

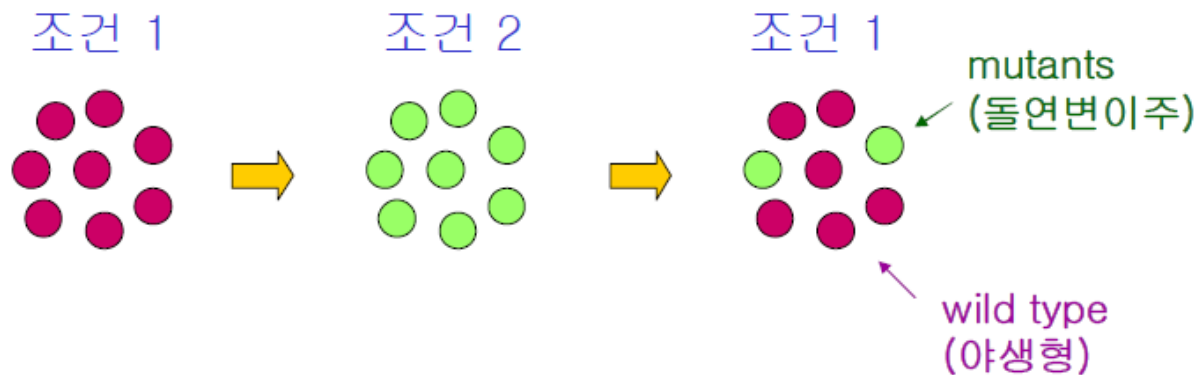
## Ch. 8 세포정보의 변경

- 추가 유전정보
  - 자연발생적 현상
  - 인공적 방법
- 세포의 유전정보상의 개조 유발 mechanism
- 생물공정 개선을 위해 이들 mechanism을 다루는 방법

# 8.1 돌연변이와 선별과정을 통한 진화

세포의 DNA 복제오류 방지 시스템, DNA 손상복구 시스템 잘못 → 돌연변이 (mutation)

- ❖ **genotype** (유전형): 한 미생물이 가진 유전정보 총체의 속성,  
- 주위환경에 관계없이 일정
- ❖ **phenotype** (표현형): 세포에 의해 발현된 속성,  
- 환경의 변화에 따라 가역적으로 응답



돌연변이: 유전형 상의 변화, 비가역적

# 돌연변이 mechanism

❖ Point mutation (점 돌연변이): 한 개의 염기가 변화

✓ Wild type (야생형)

M D L Q T L  
atg gac ctg cag act ctg

✓ Silent (침묵)

M D L Q T L  
atg gac ctg caa act ctg

✓ Sense (의미)

다른 아미노산으로 대체  
→ 단백질 활성 변화

M D L K T L  
atg gac ctg aag act ctg

✓ Nonsense (무의미, 정지)  
큰 영향

M D L stop  
atg gac ctg tag act ctg

# 돌연변이 mechanism

- ❖ Deletion mutation (삭제 돌연변이): 판독틀 이동, 단백질 전체 조성 변화
- ❖ Insertion mutation (삽입 돌연변이): 삽입 소자 (IS, 700~1400 염기배열), 대장균의 경우 5개의 IS가 알려짐
- ❖ Back mutation (역돌연변이), reversion (복귀): CAA→UAA→CAA
- ❖ Revertant (복귀주): 원래 표현형이 복구된 세포
- ❖ second-site revertant (2차 부위 복귀주): 표현형만 복귀, 유전형 미복귀, 2차 삭제에 의한 판독틀 정상화 등

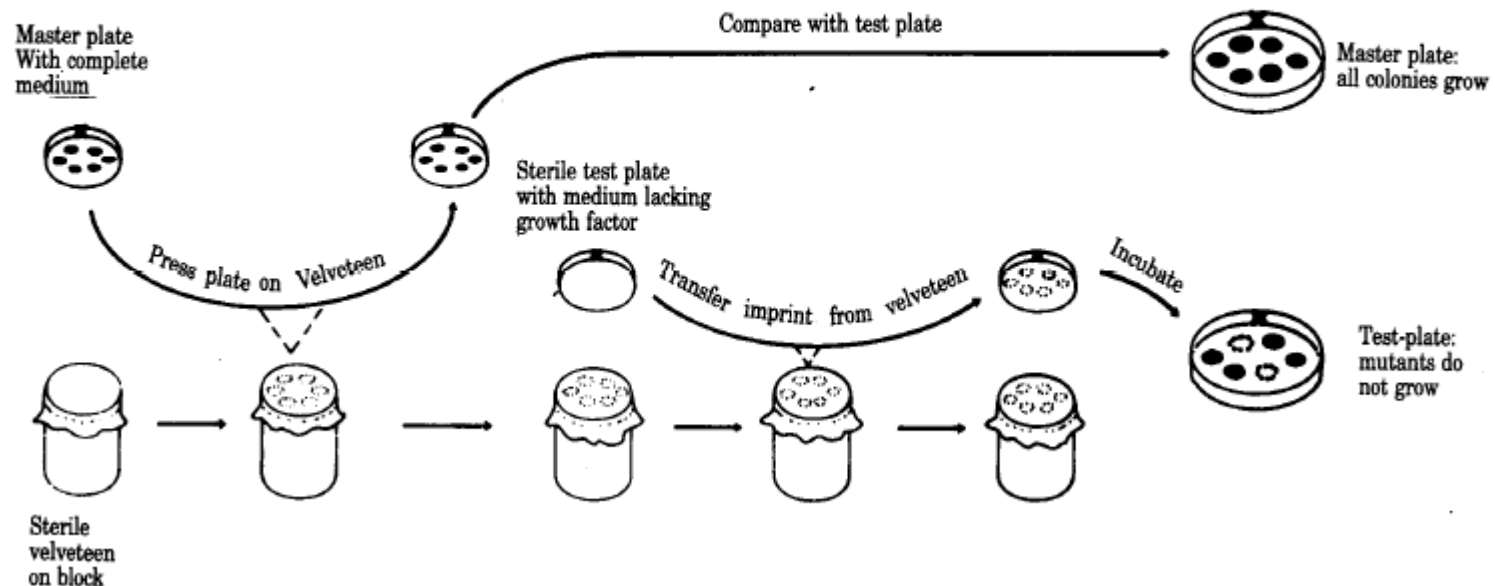
# 원하는 돌연변이주의 선별

원하는 물질의 overproduction

- ❖ 자발적 돌연변이 속도: 1회 분열시  $10^{-3} \sim 10^{-9}$  ( $=10^{-6}$ )
- ❖ 돌연변이 속도증가: mutagen(돌연변이 유도물질), 방사선      특정성 X
- ❖ 선별가능 돌연변이주: 특정 환경에서 돌연변이주만 생존
- ❖ 선별 불가능 돌연변이주: 세포마다 검사, 노동집약적
- ❖ 직접 선별: 특정 물질(항생제, 독성물질)에 내성인 세포
- ❖ 간접 선별: 특정인자(아미노산, 비타민 등) 생산능력 부족
- ❖ Auxotroph(영양요구성): 예) lysine 요구주
- ❖ Prototroph: 최소배지에 영양보충 필요없는 야생형 세포

# Replicate plating (판 복제법)

❖ 간접 선별: 판 복제법에 의해 선별 가능 (Fig. 8.3)



## 8.2 유전자 전달 및 재배열 메커니즘

- ❖ 유전자 재조합 (**genetic recombination**): 염색체 상의 두개의 다른 유전체로부터 취한 유전요소를 하나로 합쳐 돌연변이 없이 새로운 유전형질을 만드는 과정
- ❖ 형질변환 (Transformation): 자유 DNA를 받아들이는 과정
- ❖ 형질도입 (Transduction): bacteriophage에 의해 DNA가 전달
- ❖ 접합 (Conjugation): 두 세포의 접촉에 의해 DNA 전달

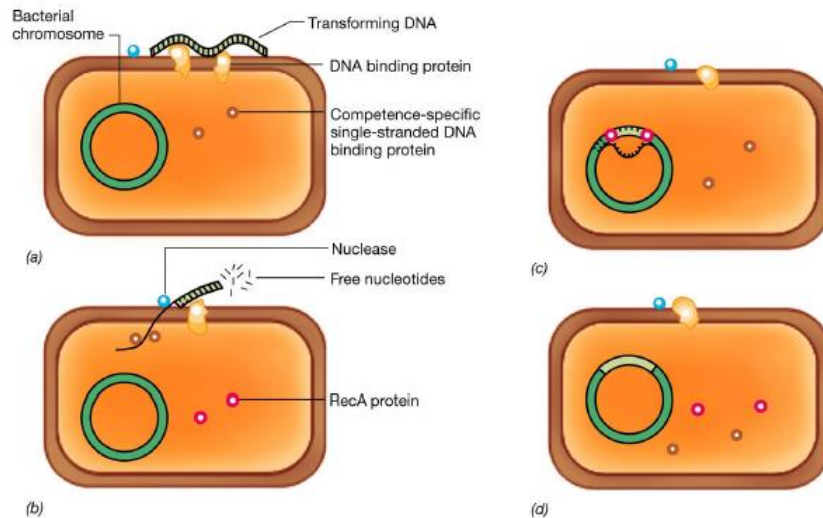
# Transformation (형질변환)

형질변환 능력 유도:  $\text{Ca}^{2+}$  처리, 백만마리 중 하나가 성공적으로 형질변환 운반체 (vector): plasmid

- 염색체 외부에 존재, 자기복제, double-stranded DNA
- low copy number: 세포당 몇 개
- high copy number: 세포당 20 - 100개
- 특정 항생제 내성 단백질 정보 수록, 세포선별에 이용

❖ 형질변환 가능 세포: 0.1~1%

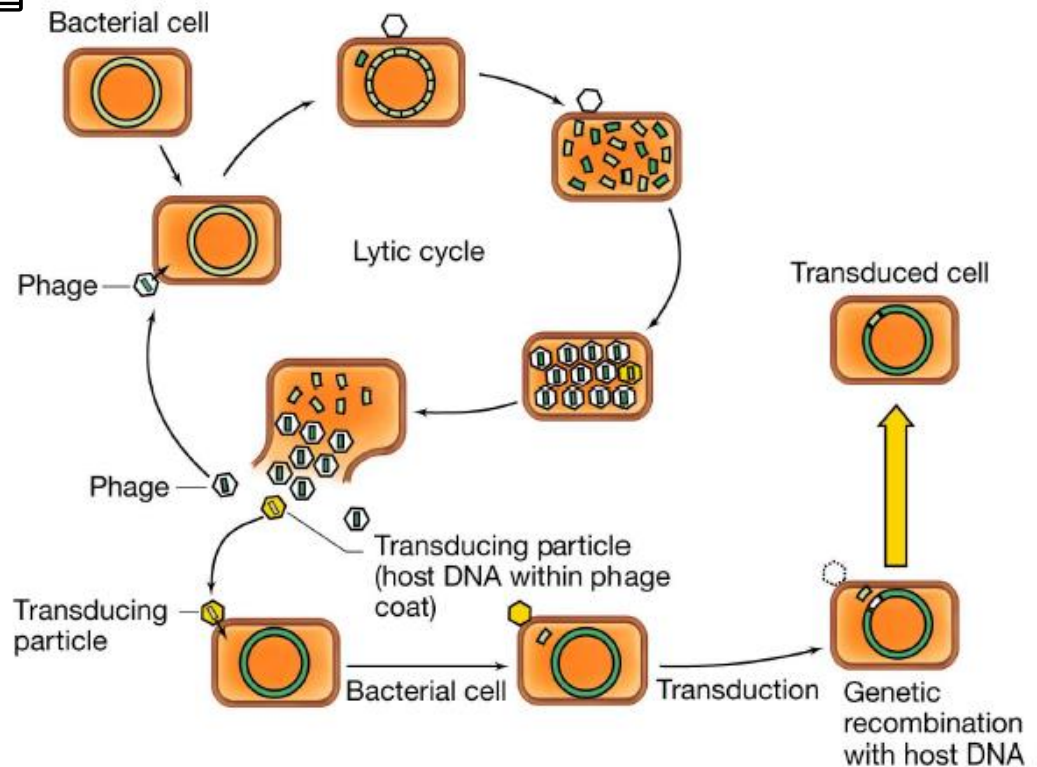
❖ 공여(Donor) DNA, 수령 (Recipient) DNA





# Generalized transduction (일반 형질도입)

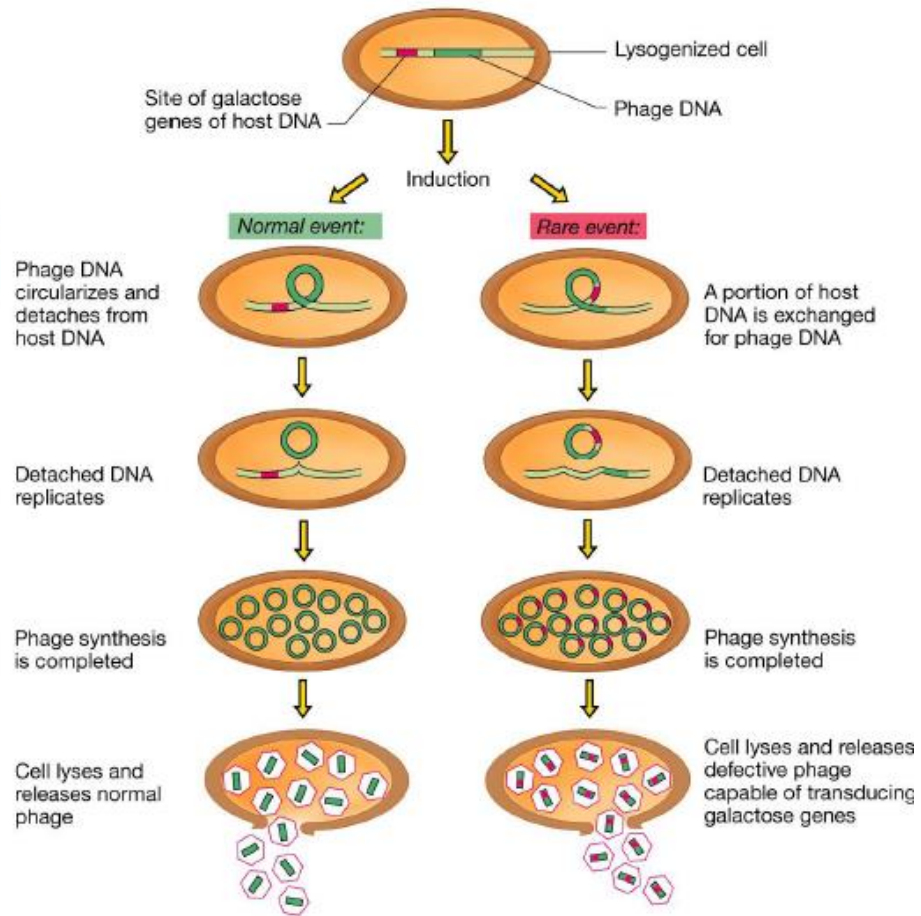
- 수형세포가 감염되어 DNA가 100개 정도로 쪼개짐
- 이 조각들의 하나가 우연히 파지 입자 속으로 들어감
- 파지 입자가 자신의 bacteria DNA를 다른 bacteria에 주입
- 주입된 DNA가 원래 DNA와 재조합



# Specialized transduction (특수 형질도입)

- 파지가 염색체 상의 특정위치에 편입

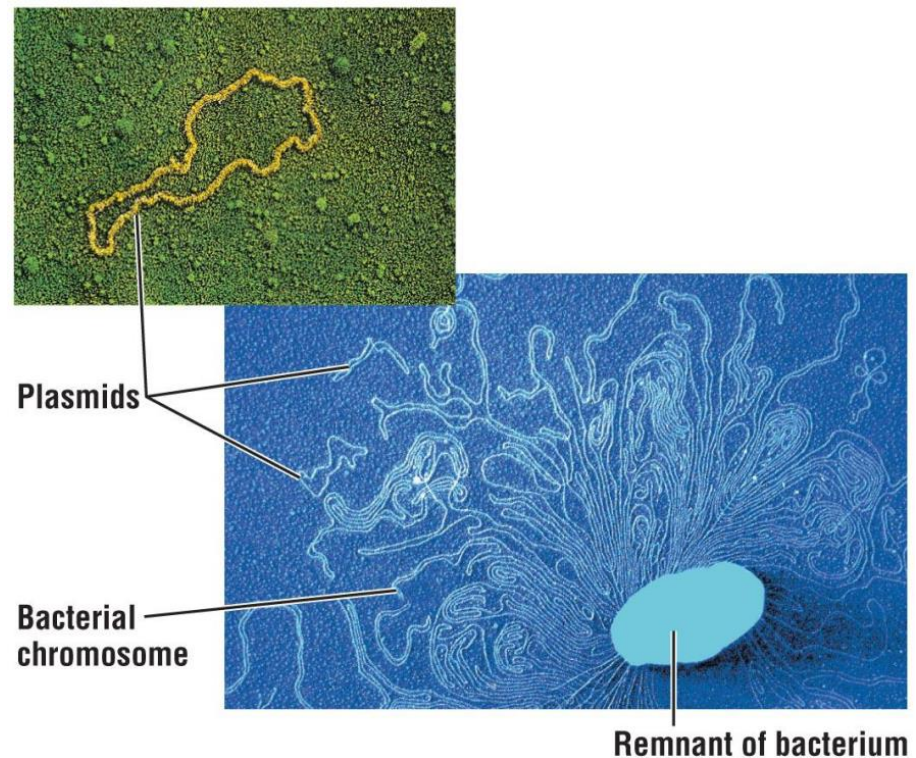
- 잠재 세포 (lysogenic cell): 파지 DNA가 염색체 DNA에 편입된 세포



# 에피솜과 접합 (Conjugation)

## 에피솜

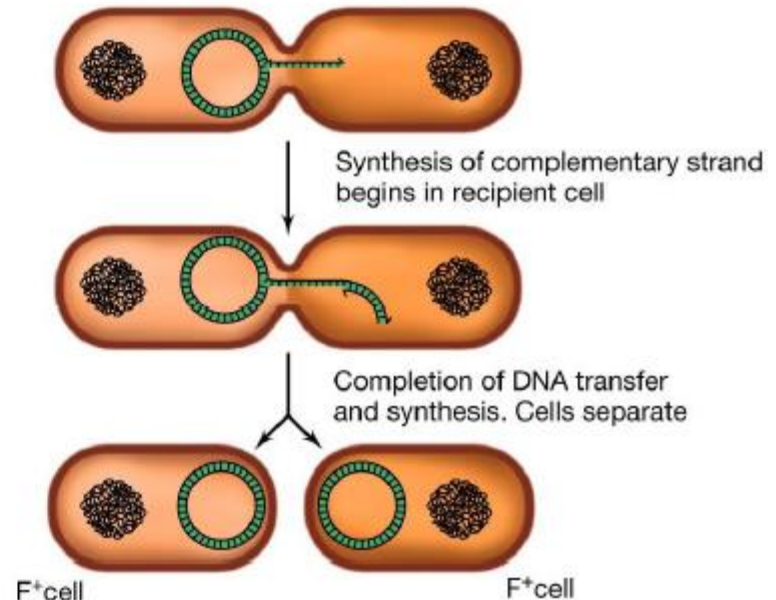
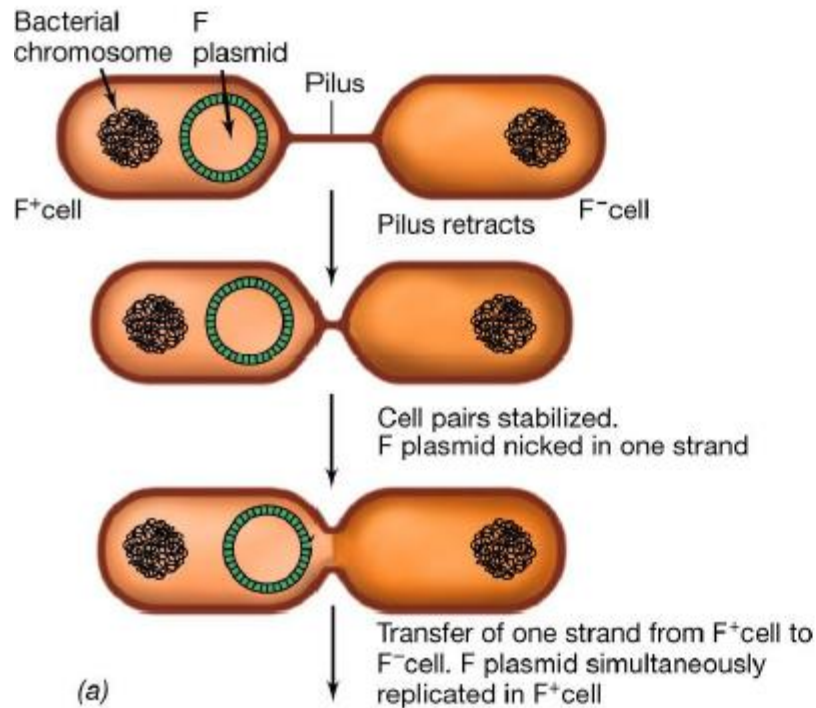
- 염색체와 합쳐지거나 분리되어 존재
- 염색체와 떨어져 존재할 때 하나의 플라스미드
- 예) F or 생식인자 (fertility factor)



# F plasmid (Fertility factor, 생식인자)

❖  $F^+$  (수컷, donor cell)  $\rightarrow$   $F^-$  cell (암컷, recipient cell)

성모 (sex pilus)를 구성하는  
단백질에 대한 유전정보



F 플라스미드 복제

## 접합 (Conjugation)

- 드물게 F 플라스미드가 염색체에 합체되어 하나의 커다란 원형 분자를 형성: Hfr (high frequency recombination) 세포
- 전달이 시작되면 F 플라스미드는 자신뿐만 아니라 붙어 있는 염색체를 수형세포로 전달
- 대장균 염색체를 전달하는데 걸리는 시간은 100분
- 만약 전달 과정 도중에 두 세포 간의 접촉이 깨어지면 그 때까지의 시간에 비례하는 만큼의 염색체가 전달 (50분이면 약 50%)



# Transposon

## ❖ 세포 내부의 유전자 전달

- 하나의 DNA에서 다른 DNA 또는 동일 DNA의 다른 위치로 점프하는 유전자
- 한 유전자의 가운데에 끼어들어 돌연변이 유도
- 분리되어 있던 유전자 결합
- 플라스미드 또는 바이러스에 의한 유전자 전달과 연계, 무관한 박테리아간 유전자 이동 중재함 (예: 여러 개의 항생제 내성 균주)

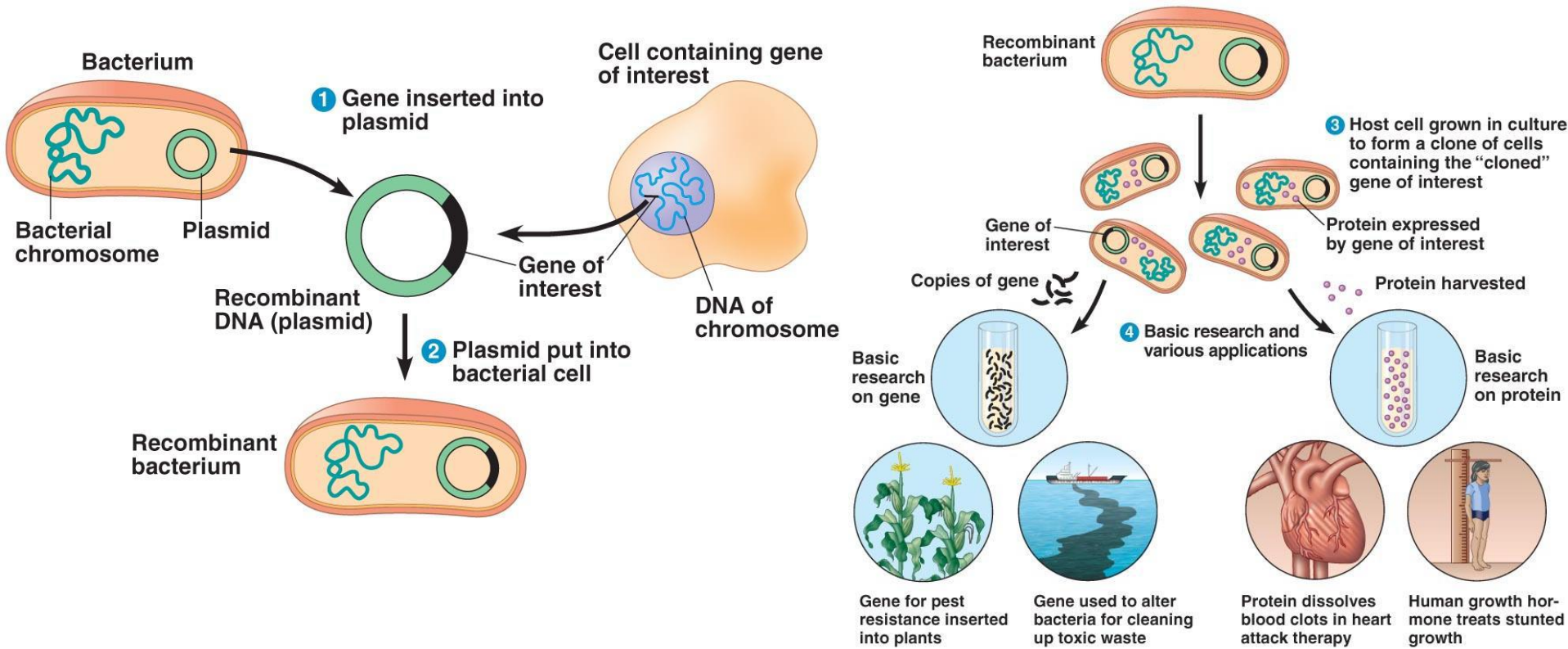
## 8.3 유전공학 (Genetic Engineering)

- ❖ 유전공학: 유전자(DNA)의 기능을 바탕으로 유전자재조합, 유전자클로닝 등의 유전자 조작기술을 응용하여 유전자산물의 효율적인 생산을 연구하는 유전자(DNA)기능 응용 공학 한 수단, not 과학의 한 분야,  
세포밖에서 행하는 DNA 조작
- ❖ 돌연변이 선별, 육종법 극복 (시간단축)
- ❖ 예: 인간 호르몬 인슐린을 재조합 대장균에 의해 대량생산

**Fig. 8.7**

- 1) 원하는 유전자 얻기
- 2) 원하는 유전자를 운반체에 삽입
- 3) 재조합 유전자를 숙주세포에 옮기기, 형질변환
- 4) 클론의 배양
- 5) 유용 물질 생산

# 유전공학





# 유전공학의 기본 요소

- 재조합 DNA 기술 (recombinant DNA technology)
  - 한 생물로부터 유전자를 취하고 그 유전자를 다른 DNA와 재조합
  - 분리된 공여 DNA 유전자를 운반체 DNA와 생체 밖에서 (in vitro) 재조합시키는 과정

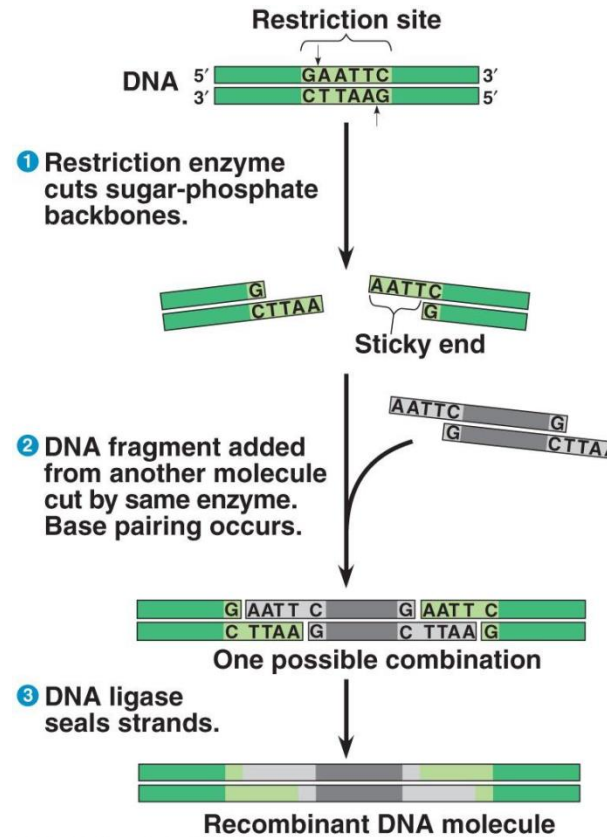
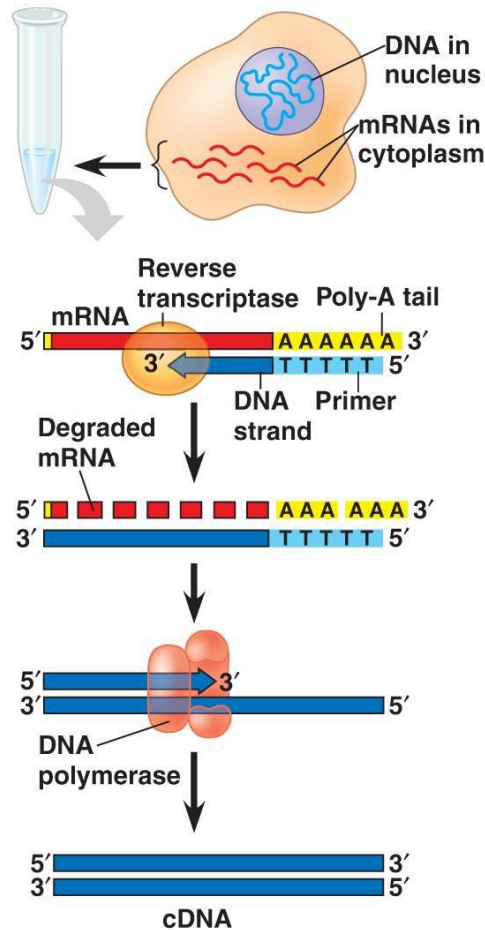
## 유전자 확보 방법

- 샷건 클로닝 (shotgun cloning): 제한효소로 DNA를 조각냄, 스크리닝, 무차별적 접근방법, 비효율적
- 이종혼합 (hybridization)
  - probe 이용, 대상 유전자 상의 한 부분에 대해 상보적인 probe 화학적 합성,
  - 원하는 유전자의 뉴클레오타이드 배열이나 부분적인 아미노산 배열을 알아야 함
- 화학합성
  - 원하는 단백질의 아미노산 배열을 알아야 함
- 역전사효소 사용, DNA 합성: cDNA (상보 DNA)
  - splicing 된 mRNA를 공여생물의 원형질로부터 분리

## 유전공학의 기본 요소

- **cDNA(complimentary DNA, 상보 DNA):** 가공된 mRNA를 주형으로 역전사효소에 의해 제작된 DNA
- 진핵세포 유전자 → 원핵세포 유전자: intron 제거
- **vector (운반체):** plasmid, virus.. DNA 전달 매개체
- **restriction enzyme (제한 효소):** DNA의 특정부위를 절단하는 효소, 절단부위 (예: EcoR1, BamH1..) → 지도, 점착성 말단을 남겨놓고 절단함
- **DNA ligase (DNA 결합효소):** DNA (공여)와 DNA(벡터) 영구적 결합

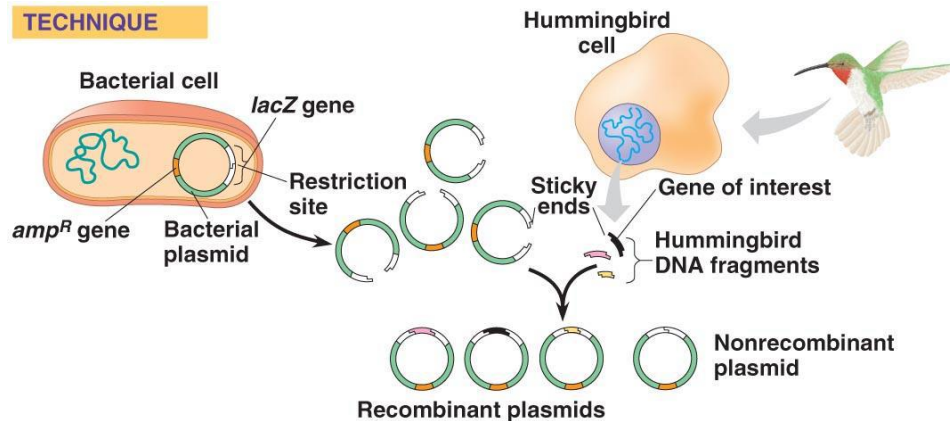
# Recombinant DNA Technique



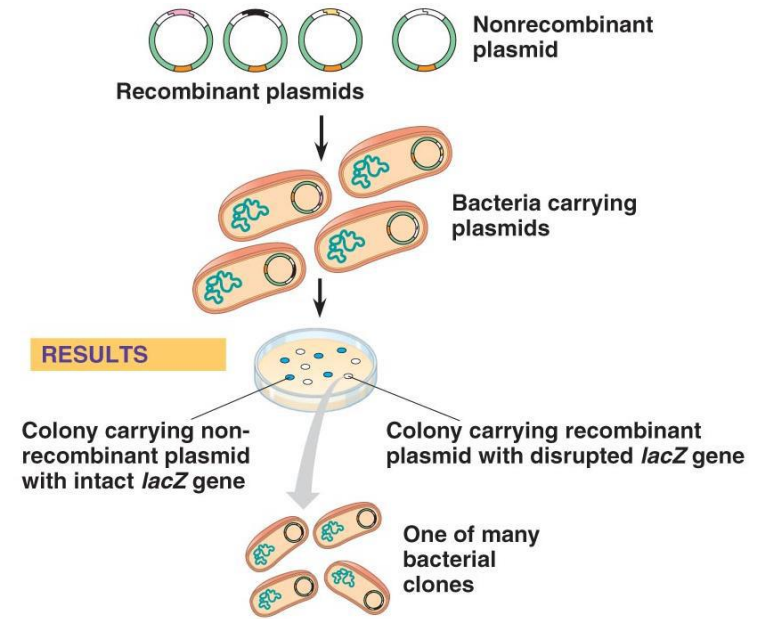
# Recombinant DNA Technique

- **유전자 클로닝:** 유전자재조합 기술로 특정한 단일 유전자 DNA를 숙주세포 안에서 균일한 유전자DNA군으로 증식시키는 것
- **Screening (선별):** 재조합 유전자의 선별, 항생제 저항성, 선별용 표식(marker), 방사능 표식, 형광 표식
- 재조합 유전자의 대량생산: plasmid stability

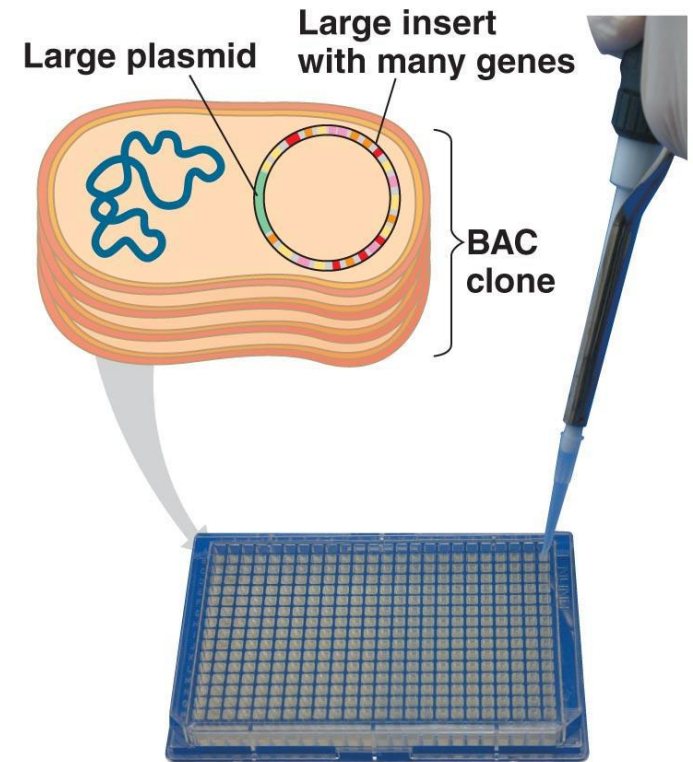
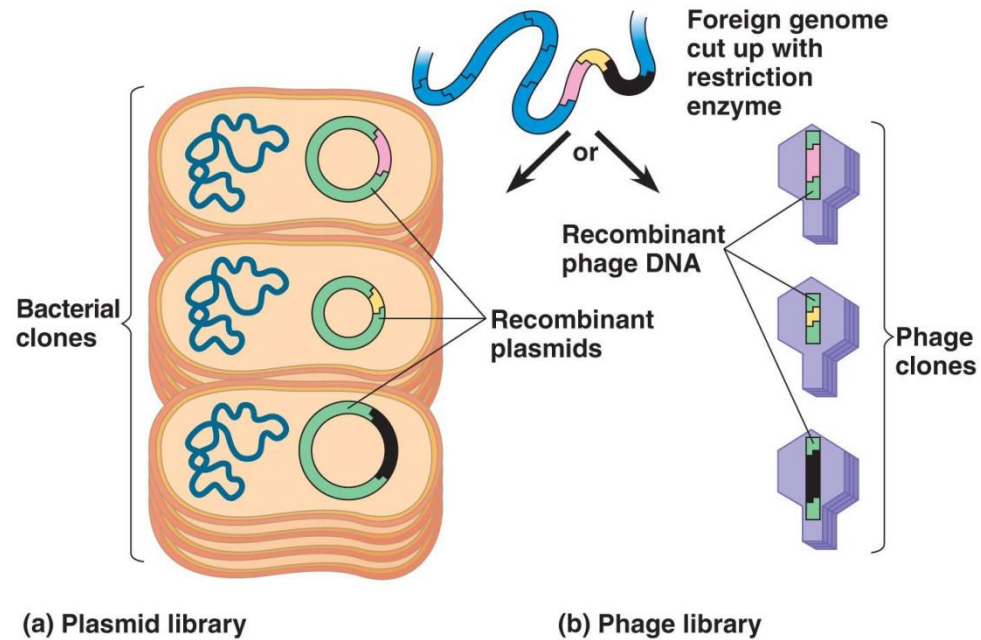
## TECHNIQUE



## RESULTS



# Genomic Library



(c) A library of bacterial artificial chromosome (BAC) clones

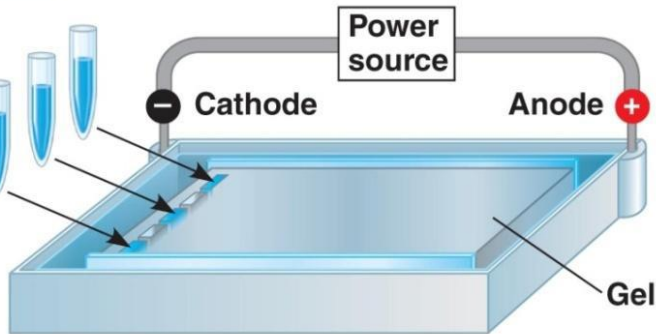


# Gel Electrophoresis

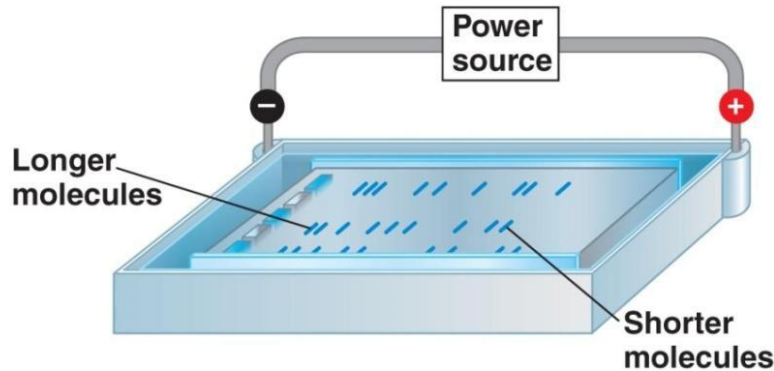
## TECHNIQUE

Mixture of DNA molecules of different sizes

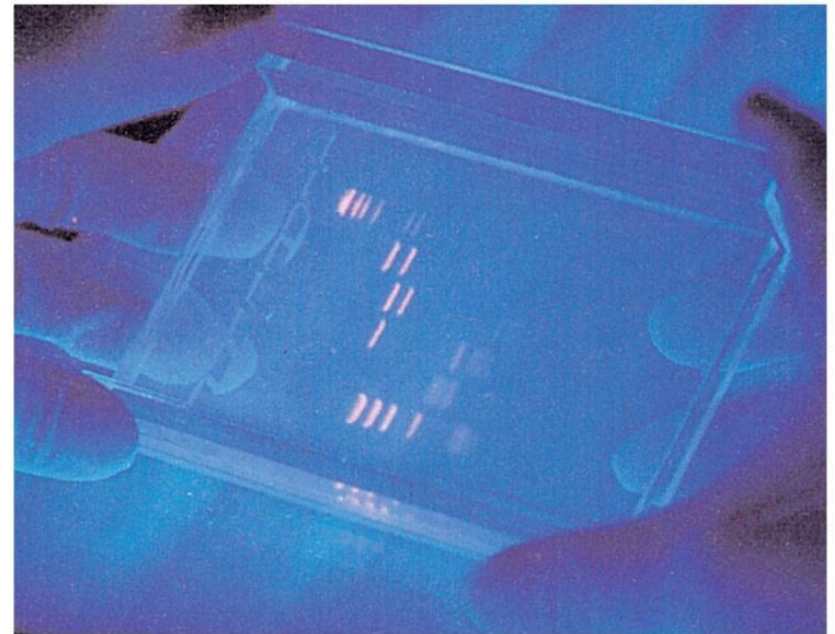
1



2



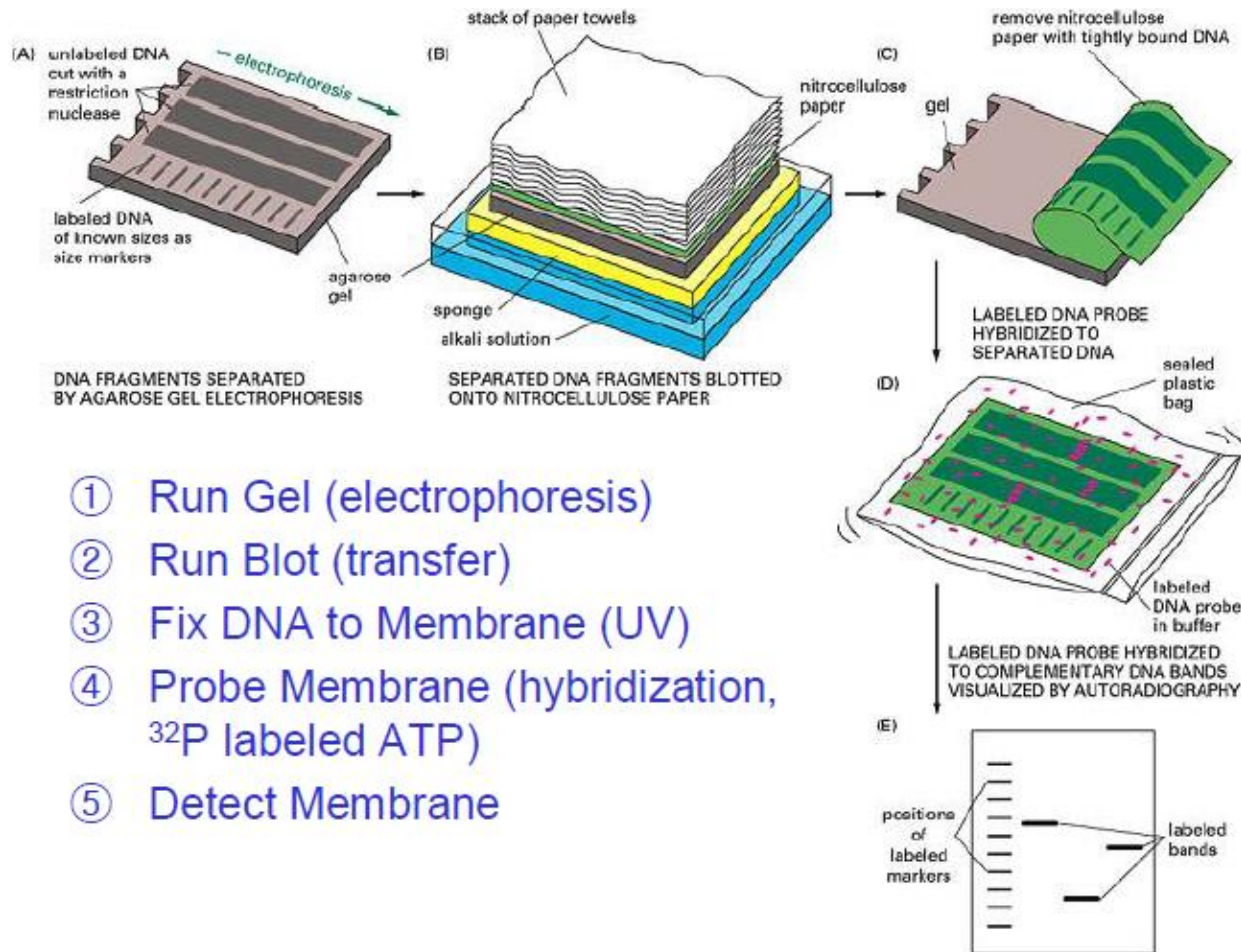
## RESULTS



# Southern Blotting

- ❖ Southern blotting : by Edward M. Southern at Edinburgh University in the 1970s.
- ❖ DNA 분자를 전기영동하여 분리후 agarose gel에서 membrane으로 전달하여 분석함
- ❖ DNA 혼합물질에서 특정 DNA 염기서열의 위치를 파악하기 위해 사용됨 (예: 전체 genome에서 특정 유전자 탐색)
- ❖ Southern: DNA, Northern: RNA, Western: 단백질

# Southern Blotting



- ① Run Gel (electrophoresis)
- ② Run Blot (transfer)
- ③ Fix DNA to Membrane (UV)
- ④ Probe Membrane (hybridization,  $^{32}\text{P}$  labeled ATP)
- ⑤ Detect Membrane

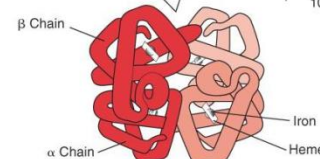
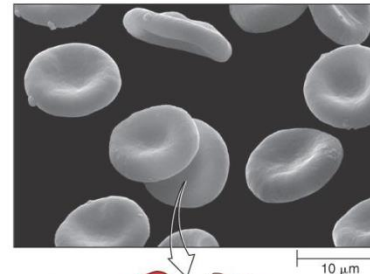
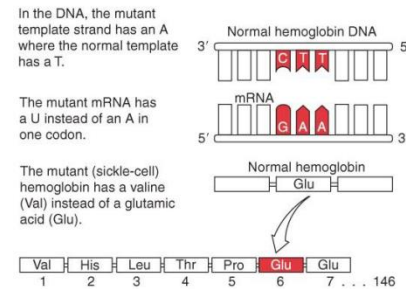


# Southern Blotting

## 겸상적혈구빈혈증 (sickle cell anemia)

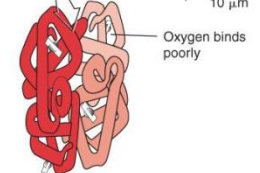
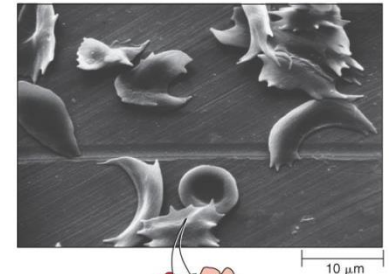
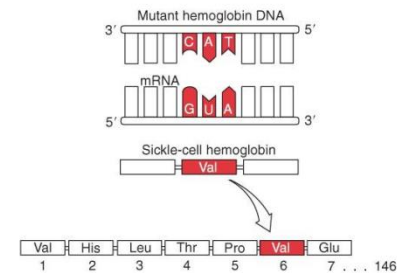
- 적혈구 헤모글로빈 단백질의 아미노산 1개 돌연변이
- 고도에 있거나 스트레스 받을 경우 혈액 내 산소 분압이 낮아져 낫 모양의 겸상적혈구 형성
- 응집하여 작은 혈관을 막고, 피로, 통증, 기관손상, 전신마비 발생
- 10명의 흑인 중 1명 발생
- 겸상적혈구빈혈증 대립유전자 1개를 가지면 말라리아 감염빈도와 증세 감소
- 말라리아 감염이 흔한 아프리카에서 겸상적혈구 대립유전자는 이익이자 손해

(a) Normal hemoglobin and normal red blood cells

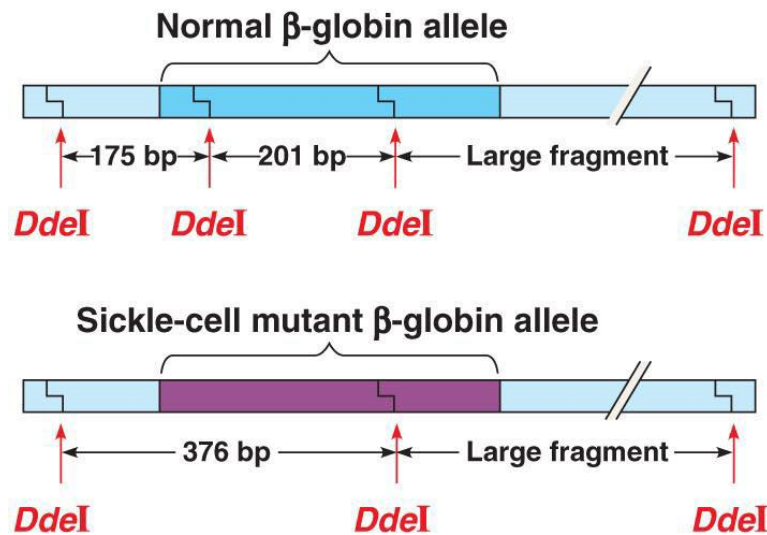


Copyright © 2009 Pearson Education, Inc.

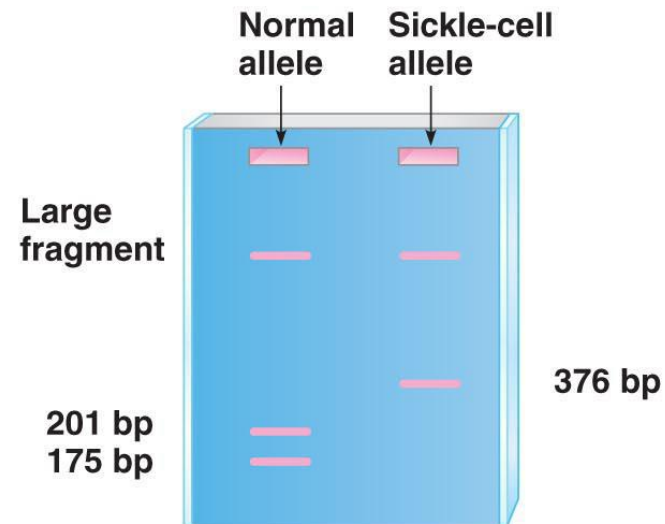
(b) Sickle-cell hemoglobin and sickled red blood cells



# Southern Blotting



(a) *DdeI* restriction sites in normal and sickle-cell alleles of  $\beta$ -globin gene



(b) Electrophoresis of restriction fragments from normal and sickle-cell alleles

# PCR

- **PCR(Polymerase Chain Reaction):**

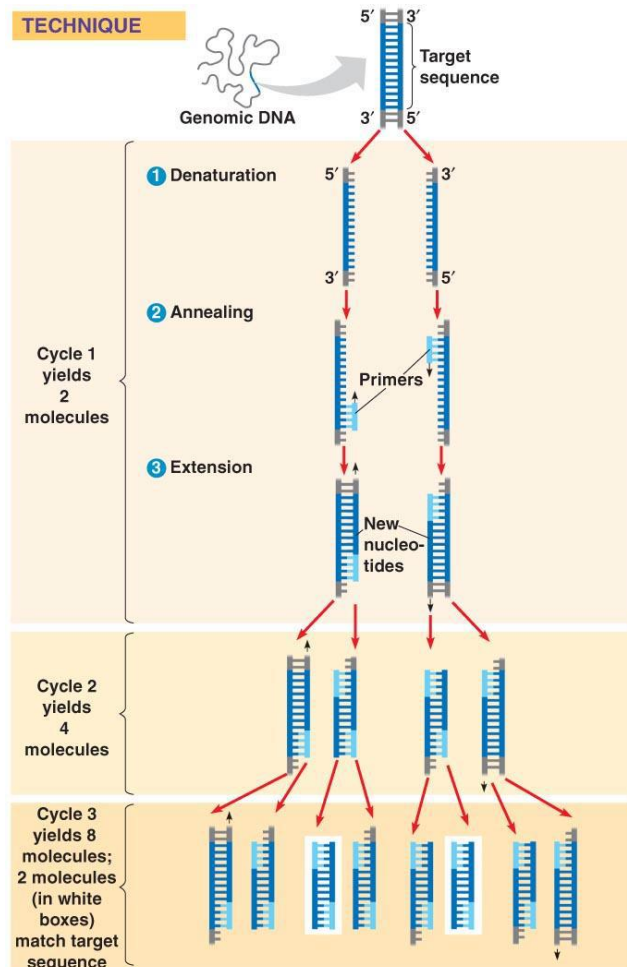
- DNA 조각의 신속한 합성을 통해 DNA를 증폭하는 기술
- Kary B. Mullis in 1983
- 특허권자 Cetus Co.가 Hoffman-La Roche 에 PCR 특허 판매 ( 3억불 ) in 1991

- 1,000,000,000 copies / day

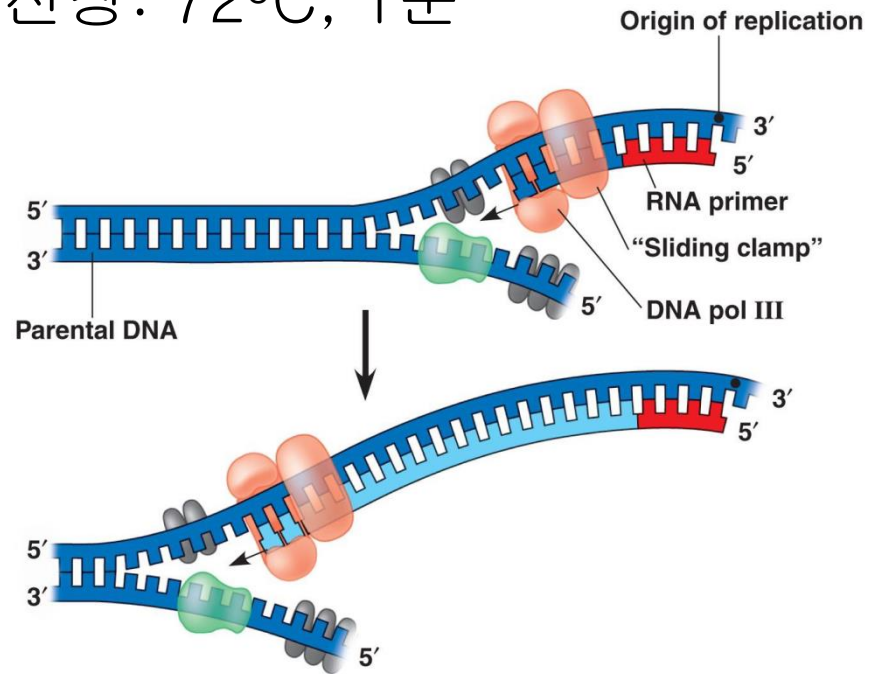
- 활용: DNA sequencing, 유전자 지도제작, 유전자 클로닝, 법의학 (범인검거), 생태학, 인류 고고학, 유전병 진단...

# PCR

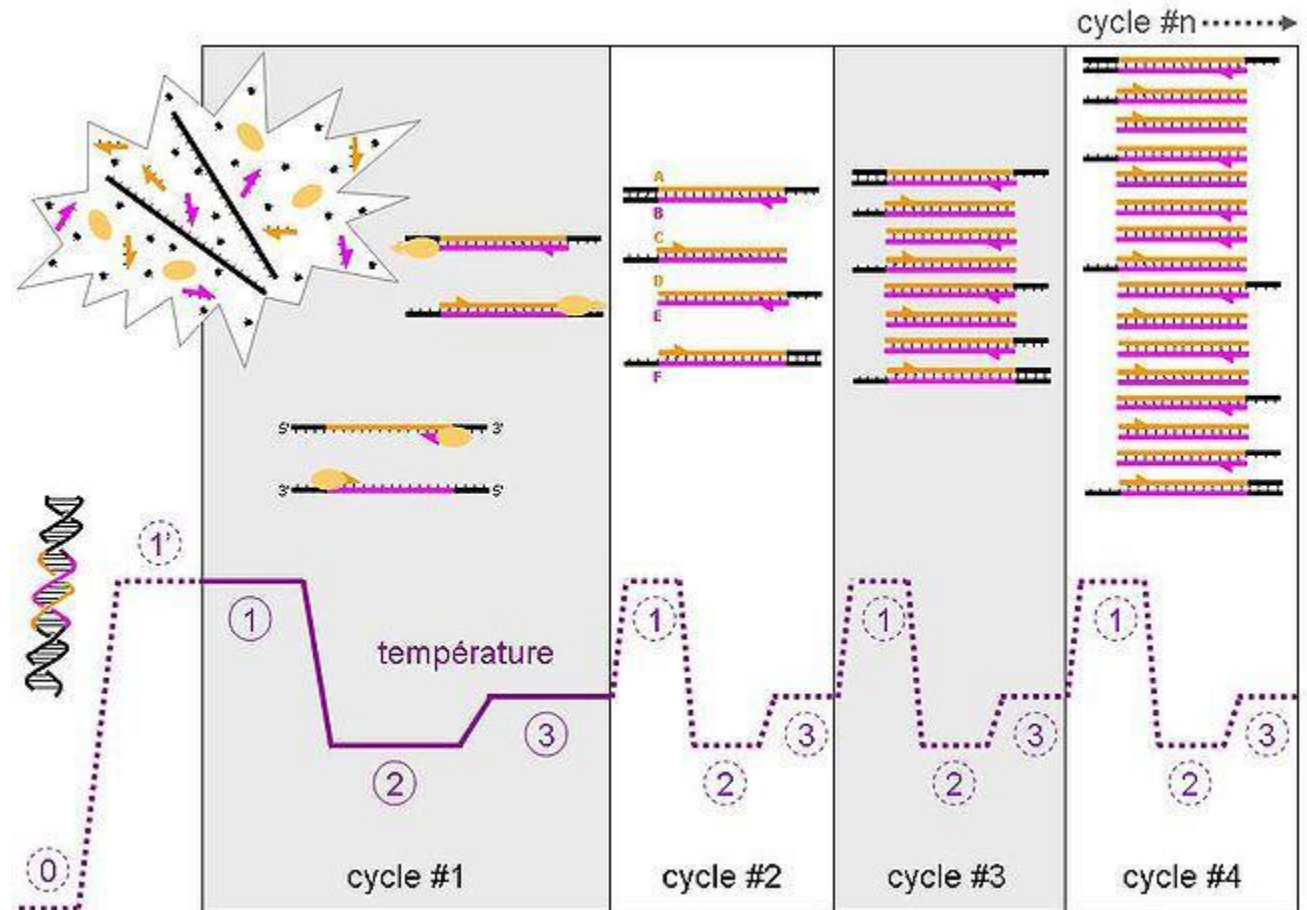
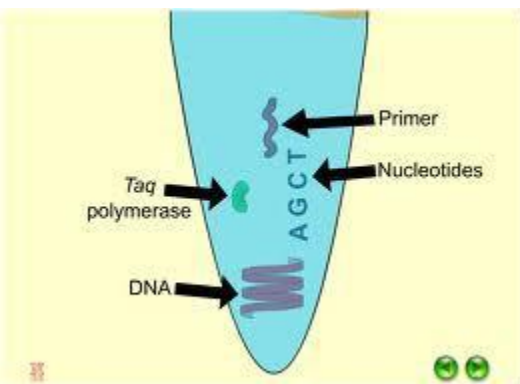
## TECHNIQUE



- 변성:  $94^{\circ}\text{C}$ , 30초
- 결합:  $55^{\circ}\text{C}$ , 1분
- 신장:  $72^{\circ}\text{C}$ , 1분

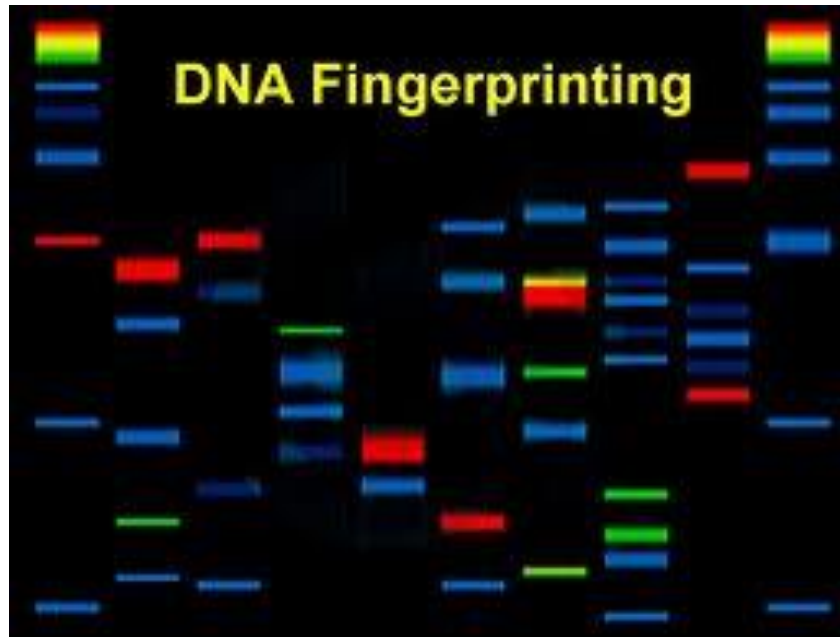


# PCR



## ■ DNA fingerprinting

- Inclusion or exclusion of a person from suspicion (혐의)
- Paternity cases (친자확인)
- Identification of human remains (인류의 흔적: 고생물학)
- Endangered species (멸종 위기의 종)
- Tracking and confirmation of the spread of disease





# Forensic Analysis



© five

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.

Collect DNA



crime scene  
evidence



suspect  
A



suspect  
B

Perform PCR  
on repeats

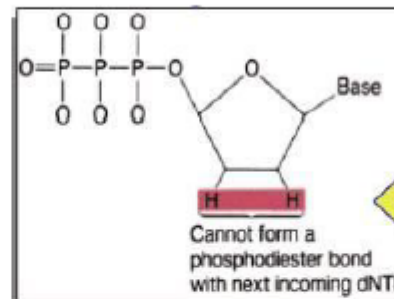


Use gel  
electrophoresis  
to identify criminals

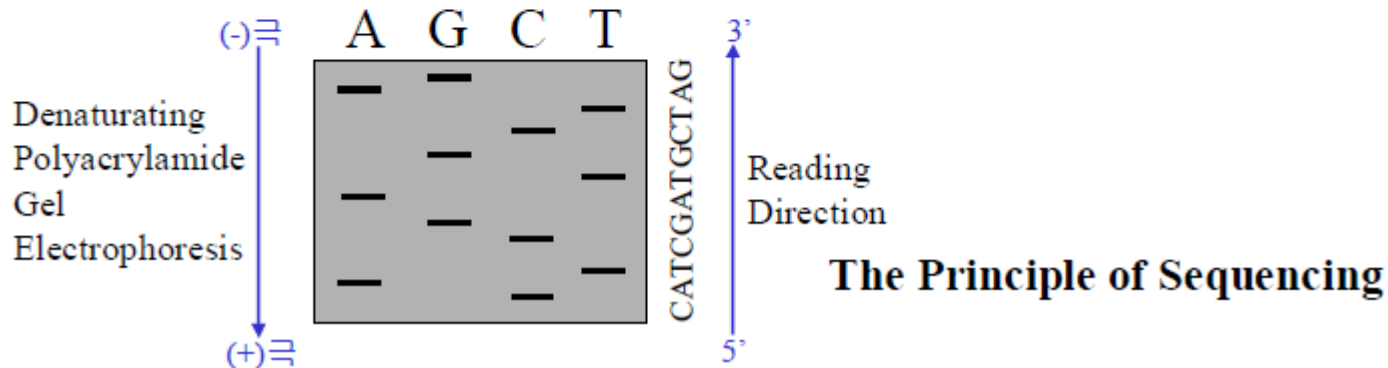


# DNA Sequencing: Chain Termination Method

- ❖ dNTP vs. ddNTP (예: dGTP, ddGTP): ddNTP에서 복제 종료
- ❖ ddNTP 첨가 시험관에서는 말단 N의 DNA 조각 생성
- ❖ 전기영동으로 분리



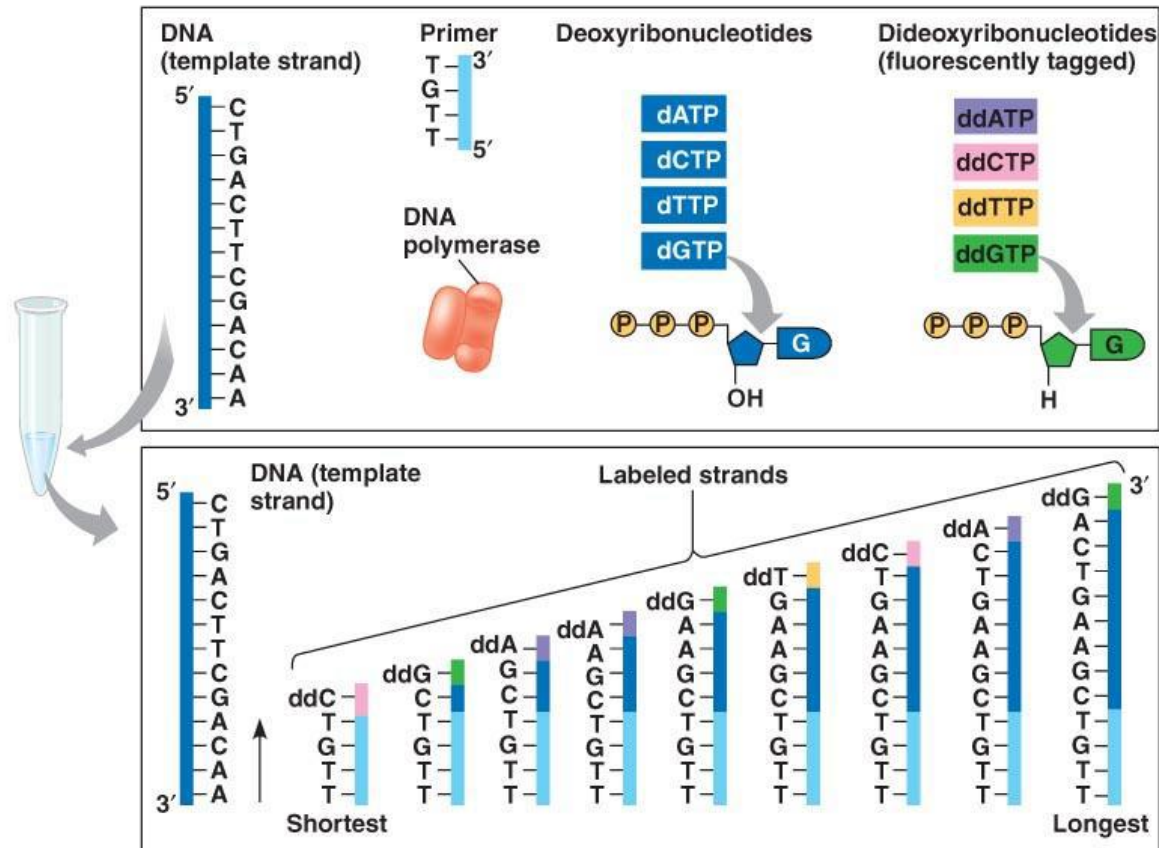
ddNTP: -OH group on the 3' carbon of deoxyribose is replaced by -H



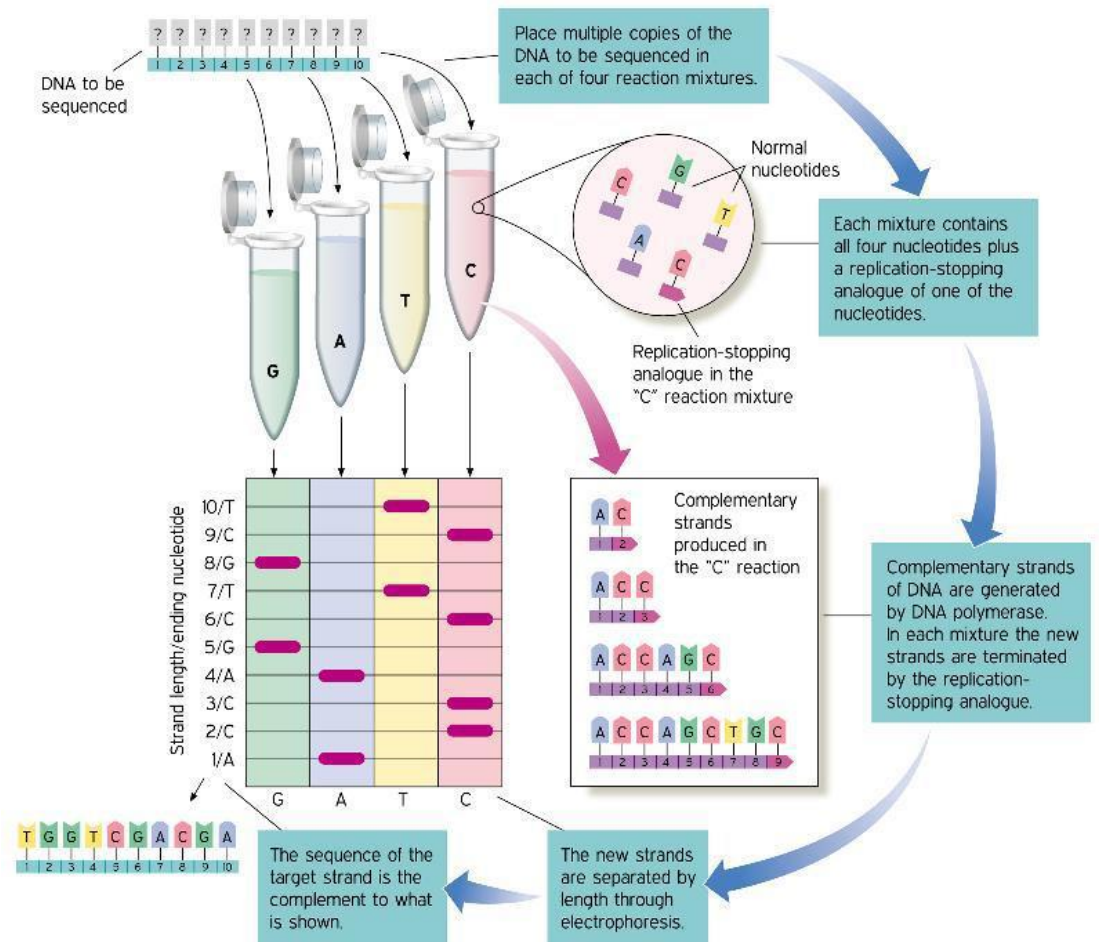
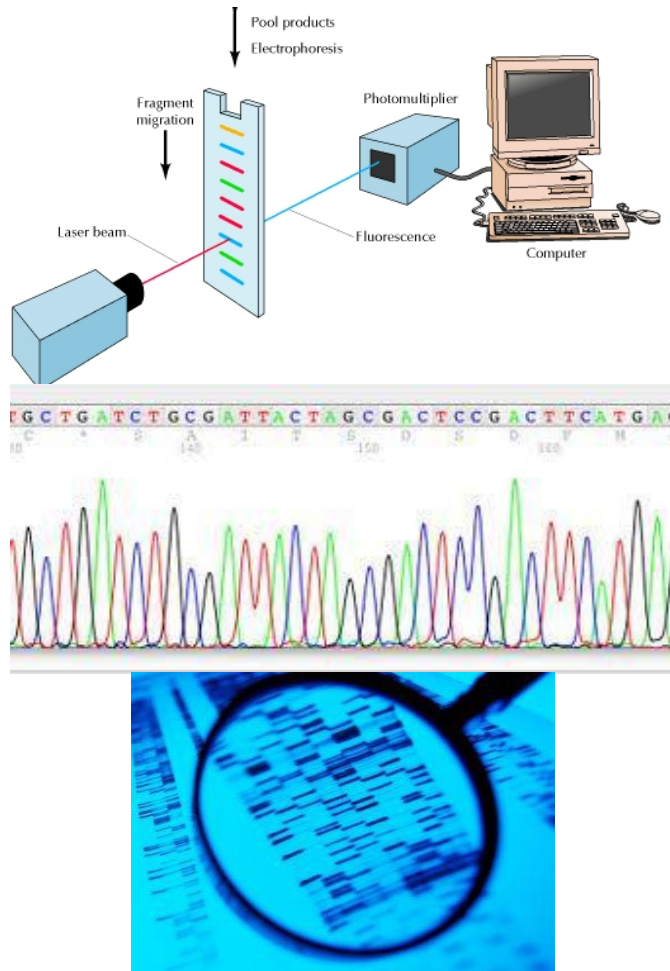


# DNA Sequencing: Chain Termination Method

## TECHNIQUE



# DNA Sequencing: Chain Termination Method



## 인간 유전체

- 인간 DNA의 약 5%만이 유전정보를 가지고 있음
- 95% Junk DNA
- 40-48% 반복염기서열: 텔로미어와 동원체 부위, 염색체 보호와 세포분열 기능 담당, 나머지 역할 모름
- 인간 유전자 3-4만개 (초파리의 2배)
- 쥐의 유전자와 95% 공유, 침팬지와 98% 유사
- 한 유전자로부터 평균 3개의 단백질 생성
- 남성이 여성에 비해 2배 정도 높은 돌연변이
- 단일염기다형성 (single nucleotide polymorphism): 인간개체 별로 게놈상의 염기서열이 동일하지 않은 것이 1000개중 1개의 빈도로 발생, 개인간, 인종간 차이