14-1 진핵생물의 게놈과 분자생물학

- **진핵생물 DNA 구조**
  - DNA 서열분석
    - DNA절편 가열 → 외가닥 → 냉각 → 이중가닥 : 흡광도 변화 측정
    - 원핵생물, 효모 : smooth
    - 진핵생물 : 계단형그래프
      - why? 고반복서열 존재 : 냉각시 상보가닥과 결합확률 大→ 더 빨리 이중가닥 형성
    - DNA를 절편화 하는 이유 : 짧은 절편일수록 반복서열 多
  - 진핵생물 DNA 특징과 진화
    - 유전자밀도 : 진핵<원핵
    - 동종효소의 존재 : 하나의 효소가 2종이상의 구조
    - 유전자 중복
      - 가외성 : 아직 돌연변이 X → 같은 유전자기능
      - 위유전자 : 돌연변이 → 기능을 잃음
      - 유전자군 : 돌연변이 → 서로다른 기능
    - **반복서열(STR)**
      - 상동염색체 연쇄 반복 서열 재조합 → DNA 절편 길이 다양화
      - 가닥 미끄러짐 : DNA 복제시 주형or복제 가닥이 한바퀴 말림 → 절편 다양화
    - 인트론 : 염색체 재조합, 중복 → 더 쉽게 진화가능

- **진핵생물 유전자발현**
  - 원핵생물과 차이점
    - 복잡한 DNA구조(히스톤 결합)
    - 복잡한 전사 조절 자리
    - 단일 시스트론성 mRNA
    - 인트론 : 선택적 스플라이싱, 가공
    - mRNA를 핵밖으로 수송
  - 염색체 상의 변화
    - 유전자 증폭 : 제노푸스 난자 (rRNA 증폭→단백질합성↑)
    - 염색체 자리바꿈
      - B세포는 한가지 가변부위 항체만 생성하는데, 항원은 무한한 다양성
      - 체성 재조합
        - 중쇄 : VDJ 무작위 연결
        - 경쇄 : VJ 무작위 연결
      - 써던블롯팅
        - 특정 DNA서열 존재여부, 양, 절편크기
        - 체성 재조합 현상 증명 : 토네가와 실험
        - 실험과정
          - 1. 게놈DNA → 제한효소(BamH1) 처리 → 아가로오스겔 전기영동
          - 2. 겔에 HCl 용액 처리 → DNA 퓨린염기 일부 out [탈퓨린]
          - 3. 겔에 NaOH용액처리
            - 이중가닥 DNA 외가닥 분리
            - 퓨린염기 없는 부분을 cut → DNA짧게 cut → NC필터로 전이 good
          - 4. 겔에 중성용액 처리
          - 5. 모세관 현상 : 겔 → NC필터 DNA전이
          - 6. NC필터 자외선 처리 → 핵산, NC필터 교차결합
          - 7. 연어정자 DNA 혼성화 → 탐침과 필터의 비특이적 결합 차단
          - 8. 방사성 표지 DNA 탐침 첨가 → 온도 높을수록 비특이적 결합↓
          - 9. NC필터 필름 감광
            - 수정란 : 탐침 결합 DNA절편 大
            - B세포 : 체성재조합 → 제한효소 작용X → 탐침결합 DNA절편 小
    - 유전자 위치조정
      - 아프리카 수면병 : 체체파리가 옮기는 기생충 = 파동편모충
      - 기생충 겉 구성 : VSG단백질
      - 항원 대변이
        - VSG유전자 1000개 이상
        - 시간경과 → 1개 무작위로 염색체 발현부위 이동
        - 발현부위의 VSG단백질 계속 바뀌면서 면역계 회피
    - 염색체 구조변화
      - 히스톤 수준
        - H1단백질
        - **히스톤 변형**
          - 아세틸화 : **리신** 아세틸화 → DNA느슨
          - 인산화, 메틸화 (DNA응축, 느슨 both)
      - DNA수준
        - 5'-CPG-3' 의 시토신 5번 C 메틸화 → 유전자 발현 억제
  - 전사 과정의 조절
    - 총괄적 조절 단백질
      - 발생 중 분화 유도 전사인자
      - 하위 유전자 발현 → 세포 운명 결정
      - MyoD : 중배엽 → 골격근 / pax6: 외배엽 → 눈
    - 일반전사인자
      - 근거리 전사인자
      - RNA Pol2가 프로모터에 결합할때 함께 결합 → 전사복합체
      - **TFIIH**
        - **헬리케이스 활성 → 전사 개시 help**
        - **RNA pol2의 CTD (C-terminal domain)를 인산화**
          - Capping, Tailing, Splicing 효소들이 CTD에 결합 가능

      TFIID : TATA 박스에 결합
      TFIIB : DNA 방향
      TFIIF : 헬리케이스 활성
      TFIIE : 결합 촉진
      TFIIH : 헬리케이스 활성+ RNA Pol2 인산화
    - 활성자
      - 활성자(특이전사인자)가 증폭자 서열 결합
      - HMG단백질 : DNA 굽힘 → 활성자-프로모터 근접
      - 히스톤아세틸화 효소, 히스톤 재구조화 복합체 → TATA박스 결합자리 마련
      - 매개자 단백질 : RNA pol2, 일반전사인자, 특이전사인자 연결 → 전사복합체
    - 억제자
      - 억제자(특이전사인자)가 침묵자 서열 결합
      - HMG단백질이 DNA굽힘
      - 매개자(히스톤 탈아세틸화 효소 활성 보유) : 보조억제자 → 전사 억제
  - **RNA가공**
    - 5'-capping : 전사인자마다 서로다른 프로모터 시작 → 5'-cap부착자리 diff
    - 3'-tailing : 전사인자마다 서로 다른 종결자리 → poly A 꼬리 부착자리 diff
    - 선택적 스플라이싱 : By 활성조절단백질, 억제조절단백질
    - **RNA편집**
      - 전사가 끝난 mRNA의 특정 염기서열 치환, 첨가, 결실
      - 치환 편집- 소장의 ApoB 유전자
        - 소장 : CAA → UAA 탈아미노화 = 짧은 ApoB-48 단백질 번역
        - 간 : 치환편집X → 정상길이 ApoB-100 번역
      - 삽입편집도 있다. (mRNA 중간에 U 삽입)
  - RNA수송
    - 3'UTR Zip code(위치제공서열) → 운동단백질 결합 → mRNA가 세포골격 따라서 특정위치 이동
  - mRNA 수명조절
    - 3'말단에 조절단백질 결합 → mRNA수명(안정성) 변화
    - 카세인 mRNA 안정성조절
      - 카세인 : 모유의 주요 단백질
      - 프로락틴 처리 → 반감기 증가 : mRNA안정성↑
  - 번역조절
    - **적혈구아세포(혈액)**
      - 트랜스페린 : Fe2+운반
      - 세포 내 [철]↓ : 3'UTR의 IRE서열에 IREB 결합 → mRNA 분해 억제 → 트랜스페린↑
      - 세포 내 [철]↑ : 3'UTR의 IRE서열에 IREB 결합 X → mRNA분해 → 트랜스페린X
    - **소장상피**
      - 페리틴 : Fe2+저장
      - 조직 세포 내 [철]↓ : 5'UTR의 IRE서열에 IREB결합 → 리보솜이 못붙음 → 번역X
      - 조직 세포 내 [철]↑ : 5'UTR의 IRE서열에 IREB결합 X → 번역↑→ 철을 세포에 저장
  - 단백질 활성조절 (효소)
    - 비가역조절
    - 가역조절
    - 조절단백질
    - 알로스테리조절
  - 단백질 분해
    - 표지 : 유비퀴틴 → 단백질의 리신기에 공유결합
    - 프로테아좀 : 표지된 단백질 분해

14-2 진핵생물 게놈과 분자생물학-실험

- **동물 세포 배양**
  - 동결세포 해동 후 세포 배양
    - pH조절 : HEPES, 글루타민, NaHCO3
    - 세균증식 방지 : 페니실린, 스트렙토마이신
    - 양분공급 : 소의 태아혈청(성장인자O), 영양 칵테일
    - 지시약
    - } 넣어준 목적!
  - 계대배양
    - 트립신-EDTA : 세포 사이의 단백질 결합, Ca2+ 제거(EDTA)
    - 트리판 블루(죽은 cell 염색) : 세포 수 셀때 살아있는 것만 세기 ~
  - 동결 보존
    - DMSO : 물대신 세포질 채움 → 얼음결정으로인한 세포손상 방지
    - 세포보존액(세포배양액 + DMSO) → 질소탱크 냉동보관
- **mRNA 발현 비교**
  - **노던 블롯팅**
    - 특정 mRNA의 존재여부, 양, 크기 확인
    - 과정
      - 1. 전체 RNA추출
      - 2. 포름알데히드(2차구조 형성 X) / 포름아마이드(2차구조 파괴 → 선형mRNA) 처리
      - 3. 겔 전기영동
        - 양이 많은 18s rRNA, 28s rRNA 밴드 확인
          - RNA는 매우 분해되기 쉽다.
          - 밴드 있으면 분해 안된것으로 상정 → 실험 가능
      - 4. 모세관현상 : 겔 → NC필터 RNA전이
      - 5. NC필터에 자외선 → 핵산, NC 교차결합
      - 6. 연어정자 DNA 혼성화
      - 7. 방사성 표지 DNA탐침 혼성화
        - 스플라이싱 후에도 남아있는 서열에 상보적 탐침 필요
        - 내부대조군
          - 각 조직이 동량의 세포를 사용했는가? 지표
          - 하우스 키핑 유전자 (액틴, 튜불린, GAPDH mRNA) → 모든세포에서 항상 일정한 발현량
          - 하우스 키핑 유전자 탐침의 밴드 진하기가 같으면 특정유전자 발현량 비교 가능
      - 8 필름 감광
        - 스플라이싱 차이 → mRNA절편 길이 차이 → 전기영동 위치 차이
  - **RT(역전사)-PCR**
    - mRNA를 cDNA로 바꿔서 특정 mRNA의 존재여부, 양, 크기 확인
    - 과정
      - RNA 추출 후 역전사반응
        - **poly dT (프라이머)**
          - 역전사할땐 RNA프라이머 아님
          - mRNA에 PolyA 꼬리 있으므로 poly dT 프라이머 사용
        - dNTP
        - 역전사 효소(RT) 첨가
      - RNAse → RNA모두 분해→ 외가닥 cDNA만 획득
      - 프라이머 세트 → PCR진행
    - 한계
      - 처음 양이 달라도, PCR로 증폭할때 포화 →최종양 비슷해지는 오차
      - 해결 : Real-time PCR
  - **실시간(Real-time) PCR**
    - PCR로 매 사이클마다 증폭된 산물의 양 확인
    - 처음 샘플에 들어있는 DNA양 확인 가능
    - SYBR그린 방법 : 형광삽입물질(SYBR 그린) 넣고 PCR → 합성된 DNA양↑ 형광량↑
    - 형광탐침 방법
      - 양끝이 형광물질↔형광억제물질인 탐침 처리
      - Taq : 5'→3' 가수분해 기능O ∴새로운 가닥 합성하면서, 형광억제 제거 → 형광 발생
  - **RNase 보호 에세이**
    - RNA가 탐침과 결합 → RNase에 의해 분해 안되는 성질 이용
    - 탐침과 결합한 mRNA의 양 확인 가능
  - **감수 혼성화**
    - 두 세포중 한쪽에서만 발현되는 유전자를 파악하는 실험
    - 과정
      - 간세포의 RNA 추출 → 역전사,표지,RNase → 외가닥cDNA 합성
      - 뇌세포의 mRNA와 혼성화
      - 이온 교환크로마토그래피 : RNA외가닥, cDNA외가닥만 분리
      - 알칼리처리 : RNA 분해 → cDNA외가닥만 get
      - 분리된 cDNA를 탐침으로 이용 → 간세포 특이적 유전자 확인
    - 한계점
      - if) 간에서 100개 발현, 뇌에서 10개 발현
      - 간세포 cDNA 90개 외가닥 나오지만, 간세포 특이적 mRNA아님 !!
      - 해결법 : 최종 검출 유전자 노던블롯팅 →간세포에만 밴드 존재 확인
  - **마이크로어레이**
    - 여러 mRNA 발현 패턴 분석 & 세포 사이 발현 패턴 차이 비교
    - 과정
      - 다양한 외가닥 DNA 합성 → 칩의 각 구멍 바닥마다 1가지씩 多심음
      - 정상 위세포, 위암세포 mRNA 각각 추출
      - **역전사 반응**
        - **poly dT (프라이머)**
        - dNTP(정상세포 : green, 암세포 : red) 표지
        - **RT**
        - } 외가닥 cDNA 확보 (ssDNA)
      - 칩에 혼성화 : 색, 형광세기 → 위암세포 특이적 유전자, 발현량 비교
  - 현장혼성화
    - 살아있는 생물체 내에서 특정유전자 발현위치 파악하는 실험
    - 박편 제작(쥐 머리) → 탐침 투여 → 발색반응 확인
  - 증폭자 찾기
    - 과정
      - by 전이인자 → 리포터 유전자(루시퍼레이스)를 절연인자(insulator) 사이에 넣음
      - 유전자A가 발현시 리포터도 발현 → A유전자 위치의 간접적 확인 가능
    - **절연인자(insulator)**
      - 프로모터와 조절부위 사이 상호작용 방해하는 서열
      - 절연인자에 단백질 결합 → 인핸서가 절연인자 넘어서 작용 못함
      - 절연인자와 게놈각인
        - H19 유전자 : 남성 게놈각인
        - Igf2 유전자 : 여성 게놈각인
        - 부계 염색체의 절연인자부분 메틸화
          - 부 : Igf2 만 발현
          - 모 : H19 만 발현
- **단백질 발현 비교**
  - 2차원 전기영동 : 등전점 전기영동 + SDS-PAGE
  - **웨스턴 블롯팅**
    - 특정 단백질A 의 존재여부, 양, 크기 등을 확인하는 실험
    - 과정
      - 세포 파쇄 → SDS-PAGE 진행
      - 겔 → NC필터 단백질 전이 : 전극이용 (SDS=음전하)
      - NC필터를 BSA용액에 담금 : 항체의 비특이적 결합방지
      - 1차 항체 투여 : 생쥐 항-A항체 =생쥐에서 얻은 A단백질에 대한 항체
      - 2차 항체 투여 : 효소-토끼 항-생쥐 항체 = 토끼에서 얻은 생쥐에 대한 항체
      - 결합하지 않은 항체 씻어내고, 발색반응 일으킴 : 형광 양 비교
  - 단백질 미세배열
    - 포획항체 : 바닥에 먼저 뿌린 항체
    - 검출항체 : 다시 뿌린 항체with 형광물질 → 포획항체에 붙은 단백질에 결합 →형광 패턴 분석
  - 면역 형광법
    - 냉동 박편 시료 → 특정 단백질 항체 1차, 2차 투여 → 단백질 발현 위치 직접 확인