

## 돼지번식 및 호흡기증후군비루스누클레오캡시드 단백질유전자의 대장균발현운반체제작

리남선, 박형범

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《우리는 현실발전의 요구에 맞게 나라의 과학기술을 빨리 발전시켜야 하겠습니다.》

(《김정일선집》 증보판 제11권 134페이지)

돼지번식 및 호흡기증후군비루스(PRRSV)는 돼지의 번식 및 호흡기증후군이라는 병을 일으키는데 주로 호흡기도와 번식기관에 영향을 미친다.[1, 3, 4]

우리는 유전자공학적방법으로 PRRSV검사키트를 만들기 위하여 RT-PCR로 합성한 PRRSV의 누클레오캡시드단백질(N)유전자를 대장균에서 발현시키기 위한 재조합운반체를 제작하였다.

### 재료와 방법

재료 PRRSV의 N유전자원천으로는 이 유전자의 cDNA가 들어있는 재조합플라즈미드 pTN을 리용하였으며 대장균발현운반체로는 플라즈미드 pET32a를 리용하였다.

N유전자발현을 위한 대장균주로는 *E. coli* BL21(DE3)을 리용하였다.

방법 플라즈미드 DNA분리와 제한효소반응, 연결반응, 대장균형질전환과 유전자의 발현산물분석은 선행연구[2]에 준하여 진행하였다.

N유전자확인을 위한 PCR프라이머는 5'-ACGAATTCATGCCAAATAACAACGGCA-3', 5'-TAGGATCCAGAATGCCAGCTCATCA-3'를 각각 정방향 및 역방향 프라이머로 리용하였다.

### 결과 및 고찰

#### 1) N유전자의 대장균발현운반체제작

PRRSV의 N유전자를 대장균에서 발현시키기 위하여 N유전자를 대장균발현운반체인 pET32a에 재조합하였는데 재조합플라즈미드 pTN과 플라즈미드 pET32a를 제한효소 *EcoR* I로 각각 분해한 다음 N유전자토막 DNA를 잘라내어 *EcoR* I로 절단시켜얻은 선형 pET32a DNA와 연결하였다.(그림 1)

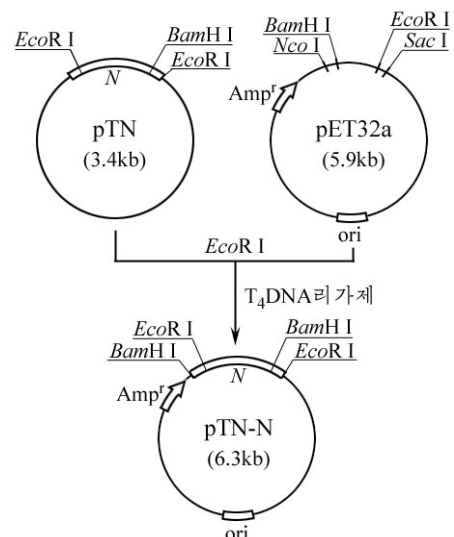


그림 1. 재조합플라즈미드 pET-N의 제작모식도

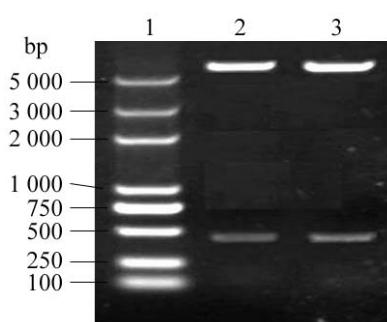


그림 2. 재조합플라스미드의 제한효소분해물에 대한 아가로스겔전기영동상  
1-DNA표식자,  
2-재조합플라스미드/*EcoR* I,  
3-재조합플라스미드/*BamH* I

연결반응물로 *E. coli* DH5 $\alpha$ 를 형질전환시키고 선발된 형질전환체들 가운데서 목적하는 크기의 재조합플라스미드를 선발확인하였다.(그림 2)

그림 2에서 보는바와 같이 재조합플라스미드를 제한효소 *EcoR* I로 분해하였을 때 분자량이 약 5.9kb인 pET32a 토막과 약 0.4kb의 *N*유전자토막이 확인되었다.

*N*유전자토막의 삽입방향을 결정하기 위하여 재조합플라스미드를 제한효소 *BamH* I로 절단하였을 때 역시 분자량이 약 5.9kb와 약 0.4kb인 2개의 DNA토막이 검출되었는데 이것은 *N*유전자토막이 pET32a의 *EcoR* I인식위치에 정방향으로 삽입된 목적하는 재조합플라스미드라는 것을 알 수 있다.

이 재조합플라스미드를 pET-N이라고 명명하였다.

## 2) 대장균에서의 발현

대장균발현운반체 pET-N을 리용하여 대장균 BL21를 형질전환하고 암피실린평판배지에서 자란 균무지들에 대하여 플라스미드DNA를 분리한 다음 *N*유전자특이프라이머에 의한 PCR분석으로 *N*유전자발현운반체 pET-N을 가지고있는 형질전환체를 선발하였다.(그림 3)

대장균에서의 *N*유전자발현산물을 확인하기 위하여 이 균주를 해당한 농도의 암피실린(100mg/L)이 들어있는 LB배지 10mL에 한백금이 접종하고 37°C, 160r/min 조건에서 대수적 증식기중간기(OD<sub>600</sub>이 약 0.5~0.7)까지 자래우고 유도제 IPTG를 최종농도가 1mmol/L되게 첨가한 다음 5h동안 유도배양을 진행하였다. 배양균체를 수집하고 균체총단백질을 추출한 다음 13.5% SDS-PAGE분석을 진행하였다. 대조로는 유도제 IPTG를 첨가하지 않고 배양한 균체총단백질을 리용하였다.(그림 4)

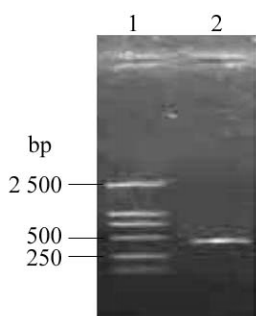


그림 3. 재조합플라스미드 확인을 위한 PCR산물의 아가로스겔전기영동상  
1-분자량표식자(DL2000),  
2-pET-N의 PCR산물

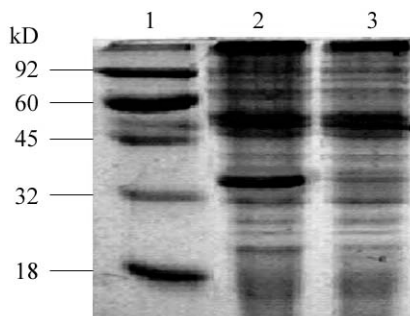


그림 4. 유도제첨가에 따르는 *E. coli* BL21(DE3)(pET-N)균체 단백질의 SDS-PAGE 분석상(13.5%)

1-단백질분자량표식자, 2-유도배양균체 단백질, 3-비유도균체단백질

그림 4에서 보는바와 같이 대장균형질전환체 *E. coli* BL21(DE3)(pET-N)의 배양과정에 유도제 IPTG를 첨가한 균체의 총단백질에서 비유도균체단백질에는 없는 분자량이 약 34kDa

에 해당하는 새로운 단백질이 검출되었는데 융합배열과 삽입유전자의 크기로부터 계산한 예상크기와 일치하였다.

이러한 결과로부터 우리가 만든 대장균형질전환체 *E. coli* BL21(DE3)(pET-N)에서 *N*유전자가 정확히 발현된다는것을 알수 있다.

## 맺 는 말

1) 돼지번식 및 호흡기증후군비루스누클레오캡시드단백질유전자발현운반체 pET-N을 제작하였다.

2) *N*유전자는 대장균발현운반체 pET32a의 제한효소 *EcoR* I인식부위에 정확히 삽입되었으며 크기는 약 6.3kb이다.

3) 대장균형질전환체 *E. coli* BL21(DE3)(pET-N)의 배양과정에 유도제 IPTG의 첨가하에 *N*유전자는 정확히 발현되며 발현산물의 크기는 약 34kDa로서 융합발현된다.

## 참 고 문 헌

- [1] H. Denac et al.; Journal of Virological Methods, 65, 169, 1997.
- [2] J. Sambrook et al.; Molecular Cloning 1, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 100~225, 1993.
- [3] Torsten Seuberlich et al.; Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 9, 1183, 2002.
- [4] Yuan Shi Shan et al.; Sci. China, C 51, 3, 271, 2008.

주체103(2014)년 7월 5일 원고접수

## **The Construction of the Expression Vector of the Nucleocapside Gene of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in *E. coli***

*Ri Nam Son, Pak Hyong Bom*

We constructed recombinant plasmid vector pET-N for expression of nucleocapsid gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus(PRRSV).

Gene *N* was correctly inserted the recognized site of *EcoR* I of vector pET32a for expression in *E. coli* and its size was about 6.3kb.

During the culture of the transformant *E. coli* BL21(DE3)(pET-N), gene *N* was correctly expressed with the IPTG and the size of expressed things was about 34kDa.

Key words: PRRSV, recombinant plasmid vector