

# TALEN Constructs and Validation for Targeting of SETDB1 Genomic DNA

Hee-Jung Noh<sup>1</sup>, Yoonsung Kang<sup>2</sup> and Keun-Cheol Kim<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biological Sciences, College of Natural Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

<sup>2</sup>Eudipia Inc., Cheongju 361-951, Korea

Received September 1, 2014 / Revised October 9, 2014 / Accepted December 4, 2014

TALEN is a newly developed gene engineering method to knock out specific genes. It contains a DNA binding domain and a Fok1 nuclease domain in the TALEN plasmid. Therefore, the engineered TALEN construct can bind to any region of genomic DNA and cut the target nucleotide, thereby inducing mutation. In this study, we constructed two TALEN constructs targeted to a protein initiation codon (DBEX2) or the 25th upstream region (DBPR25) to enable mRNA synthesis of SETDB1 HMTase. We performed the TALEN cloning in two steps. The first step was from module vectors to pFUS array vectors. We confirmed successful cloning with a colony PCR experiment and Esp31 restriction enzyme digestion, which resulted in a smear band and a 1 Kb insert band, respectively. The second step of the cloning was from a pFUS array vector to a mammalian TALEN expression vector. The engineered TALEN construct was sequenced with specific primers in an expression vector. As expected, a specific array from the module vectors was shown in the sequencing analysis. The specific module sequences were regularly arrayed in every 100 bp, and SETDB1 expression totally disappeared in the TALEN-DBEX2 transfection. PCR amplification targeting of DBEX2 was performed, and the PCR product was digested with a T7E1 restriction enzyme. The expression of SETDB1 was down-regulated in the TALEN-DBPR25 transfection. Morphological changes were also observed in the two TALEN constructs with transfected HeLa cells. These results suggest that the engineered TALEN constructs in two strategic approaches are very useful to knock-out of the SETDB1 gene and to study gene function.

**Key words** : DBEX2, DBPR25, knock-out, SETDB1, TALEN

## 서 론

유전자의 인위적인 발현 조절은 세포수준에서 형태적인 변화, 또는 세포이동 능력의 변화 등과 같은 표현형 분석이 가능할 뿐 아니라, 분자적인 수준에서 유전자 발현의 변화, 신호전달체계의 변화에 대한 분석을 할 수 있다[6]. 이러한 분자생물학적 접근방법은 유전자를 과발현 시키거나, 또는 인위적으로 억제할 수 있는 클로닝 기술이 필수적이다. 특히 유전자를 제거하기 위해서는 genomic DNA 수준에서 상동 재조합 기법이 이용되거나, 또는 전사된 mRNA 에 결합하는 발현을 억제하는 miRNA, siRNA 등을 이용한 방법들이 세포 또는 동물 들을 대상으로 이용되고 있다[5, 7].

효소가위라고 일컬어지는 TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases) 은 유전자 제거를 위한 새로운 형태의 클로닝 방법이다[3]. TALEN 플라스미드에는 DNA

결합과 관련된 TAL effector domain과 DNA 절단을 위한 Fok1 nuclease 가 융합되어 있다[4]. 특히 TALEN 플라스미드 내의 TAL effector domain 에는 DNA 내의 어떤 서열에도 결합할 수 있는 클로닝 부위가 있어 genomic DNA 중 원하는 특정서열에 결합할 수 있다. 이를 위해 TALEN 플라스미드 세트에는 DNA내의 A, G, T, C 각각 염기서열에 결합할 수 있는 다양한 모듈벡터(pNI=A, pHD=C, pNG=T, pNN=G, 또는 A)들을 포함하고 있기 때문에, 원하는 표적부위에 모듈벡터들을 배열하면 genomic DNA의 어떤 부위에도 결합 할 수 있다. 특정부위에 결합한 TALEN 은 Fok1 nuclease 활성이 결합 되어 있으며, 표적 부위 근처에서 심각한 DNA 절단을 유도할 수 있다[1]. 표적 DNA부위에서 발생한 절단으로 인해 수복 기작이 작동되지만, NHEJ (nonhomologous end joining) 등과 같은 원래의 상태로 DNA 염기서열이 돌아올 수 없는 수복 기작이 작동하기 때문에 DNA 의 돌연변이 등이 발생하게 된다. 그러므로 TALEN 클로닝은 표적에 필요한 인위적인 단백질을 합성하고, 해당부위의 DNA 절단을 유도할 수 있기 때문에 genomic DNA 내의 프로모터, ORF, enhancer 등 어떤 부위라도 유전자 제거를 유도할 수 있는 강력한 기술이다[12].

그러나 성공적인 TALEN 클로닝을 위하여 표적유전자의 genomic DNA 구조와 염기서열 분석이 반드시 필요하며, 효율적인 TALEN construct 를 선정하기 위해서는 해당 염기서

### \*Corresponding author

Tel : +82-33-250-8532, Fax : +82-33-259-5665

E-mail : kckim@kangwon.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

열 중 어느 부위를 표적해야 효율을 높일 수 있는지에 대한 경험적인 판단들이 필요하다[8]. 본 연구에서는 H3K9me3 HMTase 인 SETDB1 유전자를 대상으로 genomic DNA 의 구조를 면밀히 분석하여 프로모터 또는 ORF를 표적 하는 TALEN 클로닝을 수행하였고, SETDB1 유전자에 대한 발현 조절 효과를 비교 검증하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 생물정보학 프로그램

Ensembl ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)) 프로그램을 이용하여 SETDB1 유전자의 genomic DNA내의 프로모터, ORF, 엑손-인트론 구조 서열을 분석하였다. TALEN construct의 제작은 Cornell 대학에서 운영하는 TAL Effector Nucleotide Targeter 2.0 (<https://tale-nt.cac.cornell.edu/>) 프로그램을 이용하여 표적 부위를 선정 한 후 모듈벡터들의 배열 정보를 얻었다. 모듈벡터를 포함하는 TALEN 플라스미드들은 미국 Origene 사로부터 구입하였다.

### TALEN construct 제조

TALEN 의 표적서열에 결합할 수 있는 모듈벡터를 결정 한 후 pFusA 와 pFusB 배열벡터로 클로닝을 수행하였다. 각각의 모듈벡터(150 ng)과 pFus (150 ng)를 1 µl 씩 튜브에 넣고 Bsal 제한효소 1 µl, T4 DNA ligase 1 µl, 10X T4 DNA ligase buffer 2 µl, 증류수를 같이 넣은 후 37°C 5분, 16°C 10분을 10회 반복 반응 후, 50°C 5분, 80°C 5분간 효소 불활성화를 유도시켰다. 10 mM ATP 1 µl, plasmid-safe nuclease 1 µl, 10X plasmid-safe buffer 2.2 µl을 넣고 37°C 1시간 반응시켜 형질전환에 이용하였다. 클로닝을 통해 얻어진 배열벡터들은 다시 TALEN 발현 벡터로 삽입하였다. TALEN 발현벡터는 pCDNA-FLAG 에 TALEN 클로닝 부위를 넣어 제작되었다. 150 ng (pFusA + pFusB + pLR) + 110 ng (TALEN 발현벡터) 를 한 튜브에 넣은 뒤 Esp31 제한효소 1 µl, 10X Tango buffer 3 µl, T4 DNA ligase 1 µl, 10X T4 DNA ligase buffer 3 µl, 증류수를 넣고 37°C 5분, 16°C 10분에서 10회 반복 반응시켜 형질전환에 사용하였다.

### 형질전환 및 colony PCR

얻어진 TALEN vector 들은 42°C에서 DH5a competent cell에 형질전환 시키기 위해, 배열벡터 확인을 위해서는 spectinomycin, TALEN 벡터 확인을 위해서는 ampicillin 등이 포함된 아가 플레이트를 제작한 후, X-gal, IPTG 를 도말 후 37°C에서 배양한 후 선별과정을 거쳐 형질전환체를 얻었다. 그 후 white 콜로니를 얻어 colony PCR을 수행하였다. Colony PCR은 10 pmol 의 primer 쌍(배열벡터: pCR8\_F1: 5'-ttgatgctggcagttccct-3', pCR8\_R1: 5'-cgaaccgaacaggcttatgt-3',

TALEN 발현벡터 : TAL\_F1: 5'-ttggcgtcggcaaacagtgg-3', TAL\_R2: 5'-ggcgacgaggtggctgttg-3' 10 pmol) 1 µl, 2 mM dNTP 1 µl, 1 mg/ml BSA 1 µl, Mg<sup>2+</sup> 10X buffer 2.5 µl, Taq polymerase 1 µl 를 넣은 후 95°C 1분, 55°C 1분, 72°C 2분에서 30회 반복 반응을 수행하였다.

### 플라스미드 추출 및 DNA 염기서열 분석

LB 배지에서 배양된 대장균 형질전환체를 모아 알카리 추출방법을 이용하여 플라스미드 DNA 를 추출하였다. Sol I 100 µl, Sol II 200 µl, Sol III 150 µl 를 차례로 넣은 후 원심분리를 거쳐 페놀 정제를 수행하여 에탄올 침전을 수행하였다. 물에 녹인 후 1% 아가로스 겔을 사용하여 전기영동을 수행하였으며, 플라스미드 크기 및 제한 효소 절단 등을 이용하여 클로닝된 플라스미드 DNA를 선별하였다. 클로닝된 플라스미드는 마크로젠사에 의뢰하여 염기서열을 분석하였다.

### Transient transfection 및 Western blot

7 µl의 lipofectamine2000 (Invitrogen, USA)과 1 µg의 TALEN 플라스미드 쌍을 혼합한 후 transfection 효율을 높이기 위해 FBS가 들어있지 않은 배지를 2시간 동안 처리한 후, 약 6시간 뒤에 FBS가 들어있는 배양액으로 갈아주었다. 96시간 더 배양 한 후 세포를 모아 RIPA 완충액을 넣어 세포를 파쇄한 후 12,500 rpm으로 30분간 원심분리 하여 단백질 상층액을 얻어 사용하였다. 단백질의 농도 측정에는 BCA Protein Assay kit (PIERCE)를 이용하였다. 단백질이 포함된 상층액 2 µl 를 BCA로 발색시켜 bovine serum albumin (BSA)을 기준으로 해서 분광광도계로 농도를 측정하였다. 단백질 분리를 위해 8%의 아크릴아마이드가 포함된 겔을 준비하여 SDS-PAGE 를 수행 하였다. 아크릴아마이드 각 레인당 100 µg의 단백질 시료를 넣고 200 mA로 1시간 전기영동 한 다음 단백질을 PVDF Membrane 으로 이동시켰다. 이후 Membrane은 5% skim milk 가 포함된 1X TBST buffer [20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8.0, 0.1% Tween 20] 에서 1시간 동안 blocking 하였고, 1X TBST로 10분간 3번 washing 한 후, 1% BSA가 포함된 1X TBST에 담겨져 있는 1차 항체[SETDB1 (ab12317), FLAG (F3165)]를 이용하여 3시간 이상 반응시켰다. 다시 TBST buffer로 세척한 후 2차 항체[Rabbit (sc2004), Mouse (sc2005)]가 포함된 1X TBST에서 반응시켰다. ECL 용액 (Animal Genetics, Inc.)으로 감광시킨 후 암실에서 X-선 필름에 노출시킨 후 인화하였다.

### T7E1 assay

세포에 TALEN 플라스미드를 transfection하고 3일 후 세포를 모아 genomic DNA lysis buffer [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mM EDTA, 0.5% SDS, RNase, proteinase K (50 µg/ml)] 를 이용하여 genomic DNA 를 추출하였다. 24시간 뒤,

TALEN의 표적 DNA 부위에 대한 primer 를 이용하여 PCR 을 수행하였다. PCR 산물을 정제 가열한 후 95°C에서 59°C까지는 0.4°C씩, 59°C에서 26°C까지는 0.3°C씩 천천히 온도를 내린 후 0.5 µl, T7EI (NEW England BioLabs) 효소를 37°C에서 1시간 반응시킨 후 2% 아가로스 겔에서 전기영동으로 확인하였다.

### 결 과

#### SETDB1 genomic DNA 내의 표적 위치 분석

SETDB1을 표적하는 TALEN construct 는 표적 주위의 염기서열 약 500 bp를 TAL effector Nucleotide Targeter 2.0 (<https://tale-nt.cac.cornell.edu/>) 프로그램에서 분석하였으며, 두 종류의 표적 사이트를 제작하여 비교하고자 하였다. 첫 번째는 SETDB1 genomic DNA 내의 단백질 개시코돈 부위를 절단하기 위한 construct 를 만들고자 exon2의 단백질 개시서열ATG 부위를 표적하는 DBEX2를 도안 하였다. 두 번째는 진핵세포 프로모터 부위 중 TATA binding site 가 존재하는 -25 upstream을 대상으로 DBPR25 TALEN construct 를 도안하였다(Fig. 1A). 그 결과 표적 부위를 절단할 수 있는 TALEN 표적 염기서열을 확인하였고, 이를 표적하기 위한 왼편과 오른편의 20 개의 모듈벡터들의 배열정보를 확인할 수 있었다(Fig. 1B, C).

#### TALEN 배열을 통한 클로닝

SETDB1 genomic DNA 표적 TALEN construct 제조를 위

한 클로닝은 두 단계로 진행되었다. 먼저 표적 염기 서열에 결합하는 모듈벡터들을 차례대로 배열벡터로 삽입하였다. 첫 번째 단계에서는 pFusA 벡터에는 genomic DNA 의 5 말단 부위부터 차례대로 10개의 모듈들이 배열되었으며, 이후의 DNA 서열에 해당하는 모듈들은 pFusB 벡터로 삽입하고자 하였다. TALEN construct 는 DNA 이중나선내의 표적 염기 서열을 중심으로 왼편과 오른편에 결합하는 플라스미드를 제작하여야 하기 때문에 DBEX2-left 와 DBEX2-right 에 해당하는 TALEN construct 를 제작하였다. 배열벡터에 모듈의 삽입은 Esp1 제한효소와 ligase를 반복적으로 사용하였으며, 대장균으로 transformation 시켜 LacZ와 항생제 저항성을 이용하여 클로닝을 수행하였다. 모듈 벡터들이 배열 벡터로 삽입되었는지는 콜로니 PCR을 수행하여 smear 되는 형태의 결과들이 나오는 것으로 확인할 수 있었다(Fig. 2A). 즉 그림의 DBEX2-left의 1, 3, 4와 DBEX2-right의 1, 2, 3, 4는 모두 성공적으로 배열된 형태를 보여주고 있다는 것을 의미한다. 또한 각각의 형질전환이 성공된 세균들로부터 플라스미드를 추출하여 Esp31 효소로 자른 결과, pFusA에 배열된 약 1Kb의 insert가 있음을 확인 할 수 있었다. 두 번째 단계는 pFusA와 pFusB 벡터에 삽입된 모듈들을 다시 하나의 벡터로 연결시키는 과정으로 TALEN 발현 벡터로 construct 를 제작하였다. BamH1과 ligase를 이용하여 얻은 플라스미드를 transformation 시켜 얻은 형질전환이 성공된 세균들을 모아 콜로니 PCR 방법과 BamH1 제한효소 절단을 통해 성공적인 클로닝을 확인하였다(Fig. 2B).

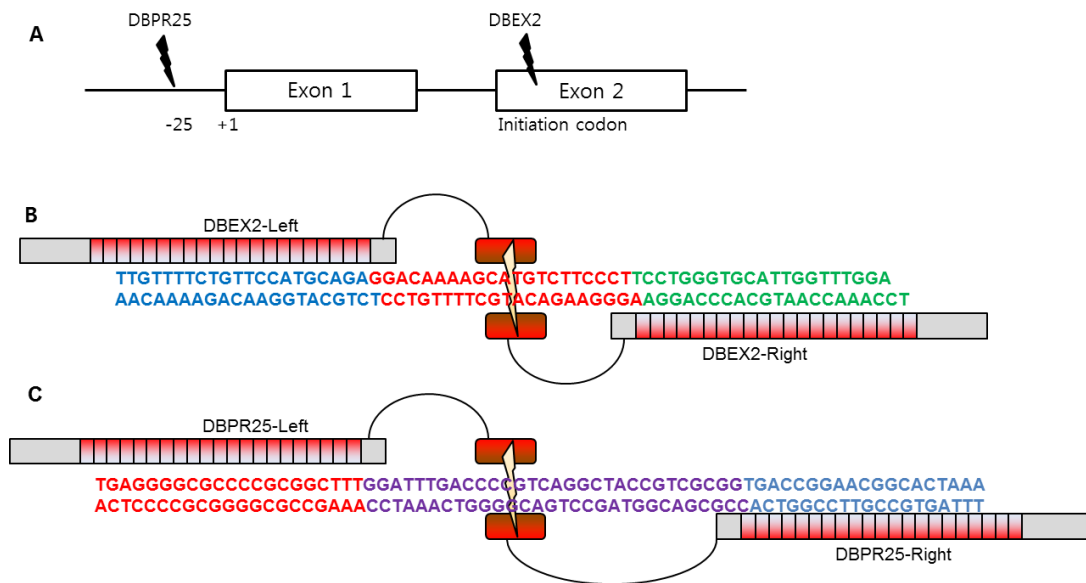


Fig. 1. Two target sites for knock-out of SETDB1 genes. (A) Schematic diagram shows two target sites of SETDB1 genomic DNA for TALEN construct. (B) DBEX2 is targeted for protein initiation codon existing in exon2 of SETDB1. (C) DBPR25 is targeted for 25 upstream region of transcription start site for SETDB1 mRNA synthesis. Target nucleotide is "C".

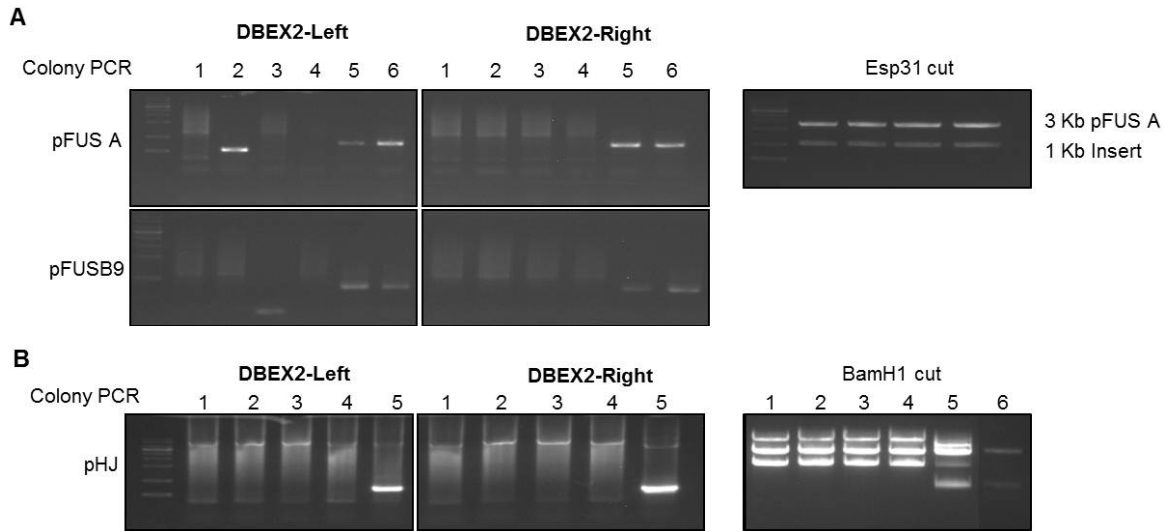


Fig. 2. Two step TALEN cloning and restriction enzyme digestion. (A) The first step was performed from module vectors to two pFUS array vectors. Smear band means successful cloning into array vector in colony PCR experiment. 1 Kb insert band was confirmed with Esp31 restriction enzyme digestion. (B) The second step of TALEN construct was performed from pFUS array vector to mammalian TALEN expression vector. Smear band means successful cloning into TALEN expression vector in colony PCR experiment. Successful cloning for TALEN construct was confirmed with BamH1 restriction enzyme digestion.

**TALEN construct 염기 서열 분석**

제작된 각각의 DBEX2-left, right 플라스미드의 염기서열은 TALEN vector 에 특이적인 프라이머를 이용하여 마크로젠사에 의뢰하여 분석을 수행하였다. 그 결과, SETDB1 genomic DNA에 결합할 수 있는 모듈 벡터들의 염기서열을 확인하였으며, 각 모듈벡터의 서열들은 약 100 bp의 일정한 간

격으로 클로닝 되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 특이한 점은 TALEN 클로닝에 사용되는 모듈벡터들은 5-8 bp 만을 제외하고 서열이 모두 같으며, 모듈벡터내의 5-8 bp 들이 해당 뉴클레오티드에 결합하는 아미노산을 합성해내는 것으로 여겨진다.

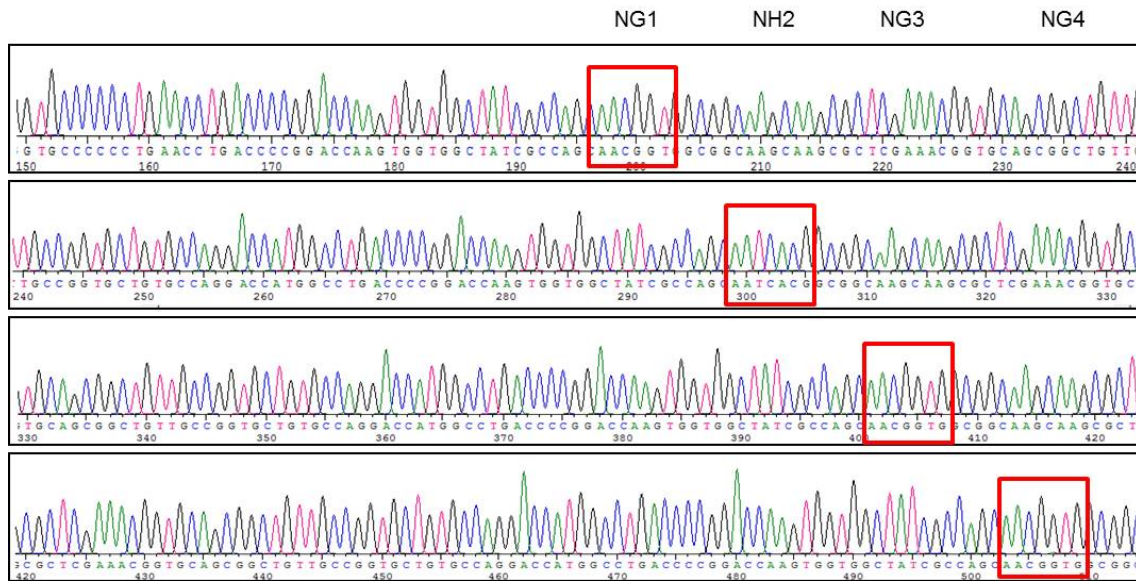


Fig. 3. DNA sequencing for TALEN-DBEX2 construct. TALEN construct was sequenced using specific primers in expression vector. As expected, specific array from module vectors was shown in sequencing analysis. Specific module sequences are regularly arrayed in every 100 bp.

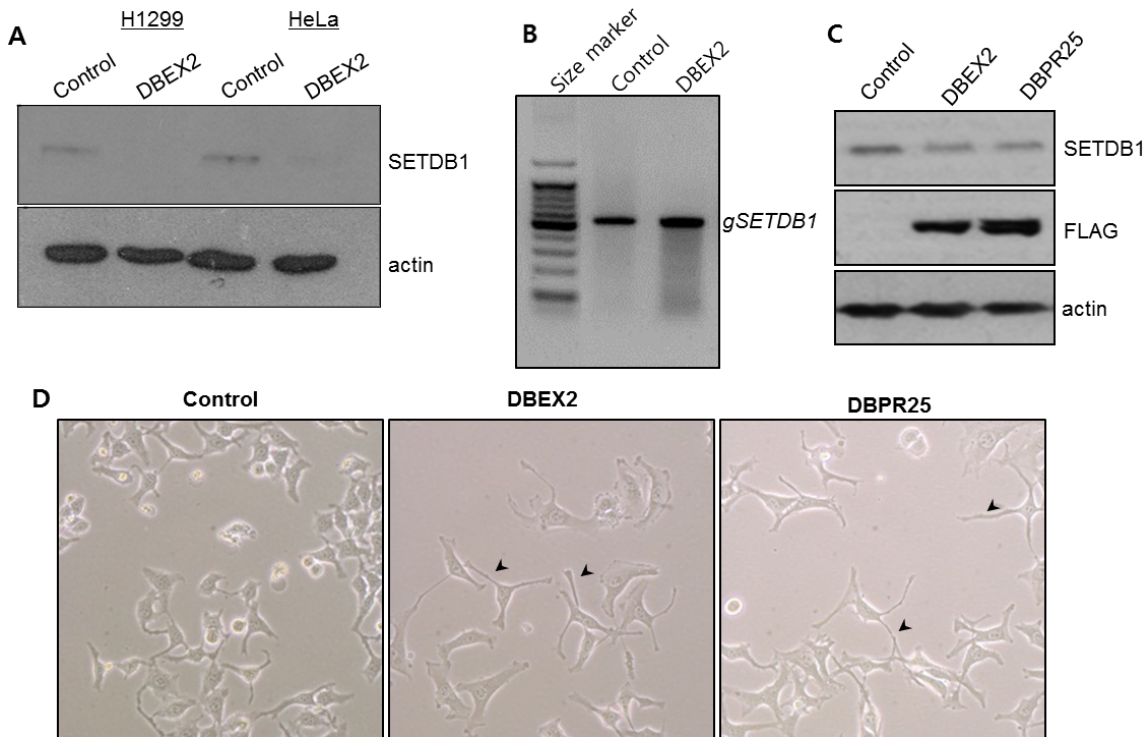


Fig. 4. Validation of SETDB1 knock-out by transfection of TALEN construct. (A) TALEN-DBEX2 construct was transfected into H1299 and HeLa cells. SETDB1 expression was totally disappeared in TALEN-DBEX2 transfection. (B) PCR amplification was performed in targeting for DBEX2. And then, PCR product was digested with T7E1 restriction enzyme. (C) two TALEN constructs were transfected into HeLa cells. SETDB1 expression was down regulated in TALEN transfection. (D) TALEN constructs were transfected into HeLa cells. Morphological changes were shown in HeLa cells.

**TALEN transfection을 통한 SETDB1 발현감소 및 세포 형태 변화 분석**

제작된 SETDB1 genomic DNA 표적 TALEN construct 가 효율적으로 knock out을 유도할 수 있는지를 조사하고자 H1299 폐암세포주와 HeLa 자궁경부암 세포주를 대상으로 TALEN construct의 transfection 을 수행하여 96시간뒤에 세포들을 모아 SETDB1 의 발현을 조사하였다. 그 결과 DBEX2 의 transfection 은 두 세포에서 모두 SETDB1 의 단백질 발현을 감소시켰음을 알 수 있었다(Fig. 4A). 한편, TALEN construct 의 transfection을 통해 발생하는 genomic DNA 의 손상을 고치기 위해 비상동말단결합 수선(non-homologous end joining; NHEJ) 이 일어날 수 있기 때문에 이 원리를 이용하여 T7E1 assay 를 수행하였다. 그 결과 DBEX2 transfection 조건하에서 NHEJ repair가 일어났음을 확인할 수 있었다 (Fig. 4B). 또한 DBEX2, DBPR25 들을 각각transfection 을 수행하여 9시간 뒤에 세포들을 모아 SETDB1 의 발현을 조사한 결과 모두 SETDB1 의 단백질 발현을 감소시켰음을 알 수 있었다(Fig. 4C). 한편, TALEN transfection 을 수행한후 HeLa 세포의 형태변화를 분석한 결과 DBEX2, DBPR25 모두에서 세포의 형태가 길어지는 현상을 관찰할 수 있었다(Fig. 4D). 이러한 결과들은 SETDB1 의 발현을 knock-out 시키기 위한

두 가지 서로 다른 TALEN construct 제작은 매우 효율적임을 의미한다.

**고 찰**

TALEN 유전자 가위는 genomic DNA 를 표적으로 하고 있기 때문에 효율적인 knock-out을 유도할 수 있다[11]. 이를 위하여 유전자의 정확한 표적 부위를 결정하는 과정이 필요하며, 실험목적에 따라 적절한 유전자 상 목적 부위를 정하고 나면 그 부위를 인식하여 자르는 유전자가위를 고안하고 제작하는 과정이 필요하다[2, 5].

본 연구는 히스톤 H3K9me3 HMTase 인 SETDB1 를 대상으로 SETDB1 유전자의 단백질 개시코돈 부위를 절단하기 위한 TALEN construct 와 프로모터 부위중 TATA binding site 가 존재하는 -25 upstream을 대상으로 TALEN construct를 제작 비교 하였다[9, 10]. 두 부위는 유전자 발현과정에서 RNA polymerase 가 결합하는데 중요하며, 단백질 발현을 위해서 중요할 것이다. 따라서 TALEN construct 를 제작하는데 knock-out 의 표적을 위해 우선적으로 고려될 수 있기 때문이다. SETDB1 genomic DNA 표적 TALEN construct 제조를 위한 클로닝은 두 단계로 진행되었다. 배열 벡터의 모듈의

삽입은 Esp31 제한효소와 ligase를 반복적으로 사용하였으며, 대장균으로 형질전환시켜 LacZ와 항생제 저항성을 이용하여 클로닝을 수행하였다. 제시하는 프로토콜을 따른 결과  $10^6$ 이 상의 white colonies 들을 얻을 수 있었다. 그러므로 TALEN construct를 제작하는 과정은 매우 손쉽고 안정적으로 수행될 수 있을 것으로 판단된다. 한편 TALEN 플라스미드에 결합하여 있는 nuclease 활성을 가진 Fok1의 활성은 DNA 이중나선내의 표적 염기서열을 중심으로 왼편과 오른편에 결합하는 플라스미드를 제작하여야 하기 때문에 표적부위의 left 와 right 에 결합하는 한 쌍의 TALEN construct를 제작하여야 한다[13]. 제작된 각각의 DBEX2-left, right 플라스미드의 염기서열은 약 100 bp의 일정한 간격으로 클로닝 되었음을 확인할 수 있었다. 이것은 모듈벡터내의 5-8 bp로부터 DNA 염기서열에 결합하는 아미노산을 합성하는 것이며, 이 부위의 특이성이 높을수록 TALEN construct 의 성공을 판가름 할 수 있을 것이다. TALEN construct 가 효율적으로 knock out 을 유도 할 수 있는지를 분석하는 것이 중요할 것이다. DBEX2, DBPR25의 transfection은 두 세포에서 모두 SETDB1의 단백질 발현을 감소시켰음을 알 수 있었다. 또한 HeLa 세포의 경우 transfection 효율이 높기 때문에 TALEN construct의 발현을 통해 형태적인 변화가 일어나는 것을 관찰 할 수 있었다. 이러한 결과들은 SETDB1의 발현을 knock-out 시키기 위한 두 부위를 표적하여 제작된 TALEN construct 제작은 매우 효율적임을 의미한다. 그러나 실험이 반복됨에 따라 어떤 경우에는 SETDB1 유전자의 발현이 효율적으로 knock-out 되기도 하였지만, 그렇지 않은 경우도 있었다. 그러므로 더 효율적인 TALEN knock-out을 위해서는 stable transfection을 통한 단일 클론을 배양하는 것이 필요할 것이다[14].

결과적으로 TALEN construct의 제작은 유전자 발현조절 연구의 효율적인 클로닝 방법이며, 적절한 프로그램 등을 사용하여 genomic DNA의 프로모터 또는 개시코돈 부위를 대상으로 TALEN 표적 부위를 선정한 후 유전자의 knock-out을 시키게 된다면, 유전자 발현 연구에 매우 유용할 것으로 사료된다.

### 감사의 글

본 연구는 2014년 강원대학교 기본연구비 지원사업과 linc 사업단 R&BD산학공동기술개발 과제의 지원을 받아 수행되었음. 또한 한국연구재단 일반연구지원사업(NRF-2010-0022705)의 지원을 받아 수행되었음.

### References

- Aryan, A., Anderson, M. A., Myles, K. M. and Adelman, Z. N. 2013. TALEN-based gene disruption in the dengue vector *Aedes aegypti*. *PLoS One* **3**, e60082.
- Carlson, D. F., Tan, W., Lillico, S. G., Stverakova, D., Proudfoot, C., Christian, M., Voytas, D. F., Long, C. R., Whitelaw, C. B. and Fahrenkrug, S. C. 2012. Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock. *Proc Natl Acad Sci USA* **43**, 17382-17387.
- Cermak, T., Doyle, E. L., Christian, M., Wang, L., Zhang, Y., Schmidt, C., Baller, J. A., Somia, N. V., Bogdanove, A. J. and Voytas, D. F. 2011. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Res* **39**(12), e82.
- Chen, K. and Gao, C. 2013. TALENs: customizable molecular DNA scissors for genome engineering of plants. *J Genet Genomics* **6**, 271-279.
- Galli-Taliadoros, L., Sedgwick, J., Wood, S. and Körner, H. 1995. Gene knock-out technology: a methodological overview for the interested novice. *J Immunol Methods* **1**, 1-15.
- Holter, N. S., Mitra, M., Maritan, A., Cieplak, M., Banavar, J. R. and Fedoroff, N. V. 2000. Fundamental patterns underlying gene expression profiles: simplicity from complexity. *Proc Natl Acad Sci USA* **15**, 8409-8414.
- Lavery, G. G., Walker, E. A., Draper, N., Jeyasuria, P., Marcos, J., Shackleton, C. H., Parker, K. L., White, P. C. and Stewart, P. M. 2006. Hexose-6-phosphate dehydrogenase knock-out mice lack 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1-mediated glucocorticoid generation. *J Biol Chem* **10**, 6546-6551.
- Lei, Y., Guo, X., Liu, Y., Cao, Y., Deng, Y., Chen, X., Cheng, C. H., Dawid, I. B., Chen, Y. and Zhao, H. 2012. Efficient targeted gene disruption in *Xenopus* embryos using engineered transcription activator-like effector nucleases (TALENs). *Proc Natl Acad Sci USA* **43**, 17484-17489.
- Noh, H. J., Kim, K. A., and Kim, K. C. 2014. p53 down-regulates SETDB1 gene expression during paclitaxel induced-cell death. *Biochem Biophys Res Commun* **1**, 43-48.
- Schultz, D. C., Ayyanathan, K., Negorev, D., Maul, G. G. and Rauscher, F. J. 3rd. 2002. SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins. *Genes Dev* **8**, 919-932.
- Sommer, D., Peters, A., Wirtz, T., Mai, M., Ackermann, J., Thabet, Y., Schmidt, J., Weighardt, H., Wunderlich, F. T., Degen, J., Schultze, J. L. and Beyer, M. 2014. Efficient genome engineering by targeted homologous recombination in mouse embryos using transcription activator-like effector nucleases. *Nat Commun* **5**, 3045.
- Sung, Y. H., Baek, I. J., Kim, D. H., Jeon, J., Lee, J., Lee, K., Jeong, D., Kim, J. S., and Lee, H. W. 2013. Knockout mice created by TALEN-mediated gene targeting. *Nat Biotechnol* **1**, 23-24.
- Tokumasu, D., Sakuma, T., Hayashi, Y., Hosoi, S., Hiyama, E. and Yamamoto, T. 2014. FAST-id system for enrichment of cells with TALEN-induced mutations and large deletions. *Genes Cells* **5**, 419-431.
- Yamaji, T. and Hanada, K. 2014. Establishment of HeLa cell mutants deficient in sphingolipid-related genes using TALENs. *PLoS One* **2**, e88124.

**초록 : SETDB1 genomic DNA 를 표적하는 TALEN construct 제작 및 분석**노희정<sup>1</sup> · 강윤성<sup>2</sup> · 김근철<sup>1\*</sup>( <sup>1</sup>강원대학교 자연과학대학 생명과학과, <sup>2</sup>주식회사 유디피아)

TALEN은 특정유전자를 표적 하여 knock-out 시킬 수 있는 새로운 개념의 유전자 클로닝 방법이다. TALEN 플라스미드에는 DNA binding 도메인과 FokI 절단효소 기능이 융합되어 있기 때문에, genomic DNA 의 어느 부위라도 결합할 수 있고, 표적 염기서열을 절단하여 유전자 돌연변이를 유도할 수 있다. 본 연구에서 우리는 SETDB1 HMTase 유전자의 단백질 개시코돈 과 프로모터 -25 upstream 부위를 표적 하는 두 종의 TALEN constructs 를 제작하였다. 이를 위하여 두 단계의 클로닝이 진행되었다. 첫 번째는 모듈벡터에서 pFUS배열벡터로 표적서열을 옮겨 콜로니 PCR을 통해 smear밴드와 Esp1 제한 효소를 이용하여 약 1 kb의 insert가 들어 있음을 확인하였다. 두 번째는 배열 벡터로부터 TALEN 발현벡터로 옮기는 과정을 진행하였으며, 염기서열분석을 통해 확인하였다. 그 결과 최초의 고안된 모듈벡터 서열들이 약 100 bp 간격으로 배열되어 있음을 확인하였다. 제작된 TALEN-DBEX2 construct는 transfection을 통해 SETDB1의 발현이 사라지는 것을 확인하였고, T7E1 분석을 통하여 표적부위에서 돌연변이가 발생하였음을 추정할 수 있었다. 한편, TALEN-DBPR25 transfection을 통하여서도 SETDB1의 발현이 감소하는 현상을 확인 하였다. DBEX2, DBPR25를 이입시킨 HeLa 세포에서 세포 형태가 길어지는 현상을 관찰할 수 있었다. 그러므로 단백질 개시코돈 또는 -25 upstream을 표적 하는 TALEN knock-out 방법은 SETDB1 유전자의 기능연구에 매우 유용하다고 사료된다.