11 DNA구조와 복제

- **DNA연구 역사**
  - 유전물질의 추적
    - 그리피스 실험 : **"형질전환 발견"**
      - S형 폐렴쌍구균 : 협막O → 숙주면역 내성 → 병원성 (쥐 die)
      - R형 : 협막X → 비병원성 (쥐 생존)
      - 죽은 S형균 + 살아있는 R형균 → 쥐 die(살아있는 S형균 발견)
    - 에이버리 실험 : **"DNA = 형질전환 물질"**
      - 형질전환된 추출물(살아있는 S형균) → DNase처리시 콜로니 형성X
    - 허시-체이스 실험 : **"DNA = 유전물질 "**
      - T2파지 : 단백질 + DNA 로 구성
        - 단백질에 35S , DNA에 32P 표지
      - T2파지 + 대장균 mix
        - 원심분리시 무거운 세균이 가라앉음
        - 상층액 : 35S → 단백질은 침투 X
        - 침전물 : 32P → DNA가 세균속 침투(자기증식)
  - DNA구조의 분석
    - 샤가프 법칙 T+C/ A+G =1 (일부 ss바이러스는 성립x)
    - 프랭클린, 윌킨슨 : X선결정학 → 0.34nm, 3,4nm, 2nm반복무늬 확인
    - 왓슨, 크릭 : 이중가닥 분자구조 구축
      - 오른나선구조
      - 뉴클레오티드 사이간격 0.34nm / 한바퀴 회전시 3.4nm / DNA폭 2nm
    - 여러가지 DNA 2차구조
      - B-DNA (Basic)
        - 물이 풍부한 조건, 실제세포내 가장 관찰 多
        - 큰 홈 : 넓고 깊게 패인 옆구리 → 특이서열 결합 단백질 결합
        - 작은 홈 : 좁게 패인 옆구리 → 히스톤 결합(인산, 당 인식)
      - A-DNA
        - 수분함량 75%로 낮은 조건
        - **DNA-RNA 이중가닥 , RNA-RNA이중가닥 발견**
      - Z-DNA (Zig-zag)
        - **G-C염기쌍 풍부한 염기서열**
        - 왼 나선 구조
  - DNA복제방법
    - 메셀슨, 스탈 실험 : 반보존적 복제

- **DNA 복제 과정 (원핵생물)**
  - Intro
    - DNA 합성 효소
      - 앞에 3-OH 존재시 합성 시작
      - DNA Pol 3
        - 긴 DNA합성
        - 5'→3' 합성효소
        - 3'→5' 핵산 말단 가수분해효소
      - DNA Pol 1
        - 짧은 DNA합성 → DNA 수선 관여
        - 큰 소단위체 (클레나우 절편)
          - 5'→3' 합성효소
          - 3'→5' 핵산 말단 가수분해효소
        - ★ **작은 소단위체 : 5'→3' 핵산 말단 가수분해 효소**
      - DNA Pol 2
        - DNA수선 관여
        - 5'→3' 합성효소
        - 3'→5' 핵산 말단 가수분해 효소 활성
    - 가수분해효소
      - Exonuclease : 핵산 말단 가수분해
      - Endonuclease : 핵산 내부 가수분해 → 제한효소, DNase1
    - 리가아제
      - DNA에서 인산디에스테르결합 끊긴 부분 인식 → 5'인산과 3'-OH 연결
      - 금(Nick) : 인산 소실 → 인산디에스테르결합 cut
      - 틈(Gap) : 염기 소실 → 인산디에스테르결합 cut
      - 리가아제로 연결
        - # Nick 이 더 큰 손상임 (Gap은 NT끼리 연결O, 염기만 out)
    - 레플리좀 : 대장균의 DNA복제에 관여하는 단백질 복합체
  - 개시
    - 복제원점 : A=T염기쌍 多
    - DnaA : 복제원점 결합 →수소결합 끊어 부분적 단일가닥 형성 (ATP사용)
    - DnaC : DnaB를 데려옴
    - DnaB
      - 5'→3' 헬리케이스
      - 복제분기점의 염기쌍들을 외가닥으로 벌림 (ATP사용)
    - SSBP : 벌어진 외가닥 DNA안정화 (다시 붙지X)
    - **자이레이스** : 이중가닥을 외가닥으로 벌릴때 발생하는 양성 초나선의 위상학적 긴장 해소 (Wr=-2)
  - 초나선
    - DNA이중나선 코일이 한번 더 꼬인 구조
      - 음성 초나선 : 이중나선 덜 꼬임
      - 양성 초나선 : 이중나선 더 꼬임
    - 고리수
      - DNA가 꼬이고 비틀린 정도 값
      - Lk(고리수) = Tw(꼬임, 코일수) + Wr(비틀림, 양성초나선수)
      - 고리수 같다 → 위상학적 특성 동일
      - 고리수 다름 → 위상이성질체(Topoisomer)
    - **위상이성질화 효소(Topoisomerase)**
      - 필요성) 헬리케이스 : 양성초나선 발생 → 계속 벌리기 힘들어짐 → 해소 필요
      - **타입 I 위상이성질화 효소**
        - **한 가닥** 끊었다가 다시 연결 (ΔLk=1)
        - ATP사용X
      - **타입 II 위상 이성질화 효소 (=자이레이스)**
        - **두 가닥** 모두 끊었다가 다시 연결 ΔLk=2
        - ATP 사용O
  - 신장
    - 선도가닥 합성
      - 프라이메이스(RNA Pol) : 복제원점에 짧은 RNA프라이머 합성
      - DNA Pol3 : RNA프라이머의 3'-OH부터 DNA합성
      - ★ dNTP에서 PPi 떨어질때 방출되는 E 사용 → dNMP연결 (ATP사용 X)
    - 지연가닥 합성
      - 프라이메이스가 적당한 간격으로 RNA프라이머 합성
      - **DNA Pol3** : 각각의 RNA프라이머로부터 DNA합성
      - 앞에 있던 RNA프라이머 만나면 복제 중단 → 오카자키 절편
      - β-클램프 : DNA합성효소가 DNA를 도넛형태로 둘러싸서 결합한 구조(복제 faster)
    - 오카자키 절편 연결
      - **DNA Pol1**
        - 오카자키절편 3'-OH에 결합
        - 앞의 RNA 프라이머를 5'→3' Exonuclease
        - 동시에 5'→3'합성효소로 DNA연장
      - **리가아제** : RNA프라이머가 모두 DNA로 바뀌면 Nick을 5'인산말단 연결
  - 종결
    - 복제원점 반대편 종결자리 (Ter site) → 두 원형 DNA고리 걸려있는 구조
    - 위상이성질화효소 IV가 두 고리를 떼어낸 뒤 각각 딸세포로 분리

DNA복제

- **진핵생물 복제**
  - 복제기구
    - 프라이메이스 + DnaPolα → RNA-DNA 프라이머 합성
    - 핵산가수분해효소(FEN-1) : RNA 프라이머 제거
  - 다수의 복제원점 → 개시 시점, 개시 위치 무작위
  - 텔로미어
    - 선형 DNA복제시 문제점 : 주형가닥 3'말단 RNA프라이머 분해시 DNA 못채움(3'-OH가 없다) → 복제할수록 말단 짧아짐 → 유전정보 소실
    - **해결책 : 텔로머레이즈**
      - 역전사효소 = RNA(자) + 단백질(효소)
      - 배세포, 배아줄기세포, 성체줄기세포, 암세포 등 분열이 많은 세포에 존재
      - 주형가닥 DNA의 3'-OH 말단에 붙어서 텔로미어 서열(TTAGGG) 2500번 합성
      - 텔로미어 서열 미리 연장 → 끝이 조금씩 짧아져도 유전정보 보존
- **플라스미드 복제**
  - 플라스미드 분류
    - R 플라스미드 : 내성 플라스미드
      - 항생제 내성O
    - 대사 플라스미드
      - 숙주 도움되는 효소 유전정보 포함
      - ex) Col플라스미드의 "박테리오신" →근처 세균 kill 유전정보
    - F 플라스미드 : 성 플라스미드
      - 성선모로 접합 → 세포질 다리형성 → F플라스미드 복제후 넘김
      - 굳이 E아깝게 왜 갖고있어야하나?
        - F 플라스미드 버리면 자이레이스 저해됨(die)
  - F 플라스미드의 복제 - 회전환 복제
    - when?
      - 다른 세균과 접합 후 F 플라스미드 복제 후 넘겨줄때
      - λ 파지의 DNA복제 시 : 연속체 형성 (원형 쭉~길게 합성후 절단 n회)
    - How?
      - 3가지 방법(길게 쭉, 절단 1회, 절단 n회) → 중요X
- **DNA복제관련 실험**
  - 탐침 합성
    - 금 번역(Nick translation)
      - DNase1 → DNA 가닥 절단
      - DnaPol I + dNTP + α-32P dTTP → 표지된 DNA가닥 합성
      - **겔여과 크로마토그래피** → dNTP조각들은 못빠져나오고 큰 DNA만 분리
    - 5'-말단 표지법
      - DNA에 CIP처리 : 탈인산화
        - Phosphatase
      - 페놀/클로로포름 추출 : 순수DNA분리(상층액)
      - T4카이네이스 + γ32P-ATP : ATP의 인산을 떼어 DNA양끝에 붙임
      - 겔여과 크로마토그래피 : DNA분리
    - 방사성 인산 표지 위치
      - DNA합성효소 이용시 → α-P 에 표지
      - 카이네이스 이용시 → γ-P 에 표지
  - 복제원점 찾기, 양방향 복제 증명실험
    - 복제원점 에세이
      - 복제원점이 없는 플라스미드(His+ 유전자존재) : DNA절편 무작위 삽입
      - His- 효모에 형질전환 후 배양 → 복제원점 삽입된 플라스미드만 콜로니 형성
    - 양방향 복제 증명
      - 강한 방사성 dNTP 넣고 일정시간 복제
      - 약한 방사성 dNTP 넣고 이어서 복제
      - 강한 표지 양쪽으로 약한 표지 존재 → 양방향성 복제
    - DNA칩 에세이
      - 제한효소로 DNA잘라 절편 순서대로 칩에 심고
      - 형광 dNTP 넣고 복제 →새로 복제된 가닥만 잘라서 칩에 뿌림
      - 결합한 부위(형광O) = 복제원점
        - 시간 지날수록 형광이 양쪽으로 길어짐
  - DNA복제기구의 연구
    - 헬리케이스 에세이
      - 전기영동 이동거리 : 헬리케이스 + ATP처리 DNA = 끓인 DNA
      - 헬리케이스 활성에 ATP가 필요함
    - DNA합성효소 에세이
      - 방사성 표지 프라이머 + DNA Pol → 시간 흐를수록 전기영동시 위에 존재
      - DNA합성효소의 합성속도 비교 가능
    - PCR
      - 시험관 내 DNA복제 (과거 PCR)
        - 94℃ 가열 → DNA프라이머 첨가 후 냉각 → DNA합성효소&dNTP 첨가
        - 가열할때 마다 DNA합성효소 변성 → 매 사이클 new DNA pol 필요
      - 현재의 PCR
        - 준비물 : DNA주형, dNTP, Taq Pol, DNA프라이머세트
          - Taq: 고온에서 변성X
        - 변성 : 94℃ 에서 약 30초 가열
        - 재결합 : 적정온도로 냉각 후 약 30초 유지
          - if 온도 too low → 100% 상보적으로 결합하지 않은 프라이머도 존재 : 엉뚱한 DNA증폭
          - **프라이머의 길이↑, GC비율↑ → 재결합 온도↑**
        - 합성 : 72℃ 에서 1분이상 가열
      - DNA지문법
        - 염기서열 반복정도 사람마다 다름 → 반복서열 PCR 후 전기영동으로 범인찾기
    - 텔로머레이스 에세이
      - 암세포 → 텔로머레이스 O 이용
      - **세포 파쇄액에 텔로머레이스 존재 → TTAGGG 반복서열 존재**
      - PCR진행 : 프라이머 2세트 첨가 → DNA절편이 여러종류 존재
      - **전기영동시 ladder 형성 → 암세포 분류**
      - **# PCR수행시 주형가닥이 꼭 이중가닥일 필요X but 프라이머는 꼭 2세트 넣어줘야 함**