

대상의 생각 패턴



1. 대장균 플라스미드에 기초한 클로닝 벡터

1. 플라스미드 클로닝 벡터의 명명법



2. pBR322의 유용한 성질



3. pBR322의 유래



4. 다른 전형적인 대장균(E. coli)
플라스미드 클로닝 벡터



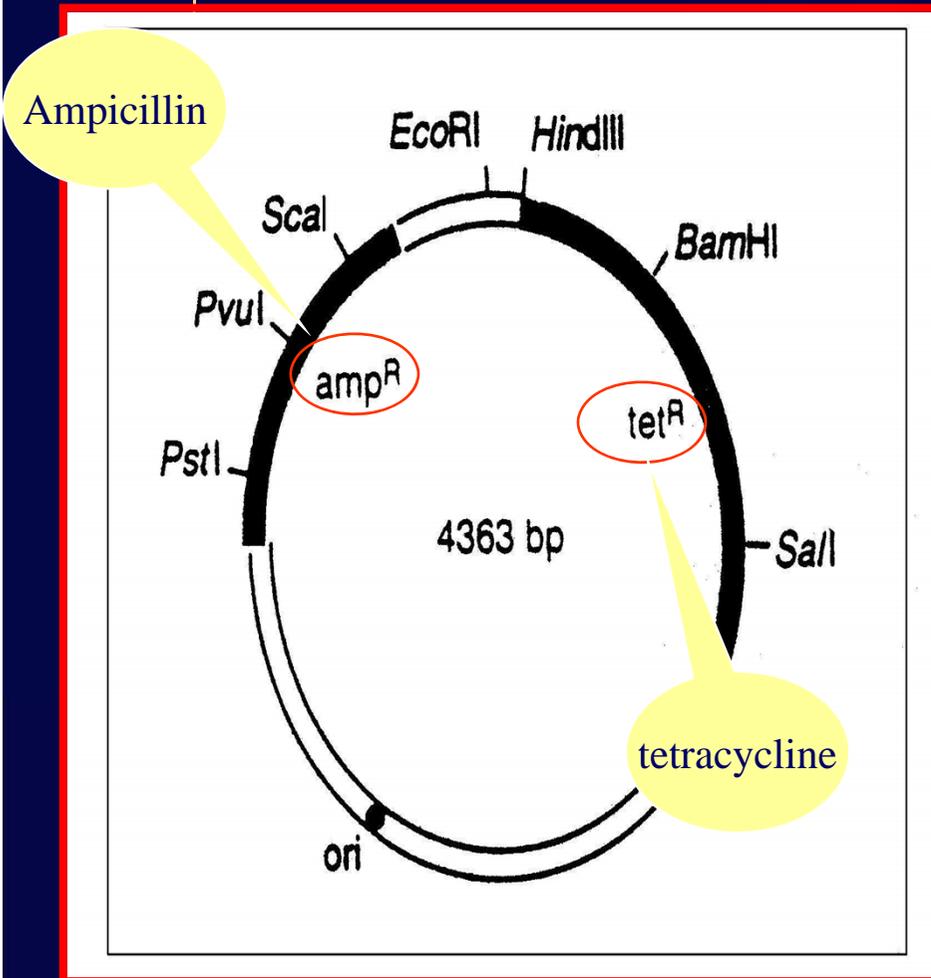
플라즈미드 클로닝 벡터의 명명법

예) 'pBR322'

- 1) 'p'는 플라즈미드(plasmid) 나타냄.
- 2) 'BR'은 벡터가 처음으로 구축된 실험실을 나타냄 (두 연구자 Boliver 와 Rodriguez)
- 3) '322'는 같은 실험실에서 개발된 다른 것과 구분하는 것.



pBR322의 유용한 성질



1. 크기

- 4363bp

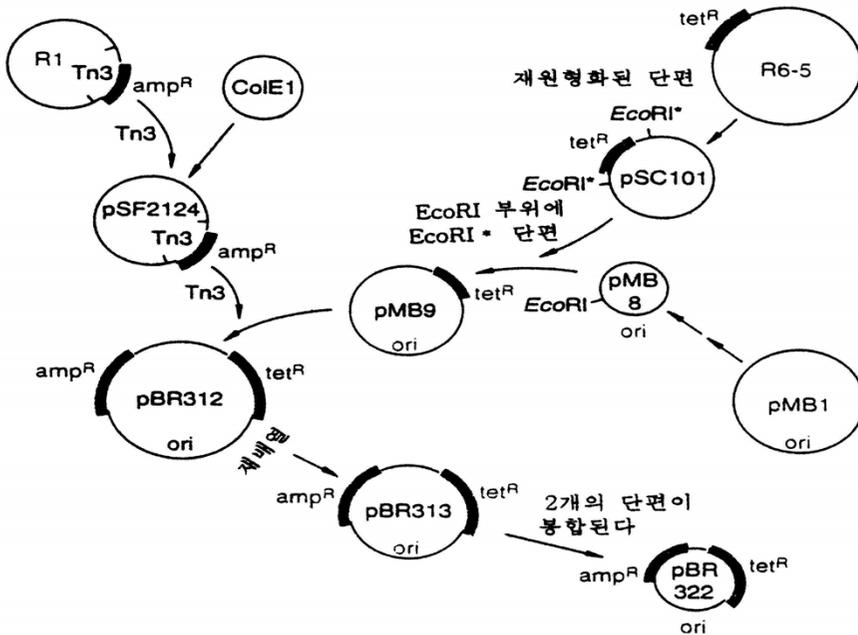
2. 항생제 저항 유전자 두
세트를 지니고 있다는 것.

3. 비교적 높은 복사수(copy
number)가 있다는 것.

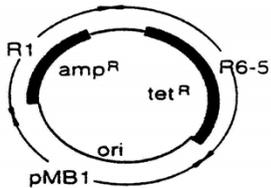


pBR322의 유래

(a) pBR322의 구축



(b) pBR322의 기원

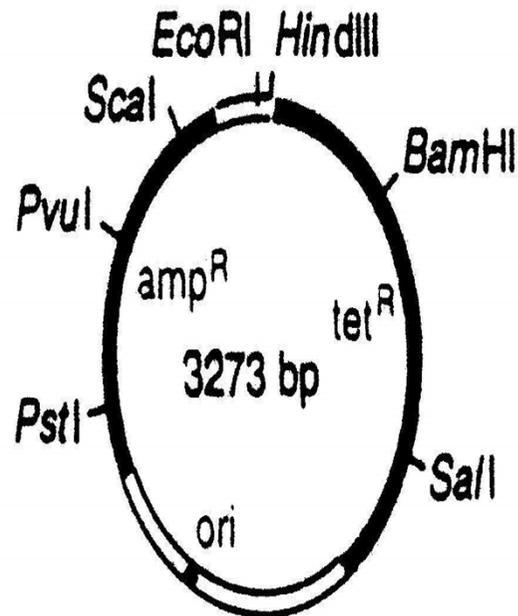


- 1) pBR322는 자연계에 존재하는 세 가지 다른 플라스미드로부터 얻어진 DNA로 구성되어 있다.
- 2) amp^R유전자 - R1에 존재
- 3) Tet^R유전자 - Rb-5에서 얻어짐



다른 전형적인 대장균(E. coli) 플라스미드 클로닝 벡터

(a) pBR327



(A) pBR327-높은 사본수를 가진 플라스미드

1. pBR322-높은 사본수를 가진 플라스미드

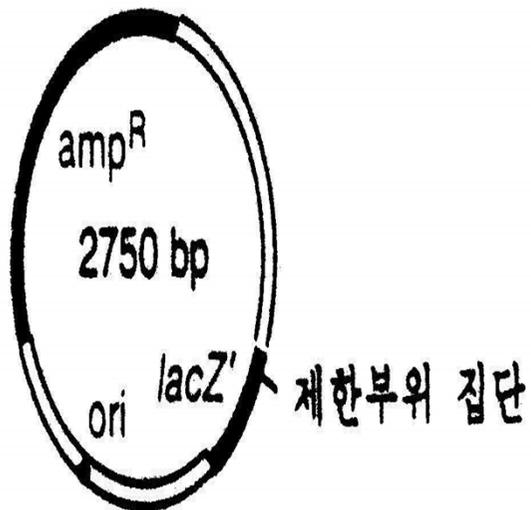
(약 30-45개/세포당)

2. pBR322의 접합력을 파손,

pBR327 자신을 다른 대장균 세포로 이동할 수 없는 비접합

플라스미드로 만듦.

(b) pUC8



(B) pUC8-Lac 선택

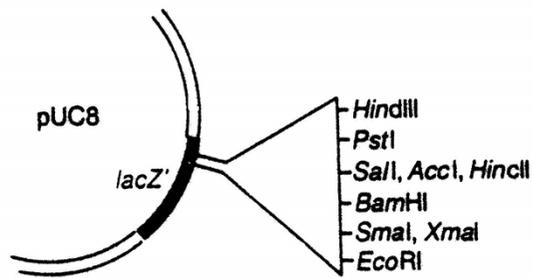
플라즈미드

1. 우연한 돌연변이에 의해 이루어짐

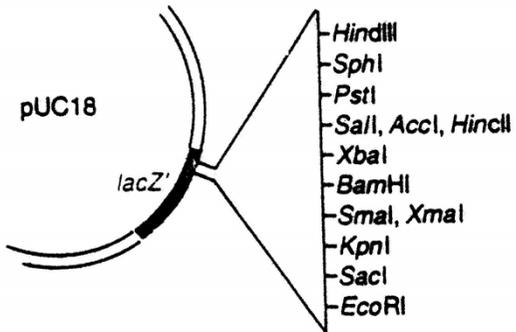
2. 재조합 세포의 확인이 단 한 단계 과정

3. 제한부위의 집단화

(a) pUC8의 제한 부위



(b) pUC18의 제한 부위 18



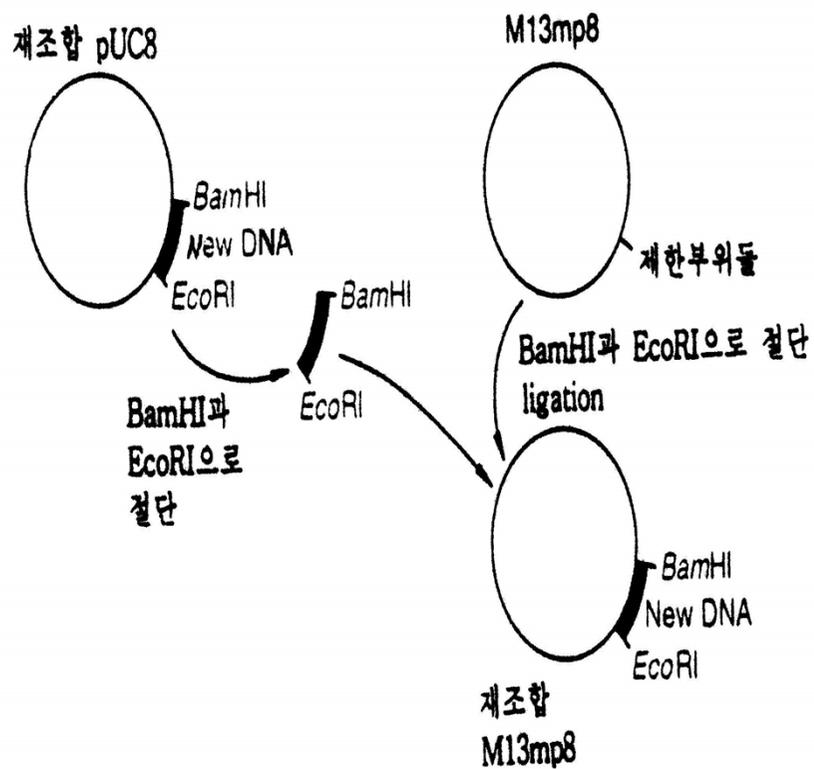
(a) pUC8의 lacZ' 유전자에

있는 제한부위 집단

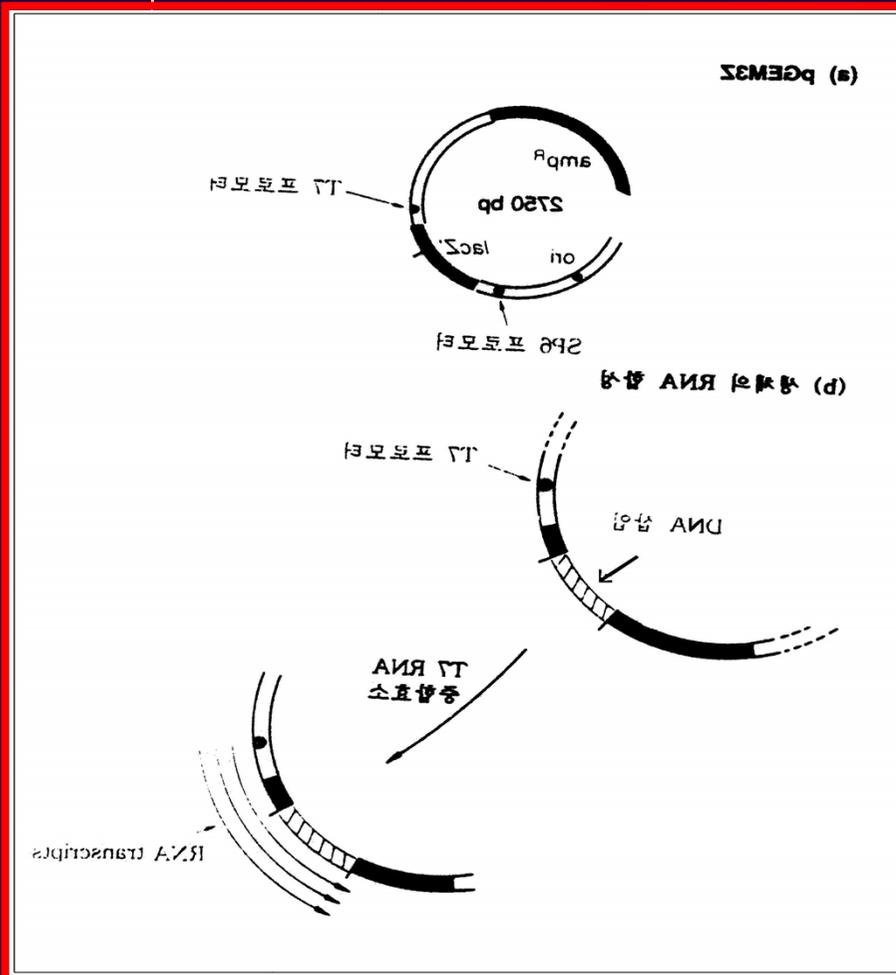
(b) pUC18에 존재하는 제한

부위 집단

(c) pUC8에서 M13mp8으로 DNA 단편의 이동



(c) pUC8에서 M13mp8로
DNA단편의 이동



(C) pGEM3Z- 클론된 DNA의

생체외 전사

1. 베타의 지도

2. 생체외 RNA합성.

- R은 EcoRI, KpnI, Aval, SmaI, BamI, BamHI, xbaI, Accl, HincII, SpnI,

그리고 HindIII에 해당하는

제한부위 집단.

2. M13 박테리오파아지에 기초한 클로닝 벡터

1. 클로닝 벡터 M13mp2의 개발 

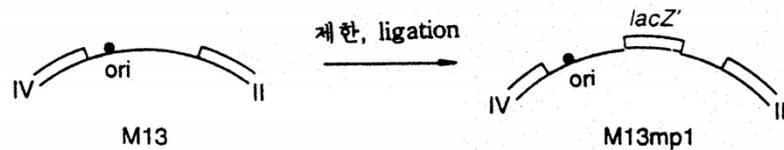
2. M13mp7 - 대형 클로닝 부위 

3. 더 복잡한 M13 벡터 

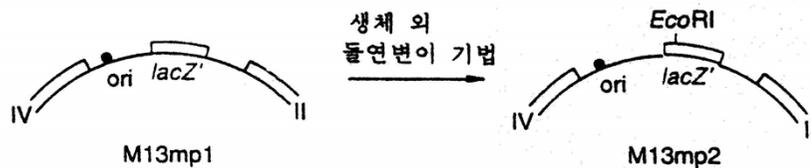
4. Hybrid 플라스미드- M13 벡터 

클로닝 벡터 M13mp2의 개발

(a) M13 mp1의 구축



(b) M13 mp2의 구축



met - thr - met - ile - thr - asp - ser -
 -ATG ACC ATG ATT ACG GAT TCA - Start of *lacZ'* in M13mp1
 *

met - thr - met - ile - thr - asn - ser -
 -ATG ACC ATG ATT ACG AAT TCA - Start of *lacZ'* in M13mp2
 *

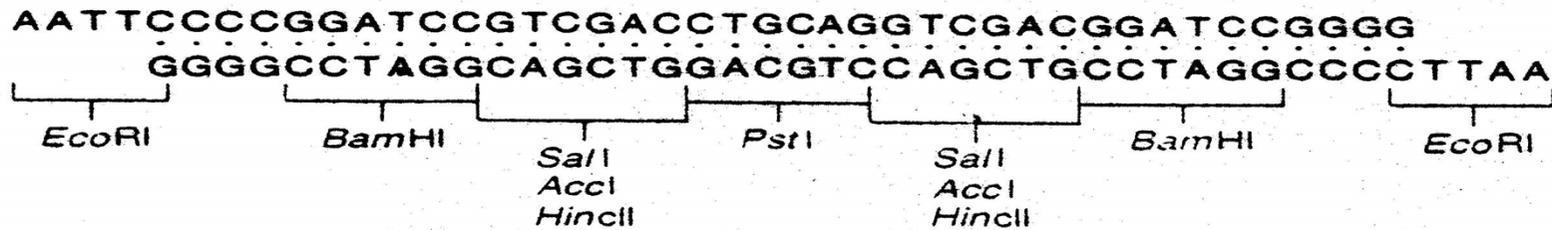


(a) M13 mp1의 구축

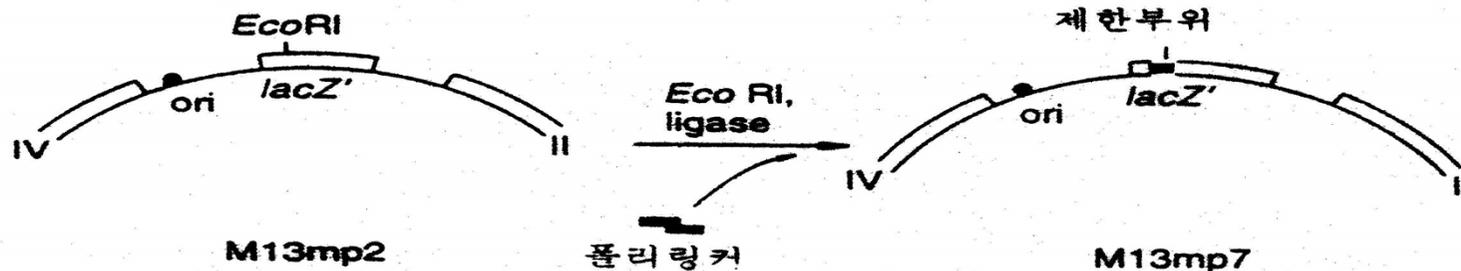
(b) 야생형(wild-type) M13

유전체로부터 M13mp2의 구축

(a) 폴리링커



(b) M13mp7의 구축



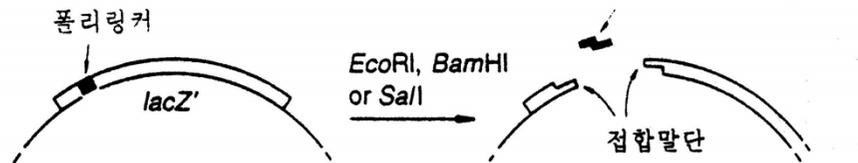
☞ M13mp7의 구축. (a) 폴리링커(polylinker)와 (b) M13mp2의 EcoRI 부위로의 삽입. SalI 제한부위는 또한 AccI과 HincII도 인식한다.



M13mp7- 대칭 클로닝 부위

- M13mp7의 클로닝

(a) M13mp7의 제한

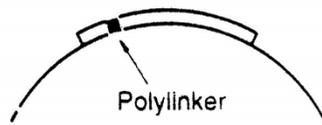


(b) 새로운 DNA와 religation 가능한 생성물들

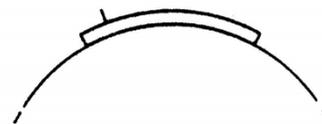
1. 새로운 DNA가 삽입된다:



2. 폴리링커가 재삽입된다:



3. 삽입 없음-self-ligation

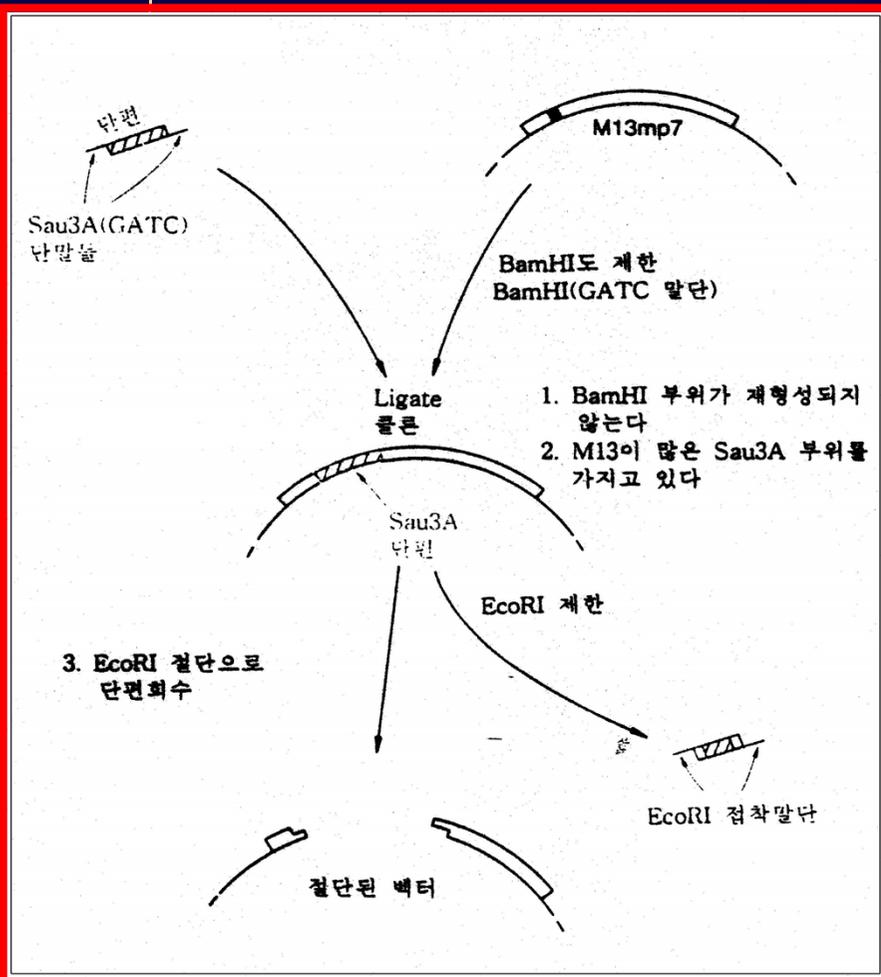


(c) X-gal 아가에 plaque 색깔

lacZ' 파괴 → β-gal → 투명 plaque

lacZ' 재형성 → β-gal → 파랑 plaque

lacZ' 재형성 → β-gal → 파랑 plaque



☞ 폴리링커(polylinker) 바깥쪽

부위에서 제한(절단)에 의해

재조합 M13mp7 재조합체로

부터 클론된 DNA의 회수.

1. 새로운 DNA가 삽입된다.

2. 폴리링커(polylinker)가

재삽입된다.

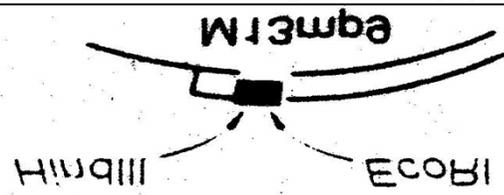
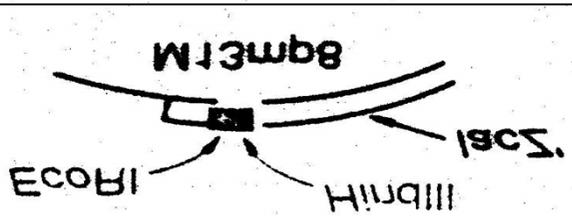
3. 벡터가 삽입없이 self-ligation 된다.

더 복잡한 M13 벡터

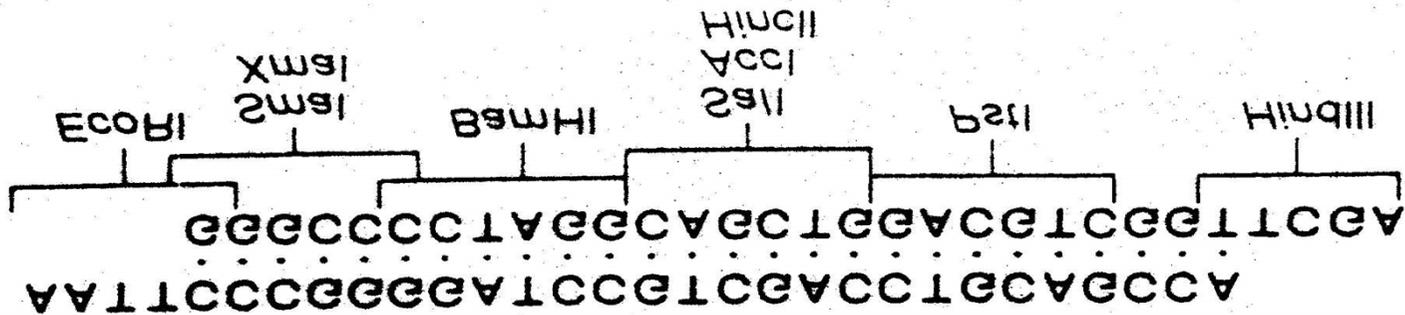
👉 M13mp8의 특징

1. 두께가 다른 sticky말단을 가진 DNA 단편을 받아 들일 수 있는 능력.
2. 동일한 폴리링커(polylinker)를 가지지만 배향이 반대(reverse orientation)인 자매 벡터 M13mp9에 의해 나타남.





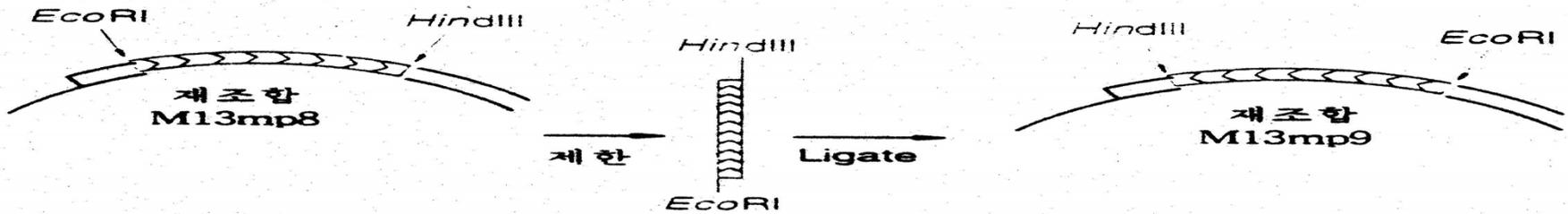
(P) 플라스미드의 배양



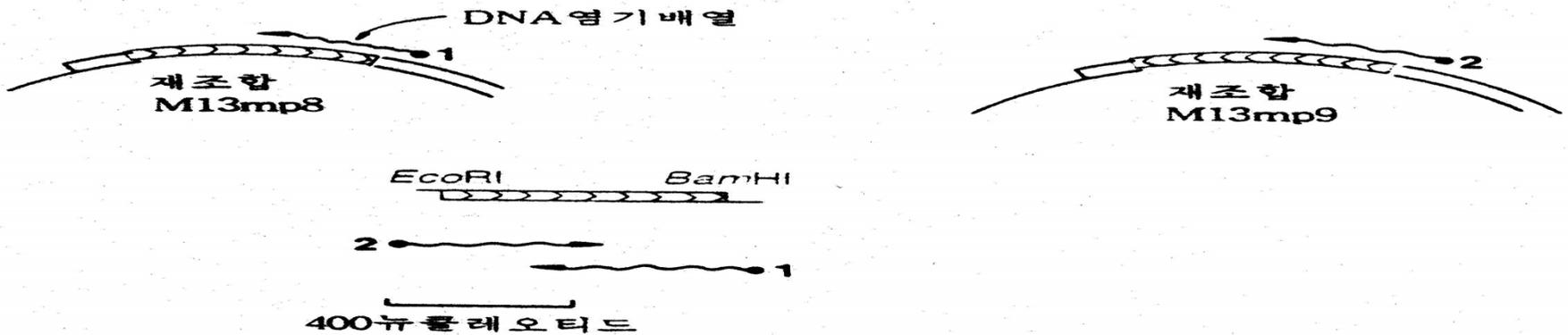
(S) M13mp8의 플라스미드

☞ M13mp8과 M13mp9

(c) M13mp8에서 M13mp9로 DNA 이동



(d) M13mp8과 M13mp9를 이용한 DNA 염기배열 결정



■  M13mp8과 M13mp9

Hybrid 플라스미드- M13 벡터

☞ M13 벡터

- 클론된 유전자의 단일사슬을 생산
- 단점 : 클론될 수 있는 DNA단편의 크기에 한계가 있다는 것
- 최대 용량 : 1500bp
- 혼성(hybrid)플라스미드 : 단일가닥 DNA로 전환 가능한 M13 벡터

