

《 지구과학2 세특 보고서 》

하이에듀

주제	지구 내부 에너지와 생명공학
관련 단원	2. 지구 내부 에너지
요약	<p>지구 내부 에너지는 지구의 내부에서 생성되고 유지되는 열 에너지를 의미합니다. 이러한 내부 에너지는 지진, 화산 폭발, 온천 등 지구의 지질 활동과 관련이 있습니다. PCR은 DNA의 대량 복제를 가능하게 하는 분자생물학 기술로, Taq polymerase라는 효소가 중요한 역할을 수행합니다. Taq polymerase는 <i>Thermus aquaticus</i> 박테리아에서 분리된 내열성 효소로, 이러한 내열성은 고온 환경에서 안정한 활성을 유지할 수 있게 합니다. 지구 내부 에너지와 Taq polymerase의 연관점은 바로 <i>Thermus aquaticus</i> 박테리아입니다. 이 박테리아는 지열 환경에서 생존하며 Taq polymerase를 생산합니다. 이렇게 지열 환경에서 발견되는 생물들은 지구 내부 에너지와 관련된 환경에서 적응하고, Taq polymerase와 같은 내열성 효소를 생산하는 특성을 가지고 있습니다. 따라서, Taq polymerase는 지구 내부 에너지 연구와 분석에 활용되며, 지구 과학과 생물학 분야에서 유용하게 사용되고 있습니다. 이러한 흐름을 활용하여 보고서를 작성해보세요.</p> <p>서론 : 지구 내부 에너지와 관련된 설명 (자료1 참고) 본론 : PCR 과 Taq Polymerase 에 관련한 설명 (자료2,3 참고) 결론 : 지구과학과 생명공학의 연관성, 연구를 통해 두 분야가 함께할 수 있다는 사실 등 느낀점을 작성</p>

자료1. 지구 내부 에너지

아이슬란드는 맨틀 대류 상승부인 해령에 위치해 지하로부터 많은 양의 열이 방출된다. 해구 부근에 위치하는 일본 또한 섭입대에서 암석권의 용융에 의한 마그마가 지표로 올라오며 많은 열이 방출된다. 따라서 이 지역들은 지온이 높기 때문에 온천이 많이 분포한다.

지구 내부 에너지원

지구 내부 열에너지의 근원으로는 지구 탄생 초기에 생성된 열이 있다. 지구는 태양계 성운 속에서 성간 물질의 수축으로 생성되었으며, 이때 중력 에너지가 열에너지로 전환된다. 원시 지구는 주변의 미행성체가 집적되면서 성장했는데 이때의 충돌에 의한 열에너지도 저장되어 있다. 또한, 원시 지구의 용융된 마그마 바다에서 맨틀과 핵이 분화될 때 무거운 금속 성분이 가라앉게 되는데, 이때 위치 에너지가 열에너지로 전환된다. 지구는 탄생 이후로 식어가는 중에 있으며, 쌓인 열에너지를 계속해서 방출하고 있다. 또 다른 지구 내부 열에너지의 근원으로 방사성 원소 붕괴열이 있다. 암석에 포함된 우라늄, 토륨, 칼륨 등의 방사성 원소는 자연적으로 붕괴하며 방사선을 방출한다. 이때 방출되는 열이 지구 내부의 주요 열에너지원으로 작용한다.

지각 열류량

지구에 축적된 열은 지구 내부에서 지표면으로 흘러나가며, 이때 1m^2 의 지표면에 1초 동안 방출되는 열량을 지각 열류량이라고 한다. 지각 열류량은 암석의 열전도도와 지온 구배에 의해 결정된다. 즉 암석의 열전도도가 높을수록, 암석층의 두께에 따른 온도차가 클수록 많은 열량이 방출된다. 일반적으로 방사성 원소는 화강암에 가장 많이 포함되어 있다. 따라서 방사성 원소 붕괴열은 현무암으로 구성된 해양 지각보다 화강암으로 구성된 대륙 지각에서 더 많이 발생한다. 그러나 방사성 원소 붕괴열 이외에 지구 내부에서 전달되는 열도 있기 때문에, 이를 모두 고려하면 해양지각에서의 열류량이 더 많다. 특히 맨틀 대류 상승부인해령에서 지각 열류량이 가장 많고 맨틀 물질이 하강하는 해구에서 지각 열류량이 적다.

열의 이동

열이 전달되는 방식에는 복사, 전도, 대류가 있다. 복사는 전자기파 형태로 열이 이동하는 것으로, 지구 내부는 불투명하기 때문에 지열에서 복사의 효과는 매우 적다. 전도는 접촉되어 있는 물질 사이에서 원자의 진동에 의해 열이 전달되는 방법이다. 지구의 온도는 중심부로 갈수록 증가하는 양상을 보이며, 딱딱한 암석권을 통한 열의 유출은 주로 전도에 의해 이루어진다. 대류는 물질이 실제적으로 이동하며 열을 전달시키는 방법으로, 특히 유체의 열전달에 효율적이다. 액체로 이루어진 외핵은 1초에 수 cm씩 이동을 하며 대류에 의해서 열을 전달시킨다. 고체인 맨틀은 지질학적인 시간 규모로 볼 때 액체와 같은 유동성을 가지며, 1년에 수 cm씩 움직이고 있다. 따라서 맨틀도 대류를 통해 열을 전달한다.

지구 내부 온도

지구 내부는 깊이에 따라 온도가 점점 증가한다. 지표면근처에서는 지온 증가율이 100m

당 3°C 정도로 매우 높다. 지구 중심까지 같은 증가율로 온도가 상승한다면 지구 중심의 온도는 20만°C 까지 올라가게 되는데, 이는 태양의 표면 온도보다 높은 값이다. 내핵은 고체이므로 지구내부의 온도는 내핵을 액체 상태로 만들만큼 높지는 않을 것이다. 따라서 과학자들은 지구 중심 온도가 5000°C보다 낮을 것으로 예상하고 있다.

자료2. PCR 과 Taq Polymerase

PCR (Polymerase Chain Reaction, 중합효소 연쇄반응), 지금은 생명과학 연구자라면 누구나 경험이 있을 정도로 흔한 기술이 되었지만, 특정 유전자의 클론을 제작하고 재조합 단백질을 생산하기 위해 필수적인 기술로, 오늘날 생명공학의 비약적인 발전을 견인한 핵심 기술이다.

PCR (Polymerase Chain Reaction)

PCR은 DNA 복제 (Replication) 반응을 고온에 안정한 Taq polymerase와 반응 온도를 프로그램으로 자동으로 조절할 수 있는 PCR 기계를 사용하여 연쇄적으로 일어나도록 만든 기술이다. PCR에 대해 알아보기에 앞서 PCR 반응의 기본이 되는 DNA 복제에 대해 알아 보자.

DNA 복제는 세포가 분열하기 전에 자신과 동일한 유전자를 전달해 주기 위해 DNA 사본을 만드는 과정이며, Topoisomerase, Helicase, DNA primase, DNA polymerase, DNA ligase로 구성된 5종의 효소 반응을 통해 일어난다. DNA 이중 나선은 5'→3' 방향의 DNA 단일 가닥에 이와 상보적인 3'←5'방향의 DNA 단일 가닥이 서로 염기쌍 (A=T, G≡C)의 수소결합으로 연결되어 있다.

DNA 복제는 주형 DNA의 이중 나선 구조를 푸는 과정으로 시작한다. Topoisomerase가 DNA에 결합하여 이중 나선이 꼬이는 것을 방지하는 동안 Helicase가 DNA 이중 나선을 풀면, 풀려진 단일 가닥에 single strand binding protein이 결합하여 상보적인 두 가닥이 다시 결합하는 것을 방지한다.

“Leading strand”라 불리는 3'←5' 주형 가닥에 DNA primase (RNA polymerase)가 결합하여 RNA primer를 합성하면, DNA polymerase는 RNA primer의 3' OH에 주형 서열과 상보적인 nucleotide를 5'→3' 방향으로 순차적으로 결합시켜 정방향 (→)으로 DNA 가닥을 연속적으로 합성한다. 여기서 한가지 궁금증이 생긴다. DNA primase가 왜 DNA polymerase가 아니고 RNA polymerase일까? 그 이유는 DNA polymerase는 중합 반응을 시작하는데 반드시 primer가 필요한 반면, RNA polymerase는 primer를 필요로 하지 않기 때문이다.

DNA 중합 반응에서 기억해야 할 것은 DNA polymerase는 항상 5'→3' 방향으로만 합성

한다는 점이다. 여기서 5', 3'는 nucleotide를 구성하는 5탄당의 탄소 번호를 나타낸다. 앞서 합성된 3'OH에 새로운 deoxyNucleotide triphosphate의 di-phosphate가 떨어져 나가면서 서로 연결되어 phosphodiester 결합 [-3'-O-P-O-5'->]을 형성하면서 상보적인 사슬이 합성된다.

“Lagging strand”라 불리는 5'→3' 주형 가닥은 5' 말단부터 합성을 시작하면 상보적으로 합성되는 DNA는 3'→5' 방향이 되어야 하는데, 앞서 언급했듯이 DNA polymerase는 5'→3' 방향으로만 합성이 가능하므로 5' 말단에서 시작하는 것이 불가능하다. 이러한 문제를 해결하기 위해 lagging strand는 주형 DNA의 말단으로부터 약 150-200 bp 떨어진 서열에서 시작하여 주형 DNA 진행방향과 반대 방향으로 주형 서열에 상보적인 nucleotide를 결합시켜 5'→3'방향으로 DNA 합성을 하게 된다. Lagging strand의 이러한 합성 방식은 불연속적인 약 ~200 bp의 DNA 단편 (Okazaki 절편)을 만들게 되는데, DNA ligase를 사용하여 연속적인 가닥으로 연결하게 된다.

PCR은 5종의 효소반응으로 이루어진 복잡한 DNA 복제 과정을 고온에서도 안정한 Taq polymerase와 3종의 효소(Topoisomerase, Helicase, DNA ligase) 반응을 대신할 3단계 온도조절 [Denaturation(열변성)-Annealing(Primer 결합)-Polymerization(DNA 합성)]이 가능한 PCR 기계, DNA primase를 대신할 DNA primer를 사용하여 연속적인 DNA 복제 반응을 가능하게 한 획기적인 유전자 증폭 기술이다. 그럼 PCR 반응을 구성하는 기본 요소에 대해 좀 더 자세히 살펴보자.

PCR 반응의 구성 요소

PCR 반응의 구성 요소는, 복제할 유전자의 원본에 해당하는 주형 (template) DNA, PCR primer, Taq polymerase, PCR buffer와 Salts, dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), PCR 반응 효율을 높이기 위해 필요에 따라 추가하는 첨가물 (supplements)로 이루어져 있다.

주형 DNA는 genomic DNA, plasmid DNA, PCR 산물 등 DNA는 모두 사용 가능하다. 단, RNAs (mRNA, rRNA)는 Taq polymerase의 주형으로 직접 사용할 수 없어 상보적인 DNA (complementary DNA, cDNA)로 만들어 사용해야 한다. RNA로부터 cDNA를 만드는 과정은 DNA에서 RNA를 만드는 전사 (Transcription)의 반대 과정으로, 역전사 (Reverse transcription)라 한다. RNA를 유전물질로 사용하는 바이러스로부터 유래한 역전사 효소 (reverse transcriptase)를 사용하여 RNA로부터 cDNA를 합성할 수 있다.

단백질 발현을 목적으로 진행 세포의 유전자를 주형으로 사용하는 경우 한가지 기억해야 할 것은, 하나의 단백질을 코딩하는 유전자가 연속적인 형태로 존재하는 원핵 세포와 달리, 진핵 세포는 하나의 단백질을 코딩하는 유전자가 여러 개의 단편 (Exon, E)으로 나뉘어져 코딩하지 않는 단편 (Intron, I)과 모자이크 형태 (예, -E1-I-E2-I-E3-)로 "불연속적"으로 이루어져 있다는 점이다. 이런 경우 Intron이 제거되어 연속적인 Exon 형태로 이루어

진 mRNA를 사용하여 cDNA를 합성한 후 주형으로 사용하여야 한다.

주형 DNA의 양은 종류에 따라 1 pg~1 µg까지 사용한다. Plasmid와 같이 단일 유전자인 경우 수 pg~수 ng 정도로도 충분하지만, genomic DNA나 cDNA library와 같이 다양한 유전자의 혼합물인 경우 1 µg까지 사용한다.

PCR primer는 증폭하고자 하는 유전자에 특이적이며 상보적인 서열로 구성된 단일 가닥 (single strand)의 DNA 단편이다. PCR primer는 증폭하고자 하는 "유전자의 합성 범위를 지정"하고, PCR 산물의 "특이성을 결정"하는 가장 중요한 요소이다. 또한 Taq polymerase 가 DNA 중합 반응을 시작할 수 있도록 "3'OH를 제공"한다.

PCR primer는 크기는 약 20 nucleotides 내외, GC 비율은 50% 내외, Tm (melting temperature)은 55°C 정도를 기본값 (default 값)으로 하여 디자인한다.

Primer는 leading strand (3'←5', anti-sense strand)의 시작 (Start) 서열에서부터 정방향으로 상보적인 "Forward primer"와, lagging strand (5'→3', sense strand)의 마지막 (Stop) 서열에서부터 역방향으로 상보적인 "Reverse primer", 2개의 쌍 (pair)으로 구성된다.

단백질 발현 목적으로 유전자 전체를 증폭해야 하는 PCR primer는 선택의 폭이 넓지 않아 이러한 조건을 모두 충족하기는 어렵다. 이 경우 PCR 반응 효율이 감소할 수 있는데, PCR 반응액의 조성이나 반응 조건을 적절히 조절하여 문제를 해결하여야 한다.

유전자의 존재 유무만 확인하는 경우, 특이성이 높은 primer 선택이 가능한 일부 서열 (100~500 bp 정도)만 증폭하도록 디자인 한다. Primer 선택의 폭이 넓을 경우, 비특이적인 증폭을 피하기 위해 3'쪽에는 AT보다는 "GC"가 되도록 하고, GC가 연속적으로 4개 이상 되는 서열은 피하도록 한다. PCR 산물의 크기가 100 bp 이하이면 확인 시 primer dimer 혹은 비특이적인 증폭 산물과 구분이 쉽지 않고, 크기가 커지면 PCR 반응 시간이 증가한다.

Primer 디자인은 선호하는 방법에 따라 무료 웹사이트 (예, Primer3: <https://bioinfo.ut.ee/primer3/>, *PrimerQuest: <https://sg.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>, *회원 가입 필요)나 유료 프로그램을 이용하여 기본값을 사용하거나 원하는 조건으로 기본값을 변경하여 디자인한다.

Primer의 특이성은 primer 서열을 입력하면 유사한 서열을 찾아주는 무료 웹사이트인 NCBI BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)에서 분석할 수 있다.

예를 들어, 사람의 A 유전자를 증폭하기 위해 디자인한 primer가 A 유전자 이외 다른 유전자와 homology가 높은 것이 많이 존재할수록 A 유전자 이외의 비특이적인 유전자가 같이 증폭될 가능성이 높으므로 피한다.

클로닝을 목적으로 하는 경우, 클로닝 벡터의 "제한 효소 (restriction enzyme)" 자리를 고려하여 각 primer의 5'쪽에 제한 효소 인식 서열 (6~8 bases)을 추가할 수 있다. 이때 제한 효소의 종류에 따라 효율적인 인식 및 절단을 위해 인식 서열 외에 1~5개의 추가적인 nucleotides 를 필요로 하므로 이를 확인 (예, NEB website: <https://international.neb.com/tools-and-resources/usage-guidelines/cleavage-close-to-the-end-of-dna-fragments>)하여 포함시킨다.

이때 주의할 점은 추가하고자 하는 제한 효소 서열이 증폭하고자 하는 유전자 서열 내부에는 존재하지 않아야 한다. 제한 효소 서열의 존재 유무는 무료 웹사이트 (예, Restriction mapper: <http://www.restrictionmapper.org>)에서 확인 가능하다.

Forward primer의 앞쪽이나 Reverse primer 뒤쪽에 정제나 확인 목적으로 "Tag" (예, -[His]6, myc tag)을 포함시킬 수 있다. Tag은 제한 효소 서열과 유전자 서열 사이에 추가하면 된다. 이 때 tag과 증폭 유전자 사이에 "frameshift" (3개의 nucleotides로 이루어진 아미노산 코딩 frame이 nucleotide의 insertion이나 deletion으로 인해 그 이후의 frame이 어긋나 다른 아미노산이 만들어 지는 것)가 일어나지 않도록 주의해야 한다.

또 한가지 주의할 점은 reverse primer 뒤쪽에 tag을 포함시킬 경우 증폭 유전자와 tag 사이의 "Stop codon"은 반드시 제거하고, tag 뒤쪽에 Stop codon이 포함되도록 해야 한다.

Taq polymerase는 온천이나 열수공 (熱水空; 뜨거운 물이 분출되는 구멍) 근처에서 서식하는 호열성 미생물 (thermophilic eubacteria)인 *Thermus aquaticus*로부터 분리되어 고온의 열변성 조건에서도 활성을 유지하는 "고온성 DNA 중합효소"이다. 일반적인 DNA polymerase는 최적 온도가 섭씨 37°C 부근이고, 60°C 이상이 되면 단백질 변성이 일어나 활성을 잃어 버린다. 반면, Taq polymerase는 고온의 서식 환경에 적응한 덕택으로 최적 온도가 섭씨 75~80°C이고, DNA 변성 조건인 95°C에서 반감기가 40분일 정도로 고온에서도 안정하게 활성을 유지할 수 있다.

Taq polymerase의 고온 안정성은 DNA 복제에 필요한 다양한 효소들을 대체하고 DNA 중합효소 하나만으로 DNA 변성 (denaturation)-Primer 결합 (annealing)-DNA 중합 (polymerization) 으로 이루어진 PCR cycle을 가능하게 만들었다.

Taq polymerase는 5'→3' DNA polymerase, 5'→3' Exonuclease 활성은 있지만, DNA 합성 과정에 잘못 결합된 nucleotide를 제거하여 교정 (proofreading)하는 3'→5' Exonuclease 활성이 없어, 약 9,000개 중 1개의 빈도도 오류가 발생한다. 이러한 에러율

은 PCR 산물에 돌연변이가 도입될 가능성을 높이는데, 3'→5' exonuclease 활성이 있는 효소를 사용하면 줄일 수 있다.

<https://www.ibric.org/myboard/read.php?Board=news&id=322351>

<https://contents.premium.naver.com/biotalkkim/knowledge/contents/221018002041672je>

자료3. 내열성 DNA polymerase

소설 <쥐라기 공원>을 쓴 마이클 크라이튼은 하버드 의대를 졸업하고 매사추세츠공대(MIT)에서 글쓰기를 가르친 독특한 이력의 소유자다. 그는 흡혈 모기에서 공룡의 디엔에이(DNA)를 추출하고 증폭해, 실제 공룡을 복원하는 상상력을 독자들에게 선보였다. 그 소설 속의 디엔에이 증폭 기술인 '중합효소 연쇄반응'(PCR)은 소설이 출판된 지 3년 뒤, 그 발명자 캐리 멀리스에게 노벨화학상을 선사했다. 흥미로운 것은 멀리스 역시 생화학으로 박사학위를 받은 뒤 소설을 쓰려고 잠시 연구를 떠났다가 돌아온 탕자였다는 사실이다.

하지만 그 중합효소 연쇄반응이라는 기술도 섭씨 70도의 고온에서 최적으로 생육하는 세균 '테르무스 아쿠아티쿠스'(Thermus aquaticus)가 없었다면 불가능했다. 고온에서도 제 기능을 하는 디엔에이 중합효소를 생산하는 테르무스 세균은 인류가 달 착륙에 성공했던 1969년 미국 미생물학자 토머스 브록에 의해 발견됐고, 화상을 입기에 충분한 온도에서 미생물이 살고 있다는 사실은 수많은 과학자들을 놀라게 만들었다. 하지만 언제나 현실은 이론보다 풍부한 법. 2년 뒤 브록은 섭씨 90도가 넘는 온도에서 생육하는 초고온균 '술폴로부스 아시도칼다리우스'(Sulfolobus acidocaldarius)를 찾아냈다.

그렇다면 생물이 살 수 있는 최고 온도는 몇 도일까? 현재까지 가장 높은 온도에서 사는 미생물은 미국 매사추세츠대 데릭 러블리 교수팀이 발견한 '균주 121'(Strain 121)인데 무려 섭씨 121도에서 최적의 생육을 한다. 121도는 실험실에서 균주를 죽일 때 사용하는 가압멸균기가 작동하는 온도다.

이렇듯 극한환경에서 자라는 미생물들을 극한미생물이라고 한다. 하지만 극한환경이란 인간의 기준일 뿐이다. 뜨거운 심해저 화산이나 온천 지대, 추운 남극과 북극, 고농도 염분이 존재하는 이스라엘 사해, 강산이나 강알칼리가 존재하는 환경 등은 극한미생물들에게 최적의 환경일 뿐이다. 이런 극한미생물들이 생산하는 효소들은 중합효소 연쇄반응 이외에도 식품공업·정밀화학·세제 등 여러 분야에서 유용하게 쓰이고 있으며, 그 유전자원과 생산물질은 생물자원이 날로 중요한 재산이 되는 21세기에 그 중요성을 인정받고 있다.

지난 9월 남아공 케이프타운에서 '2008 국제 극한미생물학회'가 열렸다. 세계 28개국 300여명의 연구자들이 새로운 미생물들을 보고했고 그 효소·유전자·생산물의 쓰임새에 대한 연구를 풍성하게 발표했다. 올해에는 극한미생물을 이용한 바이오연료 개발 연구들이 많은 주목을 받았다. 셀룰로오스를 이용한 바이오에탄올 생산, 청정기술이라고 일컬어지는 바이오수소 생산, 고온균을 이용한 오일샌드 정유기술 등에서 극한미생물은 특히 유용하게 쓰일 것으로 기대됐다.

아직 우리나라에 극한미생물을 전문으로 연구하는 연구자는 많지 않다. 하지만 최근 한국

해양연구원을 중심으로 여러 연구자들이 여러 극한미생물을 분리해냈고 게놈(유전체)을 해독하는 사업도 마무리했다. 대한민국은 신종 세균 발굴에서 세계 1위이며 남·북극에 연구 기지를 갖춘 나라다. 이렇게 곳곳에 산재한 연구 인프라들이 상승작용을 일으킬 수 있도록 연구자들이 노력하고 각계의 지원이 필요한 때다.

<https://www.hani.co.kr/arti/opinion/column/319287.html>

내열성 DNA polymerase의 생화학적 성질

(1) 내열성

DNA polymerase의 내열성은 그 효소를 생산하는 호열성 세균의 생육온도와 연관성이 있다. *Taq* polymerase의 내열성은 연속적으로 92.5°C에 놓아두면 160분 후에도 80% 이상의 활성을 가지고 있다. 96°C에서는 35분에 활성이 반감하지만, 96°C 1분, 55°C 1분, 72°C 1분의 사이클로 반복하면 40 cycles에서 반감한다. 이것은 PCR반응에는 열안정성이다 (Takara).

(2) DNA가닥 신장능력

Poi I형의 효소는 시험관 내에서의 DNA 신장활성이 강하다. 예를 들면 M13 phage의 한 가닥 DNA에 primer를 하나 annealing하고 DNA polymerase를 첨가한 뒤 합성능력을 보았는데, Poi I형인 *Taq* polymerase (TaKaRa) 및 *Bca*BEST polymerase (TaKaRa)와 α 형 효소인 *Pfu* polymerase (Stratagene) 등을 활성화 DNA를 주형-primer로 하여 얻은 활성으로부터 동일한 활성단위 (0.6U)를 사용하여 primer 신장을 시작한 후 시간경과에 따른 신장능력을 비교한 결과, *Bca*BEST, *Taq*에 비해 *Pfu* polymerase의 신장능력은 낮았다. 약 8kb의 M13 DNA를 일주하는데 *Bca*BEST, *Taq*은 5분 이내인데 반하여 *Pfu*는 20분 정도 소요된다. 이것은 PCR반응에 있어서는 불리한 성질이다.

(3) 정확도 (fidelity)

DNA polymerase의 DNA 합성에 있어서 정확도는 돌연변이 출현빈도로 나타낸다. 예를 들면 *Taq* polymerase에서 보고되고 있는 $1\sim 2 \times 10^{-4}$ 수치³⁾는 1회의 DNA가닥 합성시 10,000 nucleotide에 1~2개의 비율로 주형 DNA와 mismatch를 일으키는 변이가 생기는 것을 의미한다. 돌연변이 빈도측정으로 각 DNA polymerase의 정확도를 비교할 수 있지만, 이 값은 측정조건에 크게 영향을 받는다. 즉, dNTP 농도, 주형-primer의 종류, 반응온도, 염과 금속이온의 종류, 변이 검출의 방법 등이 다르면 결과도 달라진다. 따라서 DNA polymerase의 정확도를 비교할 때는 동시에 같은 조건으로 변이빈도를 측정해야 한다.

(4) Termination extension 활성화

DNA polymerase를 사용한 시험관내 DNA 합성의 경우, 여러 DNA polymerase에 의한 합성가닥은 주형 DNA의 3' 말단에서 정확하게 멈추지 않고 1개의 nucleotide가 여분으로 부가된다. DNA polymerase가 가지고 있는 terminal transferase 활성을 말단기 부가 활

성이라 부르지만 그 강도는 DNA polymerase의 종류에 따라 다르고, 같은 DNA polymerase라도 주형 DNA 말단의 서열에 따라 다르다. 이 성질은 PCR에 의한 증폭 DNA 단편을 plasmid vector에 삽입하고 싶은 경우에 중요한 문제가 된다. 말단기 부가 활성에 의한 3' 말단에서의 1 nucleotide 부가는 전가닥에서 일어나는 것이 아니기 때문에, PCR 산물의 말단은 평활말단과 1 nucleotide가 돌출한 것이 섞여 있어, 사용하는 DNA polymerase의 종류나 primer의 서열 등에 따라 그 혼합비도 다르다. 따라서, PCR 산물을 평활말단화한 벡터에 연결하는 것만으로 목적의 형질전환체를 얻을 수 있는 확률은 극히 낮다. 3' 말단에 부가하는 nucleotide는 거의 deoxyadenosine이므로 T 벡터라 불리는 dideoxythymidine이 하나 3' 말단에 돌출한 open circular 벡터가 개발되어 시판되고 있다. 3'→5' exonuclease 활성이 강한 DNA polymerase는 평활말단을 가지고 있는 산물을 생성하여 cloning 과정에서 상기의 내용을 고려하지 않아도 된다는 보고가 있다.

(5) 역전사 활성

대장균의 Pol I 에 역전사활성이 있는 것은 오래전부터 알려져 왔지만, PCR의 출현 후 *Taq* polymerase의 역전사 활성을 이용하여 mRNA로부터 한번에 PCR까지 수행하는 방법이 보고되었다. 그러나 증폭에는 다량 (1~5 µg)의 RNA가 필요하거나 소량의 RNA로는 검출에 southern hybridization법이 필요하였기 때문에 실용적이지 않았으나, 그 후 *Tth* polymerase 등 보다 강한 역전사활성이 있는 효소가 발견되어 single tube RT-PCR (역전사 PCR)이 실용화되었다. *Tth* polymerase의 역전사활성은 금속이온 Mn^{2+} 가 존재하면 보다 강해지기 때문에 $MnCl_2$ 존재하에서 역전사반응을 실시하고, EGTA로 킬레이트한 후 $MgCl_2$ 를 첨가해 PCR을 실시하는 방법이 이용되고 있다.

(6) 기질 아날로그의 선택성

PCR의 응용범위가 넓어짐에 따라 목적에 따라 그에 맞는 다른 능력을 갖는 DNA polymerase가 요구된다. 예를 들면 반응액의 오염을 방지할 목적으로 dTTP를 대신하여 dUTP를 이용한 PCR을 실시한 후, uracil-N-glycosidase를 처리해 혼입 DNA를 분해하는 경우, oligonucleotide를 이용한 부위특이적 변이도입법을 위해서 주형 DNA에 dUTP를 삽입하는 경우, 그리고 증폭절단을 hybridization의 probe로서 이용하기 위해 형광물질과 biotin을 부가한 dUTP 유도체를 기질로 사용하는 경우 등이다. 더욱이 GC가 풍부한 영역을 증폭하고 싶은 경우에는 dGTP 대신 d7cGTP (7-DEAZA-guanosine triphosphate)을 이용하면 성공하는 경우가 있다. 이처럼 천연의 A, G, T, C 이외의 염기를 가진 nucleotide를 삽입한 DNA 가닥을 합성하는 경우, *Taq* polymerase를 이용하는 것이 좋다. *Vent* polymerase와 *Pfu* polymerase에서는 이와 같은 DNA 가닥의 합성은 잘 되지 않는다. 기질로서의 nucleotide만이 아닌 primer 서열 중에 G대신에 I (이노신)을 이용하는 경우가 자주 있다. 아미노산의 부분서열을 알고 그에 기초하여 primer를 합성할 때, 코돈의 중첩을 위해 혼합 primer를 합성해야 한다. 아미노산 배열에 따라서는 혼합의 정도가 높아져 바른 서열의 비율이 너무 낮아진다. 이 때 중첩해 있는 부분이 이노신을 이용하는 방법이 있다. 이 경우도 *Taq* polymerase를 사용해서 PCR을 실시하면 잘 증폭되지만 *Pfu* polymerase와 *Vent* polymerase에서는 증폭되지 않는다. 3'→5' exonuclease 활성을 가진 α형 효소는 기질 아날로그와 주형중의 이노신 대신 들어간 염기를 mismatch로서 제

거해 버린다고 생각된다. 유일하게 3'→5' exonuclease 활성을 가진 *Ultma* polymerase를 사용했을 때 합성이 잘 된다는 보고가 있다.

(7) Long PCR

PCR로서 간단하게 목적의 DNA영역을 시험관 내에서 증폭할 수 있지만, 앞에서 언급한 바와 같이 증폭 서열의 정확성과 함께 PCR법이 갖는 또 하나의 큰 문제점은 증폭할 수 있는 DNA 영역의 길이에 제한이 있다는 것이다. 기존의 PCR에서 실제로 증폭할 수 있는 길이는 수 kbp 정도였고, α형의 DNA polymerase를 이용한 경우 그 실용성은 더욱 내려가, 2 kbp 이하가 된다. 주형-primer에 따라서는 반응조건을 최적화하므로써 10 kbp 이상의 증폭이 가능한 경우도 있지만, 일반적으로 긴 단편 DNA의 증폭은 곤란하다. 94년, 워싱턴대학의 Barnes가 발표한 Pol I 형 효소와 α형 효소를 혼합해 PCR에 이용한 방법은 상기의 문제점을 해결할 수 있는 획기적인 것이다. *Taq* polymerase로 PCR 반응을 실시했을 때의 증폭길이에 제약을 받는 원인으로 3'→5' exonuclease 활성이 없어 잘못 읽은 경우에 3'말단이 mismatch 되어 그 후의 합성이 저해되는 것이라 생각되므로 3'→5' exonuclease 활성을 갖는 *Pfu* polymerase와 *Vent* polymerase를 혼합하여 PCR을 실시해 보면 극히 효과가 있을 것으로 판단, 실제로 실험한 결과, 간단히 10 kbp 이상의 DNA 증폭이 가능하게 된 것이다.

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.

http://www.dynebio.co.kr/yc/bbs/board.php?bo_table=data1&wr_id=8&page=3