세포의 DNA정제

세포에서 DNA정제

★ 세포전체 DNA

세포 전체 DNA의 준비

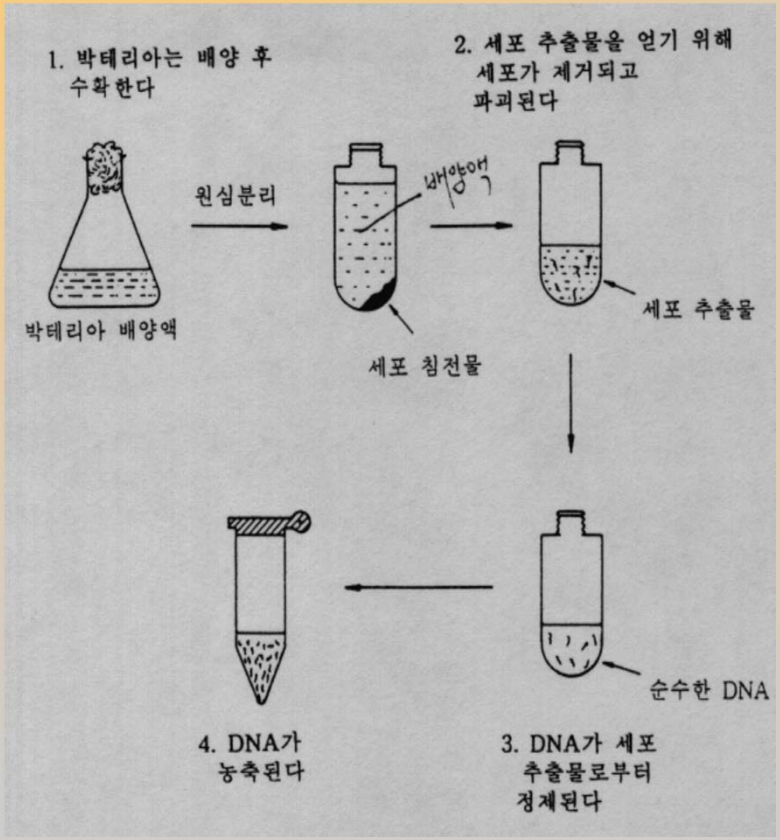
★ 플라즈미드 DNA

플라즈미드 DNA정제

★ 파아지 DNA

박테리오파아지 DNA제법

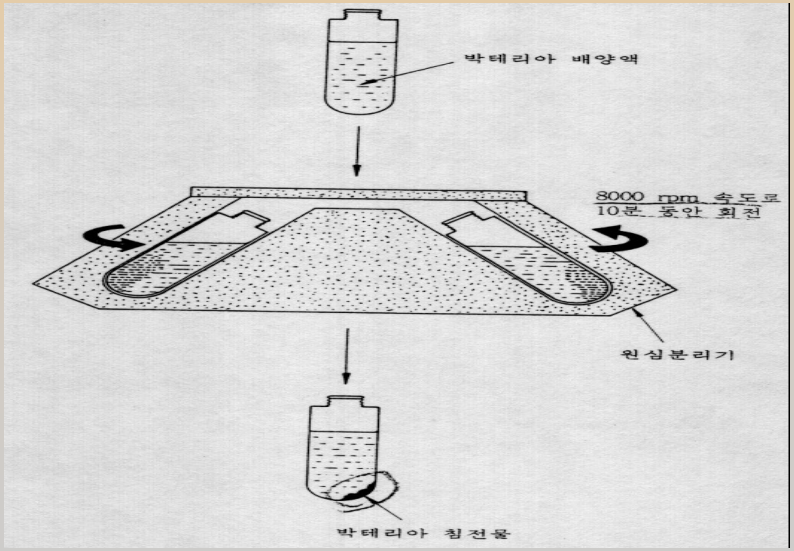
세포 전체 DNA



- ★ 박테리아 배양과 수확
- ★ 세포가 피괴되면서 내용물 유리
- ★ DNA를 제외한 모든 성분 제거위해 세포추출물 처리
- ★ DNA 용액농축

박테리아 배양액에서 세포 성장과 수확

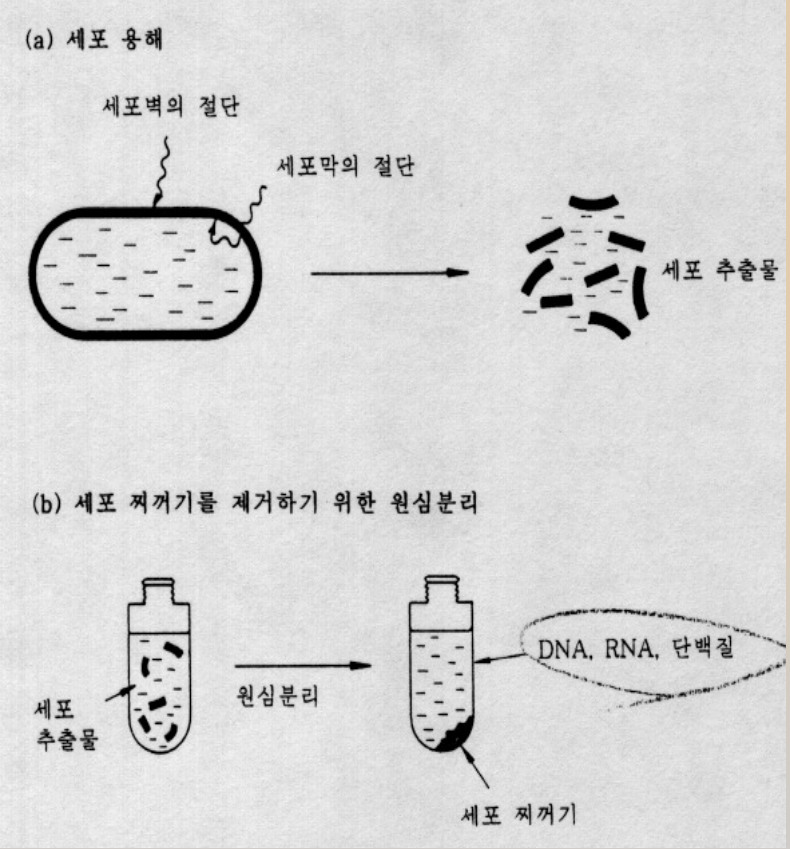
Component	g/l
1. M9 medium	
Na_2HPO_4	6.0
KH_2PO_4	3.0
NaCl	0.5
NH_4Cl	1.0
$MgSO_4$	0.5
glucose	2.0
$CaCl_2$	0.015
2. LB (Luria–Bertani) medium	
tryptone	10
yeast extract	5
NaCl	10



★ 배양배지
- M9배지(한정배지)
- LB배지(복합배지)

★ 세포추출물 준비

세포추출물의 제조



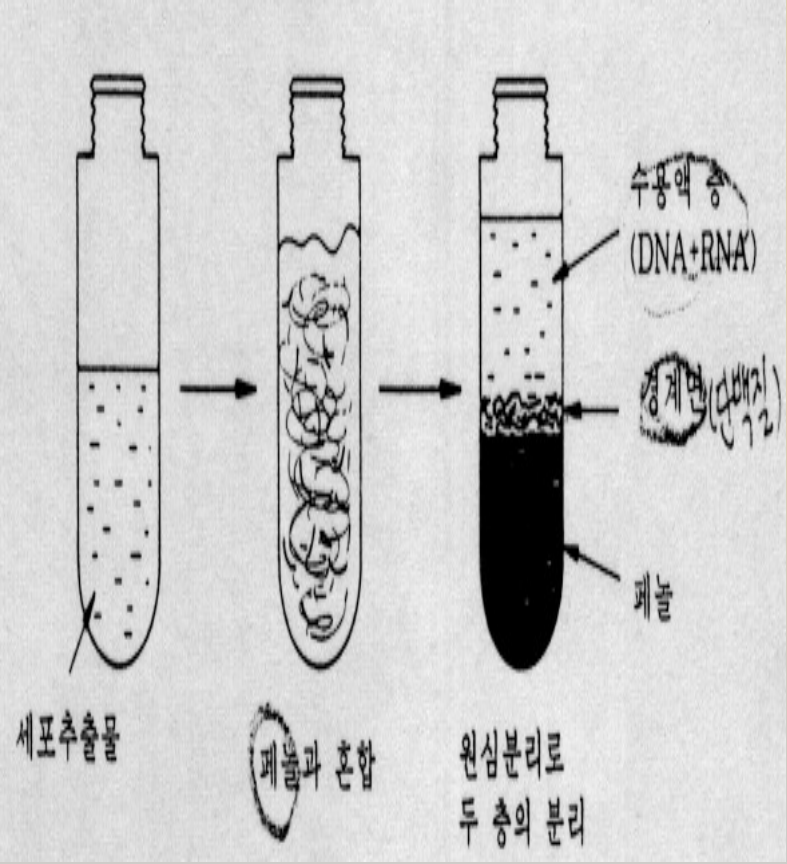
★ 박테리아
세포 파괴기술

물리적방법

화학적방법

★ 불용성세포 찌꺼기제거

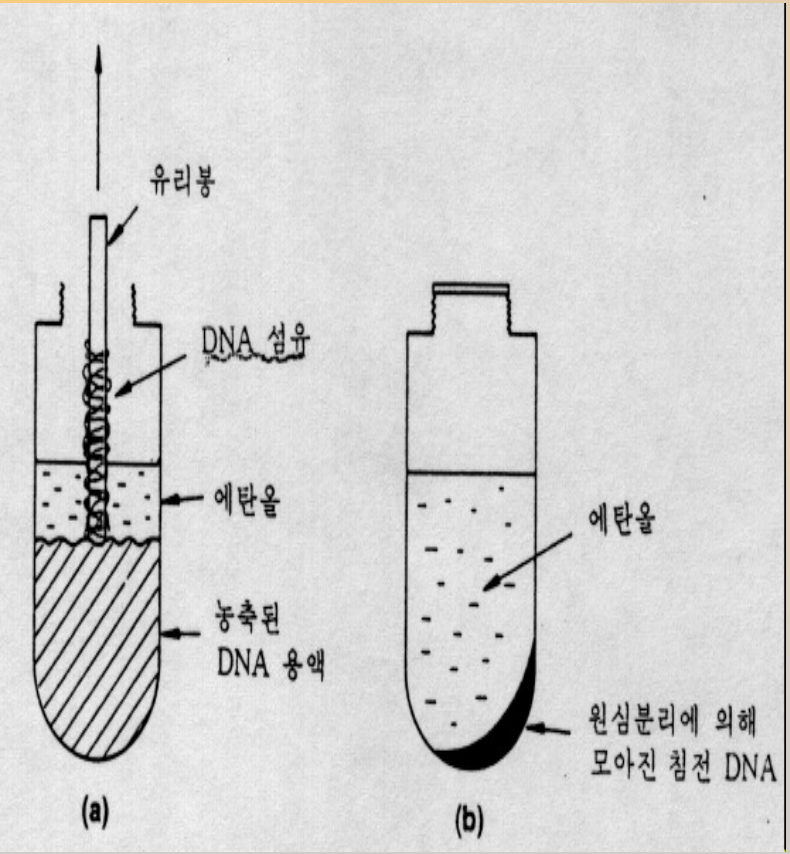
세포추출물의 DNA정제



★ 단백질제거 표준방법
- 페놀, 페놀과 클로로포름 1:1혼합물첨가

★ RNA제거
- 효소 리보뉴클레아제

DNA의 분리



★ 에탄올 침전법

– 용액에 짧은 길이와 다량체 핵산 성분 남음

DNA농도의 측정

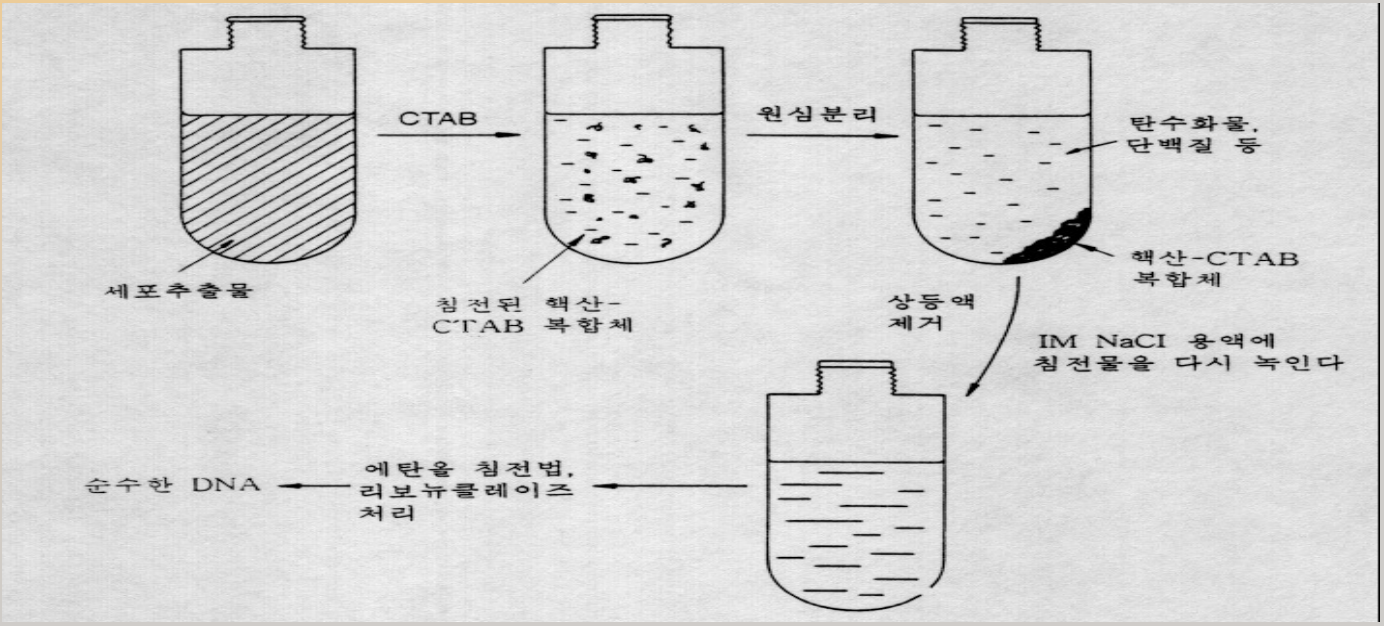
★자외선 흡수 분광기

- DNA용액에 의해 흡수된 자외선 복사량은 DNA량에 비례
- DNA순수성을 알아보기 위해 사용

  순수한 DNA : A_{260} / A_{280} = 1.8

박테리아 이외의 유기체부터 세포전체 DNA제법

- ★ 세포 파괴단계
- ★ DNA 추출하는 세포의 생화학적 내용물



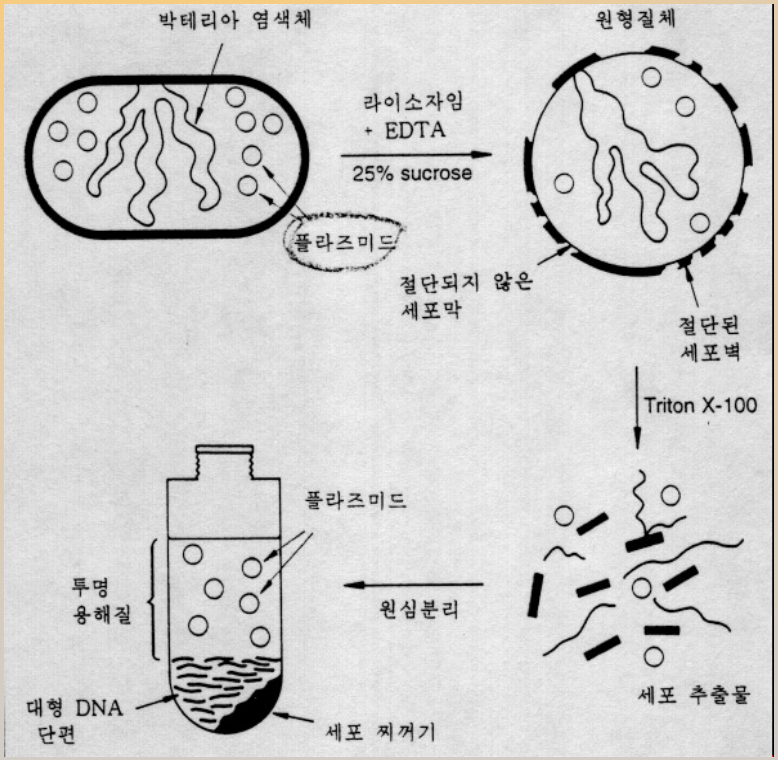
살아있는 세포에서 DNA정제

플라즈미드 DNA정제

★ 세포전체 DNA제법 같은 일반적 방법 포함

- 플라즈미드 정제에서는 세포에 존재하는 다량의 박테리아 염색체 DNA로부터 프라즈미드 분리 필요
- 플라즈미드 정제와 세포전체 DNA제법의 차이
  크기, 구조

크기에 기초한 분리



★ 세포 용해후 얻어진 DNA단편은 플라즈미드보다 훨씬 큼
  - 원심분리로 세포단편과 함께 제거

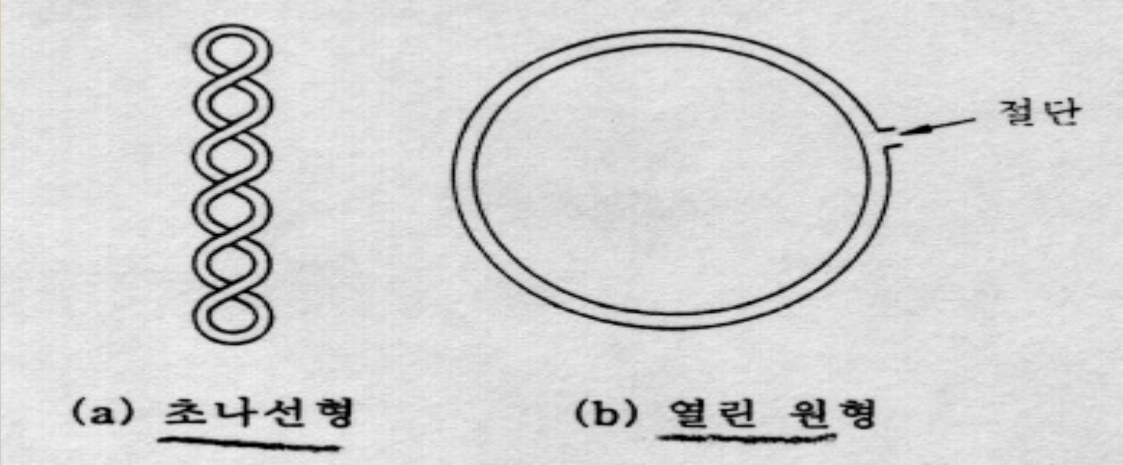
★ 투명용해질 제법

구조에 의한 분리

★ 플라즈미드 DNA전체구조

- 초나선형 분자로 존재

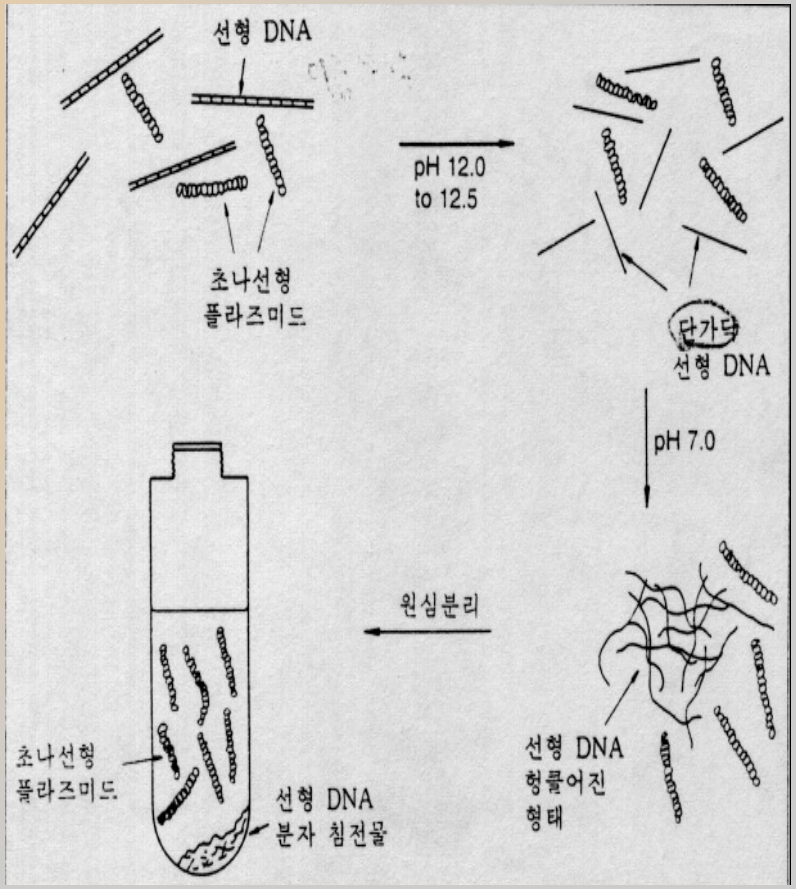
★ 초나선형화가 중요한 이유



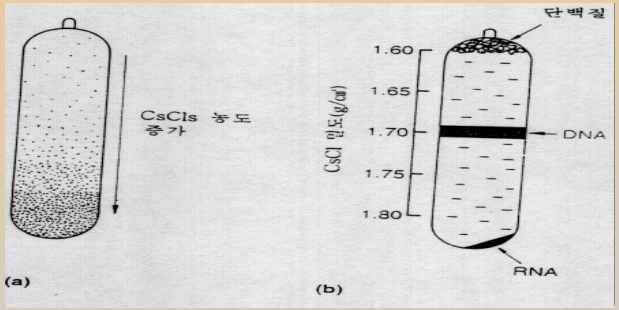
알칼리 변성

★ 알칼리 변성법에 의한 DNA정제

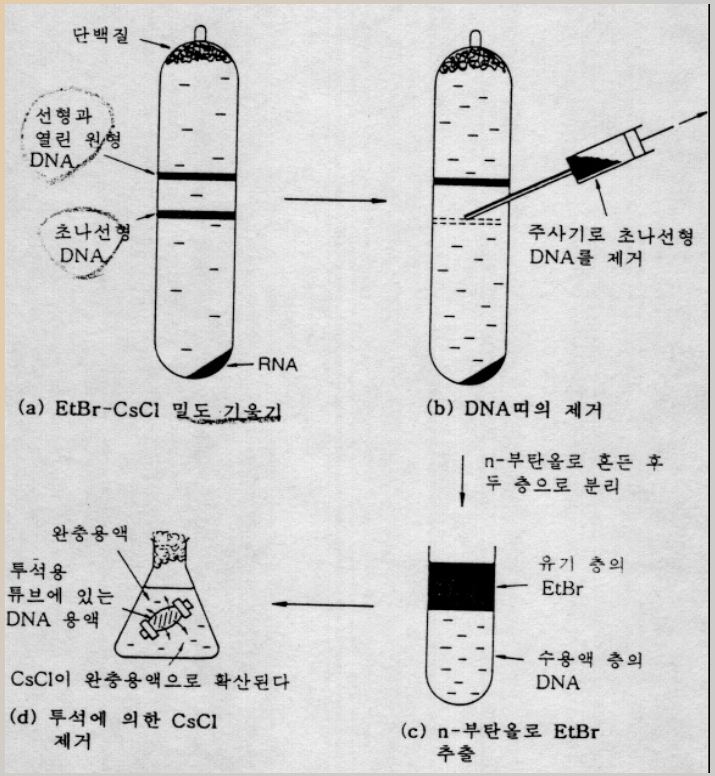
비나선형 DNA가 좁은 pH 범위에서 변성되는 반면 초나선형 플라즈미드는 넓은 pH에서 변성됨



EtBr-CsCl 밀도기울기 원심분리법



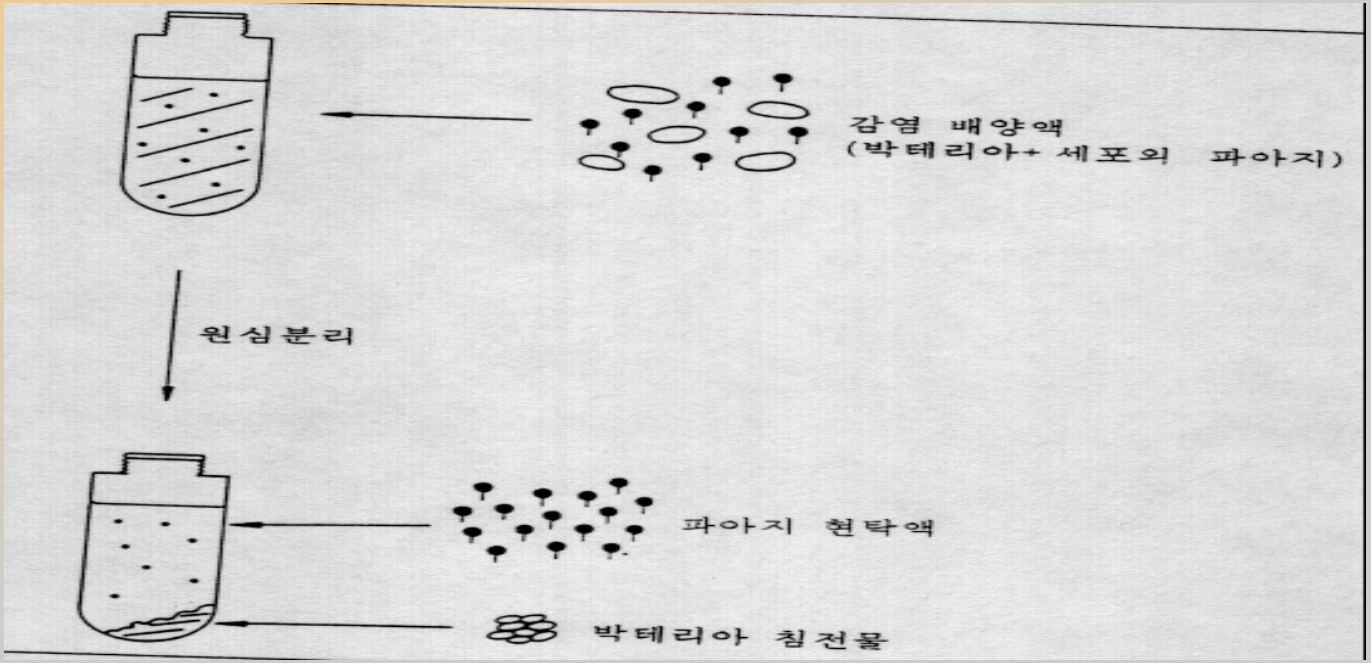
CsCl 밀도 기울기 원심 분리법



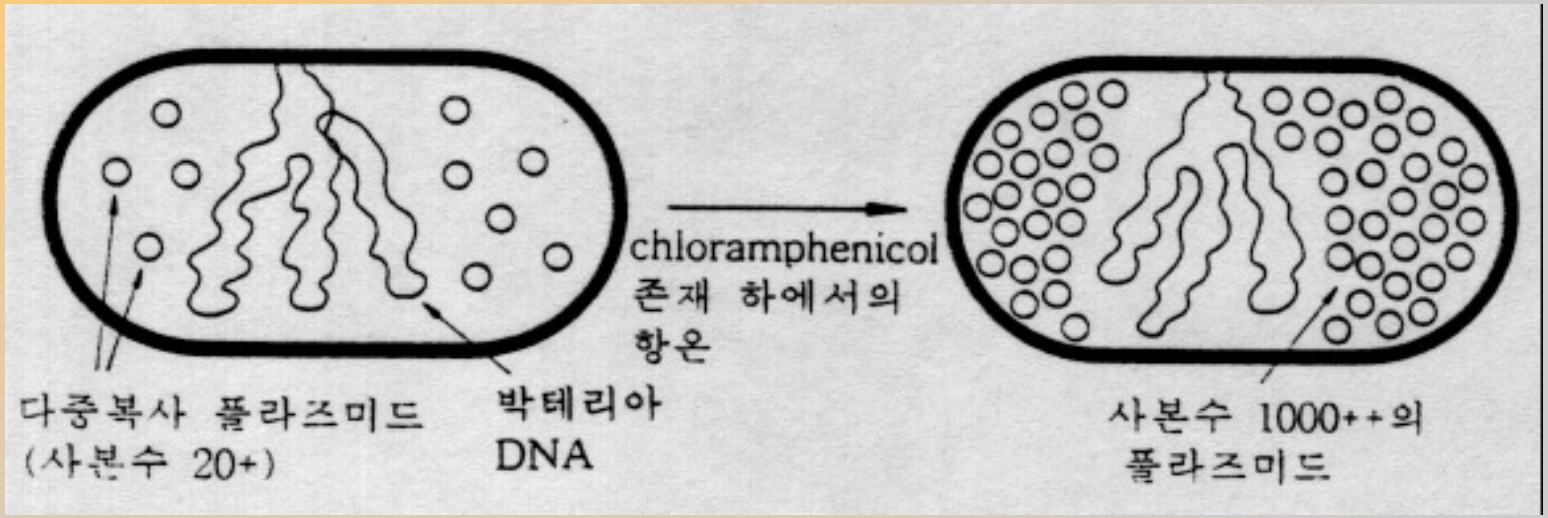
EtBr-CsCl플라즈미드 DNA정제

박테리오파아지 DNA제법

✶ 감염 박테리아 배양으로부터 파아지 현탁액 제조



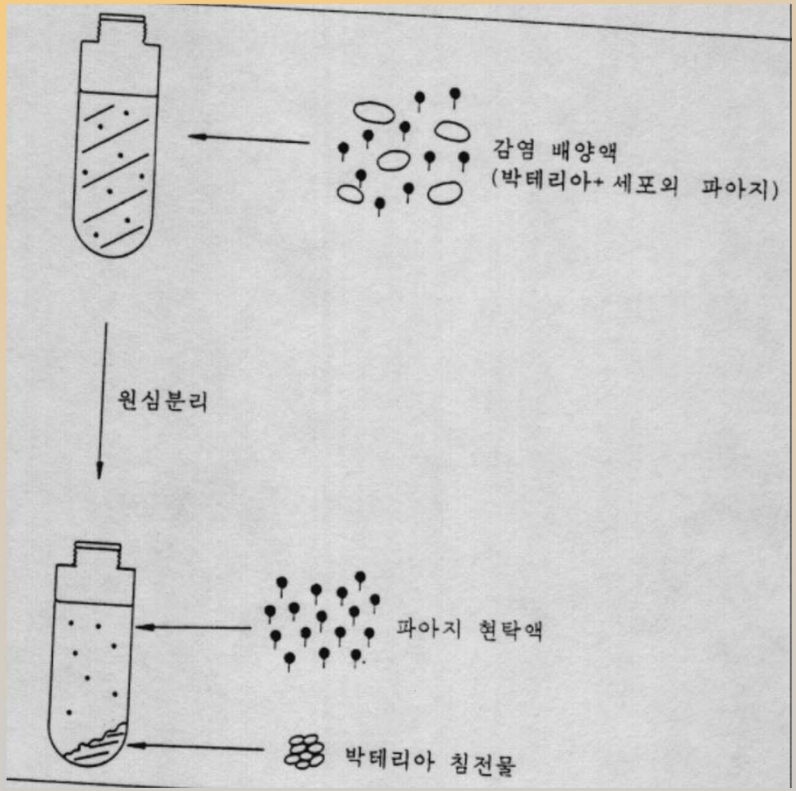
플라즈미드 증폭



★ 박테리아 세포전체 DNA중
플라즈미드 DNA매우 적음

- 플라즈미드 증폭으로 수율 증가
- 목적 : 사본수의 증가

박테리오파아지 DNA제법



- ✶ 감염 박테리아 배양액으로부터 파아지 현탁액 제조
- ✶ λ파아지에 대해 세포밖 파아지 적정량을 충분히 높이는 방법으로 감염된 배양액을 성장시키는 것이 어려움
  - 다량의 배양 필요

높은 파아지 적정량을 얻기 위한 배양

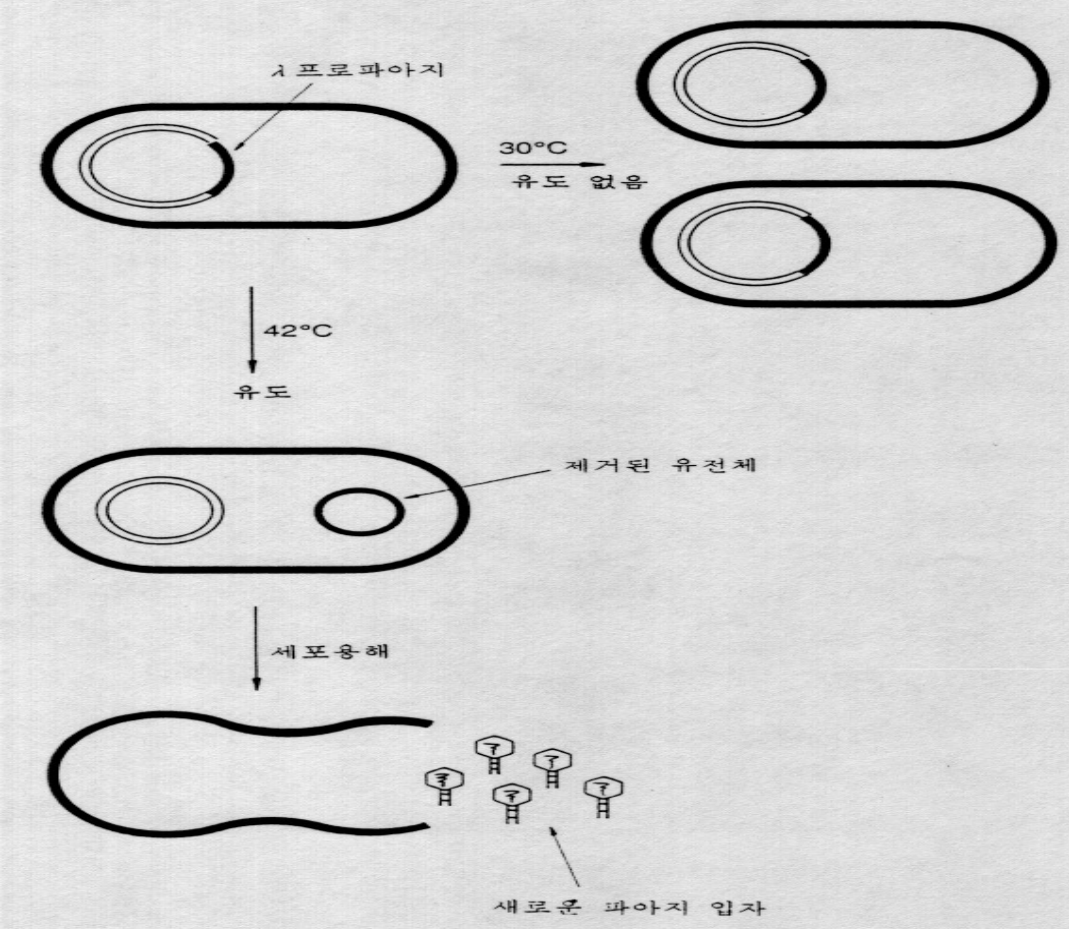
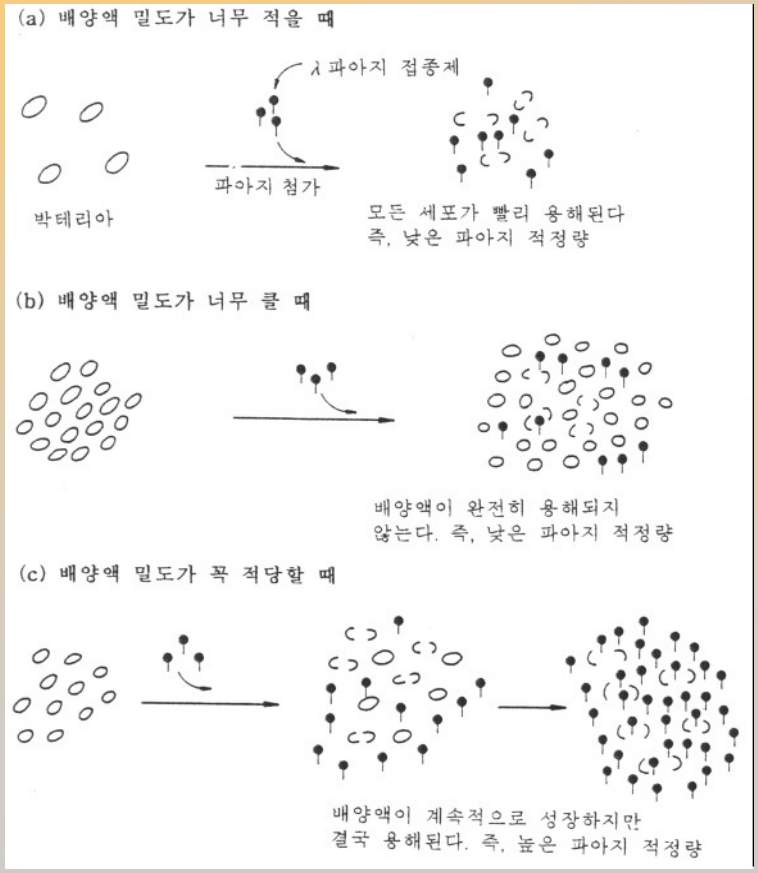


그림 3.17

Λ파아지

clts 용원균 유도

비용원성 λ파아지의 정제



(a) 세포분열 최대속도 전에 파지첨가

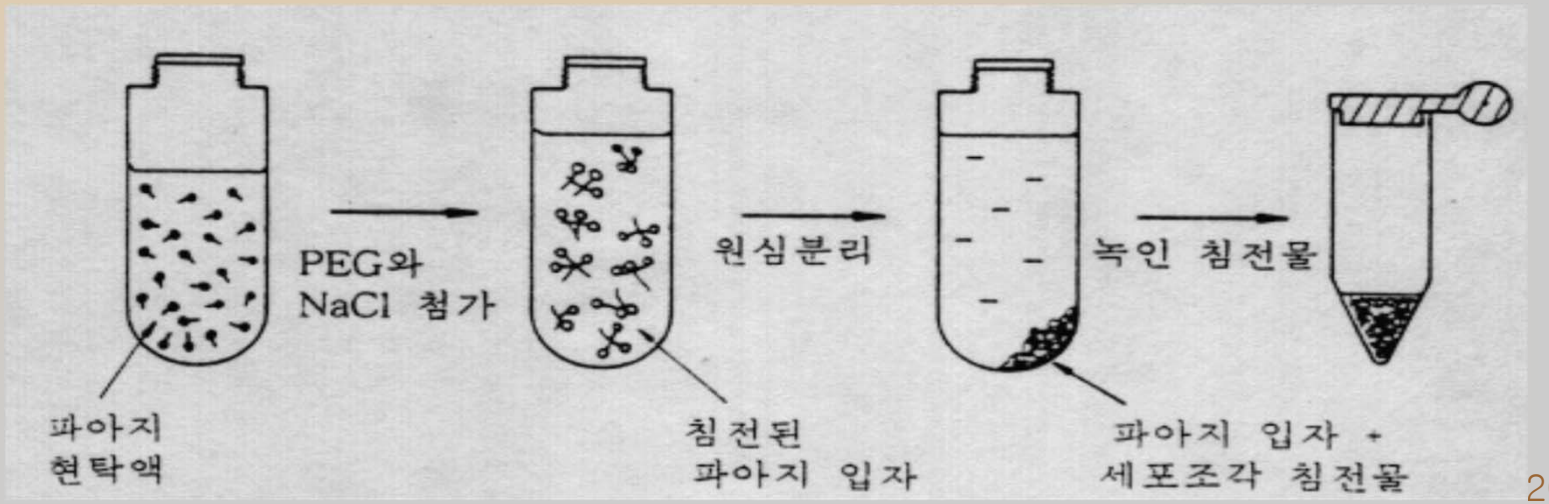
(b) 첨가시 세포밀도 매우 높을때

(c) 배양액의 나이와 파아지 접종제크기가 균형을 이룰때

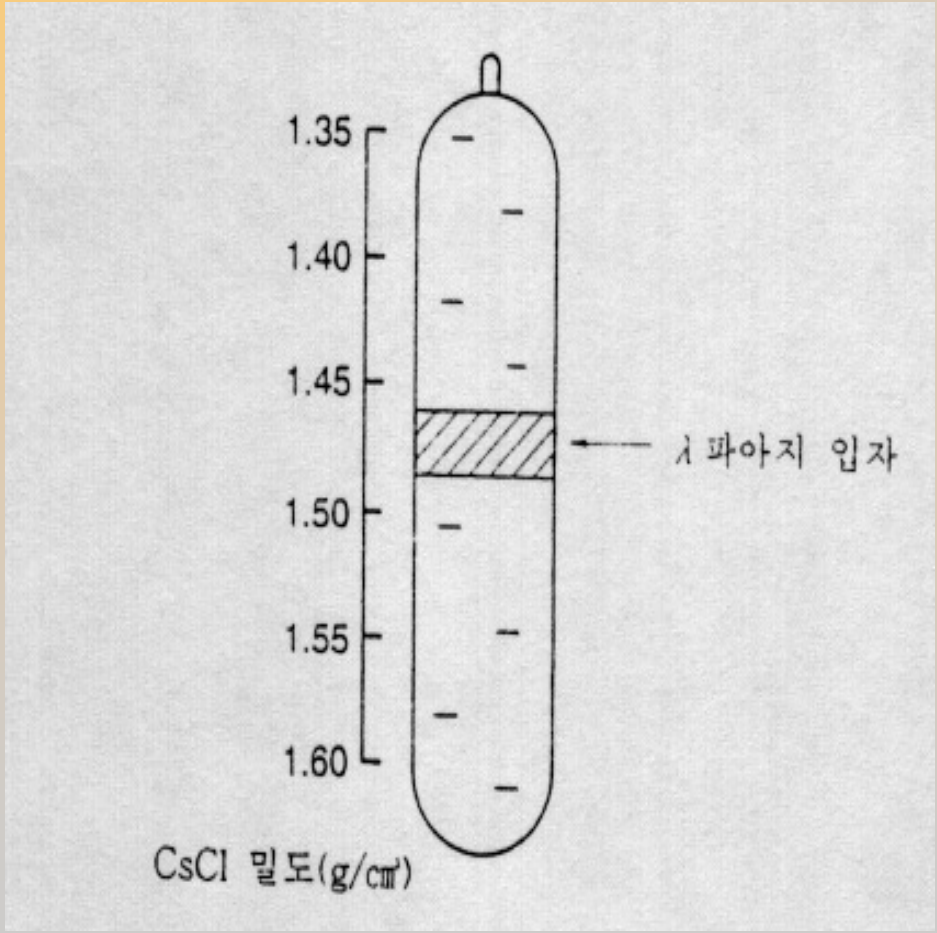
감염된 배양액에서 파아지 수집

남겨진 원래세포
용해된 박테리아 세포 나머지 → 감염된 배양액에서 제거

파아지 입자는 매우 작음 → 고속 원심분리 덩어리로 뭉침



λ파아지 입자의 DNA정제



재용해된 PEG침전물에서 단백질 제거

- λ파아지

중간 정제단계 거쳐야 함

M13 DNA 정제의 몇 가지 문제점