

3 주차

Molecular and
Biological Chemistry 2

Frame

Reading frame

GUCAUGUUUAGCGCAAUCAGGAAGUGU
Val Met Phe Ser Ala Ile Arg Lys Cys

GUCAUGUUUAGCGCAAUCAGGAAGUGU
Ser Cys Leu Ala Gln Ser Gly Ser

GUCAUGUUUAGCGCAAUCAGGAAGUGU
His Val Stop Arg Asn Gln Glu Val

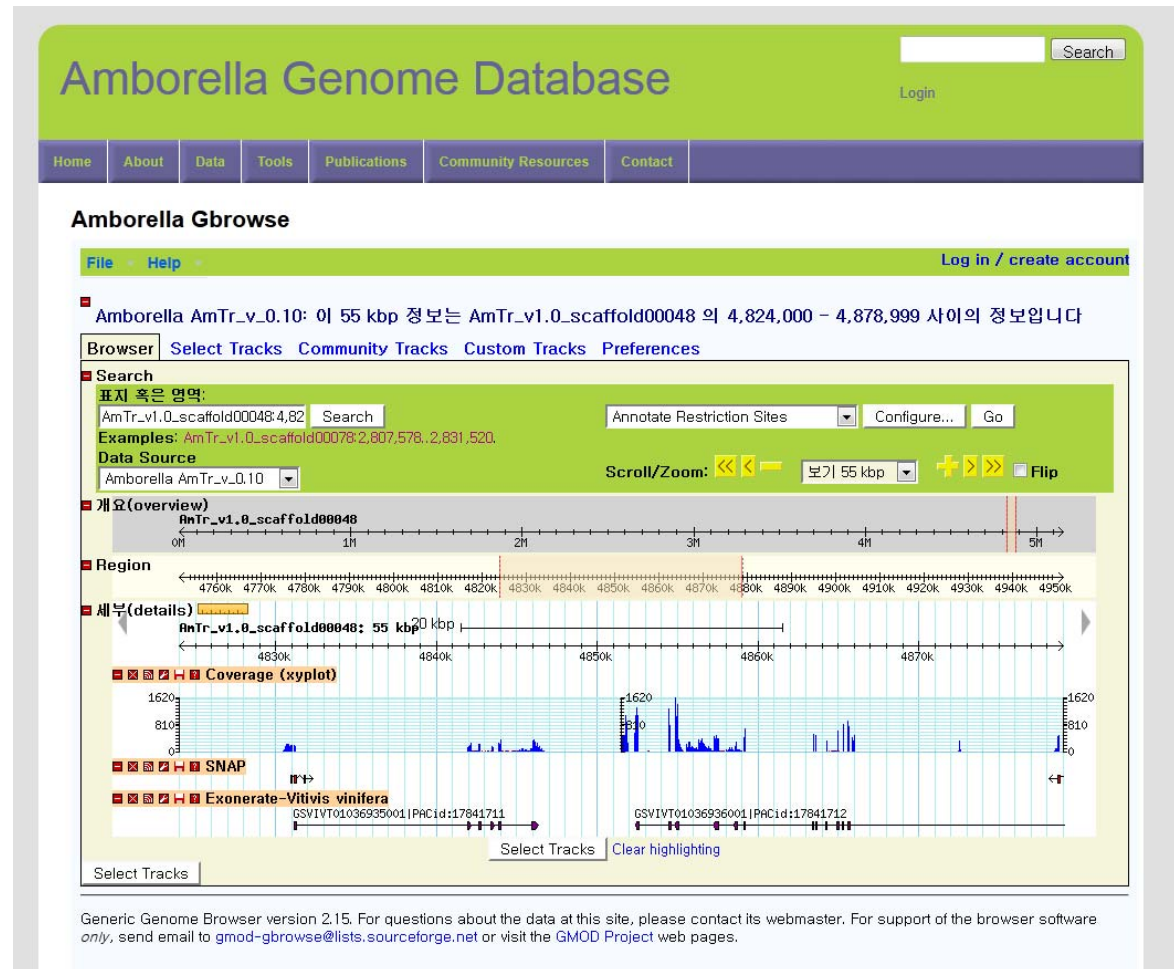
Frame

+3				1	2	3	1	2	3	1	2	3										
+2					1	2	3	1	2	3	1	2	3									
+1								1	2	3	1	2	3	1	2	3						
-1											3	2	1	3	2	1	3	2	1			
-2														3	2	1	3	2	1			
-3																	3	2	1	3	2	1

- DNA는 세 개의 염기가 하나의 amino acid를 지정하는 정보를 갖고 있으며 a몇 번째 염기 부터 시작하여 세 개의 단위로 정보를 해석할 지에 따라서 같은 염기서열이라도 매우 틀린 결과를 나타낸다.
- 하나의 염기서열에는 기본적으로 정보의 해석을 위한 여섯 개의 다른 frame이 존재한다.
- 모든 진핵생물은 + strand의 하나의 frame만을 이용하여 정보를 저장한다.
- 원핵생물은 - strand에도 정보를 갖고 있지만 +strand와 서로 겹치지 않음
- Virus는 +, - 모두를 사용하며, 사용구역이 겹치기도 하고, 다른 frame을 사용하기도 함.

Amborella (eukaryotes) uses only + strand of nuclear genome without overlapping!

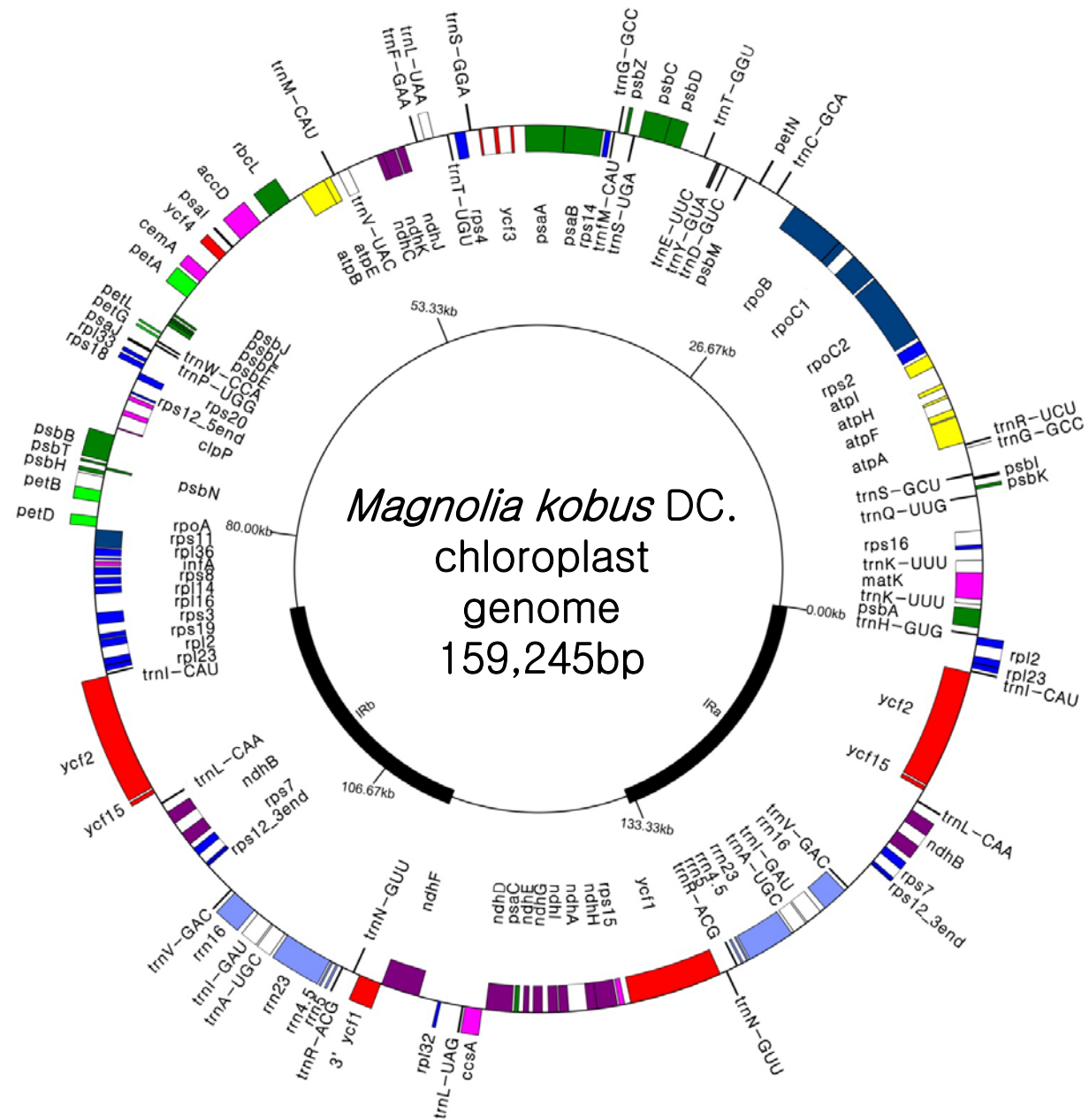
<http://amborella.org>



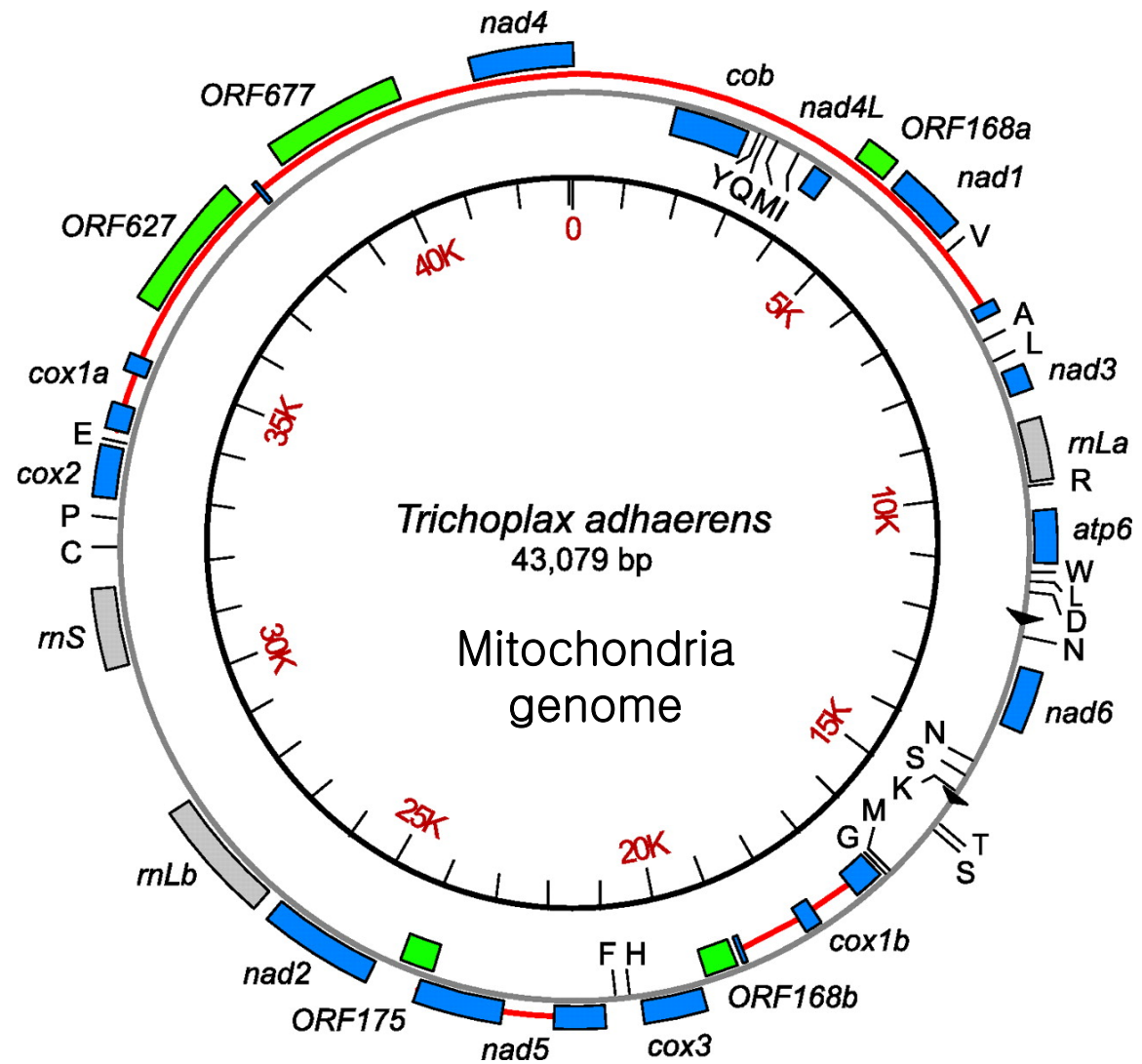
- Amborella는 약 0.75 G 정도의 유전체를 갖고 있는데, 약 96%에 해당하는 염기서열이 모두 밝혀져서 보고되어 있다. 이 정보는 amborella.org에 정리되어 공개되어 있는데, Gbrowse를 이용하여 genome 서열에서 각각의 유전자들의 위치와 방향을 살펴보면 + strand 에만 유전자들이 배열하며, 유전자들의 염기서열은 서로 겹치지 않는다.

Magnolia uses + and – strands of chloroplast genome without overlapping

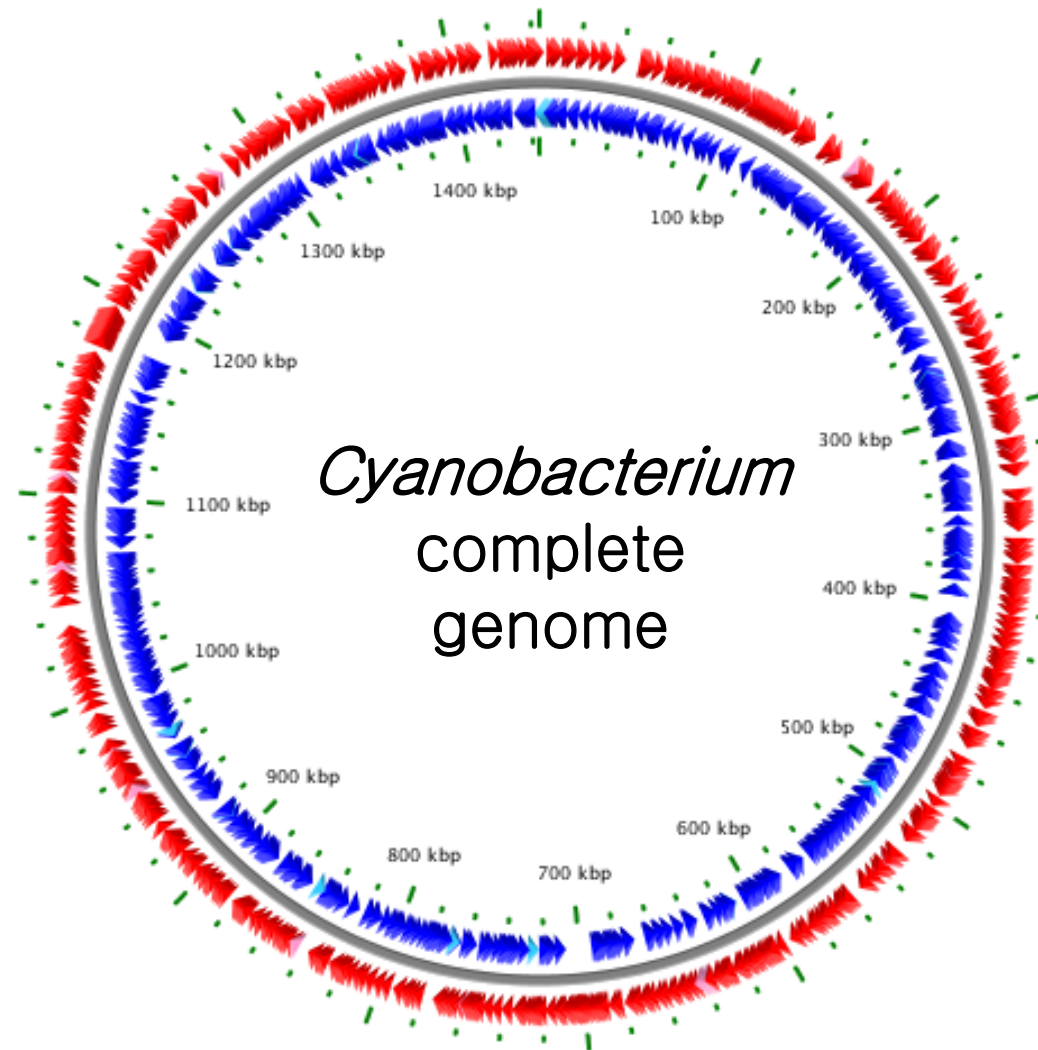
- 이에 반해 내공생을 하는 세포내 기관인 엽록체와 미토콘드리아는 원핵생물과 같은 성질을 갖고 있어 + strand 와 - strand를 모두 사용하지만 이들의 구역은 서로 겹치지 않는다.



Trichoplax (섬모충의 일종) uses + and - strands of mitochondria genome without overlapping.



Cyanobacterium also uses both strands without overlapping



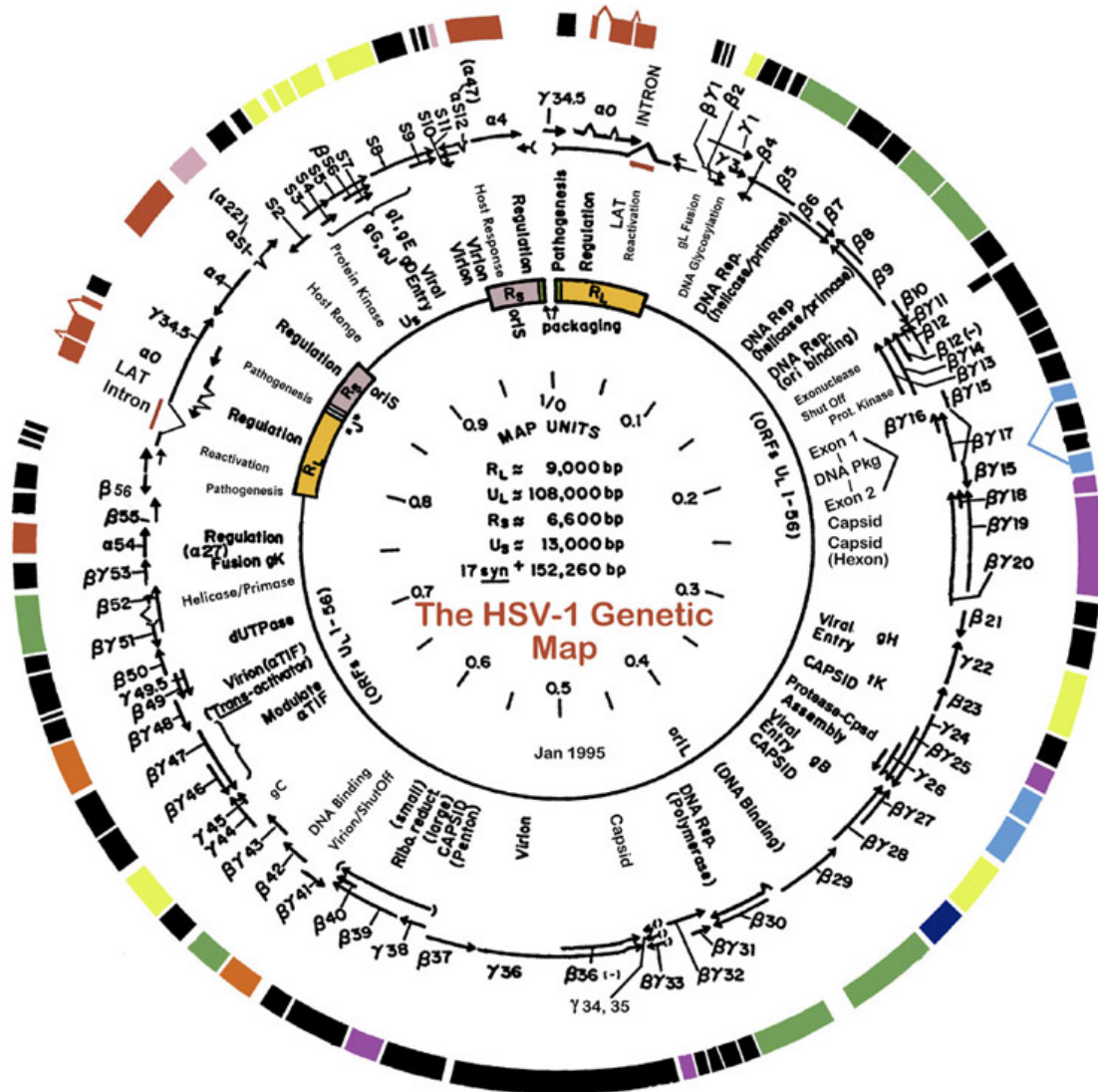
Accession: NC_013771

Topology: circular; Length: 1,443,806 bp; Genes: 1,241

DNA virus uses both strands and multiple frames!!!

Herpes simplex virus

- Virus는 생물체를 숙주로 살고 있고, 숙주에 감염을 위해 이동하여야 함으로 virus가 운반할 수 있는 매우 적은 수의 염기서열을 효율적으로 사용한다. 즉 +, - strand들을 모두 사용할 뿐만 아니라 유전자들이 겹치며 여러 frame을 사용한다.



Frame shift mutation

Ethidiumbromide (EtBr): reagent used for DNA detection. It causes frame shift mutation (carcinogen)!

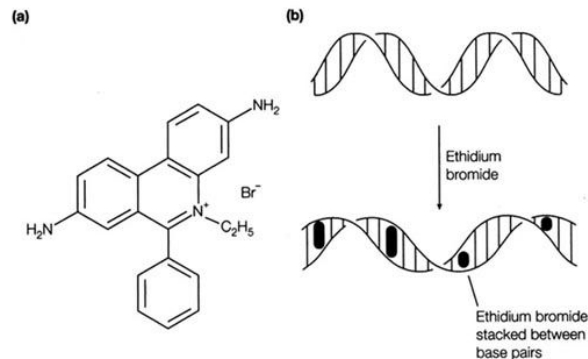
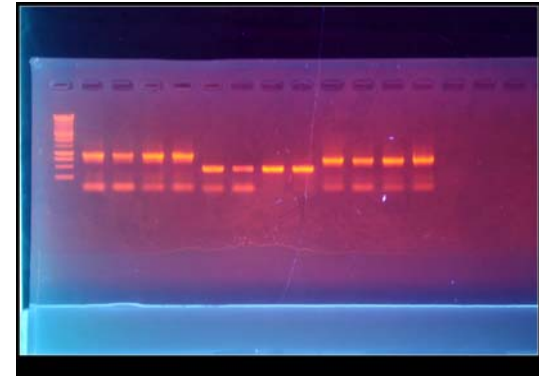


Fig. 3. (a) Ethidium bromide; (b) the process of intercalation, illustrating the lengthening and untwisting of the DNA helix.

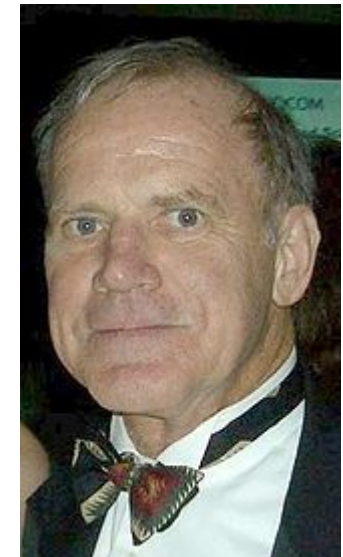


- EtBr은 DNA를 연구하는 대부분의 실험실에서 DNA 검출을 위해 사용하는 물질이다. 그 구조에서 나타나는 세 개의 벤젠고리의 형태는 purine과 pyrimidine 염기가 결합한 크기와 모양이 비슷하여 DNA 나선구조에서 염기상과 염기쌍 사이에 잘 삽입된다. EtBr은 UV를 비추면 발광하는 성질을 가져 이를 이용하여 간접적으로 DNA의 존재를 확인하는데 사용된다.
- EtBr이 삽입된 상태에서 DNA replication이 일어나면 삽입된 EtBr을 하나의 염기로 잘못 인식하는 경우가 생겨 frame shift mutation을 일으킨다. 대부분의 frameshift mutation은 유전자에 포함된 정보를 망가뜨려 mutation이 일어난 이후 codon에서 곧 종결코돈을 생성하여 해당 유전자를 발현하지 못하게 되는 것이 대부분이다.
- 그러므로 frameshift mutation은 매우 해로운 것이며 종종 carcinogen (발암물질)으로 작용하기도 한다.

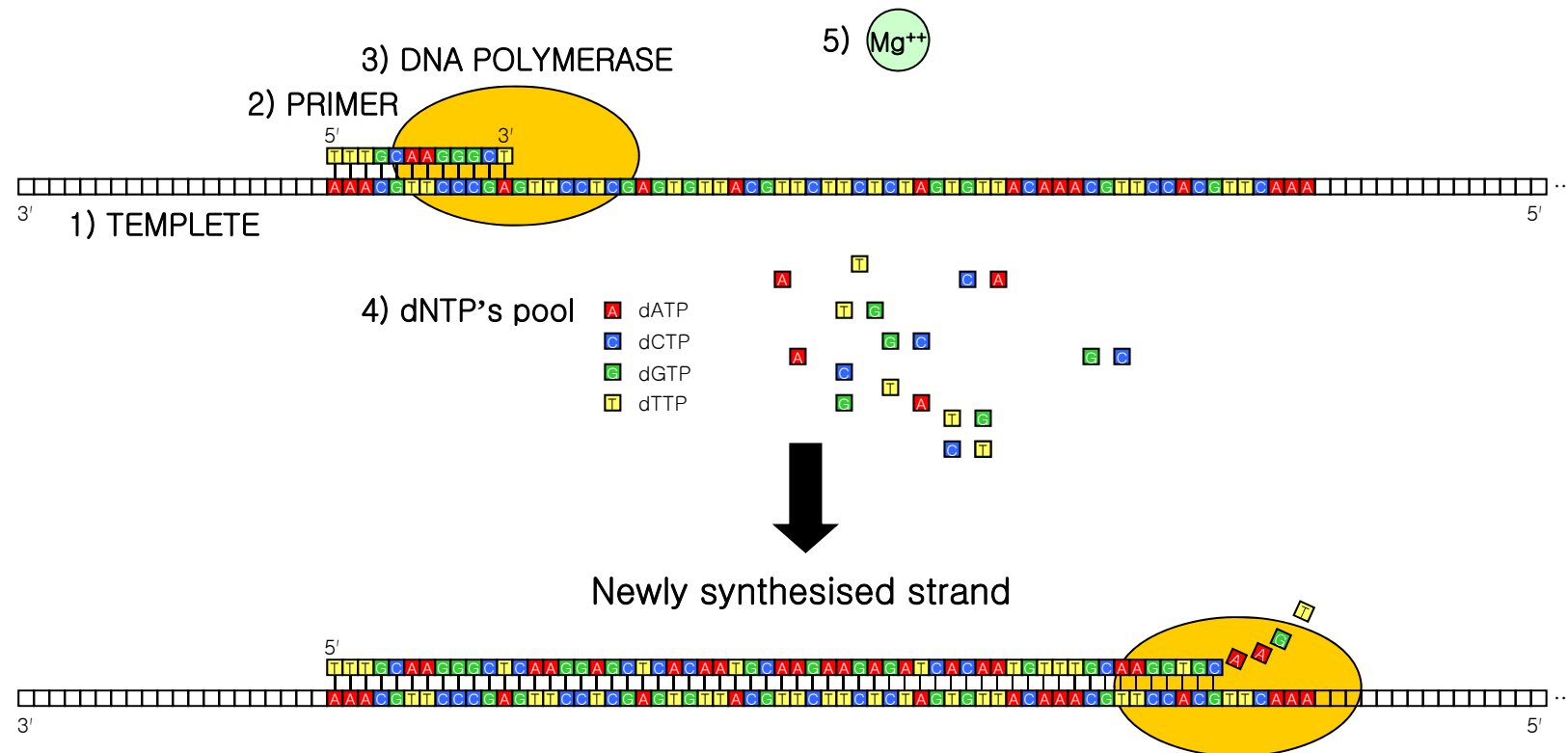
PCR

Polymerase Chain Reaction (PCR)

- A technique for the *in vitro* amplification of specific DNA sequences by the simultaneous primer extension of complementary strands of DNA ($>10^5$).
 - PCR method was devised and named by Mullis and colleagues at the Cetus Corporation (Mullis and Faloona, 1987)
 - The principle had been described in detail by Khorana et al. (Kleppe et al., 1971) over a decade earlier.
 - Kary Mullis received the Nobel prize (1993).
-
- PCR의 개발에 의해 분자생물학은 혁명적인 진보가 이루어 진다.
 - PCR은 DNA의 특정부위를 증폭해 내는 기술이다. Primer 결합, DNA 합성, single strand로의 분리를 반복하여 DNA 염기서열의 수를 기하급수적으로 늘려 나간다.
 - 최초의 개념은 Khorana에 의해 1971년 제시되었지만 내열성이 강한 Taq. Polymerase의 개발에 의해 Cetus 사의 Kary Mullis에 의해 개선되었다.
 - 이로서 Kary Mullis는 1993년 노벨상을 받게 된다.

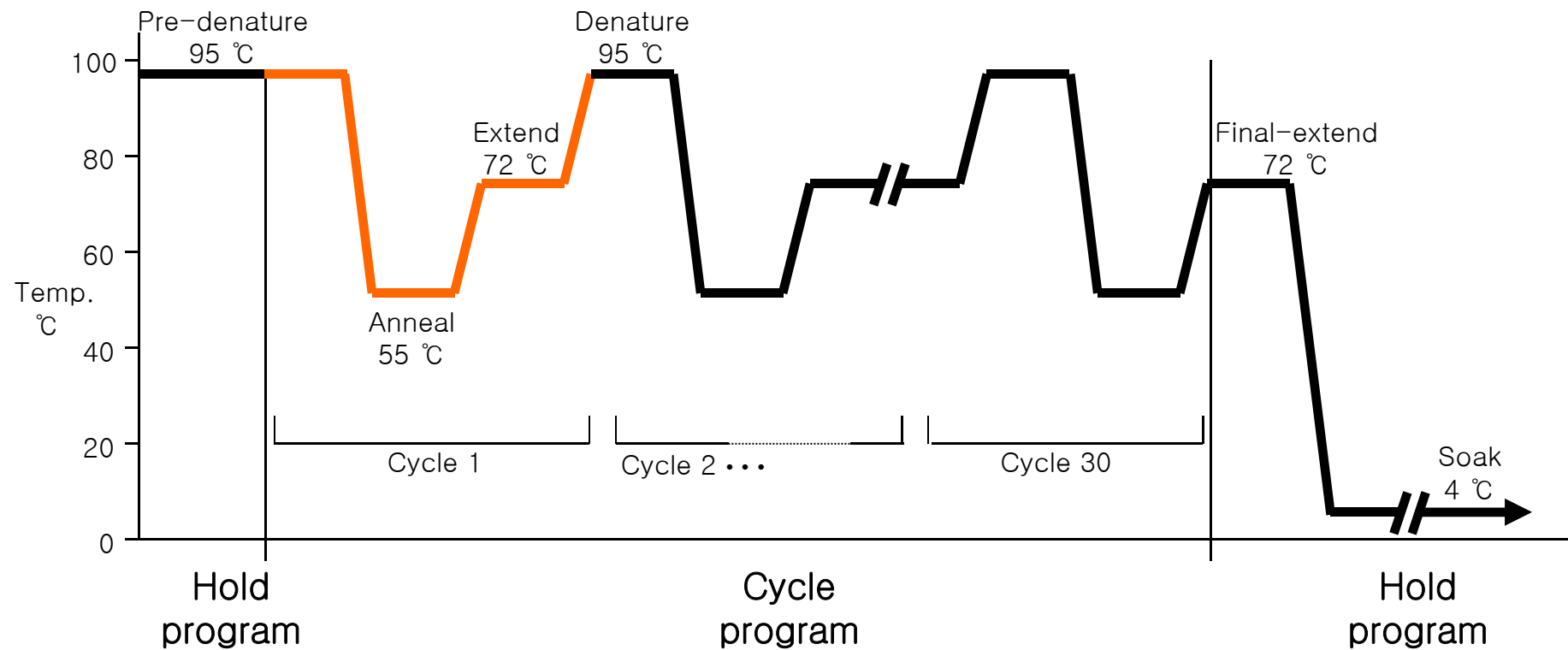


DNA polymerization: DNA polymerase extends a primer by using a complementary strand as a template.

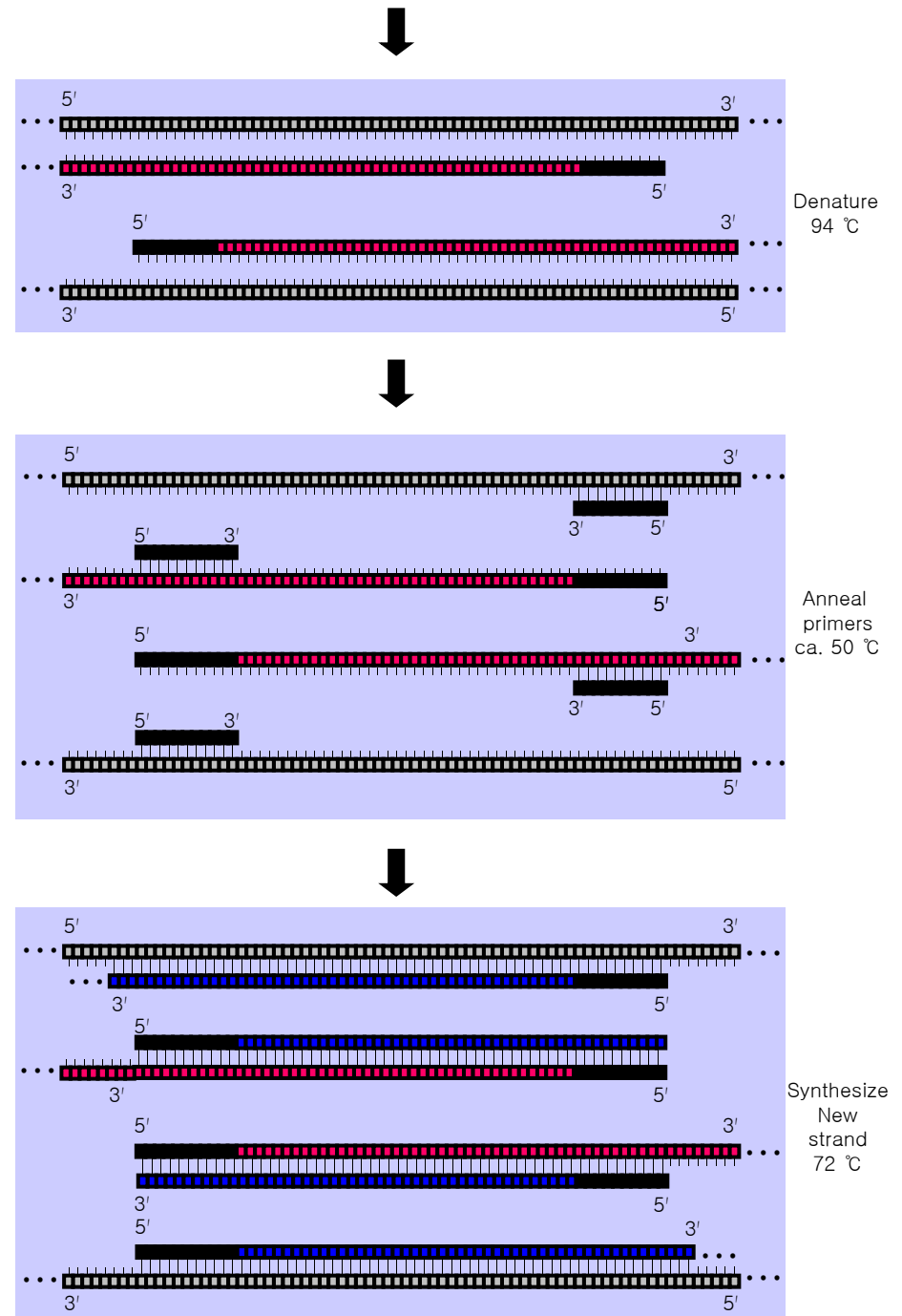
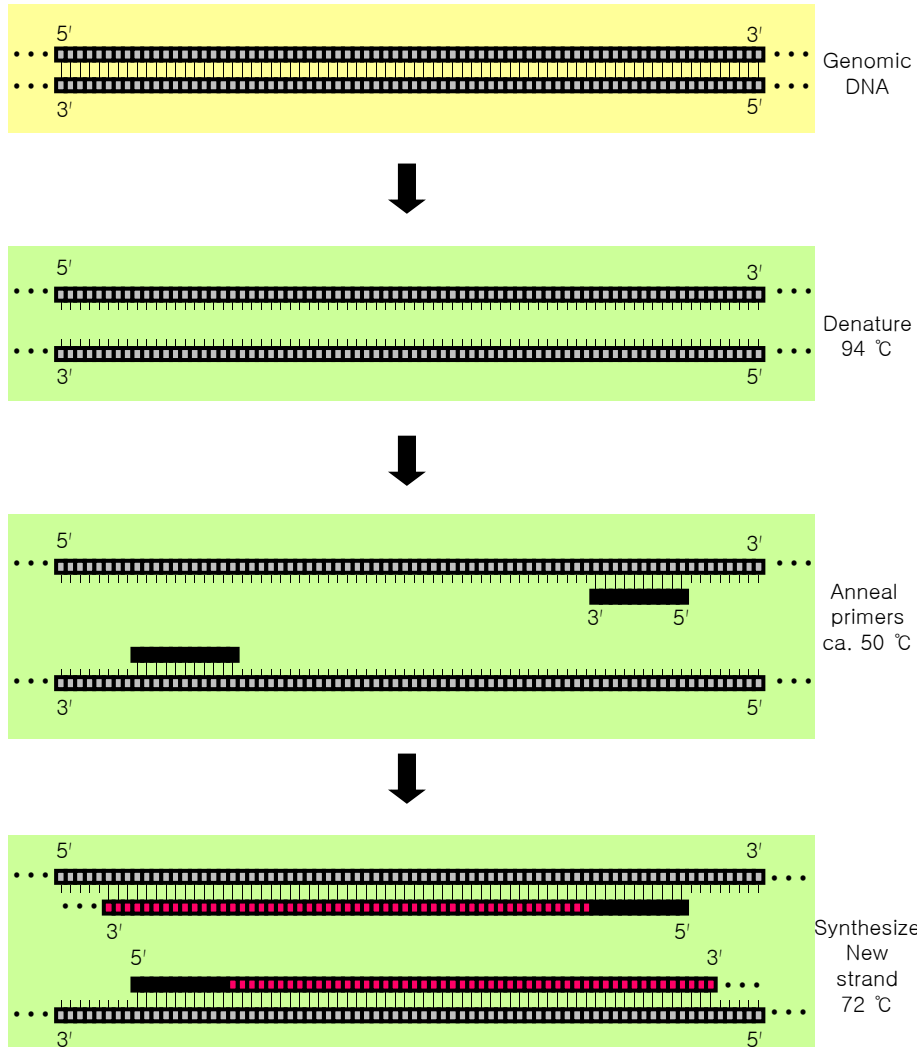


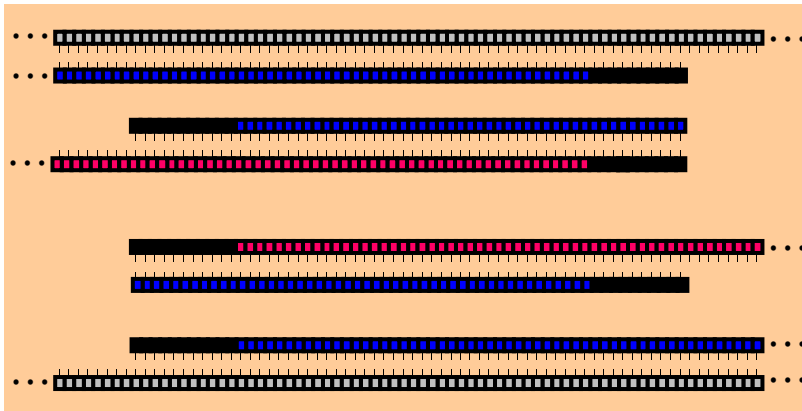
- PCR의 원리를 이해하기 전에 DNA 일반적인 DNA polymerization을 먼저 이해하여야 한다.
- 이중나선이 풀어진 single strand 는 DNA polymerization을 위한 주형이 된다. 18bp 정도의 primer가 DNA의 특정부위에 붙어 double strand를 형성하면 DNA polymerase가 이를 인식하여 붙게 된다. 반응이 일어나는 solution에는 dNTP로 불리는 일정농도 이상의 dATP, dCTP, dGTP, dTTP의 pool이 존재하여야 하고, coenzyme으로서 Ma⁺⁺ 이온이 필요하다.
- 이렇게 다섯 요소가 모두 갖춰 졌을 때 DNA polymerization이 일어나게 된다.

An example of a PCR method

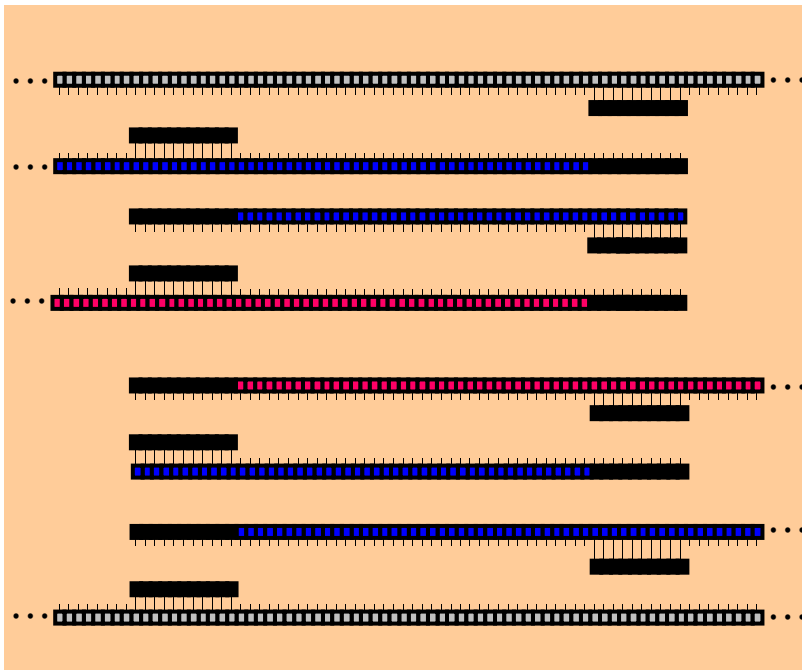


Schematic diagram of PCR

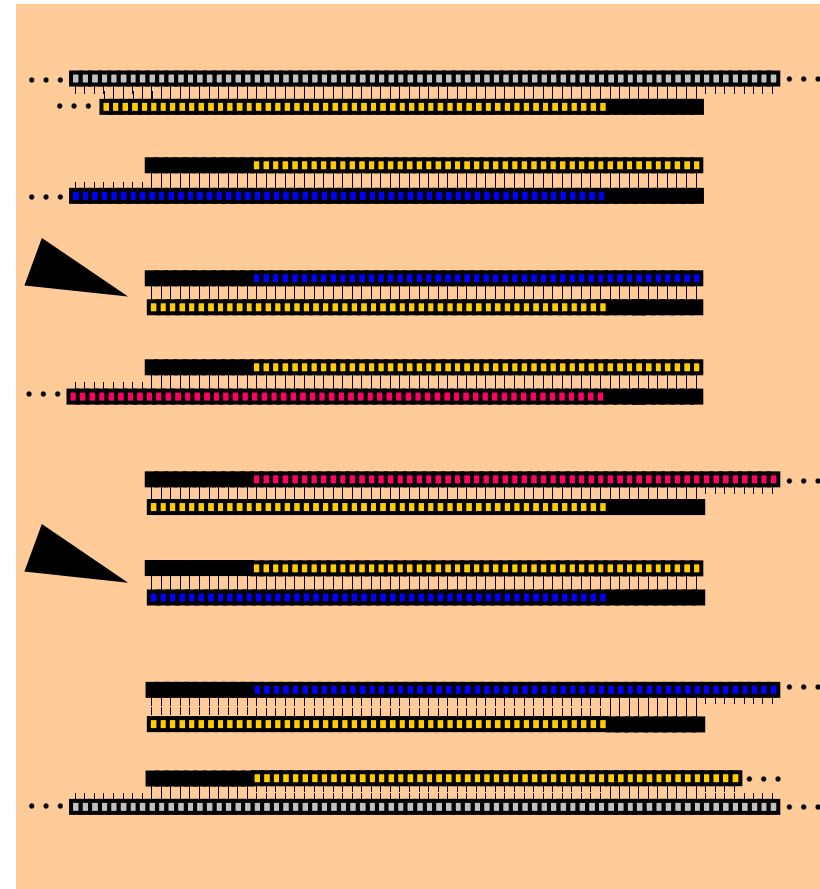




Denature
94 °C



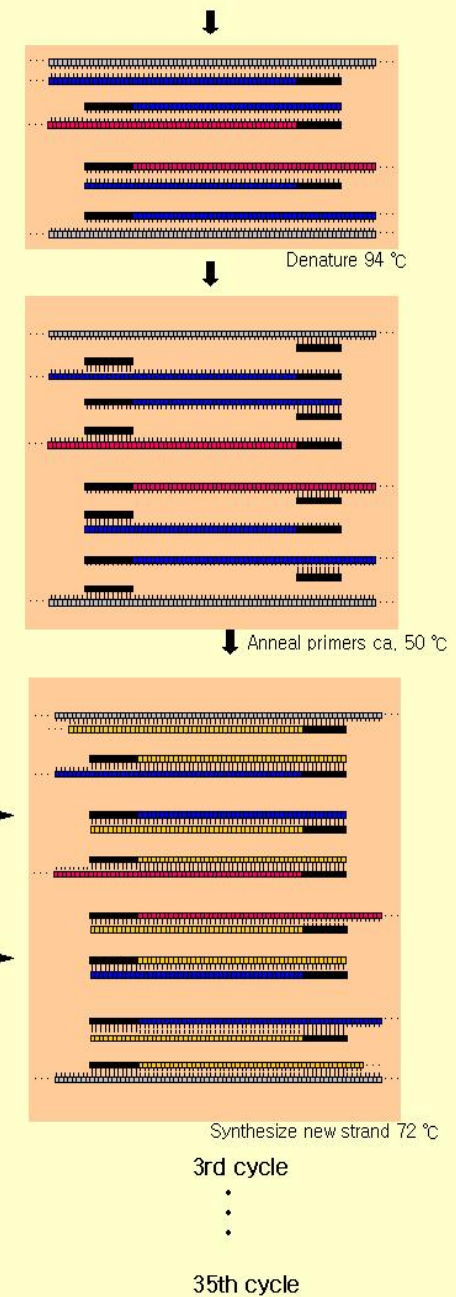
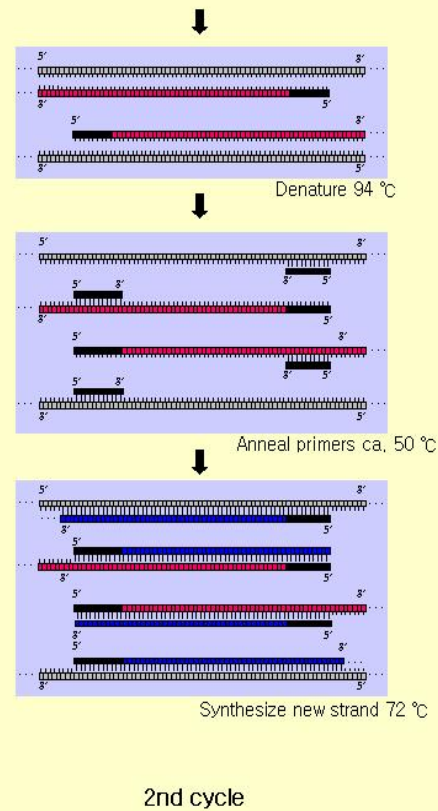
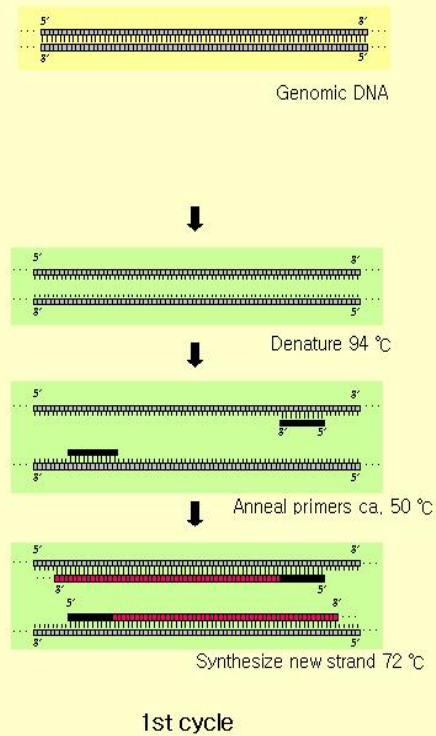
Anneal
primers
ca. 50 °C



Synthesize
New
strand
72 °C



Schematic diagram of PCR



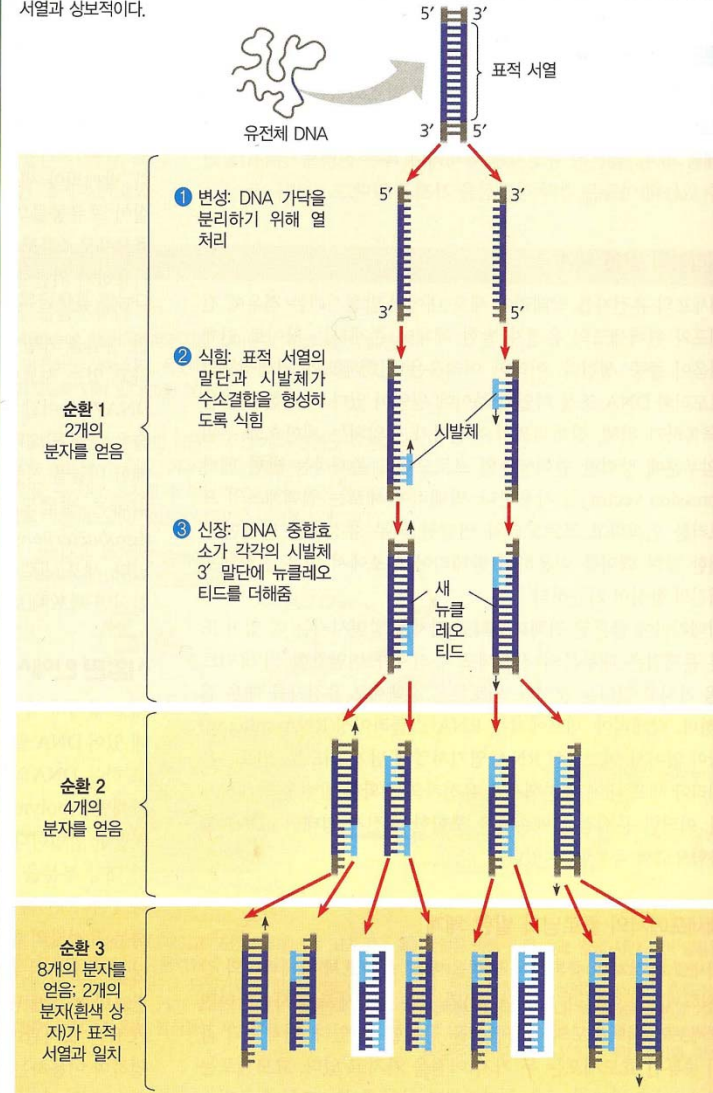
● PCR-3D model.mp4

그림 20.8 연구 방법

중합효소연쇄반응(PCR)

적용 PCR을 사용하여 DNA 샘플 내의 특정한 부분(표적 서열)을 생체 밖에서 완벽하게 여러 번 복제할 수 있다.

방법 PCR의 시작물질에는 복제되는 표적 염기서열을 포함하는 두 가닥의 DNA, 열 저항성 DNA 중합효소, 네 가지 뉴클레오타이드, 그리고 시발체로 사용되는 두 개의 짧은 단일가닥의 DNA 분자가 존재한다. 하나의 시발체는 대상 서열의 한쪽 말단의 하나의 가닥과 상보적이다. 다른 하나는 다른 가닥의 말단 서열과 상보적이다.



결과 세 번째 순환의 끝에서 1/4의 분자가(흰색 상자를 보라) 정확히 표적 서열과 일치한다. 30번째 순환반응 후에는, 99.99% 분자들이 표적 서열분자와 일치한다.

심해 열수구 (hydrothermal vents)



- Polymerase 는 생물체 안에 있는 효소기 때문에 이 효소가 활동할 수 있는 적정 온도가 있다. 일정 온도 이상이 되면 이 효소는 불활성화 된다. PCR을 위해서 DNA를 denaturation 시키려면 95도 정도의 높은 온도처리가 필요한데, 이때 일반적인 DNA polymerase는 모두 불활성화 되어 버린다.
- Taq. Polymerase가 개발되기 이전에 PCR을 위해서는 매 cycle 마다 DNA polymerase를 새로 넣어주면서 매우 비효율적인 방법으로 PCR을 수행하였다.
- 이를 보완하기 위한 혁신적인 발견이 바로 심해 열수구에 사는 박테리아이다.

Taq. DNA Polymerase:

- Most commonly used DNA polymerase for PCR
Isolated from *Thermus aquaticus*
Heat stable polymerase
- PCR technique put to practical use by finding of *Taq.*
- The use of a heat stable enzyme has two major advantages:
 - 1) replenishment after each heating step is not required, thus simplifying the process
 - 2) the enzyme is active at high temperatures, where annealing of the oligonucleotide primers is more specific and DNA synthesis more rapid.
- 호열성 박테리아는 거의 100도에 가까운 물에서도 잘 생존하므로 이들이 갖고 있는 DNA polymerase 또한 매우 열에 강할 것이다. 이를 이용하여 PCR과정을 혁신적으로 개선하였다.
- 최초로 발견되어 이용된 호열성 균주의 이름은 *Thermus aquaticus* 이며 여기에서 추출한 polymerase를 Taq. Polymerase라고 하고 이는 현재까지도 가장 많이 PCR에 활용되는 열에 강한 DNA 중합효소이다.
- Taq. Polymerase를 PCR에 이용하면 1) 각각의 PCR cycle 마다 polymerase를 새로 넣어줄 필요가 없고, 2) primer의 결합 또한 높은 온도에서 할 수 있어서 특정 DNA 구간을 정확히 증폭할 수 있게 되었다.

Reaction components

1) Thermophilic DNA polymerases

- *Thermus aquaticus* (Taq) 
- *Thermus thermophilus* (Tth)
- *Bacillus stearothermophilus* (Bst)
- *Pyrococcus furiosus* (Pfu)

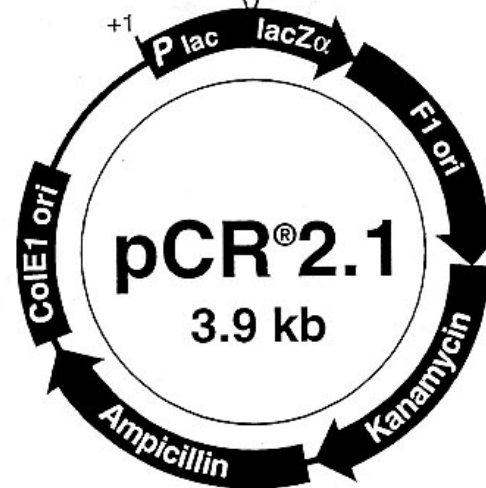
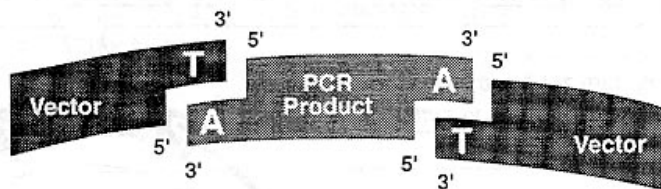
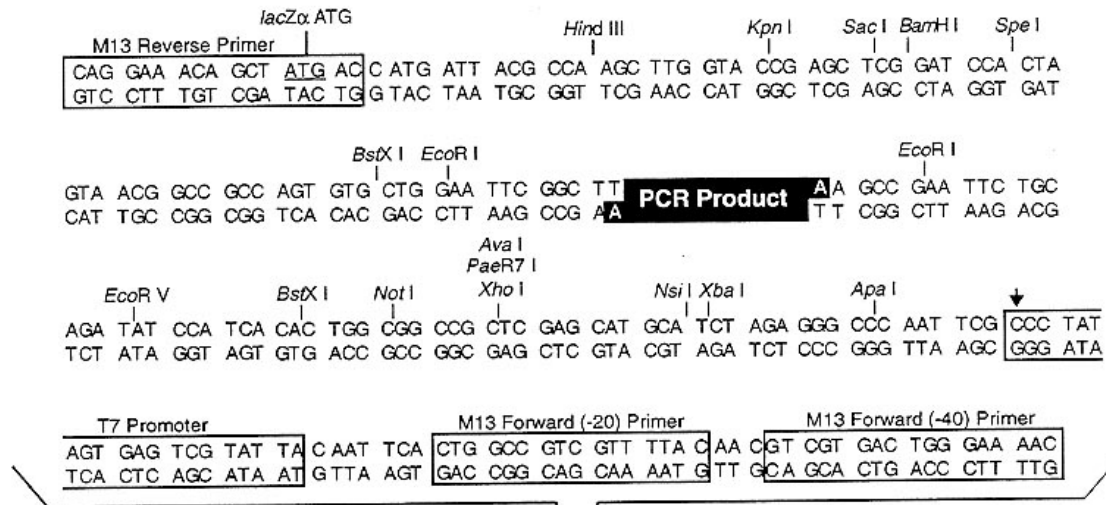
- Taq. Polymerase의 개발 이후 많은 다른 호열성 균주로부터 polymerase를 개발하여 PCR에 활용하고 있다. 특히 Pfu는 Taq. 보다 효율이 좋고 정확하여 더 고급의 PCR 실험에 적합하다.
- 최초로 개발된 Taq. Polymerase는 polymerization을 할 때 특수한 형태의 error를 유발한다. 즉 한 구간을 증폭하면 증폭하여 만들어낸 double strand DNA의 양쪽 3' end에 항상 하나의 adenine nucleotide를 첨가한다. 이는 주형의 DNA와는 일치하지 않는 서열인 셈이다.
- 하지만 Taq. Polymerase의 이러한 특징은 3' end가 “T”로 돌출된 vector와의 결합을 쉽게하여 cloning 기술에 적용되고 있다(TA cloning).

참고: cloning이란 똑같은 상태의 것을 많이 만들어낸다는 의미이고, 염기서열의 cloning을 위해서는 우선적으로 단 한가닥의 염기서열을 골라내어 이를 증폭하여야 한다. 그러므로 한가닥의 DNA를 하나의 vector에 결합시켜 결합한 한 개의 vector를 한 개의 E.coli에 넣어 E.coli를 배양하고, 배양 후 다시 vector를 분리해 내면 최초의 단 한 개로부터 cloning된 수많은 똑같은 염기서열을 얻을 수 있게 된다.

TA cloning

Map of pCR®2.1

The map of the linearized vector, pCR®2.1, is shown below. The sequence of the multiple cloning site is shown with a PCR product inserted by TA Cloning®. The arrow indicates the start of transcription for the T7 RNA polymerase.



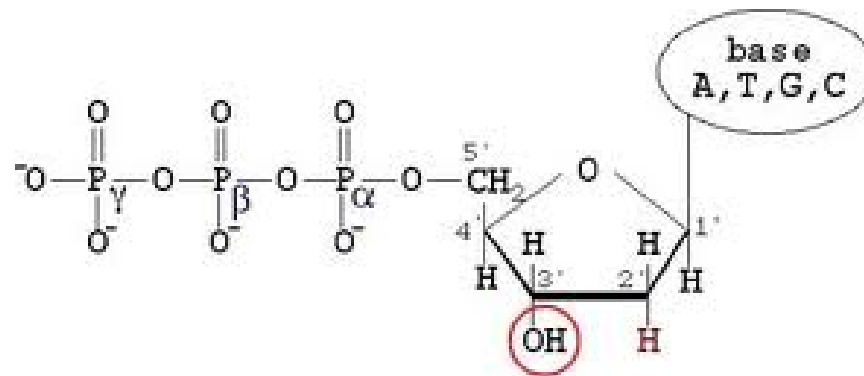
Note: The vector is modified at the unique *EcoR* I site during preparation of pCR®2.1. The inserted PCR product is flanked on **each** side by *EcoR* I sites. The sequence included after page 25 is the sequence for the closed circular (unmodified) pCR®2.1.

continued on next page

Reaction components

2) Deoxynucleotide Triphosphates

- Low dNTP concentrations minimize mispriming at nontarget sites and reduce the likelihood of extending misincorporated nucleotides (Innis et al. 1988)



dNTP

deoxyribonucleotide triphosphate

- PCR을 위해서는 적정농도의 (주로 200mM/uI) dNTP 농도가 필요한데, low concentration의 dNTP는 염기의 잘못된 결합 (error)을 줄여준다.

Reaction components

3) Primers

- Generally, use over 18 nucleotides

- Genome size of higher plants:
 $5 \times 10^8 - 6 \times 10^9$

- Check list for primer design:

- 1) Similar T_m values are recommended for two primers
- 2) Avoid self-complement sequences
- 3) Avoid primer dimer formation
- ...

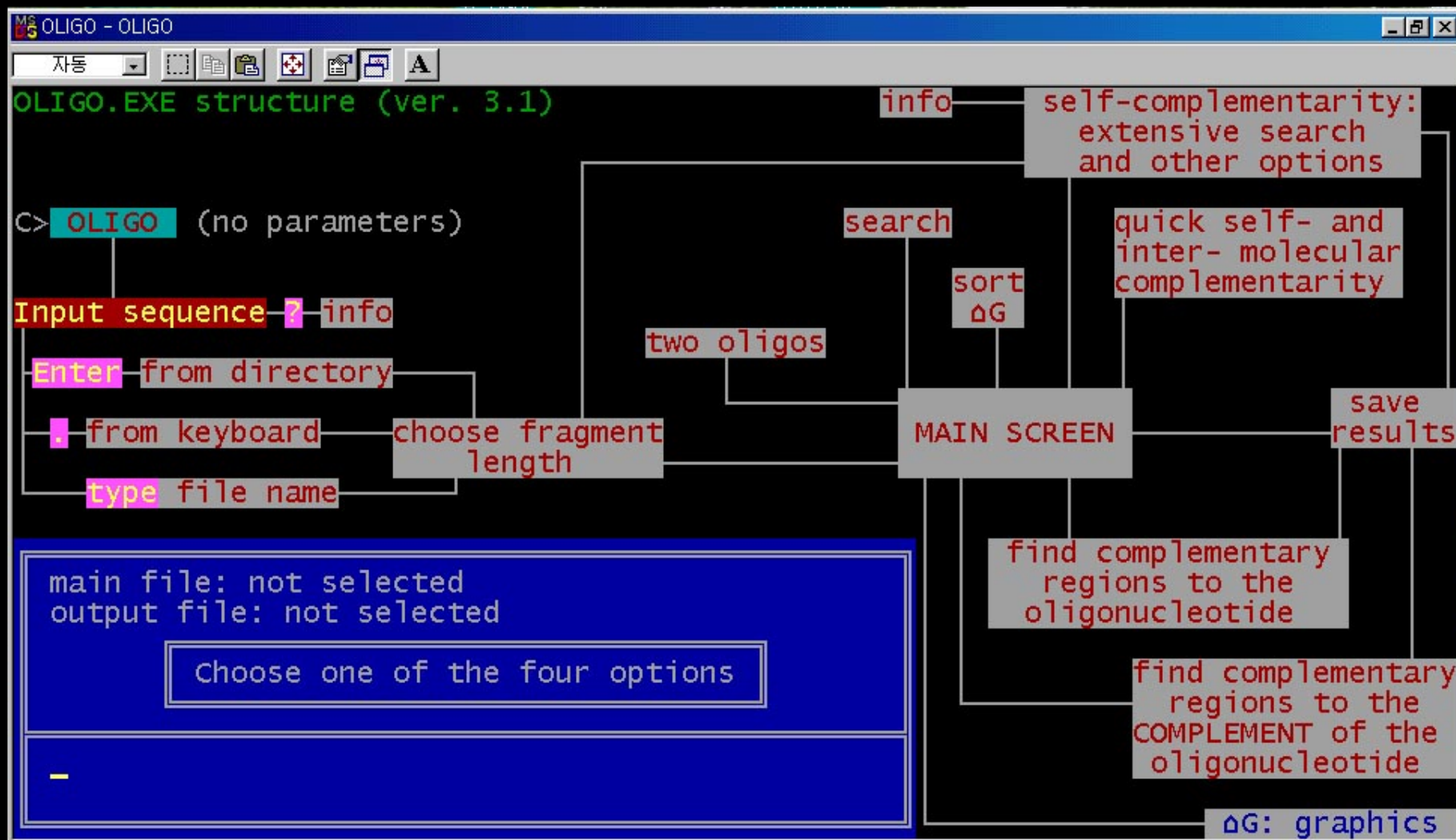
- Primer는 특정 DNA 구간을 증폭하게 해 주는 key component 이다. Primer의 서열과 상보적으로 정확히 일치하는 DNA 주형에 primer가 붙음으로서 정확한 구간을 증폭할 수 있게 해 주는 것이다.
- Primer는 주로 18mer 이상으로 디자인 해서 사용하는데, 그 이유는 생물체 유전체의 크기를 고려하여 18mer 이상의 primer 를 작성하면 이 서열과 똑같은 서열이 genome 상의 다른 곳에 존재할 가능성을 줄여야 하기 때문이다. 만약 어떤 식물의 유전체가 10^9 bp 인데, 12mer의 primer를 작성했다면 증폭을 원하는 DNA 구간 이외에 genome에 추가적으로 이 primer가 붙을 수 있는 동일한 염기서열이 존재할 가능성이 매우 높아지게 되는 것이다.

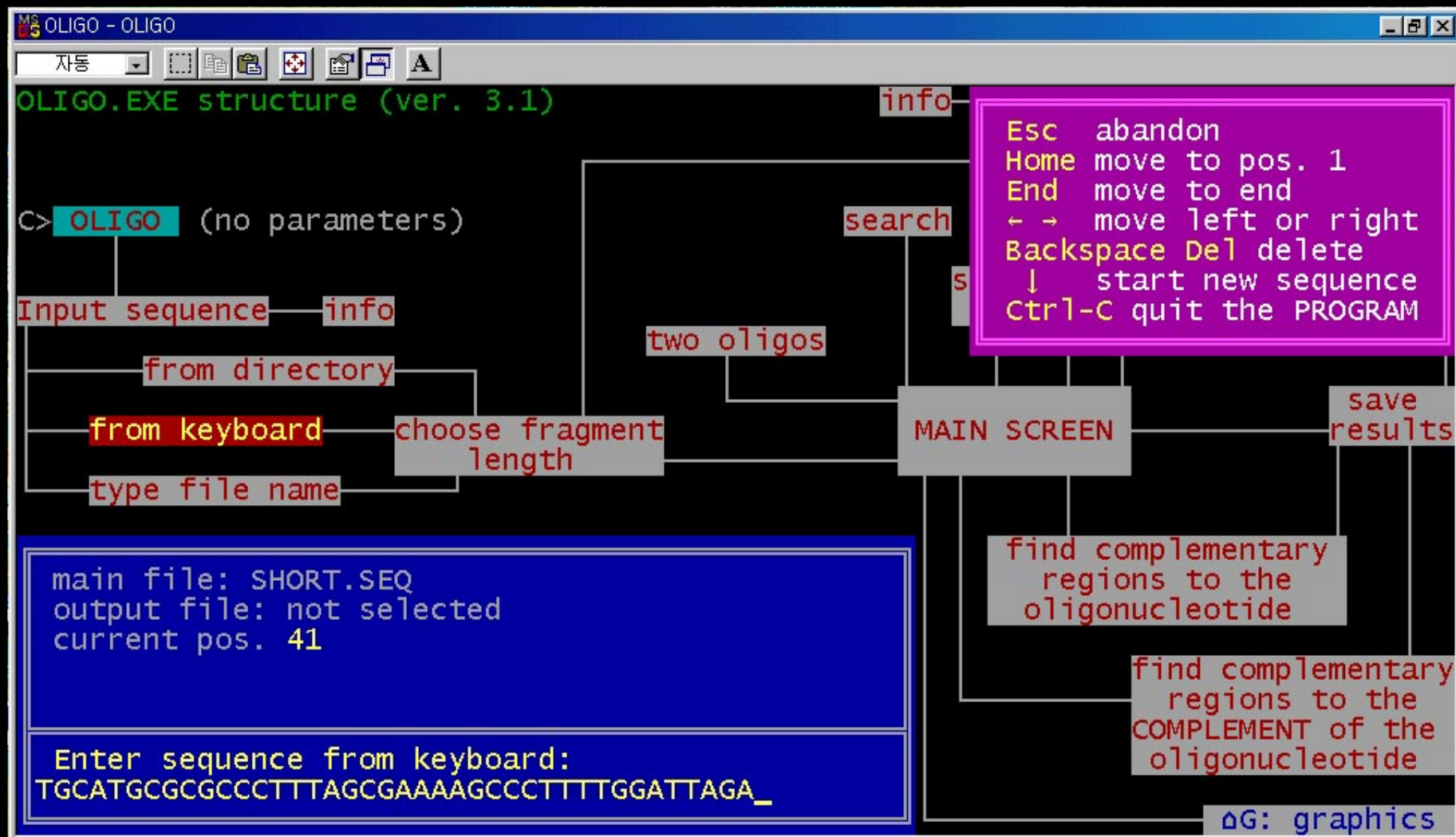
Probability of presence of same nucleotide sequences

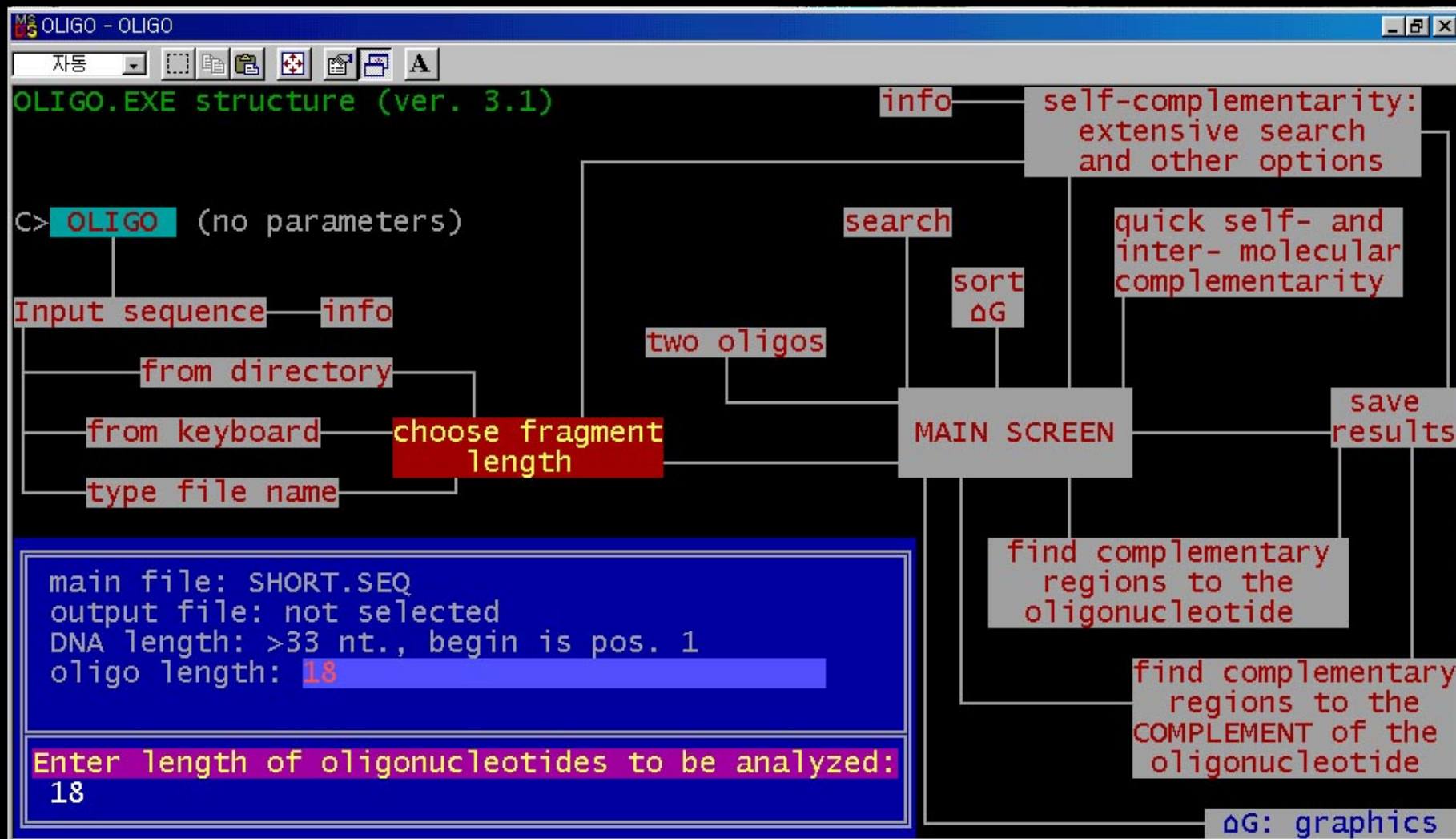
6 mer	$1/4^6 = 1 / 4 \times 10^3$
9 mer	$1/4^9 = 1 / 2.6 \times 10^5$
12 mer	$1/4^{12} = 1 / 1.7 \times 10^7$
15 mer	$1/4^{15} = 1 / 1.1 \times 10^9$
18 mer	$1/4^{18} = 1 / 6.9 \times 10^{10}$
21 mer	$1/4^{21} = 1 / 4.4 \times 10^{12}$

- Primer를 디자인 할 때 중요한 사항들은 다음과 같다.
 - 1) Primer는 18mer 이상으로.
 - 2) PCR에 사용되는 두 primer들의 annealing temp. 를 거의 비슷하게 조정한다.
 - 3) Annealing temp.는 55C~ 68C 정도로.
 - 4) Self-complementary sequence를 되도록이면 피한다.
 - 5) 두 primer의 염기서열이 상보적이어서 dimer 가 형성되는 것을 피한다.
 - 6) 3' end는 triple hydrogen bond를 형성하는 염기로 design 함 (G 또는 C)

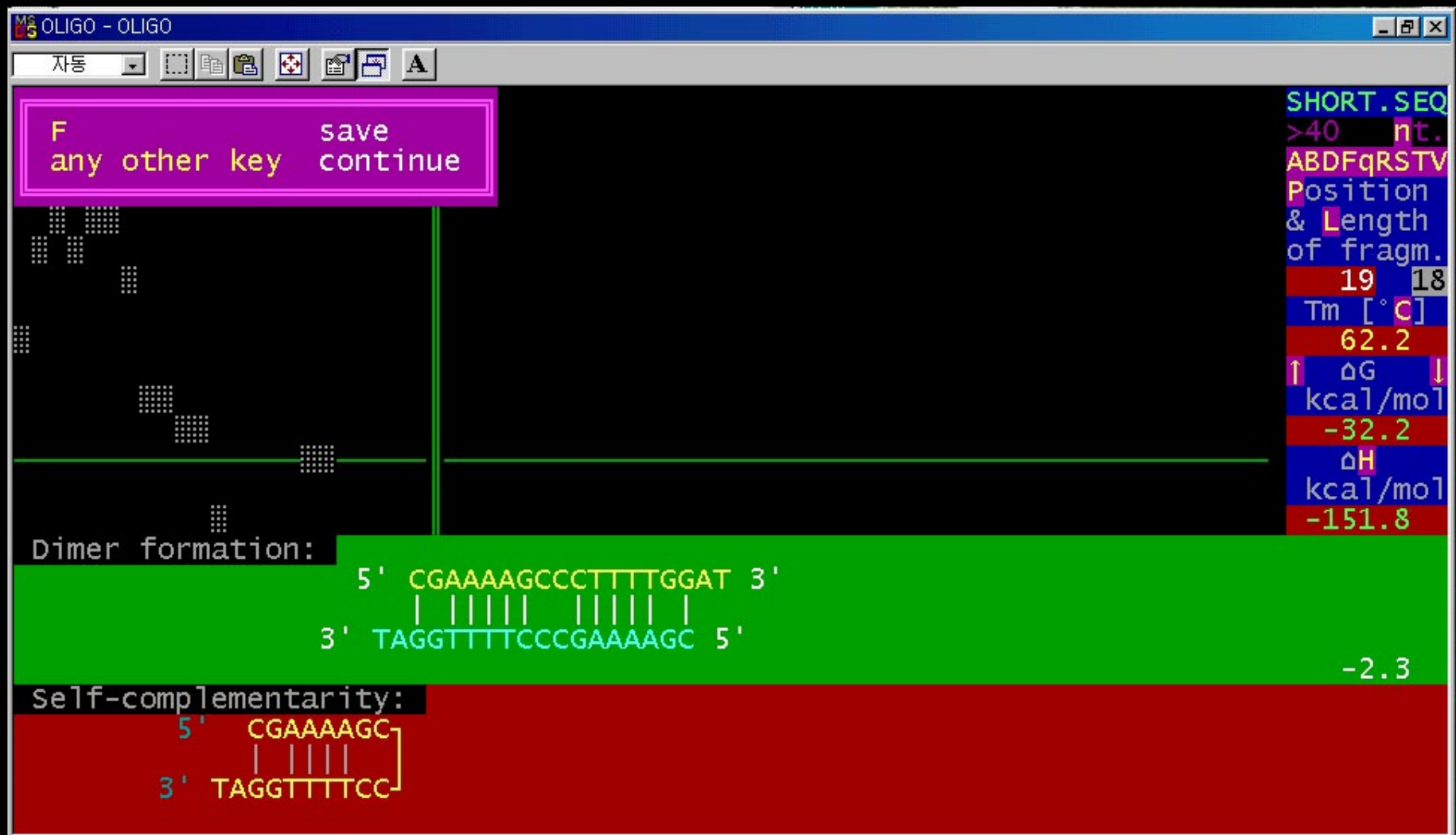
참고) degenerate primer: 원하는 염기서열이 정확하지 않을 때는 degenerate code를 이용하여 heterogeneous 한 primer를 만들기도 한다.











프라이머디자인사이트→

Primer order 의 예

주소(D) http://www.cosmo4.com/order/orderlist.htm

COSMO Custom Oligonucleotide Synthesis Manufacture Office ▶ Cart ▶ 회원가입

Order Home > Order

Home
Company
Products
Order
Q&A
Free Board

Order
Thank you for your interest in our products

주문할 프라이머 입력
Mixed Base는 아래의 code letter를 사용하여 기재하며 주십시오

R	A,G	W	A,T	S	C,G	D	A,G,T	B	C,G,T	N	A,C,G,T
Y	C,T	M	A,C	K	G,T	H	A,T,C	V	A,C,G	I	INOSINE

Oligo Name 염기수

염기배열 # 5' 3'

Scale 0.05 umoles 정제 OPC Modification 없음

Cart에 넣기 취소

주문 리스트
주문 내역이 없습니다.

50mer이상의 oligo합성은 PAGE/HPLC정제를 권해드립니다.

Copyright(c) 2000 COSMO co, Ltd. All rights reserved
서울시 성동구 성수2가 3동 275-16 제일빌딩 7층

Reaction components

4) Reaction buffer

- Mainly modified from Saiki et al. (1988)
- Low conc. of Mg^{++} : reaction failed
High conc. of Mg^{++} : mis-pairing
pseudo bands

Components of PCR buffer

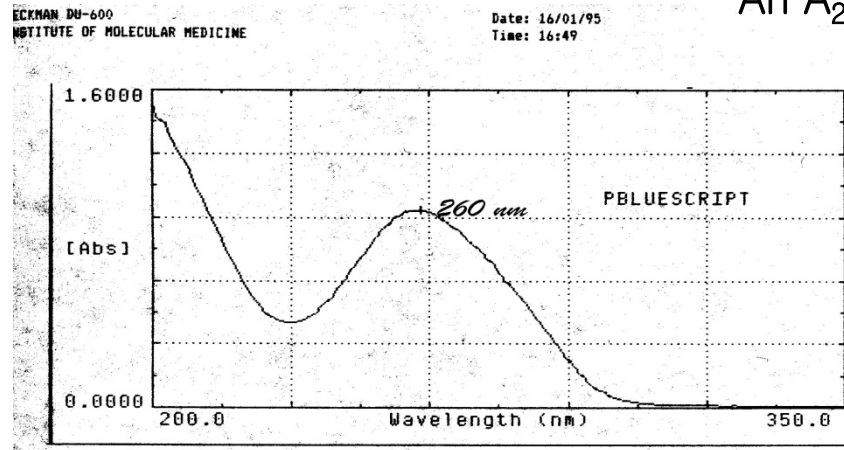
Saiki et al. (1988):		Suh lab:
Tris pH 8.4	10mM	20mM
KCl	50mM	50mM
MgCl ₂	1.5mM	1.5mM
gelatin	0.01%	–
NP40	0.01%	–
Tween-20	0.01%	0.001%

Reaction components

5) Template DNA

- General amount of template DNA: 10^5 – 10^6 target molecules
- | | | |
|---------------------------|---|--|
| 1 ug of human DNA | } | $\doteq 3 \times 10^5$ molecules of single copy gene |
| 10 ng of yeast DNA | | |
| 1 ng of <i>E.coli</i> DNA | | |
- Quantification of extracted DNA:
 - 1) spectrophotometer: OD_{260}
 - 2) spot test in agarose gel

An A_{260} of 1.0 = 50 mg/ml concentration of DNA.

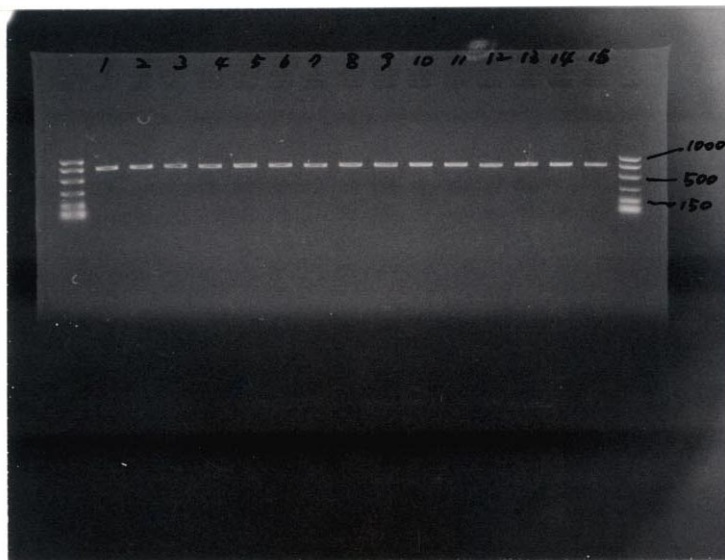


UV-spec vs. Nanodrop



Gel electrophoresis

침강제+Dye+DNA



An Example of band (spot) test

- Marker: PCR Marker
(Promega G3161)
 - Marker concentration:
5 ul contains 30–40 ng of
each DNA fragments
 - Sample DNA concentration:
6–8 ng/ul
- ∴ dilute to 1/10
→ use 2 ul of DNA
for 100ul reaction
(1.2–1.6 ng)

PCR 온도 조건의 예

Thermal condition and cycle number

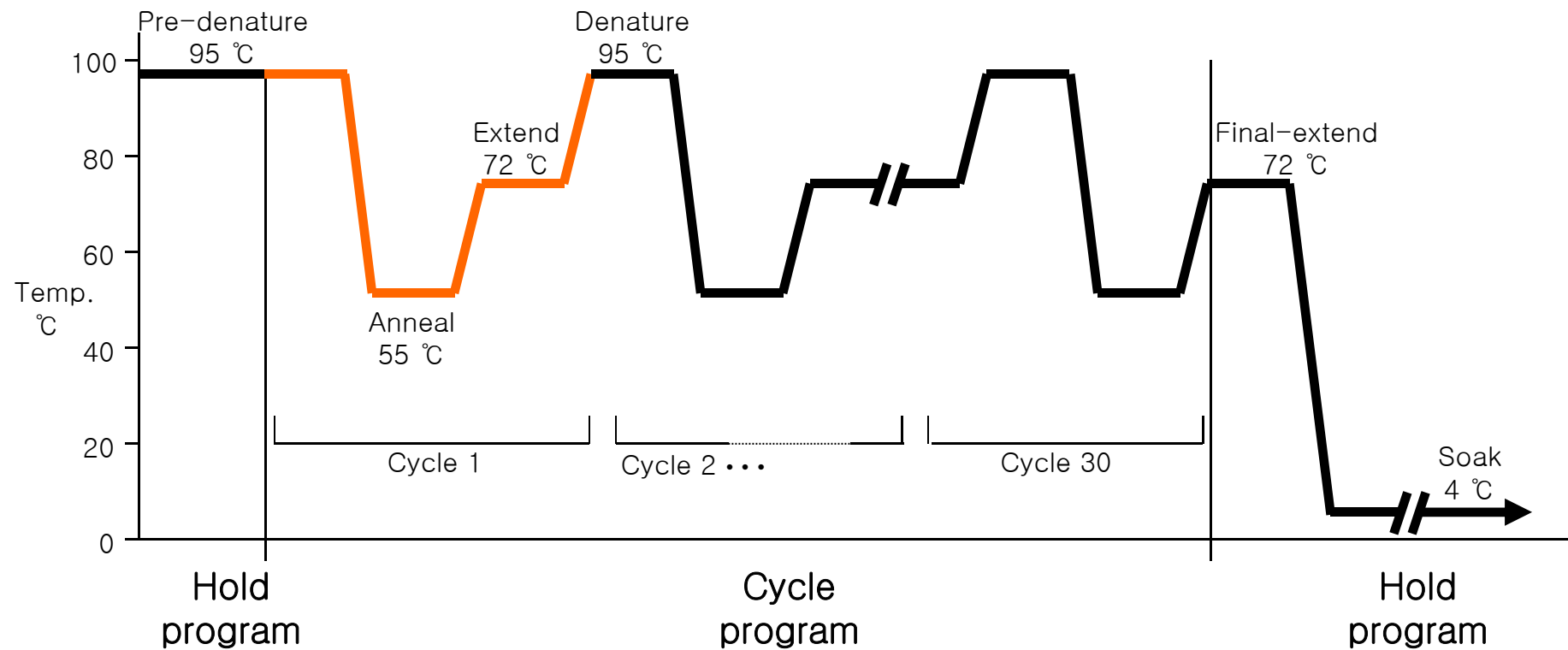
e.g. PCR amplification of *ndhF* gene in Magnoliaceae (Kim et al., 2001)

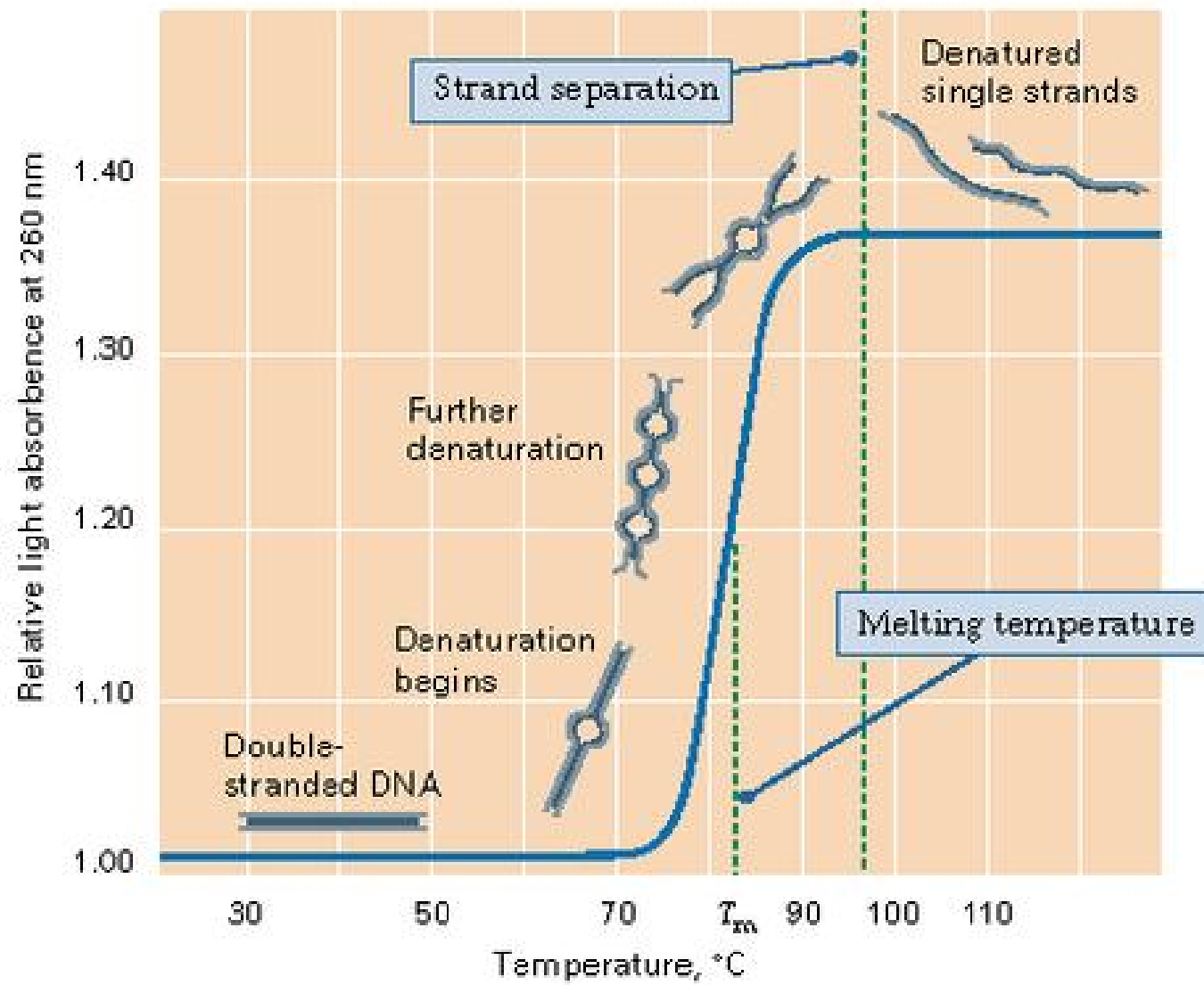
Pre-denaturation: 95 °C 10 min (← AmpliTaq. Gold)

Denaturation: 95 °C 1 min	} 30 cycles
Primer annealing: 55 °C 1 min	
Primer extension: 72 °C 1 min	

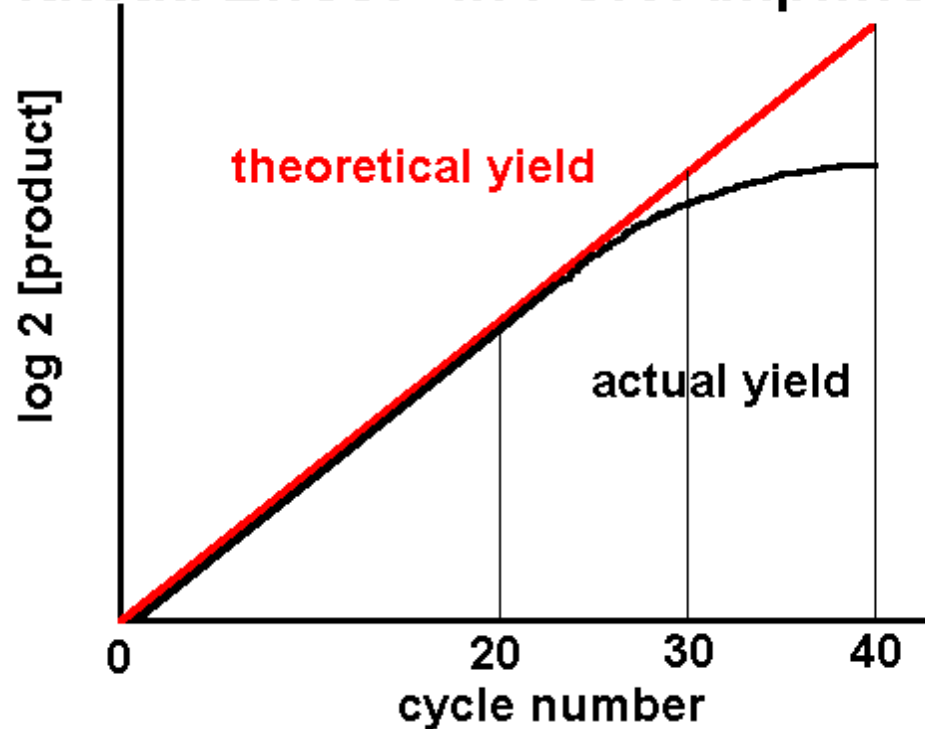
Final extension: 72°C 7 min

An example of a PCR method





"Plateau Effect" in PCR Amplification



Depending on reaction conditions and thermal cycling, one or more of the following may influence plateau:

- 1) Utilization of substrates (dNTPs or primers)
- 2) Stability of reactants (dNTPs or enzymes)
- 3) End-product inhibition (pyrophosphate, duplex DNA)

...

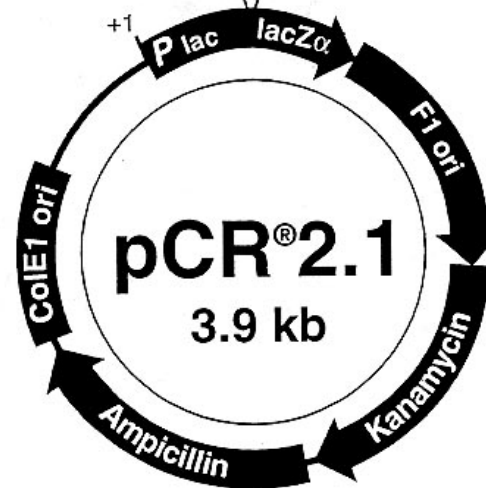
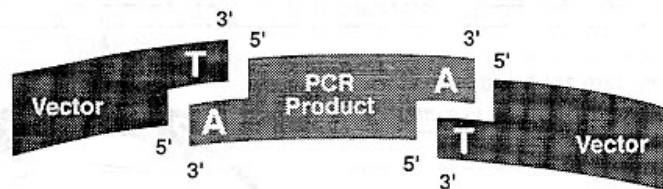
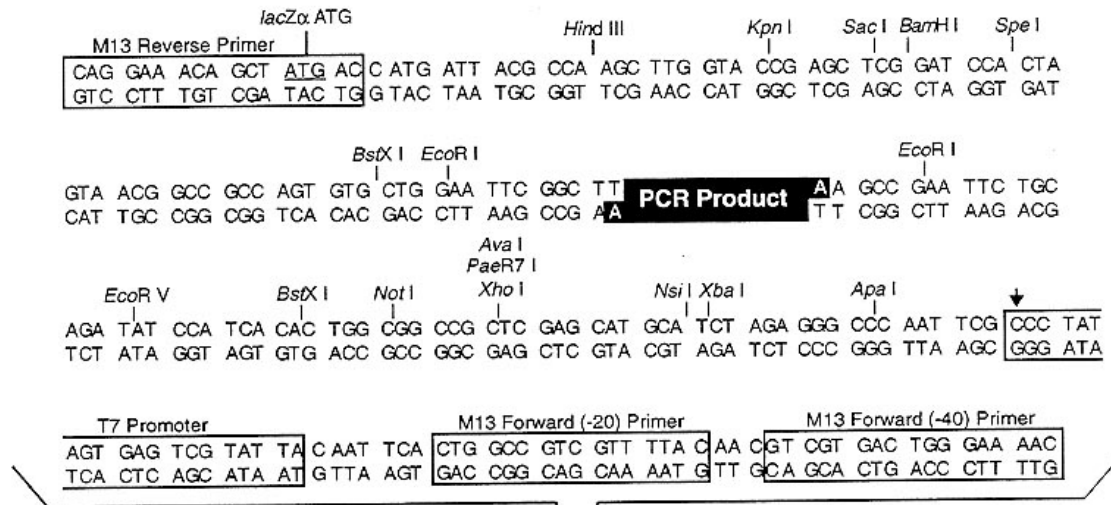
Non-PCR amplification

- Cloning
 - PCR product가 heterogenous 할 때 각각의 염기서열을 결정하려면 cloning 이 필요함.
- RCA (Rolling circle amplification)

- Cloning

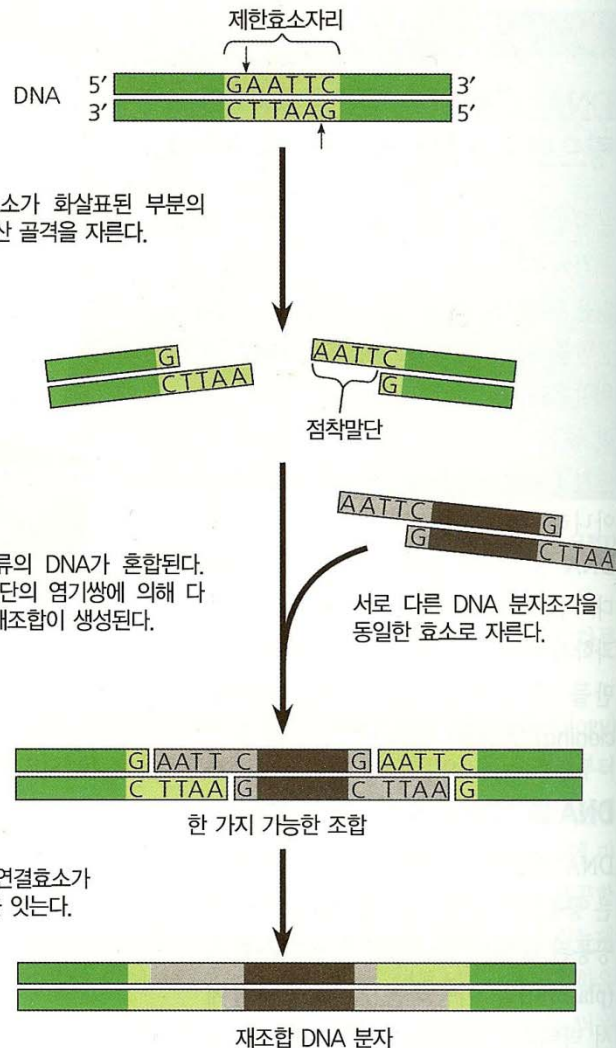
Map of pCR[®]2.1

The map of the linearized vector, pCR[®]2.1, is shown below. The sequence of the multiple cloning site is shown with a PCR product inserted by TA Cloning[®]. The arrow indicates the start of transcription for the T7 RNA polymerase.



Note: The vector is modified at the unique EcoR I site during preparation of pCR[®]2.1. The inserted PCR product is flanked on **each** side by EcoR I sites. The sequence included after page 25 is the sequence for the closed circular (unmodified) pCR[®]2.1.

continued on next page



▲ 그림 20.3 재조합 DNA를 만들기 위한 제한효소와 DNA 연결효소의 사용.

예에서 보여주는 제한효소(*EcoRI*)는 특정한 여섯 개의 염기쌍을 제한 부위로 인식하고 이 서열의 인산화 당구조에 엇갈린 절단을 만들어 점착말단을 가진 절편을 형성한다. 상보적인 점착말단을 가진 절편은 염기쌍을 형성할 수 있다. 만약 각 절편들이 다른 DNA로부터 왔다면 재조합 DNA가 된다.

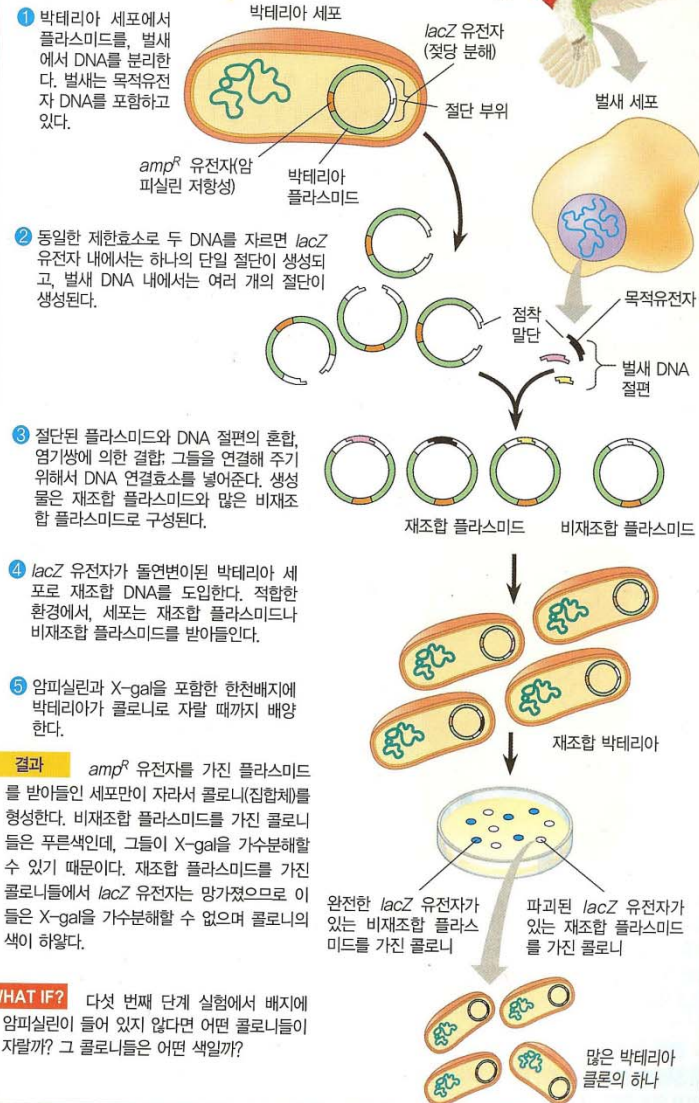
DRAW IT 제한효소 *HindIII*는 5'-AAGCTT-3' 염기서열을 인지하고 AA 사이를 자른다. 제한효소가 자르기 전과 후를 두 가닥 DNA로 그려보라.

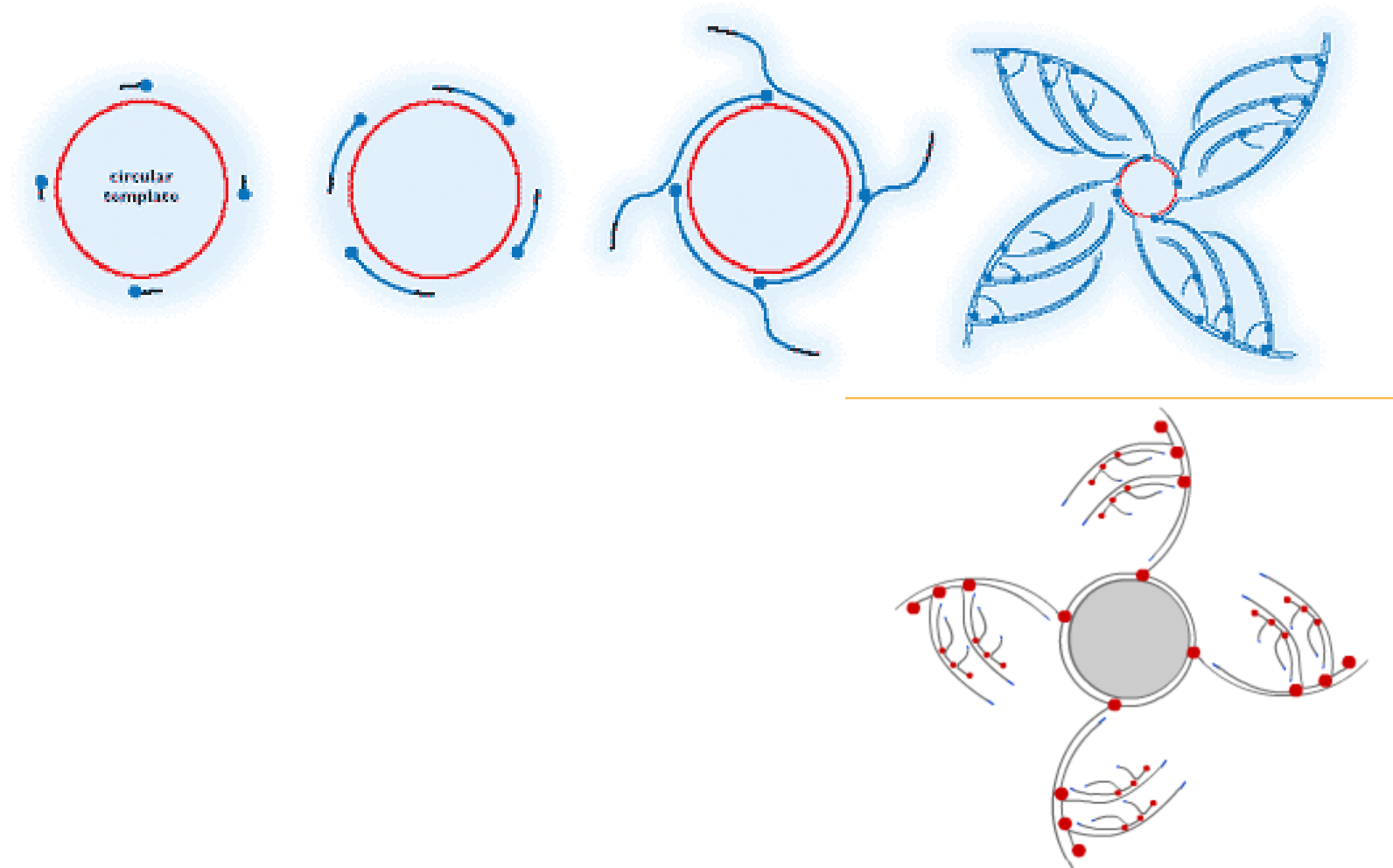
그림 20.4 연구 방법

박테리아 플라스미드에 유전자 클로닝하기

적용 클로닝은 유전자의 서열화, 단백질의 생성, 유전자 치료, 혹은 기초 연구 등에 사용하기 위한 목적유전자를 대량으로 확보하기 위하여 사용된다.

방법 이 예에서 벌새의 유전자가 *E. coli*의 플라스미드에 클로닝된다. 그림에서 세 개의 플라스미드와 세 개의 DNA 절편만을 보여주지만, 실제로는 수많은 플라스미드와 DNA 절편조각이 혼합물의 시료 내에 존재한다.





- RCA (Rolling circle amplification)
used for small amount of template such as DNA in
herbarium sheets or even fossils.

Krause et al. 2006. Multiplication of the mammoth mitochondrial genome and the evolution of Elephantidae. *Nature* 439: 724–727.

Poinar et al. 2006 Metagenomics to paleogenomics: large-scale sequencing of mammoth DNA. *Science* 311: 392–394.



Neanderthal
sequenced *now!*

Max Planck Institut
uses 454 Sequencing™
technology.

Read about it ➡

Watch the **CNN** video ➡

Hear the **NPR** broadcast ➡

Image credit:
Ken Mowbray and Blaine Moley,
American Museum of Natural History

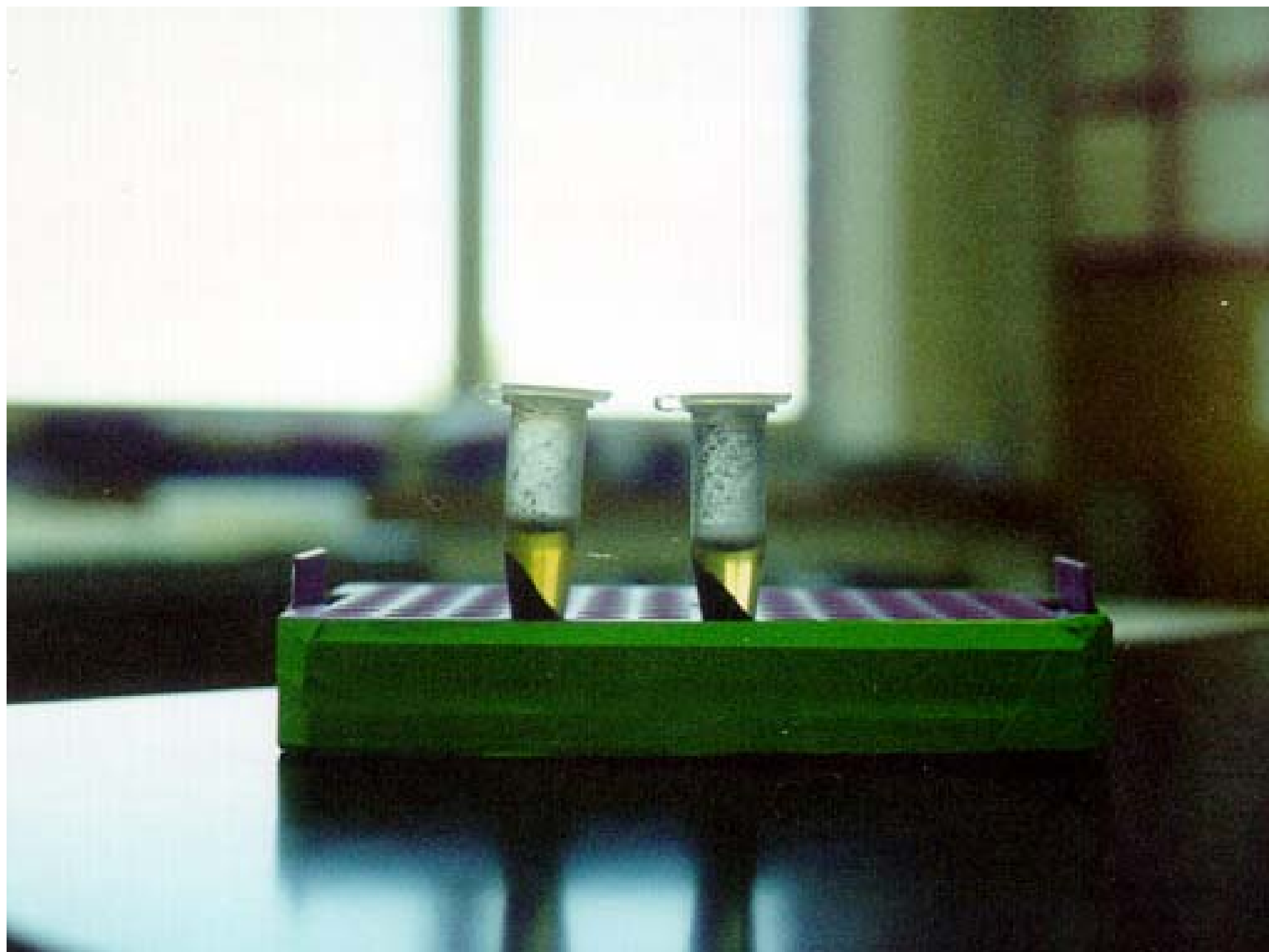
최신 DNA 추출기술과 PCR 기술의 발전은 DNA가 매우 적게 남아 있는 화석에서 DNA 염기서열 결정을 가능하게 함



1993







Magnolia latahensis (Berry) Brown

