

사람상피성장인자유전자의 클론화에 대한 연구

우소연, 김영호, 리해성

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《당의 과학기술중시로선을 철저히 관철하여 첨단과학기술분야를 개척하며 나라의 과학기술을 높은 수준에 올려세워야 합니다.》(《김정일선집》 중보판 제23권 502페이지)

사람상피성장인자(human Epidermal Growth Factor: hEGF)는 피부와 각막, 폐 등의 상피조직을 이루는 세포의 성장과 분화를 촉진하며 위산분비를 억제[1]하므로 화상과 창상, 외과적상처의 회복, 육창과 위 및 십이지장궤양, 궤저, 방사선피부부염의 치료뿐만아니라 정형수술과 화장품첨가제로도 리용[2]되고있다.

우리는 사람의 태아신장조직과 각이한 배양세포의 cDNA를 주형으로 하여 hEGF유전자를 PCR증폭하고 이 유전자를 효능높은 pET운반체에 삽입하여 재조합플라스미드 pET-hEGF를 제조하기 위한 연구를 하였다.

재료와 방법

재료 사람태아신장조직세포, 그루화된 사람배양세포들인 HEK293세포와 Hela세포, pET30c(+)운반체를 리용하였다.

시약 트리줄(《Invitrogen》), 이소프로필알콜(《Promega》), 역전사반응키트(《Fermentas》), rTaq 효소와 PCR반응키트(《Takara》), DNA회수키트(《TianGen》), 핵산분자량표식자(《Fermentas》), T4 DNA리가제와 제한효소들인 *NdeI*과 *NotI*(《BioLabs》) 등을 리용하였다.

방법 사람의 태아신장조직과 배양세포들에서 RNA를 분리하고 역전사법으로 cDNA를 얻고 이것을 주형으로 하여 PCR를 진행[2]하였다. 프라이머는 NCBI자료기지에서 hEGF 유전자(Gene ID: 1950, 등록번호: AY548762.1)배열을 탐색하고 상류프라이머에 *NdeI*인식배열, 하류프라이머에 *NotI*인식배열을 삽입한 후 DNAMAN프로그램을 리용하여 설계하였다.(표)

표. 사람상피증식인자유전자증폭을 위한 프라이머배열

프라이머 종류	염기배열	길이/bp
상류프라이머	GCCATATGAATAGTGACTCTGAAT <i>NdeI</i>	24
하류프라이머	ACGCGGCCGCCTAGCGCAGTTCCCACCACT <i>NotI</i>	30

PCR는 50μL반응계에서 예비반응 95℃ 5min→변성 95℃ 30s, 아닐링 58℃ 30s, 연장 72℃ 30s(반복 30회)의 방식으로 진행하였다. PCR산물은 2% 아가로스겔전기영동으로 확인하였고 DNA회수법으로 회수하였다.

hEGF유전자와 pET운반체에 대한 제한효소(*NdeI*과 *NotI*)절단반응과 T4 DNA리가제연결 반응, 형질전환, 플라스미드분리, DNA단편회수는 선행연구방법[3]에 따라 진행하였다. 유전자배열분석은 전문분석기관에 의뢰하여 진행하였고 분석결과를 NCBI자료지에서 BLAST검정하였다.

결과 및 논의

1) hEGF유전자의 PCR증폭

사람태아신장조직세포와 배양세포들인 HEK293세포, HeLa세포의 cDNA를 주형으로 PCR를 진행하고 2% 아가로즈겔전기영동하였다. 사람태아신장조직세포와 HEK293세포, HeLa세포에서의 hEGF유전자발현정도는 그림 1과 같다.

hEGF유전자의 실제길이는 165bp이지만 PCR산물의 크기는 제한효소인식배열과 보호배열이 삽입되어 181bp이므로 200bp근방에서 띠가 나타나야 한다. 그림 1에서 보는바와 같이 hEGF유전자로 예측되는 띠는 사람태아신장조직세포에서만 나타났고 HEK293세포와 HeLa세포에서는 전혀 나타나지 않았다. 이로부터 hEGF유전자의 PCR증폭은 사람태아신장조직세포의 cDNA를 주형으로 하여야만 가능하고 HEK293세포와 HeLa세포들의 cDNA로는 거의 불가능하다는것을 알수 있다.

다음 사람태아신장조직기원의 PCR산물을 회수하여 같은 조건에서 다시 PCR증폭하였다. hEGF유전자에 대한 PCR산물의 아가로즈겔전기영동상은 그림 2와 같다.

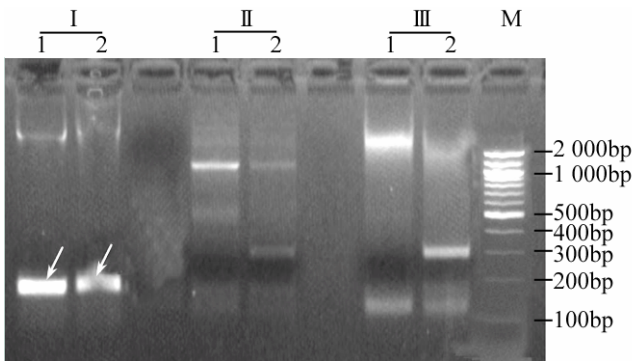


그림 1. 사람태아신장조직세포와 HEK293세포, HeLa세포에서의 hEGF유전자발현정도
I—태아신장조직세포, II—HEK293세포, III—HeLa세포, M—분자량표식자; 1—10×PCR완충액, 2—2×GC완충액

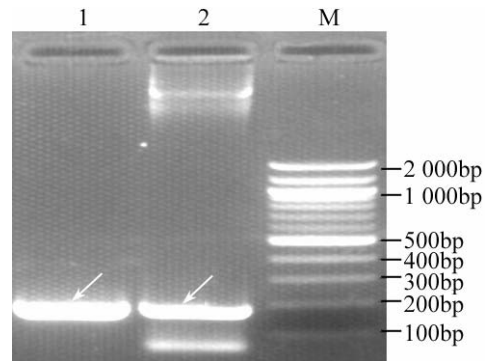


그림 2. hEGF유전자에 대한 PCR산물의 아가로즈겔전기영동상
1—10×PCR완충액, 2—2×GC완충액; M—분자량표식자

그림 2에서 보는바와 같이 두가지 완충액(10×PCR완충액과 2×GC완충액)에서 제한효소인식배열이 삽입된 띠가 200bp근방에서 밝고 선명하게 나타났다.

PCR증폭한 DNA를 회수하여 유전자배열을 분석하고 NCBI자료기지의 <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>에서 BLAST검색한 결과 염기배열이 GeneBank에 등록되어있는 hEGF유전자(등록번호 XM_006714125.1)배열과 완전히(100%) 일치하였다.

2) 재조합플라스미드 pET-hEGF의 제조

PCR증폭한 hEGF유전자와 원핵생물운반체인 pET30(+)을 두 제한효소(*NdeI*과 *NotI*)로 절단한 다음 두 DNA를 T4 DNA리가제로 연결시켰다. 이 재조합플라스미드를 대장균(*E. coli*

DH5 α)에 형질전환시키고 선발배지(카나미친을 100 μ g/mL로 첨가한 LB배지)에서 자란 균무지중에서 6개의 클론을 취하여 플라스미드를 분리한 다음 제한효소(*Nde*I과 *Not*I)로 절단하여 선발검정하였다. hEGF유전자가 삽입된 재조합플라스미드에 대한 제한효소검정결과는 그림 3과 같다.

그림 3에서 보는바와 같이 1, 4, 5번 클론들에서 크기가 170bp정도인 제한효소절단토막이 나타났다. 이로부터 1, 4, 5번 클론을 hEGF유전자가 삽입된 재조합플라스미드로 선발하였다.

제한효소검정으로 선발한 3개 클론에 대한 PCR검정을 진행하였다. hEGF유전자를 삽입한 재조합플라스미드에 대한 PCR검정결과는 그림 4와 같다.

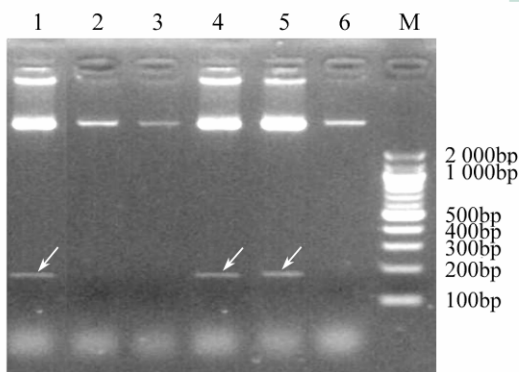


그림 3. hEGF유전자가 삽입된 재조합 플라스미드에 대한 제한효소검정결과
1-6은 각각 6개의 클론을 의미, M-분자량표식자

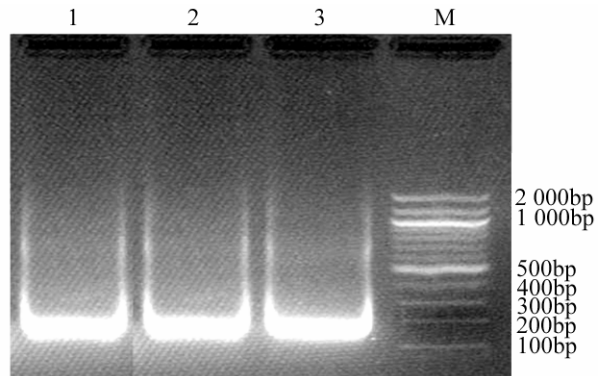


그림 4. hEGF유전자를 삽입한 재조합 플라스미드에 대한 PCR검정결과
1-3은 각각 3개의 클론을 의미, M-분자량표식자

그림 4에서 보는바와 같이 선발한 3개의 클론에서 모두 hEGF유전자에 해당하는 밝은 띠가 나타났다.

hEGF유전자를 삽입한 재조합플라스미드 pET-hEGF의 유전자배열을 T7프로모터프라이머를 리용하여 분석(그림 5)하여 hEGF유전자가 목적인 위치(*Nde*I와 *Not*I인식배열들사이)에 정확히 삽입되었는것을 확인하였다.

```

CGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCTCTAGA
      T7프로모터                                lac오페레터
AATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAATAGTGACTCTGAATGTC
                        rbs                NdeI          hEGF유전자
CCCTGTCCCACGATGGGTACTGCCTCCATGATGCTGTGTGCATGTATATTGAAGCATT
GGACAAGTATGCATGCAACTGTGTTGTTGGCTACATCGGGGAGCGATGTCAGTACCGA
GACCTGAAGTGGTGGGAAGTGCCTAG
    
```

그림 5. 재조합플라스미드 pET-hEGF에 대한 유전자배열분석결과

이렇게 우리는 hEGF유전자가 정확히 삽입된 재조합플라스미드 pET-hEGF를 제조하였다.

맺 는 말

사람태아신장조직세포의 cDNA를 주형으로 PCR증폭한 hEGF유전자를 원핵생물발현운반체 pET에 삽입시켜 재조합플라스미드 pET-hEGF를 제조하였다.

참 고 문 헌

- [1] J. Mohammadian et al.; Advanced Pharmaceutical Bulletin, 3, 2, 473, 2013.
- [2] Imen Elloumi et al.; Biomaterials, 27, 3451, 2006.
- [3] 章静泼 等; 细胞生物学实验指南, 科学出版社, 750~826, 2008.

주체106(2017)년 7월 5일 원고접수

Cloning of the Human Epidermal Growth Factor Gene

U So Yon, Kim Yong Ho and Ri Hae Song

We amplified hEGF genes with the template cDNA from the embryonic kidney tissue and the different culture cells using PCR and inserted them into the efficacious pET vector to make the recombinant plasmid pET-hEGF.

Key words: human epidermal growth factor, cloning, pET vector