

애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 양이온교환체 유전자(*AtCAX2*)의 클론화에 대한 연구

최문명, 김인철

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《생물공학부문에서는 세포공학과 유전자공학, 미생물공학을 비롯한 현대생물학의 발전에 큰 힘을 넣으며 현대생물학의 성과를 농업과 축산업, 의학과 식료공업에 널리 받아들여 생산성이 높은 농작물과 집짐승의 새 품종을 만들어내며 질 좋은 여러가지 의약품과 식료품을 많이 생산할수 있도록 하여야 합니다.》(《김정일선집》 중보판 제15권 487~488페이지)

작물의 영양학적특성개선 및 각종 스트레스에 대한 저항성을 높여주는 유전자원을 적극 찾아내어 리용하는것은 농축산부문, 식료공업부문에서 인민들의 식량문제를 해결하고 농작물의 영양학적특성을 개선하는데서 나서는 절박한 문제이다.

우리는 식물에서 미량원소의 흡수, 염저항성의 제고 및 중금속오염환경의 생물학적정화 등에서 주요한 역할을 담당하고있는 애기장대계놈의 이온교환수송체유전자들중에서 그 하나인 *AtCAX2*유전자를 합성하고 클론화하였다.

재료 및 방법

*AtCAX2*추출재료로서 5주일간 자란 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)의 잎을 리용하였다.

유전자운반체로는 pMD18T(《TAKARA》), pYES2(《Invitrogen》)를 리용하였으며 유전자제조합 및 증폭을 위하여 숙주세포로서 *E. coli* JM109균주를 리용하였다. 프라이머설계 및 염기배열분석을 위하여 국제유전자자료기(Genbank Accession)에 있는 애기장대 *AtCAX2*의 염기배열(No. ATIG55731)을 리용하였다. 애기장대 *AtCAX2*의 열린읽기틀(ORF)의 길이는 1 324bp이다. 프라이머설계를 위한 프로그램으로는 Primer Premier 5.0을 리용하였다.

유전자증폭에 주형으로 리용할 cDNA는 선행연구[1]에 준하여 애기장대로부터 RNA를 추출하고 역전사반응을 시켜 얻어냈다. *AtCAX2*합성에 필요한 프라이머로서는 두종의 프라이머 즉 *AtCAX2*의 cDNA를 증폭하기 위한 프라이머(정방향 5'-TTGACTGCAAGGTTGCTGCA-3', 역방향 5'-TCCCCAACAAATTCGTGTTCC-3', 예상된 유전자증폭산물의 크기는 1 471bp)와 목적유전자를 pYES2운반체에 삽입하기 위하여 필요한 제한효소인식부위를 덧붙인 프라이머(정방향 5'-GGATCCTGTTGGTAGCACAAGGGTAT-3', 역방향 5'-CTCGAGCAGACTCTTCTCCGGTTTA-3', 예상된 유전자증폭산물의 크기는 1 361bp, 밑줄로 표시한 부분들은 각각 *Bam*H I, *Xho* I 제한효소인식부위임)들을 설계하고 전문기관에 주문하여 합성하였다.

PCR증폭은 선행방법[2]에 준하여 진행하였다. 제한효소인식부위가 붙은 *AtCAX2*증폭을 위한 주형으로서 대장균에로의 형질전환을 통하여 분리한 pMD18T-*AtCAX2*플라즈미드추출시료를 리용하였다. 전기영동겔로부터 PCR산물의 추출은 DNA겔추출시약(《Fermentas》)

으로 하였다.

pMD18T운반체로의 PCR증폭산물의 클론화는 우선 pMD18T운반체시약가운데서 용액 I 5 μ L, pMD18T 0.5 μ L, 목적DNA 4.5 μ L(총 10 μ L)를 1개의 시험관에 혼합한 다음 시약혼합물을 16°C 수욕조에서 12h동안 방치해두는 방법으로 진행하였다. 목적DNA가 삽입된 pMD18T플라스미드운반체의 대장균 *Escherichia coli* JM109에로의 형질전환은 선행방법[3]에 준하여 진행하였다. 균무지PCR를 통하여 전이가 확인된 균무지를 취하여 5mL의 액체LB배지(멸균후 항생소 첨가한것)에 접종하고 37°C에서 12~16h동안 진탕배양하였다. 배양한 대장균으로부터 플라스미드분리는 세균플라스미드추출시약(《OMEGA bio-tek》)으로 하였다.

pYES2-*AtCAX2*운반체의 구성을 위하여 우선 pYES2왕복운반체와 pMD18T-*AtCAX2*플라스미드를 각각 제한효소 *Bam*H I과 *Xho* I로 절단하였다. 제한효소반응산물을 아가로스겔전기영동하고 목적하는 pYES2와 *AtCAX2*토막을 회수하였다. pYES2운반체와 *AtCAX2*의 DNA는 T4 DNA리가제로 결합시켰다. 반응계는 pYES2운반체 4 μ L, *AtCAX2*의 DNA 3 μ L, T4리가제반응완충액 2 μ L, T4 DNA리가제 1 μ L를 넣은 반응관에서 총반응체적을 10 μ L로 하여 16°C에서 12h동안 방치하였다. 만들어진 pYES2-*AtCAX2*운반체의 증폭을 위하여 pYES2-*AtCAX2*플라스미드를 *E. coli* JM109에 형질전환시키고 선발된 균무지를 LB배지에서 확대배양하여 세균플라스미드추출시약(《OMEGA bio-tek》)으로 플라스미드를 대장균으로부터 분리해냈다. 분리해낸 운반체의 구성을 확인하기 위하여 제한효소절단반응을 진행하였다. 염기배열분석은 전문배열분석기관에 의뢰하여 진행하고 그 해석은 DNASTar해석 프로그램을 리용하여 진행하였다.

결과 및 론의

1) *AtCAX2*의 증폭

*AtCAX2*의 증폭을 위하여 설계한 프라이머(정방향 5'-TTGACTGCAAGGTTGCTGCA-3', 역방향 5'-TCCCAACATTCGTGTTCC-3')로 PCR를 진행하여 애기장대의 cDNA에서 *AtCAX2*를 분리하였다. PCR증폭산물의 전기영동결과는 그림 1과 같다.

그림 1에서 보는바와 같이 PCR산물의 영동띠는 2 000bp와 1 000bp사이에서 나타났다.

PCR반응산물을 pMD18T플라스미드에 삽입하고 *Escherichia coli* JM109에 형질전환시켜 분리해낸 플라스미드를 해당 연구기관(BGI)에 의뢰하여 배열분석한 결과 *AtCAX2*의 증폭산물이 변이가 없이 그 길이가 1 471bp로서 성과적으로 분리되었다는것이 확인되었다.

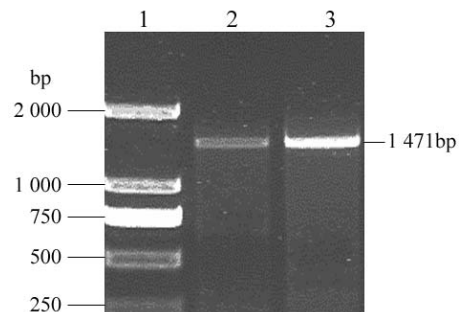


그림 1. 애기장대 cDNA로부터 증폭된 *AtCAX2*의 아가로스겔전기영동상
1-DNA표식자(DL 2000), 2, 3은 *AtCAX2*의 PCR증폭산물

2) 제한효소인식부위를 덧붙인 *AtCAX2*의 합성

제한효소인식부위를 덧붙인 목적유전자(*AtCAX2*)를 합성하기 위하여 제한효소 *Bam*H I과 *Xho* I의 인식부위를 덧붙인 프라이머(정방향 5'-GGATCCTGTTGGTAGCACAAGGGTA-3', 역방향 5'-CTCGAGCAGACTCTTCTTCCGGTTTA-3')와 위에서 얻은 pMD18T-*AtCAX2*플라스미드를 주형으로 하여 진행한 PCR결과는 그림 2와 같다.

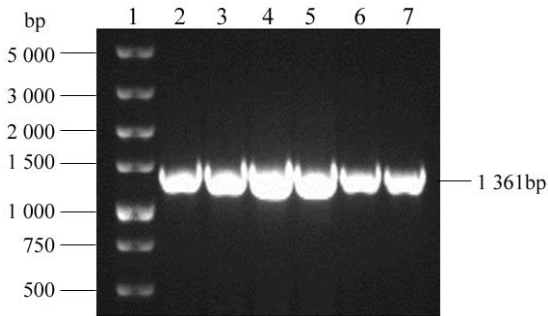


그림 2. 제한효소인식부위를 덧붙인 *AtCAX2*의 아가로스겔전기영동상
1-DNA표식자(DL 5000), 2-7은 *AtCAX2*의 PCR증폭산물

그림 3에서 보는바와 같이 제한효소로 절단한 pYES2토막은 그 크기가 5 856bp정도이며 절단된 pYES2의 나머지 50bp정도의 토막은 크기가 작은것으로 하여 아가로스겔전기영동상에서 관찰되지 않았다. 또한 제한효소로 절단한 pMD18T-*AtCAX2*운반체는 그 크기가 2 692bp인 pMD18T토막과 크기가 1 361bp인 *AtCAX2*부분으로 갈라졌다.

겔로부터 목적하는 pYES2와 *AtCAX2*유전자토막을 회수하고 pYES2운반체와 *AtCAX2*의 DNA는 T4 DNA리가제로 결합시켰다. 만들어진 pYES2-*AtCAX2*운반체의 증폭을 위하여 pYES2-*AtCAX2*플라스미드를 대장균 *E. coli* JM109에 형질전환시키고 선발을 위한 균무지PCR를 진행한 결과는 그림 4와 같다.

겔로부터 추출한 PCR반응산물을 pMD18T플라스미드에 삽입하고 *E. coli* JM109에 형질전환시켜 분리해낸 플라스미드를 배열분석한 결과 *AtCAX2*의 증폭산물의 길이가 1 361bp로서 정확하였다.

3) *AtCAX2*의 pYES2운반체로의 클론화
pYES2-*AtCAX2*운반체의 구성을 위하여 우선 pYES2왕복운반체와 pMD18T-*AtCAX2*플라스미드를 각각 제한효소 *Bam*H I과 *Xho* I로 절단하여 아가로스겔전기영동한 결과는 그림 3과 같다.

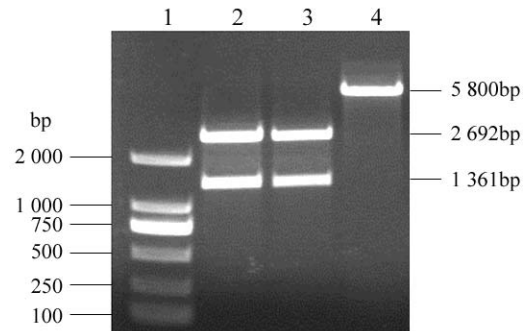


그림 3. pYES2운반체와 pMD18T-*AtCAX2* 플라스미드의 제한효소반응산물들의 아가로스겔전기영동상
1-DNA표식자(DL 2000), 2, 3은 pMD18T-*AtCAX2*플라스미드, 4-pYES2운반체

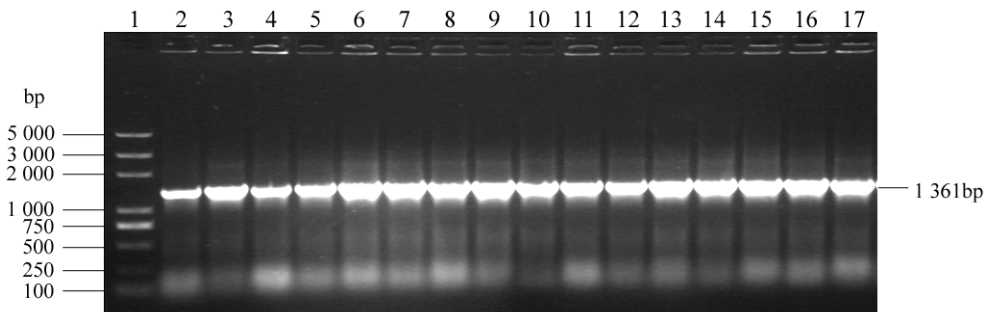


그림 4. 재조합플라스미드 pYES2-*AtCAX2*의 선발을 위한 아가로스겔전기영동상
1-DNA표식자(D 2000+), 2-17은 균무지 pYES2-*AtCAX2*플라스미드DNA

그림 4에서 보는것처럼 16개의 균무지를 임의로 취하여 PCR반응의 주형으로 리용하였는데 목적유전자에 해당하는 크기의 증폭토막이 100% 얻어졌다. 이것은 높은 재조합률로 목적유전자가 pYES2운반체로 재조합되었다는것을 말해준다.

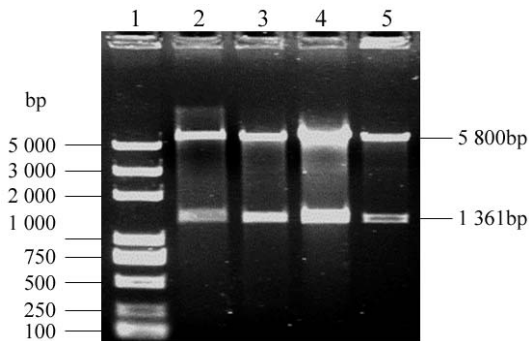


그림 5. 재조합플라스미드 pYES2-*AtCAX2*의 동정을 위하여 제한효소 *BamH* I과 *Xho* I로 절단한 제한효소반응산물의 아가로스겔 전기영동상

1-DNA표식자(D 2000+), 2-5는 pYES2-*AtCAX2*플라스미드

대장균에로의 형질전환과 LB배양을 통해서 선발확대되고 플라스미드추출시약으로 분리해낸 pYES2-*AtCAX2*운반체의 구성을 확인하기 위하여 제한효소절단반응을 진행한 결과는 그림 5와 같다.

그림 5에서 보는바와 같이 제한효소 *BamH* I과 *Xho* I로 절단된 pYES2-*AtCAX2*운반체는 pYES2토막(5 800bp)과 *AtCAX2*(1 361bp)로 갈라졌으며 이것을 통하여 pYES2-*AtCAX2*운반체가 정확히 구성되었다는것을 알수 있다.

염기배열분석을 통하여 그 정확성여부를 확인하였다.

맺 는 말

애기장대게놈으로부터 길이가 1 471bp인 *AtCAX2*를 증폭하였다.

제한효소(*BamH* I과 *Xho* I)인식부위가 붙은 길이가 1 361bp인 *AtCAX2*를 pMD18T운반체에 삽입하고 증폭하였다.

*AtCAX2*를 pYES2운반체에 클론화하고 그 정확성여부를 제한효소(*BamH* I과 *Xho* I)절단반응과 염기배열분석을 통하여 확인하였다.

참 고 문 헌

- [1] M. Kasuga et al.; Nature Biotechnology, 17, 3, 287, 1999.
- [2] K. Shinozaki et al.; Current Opinion in Plant Biotechnology, 6, 5, 410, 2003.
- [3] L. Zhang et al.; Theoretical and Applied Genetics, 118, 385, 2009.

주체104(2015)년 6월 5일 원고접수

Cloning of *AtCAX2* for a Cation Exchanger of *Arabidopsis thaliana*

Choe Mun Myong, Kim In Chol

AtCAX2 is a member of cation exchangers (CAX) group which belongs to Ca^{2+} /cation antiporter (CaCA) superfamily of *Arabidopsis thaliana*. In this study, the isolated *AtCAX2* ORF region with length of 1 471bp was sequenced and identified. We also constructed pYES2-*AtCAX2* vector by inserting *AtCAX2* ORF into pYES2 vector using restriction endonucleases *BamH* I and *Xho* I.

Key words: cation exchanger, CAX family, cloning