

## 살아있는 세포의 DNA 정제

이 시간에는 박테리아 DNA를 어떻게 분리하는가를 설명하겠습니다. 박테리아 DNA를 분리하기 위해서는 박테리아를 배양해야 되는데 박테리아 배양이라는 것은 일반적인 미생물 배양방법입니다. 일반적인 미생물 배양방법은 삼각 플라스크에 배양액을 넣고 솜마개로 막아요. 솜마개로 막은 다음에 이것을 121°C에서 멸균 후 식히면 이 배양액이 멸균상태가 되니까 미생물이 없습니다. 우리는 여기에다가 박테리아를 접종한다고 하는데 고체배지의 박테리아를 이쑤시개로 긁어서 멸균된 액체배지에 넣어서 하루정도 키우게 되면 배양액이 탁해지면서 배양액에 박테리아가 자랍니다. 박테리아가 자란 후 이것을 분리하기 위해서 원심분리를 하면 미생물 덩어리가 바닥에 깔리게 되고 위에 배양액이 액체상태로 분리됩니다. 그러면 밑에 깔린 것을 긁어서 박테리아를 초음파 또는 화학물질로 처리하게 되면 박테리아 세포가 파괴가 됩니다. 박테리아세포를 파괴하게 되면 세포 내에 있는 여러 가지 성분, 단백질이라든지 기름성분 이런 것들과 섞여있는 DNA가 같이 추출이 됩니다. 이것에서 DNA를 제외한 다른 성분을 제거하기 위해서 DNA와 단백질의 물리화학적 성질 차이를 이용합니다. DNA는 염기를 포함하고 있기 때문에 유기용매에 잘 녹습니다. 박테리아를 배양하기 위해서는 보통 배지로서 M9배지라든지 LB배지를 쓰는데 M9배지는 배지 조성물의 내용을 다 알고 있습니다. CaCl<sub>2</sub>라든지 MgSO<sub>4</sub>같은 화학적으로 모두 정의가 되는 배지입니다. 그런데 LB배지는 Luria Broth라고 해서 천연 추출물이 포함되어 있습니다. 천연추출물은 성분이 잘 알려져 있지 않습니다. LB는 이것을 만든 사람들의 이름을 딴 것이예요.

세포가 침전된 것을 거둬서 세포를 파괴하게 되는데 세포막을 터트리는 방법에는 두 가지 방법이 있습니다. 물리적인 방법과 화학적 방법이 있습니다. 물리적인 방법은 고압으로 압력을 가했다가 압력을 갑자기 낮추면 박테리아의 세포막이 터집니다. 화학적인 방법으로 세포막의 성분을 녹이는 화학물질을 사용합니다. 예를 들면, 비누성분 SDS, NaOH로 녹이는 방법이 있고, 다음에 효소를 이용해서 구멍을 내는 방법이 있습니다. 그림에서 보면 까맣게 된 부분이 세포 껍데기, 그 안의 조그만 점들이 세포 추출물입니다. 이것을 원심분리하면 원하는 DNA가 위의 상등액에 남아있고, 세포찌꺼기는 바닥에 가라앉게 됩니다.

세포추출물이 얻어지면 세포 추출물에서 DNA를 분리합니다. 분리 방법 중에서 대표적인 방법으로 페놀과 클로로포름을 1:1로 혼합해서 세포추출물에 가하는 것입니다. 가하게 되면 용매층에 DNA가 추출이 됩니다. 용매층은 밑에 가라앉게 되고 위에 수용액 층이 존재합니다. 수용액 속에는 보통 단백질이나 지방 같은 것들이 녹고 용매 층의 페놀이 DNA를 녹여서 밑에 추출하죠. 그래서 이것을 원심분리해서 두 상을 분리하면 아래층으로부터 DNA를 얻습니다.

더욱 DNA를 정제하기 위해서 폐놀에 녹아있는 DNA를 에탄올로 처리하게 됩니다. 에탄올에 의해서 불순물이 녹고, 에탄올 용액에 유리막대를 담아서 위로 잡아당기면 솜사탕같이 가는 섬유상 DNA를 고체상으로 분리합니다.

최종의 농축해서 만든 DNA의 농도를 측정하기 위해 분광광도계를 사용합니다. 자외선 흡수 분광계를 사용하게 되는데 DNA가 자외선을 흡수하므로 280nm에서 흡광도를 측정하고 260nm에서 흡광도를 측정해서 DNA가 얼마나 순수한가를 알아볼 수가 있습니다. 이상의 비율이 1.8이 되면 아주 순수한 DNA가 얻어졌다고 말할 수 있습니다.

지금까지는 주로 염색체 DNA를 분리하는 것을 얘기했는데 지금부터 플라스미드 DNA를 분리하는 방법에 대해 설명하겠습니다. 세포에 다량으로 존재하는 염색체 DNA로부터 소량의 플라스미드 DNA만 분리해야 하는 과제를 수행하기 위해 플라스미드 DNA의 정제와 세포 염색체 DNA의 정제방법에 차이에 주목하여야 합니다. 그러면 어떻게 그 차이를 이용할 것이냐, 첫째는 크기 차이에 기초한 분리입니다. 플라스미드 DNA와 염색체 DNA는 크기에서 굉장히 차이가 납니다. 세포 용해로 얻어진 DNA 혼합물에서 플라스미드의 경우는 대단히 작고 염색체 DNA는 굉장히 커서 원심분리를 하면 플라스미드 DNA는 위에 뜨고 염색체 DNA와 세포 찌꺼기는 밑에 가라앉습니다. 두 번째는 구조차이에 의한 분리입니다. DNA는 두가지 형태가 있으며, 열린 원형이 있고, 다른 하나는 초나선형이라고 해서 꼬인 형태가 있습니다. 알칼리로 처리하게 되면 원형 DNA는 좁은 pH 범위에서 변성되는 반면, 초나선형 플라스미드는 변성이 잘 안되니까 넓은 pH에 따라서 변성이 됩니다. DNA의 변성이 열물성 변화를 유도하여 온도에 따라서 비열이 달라집니다. 우리가 보통 고분자 물질을 연구할 때 TGA(Thermogravimetric Analysis)라고 해서 열을 밖에서 가했을 때 열을 고분자 물질이 어떻게 흡수하는가를 측정해서 TGA 그림을 그립니다. TGA 그림이라는 것은 X축에는 온도가 나타나고 Y축에는 열용량이 표시되며 변성점 근처에 도달해서는 선의 기울기가 달라집니다. 그래서 Tg라는 것을 측정하게 되는데 DNA도 고분자의 일종이기 때문에 Tg를 측정할 수 있습니다. Tg가 비나선형 원형 DNA의 경우는 좁은 온도 범위에서 쉽게 나타나는데 반해서, 초나선형 플라스미드는 Tg가 넓은 범위dp 걸쳐 나타납니다.

다음에 구조에 의한 분리 방법에서 EtBr-CsCl 밀도기울기원심분리법이란 방법이 있는데 이것은 초나선형 DNA와 일반 DNA의 밀도가 아주 미세하게 차이가 나며 이 미세한 밀도 차이를 이용하여 원심분리로 분리하는 것입니다. 이 때 쓰는 원심분리 방법은 초고속의 원심분리법입니다. 보통 원심분리는 10,000 rpm 이하인데 초고속 원심분리를 하면 100,000 rpm 이상으로 하루정도 시간을 줍니다. 밀도 차

이에 의해서 DNA를 분리할 때 용액속에 EtBr-CsCl 물질을 넣게 되는데 이 화학 물질의 밀도가 원심분리관의 위에서부터 아래까지 연속적으로 변하도록 제조되기 때문에 해당밀도의 위치에 가서 DNA가 띠를 형성합니다. 띠가 만들어지면 그 띠를 원심분리가 끝난 후에 플라스틱 원심분리관에 구멍을 뚫어서 분리된 DNA를 뽑아낼 수 있습니다. 그래서 초원심분리에 의해서 꼬인 DNA와 동그란 DNA를 분리할 수 있으며 플라스미드 DNA도 분리할 수 있습니다.

주사기로 뽑아낸 DNA를 처리해야 되는데 그 이유는 DNA와 EtBr-CsCl이 섞여 있으며 EtBr-CsCl을 제거하기 위해서 투석을 합니다. 투석을 설명하면 셀로판막 재질의 봉지에 DNA와 EtBr-CsCl 혼합액을 넣어서 EtBr-CsCl이 투석막을 통해서 바깥의 수용액으로 빠져 나가도록 합니다.

다음에 과아지 DNA를 분리하는 방법을 강의하겠습니다. 일단 박테리아를 키운 다음 거기에 과아지를 감염시키면 박테리아가 녹고 박테리아 바깥에 과아지가 존재하게 됩니다. 이것을 원심분리하면 과아지는 밀도가 낮기 때문에 위에 뜨고 박테리아는 밀도가 높기 때문에 밑에 가라앉게 됩니다. 위에 뜬 것에서 과아지를 분리하면 거기서 DNA를 추출할 수 있습니다.

플라스미드 증폭을 얘기할 텐데 지난번에 사본수를 얘기했습니다, R 플라스미드라고 해서 항생제에 저항성이 있는 플라스미드가 있다고 했는데 평상 시 박테리아 안에 플라스미드가 20개 정도가 있는 반면 클로람페니콜이라는 항생제를 처리하게 되면 박테리아가 살아남으려고 플라스미드 숫자를 증가시킵니다. 이때 사본수가 100개 정도로 증가한다고 알려져 있습니다.

적정량 과아지를 얻기 위한 배양을 설명 하겠습니다.  $\lambda$ 과아지 경우  $\lambda$ 과아지가 바깥으로 빠져나오는 경우가 있고 그렇지 않은 경우가 있습니다. 30°C에서 키울 때는 박테리아 DNA와 같이 존재해서 계속 분열만 하며 과아지 DNA가 캡시드를 만들지 않고 바깥으로 빠져나오지 않기 때문에 계속 숨어있는 상태가 되는데 이것을 42°C로 만들면 박테리아의 염색체와  $\lambda$ 과아지 DNA가 분리가 됩니다.  $\lambda$ 과아지 DNA가 분리가 될 때 캡시드를 만들고 캡시드를 만들면 과아지가 계속 증식을 해서 박테리아를 용해한 후 바깥으로 나옵니다. 이런 두 단계가 있으니까 30°C나 42°C나 차이를 이용해서 외부에 유출된  $\lambda$ 과아지를 정제할 것이냐 내부에 잠재된  $\lambda$ 과아지를 정제할 것이냐 이런 선택의 문제가 있습니다. 비용원성  $\lambda$ 과아지의 정제는 박테리아를 죽이지 않는 경우입니다.

과아지가 박테리아를 녹일 때 세가지 경우가 있습니다. 배양액 밀도가 아주 적을 때, 즉 박테리아 마리수가 작을 때  $\lambda$ 과아지를 접종하게 되면  $\lambda$ 과아지가 빨리 박테리아를 죽여 버리기 때문에 과아지의 적정량이 작습니다. 한편 배양액의 밀도가

클 때 파아지를 감염시키면 용해된 박테리아가 소수이고 용해되지 않은 박테리아가 대부분인 경우가 있습니다. 이때도 파아지의 적정량은 낮습니다. 배양액의 밀도가 적당할 때, 즉 박테리아 숫자가 적당할 때는 파아지의 적정량, 파아지의 농도가 최대가 됩니다. 이때는 박테리아 밀도가 높을 때와 비교해서 대부분의 박테리아가 터져서 파아지가 많은 상태입니다. 그래서  $\lambda$ 파아지를 만들 때 박테리아의 농도가 중요합니다. 세포 분열 속도가 최대가 될 때 파아지를 첨가하지 말고 박테리아 세포가 적당한 속도로 자랄 때 파아지를 넣어야 합니다.

파아지를 박테리아에 감염시켜 박테리아를 녹인 다음에 박테리아와 파아지를 분리하는 방법에 대해서 설명하는데 파아지 입자는 매우 작기 때문에 밀도도 매우 작습니다. 박테리아는 원심 분리해서 침전으로 보내고 파아지 입자는 상등액체에 남도록 합니다. 그림에 보면 파아지 현탁액이라고 해서 파아지가 액체에 떠 있습니다. 파아지를 다음단계에서 분리하기 쉽게 하기 위해 PEG(Polyethylene Glycol) 고분자 물질과 NaCl을 첨가하면 파아지끼리 응집을 하게 됩니다. 응집하면 입자크기가 커지고 원심분리에 의해서 침전으로 보낼 수 있습니다.

이제 파아지 입자의 DNA 정제를 할 단계입니다. PEG 처리에 의해서 침전이 된 파아지에서 단백질을 제거하고 나머지 DNA를 다음과 같이 분리합니다. CsCl로 밀도변화를 준 원심분리관에 파아지 용액을 넣고 초고속원심분리를 하면 밀도가 1.47위치에서 파아지 DNA가 띠를 이루게 되고 이 띠를 다시 주사기로 뽑아서 분리하게 됩니다.

지금까지  $\lambda$ 파아지 분리에 대해서 얘기했고, m13 DNA정제에서의 몇가지 차이점에 대해 얘기를 하겠습니다. 여기서도 감염세포 배양액을 원심분리하게 되면 침전된 세포가 있고 위쪽의 액체 속에 m13 파아지가 있습니다. 여기에 PEG를 첨가한 후에 원심분리하게 되면 PEG 때문에 m13이 침전되어 떨어지게 됩니다. 침전된 파아지를 긁어서 완충용액에 녹인 다음에 여기에 단백질을 제거하기 위해서 페놀을 첨가하면 페놀이 밑에 가라앉고 단백질이 중간에 있고, 위에 m13 DNA가 있는 이런 상태가 됩니다. m13 수용액속에 에탄올을 첨가하게 되면 m13 DNA가 침전이 되고 이 침전을 긁게 되면 m13 DNA를 얻게 됩니다.