

pCAMBIA13011-Bcl-2식물발현운반체제작

김영호, 리동철

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《정보기술, 나노기술, 생물공학은 현시대 과학기술발전의 핵심기초기술입니다.》

(《김정일선집》 증보판 제22권 20~21페이지)

*Bcl-2*는 여러 종류의 세포들에서 각종 자극을 받을 때 세포죽음을 억제하는 작용을 한다.[1, 2]

우리는 식물발현운반체인 pCAMBIA13011에 *Bcl-2*를 재조합시켜 식물발현유전자전이균주를 얻어내기 위한 연구를 하였다.

재료와 방법

유전자클론화를 위한 연구재료로는 대장균플라스미드재조합운반체 pGEM-7zf(+)-*Bcl-2*와 대장균 *E. coli* JM109를 리용하였다.

식물발현운반체로는 pCAMBIA1301의 *Eco*RI과 *Sac*I제한부위사이에 35S프로모터를, *Pst*I과 *Hind*III 제한부위사이에 NOS말단을 삽입하여 개조한 pCAMBIA13011을 리용하였다.

실험에 리용된 모든 시약들은 분석순(《Sigma》, 《Takara》)이다.

목적유전자의 분자클론화작업은 선행연구[3]방법에 따라 진행하였다.

플라스미드의 대장균에로의 형질전환은 염화칼시움법으로 진행하였다.

목적유전자의 삽입상태검토는 제한효소절단과 PCR증폭실험으로 확인하였다.

PCR시약으로는 PCR키트(《Promega》)를 리용하였다.

반응계의 성분함량은 표 1과 같다.

PCR는 다음과 같이 진행하였다. 예비변성 94℃ 5min→변성 94℃ 30s, 아닐링 60℃ 30s, 연장 72℃ 40s, 30회 순환→최종연장 72℃ 10min→4℃ 1h.

프라이머는 프라이머설계프로그램 Primer Premier 5.0을 리용하여 표 2와 같이 설계하여 합성하였다.

표 1. 20μL PCR반응계의 성분함량

시약	첨가량/μL
10×완충액(Mg ²⁺ 포함)	2
dNTP(2.5mmol/L)	1
프라이머(10μmol/L)	0.5
프라이머 I(10μmol/L)	0.5
Taq 효소(5U/μL)	0.2
형틀DNA(20ng/μL)	1
ddH ₂ O	14.8

표 2. PCR용프라이머배열

구분	프라이머배열
<i>Bcl-2</i> (ORF)	ATGGCGCAGCTGGGAGAACAGGG(상류)
	TCACTTGTGGCCAGATAGGCACC(하류)
CaMV 35S 프로모터	CTTGCGAAGGATAGTGGGATTG(상류)
	GATAACATGGTGGAGCACGACA(하류)
NOS	GTTTTTTATGATTAGAGTCCCGC(상류)
	TAGTAACATAGATGACACCGCGC(하류)

결과 및 논의

목적유전자의 확인 대장균중간운반체에서 *Bcl*-2의 삽입유무를 확인하기 위하여 pGEM-*Bcl*-2/JM109를 Amp가 포함된 LB고체배지에 선긋기접종하고 37°C에서 12h동안 배양한 다음 단독균무지를 취하여 LB액체배지에 접종하고 확대배양하여 PCR증폭을 진행하였다.(그림 1)

그림 1에서 보는바와 같이 선택한 3개의 단독균무지에서 모두 *Bcl*-2의 증폭띠가 나타났다. 이로부터 운반체 pGEM-7zf(+)-*Bcl*-2에 목적유전자가 존재한다는것을 알수 있었다.

운반체 pGEM-7zf(+)-*Bcl*-2의 효소절단 pGEM-*Bcl*-2/JM109의 배양액으로부터 플라스미드를 추출하여 *Kpn*I과 *Xba*I로 절단하고 전기영동을 진행하였다.(그림 2)

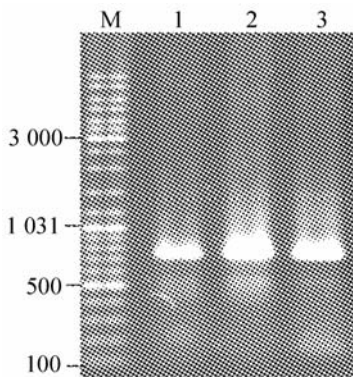


그림 1. pGEM-7zf(+)-*Bcl*-2/JM109에서 목적유전자의 존재 확인

M은 분자량표식자, 1-3은 시료; 전압 5V/cm, 1% 아가로즈겔, 1×TAE완충액

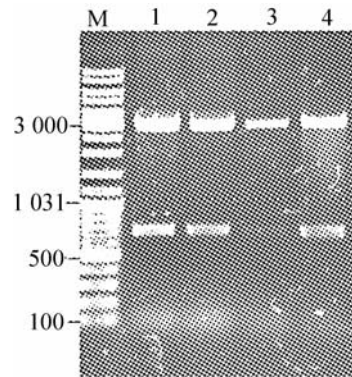


그림 2. pGEM-7zf(+)-*Bcl*-2의 효소절단반응산물의 전기영동상

M은 분자량표식자, 1-4는 반응산물; 전압 5V/cm, 1% 아가로즈겔, 1×TAE완충액

그림 2에서 보는바와 같이 720bp와 3kb위치에서 증폭띠가 확인되었는데 이것은 *Bcl*-2(720bp)와 pGEM-7zf(+)(2997bp)에 해당되는것으로서 이 운반체에 *Bcl*-2가 정확히 삽입되었다는것을 보여준다.

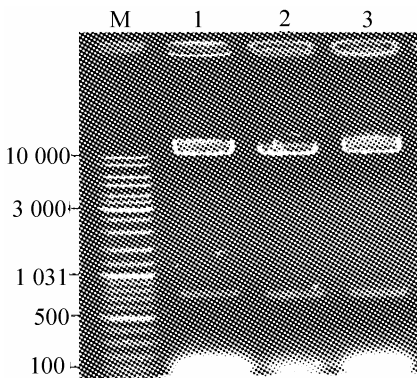


그림 3. 식물발현재조합운반체의 효소절단반응산물의 전기영동상

M은 분자량표식자, 1-3은 반응산물; 전압 5V/cm, 1% 아가로즈겔, 1×TAE완충액

얻어진 플라스미드를 *Kpn*I과 *Xba*I로 절단하고 전기영동한 결과는 그림 3과 같다.

그림 3에서 보는바와 같이 720bp와 11.8kb위치에서 증폭띠가 확인되었는데 이것은 *Bcl*-2(720bp)와 식물발현운반체 pCambia13011(11.8kb)에 해당되는것으로서 이 운반체에 *Bcl*-2가 삽입되었다는것을 보여준다. 이 재조합운반체를 pCambia13011-*Bcl*-2로 명명하였다.

식물발현운반체의 제작 pGEM-7zf(+)-*Bcl*-2와 pCambia13011을 *Kpn*I과 *Xba*I로 절단하고 전기영동을 진행한 후 720bp와 11.8kb의 토막을 회수하여 추출하고 T4 DNA리가제연결반응을 통하여 재조합플라스미드를 만들었다. 재조합플라스미드를 *E. coli* JM109에 형질전환시켜 재조합체를 선발한 다음 확대배양하여 배양액으로부터 플라스미드를 추출하였다.

식물발현운반체로의 *Bcl-2*삽입의 정확성을 확인하기 위하여 *Bcl-2*의 상류 및 하류프라이머, 35S프로모터의 상류프라이머, NOS말단의 하류프라이머를 리용하여 목적유전자의 삽입상태를 PCR증폭으로 확인하였다.(그림 4)

그림 4에서 보는바와 같이 영동주로 1에서는 *Bcl-2*의 상류 및 하류프라이머에 의한 증폭띠(720bp)가, 영동주로 2에서는 35S프로모터의 상류프라이머와 *Bcl-2*의 하류프라이머에 의한 증폭띠(1 250bp)가, 영동주로 3에서는 *Bcl-2*의 상류프라이머와 NOS말단의 하류프라이머에 의한 증폭띠(786bp)가, 영동주로 4에서는 35S프로모터의 상류프라이머와 NOS말단의 하류프라이머에 의한 증폭띠(1 316bp)가 모두 나타났다. 이것은 *Bcl-2*가 pCAMBIA13011의 *KpnI*과 *XbaI*제한부위사이에 정방향으로 정확히 삽입되었다는것을 보여준다.

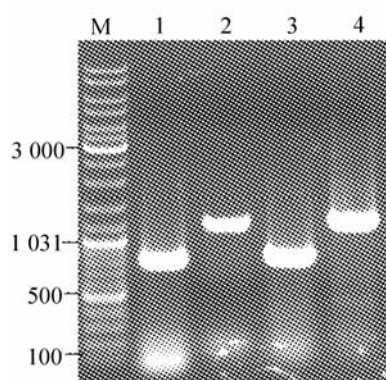


그림 4. 각이한 프라이머조합에 의한 *Bcl-2*삽입의 검정

M은 분자량표식자, 1-*Bcl-2*의 상류 및 하류프라이머, 2-35S프로모터의 상류프라이머와 *Bcl-2*의 하류프라이머, 3-*Bcl-2*의 상류프라이머와 NOS말단의 하류프라이머, 4-35S프로모터의 상류프라이머와 NOS말단의 하류프라이머; 전압 5V/cm, 1% 아가로스겔, 1×TAE완충액

맺 는 말

*Bcl-2*를 식물발현운반체 pCAMBIA13011에 재조합시켜 재조합운반체 pCAMBIA13011-Bcl-2를 제작하였다.

목적유전자는 pCAMBIA13011의 *KpnI*과 *XbaI*제한부위사이에 정방향으로 삽입되었다.

참 고 문 헌

- [1] C. W. Distelhorst et al.; Oncogene, 23, 2875, 2004.
- [2] M. Jiang et al.; Plant Cell Environ., 26, 929, 2003.
- [3] 张惠展 等; 基因工程, 高等教育出版社, 225~228, 2011.

주체106(2017)년 3월 5일 원고접수

Construction of Plant Expression Vector pCAMBIA13011-Bcl-2

Kim Yong Ho, Ri Tong Chol

The *Bcl-2* was inserted between the *KpnI* and *XbaI* restriction sites of the plant expression vector, pCAMBIA13011 to construct pCAMBIA13011-Bcl-2.

Key words: pCAMBIA13011, vector, *Bcl-2*