

서산 6쪽마늘의 Full-length cDNA library 구축 및 allinase와 lectin 유전자의 cDNA 클로닝

이 미 옥¹, 김 혜 경², 이 진 성^{1,2}

¹코아바이오시스템(주) 생명과학 연구소

²한서대학교 식품생물공학과

e-mail : molee@corebio.com¹, hkim111@hanseo.ac.kr²,
jslee@corebio.com^{1,2}

Construction of Full-Length cDNA Library from Seosan 6-pieces Gallic and cDNA Cloning of Allinase and Lectin Genes

Mi-ok Lee¹, Hae-Kyung Kim², Jin-Sung Lee^{1,2}

¹Research Institute of Bioscience & Biotechnology,
CoreBioSystem, Co., Ltd.

²Dept. of Food Biotechnology, Hanseo University

요 약

본 연구는 서산 6쪽 마늘로부터 완전장 유전자 은행의 제작과 이를 통해서 확보된 1,000여개 재조합 클론에 대한 염기서열 결과를 web-based database를 통한 상동성 분석으로 부터 서산 마늘의 발현 유전자에 대한 생물정보학적 분석에 관해 것이며 본 연구로 부터 마늘의 대표적 생리활성 물질인 allicin의 생성에 관여하는 효소인 allinase의 cDNA를 클로닝 및 완전 염기서열을 해석하였으며 allinase 유전자의 genomic structure에 대한 일부의 결과를 확보하였다. 또한 다양한 생물종에서 연구 되어지고 있는 생리활성 단백질인 lectin 유전자 cDNA를 클로닝하여 완전 염기서열을 분석하고, 6xHis Tag을 통한 재조합 단백질을 대장균에서 E.coli에서 발현시켰다.

1. 서론

마늘(*Allium sativum* L.)은 백합과에 속하는 다년생 채소이며, 중앙 아시아가 원산지로서 지중해 연안으로 보급되어 오래전부터 사용되어졌다고 알려졌다. 예부터 우리 식생활에 없어서는 안 될 식품으로 자리 잡고 있는 마늘은 항암, 항균, 항고혈압 및 항염증 등 인체에 다양한 생리활성 기능에 대한 연구가 활발하게 진행 중이다[1,2].

본 연구에서는 이런 생리활성을 가지는 마늘의 유용 유전자 연구의 초석이 될 완전장 유전자 은행을 제작하였고, 생리학적 가능성이 일부 보고되고 있는 마늘 allinase와 lectin의 발현 유전자를 분석하였다.

2. 재료 및 실험 방법

2.1. 서산 6쪽 마늘의 Full-length cDNA library 구축

기능성이 뛰어나다고 알려진 서산 6쪽 마늘로부터 완전장 유전자 은행을 제작하기 위해서 total RNA를 추출하였다. BAP과 TAP 효소를 이용하여 5' capped mRNA에만 특이적으로 RNA Oligomer를 붙여주었으며, oligoT primer를 사용하여 cDNA를 합성함으로써 Full length cDNA를 합성하였다. Gel elution을 통하여 800 bp 이상의 cDNA만을 pCNS2 vector에 ligation 해서 대장균(*E.coli*)에 형질전환하였다. 다양한 크기의 유전자가 골고루 cDNA library로 제작되었는지 확인하기 위하여 vector의 MCS에 있는 제한효소 절단부위를 인식하는 Not I/EcoR I으로 절단하였다. 그 결과 cDNA libray에 다양한

크기의 cDNA가 균일하게 삽입된 것을 확인하였다.

2.3. Full-length cDNA library의 검정

cDNA의 삽입된 유전자 크기를 확인하기 위하여 vector에 위치한 T7 promoter/SP6 primer를 사용하여 PCR을 수행하여 삽입된 유전자를 증폭하였다. 총 96개의 colony PCR을 수행한 결과 800 bp에서 1Kb사이의 크기를 가진 유전자가 74개 였으며, 1~1.5 kb 사이의 유전자가 16개, 1.5 kb 이상이 5개, 그리고 한 개는 증폭되지 않았다.

제작된 Full-length cDNA의 각 유전자를 분석하기 위하여 1,156개의 colony로부터 cDNA plasmid를 추출하였으며, 이들 모두를 T7 promoter primer를 사용하여 그 염기서열을 해독하였다.

3. 결과 및 토의

3.1. 서산 6쪽마늘 EST의 분석

Sequencing된 1,156개의 cDNA clone중 460개의 데이터를 분석한 결과 59.78% 인 275개의 clone이 database상의 유전자와 유의성을 보였으며(E-value, $1e-10$ 이상인 EST), 나머지 40.22% 는 큰 유의성을 보이지 않거나 거의 일치하지 않는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 이들 유전자는 마늘 특이적인 유전자일 가능성이 높다고 사료되었다. 유의성을 보인 275 clone 중에는 76.7%는 이미 알려진 유전자와 유의적인 상동성을 보였으며 12.7%의 유전자는 연구가 되어지지 않았으며 나머지 10.5%는 마늘에 감염된 garlic virus X와 garlic virus D로부터 유래된 cDNA임이 확인되었다.

E-value가 $1e-10$ 이상이면서 연구가 되어진 유전자를 암호화하는 211개의 EST clone이 암호화 하는 단백질은 모두 73가지 종류였다. 2개 이상의 redundancy를 보이는 EST는 27개 였으며, 나머지 46개 EST는 redundancy를 보이지 않았다. Carbohydrate binding에 관여하는 II Lectin의 경우 47개의 EST에서 확인되어 가장 높은 Redundancy를 보이는 것으로 확인되었다. 이는 Blast X를 통해 유의성 있는 E-value를 보인 EST의 17% 에 해당하며, 전체 분석된 EST의 10.2% 에 해당한다. 다음으로 높은 redundancy를 보인 EST는 putative type-1 pathogenesis-related protein, small heat shock protein Hsp23.5, putative 24 kDa seed maturation protein 등이었다.

3.2. Allinase 유전자의 분석

마늘의 향균, 항암, 항염증 등의 다양한 인체 생리활성은 allicin이란 물질에 의해 매개되어진다고 알려져 있다[3]. Allinase는 마늘 내에 존재하는 allin을 allicin으로 전환시켜 줌으로써 allicin의 생성에 관여하는 효소이다. 서산 6쪽 마늘의 뛰어난 기능성이 allinase 유전자의 유전적 특성에 기인하는 것인지를 확인하기 위하여 마늘 재배지로부터 확보한 마늘을 이용하여 polymorphism을 확인해 보고자 allinase gene의 cDNA를 클로닝 및 구조 분석을 수행하였다.

3.3. Allinase mRNA 염기서열 결정

구축된 full-length cDNA library로부터 allinase를 암호화하는 유전자를 선별, 분석한 결과 1,470 bp 크기의 cDNA를 확인할 수 있었다. NCBI상의 allinase precursor sequence와 비교한 결과 5' sequence가 390 bp정도 짧은 형태였으며, ORF 부위는 모두 포함되어 있었다. allinase cDNA sequence는 총 486개의 아미노산을 암호화 하고 있으며, NCBI상의 sequence와는 11곳에서 염기서열의 차이를 나타내었다.

서산 allinase의 염기서열을 바탕으로 allinase ORF를 증폭(1,390 bp)할 수 있는 primer를 제작하였으며, 다른 지역에서 재배된 마늘로부터 allinase cDNA를 증폭하는 데에 이용하였다. 서산이외에 국내의 대표적인 마늘 재배지역인 단양, 의성, 남해와 그리고 수입 마늘을 확보하여 cDNA를 합성하고 allinase를 증폭하였다. 국내의 다른 지역 마늘은 서산 마늘 allinase와 동일하게 1.4 kb 크기의 단일 밴드가 증폭되었지만, 수입마늘에서는 서로 다른 두 개의 약한 band가 증폭 되는 것을 확인하였다.

3.4. Allinase genomic structure의 결정

Allinase gene의 genomic structure를 확인하기 위해서 서산 6쪽 마늘로부터 추출된 gDNA를 주형으로 allinase ORF primer를 사용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과 약 2 kb 정도의 단일 밴드가 증폭되는 것을 확인 하였다. cDNA를 주형으로 증폭 했을 때 1.4 kb가 증폭되는 것과 비교해 보았을 때 allinase는 하나 이상의 600 bp 이상의 인트론을 포함하고 있는 것으로 추정되었다. 현재 gDNA allinase에 대한 염기서열을 분석 중에 있으며 그 결과로 정확한 genomic structure를 확인할 계획이다.

3.5. Lectin 유전자 분석 및 단백질 발현

Lectin 단백질은 식물을 비롯하여 다양한 생물 종에서 발견된 단백질로서 carbohydrate-binding protein이며 혈액응집 활성을 가진다고 알려져 있다. 최근에는 면역학적인 기능을 중심으로 연구되어지고 있으며, 항암, 항바이러스, 항박테리아, 항염증 기능에 대해 보고되고 있다[4].

JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY.

2007. 282: 2753-2764

3.6. Lectin 유전자의 cDNA sequence 분석

구축된 cDNA library로부터 lectin gene을 찾아 분석한 결과, lectin gene은 약 600 bp 크기를 갖는 완전장 cDNA 이었으며 연역 아미노산 분석으로 154 아미노산으로 구성됨을 예상할 수 있었다. GenBank의 lectin II 와의 높은 상동성을 보였으며 3곳의 alpha-D-mannose recognition motif를 가지고 있는 것으로 추정되었다.

3.7. Lectin 단백질의 발현

마늘의 lectin의 6x His fusion protein을 *E.coli*에서 발현시키기 위해서 pRSET vector에 cloning하였으며 *E.coli*에 형질 전환을 통해서 재조합 fusion protein을 과 발현 시켰다.

감사의 글

본 논문은 한서대학교 지방대학혁신역량강화사업의 연구비 지원을 통해서 수행되었습니다.

참고문헌

- [1] Koch H.P., Lawson L.D., Garlic, the science and therapeutic application of *Allium sativum* L. and related species, in: Retford D.C. (Ed.), Williams and Wilkins, Baltimore, 1996, pp. 1-233.
- [2] ELLEN TATTELMAN, M.D., Health Effects of Garlic. *American Family Physician. Volume 72, Number 1, p103-106, 2005*
- [3] Cavallito C., Bailey J.H., Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. Isolation, physical properties and antibacterial action, *J. Am. Chem. Soc.* 66 (1944) 1944-1952.
- [4] Nathan Sharon., Lectins: Carbohydrate-specific Reagents and Biological Recognition Molecules.