

TAR Cloning에 의한 선별적 유전자 분리에 사용되는 TAR Vectors의 유용성에 관한 연구

박정은 · 이윤주 · 정윤희 · 김재우¹ · 김승일² · 김수현² · 박인호 · 선우양일 · 임선희*
동아대학교 자연과학대학 생물학과, ¹동아대학교병원 임상병리실, ²기초과학지원연구소 프로테오믹 분석팀

The Utility of TAR Vectors Used for Selective Gene Isolation by TAR Cloning. Park, Jung-Eun, Yoon-Joo Lee, Yun Hee Jeong, Jae-Woo Kim¹, Seung Il Kim², Soohyun Kim², In-Ho Park, Yangil Sunwoo, and Sun-Hee Leem*. Department of Biology, Dong-A University, ¹Department of Clinical Pathology, Dong-A University Hospital, Busan 604-714, ²Proteome Analysis Team, Korea Basic Science Institute, Daejeon 305-806, Korea – The 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 minimum size of specific hooks required for a single-copy gene isolation and compared the utility of different TAR vectors, radial and unique vectors, by cloning the same single-copy gene. The efficiency of TAR cloning of the *hHPRT* gene was same using hooks varying from 750 to 63 bp. The number of transformants decreased approximately 20-fold when the TAR vector contained two unique hooks versus using a radial vector, but the percentage of positive recombinants increased over 2-fold when a unique TAR vector was used. Therefore, we suggest that the two-unique TAR vector is suitable for general TAR cloning given its high selectivity, and the radial TAR vector is more suitable when genomic DNA is in limited quantity, for example, DNA isolated from pathological specimens. Moreover, we confirm the minimal length of a unique sequence in a TAR vector is approximately 60 bp for a single-copy gene isolation.

Key words: TAR (Transformation-Associated Recombination) cloning, TAR vector, *hHPRT* gene isolation, yeast

Human 게놈을 비롯한 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 library를 사용하여 특정유전자를 포함한 클론을 분리하는 종래의 방법에는 여러 문제점을 지니고 있다. 첫째로 library 내의 다수의 클론 중에서 임의의 클론을 분리하는 과정은 많은 노력과 시간을 요한다는 점이다. 둘째로, library 제작과정에는 제한효소 처리가 필수적이므로 목적 유전자 중에 제한효소의 인식 부위가 존재하면 완전한 크기의 유전자 단일 클론을 분리할 수 없다. 이러한 경우, 완전한 크기의 유전자를 얻기 위해서는 중복 부분을 갖는 몇 개의 클론을 조합하여야 한다. 셋째, 현재 사용하는 library는 '종의 대표 예'로서, 다형성(polymorphism) 혹은 변이주에 대한 연구에 사용하기 위해

서는 각 개체마다 게놈을 분리하여 각각에 대한 library를 제작하여야 하는 어려움이 있다. 현재 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 배경으로 효모세포 내에서 형질전환과 동시에 일어나는 상동성 재조합(*in vivo* recombination)에 의해 고등생물의 single-copy 유전자를 특이적으로 분리하는 TAR cloning 법이 개발되었고, 최근 다수의 중요한 유전자가 이 방법에 의해 분리되었다[1, 3, 7-12, 15]. TAR cloning 법에서 상동성 재조합에 관여하는 hook(표적배열)은 사용되는 염기 배열에 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, human의 유방암 유전자 *BRCA2*를 이 방법으로 분리하였다(Fig. 2)[12]. *BRCA2* 유전자의 상류와

*Corresponding author
Tel: 82-51-200-5637, Fax: 82-51-200-7269
E-mail: shleem@daunet.donga.ac.kr

하류에 위치하는 수백 bp의 단편을 양쪽 말단에 hook으로 만든 TAR vector와 human genome DNA를 효모세포에 co-transformation한 결과, 완전한 길이인 90 kb의 *BRCA2* 유전자가 선택적으로 분리되었다. 선택배지에서 자란 약 200 개의 형질전환체 중에서 1개의 클론이 *BRCA2*의 배열을 포함하고 있는 것으로 효모의 colony PCR 해석으로 쉽게 동정되었다. 또 다른 human 유방암 유전자가 *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[7]. 이 방법은 한쪽의 hook은 목적 유전자 말단의 특이적 배열을 사용하고, 다른 쪽의 hook은 genome 중 고빈도로 산재한 반복 배열(human에서는 *Alu*, mouse에서는 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* 배열까지 다양한 크기의 영역의 분리가 가능하게 되었다(Fig. 2). 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 클로닝이 가능하게 되어[17], 목적 유전자의 매우 짧은 DNA 염기서열 정보만으로도 유전자 분리가 가능하게 되었다. 반면 hook의 길이가 60 bp 보다 작은 40 bp와 20 bp의 경우에는 클로닝 빈도가 4배 이하로 현저히 줄어들어서 마우스 모델 실험계를 사용하는 경우 hook의 최소길이가 60 bp임을 증명하였다[17]. 그러나 현재까지 복잡한 게놈 DNA로부터 직접 single-copy 유전자 분리를 통한 TAR vectors의 유용성의 비교 분석 및 hook의 최소 길이에 대한 연구는 이루어지지 않았다.

그러므로 본 연구에서는 먼저 *hHPRT*(human hypoxanthine phosphoribosyltransferase) 유전자[7]의 3'-말단 영역을 TAR vector내의 hook으로 사용하여, 그 hook의 길이에 따른 형질전환빈도 및 유전자 분리에 대한 차이를 비교하였다. 또한, *hHPRT* 유전자의 염기서열을 이용하여 만들어진 radial과 two unique TAR vector를 사용하여 유전자의 직접 분리를 시도하였다. 그 결과, 앞서 보고된 모델계[17]에서와 같이 single-copy 유전자의 분리에서도 hook의 최소 길이는 약 60 bp로 클로닝이 가능함을 알 수 있었다. 또한 TAR vector의 비교에서 형질전환 빈도는 약 20배 이상 radial vector를 사용한 경우에 높게 나타났으나, 유전자 분리 빈도는 two unique vector를 사용한 경우에 약 2배 높게 나타났다. 이러한 결과를 바탕으로 서로 다른 vector의 유용성에 대하여 비교 분석하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 plasmid DNA

본 실험에 사용된 출아효모 *Saccharomyces cerevisiae*는 VL6-48 균주(*Mat α his3- Δ 200 trp1- Δ 1 ura3-52 ade2-101 met14*)이고[9], DNA 증폭에 사용된 대장균의 균주는 DH10B(*F⁻mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80dlacZDM15 Δ lacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ (ara, leu)7697 galU galK λ^- rpsL nupG*)를 사용하였다. TAR vector에 사용되는 pVC604(Fig. 2A)는 HIS3 선택마커를 지니며, 이는 Bluescript 유래의 yeast-E. coli shuttle vector인 pRS313[9]으로부터 만들어졌다. *hHPRT* 유전자의 분리를 위한 2 종류의 TAR vector는 Fig. 2B에서 보여주는 것과 같이 여러 종류의 hook을 제작하여 TAR vector의 multi-cloning site에 삽입하였다. 이렇게 제작된 vector를 제한효소 *EcoR*I으로 잘라 hook이 양쪽 끝으로 노출되게 직선상의 vector로 만든 후 형질전환에 사용하였다.

배지 및 배양조건

효모 및 대장균을 이용한 유전학적 방법은 Sambrook *et al.*[18] 및 Sherman *et al.*[19] 방법을 사용하였다. 대장균 DH5 α 의 증식용 배지로 LB(Luria-Bertani) broth(0.5% yeast extract, 1% bactotrypton, 0.5% NaCl, 50 μ g/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 \cdot 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 \cdot 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; 2% final)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; 3% final)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 vector(Fig. 2A)로서 제한 효소 인식자리인 multi-cloning site에 hook으로 사용될 DNA 단편을 PCR로 증폭하여 삽입하였다. TAR vector 내 hook의 최소길이 결정에 사용된 5

종류의 vector는 모두 radial vector로서 *hHPRT*의 3' 염기서열을 지닌 서로 다른 길이의 hook(750, 380, 160, 93, 63 bp)이 삽입되었다(Fig. 1). 각 3'-hook의 위치는 다음과 같다: pVC-HPRT750(genomic sequence 내에서 53,462-54,211 위치, accession number M26434), pVC-HPRT380(53,462-53,842: M26434), pVC-HPRT160(53,462-53,622: M26434), pVC-HPRT93(53,462-53,554: M26434), pVC-HPRT63(53,462-53,524: M26434). 이 vector 중에서 pVC-HPRT380는 radial HPRT vector로 다음 실험에도 사용되었으며, 5'-hook으로는 *Alu* 반복서열을 사용하였다[4].

또한 hook의 종류에 따라 각각 universal TAR vector(pVC604-*Alu+Alu*: Fig. 2B(a)), radial TAR vector(pVC604-*Alu+3'hHPRT*: Fig. 2B(b)), unique TAR vector(pVC604-5'HPRT+3'HPRT: Fig. 2B(c))를 만들었다. pVC604-*Alu+Alu* vector는 human의 SINE(short interspersed nuclear element)인 *Alu* 반복서열[16]을 양쪽 말단 hook으로 사용하였다. pVC604-HPRT unique vector는 radial vector의 *Alu* 5'-hook 대신에 *XhoI*과 *EcoRV* 자리에 *hHPRT*의 상류배열 염기서열의 DNA 단편 101 bp(genomic sequence 내에서 1,229-1,329 위치, accession number M26434)를 증폭하여 삽입하였다. TAR cloning에는 이들 vector를 제한효소 *EcoRI*로 처리하여 직선상의 vector로 만들어 사용한다.

Yeast spheroplast transformation

Spheroplast competent cell을 제작하기 위해 50 ml의 YPD 액체배지에 효모 균주를 접종한 후 30°C에서 하룻밤 배양하여, O.D.₆₀₀=1.3~1.4에서 균주를 집균하고, 20 ml의 1 M sorbitol로 혼탁하여 4°C에 30분간 방치한다. 현탁액을 3000 rpm, 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 현탁한다. 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 20분간 50 rpm 이하로 매우 느리게 진탕 배양한다. 세포의 spheroplasts 정도를 조사하기 위해 현탁액을 1 M sorbitol과 2% SDS에 1/10로 넣어 O.D.₆₀₀ 값을 측정하여 1 M sorbitol/2% SDS 값

이 3~5 배가 되도록 한다. Zymolyase 처리가 끝난 세포를 1500 rpm, 4°C에서 5분간 원심 분리하여 집균한 뒤 β-mercaptoethanol의 제거를 위해 1 M sorbitol로 두 번 씻어 준다. 균체를 다시 2 ml의 STC용액(1 M sorbitol, 10 mM Tris · HCl pH 7.5, 10 mM CaCl₂)으로 현탁한다. 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 · HCl pH 7.5, 10 mM CaCl₂)을 넣고 tube inverting하여 가볍게 섞고 실온에서 10분간 둔다. 1500 rpm에서 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 배양한다. 이때 top agar Sor-His를 녹여 glass test tube에 8 ml씩 분주하여 50°C에 둔다. 위의 배양액을 top agar에 조심스럽게 섞어 넣은 후, Sor-His plate에 조심스럽게 붓는다. plate가 굳게 되면 30°C에서 3~4일간 배양한다[9, 14].

Positive clone의 확인

SD-His plate에 나온 형질전환체를 이주시개를 이용하여 한 plate 당 30개의 colony를 patch한다. 2~3일 동안 30°C에서 배양 후 다시 SD-His plate에 replica하여 복제본을 만들어 이를 primary gene pool로서 30°C에서 2일간 배양한다. Primary gene pool로 복제된 plate에서 자란 세포들을 5 ml의 물로 배지 표면을 씻어 15 ml의 Falcon tube에 넣은 후 집균한다. 집균된 균주에서 zymolyase를 사용하여 효모의 DNA를 추출한다[19]. 추출된 DNA를 400 µl의 TE buffer에 녹인 후, 이 중 1 µl를 PCR 반응에 사용한다. PCR에 이용된 부분은 *hHPRT* 유전자 내에 존재하는 두 번째 exon에 해당하는 부분으로 vector에는 존재하지 않는다. 이 primary gene pool을 이용하여 먼저 PCR로 클론이 되었는지를 확인한 후, positive PCR 밴드가 확인되면 이로부터 각각의 colony를 사용하여 두 번째 colony PCR을 수행하여 확인한다. 이러한 확인 후 각 클론의 DNA를 분리하여 *hHPRT* gene의 promoter 부분과 마지막 exon을 포함한 4 부분의 영역에서 PCR을 수행한다(Table 1). PCR 반응은

Table 1. Primers used in this study for detection of *hHPRT* positive.

| Primer | Sequence | Size | PCR product |
|--------------|---|-------|-------------|
| HPRT pro-F | 5'GCT C\AA TGA CTT GCC TAG TT-3' | 20 bp | 300 bp |
| HPRT pro-R | CAC TTA GGA CAG TAG AGT CA | 20 bp | |
| HPRT exon2-F | TGC TGG GAT TAC ACG TGT GAA CC | 23 bp | 527 bp |
| HPRT exon2-R | GAC TCT GGC TAG AGT TCC TTC TTC C | 25 bp | |
| HPRT exon3-f | CTG TAG GAC TGA ACG TCT TGC TCG AGA TG | 29 bp | 195 bp |
| HPRT exon3-r | CTC ACA CAA TAG CTC TTC AGT CTG AT | 26 bp | |
| HPRT exon9-f | GCA TGT TTG TGT CAT TAG TGA AAC TGG | 27 bp | 149 bp |
| HPRT exon9-r | GCT CTA CTA AGC AGA TGG CCA CAG AAC TAG | 30 bp | |

9700 Thermocycler(Perkin-Elmer)를 사용하여 94°C, 2 분간 1 cycle, 그리고 94°C, 30초 → 58°C, 30초 → 68°C, 1분의 반응을 30 cycles 반응시킨 후, 72°C에서 10분 1 cycle의 연장 반응을 수행한다. PCR 산물은 1.5%의 SeaKem GTG agarose gel을 사용하여 전기영동을 통하여 확인한다.

결과 및 고찰

TAR vector 내에 삽입되는 hook의 최소 길이 결정

TAR cloning 법은 복잡한 게놈 DNA로부터 분리하고자 하는 특정영역이나 유전자의 양끝에 존재하는 염기서열의 정보가 필수적이다. 그러므로 클론닝에 있어 hook 제작은 실험의 첫 단계로서 상동성 재조합에 직접 관련된 중요한 부분이다. TAR cloning을 수행할 때는 사용할 유전정보를 먼저 두 부분으로 나누어 한쪽은 hook 염기서열로 사용하고, 다른 한쪽은 클론닝 여부를 판단하는 내부 진단용 PCR 인식부위(detection primers)로 사용할 수 있다(Fig. 1). 현재까지 single-copy 유전자 분리에 사용된 hook의 크기는 약 200~1,000 bp의 길이였으므로[1, 3, 7, 8, 10-12, 17] 만약 유

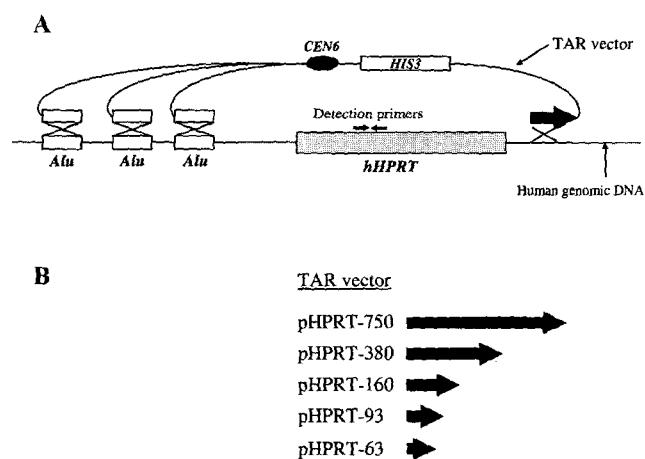


Fig. 1. A schematic of the basic plasmid pVC604 for construction of TAR cloning vectors containing different length hooks. (A) Scheme for isolation of the human *HPRT* gene as a series of circular YACs using a TAR cloning vector containing 3'-*HPRT* sequence and an *Alu* repeat. Yeast spheroplasts were transformed with genomic human DNA along with a TAR cloning vector containing a 3' sequence (large black arrow) and an *Alu* sequence at the ends of the linearized plasmid. Recombination between sequences in the vector and genomic DNA containing the *hHPRT* gene leads to the establishment of circular YACs that extend from the 3' sequence to various *Alu* positions. Arrows indicate positions of primers (specific for exon 2 of the *hHPRT* gene) used for detection of positive clones among primary transformants. (B) Scheme of different sizes of hook. A set of TAR vectors with targeting sequences of different sizes (750, 380, 160, 93 and 63 bp) homologous to the 3'-end of *hHPRT* gene was constructed. Each vector contains a 189 bp *Alu* repeat as a second targeting sequence. Vectors were linearized with *EcoRI* restriction enzyme before transforming.

전정보의 확인이 100~200 bp 이하에 불과하다면 TAR cloning법을 사용하기 어려울 것으로 사료된다. 이러한 문제점의 보완과 TAR cloning의 유용성을 증가시키기 위해서 앞서 Noskov 등[17]이 Tg.AC transgenic mouse 모델계를 이용하여 약 60 bp 길이의 hook으로 TAR cloning이 가능하다는 것을 밝혔다. 이러한 결과는 출아효모에서[4, 5] 일어나는 상동성 재조합과정에 필요한 염기서열 길이인 40 bp와 매우 유사하다.

본 실험에서는 모델계가 아닌 human single-copy 유전자인 *hHPRT*를 이용하여 hook의 길이를 63 bp에서 750 bp로 달리하여 그 빈도를 비교하였다(Fig. 1). 재료 및 방법에서 기술한 것과 같이 한번의 실험에 1 μ g의 TAR vector와 2 μ g의 genomic DNA를 사용하여 형질전환을 수행하였다. 각 TAR vector를 사용하여 얻은 형질전환체 수는 plate 당 약 400 개로 vector 간의 형질전환 빈도의 차이는 크게 나타나지 않았다. 각 vector를 이용하여 약 1,000개의 형질전환체를 조사하여 확인하였으나, pVC-HPRT380의 경우는 뒤에 보여주는 실험의 radial vector로 사용하여 실험군의 수가 증가하였고, pVC-HPRT63의 경우는 결론을 나타내므로 실험군의 수를 증가시켰다. 그 결과 Table 2에서 보여주는 것과 같이 hook의 길이가 10배 가량(pVC-HPRT750 : pVC-HPRT63) 차이를 가짐에도 불구하고, 유전자 분리 빈도는 0.40~0.45로 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 클론닝이 가능하다는 것을 보여준다.

현재까지 hook으로 사용한 DNA 염기배열의 길이는 대개 200~1,000 bp로 이 범위 내에서는 TAR cloning의 효율에 영향을 주지 않았다[1, 3, 7, 8, 10-12, 17]. 또한 hook의 최소 길이를 mouse 모델 시스템을 이용하여 조사한 결과 60 bp까지 가능하다는 것이 밝혀졌다[17]. 그러므로 본 실험 결과는 TAR cloning 법으로 human 게놈으로부터 직접 single-copy 유전자인 *hHPRT*를 분리하는데 필요한 유전정보의 길이를 최소화하여 보다 많은 경우에 TAR cloning 법이 적용될 수 있는 가능성을 보여준다.

Table 2. TAR cloning of *hHPRT* by a vector containing different sizes of targeting sequence.

| TAR vector | Analyzed transformants* | Number of positive clones | % yield |
|-------------|-------------------------|---------------------------|---------|
| pVC-HPRT750 | 1,000 | 4 | 0.40 |
| pVC-HPRT380 | 2,100 | 9 | 0.43 |
| pVC-HPRT160 | 1,100 | 5 | 0.45 |
| pVC-HPRT93 | 1,200 | 5 | 0.42 |
| pVC-HPRT63 | 2,670 | 12 | 0.45 |

*Transformants were selected from several independent transformation experiments.

서로 다른 TAR vector에 따른 형질전환 빈도의 비교

TAR cloning 법에 있어 hook의 길이가 결정이 되어지면 그 다음 단계로는 어떠한 vector를 제작할 것인지를 결정하여야 한다. 현재까지 사용된 두 개의 TAR vector의 분리는 유전정보가 양 말단에 존재하는가 아니면 한 쪽 말단에만 존재하는가로 나뉘어졌다. 또한 TAR vector 내에는 효모 내에서 스스로 복제할 수 있는 ARS(Autonomously Replication Sequence)가 존재하지 않고, 상동성 재조합에 의해 삽입된 고등동물 계놈 내에 약 20~30 kb 마다 한 분자의 비

율로 존재하는 ARS-like 배열에 의해 효모 내에서 증폭이 가능하게 된다[20, 21]. ARS가 없는 TAR vector는 사용한 TAR vector의 재연결에 의한 background 수를 줄이는데 이용되었다. 그러므로 클로닝하고자 하는 영역의 크기가 확인되지 않는 경우, 너무 작은 크기의 영역에서는 ARS-like 배열이 존재하지 않을 가능성도 있으므로 다양한 크기의 유전자 영역의 분리가 가능한 radial vector를 사용하였다(Fig. 1, Fig. 2). 이러한 분류 이외에도 같은 유전자의 분리를 통해 이 두 vector의 성질을 엄밀히 분석한다면 실험 목적에 따른 적절한 분류나 또 다른 유용성이 나타날 것으로 보인다. 이에 따라 본 연구에서는 universal TAR vector, radial TAR vector 그리고 two unique TAR vector(Fig. 2)를 제작하여 TAR cloning을 수행하였다. 먼저 이러한 TAR vector를 사용하여 형질전환 빈도를 조사하였다. 그 결과 반복서열의 hook으로만 이루어진 universal vector에서는 재조합의 가능성이 훨씬 높아지게 되므로 매우 높은 형질전환 빈도($\geq 2,000$ colonies/plate)를 나타내었다(Fig. 3). 그리고 한쪽이 반복서열로 된 radial TAR vector 역시 two unique TAR vector에 비해 약 20 배의 높은 형질전환 빈도를 나타내었다(Fig. 3과 Table 3). 이는 직선상의 계놈 DNA와 직선상의 vector 간에 일어나는 재조합과정이 hook의 배열에 매우 의존적으로 일어난다는 것을 의미한다.

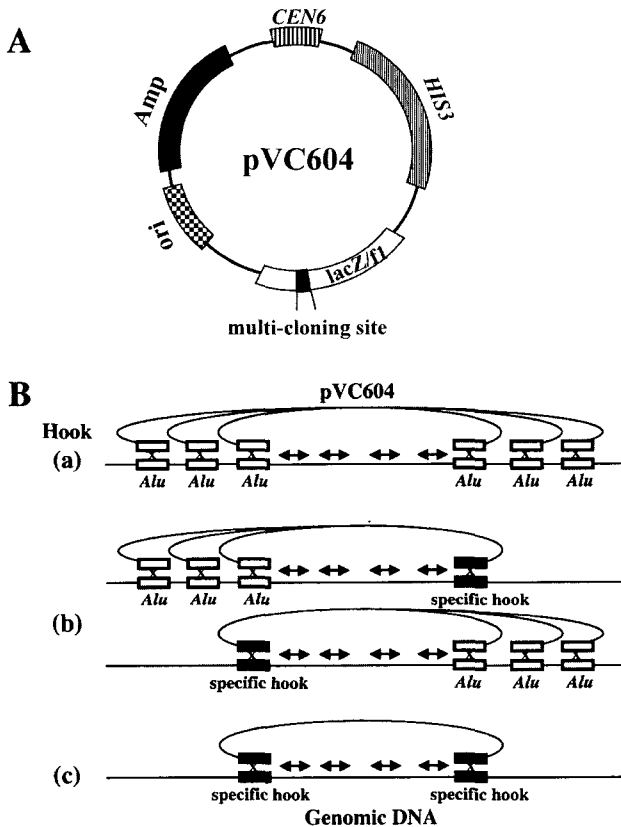


Fig. 2. Scheme of isolation of the human *HPRT* gene as circular YACs using three different types of TAR cloning vector. (A) pVC604 was generated by deletion of a 100 bp fragment containing a yeast origin of replication (*ARSH4*) from pRS313. This plasmid has an extensive multi-cloning site consisting of 14 restriction endonuclease 6 and 8 bp recognition sites for flexibility in cloning 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* = selectable marker for yeast cells; Amp = ampicillin-resistance gene. (B) Three different types of TAR vector are shown as follows: (a) *Alu* universal TAR vector, (b) radial TAR vectors, and (c) two-unique (specific) hook TAR vector. The diagram shows the DNA fragments included when yeast spheroplasts are transformed. Two different relative orientations of the radial TAR vector are possible, as shown in diagram (b). Recombination between sequences in the vector and the locus in genomic DNA creates a circular YAC. The arrows indicate the positions of primers for an internal region that can be used for initial identification of YAC clones containing the gene of interest.

TAR vector의 종류에 따른 선별력의 비교

hHPRT radial TAR vector와 two unique TAR vector를 사용하여 얻어진 형질전환체를 이용하여 *hHPRT* 유전자에 대한 positive clone의 분리빈도를 조사하였다(Table 3). *hHPRT* radial vector에서는 2,100개의 형질전환체 중 9개의 positive clone을 얻었고, *hHPRT* two unique vector에서는 1,290개의 형질전환체에서 12 개의 positive clone을 얻어 그 분리 효율은 각각 0.43과 0.93을 나타내었다. 즉 목적 유전자의 분리 빈도는 two unique TAR vector를 사용한 경우 2 배 이상 증가하였으므로 클로닝에 있어 선별력이 two unique TAR vector가 더 우수하다고 볼 수 있다. 이러한 결과는 *hTERT*(human Telomerase reverse transcriptase) 유전자의

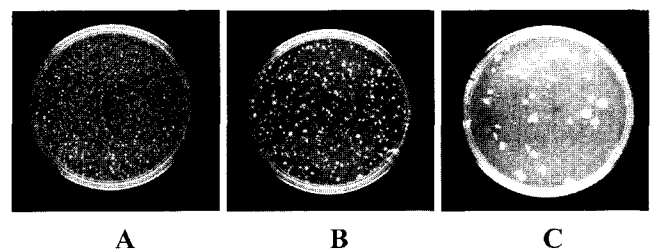


Fig. 3. Comparison of transformation frequency using three different types of TAR vector. (a) *Alu* universal TAR vector, (b) radial TAR vectors and (c) two-unique hook TAR vector. Transformation efficiency was observed in parallel samples with 1 of TAR vector and 2 of human genomic DNA.

Table 3. Isolation of *hHPRT* gene using different types of TAR vector.

| TAR vector | Average number of transformants | Number of transformants | Number of positive clones | (%) yield |
|---------------|---------------------------------|-------------------------|---------------------------|-----------|
| HPRT radial | 431 | 2100 | 9 | 0.43 |
| HPRT 2-unique | 23.92 | 1290 | 12 | 0.93 |

TAR cloning was done using 1 ug of linearized TAR vector and 2 ug of genomic DNA.

분리 빈도(radial vector : two-unique vector = ~0.033% : ~0.083%)에서도 유사하게 나타났다. 또한 각 positive clone 이 실제 약 45 kb에 달하는 *hHPRT* 유전자를 완전히 포함하는지를 조사하기 위해 *hHPRT* 유전자의 promoter 부분, exon 2, exon 3, 그리고 마지막 exon인 exon 9 영역을 PCR로 조사하였다(primer 서열은 Table 1 참조). Radial hook으로 분리된 9클론 중 5클론, unique hook으로 분리된 12클론 중 4클론을 조사한 결과, Fig. 4에서 보여주는 것과 같이 9개의 YAC 클론 모두에서 *hHPRT*의 전장에 걸친 DNA가 클로닝된 것으로 밝혀졌다. Negative control로서 *hHPRT* 유전자를 포함하지 않은 vector만을 형질전환 시킨 효모의 콜로니를 사용하여 PCR을 수행한 결과 PCR band가 확인되지 않았다(data not shown).

위의 두 결과를 종합하여 분석하면 radial TAR vector의 경우는 two unique TAR vector에 비해 20 배 이상의 형질 전환빈도를 나타내었고, 유전자 선별력에 있어서는 two unique TAR vector가 radial TAR vector에 비해 약 2 배의 증가를 보였다. 그러므로 환자의 조직이나 병리학적 표본을

사용한 경우에서처럼 소량의 게놈 DNA만을 이용할 수 있는 경우에는 radial TAR vector가 좀 더 유용하다고 볼 수 있다. Radial TAR vector를 사용함으로써 인간의 질병 연구 등에 있어서도 건강한 사람의 유전자와 환자의 유전자를 동시에 클로닝하여 유전자 내에서 변이의 위치를 밝히는 것도 가능하게 된다. 그러나 많은 양의 게놈 DNA를 확보할 수 있는 일반적 TAR cloning에는 좀 더 높은 선별력을 보여준 two unique TAR vector가 적합하다고 볼 수 있다. 예를 들어, DNA 양은 충분히 확보될 수 있지만 유전자의 클로닝이 매우 어려운 hTERT 유전자의 경우는 그 분리빈도가 radial TAR vector를 사용하였을 때 ~0.033%로 매우 낮아 two unique TAR vector(~0.083%)의 경우가 더 용이하다고 볼 수 있다. hTERT 유전자는 구조상 내부에 많은 minisatellite 를 지니고 있어 불안정하여 그 분리 빈도가 매우 낮은 것으로 밝혀졌다[6, 13, 16]. 그러므로 TAR vector의 유용성의 비교와 hook의 길이를 비교 분석한 본 연구는 TAR cloning 법의 유용성 증대와 단순화에 기여할 것으로 사료된다.

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 하며, spheroplast 형질전환 과정에서 게놈 DNA와 5'-와 3'-표적배열을 지닌 TAR vector 사이에서 일어나는 상동성 재조합과정에 의해 이루어진다. 본 연구에서는 single-copy 유전자의 클로닝에 필요한 specific hook의 최소 크기를 조사하였고, 서로 다른 TAR vector(radial과 unique vector)의 유용성을 조사하기 위해 동일한 single-copy 유전자의 클로닝을 통해 비교하였다. 그 결과, *hHPRT* 유전자에 대한 TAR cloning의 빈도는 hook의 길이가 750 bp~63 bp의 범위에서 동일하게 나타났다. radial hook을 사용한 경우보다 unique hook을 사용하였을 경우 형질전환체의 수는 약 20배정도의 감소를 보였으나 목적으로 하는 재조합체의 분리 빈도는 두 배 이상 증가하였다. 그러므로 본 연구에서 two-unique TAR vector는 선별력이 높으므로 일반적 TAR cloning에 사용할 수 있으며, radial TAR vector의 경우는 병리학적 표본과 같이 제한된 게놈 DNA를 사용하는 경우에 더 적합하다고 볼 수 있다. 또한, single-copy 유전자의 분리에 필요로 하는 specific hook의 최소 길이는 약 60 bp로도 가능하다는 것을 확인하였다.

감사의 글

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

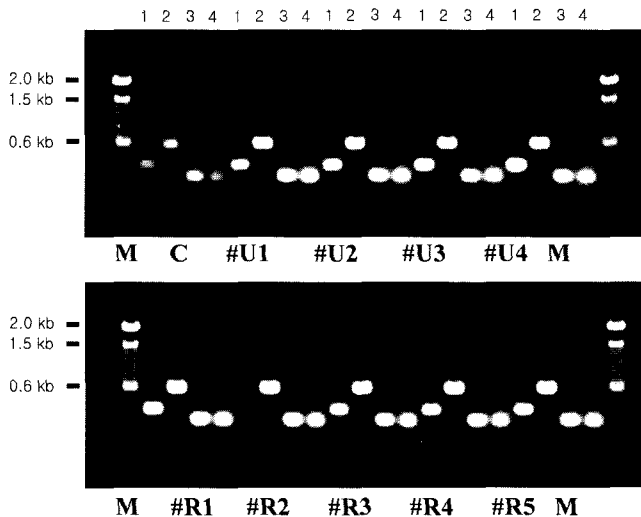


Fig. 4. Characterization of *hHPRT*-positive YAC clones by PCR analysis. The primers amplify promoter region (Lane1, 300 bp), exon 2 (Lane2, 547 bp), exon 3 (Lane3, 195 bp) and exon 9 (Lane4, 149 bp) sequences along with short sequences of flanking introns (Table 1). All YACs contained the entire *hHPRT* gene. M, 100 bp size marker (Invitrogen Inc.); C, control human genomic DNA; #U1-#U4, positive isolates from a two unique hook vector; #R1-#R5, positive isolates from a radial vector.

REFERENCES

1. 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 *BRCAl* 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. 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.
8. 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.
9. 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.
10. Larionov, V., N. Kouprina, J. Graves, X.-N. Chen, J. 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.
11. Larionov, V., N. Kouprina, J. Graves, and M.A. Resnick. 1996. 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.
12. Larionov, V., N. Kouprina, G. Solomon, J.C. Barrett, and M.A. Resnick. 1997. Direct isolation of human *BRCAl* gene by transformation-associated recombination in yeast *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **94**: 7384-7387.
13. 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.
14. 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.
15. Ma, H., S. Kunes, P.J. Schatz, and D. Botstein. 1987. Plasmid construction by homologous recombination in yeast. *Gene*. **58**: 201-216.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. Sherman, F., G.R. Fink, and J.B. Hicks. 1986. *Methods in yeast genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
20. 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.
21. 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 July 31, 2003/Accepted Nov. 23, 2003)