

## TAR cloning 법에 의한 인간 및 마우스의 상동성 *HPRT* 유전자의 분리

도은주 · 김재우<sup>1</sup> · 정정남 · 박인호 · 임선희\*

동아대학교 자연과학대학 생물학과, <sup>1</sup>동아대학교병원 임상병리실

Received September 18, 2006 / Accepted October 11, 2006

**Isolation of Human and Mouse Orthologue *HPRT* Genes by Transformation-Associated Recombination (TAR) cloning.** Eun-Ju Do, Jae-Woo Kim<sup>1</sup>, Chung-Nam Chung, In-Ho Park and Sun-Hee Leem\*. *Department of Biology, Dong-A University, <sup>1</sup>Department of Clinical Pathology, Dong-A University Hospital, Busan 604-714, Korea* – The transformation-associated recombination (TAR) cloning technique allows selective isolation of chromosome regions or genes from complex genome. The procedure requires knowledge of relatively small genomic sequences that reside adjacent to the chromosome region of interest. This method involves homologous recombination during spheroplast transformation between genomic DNA and a TAR vector that has 5' and 3' gene targeting sequences (hooks). To examine whether TAR cloning can be applied to the isolation of gene homologues, we chose the *HPRT* genes from human and mouse genome. As results, the yield of positive clones for *HPRT* gene from human and mouse genome when using a TAR vector containing *mHPRT* hook or *hHPRT* hook was almost same level. Analysis of the gap regions in *mHPRT* revealed that they contain abnormalities that could result in instability of the sequences. In conclusion, we were able to use the TAR cloning technology to isolate gene homologue (orthologue) from nonidentical genome. Moreover, the use of the TAR cloning system may accelerate work on closing the remaining gaps in mammalian genome to achieve the goal of annotation of all mammalian genes.

**Key words** – TAR (Transformation-Associated Recombination) cloning, hypoxanthine phosphoribosyltransferase (*HPRT*) 1 gene, orthologue

고등생물 게놈 분석은 Mb (Mega-base) 단위의 DNA 단편까지 사용이 가능한 BAC (Bacterial Artificial Chromosomes), PAC (P1 Artificial Chromosomes) 그리고 YAC (Yeast Artificial Chromosomes) library의 개발에 의해 진전되었다 [2]. 그러나 이러한 library는 '종의 대표 예'로서 다형성 (polymorphism) 혹은 변이주에 대한 연구에 사용하기 위해서는 각 개체마다 게놈을 분리하여 각각에 대한 library를 제작하기는 어렵다. 현재 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 library를 제작하지 않고, 고등생물의 유전체 내에 존재하는 특정 유전자 혹은 염색체 내의 특정부분만을 Targeting 하는 것과 같이 분리하는 TAR (Transformation-Associated Recombination) cloning 법이 개발되었다. 이 방법을 사용하여 특정유전자를 포함한 클론을 분리하는 종래

의 방법으로 분리되지 않았던 다수의 중요한 유전자가 이 방법에 의해 분리되었다 [1,3,8-9,11-14].

TAR cloning을 시작하기 위해서는 분리하고자 하는 유전자 영역의 양쪽 말단 DNA 염기서열에 대한 정보가 필요하다. 먼저 vector의 양쪽 끝에 목적으로 하는 유전자 혹은 특정 염색체 부위의 끝 부분에 해당하는 염기배열을 증폭한 후, TAR vector [10]의 multi-cloning site에 삽입하여 vector를 제작한다. 이 TAR vector에 삽입된 염기배열 부분을 hook (targeting sequence: 표적배열)이라 하며, 이 부분은 형질전환과 더불어 일어나는 상동성재조합에 이용된다. TAR cloning 법에서 상동성 재조합에 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 [13]. *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. 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 개발되었

### \*Corresponding author

Tel : +82-51-200-5639, Fax : +82-51-200-7269

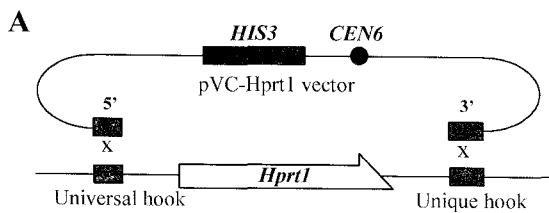
E-mail : shleem@daunet.donga.ac.kr

다[8](Fig. 1A). 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 이용하는 방법이다. *Alu* 등의 고빈도 반복 배열을 제 2의 hook으로 사용함으로써 3'-하류의 특이적 배열로부터 유전자의 5'-상류에 존재하는 몇 개의 다른 *Alu* 배열에 이르기까지 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[4,5]와 거의 유사하게 약 60 bp의 길이만으로도 cloning이 가능하게 되어[18], 목적 유전자의 매우 짧은 DNA 염기서열 정보만으로도 유전자 분리가 가능하게 되었다.

TAR cloning에서 가장 중요한 인자인 target hook은 cloning 과정에 중요한 homologous recombination에 작용하는 중요 인자로서 그 길이나 특성에 대해 많은 연구가 이루어졌다[6,7,20]. 또한 최근 활발히 진행 중인 많은 생물 종에 대한 비교 유전체(Comparative genomics) 연구에 대해 TAR

cloning 법의 적용이 가능한가를 조사하는 것도 매우 중요한 의미를 가진다. 그러므로 이러한 비교 유전체 연구에 TAR cloning 법의 유용성을 알아보기 위해 Target hook에 변이를 삽입하여 상동성에 따른 cloning 빈도를 조사하였다[19]. 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 cloning이 가능함을 밝혔다[19].

본 연구는 서로 다른 종에서 orthologue인 특정유전자를 분리하고자 할 때, 한 유전체의 계놈 정보를 지닌 target hook을 다른 종에서도 상호 적용될 수 있는가에 대하여 조사하였다. 먼저 인간의 *hHPRT* (human hypoxanthine phosphoribosyltransferase) 유전자 cloning에 사용된 hook을 마우스에 사용하여 마우스 *mHPRT* 유전자를 분리를 시도하였고, 반대로 마우스의 계놈 정보로 만들어진 target hook을 인간의 *hHPRT* 유전자 분리에 사용하였다. 그 결과, 이종 간의 hook과 동종의 hook을 사용한 경우에서 각각 유사한 cloning 빈도를 나타내었다. 또한 이 방법에 의해 cloning된 마우스의 *HPRT* (*Hprt1*)를 사용하여, 유전체 사업을 통해 염기서열이 결정되지 않고 gap으로 남아있던 부분의 염기서열을 결정하였다. 이 연구를 통해 비교유전체 연구에 이용될 수 있는 새로운 TAR cloning 기술의 도입 가능성과 DNA 염기서열 결정에 대한 문제를 지닌 영역의 특성에 대해 논의하고자 한다.



**B**

TAR vector	5'-Universal Hook	3'-Unique Hook
<i>hHPRT</i> + <i>Alu</i>	<i>Alu</i>	<i>hHPRT</i>
<i>mHPRT</i> + <i>Alu</i>	<i>Alu</i>	<i>mHPRT</i>
<i>hHPRT</i> + B1	B1	<i>hHPRT</i>
<i>mHPRT</i> + B1	B1	<i>mHPRT</i>

Fig. 1. Scheme of isolation of the *HPRT* gene as circular YACs using four different types of TAR cloning vector. (A) Isolation of the *HPRT* gene by a TAR vector containing a human or mouse *HPRT*-specific hook and repeat hook. (B) Construction for isolation of the *HPRT* gene as a series of circular YACs using a TAR cloning vector containing 3'-*HPRT* sequence and an *Alu*/B1 repeat. A set of TAR vectors with targeting sequences of homologous to the 3'-end of *HPRT* gene (93 bp from human or 96 bp from mouse) was constructed. Each vector contains a 182 bp *Alu* repeat or 130 bp B1 repeat as a second targeting sequence. Vectors were linearized with *Eco*R1 restriction enzyme before transforming.

### 재료 및 방법

#### 사용 균주 및 plasmid DNA

본 실험에 사용된 출아효모 *Saccharomyces cerevisiae*는 VL6-48 균주(*Mata his3-Δ200 trp1-Δ1 ura3-52 ade2-101 met14*) 이고[10], DNA 증폭에 사용된 대장균의 균주는 DH10B (*F<sup>-</sup> mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80dlacZDM15 ΔlacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galKX<sup>-</sup> rpsL nupG*) 를 사용하였다. 기본 TAR vector로 사용되는 pVC604 (Fig. 1A)는 *HIS3* 선택마커를 지니며, 이는 Bluescript 유래의 yeast-*E. coli* shuttle vector인 pRS313[10]으로부터 만들어졌다. 인간 계놈 DNA로부터 *hHPRT* 유전자의 분리와 마우스 계놈으로부터 *mHPRT* (*Hprt1*) 분리를 위한 총 4 종류의 TAR vector는 Fig. 1B에서 보여주는 것과 같이 여러 종류의 hook을 제작하여 TAR vector의 multi-cloning site에 삽입하였다.

#### 배지 및 배양조건

효모 및 대장균을 이용한 유전학적 방법은 Sambrook *et al.*[18] 및 Sherman *et al.*[22] 방법을 사용하였다. 대장균 DH5a의 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-His 배지는 1 L에 28 g의 Ground His minus Powder Mixture (0.67% yeast nitrogen base, 2% glucose, Adenine sulfate 3.0 g, L-Arginine · HCl 2.5 g, L-aspartic acid 3.75 g, L-glutamic acid 5.0 g, L-isoleucine 2.5 g, L-leucine 5.0 g, L-lysine · HCl 6.0 g, L-methionine 1.0 g, L-phenylalanine 2.5 g, L-serine 18.75 g, L-threonine 5.0 g, L-tryptophan 2.5 g, L-tyrosine 2.5 g, uracil 3.0 g, L-valine 7.5 g)과 형질전환체의 안정성을 위해 1 M sorbitol을 첨가하고 20 g의 Bacto agar (Difco)를 첨가하여 사용하였다. Top agar Sor-His 배지는 1 L에 28 g의 Ground His minus Powder Mixture, 1 M Sorbitol, 그리고 30 g의 Bacto agar (Difco)를 넣어 사용하였다. SD-His 배지는 1 L에 28 g의 Ground His minus Powder Mixture와 2% Bacto agar를 넣어 사용하였다.

**TAR vector 및 hook 제작**

TAR cloning에 사용되는 기본 TAR vector는 pVC604 vector에 제한 효소 인식자리인 Multi-cloning site에 3'-unique hook으로 사용될 DNA 단편을 PCR로 증폭하여 BamHI-XbaI 자리에 삽입하였다. 본 실험에 사용된 TAR vector 4종류는 모두 radial vector로서 인간의 hHPRT 유전자 혹은 마우스의 mHPRT의 3' 염기서열을 지닌 3'-hook으로 삽입되었다(Fig. 1, Table 1). 또한 5'-Universal hook으로는 인간게놈에서 사용될 때는 Alu 반복서열을 사용하였고, 마우스 게놈을 사용할 경우에는 B1 반복서열을 사용하여 ApaI-XhoI 자리에 삽입하였다(Fig. 1, Table 1). 이렇게 만들

어진 TAR vector를 TAR cloning에 사용할 때는 이들 vector를 제한효소 EcoRI으로 처리하여 직선상의 vector로 만들어 사용하였다.

**Yeast spheroplast transformation**

Spheroplast competent cell을 제작하기 위해 50 ml의 YPD 액체배지에 효모 균주를 접종한 후 30°C에서 하룻밤 배양하여, O.D<sub>600</sub>=1.3~1.4에서 균주를 집균하고, 20 ml의 1 M sorbitol로 혼탁하여 4°C에 30분간 방치하였다. 현탁액을 3000 rpm, 4°C에서 5분간 원심 분리하여 집균한 후, 20 ml의 SPEM용액(1 M sorbitol, 10 mM 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% SDS에 1/10로 넣어 O.D<sub>600</sub> 값을 측정하여 1 M sorbitol/2% SDS 값이 3~5 배가 되도록 하였다. Zymolyase 처리가 끝난 세포를 1500 rpm, 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 CaCl<sub>2</sub>)으로 현탁하였다. 15 ml의 Falcon tube에 직선상의 1 µg의 TAR vector와 2 µg의 genomic DNA를 미리 준비하여, spheroplasts 현탁액 450 µl를 넣어 가볍게 섞은 후 실온에 10분 방치한 후, 5 ml의 PEG용액(20% PEG8000, 10 mM Tris · Cl pH 7.5, 10 mM CaCl<sub>2</sub>)을 넣고 tube inverting 하여 가볍게 섞고 실온에서 10분간 방치하였다. 1,500 rpm에서 5분간 원심분리하여 집균한 후, 상층액을 조심스럽게 제거하고 1 ml의 SOS (1 M sorbitol, 6.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.25% Yeast extract, 0.5% Bacto peptone) 용액에 현탁하여 30°C에

Table 1. Targeting hook sequences for construction of TAR vectors

Hook	Sequences
B1-Universal Hook	GGGCATGGTGGCGCACGCCTTTAATCCCAGCACTTGGGAGGC AGAGGCAGGCGGATTTCTGAGTTCGAAGCCAGCCTGGTCTA CAGAGTGAGTTCAGGACAGCCAGGGGCTACACAGAGAAACC CTGT
Alu-Universal Hook	GTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTATCCTGCAGC CCGGGGATCCTTTGAGACGGAGTTTCGCTCTTGTGGCCAG GCTGGAGTGCAATGGTGTGATCTCGGCTCACTGCAACATCTG CCTCCCGGGTTCAAGCGATTCTCCTGCCTCAGCCTCAGGAGT AGCTGGGGCTACAG
hHPRT 3'-Unique Hook	TGTTCTAGTTCTGTGGCCATCTGCTTAGTAGAGCTTTTGGCA TGTATCTTCTAAGAATTTTATCTGTTTTATATTTTAGAAATG TCAGTTGCTGC
mHPRT 3'-Unique Hook	TGTTCTAGTCTGTGGCCATCTGCTTAGTAAAGCTTTTGGCA TGAACCTTCTATGAATGTTACTGTTTTATTTTAGAAATGTC AGTTGCTGGCTC

서 1시간 배양하였다. 이때 TOP agar Sor-His를 녹여 glass test tube에 8 ml씩 분주하여 50℃에 둔다. 위의 배양액을 Top Agar에 조심스럽게 섞어 넣은 후, Sor-His plate에 조심스럽게 붓고, plate가 굳게 되면 30℃에서 3~4일간 배양하였다[10,15].

**Positive clone의 확인**

SD-His plate에 나온 형질전환체를 이주시개를 이용하여 한 plate 당 30 개의 colony를 patch하였다. 2~3일 동안 30℃에서 배양 후 다시 SD-His plate에 replica하여 복제본을 만들어 이를 primary gene pool로서 30℃에서 2 일간 배양하였다. primary gene pool로 복제된 plate에서 자란 세포들을 5 ml의 물로 배지 표면을 씻어 15 ml의 Falcon tube에 넣은 후 집균하였다. 집균된 균주에서 zymolyase를 사용하여 효모의 DNA를 추출하였다[19]. 추출된 DNA를 400 μl의 TE buffer에 녹인 후, 이 중 1 μl를 PCR 반응에 사용하였다. positive 확인용 PCR에 이용된 영역은 사용한 TAR vector에는 존재하지 않으나, 재조합에 의해 hHPRT 유전자의 양말단과 연결되어 분리된다면 그 내부에 존재할 hHPRT 유전자의 exon9 부분에 해당한다(Table 2). 이 primary gene pool을 이용하여 먼저 PCR로 클론이 되었는지를 확인한 후, positive PCR 밴드가 확인되면 이로부터 각각의 colony를 사용하여

두 번째 colony PCR을 수행하여 확인하였다. 이러한 확인 후 각 클론의 DNA를 분리하여 HPRT gene의 나머지 모든 exon 영역에 대해 PCR을 수행하였다(Table 2). PCR 반응은 9700 Thermocycler (Perkin-Elmer)를 사용하여 94℃, 2 분간 1 cycle, 그리고 94℃, 30초→ 58℃, 30초→ 68℃, 1분의 반응을 30 cycles 반응시킨 후, 72℃에서 10분 1 cycle의 연장 반응을 수행하였다. PCR 산물은 2%의 SeaKem GTG agarose gel을 사용하여 전기영동을 통하여 확인하였다(Fig. 2).

**CHEF gel을 이용한 삽입된 HPRT 영역의 크기 확인**

본 실험을 통해 인간 및 마우스의 계통에서 분리한 positive 클론의 크기를 조사하기 위하여, PCR 방법으로 positive로 확인된 효모의 형질전환체로부터 YAC DNA를 분리하여[16], NotI 효소로 처리한 후 CHEF gel electrophoresis를 수행하였다. 각 클론에 삽입된 계통 DNA의 크기는 mHPRT 특이적인 exon9 영역을 probe로 사용하여 southern blotting[21]하여 확인하였다(Fig. 2).

**결과 및 고찰**

**TAR cloning 법에 의한 상동성 유전자의 분리**

TAR cloning 법이 비교 유전체 연구에 유용한가를 확인

Table 2. Primers used in this study for detection of mHPRT positive

Primers	Annealing temperature	Product size
mHPRT-ex1 F (21 bp) : GGCAGCGTTTCTGAGCCATTG mHPRT-ex1 R (18 bp) : GGGCCTCGGGAGCCTCAG	68℃	257 bp
mHPRT-ex2 F (26 bp) : CATACCCTCTGTAGCTAAATTCCTC mHPRT-ex2 R (26 bp) : AAAAATAACTTCAATCGAGGTCTTAC	60℃	250 bp
mHPRT-ex3 F (25 bp) : GCTCGAGATGTCATGAAGGAGATGG mHPRT-ex3 R (26 bp) : CACAGTAGCTCTTCAGTCTGATAAAA	63℃	172 bp
mHPRT-ex4 F (22 bp) AATGATCAGTCAACGGGGGACA mHPRT-ex4 R (27 bp) AGTACCTCTAAGTAAGTGGTTGAAAGC	63℃	150 bp
mHPRT-ex5 F (22 bp) TTGGGAATACTGTCTCACTTCA mHPRT-ex5 R (20 bp) CAAGCGCCCCGACTTACCT	63℃	158 bp
mHPRT-ex6 F (20 bp) CAAACTTTGCTTCCCTGGT mHPRT-ex6 R (27 bp) AAACGAAAGCTGAAAAAGCATGTCTCC	63℃	150 bp
mHPRT-ex7 F (20 bp) TGGGTCTGCGAAGCTGTCCT mHPRT-ex7 R (23 bp) TCGAGAGTCCCTTTTCACCAGCA	68℃	145 bp
mHPRT-ex8 F (20 bp) TGT TGT TGG ATA TGC CCT TG mHPRT-ex8 R (20 bp) GGT GCT GGA AGG AGA AAA CA	60℃	141 bp
mHPRT-ex9 F (27 bp) CACGTTTGTGTCAATTAGTGAALACTGGA mHPRT-ex9 R (25 bp) GGGAAAATACAGCCAACACTGCTGA	68℃	532 bp

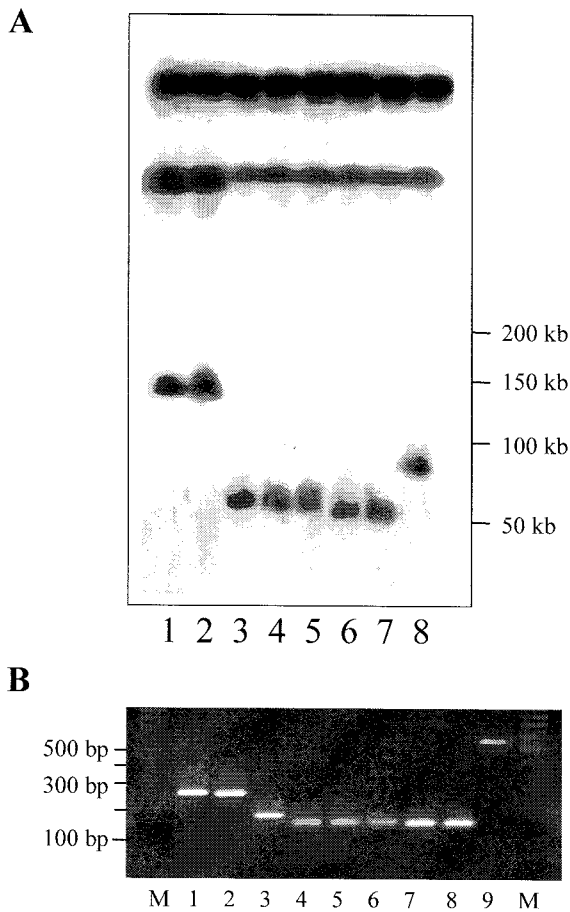


Fig. 2. Electrophoretic profile of positive *mHPRT* YAC clones. (A) YAC DNA was isolated from the *mHPRT*+B1 positive clones (lane 1-4) and *hHPRT*+B1 (lane 5-8), digested by *NotI*, separated by CHEF, and hybridized with an mouse exon9 probe. (B) PCR analysis of the one of the positive clone containing *mHPRT* gene. Presence of the entire *mHPRT* gene in the YAC clone was confirmed by PCR with primer pairs specific for 9 *mHPRT* exons. Lanes are indicated as follows: M, 100 bp size marker; 1-9, PCR products from exon1 to exon9.

하기 위하여, 플라스미드 모델이 아닌 유전체 내에 존재하는 single-copy 유전자를 선별하였다. 본 실험에 사용된 인간 및 마우스의 *HPRT* 유전자는 유전체 프로젝트에 의해 *Canis familiaris*(개), *Rattus norvegicus*(시궁쥐), *Gallus gallus*(오골계), *Caenorhabditis elegans*(꼬마선충), *Plasmodium falciparum* 3D7 (말라리아)에서 상동성 유전자가 분리되어 그 염기서열이 결정되었다(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=homologene>). 이러한 염기서열을 기초로 상동성 *HPRT* 유전자를 인간에서 말라리아에 이르기까지 분석하여 보면, 아미노산 수준과 DNA 염기서열에 있어서 매우 높은 상동성을 나타낸다. 인간과 개를 비교하였을 때 아미노산 수준에서 96.8%, nucleotide 수준에서 95.7%의

상동성을 나타내고, 인간과 마우스는 아미노산 수준에서 96.3%, nucleotide 수준에서 93.3% 그리고 말라리아와의 비교에서도 아미노산 수준에서 50.2%, nucleotide 수준에서 57.6%의 매우 높은 상동성을 나타내었다. 이렇게 높은 수치의 상동성을 보여주는 유전자들은 *HPRT* 유전자와 같이 생물체의 기능에 필수적으로 매우 중요한 기능을 갖는 것들로서, 서로 다른 이종 간의 유전체에서도 매우 높은 비율로 보존되어 있으리라 사료된다. 그러므로 이 *HPRT* 유전자를 모델로 인간과 마우스 계놈에서 상호의 염기서열을 사용하여 유전자의 분리빈도를 조사하여, orthologue 유전자의 분리빈도를 조사하였다.

본 실험에서는 먼저 TAR vector의 구축을 위하여 single-copy 유전자인 *HPRT*를 이용하여 96 bp의 마우스 유래의 3'-Unique hook과 인간 유래의 93 bp의 3'-Unique hook을 각각 제작하였다(Fig. 1, Table 1). 네 종류의 TAR vector 중 *hHPRT*+*Alu*와 *mHPRT*+*Alu*는 인간 *hHPRT* 유전자를 분리하는데 사용하였고, *hHPRT*+B1과 *mHPRT*+B1는 마우스 *mHPRT* 유전자를 분리하는데 사용하였다. 각 TAR vector를 사용하여 얻은 형질전환체 수는 plate 당 약 400 개로 vector 간의 형질전환 빈도의 차이는 크게 나타나지 않았다. 네 종류의 vector를 이용하여 얻어진 형질전환체 중 각각 2,500~3,900 개의 형질전환체에 대하여, 각 exon 영역의 primer (Table 2)를 이용하여 각각의 positive clone을 확인하였다.

*hHPRT*+*Alu*와 *mHPRT*+*Alu*의 vector와 인간 계놈 DNA를 이용하여 *hHPRT* 분리 빈도를 비교한 결과, 인간의 hook 정보를 이용한 *hHPRT*+*Alu*와에서는 총 2,500 형질전환체 중에 10개의 positive를 분리하여 0.4%를 나타내었고, *mHPRT*+*Alu*를 사용한 경우에도 총 3,900 형질전환체 중에서 13개의 positive를 얻어 0.33%를 나타내었다(Table 3). 이러한 분리 빈도는 이종 간의 유전체의 차이에도 불구하고 유사한 빈도를 보여준다. 또한 반대로 마우스 계놈에서 *hHPRT*+B1와 *mHPRT*+B1를 비교분석한 결과에서도 각각 0.3%(7/2,500, 8/2,700)를 나타내어 이종간의 상동성 *HPRT* 유전자를 분리하는 데에는 두 종의 hook이 상호 사용될 수 있음을 시사한다. 그러므로, 이 결과는 기존에 알고 있는 유전자 염기서열 정보를 이용하여 미지의 다른 종으로부터 상동성 유전자의 분리에 효과적으로 사용될 수 있을 가능성을 보여준다. 그러

Table 3. Yield of *HPRT*-positive clones from mouse and human genomic DNAs

Vector	Genomic DNA	Yield of Positive clones
<i>hHPRT</i> + <i>Alu</i>	Human	10/2500 (0.40%)
<i>mHPRT</i> + <i>Alu</i>	Human	13/3900 (0.33%)
<i>hHPRT</i> + B1	Mouse	7/2500 (0.30%)
<i>mHPRT</i> + B1	Mouse	8/2700 (0.30%)

므로 본 연구 결과는 비교유전체학 연구에 있어서 좋은 도구로 TAR cloning 기술이 이용될 수 있을 가능성을 시사한다.

**완전한 크기의 mHPRT 유전자의 확인**

본 실험을 통하여 얻어진 positive clone들은 주로 내부에 존재하는 exon의 유무를 조사하여 목적 유전자의 분리 가능성 여부를 확인하였다. 이전의 연구에서 hHPRT radial TAR vector를 통하여 얻어진 클론에 대하여 분리된 YAC DNA의 크기가 다양하게 나타나, Alu-Universal hook을 사용한 경우 다양한 크기의 클론이 분리될 수 있음이 보고되었다[8]. 이는 게놈 전반적으로 산재한 반복서열과 random하게 Universal hook이 재조합이 일어남을 보여주는 것으로 인간의 Alu 반복서열을 이용하여 확인되었다.

본 실험에서는 마우스의 B1-Universal hook을 이용한 것으로 이에 대한 확인을 수행하였다(Fig. 2A). mHPRT+B1이 삽입된 TAR vector를 사용하여 얻은 8개 클론 중 4개 클론 (lane 1-4, Fig. 2B)과 hHPRT+B1을 사용하여 얻은 7개 클론 중 4개(lane 5-8, Fig. 2B)를 사용하여 삽입된 크기를 먼저 조사하였다. Fig. 2A에서 보여주는 것과 같이 8개의 YAC 클론 모두에서 mHPRT 유전자 전체 크기에 해당되는 40 kb 이상의 크기를 나타내었다. 이와 더불어 각 positive 클론들이 유전자 내부에서 결손 등을 나타내지 않고 완전한 크기의 유전

자를 포함하고 있는가를 조사하기 위하여 mHPRT 내의 존재하는 9개의 exon에 대해 Table 2에서 나타낸 primers를 사용하여, 각각 exon1에서 exon9 영역에 대해 PCR을 수행하여 전체 exon 영역이 존재함을 확인하였다(Fig. 2B).

이러한 결과는 TAR cloning 법으로 얻은 각 positive clone들이 40 Kb 이상의 크기를 갖는 동시에 9개의 전체 exon 영역을 지니고 있음을 확인된 것으로, 이 방법이 매우 효과적으로 유전자를 분리해낼 수 있음을 보여준다. 이는 기존의 복잡한 library 제작 방법과는 달리, 전체 크기의 목적 유전자를 전체 게놈으로부터 빠르고 정확히 분리될 수 있음을 보여주는 좋은 예이다. 그러므로 이 결과는 다른 종의 유전정보를 이용한 TAR cloning법으로 이종 간의 orthologue 유전자 분리가 정확하고 효과적으로 수행될 수 있음을 보여 주며, 나아가 이 방법으로 한 종에서 여러 개 존재하는 상동 유전자인 paralogue의 분리에도 사용될 수 있음을 시사한다.

**mHPRT 유전자 내부에 존재하는 두 개의 sequencing gap의 특성**

mHPRT 유전자에 대하여 mouse genome project를 통해 염기서열을 조사한 결과, 유전자 내부의 intron2와 intron3 영역에서 두 개의 염기서열이 결정되지 않은 작은 Gap을 확인하였다(mouse hprt public, gi20983873; NM\_013556

Table 4. Analysis of Gap sequences in mouse Hpirt1 gene

Gap (Accession number)	Closed seq	Sequences	GC (%)	Character
Gap1 (AY302564)	256 bp	GAAGCATATGTATTCCAGGATGTCAGAATTGTG ATGGATTCCTCGGAAGTGGAGTTACAGACCA GTGAACCACTGTGTATGGGTGCTGGGAAGTGA CTTTAGTCTCTGCAAAAACAGTAAGGATCTT AACTGATAAACTATCTTTCTAGCCCTAAGGCTT TCTACTTTTAAAGTTCTGTTCTCTTTCTCTCTC TCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT CTCCCTCCCTCCTCCTCCTCCTCCT	44.9	CT repeats
Gap2 (AY302565)	644 bp	GCTGCCCGCGGGCCCTCGCCCCCGCGGCCCGC GGCACCCAGTCCGGCCCCCTCACCACCCGG CCTGGCCGGGCCCTGGCCCCCGCCGCACCCC CAGCGCCCCGGCCCCCAGCTAGCGGCGGCGG CGTGGTGGCCCAACGCGGCGTGTCTAATTGGA GCAGGAGGCCTGCGCCAGGCCATGTGACGGTGC TCACAGCAAAAGCGGTAGTGGCAGGTGCCACAG CAGAAACGGTAGGAACCGGTGCTCCAGTTGAAG GTGGCTTCGTAAGTGGCCATGACATCGTAGTAC CCGTGGCAGAGCTCGGCGGGAGGGGGCGCCCGG GCCGCCCGCCCGCCCCCGCCCGGGGGCGGTC CTGGTCCGTTGGCCCTGGGCTCGCCGCGCCC CCGCCCGCGTCAGCGCCCCGGTCAGGCGCCGC AGGTGCGCCAGCAGGGCGGGCAGCGGCCCGCG GGCTCGGCGCTCGTGGCGTTGGACGGGCGCGCC CTGGCCTGGCCGGCGCTAGAGCCAGGAGTACG AGGAGCAGGAGGGCCGGCATGGGGCTGCGAGGG GGTGCAGTGGGCGCCAGGCTGCGGGGAGAAC GAGAGCAGAGGTTGACGCGCTGGGCGGGAGAGA AACGGTCAGAGGGTGAG	76.4	High GC contents

range=chrX:39557221-39590617 Public). 이에 대해 본 실험에서 분리된 positive clone을 이용하여 PCR 방법으로 gap 영역을 증폭하여, 각 gap 영역에 대한 DNA 염기서열이 결정하였다. 그 결과, Gap1은 intron2에 존재하며 크기가 256 bp이며, Gap2는 intron3에 존재하며 그 크기가 644 bp로 밝혀졌다(Table 4). 이 영역에 대해 본 연구 그룹이 GenBank (NCBI)에 등록하여 각각 AY302564, AY302565의 accession 번호를 획득하였다.

이 gap 부분의 DNA 특성을 조사하여 DNA sequencing에 있어 gap으로 남는 영역의 특성을 조사한 결과, Table 4에서 보여주는 것과 같이 Gap1은 CT repeat의 반복서열이 길게 존재하고, Gap2 영역은 GC contents가 76.4%로 매우 높게 나타내 DNA 염기서열 결정에 문제를 나타내는 영역으로 보인다. 이러한 결과는 앞서 본 연구팀에 의해서 보고된 연구와 일치하는 것으로[16,17], 높은 반복서열이나 높은 GC content의 존재는 대장균 내에서 만들어진 library 제작과정에서 재배열이 일어나거나 불안정한 요인으로 작용하며, 또한 DNA sequencing 반응과정에 어려움의 요인으로 사료된다. 그러므로 TAR cloning과 같이 library 제작이 필요 없는 경우에는 이러한 재배열이 일어나지 않게 되어 특정부분의 염기서열이 보존될 수 있다.

본 연구의 결과들을 종합하면 유전체 연구의 새로운 기술인 TAR cloning 법은 이종 간의 orthologue 분리에 매우 효과적으로 사용할 수 있으며, 나아가 이 기술은 동종간의 gene duplication이나 paralogue의 분리에도 이용될 수 있을 가능성을 시사한다. 또한 염기서열의 결정에 어려워 gap으로 남게 된 DNA 염기서열의 특성(Table 4)을 밝혀, 반복서열과 높은 GC contents가 유전체 연구의 염기서열 완성에 어려운 요소로 확인되어 이에 대한 방법으로도 TAR cloning 법의 효용성이 제기된다.

## 요 약

TAR (Transformation-Associated Recombination) cloning 법은 복잡한 고등생물의 게놈으로부터 유전자나 특정 염색체 부위를 선별적 분리를 가능하게 한다. 이 방법은 목적으로 하는 염색체 부위의 주변에 존재하는 비교적 짧은 게놈 염기서열에 대한 정보를 필요로 한다. 이 기술은 출아효모의 spheroplasts 형질전환 동안 목적 유전자를 포함한 게놈 DNA와 그 유전자의 5' 또는 3' 말단 서열 (hook)을 포함하고 있는 TAR vector 사이에 일어나는 상동성 재조합에 의해 이루어진다. 본 연구에서는 TAR cloning 법을 상동성 유전자의 분리에 사용할 수 있는가를 조사하기 위해, 인간과 마우스 게놈의 *HPRT* 유전자를 선택하였다. 그 결과, 인간과 마우스의 게놈으로부터의 *HPRT* 유전자의 분리 빈도는 TAR vector로서 *hHPRT* hook 혹은 *mHPRT* hook을 사용한 경우

에 거의 동일하게 나타났다. 또한 *mHPRT* 유전자의 gap 부분의 염기서열을 결정하여, 이 부분에 염기서열의 불안정의 요인이 되는 비정상적 특성을 발견하였다. 결론적으로 TAR cloning법을 이용하여 다른 이종 간의 게놈으로부터 상동성 유전자 즉 orthologue의 분리가 가능하였다. 더욱이 TAR cloning 시스템을 이용하여 고등동물 게놈 상에 남아있는 gap 부분을 매움으로서 고등동물의 모든 유전자들의 확인이 가속화될 수 있을 것으로 사료된다.

## 감사의 글

이 논문은 2004학년도 동아대학교 학술연구비(공모과제) 지원에 의하여 연구되었음.

## 참 고 문 헌

1. Annab, L. A., N. Kouprina, G. Solomon, P. L. Cable, D. E. Hill, J. C. Barrett, V. Laronov 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.
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**, 806-812.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
  11. 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.
  12. 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 transformation-associated recombination cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 13925-13930.
  13. 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.
  14. 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.
  15. 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.
  16. Leem, S.-H., N. Kouprina, J. Grimwood, J.-H. Kim, M. Mullokandov, Y.-H. Yoon, J.-Y. Chae, J. Morgan, S. Lucas, P. Richardson, C. Detter, T. Glavina, E. Rubin, J. C. Barrett and V. Larionov. 2004. Closing the Gaps on Human Chromosome 19 Revealed Genes with a High Density of Repetitive Tandemly Arrayed Elements. *Genome Research*, **14**, 239-246.
  17. 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.
  18. 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.
  19. 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.
  20. 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.
  21. 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.
  22. Sherman, F., G. R. Fink and J. B. Hicks. 1986. *Methods in yeast genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.