

## 옥수수 $\alpha$ -amylase 遺傳子の 클로닝\*\*

金容旭\*·姜信蕙\*

### Cloning of $\alpha$ -Amylase Gene from *Zea mays*\*\*

Yong Wook Kim\* and Shin Hye Kang\*

**ABSTRACT** : The objective of this study was to clone a partial fragment of  $\alpha$ -amylase from Korean maize. We designed and synthesized an oligonucleotide probe and two kinds of PCR primers based on cDNA conserved region of  $\alpha$ -amylase sequences from other plants.

Total RNA from 3-day-old maize seedling was used as template for 1st strand cDNA synthesis and RNA-DNA hybrid was used as template for polymerase chain reaction(PCR).

The product of PCR was about 0.5 kb long and inserted into pUC19. We named this recombinant plasmid as pZM $\alpha$ '. The cloned fragment was certified by Southern blot analysis using labeled synthetic oligonucleotide as probe.

작물을 포함하는 대부분의 植物은 種子의 發芽에 있어 胚乳의 澱粉을 分解하기 위하여 澱粉分解 酵素들을 生産한다. 그 가운데  $\alpha$ -amylase는 중요한 位置를 차지하며 gibberellic acid(GA)에 의해 그 合成이 促進되고 abscisic acid에 의하여 阻害되는 등<sup>2,3,21</sup> 生理의으로도 研究의 價値가 높다. Payen등이 보리 種子내의 amylase를 報告한 이후<sup>24</sup>, 이 酵素에 관한 研究가 持續의으로 이루어져 왔다. 1967년에는 Chrispeels이 보리의 胚乳로부터 分離된 糊粉層에서  $\alpha$ -amylase와 ribonuclease 배출에 GA가 영향함을 보고하였으며<sup>5</sup>, 같은 해에 Filmer 등은  $\alpha$ -amylase의 합성이 발아에 즈음한 de novo 합성이며<sup>7,17</sup>, 이것은 RNA 합성과 밀접한 관련이 있다고 하였고<sup>2,3,6,9,19,21</sup>, 1983년에는 보리  $\alpha$ -amylase의 cDNA 클론이 報告되었으며<sup>26</sup>, 벼와 보리의 糊粉層에서의 조절기

작에 관한 報告도 있다<sup>21,23</sup>. 또한 보리 호분층에 存在하며 높은 pI 값을 보이는  $\alpha$ -amylase 複合遺傳子の 轉寫體 合成이 gibberellic acid에 의하여 促進된다는 報告도 있다<sup>21</sup>. 벼<sup>22</sup>, 귀리<sup>29</sup>, 그리고 mung bean의 경우<sup>13</sup>도 여러 報告가 있고, 벼의 경우에는  $\alpha$ -amylase의 分子量이 약 44kDa인 것으로 알려져 있으며<sup>15,16</sup>, mung bean과 함께 cDNA 클론과 種子發芽時의 mRNA 發現에 관하여 研究되었고, GA에 의해 유기되는 因子가 糊粉層組織  $\alpha$ -amylase의 發現調節部位와 相互作用하고 있음이 報告되었다<sup>23</sup>.  $\alpha$ -Amylase는 活性的 識別이 容易한 관계로 최근에는 微生物로부터 分離된  $\alpha$ -amylase<sup>4,6</sup>를 이용하여 遺傳子 클로닝에 標識으로 사용하고 있기도 하다<sup>7</sup>.

이에 본 研究에서는 우리나라뿐만 아니라 世界的으로 飼料作物로서 중요한 위치를 차지하고 있

\* 東國大 農大 農學科(Dept. of Agronomy, Col. of Agri., Dongguk Univ., Seoul 100-715, Korea)

\*\* 본 論文은 1991年度 教育部 學術研究造成費에 의해 研究되었음. <'93. 6. 17 接受>

는 옥수수  $\alpha$ -amylase 遺傳子를 클로닝하고 그調節機作的 研究基盤을 마련하기 위하여 PCR 方法을 이용한 DNA 切片을 얻고자 하였다.

## 材料 및 方法

### 1. 材料

○ 供試材料 : 實驗에 使用한 옥수수 種子는 '수원 19호'로서 國立種子普及所에서 分讓받아 使用하였다.

○ 宿主細菌과 플라스미드 벡터 : 形質轉換과 클로닝을 위하여 宿主로서 大腸菌 菌株 가운데 DH5 $\alpha$ 를 使用하였고, 클로닝 벡터로는 pUC19를 使用하였다.

○ 細菌 培養 培地 : 大腸菌 DH5 $\alpha$ 는 LB 培地 (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% sodium chloride)에서 培養하였고, 形質轉換 後 必要에 따라 ampicillin 등의 抗生劑를 함께 制限한 培地도 使用하였다.

○ 試藥 및 酵素 : 一般試藥은 미국 Sigma사 製品을, gibberellic acid(GA<sub>3</sub>)는 Fluka사 製品을, 培地用 試藥은 Difco사 製品을 使用하였으며, Southern blot analysis에 使用한 probe는 Amersham사의 ECL reagent로 標識하였고, nylon 膜도 Amersham사의 製品(Hybond-N<sup>+</sup>)을 使用하였다. 또한 制限酵素와 Taq DNA 合成酵素는 KOSCO사 製品을, 이외의 효소와 rRNase inhibitor RNasin은 미국 Promega사 製品을 使用하였다.

### 2. 方法

○ 옥수수 種子의 消毒 및 發芽 : 옥수수 種子를 發芽시키기 전에 3% sodium hypochlorite 용액에 5분간 침지하여 表面을 消毒한 후, 發芽 溶液(10mM CaCl<sub>2</sub>, 5mM GA<sub>3</sub>)에 적신 종이 타올에서 36時間 동안 暗條件에 두어 發芽시켰다.

○ 옥수수 total RNA의 抽出 및 確認 : 옥수수 幼苗로부터 전체 RNA를 抽出하기 위하여 guanidine thiocyanate를 使用하는 Chomczynski 등의 方法<sup>4)</sup>을 根幹으로 必要에 따라 實驗方法을 다소

變更하여 遂行하였다. 위에서 얻은 幼苗 3g을 液 化窒素와 막자사발을 使用하여 곱게 부수고, 10ml의 denaturing solution(용액 D : 4M guanidine thiocyanate, 25mM sodium citrate, pH 7.0 ; 0.5% sarcosyl, 0.1M 2-mercaptoethanol)에 녹인 다음, 2M sodium acetate(pH4.0) 용액 1ml과 10ml의 phenol, 그리고 49:1 比率의 chloroform : isoamylalcohol 溶液 2ml을 넣고 세게 혼든 후, 얼음에 15분간 두었다. 이를 10,000×g로 4℃에서 20분간 遠心分離하고 상등액을 취하여 동일 부피의 isopropanol을 넣은 뒤 -20℃에 1시간동안 둔 다음, 다시 10,000×g로 4℃에서 20분간 遠心分離하여 沈澱物을 얻었다. 이를 가볍게 乾燥시킨 후, 3ml의 용액 D를 添加하여 잘 녹이고 여기에 동일 부피의 isopropanol을 넣어 -20℃에 1시간 동안 둔 다음, 10,000×g로 4℃에서 20분간 遠心分離하여 RNA 沈澱物을 얻어 이를 75% ethanol로 洗滌한 후 乾燥하고 50ml의 diethylpyrocarbonate(DEPC)를 처리한 蒸溜水에 녹였다. 長期貯藏을 위하여 -20℃에 保管하면서 必要時에 녹여 使用하였다.

○ Oligonucleotide probe 및 PCR primer의 設計와 合成 : 本 實驗에서 使用한 合成 oligonucleotide는 動物, 植物, 微生物 등 11種의  $\alpha$ -amylase의 아미노산 序列을 비교한 資料<sup>20)</sup>와 비<sup>22)</sup>, 보리<sup>26)</sup>, mung bean<sup>13)</sup> 및 *Streptomyces hygroscopicus*<sup>10)</sup>의  $\alpha$ -amylase cDNA 클론들의 鹽基序列 資料, 그리고 보리의 codon usage<sup>26)</sup>를 參照하여 염기서열을 정하였고, 이를 기초과학지원센터 제 3기기부에 依賴하여 合成, 使用하였다.

○ RNA PCR을 使用한  $\alpha$ -amylase 遺傳子 切片의 增幅 : 위에서 合成한 oligonucleotide primer를 使用하여 Innis<sup>12)</sup> 및 McPherson<sup>14)</sup> 등의 方法을 참고하면서 옥수수의 전체 RNA를 鑄型으로 한 PCR을 遂行하였다. 먼저 RNA로부터 첫번째 가닥 cDNA 合成을 위하여 RNA 鑄型的 3' 末端 primer(primer II)와 avian myeloblastosis virus(AMV) 逆轉寫酵素를 利用하여 먼저 첫번째 가닥 cDNA를 合成한 다음, 이를 PCR에 使用하였다. 鑄型으로 옥수수 RNA 1 $\mu$ g을 使用하였으며, 100pmole의 primer II, rRNasin 1 unit, 25

unit의 AMV 역轉寫酵素, 1mM dNTP들을 넣고 蒸溜水와 反應溶液으로 50mM Tris·Cl(pH 8.3), 50mM KCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM DTT, 0.5mM spermidine의 條件을 만들어 42°C에서 60분 동안 反應시켜 첫번째 가닥의 cDNA를 合成하였다.

이렇게 얻은 RNA : DNA hybrid를鑄型으로 *Taq* DNA 合成酵素를 이용하여 primer I과 primer II 사이의 DNA를 增幅하였다.鑄型으로 1 $\mu$ g의 RNA : DNA hybrid를 사용하고, 100pmol의 각 PCR primer, 2.5mM MgCl<sub>2</sub>, 100 $\mu$ M의 각 dNTP, 100 $\mu$ g/ml bovine serum albumin, 그리고 10mM Tris·Cl, pH 8.8, 50mM KCl, 0.1% Triton X-100의 條件에서 전체 부피 100 $\mu$ l로 反應시켰다. *Taq* DNA 合成酵素를 除外한 混合物를 만들어 95°C에서 2분간 denaturation한 후, 2.5unit의 *Taq* DNA 合成酵素를 넣고 동일 부피의 mineral oil을 얹은 다음, 95°C에서 1분, 55°C에서 1분, 그리고 72°C에서 2분으로 이 세 段階를 35번 反復施行하였다.

○ PCR 산물의 클로닝 : 위의 PCR을 통하여 얻은 DNA 切片을 클로닝하기 위하여 벡터로 大腸菌을 宿主細胞로 하는 pUC19 플라스미드를 選擇하였다. 이의 分離를 위하여 Sambrook 등<sup>28)</sup>의 CaCl<sub>2</sub> 形質轉換 方法 및 alkaline lysis 方法을 따라 實驗하였다. 후에 PCR 산물을 클로닝한 플라스미드 DNA도 이에 準하여 形質轉換하고 抽出하였다.

위에서 PCR을 이용한 增幅이 끝난 다음, 이를 low melting temperature agarose로 만든 gel에 얹은 후, 0.5×TBE 緩衝溶液으로 電氣泳動하였다. 이로부터 0.5kb 크기의 DNA 切片을 5배 부피의 TE 緩衝溶液(10mM Tris·Cl, pH 8.0, 1mM EDTA)을 넣은 다음, 65°C에서 5분간 녹이고 동일 부피의 phenol/chloroform 溶液을 넣고 세계 흔든 후, 10,000×g에서 10분간 遠心分離하여 상등액을 취하고 다시 phenol/chloroform으로 抽出하였다. 이 溶液에 1/5부피의 10 M ammonium acetate 溶液(pH 5.3)을 넣고 여기에 2배 부피의 ethanol을 넣어 4°C에서 10분간 둔 다음, 15,000×g로 4°C에서 20분간 遠心分離하

고 여기서 얻은 침전물을 70%의 ethanol로 洗滌한 후, 이를 乾燥시키고 適當量의 滅菌된 蒸溜水에 녹였다. 이 PCR 산물의 兩端을 blunt end로 만들기 위하여 PCR 산물 50 $\mu$ l, 각 dNTP 100 pmol, 40mM Tris·Cl, pH7.5, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 그리고 5mM DTT의 條件으로 37°C에서 5분간 둔 다음, 5unit의 大腸菌 DNA 合成酵素 I large (Klenow) fragment를 添加하고 37°C에서 10분간 反應시켰다. 이를 다시 low melting temperature agarose를 이용하여 電氣泳動하고 원하는 DNA 切片을 오려내어 위의 方法과 同一하게 回收하였다. 다만 이 경우에는 sodium acetate를 DNA 運搬體로 사용하였다. 이렇게 얻은 DNA의 양 끝을 磷酸化하기 위하여 700ng의 DNA에 각 dNTP 100pmol, 40mM Tris·Cl, pH7.5, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM DTT, 그리고 10mM의 ATP를 넣은 후, 20unit의 T4 polynucleotide kinase를 添加하고 37°C에서 1시간 동안 反應시켰다. 이를 다시 phenol/chloroform 溶液으로 抽出하고 ethanol로 沈澱시켜 양끝이 脫磷酸화된 pUC19 벡터와 連結하였다. 이 DNA를 클로닝하기 위하여 11 $\mu$ g의 pUC19 DNA를 制限酵素 *Hinc* II로 자른 다음, phenol/chloroform으로 抽出하고 ethanol을 이용하여 沈澱시킨 후, 滅菌蒸溜수에 녹여 50mM Tris·Cl, pH9.0, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1mM ZnCl<sub>2</sub>, 그리고 1mM spermidine의 條件에서 10unit의 calf intestinal phosphatase(CIP)를 넣고 37°C에서 15분간 둔 다음, 다시 15unit의 CIP를 處理하고 55°C에서 45분간 反應시켰다. 反應이 끝난 후, EDTA를 最終濃度 5mM이 되게 넣어 反應을 中止시키고 75°C에서 10분간 두어 CIP를 不活性化시켰다. 이후, phenol/chloroform으로 抽出하고 ethanol 沈澱한 다음, 滅菌蒸溜수에 녹여 DNA 切片과 連結하였다. 이를 위하여 위에서 얻은 0.5kb DNA와 直線화된 pUC19 벡터 DNA를 66mM Tris·Cl, pH7.6, 6mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, 1mM ATP, 그리고 15% polyethylene glycol의 條件에서 30unit의 T4 DNA 連結酵素를 넣고 16°C에서 10時間동안 反應시켰다. 위의 反應 混合物를 미리 준비해둔 大腸菌 DH5 $\alpha$  competent cell을 앞에서 記述한 바와 같이 形質轉換

하고 ampicillin이 들어 있는 LB plate에 부어 펠친 후, colony를 얻었다.

◦ Southern blot analysis에 의한 部分的인  $\alpha$ -amylase 클론의 確認 : ampicillin을 含有한 LB plate에서 얻은 여러 colony들을 다시 ampicillin이 들어 있는 LB 液體倍地에서 37°C로 하룻동안 培養한 다음, alkaline lysis 方法으로 플라스미드 DNA를 抽出하고, *Hind*III, *Bam*H I 과 *Hind*III 등의 制限酵素로 切斷하여 0.9% agarose gel에서 0.5 × TBE 緩衝溶液으로 電氣泳動한 다음, 이 gel을 denaturation 溶液(1.5M NaCl, 0.5N NaOH)에서 15분간 흔들고 蒸溜水로 洗滌한 후, alkaline transfer 溶液(0.4N NaOH)을 이용하여 nylon 膜에 옮겨 2 × SSC(20 × SSC : 0.3M sodium citrate, pH 7.0, 3M NaCl)로 부드럽게 洗滌하였다.

◦ 클로닝된 DNA의 Southern hybridization 과 分析 : 위의 nylon 膜을 42°C에서 hybridization 溶液(5 × SSC, 0.5% hybridization blocking reagent(Amersham), 0.1% *N*-lauroylsarcosine, 0.02% SDS)으로 15분간 prehybridization하고 앞서 label한 oligonucleotide probe를 150ng 넣고 42°C에서 1時間동안 흔들며 주면서 hybridization 하였다. Hybridization이 끝난 nylon 膜을 1次 洗滌溶液(3 × SSC, 0.1% SDS)으로 42°C에서 15분간 洗滌하고 同一한 方法으로 한번 더 반복한 후, 多量의 2次 洗滌溶液(2 × SSC)으로 常溫에서 5분간 洗滌하였다. 이를 檢出溶液 1(Amersham)과 2(Amersham)를 동량 섞은 溶液에 常溫에서 1분간 反應시키고 X-ray 필름에 露出시켜 確認하였다.

## 結果 및 考察

◦ PCR primer, probe의 合成과 옥수수 전체 RNA의 抽出 및 確認

$\alpha$ -amylase의 cDNA 클로닝을 目的으로 既存의 다른 植物體로부터 알려져 있는  $\alpha$ -amylase 遺傳子의 鹽基序列들 가운데 잘 保存된 鹽基序列 [conserved region]을 參考로 하여 Southern blot analysis에 probe로 사용하거나, RNA PCR

에 primer로 사용할 oligonucleotide를 合成하였다. 특히 Southern blot analysis에 probe로 사용할 oligonucleotide를 標識하기 위하여 사용한 ECL방법은 horseradish peroxidase(HRP)를 이용한 chemiluminescence detection system으로서 人體에 매우 有害한 放射性 同位元素를 사용하지 않고 원하는 DNA 또는 RNA 切片을 追跡하는 方法으로 새로이 開發된 方法이다. 따라서 oligonucleotide의 合成時 oligonucleotide의 5' 末端에 C<sub>6</sub>-thiol modifier를 부착하도록 하였다. RNA PCR에 사용한 primer의 鹽基序列은 다음과 같다.

Primer I 5' GCC GAC ATC GTC ATC AAC CAC CG 3' (23-mer)  
  G  G

Primer II 5' GTC GTG GTT GTC IAC GAA 3' (18-mer)

Southern blot analysis에 사용한 probe의 鹽基序列은 다음과 같다.

Probe I 5' \*\*CGG TGG TTG ATT ACG ATG TCG GCI A 3' (25-mer)

\*6 : C<sub>6</sub>-thiol modifier

옥수수의 幼苗에서 抽出한 RNA를 確認하기 위하여 agarose gel 電氣泳動을 한 結果는 Fig. 1과 같다. 그림에서 보는 바와 같이 넓은 範圍에 걸쳐 RNA가 分布하고 있으며,  $\alpha$ -amylase mRNA의 存在를 確認하기 위하여 이를 nylon 膜에 옮긴 다

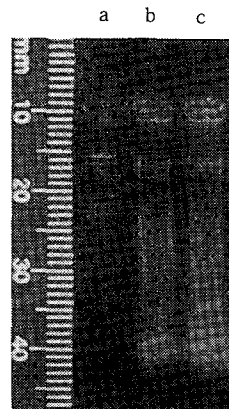


Fig. 1. Maize total RNA  
(a)  $\lambda$  DNA/*Hind*III, molecular size marker  
(b) Maize total RNA, 7 $\mu$ g (c) Maize total RNA, 4 $\mu$ g

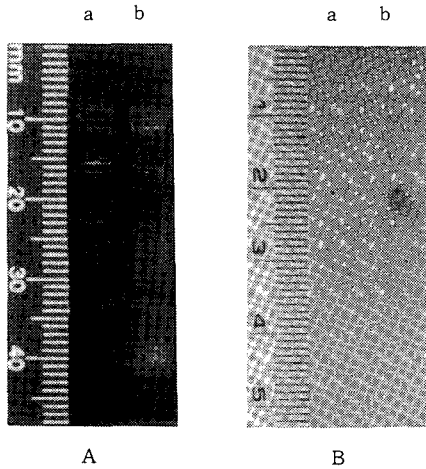


Fig. 2. Northern blot analysis of maize total RNA using synthetic probe I.

- (A) Maize total RNA  
 (a)  $\lambda$  DNA / *Hind* III, molecular size marker  
 (b) Maize total RNA  
 (B) Northern hybridization  
 (a)  $\lambda$  DNA / *Hind* III, molecular size marker  
 (b) Maize total RNA

음, 合成 後 19% polyacrylamide gel에서 1×TBE 緩衝溶液을 이용한 電氣泳動法으로 그 크기를 確認한 probe I을 이용하여 實驗한 結果, 약 2kb 附近에서 斑點이 나타났다(Figs. 2-A, 2-B).

○ PCR에 의한 增幅 및 確認

옥수수 전체 RNA로부터 첫번째 가닥 cDNA만을 合成하고 이를 鑄型으로 PCR을 행한 다음, 이를 0.9% agarose gel에서 電氣泳動한 結果, 500bp 가량의 增幅된 DNA 切片을 볼 수 있었다 (Fig. 3).

○ 增幅된 DNA 切片의 클로닝

위에서 얻은 DNA 切片을 벡터에 挿入하기 위하여 pUC19 벡터를 制限酵素 *Bam*H I 과 *Hind* II 로 동시에 자른 후, 이를 電氣泳動하여 큰 切片을 얻었다. 여기에 위에서 增幅한 약 500bp의 DNA 切片을 磷酸化한 다음 넣고 DNA 連結酵素를 이용하여 連結하였다. 이를 사용하여  $CaCl_2$  方

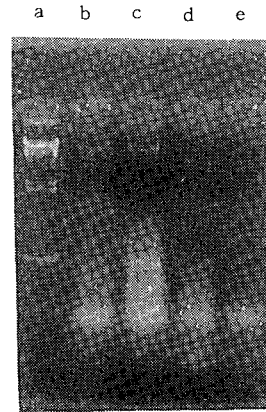


Fig. 3. PCR products templated on maize total RNA

- (a)  $\lambda$  DNA / *Hind* III, molecular size marker  
 (b)~(e) RNA PCR products

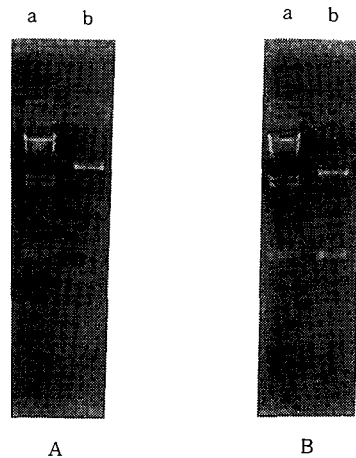


Fig. 4. Restriction fragments of 「pZM $\alpha'$ 」

- (A) Restriction fragments of 「pZM $\alpha'$ 」 by *Hind* III  
 (a)  $\lambda$  DNA / *Hind* III, molecular size marker  
 (b) 「pZM $\alpha'$ 」 / *Hind* III  
 (B) Restriction fragments of 「pZM $\alpha'$ 」 by *Bam*H I and *Hind* III  
 (a)  $\lambda$  DNA / *Hind* III, molecular size marker  
 (b) 「pZM $\alpha'$ 」 / *Bam*H I + *Hind* III

法으로 大腸菌 DH5 $\alpha$ 를 形質轉換하고 이로부터 作用기작을 究明함으로써 植物호르몬에 의한 遺

再調合 플라스미드를 갖고 있는 colony를 選拔하였다. 이렇게 얻은 再調合 플라스미드를 「pZM $\alpha'$ 」라고 命名하였다.

「pZM $\alpha'$ 」를 制限酵素 *Hind* III로 切斷한 결과, 원래의 벡터인 pUC19보다 크기가 다소 커져 있음을 確認하였으며 (Fig. 4-A), 또한 制限酵素 *Bam*H I과 *Hind* III로 동시에 切斷하여 보니, 500bp 가량의 插入切片이 確認되었다(Fig. 4-B).

○ Southern blot analysis를 통한 PCR 산물의 確認

위에서 電氣泳動한 agarose gel을 nylon 膜으로 옮기고 probe I을 이용하여 Southern hybridize한 結果, 「pZM $\alpha'$ 」의 DNA 插入部位가 合成한 PCR primer에 의해 增幅된 遺傳子의 一部分임이 確認되었다(Figs. 5-A, 5-B, 6-A, 6-B).

以上에서 밝힌 바와 같이 옥수수  $\alpha$ -amylase 遺傳子를 클로닝하기 위하여 PCR primer로 사용할 oligonucleotide를 合成하였고, 옥수수의 전체 RNA를 抽出하여 northern blot analysis를 통한  $\alpha$ -amylase mRNA를 確認하였으며, RNA로부터 cDNA 가닥을 合成하여 이를 鑄型하고, 이로부터 얻은 DNA 切片을 클로닝하였다. 또한, 이 클론을 確認하기 위한 Southern blot analysis등을 遂行하였으며, 大腸菌 形質轉換 實驗을 통하여 옥수수  $\alpha$ -amylase 遺傳子의 一部分을 갖고 있는 再調合 플라스미드인 「pZM $\alpha'$ 」를 얻었다.

이와 같은 結果는 여러 種에서 鹽基序列이 알려진 遺傳子의 잘 保存된 部分을 選擇하여 이를 primer로 한 PCR을 이용하면, 다른 種의 類似 遺傳子를 찾아 낼 수 있음을 意味한다. 또한 이렇게 얻은 DNA 切片을 이용하여 계놈 상의 원하는 部分을 精確히 찾아 낼 수도 있고, 얻고자 하는 cDNA를 찾아 낼 수도 있다. 앞으로 이 結果를 바탕으로 여러 物質의  $\alpha$ -amylase의 cDNA 클론 및 染色體 상에서 gibberellic acid에 反應하는 遺傳子 轉寫 調節部位를 찾아 내는 등의 研究를 할 수 있을 것으로 期待된다. 뿐만 아니라, 이를 통하여 植物生長調節物質과 蛋白質, 그리고 核酸과의

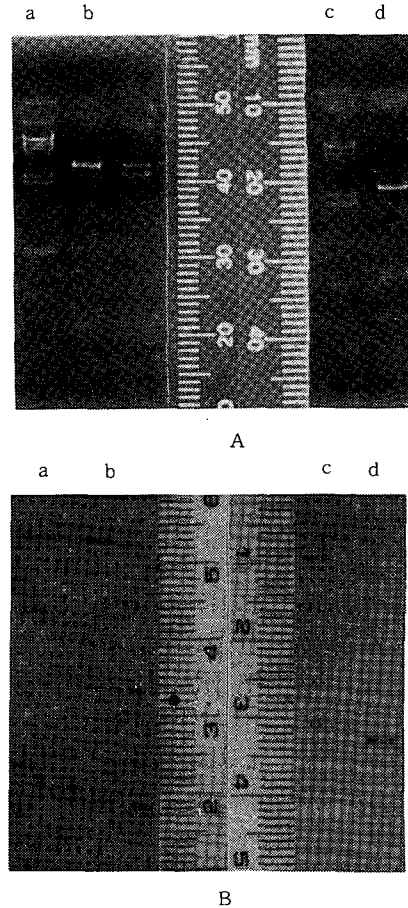


Fig. 5. Southern blot analysis using synthetic probe

- (A) Restriction fragments of 「pZM $\alpha'$ 」 by *Bam* HI and *Hind* III .  
 (a)  $\lambda$  DNA/*Hind* III, molecular size marker  
 (b) 「pZM $\alpha'$ 」/*Hind* III  
 (c)  $\lambda$  DNA/*Hind* III, molecular size marker  
 (d) 「pZM $\alpha'$ 」 by *Bam*H I + *Hind* III
- (B) Southern blot analysis  
 (a)  $\lambda$  DNA/*Hind* III, molecular size marker  
 (b) 「pZM $\alpha'$ 」/*Hind* III  
 (c)  $\lambda$  DNA/*Hind* III, molecular size marker  
 (d) 「pZM $\alpha'$ 」/*Bam*H I + *Hind* III

作用기작을 究明함으로써 植物호르몬에 의한 遺傳子 發現調節樣相 등 여러가지 生理的 作用을 깊이있게 研究할 수 있을 것으로 思料된다.

## 摘 要

本 研究는 韓國 옥수수의  $\alpha$ -amylase의 遺傳子 클로닝을 주된 目標로 하여 遂行되었다. 이를 위하여 여러 植物體의  $\alpha$ -amylase 鹽基序列로 부터 잘 保存된 部分을 參考로 oligonucleotide probe 및 PCR primer를 設計, 合成하고, 옥수수의 幼苗로부터 전체 RNA를 分離하여 northern blot analysis를 통하여 確認한 다음, 이로부터 첫번째 가닥 cDNA를 만든 후, 여기서 얻은 RNA : DNA hybrid를 鑄型으로 한 polymerase chain reaction을 통하여 길이가 약 500bp되는 PCR 산물을 얻었다. 이를 클로닝하기 위해 pUC19을 클로닝 벡터로 사용하여 再調合 플라스미드인 「pZM $\alpha$ '」를 만들었다.

合成 probe를 이용, Southern blot analysis한 결과, 「pZM $\alpha$ '」가 옥수수 mRNA로 부터 增幅된 DNA의 一部分을 갖고 있음을 確認하였으며, 그 길이는 PCR 산물과 같은 500bp 가량 되는 것으로 나타났다.

## 引 用 文 獻

1. Baulcombe, D.C., A.D. Huttly, R.A. Martienssen, R.F. Barker, and M.G. Jarvis. 1987. A novel wheat alpha-amylase gene(alpha-Amy3). Mol. Gen. Genet. 209 : 33-40.
2. Baulcombe, D.C. and D. Buffard. 1983. Gibberellic-acid-regulated expression of alpha-amylase and six other genes in wheat aleurone layers. Planta 157 : 493-501.
3. Chandler, P.M., J.A. Zwar, J.V. Jacobsen, T.J.V. Higgins, and A.S. Inglis. 1984. The effects of gibberellic acid and abscisic acid on alpha-amylase mRNA levels in barley aleurone layers. Studies using an alpha-amylase cDNA clone. Plant Mol. Biol. 3 : 407-418.
4. Chomczynski, P. and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenolchloroform extraction. Anal. Biochem. 162 : 156-159.
5. Chrispeels, M.J. and J.E. Varner. 1967. Hormonal control of enzyme synthesis : on the mode of action of gibberellic acid and abscisin in aleurone layers of barley. Plant Physiol. 42 : 398-406.
6. Deikman, J. and R. Jones. 1985. Control of alpha-amylase mRNA accumulation by gibberellic acid and calcium in barley aleurone layers. Plant Physiol. 78 : 192-198.
7. Filmer, P. and J.E. Varner. 1967. A test de novo synthesis of enzymes : Density labeling with H<sub>2</sub>O of barley  $\alpha$ -amylase induced by gibberellic acid. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 58 : 1520-1526.
8. Freundlieb, S. and W. Boos. 1986. Alpha-amylase of *Escherichia coli*, mapping and cloning of the structural gene, mals, and identification of its product as a periplasmic protein. J. Biol. Chem. 261 : 2946-2953.
9. Higgins, T.J.V., J.A. Zwar, and J.V. Jacobsen. 1976. Gibberellic acid enhances the level of translatable mRNA for alpha-amylase in barley aleurone layers. Nature 260 : 166-168.
10. Hoshiko, S., O. Makabe, C. Nojiri, K. Katsumata, E. Satoh, and K. Nagaoka. 1987. Molecular cloning and characterization of the *Streptomyces hygroscopicus*  $\alpha$ -amylase gene. J. Bacteriol. 169 : 1029-1036.
11. Ikuta, N., M.B.N. Souza, F.F.Valencia, M.E.B. Castro, A.C.G. Schenberg, A. Pizziranikleiner, and S. Astolfifilho. 1990. The  $\alpha$ -amylase gene as a marker for gene

- cloning – Direct screening of recombinant clones. *Bio-Technology* 8 : 241–242.
12. Innis, M. A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, and T.J. White. 1990. *PCR protocols : A guide to methods and applications*. Academic Press Inc.
  13. Koizuka, N., Y. Tanaka, and Y. Morohashi. 1990. Isolation of a cDNA clone for  $\alpha$ -amylase in mung bean cotyledons. *Plant Physiol.* 94 : 1488–1491.
  14. McPherson, M.J., P. Quirke, and G.R. Taylor. 1991. *PCR – A practical approach*. IRL Press.
  15. Miyata, S. and T. Akazawa. 1982a. Enzymatic mechanism of starch breakdown in germinating rice seeds. *Plant Physiol.* 70 : 147–153.
  16. Miyata, S. and T. Akazawa. 1982b. Alpha-amylase biosynthesis : Signal sequence prevents normal conversion of the unprocessed precursor molecule to the biologically active form. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 : 7792–7795.
  17. Miyata, S., K. Okamoto, A. Watanabe, and T. Akazawa. 1981. Enzymatic mechanism of starch breakdown in germinating rice seeds. *Plant Physiol.* 68 : 1314–1318.
  18. Mozer, T.J. 1980. Partial purification and characterization of the mRNA for  $\alpha$ -amylase from barley aleurone layer. *Plant Physiol.* 65 : 834–847.
  19. Muthukrishnan, S., G.R. Chandra, and S. Maxwell. 1983. Hormonal control of alpha-amylase gene expression in barley. *J. Biol. Chem.* 258 : 2370–2375.
  20. Nakajima, R., T. Imanaka, and A. Shuichi. 1986. Comparison of amino acid sequences of eleven different alpha-amylases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23 : 355–360.
  21. Nolan, R.C. and T.H. Ho. 1988. Hormonal regulation of gene expression in barley aleurone layers. *Planta* 174 : 551–560.
  22. O'Neill, S.D., M.H. Kumagai, A. Majumdar, N. Huang, T.D. Sutliff, and L. Rodriguez. 1990. The  $\alpha$ -amylase genes in *Oryza sativa* : Characterization of cDNA clones and mRNA expression during seed germination. *Mol. Gen. Genet.* 221 : 235–244.
  23. Ou-Lee, T. -M., R. Turgeon, and R. Wu. 1988. Interaction of a gibberellin-induced factor with the upstream region of an  $\alpha$ -amylase gene in rice aleurone tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 : 6366–6369.
  24. Payen, A. and J. Ferzog. 1883. *Ann. Chi. et Phys.* 53–78 (From *The Enzymes*. 1966. Academic Press, New York).
  25. Rogers, J.C. 1985. Two barley  $\alpha$ -amylase gene families are regulated differently in aleurone cells. *J. Biol. Chem.* 260 : 3731–3738.
  26. Rogers, J.C. and C. Milliman. 1983. Isolation and sequence analysis of a barley  $\alpha$ -amylase cDNA clone. *J. Biol. Chem.* 258 : 8169–8174.
  27. Rogers, J.C. and C. Milliman. 1984. Coordinate increase in major transcripts from the high pI  $\alpha$ -amylase multigene family in barley aleurone cells stimulated with gibberellic acid. *J. Biol. Chem.* 259 : 8169–8174.
  28. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning – A laboratory manual* (2nd ed.), Vol I, II, III. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
  29. Zwar, J.A. and R. Hooley. 1986. Hormonal-regulation of  $\alpha$ -amylase gene – Transcription in wild oat (*Avena fatua* L.) aleurone protoplasts. *Plant Physiol.* 80 : 459–463.