

참외과육으로부터 ADP-glucose pyrophosphorylase 유전자의 클로닝

강형일, 김인중, 정원일
한국과학기술원 생물과학과

Cloning of ADP-glucose pyrophosphorylase from melon fruit

Hyung-Yeol Kahng, In-Jung Kim, Won-Il Chung

Department of Biological Sciences, Korea Advanced Institute of Science and Technology

실험목적

참외당도관련 유전자의 분리, 발현조절을 위한 유전자재조합, 그리고 식물형질전환, 재분화 및 품종확보는 종묘산업의 우위를 점할수 있는 기술적 초석이 될 수 있다. ADP-glucose pyrophosphorylase(AGPase)는 전분의 생합성에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, AGPase유전자의 발현조절은 당도개선에 커다란 커다란 역할을 할 수 있으리라 사료된다. 본 연구에서는 참외의 과육으로부터 full-length cDNA AGPase를 클로닝하고, *in vivo* AGPase 유전자의 발현조절을 통해 참외의 당도를 증진시키는 것을 목적으로 하고 있다.

재료 및 방법

- 공시품종 : 급싸라기 참외
- 채취시기 : 개화후 6주
- 실험방법 :

D/B 검색을 통해 기존에 알려진 downstream 과 upstream에서 보존부위를 기준으로 각각 20-mer의 oligonucleotide primer를 합성하고, 참외 과육으로부터 분리한 mRNA를 주형으로한 RT-PCR에 사용하였다. RT-PCR과정에 의해 증폭된 산물을 subcloning한 후 염기서열 분석을 통해 AGPase 유전자의 절편임을 확인하였다. 이 DNA 절편을 방사성동위원소로 표지한 후, plaque hybridization에 의하여 참외의 cDNA library로부터 full-length AGPase gene을 screening하는데 probe로 사용하여 여러개의 plaque를 분리하였다. 염기서열 분석을 통해 분리된 plaque에 full-length AGPase의 large 및 small subunit의 full-length를 coding하는 유전자의 insert를 가지고 있음을 확인하였고 현재 그들의 전체 염기서열을 결정 중에 있다.

실험결과

1. RT-PCR과정을 통해 small subunit(250 및 300bp) 와 large subunit(660 bp)의 증폭산물을 얻었다.
2. 이 증폭산물들을 pGEM-T[®] vector에 연결시킨 후 염기서열을 결정한 결과 RT-PCR 산물이 AGPase 유전자의 단편임을 확인하였다.
3. 참외과육으로부터 mRNA를 순수분리하여 cDNA library를 제작하였다.
4. plaque hybridization 과정을 통해 AGPase의 전체 유전자를 가지고 있는 plaque를 분리하여 염기서열을 부분적으로 결정하였다. 이 염기서열은 다른 식물체의 AGPase 유전자와 높은 상동성을 나타내었다.

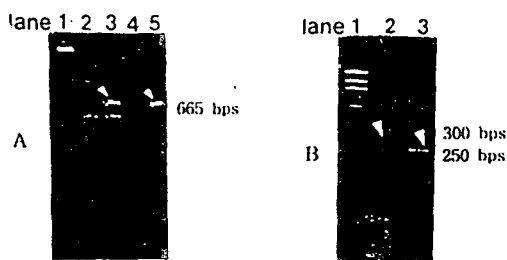


Fig. 1. The PCR products by use of *Taq* polymerase
 20g mRNA was used for the RT-PCR. PCR was performed in a thermal cycler(PCR Robot). The temperature was cycled to 95°C for 1 min., then to 55°C for 1 min., and then to 72°C for 1 min. for a total of 33 cycles. The PCR products were run on 2% metaphor agarose gel.
A: Large subunit
 lane 1, 1kb ladder; lane 2, AGLU1-AGLE1; lane 3, AGLU1-AGLE2;
 lane 4, AGLU2-AGLE1; lane 5, AGLU2-AGLE2
B: Small subunit.
 lane 1, pGEM size marker; lane 2, AU1-AL1; lane 3, AU2-AL1

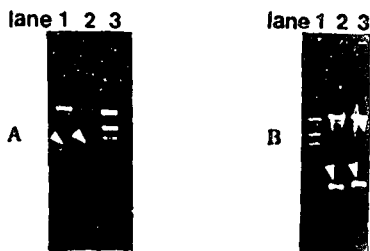


Fig. 2. Restriction digests of the subcloned recombinant plasmids
 Electrophoresis was carried out on 2% TAE metaphor agarose gel for 30 minutes. The white arrows indicate insert DNAs.
A: Large subunit
 lane 1-2, the subclones digested with *ApaI* and *SacI*
 lane 3, pGEM size marker
B: Small subunit
 lane 1, pGEM size marker; lane 2-3, the subclones digested *EcoRI-HindIII*

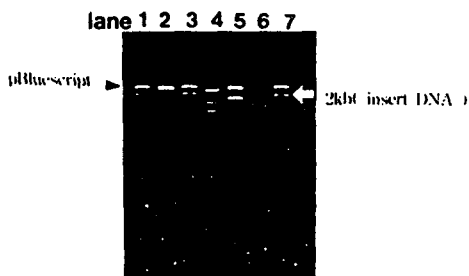


Fig. 3. Restriction digests of the pBluescript phagemids containing full length AGPase
 Firstly, *In vivo* excision of the pBluescript phagemid from the Uni Zap XR vector was done using Exassist helper phage with SOLR strain. After that, the excised pBluescript phagemids were double digested with *EcoRI* and *XbaI*. The white arrows indicate insert DNAs.
 lane 1-3, small subunit
 lane 4, pGEM size marker
 lane 5-7, large subunit

