효과적인 방법들이 고안되어 왔다. 이러한 방법 들의 예로는 세포용해물로부터 DNA를 분리하는 단계에 있어서 에탄올 침전법을 사용할 때의 불편함을 극복하고 순도를 높이고자 하여 개발된 컬럼을 통한 DNA 순수분리가 플라스미드 DNA 추출 및 정제가 대표적이다. (Horn 등, *Human Gene Ther.*, 6:565-573(1995); 미국특허 제5,707,812호; Chandra 등, *Anal. Biochem.*, 203: 169-172 (1992); Marquet 등, *BioPharm.*:26-37 (1995) 등 참조)

최근에는 이 기술을 이용하여 컬럼을 포함하는 추출 및 정제 키트가 플라스미드 DNA 정제 방법에 있어서는 기본이 되고 있는 추세이다. 이와 같은 컬럼을 사용한 플라스미드 DNA 추출의 원리는 DNA와 특이적으로 결합하는 유리섬유나 실리카 멤브레인을 사용하여 물분자와 DNA 사이의 구조적 상호작용의 원리를 이용하여 DNA 분자를 단백질 및 기타 세포내 물질로부터 정제하는 것이다.

이와 같은 컬럼의 사용을 포함하는 현재 사용되고 있는 시중구입가능한 플라스미드 DNA 정제 시스템은 상기한 종래의 전통적 방법에 있어서의 세포용해 과정과 마찬가지로 필수적으로 삼단계의 완충액 처리 및 컬럼을 사용한 정제 단계로 구성되어 있어서 다수의 샘플을 처리하는데 번거롭고 시간이 많이 소요되는 단점이 있다.

한편, 이와 같은 컬럼을 사용한 DNA 분리 방법은 현재 고도로 발달되어 전체 DNA 분리 및 정제과정 중 컬럼을 사용하는 최종 단계에 소요되는 시간은 매우 단시간이고 필요한 숙달정도가 매우 낮은 것을 고려할 때, 컬럼 원심분리 또는 여과이전에 세포용해물을 제조하는 단계의 공정 및 시간의 단순화의 필요성이 더욱 증대되고 있는 실정이다.

더욱이, 최근에는 유전공학 발달에 따라 대량의 시료를 동시에 되도록 단시간에 처리하여야 하는 경우가 많아지게 되었고, 반복적 실험에서도 재현성 있는 결과를 얻을 수 있어야만 실험의 결과를 신뢰할 수 있으므로 방법은 최소한의 단계로 이루어지고 처리과정도 단순화될 필요성이 점점증하고 있다. 더 나아가, 이와 같은 단순화된 공정을 통하여도 최대한의 후속 실험응용이 가능할 정도의 플라스미드 DNA 순도와 양을 확보할 수 있을 것이 요구된다. 공정 단순화의 또다른 잇점은 실험자의 숙련도에 의한 결과의 재현성 및 성공확률을 높여준다는 점이다.

이에, 본 발명자는 세포에서 DNA를 추출하기 위하여 종래 사용되는 회석, 파쇄 및 중화의 목적으로 종래 사용되는 세가지 서로다른 완충액 대신 새롭게 제공된 단지 한 가지의 세포분해완충액을 사용한, 보다 단순한 방법에 의하여 기존 방법보다도 짧은 시간에 적은 비용으로 높은 순도의 다량의 DNA를 분리할 수 있다는 놀라운 사실을 발견하였다. 또한, 상기 신규한

세포 용해 완충액을 포함하는 플라스미드 DNA 분리 및 정제용 키트를 제조하였고, 다양한 세포로부터 상기 완충액을 사용하여 종래 방법보다 짧은 단계와 시간으로 재현성 높게 플라스미드 DNA를 보다 고수율로 분리할 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

**발명이 이루고자 하는 기술적 과제**

본 발명의 목적은 세포에 함유된 플라스미드 DNA를 분리하고 정제하기 위한 개선된 세포용해 조성물을 제공하는 것이다.

본 발명의 목적은 세포에 함유된 플라스미드 DNA를 분리하고 정제하는 단순화된 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 세포에 함유된 플라스미드 DNA를 분리하고 정제하는 단순화된 공정에 사용되는 키트를 제공하는 것이다.

**발명의 구성 및 작용**

상기 목적을 달성하기 위하여, 2M 내지 6M의 구아니딘 HCl, 구아니딘 SCN 및 NaCl로 구성된 균으로부터 선택되는 캐오토로픽(chaotropic) 염, 0.5 중량% 내지 10 중량%의 비이온성 계면활성제, 10mM 내지 50mM의 PIPES, 0.1mM 내지 5mM의 EDTA; 및 0.2% 내지 5% 소듐 라우릴 살코실레이트를 포함하는 세포 용해 조성물을 제공한다.

본 발명의 다른 양태에서는,

(a) 세포 배양물로부터 세포를 수집하는 단계;

(b) 2M 내지 6M의 구아니딘 HCl, 구아니딘 SCN 및 NaCl로 구성된 균으로부터 선택되는 캐오토로픽 염, 0.5 중량% 내지 10 중량%의 비이온성 계면활성제, 10mM 내지 50mM의 PIPES, 0.1mM 내지 5mM의 EDTA, 및 0.2 중량% 내지 5 중량% 소듐 라우릴 살코실레이트를 포함하는 세포 용해 조성물에 단계 (a)의 세포 수집물을 현탁시켜 1분 내지 10분 동안 인큐베이션하여 세포용해물을 제공하는 단계;

(c) 단계 (b)의 세포용해물 내 불용성 물질을 제거하여 세포용해액을 얻는 단계;

(d) 단계 (c)의 세포용해액에서 DNA를 분리 및 수집하는 단계로 이루어지는, 세포내 플라스미드 DNA를 분리하는 방법을 제공한다.

세포는 미생물 세포가 바람직하며, 더 바람직하게는 박테리아 세포이다. 또한 단계 c)는 세포용해물 중의 플라스미드 DNA로부터 불용성 불순물을 원심분리 없이 플라스미드 DNA를 함유하는 용액을 제공하는 것이 바람직하다.

또다른 양태에서 본 발명은 위와 같은 플라스미드 DNA 분리방법에서 사용되는 키트를 제공한다.

본원에서 제공되는 세포용해 조성물을 사용한 단순하고 신속한 플라스미드 DNA 정제 방법은 매우 높은 수득률로 순도 높은 플라스미드를 생산한다. 이 방법은 종래 방법에서 세포용해물을 얻기 위하여는 삼단계의 완충액 처리를 수행하던 염기성 용해에 기초한 방법과는 전혀 다른 단순화된 세포용해조성물을 사용한 세포용해 방법을 도입한 것이며, 최종단계의 DNA 정제는 종래 사용되고 있는 컬럼 정제 방법을 채용한다. 이 방법은 전형적으로 박테리아 배양액 3 ml 당 30 µg 내지 60 µg의 플라스미드 DNA를 생산하고, 순도는 1.8 내지 2.0 (OD<sub>260/280</sub>)에 달한다. 이 방법을 따라 제조된 플라스미드는 종래 염기성 용해에 기초한 삼단계 세포용해 방법에 의하여 분리된 플라스미드와 비교하여 보다 높은 DNA 서열분석 성공률을 나타내는 등 기타 연계 실험 결과에서 더 우수한 것으로 나타났다.

본원에서는 플라스미드가 기존의 미니프렙 방법보다 높은 순도로 정제되기 때문에 분리된 플라스미드 DNA는 다양한 유전공학 후속실험의 시료로서 사용될 수 있고, 공정이 단순화되어 재현가능성이 높아졌으며, 시간 및 비용면에서 더욱 효율적인 방법을 제공한다. 설명된 방법은 필요에 따라서 더 대용량의 스케일업이 가능하다.

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

**정의**

본 발명에서 사용될 때 "플라스미드"는 인위적으로 조합되어 대장균등 박테리아와 효모등에서 복제 될수 있는 유전자를 가진 원형 유전자를 의미한다.

본 발명에서 사용될 때 "세포용해"는 박테리아등 세포막을 가진 단세포 생물의 세포막을 파괴 하여 세포질 용액의 유출을 의미한다.

본 발명에서 사용될 때, "DNA 부착성 컬럼"은 양이온성 금속 비드, 또는 양이온성 흡착 섬유로 패킹된 컬럼을 의미한다.

**본 발명의 구체적 수행 방법**

본 발명은 세포용해 조성물을 제공한다.

본 발명의 세포용해 조성물은 2M 내지 6M의 구아니딘 HCl, 구아니딘 SCN 및 NaCl로 구성된 균으로부터 선택되는 캐오토로픽 염, 0.5 중량% 내지 10 중량%의 비이온성 계면활성제, 10mM 내지 50mM의 PIPES 및 0.1mM 내지 5mM의 EDTA를 포함하는 세포 용해 조성물을 제공한다.

상기 세포용해 조성물은 구아니딘 HCl, 구아니딘 SCN 및 NaCl로 구성된 균으로부터 선택되는 캐오토로픽 염, 비이온성 계면활성제, PIPES 및 EDTA가 용해되어 있는 수용액으로 제조된다. 더 바람직하게는, 제1의 처리용액은 RNase A가 100ug/ml 농도로 포함된다.

상기 세포용해 조성물 구성성분 중 비이온성 계면활성제는 폴리에틸렌글리콜형 비이온성 계면활성제나 다가 알콜형 비이온성 계면활성제 모두가 사용될 수 있으나, 바람직하게는 Triton X-100, 트윈(Tween) ( ; 솔비탄 에스테르의 산화 에틸렌 부가물) 또는 2- 메르캅토에탄올이 사용되며, 가장 바람직하게는 Triton X-100이 사용된다.

상기 세포용해 조성물 구성성분 중 캐오토로픽 염은, 핵산이 친화성 결합으로 컬럼에 충전된 실리카겔 등의 물질과 결합하도록 보조 역할을 하는 이온 용도로 당업계에서 사용되는 어떤 캐오토로픽 염도 사용될 수 있다. 바람직하게는, 구아니딘 HCl, 구아니딘 SCN(티오시아네이트), NaCl이 사용되며, 가장 바람직하게는 구아니딘 HCl이 사용된다.

상기 세포용해 조성물 구성성분 중 구아니딘 HCl, 구아니딘 SCN 및 NaCl로 구성된 균으로부터 선택되는 캐오토로픽 염의 농도는 2M 내지 6M이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 2.5M 내지 4M이다. PIPES의 농도는 10mM 내지 50mM가 바람직하며, 더욱 바람직하게는 10mM 내지 30mM 이다. 비이온성 계면활성제의 농도는 0.5 중량% 내지 10 중량% 가 바람직하며, 더욱 바람직하게는 1 중량% 내지 5 중량% 이다. EDTA의 농도는 0.1mM 내지 5mM 가 바람직하며, 더욱 바람직하게는 1mM 내지 3mM이다.

다른 양태에서 본 발명은 플라스미드 DNA 분리 및 정제 방법을 제공한다.

본 발명의 플라스미드 DNA 분리 및 정제 방법은 (a) 세포 배양물로부터 세포를 수집하는 단계;

(b) 2M 내지 6M의 구아니딘 HCl, 구아니딘 SCN 및 NaCl로 구성된 균으로부터 선택되는 캐오토로픽 염, 0.5 중량% 내지 10 중량%의 비이온성 계면활성제, 10mM 내지 50mM의 PIPES 및 0.1mM 내지 5mM의 EDTA를 포함하는 세포 용해 조성물에 단계 (a)의 세포 수집물을 현탁시켜 1분 내지 10분 동안 인큐베이션하여 세포용해물을 제공하는 단계;

(c) 단계 (b)의 세포용해물 내 불용성 물질을 제거하여 세포용해액을 얻는 단계;

(d) 단계 (c)의 세포용해액에서 DNA를 분리 및 수집하는 단계로 이루어지는, 세포내 플라스미드 DNA를 분리하는 방법을 제공한다.

세포용해 조성물을 사용한 상기 세포용해 단계의 인큐베이션 시간은 3분 내지 10 분, 바람직하게는 3분, 가장 바람직하게는 5분이다. 가장 최적의 10 분을 사용한 경우 수득의 약 95%의 DNA 수득이 가능하므로 5분의 단시간 처리로도 만족할 만한 결과를 얻을 수 있다.

본 발명에 의하여 분리될 수 있는 플라스미드 크기는 0.07 kb 내지 100kb, 바람직하게는 2 kb 내지 100kb, 더욱 바람직하게는 1000 kb 이하이다. 플라스미드의 크기가 너무크면 컬럼에서 분리시 효율이 떨어 질수 있다.

상기 단계 (d)는 종래사용되는 DNA 정제를 위한 어떤 방법이라도 사용될 수 있다. 바람직하게는 에탄올 침전법, 기타 핵산 침전방법 또는 DNA 친화성 컬럼을 사용한 원심분리 또는 여과법이 사용될 수 있으며, 더욱 바람직하게는 DNA 친화성 컬럼을 사용한 원심분리 또는 여과법이 사용된다.

상기 단계 (d)는 (i) DNA 부착성 컬럼에 단계 (c)의 액체상을 로딩하는 단계; 및 (ii) 컬럼 세척 후 부착된 DNA를 용리시키는 단계로 이루어질 수 있다. DNA 부착성 컬럼은 종래 DNA 분리에 사용되고 있는 어떤 컬럼도 이용될 수 있으나, 음이온 교환수지나 유리섬유 또는 실리카 멤브레인으로 본질적으로 이루어진 컬럼이 사용될 수 있으며, 특히 실리카 멤브레인이 바람직하다. 바람직하게는 세척 완충액은 50내지 80% 에탄올 및 100mM 내지 1500mM NaCl 수용액이며 용출 완충액은 5mM 내지 20mM Tris-HCl 수용액이다.

본 발명의 플라스미드 DNA 분리방법은 플라스미드를 세포로부터 분리, 정제함에 있어서 기존의 방법보다 단계 및 처리완충액의 총량을 줄이고 또한 DNA를 분리하는데 소요되는 시간을 줄일 수 있다는 장점이 있다. 아울러 세포의 파쇄 단계부터 계면 활성제와 구아니딘 HCl 을 같이 사용 함으로써 세포내 단백질이 DNA에 영향을 줄수 있는 가능성을 줄여 기존 DNA prep의 문제점이었던 뉴클라제에 의한 DNA 손상 가능성을 최소화 할수 있다. 동시에 가능하게 하고 더욱 순도 높은 플라스미드 산물의 제공을 가능하게 한다.

또한, 본 발명은 상기 세포용해 및 DNA 분리 및 정제방법을 수행하는데 사용되는 키트를 제공한다.

본 발명의 플라스미드 DNA 분리 키트는 2M 내지 6M의 구아니딘 HCl, 구아니딘 SCN 및 NaCl로 구성된 균으로부터 선택되는 캐오토로픽 염, 0.5 중량% 내지 10 중량%의 비이온성 계면활성제, 10mM 내지 50mM의 PIPES, 0.1mM 내지 5mM의 EDTA 및 1 내지 500 ug/ml의 RNase A를 포함하는 세포 용해 조성물을 포함한다.

바람직하게는 상기 키트는 (b) DNA 부착성 컬럼; (c) 컬럼 세척 완충액; 및 (d) 컬럼 용출 완충액을 더 포함할 수 있으며, 상기 DNA 부착성 컬럼은 종래 사용되는 어떤 친화성 DNA 부착컬럼일 수 있으며 사용되는 세척 완충액 및 용출 완충액은 각 컬럼에 적합하게 종래 사용된 어떤 공지의 완충액일 수 있다.

한 바람직한 구체예에서, 상기 DNA 부착성 컬럼은 스핀컬럼이며, 원심분리 또는 여과에 의하여 용출이 수행된다.

상기와 같은 방법 및 키트를 사용하는 것은 종래 방법보다 단순화된 공정을 작업함으로써 인하여 더욱 순도 높고 타 연계 실험 응용성이 양호한 플라스미드 DNA를 제조하는데 소요되는 시간을 줄이고 사용 시약을 절약하는 장점이 있다. 또한, 종래 세단계로 나뉘어져 이루어지는 세포용해 및 DNA 분리단계를 단지 한단계로 가능케 함으로써 작업자가 범할 수 있는 실수와 오차의 기회를 줄여 더욱 재현성 높은 결과를 얻을 수 있다.

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 이들 실시예는 오직 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것일 뿐이며, 발명의 요지는 오직 청구범위에 의하여만 제한되는 것이므로 본 발명의 범위는 이들 실시예에 의하여 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

## 실시예

### 실시예 1: 본 발명의 세포용해완충액 제조

#### (제조예 1)

본 발명자들은 세포내 플라스미드 DNA를 분리하기 위한 세포용해 조성물의 한 바람직한 실시예로서 3M의 구아니딘-HCl, 5 중량%의 Triton X-100, 25mM의 PIPES, 2mM의 EDTA, 및 1 중량% 소듐 라우릴 살코실레이트로 구성된 수용액을 제조하였다.

#### (제조예 2)

본 발명자들은 세포내 플라스미드 DNA를 분리하기 위한 세포용해 조성물의 한 바람직한 실시예로서 2M의 구아니딘-HCl, 10중량%의 Triton X-100, 50mM의 PIPES, 1mM의 EDTA 및 1중량% 소듐 라우릴 살코실레이트로 구성된 수용액을 제조하였다.

### 실시예 2: E. coli에서 본 발명의 세포용해완충액을 사용한 플라스미드 분리

본 발명자들은 상기 실시예 1에서 제조한 본 발명의 세포용해 조성물과 본 발명의 바람직한 키트를 사용하여 본 발명의 방법에 따라 플라스미드 DNA를 하기와 같은 방법으로 분리 및 정제하였다.

1) 암피실린을 50 $\mu$ g/ml 포함하는 3ml의 LB 육즙 배지에서 37 °C에서 플라스미드 DNA pBluescript II(Stratagene으로부터 시중구입함)를 함유하는 E. coli (XL1 Blue) 단일 콜로니를 접종하여 16시간 동안 배양한 후 13000rpm으로 2분간 세포를 침전시켜 회수하였다.

2) 회수한 세포는 300  $\mu$ l의 3M의 구아니딘-HCl, 5 중량%의 Triton X-100, 25mM의 PIPES 및 2mM의 EDTA, 1중량% 소듐 라우릴 살코실레이트 및 100 $\mu$ g/ml의 RNase A로 구성된 수용액에 재현탁하여 5분간 실온에서 인큐베이션하였다. 인큐베이션 동안 때때로 혼합물을 교반하였다.

3) 인큐베이션한 세포 용해물 전체를 (Canada BBI로부터 구입한) 스핀컬럼에 로딩한 후 12000rpm에서 30초 동안 원심분리한 후, 500  $\mu$ l의 50%에탄올, 1M 아세트산 칼륨, 0.1M NaCl, 1mM EDTA 및 10mM Tris Cl (pH 7.5)을 함유한 세척 완충액을 첨가하여 12000rpm에서 15초 원심분리하였다. 플로쓰로를 버리고 세척단계를 한차례 반복한 후, 500  $\mu$ l의 50%에탄올, 0.1M NaCl, 1mM EDTA 및 10mM Tris Cl (pH 7.5)을 함유한 세척 완충액을 첨가하여 12000rpm에서 15초 원심분리하였다. 12000rpm에서 10초간 원심분리하여 잔여 세척액을 모두 제거하였다.

4) 컬럼을 수집용 튜브에 넣고 50  $\mu$ l의 10mM Tris HCl (pH8.0) 수용액을 컬럼에 첨가한 후 13000rpm에서 1분간 원심분리하였다.

5) 수집된 50  $\mu$ l 플라스미드 DNA 수용액 중 0.2, 0.5 및 1  $\mu$ l을 취하여 1% 아가로스 겔에 로딩한 후, 110 V로 15분 동안 전기영동하여 확인하였다.

분리 및 정제에 소요된 총 시간은 17분이다.

분리 및 정제된 50  $\mu$ l의 pBluescript II 플라스미드 DNA 수용액 중 0.5  $\mu$ l를 사용한 아가로스 겔 사진을 도 2 (레인 1)에 나타낸다.

### 비교예 1: E. coli에서 시중구입 가능한 종래 미니프렙 키트를 사용한 플라스미드 분리

실시예 2의 방법 중 단계 1)에 따라 수집한 세포에 포함된 플라스미드 pBluescript II DNA를 Qiagen 사의 Qiagen Plasmid Mini와 국외 3사(Omega 사 "Plasmid Mini Kit I", Qiagen 사 "Plasmid Mini Kit" Qbiogen 사 "Plasmid Mini

Kit") 국내 3사(바이오니아 사 "AccuPrep Plasmid Extraction Kit", 제너럴바이오시스템 사 "Plasmid DNA mini prep kit", 아트만바이오사이언스 사 "DNA purification kit") 제품을 사용하여 각각 제공된 사용법에 따라 분리하였다. 분리 플라스미드 pBluescript II DNA를 아가로스 겔에 전기 영동하였다.

분리 및 정제에 소요된 총 시간은 27분 - 35 분이다.

분리 및 정제된 50  $\mu\text{l}$ 의 pBluescript II 플라스미드 DNA 수용액 중 0.5  $\mu\text{l}$ 를 사용한 아가로스 겔 사진을 도 2 (A 내지 F에 대하여 각각 레인 2 내지 7)에 나타낸다.

실시에 2 및 비교예 1에서 본 발명의 세포용해 조성물을 포함한 본 발명의 키트, 및 종래 시중구입 가능한 키트를 사용하여 분리 및 정제된 pBluescript II 플라스미드 DNA의 농도 및 총량을 아래 표 1에 나타낸다.

표 1.

레인	제조사	농도 ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	총 분리량 ( $\mu\text{g}$ )
1	본 발명의 키트	1,200	60
2	Omega 사	300	15
3	Qbiogen	300	15
4	Qiagen 사	800	40
5	바이오니아 사	700	35
6	제너럴바이오시스템 사	300	15
7	아트만바이오사이언스 사	700	35

실시에 3. 본 발명의 방법으로 분리된 DNA를 사용한 제한 효소 절단 실험

실시에 2에서 분리한 DNA를 제조자의 지시에 따라 제한효소 (HindIII/EcoRI)로 절단한 후 1% 아가로스 겔 상에서 전기영동하여 그 결과를 도 3에 도시하였다. 도 3의 각 레인은 본원발명의 키트를 사용한 13개의 미니프랩 생성물의 제한효소 절단에 의한 결과를 나타낸다.

실시에 4. 본 발명의 방법으로 분리된 DNA를 사용한 DNA 서열결정

실시에 2의 방법에 의하여 분리된 DNA를 사용하여 DNA 서열결정을 수행하였다. 200 ng의 시료를 1 pmol의 프라이머와 2  $\mu\text{l}$ 의 Applied Biosystem사의 Bio-dye terminator와 혼합하여 PCR을 수행하고, PCR 결과물을 에탄올 정제후 Applied Biosystem사의 3700 모델을 이용하여 분석하였다.

결과를 도 4에 도시 하였다.

발명의 효과

본 발명에 의하여 제공되는 방법 및 키트를 사용하여 시간 및 비용면에서 보다 효율적으로 세균 용해물을 제조하고 플라스미드 DNA를 분리 및 정제할 수 있을 뿐 아니라, 분리 및 정제된 산물은 종래 사용되던 플라스미드 미니프랩 방법에 의한 산물 보다 플라스미드의 양이 많고 DNA 순도가 높아 더 다양하고 개선된 후속 실험이 가능하게 되었다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

2M 내지 6M의 구아니딘 HCl, 구아니딘 SCN 및 NaCl로 구성된 균으로부터 선택되는 캐오토로픽 염;

0.5 중량% 내지 10 중량%의 비이온성 계면활성제;

10mM 내지 50mM의 PIPES;

0.1mM 내지 5mM의 EDTA; 및

0.2 중량% 내지 5 중량% 소듐 라우릴 살코실레이트를 포함하는 세포용해 조성물.

청구항 2.

제1항에 있어서, 상기 비이온성 계면활성제는 0.5 중량% 내지 10 중량%의 Triton X-100인 것을 특징으로 하는 세포용해 조성물.

### 청구항 3.

제1항 내지 제2항에 있어서, 상기 조성물은 1 내지 500  $\mu\text{g/ml}$ 의 RNase A를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 세포용해 조성물

### 청구항 4.

(a) 원핵세포 배양물로부터 세포를 수집하는 단계;

(b) 2M 내지 6M의 구아니딘 HCl, 구아니딘 SCN 및 NaCl로 구성된 균으로부터 선택되는 캐오토로픽 염, 0.5 중량% 내지 10 중량%의 비이온성 계면활성제, 10mM 내지 50mM의 PIPES, 0.1mM 내지 5mM의 EDTA, 0.2 중량% 내지 5 중량% 소듐 라우릴 살코실레이트 및 1 내지 500  $\mu\text{g/ml}$ 의 RNase A를 포함하는 세포 용해 조성물에 단계 (a)의 세포 수집물을 현탁시켜 1분 내지 10분 동안 인큐베이션하여 세포용해물을 제공하는 단계;

(c) 단계 (b)의 세포용해물 내 불용성 물질을 제거하여 세포용해액을 얻는 단계;

(d) 단계 (c)의 세포용해액에서 DNA를 분리 및 수집하는 단계로 이루어지는, 세포내 플라스미드 DNA를 분리하는 방법.

### 청구항 5.

제3항 또는 제4항에 있어서, 상기 비이온성 계면활성제는 Triton X-100인 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 6.

제3항 또는 제4항에 있어서, 단계 (d)는

(i) DNA 부착성 컬럼에 단계 (c)의 액체상을 로딩하는 단계; 및

(ii) 컬럼 세척 후 부착된 DNA를 용리시키는 단계로 이루어지는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 7.

제6항에 있어서, 상기 DNA 부착성 컬럼은 스핀컬럼이고 용리는 원심분리에 의하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 8.

2M 내지 6M의 구아니딘 HCl, 0.5 중량% 내지 10 중량%의 비이온성 계면활성제, 10mM 내지 50mM의 PIPES, 0.1mM 내지 5mM의 EDTA, 0.2 중량% 내지 5 중량% 소듐 라우릴 살코실레이트 및 1 내지 500  $\mu\text{g/ml}$ 의 RNase A를 포함하는 세포 용해 조성물을 포함하는 세포내 플라스미드 DNA를 분리하기 위한 키트.

### 청구항 9.

제6항에 있어서, 키트는

(b) DNA 부착성 컬럼;

(c) 제1 세척 완충액과 제2 세척완충액; 및

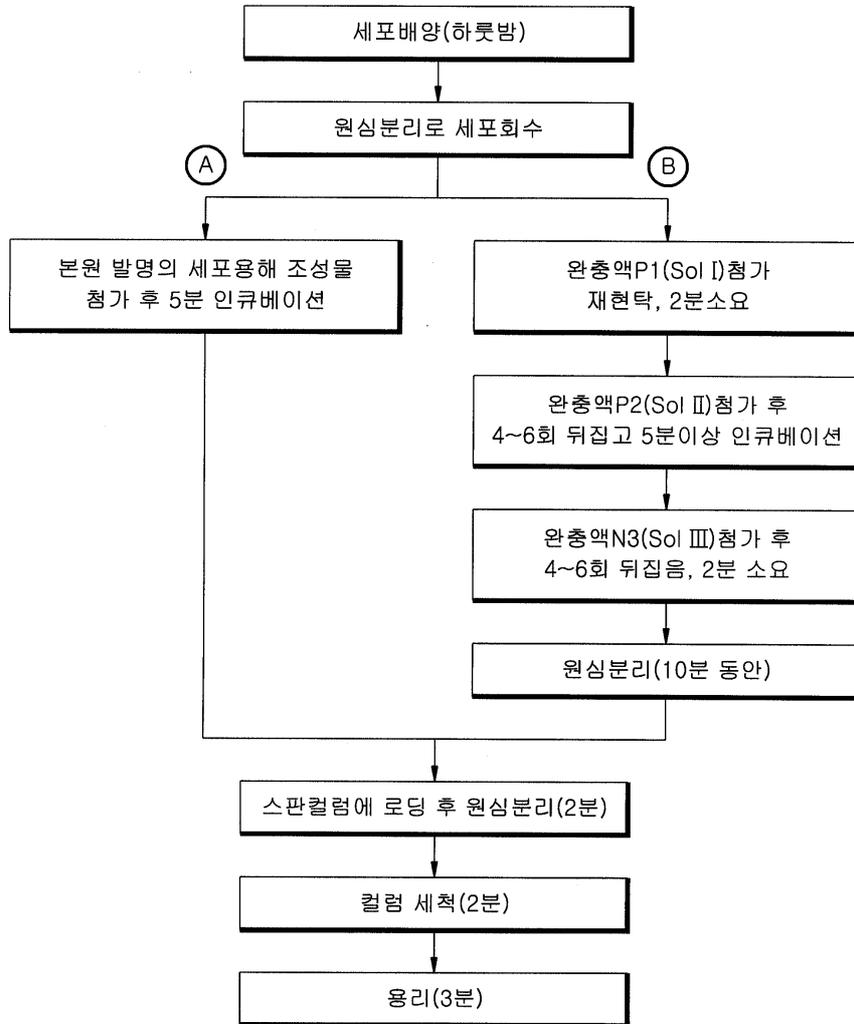
(d) 컬럼 용출 완충액을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 세포내 플라스미드 DNA를 분리하기 위한 키트.

### 청구항 10.

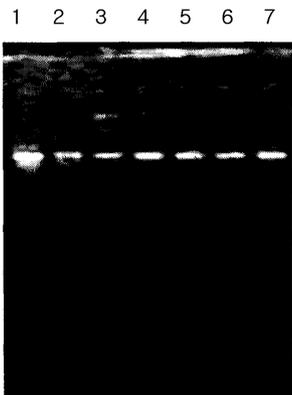
제8항 또는 제9항에 있어서, 상기 DNA 부착성 컬럼은 스피컬럼이고 제1 세척완충액은 50%에탄올, 1M 아세트산 칼륨, 0.1M NaCl, 1mM EDTA 및 10mM Tris Cl, 제2 세척완충액은 50%에탄올, 0.1M NaCl, 1mM EDTA 및 10mM Tris Cl 이며, 용출 완충액은 10mM Tris HCl인 것을 특징으로 하는 키트.

도면

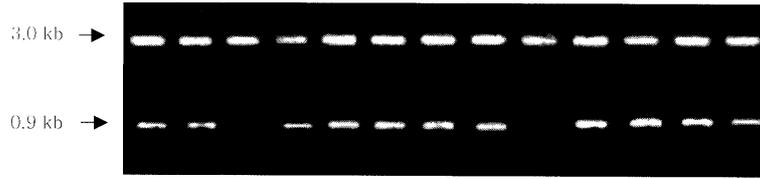
도면1



도면2



도면3



도면4

