

Yeast Artificial Chromosome의 효율적인 조작과 분석을 위한 새로운 Bicistronic Fragmentation Vector의 개발에 관한 연구

임향숙* · 최주연 · 성영모¹ · 김인경 · 강성만¹

가톨릭대학교 의과대학 연구원 분자유전학연구소, ¹고려대학교 생명공학원

본 연구에서는 Yeast Artificial Chromosome을 효율적으로 조작하고 유전자의 기능을 보다 더 용이하게 분석하기 위해 EMCV 바이러스의 IRES 염기서열과 β -galactosidase를 포함하는 새로운 bicistronic fragmentation vector를 제조하였다. 이 벡터의 폴리클로닝 site에 네 개의 희귀한 제한효소 부위를 도입하여 DNA를 용이하게 클로닝할 수 있게 만들었다. 그러므로 원하는 어떤 YAC도 효모세포에서 쉽게 상동 재조합에 의해 절편할 수 있는 장점이 있다. 이 bicistronic fragmentation vector 시스템을 이용하면 하나의 메시지로부터 연구하고자 하는 유전자와 β -galactosidase를 동시에 한 세포에서 발현할 수 있기 때문에 유전자의 발현양상을 쉽게 분석할 수 있는 새로운 도구로 이용할 수 있다.

KEY WORDS □ yeast, bicistronic YAC fragmentation vector, Yeast Artificial Chromosomes (YAC), fragmentation, homologous recombination

크기가 아주 큰 DNA를 Yeast Artificial Chromosome (YAC)에 클로닝하는 방법들이 개발됨으로써 계놈분석에 대한 연구가 용이하게 되었다(2). YAC은 자기복제, segregation, 선형 염색체를 유지하도록 하는 효모 signal들과, 효모 선택 표지인 *TRP1*과 *URA3* 염기서열을 도입하여 만들어졌으므로 선택배지를 사용하여 효모세포에서 쉽게 증식시킬 수 있다(2). YAC 클로닝의 주요한 장점 중의 하나는 cosmid에 삽입할 수 있는 DNA 크기의 10배 이상인 300~1000 kb의 DNA를 클로닝할 수 있다는 것이다. 그러나 이렇게 크기가 큰 DNA를 조작하고 분석하는 데는 아직도 어려운 점이 많다.

효모세포는 본래 DNA의 재조합율이 대단히 높다(14, 15). 그래서 효모세포에 새로운 DNA를 도입하면 효모 염색체의 DNA와 염기서열이 같은 부분에서 상동 재조합(homologous recombination)이 일어나 새로운 DNA가 효모 염색체에 삽입된다. 이 방법을 염색체 절편이라고 하는데, 이 방법을 이용하여 계놈의 염기서열을 효율적으로 치환할 수 있다(1, 18). 이때 사용되는 절편 벡터의 양끝 말단이 선형인 것이 환형일 때보다 재조합이 더 잘 일어나므로 형질전환율을 100배 이상 더 촉진시킬 수 있다(13, 14). 이 절편 방법의 의해 생성되는 절편 유도체(fragmentation derivative)들은 pulsed-field 겔 전기영동법으로 그 크기를 측정할 수 있다(7). 본래의 염색체와 절편 유도체들 사이의 거리의 차로 상동 재조합이 되는 부위를 알 수 있으며, 또한 유전자의 엑손이나 다른 부위의 위치를 분석할 수 있다. 생성된 절편 유도체의 크기가 점점 짧아지면서 제한효소 부위가 변형되거나 절실되므로 이러한 특성을 이용하여 제한효소 map을 보다

더 용이하게 작성할 수 있다.

YAC 절편 방법도 상기에서 설명한 염색체 절편방법과 유사하다(5, 6, 13, 15). YAC 절편 벡터도 보통의 플라스미드와 마찬가지로 *E. coli*에서 선택적으로 복제되고 증폭될 수 있는 염기서열들을 포함하므로 *E. coli*에서 다량으로 생산할 수 있다. 또한, 이 벡터는 *LYS2*나 *HIS3*와 같은 효모 선택표지와 telomere를 포함한다. 이 절편 벡터에 클로닝된 target DNA의 5' 말단 앞쪽과 telomere의 3' 말단사이에 존재하는 제한효소를 이용하여 벡터를 선형으로 절단한 후, 효모세포에 transformation 시킴으로써 형질전환율을 증가시킬 수 있다(13, 14). 효모세포에서 절편 벡터에 클로닝된 DNA와 YAC의 공동된 염기서열부분에서 상동 재조합이 일어난다. YAC에서 상동 재조합이 일어난 염기서열 이후의 부위가 절실되고, 대신 절편 벡터에 존재하는 *LYS2*나 *HIS3* 효모 선택표지와 telomere가 삽입된다. 이런 절편 방법의 의해 생성된 YAC은 lysine(Lys)나 histidin(His)을 포함하지 않는 선택배지를 이용하여 screen할 수 있다(14, Fig. 2, Fig. 5).

본 연구에서는 유전자의 발현양상과 조절부위의 작용 및 기능 분석을 보다 더 용이하게 하기 위해 β -galactosidase를 reporter 유전자로 발현하는 bicistronic fragmentatin vector를 제조하였다. 이 벡터는 상기에서 설명한 바와 같이 효모와 *E. coli*에서 선택적으로 복제하고 증폭시키는데 필요한 염기서열 외에도 EMCV로부터 유래되는 581 bp의 Internal Ribosomal Entry Site(IRES)를 도입함으로써 분석하고자 하는 target DNA와 reporter 유전자를 한 세포에서 동시에 발현할 수 있는 장점이 있다(9, 11). 또한 폴리클로닝 site에 4개의 희귀한 제한효소, *PmeI*, *SwaI*, *PacI*, *NofI*들을 인지하는 염기서열을 포함하고 있어 완벽한 크기의 계놈 DNA나 cDNA도 용이하게 클로닝할 수 있는 장점이 있다. 그러므로 이 bicistronic fragmentatin vector를 이용하여 어떤 DNA도

*To whom correspondence should be addressed
Tel : 02-590-2390, Fax : 02-532-0575
E-mail : hrhim@cmc.cuk.ac.kr

용이하게 클로닝할 수 있으며 효모세포에서 상동 재조합의 원리를 이용하여 YAC을 선택적으로 조작할 수 있고 YAC에 클로닝된 유전자의 방향성을 조사할 수 있으며, 더 나아가 유전자의 기능과 발현 및 조절부위 연구를 위한 클론을 생성하는데 응용할 수 있을 것이다.

재료 및 방법

효모균주와 증식

Saccharomyces cerevisiae 균주 AB1380(a, *ura3-52*, *ade2-1*, *trp1*, *lys2-1*, *his5*, *can1-100*)는 lysine(Lys), trypsin(Trp)과 uracil(Ura)이 존재하는 배지에서만 자라므로 효모 선택마커인 *TRP1*과 *URA3*를 가지는 YAC을 Trp과 Ura가 없는 배지에서 선택적으로 성장시키는데 이용할 수 있다. 또한, YAC 절편방법에 의해 효모 선택표지인 *TRP1*이나 *URA3*를 *LYS2* 마커로 치환시킨 YAC을 선택적으로 탐색하는데 이용할 수 있도록 개발된 효모균주이다(17). Mouse YAC library pool에서 primer TRP-2A: ACACCCTCCACAGATG (nucleotide 번호: 1633-1650)와 TRP-2C GTCTCAAGATGAGCGACG(nucleotide 번호: 2001-2018)를 이용하여 95°C 30초, 55°C 45초, 72°C 1분간 30회의 polymerase chain reaction(PCR)로 탐색하여 610 kb의 mouse tyrosine-related protein 2(TRP-2) YAC 클론을 얻었다. 효모세포에 DNA를 transformation하기 위해 Li-acetate 방법을 수행하였다(8). 절편된 YAC을 포함하는 효모세포는 Lys이 없는 배지에서 자라는 것만을 선택적으로 키웠다. Lys⁺ 표현형의 효모세포들은 Ura과 Lys이 없거나 Trp과 Lys이 없는 배지에서 이들의 표현형을 재확인하였다.

벡터 제조

전사단위의 방향성을 결정하기 위해 절편 벡터, pB1R(10)의 *EcoRI* site에 TRP-2 유전자의 3' 말단 부분(Genebank accession number x63349, nucleotide 번호: 1003-2182)을 양쪽 방향으로 삽입한 두 절편 벡터, pB1R/TRP-2F와 pB1R/TRP-2R를 만들었다(Fig. 1). 유전자의 발현양상과 기능분석을 위한 bicistronic fragmentation vector를 제조하기 위해, 먼저

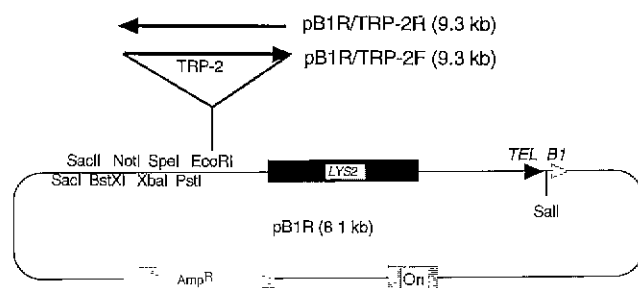


Fig. 1. The TRP-2 fragmentation vectors. Unique restriction enzyme sites are shown in the polycloning site. The *EcoRI* site was used to insert the TRP-2 segment into the pB1R fragmentation vector that contains telomere (TEL) and *LYS2* as a yeast selectable marker. The *SacI* site can be used to linearize the plasmid prior to transformation.

pB1R 벡터에 원하는 target DNA를 용이하게 삽입할 수 있도록 폴리클로닝 site에 8개 염기서열을 인지하는 4개의 회귀한 제한효소, *PmeI*, *SwaI*, *PacI*, *NofI* site들을 도입하였다. 이를 위해 sense primer: ATCGATTTAAATTAATTAAGTTTAAACTGGCCCTGCAGGCCATCGTA와 antisens primer: TACGATGGCCTCGAGGGCCAGTTTAAACTTAATTAATTTAAATCGAT를 annealing시켜 *ClaI*으로 자른 후 pBluescript II KS(+)에 삽입하여 pBS+41이라는 벡터를 제조하였다. 이 벡터를 *SacI*과 *NofI*으로 절단하여 4개의 회귀한 제한효소부위를 포함하고 있는 염기서열을 pB1R에 삽입하여 pB1R+41이라는 벡터를 제조하였다. pLIGns(11)를 *NotI*(5')과 *XbaI*(3')으로 절단하여 ECMV 바이러스의 IRES 염기서열과 β -galactosidase 유전자를 포함하는 DNA 절편을 얻었다. 또한, pUC-pA 벡터를 *XbaI*(5')과 *ExoRI*(3')으로 절단하여 쥐의 인슐린 유전자의 polyadenylation 부위를 포함하는 DNA 절편도 확보하였다. 원하는 bicistronic fragmentation vector를 제조하기 위해 pB1R+41 벡터를 *NotI*(5')과 *EcoRI*(3')으로 자른 후, 상기의 두 insert와 함께 세 조각의 DNA를 한꺼번에 ligation시켜 12.5 kb의 pB1R-iGeopA 벡터를 만들었다(Fig. 3).

Pulsed-Field Gel Electrophoresis(PFGE)

크기가 큰 YAC DNA를 완전한 상태로 뽑기 위해 아가로즈에 삽입시킨 후(3) 1% 아가로즈 겔에서 contour-clamped homogeneous electric field(CHEF) 겔 시스템(Bio-Rad)을 이용하여 14°C에서 60초 스위치 타임으로 40시간 전기영동하여 DNA를 크기별로 분리하였다(4, 7).

Southern Blot Analysis

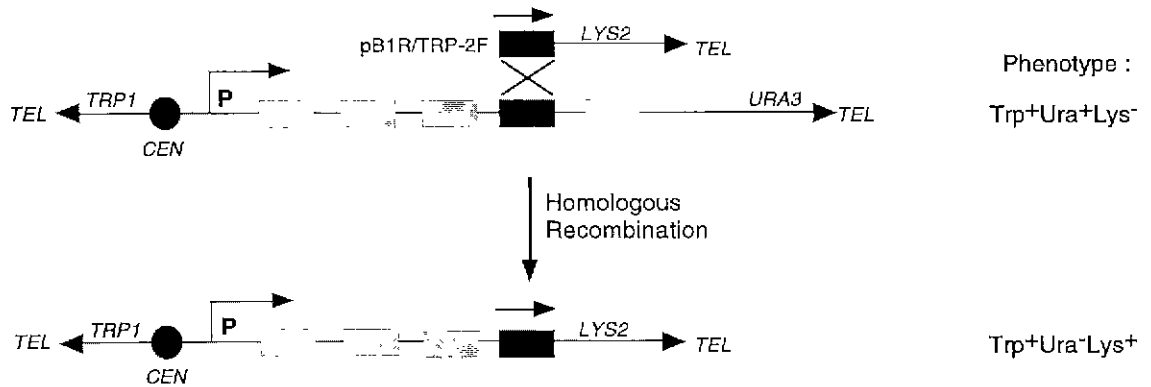
YAC DNA를 *EcoRI*으로 자른 후 0.6% 아가로즈 겔에서 24시간 동안 50볼트로 전기영동하여 크기별로 분리한 후 DNA를 Hybond N⁺ 막(Amersham)으로 옮겨 Church buffer (50 mM sodium phosphate buffer pH 7.2, 1 mM EDTA, 1% BSA, 7% SDS)에서 ³²P로 표지한 TRP-2 probe로 55°C에서 hybridization을 시켜 분리된 밴드를 확인하였다.

결과

TRP-2 YAC의 전사단위 방향성의 결정

YAC에 클로닝된 유전자의 전사방향을 확인하기 위해 YAC 절편 방법을 이용하여 실험을 수행하였다. 프린스턴 mouse YAC library pool로부터 PCR을 이용하여 melanoblast 표지인 tyrosine related protein-2(TRP-2) 유전자를 포함하는 YAC 클론을 찾았다(16). 이 TRP-2 YAC DNA를 pulse field 겔 전기영동법에 의해 분리하여 그 크기가 약 610 kb임을 확인하였다. 찾은 TRP-2 YAC의 전사방향을 알기 위해 다음과 같은 절편 벡터를 제조하였다. TRP-2의 3' 말단 부분인 1180 bp를 절편 벡터, pB1R(10)의 *EcoRI* site에 양쪽방향으로 삽입하여 절편 벡터, pB1R/TRP-2F와 pB1R/TRP-2R를 만들었다(Fig. 1). TRP-2 DNA를 양쪽방향으로 포함하는 두 절편 벡터, pB1R/TRP-2F와 pB1R/TRP-2R를 *SacI*으로 자른 후 각각의 DNA를 TRP-2 YAC을 포함하

A. Correct (forward) orientation



B. Opposite (reverse) orientation

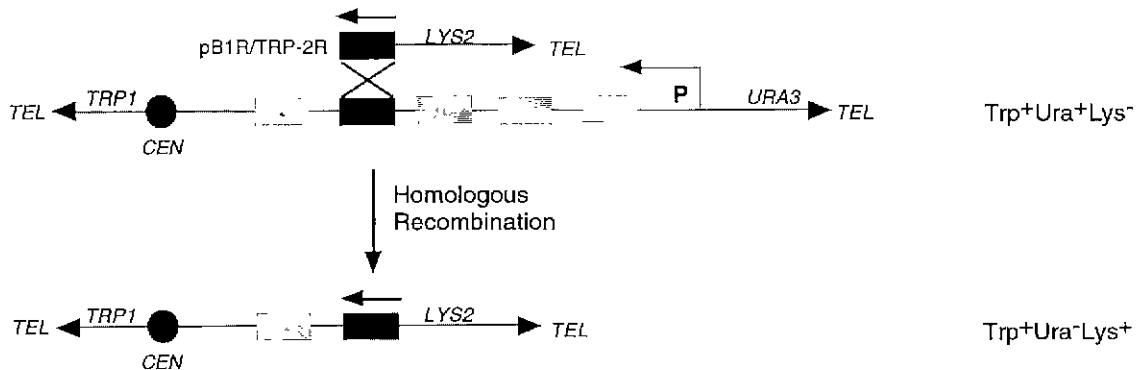


Fig. 2. TRP-2 YAC fragmentation for transcriptional orientation. Events deleting distal sequences by homologous recombination are described as follows. Homologous recombination between a TRP-2 DNA of YAC and the TRP-2 segment in pB1R/TRP-2F (A) or pB1R/TRP-2R (B) will result in deletion of all distal sequences, depending on the orientation of the transcriptional unit of TRP-2 on the YAC. Transformants containing the desired YAC fragmentation products can be identified by the change in phenotype of yeast cell. *TEL*, telomere; *CEN*, centromere; *P*, promoter.

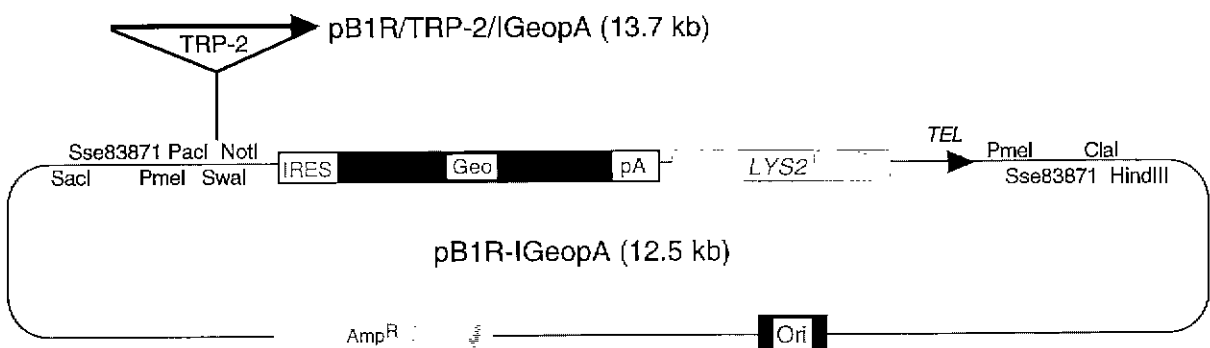


Fig. 3. A bicistronic fragmentation vector that contains IRES and β -galactosidase as a reporter gene. Unique rare restriction enzyme sites, *PacI*, *PmeI*, *SwaI*, and *NotI* are shown in the polycloning site. The TRP-2 segment was inserted into the *PacI* and *NotI* sites of the pB1R-IGeoA fragmentation vector that contains telomere (*TEL*) and *LYS2* as a yeast selectable marker. Both the *PmeI* sites can be used to linearize the plasmid prior to transformation. The plasmid was constructed as described in Material and Methods. Details of the plasmid constructs are available upon request.

는 효모세포에 Li-acetate 방법으로 삽입하였다. 효모세포에서 TRP-2 YAC과 절편 벡터의 공통부분인 TRP-2 DNA 사

이에서 상동 재조합이 일어난다(Fig. 2). TRP-2 YAC이 Fig. 2의 A에서의 같이 정확한 방향의 전사단위를 갖고 있으면

Table 1. Phenotype frequencies among transformed yeast

Plasmid	Number of colonies analyzed				
	Phenotype	Lys ⁺	Trp ⁻ Ura ⁺ Lys ⁺	Trp ⁻ Ura ⁻ Lys ⁺ **	% of Trp ⁺ Ura ⁻ Lys ⁺
pB1R/TRP-2F		52	0	32	62
pB1R/TRP-2F		52	0	10	19

* Deletion of sequences distal to the integration site produces this phenotype in a cell containing a fragmented YAC.

pB1R/TRP-2F를 이용시 삼중 재조합에 의해 생성되는 결실 유도체들은 *URA3* 표지와 재조합 부위 이후의 DNA가 결실 되고, 대신 벡터의 *LYS2*가 삽입되므로 본래의 Trp⁺Ura⁺Lys⁻의 표현형에서 Trp⁺Ura⁻Lys⁺의 표현형을 가지게 된다. 동일한 원리로 Fig. 2의 B와 같이 반대방향의 전사단위를 가지고 있는 YAC의 경우는 pB1R/TRP-2R 절편 벡터와 삼중 재조합을 일으켜 Trp⁺Ura⁻Lys⁺의 표현형을 가지게 된다. 그러나 이 경우 절편된 YAC은 프로모터 및 완전한 전사단위의 유전자를 포함하지 않으므로 유전자의 기능 및 조절부위의 기능분석과 같은 실험 목적에 사용하기가 부적당하다. 분석하고자 하는 유전자의 방향성은 Table 1에서 보여준 바와 같이 양쪽 방향의 TRP-2 DNA를 가지는 절편 벡터들을 이용하여 Lys이 없는 선택배지에서 자라는 효모들의 표현형의 빈도 수에 의해 추론할 수 있다. Lys⁺ 표현형을 가지는 세포를 Lys이 없는 배지에서 선택적으로 키워 조사한 결과, pB1R/TRP-2F vector를 사용했을 때가 pB1R/TRP-2R 벡터 사용시 보다 3.2배(32/10) 더 안정된 Lys⁺ 표현형을 나타내었다(Table 1). 이 결과로부터 Fig. 2의 A에서 설명한 바와 같이 TRP-2 YAC이 정확한 방향의 전사단위를 가진 DNA임을 알 수 있다. 더 나아가 절편된 TRP-2 YAC클론을 PCR을 이용하여 프로모터 존재 여부를 확인하였으며, 또한 원하는 전사단위를 가진 TRP-2 YAC 클론임을 Southern blot에 의해서 재확인하였다(Fig. 4).

Bicistronic fragmentation vector의 제조

진핵세포에서는 한 메시지로부터 하나의 단백질만이 생성된다. 그러나 EMCV 바이러스의 IRES DNA를 도입함으로써 리보솜이 이 염기서열을 인지하여 IRES 다음에 존재하는 유전자를 번역하므로 한 mRNA로부터 두 개의 단백질을 동시에 생성할 수 있다(9,11). IRES의 이런 성질을 이용하여 bicistronic vector를 제조하는데 응용할 수 있다. 이 실험에서는 원하는 유전자의 발현양상과 조절부위의 작용 및 유전자의 기능분석을 보다 더 용이하게 하기 위해 β-galactosidase를 reporter 유전자로 발현하는 bicistronic fragmentation vector, pB1R-IGeoA를 제조하였다(Fig. 3). 이 벡터는 효모선택 표지인 *LYS2*, telomere, *E. coli*에서 선택적으로 복제하고 증폭시키는데 작용하는 염기서열들과 ECMV로부터 유래되는 581 염기서열의 IRES를 포함하고 있어 분석하고자 하는 target DNA와 reporter 유전자를 한 세포에서 동시에 발현할 수 있는 장점이 있다. 이 IRES와 reporter 유전자를 포함하는 bicistronic fragmentation vector가 그 기능을 잘 수행하는지를 조사하기 위해 pCMV-GFP/IGeo bicist-

ronic vector를 만들었다. 이 벡터는 cytomegalovirus(CMV)의 강력한 프로모터와, 형광을 나타내는 단백질인 Green Fluorescent Protein(GFP), IRES와 β-galactosidase 유전자를 포함한다. 이 벡터를 신장세포인 293T 세포에 transfection시켜 GFP가 발현되는지는 형광현미경하에서 조사를 하고 IRES 다음에 존재하는 β-galactosidase가 발현되는지는 X-gal 염색에 의해 조사하였다. CMV-βGal과 비교하면 그 발현정도가 다소 떨어지지만 여전히 bicistronic vector로부터 β-galactosidase가 잘 발현되는 것을 관찰할 수 있었다. 이 결과로부터 본 실험에서 제조한 bicistronic fragmentation vector는 한 메시지로부터 두 단백질을 발현하는 기능단위를 갖고 있음을 알 수 있다. 그러나 IRES 뒤에 존재하는 유전자가 프로모터와 근접해 있는 유전자보다 발현이 다소 저

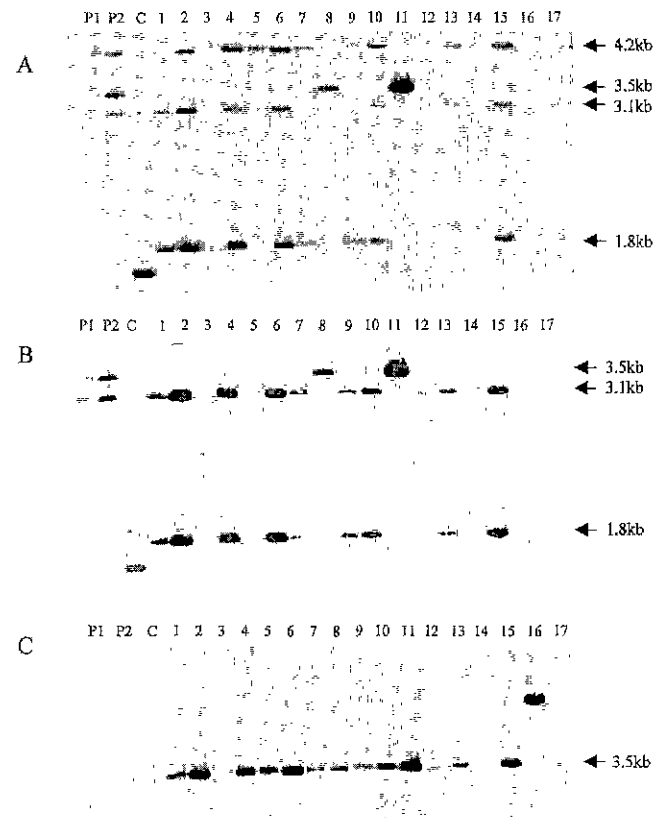


Fig. 4. *EcoRI* restriction analysis of the bicistronic TRP-2 YACs that show the Trp⁺Ura⁻Lys⁺ phenotypes. P1 and P2 are the parental TRP-2 YAC. C is the TRP-2 fragmented YAC targeting by pB1R-TRP-2/F as a control for transformation and Southern blot analysis. The fragmented bicistronic TRP-2 YACs were represented as numbers (A). Hybridization of 3' end of the TRP-2 segment (1180 bp) as a probe to the *EcoRI*-digested bicistronic TRP-2 YACs detects 4.2-, 3.5-, and 3.1-kb fragments from the parental TRP-2 YACs. The fragmented YAC contained the new 1.8 kb *EcoRI*-digested fragment which was introduced by event deleting distal sequences at site of recombination. (B). Hybridization of the TRP-2 segment containing only portion of exons 7 and 8 (360 bp) as a probe detects 3.5- and 3.1-kb fragments from parental YACs. (C). Hybridization of IRES segment (581 bp) detects 3.5 kb fragment from only fragmented YACs.

하됨을 관찰하였다(data not shown).

TRP-2 YAC의 fragmentation

절편된 bicistronic TRP-2 YAC을 만들기 위해 pB1R-IGeopA를 *PacI*과 *NotI*을 처리하여 자른 후 TRP-2 DNA를 정 방향으로 삽입한 pB1R/TRP-2/IGeopA bicistronic fragmentation vector를 제조하였다(Fig. 3). 클로닝된 pB1R/TRP-2/IGeopA 절편 벡터를 *PmeI*로 자른 후 TRP-2 YAC을 포함하는 효모세포에 Li-acetate 방법으로 삽입시켰다. Fig. 5에서 설명하는 바와 같이 상동 재조합에 의해 *URA3* 표지를 포함한 재조합 부위 뒤쪽의 염기서열이 결실되고 *LYS2* 표지가 도입되어 *Trp⁺Ura⁻Lys⁺*의 표현형을 가지게 된다. 또한, 이 절편된 YAC DNA를 분리하여 IRES 염기서열의 존재 유무를 PCR과 Southern blot으로 재확인하였다(Fig. 4). Bicistronic fragmentation vector를 삽입시킨 후 *Lys*이 없는 선택 배지에서 키운 효모세포에서는 50%(16/32)가 *Trp⁺Ura⁻Lys⁺* 표현형을 가지며 IRES 염기서열을 가지고 있는 잘 절편된 클론으로 나타났다. 이 중 세 클론은 *TRP1*과 *LYS2* 외에도 *URA3* 표지를 포함하였다. 그러므로 TRP-2 YAC을 포함하는 효모세포에서 TRP-2 공통부분의 DNA에 의한 상동 재조합률은 50% 이상임을 알 수 있다. 상기의 결과로부터 이 bicistronic fragmentation vector, pB1R-IGeopA를 이용하여 원하는 DNA를 쉽게 클로닝하고 효모에서 높은 재조합에 의해 목적하는 YAC 클론을 용이하게 얻을 수 있음을 시사하고 있다.

절편된 YAC이 원하는 목적대로 잘 생성되었는가를 조사하기 위해 YAC을 포함하는 효모로부터 DNA를 분리하여 *EcoRI*로 절단하였다. 절단한 DNA를 아가로즈 젤에서 전기

영동하여 TRP-2 유전자의 3' 말단 부분의 DNA(1180 bp), 엑손 7과 8을 포함하는 DNA(360 bp)와 IRES DNA(581 bp)를 probe로 이용하여 Southern blot을 하였다(Fig. 4). 3' 말단 부분의 TRP-2 probe를 이용하면 본래의 TRP-2 YAC 클론으로부터 4.2 kb와 3.5 kb와 3.1 kb 크기의 세 개의 밴드를 볼 수 있다(Fig. 4A). 그러나 bicistronic fragmentation vector를 이용하여 절편시킨 TRP-2/IGeopA YAC 경우에는 3.5 kb 크기의 밴드는 사라지고 대신 1.8 kb 크기의 밴드가 나타났다(Fig. 4A). 엑손 7과 8의 DNA를 probe로 이용하면 3.5 kb와 3.1 kb 밴드만이 확인되는 것으로 보아 엑손 7과 엑손 8 사이의 인트론내에 적어도 하나 이상의 *EcoRI* site가 존재함을 알 수 있다(Fig. 4B, Fig. 5). 이 결과로부터 80%(12/15) 정도가 엑손 8에서 상동 재조합이 일어남을 알 수 있다(Fig. 4, Fig. 5). 이는 Fig. 5에서 설명하는 바와 같이 엑손 8에서 상동 재조합이 일어나면 인트론과 IRES 앞쪽에 존재하는 *EcoRI* site에서 절단되므로 3.5 kb 대신 1.8 kb 크기의 DNA가 생성되는 것이다. 이 DNA blot을 IRES probe로 다시 hybridization을 시키면 IRES 앞쪽과 β -galactosidase내에 존재하는 *EcoRI* site에서 절단되어 본래의 TRP-2 YAC에서는 존재하지 않는 3.5 kb 밴드를 확인할 수 있다(Fig. 4C). 그러므로 이 실험에서 엑손 8 부위에서 상동 재조합에 의해 절편이 일어났으며, IRES와 β -galactosidase를 포함하는 bicistronic YAC이 생성되었음을 알 수 있다.

고 찰

본 연구는 크기가 큰 DNA를 효율적으로 조작하고 유전자의 발현양상과 기능을 용이하게 분석하기 위한 bicistro-

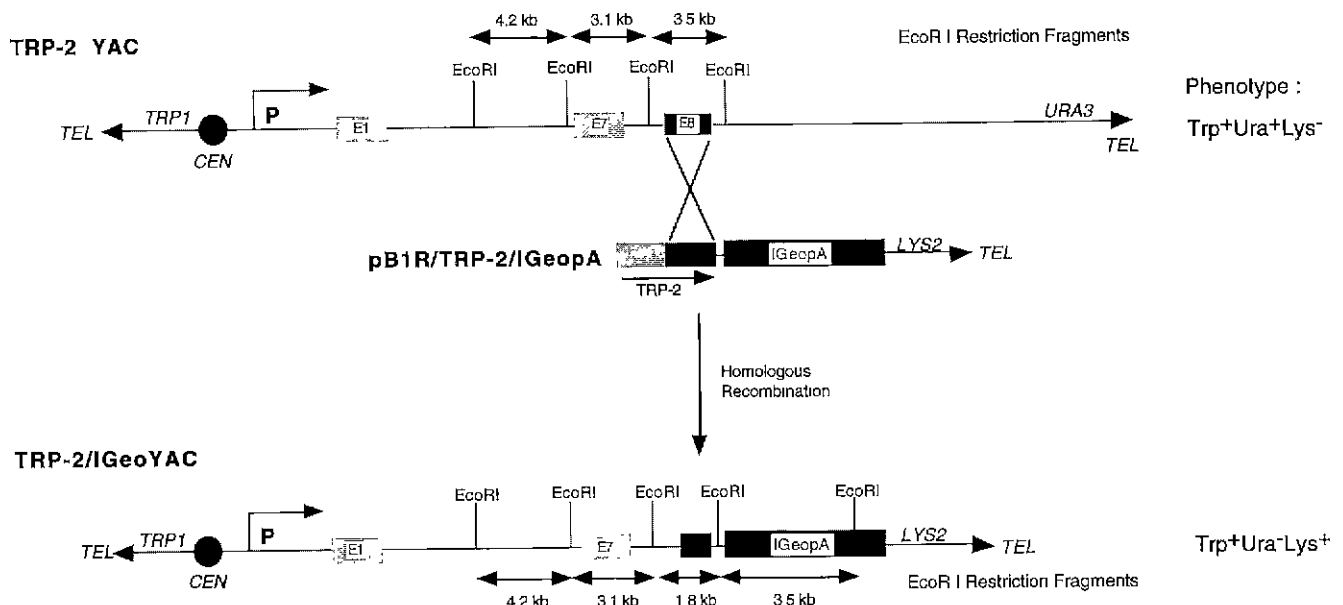


Fig. 5. Fragmentation paradigm for generating the bicistronic TRP-2 YAC Events deleting distal sequences by homologous recombination are described as follows. Homologous recombination between a TRP-2 DNA of YAC and the TRP-2 segment of pB1R/TRP-2/IGeopA will result in deletion of all distal sequences at the site of recombination. Transformants containing the desired YAC fragmentation products can be identified by changing the phenotype of a cell from *Trp⁺Ura⁺Lys⁻* to *Trp⁺Ura⁻Lys⁺*. TEL, telomere; CEN, centromere; P, promoter; E, Exon; IGeopA, IRES plus β -galactosidase as a reporter gene.

nic fragmentation vector의 제조 및 절편 시스템의 이용에 대한 것을 보고한다. 이 연구에서 제조된 bicistronic fragmentation vector, pB1R-IGeopA는 여러 가지 장점을 갖도록 개발되었다. 첫째, 이 벡터의 폴리클로닝 부위에 8개 염기서열을 인지하는 4개의 희귀한 제한효소, *PmeI*, *SwaI*, *PacI*, *NotI* site를 도입하여 큰 크기의 게놈 DNA나 어떤 cDNA도 용이하게 클로닝할 수 있는 장점이 있다. 둘째, 양쪽 폴리클로닝 site에 *PmeI* site를 삽입하여 fragmentation vector에 클로닝된 DNA를 손상시키지 않고 선형으로 자를 수 있고, 효모세포에서 YAC과 선형 DNA 사이의 상동 재조합률을 높여 절편 확률을 증가시킬 수 있다. 셋째, 원하는 절실 유도체들을 Lys이 없는 선택매지에서 키우므로 본래의 YAC과 구분이 용이하고 PCR을 이용하여 원하는 DNA를 포함하는 클론을 쉽게 찾을 수 있다. 넷째, YAC의 전사방향성을 조사 분석할 수 있다. 마지막으로 IRES DNA의 존재로 하나의 메시지에서부터 두 유전자를 동시에 발현시킬 수 있으므로 IRES 다음에 존재하는 β -galactosidase의 발현을 측정함으로써 프로모터에 근접한 target 유전자가 동시에 발현됨을 추론할 수 있는 장점이 있다.

TRP-2 유전자는 melanocyte에서만 주로 특이하게 발현된다(17). 이 연구에서 사용된 TRP-2 YAC은 자신의 프로모터를 포함하므로 melanocyte 세포에서 특이적으로 발현시켜 유전자의 기능을 분석하는데 이용할 수 있다. 제조된 bicistronic TRP-2 YAC을 분리하여 melanocyte에 삽입시켜 β -galactosidase의 발현을 조사하고자 시도하였다. 그러나 melanocyte세포로 DNA transfection시키기가 어려워 CMV나 SV 프로모터하에 있는 β -galactosidase의 발현도 확인할 수 없었다. 이와 같은 문제점을 극복하기 위해 세포의 특이성과 상관없이 원하는 유전자를 다량으로 발현하기 위해 이 연구에서 보고한 결과들을 응용하여 강력한 CMV 프로모터를 삽입할 수 있는 절편 벡터시스템을 개발할 수 있으며, 이런 벡터의 개발은 유전자 발현 및 생체 내의 기능 연구에 도움을 주리라고 생각된다. 또한, YAC DNA는 선형으로 존재하므로 효모염색체로부터 분리하기가 쉽지 않다. Bacterial Artificial Chromosome(BAC)는 YAC과 마찬가지로 크기가 큰 DNA를 클로닝할 수 있고 환형으로 존재하므로 *E. coli*에서 쉽게 분리 정제할 수 있는 장점이 있다. 그러므로 YAC에서 이용되는 절편 방법을 BAC 시스템에 응용하여 보다 더 효율적인 방법을 개발하고자 하는 연구를 진행할 수 있다.

감사의 말

본 연구의 일부는 가톨릭대학교 중앙의료원 지원으로 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Botstein, D. and G. Fink. 1988. Yeast: an experimental organism for modern biology. *Science* **240**, 1439-1442.

2. Burke D.T., G.F. Carle, and M.V. Olson. 1987. Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. *Science* **236**, 806-813.
3. Carle, G.F., M. Frank, and M.V. Olson. 1986. Electrophoretic separations of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field. *Science* **232**, 65-68.
4. Chu, G., D. Vollrath, and R.W. Davis. 1986. Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. *Science* **234**, 1582-1585
5. Emanuel, S., J.R. Cook, J. O'Rear, R. Rothstein, and S. Pestka. 1995. New vectors for manipulation and selection of functional yeast artificial chromosomes (YACs) containing human DNA inserts. *Gene*. **155**, 167-74.
6. Heard, E., P. Avner, and R. Rothstein. 1994. Creation of a deletion series of mouse YACs covering a 500 kb region around Xist. *Nucleic Acids Res.* **22**, 1830-1837.
7. Heinzen, R., G.L. Stiegler, L.L. Whiting, S.A. Schmitt, L.P. Mallavia, and M.E. Frazier. 1990. Use of pulsed field gel electrophoresis to differentiate *Coxiella burnetii* strains. *Ann. N Y Acad Sci.* **590**, 504-513.
8. Ito, H., Y. Fukuda, K. Murata, and A. Kimura. 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**, 163-168.
9. Jang, S.K., M.V. Davies, R.J. Kaufman, and E.J. Wimmer. 1989. Initiation of protein synthesis by internal entry of ribosomes into the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA *in vivo*. *J. Virol.* **63**, 1651-60.
10. Lewis, B.C., N.P. Shah, B.S. Braun, and C.T. Denny. 1992. Creation of a yeast artificial chromosome fragmentation vector based on lysine-2. *Genet. Anal. Tech. Appl.* **9**, 86-90.
11. Lillien, L. 1995. Changes in retinal cell fate induced by overexpression of EGF receptor. *Nature* **377**, 158-162.
12. McKee-Johnson, J.W. and R.H. Reeves. 1996. Fragmentation and integrative modification of YACs. *Methods in Mol. Biol.* **54**, 167-186
13. Orr-Weaver, T., J. Szostak, and R. Rothstein. 1981. Yeast transformation: a model system for the study of recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 6354-6358.
14. Orr-Weaver, T. and J. Szostak. 1983. Yeast recombination: the association between double-strand gap repair and crossing-over. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 4417-4421
15. Pavan, W.J., P. Hieter, D. Sears, A. Burkhoff, and R.H. Reeves. 1991. High-efficiency yeast artificial chromosome fragmentation vectors. *Gene*. **106**, 125-127.
16. Pavan, W.J. and S.M. Tilghman. 1994. Picbald lethal (*sl*) acts early to disrupt the development of neural crest-derived melanocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 7159-7163
17. Sikorski, R.S. and P.G. Hieter. 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**, 19-27.
18. Vollrath, D., R.W. Davis, C. Connelly, P. Hieter., R.W. Davis, C. Connelly, and P. Hieter. 1988. Physical mapping of large DNA by chromosome fragmentation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 6354-6358,

(Received December 10, 1998/Accepted December 28, 1998)

ABSTRACT: A New Bicistronic Fragmentation Vector for Manipulation and Analysis of Functional Yeast Artificial Chromosomes (YACs)

Hyangshuk Rhim*, Ju-Youn Choi, Young-Mo Sung¹, In-Kyung Kim, and Seong-man Kang¹ (Research Institute of Molecular Genetics, Catholic Research Institutes of Medical Science, The Catholic University, Seoul 137-701, Korea and ¹Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea)

Fragmentation vectors are used to analyze function and genomic structure of a gene of interest by creating deletion derivatives of large fragments of genomic DNA cloned as yeast artificial chromosomes (YACs). Herein, we developed a new bicistronic fragmentation vector that contains internal ribosomal entry site (IRES) of encephalomyocarditis virus (EMCV) and β -galactosidase as a reporter gene. This vector system provides a novel tool to analyze expression patterns of a gene of interest due to simultaneous expression of a target gene as well as β -galactosidase driven from a single message. In addition, the bicistronic fragmentation vector contains four rare-cutting restriction enzyme sites in the polycloning sites which can be used to conveniently insert any kinds of genes and therefore facilitates targeting DNA segments into YAC by means of homologous recombination. This approach establishes a paradigm for manipulation of mammalian DNA segments and characterization of expression and regulatory regions of mammalian gene cloned as YAC.