

운반체: 플라스미드와 박테리오파아지

플라스미드가 가져야 될 특성으로 클로닝 운반체는 비교적 크기가 작아야 됩니다. 이상적 크기는 10kb인데 1kb는 지난번에 얘기한 것처럼 1000개의 염기를 가지고 있는 것을 말합니다. 플라스미드는 박테리아 염색체 이외의 작은 동그라미로 표시되는 DNA입니다. 이것의 개수는 보통 copy수라고 하는데 몇 개의 카피를 가지고 있느냐에 따라서 좋은 플라스미드, 나쁜 플라스미드로 얘기하는데 카피수가 많을수록 좋습니다.

플라스미드에다가 DNA 조각을 집어넣는다고 했는데 이 DNA 조각을 넣고서 이것이 외부에서 들어갔는지 안 들어갔는지 확인하는 방법으로서 선별표식자라는 것을 쓰게 됩니다. 플라스미드에는 특성이 있는데 항생제에 내성이 있어요. 즉, 항생제에 견딜 수 있는 능력이 이 플라스미드에 있다는 것입니다. 항생제 내성 플라스미드를 갖고 있는 박테리아를 항생제가 포함된 배양액에서 키우게 되면 박테리아가 자랄 수 있습니다. 왜냐하면 항생제가 배양액 속에 있지만 배양액 속의 항생제를 분해하는 능력을 갖도록 하기 때문에 항생제 내성 플라스미드에 DNA 조각이 들어가 있다고 하면 배양액에 항생제를 포함시켜 키울 때 박테리아가 살아남는다는 얘기입니다. 이 박테리아는 DNA단편을 계속 가질 수 있는 특징이 있고 만일 DNA단편이 이 플라스미드에 들어가지 않았으면 어떻게 되겠습니까? 미생물 배양시 박테리아가 죽어버리니까 항생제가 있는 배지에서 골라 낼 수가 있습니다.

다음으로 크기와 사본수 인데 10kb이하가 좋다고 했습니다. 거기에 적당한 것이 pUC8이라는 플라스미드와 ColEI라는 플라스미드가 있어요. 크기가 2.1kb, 6.4kb입니다. 그 외에 F라든지 TOL 이런 것들은 100kb에 가깝기 때문에 운반체로 적당하지 않다고 합니다. F 플라스미드라는 것이 있었는데 F 플라스미드는 박테리아가 가끔 유성생식을 할 때 박테리아의 유전자를 서로 교환할 때 쓰여지는 플라스미드입니다. R플라스미드라는 것은 항생제에 내성이 있다는 뜻에서 R이고 Resistance 플라스미드를 표시하는 것이고 운반체로서 R 플라스미드를 많이 사용합니다.

두 번째 운반체로서 쓰이는 것이 파아지죠. 파아지에서 대표적인 것이 두 가지가 있는데 λ 파아지와 M13이라는 파아지가 있습니다. 파아지는 바이러스 중에서 박테리아에 감염되는 바이러스를 박테리오파아지 또는 파아지라고 합니다. 바이러스는 동물 바이러스, 식물 바이러스 등이 있는데 우리가 주로 다루는 것은 박테리아에 감염되는 바이러스예요. λ 파아지를 보면 모양이 로켓같이 생겼고, 꼬리에 침이 있고 머리에 DNA가 포함되어 있는 껍데기 단백질이 있습니다. M13은 굵은 담배인 여송연 모양으로 생겼고 캡시드가 전체적으로 긴 막대형으로 되어있죠. 그 안에 DNA분자가 들어 있습니다.

파아지가 박테리아에 감염될 때 두 가지 주기를 가지고 작동합니다. 하나의 주기는 박테리아 안에 들어가 있어서 숨어서 계속 파아지 DNA가 증식이 되는 단계이고 다음에 파아지 DNA가 어느정도 증식이 되어서 밖으로 탈출하고 싶으면 박테리아를 죽이는 단계가 있죠. 첫 번째 박테리아를 죽이지 않는 단계에서는 계속 파아지 DNA가 계속 증식, 증폭이 되고 다음에 파아지 DNA에 있는 정보를 이용해서 껍데기 단백질, 캡시드 단백질을 합성해서 껍데기가 만들어지죠. 그러면 껍데기의 DNA가 들어가서 포장이 되고 완벽한 파아지가 되므로(완전한 파아지가 더 증식이 되면 다른 박테리아로 옮겨가므로) 박테리아를 녹여서 구멍을 뚫어서 탈출을 하게 됩니다. 여기에 박테리오파아지 λ 의 용원성 감염주기에서 용원성이라는 말이 나오는데 용원성이라는 것은 박테리아를 죽일 수 있는 능력, 녹인다는 뜻의 용원, 녹이는 원인이 되는 감염주기 이런 말이 나옵니다. 머리, 꼬리를 가진 파아지가 박테리아에 부착이 되어 꼬리에서 박테리아 세포막에 구멍을 뚫고 머리에 있는 DNA가 박테리아 안으로 들어갑니다. λ DNA가 박테리아 DNA로 결합이 된 후 박테리아 세포가 분열이 되면서 박테리아의 염색체 DNA로 계속 숫자가 늘어납니다. 그때 동시에 박테리아 염색체 내에 있는 파아지 λ 의 DNA도 숫자가 증가합니다. λ DNA가 분리가 된 다음에 λ DNA가 캡시드라는 단백질을 껍데기를 만들고 그리고 나서 완전히 포장되어 제대로 된 박테리오파아지가 나오면 그것이 밖으로 탈출할 때 녹여서 나오는 주기를 가지고 있습니다.

M13도 마찬가지로 박테리아 세포 안으로 들어가서 M13 DNA가 계속적으로 합성이 되고 M13 DNA분자가 포장이 되죠. 포장이 돼서 M13이 계속 나오면서 감염세포가 이 경우에는 죽지 않고 계속 증식을 하는데 이때 M13이 어떻게 튀어나오는가 그것에 대해서는 설명이 없지만 M13의 경우는 약한 파아지이기때문에 λ 와 다르게 박테리아를 죽이지 않습니다. 엄마세포가 딸세포로 가면서 계속 감염세포가 계속적으로 분열하면서 딸세포가 지속적으로 M13입자를 방출한다고 설명되어 있습니다. 이렇게 M13과 λ 가 차이가 있습니다.

λ 유전자 지도를 보면 길이가 약 50kb이고 그 중에서 앞부분은 캡시드 성분을 합성하는 유전정보가 들어있고 다음에 이 부분에 초기조절, 삽입과 제거를 조절하는 유전정보가 있습니다. 파아지만 해도 생존하는 최소의 기능을 갖고 있기 때문에 유전자 지도가 매우 단순하죠. 49kb정도만 가지고도 살아남을 수가 있습니다. 그리고 λ DNA의 선형과 원형이라는 것을 설명하면 선형으로 λ DNA가 존재 할 때는 이 두 가닥이 가운데 있고 양쪽 끝 가닥은 한 가닥씩입니다. 이것을 접착말단, 영어로는 sticky end라고 하는데 sticky end가 붙어서 동그랗게 되고 동그란 원형의 λ DNA가 되죠. 원형의 DNA가 풀어지는 것을 가르켜 롤링 서클이라고 하는데 RF라고 해서 롤링 씨클 메카니즘이라고도 부르며 이 동그랗게 뒀던 것들이 풀어지며 길

게 되면 여러개의 COS부위가 나옵니다. 여러개의 λ DNA가 다수의 COS에서 연결 되고 COS부분은 잘라지고 그러면 독립된 λ DNA가 만들어집니다. 그리고 DNA의 정보를 이용해서 많은 캡시드를 합성합니다. 합성된 캡시드와 만나서 DNA 각들이 다 포장이 되는겁니다.