

## 까막전복 (*Haliotis discus discus*) cDNA library를 이용한 expressed sequence tag (EST) 분석

강현실 · 이제희

제주대학교 해양생물공학과

### 서론

발현되는 유전자의 일부 염기서열은 cDNA library에서 생성된 expressed sequence tag로 설명된다. Expressed sequence tag (EST)는 mRNA에 대한 짧은 염기서열로, 무작위로 선택된 cDNA clone을 한번의 염기서열 분석을 통해 생성되는 것이다. 이 방법은 Adams에 의해 대량의 genome sequencing을 수행하여 genome 구조와 기능 해석을 수행함으로써 처음으로 설명되었다 (Adams *et al.*, 1991). 이런 결과로써, EST는 발생단계, 생리학 또는 환경 자극에 의한 특정 조직, 기관과 생물체의 mRNA 발현 양상을 이해할 수 있다 (Gong *et al.*, 1997; Fung *et al.*, 2002; Ram and Masahiro, 2002; Gueguen *et al.*, 2003). 또한, 유전자 동정과 새로운 유전자 발굴을 위한 효율적 방법이며 (Nam and Kim, 2001), genomic mapping과 polymorphic marker에 대한 좋은 정보원으로도 이용되고 있다 (Gieser and Swaroop, 1992; Marra *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1999).

본 연구는 까막전복 (*Haliotis discus discus*) 전 조직의 유전자 발현 양상을 분석하기 위하여 까막전복 치패로부터 cDNA library를 제작하였다. 이 cDNA library로부터 약 1170개의 clone을 무작위로 선택하여 single pass sequencing을 수행하였고, 이들 서열을 이용하여 BLASTN과 BLASTX program을 이용하여 유전자 검색을 하였다.

### 재료 및 방법

까막전복 치패를 수집하여 액체질소에 동결하여 사용전까지 -70°C에 보관하였다. 보관된 치패로부터 폐각을 제외한 전 조직으로부터 hot phenol method (Verwoerd *et al.*, 1989)로 total RNA를 분리하였다. mRNA는 polyATtrack mRNA isolation system (Promega)을 사용하여 total RNA로부터 분리하였다. 분리된 약 5 $\mu$ g poly(A)<sup>+</sup> RNA를 Uni-XR vector (Stratagene)를 사용하여 cDNA library 제작에 이용하였다. In viro mass excision을 수행하여 무작위로 선택된 약 1170개의 clone을 LB-ampicillin broth에 접종하여 37°C에 밤새 배양하였다.

배양액으로부터 AccuPrep™ Plasmid Extraction kit (Bioneer)을 이용하여 plasmid DNA를 분리하였다. 분리된 plasmid DNA는 ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit과 the ABI 3700 automatic DNA sequencer (PE Applied Biosystem)를 이용하여 single pass sequencing을 수행하였다. 데이터베이스내 유사한 염기서열을 검색하기 위해, 염기서열 분석된 서열을 이용하여 low quality 서열을 trimming하였다. 이 서열들을 TIGR assembler를 사용하여 assembly process를 수행하고, assembly된 염기서열은 BLASTX와 BLASTN을 사용하여 non-redundant GenBank/DBJ/EMBL과 dbEST database내 서열과의 유사성을 비교하였다.

## 결과 및 요약

까막전복 치패 cDNA library에서 무작위로 선택된 1170개의 clone을 single pass sequencing을 수행하여, low quality data를 제거한 후 총 1096개의 염기서열을 획득하였다. 이 서열을 assembly program에 의해 assembly process를 수행한 결과, 150개의 contig와 607개의 singleton으로 확인되었다. Assembly된 서열을 BLAST 알고리즘을 이용하여 데이터베이스내 염기서열과의 유사성을 비교하였다. 그 결과, 424개의 sequence가 데이터베이스내 known gene (37%)과 EST sequence (19%)에 대하여 유의한 유사성을 보였다. 나머지 333개의 sequence (44%)는 데이터베이스내 어떤 서열과도 일치하지 않는 것으로 보아, unknown gene 또는 novel gene으로 확인되었다.

유사성이 확인된 424개의 clone을 cellular function에 기초하여 14개의 목록으로 분류하였다.; Enzyme, structure/ cytoskeleton and cell adhesion, ribosomal proteins, transcription and translation factor, signal transduction, carrier and storage protein, cell and organism defense, blood coagulation, development and growth including apoptosis, fertilization, ATP and energy metabolism, unknown function (EST sequences), unclear classification, others.

## 참고문헌

- Mark D. Adams, Jenny M. Kelley, Jeannine D. Gocayne, Mark Dubnick, Mihael H. Polymeropoulos, Hong Xiao, Carl R. Merril, Andrew Wu, Bjorn Olde, Ruben F. Moreno, Anthony R. Kerlavage, W. Richard McCobie, J. Craig Venter., 1991. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science*. 252:1651-1656.
- Sheng Zeng and Zhiyuan Gong. 2002. Expressed sequence tag analysis of expression profiles of zebrafish testis and ovary. *Gene*. 294:45-53.