

구멍갈파래(*Ulva pertusa*)의 산불로 인한 Pine needle ash에 대한 스트레스 유전자 규명

강세은 · Long-Guo Jin · 홍용기

부경대학교 생물공학과

서론

본 연구에서는 산불로 인하여 야기될 수 있는 오염원들중 Pine needle ash을 재료로 하여 구멍갈파래(*Ulva pertusa*)의 Pine needle ash에 대한 스트레스 반응 유전자 분리를 실행하였다. 이때 DDRT-PCR(differential display) (Liang et al., 1992; Hong et al., 1995)기법을 이용하였다. 이 stress반응 유전자는 장차 오염원인 Pine needle ash의 선택적인 genetic indicator로서 활용 가능할 것으로 여겨진다.

재료 및 방법

해조시료

실험에 사용한 구멍갈파래(*Ulva pertusa*)를 수분함량이 약 30% 정도로 건조된 상태에서 -20℃에 보관하면서 초음파처리, Betadine처리 등으로 무균 처리 (Park et al., 1998)를 한 다음 실험에 사용하였다.

해양환경오염원

실험에 사용된 산불에 의한 해양환경오염원은 오염원들중 소나무 잣물을 사용하였다.

RNA추출을 위한 해양환경오염원 처리

구멍갈파래 0.6g을 18℃에서 PES 배지 (Tris-HCl 성분제외) 1L에 넣어 통기배양하면서, 해양환경오염원 Pine needle ash을 MNLC 농도에서 24시간, LC₅₀ 농도에서 1, 6, 24시간 처리하여 total RNA를 추출하는 데 사용하였다. 대조구로서는 동일조건 하에서 해양환경오염원 Pine needle ash를 처리하지 않은 구멍갈파래 염체로부터 동일 조건으로 RNA를 추출하였다.

RNA 추출

해양환경오염원에 의해 특이적으로 유도 반응하는 유전자 분리를 위하여, LiCl-guanidinium 방법 (Chomczynski and Sacchi, 1987; Hong et al., 1995)으로 total RNA를 추출하였다.

DNase 처리

RNA 정량

cDNA 합성

PCR 증폭반응

PCR 증폭반응은 DNA thermal cycler (Perkin-Elmer Cetus Co.)를 이용하여 10-base oligonucleotide인 arbitrary primer들로서 OPA 20종, OPB 20종, OPC 20종의 총60종 primer (Operon Technology Co.)를 구입하여 사용하였다.

Agarose gel 전기영동

DDRT-PCR 생성물의 cloning

염기서열 조사

염기서열은 DNA Auto Sequencer (ABI PRISM 377, Perkin Elmer Co.)로 분석하였으며, 염기 상동성은 NCBI의 BLASTX search(Altschul et al, 1997) 프로그램을 이용하여 비교하였다.

결과 및 고찰

OPA 4(AATCGGGCTG) primer에서 ash 에 의하여 LC₅₀에서 24시간 처리 하였을 때 ash sensitive한 유전자를 발견하였다. 이들을 TA cloning vector에 삽입한후 대장균에서 대량 증폭시켜서 그 삽입된 유전자 부분을 DNA Auto Sequencer를 이용하여 염기서열을 조사하였다. 그 결과 725 bp 크기의 ash sensitive gene fragment(G725) 서열은 Fig. 4와 같다. NCBI blastx search 프로그램을 이용하여 이미 알려진 유전자 구조와의 유사성을 검색한 결과, 이 G725는 기존의 알려진 단백질 database와 비교한 결과, *Campylobacter jejuni*로부터의 Catalase와 34 아미노산중 29개가 일치하여 85%의 일치도를 보이것으로 미루어 보아, 이 유전자는 Catalase관련 유전자인 것으로 추정된다.

참고문헌

Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.

Chomczynski, P. and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 162, 156-159.

Hong, Y.K., C.H. Sohn, M. Polne-Fuller and A. Gibor. 1995. Differential display of tissue-specific messenger RNAs in *Porphyra perforata* (Rhodophyta) thallus. *J. Phycol.*, 31, 640-643.