

H-Y 항원 유전자의 클로닝에 관한 연구

Ⅲ. 생쥐정소 cDNA Library 구성과 유전자의 검색

이정렬 · 김창규 · 김종배

建國大學校 動物資源研究센터

Molecular Cloning of H-Y Antigen Gene

Ⅲ. Construction of Mouse Testis cDNA Library and Screening of H-Y Ag Gene

Lee, J.L., C.K. Kim and J.B. Kim

Animal Resources Research Center, Kon-Kuk University

SUMMARY

These experiments were carried out to construct mouse testis cDNA library and to screen H-Y Ag gene. Mouse testis was obtained from BALB/c inbred mouse that was after-born 1 week.

Isolation of mouse testis total RNA was carried out by guanidium/cesium chloride, poly(A⁺) mRNAs were purified by oligo d(T)-cellulose chromatography method. To investigate protein synthesis activity, *in-vitro* translation carried out by total RNA and poly(A⁺) mRNA. The products of *in-vitro* translation were identified in 12.5% PAGE. Single strand DNA and double strand DNA were synthesized from poly(A⁺) mRNA and purified using phenol/chloroform/isoamylalcohol. Synthesized cDNA was combined with cohesive Eco RI polylinker, its recombination efficiencies were identified by X-gal and IPTG.

In the cDNA library, 1×10^7 phagemids were screened with ³²P labelled probe. Hybridization were carried on 65°C for 16~20 hours. And 1×10^6 phagemids were screened with rabbit-anti-H-Y. In former, select 5 positive clones, and later, 1 positive clone. Its southern blot analysis showed various size of insert cDNA from 0.7 kb to 3 kb.

I. 緒 論

Y 염색체는 哺乳動物에 있어서 性的 分化, 決定에 매우 중요한 역할을 담당한다. 이 Y 염색체상에 존재하는 遺傳子의 調節로 性的 分化는 시작된다. 이러한 현상에 관여하는 호르몬과 단백질은 매우 다양하게 존재한다.

이러한 단백질중 雄性特異 抗原인 組織適合性 Y抗

原(Eichewald와 Silmsler, 1955)이 발견되었으며, 이와 유사한 항원의 免疫學的, 生理學的 研究는 활발히 진행되어 왔다. 분자 수준의 연구는 미국 UCLA의 Lau(1989) 등에 의해서 처음으로 소개되었다. 이미 보고된 바에 의하면, 性的 分化 및 결정에 관여하는 인자들이 많은 포유동물의 염색체 및 단백질 수준에서 발현·보존되고 있음이 밝혀졌으며 정소조직 및 sertoli cell에서도 높은 수준으로 발현(Singh, 1987; Muller, 1981; Wachtel, 1984)되어 minisatellite

* 이 연구는 1991년 교육부 학술연구조성비(유전공학)에 의하여 연구되었음.

gene repeating sequence(Singh 등, 1984)를 사용하여 조사되었다. 또한 성 분화에 관여하는 유전자 집단이 Y 염색체 상에서 N 말단에 존재함이 보고되었다(Andrew, 1990; Jone과 Singh, 1981a; Jone과 Singh, 1981b; Singh와 Jone, 1982).

그러나 이는 Y 염색체의 염기배열 전체를 조사하여 精巢發現에 관여하는 유전자의 存在 與否 및 위치만을 확인하였을 뿐, 이러한 단백질을 생산하는 유전자에 대한 정확한 보고는 없다.

이에 본 연구실에서는 재조합 유전자를 검색하였으며 이 중에서 양성의 반응을 보인 재조합 유전자 클론들을 얻었다.

이들의 southern blotting을 통해서 삽입된 재조합 유전자의 크기를 조사하였으며, 이 결과들을 통하여 알 수 있는 것은 삽입된 유전자의 염기배열과, 이들의 전사에 의해서 생산된 단백질들의 生物學的 活性 등을 확인함으로써 검색된 클론에 삽입된 유전자가 精巢發現에 어떤 역할을 하는지의 여부를 알아볼 수 있을 것으로 사료된다.

II. 材料 및 方法

1. 모든 RNA와 poly(A⁺) RNA의 分離[Isolation of total RNA and poly(A⁺) mRNA]

생후 1주령의 웅성 BALB/c의 정소를 적출하여 Ulich(1977)의 guanidium/calcium chloride 방법을 수정하여 total RNA를 분리하였으며, poly(A⁺) mRNA는 Aviv와 Leder(1972)의 oligo(dT)-cellulose chromatography법을 수정하여 정제하였다.

2. 試驗管内 判讀(In-vitro translation)

RNA의 단백질 합성 능력을 조사하기 위하여 reticulocyte lysate system (Amersham N 90)을 사용하여 total RNA와 poly(A⁺) mRNA를 각각 2 μ l씩 넣은 후에, rabbit reticulocyte lysate를 20 μ l를 넣고 32 $^{\circ}$ C에서 30분 반응한 후 합성을 유도하여 12.5% polyacrylamide gel에서 전기영동하여 확인하였다.

3. cDNA 합성 및 클로닝(cDNA synthesis and Cloning)

Poly(A⁺) mRNA로부터 cDNA의 합성은 Gubler 등의 방법(1983)에 따라 단선 DNA와 복선 DNA를 합성하였으며 소요시약 및 효소는 Amersham사의 cDNA system을 이용하여 실시하였다.

재조합 유전자의 정제는 phenol/chloroform/isoamylalcohol(50:48:2)를 혼합하여 이의 상층액만을 회수하여 정제하였다. 이의 확인은 alkaline agarose gel을 전기영동하여 실시하였다. 합성된 복선 재조합 유전자는 Eco RI polylinker에 연결하여 엇갈린 끝(cohesive end)을 준비하였고 vector(λ ZEP II (Short 등, 1988)를 연결하였다(Wood와 Lee, 1976; Zain 등, 1977). 또한 재조합한 유전자의 효율을 조사하기 위하여 X-gal과 IPTG를 이용하였다(Robert 등, 1980).

4. 再組合 遺傳子 銀行의 檢索(Screening of cDNA library)

아미노산 분석기로 아미노산 배열을 조사하였으며 여기서 얻어진 결과를 토대로 염기배열을 추정하여 이스라엘의 Weizmann Institute of Science에서 oligonucleotide probe를 제공받았다. 이 probe의 염기배열은 5'-TTC TGT AGG GCC CTG ATG TGG CCC-3'으로 ³²P를 표지하여 사용하였다(Stawinski 등, 1977; Narang 등, 1990).

Probe hybridization은 65 $^{\circ}$ C에서 16~20시간 동안 실시하였다. 또한 분리한 항원을 토끼에 2주 간격으로 免疫化(50 μ g)하여 抗體를 얻은 후 1:1,000으로 사용하여 immunoscreening(Chao 등, 1989)을 실시하였다.

5. Southern blotting

검색 결과 나타난 양성의 균락을 LB 배양접시에서 떼어내어 이를 LB broth에서 증폭하여 재조합 DNA를 회수하고 Eco RI으로 처리하였다. 이를 0.7% agarose gel에 전기영동한 후 nitrocellulose filter에 전이하여 고정(3% BSA in 0.01 M PBS)한 후 H-Y probe를 이용하여 42 $^{\circ}$ C에서 20시간 동안 50% formamide solution에서 hybridization을 실시하였다(Southern, 1975)

III. 結果 및 考察

1. 分離한 모든 RNA와 poly(A⁺) mRNA의 確認 [Identification of isolated total RNA and poly(A⁺) mRNA]

분리한 RNA들의 순도와 크기를 확인하기 위하여 glyoxal과 DMSO 존재하에서 λ /Hind III를 기준으로 하여 1.0% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다. Mouse testis를 mRNA 추출원으로하여 생후 1주령의 BALB/C의 정소 1g을 사용하여 guanidium/CsCl 법을 사용하여 3mg의 total RNA를 분리하였으며 poly(A⁺) mRNA를 30 μ g /total mRNA로 얻었다(Fig. 1).

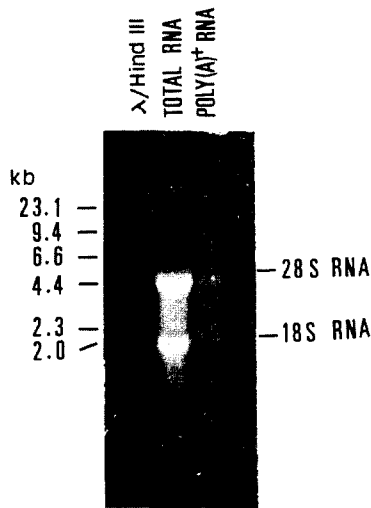


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of mouse testis total RNA and poly(A)⁺ RNA

2. 試驗管内 判讀 (In-vitro translation)

Reticulocyte lysate system을 이용하여 *in-vitro* translation product를 SDS-PAGE에서 전기영동한 결과 0.2~20kb에 달하는 분자량 분포를 보이는 단백질이 합성되었음을 알 수 있었다. 이는 mouse testis mRNA의 활성이 매우 높고 cDNA합성에 필요한 template로 사용하기에 매우 적당함을 알 수 있었다(Fig. 2).

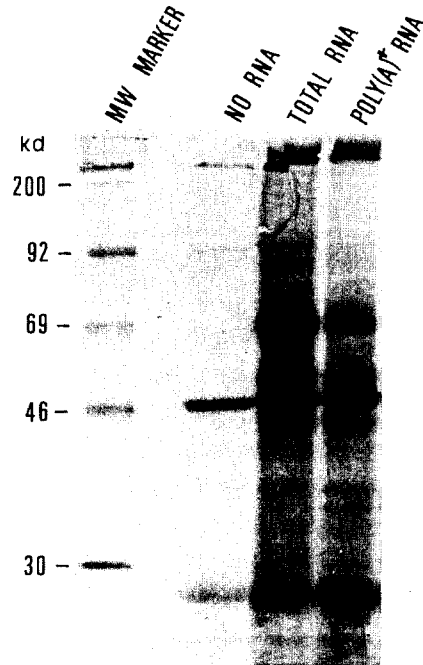


Fig. 2. SDS-PAGE pattern of mouse testis RNA *in-vitro* translation product
X-ray film was exposed for 24 hours at -70°C

3. 再組合 遺傳子의 合成 및 클로닝(cDNA synthesis and Cloning)

분리한 poly(A⁺) mRNA로 부터 차례로 단선, 복선 상보적인 유전자를 합성하였다. 單線 cDNA로부터 합성한 複線 cDNA는 1 μ g 複線 cDNA / 2 μ g mRNA이었다. 합성된 單線, 複線 cDNA를 alkaline agarose gel에 전기영동해 본 결과 0.5~10kb 크기의 cDNA가 합성되었음을 알 수 있었다(Fig. 3). 이 複線 cDNA를 λ ZAP II에 클로닝하였으며 재조합 효율은 85%이었다.

4. H-Y 遺傳子 分割의 分離(Isolation of H-Y cDNA clones)

H-Y oligonucleotide probe를 이용하여 실시한 검색에서는, mouse testis, cDNA library에서 1×10^7 plaques를 실시한 결과 6개의 양성 반응을 얻었으며

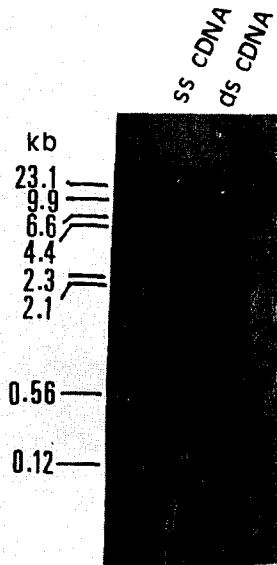


Fig. 3. Alkaline agarose gel electrophoretic pattern of cDNA synthesized from mouse testis poly(A)⁺ mRNA

항 H-Y 토끼 抗體를 이용하여 실시한 immunoscreening에서는 1×10^6 plaques를 檢索한 결과 1개의 양성 반응을 얻었다(Fig. 4, Fig. 5).

5. Southern blot analysis of cDNA

H-Y oligonucleotide probe를 이용하여 양성 반응을 보인 6개의 clone들을 制限酵素 EcoRI을 처리한 후 southern blot을 실시한 결과 이들에 재조합된 유전자의 크기는 0.7kb에서 3.0kb에 달하는 다양한 분포를 나타내었다(Fig. 6).

IV. 考 察

본 실험실에서 분리한 7개의 클론은 아직까지 분리된 일이 없었던 H-Y항원을 전사하는 유전자 분획이라 믿을 수 있는 이유는 1986년 미국의 Lau가 분리한 항원에 대한 유전자 분획은 probe로 사용한 oligonucleotide에 대한 정보가 전혀 없는 상태에서 실시하였으며 분리한 분획에 대한 조사가 정확히 실시되지 않았다. 이에 본 연구실에서 분리한 클론의 H-Y항원에 대한 유전자의 가능성은 매우 큰 것이라 할 수 있겠

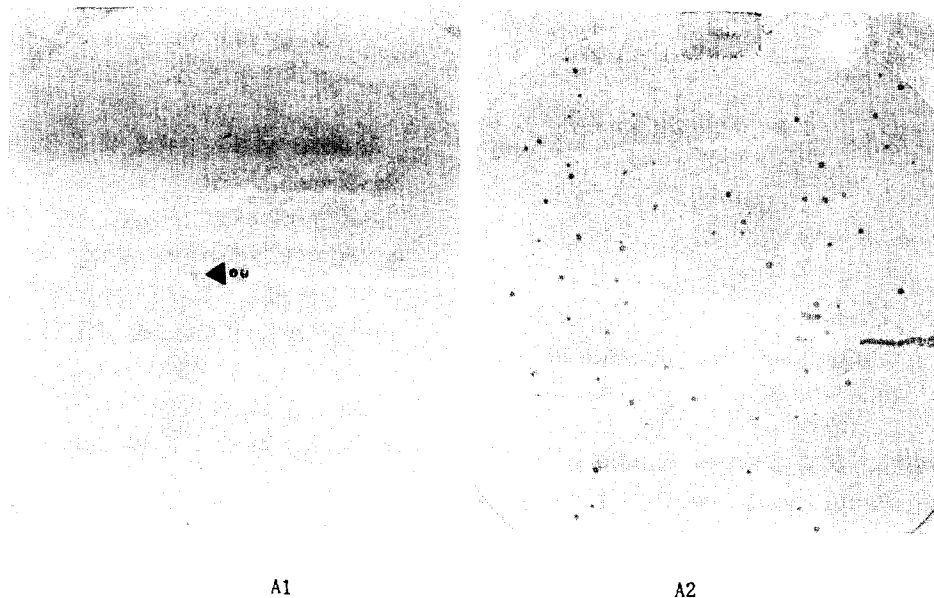
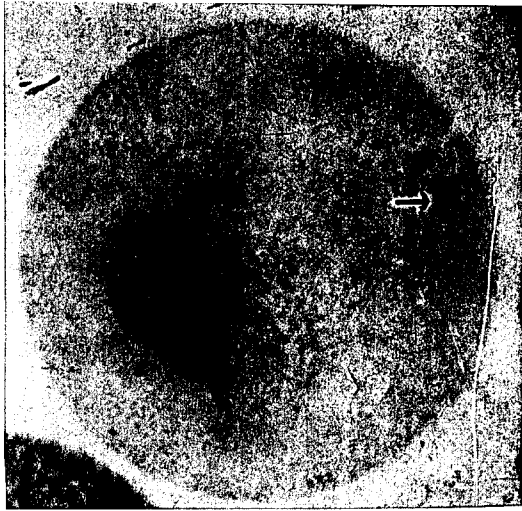


Fig. 4. Selection of positive clone by immunoscreening method using antibody probe
 A1 : Positive clone obtained at the first screening
 A2 : The purified plaque of A1 positive clone



B1

Fig. 5. Selection of positive clones by plaque hybridization detection method using oligonucleotide as a probe

B1 : Positive clone obtained at the first screening

다. 물론 본 실험에서 가장 어려운 것은 아미노산 염기 추정에서 나타난 결과를 유전자 정보은행의 정보와 비교하여 볼 때 rat albumin precursor와 가장 높은 homology를 보이지만 이는 문제되지 않는다고 사료된다.

태의 발생 초기에 보면, 가장 많이 나타나는 단백질 계통이 alpha-fetoprotein이나 albumin 관련 물질임을 볼 때, 또한 H-Y항원과 비슷한 분자량을 나타내는 것으로 보아 이번에 분리한 7개의 클론이 DNA sequencing에서도 마찬가지로 albumin 계열이라 하더라도 우리는 초기태의 발달에 있어서 albumin은 H-Y나 MEA(male enhancing antigen), 또는 TDF(testis determination factor; Philippe et al., 1990)일지도 모른다는 추정을 완전히 배제할 수는 없을 것이다.

그러므로 금번에 분리된 클론은 *in-vitro* translation을 통해 얻어진 산물로 생물학적 활성에 대하여 알아봄으로서 이 遺傳子가 轉寫하는 물질들이 위에 열거한 유전자나 항원들과 어떤 關聯性을 가지는 것으로 단언할 수 있으리라 믿어진다.

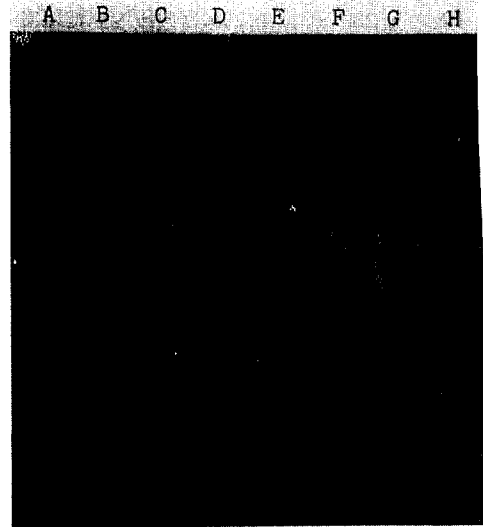


Fig. 6. Southern hybridization of positive clones

A, H : λ /Hind III, Eco RI

B : H-Y-1 clone C : H-Y-2 clone

D : H-Y-3 clone E : H-Y-4 clone

F : H-Y-5 clone G : H-Y-6 clone

V. 摘要

생쥐 精巢에서 分離한 mRNA로 부터 재조합유전자를 합성하였으며 이를 λ ZAP II에 연결하여 cDNA Library를 합성하였다. 1×10^7 의 phagemid를 합성된 oligonucleotide probe로 검색한 결과 6개의 양성 반응을 얻었으며 이들의 southern blotting을 실시하였다. 또한 토끼에서 분리한, 생쥐 음성 특이항원의 항혈청을 이용하여 재조합 유전자 은행을 검색하여 1개의 양성반응을 얻었다.

VI. 引用文獻

1. Andrew H.S. and B. Philippe. 1990. A from the sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA binding motif. Nature 346:240-244.
2. Aviv, H. and P. Leder. 1972. Purification of biologically active globin mRNA by

- chromatography on oligothymidylic acid-cellulose. Proc. Natl. Acad. Sci. 69:1408.
3. Billingham, R.E. and W.K. Silver. 1960. Studies on tolerance of the Y chromosome antigen in mice. J. Immunol. 85:14-26.
 4. Chao, S., L. Chao and J. Chao. 1989. Enhanced specificity in immunoscreening of expression cDNA clones using radiolabeled antigen overlay. BioTechniques 7(1):681.
 5. Eichwald, E.J. and C.R. Silmsler. 1955. Transplant Bull 2:148-149.
 6. Gubler, U. and B.J. Hofman. 1983. A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. Gene 25:263.
 7. Jone, K.W. and L. Singh. 1981a. Conserved sex associated repeated DNA in vertebrates., In Genomeevolution 20:135-154, London Academic Press.
 8. Jone, K.W. and L. Singh. 1981b. Conserved repeated sequence in vertebrates. Hum. Genet. 58, 46-53.
 9. Muler, U. 1981. Immunological and functional aspect of H-Y antigen Hum. Gene., 58: 29-33.
 10. Narang, S.A. 1990. Chemical synthesis of deoxyoligonucleotide modified trister method., Methods Enzymol. 65:610.
 11. Robert, J.M. 1980. A plasmid cloning vehicle allowing positive selection. Gene 12:123.
 12. Phillippe Berta, Ross Hawkins, Andrew H. Sinclair, Anne Talyor, Beatrice L. Griffiths, Peter N. Goodfellow and Marc Fellous, 1990. Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. Nature 348:448.
 13. Short, J.M., J.M. Fernandez, J.A. Sorge, and W.D. Huse. 1988. λ ZAP: A bacteriophage λ expression vection *in vivo* expression vector *in vivo* expression properties. Nucleic Acids Res. 16:7583.
 14. Singh, L., S. Mastsukuma and K. Jones. 1987. Testis determinant in a predominant XX mosaic mouse., Dev. Biol. 101:143-149.
 15. Singh L. and K.W. Jone. 1982. Sex reversal in the mouseis caused by a recurrent non-reciprocal crossover involving the X and ajn aberrant Y chromosome. Cell 28, 205-216.
 16. Sigh, L., C. Phillips and K.W. Jone. 1984. The conserved nucleotide sequence of Bkm whic define Sxr in the mouse are transcribed. Cell 36:111-120.
 17. Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequence amongst DNA fragments seperated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98:503.
 18. Stawinski, J. 1977. Arylsulfonyltetrazoles, new coupling reagents and further improvement in the triester method for the synthesis of deoxyribooligonucleotides. Nucleic Acids Res. 4:353.
 19. Ullich, A. 1977. Rat insulin genes:Construction of plasmids containing coding sequence. Science 196:1313.
 20. Wachtel, S.S. 1984. H-Y antigen in the study of sex determination and control of sex ratio. Theriogenology 21:18-28.
 21. Wood, K.O. and J.C. Lee. 1976. Integration of synthetic globin genes into a *E. coli* plasmid., Nucleic Acids Res. 3:1961.
 22. Yun-Fai Chris Lam, Kaimin Chan and Robiri Sparkes, 1989. Male-enhanced antigen gene is phylogenetically conserved and expressed at late stage of spermatogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8462.
 23. Zain, S. 1977. Nucleotide sequence analysis of the leader fragments in a cloned copy of adenovirus 2 fiber mRNA. Cell 16:851.