

Transformation-associated recombination cloning에 의한 유전자 분리에 사용되는 target hook에 대한 GC content의 영향

김중현 · 신영선 · 윤영호 · 장형진 · 김은아 · 김광섭 · 정정남 · 박인호 · 임선희 · 선우양일*
동아대학교 자연과학대학 생물학과

Transformation-associated recombination (TAR) 클로닝법은 목적 유전자를 포함한 게놈 DNA와 그 유전자의 5' 또는 3' 말단 서열을 포함하고 있는 선형의 TAR vector를 동시에 출아효모의 spheroplast내로 co-penetration 시켜 상동부위에서 일어나는 재조합에 의해 환형의 Yeast Artificial Chromosome (YAC)으로 분리되는 방법이다. 일반적으로 TAR 클로닝법에 의한 목적의 single-copy 유전자 분리 빈도는 전체 형질전환체의 0.01~1% 정도이다. 이러한 TAR 클로닝법을 개선하기 위하여 Tg-AC transgenic mouse를 모델계로 사용하여 유전자 분리에 대한 target hook 내의 GC content가 미치는 영향을 조사하였다. 이러한 목적으로 한쪽에는 다양한 GC content (18~45%)를 지닌 transgene 특이적 hook을 포함하고 다른 한쪽은 B1 반복서열을 가지는 radial TAR vector를 사용하여 transgene 분리 빈도를 측정하였다. 그 결과 target hook의 GC content는 23% 이하의 경우, ~40%인 경우에 비해 두 배 정도 클로닝 빈도가 감소하였다. 따라서 TAR vector를 제작할 때, 유전자 분리에 이용되는 target hook의 GC content는 약 40% 일 때 가장 적정한 것으로 나타났다. 또한 높은 target hook 내의 GC content (65%) 위치 분포에 의한 차이는 클로닝 빈도에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

Key words □ *Saccaromyces cerevisiae*, Transformation-associated recombination (TAR) cloning, Yeast Artificial Chromosome (YAC)

현재까지 수행된 다양한 생물종에 대한 유전체 연구는 주로 library 제작을 통해 이루어졌다. 2003년 6월 현재의 기술로는 메울 수 없는 틈새(Gap) 약 400여 개(전체 유전체의 약 0.1% 이하)를 남기고 휴먼 게놈 프로젝트의 완성이 발표되었다. 그리고 마우스 게놈 프로젝트 역시 90% 완성으로 그 종료도 멀지 않다. 이러한 성과는 주로 Bacterial Artificial Chromosome (BAC), P1 Artificial Chromosomes(PAC) 및 Yeast Artificial Chromosomes (YAC) library에 의하여 이루어졌다(2, 4, 19, 23). 이러한 방법 중 특히 YAC은 Megabase 단위의 DNA 단편을 분리 가능하게 하여 전장유전자의 클로닝 및 chromosome mapping을 단순화시켰다(3, 9). 그러나 현재까지의 방법은 대량의 유전체를 이해하는 데는 유용하나 특정의 염색체 부위나 유전자만을 분리하여 해석하기에는 여러가지 어려움이 있다. 먼저 library의 구축에 많은 노력과 시간이 소요되며, 구축된 library내에서 목적으로 하는 임의의 단일 클론을 분리하기 위해서는 다시 많은 노력과 시간이 소요된다는 점이다(6, 18). 또한 종내의 다형성(polymorphism)의 비교에 있어서도 비교하고자 하는 각 개체마다 library 구축이 요구되므로 많은 어려움이 있다. 더욱이 library 제작에는 제한효소의 처리가 필요하며, 만일 목적으로 하는 유전자가 제한효소의 인식부위를 포함하는 경우 완전한 크기의 단일 유전자가 클로닝

될 수 없다. 따라서 완전한 크기의 유전자를 얻기 위해서는 중복 부분을 가지는 몇 개의 클론을 서로 조합해야 하는 어려움이 있다(8, 20).

본 연구에서 소개할 TAR (Transformation-associated recombination) cloning법은 library 제작 없이 소량의 게놈 DNA와 target hook을 지닌 vector 간의 상동성 재조합에 의해 출아효모내에서 직접 분리하는 방법이다(10, 11). 이에 앞서 Ma 등(16)에 의해 DNA 단편과, 이 DNA 단편과 상동성 서열을 양끝에 포함하는 선형 vector를 동시에 효모내로 형질전환할 경우, 효모내에서 일어나는 상동성 재조합에 의해 선형 vector와 DNA 단편이 환형의 DNA 분자로 재구성됨이 밝혀졌다. 이러한 결과를 기초로 TAR cloning법이 개발되었고, 이 방법은 목적 유전자의 양쪽 말단에 존재하는 유전자 정보를 이용하여 vector를 제작하게 된다. TAR vector는 먼저 목적 유전자(혹은 특정 염색체 부위)의 양쪽 끝에 존재하는 염기배열 정보를 이용하여 짧은 DNA 단편(200-800 bp)을 target hook으로 만들어 TAR vector내의 multi-cloning site에 삽입한다(11). 이 hook 부분은 형질전환과 더불어 일어나는 상동성 재조합에 이용된다. 이렇게 제작된 TAR vector를 제한효소로 처리하여 양쪽 말단에 상동성 서열을 노출시킨 후 목적 생물종의 게놈 DNA와 함께 효모내로 형질전환시키면, 선형 TAR vector와 목적 유전자간에 상동성 재조합이 일어나 원하는 유전자를 얻을 수 있다. 또한 클로닝하고자 하는 유전자의 한쪽 서열만을 알고 있을 경우에도 포유동물의 게놈 DNA에 산재하는 반복서열(human의 *Alu* 반복서열(20) 또는 mouse의 B1, B2 반복

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-51-200-5637, Fax: 82-51-200-7269
E-mail: shleem@daunet.donga.ac.kr

서열(1)을 이용하여, 한쪽은 목적 유전자 서열을 그리고 다른 한 쪽은 반복서열을 가지는 radial TAR vector를 제작하여 유전자 클로닝이 가능하다(8, 10). 또 하나의 특징으로서 TAR vector는 효모내에서 스스로 증식할 수 있는 Autonomously Replication Sequence(ARS) 배열(17bp의 중심 배열을 포함한 약 100 bp의 AT-rich의 배열)(25)을 지니고 있지 않아 vector만으로는 효모내에서 증식이 되지 않는다. 그러나 고등생물의 게놈 상에는 30-40 kb마다 하나 정도로 ARS 유사배열이 존재하여, TAR cloning 법에 의해 연결된 환형의 YAC은 약 30 kb 이상의 게놈 DNA 단편을 vector내에 지니고 있어야만 증식이 가능하게 되고, vector 만을 지닌 background가 없어지게 된다. 이러한 효모의 ARS 유사배열은 human, mouse, 초파리, 해양생물, 미생물 중에서도 발견되어 다양한 생물종에 대해 TAR cloning법이 적용될 수 있다(24, 자료 미제시).

TAR cloning법의 유용성에도 불구하고 재조합으로 분리된 positive clone은 전체의 0.01-1% 미만에 불과하다(7, 13, 14). 이러한 TAR cloning법의 빈도 개선에 가장 중요한 요인으로서는 상동성 재조합에 필요한 target hook이라 볼 수 있다. 앞선 TAR cloning법의 상동성 재조합에 필요한 hook의 길이에 대한 연구에서 약 40 copy를 지닌 mouse 모델계(v-Ha-ras: Tg.AC transgene)를 사용하여 효모에서 밝혀진 길이인 약 40 bp(3, 4)와 거의 유사하게 약 60 bp의 길이만으로도 클로닝이 가능하게 되어(16), 목적 유전자의 매우 짧은 DNA 염기서열 정보만으로도 유전자 분리가 가능하게 되었다. 또한, 출아효모내에서 PCR product가 상동성 재조합에 의해 gene replacement가 일어나는 과정에서 PCR product의 말단서열의 GC content가 이 과정에 영향을 미치는 것이 보고 되었다(5). 그러므로 TAR cloning 과정에서 상동성 재조합 과정에 직접 관여하는 target hook의 염기조성비는 TAR cloning법의 유전자 분리 빈도에 중요한 요인으로 작용할 수 있을 것이다. 그러므로 본 연구에서는 TAR cloning 법에 이용되는 target hook의 염기서열 정보에 따른 상동성 재조합 과정에 미치는 영향을 조사하기 위하여, mouse 모델계(v-Ha-ras: Tg.AC transgene)(12)를 사용하여 60 bp hook 염기서열내의

GC content에 따른 유전자 클로닝 빈도를 비교 분석하였다. 그 결과 hook 염기서열내의 GC content가 약 40%일 때 형질전환 빈도 및 목적 재조합체의 분리 빈도가 가장 높은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 hook 길이에 대한 정보와 함께 target hook의 제작에 있어 매우 유용한 정보로 이용될 것으로 사료된다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

본 실험에 사용된 출아효모(*Saccharomyces cerevisiae*)는 VL6-48(MATa his3- Δ 200 trp1- Δ 1 met14 ura3-52 ade2-101 lys2)로서 spheroplast transformation에 대해 매우 높은 형질전환율을 나타내며(10), 미국 National Institute of Health (NIH)의 Dr. Vladimir Larionov로부터 제공받았다. Vector DNA의 증폭에는 대장균 균주인 DH5 α (supE44, Δ lacU169(Φ 80lacZ Δ M15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1)를 이용하였다.

효모의 기본 배지 및 배양 조건에는 Sherman *et al.*(22)의 방법을, 대장균에는 Maniatis *et al.*(17)의 방법을 사용하였고, spheroplast transformation에 사용된 배지와 배양 조건은 Leem *et al.*(15)에 의한 방법을 사용하였다.

Radial TAR vector의 제작

TAR cloning에 사용되는 기본 vector인 pVC604 vector는 shuttle vector인 pRS313 vector에서 yeast origin(ARSH4)을 약 100 bp 제거하여 만들어졌으며 14종류의 제한 효소 인식자리인 Multi-cloning site에 target hook으로 사용될 DNA 절편을 PCR로 증폭 제작하여 삽입하게 된다(17). pVC604 vector는 효모내의 선택마커로 HIS3 gene을 포함하고 있으며, 대장균내의 선택 마커로 ampicillin-resistance gene을 포함하고 있다.

본 연구에 사용되는 transgenic mouse인 Tg.AC mouse (Taconic Inc.)에는 1.0 kb의 zeta-globin promotor 부위와 돌연변이 된 1.8 kb의 V-Ha-ras gene, 그리고 0.9 kb의 3'SV40 polyA

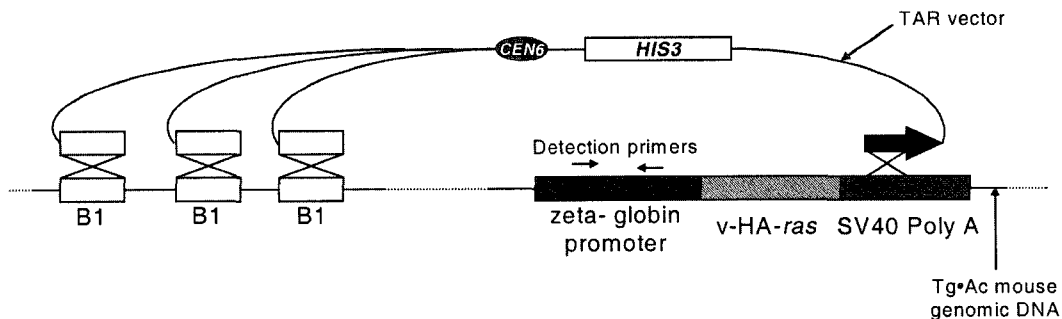


Fig. 1. Scheme of isolation of the Tg.AC transgene as a series of circular YACs using a TAR vector containing a B1 repeat and a 3'-Tg-AC sequence. This model SV40 system was driven from Tg.AC transgenic mouse genomic DNA (Taconic Inc.). The transgene includes a 1.8 kb v-Ha-ras gene fused to a 1.0 kb embryonic zeta globin promoter and a 0.9 kb SV40 polyadenylation sequence. Yeast spheroplasts were transformed with Tg.AC mouse genomic DNA along with a TAR vector containing different GC contents in the targeting hook (bold arrow) and a B1 element at the ends of linearized plasmid. Small arrows indicate the position of diagnostic primers (ZG-F, ZG-R; Table 1) used for detection of positive clones among primary transformants. The position of the B1 consensus sequence hook is represented by a white box.

Table 1. Primers used in this study for (A) construction of TAR vectors and (B) detection of Tg·AC positive YAC clones

	Name	Sequence	
A	GC10-F	5'- atg cg g g cc ca A TAC ACA AAC AAT TAG AAT CAG TAG-3'	
	GC10-R	5'- atg cg t cg a cg T CGA CAA ATA TAA AAT TTT TAA GTG TAT AAT GTG -3'	
	GC20-F	5'- atg cg g g cc ca A AAA AAT GCT TTA TTT GTG AAA TTT GTG -3'	
	GC20-R	5'- atg cg t cg a cg T TAT AAT GGT TAC AAA TAA AGC -3'	
	GC30-F	5'- atg cg g g cc ca A CCC CTT TAC AAA TTA AAA AGC -3'	
	GC30-R	5'- atg cg t cg a cg C TAT TAA TAA CTA TGC TCA -3'	
	GC40-F	5'- atg cg g g cc cg T AAA ACC TCT ACA AAT GTG -3'	
	GC40-R	5'- atg cg t cg a cg A TGT ATA GTG CCT TGA CTA -3'	
	GC50-F	5'- atg cg g g cc cg A GCA AAA CAG GTT TTC CTC -3'	
	GC50-R	5'- atg cg t cg a cg T GAA CTG ATG AAT GGG AGC -3'	
	GC65L -F	5'- atg cg g g cc ca T GGC ATT TCT TCT GAG C -3'	
	GC65L -R	5'- atg cg t cg a cg G GAG CAG TGG TGG A -3'	
	GC65M -F	5'- atg cg g g cc ca A CAG GTT TTC CTC ATT AAA GGC -3'	
	GC65M -R	5'- atg cg t cg a ca A CCT ATG GAA CTG ATG AAT GGG -3'	
	GC65R -F	5'- atg cg g g cc cg G CAT TCC ACC ACT G -3'	
	GC65R -R	5'- atg cg t cg a cg T TTG TGT ATT TTA GAT TCC AAC C -3'	
	B	ZG-F	5'- GTG AGA GGA ATT ACT GCT TCC-3'
		ZG-R	5'- AGG CTG CGC TGG AGT TGA GT-3'

Upper case letters indicate a region of homology to SV40 promoter. Lower case letters indicate sequence non-homologous to SV40 promoter. Bold letters indicate endonuclease restriction sites used for cloning of PCR products. (A) represents primers for construction of TAR vectors and (B) shows detection primers for positive clones.

Table 2. Targeting hook sequences containing different GC contents for construction of TAR vectors

TAR vector	Targeting Hook sequences
pSV-GC10	ATACACAAAC AATTAGAATC AGTAGTTTAA CACATTATAC ACTTAAAAAT TTTATATTT
pSV-GC20	AAAAAAATGC TTTATTTGTG AAATTTGTGA TGCTATTGCT TTATTTGTAA CCATTATAAG
pSV-GC30	AACCCCTTTA CAAATTAATA AGCTAAAGGT ACACAATTTT TGAGCATAGT TATTAATAGC
pSV-GC40	GTAAAACCTC TACAAATGTG GTATGGCTGA TTATGATCTC TAGTCAAGGC ACTATACATC
pSV-GC50	GAGCAAAACA GGTTTTCCCTC ATTAAGGCA TTCCACCACT GCTCCCATTC ATCAGTTCCA
pSV-GC65L	ATGGCATTTT TTCTGAGCAA AACAGGTTTT CCTCATTTAA GGCATTCCAC CACTGCTCCC
pSV-GC65M	AACAGGTTTT CCTCATTTAA GGCATTCCAC CACTGCTCCC ATTCATCAGT TCCATAGGTT
pSV-GC65R	GGCATTTCCAC CACTGCTCCC ATTCATCAGT TCCATAGGTT GGAATCTAAA ATACACAAAC

부위가 transgene되어 있으며, Tg·AC transgenic mouse의 간에서 게놈 DNA를 직접 추출하여 사용하였다. Vector 내의 target hooks의 한쪽은 mouse의 반복서열인 130 bp의 B1서열을 가지고, 다른 한쪽은 다양한 GC content (18.5-45%)를 가지는 radial TAR vector를 제작하였다(Fig. 1). Mouse의 130 bp B1 반복서열은 pWJ522 vector를 사용하여 PCR 방법으로 증폭 후, pVC604 vector의 *Sall-SmaI* 자리에 삽입하여 pVC604-B1 vector를 제작하였다(Fig. 2A). 다양한 GC content를 가지는 60 bp의 target hook의 제작은 mouse model system의 SV40 polyA 서열을 이용하여 각각 18.5%, 23.3%, 28.5%, 38.3%, 45.0%의 GC content를 포함

하도록 PCR 방법을 이용하여 제작하였으며(Table 1, Table 2), *Apal-Sall* 자리에 각각의 절편을 삽입하여 pSV-GC10(18.5%), pSV-GC20(23.3%), pSV-GC30(28.5%), pSV-GC40(38.5%), pSV-GC50(45.0%) vector로 제작하였다(Fig. 2). 또한, GC content의 분포 위치가 TAR cloning 빈도에 미치는 영향을 조사하기 위해, 60 bp의 target hook을 20 bp씩 세 부분으로 나누어 각각 왼쪽(L; Left), 중앙(M; Middle), 오른쪽(R; Right) 부분에 65%의 GC content가 분포되게 target hook을 제작하고 pVC604-B1 vector의 *Apal-Sall* 자리에 삽입하여 각각 pSV-GC65L, pSV-GC65M, pSV-GC65R vector라고 명하였다(Fig. 2).

Spheroplast transformation

TAR cloning은 100-200 kb 정도 이상의 큰 분자 DNA 삽입을 필요로 하므로 효모의 형질전환법으로는 spheroplast transformation 법이 가장 유용하다. Yeast spheroplasts를 만들기 위하여 50 ml YPD 액체배지에 VL6-48 균주를 접종한 후 30°C에서 O/N culture하였다. 다음날, 분광광도계를 사용하여 O.D₆₀₀=0.13~0.14 정도에서 균주를 집균하고 침전된 균체를 멸균수로 50 ml로 혼탁한 후 다시 집균하여 20 ml의 1 M sorbitol로 혼탁한 후 4°C에 30분간 두었다. 이 균주를 700 × g, 4°C에서 5분간 원심 분리하여 집균한 후 20 ml SPE 용액(1 M sorbitol, 0.01 M Sodium-phosphate, pH 7.5, 10 mM Disodium-phosphate, pH 7.5, 0.5 M EDTA)을 첨가하여 현탁하고 20 µl의 zymolyase (10 mg/ml)와 40 µl의 14 M β-mercaptoethanol을 넣어 잘 섞은 후, 30°C에서 약 20분간 매우 느리게 진탕 배양하였다. 세포의 spheroplast 정도를 조사하기 위해 현탁액을 1 M sorbitol과 2% SDS에 넣어

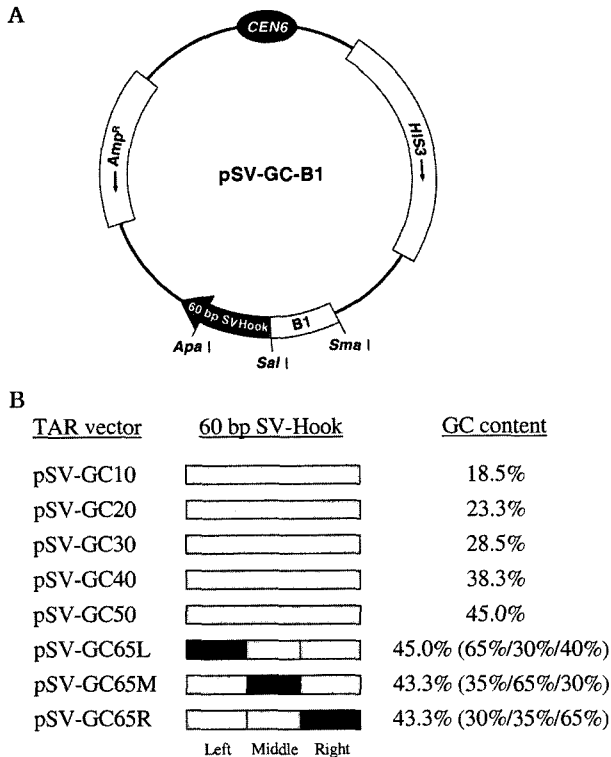


Fig. 2. Scheme of a TAR vector containing a different GC contents in target hook. (A) pSV-GC-B1 was generated by deletion of a ~100 bp fragment containing a yeast origin of replication (ARS4) from pRS313. This plasmid has an extensive multi-cloning site consisting of 14 restriction endonuclease 6 and 8 bp recognition sites for flexibility in cloning of particular fragments of interest. The functional DNA segments of the plasmid are indicated as follows: CEN6 = a 196 bp fragment of the yeast centromere VI; HIS3 = selective marker for yeast cells; Amp = ampicillin-resistance gene. A set of TAR vectors with targeting hook sequences (60 bp SV-hook) 3' to the end of the transgene, containing different GC contents was constructed. A 130 bp mouse B1 element was cloned into SalI-SmaI sites of a pSV-GC-B1 vector. Vectors were linearized by a SalI restriction endonuclease digestion before spheroplast transformation. (B) Alignment of targeting sequences derived from the transgene-specific sequence with different GC contents. All hook sequences are 60 bp. The high GC content (65%) domain is indicated by a black box.

혼탁한 후, O.D₆₀₀ 값을 측정하여 O.D₆₀₀ 값의 차이가 3~5배 정도가 되도록 하였다. Zymolyase의 처리가 끝난 세포를 100 × g, 4°C에서 5분간 원심 분리하여 집균한 뒤 β-mercaptoethanol 제거를 위해 차가운 1 M sorbitol로 2번 씻어주었다. 상층액을 제거한 후 2 ml의 STC 용액(1 M sorbitol, 10 M Tris · Cl, pH 7.5, 10 mM CaCl₂)으로 현탁하였다.

15 ml의 Falcon tube에 미리 SalI 제한효소를 처리하여 선형으로 만든 vector 1 μg과 Tg.AC mouse의 간에서 추출한 genomic DNA 2 μg을 넣어둔 후, spheroplast 현탁액 450 μl를 넣어 가볍게 섞은 후 실온에 10분 방치하였다. 여기에 다시 5 ml의 PEG 용액(20% PEG 8000, 10 mM Tris · Cl, pH 7.5, 10 mM CaCl₂)을 넣고 tube inverting하여 가볍게 섞고 실온에서 10분 동안 반응시

켰다. 100 × g 에서 5분 동안 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 반응시켰다. 이때, Top agar SC-His+Sor을 녹인 후 50°C의 항온 수조에 둔다. 1시간 후 SOS 용액에 현탁된 배양액에 Top Agar 9 ml를 섞은 후 SC-His+Sor plate에 조심스럽게 붓고 plate를 굳힌 후 30°C에 약 4~5일 배양하였다.

Positive clone의 확인

SC-His plate에서 자란 형질전환체를 멸균된 이쑤시개를 이용하여 한 plate에 30개의 colony를 patch하여 하나의 gene pool로 정하였다. 30°C에서 2~3일 배양 후 다시 SC-His plate에 복제하여 복제본을 만들고 원본은 4°C에 보관하고 복제본은 30°C에서 2일 배양하였다.

복제된 plate에서 자란 세포들을 5 ml의 물로 배지의 표면을 씻어 15 ml의 Falcon tube에 집균하여 상층액을 버리고 1 ml의 sorbitol 용액에 현탁한 후, 1.5 ml의 eppendorf tube에 옮겨 다시 집균하였다. 0.5 ml의 SPE 용액에 현탁한 후, 각 tube에 2 μl의 β-mercaptoethanol과 20 μl의 zymolyase(10 mg/ml)를 첨가하여 37°C에서 1시간 처리하였다. 다시 집균한 후 0.5 ml의 50 mM EDTA 용액에 현탁하고 2% SDS를 50 μl 첨가한 후, 70°C에서 15분간 처리하였다. 여기에 120 μl의 5 M potassium acetate 용액을 넣어 잘 섞어 얼음위에서 30분동안 처리하였다. 다시 집균하여 상층액을 새로운 eppendorf tube에 옮기고 ethanol로 tube를 채운 뒤 가볍게 섞고 10,000 × g 에서 5분 동안 원심분리하여 DNA를 침전시킨다. DNA 침전물은 70% ethanol로 씻어준 후 말린 다음 200 μl의 TE buffer에 녹여 1 μl를 다음 PCR 반응에 사용하였다.

Positive clone의 확인을 위하여 먼저 gene pool로부터 뽑은 DNA를 사용하여 Tg.AC transgene의 zeta globin-promoter 내의 54 bp에서 469 bp(416 bp PCR product)까지의 영역으로 PCR을 수행하였다. 이 primary gene pool에서 positive PCR 밴드가 확인되면 이로부터 각각의 colony를 사용하여 두 번째 colony PCR을 수행하여 확인하였다(Table 1). PCR 반응은 9700 Thermocycler(Perkin-Elmer)를 사용하여 94°C, 2분간 1 cycle, 그리고 94°C, 30초→58°C, 30초→68°C, 1분의 반응을 30 cycles 반응시킨 후, 72°C에서 10분 1 cycle의 연장반응을 수행하였다. PCR 산물은 1.5%의 SeaKem GTG agarose gel을 사용하여 전기영동을 통하여 확인하였다.

결과 및 고찰

Target hook의 GC content에 따른 형질전환 빈도의 비교

출아효모(*Saccharomyces cerevisiae*)를 중심으로 상동성 재조합 과정에 대한 많은 연구가 이루어졌으며, 재조합이 일어나는 염기 서열 부분에 대한 연구도 많이 이루어졌다(21). 상동성 재조합 과정은 특히 감수분열 시기에 체세포분열기에 비해 약 100-1000 배의 고빈도로 염색체 전반에 걸쳐 일어난다. 염색체상에서 이러

Table 3. Transformation frequency by TAR vectors containing different GC contents in targeting sequences

TAR vectors	Transformation frequency (colonies/plate)
pSV-GC10	110
pSV-GC20	210
pSV-GC30	280
pSV-GC40	290
pSV-GC50	220
pSV-GC65L	240
pSV-GC65M	220
pSV-GC65R	210

한 재조합이 고빈도로 일어나는 영역을 hot-spot이라 하며, 반대로 재조합이 거의 일어나지 않는 부분을 cold-spot이라 한다 (21). 또한 상동성 재조합과정에 영향을 미치는 염기서열의 특성을 조사한 연구에서 GC content가 높을수록 (40~50%) 상동성 재조합이 많이 일어남을 밝혔다(5). 그러므로 상동성 재조합을 기본으로 한 TAR cloning 법에서 이러한 과정에 가장 중요한 역할을 하는 hook 염기조성의 비율은 중요한 요인으로 작용할 수 있다. 이러한 목적으로 제작된 GC content 비율을 달리한 5종의 vector와 GC content 분포를 달리한 3종의 vector를 이용하여 spheroplast transformation에 대한 형질전환 빈도를 비교하였다(Table 3). 한 번의 형질전환 실험에 각각 1 µg의 선형 TAR vector와 2 µg의 게놈 DNA를 사용하였다. 또한 실험오차를 줄이기 위하여 한 번의 형질전환 실험마다 각 vector별로 10번의 실험을 동시에 수행하여 오차가 적은 실험군만을 선별하였으며, 이러한 형질전환 실험을 독립적으로 세 번 수행하여 평균을 나타내었다. 그 결과 오차값의 범위는 약 10% 이내로 나타났다.

GC content의 분포를 달리한 pSV-GC65L, pSV-GC65M, pSV-GC65R vector에서는 비교적 유사한 형질전환 빈도(240, 220, 210 colonies/plate)를 나타내었으나, GC content의 비율을 달리한 5종의 vector에서는 그 비율에 따라 형질전환 빈도가 두 배 이상의 차이를 나타내었다(Table 3). pSV-GC40(38.5%) vector를 사용한 경우 가장 높은 형질전환 빈도(290 colonies/plate)를 나타내었고, 이에 비해 가장 낮은 GC content의 비율을 지닌 pSV-GC10(18.5%) vector를 사용한 경우에는 다른 vector를 사용한 경우에 비해 두 배 이상 낮은 빈도(110 colonies/plate)를 나타내었다(Table 3). 이 결과는 GC content 비율이 재조합과정에 영향을 줄 수 있다는 것을 시사하는 것으로 앞서 발표된 targeted gene replacement의 연구(5)와도 유사한 경향을 나타내었다. 반면 45% 이상의 GC content를 지닌 경우는 28.5%에 비해 더 낮은 형질전환 빈도를 나타내어, 45% 이상의 GC content는 높은 Tm 값으로 인하여 오히려 재조합 빈도의 감소를 나타낼 수 있음을 보여준다.

Table 4. Effect of targeting hooks containing different GC content on the % yield of transgene-positive clones

TAR vectors	G-C content	Transgene-positive Transformants	
		Frequency	Yield (%)
pSV-GC10	18.5%	8/1600	0.50
pSV-GC20	23.3%	8/1600	0.50
pSV-GC30	28.5%	13/1600	0.81
pSV-GC40	38.3%	16/1600	1.00
pSV-GC50	45.0%	11/1600	0.69
pSV-GC65L	45.0% (65%/30%/40%)	12/1600	0.75
pSV-GC65M	43.3% (35%/65%/30%)	13/1600	0.81
pSV-GC65R	43.3% (30%/35%/65%)	12/1600	0.75

Target hook의 GC content 비율에 따른 유전자 분리 빈도의 비교

TAR cloning의 형질전환 빈도는 상동성 재조합에 이용되는 hook과 동시에 co-penetration시킨 게놈 DNA가 어느 정도 유사한 배열을 가지는가에 의존한다. 단순히 vector 종류별로 형질전환 빈도를 비교해 보면, 양쪽 hook 모두 반복서열만을 가지는 경우(universal vector)는 한쪽만 반복서열을 지닌 radial hook을 지닌 경우(radial vector) 비해 약 10배 정도 높은 형질전환 빈도를 나타내고, 이 radial hook 보다 양쪽 모두 specific hook을 지닌 two-unique vector에서는 약 20배가량의 낮은 형질전환 빈도를 나타낸다(15). 그러나 같은 종류의 vector에서도 위에서 보여준 것과 같이 형질전환 빈도의 차이를 나타내며, 형질전환 빈도와 positive clone 분리 빈도가 반드시 상관관계를 가지는 것은 아니다. 그러므로 hook의 유용성에 대한 확인은 반드시 최종 목적으로 하는 유전자가 전체 형질전환체에서 어느 정도의 비율로 포함되어 있는지를 확인하는 것이 중요하다.

Target hook의 GC content 비율에 따른 유전자 분리 빈도를 조사하기 위해 먼저 5종류의 vector(pSV-GC10, pSV-GC20, pSV-GC30, pSV-GC40, pSV-GC50)를 이용하여 세 번 이상의 독립적인 실험을 통해 얻어진 1,600개의 형질전환체를 비교 분석하였다(Table 4). Positive clone의 선별에는 transgene system의 1.0 kb zeta globin-promoter 부위를 ZG-F, ZG-R primer (Table 1)를 사용하여 PCR 방법으로 증폭한 후 전기영동으로 확인하였다(재료 및 방법 참조). 그 결과 가장 낮은 형질전환 빈도를 보였던 pSV-GC10 vector를 사용한 실험에서 1,600개의 형질전환체 중 8개의 positive clone이 확인되어 0.5%의 빈도를 나타내었다. 이와 동일한 빈도가 pSV-GC20 vector에서도 나타났으나 그 이상의 GC content를 지닌 vector에서는 1.5-2배 정도 증가하였으며, 그 중 pSV-GC40 vector는 가장 많은 13개의 positive clone이 확인되었다(Table 4). 따라서 약 40%가량의 GC content를 가진 hook을 사용하였을 때 형질전환 빈도 및 유전

자 분리 빈도가 동시에 가장 높게 나타나, TAR cloning의 hook 배열 선정에 있어 중요한 정보로 사용될 것으로 사료된다.

Target hook의 GC content 분포에 따른 유전자 분리 빈도의 비교

상동성 재조합에 미치는 GC content 비율을 조사하기 위하여 target hook 서열의 GC content를 달리한 5종류의 TAR vector를 제작하여 target hook의 최적 GC content 비율을 조사하였다. 그러나 염색체상의 염기서열은 hook의 길이에 비례적으로 항상 균일한 염기조성비를 나타내지는 않는다. 그러므로 본 실험에서는 60 bp의 hook을 세 영역으로 나누고, 비교적 높은 GC content(65%)를 지닌 염기서열을 왼쪽(L; Left)과 중앙(M; Middle), 오른쪽(R; Right)으로 분포되게 세 종류의 TAR vector (pSV-GC65L, pSV-GC65M, pSV-GC65R)를 제작하였다. 이 vector들의 최종 GC content는 각각 45.0%, 43.3%, 43.3%로서 비율에는 차이를 두지 않았다. 그 결과 위에서 언급한 것과 같이 모두에서 형질전환 빈도에 차이를 나타내지 않았으며, positive clone의 분리 빈도에 있어서도 각각 0.75%, 0.81%, 0.75%로 유사한 결과를 나타내었다(Table 4).

위의 결과를 종합하면, 형질전환 빈도 및 유전자 분리빈도가 target hook 서열의 GC content가 18.5%일 때 가장 낮게 나타났으며, 38.3%일 때 가장 높게 나타났다. 또한 약 45%의 GC content를 지닌 pSV-GC65L, pSV-GC65M, pSV-GC65R vector를 각각 사용한 경우 모두 비슷한 형질전환 빈도와 positive clone 분리 빈도를 나타내어 60 bp target hook내 GC content의 분포 차이는 상동성 재조합에 크게 영향을 미치지 않음을 보여주었다. 따라서 본 연구를 통해 target hook의 GC content는 TAR cloning에 중요한 인자로서 작용하며, 약 40%가량의 염기서열을 선택하였을 때 형질전환 빈도 및 positive clone의 분리 빈도가 가장 높게 나타났다. 이러한 결과는 TAR cloning의 빈도 개선에 매우 유용한 자료로 사용될 것으로 사료된다.

감사의 글

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

참고문헌

- Bennett, K.L., R.E. Hill, D.F. Pieras, M. Wood worth-Guta, C. Kane-Haas, J.M. Houston, J.K. Heath, and N.D. Hastie. 1984. Most highly repeated dispersed DNA families in the mouse genome. *Mol. Cell. Biol.* 4, 1561-1571.
- Burke, D.T., G.F. Carle, and M.V. Olson. 1987. Cloning of large segments of DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. *Science* 236, 806-812.
- Chartier, F.L., J.T. Keer, M.J. Sutcliffe, D.A. Henriques, P. Mileham, and S.D. Brown. 1992. Construction of a mouse yeast artificial chromosome library in a recombination-deficient strain of

- yeast. *Nature Genet.* 1, 132-136.
- Clarke, L. and J. Carbon. 1980. Isolation of a yeast centromere and construction of a functional small circular chromosome. *Nature* 287, 504-509.
- Gray M. and S.M. Honigberg. 2001. Effect of chromosomal locus, GC content and length of homology on PCR-mediated targeted gene replacement in *Saccharomyces*. *Nucleic Acids Res.* 29, 5156-5162.
- Green, E.D., H.C. Riethman, J.E. Dutchik, and M.V. Olsen. 1991. Detection and characterization of chimeric yeast artificial-chromosome clones. *Genomics* 11, 658-669.
- 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.
- Kouprina, N., M. Eldarov, R. Moyzis, M. Resuick, and V. Larionov. 1994. A model system to assess the integrity of mammalian YACs during transformation and propagation in yeast. *Genomics* 21, 7-17.
- Larin, Z., A.P. Monaco, and H. Lehrach. 1991. Yeast artificial chromosome libraries containing large inserts from mouse and human DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 4123-4127.
- Larionov, V., N. Kouprina, N. Nikolaishvili, and M.A. Resnick. 1994. Recombination during transformation as a source of chimeric mammalian artificial chromosomes in yeast(YACs). *Nucleic Acids Res.* 22, 4154-4162.
- Larionov, V.N., N. Kouprina, J. Graves, X.-N. Chen, J.R. Korenberg, and M. A. Resnick. 1996. Specific cloning of human DNA as yeast artificial chromosomes by transformation-associated recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 491-496.
- Larionov, V.N., M. Koriabine, G. Solomon, M. Randolph, J.C. Barrett, S.-H. Leem, L. Stubbs, N. Kouprina, and V. Larionov. 2001. Defining the minimal length of sequence homology required for selective gene isolation by TAR cloning. *Nucleic Acids Res.* 29, 6e32.
- Larionov, V. 1998. Direct isolation of specific chromosomal regions and entire genes by TAR cloning, *Genet. Eng. Princ. Methods* 21, 141-159.
- 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.
- 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 Res.* 31, e29.
- Ma, H., S. Kunes, P. J. Schatz, and D. Botstein. 1987. Plasmid construction by homologous recombination in yeast. *Gene* 58, 201-216.
- Maniatis T., E.F. Fritsch, and J. Sanbrook. 1997. Molecular cloning a laboratory manual, Cold spring Harbor Laboratory, *Cold Spring Harbor Press*, N. Y.
- McGonigal, T., P. Bodell, C. Schopp, and A.V. Sarthy. 1995. Construction of a human DNA library in a circular centromere-based yeast plasmid. *Gene.* 155, 267-271.
- Murray, A.W. and J.W. Szostak. 1983. Construction of artificial chromosomes in yeast. *Nature.* 305, 189-193.
- 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.
21. Petes, T.D. and J.D. Merker. 2002. Context dependence of meiotic recombination hotspots in yeast: The relationship between recombination activity of a reporter construct and base composition. *Genetics* 162, 2049-2052.
22. Sherman F., G.R. Fink, and J.B. Hicks. 1989. Laboratory course of manual for methods in yeast genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, *Cold Spring Harbor Press*. N. Y.
23. Shizuya, H., B. Birren, U.J. Kim, V. Mancine, T. Slepak, Y. Tachiri, and M. Simon. 1992. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 8794-8797.
24. Stinchomb, D.T., M. Thomas, Kelly, I., E. Selker, and R.W. Davis, 1980. Eukaryotic DNA segments capable of autonomous replication in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 4559-4563.
25. Theis, J.F. and C.S. Newlon, 1997. The ARS 309 chromosomal replicator of *Saccharomyces cerevisiae* depends on an exceptional ARS consensus sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 10786-10791.

(Received August 14, 2003/Accepted August 29, 2003)

ABSTRACT: Effect of GC Content on Target Hook Required for Gene Isolation by Transformation-Associated Recombination Cloning

Jung-Hyun Kim, Young-Sun Shin, Young-Ho Yoon, Hyung-Jin Jang, Eun-A Kim, Kwang-Sup Kim, Chung-Nam Chung, In-Ho Park, Sun-Hee Leem, and Yangil Sunwoo* (Department of Biology, Dong-A University, Busan 604-714, Korea)

Transformation-associated recombination (TAR) cloning is based on co-penetration into yeast spheroplasts of genomic DNA along with TAR vector DNA that contains 5'- and 3'-sequences (hooks) specific for a gene of interest, followed by recombination between the vector and the human genomic DNA to establish a circular YAC. Typically, the frequency of recombinant insert capture is 0.01-1% for single-copy genes by TAR cloning. To further refine the TAR cloning technology, we determined the effect of GC content on target hooks required for gene isolation utilizing the Tg-AC mouse transgene as the targeted region. For this purpose, a set of vectors containing a B1 repeated hook and Tg-AC-specific hooks of variable GC content (from 18 to 45%) was constructed and checked for efficiency of transgene isolation by radial TAR cloning. Efficiency of cloning decreased approximately 2-fold when the TAR vector contained a hook with a GC content $\sim \leq 23\%$ versus $\sim 40\%$. Thus, the optimal GC content of hook sequences required for gene isolation by TAR is approximately 40%. We also analyzed how the distribution of high GC content (65%) within the hook affects gene capture, but no dramatic differences for gene capturing were observed.