

DNA절단과 접합

DNA를 분리한 것을 조작하게 되는데 DNA를 조작할 때 우리가 어떤 것을 배워야 할지를 보면, DNA를 조작할 때 사용되는 효소에 대해 배웁니다. 대표적인 것이 크게 두 가지가 있는데 절단하는 제한효소와 붙이는 ligation 효소가 그것입니다.

DNA 조작 효소를 세부적으로 들여다보면 연결시켜 주는 ‘리가제’라는 효소가 있고, 핵산 분자를 절단하거나 짧게 하는 ‘뉴클레아제’라는 효소가 있습니다. 그리고 DNA를 합성하는 중합효소가 있어요. 그러니까 DNA분자의 복사체를 만드는 겁니다. 다음에 변형효소라고 해서 DNA의 화학구조를 바꿔주는 효소가 있고, 이중에 ‘토포아이스머라제’라고 해서 네 가지의 공유된 기능을 갖고 있는데, 전번 원형 DNA를 얘기했었는데 원형 DNA를 초나선형으로 만들어주는 효소가 있었습니다. 이것을 ‘토포아이스머라제’라고 합니다.

이제 하나씩 자세히 보면 ‘뉴클레아제’는 크게 두 가지가 있습니다. ‘엑소뉴클레아제’와 ‘엔도뉴클레아제’입니다. ‘엑소뉴클레아제’는 끝에서부터 절단을 해나가는 거예요. 절단할 때는 ‘뉴클레오타이드 포스포디에스테르’ 결합을 자릅니다. DNA 구조가 여기에는 안 나와있는데 뒤에 가서 배우겠지만 DNA는 일단 ‘뉴클레오타이드’끼리 연결을 해주는 것이 포스포디에스테르 결합이라고 생각합니다. 이결합은 인산결합이라고 합니다. 인산결합을 잘라주게 되면 하나씩 DNA의 단량체가 떨어져 나옵니다. 엔도뉴클레아제는 중간에서부터 잘라줍니다. 엔도와 엑소는 접두사인데 엑소는 끝에, 엔도는 안에 또는 내부에 라는 의미를 갖고 있습니다. 엑소뉴클레아제는 여러 가지가 있고 Bal31이라는 뉴클레아제는 이중가닥 중에서 두 개씩 양쪽 끝에서 잘라내는데 양쪽 사슬을 모두 잘라냅니다. 엑소뉴클레아제 III는 두 가닥 중에 하나만 잘라서 꺾쇠 모양으로 잘라냅니다. 이때 3말단의 뉴클레오타이드를 제거하면 모양이 sticky end가 나오는데 sticky end는 DNA가 동그랗게 말릴 수 있도록 해주는 역할을 합니다. 여기에서 5말단, 3말단이라는 용어가 나오는데 DNA 분자구조를 보면 염기가 있고, 당이 들어 있는데, 5탄당이라고 해서 ‘펜토스’가 있습니다. 펜토스에서 5번위치, 3번위치를 얘기하는 겁니다. 나중에 5탄당 구조를 보고 설명하겠습니다. 엔도뉴클레아제에 대해 얘기하면, 엔도뉴클레아제도 종류가 여러 가지가 있습니다. S1뉴클레아제는 엔도뉴클레아제의 일종이니까 DNA 가운데에서 잘라줘야 되는데 이중가닥 분자의 한 가닥 DNA를 잘라 냅니다. S1뉴클레아제는 이중가닥이 아니고 단일가닥을 중간에서 잘라 줍니다. 또는 이중가닥의 두 가닥 중에서 한 가닥을 잘라내고 이어서 다음을 잘라 냅니다. ‘DNase I’은 두 가닥을 하나만 자르는 것이 아니고, 두 개를 한꺼번에 자릅니다. 그리고 제한효소는 엔도뉴클레아제의 일종이고 특정한 염기서열만 인식해서 잘라 줍니다. 제한효소는 수십 가지가 있고 각각의 제한효소가 인식하는 염기서열이 모두 정해져 있습니다.

다음에 리가제라는 것이 있는데, 리가제는 붙이는 역할을 합니다. DNA 가닥 중 잘라진 손상된 부위가 있을 때 이것을 때워서 DNA를 복구하는 역할도 하고, 또 분자간 결합이라고 해서 완전히 잘라져 있는 두 가닥의 DNA를 붙여주는 역할도 합니다. 손상을 막기도 하고 두 가닥을 한꺼번에 붙여주는 역할을 동시에 합니다.

다음에 'Polymerase'라는 중합효소가 있습니다. 중합효소는 기본 중합 반응과 DNA 중합효소 반응 I, 'Klenow fragment'반응, 다음에 '역전사효소'반응을 수행합니다. 기본반응이 뭔지 보면 그림에 5번, 3번 위치가 표시되어 있고, 염기가 있습니다. A-T-G-C-A-A으로 염기서열이 나와 있는데 이 주형을 바탕으로 해서 5번부터 시작해서 T의 경우는 A, A의 경우는 T, C의 경우는 G, 이런 식으로 '프라이머'를 기초로 하여 뉴클레오타이드 단량체를 붙여서 폴리머를 만들어주는 기본반응을 수행합니다. 중요한 것은 5번 위치에서부터 3번 위치로 중합을 해나가고 그 때 프라이머라는 것이 필요합니다. 이것이 없으면 중합반응이 일어나지 않습니다. 씨앗 역할을 해준다고 볼 수 있어요.

다음으로 DNA 중합효소 I은 어떤 DNA가 두 가닥이 있는 데 일부분이 잘라져서 없어졌다고 하면 이것을 채웁니다. G-C-A-T라는 것이 존재하였다가 상실되었으면 이것을 똑같은 것으로 다시 대체하고 그 다음 서열도 또 중합하여 메꿉니다. 다음에 Klenow fragment는 DNA 중합효소 I과 기능은 비슷한데 빈곳을 채우고 기존의 뉴클레오타이드는 그냥 놓아 둡니다. 그래서 Klenow fragment와 중합효소 I은 기능은 비슷한데 나머지 부분을 대체하느냐 안하느냐의 차이가 있습니다.

역전사효소는 RNA 바이러스에서 중요한 역할을 합니다. 보통은 DNA 정보가 RNA로 가고, RNA 정보가 단백질로 가죠. 그런데 어떤 바이러스의 경우는 RNA만 갖고 있고 RNA 바이러스는 RNA로 부터 바로 단백질을 만들지 못합니다. 그래서 거꾸로 RNA를 가지고 DNA를 만들기 위해 역전사효소라는 것을 이용하게 됩니다. 그래서 RNA를 기본바탕으로 해서 DNA를 합성하는 특수한 효소가 필요합니다.

DNA의 화학적인 모양을 바꾸는 효소가 있는데 그것을 DNA 변형 효소라고 합니다. 보통 DNA 말단을 보면 한 쪽은 OH 그룹이 있고 한 쪽은 인산그룹이 있습니다. 어떤 경우는 인산그룹을 OH그룹으로 바꿀 필요가 있습니다. 그래서 알칼린 포스포타제는 DNA 5말단에 있는 인산기를 제거하고 OH로 바꾸는 역할을 합니다. '폴리뉴클레오타이드 키나제'라는 것은 OH 그룹을 인산그룹으로 바꾸는 반대의 역할을 합니다. '터미널 디옥시뉴클레오타이드 트랜스페라제'라는 것은 DNA 3번 말단에 한 개 또는 그 이상의 디옥시뉴클레오타이드 단량체를 하나씩 붙여나갑니다. 한 가닥도 가능하고 두 가닥도 가능한데 두 가닥의 경우에 그림과 같이 이 한가닥 부분만 붙고 또 다른 한가닥 부분만 붙어서 Sticky end를 만듭니다. 그러니까 DNA 사슬을 연장을 시키는데 두 가닥 중 한 가닥만 연장을 시킵니다.

DNA를 절단하는 제한효소가 있다고 했는데 제한효소는 엔도뉴클레아제의 일종입니다. 제한효소는 벡터를 잘라주고 원하는 유전자가 들어있는 DNA를 또 자른 후 원하는 유전자와 벡터를 붙일 수 있도록 규칙성이 있는 염기배열을 인식합니다. 클로닝 하려는 유전자는 보통 3kb정도의 크기를 갖고 있고, 이 3kb는 대형 DNA분자, 약 80kb크기에서 잘라냅니다. 제한효소라는 이름이 붙은 유래로서 50년대 초에 숙주 조절 제한이라는 현상이 발견됐어요. 어떤 박테리아가 박테리오파지의 감염에 대해 면역성이 있음을 발견하였습니다. 고등동물에서 면역성과 비슷하게 박테리아도 면역성이 있다는 것이 발견되었습니다. 박테리아의 면역성은 파아지의 특정 DNA위치를 박테리아 효소가 인식을 해서 잘라버리는 것에서 나옵니다. 우리 몸의 백혈구가 외부에서 세균이 들어오면 잡아먹듯이 박테리아는 외부에서 들어오는 박테리오파지 DNA를 잘라버립니다. 자를 때 제한효소가 어떤 특정 부위를 인식합니다. 그러면 여기서 파아지의 DNA는 자르면서 자기 자신의 DNA는 자르지 않느냐는 의문이 생깁니다. 자기 자신의 DNA를 제한효소가 자르는 것을 방지하기 위해서 박테리아 DNA에 어떤 화학적인 변형이 생깁니다. 박테리아 자체 DNA는 공격으로부터 보호되는데 이것은 제한효소의 활동을 막는 부가적인 메틸기를 박테리아 DNA가 가지고 있기 때문입니다. 우리 몸과 유사한 점이 있는데 우리 몸의 위장에서 펩신이 나와서 소화를 시키는데 위장벽은 펩신에 의해서 공격을 받지 않습니다. 그 이유는 위장벽에 펩신에 의해 공격받지 않도록 코팅해주는 특수한 물질을 만들기 때문입니다.

형태II 제한효소는 보통 세자로 이름을 붙입니다. 예를 들면 Alu1, EcoR1 이렇게 나오는데 EcoR1은 대장균인 *E. coli*에서 나온 것이고, R1은 그 중의 한 종류라는 얘기에요. 다음에 BamH1 이라든지 BglIII라든지 이런 식으로 제한효소의 이름을 붙이게 됩니다. 자를 때 여러 가지 방법으로 자를 수 있습니다. 무 자르듯이 자르는 blunt 말단을 유지하는 제한효소의 대표적인 것이 Alu1이라는 것이고, sticky 말단은 자를 때 한쪽을 길게 자릅니다. sticky 말단을 만드는 이유는 나중에 다른 DNA를 집어넣을 때 여기에 딱 맞게 집어넣을 수 있기 때문입니다. 그리고 선형 DNA를 말아서 동그랗게 만들 수도 있습니다. sticky 말단을 만드는 대표적인 것이 EcoR1입니다. Sticky 말단에서 다른 제한효소가 같은 말단을 만드는 경우가 있어요. BamH1 이나 BglIII 으로 조작하면 끝이 C-T-A-G로 끝나게 됩니다. Sau3AI도 같은 모양으로 끝나게 할 수 있습니다. BamH1은 바실러스 균에 의해서 만들어진 제한효소인데 BglIrhk 같이 다른 균에 의해서 만들어진 제한효소가 같이 형태로 DNA를 끊는다는 것은 다른 종류의 박테리아라고 하더라도 자르는 형태는 같다는 것을 의미합니다.

실험실에서 제한효소에서 실험하는 예를 들면, 보통 1mL정도 들어가는 뚜껑이 달린 튜브를 예로 듭니다. λ 파아지로부터 분리한 보통 2 μ g의 λ DNA를 1mL 튜브에

약 16 μ L를 넣습니다. 여기에 2 μ L의 BglIII 완충용액을 첨가하죠. 그러니까 제한효소 반응을 시키려면 완충용액을 집어넣는데 완충용액은 pH를 일정하게 유지시켜 주는 용액입니다. 2 μ L에 16 μ L를 넣었으니까 18 μ L가 됐습니다. 여기에 물을 1.5 μ L 넣고, BglIII 0.5 μ L를 넣습니다. 그러니까 DNA를 제일 먼저 넣고, 완충용액을 넣고 제한효소를 넣은 후 온도를 37 $^{\circ}$ C로 해서 한시간 동안 반응시킵니다. 그러면 λ DNA가 잘라지고 잘라진 DNA용액에 페놀을 첨가해서 15분 동안 100 $^{\circ}$ C에서 가열하면 효소의 기능이 떨어지게 됩니다. 제한효소반응을 정지시킵니다. 이렇게 잘라내면 어느 위치에서 잘라졌는지를 알 수 있어요. BglIII로 해서 잘랐을 때 전기영동을 하면 6개의 위치에 띠가 생깁니다. λ DNA를 한가지 제한효소로만 자르면 정보를 많이 알 수 없는데 다른 종류의 제한효소 BamHI이라든지 Sal I으로 자르면 전기영동상에서 여러 가지 다른 위치에 띠들이 생깁니다. 그래서 이 정보를 종합하게 되면 제한효소 지도라는 것이 만들어집니다. 전기영동에 의해서 제한효소로 잘린 조각 분자들을 분리해서 이 단편들의 길이가 얼마가 되는지를 길이가 알려진 표준 DNA 분자와 비교해 보는 것입니다. 전기영동 젤상에서 DNA 분자를 보는 방법은 염색하는 방법이 있고, DNA에 방사선을 표시해서 방사선으로 보는 두 가지 방법이 있습니다.