

## 초어성장호르몬유전자발현운반체의 제작에 대한 연구

현남철, 주창성, 장성훈

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

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

세계적으로 성장호르몬유전자를 리용하여 성장속도가 빠른 물고기를 얻기 위한 연구가 많이 진행되고있다.[1, 3-5]

우리는 초어 $\beta$ 악틴프로모터부위와 초어성장호르몬구조유전자를 리용하여 물고기기원의 유전자전이발현운반체를 만들기 위한 연구를 하였다.

### 재료와 방법

출발플라즈미드 초어 $\beta$ 악틴프로모터부위와 성장호르몬구조유전자부위를 pMD-18T-운반체에 재조합하여 클론화한 재조합플라즈미드들인 pTgc $\beta$ A(4 303bp)와 pTgcGH(5 325bp)를 리용하였다.

제한효소절단반응 재조합플라즈미드를 해당 제한효소로 처리하였다.

제한효소절단반응용액(50 $\mu$ L)의 조성은 다음과 같다.

플라즈미드DNA 10 $\mu$ L, 다중효소반응완충용액(10 $\times$ ) 5 $\mu$ L(《TAKARA》), 제한효소I 1 $\mu$ L(《TAKARA》), 제한효소II 1 $\mu$ L(《TAKARA》), ddH<sub>2</sub>O 33 $\mu$ L.

혼합된 반응용액을 37 $^{\circ}$ C의 수욕에 12h동안 방치한 다음 0.8% 아가로스겔전기영동을 진행하여 효소절단반응결과를 확인하였다. 목적하는 크기의 DNA단편은 겔회수키트(D2500/D2501-01 《OMEGA》)로 회수하여 다음실험에 리용하였다.

DNA단편연결반응 DNA단편들의 연결반응용액(25 $\mu$ L)의 조성은 다음과 같다.

10 $\times$ T4 DNA리가제완충용액 2.5 $\mu$ L(《TAKARA》), 운반체DNA 1 $\mu$ L, DNA단편들 5 $\mu$ L, T4 DNA리가제 1 $\mu$ L(《TAKARA》), ddH<sub>2</sub>O 16.5 $\mu$ L.

혼합된 반응용액을 16 $^{\circ}$ C의 수욕에서 하루밤동안 반응시킨 다음 0.8% 아가로스겔전기영동을 진행하여 DNA연결반응결과를 확인하였다.

성장호르몬발현운반체의 제작과 확인[2] 제작한 초어성장호르몬유전자발현운반체를 *E. coli* DH5 $\alpha$ 에 형질전환하여 클론화하고 플라즈미드를 추출한 다음 전문배열분석기관에서 발현운반체염기배열을 분석하였다. 배열분석에 리용된 프라이머는 T-운반체의 프라이머들(M13-47, RV-M)이었다. 밝혀진 배열들을 Vector NTI를 리용하여 조립한 다음 BLAST기능을 리용하여 T-운반체에 삽입된 초어 $\beta$ 악틴프로모터배열과 초어성장호르몬유전자배열의 정확성을 확인하였다.

## 결과 및 논의

### 1) 성장호르몬발현운반체제작을 위한 제한효소절단반응 및 단편분리

먼저 초어 $\beta$ 악틴프로모터배열부위가 재조합된 플라스미드 pTgc $\beta$ A(4 303bp)를 제한효소 *Nco*I과 *Eco*RI로 동시에 절단하였다. 결과 초어 $\beta$ 악틴프로모터배열부위가 정방향으로 재조합된 플라스미드에서는 크기가 각각 1 639, 2 664bp인 2개의 토막이 생겨났으며 역방향으로 재조합된 플라스미드에서는 각각 37, 4 266bp크기의 단편이 생겨났다.(그림 1) 우리는 역방향으로 재조합된 플라스미드에서 4 266bp크기의 단편을 발현운반체제작에 리용하였다.

다음으로 우리는 초어성장호르몬구조유전자배열이 재조합된 플라스미드 pTgcGH(5 325bp)를 제한효소들인 *Nco*I과 *Sac*I 그리고 *Eco*RI과 *Sac*I로 각각 절단하였다. 결과 초어성장호르몬유전자배열이 역방향으로 재조합된 플라스미드에서는 *Nco*I과 *Sac*I로 처리하였을 때 크기가 각각 833, 1 011, 1 844, 3 481, 4 314, 4 492bp인 6개의 단편이 생겨났으며 *Eco*RI와 *Sac*I로 처리하였을 때에는 1 651, 3 674bp크기의 단편이 생겨났다.(그림 2) 정방향으로 재조합된 플라스미드에서는 *Nco*I과 *Sac*I로 처리하였을 때 크기가 각각 841, 1 003, 1 844, 3 481, 4 322, 4 484bp인 6개의 단편이 생겨났으며 *Eco*RI와 *Sac*I로 처리하였을 때에는 각각 1 039, 4 286bp크기의 단편이 생겨났다.(그림 3) 우리는 역방향으로 재조합된 플라스미드에서 *Nco*I과 *Sac*I에 의하여 얻어진 1 011bp크기의 단편과 *Eco*RI와 *Sac*I에 의하여 얻어진 1 651bp크기의 단편을 회수하여 발현운반체제작에 리용하였다.

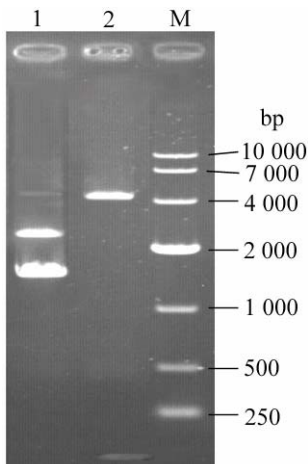


그림 1. pTgc $\beta$ A(4 303bp)의 제한효소처리산물전기영동상 (*Nco*I과 *Eco*RI의 동시처리)

1-정방향, 2-역방향; M은 DNA분자량표식자 (DL10000)

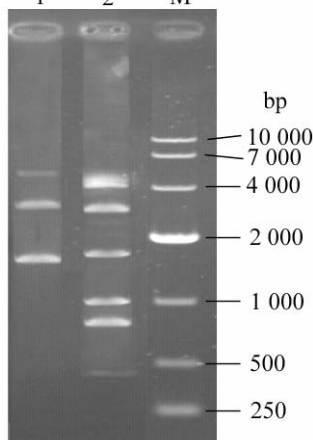


그림 2. pTgcGH(5 325bp)의 제한효소처리산물전기영동상 (역방향)

1-*Eco*RI와 *Sac*I처리, 2-*Nco*I과 *Sac*I 처리; M은 DNA분자량 표식자(DL10000)

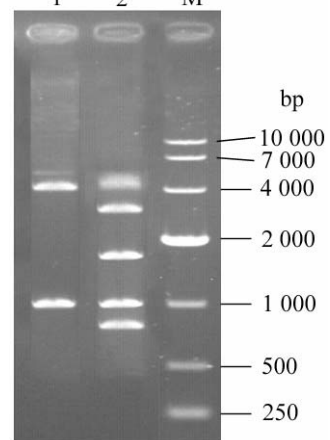


그림 3. pTgcGH(5 325bp)의 제한효소처리산물전기영동상 (정방향)

1-*Eco*RI와 *Sac*I처리, 2-*Nco*I과 *Sac*I처리; M은 DNA분자량 표식자(DL10000)

### 2) 초어성장호르몬유전자발현운반체의 제작과 확인

초어성장호르몬유전자발현운반체의 제작공정을 보면 그림 4와 같다.

우리는 위에서 회수정제하여 얻은 4 266, 1 011, 1 651bp의 DNA단편들을 T4 DNA리가제로 연결시켜 초어성장호르몬유전자발현운반체 pTgc $\beta$ AGH를 제작하였다.(그림 5)

그림 5에서 보는바와 같이 초어성장호르몬유전자발현운반체 pTgc $\beta$ AGH에 해당하는 띠가 6 928bp위치에서 나타났다.

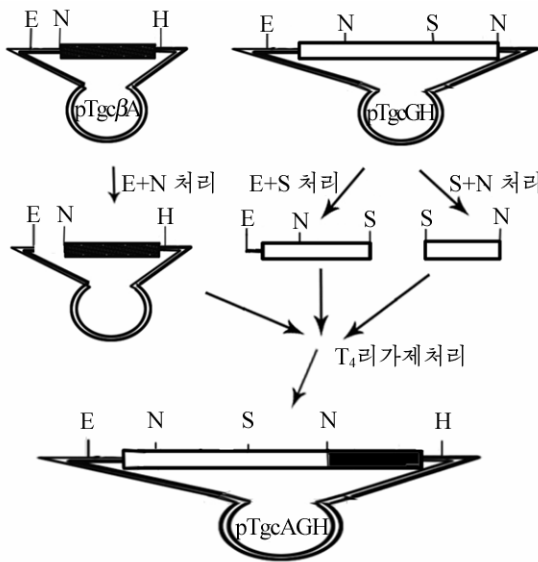


그림 4. 초어성장호르몬유전자발현 카세트의 제작공정도식

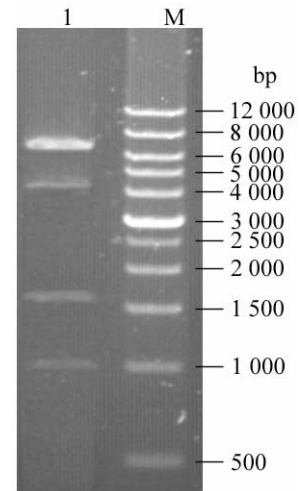


그림 5. pTgc $\beta$ AGH(6 928bp)의 전기영동상

1-pTgc $\beta$ AGH(6 928bp); M은 분자량표식자

우리는 제작한 초어성장호르몬유전자발현운반체를 *E. coli* DH5 $\alpha$ 에 형질전환하여 클론화하고 플라스미드를 추출한 다음 전문배열분석기관에 의뢰하여 발현운반체배열을 분석하였다. 분석된 배열을 BLAST기능을 리용하여 검사한 결과 운반체에 들어있는 초어 $\beta$ 악틴프로모터배열과 초어성장호르몬구조유전자배열은 예상하였던 염기배열들과 완전히 일치하였다.

초어성장호르몬유전자발현운반체는 크기가 6 928bp로서 초어 $\beta$ 악틴프로모터배열부위(1 605bp)와 초어성장호르몬구조유전자부위(2 662bp, 3'-폴리A배열 포함) 그리고 T-운반체부위로 이루어져있다.

## 맺는 말

우리는 초어 $\beta$ 악틴프로모터배열부위(1 605bp)와 초어성장호르몬구조유전자부위(2 662bp, 3'-폴리A배열 포함), T-운반체부위로 이루어진 초어성장호르몬유전자발현운반체를 제작하였다.

## 참고 문헌

- [1] 윤광일 등; 생물학, 1, 30, 주체103(2014).
- [2] J. Sambrook et al.; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 118~190, 1989.
- [3] A. Krasnov et al.; Genet. Anal., 15, 115, 2001.
- [4] J. M. Berg et al.; Biochemistry, Springer, 250~280, 2014.
- [5] 潘登 等; 台湾海峡, 4, 20, 85, 2013.

## **Research on the Making of Grass Carp GH Gene Expression Vector**

*Hyon Nam Chol, Ju Chang Song and Jang Song Hun*

We made the grass carp growth hormone gene expression vector consisted of the grass carp beta actin promoter(1 605bp), grass carp growth hormone gene(2 662bp, 3'-poly A sequence) and T-vector.

Key words: grass carp, growth hormone