

몇가지 miRNA유전자의 프라이머설계와 PCR에 의한 합성

허동수, 허철, 김강

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 지적하시였다.

《생물공학부문에서는 세포공학과 유전자공학, 미생물공학을 비롯한 현대생물학의 발전에 큰 힘을 넣으며 현대생물학의 성과를 농업과 축산업, 의학과 식료공업에 널리 받아들이 생산성이 높은 농작물과 집짐승의 새 품종을 만들어내며 질 좋은 여러가지 의약품과 식료품을 많이 생산할수 있도록 하여야 합니다.》(《김정일선집》 제15권 증보판 487~488페이지)

세포안에서 목적유전자의 발현을 배렬특이적으로 억제할수 있는 miRNA에 의한 간섭물림새가 발견된 후 이것을 유전자치료와 육종분야에 리용하기 위한 연구가 광범히 진행되고있다.[2, 4]

miR393a와 같은 일부 유전자는 염, 건조, 추위 등의 환경스트레스가 작용할 때 발현량이 증가되어 식물의 스트레스견딜성을 높인다는것이 증명되였다.[1, 2]

논문에서는 벼를 비롯한 농작물들의 각종 환경스트레스견딜성을 높이는데 리용할수 있는 miRNA유전자를 클론화하기 위하여 프라이머를 설계하고 PCR에 의하여 증폭한 연구결과를 고찰하였다.

재료 및 방법

재료로는 논벼품종 《Nipponbare》를 리용하였다.

프라이머의 설계와 합성 GENBank자료기지의 배렬자료에 기초하여 Primer Premier 5.0프로그램으로 miRNA유전자에 대한 특이프라이머를 설계한 다음 전문기관에 의뢰하여 합성하였다.

DNA분리 2일단계의 논벼잎조직 0.1g을 취하여 CTAB법[3]으로 핵산을 분리하고 그 특성을 평가하였다.

PCR클론화 합성한 프라이머를 리용하여 분리한 DNA를 PCR증폭하였다. PCR반응액 조성은 표 1과 같다.

표 1. PCR반응액조성

시약	첨가량/ μ L	시약	첨가량/ μ L
재증류수(ddH ₂ O)	12.0	Taq폴리메라제(5U/ μ L)	0.5
정방향올리고DNA(5 μ mol/L)	1.0	주형DNA(2~10ng)	1.0
역방향올리고DNA(5 μ mol/L)	1.0	DMSO	1.5
10 \times 완충액(Mg ²⁺ 포함)	2.0	총체적	20.0
dNTP(2.5mmol/L)	1.0		

PCR분석에 필요한 DNA표식자로는 DNA 100bp Ladder(《Fermentas》)를 리용하였다.

결과 및 고찰

프라이머의 설계 및 합성 벼의 몇 가지 miR 유전자에 대하여 설계한 프라이머배열은 다음과 같다.

miR393a 유전자(2 307 749–2 308 663 *Oryza sativa* 게놈 DNA, 염색체 1)

정방향: 5'-GGTACC46TACACAAACCAGGCATCTCCAC67-3' *Kpn* I

역방향: 5'-GGATCC628GAGCTTTCTTGCACAACACCTT607-3' *Bam*H I

miR393b 유전자(34 966 612–34 967 543 *Oryza sativa* 게놈 DNA, 염색체 4)

정방향: 5'-GGTACC150TACTCCTACTGTTGTTTCATTTCTTG182-3' *Kpn* I

역방향: 5'-CTGCAG912TCCATCTCATTGCCCTGT887-3' *Pst* I

miR408 유전자(12 284 140–12 285 152 *Oryza sativa* 게놈 DNA, 염색체 1)

정방향: 5'-GGTACC145CTTGGGACAGGTCAGCATC163-3' *Kpn* I

역방향: 5'-CTGCAG733CAACAGCCCTTGAAGTGTC715-3' *Pst* I

Primer Premier 5.0 프로그램으로 해석한 miRNA 유전자에 대한 특이 프라이머의 특성은 표 2와 같다.

표 2. 몇 가지 miR 유전자 프라이머의 특성

유전자	배열	등급	배열번호	길이* /bp	Tm /°C	GC /%
<i>miR393a</i>	정방향	100	46	22	59.9	50.0
	역방향	88	628	22	58.9	45.5
	산물	87		583	87.2	44.1
<i>miR393b</i>	1	83	150	33	70.0	45.5
	2	78	912	26	69.2	50.0
	3	70		763	88.8	48.0
<i>miR408</i>	1	100	145	19	55.4	57.9
	2	93	733	19	53.1	52.6
	3	85		589	87.8	45.5

* 인식부위배열을 계산하지 않은 것

miR 유전자의 PCR 합성 먼저 *miR393a* 유전자를 PCR 합성하였다.

이를 위하여 먼저 잎으로부터 CTAB법으로 DNA를 추출하였다. 이때 추출된 핵산의 특징은 표 3과 같다.

표 3의 결과로부터 얻어진 핵산을 다음 조작에 리용할 수 있다고 보았다. PCR 조건을 다음과 같이 설정하고 증폭한 유전자들을 아가로즈 겔 전기영동으로 확인하였다.(그림 1–3)

PCR 조건: 94°C 5min → 94°C 30s, 60°C 30s, 72°C 90s; 30회 순환 → 72°C 10min(종결) → 10°C 6min.

표 3. 추출한 핵산의 특성

구분	값
DNA 농도/($\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	5.509
OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	1.89
OD ₂₆₀ /OD ₂₃₀	2.13

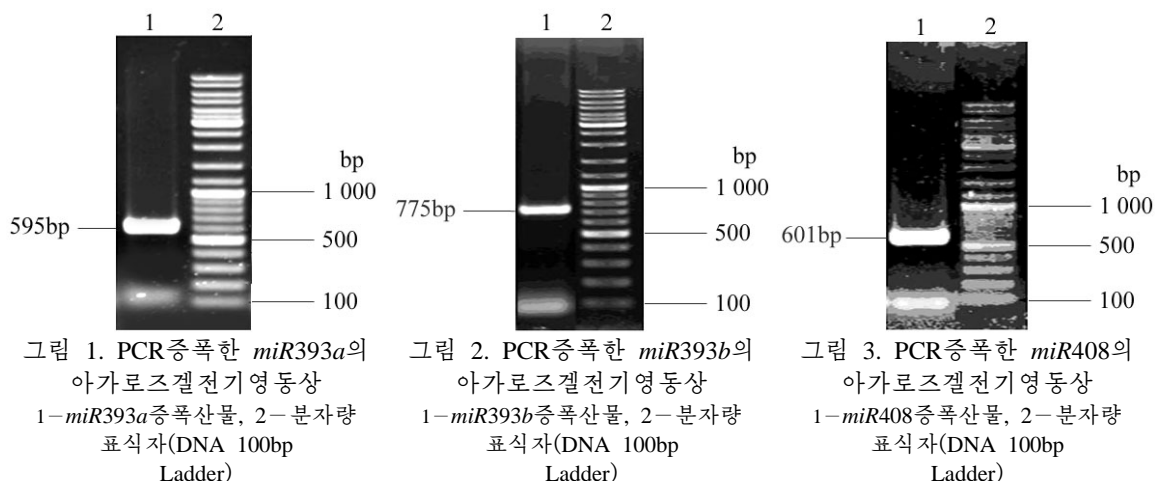


그림 1-3에서 보는바와 같이 목적인 유전자가 600~750bp 근방에서 나타났는데 염기배열해석결과 그것은 각각 595, 775, 601bp라는것을 확인하였다. 이것은 목적인 *miR393a*, *miR393b*와 *miR408* 유전자들이 정확히 합성되어 나타났다는것을 보여준다.

맺 는 말

논벼게놈배열자료에 기초하여 설계한 프라이머들은 프라이머설계요구에 맞으며 PCR에 의하여 각각 595, 775, 601bp의 *miR393a*, *miR393b*, *miR408* 유전자를 합성하였다.

참 고 문 헌

- [1] Botao Zhao; Biochem. Biophys. Res. Commun., 354, 585, 2007.
- [2] Han-Hua Liu et al.; RNA, 14, 836, 2008.
- [3] Hyun Ju Jung et al.; Plant Physiol. Biochem., 45, 805, 2007.
- [4] Isabella Faraoni et al.; Molecular Basis of Disease, 2, 13, 1~30, 2009.

주체103(2014)년 6월 5일 원고접수

Design of Primers for Some miRNAs and Their Amplifications by PCR

Ho Tong Su, Ho Chol and Kim Kang

Since it was found that miRNAs could inhibit the expression of target genes in the cell, miRNAs are widely used in breeding and therapy.

miRNAs as well as *miRNA393a* are involved in the environmental stress such as high salinity, drought, and low temperature and increase the stress tolerance in plants.

To clone the miRNAs that we can use in breeding of environmental stress-tolerance crops, their primers were designed and the genes were amplified from rice genome by PCR.

Key words: miRNAs, primer design, PCR amplifications