

세포로 DNA의 도입

형질 전환된 세포를 이용해서 무엇을 할 수 있는가에 대해 알아보자. 동물 단백질을 박테리아에서 발현(만든다)하든지 병충해에 강한 식물 세포를 만드는 일을 할 수 있다. 일단 형질 전환된 세포는 한 두 마리만 가지고는 DNA의 양을 매우 적게 밖에 얻을 수 없다. 그러므로 DNA의 양을 늘리기 위해서는 세포의 수를 늘려야 한다. 한정된 양의 출발 DNA로부터 다수의 재조합 DNA 분자를 형성하는 과정이 클로닝의 중요한 목적중의 하나이다. DNA가 미생물 한 마리에는 매우 작은 양이 들어가 있고 이것이 고체배지 내에서 콜로니를 형성하게 되면 대부분 μg 단위의 DNA를 포함하는 세포수가 된다. 고체배지에서 콜로니로 성장한 것을 끊어서 액체 배지에서 배양하게 되면 mg 단위의 DNA를 얻을 수 있다. 따라서 μg 에서 mg 으로 가는 데 약 1000배로 DNA를 증폭할 수 있다. 미생물 한 마리에서 콜로니가 되는 것은 약 1000배의 증폭효과가 있다. 미생물 세포 하나에는 ng 정도의 DNA가 들어 있다. 즉 우리가 다루는 DNA의 양이 ng 단위에서 시작해서 μg , mg 순으로 증가한다.

클로닝의 주요목적 중에서 다른 것으로 정제기능이 있다. 우리가 벡터를 잘라서 잘라진 공간에 유전자를 넣는데 우리가 원하는 재조합 DNA 분자가 들어가기도 하고 원하는 유전자가 아닌 다른 유전자들도 들어갈 수 있다. 즉, 잘못된 재조합 DNA 분자도 있고 DNA 조각이 들어가지 않고 그냥 self-ligation된 DNA도 있다. 그래서 클로닝 한다는 것은 우리가 원하는 DNA만 골라내는 작업이라고 할 수 있다.

Self-ligation된 벡터분자와 잘못된 재조합 플라스미드가 포함된 세포는 원하는 DNA를 포함하는 세포와 마찬가지로 콜로니를 형성한다. 이들 콜로니에서 원하는 콜로니만 골라내는 것이 우리의 목표이다. 그래서 벡터 중 하나인 플라스미드에는 여러 가지가 있는데 그 중 대표적인 것이 pBR 322라는 플라스미드가 있다. 이것의 유전적인 특징은 항생제에 내성을 가지고 있다는 것이다. 즉, 항생제를 분해해서 세포가 항생제가 있는 영양액 속에 자랄 수 있게 하는 것이다. 항생제의 내성은 항생제를 분해하는 효소인 β -lactamase를 만듦으로 생긴다. 이때 tetracycline과 ampicillin을 분해할 수 있다. pBR322 플라스미드가 들어가 있는 세포는 $\text{amp}^{\text{s}}\text{tet}^{\text{s}}$ 에서 $\text{amp}^{\text{R}}\text{tet}^{\text{R}}$ 로 형질 전환시킨다고 할 수 있다. 여기서 S는 sensitive(민감한)의 뜻이고 R은 resistance(저항성이 있는)의 뜻이다. 민감성 세포에서 저항성 세포로 바꾸는데 pBR322 벡터 운반체가 역할을 한다고 할 수 있다.

DNA를 구체적으로 어떻게 세포 속으로 넣는가를 알아보면 세포막을 통해서 DNA 분자가 들어가게 되는데 일반 박테리아에는 DNA를 바로 넣을 수가 없다. 그래서 박테리아의 세포막을 변화시키기 위해서 CaCl_2 로 처리하게 되면 반응능 박테리아가 많이 생긴다. DNA에 대해서 반응성이 있는 세포가 만들어지는 것인데 그때 세포막의 구조가 바뀌게 된다. 그리고 온도를 올리게 되면 세포막의 구멍이 커져서

DNA가 들어가게 된다. 따라서 온도가 높아야 하고, CaCl_2 가 용액 속에 있을 때 DNA가 세포 표면에 붙었다가 안으로 들어갈 수 있다. 반응능 대장균이란 DNA를 흡수할 수 있는 세포를 말한다. 일단 DNA를 집어넣었으면 플라스미드가 가지고 있는 선별 표식자를 이용해서 항생제에 내성을 가지고 있는 세포를 골라내면 된다. 고체배지에 약 10mg/ml로 tetracycline을 넣어서 pBR322 플라스미드가 들어가 있는 세포를 골라내는 것이다. pBR322가 항생제를 분해하는 효소를 만들기 때문에 콜로니를 형성한다. 일반 대장균 세포는 pBR322를 가지고 있지 않기 때문에 죽게 된다. 우리는 클로닝할 때 선별 할 수 있는 표식자를 갖게 되는 것이다.

형질 전환된 세포를 선택할 때 주의점은 미생물이 항생제 저항성을 나타내려면 시간이 필요하다는 것이다. 바로 형질전환된 미생물세포를 항생제로 처리하게 되면 세포가 죽어버린다. 항생제 처리를 1시간 정도 지연시켜서 항생제 저항 단백질이 만들어 진 후에 세포를 항생제 처리 해야 한다. 즉, 어느 정도 적응 기간이 필요하다.

삽입비활성화를 설명하겠다. 재조합 되지 않은 벡터 분자는 숙주세포에서 벡터의 성질을 유지하고, 재조합 분자는 유전자가 불활성화됨으로 특성이 숙주세포에 의해 나타나지 않는다. 유전자 위치에 새로운 DNA가 들어가서 유전자가 처음 만들던 유전자 생성물을 만들지 않기 때문에 삽입해서 비활성화 됐다고 말한다. 항생제 내성 유전자의 삽입비활성화를 살펴보자. tetracycline 저항성 유전자 집단을 BamH1로 잘라서 이 위치에 외부 유전자를 넣으면 tetracycline을 분해하는 효소가 만들어지지 않는다. 그러면 삽입비활성화가 일어나 tetracycline 저항성이 없어진다. pBR322의 tetracycline 저항성이 없어지기 때문에 pBR322의 고유한 기능인 항생제 저항성이 없어진다는 뜻이다.

pBR322 재조합체의 선별에서 일단 ampicillin 배지에서 자란 콜로니를 선별한다. 그러면 이 사실로 부터 pBR322가 들어갔다는 것을 알 수 있고 다음에 콜로니를 나무 벽들에 접촉해서 붙인다. 벽들에 붙어있는 콜로니의 미생물을 tetracycline배지에 집어넣으면 tetracycline 저항성이 있는 미생물은 자라나고 tetracycline에 민감한 것은 죽게된다. 그러면 ampicillin resistance, tetracycline resistance 콜로니가 tetracycline 배지에서 자란다. amp^Rtet^R 은 비 재조합체가 되고 amp^Rtet^S 는 재조합체가 된다. 여기에서는 ampicillin 저항성은 유지하면서 tetracycline 저항성을 비활성화시키는 방법을 이용해서 외부 유전자를 pBR322에 cloning한 방법을 설명하였다.

벡터 운반체로서 pUC8을 많이 쓰는데 이것은 제한효소 BamH1로 자르면 외부 유전자를 삽입할 수 있다. pUC8의 특징은 ampicillin 저항성을 유지하고 tetracycline 대신에 β -galactose⁻라는 유전자를 갖고 있다. pUC8은 항생제 저항성과 lactose를 분해할 수 있는 능력이 있는지 없는지를 확인하는 벡터이다. β -galactosidase는 lactose를 glucose와 galactose로 분해하는 효소다. 이것이 있는지 없는지를 확인하는 방법을 lac 선택이라 한다.

박테리아 세포에 파아지 DNA를 넣어서 콜로니를 선택하는 방법에 대해서 얘기를 하겠다.