

유전공학은 무엇인가?

❖ 유전공학의 발달사

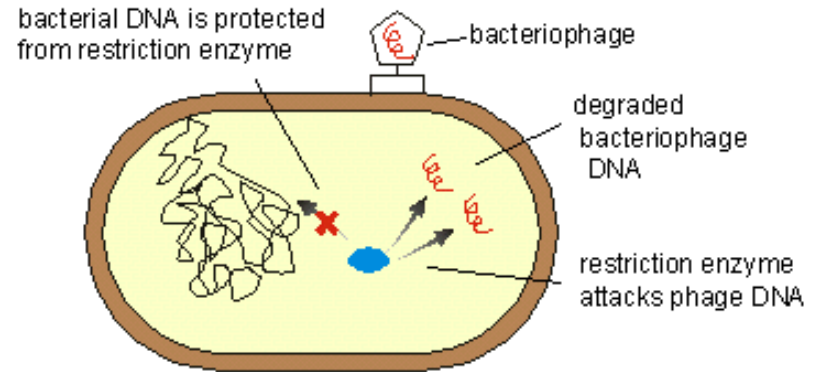
- 1953년 J. Watson, F. Crick DNA 이중나선구조 규명
- 1970년 제한효소(restriction enzyme) 분리
- 1973년 Boyer와 Cohen, 재조합 DNA 기술 구축
- 1975년 Kohler와 Milstein, 단일클론 항체(monoclonal antibody) 생산
- 1976년 재조합 DNA 연구 가이드라인 발간, DNA 염기배열 결정 기술 개발(Sanger 등)
- 1978년 미국 제넨텍(Genentech)사, 사람의 인슐린을 대장균에서 생산
- 1988년 PCR(Polymerase Chain Reaction) 방법 개발 (Mullis 등)
- 1997년 복제양 돌리 탄생 발표

❖ 유전공학 적용의 예

- 고가의 의약품을 싼 가격으로 생산
- 살충성 혹은 항바이러스성 유전자를 작물의 염색체 속으로 삽입 → 형질전환 식물체(transgenic plant)

제한효소

- 주로 세균이 갖고 있는 DNA를 자를 수 있는 효소(endonuclease)
- 세균이 외부 DNA(virus)를 제거하기 위한 수단으로 사용
- 세균 자신의 DNA는 methyl화시켜 보호



❖ Restriction enzyme type II의 특징

1) 이름은 발견된 세균, serotype, 발견 순서로 명명합니다.

Hin d II: H는 균주의 속명 *Haemophilus*의 첫 문자, in은 종명 *influenzae*의 처음 2문자, d는 균주의 이름, II는 이 균주에서 3종류의 제한효소가 분리되었으므로 이것을 구별하는 번호임

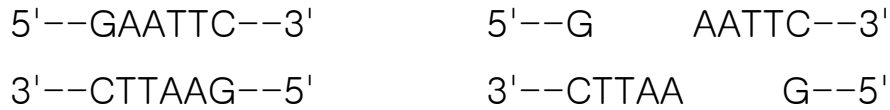
2) 인식부위와 절단부위가 같고 특이적(specific)입니다.

6개의 염기서열을 인식할 경우: $4^6=4096$, 즉 1/4096의 확률로 인식부위 존재

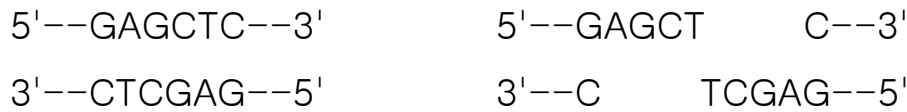
3) Palindrome(회문구조, 역반복배열)을 주로 인식합니다.

4) 절단 후 모양은 세가지가 가능합니다.

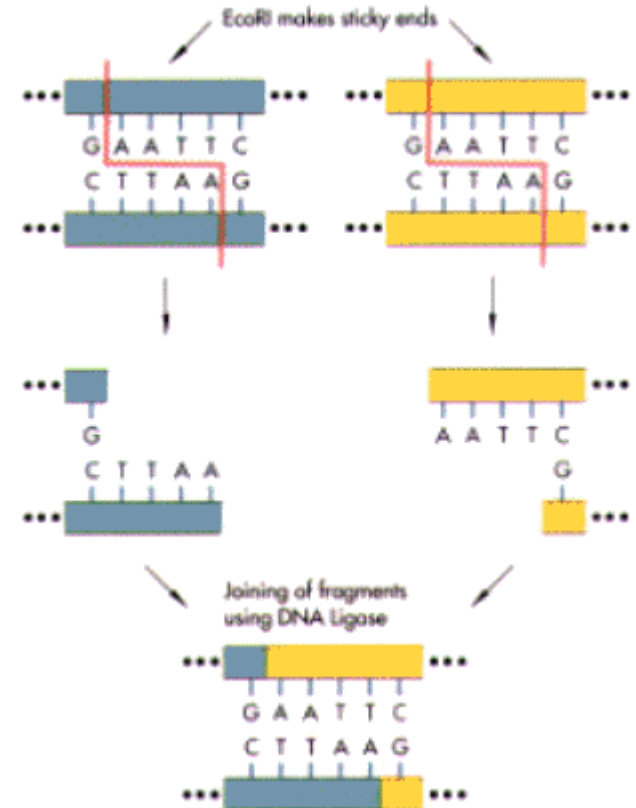
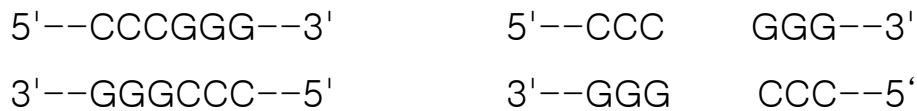
5'-overhang cohesive (sticky) end - ex) EcoR I



3'-overhang cohesive (sticky) end - ex) Sac I



blunt end - ex) Sma I



❖ 제한효소 1 unit

: 반응완충용액(buffer) 50μl에서 한시간 동안 1μg의 λ DNA를 37℃에서 완전 분해하는 양

❖ Methylation의 영향

DNA 염기의 일부가 methylation 되어 있어 해당 서열을 인식하여 절단하는 제한효소를 사용하여도 그 서열이 절단되지 않음

✓ Site-specific DNA methylase

대장균: dam methylase(G^6mATC) & dcm methylase(C^5mCWGG)

포유류: CG methylase(5mCG)

제한효소	인식서열 ¹⁾	절단에 영향을 미치는 Methylase와 그 인식서열	Methylase의 영향을 받는 서열 ²⁾	문헌 보고 내용	
				Methyl화의 영향을 받지 않는 서열	Methyl화의 영향을 받는 서열
<i>EcoRI</i>	GAATTC	CG methylase 5mCG	GAATT 5mCG	GAATT 5hmC GAA 5hmI J 5hmUC	$G^6mAATTC$ GA 6mATTC GAATT $^5mC^{*3}$

❖ Star activity

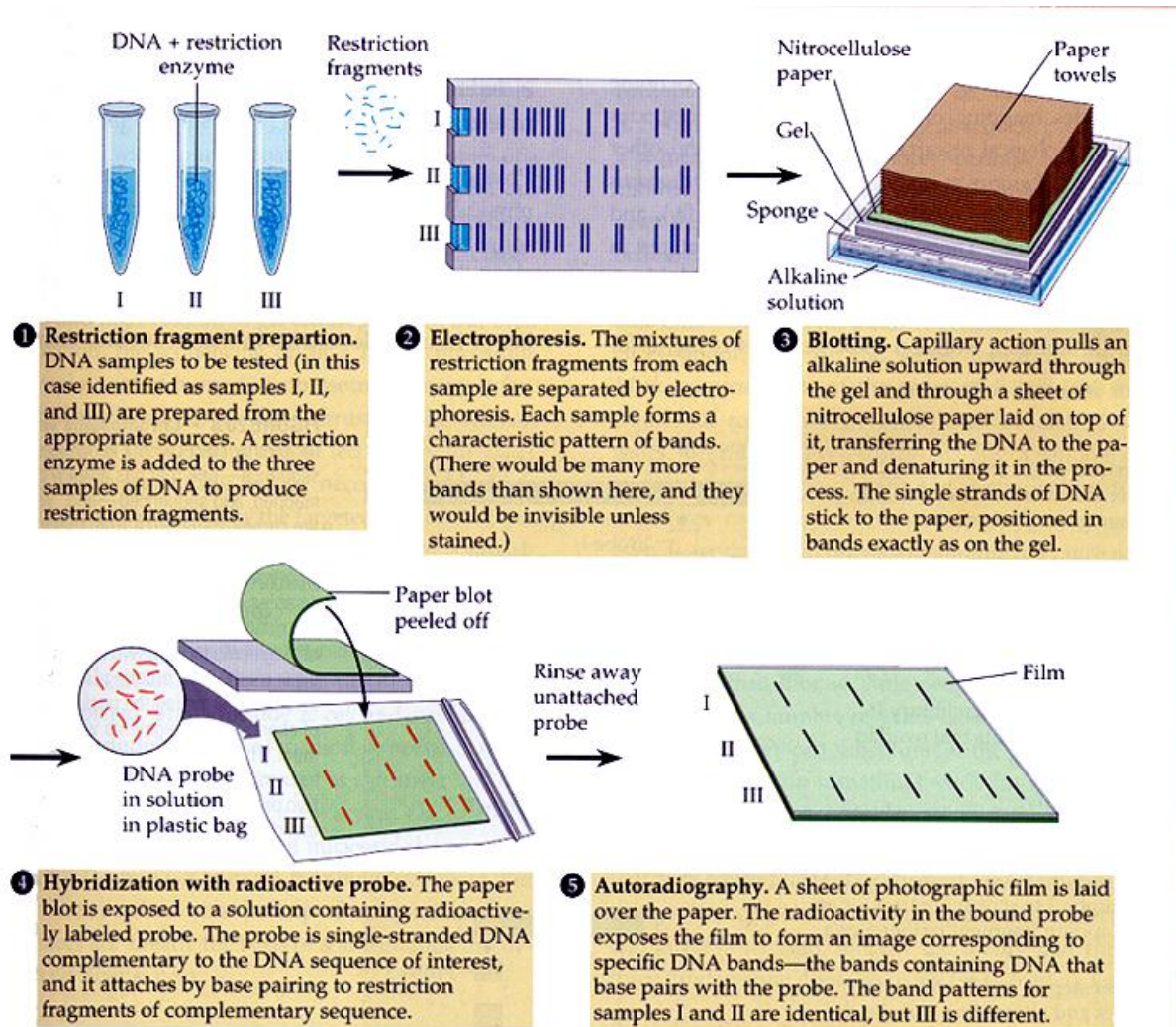
제한효소의 특이성이 저하하여 본래의 인식서열과 다른 염기서열을 절단하기도 함

Star activity 억제를 위해서는 적당량의 효소 사용과 낮은 글리세린 농도, 중성pH, 높은 염 농도 상태에서 실험하는 것이 좋음

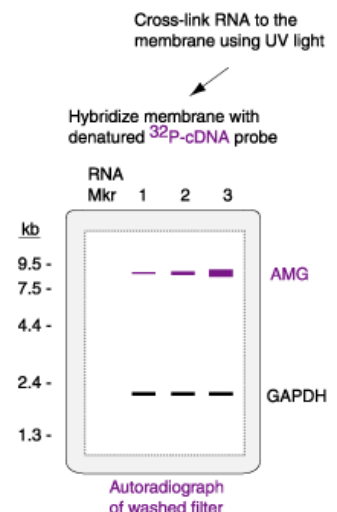
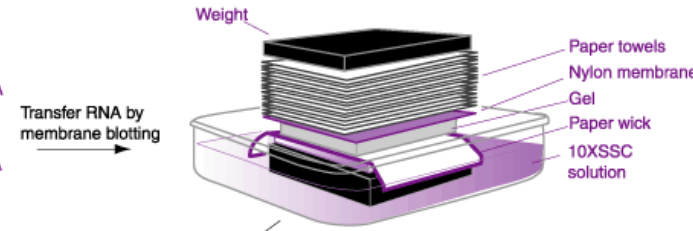
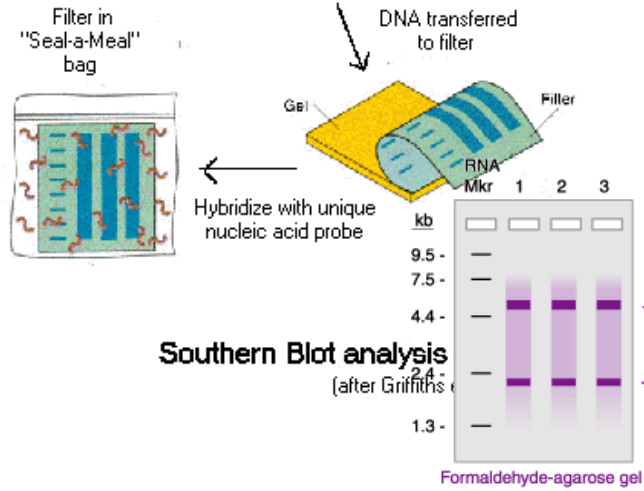
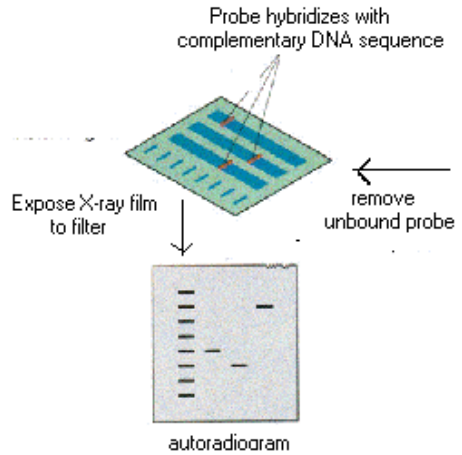
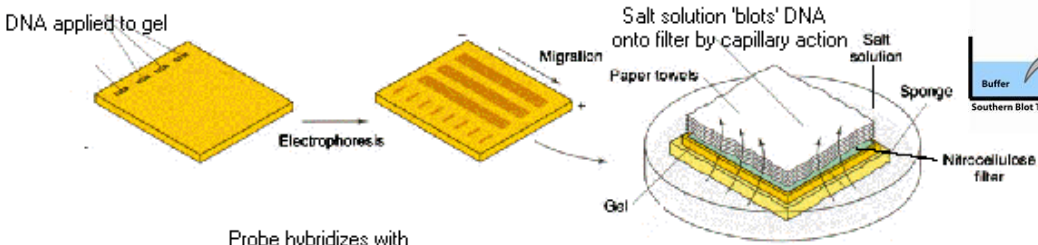
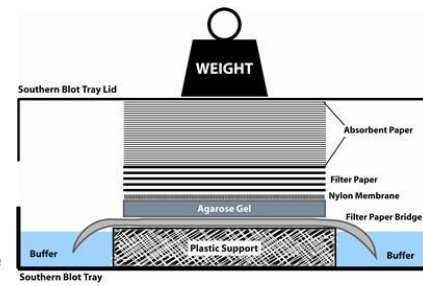
제한효소	정상적인 인식서열 ¹⁾	반응조건 ²⁾	인식가능서열 ¹⁾
<i>EcoRI</i>	G↓AATTC	A, B, E, F	NAATTN

- ²⁾ A : 고농도 glycerol 존재
 B : Mn^{2+} 존재
 C : alkali pH
 D : acid pH
 E : DMSO 존재
 F : 저이온 강도
 G : 고이온 강도
 H : 2-mercaptoethanol 존재

RFLP (restriction fragment length polymorphism)

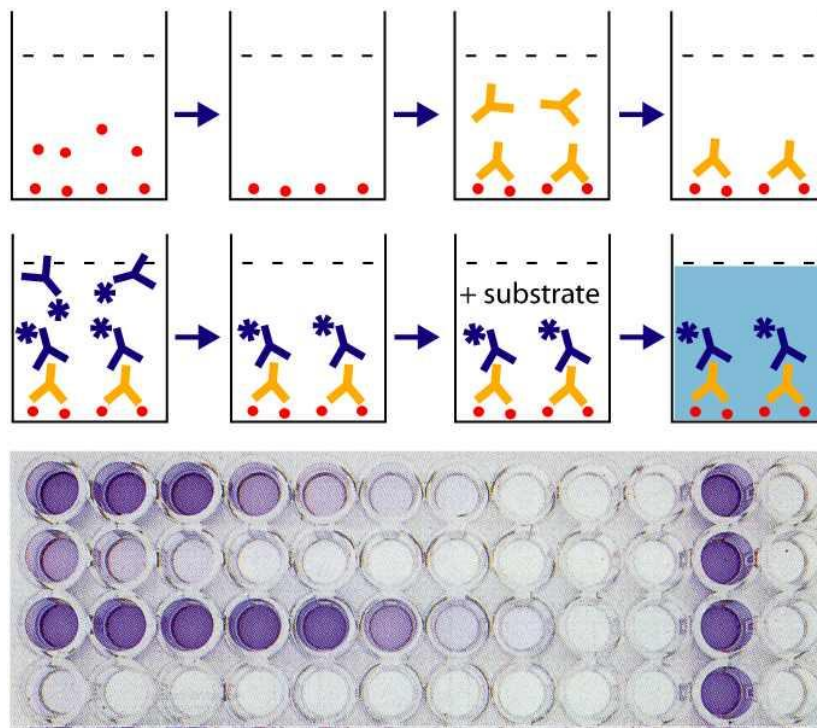


서던, 노던 그리고 웨스턴 블롯

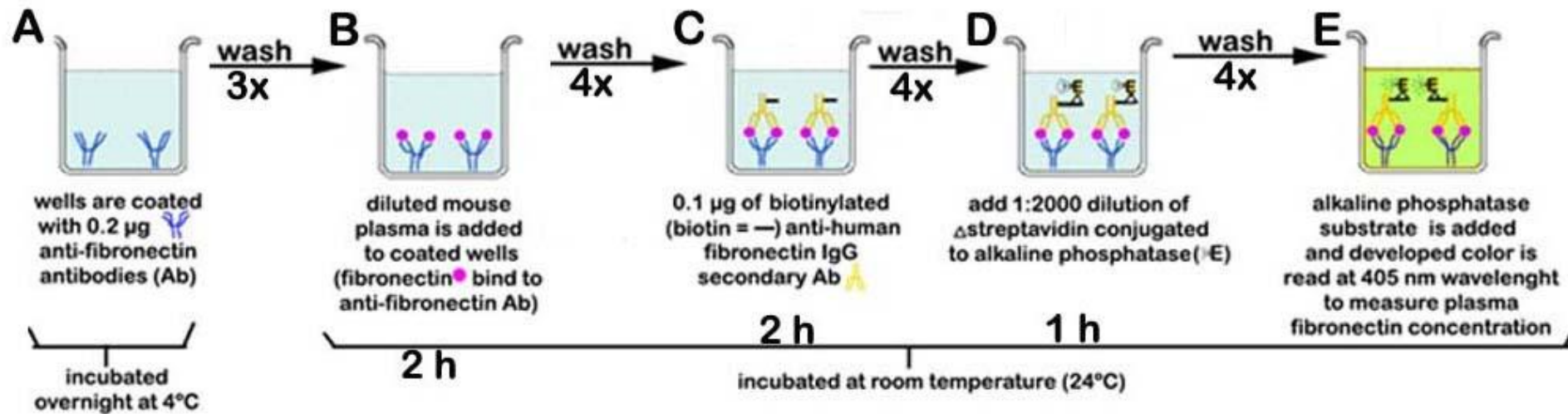


➤ Northern Blot analysis

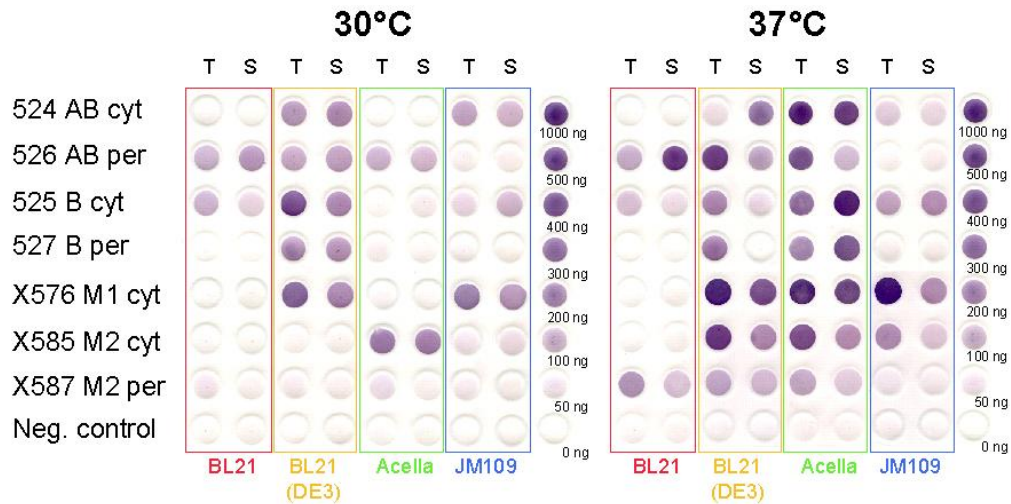
➤ Direct ELISA



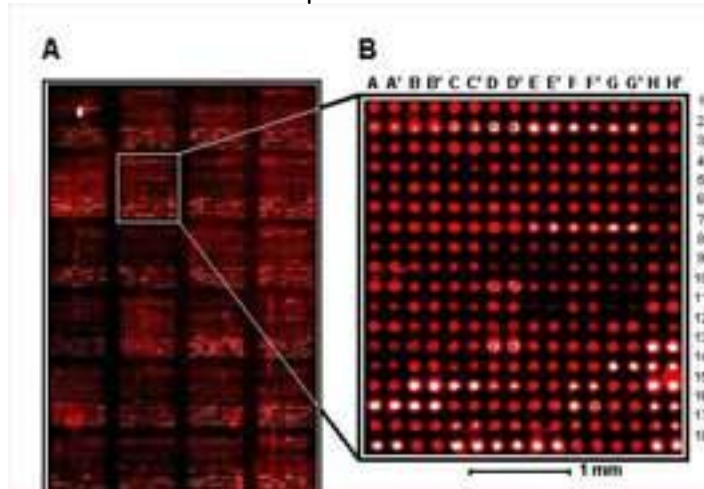
➤ Sandwich ELISA



➤ Protein Dot Blot



➤ Protein Chip



ProteinChip Technology: ProteinChip Array Preparation

1. Apply Crude Sample

Proteins within the sample bind to chemical or biological "docking sites" on the ProteinChip surface through an affinity interaction.



2. Wash ProteinChip Array

Proteins that bind non-specifically or buffer components are washed away, eliminating sample "noise".



3. Add Energy Absorbing Molecules or "Matrix"

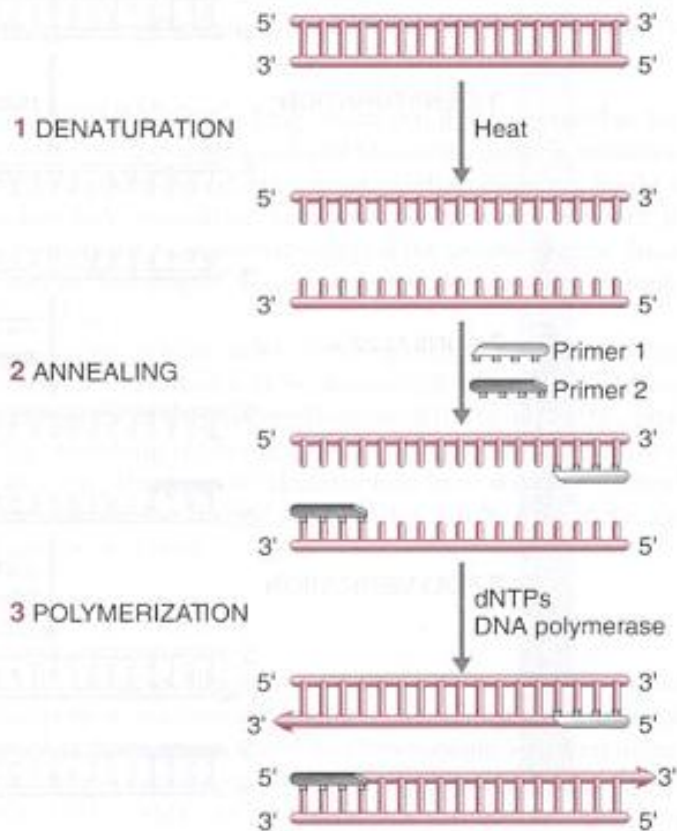
After sample processing the chip is dried and EAM is applied to each spot to facilitate desorption and ionization in the TOF-MS.



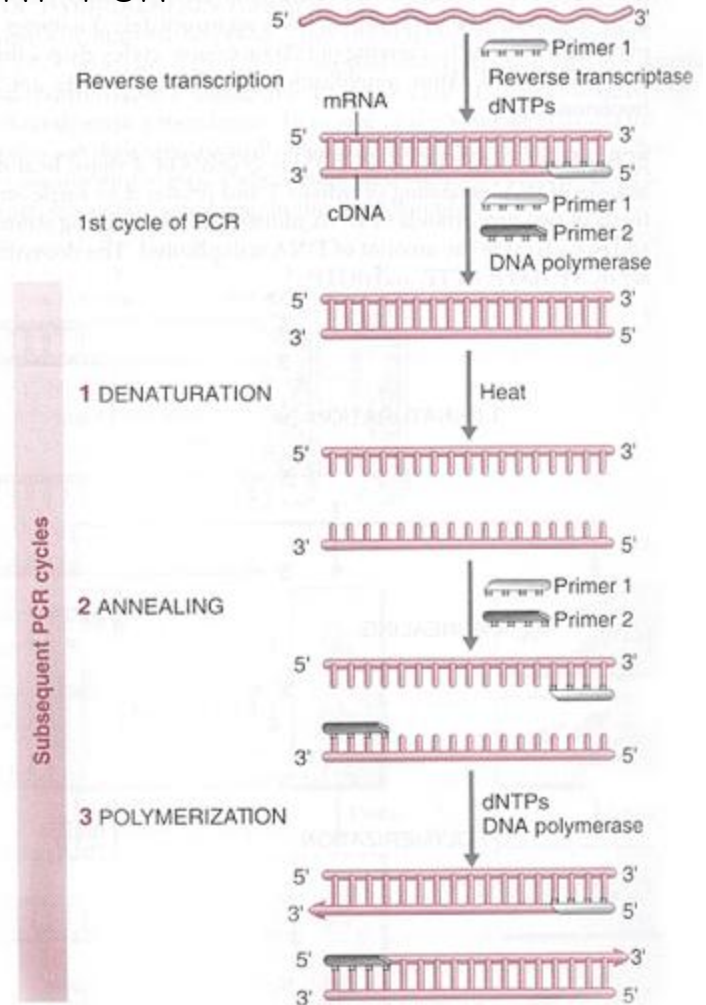
중합효소연쇄반응

- DNA 또는 RNA의 특정부위를 in vitro에서 대량으로 증폭하는 기술
- 열에 안정한 중합효소 발견 & 온도주기 자동화 기기 개발

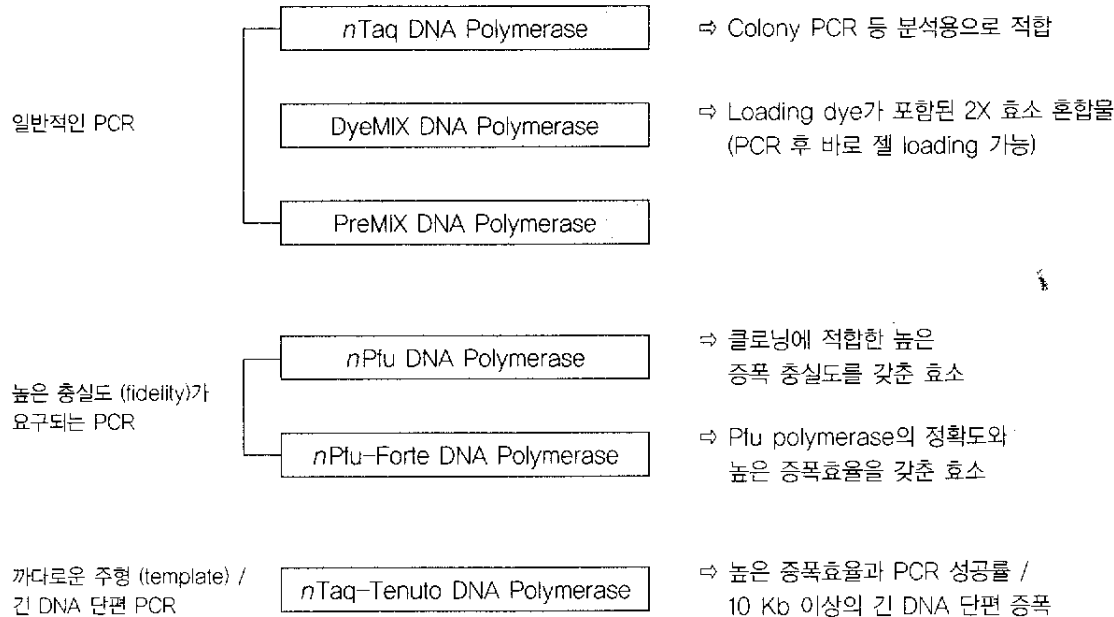
➤ PCR



➤ RT-PCR



➤ PCR polymerase



➤ PCR polymerase의 특성

	nPfu	nPfu-Forte	nTaq	nTaq-Tenuto	PreMIX	DyeMIX
증폭산물 길이	< 5 kb	< 15 kb	< 5 kb	< 15 kb	< 10 kb	< 10 kb
수율 (yield)	+	++	+	+++	++	++
5'→3' Exonuclease	-	-	± ^a	± ^a	± ^a	± ^a
3'→5' Exonuclease	++	++	-	+ ^b	+ ^b	+ ^b
Error rate (x10 ⁻⁶)	0.28	0.28	8.0	3.0	3.0	3.0
증폭산물 말단	Blunt end	Blunt end	A tail	A tail	A tail	A tail

^a 유전자 변형을 통하여 활성이 약화되었음.

^b 미량 첨가된 Pfu polymerase에 의한 활성.

➤ PCR primer

✓ Primer 설계상의 주의점

- 길이 : 15 - 30 bp
- Primer 간의 상보성 : 특히 3'-terminal의 상보성 결합으로 인한 primer dimer 형성 주의
- GC 함량 : GC 함량은 50% 전후로, GC 또는 AT-rich 주의, 특히 3'-terminal의 AT-rich 주의
- Primer 내의 2차 구조 : intra-base pairing 주의
- Tm 값 : 두 primer의 Tm 값이 비슷하도록, Tm 값이 높은 것으로 선택
- 사용 농도 : 0.2 - 1uM

✓ PCR primer의 설계방법

- 지정된 안정성 내에 있을 것 : Tm 값이 최대치와 최소치의 25-75%내에 있는 것
- 3개 이상의 반복 배열이 없고, 5개 이상 같은 염기가 속하지 않을 것
- 특이성이 높을 것 : primer와 template의 duplex stability 점검
- Dimer와 hair pin 구조를 형성할 가능성이 없을 것
: 3 염기 이상 수소결합이 가능한 stem을 형성할 가능성이 있는 건은 제외
- 3' 측의 서열이 특이적일 것 : template의 다른 부위와 3' 측 7염기의 배열이 같은 primer는 제외

➤ PCR Troubleshooting

PCR 산물이 없는 경우

원 인	해 결 책
PCR이 잘 되지 않는 주형 DNA (예 GC 비율이 높은 주형)	DMSO를 첨가하고 효소량을 0.5 unit 단위로 줄여본다. T _m 값을 떨어뜨리는 기타 유기용매를 사용한다.
DNA 주형 문제	주형 DNA의 농도와 품질을 검사해 본다. 아가로스 젤에서 주형 DNA가 분해되지 않았는지 확인한다. 이미 성공한 적이 있는 primer로 PCR을 수행해 본다. 주형 DNA를 다시 준비한다.
효소 농도가 너무 낮은 경우	효소량을 100 μ l 반응액당 5 units 까지 늘려 본다. 필요한 경우, 0.5 unit 단위로 효소량을 늘려 본다.
MgCl ₂ 농도가 너무 낮은 경우	MgCl ₂ 농도를 0.25 mM 단위로 늘려 본다.
PCR cycle 조건이 적절치 않은 경우	Annealing 온도를 낮추어 본다. Cycle 수를 늘려 본다. Final elongation 단계가 수행되었는지 확인한다.
Primer가 적당하지 못한 경우	새로운 primer를 제작한다.
Primer 농도가 적절하지 못한 경우	두 primer의 농도는 동일하여야 한다. Primer 농도를 적정해 본다 (0.1 - 0.6 μ M).
Primer 품질 또는 보관의 문제	Primer가 분해되지 않았는지 확인한다. Primer는 -15°C에서 -30°C 의 온도에서 보관하여야 한다.
Primer 이합체의 형성	Hot start PCR을 수행한다. 각각의 반응액에서는 반응이 일어날 수 없도록 PCR 반응액을 둘로 나누어 제조한 후 반응 직전 혼합한다.

PCR 산물의 개수가 여럿이거나 끌림 현상이 나타나는 경우

원 인	해 결 책
Annealing 온도가 너무 낮은 경우	Primer 길이와 염기서열에 따른 적절한 annealing 온도로 높여준다. Primer 디자인이 적절한지 확인한다.
Primer가 적절하지 못하거나 농도가 낮은 경우	Primer 농도를 적정해 본다 (0.1 - 0.6 μ M) 두개의 primer 농도가 동일한지 확인한다. Nested PCR*을 수행한다.
PCR이 잘 되지 않는 주형 DNA (예 GC 비율이 높은 주형)	DMSO를 첨가하고 효소량을 0.5 unit 단위로 줄여본다. T_m 값을 떨어뜨리는 기타 유기용매를 사용한다.
DNA 주형 문제	주형 DNA를 순차적으로 희석하여 사용해 본다.

※ Nested PCR : 1차 PCR을 수행한 후 그 산물을 주형 DNA로 하여 증폭한 범위 안쪽의 primer 쌍을 이용하여 두 번째 PCR을 수행하는 방법.

칩 DNA & 표현 열(expression arrays)

<Difference>

1. Southern, Northern Blot : " one gene, one messenger "
 - Distribute the oligonucleotide probes over a gel
 - Radioactively labeled oligonucleotide
2. DNA array : " many genes, many messenger "
 - Oligonucleotide probes are immobilized on a surface at micrometer distance
 - Sample is usually labeled with a fluorescent dye

<DNA microarray 종류 및 제작 방법> - 붙이는 유전물질의 크기에 따라 분류 가능

1. Oligonucleotide microarray

- 보통 15~25개의 염기들로 이루어진 nucleotide가 microarray 구성
- 종류 : Affymetrix - photosynthesis를 통해 DNA microarray substrate에 직접 oligonucleotide 합성
Nanogen - oligonucleotide 합성한 후, 전기장을 이용해서 microarray 위의 특정 위치에 배열
- 질병관련 유전자의 돌연변이 검색, 병원균의 검출, 약제내성, DNA 염기서열 분석, 개체 식별 등에 이용

2. cDNA microarray

- 최소한 500bp 이상의 유전자 조각이 붙여져 있음
- Stanford 대학에서 처음 개발됨, 주로 pin spotting과 inkjet 방식으로 만듦
- 유전자 발현 및 분석, 암 및 질병관련 유전자에 대한 진단, 유전자 치료 등 여러 분야에서 사용

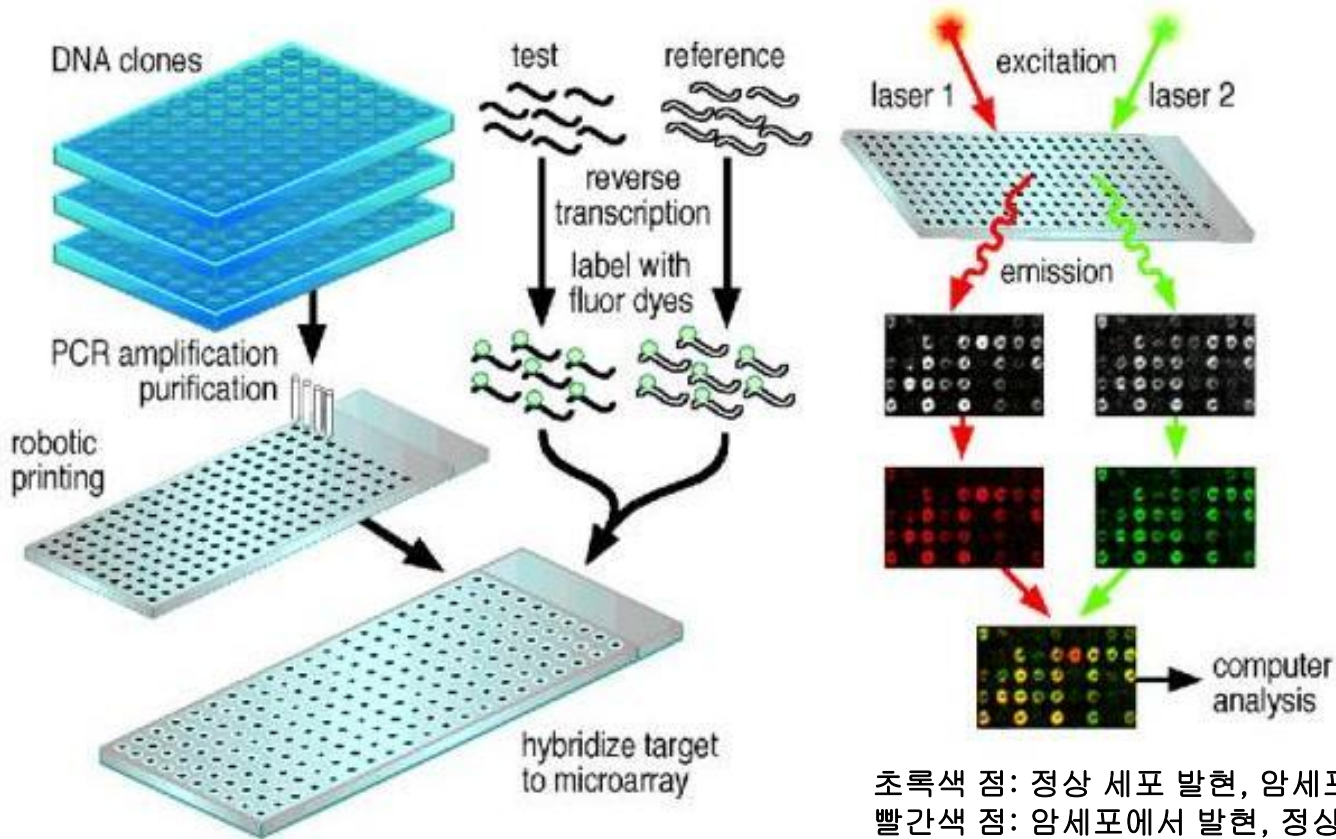
☞ DNA chip 기술 : microarray technology

정상 세포 → mRNA → DNA → 초록색으로 염색

암세포 → mRNA → DNA → 빨간색으로 염색



10만의 유전자가 담긴 DNA 칩과 반응 → 스캐너로 검사 → 컴퓨터로 분석



초록색 점: 정상 세포 발현, 암세포 발현되지 않는 유전자
빨간색 점: 암세포에서 발현, 정상세포에서 발현되지 않는 유전자
노란색 점: 정상 세포와 암세포에서 모두 발현되는 유전자

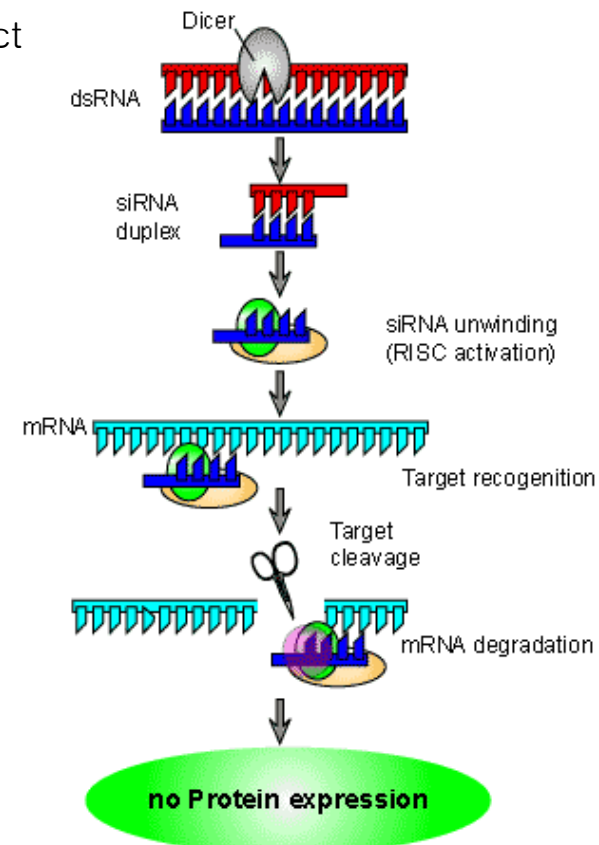
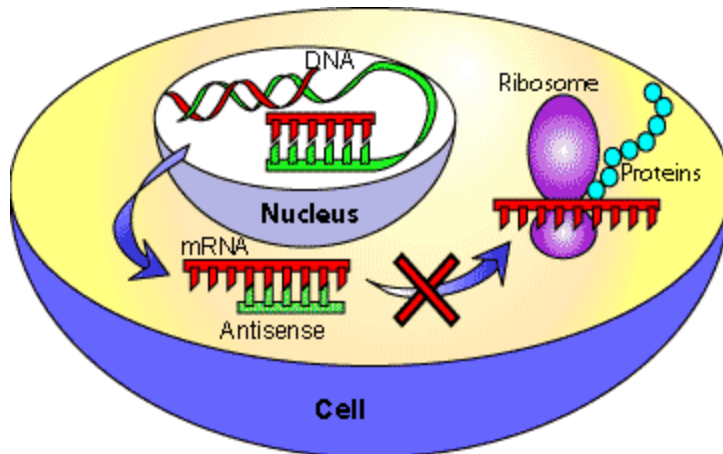
안티센스 올리고핵산염

RNAi and antisense RNA

– destruction of mRNA in the cytoplasm and inhibit or block production of protein for a particular function (e.g. inducing fruit ripening, causing cancer etc.)

1. **RNAi:** dsRNA is introduced into a cell and gets chopped up by the enzyme dicer to form siRNA. siRNA then binds to the RNA-induced silencing complex (RISC) and is unwound. The antisense RNA complexed with RISC binds to its corresponding mRNA. And then, mRNA cleaved by the enzyme slicer and makes it inact

2. Antisense RNA



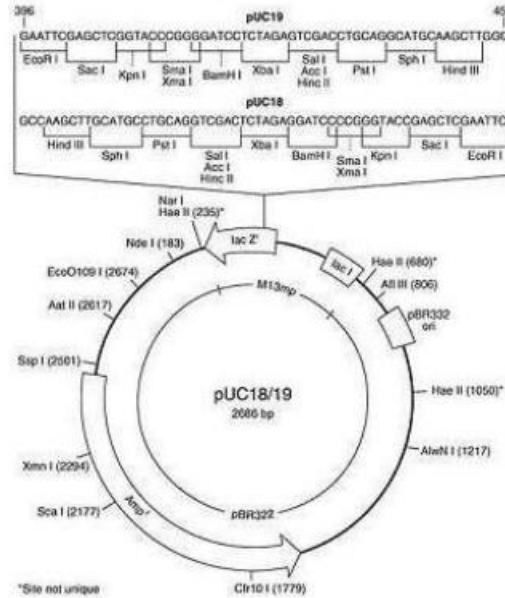
유전자 벡터

pUC18/19

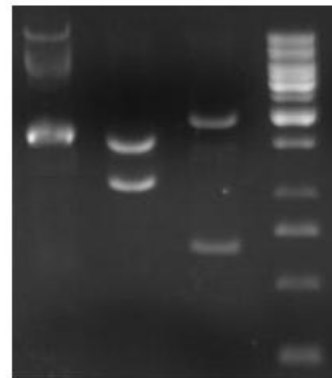
Code: PEC 002

pUC18/19 vectors

Vector size(bp)	2686
pBR322 origin	852-1466
lacI binding site	507-487
lacZ'	469-146
CAP binding site	591-554
β- lactamase coding sequence	2486-1626



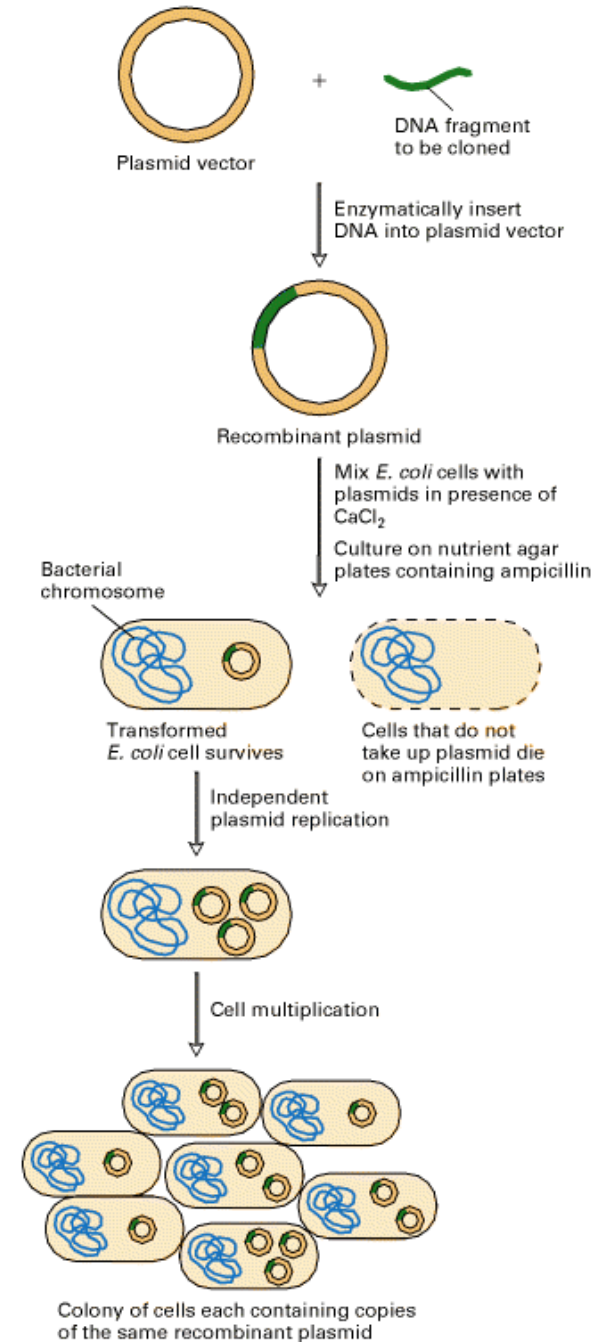
pUC18 and pUC19, small and high copy number *E. coli* cloning vectors, used for cloning, blue/white screening and single strand production.

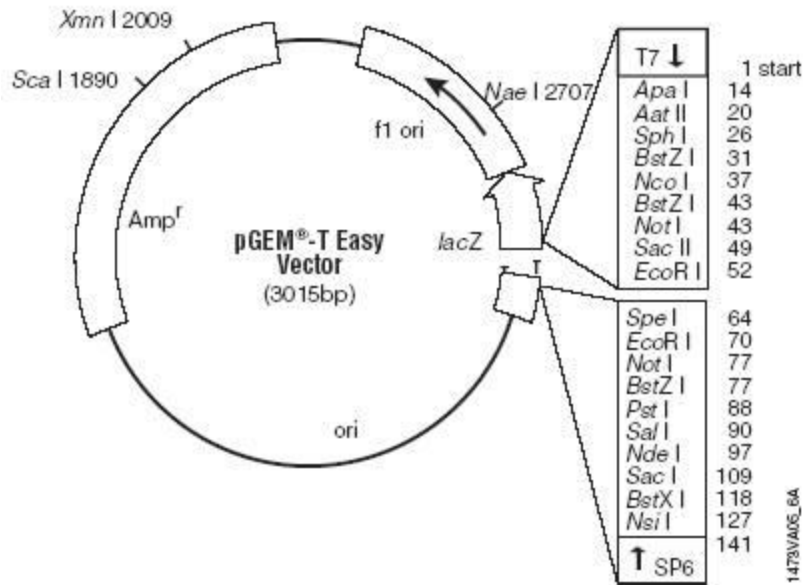


BglI	DraI
1568	1975
1118	692

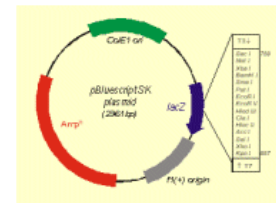
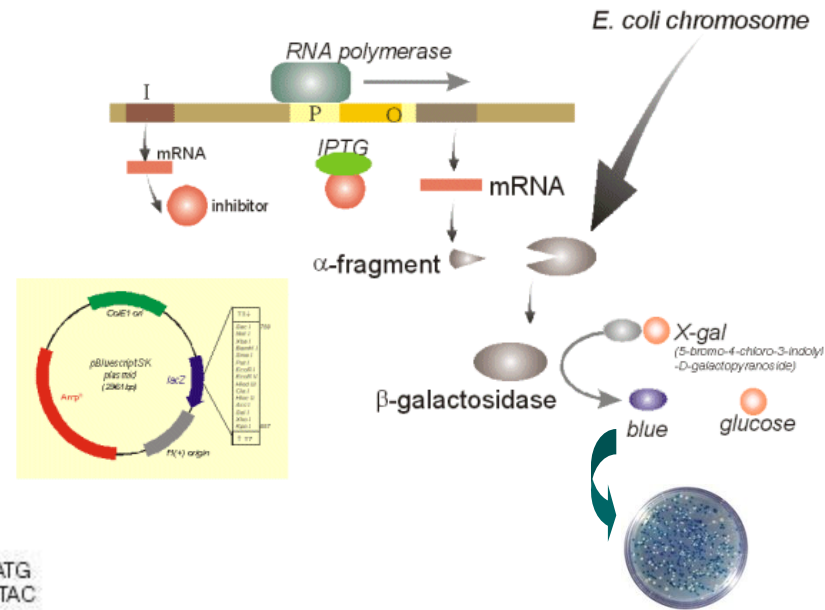
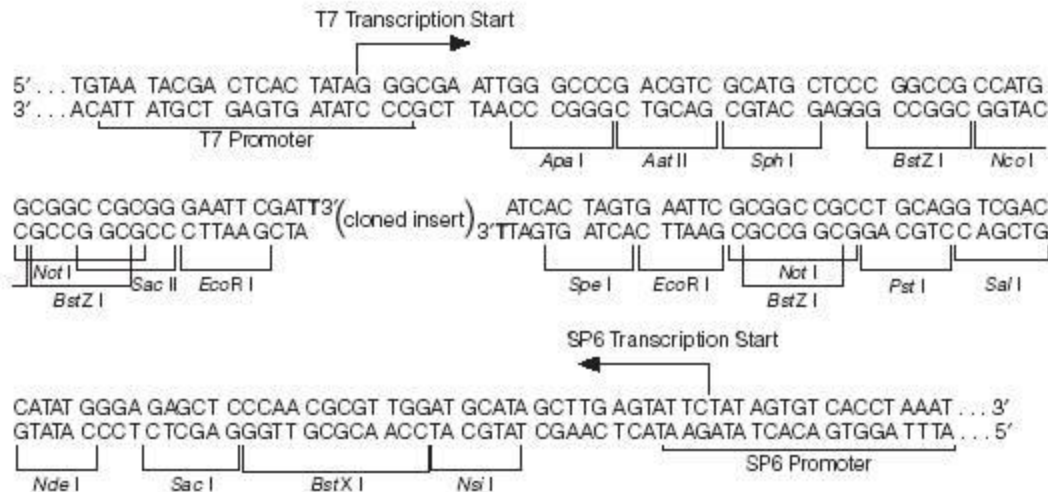
For local research purposes only

اهدای دکتر روحوند





pGEM[®]-T Easy Vector

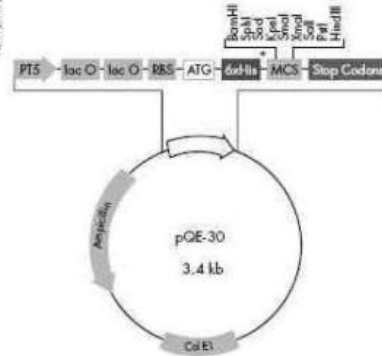


1473VA06_6A

pQE-30 Vector

Positions of elements in bases

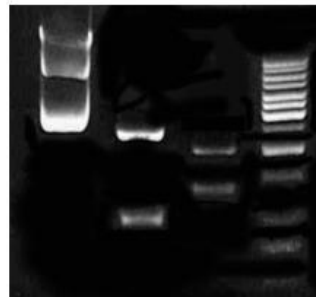
Vector size (bp)	3461
Start of numbering at XhoI (CTCGAG)	1-6
T5 promoter/lac operator element	7-87
T5 transcription start	61
6xHis-tag coding sequence	127-144
Multiple cloning site	145-192
Lambda t_0 transcriptional termination region	208-302
rrnB T1 transcriptional termination region	1064-1162
ColE1 origin of replication	1638
β -lactamase coding sequence	3256-2396



pQE-30, a T5 promoter-based *E. coli* expression vector, enables His-Tag fusion at the N-terminus.

For local research purposes only

اهدای دکتر روحوند



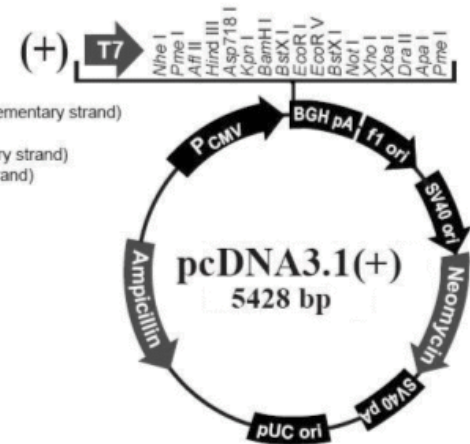
<i>Bgl</i> I	<i>Nde</i> I
+	+
<i>Pst</i> I	<i>Xho</i> I
2406	2063
1055	1398

pcDNA3.1(+)

Comments for pcDNA3.1 (+)

5428 nucleotides

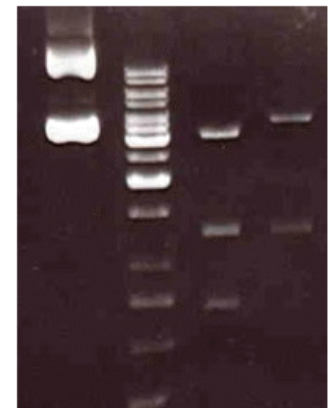
- CMV promoter: bases 232-819
- T7 promoter/priming site: bases 863-882
- Multiple cloning site: bases 895-1010
- pcDNA3.1/BGH reverse priming site: bases 1022-1039
- BGH polyadenylation sequence: bases 1028-1252
- f1 origin: bases 1298-1726
- SV40 early promoter and origin: bases 1731-2074
- Neomycin resistance gene (ORF): bases 2136-2930
- SV40 early polyadenylation signal: bases 3104-3234
- pUC origin: bases 3617-4287 (complementary strand)
- Ampicillin resistance gene (*bla*): bases 4432-5428 (complementary strand)
- ORF: bases 4432-5292 (complementary strand)
- Ribosome binding site: bases 5300-5304 (complementary strand)
- bla* promoter (P3): bases 5327-5333 (complementary strand)



pcDNA3.1 (+), a mammalian expression vector derived from pcDNA3, contains CMV promoter and neomycin resistance coding gene and allows high-level stable and transient expression in mammalian cells.

For local research purposes only

اهدای دکتر روحوند



<i>Nco</i> I	<i>Pst</i> I
3342	4072
1351	1356
735	

표 3-1. 유전자 클로닝 벡터의 예

AdV, 아데노바이러스	만들기가 쉽다; 커다란 크기의 DNA를 넣을 수 있다; 바이러스 자체 유전자를 제거하면 면역반응을 거의 일으키지 않는다; 숙주 세포의 유전체 안으로 들어가지 않아, 제한된 시간만 이식된 유전자가 발현된다.
AAV, 아데노 연관 바이러스	단순헤르페스 바이러스나 아데노바이러스의 동반 감염 없이도 복제되지 않는다; 숙주세포의 유전체로 삽입된다. 작은 크기의 DNA만 받아들일 수 있다(4.5kb).
HSV, 단순헤르페스 바이러스	중추신경계 세포를 핵산전달감염시킬 경우 특히 좋다; 숙주세포 유전체 안으로 삽입되지 않는다.
리포솜 - DNA를 갖고 있는 지질 조각	많은 양을 만들기에 쉽다; 면역반응을 유발하지 않는다; 숙주세포 유전체로 쉽게 삽입되지 않는다.