

vWF A3 Gene Cloning

참여기간: 160704 ~ 150729

참여연구실: 친환경 생체모사 재료연구실

지도교수: 황동수 교수님

소속: 부산대학교 해양학과

이름: 박지현

목 차

| | |
|--------------------------|---|
| 1. 서론 | 2 |
| 1.1. 실험목적 | |
| 1.2. 주요 실험기구 및 시약 | |
| 2. 본론 | 3 |
| 2.1. 유전자 클로닝 | |
| 2.2. 실험과정, 실험결과 | |
| 2.2.1. PCR | |
| 2.2.2. Electrophoresis | |
| 2.2.3. Gel purification | |
| 2.2.4. Digestion | |
| 2.2.5. Ligation | |
| 2.2.6. Transformation | |
| 2.2.7. Pick | |
| 2.2.8. Plasmid mini prep | |
| 3. 결론 | 8 |
| 4. 참고문헌 | 8 |

1. 서론

1.1. 실험목적

홍합은 족사(byssus thread)를 이용하여 거의 대부분의 건조·수중 환경 표면에서 강하게 붙어서 자라는 연체동물문에 속하는 수중생물이다. 홍합의 족사는 미세섬유 조직 속에 박혀있는 PreCol-P(elastin 같고, 히스티딘이 풍부한 domains)같은 섬유질의 콜라겐으로 구성되어 있다. 이 콜라겐에 붙어서 신축성 있게 해주는 역할은 수용성 비콜라겐 단백질인 PTMP1(Proximal Tread Matrix Protein 1)이며 이는 우선적으로 각각의 족사의 proximal 부분에 주로 위치해있으며, distal부분으로 갈수록 감소한다.(Figure 1) PTMP1은 2개의 sequence stretches로 구성되어 있으며 이는 홍합의 콜라겐을 조합함으로써 콜라겐을 꼭 붙잡을 수 있는 역할을 하는 von Willebrand factor type A3 (vWF A3) domains의 그룹과 상응한다. vWF는 콜라겐 I 과Ⅲ를 포함한 다양한 ligands에 잘 붙을 수 있다고 알려져 있고, hemostasis(지혈작용)에 필수적이다. 이번 실험에서는 이러한 vWF A3 gene을 유전자 클로닝으로 4개를 이어 붙일 것이다. 콜라겐은 α -helix 3개로 fiber한 형태임으로 3D-printing할 때 콜라겐만 프린팅하면 형태를 잡지 못한다. 근데, vWF A3 gene을 같이 넣어 3D-printing 하면, 형태를 잡아줄 수 있다는 가정 하에 한 달 동안 실험을 진행해 보았다.

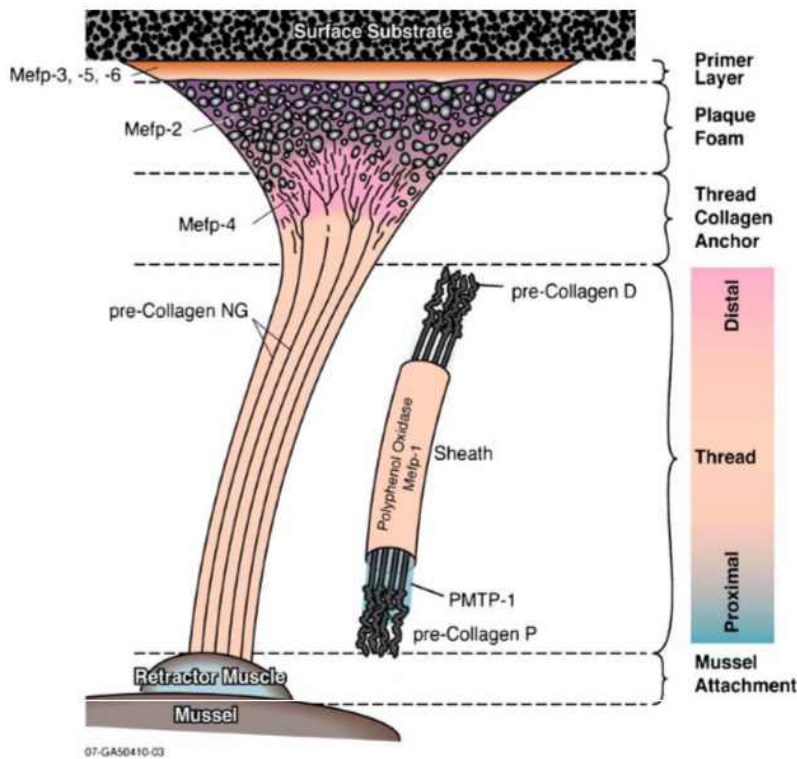


Figure 1. M.edulis의 족사 구성 단백질 위치

1.2. 주요 실험기구 및 시약

실험 기구는 LB 배지를 만들 때 고압, 고온으로 멸균시켜주는 autoclave, DNA를 증폭시켜 주는 PCR기기, DNA, RNA, protein과 같은 큰분자들을 전기적으로 크기에 따라 서로 분리시켜주는 DNA electrophoresis, DNA를 관찰 할 수 있게 하는 UV transilluminator, 배양기 incubator등이 쓰였고 시약은 EtBr, TAE buffer, GB, NW, EB buffer, S1, S2, S3 buffer, AW buffer등이 사용되었다.

2. 본론

2.1. 유전자 클로닝

유전자 클로닝(gene cloning)이란 특정한 유전자만을 세포에서 꺼내 단일 유전자를 원핵세포 또는 진핵세포에 넣어 증가시키는 현상, 또는 유전자재조합에 의해 만든 특정 유전자를 벡터(유전자의 운반자)에 결합시켜 대장균 등의 숙주에서 증식하여 균일한 유전자 집단 클론(clone:무성생식적인 증식에 의해 생긴 개체와 동일한 유전적 구성을 갖는 개체의 집단)을 만드는 기술을 말한다. 유전자 클로닝은 원하는 target 단백질을 짧은 시간에 다량으로 얻을 수 있어 많은 분야에서 이용된다.

2.2. 실험과정, 실험결과

2.2.1. PCR

PCR((Polymerase Chain Reaction)이란 미량의 DNA 또는 RNA의 특정영역을 시험관 내에 대량으로 증폭하는 기술이다. PCR은 세 가지 반응단계로 이루어져 있다.(Figure 2)

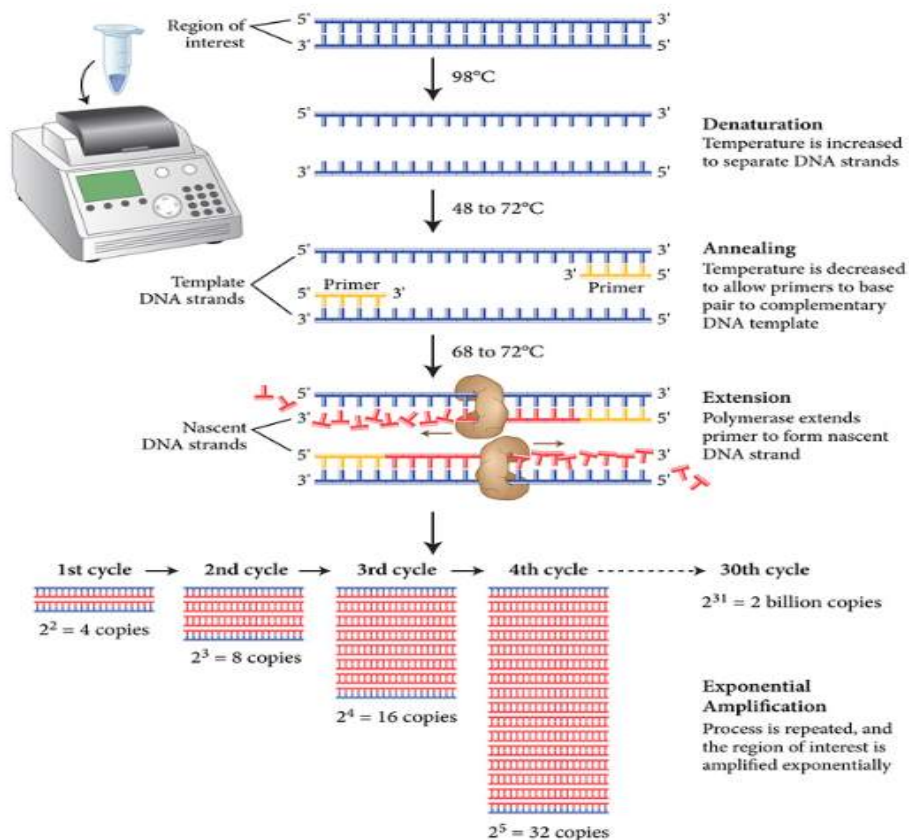


Figure 2. PCR 원리: 목적하는 DNA영역을 사이에 둔 2종류의 primer를 사용하여 연속적인 효소반응으로 증폭시키는 방법, <https://www.neb.com>

DNA 변성(Denaturation)이란, DNA 두 가닥을 약 94~98°C에서 15~30초간 처리하여 수소결합을 절단하여 각각 한 가닥의 DNA로 분리시키는 것이다. 이때 온도가 너무 높거나 처리시간을 지나치게 늘리면 내열성 DNA 중합효소(Polymerase)라 해도 활성을 잃게 되므로 주의가 필요하다. Annealing은 앞

서 열처리로 한 가닥으로 변성한 DNA와 primer를 공존시킨 후 온도를 낮추면 2종류의 primer는 각각 상보적인 한 가닥의 주형 DNA(Template DNA)에 결합한다. Annealing에 가장 적합한 온도와 시간은 primer의 염기배열과 그 길이에 따라 결정되지만 일반적으로 55℃에서 30초~1분간 이루어진다. 신장반응(Extension)이란, 다시 68℃로 온도를 올려 DNA polymerase를 작용시켜 primer를 신장시키는 반응이다. 그리고 다시 94℃로 가열하여 2번째 cycle을 수행하고, 이를 30번 반복 시 표적배열은 2^{31} 가 되지만 실제로는 이보다 낮다.

실험에 사용된 PCR의 조성은 distilled water(9μl), green PCR kit(10μl), Bioneer vWF gene plasmid(0.2μl), forward primer(0.4μl), reverse primer(0.4μl)로 총 20μl이다.

2.2.2. Electrophoresis

PCR 이후에는 굳힌 agarose gel(0.4g)과 1X TAE buffer(40ml)를 DNA loading system에 넣고, DNA ladder와 PCR product를 loading하여 전기영동 한다.(Figure 3) Electrophoresis(전기영동)이란 DNA, RNA, protein과 같은 큰분자들을 전기적인 힘을 이용하여 gel에서 이동시켜 크기에 따라 서로 분리하는 기술이다. DNA는 backbone의 phosphate group 때문에 전기영동에 사용되는 buffer에서 음전하를 띤다. 이때 DNA분자가 gel matrix사이를 통과하는 속도는 분자량이 커질수록 늦어지며 gel matrix가 치밀할수록(gel %가 높을수록) 늦어진다. 또한 DNA분자량이 같더라도 구조에 따라서 움직이는 속도가 다르다. 예를 들면 supercoiled DNA는 circular DNA보다 빠르게 움직인다. 전기영동을 약 20분간 진행한 뒤, UV transilluminator로 PCR로 증폭된 DNA를 볼 수 있다.(Figure 4) DNA는 무색으로 눈에 보이지 않지만, EtBr(Ethidium Bromide)을 이용하면 DNA의 base사이에 끼여 들며 자외선 하에서 DNA band를 쉽게 관찰할 수 있다.

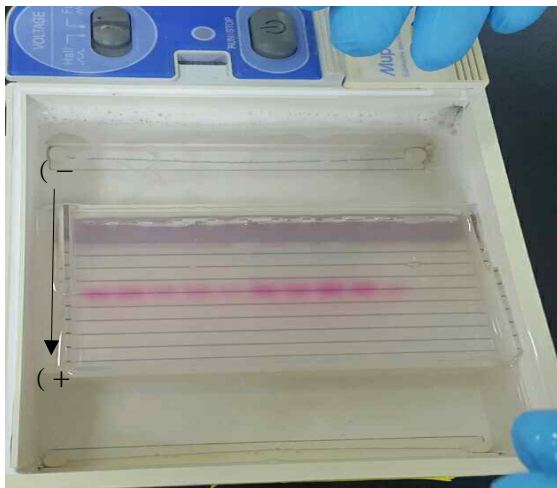


Figure 3. Electrophoresis

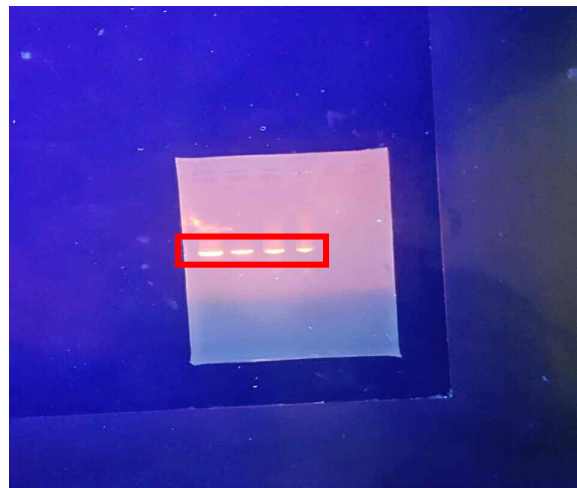


Figure 4. UV transilluminator로 관찰한 PCR로 증폭된 vWF A3 DNA

2.2.3. Gel purification

잘라진 gel 안의 DNA만을 분리하기 위한 과정이며, 원하는 유전자 band만을 정확하게 잘라서 이용한다. 우선, GB buffer(Gel DNA Binding buffer)를 gel 양의 3배 약 700μl정도 넣은 뒤, gel을 녹이기 위해 50~70℃ water bath에 넣어둔다. gel을 녹인 용액을 DNA binding column인 SV column으로 옮기고, centrifuge하여 걸러진 용액을 버린다. 그 다음, DNA를 제외한 나머지 불순물들을 내려 보내주는 NW buffer(Column Wash Solution N)를 700μl 넣고, centrifuge해준다. 마지막으로 새로

운 tube에 column을 옮기고 EB buffer(Elution buffer)를 50 μ l 넣어 걸러진 DNA를 떼어준다. 이때 EB buffer의 양이 purify한 DNA 농도를 결정한다.

2.2.4. Digestion

Restriction enzyme(제한 효소)란 DNA 분자내의 특정한 염기서열을 인식하고, 인식한 서열 내 또는 근처의 특정한 부위에서 이중나선 DNA를 절단하는 군주 특이성이 있는 엔도뉴클라아제로써 이는 세균이 외부 DNA를 제거하기 위한 수단으로 이용된다.

실험에서 이용되는 plasmid vector는 pET-28b이다.(Figure 5) plasmid는 크게 3부분으로 구성되어 있는데, 하나는 Replication origin으로 이 부분은 plasmid가 자가 복제할 때 처음 인식하는 부위이므로 모든 plasmid에 꼭 필요한 부분이다.(Fig5 ori 부분) 두 번째는, Antibiotics resistance gene으로 이는 항생제에 내성을 나타내는 유전자이고 pET-28b plasmid의 경우 kanamycin resistance gene이 들어있다.(Fig5 Kan 부분) 세 번째는, Multiple cloning site(MCS)와 LacZ'이다. 이 부위는 제한 효소로 잘릴 수 있는 부위를 한꺼번에 모아놓은 부분이며 다른 부분은 절대 잘리지 않고 이 부분에만 잘릴 수 있도록 열 몇 가지 제한효소 절단부위를 인위적으로 조작해 놓은 것이다.

이 plasmid에 4개의 vWF gene을 넣어야 하므로 총 4번의 double digestion을 실행한다. double digestion이란 같은 DNA 샘플에 두 가지 다른 제한효소가 작동할 때 형성되는 것으로 두 가지의 제한효소를 쓰면 self-ligation(DNA의 양 끝이 붙는 것, 즉 자기 자신이 연결 되는 것)과 삽입유전자가 거꾸로 들어가는 것을 방지할 수 있다. 실험에서는 pET-28b plasmid와 PCR vWF product를 digestion시켜준다. 이때 사용되는 제한효소는 순서대로 Not I와 Sal I (1번), Sal I와 EcoR I (2번), EcoR I와 BamH I (3번), BamH I와 Nde I (4번)이다. 그리고 digestion이 끝난 후 다른 잔류 효소들을 제거하기 위해서 한 번 더 앞서 설명한 gel purification을 해준다.

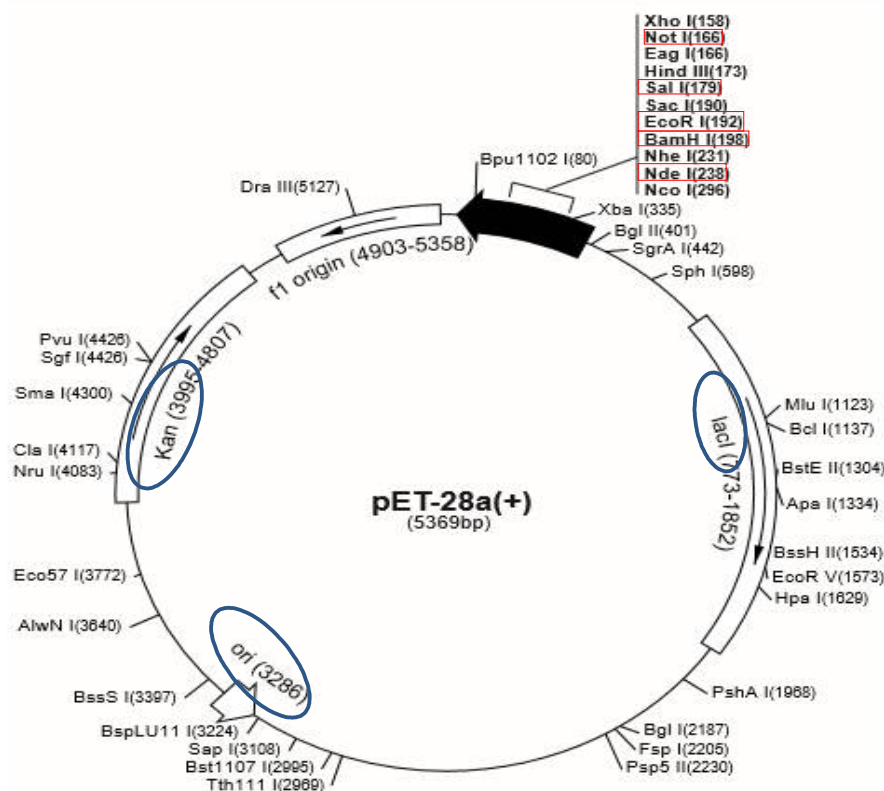


Figure 5. pET-28a(+) Vector Map; pET-28b(+) map은 pET-28a(+)와 거의동일 (하지만, pET-28b(+)는 5368 bp이다.)

Figure 6은 pET-28b plasmid(왼쪽 5개)와 PCR vWF product(오른쪽 5개)를 digestion한 결과를 UV transilluminator로 관찰 한 것이다. pET-28b plasmid(5368bp)는 원형인데, digestion에 의해 잘린 plasmid는 퍼져서 gel속에서 원형에 비해 잘 빠져나가지 못하여 더 크게(위에서) 측정된다. 실험에서는 digestion에 의해 잘린 plasmid를 사용해야하기 때문에 원형의 plasmid보다 위에 있는 DNA band를 사용한다. Fig 6에서 보다시피 왼쪽의 plasmid는 거의 사진으로 보이지 않을 정도로 희미하게 나타나는데 이는 plasmid prep과정(bacteria에서부터 plasmid DNA를 추출하는 과정)에서 distilled water를 과량으로 넣어(50 μ l) 낮은 수율(yield)을 보였기 때문이라 예상된다.

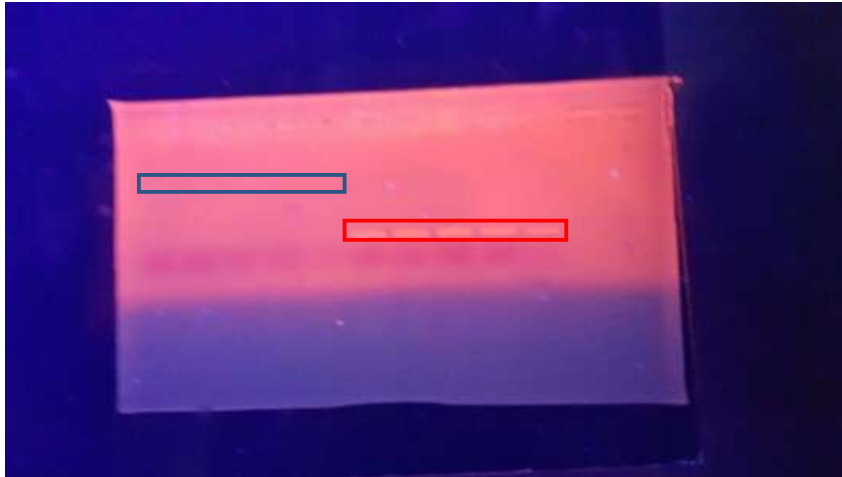


Figure 6. pET-28b plasmid(왼쪽 5개, 파란색)와 PCR vWF product(오른쪽 5개, 빨간색)를 digestion한 결과

2.2.5. Ligation

Ligase효소의 작용을 이용하여 DNA나 RNA의 5'-phosphoryl기와 3'-hydroxyl기가 phosphodiester bond(인산디에스테르결합)를 이루도록 하는 반응으로 nick 이 생긴 DNA 나 RNA, 또는 linear form인 두 종류의 DNA나 RNA를 연결시키는 반응을 ligation이라 한다. 이 반응은 유전자 재조합 기술에서 원하는 유전자를 vector에 연결시키고자 할 때 기본적으로 사용되는 효소반응이다.

실험은 vWF A3 gene: pET-28b plasmid: ligation mix(TAKARA Ligation kit)=0.5:0.5:1 비율로 각각 10 μ l, 10 μ l, 20 μ l 넣어준다. 그리고 PCR 기기에 넣어 16 $^{\circ}$ C로 약 1시간 ligation 시켜 pET-28b plasmid에 vWF A3 gene이 재조합 되도록 한다.

2.2.6. Transformation

Transformation(형질 전환)이란 외부 DNA를 숙주 세포 내에 넣어주어 세포가 원래의 성질과는 다른 새로운 유전형질을 추가로 얻게 되는 것을 말한다. 박테리아의 유전물질 전달방법은 3가지가 있는데, 하나는 실험실에서 많이 쓰는 방법으로 DNA 분자를 직접 유입시켜주는 transformation이고, 두 번째는 박테리오파지를 매개로 하여 전 숙주 DNA 일부를 다음 숙주에게 전달하여 재조합을 유발하는 transduction(형질 도입)이다. 세 번째는 박테리아와 박테리아 사이의 유전물질 이동 및 재조합을 하는 방법으로 conjugation(접합)이 있고, 이는 자연적으로 가장 많이 일어나는 방법이다.

transformation은 원래 자연적으로도 일어나지만, 드물게 일어나 인공적으로 시켜준다. 그 중 하나가

CaCl_2 로 화학적 처리를 하여 정상적인 박테리아를 DNA가 잘 들어갈 수 있는 competent cell(수용성 세포)로 만들어 준다. 하지만 이번 실험에서는 화학적으로 처리된 competent cell kit를 구입하여 사용하였기 때문에 따로 화학적 처리를 해주지는 않았다. 사용된 cell은 E.coli(대장균)이며, cell strain은 DH5α이다.

LB agar는 보통 박테리아 키울 때 많이 사용되는 배지로써 영양성분이 아주 풍부해 보통 어떤 종류의 균이든지 빠르고 대량으로 배양할 때 쓰는 배지이다. 하지만 실험에서는 pET-28b plasmid에 kanamycin resistance gene이 들어있기 때문에 kanamycin(50mg/ml)를 500ml LB에 500μl 넣어주어 pET-28b plasmid를 가진 E.coli만 colony를 형성하게 한다.

실험은 -80℃에 보관된 competent cell kit를 얼음에서 녹이고, 이전에 ligation된 혼합물을 cell에 다 넣어준다. 그리고 만들어 놓은 LB agar에 single colony를 얻기 위해 spreading(평판 도말)을 하여 incubator에 넣어준다.

2.2.7. Pick

transformation후 형성된 colony(Figure 7)를 하나 멸균된 tip으로 picking해서 만들어 놓은 kanamycin(5μl)를 넣은 LB broth(5ml)에 담가 overnight(12~16h) 37℃ 에서 200-250 rpm으로 shaker incubator시킨다.(Figure 8)



Figure 7. 37℃ incubator에 넣고 overnight (12~16h)로 키운 pET-28b plasmid

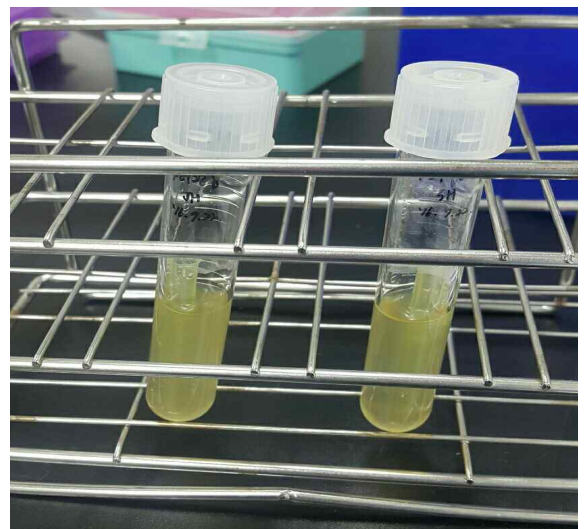


Figure 8. LB broth에 담긴 single colony

2.2.7. Plasmid mini prep

prep은 ‘preparation’의 줄임말로 bacteria에서부터 DNA를 소량으로 추출한다는 의미를 가진다. E.coli로 부터 plasmid를 추출하는 방법으로는 기본적으로 여러 가지가 있지만 그 가운데 대표적인 방법으로 alkaline lysis (denaturation) method를 이용하고 있다. DNA와 plasmid의 고유 형태구조 원리에 의한 분리 방법으로써 세포 내에 DNA는 일반적인 이중 나선(double-helix)구조를 가지는 반면 plasmid는 super coiled 형태를 가짐으로써 PH의 변화에 따라서도 plasmid의 형태와 구조가 크게 변

하지 않아 순수한 plasmid만을 추출하는 구조적 기본원리에 의한 방법이다.

실험은 LB broth(5ml)에 담가 overnight(12~16h)동안 37°C 에서 shaker incubator넣어둔 혼합물을 꺼내어 e-tube에 담아 centrifuge에 돌린다. 그러면 cell이 뭉쳐 pellet을 형성하여 가라앉고, 나머지 용액은 버려준다. 그리고 먼저 S1 buffer(250μl)를 넣는데 이의 조성을 살펴봤을 때 glucose는 삼투압을 유지시켜 세포의 외형을 유지해 주고, Tris-Cl은 pH의 급격한 변화를 막기 위한 buffer의 역할을 한다. EDTA는 2가 양이온을 chelation 시키는 역할을 하는데, 세포벽을 주로 구성하고 있는 2가 양이온인 Ca^{2+} 에 작용하여 세포벽의 견고함을 무너뜨려 용해가 잘 일어나도록 도와준다. 그 후 resuspension 해주어 bacteria의 pellet을 풀어준다. 그 다음 S2 buffer(Cell Lysis Solution, 250μl)는 세포막을 깨고 pH를 높여 DNA와 plasmid, protein을 변성시킨다. 조성을 살펴보면 SDS는 음이온 계면활성제로 세포막의 phospholipid를 녹이고 세포 단백질을 변성 시켜서 cell을 lysis 시켜 세포 내의 내용물이 바깥의 용액으로 흘러나오도록 하는 역할을 하고, 흘러나온 내용물은 NaOH에 노출되어 DNA는 변성이 된다. 그 후, 4~6회 정도로 inverting 시킨다. S3 buffer(350μl)는 pH를 낮추어 DNA를 응집시키고 plasmid를 renaturation시키는 역할을 한다. 조성을 살펴보면 potassium acetate는 강력한 산으로 NaOH에 의해 염기성이 된 용액을 다시 중성으로 돌려놓아 DNA를 renaturation 시키는 역할을 한다. 이때, size가 작은 plasmid만 원래대로 돌아가고 size가 큰 DNA는 SDS에 의해 변성된 단백질과 함께 침전되어 원래대로 돌아가지 못하고 엉기게 되고, SDS는 acetate와 반응하여 soluble한 형태에서 흰색 침전물의 원인인 insoluble한 potassium dodecyl sulfate를 형성하게 됩니다. 그 후, inverting을 해준다. 그 다음, 흰 침전물이 들어가지 않게 SV column에 transfer하고, centrifuge를 돌린 뒤 순서대로 AW buffer(500μl), PW buffer(700μl), EB buffer(20μl)를 넣어준다.

III. 결론

전체적인 실험의 결과로선 원하던 목표인 vWF A3 gene을 4개 다 붙이지 못하였다. 이에 대한 원인은 PCR, digestion등 너무 다양하고 복잡하여 명확하게 제시하긴 어렵다. 하지만 홍합이 가지는 vWF A3 gene을 이용하여 앞서 서론에 제시한 용도로 이용할 수 있고, 이외에도 홍합의 접착 단백질을 이용하여 인공 접착제가 가지는 장점은 부각하고 단점은 최소화시킨 천연 홍합접착제로도 활용가능하다. 이처럼 해양바이오신소재라는 바다 속의 신비한 해양생물들의 특성을 잘 활용하여 널리 사용할 수 있는 ‘무언가’를 찾아내는 학문은 굉장히 매력적인 것이라 생각이 들었다.

III. 참고문헌

- 1)Inni,M.A.,Myambo,K.B.,Gelfand,D.H.,Brow,M.A.D.:Pro.Natl.Acad.Sci.USA, 85, 9436-9440(1988)
- 2)Higuchi, R., von Berldingen, C.H.,Sensabaugh. G.H.Erlich, H.,A,:Nature,322,543-546(1998)
- 3)Sun CJ, Lucas JM, Waite JH:Collagen-binding matrix proteins from elastomeric extraorganic byssal fibers(2002)
- 4)Hee Young Yoo,Jung Hung,Lin Li,Mathias Foo,Hongbo Zeng,and Dong Soo Hwang: Nanomechaical Contribution of Collagen and von Willebrand Factor A in Marine Underwater Adhesion and Its Implication for Collagen Manipulation