

12.

노던 블랏팅(Northern blotting)

• 샘플 내 특정 mRNA의 존재 여부, 양, 크기 등을 확인하는 실험법

(i) 세포에서 전체 RNA를 추출함

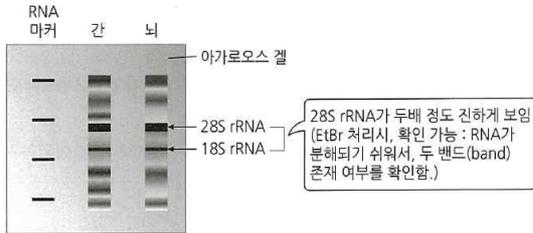


(ii) 전체 RNA에 포름알데히드와 포름아미드를 처리함

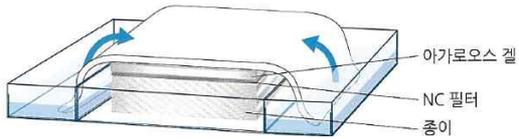
- 포름알데히드 : RNase 불활성화 및 A, G, C의 아민과 공유 결합해 mRNA가 2차 구조를 형성하지 못하게 함
- 포름아미드 : mRNA 2차 구조의 수소 결합을 파괴해서 선형으로 만들

(iii) 겔에 전기영동을 함

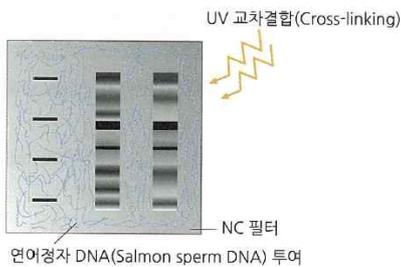
- RNA는 분해가 쉽게 일어나기 때문에, 전기영동을 한 뒤 겔에서 28S, 18S rRNA의 밴드들을 확인해서 RNA들이 분해되지 않고 남아 있는지 확인함



(iv) 모세관 현상을 이용해서 겔에서 NC 필터로 RNA를 전이함



(v) NC 필터에 자외선을 쬐어 핵산과 NC 필터 사이에 교차 결합을 형성함



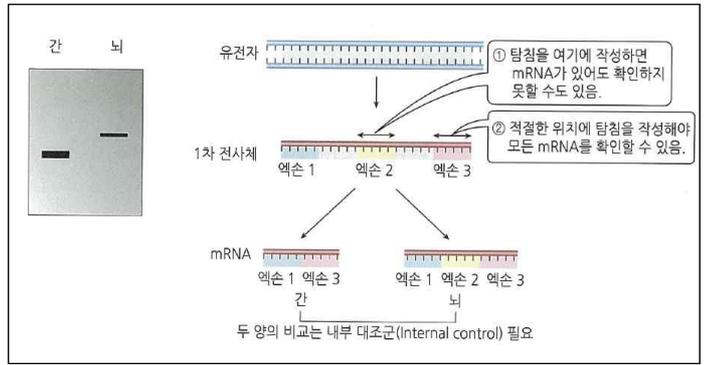
(vi) NC 필터를 연어 정자 DNA가 들어 있는 혼성화 용액에 넣고 62°C에서 전혼성화 반응을 진행 함

- 연어 정자 DNA : 탐침이 NC 필터에 비특이적으로 붙지 못하도록, 겔에서 RNA가 전이 되지 않은 NC 필터의 부분들을 모두 연어 정자 DNA로 코팅함

(vii) 방사성 표지된 DNA 탐침을 넣고 62°C에서 혼성화 반응을 진행함

- 탐침이 잘 붙을 수 있는 적당한 온도를 정함
- 온도가 높을수록 탐침이 아무 서열이나 비특이적으로 결합할 확률이 줄어듦

(viii) NC 필터를 60°C에서 세척한 뒤, 필름에 노출시켜 감광함



13.

웨스턴 블랏팅

• 샘플 내에 특정 단백질의 존재 여부, 양, 크기 등을 확인하는 실험법



(i) 세포를 파쇄한 후 단백질들을 얻어서 SDS-PAGE를 진행함

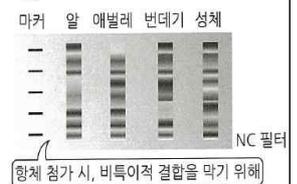


(ii) 겔에서 NC 필터로 단백질을 전이함



(iii) NC 필터를 BSA 용액에 담금

- BSA : 항체가 NC 필터에 비특이적으로 붙지 못하도록, 겔에서 단백질이 전이되지 않은 NC 필터의 부분들을 모두 BSA로 코팅함



(iv) 1차 항체를 투여 : 생쥐 항-A 항체 얻은 개체 항원

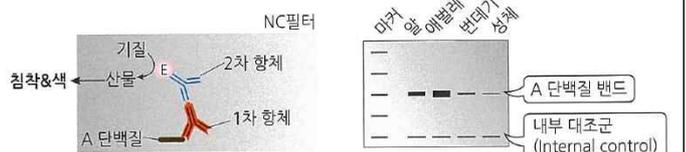
(v) 결합하지 않은 항체들을 씻어냄

(vi) 2차 항체를 투여 : 효소-연결된 토끼 항-생쥐 항체

생쥐 항체의 Fc 부분을 토끼에 주사해서 얻은 항체

(vii) 결합하지 않은 항체들을 씻어냄

(viii) 발색 반응을 일으켜서 밴드를 확인함



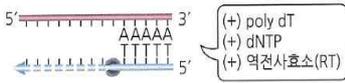
14.

RT(Reverse transcriptase)-PCR

• mRNA를 cDNA로 바꿔서 샘플 내 특정 mRNA의 존재 여부, 양, 크기 등을 확인하는 실험법

(i) 세포에서 전체 RNA를 추출함

(ii) 폴리 dT 프라이머를 넣고 37°C에서 1시간 동안 역전사 반응을 진행함



(iii) 75°C, 10분간 가열해서 반응을 멈춤

(iv) RNase를 처리해 RNA들을 모두 분해하고 외가닥의 cDNA만 얻음

(v) 특정 유전자에 대한 프라이머 세트를 넣고 PCR을 진행함

15.

DNA 미세배열(Microarray, DNA chip assay)

• 세포에서 전사된 여러 mRNA들의 발현 패턴을 분석하고, 세포들 사이의 발현 패턴 차이를 비교하는 실험법

(i) 다양한 외가닥 DNA들을 합성해서 칩의 각 구멍 바닥마다 차례로 한 가지씩 심어줌

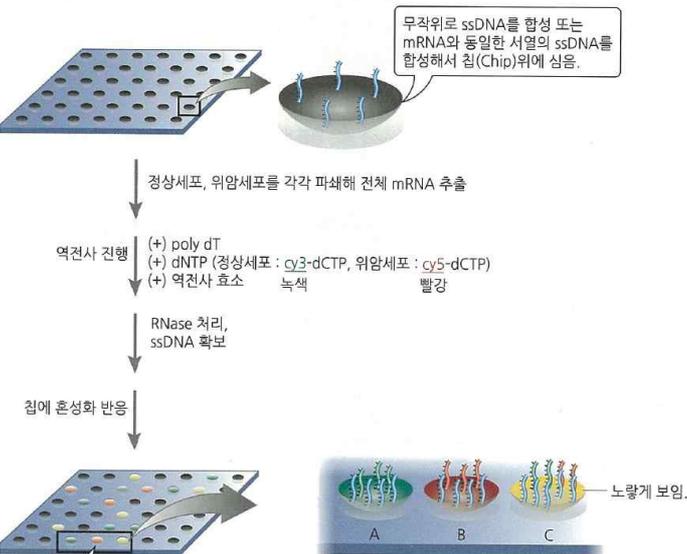
- 한 구멍에는 똑같은 외가닥 DNA를 충분히 많이 심어줌

(ii) 정상 위세포와 위암세포 파쇄물에서 전체 mRNA를 각각 추출함

(iii) 각 전체 mRNA에 서로 다른 형광 표지 핵산을 넣고 역전사 반응을 진행함

(iv) 합성한 cDNA들을 칩 위에 뿌려 혼성화 함(결합하지 않은 cDNA들은 씻어냄)

- 녹색 : 정상 위세포만 발현하는 유전자
 - 빨간색 : 위암세포만 발현하는 유전자
 - 노란색 : 정상 위세포와 위암세포가 공통적으로 발현하는 유전자
- 형광의 세기를 통해 각 유전자들의 상대적 발현양도 비교할 수 있음



위암세포 특이 유전자 추적 가능
(스팟(Spot)의 세기를 이용하여 유전자들의 발현양 비교 가능.
모든 세포들에서 늘 동일한 스팟이 나온다면, 하우스키핑 유전자로 생각해 볼 수도 있음.)

18.

RNA 편집

• 전사가 끝난 mRNA의 특정 염기를 다른 염기로 치환하거나 특정 염기 서열을 첨가 또는 결실함

(i) 치환 편집(Substitution editing) - ApoB 유전자

소장 : ApoB 유전자 mRNA 중간의 C 염기를 탈아미노화 해서 U 염기로 바꿈
- CAA 염기 서열이 UAA로 바뀌면서 중간에 종결 코돈이 생겨 짧은 Apo B-48 단백질로 번역됨

간 : ApoB 유전자 mRNA의 치환 편집이 일어나지 않음
- 정상 길이의 Apo B-100 단백질로 번역됨

19.

* 일반 전사인자

• 근거리 전사인자에 속함
• RNA 합성효소 II가 프로모터에 붙을 때 항상 함께 결합해서 전사를 도와줌(전사복합체를 이룸)

(i) TFIID

• TBP(TATA binding protein)
- TATA 박스의 작은 홈에 붙어서 DNA를 큰 홈 쪽으로 80°정도 꺾이게 함
- 활성자와 TATA 박스가 가까워지고, DNA가 느슨하게 감겨서 이중가닥이 잘 벌어지게 됨
• TAF(TBP-associated factor)
- TBP의 결합을 도와줌

(ii) TFIIB

• RNA 합성효소 II가 DNA에 붙는 방향을 정해줌

(iii) TFIIF

• RNA 합성효소 II를 DNA에 단단히 결합하고, 헬리케이스 활성을 지녀서 전사 개시를 도와줌

(iv) TFIIE

• TFIIF의 결합을 촉진함

(v) TFIIH

• 헬리케이스 활성을 지녀서 전사 개시를 도와줌
• RNA 합성효소 II의 CTD(C-terminal domain)를 인산화해서 모자 씌우기, 꼬리 달기, 스플라이싱을 하는 가공 단백질들이 CTD에 결합할 수 있게 함

TFIID → TFIIB → TFIIF → polII
→ TFIIE → TFIIH 순서로 전사 복합체를 형성함

1.

(i) 치환(Substitution)

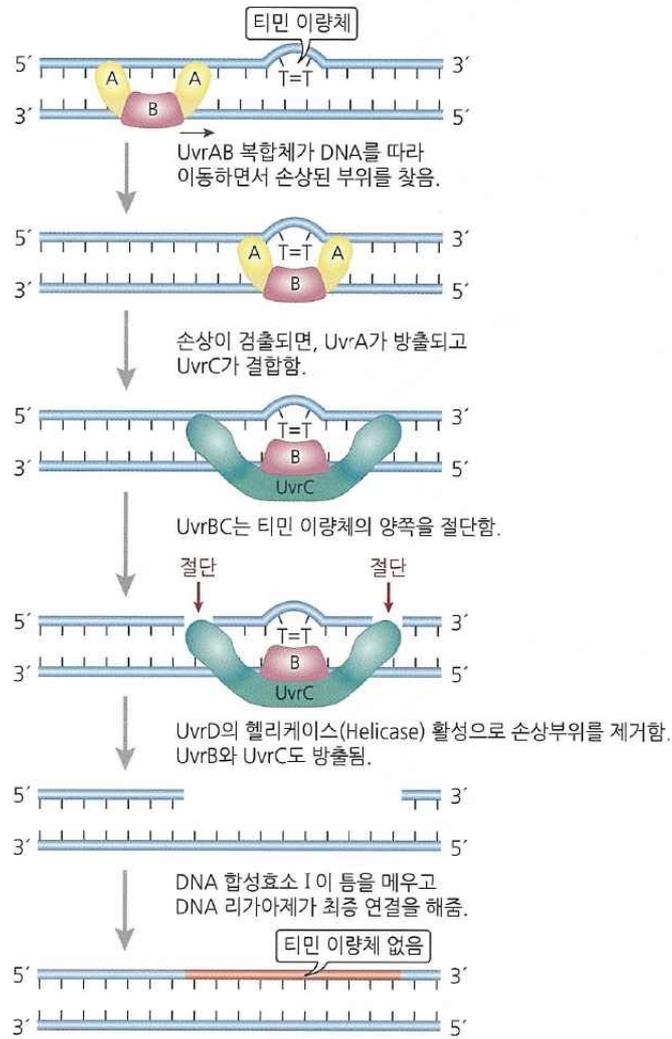
• 원래 염기가 다른 염기로 바뀜

- └ 전위(염기치환, Transition) : 퓨린이 퓨린으로, 피리미딘이 피리미딘으로 바뀜
- └ 전좌(염기전환, Transversion) : 퓨린이 피리미딘으로, 피리미딘이 퓨린으로 바뀜

5.

뉴클레오티드 절제 수선(Nucleotide excision repair)

• 티민 이량체 때문에 DNA에 심한 왜곡이 생김

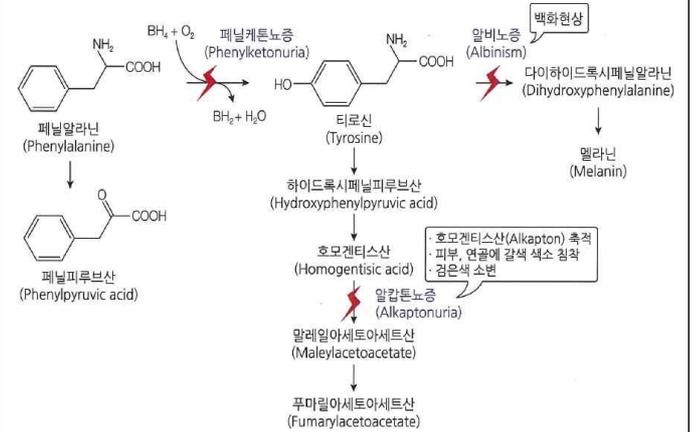


7.

* 페닐케톤뇨증

(i) 원인

- 상염색체 열성 질환
- 페닐알라닌 대사에 이상이 생겨 혈중에 페닐알라닌과 페닐케톤(Phenylketone)의 양이 많아짐
 - 출생 후 아이는 각종 신체 기관들의 발달을 위해 혈중 아미노산들이 원활히 공급되어야 함
 - 뇌는 혈뇌 장벽(blood-brain barrier, BBB)이 있어서 특정 트랜스포터를 통해서만 혈중 아미노산들을 공급할 수 있음
 - LNAAT(Large neutral amino acid transporter)는 발린, 류신, 이소류신, 트립토판, 티로신 등의 아미노산들을 주로 수송함
 - 혈중에 페닐알라닌의 농도가 높아지면, LNAAT가 페닐알라닌으로 포화되어 다른 아미노산들의 수송이 어려워져서 뇌 발달에 이상이 생김



(ii) 증상

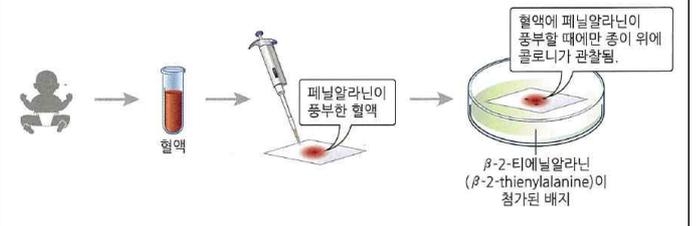
- 뇌 발달 이상으로 지적 장애 발생
- 멜라닌 색소의 합성에 이상이 생겨 백화 현상이 나타남
- 페닐케톤의 휘발성 때문에 소변에서 독특한 냄새가 남

(iii) 특징

- 열성 동형 접합자인 태아 : 정상인 엄마 배 속에서 태아의 노폐물들은 태반을 통해 엄마에게 전달되어 제거되기 때문에 문제가 없음
- 열성 동형 접합자 출생 후 : 페닐알라닌이 최소로 들어있는 음식물로 식이요법을 해야 함
열 살 정도면 뇌의 발달이 거의 끝나기 때문에, 이후에는 음식물 섭취에 큰 지장을 받지 않음
- 열성 동형 접합자가 임신 시 : 배 속에 정상 유전자를 지닌 아이를 갖더라도 식이요법을 하지 않으면 엄마의 혈액에 쌓인 과량의 페닐알라닌이 태반을 통해 태아에게 전달되어 태아의 뇌가 비정상적으로 발달함

(iv) 진단법 : 구쓰리(Guthrie) 테스트

- ㄱ) 영아로부터 혈액 샘플을 얻어 멸균된 종이 위에 떨어뜨림
- ㄴ) *Bacillus subtilis*와 β -2-Thienylalanine(페닐알라닌의 경쟁적 저해제)을 섞은 배지 위에 종이를 올려놓고 37°C에서 하루밤 배양
- ㄷ) 다음날 종이 주변에서 세균이 자라는지 여부를 관찰
 - 세균이 잘 자랄 경우 페닐케톤뇨증 환자로 진단할 수 있음

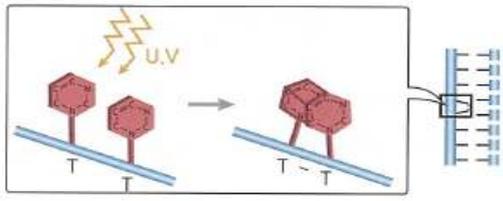


12.

● 물리적 돌연변이

ㄱ) 자외선 조사 - 틀이동 돌연변이

- 피리미딘 이량체 : DNA에 자외선을 쬐이면, 한 가닥 내에서 인접한 피리미딘 염기들이 서로 공유결합으로 연결됨. 티민 이량체가 가장 대표적임



ㄴ) 방사선 조사

- 고에너지 방사선을 쬐이면, 라디칼이 생겨서 DNA 내의 공유 결합들을 파괴할 수 있음

ㄷ) 열

- 가열에 의해 이중가닥 DNA가 벌어지면, 그 자리에 물이 들어와 반응해서 염기가 이성질화 반응을 일으킬 수 있음

② Colchicine은 미세소관 합성 저해제로, 콜히친을 처리할 경우 방추사 형성이 되지 않아 세포 분열 시 염색체 비분리가 일어난다. 따라서 염색체 수 이상 돌연변이가 일어날 수 있다.

13.

⑤ proto-oncogene(원발암 유전자)은 생체 내에 존재하는 정상 유전자로 세포 주기를 정상적으로 조절하는 기능을 가지고 있다. 만약 이들 유전자에 돌연변이가 생기면 oncogene(발암 유전자)로 바뀌고 세포 주기가 조절되지 않아 암이 발생한다.

14.

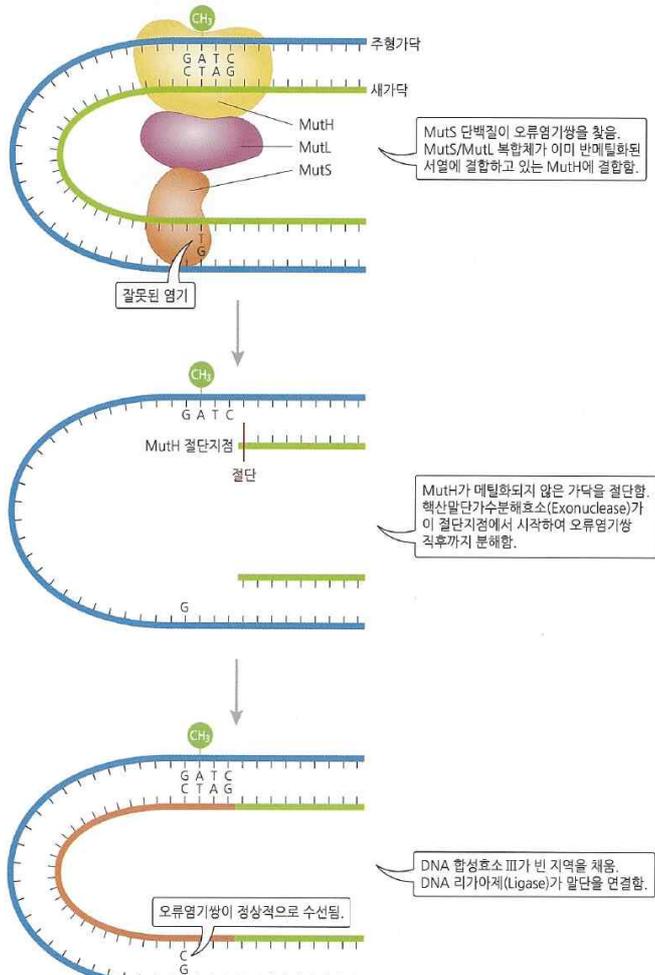
● 유전자 파괴로 인한 암 발생

- (1) proto-oncogene의 파괴
: 세포 성장 관련 세포 신호전달계 유전자
- (2) tumor-suppressor gene의 파괴
: apoptosis 유전자 또는 세포 주기 조절 유전자
- (3) caretaker gene의 파괴
: DNA 수선 유전자 → (예) BRCA2 유전자 파괴 → 유방암

18.

미스매치 수선(Mismatch repair)

- DNA를 복제하는 과정 중 잘못된 염기쌍이 생김
- MutS가 잘못된 염기쌍을 인식하면 MutL과 함께 주변의 메틸화 된 5'-GATC-3' 염기 서열을 찾아냄
- MutH가 활성화 돼서 메틸화 되지 않은 5'-GATC-3' 염기 서열이 있는 가닥을 끊음
- MutU(UvrD) 헬리케이스가 끊어진 가닥을 풀어줌
- 핵산외부 가수분해효소가 풀린 가닥을 분해해서 큰 틈을 만들음
- DNA 합성효소 III가 결합해서 틈을 수선한 후, DNA 리가아제가 틈을 연결함



주형가닥
새가닥

CH₃
G A T C
C T A G

MutH
MutL
MutS

잘못된 염기

MutS 단백질이 오류염기쌍을 찾음. MutS/MutL 복합체가 이미 반메틸화된 서열에 결합하고 있는 MutH에 결합함.

MutH가 메틸화되지 않은 가닥을 절단함. 핵산말단가수분해효소(Exonuclease)가 이 절단지점에서 시작하여 오류염기쌍 직후까지 분해함.

DNA 합성효소 III가 빈 지역을 채움. DNA 리가아제(Ligase)가 말단을 연결함.

오류염기쌍이 정상적으로 수선됨.

20.

코리슴산 → 프리펜산 → 페닐피루브산 → 페닐알라닌
III I II

2.

● PCR

DNA 주형
dNTPs
Taq DNA 합성효소
DNA 프라이머 세트(증폭할 절편의 양 끝 서열에 상보적인 외가닥 DNA들)

변성 : 이중가닥 DNA를 외가닥으로 별됨, 94℃에서 약 30초 진행
재결합 : DNA 프라이머를 상보 서열에 붙임, 적당한 온도에서 약 30초 진행
- 온도를 너무 낮게 세팅하면 프라이머가 비특이적으로 붙어서 엉뚱한 DNA 절편이 증폭될 수 있기 때문에 온도를 잘 조절해야 함
합성 : 새로운 DNA 가닥을 합성, 72℃에서 합성할 DNA 길이에 비례한 시간 동안 진행
- Taq 합성효소의 최적 활성 조건인 72℃에서 반응시킴
→ 전체 과정을 20~30번 반복하면 원하는 DNA 절편이 수백만 개로 증폭됨

온도 (°C) vs 시간

30 회

변성 94°C 30 초

재결합 30 초

합성 72°C 30 초

Taq의 최적 활성 온도

신장 시간: 합성하려는 DNA 길이에 비례 (≈1분 이상)

재결합 온도

5' AGGCTTCAGGCATCCTGG 3'

G=C: 4°C
A=T: 2°C

→ 2x7+4x11=58+44=102 (온도가 높을수록 특이성 ↑)

* 주의점 : 프라이머(Primer) 세트가 함께 붙어야 함
→ 두 프라이머가 재결합하는 온도를 같게 해야 함.

증폭수 : 0 → 1 → 3 → 7 → ...
→ n번째 생성된 절편 수 : 2ⁿ⁻¹

절편 수 vs 시간

이론

실제

30회 이상 돌러도 소용없음

6.

- * 30 cycle 이상이 안되는 이유
- (1) primer와 dNTPs 고갈
 - (2) DNA congestion
 - (3) Taq polymerase의 변성

9.

진핵생물 유전자 → 원핵생물 발현 : 원핵 프로모터 - SD서열 - cDNA - 전사종결 서열
원핵생물 유전자 → 진핵생물 발현 : 진핵 프로모터 - 코작서열 - AATAAA 서열

10.

● 벡터의 종류

① 플라스미드 : ~10kb까지 삽입

- * 숙주 DNA와 별개로 독립적으로 존재하는 작은 기생 DNA
- 세포에서 숙주 DNA와 따로 복제가 일어날 수 있도록 Ori 서열을 지님
- 플라스미드에 인위적으로 선택 마커와 MCS를 삽입해서 벡터로 이용함

② 코스미드(Cosmid) : ~50kb까지 삽입

- * 람다 파지 DNA의 양 끝에 cos(cohesive end) 서열만 남겨두고, 중간에 복제원점, 선택 마커, 관심 있는 DNA 절편을 삽입함
- 재조합 된 DNA를 코트 단백질과 섞어 바이러스 입자로 조립한 뒤 대장균에 감염함
- 대장균으로 들어간 DNA가 원형으로 바뀌어서 계속 플라스미드처럼 유지됨

③ BAC(Bacterial artificial chromosome) : ~300kb까지 삽입

- * 비교적 크기가 큰 F 플라스미드를 벡터로 사용하기 위해서 플라스미드의 중간에 선택 마커와 MCS를 삽입함

④ YAC(Yeast artificial chromosome) : ~1Mb까지 삽입

- * 중심절과 텔로미어가 있는 선형 DNA의 중간에 복제원점, 선택 마커, MCS를 삽입해서 만들
- 효모에 DNA를 형질전환하면 핵 속에서 다른 염색체들처럼 유지되고, 세포분열 시에도 딸세포들로 잘 분배될 수 있음

ori, MCS, 선택 마커

보통 대사 유전자 삽입 (Leu⁺ 유전자)

중심절

텔로미어

삽입

효모 (Leu⁻)

최소 배지

벡터 지닌 것들만 살게 됨

13.

② vector의 크기가 너무 크면 숙주 내로 vector를 집어넣기가 어렵다.

15.

<house-keeping gene>

- 세포의 생명 활동에 필수적인 유전자로 모든 세포에서 항상 발현되는 유전자
- 모든 세포에서 발현양이 일정하게 유지되기 때문에 내부 대조군으로 사용하기에 적합
: (예) 액틴, 튜블린, GAPDH 유전자

22.

● DNA 지문법

• 염색체 내 특정 위치들에 일부 염기서열이 반복해서 나타남
• 염기서열의 반복 정도가 사람마다 다름
- 염기서열이 반복된 구간을 PCR로 증폭해서 전기영동하면 사람마다 밴드 길이가 다르게 나옴
→ 개개인을 구분하는 지표로 사용할 수 있음

일치

B의 DNA가 사건 현장의 DNA와 일치함.

26.

프롬oter 프롬oter
Amp^r BamHI(376)
PstI(3612) Tet^r
pBR322
4361 bp
Ori

<pBR322>
• pBR322 벡터에는 Amp^r, Tet^r 두 개의 항생제 내성 유전자가 있음
- Tet^r 내의 제한효소 자리를 자르고 DNA 절편과 섞어서 연결 반응을 함
- 벡터들을 대장균에 형질전환하고, 암피실린 첨가 배지에 뿌려 키움
→ 자기 연결된 벡터 또는 절편이 삽입된 벡터를 가진 대장균들이 콜로니를 형성함
- 암피실린 첨가 배지에 생긴 콜로니들을 복제판 배양법으로 테트라사이클린 첨가 배지로 옮김
→ 자기 연결된 벡터를 가진 대장균들만 콜로니를 형성함
- 암피실린 첨가 배지에서는 자라지만 테트라사이클린 첨가 배지에서는 자라지 못한 콜로니를 얻으면, 절편이 삽입된 벡터를 가진 대장균들을 확보할 수 있음

Ori 프롬oter Ori 프롬oter
Amp^r Tet^r Amp^r Tet^r
절편 삽입
콜로니
암피실린 배지 복제판 배양 테트라사이클린 배지
절편 삽입된 콜로니

28.

④ 줄기세포는 배반포의 바깥층인 영양세포층에서 얻는 것이 아니라 안쪽에 모여 있는 세포들인 inner cell mass(내세포괴)로부터 얻는다.

31.

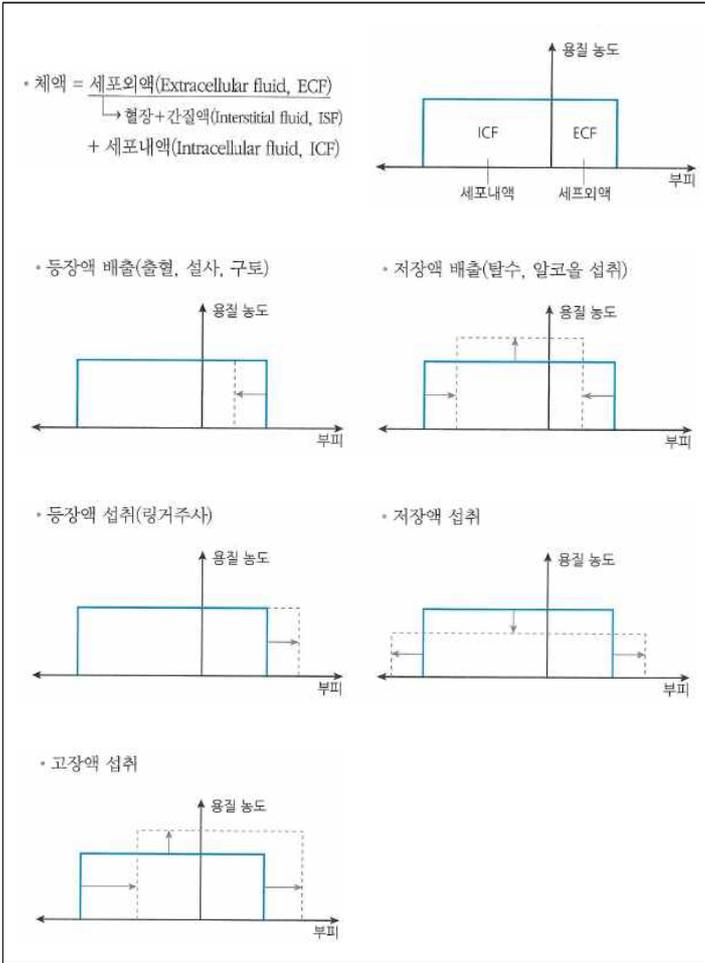
④ mRNA로부터 만든 cDNA 라이브러리는 mRNA를 분리할 당시에 전사되어 있는 일부 유전자들에 대해서만 라이브러리를 만들 수 있다. 따라서 cDNA 라이브러리는 세포 내 모든 유전자들의 서열을 포함하지는 않는다.

33.

반복 서열(Short tandem repeat, STR)의 존재

- 염색체에 짧은 DNA 서열이 연속 반복되어 있을 경우
 - 상동 염색체들의 연속 반복된 서열들 중 같은 위치가 아닌 자리에서 서로 상동 재조합이 일어남
 - DNA 복제 시 가닥 미끄러짐 현상이 일어남
 - 개체마다 연속 반복횟수가 바뀌어서 DNA 절편의 길이가 서로 달라지는 RFLP가 나타남

1.



6.

	골격근	심장근	평활근
근절	가로무늬근	가로무늬근	근절 없음
핵의 수	다핵 세포	단핵 세포	단핵 세포
모양	원통형 핵 근섬유 근절	원통형, 가지형 근절 근섬유 개재판 핵	방추형 근섬유 핵
조절	수의적 조절	불수의 조절	불수의 조절
근수축 조절 단백질 (Ca ²⁺ 결합)	트로포닌	트로포닌	칼모둘린
근수축 자극 방식	개별 신경 자극 (개별 수축)	신경 자극/간극 연결 (동시 수축)	신경 자극/간극 연결 (동시 또는 개별 수축)
예	골격근, 팔아근, 횡격막	심장 근육	소화관, 혈관 내벽근