

생물학실험

-모듈 1 실험 보고서-

생물학실험 (001)

서울대학교 컴퓨터공학부
2017-18570 이성찬

2017년 9월 29일

실험1. 균류 관찰 및 염색

Abstract

이 실험에서는 균류에 대해서 알아보고 효모와 버섯을 현미경으로 관찰하는 것을 목표로 한다. 시료를 염색하고 표본을 만들어 관찰하고, 현미경으로 관찰한 결과를 사진으로 남겼다. 효모는 budding yeast가 잘 관찰 되었지만, 버섯 갓의 검은 gill 부분의 경우에는 표본 샘플과는 결과가 매우 달랐으나 이에 대한 원인은 밝혀내지 못했다.

1 Introduction

1.1 배경 이론

1.1.1 균계(Fungi) [1]

균은 진핵 생물 중 하나로, 효모, 곰팡이, 버섯 등을 포함한다. 다르게는 진균류라고도 불린다. 균류는 지구에서 가장 광범위하게 분포하고 있는 생명체들 중 하나이며 환경적으로, 의학적으로 중요한 가치를 지닌다. 많은 균류들은 땅과 물에서 자유롭게 서식하고 있고, 다른 동식물과 기생 혹은 공생하기도 한다. 균류는 진핵 생물이기 때문에 막성 세포 소기관을 갖고 있으며, 핵도 갖고 있다. 역사적으로 균류는 식물로 분류되었으나, 균류는 엽록소가 없고 세포막과 세포벽의 구성 성분이 식물과는 달라 현재 균류로 분류되고 있다.

균류는 생장을 거친 후 번식할 때가 되면 상당한 양의 포자를 만들어 방출한다. 무성 생식과 유성 생식 두 방법 모두 포자를 생성할 수 있으며 유성 생식의 경우 다른 생명체들처럼 두 생식 세포의 결합을 포함한다. 반면 무성 생식은 간단하고 직접적인 방법으로 진행된다.

균계의 하위분류에는 여러 문들이 있는데, 그 중에서는 자낭균문과 담자균문이 가장 대표적이다. [2]

자낭균문에 속한 균은 포자를 자낭 안에 만드는 것이 특징이다. 유성 생식시에는 자낭을 이용하고, 반수체 자낭포자를 가진다. 무성 생식을 할 때에는 분생포자를 생성한다. 대부분은 균사의 생장과 무성포자에 의

해 번식한다. 여기에 속하는 효모도 있는데, 자낭균류 효모는 출아법으로 번식한다.

담자균문에 속한 균류는 담자기가 있다. 균사의 끝에 부풀은 세포이며, 핵융합과 감수분열이 일어나는 장소이다. 버섯과 같은 자실체도 담자균에 포함된다.

균류는 다양한 곳에 서식하고 있다. 땅속, 공기 중, 호수, 강, 바다, 그리고 동식물의 몸 속, 그리고 심지어 사람의 몸속에도 있다. 박테리아(Bacteria)와 함께 균류는 유기물을 분해하고 탄소, 산소, 질소와 인을 토양과 대기로 방출하는데 핵심적인 역할을 한다. 이렇게 균류는 인간 생활에 중대한 영향을 미치기도 한다. 인간은 빵을 굽고, 와인이 생성될 때부터 간접적으로 균류의 존재에 대해 알고 있었다. 현재도 균류는 가정과 산업 공정에 있어 필수적인 역할을 한다. 빵을 만들 때, 와인 및 맥주를 생산할 때, 그리고 특정 치즈를 생산할 때 균류가 필요하다. 균류는 또 식품으로 사용되기도 한다. 각종 버섯은 이미 널리 쓰이고 있으며 mycoprotein (균류에 의한 단백질)은 고단백질 음식을 만드는데 사용된다.

균류는 의학적으로도 중요한 역할을 했다. 1928년 알렉산더 플레밍 (Alexander Fleming)이 *Penicillium notatum*이 포도상구균에서 자라고 있는 것을 발견했는데, 그 주변에는 박테리아가 자라지 못했다. 플레밍은 박테리아를 자라지 못하게 하는 그 물질을 성공적으로 얻어내 1929년 페니실린이라는 항생제를 만들 수 있었다.

1.2 실험 목표

이번 실험에서는 이렇게 생태계와 인간의 생활에 중대한 영향을 미치고 있는 균류를 관찰해보려고 한다. 현미경으로 다양한 균류들을 관찰해 보고, 관찰을 돕기 위해 염색을 해보며, 자낭균문과 담자균문 생물을 비교해 본다.

1.3 실험 과정

1.3.1 실험 재료

실험의 재료에는 버섯 시료와 효모(yeast) 시료를 준비했다. 효모는 PDA 배지에서 3~5일간 배양된 것이다. 시료의 염색을 위해 메틸렌 블루를 준비했고, 물, 파이펫, 관찰을 위한 현미경과 시료를 놓기위한 커버 글라스, 슬라이드 글라스, 액체를 닦아내기 위해 킴와이프를 준비했다.

1.3.2 효모(Yeast) 관찰 방법

파이펫을 이용해 슬라이드 글라스에 물을 한 방울 떨어뜨렸다. 효모 시료에서 틱을 이용해 효모를 살짝 긁어내고 떨어뜨린 물방울 위에 효모가 골고루 퍼질 수 있도록 해주었다. 그리고 커버글라스로 시료를 덮고 킴와이프를 빠져나온 물을 제거한 뒤 현미경으로 관찰했다.

1.3.3 담자균(버섯) 관찰 방법

버섯의 밑동을 제거하고, 매스를 이용하여 갓을 반으로 잘랐다. 이 때 파이펫으로 슬라이드 글라스 위에 물을 떨어뜨려 두었다. 핀셋으로 갓의 검은 부분을 아주 소량 떼어내어 슬라이드 글라스의 물에 떨어뜨리고 메틸렌블루를 시료의 옆에 떨어뜨렸다. 침을 이용하여 시료와 염색약을 섞어주었다. 염색약이 스며드는 것을 1분정도 기다리고 커버글라스를 덮은 후 현미경으로 관찰했다.

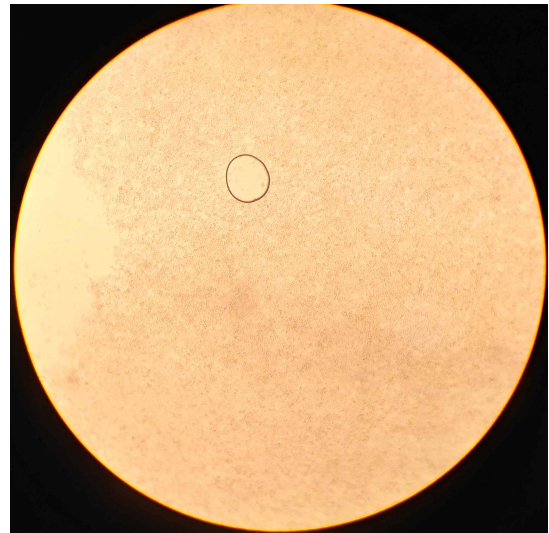
버섯을 자를 때 가늘게 잘라야 한다. 주름이 너무 많거나 두꺼우면 관찰이 힘들다. 또 염색약을 시료위에 바로 떨어뜨리지 않도록

주의해야 했다.

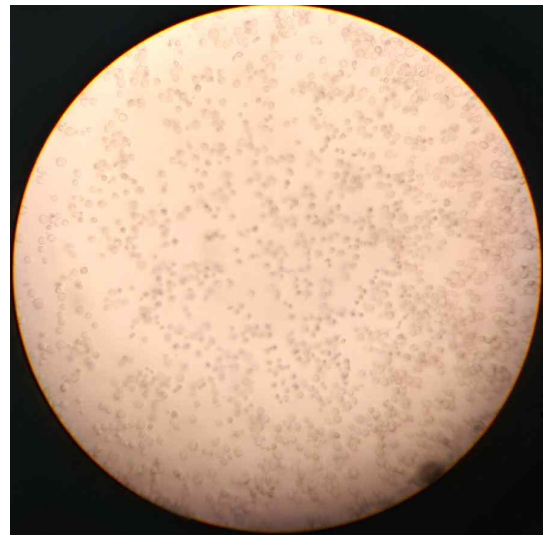
2 Results

2.1 효모 관찰

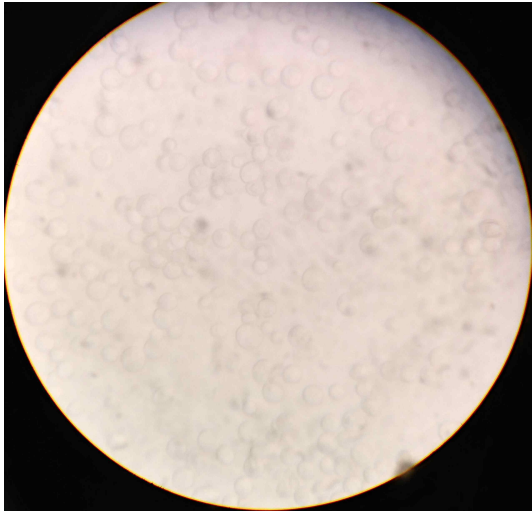
효모를 관찰한 결과는 다음과 같다. 효모 시료를 준비한 뒤 관찰한 결과 작은 구체 형태의 Budding Yeast를 관찰할 수 있었다.



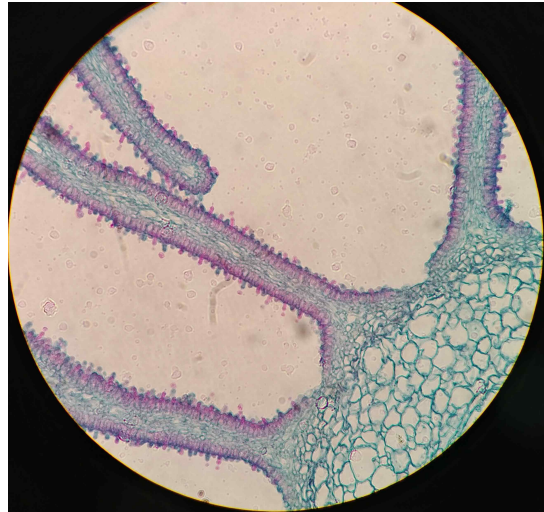
<Figure 1: 효모 관찰 - 1>



<Figure 2: 효모 관찰 - 2>



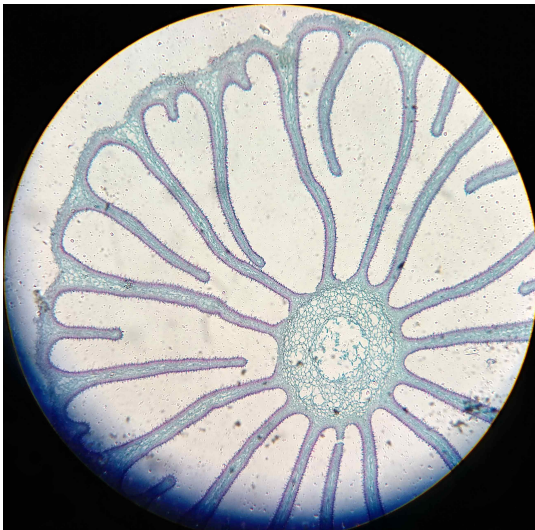
<Figure 3: 효모 관찰 - 3>



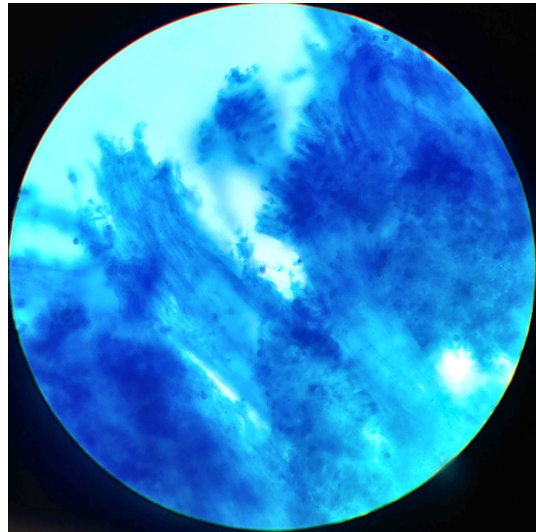
<Figure 5: 버섯 관찰 표본 샘플 - 2>

2.2 담자균(버섯 관찰)

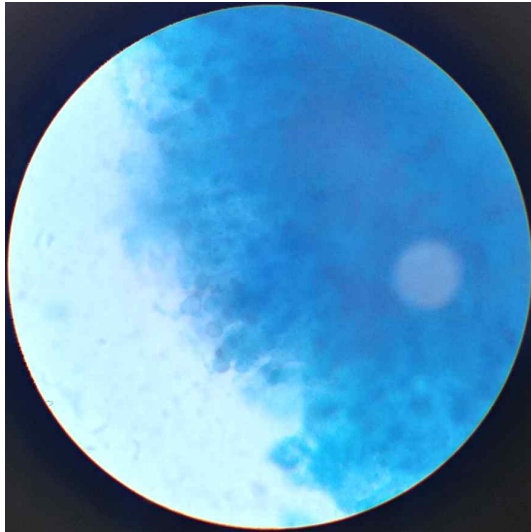
버섯 시료를 준비한 뒤 현미경으로 관찰을 하였으나 표본 샘플의 결과와는 완전히 달랐다. 3번을 시도해 보았으나, 마찬가지로 표본 샘플과는 전혀 다른 결과를 얻었다. 분명 버섯 갓의 검은 부분 (Gill)의 소량을 얇게 떼어내어 시료를 만들었으나 무엇을 관찰한 것인지 알 수 없을 정도로, 원하는 결과는 나오지 않았다.



<Figure 4: 버섯 관찰 표본 샘플 - 1>



<Figure 6: 버섯 관찰 결과 - 1>



<Figure 7: 버섯 관찰 결과 - 2>

3 Discussion & Conclusion

3.1 결과 분석 및 토의

3.1.1 효모 관찰

두 번의 시도 끝에 효모를 관찰할 수 있었다. 둥글게 생겼다는 것을 확인할 수 있었고, 커버 글라스와 슬라이드 글라스 사이에 남아있는 물 때문이었는지 알 수는 없었지만 효모가 유동적으로 움직이는 (flow) 모습도 관찰할 수 있어 동영상으로 남겼다.

3.1.2 담자균(버섯) 관찰

세 번의 시도를 하였으나 샘플 표본의 결과와는 지나치게 모양이 달랐다. 게다가 왜 이러한 결과가 나오게 되었는지 분석 할 수 없었다. 이 부분을 고치지 못한 것이 이 실험의 한계점으로 남았다.

3.2 진균이 생활에 미치는 영향

진균은 인간 생활과 산업 공정에 중요한 역할을 하고 있다는 것을 1.1.1에서 살펴보았다. 맥주, 포도주, 빵, 요구르트의 발효과정에서 사용되고, 페니실린과 같은 항생제의 발견에도 도움이 되었다.

Mycoprotein (균단백질)에서도 활용되고 있다.[3] Quorn이라는 단백질이 개발되어

세계에서 널리 팔리고 있고 단백질 함량이 높고 지방이 낮고 콜레스테롤이 없어 다양한 분야에 활용되고 있다.

4 Reference

- [1] Vernon Ahmadjian, et al.
Encyclopædia Britannica, "Fungus",
Aug 16, 2017, Web: Sep 28, 2017
- [2] Moore, R.T. (1980). "Taxonomic proposals for the classification of marine yeasts and other yeast-like fungi including the smuts". *Bot. Mar.* 23: 371.
- [3] Yoder, W.T. & Christianson, LM (1998). Species-specific Primers Resolve Members Of Fusarium Section Fusarium. Taxonomic Status of the Edible "Quorn" Fungus Re-evaluated. *Fungal Genetics & Biology*, 23, 62-80.

실험2. 미생물 배양

Abstract

이 실험에서는 배지와 CFU에 대해 알아보고, 대장균 E.coli의 시료를 Serial Dilution 과 Spread Plate Technique를 활용하여 희석시킨 후 1일간 항온 인큐베이터에 배양한다. 배양 후 형성된 colony의 숫자를 세어 원래 E.coli 시료의 CFU를 추정해본다. 추정 결과 10000 ~ 50000 CFU/mL를 얻었다. 추정의 범위가 지나치게 넓은 원인은 정확하게 밝혀내지는 못했다. 더불어 생명체에 필수적인 영양소를 알아보고, CFU를 사용하는 이유에 대해 알아보았다.

1 Introduction

1.1 배경 이론

1.1.1 배지(Culture Medium)

배지는 미생물, 세포, 작은 식물들의 생장을 돕기 위해 만들어진 고체, 액체이다. [1] 배양하고자 하는 생명체에 따라 배지도 달라진다. 배지의 유형에는 Defined Medium, Rich Medium, Selective Medium, Differential Medium 등이 있다.

Defined 에서는 배지를 만드는데 사용된 모든 화합물을 정확히 알고 있다. 반대로 Undefined Medium의 경우 일반적인 배양을 위해 만들어진 배지로, 유기물, 물, 다양한 염류, 다양한 아미노산 등이 들어간다.

Rich Medium 에서는 다양한 종류의 영양분을 섞어서 만든다. 미생물의 필수 영양소가 무엇인지 중요하지 않을 때 미생물이 잘 자라도록 하기 위해 사용한다.

Selective Medium의 경우에는 특정 미생물만 골라 자라고 다른 생물의 성장은 막은 배지이다.

Differential Medium은 미생물의 특성에 따라 자라는 미생물 종류가 구분되도록 한 배지이다.

미생물의 분리에는 Dilution Streaking Technique[2]와 Spread Plate Technique이 있다. Dilution Streaking 에서는 플레이트에서 streak하여 colony가 줄어들도록 만든다. 그렇게 하면 줄어든 colony를 새로운 플레이트로 옮겨서 그 생명체를 분석하고 테스트 할 수 있게 된다.

Spread Plate 에서는 샘플을 플레이트 전체에 넓게 퍼서 말린 후 인큐베이터에 넣은 뒤 colony의 숫자를 센다.

1.1.2 Colony-Forming Unit(CFU)

미생물학에서, colony-forming unit은 샘플에 생존해 있는 박테리아나 균의 개수를 추정하기 위해 고안된 단위이다. [3] CFU를 셀 때에는 각 colony는 분리되어 있으며 하나의 생존한 미생물 세포로부터 형성된다고 가정한다.

CFU를 계산하기 위해서 Serial Dilution 방법이 사용되는데, Serial Dilution은 어떤 물질을 반복적으로 희석하는 것이다. 대체로 1회 희석 시 희석 배수는 상수로 고정시켜 두고, 결과 희석 배수는 logarithmic scale의 등비수열을 이룬다. 주로 생물학이나 약학에서는 미생물이나 세포들의 농도를 감소시키기 위해 사용된다. 주어진 시간 동안 agar plate에서 자라는 Bacterial colony의 숫자와 크기는 농도에 종속되어 있다. 물론 세포의 숫자를 격자 위에서, 혹은 주어진 부피 위에서 세는 방법도 존재하나, serial dilution을 활용하면 더욱 처리하기가 손쉬워진다.[4]

1.2 실험 목표

이 실험에서는 대장균 E.coli 시료에서의 CFU를 계산하는 것을 목표로 한다. 계산을 위해 대장균 시료를 1/10, 1/100, 1/1000로 희석한 후 Spread Plate Technique를

이용하여 희석된 대장균 시료액을 플레이트에 편다. 그리고 일정 기간 동안 표본 플레이트를 배양하여 colony가 형성되도록 한 후, 희석된 시료 액체에서의 colony 개수를 세어 역으로 원래 시료의 CFU를 추정해 낼 것이다.

1.3 실험 과정

1.3.1 실험 재료

우선 대장균(*E. coli*) 시료를 준비했다. 그리고 대장균 시료를 희석하기 위해 사용할 1.5ml 튜브 3개를 준비했다. 각각 튜브에 희석 배수 10, 100, 1000을 적었다. 희석시 사용할 액체에는 미생물이 없어야 하므로 멸균수를 준비했고, 희석 후 spread할 LB plate를 2개 준비했다. Plate의 뒷면에는 수업 요일, 반 호수, 조원 이름, 희석 배수를 미리 적어두어 혼란을 방지했다. Spreading에 사용할 일회용 Spreader도 plate의 개수에 맞게 준비했다. 그리고 주변의 미생물이 섞이는 것을 막기 위해 Clean bench가 준비되어 있어야 했으며, spreading 후 배양할 인큐베이터도 준비되어있어야 했다.

1.3.2 실험 방법

다음 과정들은 기타 미생물이 섞이는 것을 방지하기 위해 clean bench에서 수행했다. 파이펫을 이용하여 멸균수 900 μ l를 1.5ml 튜브 3개에 각각 담았다. 이때 튜브에 멸균수를 담은 후에는 튜브의 뚜껑을 닫아 주었다. *E.coli* 원액에서 파이펫을 이용해 100 μ l를 뽑아 희석 배수가 10인 튜브에 옮겼다. 또 희석배수 10인 튜브에서 100 μ l를 뽑아 희석배수 100인 튜브에 옮겨 담았다. 마지막으로 희석배수 100인 튜브에서 100 μ l를 뽑아 희석배수 1000인 튜브에 옮겨 담았다. 옮겨 담을 때 마다 대장균이 최대한 균일하게 희석될 수 있도록 하기 위해서 튜브 뚜껑을 닫고 흔들어 주었다.

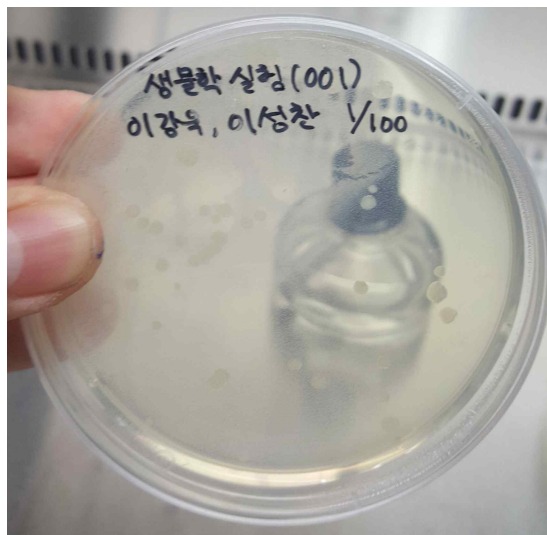
희석이 완료되면 희석 배수가 100, 1000인 튜브에서 각각 100 μ l를 뽑아 plate에 뿌

리고 일회용 spreader를 이용해 plate에 골고루 퍼 발라주었다. (Spread Plate Technique) 퍼 발라준 후 spreader는 폐기했고, 알코올램프에 살짝 가까이 한 뒤 바로 plate의 뚜껑을 덮어 준 후 랩으로 포장해 주었다. 이후에는 plate를 섭씨 37도의 항온 인큐베이터에 넣어주었고, colony 숫자를 세기 위해 사진을 찍었다.

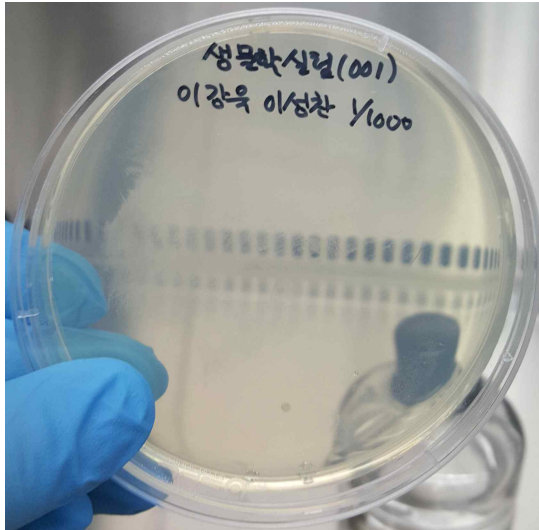
2 Results

2.1 실험 결과

항온 인큐베이터에서 배양한 *E. coli* 의 콜로니 사진이다. 희석 배수 100인 시료에서의 콜로니 수는 50이었으며, 희석 배수 1000인 시료에서 콜로니 수는 1 이었다.



<그림 1: 희석 배수 100인 시료를 spread해 배양한 후의 콜로니 사진이다. 콜로니의 개수는 50개가 count 되었다.>



<그림 2: 희석 배수 1000인 시료를 spread해 배양한 후의 콜로니 사진이다. 콜로니의 개수는 1개가 count 되었다.>

3 Discussion & Conclusion

3.1 결과 분석

희석 배수와 그 콜로니 수로부터 원래 시료의 CFU를 계산할 수 있다. 희석 배수가 1000일 때 콜로니 수가 1이었으므로, 원래 시료의 CFU는 $1 \times 1000 = 1000$ 임을 추정할 수 있다. 한편 희석 배수가 100인 시료에서의 콜로니 수는 50 이었으므로 이 시료를 기준으로 하면 원래 시료의 CFU는 $50 \times 100 = 5000$ 임을 추정할 수 있다. Spreading에 사용된 시료의 양이 0.1ml이므로 단위를 CFU/mL로 바꿔주면 10000~50000 이라는 결론을 얻는다.

각 시료를 기준으로 했을 때 원래 시료의 CFU 범위가 10000 ~ 50000으로 지나치게 범위가 넓다. 이렇게 범위가 넓어진 이유는 count 된 콜로니의 숫자를 비교해 보면, 희석 배수가 100일 때 50, 1000일 때 1로, 10배가 아니라 50배나 차이가 났기 때문이다. 그리고 실험 중에 1000배 시료를 spread한 후 알코올램프에 지나치게 오랜 시간 가까이 했던 것을 원인으로 추측한다.

3.2 Conclusion

이번 실험을 통해서 대장균을 배지에 배양해 보고, 또 Serial Dilution 과 Spread Plate Technique를 활용하여 원래 대장균 시료의 CFU를 구해 보았다.

3.2 Discussion

3.2.1 생물의 필수 원소들과 생장

생물이 존재하는데 필요한 원소는 대표적으로 탄소, 수소, 산소, 질소, 인, 황 등이 있다. CHNOPS 라고 줄여 쓰기도 하는데, 이 원소들은 지구상의 대부분 생명 활동에 쓰이는 분자들의 구성 성분이 된다.[5] 몇 개만 살펴보자면, 황의 경우 cysteine, methionine 이라는 아미노산에 활용되고 [6], 인의 경우 phospholipids (세포막, 인지질 2중층 등의 구성성분)을 만드는데 사용된다. 더불어 생명체의 기본 에너지원인 ATP의 구성 원소이기도 하다. [7]

3.2.2 CFU를 사용하는 이유

CFU의 정의는 서론에서 살펴보았다. 한편 CFU를 사용하면 문제가 생기기도 한다. 모든 colony가 하나의 세포로부터 생겨났는지 확인할 방법이 없기 때문이다. 게다가 colony 특성상 여러 개의 세포가 쌓여 있다. 예를 들어 Streptococcus와 같은 박테리아는 연쇄적으로 (chain) 자라고, Staphylococcus 와 같은 박테리아는 덩어리(clump) 자란다. 하지만 CFU를 셀 때에는 모든 colony가 분리되어 있고 하나의 살아있는 세포로부터 발생했다고 가정하기 때문에, CFU로 세는 경우에는 샘플에 존재하는 살아있는 세포의 수보다 덜 세게 된다. [3]

이럼에도 불구하고 CFU를 사용하는 이유는 세포의 숫자를 세기가 훨씬 수월해지기 때문이다. [4] 만약 현미경이나 특수 처리된 모눈종이에 샘플을 올리는 등의 직접적인 방법으로 세포를 세려고 했다면 매우 상황이 복잡해졌을 것이다.

4 Reference

[1] Madigan M, Martinko J, eds. (2005). Brock Biology of Microorganisms (11th ed.). Prentice Hall. ISBN 0-13-144329-1

[2] Bauman, R. (2004) Microbiology. Pearson Benjamin Cummings.

[3] Goldman, Emanuel; Green, Lorrence H (24 August 2008). Practical Handbook of Microbiology, Second Edition (Google eBook) (Second ed.). USA: CRC Press, Taylor and Francis Group. p. 864. ISBN 978-0-8493-9365-5. Retrieved 2014-10-16.

[4] K. R. Aneja. Experiments in Microbiology, Plant Pathology and Biotechnology. New Age Publishers, 2005, p. 69. ISBN 81-224-1494-X

[5] The acronym S.P. Cohn was also used in high school biology classes to represent the six chemical elements. Education (2010). "CHNOPS: The Six Most Abundant Elements of Life". Pearson Education. Pearson BioCoach. Retrieved 2010-12-10.

[6] Brosnan JT, Brosnan ME (June 2006). "The sulfur-containing amino acids: an overview". The Journal of Nutrition. 136 (6 Suppl): 1636S-1640S. PMID 16702333.

[7] Campbell, Neil A.; Brad Williamson; Robin J. Heyden (2006). Biology: Exploring Life. Boston, Massachusetts: Pearson Prentice Hall. ISBN 0-13-250882-6.

실험3. Phylogenetic Tree

Abstract

이 실험에서는 생물정보학과 Phylogenetic Tree에 대해서 알아본다. 그리고 각종 박테리아와 척추동물들의 DNA Sequence 자료를 수집하여 MEGA7 프로그램을 활용해 Phylogenetic Tree를 그려보았다. 결과로 볼 때, 가장 진화된 생명체는 인간이라는 결론을 얻었다.

1 Introduction

1.1 배경 이론

1.1.1 생물정보학(Bioinformatics) [1]

생물정보학은 생물학적 데이터를 이해하기 위한 방법들과 소프트웨어를 개발하는 분야이다. 컴퓨터 과학, 통계학, 수학과 공학을 융합해 생물학적 데이터를 분석하고 해석하는 과학의 영역이다. 또한 생물학적 데이터를 정보의 저장, 전달 및 해석과 연계하여 생물의학(biomedicine)과 같은 타 과학 분야를 돕는다. 예를 들어, 유전자 염기 서열과 질병간의 상관관계를 분석하고, 단백질의 구조와 아미노산 서열을 분석하며 약품의 개발에 도움을 주기도 한다. 혹은 각 환자의 DNA 염기서열에 맞는 약을 처방하는 데에도 사용할 수 있다. (pharmacogenomics)

생물정보학에서 분석하는 데이터에는 다음과 같은 데이터들이 있다. DNA의 서열이나 단백질의 아미노산 서열, 단백질의 3차원 입체 구조, 핵산, 복합체, DNA로부터 생성된 RNA의 서열, 세포 내에서 단백질의 분포 등이 있다. 각각의 경우마다 특정 세포에 대하여 포괄적이고 정확한 결과를 도출해 내고, 데이터 내에서 변형을 밝혀내는 것을 목표로 한다. 예를 들어, 세포의 종류, 데이터를 추출한 시간에 따라 데이터는 계속 달라질 수 있다. (세포 주기에 따라, 혹은 외부 환경에 따라)

1.1.2 DNA Sequencing

DNA Sequencing 은 DNA 내부의 뉴클레오타이드의 정확한 서열을 분석하는 과정

이다. 빠른 DNA sequencing 방법들의 발전은 생물학과 의학 분야의 연구를 가속해 주었다.

첫 DNA sequence는 1970년대 초반 연구자들이 매우 힘든 방법으로 2-D 크로마토 그래피를 했을 때 얻어졌다. Fluorescence 을 기반으로 한 sequencing method와 DNA sequencer의 발명과 함께[2] DNA sequencing은 쉬워졌으며 빨라졌다.[3]

Next Generation Sequencing(NGS)을 사용하면 인간의 게놈이 하루만에 sequencing이 가능해진다 [4] 반면 이전에 인간 게놈을 해독하던 Sanger sequencing 방법은 최종본 결과를 내놓기까지 10년이 넘게 걸렸다. Sanger는 ddNTP에 의한 polymerization 종결을 감지해 해당 서열을 알아냈지만, 인간의 게놈과 같은 대규모, 포괄적 서열 분석을 위한 방법이 필요해 지게 되어 NGS가 사용되고 있다. NGS는 기존의 sequencing 방법보다 빠르고 저렴하며 정확하다. 이로부터 쏟아져 나오는 생물학적 데이터를 처리하기 위해 동원되는 것이 생물정보학으로, 이 데이터를 생물학적 언어로 번역하여 데이터를 가공하고 유의미한 결론을 도출해 낸다.

이 NGS 기술은 단지 서열 해독을 넘어서 생물학의 다양한 분야에서 사용한다. 의학 연구에서 많이 쓰인다. 예를 들어, mRNA-seq: 세포 내 유전자 발현양상, TAIL-seq: mRNA 말단 poly-A 꼬리의 길이 재기 등등에 활용된다. [5]

1.1.3 16S rRNA의 기능

16S rRNA는 리보솜 내에서 리보솜 단백질의 위치를 잡아주는 틀 역할을 한다. mRNA가 번역을 시작하기 위해 자리를 잡을 수 있도록 도와준다. 이 유전자가 계통수를 그리는데 사용되는 이유는 모든 원핵생물 내에서 동일한 기능을 수행하고 있는데다가, 서열과 구조가 보존되어 있어 다른 종끼리 비교하는데 용이하다. 더불어 많은 종들의 16S rRNA 서열이 분석되어 데이터베이스화되어있으므로 사용하기 편리하다.

1.1.4 Phylogenetic Tree

Phylogenetic Tree 혹은 Evolutionary Tree는 다양한 생물 종들과 그 사이의 진화적 관계를 나타내 주는 수형도이다. 관계를 판단할 때에는 생명체들의 물리적 혹은 유전적 특성의 차이를 바탕으로 한다. 컴퓨터를 이용해 optimal phylogenetic tree를 그리는 문제는 NP-hard에 속하는 문제이다. [6] 그러므로 발견적 검색(heuristic search)와 최적화 방법들은 수형도에 점수를 매기는 함수와 함께 사용되어 데이터에 충분히 타당한 수형도를 찾아낸다.

1.2 실험 목표

이번 실험에서는 16S rRNA를 이용하여

Bacterial phylogenetic tree를 그려본다.

그리고 MT gene을 이용하여 척추동물의 phylogenetic tree를 그려본다. 그려진 계통수를 보고 어떤 생물이 가장 진화된 생물이 라고 판단되는지 알아본다.

1.3 실험 과정

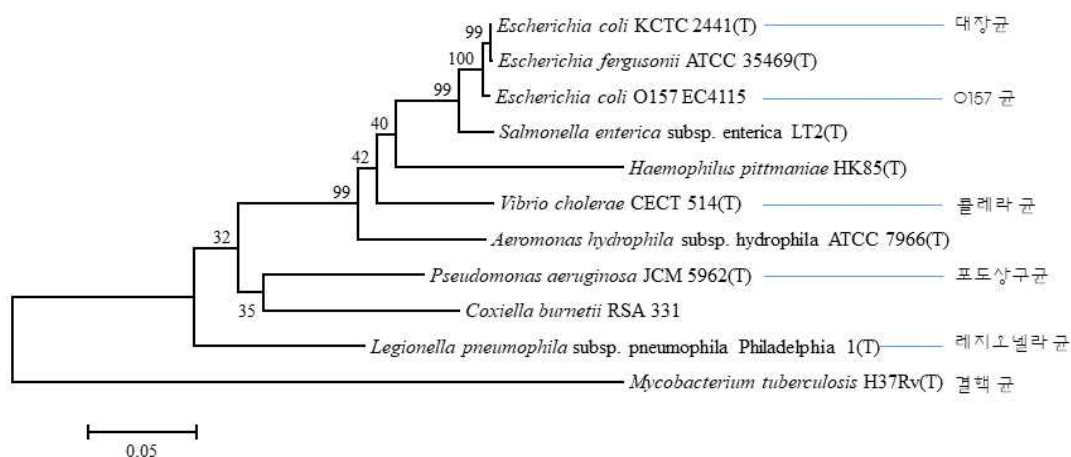
1.3.1 실험 재료

실험 준비물로는 개인 PC와 PC에 설치된 MEGA7 프로그램, 그리고 몇 가지 염기 서열이 있으면 된다. 박테리아의 16S rRNA 서열, 그리고 척추동물들의 미토콘드리아 게놈 (사람, 침팬지, 고릴라, 오랑우탄, Blue 고래, 소, 쥐, 닭, 칠성장어)이 필요하다.

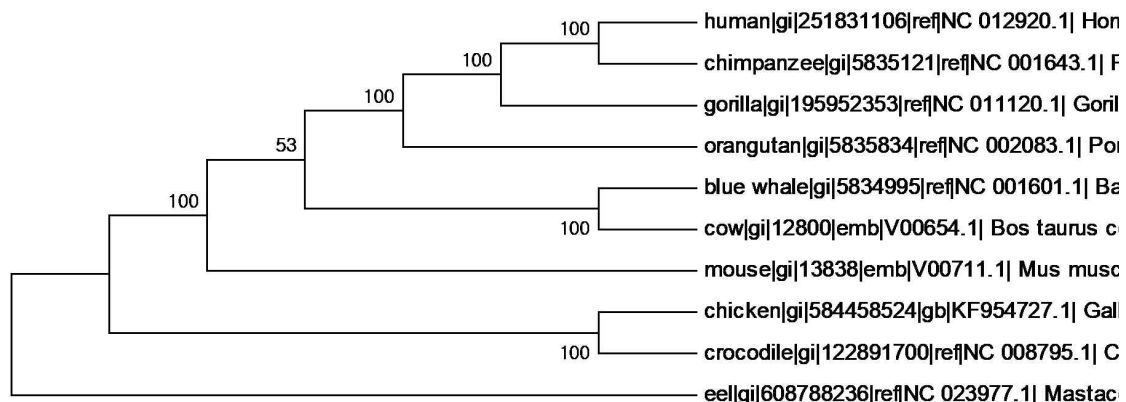
1.3.2 실험 방법 - 실습 1

우선 개인 PC에서 구글에 MEGA7 프로그램을 검색하여 프로그램을 PC에 설치했다. 제공된 16S rRNA gene sequence 들을 fasta 파일 형식으로 만들고 MEGA7에 로딩했다. 그다음 align시키고 phylogenetic tree를 그려주었다.

Sequence가 필요할 때에는 NCBI에 들어가서 뉴클레오타이드 데이터 검색으로 해주면 sequence를 얻을 수 있었다.



<그림 1: Bacterial Phylogenetic Tree - 주어진 박테리아들의 Coding Sequence를 MEGA7을 활용해 Phylogenetic Tree를 그린 결과이다.>



<그림 2: 척추동물의 MT gene을 이용해 그린 Phylogenetic Tree이다. 사람, 침팬지, 고릴라, 오랑우탄 등 각종 척추동물들의 데이터를 NCBI에서 받아 MEGA7로 그렸다.>

1.3.2 실험 방법 - 실습 2

척추동물에서 MT gene으로 phylogenetic tree를 그리는 경우에는 NCBI에서 sequence들을 검색하여 fasta 파일로 만들고 MEGA7 프로그램을 이용해 tree를 그려주면 되었다.

2 Results

2.1 Bacterial Phylogenetic Tree

주어진 박테리아들의 Coding Sequence를 MEGA7 프로그램으로 로딩하고, Align한 다음 Neighbor Joining algorithm을 이용해 Phylogenetic Tree를 그린 결과가 그림 1이다.

2.2 척추동물 Phylogenetic Tree

NCBI에서 각종 척추동물들의 MT gene을 검색하였다. 사람, 고릴라, 오랑우탄, 소, 쥐, 닭 등의 데이터를 수집하였다. Bacterial Phylogenetic Tree를 그릴 때와 마찬가지로 MEGA7을 이용해 Phylogenetic Tree를 그려본 결과가 그림 2이다.

3 Discussion & Conclusion

3.1 가장 진화된 생물

척추동물의 Phylogenetic Tree를 살펴보니 가장 진화된 생물은 인간이라는 결론을 얻을 수 있었다.

3.2 Mitochondrial Eve

Mitochondrial Eve는 한 어미로부터 대가 끊어지지 않고 이어져 내려온 자손들 중에서 가장 최근의 공통조상이다. (Matrilineal most recent common ancestor) (MRCA)

우리가 사용한 MT gene이 Phylogenetic Tree를 그리는 데 적합한 이유는 MT DNA의 경우 어미로부터 자식에게 전달이 될 때 재조합 없이 (예외가 있긴 하지만) 전달되기 때문이다. 그래서 대부분의 생존한 사람들의 MT DNA는 Mitochondrial Eve 이후 세대를 거듭하면서 생식세포의 MT DNA에 생긴 돌연변이 이외에는 차이가 나지 않는다. 이러한 점에서 phylogenetic tree를 그리기에 매우 적합하다고 할 수 있다.

4 Reference

[1] Arthur M. Lesk, Bioinformatics, Encyclopædia Britannica, Encyclopædia Britannica Inc. Published Jul 26, 2013.

<https://www.britannica.com/science/bioinformatics>. Web: Oct 1, 2017

[2] Olsvik O, Wahlberg J, Petterson B, Uhlén M, Popovic T, Wachsmuth IK, Fields PI (January 1993). "Use of automated sequencing of polymerase chain reaction-generated amplicons to identify three types of cholera toxin subunit B in *Vibrio cholerae* O1 strains". *J. Clin. Microbiol.* 31 (1): 22-25. PMC 262614

[3] Pettersson E, Lundeberg J, Ahmadian A (February 2009). "Generations of sequencing technologies". *Genomics*. 93 (2): 105-11. PMID 18992322.

[4] Behjati, S., & Tarpey, P. S. (2013). What is next generation sequencing? *Archives of Disease in Childhood. Education and Practice Edition*, 98(6), 236-238.
<http://doi.org/10.1136/archdischild-2013-304340>

[5] Chang, Hyeshik et al.
Molecular Cell, Volume 53, Issue 6, 1044 - 1052, TAIL-seq: Genome-wide Determination of Poly(A) Tail Length and 3' End Modifications

[6] Felsenstein J. (2004). *Inferring Phylogenies* Sinauer Associates: Sunderland, MA.