

Target DNA 염기서열 내에 존재하는 비상동성 간격이 상동성재조합을 이용한 클로닝 빈도에 미치는 영향

김재우¹ · 도은주 · 윤세련 · 정윤희 · 윤영호 · 임선희 · 선우양일 · 박인호*

동아대학교 자연과학대학 생물학과, ¹동아대학교병원 임상병리실

Transformation-associated recombination (TAR) 클로닝 법은 복잡한 게놈으로부터 염색체 내의 특정부위나 유전자를 선택적으로 분리할 수 있다. 이 방법은 목적 유전자에 근접한 작은 게놈 DNA 염기서열 정보를 필요로 한다. 이 기술은 효모의 spheroplast transformation을 시키는 동안 목적으로 하는 유전자의 5' 또는 3' 서열을 포함하고 있는 TAR vector와 게놈 DNA 사이에서 일어나는 상동성재조합에 의해 이루어진다. 본 연구에서는 plasmid 모델 시스템을 이용하여 target hooks 내에 존재하는 비상동성 염기서열이 상동성재조합에 미치는 영향을 조사하였다. plasmid에 존재하는 *HIS3* 유전자와 변형시킨 *his3-TRP1-his3* 단편 사이의 상동성재조합의 효율은 Ura⁺ 형질 전환체의 형질분석에 의해 이루어졌다. Ura⁺ 형질전환체의 수는 7 종류의 서로 달리 변형된 *his3-TRP1-his3* 단편들을 사용하였을 때 거의 동일하게 나타났다. 그러나 Trp⁺His⁺ positive recombinants의 빈도는 변형된 *his3-TRP1-his3* 단편 내에 비상동성 영역에 부정확한 간격을 지닐 때 현저한 감소를 나타내었다. 이러한 결과로서, 부정확한 간격이 target hook과 substrate DNA 사이에 일어나는 상동성재조합을 방해하는 것으로 사료된다. 그러므로 이 종간의 상동 유전자를 클로닝 할 때에는 target hook 내의 비상동성 염기서열이 존재한다면 이것이 정확한 간격을 지니는지 여부를 중요한 요인으로 고려해야 한다.

Key words □ homologous recombination, orthologue isolation, *Saccharomyces cerevisiae*, transformation-associated recombination (TAR) cloning

인간을 비롯한 여러 생물 종에서 게놈 프로젝트의 진행으로 많은 DNA 정보가 밝혀졌지만 여전히 다양한 생물 종에서 유전정보의 규명이란 어려운 일이다. 더욱이 유전정보가 밝혀진 유전자라 하더라도 복잡한 게놈으로부터 실험상에 필요로 하는 유전자만을 분리해서 사용하는 것은 고등생물 종에서는 많은 어려움이 있다. 이러한 어려움과 문제점을 해결할 수 있는 방법으로 효모세포 내에서 형질전환과 동시에 일어나는 상동성재조합(*in vivo* homologous recombination)에 의해 고등생물의 유전체 내에 존재하는 단일 유전자 혹은 염색체 내의 특정부분을 특이적으로 분리하는 TAR (Transformation-Associated Recombination) cloning 법이 개발되었다. BAC (Bacterial Artificial Chromosomes), PAC (P1 Artificial Chromosomes) 혹은 YAC (Yeast Artificial Chromosomes) library를 사용하여 특정유전자를 포함한 클론을 분리하는 종래의 방법으로 분리되지 않았던 다수의 중요한 유전자가 이 방법에 의해 분리되었다(1, 4, 9, 10-15).

TAR cloning을 시작하기 위해서는 분리하고자 하는 부분의 양쪽 말단 DNA 염기서열에 대한 정보가 필요하다. 먼저 vector의 양쪽 끝에 목적으로 하는 유전자 혹은 특정 염색체 부위의 끝 부분에 해당하는 염기배열을 TAR vector(11)의 multi-cloning site에 삽입하여 vector를 제작한다. 이 TAR vector에 삽입된 염기배

열 부분을 hook(Targeting sequence: 표적배열)이라 하며, 이 부분은 형질전환과 더불어 일어나는 상동성재조합에 이용된다. TAR cloning 법에서 상동성재조합에 관여하는 hook은 사용되는 염기배열에 따라 크게 두 가지로 나눌 수 있다. 첫 번째는 각 목적 유전자의 5'-상류와 3'-하류 말단 부위에 존재하는 특이적 배열을 hook으로 사용하는 방법(two unique hook/two-specific hook)으로, 인간의 유방암 유전자 *BRCA2*를 이 방법으로 분리하였다(14). *BRCA2* 유전자의 상류와 하류에 위치하는 수백 bp의 단편을 양쪽 말단에 hook으로 만든 TAR vector와 human genome DNA를 효모세포로 co-transformation한 결과, 완전한 길이인 90 kb의 *BRCA2* 유전자가 선택적으로 분리되었다. 선택배지에서 자란 약 200 개의 형질전환체 중에서 1 개의 클론이 *BRCA2*의 배열을 포함하고 있는 것으로 효모의 colony PCR 해석으로 쉽게 동정되었다. 또 다른 인간 유방암 유전자인 *BRCA1*도 이와 같은 방법으로 얻어졌다. TAR cloning 법에 의해 얻어진 *BRCA2*와 *BRCA1* 유전자 지도는 종래의 YAC 클론으로부터 얻어진 결과와 정확히 일치하였다. 그러나 이 방법은 일부분의 cDNA 배열만 알고 있는 경우는 사용할 수 없다. 이러한 문제점을 해소하기 위해 유전자의 한쪽 부분 배열만으로 전체 게놈 DNA로부터 직접 유전자를 분리하는 다른 방법이 개발되었다(9). 이 방법은 한쪽의 hook은 목적 유전자 말단의 특이적 배열을 사용하고, 다른 쪽의 hook은 genome 중에 고빈도로 산재한 반복 배열(인간에서는 *Alu*, 마우스에서는 B1 혹은 B2 배열 등)을 이

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-51-200-7265, Fax: 82-51-200-7269
E-mail: ihpark@dau.ac.kr

용하는 방법이다. *Alu* 등의 고빈도 반복 배열을 제 2의 hook으로 사용함으로써 3'-하류의 특이적 배열로부터 유전자의 5'-상류에 존재하는 몇 개의 다른 *Alu* 배열까지 다양한 크기의 영역의 분리가 가능하게 되었다. 또한 TAR cloning법의 상동성 재조합에 필요한 hook의 길이에 대한 연구에서 약 40 copy를 지닌 마우스 모델(v-Ha-ras: Tg.AC transgene)을 사용하여 효모에서 밝혀진 길이인 약 40 bp(5, 6)와 거의 유사하게 약 60 bp의 길이만으로도 클로닝이 가능하게 되어(19), 목적 유전자의 매우 짧은 DNA 염기서열 정보만으로도 유전자 분리가 가능하게 되었다.

TAR cloning에서 가장 중요한 인자인 hook은 homologous recombination에 작용하므로 많은 연구가 이루어졌다(5, 6, 8, 19-21). 또한 근년 활발히 진행 중인 많은 생물 종에 대한 비교 유전체(Comparative genomics) 연구에 대해 TAR cloning 법의 적용 가능성을 조사하는 것도 매우 중요한 의미를 가진다. 그러므로 이러한 비교 유전체 연구에 TAR cloning 법의 유용성을 알아보기 위해 Target hook에 변이를 삽입하여 상동성에 따른 클로닝 빈도를 조사하였다(20). 그 결과, 마우스 모델(v-Ha-ras: Tg.AC transgene)을 사용하여 TAR cloning법의 상동성재조합에 필요한 hook의 상동성 정도는 약 80%의 상동성 hook으로 충분히 클로닝이 가능함을 밝혔다(20). 이러한 결과는 40 bp의 길이로서 약 80%의 상동성을 지닌 hook으로도 클로닝이 가능하다는 것을 의미하여, 한 종에서 밝혀진 유전자 정보를 이용하여 정보가 없는 다른 생물종의 orthologue 분리가 가능하다는 것을 시사한다(20). 또한 인간의 *hHPRT*(human hypoxanthine phosphoribosyl-transferase) 유전자 클로닝에 사용된 hook을 마우스에 적용하여 성공적으로 마우스 *mHPRT* 유전자를 분리하였다(20).

본 연구는 서로 다른 종에서 특정유전자 orthologue를 분리하고자 할 때, 계능 상에는 단순히 상동성배열의 비율뿐 아니라 Target 배열 내부에 존재하는 비상동성 부분이 같은 크기 혹은 다른 크기로 존재할 수 있다. 그러므로 본 연구에서는 plasmid 모델계를 이용하여, plasmid에 존재하는 *HIS3* 유전자와 변형시킨 *his3-TRP1-his3* 단편 사이의 상동성재조합의 효율을 조사하였다. 변형시킨 *his3-TRP1-his3* 단편 내에는 plasmid에 존재하는 *HIS3* 유전자와 비상동성 염기서열을 지니며, 이 중에서 이러한 비상동성 염기서열 부분이 원래의 target sequence와 비교하여 정확한 간격을 지닌 것과 부정확한 간격을 지닌 것을 제작하였다. 그 결과 비상동성 염기서열 부분에 부정확한 간격을 지닌 단편을 사용한 경우, 상동성재조합의 효율이 2배 이상 감소하여 이러한 간격이 상동성재조합의 효율에 영향을 미치는 것으로 밝혀졌다. 그러므로 이러한 결과는 다른 종 사이의 orthologue 분리에 필요한 target hook 제작에 중요한 인자로서 작용할 것으로 사료된다.

재료 및 방법

사용 균주 및 plasmid DNA

본 실험에 사용된 출아효모 *Saccharomyces cerevisiae*는 VL6-48 균주(*Mat a his3-Δ200 trp1-Δ1 ura3-52 ade2-101 met14*)이고(11), DNA 증폭에 사용된 대장균의 균주는 DH10B (*F⁻ mcrA Δ*

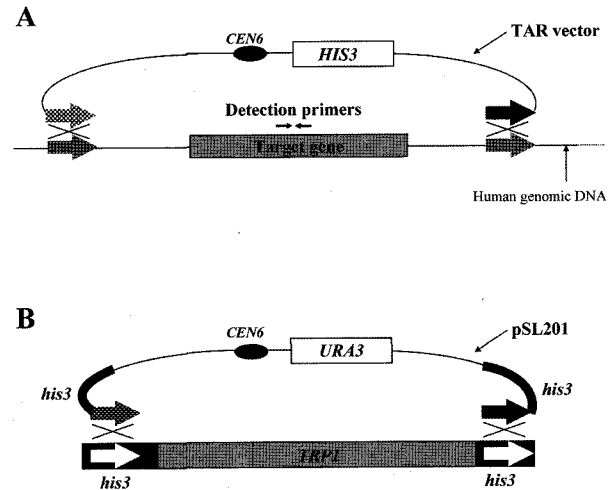


Fig. 1. Isolation of the target gene by *in vivo* homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. (A) Scheme for isolation of the target gene as a circular YACs using TAR vector. The TAR vector contains sequences from 5'promoter region (checked arrow) and from 3' end (large black arrow) of target gene. Yeast cells were transformed with genomic human DNA along with a TAR vector containing two target hooks. Arrows indicate positions of primers used for detection of positive clones among primary transformants. (B) Schematic diagram of genetic selection by homologous recombination between the modified *his3-TRP1-his3* fragment and *HIS3* gene on pSL201. *TRP1* gene was used for detection of positive clones after homologous recombination.

(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*dlacZDM15 ΔlacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galKλ⁻ rpsL nupG*)를 사용하였다.

본 실험에 사용된 pSL201 (Fig. 1, Fig. 2)은 YDp-U plasmid (2) 유래의 1.1 kb *URA3* 유전자를 *Bam*H1 효소로 잘라 분리하여 pRS313 vector (24)의 multi-cloning site 내의 *Bam*H1 site에 ligation으로 삽입시켰다. 이 결과 새로운 pSL201 vector는 *HIS3* 선택마커와 동시에 *URA3* 선택마커를 지니게 되었다. 형질전환에 사용할 때는 pSL201 vector를 제한효소 *Bgl*III로 처리하여 직선상의 vector로 만들어 사용한다.

Target hooks와 변형시킨 DNA 단편의 제작

본 실험에 사용될 plasmid model system은 기본적으로 상동성 염기서열이 부분적으로 존재하는 pSL201 vector (Fig. 2) 내의 *HIS3* 유전자와 이 *HIS3* 유전자의 양끝 부분(40 bp의 5'-hook과 20~80 bp의 변형된 3'-hook)만을 제외하고 *TRP1* 유전자로 치환된 *his3-TRP1-his3* DNA 단편들(Fig. 3)사이의 상동성재조합을 측정하였다(Fig. 5).

먼저 Target hook으로 제작된 original hook의 구조는 Fig. 3의 위쪽에 나타내었으며, 이 hook의 *HIS3* 유전자 내에서의 위치 및 서열은 Fig. 4에 나타내었다. 양쪽 말단에 존재하는 40 bp의 5'-hook과 20~80 bp의 변형된 3'-hook의 구조 및 염기서열은 각각 Fig. 3, Fig. 4와 Table 1에서 보여준다. 양쪽 말단에 존재하는

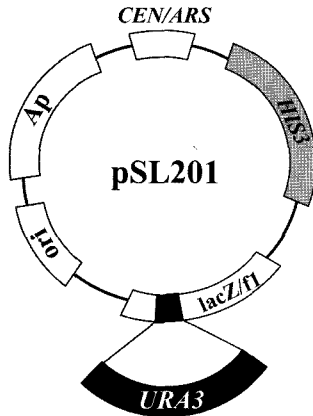


Fig. 2. Construction of new yeast plasmid pSL201. The pRS313 (Sikorski and Philip, 1989) plasmid was modified by ligating a *Bam*H1 fragment (1.1 kb) of YDp-U (Berben et al, 1991). Finally, this new plasmid (pSL201) contained two auxotrophically selectable marker genes (*HIS3* and *URA3*). The functional DNA segments of the plasmid are indicated as follows: *CEN/ARS* = a 518 fragment of a yeast centromere sequence (*CEN6*) and autonomously replicating sequence (*ARSH4*); *HIS3* and *URA3* = auxotrophic markers for yeast cells; Ap = ampicillin-resistance gene.

his3 단편 서열에 *TRP1* 유전자를 연결하기 위하여, Table 1의 5'-hook 뒤쪽에 YDp-W(2) vector 내의 *TRP1*을 합성하기 위한 GAATTCCTCCGGGGATCCG (17 bp)의 염기서열을 연결하여 primer를 합성하였고, 3'-hook 뒤쪽에는 AAGCTAGCTTGCTGCA (17 bp)를 연결한 primers를 합성하였다. 이러한 primers들과 주형 DNA로 YDp-W vector를 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응은 9700 Thermocycler (Perkin-Elmer)를 사용하여 94°C, 2분간 1 cycle, 그리고 94°C, 30초→58°C, 30초→72°C, 2분의 반응을 25 cycles 반응시킨 후, 72°C에서 7분 1 cycle의 연장 반응을 수행하였다. PCR 산물은 1%의 SeaKem GTG agarose gel을 사용하여 전기영동을 통하여 확인하였다. 이렇게 얻어진 PCR 산물을 *Bg*III 효소를 처리하여 선형화한 pSL201 vector와 형질전환에 사용하였다(Fig. 5).

배지 및 배양조건

효모 및 대장균을 이용한 일반적인 유전학적 방법은 Sambrook

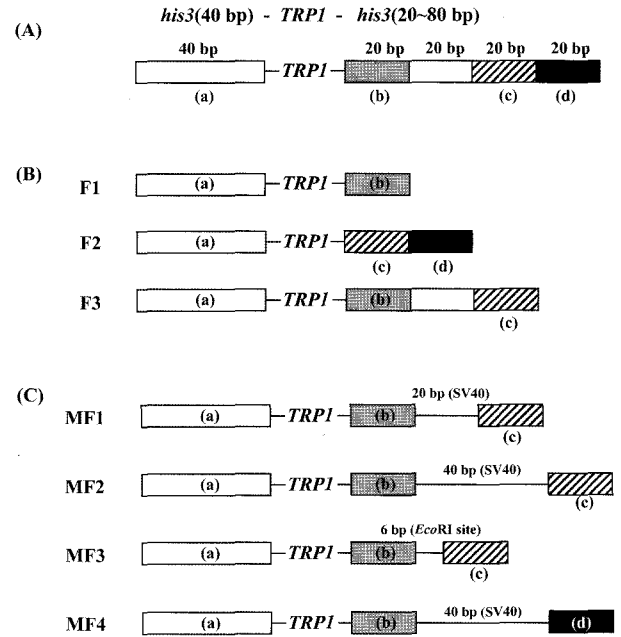


Fig. 3. Construction of the mosaic hooks contained different spacing. (A) showed the original hook of *his3*(40 bp)-*TRP1*-*his3*(20~80 bp). *TRP1* was used as a selection marker after TAR cloning. (B) F1~F3 showed the different size for 3'-hook. (C) MF1~MF4 contained the modified spacing on 3'-hook. *URA3* was used as a selection marker after transformation.

et al. (22) 및 Sherman *et al.* (23) 방법을 사용하였다. 대장균 DH10B의 증식용 배지로 LB (Luria-Bertani) broth (0.5% Yeast extract, 1% Bactotrypton, 0.5% NaCl, 50 µg/ml Ampicillin)를 사용하여 37°C에서 배양하였다. 효모의 배양에는 YPD(1% yeast extract, 2% polypeptone, 2% glucose) 액체배지와 여기에 2% Bacto-agar를 첨가한 YPD 고체배지를 사용하였다.

Spheroplasts transformation에 사용되는 Sorbitol-Ura 배지는 1 L에 28 g의 Ground Ura minus Powder Mixture[0.67% yeast nitrogen base (6.7 g), 2% glucose (20 g)와 His를 제외한 혼합 아미노산(1.3 g)]과 형질전환체의 안정성을 위해 1 M Sorbitol을 첨가하고 20 g의 Bacto agar (Difco; 2% final)를 첨가하여 사용하였다. 이때 사용되는 혼합 아미노산의 비율은 다음과 같다: Adenine sulfate 4 g, L-Arginine · HCl 2 g, L-Histidine 2 g, L-

Table 1. DNA modified target fragment for this study

	<i>his3</i> arm : 5'-hook	Length	Spacing
	ATGACAGAGCAGAAAGCCCTAGTAAAGCGTATTACAAATG	40 bp	Correct
Modified region	<i>his3</i> arm : 3'-hook	Length	Spacing
F1	TTATGGCAACCGCAAGAGCC	20 bp	Correct
F2	ACATAAGAACACCTTTGGTGGAGGGAACATCGTTGGTACC	40 bp	Correct
F3	GAGGGAACATCGTTGGTACCATTGGGCGAGGTGGCTTCTCTTATGGCAACCGCAAGAGCC	60 bp	Correct
MF1	GAGGGAACATCGTTGGTACCtatacactaaaaatgaattcTTATGGCAACCGCAAGAGCC	60 bp	Correct
MF2	GAGGGAACATCGTTGGTACCtatacactaaaaatttatatttaccttagagaattcTTATGGCAACCGCAAGAGCC	80 bp	Incorrect
MF3	GAGGGAACATCGTTGGTACCtatacaTTATGGCAACCGCAAGAGCC	46 bp	Incorrect
MF4	ACATAAGAACACCTTTGGTGTatacactaaaaatttatatttaccttagagaattcTTATGGCAACCGCAAGAGCC	80 bp	Correct

5'-hook (a)
 ATGACACAGCAGAGAAAGCCCTACTAAAGCCCTATTACAAATGAAACCAAGAT
 TCAGATTGCGATCTCTTTAAAGGGTGGTCCCTAGCGATAGAGCACTCGA
 TCTTCCAGAAAAAGAGGCAGAAGCAGTAGCAGAACAGGCCACACAATCG
 CAAGTGATTAACGTCCACACAGGTATAGGGTTTCTGGACCATATGATACA
 TGCTCTGGCCAAGCATTCCGGCTGGTTCGCTAATCGTTGAGTGCATTGGTG
 ACTTACACATAGACGACCATCACACCACTGAAGACTGCGGGATTGCTCTC
 GGTAAGCTTTTAAAGAGGCCCTAGGGGCCGTGCGTGGAGTAAAAAGGTT
 TGGATCAGGATTTGCGCCTTTGGATGAGGCACTTCCAGAGCGGTGGTAG
 ATCTTTTCGAACAGGCCGTACGCAGTTGTCGAACTTGGTTTGAAGGGGAG
 AAAGTAGGAGATCTCTCTTTCGAGATGATCCCGCATTTTCTTGAAAGCTT
 TGCAGAGGCTAGCAGAATTACCCTCCACGTTGATTGTCTGCGAGGCAAGA
 ATGATCATCACCGTAGTGAGAGTGCCTTCAAGGCTCTTGGCGTTGCCATA
 (b)
 ATGAGAGCCACCTGCCCCAATGGTACCAACGATGTCGCTCCACCAAAGG
 (c)
 TGTCTTATGTAAGTGAACACCGATTATTTAAAGCTGCAGCATACGATATAT

Fig. 4. Composition of the target hooks for *HIS3* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. The 5' hook sequence showed the (a) region of Fig. 3. The other sequences, (b), (c) and (d), matched with left side on *his3-TRP1-his3* fragment, and dotted box (variable region) showed the region located between (b) and (c) in Fig. 3.

Isoleucine 3 g, L-Leucine 3 g, L-Lysine · HCl 3 g, L-Methionine 2 g, L-Phenylalanine 6 g, L-Threonine 20 g, L-Tryptophan 2 g, L-Tyrosine 3 g, Uracil 2 g, L-Valine 15 g을 볼밀을 이용하여 잘 섞은 후 1 L 배지에 1.3 g을 사용하였다. Top agar Sor-Ura 배지는 1 L에 28 g의 Ground Ura minus Powder Mixture, 1 M Sorbitol, 그리고 30 g의 Bacto agar (Difco; 3% final)를 넣어 사용하였다. SD-His 배지와 SD-Trp 배지는 1 L에 28 g의 Ground His minus Powder Mixture 혹은 Ground Trp minus Powder Mixture와 2% Bacto agar를 넣어 사용하였다.

Yeast spheroplast transformation

Spheroplast competent cell을 제작하기 위해 50 ml의 YPD 액체배지에 효모 균주를 접종한 후 30°C에서 하룻밤 배양하여, O.D₆₀₀=1.3~1.4에서 균주를 집균하고, 20 ml의 1 M sorbitol로 혼합하여 4°C에 30분간 방치하였다. 현탁액을 2300 × g, 4°C에서 5분간 원심 분리하여 집균한 후, 20 ml의 SPEM용액(1 M sorbitol, 0.01 M sodium-phosphate pH 7.5, 10 mM disodium-phosphate pH 7.5, 0.5 M EDTA)에 다시 현탁하였다. 현탁액에 20 µl의 zymolyase(10 mg/ml) (ICN Biomedicals, Inc. 20T)와 40 µl의 14 M β-mercaptoethanol을 넣고 잘 섞은 후, 30°C에서 약 20 분간 50 rpm 이하로 매우 느리게 진탕 배양하였다. 세포의 spheroplasts 정도를 조사하기 위해 현탁액을 1 M sorbitol과 2% SDS의 1/10로 넣어 O.D₆₀₀ 값을 측정하여 1 M sorbitol/2% SDS 값이 4~5 배가 되도록 하였다. zymolyase 처리가 끝난 세포를 1000 × g, 4°C에서 5분간 원심 분리하여 집균한 뒤 β-mercaptoethanol의 제거를 위해 1 M sorbitol로 두 번 씻어주었다. 균체를 다시 2 ml의 STC용액(1 M sorbitol, 10 mM Tris · Cl pH 7.5, 10 mM CaCl₂)으로 현탁하였다. 15 ml의 Falcon tube에

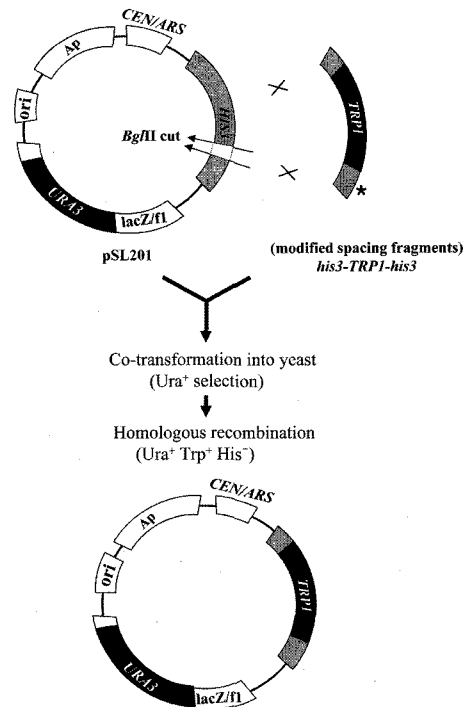


Fig. 5. Schematic diagram of genetic selection by homologous recombination between the modified *his3* (40 bp)-*TRP1-his3* (20~80 bp) fragment and *HIS3* gene on pSL201. The pSL201 vector carries a yeast centromere (*CEN6*), a yeast selection marker (*URA3*) and a negative selectable marker (*HIS3*). The original hook fragment, *his3* (40 bp)-*TRP1-his3* (20~80 bp), also contains two *HIS3* gene-specific targeting hooks and a positive selectable marker (*TRP1*). Homologous recombination between the modified *his3-TRP1-his3* fragment and *HIS3* gene leads to *his3* disruption and then shows the *Trp*⁺ phenotype.

직선상의 50 ng의 TAR vector와 100 ng의 각 종류별 DNA 단편을 미리 준비하여, Spheroplasts 현탁액 450 µl를 넣어 가볍게 섞은 후 실온에 10분 방치한 후, 5 ml의 PEG용액(20% PEG 8000, 10 mM Tris · Cl pH 7.5, 10 mM CaCl₂)을 넣고 tube를 inverting하여 가볍게 섞고 실온에서 10분간 두었다. 1000 × g에서 5분간 원심분리하여 집균한 후, 상층액을 조심스럽게 제거하고 1 ml의 SOS (1 M sorbitol, 6.5 mM CaCl₂, 0.25% Yeast extract, 0.5% Bacto peptone) 용액에 현탁하여 30°C에서 1시간 배양하였다. 이때 TOP agar Sor-His를 녹여 glass test tube에 8 ml씩 분주하여 50°C에 두었다. 위의 배양액을 Top Agar에 조심스럽게 섞어 넣은 후, Sor-Ura plate에 조심스럽게 부어 plate가 굳은 후, 30°C에서 3~4일간 배양하였다(11, 16).

Positive clone의 확인

본 실험에서는 pSL201의 *HIS3* 유전자 내에 존재하는 *Bgl*II 자리를 잘라 선형으로 만든 후, 변형시킨 *his3-TRP1-his3* 단편들 (Fig. 3)과 효모 내로 형질전환하여 선형 vector 내의 *HIS3* 유전자와 *his3-TRP1-his3* DNA 단편 사이의 상동성제조합 빈도를 조사하였다(Fig. 5).

spheroplast 형질전환법으로 SD-Ura plate에 나온 형질전환체를 이쑤시개를 이용하여 한 plate 당 30 개의 colony를 patch한다. 2~3일 동안 30°C에서 배양 후 다시 SD-His plate와 SD-Trp plate에 replica하여 30°C에서 2 일간 배양한다. 각 단편으로 형질전환 시킨 실험군에서 각각 1000 개의 형질전환체를 조사하였다. 이때 SD-His plate에서는 자라지 않고 SD-Trp plate에서는 잘 자라는 콜로니가 Fig. 5와 같은 재조합이 일어난 His⁻Trp⁺ 형질전환체로서 positive colony로 간주하였다.

결과 및 고찰

in vivo homologous recombination 빈도에 대한 target hook의 model system의 구축

출아효모 내에서 일어나는 상동성재조합과정을 이용한 TAR cloning 법은 복잡한 게놈 DNA로부터 특정 유전자를 직접 분리해낼 수 있는 방법으로서 Target 유전자의 양끝에 존재하는 염기서열의 정보가 필수적이다. 이러한 염기서열의 정보를 이용하여 100~500 bp 크기의 target sequence를 PCR 방법으로 증폭하여, 이를 vector에 넣어 hook으로 이용한다. 그러므로 클로닝에서 hook 제작은 실험의 첫 단계로서 상동성재조합에 직접 관련된 중요한 부분이다(Fig. 1). 현재까지 single-copy 유전자 분리에 사용된 hook의 크기는 약 200~1,000 bp의 길이였으므로(1, 4, 9-10, 12-14, 19) 만약 유전정보의 확인이 100~200 bp 이하에 불과하다면 TAR cloning법을 사용하기 어려울 것으로 사료된다. 이러한 문제점의 보완과 TAR cloning의 유용성을 증가시키기 위해서 앞서 Noskov 등(19)이 Tg.AC transgenic mouse 모델계를 이용하여 약 60 bp 길이의 hook으로 TAR cloning이 가능하다는 것을 밝혔다. 이러한 결과는 출아효모에서(5, 6) 일어나는 상동성재조합과정에 필요한 염기서열 길이인 40 bp와 매우 유사하다.

본 실험에서는 human single-copy 유전자를 직접 클로닝에 사용하지 않고(Fig. 1A), 실험을 보다 단순화할 수 있는 plasmid system을 구축하였다(Fig. 1B). 먼저 재료 및 방법에서 기술한 것과 같이 pSL201 vector를 만들고 vector 내의 HIS3 유전자와 상동성재조합을 할 수 있는 양끝에 his3 발단을 지니며 선택마커로서 TRP1 유전자를 가지는 DNA 단편을 DNA 합성과 PCR 법을 이용하여 제작하였다(Fig. 3, Table 1). Fig. 3에서 보여주는 his3-TRP1-his3 DNA 단편을 이용하여 F1~F3과 MF1~MF4의 7 종류의 변형시킨 단편을 제작하였다. target hook으로 사용되는 염기서열 정보 및 위치는 Fig. 4에서 보여주는 것과 같이 출아효모 HIS3 유전자의 5'-와 3'-끝에 존재하는 염기서열로서, 5'-target hook으로는 40 bp의 동일한 염기서열을 지니고 3'-hook은 각각 다른 크기의 비상동성 염기서열 정보를 포함한 20~80 bp의 염기서열을 넣어 제작하였다. 이렇게 제작된 vector 및 DNA 단편들의 DNA 염기서열을 결정하여 정확한 서열을 확인하였다.

Plasmid system 내에서 target hook의 길이에 따른 영향

현재까지 hook으로 사용한 DNA 염기배열의 길이는 대개 200~1,000 bp로 이 범위 내에서는 TAR cloning의 효율에 영향을

주지 않았다(1, 4, 9-10, 12-14, 19). 또한 hook의 최소길이를 마우스 모델 시스템을 이용하여 조사한 결과 60 bp까지 가능하다는 것이 밝혀졌다(19). 또한 본 연구그룹에서 TAR cloning 법으로 인간 게놈으로부터 직접 single-copy 유전자인 hHPRT를 분리하는데 필요한 유전정보의 길이를 최소화하여 TAR cloning 법이 보다 많은 경우에 적용될 수 있는 가능성을 보여주었다(19). 이는 마우스의 게놈 DNA를 이용한 경우로서 hook의 길이가 63 bp~750 bp로 길이가 10 배 이상 차이를 가짐에도 불구하고, 유전자 분리 빈도는 0.40~0.45%로 거의 동일한 수준을 나타내었다. 이는 고등생물의 single-copy 유전자를 분리에도 hook의 최소 길이를 약 60 bp까지 축소할 수 있다는 것을 의미하는 것으로, 부분적 cDNA 염기서열의 해석을 통한 짧은 염기서열 정보만으로도 클로닝이 가능하다는 것을 보여주었다.

본 연구는 plasmid system으로서 상동성재조합이 일어날 수 있는 hook의 길이를 좀 더 줄이기 위하여, Fig. 3과 4에서 보여주는 3'-hook 부분을 조절하여 각각 20 bp(b 영역), 40 bp(c+d 영역) 그리고 60 bp(c+variable region+b)로 길이가 서로 다른 hook을 지닌 DNA 단편을 제작하였다. 이렇게 제작된 상동성재조합에 영향을 미치는 Target hook의 구조는 Fig. 3B에 나타내었고, 한번의 실험에 50 ng의 TAR vector와 100 ng의 서로 다른 크기의 DNA 단편을 사용하여 형질전환을 수행하였다. Original fragment를 비롯하여, F1~F3 단편을 이용한 각 실험을 통하여 얻어진 Ura⁺ 형질전환체 수는 한번의 실험 당 약 3,000 개로 서로 다른 DNA 단편 간에 거의 유사한 빈도를 나타내었다.

이러한 Ura⁺ 형질전환체 중에서 1000 개의 콜로니를 사용하여 positive colony(His⁻Trp⁺)를 조사하였다(Fig. 5). 서로 다른 크기의 네 종류의 DNA 단편을 사용하여 상동성재조합을 조사한 결과 20 bp, 40 bp, 60 bp, 80 bp의 hook을 사용하였을 때, 각각 그 빈도가 2.7, 3.5, 3.3, 3.6%로 유사하게 나타났다(Table 2). 그러므로 본 실험에 사용한 plasmid system에서는 target hook의 길이가 20~80 bp까지 변화시켜도 그 길이에 따른 영향이 크게 나타나지 않아, target hook의 길이를 plasmid system에서는 약 20 bp까지 축소할 수 있음을 보여준다.

Target 서열 내에 존재하는 비상동성 염기서열이 TAR 클로닝의 빈도에 미치는 영향

앞선 연구에서 TAR cloning 법으로 Tg.AC transgenic mouse 를 모델계로 사용하여 유전자 분리가 가능한 target hook의 염기서열에 대한 상동성 정도를 조사하였다(20). 그 결과 약 70%의 상동성만으로도 목적유전자의 분리가 가능하다는 것이 밝혀졌다. 이는 TAR 클로닝법이 알려진 종의 염기서열정보를 이용하여 이

Table 2. Frequency of Trp⁺His⁻ positive recombinants among the Ura⁺ transformants for different size of 3'-hook

DNA fragment	Trp ⁺ His ⁻ /Ura ⁺	Frequency (%)
Original hook (80bp)	36/100	3.6
F1 (20 bp)	27/1000	2.7
F2 (40 bp)	35/1000	3.5
F3 (60 bp)	33/1000	3.3

Table 3. Frequency of Trp⁺ His⁻ positive recombinants among the Ura⁺ transformants for different spacing on 3'-hook

DNA fragment	Trp ⁺ His ⁻ /Ura ⁺	Frequency (%)
Original hook (80bp)	36/100	3.6
F1 (20 bp)	27/1000	2.7
MF1	9/1000	0.9
MF2*	0/1000	0.0
MF3*	3/1000	0.3
MF4	15/1000	1.5

종에서의 orthologue 유전자 분리가 가능하다는 것을 시사한 결과이다. 이러한 가능성을 확인하기 위하여 마우스의 single-copy 유전자인 *mHPRT*를 인간 게놈으로부터 *hHPRT* 유전자의 분리에 사용된 TAR vector를 사용하여 마우스 게놈으로부터 성공적으로 분리하였다(20). 이때 사용된 target 염기서열은 인간과 마우스 간에 약 85%의 상동성을 나타내었다. 이러한 연구결과는 orthologue 분리에 대한 TAR 클로닝의 유용성을 시사한 것이다(20). 그러나 이종간의 orthologue 분리하고자 할 때 알려진 종에서는 존재하지 않는 염기서열이 다른 종에서는 존재하는 경우가 있다. 이렇게 상동성 부분과 비상동성 부분이 같이 존재할 경우에는 target 영역 내의 상동성 뿐 아니라 비상동성 염기서열이 상동성 염기서열 사이에 어떻게 존재하는가도 클로닝의 성공에 중요한 요인으로 작용할 수 있다. 그러므로 본 연구에서는 상동성 염기서열 사이에 존재하는 비상동성 염기서열의 간격이 미치는 영향을 조사하였다.

본 연구에 사용된 상동성재조합에 영향을 미치는 target hook 내의 비상동성 염기서열의 간격과 크기는 Fig. 3 C에 보여주며, 이렇게 제작된 original fragment, F1 단편 그리고 target hook 내에 비상동성 간격을 넣어서 변형시킨 MF1~MF4 단편을 사용하여 Fig. 5와 동일한 과정으로 형질전환 실험을 수행하였다. 앞의 결과와 같이 MF1~MF4 단편을 이용한 경우에도 Ura⁺ 형질전환체를 이용하여 각 실험군 당 1000 개의 콜로니를 이용하여 positive colony(His⁺Trp⁺)를 조사하였다. 그 결과 20 bp와 80 bp의 3'-hook을 지닌 original fragment와 F1의 클로닝 빈도는 약 3%를 보여주었으나, 비상동성 염기서열을 내포하고 있는 MF1~MF4를 사용한 경우가 비상동성 염기서열을 갖지 않는 20 bp의 hook을 사용한 경우보다 낮은 빈도를 나타내었다. 이 결과는 비상동성 염기서열이 상동성 염기서열 사이에서 일어나는 상동성재조합을 방해하여 빈도의 감소를 나타낸 것으로 보인다. 특히 이러한 감소는 네 종류의 MF1~MF4를 사용한 실험에서 각각 다르게 나타나, 비상동성 염기서열의 존재가 상동성 염기서열의 간격을 유지시킨 단편들(correct spacing; MF1, 4)은 2~3 배(0.9~1.5%)의 감소만을 나타내었으나 간격이 달라진 단편들(incorrect spacing; MF2, 3)을 사용한 경우에는 10 배 이하(0~0.3%)의 현저한 감소를 나타내었다(Table 3).

이러한 본 연구의 결과들을 종합하면 TAR 클로닝 법을 이종간의 orthologue 분리에 매우 효과적으로 사용할 수 있으며, 클로닝의 효율은 단지 상동성 정도의 비교뿐 아니라 비상동성 염

기서열의 분포와 간격에도 영향을 받는다는 것을 시사한다.

감사의 글

이 논문은 2001학년도 동아대학교 학술연구비(공모과제) 지원에 의하여 연구되었음.

참고문헌

- Annab, L.A., N. Kouprina, G. Solomon, P.L. Cable, D.E. Hill, J.C. Barrett, V. Larionov, and C. A. Afshari. 2000. Isolation of a functional copy of the human *BRCA1* gene by transformation-associated recombination in yeast. *Gene* 250, 201-208.
- Berben, G., J. Dumont, V. Gilliquet, P.-A. Bolle and F. Hilger. 1991. The YDp plasmids: a uniform set of vectors bearing versatile gene disruption cassettes for *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 7, 475-477.
- 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, 806-812.
- Cancilla, M.R., K.M. Tainton, A.E. Barry, V. Larionov, N. Kouprina, M.A. Resnick, D. Dustart, and K.H.A. Choo. 1997. Direct Cloning of Human 10q25 Neocentromere DNA Using Transformation-Associated Recombination(TAR) in Yeast. *Genomics* 47, 399-404.
- Hua, S.-B., M. Qui, E. Chan, L. Zhu, and Y. Luo. 1997. Minimum Length of Sequence Homology Required for *in Vivo* Cloning by Homologous Recombination in Yeast. *Plasmid* 38, 91-96.
- Jinks-Robertson, S., M. Michelitch, and S. Ramchran. 1993. Substrate length requirements for efficient mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 13, 3937-3950.
- Kim, J.-H., S.-H. Leem, Y. Sunwoo, and N. Kouprina. 2003. Separation of long-range human *TERT* gene haplotypes by transformation-associated recombination cloning in yeast. *Oncogene*, 22, 2452-2456.
- Kim, J.-H., Y.-S. Shin, Y.-H. Yoon, H.-J. Jang, E.-A. Kim, K.-S. Kim, C.-N. Chung, I.-H. Park, S.-H. Leem, and Y. Sunwoo. 2003. Effect of GC content on target hook required for gene isolation by transformation-associated recombination cloning. *Kor. J. Microbiol.* 39, 128-134.
- Kouprina, N., L. Annab, J. Graves, C. Afshari, J.C. Barrett, M.A. Resnick, and V. Larionov. 1998. Functional copies of a human gene can be directly isolated by transformation-associated recombination cloning with a small 3' end target sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 4469-4474.
- Kouprina, N., M.R. Cancilla, J. Graves, M.A. Resnick, and V. Larionov. 1997. Specific isolation of human rDNA genes by TAR cloning. *Gene* 197, 269-276.
- Kouprina, N. and V. Larionov. 1999. Selective Isolation of mammalian Genes by TAR cloning, In *Current Protocols in Human Genetics*, UNIT 5.17, John Wiley & Sons, Inc.
- Larionov, V., N. Kouprina, J. Graves, X.-N. Chen, J. Korenberg, and M.A. Resnick. 1996a. Specific cloning of human DNA as yeast artificial chromosomes by transformation-associated recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 491-496.
- Larionov, V., N. Kouprina, J. Graves, and M.A. Resnick. 1996b. Highly selective isolation of human DNAs from rodent-human hybrid cells as circular yeast artificial chromosomes by transfor-

- mation-associated recombination cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 13925-13930.
14. Larionov, V., N. Kouprina, G. Solomon, J.C. Barrett, and M.A. Resnick. 1997. Direct isolation of human *BRCA2* gene by transformation-associated recombination in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 7384-7387.
 15. Leem, S.-H., J.A. Londono-Vallejo, J.-H. Kim, H. Bui, E. Tubacher, G. Solomon, J.-E. Park, I. Horikawa, N. Kouprina, J.C. Barrett, and V. Larionov. 2002. The human telomerase gene: complete genomic sequence and analysis of tandem repeat polymorphisms in intronic regions. *Oncogene*, 21, 769-777.
 16. Leem, S.-H., V.N. Noskov, J.-E. Park, S. I. Kim, V. Larionov, and N. Kouprina. 2003. Optimum conditions for selective isolation of genes from complex genomes by transformation-associated recombination cloning. *Nucleic Acid Research*, 31, e29.
 17. Ma, H., S. Kunes, P.J. Schatz, and D. Botstein. 1987. Plasmid construction by homologous recombination in yeast. *Gene* 58, 201-216.
 18. Neil, D.L., A. Villasante, R.B. Fisher, D. Vetric, B. Cox, and C. Tyler-Smith. 1990. Structural instability of human tandemly repeated DNA sequences cloned in yeast artificial chromosome vectors. *Nucleic Acids Res.* 18, 1421-1428.
 19. Noskov, V.N., M. Koriabine, G. Solomone, M. Randolph, J. C. Barrett, S.-H. Leem, L. Stubbs, N. Kouprina, and V. Larionov. 2002. Defining the minimal length of sequence homology required for selective gene isolation by TAR cloning. *Nucleic Acids Res.*, 29, e32.
 20. Noskov, V.N., S.-H. Leem, G. Solomone, M. Mullokandov, J.-Y. Chae, Y.-H. Yoon, Y.-S. Shin, N. Kouprina, and V. Larionov. 2003. A novel strategy for analysis of gene homologues and segmental genome duplications. *J. Mol. Evol.* 56, 702-710.
 21. Park, J.-E., Y.-J. Lee, Y.-H. Jeong, J.-W. Si. Kim, S. Kim, I.-H. Park, Y. Sunwoo, and S.-H. Leem. 2003. The utility of tar vectors used for selective gene isolation by TAR cloning. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 31, 322-328.
 22. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
 23. Sherman, F., G.R. Fink, and J.B. Hicks. 1986. *Methods in yeast genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
 24. Sikorski, R., and P. Philip. 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122, 19-27.
 25. Stinchomb, D.T., M. Thomas, I. Kelly, E. Selker, and R.W. Davis. 1980. Eukaryotic DNA Segments Capable of Autonomous Replication in Yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 4559-4563.
 26. Theis, J.F., and C.S. Newlon. 1997. The ARS309 chromosomal replicator of *Saccharomyces cerevisiae* depends on an exceptional ARS consensus sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 10786-10791

(Received August 22, 2005/Accepted October 24, 2005)

ABSTRACT : Effect of Non-homologous Spacing in Target DNA Sequence on the Frequency of Cloning Based Homologous Recombination

Jae-Woo Kim¹, Eun-Ju Do, Se-Lyun Yoon, Yun-Hee Jeong, Young-Ho Yoon, Sun-Hee Leem, Yangil Sunwoo, and In-Ho Park*. (Department of Biology, Dong-A University, ¹Department of Clinical Pathology, Dong-A University Hospital, Busan 604-714, Korea)

Transformation-Associated Recombination (TAR) cloning technique allows selective isolation of chromosomal regions and genes from complex genomes. The procedure requires knowledge of relatively small genomic sequences that reside adjacent to the chromosomal region of interest. This technique involves homologous recombination during yeast spheroplast transformation between genomic DNA and a TAR vector that has 5' and 3' gene targeting sequences. In this study, we examined the effect of non-homologous spacing sequence in target hooks on homologous recombination using a plasmid model system. The efficiency of homologous recombination between the modified *his3-TRP1-his3* fragments and *HIS3* gene on plasmid were analyzed by the characterization of Ura⁺ transformants. The numbers of Ura⁺ transformant showed same level when seven different modified *his3-TRP1-his3* fragments were used. But the percentage of positive recombinants, Trp⁺His⁻, dramatically decreased when used the modified *his3-TRP1-his3* fragments contained incorrect spacing of non-homologous region. As a result, we suggest that incorrect spacing inhibits the homologous recombination between target hook and substrate DNA. Therefore, we should consider the correct spacing in target hook when the target hook are used for cloning of orthologue gene.