

## Ezrin siRNA발현용재조합운반체의 제작

리 호 남

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《의학과학부문에서는 이미 이룩된 성과에 토대하여 유전자공학, 면역학, 분자생물학 분야를 개척하며 전자공학과 레이자공학을 비롯한 최신과학기술의 성과를 치료예방사업에 널리 받아들이기 위한 연구사업을 강화하여야 하겠습니다.》(《김정일선집》증보판 제11권 82페이지)

Ezrin은 세포골격단백질과 세포막단백질사이의 호상작용을 중개하는 단백질의 하나이다.[1-5] 이 단백질은 사람몸에서 세포증식, 접착, 운동성 등 여러가지 기능수행에 참가[3, 5]하며 취장암, 자궁암을 비롯한 여러가지 암들에서 과잉발현된다는 연구결과들이 발표[1, 3, 6]되고있다.

암세포의 증식과 전이에서 Ezrin이 노는 역할을 해명하기 위해서는 Ezrin의 발현을 완전히 차단하거나 억제한 Ezrin너카우드 또는 Ezrin너크다운암세포를 만들고 그 증식 및 침습특성을 보아야 한다.

이로부터 우리는 Ezrin의 siRNA 및 siRNA머리핀구조를 설계합성하고 그것을 발현운반체에 태운 재조합Ezrin siRNA발현운반체를 제작하였다.

### 재료와 방법

Ezrin의 siRNA와 운반체에 삽입하는 머리핀구조는 Ezrin의 유전자배열과 siRNA 및 siRNA머리핀구조설계원칙에 기초하여 Block-iT RNAi Designer프로그램을 리용하여 설계하였다.

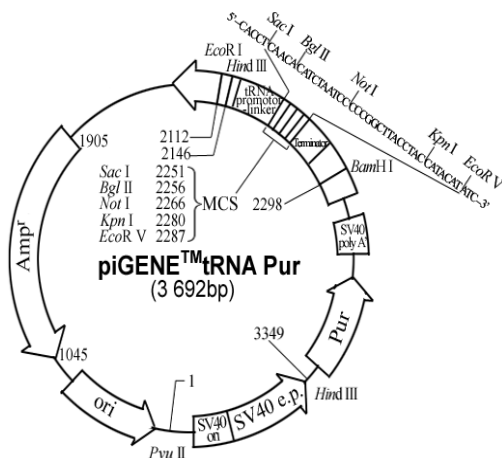


그림 1. siRNA발현용운반체 piGENE™tRNAPur의 지도

Ezrin siRNA머리핀구조를 삽입하는 운반체로서는 siRNA발현용플라스미드운반체인 piGENE™ tRNAPur(그림 1, 이하 간단히 pPur라고 표기)를 리용하였다. pPur운반체의 절단반응에 리용한 제한효소는 Sac I과 Kpn I이며 반응체계와 조건은 다음과 같다.

제한효소의 반응체계 정제한 플라스미드DNA 30μL(OD<sub>600</sub>값이 1.2일 때까지 배양한 *E. coli* DH5α 배양액 4mL로부터 플라스미드분리정제시약키트(《AxyPrep 质粒DNA小量试剂合》)를 리용하여 분리정제한 최종산물 50μL중 30μL를 리용), 10×완충액 5μL, 재증류수 13μL, Sac I 1 μL, Kpn I 1μL.

제한효소의 반응조건 37℃의 수욕에서 하루밤(약 12h) 반응시킨다.

재조합용 DNA 토막의 분리 아가로스겔로부터의 DNA 회수시약(《TIANGel Midi Purification Kit》)을 리용하여 pPur 플라스미드 제한효소절단 반응산물의 아가로스겔 전기영동산물로부터 재조합에 필요한 DNA 토막을 분리하였다.

합성유전자의 아닐링반응 의미사슬과 반의미사슬 각각으로 합성한 Ezrin siRNA 머리핀 구조유전자의 아닐링반응은 다음과 같이 진행시켰다.

100μmol/L로 푼 의미사슬과 반의미사슬을 각각 5μL씩 취하고 여기에 아닐링 완충액(또는 재증류수) 40μL를 첨가하였다. 다음 PCR 장치에서 다음과 같은 프로그램으로 반응을 진행하여 아닐링반응을 완성하였다.

95℃에서 3min, -0.1℃/s의 속도로 72℃까지 랭각, 72℃에서 60min, -0.1℃의 속도로 25℃까지 랭각, 25℃에서 2min, 4℃의 조건에 방치.

아닐링된 Ezrin siRNA 머리핀 구조와 pPur 제한효소절단 토막과의 재조합반응은 T4 DNA 리가제를 리용하여 진행하였으며 그 반응체제와 반응조건은 다음과 같다.

재조합반응체제 pPur(제한효소절단 토막, 선형) 1μL(우의 제한효소절단 토막 분리 정제 단계에서 얻은 30μL의 산물 중 1μL), siRNA 머리핀 구조(아닐링 산물) 4μL, 10×T4 DNA 리가제 완충액 1μL, T4 DNA 리가제 1μL, 재증류수 3μL.

재조합반응조건 16℃에서 하루밤(약 12h 정도) 반응시킨다.

재조합과정과 정확성판정 재조합 반응산물(10μL)을 전부 200μL의 감수태대장균 *E. coli* DH5α에 형질 전환하고 42℃에서 90s 동안 온도유발한 다음 미리 37℃로 덤힌 항생소가 포함되어 있지 않은 LB 액체배지 1mL를 첨가하여 37℃, 200r/min에서 45min 동안 진탕배양한 다음 그중 100μL를 암피실린(Amp)이 포함된 고체 LB 배지(Amp 100μg/mL, 우무농도 1.5%)에 도말하고 37℃의 정온기에서 24h 동안 정치배양하여 배지 위에 생겨난 균무지들을 관찰하였다.

재조합 정확성 판정을 위한 균무지 PCR 반응에 필요한 프라이머는 siRNA 머리핀 구조 전후의 pPur 배열 정보에 기초하여 Primer Premier 5.0 프로그램을 리용하여 설계하였다.

## 결과 및 논의

### 1) Ezrin siRNA 및 머리핀 구조의 설계

Ezrin siRNA의 설계 설계한 Ezrin siRNA 후보 배열들은 표 1과 같다.

표 1. 설계한 Ezrin siRNA 후보 배열

No.	시작위치	배열(DNA)	GC 함량/%	번역억제효율
1	270	GCAATCCAGCCAAATACAA	42.31	+++++
2	352	GCCTCCACTATGTGGATAA	47.37	++++
3	353	CCTCCACTATGTGGATAAT	42.11	+++++
4	356	CCACTATGTGGATGGTAAA	31.58	++++
5	388	GGCTGAAGCTGGATAAGAA	47.37	+++++
6	879	GCCCTTGGACTGAATATTT	42.11	++++
7	881	CCTTGGACTGAATATTTAT	31.58	+++++
8	931	GCTTTCCTTGGAGTGAAAT	42.11	++++
9	940	GGAGTGAAATCAGGAACAT	42.11	+++++
10	1072	GCAACCATGAGTTGTATAT	36.85	+++++

표 1에서 보는바와 같이 적합한 Ezrin siRNA 후보배열의 수는 10개인데 Ezrin 너크다운 가능성과 시작배열의 위치 및 GC 함량을 고려하여 3번 후보배열을 선택하고 그에 기초하여 Ezrin siRNA 머리핀 구조를 설계하였다.

Ezrin siRNA 머리핀 구조의 설계 siRNA 머리핀 구조는 일반적으로 양쪽 말단에 재조합반응에 유리한 제한효소절단부위를 도입하는 것과 함께 의미사슬(사슬방향 →), 연결자배열, 반의미사슬(사슬방향 ←)의 구조로 설계한다. 리용하는 pPur 운반체의 다중클론화부위에 *Sac* I과 *Kpn* I 절단부위가 존재하므로 Ezrin siRNA 머리핀 구조의 양쪽 말단에 *Sac* I과 *Kpn* I의 절단부위를 도입하였으며 연결자배열은 mRNA 전사수준억제물이 높은 것으로 알려진 9염기 연결자배열을 도입하여 설계하였다. (총염기수 51bp, 그림 2)

*Sac* I 절단부위

5'-CCTCCACTATGTGGATAATTTCAAGAGAATTATCCACATAGTGGAGG**GTAC**-3'

3'-TCGAGGAGGTGATACACCTATTAAAGTTCTCTTAATAGGTGTATCACCTCC-5'

*Kpn* I 절단부위

그림 2. 설계한 Ezrin siRNA 머리핀의 구조

사선강조체로 표시한 것은 제한효소인식 및 절단배열, 한 밑줄로 표시한 배열은 Ezrin siRNA의 의미사슬배열, 두 밑줄로 표시한 배열은 Ezrin siRNA의 반의미사슬배열, 강조체로 표시한 배열은 연결자배열임.

리용하는 pPur 운반체의 다중클론화부위 뒤부분에 tRNA의 전사를 담당한 RNA 폴리메라제 III의 전사종결배열이 존재하므로 Ezrin siRNA 머리핀 구조의 끝부분에 전사종결배열을 따로 삽입하지 않았다.

## 2) 운반체의 준비 및 제한효소절단

-20℃에 보관하였던 플라스미드 운반체 pPur 1μL를 200μL의 감수태대장균 *E. coli* DH5α에 형질전환시키고 42℃에서 90s 동안 온도유발한 다음 미리 37℃로 덥힌 항생소가 포함되어 있지 않는 LB 액체배지 1mL를 첨가하고 37℃, 200r/min에서 45min 동안 진탕배양한 다음 100μL를 취하여 암피실린이 100μg/mL 포함된 LB 고체배지(우유 1.5%)에 도말하였다. 그것을 37℃의 정온기에서 24h 동안 정치배양하고 평판배지 위에 생겨난 단독균무지를 LB 액체배지(Amp 100μg/mL) 5mL에 접종

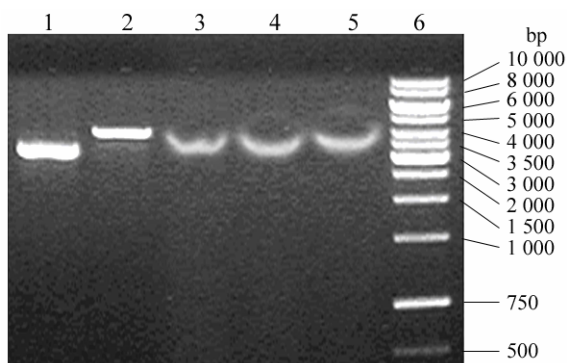


그림 3. 제한효소절단산물 및 연결반응산물의 2% 아가로스겔 전기영동결과

1-pPur, 2-제한효소절단산물, 3-5는 연결 반응산물, 6-DNA 분자량표식자

하고 37℃, 200r/min에서 OD<sub>600</sub> 값이 1.2에 이를 때까지 진탕배양하였다. 플라스미드 분리정제시약키트(《AxyPrep 质粒DNA小量试剂合》)를 리용하여 배양액 4mL로부터 50μL의 플라스미드정제물을 얻었다.

플라스미드정제물 30μL를 제한효소 *Sac* I과 *Kpn* I을 리용하여 절단하고 아가로즈겔로부터의 DNA 회수시약키트(《TIANGel Midi Purification Kit》)를 리용하여 분리정제한 다음 2% 아가로즈겔에서 전기영동한 결과는 그림 3과 같다.

그림 3에서 보는바와 같이 제한효소절단

산물은 순수하게 분리정제되었다. 예상되는 제한효소절단산물의 길이는 제한효소절단반응 전의 pPur보다 약 30bp 정도 작아지는데(그림 1) 아가로스겔 전기영동상에서는 오히려 그 이동도가 pPur보다 작아졌다. 이것은 제한효소절단반응에 의해 고리형으로부터 선형으로 변화되었기 때문이라고 볼 수 있다.

### 3) 연결반응 및 연결반응산물의 정확성평가

siRNA 머리핀 구조의 아닐링 반응산물과 pPur의 *Sac* I 및 *Kpn* I의 제한효소절단 반응산물과의 재조합 반응을 진행하고 그 산물을 2% 아가로스겔에서 전기영동(120V, 40min)한 결과는 그림 3의 3-5와 같다.

그림에서 보는바와 같이 연결 반응산물의 이동도는 pPur보다는 작고 pPur의 *Sac* I과 *Kpn* I의 제한효소절단산물보다는 크다. 제한효소반응에 의해 절단되어 나가는 DNA 배렬과 siRNA 머리핀 구조의 크기로부터 고려하여 보면 연결 반응산물의 크기는 pPur보다는 약 20bp 정도 크고 pPur의 제한효소절단산물보다는 약 50bp 정도 크다. 그러나 연결 반응산물은 고리형인 것으로 하여 제한효소절단산물보다 이동도가 커진다고 볼 수 있다.

연결 반응산물(10 $\mu$ L)을 *E. coli* DH5 $\alpha$ 에 형질 전환하고 암피실린 포함 고체 LB 배지에서 선발하면 평판 배지 위에 많은 단독 균무지들이 생겨났다. 리용한 pPur 운반체에 암피실린 저항성 유전자가 있으므로 평판 배지 위에 생겨난 단독 균무지들은 pPur나 그것의 제한효소절단산물 또는 재조합산물이 형질 전환된 *E. coli* DH5 $\alpha$  세포라고 볼 수 있다.

단독 균무지들 속에 들어있는 운반체가 정확히 재조합된 것인가를 확인하기 위하여 균무지 PCR 반응을 진행하였다.

siRNA 머리핀 구조 전후의 pPur 배렬 정보에 기초하여 Primer Premier 5.0 프로그램을 리용하여 설계한 균무지 PCR를 위한 정방향 및 역방향 프라이머는 다음과 같다.

정방향 프라이머 5'-CCGTTGGTTTCCGTAGTGTAGTGG-3',

역방향 프라이머 5'-CACACCTCCCCCTGAACCTGAAAC-3'.

평판 배지 위에 생겨난 단독 균무지 15개를 선택하여 균무지 PCR 반응을 진행한 결과는 그림 4와 같다.

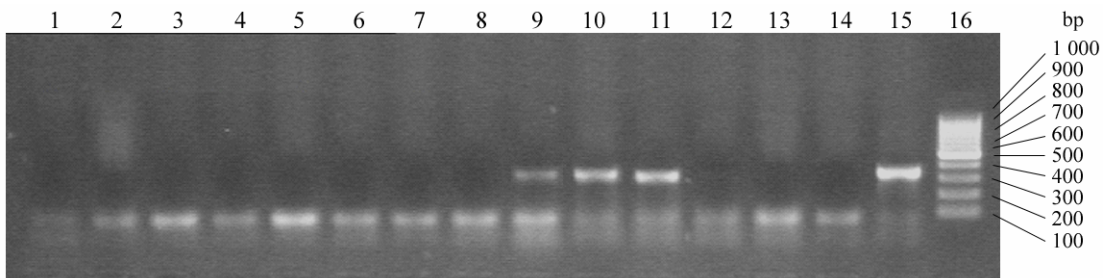


그림 4. 양성 클론의 재조합 정확성 판정을 위한 균무지 PCR 결과  
1-15는 각각 Amp 포함 고체 LB 배지 위에 생겨난 단독 균무지들, 16은 DNA 분자량표식자

그림 4에서 보는바와 같이 15개의 단독 균무지 중 4개의 균무지만이 균무지 PCR 적으로 양성이었다. 이 가운데서 3개의 단독 균무지(E10, E11, E15)를 선택하여 배양한 다음 플라스미드 분리 정제 시약 키트를 리용하여 분리 정제하고 배렬 분석한 후 Vector NTI의 Align 프로그램을 리용하여 Ezrin siRNA 머리핀 구조의 배렬과 일치성을 검정한 결과는 표 2와 같다.

표 2. 염기배열분석결과와 Ezrin siRNA머리핀구조배열과의 일치성검정결과

균무지번호	배열분석결과
10	AGCT CCTCCACTATGTGGATAATTTCAAGAGAATTATCCACATAGTGGAGGGTACCATA
11	AAAA CCTCCTTACAAA TGTGGT--ATGGCT-GATTATGATCCTCTAGAGTCGGTGGGCTTCGG
15	AGCT CCTCCACTATGTGGATAATTTCAAGAGAATTATCCACATAGTGGAGGGTACCATA

표 2에서 보는바와 같이 배열분석결과 염기탈락이나 삽입 등이 없이 siRNA머리핀구조가 정확히 재조합된것은 15번 균무지뿐이었다.

### 맺 는 말

Ezrin의 siRNA와 siRNA머리핀구조를 설계합성하고 그것을 siRNA발현용플라스미드 운반체 piGENE<sup>TM</sup>tRNAPur에 재조합하였다.

### 참 고 문 헌

- [1] Kaori Ohtani et al.; Cancer Letters, **179**, 79, 2002.
- [2] Kaori Ohtani et al.; Cancer Letters, **147**, 31, 1999.
- [3] Zhi-Qiang Zhong et al.; Asian Pacific J. Cancer Prev., **13**, 3781, 2012.
- [4] Benjamin Bruce et al.; Clin. Exp. Metastasis, **24**, 69, 2007.
- [5] S. H. Ross et al.; J. Cell Sci., **124**, 1808, 2011.
- [6] Naoaki Akisawa et al.; Biochemical and Biophysical Research Communications, **258**, 395, 1999.

주체104(2015)년 5월 5일 원고접수

## Construction of Recombinant Vector for the Expression of Ezrin siRNA

*Ri Ho Nam*

We designed and synthesized the siRNA and siRNA hair-pin structure of Ezrin, and recombined it into the piGENE<sup>TM</sup>tRNAPur which is typical plasmid vector for siRNA expression.

Key words: Ezrin, siRNA, recombinant vector