

DNA의 분리 및 제한효소에 관한 연구

물리치료과
전임강사 김 상 업
외래강사 박 민 희

I. 서 론

Yanopsky와 공동연구자들(1981)¹²⁾은 1960년대부터 tryptophan operon에 대해서 꾸준한 연구를 해 왔으며, Yanopsky(1981)¹²⁾는 pVH153와 pBR322를 제한효소 HindIII와 SalI으로 digestion하고 ligation하여 *E. coli* W3110 trpA 33에 형질전환함으로써 Ampiciline-resistant, tryptophan-independent 플라스미드 DNA를 가지고 있는 colony를 screen하여 5.8Kb의 가장 작은 플라스미드 pBN18을 만들었다.

즉 pBN18은 HindIII와 SalI으로 double digestion한 pBR322의 3.7Kb에 pVH153의 trp operon 끝부분에서 절단한 2.1Kb(trpA region)을 ligation한 vector이다.

pBN18계열의 플라스미드들은 분자생물학적으로 유용하여 널리 연구되고있는 것들으로써, Selker와 Yanopsky(1979)⁹⁾에 의해서 pBN2, pBN18, pBN24가 연구되었고, Yamagish와 Kunisada(1982)¹¹⁾에 의해서 pBN37, pBN38 그리고 pBN69, pBN70이 연구되었다.

이들 대부분이 trp promoter를 이용한 gene fusion vector로 이용되고 있다 (Silhavy et al., 1983)¹⁰⁾.

본 연구에서는 제한효소를 이용하여 pBN18(Yanopsky, 1981)¹²⁾과 pBN18A, pBN18B(Oxender's Lab. per. com., 1985⁸⁾) 플라스미드들의 제한효소 위치를 확인함으로써 유전공학 분야의 실험에 유용한 vector로 이용될 수 있도록 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재 료

1) 사용균주와 플라스미드

본 실험에서 사용된 균주와 플라스미드는 Table 1.에 제시하였다. 모든 균주는 *E. coli* K-12 계통으로 X1411, DH1, RR1은 플라스미드 증식, 분리 및 형질전환을 위하여 사용되었다. 사용된 플라스미드는 pBN18, pBN18A, pBN18B 그리고 pBR322이다.

pBN18 플라스미드 DNA의 제한 지도는 Fig. 1과 같다(C. Yanofsky, 1981)¹²⁾.

Table 1. Bacterial strains and plasmids

Designation	Genotype	Reference
<i>Escherichia coli</i>		
DH1	F ⁻ recA1 end gyrA thi-lhsdsRI7 relA	Low (1968) ⁵⁾
PR1	F ⁻ leuB ₆ proA2 ara14 supE44 hsdS20(r _B m _B)	Bolivar(1977) ¹⁾
X1411	F ⁻ prototroph minA1 glnU42 ^A -minB2	Frazer and C CurtissIII(1975) ²⁾
Plasmid		
pBN18	Ap ^r	Yanofsky(1981) ¹²⁾
pBN18A	Ap ^r	Oxender's Lab. (Per. Com) ⁸⁾
pBN18A	Ap ^r	" " (") ⁸⁾
pBR322	bla ^r Tc ^r	Bolivar(197) ¹⁾

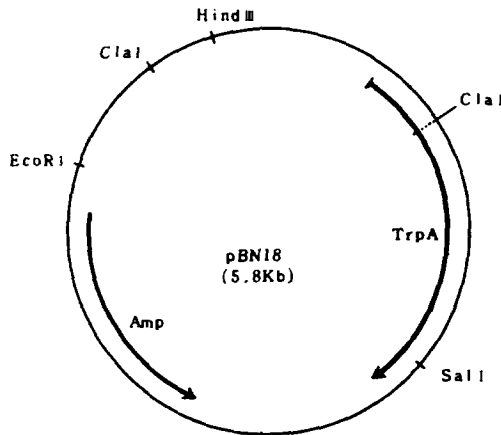


Fig. 1. The restriction map of pBN18(prepared by C. Yanofsky).

2) 시약 및 배지

본 실험에 사용된 항생제와 시약은 Sigma 제품을, 제한효소는 New England Bio-Lab과 Kosco 제품을 사용하였다. 배지는 Difco 제품을, Culture용 배지는 Luria-broth medium(LB)과 M9 최소 배지를 사용하였다.

항생제는 Ampiciline(35-50mg/ml), Tetracycline(13.5mg/ml)을 사용하였으며, 형질전환체의 확인은 LB배지에 Bacto-agar 1.5%를 첨가한 한천 평판 배지를 이용하였다.

Table 2. Chemical composition of the media

LB medium	pH 7.5
Bacto-tryptone	10g
Bacto-yeast extract	5g
NaCl	10g
Bacto-Agar	1.5%
	Up to dH ₂ O 1L
M9 medium	pH 7.4
Na ₂ HPO ₄	6g
KH ₂ PO ₄	3g
NaCl	0.5g
NH ₄ Cl	1g
Bacto-Agar	1.5%
	Up to dH ₂ O 1L
	Autoclave and then add:
1M MgSO ₄	2ml
20% Glucose	10ml
1M CaCl ₂	0.1ml

2. 방 법

1) 플라스미드의 분리

(1) 대량 분리

pBN18의 대량분리는 종전에 많이 이용되었던 Maniatis *et al.*(1982)의 alkaline lysis method를 약간 변형하여 사용하였다.

균주를 50ml의 L-Broth에 접종하여 37°C에서 하룻밤동안 진탕배양한 후 세포배양액을 4°C에서 5,000rpm(Beckman J.A 20 rotor)으로 5분동안 원심분리함으로써, 균체를 수확하였다. 수확된 균체를 10ml Solution I[50mM glucose, 25mM Tris.Cl(pH8.0), 10mM EDTA]을 넣어 현탁시킨후 lysozyme-용액(5mg/ml in 0.25M Tris, pH 8.0)을 넣고 충분히 섞어 0°C에서 5분간 방치한후 Solution I(0.2N NaOH, 1% SDS)를 넣어 조심스럽게 잘 섞어주고, 얼음위에서 10분간 방치한후 Beckman JA 20 rotor를 이용하여 4°C, 20,000rpm으로 20분간 원심분리 하였다.

상층액을 새 tube로 옮기고 0.6배 isopropanol을 넣어 잘 섞은후 -20°C에서 15분간 방치한다.

다음 상온에서 Beckman rotor 12,000g로 30분간 원심분리하고 상층액을 버린후 상온에서 70% ethanol로 DNA pellet을 씻어주고 말린후 100μl TE buffer[10mM Tris-Cl(pH 7.6), 1mM EDTA (pH 8.0)]에 녹인다.

(2) 소량 분리

Alkaline SDS-LiCl procedure의 변형된 방법(Oxender's Lab. Per.Com., 1985)⁸⁾을 사용하여 형질전환체의 플라스미드를 screening하였고, Maniatis *et al.* (1982)⁶⁾의 변형된 방법도 사용하였다.

Alkaline SDS-LiCl procedure을 약간 변형하여 다음과 같이 수행하였다.

5ml의 LB에 균을 접종한후 하룻밤동안 진탕배양하고 그 배양액을 6,000rpm으로 4°C에서 5분간 원심분리하여 균을 수확하였다.

100µl Sol. I을 첨가하여 cell을 현탁시키고 상온에서 5분간 방치한 후 신선하게 만든 200µl Sol. I를 가하여 부드럽게 섞어준 다음 0°C에서 10분간 방치하였다.

150µl 5M Potassium acetate(pH 4.8)를 넣고 전위하여 골고루 섞어준 후 다시 0°C에서 10분간 방치하고 12,000rpm으로 4°C에서 30분간 원심분리하여 상등액을 얻었다. 여기에 2배의 ethanol을 첨가하고 상온에서 2분간 방치 하였다가 10분간 원심분리한 후 상등액을 버리고 pellet을 50µl TE buffer로 녹인다.

다음 50µl 5M LiCl를 넣고 0°C에서 10분간 방치한 후 5분간 microcentrifuge에서 원심분리 한다.

상등액을 새로운 tube로 옮긴후 두배의 cold ethanol를 첨가하고 dry ice에서 10분간 방치, 5분간 원심분리하여 상등액을 버린뒤 pellet을 25µl TE buffer로 녹인후 2.5µl 3M Na-acetate (pH 6.0)와 60µl EtOH을 첨가하고 -20°C에서 10분간 방치한 후 원심분리하여 상등액을 버리고 증류수나 TE buffer에 침전물을 녹인다.

(3) 전기영동

분류된 DNA를 확인하기 위하여 Michael and Mcdonell의 방법(1977)⁷⁾을 이용하여 다음과 같이 전기영동 하였다.

DNA용액에 tracking dye(0.25% bromophenol blue, 0.25% Xylene cyanol, 30% glycerol)을 첨가하여 0.7% agarose horizontal slab gel에 50V와 100V 로 전기영동하였으며, running buffer는 TBE buffer(0.089M Tris-borate, 0.089M Boric acid, 0.002M EDTA, pH 8.0)를 사용하였다.

2) 제한효소 처리

pBN18의 제한효소 처리는 Maniatis등(1982)⁶⁾의 방법과 공급처 지시를 참고로 하여 행하였다.

pBN18을 EcoRI(5'G AATTC3')과 HindIII(5'A AGCTT3')으로 double digestion 하였다. Core buffer[50mM Tris-HCl(pH 8.0), 10mM MgCl₂, 50mM NaCl]를 reaction buffer로

사용하였다.

효소의 양은 DNA의 농도에 따라 적당량(0.5U/ul)처리 하였고, 37°C에서 2시간 반응시간을 주었다.

3) Low Melting Agarose로부터 DNA 회수

pBN18, pBN18A, pBN18B 플라스미드의 회수는 electroelution방법을 변형하여 다음과 같이 수행하였다.

TBE buffer에 0.7 - 1.2% agarose gel을 이용하여 DNA 용액을 150 V에서 2 - 4시간 전기영동 하였으며, 이때 TBE buffer(50mM Tris-HCl, 50mM Boric Acid, 2.5mM EDTA)을 사용하였다.

Gel을 ethidium bromide(5ug/ml)로 염색, UV로 관찰하여 원하는 DNA band를 확인한 후 DNA band의 앞 혹은 뒤에 홈을 만들어 1%의 low melting agarose(LMA)를 부어서 cold room에서 gel화 시킨후, 다시 전기영동을 하여 원하는 DNA band가 LMA 부위로 옮겨갈때까지 전기영동을 실시하여 LMA를 취하여 eppendorf tube에 넣고 잘 으깨어 얻어진 gel volume을 측정하여 1/10 1M NaCl을 첨가한 후, 65°C에서 gel이 녹을때까지 가열하여 37°C로 옮겼다(이때 1% Agarose/0.1M NaCl의 비율이 되어야 함).

여기에 0.1M NaCl이 포함된 STE 혹은 TBE buffer로 포화시킨 phenol 3/4 volume을 첨가시켜(이때 phenol양이 중요함) 강하게 교반시킨후, eppendorf centrifuge에서 5-10분간 원심분리를 한 다음, 원심분리 후 3층의 상이 형성되는데 제일 상층부의 상층액을 취하여 n-Butanol 2 volume을 첨가하고 잘 섞은후 1분간 원심분리를 하여 상층액을 조심스럽게 제거하고 수용액층을 취하여(반복해서 EtBr 및 Organic Phase를 제거함), 이 수용액에 3M NaOAc(pH4.8)를 1/10 volume 넣고 2.5 volume의 ethanol(95%)을 넣어 -20°C에서 30분간 방치한 후 원심분리에 의하여 DNA 침전물을 취하였다.

이 과정을 다시 반복하여 0.3M NaOAc에 녹여 2.5 volume의 ethanol로 침전시켜 70% ethanol로 두번 씻은후, 이 DNA pellet을 진공 건조시켜 dH₂O에 녹여 플라스미드 DNA는 형질전환 및 제한효소처리에 이용하였다.

4) 형질 전환

형질전환은 Lederberg and Cohen(1974)⁴⁾와 Hanahan(1983)³⁾의 방법을 변형하여 이용하였다. DNA의 recipient로 사용될 *E. coli* 균주를 5ml의 LB배지에 0. D₅₀₀ = 0.2 - 0.4 되도록 진탕배양한 다음 이 배양액의 1ml을 LB 20ml에 접종하여 2시간에서 2시간

30분 동안 진탕배양 한다.

Cell 배양액 5ml을 원심분리하여 수확한 다음 1ml의 cold 0.1M MgCl₂로 씻어준 다음, 1/4 original volume T-Salts (0.075M CaCl₂, 0.006M MgCl₂)를 넣고 현탁시킨후 0°C에서 20분간 방치한다.

원심분리하여 상층액은 버리고 2.5ml cold T-Salts로 현탁시킨 다음, 0.1ml DNA용액에 0.2ml competent cell을 혼합하여 30분간 0°C에서 잠시 방치하였다가, 37°C의 LB 배지로 열배 희석하여 37°C에서 1시간 배양한다.

배양된 형질전환체들을 선택배지에서 선별하였다.

III. 결과 및 고찰

pBN18, pBN18A, pBN18B vector의 제한효소지도

Gene fusion vector인 pBN18의 제한효소 위치를 확인하기 위하여 HindIII와 EcoRI으로 double digestion하였다 (Fig. 2).

그 결과 약 1.2Kb와 4.6Kb의 fragment 2개가 만들어지게 되며, Fig. 2에서는 partial digested pBN18 플라스미드 DNA를 보여주고 있다.

이러한 현상은 DNA에 단백질이 결합되었거나, DNA농도가 제한 효소량을 초과했기 때문이라고 생각된다. 따라서 pBN18에 HindIII와 EcoRI site가 있다는 것을 확인할 수 있었다.

또한 제한효소 처리로 절단된 pBN18의 4.6Kb fragment를 ligation하여 만들어진 pBN18A를 다시 제한효소 HindIII와 EcoRI으로 double digestion한 결과, Hind, EcoRI site가 없음을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

그리고 pBN18A 플라스미드를 제한효소 ClaI으로 digestion함으로써 ClaI site가 있음을 확인할 수 있었으며(Fig. 4), 이때 DNA량이 효소량에 비해서 더 높았기 때문에 pBN18A가 partial digestion된 것으로 생각되며, agarose gel상에 나타난 여러 band는 ocDNA들로 여겨진다.

pBN18, pBN18A 그리고 pBN18B의 생성 과정과 각 제한효소 지도를 Fig. 6에 나타냈으며, pBN18A에 Bgl II linker를 삽입한 pBN18B에 Bgl II site가 있는지를 확인하기 위해서 Bgl II를 이용하여 절단한 결과 pBN18B가 절단되었음을 확인할 수 있었다 (Fig. 5).

본 연구에서는 pBN18, pBN18A 그리고 pBN18B의 제한효소 처리로 정확한 제한효소 위치를 확인하였다. 최종적으로 pBN18, pBN18B의 크기를 비교하기 위해서 제한효소 처리되지 않은 각 DNA를 동일한 Gel상에서 전기영동 하였다(Fig. 7).

그 결과 개략적인 플라스미드의 크기를 비교할 수 있었다.

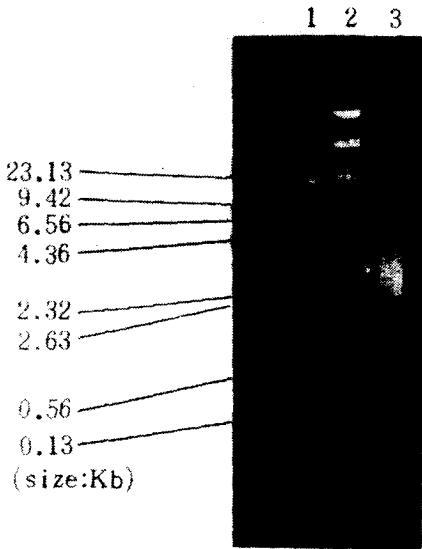


Fig.2. Agarose gel electrophoresis of pBN18 digested

with EcoRI and HindIII restriction enzyme.

Lane 1: λ DNA / HindIII

Lane 2: pBN18

Lane 3: pBN18 / EcoRI-HindIII

Arrow indicates pBN18 which digested with HindIII and EcoRI restriction enzyme.

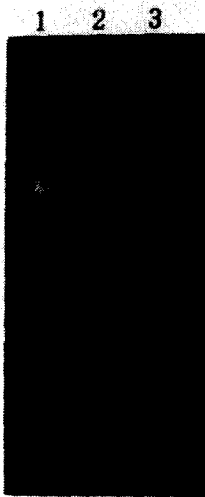


Fig.3. Agarose gel electrophoresis of pBN18A with EcoRI and HindIII restriction enzyme.

Lane 1: λ DNA / HindIII

Lane 2: pBN18A

Lane 3: pBN18A / EcoRI - HindIII



Fig.4. Agarose gel electrophoresis of pBN18A with Clal restriction enzyme.

Lane 1: λ DNA / HindIII

Lane 2: pBN18A

Lane 3: pBN18A / Clal(partial digestion)

Arrow indicates pBN18A which digested with Clal restriction enzyme.

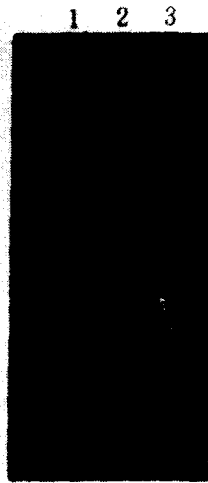


Fig. 5. Agarose gel electrophoresis of pBN18B with EcoRI and HindIII restriction enzyme.

Lane 1: λ DNA / HindIII

Lane 2: pBN18A

Lane 3: pBN18A / EcoRI - HindIII

Arrow indicates pBN18B with digested with Bgl II restriction enzyme.

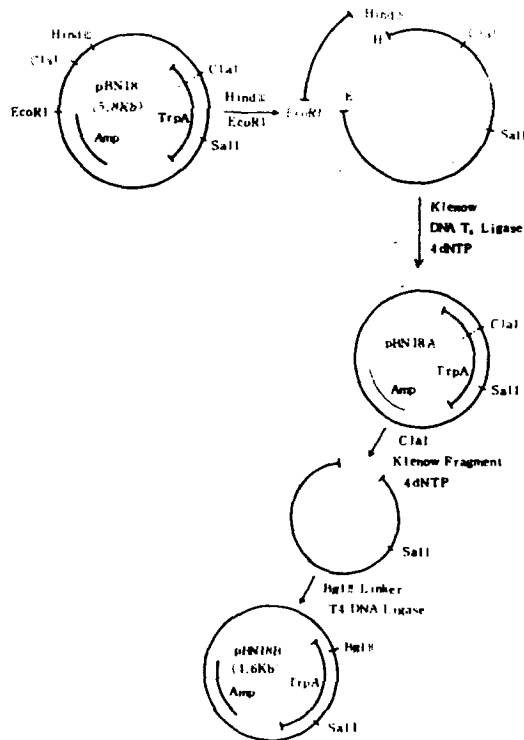
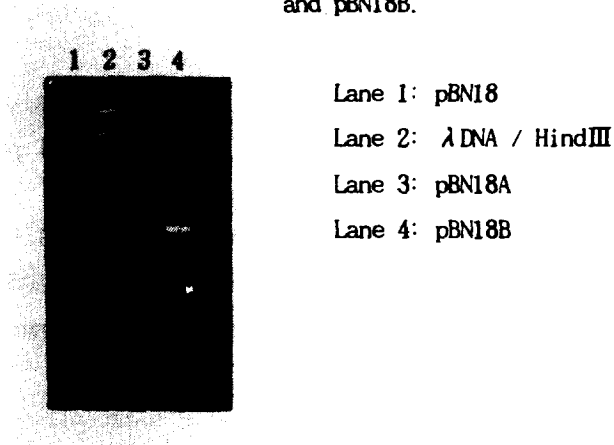


Fig. 6. The restriction map and the construction of pBN18, pBN18A and pBN18B(prepared by Oxender's Lab.).

Fig. 7. Agarose gel electrophoresis of pBN18, pBN18A and pBN18B.



IV. 결 론

Gene fusion vector인 pBN18의 제한효소 위치를 확인하기 위하여 HindIII와 EcoRI으로 double digestion 함으로써 다음과 같은 결과를 얻었다.

약 1.2Kb와 4.6Kb의 fragment 2개가 만들어지게 되었으며 따라서 pBN18에 HindIII와 EcoRI site가 있다는 것을 확인할 수 있었다. 그리고 pBN18A 플라스미드를 제한효소 ClaI으로 digestion함으로써 ClaI site가 있음을 확인할 수 있었다.

결론적으로 본 연구에서는 pBN18, pBN18A 그리고 pBN18B의 제한효소 처리로 정확한 제한효소 위치를 확인하였다. 또한 pBN18, pBN18B의 크기를 비교하기 위해서 제한효소 처리되지 않은 각 DNA를 동일한 gel상에서 전기영동하여 개략적인 플라스미드의 크기를 비교하였다.

참고문헌

1. Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C. and Falkows, S., "Construction and characterization of a new *E. coli* plasmid pBR322 serving as a cloning in an EK 2 system", *Gene in press*, (1977).
2. Frazer, A.C., and Curtiss, R., "Production, Properties and Utility of Bacterial Minicells", *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **69**, 1 (1975).
3. Hanahan, D., "Studies on transformation by plasmid deoxyribonucleic acid", *Bacteriol.*, **119**(3), 1072-1074 (1983).
4. Lederberg, E.M. and Cohen, S.N. "Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid", *J. of Bacteriology*, **119**(3), 1072-1074 (1974).
5. Low, B., "Formation of merodiploids in matings with a class of Recrecipient strains of *Escherichia coli* K-12", *Pro. Natl. Acad. Sci.*, **60**, 160 (1968).
6. Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J., "Molecular cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory", CSH, New York (1982).
7. Michael, W. McDonell, Martha, N. Simon and William Studier, F. "Analysis of Restriction Fragments of T₇ DNA and Determination of Molecular Weights by Electrophoresis in Neutral and Alkaline Gels", *J. Mol. Biol.*, **110**, 119-146 (1977).
8. Oxender's Lab. Per. Com., (1985) Rhodes, D. and Klug, A. "Helical periodicity of DNA determined by enzyme digestion", *Nature (London)*, **286**, 573-578 (1980).
9. Selker, E. and Yanofsky, C. "Nucleotide Sequence of the trpC-trpB Intercistronic Region from *Salmonella typhimurium*", *J. Mol. Biol.*, **130**, 135-143 (1979).
10. Silhavy, T.T., Berman, M.L. and Enquist, L.W. "Experiments with Gene Fusion: A Laboratory Manual" (1983).
11. Yamagishi, H., T. Kunisada, and Y. Tsuda, "Small Circular DNA Complexes in Eukaryotic cells", *Plasmids*, 299-306 (1982).
12. Yanofsky, C., Platt, T., Crawford, I.P. and Van Cleemput, M. "The complete nucleotide sequence of the Tryptophan operon of *Escherichia coli*", *Nucleic Acids Reserch*, **9**, 6647-6667 (1981).

A Study on the isolation and restriction
enzyme of DNA

Kim, Sang-Yub

Dept. of physical therapy

Park, Min-Hee

Part time lecturer

> Abstract <

The pBN18 of the gene fusion vector was double digestion with HindIII and EcoRI for the analysis of the restriction enzyme sites.

As a results, the fragments of 1.2Kb and 4.6Kb were made. Therefore it was conformed that pBN18 includes the sites of HindIII and EcoRI. The pBN18 contained the ClaI site to digestion with ClaI restriction enzyme.

A study was conformed the restriction enzyme sites of pBN18, pBN18A and pBN18B and the DNA sizes of pBN18 and pBN18B were compared with the agarose gel of the electrophoresis.