

사람의 몇가지 조직들과 배양세포들에서 상피증식인자유전자의 발현

김영호, 이성실

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

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

우리는 사람상피증식인자(Human Epidermal Growth Factor: hEGF)유전자의 발현정도를 밝히고 정확한 hEGF유전자를 얻기 위한 연구를 하였다.

hEGF는 피부와 각막, 폐 등 상피조직을 이루는 세포의 성장과 분화를 촉진하며 위산 분비를 억제[1, 2]하므로 화상과 창상, 외과적상처의 회복, 욕창, 위 및 십이지장궤양, 피저, 방사선피부염치료뿐만아니라 정형수술과 화장품첨가제로도 리용되고있다.[3, 4]

우리는 사람의 몇가지 조직들과 배양세포들에서 hEGF유전자의 발현정도를 PCR방법으로 평가하고 그것의 유전자배열을 분석하여 그 정확성을 확인하였다.

재료와 방법

재료로는 사람성체에서 신장과 간, 비장조직, 사람태아에서 신장조직, 그루화된 사람 배양세포들인 HEK293세포와 Hela세포를 리용하였다.

시약으로는 트리아졸(Trizol, 《Invitrogene》), 이소프로필알콜(《Promega》), 역전사반응키트(《Fermentas》), rTaq효소와 PCR반응키트(《Takara》), DNA회수키트(《TianGen》), DNA분자량표식자(《Fermentas》) 등을 리용하였다.

방법 사람의 각이한 조직과 배양세포들에서 RNA를 분리한 다음 역전사법으로 cDNA를 얻고 이것을 형틀로 PCR를 진행하였다.[4]

프라이머는 NCBI자료기지에서 hEGF유전자(Gene ID: 1950, 등록번호: AY548762.1)배열을 탐색하고 5'-프라이머에 *Sal* I, 3'-프라이머에 *Not* I제한효소절단점을 덧붙여 DNAMAN 프로그램을 리용하여 설계하였다.(표)

표. 사람상피증식인자유전자증폭을 위한 프라이머배열

프라이머 종류	염기배열	길이 /bp
5'-hEGF <i>Sal</i> I primer	GCGTCGACAATGAATAGTGACTCTGAATGT <i>Sal</i> I	30
3'-hEGF <i>Not</i> I primer	ACGCGGCCGCGCTAGCGCAGTTCCCACT <i>Not</i> I	30

PCR반응은 50μL반응계로 예비반응 95℃ 5min→변성 95℃ 30s, 아닐링 58℃ 30s, 연장 72℃ 30s, 변성부터 연장까지 30회 순환하였다. 1차PCR와 2차PCR반응은 같은 조건에서 진행하였다. PCR산물은 2%

아가로즈겔전기영동으로 확인하였고 DNA회수법으로 회수하였다. 유전자배열분석은 전문배열 분석소에 의뢰하여 진행하였으며 결과를 NCBI자료기지에서 BLAST검정을 통하여 확인하였다.

결과 및 논의

1) 몇가지 조직들과 배양세포들에서 hEGF유전자의 발현특성

먼저 사람성체에서 hEGF유전자발현이 주목되는 신장조직, 간조직, 비장조직의 cDNA를 형틀로 PCR를 진행하였는데 그 결과는 그림 1과 같다. hEGF유전자의 실제길이는 165bp이지만 PCR산물의 크기는 제한효소절단점과 보호배열이 덧붙여 187bp이다.

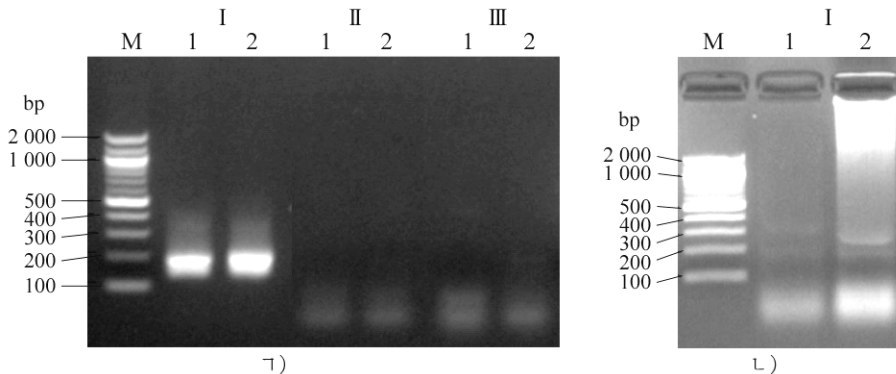


그림 1. 사람성체조직들에서 hEGF유전자의 발현정도

1) 1차PCR결과: I - 신장조직, II - 간장조직, III - 비장조직, M은 분자량 표식자, 1-10×PCR완충액, 2-2×GC완충액, 2) 2차PCR결과

그림 1의 1)에서 보는바와 같이 hEGF유전자로 예측되는 크기가 190bp정도인 띠는 신장조직에서만 나타났고 다른 조직들에서는 나타나지 않았다. 1차PCR산물을 회수하여 다시 2차PCR를 진행하였는데 완충액의 종류에 관계없이 예측되는 띠는 전혀 나타나지 않았다.(그림 1의 2)) 이것은 1차PCR산물이 hEGF유전자가 아니며 사람성체에서 hEGF는 일정하게 분비되지만 해당 조직에서 그 유전자의 발현은 PCR방법으로 검출하기 힘들 정도로 매우 낮다는것을 보여준다.

다음 태아신장조직과 배양세포들인 HEK293세포, Hela세포의 cDNA를 형틀로 PCR반응을 진행하고 2% 아가로즈겔전기영동을 하였다.(그림 2)

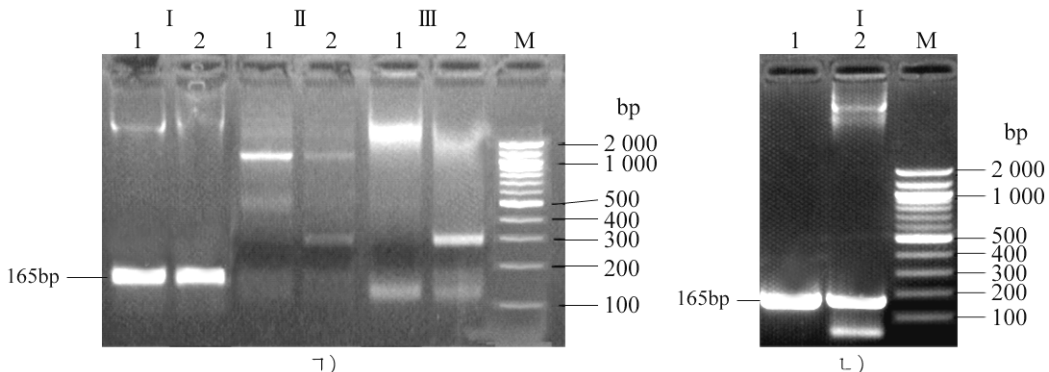


그림 2. 사람태아신장조직과 사람배양세포들에서 hEGF유전자발현정도

1) 1차PCR결과: I - 태아신장조직, II - HEK293세포, III - Hela세포, M은 분자량 표식자, 1-10×PCR완충액, 2-2×GC완충액, 2) 2차PCR결과

그림 2의 ㄱ)에서 보는바와 같이 hEGF유전자로 예측되는 띠는 사람태아신장조직에서만 나타났고 HEK293세포와 Hela세포에서는 전혀 볼수 없었다. 1차PCR산물을 회수하여 다시 2차PCR를 진행한 결과 역시 같은 크기의 띠가 나타났는데 이것은 태아신장조직을 형틀로 한 PCR산물이 hEGF유전자라는것을 보여준다.(그림 2의 ㄴ)) 두차례의 PCR 결과에서 완충액의 종류에 따르는 차이는 나타나지 않았다.

이로부터 사람성체조직과 HEK293세포, Hela세포와 같은 그루화된 배양세포들에서 hEGF유전자는 PCR법으로 검출하기 힘들 정도로 거의나 발현되지 않지만 태아신장조직에서는 높은 수준에서 발현된다는것을 알수 있다.

2) hEGF유전자의 염기배열분석

태아신장조직으로부터 PCR반응으로 증폭시킨 hEGF유전자의 정확성을 확인하기 위하여 배열분석을 진행하였다.(그림 3)

```
ATGAATAGTGACTCTGAATGTCCCCTGTCCCACGATGGGTACTGCCTCCATGATGGT
GTGTGCATGTATATTGAAGCATTGGACAAGTATGCATGCAACTGTGTTGTTGGCTAC
ATCGGGGAGCGATGTCAGTACCGAGACCTGAAGTGGTGGGAAGTGCCTAG
```

그림 3. 태아신장조직으로부터 얻은 hEGF유전자배열분석결과

그림 3에서 보는바와 같이 hEGF유전자배열분석결과 그 길이는 165bp였으며 배열분석결과를 NCBI자료지의 <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>에서 BLAST검색한 결과 GeneBank에 등록되어있는 hEGF유전자(등록번호 XM_006714125.1)와 염기쌍이 완전히 일치(100%)하였다. 이로부터 태아신장조직의 cDNA를 형틀로 증폭한 PCR산물은 정확한 hEGF유전자라는것을 알수 있다.

사람태아신장조직을 리용하여 정확한 hEGF유전자를 얻은 우리의 실험결과는 선행연구결과[5]와도 일치하였다.

또한 사람성체조직들에서 hEGF유전자는 발현되지 않는데 이것은 사람성체에서 피부의 정상생장과 피부로화를 방지하기 위하여서는 외부적으로 hEGF를 주입하는것이 필요하다는것을 보여준다. 실지로 HEK293세포와 Hela세포에서도 hEGF유전자의 발현이 관측되지 않았는데 이로부터 이 세포들의 생장을 위하여 배지에 혈청이나 hEGF를 첨가하는 것이다.

맺 는 말

hEGF유전자는 사람성체조직들인 신장, 간장, 비장과 배양세포들인 HEK293세포와 Hela세포에서 발현되지 않고 사람태아신장조직에서만 발현되는데 그 발현정도는 매우 높으며 이를 형틀로 PCR법으로 증폭한 hEGF유전자는 정확하다.

참 고 문 헌

- [1] S. Cohen et al.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **72**, 1317, 1975.
- [2] J. Mohammadian et al.; Advanced Pharmaceutical Bulletin, **3**, 2, 473, 2013.
- [3] Imen Elloumi et al.; Biomaterials, **27**, 3451, 2006.
- [4] L. Ferrer Soler et al.; Journal of Chromatography, **B 788**, 113, 2003.
- [5] 王保莉 等; 西北农林科技大学学报(自然科学版), **32**, 2, 83, 2004.

주체104(2015)년 4월 5일 원고접수

The Expression of Human Epidermal Growth Factor Gene in Some Human Tissues and Human Cultural Cell Lines

Kim Yong Ho, Ri Song Sil

The human epidermal growth factor(hEGF) gene never express in human tissues and cultural cell lines—HEK293 and Hela.

The expression level of hEGF gene in human fetal kidney tissue is very high and hEGF gene amplified by PCR is correct.

Key words: hEGF, gene expression, human fetal kidney