

인공miRNA-53R-1에 의한 개구리홍채바이러스증식의 억제

최유미, 김유신

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《양어과학과 기술에 대한 연구사업을 강화하고 선진적인 물고기기르기기술을 적극 받아들여 우리 나라의 양어사업을 최신과학기술에 기초하여 발전시켜나가도록 하여야 합니다.》(《김정일선집》 증보판 제20권 178~179페이지)

현시기 유전자기능연구와 암치료, 항바이러스연구에 인공microRNA(간단히 인공miRNA)에 의한 RNA간섭기술이 광범히 적용되고있는데 특히 이 기술은 에이즈, 조류독감을 비롯한 전염병을 일으키는 바이러스들을 막기 위한 연구에 적극 활용되고있다.[2-4]

론문에서는 인공miRNA-53R-1이 홍채바이러스낭막단백질유전자 53R의 발현을 억제하는 합리적인 구조라는것을 밝힌[1]데 기초하여 그것의 바이러스증식억제특성을 고찰한 결과를 논의하였다.

재료와 방법

재료로는 잉어상피세포(Epithelioma Papulosum Cyprinid: EPC), 개구리홍채바이러스(Rana grylio virus: RGV)를 리용하였다.

인공miRNA의 발현과 바이러스증식억제효과측정방법 RGV복제에 대한 인공miRNA-53R-1의 항바이러스효과를 측정하기 위하여 pSM155-miR-53R-1과 RGV로 감염시킨 EPC세포에서 24h후 53R유전자의 발현을 측정하였다. 음성대조로 pSM155-miR-PB2를 리용하였다.

전자현미경관찰방법 EPC세포들을 pSM155-miR-53R-1로 형질감염시킨 후 RGV를 감염시켰다. RGV감염 72h후 세포들을 2 000×g에서 원심분리하고 침전물을 2.5% 글루타르알데히드가 포함된 0.1mol/L 린산완충액(pH 7.4)으로 하루동안 고정하고 1% 오스미움4산화물이 포함된 0.1mol/L 린산완충액으로 4℃에서 1h동안 씻어낸 다음 알콜계렬로 탈수한 후 Spurr수지에 포매하였다. 세포침전물을 카코딜산나트륨완충액의 2% 오스미움4산화물로 2h동안 다시 고정하고 아세톤계렬로 탈수한 다음 LR100수지에 포매하였다. 초박편들을 2% 우라닐 초산염과 3% 초산염으로 염색하고 주사식전자현미경(《JEOL 1230》)을 리용하여 100kV에서 관찰하였다.

결과 및 논의

EPC세포에서 인공pSM155-miRNA에 의한 홍채바이러스 RGV의 병변지연효과와 적정도의 감소 병변효과는 바이러스축적량을 반영하는 가장 중요한 파라메터이다. pSM155-miR-53R-1을 EPC세포에 형질감염시키고 24h후에 RGV를 감염시킨 다음 EPC세포의 병변효과를 현미경으로 관찰하였다. 결과 pSM155-miR-53R-1로 형질감염시킨 EPC세포에서는 음성대조인 pSM155-miR-PB2에 비하여 RGV에 의한 세포병변이 뚜렷하게 지연되었다.(그림 1)

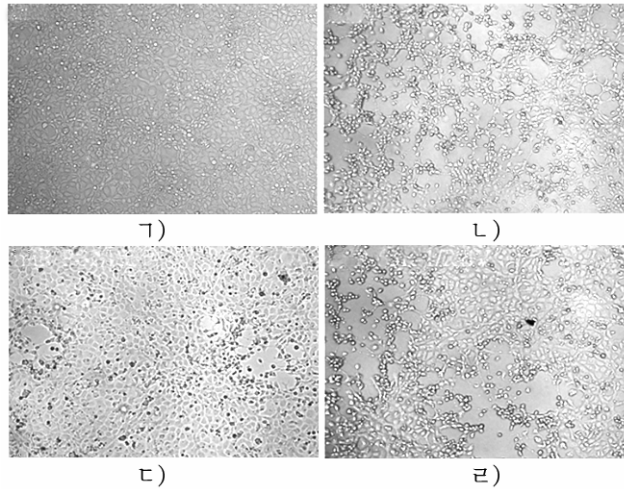


그림 1. RGV로 감염시킨 EPC세포들에 대한 현미경적 관찰

가) 대조구, 나) RGV구, 다) pSM155-miR-PB2/RGV구, 라) pSM155-miR-53R-1/RGV구; 서로 다른 인공miRNA발현 플라스미드들을 형질감염시킨 세포들에 24h후 RGV를 감염시켰다. 72h이후 현미경관찰결과는 pSM155-miR-53R-1로 형질감염시킨 세포들에서 병변효과가 매우 적게 나타난다는 것을 보여주었다. 그러나 pSM155-miR-PB2로 감염시킨 세포나 대조구에서는 많은 세포들이 단층으로부터 분리되어 뭉쳐지고 비루스덩어리들이 나타났다.

miR-53R-1에 의한 RGV증식의 억제 pSM-miR-53R-1이 RGV의 포장과 생성을 저해할수 있는가를 보기 위하여 pSM155-miR-53R-1과 음성대조인 pSM155-miR-PB2를 EPC세포에 각각 형질감염시키고 24h후에 RGV를 감염시켰다.(그림 2)

그림 2에서 보는바와 같이 RGV감염후 세포상청액을 24, 48, 72, 96h후에 수집하여 비루스의 생성을 평가한 결과 pSM-miR-53R-1로 형질감염시킨 세포에서 RGV증식은 pSM155-miR-PB2를 감염시킨 음성대조에서보다 시간에 따라서 각각 현저히 감소되었다.

전자현미경관찰결과 전자현미경으로 EPC세포들에서 비루스립자들을 관찰한 결과(그림 3) RGV만으로 감염시킨 대조세포들에서 더 많은 비루스립자들이 조립되고 규칙적으로 배열되어있었지만(그림 3의 가)) pSM155-miR-53R-1로 형질감염시킨 EPC세포들에서는 RGV립자들이 비규칙적으로 세포질에 존재하며 그 수도 뚜렷하게 감소되었다는 것을 알수 있다.(그림 3의 나))

EPC세포에서 인공pSM155-miR-53R-1에 의한 홍채비루스RGV의 억제 pSM155-miR-53R-1에 의한 53R의 발현억제와 RGV증식억제실험결과는 pSM155-miR-53R-1과 RGV로 형질감염시킨 물고기세포에서 세포병변의 지연과 RGV력가가 감소된다는 것을 보여주었다. 그리하여 우리는 pSM155-miR-53R-1과 음성대조인 pSM155-miR-PB2로 EPC세포를 각각 형질감염시키고 24h후

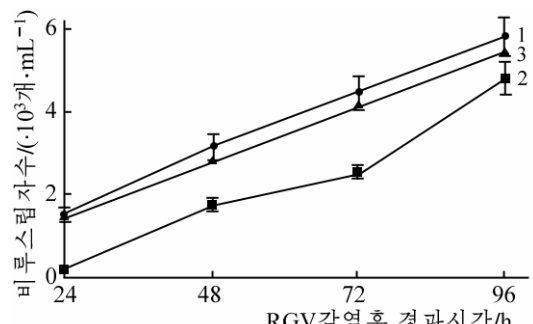


그림 2. 서로 다른 처리를 한 세포들에서 비루스증식억제

1-RGV, 2-RGV+pSM155-miR-53R-1,
3-RGV+pSM155-miR-PB2

에 RGV를 감염시킨 다음 RGV증식억제효과를 검증하기 위하여 53R유전자의 발현을 RT-PCR에 의하여 조사하였는데 그 결과는 그림 4와 같다.

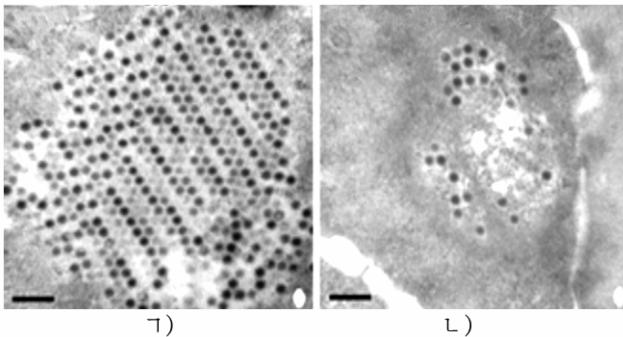


그림 3. RGV의 전자현미경 관찰
 ㄱ) RGV만으로 감염시킨 대조세포,
 ㄴ) pSM155-miR-53R-1로 형질감염시킨 EPC세포

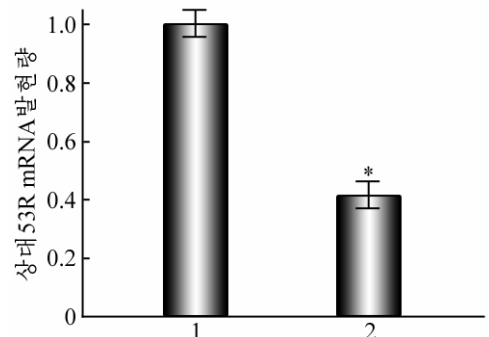


그림 4. miR-53R-1에 의한 RGV감염세포들에서 상대적인 53R mRNA의 수준비교
 1-pSM155-miR-PB2로 형질감염시킨 세포,
 2-pSM155-miR-53R-1로 형질감염시킨 세포

그림 4에서 보는바와 같이 pSM155-miR-53R-1로 형질감염시키고 72h후에 RGV를 감염시킨 EPC세포에서 53R의 발현은 음성대조인 pSM155-miR-PB2에 비하여 58% 감소되었다. 이것은 pSM155-miR-53R-1에 의하여 53R의 발현이 뚜렷하게 억제된다는것을 보여준다.

맺 는 말

pSM155-miR-53R-1은 EPC세포에서 개구리홍채비루스증식을 효과적으로 억제하는데 pSM155-miR-53R-1로 감염시킨 시험구들에서의 RGV증식은 대조인 pSM155-miR-PB2로 감염시킨 시험구들에 비하여 현저히 낮아졌다.

참 고 문 헌

- [1] 최유미 등; 생물학, 3, 45, 주체107(2018).
- [2] Gang Huang et al.; Gene, 558, 2, 1, 2015.
- [3] L. T. Dang et al.; Antiviral Res., 80, 316, 2008.
- [4] W. P. Kloosterman et al.; Dev. Cell, 11, 441, 2006.

주체107(2018)년 4월 5일 원고접수

Rana Grylio Virus Resistance by amiRNA-53R-1

Choe Yu Mi, Kim Yu Sin

The experimenral results demonstrate that the viral infection is efficiently suppressed(58%) with amiR-53R-1 targeting positon 36-57 of RGV 53R.

Key words: amiRNA, rana grylio