

2. 유전공학

01. 무균조작
02. 순수 배양 기술
03. 세균의 염색법
04. 미생물의 생장곡선 구하기
05. 플라스미드 분리와 절단
06. DNA 절단 및 전기영동
07. DNA 지문법
08. 대장균 형질전환
09. PCR을 이용한 DNA 증폭
10. 단백질 분석



유전자를 활용하여 인간에게 유용한 물질을 대량 생산할 수 있는 생명공학은 21세기를 새로운 세상으로 만들어가고 있다. 식량, 자원, 물, 환경 같은 인류가 직면하고 있는 다양한 문제를 해결할 한 방법으로 재조합 DNA 기술을 활용한 클로닝에 기반한 생명공학은 크게 각광받고 있다.

이 장에서는 유전공학 기술의 기초가 되는 무균조작 기술이나 순수배양과 같은 기초 미생물 실험부터 유전자 클로닝까지의 과정을 알아보자.

01

무균조작

학·습·목·표

- 무균조작의 중요성을 인식하고 무균조작 방법을 안다.
- 작업공간을 소독하는 방법과 그 한계를 안다.
- 백금이를 이용하여 필요한 배지에 균을 접종할 수 있다.

미생물은 우리 주변 어디에나 존재한다. 공기 중의 먼지에도 엄청난 수의 미생물이 존재하며, 말할 때 입속에서도 침과 함께 많은 수의 세균이 바깥으로 나온다. 레이우엔훅은 전 지구상의 사람의 수보다 사람의 치아의 치석 속 미생물 수가 더 많을 것이라고 이야기 했을 정도이다. 따라서 미생물을 다루는 실험을 할 때는 실험의 정확도를 높이고 다른 미생물의 오염을 막기 위해 하는 조작이 중요하다. 또한 나와 내 주변의 안전을 위해서도 무균조작은 필요하다. 만약 몸에 상처가 있어 미생물이 인체 내로 침투하게 하거나 몸의 일부에 위험한 미생물을 묻혀 실험실 밖으로 나온다면 나와 내 주변의 건강에 큰 영향을 미칠 수도 있다. 이런 이유로 올바른 미생물 실험을 위해서는 세균을 다루는 실험에 사용할 재료나 도구들은 그 성질에 따라 적절히 멸균되어야 할 것이며, 미생물을 다루는 공간이나 실험자의 손과 같은 오염원도 실험과정에서 소독되어야 한다.



❖ 레이우엔훅
(Leeuwenhoek, A. V.;
1632~1723)

현미경을 제작하여 미생물을 관찰하고 묘사하였다. 미생물학의 아버지로 불린다.

토론하기

소독과 멸균은 다른 용어이다. 일상적으로 쓰이는 두 용어의 차이는 어떤 것이 있을지 친구들과 토론했고 보고 자신의 생각을 정리해 보시오.

가장 확실하게 시료를 무균조작하는 방법은 클린벤치나 무균실에서 실험하는 방법이다. 그러나 이런 것이 없어도 실험대를 잘 소독하고 알코올램프를 장치하여 일부의 공간에 오염된 공기가 들어오지 않게 한 다음 깨끗이 손을 씻고 알코올로 소독한 후 멸균한 실험 기구를 사용하여 미생물을 다룬다면 충분히 무균조작이 가능하다.

무균조작기술을 이용하여 미생물을 배양해 보자.

무균조작하여 액체배지에 배양한 미생물을 액체배지로 접종해 보고 또 고체 배지에 옮겨 도말하거나 균주를 보관하기 위해 고체배지에서 콜로니를 분리하여 사면배지로 옮기는 작업을 시도해 보자. 이 과정에서 다른 미생물이 오염되지 않도록 멸균조작에 특별히 유의하여야 한다.



〈그림 Ⅲ-22〉 고온가압멸균기

배지를 멸균할 때 쓰며 121℃에서 15 lb/inch² 압력으로 15분 정도 유지하여 포자까지 멸균한다.

탐구 활동 1

무균조작기술

세균이나 미생물을 연구하기 위해서는 이들 미생물을 오염시키지 않아야 한다. 어떻게 하면 세균을 오염시키지 않고 키울 수 있을까?

준비물

- 재료: 액체 배양 대장균 균주, 멸균된 액체 배양 배지, 접종용 백금이, 알코올램프, 소독약, 종이 타월, 유성펜, 페트리 접시, 시험관대, 한천사면배지에서 배양된 대장균 균주, 세균 콜로니가 접종된 영양한천배지

방법 및 절차

준비1) 사면배지 만들기

- (1) 500 mL 플라스크에 250 mL 정도의 배지를 넣고 여기에 1.5~2% 정도가 되도록 아가를 넣고 열을 가해 녹인다.
- (2) 배지가 담긴 플라스크를 고온 가압멸균한다.
- (3) 멸균이 끝난 배지를 65℃ 식힌 후 플라스크 입구 주변을 불꽃으로 멸균한다.

(4) 멸균된 시험관에 플라스크의 배지를 적당량 부은 후 35~45° 기울여 굳힌다.

(5) 사면배지가 굳으면 배양기에 넣고 1일 정도 보관한 후 수분량을 조절 한 후 사용한다.

준비2) 평판배지 만들기

(1) 준비과정은 사면배지 만드는 법과 동일하다.

(2) 멸균된 페트리 접시에 배지를 적당량 부어 담고 평편한 곳으로 옮겨 굳힌다.

(3) 굳으면 배양기 속에 뒤집어 하루정도 보관하며 수분량을 조절한 후 사용한다.

실험1) 액체배양 균주를 다른 액체배지에 접종하기

(1) 종이타월을 이용하여 소독약으로 실험대의 표면을 문질러 닦는다.

(2) 유성펜으로 멸균된 액체영양배지 시험관에 균주명과 접종일, 배지명, 실험자의 이름을 적는다.

(3) 알코올램프의 불꽃 위에서 접종용 백금이를 빨강게 달궈질 때까지 잡고 소독을 한다. 백금이 전체가 가열되어야 한다.

(4) 백금이를 잡은 반대편 손으로 시험관을 가볍게 흔들어 균주 배양액이 잘 섞이도록 한다.

(5) 백금이를 잡고 있는 손의 다섯 번째 손가락으로 시험관의 마개를 연 후 잡고 있다. 시험관 입구를 불꽃에 소독한다.

(6) 백금이를 배양액에 집어넣고 배양액이 묻은 백금이를 꺼낸 후 시험관의 입구를 다시 불꽃에 소독하고 시험관의 마개를 닫는다. 배양시험관을 시험관대에 꽂는다.

(7) 멸균된 액체 영양배지 시험관을 손으로 잡은 후 반대편 손의 다섯 번째 손가락(소지)으로 마개를 열어 이 시험관의 입구를 불꽃 소독한다.

(8) 백금이를 멸균된 액체배지에 넣어 접종한다. 이때 백금이를 시험관에 넣었다 뺐다를 반복하여 잘 접종되도록 한다.

(9) 시험관으로 부터 백금이를 뺀 후 시험관 입구를 다시 불꽃에 소독하고 마개를 닫는다.

(10) 백금이를 불꽃으로 멸균한다.

(11) 접종한 배지를 37℃에서 1~2일 배양한다.



〈그림 Ⅲ-23〉 시험관에 균주명, 접종일, 배지명, 실험자를 적는다.



〈그림 Ⅲ-24〉 백금이 소독



〈그림 Ⅲ-25〉 시험관 입구 불꽃 소독

창의력 키우기

가게에서 생막걸리 한 병을 사자. 막걸리에 들어있는 효모를 접종하여 키워보자. 효모를 키우는 배지는 어떤 배지여야 할까? 효모는 어떤 방식으로 접종할 수 있을까?

실험2) 사면배지로부터 사면배지로 옮겨 접종

- (1) 주변을 소독하고 접종할 영양한천 사면배지를 준비하여 중요 정보를 적는다.
- (2) 접종용 백금이를 가열한 후 백금이를 잡은 반대편 손으로 대장균이 배양된 사면배지 시험관을 잡아 백금이를 잡고 있는 손의 작은 손가락으로 시험관의 마개를 열은 후 잡는다.
- (3) 시험관의 입구를 불꽃으로 소독하고 식은 접종용 백금이를 시험관에 넣고, 백금이에 배양 균주를 약간 문힌 후 시험관으로부터 백금이를 뺀다.
- (4) 시험관의 입구를 불꽃 소독하고 손에 화상이 입지 않게 조심하여 시험관의 마개를 닫아 시험관대에 꽂는다.
- (5) 멸균된 영양한천 사면배지 시험관을 비어있는 손으로 잡은 후 반대편 손의 소지로 마개를 열어 이 시험관의 입구를 불꽃에 소독한다.
- (6) 백금이를 사면배지 표면에 부드럽게 아래 위로 움직이며 접종한다. 한천 표면에 접종 시 뱀처럼 구불구불하게 혹은 지그재그 형태로 한천이 찢어지지 않게 백금이를 움직인다.
- (7) 시험관으로부터 백금이를 뺀 후 시험관 입구를 다시 불꽃에 소독하고 마개를 닫은 후 시험관대에 꽂는다. 백금이라도 멸균한다.
- (8) 접종된 한천 사면배지는 30℃에서 1~2일 배양한다.

실험3) 한천 평판배지로부터 사면배지로 접종

- (1) 작업공간을 소독하고 멸균된 영양한천 사면배지에 날짜와 균주명, 실험자명, 배지 종류 등의 기초 정보를 적는다.
- (2) 멸균된 백금이로 콜로니를 문힐 수 있을 정도로만 펠트리 접시의 뚜껑을 살짝 들어 연다. 백금이로 미생물 콜로니를 문힐 때 한천 표면에 깊게 찌르지 말고, 뚜껑 또한 완전히 열어 배지 표면이 공기에 노출되지 않게한다. 콜로니를 백금이에 문힌 후에는 즉시 뚜껑을 닫는다.

(3) 접종방법은 실험2의 뒤 과정과 동일하다.

결과 및 논의

(1) 접종은 모두 성공하였는가? 그 증거는 무엇인가?

(2) 미생물 배양을 할 때 무균조작방법 사용이 필수적인 까닭은 무엇일까?

(3) 한천 평판배지의 뚜껑이 아니라 바닥에 정보를 기록하는 까닭은 무엇일까?

(4) 한천 평판배지를 뒤집어서 배양하는 까닭은 무엇일까?

(5) 소독약은 어떤 미생물에는 효과가 있으나 또한 어떤 종류의 미생물에는 효과적이지 않다. 왜 그럴까?

(6) 이번 실험에 쓰인 무균 조작 기술을 정리해 보자.

무균조작기술은 배양물을 접종하거나 취급할 때 배양액에 다른 오염미생물이 들어가지 않게 하거나 취급하는 생물이 취급하는 사람이나 주변의 다른 사람에게 오염되지 않게 하는 방법을 말한다. 이를 위해서는 실험기구나 재료의 멸균이 필요하며 작업하는 실험자나 미생물을 다루는 작업 공간의 소독이 필요하다.

일반적으로 이용되고 있는 멸균방법에는 고압멸균법, 여과법, 가스멸균법, 소각멸균법 등이 있다. 이들 중 고압멸균법은 높은 증기압에서 물을 끓여 수온을 120℃로 올림으로써 액체 속에 존재하는 미생물들을 죽이는 방법이다. 여과법은 세균이 통과하지 못하는 0.45 μm 의 여과지를 이용하여 멸균하는 방법이며, 가스멸균법은 독성가스나 방사선 조사와 같은 방법으로 멸균하는 방법을 말한다. 소각방법은 불이나 고온의 건조오븐을 이용하여 멸균하는 방법이다.

이러한 재료나 도구의 멸균 이외에도 실험에 사용되는 기구나 실험자의 손과 같은 오염원도 소독해야 한다. 멸균 할 수 없는 실험대의 표면이나 사람의 손은 깨끗이 한 후 70% 에탄올이나 소독약 등을 이용하여 소독할 수 있다. 또한 소독으로만 그칠 것이 아니라 실험하는 중 실험기구를 향해 기침을 하거나 말을 삼가하여 가능하면 오염의 가능성을 줄이도록 해야 한다.

02

순수 배양 기술

학·습·목·표

- 여러 미생물이 혼합된 시료나 배양액으로부터 단일 콜로니를 순수 분리할 수 있다.
- 순수 분리된 미생물을 계대 배양할 수 있다.
- 도말평판법과 주입평판법, 획선평판법의 장단점을 비교하여 설명할 수 있다.

자연상태에서 미생물은 여러 종이 섞여 복잡한 군집형태로 자란다. 그러므로 시료를 자연으로부터 채취하여 배양하면 여러 종이 섞인 혼합종이 자라게 될 것이다. 혼합 배양을 통해 미생물들의 관계나 생태를 연구할 수도 있지만 어떤 종의 특성을 연구하거나 분자생물학 방법으로 원하는 종을 분리해 실험하기 위해서는 순수 배양이 필요하다. 순수 배양은 단일세포에서 자란 유전적으로 동일한 세포집단으로 키우는 것을 말하며, 고체배지에서 단일세포가 순수 배양되어 형성된 세포 집단을 집락 또는 콜로니라고 한다.

토론하기

자연에서 채취한 시료로부터 순수 배양해서 얻은 미생물이 있다. 이 미생물이 실험실에서 보이는 특성과 자연 상태에서 보이는 특성은 똑같은까? 자신의 생각을 친구들과 토론했다.

혼합 배양액에서 세균을 어떻게 분리하여 순수 배양할 수 있을까? 순수 배양한 세균을 빠르게 얻기 위해서는 어떤 방법이 좋을까? 다음 실험 과정을 통해 알아보자.

탐구 활동 2

순수 배양 기술

자연 상태에서 균이 자랄 때는 다양한 세균들이 섞이게 된다. 이런 다양한 세균들로부터 한 종류의 세균을 분리하여 배양하는 방법에는 어떤 것이 있을까?

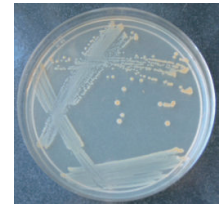
준비물

- 재료: 항원수저, 시험관대, 알코올램프, 비커, 백금이, 온도계, 유성펜, 영양한천배지, 멸균페트리접시, 균주, 3개의 영양한천배지가 들어있는 시험관, 유리봉

방법 및 절차

실험1) 획선평판법

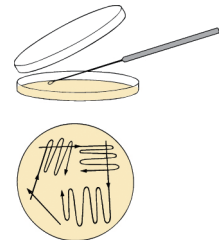
- (1) 실험대의 표면과 손을 소독한다.
- (2) 멸균된 페트리 접시 아래에 기본적인 정보를 적는다.
- (3) 고온가압 멸균된 영양한천 배지가 들어있는 시험관을 50℃로 식힌 후 멸균된 페트리 접시에 붓고 한천이 골고루 퍼지도록 페트리 접시를 부드럽게 돌려준다.
- (4) 한천배지가 굳은 후 평판배지에 사분면 획선접종법, 혹은 방사상 획선접종법, 연속 획선접종법 중의 한 방법으로 접종한다.
- (5) 접종한 평판배지는 뒤집어서 25℃에서 1-2일간 배양한다.



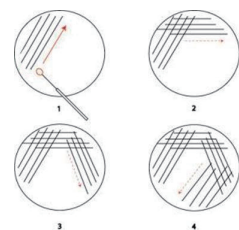
〈그림 III-26〉 획선평판법

실험2) 주입평판법

- (1) 3개의 멸균된 영양한천 배지가 들어있는 시험관에 유성펜으로 I, II, III이라고 적고 획선평판법에서 사용했던 방법과 같이 배지가 들어있는 시험관을 50℃ 정도로 식힌다. 전기 전열판 위의 비커 속에 물을 집어넣어 녹인다.
- (2) 시험관 안의 배지가 녹는 동안 3장의 플레이트 바닥에 I, II, III이라고 적는다.
- (3) 혼합균주를 멸균된 팁을 이용하여 1 mL를 취하여 첫 번째 시험관에 접종한다.
- (4) 첫 번째 시험관을 섞은 후 멸균된 팁을 이용하여 1 mL를 취하여 두 번째 시험관에 접종한다. 매번 시험관은 위쪽과 아래쪽으로 흔들거나 양손바닥 사이에서 강하게 굴러서 잘 섞는다.
- (5) 첫 번째 시험관을 항온수조에 넣는다.
- (6) 두 번째 시험관을 충분히 섞은 후 멸균된 팁을 이용하여 1 mL를 취하여 세 번째 시험관에 접종하고 두 번째 시험관은 다시 항온수조에 넣는다.
- (7) 세 번째 시험관을 잘 섞은 후 입구를 불꽃으로 멸균하고 내용물을 플레이트 III에 붓는다.
- (8) 마찬가지로 시험관 I, II를 각각 플레이트 I, II에 붓는다.
- (9) 배지가 완전히 굳은 후 뒤집어 25℃에서 2일간 배양한다.



〈그림 III-27〉 획선긋기



〈그림 III-28〉 획선긋기 순서

❖ 주의사항

배지를 굳게 하는데 사용하는 아가는 끓이면 액체가 되고 약 42℃ 이하에서는 다시 고체로 굳게 된다. 페트리 접시에 한천 배지를 붓기 전에 어느 정도 식히지 않으면 페트리 접시 뚜껑에 물방울이 맺히고 이것이 한천배지 표면에 떨어져 자라고 있는 미생물을 퍼지게 만든다. 이런 경우 세균의 순수분리가 어렵다.

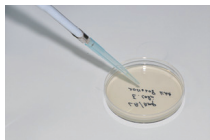
❖ 도말평판법



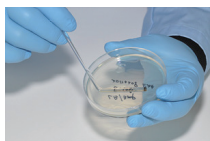
〈그림 Ⅲ-29〉 유리봉을 에탄올에 담금



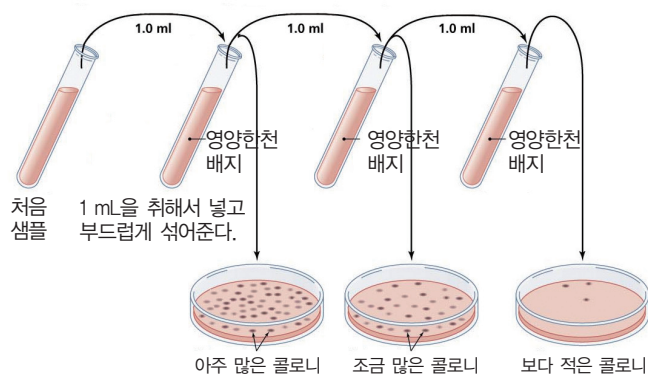
〈그림 Ⅲ-30〉 유리봉 소독



〈그림 Ⅲ-31〉 배양액 펼침



〈그림 Ⅲ-32〉 배양액 펼침



〈연속 희석에 의한 주입 평판법〉

실험3) 도말평판법

- (1) 한천 영양배지에 접종한 균주의 이름을 적는다.
- (2) 95% 에탄올이 담겨 있는 비커에 유리봉을 담근다. 이 때 유리봉의 구부러진 부분이 충분히 잠기도록 한다.
- (3) 불꽃으로 살균한 백금이를 공기 중에서 10-15초간 식힌 다음 서너 차례 *S. marcescens* 배양액을 떠서 한천영양배지의 중앙에 떨어뜨린다. 멸균된 피펫을 이용하여 50~100 μm 정도 배양액을 취할 수도 있다.
- (4) 백금이를 불꽃으로 살균하여 내려놓고 배지의 뚜껑을 덮는다.
- (5) 비커로부터 유리봉을 꺼내어 불꽃을 통과시킨다. 이 때 배지에 닿을 유리봉 부분이 아래로 향하게 한다. 불꽃을 통과한 유리봉을 10-15초간 식힌 후 배지 표면에 대고 주입된 배양액이 배지 표면에 골고루 퍼지도록 가볍게 밀고 당긴다.
- (6) 도말이 끝나면 배지 뚜껑을 덮고 유리봉을 비커에 담는다.
- (7) *Micrococcus luteus* 배양액과 *S. marcescens*와 *M. luteus*가 섞인 배양액을 떠서 3~6 과정을 반복한다.
- (8) 도말이 끝난 평판배지를 뒤집어서 2일간 25℃에서 배양한다.

실험4) 계대배양기술

순수배양 균주의 계대배양방법은 페트리 접시로부터 분리한 콜로니를 영양액체 배양액 혹은 영양한천 사면배지에 연속하여 옮기는 것이다.

- (1) 각각의 시험관에 *M. luteus*, *S. marcescens*라고 적는다.
- (2) 도말된 평판배지의 잘 분리된 *S. marcescens* 콜로니를 선정하여 접종용 백금리로 적힌 배양액이 들어 있는 시험관에 접종한다.
- (3) 노란색/크림색 색깔의 콜로니를 위와 같은 방법으로 *M. luteus*라고

- 적힌 배양액이 들어있는 시험관에 접종한다.
- (4) 시험관을 25℃에서 2일간 배양한다.

창의력 키우기

생막걸리에 들어있는 효모의 한 콜로니를 얻으려 한다면 어떤 방법으로 하는 것이 좋을까?

결과 및 논의

- (1) 콜로니 내의 미생물 생장은 모두 똑같은가? 만약 다르다면 콜로니의 형태가 어떻게 다른지 묘사하고 무엇이 이러한 차이를 만드는지 생각해 보자.
- (2) 세균을 순수 배양할 수 있었는가? 순수 배양 여부를 어떻게 확인할 수 있을까?
- (3) 고체배지 상에서 세균의 성장과 관련하여 ‘콜로니’를 정의한다면?
- (4) 어떤 순수 배양 기술을 이용하든 희석법이 왜 일반적인 접근방법일까?
- (5) 획선평판법이 주입평판법보다 어떤 점에서 더 좋을까?

미생물을 가지고 연구하기 위해서는 자연에서 얻은 시료로부터 원하는 종을 순수 분리하여 그 특성을 연구할 필요가 있다. 일반적으로 순수 배양 균주를 얻는 방법으로 획선평판법과 주입평판법이 있다. 두 가지 방법 모두 시료의 세균 세포를 하나의 세포가 분열하여 단일 콜로니가 형성될 수 있도록 희석하는 과정이 포함되어 있다. 한 세균으로부터 유래하여 동일한 후손으로 구성되어 있다고 가정 할 수 있기 때문에 콜로니는 후속 세균연구에 사용될 수 있다.

1) 획선평판법

멸균된 백금이에 분리하고자 하는 미생물 시료를 묻혀 고체배지의 한쪽에서 시작하여 점진적으로 획선을 긋는다. 첫 번째 부분에 획선한 다음 백금이를 멸균하고 첫 번째 획선에서 접종원을 취해 두 번째 부분에 획선을 긋는다. 동일한 방법으로 획선을 그어 나가면 접종원이 점차 희석되어 마지막 획선 부위는

한 개의 세포가 존재한다. 이것이 자라 콜로니를 형성하게 된다. 이 방법은 재료와 시간의 경제적인 측면에서 가장 좋다. 그러나 이 방법은 재료와 시간을 아낄 수 있는 좋은 방법이다. 그러나 이 방법은 연습이 필요하며 경험이 많이 요구된다. 적절하게 희석 접종한 평판배지는 모든 미생물 실험에 유용하도록 미생물은 순수분리시킨다.

2) 주입평판법

원 시료를 여러 번 희석하여 배양접시에 붓는 것으로 미생물 각각을 분리된 군체로 형성할 수 있도록 한다. 대부분의 세균이나 균류는 아직 굳지 않은 45~50℃의 배지에서 즉시 사멸되지 않으므로 이 방법이 가능하다. 한천이 굳으면 각각의 세포는 그 자리에 고정되므로 개별 군체를 형성한다. 이 방법은 희석평판법에 비해 숙련된 기술을 덜 필요로 한다. 그러나 더 많은 영양배지, 시험관, 펄트리 접시 등이 필요하다는 것은 단점이다.

3) 도말평판법

미생물이 포함된 한 방울의 현탁액을 고체 배지 위에 떨어뜨리고 멸균된 유리막대로 펼치는 방법으로 군체가 충분히 분리되기 위해서는 미리 현탁액을 희석시킬 필요가 있다.

읽을거리

로버트 코흐(Robert Koch, 1843~1910)는 의학 미생물의 아버지로 탄저병 연구를 통해 질병 유발 과정에서 세균의 역할을 직접적으로 증명하였다. 그는 결핵의 원인이 되는 미생물이라면 모든 감염된 숙주로부터 발견되어야 하고 건강한 사람에게는 발견되지 않아야 한다고 생각했다. 또한 의심되는 미생물을 순수 배양할 수 있어야 하며 이 미생물을 건강한 숙주에 투여했을 때 병에 걸려야 하고 다시 병에 걸린 숙주에게 동일 미생물이 발견되어야 한다는 가정을 하였고 실험을 통해 결핵균이 결핵의 원인균임을 밝혔다. 그가 한 가정을 코흐의 가정이라고 하며 현재도 특정 미생물이 특정한 질병의 원인임을 밝힐 때 기준으로 사용하고 있다.

생각해 보기

많은 연구자들이 코흐의 가정을 이용하여 수많은 질병의 원인균을 밝혔다. 코흐의 가정은 모든 질병원인균을 밝히는데 유용할까? 만약 예외가 있다면 어떤 경우가 있는지 생각해 보자.

03

세균의 염색과 관찰

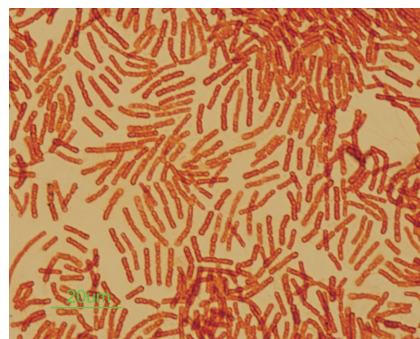
학·습·목·표

- 미생물 염색의 필요성과 원리를 설명할 수 있다.
- 그람염색의 원리와 세균의 동정에 어떻게 이용되고 있는지 설명할 수 있다.

미생물의 군체는 크기가 미세하여 투명하거나 색깔이 없기 때문에 살아 있는 상태로 관찰하기는 대단히 어렵다. 따라서 이들의 형태와 특징을 관찰하기 위해서는 염색하여 현미경으로 관찰해야 한다. 이러한 염색시약을 이용한 관찰은 세포의 형태학적 특성과 세포 구조를 알아내는데 도움을 준다.

염색은 세포 성분 중 단백질이나 핵산 같은 거대분자와 염색액 성분이 정전기적 인력에 의해 결합하여 색을 띠게 되는 원리를 이용한다. 산성 염색시약은 색을 띠는 부분이 음전하를 띠므로 세포 내 양전하를 띤 분자와 결합하며, 염기성 시약은 색을 나타내는 부분이 양전하를 띠고 이것이 세포의 음전하 성분과 강하게 결합하여 염색된다.

세균을 염색 하는 데는 한 가지 염색시약을 사용하여 염색하는 단순염색과 두 가지 염색시약을 사용하는 분별염색으로 나눈다.



〈그림 Ⅲ-33〉 사프란인 염색된 세균(X1000)

조사하기

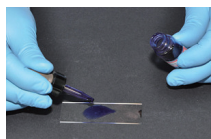
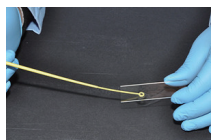
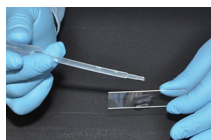
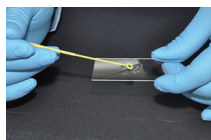
현미경으로 관찰할 때 염색과 함께 고정 과정도 중요하다. 고정 과정이라는 것은 무엇을 말하며 왜 필요한지 조사해 보자.

사람의 입 속에는 어떤 세균들이 살고 있을까? 사람의 구강세포를 메틸렌 블루로 염색하여 관찰할 경우 간혹 아주 작은 푸른색 막대 모양이 관찰 될 때가 있다. 이것이 바로 입속에 살고 있는 세균이다. 세균을 광학현미경으로 형태적인 특징을 살려 관찰하고, 또한 미래의 연구를 위해 장기보관하기 위해서는 어떤 방법을 사용할까?

❖ **시료 준비 시 주의사항**
표면에 부착된 시료가 세척 과정에서 유실될 우려가 있으므로 도말표본 제작 시 세균에 열을 가해 받침 유리에 세균을 고정시킨다. 이 과정은 이어지는 염색 과정을 위해서도 필요하다.

세척 시 물에 의해 표면에 부착된 시료가 씻겨나가지 않도록 하기 위하여 받침 유리를 뒤집어 시료가 없는 면에 물을 물살이 세지 않게 흘려보내면 된다. 그리고 거름종이로 잔여 수분을 제거할 때는 닦아내지 말고 가볍게 눌러 수분을 제거한다.

❖ **현미경 관찰 시 주의사항**
미생물 관찰 시 덮개 유리를 사용하지 않으며, 고배율 관찰 시에는 이물질 오일을 사용한다.



탐구 활동 9

세균의 염색과 관찰

크기가 작은 세균을 맨눈으로 관찰할 수는 없다. 현미경을 사용하면 세균을 볼 수 있지만 많은 세균은 색깔이 없거나 투명하여 또한 보기가 어렵다. 세균을 보려면 어떻게 할까?

준비물

- 재료: 세균 배양 플레이트, 루프, 그람 아이오딘액, 메틸렌 블루, 크리스탈 바이올렛, 사프란인 용액, 알코올 램프, 플라스크(250mL), 멸균한 2X YT 액체배지 50mL, 집종할 대장균 플레이트, 받침 유리, 집게 덮개 유리, 현미경, 세척병, 95%에탄올, 1회용 살균 플라스틱 루프, 거름종이

방법 및 절차

실험1) 단순염색법을 이용한 입 속의 미생물 관찰

- (1) 살균된 1회용 플라스틱 루프로 혀바닥, 치아와 잇몸 사이, 또는 치아와 치아 사이 등을 가볍게 긁어 받침 유리 위에 바른다.
- (2) 받침 유리에 물 한 방울을 떨어뜨리고 1의 루프에 채취된 미생물을 얇게 펴 바른다.
- (3) 알코올 램프를 켜서 도말한 받침 유리를 불 위에 가볍게 스치며 말리며 미생물을 고정시킨다.
- (4) 메틸렌블루 용액을 떨어뜨리고 2분간 방치한다.
- (5) 과량의 염료를 행구고 나서 거름종이 사이에 받침 유리를 놓고 거름 종이를 가볍게 눌러 즉시 빨아들이게 한다.
- (6) 현미경 위에 염색된 받침 유리를 놓고 관찰한다.



〈단순 염색법〉

실험2) 그람염색법을 이용한 입속의 미생물 관찰

- (1) 멸균된 1회용 플라스틱 루프로 혀바닥, 치아와 잇몸 사이, 또는 치아와 치아 사이 등을 가볍게 긁어 반침 유리 위에 바른다.
- (2) 반침 유리에 물 한 방울을 떨어뜨리고 1의 루프에 채취된 미생물을 얇게 펴 바른다.
- (3) 알코올 램프를 켜서 도말한 반침 유리를 불 위에 가볍게 스치며 말리어 미생물을 고정시킨다.
- (4) 반침 유리 위에 크리스털 바이올렛을 몇 방울 떨어뜨리고 30초~1분 후 물로 씻어낸다.
- (5) 그람 아이오딘 용액 몇 방울을 반침 유리에 떨어뜨리고 1분 후 물로 행군다.
- (6) 45° 각도로 반침 유리를 잡고 약 10초간 95% 알코올로 행군다. 더 이상의 탈색을 방지하기 위해서 즉시 물로 행군다.
- (7) 사프란인을 반침 유리에 떨어뜨린 후 30초~1분 후 물로 행군다.
- (8) 반침 유리를 거름종이로 가볍게 두드려 닦은 후 현미경을 이용하여 관찰한다.

창의력 키우기

생막걸리 속에 들어있는 효모는 어떻게 관찰 할 수 있을까? 세균의 관찰과는 어떻게 다른가? 실제로 현미경을 이용하여 관찰해 보자.

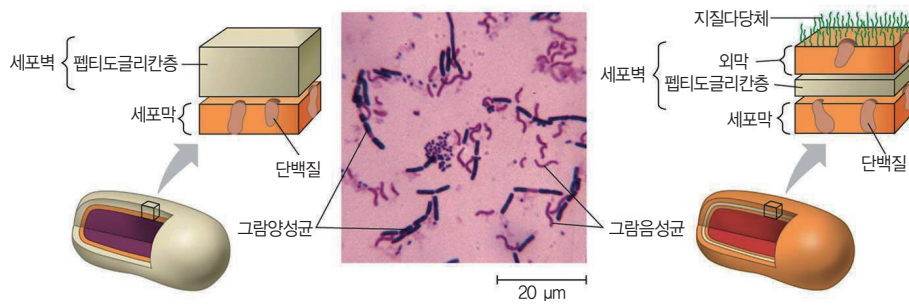
결과 및 논의

- (1) 단순염색과 그람염색으로 관찰한 자신의 입 속 미생물을 그려보자.
- (2) 같은 조의 친구들 결과와 종합해 보자. 각 조원의 입속에서 발견된 미생물들의 모양에는 어떤 것들이 있는지 조별로 모으고 분류해 보자. 또한 분류의 기준에 대해서도 토의해 보자.
- (3) 박테리아의 크기는 얼마나 될까? 크기를 측정하기 위해서는 어떻게 하면 될까?

- (4) 자신의 입속에서 발견된 미생물의 외형 및 염색 상태를 보고 어떤 종류의 박테리아인지 알아보자. 충치를 일으키는 세균을 발견할 수 있는가?
- (5) 미생물들이 우리 입속에서 잘 자랄 수 있는 이유는 무엇일까?
- (6) 미생물 관찰시 열고정을 하는 이유와 열고정의 단점은 무엇일까? 또한 화학적 고정과는 어떤 점이 다른지 알아보자.
- (7) 세균세포들을 염색하기 위해 메틸렌 블루와 같은 염료를 쓰는 이유는 무엇 때문인가?

명시야 현미경의 분해거리는 최대 $0.2\ \mu\text{m}$ 로 작은 작은 세균의 크기와 같아 광학현미경으로 살아있는 세균을 직접 관찰할 수도 있다. 그러나 세균의 특징을 보다 자세히 알고 또 관찰을 용이하게 하기 위해 보통 염색의 과정을 거친다. 단순염색은 반침 유리 위에 도말된 균체를 한 가지 염색약으로 염색하는 방법으로 세균의 핵산물질과 단백질 물질이 음전하를 띠므로 주로 염기성 염색시약을 써 염색한다. 염기성 염색시약에는 메틸렌 블루, 크리스탈 바이올렛, 카르볼푸신 등이 있고 염색 시간은 염색시약에 따라 차이가 있다. 음전하를 띠는 세포에 산성 염색시약, 예오신 또는 니그로신을 사용하면 세포는 염색이 되지 않고 배경이 염색되어 세포의 형태를 관찰할 수 있다. 배경을 염색하므로 이 염색 방법은 열고정과 화학약품처리를 하지 않아 세균의 원래 모양을 변화시키지 않고 그대로 관찰할 수 있는 장점을 가지고 있다. 또한 이런 염색 방법은 염기성 염료로 염색이 잘되지 않는 나선균의 관찰에 주로 사용된다.

그람염색은 1884년 그람(Gram, C.)에 의해 완성된 염색법으로 이 염색법에 의해 세균은 크게 그람양성균과 그람음성균으로 분류된다. 이 염색법은 세균에 따라 차이를 보이는 세포막과 세포벽의 특성에 따라 세균의 염색이 달리되는 성질을 이용한 것이다. 그람 양성세균의 경우 세포벽이 한 층의 두꺼운 펩티도글리칸 층으로 구성되어 있으며, 음전하를 띠는 테이콘산 등을 함유하며 그람 염색에 대해 보라색을 띤다. 그람음성균은 세포벽이 삼층 구조로 세포막, 얇은 층의 펩티도글리칸, 지질로 구성되어 있는 외막으로 1차 그람염색이 에탄올에 의해 탈색된 후 이차 염색인 샤프라닌에 의해 염색되어 핑크빛을 띤다.



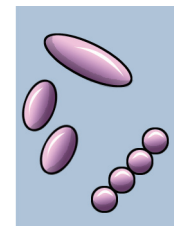
(a) **그람양성** 그람양성균은 펩티도글리칸이 풍부한 두꺼운 세포벽을 지니고 있어 알코올로 세척하여도 세포질에 들어간 보라색 염료가 잘 빠져나오지 못한다. 따라서 붉은색으로 2차 염색을 하더라도 보라색이 그대로 유지된다.

(b) **그람음성** 그람음성균은 세포벽에는 펩티도글리칸의 양이 적고 짧은 세포벽이 세포막과 외막 사이에 존재한다. 알코올에 의해 보라색이 쉽게 탈색되어 2차 염색약인 붉은색으로 염색된다.

〈그림 III-34〉 그람양성균, 그람음성균

그람염색은 먼저 열 고정된 박테리아 세포를 도말한 후 1차 염색시약인 크리스탈 바이올렛으로 박테리아를 염색하는 것으로부터 시작한다. 그 다음 크리스탈 바이올렛을 세포에 강하게 고정시키기 위해 아이오딘 용액을 사용하는데, 이 용액은 크리스탈 바이올렛과 결합하여 불용성 복합체인 크리스탈 바이올렛-아이오딘 복합체를 형성하여 세포에 더욱 강하게 고정된다. 특히 그람양성균은 세포벽의 마그네슘-리보핵산이 CVI 복합체와 결합하여 Mg-RNA-CVI 복합체를 형성하는데 이것은 CVI 복합체보다 세포에 더욱 강하게 결합한다. 여기에 탈색제로 지방용해와 단백질 탈수작용이 있는 95% 에탄올을 사용하면, 그람음성균은 인지질로 구성된 외막이 알콜에 의해 쉽게 용해되고 불용성 복합체가 쉽게 탈색되는 반면 그람양성균은 잘 탈색되지 않는다. 여기에 사프라닌으로 재 염색을 하게 되면 그람양성균은 보라색을 유지하는 반면 탈색된 그람음성균은 사프라닌에 의해 분홍색으로 염색된다. 그람 양성균에는 대부분의 구균과 유포자 간균이, 그람 음성균에는 대부분의 간균이 속해 있다.

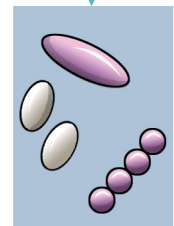
또 다른 분별염색인 항산성염색법 또는 지열-닐센법은 지질 함량이 높아 일반적인 염료로 염색되지 않는 결핵균이나 나균을 동정하는데 많이 사용한다. 1차 염색시약으로 염기성 시약인 카르볼복신을 페놀과 혼합하여 처리한 후 받침유리를 가열하여 염색액이 세균 내부로 들어갈 수 있게 한다. 이후 강력한 탈색제인 산성알코올을 처리하면 다른 세균 등은 염색시약이 쉽게 제거되나 항산성 세균들은 세포벽에 지질을 많이 함유하여 쉽게 탈색되지 않는다. 2차 대조염색으로 메틸렌블루를 이용하면 비항산성세균들이 푸른색으로 염색된다.



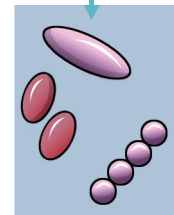
1차 염색



착색



탈색



대조염색

〈그림 III-35〉 그람염색 과정

조사하기

세균을 염색하는 데 있어 세균의 세포벽의 구성은 큰 영향을 미친다. 세균의 세포벽에 대해 조사하시오.

04

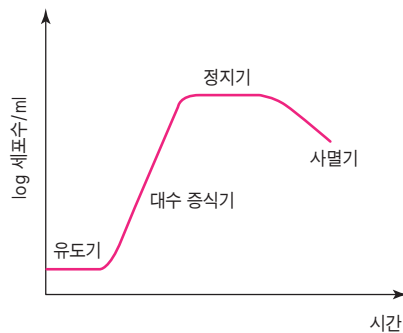
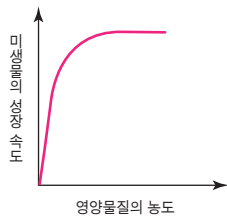
미생물의 성장

학·습·목·표

- 분광 광도계의 사용법을 안다.
- 세균의 성장곡선을 그릴 수 있다.
- 세균의 성장과 분열과정을 이해한다.

시험관이나 플라스크의 액체배지에서 배양하는 미생물은 새로운 영양배지의 첨가나 노폐물의 제거 없이 닫힌계에서 자라게 되므로 예측 가능한 형태로 증가하고 사멸하는 성장의 형태를 보인다. 이러한 미생물의 성장형태를 그래프로 나타낸 것이 미생물의 성장곡선이며, 시간에 따른 미생물의 수를 로그값으로 나타낸다. 미생물의 성장단계는 성장곡선을 바탕으로 네 시기로 구분한다.

❖ 영양물질의 농도에 따른 미생물의 성장속도



〈그림 Ⅲ-36〉 미생물의 성장곡선

증식의 첫 번째 단계는 유도기 또는 지체기라고 한다. 이 시기는 세포가 새로운 환경에서 증식하는 데 필요한 각종 효소를 생합성한다. 주로 환경이 바뀔 때 나타난다. 유도기에는 세포의 사멸과 균형이 맞으므로 세포 수 증가는 나타나지 않지만 세포의 크기는 증가한다. 영양물질의 조성이 같은 배지로 옮긴 경우 유도기는 나타나지 않는다.

다음 단계는 대수 증식기이다. 이 시기 동안 미생물은 최대 속도로 증식하고 분열한다. 세균의 경우 세대시간이라 불리는 일정한 시간 간격에 따라 배로 증가한다. 이 시기 개체군은 생화학적으로 최적의 상태를 보이므로 대부분의 연구들은 이 대수 증식기 동안 행해진다. 영양물질의 농도가 증가하면 미생물의 성장속도도 증가하지만 영양물질의 농도가 일정 이상이 되면 미생물의 성장속도도 일정해지는 형태를 띤다. 이것은 세포막에 존재하는 운반체가 포화되기 때문이다.

이 기간 이후에 미생물 개체군은 정지기로 들어간다. 이 기간에는 새롭게 분

열하여 생성된 세포 수와 사멸하는 세포 수가 같아 균형을 이룬 시기이다. 세균은 이 시기에 내생포자를 형성하거나 다른 변화를 통해 외부의 물리적·화학적 처리에 대해 내성을 갖추게 된다. 이 시기 세균은 기아단백질을 형성하여 자신을 외부로부터 지킬 수 있게 된다. 정지기는 영양소의 소모와 노폐물의 증가로 일어난다.

개체군 생장의 마지막 단계는 사멸기이다. 이 기간 동안 미생물들은 급속히 사멸하며 대수 증가기와 마찬가지로 개체군의 크기는 대수적으로 감소된다. 만약 미생물이 *Bacillus* 또는 *Clostridium* 종이면 영양세포들은 포자로 전환되어 정지기는 여러 달 혹은 수 년 연장될 수 있지만 많은 종에 있어서 특정한 미생물 집단의 역사는 마지막 세포 사멸로 끝난다.

토론하기

냉장고에 보관하고 있던 박테리아와 왕성하게 성장하고 있는 같은 종류의 박테리아를 새로운 배지에 접종했을 때 두 개체군의 성장속도는 같을까? 만약 차이가 있다면 왜 차이가 나는지 토론해 보자.

탐구 활동 4

미생물의 성장곡선 구하기

준비물

- 재료: 균주, *E. coli* 배양액(6시간 이상 배양), LB 영양배지, LB 한천 배지, 분광 광도계, 멸균된 피펫, 멸균 시험관, 멸균 증류수, 배양기

방법 및 절차

- (1) 멸균된 상태의 배지 100 mL에 대장균 배양액 1 mL을 접종하여 키운다. (37°C, 200 rpm).
- (2) 접종 후 4시간 동안 0 time을 포함하여 4시간 동안 시료를 무균조작 방법으로 채취하여 다음과 같이 흡광도 측정 및 콜로니 계수법을 수행한다.
 - ① 시간별로 시료를 채취하여 흡광도(파장은 595 nm 또는 600 nm)를 측정한다. 0 time에서의 O.D.₆₀₀은 0.08~0.1로부터 출발하는 것이 적당하다. 배양시간에 따른 흡광도의 변화를 그래프 용지

❖ 주의 사항

1. 시간별로 시료를 채취할 때 반드시 무균조작을 하고, 채취가 끝난 배지는 바로 배양기에 넣어 시간을 지체하지 않도록 한다.
2. 분광 광도계를 사용할 때는 미리 10분 전에 예열을 해야 하며 반드시 멸균된 동일 배지로 영점 조정을 한 후 사용한다.

를 사용하여 그려 보고 이로부터 대수기에서의 세대시간을 간접적으로 구해본다. 세대시간은 흡광도의 변화가 2배가 될 때까지 걸리는 시간이다.

- ② 시간별로 시료 약 1 mL을 채취하여 멸균된 증류수로 10^{-5} , 10^{-7} 및 10^{-9} 로 희석한다. 희석된 시료 100 μL 씩을 미리 준비한 LB평판배지에 접종한 후에 37℃ 배양기에서 하룻밤 배양한다. 다음 날 자란 콜로니 숫자를 세어 시료 1 mL당 세균 수를 배양시간별로 구한다.(세 종류의 희석 배수 중에서 콜로니 숫자가 너무 많아서 셀 수 없거나 또는 너무 적은 경우에는 제외한다.)

창의력 키우기

막걸리에서 순수 분리한 효모를 접종하여 성장곡선을 그려보자. 효모의 성장곡선은 세균의 성장곡선과 어떤 점에서 차이가 있는가?

결과 및 논의

- (1) 배양 시간에 따른 세균수의 변화를 세미로그 그래프 용지를 사용하여 그려보고 세대시간(GT)을 구해보자

$$GT = \frac{\log 2 \times t}{\log N_t - \log N_0} = \frac{\log 2 \times t}{\log A - \log B}$$

단, B = 대수 성장기에서 한 시점에서의 세균 수

A = 대수 성장기에서 다른 시점에서의 세균 수

t = A, B 두 시점 사이의 시간

- (2) 계수법으로 측정한 콜로니의 수

분 희석	0	30	60	90	120	150	180	210	240
10^{-5}									
10^{-7}									
10^{-9}									

(3) 흡광도 측정 및 콜로니 계수법의 두 가지 방법으로 구한 세대시간을 비교해 보고 또 대수기에서의 흡광도와 균체수와의 상관관계가 어떻게 되는지 알아보자.

(4) O. D. 600 nm에서 흡광도를 측정하는 까닭은 무엇 때문인가?

(5) 각 시간별 특정 희석배수에서 시료 1 mL 당 세균수는 구하는 식을 세워보자.

미생물 집단은 매 세대마다 두 배씩 증가하므로 미생물의 세대수(n)에 따라 미생물 수는 2^n 으로 증가한다. 따라서 초기 집단의 크기를 N_0 라고 하고, t 시간 후 집단의 크기를 N_t 라고 한다면, N_t 는 $N_0 \times 2^n$ 으로 나타낼 수 있다. 이를 세대수(n)로 나타내면 $n = \frac{\log N_t - \log N_0}{\log 2}$ 과 같다.

액체배지에서 배양할 때 대수 증식기의 성장률($\text{growth rate} = k$)은 시간에 따른 세대수로 보통 한 시간 동안의 세대수로 나타낼 수 있으며, 세대시간($\text{generation time} = GT$)은 미생물 집단의 규모가 두 배로 증가하는 데 걸리는 시간임으로 GT 는 성장률의 역수임을 알 수 있다. 따라서 처음 시작점에서 세균의 수(N_0)와 일정 시간(t) 경과 후 세균의 수(N_t)를 안다면 세대시간(GT)은 다음과 같이 구할 수 있다.

$$GT = \frac{1}{k} = \frac{1}{n} \frac{\log 2 \times t}{\log N_t - \log N_0}$$

조사하기

미생물의 증식은 화학적 물리적 환경에 크게 영향 받을 수 있다. 미생물의 증식에 영향을 미치는 화학적 물리적 요인을 알아보고 이들 요인이 어떻게 영향을 미치는지 조사해보자.

05

플라스미드의 분리 및 절단

학·습·목·표

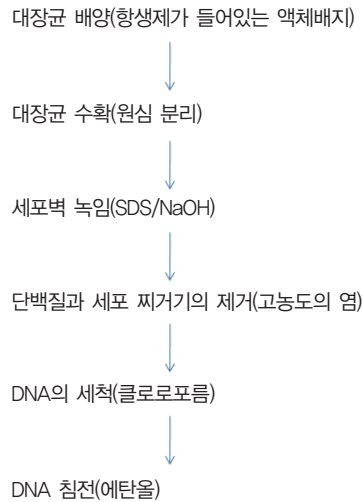
- 대장균으로부터 플라스미스 DNA를 분리할 수 있다.
- 플라스미드 DNA의 특성을 설명할 수 있다.
- 플라스미드의 벡터로써 가지는 유용성을 이해한다.
- 제한효소의 기능과 그 특징을 설명할 수 있다.
- 플라스미드와 제한효소의 중요성을 말할 수 있다.

재조합 DNA 기술을 이용하여 우리가 원하는 DNA를 대량으로 만들어내는 것을 DNA 클로닝이라고 한다. 유전자를 활용하여 인간에게 유용한 물질을 대량생산 할 수 있는 DNA 클로닝 기술은 생명과학이 DNA 클로닝 기술을 통해 원하는 DNA를 대량으로 얻을 수 있게 함으로써 생명과학이 비약적으로 발전할 수 있는 토대를 마련하게 하였다

유전자 클로닝 실험은 대량 생산하고자 하는 DNA 단편을 얻어야 한다. DNA 단편은 보통 제한효소를 이용하여 얻으며, 이를 벡터라고 불리는 DNA 운반체에 삽입한다. 이 DNA 운반체로는 대장균의 경우 플라스미드가 널리 쓰인다. 플라스미드는 아래 <그림 3-37>에서처럼 대장균 속에 들어 있는 주염색체 이외의 여분의 조그마한 동그라미 염색체를 말한다. 이 플라스미드에 원하는 DNA가 끼어들어간 재조합 플라스미드를 숙주세포인 대장균에 넣어주면 대장균 안에서 플라스미드는 복제되어 자신과 동일한 다량의 재조합 플라스미드를 만들어낸다. 또한 대장균이 분열할 때 재조합 DNA 분자는 자손에게 전달되며 자손에서도 복제가 일어난다.



<그림 Ⅲ-37> 세균의 주 DNA와 플라스미드



〈그림 Ⅲ-38〉 플라스미드를 얻는 과정

DNA의 운반체로 쓰이는 플라스미드는 세균 내에서 자신의 염색체 DNA와 관계없이 스스로 복제할 수 있는 환형의 작은 DNA이다. 이 환형의 작은 DNA에는 복제 시작점이 있고 엠펬실린과 같은 항생물질에 저항하는 표지유전자, 외부 DNA를 끼워넣을 수 있다. 또한 제한효소가 작용하는 염기서열이 있어 외부 DNA를 끼워 넣을 수 있다.

유전자 클로닝의 핵심적인 역할을 하는 플라스미드는 〈그림 Ⅲ-38〉에 있는 것과 같이 몇 단계를 거쳐서 얻을 수 있다. 먼저 항생제가 들어있는 액체배지에서 플라스미드가 들어있는 대장균을 배양한 후 이를 원심분리로 수확한다. 수확한 대장균의 세포벽을 녹여서 대장균을 터트린 후 단백질과 세포 찌꺼기를 제거하고 DNA를 얻어 씻은 후 에탄올로 처리하여 플라스미드 DNA를 얻을 수 있다.

플라스미드에 원하는 DNA를 넣어주기 위해서는 플라스미드를 절단해야 한다. 플라스미드를 절단하는데 쓰이는 효소는 제한효소라고 불린다. 제한효소는 DNA의 특정염기 서열을 인지하여 특정부위를 자르는 효소이다. 원래 제한효소는 박테리아가 외부에서 침입한 바이러스 DNA를 잘라 자신을 방어하기 위한 목적으로 만들어 내는 것이다. 이 제한효소를 이용하여 DNA를 자르고 외부 DNA를 끼워 넣는 재조합이 가능하게 되었다. 제한효소의 발견은 DNA조작의 계기가 될 수 있었다. 제한효소의 이름은 추출한 미생물의 종, 속명을 따서 *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII* 등으로 부른다. 제한효소로 자르게 되면 두 가닥의 DNA가 엇갈려서 잘려지게 되어 서로 상보성 있는 한 가닥의 DNA가 노출된다. 이 상태를 이용하여 같은 효소를 잘린 DNA조각을 연결하여 DNA 클로닝

이 가능하게 되는 것이다.

여기에서는 대장균에서 플라스미드 DNA를 얻어 여기에 식물체의 DNA를 넣어 재조합 DNA를 만들고, 재조합 DNA를 대장균에 다시 넣어주는 일련의 실험과정을 알아보자.

탐구 활동 5

플라스미드 DNA 분리 및 절단

❖ GET buffer

50mM glucose, 25mM Tris-cl (pH 8), 10mM EDTA(pH 8)

❖ 2X YT 배지

효모 추출물 1g, 박토틱린 톤 1.6g, NaCl 0.5g을 증류수 100mL에 녹임

❖ K-acetate 용액

5M potassium acetate 60mL, glycolic acetic acid 11.5mL, H₂O 28.5mL

준비물

- 소형원심분리기, 피펫 맨(용량 200 μ L, 20 μ L), 항온기, 교반기, 볼텍스, 1.5 ml 튜브, 팁, 피펫, GET용액, K-acetate 용액, 10% SDS, 1M NaOH, TE 용액, 2X YT 배지, 클로로포름/아이소아밀 알콜 (Chloroform/Isoamylalcohol)=50/1 용액, 엠포실린 용액 (50 mg/ml) 여러 제한효소와 그 완충용액

방법 및 절차

A. 플라스미드의 분리

- (1) 2X YT 배지에 엠포실린을 100 μ g/ml 되게 넣은 후 대장균을 접종하여 하룻밤 배양한다. (37°C, 200 rpm) - 전날 준비한다.
- (2) 1.5 ml 튜브에 배양액을 가득 붓고 30초간 1200 rpm에서 원심분리 한다.
- (3) 배양액을 따라 버리고 휴지에 뒤집어 놓아둠으로 흐르는 남은 물기를 제거한 후 GET 용액을 150 μ L 넣고 박테리아 덩어리가 완전히 풀어지도록 강하게 볼텍스 한다.
- (4) 0.2N NaOH/1% SDS 용액을 200 μ L 넣고 손으로 가볍게 위 아래로 3-4번 흔들어 준다. 배양액이 맑아지는 것을 확인한다.
 - 이때 0.2N NaOH/1% SDS 용액은 사용 직전 새로 만들어 사용하여야 하며 그 방법은 10% SDS : 1N NaOH : 멸균수=1 : 2 : 7의 비율로 섞어 희석하면 된다.
- (5) 냉장실에 보관한 차가운 K-acetate용액을 150 μ L 넣고 손으로 세게 흔들며 하얀 침전물이 생기는 것을 확인한다.
- (6) 12,000 rpm에서 10분간 원심분리한다.
- (7) 상층액을 건더기가 함께 들어가지 않도록 주의하며 새 튜브에 가만히 따라 옮긴다.

- (8) 손에 묻지 않게 조심하고 화기에 닿지 않도록 유의하며 상층액과 동량 (약 400 μ l)의 클로로포름/아이소아밀 알콜을 넣고 강하게 30초간 볼텍스 한다.
- (9) 3-5분간 12,000 rpm에서 원심분리한다.
- (10) 클로로포름층을 팁이 건드리지 않도록 주의하여 상층액을 팁을 이용하여 새 튜브로 옮기고, 옮긴 용액 2배 부피의 에탄올을 넣고 섞는다. 만일 중간층에 하얀 단백질층이 보이면 없어질 때까지 9번의 과정을 반복한다.
- (11) 10분간 12,000 rpm에서 원심분리하고 에탄올을 버리고 하얀 침전물을 건조시킨다.
- (12) 튜브에 20 μ l TE용액을 넣고 DNA를 녹인다.

B. 제한효소를 이용한 플라스미드 DNA 자르기

- (1) 자르고자 하는 DNA용액 (5 μ l), 완충용액 (2 μ l), 제한효소 (0.5 μ l), 멸균기($X \mu$ l=12.5, $X=20-7.5$)를 섞어 총 20 μ l되게 한다. (이때 DNA 용액에 대한 대조군도 같이 반응시킨다)
- (2) 37°C 항온기에서 2시간 이상 반응시킨다. 만약 DNA량이 많거나 깨끗하지 못하여 잘 잘리지 않으면 하룻밤 반응시킨다.

결과 및 논의

- (1) 실험과정 중 플라스미드 DNA가 대장균의 DNA, 단백질, 세포 찌꺼기 등과 분리 되는 단계와 그 원리를 생각해 보자.
- (2) 위 실험단계 중 플라스미드 회수양에 영향을 가장 크게 주는 단계를 논의해 보고 실험상 주의해야 할 단계들을 이야기해 보자.
- (3) 플라스미드 DNA를 이용하여 제한효소로 잘랐는데 DNA가 깨끗하지 못해 잘리지가 않는다. 어느 단계를 다시 반복해야 할까?
- (4) 제한효소를 이용하여 DNA를 자를때, 완충용액에 대한 대조군을 생각하여 실험설계를 해보자. 그리고 그 결과를 예측해 보자.
- (5) 원심분리기를 사용할 때는 샘플을 대칭으로 꽂아야 하며 무게를 비슷하게 하여 원심분리해야 한다. 그 이유를 생각해 보자.

(6) 유전공학에서 제한효소 발견의 중요성과 플라스미드를 벡터로써 사용할 때의 이점을 토론했다.

DNA 분자가 유전자 클로닝의 운반체 역할을 하기 위해서는 몇 가지 조건을 충족해야 한다. 첫째 숙주 세포 내에서 복제가 가능해야 하며, 둘째 정제하고 다루는데 편리하기 위해서는 비교적 크기가 작아야 하며, 셋째 항생제 저항성 유전자와 같은 표지 유전자를 가지고 있어야 하고 제한효소 절단부위를 가지고 있어야 한다. 이러한 기준을 만족시키는 DNA 운반체가 대표적으로 플라스미드이다.

플라스미드는 원형의 DNA 분자로 복제 시작점을 갖고 있어 숙주세포 내에서 세균염색체와는 독립적으로 복제가 가능하며 종종 옴피실린과 같은 항생제에 대한 저항성 유전자를 갖고 있다. 이런 저항성 유전자를 갖고 있기에 실험실에서 우리가 원하는 유전자를 갖고 있는 플라스미드가 세균속으로 들어갔는지를 확인하는데 매우 유용하다. 작은 플라스미드는 숙주세포의 DNA를 이용하여 사본을 만들지만 큰 플라스미드는 플라스미드 복제에 필요한 특별한 효소 유전자를 지니고 있기도 하다.

플라스미드 중 어떤 것은 박테리아 염색체 내로 자신을 삽입하여 복제할 수 있다. 이러한 삽입 플라스미드 혹은 에피솜(episome)은 수 많은 세포분열 후에도 이런 형태로 유지되지만 어떤 단계에서는 독립적인 요소처럼 존재한다.

클로닝 운반체로는 10 kb 이하가 좋은데, 플라스미드 크기는 최소 1.0 kb에서 250 kb까지 다양하다.

사본수는 주로 하나의 세균에서 발견되는 개개의 플라스미드 분자의 수이다. 사본수를 조정하는 인자는 잘 알려져 있지 않지만 큰 분자는 1분자 정도로 적으며 어떤 것은 사본이 50개 이상인 플라스미드도 있다. 보통은 다량의 사본체가 세포에 존재하는 것이 좋은 클로닝 운반체이다.

어떤 플라스미드는 특이한 대사 기능을 수행하도록 하는 유전자를 가지고 있는 경우도 있다. 가령 석유 누출지에는 특이한 많은 탄화수소가 있는데 어떤 세균은 이들 분자를 탄소원으로 사용해 살아간다. 이 탄화수소를 분해하는데 관련된 효소를 암호화하는 유전자가 플라스미드에 존재한다.

조사하기

1. 원하는 DNA를 얻는 방법을 조사해 보자. 클로닝하기 위해 필요한 DNA를 식물 혹은 동물로부터 얻으려고 할 때의 과정을 알아보고, 실제로 플라스미드 DNA를 얻는 것 처럼 재조합 DNA를 만들기 위해 원하는 DNA를 얻는 방법을 조사해 보자.
2. 재조합 플라스미드를 만드는 법을 조사해 보자. 재조합 플라스미드를 만들기 위해서는 어떤 효소가 필요한가?

읽을거리

유전자 재조합은 누구의 아이디어로부터 시작했을까?

1972년 허버트 보이어는 제한효소에 관한 내용을 하와이에서 열린 학회에서 발표하였다. 이 당시 플라스미드에 대한 내용도 같이 발표되었는데 여기에 아이디어를 얻은 27세의 벤처 투자가인 밥 스완슨은 보이어를 설득하여 1976년 제넨텍이라는 회사를 설립하였다. 이들의 목표는 유전자 재조합을 이용하여 인슐린을 대량으로 생산하는 것이었다. 여러 번의 어려움 끝에 성공적으로 기술이 개발되었다.

당시 굴지의 제약회사인 릴리사가 인슐린 사업을 독점하고 있었는데 유전자 재조합의 응용으로 인슐린을 쉽게 얻을 수 있자 제넨텍을 인수하였다. 1980년 인수소식에 제넨텍의 주식은 상한가를 기록하였고 스완슨과 보이어는 백만장자가 될 수 있었다.

1980년 3,500만 달러 규모였던 이 회사는 현재 170억 달러의 자본금에 22억 달러 매출을 올리는 거대회사로 성장했다.

2006년 창립 30주년을 맞이하여 제넨텍(Genentech)사는 1904년 유전공학이 미국에서 처음으로 시작된 콜드 스프링 하버 연구소의 카네기 건물에 분자 생물학 및 바이오 테크놀로지 센터 설립을 위해 250만 달러의 기부금을 출연했다. 이 곳에는 노벨상 수상자인 제임스 왓슨, 시드

니 브레너, 바바라 맥 클린톡 그리고 헤르만 뮐러 등의 분자 생물학 혁명의 기록들을 소장하고 있다.

최초의 바이오 회사인 제넨텍사는 새로운 산업혁명의 길을 열었고 오늘날 바이오 테크놀로지는 의학 혁명과 심각하게 생명을 위협하는 질병을 가진 수백만 명을 치료할 수 있는 치료법을 제공하고 있다.



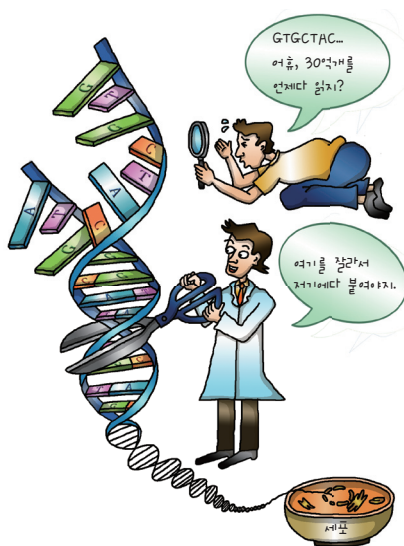
〈그림 Ⅲ-38〉 제넨텍사의 로고

06

DNA 절단 및 전기영동

학·습·목·표

- 생명공학 도구로써 제한효소가 어떻게 사용되는지 알 수 있다.
- 겔 전기영동의 원리와 사용법을 알 수 있다.
- 아가로스젤 전기영동 결과로부터 DNA 조각의 크기를 알아 낼 수 있다.



〈그림 III-39〉 제한효소

박테리아는 바이러스나 박테리오파아지 등의 외부에서 유래한 DNA에 대해 자신을 보호하기 위해 이를 절단하는 효소를 가지고 있는데 이를 제한효소라고 부른다. 박테리아는 진화의 과정에서 생존과 관련하여 제한효소를 가지게 되었지만 유전공학에서는 없어서는 안 될 아주 중요한 물질이 되었다.

제한효소의 이름은 분리한 원핵생물의 속명 첫 글자(대문자)에 종명의 처음 두 글자(소문자) 그리고 균주명과 분리된 순서에 따라 이름을 붙인다. 예를 들어 *EcoRI*은 *Escherichia coli*의 R 균주에서 첫 번째로 분리된 제한효소를 의미한다.

제한효소는 핵산의 특정 염기서열만을 인식하여 절단하므로 DNA의 유전자 재조합 실험은 이를 사용하여 이루어지게 된다.

제한효소에 의해 만들어지는 새로운 DNA의 말단을 엇갈려 절단되면 점착성말단이라고 하며, 정확히 제한자리의 중앙을 절단하게 되면 평활말단이라고 부른다. 점착성말단이 만들어 질 경우 재조합 하려는 DNA조각도 같은 제한효소를 사용해 절단해야 말단들 사이에 상보적인 염기쌍 사이에 수소결합이 형성된다. 여기에 DNA 연결효소를 넣으면 절단된 DNA가 다시 연결될 수 있다. 반면 평활말단을 가지는 경우 제한효소에 관계없이 연결될 수 있으나 절단된 말단 사이의 염기들에 의한 수소 결합이 없기 때문에 DNA 연결효소에 의해 연결될 확률은 낮다.

토론하기

DNA를 절단하고 다시 재조합 시킬 때 점착성말단을 만드는 제한효소와 평활말단을 만드는 제한효소들을 각각 이용했을 때의 장점, 단점에 대해서 토론해 보자.

DNA가 제한효소에 절단되었다는 것을 어떻게 알 수 있을까? 다음 실험을 통해 λ 바이러스의 DNA를 제한효소로 절단해 보고 이를 전기영동을 통해 확인해 보자.

탐구 활동 6

제한효소와 λ DNA의 분석

제한효소는 DNA를 자르는 효소이다. 제한효소로 DNA를 절단했을 때 실제로 그 DNA가 잘라졌는지 그렇지 않은지는 어떻게 확인할 수 있을까?

준비물

- 제한효소(Hind III, Pst I, EcoR I), 제한효소 2X 완충용액, λ DNA, DNA 염색액(Coomassie Brilliant Blue R 250), 아가로스, 전기영동 장치, TAE 완충용액, 마이크로피펫(2-20 μ L, 20-200 μ L), 피펫 팁, 유성펜, 전 원장치, 자, 실험실용 테이프, 6X 로딩 염색액, 표준분자량 DNA 용액

방법 및 절차

실험1) 람다 DNA의 절단

- (1) 람다 DNA와 2X 완충용액을 꺼내 얼음통에 박는다.
- (2) 노란색, 보라색, 녹색, 오렌지색 1.5 mL 튜브 뚜껑에 L, P, E, H라고 적는다.
- (3) 깨끗한 팁을 사용하여 튜브에 아래 표에서와 같이 용액을 각 튜브에 넣어준다.

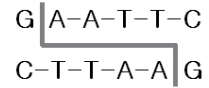
튜브	λ DNA	완충용액	PstI	EcoRI	HindIII
L	4 μ L	6 μ L			
P	4 μ L	5 μ L	1 μ L		
E	4 μ L	5 μ L		1 μ L	
H	4 μ L	5 μ L			1 μ L

- (4) 튜브의 끝을 손가락으로 가볍게 튕겨서 용액을 섞어 준다.
- (5) 튜브로 책상 위를 가볍게 두드려 용액을 모으거나 탁상용 원심분리기로 1-2초간 짧게 원심 분리하여 용액을 모은다.
- (6) 37°C에서 30분 혹은 상온에서 밤새 반응시킨다.
- (7) 반응 후 냉장고에 보관하거나 바로 전기영동 단계를 진행한다.

❖ 제한효소

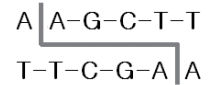
EcoRI

절단



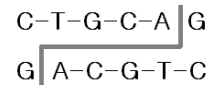
HindIII

절단



PstI

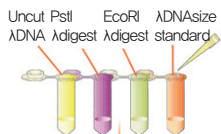
절단



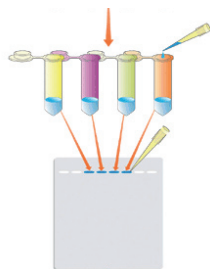
❖ 실험 시 유의사항

1. 실험 시 고글이나 글로브를 착용한다.
2. 실험 전·후 비누로 손을 씻는다.
3. 실험 도중 용액이 눈에 튀면 물로 깨끗이 씻는다.
4. 실험 시 사용하는 염색액은 쉽게 지워지지 않으므로 반드시 비닐장갑을 끼고 실험복을 입고 실험에 임한다.

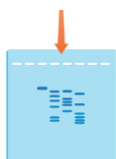
❖ 전기영동 실험 개요



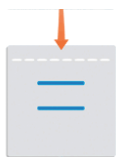
각 튜브에 준비된 DNA시료를 넣는다.



로딩염색액을 각 시료에 넣고 전기영동 웰에 각 시료를 넣는다.



로딩염색액의 이동을 관찰하며 DNA 시료를 100V에서 30분간 전기영동한다.



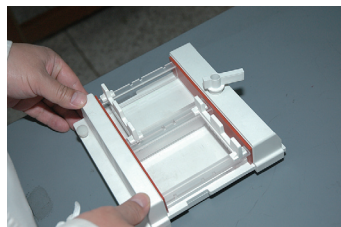
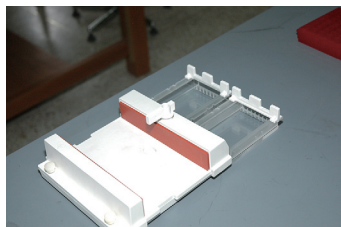
Fast Blast DNA 염색액으로 겔을 염색시키고 관찰한다.

❖ 주의 사항

사용한 염색액은 재사용이 가능하므로 병에 모아 둔다.

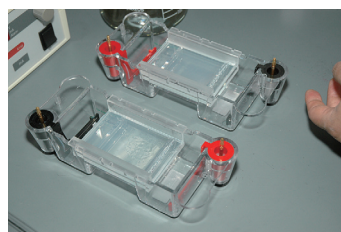
실험2) 전기영동 수행하기

- (1) 저울을 이용하여 1 g의 아가를 준비하여 100 mL의 1X TAE 완충용액에 녹인다.
- (2) 겔 트레이를 준비하고 겔을 붓기 위해 조립한다.



〈그림 III-40〉 겔트레이에 겔 붓기

- (3) 전자레인지에서 3~4분 아가를 녹인 후 겔 트레이 틀에 녹인 겔을 부어서 굳힌다.
- (4) DNA를 로딩하기 위해 전기영동장치를 준비한다.
- (5) 굳은 겔에서 콤을 빼고, 전기영동장치에 장착한다.



〈그림 III-41〉 굳은 겔에서 콤 제거하기, 전기영동장치 장착

- (6) 전기영동을 위해 1X TAE 완충용액을 약 275 mL 전기영동 챔버에 붓는다.
- (7) 각 튜브에 2 μ L의 6X 로딩염색액을 넣고 손가락으로 살살 튜브를 치며 섞고, 짧은 시간(1-2초)간 탁상용 원심분리기로 가볍게 돌려서 용액을 모은다.
- (8) 표지 DNA는 투명한 튜브에 준비한다.
- (9) DNA 시료를 65°C에서 5분간 처리한 후 얼음에 박는다.
- (10) 아가로스 겔의 웰이 (-)극 쪽에 위치하는지 확인한다.
- (11) 아래 표의 순서대로 10 μ L의 시료를 로딩한다.

레인	1	2	3	4	5
표지	M	L	P	E	H
시료	표지 DNA	자르지 않은 λ DNA	PstI 처리한 λ DNA	EcoRI 처리한 λ DNA	Hind III 처리한 λ DNA

- (12) 뚜껑을 덮고 전원장치에 빨간색(+)은 빨간색 전선을, 검은색(-)은 검은색 전선을 연결하고, 전원을 켜고 100 V에서 로딩염색액의 이동을 보면서 약 30분 정도 전기영동한다.
- (13) 전기영동이 끝나면 전원을 끄고 겔 접시로부터 겔을 꺼내 염색접시에 넣는다. 이때 겔은 깨지기 쉽고 미끄러우므로 다룰 때 조심한다.
- (14) 겔을 염색하여 결과를 확인한다. 100X Fast Blast Stain용액을 120 mL 염색 접시에 붓고 살살 흔들어주며 2분간 염색한다. 염색액을 제거한 후 겔을 더 큰 씻기용 용기에 옮긴 후 40~55℃ 정도의 물로 10초 정도 행궈준다. 5분 정도 따뜻한 물로 살살 흔들면서 3~4번 정도 더 행궈준다.
- (15) 결과를 기록하고 겔을 말려서 실험노트에 붙인다.

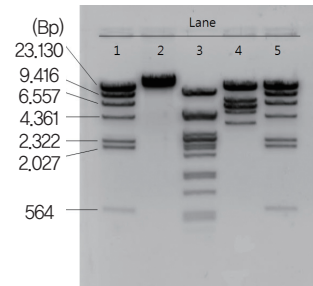
결과 및 논의

- (1) 전기 영동한 자료를 다음 표에 기록하시오. 이때 표지 DNA의 이동 거리와 크기는 비례하는가? 다른 시료의 DNA 크기를 예측하기 위해서는 어떤 방법이 좋을까를 생각해 보고 그 방법에 따라 다른 시료의 DNA크기를 예측하시오.

큰 조각부터 ↓	표지 DNA		L		P		E		H	
	이동 거리 (mm)	실제 염기쌍수	이동 거리 (mm)	예측 염기쌍 수	이동 거리 (mm)	예측 염기쌍 수	이동 거리 (mm)	예측 염기쌍 수	이동 거리 (mm)	예측 염기쌍 수
밴드 1		23,130 bp								
밴드 2		9,416 bp								
밴드 3		6,557 bp								
밴드 4		4,361 bp								
밴드 5		2,322 bp								
밴드 6		2,027 bp								

- (2) DNA 전기영동 시 DNA의 이동속도에 영향을 미치는 요인에는 무엇이 있는지 조사해 보시오.

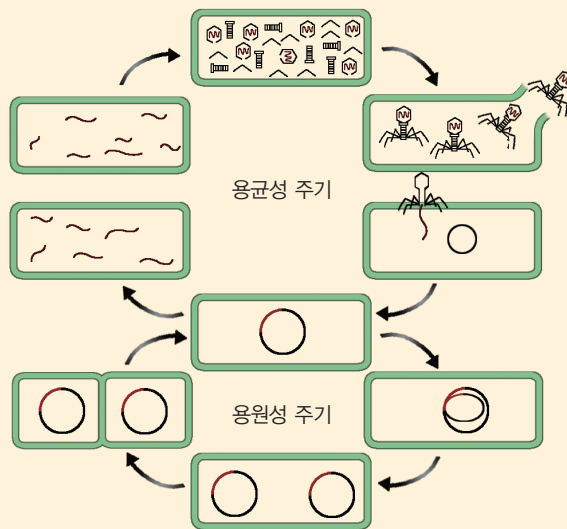
❖ 전기영동 수행 실험 결과



이 실험에서는 DNA를 제한효소로 절단하여 크기별로 분리하는 것이 목표였다. DNA를 크기별로 분리하기 위해서는 겔 전기영동의 방법이 쓰인다. 젤라틴 판에 DNA를 위치시키고 전기장을 걸어주면 (+)쪽으로 DNA가 이동하는데 이는 DNA를 구성하는 당-인산 축의 바깥 쪽이 (-)전하를 띠므로 일어나는 현상이다. 이때 분자량이 작을수록 이동이 빠르고 큰 조각일수록 이동이 느린데 이는 겔이 분자를 거르는 체의 역할을 하기 때문이다. 즉, 작은 분자는 겔 구멍 속을 쉽게 빠져나갈 수 있는 반면 큰 분자는 저항이 커 이동속도가 느리기 때문이다. 따라서 전기영동한 DNA 분자의 이동거리는 크기에 반비례하여 분리되므로 이동속도를 비교하면 DNA의 상대적 크기를 알 수 있다.

이번 실험의 재료로 쓰인 DNA는 λ DNA로 세균바이러스 즉 박테리오파지의 DNA이다. λ 바이러스는 대장균을 감염시키는 파지를 일컬으며, 단백질로 이루어진 캡시드와 DNA를 유전물질로 가지고 있고, 그 크기는 약 48 Kb 정도이다. λ 바이러스는 용균성과 용원성주기를 가지고 있다. λ 바이러스의 캡시드가 숙주 박테리아의 세포에 부착되면 캡시드에 의해 DNA가 숙주세포로 주입된다. λ DNA의 초기 유전자가 발현되어 λ DNA가 복제될 수 있는 환경을 만든 후 박테리아의 시스템을 사용하여 자신의 DNA를 빠르게 복제한다. λ DNA의 후기유전자가 발현되어 캡시드를 만들고 박테리아의 세포벽을 파괴할 수 있는 효소 또한 합성되어 박테리아를 파괴시키고 λ 바이러스가 방출된다.

더 알아보기 박테리아의 생활사 - 용균성 주기와 용원성 주기



〈그림 III-42〉 박테리아의 생활사

07

DNA 지문법(RFLP 분석)

학·습·목·표

- DNA 지문법이 무엇이며 이것을 통해 무엇을 분석할 수 있는지 설명할 수 있다.
- DNA 전기영동의 결과를 비교 분석하여 범인의 DNA 지문을 찾아낼 수 있다.

DNA 지문법은 DNA가 분리될 때 나타나는 패턴을 분석하는 기법으로 어떤 개체도 동일한 DNA를 가질 수 없으므로 이 방법을 통해 개인을 식별할 수 있게 된다.

DNA 지문을 조사하기 위해서 먼저 특정 제한효소를 이용하여 DNA를 절단하고 거기서 나타나는 제한 절편의 길이를 비교하는데 이를 RFLP분석라고 한다. 이 방법으로 특정 지역의 염기 차이를 확인할 수 있게 된다.

❖ RFLP (제한 절편 길이 다형성, restriction fragment length polymorphism)

DNA를 제한효소로 절단했을 때 잘라진 DNA 도막의 길이가 개인에 따라 다양하게 나타나는 현상.

조사하기

DNA 지문법이 어떤 분야에 쓰이고 있는지 조사해 보자.

범죄현장에 범인의 것으로 추정되는 머리카락을 발견할 수 있었고 그것으로부터 DNA를 추출할 수 있었다. 현재 용의자는 5명으로 압축되었지만 그들은 사건 당일 알리바이가 뚜렷하여 체포하지 못하고 있는 상황이다. 생명공학기술은 이 상황에서 범인검거를 위해 어떤 일을 해줄 수 있을까?

탐구 활동

DNA 지문법

지문처럼 어떤 개체도 동일한 DNA를 가질 수 없다. 이를 이용하여 개인을 식별할 수 있다. 특정 제한효소를 이용하여 DNA를 절단하고 절단된 DNA를 전기영동으로 분석함으로써 범죄현장에서 범인을 식별하는데 이용할 수 있다.

준비물

- 제한효소(EcoR I, Pst I), 범인 DNA, 용의자 1~5의 DNA, 마이크로

❖ DNA 지문법 실험 개요

Lab 1



1. 범죄현장의 DNA와 용의자 5명의 DNA, 표지 DNA를 준비한다. (범인의 DNA와 용의자 DNA는 플라스미드 DNA를 이용하여 준비할 수 있다.)
2. DNA 시료에 EcoRI과 PstI 제한효소 처리를 한다.
3. 37℃에서 45분이나 또는 상온에서 하룻밤 반응시킨다.

피펫(2~20 μL , 2~200 μL , 100~1000 μL), 1.5 mL 튜브(빨강, 파랑, 초록, 주황), 피펫 팁, 전원장치, 플라스크(500 mL), 증류수, 전자레인지 혹은 핫플레이트, 얼음과 얼음통, 유성펜, 실험용 테이프, 항온수조, 탁상용 원심분리기

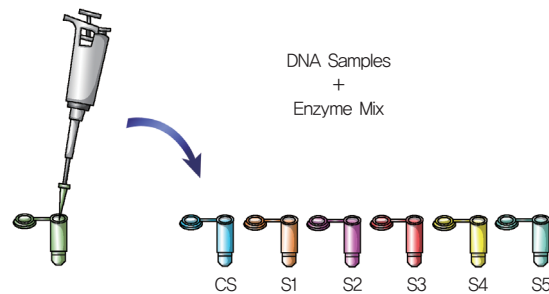
방법 및 절차

실험1) DNA 시료 준비

- (1) ENZ으로 표기된 제한효소 혼합액을 얼음 위에 놓는다.
- (2) 서로 다른 색깔로 되어 있는 튜브에 본인의 이름, 날짜 등을 표기하여 랙에 꽂아 둔다.

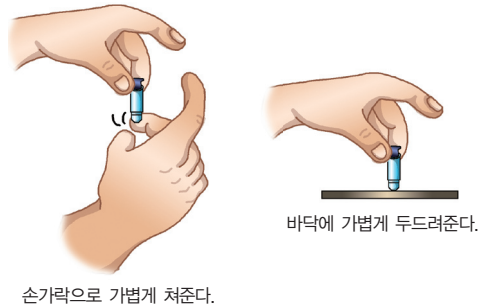
튜브색	녹색	파란색	주황색	보라색	빨간색	노란색
추출 DNA	범죄현장	용의자1	용의자2	용의자3	용의자4	용의자5
식별기호	CS	S1	S2	S3	S4	S5

- (3) 각 튜브에서 DNA를 10 μL 를 취하여 각 색깔별 튜브에 넣고 이를 확인한다. 그리고 ENZ으로 표기된 제한효소 혼합액 10 μL 를 각 튜브에 넣는다.



- (4) 튜브를 툭툭 쳐 잘 섞이도록 하며, 짧게 원심분리를 하거나 튜브를 탁자 위에서 쳐서 시료가 아래로 오도록 한다.

시료를 아래로 모으는 방법



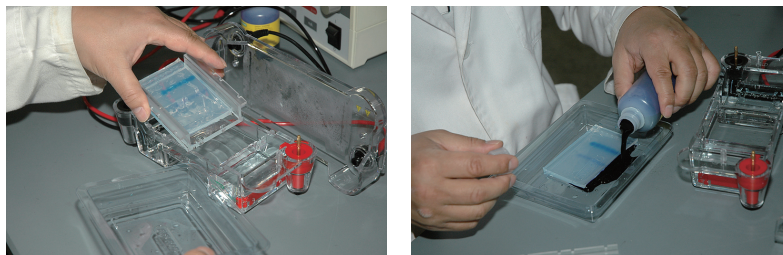
손가락으로 가볍게 쳐준다.

바닥에 가볍게 두드려준다.

- (5) 각 튜브를 플로팅 랙에 꽂은 후 37℃의 항온수조에서 45분 동안 반응 시키거나 상온에서 하룻밤 반응시킨다.
- (6) 항온수조에서 꺼낸 후 다음 실험까지 냉장고(4℃)에 보관한다.

실험2) DNA의 전기영동 및 DNA 관찰

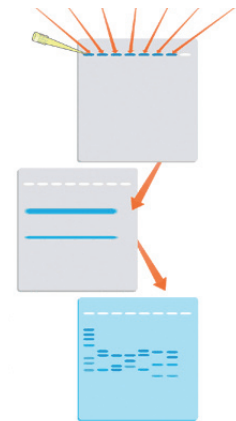
- (1) 준비된 시료를 냉장고에서 꺼낸 후 원심분리기로 짧게 돌려 시료를 모두 아래쪽으로 모은다.
- (2) LD (로딩염색액)로 표기된 튜브에서 5 μ l를 취하여 각 튜브에 넣고 잘 섞이도록 손끝으로 가볍게 두드려 주면서 섞는다. LD는 가장 작은 DNA분자 보다 빨리 이동하므로 LD가 겔의 끝에 다가오면 전원을 끌 수 있도록 하기 위해 사용한다.
- (3) 전기영동장치에 아가로스 겔을 놓고 겔이 잠길 때까지 1X TAE 완충 용액을 붓는다. 이때 웰이 있는 쪽이 (-)극에 가까이 있어야 한다.
- (4) 아가로스 겔의 웰에 준비된 시료를 넣는데 맨 왼쪽 레인에는 표지 DNA를 넣고 나머지는 각각의 준비된 시료를 넣는다.
- (5) 전기영동장치의 뚜껑의 방향을 확인하고 덮는다. 이때 빨간색과 검은 색의 전극 위치가 일치해야 한다. 전기영동은 100 V에서 30분간 진행한다.
- (6) 전기영동이 끝나면 전원을 끄고 겔을 분리하여 접시로 옮긴다. 겔은 매우 미끄럽고 깨지기 쉬우므로 조심해서 다룬다. 겔에 DNA 염색시약을 붓고 2분 동안 흔들어 주며 염색시킨다.
- (7) 남아있는 염색시약을 병으로 옮기고 겔에 35℃정도의 따뜻한 증류수를 붓고 10분간 기다린다. DNA가 잘 보일 때까지 물을 갈아주며 3~4회 반복한다.
- (8) 염색이 빠진 겔을 말린 후 실험 노트에 붙이고 결과를 분석한다.



〈그림 III-43〉 전기영동 염색과정

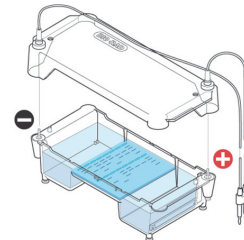
❖ 실험 개요

Lab 2



1. 시료에 로딩염색액을 첨가하고 전기영동 웰에 준비한 시료를 넣는다.
2. 100 V에서 30분간 전기영동한다.
3. Fast Blast DNA로 염색한다.

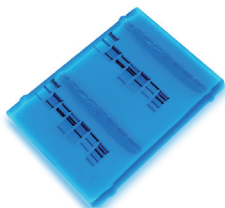
❖ DNA 전기영동 장치



❖ 디스테인 과정

DNA를 보기 위해서는 겔로부터 염색액을 없애는 과정

❖ DNA 전기영동 실험결과



결과 및 논의

- (1) 전기 영동한 자료를 다음 쪽의 표에 기록하시오. 이때 표지 DNA 자료를 가지고 다른 시료의 DNA 크기와 염기쌍 수를 예측하시오.
(단 직선 그래프보다는 세미로그 그래프를 사용하여 DNA크기를 구하시오. x축: 이동거리, y축: 염기쌍 수)
- (2) 범인은 누구인지 쓰고 왜 그렇게 생각하는지에 대해 서술하시오.
- (3) 만약 환상의 DNA가 이 실험에 사용되었다면 각 샘플의 DNA는 제한 효소에 의해 몇 군데 잘렸을까?

전기영동 자료 분석표

큰 절 편 부 터 ↓	λ/HindIII 표지 DNA		범죄 현장의 DNA		용의자 1		용의자 2		용의자 3		용의자 4		용의자 5	
	이동 거리	실제 크기	이동 거리	예측 크기	이동 거리	예측 크기	이동 거리	예측 크기	이동 거리	예측 크기	이동 거리	예측 크기	이동 거리	예측 크기
	(mm)	(bp)	(mm)	(bp)	(mm)	(bp)	(mm)	(bp)	(mm)	(bp)	(mm)	(bp)	(mm)	(bp)
1		23,130												
2		9,416												
3		6,557												
4		4,361												
5		2,322												
6		2,027												

DNA 지문법은 현재 진단의학, 친자감별, 범인 추적, 계통 분석 등의 많은 분야에서 활용하고 있다. 또한 동일 DNA를 서로 다른 제한효소로 잘라 제한

가변수의 직렬반복서열 (Variable Number of Tandem Repeat/VNTR)



짧은 직렬반복서열 (Short Tandem Repeat/STR)



〈그림 Ⅲ-45〉 가변수의 직렬반복서열

절편의 길이를 분석할 경우 제한효소 지도도 작성할 수 있다.

만약 특정 제한효소 자리에서 일어난 염기의 변화로 유전병이 발생하였거나, 제한효소 자리가 아니었지만 염기의 변화로 제한효소 자리가 되었다면, 쉽게 제한효소의 작용 유무를 통해 병을 쉽게 진단할 수 있다. 이러한 예의 대표적인 것이 겸형적혈구 빈혈증 진단 방법이다. 이 빈혈증은 β -글로빈의 6번째 아미노산 자리의 유전암호가 GAG가 GTG로 바뀌게 되어 적절치 못한 아미노산으로 치환되어 발생한다. 이 과정에서 제한효소 인식자리에도 변화가 오게 되므로 변화가 발생한 유전자는 정상 유전자와는 달리 제한효소에 의해 인식되지 않게 된다. 결국 겸형 적혈구 유전자를 가진 사람의 DNA는 정상인에 비해 더 큰 DNA조각을 갖게 되므로 유전자 지문법으로 이 병을 진단해 낼 수 있게 된다.

가계도 분석이나 친자감별 및 범인을 추적해야 할 경우 사람의 모든 DNA 지역을 사용하지 않고 가변수 직렬 반복서열(VNTR)을 이용하여 분석한다. VNTRs는 일부 서열이 반복적으로 나타나는 지역을 말한다. 이 반복서열은 사람마다 동일하지만 반복 수는 사람에 따라 다양하게 나타난다. 따라서 이 지역에 대한 제한 절편의 길이는 제한효소 자리의 변화에 의해 길이가 다양하게 관찰되는 것이 아니라 특정 염기 서열의 반복수 차이에 의해 다양하게 나타난다. 따라서 VNTR지역에 대한 RFLP의 패턴은 개인마다 독특한 유전자 지문을 형성할 수 있게 된다. 이때 반복되는 염기서열의 길이가 10 bp 미만일 경우에는 짧은 직렬 반복서열(STR)이라고 한다.

08

대장균 형질전환

학·습·목·표

- 플라스미드가 무엇이고 어떻게 활용되는지 설명할 수 있다.
- 플라스미드를 이용하여 대장균을 형질전환시킬 수 있다.
- 항생제 저항성을 가지는 형질전환 세포를 선별할 수 있는 실험방법을 고안할 수 있다.
- 박테리아에서 일어나는 형질전환의 생물학적 과정을 설명할 수 있다.

형질전환은 외래의 유전 정보를 가진 DNA 조각이 수용체 세포에 들어가 유전적 변화를 일으키는 과정을 말한다. DNA 분자를 흡수하고 형질전환될 수 있는 세포를 수용성이 있다고 말하며, 외래의 DNA로 인해 새로운 특성을 갖게 된 개체를 형질전환 생물이라고 한다.

박테리아에서 형질전환은 외래 플라스미드가 일정조건에서 한 개체에서 다른 개체로 이동할 수 있기 때문에 일어난다. 플라스미드 DNA는 보통 박테리아의 생존에 도움이 되는 하나 이상의 유전자를 가지고 있는 원형의 DNA로 박테리아의 주염색체와는 구별되는 별도의 DNA이다. 자연상태에서 박테리아는 플라스미드를 다른 개체로 옮길 수 있고, 유익한 유전자를 공유한다. 이러한 방법을 통해 박테리아는 새로운 환경에 잘 적응할 수 있다. 하나의 예로 항생물질에 대해 박테리아가 저항성을 나타내는 것도 박테리아가 항생제에 저항성을 갖는 유전자를 플라스미드나 주염색체에 갖고 있거나 전달받았기 때문이다.

조사하기

자연상태의 박테리아들 사이에서 형질전환은 어떤 환경에서 일어나는지 조사해 보자.

대장균에 일정 조건을 갖추어주면 인위적으로 외래의 플라스미드를 받아 형질전환을 일으킬 수 있다. 형질전환이 어떻게 일어나는지 다음 실험을 통해 알아보자.

탐구 활동 8

대장균의 형질전환

준비물

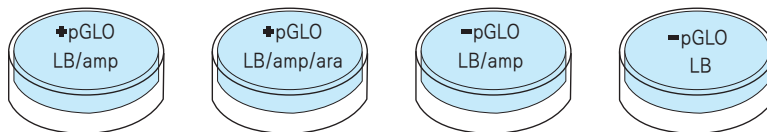
- *E. coli* 플레이트, 아가배지(LB, LB/amp, LB/amp/ara), 형질전환 용액(50 mM CaCl₂, 1회용 루프, UV램프(긴파장), 초시계, 전자레인지, 항온수조, 배양기(37℃), 온도계, 플라스크(1 L), 메스실린더(500 mL), 증류수, 얼음과 얼음통, 탈색제, 유성펜



〈그림 III-46〉 형질전환 실험 준비물

방법 및 절차

- (1) 1.5 mL 튜브 2개를 준비하여 각각 '+'와 '-'로 표시한다.
- (2) 살균된 피펫으로 튜브에 형질전환 용액 250 μ L를 옮기고 튜브를 얼음에 꽂는다.
- (3) 플레이트에 있는 박테리아 콜로니 하나를 멸균된 백금으로 얼음에 꽂아 놓은 '+'라고 적힌 튜브에 접종하고 콜로니가 형질전환 용액에 완전히 섞이도록 플라스틱 루프를 돌려준다. 현탁이 되면 튜브를 얼음에 꽂는다. '-' 튜브에도 같은 방법으로 콜로니 하나를 접종하여 현탁시킨다.
- (4) UV 램프로 플라스미드가 들어있는 튜브를 확인해본다. 살균된 루프를 플라스미드가 들어있는 튜브에 담갔다 뺀다. 루프의 구멍사이로 비누방울 같은 얇은 막이 형성된 것을 볼 수 있음. 박테리아가 현탁되어 있는 '+' 튜브에 루프를 넣고 잘 섞은 후 튜브를 다시 얼음에 꽂는다. '-' 튜브는 그대로 둔다.
- (5) 얼음에서 10분간 방치한다. 이때 튜브가 확실히 얼음에 꽂혀 있도록 한다. 그사이 각각의 한천배지 플레이트 바닥에 다음과 같이 표기한다.



- (6) 42℃로 맞춰진 항온수조에 위의 2개의 튜브를 50초 동안 담근다. 튜브의 형질전환 용액 부분까지 물에 확실히 잠기도록 한다. 50초가 지나면 두개의 튜브를 얼음에 즉시 꽂고, 2분간 방치한다.

❖ LB 아가배지

Luria-Burtani 배지의 약
자로 Tryton 10 g, Yeast
Extract 5 g, NaCl 10 g, 아
가 15 g을 1L의 증류수에
녹여서 만든다.

❖ LB/amp 아가배지

LB배지에 항생물질인 앰피실린을 넣은 배지.

❖ LB/amp/ara 배지

LB배지에 항생물질인 앰피실린과 당의 일종인 arabinose를 넣어서 만든 배지.

◆ 주의사항

뚜껑이 뒤 바뀔 수 있으므로 표시를 할 때는 배지 바닥면에 한다.

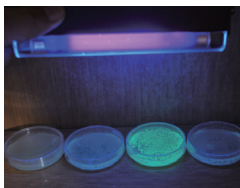
- (7) 튜브에 250 μ l LB 배지를 넣고 뚜껑을 닫고 상온에서 10분간 방치한다.
- (8) 튜브를 살살 쳐서 안의 용액이 서로 잘 섞이도록 한다. 각 튜브에서 100 μ l씩 덜어 앞에서 표기한 각각의 플레이트에 떨어뜨린 후 배지표면에 고르게 편다.(루프의 평평한 면을 이용하여 앞뒤로 빠르게 움직인다.)



〈그림 Ⅲ-47〉 대장균을 배지에 접종하기

- (9) 플레이트를 겹쳐서 함께 테이프로 묶는다. 바닥에 실험자의 이름과 날짜를 적는다. 플레이트를 뒤집어 37℃ 배양기에서 다음날까지 배양한다.(16시간 정도).

❖ 대장균 형질전환 실험 결과

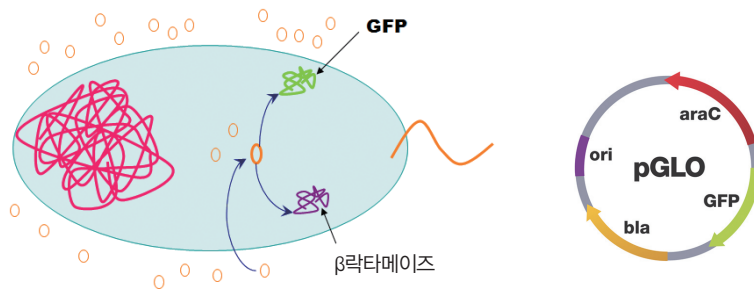


형질 전환이 일어난 콜로니는 UV를 비추면 녹색형광을 발한다.

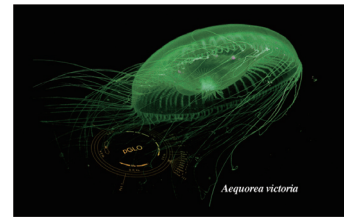
결과 및 논의

- (1) 녹색형광의 콜로니가 형성되었는가? 실험구와 대조구를 나누어 4개의 플레이트 각각에 생긴 콜로니의 형태와 모양을 그리고 관찰내용을 쓰시오.
- (2) 형질전환 실험을 할 때 실험재료로는
가. 다세포 생물이 유리할까 아니면 단세포 생물이 유리할까?
나. 한 세대의 길이가 짧은 것이 유리할까 긴 것이 유리할까?
다. 안전성이 중요한 요소가 될 수 있다. 안전성이라는 측면에서 실험재료는 어떤 특징을 가져야 할까?
- (3) 형질전환 시험이 성공했는지의 여부를 알려주는 증거에는 어떤 것이 있는가?
- (4) 형질전환 용액의 성분은 무엇이며 이 용액은 어떤 역할을 할까?

녹색 형광 단백질(GFP)은 생물 발광체인 해파리가 만들어 내는 물질로 어두운 곳에서 빛을 발하므로 형광을 띤다. 해파리로부터 GFP 유전자를 분리하여 유전자 조작 과정을 거쳐 플라스미드로 만든 후 대장균을 형질전환 시킬 수 있다. 형질전환된 박테리아는 해파리의 유전자를 얻게 되므로 자외선 아래에서 반짝이는 빛을 내는 형광 단백질을 만들 수 있게 된다.

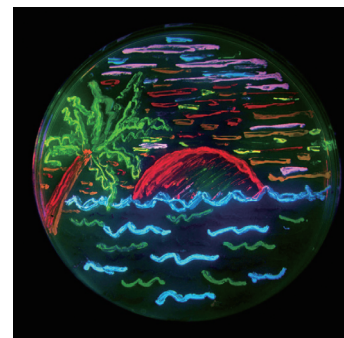


〈그림 Ⅲ-48〉 녹색 형광 단백질 (GFP)



〈그림 Ⅲ-49〉 *Aequorea victoria* GFP를 추출한 해파리

pGLO 플라스미드는 GFP유전자와 항생제인 암피실린에 저항성을 가진 유전자를 포함하고 있으며, 아라비노오스가 영양배지에 포함되어 있을 경우 형질이 발현되는 조절 기작을 가지고 있다. pGLO를 가진 세포를 구별하기 위해 항생제가 들어 있는 배지에서 배양할 경우 형질전환된 세포는 아라비노오스를 가지고 있지 않은 배지에서는 하얀 콜로니를 형성하고 아라비노오스가 들어 있는 영양 배지에서는 UV를 비칠 경우 형광 녹색으로 나타난다. pGLO의 이러한 특성으로 유전공학연구에서 유전적 선택과 유전자 조절의 기작을 쉽게 탐구할 수 있게 하며, 전체 형질전환 과정을 UV램프(긴 파장)로 쉽게 관찰할 수 있어 유전공학 도구로 많이 활용되고 있다.



〈그림 Ⅲ-50〉 형광 단백질을 발현하는 세균을 점종하여 얻은 그림

읽을거리

녹색 형광 단백질(GFP)은 자외선 램프로 쉽게 세포내에서 발현되었는지를 조사할 수 있고 다른 합성 형광물질과는 달리 독성이 적어 살아있는 세포에도 활용할 수 있다. 이런 특성으로 GFP 유전자를 연구하고자 하는 다른 유전자와 결합시켜 생명공학 연구에 아주 중요한 도구로 사용할 수 있다. 1960년대 해파리(*Aequorea victoria*)로부터 GFP를 분리한 미 보스턴 대학의 시모무라 오사무(下村修) 명예교수, 1990년대 이 유전자를 대장균에서 발현시킨 컬럼비아 대학의 마틴 찰피(Martin Chalfie)교수, GFP 돌연변이체를 만들어 생물학 연구에 적합한 특성을 가지게 한 캘리포니아 대학 조저 첸(Roger Tsien)교수는 이 공로를 인정받아 2008년 노벨화학상을 받았다. 한편 GFP 연구를 통한 노벨상 수상에는 슬픈 숨겨진 사연이 있다. GFP를 생명공학에 활용할 수 있을 것이라는 아이디어와 GFP 유전자의 클로닝은 사실 또다른 과학자의 공적이다. 이 사람이 노벨상 수상을 하지 못한 까닭은 무엇일까?

09

PCR을 이용한 DNA의 증폭

학·습·목·표

- 식물체로부터 DNA를 추출할 수 있다.
- PCR 기계를 이용하여 원하는 유전자를 증폭할 수 있다.
- PCR로 증폭된 유전자를 전기영동으로 확인할 수 있다.



❖ 멀리스(Mullis, K. B.)
중합효소연쇄반응이라고 불리는 DNA 초고속 증폭 장치(PCR)를 발명한 공로로 지난 1993년 노벨화학상을 수상.

1980년대 유전자 클로닝의 혁명은 멀리스(Mullis K.)가 발명한 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction)으로 다시 한번 도약하였다. 이 기술은 연구에 있어 많은 노동과 시간을 절약할 수 있게 하였다. DNA의 양을 충분히 확보하는 것 뿐만 아니라 분자 생물학 기술에 접근을 어려워 하던 분야(병리학, 식물학, 동물학, 제약학)에 있어서도 쉽게 분자 생물학적인 기술을 이용할 수 있는 계기를 마련하게 되었다. PCR은 상보적인 DNA 가닥의 결합과 DNA 중합효소를 통한 DNA 가닥 합성이라는 유전학의 가장 기본적인 두 가지 원리를 이용하고 있다. 상보적인 가닥의 결합이란 두 가지 다른 프라이머가 각각의 상보적인 주형 DNA 가닥에 결합하는 것을 말한다. DNA의 특정 부분을 증폭시키기 위해서는 그 부분을 인식해야 하고 그 부분을 결정하여야 한다. 프라이머를 사용하여 이것이 가능하며 프라이머가 결합하는 부위로부터 DNA의 복제가 시작된다. 따라서 프라이머는 DNA의 복제에 있어서 꼭 필요한 요소이다. 왜냐하면 DNA 중합효소는 프라이머와 주형 DNA 가닥이 결합하여 이중나선구조를 만들었을 때 작용을 하기 때문이다.

DNA 중합효소는 온도에 대하여 구조적으로 강해야 한다. 그 이유는 PCR의 온도의 범위가 64℃-94℃의 범위를 갖기 때문이다. 그 온도에서 안정적인 DNA 중합효소(Taq)는 옐로 스톤 공원의 간헐천에 사는 테르무스 아쿠아티쿠스(*Thermus aquaticus*)라는 박테리아로부터 분리해낸 효소이다.

각각의 주형 DNA 가닥으로부터 새로운 가닥이 생성되므로 한 주기마다 새로운 두 가닥을 형성하게 된다. 따라서 한 주기가 지나면 원래의 가닥의 수보다 배가 되게 된다. 만약, 30사이클이 순환이 되면 2^{30} 의 양이 증폭된다. 충분히 증폭이 되면 그 DNA는 전기영동을 통하여 겔상에서 확인을 할 수 있다. 여기에서는 식물의 DNA를 추출하여 LOV 유전자를 증폭하는 과정에 대해서 알아보자.

탐구 활동 9

식물에서 DNA 추출

준비물

- 식물, 막자사발, 막자, 약수저, 열 블록, 1.5 mL 튜브, 튜브 랙, 피펫, 팁, 원심분리기, 에탄올, 전자저울, 네임펜, DNeasy plant Mini kit Cat No.69104(Qiagen)

방법 및 절차

- (1) 100 mg의 식물을 1.5 mL 튜브에 담고 액체질소를 이용하여 막자사발에서 충분히 갈아준다.
- (2) AP1 400 μ L에 RNase 4 μ L를 넣어준 후 65°C에서 10분간 반응시킨다.
(AP1 버퍼와 RNase는 병째로 섞지 말고 실험 전 섞어서 사용한다.)



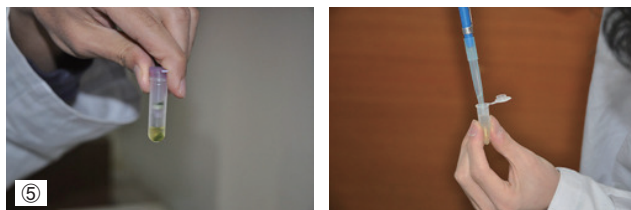
〈그림 Ⅲ-51〉 식물에서 DNA 추출 과정 ①, ②

- (3) AP2 버퍼 130 μ L를 넣고 잘 섞어준 후 얼음에서 5분간 반응시킨다.
- (4) 2 mL 컬렉션 튜브에 QIAshredder Mini spin column을 조립하고 피펫으로 (3)의 반응액을 옮긴 후 20,000 g에서 2분간 원심분리한다.



〈그림 Ⅲ-52〉 식물에서 DNA 추출 과정 ③, ④

- (5) 2 mL 컬렉션 튜브에 모아진 용액을 새로운 1.5 mL 튜브로 옮기고 1.5 배의 부피의 AP3/E 완충용액을 더한 후 피펫을 사용하여 섞어 준다.

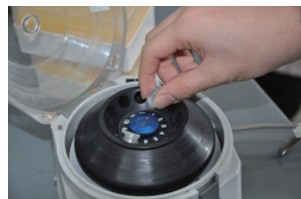


〈그림 Ⅲ-53〉 식물에서 DNA 추출 과정 ⑤

❖ 주의사항

1. 모든 원심분리 단계는 상온에서 실행한다.
2. AP1 & AP3에 침전물이 있을 경우 다시 녹인다.
3. AW & AP3/E에 에탄올을 넣는다.
4. 항온수조나 열 블록 (Thermo block)은 사용 전 65°C로 미리 맞춰둔다.

- (6) 2 ml 컬렉션 튜브에 이번에는 DNeasy Mini spin column을 조립하고 (5)의 용액을 피펫으로 옮긴 후 6,000 g에서 1분간 원심분리한다. 원심분리 된 용액은 따라 버린다.



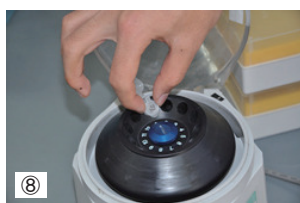
〈그림 III-56〉 식물에서 DNA 추출 과정 ⑥

- (7) 새로운 2 ml 컬렉션 튜브에 스핀 컬럼을 재조립하고 AW 완충용액 버퍼 500 μ l 첨가한 후 6,000 g에서 1분간 원심분리한다. 원심분리 된 용액은 따라 버린다.



〈그림 III-55〉 식물에서 DNA 추출 과정 ⑦

- (8) AW 버퍼 500 μ l를 다시 넣고 20,000 g에서 2분간 원심분리한다. (스핀 컬럼을 분리 할 때는 원심분리 된 용액과 접촉하지 않도록 주의한다.)



〈그림 III-56〉 식물에서 DNA 추출 과정 ⑧

- (9) 스핀 컬럼을 1.5 ml 또는 2 ml 튜브로 옮기고 AE 버퍼 100 μ l 흡인 후 실온에 5분간 둔다. 이 후 6,000 g에서 1분간 원심분리한다.



〈그림 III-57〉 식물에서 DNA 추출 과정 ⑨

탐구 활동 10

PCR of Lov2 gene

준비물

- 주형 DNA, 10X 완충용액, Taq 중합효소, dNTP each 10mM, Lov2 primer(F, R), 피펫, 팁, EP 튜브, PCR 튜브, 튜브 랙, PCR 기계

방법 및 절차

- (1) <표 III-1>과 같이 PCR 튜브에 용액의 양이 많은 것부터 넣고 섞어서 준비한다.

<표 III-1>

No.	Reagent	Volume	Remark
1	DW	13.9 μ l	
2	10X 완충용액	2 μ l	
3	dNTP	1.6 μ l	
4	Lov2 primer	각 0.2 μ l	
5	Taq polymerase	0.1 μ l	
6	실험1에서 얻은 주형 DNA	2 μ l	
총		20 μ l	

- (2) <표 III-2>와 같이 PCR 진행온도와 시간을 맞추고 PCR 기계를 작동시킨다.

<표 III-2>

단계	온도	시간
변성	94℃	30초
결합	50℃	1분
신장	72℃	30초

❖ 목표유전자: LOV2 gene (701bp)

Primer sequence

-LOV2 left ; 5'-AAT TTC
GTC ATC ACT GAT
CC-3'

-LOV2 Right ; 5'-TCC
CGT CTA GTT GAA
CTC C-3'

탐구 활동 11

전기영동을 통한 PCR 결과의 확인

준비물

- PCR 결과물, Agar powder(molecular grade), TAE 완충용액, Gel cast system, Power supply, DNA Loading Star

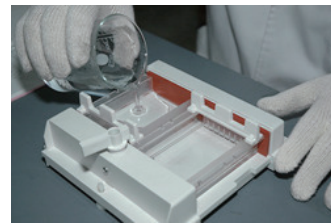
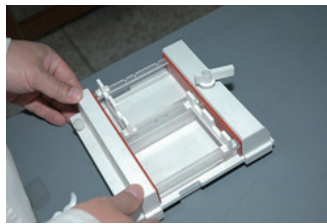
방법 및 절차

- (1) TAE 완충용액 50 ml에 아가로스 0.5 g을 섞고 전자레인지에 2분간 녹여준다.



〈그림 III-58〉 PCR 결과 확인 과정 ①

- (2) Gel cast에 조심스레 붓고 콤을 위치 시키고 상온에서 10분간 굳을 때까지 기다린다.



〈그림 III-56〉 PCR 결과 확인 과정 ②

- (3) 다 굳으면 콤을 제거하고 TAE 완충용액이 채워진 전기영동 탱크에 위치 시키고 겔 표면이 1~2 mm 정도 잠기도록 TAE 완충용액을 채워준다.

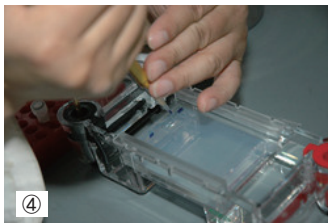


〈그림 III-59〉 PCR 결과 확인 과정 ③

(4) 아래 표에 따라 파라필름 위에서 섞고 흡에 피펫을 이용하여 조심스럽게 넣어준다.

No.	Reagent	Volume	Remark
1	DW	10 μl	
2	PCR product	5 μl	
3	Loading Star	3 μl	
		18 μl	

(5) 100~150 V에서 30~60분간 전원을 공급한다.



〈그림 III-61〉 PCR 결과 확인과정 ④, ⑤

(6) 눈으로 DNA의 상대적 이동거리를 확인하고 겔 영상분석 장치에서 결과를 확인한다.



〈그림 III-62〉 PCR 결과 확인과정 ⑥

PCR 과정은 주형 DNA가닥의 분리를 위한 변성(Denaturation), 프라이머와 주형 DNA와의 결합(Primer Annealing), Taq 중합효소를 통한 DNA가닥의 합성(Extension)으로 나뉘어 진다. 이러한 PCR 반응을 가능케 하는 장비를 PCR 기계라고 한다. 이 장비는 온도의 빠른 증감을 가능케 하는 장비이다. PCR의 사이클 과정 중에 첫번째 과정이 샘플의 온도를 94℃까지 올려 DNA의 두 가닥을 분리한다. 이 과정을 DNA가닥 변성 단계라고 한다. 그 다음 온도를 떨어뜨려 64℃가 되면 프라이머가 주형의 DNA가닥에 붙게 되며 이 과정을 결합 단계라고 한다. 마지막으로 Taq 중합효소를 이용하여 프라이머가 확장되어

관심이 있는 유전자 부위를 증폭을 하게 된다. 이 과정을 합성단계라고 한다. Taq 중합효소의 작용 온도는 72℃이므로 합성 과정은 72℃에서 진행된다.

PCR 기술에 존재하는 하나의 문제는 DNA를 변성시키기 위해서는 90℃ 이상으로 열을 가해야하는데 이 정도의 온도는 DNA 중합효소를 파괴시킨다는 것이다. 이 문제는 미국 옐로스톤 국립공원의 온천에 사는 테르무스 아쿠아티쿠스에서 얻은 DNA 중합효소로 해결되었다. 이 중합효소는 고온에서도 활성을 잃지 않았다.

PCR 기술을 이용함으로써 유전체 DNA와 같은 아주 큰 DNA로부터 원하는 DNA 부분만을 선택적으로 $10^5 \sim 10^8$ 배까지 수 시간 내에 증폭시킨 후 일반적으로 사용되는 아가로스 겔(agarose gel)이나 폴리아크릴아미드 겔(polyacrylamide gel) 상에서 뚜렷하게 보이는 밴드로 확인 할 수 있게 되었다.

PCR을 수행할 때 주형 DNA에 불순물이 섞여 있으면 반응을 억제할 수 있으므로 가능한 한 정제하여 사용하는 것이 좋다. 주형 DNA로 염색체DNA인 경우 1 μg 이내, 플라스미드 DNA의 경우 100 pg~100 ng 정도를 일반적으로 사용하지만 DNA 내에 증폭하고자 하는 목표 DNA의 copy 수에 따라서 달라질 수도 있다.

PCR에서 사용하는 프라이머는 주형 DNA 가운데 선택적으로 증폭시키고자 하는 목표 DNA 단편의 양쪽 끝에서 안쪽으로 약 20 bp 내외의 염기서열에 대응하는 올리고뉴클레오타이드를 DNA 합성기로 합성하여 이용한다. G+C 비율이 반 정도 되게 디자인하는 것이 프라이머와 주형간의 결합력을 강하게 유지하는데 좋다. 프라이머 제작시에는 무엇보다도 양쪽 프라이머의 결합 온도를 비슷하게 만들어야 한다. 또한 양쪽 프라이머가 서로 상보적인 염기 결합이 일어나지 않도록 한다. 프라이머의 디자인이 PCR 반응의 성공 유무의 90%를 차지한다고 할 수 있기 때문에 합성하기 전에 충분히 생각하여 제작한다. 프라이머 합성은 염기서열을 적어 제작해주는 회사에 의뢰하면 주문에 따라서 정제도 해준다.

조사하기

생명과학 연구에서 PCR이 어떻게 활용되고있는지 그 사례를 조사해보자.

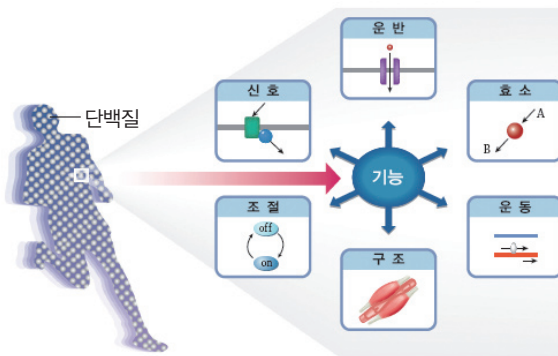
10

단백질 분석

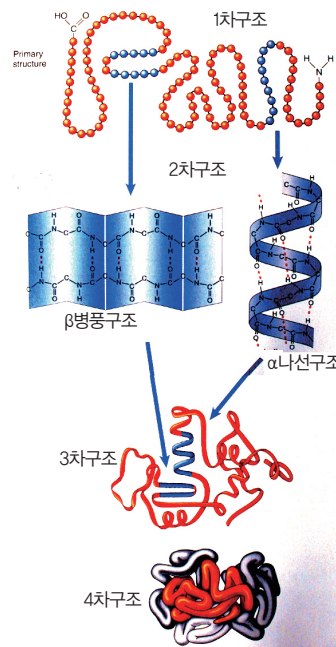
학·습·목·표

- 용액 속의 단백질의 양의 측정할 수 있다.
- 전기영동을 이용하여 단백질을 분자량에 따라 분리할 수 있다.
- 단백질 전기영동의 결과를 해석할 수 있다.

단백질은 아미노산이 펩티드 결합으로 연결되어 만들어진 고분자 화합물이다. 부모가 자손에게 전달한 유전자에 의해 발현되는 물질이 바로 단백질로 각종 생명활동의 기본이 되는 물질이다.

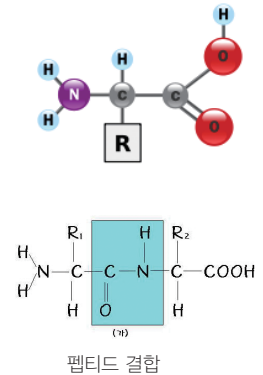


〈그림 III-63〉 단백질의 역할



〈그림 III-64〉 단백질의 입체 구조

❖ 아미노산의 구조



단백질의 구성 기본단위인 아미노산은 α 탄소에 4개의 서로 다른 원자단으로 구성되어 있으며 R기의 특성에 따라 다양한 화학결합을 나타낼 수 있다.

조사하기

단백질의 기본적인 구조에는 어떤 것이 있는가, 1차 구조를 이루는 중요한 결합에 대해서 알아보고 2, 3, 4차 구조를 이루는 결합에는 어떤 것이 있는지 조사해 보자.

세포 내의 단백질은 구성하는 아미노산의 수, 전하량, 용매에 대한 친매성 등 다양한 화학적 특징을 가지고 있다. 이런 화학적 특징은 단백질이 독특한 구조를 이루고 세포 내에서 서로 상호작용하는데 중요하다.

탐구 활동 12

달걀 한 알속의 단백질 양은?

단백질이 풍부한 음식이 몸에 좋다는 말을 흔히 듣는다. 어떤 음식물 중에 단백질 들어 있는지는 뷰렛반응을 통해서 알 수 있지만 얼마나 많은 양이 들어있는지는 어떻게 알 수 있을까?

❖ 1X 브래드포드 용액

단백질과 반응하여 색깔을 나타내며 단백질 정량 방법 중의 하나인 브래드포드 반응에 사용되는 염색 반응액.

❖ 주의사항

큐벳을 만질 때에는 손으로 만질 수 있는 부분과 빛이 통과하는 부분을 확인한 후 다루며 광도계에 꽃을 때에도 이를 확인한다.

준비물

- 달걀 1알, 1X 브래드포드 용액, 시험관, 증류수, 1.5 ml 튜브, 1회용 큐벳(3ml), 1회용 10 ml 피펫, 오토피펫(200 μ l, 1 ml), 팁(blue, yellow), 분광기, 세척병, 팁떨이, BSA(2 mg/ml), 시험관대, 볼텍스 믹서, 메스 실린더(500 ml, 100 ml)

방법 및 절차

- (1) 달걀 한 알에서 달걀 흰자와 노른자를 분리한다.
- (2) 흰자와 노른자의 부피를 구한다.



〈그림 III-65〉 흰자와 노른자 부피 측정

- (3) 흰자와 노른자를 적당히 희석하여 1.5 ml 튜브에 담는다.
(가령, 10배 20배 30배, 40배로 희석한다.)
- (4) 4℃ 냉장고에서 1X 브래드포드 용액을 꺼내서 상온이 될 때까지 기다린다.
- (5) 분광기를 켜다. 파장을 595 nm로 맞춘다.
- (6) 2 mg/ml의 BSA를 이용해서 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1 mg/ml의 표준단백질을 200 μ l만든다.
- (7) 시험관에 3 ml의 1X 브래드포드 용액과 단백질 용액(표준 단백질 및

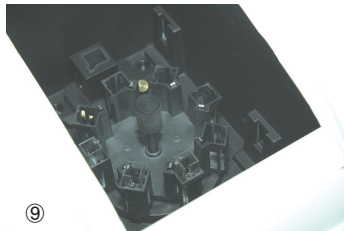
시료) 60 μ l를 넣는다.



〈그림 Ⅲ-66〉 단백질 양 측정 과정 ⑥, ⑦

(8) 용액을 섞어준 후 상온에서 5분간 방치한다.

(9) 큐벳에 용액을 옮긴 후 UV/VIS 분광광도계를 이용하여 단백질양을 측정한다.



〈그림 Ⅲ-67〉 단백질 양 측정 과정 ⑧, ⑨

결과 및 논의

(1) 표준 곡선을 그린다.



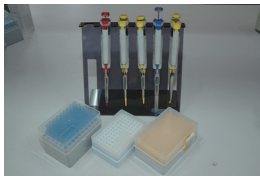
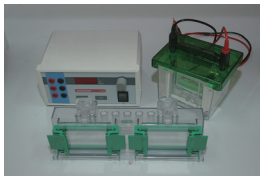
(2) 달걀 흰자와 노른자의 단백질 양은 얼마인지 계산해 보자. 어느 쪽이 단백질이 더 많은가?

탐구 활동 13

단백질 전기영동, SDS-PAGE

단백질의 종류와 크기는 매우 다양하다. 우유나 달걀 흰자나 노른자 역시 한 종류의 단백질로 이루어진 것은 아니며 다양한 단백질로 구성되어 있다. 달걀 속에는 얼마나 다양한 단백질이 들어있을까? 달걀속에는 얼마나 다양한 단백질이 들어있고 그 분자량이 얼마나 되는지 어떻게 알아볼 수 있을까?

❖ 단백질 전기영동 준비물



❖ 알코올을 가하는 이유

분리용 겔 윗 표면을 고르게 해주며 공기를 차단하여 겔이 고르게 중합되기 위함이다.

❖ 주의사항

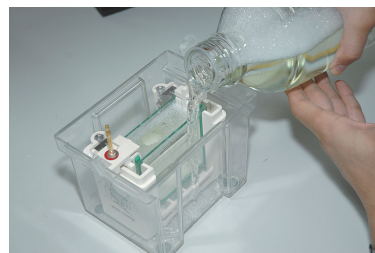
과정 (5)에서 겔의 내부나 표면, comb과 겔 사이의 기포가 생기면 좋은 전기영동결과를 얻기 어려우므로 세심한 주의가 필요하다. 기포는 겔 용액에 첨가한 SDS에 의해 더욱 심해지므로 겔 용액에서 SDS를 생략하는 것도 고려해볼 필요가 있다.

준비물

- 재료: 증류수, 30% 아크릴아마이드 혼합액, 1.5 M 트리스 완충용액 (pH 8.8), 1.0 M 트리스 완충용액(pH6.8), 10% SDS, 10% APS(황산암모늄용액), TEMED, 시료 완충용액, EP 완충용액, 표준분자량 단백질 용액, 단백질 전기영동 키트, EP 튜브, 마이크로피펫, 전원장치, 라텍스장갑, 70% 에탄올, 전기영동할 단백질(우유, 달걀 흰자)

방법 및 절차

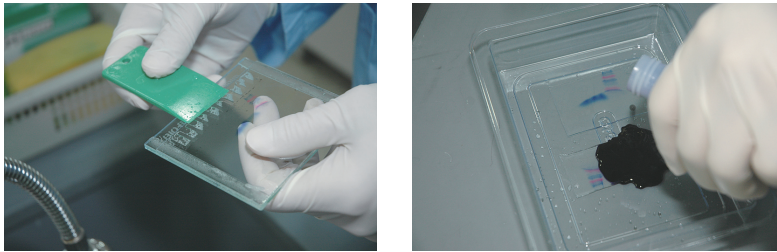
- (1) 전기영동 키트 방법에 따라 유리판을 조립하고 겔을 준비한다.
- (2) 분리용 겔 용액에 APS와 TEMED를 첨가한 후 거품이 나지 않을 정도로 신속히 섞고 피펫을 사용하여 조심스럽게 유리판 사이의 공간에 붓는다.
- (3) 스테킹 겔의 높이를 고려하여 분리용 겔 용액을 부어준 후 그 위에 증류수 또는 알코올을 조심스럽게 넣어주고 겔이 굳을 때까지 기다린다. 겔이 굳으면 상층에 가한 알코올과 아크릴아마이드 사이에 뚜렷한 경계가 보이는데 이때 알코올을 제거하고 증류수로 씻어준다.
- (4) 미리 준비해 놓은 스테킹겔 용액에 APS와 TEMED를 첨가한 후 신속히 섞은 후 피펫을 사용하여 조심스럽게 유리판 사이의 공간에 붓고 콤을 끼운다.



〈그림 Ⅲ-68〉 단백질 전기영동 과정 ④

- (5) 전기영동할 시료를 로딩완충용액과 혼합한다.

- (6) 90℃에서 10분간 변성시킨 후 탁상용 원심분리로 1~2분 원심분리한다.
- (7) 겔을 전기영동장치에 장착하고 전기영동용 완충용액을 위와 아래의 완충용액탱크에 붓는다.
- (8) 웰에 조심스럽게 시료를 가한다. 이 때, 사용하지 않는 웰에도 시료와 같은 용량의 1x 시료 로딩 완충용액을 가한다.
- (9) 전기영동 기구를 전원에 연결시킨 후 정전압 또는 정전류에서 전기영동을 한다.
- (10) 이동지표인 브로모페놀 블루가 겔의 끝부분에 도달하면 전원을 내리고 전기영동 장치로부터 유리판을 분리한다.
- (11) 전기영동이 끝난 후 겔을 조심스럽게 분리한 후 플라스틱 또는 유리 용기에 옮기고 겔 부피의 5배 정도의 염색액을 붓는다.



〈그림 Ⅲ-69〉 단백질 전기영동 과정 ⑪

- (12) 진탕기에 올려놓은 후 30분~1시간 염색한다. 전반적으로 겔이 파랗게 보이고 단백질 밴드가 좀 더 진하게 보이는 상태가 가장 좋다.
- (13) 수돗물로 가볍게 세척해 주고 디스테인 용액을 부어 준 후 진탕기에 올려 놓는다.
- (14) 디스테인용액을 수차례 교환하면서 겔의 염색시약이 모두 빠지도록 한다.

결과 및 논의

- (1) 각 시료의 단백질 전기영동 결과가 어떻게 나왔는지 사진을 찍거나 겔을 말린 후 노트에 붙이고 두 시료 단백질의 차이를 설명하시오.
- (2) 단백질을 분리시키기 위해 변성과정을 거치는데 SDS 각 과정이 어떻게 단백질을 변성시킬 수 있는지 설명하시오.

❖ 사용하지 않는 다른 웰에도 시료와 같은 용량의 버퍼를 가하는 이유는?

❖ 주의 사항

염색과 디스테인 용액에는 과량의 메탄올이 들어 있으므로 뚜껑을 잘 닫아 증발하지 않게 한다.

❖ SDS-PAGE
SDS-polyacrylamide-gel electrophoresis

❖ 등전점(pI)

아미노산은 아미노기와 카르복시기 그리고 R 기에 따라 전하를 띌 수 있는데 주위의 pH에 따라 전하량이 달라진다. 등전점은 알짜 전하가 0이 되는 pH를 말하며 등전pH 또는 pI이라고 부른다.

❖ 폴리아크릴아마이드 겔
(polyacrylamide gel)



폴리아크릴아마이드 겔은 아크릴아마이드(acrylamide)의 축쇄 기능기가 N, N'-methylene bisacrylamide와 같은 2개의 기능기를 가지는 화합물에 의해 교차 연결되어 형성되는 중합체이다. 이렇게 만들어진 겔은 자체의 강도와 탄성을 유지하고 SDS-폴리펩티드가 통과할 작은 구멍을 형성한다. 대체적으로 아크릴아마이드 : bisacrylamide = 29 : 1의 비율로 만든다. 그러나 이 물질은 피부로 흡수되어 매우 강력한 신경 독성을 나타내며 효과 또한 축적되므로 반드시 장갑과 마스크를 착용해야 한다.

(3) 환원성 SDS-PAGE와 비환원성 SDS-PAGE가 무엇인지 조사하고 그 차이점에 대해 서술하시오.

가. 실험 방법상의 차이점

나. 결과 해석상의 차이점

(4) SDS는 무엇이며 그것의 기능에 대해 조사해 보자.

1) 단백질 정량의 원리

단백질 정량은 생화학의 가장 기본적인 실험중의 하나다. 보통 ABS ratio assay, Lowry assay, Bradford assay의 3가지 방법이 널리 쓰인다. 그 중 브래드포드(Bradford) 단백질 정량법은 용액 속에 녹아있는 단백질 양을 측정하는데 매우 유용한 방법이다. 브래드포드법은 발색제로 Coomassie Brilliant Blue G-250을 이용하여 단백질을 염색한다. CBBG는 3가지 형태로 존재한다. 양성자를 얻어 양전하를 띠면 붉은색, 중성에서는 녹색, 음전하를 띠면 파란색을 띤다. 보통 산성용액에서 염료는 두개의 양성자를 얻어 적색을 띄나 염료가 단백질과 결합하면 양성자를 잃고 안정된 파란색으로 변한다. 단백질과 염료가 결합한 이 형태는 595 nm에서 분광기를 이용하여 흡광도를 측정하여 그 양을 알아낼 수 있다. 발색반응은 2분 이내에 완결되며 1시간 정도 안정성이 유지된다. 브래드포드 법은 빠를뿐 아니라 비단백질 성분들에 의한 방해도 거의 없다는 장점이 있어 일반적으로 가장 많이 사용되는 단백질 정량법이다.

Lowry 법에서는 생기는 청색은 (1)뷰렛반응에서와 같이 Cu^{2+} 이 펩티드 결합과 반응하는데 기인되며, (2)포스포몰리브덴산을 함유하는 착화합물 시약(페놀 시약, Folin 시약, Lowry 시약, Folin-Ciocalteu 시약)을 단백질에 있는 티로신과 트립토판 잔기들이 환원하는데도 기인된다. 이방법의 감도는 100-200 μg 의 단백질량이다.

이번 실험에서는 브래드포드법을 이용하여 단백질을 정량한다.

2) 램버트-비어(Lambert-Beer) 법칙

광도측정법의 대부분은 두 가지 법칙에 근거를 둔다. 첫째는 램버트(Lambert)의 법칙이다. 이 법칙에 의하면 매질에 의해 흡수된 입사광의 비율은 입사광의

광도와 무관하며 또 매질의 각 연속적 단위층은 그것을 통과한 빛의 동등한 부분을 흡수한다. 예를 들어, 만일 용액에 입사되는 빛의 강도가 I_0 이고 흡수 용액의 각 단위층의 흡수가 입사광의 1/10이라면, 빛의 강도는 각 단위층을 통과할 때마다 연속적으로 다음과 같이 감소할 것이다

1.0, 0.9, 0.81, 0.73, 0.66, 이 말을 수학적으로 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$I = I_0 e^{-\alpha l} \quad \dots\dots\dots(1)$$

I_0 = 입사광의 강도

I = 통과된 빛의 강도

l = 빛이 통과한 길이(cm)

α = 용액의 흡광계수

이 식을 대수형태로 바꾸면,

$$\ln = \alpha l \quad \dots\dots\dots(2)$$

이 되며 이 식을 10을 밑수로 하는 대수로 표현하면 다음과 같이 된다.

$$\log_{10} = K l \quad \dots\dots\dots(3)$$

여기서 $K = \alpha / 2.303$ 이고 $\log$ 는 흡광도(Absorbance, A, 또는 Optical density, O. D.)라고 한다.

α 계수와 K 는 농도 요소를 포함한다. 광도측정법의 두 번째 법칙인 비어(Beer)의 법칙은 이변수를 다룬다. 비어(Beer)는 빛이 c 의 농도와 l 의 길이를 갖는 용액을 통과할 때와 $c/2$ 의 농도와 $2l$ 의 길이를 갖는 동일한 물질의 용액을 통과할 때 통과한 빛의 강도가 서로 같다는 것을 발견했다. 일반적으로 비어의 법칙은 빛의 흡수는 빛이 통과하는 흡광물질의 분자수에 비례한다고 표현할 수 있다. 그러므로 만약 흡수물질이 투명한 용매에 녹아 있다면 용액의 흡광도는 흡광물질의 몰 농도에 비례한다.

비어의 법칙과 램버트의 법칙은 α 와 K 의 농도요소들이 있기 때문에 쉽게 합칠 수가 있다. 두 법칙을 합쳐서 다음과 같이 쓸 수 있다.

$$E c = K \quad \dots\dots\dots(4)$$

여기서 E 는 흡광계수, c 는 농도이다. 식(4)의 관계를 식 (3)에 대입하면

$$\log = E c l$$

또는 $A(\text{또는 } O.D.) = E c l$ 이 된다.

한편 농도 c 의 용액을 통과하기 전(I_0)과 후(I)를 나타낸다. 이때 투광도를 T

라 하면 빛이 용액을 통과하기 전후의 빛 세기는 아래 식처럼 나타낼 수 있다.

$$T = \frac{I}{I_0}$$

빛이 용액에 흡수된 양을 흡광도와 투광도는 아래 식과 같은 관계를 갖는다.

$$A = -\log T = \log \frac{I}{I_0}$$

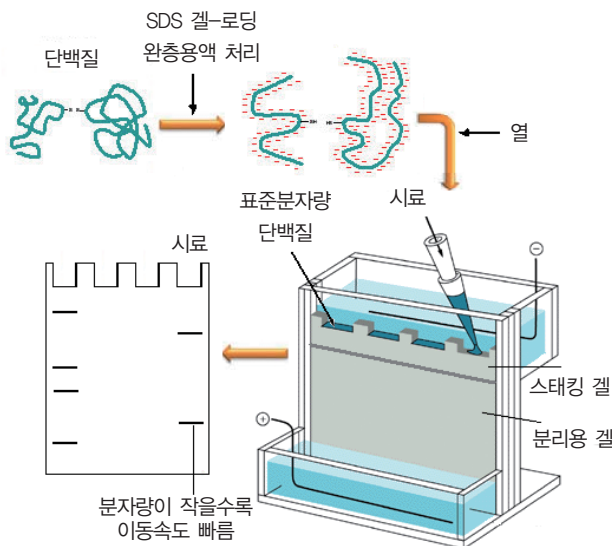
흡광도는 흡광도의 셀의 길이 l 과 셀에 들어있는 물질의 농도 c 에 비례한다.

$$A = Ecl$$

이 실험에서 단백질의 농도가 진하면 CBBR 염료에 의해 염색된 발색 정도도 진하므로 정량하여 이미 농도를 알고 있는 BSA 표준용액의 발색정도와 비교하여 미지시료의 단백질 농도를 구할 수 있다.

3) SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동

SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동은 단백질을 분리하고 분자량을 추정하는데 많이 이용되는 방법이다. 단백질은 각각 분자량과 등전점(PI)이 다르므로 전기장을 걸어주면 분자량과 등전점의 차이로 단백질이 분리된다. 그러나 SDS-PAGE를 시행할 때는 먼저 SDS를 이용하여 아미노산 잔기에 (-)전하를 띠게 한 후 겔에서 전기영동을 하므로 등전점 차이보다는 단백질의 분자량 차이에 의해 이동속도가 달라지게 된다. 분자량이 크면 겔과의 충돌이 커지고 저항이 증가하므로 이동속도가 느리고, 반면 분자량이 작으면 이동속도가 증가한다. 이때 구조적 차이에 의해 이동속도가 영향을 받을 수 있으므로, 환원제인 머캅토에탄올이나 DTT를 사용하여 단백질 내 이황화 결합을 파괴시켜 단백질을 1차 구조로 변성시킨다. 관찰하려는 단백질의 크기에 따라 겔의 농도를 달리하여 단백질의 이동속도를 조절할 수 있다. 단백질의 크기가 클수록 이동속도를 증가시키는 것이 좋으므로 낮은 농도의 겔을 사용한다.



〈그림 III-70〉 단백질 전기영동 (SDS-PAGE)

무균조작 기술

- 무균조작 기술은 배양물을 접종하거나 취급할 때 배양액에 다른 오염미생물이 들어가지 않게 하거나 다루는 미생물이 취급하는 사람이나 주변의 다른 사람에게 오염되지 않게 하는 방법이다.

순수배양 기술

- 획선평판법 : 멸균된 백금이에 분리하고자 하는 미생물의 시료를 묻혀 고체배지의 한쪽에서 시작하여 점진적으로 획선을 긋는 방법이다.
- 주입평판법 : 원 시료를 여러 번 희석하여 배양접시에 붓는 것으로 미생물 각각을 분리된 군체로 형성할 수 있도록 하는 방법이다.
- 도말평판법 : 미생물이 포함된 한 방울의 현탁액을 고체배지 위에 떨어뜨리고 멸균된 유리막대로 펼치는 방법이다.

세균의 염색과 관찰

- 염색은 세포 성분 중 단백질이나 핵산 같은 거대분자와 염색액 성분이 정전기적 인력에 의해 결합하게 색을 띠게 되는 원리를 이용한다.
- 그람염색법은 세균에 따라 차이를 보이는 세포막과 세포벽의 특성에 따라 세균의 염색이 달리되는 성질을 이용한 방법으로 세균 분류의 한 기준이다.

미생물의 생장곡선 구하기

- 세대시간(generation time=GT)은 미생물 집단의 규모가 두 배로 증가하는 데 걸리는 시간으로 GT는 다음과 같이 구할 수 있다.

$$GT = \frac{1}{k} = \frac{1}{n} \frac{\log 2 \times t}{\log N_t - \log N_0}$$

(단, N_0 : 처음 시작점에서 세균의 수, N_t : 일정 시간(t) 경과 후 세균의 수)

플라스미드 분리 및 절단

- DNA의 운반체로 쓰이는 플라스미드는 세균 내에서 자신 DNA와 관계 없이 스스로 복제할 수 있는 환형의 작은 DNA이다.
- 플라스미드를 절단하는데 쓰이는 효소는 제한효소라고 불린다. 제한효소는 DNA의 특정 염기서열을 인지하여 특정부위를 자르는 효소이다.

DNA 절단 및 전기영동

- DNA를 크기별로 분리하기 위해서는 전기영동의 방법이 쓰인다. 아가로스판에 DNA를 위치시키고 전기장을 걸어주면 당-인산 축의 바깥 쪽이 (-)전하를 띠는 DNA는 (+)쪽으로 이동한다.
- DNA는 겔 상에서 DNA 작은 분자는 겔 구멍 속을 쉽게 빠져나갈 수 있는 반면 큰 분자는 저항이 커 이동속도가 느리기 때문에 분자량이 작을수록 이동이 빠르고 큰 조각일수록 이동이 느리다.
- 전기영동한 DNA 분자의 이동거리는 크기에 반비례하여 분리되므로 이동속도를 비교하면 DNA의 상대적 크기를 알 수 있다.

DNA 지문법

- DNA 지문법은 DNA가 분리될 때 나타나는 패턴을 분석하는 기법으로 어떤 개체도 동일한 DNA를 가질 수 없으므로 이 방법을 통해 개인을 식별할 수 있게 된다.
- DNA 지문법은 현재 진단의학, 친자감별, 범인 추적, 계통 분석 등의 많은 분야에서 활용하고 있다. 또한 동일 DNA를 서로 다른 제한효소로 잘라 제한절편의 길이를 분석할 경우 제한효소 지도도 작성할 수 있다.

대장균의 형질전환

- 형질전환은 외래의 유전 정보를 가진 DNA 조각이 수용체 세포에 들어가 유전적 변화를 일으키는 과정을 말한다.
- pGLO 플라스미드는 GFP유전자와 항생제인 암피실린에 저항성을 가진 유전자를 포함하고 있다. 아라비노오스가 영양배지에 포함되어 있을 경우 GFP 유전자가 발현되어 콜로니는 UV를 비추면 녹색형광을 띄게 된다.

PCR을 이용한 DNA 증폭

- PCR 과정은 주형 DNA 가닥의 분리를 위한 변성(Denaturation), 프라이머와 주형 DNA와의 결합(Primer Annealing), Taq 중합효소를 통한 DNA가닥의 합성(Extension)으로 나뉘어 진다.
- PCR은 고온에서도 활성을 잃지 않는 효소를 미국 옐로스톤 국립공원의 온천에 사는 테르무스 아쿠아티쿠스(Thermus aquaticus)에서 얻어 가능하게 되었다.

단백질 분리

- SDS 겔 전기영동은 단백질을 분리하고 분자량을 추정하는 데 많이 이용되는 방법이다. 단백질은 각각 분자량과 등전점(PI)이 다르므로 전기장을 걸어주면 분자량과 등전점의 차이로 단백질이 분리된다.
- SDS-PAGE를 시행할 때는 먼저 SDS를 이용하여 아미노산 잔기에 (-) 전하를 띠게 한 후 겔에서 전기영동을 하므로 등전점 차이보다는 단백질의 분자량 차이에 의해 이동속도가 달라지게 된다.

논술 및 토의

1. 멸균과 소독은 어떤 차이가 있는지 쓰시오.
2. 일반적인 용액의 멸균, 가압멸균법으로 손상을 받는 재료의 멸균, 열에 약한 기구를 대량으로 멸균할 경우, 불에 강한 금속도구나 유리기구를 멸균해야 할 경우 각각 어떤 방법의 멸균법이 좋을지 토론하시오.
3. 영양배지에 한천을 녹인 후 플레이트에 부어 고체배지를 만들 때 한천 배지를 바로 플레이트에 안에 붓지 않고 반드시 50℃정도 식힌 후 붓는다. 또한 배지가 굳자마자 사용하지 않고 일반적으로 하루 정도 지난 후 사용하기도 한다. 미생물을 배양할 때는 플레이트를 뒤집어 배양기에 넣는데 이러한 방법은 모두 어떤 이유와 관련되어 있다. 그것이 무엇인지 설명하시오.
4. 그람 양성과 그람 음성의 세균이 나타나는 것은 각 세균들에 있어서 무엇의 차이점 때문일까?
5. 환경이 최적일 때 미생물의 개체군은 대수적 증가 곡선을 그린다. 만약 세균 하나의 무게가 약 $1 \times 10^{-12} \text{g}$ 이고 지구의 무게는 대략 $6 \times 10^{24} \text{g}$ 이라고 하자. 그리고 하나의 박테리아가 분열하여 두 개의 세균이 되는데 20분이 걸린다고 가정하자. 세균 하나가 지구 무게만큼의 세균 개체군을 형성하는데 얼마의 시간이 걸릴지 계산해 보시오. 또 실질적으로 이런 일이 결코 일어날 수 없는 이유에 대해서도 토론해 보시오.
6. 한 배지에 키운 5×10^2 의 세균이 하루동안 배양한 결과(24시간) 1×10^8 로 증가하였다. 이 배양액 속의 세균의 세대시간을 구하시오.

1. pGLO의 녹색형광단백질의 발현은 araC 유전자에 의해 조절된다. araC 유전자는 아라비노오스 오페론에서 조절유전자의 역할을 하는데 아라비노오스 오페론이 무엇인지 조사하고 pGLO에서 어떻게 araC가 녹색형광단백질의 발현을 조절하는지 설명하시오.
2. 친화크로마토그래피로 단백질을 분리할 때 단백질의 특성을 이용하여 분리한다. 단백질의 기본구조는 아미노산들 사이의 공유결합에 의해 결정되지만 단백질의 형태는 아미노산들 사이의 비공유결합에 의해 이루어진다. 단백질의 구조를 결정짓는 비공유결합에는 어떤 것이 있는지 쓰시오.
3. 플라스미드(환상의 DNA)와 제한효소를 가지고 플라스미드의 제한효소자리 지도를 그리려고 한다. 어떻게 하면 그릴 수 있는지 실험 방법을 디자인 하시오.
4. SDS-PAGE를 하기 위해서는 분리용 겔 용액과 스테킹 겔 용액이 필요하다. 이 두 용액의 아크릴아마이드농도와 pH는 다르다. 스테킹 겔은 분리용 겔보다 농도가 낮는데 그 이유는 무엇인지 설명하시오. 또 분리용 겔의 농도도 분리하려는 단백질 시료에 따라 조절할 수 있는데 단백질의 분자량이 큰 것을 분리하기 위해서는 작은 것을 분리할 때 보다 아크릴아마이드의 농도를 어떻게 조작해야 하는지 설명하시오.
5. 여러분은 이 단원을 통해 SDS-PAGE나 크로마토그래피를 이용하여 단백질을 분리하였다. 그러나 세포로부터 내가 원하는 단백질을 찾아내 연구하기에는 이러한 분리방법만으로는 부족하다. 내가 원하는 단백질을 찾아내기 위해서는 어떤 생명공학 방법이 쓰일지 조사하시오.