

Chapter 6. Nucleotides and Nucleic Acids

Nucleic acid	
Objective	<ul style="list-style-type: none"> ○ 세포대사에서 뉴클레오타이드(nucleotide)의 기능은 무엇인가? ○ 유전체학 (genomics)과 단백질체학 (proteomics) 기본개념 이해 ○ 재조합 DNA 기술(recombinant DNA technology)란?
Key words	<ol style="list-style-type: none"> 1. Nucleotide의 기능은? <ul style="list-style-type: none"> - 효소의 보조인자, 대사중간산물 구성성분, 유전정보함유 등 2. 유전자의 2차 구조 (DNA secondary structure)는? 3. HIV 란 4. 인트론과 엑손(Intron and exon)의 차이점은? 5. 제한효소(restriction endonuclease)란? 6. 중합효소연쇄반응(Polymerase chain reaction, PCR) 7. Hybridization(Southern, Northern, Western) 8. 뉴클레오솜(Nucleosome)이란? 9. Hypochromic effect(흡광도감소효과)란 10. 대체절단연결(alternate splicing) 11. 박테리오파아지의 생활환(Life cycle of bacteriophage) 12. tRNA 구조적인 특성 13. RNAi의 기능 14. Gene cloning이란? 15. RNA processing이란? 16. List three difference between eukaryotic and procaryotic DNA 17. What are the three most common forms of RNA? What roles do they play in cell function.

◎ **분자생물학(molecular biology)**

- 유전자구조와 유전정보 가공을 연구 하는 분야

◎ 유전자는 유전자 생성물(폴리펩타이드 또는 여러 종류의 RNA분자)을 암호화 하는데 필요한 염기서열정보와 유전자 생성물을 조절하는 DNA 서열이다

◎ **Nucleic acids : DNA and RNA**

- 유전정보(genetic information)를 저장하고 전달하는 기능을 한다
- genetic information is stored in **the sequence of bases** along a nucleic acid chain
- DNA (deoxyribonucleic acid), RNA : ribonucleic acid

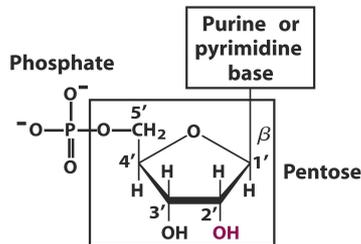
◎ **유전자 발현(gene expression)** : 세포가 환경 또는 발생신호들에 반응하여 유전자 생성물 합성의 시간을 조정하는 메카니즘이다.

◎ **유전정보의 흐름 : 중심원리(central dogma)**



1. Structural component of nucleotide

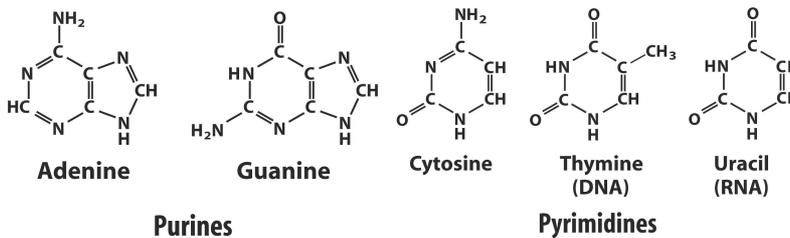
Nucleotide = **Phosphate**---**Sugar(pentose)**---**N-base(염기)**



1) Nucleotide component

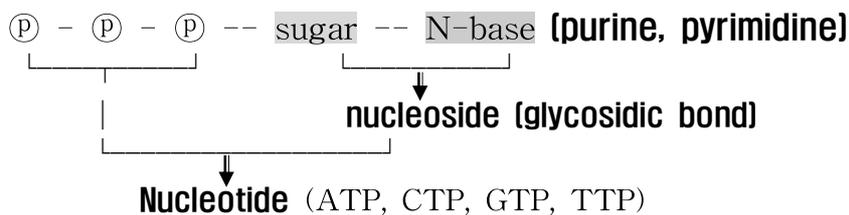
① N-base (염기)

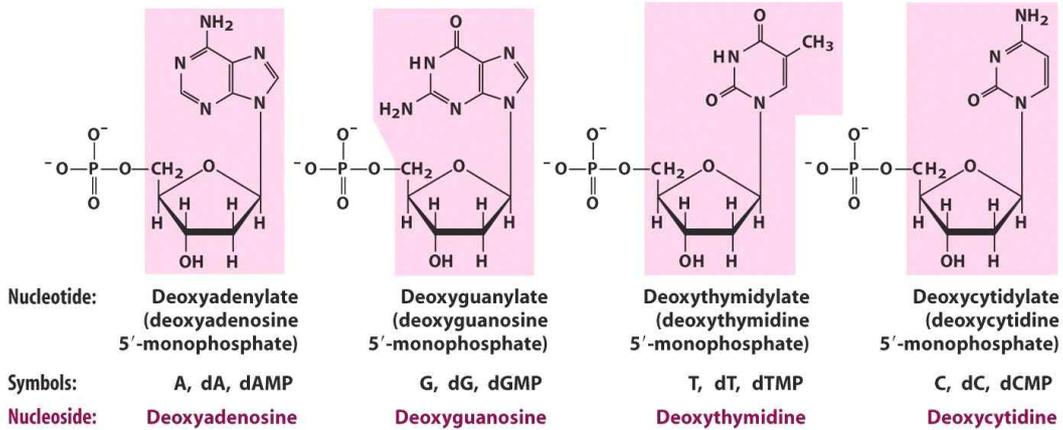
- Purine bases : adenine (A), guanine (G)
- Pyrimidine bases : cytosine (C), thymine (T), **uracil (U)**



② Pentose (sugar) : DNA (deoxyribose), RNA (ribose)

③ Phosphate

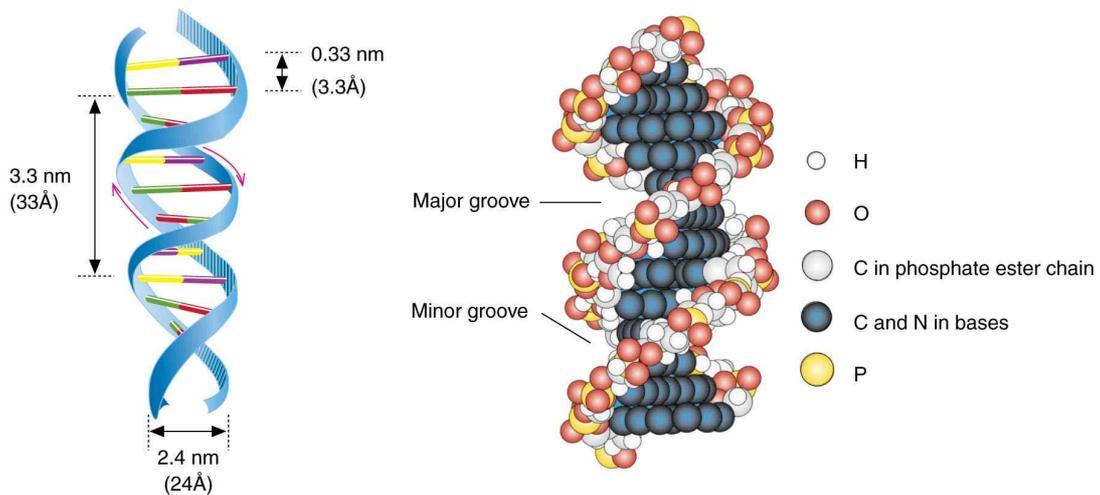




(a) Deoxyribonucleotides

TABLE 8-1 Nucleotide and Nucleic Acid Nomenclature

Base	Nucleoside	Nucleotide	Nucleic acid
Purines			
Adenine	Adenosine	Adenylate	RNA
	Deoxyadenosine	Deoxyadenylate	DNA
Guanine	Guanosine	Guanylate	RNA
	Deoxyguanosine	Deoxyguanylate	DNA
Pyrimidines			
Cytosine	Cytidine	Cytidylate	RNA
	Deoxycytidine	Deoxycytidylate	DNA
Thymine	Thymidine or deoxythymidine	Thymidylate or deoxythymidylate	DNA
Uracil	Uridine	Uridylate	RNA



(a)

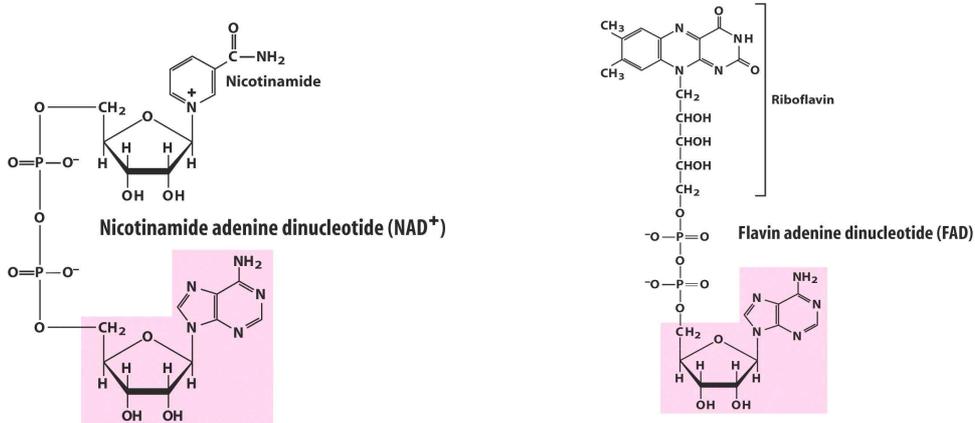
(b)

2) Function of nucleotide [인산 + 당 + 염기]

- Nucleotide는 핵산의 기본 구성 단위(monomeric units)
- 생체내에서 유리상태로 존재하면서 중요한 biological 기능
- 대사과정중의 에너지의 저장 공급 등의 역할 (metabolic intermediates)
- 산화 환원 과정에 관여하는 dehydrogenase의 조효소 역할(enzyme cofactor)

- ex) NAD : nicotinamide adenine dinucleotide
 NADP : " " " phosphate
 UDP : uridine diphosphate
 FAD : flavin adenine dinucleotide

☞ **Point : 생리활성이 있는 nucleoside → adenosine(심박동조절, 수면조절)**



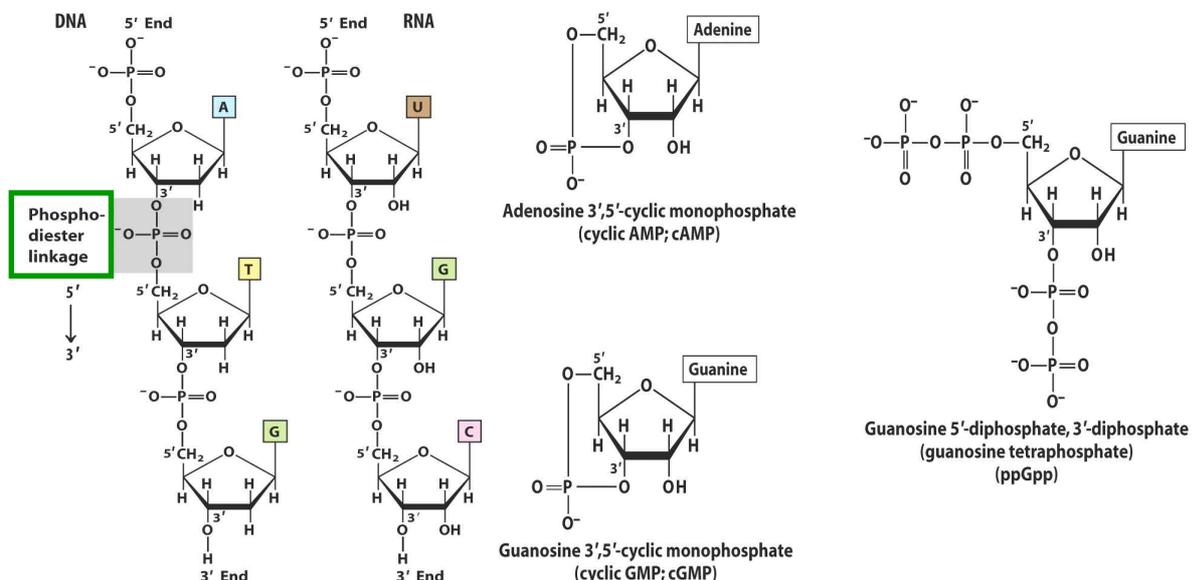
3) Nucleoside 이인산 및 삼인산 (Cyclic nucleotide) : regulatory function

- ① Adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate (cAMP) : serve as second messenger
 - ATP → adenylate cyclase → cAMP
- ② Guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate (cGMP)
- ③ Cytidine 2', 3'-cyclic monophosphate (cCMP)
 - RNA alkaline 가수분해 or 효소분해 중간체로 작용 → 조절기능
- ④ ppGpp (사인산 구아노신) :
 - 세균에서 아미노산 결핍으로 단백질 합성이 저하될 때 생성
 - 단백질 합성에 사용되는 rRNA, tRNA의 합성을 억제하여 불필요한 핵산의 합성을 방지

2. RNA와 DNA의 공유결합구조

1) Phosphodiester linkage

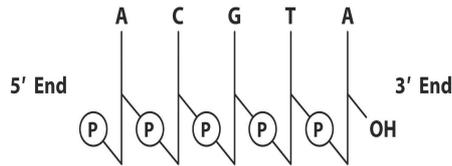
- DNA & RNA 의 backbone (phosphate, pentose) : hydrophilic (친수성)



2) DNA is an acid

- **Negative charges** are generally neutralized by ionic interaction with positive charges on **proteins, metal ions, and polyamines**

3) Base sequence : 5' → 3' 방향으로 쓴다.



4) The properties of nucleotide bases affect the structure of nucleic acid

- **약한 염기성 화합물 (basic compound)**
- **hydrophobic(소수성), water insoluble at neutral pH**
- **absorbed UV light (260nm)**
- highly conjugated molecules

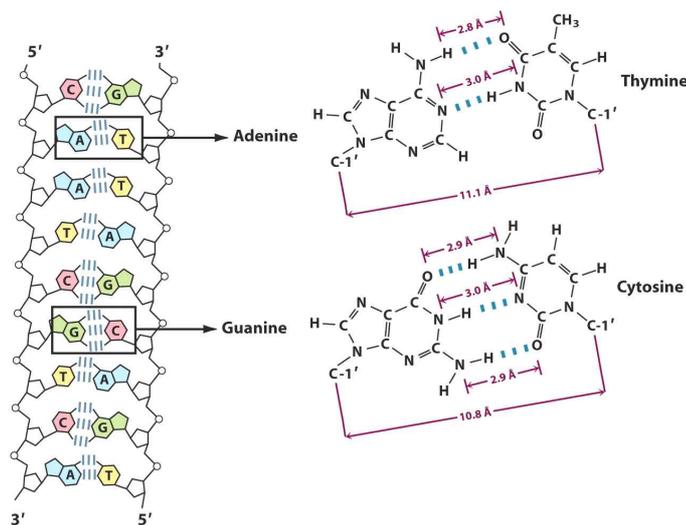
3. DNA structure

- * DNA의 Nucleotide 는 **인산 + 당(deoxyribose) + 염기(A,G,C,T)**로 구성되어 있다.
- * DNA는 **이중나선구조(double helix)**로 두개의 polynucleotide는 **역 평행구조**이다.
- * DNA의 두개의 nucleotide는 **3' 5'-phosphodiester 결합**에 의해서 연결되어 있다.
- * **DNA분해효소** : deoxyribonuclease (DNase)
- * Phosphodiesterase : phosphodiester bond 절단

1) DNAs have distinctive base compositions

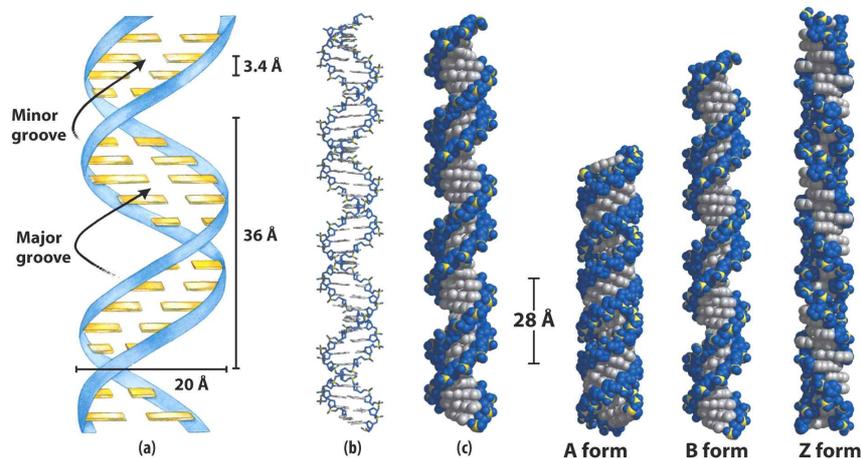
- 염기조성은 종에 따라 다르다
- 같은 종에서 분리된 DNA는 조직과 관계없이 동일하다.
- DNA composition은 변화지 않는다(aging & nutritional state)
- **Chargaff's rule (샤가프의 법칙)**
 - $A = T, G \equiv C, A + G = C + T$
 - DNA의 3차 구조를 해명하는 열쇠

ex) 40% GC, AGCT의 비 : [] : [] : [] : []



2) DNA is a double helix(DNA는 이중나선구조이다)

- **Watson & Crick 가 DNA secondary structure (DNA 2차구조) 분석**
 - x-ray diffraction analysis(X-선 회절분석)으로 확인
- **right handed double helix**
- two strands of helix are **antiparallel**
- DNA sequence of two strand are complementary to each other
- **DNA double helix (duplex) is held by two sets of force**
 - **hydrogen bond** between complementary base pairs
 - **base-stacking interactions [소수성상호작용]**
 - 염기 쌓임(반데르발스힘), 정전기적 상호작용
 - 수화 : 물은 핵산의 3차구조를 안정화한다. DNA는 상당수의 물 분자와 결합
- Minor groove and major groove



[DNA 구조에 대한 Watson-Crick 모형]

[A형, B형, Z형 DNA의 비교]

3) DNA can occur in different structural forms

- ① B-form : **most stable structure (Watson & Crick model)**
sugar-phosphate backbone rotation

**10.4 base pairs/turn, 2.4 nm/diameter, 3.4 nm/turn,
0.34 nm/base pairs, 18-19 H₂O/nucleotide**

- ② A-form : **right handed helix, relatively devoid of water**
2.5 nm/turn, 0.23 nm/base pairs
11 base pairs/turn, 2.6 nm/diameter

A-form은 길이가 짧고 B-form보다 직경이 크다

- ③ Z-form : **left handed helix**
4.5 nm/turn, 0.38 nm/base pairs
12 base pairs/turn, 1.8 nm/diameter
backbone : zig-zag appearance

4) DNA supercoiling (DNA 3차구조)

DNA packaging, 복제, 전사 등 생물학적 반응을 잘 진행되게 한다.

4. Nucleoprotein (핵단백질)

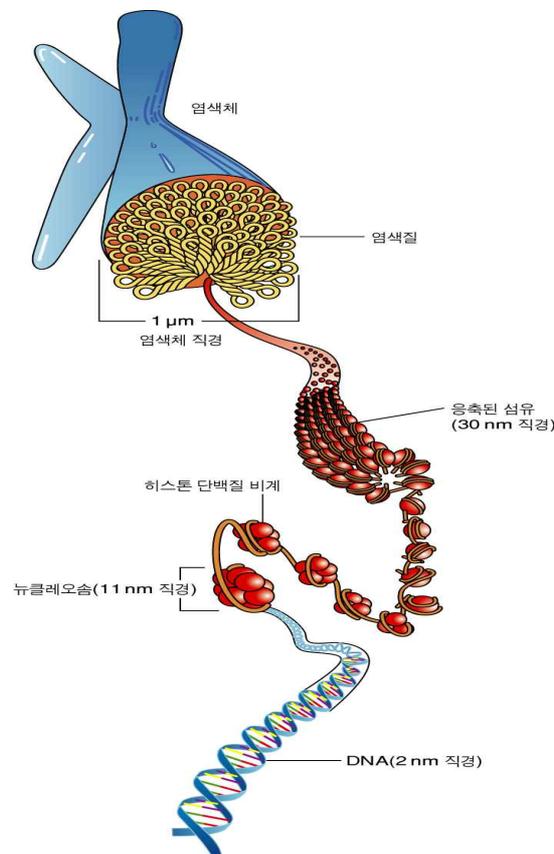
: 세포의 DNA 및 RNA는 단백질과 결합한 복합체로 존재

1) Nucleosome(뉴클레오솜) : histone-DNA complex

- 진핵세포 염색체의 구조적단위, 8량체
- histone 8량체에 연결된 DNA는 약 140bp
- nucleosome과 nucleosome 사이를 연결하는 H1은 약 60bp

2) 염색질 (chromatin)

- 단백질 부분 : histone (50%) → 염기성 단백질, positively charged
 - DNA 인산 ester기에 있는 이온 전하의 약 1/5 를 중화
- Histone protein : regulation of protein folding
- Nonhistone protein : 유전자 발현 조절자와 촉매가 존재



3) 유전체구조

- * 모든 생물의 유전체(genome)는 생명활동에 필요한 유전정보를 함유하고 있다.
- * 유전체는 크기, 모양과 서열복잡성에서 다르다.
- * 유전체의 크기는 Mycoplasma가 가장 작은 세균이다
- * 원핵생물의 유전체는 진핵생물 유전체보다 더 작다.
- * 유전자의 구조가 원핵생물(유전체는 하나의 환상의 구조)과 진핵생물(유전체는 2개 또는 그 이상의 선상구조)은 다르다.

① 원핵생물 유전체의 특징

○ Genome size (유전체크기) :

- 대부분의 원핵생물의 게놈은 진핵생물보다 훨씬 적다. ex) E. coli 4.6Mb

○ **암호화기능 :**

- 원핵생물의 유전자는 **짜임새 있고 연속적**이다.
- 유전자 서열사이 및 유전자 서열속에 비암호 DNA를 거의 포함하고 있지 않다

○ **유전자 조절 :**

- 기능적으로 관련된 유전자들은 **오페론(operon)으로 구성되어 조절**된다.

☞ 원핵생물은 plasmid를 함유하며 항생제 내성 및 독특한 대사능력을 갖고 있다

② **진핵생물 유전체의 특징**

○ Genome size (유전체크기) :

- human genome은 3200 Mb, **25,000 - 40,000만개 유전자**로 추정되고 있다.
- **인간 게놈의 약 45%는 반복서열(repetitive sequence) 함유하고 있다**

○ **암호화기능 :**

- 진핵생물 대다수의 DNA 서열은 암호능력을 갖고 있지 않다.
- 즉 전사를 개시하는 온전한 조절부위를 가지고 있지 않다.
- 비암호화 서열의 기능은 알려져 있지 않으나 **조절이나 구조적 기능을 하는** 것으로 추정되며, 인간의 **유전체중 약 1.5%가 단백질을 암호화**한다.
- 진핵세포의 대부분의 DNA는 단백질 합성을 하지 않는다.

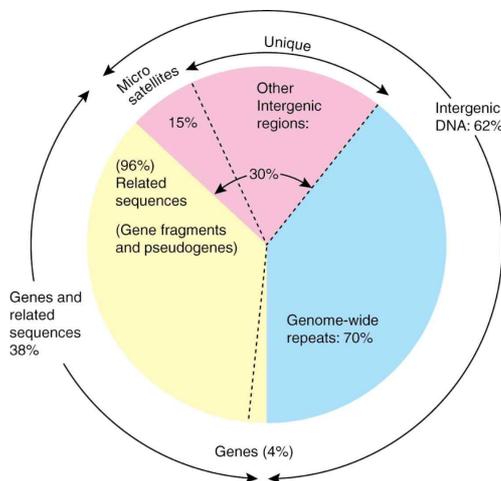
○ **암호화 연속성 :**

- 진핵생물의 유전자는 불연속적이다. **비 암호염기서열(intron)은 유전자생성물을 암호화하는(exon)서열** 사이에 산재해 있다.
- **진핵세포의 유전자는 exon과 intron이 존재**

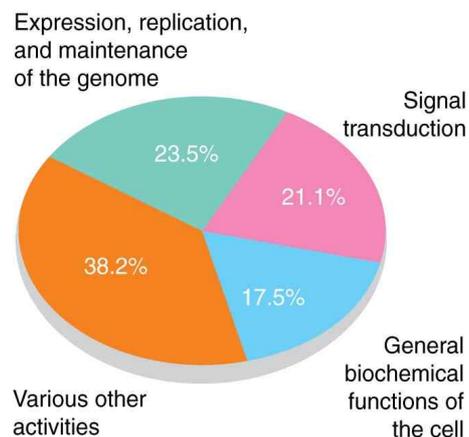
◎ **대체절단연결(alternate splicing) :**

- 엑손과 인트론의 존재 때문에 진핵생물은 1개의 유전자로부터 1개 이상의 polypeptide를 생산한다.
- 대체절단연결(alternate splicing)을 이용함으로써 엑손의 다양한 조합이 서로 연결되어 일련의 mRNA를 만든다.

ex) 면역글로불린의 항원 수용체를 암호화하는 유전자 서열의 rearrangement는 면역계에서 생산되는 수백만 개의 림프구와 항체를 생산



[인간유전체]



[유전자를 암호화하는 인간 단백질]

◎ 인간유전체의 DNA서열 분석

- 약 3200Mb의 인간유전체중 약 38%가 유전자와 관련된 서열을 가지고 있다.
- 이 서열들 중 유전자 생성물을 암호화하는 부분은 약 4%이다
- 규명된 유전자중 전체수에서 2500보다 더 적은수가 RNA분자들을 암호화하고 나머지는 단백질을 암호화한다.

○ 위유전자(pseudogene) : 불활성화 되고 비 기능적인 유전자 복제물

○ 직렬반복(tandem repeat) : 다중 복제물이 나란히 배열되어 있는 DNA 염기서열

- 위성DNA(satellite DNA), **minisatellite, microsatellite : 유전병진단**

○ 산재유전체 반복(interspersed genome-wide repeat) : 유전체주변에 산재한 반복 서열로 이 서열의 대부분은 전위의 결과이다

5. RNA structure

* 세포에는 DNA의 10배 정도에 해당하는 RNA가 있다

* DNA와 RNA의 차이점

- 당질 : deoxyribose(DNA), ribose(RNA)
- 염기 : AGCT(DNA), AGCU(RNA)
- structure : double helix(DNA), 단일가닥으로 특이한 3차구조 형성(RNA)
- Chargaffs rule이 적용되지 않는다.
- RNA의 종류 : mRNA, tRNA, rRNA

1) Messenger RNA (mRNA) :

○ carry the information from genes to the ribosome

○ 총 RNA의 5%를 차지하며 크기는 다양하다.

○ 원핵세포 mRNA는 여러 단백질을 합성할 수 있는 유전정보를 함유(polycistronic)

○ 진핵세포 mRNA는 단 하나의 단백질을 합성할 수 있는 유전정보를 함유(monocistronic)



(a) Monocistronic



(b) Polycistronic

○ mRNA 합성 후 modification : RNA processing (5'cap (methylguanosine, 3'poly(A) tailing)

○ Cistron : polypeptide를 합성하는 정보와 라이보솜 기능에 필요한 신호분자를 가지고 있는 DNA 서열이다.

2) Transfer RNA (tRNA)

○ mRNA의 정보를 아미노산의 특이한 서열로 번역한다.

○ 총 RNA의 15%를 차지하며, 단백질 합성을 위해 아미노산을 ribosome에 운반한다.

○ tRNA분자의 평균길이는 75 nucleotide

○ tRNA 분자는 특별한 아미노산과 결합하기 때문에 세포는 단백질에서 발견되는 20 아미노산에 대해서 적어도 한 개 이상의 tRNA를 함유하고 있다

○ tRNA structure : 3'end-CCA, anticodon, loop

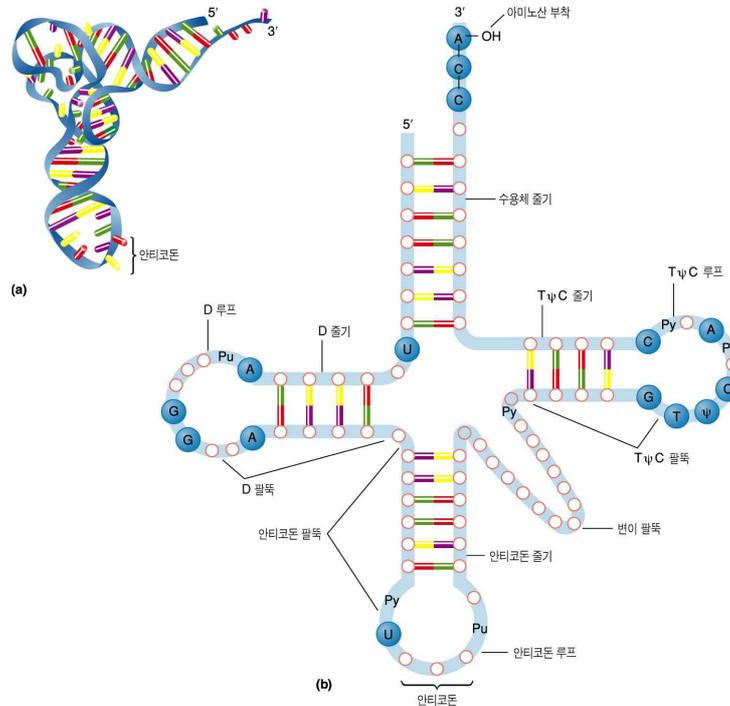


Fig. tRNA structure

3) Ribosomal RNA (rRNA) :

- structural components of ribosomes, 총 RNA의 80%를 차지
- 기능 : 단백질을 합성을 수행한다(carry out the synthesis of proteins)
- 원핵세포 : $70S = 50S + 30S$
 - 50S : 5S, 23S, 34 polynucleotide
 - 30S : 16S, 21 polynucleotide
- 진핵세포 : $80S = 60S + 40S$
 - 60S : 5S, 5.8S, 49 polynucleotide
 - 40S : 18S, 30 polynucleotide

4) Heterogeneous RNA and small nuclear RNA

- ① **Heterogeneous RNA (hnRNA)** : DNA의 primary transcript, mRNA의 전구체
 - ② **Small nuclear RNA** : small nuclear ribonucleoprotein particles를 형성하기 위해서 몇몇 단백질과 결합, splicing 활성화 관계
 - ③ **비암호 RNA (ncRNA)** :
 - 미소 RNA(micro RNA, miRNA)
 - 소형방해 RNA(small interfering RNA, siRNA)
 - 소형인 RNA(small nucleus RNA, snoRNA)
 - 소형핵 RNA(small nuclear RNA, snRNA)
- ◎ **miRNA, siRNA** : RNA 방해(RNAi)라고 부르는 RNA 분해과정에 관여
 - ◎ **RNAi의 기능** :
 - 선택한 유전자들을 불활성화함으로써 발생과정에서 유전자발현을 조절
 - 바이러스 RNA 유전체로부터 세포를 보호한다.

6. Virus(바이러스)

- * 바이러스는 생존을 위한 모든 대사활동을 스스로 할 수 없으며, 세포내 기생물처럼 살아가는 **이동성 유전물질**(mobile genetic element)이다
- * 바이러스는 많은 **질병의 원인**이 되며, **세포대사나 재조합기술 개발**에 크게 공헌

1) Virus structure (바이러스구조)

- Virus는 **핵산**과 **capsid(외피단백질)**로 구성되어 있다.
- 대부분의 외각은 20면체이다.
- 대부분의 virus 유전자 : 이중가닥 DNA, 단일가닥 RNA
- 단일가닥 DNA or 이중가닥 RNA도 존재

2) 박테리오파지 T4 (T4-bacteriophage)

- 숙주세포로 bacteria를 이용, 유전자의 구조는 dsDNA이다
- **Life cycle (생활환) : Lytic cycle 과 lysogenic cycle**
- **형질도입(Transduction)** : 바이러스를 이용하여 숙주세포를 형질전환 시키는 것

3) HIV (human influenza virus)

- human 면역결핍 virus : AIDS 유발
- HIV가 인체의 면역계를 파괴시킨다.
- retrovirus : ssRNA → DNA(역전사효소 함유)
- ssRNA genome, reverse transcriptase, RNA 가수분해효소, 단백질 가수분해효소, integrase 함유
- HIV는 T-helper lymphocyte를 공격한다.

7. 핵산의 종류

1) Chromosomal DNA : store genetic information

ex) E. coli : 4.3kbp, ds DNA, 예외 : virus (RNA)

2) Plasmid DNA

- 세균은 chromosomal DNA외에 plasmid를 함유
- 자신의 복제에 필요한 유전정보를 일부 함유, vector(운반체)로 이용
- 기능 : 항생제에 관한 세균의 내성, F-pilus의 형성, 독소의 생성

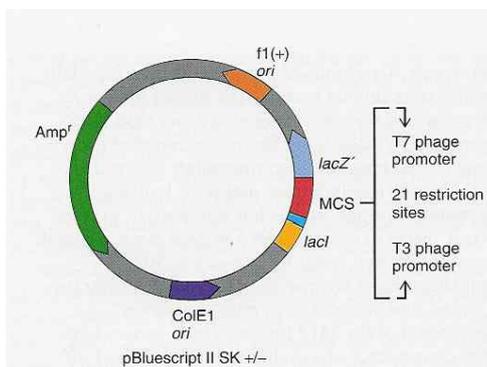


Figure 4.11 The pBluescript vector. This plasmid is based on

3) Mitochondrial DNA

4) Chloroplast DNA

보충학습 : 실험과정 및 용어설명

1. Nucleic acid & gel electrophoresis : Agarose gel 농도(0.7%)

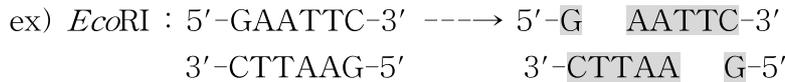
- DNA staining reagent : ethidium bromide

UV 조사 → 형광 (300nm)

- Agarose + urea or (formaldehyde) : ss nucleic acid 분자의 크기 결정
 → (염기의 수소결합을 방지)

2. 제한효소 (Restriction endonuclease)

- DNA의 특정 sequence 부위를 인지하여 절단하는 효소



* 제한효소절단모형 : sticky end 와 blunt end

* 제한효소 인지 염기수 : 4 base recognition, 6 base recognition 등

* Restriction enzyme mapping (제한효소지도)

ex) *BamHI*, *Hind III*, *PstI*

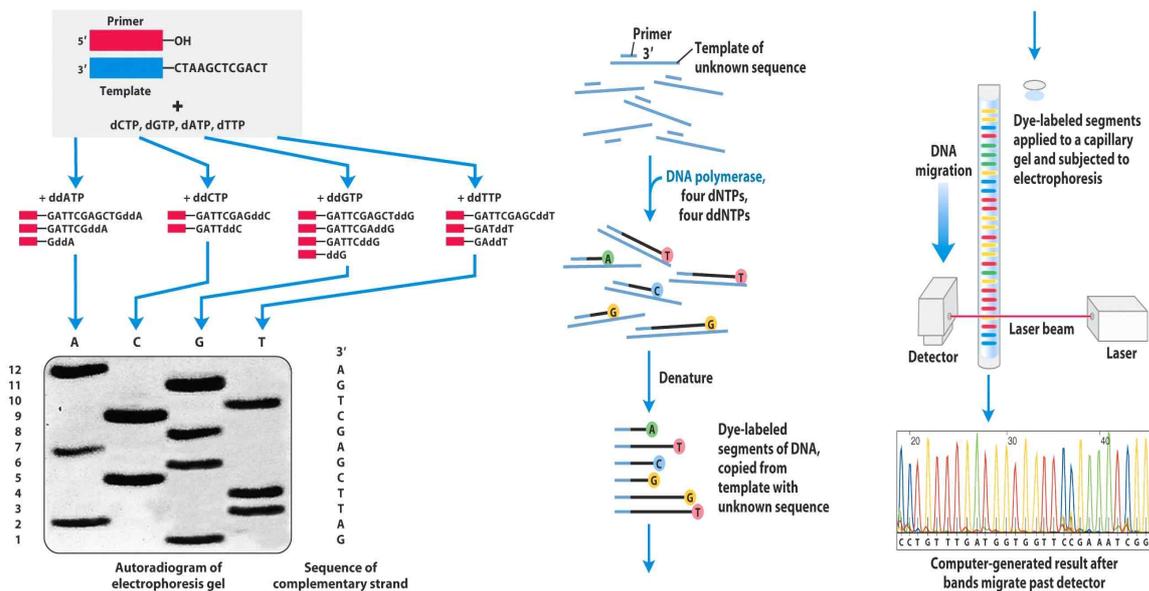
3. DNA sequence

① Maxam & Gilbert method : chemical method

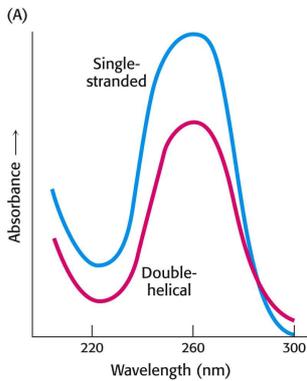
② Sanger method (dideoxy method)

◎ Reagent

- primer
- DNA template (ssDNA)
- dNTP, ddNTP
- DNA polymerase



4. Denaturation and renaturation of nucleic acid



① DNA melting :

- dsDNA → ssDNA (boiling 100°C for 5 min, NaOH)

② Hypochromic effect : 흡광도감소효과

- ssDNA → dsDNA 로 전환될 때 흡광도가 감소하는 현상

☞ Hyperchromic effect

③ Tm value : depend on GC ratios(G,C 비율에 의존)

dsRNA는 dsDNA 보다 안정 동일한 GC%에 대해 Tm value가 높다.

5. 종합효소연쇄반응 (Polymerase chain reaction, PCR)

1) PCR의 개념

- DNA 종합효소를 이용해 DNA의 일부분을 복제하는 방법
- DNA의 일부영역(target region)을 수 시간 동안 수십만 배로 증폭하는 방법
- 아주 적은 양의 DNA를 이용하여 많은 양의 DNA 합성이 가능

2) Reagent (시약)

- primer, DNA template (ssDNA) : 표적염기서열
- dNTP, Taq polymerase, 온도사이클러(thermocycler) : PCR 기기

3) PCR 과정

① DNA의 변성(denaturation)

- 90°C - 96°C로 가열하여 dsDNA를 ssDNA로 분리시킨다

② Primer의 결합(annealing)

- 변성된 single stranded DNA에 primer를 낮은 온도(50-65°C)에서 결합시킨다.

③ DNA의 합성(polymerization)

- 72-75°C에서 Taq polymerase가 Primer로부터 DNA를 합성한다.

4) ① - ③ cycle을 반복해서 DNA를 증폭한다.



그림 90°C에서 dsDNA → ssDNA ①

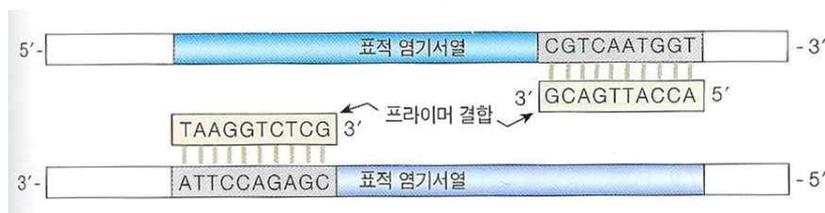


그림 50 -60°C에서 primer 결합② 후 → 70°C 새로운 가닥 합성③

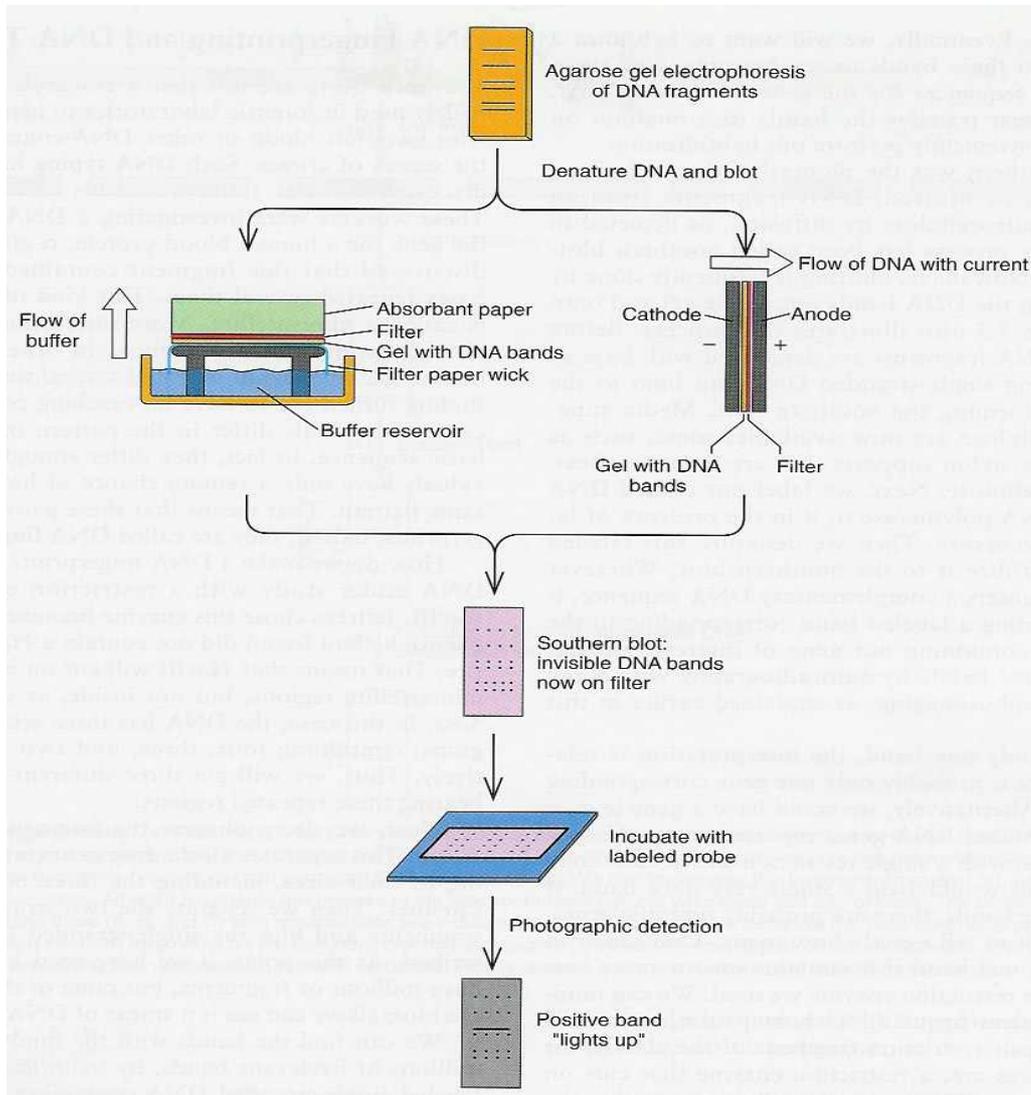
6. Hybridization (유사성검증)

- * **Southern hybridization** : DNA와 DNA의 유사성(homology) 검정
- * **Northern hybridization** : DNA와 RNA의 유사성 검정
- * **Western hybridization** : Protein과 protein의 유사성 검정

1) [Southern blotting]

- ① DNA electrophoresis (digested DNA, plasmid or genomic DNA)
- ② Denaturation (dsDNA→ssDNA) : 변성
- ③ Transfer DNA into nitrocellulose membrane
- ④ Baking the filter at 80°C for 1hr : DNA를 membrane에 고정
- ⑤ **Hybridization : (membrane + 탐침을 일정한 온도에서 annealing**
- ⑥ Washing (SSC buffer) ⑦ Exposure X-ray film

[Southern Hybridization 과정]



2) Probe preparation (탐침조제)

- **short DNA, RNA 및 antibody를 isotope로 labelling하는 것**

7. RNA processing (RNA 가공)

아미노산을 암호화하지 않는 intron이 제거되고 아미노산을 암호화하는 exon만 연결되어 변형이 일어난 성숙된 mRNA가 되는 과정

- 1) 5'CAP :
- 2) Splicing :
- 3) 3'Poly(A) tailing

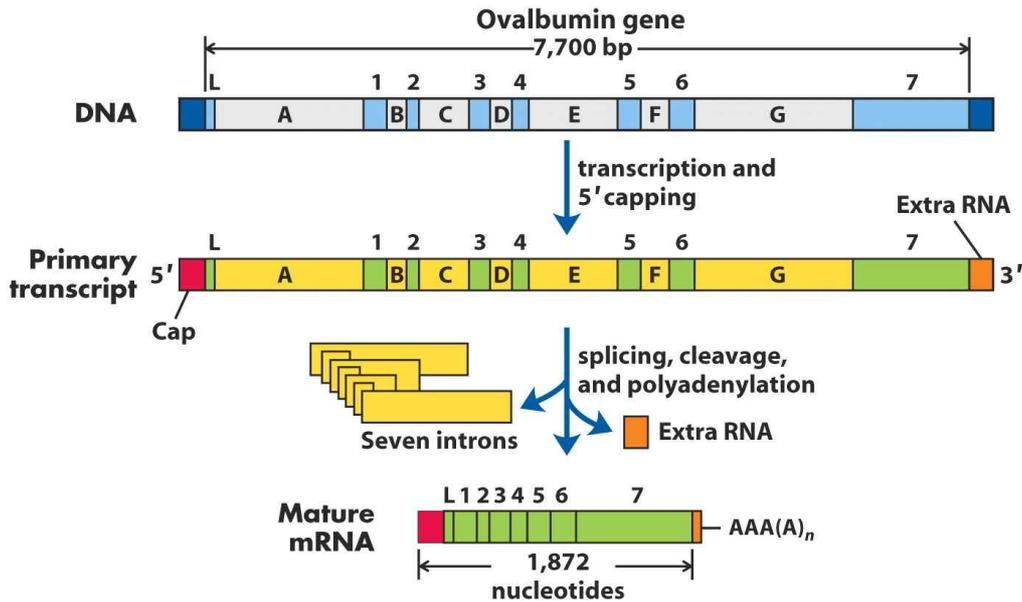


Fig. Overview of the processing of a eukaryotic mRNA

◎ 생물정보

