

## DNSH기술을 리용한 고세균(*Sulfolobus solfataricus* P2)에서 발현차이유전자선발

리동철, 강기찬

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 지적하시였다.

《정보기술, 나노기술, 생물공학은 현시대 과학기술발전의 핵심기초기술입니다.》

(《김정일선집》 제22권 증보판 20~21페이지)

생물체의 조직이나 세포는 발육시기에 따라 서로 다른 스트레스조건하에서 일부 유전자를 선택적으로 발현시킬수 있는데 이와 같이 발현량이나 발현시기가 다른 유전자를 발현차이유전자라고 한다.

발현차이유전자를 클론화하여 선발하면 생물개체의 발육과 분화, 암화 등 과정의 물림새를 연구할수 있다.

현재 발현차이유전자를 선발하는 방법[1, 3, 4]에는 여러가지가 있지만 매 방법에는 일련의 결함이 있다. 이러한 결함들을 극복하기 위하여 새로 나온 기술이 DNSH(Duplex-specific nuclease-mediated normalization and subtractive hybridization, 두오리사슬특이적누클레아제에 의한 cDNA균일화감소잡종화)기술이다.

우리는 DNSH기술을 응용하는 과정에 복잡한 몇 단계의 공정을 피하고 더욱 간단하게 할 목적으로 이 기술을 개작하여 발현차이유전자들을 효과적으로 선발하기 위한 방법을 확립하였다.

### 재료와 방법

연구재료로는 대장균(*E. coli* DH5 $\alpha$ , Amp<sup>r</sup>)과 고세균(*Sulfolobus solfataricus* P2)을 리용하였다.

시약으로는 Taq DNA폴리메라제, dNTPs, DNA표식자(1kb Marker), Trizol, 역전사키트(《Superscrip TM/First-strand cDNA Synthesis kit》), PCR산물정제시약키트(《Sangon》), PCR런결시약키트(《Sangon》), X-Gal, IPTG(이소프로필티오갈락토시드), 제한효소 *Sal* I, 리가제, 아가로즈(《Qiagen》) 등을 리용하였다.

실험기구로는 PCR장치(《Eppendorf》), 극동기, 분석천평(《Eppendorf》), pH미터(《Eppendorf》), 항온수욕조, 핵산전기영동기, 고압멸균기, 무균조작대(《Eppendorf》) 등을 리용하였다.

고세균(*Sulfolobus solfataricus* P2)의 배양은 75℃(최적온도, 대조구)와 80℃(시험구)의 항온수욕조에서 진행하였다.

실험은 선행연구의 방법[2, 3]에 기초하여 진행하였다.

## 결과 및 고찰

실험에서 리용된 프라이머(표)와 DNSH방법의 원리도는 그림 1과 같다.

표. 프라이머배열

올리고	배열(5'—3')
Ts Oligo-p	GTAATACGACTCACTATAGGGGG-p
T7 Oligo dT	GTAATACGACTCACTATAGGGGG (T) 15VN
SOI	CTGCAGCGAACCAATCCTCTGTAATACGACTCACTATAGGG
PI	CTGCAGCGAACCAATCCTCTG
SalT7P	GATCGTCGACGTAATACGACTCACTATAGGG
M13F	GTAAACGACGGCCAG
M13R	CAGGAAACAGCTATGAC

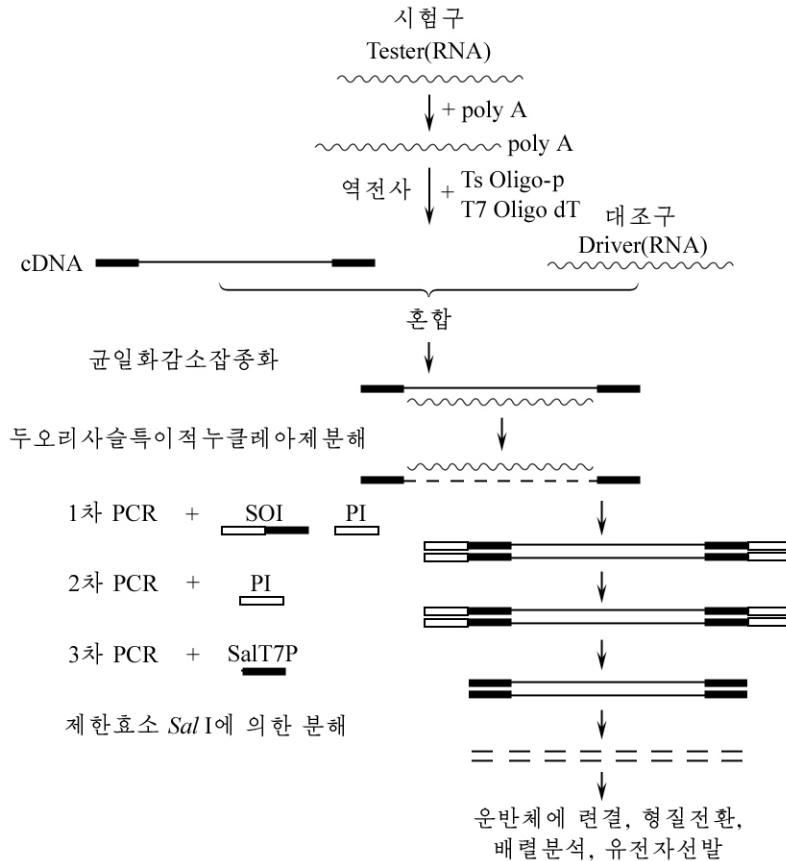


그림 1. 새로운 DNSH방법

새로운 방법은 크게 한오리사슬cDNA(Tester)의 합성과 균일화감소잡종화, 두오리사슬 특이적누클레아제에 의한 분해, PCR기술을 리용한 발현차이유전자의 증폭, 효소절단반응, 리가제연결반응, 대장균형질전환 등의 과정으로 이루어졌다. 매 단계에 따르는 결과는 다음과 같다.

1차 PCR 특이적프라이머 SOI와 PI로 1차 PCR증폭산물을 얻어 아가로스겔전기영동한 결과는 그림 2와 같다.

그림 2에서 보는바와 같이 1차 PCR결과 증폭된 토막들은 명확한 띠로 나타나지 않았다. 이것은 PCR증폭산물이 크기가 서로 다른 발현차이유전자들로 이루어진 cDNA이며 일부 비특이적유전자산물도 포함되어있는것과 관련된다.

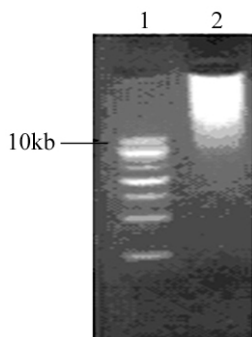


그림 2. 1차 PCR증폭산물의 아가로스겔전기영동상

1-DNA표식자(1kb),  
2-1차 PCR증폭산물

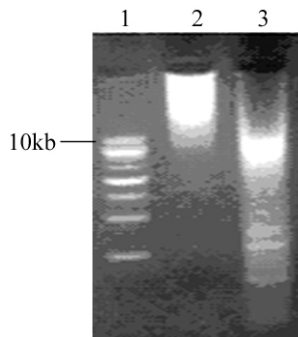


그림 3. 2차 PCR증폭산물의 아가로스겔전기영동상

1-DNA표식자(1kb), 2-1차  
PCR증폭산물, 3-2차  
PCR증폭산물

는 더 높아질수 있다.

발현차이유전자선발을 위한 PCR PCR증폭산물을 제한효소 *Sal* I로 절단하여 대장균에 형질전환시킨 다음 개별적균무지들을 선발하고 PCR증폭하여 아가로스겔전기영동한 결과는 그림 4와 같다.

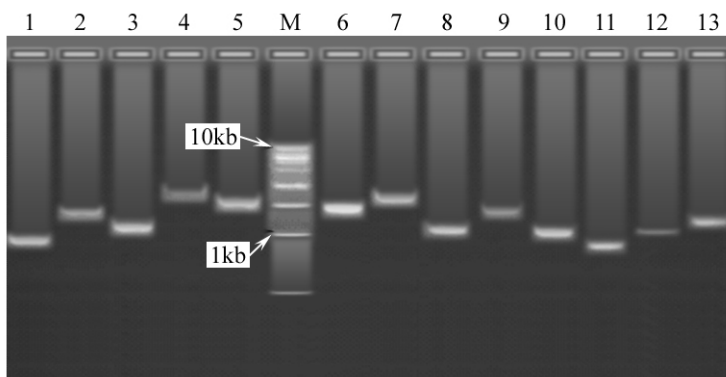


그림 4. 개별적균무지들을 PCR증폭한 아가로스겔전기영동상

M은 DNA표식자(1kb), 1-13은 개별적균무지들의 PCR증폭산물

그림 4에서 보는바와 같이 크기가 서로 다른 DNA토막들이 나타났다. 크기가 같은 DNA토막들을 제외하고 크기가 다른 DNA토막들에 해당하는 개별적균무지들을 37°C에서 암피실린을 포함한 LB액체배지에 접종하고 OD<sub>600</sub>=0.6~0.8되도록 배양한 다음 전문분석기관에 의뢰하여 염기배열을 결정하였다. 국제생물기술정보중심(National Center of Biotechnology Information)자료기지(망주소: <http://www.ncbi.com/>)에서 Nucleotide-nucleotide

BLAST(blastn)를 리용하여 해당한 유전자의 명칭을 확정한 결과는 다음과 같다.

1은 열충격단백질 HSP20(heat shock protein HSP20), 2는 리보솜 RNA(16s ribosomal RNA), 3은 열충격단백질 HtpX(heat shock protein HtpX), 4는 보수적인 단백질(conserved protein), 5는 합성구조 DNA(synthetic construct DNA), 13은 열충격단백질 HtpX-1(heat shock protein HtpX-1)이다.

## 맺 는 말

고세균(*Sulfolobus solfataricus* P2)을 서로 다른 온도스트레스조건에서 배양하여 발현차이유전자들을 선발하면 한번에 수백개의 발현차이유전자를 가진 cDNA서고를 만들수 있으며 유전자사이의 발현량차이도 대단히 큰 DNSH기술을 확립하였다.

## 참 고 문 헌

- [1] N. A. Lisitsyn et al.; Science, 259, 946, 1993.
- [2] L. Diatchenko et al.; Proc. Natl. Acad. Sci., 96, 6025, 1996.
- [3] Z. M. Dai et al.; J. Biotechnol., 128, 435, 2007.
- [4] K. A. Lukyanob et al.; Anal. Biochem., 229, 198, 1995.

주체103(2013)년 6월 5일 원고접수

## **The Screening of the Differentially Expressed Genes of the Archaea, *Sulfolobus solfataricus* P2 by using DNSH Technology**

*Ri Tong Chol, Kang Ki Chan*

The screening of the differentially expressed genes of the archaea, *Sulfolobus solfataricus* P2 incubated at the different temperature stress condition, by the DNSH(Duplex-specific nuclease-mediated Normalization and Subtractive Hybridization) showed the effectiveness of the method, which can give cDNA library of hundreds of differentially expressed genes at once, their mRNA levels being quite different.

Key words: DNSH, archaea