

사과 과육으로부터 AGPase 유전자의 Small Subunit 클로닝

김인중, 오동하, 김영숙, 정원일
한국과학기술원 생물과학과

Cloning of small subunit of AGPase from Apple fruit

In-Jung Kim, Dong-Ha Oh, Young-Sook Kim, Won-Il Chung
Department of Biological Sciences, Korea Advanced Institute of Science and Technology

실험목적

사과의 품질을 좌우하는 여러가지 형질 중 당도는 매우 중요한 결정인자이다. 본 연구에서는 당도제어에 관여하는 여러 유전자 중 ADP-glucose pyrophosphorylase(AGPase)를 code하는 유전자를 클로닝하고, 이 유전자를 이용하여 사과 과육의 당도를 향상시키고자 한다.

재료 및 방법

- 공시품종 : 후지사과
- 채취시기 : 개화후 6주
- 실험방법 :

지금까지 보고된 여러 AGPase의 small subunit들의 염기서열을 비교하여, 보존된 부위에 해당되는 oligomers(U1, AL1)를 합성하였다. 이 oligomer를 사과과육으로부터 분리된 mRNA를 주형으로 한 RT-PCR 과정의 primer로 사용하였다. RT-PCR과정에 의해 증폭된 산물을 subcloning한 후 염기서열 분석을 수행하였다. subclone된 DNA를 방사성동위원소를 표지한 후 plaque hybridization 과정의 probe로 사용하여 여러 plaque를 분리하였다. 염기서열을 통해 분리된 plaque가 AGPase의 small subunit를 code하는 유전자를 insert로 가지고 있음을 확인하였고 현재 전체 염기서열을 결정 중에 있다.

실험결과

1. RT-PCR과정을 통해 예상 크기 400bp의 증폭산물을 얻었다.
2. 400bp 산물을 pGEM-T^o vector에 연결시킨 후 염기서열을 결정한 결과 RT-PCR 산물이 AGPase 유전자의 small subunit 단편임을 확인하였다.
3. 사과과육으로부터 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.

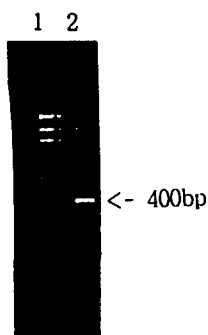


Fig. 1. Metaphor agarose gel(2.0%) electrophoresis pattern of RT-PCR product. The expected length of PCR product is 400bp. This band was eluted by use of GeneCleanII kit. Lane 1, pGEM marker: Lane 2, RT-PCR product



Fig. 2. Metaphor agarose gel(2.0%) electrophoresis pattern of restriction(*ApaI-SaII*) digests for plasmid of which PCR product was ligated into pGEM-T^o vector. Lane 1, pGEM marker: Lane 2, restriction digests.

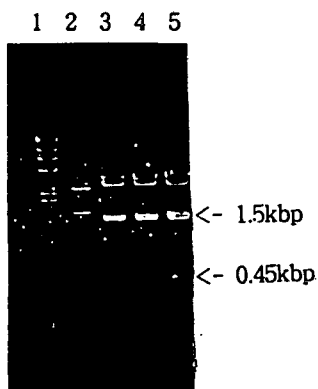


Fig. 3. Agarose gel(0.8%) electrophoresis pattern of the restriction(*EcoRI-XhoI*) digests for small subunit of AGPase gene(1.95kbp) excised from λ phage DNA. Lane 1, λ /*HindIII* marker: Lane 2, pGEM marker: Lane 3, 4 & 5, restriction digests.

Table 1. Comparison nucleotide sequence(ORF) of cloned gene to other small subunit of AGPase

Plant species	Homology
<i>I. batatas</i>	84%
<i>S. oleracea</i>	84%
<i>B. vulgaris</i>	84%
<i>V. faba</i>	83%
<i>P. sativum</i>	82%
<i>L. esculentum</i>	81%