

차널메기의 metallothionein cDNA 유전자의 cloning 및 그 특성에 관한 연구

이인정, 송영환

부산수산대학교 미생물학과

Metallothionein은 세포내의 중금속의 농도를 조절하는 주요한 단백질로서 bacteria에서 척추동물에 이르기까지 모든 생명체에서 나타나는 공통된 단백질이다. 비록 metallothionein의 정확한 기능은 알려져 있지 않으나 독성을 나타내는 중금속에 대하여 세포내 방어기작에 관여할 뿐만 아니라 여러다른 유전자의 총괄적 조절기작 및 metalloprotein의 발현에 관여할 것으로 보고있다. 본 연구에서는 Channel Catfish의 metallothionein cDNA 유전자를 poly(A)를 갖는 mRNA로부터 Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction(RT-PCR)에 의하여 cloning하였다. 증폭된 PCR products는 pBluescript SK+의 EcoRV site 및 pUC19의 SmaI site에 dT tailing을 하여 cloning하였으며, PCR products는 multicloning site에 있는 EcoRI 및 HindIII 로 절단하여 확인하거나 신속한 PCR screening에 의하여 확인하였다. 여러 PCR clone 중 하나인 pMT150에 대한 DNA 염기서열을 조사한 결과 다른 어류의 metallothionein cDNA 유전자와 높은 유사성을 보였다.

Key words : metallothionein, cDNA clone, RT-PCR, DNA sequencing

Metallothionein은 대부분의 진핵세포에서 나타나는 cystein-rich protein으로(Chernaik and Huang, 1991) 세포내의 Zn, Cu등의 중금속의 농도를 조절하는 작용을 하며 중금속의 독성제거(detoxification)에 관여한다(Hamilton and Mherle, 1986). Zinc, Copper, Cadmium, Silver, Mercury 등은 생물권(biosphere)에는 극미량으로 존재하는 중금속이며, 특히 Zn, Cu등은 생체내의 효소반응에 이용되는 중요한 trace element이나, 일정농도 이상으로 존재할 경우 toxic effect를 나타낸다. 진핵세포의 경우 이러한 환경변화에 대처하기 위해 metallothionein을 생산하며, metallothionein의 생합성은 transcriptional level에서 조절되며 이는 metallothionein 유전자의 5'-flanking sequence에 존재하는 URS(upstream regulatory sequence)와 cellular factor의 작용으로 일어난다(Murphy et al., 1990; Zafarullah et al., 1988). Metallothionein의 생합성을 induction할 수 있는 inducer로는 heavy metal외에도 glucocorticoid, interfe-

ron 및 UV 등의 stress를 가할 경우에도 transcriptional level에서 induction효과가 나타나 분자생물학적 연구에 있어 중요한 유전자로 인식된다(Silar et al., 1991).

Metallothionein은 분자량이 10K dalton밖에 되지 않아, 약 60개의 amino acid로 구성되어(Bonham et al., 1987) cDNA clone을 얻었을 때 쉽게 유전자를 변형할 수 있는 장점을 가지고 있다. 또한 metallothionein의 합성이 증가되었을 때에 anticancer drug에 대한 내성이 높아지는등(Lazo and Bahnson, 1989) 의학적인 면에서도 중요한 연구 대상이라 할 수 있다.

특히 중금속에 의한 환경오염이 증가되고 있고, 수질에 오염된 중금속을 제거하려는 연구가 많이 진행되고 있어(Kille et al., 1991) 본 연구에서는 차널메기(Channel Catfish, *Ictalurus punctatus*)로부터 metallothionein 유전자를 cloning하고 이들의 유전자의 구조를 현재 알려진 다른 종의 어류와 비교하여 유사성이 있음을 DNA sequencing 을 통하여 밝혔다.

재료 및 방법

차널메기로 부터 mRNA의 추출

차널메기의 간으로 부터 total RNA 및 mRNA를 추출하기 위하여 Lee 등의 방법(1992)에 따라 준비하였다.

Oligonucleotide primer의 준비

PCR에 의해 metallothionein 유전자를 증폭하기 위하여 현재까지 알려진 metallothionein 유전자의 염기서열을 분석하여 보존되어 있는 부분에 대한 oligonucleotide를 결정하고, oligo (dT)-adapter primer 및 N-terminus에 대한 oligonucleotide를 정하고 이를 Biosynthesis 사에 합성되도록 하여 사용하였다. metallothionein 내의 internal primer의 염기서열은 5'-AGGACAG-CAGGGCAGCAACTTTTCTT-3'과 5'-AAGAAA-AGTTGTGCCCTGCTGCCT-3'이었으며 N-terminus에 해당하는 primer의 염기서열은 5'-CCCATC-GATATATATATGGATCCTGTGGAATCG-3'(5'MT primer)이고 3' primer의 염기서열은 5'-GAGGCCGCTTTTTTTTTTTTTTTT-3'(3' universal primer)이다.

PCR amplification

일반적인 PCR의 증폭은 92°C(1 min), 55°C(1min), 72°C(1min)을 30-40 cycle을 반복하였으며 PCR products의 말단을 blunt end로 만들어 주기 위하여 72°C에서 20분간 반응을 행하였다. 사용한 buffer는 1.5mM MgCl₂가 포함된 standard buffer를 사용하였으며, Taq DNA polymerase는 한국과학기술원 부속 유전공학 연구소로부터 분양을 받아 사용하였다.

*E. coli*의 형질변환

*E. coli*의 형질전환은 Bio-Rad사의 *E. coli pulser*를 이용하여 *E. coli*에 electroporation 하였다. 0.1ml의 cuvette을 사용하여 1800 V에서 pulser를 가하여 electroporation을 행하였다.

각종 plasmid의 추출

실험에 사용한 각종 plasmid를 추출하기 위하여 Terific Broth(Sambrook *et al.*, 1989)를 이용하였으며 alkaline lysis방법에 의하여 plasmid를 추출하였다.

T-vector의 준비

Taq DNA polymerase는 dA에 대한 친화력이 높아 PCR product가 dA tailing이 되는 경우가 있어 blunt end ligation이 잘 일어나지 않게 된다(Marchuk *et al.*, 1991). 이를 보완하기 위하여 T-vector를 준비하여 ligation에 사용하였다.

DNA sequencing

cloning된 유전자의 염기서열을 정하기 위하여 United States Biochemical사의 Sequenase Version 2.0 kit를 이용하여 dideoxy-chain termination method(Sambrook *et al.*, 1989)를 변형한 방법을 사용하였으며, 35S-dATP는 Amersham사로 부터 구입하여 사용하였다.

PCR에 의한 recombinant들의 검색

recombinant들을 선별하기 위하여 PCR에 의한 screening을 행하였다. 2종류의 primer를 넣은 PCR 반응 용액에 colony를 toothpick로 찍어 이를 template로 이용하였다. 그외의 모든 DNA 재조합기술은 Sambrook (1989) 등의 방법에 준하여 행하였다.

결과 및 고찰

cDNA library로 부터 metallothionein 유전자의 증폭

metallothionein 유전자를 증폭하기 위하여 5' MT primer와 3' universal primer를 PCR primer 및 5' MT primer와 internal region에 있는 antispecific primer를 이용하고 template로는 본 연구실에서 제조한 cDNA library를 이용하였다. Fig 1에서 보는 바와 같이 antispecific primer를 첨가한 경우(lane 4, 5)에는 두개의 PCR product가 증폭되는 것을 확인하였고 이들의 크기는 150 bp 및 105bp에 해당하였다. 한편 3' universal primer를 이용하였을 경우 약 400bp에 해당하는 PCR product를

확인할 수 있었다. Lee(1992)등의 결과에 의하면 northern blotting에 의해 차벨메기의 metallothionein 유전자의 크기는 약 400bp에 해당하므로 lane 8, 9에서 얻어진 PCR product 및 lane 4, 5에서 얻어진 PCR product를 agarose gel상에서 electroelution 방법에 의해 순수분리하였다.

증폭된 DNA의 subcloning

Fig 1에서 나타난 각각의 DNA를 pBluescript SK+의 EcoRV site에 blunt end ligation에 의해 subcloning시켰다. Taq DNA polymerase는 dA에 대해 친화력이 높아 증폭된 DNA의 3'말단은 몇개의 dA가 튀어나와 있는 상태로 되어 있을 것이다. 그러나 모든 DNA가 3'

Fig 1. 3.0% Nusieve GTG agarose gel electrophoresis of PCR-amplified fragments. The pUC19 fragments that Sau3AI digested are used as size marker(960bp, 585bp, 341bp, 285bp, 141bp, 105bp in lane M). Reaction mixture(100 μ l) for PCR contained 200 μ M of dNTPs, 1 μ l of cDNA(50ng of cDNA pool) and 2.5 unit of Taq DNA polymerase. 5'MT primer(33 μ mole), oligo(dT)₁₇ adapter primer(40 μ mole) and MT specific primer (30 μ mole) were added in reaction mixtures. Denaturation, annealing and chain termination were performed in an Ericomp Easy Cyclor using a program consisting of 40 cycles of 1 min at 92 $^{\circ}$ C, 2 min at 50 $^{\circ}$ C, 3 min at 72 $^{\circ}$ C with a period of 20 min at 72 $^{\circ}$ C. lane 1, 2 : both of 5' MT primer and oligo(dT)₁₇ adapter primer were added in polymerase reaction, lane 3 : only oligo(dT)₁₇ adapter primer was added, lane 4, 5 : both of 5'MT primer and antispecific primer were added in reaciton. lane 6, 7 : both of specific primer and oligo(dT)₁₇ adapter primer added in reaction, lane 8, 9 : EcoRI/HindIII digestion of clone pMT400 which carry 400bp of amplified fragment in PCR(lane 7) in pBluescript.

overhanging 되어 있지는 않기 때문에 비록 효율은 낮지만 blunt으로 subcloning을 시도하였다. X-Gal이 첨가된 배지에서 insert를 지니는 recombinant는 white color를 나타내므로 쉽게 recombinant를 선별할 수 있었다. 재조합 plasmid를 분리하여 EcoRI 및 HindIII로 절단하여 3.5% polyacrylamide gel상에서 전기영동한 결과가 Fig 2에 나타나 있고 정확하게 증폭된 절편이 subcloning 되었음을 알 수 있었다.

DNA 염기서열의 결정

각각의 재조합 plasmid가 실제 metallothionein 유전자를 갖고 있는지를 확인하기 위하여 DNA sequencing을 행하였으며 그 결과가 Table 1에 나타나 있다. DNA sequencing을 행한 결과 full length의 cDNA 유전자를 갖고 있을 것으로 예상했던 400bp의 절편은 이를 증폭

하기 위해 사용하였던 PCR primer의 염기서열이 나타나지 않아 더 이상 분석을 행하기 않고 150bp의 절편을 갖는 재조합 plasmid만 이 metallothionein의 염기서열과 유사성이 높고 PCR primer의 염기서열이 존재하는 등 정확한 clone임을 확인 할 수 있었다. 비록 부분적인 clone이지만 이들을 rainbow trout, pike, stone loach, plaice등에서 알려진 metallothionein 유전자와 비교하였을 때 매우 높은 유사성을 보임을 알 수 있었다. 150bp의 clone을 probe로 이용하여 차넬메기의 metallothionein genomic gene에 대한 연구가 진행될 수 있는 계기가 되어 그 중요성을 찾을 수 있을 것이다.

RT-PCR에 의한 full length metallothionein 유전자의 cloning

full length를 갖는 metallothionein 유전자를 clo-

Fig 2. Identification of three kinds of PCR amplified fragments. PCR amplified fragments were subcloned into EcoRV site in pBluescript SK+. Recombinant plasmids were codigested with EcoRI/HindIII and identified by 3.5% polyacrylamide gel electrophoresis. 400bp fragment(lane 1), 150bp fragment(lane 2) and 100bp fragment(lane 3) were visualized with size marker(pUC 19-Sau3AI). The 150bp fragment was identified by dideoxy DNA sequencing using Sequenase V2.0 Kit that it contained beta domain of Channel Catfish metallothionein cDNA gene.

ning하기 위하여 mRNA를 추출하고 이들 reverse transcriptase와 3'universal primer를 annealing 하여 1st strand single strand DNA를 준비하였다. 이들 template로 하여 다시 5' MT primer 와 3' universal primer를 첨가하여 PCR을 행하고 이들 전기영동하여 분석한 결과가 Fig 3에 나타나 있다. lane 4에서 보는 바와 같이 비록 그 양은 적으나 400bp 근처에서 증폭된 DNA를 확인 할 수 있어 이를 순수 분리하여 pUC19의 SmaI site에 subcloning 하고자 하였다. 증폭된 DNA의 양이 부족하여 ligation 효율을 높이기 위하여 T-vector를 준비하였고, JM109에 transformation을 할 경우 효율을 최대한으로 증가 시키기 위하여 electroporation을 행하여 여러개의 transformant 들을 얻을 수 있었다.

PCR에 의한 clone들의 검색

metallothionein 유전자가 cloning 되어도 이를 증명하기 위하여는 결국 DNA sequencing 을 행하여 확인하여야 한다. 그러나 빨리 clone을 분석하기 위하여 PCR 에 의한 clone을 분석하고자 하였다. 방법에서 언

급한 바와 같이 5' MT primer와 3' universal primer를 첨가하고 PCR을 행하여 이를 전기영동한 결과가 Fig 4에 나타나 있다. Lane 8을 보면 Fig 3에서 확인하였던 크기의 DNA가 증폭됨을 확인하였다. 즉 3' universal primer에는 poly dT가 존재하므로 bacteria의 유전자와는 서로 annealing이 되지 않고 poly A를 갖는 진핵세포의 cDNA와 annealing이 가능할 것이다.

Full length clone의 분석

증폭된 transformant로 부터 plasmid를 추출하여 이를 각종 제한 효소로 절단하여 제한효소 인식 부위를 조사하였다(Fig 5). Table 1에서 보는 바와 같이 metallothionein 유전자의 N-terminus에 BamHI site가 존재함으로 이를 이용하여 full length clone 을 분석하였다. lane 1에서 보는 바와 같이 BamHI으로 절단하였을 경우 약 360bp에 해당하는 절편을 확인하였기에 400bp의 PCR product보다 크기가 작아진 것은 유전자의 N-terminus에 BamHI site가 존재함을 알 수 있다.

이 논문은 1991년도 교육부 유전공학연구비의 지원에 의하여 수행되었음.

Fig 3. 1st strand synthesis of Channel Catfish mRNA was used as template for RT-PCR including 5' MT primer and 3' universal primer. The faint 400bp of amplified fragment was detected in 2.0% agarose gel electrophoresis(lane 4, arrow). The fragment was eluted, ligated into dT tailed SmaI site of pUC19 and transformed to JM109 by electroporation.

Fig 4. Rapid screenig of full length metallothionein gene by PCR. Both of 5'MT primer and 3'universal primer have been added in 20 μ l of PCR reaction mixture. The distinct 400bp fragment was amplified and visualized in lane 8. pUC19-Sau3AI digested fragment was used as size marker (lane M).

Fig 5. Recombinant DNA which contained full length metallothionein cDNA gene was digested BamH I, Pst I, Kpn I, EcoR I, HindIII, EcoRV, Nde I, Xho I, Xba I and run agarose gel edelectrophoresis. The only BamHI cleavage showed ca. 400bp of the inserted fragment in lane 1. As the BamHI site of the N-terminus of metallothionein gene has been identified by DNA sequencing analysis from pMT150, it is strongly proved that this clone harbor the true full length metallotionein cDNA gene.

참 고 문 헌

- Bonham, K., Zafarullah, M. and Gedamu, L. : The rainbow trout metallothionein molecular cloning and characterization of two distinct cDNA sequences. *DNA* 6(6) : 519~528, 1987.
- Chernaik, M. and Huang, P.C. : Differential effect of cysteine-to-serine substitutions in metallothionein on Cadmium resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 : 3024~3028, 1991.
- Hamilton, S. J. and Mherle, P. M. : Metallothionein in Fish: Review of its importance in assessing stress from metal contaminants. *Trans. Amer. Fisher. Soc.* 115 : 596~609, 1986.
- Kille, P., Stephens, P. E. and Kays, J. : Elucidation of cDNA sequences for metallothioneins from rainbow trout, stone loach and pike liver using the polymerase chain reaction. *Bioche. Biophys. Acta* 1089 : 407~410, 1991.
- Lazo, J. S. and Bahnson, R. R. : Pharmacological modulators of DNA-interactive antitumor drugs. *Tips* 10 : 369~373, 1989.
- Lee, S. Y., Lee, K. M., Shu, S. S. and Song, Y. H., Lee, B. L. : Induction of Metallothionein-like Proteins and Metallothionein mRNA in Channel Catfish Liver Following Cadmium and Zinc Treatment. *Korean Biochem. J.* 25(1) : 48~53, 1992.
- Marchuk, D., Drumm, M., Saulino, A. and Collins, F. S. : Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucleic Acids Res.* 19(5) : 1154, 1991.
- Murphy, M. F., Collier, J., Koutz, P. and Howard, B. : Nucleotide sequence of the trout metallothionein A gene 5' regulatory region. *Nucleic Acids Res.* 18(15) : 4622, 1990.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. : A laboratory manual. *Molecular Cloning*, 1989.
- Silar, P., Butler, G. O. and Thiele, D. : Heat shock transcription factor activates transcription of the yeast metallothionein gene. *Mol. Cell. Biol.* 11(3) : 1232~1238, 1991.
- Zafarullah, M., Bonham, K. and Gedamu, L. : Structure of the rainbow trout metallothionein B gene and characterization of its metal-responsive region. *Mol. Cell. Biol.* 8(10) : 4469~4476, 1988.

**Molecular cloning and characterization of metallothionein
cDNA gene in channel catfish**

In Jung Lee and Young Hwan Song

*Department of Microbiology, National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-737,
Korea*

Metallothionein is an essential and common protein to regulate the intracellular concentration of heavy metals, which exist in most organisms from bacteria to vertebrates. Although the detailed function of metallothionein has not been fully identified until yet, it may be involved in the cellular protection against the heavy metal toxicity and in the global regulation of several other genes and the expression of metalloproteins. We have cloned the full cDNA clone of metallothionein gene in Channel Catfish by Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction(RT-PCR) starting from poly(A)-containing mRNAs. All PCR fragments have been subcloned into EcoRV site of pBluescript SK+ and dT-tailed at SmaI site of pUC19, then PCR products are recovered by the double digestion of recombinant plasmids with EcoRI and HindIII, which are adjacent to EcoRV site in multicloning sites or by rapid PCR screening. The nucleotide sequence analysis of pMT150(one of the PCR clones) showed high homology with several other piscine metallothionein cDNA genes.

