

농마합성효소 작은아단위유전자를 감자에서 발현시키기 위한 연구

김미향, 계인철, 남충혁

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《감자농사에서 혁명을 일으켜 먹는 문제를 풀려고 하는것은 우리 당이 내놓은 중요한 방침입니다. 우리 당은 농업생산을 추켜세우기 위하여 감자농사에서부터 혁명을 일으키려고 합니다.》(《김정일선집》증보판 제19권 413페이지)

최근 생물공학적인방법으로 감자에서 기본유용물질인 농마합량을 높이기 위한 연구들이 진행되고있는데 그 기본초점은 농마합성의 관건적인 단계에 관여하는 농마합성효소인 AGPase(ADPGlu PPi: Glucose-1-P-adenyltransferase 포도당-1-린산아데닐트랜스페라제, EC 2.7.7.27)의 발현을 증가시키는데로 돌려지고있다.

우리는 AGPase작은아단위유전자(*sAGPase*)를 감자에서 발현시킴으로써 농마합량이 높은 새로운 감자를 육성하기 위한 연구를 하였다.

재료와 방법

재료 식물재료로는 감자(*Solanum tuberosum*)품종 《라야(Raja)》의 무균묘를 리용하였으며 식물형질전환을 위한 아그로박테리움균주로는 *Agrobacterium tumefaciens* EHA105(pCAM-35S-sAGPase)를 리용하였다.

*sAGPase*확인을 위한 프라이머는 다음과 같다.

상류프라이머 5'-ATGGATCCATGGCGGCTTCCATTGGA-3'

하류프라이머 5'-TTGGATCCTCAGATGACGATTCCACTTG-3'

방법 식물형질전환은 잎절편감염도입법[3, 4]에 준하여 진행하였다. 감자줄기절편을 세균농도 $2 \cdot 10^5$ 개/mL, 온도 20~22℃ 조건에서 48h동안 공존배양시키고 카나미친 50mg/L, 세포탁심 500mg/L의 농도로 들어있는 MS배지에서 선발하였다.

PCR분석[2]으로 형질전환체들을 선발하였으며 농마합량은 선행방법[1, 5]에 따라 분석하였다.

결과 및 논의

1) *A. tumefaciens* EHA105(pCAM-35S-sAGPase)에 의한 감자품종 《라야》의 형질전환 선행방법[3, 4]에 준하여 *A. tumefaciens* EHA105(pCAM-35S-sAGPase)를 《라야》에 감염도입시켜 카나미친저항성작 248개를 선발하였으며 카나미친저항성작형성률은 15~17%였다.

1차선발한 카나미친저항성작들에 대하여 PCR분석을 진행하여 *sAGPase*의 존재유무를 확인하였다. PCR산물을 1% 아가로스겔에서 전기영동한 결과는 그림 1과 같다.

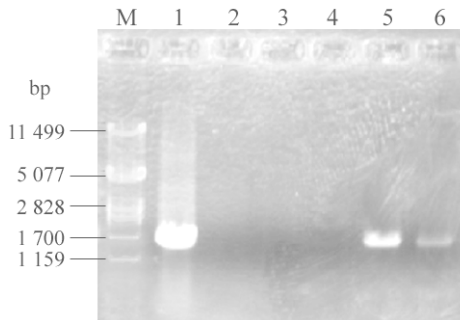


그림 1. 카나미핀저항성싹들에서 *sAGPase* 증폭산물의 1% 아가로스 겔전기영동상
M은 DNA분자량표식자(λ DNA/*Pst* I),
1-pCAM-35S-*sAGP*양성대조(1.5kb),
2-음성대조, 3-6은 카나미핀
저항성싹(1.5kb)

표 1에서 보는바와 같이 얻어진 계통들은 모두 대조보다 농마함량이 높았으며 특히 <AGP 83> 계통은 농마함량이 18.4%로서 대조에 비하여 1.44배 높았다. 이것은 *sAGPase*가 감자의 농마함성에 뚜렷한 영향을 주며 얻어진 계통들중에서 <AGP 83>이 목적하는 계통이라는것을 보여준다.

3) 후대에서 *sAGPase*의 확인

*sAGPase*가 도입된 감자의 T_1 , T_2 에서 *sAGPase*의 존재유무를 확인한 결과는 그림 2, 3과 같다.

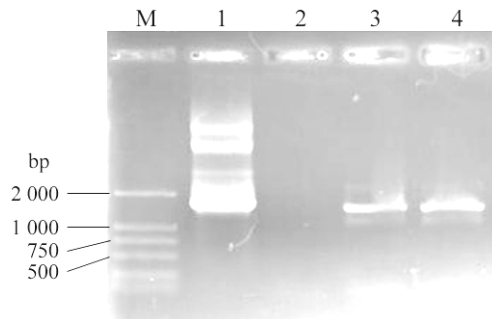


그림 2. *sAGPase*가 도입된 감자계통의 T_1 에서 *sAGPase* 증폭산물의 1% 아가로스 겔전기영동상
M은 분자량표식자(DL2000 Marker), 1-pCAM-35S-*sAGP*양성대조(1.5kb), 2-《라야》계놈(대조식물체),
3, 4는 전이계통(20, 83)의 계놈

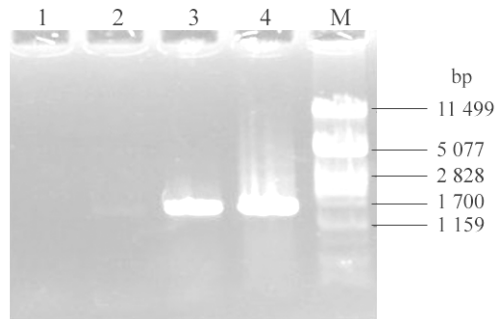


그림 3. *sAGPase*가 도입된 감자계통의 T_2 에서 *sAGPase* 증폭산물의 1% 아가로스 겔전기영동상
M은 DNA분자량표식자(λ DNA/*Pst* I), 1-《라야》계놈
(대조식물체), 2, 3은 전이계통(20, 83)의 계놈,
4-pCAM-35S-*sAGP*양성대조(1.5kb)

그림 2, 3에서 보는바와 같이 *sAGPase*가 도입된 감자계통의 T_1 , T_2 계놈에서 1.5kb 정도의 PCR토막이 정확히 얻어졌으나 대조식물체에서는 나타나지 않았다. 이것은 얻어진 감자계통의 계놈속에 *sAGPase*가 정확히 삽입되어 후대에까지 안정하게 유지되었다는것을 보여준다.

그림 1에서 보는바와 같이 *sAGPase*의 증폭산물과 같은 크기(1.5kb정도)의 증폭산물이 얻어졌으므로 목적유전자가 감자의 핵게놈에 정확히 삽입되었다는것을 알수 있다. 얻어진 PCR양성싹들을 뿌리배지에 이식하고 3주간 키운 다음 순화기질에 옮겨 순화시키고 야외포전에서 재배하였다.

2) *sAGPase*가 도입된 감자계통들의 농마함량분석
포전재배하여 얻은 감자계통들에 대하여 농마함량을 분석한 결과는 표와 같다.

표. <i>sAGPase</i> 가 도입된 감자계통들의 농마함량측정결과		
계통번호	농마함량/%	농마함량증가비
대조	12.8	1.0
<AGP 3>	15.3	1.12
<AGP 17>	14.9	1.16
<AGP 20>	16.3	1.27
<AGP 83>	18.4	1.44

맺 는 말

1) 아그로박테리움감염도입계(*A. tumefaciens* EHA105(pCAM-35S-sAGP))를 리용하여 감자품종 《라야》를 형질전환시켜 카나미핀저항성쌍 248개를 선발하였으며 카나미핀저항성쌍형성률은 15~17%였다.

2) *sAGPase*가 도입된 계통들에 대한 농마함량을 분석하여 대조보다 농마함량이 1.3배 이상 높은 개체들을 선발하였다.

3) *sAGPase*는 감자계놈속에서 후대에까지 안정하게 유지, 발현되었다.

참 고 문 헌

- [1] 남충혁 등; 생물공학연구통보, 1, 17, 주체104(2015).
- [2] J. Sambrook et al.; Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 163~172, 2000.
- [3] K. B. Anjan et al.; Plant Science, 170, 732, 2006.
- [4] Sudesh Chhikara et al.; Industrial Crops and Products, 37, 457, 2012.
- [5] 门福义 等; 马铃薯栽培生理, 北京中国农业出版社, 317~322, 1995.

주체105(2016)년 9월 5일 원고접수

Study to Express Starch Synthetase Small Subunit Gene in Potato

Kim Mi Hyang, Kye In Chol and Nam Chung Hyok

ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit gene was introduced in potato cv. “Raja” to obtain the potato lines which has increased starch content.

Key words: starch synthetase, small subunit gene, potato, expression