

큰수지맨드라미 *Dendronephthya gigantea*의 expressed sequence tags (EST) 작성

박경일, 강현중*, 최광식

제주대학교 해양생산과학부, *서울대학교 해양학과

서론

제주연안은 쿠로시오 난류와 황해냉수괴가 교차하는 지역이며, 동시에 아열대 해양의 북방한계 지역으로 분류되고 있다. 이러한 해양학적 특성은 제주도가 우리나라에서 가장 종 다양성이 높은 해역을 형성하도록 한다. 높은 종 다양성은 신물질 개발을 위한 기초적 환경을 제공하게 되는데 특히 서귀포 연안에 서식하는 연산호나 해면류와 같은 생물들은 신약개발의 후보로서 높은 가치를 내포하고 있다. 이 같은 의학목적의 물질을 탐색하기 위하여 현재까지 다양한 기법이 개발되어 이용되고 있으며, 특히 유용 유전자원 탐색의 경우 cDNA library에서 생성된 expressed sequence tag (EST) 분석을 이용한 방법이 유용하게 이용되고 있다.

EST는 mRNA에 대한 짧은 염기서열로, 무작위로 선택된 cDNA clone의 염기서열을 분석함으로써 genome 구조와 기능 해석을 수행할 수 있게 하며, 발생단계, 생리학 또는 환경 자극에 의한 특정 조직, 기관과 생물체의 mRNA 발현 양상을 이해할 수 있다. 또한, 유전자 동정과 새로운 유전자 발굴을 위한 효율적 방법이며, genomic mapping과 polymorphic marker에 대한 좋은 정보원으로도 이용되고 있다.

본 연구는 큰수지맨드라미 (*Dendronephthya gigantea*) 전(全) 조직의 유전자 발현 양상을 분석하기 위하여 cDNA library를 제작하고 이로부터 얻어진 염기서열을 BLAST N과 BLAST X program을 이용하여 유용 유전자를 검색하고자 실시되었다.

재료 및 방법

본 연구에 이용된 큰수지맨드라미 (*D. gigantea*)는 서귀포 문섬에서 스쿠버 다이빙으로 채집하고, total RNA를 분리하기 전까지 동결하여 -70℃에 보관하였다. 보관된 큰수지맨드라미 전 조직으로부터 total RNA를 분리하였다. mRNA는 polyATrack mRNA isolation system (Promega)을 사용하여 mRNA로부터 분리하였다. 분리된 약 1 μ g poly(A)⁺ RNA를 Uri-XR vector (Stratagene)를 사용하여 cDNA library 제작에 이용하였다. *In vitro* mass excision을 수행하여 무작위로 선택된 2016개의 clone을 LB-ampicillin broth에 접종하여 37℃에 배양하였다. 배양액으로부터 AccuPrep™ Plasmid Extraction kit (Bioneer)을 이용하여 plasmid DNA를 분리하였다. 분리된 plasmid DNA는 ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit과 the ABI 3700 automatic DNA sequencer (PE Applied Biosystem)를 이용하여 single pass sequencing을 수행하였다. 데이터베이스내 유사한 염기서열을 검색하기 위해, 염기서열 분석된 서열을 이용하여 low quality 서열을 Phred & Phrap으로 trimming하였다. 이 서열들을

Assembly program을 사용하여 assembly process를 수행하고 assembly된 contig와 singleton 서열을 BLASTX와 BLASTN을 사용하여 non-redundant GenBank/DDBJ/EMBL과 dbEST database내 서열과의 유사성을 비교하였다.

결과 및 요약

큰수지맨드라미(*D. gigantea*) cDNA library에서 무작위로 선택된 2016개의 clone을 single pass sequencing을 수행하여, low quality data를 제거한 후 총 1807개의 염기서열을 획득하였다. 이 서열을 assembly program에 의해 assembly process를 수행한 결과, 34개의 contig와 463개의 singleton으로 확인되었다. Assembly된 서열을 BLAST 알고리즘을 이용하여 데이터베이스내 등록되어 있는 염기서열과의 유사성을 비교하여, E-value가 10^{-5} 미만의 결과만 선택하여 상동성을 확인하였다. 그 결과, 105개의 sequence가 데이터베이스내 known gene에 유의한 상동성을 보였고, 나머지 392개의 sequence는 데이터베이스내 어떤 서열과도 상동성을 보이지 않아, unknown 또는 novel gene으로 추정된다.

또한 유사성이 확인된 105개의 clone을 biological process, cellular component, molecular function에 기초하여 각각의 목록을 분류함으로써 큰수지맨드라미 유래 유용 유전자 발굴을 시도하였다.