

벼의 *OsNRT1.1A*와 애기장대의 *AtWRKY57*, 효모의 *SaTPSP*, 사람의 *HsBcl2*발현카세트를 가진 식물발현운반체의 제작

정예진, 한금성, 리원남, 허명식

경애하는 최고령도자 김정은동지께서는 다음과 같이 말씀하시였다.

《우리 나라의 기후풍토조건에서 수확고가 높으면서도 비료를 적게 요구하고 생육기일이 짧으며 가물과 비바람, 병충해를 비롯한 여러가지 피해에 잘 견디는 품종을 얻어내야 합니다.》

오늘 이상기후의 영향으로 가물과 고온, 냉해 등 비생물성피해가 심해지면서 벼재배에서는 적지 않은 손실을 보고있다. 그러므로 이러한 비생물성스트레스에 잘 견디면서도 수확고가 높고 비료를 적게 요구하면서도 생육기일이 짧은 벼를 육종하는것은 현실적으로 중요한 문제로 나서고있다. 지금까지 비생물성스트레스에 견디는 벼를 육종하기 위하여 세계적으로 많은 연구[1-3]가 진행되었지만 모두 한가지 경로의 한가지 유전자만을 대상으로 하였다. 그러나 스트레스견딜성은 식물세포에 있는 여러 경로들이 복잡하게 얽혀 호상작용하면서 나타나므로 벼의 스트레스견딜성을 높이자면 그것과 관련된 여러 경로에 속한 유전자들을 동시에 발현시켜야 하며 이와 동시에 수확고도 높아야 한다. 이로부터 수확고가 높고 비료를 적게 요구하며 생육기일이 짧으면서도 스트레스견딜성이 높은 벼를 육종하기 위하여 벼의 질산염수송체유전자의 하나인 *OsNRT1.1A*[5]와 애기장대의 *AtWRKY57*[2], 사람의 *HsBcl2*[6], 효모의 *SaTPSP*[3]가 동시에 발현되게 하는 식물발현운반체를 제작하였다.

재료와 방법

운반체로는 pCAM-P_{35S}-*OsNRT1.1A*와 pUC-WRKY57-Bcl2-TPSP를, 숙주로는 *Escherichia coli* Top10을 리용하였다. 모든 PCR반응과 제한효소, 리가제반응, 플라스미드들의 분리정제와 형질전환 등은 표준조작[1, 4]대로 진행하였다.

결과 및 논의

pCAM-*OsNRT1.1A*의 제한효소처리 스트레스견딜성이 강한 벼육종의 가장 중요한 지표의 하나가 불리한 환경속에서도 높고 안전한 수확을 보장하는것이므로 우리는 수확고가 높고 비료를 적게 요구하며 생육기일을 앞당기는데 기여하는 유전자인 *OsNRT1.1A*를 여러 스트레스견딜성유전자들과 함께 발현시키기로 하였다.

먼저 우리는 이미 제작한 식물발현운반체인 pCAM-P_{35S}-*OsNRT1.1A*를 대장균으로부터 분리정제하고 제한효소 *Hind*Ⅲ, *Sac*I로 2중분해하였다.(그림 1)

그림 1에서 보는바와 같이 플라스미드 pCAM-P_{35S}-*OsNRT1.1A*가 제한효소 *Hind*Ⅲ+*Sac*I에 의하여 2중분해된 결과 *OsNRT1.1A*를 가진 선형플라스미드가 생겼다. 이 2중분해산물을 아가로스겔전기영동하고 겔분취하여 *OsNRT1.1A*를 가진 선형플라스미드를 얻었다.

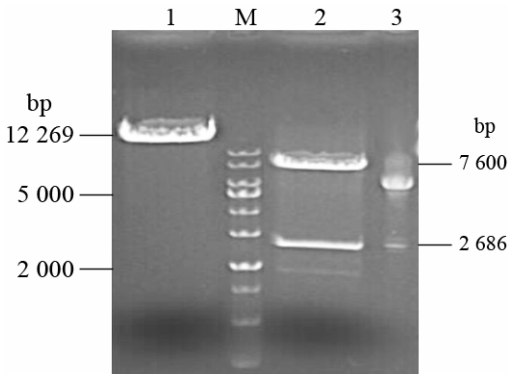


그림 1. 식물발현운반체 pCAM-OsNRT1.1A-P_{35S}와 플라스미드 pUC-WRKY57-Bcl2-TPSP에 대한 제한효소(*Hind*Ⅲ과 *Sac*I) 분해산물의 0.7% 아가로스겔전기영동상
1—식물발현운반체 pCAM-P_{35S}-OsNRT1.1A의 제한효소분해산물, 2—pUC-WRKY57-Bcl2-TPSP의 제한효소분해산물, 3—플라스미드 pUC-WRKY57-Bcl2-TPSP, M은 1kb DNA분자크기표식자

들이 들어있는 7 600bp의 단편이 생겨났다. 이 7 600bp의 단편을 겔분취하여 다음의 반응에 리용하였다.

*OsNRT1.1A*와 *AtWRKY57*, *HsBcl2*, *SaTPSP*의 발현카세트를 가진 식물발현운반체제작과 정확성확인 위해서 얻은 *OsNRT1.1A*발현카세트를 가진 플라스미드단편과 *AtWRKY57*, *HsBcl2*, *SaTPSP*발현카세트를 가진 단편을 1:3의 비율로 섞고 T7 DNA리가제로 처리한 다음 *E. coli* Top10숙주균에 형질전환시켰다. 다음 얻어진 형질전환체들에서 재조합플라스미드들을 신속분리하고 크기가 20kb정도인 재조합플라스미드를 가진 재조합균무지를 1차선발하고(그림 2) 그것으로부터 재조합플라스미드를 분리정제하였다. 이 플라스미드를 다시 *Hind*Ⅲ과 *Sac*I로 2중제한절단하여 그 정확성을 확인하였다.(그림 3)

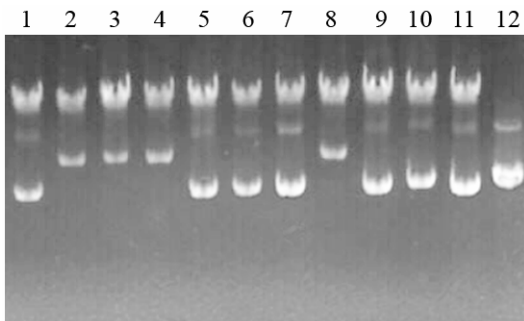


그림 2. 신속분리한 재조합플라스미드들의 0.7% 아가로스겔전기영동상

1—11은 신속분리한 재조합플라스미드, 12는 대조플라스미드 pCAM-P_{35S}-OsNRT1.1A

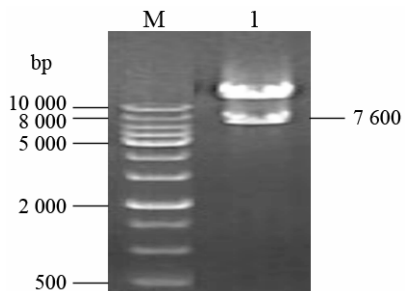


그림 3. 재조합플라스미드 pCAM-OsNRT1.1A-WRKY57-Bcl2-TPSP에 대한 제한효소(*Hind*Ⅲ, *Sac*I)분석상

1—재조합플라스미드 pCAM-OsNRT1.1A-WRKY57-Bcl2-TPSP의 2중분해산물, M은 1kb DNA분자크기표식자

그림 3에서 보는바와 같이 재조합플라스미드를 *Hind*Ⅲ과 *Sac*I로 2중제한절단하였을 때 7 600bp의 WRKY57-Bcl2-TPSP단편과 12 269bp의 pCAM-OsNRT1.1A단편이 정확히 얻어졌다.

이렇게 얻은 재조합플라즈미드를 pCAM-OsNRT1.1A-WRKY57-Bcl2-TPSP로 부르기로 하였다.

식물발현운반체 pCAM-OsNRT1.1A-WRKY57-Bcl2-TPSP의 물리적지도는 그림 4와 같다.

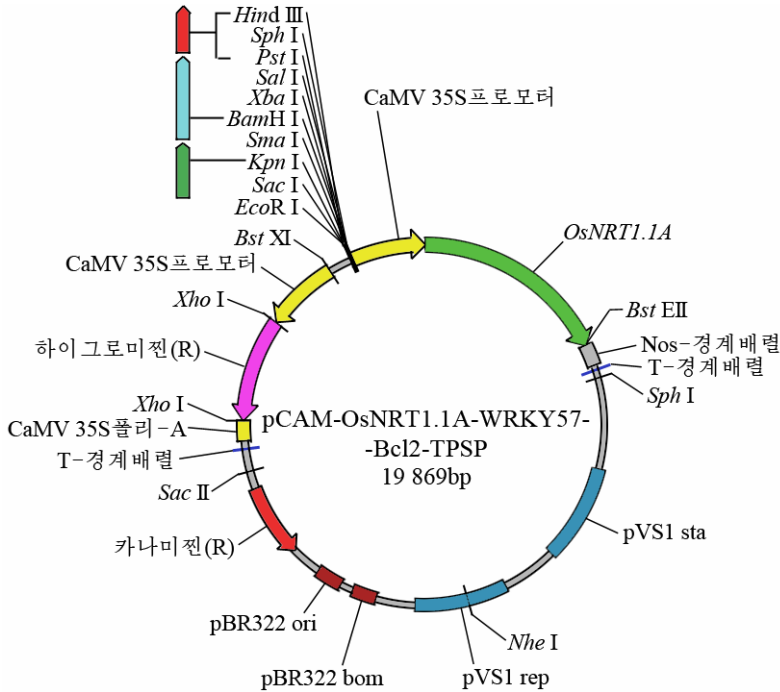


그림 4. 식물발현운반체 pCAM-OsNRT1.1A-WRKY57-Bcl2-TPSP의 물리적지도

맺는 말

식물발현운반체 pCAM-P₃₅-OsNRT1.1A와 재조합플라즈미드 pUC-WRKY57-Bcl2-TPSP를 제한효소 *Hind*III과 *Sac*I로 2중제한절단하여 얻은 선형플라즈미드 pCAM-P₃₅-OsNRT1.1A와 WRKY57-Bcl2-TPSP단편을 T7 DNA리가제로 연결하여 재조합플라즈미드 pCAM-OsNRT1.1A-WRKY57-Bcl2-TPSP를 제작하고 그 정확성을 확인하였다.

참고 문헌

- [1] T. M. L. Hoang et al.; Agronomy, 6, 54, 2016. DOI:10.3390/agronomy6040054
- [2] Y. Jiang et al.; Front. Plant Sci., 7, 572, 2016. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00145>.
- [3] J. A. Miranda et al.; Planta, 226, 1411, 2007.
- [4] J. Sambrook et al.; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 196~277, 2001.
- [5] W. Wang et al.; Plant Cell, 30, 3, 638, 2018. DOI:10.1105/tpc.17.00809.
- [6] C. W. Distelhorst et al.; Oncogene, 23, 2875, 2004.

Construction of Plant Expression Vector with Expressing Cassettes of *OsNRT1.1A*, *AtWRKY57*, *HsBcl2* and *SaTPSP*

Jong Ye Jin, Han Kum Song, Ri Won Nam and Ho Myong Sik

Salt-resistance exhibits by complex network of different pathways associated with it, so for increasing salt resistance, different genes associated with it must be pyramided in rice to express at the same time. Thus, we constructed the plasmid for pyramiding several gene-expressing cassettes such as *AtWRKY57*, *HsBcl2* and *SaTPSP* into plant expression vector pCAM-NRT1.1A-P_{35S}.

Keywords: *OsNRT1.1A*, *SaTPSP*, *AtWRKY57*, *HsBcl2*, pCAMBIA1301, 2×P_{35S}, T_{nos}