

*E.coli*의 pBN18 플라스미드 DNA의 구조 및 발현의 전자현미경 관찰

물리치료과
전임강사 김 상 엽

I. 서 론

유전자 재조합 및 분자생물학 등에 있어서 전자현미경의 이용은 점차적으로 증가되어 현재는 분자 수준의 생명현상 규명에 필수적인 기기로써 이용되고 있다.

Kleinschmidt와 Zahn (1959)⁸⁾에 의해서 DNA 관찰에 전자현미경이 이용된 후 Miller (1969,1970)¹⁵⁾¹⁶⁾에 의하여 원핵세포와 진핵세포의 유전자 발현시 mRNA, rRNA 그리고 RNA polymerase 등의 상호작용기전이 전자현미경을 통하여 관찰되었다.

특히 Miller(1969)¹⁶⁾는 chromatin-spreading 방법에 의해서 전사과정중에 염색체를 원심분리하여 단순히 sucrose-formalin cushion을 이용하여 친수성인 grid위에 침전시켰다.

그 grid를 surface-tension-reducing인 희석된 photoflo 용액에 세척한 후, 공기-건조시켜 PTA(phosphotungstic acid)와 UAA(Uranylacetate)에 염색하는 법을 개발하였다(Hamkalo et al., 1973)⁵⁾.

그로부터 얼마 후 Miller의 chromatin-spreading법의 몇가지 단점을 보완하기 위해서 mica-press adsorption이 플라스미드 DNA 관찰에 이용되었다.

이 방법은 Kunisada (1983)¹⁰⁾법을 변형하여 세포내에 포함되어 있는 플라스미드를 선별적으로 관찰하기 위하여 박테리아 세포를 in situ에서 플라스미드가 방출되도록 한 것이다.

즉, mica는 세포막이나 단백질 복합체를 통하여 플라스미드 DNA를 잘 흡착시키므로, 다양한 크기의 플라스미드 DNA를 갖는 세균 등을 파열 시켰을 때 mica

에 Mg^{2+} 이온이 없는 상태로 흡착된다.(Kunisada and Yamagishi, 1983)¹⁰⁾

최근 우리나라에서도 전자현미경을 통한 유전자의 구조 및 발현에 관한 연구가 활발하게 시작되고 있다(Kim, 1991, Yu, 1991, Jung, 1992)^{23.28.7)}.

Yanofsky와 공동연구자들(1981)²⁷⁾은 1960년대부터 tryptophan operon에 대해서 꾸준히 연구를 해 왔으며, Yanofsky(1981)는 pVH153와 pBR322를 제한효소 HindⅢ와 Sal I 으로 digestion하고 ligation하여 *E.coli* w3110 trpA 33에 형질 전환함으로써, Ampiciline-resistant, tryptophan-independent 플라스미드 DNA를 가지고 있는 colony를 screen하여 5.8Kb의 가장 작은 플라스미드 pBN18을 만들었다.

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

pBN18 계열의 플라스미드들은 분자 생물학적으로 유용하여 널리 연구되고 있는 것들로써, Selker와 Yanofsky (1979)²¹⁾에 의해서 pBN2, pBN18, pBN24가 연구 되었고, Nichols와 Yanofsky (1981)²⁷⁾에 의해서 pBN37, pBN38 그리고 pBN69, pBN70이 연구되었다.

이들 대부분이 trp promoter를 이용한 gene fusion vector로 이용되고 있다 (Silhavy et al., 1983)²²⁾.

본 연구에서는 pBN18 (Yanofsky, 1981)²⁷⁾과 pBN18A, pBN18B(Oxender's Lab . Per . Com) 플라스미드들을 전자현미경을 이용하여 Miller chromatin-spreading 법과 mica-press adsorption법에 의해서 pBR 322 플라스미드 DNA와 함께 이들의 모양과 크기를 비교 관찰 하였으며 세균 염색체의 유전자 발현과정을 관찰하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재 료

1) 사용균주와 플라스미드

본 실험에서 사용된 균주와 플라스미드는 Table.1에 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)²⁷⁾.

Table.1. Bacterial strains and plasmids

Designation	Genotype	Reference
<i>Escherichia coli</i>		
DH1	F ⁻ recA1 endA gyrA thi-1hsdsR17 relA	Low (1968) ¹³⁾
RRI	F ⁻ leuB ₆ proA2 ara14 supE44 hsdS20(r _B ⁻ r _B ⁻)	Bolivar (1997) ²⁾
X1411	F ⁻ prototroph minA1 glnU42 λ ⁻ minB2	Frazer and C. Curtiss III (1975) ³⁾
Plasmid		
pBN18	Ap ⁺	Yanofsky (1981) ²⁷⁾
pBN18A	Ap ⁺	Oxender's Lab. (Per. Com)
pBN18B	Ap ⁺	Oxender's Lab. (Per. com) ¹⁸⁾
pBN322	bla ⁺ Tc ⁺	Bolivar (1977) ²⁾

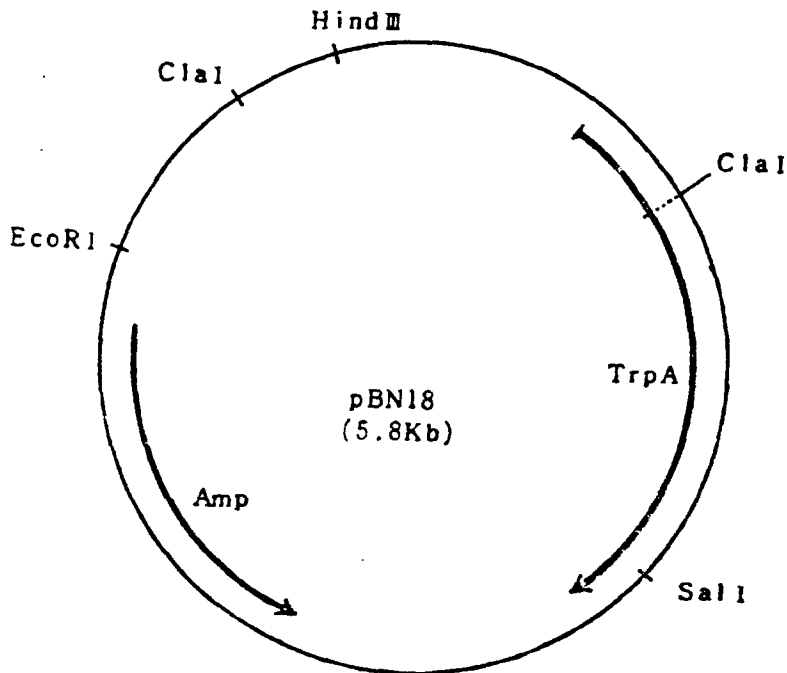


Fig. 1 The restriction map of pBN18(prepared by C.Yanofsky).

2) 시약 및 배지

본 실험에 사용된 항생제와 시약은 Sigma 제품을, culture용 배지는 Luria-broth medium (LB)과 M9 최소 배지를 사용하였다.

항생제는 Ampiciline (35-50 $\mu\text{g/ml}$), Tetracycline (13.5 g/ml)을 사용하였으며, 형질전환체의 확인을 LB배지에 bacto-agar 1.5%를 첨가한 한천 평판 배지를 이용하였다.

배지 조성은 Table. 2에 나타내었다.

Table. 2 Chemical composition of the media

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

2. 방 법

1) 플라스미드의 분리

(1) 대량 분리

pBN18의 대량분리는 종전에 많이 이용되었던 Maniatis et al. (1987)의 alkaline lysis method를 약간 변형하여 사용하였다.

균주를 50ml의 L-Broth에 접종하여 37°C에서 하룻밤동안 진탕 배양한 후 세포 배양액을 4°C에서 5,000 rpm(Beckman J A 20 rotor)으로 5분동안 원심분리함으로써 균주를 수확하였다.

수확된 균체를 10ml solution I [50mM glucose, 25mM Tris-Cl(pH8.0), 10mM

EDTA]을 넣어 현탁시킨 후 lysozyme 용액 (5mg/ml in 0.25M Tris, PH8.0)을 넣고 충분히 섞어 0℃에서 5분간 방치한 후 solution II (0.2N NaOH, 1% SDS)를 넣어 조심스럽게 잘 섞어 주고 얼음위에서 10분간 방치한 후 Beckman J.A 20 rotor를 이용하여 4℃, 20,000 rpm으로 20분간 원심분리 하였다.

상층액을 새 tube로 옮기고 0.6배 isopropanol을 넣어 잘 섞은 후 -20℃에서 15분동안 방치한다.

다음 상온에서 Beckman rotor 12,000g로 30분동안 원심분리하고 상층액을 버린 후 상온에서 70% ethanol로 DNA pellet을 씻어 주고 말린 후 100 μ l 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)¹⁸⁾을 사용하여 형질전환체의 플라스미드를 screening하였고, Maniatis et al.(1987)¹⁴⁾의 변형된 방법도 사용하였다.

alkaline SDS-LiCl procedure을 약간 변형하여 다음과 같이 수행하였다. 5ml의 LB에 균을 접종한 후 하룻밤동안 진탕배양하고 그 배양액을 6,000rpm으로 4℃에서 5분간 원심분리하여 균을 수확하였다.

100 μ l Sol.I을 첨가하여 cell을 현탁시키고 상온에서 5분간 방치한 후 신선하게 만든 200 μ l Sol.II를 가하여 부드럽게 섞어준 다음 0℃에서 10분동안 방치하였다.

150 μ l 5M potassium acetate(pH 4.8)를 넣고 전위하여 골고루 섞은 후, 다시 0℃에서 10분간 방치하고 12,000rpm으로 4℃에서 30분간 방치하였다가 10분동안 원심분리한 후 상층액을 버리고 pellet을 50 μ l TE buffer로 녹인다.

다음 50 μ l 5M LiCl를 넣고 0℃에서 10분동안 방치한 후 5분동안 microcentrifuge에서 원심분리 한다.

상층액을 새로운 Tube로 옮긴 후 두배의 cold ethanol를 첨가하고 dry ice에서 10분간 방치, 5분동안 원심분리하여 상층액을 버린 뒤 pellet을 25 μ l TE buffer로 녹인후 2.5 μ l 3M Na-acetate (pH 6.0)와 60 μ l EtOH을 첨가하고 -20℃에서 10분동안 방치한후 원심분리하여 상층액을 버린다음 70% EtOH로 DNA pellet를 2회 반복하여 씻어 주고 말린 후 20 μ l TE buffer [10mM Tris-Cl (pH 7.6), 1mM EDTA (pH 8.0)]에 녹인다.

(3) 전기 영동

분류된 DNA를 확인하기 위하여 Michael and McDonell의 방법(1977)¹⁵⁾을 이용하여 다음과 같이 전기영동하였다.

DNA 용액에 tracking dye (0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol, 30% glycerol)을 첨가하여 0.7% agarose horizontal slab gel에 50V로 전기영

동하였으며, running buffer는 TBE buffer (0.089M Tris-borate, 0.089M boric acid, 0.002M EDTA, pH 8.0)를 사용하였다.

(4) DNA의 전자현미경 관찰법

전자현미경으로 DNA를 관찰하기 위하여 Miller spreading method(Miller et al., 1970)와 mica-press adsorption method(Kunisada and Yamagishi, 1983)¹⁰⁾을 사용하였다.

가. Miller spreading procedure

㉠ Chromatin dispersal

플라스미드 DNA 및 유전자 발현의 전자현미경 관찰법으로써 pBN18, pBN18A, pBN18B 그리고 pBR322를 형질전환시켜 LB 배지에서 대수기($0.D_{550} = 0.3$)까지 배양한 배지를 잘게 쪼개 얼음속에 묻어둔 30ml corex tube에 배양액 5~10ml를 넣고, HB-4 rotor를 이용하여 0~4°C에서 5분동안 5,000rpm으로 원심분리하여 상층액을 버린 후, cold 1.5M sucrose(pH 7.5) 1ml을 넣고, 중간 속도로 10~15초간 교반하였다.

0.9M sucrose (pH 7.5) 1.7ml을 넣고 중간속도로 10~15초간 교반한 후 lysozyme의 최종농도가 50 ~ 100 μ g/ml이 되도록 3~6mg/ml의 lysozyme 50 λ 넣고 tube를 얼음위에서 조심스럽게 흔들어준 다음, 0.1M Sucrose - 10% Formalin(pH 8.5) 1ml을 넣고 현탁하였다.

㉡ Preparation for electron microscopy

carbon막을 입힌 grid를 ethanol에 1분동안 담그어 덩으로써 친수성으로 바꾸어준 다음, 투명한 원심분리 tube에 0.1M sucrose-10% formalin solution(pH8.5)를 가득 채우고, grid를 sucrose-formalin으로 씻고 반짝이는 측면이 tube의 밑바닥에 닿도록 grid를 띄웠다.

pipette로 sucrose-formalin을 아주 작은 층만 남기고 모두 제거하고 tube를 bottle cap에 넣고 HB-4 rotor에서 0~4°C, 10,000rpm으로 10분간 원심분리한 후, tube의 벽을 따라 sucrose-formalin을 한 방울을 넣고 tube를 거꾸로 뒤집어 tube의 밑바닥에 붙어있는 grid를 핀셋으로 쉽게 제거해 낼수 있었으며, Kodak photoflo 세방울을 떨어뜨린 50ml의 dH₂O(pH 8.5)에 grid를 10초간 염색한 다음, 진공 건조하여 grid를 회전하면서 백금으로 shadowing하였다.

㉢ staining grids

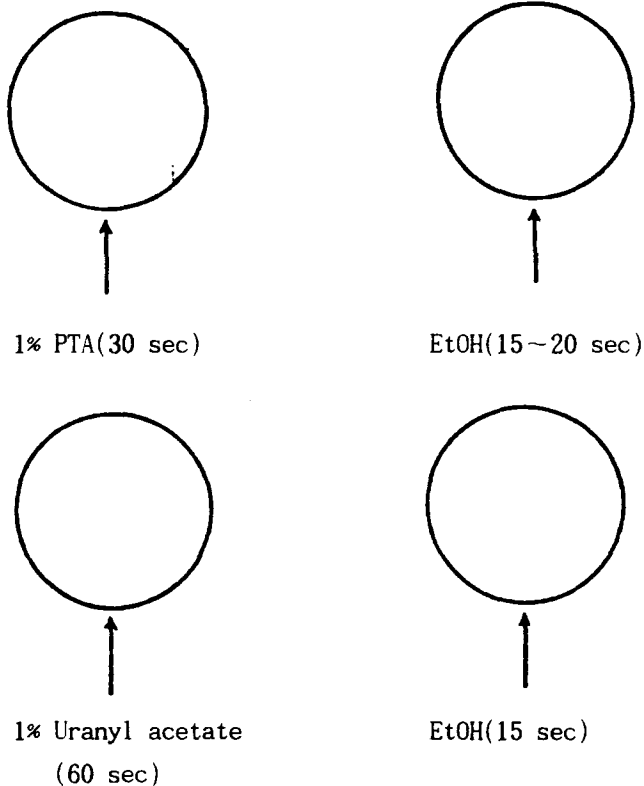
Stock solutions(phosphotungstic acid와 uranyl acetate)는 각각 4%로 준비하였으며 염색 절차는 다음과 같다.

염색은 microtitric dish에서 쉽게할 수 있으나 dish를 사용할 수 없을 때는 마분지를 접시의 크기로 잘라서 대응하는 것도 가능하였다.

한 well에 세방울의 PTA를 넣고, 다른 두번째 well에 세방울의 uranyl acetate

를 넣은 후 ethanol 아홉방울씩 각 well에 넣어 전체의 well ethanol로 채우고 grid를 PTA에 30초간 담가 두었다.

또한 PTA를 제거하고 10~20초간 ethanol에 담근 후 grid를 uranyl acetate에 60초동안 염색시키고 ethanol에서 10~20초간 담근후 photoflo에 담근 다음 air-dry 시켰다.



㉔ rotary shadowing 방법

재료는 filament : platinum으로 둘러 쌓인 tungsten

tungsten : 0.025 diameter

platinum : 8mi/wire

절차는 다음과 같다.

백금선 (8mi/wire)으로 tungsten을 4~6회 반복하여 감은 다음, rotary platform으로부터 7~9° 정도로 거리를 조정하여 백금선이 감긴 tungsten(0.025 diameter)을 설치하였다.

- ① 25 Amp로 30초 동안 오염물질을 태우고
- ② 28 Amp에서 45초, 30 Amp에서 60초동안 shadowing로 실시한 후,
- ③ 전자현미경하에서 20,000배 정도로 관찰하였다.

나. Mica-press adsorption method

plasmid DNA를 전자현미경하에서 관찰하기 위해서 mica-press adsorption method를 사용해서 세포를 lysis하여 준비하였는데, Koller 등 (1974)⁹⁾의 방법을 이용하였다.

균세포(4×10^8 cells/ml)를 원심분리하여 수확하고 냉장된 용액(150mM NaCl, 50mM Tris-HCL; pH 7.5)의 1/10volume에 희석시킨 후 희석된 세포용액에 $1\mu\text{l}$ 의 lysozyme(2mg/ml)을 첨가하여 ice bath에 3분동안 방치하였다.

parafilm위에 $10\mu\text{l}$ 의 증류수를 떨어뜨리고 lysozyme이 처리된 용액 0.5~1.0 μl 를 증류수 방울위에 떨어뜨린 후, mica(0.51cm)를 방울 위에 접촉시켜 잠시 핀셋으로 누른 후 1~3분동안 방치한 다음, 과도한 용액을 제거시키고, DNA 접촉면을 위로하여 증류수에서 1시간동안 두었다.

99% ethanol로 수초동안 수분을 제거하여 air-dry를 시킨 후, platinum-carbon으로 shadowing 하였다.

III. 결과 및 고찰

1. DNA의 전자현미경 관찰

세포내의 유전물질인 DNA에 관한 연구는 여러 방법에 의해서 전자현미경으로 관찰함으로써 진행되었다(Miller and Beatty, 1969; Miller et al., 1970)^{15,16)}.

최초로 전자현미경 관찰을 가능케한 Kleinschmidt와 Zahn(1959)⁸⁾은 전자현미경하에서 protein carrier인 cytochrome C를 이용하여 간단하고 신속한 핵산관찰 방법을 제시하였다.

이 방법은 음성전기를 띤 DNA(혹은 RNA)와 염기성 단백질인 cytochrome C를 혼합하여 저농도의 염용액에 DNA-cytochrome C용액을 spreading함으로써 확산에 의하여 표면막이 형성되게 한다(Lang, 1970)¹¹⁾.

그러나 DNA에 약간의 단백질이 결합되어 있으므로 확실하게 DNA를 관찰할 수 없다는 단점이 있다.

그러나 본 연구는 Kleinschmidt-Zahn method의 단점을 보완한 Miller chromatin-spreading법과 mica-press adsorption법을 사용하게 되었다.

그러나 최근까지 Miller의 spreading법으로는 아주 작은 유전물질인 플라스미드 DNA 관찰이 어려웠었다(Yamagishi and Okamoto, 1978)²⁵⁾.

그러나 이러한 크기가 작은 플라스미드를 관찰하기 위해서 세포를 lysozyme 등으로 처리하여 mica표면에 흡착시킴으로써 플라스미드 DNA가 Mg^{2+} 이온들의 영

향에 의해서 mica표면에 용이하게 결합되는 것을 관찰하였다(Portmann and Koller, 1976, Yu, S.C. et al., 1991)^{19,28)}.

Koller 등 (1974)에 의하여 플라스미드 DNA 분자를 전자현미경하에서 관찰할 수 있는 방법을 변형하여 2가 양이온 없이 mica에 흡수시켜 세포내 플라스미드를 관찰할 수 있는 것도 확인하였다(Kunisada and Yamagishi, 1983, Sung, J.K. et al., 1991)^{10,23)}.

따라서 mica-press adsorption법은 복잡한 형태의 ccc form의 bacterial 플라스미드를 탐지하는데 유용하게 이용되었다.

또한 Yamagishi(1982)²⁶⁾등은 Miller spreading법에 의하여 플라스미드의 관찰이 어렵다고 하였으나, 본 실험에서는 여러 모양의 많은 플라스미드를 이 방법에 의하여 비교 관찰하였으며, 유리된 polyribosome들이 거의 드물게 나타났음을 볼 수 있었다(Fig.2).

이것들은 세포 파괴시 절단된 것으로 추측되며, 여기에서 플라스미드 DNA의 복제를 Fig.2 D에서는 몇개의 DNA가 folding되어 있는 것을 관찰할 수 있었다.

특히 플라스미드 DNA의 Miller spreading에 의한 전자현미경 관찰중에 실제 DNA 모양과 가장 가까운 것으로 추측되는 특이한 모양의 DNA를 볼 수 있었다(Fig.3).

그리고 DNA분자와 mica 표면 모두가 음이온을 가지므로 2가 양이온(Mg^{2+})에 의하여 mica표면에 DNA가 흡착되도록 하는 mica-press adsorption법은 세포내 플라스미드 DNA분자가 단백질이나 세포막 등과 복합체를 형성한다는 결과가 보고되었다(Kunisada and Yamagishi, 1983)¹⁰⁾.

본 실험에서도 Fig.4에 의하여 DNA-binding protein은 세포 내용물들이 약한 양전기(positive charge)를 가지므로써 플라스미드 DNA분자와 mica표면 사이의 결합을 증대함을 입증하였다.

또한 mica-press adsorption법을 통하여 관찰된 플라스미드 DNA는 선이 두껍고 모양을 확실하게 관찰 할 수 있었으며, 시료 조작시의 조건에 따라 여러 모양을 하고 있음을 알 수 있었으며, curve meter(Sakurai)를 이용하여 본 연구에서 이용된 플라스미드 DNA의 길이를 다음과 같이 측정하였다.

측정된 DNA의 평균값은 pBN18이 1.87 ± 0.28 (약 5.6Kb) $_{\mu m}$, pBN18A 1.53 ± 0.12 (약 4.6Kb) $_{\mu m}$, pBN18B 1.53 ± 0.12 (약 4.6Kb) $_{\mu m}$ 그리고 pBR 322은 1.50 ± 0.03 (약 4.50Kb) $_{\mu m}$ 이었으며, 측정치 $1_{\mu m}$ 은 개략 3.0Kb에 해당되었다.

위에서 측정한 측정치는 Yanofsky(1981)²⁷⁾에 의해서 보고된 것과 비슷하였으며, 실제 길이와는 0.5% 차이가 있다고 보고되었다(Yamagishi et al., 1976)²⁴⁾.

또한 분자량이 큰 bacterial chromosomal DNA도 단백질 linker 를 이용하여 mica표면의 음성전기에 양이온의 약한 양성전기를 이용함으로써 DNA를 mica에

흡착 시킬 수 있을 것으로 생각된다.

본 mica-press adsorption법은 2시간 정도로 쉽게 플라스미드를 관찰 할 수 있으며, Rhodes와 Klug(1980)²⁰⁾가 mica 표면에서 부동의 순수한 DNA의 규칙적인 helical 주기를 관찰하였듯이 본 실험에서도 Fig.4에서 규칙적인 DNA band들을 확인 할 수 있었다.

따라서 mica-process adsorption법은 소량의 플라스미드 DNA의 in situ visualization에서 신속한 유용성을 제시하여 주었다.

또한 DNA의 전사체는 수 많은 과립들이 결합되어 있었으며, 이러한 크기의 과립들은 대개 *E.coli*의 ribosome의 크기였다.

삼투압에 의한 과열후 deoxyribonuclease를 처리한 결과 섬유가 파괴된 반면, ribonuclease는 섬유에 결합된 과립들을 연결하는 선을 제거한 결과로부터 mRNA 분자로된 ribosome으로 밝혀졌다(Miller, 1970).

본 연구에서도 Fig.5,6에서 제시된 것과 같이 spreading법에 의해서 Miller와 동일한 결과로 polyribosome과 DNA가닥 등을 관찰 할 수 있었다.

그러나 상당히 많은 양의 내용물이 세포 주위에 퍼져 있지만, 세포 내용물이 삼투충격에 의해 완전히 제거되지 않았으며 결과적으로 완전한 genome보다는 일부분들이 관찰되었다(Fig.5).

또한 DNA 가닥에 수 많은 RNA polymerase가 결합된 것으로 관찰되었으며, 이것은 French(1985)⁴⁾의 실험과 일치된다(Fig.6).

Fig.6에서 활동적인 구조 operon을 볼 수 있으며 또한 여기에서 polyribosome이 short-to-long polyribosome 구배로 구성된 것을 볼 수 있으며, polyribosome 길이의 이러한 구배로부터 mRNA 합성의 개시점의 위치를 추측할 수 있다.

이러한 결론은 Miller(1970)¹⁷⁾의 실험결과와 일치되었다.

이 위치에서 과립은 promoter위치의 RNA polymerase에 해당되는 것이다.

단위체로서 전사되고 있는 DNA단편의 termination site는 polyribosome 부위 부위의 공간적인 배치의 상당한 다양성 때문에 예측하기 어렵다.

또한 polyribosome들의 결합간격이 불규칙임을 확인하였고, 이것은 전사개시기 비 동시성임을 입증한 것이며(Fig.6.A.C), attenuation 부위를 포함한 다양한 배열과 조건의 변화에 따른 전사율의 차이점에서 기인된 것으로써 Baker와 Yanofsky(1970)의 전사 개시 빈도에 대한 연구와 일치된다.

원심분리후 grid나 상층액 단편의 소량의 유리 polyribosome과 규칙적인 polyribosome의 구배 등이 활성적인 염색체상에 전면적으로 배치되었다는 사실은 (Fig.6.B), bacterial chromosome에 결합된 polyribosome에서 mRNA가 분해된다는 점과 일치한다(Miller, 1970, Jeong, B.K. et al., 1992)^{17.7)}.

대부분의 생화학적 연구에서 mRNA퇴화는 해독방향인 5'→3' 쪽으로 일어난다.

Fig.6.에 의해서 polyribosome의 길이를 통하여 개시점을 추론할 수 있고, polyribosome의 길이 측정을 통하여 전사된 DNA의 길이를 측정할 수 있다.

또한 전사 개시점으로 부터 polyribosome의 길이가 증가되지만 마지막부위에서 polyribosome이 퇴화되는 경향이 관찰되었다(Fig.6 B).

즉 본 연구를 통하여 플라스미드 DNA의 모양과 크기를 비교 관찰할 수 있었으며, 염색체상의 polyribosome의 길이는 규칙적으로 증가되었으며 이러한 polyribosome의 길이 구배로 말미암아 개시점과 promoter 위치에 존재하는 RNA polymerase를 관찰할 수 있었다(Fig.6 B).

따라서 전자현미경은 DNA의 base analysis와 DNA의 제한 효소지도까지도 작성할 수 있게 됨으로써 DNA의 유전적 관찰을 위한 분자 생물학의 필수도구가 되었으며, 소량의 플라스미드 DNA의 in situ visualization에서 신속한 유용성을 제시하여 주었다.

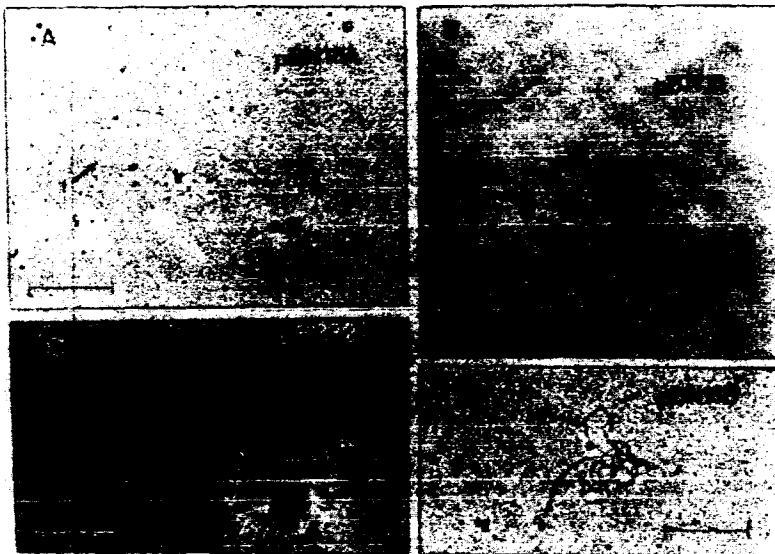


Fig.2. Electron micrograph of pBN18A, pBN18B, and pBR322 prepared by Miller chromatin-spreading method.

Positive(1% PTA) and negative(1% UAA) staining was used in this observation.

- A. Indicates that pBN18A is various form.
Arrows indicate variant pBN18ADNA(1) and cell debris(2).
- B. Indicates that the form of pBN18 plasmid is variability.
Arrows indicate variant pBN18DNA(1) and cell debris(2).
- C. Indicates that pBR322 plasmid is replicating.
Arrows indicate replication of pBR322 plasmid(1) and cell debris(2).
- D. Indicates that pBN18B plasmids are folding.
Arrows indicate folding status of pBN18B plasmids(1) and cell debris(2).
(Bars indicate 0.25 μ m)

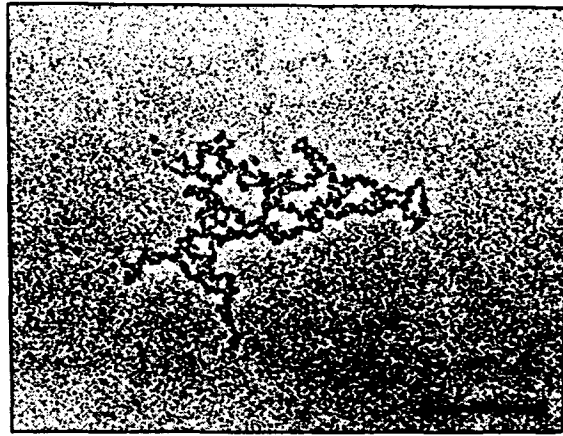


Fig. 3 Electron micrograph plasmid DNA prepared by Miller chromatin-spreading method. (Bar indicates $0.5\mu\text{m}$)

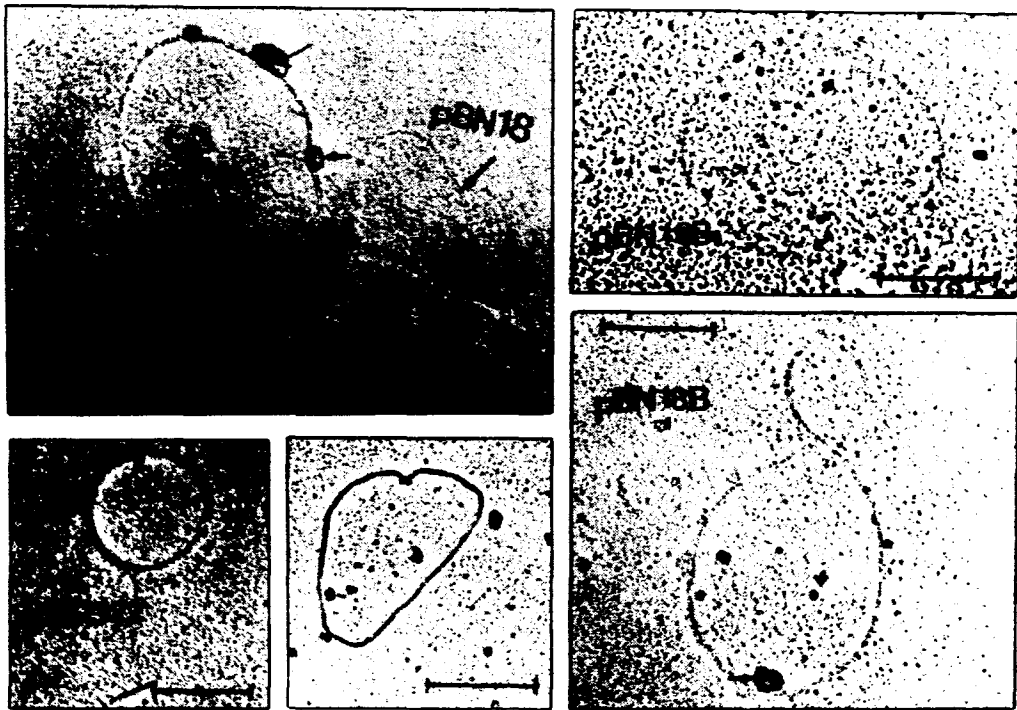


Fig. 4 Electron micrograph of small plasmid DNA pBN18, pBN18A, pBN18B and pBR322 prepared by mica-press adsorption method. Arrows in the part indicate that intracellular DNA molecules are present in a complex formed with (Bars indicate $0.5\mu\text{m}$)



Fig.5 Electron micrograph of obscured DNA and DNA transcription process prepared by Miller chromatin-spreading method. The observation was carried out at 20,000 magnification. Arrows indicate DNA. (Bars indicates $0.5\mu\text{m}$)



Fig.6 Electron micrograph of transcriptional and non-transcriptional regions of *E.coli* chromosome. The polyribosomes attached to the active segments exhibit regular short-to-long gradients of increasing lengths (Fig. 6.A, B, C, D).

A. Arrow indicates mRNA with polyribosome.

B. The shorter, most distal polyribosome in Fig.6, B may have resulted from mRNA degradation. Arrow indicates RNA polymerase.

C, D. Transcriptionally active regions of *E.coli* chromosome.

IV. 결 론

본 연구는 전자현미경에 의해서 플라스미드 DNA의 모양과 크기 및 염색체 DNA의 유전자 발현 과정을 관찰하였다.

전자현미경 관찰을 위하여 본 연구에서는 Miller chromatin-spreading법과 mica-press adsorption법을 이용하여, pBN18, pBN18A, pBN18B 그리고 pBR322 플라스미드 DNA들을 관찰하였다.

그 결과 이들의 크기가 각각 $1.87 \pm 0.28(5.6\text{Kb})_{\mu\text{m}}$, $1.53 \pm 0.12(4.6\text{Kb})_{\mu\text{m}}$, $1.53 \pm 0.12(4.6\text{Kb})_{\mu\text{m}}$, 그리고 $1.50 \pm 0.03(4.50\text{Kb})_{\mu\text{m}}$ 이었음을 mica-press adsorption법에 의하여 측정하였다.

그리고 Miller chromatin-spreading법을 이용한 chromosomal DNA의 유전자 발현과정의 관찰로 transcription을 관찰함으로써 전사과정이 활발한 유전자 부위와 전사과정이 활발하지 않은 유전자 부위를 관찰 할 수 있었다.

따라서 세포내에서 방출된 플라스미드 DNA를 선별적으로 관찰할 수 있는 mica-press adsorption법을 이용하여 분자량이 적은 플라스미드의 관찰을 신속하고 유용하게 할 수 있었으며, 플라스미드 DNA들은 2가 양이온이 없어도 mica에 잘 흡착되어졌다.

또한 Miller chromatin-spreading법은 *E. coli*에서 유전자 발현에 관한 초미세 구조적 관찰로 개개의 유전자 수준에서 조절기작을 연구 할 수 있게하며 유전자들의 replication과 transcription 수준에서의 물리적 상호작용을 관찰하는데 적용될 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Baker, R. and C. Yanofsky, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.,35:467-470, 1970.
2. Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Falkows, S., Construction and characterization of a new *E.coli* plasmid pBR322 serving as a cloning in an EK 2 system, Gene in press, 1997.
3. Frazer, A.C., and CurtissIII, R., Production, Properties and Utility of Bacterial Minicells, Curr. Top. Microbiol. Immunol.,69:1, 1975.
4. French, S., K. Martin, T. Patterson, R. Bauerle, and O.L. Miller, Electron microscopic visualization expression in *Salmonella typhimurium*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1985.

5. Hamkalo, B.A. and O.L. Miller, JR., Electron microscopy of Genetic Activity, *Ann. Rev. Biochem.*, 42:379-396, 1973.
6. Hanahan, D., Studies on transformation by plasmid deoxyribonucleic acid, *J. Bacteriol.*, 119(3):1072-1074, 1983.
7. Jeong, B.K., Jae-Kyun Sin and Woo Kap Kim, Ultrastructural Study on Nectar Secretion from Extrafloral Nectary of *Prunus yedorensis* Matsumura, *Korean J. Bot.*, 35:2, 143-153, 1992.
8. Kleinschmidt, A.K. and R.K. Zahn, Über desoxyribonucleinsäure-Molekül in Protein-Mischfilmen, *2 Naturforsch.*, 14b:770-779, 1959.
9. Koller, T., Sogo, J.M., and Bujard, H., An electromicroscopic method for studying nucleic acid protein complexes. Visualization of RNA polymerase bound to the DNA of bacteriophage T7 and T3, *Biopolymers*, 13:995-1009, 1974.
10. Kunisada, T. and H. Yamagishi, Rapid microsomal procedure for visualizing intracellular plasmid DNA by electron micrography plasmid, 9:8-16, 1983.
11. Lang, D., Molecular weights of coliphages and coliphage DNA contour lengths and molecular weight of DNA from bacteriophages T₄, T₅ and T₇, and from bovine papilloma virus, *J Mol Biol*, 54:557-565, 1970.
12. Lenderberg, E.M. and S.N. Cohen, *J Bacteriol*, 1072-1074, 1974.
13. Low, B., Formation of merodiploids in matings with a class of reciprocant strains of *Escherichia coli* K-12, *Pro. Natl. Acad. Sci.*, 60, 160(1968).
14. Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J., *Molecular cloning : A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, CSH, New York, 1987.
15. Michael, W. McDonnell, Martha, N. Simon and F. William Studier, 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.
16. Miller, O.L., Jr and Beatty, B.R., Visualization of nucleolar genes, *Science* 164:955-957, 1969.
17. Miller, O.L., Jr Hamkalo. B.A. and Thomas, C.A., Jr., Visualization of bacterial genes in action, *Science*, 169:392-395, 1970.
18. Oxender's Lab. Per. com., 1985.
19. Portmann, R. and T, Koller, The divalent cation method for protein-

- free spreading of nucleic acid molecules, in: Ben-shaul Y (ed.). sixth European Congr. Electron Microscopy, Jerusalem, Vol.2. Tal, israel, pp.546-548, 1976.
20. Rhodes, D. and A. Klug, Helical periodicity of DNA determined by enzyme digestion, *Nature(London)*, 286:573-578, 1980.
 21. Selker, E. and C. Yanofsky, Nucleotide sequence of the trpC-trpB Intercistronic region from *Salmonella typhimurium*, *J. Mol. Biol.*, 130:135-143, 1979.
 22. Silhavy, T. T., M.L. Berman, and L.W. Enquist, Experiments with gene fusions:A Laboratory Manual, 1983.
 23. Sung-Jun Kim and Seong-Sub Kim, Electron microscopic visualization of structure and expression of the livgenes in *Escherichia coli*, *Mol. Cells*. Vol.1, 1991.
 24. Yamagishi, H., Inokuchi, H., and Ozeki, H., Excision and duplication of Su^{3+} -transducing fragments carried by bacteriophage $\phi 80$. 1. Novel structure of $\phi 80$ sus 2psu3 DNA molecule,*J. Virol.*, 18, 1016-1023, 1976.
 25. Yamagishi, H. and Okamoto, M., Visualization of the intracellular development of bacteriophage λ , with special reference to DNA packaging, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 75:3206-3210,1978.
 26. Yamagishi, H., T. Kunisada, and T. Tsuda, Small circular DNA complexes in eukaryotic cells, *Plasmids*, 299-306, 1982.
 27. Yanofsky, C., Platt, t., Crawford, I.P., M Van Cleemput, The complete nucleotide sequence of the tryptophan operon of *Escherichia coli*, *Nucleic acids Research*, 9:6647-6667, 1981.
 28. Yu, Seong Cheol and Woo Kap Kim, Ultrastructural changes and formation of storage materials in endosperm cells during the seed formation of panax ginseng C.A. Meyer, *Korean J. Bot.* 34:3, 201~213, 1991.

Electron microscopic visualization of pBN18 plasmid DNA structure and expression in the *Escherichia coli*

Kim, Sang-yub
Dept. of Physical Therapy
Kwangju Health College

> Abstract <

This study was visualized the transcriptional activity, the size and the model of plasmid DNA by electron microscopy.

Plasmid pBN18, pBN18A, pBN18B and pBR322 were visualized by way of electron microscopy.

Mica-press adsorption method that allows selective visualization of the plasmid DNA released in situ from the bacterial cell is rapid and useful for visualization of plasmids.

The released plasmid DNA was adsorbed preferential on mica in a divalent cation-free solution, and the Miller chromatin-spreading method may allow the physical interaction and transcription to be visualized.

Therefore mica-press adsorption method and Miller chromatin-spreading method used to visualize the plasmid DNA, chromosomal DNA and gene expression.

As a result, their estimated sizes of plasmid pBN18, pBN18A, pBN18B and pBR322 were $1.87 \pm 0.28(5.6 \text{ Kb})_{\mu\text{m}}$, $1.53 \pm 0.12(4.6\text{Kb})_{\mu\text{m}}$, $1.53 \pm 0.12(4.6\text{Kb})_{\mu\text{m}}$, and $1.50 \pm 0.03(4.50\text{Kb})_{\mu\text{m}}$, respectively, and transcriptional activity was observed by the visualization of gene expression of chromosomal DNA.