



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 재조합 기술에 이용되는 신호소 개발"에 관한 최종  
보고서로 제출 합니다.

1988.11

주관연구기관명: 한국과학기술원 부설 유전공학센터

총괄연구책임자: 이대실 (유전공학센터 책임연구원)

연 구 원: 김명희 (유전공학센터 선임연구원)

민경태 (유전공학센터 연구원)

서경숙 (유전공학센터 연구조원)

함경수 (유전공학센터 책임연구원)

이명규 (유전공학센터 연구원)

## 요 약 문

### I. 제목

DNA 재조합 기술에 이용되는 신효소 개발

### II. 연구 개발의 목적 및 중요성

유전 공학의 발달로 유전자 조작의 필수 소재인 제한 효소에 관한 연구가 점차 다양화 되어 가고 있으며, 따라서 새로운 제한 효소의 개발에 대한 요구가 절실해 지고 있다. 현재까지는 기존에 존재하고있는 제한 효소들의 분리 정제 및 공급이 주 였으나 앞으로는 단백질 공학을 이용한 기존 제한 효소의 변이체에 대한 연구가 필요 하리라고 본다. 더 나아가 제한 효소는 DNA binding 효소 중의 하나로서 생명 현상의 이해를 위해 근본적으로 풀어야 할 과제인 유전자-단백질 간의 상호 작용에 대한 연구의 활성화에도 기여를 하리라고 본다.

따라서 본 연구의 목적은 기존 제한 효소 중의 하나인 EcoRI의 정제와 단백질의 구조-기능 및 protein-DNA interaction에 대한 연구에 두고 제한 효소 EcoRI을 model case로 선정 하였다. 이 효소는 이미 그 3차원 구조가 밝혀져 있고 효소의 특성도 다른것들에 비해 비교적 잘 알려져 있으므로 단백질 공학을 이용하여 몇몇 아미노산을 다른 것으로 대체 시켜 이 특정 부위가 단백질의 구조와 catalytic activity, DNA binding activity에 미치는 영향에 대하여 분석 하는 것을 목표로 하였다.

### III 연구 개발의 내용 및 범위

1. 올리고뉴클레오타이드를 이용한 EcoRI 제한 효소의 특정 부위 변이
  - 1) EcoRI 제한 효소 유전자에서 변이를 시킬 199 번째의 아미노산을 포함 한 염기 서열을 결정 하고 거기에 해당하는 올리고 뉴클레오타이드를 합성 정제 하였다.
  - 2) 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 플라스미드로 부터 직접 heteroduplex를 형성 하였고 이것을 E.coli에 도입 시켰다.
  - 3) 콜로니 hybridization을 통해 변이체라고 생각되는 클론들을 선정 하였고, 이들의 플라스미드를 정제 하여 염기 서열을 결정 하였다.
2. 유전자 조립에 의한 EcoRI 유전자의 변이
  - 1) 변이를 시킬 아미노산을 포함 하는 약 185-bp EcoRI 제한 효소 유전자의 일부를 고안 하였다: 양 끝에 적절한 제한 효소 인식 부위를 두었으며, 아미노산은 치환 시키지 않으면서 적절히 염기만 바꾸어 여러 종류위 제한 효소 인식 부위를 포함 하도록 하였다.
  - 2) 29 에서 40 뉴클레오타이드 정도 길이의 올리고들을 ABI DNA 합성기로부터 DMT 기가 붙어 있는 상태로 합성 하였으며, 이들을 순수 정제 하였다.
  - 3) 합성 올리고들의 5' 끝에 인산기를 붙인 후 shot-gun과 block ligation 방법으로 제한 효소 유전자의 일부를 조립 하였다.
  - 4) 합성 조립된 제한 효소 유전자의 치환이 용이하도록 pUC9 벡터와 pSCC2 플라스미드를 이용하여 새로운 벡터를 고안 하였다.
3. EcoRI 제한 효소의 정제

- 1) E.coli로 부터 phosphocellulose, hydroxylapatite column을 이용하여 제한 효소 EcoRI을 정제 하였다.
- 2) pUC9과 람다 바이러스 DNA를 이용하여 효소의 활성도를 측정 하였다.

#### IV. 연구 개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구를 통해 EcoRI 제한 효소의 정제 기술과 변이 효소 정제를 위한 기본 기술을 확립 하였다. 본 결과를 통해 얻어진 EcoRI 효소는 이미 보고된 효소에 비해 월등히 높은 활성도를 나타 내었고 본 정제 기술을 응용하여 다른 제한 효소의 정제를 가능하게 하여 줄 것이다. 또 아미노산이나 염기 서열이 이미 알려진 경우 유전자의 합성에 의하여 아미노산 자체를 대체, 삭제, 혹은 첨가하여 아미노산의 순서를 임의로 바꾸는 등 단백질 공학 분야의 기술 일부를 정착 시켰다고 볼 수 있으나 생물학의 근본 질문인 protein-DNA interaction에 대한 연구는 앞으로 여러 종류의 변이 효소를 확보한 다음에야 가능 하리라고 본다.

## Summary

To study the structure and function relationship as well as protein-DNA interaction, EcoRI restriction endonuclease was chosen as a model system since it is one of the well known DNA binding protein. On the basis of its tertiary structure and well characterized catalytic and DNA binding function, Asn-199 amino acid residue which is protruded into the DNA and located right in front of outer  $\alpha$ -helix connecting the 4th and the 5th  $\beta$ -strand was targeted for the mutagenesis.

Two different schemes were designed and performed to conduct the site-specific mutagenesis at this site on EcoRI endonuclease. One is oligonucleotide-directed mutagenesis, in which the oligonucleotide containing random nucleotide combination at the region for Asn-199 was chemically synthesized and used for heteroduplex formation with pSCC2 plasmid which has the whole EcoRI restriction and modification enzyme sequences. Using the same oligonucleotide as a probe plausible mutants were screened and finally sequenced. The other is so called cassette mutagenesis. Portable cassette mixture, which is about 185-bp fragment, was constructed with 10 different oligonucleotides. This DNA was originally designed to contain the mutations at the target region as well as several convenient restriction endonuclease recognition sites by changing the nucleotide sequences, but not the

amino acid sequences. The mutagenesis with mutable cassette is being under study.

From this study, the methodology for the purification of EcoRI as well as other related restriction endonuclease has been established. EcoRI endonuclease was purified from E.coli through phosphocellulose and hydroxylapatite column. The final activity was  $1.5-4 \times 10^5$  units and its specific activity was much higher than the others which had previously reported.

## 목차

제 1 장	서론 .....	11
제 2 장	실험재료및 방법 .....	19
제 1 절	올리고뉴클레오타이드를 이용한 변이 .....	19
1.	균주, 배지, 완충 용액 및 화학 물질 .....	19
2.	올리고뉴클레오타이드의 합성과 정제 .....	20
3.	Heteroduplex의 형성 .....	20
4.	Gap filling 과 ligation .....	21
5.	<u>E.coli</u> 의 형질 전환 .....	21
6.	Colony hybridization .....	21
7.	플라스미드 정제 .....	22
8.	DNA 염기 서열 결정 .....	23
제 2 절	유전자 조립에의한 변이 .....	24
1.	DMT가 부착된 올리고뉴클레오타이드의 정제 .....	24
2.	Phosphorylation및 ligation .....	25
제 3 절	EcoRI 제한 효소의 정제 .....	26
1.	EcoRI의 정제 .....	26
2.	EcoRI의 활성화도 측정 .....	27
제 3 장	실험결과 및 고찰 .....	28
제 1 절	올리고뉴클레오타이드를 이용한 아미노산 치환 .....	28
제 2 절	유전자 조립에의한 변이 .....	36



제 3 절	EcoRI 제한 효소의 정제 .....	43
제 4 장	결론 .....	51
제 5 장	참고문헌 .....	52

## 제1장 서론

생체내의 수많은 유전 정보와 그에따른 각종 기능과 시행은 생체의 유지, 성장, 번식등 생명 현상의 필수적인 과정으로 고도의 정밀성과 복잡성으로 정교하게 진행이 되고 있다. 이렇게 정교하면서도 질서있게, 그리고 계획적으로 생명 현상이 유지되기 위해서는 유전자 자체에 이에 대한 암호와 이를 인식하고 적절히 번역하여 진행 시켜주는 신호 물질이 있어야 하는데 이 물질들이 DNA 결합 단백질들이다. 이 DNA 결합 단백질들과 DNA간의 상호 작용에 대한 이해는 분자 생물학의 주요 연구 목표로서 생명 현상 이해를 위한 핵심 연구라 할 수 있다.

본 연구에서는 DNA 결합 효소중 한 범주에 속하는 제한 효소를 설정 하였는데, 제한 효소의 기능은 현재 미생물에서 자체 방어에 관여할 것이라고 알려져 있으며, 이들을 분리하여 유전자 재조합, 즉 유전공학 실험의 필수 수단으로도 사용되며 현재 알려진 종류만도 수백종에 이르고 있다. 또 효모등 진핵 세포에도 제한 효소가 존재 한다는 것이 밝혀진 이래 제한 효소의 생체내 기능이 자체 방어 목적 뿐이 아닌 유전자의 재결합이나 유전자의 회복에도 관여할 것 이라는 것이 알려지게 되었다. 현재 까지 알려진 제한 효소중 활성 부위및 기작이 비교적 잘 밝혀져 있고 이미 그 3 차원 구조까지 알려져 있는 EcoRI 제한 효소를 선정하여 DNA와 단백질 간의 결합 특이성을 변형시켜 유전자와 효소간의 상호 작용및 구조-기능 관계를 규명해 보고자 하였다. 오늘날 분자 생물학에서 가장 흥미를 끄는 진보 중의 하나는 새로운 기능을 갖는 단백질이나 효소를 설계하고 만들수 있다는 점 인데, 유전자 재조합 기술의 발달로 단백질의

아미노산기를 대체, 삭제, 또는 첨가하여 아미노산의 순서를 임의로 바꿀수 있게 되었고 두개 또는 그 이상의 단백질을 서로 붙여 혼합 단백질을 만들기도 하며 심지어는 새로운 기능을 갖는 단백질을 유전자의 화학적 합성으로부터 창제해 낼수도 있게 되었다. 이러한 일련의 분야가 단백질 공학이라고 불리어지고 있으며 여기서는 EcoRI 제한 효소를 대상으로 이런 분야를 확립해 보고자 한다.

EcoRI 제한 효소는 276개의 아미노산기로 이루어진 31-kilodalton의 작은 단백질이며 이것의 DNA 염기와 아미노산 서열 정보는 이미 다 알려져 있다. 이 효소는 이중 나선 DNA 상에서 d(GAATTC)의 6 염기를 인지하고 G와 A 염기 사이의 phosphodiester bond를 가수분해 한다. 이때 magnesium 이온을 필요로 하지만 이 이온이 없을 때도  $10^{-11} M^{-1}$  dissociation constant로 cognate hexanucleotide와 특이 결합을 한다. EcoRI은 또 nonspecific하게 DNA와 결합 할 수 있으나 DNA상에서 facilitated diffusion을 하여 specific complex 의 형성 비율을 증가 시킨다. EcoRI 제한효소의 기능은 이 효소의 구조가 X-Ray Crystallography에 의하여 3Å 정도의 거리까지 해독이 가능해. 질에따라 효소의 염기 인식 및 염기 절단 반응을 분자 수준에서까지 설명이 가능하게 되었다. EcoRI의 3차 구조를 먼저 살펴보면 EcoRI은  $\alpha/\beta$  2차 구조로 이루어져 있으며 크게 parallel motif와 antiparallel motif 로 나눌 수 있다 (Fig. 1). Parallel motif는  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ , 그리고  $\beta 3$ 로 이루어져 있으며 단백질과 DNA 염기 간의 직접 접촉과 subunit간의 상호 작용에 관여하며  $\beta 3$ ,  $\beta 4$ , 그리고  $\beta 5$ 로 이루어진 antiparallel motif는 DNA 절단에 관여를 한다는 것이 알려졌다. 또 더 나아가 단백질을 형성하고 있는 아미노산 사슬의 구조적 특성들도 밝혀지게 되었는데 N-terminal에 위치하고 있는 2번부터 17번까지의

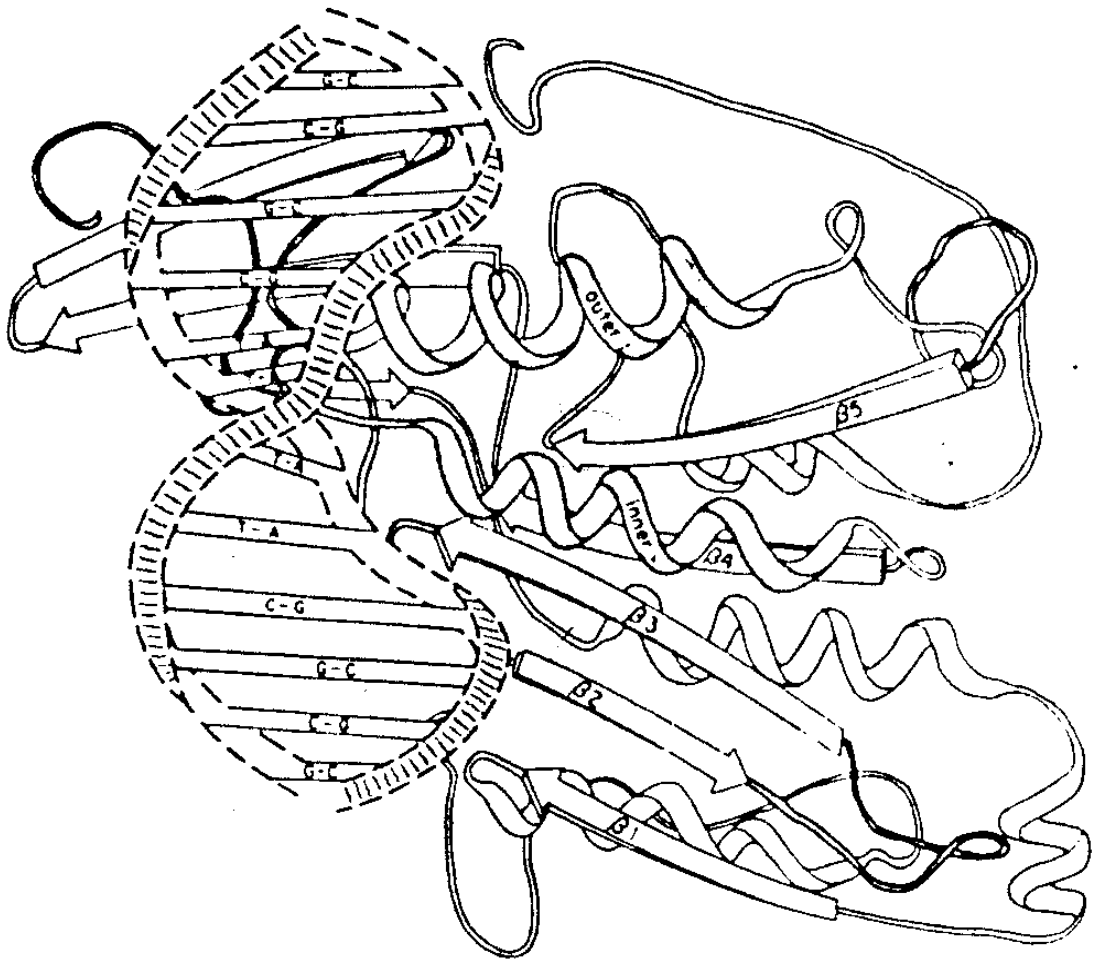


Fig. 1. Schematic backbone drawing of one subunit of (dimeric) EcoRI endonuclease and both strands of the DNA in the complex.

아미노산기들은 DNA를 감싸고 있는 팔(arm)의 일부를 형성하고 18번에서 28번 아미노산기들은 단백질의 표면을 이루고 있으며 29번부터 43번까지의 아미노산은 긴  $\alpha$ -helix를 형성하여 역시 단백질의 표면에 위치하며 첫번째  $\beta$ -strand ( $\beta$ 1: 44-56 아미노산기)와는 loop으로 연결되어 있다.  $\beta$ -Sheet는 antiparallel motif의 바깥에서부터 순차적으로 형성이 되는데 63번 부터 102번까지의 아미노산기가 첫번째와 두번째의  $\beta$ -strand를 연결해 주는 loop의 역할을 하고 두번째와 세번째 antiparallel  $\beta$ -strand를 연결하는 loop (110-122 residues)는 용액에 약간 노출되어 있으며 단백질-단백질 상호 작용에 관여 하고 있다. 세번째의  $\beta$ -strand는 동시에 parallel과 antiparallel motif에 중복되어 사용되고 있으며 이는 DNA 인식 및 부착과 절단에 모두 관여함을 뜻한다. Parallel motif는 123번부터 228번 residue들로 형성 되는데  $\beta$ -sheet의 중간 부위부터 시작하여  $\beta$ -sheet의 끝 즉, 5번째  $\beta$ -strand로 이루어져 있다. 세번째와 네번째  $\beta$ -strand를 연결하는  $\alpha$ -helix (146-158 residues)는 "inner recognition module"의 일부 이므로 "inner  $\alpha$ -helix"라고 불리며, 또 비슷하게 4번째와 5번째의  $\beta$ -strand를 연결하는  $\alpha$ -helix (201-209 residues)는 "outer  $\alpha$ -helix"라고 불린다. 다섯번째  $\beta$ -strand의 끝에 위치하고 있는 229번 아미노산이 excite되면 C-말단에 존재하고 있는 아미노산기들은 단백질의 표면에서 돌출된 loop을 형성함과 동시에 DNA 등뼈에 근접하게 된다. 대부분의  $\alpha$ -helix들은 N-말단 끝이 DNA를 향하도록 정비가 되어 있으며, 이런 방향으로  $\alpha$ -helix들이 놓여 있음으로하여 음전하를 띤 DNA 등뼈에 의해 만들어진 electrostatic field와 조화롭게 작용을 하며 그와 더불어 단백질-DNA 복합체를 안정하게 하는데도 기여를 한다. Inner- 그리고 outer  $\alpha$ -helix들 역시 N-말단 끝이

DNA의 major groove로 향해 나와 있으며 DNA염기와 직접 작용을 하는 아미노산 잔기는 이들 helix의 끝에 또는 바로 앞에 위치한다 (Fig. 2).

Subunit간의 상호 작용은 주로 parallel motif에 존재하는 아미노산기들에 의하여 이루어지며 이는 또다시 두 부위로 나뉘어진다. 하나는 용매가 닿을 수 없는 중심부이고 다른 하나는 용매 속에 나와 있는 표면부이다. 중심부는 inner와 outer  $\alpha$ -helix의 두 교차(crossover) helix와 5번째  $\beta$ -strand의 N-말단에 위치한 잔기들이 포함 되는데 이 잔기들은 소수성 과 polar side-chain을 갖고 있다. 표면부는 5번째  $\beta$ -strand 앞부위에 존재하는 전하를 띤 residue들과 C-말단의 표면 loop 그리고 antiparallel motif의 표면에 존재하고 있는 두개의 residue들로 이루어져 있다. Subunit간의 상호 작용에 관여하는 모든 전하를 띤 residue들은 또 역시 DNA-단백질 간의 상호 작용에도 관여를 한다.

DNA와 EcoRI 제한 효소의 접촉은 두 부위에서 일어 나는데, 단백질들과 DNA 등뼈 사이의 접촉과 GAATTC 염기 서열의 major groove를 부분적으로 감싸면서 동시에 염기와 하는 접촉이다. 단백질과 DNA 등뼈간의 접촉은 인산기와 디옥시리보오즈와의 접촉이며 단백질-염기간의 접촉 보다는 훨씬 더 넓은 부위와 접촉하고 minor groove는 용매에 노출되어 있다. Glu-144, Arg-145 그리고 Arg-200의 side chain들은 hexanucleotide의 purine 염기들과 수소 결합을 하여 (Fig. 3) 직접적으로 sequence-specific DNA-protein interaction을 한다. Arg-200의 guanidium moiety 는 구아닌 염기와 두개의 수소 결합을 하는데, 구아닌의 N-7 원자와 O-6 원자에 각각 수소 결합을 한다. Glu-144 와 Arg-145의 side chain은 두개의 아데닌의 N-6 amine group과 두개의 아데닌 N-7 원자에 각각 수소 결합을 한다. 이들 상호 작용은 다른 모든 hexanucleotide들로부터

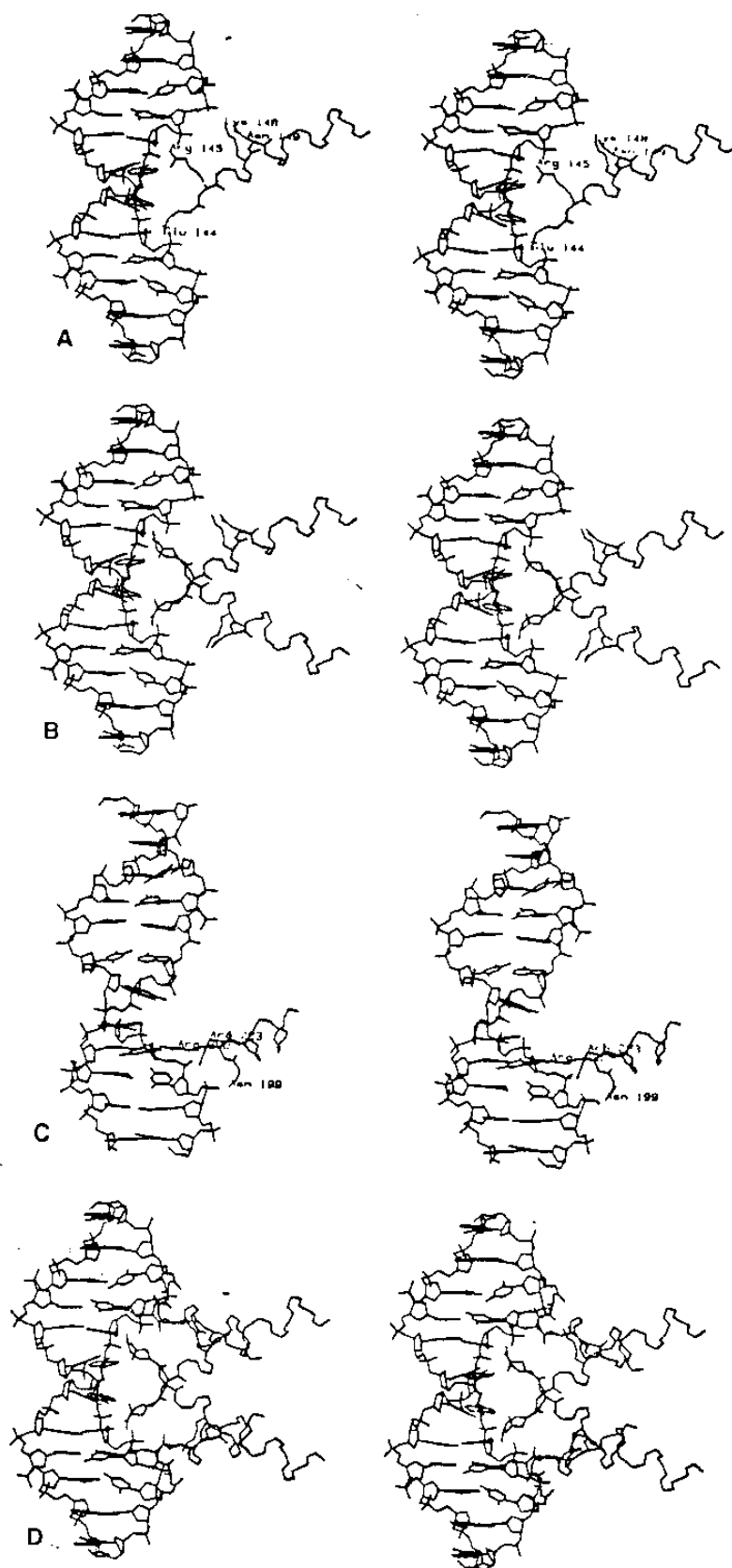
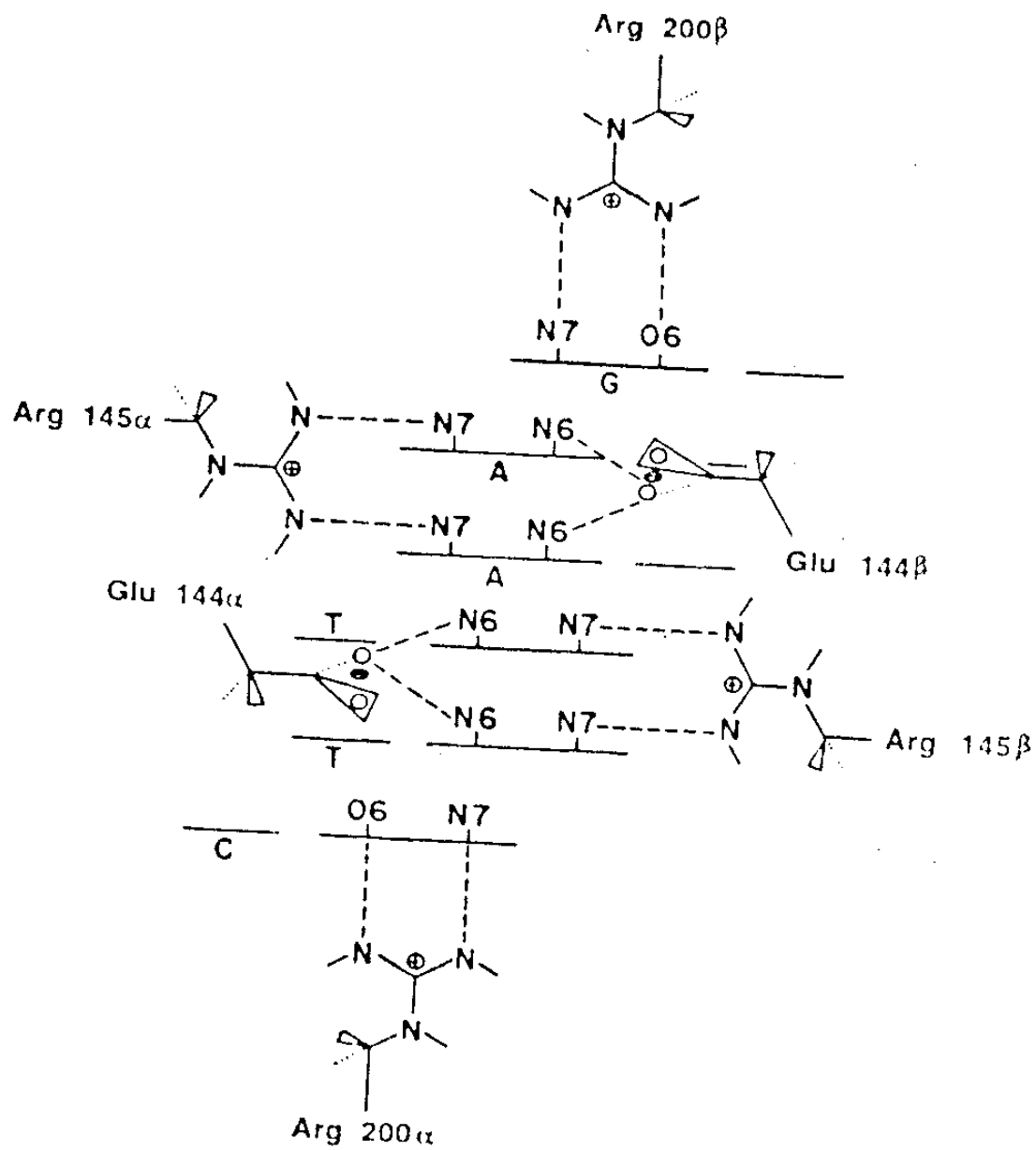


Fig. 2. Stereo drawing showing the recognition  $\alpha$ -helices and modules.



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

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



구별하여 EcoRI의 인식 염기인 5'-GAATTC-3' 만을 인식 하도록 한다.

본 연구에서는 200번째의 아미노산 arginine이 outer  $\alpha$ -helix의 N-term끝에 위치 하며 hexanucleotide중 구아닌 염기를 인식한다는점에 착안하여 Arg-200 바로 앞의 아미노산 Asn-199를 다른 아미노산으로 대체 하였을 때 기존 6개 인식 염기와는 다른 새로운 염기를 인식 하거나 또는 6개 이상의 인식 염기를 갖는 변이 EcoRI을 만들고자 하였다. 두개의 서로 다른 방법을 통하여 변이 EcoRI 효소를 만들고자 하였는데 하나는 oligonucleotide-directed mutagenesis이고 다른 하나는 유전자 조립에 의한 mutagenesis이다. 본 연구의 최종 목표는 신규 변이 EcoRI을 유전자 합성및 재조합기술로 고안 제조하고, 그 유전자를 적절한 조건에서 발현 정제하여 EcoRI 제한 효소에 있어 199번 아미노산이 단백질-DNA interaction 즉, binding specificity와 catalytic activity에 미치는 영향에 대하여 알아보고 , 더 나아가 단백질의 구조-기능 관계및 분자 생물학의 근본 질문이라 할 수 있는 DNA-단백질 상호 작용에대한 이해와 이론을 정립하고자 하는 것이다. 또 더 나아가 이 연구를 연장하여 새로운 기능을 갖는 신 효소를 제조할 수 있는 기반이 이루어 질 것으로 본다.

## 제 2 장 실험재료 및 방법

### 제 1 절 올리고뉴클레오타이드를 이용한 변이

#### 1. 균주, 배지, 완충용액 및 화학 물질

사용된 *E.coli* 균주는 M5248 ( bio275, cI857,  $\Delta$ H1)이다. LB 배지는 1 liter당 bacto-trypton 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 10 g을 함유하며 고체 배지를 만들 때는 1.5% (w/v)의 bacto-agar 를 넣어 사용 하였고 ampicillin 배지에는 ampicillin을 50  $\mu$ g/ml 농도로 넣어 주었다. SOB 배지의 조성은 2% (w/v) bacto-trypton, 0.5% (w/v) yeast extraect, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM  $MgSO_4$  이며, 배지를 만들 때에는  $Mg^{+2}$  이온이 든 salt를 제외한 나머지를 혼합하여 멸균한 후 filter-sterilize한  $Mg^{+2}$  이온을 최종 20 mM 농도가 되도록 배지에 넣어 주었다. SOC 배지는 SOB에 20 mM glucose를 함유한 것으로 filter-sterilize한 2 M glucose 용액을 20 mM이 되도록 SOB와 혼합하여 사용 하였다. 제한 효소 및 DNA중합 반응에 사용한 완충 용액은 다음과 같다. 제한 효소 BamHI, AvaI, HindIII의 반응을 위한 완충 용액은 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM  $MgCl_2$ , 1 mM DTT이다. 5X polymerase-ligase buffer는 500 mM NaCl, 32.5 mM Tris-HCl (pH7.5), 40 mM  $MgCl_2$ , 5 mM beta-mercaptoethanol이고, gel electrophoresis에 사용된 TBE buffer (5X)는 1 liter 당 tris base 54 g, boric acid 27.5 g, 0.5 M EDTA (pH8.0) 20 ml를 혼합하여 만들었다. Hanahan 방법에 사용되는 transformation buffer는 10 mM potassium

morpholino-ethanesulfonic acid (MES), 10 mM RbCl, 45 mM MnCl<sub>2</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 3 mM HAcOCl<sub>3</sub>로 구성된다. 1M MES는 KOH를 이용 하여 pH 6.3 을 맞춘 뒤 filter-sterilize 하여 -20 °C에 저장 하였다가 사용하며 다른 모든 성분을 섞어 녹인 후 filter를 통과시켜 4 °C에 저장한다. DMSO (dimethyl sulfoxide)는 새로운 병에 보관하면서 필요할 때 마다 하나씩 꺼내 사용을 한다. DTT 용액은 2.25 M DTT, 40 mM potassium acetate (pH 6.0)를 함유하며 filter-sterilize한 후 -20 °C에 보관 하였다. 제한 효소, T4 DNA ligase, Klenow Fragment, Bacterial Alkaline Phosphatase 등의 효소들은 Bethesda Research Laboratory (BRL), Biolabs, 그리고 KOSCO에서 구입하였고, Lysozyme, SDS, tris base, acrylamide 등은 Sigma Chemical Co.로 부터, TEMED, ammonium persulfate는 BRL로부터, N'N'-methylene-bis-acrylamide와 rubidium chloride는 Fluka에서 구입 하였다. 그의 사용된 chemical들은 모두 reagent grade 이다.

## 2. 올리고뉴클레오타이드의 합성과 정제

Mutagenesis와 sequencing에 사용 할 올리고뉴클레오타이드들은 Beckman DNA 합성기를 이용하여 phosphite triester 합성법으로 합성 하였고, polyacrylamide gel과 SEP-PAK을 사용하여 정제 하였다(BS F8003-40-1).

## 3. Heteroduplex의 형성

pSCC2 DNA를 제한 효소로 자르고 5' 끝에 인산기를 붙인 primer와 혼합하여 polymerase-ligase buffer가 들어있는 용액에 넣고 끓는 물에서 3분간 방치한 후 재빨리 30 °C incubator로 옮겨 30분동안 반응을 시킨다.

그리고 4 °C 냉장고로 옮겨 30분 동안 더 방치한 후 얼음에 10분동안 놓아 둔다.

#### 4. Gap filling 과 ligation

위에서 만든 heteroduplex mixture에 dTTP, dCTP, dATP, dGTP 를 각각 2.5 mM 씩 넣고 10 mM ATP, Klenow Fragment, T4 DNA ligase 를 첨가하여 12.5 °C에서 하룻밤 동안 반응 시켰다.

#### 5. E.coli의 형질 전환

사용할 숙주 세포들은 하루 전에 seed 하여 하룻 밤 키운 후 SOB 배지 50 mL에 0.1-1 mL 접종 하여 37 °C shaker에서 2-3 시간 키워 OD (600 nm)= 0.2가 되면 얼음에 10분간 방치 하였다가 4 °C, 4,000 g 에서 5분간 원심 분리하여 모은 세포에 1/3V transformation buffer를 넣은 후, DMSO 용액을 천천히 가하여 3.5%가 되게 하였다. 세포가 담긴 시험관을 얼음에 5분간 두었다가 DTT용액을 75 mM이 되도록 첨가 하고 얼음에 다시 10 분간 두었다가 먼저와 같은 양의 DMSO를 천천히 넣고 얼음 위에 5분간 더 방치한 후 이것을 200  $\mu$ l씩 취하여 플라스미드 DNA와 섞고 얼음 위에서 30분, 42 °C에서 90초, 다시 얼음 위에서 5분간 방치 하였다. 여기에 800  $\mu$ l의 SOC를 넣고 37 °C에서 1 시간 배양하고 배양액 300  $\mu$ l씩을 ampicillin이 든 LB plate에 골고루 펴서 말린 후 37 °C에서 하룻밤 배양 하였다.

#### 6. Colony hybridization

Ampicillin이 함유된 LB agar plate 3개중 2개는 nitrocellulose (NC) 필터를 각각 붙여서 젖게하고 그위에 시험 할 각 콜로니들을 멸균된

이쑤시개로 다시 plate의 같은 위치에 옮겼다. NC 필터 위의 콜로니가 0.5-1 mm의 폭을 가질때까지 37 °C에서 키운 후 잉크로 비대칭의 3 점을 찍어 위치를 표시하고 NC 필터가 없는 plate는 4 °C에서 보관 하였다. 콜로니가 자란 필터를 핀셋으로 꺼내어 변성 용액에 5분간, neutralizing solution에 5분간 그리고 2XSSC에 5분간 담궈 두었다. 콜로니 부분을 깨끗한 종이로 부스러기를 닦아 낸 후 80 °C의 진공 오븐에서 2 시간 동안 구웠다. 이 NC 필터를 전 처리 용액 (3X SSC, 0.1% SDS)에 담구어서 50 °C에서 약 2시간 흔들여 준 후 prehybridization 용액 (6X SSC, 5X Denhardt solution, 0.1% SDS, 0.05% Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) 에 넣어, 40 °C에서 2시간 흔들여 주면서 prehybridization을 하였고, <sup>32</sup>P-labelled probe를 넣고 40 °C에서 15 시간정도 hybridization 하였다. Washing은 6X, 2X, 1X로 SSC의 농도를 낮춰가면서 각각 1시간씩 해 주었으며 최종 으로 필터를 Whatman paper에 넣어 말린 후 X-Ray 필름에 노출 시킨 후 현상 하였다.

## 7. 플라스미드 정제

플라스미드가 들어 있는 E.coli균주는 1 liter LB 배양액에서 하룻밤 배양 하여 pellet을 얻은 후 20 ml의 lysozyme 용액 (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 4 mg/ml lysozyme)에 현탁 시켜 실온에서 5분간 방치해 두었다가 40 ml의 0.2 N NaOH, 1% SDS 용액에 넣고 섞은 후 얼음에 10분간 둔다. 다시 30 ml의 5 M potassium acetate을 넣고 얼음에 15분간 두었다가 이것을 Beckman GS-3 roter로 4 °C에서 7,500 rpm으로 30분간 원심 분리 한다. 상층액을 2 배 부피의 ethanol과 잘 섞은 후 실온에 5분간 놓아 둔다. 원심 분리 하여 침전물을 70% ethanol로 씻어 말리고 8 ml의 TE 용액에 녹인다. 1 ml당 1 g씩의 CsCl을 첨가 하여

완전히 녹인 후 EtBr을 600  $\mu\text{g/ml}$ 이 되도록 섞어 주었다. 이것을 Beckman type 50.1 rotor로 20°C, 40,000 rpm에서 40시간 동안 원심 분리한 후 플라스미드 band를 주사기로 뽑아 내었다. DNA 용액으로부터 EtBr을 물로 포화 된 n-butanol로 여러번 추출하여 제거 하였다. 그 다음엔 1.5배 부피의 물을 섞고 phenol-chloroform으로 추출한 후 ethanol로 침전 시켰다. 미량의 RNA는 DNase free RNase로 실온에서 1 시간동안 반응시킨 뒤 다시 phenol-chloroform으로 처리한 후 ethanol로 침전시키고 말린 다음 적당량의 TE 용액에 녹여 -20°C에 보관 하였다. DNA 농도는 260 nm에서 absorbance를 측정하여 알 수 있었다. 짧은 시간에 간단히 적은 양의 플라스미드를 얻기 위하여 over night culture 1.5 ml을 원심 분리 하여 *E.coli* pellet을 얻고 앞서서와 같은 용액을 각각 100  $\mu\text{l}$ , 200  $\mu\text{l}$ , 150  $\mu\text{l}$ 씩 넣고 5분간씩 반응시킨 후 상층액을 떠내 phenol-chloroform 처리한 후 ethanol로 침전시키고 이를 0.5  $\mu\text{g/ml}$  RNase를 함유한 TE 용액에 녹여 사용 하였다.

## 8. DNA 염기서열 결정

DNA 염기서열을 결정하기 위하여 Sanger의 Dideoxynucleotide chain termination sequencing method를 수정 한 Chen and Seeburg (1983)의 방법을 이용하였다. Super-coil plasmid DNA 1-2  $\mu\text{g}$  을 NaOH로 변성 시키고 ammonium acetate (pH 4.5)를 넣어 중화 시켜 에탄올에 침전시켰다가 물에 녹여 primer와 Klenow buffer를 넣고 annealing 하였다. 여기에 Klenow Fragment와  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -dATP를 넣어 섞은 후 G, A, T, C 네 가지 반응을 위해 4개의 Eppendorf tube에 똑같은 양으로 나누었다. 여기에 각각 적당한 농도의 dATP/ddATP, dCTP/ddCTP, dGTP/ddGTP, dTTP/ddTTP

혼합물을 각각 넣고 반응 시킨 후 dNTP를 적당량 넣어 chase reaction시킨 다음 stop solution을 섞어 반응을 중지 시켰다. 이 반응액을 2  $\mu$ l 따서 3분간 끓인 후 8% polyacrylamide-8 M urea gel에 loading 하여 1,500-1,700 volt로 여러시간 동안 전기 영동 하였다. Gel을 떼어내어 비닐로 싸서 X-ray 필름에 8 시간 동안  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 노출한 후 현상 하였다.

## 제 2 절 유전자 조립에 의한 변이

### 1. DMT가 부착된 올리고뉴클레오타이드의 정제

각각의 올리고뉴클레오타이드들은 DMT (Dimethoxy trityl) group 이 붙어 있는 채로 ABI (Applied Biosystem Inst.) DNA 합성기로부터 합성을 하였고 DMT 기를 포함한 모든 보호기를 제거하는 방법은 다음과 같다: 실리카에 붙어 있는 올리고뉴클레오타이드는 우선 실온에서 3 시간동안 c-NH<sub>4</sub>OH를 넣고 반응을 시켜 실리카로부터 분리를 하고 다시 52 $^{\circ}\text{C}$ 에서 하룻밤 (약 12시간) 놓아두어 탈보호 반응을 한다. DMT기를 제거하기 전에 우선 Rotary Evaporator를 이용하여 양을 약 1 ml 정도로 줄이고 여기에 25 mM TEAB 를 1-2 ml첨가한다. 그동안 SEP-PAK column은 CH<sub>3</sub>CN, 30% CH<sub>3</sub>CN/ 70% 50 mM TEAB, 25mM TEAB를 각각 10 ml 씩 취하여 차례로 씻어 주고 여기에 위에서 준비된 DMT-Oligo sample을 주입한다. 두차례 25 mM TEAB (10 ml씩) 로 씻어 salt를 제거하고 failure DNA들은 10% CH<sub>3</sub>CN/ 90% 50 mM TEAB로 제거한다. 최종 으로 원하는 크기의 DMT-oligo들은 30% CH<sub>3</sub>CN/ 70% 50 mM TEAB으로 elute하고 (기대되는 OD 값은 100 정도) Rotary Evaporator를 이용하여 분량을 약 100  $\mu$ l로 줄인다. Detritylation은 80%

Acetic acid 용액 내에서 실온에 15분간 진행 시켰고 50 mM TEAB 를 같은 분량 첨가 함으로서 반응을 중단 시켰고 Rotary Evaporator 와 Speed Vac 을 이용하여 acetic acid 를 완전히 제거 하였다. 그 다음의 polyacrylamide gel 과 SEP-PAK 을 이용한 정제는 보고서 BS N-7004-25-1 과 동일하게 하였다.

## 2. Phosphorylation 및 ligation

각각의 정제된 올리고뉴클레오타이드들을 0.2 nmole 씩 취하고 물을 넣어 25  $\mu$ l 가 되도록 하였다. 여기에 0.2 M  $MgCl_2$  와 0.1 M Tris-HCl, pH 7.5 를 각각 5  $\mu$ l 씩 넣고 100 °C 에서 3분간 끓인 후 재빨리 얼음에 박는다. 다시 0.1 M DTT 5  $\mu$ l, 0.05 M Spermidine 1  $\mu$ l, 1 mM ATP (2 mole 에 상응 함) 2  $\mu$ l 그리고  $\gamma$ - $^{32}P$ -ATP 1  $\mu$ l 을 첨가하여 혼합하고 이 혼합물에서 1  $\mu$ l 의 시료 (0분) 를 취한다. T4 Kinase 10 units 을 넣고 37 °C 에서 30분간 반응을 시키고 다시 1  $\mu$ l 의 시료 (30 분) 를 취하고 혼합물을 100 °C 에서 3분간 denature 한 후 얼음에 박는다. 한번 더 kinase 반응을 시키기 위하여 0.1 M DTT 5  $\mu$ l 와 T4 Kinase 1  $\mu$ l 를 첨가하여 37 °C 에서 30분간 놓아둔 후 시료 1  $\mu$ l (60분) 를 따 두고 sample 은 100 °C 에서 3분간 처리하여 완전히 denature 한 후 -20 °C 에 보관한다.

인산기가 oligonucleotide 의 5' 끝에 제대로 붙었는지는 매 30분마다 취한 시료들을 PEI plate 에 찍어서 0.75 M sodium phosphate 용액으로 develop 하고 PEI plate 를 말려서 X-ray 필름에 노출 시켜 autoradiograph 를 떴다.

Ligation 은 2 nmole scale 로 shot-gun (S; E1-E10), block ligation I (A; E1-E4/ B; E5-E10), block ligation II (C; E1-E6/D; E7-E10) 을 하였다. 각각 batch 별로 (S, A, B, C, D) 올리고뉴클레오타이드들을 넣고



동시에 위와 같은 방법으로 kination 하여 확인 하고 T4 DNA ligase 를 첨가하여 16 °C에서 하룻밤 반응 시켰다. Block ligation 의 경우는 각 block (A, B, C, D) 을 먼저 ligation 시킨 후 다시 A와 B, C와 D를 혼합하여 하룻밤 더 ligation 시켰다. 각 batch의 ligation product들은 denaturing polyacrylamide gel에서 확인 하였다.

### 제 3 절 EcoRI 제한 효소의 정제

#### 1. EcoRI 의 정제

배양한 E.coli 세포로부터 EcoRI의 정제는 Rubin 과 Modrich (1980)의 방법을 일부 수정하여 다음과 같이 수행하였다. E.coli (14 g)에 56 mM 2-mercaptoethanol 및 1 mM EDTA가 함유된 0.2 M potassium phosphate 완충액, pH 7.4 를 넣어 현탁 시킨 후 sonication 하고 15,000 rpm에서 원심 분리 (4 °C, 20분간) 하여 상층액을 취하였다. 이 상층액에 ammonium sulfate를 가하여 최종 농도가 25% 포화 용액이 되게 한 후 원심 분리 하여 얻은 상층액을 다시 ammonium sulfate 농도가 60% 포화 용액이 되게 하고 원심 분리하여 침전물을 취하였다. 침전물을 5 mM 2-mercaptoethanol 및 1 mM EDTA가 첨가된 0.02 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  완충액 (pH 7.4)에 녹이고 투석한 후 10배 용적의 5 mM 2-mercaptoethanol, 0.5 mM EDTA 및 10% glycerol이 함유된 0.02 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  완충액 (pH 7.4)를 가하고 chromatography를 수행 하였다. Chromatography는 먼저 phosphocellulose chromatography를 수행 하였으며,

0.65 M KCl 용액으로 용출시킨 분획들을 모아 hydroxylapatite chromatography를 수행 하였다. Hydroxylapatite column은  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  완충액으로 유출 시켰으며 EcoRI 활성을 갖는 분획은 0.5 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  용액으로 유출시킨 분획 이었으며, 분리된 EcoRI은 0.4 M KCl, 1 mM EDTA, 0.2 mM dithiothreitol 및 60% glycerol이 포함된 0.2 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  완충액 (pH 7.4)에 투석한 후  $-20^\circ\text{C}$ 에 보관 하였다.

## 2. EcoRI의 활성도 측정

EcoRI 의 1 unit은 단위 시간당 람다 및 pUC9 DNA 1  $\mu\text{g}$ 을 분해하는 효소량으로 정하였고, 그 활성도는 람다 바이러스 및 pUC9 플라스미드 DNA를 이용하여 측정 하였다. 반응 완충 용액은 medium buffer에 0.2 mg/ml bovine serum albumin과 0.2% glycerol을 첨가한 용액 이며, specific activity는 람다와 pUC9 DNA 1  $\mu\text{g}$ 이 1 시간 동안에 완전히 분해될 수 있는 최소 단백질의 양 (mg)으로 정의 하였다.

### 제 3 장 실험 결과 및 고찰

#### 제 1 절 올리고뉴클레오타이드를 이용한 아미노산 치환

EcoRI 제한 효소 (Fig. 4)에서 199번째의 아미노산을 무작위로 다른 아미노산과 대체시키기 위하여 Asn-199번 코오돈을 random base로 대체한 31-mer 올리고뉴클레오타이드를 합성 하였다:

196	197	198	199	200	201	202	203	204		AA position
Gly	Ile	Leu	Asn	Arg	Leu	Asp	Arg	Leu		AA
5'CT	GGT	ATA	TTA	AAT	AGG	TTA	GAT	CGA	CTA	AC3' Nuc. seq.
3'GA	CCA	TAT	NNN	TTA	TCC	AAT	CTA	GCT	GAT	TG5' 31-mer oligo

위의 mutagenic 31-mer oligonucleotide는 고상에서 phosphite triester 법으로 합성 하였고, 실험 재료 및 방법에서와 같이 정제 하였다.

Mutagenic oligonucleotide를 이용 하여 직접 플라스미드 와 heteroduplex를 만들기 위하여 벡터내에 partial single-stranded region을 먼저 만들어야 하는데, 이때 적절한 제한 효소의 절단 위치가 있어야 한다. 그리하여 본 실험에서는 pSCC2 plasmid (Fig. 5)를 한 군데서만 자르는 Sall 효소로 완전히 자르고 gel에서 추출하여 이들이 heteroduplex 형성시 self-ligation 되는 것을 막기 위하여 Bacterial

Met Ser Asn Lys Lys Gln Ser Asn Arg 10  
 ATC TCT AAT AAA AAA CAG TCA AAT AGC CTA ACT GAA CAA CAT AAG TTA TCT CAA GGT GTA ATT GGG 407

Ile Phe Gly Asp Tyr Ala Lys 30  
 ATT TTT GGG GAT TAT GCA AAA GCT CAT GAT CTC GCT GTT Gly Glu Val Ser Lys Leu Val Lys Lys Ala Leu Ser Asn Glu Tyr 50  
 TCA TTT CGA TAT ACA GAT AGT ATA AAG AAA ACA GAA ATA AAT GAA GCT TTA AAA AAA ATT GAC CCT GAT CTT GGC UGT ACT TTA TTT GTT TCA 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 80  
 TCA TTT CGA TAT ACA GAT AGT ATA AAG AAA ACA GAA ATA AAT GAA GCT TTA AAA AAA ATT GAC CCT GAT CTT GGC UGT ACT TTA TTT GTT TCA 593

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 110  
 AAT TCC AGC ATC AAA CCT GAT GCT GGA ATT GTA GAG CTC AAA GAT GAT TAT GGT GAA TGG AGA GTT GTA CTT GTT GCA GCC AAA CAC CAA 686

Gly Lys Asp Ile Ile Asn Ile Arg Asn Gly Leu Leu Val Glu Val Lys Arg Gly Asp Gln Asp Leu Met Ala Ala Glu Asn Ala Ile Glu-Arg-Ser- 140  
 GGT AAA GAT ATT ATA AAT ATA AGC AAT GGT TTG TTA GTT GGG AAA AGA GGA GAT CAA CAT TTA ATG-GCT-GCT-GGT AAT GCT ATC GAA-AGA-TCT 774

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 170  
 CAT AAG AAT ATA TCA GAG ATA GCG AAT TTT ATG CTC TCT GAG AGC CAC TTT CCT TAC CTC CTT TTC TTA CAG GGG TCT AAC TTT TTA ACA GAA 472

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 200  
 AAT ATC TCA ATA ACA AGA CCA GAT GGA AGG GTT Val Asn Leu Glu Tyr Asn Ser Gly Ile Leu Asn Arg Leu Asp Arg Leu Thr Ala Ala Asn 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 230  
 TAT GGA ATG CCT ATA AAT AGT AAT CTA TCT ATT AAC AAA TTT CTA AAT CAT AAA GAC AAA AGC ATT ATG CTA CAA GCA 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 270  
 CAA GGA GAT GGG AGG GAG TGG GAT TCG AAA ATC ATG TTT CAA ATA ATG TTT GAT ATA TCA AGC ACT TCG CTC AGA GTG TTG GGG CGT GAC TTG 1111

Phe Glu Gln Leu Thr Ser Lys 1200 Met Ala Arg Asn Ala Thr Asn Lys Leu Leu His Lys Ala Lys Lys 1247  
 TTT GAA CAG CTT ACA TCT AAG TGATATTTTTTATTATAAAGTTTAAATTA ATG GCT AGA AAT GCA ACA AAC AAC TTA CTG CAC AAA CCT AAA AAA

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 40  
 TCG AAA AGC GAC CAA TTT TAC ACT CAG TAT TGT CAT ATT GAG AAC GAA CTG CAA TAC TAC AGA GAG CAC TTC TCT GAT AAC GTT GTT TAT TCG 1342

Asn Cys Asp Asp Pro Arg Val Ser Ser Asn Phe Phe Lys Tyr Phe Ala Val Asn Phe Asp Asn Leu Gly Leu Lys Leu Ile Ala Ser Cys Tyr 70  
 AAT TCT GAT GAT CCT AGA GTA AGC AAT TTC TTT AAA TAT TTT GCA CTG AAT TTT GAT AAT CTT GGC TTC AAA AAG TTA ATA GCA TCT TCG TAT 1435

Val Glu Asn Lys Glu Gly Phe Ser Ser Ser Glu Ala Ala Lys Asn Gly Phe Tyr Tyr Glu Tyr His Lys Glu Asn Gly Lys Lys Leu Val Phe 100  
 GTA GAG AAT AAA CAA GGT TTT TCT AGT AGC GAA GCC GCG AAG AAC GGA TTT TAC TAT GAA TAT CAT AAA GAA AAT GCA AAG AAA TTA GTT TTT 1446

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 130  
 GAT GAT ATT AGT GTT TCT TCT TTC TGT GGC GAT GGC GAT TTT GCG AGT TCG CAG ACC ATT GAT CTG CTA AAA AAA TCA CAT ATT GTT GTT AGC 1521

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 170  
 AAT CCT CCA TTC TCG TTA TTT ACA GAG TAT CTT GAT CAA CTA ATT AAG TAT CAT AAG AAA TTC CTT ATA ATT GCT AAT GTT AAT TCA ATA ACA 1714

Tyr Lys Glu Val Phe Asn Leu Ile Lys Glu Asn Lys Ile Trp Leu Gly Val His Leu Glu Arg Gly Val Ser Gly Phe Ile Val Pro Glu His 200  
 TAT AAA GAG GTG TTT AAT CTA ATT AAG CAA AAT AAG ATT TGG CTT GCG GTT CAT CTC GCG AGA GGT GTT 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 230  
 TAT GAA TTA TAT GCT ACT GAG GCG AGA ATT GAT TCT AAT GGT AAT AGA ATT ATC TCG CCA AAC AAC TCG TTA TGG CTA ACT AAC CTA CAT GTC 1900

Phe Ile Asn 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 240  
 TTT ATT AGC CAT AAA GAC TTT CTT CTT ACA AGA AAA TAT TTT GGG AAT GAA ACT TCA TAT CCA AAA TAT GAT AAT TAT GAT GCT ATA AAT GTA 1893

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 280  
 AAC AAA ACA AAG GAT ATT CCA TTA CAT TAC AAT GGG GTT ATG GCG GTT CCT ATC ACA TTC TTC CAT AAG TTT AAC CCT GAG CAA TTT GAG TTA 2066

Ile Lys Phe Arg Lys Gly Val Asp Glu Lys Asp Leu Ser Ile Asn Gly Lys Lys Pro Tyr Phe Arg Ile Leu Ile Lys Asn Lys Arg Leu Gln 310  
 ATA AAA TTT ACA AAG GCT GTT GAT GAA AAA GAT TTC TCT ATA AAT GGT AAA TCC CCT TAT TTC AGA ATT TTC ATA AAA AAC AAA CCA TTA CAA 2174

Lys 2200  
 AAG TAATTGATCTTTCTTATTTTCTTCAGATGATTAGCTTCGTGTAAATTT

Fig. 4. Nucleotide and amino acid sequences of the EcoRI endonuclease and methylase.

-----  
 primer for mutagenesis  
 -----  
 primer for sequencing

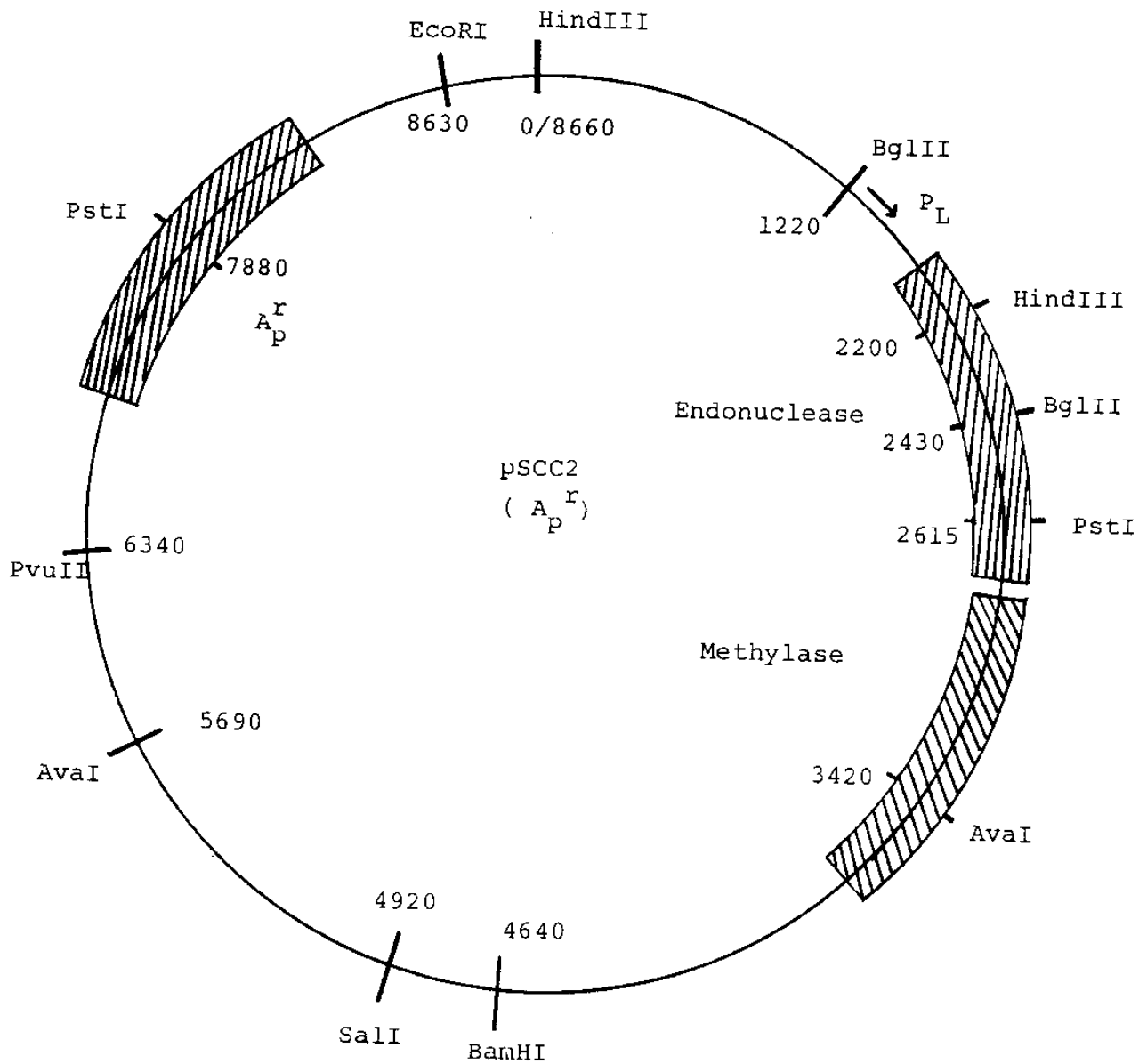


Fig. 5. Restriction and genomic map of pSCC2 plasmid.

Alkaline Phosphatase로 65 °C에서 60분간 반응시켜 벡터 절편 을 제조 하였다. pSCC2 plasmid를 한 군데서 그리고 두 군데서 각각 자르는 BamHI 과 BglII를 동시 처리하여 3개의 절편 (5240-bp, 2210-bp, 1210-bp) 을 얻고 이 중 우리가 원하는 5240-bp 절편을 1% agarose gel상에서 elution하였다. Heteroduplex 형성은 dephosphorylation과 annealing 과정을 밟아 수행 하였다 (Fig. 6). 우선 pSCC2를 SalI 제한 효소로 자른 벡터 절편과 BglII와 BamHI으로 자른 5240-bp 벡터 절편들을 BAP 처리 하였다. 또 mutagenic oligonucleotide의 5'끝에 T4 DNA kinase, ATP, 그리고 magnesium 이온 존재하에 인산기를 붙였다. 얻어진 벡터 절편들과 denature된 mutagenic oligonucleotide를 섞어서 서서히 annealing 하였다. 이때 반응 전과 비교하여 반응 후에 SalI 제한 효소로 자른 벡터 절편과 BglII-BamHI 제한 효소로 자른 후 elution 한 5240-bp 이외의 다른 band들이 보이므로 얻고자 하는 heteroduplex가 형성되었음을 확인 하였다(Fig. 7).

위에서 얻은 heteroduplex가 포함된 반응물 중 벡터 절편에서 single-strand로 노출 된 곳을 double-strand로 만들기 위하여 dNTP와 Klenow Fragment 존재 하에 fill in 시키고 T4 ligase와 magnesium 존재 하에 nick 부위를 연결 시켰다. E.coli JM109 에로의 형질 전환은 Hanahan 방법으로 하여 수백개의 콜로니들을 얻었다. 변이체의 선별은 31-mer mutagenic oligonucleotide를 이용 하여 실험 재료및 방법에서와 같은 방법으로 colony hybridization을 하였다. 이때 mismatch에 의하여 melting temperature가 내려가는 점을 이용하여 온도를 변화시켜 가면서 washing을 하였고 온도가 올라감에따라 probe-oligo가 떨어져 나가는 콜로니들(Fig. 8)을 선별하여 DNA sequencing을 하였으나 모두 다

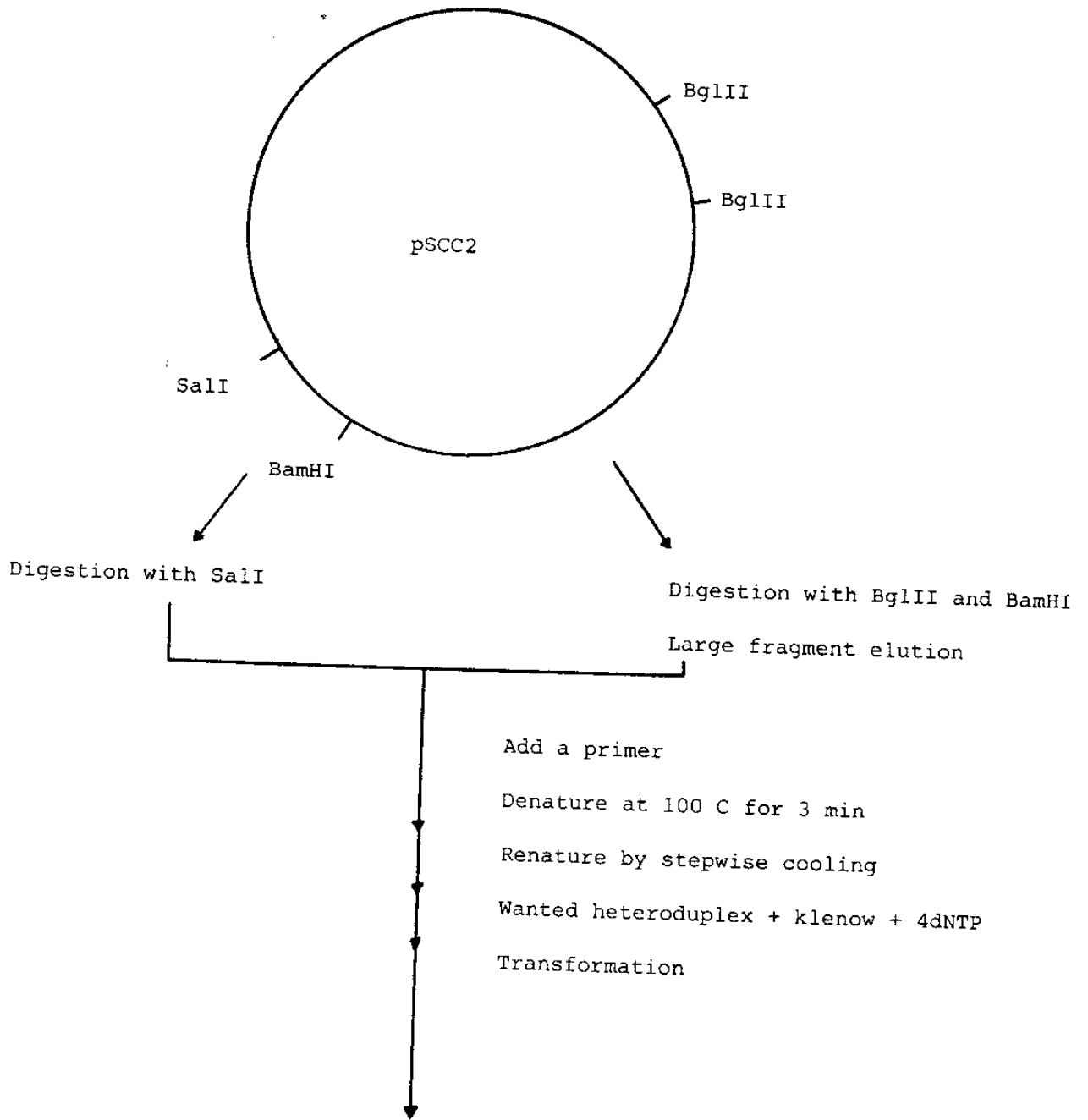
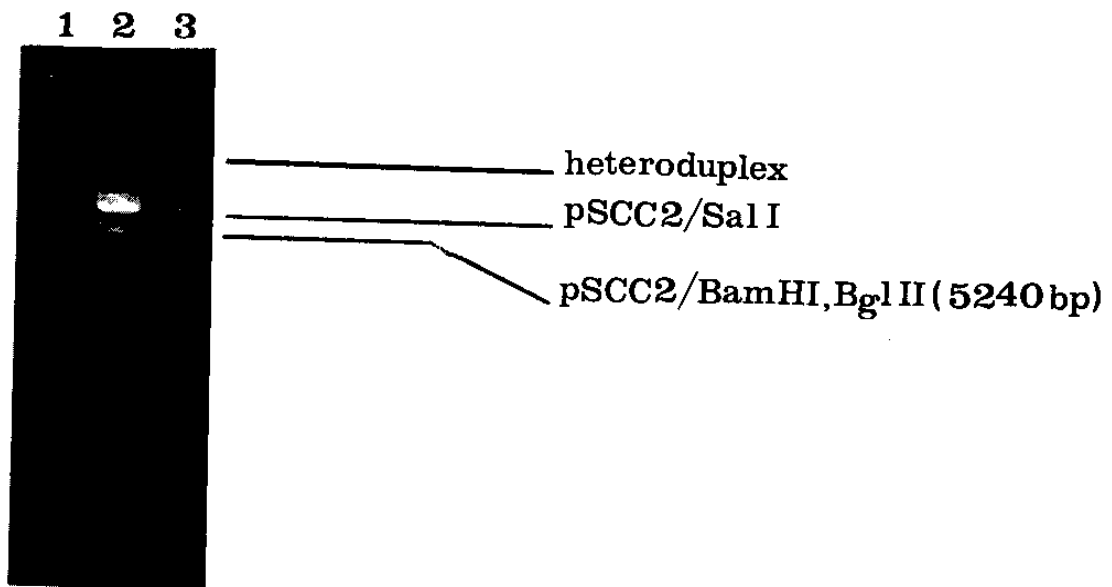
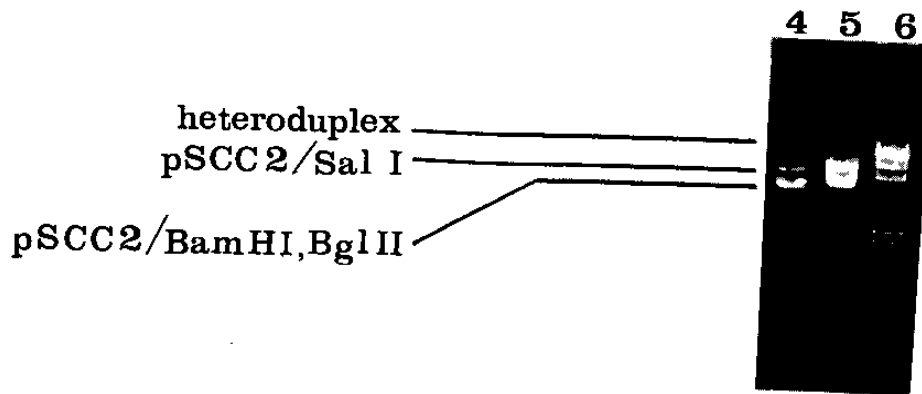


Fig. 6. Strategy for heteroduplex formation.



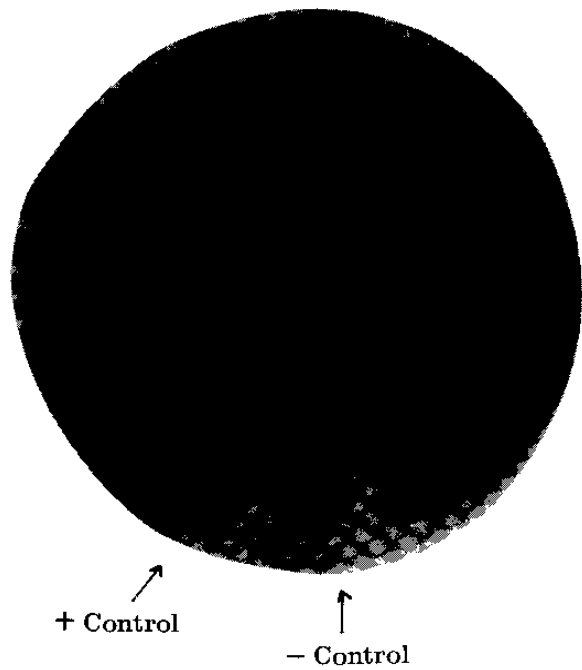
I



II

Fig. 7. Agarose gel analysis of heteroduplex DNA.  
 lane 1; 1-kb ladder  
 lanes 2 and 5; mixture of 2 fragments and oligomer before heteroduplex formation  
 lanes 3 and 4; mixture of 2 fragments and oligomer after heteroduplex formation  
 lane 6; HindIII molecular size marker

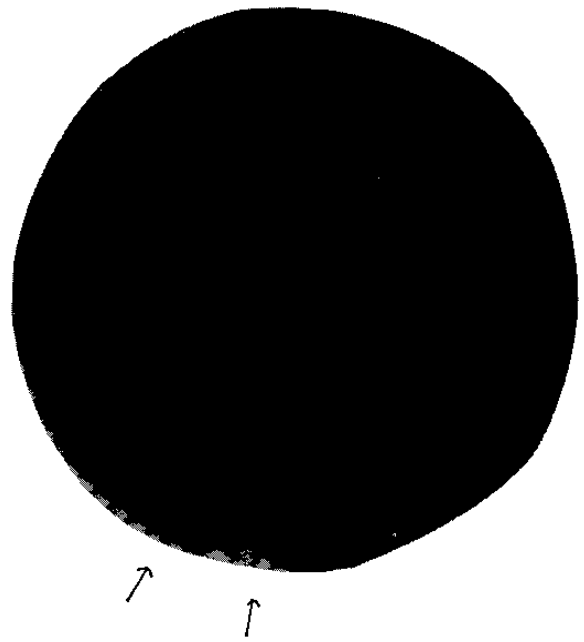




+ Control

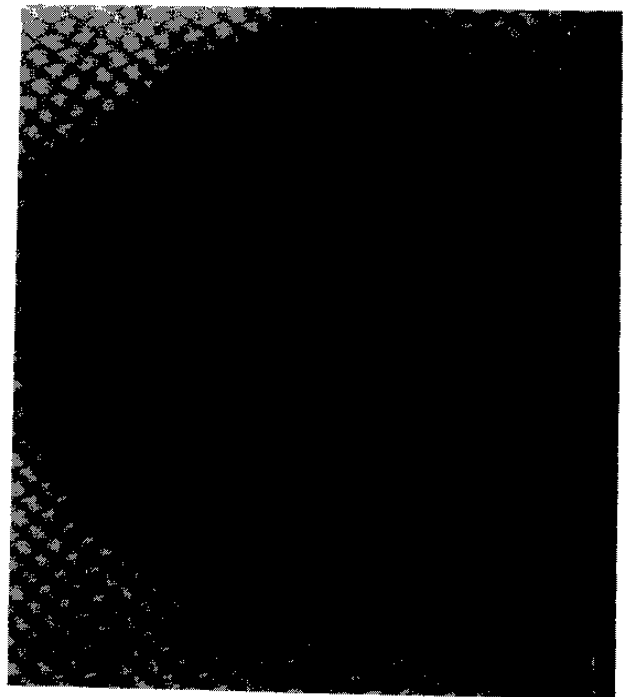
- Control

25 C Washing



43C Washing

I



II

Fig. 8. Colony hybridization.

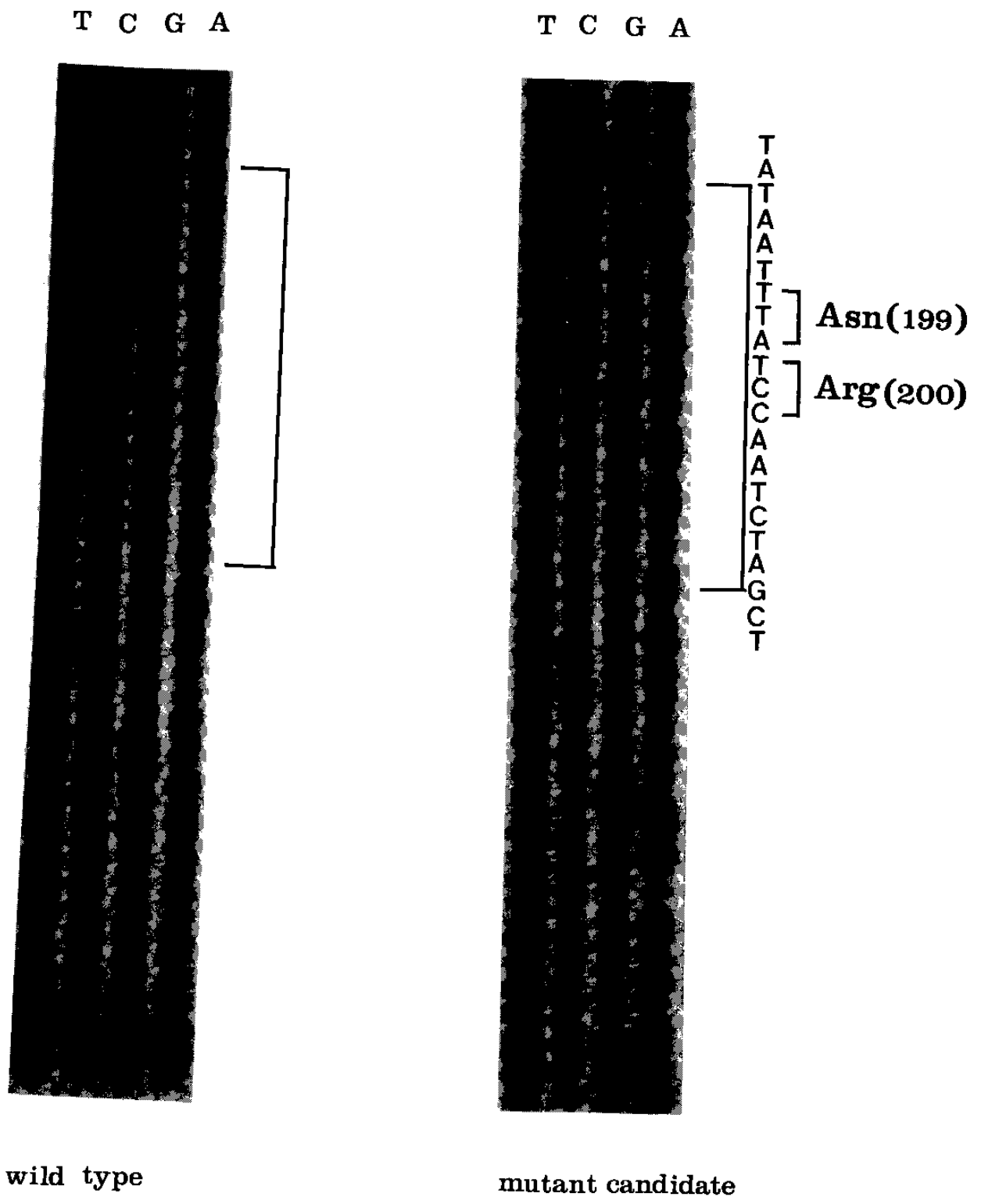


Fig. 9. Nucleotide sequencing comparison between wild-type and mutant candidate.

wild-type sequence와 차이가 없었다 (Fig. 9). 이러한 예상 외의 결과에 대한 원인으로 생각되는 것은, 가능성은 극히 적으나, 합성한 mutagenic oligonucleotide가 예상외의 위치에 hybridize하여 기대하지 않았던 다른 곳에 돌연변이를 시켜 Asn-199 위치에서 150 nucleotide upstream region에 위치한 sequencing primer 로는 인지가 되지 않았을 가능성이 있다고 볼 수 있겠다. 따라서 이런 제반 문제를 극복하기 위하여 유전자 조립에 의한 mutagenesis를 하게 되었다.

## 제 2 절 유전자 조립에 의한 변이

### 1. 유전자 조립

제한 효소 EcoRI에 있어 치환 하고자 하는 이미노산의 위치가 Asn-199이므로 여기를 중심으로 좌우로 적절한 제한 효소 위치를 선정하여 이 부위의 유전자를 화학적으로 합성 하였는데, 그 이유는 나중에 조립된 유전자를 카세트화 하여 pSCC2내에 있는 wild type 유전자와 쉽게 대체 시키기 위한 것이다. 여기서는 BglIII와 PstI 효소에 의해 생기는 약 180-bp (185/177)의 유전자 절편을 선정 하였고 가능 하면 codon redundancy를 이용하여 아미노산 서열은 바꾸지 않는 범위에서 염기 서열만 바꿔 새로운 제한 효소 인식 부위를 만들었는데 (Fig. 10) 이는 나중에 EcoRI 효소 중 Asn-199 위치가 아닌 다른 곳의 변이를 수월하게 해 주기 위한 것이다.

본 실험에서는 각 올리고뉴클레오타이드의 길이가 29-40

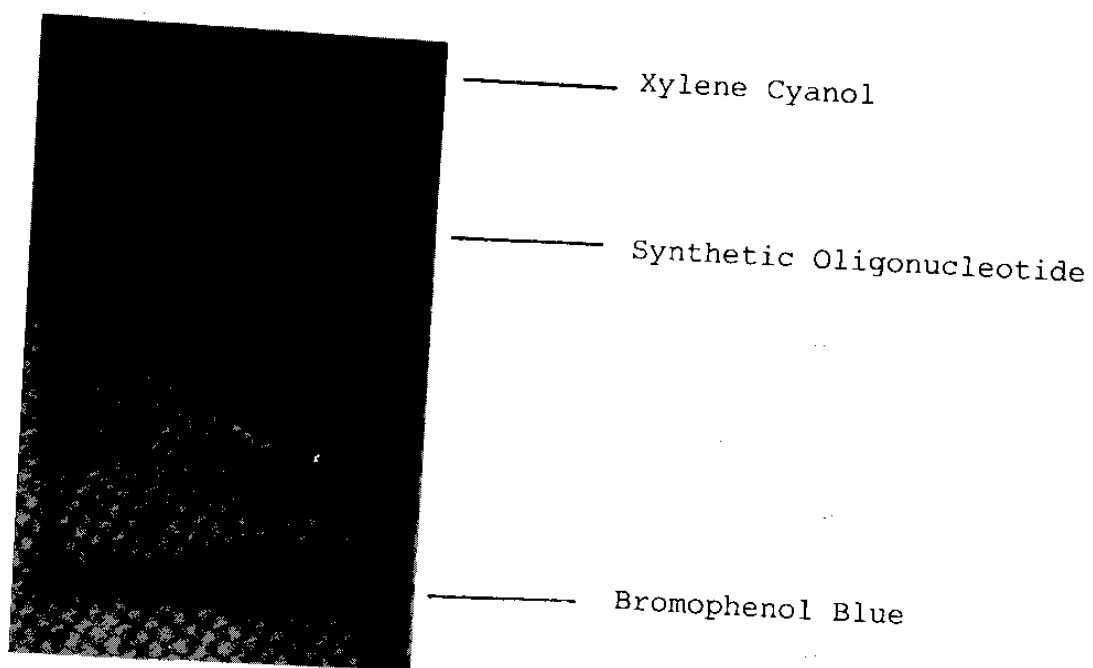
EcoRI  
Site-Specific Mutagenesis

Arg	Ser	His	Lys	Asn	Ile	Ser	Glu	Ile	Ala
<u>GA</u>	<u>ICT</u>	<u>CAT</u>	<u>AAG</u>	<u>AAT</u>	<u>ATA</u> <sup>Em1(35)</sup>	<u>TCA</u>	<u>GAG</u>	<u>ATA</u>	<u>GCG</u>
BglII		<u>GTA</u>	<u>TTC</u>	<u>TTA</u>	<u>TAT</u> <sup>Em2(40)</sup>	<u>AGT</u>	<u>CTC</u>	<u>TAT</u>	<u>CGC</u>
Asn	Phe	Met	Leu	Ser	Glu	Ser	His	Phe	Pro
<u>AAT</u>	<u>TTT</u>	<u>ATG</u>	<u>CTC</u>	<u>TCT</u>	<u>GAG</u>	<u>AGC</u>	<u>CAC</u> <sup>Em3(36)</sup>	<u>TTT</u>	<u>CCT</u>
<u>TTA</u>	<u>AAA</u>	<u>TAC</u>	<u>GAG</u>	<u>AGA</u>	<u>CTC</u>	<u>TCG</u>	<u>GTG</u> <sup>Em4(36)</sup>	<u>AAA</u>	<u>GGA</u>
Tyr	Val	Leu	Phe	Leu	Glu	Gly	Ser	Asn	Phe
<u>TAC</u>	<u>GIA</u> <sup>C</sup>	<u>CTT</u>	<u>TTC</u>	<u>TTA</u>	<u>GAG</u>	<u>GGT</u> <sup>G</sup>	<u>TCT</u>	<u>AAC</u>	<u>TTT</u>
SnaBI	<u>CAT</u>	<u>GAA</u>	<u>AAG</u>	<u>AAT</u>	<u>CTC</u>	<u>CCA</u>	<u>AGA</u>	<u>TTG</u>	<u>AAA</u>
Leu	Thr	Glu	Asn	Ile	Ser	Ile	Thr	Arg	Pro
<u>TTA</u>	<u>ACA</u>	<u>GAA</u>	<u>AAT</u> <sup>Em5(38)</sup>	<u>ATC</u>	<u>TCA</u>	<u>ATA</u>	<u>ACA</u>	<u>AGG</u> <sup>A</sup>	<u>CCT</u> <sup>A</sup>
<u>AAT</u>	<u>TGT</u>	<u>CTT</u>	<u>TTA</u> <sup>Em6(38)</sup>	<u>TAG</u>	<u>AGT</u>	<u>TAT</u>	<u>TGT</u>	<u>TCC</u> <sup>StuI</sup>	<u>GGA</u>
Asp	Gly	Arg	Val	Val	Asn	Leu	Glu	Tyr	Asn
<u>GAT</u>	<u>GGA</u>	<u>AGG</u> <sup>Em7(37)</sup>	<u>GTT</u>	<u>GTT</u>	<u>AAT</u>	<u>CTC</u> <sup>T</sup>	<u>GAG</u>	<u>TAT</u>	<u>AAT</u>
<u>CTA</u>	<u>CCT</u>	<u>TCC</u>	<u>CAA</u>	<u>CAA</u>	<u>TTA</u>	<u>GAG</u>	<u>CTC</u>	<u>ATA</u>	<u>TTA</u>
		Em8(34)				XhoI			
Ser	Gly	Ile	Leu	xxx	Arg	Leu	Asp	Arg	Leu
<u>TCC</u> <sup>T</sup>	<u>GGA</u> <sup>T</sup>	<u>ATA</u>	<u>TTA</u>	<u>NNN</u> <sup>Em9(39)</sup>	<u>CGT</u> <sup>A</sup>	<u>CTA</u> <sup>G</sup>	<u>GAT</u>	<u>CGA</u>	<u>CTA</u>
BspMII	<u>AGG</u> <sup>CCT</sup>	<u>TAT</u>	<u>AAT</u>	<u>OOO</u> <sup>Em10(29)</sup>	<u>GCA</u>	<u>GAT</u> <sup>XbaI</sup>	<u>CTA</u>	<u>GCT</u>	<u>GAT</u>
Thr	Ala								
<u>ACT</u>	<u>GCA</u>								
PstI	<u>TG</u>								

Fig. 10. Gene design for part of EcoRI restriction endonuclease. Several restriction endonuclease recognition sites are generated, where the original nucleotide sequences are also marked with small letter above the mutable cassette sequences.

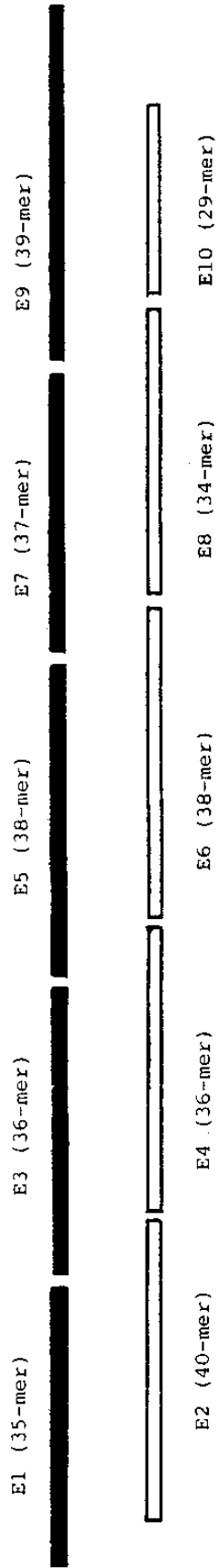
뉴클레오타이드 정도 되게 총 10개의 올리고뉴클레오타이드를 고상에서 triester 방법으로 합성 하였고 실험 방법에서와 같이 정제 (Fig. 11)하여 ligation 하였다. 이때 block과 shot-gun ligation (Fig. 12)을 동시에 병행 하였고 Fig. 13 에서 보여 주듯이 185과 177 뉴클레오타이드 band를 확인 하였고 최종 ligation 수율은 10% 이었다.

플라스미드 pSCC2에는 두개의 PstI과 두개의 BglII 인식 부위가 있으므로 위에서 조립된 BglII-PstI 유전자 절편을 직접 대체 하기가 어려우므로, 각 제한 효소 인식 부위가 한 군데씩만 있도록 하여 위의 mutagenic 유전자를 쉽게 넣고 빼고 할 수 있게 함과 동시에 EcoRI 제한 효소와 EcoRI methylase 유전자를 완전한 상태로 갖고 있는 새로운 벡터를 고안 하였다 (Fig. 14). 이를 위하여 우선 pSCC2를 BamHI으로 완전히 자르고 다시 BglII로 부분 절단 하면 EcoRI 제한 효소와 EcoRI methylase 그리고 pL promoter를 모두 함유 하고 있는 3420bp 짜리 절편을 얻을 수 있다. 이것을 gel 에서 추출하여 분자의 끝을 blunt end로 만든 후 HindIII와 BamHI으로 자르고 끝을 blunt end로 만든 pUC9 벡터에 삽입 한다. 이렇게 하여 새로이 만들어진 벡터 (Fig. 14)는 pUC9에 존재하던 PstI 위치는 없어지고 EcoRI 제한 효소에만 한 개의 인식 부위를 갖고 또 BglII는 pUC9에는 없으므로 EcoRI 유전자 부위에서만 한 군데 인식하게 되는데 현재 이 벡터의 조립 과정 중에 있으며, 이 새로운 벡터만 얻으면 위에서 조립 한 180-bp 짜리 BglII-PstI 유전자 절편을 대체 하여 199 번째 아미노산이 원래와 다른 아미노산으로 대체된 변이체를 얻을 수 있을 것으로 본다.



12% denaturing Polyacrylamide Gel

Fig. 11. UV shadow photograph of 12% denaturing polyacrylamide gel after electrophoresis for purification of one of the oligonucleotides (E-10).



- S: E1+E2+E3+E4+E5+E6+E7+E8+E9+E10
- A: E1+E2+E3+E4
- B: E5+E6+E7+E8+E9+E10
- C: E1+E2+E3+E4+E5+E6
- D: E7+E8+E9+E10

Fig. 12. Strategy for gene construction. Oligonucleotides involved in shot-gun ligation (S), block ligation I (A and B), and II (C and D) are shown.

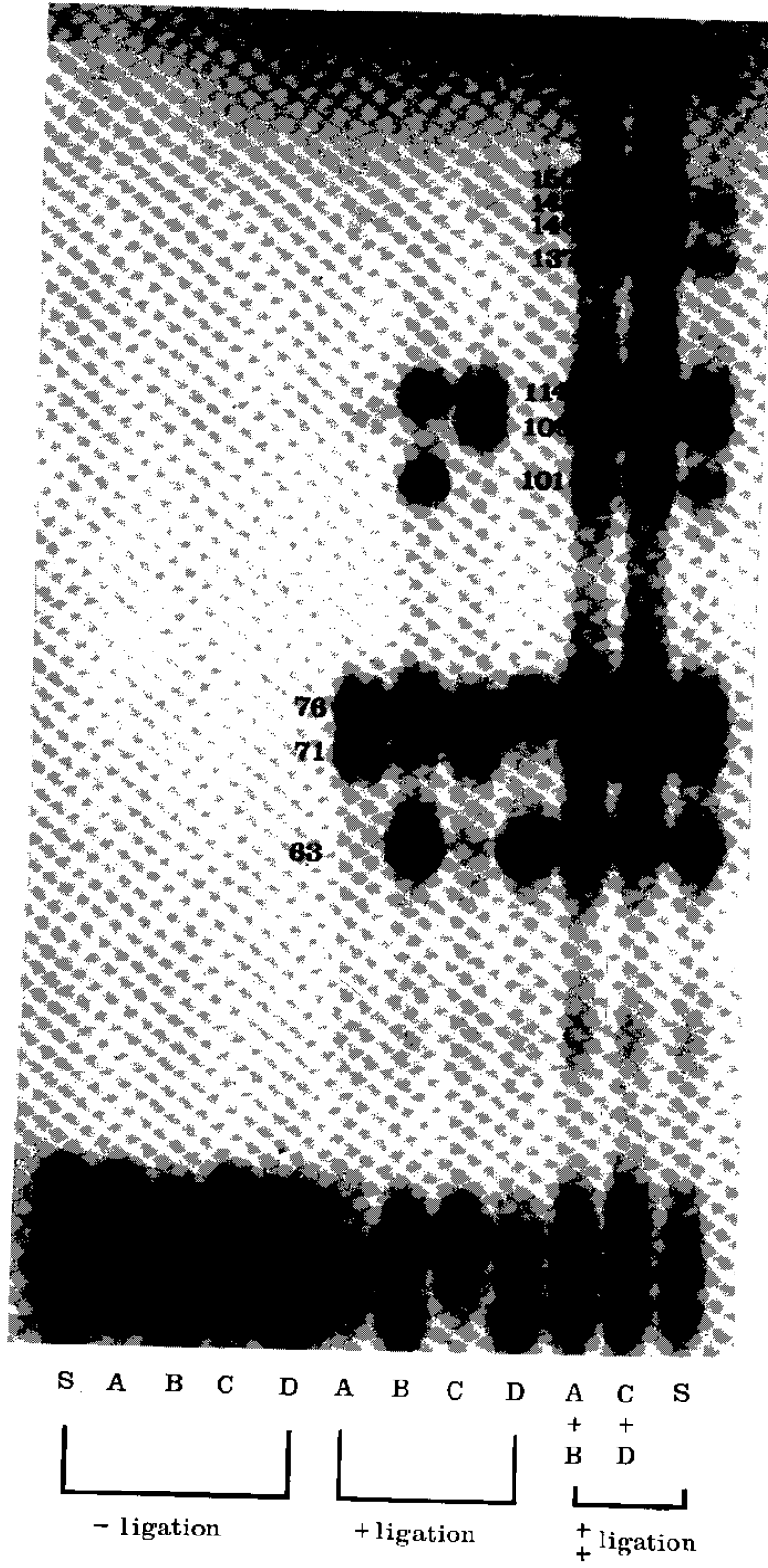


Fig. 13. Autoradiograph of gene construction.



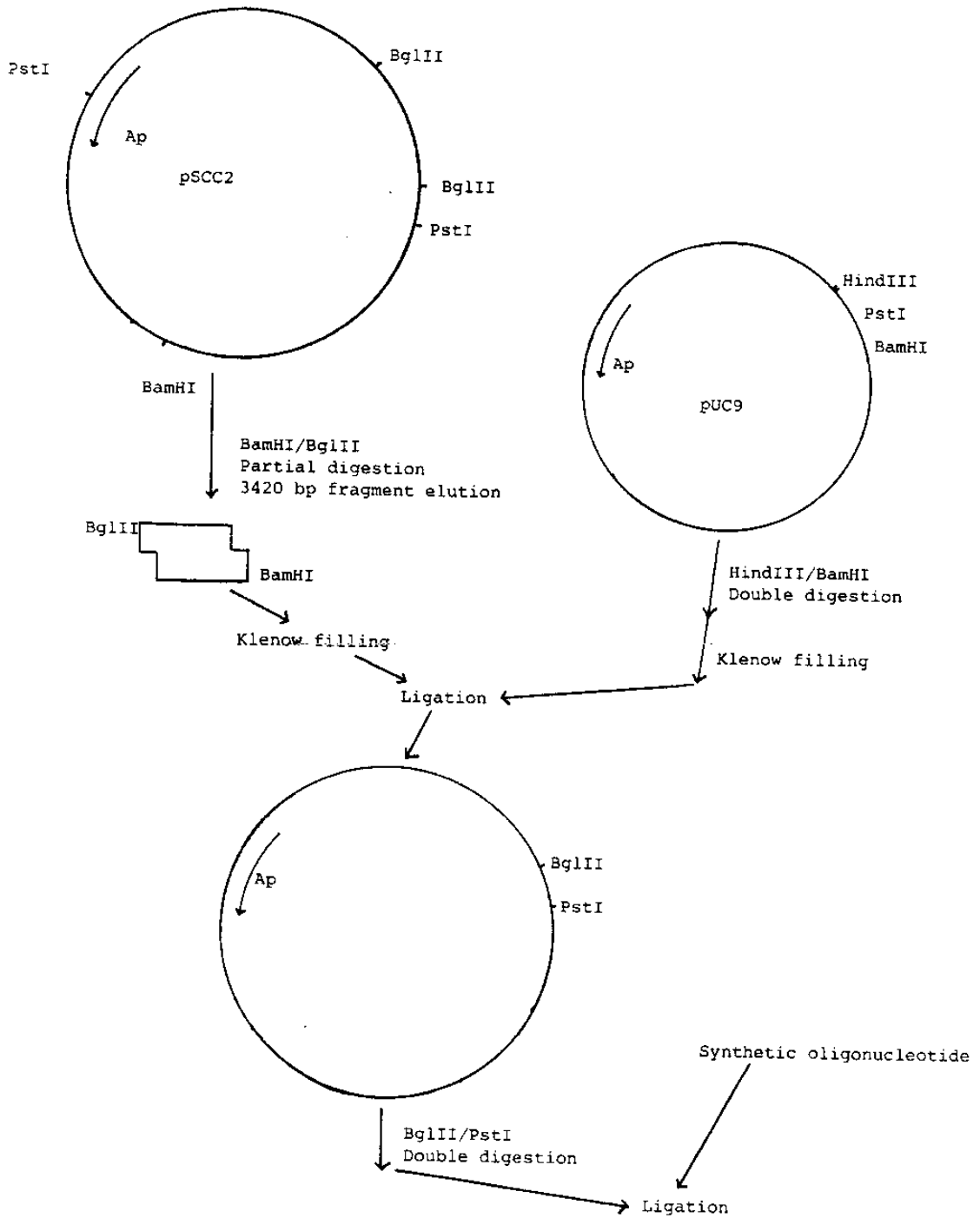


Fig. 14. Scheme for vector construction.

### 제 3 절 EcoRI 제한 효소의 정제

EcoRI 정제는 주로 streptomycin sulfate 처리, ammonium sulfate back extraction, DNA-cellulose chromatography 및 linear gradient를 이용한 chromatography 등의 방법이 주로 이용되어 왔으나, 본 연구에서는 streptomycin sulfate 처리 과정을 생략 하는 등 그 방법을 단순화 시켰다. 즉 ammonium sulfate 처리를 거쳐 얻어진 용액을 먼저 phosphocellulose column을 통과 시켰으며, linear gradient 대신 step gradient 유출 방법을 이용 하였다. 그 결과 (Fig. 15) 얻어지는 EcoRI 활성을 갖는 분획을 모아서 hydroxylapatite column을 통과 시킴으로서 EcoRI 효소를 분리 하였다 (Fig. 16). 정제된 EcoRI의 순수도는 전기 영동에 의하여 분석 하였으며 (Fig. 17), 11% SDS-PAGE 결과 단일 band로 나타나는 것으로 보아 순수 분리 되었음을 알 수 있었다. 표1에 E.coli 14 g으로 부터의 정제 과정을 요약 하였다. 정제된 EcoRI은 1.73 mg이었으며, specific activity는 람다 DNA에 대해서는  $2.5 \times 10^6$  units/mg 단백질, pUC9 DNA에 대해서는  $9.09 \times 10^5$  units/mg 단백질로서 이미 보고된 활성도 ( $4.35 \times 10^5$  units/mg 단백질)에 비해 월등히 높은 활성도를 나타내었다 (Fig. 18, 19, 20).

Table 1. Purification of EcoRI Endonuclease<sup>a</sup>

Step	Volume (ml)	Protein (mg/ml)	Total Protein (mg)	Specific Activity (units/mg)	Total Activity (units)
Total cell extract	84	23,959	2,012.6		
10,000xg supernatant	77	15,762	1,213.7		
Ammonium sulfate fraction	16.5	39,260	647.8		
Phosphocellulose column	42	0.364	15.288		
Hydroxylapatite column	7.5	0.230	1.73	<sup>b</sup> $\geq 2.5 \times 10^6$ <sup>c</sup> $\geq 9.1 \times 10^5$	$\geq 4.325 \times 10^6$ $\geq 1.573 \times 10^6$

<sup>a</sup> from 14 g of cells

<sup>b</sup> full digestion of 1.0  $\mu$ g (1 unit) of lambda DNA for 1 hr. at 37 °C in 50  $\mu$ l of medium buffer containing 0.2 mg/ml BSA and 0.2% glycerol

<sup>c</sup> same as b. except for using pUC9 DNA

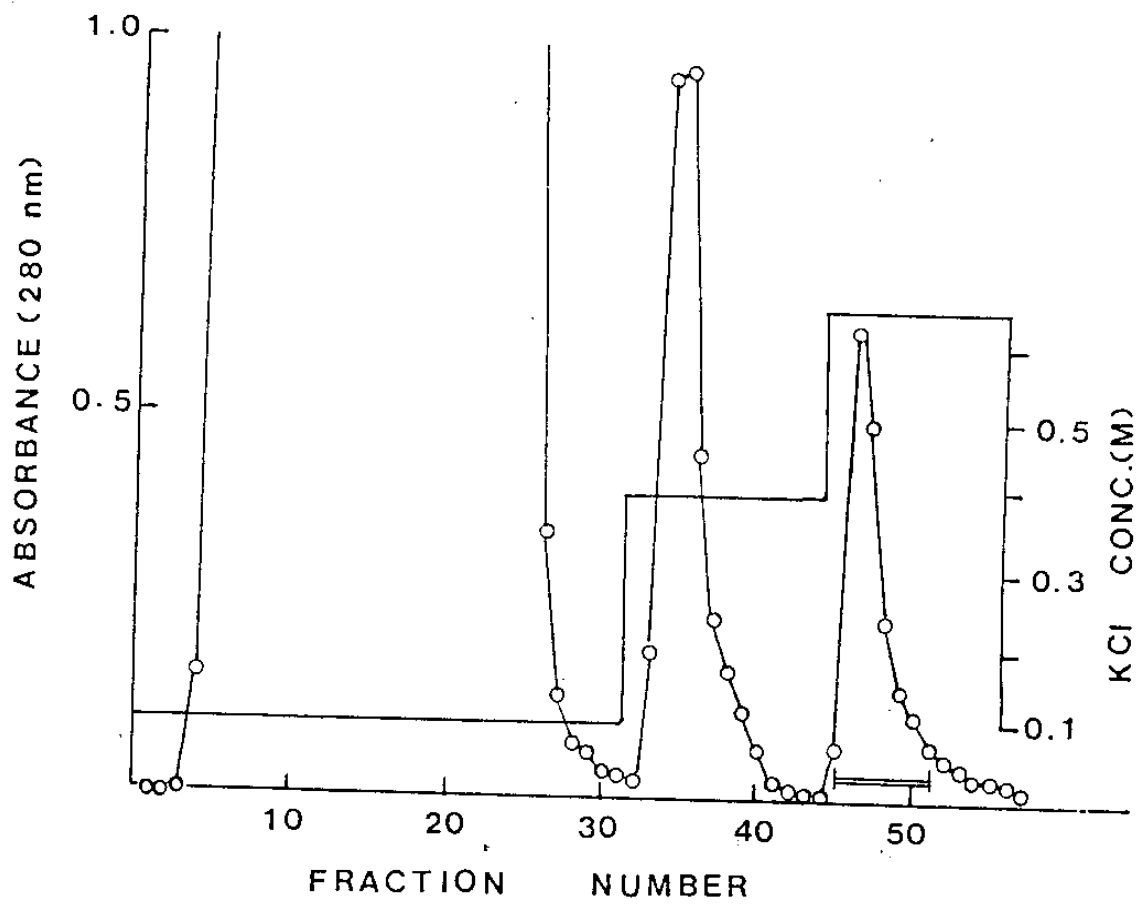


Fig. 15. Elution profile of phosphocellulose column chromatography. Pooled fractions are indicated as

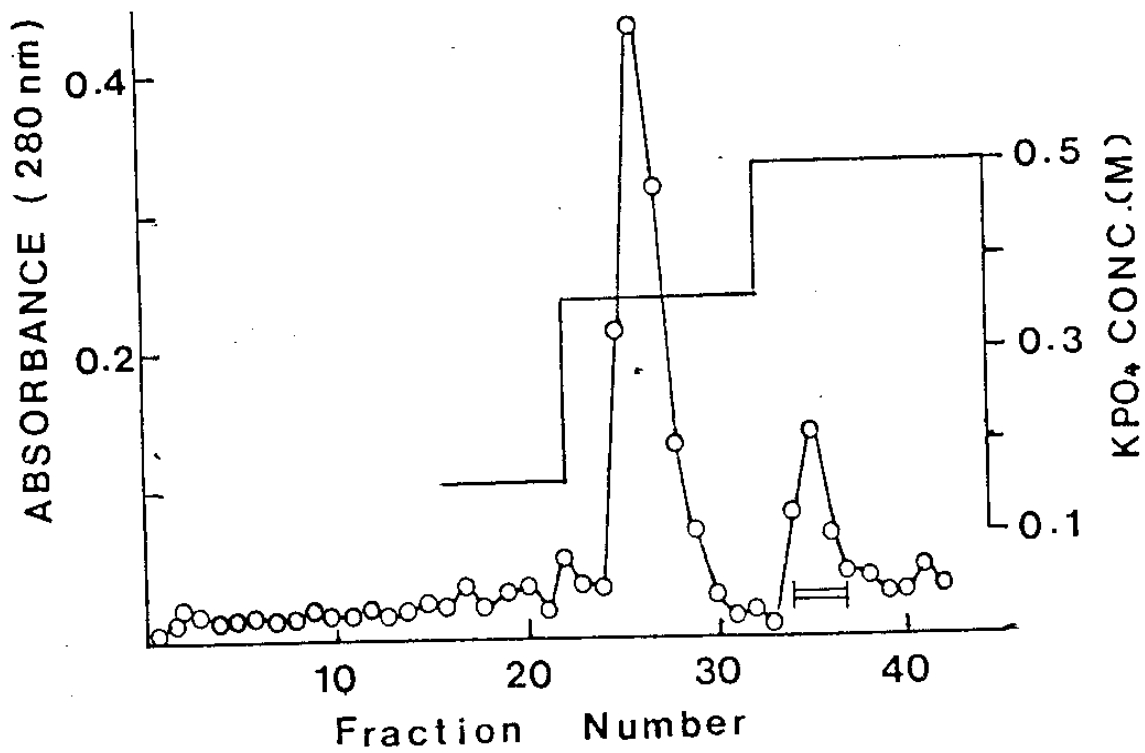


Fig. 16. Elution profile of hydroxylapatite column chromatography of pooled fractions obtained from phosphocellulose column. Fractions of EcoRI activity are indicated as

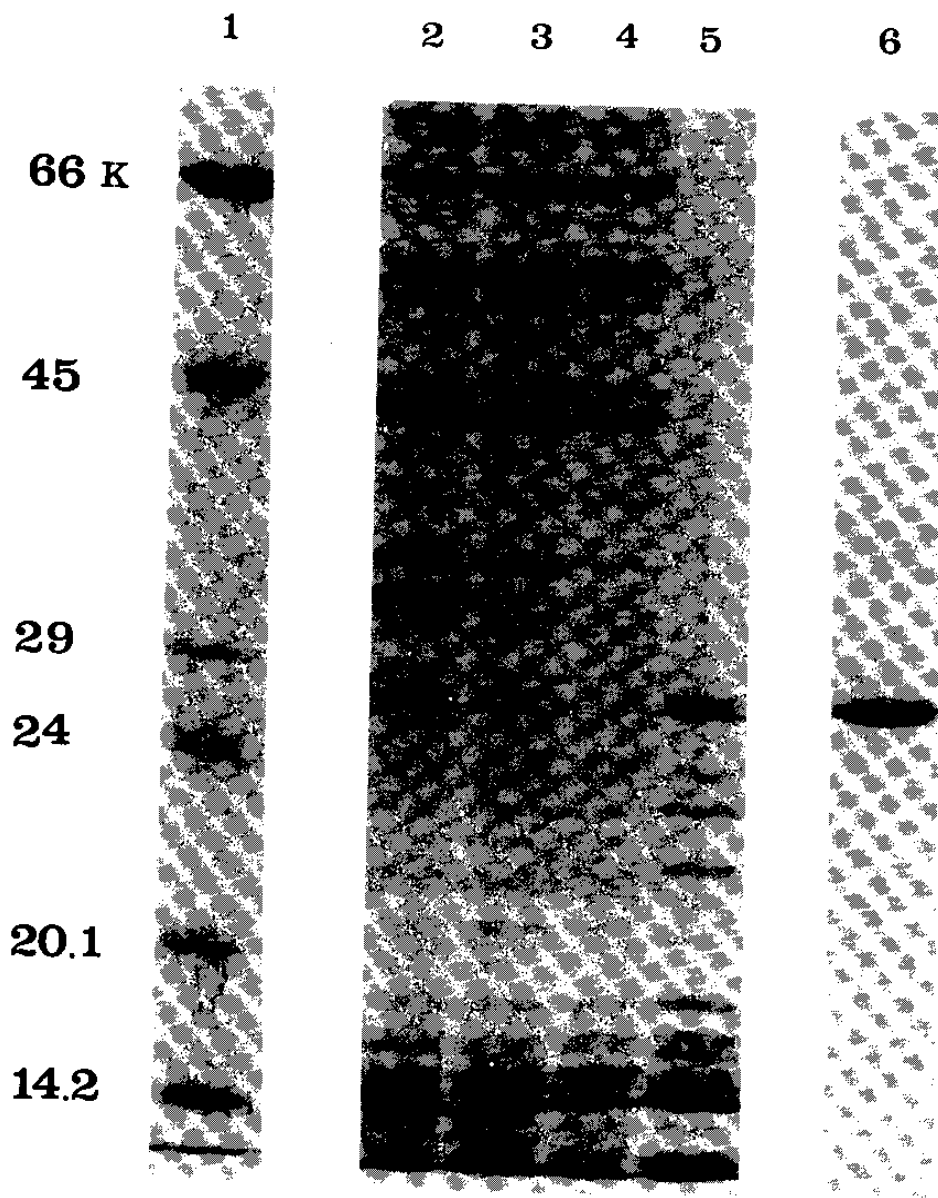


Fig. 17. Electrophoretic analysis (11% SDS-PAGE) of EcoRI during and after purification. Lane 1, MW standards; lane 2, total cell extract; lane 3, 10,000xg supernatant; lane 4, ammonium sulfate fractionate; lane 5, phosphocellulose column eluate; lane 6, purified EcoRI after hydroxylapatite column.

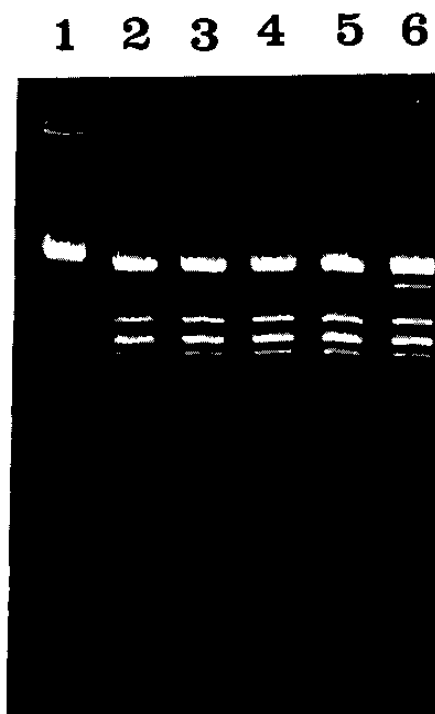


Fig. 18. Estimation of specific activity of purified EcoRI against lamda DNA. Lane 1, undigested DNA; lane 2 through 6; 1 µg of DNA digested with 2.0, 1.0, 0.67, 0.4 and 0.29 ng of purified EcoRI.

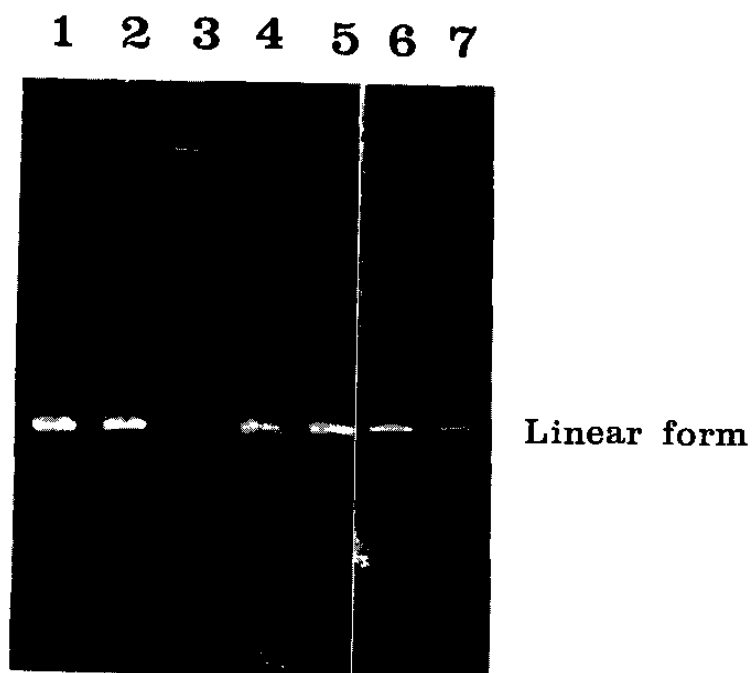


Fig. 19. Estimation of specific activity of purified EcoRI against pUC DNA. Lanes 1 and 2, 1  $\mu$ g of pUC9 DNA digested with 5.0 and 2.5 ng of EcoRI; lane 3, undigested pUC9 DNA; lane 4 through 7, 1  $\mu$ g pUC9 DNA digested with 1.6, 1, 0.83, and 0.73 ng of EcoRI.



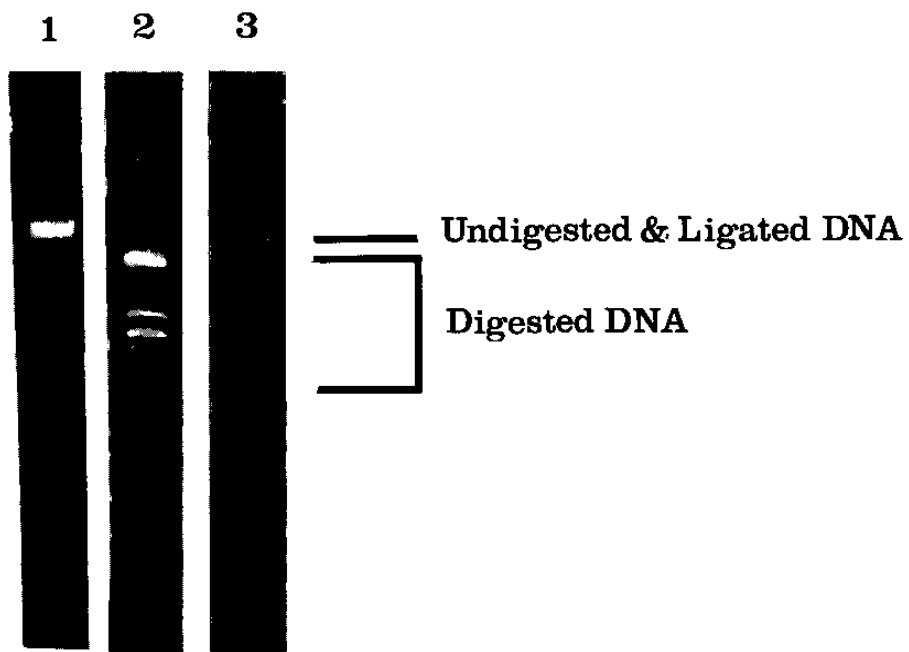


Fig. 20. Ligation of over-digested DNA. Lane 1, DNA standard; lane 2, over-digested DNA; lane 3, ligated DNA.

## 제 4 장 결론

본 보고서에서는 E.coli로 부터 EcoRI 제한 효소의 정제와 올리고뉴클레오타이드를 이용한 site-directed mutagenesis, 그리고 유전자 조립에 의한 변이에 관한 연구 결과에 대하여 기술 하였다.

EcoRI 제한 효소는 14 g의 E.coli로 부터 phosphocellulose, hydroxylapatite column을 이용하여 최종  $1.5-4 \times 10^6$  units을 얻었고, 올리고뉴클레오타이드를 이용한 변이 실험에서는 변이 효소를 얻을 수가 없었다. 그러나 유전자 조립에 의하여 약 180-bp 되는 복합 변이 유전자 절편들을 얻었고 현재 새로운 벡터에 넣어 변이 EcoRI을 얻는 연구를 수행 중에 있다.

본 연구를 통하여 EcoRI의 정제 기술과 변이 효소의 정제를 위한 기본 기술을 확립 하였고, 아미노산이나 뉴클레오타이드의 서열이 이미 알려져 있는 경우 유전자의 합성에 의하여 임의로 원하는 위치에 제한 효소 인식 부위를 첨가 한다거나 codon usage에 따라 아미노산의 코오돈을 바꾼다거나, 유전자의 발현에 의한 단백질의 분리 정제를 용이하게 하기 위해 유전자 합성 과정에서 임의로 유전자를 조작 및 조립 할 수 있는 단백질 공학 분야의 주요 기술을 정착시켜 그 의의가 매우 크다고 할 수 있다.

그러나 분자 생물학의 근본 질문인 protein-DNA interaction등에 대한 이해는 여러 종류의 변이 효소를 얻은 후에야 부분적으로나마 설명이 가능 하리라고 본다.

## 제 5 장 참고문헌

1. J.A.McClarin, C.A.Frederic et al., Science 234, 1526 (1986).
2. W.F. Anderson, D.H.Ohlendorf, Y.Takeya, B.W.Mattews, Nature 290, 754 (1981).
3. W.F.Anderson, Y.Takeya, et al., J. Mol. Biol. 159, 745 (1982).
4. C.O.Pabo, M.Lewis, Nature 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, 285 (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.Jeffery, R.T.Sauer, Nature 298, 441

(1982).

17. J.L.Eliason, M.A.Weiss, M.Ptashne, Proc. Natl. Acad. Sci.USA 82, 2339 (1985).
18. F.H.C.Crick, A.Klug, Nature 255, 530 (1975).
19. J.C.Wang, J.Mol.Biol. 43, 25 (1969).
20. J.L.Woodhead, N.Bhave, A.D.Malcome, Eur.J.Biochem.115, 293 (1981).
21. S.Inouye, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 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).

35. E.Y.Chen, P.H.Seeburg, in New England Biolabs Manual, 20 (1983).
36. 이대실, 김명희, 임향숙, 박병철, 서경숙, 인슈린 제조 기술 개발 (I), BS N7004-25-1 (1987).

## 주 의

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