

逆轉寫酵素 遺傳子の cloning 에 關한 研究

金容雄 · 金廣植 · 徐鎔澤 · R.V.Guntaka*

全南大學校 農科大學 農化學科

* 미국 미주리 대학교

Cloning of Reverse Transcriptase Gene of Avian Sarcoma Virus

Yong-Woong Kim, Kwang-Sik Kim, Yong-Tack Suh and R.V. Guntaka*

Department of Agricultural Chemistry, Chonnam National University, Kwangju, Korea

*Department of Microbiology, University of Missouri Columbia, U.S.A.

Abstract

Reverse transcriptase gene of Avian sarcoma virus(ASV) was cloned with a thermoinducible expression vector, pPL-lambda. *E. coli* N4830 which carries temperature sensitive ci857 lambda repressor, was transformed with this pPL-pol plasmid DNA. The RNA transcribed by those transformants was isolated and analyzed. It was shown that the inserted reverse transcriptase gene of ASV was transcribed at high-level when cells were grown at high temperature. (IN KOREAN)

서 론

DNA의 transcription은 삽입되는 DNA fragment에 존재하는 promoter sequence에서부터 시작되는 수도 있고¹²⁾ vector 내에 들어 있는 promoter로부터 비롯되는 경우도 있다.²³⁾ 後者の 경우 活性도가 實驗적으로 調節될 수 있는 promoter를 選擇할 수 있는 기회를 提供한다.¹⁸⁾

Bacteriophage lambda의 主要한 leftward operon은 pL promoter와 terminator, antiterminator인 N遺傳子, antiterminator의 認識 sequence인 nutL 등 여러가지의 transcription을 調節하는 module을 含有하고 있다.^{20,21)} Transcription은 sL start point에서 code된 5' nucleosid triphosphate의 存在下에 pL promoter에서 start하고 N遺傳子の antitermination의 機能이 不活性으로 될 때 tL terminator에 依해서 정지된다.⁵⁾ promoter인 pL의 transcription의 시작은 phage 중 ci gene 產物

에 依해서 檢出限界濃度 以下の 濃度로 抑制를 받는 것으로 나타났다.¹³⁾ pL promoter의 生成도는 ci857 gene의 熱에 不安定한 repressor 產物에 依하여 低溫에서 完全하게 抑制될 수 있고 溫度의 上昇으로 repressor의 activity가 破壞되어 pL promoter로부터 強力한 transcription이 일어난다. 이 system은 transposon γ^2 의 tnpR gene의 product¹⁷⁾와 SV40의 small-t antigen⁷⁾, 그리고 lambda cII repressor²⁴⁾를 overproduction하는데 使用되었다.

Bacteriophage lambda의 pL promoter는 強力하고 調節이 容易한 promoter로 알려져 몇가지의 expression vector로 開發되었다.^{1,11,18)} 한편 溫度에 민감한 lambda repressor를 encoding하는 gene은 cloning vector에 挿入될 수도 있고 Bacteria의 chromosome에 있는 prophage에 依해 供給될 수도 있다.¹⁾

Expression vector인 pPL-lambda는 lambda phage의 pL-promoter와 terminator, antiterminator인 N gene, 그리고 nut⁸⁾ gene이 pBR 322의 Eco RI과 Bam HI site 사이에 挿入되어 있다. N gene에 單一의 Hpa I site는 pL의 transcription

1988년 4월 18일 수리

Corresponding Author: Y.T. Suh

start point에서 321 base pair의 downstream에 위치하고 있다. 이 site에 挿入된 DNA는 thermo-inducible system인 pL-λ cI857 gene에 의해調節을 받는다.¹⁸⁾

한편 Avian Sarcoma Virus(ASV)의 supercoil DNA는 감염된 quail의 tumor cell에서分離되었으며 pBR 322에 이미 Cloning되었다.¹⁴⁾ 이 DNA는 gag, pol, env, src의 4개의 gene을 갖고 있으며 이것은 分子質量이 92,000이 되는 reverse transcriptase의 β-chain을 code한다.²²⁾

本 研究은 ASV DNA의 pol gene을 expression vector에 挿入하여 *E. coli* 내에서 發現을 하도록 하기 위하여 ASV의 DNA에 있는 pol gene만을 restriction enzyme으로 절단하고 溫度依存性 expression vector인 pPL-lambda에 subcloning하여 pol gene을 挿入시키고 *E. coli*에 transformation시켜 高溫에서 培養한 菌體에서 RNA를 抽出하고 分析을 行하여 얻어진 結果를 報告한다.

材料 및 方法

Bacterial strains

E. coli HB 101이 pBR 322 vector와 그의 recombinant plasmid를 transformation시키는데 使用하였으며 L Broth培地(Bacto tryptone 10g, Bacto yeast extract 5g, NaCl 5g/l, pH 7.5)와 200mg/l의 Ampicillin을 含有한 LB培地(LBamp)가 使用되었다. M13mp19의 recombinant를 transformation하는 데는 *E. coli* Jm 103을 利用하였으며 이때의 使用培地는 2xYT(Bacto trypton 16g, Bacto yeast extract 10g, NaCl 5g/l)였다. *E. coli* N99

Table 1. *E. coli* strains used and their characteristics

Strains	Characteristics	References
HB 101	F ⁻ pro leu thi lacY str ^R r _K ⁻ mk ⁻ endA ⁻ recA ⁻	(10)
Jm 103	Δ(lac pro), thi, strA, supE, endA sbcB, hsdR ⁻ , F'traD36, proAB, lacI ^o , ZΔM15	(15)
N4830	f ⁻ su ^o his ⁻ ilu ⁻ galk ⁻ 8 (Δch10-pgI) [λBam N ⁺ cI857 H1]	(16)
N99cI ⁺	wild type cI repressor	(16)

cI⁺와 N4830은 pPL-Lambda와 그의 recombinant를 transformation하는데 使用되었다.

N99cI⁺는 Wild type의 cI repressor를 가지고 있는 lambda lysogen이고 N4830은 溫度依存性 cI857 repressor와 N gene이 들어 있는 lysogen¹⁶⁾이다. *E. coli* 특성은 表 1과 같으며 本 研究에 使用된 vector로는 M13mp19(Biolab)과 pPL-lambda(Pharmacia)였다.

ASV DNA의 抽出

ASV DNA를 cloning vector인 pBR 322에 cloning시킨 plasmid DNA¹⁴⁾를 calcium chloriderubidium chloride method¹⁵⁾로 *E. coli* HB 101이 transformation시키고 이를 LBamp plate에 接種시켜 37°C에서 하룻밤 培養한 후 colony를 LBamp medium에 shaking incubation하여 얻은 菌體를 원심분리하여 수집했다. minilysate method¹⁵⁾로 plasmid DNA를 抽出하고 restriction enzyme으로 DNA를 確認한다. 確認된 clone을 LBamp 1~2/에 大量培養한 다음 遠心分離하여 菌體를 收集한다. Boiling method^{2, 16)}에 依하여 lysis하고 cesium chloride ethidium bromide gradient method로 DNA를 分離하고 ion exchange resin으로 ethidium Bromide를 除去한다. . 를 T₁₀E₁(10mM Tris/1mM EDTA) (pH 8.0)에 對하여 dialysis하여 cesium chloride를 除去하고 phenol-chloroform으로 精製하여 回收된 DNA를 alcohol로 沈澱시켜 DNA를 濃縮 乾燥한다. T₁₀E₁(10mM Tris/1mM EDTA)에 溶解시킨 DNA를 OD₂₆₀에서 濃度を 定量하였다.

Reverse transcriptase gene의 cloning

精製된 plasmid DNA를 restriction enzyme으로 處理하여 agarose gel 電氣泳動法으로 DNA fragment를 分離하고, gel上的 pol gene fragment部分을 베어내어 elution buffer(0.5M NH₄OAc, 10 mM MgOAc, 0.2% SDS)에 옮겨 振盪하여 DNA를 agarose에서 溶出시키고 여과하여 agarose를 除去한다. phenol-chloro-form으로 精製하고 alcohol로 沈澱시켜 DNA를 回收한다. vector DNA도 restriction enzyme으로 切斷하고 같은 方法으로 alcohol 沈澱시켜 回收한 두 DNA를 混合하고 T₄-DNA ligase로 ligation시킨다.³⁾ ligation된 DNA를 calcium chloride-rubidium chloride method¹⁵⁾로 *E. coli*에 transformation시키고 plate에 接種

培養시켜 發現된 colony를 nitrocellulose filter paper에 transfer하여 colony hybridization method⁹⁾로 transformant를 確認한다. Right clone을 다시 培養하여 DNA를 抽出하고 restriction enzyme으로 切斷하여 agarose gel electrophoresis 法으로 double check하여 pol gene의 導入을 確認한다.

RNA의 抽出 및 確認

pol gene이 挿入된 clone을 LB medium에 接種하여 培養한 後 菌體를 回收한다. 菌體를 sarcosyl로 抽出하고 cesium chloride gradient method^{4,10)}로 RNA를 分離한 다음 RNA dot blot method⁹⁾로 pol gene의 transcription을 確認하고 각각의 spot를 切斷하여 liquid scintillation counter로 定量하였다. 使用된 probe는 ³²PdCTP로 M13mp19-pol이 DNA를 nick translation¹¹⁾하여 使用하였다.

結果 및 考察

M13mp 19에 pol gene의 cloning

ASV gene의 restriction map은 그림 1에 表示한 바와 같이 gag, pol, env, src 등 4개의 gene을 갖고 있으며 이 DNA는 Guntaka 등¹⁴⁾에 依하여 cloning vector인 pBR-322에 挿入된 바 있다. 이 plasmid DNA를 restriction enzyme인 Pst I과 xho I으로 切斷한 다음 agarose gel 電氣泳動한 結果는 그림 2에 表示되었으며 이 중 2.8Kb의 pol gene만을 agarose gel上에서 切斷하여 elution하고 cloning vector인 M13mp 19도 Pst I과 Sal I으로 切斷하고 두 fragment를 混合한 後 T₄-DNA ligase를 使用하여 cloning하였다. 이들의 cloning 過程은 그림 3에 表示하였으며 ligate로 *E. coli* Jm 103를 transformation시켜 2xYT培地上에 IPTG와 Xgal과 함께 接種하고 37°C에서 하룻밤 培養하여

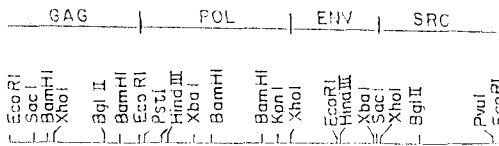


Fig. 1. Restriction enzyme map of the genome of Avian Sarcoma Virus(ASV). The map is aligned so that the gene order corresponds to that of viral RNA. A map of the genes of ASV is included for reference: GAG, group-specific antigen; POL, reverse transcriptase; ENV, envelope glycoproteins; and SRC, transformation gene.

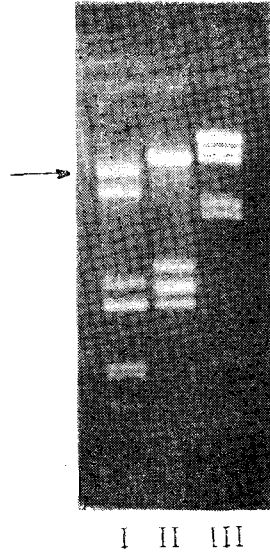


Fig. 2. Agarose gel electrophoretogram of restriction enzyme digests of ASV DNA. lane I : Pst I+Xho I, lane II : Xho I, lane III : λ with Hind III. The fragment of pol gene is indicated by arrow.

生成된 無色の plaque를 選別하였다. 2xYT plate上에 나타난 white plaque는 1%미만이였다.

pol gene의 挿入을 確認하기 위하여 clone들을 2xYT培地에 培養하고 plasmid DNA를 抽出하여 restriction enzyme으로 切斷하고 電氣泳動法으로 確認된(그림 4) clone을 大量培養하고 DNA를 抽出 精製하였다. reconstruct된 本 plasmid는 M13 mp19-pol로 명명하고 nick translation과 다음 실험의 原料로 使用하였다.

Expression vector에 pol gene의 導入

M13mp19-pol DNA를 Pst I과 Sma I으로 切斷하였다. 다음에 S₁ nuclease로 sticky end를 切斷하여 agarose gel 電氣泳動으로 pol gene 部分만을 分離하였다.

pPL-lambda DNA는 Hpa I으로 切斷하고 DNA를 T₄-DNA ligase에 依하여 ligation시켰으며 그 과정은 그림 5에 表示하였다.

E. coli N99cl⁺에 transformation시킨 後 LBamp plate上에 接種하고 37°C에서 하룻밤 培養하였다. plate上的 colony를 nitrocellulose paper. 에 옮긴 다음 colony hybridization을 行하였으며 그 結果는 그림 6에 表示한 바와 같다. Hybridization된 colony를 LBamp培地에 接種하여 培養하고 DNA

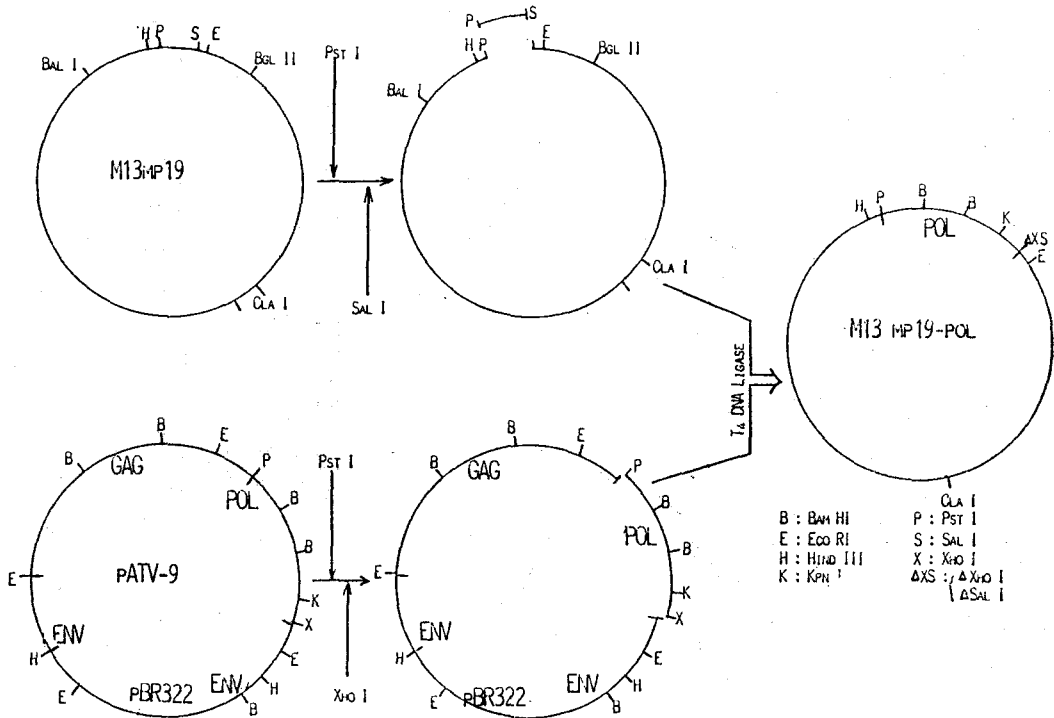


Fig. 3. Schematic illustration for the insertion of Pol gene fragment of Avian Sarcoma Virus DNA in M13mp19



Fig. 4. Agarose gel electrophoretogram of restriction enzyme digests of M13mp19-pol with Pst I and Sma I
1 : Sma I, 2 : Sma I+Pst I, III : λ with Hind III.

를 추출한 뒤 restriction enzyme으로 확인하였다 (그림 6의 화살표). 그런데 N99cl⁺에서 생성되는 wild type repressor는 온도에 sensitive하지 않고

37°C에서 recombinant vector의 適當한 生長을 할 수 있도록 해 준다고 한다.²²⁾ 따라서 確認된 clone을 大量 培養하여 DNA를 抽出하여 精製한 다음 이 DNA를 溫度 依存性 lambda repressor인 ci857 gene을 갖고 있는 lambda lysogen인 N4830에 다시 transformation시켰다. transformant를 LBamp plate에 接種하고 30°C에서 培養하여 生存한 colony를 確認하고 이 colony를 LB培地에 培養하고 DNA를 抽出하여 restriction enzyme으로 確認하였다. 이 recombinant plasmid DNA를 pPL-pol로 명명하였다.

RNA의 分析

pPL-pol clone을 LB medium에 接種하고 28°C에서 振盪하면서 菌이 10⁸/ml가 되도록(OD₆₀₀—0.3) 培養하였다. 이를 二分하여 하나는 28°C에서 다른 하나는 42°C에서 각각 90分間 더 培養하고 遠心分離하여 菌體를 回收하고 sarcosyl로 RNA를 抽出하고 cesium chloride gradient method로 RNA를 分離한 다음 定量하고 이것을 nitrocellulose paper에 吸收시킨 다음 RNA-DNA hybridiza-

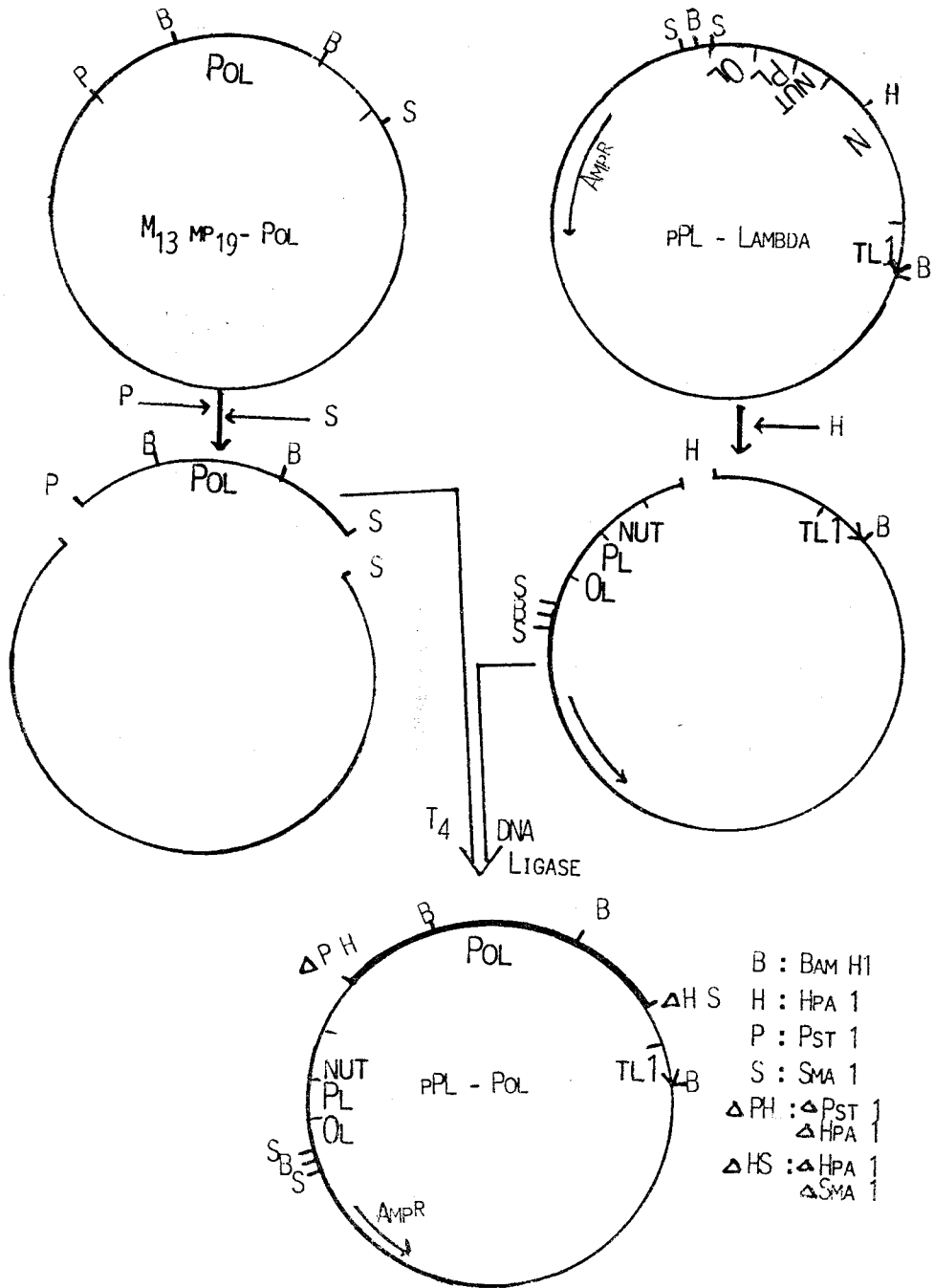


Fig. 5. Schematic illustration for insertion of Pol gene fragment in pPL-lambda. Solid black indicates Pol fragment

tion을 하였다. x-ray film上的 結果는 그림 7과 같다. 42°C에서 培養했던 clone에서 抽出한 RNA 가 pol gene 即 reverse transcriptase gene을 쥘

선 높것 transcription하였다. 각각의 spot를 가위로 切取하고 이것을 liquid scintillation counter로 定量한 結果는 表 2에 表示한 바와 같이 高溫(42°

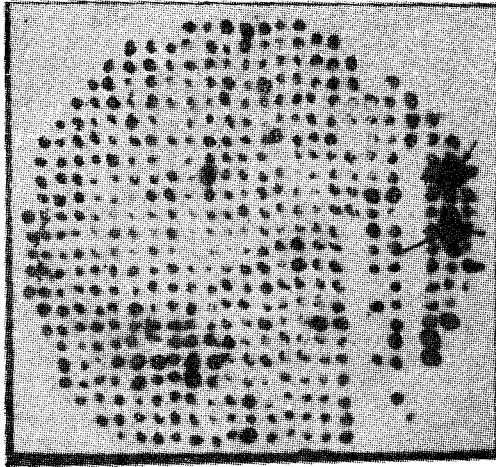


Fig. 6. Colony hybridization result of *E. coli* N99cI⁺ transformants with pPL-Pol plasmid DNA.

Arrows indicate right clones.

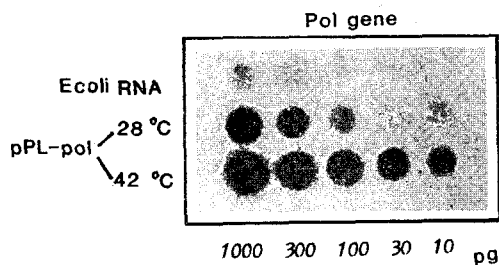


Fig. 7. Blot analysis of RNA from pPL-Pol clone

Bacteria were grown at different temperature in L-broth

Table 2. Quantitive analysis of RNA by scintillation counter

Incubation temp.	Amount of RNA(pg)	
	28°C	42°C
10	0	20
30	6	58
100	9	123
300	38	194
1000	128	367

* The background was subtracted from the experimental values.

C)에서培養했던 clone에서 약 10배 정도로 높게 pol gene이 transcription되었다.

Davidson등²³⁾은 *E. coli*의 tryptophan operon(trp)

을 λ phage에 clone하였을 때 pL promoter에 의한 transcription이 완전한 구조를 한 조건을 가진 trp promoter 자체에 의한 transcription보다 11배나 높았다고 했다. Shimataka등²⁴⁾은 bacteriophage λ의 regulatory protein인 cII gene을 pL promoter가 들어 있는 vector에 삽입시키고 λ lysogen을 함유하고 있는 *E. coli* strain과 lysogen이 함유되지 않은 *E. coli* strain에 각각 transformation시켰을 때, lysogen이 들어 있는 *E. coli* strain에서만 transformation이 일어났다고 했으며 lysogen 내에서 cII gene product를 expression시키기 위해서는 phage repressor인 cI857에 temperature sensitive한 mutation이 된 lysogen을 사용하기 때문에 pL promoter의 repressor가 불활성화되어 pL promoter에 의한 transcription이 일어난다고 했다. 본 연구의 결과도 pPL-lambda의 pL promoter는 저온에서 cI857 gene product에 의해沮害를 받으나 고온에서는 repressor가 上活性化되므로 transcription이 증가되었음을 確認할 수 있었다.

한편 Remaut등¹⁸⁾은 phage λ의 promoter pL이 *E. coli*에 clone된 gene을 効率的으로 發現시키기 위해 사용되었으며, 이 pL promoter의 活性은 λ cI857 gene의 thermolable repressor의 product에 의해 저온에서 완전히 低下하고 heat induction에 의해 活性化되었으며, 最適 條件下에서 合成된 全蛋白質의 30~40%가 clone화된 gene에 依해서 pL의 調節을 받았다고 했다. 또 Derom등²⁵⁾은 SV 40의 small-t antigen을 bacteriophage λ의 thermo-inducible leftward promoter pL의 downstream에 挿入하고 溫度를 變更시켜 주므로써 19,000dalton의 polypeptide가 發現되었고, 이 peptide는 새로 合成된 蛋白質中에 約 2.5%를 차지하였으며 small-t antigen에 特異성을 갖는 anti-T serum으로 immunoprecipitation을 行하고 또 2차원 fingerprint analysis를 한 結果 이 protein small-t antigen이라는 것을 밝혔다. Shimataka 등²⁴⁾도 bacteriophage의 regulatory gene인 cII를 強力한 lambda promoter pL이 들어 있는 vector인 pKC 30에 挿入하고 發現시켰을 때, cellular protein의 5%에 이르는 cII protein이 over-production 되었다고 報告한 바 있다.

따라서 본 研究의 結果에 依하면 pol gene에 依한 RNA의 發現에 依해 蛋白質이 生成될 可能性은 매우 크다고 생각된다. 물론 translation된 蛋白質의 分析을 行하여 reverse transcriptase의 發

現을 check하여야 될 것이며 앞으로 계속 研究를 수행해야 할 것이다.

초 록

Avian Sarcoma Virus의 plasmid DNA中的 역이사효소의 遺傳子를 溫度依存性 發現 vector인 pPL-lambda에 cloning하여 溫度에 민감한 phage λ의 repressor인 cI857 gene을 갖고 있는 bacteriophage lysogen인 N4830에 transformation시켰다. transformant를 pL promoter의 發現을 抑制하는 低溫(28°C)에서 培養시킨 뒤, 이 repressor를 抑制하여 transcription을 促進하게 하는 高溫(42°C)에서 培養시킨 다음 菌體를 回收하여 RNA를 抽出하고 分析을 한 結果 導入된 역전사 효소 遺傳子の 轉寫가 高溫에서 增大되었다.

사 사

本研究는 1987年度 文敎部 大學附設 遺傳工學研究所 研究費 支援에 依하여 遂行되었으며 關係하신 분들에게 感謝를 드린다.

參 考 文 獻

- Bernard, H.U., Remaut, E., Hershfield, M. V., Das, H.K., Helinski, D.R., Yanofsky, Co and Franklin, N: Gene, 5 : 59(1979)
- Birnboim, H.C. and Doly, J.: Nucleic Acids Res. 7 : 1513(1979)
- Bolivar, R., Rodriguez, R.L. Betlach, M.C. and Boyer, H.W. Gene, 2 : 75(1977)
- Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J. and Rutter, W.J.: Biochemistry, 18 : 5294(1979)
- Davids, L.G., Dibner, M.V. and Battley, J. F.: Method in molecular biology. 227 Elsevier, New York. (1986)
- Davison, J., Brammar, W.J. and Brunel, F.: Mol. Gen. Genet, 130 : 9(1974)
- Derom, C., Gheysen, D. and Fiers, W. Gene, 17 : 45(1982)
- Drahoš, D. and Szybalsky, W.: Gene, 16 : 261(1981)
- Gowda, S. Rao, A.S., Kim, Y.W. and Guntaka, R.V.: Virology, 162 : 243(1988)
- Guntaka, R.V. and Weiner, A.J. Nature, 274 : 274(1978)
- Hedgpeth, J., Ballivet, M. and Eisen, H.: Mol. Gen. Genet., 163 : 197(1978)
- Hershfield, V., Boyer, H.W., Yanofsky, C., Lovett, M. and Helinski, D.R.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 71 : 3455(1974)
- Isaacs, L.N., Echols, H. and Sly, W.S.: J. Mol. Biol., 13 : 963(1965)
- Katz, R.A., Omer, C.A., Weis, J.H., Mitsialis, S.L., Faras, A.J. and Guntaka, R.V.: J. of Virology, 42 : 346(1982)
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J.: Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory. U.S.A. (1982)
- Pharmacia. Molecular biologicals. 69. Pharmacia Inc. U.S.A. (1984)
- Reed, R.R.: Cell, 25 : 713(1981)
- Remaut, E., Stanssens, P. and Fiers, W.: Gene, 15 : 81(1981)
- Rigby, P. W.J., Dieckmann, M., Rhodes, C. and Berg, P.: J. Mol. Biol., 113 : 237(1977)
- Salstrom, J.S. and Szybalsky, W.: J. Mol Biol., 124 : 195(1978a)
- Salstrom, J.S. and Szybalsky, W.: Virology 88 : 252(1978b)
- Schwartz, D.E., Tizard, R. and Gilbert, W. Cell, 32 : 853(1983)
- Selker, E., Brown, K. and Yanofsky, C.: J Bacteriol., 129 : 388(1977)
- Shimatake, H. and Rosenberg, M.: Nature 292 : 128(1981)