

애기장대의 *AtWRKY57*과 사람의 *HsBcl2*, 효모의 *SaTPSP*의 발현카세트들을 가진 중간운반체의 제작

정예진, 김순의, 허명식

오늘 우리 나라에서 가뭄과 고온, 랭해 등 불리한 자연기후조건에 잘 견디는 알곡작물을 육종하는것은 중요한 문제로 제기되고있다. 지금까지 이러한 비생물성스트레스에 대한 견딜성을 높이기 위하여 세계적으로 많은 연구[2-4]가 진행되었지만 모두 한가지 유전자만을 대상하여왔다. 그러나 비생물성스트레스에 대한 견딜성은 벼에서 여러가지 복잡한 경로에 의하여 다중조절되므로 스트레스견딜성을 높이자면 그것과 관련된 여러 경로에 속한 유전자들을 동시에 발현시켜야 한다.

이로부터 우리는 이미 벼에서 스트레스에 대한 견딜성을 높여준다고 알려진 개별적인 유전자들을 알곡작물에서 동시에 발현시키기 위한 식물발현운반체제작의 중간단계로서 애기장대의 *AtWRKY57*과 사람의 *HsBcl2*, 효모의 *ScTPSP*의 발현카세트들이 모두 클론화된 중간운반체를 제작하였다.

재료와 방법

운반체로는 pUC18을, 숙주로는 *Escherichia coli* Top10을 리용하였다. 모든 유전자발현 카세트들은 전문기관에 의뢰하여 합성하였다. 그리고 모든 PCR반응과 플라스미드들의 분리정제와 형질전환은 표준조작[3, 6, 8]대로 진행하였다.

결과 및 논의

1) 발현카세트들의 설계

*AtWRKY57*발현카세트의 설계와 합성 *AtWRKY57*[2, 5, 6, 9]의 CDS는 864bp로 되어있고 287개의 아미노산을 암호화하는데 CDS배열을 분석하였을 때 제한효소 *HindIII*, *BamHI*, *PstI*, *KpnI*, *NcoI*, *XhoI*, *SacI*의 절단점이 없고 *EcoRI*의 절단점이 있었다. 따라서 우리는 이 CDS배열을 그대로 리용하기로 하였다. 다음 프로모터는 CaMV의 2×35S프로모터를 리용하고 터미네이터는 T_{nos}를 리용하기로 하였다. 그리고 클론화를 위하여 이 발현카세트의 앞뒤에 제한효소 *KpnI*의 인식배열을 붙여주었으며 이렇게 설계된 *AtWRKY57*발현카세트(1 975bp)를 전문기관에 의뢰하여 합성하였다.

*HsBcl2*발현카세트의 설계와 합성 *HsBcl2*[3]의 CDS(720bp)는 239개의 아미노산을 암호화하는데 CDS배열을 분석하였을 때 제한효소 *BamHI*, *PstI*, *SacI*의 절단점이 각각 1개씩 있었다. 그런데 우리는 여러개의 유전자발현카세트를 동시에 클론화하기로 계획하였으므로 클론화 부위에 제한효소들의 절단배열이 있으면 클론화조작이 어렵게 된다. 따라서 이 절단점부위들의 배열을 수식하기로 하였다. *BamHI*의 절단배열 *tgg(W)atc(I)c*에서 W에는 코돈이 1개이므로 바꿀수 없고 따라서 *atc(I)*코돈을 *att(I)*로 바꾸어 *tggatcc*가 *tggattc*로 수식되게 하

였다. *Pst*I의 절단배열 ctg(L)cag(Q)는 ctg(L)을 ctc(L)로 바꾸어 ctccag로, *Sac*I의 절단배열 gag(E)ctc(L)은 ctc(L)을 ctg(L)로 바꾸어 gagctg로 수식되게 하였다. 이렇게 수식된 CDS배열을 단백질로 번역하고 본래의 단백질배열과 정렬시켜 아미노산배열수준에서 변화가 하나도 없다는것을 확인하였다. 이 CDS배열에 CaMV의 2×35S프로모터와 T_{nos}를 붙이고 제한효소 *Hind*III와 *Pst*I의 인식배열을 각각 앞뒤에 연결하여 발현카세트를 설계하였을 때 크기는 1 833bp였으며 이것을 전문기관에 의뢰하여 합성하였다.

*ScTPSP*발현카세트의 설계와 합성 효모의 트레할로즈생합성융합유전자(*ScTPSP*)[1, 4, 7]의 크기는 2 679bp로서 892개의 아미노산을 암호화하는데 CDS를 분석하였을 때 *Bam*HI와 *Hind*III, *Pst*I의 절단점이 각각 1개씩 있었고 *Eco*RI와 *Sal*I의 절단점이 각각 2개씩 있었다. 따라서 이 절단점들의 배열을 수식하기로 하였다. *Bam*HI의 절단점 gga(G)tcc(S)를 ggt(G)tcc(S)로, *Hind*III의 절단점 aaa(L)gctt를 aag(L)gctt로, *Pst*I의 절단점 gct(A)gcag를 gca(A)gcag로 수식되게 하였다. 또한 *Eco*RI의 절단점 gaa(E)ttc를 모두 gag(E)ttc로, *Sal*I의 절단점 gtc(V)gac를 모두 gtt(V)gac로 수식되게 하였다. 수식된 CDS배열을 단백질로 번역하고 원래의 단백질배열과 정렬시켜 단백질의 1차구조수준에서 차이가 하나도 없다는것을 확인하였다. 이 수식CDS배열에 CaMV의 2×35S프로모터배열과 T_{nos}배열을 연결하고 제한효소 *Pst*I와 *Bam*HI의 인식배열을 각각 앞뒤에 부가하였을 때 길이는 3 792bp였으며 이 배열을 전문기관에 의뢰하여 합성하였다.

2) 발현카세트들의 운반체로의 클론화

*AtWRKY57*발현카세트의 pUC18에로의 클론화 우리는 앞으로 위의 세가지 유전자들을 모두 식물발현운반체인 pCambia1301에 클론화하기로 계획하였는데 이 운반체의 크기가 11 837bp로서 매우 크므로 유전자조작을 하기에 매우 불리하다. 따라서 우리는 먼저 3개의 유전자발현카세트를 크기가 작은 대장균의 pUC18에 클론화하고 3개의 유전자발현카세트를 통채로 pCambia1301에 클론화하기로 하였다.

대장균의 플라스미드 pUC57(2 686bp)에 클론화된 우에서 설계 및 의뢰합성한 1 975bp 크기의 *AtWRKY57*발현카세트를 제한효소 *Kpn*I로 절단하였다.(그림 1) 플라스미드 pUC18도 제한효소 *Kpn*I로 처리한 다음 위의 제한효소산물과 1:5의 비율로 섞어 T7 DNA리가제로 연결하여 *E. coli* Top10에 형질전환시켰다. 다음 재조합체를 X-Gal을 리용하여 흰색균무지를 선별하는 방법으로 1차선발을 진행하고 재조합플라스미드들을 분리정제한 다음 제한효소 *Kpn*I로 처리하여 그것이 목적하는 재조합균무지라는것을 확인하였다.(그림 2)

*AtWRKY57*의 삽입방향을 결정하기 위하여 발현카세트속에 절단점을 가지고있는 제한효소 *Eco*RI를 리용하였다. 제한효소 *Eco*RI는 1 975bp의 발현카세트에서 1 225bp위치와 재조합플라스미드에서 삽입발현카세트시작코돈의 상류 16bp에 절단점을 가지고있으므로 *Eco*RI로 절단하였을 때 정방향으로 삽입된 경우에는 3 420bp의 단편과 1 241bp의 단편이 생기며 거꾸로방향으로 삽입된 경우에는 766bp의 단편과 3 895bp의 단편이 생기게 된다.

그림 3에서 보는바와 같이 재조합플라스미드를 *Eco*RI로 절단하였을 때 1번과 3번재조합플라스미드에서는 3 420bp와 1 241bp정도의 단편이 생겼으며 2번재조합플라스미드에서는 766bp와 3 895bp정도의 단편이 생겼다. 즉 1번과 3번재조합플라스미드에는 *AtWRKY57* 발현카세트가 정방향으로, 2번재조합플라스미드에는 *AtWRKY57*발현카세트가 역방향으로 삽입되었다는것을 알수 있다. 이로부터 우리는 *AtWRKY57*발현카세트가 정방향으로 삽입되어있는 1번재조합플라스미드를 다음단계실험에 리용하기로 하였다. 우리는 이렇게 얻어진 재조합플라스미드를 pUC-WRKY라고 명명하였다.

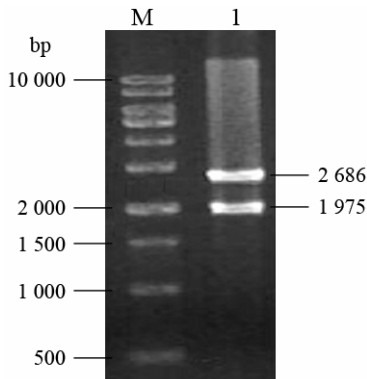


그림 1. pUC57-WRKY57을 제한효소 *KpnI*로 처리한 전기영동상
1-2 686bp크기의 pUC18운반체와 1 975bp 크기의 *WRKY57*발현카세트, M은 1kb DNA 분자크기표식자

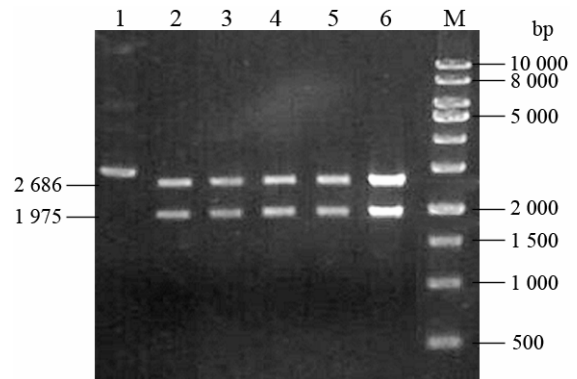


그림 2. 1차선발한 재조합플라스미드들에 대한 제한효소분석상(*KpnI*로 처리)
1-재조합플라스미드 pUC57-WRKY57, 2-6은 선발한 재조합플라스미드들을 제한효소 *KpnI*로 처리한 구, M은 1kb DNA분자크기표식자

*HsBcl2*발현카세트의 pUC-WRKY에로의 클론화
우리는 pUC-WRKY에 *HsBcl2*를 클론화하기로 하였다.

먼저 pUC57에 클론화되어 의뢰합성한 *HsBcl2* 발현카세트를 프라이머

F: 5'-tgtaaaacgacggccagt-3',

R: 5'-caggaaacagctatgacc-3'

를 리용하여 PCR로 증폭(그림 4)하고 겔분취하여 목적하는 단편만을 얻은 다음 제한효소 *HindIII*과 *PstI*로 2중분해하고 똑같이 2중분해한 재조합플라스미드 pUC-WRKY와 섞어 T7 DNA리가제로 연결하였다. 다음 *E. coli* Top10을 형질전환시키고 얻어진 재조합균무지들에서 플라스미드들을 분리정제하고 제한효소 *HindIII*과 *PstI*로 2중분해하여 목적하는 균무지들을 선발하였다.(그림 5)

이렇게 얻어진 재조합플라스미드를 pUC-WRKY-Bcl2로 부르기로 하였다.

*ScTPSP*발현카세트의 pUC-WRKY-Bcl2에로의 클론화 pUC-WRKY-Bcl2에 *ScTPSP*를 클론화하기 위하여 pUC57에 클론화하여 의뢰합성한 *ScTPSP*발현카세트를 프라이머

F: 5'-tgtaaaacgacggccagt-3'

R: 5'-caggaaacagctatgacc-3'

를 리용하여 PCR로 증폭(그림 6)하고 겔분취하여 목적하는 DNA단편만을 얻은 다음 제한효소 *BamHI*과 *PstI*로 2중분해하고 똑같이 2중분해한 pUC-WRKY-Bcl2와 섞어 T7 DNA리가제로 연결하였다. 다음 *E. coli* Top10을 형질전환시키고 얻어진 재조합균무지들에서 플라스미드를 분리정제한 다음 제한효소 *BamHI*과 *PstI*로 2중분해하여 목적하는 균무지라는 것을 확인하였다.(그림 7)

이 중간운반체를 pUC-WRKY-Bcl2-TPSP라고 명명하였다.

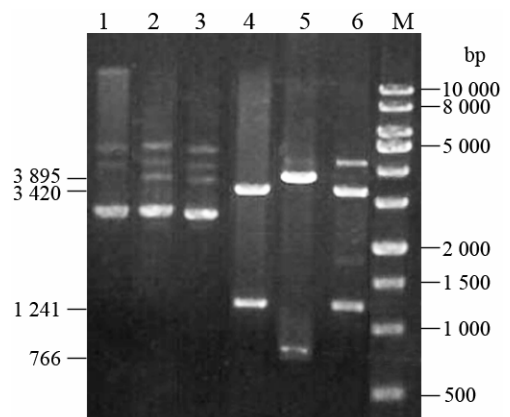


그림 3. 재조합플라스미드 pUC-WRKY에서 *AtWRKY57*발현카세트의 방향결정
1-3은 선발한 재조합균그룹에서 분리한 재조합플라스미드, 4-6은 1-3번 재조합플라스미드들에 대한 제한효소 *EcoRI* 절단상, M은 1kb DNA분자크기표식자

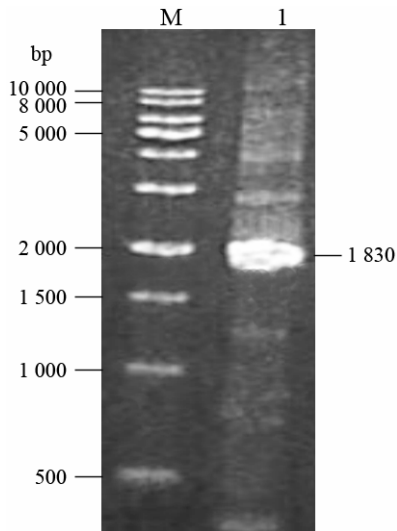


그림 4. *HsBcl2* 발현카세트의 PCR 전기영동상
1—*HsBcl2* 발현카세트의 PCR산물, M은 1kb DNA분자크기표식자

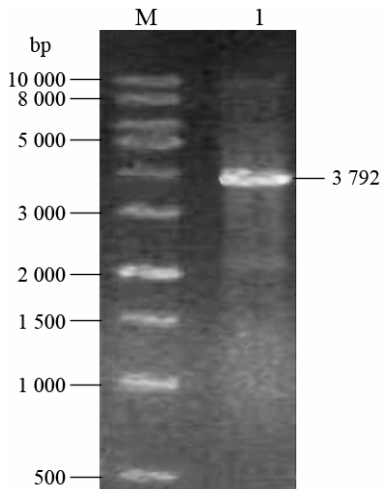


그림 6. *ScTPSP* 발현카세트의 PCR 전기영동상
1—*HsBcl2* 발현카세트의 PCR산물, M은 1kb DNA분자크기표식자

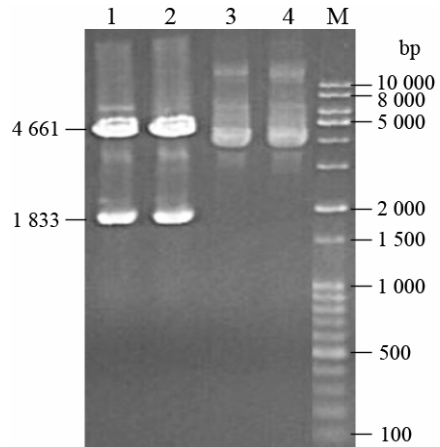


그림 5. 재조합플라스미드 pUC-WRKY-Bcl2에 대한 제한효소분석상(*Hind*III와 *Pst*I로 처리)
1, 2는 선발한 재조합플라스미드 pUC-WRKY-Bcl2를 제한효소 *Hind*III과 *Pst*I로 처리한 구, 3, 4는 선발한 균그루에서 분리한 재조합플라스미드 pUC-WRKY-Bcl2, M은 1kb DNA분자크기표식자

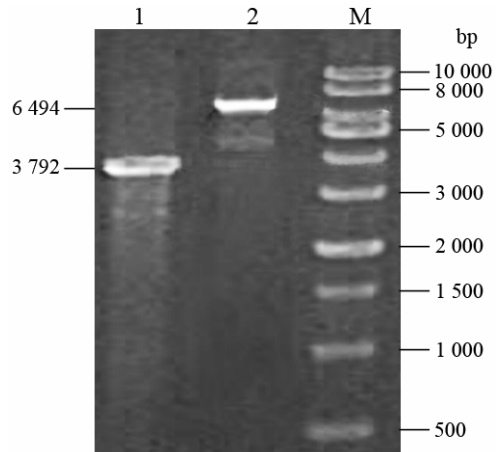


그림 7. *ScTPSP* 발현카세트의 PCR산물과 pUC-WRKY-Bcl2를 제한효소 *Bam*HI과 *Pst*I로 처리한 전기영동상
1—*ScTPSP* 발현카세트의 PCR산물, 2—pUC-WRKY-Bcl2, M은 1kb DNA분자크기표식자

pUC-WRKY-Bcl2-TPSP의 정확성확인 중간운반체 pUC-WRKY-Bcl2-TPSP의 정확성을 확인하기 위하여 제한효소 *Kpn*I, *Hind*III+*Pst*I, *Bam*HI+*Pst*I로 절단하였는데 그림 8에서와 같이 삽입단편들이 정확히 얻어졌다. 또한 pUC-WRKY-Bcl2-TPSP를 주형으로 하여 해당한 발현카세트들에 특이적인 프라이머들로 PCR를 진행하였을 때 모두 해당한 크기의 DNA단편들이 얻어졌다. 따라서 우리는 재조합플라스미드 pUC-WRKY-Bcl2-TPSP에 목적하였던 세 가지 유전자발현카세트가 정확히 클론화되었다는것을 확인하였다.

pUC-WRKY-Bcl2-TPSP의 물리적지도는 그림 9와 같다.

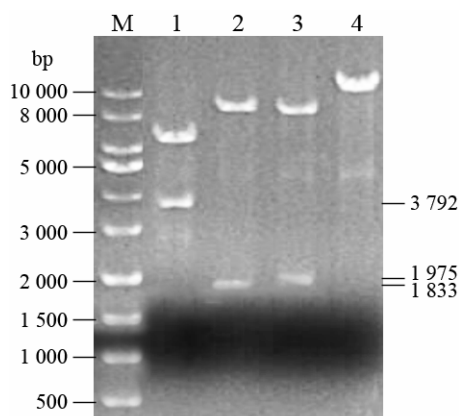


그림 8. 재조합플라스미드 pUC-WRKY-Bcl2-TPSP에 대한 제한효소분석상

- 1-제한효소 *Bam*HI+*Pst*II절단산물(3 792, 6 494bp),
 2-제한효소 *Hind*III+*Pst*II절단산물(1 833, 8 453bp),
 3-제한효소 *Kpn*I절단산물(1 975, 8 311bp),
 4-재조합플라스미드 pUC-WRKY-Bcl2-TPSP,
 M은 1kb DNA분자크기표식자

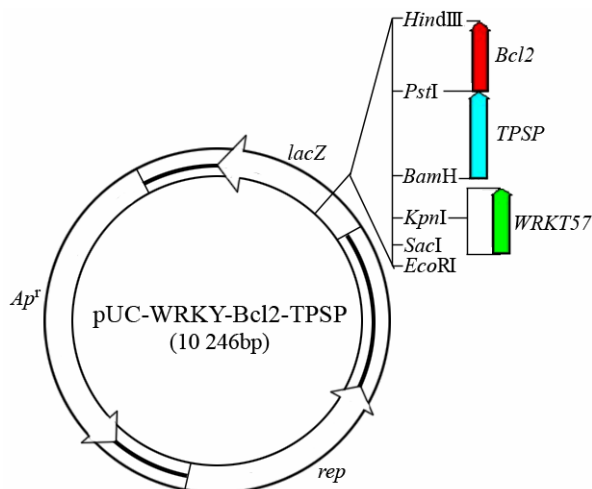


그림 9. 중간운반체 pUC-WRKY-Bcl2-TPSP의 물리적지도

맺 는 말

1) *AtWRKY57*의 CDS와 CaMV 2×35S 프로모터, *T_{nos}*를 리용하여 *AtWRKY57*발현카세트를 설계하고 의뢰합성하였다.

2) *HsBcl2*의 CDS에서 *Bam*HI, *Pst*II, *Sac*I의 절단점을 수식한 수식CDS와 CaMV 2×35S 프로모터, *T_{nos}*를 리용하여 *HsBcl2*발현카세트를 설계하고 의뢰합성하였다.

3) *ScTPSP*의 CDS에서 *Eco*RI, *Bam*HI, *Hind*III, *Pst*II, *Sal*I의 절단점을 수식한 수식CDS와 CaMV 2×35S 프로모터, *T_{nos}*를 리용하여 *ScTPSP*발현카세트를 설계하고 의뢰합성하였다.

4) 대장균의 플라스미드 pUC18에 *AtWRKY57*발현카세트를 아클론화하고 그것의 삽입 방향을 결정하였다.

5) 재조합플라스미드 pUC-WRKY에 *HsBcl2*발현카세트를 아클론화하고 그것의 정확성을 확인하였다.

6) 재조합플라스미드 pUC-WRKY-Bcl2에 *ScTPSP*발현카세트를 아클론화하여 pUC-WRKY-Bcl2-TPSP를 만들고 그것의 정확성을 확인하였다.

참 고 문 헌

- [1] 유웅주 등; 생물학, 4, 5, 주체105(2016).
- [2] M. B. Dickman et al.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 6957, 2001.
- [3] C. W. Distelhorst et al.; Oncogene, 23, 2875, 2004.
- [4] A. K. Garg et al.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99, 15898, 2002.
- [5] Y. Jiang et al.; Front. Plant Sci., <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00145>, 2016.
- [6] Y. J. Jiang et al.; Mol. Plant, 5, 1375, 2012.

- [7] J. A. Miranda et al.; *Planta*, 226, 1411, 2007.
- [8] J. Sambrook et al.; *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 196~277, 2001.
- [9] K. L. Wu et al.; *DNA Res.*, 12, 9, 2005.

주체108(2019)년 10월 5일 원고접수

Construction of Intermediate Vector with Expression Cassettes for *WRKY57* from *Arabidopsis thaliana* and human *Bcl2*, *TPSP* from *Saccharomyces cerevisiae*

Jong Ye Jin, Kim Sun Ui and Ho Myong Sik

Salt-resistance exhibits by complex combination of different routes, so different genes associated salinity tolerance seem to be pyramided to express at the same time to increase salt resistance. As an intermediate step of constructing plant-expressing vector to express several genes at the same time, we produced intermediate vector containing expression cassettes of *WRKY57* from *Arabidopsis thaliana* and human *Bcl2*, *TPSP* from *Saccharomyces cerevisiae*.

Keywords: pUC18, *AtWRKY57*, *HsBcl2*, *ScTPSP*, 2×35S promoter, T_{nos}, expression cassette