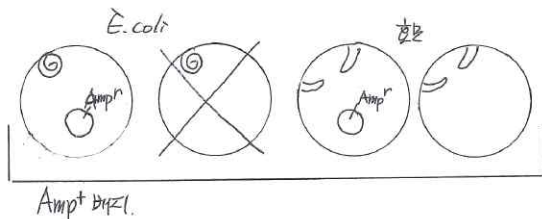


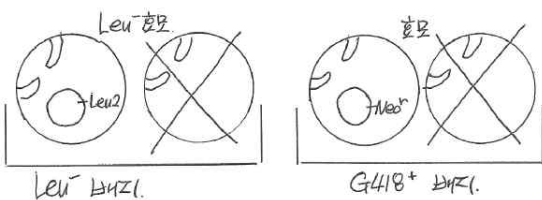
<선별표시자는 숙주에 맞게 사용되어야 한다.>

**[원핵:대장균]**에서 Amp<sup>r</sup> 유전자가 발현되면 β-lactamase가 발현되어 암피실린의 작용을 억제한다. 따라서 Amp<sup>r</sup> 플라스미드를 포함하는 **[대장균]**은 암피실린 배지에서 살아남아 콜로니를 형성하지만, Amp<sup>r</sup> 플라스미드를 포함하지 않는 대장균은 콜로니를 생성하지 못한다.

**[진핵:효모]**는 펩티도글리칸 세포벽을 지니지 않으므로, Amp<sup>r</sup> 플라스미드를 포함하는 효모나 포함하지 않는 효모 모두 암피실린 배지에서 콜로니를 생성할 수 있다. 따라서 Amp<sup>r</sup> 유전자는 효모에 대해 선별표시자로 사용될 수 없다.



대신 류신 합성 유전자(*leu2*)와 Neo<sup>r</sup> 유전자는 효모에 대해 선별표시자로 사용될 수 있다.

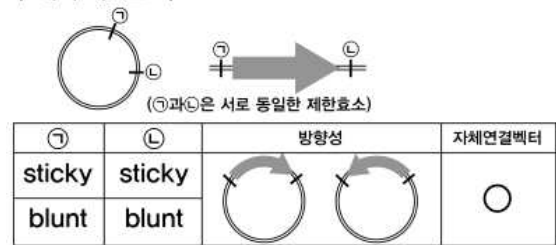


#### <항진균제>

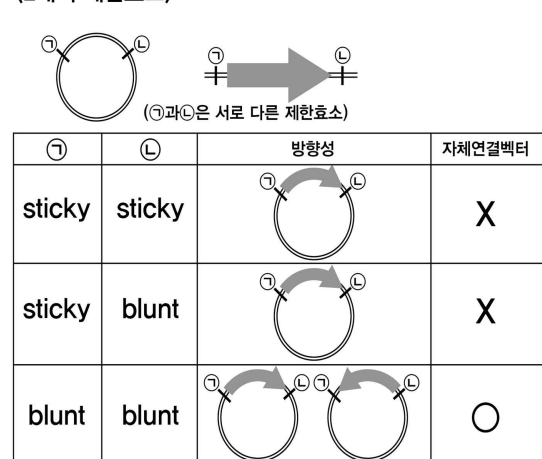
- ① amphotericin B, nystatin: ergosterol에 결합하여 세포막의 투과성을 증가시킴
- ② Azole 계(ketoconazole): ergosterol의 생성 억제
- ③ terbinafine: ergosterol의 생성 억제

**박테리옌(Bacteriocin):** 유사하거나 밀접한 세균의 성장을 억제하거나 죽이기 위해 세균이 생성하는 단백질성 독소, 물론 자신에게는 무해하다.

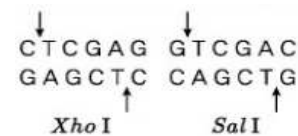
#### <1개의 제한효소>



#### <2개의 제한효소>



(단, 상보적인 sticky end를 형성하는 *Bam*HI & *Sau*3 AI이나 *Sal* I & *Xho* I으로 절단한 절편의 경우 정방향과 역방향의 재조합 플라스미드가 모두 생성될 수 있다.)

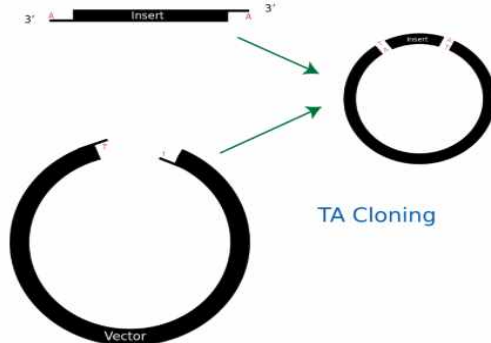


	Taq	Tth	Tfi
균주	<i>Thermus aquaticus</i>	<i>Thermus thermophilus</i>	<i>Thermus flavus</i>
교정판독			
진행성			

	Vent(Tli)	Pfu
균주	<i>Thermococcus litoralis</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
교정판독		
진행성		

### TA cloning

Rapid cloning 또는 T cloning이라고도 부르며, 전통적인 기술보다 매우 간단하고 빠른 클로닝 기술이다.



#### ① Insert DNA의 제작

insert DNA 제작 시, Taq DNA polymerase를 이용한 PCR 기술로 증폭하므로 insert DNA를 얻기 위해 전통적으로 사용되는 제한효소가 불필요하다.

Taq DNA polymerase는 3'→5' exonuclease 활성이 부족하여, 3' 말단에 단일 아데닌 염기를 추가(3' adenine overhang)하는 경향이 강하다.

#### ② Vector의 제작

플라스미드를 blunt-end 제한효소로 절단하여 선형화한 후, terminal transferase를 이용하여 ddTTP를 꼬리에 추가한다.(3' thymidine overhang)

#### ③ Insert DNA와 Vector의 연결

Ligase를 이용하여 서로 연결한다. 각 말단이 A와 T의 상보성을 지니므로 쉽게 서로 연결된다.

1. PCR로 유전자를 증폭한 후 T-vector에 연결(ligation)하여 재조합 클로닝을 수행하였다. TA-클로닝 기술이 가능한 이유는 PCR 과정에서 사용하는 Taq polymerase의 어떤 활성 때문인가?

- ① Alkaline phosphatase      ② klenow enzyme
- ③ Poly A polymerase      ④ Polynucleotide kinase
- ⑤ Terminal nucleotidyl transferase

2. TA 클로닝 기술과 관련된 설명으로 옳은 보기를 모두 고르시오.

- ① 삽입되는(insert) DNA를 제작하기 위해 제한효소와 Taq DNA 중합효소를 사용한다는 특징을 갖는다.
- ② insert DNA 제작 시, Taq 대신 Pfu나 Vent와 같은 DNA 중합효소를 사용할 수도 있다.
- ③ insert DNA에 적합한 제한효소자리가 없을 때, TA 클로닝이 유용하다.
- ④ Vector 제작 시, ddTTP 대신 dTTP를 꼬리에 추가할 경우 실험의 효율이 높아진다.
- ⑤ insert DNA와 vector를 연결할 때, 원하는 방향으로만 연결되는 방향성 클로닝(directional cloning)이 가능하다.

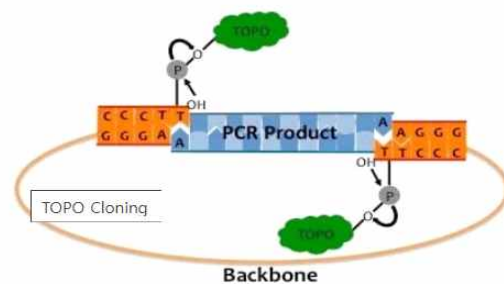
### TOPO cloning(Topoisomerase based cloning)

Vaccinia virus 유래 topo I은 5'NCCCTT↓N3' 또는 5'NTCCTT↓N3' 서열에서 한 가닥을 절단하고 서로 연결하는 효소이다.

#### • TOPO blunt cloning

#### • TOPO TA cloning

- ① 3' adenine overhang을 가진 Insert DNA의 제작
- ② 3' thymidine overhang과 여기에 연결된 topo를 가진 Vector의 제작
- ③ topo I에 의해 insert DNA의 3'-OH가 인산기가 연결되고 효소는 떨어져나온다.  
→ 이 경우 두 가닥 중 한 가닥만이 연결된 상태이지만 세포 내에서 nick은 repair 된다.



#### • Directionally TOPO cloning

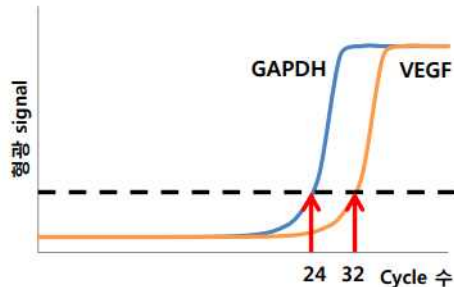
PCR 산물의 한쪽 말단에 CACC 서열을 포함시키고, 벡터는 GTGG overhang을 갖고 있어서 삽입 가능한 방향이 단 하나로 제한되도록 하는 방법.

3. TOPO cloning 기법에 대한 설명으로 옳은 설명을 모두 고르시오.

- ① TOPO cloning은 제한효소와 DNA ligase를 이용하여 DNA 단편을 벡터에 삽입하는 전통적인 클로닝 방식이다.
- ② TOPO 벡터는 일반적으로 topoisomerase I가 벡터의 말단에 공유 결합되어 있다.
- ③ TOPO cloning은 DNA ligase 없이 topoisomerase 효소를 이용하여 DNA 단편을 벡터에 삽입하는 방식이다.
- ④ TOPO cloning은 PCR 산물의 3' 말단에 G 염기를 추가하여 벡터에 삽입하는 방식이다.
- ⑤ TOPO cloning은 항상 단일 복제원점(ori)을 가지는 벡터에서만 수행할 수 있다.
- ⑥ TOPO cloning은 일반적으로 삽입 효율이 낮기 때문에 주로 제한효소 기반 클로닝이 선호된다.

## Cancer mouse cell과 normal mouse cell(negative control)에서 VEGF 발현량의 비교

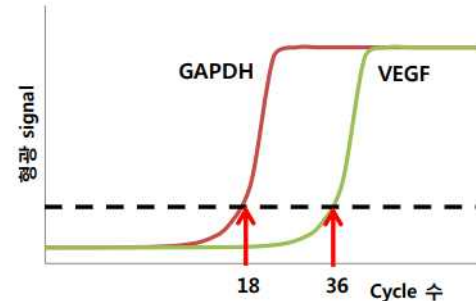
## Cancer cell



Cancer 각 유전자의 Ct?  
 GAPDH = 24  
 VEGF = 32

Cancer의  $\Delta Ct$   
 = Target gene Ct - H.K.G Ct  
 = 32 - 24  
 = 8

## Negative control



Negative 각 유전자의 Ct?  
 GAPDH = 18  
 VEGF = 36

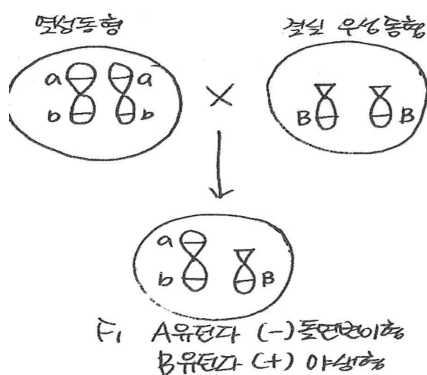
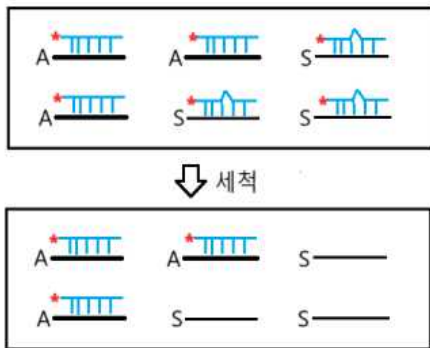
Negative의  $\Delta Ct$   
 = Target gene Ct - H.K.G Ct  
 = 36 - 18  
 = 18

$$\begin{aligned}\Delta \Delta Ct &= \text{Cancer } \Delta Ct - \text{Negative } \Delta Ct \\ &= 8 - 18 \\ &= -10\end{aligned}$$

$\Delta Ct$ : target 유전자와 reference 유전자 Ct 값의 차이.  
 유전자 발현량의 상대적인 비교를 위해 사용.

$\Delta \Delta Ct$ : 실시간 정량 PCR(Real-Time PCR)에서 유전자 발현량을 상대 비교 분석할 때 사용되는 방법.  
 주로 실험군과 대조군에서 특정 유전자 발현 변화를 상대적으로 정량화하는데 활용되며, 이 방법으로 유전자 발현량의 변화를 배수(fold change)로 나타낼 수 있다.

Q. Cancer cell에서의 VEGF 발현량은 normal cell 보다  $2^{10}$ 배 (높다/낮다)



1. 다음의 유전체에 관한 설명으로 옳지 않은 것은?

- ① 사람 유전체의 0.05%는 미토콘드리아에 존재한다.
- ② 반복되는 염기서열을 지문처럼 개인의 식별에 이용할 수 있다.
- ③ 사람의 DNA는 대부분 암호화 서열로 구성된다.
- ④ 세균과 고세균에서도 인트론이 발견된다.
- ⑤ 사람 유전체의 비암호화서열에서 약 절반은 반복 서열로 구성된다.

2. 다음 중 Human Genome Project(HGP)에 관한 설명으로 옳지 않은 것은?

- ① HGP는 1990년에 시작되어 2003년에 공식적으로 완료되었다.
- ② HGP의 목표는 인간 유전체 전체 염기서열을 해독하는 것이었다.
- ③ HGP에서는 주로 de novo assembly 방식만 사용하여 유전체를 조립하였다.
- ④ HGP는 인간 질병 연구와 맞춤의학 발전에 큰 기여를 하였다.
- ⑤ HGP는 미국, 영국, 일본의 과학자가 참여한 국제적인 공동 연구 프로젝트였다.

3. 다음 중 de novo assembly와 reference-based assembly의 차이에 대한 설명으로 옳지 않은 것은?

- ① De novo assembly는 참고 유전체(reference genome)가 없을 때, 시퀀싱된 read를 겹침정보를 이용해 조립한다.
- ② Reference-based assembly는 이미 알려진 유전체 서열에 read를 정렬하여 변이를 분석하는 데 주로 사용된다.
- ③ Reference-based assembly는 참조 유전체가 존재할 때 시퀀싱 데이터를 조립하는 데 효과적이다.
- ④ De novo assembly는 주로 새로운 종의 유전체 해독에 사용되며, 참조 유전체가 없는 경우 필수적이다.
- ⑤ De novo assembly는 reference-based assembly보다 계산 비용이 적고 더 빠르다.

4. 다음은 염기서열이 밝혀진 여러 개체에 대한 설명이다. 옳은 보기를 모두 고르시오.

- ① MS2 phage에 대해 최초로 염기서열분석이 시작되었지만, MS2 phage보다  $\phi$ X174의 전체 염기서열이 먼저 분석되었다.
- ② *Hemophilus influenza*는 처음으로 전체 유전체 염기서열이 분석된 생명체이다.
- ③ 진핵세포로는 *S. cerevisiae*가 처음으로 분석되었다.
- ④ *C. elegans*는 진핵 다세포 생명체 중에서 처음으로 전체염기서열이 분석되었다.

### 질량분석법(Mass spectrometry)

- MALDI-TOF MS
- ESI-MS
- LC-MS/MS (Liquid Chromatography-MS/MS)
- TMT-labelling MS  
(tandem mass tag labeling MS)

#### 1. 시료 전처리

단백질이 포함된 혈액, 세포 등 생체 시료를 추출, 분리, 정제한 후, 얻어낸 단백질을 펩타이드로 가수분해하여 질량 분석에 적합하도록 처리한다.

#### 2. 이온화(ionization)

펩타이드들을 기체 상태의 이온으로 변환한다.

- MALDI  
(Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization)
- ESI(Electrospray Ionization)

#### 3. 분석 및 검출

이온화된 펩타이드들을 질량 분석기(mass analyzer)를 이용하여 검출한다.

대표적인 질량 분석기인 Time-of-Flight(TOF)는 이온을 비행시켜 질량/전하( $m/z$ )에 따른 비행시간 차이로 검출하며, 그 외에도 Quadrupole(Q), Orbitrap 등이 있다.

#### 4. 데이터 분석

질량 분석 결과를 분석하여 펩타이드 서열 및 단백질을 동정(identification)하고, 정량 정보를 얻는다.

줄기세포	형성 가능한 세포	종류	유연성
전능성 (totipotency)			↑
만능성 (pluripotency)			↑
다능성 (multipotency)	특정 계열 세포		특정 조건에서 가능
단능성 (unipotency)	하나의 세포 유형		X

FRET(Fluorescence Resonance Energy Transfer,  
형광 공명 에너지 전달)

