

과립결합형농마합성효소유전자의 클론화에 관한 연구

박종현, 박형범, 리선옥

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《오늘 세포공학, 유전자공학과 같은 첨단과학기술이 빠른 속도로 발전하고있는 조건에서 이러한 과학기술의 성과를 농업과학연구사업에 적용하면 종자문제를 해결하는데서 비약을 일으킬수 있습니다.》(《김정일선집》 증보판 제22권 166페이지)

생물공학과 같은 첨단과학기술을 적용하여 수확성이 높고 경제적가치가 높은 우량한 감자품종을 비롯한 새로운 농작물을 육성해내는것은 경제강국건설과 인민생활향상에서 중요한 의의를 가진다.

과립결합형농마합성효소(granule-bound starch synthase: GBSS)는 아밀로즈합성을 촉매하는 농마합성효소의 일종으로서 이 유전자의 발현을 억제하면 아밀로펙틴이 우세하게 축적된다는것이 알려졌다.[3]

우리는 분자생물학적방법으로 아밀로펙틴형농마형성에 관계하는 유전자들의 작용을 연구하기 위하여 GBSS유전자를 합성하고 클론화하기 위한 연구를 하였다.

재료와 방법

유전자를 클론화하기 위한 재료로는 감자(*Solanum tuberosum* L.)품종 《라야》를, 클론화운반체로는 pMD19-T를 리용하였다.

GBSS유전자합성을 위한 프라이머는 생물공학정보자료기지에 제시된 감자의 GBSS배열(X58453.1)에 기초하여 설계하고 주문합성하였는데 그 프라이머배열은 다음과 같다.

상류프라이머 5'-ATGGCAAGCATCACAGCTTCAC-3'

하류프라이머 5'-TTAGGGAGTGGCTACATTTTCCTTG-3'

감자의 총RNA분리와 RT-PCR, 제한절단, 런겔반응, 대장균형질전환은 선행방법[2]에 준하여 진행하였다.

DNA염기배열분석은 디데옥시사슬종지법으로 진행하였으며 DNA Star 프로그램을 리용하여 해석하였다.

결과 및 논의

1) RT-PCR에 의한 감자GBSS유전자의 합성

감자GBSS유전자를 합성하기 위하여 감자덩이줄기의 총 RNA를 주형으로 하고 GBSS특이프라이머와 oligo dT18을 리용하여 RT-PCR를 진행한 결과는 그림 1과 같다.

그림 1에서 보는바와 같이 GBSS특이프라이머에 의한 RT-PCR로부터 1.8kb정도의 DNA토막이 증폭되었으며 이것은 예상크기와 류사하였다.

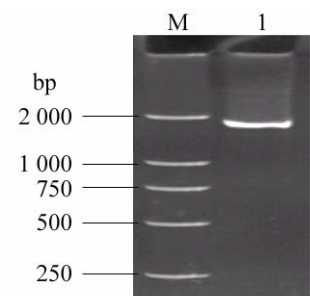


그림 1. RT-PCR산물의 전기영동상

M은 DNA분자량표식자 (DL2 000), 1-RT-PCR산물

2) GBSS유전자의 클론화

GBSS유전자 합성용 프라이머를 리용하여 증폭한 1.8kb의 RT-PCR산물을 pMD19-T운반체에 연결하고 재조합플라스미드(pMD-GBSS1824)를 동정한 결과는 그림 2와 같다.

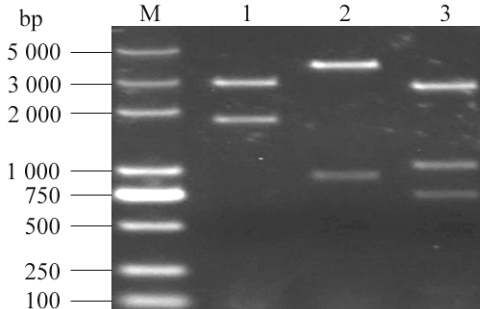


그림 2. pMD-GBSS1824에 대한 제한효소분해물의 전기영동상
M은 DNA분자량표식자, 1-Hind III, 2-EcoR I, 3-Hind III+EcoR I

그림 2에서 보는바와 같이 재조합플라스미드 pMD-GBSS1824는 제한효소 *Hind* III에 의한 반응에 의하여 2개의 토막(1.7, 2.8kb)으로 절단되었으며 제한효소 *Eco*R I에 의하여 2개의 토막(0.8, 3.7kb)으로, 제한효소 *Hind* III과 *Eco*R I의 동시반응에 의하여 3개의 토막(0.7, 1, 2.8kb)으로 절단되었다. 이것은 자료기지의 GBSS유전자염기배열로부터 예상되는 결과와 일치하는것으로서 pMD-GBSS1824가 클론화운반체인 pMD19-T에 1.8kb의 RT-PCR증폭산물이 삽입된 목적하는 재조합플라스미드(그림 3)라는것을 보여준다.

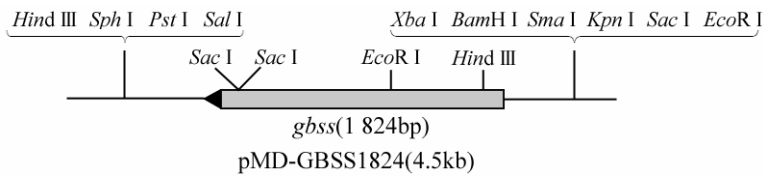


그림 3. 플라스미드pMD19-GBSS1824의 제한효소절단점 지도

3) GBSS유전자의 부분클론화

GBSS유전자의 부분클론화를 위하여 설계, 합성한 프라이머(F: 5'-GCGAGCTCATTGATGGATATG-3', R: 5'-GCGGTACCTGTTACTATCTTAAG-3')를 리용하여 증폭한 750bp의 PCR산물을 pMD19-T운반체에 연결하고 재조합플라스미드(pMD-GBSS750)를 동정한 결과는 그림 4와 같다.

그림 4에서 보는바와 같이 재조합플라스미드 pMD-GBSS750은 제한효소 *Kpn* I과 *Sac* I에 의한 동시반응에 의하여 2개의 토막(750bp 토막과 플라스미드 pMD19-T토막)으로 절단되었다. 이것은 pMD-GBSS750이 클론화운반체인 pMD19-T에 750bp의 PCR 증폭산물이 삽입된 목적하는 재조합플라스미드라는것을 보여준다.

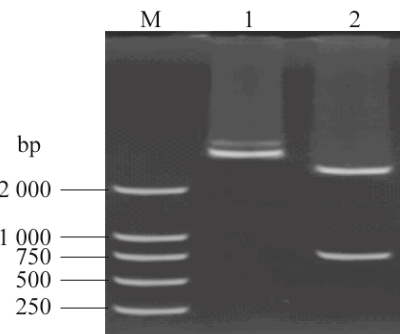


그림 4. pMD-GBSS750에 대한 제한효소분해물의 전기영동상
M은 DNA분자량표식자(DL2 000), 1-pMD-GBSS750, 2-pMD-GBSS750/(*Kpn* I+*Sac* I)

4) GBSS유전자의 염기배열분석

재조합플라스미드 pMD-GBSS750에 삽입된 GBSS유전자의 DNA염기배열을 분석한 결과는 그림 5와 같다.

그림 5에서 보는바와 같이 감자GBSS유전자의 염기배열은 750bp이며 이 유전자염기배열과 생물공학정보자료기지의 GBSS유전자배열과 99.7% 일치하였다. 이것은 클론화운반체 pMD19-T에 삽입된 750bpDNA토막은 목적하는 감자GBSS유전자라는것을 보여준다.

```
ATTGATGGAT ATGAGAAGCC TGTTAAGGGT AGGAAAATCA ACTGGATGAA
GGCTGGGATA TTAGAATCAC ATAGGGTGGT TACAGTGAGC CCATACTATG
CCCAAGAACT TGTCTCTGCT GTTGACAAGG GTGTTGAATT GGACAGTGTC
CTTCGTAAGA CATGCATAAC TGGGATTGTG AATGGCATGG ATACACAAGA
GTGGAACCCA GCGACTGACA AATACACAGA TGTCAAATAC GATATAACCA
CTGTCATGGA CGCAAAACCT TTAATAAAGG AGGCTCTTCA AGCAACAGTT
GGCTTGCCCTG TTGACAAGAA GATCCCTTTG ATTGGCTTCA TCGGCAGACT
TGAGGAGCAG AAAGGTTTCA ATATTCTTGT TGCTGCAATT CACAAGTTCA
TCGGATTGGA TGTTCAAATT GTAGTCCTTG GAACTGGCAA AAAGGAGTTT
GAGCAGGAGA TTGAACAGCT CGAAGTGTTG TACCCTAACA AAGCTAAAGG
AGTGGCAAAA TTCAATGTCC CTTTGGCTCA CATGATCACT GCTGGTGCTG
ATTTTATGTT GGTTCCAAGC AGATTTGAAC CTTGTGGTCT CATTCAGTTA
CATGCTATGC GATATGGAAC AGTGCCAATC TGTGCATCGA CTGGTGGACT
TGTTGACACT GTGAAAGAAG GCTATACTGG ATTCCATATG GGAGCCTTCA
ATGTTGAATG CGATGTTGTT GACCCAGCTG ATGTGCTTAA GATAGTAACA
```

그림 5. 감자GBSS유전자의 DNA염기배열분석결과

맺 는 말

- 1) RT-PCR방법으로 감자의 GBSS유전자를 합성하고 클론화하였다.
- 2) GBSS유전자의 871-1620bp부분(750bp)을 부분클론화하고 그것의 염기배열을 밝혔다.

참 고 문 헌

- [1] 계인철 등; 조선생물공학학회지, 4, 23, 주체100(2011).
- [2] J. Sambrook et al.; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 30~95, 1999.
- [3] A. G. J. Kuipers et al.; Mol. Gen. Genet., 246, 745, 1995.

주체104(2015)년 4월 5일 원고접수

Cloning of Granule-Bound Starch Synthase(GBSS) Gene

Pak Jong Hyon, Pak Hyong Bom and Ri Son Ok

We synthesized GBSS gene from potato by RT-PCR and cloned into pMD19-T vector.

871-1620bp partial fragment(750bp) of GBSS gene was amplified by PCR and subcloned into pMD19-T vector and sequenced.

Key words: GBSS gene, potato, amylopectin