

초어에서 출혈성비루스감염시 *cd36*유전자의 발현특성

장성훈

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《양어과학과 기술에 대한 연구사업을 강화하고 선진적인 물고기기르기기술을 적극 받아들여 우리 나라의 양어사업을 최신과학기술에 기초하여 발전시켜나가도록 하여야 합니다.》
(《김정일선집》 증보판 제20권 178~179페이지)

CD36(cluster of differentiation 36)단백질은 흰생쥐와 같은 포유류에서 혈소판점착이나 기름질대사, 염증, 아포토시스와 같은 많은 과정들에 참가하는 단백질이지만 비루스침입과 관련된 과정에서 노는 역할은 아직까지 명백히 해명되지 않았다.

우리는 초어를 대상으로 출혈성비루스감염시 *cd36*유전자의 발현에 대한 연구를 하였다.

재료와 방법

실험에 리용한 초어새끼고기는 1년생이고 몸질량은 27.1~31.8g이며 몸길이는 11.3~11.8cm였다. 초어출혈성비루스(Grass Carp Reovirus: GCRV)는 이 병에 걸린 초어개체에서 분리하여 리용하였다.

초어출혈성비루스(GCRV)에 의한 초어의 감염 비루스로 감염시키기 전에 온도를 28℃로 보정한 실내순환체계에서 물고기들을 1주일정도 관리하였다.

초어출혈성비루스에 감염시키기 위하여 28℃에서 물고기몸질량 1g당 50μL의 PBS용액(대조구)과 PBS에 현탁시킨 50μL의 초어출혈성비루스(5×10^8 PFU/mL)를 주사하였다.

초어출혈성비루스병에 걸린 초어의 아가미와 뱃, 간과 비장 등을 취하여 선행방법[1]에 준하여 트리졸법으로 총RNA를 분리한 다음 역전사시켜 조직별발현을 분석하기 위한 출발재료로 리용하였다. 주사하지 않은 개체들은 빈시험구로 리용하였으며 매 분석조작들에서 3마리씩 취하여 시료로 리용하였다.

mRNA의 발현분석 각이한 조직들과 감염상태에서 반정량분석은 선행방법[2]으로 진행하였으며 ABI실시간정량분석기(《Applied Biosystems》)를 리용하여 실시간정량역전사PCR(qRT-PCR)를 진행하였다. 이를 위하여 실시간정량역전사PCR의 반응액에 1μL cDNA, 8μL 증류수, 10μL SYBR형광색소(《Toyobo》), 0.5μL 프라이머(5μmol/L)를 첨가하였다.

PCR조작조건은 다음과 같다.

예비변성 95℃에서 2min→변성 95℃에서 25s, 아닐링 60℃에서 30s,

연장 72℃에서 1min, 순환회수 40회→최종연장 72℃에서 10min

발현분석에 리용한 프라이머 프라이머는 프라이머설계프로그램인 Primer premier 5.0으로 설계하였다.(표)

표. 유전자들의 발현분석에 리용한 프라이머

프라이머이름	배열(5'→3')	크기/bp	중복배열/bp	$T_m/^\circ\text{C}$
cd36_QF(정방향)	CAACTTGGCTGTAGCAGGTATC	22	98	60
cd36_QR(역방향)	CAGTCCTGTTCTGGAAGAGTGT	22		
Qb-actinF(정방향)	GATGATGAAATTGCCGCACTG	21	120	62
Qb-actinR(역방향)	ACCAACCATGACACCCTGATGT	22		

결과 및 논의

1) 반정량RT-PCR(sqRT-PCR)를 리용한 *cd36*유전자의 조직별발현

초어출혈성비루스로 초어를 감염시키고 반정량RT-PCR를 리용하여 여러 조직들에서 감염일수에 따르는 *cd36*유전자의 발현변화를 관찰하였다. 물고기에서 병원체감염과 관련이 있는 아가미와 빨, 간과 비장에서 6일간 일별로 조직시료를 취하여 반정량RT-PCR를 진행한 실험결과는 그림 1과 같다.

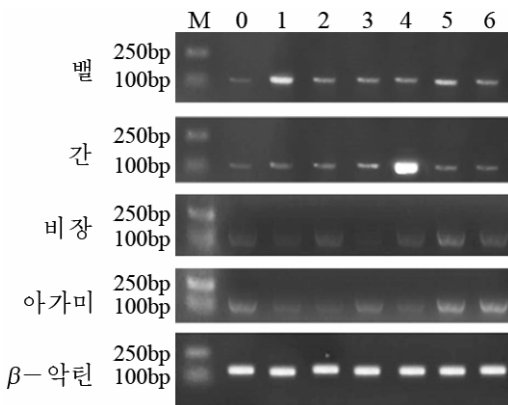


그림 1. 초어출혈성비루스에 감염된 초어의 여러 조직들에서 감염일수에 따르는 *cd36* mRNA의 발현변화
M은 분자크기표식자(DL 2000),
0-6은 감염일수(d)임.

그림 1에서 보면 감염된 초어의 빨에서 *cd36* mRNA의 발현은 감염 1일에 최대가 되고는 그 이후에 일정한 양으로 유지되었다. 간장에서 *cd36* mRNA의 발현은 감염후 높아지다가 4일만에 최대가 되고 그후 감소하였으며 비장과 아가미에서는 눈에 띄우는 명확한 변화들이 관찰되지 않았다.

2) 실시간정량RT-PCR를 리용한 *cd36*유전자의 조직별발현

초어출혈성비루스에 감염된 초어의 빨과 간장, 비장, 아가미에서 실시간정량RT-PCR분석을 진행한 결과(그림 2)는 기본상 그림 1과 유사하였다.

간장에서는 감염후 1일에는 발현변화가 없다가 감염후 2일에는 4배이상으로 상대발현량이 높아졌으며 감염후 4일만에 최대(57.8배)로 되었다가 다시 발현량이 떨어지는 경향성이 나타났다.(그림 2의 ㄱ))

포유류에서 CD36은 HDL과 LDL을 효과적으로 인식하고 세포내포화작용을 일으키며 특히 간장모세혈관들에서 혈액속의 콜레스테롤함량을 조절하는 작용을 한다.

간장에서 감염후 4일만에 *cd36* mRNA의 발현량이 급격히 높아지지만 이것은 비루스 침입과정에 나타나는 직접적인 작용이 아니라 감염후기에 2차 혹은 3차적인 반응으로 나타나는 현상이라고 본다.

빨에서는 감염후 1일만에 최대(약 7배)로 되었다가 2일째부터는 발현량이 감염후 1일의 절반으로 줄어들었는데 그 이후로 유의한 수준의 변화가 나타나지 않았다.(그림 2의 ㄴ))

초어출혈성비루스가 자연적으로 감염되는 경로는 중간빨과 아가미, 피부인데 주로 중간빨을 통하여 유기체에 침입한다.[2] 빨에서 감염후 1일만에 *cd36* mRNA발현량이 급격히 높아지는것은 초어출혈성비루스가 중간빨을 통하여 침입할 때 CD36이 비루스침입과정에서 일정한 작용을 할수 있다는것을 보여준다.

비장에서는 상대발현량이 낮아졌다 높아졌다 하면서 유의성있는 뚜렷한 변화가 관찰되지 않았지만 감염 5일만에 약간 높아지는 경향성이 나타났다. 이것은 *cd36*유전자가 비장과 같은 면역기관에서는 잘 발현되지 않는다는것을 보여준다.(그림 2의 ㄷ))

아가미에서는 *cd36* mRNA의 발현량이 감염 1~4일까지는 대조보다 낮았으며 감염 5일부터 정상으로 회복되는 경향성이 나타났다.(그림 2의 ㄹ))

아가미조직에서 *cd36* mRNA의 발현량이 낮아진다는것은 아가미가 비루스침입경로나 기름질수송에 관계되는 직접적인 조직이 아니라는것을 보여준다.

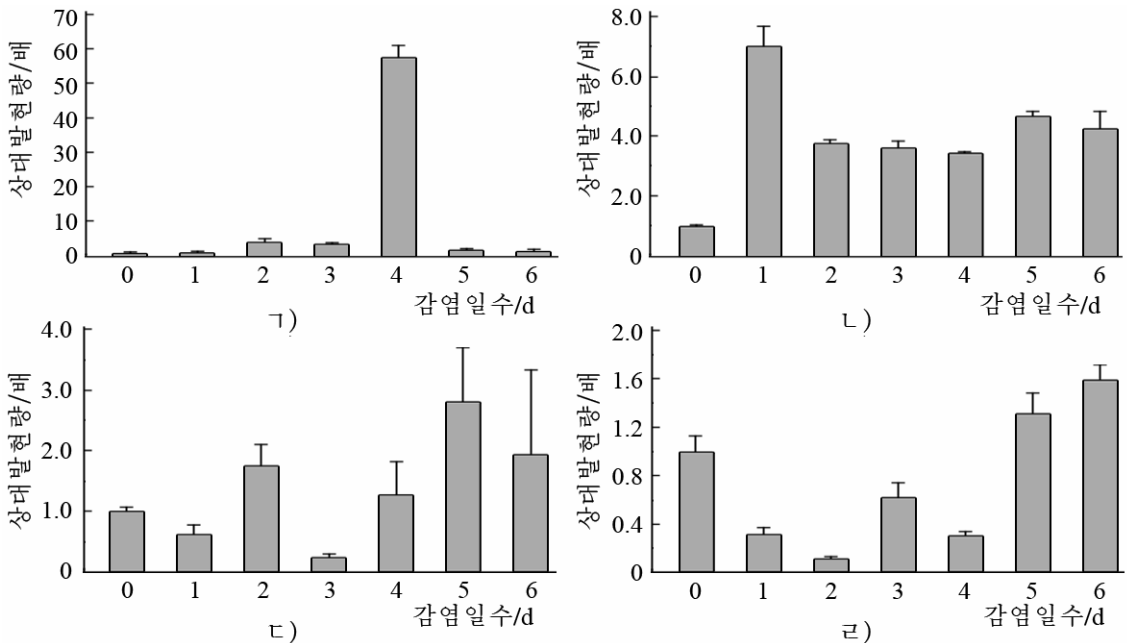


그림 2. 출혈성비루스에 감염된 초어의 몇 가지 조직에서 감염일수에 따르는 *cd36* mRNA의 발현변화(* $p < 0.05$)
 가) 간장, 나) 뱃, 다) 비장, 라) 아가미

맺는 말

초어의 간장과 뱃, 비장, 아가미와 같은 여러 조직들에서 출혈성비루스감염시 *cd36* 유전자의 발현특성을 분석한데 의하면 간장과 뱃에서 현저한 발현변화들이 나타났다. 초어뱃에서 감염 1일만에 *cd36* mRNA 발현량이 최대로 높아졌지만 간장에서는 감염 4일만에 최대로 높아졌다.

참고 문헌

- [1] M. Febbraio et al.; Int. J. Biochem. Cell Biol., 39, 2012, 2007.
- [2] R. F. Inge et al.; Molecular Immunology, 63, 381, 2015.

주제 110(2021)년 1월 5일 원고접수

Expressions of the *cd36* Genes from Grass Carp in GCRV Infection

Jang Song Hun

Analysis of *cd36* mRNA expressions from some tissues of grass carp, including liver, intestine, spleen and gill was conducted.

In infected intestine tissues, expression of *cd36* mRNA reached a peak on the first day following infection, while in infected liver it hit high on the fourth day following infection.

Keywords: *cd36* mRNA, grass carp, grass carp reovirus