H-5

카드뮴에 노출된 왼돌이물달팽이(*Physa acuta*)의 EST 연구와 새로운 환경오염 바이오마커 유전자 발굴

Yong Seok Lee[1], In-Seon Byun[3], Sang Haeng Choi[3], Sung-Hwa Chae[3], Han-Ho Choi[3], Yong-Hun Jo[2], Se-Won Kang[2], Weon-Gyu Kho[1], Kye-Heon Jeong[2], Hong Seog Park[3*]

[1]Department of Parasitology, College of Medicine, Inje University, Gaegum-Dong usanjin-Gu, Busan 614-735. [2]Department of Biology, College of Natural Sciences, Soonchunhyang University, Chungnam 336-745. [3]Genome Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, 52 Oun-dong, Yusong-gu, Daejeon 305-333, Korea

서론

왼돌이물달팽이(*Physa acuta*)는 논이나 논의 수로, 강가, 호수주변 또는 유원지의 오염된 하천이나 강, 작은 도시의 하수구나 수로 등에 서식하는 종으로 심하게 오염된 곳에도 서식하는 수질오염 지표종으로 잘 알려져 있다. 본 실험에서는 왼돌이물달팽이의 EST(Expressed Sequence Tags) library를 만들고 무작위 염기서열분석을 실시하여 유효한 서열 1192개를 확보하였다 (Accession numbers BW985220-BW986415). 이 서열들을 clustering 및 assembly 하여 얻은 contig 중 대부분은 동정 되었으나 일부 서열들은 동정이 되질 않았다. 이 서열 중 중금속(카드뮴) 노출에 대한 마커를 찾기 위해 노출 실험을 실시하였다. 실험결과 카드뮴에 대한 매우 유용한 바이오마커로 생각되는 novel gene 을 찾아내었다. Novel gene의 유전자 길이는 303bp 였으며 발현되는 단백질은 100개의 아미노산으로 구성되어 있었다.

재료 및 방법

*P. acuta*의 total mRNA를 추출한 후 5' oligo capping를 통해 제작한 cDNA library에서 1996개의 클론을 무작위 서열분석하여 얻은 trace file을 phred 프로그램을 통해 Phred 20 조건에서 base calling 한 후 fasta file을 만들었다. 그 후 TIGR(The Institute for Genomic Research)에서 제공받은 TGICL(TIGR Gene Indices Clustering Tools) 프로그램을 통해 clustring 및 assembling 한 후 연체동물 전용 BLAST 서버 (http://blast.inje.ac.kr/mollusks)를 이용하여 서열분석한 후 COG(clusters of orthologous groups) 및 문헌에 근거하여 25개의 바이오마커 후보유전자를

선정 한 후 각각의 서열에 대해 primer를 제작하였다.

바이오마커 후보 유전자들의 유의성을 검증하기 위하여 우선 카드뮴(Cd) 노출실험을 실시 하였다. 노출 조건은 50ppb에서 시간별(4hrs, 8hrs, 12hrs, 24hrs) 및 8시간에서 농도별(5ppb, 50ppb, 500ppb, 5000ppb) 으로 실시하였다. 노출실험이 끝난 각 검체에서 추출한 total mRNA를 이용하여 합성한 cDNA와 후보유전자의 primer를 이용한 RT-PCR 실험을 통해 유전자의 발현 양상을 조사하였다.

결과 및 고찰

Novel gene으로 판단되는 본 유전자는 EST library 중 염기서열이 해독되어진 1192개의 random sequence 중 5개로 유전자 cluster 중 32번째로 빈도가 높았다. 같은 cluster로 묶인 5개의 유전자는 염기서열상 조금 다른 부분이 있어 2 type 로 분류되었으나 아미노산으로 translation 된 경우 모두 같은 아미노산을 코딩하고 있었다. Novel gene의 길이는 Emboss package의 sixpack 프로그램 및 Genscan 프로그램으로 예측한 결과 염기서열이 303bp 였으며 발현되는 단백질은 100개의 아미노산으로 구성되어 있음을 알 수 있었다.

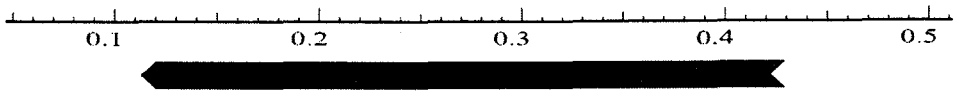

그림 1 Genscan prediction results of novel gene from *Physa acuta*

카드뮴노출 실험결과 시간에 따라 4시간 노출 시 가장 발현이 많이 되었으며, 8시간 이후로는 오히려 발현량이 떨어지는 결과를 볼 수 있었다. 노출 농도에 따른 변화는 5ppb 때 증가하다 50ppb 에선 오히려 감소하는 경향을 보였으며 500 ppb 이상에선 발현이 매우 활발해 졌다.

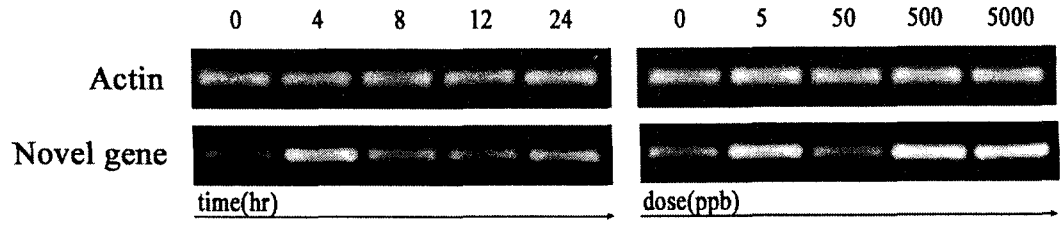

그림 2 RT-PCR results for Novel Gene from *Physa acuta*

참고문헌

Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Meyers, and D. J. Lipman. 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.

Davey, G. C., N. C. Caplice, S. A. Martin, and R. Powell. 2001. A survey of genes in the Atlantic salmon (*Salmo salar*) as identified by expressed sequence tags. *Gene* 263: 121-130.

Lee, Y. S., Y. H. Jo, D. S. Kim, D. W. Kim, M. Y. Kim, S. H. Choi, J. O. Yon, I. S. Byun, B. R. Kang, K. H. Jeong, and H. S. Park. 2004. Construction of BLAST Server for Mollusks. *Korean Journal of Malacology* 20: 165-169.

Jenny MJ, Ringwood AH, Lacy ER, Lewitus AJ, Kempton JW, Gross PS, Warr GW, Chapman RW (2002) Potential indicators of stress response identified by expressed sequence tag analysis of hemocytes and embryos from the american oyster, *Crassostrea virginica. Marine Biotechnology* 4:81-93

Huang X, Madan A (1999) Cap3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res*9:868-77