

초어톨루사접수체유전자3(*tlr3*) cDNA의 분리와 계놈구조

장성훈, 황승철, 강철호

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《기초과학부문들을 발전시켜야 나라의 과학기술수준을 빨리 높일수 있고 인민경제 여러 분야에서 나서는 과학기술적문제들을 원만히 풀수 있으며 과학기술을 주체성있게 발전시켜나갈수 있습니다.》(《김정일선집》 증보판 제10권 485페이지)

유전자의 분자구조특성을 밝히는것은 해당 유전자의 기능을 깊이있게 해명하고 실전에 도입하는데 필요한 기초자료를 마련하는데서 큰 의의를 가진다. 우리는 초어의 선천성 면역조절에서 중요한 역할을 하는 TLR3유전자의 계놈구조에 대한 연구를 하였다.

재료와 방법

초어*tlr3* cDNA의 전배열의 증폭 cDNA말단증폭방법[1]을 리용하여 초어의 두신으로부터 총RNA를 분리한 다음 설명서[1]에 따라 cDNA전배열을 얻었다.

실험에 리용한 프라이머 프라이머는 Primer 5.0프로그램으로 설계하였다.(표)

표. 초어*tlr3* cDNA의 분리에 리용한 프라이머

프라이머이름	배열*(5'→3')	증폭위치
SCTF1(상류프라이머)	CTCAGYAAYAAYATYGCMAACAT	보존배열
SCTR4(하류프라이머)	TTCCAGWAGAAYYGRATYCTCCA	
SCTF20(상류프라이머)	CAAACTGTCTGTTCTGGATCTG	
SCTF6(상류프라이머)	TGATGCTTTGCGTGGCTTCTCTGA	3'-말단
SCTR22A(하류프라이머)	TCAGAGAAGCCACGCAAAGCATCA	5'-말단
SCTR23A(하류프라이머)	CAGATCCAGAACAGACAGTTTTG	
SMART II(상류프라이머)	AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACGCGGG	5'-말단
CDS III(하류프라이머)	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC (T) 30VN	3'-말단

* R=A/G, S=C/G, Y=C/T, D=A/G/T, K=G/T, M=A/C, W=A/T, V=A/G/C, N=A/G/C/T

초어TLR3유전자의 구조분석 초어TLR3유전자의 계놈배열과 cDNA배열을 Vector NTI프로그램으로 비교하여 엑손, 인트론배열을 갈라낸다. 다음 비교분석에 리용하기 위하여 여러 종들의 *tlr3* cDNA배열을 NCBI홈페이지에서 찾고 Ensembl(<http://www.ensembl.org/>)자료기지를 리용하여 매 종의 cDNA배열에 대응하는 계놈배열을 선택한 다음 우와 같은 방법으로 엑손, 인트론배열을 갈라낸다. 유전자의 구조분석은 매 유전자들의 계놈배열과 cDNA배열을 비교하여 엑손과 인트론 및 비번역배열을 분리하는 방법으로 진행하였다.

아미노산배열에 기초한 단백질구조는 SMART(<http://www.smart.embl-heidelberg.de/>)와 TMHMM(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)프로그램으로 분석하였다. 분석에는 초어(*Ctenopharyngodon idella*, ABI64155), 줄말고기(*Danio rerio*, NP_001013287), 칠색송어(*Oncorhynchus mykiss*, AY883999)의 배열들을 리용하였다.

결과 및 고찰

cDNA말단증폭방법을 리용하여 초어 *tlr3* cDNA를 증폭한 결과 1 950bp의 보존배열과 1 930bp의 5'-말단배열, 1 098bp의 3'-말단배열들이 각각 증폭되었다.(그림 1) 이 배열들을 증폭하는데 리용된 프라이머들은 이미 표에 제시하였다. 배열분석을 통하여 얻어진 3개의 배열들을 Vector NTI프로그램으로 조합하여 3 681bp의 초어 *tlr3* cDNA전배열을 얻어냈다.

국제유전자은행(GenBank)의 자료기지에서 분리한 초어TLR3유전자의 계놈배열과 cDNA배열을 비교분석하여 초어TLR3유전자의 계놈구조를 확정하였으며 다른 종들의 TLR3유전자의 계놈구조는 같은 방법으로 자료기지에서 내리적재한 배열을 가지고 확정하였다.(그림 2)

그림 2에서 보면 대다수 물고기종들에서 TLR3유전자는 5개의 엑손과 4개의 인트론을 가진 유전자라는것을 알수 있다. 초어TLR3유전자는 5개의 엑손과 4개의 인트론으로 이루어졌다. 이 유전자는 3'-말단에 14개의 로이신평부반복배열(LRR)과 5'-말단에 진화적으로 보존된 하나의 TIR도메인을 가지고있다. TLR족 유전자는

세포질의 바깥쪽에 병원체를 인식하는데 적응된 로이신평부반복배열(LRR)들을 여러개 가지고있으며 세포질의 안쪽에는 진화상 보존되고 신호전달에 관여하는 TIR도메인을 가지고있다.[2, 3]

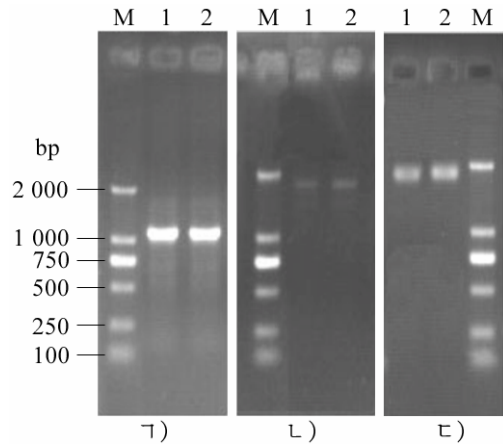


그림 1. 초어 *tlr3* cDNA의 PCR증폭

단편의 영동상

1) 3'-말단배열, 2) 5'-말단배열, 3) 보존배열; M은 분자량표식자(DL2000), 1, 2는 시료

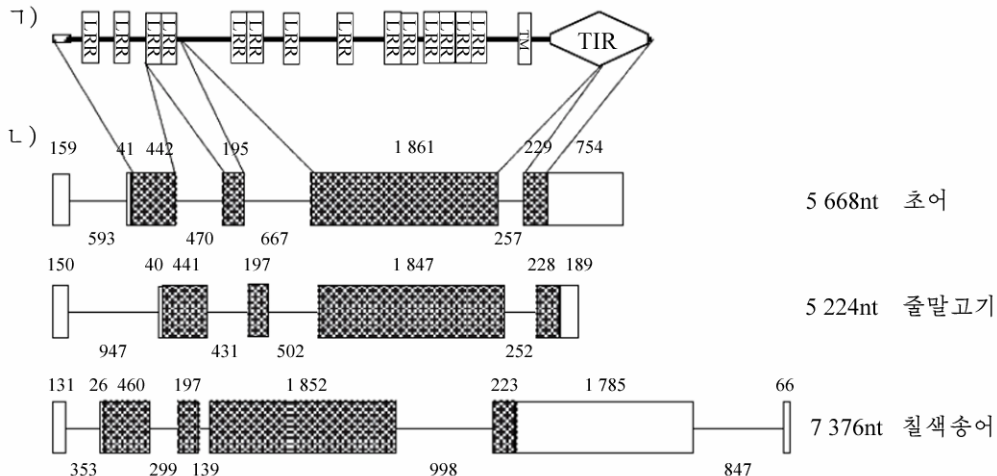


그림 2. 초어TLR3유전자의 계놈구조

1) SMART와 TMHMM프로그램으로 초어TLR3유전자의 도메인을 분석한 결과,

2) 여러 종들에서 TLR3유전자의 구조; LRR는 로이신평부반복배열, TM은 막투과영역배열, TIR는 톨린터로이킨접수체도메인, 엑손크기는 숫부분에,

인트론의 크기는 아래부분에 줌, 어두운 색으로 표시한 부분은

엑손이고 투명한 부분은 인트론임

초어TLR3유전자의 구조에 대한 연구결과들은 물고기류에서도 포유동물에서와 마찬가지로 TLR3유전자가 두오리사슬비루스를 인식하고 신호통로를 통하여 선천성면역반응을 일으키는 기능을 수행할수 있다[4]는것을 보여준다. 계놈구조의 해석은 TLR3유전자의 다형성과 초어출혈성비루스(GCRV)에 대한 감수성과 관련된 연구를 하기 위한 기초자료로 된다.

맺 는 말

1) 초어*tlr3* cDNA의 보존배열과 5'— 및 3'—말단배열들을 증폭하고 3 681bp의 전배열을 얻어냈다.

2) 초어TLR3유전자는 5개의 엑손과 4개의 인트론으로 이루어졌다. 이 유전자는 3'—말단에 14개의 로이신평부반복배열(LRR)과 5'—말단에 진화적으로 보존된 하나의 TIR도메인을 가지고있다.

참 고 문 헌

- [1] J. R. Sambrook; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 11 ~25, 2001.
- [2] M. F. Rodriguez et al.; Immunogenetics, 57, 510, 2005.
- [3] J. Lee; Curr. Opin. Gastroenterol., 23, 27, 2007.
- [4] Y. Jiang et al.; Fish & Shellfish Immunology, 44, 88, 2015.

주체106(2017)년 10월 5일 원고접수

Isolation and Genomic Organization of Toll-Like Receptor 3 Gene(*tlr3*) from Grass Carp

Jang Song Hun, Hwang Sung Chol and Kang Chol Ho

We amplified the conserved sequence, 5'- and 3'-terminal sequences of *tlr3* cDNA from grass carp, and the whole length of this gene is 3 681bp. The TLR3 gene of grass carp consists of five exons and four introns. This gene has fourteen LRR motifs in 3'-terminal region and one evolutionarily conserved TIR domain in 5'-terminal region.

Key words: toll-like receptor 3, *tlr3*, grass carp