

E.coil 형질 전환과 재조합 DNA 추출, 제한효소 반응과 RFLP확인

-형질전환 실행, 세균 배양, DNA prep, 제한효소 반응과 RFLP-

공과대학 컴퓨터공학부
18학번 김상민

Abstract

Plasmid를 제한효소로 잘라내어 다른 DNA를 삽입하는 형질전환을 시행하고, 형질 전환의 결과물인 재조합 DNA를 E.coil(competent cell)에 주입하여 LA 배지에서 배양하는 DNA cloning을 실행하였다. 이후 복제된 E.coil 세포를 DNA prep의 과정을 거쳐 DNA를 추출하였다. 추출한 DNA를 제한효소로 잘라내고, loading dye로 염색 후 전기영동하여, UV transilluminator로 영동된 RFLP 패턴을 관찰하였다. 또한 RFLP 패턴의 비교를 통해 target DNA를 확인하였다.

1 Introduction

생물학자들은 특정 유전자를 연구할 때 다양한 문제들을 마주하게 된다. 대표적인 문제는 자연적으로 확인 가능한 염색체 속 DNA 분자들은 수많은 유전자들을 가지고 있어서 매우 길어 연구에 적합하지 않다는 것이다. 또한 이 염색체에서 유전정보를 가진 유전자는 일부분일 뿐이고, 대부분의 나머지는 비암호화 염기서열이다. 예를 들어, 인간의 유전자 하나는 한 개 염색체에서 단지 1/1000000만을 차지하고 있다. 따라서 과학자들은 특정 유전자만을 분리하여 연구하기 위해 동일한 염기서열의 DNA를 대량으로 제조할 수 있는 방법을 개발하였다.[1] 이것이 바로 DNA 클로닝이다. DNA 클로닝은 박테리아 플라스미드에 복제하고자 하는 DNA를 효소를 통해 삽입하여 재조합 DNA를 만드는 '형질전환'을 통해 시작된다. 이제 이 재조합 DNA를 다시 박테리아 세포에 넣어주고 배양하면, 박테리아가 세포분열을 통해 clone을 만들어 내고, 이때 복제하고자 한 DNA도 같이 복제되어 대량 생

산이 가능해진다.[2] 본 실험에서는 A와 C라는 Sample DNA를 E.coil에 삽입하여 cloning의 초석이 되는 E.coil 형질전환 방법을 익히고, LA 배지를 통해 재조합한 E.coil을 배양하며 미생물을 배양하는 기본적인 방법을 알아보았다.

이제 복제된 세포로부터 배양된 재조합 DNA를 연구하려면, 복제된 재조합 DNA로부터 조사하고자 하는 DNA만 분리해 내는 과정을 거쳐야 한다. 이 과정은 다양한 buffer 용액이 필요하다. Resuspension Buffer는 용액의 pH를 일정하게 유지하는 Tris-Cl, 세포벽의 안정성을 유지하는 calcium ion을 제거하는 EDTA, 세포 내외의 용질 농도를 맞춰 삼투압을 유지시켜 세포의 외형을 유지하는 Glucose를 가지고 있다. Lysis Buffer는 산성을 띄는 DNA를 변성시키는 NaOH, 인지질 세포막을 분해하는 계면활성제 역할을 하는 SDS를 가지고 있다. Neutralization Buffer는 앞서 NaOH에 의해 염기성이 된 용액을 강한 산을 이용해 다시 중성으로 바꿔 변성된 DNA를 재결합

시키는 역할을 한다. Washing Buffer은 DNA의 용해도를 낮춰 DNA를 filter에 묶어 주고, 다른 buffer의 염을 제거하는 역할을 맡는다. 마지막으로 Elution Buffer는 DNA를 안정화시켜 물 속 filter의 DNA를 추출하는 역할을 한다.[3] 본 실험에서는 위의 Buffer용액을 갖춘 GeneAll Exprep plasmid Kit, Hybfiid-Q plasmid mini를 활용하여 플라스미드를 분리해 보며 배양한 세포에서 DNA를 추출하는 방법을 알고, 추출한 plasmid를 어떻게 활용할지 생각해 보았다.

이제 분리된 DNA를 어떻게 활용 할 수 있을까? RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)는 분리된 DNA가 개인을 식별하는 단서로 활용할 수 있게 도와주는 1980년 David Bostein이 발견한 기술이다. DNA는 개체 집단에서 대부분 genome이 일정하지만, 특정 부위에서 점 돌연변이가 발생하는데 이를 SNP(Single nucleotide polymorphism)이라고 한다. SNP는 개체마다 차이가 있어서, 제한효소(Restriction enzyme, 특정 염기서열을 잘라내는 효소)를 통해 잘라내면, 개체마다 길이가 다른 DNA 조각의 패턴이 나타나게 하는데 이를 RFLP라고 한다. 이 패턴은 개인마다 차이가 있기에 친자 확인이나 개인 식별에 활용 될 수 있는 것이다.[4] 따라서 본 실험에서는 앞서 제작한 sample plasmid를 제한효소로 자르고 전기영동을 통해 잘린 패턴을 확인하며 RFLP에 대해 알아보고자 한다.

2 Materials and Method

<대장균 형질전환과 클로닝>

먼저 대장균의 DNA cloning을 진행하였다. Competent cell로 사용된 E.coil(DH5a), 재조합이 완료된 DNA 샘플 A와 D, LA(LB + Ampicillin)배지, floater를 준비했다. 먼저 competent cell을 얼음에서 녹였다. 이후 재조합 DNA 샘플 A와 C를 각 2ul씩 tube에

넣고, tube에 녹인 competent cell을 각각 50 ul씩 넣은 후 가볍게 tapping하여 DNA와 cell을 섞어주었다. tube를 얼음에 5분간 두었고, 이후 floater에 꽂아 42°C의 water bath에 45초간 담겼다. 각 tube에서 샘플을 30ul 씩 뽑아내어 LA배지에 spreader로 도말하였다(이 작업은 알코올 램프 앞에서 진행한다).도말된 배지에 배양 시작시간과 샘플의 종류를 적은 후 뚜껑이 아래를 보게 뒤집어 37°C 배양기에 15-16시간 배양하였다.

<재조합 DNA plasmid 추출>

배양이 완료된 E.coil pellet을 tube에 옮겨 담고, 250 ul의 S1 buffer을 넣어 pipetting해 pellet을 완전히 풀어 줬다. 250 ul의 S2 buffer을 tube에 담고, inverting을 통해 섞어 주고 상온에서 3분간 기다렸다(vortex하지 않았다). 350 ul의 S3 buffer을 tube에 담고, inverting을 통해 섞어 준 후 얼음 속에 넣고 5분간 기다렸다(마찬가지로 vortex하지 않았다). 원심분리기를 통해 13000 rpm으로 10분간 분리를 진행했다. 분리 후 pellet은 가만히 두고 supernatant만 spin column으로 옮겼다. column을 13000 rpm으로 30초간 분리를 진행하였다. 이후 filtrate를 제거하고, 500 ul의 buffer AW를 column에 넣고 13000 rpm으로 30초간 분리를 진행하였다. 이후 filtrate를 제거하고, 700 ul이 buffer PW를 column에 넣고 13000 rpm으로 30초간 분리를 진행하였다. 다시 filtrate를 제거하고, 13000 rpm에서 1분간 분리를 진행 하였다. 이후 내용물을 새로운 microcentrifuge tube에 옮겨 담고 50 ul의 buffer EB를 넣은 후 1분간 기다렸다. 또 다시 13000 rpm으로 1분간 분리를 하고 eluate를 추출했다.

<제한효소 반응 및 RFLP>

50ml의 1x TAE가 담긴 플라스크에 agarose를 0.5g 넣고, 전자레인을 통해 1

분 30초 가열한 후 식혀 1% agarose gel(50ml)을 준비했다. 1% agarose gel(50ml)에 5 ul의 EtBr을 넣어주고, 균등히 섞이도록 약간 흔들어 줬다. 이후 comb를 꽂은 gel set에 gel을 붓고, 20~30 분간 굳혔다. 다음으로 전기영동을 통해 조사할 DNA Sample A와 D를 각 10ul 추출하여 각 2ul의 loading dye를 섞어줬다. 이 Sample 들을 gel set의 각 well에 10 ul씩 loading 하였다. 그리고 high voltage에서 25분간 running하였다. Running 후 Hand UV transilluminator로 영동된 상을 관찰하고 촬영했다. 촬영한 각 Sample들의 패턴을 바탕으로 A와 동일한 DNA를 가진 범인을 확인하였다.

3 Result



그림 1 LA 배지에 배양중인 E.coil(Sample 'A') 재조합 DNA plasmid(Sample 'A')를 주입한 E.coil을 LA 배지에서 배양하고 있다.



그림 2 배양이 완료된 E.coil(Sample 'A' 와 'C') 배양기에서 배양이 완료된 E.coil(Sample 'A' 와 'C') 이다.

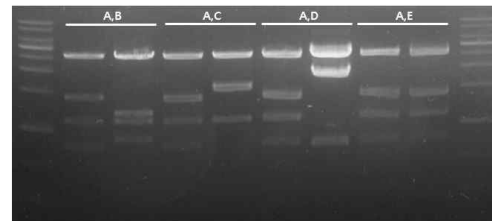


그림 3 전기영동을 통해 확인한 Sample A, B, C, D, E의 RFLP 패턴 전기영동을 통해 Sample A, B, C, D, E의 RFLP 패턴을 UV transilluminator로 관찰한 사진이다.

실험 결과 Sample A와 E의 RFLP 패턴이 유사하게 나타난 것으로 보아, Sample E는 target sample A와 동일한 개체의 유전자이다.

4 Discussion

E.coil의 형질전환 과정을 직접 시행해 보고, 재조합 DNA를 LA 배지에 배양해 대량 생산해 보았다. 제한 효소를 통해 복제하고자 하는 DNA를 잘라내어 플라스미드에 접합시켰다. 이후 Competent cell(E.coil)에 플라스미드를 주입하여 LA 배지에서 배양하는 과정을 거쳤다. 위 실험에서는 형질전환을 통해 외래 유전자를 E.coil 플라스미드에 도입하였다. 하지만 외래 유전자를 도입하는 방법은 형질전환 뿐만이 아니라 형질도

입과 접합이 존재한다. 형질도입은 박테리오파지와 같은 바이러스의 감염을 통해 유전형질이 도입되는 것을 말한다. 박테리오파지는 세균의 내부로 침투하여 성장하고 증식하는 바이러스이다. 이 박테리오파지가 세균 세포로 침투하며 외래 DNA 조각을 세포로 전달하며 형질도입이 성사된다. 형질도입은 박테리오파지라는 매개체를 통해 DNA의 도입이 일어나는 것에서 형질 전환과 차이를 보인다. 접합은 하나의 세균에서 다른 세균으로 유전물질이 직접 전해지는 과정이다. 플라스미드나 세균 염색체의 일부가 한 세포에서 다른 세포로 전달되어 수용세포의 염색체의 염색체와 재조합이 일어나는 것을 의미한다.[5] 접합은 형질전환과 달리 자연적으로 세균세포들이 유전적 다양성을 확보하기 위해 일어난다는 것에서 차이점을 가진다.[6] 위 실험에서 LA 배지는 Ampicillin이라는 항생제를 가진 배지를 의미한다. 항생제는 배양할 세균 외에 다른 균들을 제거하여 실험 결과를 도출하는데 도움을 준다. 그럼 Ampicillin과 함께 자주 사용되는 Kanamycin이라는 항생제는 어떤 원리를 통해 항생작용을 하는 것일까? Ampicillin은 세균에게 필요한 특별한 효소에 고착하여 세포벽을 약화시켜 세포의 합성과 생성을 방해하는 세포벽 합성 저해제의 역할을 한다. Kanamycin은 rRNA와 tRNA 사이의 상호작용을 방해하여 세균세포가 단백질 합성 하는 것을 방해하는 단백질 합성저해제의 역할을 한다.[7]

다음으로 재조합된 세포에서 DNA를 추출하는 DNA prep 과정을 학습하고 실행해 보았다. 이 과정에서 세포벽의 Ca^{+} 이온을 제거해 세포벽을 약하게 하고, 인지질 세포막을 제거하고, pH와 삼투압을 유지하는 다양한 buffer(서론 참고)들이 필요했다. 위 과정을 거쳐 plasmid DNA를 추출해 내었다. 그런데, 우리가 추출한 plasmid DNA가 아닌 chromosomal DNA 또한 생물체를 구성하는 DNA의 일종이다. 그렇다면 plasmid

DNA와 chromosomal DNA의 기능과 구조적 차이는 무엇일까? 구조적 차이를 먼저 비교해 보자면, plasmid DNA는 이중 나선 가닥이 원형의 닫힌 형태로 존재하고, chromosomal DNA는 이중 나선 가닥이 길게 늘어져 있는 선형의 형태를 띠고 있다. 기능적 차이는 plasmid DNA는 항생제에 박테리아가 내성을 지닐 수 있게 하는 단백질이 코딩되어있고, chromosomal DNA는 박테리아의 생식에 필수적인 정보들이 코딩되어있다. 따라서 plasmid DNA가 없이 chromosomal DNA만 존재하여도 박테리아는 생존 할 수 있다는 차이점이 존재한다.[8] 앞서 cloning 과정을 통해 DNA를 대량 생산법을 알아냈다. 이 DNA cloning은 Human genome project에서도 활용된 중요한 기술이다. Human gene을 연구하기 위해서는 동일한 gene을 대량으로 가지고 연구하는 과정이 필요한데, 이때 DNA cloning이 활용되는 것이다. 앞서 DNA prep의 과정을 거쳐서 DNA를 competent cell로부터 추출하였는데, 이 추출한 DNA를 어떻게 확인 할 수 있을까? DNA를 염색하여 확인 할 수 있다.[9]

마지막으로 추출한 재조합 DNA Sample들을 각각 전기영동을 통해 RFLP 패턴을 확인하여 주어진 target sample(Sample 'A')과 일치하는 sample을 확인해 보았다. 각 개체별로 DNA는 다른 위치에 point mutation이 일어나고, 이를 제한효소 처리를 통해 잘라 절편의 길이가 생성하는 패턴을 RFLP이라고 한다. DNA sample을 전기영동해서, DNA조각이 길이에 따라 이동속도가 달라 RFLP 패턴을 실제로 확인 할 수 있었다. 이를 통해 target sample과 일치하는 sample은 sample 'C'임을 확인 할 수 있었다. 앞서 RFLP의 과정에서 사용된 제한효소는 일반적으로 세포 내에서 외래의 DNA를 인식하여 자르는 역할을 수행한다. 그렇다면 제한효소를 지닌 bacteria 자신의 DNA는 어떻게 제한효소로부터 보호하는

것일까? Bacteria는 자신의 DNA를 DNA methylases 시켜 제한효소로부터 보호한다. Bacteria는 DNA 복제과정에서 제한효소자리 또는 근처의 염기에 메틸기를 첨가하고, 제한효소는 이 메틸기를 인식하여 DNA를 절단하지 않는 것이다.[10] RFLP는 자식세대에 유전되는 특징이기에, 자식은 부모의 RFLP 패턴의 일부를 가지게 된다. 이 덕분에 RFLP는 친자 확인을 할 때 사용되기도 한다. 하지만 이때 양 쪽 부모 모두에게서 나타나지 않는 패턴이 자식에게서 발견될 수 있다. 이는 자식세대의 세포들이 분열하는 과정에서 새로운 point mutation이 발생하였기 때문이라고 설명할 수 있다. 제한효소가 자식세대의 새 point mutation을 인식하면 RFLP의 패턴이 변화한다는 사실을 통해 이를 설명할 수 있다.[11]

DNA의 cutting은 CRISPR 이라는 염기서열을 활용한다. CRISPR은 DNA 염기서열 중 하나로 우리 몸 안에서 적응 면역 기능을 담당한다. 세포내로 박테리오파지가 침투하게 되면 박테리오파지 염기서열의 일부를 CRISPR 구조로 옮겨온다. 그러면 CRISPR 구조는 이 염기서열을 인식해 잘라내는 효소를 만들고, 이 효소들이 박테리오파지의 유전자를 분해하여 면역기능을 실행한다. 이를 활용하면, 원하는 염기서열을 잘라낼 수 있기에, 활용도가 높은 기술이라고 할 수 있다.[10]

*Reference

- [1] Martin, Hatherway (2011). DNA : Genome Problem. New York: Oxford University Press. 129p.
- [2] Reece, Talor, Simon, Dickey, 『생명과학-개념과 현상의 이해』, Pearson, 2011. 156-167p
- [3] Renold, M. (1990). Supercoil sequencing: a fast and simple method for sequencing plasmid DNA. New York : Chaser
- [4] Chlrora Logos (2017). "Mutation can be anywhere" New York : Manchester
- [5] 이현재, (1993) "Plasmid와 Chromatin"

- [6] Reece, Talor, Simon, Dickey, 『생명과학-개념과 현상의 이해』, Pearson, 2011. 189-201p
- [7] Arnest Runtress (1984). "Methylize of DNA". Journal of the UK Chemical Society. 256p
- [8] 이동현 (2011) ; "제한효소 처리와 박테리아" 한국생물정보학회.
- [9] Tangron Lamin (2012). "Dying DNA", New York : Manchester
- [10] 김석준 (2001). "메틸화 DNA"
- [11] Bryan Kim (2012). "RFLP pattern and point mutation" New York : Chaser.