

잉어펩티드글리칸식별단백질 2(PGRP 2) 유전자의 배열해석

김동률, 김유신, 강기찬

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 지적하시였다.

《자연과학부문 교원, 연구사들은 수학, 물리학, 생물학을 비롯한 기초과학에 대한 연구를 심화시키고 사회주의경제건설과 인민생활향상에서 나서는 과학기술적문제들을 풀기 위한 연구사업을 적극 벌리며 여러 분야의 첨단과학기술을 연구도입하는데 힘을 넣어야 합니다.》(《김정일선집》 제18권 증보판 457페이지)

펩티드글리칸식별단백질(Peptidoglycan recognition protein: PGRP 혹은 PGLYRP)들은 세균의 펩티드글리칸(PGN)을 인식하는 선천적인 면역분자들의 집단으로서 그 종류는 다양하다.[1] 포유동물에서 네 종류의 PGRP(PGRP 1, PGRP 2, PGRP 3, PGRP 4)가 밝혀졌고[2] 물고기에서도 두가지 형(L형과 S형)에서 PGRP 1, PGRP 2, PGRP 3, PGRP 4, PGRP 5, PGRP 6 등이 연구되었다.[3]

세계적으로 초어와 줄말고기 등에서 PGRP에 대한 연구가 일정하게 진행되었지만 잉어에서는 아직 이 연구가 거의 진행되지 못하였다.

우리는 잉어에서 PGRP 2유전자를 얻어내고 그 배열을 밝히기 위한 연구를 하였다.

재료와 방법

시약으로는 SMART cDNA합성키트, 역전사효소키트, 제한효소(*Bam*H I, *Hind* III), Taq DNA폴리메라제(5U/L), pMD18운반체를 썼다.

균주로는 *Escherichia coli* DH5 α 를 썼다.

실험에 리용된 프라이머들은 표와 같다.

표. 잉어PGRP 2의 게놈해석을 위한 프라이머들

프라이머명	염기배열	구분
PGRP2F	GAGCAGATCATCTGAGGAACAT	보수배열을 증폭하기 위한 프라이머
PGRP2R	GGTATGGTGTTGCTTTCATTGG	보수배열을 증폭하기 위한 프라이머
5PG2out	CTGTCCCTCGTTAGCCCGTAGCCCA	5' RACE 첫 회전프라이머
5PG2in	AGAAGATTTAAACCCAGGACTA	5' RACE 둘째 회전프라이머
3PG2out	TCAACCCCTCTGTCTCCACCCCTGC	3' RACE 첫 회전프라이머
3PG2in	GCTACATCTACGAAGGACGAGGTTG	3' RACE 둘째 회전프라이머
UPM Long	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGT GGTATCAACGCAGAGT	RACE-P의 공통프라이머
UPM Short	CTAATACGACTCACTATAGGGC	RACE-PCR의 공통프라이머

프라이머명	염기배열	구분
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	RACE-PCR의 공통프라이머
SMART II™	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG	RACE-PCR의 공통프라이머
3'-CDS	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC (T) 30VN	RACE-PCR의 공통프라이머
cPG2F	ACACCGTATTCAAATCAAGC	계놈증폭을 위한 프라이머
cPG2R	GTGTTCCCAGGTTGTTATCT	계놈증폭을 위한 프라이머

분석에 리용된 프로그램과 자료기지들은 다음과 같다.

Vector NTI, Primer Premier 5.0, MEGA 4.0, Clustal-X 등의 프로그램들과 유전자는 행(NCBI, National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 등의 자료기지들을 리용하였다.

RNA분리 무균조건에서 신선한 조직 100mg을 취하여 1mL의 트리졸이 들어있는 에펜도프관에 넣고 회전연마기로 죽탕을 친다. 방온도에서 10min동안 방치하고 원심분리(12 000×g, 10min, 4℃)한 다음 상청액을 취하여 새 에펜도프관에 옮긴다. 여기에 200 μ L의 클로로포름을 첨가하고 15s동안 강하게 흔들어준다. 방온도에서 3min동안 방치한 다음 원심분리(12 000×g, 15min, 4℃)하여 상청을 취한다. 상청액에 이소프로필알콜 600 μ L를 첨가하고 방온도에서 10min동안 방치한 다음 다시 원심분리(10 000×g, 10min, 4℃)하였다. 상청액을 버리고 75% 무수알콜로 두번 세척한 다음 침전물을 DEPC수(diethyl pyrocarbonate H₂O)로 용해하고 분광광도계로 농도를 측정하였다.

cDNA합성 올리고dT 1 μ L, DEPC수 5 μ L와 RNA 6 μ L를 PCR관에 넣고 72℃에서 3min, 얼음우에서 2min동안 방치하였다. 여기에 완충액 4 μ L, 리보뉴클레아제(40U/ μ L) 1 μ L, dNTP(10mmol/L) 1 μ L, 역전사효소(200U/ μ L) 1 μ L를 첨가하고 42℃에서 1.5h, 72℃에서 15min동안 방치하였다. cDNA의 순도는 정량형광PCR(RT-PCR, Real Time PCR)에서 검사하였다.

결과 및 고찰

1) 잉어PGRP 2유전자의 보수배열

먼저 유전자는 행(NCBI)에 등록된 초어PGRP 2유전자 전체 cDNA염기배열자료를 리용하여 잉어PGRP 2유전자의 cDNA보수배열부분을 증폭하기 위한 프라이머 PGRP2F와 PGRP2R를 설계하고 합성하였다.

잉어의 cDNA를 주형으로 하여 PCR로 보수배열을 증폭하고 전기영동한 결과는 그림 1과 같다.

PGRP 2의 보수배열을 PCR증폭한 결과 크기가 1 000~1 200bp인 토막이 얻어졌다. 이것을 회수하여 배열분석한 결과는 그림 2와 같다.

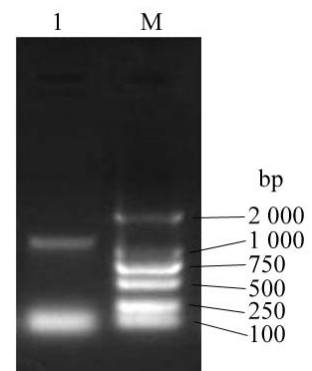


그림 1. PCR로 증폭한 PGRP 2유전자보수배열의 전기영동상
1- 잉어PGRP 2유전자의 보수배열, M은 분자량표식자

TCTGAGGAACATGGAGCACTTTACAACCTGCTGTTTCACACTTAGAAGATTTAAACCCAGGACTAAGTC
 CACTGGCTTTAGTGACGAATCTACGCAAAATTGCAGACCAAAGTGACAATCTCACACATGACCTTATG
 GGATCATCTGACAATCGAGGTGATGTTCACTATGAAAACAACAGCTTTATCACAGAGCAGATGAATAT
 AAACCACAATCTCTCCAATTTCTGACGGAAGTCACTCATCATTTTCATAACAAATGATCATGATGAGA
 GAGGAGTTGTTCTGACTCCTGATGGCACGACGGTTGCCCTTGCTCCTCTCCTTTTAGGTATTGAATAT
 GGGCTACGGGCTAACGAGGACAGTAACCAGCCTCATGGTTTCTACCTACTCCCACTGGCCAAGTACTT
 AGGCATGTCATTTCTGCAGTTTGGGAATGCAACTCCACCTGAGCGGCTTGGCCCCGGATGGTTGTTGGG
 ATAATGTATCTGCTCCCATGGTTTTTACTCTTTTCAAGGCATGCCAACCTTGGCCACTGATGCTCTGGTC
 CATGGTGAATGGATGGAGCCATACTTGGGAAGCATCTTTCTGTTGTTAACTGCTCTGAAGTAAATTT
 GAGCACACTACTGAGGAGCTACTACTTAGATACTATGGAAGAGTTGGATCATGACTTGAATACTCATC
 TGAGAGGACGCTATCGCAGACCGAATTTTAAAAAGATCACAAATTTATCACTGCTTAAAGAGAAAAGTA
 GCAAATGCACTACATAGTCATCAACAAAAAGGAGACCTTGGGGTTGAGAGTCTTATAGAAAAAGGAAT
 GAAAGACTTTATGCTACGTTATATGGAGTGTCTTGCCATCATTTCCAAGATGTATGTGGGGAGCAGCAC
 CACCCGTGGTTTCTCTCAACCCTCTGTCTCCACCCCTGCCATTTCTGTATATTACCACACAGCGAGT
 CCCAGCAAACCTGTGCGAAACCTTCAGATGTGTTCCAAAAATATGAAGGCAATGCAACATTTCCACCA
 GAAGGGGCGGGGCTGGTACGACATCGGTTACAGCTTTGTTGTTTGGTCTGATGGCTACATCTACGAAG
 GACGAGGTTGGATGTCAACAGGGGCTCATACTAAAGGACACAATAGTGTGGGTATGGTGTAGCTTTC
 ATTGG

그림 2. PCR로 증폭한 PGRP 2유전자보수배열(염기수 1 161bp)

2) 잉어PGRP 2유전자의 cDNA 전 배렬과 계놈구조

보수배열에 기초하여 5'—배열과 3'—배열을 얻기 위한 첫 회전과 둘째 회전프라이머 (5PG2out, 5PG2in, 3PG2out, 3PG2in)를 설계하고 RACE PCR를 진행하여 PGRP유전자의 5'—배열과 3'—배열을 얻어냈다.

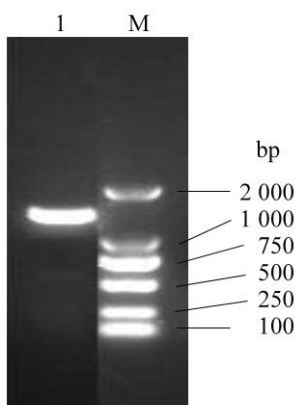


그림 3. PGRP 2유전자의 cDNA의 PCR전기

영동상

1—잉어PGRP 2유전자의 cDNA 전 배렬,
 M은 분자량표식자

Vecer NTI, Primer Premier 5.0, MEGA 4.0, Clustal-X 등의 프로그램들을 리용하여 cDNA 전 배렬을 얻었다.

이 cDNA 전 배렬을 확인하기 위하여 다시 PGRP 2의 전체 배렬을 증폭하기 위한 프라이머(cPG2F, cPG2R)를 설계하고 합성하였다. 잉어의 cDNA를 주형으로 하여 PCR로 PGRP 2의 cDNA 전 배렬을 증폭하고 전기영동한 결과는 그림 3과 같다.

염기배렬분석결과 잉어PGRP 2유전자의 cDNA 전 배렬의 길이는 1 844bp이고 열린읽기틀(ORF)의 길이는 1 446bp였다.(그림 4)

다음 PGRP 2의 전체 배렬을 증폭하기 위한 프라이머(cPG2F, cPG2R)와 잉어계놈을 주형으로 하여 PCR로 PGRP 2의 계놈을 증폭하였다. 염기배렬을 분석한 다음 cDNA 전 배렬과 비교하여 인트론, 엑손구조를 밝혔다.(그림 5)

분석결과 잉어펩티드글리칸식별단백질 2(PGRP 2)유전자의 계놈 전 배렬은 3 221bp이며 5개의 엑손과 4개의 인트론으로 구성되어 있다.

actcttacaccgtattcaaatacaagcacttagtactgagtcgtagcatttagtactgata	60
at gacaccaggagcattgtggattattaccatgtctgggatatgtgtagtcattcagagc	120
M T P G A L W I I T M S G I C V V I Q S	
tcagttacagcagttcatctgaggaacatggagcactttacaactgctgtttcacactta	180
S V T A V H L R N M E H F T T A V S H L	
gaagatttaaaccaggactaagtccactggcttttagtgacgaatctacgcaaattgca	240
E D L N P G L S P L A L V T N L R K I A	
Gaccaaagtgacaatctcacacatgaccttatgggatcatctgacaatcgaggtgatgtt	300
D Q S D N L T H D L M G S S D N R G D V	
cactatgaaaacaacagctttatcacagagcagatgaatataaaccacactctctccaat	360
H Y E N N S F I T E Q M N I N H N L S N	
ttcctggacgaagtcactcatctttcatacaaatgatcatgatgagagaggagttgtt	420
F L D E V T H H F I T N D H D E R G V V	
ctgactcctgatggcagcagcgttgcccttgctcctctccttttaggtattgaataggg	480
L T P D G T T V A L A P L L L G I E Y G	
ctacgggtaacagcatgaataaccagcctcatgggtttctacctactcccactggccaag	540
L R A N E D S N Q P H G F Y L L P L A K	
tacttaggcagtgctatttctgcagtttgggaatgcaactccacctgagcggcttgcccg	600
Y L G M S F L Q F G N A T P P E R L G P	
gatgggtgttgggataatgtatctgctcccattgggttttactctttcaggcatgccaac	660
D G C W D N V S A P M V F T L S G M P T	
ttggccactgatgctctgtggtccatgggtggaatggatggagccatacttgggaagcatt	720
L A T D A L V H G G M D G A I L G K H L	
tctgttggttaactgctctgaagtaaatttgagcacactactgaggagctactacttagat	780
S V V N C S E V N L S T L L R S Y Y L D	
actatggaagagttggatcatgacttgaatactcatctgagaggacgctatcgagaccg	840
T M E E L D H D L N T H L R G R Y R R P	
Aattttaaaagatcacaaatttatcactgcttaaaagagaagtagcaaatgcactacat	900
N F K K I T N L S L L K E K V A N A L H	
agtcatcaacaaaaaggagaccttgggggtgagagtccttatagaaaaaggaatgaaagac	960
S H Q Q K G D L G V E S L I E K G M K D	
tttatgctacgttatatggagtgctcctgccatcattccaagatgtatgtggggagcagca	1 020
F M L R Y M E C P A I I P R C M W G A A	
ccaccggtgttctctcaaccctctgtctccaccctgccatttctgtatattcaccac	1 080
P P V V P L N P L S P P L P F L Y I H H	
acagcgagtcaccagcaaacctgtcgaaaccttcagatgtgttccaaaaatatgaaggca	1 140
T A S P S K P C R N L Q M C S K N M K A	
atgcaacatttccaccagaaggggcggtgtgtacgacatcggttacagctttgtgtgtt	1 200
M Q H F H Q K G R G W Y D I G Y S F V V	
tggtctgatggctactacgaaggacgaggttgatgtcaacaggggtcctatactaaa	1 260
W S D G Y I Y E G R G W M S T G G A H T K	
ggacacaatagtgttgggtatgggtgtagctttcattgactacactgctcatttaccgcc	1 320
G H N S V G Y G V A F I D Y T A H L P A	
caatatgccatggacctagtgcaccatcatctgggtcaaatgaggagtgagcaaaggattt	1 380
Q Y A M D L V H H H L V K C G V S K G F	
ctgcaggagaatttgaccatttctgggtcatagacaagtggtagcaggcacagaattgtcca	1 440
L Q E N L T I L G H R Q V V A G T E C P	
ggggagtcactgtattctgagataacaacctgggaacactacaaagaaacggatcctttt	1 500
G E S L Y S E I T T W E H Y K E T D P F	
Aagta aacacgaggacatctactgtcactgacatgacatgacttaaggtgcatgactgct	1 560
K -	
ttagaagccacaacaatgaaacccactaaatagtatgaaaagtatttttaatttttaata	1 620
tacatttagtttttaaatataatttagaagtttaaagattggcattttaattgtgaggttat	1 680
tagcataaaacaggccattagcattactctgtacattgggttggaagtctgtatgaaacct	1 740
tgaagtgttactgtactgtatgtaagtgaataatgttttgcaaaaaataaacaagatgat	1 800
ttttaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa	

그림 4. 잉어PGRP 2의 cDNA 전 배열과 아미노산배열

강조체로 표시한것은 시작코돈과 종결코돈임

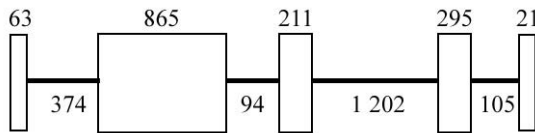


그림 5. 잉어PGRP 2의 계놈구조

맺는 말

잉어펩티드글리칸식별단백질 2(PGRP 2) 유전자의 cDNA 전 배렬길이는 1 844bp, 열린읽기틀(ORF)의 염기수는 1 446bp이며 482

개의 아미노산으로 암호화되어있다.

잉어펩티드글리칸식별단백질 2(PGRP 2) 유전자의 계놈 전 배렬은 3 221bp이고 5개의 엑손과 4개의 인트론으로 구성되어있다.

참고 문헌

- [1] Duo Jiao Ni et al.; Developmental and Comparative Immunology, 31, 548, 2007.
- [2] Naoki Itoh et al.; Molecular Immunology, 46, 1768, 2009.
- [3] Xiumei Wei et al.; Fish & Shellfish Immunology, 32, 178, 2012.

주체103(2014)년 4월 5일 원고접수

Sequencing on Peptidoglycan Recognition Protein 2(PGRP 2) Gene of Common Carp *Cyprinus carpio*

Kim Tong Ryul, Kim Yu Sin and Kang Ki Chan

The full-length of cDNA of ccPGRP 2 gene was 1 844bp, containing an open reading frame (ORF) of 1 446bp, encodes 462 amino acids.

The ccPGRP 2 gene consists of five exons and four introns, spacing approximately 3.2kb of genomic sequence.

Key words: PGRP, *Cyprinus carpio*, sequencing