

## 사람줄기세포인자(hSCF)유전자의 클론화에 대한 연구

김영호, 조충원

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

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

21세기 세계적인 첨단과학기술분야의 하나인 줄기세포연구에서 중요한 사람줄기세포인자에 대한 연구가 광범하게 진행되고있다.

사람줄기세포인자(Human Stem Cell Factor: hSCF)는 다른 말로 Kit결합체(Kit ligand: KL), Steel인자(steel factor: SLF) 또는 비대세포성장인자(mast cell growth factor: MGF)라고 부른다. hSCF는 적혈구나 백혈구를 비롯한 조혈세포발육과정의 초기단계에서 다능성조혈줄기세포/시원세포(haematopoietic stem cell/progenitor cell: HSC/HPC)의 분열증식과 분화를 촉진하고 비대세포의 성장과 흑색소세포의 성장과정을 조절하는 작용을 하므로 림상에서 화학물질이나 방사선과 같은 각종 원인에 의한 재생불량성빈혈과 백혈병, 적혈구감소증과 같은 조혈계통질환치료와 암치료, 피부개선 등에 효과적인 치료약물[1-4]로 주목되고있다.

우리는 사람태아신장조직의 cDNA로부터 hSCF유전자를 얻어내어 대장균발현운반체인 pET30c(+)에 삽입하고 그 정확성을 제한효소절단법과 유전자배열분석으로 확인하였다.

### 재료와 방법

재료 사람태아신장조직에서 RNA를 분리하고 역전사법으로 cDNA를 얻은 다음 PCR 증폭용DNA형틀로 리용하였다.

시약으로는 Trizol(《Invitrogen》), Isopropylalcohol(《Promega》), 역전사반응키트(《Fermentas》), rTaq 효소와 PCR반응키트(《Takara》), DNA회수키트(《TianGen》), 핵산분자량표식자(《Fermentas》) 등을 리용하였다.

방법 PCR를 위한 프라이머는 NCBI자료기지에서 hSCF유전자(Gene ID: 4254, 등록번호 NM\_000899.4와 NM\_003994.5)의 배열을 탐색하고 정방향프라이머에 *Sal* I, 역방향프라이머에는 *Not* I절단점을 덧붙여 설계하였다.(표)

표. 사람줄기세포인자유전자의 PCR를 위한 프라이머배열

프라이머종류	염기배열	길이/bp
정방향프라이머	GCGT <u>CGACA</u> ATGAAGAAGACACAAACTTGG <i>Sal</i> I	30
역방향프라이머	CCGCGGCGCGCTTACACTTCTTGAAACTCTC <i>Not</i> I	30

PCR는 50 $\mu$ L 반응계로 예비반응 95 $^{\circ}$ C 5min, 변성 95 $^{\circ}$ C 30s, 아닐링 58 $^{\circ}$ C 30s, 연장 72 $^{\circ}$ C 60s, 72 $^{\circ}$ C 10min, 반복차수  $n=30$ 으로 하였다. PCR산물은 1% 아가로스겔 전기영동으로 확인하였으며 DNA회수는 선행방법[5]대로 진행하였다.

PCR로 증폭한 hSCF유전자를 대장균발현운반체인 pET30c(+)의 *Sal* I와 *Not* I절단점 사이에 삽입시키고 제한효소검정과 유전자분석을 진행하였다. 제한효소검정에서 *Nco* I와 *Not* I+*Apa* I의 반응완충액은 《Tango buffer》, *Pst* I+*Not* I와 *Sal* I+*Not* I의 반응완충액은 《O buffer》를 리용하였고 반응조건은 37 $^{\circ}$ C 수욕에서 2h동안 진행하였다. 유전자배열분석은 전문배열분석소에 의뢰하여 진행하였고 결과를 NCBI자료기지에서 BLAST검정하였다.

## 결과 및 논의

### 1) hSCF유전자의 PCR증폭

먼저 각이한 PCR완충액(10 $\times$ PCR, 2 $\times$ GCI, 2 $\times$ GCII)에서 사람태아신장조직의 cDNA를 형틀로 하여 hSCF유전자에 대한 PCR를 진행하였다.(그림 1)

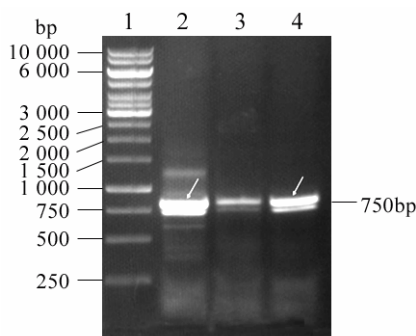


그림 1. 각이한 PCR완충액에서 hSCF유전자의 PCR결과  
1-분자량표식자, 2-10 $\times$ PCR,  
3-2 $\times$ GCI, 4-2 $\times$ GCII

그림 1의 전기영동상에서 보는바와 같이 hSCF유전자로 예측되는 밝은 띠는 750bp 구역에서 정확히 나타났으며 그 세기는 10 $\times$ PCR완충액에서 더 선명하였다. 즉 hSCF유전자의 PCR에는 10 $\times$ PCR완충액이 더 적합하다는 것을 알 수 있다. 그런데 목적하는 750bp 구역에는 약간의 크기차이를 가지는 두가지의 띠들이 동시에 나타났다. 사실 NCBI자료기지의 hSCF유전자에는 5'-말단과 3'-말단이 꼭같은 크기가 738bp인 hSCFa와 822bp인 hSCFb가 등록되어있으므로 영동에서 나타난 두가지 띠들은 hSCFa와 hSCFb유전자일 가능성이 높다.

그러므로 PCR로 증폭한 DNA를 회수하여 10 $\times$ PCR완충액에서 같은 프라이머를 리용하여 다시 2차PCR를 진행하였다.(그림 2의 ㄱ))

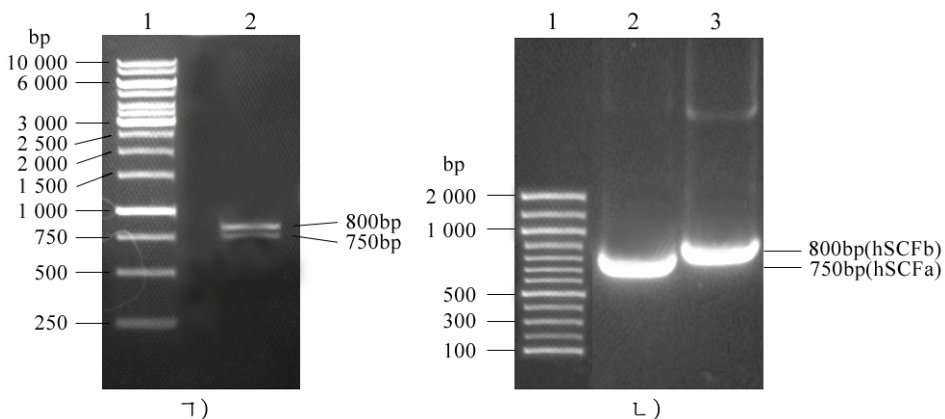


그림 2. hSCF유전자의 2차PCR(ㄱ))와 3차PCR결과(ㄴ))

1-분자량표식자, ㄱ)에서 2-2차PCR증폭산물,  
ㄴ)에서 2-750bp 근방의 토막, 3-800bp 근방의 토막

그림 2의 1)에서 보는것처럼 2차PCR에서도 750bp 구역에서 두가지 띠가 갈라져 나타났다. 영동시간을 더 늘여 두 띠를 명백히 갈라 회수하여 이것들을 서로 다른 형틀로 다시 3차PCR를 진행한 결과 두 종류의 hSCF유전자들은 여전히 밝은 띠로 나타났다.

이로부터 크기가 각각 738, 822bp(영동에서 실지크기 757, 841bp)인 해당 위치의 띠들을 hSCFa와 hSCFb유전자라고 보고 따로 회수하여 보관하였다.

## 2) hSCF유전자에 대한 제한효소검정

hSCF유전자배열을 DNAMAN프로그램으로 제한효소절단분석을 하면 hSCFa유전자에는 566bp 위치에 *Nco* I절단점과 88bp 위치에 *Pst* I 절단점이, hSCFb유전자에는 650bp 위치에 *Nco* I절단점과 88bp 위치에 *Pst* I 절단점이 각각 1개씩 들어있다.

먼저 제한효소 *Nco* I로 hSCFa와 hSCFb유전자에 대한 검정을 진행하였다.(그림 3)

그림 3에서 보는바와 같이 제한효소처리후 hSCFa에서 566bp와 172bp(영동에서 실지크기 575bp와 182bp), hSCFb에서 650bp와 172bp(영동에서 실지크기 559bp와 182bp)크기의 *Nco* I 절단토막들이 예상한 위치에서 정확히 관찰되었다.

다음으로 hSCFa와 hSCFb유전자를 대장균발현운반체 pET30c(+)에 삽입시키고 유전자안의 절단점(*Pst* I)과 유전자삽입점(*Sal* I+*Not* I), pET30c(+)운반체안의 절단점(*Apa* I)에 의한 제한효소검정을 진행하였다.(그림 4)

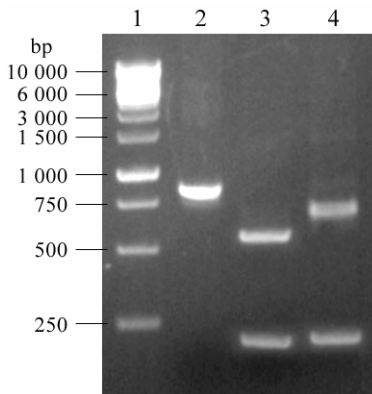


그림 3. hSCF유전자에 대한

*Nco* I검정결과

1-분자량표식자, 2-hSCFb유전자  
(대조), 3, 4-*Nco* I처리한  
hSCFa와 hSCFb유전자

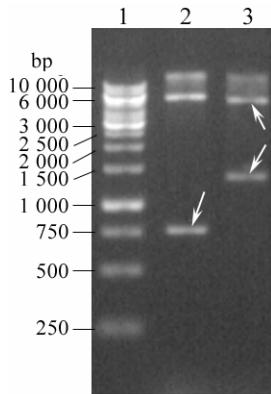


그림 4. pET30c-hSCF에 대한 제한효소검정결과

1-분자량표식자, 2-pET30c-hSCFb/(*Sal* I+*Not* I), 외부절단: 5 400,  
800bp, 3-pET30c-hSCFb/(*Not* I+*Apa* I), 외부절단: 4 900, 1 300bp,  
4-pET30c-hSCFb/(*Pst* I+*Not* I), 내부절단: 5 480, 740bp,  
5-pET30c-hSCFa/(*Sal* I+*Not* I), 외부절단: 5 400, 740bp

그림 4에서 보는바와 같이 유전자안의 절단점과 유전자삽입점, 운반체안의 절단점들이 모두 정확히 확인되었다. 즉 hSCFb를 삽입한 플라스미드 pET30c-hSCFb에 대한 제한효소검정결과 *Sal* I+*Not* I에 의하여 0.8kb의 절단토막이, *Not* I+*Apa* I에 의하여 1.3kb의 절단토막이, *Pst* I+*Not* I에 의하여 0.74kb의 절단토막이 정확한 위치에서 나타났다.

한편 hSCFa를 삽입한 pET30c-hSCFa에 대한 제한효소검정결과 *Sal* I+*Not* I에 의하여서도 750bp 근방에서 절단토막이 정확히 나타났다. 이것은 우리가 얻은 hSCF유전자들은 모두 제한효소 *Nco* I와 *Pst* I의 절단점을 가지고있으며 재조합플라스미드 pET30c(+)에도 hSCFa와 hSCFb유전자가 *Sal* I와 *Not* I사이에 정확히 삽입되었다는것을 보여준다.

## 3) hSCF유전자에 대한 염기배열분석

염기배열 분석용 프라이머로 *hSCFa*와 *hSCFb*에서는 hSCF유전자 프라이머를, pET30c-hSCF에서는 T7프로모터를 리용하여 배열 분석을 진행하였다.

*hSCFa*

ATGAAGAAGACACAACTTGGATTCTCACTTGCATTTATCTTCAGCTGCTCCTATTTAATCCTCTCGTCA  
AAACTGAAGGGATCTGCAGGAATCGTGTGACTAATAATGTAAAAGACGTCACCTAAATTGGTGGCAAATCT  
TCCAAAAGACTACATGATAACCCCTCAAATATGTCCCCGGGATGGATGTTTTGCCAAGTCATTGTTGGATA  
AGCGAGATGGTAGTACAATTGTCTAGACAGCTTGACTGATCTTCTGGACAAGTTTTCAAATATTTCTGAAG  
GCTTGAGTAATTATTCCATCATAGACAACTTGTGAATATAGTGGATGACCTTGTGGAGTGCGTGAAAGA  
AACTCATCTAAGGATCTAAAAAATCATTCAAGAGCCCAGAACCAGGCTCTTTACTCCTGAAGAATTC  
TTTAGAATTTTAAATAGATCCATTGATGCCTTCAAGGACTTTGTAGTGGCATCTGAACTAGTGATTGTG  
TGGTTTCTTCAACATTAAGTCCTGAGAAAGGGAAGGCCAAAAATCCCCCTGGAGACTCCAGCCTACACTG  
GGCAGCCATGGCATTGCCAGCATTGTTTTCTCTTATAATTGGCTTTGCTTTTGGAGCCTTATACTGGAAG  
AAGAGACAGCCAAGTCTTACAAGGGCAGTTGAAAATATACAAATTAATGAAGAGGATAATGAGATAAGTA  
TGTTGCAAGAGAAAGAGAGAGAGTTTCAAGAAGTGTA

*hSCFb*

ATGAAGAAGACACAACTTGGATTCTCACTTGCATTTATCTTCAGCTGCTCCTATTTAATCCTCTCGTCA  
AAACTGAAGGGATCTGCAGGAATCGTGTGACTAATAATGTAAAAGACGTCACCTAAATTGGTGGCAAATCT  
TCCAAAAGACTACATGATAACCCCTCAAATATGTCCCCGGGATGGATGTTTTGCCAAGTCATTGTTGGATA  
AGCGAGATGGTAGTACAATTGTCTAGACAGCTTGACTGATCTTCTGGACAAGTTTTCAAATATTTCTGAAG  
GCTTGAGTAATTATTCCATCATAGACAACTTGTGAATATAGTGGATGACCTTGTGGAGTGCGTGAAAGA  
AACTCATCTAAGGATCTAAAAAATCATTCAAGAGCCCAGAACCAGGCTCTTTACTCCTGAAGAATTC  
TTTAGAATTTTAAATAGATCCATTGATGCCTTCAAGGACTTTGTAGTGGCATCTGAACTAGTGATTGTG  
TGGTTTCTTCAACATTAAGTCCTGAGAAAGATTCCAGAGTCAGTGTCACAAAACCATTTATGTTACCCCC  
TGTTGCAGCCAGCTCCCTTAGGAATGACAGCAGTAGCAGTAATAGGAAGGCCAAAAATCCCCCTGGAGAC  
TCCAGCCTACACTGGGCAGCCATGGCATTGCCAGCATTGTTTTCTCTTATAATTGGCTTTGCTTTTGGAG  
CCTTATACTGGAAGAAGAGACAGCCAAGTCTTACAAGGGCAGTTGAAAATATACAAATTAATGAAGAGGA  
TAATGAGATAAGTATGTTGCAAGAGAAAGAGAGAGAGTTTCAAGAAGTGTA

그림 5. *hSCFa*(738bp)와 *hSCFb*(822bp)의 염기배열 분석 결과

*hSCF*에 대한 염기배열 분석 결과를 NCBI자료기지에서 BLAST검색한 결과 GeneBank의 NM\_000899.4와 NM\_003994.5에 등록되어 있는 *hSCFb*와 *hSCFa*의 배열과 완전히 일치하였다.

이로부터 사람태아신장조직의 cDNA를 형틀로 PCR하여 얻은 hSCF유전자는 정확하며 재조합플라즈미드 pET30c-hSCF에 hSCF유전자는 정확히 삽입되었다는 것을 알 수 있다.

## 맺 는 말

사람태아신장조직의 cDNA를 형틀로 하고 10×PCR완충액에서 PCR를 진행하여 크기가 738bp와 822bp인 두 종류의 hSCF유전자를 얻었다.

hSCF유전자와 재조합운반체 pET30c-hSCF에 대한 제한효소검정과 유전자배열 분석에 의하면 두 종류의 hSCF유전자는 재조합플라즈미드 pET30c-hSCF에 정확히 삽입되었다.

## 참 고 문 헌

- [1] S. Asgharil et al.; Advanced Pharmaceutical Bulletin, 4, 1, 91, 2014.
- [2] C. Balsa et al.; Journal of Biotechnology, 152, 1, 2011.
- [3] E. R. Gagari et al.; European Journal of Oral Sciences, 114, 409, 2006.
- [4] Lin Su et al.; Protein Expression and Purification, 47, 477, 2006.
- [5] 章静泼 等; 细胞生物学实验指南, 科学出版社, 750~826, 2008.

주체104(2015)년 11월 5일 원고접수

## Cloning of Human Stem Cell Factor's(hSCF) Gene

*Kim Yong Ho, Jo Chung Won*

Two kinds of hSCF gene whose size are 738bp and 822bp was obtained from cDNA of human fetal kidney by PCR method using 10×PCR buffer.

Results of restriction enzyme test of hSCF gene and sequencing analysis about recombinant plasmid pET30c-hSCF show that two kinds of hSCF genes are all correctly inserted into recombinant plasmid pET30c-hSCF.

Key words: hSCF gene, human fetal kidney, recombinant plasmid