

[2016년 하계 환경연수프로그램]

## **vWF A3 gene cloning**

참여 기간: 160704 ~ 160729

참여 연구실: 친환경 생체모사 재료연구실

지도교수: 황동수 교수님

소속: 부산대학교 바이오소재과학과

이름: 박소희

# Table of Contents

## 1. Introduction

## 2. Method

### 2.1. 시약 & 실험기구

### 2.2. 유전자 cloning 실험 원리 & 과정

#### 2.2.1. PCR (Polymerase Chain Reaction)

#### 2.2.2. Electrophoresis & Purification

#### 2.2.3. Digestion

#### 2.2.4. Electrophoresis & Purification

#### 2.2.5. Ligation

#### 2.2.6. LB agar & LB broth 만들기

#### 2.2.7. Transformation

#### 2.2.8. Picking & Incubation

#### 2.2.9. Plasmid prep.

## 3. Result

### 3.1. 유전자 cloning 실험 결과

#### 3.1.1 PCR 후 electrophoresis

#### 3.1.2 Digestion 후 electrophoresis

#### 3.1.3 Ligation 후 transformation

#### 3.1.4 Picking & Incubation & Plasmid prep.

## 4. Conclusion & Summary

## 5. Reference

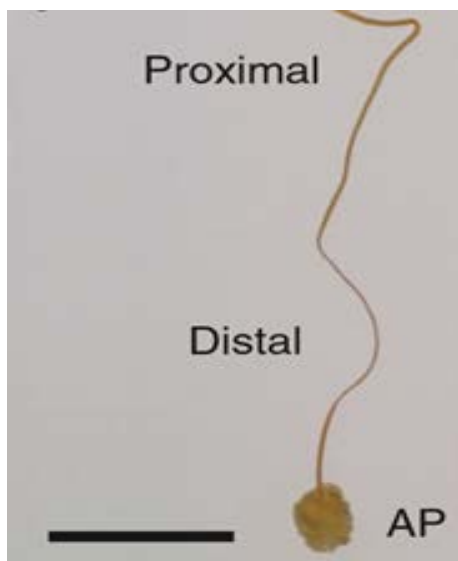
## 1. Introduction

Mussel(홍합)은 byssus(족사)를 이용하여 건조, 수중 환경의 거의 모든 표면에 강하게 붙어서 자라는 수중 생물이다. Byssus는 mussel을 암석이나 해초 등에 고착시키고 특정 구조를 유지하게 해주는 뛰어난 재료이다. (Fig. 1)



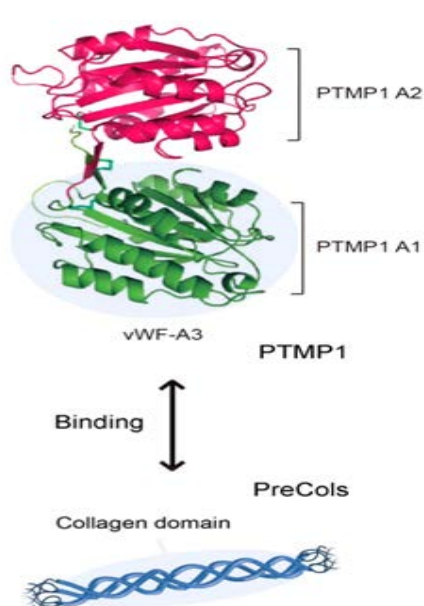
Figure 1. mussel

Byssus는 byssus thread로 구성되어 있다. 엄밀하게 말하면, 바다에서 서식하는 mussel은 접착력을 가지는 단백질로 만들어진 byssus thread에 의해 돌이나 이끼, 수초 등에 붙어서 자란다. 접착력을 가지는 단백질인 mussel adhesive protein은 일반적으로 실생활에서 사용되는 본드나 테이프 등이 물에 접촉하였을 때 접착력을 잃어버리는 것과 달리 수중 환경에서 강한 접착력을 가지고 있고 금속, 비금속, 유기 고분자, 무기물질 등 대부분의 표면에 모두 강한 접착력을 가지는 것으로 알려져 있어 접착 메커니즘(mechanism)에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.



Byssus thread는 지지와 보호의 기능을 하는 경단백질로 구성되어 있고 각각의 thread는 유연하고 탄성이 있는 proximal part, 딱딱하고 견고한 distal part, 기층에 부착되는 adhesive plaque라는 3개의 부분으로 나뉘어져 있다. (Fig. 2)

Figure 2. mussel part



**Figure 3 PTMP 1의 vWF domain과 collagen의 binding.**

proximal thread는 부드러운 특성이 있는 반면에 distal thread는 딱딱한 특성이 있다. 이렇게 다른 기계적 특성들은 성질이 다른 두 단백질에 의해 영향을 받는다.

서로 다른 특성을 나타내는 두 개의 byssal matrix protein은 Thread Matrix Proteins(TMPs)와 Proximal Thread Matrix Protein 1(PTMP 1)이다. .

각각의 byssal thread에서 distal 부분 보다 proximal 부분에 더 많이 존재하는 flexible한 형태의 PTMP 1은 두 개의 vWF type A domain으로 구성되어있으며 이는 홍합, 불가사리 등의 바다생물에서도 흔히 발견된다. vWF domain은 세포외기질 내에 있는 mammalian collagen, elastin, glycosaminoglycan과 mussel collagen과 같은 ligand와 결합함으로써 cell adhesion에 도움을 준다. (Fig. 3)

따라서, 이 실험에서는 collagen과 잘 결합하는 vWF domain을 이용하여 형태가 없는 collagen의 형태를 잡아줄 수 있는 물질을 만들고자 한다. 유전자 cloning 방법을 이용하여 4개의 vWF gene을 연결하고 그 gene들을 동시에 발현시켜 4개의 vWF domain을 가진 protein을 만들어 collagen의 형태를 잡아주어 형태 잡힌 collagen을 3D printing에 이용하고자 한다.

## 2. Method

### 2.1. 시약 & 실험기구

#### \* 시약

Bioneer vWF gene plasmid, forward primer , reverse primer, Green PCR kit, D.W, agarose, 1X TAE buffer, EtBr solution, Bioneer 1kb DNA marker, GB buffer, NW buffer, EB buffer, pET28b plasmid, 10X buffer 3.1, dye, TAKARA ligation kit, LB agar, LB broth, kanamycin, DHV-  $\alpha$

## \* 기기

Micro pipette, micro pipette tip, 1.5ml micro tube, PCR 기기, PCR tube, gel loading 기기, ice, UV transilluminator, water bath, SV column, centrifuge, vortex mixer, incubator, autoclave

## 2.2. 실험과정

### 2.2.1. PCR (Polymerase Chain Reaction)

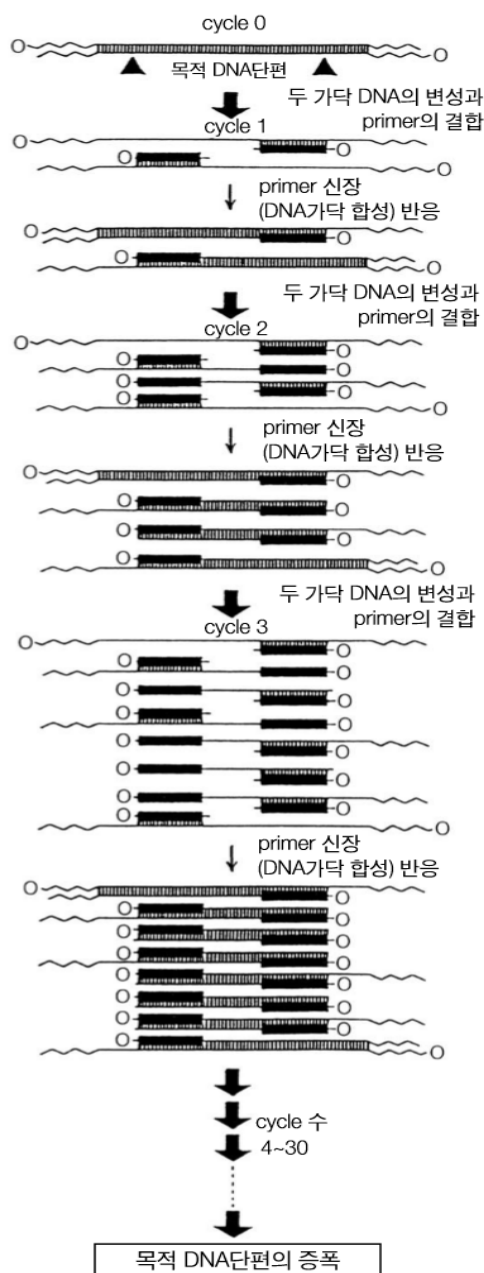


Figure 4. PCR 과정

PCR (Polymerase Chain Reaction)은 일부의 염기서열을 알고 있는 DNA 또는 RNA의 특정 영역을 대량으로 증폭하는 방법이다.

#### ① PCR의 원리

- DNA denaturation : 두 가닥 DNA를 94°C에서 15~30초간 처리하여 각각 한 가닥의 DNA로 분리시킨다. 너무 온도를 높이거나 처리시간을 지나치게 늘리면 DNA polymerase가 활성을 잃게 되므로 주의가 필요하다.

- Primer의 annealing : 한 가닥으로 변성된 DNA와 primer를 공존 시킨 후 온도를 낮추면 2종류의 primer는 각각 상보적인 한 가닥의 주형 DNA에 annealing한다. Annealing에 가장 적합한 온도와 시간은 일반적으로 55°C에서 30초~1분간 annealing 한다.

- Extension : 4종류의 기질(dNTP)이 공존하는 상태에서, DNA polymerase를 작용시켜 primer를 신장시킨다. Extension 반응에 필요한 시간은 주형 DNA의 농도, 증폭 segment의 크기, 반응 온도에 따라 좌우되지만 일반적으로 68~72°C에서 30초~1분간 처리한다.

## ② PCR product의 조성

- PCR 할 때 필요한 물질 : gene, forward primer, reverse primer, enzyme, PCR master mix

Component	Volume
Bioneer vWF gene plasmid	0.2 $\mu$ l
Not I - F (forward primer)	0.4 $\mu$ l
Sal I - R (reverse primer)	0.4 $\mu$ l
D.W	9 $\mu$ l
Green PCR kit	10 $\mu$ l
TOTAL	20 $\mu$ l

## 2.2.2. Electrophoresis & Purification

### \* Electrophoresis (전기영동)

PCR product에는 필요한 vWF gene 이외에도 enzyme, primer, 등의 불필요한 물질이 많이 포함되어있다. 따라서 이중에서 원하는 vWF gene만 추출하기 위해 agarose gel에 전기영동하여 특정 band에 있는 원하는 vWF gene만 추출해낸다.

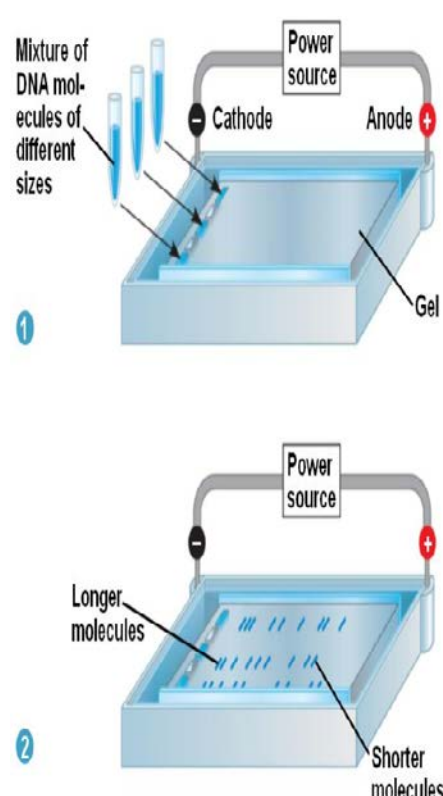


Figure 5. Electrophoresis 원리

### ① 기본원리

- DNA gel 전기영동은 DNA를 크기에 따라서 분리하는 방법이다.
- DNA는 backbone의 phosphate group 때문에 전기영동에 사용되는 buffer에서 음전하를 띄고 있으며 두 전극 사이에 위치했을 때 양극 쪽으로 움직이는 원리이다. 이때 DNA 분자가 gel matrix 사이를 통과하는 속도는 분자량이 커질수록 높아지며 gel matrix가 치밀할수록 늦어진다. 또한 DNA의 분자량이 같더라도 구조에 따라서 움직이는 속도가 다르다.
- Gel의 재료는 agarose 또는 polyacrylamide가 흔히 사용되며 분리하고자 하는 DNA의 크기에 따라 선택한다. 우리가 사용한 agarose gel은 100bp 이상 20kb까지의 DNA를 분리하는데 사용된다.
- 필요한 gene이 나타내는 band를 확인한 다음 그 band만을 추출하여 purification 한다.

## ② agarose gel에서 DNA migration rate에 영향을 주는 factors

- a. DNA molecule size
- b. Agarose concentration
- c. DNA의 conformation : superhelical DNA > circular DNA > nicked circular DNA
- d. Applied voltage
- e. Intercalating dyes
- f. Electrophoresis buffer의 composition과 ion strength

## ③ 주의사항

전기영동 시 사용하는 전류의 voltage가 너무 낮으면 시간이 오래 걸리고 너무 높으면 전기저항이 높아져서 gel의 온도가 오르게 된다. Agarose gel은 온도가 올라가면 해상도가 떨어지기 때문에 온도에 주의하여야 한다.

## ④ agarose gel의 조성

Component	Volume
agarose	0.4 g
1X TAE buffer	40 ml
EtBr	0.5 $\mu$ l

## \* Purification

가능한 작게 band를 추출하여 micro tube에 담는다. 추출한 band에는 필요한 gene 이외에도 agarose gel의 잔해 등 불필요한 물질이 다소 포함되어있다. 따라서 purification해서 원하는 gene만을 추출해야 한다.

## ① 실험과정

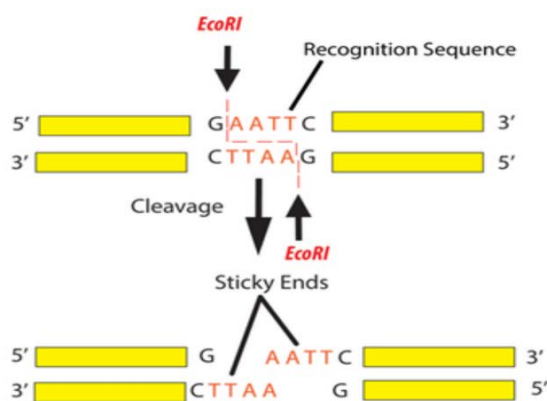
- a. 가능한 작게 추출한 band를 micro tube에 담는다.
- b. gel의 3배 정도되는 양(700  $\mu$ l)의 GB buffer(Gel DNA binding buffer)를 넣는다.
- c. 50~70°C로 water bath에서 완전하게 녹인다.
- d. SV column에 mixture를 넣고 15초 정도 centrifuge 한다.
- e. SV column에 NW buffer를 700 $\mu$ l을 넣어준 후, centrifuge한다. Column을 빠져나온 용액은 버리고, column에 의해 걸러진 DNA만 그대로 둔다.
- f. 밑에 내려온 찌꺼기를 버리고 난 후, 빈 column을 다시 한번 centrifuge하여 남아있는

NW buffer를 완전히 제거해준다.

g. EB buffer를 넣어주기 전에는 밑에 물질이 빠져나오는 통을 1.5ml micro tube로 반드시 교체해야한다. 그 다음, EB buffer 50  $\mu$ l을 넣어주고 elution 반응이 일어날 때까지 조금 기다린 후 centrifuge한다.

h. column을 통과한 물질을 최종적으로 얻는다. 이 물질이 실험에 필요한 vWF gene이다.

### 2.2.3. Digestion



\* Digestion (Double Digestion)

제한효소를 사용하여 plasmid를 자르는 과정

Figure 6. digestion 원리

#### ① 제한 효소 (restriction enzyme)

- Double stranded DNA 분자 내의 특정한 염기서열을 인식하여 그 부분이나 그 주변을 절단하는 것을 촉매 하는 endonuclease를 지칭한다.
- 대부분의 제한 효소는 각각 인식 자리(recognition site)를 인식하고 인식한 서열 내 혹은 근처의 특정 부위인 제한 자리(restriction site)라는 특수한 염기서열을 가진 위치에서 DNA를 절단한다.
- 원래 제한 효소는 세균이 bacteriophage라는 바이러스 또는 외래 DNA의 공격을 받으면 생산하는 효소로, 바이러스나 외래 DNA를 절단하여 제거함으로써 침입으로부터 자신을 방어하는 역할을 한다.
- 세균은 자신의 DNA 인식 절단 부위의 염기는 methylation시키기 때문에 자신의 제한 효소 작용으로부터 자신을 보호한다.
- DNA를 자른다는 것은 염기들이 서로 연결되어 있는 결합(phosphodiester bond)를 끊어내는 것을 의미한다.



- 제한효소에는 3가지 종류가 있다.

대분류	반응필수인자	절단부위	효소 예
I 형	ATP, S-adenosyl methionine, $Mg^{2+}$	인식부위와 절단부위가 다르고 절단부위도 일정치 않음	EcoB, EcoK
II 형	$Mg^{2+}$	인식부위내 또는 그 근방의 특정부위를 절단	EcoR I, BamH I
III 형	ATP, $Mg^{2+}$	인식부위와 절단부위는 다르나 특정부위를 절단	EcoP I, Hinf III

## ② 실험과정

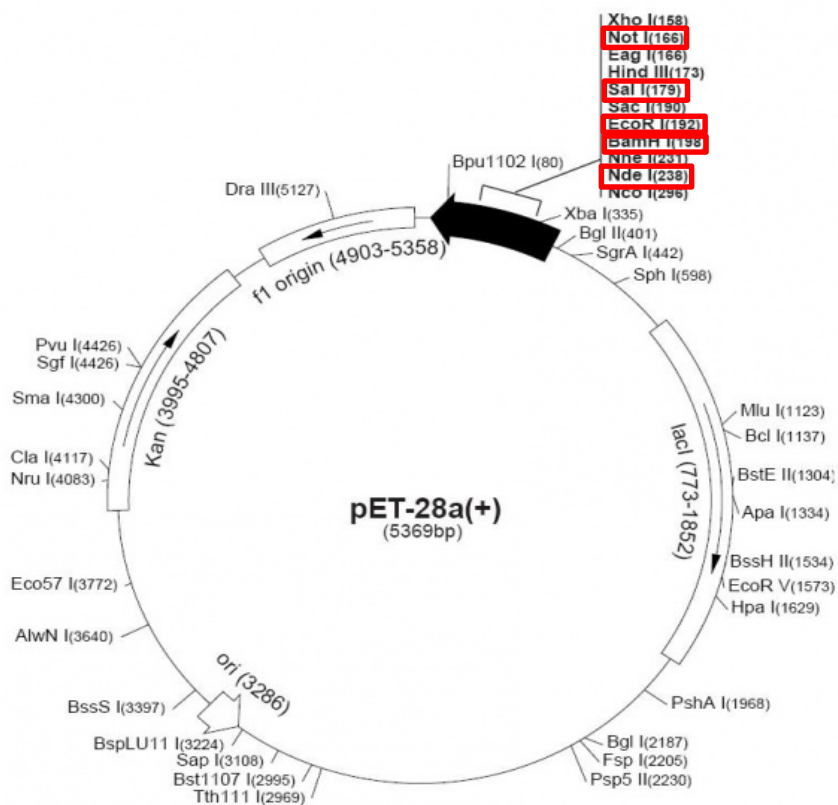


Figure 7. 이 실험에서 사용하는 제한효소 자리

1X : Not I, Sal I

2X : Sal I, EcoR I

3X : EcoR I, BamH I

4X : BamH I, Nde I

Digestion of pET28b plasmid		Digestion of PCR Vwf gene	
pET28b plasmid	30 $\mu$ l	PCR vWF product	50 $\mu$ l
10X buffer 3.1	10 $\mu$ l	10X buffer 3.1	10 $\mu$ l
Not I	1 $\mu$ l	Not I	1 $\mu$ l
Sal I	1 $\mu$ l	Sal I	1 $\mu$ l
D.W	58 $\mu$ l	D.W	38 $\mu$ l
TOTAL	100 $\mu$ l	TOTAL	100 $\mu$ l

해당 물질들을 다 혼합하여 37°C에서 overnight으로 incubation 한다.

#### 2.2.4. Electrophoresis & Purification

- Digestion 한 후 바로 ligation을 하면 안된다. Ligation 전에는 반드시 electrophoresis와 purification을 해야한다. 왜냐하면 digestion 과정에서 넣어준 여러효소들의 잔여물 등 불필요한 물질들을 제거해야하기 때문이다.

##### ① 실험 원리 & 과정

- 원리와 과정은 앞에서 했던 electrophoresis & purification과 동일하다.
- 그러나 앞의 과정에서는 green PCR kit를 사용했지만 digestion에서는 사용하지 않았기 때문에 electrophoresis을 했을 때 dye band가 보이지 않는다. 따라서 dying 과정을 거쳐야 한다.
- Digestion 한 용액에 dye 20 $\mu$ l을 섞고 electrophoresis를 한 후 UV transilluminator로 비추어 보면 band가 보이게 된다. 또한 이 dye에는 digestion을 stop 시키는 enzyme도 포함되어있다.
- Electrophoresis를 하면 두 개의 band가 나타난다. 왜냐하면 plasmid는 원래 원형인데 제한 효소에 의해 잘려서 linear한 상태가 된다. Linear한 상태가 되면 agarose gel의 그물망 같은 공간을 통과하기가 더 어려워서 원형 plasmid가 나타내는 band의 위치보다 더 위에서 band가 나타나게 된다. 따라서 제한 효소에 의해 잘려진 linear plasmid를 얻으려면 위쪽에 나타난 band를 추출해서 purification 해야한다.

## 2.2.5. Ligation

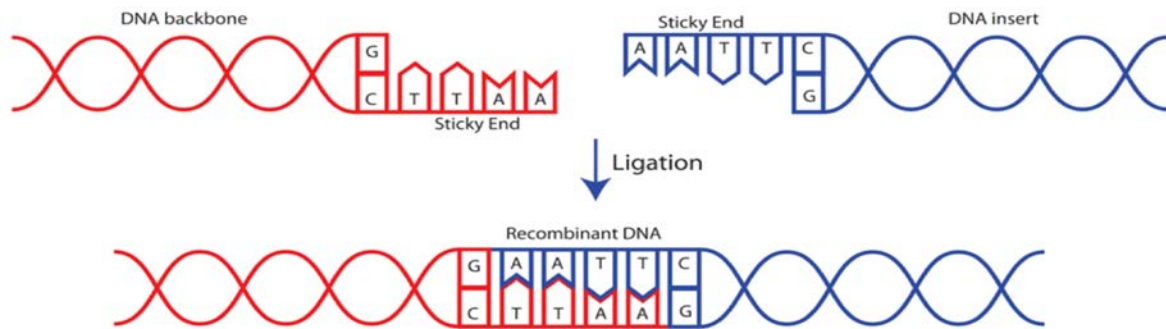


Figure 8. ligation 원리

Ligation이란 DNA나 RNA의 끝을 이어주는 과정을 말한다. 이 반응에 이용되는 효소를 ligase라고 하고 DNA를 기질로 사용하는 ligase를 DNA ligase, RNA를 기질로 사용하는 ligase를 RNA ligase라고 한다.

여기서 이용 되는 효소는 DNA ligase로, 대표적으로 T4 ligase와 E.coli DNA ligase가 존재한다.

### ① DNA ligase의 기본원리

Nick이 생긴 DNA 또는 linear form인 두 종류의 DNA를 5'-phosphodiester bond를 이루도록 하여 서로 연결시키는 반응을 한다. DNA ligase는 DNA 복제 시 okazaki fragment를 서로 이어주는데 영향을 끼치며, 유전공학에서는 이러한 원리를 이용하여 blunt-end, cohesive end DNA 등을 연결시키는데 이용한다.

### ② 실험과정

Component	Volume
vWF A3 gene	5 $\mu$ l
Plasmid (pET28b)	5 $\mu$ l
TAKARA ligation mix	10 $\mu$ l

해당 물질들을 다 혼합하여 16°C에서 25분 동안 PCR 기기를 이용하여 incubation 한다.

### 2.2.6. LB agar (고체 배지) & LB broth (액체 배지) 만들기

재조합 된 plasmid를 E.coli에 넣고 배양하기 위해서 LB agar와 LB broth가 필요하다.

#### ① 실험과정

LB agar		LB broth	
LB agar	17.5 g	LB broth	10 g
D.W	500 ml	D.W	500 ml

각각 해당 물질들을 다 혼합하여 autoclave로 멸균한다. LB agar는 plate에 깔고 식히면서 굳힌다.

#### ② Autoclave

- Autoclave의 원리 : 끓는점이 압력에 따라 달라지는 원리를 이용한다. 내부의 압력을 높여서 끓는점을 상승시키고 같은 시간에 더 많은 열이 발생하게 하여 짧은 시간 안에 멸균을 할 수 있도록 한다. 내부압력을 대기압보다 높은 1.2기압 정도로 높여 약 121°C의 온도에서 멸균한다. 멸균이 다 되었는지 확인하기 위해서 autoclave tape를 사용한다.

- Autoclave tape의 원리 : 멸균이 되었는지 여부를 알기 위해 사용하는 tape로 완전 멸균 시 사선의 검은 띠가 나타난다. 이처럼 색이 변하는 이유는 잉크를 캡슐에 싸서 그 캡슐을 테이프에 입힌 다음 일정 온도가 되었을 때 녹거나 터지게 해서 그 안의 잉크가 새어 나오게 하는 것이다. 그렇게 해서 색이 변하고 그 색의 변화로 원하는 온도까지 도달할 것을 파악하고 확인 할 수 있다. 온도가 121°C 이상이 되면 tape의 색이 변한다.

#### ③ Kanamycin plate 만들기

- Antibiotic (항생제)

원하는 유전자만 얻기 위해서는 selection marker가 필요하다. 즉, 유전자를 포함하고 있는 항생제 내성을 가진 plasmid만을 배양하기 위해서 antibiotic을 사용한다. 항생제가 있는 배지에서 E.coli를 배양하게 되면, 항생제 내성을 가진 plasmid가 포함된 세포만 살아남아 colony 형태로 나타나고 그렇지 않은 세포들은 죽게 되어 원하는 물질만 얻을 수 있다.

- Kanamycin : 방선균 Streptomyces kanakyceticus가 생산하는 아미노글리코시드계 항생물질 중 하나이다. 그람 양성균, 그람 음성균, 결핵균 등에 살균적으로 작용하지만 혐기성균에는 효과가 없다. 청력, 평형감각 장애 등의 부작용을 일으킨다. 작용기전은 단백질 합성의 저해이다.

- pET28b는 kanamycin에 저항성이 있다. 만약 그냥 LB 배지에서 E.coli를 배양하게 되면 우리가 원하는 재조합 된 plasmid 이외의 것들도 함께 자리기 때문에 해당 plasmid에 저항성이 있는 antibiotics(kanamycin)를 넣은 배지를 사용하여 원하는 것만 배양하도록 한다.

## 2.2.7. Transformation

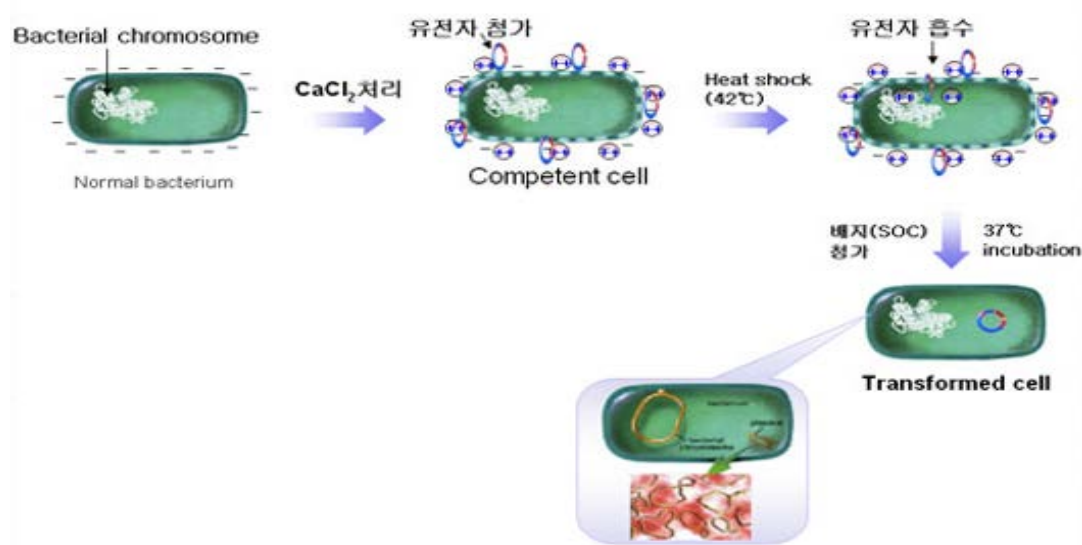


Figure 9. transformation의 원리

### ① Transformation

외부의 DNA를 숙주 세포 내에 넣어주어 세포가 원래의 성질과는 다른 새로운 유전형질을 추가로 얻게 되는 것을 말한다. E.coli의 transformation은 Bacteria를 차가운  $\text{CaCl}_2$ 로 처리한 다음 잠시 열처리를 하면 bacteriophage  $\lambda$ 가 세포 내로 들어가 phage를 형성한다는 사실에 의해 처음 관찰되었다. 이것은 bacteria의 세포막을 DNA가 infection 될 수 있는 competent 상태로 일시적으로 유도하여 새로운 유전형질을 도입하는 방법이다.

### ② Competent cell

정상적인 bacteria에 화학적 처리를 하여 DNA가 잘 들어갈 수 있게 만든 cell을 의미한다. Ligation을 마친 DNA나, circular 형태의 plasmid를 증폭시키거나 cloning을 끝낸 vector를 expression하기 위해서는 transformation을 해야하는데 이때 사용하는 E.coli host cell을 competent cell이라고 한다.

### ③ Competent cell의 원리

Competent cell의 기본은 DNA를 흡수할 수 있는 상태를 가진다. 따라서 세포막 주위에는 DNA가 존재하여야 한다. 그러나 DNA는 phosphate에 의해 (-) charge를 띠며 세포막 또한 (-) charge를 띄기 때문에 서로 척력이 발생한다. 이것을 중화시키기 위해  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Rb}^{2+}$ (divalent cation) 등을 사용한다. 그러면 세포막의 고유 charge가 순간적으로 변하게 되고 이 때 heat shock을 주면 세포벽이 유동하여 vesicle을 형성하면서 주변에 있는 DNA가 순간적으로 숙주 세포 내로 빨려 들어가게 된다.

### ④ 실험과정

- ice에 박아둔 E.coli가 반 정도 녹으면 ligation product를 다 E.coli에 넣는다. 이 때, E.coli는 competent cell로 만들어 났기 때문에 매우 민감하다. 따라서 충격을 주지 않아야 하며 ice에서 녹여야 한다.
- 1초동안 vortexing 한다.
- 5분동안 icing한다. 이 모든 과정은 빨리 진행해야한다. 느리면 cell이 다 죽기 때문이다.
- 그 후, LB agar에 spreading하여 overnight으로 배양한다. Spreading 과정은 반드시 후드 내에서 진행해야 한다.

## 2.2.8. Picking & Incubation

### ① 실험방법

Component	Volume
LB broth	5 ml
kanamycin	5 $\mu\text{l}$

LB agar에서 자란 colony들 중 single colony한 개를 따서 LB broth + kanamycin이 포함된 tube에 넣고 37 °C incubator에서 overnight으로 shaking incubation 한다.

### 2.2.9. Plasmid Prep.

재조합 된 plasmid(vWF A3 gene 1 개 포함)를 뽑아서 vWF A3 gene 4 개가 붙을 때 까지 PCR 부터 과정을 반복해야한다.

#### ① 실험방법

- a. 하루 동안 shaking incubation 을 하면 LB broth 내에 colony 가 자라서 tube 내부가 뿌옇게 된다. Tube 의 내부 물질을 centrifuge 하여 상층액은 버리고 pellet 만을 남긴다.
- b. 4°C에 보관된 S1 buffer(resuspension buffer)를 250  $\mu$ l 만큼 넣는다. 넣은 후 바로 resuspend 한다.
- c. S2 buffer 를 250  $\mu$ l 만큼 천천히 벽면을 따라 넣고 자극을 주지 않고 천천히 inverting 한다. S2 buffer 에는 lysozyme 이 포함되어있다. S2 buffer 는 cell lysis solution 이다.
- d. S2 buffer 를 넣고 재빨리 S3 buffer 를 350  $\mu$ l 만큼 천천히 자극을 주지 않고 벽면을 따라 넣고 천천히 inverting 한다. S3 buffer 는 필요 없는 물질들을 뭉쳐서 하얀색 침전물을 생성하도록 한다. DNA 만 solution 상에 있고 깨진 cell 은 하얀색으로 뭉쳐 침전물을 형성한다.
- e. 그 후, pure 한 DNA 만 얻기 위해서 centrifuge 한다.
- f. 상층액만 따서 SV column 에 넣는다. 상층액을 딸 때에는 pellet 이 함께 따지지 않도록 주의해야한다. SV column 의 용량이 700  $\mu$ l 이기 때문에 나누어서 centrifuge 를 돌린다. Centrifuge 를 하고 아래 용액을 버린 후, 나머지 상층액을 모두 따서 SV column 에 넣고 다시 centrifuge 를 하고 아래 용액은 모두 버린다.
- g. 그 후, AW buffer 를 500  $\mu$ l 넣고 centrifuge 하고 아래 용액을 버린다. PW buffer 를 700  $\mu$ l 넣고 10 초 동안 centrifuge 한다. AW buffer 와 PW buffer 는 물질을 한 번 씻어서 불순물을 걸러주는 역할을 한다.
- h. centrifuge 한 후, 아래 용액을 모두 버린 후 빈 칼럼을 한번 더 centrifuge 한다.

i. column 의 아래 통을 버리고 micro tube 로 갈아 끼운 후, EB buffer 를 20  $\mu$ l 넣는다. DNA 가 elution 될 시간을 조금 준 후, 1 분동안 centrifuge 한다. EB buffer 는 DNA 를 elution 시키는 buffer 이다.

j. 그 다음, 아래로 down 된 용액(plasmid 가 포함)을 새로운 micro tube 담는다.

총 4 개의 gene 을 붙여야 하므로 PCR 과정부터 다시 실험을 반복한다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. 유전자 cloning 실험 결과

##### 3.1.1 PCR 후 electrophoresis



PCR을 한 후 전기영동 한 사진이다. 표시된 band에는 우리가 원하는 vWF A3 gene이 포함되어있는 plasmid가 들어있다.

vWF A3 gene 을 얻기 위해서 이 band 를 추출한다. 그러나, 추출하는 과정에서 agarose gel 등의 불순물도 함께 추출되므로 purification 과정을 통해 순수한 vWF A3 gene 만을 얻어야 한다.

Figure 10. PCR 후 electrophoresis



### 3.1.2 Digestion 후 electrophoresis



Figure 11. digestion 후 electrophoresis

노란색 박스로 표시된 5개는 digestion 된 pET28b plasmid이다. 원래 25분 동안 incubator에서 digestion을 하면 위쪽 band는 digestion 된 linear pET28b plasmid, 아래쪽 band는 digestion 되지 않은 circular pET28b plasmid가 나타나야 한다. 그러나 이 실험에서는 band가 하나가 나타났다. 생각을 해보니 이번 실험에서는 거의 모든 plasmid를 digestion 시키기 위해 overnight으로 배양했다. 따라서 나타난 하나의 band가 완전히 digestion 된 linear pET28b plasmid라고 가정하고 실험을 진행하였다.

### 3.1.3 Ligation 후 transformation

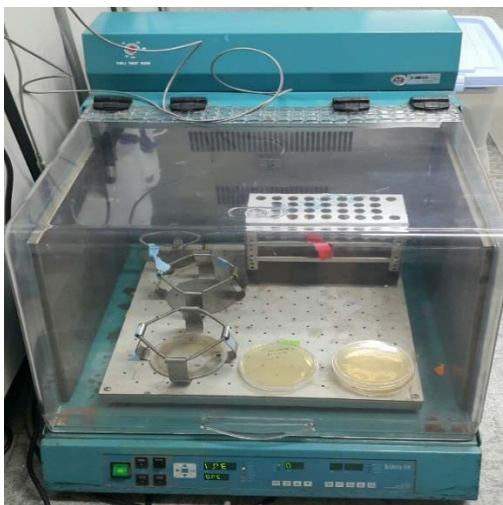


Figure 12. incubation 과정과 결과

PCR 기계에서 ligation 한 후, ligation product와 E. coli를 혼합한 후, 미리 만들어 놓은 LB agar에 spreading 한다.

Overnight으로 incubator에서 incubation하면 transformation된 E.coli들이 자라서 colony 형태로 뭉쳐 있게 된다.

그러나 이번 실험에서는 colony들이 자라지 않았다. 따라서 예전에 키워 놓았던 circular pET28b plasmid를 prep. 하여 다시 digestion 과정부터 시행 했다.

### 3.1.4 Picking & Incubation & Plasmid Prep.



Figure 13. pET28b colony



Figure 14. picking 한 후

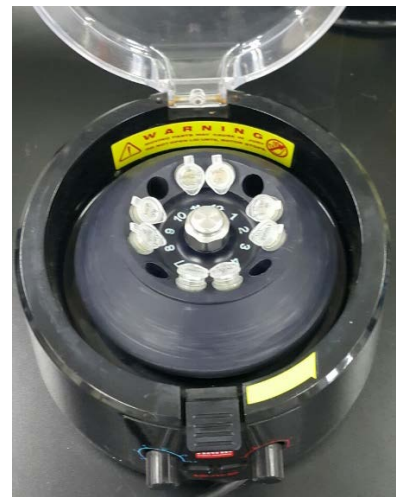


Figure 15. centrifuge

예전에 LB agar에 키워 났던 circular pET28b plasmid의 single colony 하나를 picking하여 15ml tube에 LB broth와 함께 넣고 overnight으로 배양한다. 그 다음날 micro tube에 담고 centrifuge를 돌려 필요한 circular pET28b plasmid가 들어있는 상층액을 따서 plasmid를 다시 digestion하고 이어서 다음 과정을 진행한다.

그러나 결국 같은 transformation 하는 과정에서 계속 colony가 자라지 않았다.

## 4. Conclusion & Summary

Gene clone이란 같은 특정 유전자를 가지는 균일한 개체군, 집합을 의미하며, gene cloning이란 gene clone을 만드는 과정을 의미한다. Gene cloning은 DNA를 자르고, 붙이고, 변형시켜서 실험에 필요한 재조합 DNA를 제조하여 필요한 생체 내 유전자를 대량으로 복제 시켜 얻을 수 있는 분자생물학적 기법이므로 많이 사용되고 있다.

먼저, cloning할 gene을 준비하고, 그 gene을 제한 효소에 의해 digestion 된 vector에 삽입한다. 그 후, DNA ligase를 사용하여 gene과 vector를 ligation하여 세포 내로 주입하는 transformation 과정을 거친다. 그 다음, 형질전환 된 세포를 배양함으로써 세포 내의 재조합 DNA를 얻을 수 있고 대량으로 증폭시킬 수 있다. 이렇게 형질전환 된 동일한 개체군을 clone이라 한다. 재조합 된 DNA에 원하는 gene이 잘 재조합 되었는지 전자현미경 분석 등의 여러가지 분석방법을 통하여 확인한다. 잘 재조합이 되었으면 숙주세포 내에서 재조합 DNA에 삽입된 특정 DNA segment의 유전정보를 발현시켜 최종생산물인 단백질을 생산할 수 있다.

이 실험은 vWF A3 gene 4개를 연결하여 collagen과 binding 시켜 collagen의 형태를 잡아주는 protein 생성을 목표로 하였다. 그러나 계속 transformation 과정에서 colony들이 형성되지 않아 더 이상 실험을 진행하지 못했다. colony들이 생기지 않은 이유는 무수히 많다. Digestion 또는 ligation 과정이 제대로 일어나지 않았거나, transformation 하기 전 competent cell을 다룰 때 잘 못 다루어 cell 들이 죽었거나, transformation 과정을 빠르게 진행하지 않았거나 등의 여러가지 실패 요인이 있다. 나는 많은 요인 중, digestion이 제대로 일어나지 않았다고 생각한다. 원래 digestion 후, electrophoresis를 하면 pET28b plasmid는 2개의 band를 나타내야 한다. 그러나 overnight으로 digestion을 진행했기 때문에 plasmid가 완전하게 다 잘려서 1개의 band가 나왔다고 생각했는데 그게 아니라 아예 plasmid가 잘리지 않았던 것 같다.

실험을 끝까지 진행하지 못해서 아쉬웠지만 유전자 cloning의 원리에 대한 많은 지식을 얻을 수 있었고 직접 실험해 보면서 많은 것을 배울 수 있었던 기회였다.

## 5. Reference

- [1] Recombinant mussel proximal thread matrix protein promotes osteoblast cell adhesion and proliferation Hee Young Yoo<sup>1†</sup>, Young Hoon Song<sup>2†</sup>, Mathias Foo<sup>3</sup>, Eunseok Seo<sup>1</sup>, Dong Soo Hwang<sup>1,4\*</sup> and Jeong Hyun Seo<sup>2</sup>(Yoo et al. BMC Biotechnology (2016) 16:16 DOI 10.1186/s12896-016-0247-z)
- [2] Nanomechanical Contribution of Collagen and von Willebrand Factor A in Marine Underwater Adhesion and Its Implication for Collagen Manipulation Hee Young Yoo,<sup>†,‡</sup> Jun Huang,<sup>†,§</sup> Lin Li,<sup>§</sup> Mathias Foo,<sup>||</sup> Hongbo Zeng,<sup>\*,§</sup> and Dong Soo Hwang
- [3] Structural and functional features of a collagen-binding matrix protein from the mussel byssus (Michael H. Suhre<sup>1,w</sup>, Melanie Gertz<sup>2,w</sup>, Clemens Steegborn<sup>2,3,4</sup> & Thomas Scheibel<sup>1</sup>)
- [4] Understanding Marine Mussel Adhesion Heather G. Silverman, Francisco F. Roberto  
Biological Systems Department, Idaho National Laboratory, Idaho Falls, Idaho 83415, USA  
Received: 7 March 2007 / Accepted: 5 September 2007 / Published online: 8 November 2007