

Annealing control primer system을 이용한 볼락의 성장단계 특이적 발현 유전자 탐색

장요순, 노충환, (故)홍경표
한국해양연구원 바다목장화연구사업단

서론

어류의 성장관련 기능성 유전자를 발굴하기 위하여 성장단계가 다른 근육조직으로부터 mRNA의 변화를 조사하였다. 본 연구에서는 ACP(annealing control primer)를 사용하여 볼락 6개월령과 18개월령 근육조직에서 성장함에 따라 발현량 차이를 나타내는 65개의 DEG(differentially expressed genes)를 확보하였다. 발현량 차이가 현저한 3개의 DEG(DEG14, DEG38, DEG60)를 성장단계를 달리하여 발현양상을 재확인한 결과, DEG38은 볼락의 성장초기에 많은 양이 발현되고, 성장함에 따라 발현량이 급격하게 감소하였다. DEG38의 염기서열은 *Sparus aurata*의 parvalbumin-like protein을 암호화하는 유전자와 87%의 identity를 갖고 있었으며, 근육조직과 신장조직에서는 발현되는 반면에, 간조직과 비장조직에서는 발현되지 않았다. 볼락의 근육조직에서 발현되는 parvalbumin mRNA의 크기는 659bp 이었고, 염기서열로부터 110개의 아미노산을 암호화 할 것으로 판단하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

경남 통영시 소재의 해상가두리에서 일반적인 관리방법으로 사육된 볼락의 근육조직

2. Total RNA 분리 및 정제

TRIZOL® Reagent(Invitrogen, USA)를 이용하여 분리·정제하였다.

3. GeneFishing™ DEG(differentially expressed gene) discovery

(1) 한가닥 cDNA 합성

Total RNA 3 μ g을 dT-ACP1(5'-CGTGAATGCTGCGACTACGATIIIIIT(18)-3', Seegene, Korea)을 이용하여 한가닥 cDNA로 만들었다.

(2) ACP-based GeneFishing™ PCR

GeneFishing™ DEG Kits(Seegene, Korea)을 사용하여, 94°C에서 40초, 65°C에서 40초, 72°C에서 40초의 조건으로 40회 반응하였다.

(3) DEG(differentially expressed gene)의 염기서열 결정

발현량 차이를 확인한 cDNA 밴드를 재 증폭시켜 염기서열을 분석하였다.

4. Real-time quantitative PCR 분석

한가닥 cDNA 5ng을 target 유전자의 primer를 사용하여 95°C에서 30초, 60°C에서 30분, 72°C에서 30초의 조건으로 40회 반응시켜 정량분석하였다.

5. Rapid Amplification cDNA ends(RACE) 방법으로 cDNA cloning

BD SMART™ RACE cDNA Amplification Kit(Clontech, USA)을 사용하여 cDNA 말단 염기서열을 포함하는 단편을 얻었다.

결과 및 요약

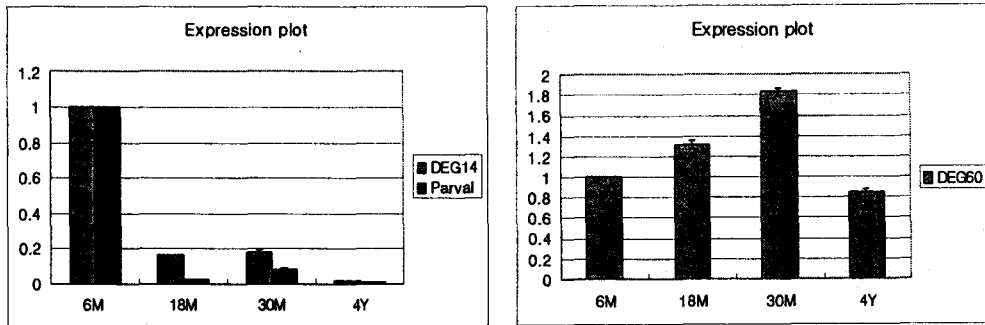


Figure 1. Relative gene expression measured by quantitative RT-PCR

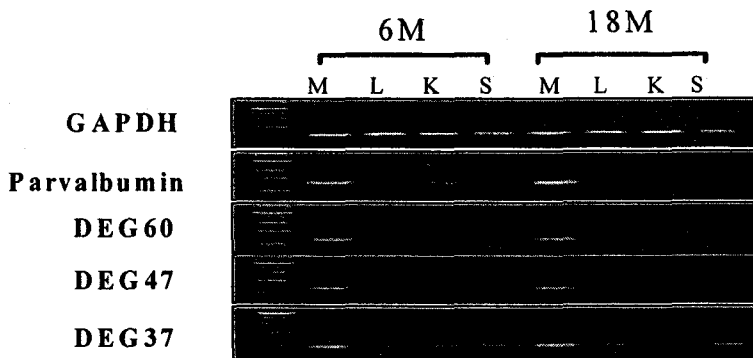


Figure 2. Tissue-specific expression patterns of DEGs in dark-banded rock fish. M, skeletal muscle; L, liver; K, Kidney, S; spleen.

참고문헌

1. Kim, Y. J., C. I. Kwak, Y. Y. Gu, I. T. Hwang and J. Y. Chun. 2004. Annealing control primer system for identification of differentially expressed genes on agarose gels. *Bio Techniques* 36: 424-426, 428, 430.
2. Berchtold, M. W., Epstein, P., Beaudet, A. L., Payne, M. E. Heizmann, C. W. Means, A. R. 1987. Structural organization and chromosomal assignment of the parvalbumin gene. *J Biol Chem* 262: 8696-8701