

# PNMT 유전자 조각의 Shot-gun Cloning에 관한 연구

조흥범 · 최영길

한양대학교 자연과학대학 생물학과

## I. 서 론

동물체의 신경전달물질은 acetylcholine을 비롯한 9종 이상의 물질이 알려져 있으며 이들 물질의 생체내에서의 기작과 생합성 과정에 관해서는 많이 알려져 있고 또한 이 방면의 연구도 활발하다.

그 중에서도 방향족 아미노산으로부터 유도되는 신경흥분 전달물질을 총칭하여 catecholamine 으로 부르고 있으며, 체내에서 진행되는 생합성 과정은 tyrosine을 전구물질로 하여 L-dopa로 전환되고 이어서 dopamine, norepinephrine, 최종적으로 epinephrine으로 합성되는 것으로 알려졌다. 그 매 단계마다 순서적으로 이들 물질의 전환에 관여하는 효소는 tyrosine hydroxylase

$\beta$ -hydroxylase(DBH) 및 phenylethanolamine-N-methyltransferase(PNMT) 등의 효소들인데 이들 효소의 물리 화학적 특성에 관하여 이미 모두 밝혀진 바 있다(Joh, 1984). 그 중에서도 Joh와 Baetge 등에 의하여 DBH와 PNMT 효소의 생산에 관여하는 mRNA가 면역침전법에 의하여 순수 분리되고 이를 주형으로 하여 DBH와 PNMT 효소 생산에 근본이 되는 유전자의 염기서열 및 유전자의 구조를 규명하는 작업이 진행되고 있으나 아직도 그 전체가 규명된 바는 없다(Baetge 등, 1981; 1983; Joh 등, 1983; 1984).

그리하여 본인들은 상기의 연구자들로부터 PNMT 유전자인 cDNA를 분양받아서 이 유전자의 염기서열 및 유전자의 구조를 규명하는데 자료가 되는 외가닥 cDNA를 M13mp18과 19의 vector phage에 재조합시키고 이 cDNA를 JM 107과 109의 host bacteria에 도입하여 형질발현 실험을 통하여 확인하고자 하였다.

숙주세균에 의하여 유전자 재조합된 template는 증폭되어질 것이며, 순수분리하여 신경전달물질 유전자의 염기서열과 분자구조의 파악에 재료로 사용되게 될 것이고 이것은 의학적으로 필요한 신경조절물질의 인공적 생산에 이용될 것으로 사료되어진다.

## II. 재료 및 방법

### 균주

PNMT gene의 cDNA가 삽입된 pBR 322 plasmid와 vector phage(M13mp18과 19)의 증폭을 위한 숙주로는 각각 *Escherichia coli* JM 109, 105, 107 strain을 사용하였다.

### Plasmid DNA의 준비

700 base pair 크기의 PNMT gene 조각의 cDNA가 삽입된 pBR 322 plasmid를 가지고 있는 JM 109 strain을 chloramphenicol과 tetracycline이 함유되어 있는 LB 배지에서 36시간 배양한 후(Parnes, 1981), cell을 수확하고 Alkaline lysis 방법(Birnboim and Doly, 1979)으로 plasmid를 순수 분리하였다.

### PNMT gene의 subcloning 및 transformation

PNMT gene의 cDNA는 pBR 322의 Amp<sup>r</sup> gene의 pst I site에 삽입되어 있으므로 pst I 효소로 digestion하고 low melting agarose gel에 전기영동하여 cDNA 위치를 확인하여 도려낸 후 cDNA만을 순수 분리하였다. 분리된 cDNA는 200~300 bp 크기로 절단하기 위해 수종의 제한효소를 각각 처리하였다.

M13mp18과 19 vector phage는 각각 JM 105, 107 등의 숙주세균에 감염시켜서 reproductive form(RF)을 얻고 YT 배지에서 대량 배양

한 후 RF phage DNA를 순수 분리하였다 (Parnes 등, 1981; Baetge 등, 1983).

200~300 bp의 크기로 절단된 PNMT cDNA 조각들과 RF phage DNA는 10x T<sub>4</sub> DNA ligase buffer (0.66M Tris-HCl, pH 7.5; 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM DTT), T<sub>4</sub> DNA ligase, 100 mM ATP 등과 혼합하고 12°C에서 12시간 처리하여 ligation 시켰다.

JM 105, 107 숙주세포 각각의 전배양액은 50 : 1의 비율로 신선한 YT 배지에 재접종하고 OD<sub>600</sub> = 0.6~0.7이 될 때까지 배양한 후 수확하여 50 mM CaCl<sub>2</sub>를 두 차례 처리하고 4°C에서 수시간 방치하였다.

전처리된 숙주세포 300  $\mu$ l와 recombinant DNA 5  $\mu$ l를 top agarose 용액에 혼합하여 YT 고체배지 위에 접종하고 37°C에서 24시간 배양하였다 (Maniatis 등, 1982).

#### Colony hybridization

PNMT gene이 subcloning된 vector phage의 transformation을 확인하기 위하여, 4°C로 cooling한 agar plate에 nitrocellulose filter를 30초간 붙여서 indian ink로 marking한 후, 0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl 용액에 30초간 처리하여 denaturation을 시켰다. 이후 neutralizing 용액 (0.5 M Tris, pH 7.2, 1.5 M NaCl)에 1분간 두 차례 처리하고, 2x SSPE에 1분간 처리한 다음 30분간 air-dry 시킨 후 80°C vacuum oven에서 2시간 동안 filter를 건조시켰다. Filter는 2x SSC (1x SSC : 0.15 M NaCl, 0.015 M sodium citrate, pH 7.0)에 잠시 적신 후 prehybridization 용액 (6x SSC, 10x Denharts 용액, 0.1% SDS, 0.1% sodium pyrophosphate, 250  $\mu$ g/ml denatured salmon sperm DNA)에 넣고 42°C에서 1시간 동안 shaking한 다음 P<sup>32</sup>-cDNA probe를 첨가하고 42°C에서 shaking하여 hybridization 시켰다. 10~20시간 후 hybridization 용액을 버린 다음 filter paper 당 20 ml의 washing solution (6x SSC, 5x Denhardt's, 0.1% SDS, 0.1% sodium pyrophosphate)을 넣어 42~50°C에서 shaking하고 2x SSC, 0.1% SDS로 30분간 2~3차례, 0.5x

SSC, 0.1% SDS로 2~3차례 씻은 후 filter를 air dry 시켰다. 건조시킨 filter는 -70°C deep freezer에서 12시간 감광시킨 후 x-ray film을 현상하였다.

#### 외가닥 template의 정제

Clear plaque를 따서 5 ml의 2x YT 배지에 접종하고 37°C에서 12시간 배양한 후 10,000 rpm으로 20분간 원심분리하였다. 상등액 1 ml에 150  $\mu$ l/ml RNase : A; 15 mM EDTA, pH 8.0; 2.5 M NaCl; 10% PEG 조성의 용액 250  $\mu$ l를 첨가하고 4°C에서 10,000 rpm으로 20분간 원심분리한 후, 침전물이 흐트러지지 않도록 조심스럽게 aspiration하고 10 mM Tris HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA, pH 8.0; 0.2% sarkosyl; 50  $\mu$ g/ml Proteinase K 조성의 용액 50  $\mu$ l를 첨가하여 55°C에서 20분간 배양한 다음 상온에서 10~15분간 방치하여 식혔다.

5 M NaCl 4  $\mu$ l를 첨가하고 1/2 양의 포화 phenol, 1/2 양의 CHCl<sub>3</sub>와 혼합하여 10,000 rpm에서 3분간 원심분리하고 상등액에 1 ml의 H<sub>2</sub>O 포화 ether를 첨가한 후 다시 10,000 rpm으로 30초간 원심분리하였다.

Hood 내에서 ether를 제거하고 100% Et-OH 150  $\mu$ l를 첨가하여 잘 혼합한 후 30분간 -70°C deep freezer에서 방치하였다. 4°C에서 10,000 rpm으로 10분간 원심분리하고 Et-OH를 완전히 제거한 후 50  $\mu$ l TE 용액을 첨가하여 냉장고에 보관하였다.

### III. 결과 및 고찰

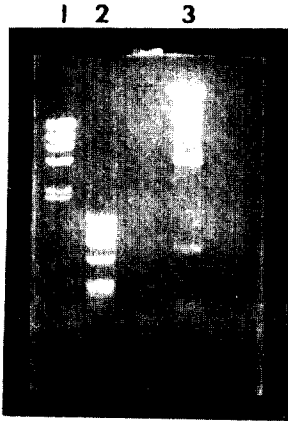
#### PNMT cDNA의 분리 및 정제

JM 109 균주를 chloramphenicol과 tetracycline이 함유된 LB 배지에서 36시간 배양한 후 Alkaline lysis 방법으로 PNMT gene의 cDNA가 삽입된 pBR 322 plasmid를 분리한 결과는 Fig. 1과 같다.

PNMT gene의 cDNA는 pBR 322의 Amp<sup>r</sup> gene의 pst I site에 삽입되어 있으므로 제한효소 pst I으로 37°C에서 1시간 digestion하여 전기영동한 결과 700 bp 크기의 cDNA의 분리를 확인하



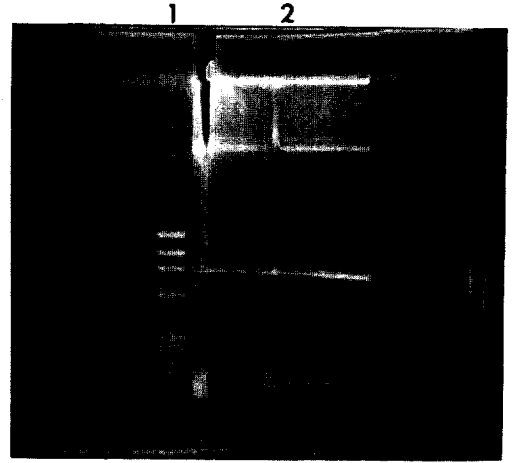
**Fig. 1.** Gel electrophoretic pattern of plasmid DNA in JM 109 strain.  
lane 1: *Hind*III + *Eco*RI double-digested DNA.  
lane 2: *Hind*III digested  $\lambda$  DNA. lane 3,4: cDNA of PNMT gene fragment cloned pBR 322. Electrophoresis was carried out at 50 V for 1 hr in 1% agarose gel.



**Fig. 2.** Electrophoretic pattern of plasmid pBR 322 digested with *pst*I.  
lane 1: *Hind*III digested  $\lambda$  DNA. lane 2: *HAE*III digested  $\lambda$  DNA. lane 3: *pst*I digested cDNA cloned plasmid pBR 322

였다(Fig. 2).

cDNA의 대량획득을 위하여 *pst*I 제한효소를 처리한 pBR 322 plasmid를 1% low melting agarose에 울리고 40 V에서 4시간 전기영동한 후 size mark DNA와 *pst*I에 의하여 가수분해



**Fig. 3.** Low melting agarose gel electrophoresis for isolation of cDNA.  
lane 1: *HAE* III digested  $\lambda$  DNA. lane 2: *pst*I digested cDNA cloned plasmid pBR 322



**Fig. 4.** Electrophoretic pattern of pure cDNA.  
Electrophoresis was carried out at 50 V for 1 hr in 1.2% agarose gel.

된 시료의 일부를 중축으로 절단하고 ethidium bromide로 염색한 후 cDNA의 band를 확인하여 깨끗한 면도칼로 오려내었다(Fig. 3). 오려낸 gel을 액상으로 바꾸어 Stephen Anderson의 변법(Anderson, 1983; Baetge, 1983)으로 순수한 cDNA를 정제하였다(Fig. 4).

#### PNMT cDNA의 절단

Shot-gun cloning에 이용되는 M13mp18과 19는 300~350 bp가 알맞은 삽입 크기이므로 700 bp

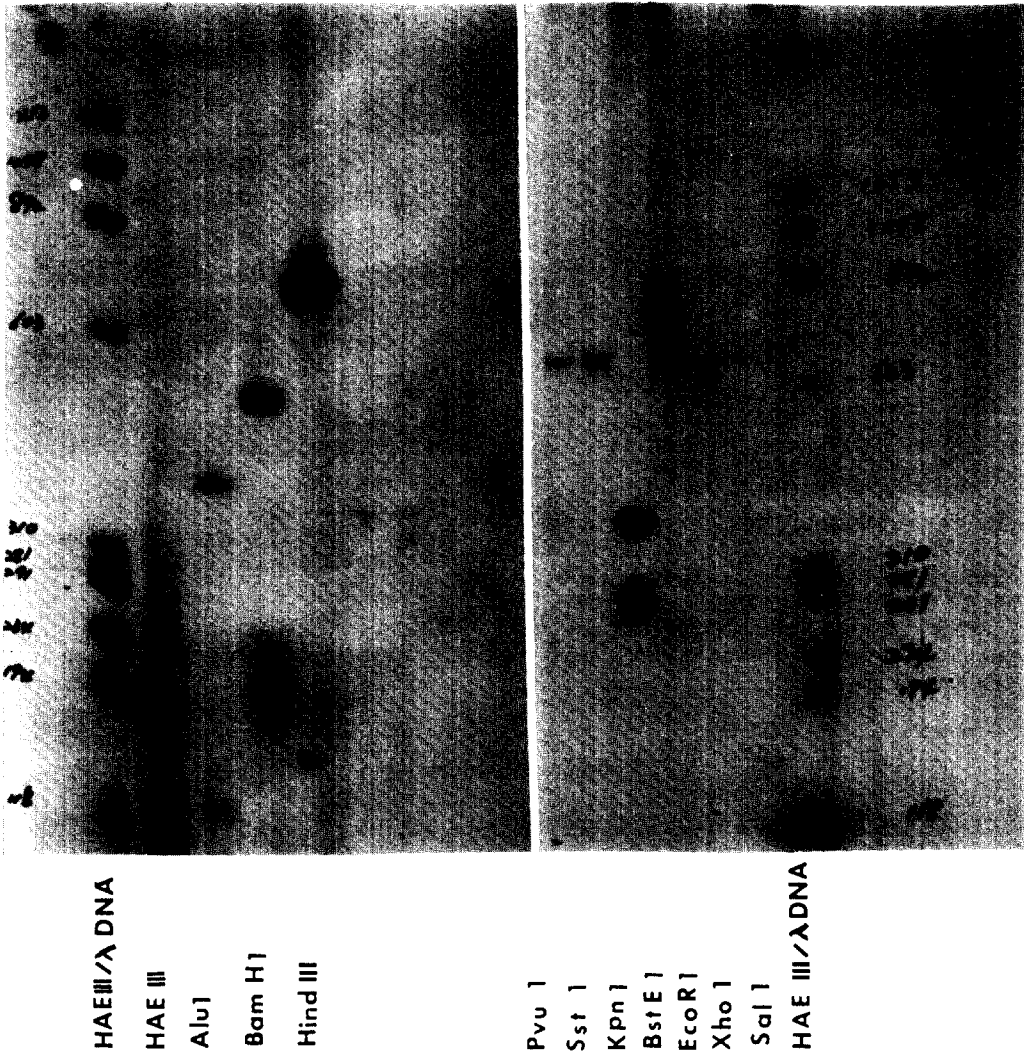


Fig. 5. Electrophoretic pattern of acrylamide gel for identification of restricted cDNA fragment.

의 PNMT cDNA를 적당한 크기로 절단할 필요가 있다.

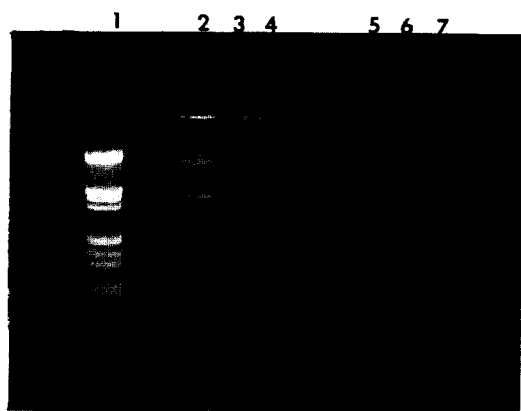
cDNA와 11종의 제한효소를 1:1로 하여 37°C에서 1시간 처리한 후 각 제한효소에 따라 적당한 [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dNTP와 klenow 효소를 첨가하고 실온에서 10분간 처리하여 end-labelling을 시킨 다음 3.5% acrylamide gel에 loading하여 240 V 전압으로 전기영동한 gel을 Whatman 용지 위에서 건조시키고 X-ray 필름에 24시간 감광시켜 얻은 결과가 Fig. 5이다.

이 결과에서 BamHI을 처리하였을 때 200과

500 bp를 가지는 2개의 조각으로 절단되었으며, kpnI을 처리하였을 때 300과 400 bp를 가지는 2개의 조각으로 절단되었음을 확인하고 각각의 fragment를 순수 분리하였다.

#### RF phage DNA의 분리 및 정제

M13mp18과 19 phage를 JM 105와 107 속주 세균에 감염시켜 배지상에 형성된 blue plaque의 single clone을 취하여 2 ml의 2x YT 배지에서 12시간 배양하고, 이 배양액을 1 l의 1x YT 배지에 첨가하여 37°C에서 12시간 배양한 후 10,000 rpm으로 원심분리해서 수확한 세포를 용혈시키고

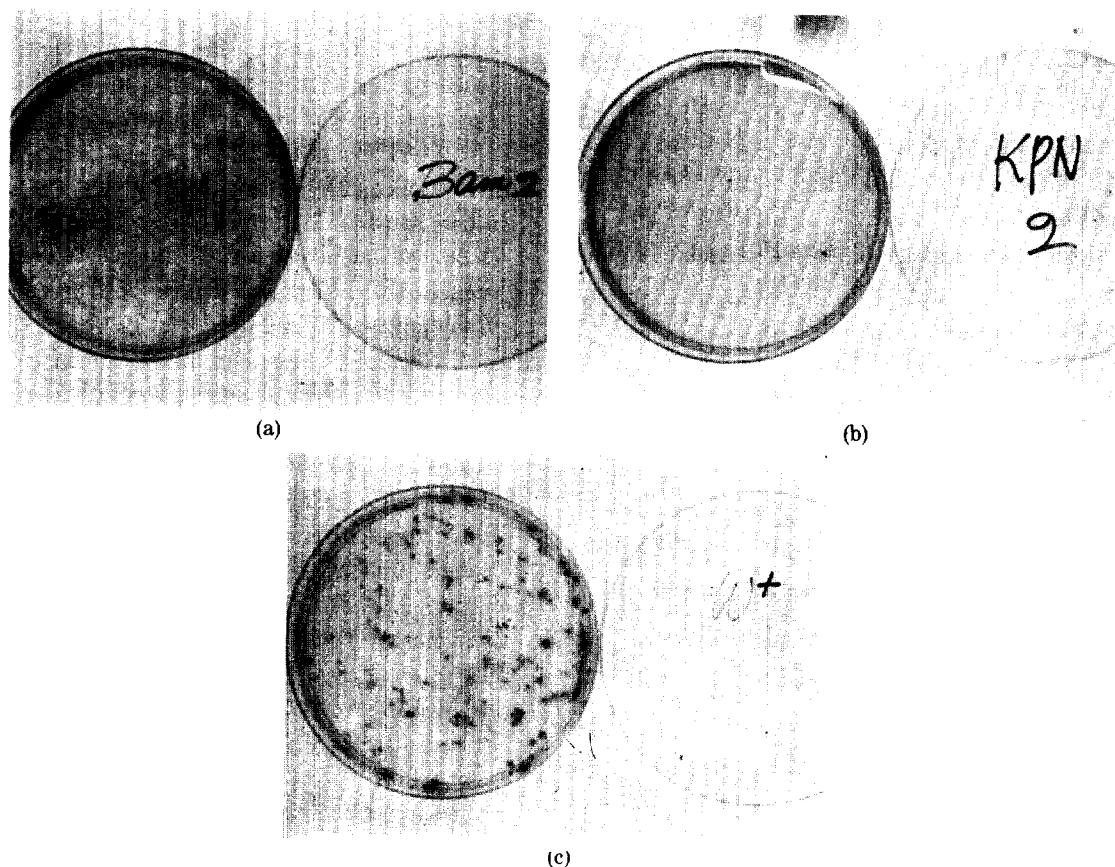


**Fig. 6.** Electrophoretic pattern of RF phage DNA. lane 1: *Hind*III + *Eco*RI double-digested  $\lambda$  DNA. lane 2-4: DNA of M13m p19 lane 5-7: DNA of M13mp18 Electrophoresis was carried out at 50 V for 2 hr in 1% agarose gel.

4°C, 12,000 rpm 에서 20분간 원심분리하여 상등액만 취해서 CsCl-ethidium bromide equilibrium centrifugation 을 하였다. Centrifuge tube 상에 나타난 두 개의 band 중 상대적으로 짙은 band 의 내용물만을 조심스럽게 멸균된 주사기로 수확하여, n-butanol 용액으로 7~8회 세척하고 TE 용액으로 24시간 투석시킨 후 Et-OH로 침전시켜 정제한 DNA 를 전기영동한 결과 7kb 위치에서 RF phage DNA 를 확인하였다(Fig. 6).

#### Subcloning 과 transformation

*Bam*HI 및 *KPN*I 제한효소 처리결과 형성된 PNMT gene 조각들과 RF phage DNA 는 T<sub>4</sub> DNA ligase 등을 처리하여 ligation 시키고 전처리된 JM 105, 107 숙주세포와 함께 top agarose



**Plate 1.** Gene expression of transformant.

- (a) Clear plaque of *Bam*HI digested fragment carried transformant
- (b) Clear plaque of *KPN*I digested fragment carried transformant
- (c) Blue plaque of wild vector carried host strain



Plate 2. Ratio autoradiography of colony hybridization

용액에 혼합하여 YT 고체배지에서 24시간 배양한 결과 clear plaque가 형성된 colony를 확인하였다(Plate 1(a), (b)).

#### Colony hybridization 및 외가닥 template의 정제

Vector phage에 cloning된 cDNA가 확실한 PNMT gene 인지를 확인하기 위하여 PNMT의 cDNA를 nick translation으로 방사표지한 후 nitrocellulose paper로 hybridization시켜서 얻은 radio autoradiography가 Plate 2이다. 이 film에 따라 확인된 plaque들을 YT 배지에서 순수 분리 배양한 후 상기한 재료 및 방법에 의해 정제한 결과 shot-gun 방법에 의한 핵산의 염기서열 판독을 위한 재료로 사용할 수 있음을 확인하였다.

#### 감사의 글

본 연구는 1986년~1988년(2년)도 과학재단의 연구비에 의하여 수행되었음.

#### 참고문헌

1. Anderson, S., M.J. Gait, L. Mayol and I.G.

- Young 1980. A short primer for sequencing DNA cloned in the single-stranded phage vector M13mp2. *NAR* 8: 1731.
2. Baetge, E.E., B.B. Kaplan, D.J. Reis and T.H. Joh. 1981. Translation of tyrosin hydroxylase from poly (A)-mRNA in pheochromocytoma cells is enhanced by dexamethasone. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78: 1269-1273.
3. Baetge, E.E., H.M. Moon, B.B. Kaplan, D.H. Park, D.J. Reise and T.H. Joh. 1983. Identification of clones containing DNA complementary to phenyl-ethanolamine N-methyltransferase mRNA. *Neurochemistry International.* 5: 611-617.
4. Birnboim, H.C. and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *NAR.* 7: 1513.
5. Joh, T.H., E.E. Baetge and D.J. Reis. 1983. Evidence for the existence of a single gene or linked genes coding for catecholamine biosynthetic enzyme. *Cold Spring Harbour Symposia Vol. XLVIII.*
6. Joh, T.H., E.E. Baetge, M.E. Ross, V.R. Albert and D.J. Reis. 1984. Gene expression of catecholamine biosynthetic enzyme. Existence of Neuroactive substances in Neurons. *Wiley and son.* pp.171-179.
7. Joh, T.H. 1984. Genes for neurotransmitter biosynthetic enzyme: Neurochemical and pharmacological implications. *ASBC/AAI Abstract.*
8. Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook. 1982. *Molecular cloning. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbour.
9. Parnes, J.R., B. Vilan, A. Felesenfeld and L. Ramanathan. 1981. Mouse B<sub>2</sub> Microglobulin cDNA clones: A screening procedure for cDNA clones corresponding to rare mRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78: 2253-2257.
10. Rigby, P.W., et al., 1977. Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity *in vitro* nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* 113: 237-251.