



DNA 재조합 기술에 이용되는 신호소 개발에 관한 연구

A Study on Novel DNA Enzymes for Development
of New Recombinant DNA Technology

연구기관
한국과학기술원

과 학 기 술 처

제 출 문

과학기술처 장관 귀하

본 보고서를 " DNA 재조합기술에 이용되는 신호소개발 "에
관한 최종보고서로 제출합니다.

1987. 11

주관연구기관명 : 한국과학기술원 부설 유전공학센터

총괄연구책임자 : 이대실 (유전공학센터 선임연구원)

연 구 원 : 김명희 (유전공학센터 선임연구원)

민성태 (유전공학센터 연구원)

요 약 문

I. 제 목

DNA 재조합기술에 이용되는 신호소 개발

II. 연구개발의 목적

생명현상의 이해를 하기 위해서는 유전자 관련된 단백질의 기능을 분자수준에서 설명할 수 있어야 한다. 이와 같은 맥락의 유전자 단백질 상호작용에 관련된 본 연구에서는 두가지 목표를 설정하여 연구를 진행하였다. 첫째는 단백질 구조와 기능 관계연구로 EcoRI 제한효소의 특정부위변이 연구를 목표로 설정하고 진행하였다. 둘째로 발현에 직접 영향을 주는 번역과정에서 ribosome binding site의 DNA서열은 중요한 의미를 갖는데 본 연구에서는 합성된 random DNA를 클로닝하여 발현수준이 좋은 것들을 추적하고 분석하는 것을 목표로 하였다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

1. EcoRI 제한효소의 특정부위 변이

- 1) EcoRI 제한효소유전자 크론을 제한효소 mapping으로 확보하였다.
- 2) EcoRI 제한효소의 구조이해와 변이위치를 결정하였다.
- 3) Site-specific mutagenesis에 heteroduplex 형성법을 선택하고 타당성을 조사하였다.

- 4) Heteroduplex 형성의 실험전략을 2 가지 선정하였다.
 - 5) 형성된 Heteroduplex 를 E. coli 에 도입하였다.
 - 6) 부분 Dideoxysequencing 에 의하여 변이선별을 시도하였다.
2. Search for the Optimal Sequence of Ribosome Binding Site from Random DNA Sequences.
- 1) 유전자기능의 구별과 발현수준선별을 위해 직접선별법을 확립하였다.
 - 2) Random DNA 를 고상 phosphite triester 법을 통하여 합성하였다.
 - 3) Random DNA 를 선별벡터에 클로닝하였다.
 - 4) 색깔의 강약에 의한 직접선별법을 통해 발현최적화된 클론을 얻었다.
 - 5) 얻은 각 클론의 beta-gactosidase 의 활성특정을 통해 발현수준을 재확인하였다.
 - 6) 얻은 클론의 벡터를 정제하였다.
 - 7) Ribosome binding site 의 DNA 서열을 결정하였다.
 - 8) 신규 RBS DNA 서열의 분석
 - 9) RBS 서열에 대한 general context 를 정립하였다.
 - 10) 16s rRNA 와의 complementarity 를 computer 분석을 통해 결정을 하였다.
 - 11) SD 서열과 위치를 결정하였다.
 - 12) 유전자기능의 발현관련연구에서 유전자기능의 이해를 넓혔고, 발현을 최적화하는 새로운 방법을 개발하였다.

IV. 연구개발결과 및 활용에 관한 건의

1. 단백질공학의 연구방향정립
2. Site-specific mutagenesis 기술확립
3. 유전자재조합산물의 유도체 제조기술확립
4. 새로운 기능유전자 추적의 방법개발로 본 분자생물학연구에
이용
5. 유전공학산물의 양산을 위한 발현체계 확립

Summary

Abstract 1

In order to do site-specific mutagenesis of EcoRI restriction endonuclease, the gene was confirmed with the mapping of restriction endonuclease. The site to be mutated, Arg-200, was decided on the basis of the structure-function relationship of the EcoRI restriction endonuclease relating to the recognition of bases, not reactive site. The methodology employing heteroduplex formation for the mutagenesis was adopted, rather than M13 method and the synthetic approach. Two experimental strategies were designed for the formation of the heteroduplex. The screening of mutant obtained from strategy-1 through the partial dideoxy-sequencing have been attempted. Also, heteroduplex formation through strategy-2 was confirmed and the screening is being undergone.

Abstract 2.

Two synthetic DNA duplexes corresponding to the ribosome binding site(RBS) were synthesized through the phosphite method on solid support; one for correcting the reading frame of beta-galactosidase with an optimized sequence and the other possessing partly random sequences. The synthetic RBS DNA duplexes having EcoRI and HindIII cohesive ends were cloned into an appropriate site between lpp-lac promoter and beta-galactosidase structural gene in plasmid pMKT2. This construction gave a direct screening system for the detection of expression level on the plate by differentiating color intensities of colonies formed. Colonies with the most intense blue color were characterized in terms of beta-galacto-

sidase activity and RBS sequences. The results could provide the correlation between the novel sequences and the expression level, and define the ribosome binding site with aspects of the general context. This approach provides a useful methodology to search for the meaningful regulatory genes on the basis of phenotypical screening from the random DNA sequence.

Contents

Chapter 1. Site-Specific Mutagenesis of EcoRI Restriction	
Endonuclease	13
I. EcoRI Restriction Endonuclease	14
II. Materials and Methods	23
1. Materials	23
1) <u>E.coli</u> strain	23
2) Medium	23
3) Solutions and Buffers	24
4) Chemicals and Enzymes	25
2. Methods	25
1) Large-Preparation of Plasmid	25
2) Rapid Preparation of Plasmid DNA	26
3) Transformation	26
4) Synthesis and Purification of Oligonucleotides ..	27
5) Phosphorylation of Oligonucleotides	27
6) Formation of Heteroduplex	28
7) Fill-in Reaction and Ligation	28
8) DNA Sequencing	28
III. Results	30
1. Oligonucleotide Synthesis	30
2. Plans for Heteroduplex Formation	32
3. Preparation of Vector Fragments in Strategy-1	36
4. Formation of Heteroduplex	36
5. Transformation and Screening	38
6. Preparation of Vector Fragments and Formation of Heteroduplex in Strategy-2	39
IV. Discussion	40
References	42

Chapter 2. Search for the Optimal Sequence of Ribosome Binding Site from Random DNA Sequence	44
I. Introduction	44
II. Materials and Methods	46
1. Strain, plasmids, and enzymes	46
2. Oligonucleotide synthesis	47
3. Computer analysis	47
4. Annealing	48
5. Beta-galactosidase assay	48
6. DNA sequencing	49
7. Construction of plasmids, pMKT1, pMKT2 and pMKT2-series	49
III. Results	50
IV. Discussion	54
References	61

목 차

제 1 장 EcoRI 제한효소의 특정부위변이	13
제 1 절 EcoRI 제한효소	14
제 2 절 연구내용 및 방법	23
1. 실험재료	23
1) E. coli strain	23
2) 배 지	23
3) 반응용액 및 완충용액	24
4) 화합물과 효소	25
2. 실험방법	25
1) Plasmid의 large-preparation	25
2) Rapid plasmid DNA 제조	26
3) E. coli의 transformation	26
4) Oligonucleotide의 합성과 정제	27
5) Oligonucleotide의 phosphorylation	27
6) Heteroduplex의 형성	28
7) Fill-in 반응과 ligation	28
8) DNA sequencing	28
제 3 절 실험결과	30
1. Oligonucleotide의 화학합성	30
2. Heteroduplex 제조계획	32

3. 실험전략 - 1 의 벡터절편제조	36
4. Heteroduplex 의 형성	36
5. Transformation 과 선별	38
6. 실험전략 - 2 의 벡터절편제조와 heteroduplex 형성	39
제 4 절 고찰	40
참고문헌	42
제 2 장 Search for the Optimal Sequence of Ribosome	
Binding Site from Random DNA Sequences	44
제 1 절 서론	44
제 2 절 실험재료 및 실험방법	46
1. 균주, 플라스미드, 효소	46
2. Oligonucleotide 합성	47
3. Computer 분석	47
4. Annealing	48
5. Beta-gactosidase assay	48
6. DNA 서열결정	49
7. 플라스미드 건설	49
제 3 절 실험결과	50
제 4 절 고찰	54
참고문헌	61

제 1 장 EcoRI 제한효소의 특정부위 변이

생명현상을 이해하기 위해서는 생체내 존재하는 유전자기능 이해와 함께 각종 기능 단백질, 효소등의 생체활성물질등을 파악하고, 본래 가지고 있는 고유의 기능을 분자수준에서 이해하여야 한다. 더 나아가 이들의 기능을 분자수준에서 이해하여야 한다. 더 나아가 이들의 기능을 이용하여 생명과학의 탐구의 심층을 더 깊이 할 수 있고, 더불어 생물공업의 범위를 확장하게 된다고 말할 수 있다. 이러한 대표적인 예는 미생물에 존재하는 제한효소를 찾아 유전자절단기능을 추적하였고, 이 기능을 이용하여 유전자 재조합연구의 필수소재로 사용하므로서 유전공학이라는 신과학기술이 등장하게 된 경우라 할 수 있다.

분자생물학의 기본적인 질문의 하나는 유전자 기능을 이해하기 위해서 유전자와 기능단백질 혹은 관련 효소간의 상호작용연구라고 할 수 있다. 또한 이와 관련하여 기능단백질과 효소의 구조와 기능간의 상호관계연구는 유전자가능 이해와 함께 가장 기본적이면서 생명현상이해의 중심연구목표라 하겠다. 이러한 목표의 연구대상으로 본 연구에서는 beta-galactosidase 와 EcoRI 제한효소를 선정하여 연구를 진행하게 되었다. 이러한 효소들은 상당한 배경지식이 알려져 있고 쉽게 구할 수 있는 효소들로서 유전자기능 연구와 효소와 유전자간의 상호작용연구 및 구조-기능관계연구의 좋은 연구소재로 판단되었으며 연구복표수행

과 더불어 유전공학산불제졌등의 응용성이 많으므로서 목적기초연구로서의 적합성이 있다고 사료되어 본 연구를 추진하게 되었다.

본 연구보고서에는 두개의 연구목표의 진행을 기술하였다. 첫째로 EcoRI 제한효소 유전자의 특정부위변이를 통해서 신규 제한효소 유도체 제조와 관련기술을 정착하고, EcoRI 제한효소 유전자의 특정부위변이를 통해서 신규 제한효소 유도체 제조와 관련기술을 정착하고, EcoRI 제한효소의 구조-기능관계 연구를 수행과 DNA-단백질간의 상호작용장 관한 연구진행을 보고하였다. 둘째로 beta-galactosidase의 유전자가 있는 벡터를 이용하여 발현의 수준을 색깔로 감지할 수 있는 발현수준직접선별법을 고안하였고, beta-galactosidase 유전자 앞에 임의 합성유전자를 삽입하여 발현최적화에 필요한 유전자서열을 추적, 감지하고 이에 관련된 유전자 기능연구를 수행한 내용으로 구성되었다.

제 1 절 EcoRI 제한효소

오늘날 분자생물학에서 가장 흥미를 끄는 진보중의 하나는 새로운 기능을 갖는 단백질이나 효소를 설계하고 만들 수 있다는 것이다. 유전자재조합기술의 발달을 단백질의 아미노산 residue를 대체, 삭제 또는 첨가해서 아미노산 순서를 임의로 바꿀 수 있게 하였고, 또 두개 이상의 단백질을 서로 붙여 혼합 단백질을 만들며, 심지어 새로운 기능을 갖는 단백질을 위해 유전자를 모두 합성할 수도 있게 하였다. 이러한 일련의 분야들

이 현재 단백질 공학이라 불리어지고 있으며 본 연구에서는 유전자 재조합기술에서 가장 많이 쓰이는 EcoRI 제한효소를 대상으로 이들 분야에 진입하고자 한다.

EcoRI 제한효소는 dsDNA의 d(GAATTC) 서열부위를 인식하고 절단하는 효소로서 DNA 재조합실험에 이 제한효소가 가장 많이 사용되는 필수도구중 하나가 되고 있다. 이 EcoRI 제한효소는 276개의 아미노산으로 구성되어 있으며 그 아미노산 서열과 DNA 서열정보는 모두 알려져 있다. 분자량은 31,065 dalton이며 용액 상에서는 매우 안정된 catalytically active dimer를 형성하지만 단백질의 농도가 높을 때에는 tetramer를 형성할 수도 있다. EcoRI은 magnesium ion 존재하에 guanylic 과 adenylic residue 사이의 phosphodiester bond를 가수분해를 한다. 비록 EcoRI이 phosphodiester bond의 가수분해에 magnesium ion이 필요하지만, magnesium ion이 없어도 $10^{-11}M^{-1}$ dissociation constant를 가지고 cognate hexanucleotide와 specific하게 결합한다. EcoRI 제한효소도 specific sequence와 interaction하며, 더불어 DNA를 가수분해하지 않는 nonspecific한 방법으로 DNA와 결합하는데 이것은 nonspecific complex가 DNA를 따라 facilitated diffusion함으로써 specific complex의 형성비율을 증가시킨다. EcoRI 제한효소와 EcoRI methylase는 같은 hexanucleotide를 인식하지만 EcoRI methylase는 double-strand DNA의 각 strand에서 central adenine residue의 exocyclic N-6 amino

group 을 methylation 시킨다. 어느 한쪽 group 이 methylation 되어도 제한효소는 ds DNA 를 자르지 못한다. 그러므로 EcoRI 제한효소는 specific hexanucleotide 와 다른 모든 hexanucleotide 를 구별하며 또한 같은 hexanucleotide 에서의 methylation 상태를 구별할 수 있다.

이렇게 정확도를 가진 EcoRI 제한효소의 기능은 3 차구조를 통하여 효소의 염기인식, 염기절단반응의 분자수준 설명을 가능하게 해주고 있다. EcoRI 제한효소의 subunit 는 alpha-helix 에 의해 양 옆 부분이 둘러싸인 5-stranded beta-sheet 로 구성되어 있다. 이 beta-sheet 의 5개 strands 중 4개는 parallel 이며, 한개의 antiparallel strand 는 beta-sheet 를 개념적으로 parallel 과 antiparallel three-stranded motifs 로 나눌 수 있도록 한다. Parallel motif 는 subunit 상호작용뿐만 아니라 단백질과 DNA base 사이의 직접접촉에 관여하며 antiparallel motif 는 DNA strand scission site 와 관련이 있는 것으로 알려졌다 (Fig.1). 사슬의 amino terminal 부분 (residue 2 ~ 17) 은 DNA 를 감싸는 역할을 담당하는 arm 의 일부를 형성하고, residue (18 ~ 28) 은 enzyme 의 표면을 이루고, residue (29 ~ 47) 은 표면에 alpha-helix 를 형성한다. 이것은 다음에 오는 loop 을 통해 beta-sheet 의 첫번째 strand 로 이어진다 (residue 44 ~ 56). Beta-sheet 는 antiparallel motif 의 바깥에서부터 시작하며 순서적으로 형성된다. 다음 loop (residue 63 ~ 102) 는 첫번째와 두번째와 beta-strand 를 연결

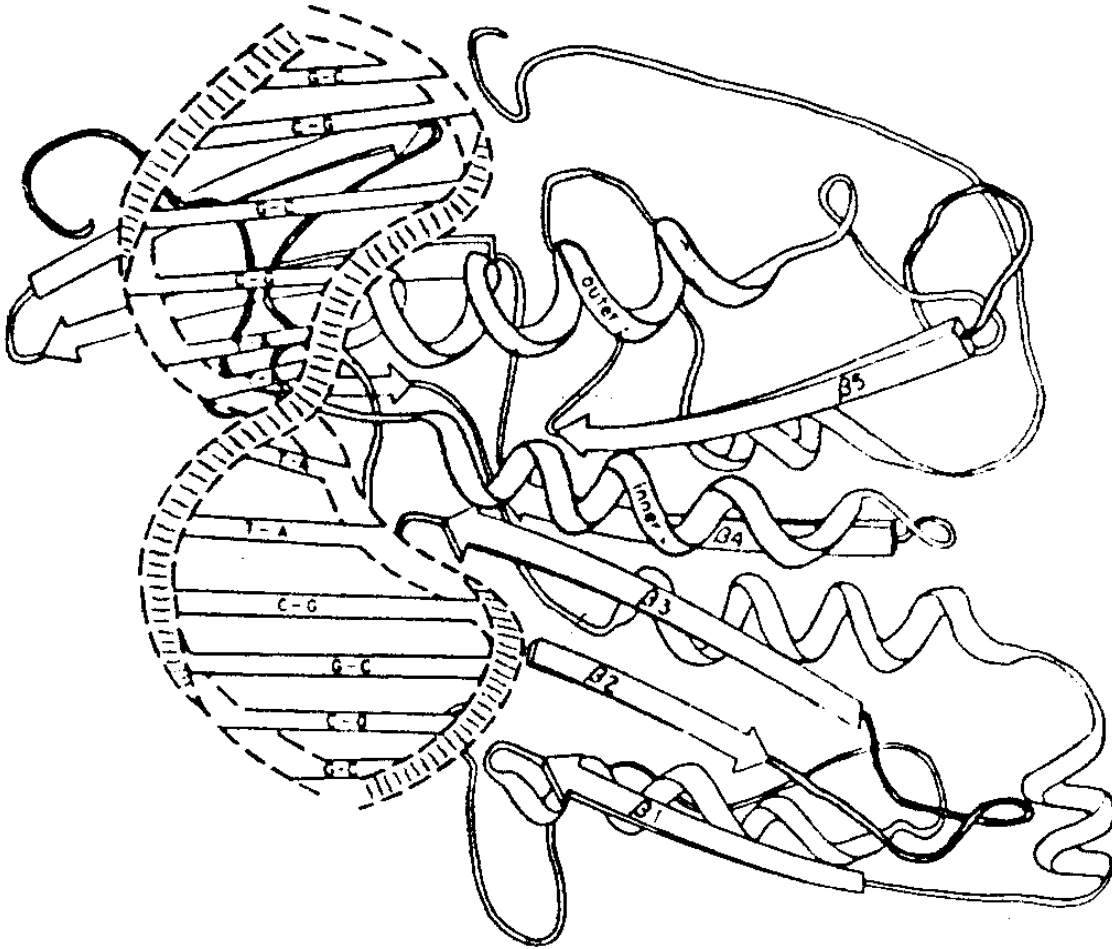


Fig. 1. Schematic backbone drawing of one subunit of (dimeric) Eco RI endonuclease and both strands of the DNA in the complex

결한다. 두번째와 세번째 antiparallel beta-strands (residue 110~122)의 loop는 용액에 약간 노출되어 있으며 세번째 beta-strand는 antiparallel과 parallel motif의 분기점에 위치하여 양 motif에 관련을 갖고 있다. 양 motif 사이의 역할은 EcoRI 제한효소기능인 DNA 인식과 DNA strand scission activity에 대한 두 지역간의 구조적 상호작용의 방법을 제공한다. 세번째와 네번째 strand(residue 146~15)를 연결하는 alpha-helix를 'inner alpha-helix'라 하며 inner recognition module의 일부를 이룬다. 4번째와 5번째 (residue 201~209)의 beta-strand를 연결하는 alpha-helix는 'outer alpha-helix'라고 한다. Residue 229에 5번째 beta-strand가 있은후 polypeptide chain은 complex의 표면을 둘러싸는 extended loop를 형성하며 carboxyl terminus가 DNA backbone 근처에 있게된다 (Fig. 2). 각 subunit의 inner outer alpha-helix는 amino terminal ends가 DNA의 major groove로 돌출되도록 위치하고 있으며, DNA 염기와 상호작용하는 아미노산 side chain은 이들 helices의 끝에 또는 helix 바로 앞의 residue에 위치한다.

DNA와 EcoRI의 접촉은 두 부분으로 볼수 있는데 첫째는 protein과 DNA backbone사이의 광범위한 접촉이고, 둘째는 효소가 인식하는 hexanucleotide (GAATTC)의 major groove의 일부분을 cover하고 있는 것이다. minor groove는 용액상에 노출되어 있다. 아미노산 side chain (Glu-144, Arg-145, Arg-200)

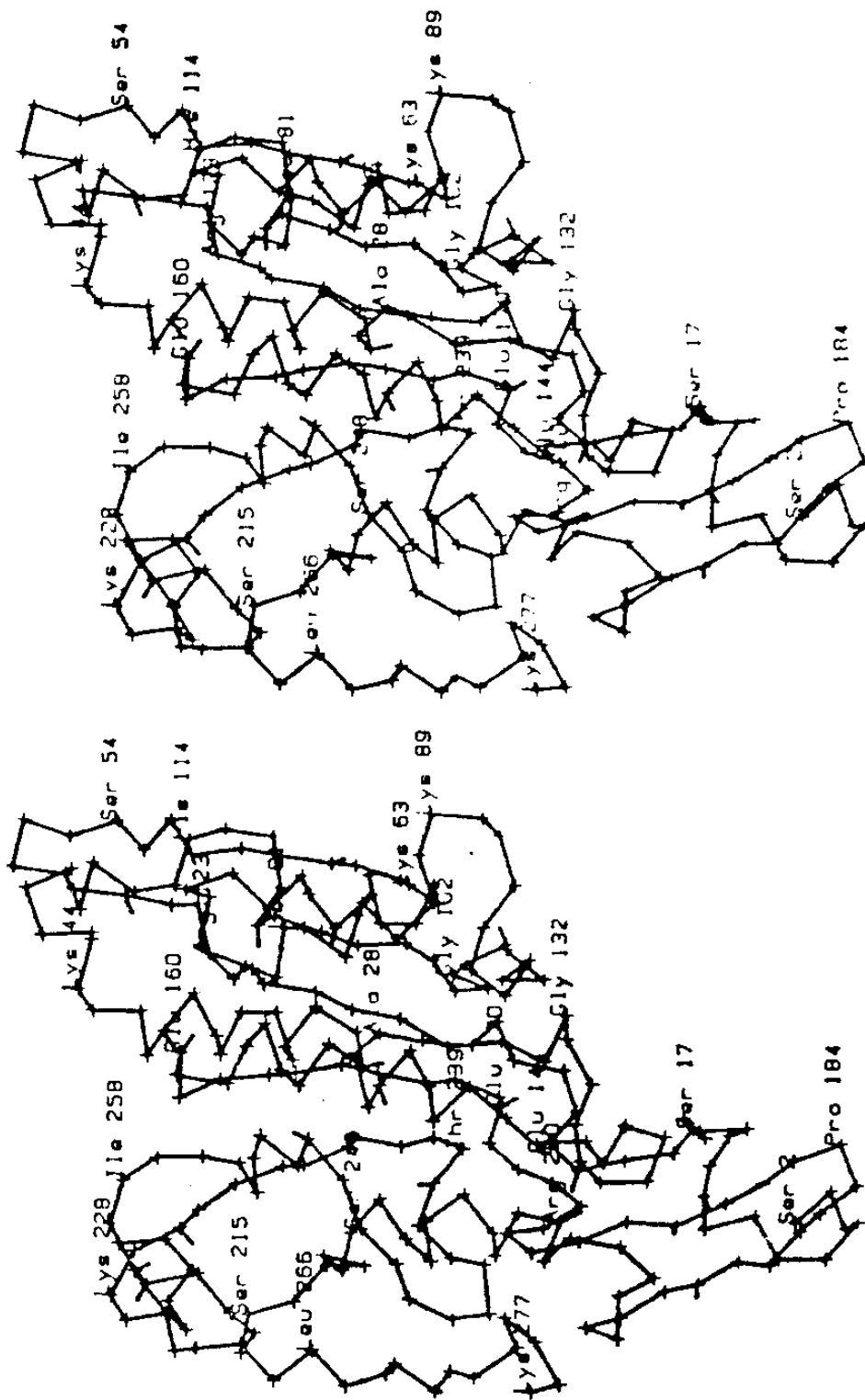


Fig. 2. Astereo drawing of the alpha carbon trace of one subunit of Eco RI endonuclease

과 hexanucleotide의 purine 염기 사이의 수소결합은 complex 에서 직접적으로 sequence-specific DNA-protein interaction 을 이룬다 (Fig. 3-4). Arg-200 의 guanidium moiety 는 guanine 염기와 두개의 수소결합을 한다. Guanine N-7 원자와 O-6 원자에 각각 수소결합을 이루게 된다. Glu-144 의 side chain 은 2 개의 adenine N-6 amine groups 과 수소결합을 하며, Arg-145 는 2 개의 adenine N-7 원자에 수소결합을 한다. 이들 상호작용은 다른 모든 hexanucleotide 로부터 구별하여 EcoRI 의 인식 염기인 hexanucleotide GAATTC 만을 구별하도록 한다.

본 연구에서는 d(GAATTC) EcoRI 인식부위에서 맨 끝의 guanylic residue 가 Arg-200 에 의해 인식되므로 Arg-200 바로 앞의 아미노산 Asn-199 를 다른 아미노산으로 대체 하였을 때 기존 6개 염기인식부위에서 새로운 인식염기를 인식하거나, 6개 이상의 염기인식기능을 갖게 되는 신규 변이 EcoRI 이 만들어질 수 있다는 점에 착안하여, EcoRI 유전자내의 Arg-200 바로 앞 Asn-199 에 해당하는 codon 의 3개 염기 AAT 를 모두 random 하게 합성한 oligonucleotide 로 바꾸어 oligonucleotide-directed, site-specific mutagenesis 계획을 수립하여 수행하였다.

본 연구의 목표는 새로운 인식부위를 갖는 신규 변이 EcoRI 제한효소를 DNA 재조합기술로 고안 제조하고, 더불어 EcoRI 효소의 아미노산 - 199 위치가 catalytic activity 와 specific sequence 의 인식에 어떠한 영향을 미치는가를 구조 - 기능관계연구 측면에서 조사하고 더 나아가 분자생물학의 기본 질문인 DNA-

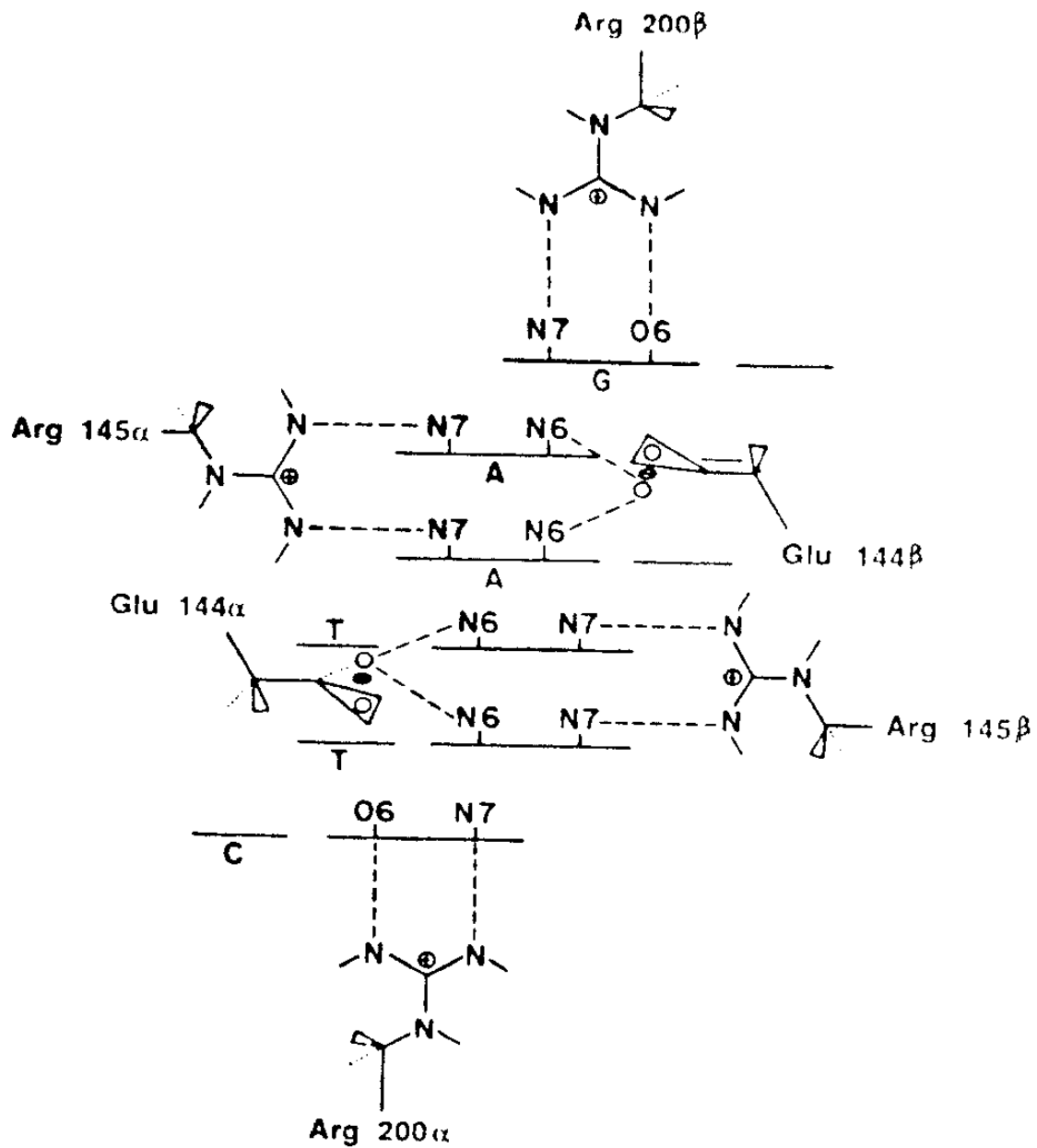


Fig. 3. A schematic representation of the recognition interactions and the 12 hydrogen bonds that determine the specificity of EcoRI endonuclease

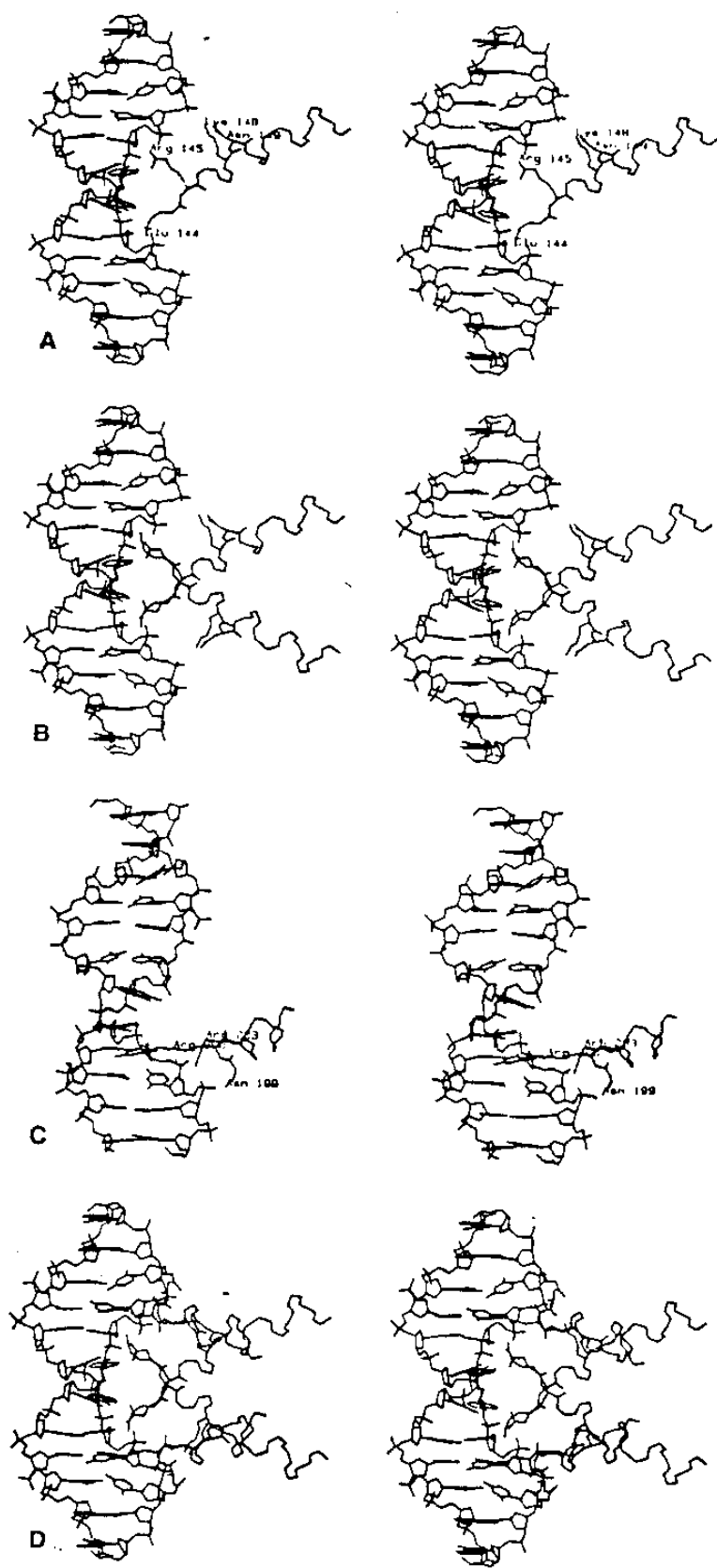


Fig. 4. Stereo drawing showing the recognition alpha helices and modules

단백질 상호작용에 관한 이해와 이론을 정립하고자 하는 것이다. 궁극적으로 이 연구의 연장은 신규의 기능효소를 제조할 수 있는 기반을 다지며, 단백질공학의 목표설정을 원활하게 할 것으로 본다.

제 2 절 연구내용 및 방법

1. 실험재료

1) E. coli strain

JM 109 (recA1, end A1, gyr A96, thi, hsd R17, SupE 44, (lac-proAB), F' tra D36, proAB, lacI Z M15)

2) Medium

LB 배지는 1 liter 당 10 g의 bacto-tryptone, 5 g의 yeast extract, 10 g의 NaCl 을 포함하며 plate 를 만들 때는 15 % (W/v) 의 bacto-agar 를 넣어 사용하였다. SOB 배지의 조성을 2 % (w/v) bacto-trytone, 0.5 % (w/v) yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgSO₄ 이며, 배지를 만들 때는 Mg²⁺가 든 salt 를 제외한 나머지를 혼합하여 autoclave 한 다음 filter-sterilize 한 Mg²⁺의 2M stock 용액을 20 mM 농도가 되도록 배지에 넣어주었다. SOC 배지는 SOB 에 20 mM glucose 를 함유한 것으로 filter-sterilize 한 2 M glu-

cose 용액을 20 mM이 되도록 SOB와 혼합하여 사용하였다.

3) Buffers

제한효소 및 polymerization에 사용한 buffer는 다음과 같다. 제한효소 BamHI, Aval, Hind III의 반응을 위한 buffer는 100 mM NaCl, 50 Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT의 농도이다. 5 × polymerase-ligase buffer는 500 mM NaCl, 32.5 mM Tris-Cl (pH 7.5), 40 mM MgCl₂, 5 mM beta-mercaptoethanol이다. Gel electro-phoresis에 사용한 buffer는 다음과 같다. TBE buffer (×5)는 1 liter당 tris base 54 g, boric acid 27.5 g, 0.5 M EDTA (pH 8.0) 20 ml를 혼합하여 만들었다. Hananan method에 사용되는 transformation buffer는 10 mM potassium morpholino-ethanesulfonic acid (MES), 10 mM RbCl, 45 mM MnCl₂, 10 mM CaCl₂, 3 mM HAcOCl₃로 구성된다. 1 M MES는 KOH를 이용하여 pH 6.3을 맞춘 후 filter-sterilize하여 20 °C에 저장하였다가 사용하며 다른 모든 성분을 섞어 녹인 후 0.22 filter를 통과시켜 4 °C에 저장한다. DMSO (dimethyl sulfoxide)는 새로 판병에 250 ml씩 따라서 -20 °C에서 보관하다가 하나씩 꺼내 사용하였다. DTT 용액은 2.25 M DTT, 40 mM potassium acetate (pH 6.0)를 함유하며 filter-sterilize하고 -20 °C에서 보관하였다.

4) Chemical 과 enzymes

BamHI, HindIII 등의 제한효소, T4 DNA ligase, Klenow fragment, Bacterial alkaline phosphatase, T4 polynucleotide kinase 등의 enzyme 들은 Bethesda Research Laboratories (BRL)에서 구입하였다. Lysozyme, SDS, Tris-base, acrylamide 등은 Sigma chemical co.로부터 구입하였고 TEMED, ammonium persulfate 는 BRL에서 구입하였다. N,N'-methylene-acrylamide 와 Rubidium chloride 는 Fluka에서 구입하였다. 기타 사용된 chemicals 등은 모두 reagent grade 이다.

2. 실험방법

1) Plasmid DNA 의 large-preparation

Plasmid 가 들어있는 E. coli 균주는 1 liter LB 배양액에서 overnight 배양하여 pellets 을 얻은 후, 20 ml 의 lysozyme 용액 (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA, 4 mg/ml lysozyme) 에 녹여 실온에서 5 분간 방치해 두었다가 40 ml 의 0.2 N NaOH, 1 % SDS 용액에 넣고 섞은 후 얼음에 10 분간 둔다. 다시 30 ml 의 5 M potassium acetate 를 넣고 얼음에 15 분간 두었다가 이것을 Beckman GS-3 rotor 로 4 °C 에서 7,500 rpm 으로 30 분간 원심분리하여 상층액을 0.6 부피의 isopropanol 과 잘 섞은 후 실온에서 15 분간 방치한다. 이어서 다시 원심분리하여 침전물을 70 % ethanol 과 잘 섞은 후

실온에서 5분간 방치한 다음 다시 원심분리하여 침전물을 70% ethanol로 씻고 말린 후, 8 ml의 TE 용액에 녹인다. 1 ml 당 1 g씩의 CsCl을 첨가하여 완전히 녹인 후 EtBr을 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 되도록 섞어주었다. 이것을 Beckman type 50.1 rotor로 20 $^{\circ}\text{C}$, 40,000 rpm에서 40시간동안 원심분리한 후 plasmid DNA band를 주사기로 뽑아 내었다. 이 DNA 용액에서 EtBr을 물로 포화된 n-butanol로 여러번 추출하여 제거하였다. 그 다음 1.5배 부피의 물을 섞고 phenol/chloroform으로 추출한 후 ethanol로 침전시켰다. 미량의 RNA가 섞어있을 수 있으므로 DNase free RNase로 실온에서 1시간동안 반응시킨 뒤 다시 phenol/chloroform으로 처리한 후 ethanol로 침전시키고, 말린 다음 적당량의 TE 용액에 녹여 -20 $^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다. DNA의 농도는 260에서 absorbance를 측정하여 알 수 있었다.

2) Rapid plasmid DNA preparation

Overnight culture 1.5 mL은 1분동안 원심분리하여 얻은 E. coli pellets을 앞에서와 같은 용액을 각각 100 μL , 200 μL , 150 μL 씩 넣고 원심분리한 후 상층액을 떠내 phenol/chloroform 처리한 후 ethanol로 침전시키고 이를 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNases를 함유한 TE 용액에 녹여 앞에서와 같이 정제하였다.

3) E. coli의 transformation

E. coli의 transformation에는 Hanahan method를 사용

하였다. 사용할 *E. coli* strain 을 하루 전에 seed 하여 하룻밤 키운 후 50 ml SOB broth 에 0.5~1 ml 접종하여 37 °C shaker 에서 2~3 시간 키워 OD (600 nm) = 0.2 가 되면 얼음에 10 분간 두었다가 4 °C, 400 *g* 에서 5 분간 원심분리하여 모은 세포에 1/3 volume transformation buffer 를 넣은 후 dimethylsulfoxide (DMSO) 용액을 천천히 가하여 3.5 % 가 되게 하였다. 세포가 담긴 시험관을 얼음에 5 분간 둔 후, DTT 용액을 75 mM 가 되도록 첨가하고 얼음에 다시 10 분 두었다가 먼저와 같은 양의 DMSO 를 천천히 넣어 다시 얼음위에 5 분간 두었다가 이것을 200 μ l 씩 취해서 plasmid DNA 와 섞고 얼음에서 30 분, 42 °C 에서 90 초 다시 얼음위에서 5 분간 incubation 하였다. 여기에 800 μ l 의 SOC 를 넣고 37 °C 에서 1 시간 배양하고 배양액 300 μ l 씩을 ampicillin 등이 든 LM plate 에 골고루 펴서 말린 후, 37 °C 에서 하룻밤 배양하였다.

4) Oligonucleotide 의 합성과 정제

Mutagenesis 와 sequencing 에 사용할 oligonucleotide 들은 고상 phosphite triester 합성법을 이용 합성하였고, polyacrylamide gel electrophoresis 와 SEP-PAK 을 이용하여 정제 사용하였다.

5) Kination

합성한 oligonucleotide (20 p mole / mL) 를 0.5 M Tris -

HCl (pH 7.5), 0.1M $MgCl_2$, 0.1M beta-mercaptoethanol, 1mM ATP. T4 polynucleotide kinase 가 들어있는 용액 상에서 60 분 동안 37 °C에서 반응시킨 후 65 °C에서 10 분간 incubation 으로 반응을 정지시킨 후 -20 °C에 보관하였다.

6) Heteroduplex 의 형성

제한효소로 자른 fragment 들을 5 ' 끝에 phosphorylated 된 primer 와 5× polymerase-ligase buffer 가 들어 있는 용액에 넣고 boiling water bath에서 3 분동안 incubation 하고 재빨리 30 °C incubator 로 옮겨 30 분동안 incubation 한다. 그리고 냉장고 (4 °C)로 옮겨 30 분동안 있는 후 얼음에 10 분 동안 놓아둔다.

7) Polymerization 과 ligation

위에서 만든 reaction mixture 에 2.5 mM의 dTTP, dCTP, dATP, dGTP, 10 mM ATP, Klenow fragment, T4 DNA ligase 를 넣고 12.5 °C에서 overnight incubation 시켰다.

8) DNA sequencing

Sanger 의 dideoxynucleotide chain termination sequencing method 를 약간 변형하여 double-stranded supercoiled plasmid 에서 직접 sequencing 하였다. 정제된 plasmid 1~2 μg 을 물에 녹여 NaOH 농도가 0.2 M이 되도록 넣어 denature

시킨 후, ammonium acetate (pH 4.5)를 0.2 M이 되도록 넣어 neutralization 하고 EtOH를 넣어 침전시켜 말린 후 다시 9 ml의 물에 녹이고 10 pmole의 primer와 Klenow buffer를 첨가하여 37 °C에서 15분간 두어 annealing 했다. 여기에 1~5 unit의 Klenow fragment와 (alpha-32 P) dATP 1 μg (3 pmole)을 넣어 섞은 후, G.A.T.C. 네가지 반응을 위해 4개의 eppendorf tube에 똑같은 양으로 나누었다. 여기에 각각 적당한 농도의 dATP/ddATP, dCTP/ddCTP, dGTP/ddGTP, dTTP/ddTTP mixture를 각각 넣고 섞은 후 37 °C에서 15분간 reaction시키고 다시 0.25 mM의 dNTPs를 각 tube에 1 μl씩 넣어 37 °C에서 15분간 chase reaction시키고, deionized formamide에 xylene cyanol과 bromophenol blue를 0.3% 되도록 섞고 EDTA (pH 7.0)를 0.37% 되도록 넣은 stop solution을 각 tube에 5 μl씩 넣어 반응을 중단시켰다. 이 반응 mixture를 각 2 ul씩 따서 90~100 °C에서 3분간 끓인 후 8% polyamylamide, 8M urea gel에 loading하여 1500~1700 volts (20 mA ~ 30 mA)로 5~6시간 electrophoresis 하였다. Electrophoresis가 끝난 후 유리판을 식혀 떼어낸 후 gel을 wrap으로 싸서 x-ray film에 붙여 -70 °C에서 overnight expose하고 film을 developing하여 sequence를 읽었다.

제 3 절 실험결과 및 고찰

1. Oligonucleotide 의 합성

E. coli 제한효소 유전자 (Fig. 5)에서 Ser-195의 codon TCT의 CT에서부터 Thr-205의 codon ACT의 AC는 complementarity를 유지하면서 Asn-199의 codon AAT는 모두 다 random base로 하여 EcoRI 제한효소의 mutagenic oligonucleotide를 실험에 맞추어 계획하였다.

Gly Ile Leu Asn Arg Leu Asp Arg Leu
-- ct ggt ata tta aat agg tta gat cga cta ac --
3'-GA CCA TAT NNN TCC AAT CTA GCT GAT TG-5'
: Mutagenic oligonucleotide

이 계획한 mutagenic oligonucleotide는 고상 phosphite triester 법으로 합성하였다. 합성된 oligonucleotide의 deprotection은 5' 끝에 DMT기가 없으므로 conc.-ammonium hydroxide의 처리로 수행하였다. 이어서 진행된 정제는 denaturing polyacrylamide gel electrophoresis와 SEP-PAK을 이용하여 정제하였다. 이 mutagenic oligonucleotide는 T4 polynucleotide kinase에 의해 phosphorylation하여 형성된 hetero-duplex에 annealing하여 site-specific mutagenesis 실험에 사용하였다.

Met Ser Asn Lys Lys Gln Ser Asn Arg 10 Thr Glu Gln His Lys Leu Ser Gln Gly Val Ile Gly
 ATG TCT AAT AAA AAA CAG TCA AAT AGG CTA ACT GAA CAA CAT AAG TTA TCT CAA GGT GTA ATT GGG 407
 Ile Phe Gly Asp Tyr Ala Lys 30 Ala His Asp Leu Ala Val Gly Glu Val Ser Lys Leu Val Lys Lys Ala Leu Ser Asn Glu Tyr Pro Gln Leu
 ATT TTT GGG GAT TAT GCA AAA GCT CAT GAT CTC GCT GTT GGT GAG GTT TCA AAA TTA GTA AAG AAA GCT CTT AGC AAC GAA TAC CCT CAA TTA 500
 Ser Phe Arg Tyr Arg Asp Ser Ile Lys Lys Thr Glu Ile Asn Glu Ala Leu Lys Lys Ile Asp Pro Asp Leu Gly Gly Thr Leu Phe Val Ser
 TCA TTT CGA TAT AGA GAT ACT ATA AAG AAA ACA GAA ATA AAT GAA GCT TTA AAA AAA ATT GAC CCT GAT CTT GGC GGT ACT TTA TTT GTT TCA 591
 Asn Ser Ser Ile Lys Pro Asp Gly Gly Ile Val Glu Val Lys Asp Asp Tyr Gly Glu Trp Arg Val Val Leu Val Ala Glu Ala Lys His Gln
 AAT TCC AGC ATC AAA CCT GAT GGT GGA ATT GTA GAG GTC AAA GAT TAT GGT GAA TCG AGA GTT GTA CTT GGT GCT GAA GCC AAA CAC CAA 686
 Gly Lys Asp Ile Ile Asn Ile Arg Asn Gly Leu Leu Val Gly Lys Arg Gly Asp Gln Asp Leu Met Ala Ala Gly Asn Ala Ile Glu Arg Ser
 GGT AAA GAT ATT ATA AAT ATA AGC AAT GGT TTG TTA GTT GGG AAA AGA GCA GAT TAT GGT GAA TCG AGA GTT GTA CTT GGT GCT GAA GCC AAA CAC CAA 779
 His Lys Asn Ile Ser Glu Ile Ala Asn Phe Met Leu Ser Glu Ser His Phe Pro Tyr Val Leu Phe Leu Glu Gly Ser Asn Phe Leu Thr Glu
 CAT AAG ACA ATA TCA GAG ATA GCG AAT TTT ATG CTC TCT GAG AGC CAC TTT CCT TAC GTC CTT TTC TTA GAG GGG TCT AAC TTT TTA ACA GAA 872
 Asn Ile Ser Ile Thr Arg Pro Asp Gly Arg Val Val Asn Leu Glu Tyr Asn Ser Gly Ile Leu Asn Arg Leu Asp Arg Leu Thr Ala Ala Asn
 AAT ATC TCA ATA ACA AGA CCA GAT GGA AGG GTT TTA AAT CTT GAG TAT AAT TCT GGT ATA TTA AAT AGG TTA GAT CGA GTA ACT GCA GCT AAT 965
 Tyr Gly Met Pro Ile Asn Ser Asn Leu Cys Ile Asn Lys Phe Val Asn His Lys Asp Lys Ser Ile Met Leu Gln Ala Ala Ser Ile Tyr Thr
 TAT GGA ATC CCT ATA AAT AGT AAT CTA TGT ATT AAC AAA TTT GTA AAT CAT AAA GAC AAA ACC ATT ATG CTA CAA CCA GCA TCT ATA TAT ACT 1058
 Gln Gly Asp Gly Arg Glu Trp Asp Ser Lys Ile Met Phe Glu Ile Met Phe Asp Ile Ser Thr Thr Ser Leu Arg Val Leu Gly Arg Asp Leu
 CAA CGA GAT GGG AGC GAG TCG GAT TCG AAA ATC ATG TTT GAA ATA ATG TTT GAT ATA TCA ACC ACT TCG CTC AGA GTG TCG GGG CGT GAC TTT 1111
 Phe Glu Gln Leu Thr Ser Lys 1200 Met Ala Arg Asn Ala Thr Asn Lys Leu Leu His Lys Ala Lys Lys
 TTT GAA CAG CTT ACA TCT AAG TCATATTTTTTATTTTAATAAAGGTTTAATTA ATC GCT AGA AAT GCA ACA AAC AAG TTA CTC CAC AAA GCT AAA AAA 1249
 Ser Lys Ser Asp Glu Phe Tyr Thr Gln Tyr Cys Asp Ile Glu Asn Glu Leu Gln Tyr Tyr Arg Glu His Phe Ser Asp Lys Val Val Tyr Cys
 TCG AAA AGC CAC GAA TTT TAC ACT CAG TAT TTT GAT ATT GAG AAC GAA CTC CAA TAC TAC ACA GAG CAC CAC TTC TCT GAT AAG GTT GTT TAT TCG 1342
 Asn Cys Asp Asp Pro Arg Val Ser Asn Phe Phe Lys Tyr Phe Ala Val Asn Phe Asp Asn Leu Gly Leu Lys Lys Leu Ile Ala Ser Cys Tyr
 AAT TCT GAT GAT CCT AGA GTA AGC AAT TTC TTT AAA TAT TTT GCA GTC AAT TTT GAT AAT CTT GGC TTG AAA AAG TTA ATA GCA TCT TCG TAT 1415
 Val Glu Asn Lys Glu Gly Phe Ser Ser Ser Glu Ala Ala Lys Asn Gly Phe Tyr Tyr Glu Tyr His 100 Lys Lys Glu Asn Gly Lys Lys Leu Val Phe
 GTA CAG AAT AAA GAA GGT TTT TCT AGT AGC GAA GCC GCG AAG AAC GGA TTT TAC TAT GAA TAT CAT AAA GAA AAT GGA AAG AAA TTA GTT TTT 1520
 Asp Asp Ile Ser Val Ser Ser Phe Cys Gly Asp Gly Asp Phe Arg Ser Ser Glu Ser Ile Asp Leu Leu Lys Lys Ser Asp Ile Val Val Thr
 GAT GAT ATT AGT GGT TCT TCT TTC TGT GGC GAT GGC GAT TTT CCG ACT TCG GAG AGC ATT GAT CTG CTA AAA AAA TCA GAT ATT GTT GTT AGC 1621
 Asn Pro Pro Phe Ser Leu Phe Arg Glu Tyr Leu Asp Gln Leu Ile Lys Tyr Asp Lys Lys Phe Leu Ile Ile Ala Asn Val Asn Ser Ile Thr
 AAT CCT CCA TTC TCG TTA TTT AGA GAG TAT CTT GAT CAA GCA AAT AAG TAT GAT AAG AAA TTC CTT ATA ATT GCT AAT GTT AAT TCA ATA ACA 1714
 Tyr Lys Glu Val Phe Asn Ile Ile Lys Gln Asn Lys Ile Trp Leu Gly Val His Leu Gly Arg Gly Val Ser Gly Phe Ile Val Pro Glu His
 TAT AAA GAG GTC TTC AAT TTA AAT AAG GAA AAT AAG ATT TCG CTT GGG GTT CAT CTC GCG AGA GGT CTT TCT GGA TTT ATT GTT CCA GAG CAT 1807
 Tyr Glu Leu Tyr Gly Thr Glu Ala Arg Ile Asp Ser Asn Gly Asn Arg Ile Ile Ser Pro Asn Asn Cys Leu Trp Leu Thr Asn Leu Asp Val
 TAT GAA TTA TAT GGT ACT CAG GCG AGA ATT GAT TCT AAT GGT AAT AGA ATT ATC TCG CCA AAC AAC TCG TTA TCG CTA ACT AAC CTA GAT GTC 1900
 Phe Ile Arg His Lys Asp Leu Pro Leu Thr Arg Lys Tyr Phe Gly Asn Glu Ser Ser Tyr Pro Lys Tyr Asp Asn Tyr Asp Ala Ile Asn Val
 TTT ATT AGC CAT AAA GAC TTT CCT CTT ACA AGA AAA TAT TTT GGC AAT GAA ACT TCA TAT CCA AAA TAT GAT AAT TAT GAT GCT ATA AAT GTA 1993
 Asn Lys Thr Lys Asp Ile Pro Leu Asp Tyr Asn Gly Val Met Gly Val Pro Ile Thr Phe Leu His Lys Phe Asn Pro Glu Gln Phe Glu Leu
 AAC AAA ACA AAG GAT ATT GCA TTA GAT TAC AAT GGG GTT ATG GGG GTT CCT ATC ACA TTC TTG CAT AAG TTT AAC CCT GAG CAA TTT GAG TTA 2086
 Ile Lys Phe Arg Lys Gly Val Asp Glu Lys Asp Leu Ser Ile Asn Gly Lys Cys Pro Tyr Phe Arg Ile Leu Ile Lys Asn Lys Arg Leu Gln
 ATA AAA TTT AGA AAG GGT GGT GAT GAA AAA GAT TTG TCT ATA AAT GGT AAA TCG CCT TAT TTC ACA ATT TTG ATA AAA AAC AAA CGA TTA CAA 2174
 Lys 2200
 AAG TAATCATCTTTTATCTTTTCTCTGAGATATTAGCTTCCGCTGTAAGCTT

Fig. 5. Nucleotide sequences and amino acid sequences of the
 Eco RI endonuclease and methylase
 ——— primer for mutagenesis
 - - - - - primer for sequencing

2. Hetero duplex 제조계획

Hetero duplex를 형성하기 위해서는 mutagenic oligonucleotide가 annealing하는 위치를 제외하고는 가끔적 double-strand를 유지하여야 한다. 물론 이때에 적절한 제한효소의 절단위치가 있어야 한다. 그러나 적당한 제한효소절단 위치가 없으면 mutagenic oligonucleotide의 annealing 위치의 주위가 single-stranded로 유지되어도 괜찮으나 2 kbp 이상이 넘지않도록 계획하는 것이 좋다. 너무 긴 single-stranded open은 mutagenesis의 효율을 낮추는 결과가 된다. 본 연구에서는 Fig. 6, 7, 8에 나타난 대로 변이를 위한 유전자재조합실험상에서 두가지의 실험전략을 계획하였다. 실험전략 - 1은 EcoRI 제한효소의 유전자를 가지로 있는 벡터 pSCC2로부터 BamHI 제한효소를 처리하여 얻은 벡터절편과 Hind III와 Ava I를 처리하여 얻은 두종류 벡터절편을 얻는다. 이어서 두 종류의 벡터절편을 denaturing과 annealing 과정을 거쳐 계획한 heteroduplex 형성하고, transformation과 부분서열결정에 의한 변이선별을 통하여 EcoRI 제한효소의 변이체를 얻는 실험전략이다.(Fig. 7). 실험전략 - 2는 Pvu II와 Bg III 제한효소를 이용하여 두 종류의 벡터절편을 만들고 그외의 실험과정은 실험전략 - 1과 동일하게 세운 실험전략이다(Fig. 8). 두 실험전략의 차이는 mutagenic oligonucleotide가 annealing된후에 single strand로 노출된 범위가 실험전략 - 2가 실험전략 - 1보다 넓으므로 본 실험에서는 전략 - 1에 우선순위를 두어 진행하였다.

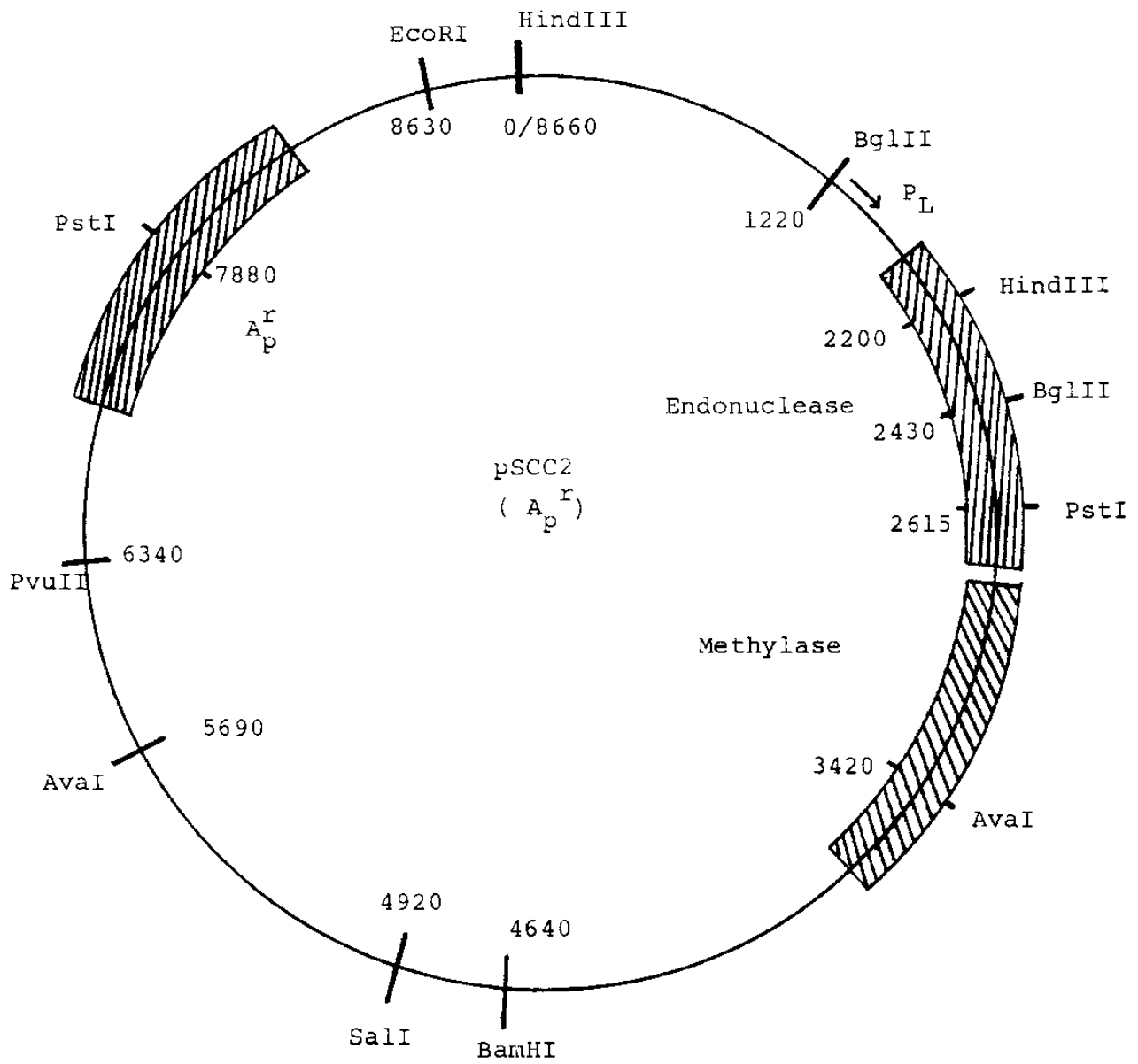


Fig. 6. Map of pSCC2 plasmid

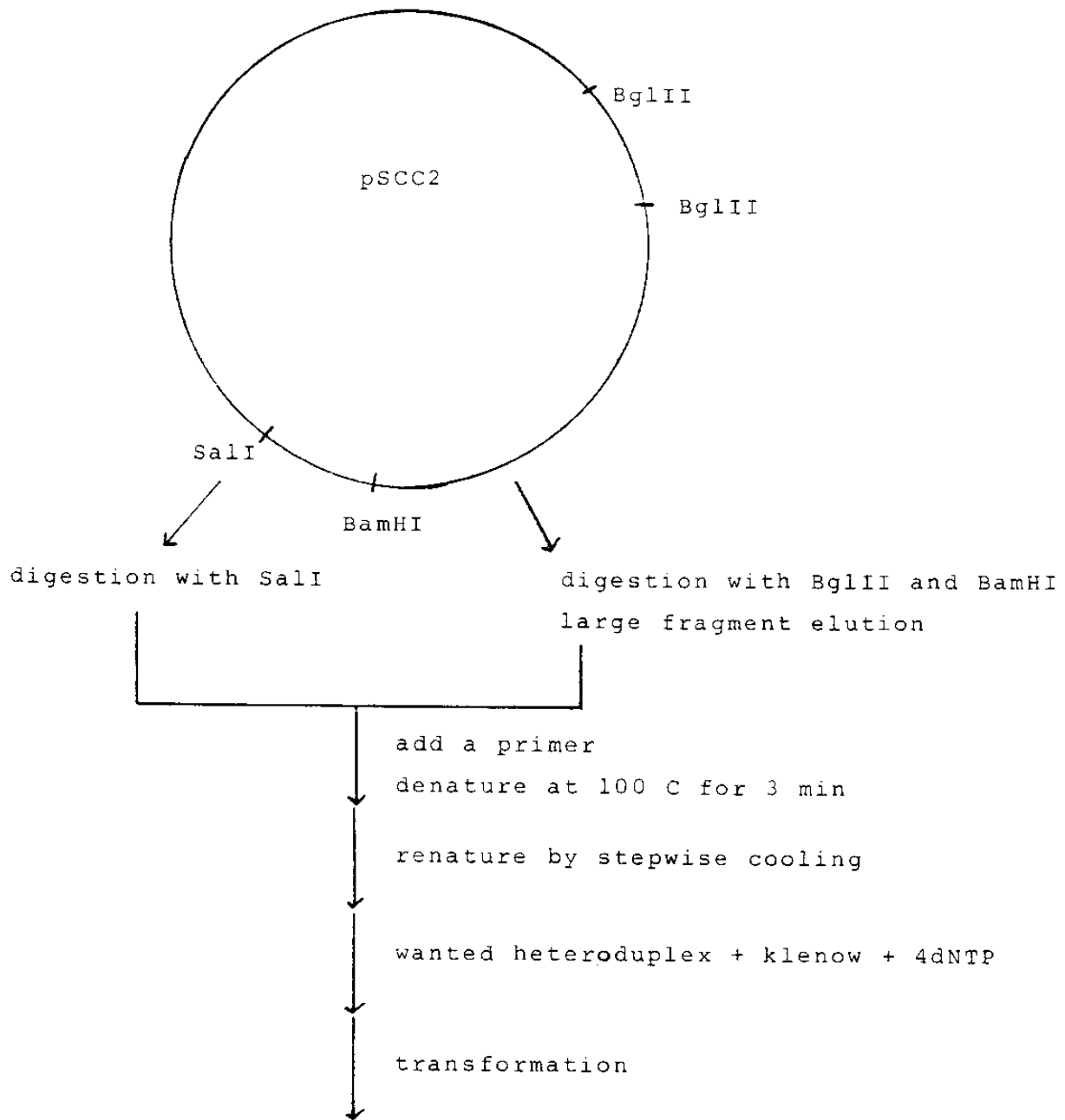


Fig. 8. Another strategy for heteroduplex formation

3. 실험전략 - I의 벡터절편의 제조

pSCC 2 plasmid 를 BamHI 제한효소로 자른 후 electro-relation 하고 이들이 heteroduplex 형성시 self-ligation 되는 것을 막기 위해 bacterial alkaline phosphatase 와 65 ℃ 에서 60 분간 반응시키므로 벡터절편 - I 을 제조하였다. pSCCC 2 plasmid 를 Ava I 과 Hind III 제한효소로 double digestion 하면 벡터절편 4 개가 나오는데 그것은 2200 bp 와 1220 bp, 2770 bp, 2970 bp 벡터절편 등이다. 이 중 우리가 원하는 벡터절편은 1220 bp 절편을 제외한 나머지 3 개의 벡터절편들이다. 1 % agarose gel 상에서는 2200 bp 와 2270 bp 벡터절편은 agarose gel 상에서 band 로서 구별되지 않으므로 이들은 동시에 electro-elution 하였고, 또 2970 bp 벡터절편은 따로 electroelution 하여 벡터절편을 제조하였다.(Fig. 7, 9).

4. Heteroduplex 의 형성

Heteroduplex 형성을 위해서 dephosphorylation 과 annealing 과정을 밟아 수행하였다. 우선 pSCC2 를 BamHI 제한효소로 자른 벡터절편과 Hind III 와 Ava I 제한효소로 자른 2200 bp, 2270 bp, 2970 bp 벡터절편들을 BAP 처리하였다. 또 mutagenic oligonucleotide 의 5' 끝에 phosphorylation 을 T4 DNA kinase 로 ATP 와 magnesium ion 존재하에 수행하였다. 얻어진 벡터절편들과 denature 된 mutagenic oligonucleotide 을 섞어서 서서히 annealing 하였다. 이때 반응전과 비교하여 반응후에는 4 개의 extra band 중에서 BamHI 제한효소의 벡터

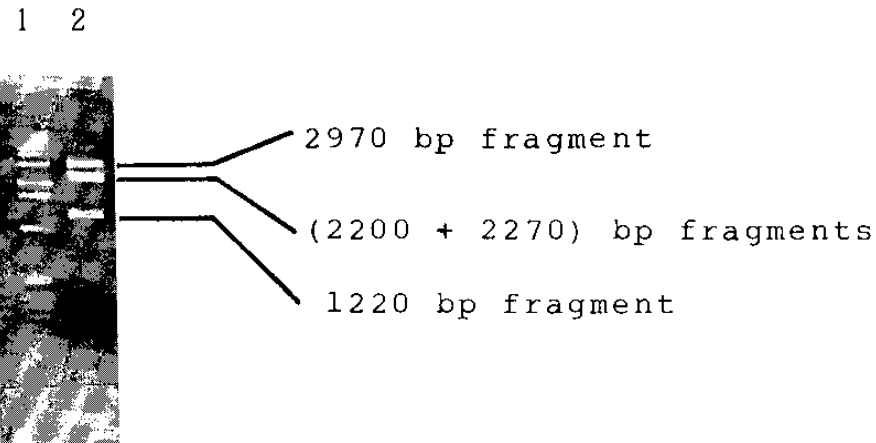


Fig. 9. Agarose gel after Ava I and Hind III double digestion of pSCC2.

lane1, 1Kb ladder

lane2, pSCC2/Ava I, Hind III

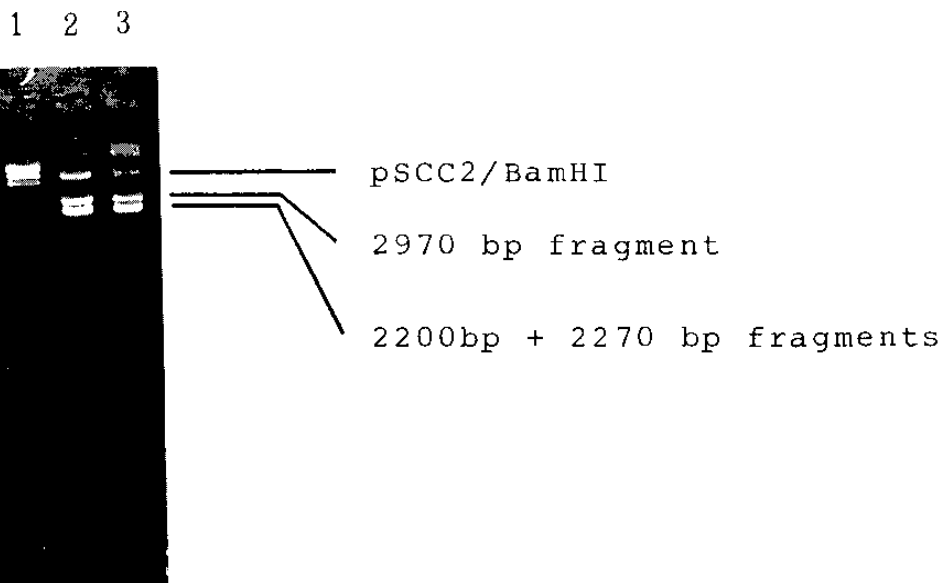


Fig.10. Analysis of DNA after denaturation and subsequent renaturation.

lane1, lambda DNA/Hind III

lane2, mixture of 4 fragments and oligomer (31-mer)

lane3, the same mixture after denaturation and renaturation by gradual cooling.

절편에 해당하는 band 와 2970 bp 벡터절편에 해당하는 band 와 2970 bp 벡터절편에 해당하는 band 사이에 band 가 나타나므로서 얻고자 하는 heteroduplex가 형성된 것을 확인하였다(Fig. 10).

5. Transformation 과 선별

위에서 얻은 heteroduplex가 포함된 반응 mixture의 벡터절편에서 single strand로 노출된 곳을 double strand로 만들기 위해서 NTP와 klenow 존재하에 polymerization 시키고, nick된 부위를 연결하기 위하여 T4 ligase와 magnesium 존재하에 ligation 한후, Hanahan method에 의해 E.coli에 transformation시켜 160개 colony들을 얻었다. 변이체의 선별은 벡터 DNA의 partial dideoxysequencing에 의하여 수행하였다. 그래서 일차로 형성된 colonies로부터 plasmid DNA를 mini-prep 방법으로 정제하였다. 얻어진 각 벡터 DNA에서 A, T lanes만의 dideoxysequencing 하여 변이체를 선별하였다. 그러나 sequencing 수행결과 colony들의 pSCC2 plasmid DNA서열과는 다른 형태의 서열이 보였으며, 이 서열들이 pSCC2의 어느 부분에 해당하는지 추적중에 있다. 이러한 결과의 원인으로 생각되는 것은 합성한 mutagenic oligonucleotide가 예상외의 위치에 priming 함으로서 발생되는 것으로 추정하고 있다. 또 heteroduplex 형성시에 여러개의 fragment가 denature와 renature를 함으로 이 과정에서 우리가 원하는 것이 아닌 heteroduplex form이 형성되었을 가능성이 있다고 할 수 있다.

따라서 이 문제를 해결하기 위해서는 heteroduplex 형성과정에 관여되는 벡터절편의 수를 줄여 본 site-specific mutagenesis를 수행하여야 할것으로 사료되었다. 그래서 실험전략 - 2 를 추진하게 되었다.

6. 실험전략 - 2 의 벡터절편제조와 heteroduplex 형성

실험전략 - 1 과 동일하나 사용한 제한효소가 Pvu II 와 Bgl II 이었다. 본 실험과정에서는 벡터 DNA 의 5' 끝의 dephosphorylation 을 시키지 않았으며, mutagenic oligonucleotide 도 5' 끝에 phosphorylation 시키지 않고, heteroduplex 를 형성하였다. (Fig. 11). 이 과정의 이후의 실험은 진행중에 있으므로 다음 보고서에 결과를 발표할 예정이다.

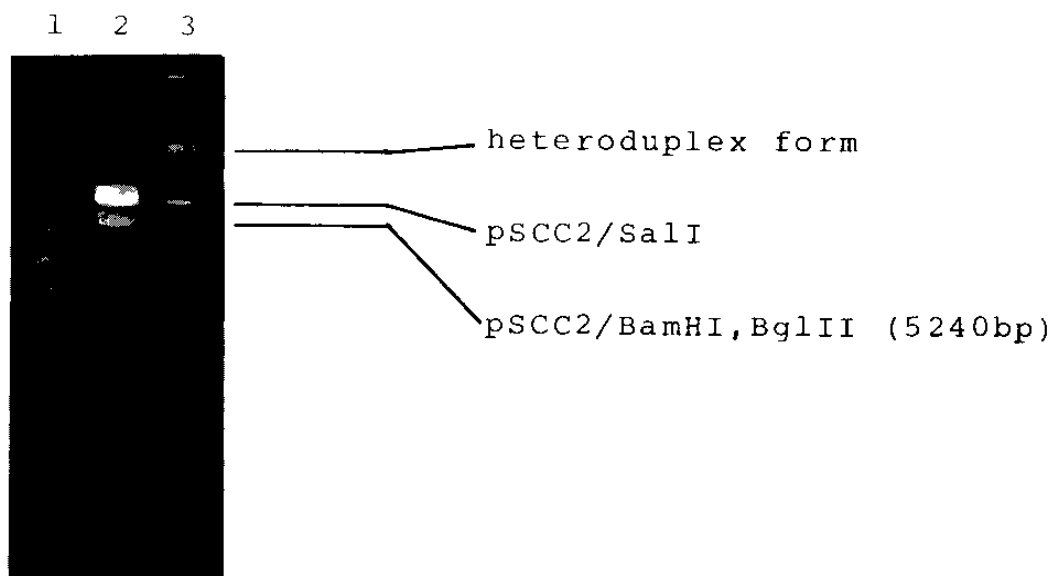


Fig.11. Analysis of DNA after denaturation and subsequent renaturation

lane1, 1kb ladder

lane2, mixture of 2 fragments and oligomer (31-mer)

lane3, the same mixture after denaturation and renaturation by gradual cooling

제 4 절 고 찰

본 연구에서는 효소의 구조-기능관계연구를 위해서 EcoRI 제한효소의 특정 부위변이론 시행하였다. 실험진행은 double-stranded plasmid를 template로 하여 oligonucleotide-directed site-specific mutagenesis 방법을 채택하여 수행하였다. 이들 방법은 단백질의 특정부위를 원하는대로 바꿀 수 있으므로 단백질의 구조와 기능을 연구하는데 현재 가장 주목받기 시작한 방법으로 M13에의 한 방법보다 우수한 것으로 나타나 있다. 이 방법의 중요강점은 heteroduplex formation을 agarose gel 상에서 확인할 수 있다. 본 연구에서의 site-specific mutagenesis 할 대상으로 선택한 EcoRI 제한효소는 유전자재조합기법에서 가장 많이 쓰이고 있는 효소로서 응용적인 측면과 학문적인 측면으로도 의미가 큰 대상이라고 생각되어진다. 이 효소가 지금의 기능이외의 새로운 기능을 갖는 변형효소로서 만들어진다면 이는 prokaryotic의 유전자재조합뿐만 아니라 animal과 plant cell에서 널리 이용할 수 있는 중요한 효소를 개발하는 것이며 또 DNA와의 binding 그리고 catalytic activity의 관계를 규명함으로써 이 효소이외의 제한효소 또 세포내의 여러 단백질과 DNA와의 상호관계를 추론함으로써 분자생물학분야의 진일보에 박차를 가할 수 있을 것이다. 본 연구에서는 신규 변형 EcoRI를 현재 선별과정이 진행하고 있으나, 이전에 plasmid에 의한 site-specific mutagenesis method를 확립

하였고, 새로운 분야인 단백질공학연구에 들어섰다는데 의의를 찾으며 앞으로 지속적인 연구과성중에 원하는 변형 EcoRI 제한효소를 찾으리라 확신한다.

참 고 문 헌

1. J.A.McClarín, C.A.Frederick et al., Science 234, 1526 (1986).
2. W.F.Anderson, D.H.Ohlendorf, Y.Takeda, B.W.Matthews, Nature(London) 290, 754(1981).
3. W.F.Anderson, Y.Takeda, et al., J. Mol. Biol. 159, 745 (1982).
4. C.O.Pabo, M.Lewis, Nature(London), 298, 443(1982).
5. M.Lewis, et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 42, 440(1983).
6. P.J.Greene, M.Gupta, H.W.Boyer, W.E.Brown, J.M.rosenberg, J. Biol. Chem., 256, 2143(1981).
7. H.Wolfes, J.Alves, et al., Nucleic Acids Res., 14, 9075 (1986).
8. S.C.Cheng, R.Kim, K.King, S.H.Kim, P.Modrich, J. Biol. Chem., 259, 11571(1984).
9. J.M.Rosenberg, P.J.Greene, DNA, 1, 117(1982).
10. R.Kim, P.Modrich, S.H.Kim, Nucleic Acids Res., 12, D285 (1984).
11. B.J.Terry, W.E.Jack, P.Modrich, J. Biol. Chem., 258, 9820 (1983).
12. R.E.Dickerson, H.R.Drew, J.Mol.Biol., 149, 761(1981).
13. R.E.Dickerson, J.Mol.Biol., 166, 419(1983).
14. L.Jen-Jacobson, D.Lesser, M.Kurpiewski, Cell, 45, 619 (1986).
15. R.P.Whanton, E.L.Brown, M.Ptashne, Cell, 38, 361(1984).

16. C.O.Pabo, W.Krowvatin, A.Jeffrey, R.T.Sauer, Nature(London), 298, 441(1982).
17. J.L.Eliason, M.A.Weiss, M.Ptashne, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82, 2339(1985).
18. F.H.C.Crick, A.Klug, Nature(London), 255, 530(1975).
19. J.C.Wang, J. Mol. Biol., 43, 25(1969).
20. J.L.Woodhead, N.Bhave, A.D.BMalcolm, Eur. J. Biochem., 115, 293(1981).
21. S.Inouye, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 79, 3438 (1982).
22. S.Inouye, C.P.S.Hsu, M.Inouye, Science, 221, 59(1983).
23. K.Itakura, et al., Ann. Rev. BioChem., 53, 323(1984).
24. Y.Morinaga, M.Inouye, et al., Bio/Technology, 2,636(1984).
25. J.Messing, R.Crea, P.H.Seeburg, Nucleic Acids Res., 9, 309(1981).
26. T.Maniatis, E.F.Fritsch, J.Sanbrook, in "Molecular Cloning ; A laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory, New York(1982).
27. D.Suck, C.Oefuer, Nature, 321, 620(1986).
28. A.R.Fersht, R.J.Leatherbarrow, T.N.C.Wells, Nature, 322, 284(1986).
29. S.E.Halford, N.P.Johnson, Biochem. J. 211, 405(1983).
30. C.A.Fredrick, J.Grable, et al., Nature, 309, 327(1984).
31. A.H.Maxam, W.Galbert, Proc. Natl. Acad. Sci., 74, 560 (1977).
32. F.Sanger, S.Nicklen, A.R.Coulson, Proc. Natl. Acad. Sci., 74, 5463(1977).

Chapter 2. Search for the Optimal Sequence of Ribosome Binding Site from Random DNA Sequences

ABSTRACT

Two synthetic DNA duplexes corresponding to the ribosome binding site(RBS) were synthesized through the phosphite method on solid support : one for correcting the reading frame of β -galactosidase with an optimized sequence and the other possessing partly random sequences. The synthetic RBS DNA duplexes having EcoRI and HindIII cohesive ends were cloned into an appropriate site between lpp-lac promoter and β -galactosidase structural gene in plasmid pMKT2. This construction gave a direct screening system for the detection of expression level on the plate by differentiating color intensities of colonies formed. Colonies with the most intense blue color were characterized in terms of β -galactosidase activity and RBS sequences. The results could provide the correlation between the novel sequences and the expression level, and define the ribosome binding site with different aspects. This approach provides a useful methodology to search for the meaningful regulatory genes on the basis of phenotypical screening from the random DNA sequences.

I. INTRODUCTION

Translational initiation in *E.coli* is the multicomponent processes requiring the base-pairing between RNA species(mRNA, 16s rRNA and fMet-tRNA^{fMet}), initiation factors(IF-1, -2, and -3), and the ribosomal protein S1(1). Shine and Dalgarno

postulated that the base-pairing might occur between pruinerich sequences upstream from the AUG initiation codon in mRNA and complementary sequences near the 3' end of E.coli 16s rRNA(2). Thus far, well over 150 bacterial and phage mRNAs have been sequenced(3,4). Nearly all mRNAs include the sequences complementary to the 3' end of 16s rRNA, at 5 to 9 bases upstream from the AUG initiation codon. It is generally known that the formation of initiation complex is correlated to the regulation of protein synthesis in E.coli (1, 2, 3). Several sequential parameters influencing the formation of the translational initiation complex are understood as the essential requirements: the length of complementarity of mRNA to 16s rRNA(3, 4), the distance(spacer) between the Shine-Dalgarno(SD) sequence and the initiation codon(5,6,7), the extent to which the Shine-Dalgarno sequence being masked by the secondary structure (4,5,8,9), and the nucleotide sequences on either side of the AUG initiation condon (10,11) as well as on the spacer (12). To date, there were the variety of examinations on the functional regulatory genes in relation to translation by mutagenesis on the ribosome binding sites (12-14). Most of the studies emphasized the significance of individual nucleotide rather than the group of nucleotides on the region, because site-specific mutagenesis gave only the effect of individual nucleotide (15-17). In this study, the random mutagensis at targeted region was chosen to find the significance of nucleotide combination as a sequence, not the effect of individual nucleotide on translation.

We report here that the construction of an expression vector by the replacement of RBS sequence with the synthetic random DNA and the selection of the optimal sequence allowed

us a series of novel RBS sequences. The direct screening system based upon the color intensities of colonies on the plate containing 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-gal), isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) and ampicillin by β -galactosidase activity has been developed to identify the colonies in which β -galactosidase gene relatively expresses well. Then, the vectors obtained from the colonies were directly sequenced to give the novel RBS sequences. The results augment the understanding of the translational role of ribosome binding site on the basis of the primary structure. And the variety of novel RBS sequence was explored through this approach.

II. MATERIALS AND METHODS

1. Strain, plasmids, and enzymes

E.coli strain JM109(recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, supE44, relA1, Λ^- , Δ (lac-proAB), F'traD36, proAB, lacI^qZ Δ M15) was used for transformation. The CaCl₂ procedure and Hanahan method were employed for transformation of E.coli (18,19).

The sources of lpp-lac promoter and the β -galactosidase gene were the plasmid pINIII-A1(20) and pDRF2(21), respectively. Standard molecular cloning methods for isolation of plasmid, digestion by restriction enzymes, kination, and ligation were employed (22).

All restriction endonucleases, T4 DNA ligase, and Klenow fragment were purchased from KOSCO enzymes (Seoul, Korea) and New England Biolabs (Beverly, MA. USA), and the enzyme reactions were done as directed by the manufacturer.

2. Oligonucleotide synthesis

Oligonucleotides were synthesized through the phosphite triester method on solid support by an automated DNA synthesizer (Beckman system plus). The modified deprotection was adopted to simplify the procedure employing the single treatment of conc. NH₄OH at 50°C, 12h, then followed the final purification through polyacrylamide gel electrophoresis(23, 24).

Synthetic dsDNA-1 :

```
          XbaI EcoRI                      SalI HindIII
5'-CTAGAGAAATTCGAGGGTATTAATAATGCAGTCGACA
          TCTTAAGCTCCCATAAATTATTACGTCAGCTGTTTCA-5'
          SD                      I.C.
```

Synthetic dsDNA-2 :

```
          EcoRI                      SphI SalI HindIII
5'-AATTCGFFFFNNNNNNNGCATGCAGTCGACA
          GCYYYYNNNNNNNCGTACGTCAGCTGTTTCA-5'
          I.C.
```

P, Y, and N stand for purine, pyrimidine, and random bases with equivalent molar ratio, respectively. I.C. stands for the initiation codon.

Synthetic primer for sequencing:

5'-GTTTTCCCAAGTCACGACGTTTGA

Position of the primer is from 13 bases upstream from the unique BamHI site.

3. Computer analysis

Computer searches were performed with the Microgenie program purchased from Beckman co.

4. Annealing

Annealing of synthetic oligonucleotides for dsDNA (36 base-long dsDNA-1, and 31 base long dsDNA-2) was performed by mixing the equimolar ratio of the corresponding oligonucleotides in annealing buffer containing 0.1M NaCl, 10mM Tris. HCl, pH 7.8, and 10 mM EDTA, and heating to 98°C for 5 minutes, followed slow-cooling of the solution to room temperature for an overnight.

5. β-Galactosidase assay

For β-galactosidase assay, E.coli was cultured overnight in M9 minimal media(3mL) containing ampicillin (40μg/ml), and subcultured in fresh minimal media for 3 hours. The activation of β-galactosidase gene was done by adding IPTG as inducer(1mM), and followed by cultivation at 37°C for 3 hours. The β-galactosidase assay of the samples was performed according to Putnum and Koch (25). The harvested cell fraction in Z buffer(1mL) supplemented with chloroform (1μL) and 0.1% SDS solution(5μL) was reacted with o-nitrophenol-β-D-galactoside(0.2mL, 4mg/mL), at 28°C, and then the reaction was stopped with 1M Na₂CO₃ solution. After the cell debris was removed by microcentrifugation, the optical densities were measured at 420 nm, and the β-galactosidase activity was calculated, following the equation; β-Galactosidase activity (unit) = $OD_{420\text{ nm}} \times 1000 / t \times V \times OD_{600}$ (t, reaction time, min.; V, assay volume, mL). For an example, the average value of β-galactosidase activity of mutant-1 (pMKT2-1) was 16905 units.

6. DNA sequencing

The modified dideoxynucleotide chain termination method was employed for direct determination of RBS sequences on double-stranded plasmid DNA. For denaturation, the plasmid DNA was incubated at room temperature for 5 minutes in the presence of 0.2M NaOH and 0.2mM EDTA. After that, DNA was ethanol-precipitated and ready for the usual polymerization reaction(26).

7. Construction of plasmids, pMKT1, pMKT2, and pMKT2-series

After digestion of plasmids, pINIII-A1 and pORF2 with both PstI and BamHI restriction endonucleases, the small DNA fragment (about 1.1 kilo base pairs) carrying both lpp-lac promoter and RBS, and the large DNA fragment (about 5.5 kilo base pairs) carrying the entire β -galactosidase gene were obtained, respectively. Following the ligation of these two fragments with T4 DNA ligase, E.coli strain JM109 was transformed with the resulting plasmid pMKT1 by CaCl₂ procedure.

Since pMKT1 does not have the correct reading frame for the β -galactosidase gene, the small XbaI-HindIII fragment of pMKT1 was replaced with the synthetic dsDNA-1 carrying RBS sequence and XbaI and HindIII cohesive ends(Fig.2). The resulting plasmid named pMKT2 was used to transform JM109 cells. The colonies were selected on LB plates containing ampicillin, X-gal and IPTG. To confirm the construction of pMKT2, plasmid DNA was purified from the blue colonies, and analyzed with several different restriction endonucleases. In pMKT2, EcoRI site was shifted to just the upstream of SD region, and new Sall site was created just following the ATG initiation codon. They facilitated the construction of pMKT2 series with dsDNA-2. In addition to that, β -galactosidase

activity in pMKT2 was restored due to the gene being in frame.

For the efficient insertion of single dsDNA-2 into plasmid pMKT2, the synthetic dsDNA-2 was phosphorylated with T4 polynucleotide kinase and joined in the presence of T4 DNA ligase with large EcoRI-HindIII fragment of pMKT2. The resulting plasmids containing the multiply joined dsDNA-2 were digested with HindIII to get rid of any extra dsDNA-2. Then, the resulting large fragment possessing only one dsDNA-2 was electroeluted and self-joined in the presence of T4 DNA ligase, and transformed JM109 cells through Hanahan's method. This additional procedure improved the transformation efficiency.

III. RESULTS

In order to search for the optimal RBS sequence, the plasmid system possessing the appropriate regulatory and structural genes requires the availability of cloning sites and the screening system. For that, we chose lpp-lac promoter and β -galactosidase structural gene which gave a couple of advantages. At first, pMKT1 was constructed from pINIII-A1(20) and pORF2(21), which possessed the lpp-lac regulatory system and the whole β -galactosidase gene, respectively (Fig.1). Then, the synthetic dsDNA-1 was introduced not only for the new restriction enzyme sites, EcoRI and Sall, but to make the reading frame of the β -galactosidase gene correct. The joining of the synthetic dsDNA-1 and the large XbaI-HindIII fragment of pMKT1 yielded pMKT2, in which the RBS sequence was identical to that of lpp regulatory gene, and EcoRI site was shifted to just upstream of SD region, and new Sall site was created just following the AUG initiation codon.

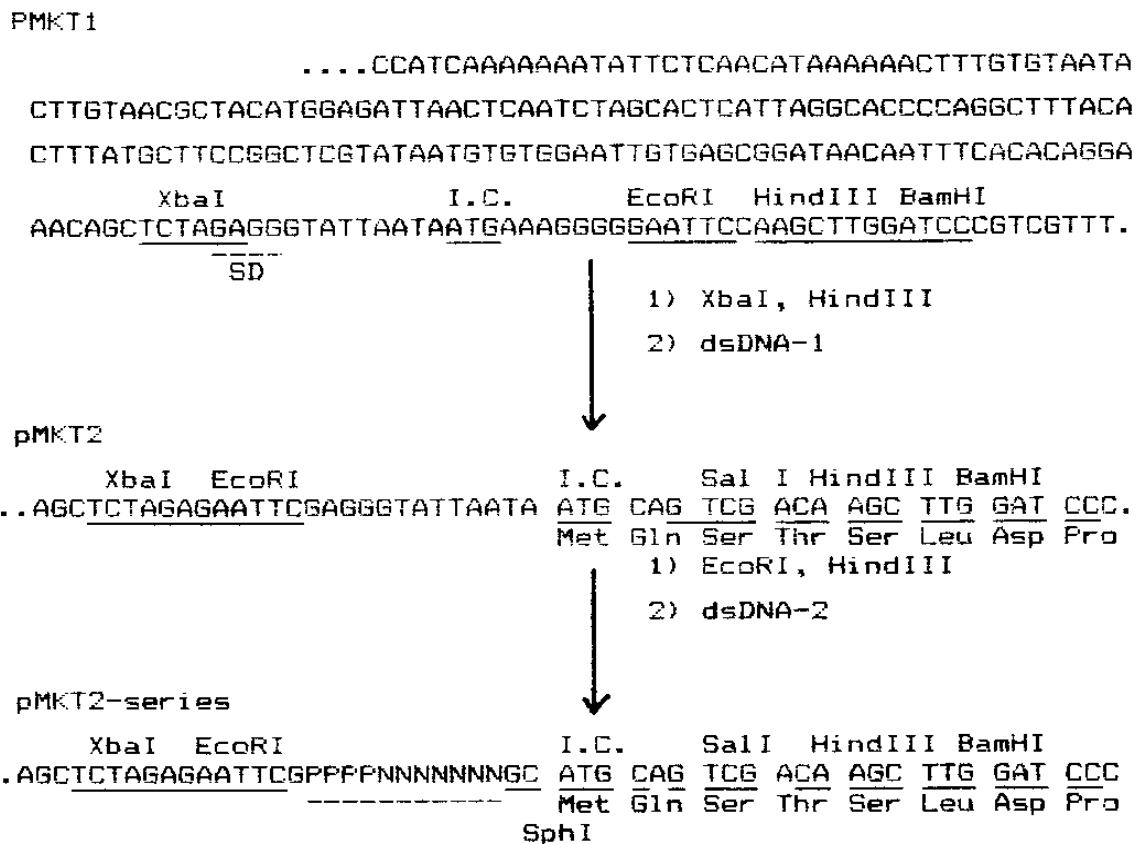


Fig. 1 Scheme for experimental strategy for mutagenesis with the synthetic dsDNA-1 and -2. I.C. is for the initiation codon. P and N stand for purine and random nucleotides, respectively.

They facilitated the construction of pMKT2-series with the synthetic dsDNA-2. In addition to that, translation of β -galactosidase gene in pMKT2 was resumed due to new SalI site, which made the β -galactosidase gene in frame and facilitated the analysis of the plasmid.

In order to see the effect of nucleotide sequence at the ribosome binding site on gene expression through targeted mutagenesis, the synthetic dsDNA-2 was chemically synthesized. It possesses the plausible SD region(-13 to -10) and seven base spacer (-9 to -3), which have been synthesized with purines (A or G) and with all 4(A,C,G, and T) nucleotides in

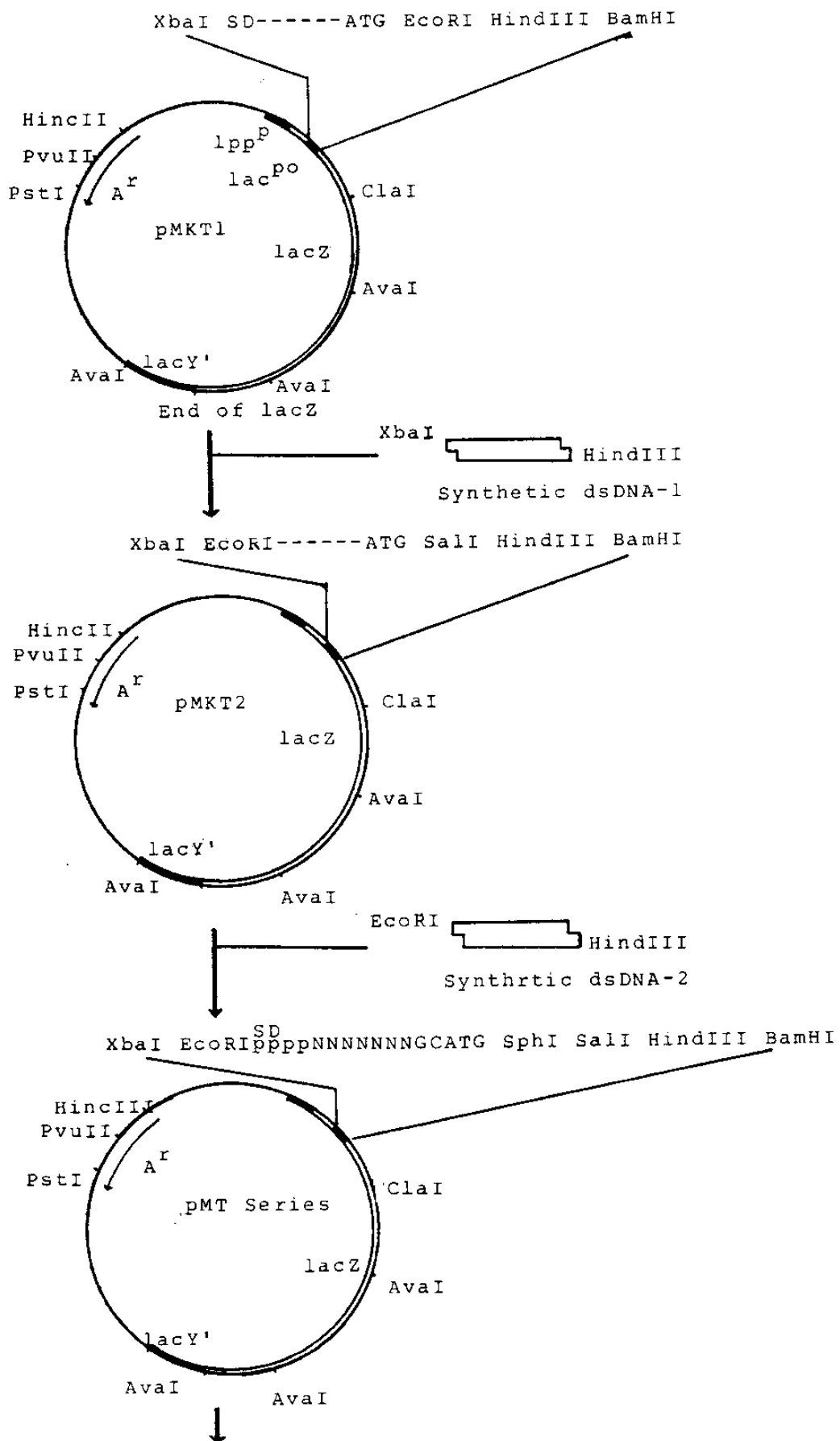


Fig. 2. Construction of pMT Series

equimolar ratio, respectively. The two bases at -2 and -1(GC) immediately preceding ATG were fixed to create SphI site which would be a useful cloning site for any structural gene to be expressed efficiently.

The additional procedures for the construction of pMKT2-series, the phosphorylation at the 5'ends of dsDNA-2, the ligation with plasmid DNA, the removal of the additional synthetic fragment by HindIII digestion, and self-ligation, greatly improved the transformation efficiency. About 1000 blue colonies with different color intensities appeared on the plate. We assumed that the colonies having different β -galactosidase activities would reflect proportionally their color intensities on the plates. Accordingly, it can be said that the color intensities is directly proportional to the expression level. So we picked up three hundred colonies showing blue color, and analyzed them to confirm the assumption by assaying β -galactosidase activities. As expected, the results indicate that the color intensities directly reflect the activities of β -galactosidase gene. It turned out that their activities were in the range of six hundred-fold (data not shown). Among the colonies examined, sixteen colonies showing high color intensities as well as strong β -galactosidase activities were chosen and each plasmid (pMKT2-1 through pMKT2-16) was isolated and RBS regions were sequenced from double-stranded plasmid DNA by the modified dideoxy chain termination method(Table 1).

Table 1. Novel RBS sequences obtained from the random mutagenesis and their relative β -galactosidase activities.

Mutant Number	RBS Sequences				Relative β -gal. Activity
	-15	-10	-5	+1	
1	gaauucg	A A G G	A G C U U U U U	gcaug	100
2		A A G G	A G G <u>U A G U</u>		64.1
3		A G G A	G U A <u>U G A</u>		50.3
4		A G G A	G A U C G C C		47.4
5		G G A G	G A U <u>U A A C</u>		47.1
6		G A G G	<u>U U A A</u> A C G		45.8
7		A A G A	<u>U U A G</u> A A A		45.8
8		G A G G	A A A A C <u>U A</u> g		41.7
9		A A G G	A G G C <u>U G A</u>		41.0
10		A A G A	G G C U U U U		29.8
11		A G A G	U U A C <u>U A A</u>		27.9
12		A A G G	A G G U A C U		24.7
13		G G G G	G U G C <u>U A G</u>		16.7
14		A A G G	C C A C <u>A U G</u>		15.1
15		A A G A	G C A <u>U G A G</u>		12.5
16		G G A G	G C G <u>A G U C</u>		11.5
pMKT2	gaauuc	G A G G	G U A U U A A	taaugc	32.1

The RBS sequence from pMKT2 is identical to that of *lpp* signal sequence. The initiation and termination codons preceding the actual initiation codons are underlined. The range of experimental error was within $\pm 15\%$. The relative β -gal. activity is an average value from three individual experiments.

IV. DISCUSSION

The random mutagenesis with the synthetic DNA at targeted region turned out to be one of the most powerful methods for selecting the meaningful sequences from the random DNA sequences. Especially, the direct screening system employed here with the activity of β -galactosidase appeared to be very

Table 2. Statistical data of nucleotide distribution at each position of RBS sequences.

Nucleotide	Position											
	-13	-12	-11	-10	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	
A	11	10	3	5	5	3	7	3	6	5	5	
G	5	6	13	11	7	5	5	1	3	3	4	
C					1	3	2	5	1	3	3	
T					3	5	2	7	6	5	4	

This data was obtained from sixteen RBS sequences described in Table 1. Adenosine(A) of the initiation codon was numbered as +1. Position -10 to -13 and position -3 to -9 were random-mutagenized with purine nucleotides(A and G) and all four nucleotides(A, C, G, and T) with equimolar ratio, respectively.

The interpretation of the results is in a broad sense that the sequential context of ribosome binding site is consisted of the purine-rich region and the AT-rich spacer region. It is generally consistent with the contexts reported (27, 28). At positions -13 to -10 mutagenized with purine nucleotides, as are predominant at positions -13 and -12, while Gs are in preference to As at positions -11 and -10. It should be pointed out that nucleotides at positions -9 to -3 corresponding to the spacer region are purely by the phenotypic selection from the random DNA sequences. Hence, the choice of the spacer sequences as well as RBS ones might be favorable for the translation in E.coli. Positions -9 and -7 strongly prefer the purine to pyrimidine nucleotides. The rest of the positions, -3, -4, -5, -6, and -8, shows a strong preference of A and T nucleotides. Even though the sequences are generally explained by the significance of individual nucleotide (29-32), what we can emphasize here is that the RBS sequences obtained on the basis of function-related group selection give the significance of the nucleotides as a group, rather than that of individual nucleotide. In addition, we also

observed a couple of examples which showed the importance of individual nucleotides. From mutants pMKT2-1 and -10, the exchange of nucleotides at position -10 and -9 from GA to AG drops the expression level down three-fold. And the single nucleotide change from G to C in the mutant-2 and -3 lowered the expression level nearly 3 times.

As described above, the Shine and Dalgarno sequence has been defined and discussed in various reports, but the sequence and position are variable depending on which systems were employed. We felt that our sequential data should also be defined in terms of SD sequence and its position, because the data were originated from the selection by random mutagenesis on the region preceding the initiation codon. In order to do that, the sequential data was undergone for computer search to find the complementarity to the 3' end of E.coli 16s rRNA (Table 3). Interestingly, all the RBS sequences hold up good complementarity, which is in good agreement with generalized RBS sequences from the known prokaryotic genes. In addition to that, the frequencies of the complementarity at each position of RBS sequences were examined to check the possibility whether the position of Shine and Dalgarno sequence could be precisely defined in this system. The results were surprising to find that the position -13 to -9(AAGG) of every RBS sequence obtained were holding up nearly 90% of complementarity (Table 4), in which the position -9 was randomly synthesized with all four nucleotides. It could confirm again that the complementarity of this region to the 3' end of 16s rRNA is necessary and the 16s rRNA is directly mediated during the translation initiation. Hence, it is quite meaningful that this findings can extend to define the SD sequences as well as its position, although

Table 4. The frequency of complementarity at each position between the novel RBS sequences and the 3'end of *E. coli* 16s rRNA.

Position	-14	-13	-12	-11	-10	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1
Freq.	7	13	14	14	14	14	6	11	9	4	6	9	0	16
%	44	81	88	88	88	88	38	69	56	25	38	56	0	100

they are derived on the basis of phenotypical selection from random DNA sequences on the targeted region, not from the known regulatory sequences. On the other hand, it is difficult to find the correlation between the degree of the complementarity of the RBS sequences and the translation efficiency from the data shown in Table 3. Incidentally, it is interesting to note that C residues at the position -1 of every RBS sequences here has complementarity to certain nucleotide of 3'end of 16s rRNA, but the significance of the observation could not be evaluated yet.

The influence of the mRNA secondary structure to translation efficiency was investigated with a computer program described by Tinoco et al.(33). All the possible secondary structures related to the RBS sequences were collected(Table 5). The analysis shows that even though there is a weak trend of the decrease in the expression level as the stem structures more stabilized, the observation relating to the secondary structure of mRNA remains to be evaluated.

It has been discussed in other reports that the initiation and termination codon preceding the actual initiation codon of mRNA may greatly affect the translation efficiency (13). Although we found such codons on our RBS sequences (Table 1), the data was not sufficient to define their influences on the translation of mRNA.

Table 5. Secondary structure analysis of RBS sequences of the mutants.

Mutant	Region-1	Region-2	ΔG (kcal/mol)	relative β -gal. levels
1	-3 ~ 12	-28 ~ -15	-0.2	100
2	-	-	-	64.1
3	-9 ~ -3	-70 ~ -64	0.6	50.3
4	-9 ~ -3	-70 ~ -64	0.6	47.4
5	-6 ~ 6	-83 ~ -72	-3.4	47.1
6	-4 ~ 2	-23 ~ -16	-2.9	45.8
7	-5 ~ 2	-37 ~ -32	1.4	45.8
8	-6 ~ 2	-79 ~ -72	-2.4	41.7
9	-4 ~ 5	-113 ~ -104	-4.8	41.0
	-1 ~ 16	-85 ~ -68	-7.2	
10	-4 ~ 4	-113 ~ -104	-6.0	28.8
11	-7 ~ -1	-18 ~ -12	0.2	27.9
	-9 ~ -3	-70 ~ -64	0.6	
	-10 ~ 3	-114 ~ -104	2.6	
12	-	-	-	24.7
13	-5 ~ 4	-101 ~ -95	-14.4	16.7
14	-6 ~ 2	-72 ~ -67	-7.6	15.1
	-4 ~ 11	-62 ~ -51	-5.0	
15	-5 ~ 6	-82 ~ -74	-4.6	12.5
	-4 ~ 13	-101 ~ -88	-7.2	
	-2 ~ 16	-85 ~ -68	-15.0	
16	-7 ~ 4	6 ~ 19	-2.6	11.5
pMKT2	-10 ~ -3	-104 ~ -109	2.4	32.1

Analysis was done with DNA sequences due to the non-availability of mRNA informations.

In conclusion, the direct screening system employed with the β -galactosidase activity has selected the meaningful genes easily and successfully from the random combination of nucleotide by the mutagenesis at the targeted region with the synthetic DNA. The novel RBS sequences obtained are in good agreement with the known functional regulatory genes in terms of the Shine and Dalgarno sequence, the spacer and its nucleotide sequences. This approach could be further extended to study the variety of the gene functions.

REFERENCES

1. Steitz J.A. (1977) In: Biological Regulation and Development, I.(Gene Expression): pp.349-399. Ed.R.F.Goldberger, Plenum. press, New York.
2. Shine, J., and Dalgarno, L. (1974) Proc. Natl. Acad.Sci. USA 71, 1342-1346.
3. Lodish, H.F. (1976) Ann. Rev. Biochem 45, 39-72.
4. Iserentant, D. and Fiers, W. (1980) Gene 9, 1-12.
5. Shepard, H.M., Yeleverton, E. and Goeddel, D.V. (1982) DNA 1, 125-131.
6. Roberts, T.M., Kacich, R. and Ptashne, M. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 760-764.
7. Siner, B.S., Gold, L., Shinedling, S.T., Hunter, L.R., Pribnow, D., Nelson, M.A. (1981) J. Mol. Biol 149, 405-432.
8. Hall, M.N., Gabay, J., Debarbouille, M. and Schwartz, M. (1982) Nature 295, 616-618.
9. Gheysen, D., Iserentant, D., Derom, C. and Fiers, W. (1982) Gene 17, 55-63.
10. Ganoza, M.C., Sullivan, P., Cunningham, C., Harder, P., Kofoid, E.C. and Neilson, T. (1982) J. Biol. Chem. 257, 8228-8232.
11. Taniguchi, T., and Weissmann, C. (1979) J. Mol. Biol. 128, 481-500.
12. Matteucci, M.D., and Heyneker, H.L. (1983) Nucleic Acid Res. 4, 3113-3121.
13. Kozak, M. (1986) Cell 44, 283-292.
14. Hui, A., Hayflick, J., Dinkelspiel, K. and de Boer, H.A. (1984) EMBO J. 3, 623-629.

15. Hutchison, C.A. III, Philip, J., Edgell, M.H., Gillam, S., Jahnke, p. and Smith, M. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 6551-6560.
16. Wallace, R.B., Schold, M., Johnson, M.J., Demberk, P. and Itakura, K. (1981) *Nucleic Acids Res.* 9, 3647-3656.
17. Kim, M.H. and Ray, D.S. (1985) *J.Virol.* 63, 871-878.
18. Daget, M. and Ehrich, S.D. (1979) *Gene* 6, 23-28.
19. Hanahan, D. (1983) *J. Mol. Biol.* 166, 557-580.
20. Queen, C. et al., (1983) *J. Mol. Appl. Genet.* 2, 1-10.
21. Weinstock, B.M. et al., (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 4432-4436.
22. Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982) In *Molecular Cloning: A Lab. Manual*, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor.
23. Lo, K.M., Jones, S.S., Hackett, N.R. and Khorana, H.G. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 2285-2289.
24. Gilles-Gonzalez, M.A., Hackett, N.R., Jones, S.S., Khorana, H.G., Lee, D.-S., Lo, K.-M. and McCoy, J.M. (1986) *Methods Enzymol.* 125, Academic Press, New York.
25. Putnam, S.L. and Koch, A.L. (1975) *Anal. Biochem.*, 63, 350-360.
26. Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.
27. de Boer, H.A., Hui, A., Comstock, L.J. Wong, E. and Vasser, M. (1983) *DNA* 2, 231-235.
28. de Boer, H.A., Comstock, L.J., Hui, A., Wong, E., and Vasser, M. (1983) *Gene Amplification and Analysis, Vol.3, Expression of Cloned Genes in Prokaryotic and Eukaryotic cells*, Elsevier Publishing, Amsterdam, pp.103-116.
29. Scherer, G.F.E., Walkinshaw, M.D., Arnott, S. and Morre, D.J. (1980) *Nucleic Acids Res.* 8, 3895-3907.

30. Gold, L., Pribnow, D., Schneider, T., Shinedling, S., Singer, B.W., and Stormo, G. (1981) *Annu. Rev. Microbiol.* 35, 365-403.
31. Stormo, G.D., Schneider, T.D. and Gold, L.M. (1982) *Nucleic Acids Res.* 10, 2971-2996.
32. Wulff, D.L., Beha, M., Izumi, S., Bock, J., Mahoney, M., Shimatake, H., Brady, C., Court, D., and Rosenberg, M. (1980) *J. Mol. Biol.* 138, 209-230.
33. Tinoco, I., Borer, P.N., Dengler, B., Leving, M.D., Uhlenbeck, O.C., and Crothers, D.M. (1973) *Nature New Biol.* 246, 40-41.

주 의

1. 이 보고서는 과학기술처에서 시행한 특정연구개발사업의 연구보고서이다.
2. 이 연구개발내용을 대외적으로 발표할 때에는 반드시 과학기술처에서 시행한 특정연구개발사업의 연구결과임을 밝혀야 한다.