

# 생쥐의 MT Transposon-like Element, Clone MTi7(MTi7) 유전자의 포유류 Homolog 및 Flanking Sequence에 대한 연구

김영훈 · 고민수<sup>1</sup> · 우대균<sup>2</sup> · 최돈찬<sup>2</sup> · 이경아<sup>†</sup>

포천중문의과대학교 생명과학전문대학원, <sup>1</sup>솔젠트사, <sup>2</sup>용인대학교 환경생명학부

## Studies on Mammalian Homolog and Flanking Sequence of Mouse MT Transposon-like Element, Clone MTi7(MTi7)

Young-Hoon Kim, Minsu Ko<sup>1</sup>, Dae-Gyun Woo<sup>2</sup>, Donchan Choi<sup>2</sup> and Kyung-Ah Lee<sup>†</sup>

Graduate School of Life Science and Biotechnology, Pochon CHA University College of Medicine, Seoul, 135-081, Korea,

<sup>1</sup>SolGent Co., Ltd, Daejeon 302-858, Korea

<sup>2</sup>Division of Environmental and Biological Sciences, College of Natural Science, Yong-In University, Yong-In, Gyeonggi-do 449-714, Korea

**ABSTRACT** : In the previous study, we obtained list of differentially expressed genes between postnatal day 1 and day 5 mouse ovaries using suppression subtractive hybridization(SSH) and found that MT transposon-like element, clone MTi7(MTi7) was one of the highly expressed genes in the day 5 mouse ovary(Park et al., 2002). Results of *in situ* hybridization and RNA interference revealed that the expression of MTi7 is oocyte-specific in the ovary and may be involved in the regulation of oocyte maturation(Park et al., 2003). At present, MTi7 sequence has been known only in the mouse. Therefore, the present study was accomplished 1) to identify MTi7 sequence in the other mammalian species, such as bovine, porcine, rat, and human, and 2) to evaluate the flanking sequence of the mouse MTi7 since it has transposon characteristics. Using ovarian cDNAs derived from four different species, we cloned and identified new MTi7 sequence showing a high degree of sequence homology with the mouse MTi7(87~98%). By using inverse PCR, we found that the mouse MTi7 may intercalated the beta-carotene 15, 15'-monooxygenase(Bcdo) gene and/or serine protease inhibitor, Kunitz type I(Spint 1) gene. By finding the MTi7 sequences in the other mammalian species and the flanking gene of the MTi7 in mouse, it is expected to reveal the role(s) of MTi7 in the oogenesis as well as folliculogenesis in the near future.

**Key words** : MTi7, Cloning, Sequencing, Inverse PCR.

**요 약** : 본 연구실에서는 이전의 실험에서 suppression subtractive hybridization(SSH)을 통하여 생쥐의 생후 1일자 난소와 5일자 난소에서 차이 나게 발현하는 유전자들의 목록을 얻었고 그 중에서 MT transposon-like element, clone MTi7(MTi7)이 성장하는 난포에서 더 높게 발현한다는 것을 알아냈다(Park et al., 2002). *In situ* hybridization과 RNA interference를 이용한 연구결과, MTi7은 난자에서 특이적으로 발현하는 유전자로 특히 난자성숙에 관여하는 것으로 관찰되었다(Park et al., 2003). 그러나 현재까지 MTi7의 염기서열은 생쥐에서만 알려져 있다. 따라서 본 연구는 두 부분으로 나누어서 첫째, MTi7이 다른 포유류에도 존재하는지 알아보기 위해 소, 돼지, 흰쥐 그리고 사람 등 각기 다른 네 종의 난소 cDNA를 사용하여 새로운 MTi7을 분리하고자 하였으며, 둘째, 생쥐의 MTi7이 transposon의 특징을 갖고 있어 다른 유전자에 삽입되어 있는지를 알아보기 위해 inverse PCR을 시행하여 MTi7 주변의 유전자가 있는지를 조사하였다. 네 종의 난소 cDNA를 사용하여 생쥐의 MTi7과 매우 유사한 염기서열을 갖고 있음을 알았다(87%~98%). Inverse PCR 결과, 생쥐의 MTi7은 beta-carotene 15, 15'-monooxygenase(Bcdo) 유전자 혹은 serine protease inhibitor, Kunitz type I(Spint 1) 유전자에 삽입되어 있음을 알 수 있었다. 본 연구의 결과로 여러 포유류의 MTi7 sequence를 알아내고, 또한 생쥐의 MTi7이 삽입되어 있는 유전자를 알아냄으로써 머지않은 장래에 난자형성 및 난포형성과정에 있어서 MTi7의 역할을 밝혀 낼 수 있을 것으로 기대된다.

## 서 론

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(2000-2-20500-001-2)지원으로 수행되었음.

<sup>†</sup>교신저자: 서울시 강남구 역삼1동 606-5, 차병원 여성의학연구소, 포천중문 의과대학교 생명과학전문대학원. (우) 135-081, (전) 02-3468-3440, (팩) 02-501-8704, E-mail: leeka@nuri.net

본 연구실에서는 이전의 실험결과, MT transposon-like element, clone MTi7(MTi7)이 생쥐의 난소에서 모든 발달단계의 난자에서 특이적으로 발현하는 유전자라는 것을 알았으

며, 따라서 난자의 성장과 성숙과정에 밀접한 관계를 갖고 있을 것으로 추측하고 있다(Park et al., 2002). MTi7이 난자에서 특이적으로 발현하며 난자성숙과 밀접한 관련을 갖는 유전자일 것이라는 사실은 난자성숙에 관여하는 하나의 인자로서 MTi7에 대한 더 자세한 연구를 촉발하는 계기가 되었다. 즉 이와 같은 현상이 모든 포유류에서 일어나는가를 확인하는 것은 매우 중요한 일로 생각된다. 그러나 MTi7의 염기서열은 현재까지 단지 생쥐에서만 밝혀져 있다. 따라서 본 연구에서는 다른 실험동물인 흰쥐, 대표적인 대동물인 소, 돼지, 그리고 사람의 난소에서도 MTi7이 존재하는지 확인하고자 cloning과 sequencing을 하게 되었다. 현재, 제작 가능한 것은 생쥐의 MTi7 sequence 뿐이므로 이를 가지고 만든 두 종류의 primer set를 조합해서 PCR하였으나, 사용한 네 종류의 난소조직 모두에서 PCR산물을 얻을 수 없었다. BLAST에 등록되어 있는 생쥐의 MTi7은 MTi5, 6, 9, 10등과 매우 유사하여 MTi7만을 증폭할 primer를 제작하는 일이 매우 어려웠다. 따라서 본 연구에서는 이제까지 사용된 PCR 방법과는 다르게 mouse MTi7 PCR 산물 자체를 제한효소로 처리하여 몇 개의 단편으로 만든 후에 그 중에서 가장 짧은 단편이 primer로 작용할 수 있도록 고안하여 다른 종의 난소에서 PCR산물을 얻는데 성공하였다.

대부분의 포유류의 genome에 MT transposon-like element family가 현저히 많이 분포하고 있다고 알려져 있지만(Smit, 1993), 그 기능에 대해선 아직 밝혀지지 않고 있다. Transposon은 다른 유전자 염기서열 안으로 삽입되어 해당 유전자의 발현을 조절하는 기능을 갖는다. 따라서 MTi7의 기능도 그 이름에서 볼 수 있는 것처럼 알려져 있는 transposon과 같이 어떤 유전자의 sequence 사이에 삽입되어 그 유전자의 발현을 조절할 수 있으리라는 가정 하에 생쥐에서 이 유전자의 주변에 어떤 sequence가 있는지, 실제로 어떤 유전자의 중간에 삽입되어 있는지 그 위치를 찾아보고자 inverse PCR을 수행하였다. Inverse PCR은 genomic DNA를 제한효소로 절단하고 절단된 DNA의 free end를 ligation한 후 알고 있는 유전자의 염기서열, 예를 들면 transposon sequence를 이용하여 증폭해서 그 유전자의 flanking region을 찾아내는 방법이다(Ochman, 1988). 이렇게 찾아낸 flanking region의 염기서열을 분석함으로써 transposon이 어떤 유전자에 삽입되어 자리 잡고 있는지를 알 수 있다.

본 연구에서는 생쥐의 MTi7 PCR산물을 제한효소 처리하여 만든 단편을 primer로 이용하여 소, 돼지, 흰쥐 그리고 사람으로부터 MTi7 sequence를 찾아내고, inverse PCR방법으로

생쥐의 MTi7 주변에 위치하는 유전자를 찾아낸 결과를 보고 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. Total RNA의 분리 및 cDNA 합성과 primer 제작

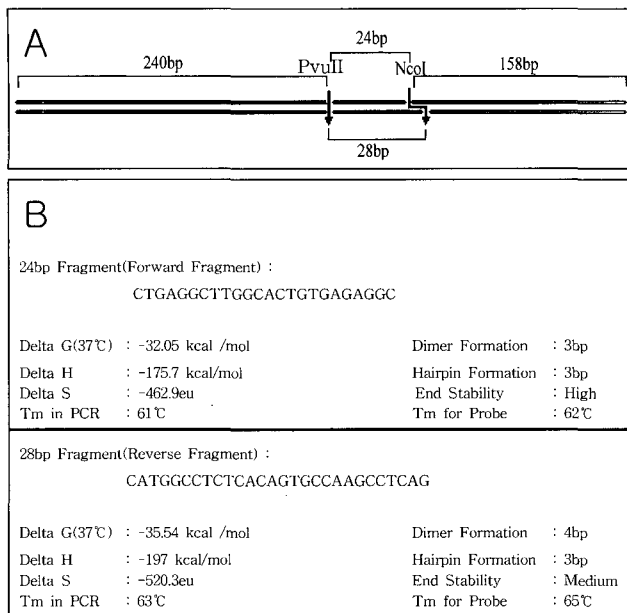
소, 돼지, 흰쥐 그리고 사람으로부터 얻은 난소에 Trizol Reagent(Invitrogen, Carlsbad, CA)를 넣어 균질화 시킨 후 상온에서 5분간 방치하였다. 여기에 전체 부피의 1/5에 해당하는 chloroform을 넣고 상온에서 15분 두었다가 4°C에서 12,000g로 20분간 원심분리한 뒤, RNA를 포함하는 무색의 상층액을 새로운 튜브로 옮겼다. 여기에 동일한 양의 isopropanol과 15ug/ul의 glycoblue(Ambion, Austin, TX) 1ul을 첨가하여 상온에서 10분간 두었다가 4°C에서 12,000g로 15분간 원심 분리하여 RNA를 침전시켰다. 상층액을 따라 버린 후 75% ethanol을 넣고 4°C에서 10분간 8,000g로 원심 분리하여, RNA침전물을 공기 중에서 건조시킨 후 DEPC 처리된 증류수로 용해 시켜 사용 전까지 -70°C에 보관하였다.

역전사(reverse transcription) 반응에는 분리된 total RNA 2ug을 사용하였다. 최종 cDNA합성물이 20ul이 되도록, 1U/ul의 DNase I(Invitrogen)로 처리된 total RNA 2ug에 oligo(dT)<sub>20</sub> 1ul을 첨가하여 70°C에서 10분간 배양한 후 Superscript II reverse transcriptase(Invitrogen) 200U/ul(1ul), 5X RT buffer 5ul, 10mM dNTP 1.25 ul, DEPC-treated water 2.75ul을 첨가하여 42°C에서 1시간, 94°C에서 2분간 반응하여 역전사 반응을 수행하였다.

### 2. Primer의 조합과 MTi7의 PCR

소, 돼지, 흰쥐 그리고 사람의 난소로부터 합성한 cDNA를 PCR증폭의 주형으로 사용하였다. 새로운 MTi7을 증폭하기 위한 primer의 조합은 세 가지로 준비하였다. 첫째, 생쥐의 PCR 증폭산물을 제한효소로 절단한 단편만을 사용한 조합, 둘째, 생쥐의 PCR 단편과 생쥐의 MTi7 forward primer 조합, 셋째, 생쥐의 PCR 단편과 생쥐의 MTi7 reverse primer 조합으로 각각 touch-down PCR 증폭을 수행하였다. 생쥐의 MTi7 PCR증폭산물의 단편을 만든 방법은 다음과 같다. 생쥐의 MTi7 PCR 증폭산물을 제한효소 *PvuII*와 *NcoI*으로 절단하였을 때, 이 중에서 24 bp와 28 bp의 단편에 대한 Tm값과 GC content를 확인하여 primer로 사용하기에 적당한 것을 확인하였다(Fig. 1).

PCR 증폭은 cDNA 1ul에 각 세 가지 조합의 primer 2ul,



**Fig. 1. Characteristics of 24bp and 28bp of the mouse MTi7 fragments.** A. The mouse MTi7 PCR product(422bp) was treated by PvuII and NcoI. B. Primer conditions for 24 bp- and 28 bp-fragments of the mouse MTi7 PCR product such as Tm and GC contents.

25mM MgCl<sub>2</sub> 2.5ul, 10X buffer 2.5ul, 10mM dNTP 0.5ul, 5U/ul Taq DNA polymerase(Promega, Madison, WI) 0.25ul, 그리고 멸균된 3차 증류수로 전체 반응용액을 25ul로 맞추어 수행하였다. Touch-down PCR 조건은 94°C에서 5분, 94°C에서 40초, 64°C~50°C로 cycle당 0.4°C씩 내려가도록 하여 각각 40초, 72°C에서 1분, 70°C에서 7분으로 40 cycle을 수행하였다.

### 3. PCR 산물의 cloning 과 sequencing

생쥐의 MTi7 PCR 단편과 생쥐의 primer를 조합으로 한 경우에만 PCR 산물을 얻을 수 있었는데, 이렇게 얻은 PCR 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동 한 후 증폭된 band 만을 잘라내 분리하였으며, Gel Extraction Kit(QIAGEN, Santa Clara, USA)를 사용하여 정제하였다. pGEM-T easy vector(Promega)에 cloning 하기 위해 4°C에서 overnight self-ligation 시켰고, cloning된 DNA는 *Escherichia coli* strain, JM109에 형질 전환하여 DNA를 증폭하였다. Plasmid DNA는 Plasmid Isolation Kit(QIAGEN)를 사용하여 분리하였다.

Cloning된 sample중 PCR 증폭산물이 insert로 들어간 positive clone을 T7 promoter의 primer를 사용하여 염기서열을 분석하였다(Macrogen Co., Ltd. Seoul, Korea). MTi7의 염기서열은 BLAST network server를 통하여 GeneBank database로부터 검색하고 DNAssist(DNAssist cc. Bellville, South Africa)와

GeneDoc(Pittsburgh Supercomputing Center. Pittsburgh, PA, USA: version 2.6.002) program을 사용하여 분석하였다.

### 4. In Situ Hybridization

*In Situ* Hybridization에 사용되는 RNA probe를 제작하기 위하여, RNA *in vitro* transcription(*In Vitro* Transcription kit, Promega) 반응을 시켰다. 이때 1ug/ul DNA template 1ul, 5X Trans buffer 4ul, RNasin 2ul, T7 또는 SP6 RNA polymerase 2ul, DIG RNA labeling mix(Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) 2ul, 100mM DTT 2ul 및 DEPC-H<sub>2</sub>O를 전체 20ul가 되도록 첨가하여 37°C에서 overnight 반응시킨 후 RNase-free DNase I(Promega)를 처리하였다. RNA probe의 생산을 확인하기 위하여 반응물 1ul를 1% agarose gel에 전기영동하여 band를 조사하였다. DNA량을 확인한 후 probe 반응물을 G-50 Columns (Amersham Pharmacia Biotech Ltd., Piscataway, NJ)으로 정제한 후 DNA 농도가 100ug/ml이 되도록 Hybe buffer(50% formamide, 5X SSC, 1mg/ml Torula yeast RNA, 100ug/ml heparin, 1X Denhardt's solution, 0.1% Tween-20, 0.1% CHAPS, 0.5mM EDTA)로 희석하였다.

각 포유류의 난소조직을 4% paraformaldehyde에 고정시킨 후 paraffin block을 제작하였으며, 5um 두께의 절편을 silanized glass slide에 부착하여 보관하였다. Paraffin 절편 슬라이드를 xylene에 처리하여 paraffin을 제거하고, 알코올 처리 과정을 거쳐 PBS 용액으로 세척한 후 4% paraformaldehyde 용액으로 실온에서 10분간 재고정 하였다. PBS 용액으로 세척한 후 0.1M triethanolamine(TEA)용액으로 5분간 반응시키고, 0.25% acetic acid가 포함된 0.1M TEA 용액으로 실온에서 10분간 처리하였다. 알코올 처리과정을 거쳐 탈수시킨 후 Hybe buffer에 RNA probe를 100배 희석하여 조직위에 처리하였다. 조직이 마르지 않도록 parafilm을 덮어서 65°C humid chamber에서 overnight 처리하였다. 이후 65°C로 예열된 2X SSC/50% formamide 용액으로 30분간 처리한 후 blocking reagent(20% sheep serum, 2% BMB; Boehringer Mannheim Blocking buffer)가 들어있는 MAB(100mM maleic acid in 150mM NaCl, pH 7.5) 용액으로 실온에서 1시간 반응시켰다. 여분의 용액을 제거하고 anti-DIG antibody(Boehringer Mannheim)를 blocking reagent가 포함된 MAB 용액으로 1,000배 희석하여 실온에서 1시간 반응시켰다. MAB 용액으로 10분간 4회 수세하고 BCIP/NBT(Sigma)로 실온에서 overnight 발색시켰다. 발색 후 PBS로 수세하고, Nuclear Fast Red(sigma)로 counter stain한 후 Aqueous mounting medium(DAKO, Carpinteria, CA)으로 봉입하여 관찰하였다.

### 5. 생쥐의 MTi7 Inverse PCR

6주령 ICR 생쥐의 난소로부터 Genomic DNA isolation kit(QIAGEN)을 이용하여 genomic DNA를 분리하였다. 분리한 genomic DNA는 생쥐의 MTi7을 단일 site로 절단하는 제한효소인 *NcoI*과 *BamHI* 10U로 각각 절단하였다. 반응용액 총 50ul에 genomic DNA 2ug, 10X enzyme buffer 5ul, restriction enzyme 10U를 사용하여 37°C에서 overnight 절단하여, genomic DNA의 최종농도가 20ug/ul 이하가 되도록 하여 4°C에서 self-ligation시켰다.

*BamHI*과 *NcoI*으로 각각 절단한 genomic DNA 염기서열에서 그 절단면을 기준으로 한쪽방향에 forward와 reverse primer가 들어갈 수 있도록 primer를 제작하였다.

Self-ligation 시킨 genomic DNA를 PCR증폭 주형으로 사용하여 inverse PCR를 수행하였다. 먼저 F1/R1로 일차 증폭을 수행하였는데, 반응용액 50ul에 self-ligated genomic DNA 3ul, 10X PCR buffer 5ul, 10mM dNTP 1ul, F1/R1 primer 각 1ul 그리고 Tag polymerase 1ul을 사용하였다. 일차증폭산물을 PCR purification kit(QIAGEN)로 정제하여 다시 이차증폭에서 주형으로 사용하였다. 이차반응에서는 반응용액 50ul에 일차증폭산물 3ul, 10X PCR buffer 5ul, 10mM dNTP 1ul, F2/R2 primer 각 1ul 그리고 Tag polymerase 1ul를 사용하였다. 일차와 이차 PCR증폭산물크기의 차이가 120 bp가 되므로 이차증폭산물을 1.5% agarose gel에서 전기영동 하여 일차증폭산물보다 약 120 bp 정도 작게 나온 각 band를 elution하여 cloning 하고 sequencing 하였다.

이차증폭에서 얻은 염기서열 중 MTi7이 삽입되어 있을 것으로 예상되는 flanking유전자의 염기서열에서 flanking primer를 제작하여 이차증폭에 사용한 F2 primer와 함께 genomic DNA를 주형으로 사용하여 PCR을 수행하였다. 총 반응용액 50ul에 *NcoI* digested self-ligated genomic DNA 1ul, 10X

PCR buffer 5ul, 10mM dNTP 1ul, F2/R2 primer 각 1ul 그리고 *Pfu* polymerase 1ul을 사용하였다. 이때 PCR증폭 중에 일어날 수 있는 염기서열의 변이를 최소화하기 위해 *Pfu* polymerase (Solgent Co., Ltd. Daejeon, Korea)를 사용하였고, 이차증폭에 사용된 F2 primer로 염기서열을 분석하였다.

## 결 과

### 1. 포유류 MTi7 element의 분리 및 확인

생쥐의 MTi7 PCR 증폭산물을 제한효소 *PvuII*와 *NcoI*으로 절단하여 얻은 MTi7 24/28 bp 단편을 에탄올 침전을 통해 정제한 후 한쪽 primer로 사용하였다. PCR 증폭 결과, primer만을 사용할 경우는 PCR이 되지 않았으나 단편을 사용한 두 번째 조합과 세 번째 조합에서 각각 1개와 3개의 band가 증폭되었다(Fig. 2A, B). 그러나 소의 경우는 세 번째 조합에서는 한 개의 band만 얻을 수 있었다(Fig. 2B). 두 번째 조합을 사용해서 얻어진 염기서열은 생쥐에서의 경우 5'쪽이 증폭된 것이고, 세 번째 조합을 사용해서 얻어진 염기서열은 3'쪽이 증폭된 것으로 각각의 band를 정제하고, cloning하여 염기서열을 확인한 후 생쥐의 MTi7과 정렬시켰다(Fig. 2C, D). 그 결과 두 번째 조합을 사용한 증폭산물은 생쥐의 MTi7 5' 부위와 91~92%의 상동관계를 나타냈고, 세 번째 조합을 사용한 증폭산물은 생쥐의 MTi7 3' 부위와 93~98%의 상동관계를 나타냈다.

각 종에서 MTi7이라고 생각되어지는 염기서열이 증폭되는지, 그리고 조금 더 긴 PCR product를 증폭하기 위해 5'쪽에서 얻은 염기서열에서 forward primer를 제작하고 3'쪽에서 얻은 염기서열에서 reverse primer를 제작하였다. 이들을 각종의 ovarian cDNA를 주형으로 PCR 증폭을 수행하여 각각의 포유류에서 band를 확인하였다(data not shown). 이렇게 얻은

Table 1. BLAST results of MTi7-like elements found in 4 different mammalian species

Clone	Accession	BLAST search result	Identity	Local	Subject	Local
Human	AC101889	Mus musculus chromosome 3, clone RP23-465M13, complete sequence	331/361 (91%)	1-359	6142-5784	
Rat	AL732464	Mouse DNA sequence from clone RP23-453F10 on chromosome 4, complete sequence	367/417 (88%)	1-417	14076-13663	
Porcine	AC091755	<i>Sus scrofa</i> clone RP44-123F10, complete sequence	236/261 (90%)	32-292	6693-6953	
Bovine	AC136146	<i>Mus musculus</i> chromosome 7 clone RP23-4H17, complete sequence	210/213 (98%)	1-213	56704-56492	

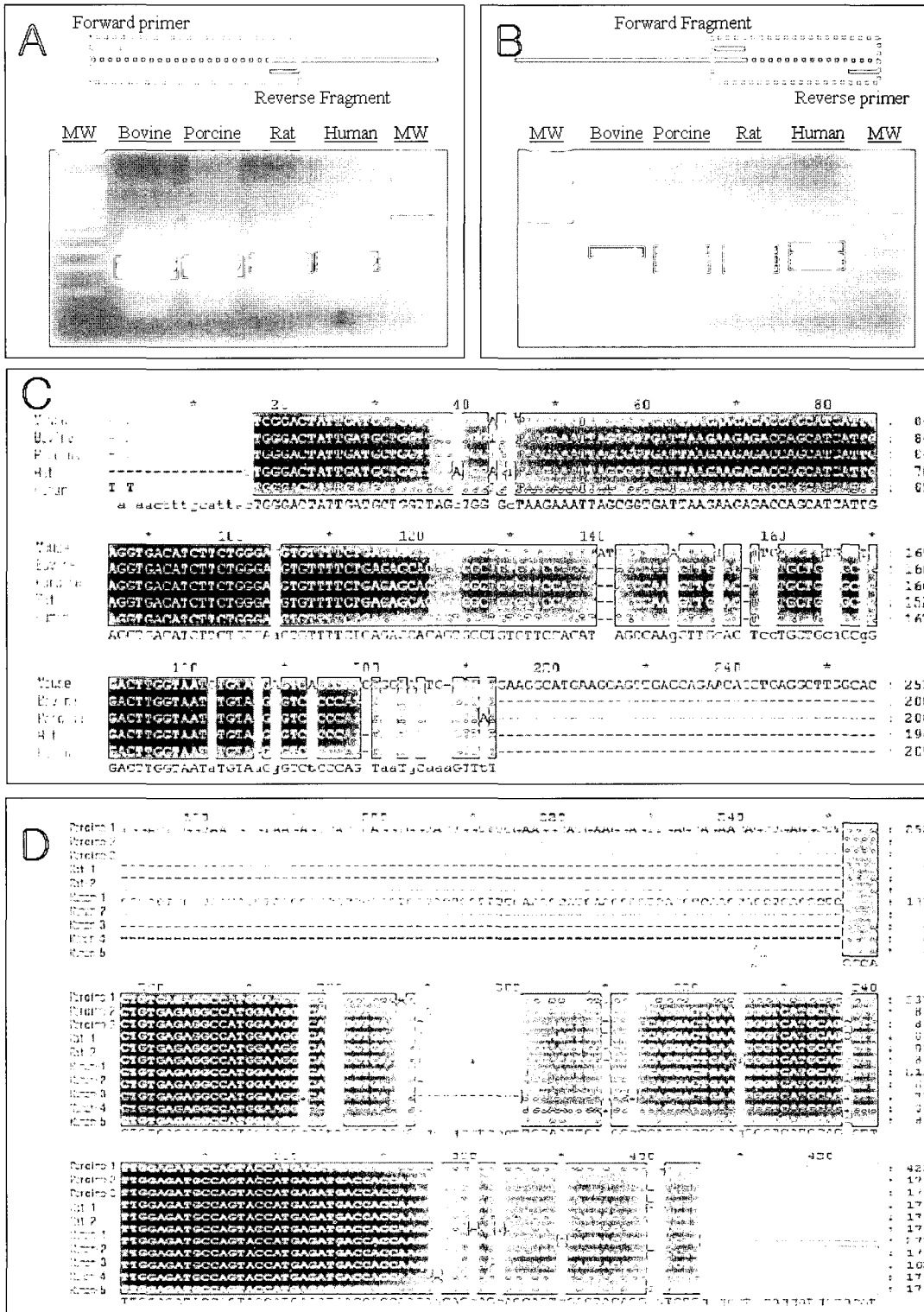


Fig. 2. Touch-Down PCR results in 4 different species by using mouse MTi7 fragments and primers for mouse MTi7 in combination. A. Combination of forward primer and reverse fragment resulted in one band of PCR product in all 4 species. B. Combination of reverse primer and forward fragment resulted in 3 bands of PCR product in all species except bovine where only 1 band found. C, D. Alignment results of MTi7 from 4 different species with the mouse MTi7. C. Alignment of 5'sequences with the mouse MTi7 sequence. D. Alignment of 3' sequence with the mouse MTi7 sequence. All sequence showed high similarity(black).

각각의 band를 다시 cloning하여 최종적으로 각 종의 cDNA로부터 얻은 MTi7에 해당하는 염기서열을 알아내었다. 각 염기서열을 BLAST에서 검색한 결과를 Table 1에 정리하였다.

각 종으로부터 얻은 염기서열들은 어떠한 특정 유전자도 나타내는 것이 아니었고 다만 염색체 clone으로만 알려져 있었다.

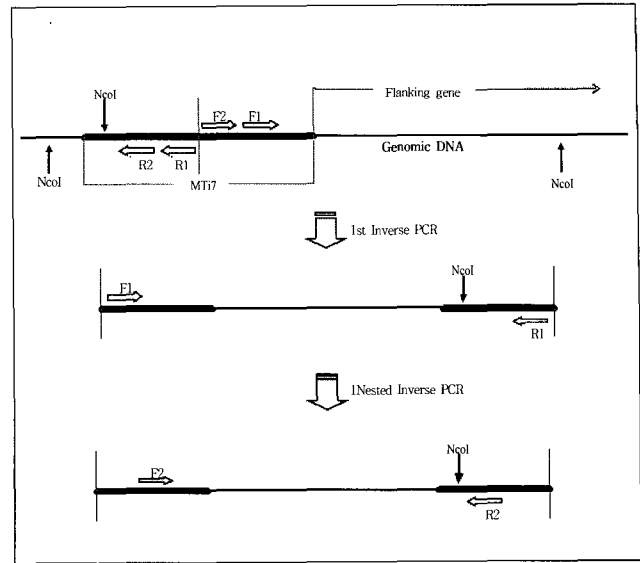
BLAST2를 통해 각각의 염기서열을 생쥐의 MTi7과 비교했을 경우, 돼지의 염기서열만을 제외하고, 생쥐의 MTi7과 80%이상의 상동관계를 나타내었다. 그 중 소에서의 염기서열이 생쥐의 MTi7과 98%로 유사성이 가장 높았으며 그 다음으로 사람(88%), 흰쥐(87%)의 순서로 유사성을 보였으나 돼지에서는 전혀 유사성을 보이지 않았다. 그러나 GeneDoc program을 이용하여 상동관계를 알아보면 돼지의 sequence도 생쥐의 MTi7과 유사성을 보였다. BLAST를 통해 알아본 각 종간의 유사성은 Table 2에 정리하였다.

또한 *in situ* hybridization을 통하여 그 위치를 흰쥐에서 확인해 본 결과 생쥐에서의 결과와 유사하게 난자에서만 특이적으로 발현하고 있음을 알 수 있었다.

### 2. 생쥐 MTi7의 inverse PCR

Primer의 방향은 self-ligation시킨 genomic DNA를 증폭시킬 수 있도록 바깥쪽을 향하도록 제작하였으며, 각각 F1/R1 그리고 F2/R2로 두 set로 제작하여 F2/R2를 nested PCR primer로 사용하였다. Primer의 위치와 MTi7의 염기서열 그리고 그 안의 제한효소의 위치를 Fig. 3에 보여주고 있다.

생쥐의 genomic DNA를 이용한 inverse PCR에서 얻은 일차증폭산물(Fig. 4A)을 정제한 후, 다시 이차증폭에 사용하여 얻은 결과, 예상했던 대로 일차증폭에서 나온 band보다 약



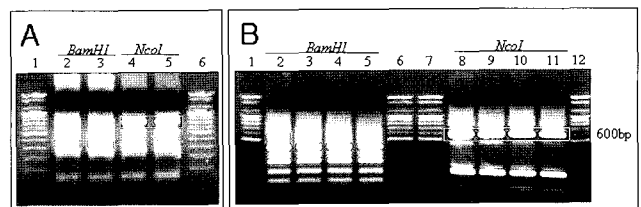
**Fig. 3. Schematic presentation of the primers for inverse PCR to find flanking genes outside the mouse MTi7.** F1/R1: First forward and reverse primers for inverse PCR; F2/R2: second nested inverse PCR primers.

120 bp 정도 작게 나오는 각 band들의 염기서열을 확인해본 결과 *NcoI*으로 절단한 genomic DNA를 주형으로 증폭한 band 중에 약 600 bp로 증폭된 band가 MTi7의 flanking gene을 포함하고 있었다(Fig. 4B, box로 표시된 band부분). 이 염기서열을 BLAST에서 검색한 결과 beta-carotene 15,15'-mono oxygenase(Bcdo) gene과 166 bp중 164 bp가 일치하였고 serine protease inhibitor, Kunitz type 1(Spint 1)과는 166 bp중 163 bp가 일치하여 98%의 유사성을 보였다(Table 3).

이렇게 확인한 유전자가 Genomic DNA상에서 MTi7과 나란히 위치하고 있는지를 확인하기 위하여 이번에는 MTi7 염기서열 중에서 forward primer를, 그리고 위의 유전자 염기서

**Table 2. Homology of MTi7 sequences found in 4 different mammalian species**

MTi7	Rat	Bovine	Human	Porcine
	(417 bp)	(213 bp)	(361 bp)	(261 bp)
Mouse	254/290 (87%)	131/133 (98%)	213/241 (88%)	24/24 (100%)
Rat		115/133 (86%)	294/333 (88%)	20/20 (100%)
Bovine			105/122 (86%)	24/24 (100%)
Human				20/20 (100%)



**Fig. 4. A. Electrophoresis of first inverse PCR products.** Lane 1, 6: 100bp marker, lane 2, 3: PCR with *BamHI* digested genomic DNA, lane 4, 5: PCR with *NcoI* digested genomic DNA. **B. Electrophoresis of second nested inverse PCR.** Lane 2~5: PCR with first inverse PCR products at lanes 2 and 3 in Fig. 4A, lane 8~11: PCR with first inverse PCR products at lanes 4 and 5 in Fig. 4A. Band at about 600bp size, 120bp shorter than first product, were bands expected as flanking gene(s) for the mouse MTi7.

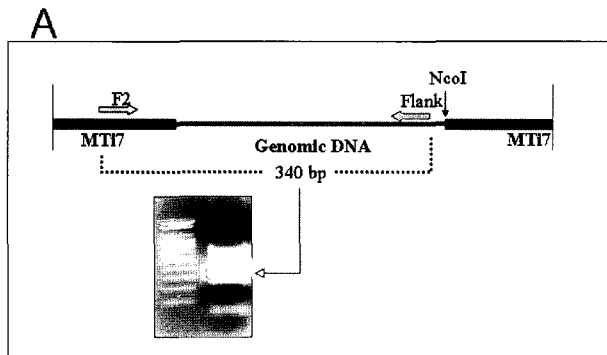
**Table 3. BLAST search results for flanking genes of the mouse MTi7**

Clone	Cloning size	Flank size	BLAST result	Accession	Homology
N60	605	166	<i>Mus musculus</i> beta-carotene 15,15'-mono oxygenase(Bcdo) gene, exons 1, 2, and 3	AY114294	164/166 (98%)
			<i>Mus musculus</i> serine protease inhibitor, Kunitz type 1(Spint1), mRNA	NM_016907	163/166 (98%)

열 중에서 reverse primer(flanking primer)를 제작하여 self-ligated genomic DNA에서 gradient PCR을 수행한 결과 예상크기인 340 bp에서 band가 확인되었고(Fig. 5A), 그 염기서열을 Fig. 5B에 나타내었다.

**고 찰**

본 연구에서는 생쥐의 한 쪽 방향의 MTi7 primer와 생쥐 MTi7 PCR product를 제한효소로 자른 단편을 PCR primer로 혼합하여 사용하는 실험방법을 고안하여 소, 돼지, 흰쥐, 사람 등 네 종의 포유류의 MTi7 homolog를 찾아내었다. MT transposon-like element는 현재 생쥐에서만 그 염기서열이 알려져 있으며, MTi5, 6, 7, 9, 10 등 다섯 종이 BLAST database에 등록되어 있는데, 서로간의 염기서열이 매우 유사하여 거의 한가지로 의심된다. 따라서 MTi7만 찾아낼 수 있는 PCR primer를 제작하는 일이 매우 어려워져서, 생쥐 MTi7 primer 두 set를 사용해서도 다른 종에서 MTi7을 PCR 증폭하는데 실패하였다. 이런 실패를 전제로 생쥐의 MTi7 PCR 생성산물을 제한효소로 단편을 만들어서 primer로 사용하려는 고안을 하게 되었다. 그 결과, 각 종에서 80% 이상의 상동관계를 나타내는 sequence를 찾을 수 있었다. 비록 PCR 산물의 단편을 정제하지 않고 그대로 사용했지만 생쥐 MTi7 primer만 사용할 경우에는 얻지 못했던 각 종의 PCR 산물을 얻는데 성공하였다. 또한 생쥐의 MTi7 PCR 단편만을 primer로 사용하여 PCR 하여도 역시 네 종류 모두 PCR 생성산물을 얻을 수 없었으며, 오직 단편과 생쥐의 primer 한쪽을 섞어서 사용할 경우에만 PCR 결과물을 얻을 수 있었다. 그러나 아직도 그 이유가 무엇인지는 밝혀내지 못하였다. 네 종의 결과 중에서 돼지의 경우는 매우 낮은 상동성을 보였는데, 이는 그 자체의 sequence에 문제가 있다기보다는 이미 database에 올려져 있는 염기서열이 많지 않기 때문에 그런 것으로 생각된다. 또한 흰쥐보다 소에서 상동성이 높게 보이는 것은 실험에서 얻은 sequence중 흰쥐에서 얻은 것이 가장 길고 소에서 얻은 것이 가장 짧았기 때문에 상동성에 차이를 보이는 것으로 생각된다. 본 연구결과 찾아낸 각 포유류의 MTi7 염기서열을 이용하면 각 종의 난소에서 난자성숙 및 난포발달에 미치는 MTi7의 기능을 연구하는데 기여할 수 있을 것으로 기대된다. MTi7은 그 염기서열의 구조가 transposon과 유사하여 transposon-like element 라고 이름 지어졌다. MTi7의 염기서열



**B**

F2 primer  
AAGCATATGTAAGACTGTGGGACTTTTAAAGTTATTTAGATCTTGGGGA  
 TGAATAAGAATGTAAGGGTTGAGGCTTACTAGTGATGTGTTGTGTGTCA  
 AGTTGACAAGGGGGTCAATTGTACTGGCTAGTTTTGTGTCAACTTGACAC  
 AGCTGGGGTTATCAGAGAGAAAGAGCTTCAGTTGAGGAAATGCCTCCAT  
 GAGATCCAAGTGTAGGGCATTCTCAGTTAGTGATCAAGGGGAAAGGC  
 CCCTGTGGTGGGACCATCTCAGGGCTGGTAGTCTTGGTTCTATAAGAA  
 AGCAGGCTGAGCAAGCCAGGTGAGGCAAGCCAGTAAAGAACATCCCTCCA  
 Flanking primer  
 TGGAAGGCCATTGGTGAAGGTGCAGCCTCATTGCAATTGACTGCCAGG  
 ATTGAAGGAGTCATGCGGTGTTTTGGAGATGCCAGTACCATGAGATGACC  
 ACCAAGACCAGCAGCAGTGGAGTACAGGCATCTGGAGCCTAGAGGATGCC  
 GCGTGTGCTACAAAGGGCATGGCTGGAGAAGTGACCCAAACCCCTGGAGG  
 AGCCAGAAGATTGTGTGTTGGATCCAGACATTGGACGGTTAGAGATTG  
 AC

**Fig. 5. A.** Schematic diagram for PCR with *Pfu* polymerase with mouse MTi7 forward(F2) primer and flanking primer(Flank) to confirm the flanking gene(s) of the mouse MTi7. **B.** Sequence of flanking region of the mouse MTi7.

을 RepeatMasker program(version 01012001; <http://repeatmasker.genome.washington.edu>)을 통하여 알려진 repeat family들의 염기서열과 비교한 결과 LTR element의 MaLR class와 100% 같은 염기서열을 가지고 있었다. 포유류에서는 거의 모든 transposon이 각 염기서열에 따라 long interspersed elements(LINEs), short interspersed elements(SINEs), LTR retroposon 그리고 DNA transposon의 네 가지 type으로 분류된다(International Human Genome Sequencing Consortium, 2001). 이 중에서 MTi7의 경우는 세 번째 LTR group의 MaLR class에 해당하는 것으로 보인다. LTR retroposon은 가능한 모든 transcriptional regulatory elements를 가지는 long terminal direct repeats에 의해 flanking되어 있다. Autonomous elements로는 protease, reverse transcriptase, RNase H 그리고 integrase를 coding하는 gag와 pol gene을 가지고 있다. 비록 LTR retroposon의 다양성이 존재하지만, 척추동물에 특이적인 endogenous retroviruses(ERVs)만이 포유류의 genome에서 활성을 나타낸다. 포유류의 retroviruses는 세 가지 class(I-III)로 나뉘고 각각 독립적인 origin의 많은 family들을 포함한다. LTR retroposon에서 유래된 것들 중에 대부분은 flanking LTRs 사이의 homologous recombination에 의해 internal 염기서열이 결여되어 하나의 분리된 LTR를 구성하고 있다.

만약 우리가 연구하고 있는 MTi7이 transposon의 일종으로 일하고 있는 유전자라면, 어떤 유전자의 염기서열 안에 삽입되어 들어가 그 유전자의 발현을 조절하고 있을 것으로 추측할 수 있기 때문에 우리는 inverse PCR 방법을 이용하여 생쥐의 MTi7의 위치를 추적하였다. 그 결과 생쥐의 MTi7 주변의 flanking sequence는 beta-carotene 15,15'-mono oxygenase(Bcdo) 유전자 또는 serine protease inhibitor, Kunitz type 1(Spint1) 유전자인 것을 확인하였다. 이로서 생쥐에서 MTi7이 기존의 transposon과 유사한 방법으로 다른 유전자에 삽입되어 있다

는 것을 알 수 있었고, 이것은 MTi7이 위에서 찾은 유전자의 발현 및 기능에 어떤 영향을 줄 수 있다는 것을 시사한다. 본 연구결과 얻어진 두 유전자, Bcdo와 Spint 1은 또한 database에 의하면 매우 유사한 염기서열을 갖고 있는 것이어서, 두 유전자의 전체 sequence 및 exon과 intron을 고려한 MTi7과의 연관관계에 대한 조금 더 심도 깊은 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

## 인용문헌

- Hennebold JD, Tanaka M, Saito J, Hanson BR, Adashi EY (2000) Ovary-selective gene I: The generation and characterization of an ovary-selective complementary deoxyribonucleic acid library. *Endocrinol* 141:2725-2734.
- International Human Genome Sequencing Consortium (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860-921.
- Park CE, Ko JJ, Lee SH, Cha KY, Kim K, Lee KA (2002) Analysis of the gene expression by laser capture microdissection(II): Differential gene expression between primordial and primary follicles. *Dev Reprod* 6:89-96.
- Park CE, Shin MR, Jeon EH, Cho SW, Lee SH, Kim K, Kim NH, Lee KA (2003) Mobile transposon-like element, clone MTi7: Finding its role(s) by RNA interference. *Korean J of Fertility and Sterility* 30:299-307.
- Ochman H, Gerber A S, Hartl D L (1988) Genetic applications of an inverse polymer chain reaction. *Genetics* 120:621-625.
- Smit AF (1993) Identification of a new, abundant superfamily of mammalian LTR-transposons. *Nucleic Acids Res* 21:1863-1872.