

벼의 질산염수송체수식유전자 *OsNRT1.1A-m*의 식물발현운반체제작

한금성, 정예진, 김순의, 허명식

경애하는 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.》

식량문제를 원만히 해결하는것은 농업부문앞에 나서고있는 가장 절박한 요구라고 말할 수 있다. 특히 당의 종자혁명방침을 철저히 관철하는데서 수확고가 높고 비료를 적게 요구하며 생육기일이 짧은 벼를 육종하는것은 중요한 문제로 제기되고있다. 일반적으로 질소는 알곡수확고를 높이는데서 결정적인 작용을 하지만 질소비료를 많이 치면 꽃피기가 늦어지고 생육기일이 길어져 수확고에 영향을 미치게 된다.[8] 지난 시기 *OsNRT2.3b*를 비롯하여 몇가지 질산염수송체유전자를 과잉발현시킬 때 수확고가 높고 비료를 적게 요구하는 형질이 나타났지만 대신에 생육기일이 길어지는 결함이 있었다.[2, 4, 5] 그러나 최근에 *OsNRT1.1A*를 벼에서 과잉발현시키면 수확고는 25~50%, 비료리용률이 33~54% 높아지며 더우기 생육기일이 10~18일 당겨진다는것이 밝혀졌다.[7]

이로부터 우리는 우리 나라의 알곡작물에서 *OsNRT1.1A*의 수식CDS를 얻은[1]데 기초하여 알곡작물에서 이 수식유전자를 리용하기 위한 식물발현운반체를 제작하였다.

재료와 방법

운반체로는 식물발현운반체인 pCAMBIA1301을, 숙주로는 *Escherichia coli* Top10과 *Agrobacterium tumefaciens* EA105를 리용하였다. *OsNRT1.1A-m*을 발현시키기 위한 CaMV의 35S 프로모터(P_{35S})로는 식물발현운반체 pCAMBIA1301로부터 PCR로 증폭한것을 리용하였다.

모든 프라이머들은 전문기관에 의뢰하여 합성하였다. 그리고 모든 PCR와 플라스미드들의 분리정제 및 형질전환, Golden Gate반응은 표준조작[3, 6]대로 진행하였다.

결과 및 논의

1) P_{35S}의 PCR클론화

우리는 이미 우리 나라의 벼품종인 《평양 53》호의 게놈DNA에서 얻어낸 *OsNRT1.1A*의 수식CDS를 잘 알려진 CaMV의 P_{35S}로 과잉발현시키기 위하여 그것의 DNA배열을 식물발현운반체인 pCAMBIA1301로부터 PCR법으로 얻어내기로 하였다.

먼저 플라스미드 pCAMBIA1301의 배열자료에 기초하여 P_{35S}를 클론화하기 위한 프라이머를 다음과 같이 설계하였다.

FP: 5'-TCggtctctctAGAATCCCGCCTTCAGTTTAGC-3'

RP: 5'-TAggtctctctCAAGAGTCCCCCGTGT-3'

다음 이 프라이머들을 리용하여 플라스미드 pCAMBIA1301의 DNA를 주형으로 PCR를 진행하였을 때 목적하는 841bp크기의 P_{35S}의 DNA배열이 정확히 증폭되었다.(그림 1)

그림 1에서 보는바와 같이 플라스미드 pCAMBIA1301을 주형으로 하여 PCR를 진행하였을 때 841bp에 해당하는 P_{35S}의 띠가 정확히 나타나고 약간의 부피들이 생겼다. 따라서 이 PCR산물을 겔분취하여 리용하였다.

2) Golden Gate법에 의한 *OsNRT1.1A-m*발현카세트의 제작

앞에서 얻어낸 P_{35S}와 *OsNRT1.1A*의 수식CDS를 Golden Gate법으로 하나로 연결하여 *OsNRT1.1A-m*발현카세트를 제작하기로 설계하였다. 이때 P_{35S}프로모터의 앞에 제한효소 *Hind*III의 인식부위를, *OsNRT1.1A*의 CDS끝에는 제한효소 *Bst*II의 인식부위를 붙여주고 식물발현운반체인 pCAMBIA1301의 *Hind*III과 *Bst*II사이에 있는 P_{35S}와 GUS유전자대신에 이 발현카세트를 치환하기로 하였다. pCAMBIA1301에서 *Bst*II의 뒤에 T_{nos}배열이 있으므로 그것을 그대로 리용하기로 설계하였다.

우에서 얻어진 P_{35S}프로모터의 PCR산물과 *OsNRT1.1A*의 수식CDS의 PCR산물을 Golden Gate반응으로 연결하고 *Hind*III인식부위가 있는 P_{35S}의 F프라이머와 *Bst*II인식부위가 있는 엑손 3의 R프라이머를 리용하여 PCR증폭하고 아가로즈겔전기영동을 진행하였다.(그림 2)

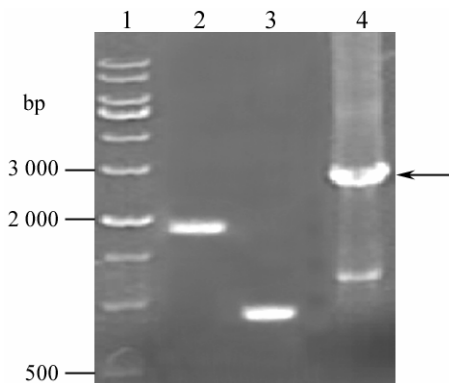


그림 2. P_{35S}와 *OsNRT1.1A*의 수식CDS의 PCR산물과 그것들을 Golden Gate법으로 하나로 연결하고 PCR한 산물의 아가로즈겔전기영동상
1-분자크기표식자(1 000bp),
2-*OsNRT1.1A*의 수식CDS의 PCR산물, 3-P_{35S}의 PCR산물,
4-Golden Gate산물을 PCR한것.

그림 2에서 보는바와 같이 P_{35S}의 PCR산물과 *OsNRT1.1A*의 수식CDS의 PCR산물이 Golden Gate반응으로 정확히 연결되어 목적하는 2 670bp의 PCR증폭산물이 얻어졌다. 이렇게 하여 P_{35S}와 *OsNRT1.1A*의 수식CDS로 이루어진 *OsNRT1.1A-m*발현카세트가 Golden Gate반응과 PCR에 의하여 정확히 합성되었다.

3) *OsNRT1.1A-m*발현카세트의 pCAMBIA1301에로의 클론화와 정확성확인

앞에서 얻은 수식*OsNRT1.1A-m*의 발현카세트를 식물발현운반체인 pCAMBIA1301에 클론화하기 위하여 pCAMBIA1301과 *OsNRT1.1A-m*발현카세트를 각각 *Hind*III과 *Bst*II로 2중분해하고(그림 3의 1)) 겔분취하였다. 다음 T4 DNA리가제로 연결하고 *Escherichia coli* Top10에 형질전환시켜 배양하였다. 3개의 균무지로부터 재조합플라스미드를 분리한 다음 P_{35S}의 F프라이머와 수식엑손 3의 R프라이머를 리용하여 PCR증폭하고 아가로즈겔전기영동을 진행하였다.(그림 3의 2))

그림 3의 1)에서 보는바와 같이 플라스미드 pCAMBIA1301은 제한효소 *Hind*III과 *Bst*II에 의하여 각각 1개의 띠로 절단되고 *Hind*III+*Bst*II 2중분해에 의해서는 2 810bp의 P_{35S}+GUS 단편이 떨어져나오고 약 9kb의 단편이 생겼다. 또한 재조합플라스미드를 주형으로 하여 P_{35S}의 F프라이머와 수식엑손 3의 R프라이머로 PCR증폭하였을 때 운반체에 삽입된 자기의 2 670bp

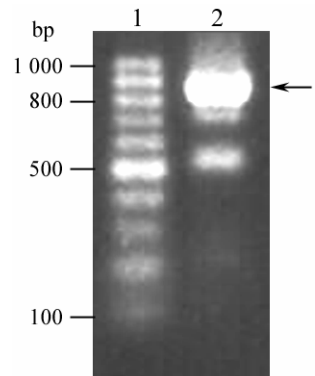


그림 1. P_{35S}에 대한 PCR산물의 아가로즈겔전기영동상
1-DNA크기표식자(DNA Ladder 100), 2-P_{35S}에 대한 PCR산물

에 해당한 *OsNRT1.1A-m*발현카세트가 얻어졌다. 이로부터 우리는 *OsNRT1.1A-m*발현카세트가 pCAMBIA1301에 정확히 클론화되었다는것을 확인하였다.

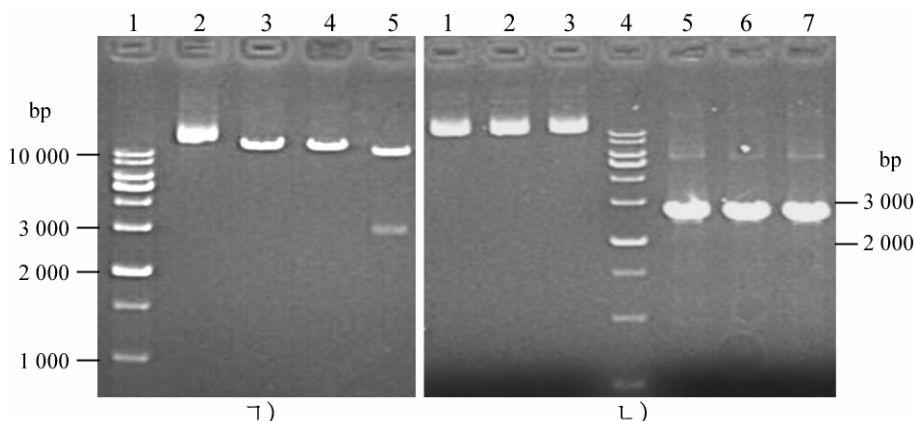


그림 3. 플라스미드 pCAMBIA1301 및 재조합플라스미드의 제한효소분해산물과 그에 대한 PCR산물의 아가로스겔전기영동상

- ㄱ) 플라스미드 pCAMBIA1301과 그 제한효소분해산물: 1-분자크기표식자(1 000bp), 2-pCAMBIA1301, 3-HindⅢ으로 처리한 pCAMBIA1301, 4-BstEⅡ로 처리한 pCAMBIA1301, 5-HindⅢ+BstEⅡ로 처리한 pCAMBIA1301, ㄴ) 재조합 플라스미드와 그에 대한 PCR산물들: 1-3은 3개의 균무지에서 분리한 재조합플라스미드, 4-분자크기표식자(1 000bp), 5-7은 재조합플라스미드들을 주형으로 한 PCR산물들

4) 클론화된 *OsNRT1.1A-m*발현카세트의 정확성확인

클론화된 *OsNRT1.1A-m*발현카세트의 정확성을 확인하기 위하여 먼저 재조합플라스미드를 제한효소 HindⅢ과 BstEⅡ로 단일분해 및 2중분해를 진행하였다. 다음 본래의 *OsNRT1.1A*에 절단점을 가지고있던 제한효소 NcoⅠ와 SacⅠ, BstEⅡ의 인식부위를 수식하였으므로 재조합플라스미드를 주형으로 하여 P_{35S}의 F프라이머와 수식엑손 3의 R프라이머로 PCR증폭하고 그것을 NcoⅠ, SacⅠ, BstEⅡ로 분해하였다. 또한 *OsNRT1.1A-m*발현카세트속에 제한효소 XhoⅠ(2개), AflⅢ, DdeⅠ(4개), AscⅠ, SexAⅠ의 인식부위가 있으므로 같은 PCR산물을 이 제한효소들로도 절단하였다.(그림 4)

그림 4에서 보는바와 같이 재조합플라스미드는 제한효소 HindⅢ과 BstEⅡ에 의하여 단일띠로 절단되고 두 제한효소의 2중분해에 의해서는 자기의 2 670bp의 띠가 떨어져나왔다. 또한 *OsNRT1.1A-m*발현카세트에 대한 PCR산물을 제한효소 NcoⅠ, SacⅠ, BstEⅡ로 절단하였을 때 하나도 분해되지 않았으므로 정확히 자기의 수식CDS를 가지고있다는것을 알수 있다. 제한효소 DdeⅠ는 P_{35S}프로모터속에 2개의 절단점을, 수식엑손 3속에 2개의 절단점을 가지고 있으면서 PCR산물을 절단하면 83, 263, 327, 829, 1 156bp의 띠를 만들게 된다. 그리고 제한효소 SexAⅠ는 엑손 1을 절단하여 1 027bp와 1 639bp의 띠를, AscⅠ는 엑손 3을 절단하여 561bp와 2 105bp의 띠를, AflⅢ은 엑손 1을 절단하여 907bp와 1 759bp의 띠를, XhoⅠ은 P_{35S}프로모터와 엑손 2를 절단하여 814, 851, 1 002bp의 띠를 만들게 된다. 그런데 83, 263, 327bp를 제외하고(크기가 너무 작아 보이지 않음.) 모든 DNA단편들의 띠가 생겼으므로 위의 PCR산물이 이 제한효소들로 정확히 분해되었다는것을 알수 있다. 이상의 자료들로부터 우리는 우리 나라의 벼품종인 《평양 53》호로부터 얻은 *OsNRT1.1A-m*식물발현카세트가 pCAMBIA1301의 HindⅢ-BstEⅡ사이에 정확히 클론화되었다는것을 확인하였다. 우리는 이 재조합플라스미

드를 pCAM-P_{35S}-OsNRT1.1Am이라고 명명하였다.(그림 5)

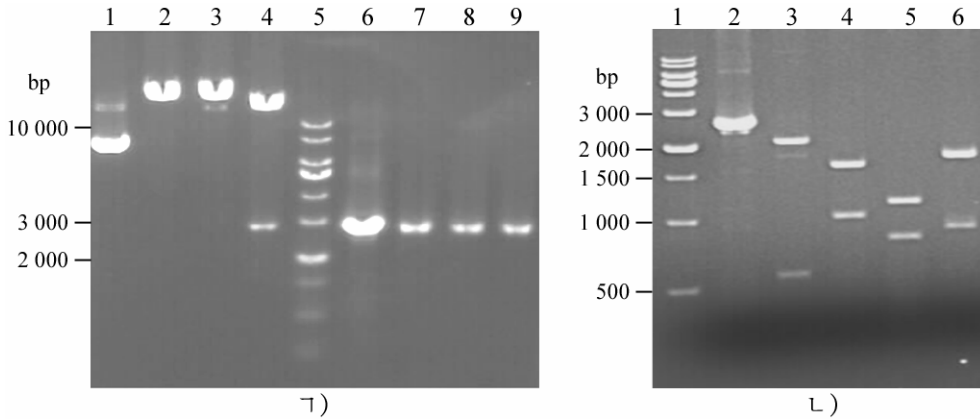


그림 4. 재조합플라스미드와 *OsNRT1.1A-m*발현카세트의 정확성을

확인하기 위한 제한효소분해산물들의 아가로스겔전기영동상

- 7) 재조합플라스미드와 PCR산물의 여러가지 제한효소분해산물들: 1-재조합플라스미드, 2, 3은 재조합플라스미드를 각각 *Hind*III, *Bst*EII로 절단한것, 4-재조합플라스미드를 *Hind*III+*Bst*EII로 절단한것, 5-분자크기표식자(1 000bp), 6-PCR산물, 7-PCR산물을 *Nco*I로 절단한것, 8-PCR산물을 *Sac*I로 절단한것, 9-PCR산물을 *Bst*EII로 절단한것, 8) PCR산물의 여러가지 제한효소분해산물: 1-분자크기표식자(1 000bp), 2-PCR산물, 3-PCR산물을 *Asc*I로 절단한것, 4-PCR산물을 *Sex*AI로 절단한것, 5-PCR산물을 *Dde*I로 절단한것, 6-PCR산물을 *Afl*III으로 절단한것.

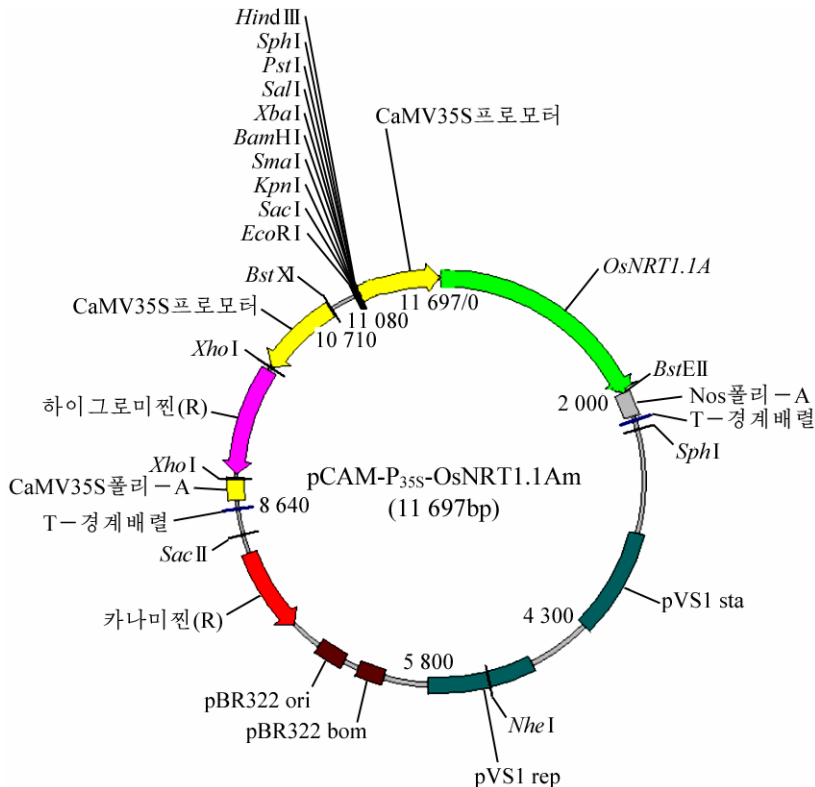


그림 5. 재조합플라스미드 pCAM-P_{35S}-OsNRT1.1Am의 물리적지도

맺 는 말

1) pCAMBIA1301로부터 PCR법으로 얻은 P_{35S}와 *OsNRT1.1A*의 수식CDS를 Golden Gate 법으로 연결하고 PCR를 진행하여 *OsNRT1.1A-m*발현카세트를 얻었다.

2) *OsNRT1.1A-m*발현카세트를 식물발현운반체인 pCAMBIA1301에 제한효소-리가제법으로 클론화하였다.

3) 재조합플라스미드 pCAM-P_{35S}-*OsNRT1.1Am*의 정확성을 여러가지 제한효소들을 리용하여 확인하였다.

참 고 문 헌

- [1] 한금성 등; 생물학, 1, 9, 주체110(2021).
- [2] J. G. Chen et al.; Plant Biotechnol. J., 14, 1705, 2016.
- [3] C. Engler et al.; PLoS ONE, 3, 11, e3647, 2008. DOI:10.1371/journal.pone.0003647.2008.
- [4] X. Fan et al.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 113, 7118, 2016.
- [5] Z. Fang et al.; Plant Biotechnol. J., 11, 446, 2013.
- [6] J. Sambrook et al.; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 18~98, 2001.
- [7] W. Wang et al.; Plant Cell, DOI:10.1105/tpc.17.00809, 2018.

주체110(2021)년 1월 5일 원고접수

Construction of Plant Expression Vector for Rice Modified Nitrate Transporter Gene, *OsNRT1.1Am*

Han Kum Song, Jong Ye Jin, Kim Sun Ui and Ho Myong Sik

It is very important to breed the rice cultivar, which is high-yielding and is needed less amount of fertilizer, the growing period of which is short, in our country. Recently, it has been shown that overexpression of the rice nitrate transporter gene, *OsNRT1.1A*, in rice confers a high yield, high nutrient use efficiency, and early maturation. Thus, to use the *OsNRT1.1A* in our country's crop plants, modified *OsNRT1.1A-m* gene was ligated with the promoter P_{35S} obtained with PCR from plasmid pCAMBIA1301, by Golden Gate method to assembly the *OsNRT1.1A* expression cassette, that was subcloned between *Hind*III-*Bst*EII sites of plasmid pCAMBIA1301, which was given its entity with several restriction enzymes to construct recombinant plasmid pCAM-P_{35S}-NRT1.1Am.

Keywords: rice, *Pyongyang No. 53*, *OsNRT1.1A*, Golden Gate method, pCAMBIA1301, P_{35S}