

DNA 연구 기법

순천향대학교 부설 현암신장연구소

김 성 일

서 론

최근에 의학 분야에서 분자생물학(Molecular Biology)이란 용어가 유행처럼 언급되어지고 있다. 그렇다면 분자 생물학이란 도대체 어떤 학문이기에 의학 분야에서 중요하게 인식되어 지고 있는 것일까? 분자 생물학이란 말 그대로 세포내에 존재하는 분자, 특히 거대분자(macromolecules)들의 생물학적인 기능을 연구하는 학문이다. 세포내의 거대분자란 DNA(Deoxyribonucleic Acid), RNA(Ribonucleic Acid)와 같은 핵산과 단백질(Protein)들을 말하며 그 중 유전 인자를 암호화하고 있는 DNA를 중심으로하여 RNA와 Protein을 연구하는 분야이다.

1944년도에 Avery 등에 의하여 처음으로 DNA가 유전물질 이라는 것과 1953년도에 Watson과 Crick이 DNA의 구조가 이중 나선형(α -helix, double stranded DNA)으로 되어있다는 것을 발표한 이후 분자생물학은 급속한 발전을 해왔으며 앞으로는 더욱 빠른 속도로 발전할 것이다. 1896년도 DNA가 처음 발견된 이래 100년만에 우리 인간은 복제 양과 복제 원숭이 그리고 복제 송아지를 창출하였다. 또한 1990년부터 시작되어 2005년에 끝날 Human Genome Project(인체 유전자 연구 계획)는 우리 인간 자신의 모든 유전자의 청사진을 제시하게 될 것이며 이에 따라 인체 질병의 원인 분석과 치료에 있어서 획기적인 방법들이 개발될 것으로 추측된다.

DNA는 모든 생물에서 유전 정보를 그 염기 서열에 암호화하여 저장하고 있으며 두 가지의 중요한 기능을 수행하는데 첫째가 DNA의 replication(복제) 과정이며 둘째는 유전자 발현(Gene expression)이다. 이는 동일한 DNA분자를 만들어 후손에 그대로 유전 정보를 물려줄 뿐만 아니라 그 유전 정보에 상응하는 전령 RNA(mRNA)를 합성하고 이를 통해서

필요한 단백질들을 합성하여 그 개체나 조직의 구조 유지뿐만 아니라 신진 대사에 요구되는 모든 효소(enzyme)를 제공한다. 결국 생명 현상에 필수적인 단백질을 합성하고 분해하는 모든 것은 DNA에 의하여 암호화되어 있다. 질병이란 것이 인체 내 신진대사의 이상에서 오는 것이므로 이를 관장하는 DNA, RNA 그리고 Protein의 기능을 연구하는 것이 질병의 원인, 진행 과정의 이해, 치료 방법의 개발에 매우 중요한 분야임은 더 강조할 필요가 없을 것이다.

의학 연구에는 분자생물학 뿐만 아니라 세포생물학(Cell Biology), 생화학(Biochemistry), 유전학(Genetics) 그리고 면역학(Immunology) 등의 학문들도 매우 중요하다. 그러나 이러한 학문 영역 자체도 분자생물학과 별개로 취급하기 어려울뿐 아니라 그 학문적 영역조차도 구분하기가 애매해 지고 있다. 결국 이러한 학문들로 부터 얻어진 총체적인 정보가 모여져 하나의 훌륭한 결과를 얻을 수 있으며 얻어진 결과들은 생명공학(Biotechnology)이란 분야로 집결되고 산업화 되어 많은 인류에게 큰 혜택이 주어질 것이다. 이러한 추세를 볼 때 상기에 언급한 학문 분야가 균형있게 발전되는 것이 기초의학 분야가 발전되고 나아가서 임상의학의 발전을 도모할 수 있을 것으로 생각된다.

유전자의 cloning

1. 유전자(Gene) cloning

유전자란 특정 기능을 갖는 단백질의 아미노산의 서열(amino acid sequence)을 DNA의 염기서열(DNA sequence)로 암호화하여 저장하고 있는 부위를 말한다. 인체에 존재하는 각 체세포의 유전체(genome)에는 약 30억개의 염기로 되어 있으며 이 안에 약 10만개의 유전자가 존재하고 있다. 만약 A라는 유전자에 관심이 있다면 우리는 10만개의 유전자 중 A라는

하나의 유전자를 분리해서 연구하게 된다. 그러나 매 실험 때마다 10만개의 유전자에서 A 유전자를 분리한다는 것은 많은 시간과 노력을 소모하는 일이 아닐 수 없다. 그러므로 A라는 유전자를 따로 분리하여 보관할 수 있다면 이러한 소모적인 낭비를 줄일 수 있다. 이렇게 특정 유전자를 따로 분리 보관하는 것을 실험적으로 유전자 클로닝(cloning)이라 한다. 분리, 정제된 특정 유전자를 보관하고 나아가 대량으로 증폭시키기 위하여 우리는 대장균을 이용한다. 대장균 뿐 아니라 많은 세포들에는 염색체와 상관없이 존재하고 스스로 복제하는 DNA들이 있다. 이들을 생물학적 용어로는 에피솜(episome)이라 하며 이중 한 부류가 플라스미드(plasmid)이다. 플라스미드 중 여러번의 유전자 조작을 거쳐 유전자의 cloning과 증폭에 쉽게 이용할 수 있도록 조작한 것을 클로닝 벡터(cloning vector)라고 하고 현재 가장 일반적인 클로닝 벡터는 대장균에 잘 도입되는 것을 이용하며 이들의 세포 당 복제되는 개수(copy number)는 대략 200-1,000 copies/cell이다. 그러므로 만약 한 사람의 유전자 하나를 cDNA로 분리하여 클로닝을 하고 이를 갖는 대장균을 하루 밤을 배양하여 10^8 세포를 얻어 플라스미드를 분리하면 10^{11} 개의 클로닝된 특정 유전자를 얻게되는 것이다. 그러므로 유전자의 클로닝은 이제 유전자를 연구하기 위하여 진행하는 가장 기본적인 실험이 되었다. 유전자의 클로닝을 위하여 기본적으로 클로닝 벡터, 재조합 플라스미드를 증폭할 숙주세포, DNA를 자를 수 있는 제한효소(restriction enzyme), DNA를 다시 연결시키는 DNA ligase 등과 조작된 DNA들을 확인하기 위한 agarose gel 전기영동 장치 등이 필요하다.

2. 제한효소(Restriction enzymes)

제한 효소는 처음 발견당시의 기능은 대장균(*E. coli*, 일반적으로 실험에 이용되는 대장균은 K, B, C strain이 있음)가 bacteriophage 감염이나 다른 외래 DNA가 세포내로 침입하였을 경우 non-self로 인식하여 잘라버리는 기능이였다. 그 후에 type 2 제한효소가 발견되었으며 특징적으로 효소가 인식하는 부위와 자르는 부위가 동일함이 알려져 DNA를 자르기 위하여 실험에 사용하기 시작했다. 이는 DNA를 마음대로 재단할 수 있는 가위를 갖게 되었음을 의미하며 그 후 잘려진 DNA를 붙이는 효소인 DNA

ligase가 알려져 결국 실험자 마음대로 DNA를 자르고 붙일 수 있게 되어 유전공학과 분자생물학을 포함하여 생물학 분야의 급속한 발전이 이루어 졌다. 제한 효소는 일반적으로 4-8 base(주로 6 base)의 특정서열을 인식하고 자른다. 예로 Eco RI의 경우 5'-GAATTC-3' 서열을 인식하여 5'-G↓AATTC-3'로 자른다. 현재 여러 회사에서 매우 다양한 제한효소를 생산 판매하고 있으므로 각 회사의 catalogue를 얻어 필요한 제한 효소를 선택하여 구입하면 된다.

판매되는 제한 효소는 효소의 안정성을 증가시키기 위하여 모두 50% glycerol로 혼합되어 있기 때문에 사용할 때 주의를 해야한다. DNA를 자르는 반응액에 glycerol이 5% 이상되면 star activity(non-specific digestion)가 나타날 수 있기 때문이다. 이러한 이유에서 효소 용액은 반응 총 부피의 1/10 이하로 한다. 또 다른 주의점은 각 효소들마다 이용되는 반응 buffer가 다르다. 일반적으로 NaCl농도 0, 5, 10mM을 사용하며 10배 짜리 buffer들을 각 효소와 함께 공급하기 때문에 해당하는 buffer를 사용하면 된다. 끝으로 항상 효소를 사용할 때 주의점은 효소는 가급적 최후에 꺼내서 빨리 사용하고 곧 바로 -20°C 에 보관한다. 사용하느라 잠시라도 냉동보관을 하지 못할 경우에는 on ice상태를 유지하여야 한다. 이러한 효소는 U/ μl 로 표시된다. 이는 linear DNA 1 μg 을 적정온도(일반적으로 37°C)에서 1시간에 자르는 양이지만 플라스미드는 구조적으로 supercoiled form으로 존재하여 효소의 공격에 대하여 linear form보다 저항성이 있다. 이런 이유로 일반적으로 플라스미드를 자를 경우에는 필요한 효소 양의 5배 정도를 이용한다. 다음은 플라스미드 1 μg 과 linear DNA 1 μg 을 자를 경우의 반응액 구성이다.

플라스미드	10 μl	(1 μg)
10X buffer	2 μl	
효소용액	0.5-1 μl	(10U/ μl)
H ₂ O	7-7.5 μl	
Total 20 μl 37 $^{\circ}\text{C}$ 2-3h		
linear DNA	10 μl	(1 μg)
10X buffe	2 μl	
효소용액	0.1 μl	(10U/ μl)
H ₂ O	7.9 μl	
Total 20 μl 37 $^{\circ}\text{C}$ 1-2h		

제한 효소로 DNA를 자르고 나면 제한효소의 특성에 따라 blunt end나 혹은 cohesive end가 형성된다. 그러므로 효소를 선택하기 전에 이를 잘 확인하여야 한다.

3. 유전자 클로닝을 위한 벡터와 insert의 준비

1) 벡터의 준비

사용할 클로닝 벡터는 insert DNA에 따라 아래와 같이 달라질 수 있다.

(1) insert의 크기가 클 경우(4kb 이상): insert DNA가 클 경우에 high copy plasmid를 사용하면 숙주 대장균의 성장을 심하게 저해할 수 있기 때문에 이런 경우에는 moderate copy number의 플라스미드를 사용하는 것이 좋다(예: pBR322, 50copies/cell).

(2) insert DNA가 cohesive end인 경우: 일반적으로 insert와 동일한 효소로 자른 벡터를 사용한다. 간혹 단일가닥 부분이 서로 동일할 경우도 있으며 이때에는 서로 교차 이용 가능 하다.

(3) insert DNA가 blunt end인 경우: 벡터는 blunt end를 형성하는 어떤 제한 효소를 이용하여도 무방하다.

(4) insert가 PCR산물일 경우: Taq DNA 합성 효소를 이용하여 DNA를 증폭시킨 경우(RT-PCR 산물 포함) 두가지 end가 형성된다. 그 하나는 blunt end이고 다른 한 종류는 3' end에 A가 하나씩 추가된 경우이다. 또한 PCR 산물은 각 end에 인산화가 되어 있지 않기 때문에 곧 바로 blunt end ligation을 할 수가 없으며 polynucleotide kinase로 각 end를 인산화시킨 후 벡터와 결합시켜야 한다. 반면 최근에는 A가 하나씩 추가된 경우 바로 벡터에 연결할 수 있도록 T-vector 혹은 TA cloning vector가 판매되고 있으며 특히 Invitrogen사 제품의 Topo system은 PCR산물의 클로닝을 매우 쉽게할 수 있도록 되어 있다.

4. DNA ligation

준비된 클로닝 벡터와 insert DNA를 연결시키는 것을 DNA ligation이라 하며 이는 DNA ligase를 이용하여 일반적으로 T4 DNA ligase를 주로 사용한다. 요즘은 ligase를 구입하면 ligase용 완충용액을 기본적으로 공급하나 이때 ATP가 ligation 반응에 기본적으로 들어가야 하므로 이를 확인하여야 한다. 일반적으로 blunt end ligation은 그 효율이 낮다. 벡

터와 insert의 비율은 기본적으로 1:10 정도로 한다. 반응 온도는 cohesive end ligation의 경우는 주로 13°C에서, blunt ligation은 23°C에서 하룻 밤 시행한다.

5. 대장균의 형질전환(Transformation)

DNA를 ligation한 후 형질전환용 대장균(competent cells)에 도입한다. 일반적으로 형질전환용 대장균은 CaCl₂를 이용하여 쉽게 제조할 수 있다. 형질전환 후 대장균을 선별 한천배지(일반적으로 항생제 marker를 이용함)에서 하룻 밤 키워 잘 성장한 colony들을 고른다. Cloning된 colony들을 가장 쉽게 선별하는 방법은 벡터의 β -galactosidase 유전자가 불활성화 되어 X-gal이 분해되지 않아 white colony로 나타나는 것을 선별하는 것이다. 이때 cloning이 되지 않은 것들은 정상적인 β -galactosidase의 활성을 갖고 있어 X-gal을 분해하여 blue color를 나타내게 된다.

6. Clone의 확인

X-gal을 이용하여 선별된 형질전환된 대장균(형질전환체: transformant)을 항생제가 첨가된 액체 배양액에서 약 16시간 정도 배양한 후 세포를 모아 플라스미드를 분리한다. 일반적으로는 alkaline lysis method를 이용하나 최근에는 mini plasmid prep kit들이 많이 실용화되어 있으므로 이들을 이용하는 것이 임상외에게는 보다 용이할 것이다. 분리된 plasmid를 적당 농도의 한천 겔(agarose 0.7-1%) 전기영동을 실시한 후 colning되지 않은 control plasmid와 그 크기를 비교한다. 이때 cloning된 플라스미드는 이동 속도가 더욱 느리기 때문에 쉽게 구별되거나 간혹 insert의 크기가 너무 작아(<200bp) 구분이 쉽지 않은 경우가 있으며 이때는 겔의 농도를 높이고 전압을 낮추어 전기영동 시간을 길게 하면 해결할 수 있다. 특히 주의 할 것은 간혹 임상 논문에서 플라스미드를 확인하는 과정에서 시판되고 있는 DNA size marker를 control로 하는 경우가 있는데 이들 marker들은 linear DNA이기 때문에 supercoiled plasmid를 확인하는데는 아무런 의미가 없는 것이므로 주의해야 할 것이다.

DNA size가 커진 것들이 모두 원하는 clone이라고 단정 지을 수는 없다. 그러므로 계속적인 확인이 필요하다. 그중 DNA sequencing이 가장 확실한 방

법이기는 하나 시간적, 기술적인 것들이 요구됨으로 우선 제한효소 지도를 작성하여 보는 것이 좋다.

Clone의 이용

얻어진 clone은 그 크기에 따라 다양하게 이용될 수 있다. 이는 실험 목적에 맞게 cloning을 하여야 한다는 이야기도 될 수 있다. 우선 일반적인 사용을 보면, 1) probe DNA for Southern and Northern blot, 2) overexpression, 3) protein production, 4) analysis of gene regulation, 5) gene therapy 등이다. 이중 hybridization을 위한 probe로 이용하는 경우를 빼고는 모두 세포내에서 실험이 진행되므로 세포내로 도입을 해야한다. 진핵세포내로 유전자를 도입하는 실험을 transfection이라한다. Transfection study에 요구되는 DNA는 full length cDNA 이거나 genomic DNA(promoter analysis)이다.

1. Use in hybridization

임상적 혹은 기초학적인 연구에서 일반적으로 많이 쓰이는 방법 중 northern blot과 Southern blot이 있다. 이는 특정 유전자의 존재 유무, 크기 변화의 유무를 확인하는 경우(Southern blot)와 특정 유전자의 발현 정도를 확인하는 경우에 northern blot이 많이 이용되며 특히 최근 RT-PCR법도 이용된다.

2. Use in overexpression of functional or dominant negative gene

임상적으로나 생물학적으로 특정 유전자의 과발현은 그 유전자 산물의 기능을 확인하기 위하여 실행하여야 할 중요한 방법이다. 이 경우 특정 유전자의 full length cDNA를 강력한 promoter(예: CMV, SV40 등의 viral promoter)에 연결시켜 표적세포에 도입하여 과발현 시키고 그 기능을 확인한다. 반면 특정 유전자의 산물이 억제되었을 경우 발생하는 여러 현상을 확인하기 위하여 dominant negative mutant를 이용한다. 이는 세포내에 돌연변이 산물을 과발현시켜 상대적으로 정상적인 특정 유전자의 산물보다 많게하여 그 영향을 확인하는 것이다. 이와 유사하게 최근에 이용되는 연구 방법들은 antisense RNA expression, antisense ODN을 이용하는 경우도 있다.

3. Use in overexpression

우리는 여러 이유로 특정 유전자의 산물 즉, 그 단

백질이 필요할 때가있다. 한 예로 polyclonal anti-"A" antibody(A란 단백질에 대한 항체)가 상업적으로 이용할 수 없을 때 이를 토끼로부터 제조할 수 있다. 그를 위하여는 순수 분리, 정제된 단백질 약 3-5mg 정도가 필요하게 된다. 생물학적 활성을 갖는 특정 단백을 대장균이나 곤충세포를 이용하여 그 유전자를 과발현시켜 얻을 수 있다.

4. Use in transcriptional regulation study

인체 내 모든세포는 동일한 DNA와 유전자를 갖고 있다. 그러나 어떤 유전자들은 모든 세포에서 항상 발현되나(house keeping gene) 또 다른 유전자들은 특정 세포에서만 혹은 특정

조건에서만 발현되는(inducible gene) 경우도 있다. 그러나 가장 일반적인 것은 정상 조건하에서는 basal level로 유전자가 발현되다가 특정조건에서 발현이 증가되거나 혹은 억제되는 유전자들이다. 유전자로부터 단백질 합성까지는 여러 단계들에서 조절이 되어지지만 그중 mRNA를 생성하는 전사단계에서의 조절(transcriptional control)이 일차적인 책임을 갖는다. 이러한 전사 수준의 조절은 전사 시작점(transcription initiation site)의 위쪽(upstream)에 일반적으로 말하는 promoter가 존재하며 여기에 RNA중합효소(RNA polymerase II)뿐만 아니라 매우 다양한 전사인자(Transcription factor)들이 결합하여 전사수준을 증가 혹은 감소 시킨다. 다양한 전사인자들은 각기 인식하고 결합하는 DNA의 염기서열이 있다. 이러한 전사인자들이 결합하는 염기서열들을 element라고 한다. 예로 cAMP에 의하여 조절되는 부위를 CRE(cAMP responsible element)라 하고 여기에 결합하는 전사인자를 CREB(cAMP responsible element binding protein)라 하며 SRE는(Serum responsible element)이고 여기에 결합하는 전사인자는 SREB(Serum responsible element-binding protein)이라 한다. 또한 직접적으로 전사인자 결합부위로도 나타낸다. 예로 전사인자 AP-1, NF-kB 혹은 Sp1의 경우 AP-1 binding site, NF-kB binding site 그리고 Sp1 binding site라고 한다. 그러므로 특정한 조건에서의 전사수준의 조절은 합성된 전사인자들의 양과 활성화된 정도에 의하여 결정된다.

이러한 전사 조절에 관한 연구는 실험적으로 크게

두 가지 방향에서 진행된다.

1) Transient transfection study

확인하고 싶은 promoter를 genomic DNA로부터 일정부분 cloning하고 이를 순차적으로 deletion시킨 후 각각의 promoter에 reporter gene(lac Z, CAT 혹은 luciferase gene 등)을 결합시킨 후 표적세포로 도입하고 이들 세포를 특정 조건에서 배양한 후 reporter system을 assay하여 그 발현정도를 확인한다. 이때 특정 부위의 deletion이 유전자 발현에 영향을 미쳤을 경우 이 부위 내에 존재하는 전사조절인자 결합부위를 확인한다.

2) Electrophoretic Mobility shift Assay (EMSA)/Antibody supershift Assay

Reporter gene system에서 특정 전사인자 결합 부위를 확인한 경우 이를 in vitro에서 확립하기 위하여 EMSA와 antibody supershift assay를 시행한다. 이는 transient transfection study가 전사에 관여하는 염기서열을 확인하는 실험방법인 반면 EMSA는 실제로 핵내에 전사에 관여한 활성화된 전사인자의 양을 확인하는 실험이다. 이를 위하여 표적 세포를 특정 조건에서 배양한 후 핵을 분리하고 분리된 핵으로부터 단백질을 분리하여 전사인자들을 준비한다. 한편으로는 예상되는 전사인자의 결합부위로 생각되는 부위의 염기서열을 이용하여 double-stranded oligonucleotide를 합성한 후 양 말단에 동위원소(³²P)로 표지한다. 동위원소로 표지된 oligonucleotide와 핵에서 얻은 단백질들을 반응시킨 후 전기영동한다. 만약 기대했던 활성화된 특정전사인자들이 많이 존재한다면 동위원소로 표지된 상응하는 oligonucleotide에 결합하여 전기영동시 그 이동 속도가 느려진다. 반면 그러한 전사인자가 핵 내에 없다면 동위원소로 표지된 oligonucleotide는 원래 크기에 따라 빨리 이동한다. Antibody supershift assay는 방법은 EMSA와 유사하나 동위원소로 표지된 oligonucleotide에 결합한 전사인자가 기대한 것과 같은 지를 확인하고자 하는 실험으로 기대하는 특정 전사인자에 대한 항체를 반응에 첨가하면 동위원소로 표지된 oligonucleotide의 이동속도는 EMSA때보다 더욱 느려지게 되므로 결과적으로 동위원소로 표지된 oligonucleotide에 결합된 전사인자를 완벽하게 확인할 수 있다.

5. Use in Gene Therapy

1990년 ADA 유전병을 갖고 있는 소녀에게 처음 유전자치료를 시행한 이후 최근에는 약 3,000건 정도의 유전자치료 protocol이 미국 NIH의 허가를 받아 진행 중이거나 예정이다. 현재 진행 중인 많은 부분이 암치료를 위한 유전자 치료이지만 인체 유전자의 모든 서열이 밝혀지는 2005년 이후에는 보다 많은 질병에 대한 유전자 치료가 시도될 것으로 추측된다. 현재까지 개발된 유전자의 도입 방법은 몇 종의 virus와 plasmid를 이용하는 것으로 이러한 전달체에 표적유전자를 연결하여 세포내로 도입한다. 이때에도 표적 유전자는 cDNA를 이용하므로 우선적으로 cDNA가 클로닝되어 확보되어야한다.

mRNA differential display(DD-PCR)

전술한 바와 같이 세포들은 동일한 유전체(genome)를 갖고는 있으나 유전자의 발현 양상은 다를 수 있으며 특히 동일 세포에서도 환경에 따라 유전자 발현의 양상은 변화된다. 이러한 유전자 발현의 변화를 전반적인 mRNA 생성량으로 확인하는 실험법이 있으며 이중하나가 differential display-PCR(DD-PCR)이다. DD-PCR은 기본적으로 RT-PCR방법을 이용하며 차이점은 다양한 reverse PCR primer와 arbitrary primer들을 조합하여 PCR을 한다는 것이다. 이 실험에서 주의해야 할 사항은 세포 배양이나 sample의 채취 시부터 RNA추출 그리고 PCR까지 대조군과 실험군을 동시에 같은 조건으로 다루어야 한다는 것이다. 또한 동위원소(³³P-αATP or ³⁵S-αATP)를 이용하기 때문에 실험시 동위원소에 대한 방호 시스템의 준비, 폐기물처리 및 동위원소 사용자 교육을 필히 받아야한다. 현재 여러 회사에서 kit로 제조하여 판매하므로 기본적인 이론과 실험기술만 있으면 누구나 쉽게 실행할 수 있다.

참 고 문 헌

- 1) Sambrook, Fritsch and Maniatis : Molecular Cloning : A Laboratory Manual 2nd Ed., 1989
- 2) Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K : Current Protocols in Molecular Biology