

## 애기장대에서 *At3g23880*을 고발현시키기 위한 운반체의 제작

김명옥

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《정보기술, 나노기술, 생물공학은 현시대 과학기술발전의 핵심기초기술입니다.》

(《김정일선집》 증보판 제22권 20~21페이지)

우리는 애기장대에서 *At3g23880*이 압시신산에 응답하며 그 발현산물이 핵내에 국재한다는것을 밝힌데[1] 이어 *At3g23880*의 기능을 밝히기 위하여 애기장대에서 그것을 고발현시키기 위한 재조합운반체를 제작하기 위한 연구를 하였다.

### 재료와 방법

유전자단편으로는 선행연구[1]에서 RT-PCR를 통하여 얻은 cDNA를 리용하였다.

운반체로는 35S 프로모터와 N말단HA가 있는 pUC19[2, 4]와 2원운반체 pPZP211[3]을 리용하였다.

*At3g23880*을 CaMV의 35S 프로모터의 조절을 받도록 pUC19운반체에 클론화한 다음 제한효소들로 분해하여 35S 프로모터와 N말단HA를 가진 *At3g23880*단편을 얻고 이것을 T4 DNA 리가제를 리용하여 pPZP211에 옮겼다.

균그루로는 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ 를 리용하였다.

형질전환은 2 $\mu$ L의 재조합운반체용액을 얼음욕에서 녹인 20 $\mu$ L의 감수성대장균현탁액에 넣고 얼음욕에서 30min, 42 $^{\circ}$ C에서 30s, 얼음욕에서 2min 처리한 다음 500 $\mu$ L의 LB배지를 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 1h동안 진탕배양한 후 해당 항생제를 첨가한 LB평판에 도말하여 37 $^{\circ}$ C에서 하루밤동안 배양하는 방법으로 진행하였다.

플라즈미드분리에는 플라즈미드분리키트(《CWbiotech》)를, DNA단편의 겔분리에는 DNA 겔분리키트(《AXYGEN》)를, 제한효소로 절단한 DNA단편의 정제에는 DNA단편정제키트(《Axyprep》)를 리용하였다.

PCR증폭에 리용한 프라이머와 반응조건은 선행방법[1]에 준하였다.

### 결과 및 논의

먼저 *At3g23880*을 CaMV의 35S 프로모터가 있는 pUC19운반체에 클론화하였다. *At3g23880*의 RT-PCR산물에 대한 0.7% 아가로스겔전기영동상은 그림 1과 같다.

겔에서 분리한 *At3g23880*단편을 *Nde*I과 *Sac*I로 절단하고 정제하였다. 같은 제한효소들로 절단한 pUC19운반체를 아가로스겔전기영동으로 분리한 다음 여기에 위에서 얻은 *At3g23880*단편을 T4 DNA 리가제를 리용하여 연결시켰다. 이 재조합운반체 pUC19(35S: HA-*At3g23880*)로 형질전환시킨 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ 를 암피실린을 100 $\mu$ g/mL 되게 첨가한 LB평판배지에 도말한 다음 37 $^{\circ}$ C에서 하루밤동안 배양하였다. 몇개의 균무지를 선발하

여 암피실린을 100 $\mu$ g/mL 되게 첨가한 LB배지에 각각 접종하고 37 $^{\circ}$ C에서 하루밤동안 진탕배양하였다. 다음 플라즈미드를 분리하고 제한효소들(*Nde*I과 *Sac*I)로 분해한 다음 *At3g23880-Nde*IF와 *At3g23880-Sac*IR[1]를 리용한 PCR를 진행하였다. 제한효소분해단편들과 PCR산물을 0.7% 아가로즈겔에서 전기영동한 결과 예상크기의 띠들이 얻어졌다.(그림 2)

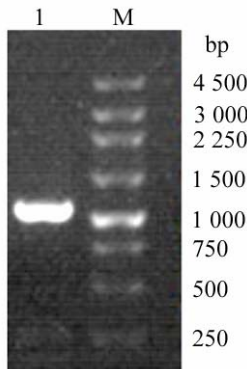


그림 1. *At3g23880*의 RT-PCR산물에 대한 0.7% 아가로즈겔전기영동상  
1—RT-PCR산물, M—DNA크기표식자

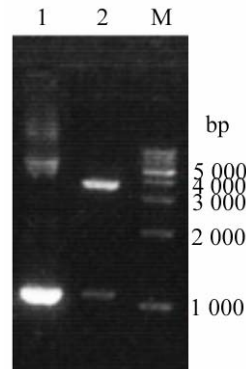


그림 2. pUC19(35S:HA-*At3g23880*)의 제한효소분해단편과 PCR산물의 0.7% 아가로즈겔전기영동상  
1—pUC19(35S:HA-*At3g23880*)를 주형으로 한 *At3g23880*의 증폭산물, 2—*Nde*I과 *Sac*I에 의한 pUC19(35S:HA-*At3g23880*)의 분해산물, M—DNA크기표식자

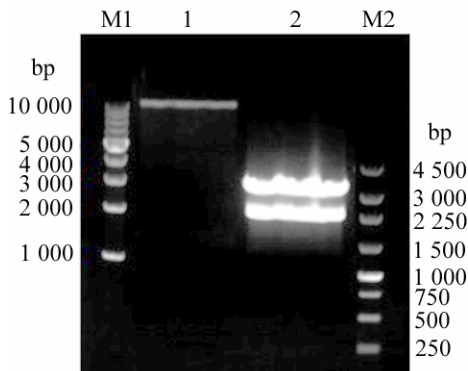


그림 3. pUC19(35S:HA-*At3g23880*)과 *Pst*I 및 *Sac*I에 의한 pPZP211의 분해산물의 0.7% 아가로즈겔전기영동상

M1과 M2는 DNA크기표식자, 1—pPZP211의 분해산물, 2—pUC19(35S:HA-*At3g23880*)의 분해산물

에서 얻은 35S:HA-*At3g23880*단편을 T4 DNA 리가제를 리용하여 연결시켰다.

이 재조합운반체 pPZP211(35S:HA-*At3g23880*)로 형질전환시킨 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ 를 스펙티노미친을 100 $\mu$ g/mL 되게 첨가한 LB평판배지에 도말하고 37 $^{\circ}$ C에서 하루밤동안 배양하였다. 몇개의 균무지를 선발하

이 플라즈미드를 제한효소 *Pst*I과 *Sac*I로 절단한 다음 아가로즈겔에서 전기영동(그림 3)하고 35S:HA-*At3g23880*단편을 분리하였다. 같은 제한효소들로 절단한 pPZP211운반체를 아가로즈겔에서 전기영동하고 분리한 다음 여기에 우

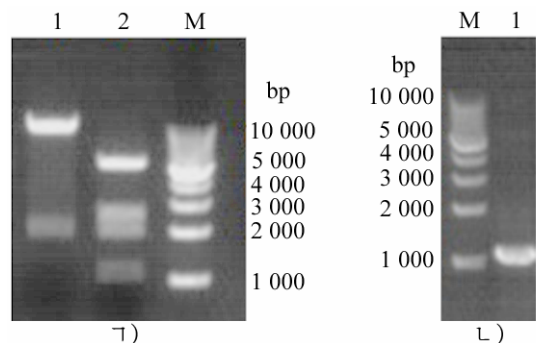


그림 4. pPZP211(35S:HA-*At3g23880*)의 제한효소분해단편과 PCR산물의 0.7% 아가로즈겔전기영동상

1) pPZP211(35S:HA-*At3g23880*)의 제한효소분해단편, 1—*Pst*I과 *Sac*I에 의한 분해산물, 2—*Nde*I과 *Sac*I에 의한 분해산물, M—DNA표식자; 2) pPZP211(35S:HA-*At3g23880*)을 주형으로 한 *At3g23880*의 PCR산물, M—DNA크기표식자, 1—PCR산물

여 스펙티노미핀을 100 $\mu$ g/mL 되게 첨가한 LB배지에 각각 접종하고 37°C에서 하루밤동안 진탕배양하였다. 다음 플라즈미드를 분리하고 제한효소들(*Pst*I과 *Sac*I)로 분해한 다음 *At3g23880-Nde*IF와 *At3g23880-Sac*IR[1]를 리용한 PCR를 진행하였다. 제한효소분해단편들과 PCR산물을 0.7% 아가로즈겔에서 전기영동한 결과 예상크기의 띠들이 얻어졌으며(그림 4) 따라서 만들어진 재조합운반체가 정확하다고 볼수 있다.

## 맺 는 말

애기장대에서 RT-PCR로 얻은 완전길이 *At3g23880*단편을 CaMV의 35S 프로모터의 조절을 받으며 N말단HA를 가지도록 2원운반체 pPZP211에 클론화한 재조합운반체 pPZP211(35S:HA-*At3g23880*)을 제작하였다.

## 참 고 문 헌

- [1] 김일성종합대학학보 생명과학, 66, 2, 34, 주체109(2020).
- [2] S. Wang et al.; Plant Cell, 17, 1979, 2005.
- [3] P. Hajdukiewicz et al.; Plant Mol. Biol., 25, 989, 1994.
- [4] H. Tian et al.; Plant Cell & Environment, 40, 1, 2017.

주체109(2020)년 4월 5일 원고접수

## Construction of Vector to Overexpress *At3g23880* in *Arabidopsis thaliana*

Kim Myong Uk

We cloned the full-length ORF of *At3g23880*, amplified by RT-PCR using *Arabidopsis thaliana* seedlings, in frame with N-terminal HA tag into the pUC19 under the control of the 35S promoter, and subcloned the HA tagged *At3g23880* construct into the binary vector pPZP211 to generate pPZP211(35S:HA-*At3g23880*).

Keywords: *At3g23880*, *Arabidopsis thaliana*