

초어 *nf- κ b*유전자의 발현특성

장 성 훈

NF- κ B(Nucleic factor kappa B)단백질은 여러가지 면역계통의 신호전달경로를 통하여 인터페론과 염증성사이토카인을 발현시켜 획득성면역계통과 면역반응을 활성화시키는데서 관건적인 작용을 한다. 물고기에서는 이 인자에 대한 연구가 매우 적게 진행되었다.

우리는 초어를 대상으로 *nf- κ b*유전자의 조직별발현특성과 초어출혈성비루스에 감염되었을 때의 발현특성에 대한 연구를 하였다.

재료와 방법

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

총RNA분리, 조직별발현분석방법 총RNA는 선행연구[1]에 준하여 트리졸법으로 분리하였다. 조직별발현분석을 위하여 건강한 초어의 간장과 뇌수, 아가미, 심장, 두신, 뱀, 신장, 근육, 비장을 취하여 총RNA를 분리한 다음 역전사시켜 리용하였다.

GCRV에 의한 초어의 감염 온도를 28°C로 보장한 실내순환체계에서 물고기를 1주일정도 유지한 후 몸질량 1g당 50 μ L의 PBS용액(대조구)과 PBS에 현탁시킨 50 μ L의 초어출혈성비루스(5 $\times 10^8$ PFU/mL)를 주사하였다.

주사하지 않은 개체들은 빈시험구로 리용하였다. 매개 시점에서 각이한 처리구들로부터 3마리를 시료로 취하여 리용하였다.

실시간정량역전사PCR법(qRT-PCR)에 의한 mRNA발현의 정량분석 정량분석은 qRT-PCR법을 리용하여 ABI실시간정량분석기(《Applied Biosystems》)에서 진행하였다. qRT-PCR의 반응액에는 1 μ L cDNA, 8 μ L 증류수, 10 μ L SYBR형광색소(《Toyobo》), 0.5 μ L 프라이머(5 μ mol/L)를 첨가하였다. 각이한 조직들과 감염상태에서 반정량분석은 선행방법[2]으로 진행하였다.

PCR증폭조건은 다음과 같다.

예비변성 95°C에서 2min→변성 95°C에서 25s, 아닐링 60°C에서 30s,

연장 72°C에서 1min, 순환 40회→최종연장 72°C에서 10min

프라이머설계 발현분석에 리용한 프라이머(표 1)는 전용프로그램 Primer premier 5.0을 리용하여 설계하였다.

표 1. 유전자들의 발현분석에 리용한 프라이머

프라이머이름	배열(5' → 3')	크기/bp	증폭배열 크기/bp	$T_m/^{\circ}\text{C}$
nf κ B-IF(정방향)	GTTTCCAACCCTATCTATGA	20	120	62
nf κ B-IR(역방향)	GAAGTCTCCAAATGCCTC	18		
Qb-actinF(정방향)	GATGATGAAATTGCCGCACTG	21	120	62
Qb-actinR(역방향)	ACCAACCATGACACCCTGATGT	22		

결과 및 고찰

1) 초어*nf-κb*유전자의 조직별mRNA발현특성

초어*nf-κb*유전자의 mRNA발현을 분석한데 의하면 *nf-κb*유전자는 모든 조직들에서 다 발현되었다.(그림 1)

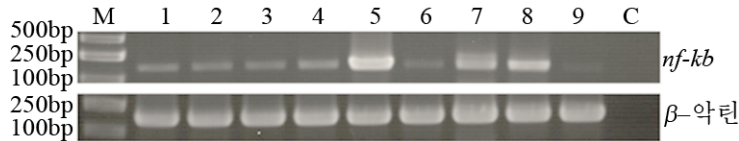


그림 1. 건강한 초어의 각이한 조직들에서 *nf-κb* mRNA의 발현영동상
1-아가미, 2-근육, 3-뇌수, 4-두신, 5-간장, 6-비장, 7-뱀, 8-신장,
9-심장, M은 DNA분자크기표식자(DL 2000), C는 음성대조

건강한 초어에서 *nf-κb* mRNA발현량은 간장과 신장, 뱀에서 상대적으로 많고 나머지 조직들에서는 적었다.(그림 2) 특히 간장에서 상대발현량이 제일 많았고 신장과 두신, 뱀, 뇌수, 근육, 아가미, 비장, 심장의 순서로 발현량이 적어졌다.

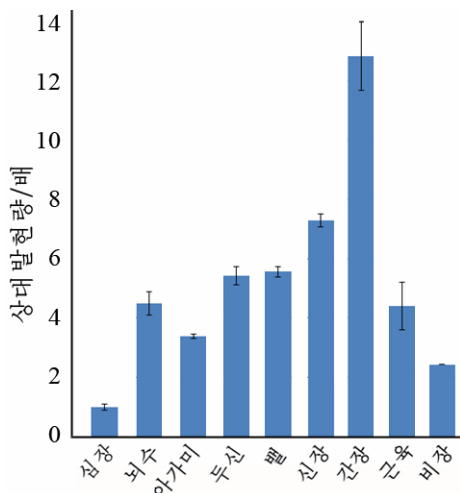


그림 2. 건강한 초어의 각이한 조직들에서 *nf-κb* mRNA의 상대발현량

초어*nf-κb*유전자가 신장이나 두신과 같은 면역기관뿐만아니라 병원체와 직접 접촉하는 뱀에서 많이 발현된다는것은 이 유전자가 병원체의 침입시 그 방어 기능에 관계될수 있다는것을 보여준다.

2) GCRV에 감염된 초어의 여러가지 조직들에서 감염일수에 따르는 *nf-κb* mRNA의 발현변화

물고기류에서는 현재까지 줄말고기와 황쏘가리, 대서양련어와 같은 일부 물고기들에서 *nf-κb*유전자들의 배열이 밝혀졌지만 그 발현특성에 대한 연구는 적게 진행되었다.

GCRV에 감염된 초어의 아가미와 뱀, 비장, 간장에서 감염일수에 따르는 *nf-κb* mRNA의 발현변화를 반정량RT-PCR법으로 측정하였다.(그림 3)

그림 3에서 보는바와 같이 아가미와 비장, 간장에서는 감염일수에 따라 *nf-κb* mRNA의 발현량에서 약간한 변화가 있었으나 대조와 큰 차이가 없었다. 그러나 뱀에서는 대조에 비하여 감염 1일부터 6일사이에 발현량이 뚜렷이 많아진다는것을 알수 있다.

감염일수에 따르는 *nf-κb* mRNA의 발현변화를 qRT-PCR법으로 측정한 경우에도 아가미와 간장, 비장에서는 발현량이 변화되었으나 현저한 차이는 없었다. 그러나 뱀에서는 감염 1일만에 발현량이 4.5배정도까지 급격히 증가되었으며 감염 4일에는 6배정도까지 증가되었다.

최근에 GCRV가 주로 중간뱀을 통하여 물고기에 침입한다는 연구자료[1]들이 발표되었다. NF-κB는 염증반응을 일으키는 종양괴사인자(TNF-α), 인터로킨-1(IL-1), T세포와 B세포의 유사분열물질, 세균 및 세균리포다당(LPS), 비루스립자 및 비루스단백질들, 두오리사슬RNA(dsRNA), 면역자극DNA배열(ISS-DNA), 생리적 및 화학적자극물질 등 여러가지

자극인자들에 의하여 활성화될 수 있으며 비루스나 세균과 같은 병원체의 침입과 관련된 톨류사접수체 신호통로를 활성화 시키는데서 관건적인 역할을 한다.[3]

GCRV에 감염된 초어의 뱀에서 초어 *nf-κb* mRNA의 발현량이 급격히 많아지는 것은 GCRV가 주로 뱀을 통하여 감염되며 뱀에서 비루스의 침입과 관련한 신호 전달통로를 매개하는 기능을 수행한다는 것을 보여준다.

맺는 말

1) 초어 *nf-κb* 유전자는 간장에서 상대 발현량이 특별히 많으며 다음으로 신장과 두신, 뱀, 뇌수, 근육, 아가미, 비장, 심장 순서로 적어진다.

2) GCRV에 감염된 초어의 뱀에서 감염일수에 따르는 *nf-κb* 유전자의 발현량변화를 보면 감염 1일만에 4.5배 정도까지 급격히 많아지며 감염 4일에는 6배 정도까지 많아진다.

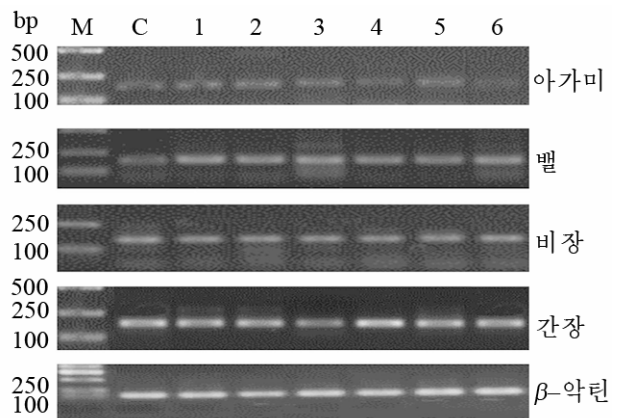


그림 3. GCRV에 감염된 여러가지 조직들에서 감염 일수에 따르는 초어 *nf-κb* mRNA의 발현변화
C는 대조(건강한 물고기), M은 DNA분자크기 표식자(DL 2000), 1-6은 감염일수(d)임.

참고 문헌

- [1] X. Lin et al.; Mol. Cell Biol., 18, 5899, 2008.
- [2] C. Y. Wang et al.; Science, 281, 1680, 2011.
- [3] M. Karin et al.; Annu. Rev. Immunol., 18, 621, 2000.

주제 110(2021)년 4월 5일 원고접수

Expressions of the *nf-κb* Genes from Grass Carp, *Ctenopharyngodon idella*

Jang Song Hun

Real-time quantitative PCR revealed that the *nf-κb* mRNA from grass carp were constitutively expressed in all examined tissues.

Following exposure to grass carp reovirus, *nf-κb* genes expressions in infected intestine were significantly up-regulated. *nf-κb* genes expressions in infected intestines were suddenly up-regulated to 4.5 times at the first day post-infection, and also up-regulated to about 6 times at the fourth day post-infection.

Keywords: *nf-κb* gen, grass carp, grass carp reovirus