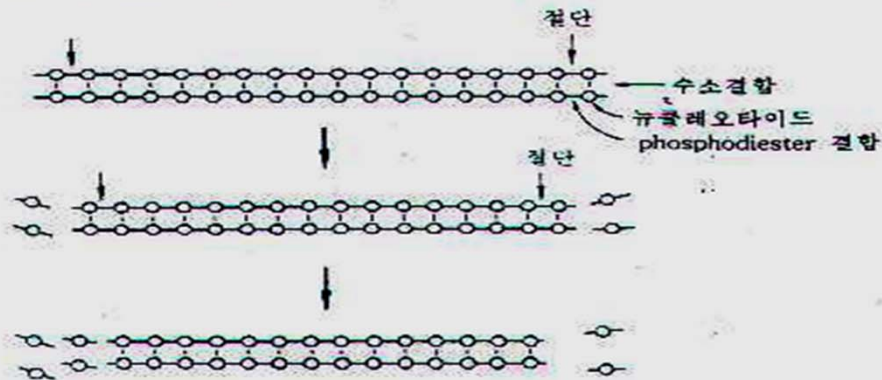


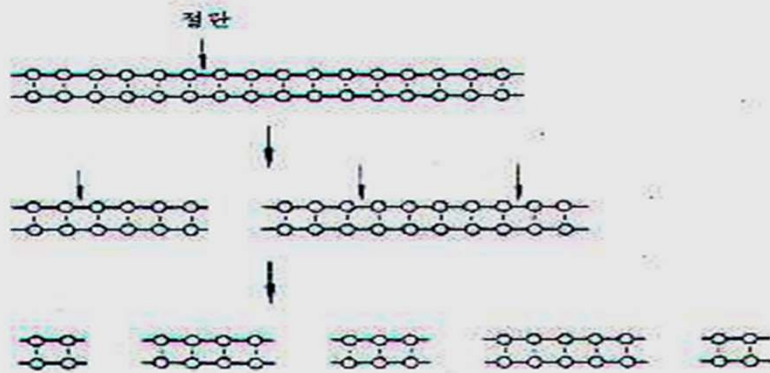
정제된 DNA의 조작

뉴클레아제(nuclease)

(a) 엑소뉴클레아제

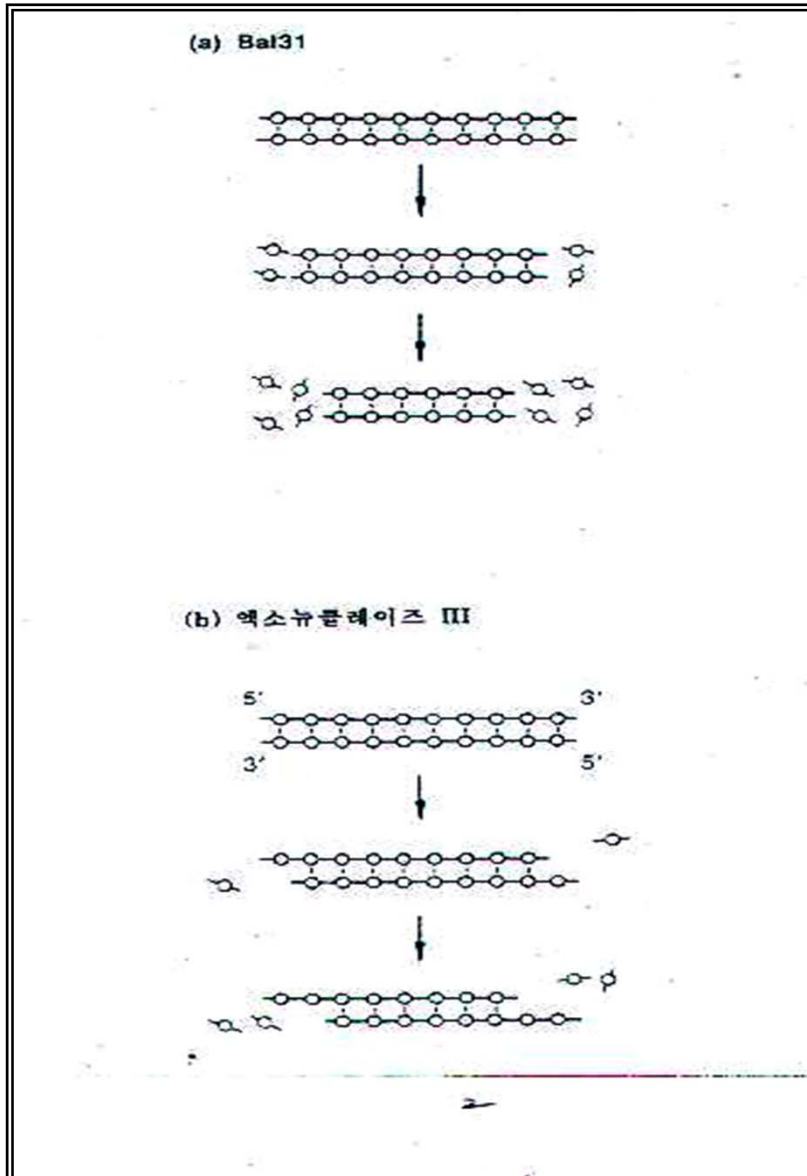


(b) 엔도 뉴클레아제



- 두가지 다른 종류의 뉴클레아제에 의한 촉매반응
- (a) DNA분자의 말단에서 뉴클레오타이드를 제거하는 엑소뉴클레아제
- (b) 내부의 포스포디에스테르 결합을 끊는 엔도뉴클레아제

다른 종류의 엑소뉴클레아제

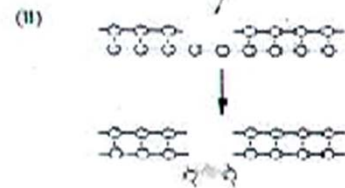
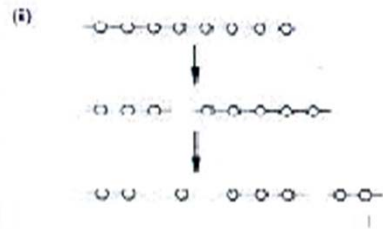


(a) Bal31은 이중가닥 분자의 양가닥으로부터 뉴클레오티드를 제거한다

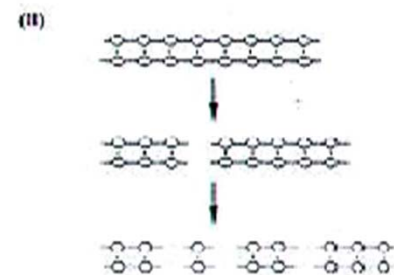
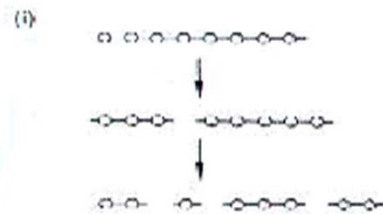
(b) 엑소뉴클레아제 III는 3' 말단에서만 뉴클레오티드를 제거한다

다른 종류의 엔도뉴클레아제

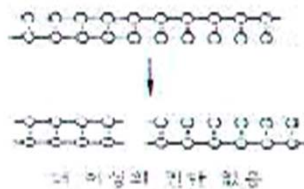
(a) S1 뉴클레아제



(b) DNase I



(c) 제한효소

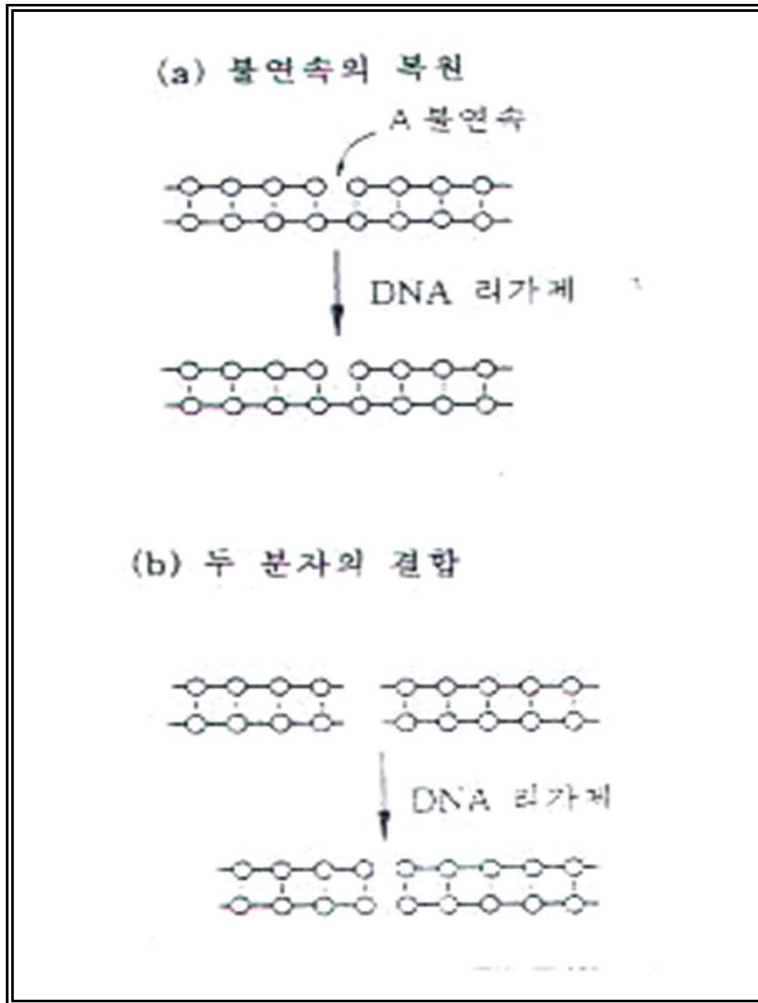


(a) S1뉴클레아제는 주로 이중가닥 분자의 한가닥과 한가닥 DNA 절단

(b) DNase I 은 한가닥과 이중가닥 모두를 절단

(c) 제한효소는 제한된 자리에서만 이중가닥 DNA 절단

리가제(ligase)

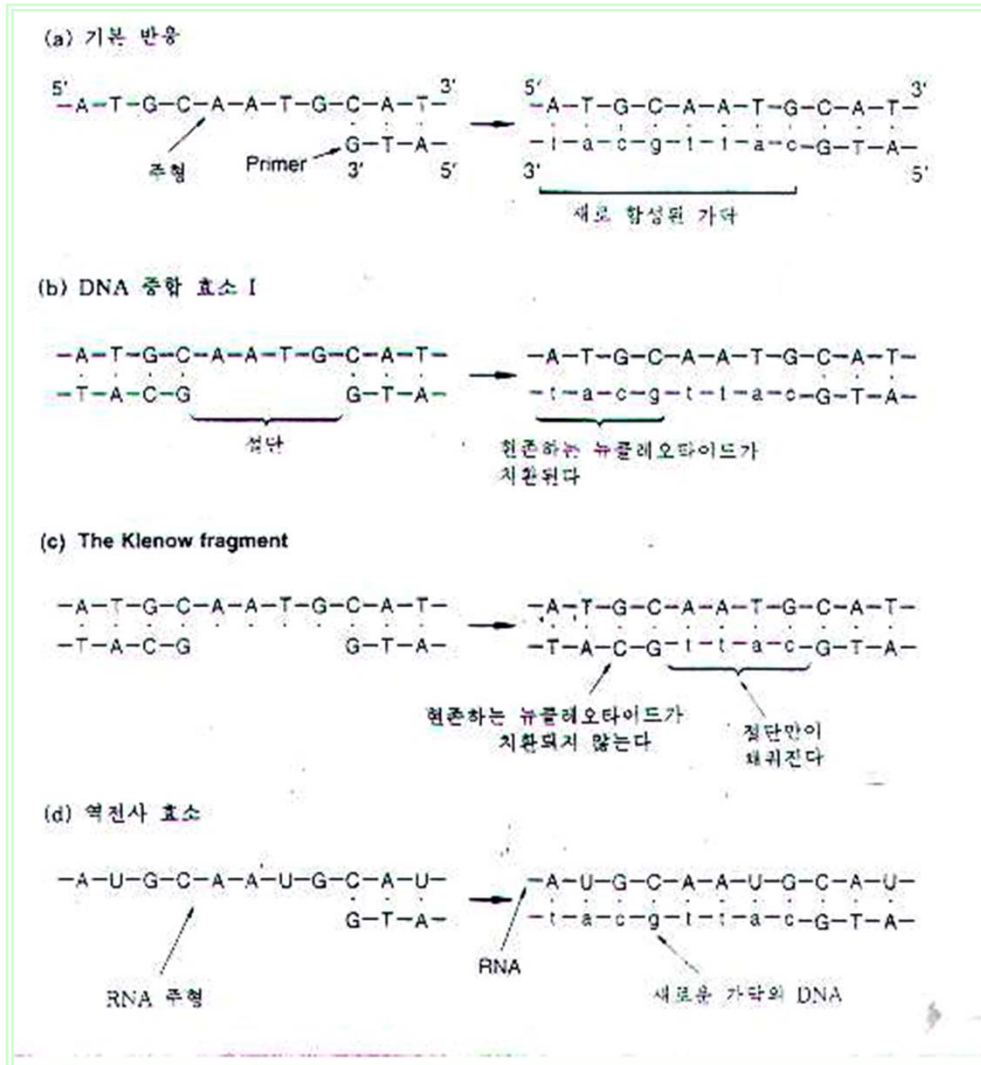


- DNA 리가제에 의한
촉매반응

(a) 이중가닥 분자의 하
가닥에 포스포디에
스테즈 결합이 잃
은 즉, 불연속의 복
원

(b) 두 분자의 결합

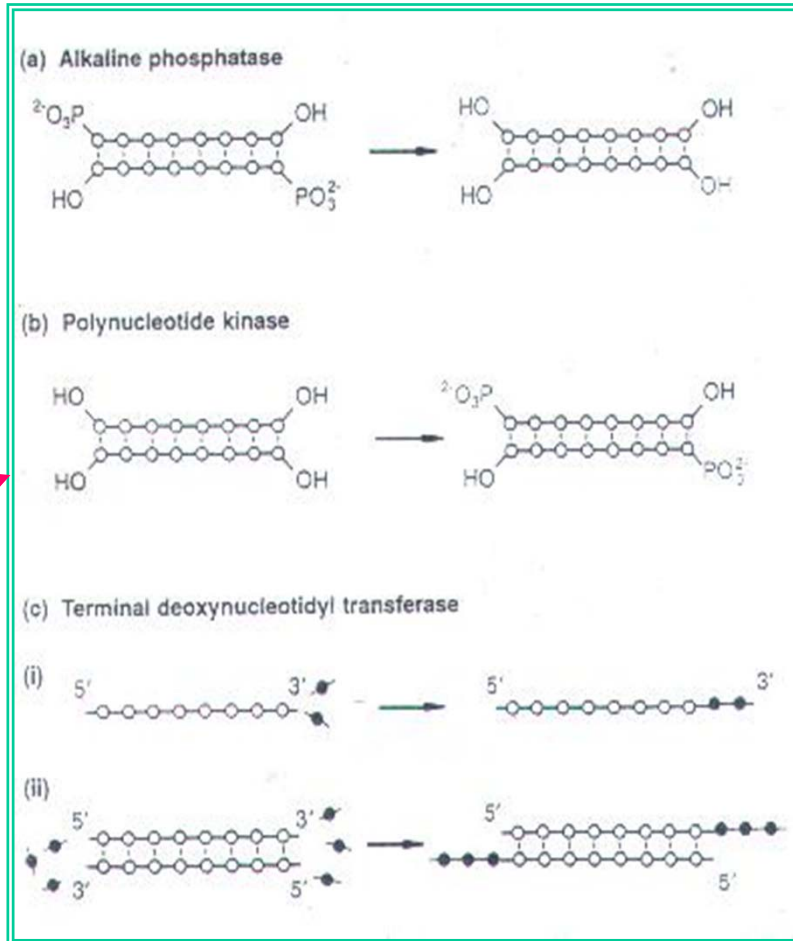
중합효소(polymerase)



- DNA 중합효소에 의한 촉매반응

- (a) 기본반응 : 새로운 DNA가닥이 5'에서 3' 방향으로 합성
- (b) DNA 중합효소 I은 초기에 절단을 채우지만, 새로운 가닥을 합성하면 현존하는 가닥을 절단
- (c) Klenow fragment는 절단을 채움
- (d) 역전사효소는 RNA를 주형으로 이용

DNA 변형 효소



DNA 변형효소의 촉매반응

중요 변형효소

1. 알칼린 포스파타제

- DNA분자의 5'말단에 존재하는 인산기 제거

2. 폴리뉴클레오티드 키나제

- 자유 5'말단에 인산기를 첨가, 알칼린 포스파타제의 반대 역할

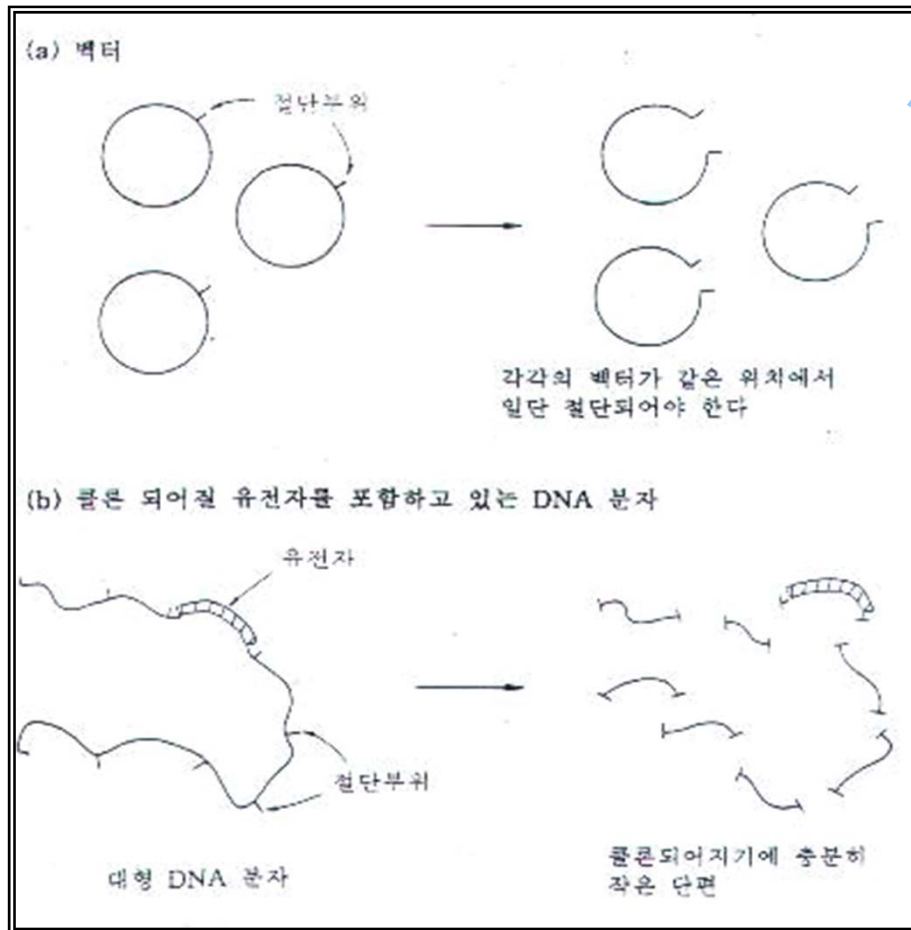
3. 터미널 디옥시뉴클레오티딜 트랜스페라제

- DNA분자의 3'말단에 한 혹은 그 이상의 디옥시뉴클레오티드를 첨가

토포이소메라제(topoisomerase)

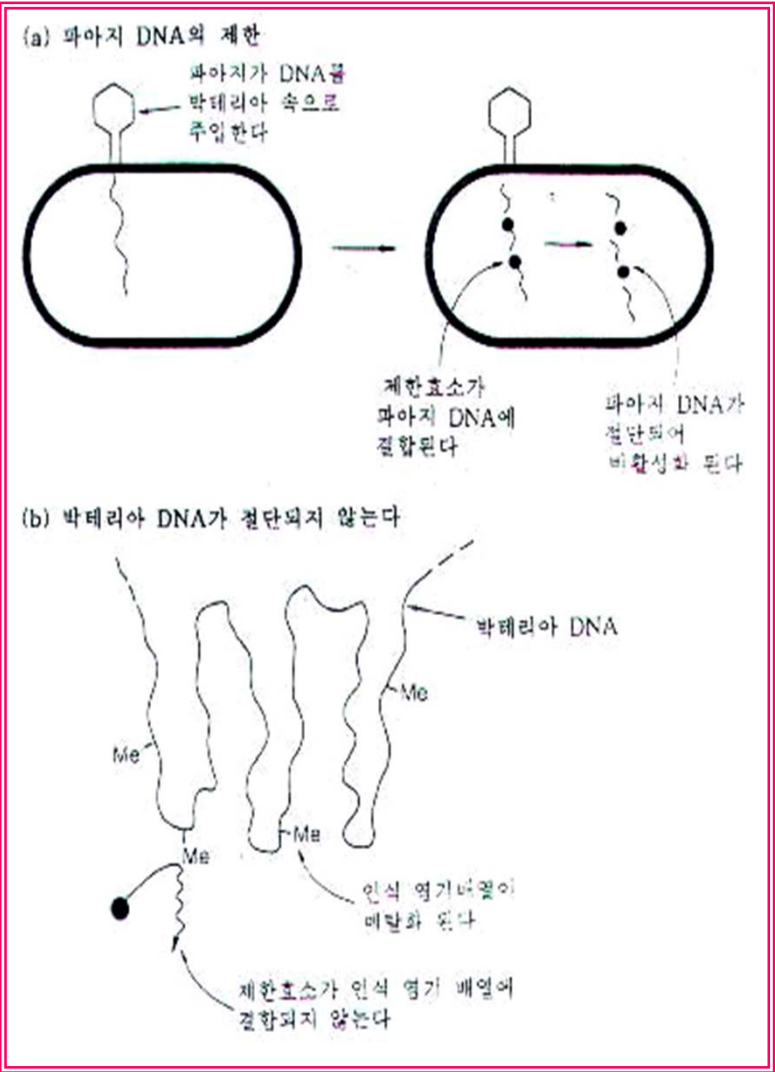
- DNA 조작효소의 마지막 부류로 이것은 공유결합으로 닫혀진 원형 DNA의 모양을 초나선형으로 도입하거나 제거함으로써, 변화시킬수 있다.

DNA를 절단하는 효소들 - 제한효소



1. 2내지 3kb DNA로 이루어진 단 하나의 유전자를 클로닝시키려면 그 유전자는 제조기술에 의해 생성된 대형 DNA 분자(80kb)를 절단해야 한다.
2. 대형 DNA 분자는 벡터가 운반할 수 있도록 충분히 작은 단편을 생성하기 위해 조각져야 한다.

제한효소의 발견과 기능



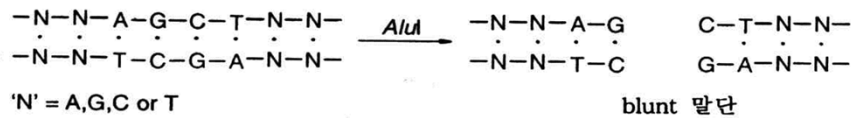
❖ 제한효소 : 우연한 발견으로 1950년 초에 숙주조절제한이라 부른 현상



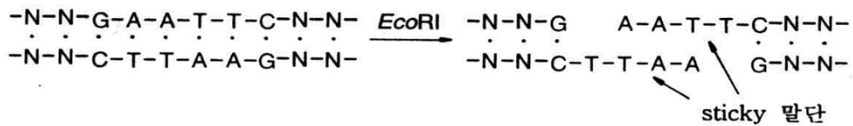
➤ 숙주 조절 제한 : 어떤 균주의 박테리아가 박테리오파아지 감염에 면역성이 있다는 것

치명적인 파괴인 박테리아 자체 DNA는 공격으로부터 보호되는데, 이것은 절단효소의 활동을 막는 부가적인 메틸기를 가지고 있기 때문이다. 이러한 절단효소를 제한효소라한다.

형태II제한효소의 특별한 염기배열 절단



(b) sticky 말단의 생성



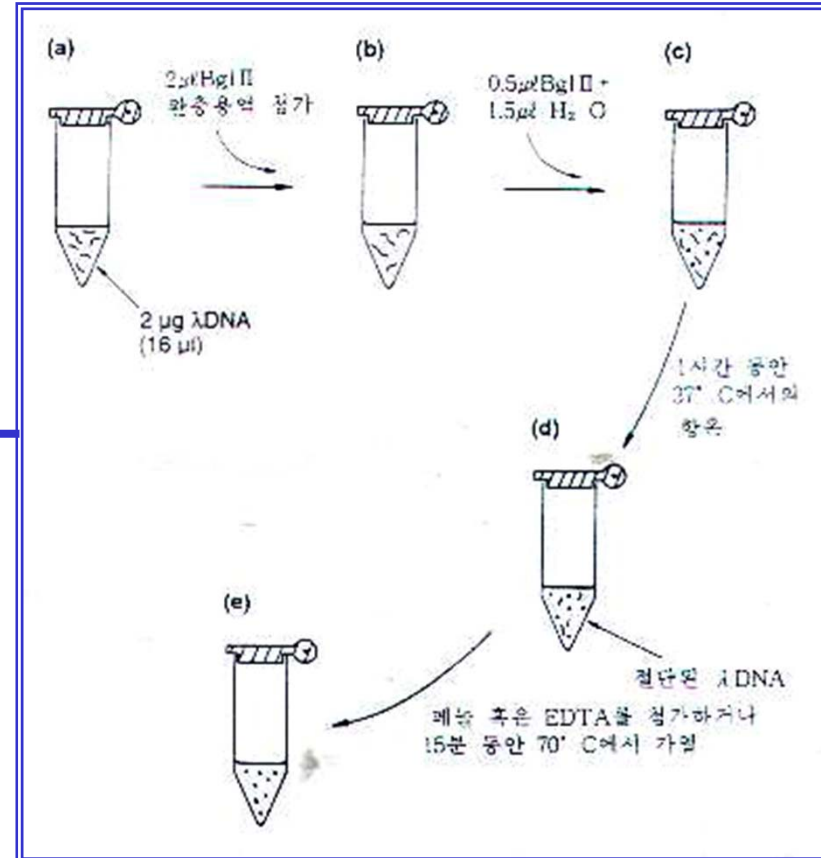
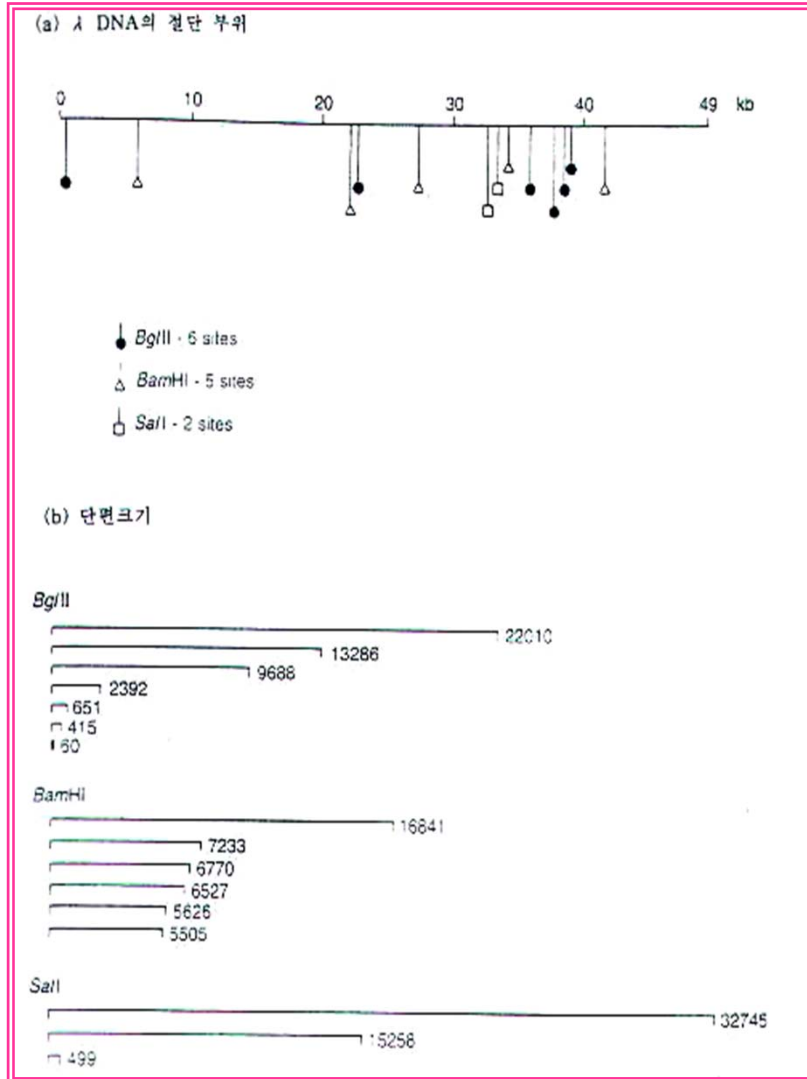
(c) 다른 제한효소에 의해 생성된 동일한 sticky 말단



다른 제한효소로 절단한 DNA에 생성된 말단

- (a) Alu I에 의한 blunt 말단
- (b) EcoRI에 의한 sticky 말단
- (c) BamHI 및 BglII 그리고 Sau3AI에 의한 sticky 말단

실험실에서 제한효소에 의한 절단



실험실에서의 제한절단

제한효소 절단 결과의 분석

제한 절단으로 생긴 수많은 DNA의 단편 각각의 수와 크기를 알아내는 방법에는 크게 2가지가 있다.

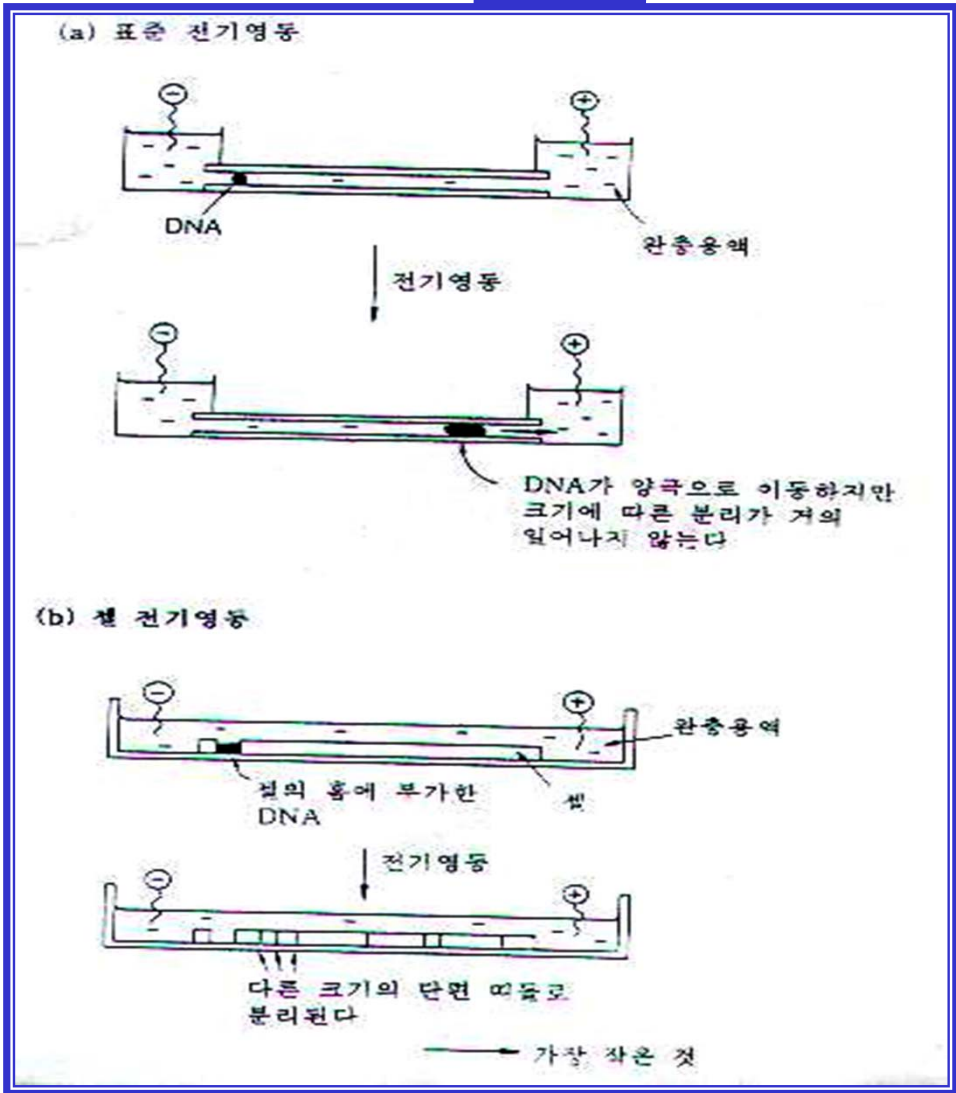
(a) 젤 전기영동에 의한
분자들의 분리

(b) 젤 상에서 DNA분자를
보는 방법

1. 염색

2. 방사성 표지 DNA의
자동방사선 사진법

(a) 젤 전기영동



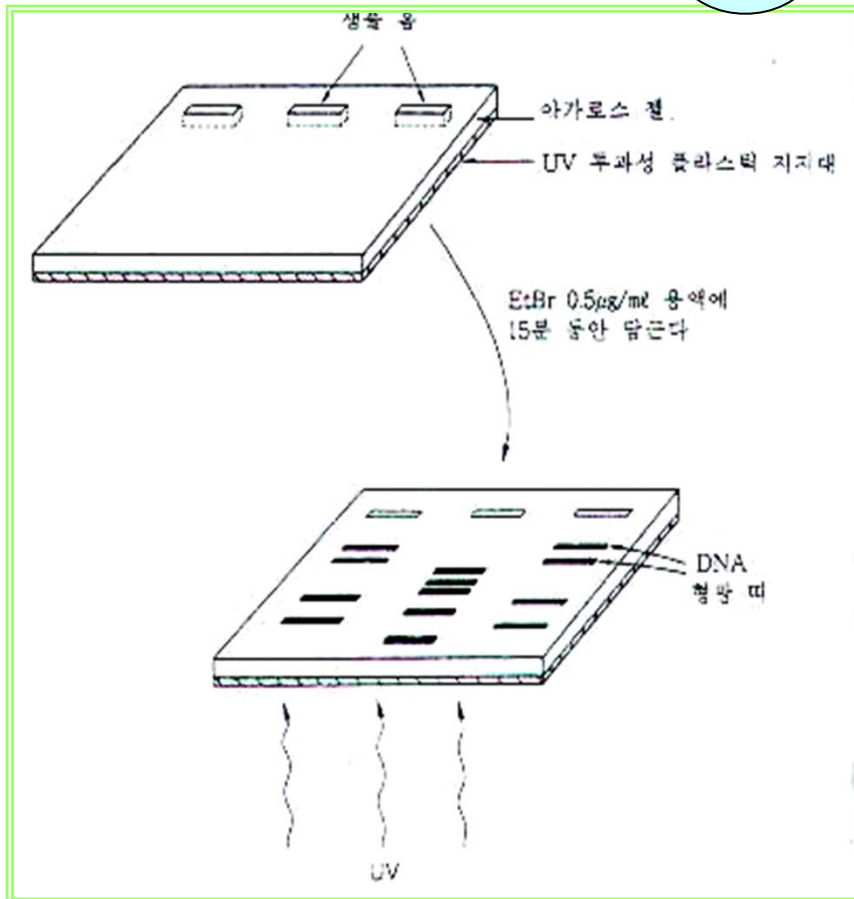
-DNA는 음전하를 띠는데, 그 결과로 DNA 분자가 전기장에 놓여질때 양극을 향해 이동한다. (분자의 이동속도는 그것의 모양과 전하대질량비의 두가지 인자에 의존, 대부분의 DNA분자는 같은 모양이며 아주 비슷한 전하대 질량비를 가지고 있어 다른 단편들은 표준 전기영동으로 분리 될 수 없다.)

- 젤 전기영동은 다른 크기의 단편 띠들로 인한 다른 DNA단편의 분리가 가능하다.

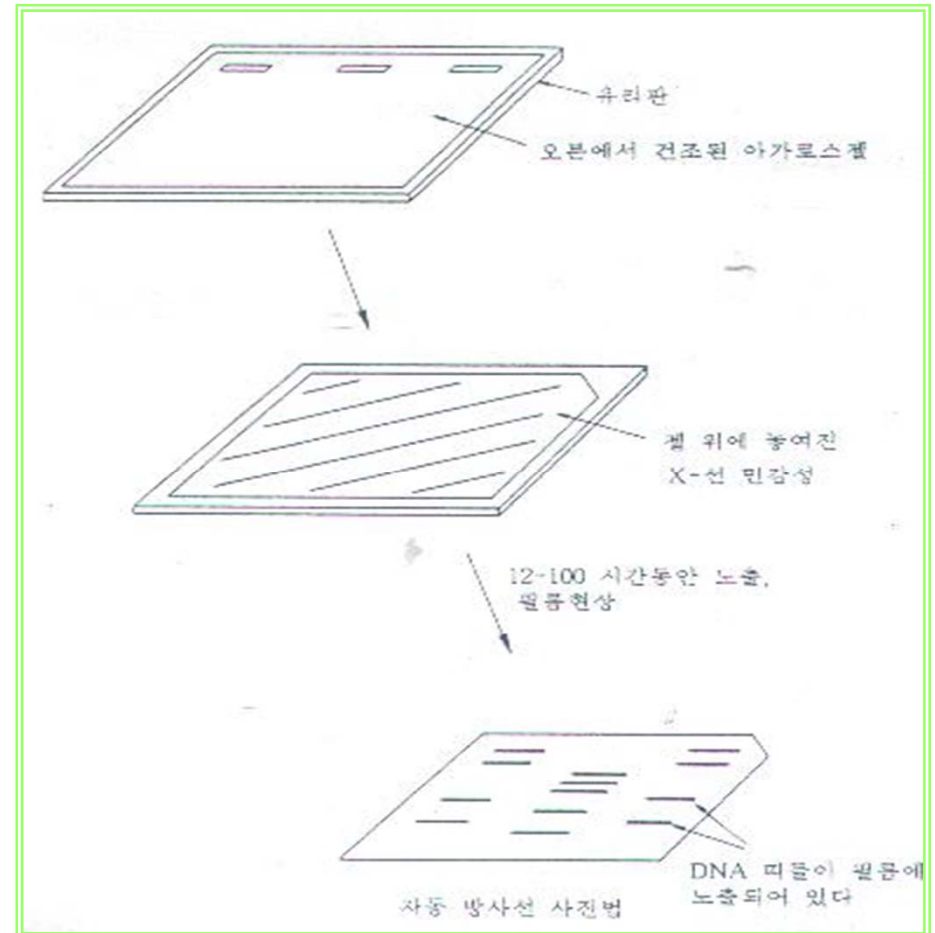
(b) 젤 상에서 DNA분자 보는 방법

1. 염색

아가로스 젤에
있는 DNA띠를
EtBr 염색법과
UV에 의해보기



2. 방사성 표지 DNA 의 자동방사선 사진법

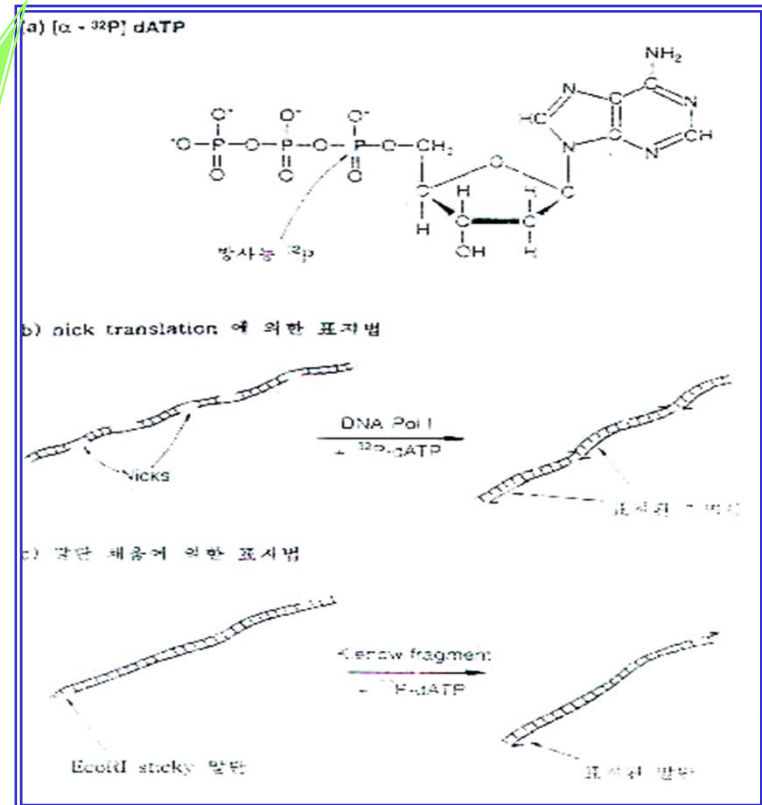


I. 설명

1. 자동방사선 사진법 : 한때에 약25ng이하의 DNA가 존재한다면 EtBr 염색법으로 확인이 불가능한것을 방사성 DNA 가 필름에 노출되어 띠 형태를 나타내는 방법

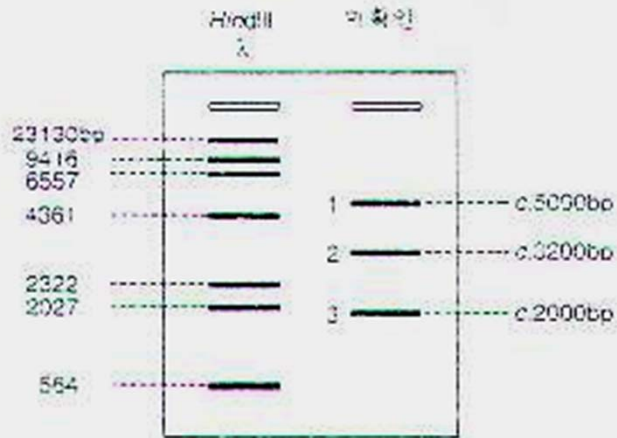
(a) 자동방사선 사진법은 전기영동전에 DNA의 각 분자에 방사성 표지인자로 표지한다면 젤 위에 X-선에 민감한 사진 필름을 놓아서 DNA를 볼수 있다.

DNA분자는 주로 인 방사성 동위원소인 ^{32}P 를 지닌 뉴클레오티드를 결합시켜 표지된다. 몇가지 방법으로 주로 Nick 트랜스레이션과 말단채움 이있다.

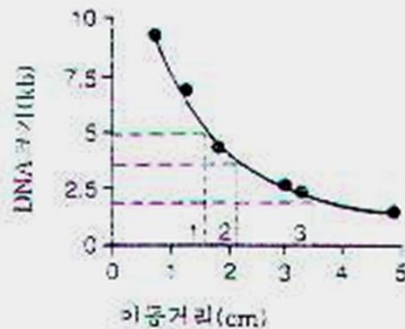


DNA 분자의 크기 측정

(a) 눈으로 대강 측정



(b) 정확한 그래프상의 측정



□ DNA 분자 크기 측정

- 이동속도를 분자량과 연결시키는 수학적 관계사용

$$D = a - b(\log M)$$

(D:이동거리, M:분자량,

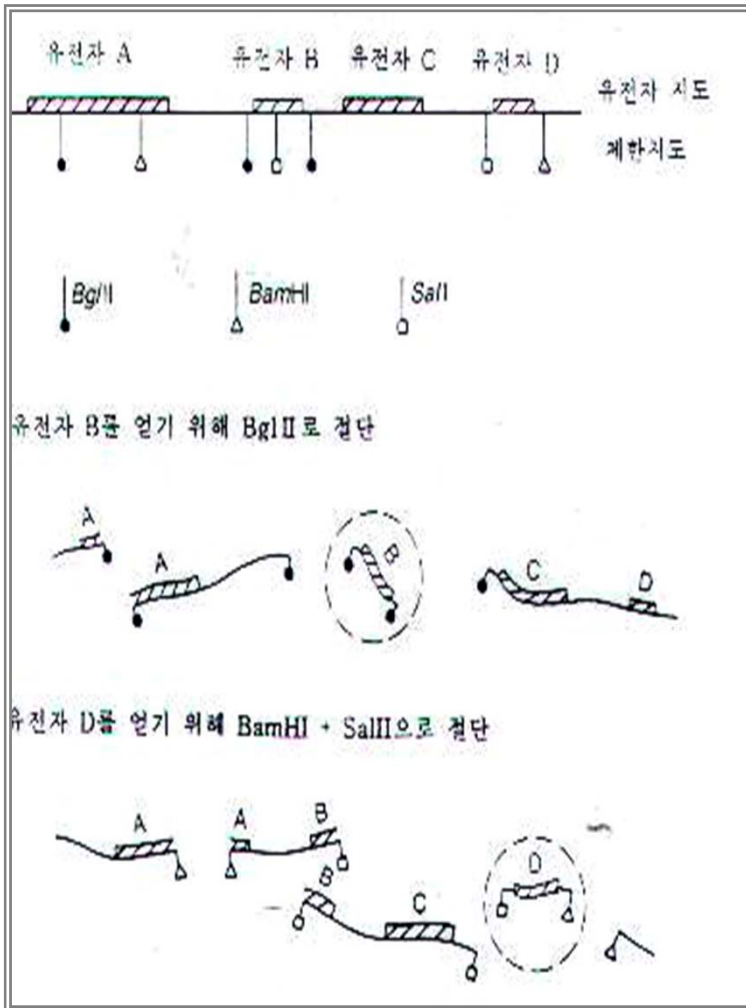
a,b:전기영동조건에 따라 달라지는 상수)

아가로스 젤에서 DNA 단편의 크기 측정

(a) 눈으로 대강 단편 크기의 예측 가능

(b) 검정선을 그려 HndIII 단편의 이동율로부터 정확한 단편의 크기 측정; 알려지지 않은 단편의 크기는 이동거리로부터 결정된다.

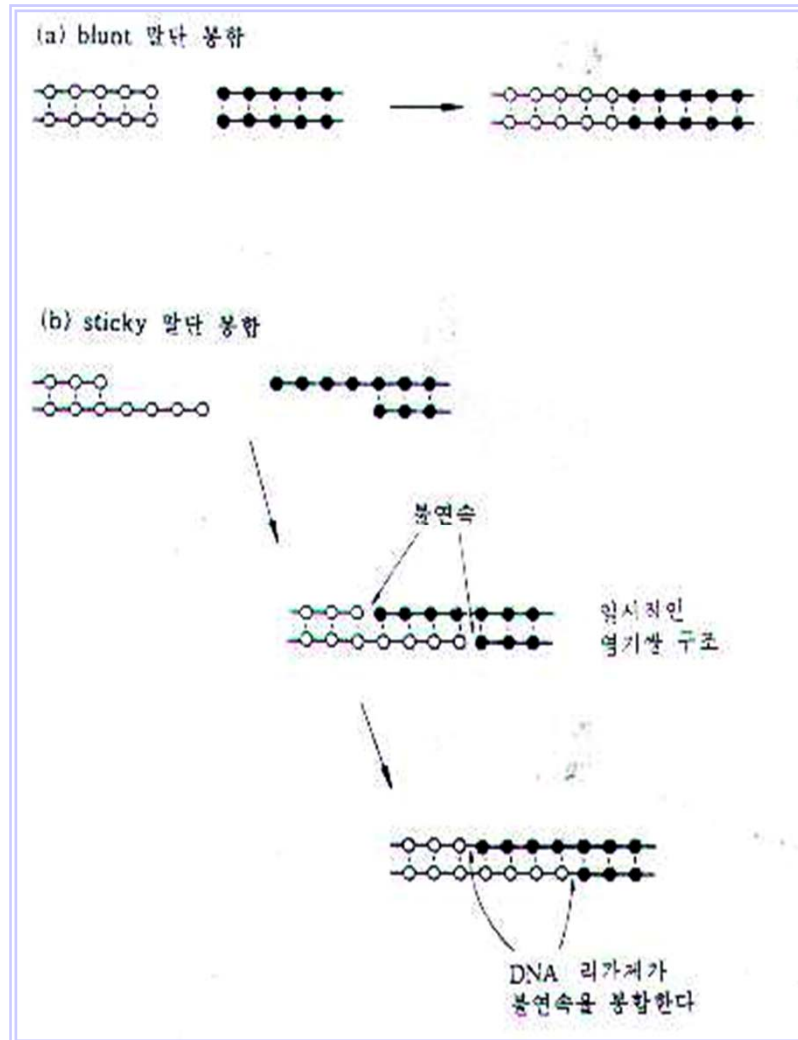
DNA 분자의 다른 제한부위의 위치도



- 제한지도를 이용하여 어떤 제한효소가 각 유전자를 포함하는 DNA 단편을 얻을 수 있는가를 알 수 있다.

제한분석의 다음단계로 수많은 다른 효소에 대해 DNA 분자에서 인식염기배열의 상대적인 위치를 보여주는 지도를 만들어 필요한 절단 조작에 대한 정확한 제한효소를 선택할 수 있다.

ligation - DNA 분자의 결합

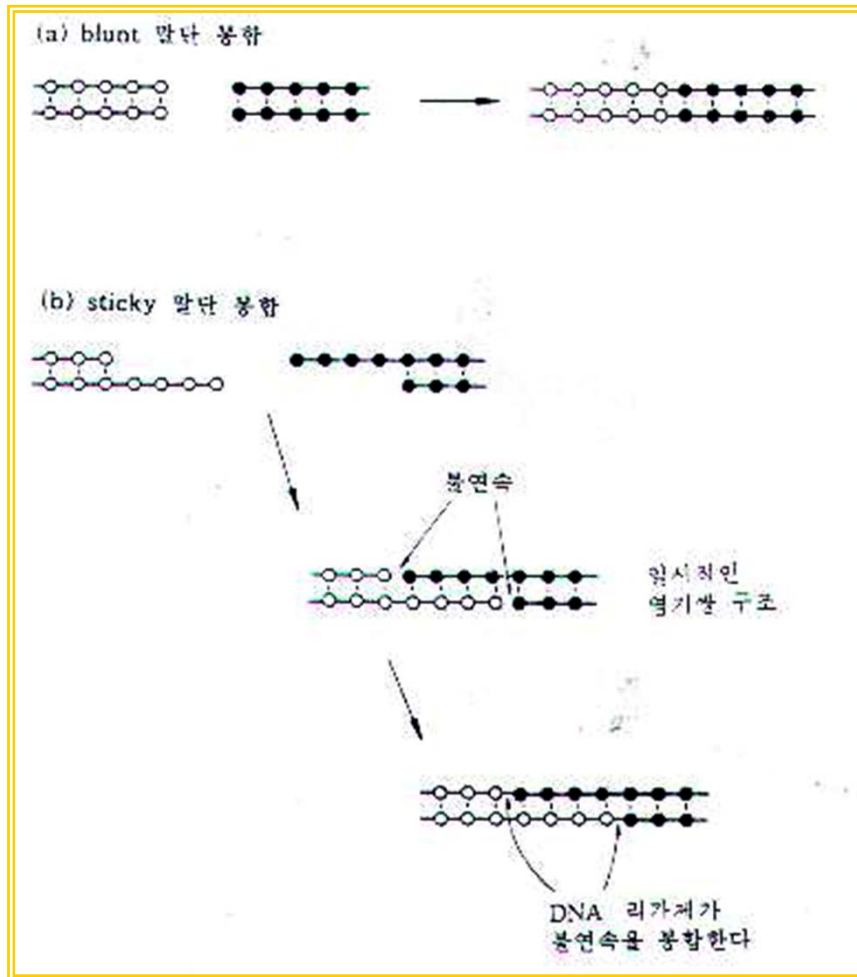


1. **Ligation** : 재조합 DNA 분자구축의 마지막 단계에 벡터분자와 클로닝될 DNA의 결합이 일어나는 것.

2. **Ligase** : 이 반응을 촉매시키는 효소를 말함.

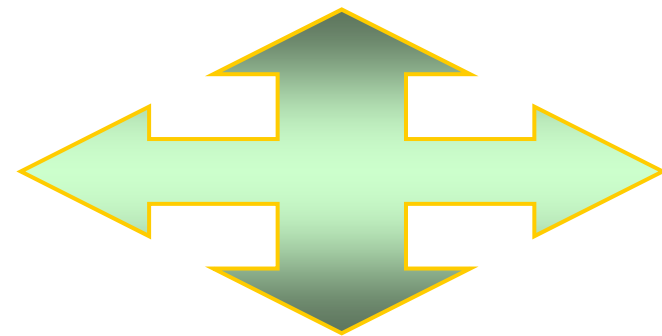
1. 재조합 DNA 분자구축의 마지막 단계

(a) DNA리가제에 의한 촉매 결합반응

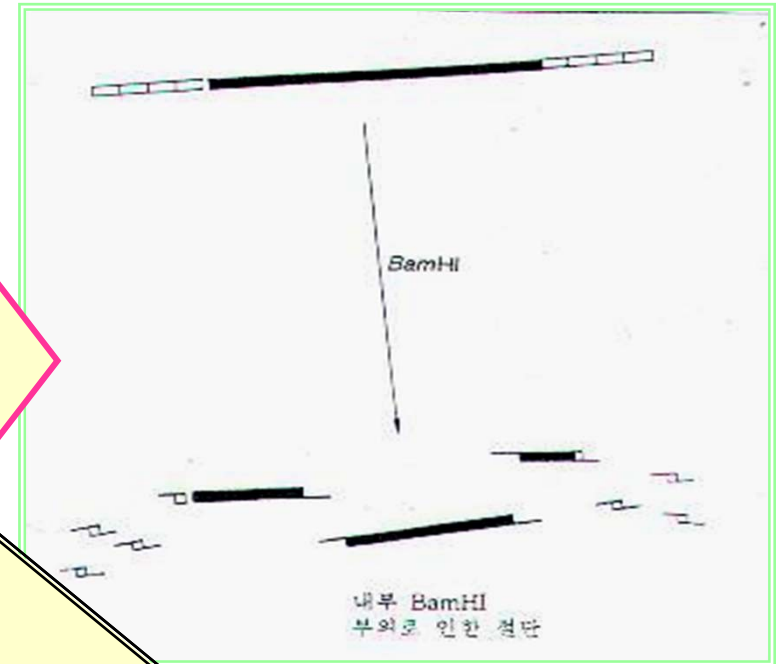
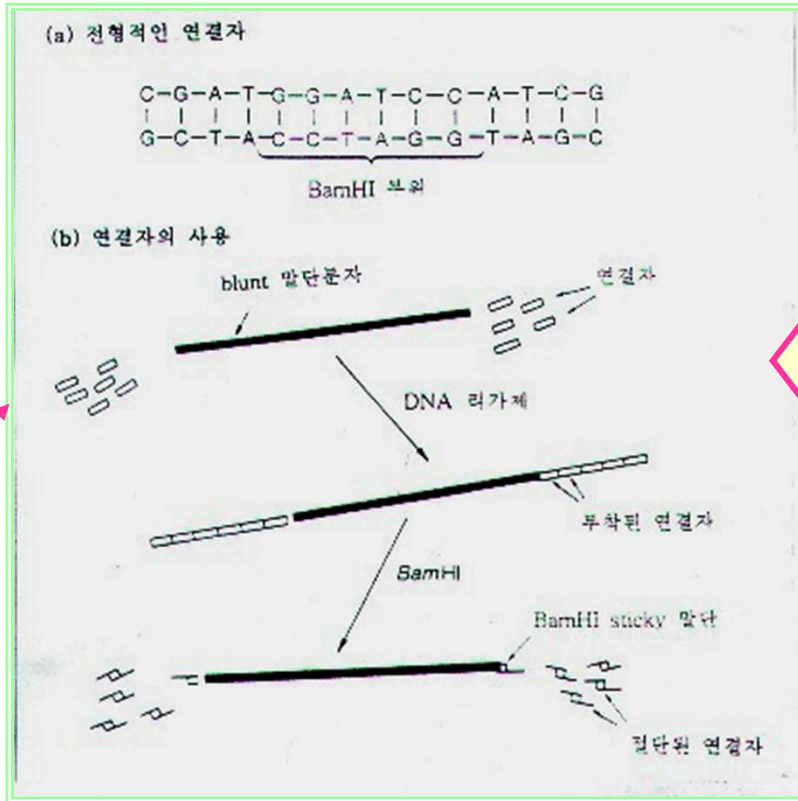


1. Sticky말단은 ligation효율증가

- 효소가 작용할 수 있도록 비교적 안정한 구조를 형성하는 수소결합에 의해 상보적인 sticky말단이 염기쌍을 이룰 수 있기 때문이다.



Blunt말단 분자에 Sticky말단 도입



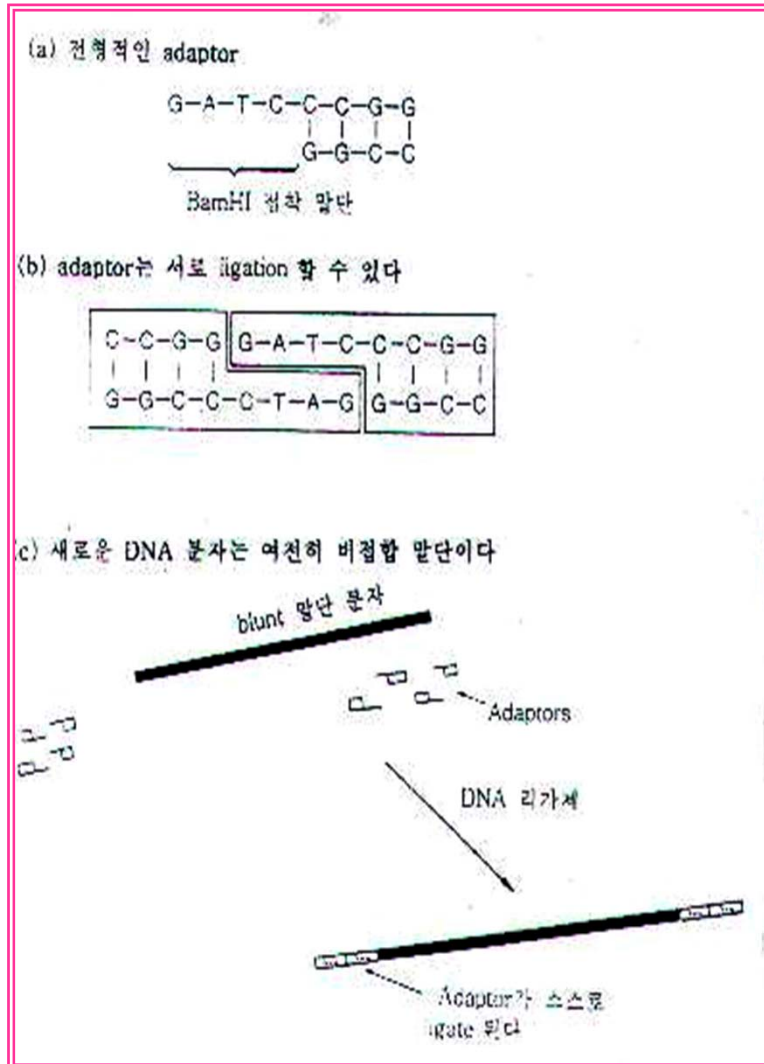
1.연결자

1.문제발생

- sticky말단을 만들기위해 제한단계에서 blunt말단 분자를 절단할때, blunt말단 단편에 포함된 유전자가 여러조각으로 쪼개질수 있다.

1.저농도에서도 잘 붙이기 위해 sticky말단을 도입하는 과정

2. 어답터(adaptor)



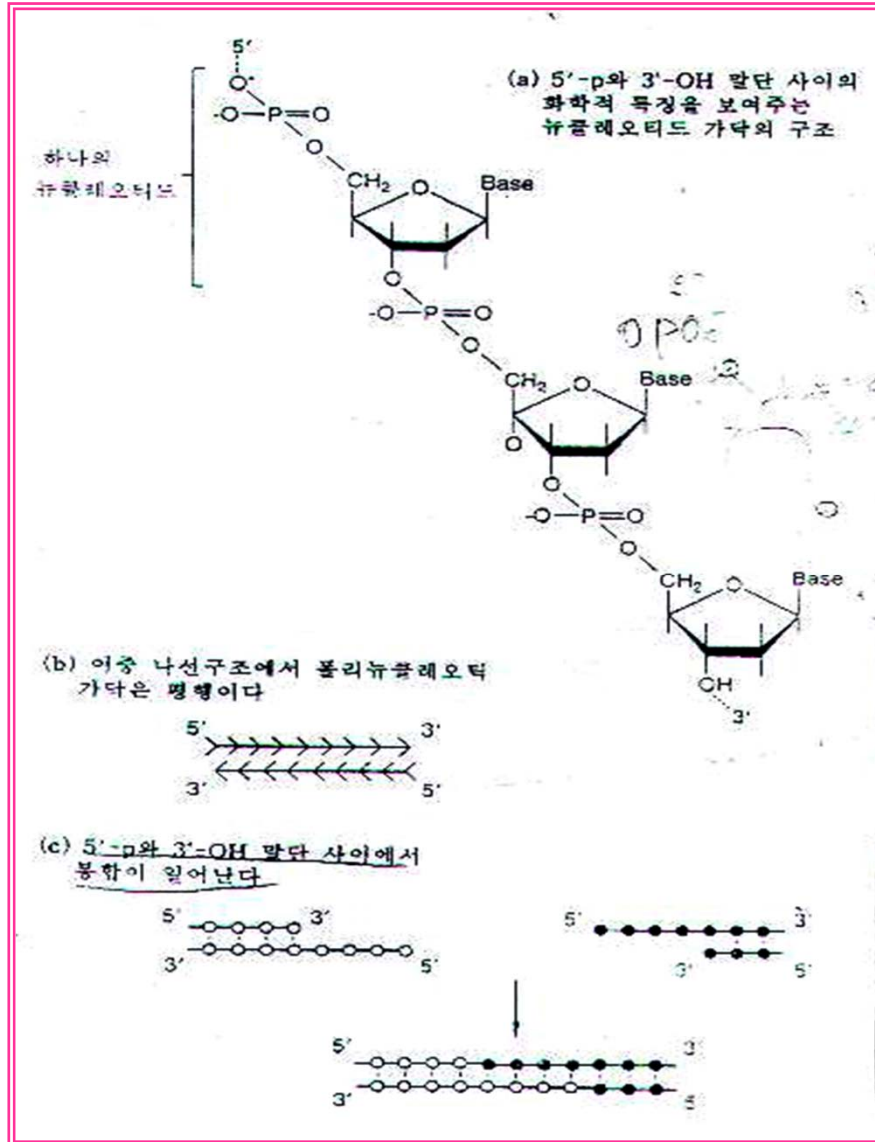
- 어답터와 그 이용에서 잠재된 문제.

(a) 전형적인 어답터

(b) 두개의 어답터는 연결자와 유사한 분자를 생성하기 위해 서로 **ligation** 될 수 있으므로

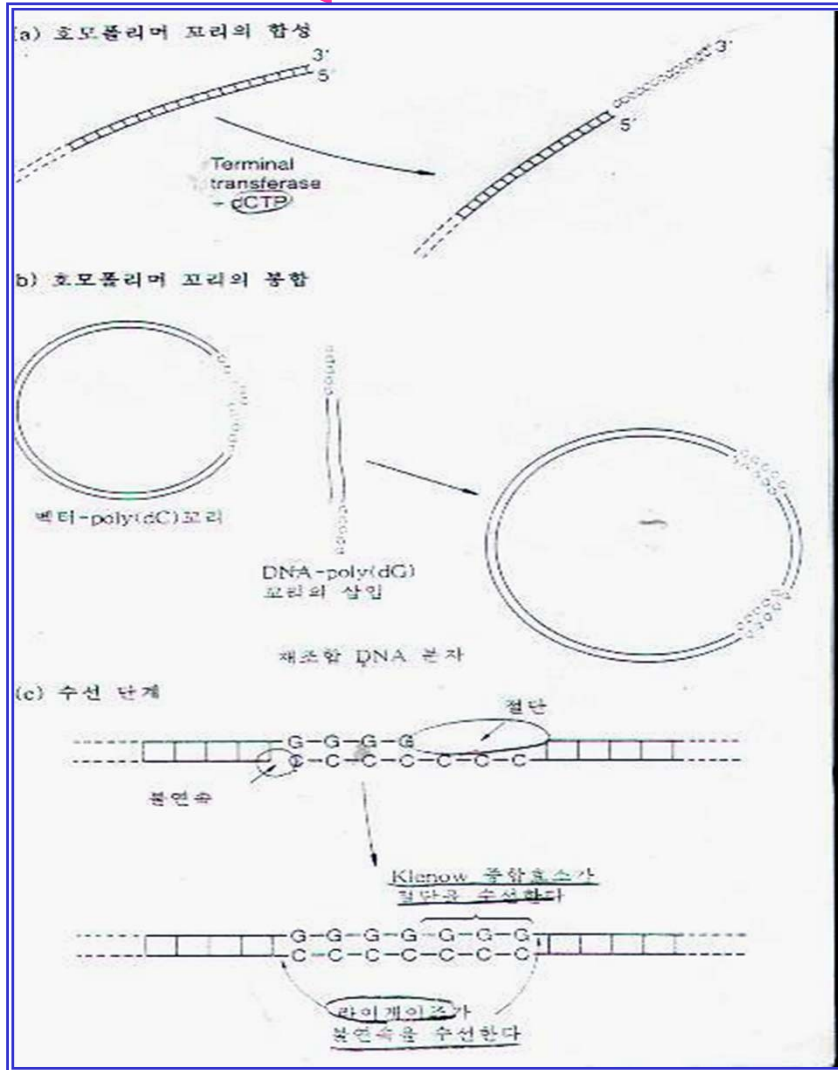
(c) 어답터의 **ligation** 이후 **blunt**말단이 되며 절단 단계가 필요하다.

어답터 분자말단의 화학구조



- 폴리뉴클레오티드의 5' 말단과 3' 말단 사이의 차이점

homopolymer tailing에 의한 접착말단의 도입



- homopolymer tailing
- (a) homopolymer tailing의 합성
- (b) Tailed vector 와 tailed insert DNA로부터 재조합 DNA 분자의 구축
- 실제로 poly(dG)와 poly(dC) 꼬리는 정확하게 같은 길이가 아니며, 염기쌍이 형성된 재조합 분자는 불연속뿐만 아니라, 절단도 포함할 것이다. 그러므로 복원은 두단계과정으로 절단을 채우기 위해 Klenow 중합효소를 사용한 후 마지막 포스포디에스테르결합을 만들기 위해 DNA리가제를 사용한다.