

애기장대에서 *At3g23880*의 압시신산응답과 *At3g23880*의 세포내국재화

김명욱, 한진성

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《정보기술, 나노기술, 생물공학은 현시대 과학기술발전의 핵심기초기술입니다.》
(《김정일선집》 증보판 제22권 20~21페이지)

식물호르몬인 압시신산은 씨앗의 싹트기와 성숙, 휴면과 같은 식물의 성장 및 발육의 일부 과정들을 조절할뿐아니라 가물과 한랭, 고온, 고염 등 환경스트레스에 대한 식물의 응답과정을 조절하는데서 주요한 역할을 한다. 이 압시신산의 신호전달경로에는 접수체들과 린산화효소들, 단백질키나제들, E3유비키틴리가제들, 전사인자들을 비롯한 많은 성분들이 참가한다. E3유비키틴리가제는 그 구성성분인 F-box단백질이 특이하게 결합하는 기질단백질을 유비키틴화하여 26S 프로테아솜에서 분해되게 하는 단백질복합체이다.[1] F-box 및 그 관련도메인을 가지고있는 애기장대의 *At3g23880*단백질[2]이 압시신산경로에 참가할수 있는가를 보기 위하여 우리는 *At3g23880*의 압시신산에 대한 응답성과 그 발현산물의 세포내국재화에 대하여 보았다.

재료와 방법

재료로는 야생형애기장대(*Arabidopsis thaliana* Columbia ecotype “Col-0”)를 리용하였다. 애기장대씨앗을 흙단지에 직접 심고 22°C, 16h/8h(빛/어둠)의 빛주기, 약 120 μ mol/(m²·s)의 빛세기가 보장되는 방에서 자래웠다.

압시신산에 대한 *At3g23880*의 응답을 보기 위하여 RT-PCR를 리용하여 압시신산을 처리한 개체와 압시신산을 처리하지 않은 개체에서 *At3g23880*의 발현량을 비교하였다.

압시신산처리는 12일동안 자래운 야생형애기장대개체들을 50 μ mol/L의 압시신산용액에 넣고 어둠속에서 40r/min의 속도로 4h동안 진탕하는 방법으로 진행하였다. 이 개체들을 꺼내어 액체질소속에서 얼구고 RNA를 Easy Pure Plant RNA kit(《TransGene》)를 리용하여 분리하였다.

RNA농도는 NanoDrop를 리용하여 결정하였다. 여기서 얻은 2 μ g의 총RNA를 Oligo(dT)프라이머와 EazyScript First-Strand DNA Synthesis Super Mix(《TransGen Biotech》)를 리용하여 42°C에서 30min동안 역전사하고 85°C에서 10s동안 역전사효소를 변성시키는 방법으로 cDNA를 합성하였다. 이 cDNA를 주형으로 하고 다음과 같은 프라이머와 조건에서 *At3g23880*을 PCR증폭하였다.

At3g23880-NdeIF: 5'-CAACATATGGATGAAACTACCAGAGAG-3'

At3g23880-SacIR: 5'-CAAGAGCTCAAAGATCATTTGGAGAAACC-3'

PCR조건: 94°C에서 예비변성 5min→30회전의 94°C에서 변성 30s, 58°C에서 아닐링 30s, 72°C에서 연장 1min→72°C에서 최종연장 10min

대조로는 *ACTIN2*유전자(*ACT2*)[4]를 리용하였다. 증폭산물은 0.7% 아가로즈겔전기영동으로 확인하였다.

*At3g23880*발현산물의 세포내위치는 풀색형광단백질유전자 *gfp*를 융합시킨 *At3g23880*유전자를 애기장대원형질체에서 림시발현시키고 GFP의 형광을 관찰하는 방법으로 확인하였다.

애기장대에서 분리한 RNA로부터 RT-PCR를 통하여 얻은 완전길이 *At3g23880*유전자단편을 0.7% 아가로즈겔에서 분리한 다음 제한효소 *NdeI*과 *SacI*로 자르고 정제하였다.

CaMV의 35S 프로모터를 가진 N-말단*gfp*가 있는 pUC19운반체[5, 6]를 같은 제한효소로 자르고 0.7% 아가로즈겔에서 전기영동하여 해당한 단편을 분리하였다. 여기에 위의 유전자단편을 T4 DNA리가제를 리용하여 클론화하였다.

플라즈미드분리에는 플라즈미드분리키트(《CWBiotech》)를, 겔에서 DNA단편을 분리하는데는 DNA겔분리키트(《AXYGEN》)를, 제한효소로 절단한 DNA단편을 정제하는데는 정제키트(《Axyprep》)를 리용하였다.

원형질체분리와 원형질체감염은 선행방법[3-7]에 따라 진행하였다. 약 4주일 키운 야생형애기장대의 앓은잎 15개를 효소(셀룰라제, 마세로짐)용액에 잠그고 40r/min에서 3h동안 분해한 다음 나이론그물로 걸러 여과액을 얻었다.

여기에 팽각된 200mmol/L의 염화칼슘용액을 절반체적으로 첨가하고 얼음욕에 방치하였다가 800r/min에서 3min동안 원심분리하고 상청액은 버리었다.

얻어진 침전물에 25mL의 W5용액을 조심히 섞고 얼음욕에 30min동안 방치하였다가 800r/min에서 3min동안 원심분리하고 상청액을 버리었다. 위의 조작을 다시 반복하여 얻은 원형질체에 1mL의 MMG용액을 첨가하고 얼음욕에 방치하였다.

이 원형질체용액 200μL에 10μg의 재조합플라즈미드를 섞고 여기에 같은 체적의 40% PEG를 넣어주고 조심히 혼합한 다음 얼음욕에 20min동안 방치하였다. 여기에 800μL의 W5용액을 넣어주고 10min이 지나 800r/min에서 3min동안 원심분리하여 PEG를 제거하고 여기에 1mL의 WI용액을 첨가하고 조심히 혼합하였다. 이것을 약 22h동안 방온도에서 어둡조건에 두었다가 800r/min에서 3min동안 원심분리하여 원형질체들을 모았다.

감염된 원형질체에서 림시발현된 GFP의 형광은 공초점현미경(《Olympus FV1000》)으로 관찰하였다.

결과 및 논의

먼저 압시신산처리에 따라 *At3g23880*의 발현량이 달라지는가를 보았다. *At3g23880*은 길이가 1 095bp이며 엑손 1개로 되어있다.[2] RT-PCR산물의 전기영동사진(그림 1)을 보면 대조로 리용한 *ACT2*유전자증폭산물의 띠들은 밝기가 비슷하지만 *At3g23880*에 해당한 띠들은 밝기가 차이난다. 즉 압시신산으로 처리한 개체의 *At3g23880*발현량은 처리하지 않은 대조개체에 비하여 적다. 이것은 *At3g23880*

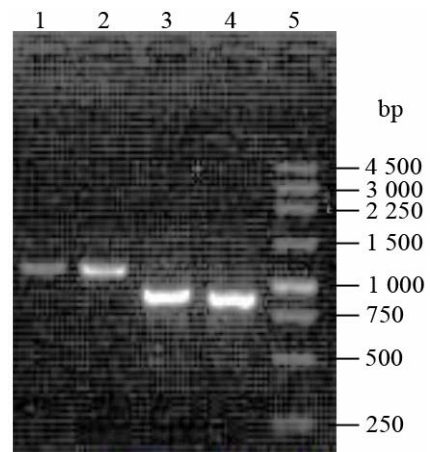


그림 1. 압시신산처리때 애기장대에서 *At3g23880*의 발현량변화

1-압시신산처리개체의 *At3g23880*증폭산물, 2-대조개체의 *At3g23880*증폭산물, 3-압시신산처리개체의 *ACT2*증폭산물, 4-대조개체의 *ACT2*증폭산물, 5-DNA표식자

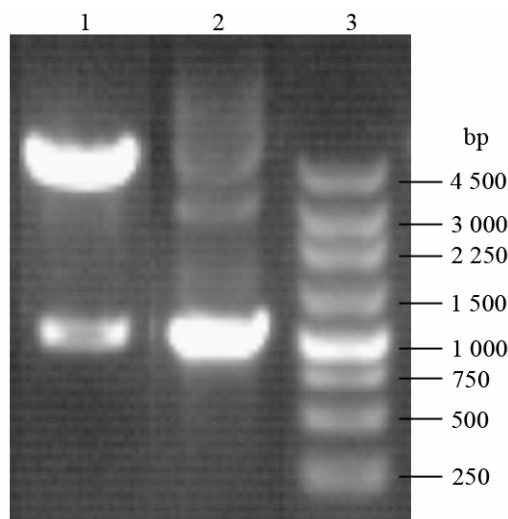


그림 2. pUC19(35S:gfp-At3g23880)의 아가로스겔전기영동상

1-재조합플라스미드의 *NdeI* 및 *SacI*분해단편, 2-재조합플라스미드를 주형으로 한 *At3g23880*의 PCR증폭산물, 3-DNA크기표식자

유전자가 외적으로 처리한 압시신산에 응답하여 내리조절되며 압시신산신호전달경로에 참가할수 있다는것을 보여준다.

다음으로 풀색형광단백질유전자 *gfp*를 융합시킨 *At3G23880*유전자의 발현운반체를 만들었다.

*At3G23880*유전자가 클론화된 재조합운반체 pUC19(35S:gfp-*At3g23880*)로 *Escherichia coli* DH5 α 를 형질전환시키고 암피실린을 100 μ g/mL 첨가한 LB평판배지에서 37°C를 보장하면서 하루밤 동안 배양하였다.

몇개의 균무지를 선발하여 암피실린을 100 μ g/mL 첨가한 LB배지에 각각 접종하고 37°C에서 하루밤동안 진탕배양하였다. 다음 플라스미드를 분리하고 제한효소(*NdeI*과 *SacI*)분해와 *At3g23880-NdeI* 및 *At3g23880-SacI*를 리용한 PCR증폭을 진행하였다. 0.7% 아가로스겔전기영동결과(그림 2) 예상되는 크기의 띠들이 정확히 얻어졌다.

얻어진 재조합운반체 pUC19(35S:gfp-*At3g23880*)를 애기장대의 원형질체에 감염시켜 림시발현시

켰다.

원형질체에서 림시발현된 GFP의 형광현미경사진(그림 3)으로부터 *At3g23880*의 발현산물이 기본적으로 핵안에 국재하고있는것을 알수 있다. 즉 *At3g23880*은 핵에서 기능을 수행하며 F-Box단백질로서 핵에서 전사인자의 분해를 통하여 전사조절에 참가할수 있다.



그림 3. 원형질체에서 림시발현된 *At3g23880*발현산물의 위치

ㄱ) 보임빛, ㄴ) 풀색형광, ㄷ) 융합

맺 는 말

애기장대에서 *At3g23880*은 외적으로 처리한 압시신산에 응답하여 발현량이 줄어들며 그 발현산물은 기본적으로 핵내에 국재한다.

참 고 문 헌

- [1] E. Lechner et al.; Curr. Opin. Plant. Biol., 9, 6, 631, 2006.
- [2] [http://www. arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)
- [3] X. Wang et al.; Plant J., 83, 300, 2015.
- [4] S. Liu et al.; Frontiers in Plant Science, 6, 388, 2015.
- [5] H. Tian et al.; Sci. Rep., 5, 17587, 2015.
- [6] S. Wang et al.; Plant Cell, 17, 1979, 2005.
- [7] Hainan Tian et al.; Plant Cell Environ., 40, 1, 2017.

주체109(2020)년 1월 5일 원고접수

ABA Response of *At3g23880* and Subcellular Localization of *At3g23880* in Arabidopsis

Kim Myong Uk, Han Jin Song

The expression level of *At3g23880* was reduced in response to exogenously applied ABA and *At3g23880* was predominantly localized in the nucleus in arabidopsis.

Keywords: ABA response, F-box, arabidopsis