

Hygromycin 내성 *Tetrahymena thermophila*의 17S-Ribosomal RNA 유전자의 Cloning

홍 옹 기

부산수산대학 생물공학과
(1986년 1월 21일 수리)

Cloning of 17S-Ribosomal RNA Gene from the Hygromycin Resistant *Tetrahymena thermophila*

Yong Ki Hong

Department of Biological Science and Technology,
National Fisheries University of Pusan, Korea
(Received January 21, 1986)

17S-ribosomal RNA gene from the hygromycin resistant protozoan *Tetrahymena thermophila* hmr 3 was cloned on *E. coli* vector pBR 322 as part of study to work the 17S-rRNA structure and the mechanism of hygromycin resistance. The 17S-rDNA was inserted into the Hind III site of pBR 322. The clones having recombinant plasmid were selected by the method of colony hybridization with a 17S-rDNA probe of wild type B1868. The orientation of 17S-rDNA insert was located near the tetracycline resistant gene of pBR 322 in a clone 5-19 with the recombinant plasmid.

원생동물들은 유전형질을 보존하는 소핵과 그 유전자를 전사시켜 형질을 표현시키는 능력을 가진 대핵을 독립적으로 갖고 있으면서⁽¹⁾ 이들 생활사중 접합단계후 소핵 유전자가 5000 군데 이상 재배열되어 유전자의 활성화와 다양화가 유도되어 대핵이 형성된다^(2,3,4). 이들 대핵의 유전자들은 평균 600 kbp 정도의 염색체의 DNA로 선상태로 존재한다⁽⁵⁾. 그중 특히 ribosomal RNA (rRNA)의 합성을 지령하는 유전자는 약 9000 개 이상 증폭되어 그 함유비율이 가장 많고, 추출 정제하기가 쉬워서 그 증폭 기구에 대해서 많이 연구되어져 왔다^(2,6,7,8). 그 구조도 약 21 kbp의 palindrome 형태를 이루고, 17S, 5.8S, 26S의 각 rRNA를 2 개씩 전사한다^(6,9,10,11). 이들중 단백질 생합성의 시작에 관여하는 ribosome의 40S subunit 내에 존재하는 17S-rRNA의 구조를 야생형과 단백질 생합성 저해 항생물질인 hygromycin의 내성 변이주와 비교하고 그 내성 기구를 조사하고자, 우선 이 변이주의 17S-ribosomal RNA 유전자(17S-rDNA)를 추출 분리하여 대장균의 pBR

322 plasmid에 cloning한 결과를 발표하고자 한다.

재료 및 방법

배양조건

Hygromycin 내성 *Tetrahymena thermophila* Hmr-3은 PPYS 배지 (2% proteose peptone, 0.1% yeast extract, 0.003% sequestrine)에서 대수기까지 배양하여 사용하였으며⁽¹²⁾, 대장균 DH-1은 LB-Broth에서 50 내지 65 Klett unit 까지 배양하여 competent cell로 사용하였다.

rDNA 추출

rDNA 추출은 hot phenol-cresol 추출법⁽¹⁰⁾에 따라 행하였으며 마지막에 RNase 처리와 알콜침전으로 분리하였다.

17S-rDNA 정제

위와 같이 추출된 rDNA를 제한효소 Hind III 처리로서 17S-rDNA 부분만 분리하고⁽⁹⁾ 이를 1% agarose gel의 전기영동상에서 glass bead를 사용하여

회수하였다⁽¹³⁾.

pBR322에 Ligation

Plasmid pBR 322에 제한효소 Hind III를 처리한 다음 bacterial alkaline phosphatase로 탈인산시켰다⁽¹⁴⁾. 20 μ l의 반응액에 17 S-rDNA 9 μ l (4 μ g)와 linearized pBR 322 4 μ l (0.5 μ g), 10배 ligation buffer 2 μ l, 10 mM ATP 2 μ l, 200 mM Dithiothreitol 1 μ l, T₄-DNA ligase 20 μ l를 각각 넣어 12°C에서 밤새동안 ligation 시켰다⁽¹⁵⁾.

대장균의 형질전환

대장균 DH-1 (rec⁻균주)에 calcium 처리방법⁽¹⁶⁾으로 형질전환시켰다. Ampicillin 내성주를 증폭시켜 선별하기 위하여 nitrocellulose 상에 도달한 다음 Tetracycline (30 μ g/ml)-LB 배지에서 2 시간, Tetracycline (30 μ g/ml)-Cycloserine (300 μ g/ml)-LB 배지에서 2 시간, Ampicillin (50 μ g/ml)-LB 배지에서 밤새동안 배양하였다.

Colony Hybridization 방법

Plasmid pB-6로부터 야생종의 17 S-rDNA를 Hind III로 분리하여 α -³²P-dNTP들로서 nick translation 시켰다^(17,18). Colony hybridization은 65°C에서 5배 SET, 0.5% SDS, 1배 Denhardt 용액내에서 밤새동안 행하였다⁽¹⁹⁾. 다음 nitrocellulose filter를 -70°C에서 Kodak Xar-5 film과 Intensifying screen을 사용하여 autoradiograph 시켰다⁽²⁰⁾.

Plasmid 추출

Recombinant plasmid를 소량 간단히 확인하기 위

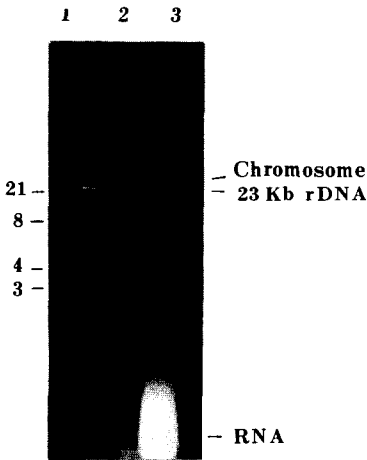


Fig. 1. Isolation of extrachromosomal rDNA.
rDNA was extracted by the hot phenol-cresol method, runned on 0.7% agarose gel electrophoresis, and stained with ethidium bromide. Lane 1, T₄Dpn II marker (Kbp). Lane 2, rDNA of wild type B1868 (0.1 μ g/ μ l). Lane 3, rDNA of hmr 3.

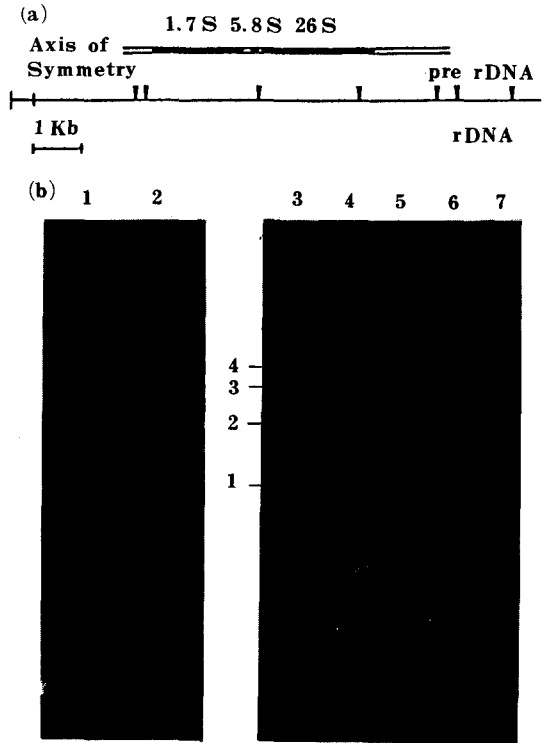


Fig. 2.
(a) Schematic representation of a linear extrachromosomal rDNA molecule showing restriction site for Hind III (▼). This figure is a summary of data presented by J. Engberg⁽⁹⁾.
(b) 17S-rDNA on the 1% agarose gel electrophoreses, Lane 1, rDNA of wild type B1868. Lane 2 and 6, undigestible rDNA of hmr 3, extracted by phenol-cresol, and treated with RNase. Lane 3, molecular weight marker, BRL 1kb ladder. Lane 4, hmr 3 rDNA restricted with Hind III, rDNA was filtered through Biogel A-50 in advance but not treated with RNase. Lane 5, hmr 3 rDNA restricted with Hind III, rDNA was treated with RNase and filtered through Biogel A-50 in advance. Lane 7, RNA.

하여는 Boiling법⁽¹⁵⁾으로 추출하였으며, 대량추출시에는 M-9배지에서 배양하여 alkaline lysis법⁽¹⁵⁾으로 추출한 후 cesium chloride 밀도구배 원심분리하여 정제하였다.

사용한 효소와 시약

제한효소들과 T₄ DNA ligase는 New England Biolabs 제품을 사용하였으며, bacterial alkaline phosphatase는 Worthington 제품을, DNA polymerase I은 Boehringer Mannheim 제품을, nitrocellulose는 Schleicher & Schuell 제품을, α -³²P-dNTP 들은 Amersham 제품을 각각 사용하였다.

결과 및 고찰

rDNA 추출

Aminoglycoside 계열의 항생물질인 hygromycin 에 대한 내성을 가진 원생동물 *Tetrahymena thermophila* Hmr 3 으로부터 rDNA를 추출하고자 PPYS 배지에서 약 2.5×10^5 cells/ml 되게 배양시켰다. 이를 6 배량의 hot phenol-cresol 용액으로 추출하고 chloroform 추출과 SEVAG 추출을 거쳐 ethanol 로 침전시켰다⁽¹⁰⁾. 이 결과 Fig. 1 에서 보는 바와 같이 야생종의 rDNA와 같은 크기로 약 23 kbp의 rDNA를 볼 수 있다. Gel의 하단부분에는 RNase 를 처리하지 않았기 때문에 다량의 RNA가 나타나 있다.

17 S-rDNA 분리

Extrachromosomal rDNA의 제한효소 지도에 의하면^(9,21) 17 S-rDNA는 Fig. 2a에서와 같이 palindromic 구조의 중앙에서 2 번째의 Hind III 마디 즉 약 2.2 kbp의 크기를 가진 마디 속에 포함되어 있다. 따라서 rDNA에 우선 RNase로 다량의 RNA를 제거시킨 후 Hind III로 분해시켜 보았다. 그 결과 Fig. 2b 의 lane 2 에서 보는 바와 같이 전연 분해되지 않았다. RNase가 rDNA에 결합되어 제한효소의 작용을 방해할 가능성을 제거하기 위하여 pronase로 밤새 동안 처리한 후 제한효소를 처리한 바 마찬가지로 분해되지 않았다. 그래서 rDNA추출시 혼입된 탄수

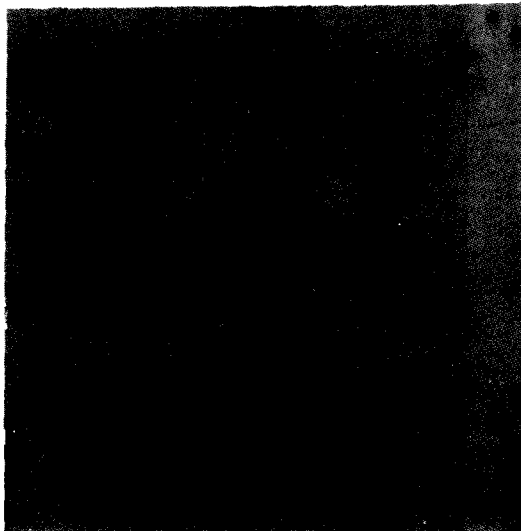


Fig. 3. Autoradiograph of colony hybridization. Transformants on nitrocellulose filter were hybridized with ³²P 17 S-rDNA probe (10⁷ cpm) of wild type B 1868 and exposed on Xar-5 film for 3 days at -70°C. Colonies of black dot were selected for recombinant plasmid.

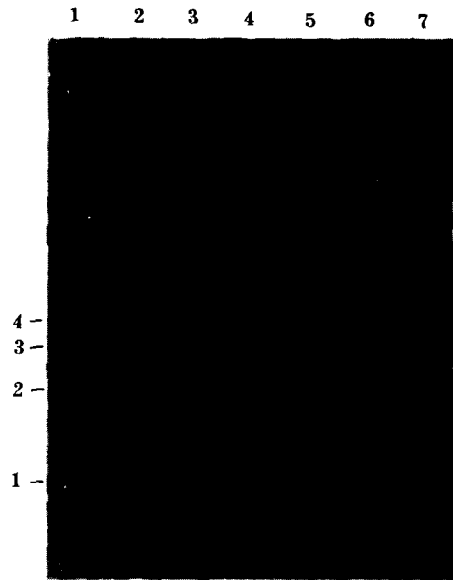


Fig. 4. Agarose gel showing Hind III digested recombinant plasmid.

Lane 1, molecular weight marker, BRL 1 Kb ladder. Lane 2, 3, 4, 5 were restricted with Hind III from recombinant plasmids of strains 5-44, 5-19, 5-18, 2-2, respectively. Lane 6, wild 17 S-rDNA recombinant plasmid, pB-6. Lane 7, vector pBR 322.

화물들이 제한효소의 작용을 저해할 가능성을 제거하기 위하여 Biogel A-50 column을 통과시켰다. 이 rDNA를 Hind III로 분해시킨 결과 Fig. 2b의 lane 5에서와 같이 약 2.2 kbp의 17 S-rDNA를 분리할 수 있었다. 이 마디를 잘라서 glass bead로 회수하였다. Lane 4는 탄수화물들만 제거하고 RNase 처리를 하지 않았는 경우이므로 다량의 RNA에 의한 점성 때문에 충분한 제한효소의 작용을 받지 못한 것으로 보여지며 따라서 탄수화물들과 RNA 모두 사전에 제거시켜야만 한다는 것을 알 수 있었다.

대장균에의 형질전환

17 S-rDNA를 대장균에 cloning하기 위하여 vector로서 pBR 322 (0.5 µg/µl)를 사용하여 제한효소 Hind III (10 u)로 37°C에서 1시간 동안 처리한 후 이를 실험시키기 위하여 65°C에서 15분 동안 두었다. 다음 5 µl의 bacterial alkaline phosphatase로서 5' 위치의 탈인산처리를 하였다. 여기에 17 S-rDNA를 DNA ligase로서 봉합시킨 후 대장균 DH-1 (rec⁻)에 형질전환시켰다. 그 결과 형질전환 빈도는 6.1×10^{-4} 이었다. 다음 이 재조합 plasmid를 가진 대장균을 선별하기 위하여 Tetracycline, Tetracycline + Cycloserine, Ampicillin이 각각 함유된 LB 환천배지

에 각각 2 시간, 2 시간, 밤새동안 배양하여 enrichment시켰다.

Clone의 선별

Cloning된 colony를 선별하기 위하여 우선 plasmid pB-6로부터 야생형의 17 S-rDNA를 Hind III로 분리하고, 이 DNA 조각(1 μg)에 α-³²P-dNTP들 (약 30 μCi)과 함께 DNase I (16 pg/ml)과 DNA polymerase I (2 u)으로서 nick translation한후 spun column을 사용하여 1 krpm에서 유리의 dNTP들을 제거한후 Scintillation counter상에 2.8 × 10⁷ cpm으로 나타났다. 이 probe (10⁷ cpm/50 μl)를 65°C에서 밤

새동안 nitrocellulose filter의 transformant들과 De-nhardt방법⁽¹⁸⁾에 따라 hybridization시킨 결과 Fig. 3과 같다. 여기서 hybridization된 colony들은 모두 감광이 되었다. 이때의 hybridization된 비율은 전체 colony에 대해 약 73% 정도 되었다. 이들을 2 ml의 LB 배지에 배양하여 간단하게 boiling법으로 plasmid를 추출하여 전기영동하여 본 결과 모두 2.2 kbp 정도의 17 S-rDNA 분자량만큼 커진 약 6.6 kbp의 재조합 plasmid로서 나타났다.

재조합 Plasmid의 확인

이들 rDNA를 재확인 하고 orientation 위치를 조사하기 위하여 1 l의 M-9 배지에 배양하여 chloramphenicol로 plasmid를 증폭시킨후 alkaline-lysis 법⁽¹⁸⁾으로 추출하였다. 이를 VTi 50 rotor에서 CsCl 밀도구배 원심분리시켜 정제한후 Hind III를 처리시켜 본 결과 Fig. 4와 같이 5-44, 5-19, 5-18, 2-2 균주 모두 2.2 kbp의 17 S-rDNA와 약 4.4 kbp의 pBR 322를 가지고 있었다.

Orientation 위치

rDNA가 pBR 322의 Hind III 위치에 삽입됨에 따라 rDNA의 전사 시작위치가 어느 방향으로 위치하는지를 조사하기 위하여 Fig. 5a에서 보는 바와 같이 재조합 plasmid에 Bam HI와 Bgl II를 처리하여 보면 서로 다른 삽입방향을 구별할 수 있다. 그 결과 b의 전기영동 lane 1에서 5-19균주의 recombinant plasmid가 4.1 kbp, 2.3 kbp, 120 bp 조각으로 분해되었다. 이로서 17 S-rDNA의 전사 시작위치⁽²²⁾는 pBR 322의 Tetracycline 내성 유전자부위쪽에 방향을 두고 있다는 것을 알 수 있다.

요 약

원생동물인 *Tetrahymena thermophila*의 17 S-rDNA 구조 및 hygromycin 내성 기구에 대한 연구의 일부로서 hygromycin 내성변이주 hmr 3의 17 S-rDNA를 대장균의 vector pBR 322에 cloning하였다. 우선 rDNA는 hot phenol-cresol 용액으로 추출하여 제한효소 Hind III 처리로서 약 2.2 kbp의 17 S-rDNA를 agarose 전기영동상에서 분리하였다. 이를 pBR 322에 cloning하여 wild type의 17 S-rDNA probe와 colony hybridization시켜 선별하였다. 그중 5-19 균주의 recombinant plasmid로부터 17 S-rDNA의 전사 orientation 위치가 pBR 322의 tetracycline 내성 유전자 쪽으로 삽입되어 있는 것을 확인하였다.

사 사

본 연구는 한국과학재단의 postdoctoral fellowship으로 University of California, Berkeley의 분자생

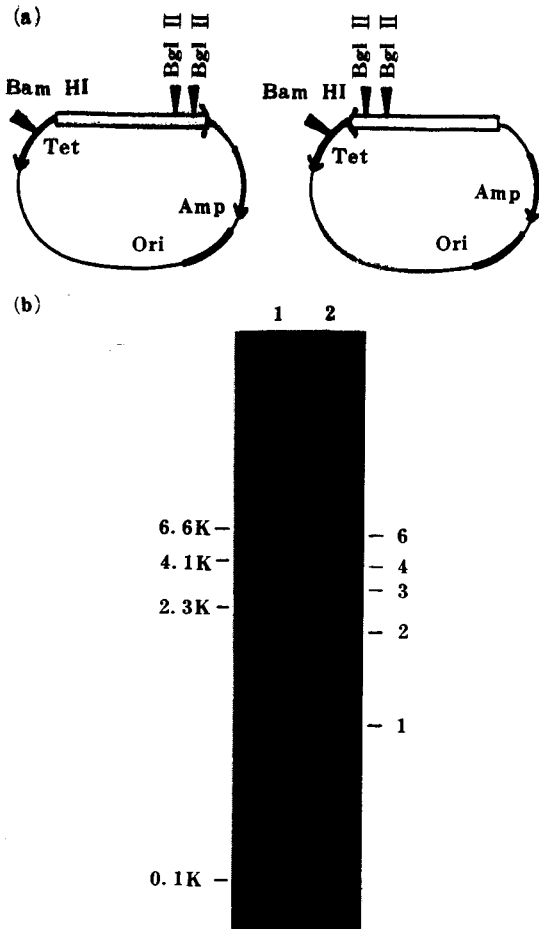


Fig. 5. Orientation position of 17 S-rDNA Insert of hmr 3.

(a) Diagrams of two possible insertion of 17 S-rDNA.

(b) Agarose gel showing Bgl II and Bam HI digested recombinant plasmid of strain 5-19. Lane 1, recombinant plasmid (5.6 μg/μl) restricted with Bgl II (5 u) and Bam HI (10 u). Lane 2, Molecular weight marker, BRL 1 Kb ladder.

물학과 E. Blackburn 교수 연구실에서 행한 연구의 일부이며, 실험 technique에 많은 도움을 준 B. Spangler에 감사드린다.

참고문헌

1. Allen, S., I. Gibson: *Biology of Tetrahymena*, Hutchinson & Ross Inc., Pennsylvania, 306 (1973).
2. Blackburn, E.H., M.L. Budarf, P.B. Challoner, J.M. Cherry, E.A. Howard, A.L. Katzen, W.C. Pan, T. Ryan: *CSH Symp. Quant. Biol.*, Vol. 47, 1195 (1983).
3. Callahan, R.C., G. Shalke, M.A. Gorovsky: *Cell*, **36**, 441 (1984).
4. Yao, M.C., J. Choi, S. Yokoyama, C.F. Austerberry, C.H. Yao: *Cell*, **36**, 433 (1984).
5. Preer, J.R., L.B. Preer: *J. Protozool.*, **26**, 14 (1979).
6. Cech, R.R., S.L. Brehm: *Nucl. Acids Res.*, **9**, 3531 (1981).
7. Tobler, H.: *Biochemistry of Animal Development*, Academic Press, Vol. 3, 91 (1975).
8. Vogt, V.M., R. Braun: *Eur. J. Biochem.*, **80**, 557 (1977).
9. Engberg, J., N. Din, W.A. Eckert, W.Kaffenberger, R.E. Pearlman: *J. Mol. Biol.*, **142**, 289 (1980).
10. Din, N., J. Engberg: *J. Mol. Biol.*, **134** 555 (1979).
11. Karrer, K.M., J.G. Gall: *J. Mol. Biol.*, **104**, 421 (1976).
12. Pan, W.C., E.H. Blackburn: *Cell*, **23**, 459 (1981).
13. Vogelstein, B., D. Gillespie: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **76**, 615 (1979).
14. Chaconas, G., J.H.Sande: *Methods Enzymol.*, **65**, 75 (1980).
15. Maniatis, T., E.F. Fritsch, J. Sambrook: *Molecular Cloning*, CSH Laboratory, **86**, 365 (1982).
16. Mandel, M., A. Higa: *J. Mol. Biol.*, **53**, 154 (1970).
17. Rigby, P., M. Dieckmann, C. Rodes, P. Berg: *J. Mol. Biol.*, **113**, 237 (1977).
18. Maniatis, T., A. Jeffrey, D.G. Kleid: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 1184 (1975).
19. Denhardt, D.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **23**, 641 (1966).
20. Laskey, R.A., D. Mills: *FEBS Letters*, **82**, 314 (1977).
21. Cech, T.R., C.D. Rio: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **76**, 5051 (1979).
22. Engberg, J., N. Din, H. Saiga, T. Higshinakagawa: *Nucl. Acids Res.*, **12**, 959 (1984).