遺傳子工學을 應用한 遺傳子의 切斷과 結合(下)

柳 洲 鉉
〈延世大學校 食品工學科 教授〉

魚 住 武 司
〈東京大學校 農藝化學科 助教授〉

(2) Terminal transferase법

제한효소와 DNA ligase에 의한 시험관내 遺傳子 再結合 方法은 간편하지만 유전자가 절단되는 곳이 제한되어 있고, 목적하는 유전효소자 內部에 절단되는 곳이 있는 경우에는 제한를 사용할 수 없다. 또한 고등동물의 *m*RNA를 정제하여 여기에다 reverse transcriptase를 작용시켜 *c*DNA를 만드는 경우에는 요구하는 DNA의 양쪽에 餘分의 DNA가 부착되어 있지 않기 때문에 제한효소에 의한 cohesive end를 만들 수가 없다. 이와 같은 경우에는 임의의 *c*DNA의 3′ OH의 兩末端에 DNA의 homopolymer를 부가할 수 있는 terminal transferase에 의해 DNA를 연결한다. terminal transferase法은 初期[17]에는 시험관 내에서 완전한 再結合體를 만들기 위해서는 λ exonuclease, DNA polymerase, exonuclease Ⅲ 및 terminal transferase를 모두 作用시켜야 했으나 最近에는 terminal transferase만으로도 再結合體를 만들 수 있다.[18]

Uozumi등[19]이 terminal transferase法에 의해 pSC 101과 RSF 2124를 연결한 例를 그림 4에 表示하여 본다. pSC 101과 RSF 2124를 *Eco* RI 효소로 각각 한군데를 절단하여 直鎖의 分子로 만든다. 이 DNA分子의 양쪽 말단은 5′측(AATT-)이 튀어 나오고 3′ OH 말단이 들어간 형태이다. terminal transferase는 3′ OH 말단에 DNA의 polymer를 연결시키는 성질이 있으며 3′ OH 말단이 들어간 경우에는 부가 반응이 잘 일어나지 않으나 Co^{++} 存在下에서는 들어간 3′ OH 말단에도 부가 반응이 일어날 수 있기(Roycl oudhury 등[20]) 때문에 Co^{++} ion 존재下에서 반응을 시킨다.

Terminal transferase(이하 TdT로 생략함)에 의한 $(dA)_n$의 부가는 $(dT)_n$의 부가보다도 어려운 문제가 있으나 3′OH 말단에 150잔기를 부가시키기 위한 조건은 다음과 같다. 즉 RSF 2124의 양 3′OH 말단에 $(dA)_{150}$을 부가하기 위해서는 〔RSF 2124 DNA 3μg, 100 mM K-cacodylate, 30mM Tris, pH 7.6, BSA (bovine serum albumin) 100μg/m*l*, 0.4mM dATP, 1.1mM Co^{++}, TdT 9 Unit〕(全容量 120μ*l*)에서 37°C 105분간의 반응이 필요하다. 한편 pSC 101의 3′OH 兩말단에 $(dT)_{150}$을 부가하기 위하여는 〔pSC 101 DNA 2.5μg, 100

mM K-cocadylate, 30mM Tris, pH 7.6, BSA 100 $\mu g/ml$, 0.2mM dTTP, 1.3mM Co^{++}, TdT 3units〕(全容量 120μl)에서 25°C 33분간 반응시키면 된다.

이와 같이 하여 얻어진 RSF 2124—$(dA)_{150}$과 pSC 101—$(dT)_{150}$을 각각 phenol로 추출하여 TdT를 失活시켜 제거하고 DNA를 ethanol로 침전시켜 회수하여 兩者를〔10mM Tris-HCl, pH 8.0—0.2M NaCl—1mM EDTA) 0.5ml에 혼합하여 50°C에서 1시간 방치한 후 −3°C/hr의 속도로 10°C까지 냉각하여 $(dA)_n$과 $(dT)_n$을 annealing시킨다. 그 일부를 취하여 agarose gel electrophoresis를 하여 두개의 DNA가 서로 annealing하여 고분자의 band로 되었는 지를 확인한다.

이와 같이 annealing한 DNA의 혼합물을 $CaCl_2$ 처리한 *E. coli* C 600r^-, m^-에 넣어 형질전환하여 ampicillin (AP) 30 $\mu g/ml$과 tetracycline(Tc) 10$\mu g/ml$를 함유한 平板培地에서 배양하여 약 1,000개의 colony를 얻었다. 이 가운데 5株를 선택하여 그 분자량이 親株의 plasmid가 서로

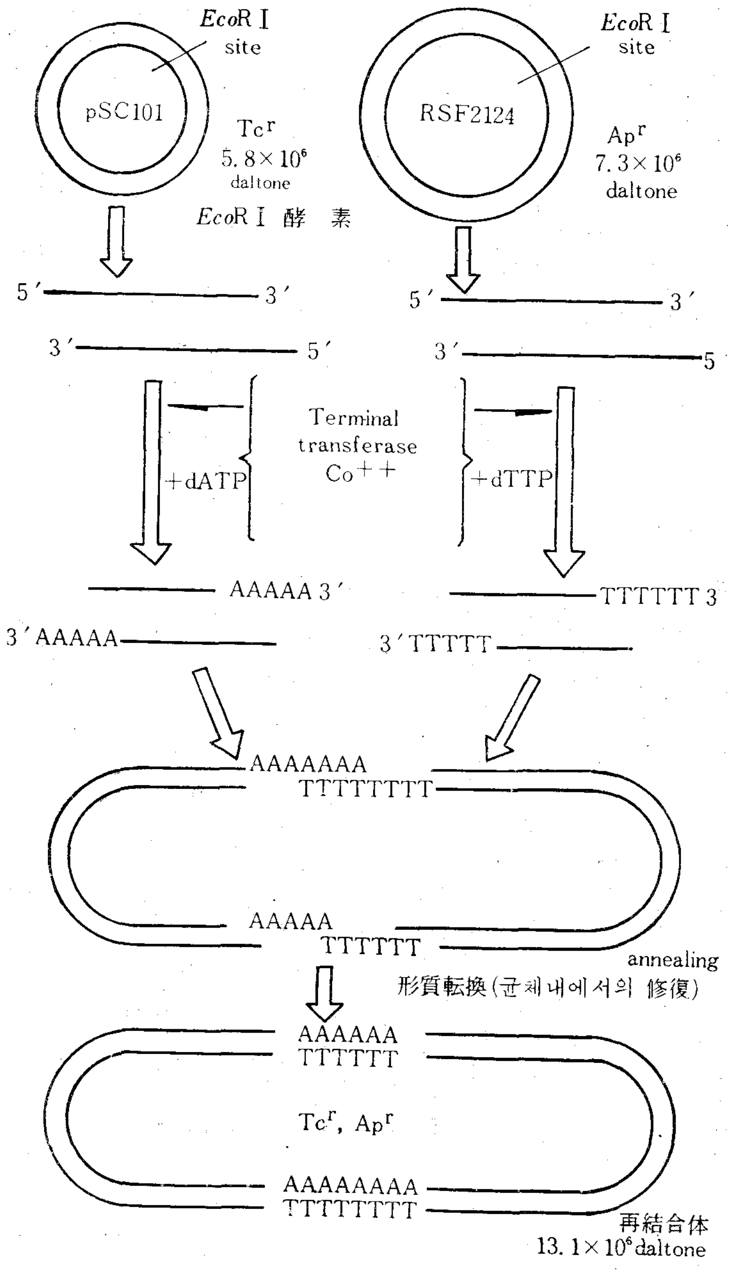

그림 4. Terminal transferase 法(polydapolyd T 法)에 의한 再結合體의 형성

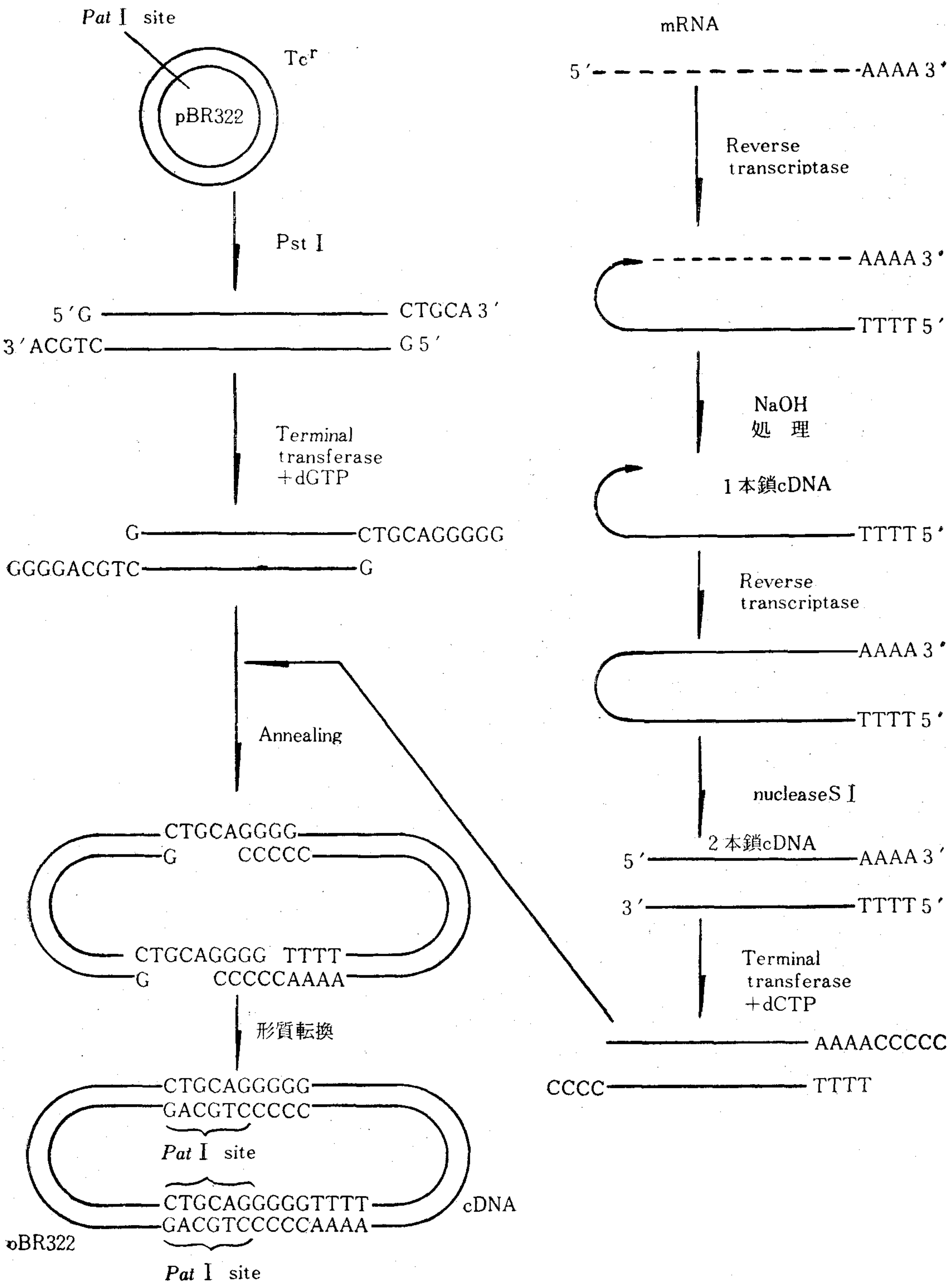

그림 5. **Terminal transferlase 法(polyd G-dC 法)에 의한 再結合體의 형성**

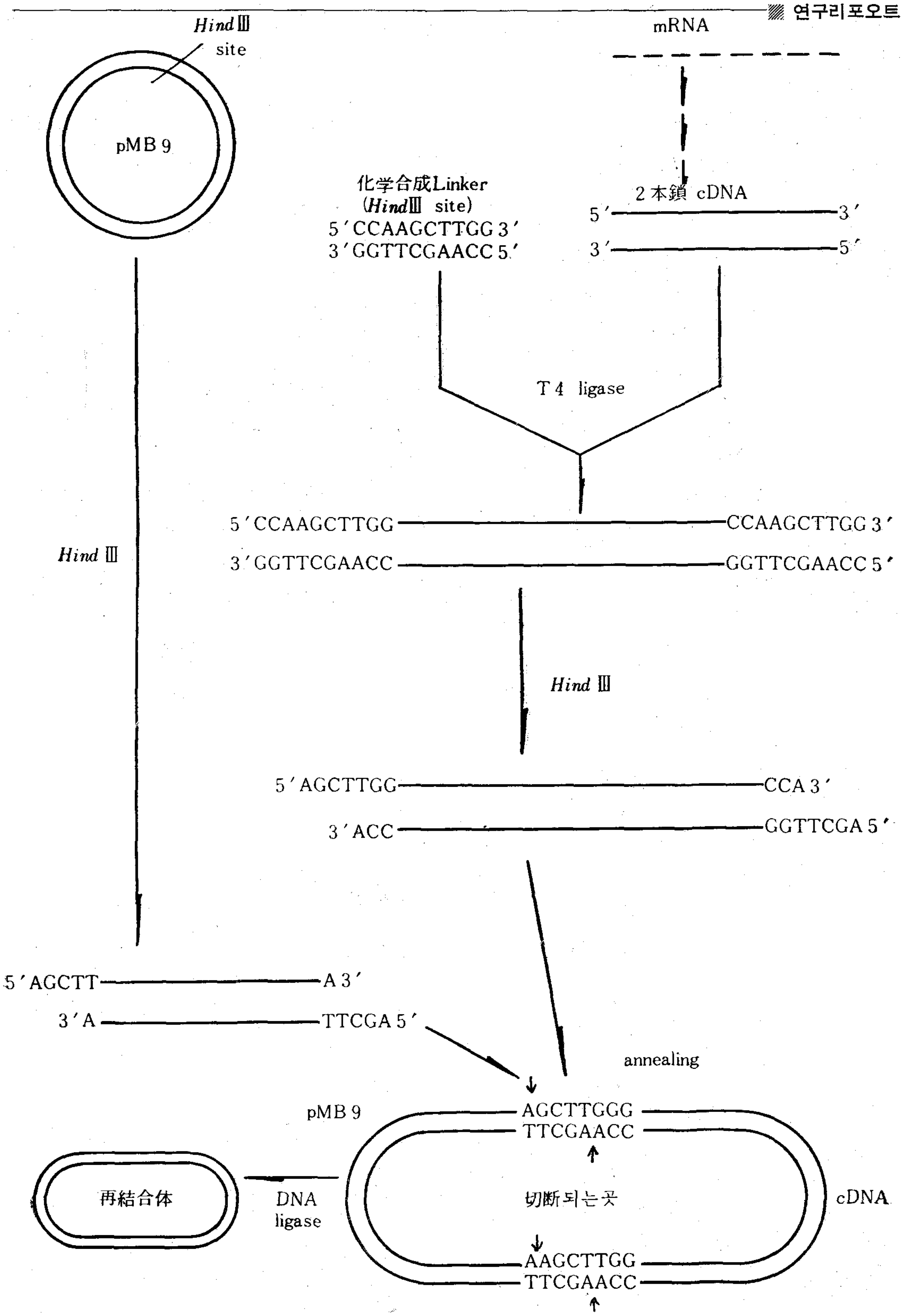

그림 6. Linker 法에 의한 再結合體의 형성

연결된 것인가를 확인한다. 또한 RSF 2124의 *Eco* RI site에는 *Col*El 生産性 유전자가 있으나 再結合體에는 이 유전자가 분단되어 예상한 바와 같이 *Col* El 생산성을 잃어버린 것이 확인되었다. 또한 여기서 얻어진 再結合體(recombinant)는 *Eco* RI site가 poly A와 poly T에 의해 치환되었기 때문에 *Eco* RI에 의하여 절단되지 않는다.

Terminal transferase法에 의해 DNA를 연결할 때는 효소를 순수하게 정제하여 DNase를 함유하지 않은 제품을 얻을 필요가 있다. Uozumi 등은 이 효소를 Chang등[21]의 方法에 의해 송아지의 胸腺으로부터 정제하여 이용하였으며 DNA의 연결을 위하여 문헌에 의한 방법보다 한번 더 hydroxyl apatite column에 의해 정제하여 DNase를 제거할 필요가 있다. TdT法에 의한 DNA의 연결에서 注意할 점은 plasmid중에 存在하는 RNA이다. 1회의 CsCl-ethidium bromide 원심분리에 의해 만들어진 plasmid DNA중에는 상당량의 저분자 RNA(*t* RNA등)가 함유되어 있다. 저분자 RNA가 존재하면 그 3′OH 말단에도 TdT에 의한 $(dA)_n$ 혹은 $(dT)_n$이 부가되어 DNA와 DNA간의 연결을 저해한다. 그러므로 plasmid를 RNase T_1 및 RNase A로 처리한 후 Sepharose 6B column에 의해 RNA를 제거한 후 DNA를 이용하여 TdT를 반응시킬 필요가 있다. 위의 실험에서는 DNA연결 조건을 검토하기 위하여 길고 같은 형태의 DNA를 얻을 필요가 있기 때문에 plasmid를 直鎖로 하기 위하여 *Eco* RI을 이용하였지만 TdT法에 의한 DNA의 연결은 DNA를 任意의 方法(Shearing force 등)으로 절단하여 이용하는 것도 가능하다.

Terminal transferase를 이용하여 DNA의 양쪽 3′OH 말단에 $(dC)_n$ 혹은 $(dG)_n$을 부가하여 DNA를 연결하는 방법이 최근에 널리 이용되고 있다. 이 방법을 이용하여 plasmid의 *Pst* I site에 다른 DNA를 삽입한 경우에는 *Pst* I site가 보존되기 때문에 clone化된 DNA도 *Pst* I에 의해 절단할 수 있다. 이 방법을 그림으로 표시하면 그림 5와 같다. Villa-Komaroff등[22]은 이와같은 방법으로 rat의 preproinsulin의 *c*DNA를 pBR 322의 *Pst* I site에 삽입하였다. annealing한 DNA를 *E. coli*에 가하여 형질전환을 시키면 균체 내에서 DNA의 절단 부분이 修復복사되고 완전히 연결되어 *Pst* I site가 再生된다. 따라서 이 경우 pBR 322가 생산하는 penicillinase의 단백질 중간에 insulin의 peptide가 연결되어 菌體 내에서 合成되는 것이 報告되고 있다.

(3) 화학합성 Linker法

이 方法은 *Eco* RI, *Hind* Ⅲ 등의 cohesive restriction site를 가진 저분자의 DNA 斷片(Linker라 칭한다.)을 化學合成하여 이것을 임의의 DNA 兩末端에 T_4 ligase로 연결하고 그 후 cohesive end를 이용하여 이 DNA를 vector에 삽입한다(그림 6). Ullrich등[22]은 이 방법에 의해 rat insulin의 *c*DNA를 plasmid pMB9에 연결하여 *E. coli*에 도입하였다. 한편 Linker의 합성법에 대하여는 Scheller[24]의 문헌이 있고 이러한 合成 peptide는 미국에서 시판되고 있기 때문에 수입이 가능하다.

5 形質轉換의 方法

시험관 내에서 再結合體를 만들면 대부분 目的으로하는 完全한 再結合體 이 외에 不完全하게 연결된 것, 목적으로 하지않는 再結合

體등 각종 분자의 混合物로 된다. 이들이 형질전환에 의해 미생물에 導入되면 불완전한 것은 균체내에서 修復되고 잡다한 DNA는 개개의 미생물에 분배되어 single colony 분리에 의해 clone化된다. 특히 terminal transferase法의 경우에는 2종의 DNA는 poly dA-poly dT 혹은 poly dG-poly dC에 의해 시험관 내에서 annealing만된 상태이고 兩者는 공유결합에 의해 결합되지는 않는다. 이것들은 형질전환에 의해 균에 들어가 균체 내에서 DNA polymerase, DNA ligase등의 작용으로 修復되어 완전한 再結合體로 된다. 그러므로 terminal transferase法의 경우에는 형질전환의 조작은 再結合體를 만드는 과정에서 중요한 일부분이 된다.

대장균[25~28], *Salmonella*, *Pseudomonas*등[27]의 형질전환에는 log phase의 균체를 냉각한 $CaCl_2$용액에서, 초기에 사용한 방법[25]에서는 균을 合成培地에서 배양하여 log phase의 균을 이용하면 형질전환의 효율은 $10^5/\mu g$ DNA 이하였다. 그러나 후에 L-broth가 이용되고[26,27] competent cell을 만들기 위하여 $MgCl_2$와 $CaCl_2$를 같이 사용하면 효율이 $10^6/\mu g$ DNA 정도로 상승하였다. 더우기 Norgard등[28]이 특히 EK2 host의 X1776用으로 개발한 새로운 방법에서는 $10^7/\mu g$ DNA까지 효율이 높아졌다. 이 방법은 Uozumi등이 *E. coli* C-600에 대하여 처리한 결과 약 $10^7/\mu g$ DNA까지 효율이 높아졌다. 그 방법은 다음과 같다. C 600 r^-, m^-을 L-broth(pepton 10g, yeast extract 5g, glucose 1g, NaCl 5g, H_2O 1*l*, pH 7.2) 10m*l*에서 L tube로 하룻밤 배양한다. 이 배양액 0.1m*l*를 미리 加溫한 L broth 10m*l*에 접종하여 18mm의 L tube로 37°C에서 진탕배양한다. 비색계(spectronic 20)에서 $O.D._{550}$≑0.3 되었을 때 얼음에서 냉각하여 5°C에서 3,500rpm 10분간 원심분리하여 균을 모은다. 침전된 균체에 0°C의 〔0.1M NaCl, 5mM $MgCl_2$, 5mM Tris-HCl, pH 7.6〕을 5m*l*가하여 현탁한 후 6°C에서 3,500rpm 5分 원심분리하여 다시 균체를 모은다. 이와 같은 균체의 세척을 한번 더 반복한다. 침전에 0°C의 〔100mM $CaCl_2$, 250mM KCl, 5mM $MgCl_2$, 5mM Tris-HCl, pH 7.6〕 4m*l*을 가하여 균체를 현탁하여 0°C에서 25분간 방치한다. 3,500rpm 5분 원심분리하여 침전된 균체를 위의 $CaCl_2$ 등을 함유한 액 0.4m*l*에 현탁한다. TEN buffer 〔20mM NaCl, 1mM EDTA·Na_2, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0〕로 희석한 plasmid pBR 322의 DNA 1mg(4m*l*)을 加하여 0°C에서 60분간 방치하면서 10분마다 천천히 교반한다. 이것을 희석하여 미리 냉각한 평판 한천배지(Tc함유)에 도말하여 37°C에서 배양한다. 이 결과 1ng DNA당 5만개의 Tc^r colony가 얻어졌다. 1μg당으로 환산하면 5×10^7에 상당한다.

*Bacillus*의 형질전환은 基本的으로 Anagnostopoulos등[29]의 방법이 그대로 이용되고 있다. Uozumi 등이 *B. subtilis* RM 125 arg, leu, r^-, m^-[31]에 대하여 실험한 방법은 다음과 같다. RM 125를 Nutrient broth에 하룻밤 배양하여 0.2m*l*를 M1〔Spizizen의 최소배지+yeast extract 0.2%, arginine 250μg/m*l*, leucine 50μg/m*l*〕 2m*l*에 접종하여 직경 18mm의 Ltube에서 37°C, 4시간 진탕배양한다. 배양액 0.2m*l*를 M2〔Spizizen의 최소배지(단 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$는 0.12%)+yeast extract 0.02%, arginine 50μg/m*l*, leucine 5μg/m*l*〕 2m*l*에 접종하여 37°C, 1.5시간 진탕배양한다.

여기에서 competent cell이 만들어지는데

이것에 직접 plasmid DNA를 가하여 형질전환을 할 수 있다. Dubnau 등의 方法[30]에 의해 competent cell을 동결보존하여 필요할 때 사용하면 편리하다. competent cell을 0°C, 8,000rpm 15分간 원심분리하여 균을 모은다. 균체에 원래 배양한 액량의 9/100에 해당하는 상등액과 9/100 volume의 glycerol을 가하여 현탁하여 0.2~0.5ml씩 작은 시험관에 분주하여 액체질소에서 급속히 냉동시켜 −80°C의 deep freezer에 보존한다. 보존균을 사용할 때에는 동결한 균을 45°C에서 빨리 용해하여 competent cell 0.1ml에 대하여 plasmid DNA 0.1~0.5μg을 가하고 37°C에서 45분간 진탕한다. 그 후 Nutrient broth 0.2ml를 가하여 37°C에서 90分 배양하여 약제 내성을 나타내게한 후 선택배지에 도말한다. 형질전환의 효율은 plasmid에 따라 다르나 10^3~10^6/μg DNA 이다.

방선균의 형질전환에 대하여는 Bibb등[32]이 protoplast와 polyethylene glycol을 이용하는 방법을 보고하고 있는 데 참고하면 좋다.

참 고 문 헌

1) Guerry, P., LeBlanc, D.J., Falkow, S. ; General method for the isolation of plasmid DNA, *J. Bacteriol.* **116,** 1064—1066(1973).

2) Tanaka, T., Weisblum, B. ; Construction of a *Colicin* EI-R composite plasmid in vitro Means for amplification of DNA, *J. Bacteriol.* **121,** 354—362(1975).

3) Humphreys, G.O., Willshaw, G.A., Anderson, E.S. ; A simple method for the preparation of large quantities of pure plasmid DNA, *Biochim. Biophys. Acta,* **383,** 457—463(1975).

4) Schindler, C.A., Schulhardt, V.T. ; Lysostaphin : A new bacteriolitic agent for the *Staphylococcus, Proc. Nat. Acad. Sci. USA,* **51,** 414—421(1964).

5) Lindberg, M., Sjostrom, J.E., Johansson, T. ; Tansformation of chromosomal and plasmid charters in *Staphylococcus aureus, J. Bacteriol.* **109,** 844—847(1972).

6) Horinouchi, S., Uozumi, T., Beppu, T., Arima, K. ; A new isolation method of plasmids DNA from *Staphylococcus aureus* using a lytic enzyme of *Achromobacter lyticus, Agric. Biol. Chem.,* **41,** 2487—2489 (1977).

7) Tanaka, T., Kuroda, M., Sakaguchi, K. ; Isolation and characterization of four plasmids from *B. subtilis, J. Bacteriol.* **129,** 1487—1494(1977).

8) Hansen, J.B., Olsen, R.H. ; Inc P2 group of *Pseudomonas*, a class of uniquely large plasmids, *Nature,* **274** ; 715—717(1978).

9) Hansen, J.B., Olsen, R.H. ; Isolation of large bacterial plasmids and characterization of the P2 incompatibility group plasmids pMG1 and pGM5, *J. Bacteriol.* **135,** 227—238 (1978).

10) Yagisawa, M., Huang, T-S.R., Davies, J. E. ; Possible involvement of plasmids in biosynthesis of neomycin, *J. Antibiotics,* **31,** 809—813(1978).

11) Schrempf, H., Goebel, W. ; Characterization of a plasmid from *Streptomyces coelicolor* A3(2), *J. Bacteriol,* **131,** 251—258(1977),

12) 魚住武司, 下津秀則, 堀之內末治, 別府輝彥 ; 「放線菌プラスミッドの検索」, 日本農藝化學會昭和53年度大會講演旨集, p.41, 2D—17(1978).

13) 外山博視, 市原賢, 岡西昌則, 梅澤浜夫 ;「抗生物質オ I レオスリシンの生合成とプラスミィドの役割(第2報)無細胞液を用しての檢討」, 日本農藝化學會昭和53年度大會講演要旨集, p.38, 2D—12(1978).

14) Horinouchi, S., Uozumi, T., Hoshino, T., Ozaki, A., Nakajima, S., Beppu, T., Arima, K. ; *B. subtilis,* plasmid in *E. coli, Molec. Gen. Genet,* **157,** 175—182(1977).

15) Horinouchi, S., Uozumi, T., Beppu, T. ;

Electron microscopy and restriction endonuclease analysis of RSF 2124-pLS11 composite plasmid constructed in vitro, *Agric, Biol. Chem.* **42,** 1841—1846(1978).

16) Modrich, P., Anraku, Y., Lehman, I.R. ; DNA ligase : Isolation and physical characterization of the homogeneous enzyme from *E. coli, J. Biol. Chem,* **248,** 7495—7501 (1973).

17) Jackson, D.A., Symons, R.H., Berg, P ; Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of SV40 : Circular SV40 DNA molecules containing λ phage genes and galactose operon of *E. coli, Proc. Nat. Acad. Sci. USA,* **69,** 2904—2909(1972).

18) Clarke, L., Carbon, J. ; A colony bank containing synthetic *Col*E1 hybrid plasmids representative of entire *E. coli* genome, *Cell.* **9,** 91—99(1976).

19) 西森克彦 ; 修士論文「異種 DNAによる細菌の形質轉換」(東京大學, 昭和 54年3月).

20) Roychoudhury, R., Ernest, J., Wu, R. ; Terminal labeling and addition of homopolymer tracts to duplex DNA fragments by terminal deoxynucleotidyl transferase, *Nucleic Acid Research,* **3,** 863—877(1976).

21) Chang L, M.S., Bollum, F.J. ; DNA-polymerizing enzymes of calf thymus gland : V. Homogeneous terminal deoxynucleotidyl transferase, *J. Biol. Chem,* **246,** 909—916 (1971).

22) Villa-Komaroff, L., Efstratiadis, A., Broome, S., Lomedico, P., Tizard, R., Naber, S.P., Chick, W.L., Gilbert, W. ; A bacterial clone synthesizing proinsulin, *Proc. Natl. Acd. Sci. USA,* **75,** 3727—3731(1978).

23) Ullrich, A. Shine, J., Chirgwin, J., Pictet, R., Tischer, E., Rutter, W.J., Goodman, H. M. ; Rat insulin genes : Construction of plasmids containing the coding sequences, *Science,* **196,** 1313—1319(1977).

24) Scheller, R.H., Dickerson, R.E., Boyer, H. W., Riggs, A.D., Itakura, K. ; Chemical symthesis of restriction enzyme recognition sites useful for cloning, *Science,* **196,** 177—180(1977).

25) Cohen, S.N., Chang, A.C.Y., Hsu, L. ; Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria : Genetic transformation of *E. coli* by R-factor DNA, *Proc. Nat. Acad, Sci. USA,* **69,** 2110—2114(1972).

26) Lederberg, E.M., Cohen, S.N. ; Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid DNA, *J. Bacteriol,* **119,** 1072—1074 (1974).

27) Chakrabarty, A.M., Mylroie, J.R., Friello, D.A., Vacca, J. G. ; Transformation of *Pseudomonas putida* and *E. coli* with plasmid-linked drug-resistance factor DNA, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA,* **72,** 3647—3651 (1975).

28) Norgard, M.V., Keem, K., Monahan, J.J. ; Factors affecting the transformation of *E. coli* strain X 1776 by pBR 322 plasmid DNA, *Gene,* **3,** 279—292(1978).

29) Anagnostopoulos, C., Spizizen, J. ; Requirements for transformation in *Bacillus subtillis, J. Bacteriol,* **81,** 741—746(1961).

30) Dubnau, D., Davidoff-Abelson, R. ; Fate of transforming DNA following uptake by competent *Bacillus subtilis* I. Formation and Properties of the donor-recipient complex, *J. Mol. Biol,* **56,** 209—221(1971).

31) Uozumi, T., Hoshino, T., Miwa, K., Horinouchi, S., Beppu, T., Arima, K,. ; Restiction and modification in *Bacillus* species : Genetic transformation of bacteria with DNA from different species, Part 1, *Molec. Gen. Genet,* **152,** 65—69, 1977.

32) Bibb, M.J., Ward, J.M., Hopwood, D.A. ; Transformation of plasmid DNA into *Streptomyces* at high frequency, *Nature,* **274,** 398—400(1978).

33) Blin, N., Gabain, A.V., Bujard, H. ; Isolation of large molecular weight DNA from agarose gels for further digestion by restriction enzymes, *FEBS Letters,* **53,** 84—86(1976).