

Taq polymerase 제조와 그 응용에 관한 연구

A Study on Taq polymerase and its Application

1991. 2

한국과학기술연구원
부설 유전공학연구소

배 포 선

사 본 번 호	부 수	배 포 처
1/15 ~ 2/15	2	유전공학연구소 연구관리과 영구보존용
3 ~ 15	1	유전공학연구소 연구관리과 참고용
4/15 ~ 13/15	10	유전공학연구소 연구관리과 보관용
14/15 ~ 15/15	2	유전공학연구소 분자생물학연구실

제 출 문

한 국 과 학 기 술 연 구 원

부설 유전공학연구소 소장 귀하

본 보고서를 "Taq polymerase 제조와 그 응용에 관한 연구" 과제의 최종
보고서로 제출합니다.

1991 년 2 월

연구책임자 : 이대실 (분자생물학실 책임연구원)

연 구 원 : 권석태 (분자생물학실 선임연구원)

박종훈 (소재개발실 연구원)

고석훈 (분자생물학실 연구원)

김중수 (분자생물학실 연구원)

요 약 문

1. 제 목

Taq polymerase 제조와 그 응용에 관한 연구

2. 연구개발의 목적 및 중요성

1957년 Arther Kornberg에 의해 *E. coli*에서 DNA polymerase I (Pol)을 처음으로 발견한 뒤, 많은 DNA polymerase가 발견되어 분자생물학 연구에 사용되어 왔다. 그러나, 이 효소들은 $3' \rightarrow 5'$, $5' \rightarrow 3'$ exonuclease activity를 갖고 있고, 열에 불안정하여 사용에 제한점이 있다. 최근에 발견된 Taq (*Thermus aquaticus* YT-1) polymerase는 이러한 단점들을 보완할 수 있어, 유전자 증폭을 위한 PCR(polymerase chain reaction)기술, 유전병 진단 연구, 유전자 구조 해석에 필수 불가결한 효소로 등장하였다. 그러나, 미국 Cetus 회사의 독점으로 국내에서는 전량 수입에 의존하고 있는 실정이다. 본 연구에서는 호열성균, *Thermus aquaticus* YT-1의 염색체 DNA로부터 Taq polymerase(Taq Pol) 유전자를 대장균에 cloning하여, 발현시킨 후, 대량 생산하여, 유전공학 관련 연구의 활성화를 도모하고자 한다.

3. 연구개발의 내용 및 범위

1990년도 기본연구 과제에서는 균주를 분양받아서 Taq polymerase를 정제하여 기존 Taq polymerase와 비교 검토하였다. 1991년도 기본 연구 과제에서는 대량생산을 위한 다음과 같은 연구를 수행하였다.

가) 균체 배양 및 염색체 DNA 분리

Thermus aquaticus YT-1 균주를 70°C, 24시간 진탕 배양하여, 균체를 회수한 후, 염색체 DNA를 분리하였다.

나) Taq polymerase(Taq Pol) 유전자의 선별 및 대장균에 cloning

기존에 밝혀진 Taq polymerase의 DNA 서열을 바탕으로 27-35 mer 정도의 상보적인 oligo DNA 6개를 합성하였다. 이 oligo DNA를 primer로 이용하여 PCR 방법으로 Taq polymerase 유전자의 5' 영역의 전반부 및 중간부분을 증폭하여 대장균에 각각 cloning하였다. 또 Taq polymerase 유전자의 3' 영역의 후반부는 위의 oligo DNA를 probe로 이용하여 hybridization 방법으로 선별하여 대장균에 cloning하였다.

다) Taq polymerase 유전자의 대장균에서의 대량 발현

대장균에 각각 cloning된 Taq polymerase 유전자의 3개의 영역을 다시

분리하여, *tac promoter*를 이용한 발현 벡터에 삽입하여 완전한 Taq polymerase 유전자를 재구성하였다. IPTG 첨가에 의해 발현을 유도한 후, 균체를 회수하여 polymerase 활성을 측정한 결과, *Thermus aquaticus* YT-1 균체가 생산하는 효소 활성의 수배 이상의 활성을 검출하였다. 또, Taq polymerase의 개시코돈과 SD sequence 사이의 거리를 17bp에서 10bp로 단축한 결과 효소활성이 14배 이상 증가되었다.

라) Taq polymerase의 대장균에서의 정제

적당한 배양시점에서 IPTG 첨가에 의해 Taq polymerase를 유도시킨 후, 균체를 회수하여 sonicator로 균체를 파쇄하였다. 원심분리에 의해 상층액을 회수한 후, 74°C에서 30분, 열처리하여 대장균 유래의 단백질을 거의 제거하고, FPLC에 의해 정제하였다.

4. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구개발 결과, Taq polymerase의 유전자를 대장균에 cloning하는데 성공하였으며, 따라서, *Thermus aquaticus* YT-1 균체에서 생산하는 것보다 수십배 이상의 대량 생산이 가능하게 되었다. 그러므로 기존의 DNA polymerase들이 갖고 있는 단점을 극복할 수 있는 Taq polymerase를 대량 제조하므로써 다음과 같은 연구에 이용할 수 있다.

가) PCR 방법에 의한 유전자 증폭에 이용

나) 유전병 조기진단에 이용

다) 법의학적 연구에 이용

라) Human Genome Sequencing에 이용

마) 기타 분자생물학 및 유전공학 연구에 이용

Summary

Taq DNA polymerase has been shown to be highly useful in the polymerase chain reaction(PCR) method of amplifying DNA fragments. The Taq polymerase gene from *Thermus aquaticus* YT-1 was cloned in *Escherichia coli*, in which the gene was obtained through PCR and hybridization methods. To synthesise Taq polymerase in *E. coli*, We chose the expression vector for the taq polymerase gene, plasmid pKTPOL17, was constructed, in which comprised the replication origin of the plasmid from pUC18, the lac I^q gene from pMJR1560. Plasmid pKTPOL17 was transformed into *E. coli* MV1184, and then the gene expression in pKTPOL17 was induced by the addition of an inducer, IPTG. Using pKTPOL17, the expression of Taq polymerase gene(Taq Pol gene) was showned to low expression level. Consequently, we adjusted the length of a spacer nuciotides to 10 base pairs of translation initiation region by PCR method using the primers, and then plasmid pKTPOL10 was constructed. pKTPOL10 is identical to pKTPOL17 except reducing the length of spacer nucleotides. We have detected the level expression of Taq Pol gene in *E. coli* containing pKTPOL10. The yield of expression from *E. coli* harboring pKTPOL10 was at least 14-fold higher than that of the natural Taq polymerase from *Thermus aquaticus* YT-1.

목 차

제 1 장 서론 -----	11
제 2 장 실험재료 및 방법 -----	13
1. 실험재료 -----	13
2. 제한효소 및 수식효소 -----	13
3. 대장균과 배양조건 -----	13
4. Oligo DNA 합성, 정제 및 방사선 동위원소 표지 -----	14
5. <i>Thermus aquaticus</i> YT-1의 염색체 DNA 추출 -----	15
6. Polymerase chain reaction (PCR) 방법 -----	15
7. 알카리 용균법에 의한 Plasmide DNA의 분리 -----	16
8. 저융점 agarose gel로부터 DNA 단편 회수 -----	17
9. Ligation 및 Transformation -----	18
10. 건조 agarose 막 hybridization -----	18
11. Colony hybridization -----	19
12. DNA polymerase 활성 측정 -----	20
13. 단백질의 발현 유도 -----	20
14. 대장균에서 발현된 Taq Polymerase의 정제 -----	21
15. Polyacrylamide gel electrophoresis -----	21

제 3 장	결과 및 고찰	23
1.	Oligo DNA의 제조	23
2.	PCR 방법에 의한 Taq Pol 유전자의 5' 영역 cloning	26
3.	Hybridization에 의한 Taq Pol 유전자의 3' 영역 cloning	29
4.	발현 벡터 내의 완전한 Taq Pol 유전자의 구축 및 발현	32
5.	Spacer nucleotides 단축에 의한 고발현 유도	40
제 4 장	결론	46
참고문헌		47

제 1 장 서 론

1969년, Brock and Freez에 의해 75°C에서 생육할 수 있는 *Thermus aquaticus* YT-1 균을 온천에서 분리한 이후, 현재까지 많은 *Thermus*속 세균이 분리되었고, biotechnology의 연구방향도 점차 높은 온도와 각종 시약에 상당히 안정하다고 알려진 *Thermus*속 세균 유래의 단백질 및 효소에 관심을 갖게 되었다. 현재까지 보고된 *Thermus*속 세균 유래의 단백질 및 효소는 아직 수십종류에 불과하며, 대표적인 예로서 Taq polymerase, Aqualysin I, lactate dehydrogenase 등이 있다. Taq polymerase는 1976년, Chien 등에 의해 처음으로 분리 정제되어, 분자량 63-68 KDa로 추정되었으며, specific activity, 2,000-8,000 unit/mg를 나타내며, phosphomonoesterase, exonuclease, phosphodiesterase 활성을 나타내지 않았고, Mg²⁺ 이온이 활성에 꼭 필요한 것으로 나타났다. 1980년에 Kaledin 등에 의해 내열성 DNA polymerase가 분리 정제되었는데, Chien 등이 분리한 효소와 동일한 것으로 생각된다. 정제된 이 효소는 내열성 효소로서 DNA 단편을 증폭시키는 polymerase chain reaction(PCR) 방법과 DNA sequencing에, 기존의 대장균 DNA polymerase(Klenow fragment)보다 탁월한 효과를 보였다. 1989년, Lawyer 등이 Taq polymerase 유전자를 대장균에 cloning하여, 비로소 DNA의 염기배열 및 아미노산 구조가 밝혀졌다. Taq polymerase 유전자는 2499 염기쌍으로 분자량 94 KDa로 대장균의 DNA polymerase I의 분자량(103 KDa)과 유사한 크기였다. 이미 특성이 잘 밝혀진 대장균의 DNA polymerase I과 Taq polymerase와의 아미노산 배열 비교에서 전체 38%의 유사성을 보였다. 그

중에서 대장균 DNA Pol I의 5' → 3' exonuclease activity에 관여하고 있는 domain (N 말단 영역 1- 323 아미노산 잔기)은 약 57%의 유사성을 나타낸 반면에, 3' → 5' exonuclease activity에 관여되는 것으로 추정되는 domain(N 말단으로부터 324-515 아미노산 잔기)은, 많은 아미노산 잔기의 결실에 의하여 2 % 이하의 낮은 유사성을 나타내었다. 그러므로 Taq polymerase의 3' → 5' exonuclease activity의 결여는 당연한 것으로 추측할 수 있다. 또 5' → 3' polymerase activity에 관여하는 domain(N 말단으로부터 515-928 아미노산 잔기)은 약 70%의 높은 유사성을 보였다. Taq polymerase는 PCR 방법에 의한 유전자 증폭, DNA 서열분석 등에 탁월한 효소로서 분자생물학실험을 비롯하여 유전병진단, 암 유전자의 조기진단, AIDS 유전자의 조기진단 등에 필수적인 효소이다. 또 이 효소가 갖는 특성으로서 reverse transcriptase activity가 있다는 것이 최근에 보고되어 더욱 관심의 대상이 되고 있다. 본 연구에서는 *Thermus aquaticus* YT-1의 염색체 DNA로부터 Taq polymerase 유전자를 대장균에 cloning하여 대량 생산하고, 그 정제단계를 간략히 하는데 목적을 두고 있다.

제 2 장 실험재료 및 실험방법

1. 실험재료

DNA 분석용 agarose(SeaKem GTG), 저융점 agarose(Seaplaque)는 FMC 회사 제품을 사용했다. Nick translation Kit 및 방사선 화합물 [α - 32 P]CTP는 Amersham 회사의 제품을 사용했다. 이것 이외의 화합물에 대해서는 아래 문장내에 기록한다.

2. 제한효소 및 수식효소

제한효소 및 수식효소는 제철화학, BRL, New England Biolab, Boehringer Mannheim 그리고 Promega 등의 회사제품을 사용했다. 제한효소 및 수식효소의 사용법은 Manintis 등의 방법과 각 회사 제품 사용법에 따랐다.

3. 대장균과 배양 조건

대장균은 *Escherichia coli* JM 107(*supE* Δ (*lac-proAB*)*hsdR17* F' *traD36 proAB⁺ lacI^q lacZ* Δ M15)), *Escherichia coli* MV1184(Δ (*lac-proAB*) Δ (*srl-recA*)306::Tn10(*tet^r*)(ϕ 80 *lacZ* Δ M15) F' *traD36 proAB⁺ lacI^q lacZ* Δ M15) 등을 사용하였다. 이들 균은 M9 배지, LB 배지, 또는

bactotryptone(Difco) 배지에 배양했다. M9 배지는 1 liter 당 6g의 Na_2HPO_4 , 0.5g의 NaCl, 그리고 1g의 NH_4Cl 을 넣어 멸균하고, 별도로 멸균한 1M MgSO_4 2ml와 20% glucose 10ml에 1M CaCl_2 0.1 ml를 넣어 사용하였다. LB 배지는 1 liter 당 10g의 bactotryptone 15g, 5g의 Yeast extract, 10g의 NaCl을 포함하며, bactotryptone 배지는 1 liter당, bactotryptone 15g, NaCl 5g, thiamin 50 mg을 각각 함유하고 있다. 또 plate 제조시에는 1.5%의 Bacto-agar(Difco)를 사용했고, 항생제로서는 ampicillin($100\mu\text{g/ml}$)를 사용했다.

4. Oligonucleotide 합성, 정제 및 방사선 동위원소 표지

Applied Biosystem회사의 DNA 합성장치를 이용하여, phosphite triester 합성법에 의해 PCR용 primer 및 hybridization용 prob를 합성하였다. 합성된 oligonucleotide를 conc. NH_4OH 5ml를 넣어 밀봉한 후, 50°C 에서 20 시간 처리하여 silica support에서 떼어 내었다. 8M Urea를 함유한 denatured polyacrylamide gel에서 각 oligonucleotide를 전기영동한 후, band를 절단하여 TEAB buffer로 용출시켰다. Sep-Pak(Waters Associates)으로 염을 제거한 후, 실험에 사용하였다. Oligonucleotide의 방사선 동위원소 표지는 [γ - ^{32}P]ATP를 이용하여 5' 말단을 표지했다. oligo DNA $2\mu\text{l}(\mu\text{g})$, [γ - ^{32}P]ATP(7000 ci/mmol) $10\mu\text{l}$, 10x Kinase buffer $6\mu\text{l}$, T4 polynucleotide kinase $2\mu\text{l}$ 를 혼합하여 37°C , 90 분간 반응시켰다. 반응 완료 후, Sep-Pak C_{18} cartridges에 의해 표지된 합성 oligonucleotide와 미반응된 [γ - ^{32}P]ATP를 분리하였다.

5. *Thermus aquaticus* YT-1의 염색체 DNA 추출

Thermus aquaticus YT-1 균주를 75°C 16 시간 배양한 후, 원심분리에 의해 균체를 회수하였다. -70°C에서 5분, 그리고 37°C에서 5분, 반복하여 5회 정도 incubation 하여 동결용해를 한 후, Marmur 방법으로 염색체 DNA를 추출, 정제하였다.

6. Polymerase chain reaction (PCR) 방법

반응화합물(100 μ l)은 template DNA 1 μ g, primer 1 μ M, dNTP 300 μ M, 1 % gelatin 0.01 %, KCl 50mM, Tris-Cl(pH 8.3) 20mM, MgCl₂ 1.5 mM 이다. 반응 화합물위에 mineral oil를 overlay한 다음, cycle 1을 수행하여 template DNA를 denaturation한다. 효소용액을 가한 후에 PCR robot를 이용하여 PCR를 2 cycle를 아래의 반응 수행 조건으로 33회 수행하였다. 최종 단계인 3 cycle은 반응시간을 좀더 길게 하였다. 반응이 끝난 후 chloroform을 처리하여 mineral oil를 제거하고, phenol/chloroform 처리 후, ethanol로 침전시켜 증폭된 DNA를 회수하여 agarose gel에서 확인한다.

* 반응 수행 조건

cycle	loops	Temp. (°C)	Time (min)
1(first)	1	95	5
2	33	94	1.5
		65	1
		72	2.5
3(final)	1	94	1.5
		65	1
		72	7

7. 알카리 용균법에 의한 Plasmid DNA의 분리

Plasmid의 분리는 Maniatis의 방법에 준하되 약간 변경해서 실시하였다. Plasmid를 함유하고 있는 균주를 항생제를 포함한 LB 배지에 2-3 ml에 접종하여 하룻밤 배양한다. 원심분리하여 균체를 회수한 후, 50mM Tris-HCl (pH 8.0), 10mM EDTA, 4mg/ml lysozyme 용액 150 μ l에 현탁시켜 상온에서 5분간 방치한다. 0.2N NaOH, 1% SDS 용액 300 μ l을 가하여 얼음에서 5분간 방치한

후 5 M potassium acetate 용액 200 μ l을 가하고 얼음에서 15분간 둔다. 이것을 원심분리(4 $^{\circ}$ C 2,000 rpm)하여 상층액만을 모으고, 동량의 phenol을 1-2회, chloroform/isoamylalcohol (24:1) 혼합액을 1회 처리한 후, 2배의 EtOH를 가하여 상온에서 5분간 놓아둔다. 원심분리하여 침전물을 얻고 70% EtOH로 씻어준 다음 완전히 말려준다. 0.5 μ g/ml의 DNase free RNase를 포함한 TE buffer에 DNA 침전물을 녹이고 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응한다. DNA 용액의 60%에 해당하는 20% PEG 6000, 2.5 M NaCl 용액을 가하고 얼음에서 1시간 이상 방치, 원심분리하여 얻은 DNA 침전물을 70% EtOH로 씻은 다음 완전히 말린다. 이렇게 하여 얻어진 DNA를 파장 260 nm에서 농도 측정 후 사용하였다.

8. 저융점 agarose gel로부터 DNA 단편 회수

0.7-1.0% 농도로 만들어진 저융점 agarose gel에 DNA 시료와 DNA MW standard marker와 같이 전기영동하고, 전개된 gel 상에서 원하는 크기 DNA에 해당하는 부분을 잘라 회수하였다. 이렇게 얻은 gel 조각을 65 $^{\circ}$ C로 가열하여 완전히 녹이고 동량의 TE buffer를 가한 후 다시 5분간 가열하였다. 이 DNA/agarose 용액을 동량의 phenol로 2회, chloroform/isoamylalcohol (24:1) 혼합용액으로 1회 처리하고, 1/10배 5 M potassium acetate, 3 배 EtOH를 가하여 -70 $^{\circ}$ C 30분간 방치한 후 원심분리에 의해 DNA 조각을 회수하였다.

9. Ligation 및 Transformation

저융점 agarose gel로 부터 회수한 목적의 DNA fragment를 pUC 또는 pKC14의 vector에 삽입하여 Maniatis의 "Molecular cloning, A Laboratory Manual"에 기술된 방법에 준해서 ligation 하였다. 또 준비된 plasmid에 의한 *E. coli*의 형질 전환은 Maniatis의 "Molecular cloning, A Laboratory Manual"에 기술된 방법에 준하거나, 다소 변경시켜 실시하였다. LB 배지 10 ml 접종하여, 37°C에서 OD 0.25가 될 때까지 키운다. 4,000g로 10분 원심분리하여 세포들을 모으고, 5ml의 10mM MOPS (pH 7.0), 10 mM RbCl 용액으로 세포를 씻은 다음 5 ml의 100 mM MOPS (pH 6.5), CaCl₂, 10 mM RbCl 용액을 가하여 얼음에서 15분간 방치한다. 다시 세포들을 모아 위의 용액 1 ml에 현탁시키고, 그 중 100 μ l를 취해 DNA 10 μ l (1-200 ng)과 DMSO 1.5 μ l를 가하고 얼음에서 30분간 방치한다. 43-44°C로 30초간 처리하고 LB 배지 0.9 ml를 가하여 37°C에서 1시간 배양한다. 이렇게 형질 전환된 세포들을 항생제를 포함한 고형 배지에 도포하여 배양하였다.

10. 건조 agarose 막 hybridization

이것은 nitrocellulose membrane filter와 nylon membrane 대신에 DNA를 agarose gel 전기영동한 후, gel을 건조하여 membrane 형태로 하여, 합성 oligonucleotide probe와 hybridization 실험을 행하는 방법이다. Gel 건조와 hybridization은 Silhavy 등의 방법과 hybridization 온도 설정은, Wallace 등의 "분자생물학노트, 한국과학기술연구원 유전공학연구소 발행"

에 기술된 방법에 따랐다. *Thermus aquaticus* YT-1 염색체 DNA를 각종제한 효소로 절단하여 0.7% agarose gel에서 전기영동하여, ethidium bromide로 DNA 밴드를 염색한 후, UV 램프 하에서 사진을 찍었다. 다음으로, 이 gel을 0.5 N NaOH, 0.1 N NaCl 수용액 중에 60분간 담근 후 증류수로 30분간 세척했다. 이 gel을 paper towel 사이에 넣어 압축하여 수분을 가능한한 제거했다. 이렇게 하여 약 1mm 두께가 된 gel을 Whatman 3MM paper에 옮겨서 gel 건조장치 위에서 60°C 30분간 감압 상태에서 건조시켜 membrane 상태로 만들었다. 이 막을 prehybridization solution (6 x SSC, 5 x Denhardt's solution, 50mM sodium phosphate buffer (pH 6.5), 250 μ g/ml의 sonicated salmon testes DNA (Sigma, type III Na salt)) 내에 담구어 65°C, 1시간 prehybridization 반응시킨 후, 그 gel을 또 hybridization solution (6 x SSC, 1 x Denhardt's solution, 50mM sodium phosphate buffer (pH 6.5), 100 μ g/ml의 sonicated salmon testes DNA) 내에 담구어 60°C에서 16시간 hybridization 반응을 시켰다. 세척은 2 x SSC 용액 중 55°C에서 10분씩 3회 반복하였다. 이것을 공기 중에 건조시킨 후 autoradiography를 행했다.

11. Colony hybridization

Colony hybridization은 Douglas Hanahan등의 “분자생물학노트”(한국과학기술원 유전공학연구소 발행)에 기술한 방법에 따랐다.

12. DNA polymerase 활성 측정

효소의 DNA polymerase 활성도 측정은 1.5ml ependorf tube를 사용하였다. 반응혼합물 (50 μ l)은 25 ml Tris-Cl (pH 8.3), 1 mM β -mercaptoethanol, 2 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 200 mM dATP, 200 mM dGTP, 200 mM dCTP, (methyl, 1',2'-³H) Thymidine 5'-triphosphate 48 mCi/mmol, 1.43 μ g activated calf thymus DNA로 이루어져 있다. 반응혼합물에 DNA polymerase를 가한 후 70°C에서 30분 반응하여 ice bath에서 5분 동안 chilling 시켜서 반응을 정지시켰다. 50 μ l의 시료를 DE-81 filter paper disk에 점적시켜 heat block을 이용하여 신속히 건조시킨다. 건조된 filter paper disk를 완충용액(0.5 M Na₂HPO₄, pH7.0)이 포함된 petri dish로 옮긴 다음, 10분 동안 shaking하였다. 70% EtOH가 포함된 petri dish로 옮긴 후 5분동안 shaking한 후 filter를 heat block를 이용하여 건조시켰다. Filter를 cocktail fluid(PP0 4g, POPOP 0.05g, toluene 1 liter)가 포함된 disposal vial에 넣어 insoluble 물질에 incorporation 되는 (methyl, 1',2'-³H) dTTP의 양을 Beckman LS 6800 liquid scintillation counter를 이용하여 측정하였다. 효소의 1 unit는 70°C, 30분 동안 1 nmol (³H) dTTP가 acid-insoluble 물질로 incorporation되게 하는 효소의 양으로 정하였다.

13. 단백질의 발현 유도

Tac promoter 조절하의 Taq polymerase 유전자를 가진 clone의 단백질 발현을 유도하기 위하여, 고형배지의 colony에서 새로이 seed culture (37

°C overnight, 3 ml)하여 seed를 확보한 후, 100 ml의 발현 배지에 접종하여 37°C에서 배양하였다. 일정한 시간 (약 2-3시간)이 지난 후 600 nm에서의 O.D 값이 0.8일 때 IPTG (isopropyl-β-thiogalactoside)를 최종 1 mM 농도로 가한 뒤, 다시 4시간 더 배양하였다. 배양액을 원심분리하여 얻은 균체를 sonication하여 crude extract 를 제조하여 DNA polymerase활성을 측정하였다.

14. 대장균에서 발현된 Taq polymerase의 정제

대장균내에 IPTG로 유도 발현된 Taq polymerase를 정제하기 위해서는, 균체를 완충용액(50mM Tris-Cl, pH 7.5, 1 mM DTT, 1 mM PMSF containing 1mg/ml pepstatin P and trypsin inhibitor)에 녹여, sonication 또는 French press로 균체를 마쇄한 후, 원심분리(8000 g)에 의해 균체 및 debris부분을 제거하였다. 이것을 74°C에서 30분간 열처리하여 대장균 유래의 단백질 부분을 변성시킨 후, 원심분리(10,000g)에 의해 제거하였다. 이것을 FPLC를 이용하여 정제하였다.

15. Polyacrylamide gel electrophoresis

Phast system(Pharmacia Co)를 이용하여 12-18% gradient gel를 이용하여 manual에 준해서 전기영동, 염색 및 탈색하였다. 또는 Lamemml의 방법을 수정하여 Mighty small II Kit에 12% acrylamide running gel과 5% acrylamide stacking gel 이 되도록 만든 vertical slap gel(7x8 cm)를 만

들어 시료를 loading하여, stacking 시에는 50 Volts를, running 시에는 80 Volts의 전류를 가하여 약 2.5 시간 동안 전개시켰다. 이때 사용된 완충 용액은 Tris-glycine(pH 8.3, 25 mM)이었다. 전개가 끝난 후, coomassie brilliant blue R-250이 들어있는 염색액에 2시간 담군 후, 탈색액(40% methanol, 7% acetic acid)에서 탈색시켰다. 단백질 분자량 측정은 electrophoresis calibration kit(Pharmacia Co)을 표준으로 사용하였다.

제 3장 결과 및 고찰

1989 년 Lawyer 등이 보고한 Taq polymerase의 DNA sequence를 참조하여 PCR방법에 의한 Taq Pol 유전자를 cloning하려고 계획을 세웠다. 그러나, PCR 방법으로는 Taq polymerase의 완전한 유전자를 얻을 수가 없었기 때문에 PCR 방법 및 hybridization 등을 이용하여 3개의 영역으로 나누어 각각 cloning하여 최종적으로 발현 벡터에 완전한 유전자를 재구성하는 방법을 택하였다. 또, 이렇게 구축된 유전자의 고발현을 위해 다양한 방법을 시도 하였다.

1. Oligonucleotide의 제조

Lawyer등이 보고한 Taq polymerase 유전자의 restriction maps을 그림 1에 도식하였다. Taq polymerase 유전자의 cloning을 위해, PCR 방법으로 유전자를 증폭한 후, pUC계열 벡터에 cloning하는 방안을 선택하였다. 따라서 PCR 실험을 위한 primer의 위치 선정과 primer의 설계가 DNA 증폭실험에 가장 중요한 점이라고 할 수 있다. Primer의 위치는 그림 1에 표시하였으며, primer는 아래 그림 2와 같이 6개를 설계하였다.

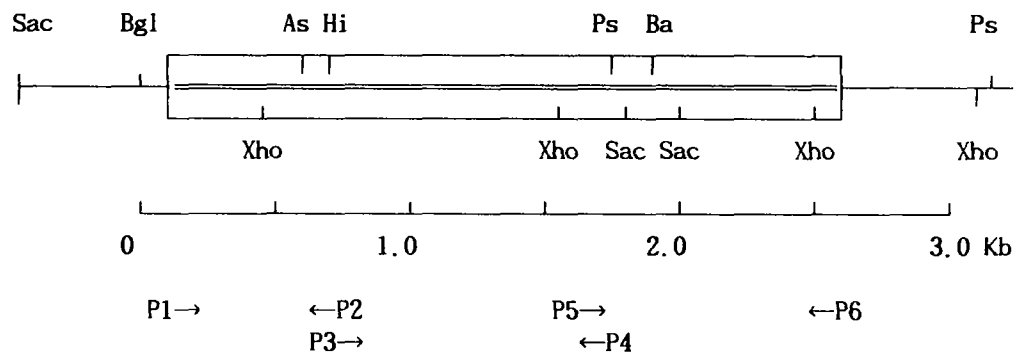


Fig.1. Restriction map of Taq Pol gene and strategy for PCR

Sac(Sac I), Bgl(Bgl I), As(Asp 718), Hi(Hind III), Ps(Pst I),
 Ba(BamHI), Nh(NheI), Xho(Xho I). Primer의 위치는 P1, P2, P3,
 P4, P5, P6으로 표시하였다. == Taq Pol gene의 방향 표시.

**

Primer 1 : 5' GAAGCTTAACATGAGGGGATGCTGCCCTCT 3' 32 mer
Hind III (Taq gene, -10 — 22)

Primer 2 : 3' AGCCCCTCTTCTGCCCTCCTTCGAAG 5' 27 mer, R
Hind III (Taq gene, 596 - 622)

Primer 3 : 5' GAAGCTTCTGGAGGAGTGGGGGAGCCT 3' 27 mer
Hind III (Taq gene, 615 - 641)

Primer 4 : 3' TGGGGTAGCACCTCTTCTAGGACGCAT 5' 28 mer, R
Pst I (Taq gene, 1577-1604)

Primer 5 : 5' CCTGGCCGGCCACCCCTTCAACCTCAACTCCCG 3' 33 mer
(Taq gene, 1428-1460)

** *

Primer 6 : 3' CCCTCCTGACCGAGAGGCGGTTCTCACTCAGCTGG 5' 35 mer, R
Sal I (Taq gene, 2471-2506)

Fig.2. Sequence of oligonucleotide PCR primers for Taq Pol gene amplification

Primer 1의 경우 Taq polymerase 유전자의 5' 상류 영역에 존재하는 개시코돈(ATG)앞에 Hind III site를 넣었다. Primer 2, 4, 5는 역방향으로, primer 3은 정방향으로 각각 설계하였다. Primer 6의 경우 3' 하류 영역에 존재하는 종지코돈(TGA) 다음에 Sal I site를 각각 넣었다. 여기에서 * 표시는 mismatch된 염기를 나타낸다. 이렇게 설계된 5개의 oligonucleotide를 Applied Biosysteme DNA 합성기로 합성하였다. 합성된 oligonucleotide를 acrylamide gel로 전기영동 후, 분리, 정제하여, Taq polymerase gene의 cloning을 위한 PCR 실험용 primer 및 hybridization probe로 사용하였다.

2. PCR 방법에 의한 Taq Pol 유전자의 5' 영역 cloning

Thermus aquaticus YT-1의 염색체 DNA를 template로 넣은 3개의 준비된 eppendorf tube에 primer 1과 2, primer 3과 4, primer 5와 6을 각각 넣고 실험방법에서 기술한 조건으로 PCR 실험을 행하여 Taq Pol gene의 각 영역을 증폭시켰다. 증폭이 완료된 DNA시료에서 oil를 제거 후, phenol-chloroform 처리 및 ethanol 침전 등을 거쳐 agarose gel 전기영동에서 최종 확인하였다. 그림 3에서 lane 1, 2는 primer 1과 2로 증폭된 Hind III fragment(약 0.6 kb), lane 3, 4는 primer 3과 4로 증폭된 Hind III/Pst I fragment(약1.0kb), lane 5, 6은 primer 5와 6으로 증폭된 Sal I fragment(1.1Kb) 등을 전기영동한 것이다. PCR실험 조건은 94°C 1.5분→ 65°C 1분 → 72°C 2.5분 순서로 32회 반복한 것이다. lane 1, 2와 lane 3, 4는 예상되로 약 0.6 Kb, 1.0 Kb에 증폭된 DNA band를 형성하였으나, lane 4, 5는 DNA band를 형성하지 않았다. 그러나, anealing 온도를 65°C에서 55

°C로 낮추면 DNA band를 형성하였다(실험 data 생략). 또한 primer 1과 6, primer 1과 4, primer 3과 6을 각각 넣고 실험방법에서 기술한 조건으로 PCR 실험을 행하여 Taq Pol gene의 각 영역을 증폭시켰으나, 바람직한 결과는 얻지 못했다(실험 data 생략). 이러한 원인은 *Thermus aquaticus* YT-1의 염색체 DNA의 G + C 함량이(약 70%) 상당히 높아서 primer들의 정위치에 결합하는 빈도를 낮출 수 있다. 또 증폭해야할 DNA 길이가 길수록 원하는 많이 나타난다. 이렇게 증폭된 DNA band들을 저용점 agarose gel에서 회수하여 pUC18의 Sma I site에 blunt ligation하였다. pUC 18의 Sma I site에 primer 1과 2로 증폭된 Hind III fragment를 삽입시켜 구축한 것을 pHH, primer 3, 4로 증폭된 Hind III/ Pst I fragment를 삽입시킨 것을 PHP라고 각각 명명하고 그림 4에 도시하였다. 이렇게 구축된 plasmid 들을 대장균 JM 107에 transformation시킨 후, 각 transformant들로부터 plasmid를 분리하여 제한효소로 절단하여 확인하였다(실험 data 생략).

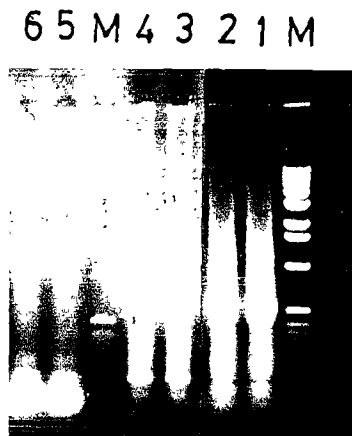


Fig.3. Agarose gel analysis of PCR products.

Lane 1-2:by primer 1 and 2, lane 3-4:by primer 3 and 4,

lane 5-6:by primer 5 and 6, M:1 kb DNA ladder.

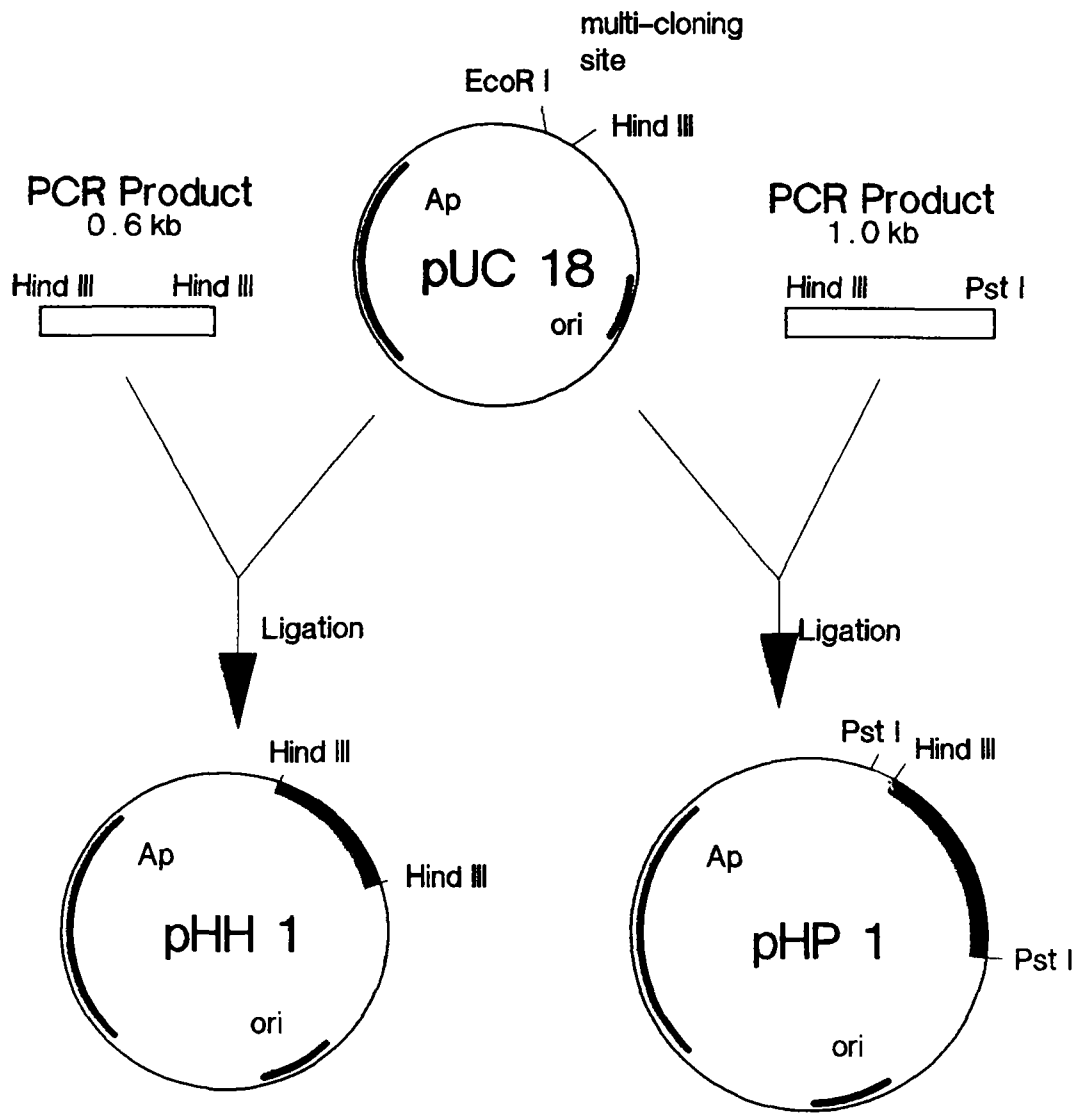


Fig. 4 Construction of pHH1 and pHP1 from pUC18

3. Hybridization에 의한 Taq Pol 유전자의 3' 영역 cloning

PCR 실험방법으로 Taq pol gene의 3' 영역을 cloning하지 못했기 때문에 primer 6을 probe로 이용하여 hybridization 방법으로 3' 영역을 screening 하기로 했다. *Thermus aquaticus* YT-1의 염색체 DNA를 Pst I 또는 Bgl II로 절단하여 agarose gel 전기영동을 한 후, 방사선 동위원소 [γ - 32 P]ATP로 kination하여 표지한 primer 6을 probe로 하여 hybridization 한것이 그림 5이다. 여기에서 probe는 Pst I의 1.7kb 부근에서 hybridization 하는 것으로 나타났다. 따라서 이 1.7kb 영역을 저용점 agarose gel에서 절단, 분리하여 회수하였다. 이 Pst I fragment를 pUC 18의 Pst I site에 삽입, ligation하여 pPP1(그림 6 참조)을 구축한 후, 대장균 JM107에 transformation 하였다.

많은 transformants로 부터 Taq pol gene의 3' 영역을 cloning하기 위하여, 위에서 사용한 probe를 이용하여 colony hybridization을 수행하였다 (실험 data 생략). Positive signal를 나타낸 몇개의 colony를 선택하여 plasmid를 분리하였다. 제한효소, Pst I으로 절단하여 agarose gel 전기영동 및 hybridization를 한 결과, Taq pol gene의 3' 영역인 Pst I fragment가 cloning된 것을 알았다.

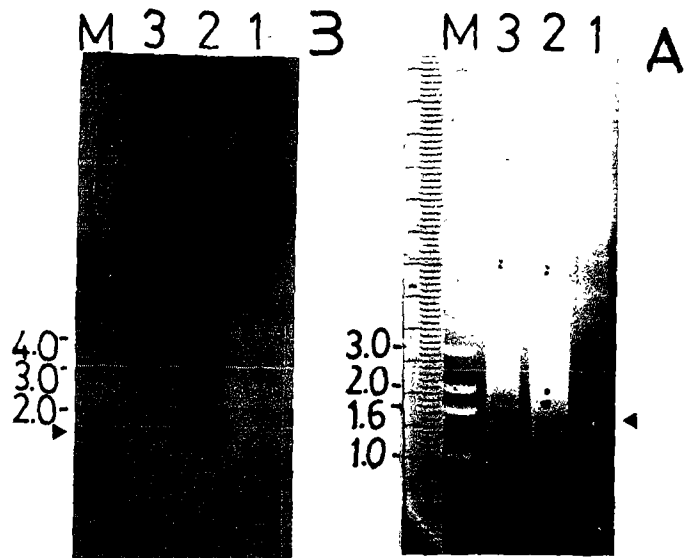


Fig.5. Agarose gel membrane hybridization.

(A) Digestion of *T. aquaticus* YT-1

Lane 1: intact DNA, lane 2: PstI,

(B) Hybridization with primer 6

Taq DNA polymerase gene map/

Cloning Strategy

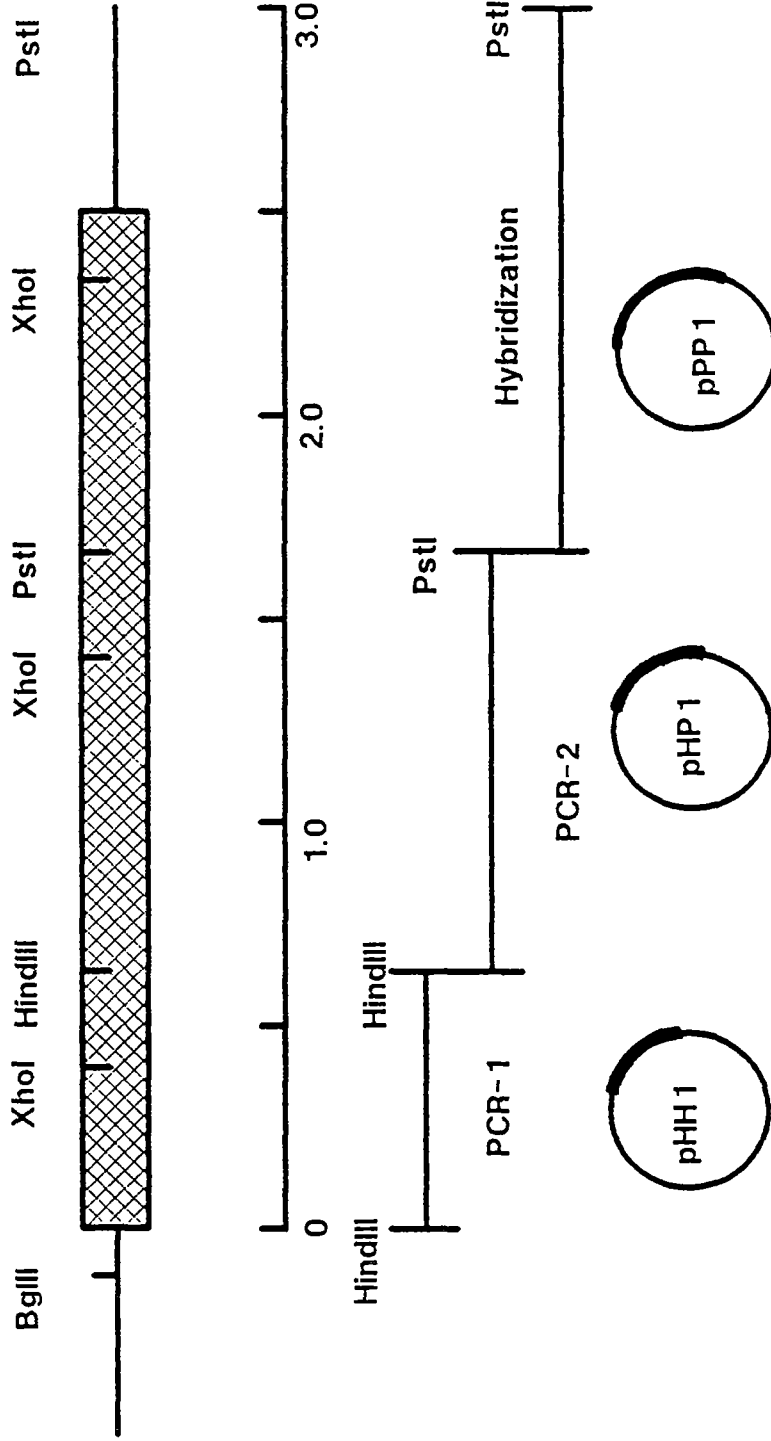


Fig. 6. Cloning strategy of Taq polymerase gene.

4. 발현 벡터 내의 완전한 Taq Pol 유전자의 구축 및 발현

Taq polymerase gene의 5' 및 3' 영역에 해당하는 gene fragments를 PCR 및 hybridization 방법을 이용하여 pUC 18에 각각 cloning하는데 성공하였다. 이것을 간략히 도식하면 그림 6과 같다. 발현 벡터 pKC14에서 Taq Pol gene이 완전히 구축된 pKTPOL17까지의 제조과정을 순서대로 서술하겠다.

A) 발현 벡터 pKC14

그림 8과 같이 각각의 subclone를 얻어서 당 연구실에서 제조한 pKC14에 구축하기로 했다. pKC14는 pKK233-3에서 유래한것으로 tac promoter와 multiple cloning site(MCS) 바로 뒤에 *rrnB* T₁T₂ ribosomal RNA transcription terminator가 삽입되어 있다. 여기에 plasmid의 copy 수를 증가 시키기 위해 replication origin를 pUC로 교체시키고 tac promoter의 발현을 억제하기 위해 *lac I^q*를 새로 도입하였다. 여기에 pHP의 Pst I fragment와 pHH의 Hind III fragment가 순서적으로 쉽게 구축될 수 있도록 multiple cloning site(MCS)의 마지막에 있는 Pst I site를 미리 제거한 것이다(그림 7).

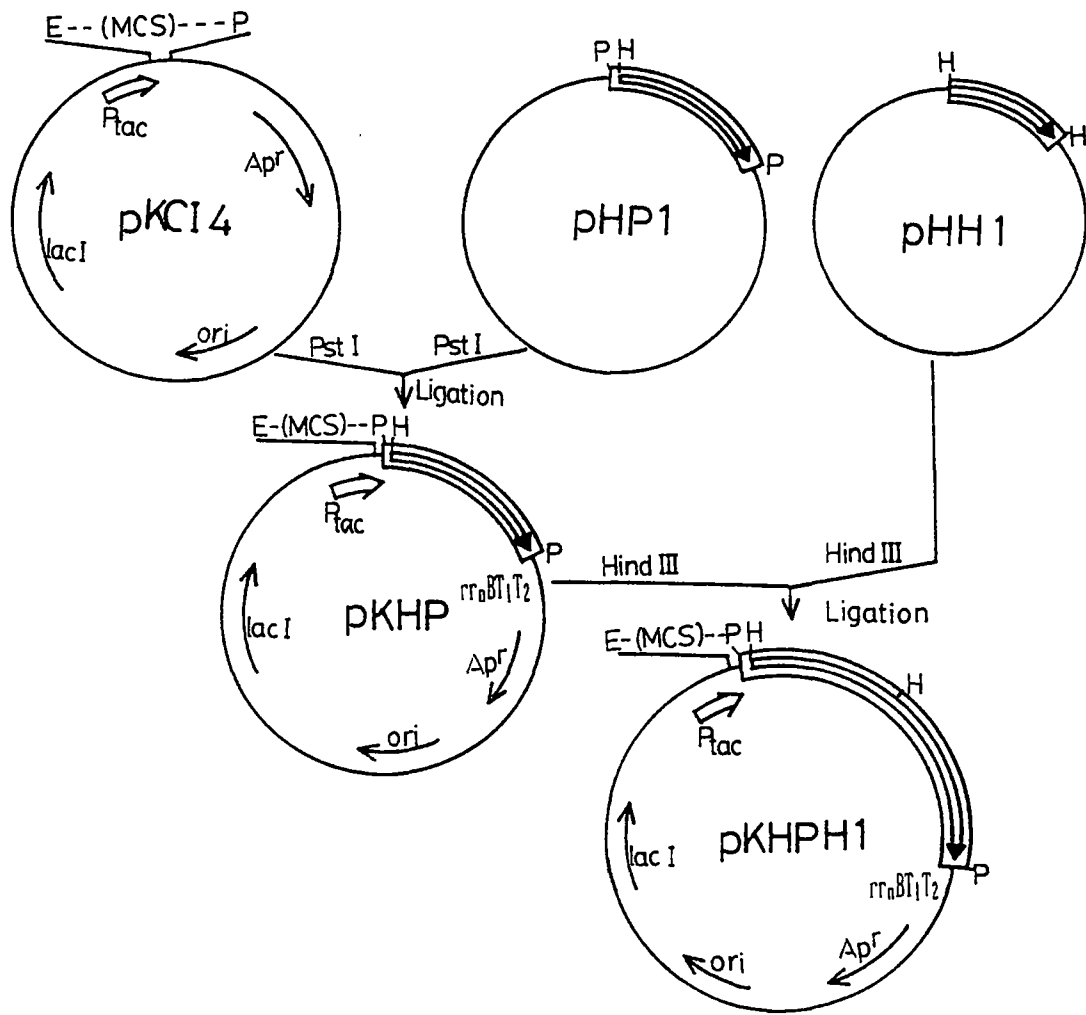


Fig.7. Construction of pKHP and pKHPH₁ from pKCI4.

B) pKHP1의 구축

발현 벡터 pKC14에 Taq pol gene의 구축순서는 그림 7와 같다. 먼저 pKC14를 Pst I으로 절단하여, alkaline phosphatase 처리한 다음, pHPI의 Pst I fragment(Taq Pol gene의 5' 영역)를 삽입, ligation하여 pKHP를 구축하였다(그림 7). 이것을 대장균 JM 107에 transformation한 다음 transformants들로부터 plasmid를 분리하여 제한효소로 절단하여 pKHP가 구축된 것을 확인하였다(실험 data 생략).

C) pKHPH1의 구축

구축된 pKHP를 Hind III로 절단하여, alkaline phosphatase 처리한 다음, pHH1의 Hind III fragment(Taq Pol gene의 중간영역)를 삽입, ligation하여 pKHPH1를 구축하였다(그림 7). 이것을 pKHP가 구축된 것을 확인했던 것과 동일한 방법으로 대장균 JM 107에 transformation한 다음 transformants들로부터 plasmid를 분리하여 제한효소로 절단하여 pKHPH1이 구축된 것을 확인하였다(실험 data 생략).

D) Spacer nucleotides의 길이 조정(pKHPH1-1)

구축된 pKHPH1의 Pst I site에 pPP1의 Pst I fragment를 삽입하여 Taq Pol gene의 구축을 완료하기 전에, pKHPH1의 Shine-Dalgarno(SD) sequence와 Taq Pol gene의 개시코돈 (ATG) 사이의 spacer nucleotides의 길이를 17 bp 까

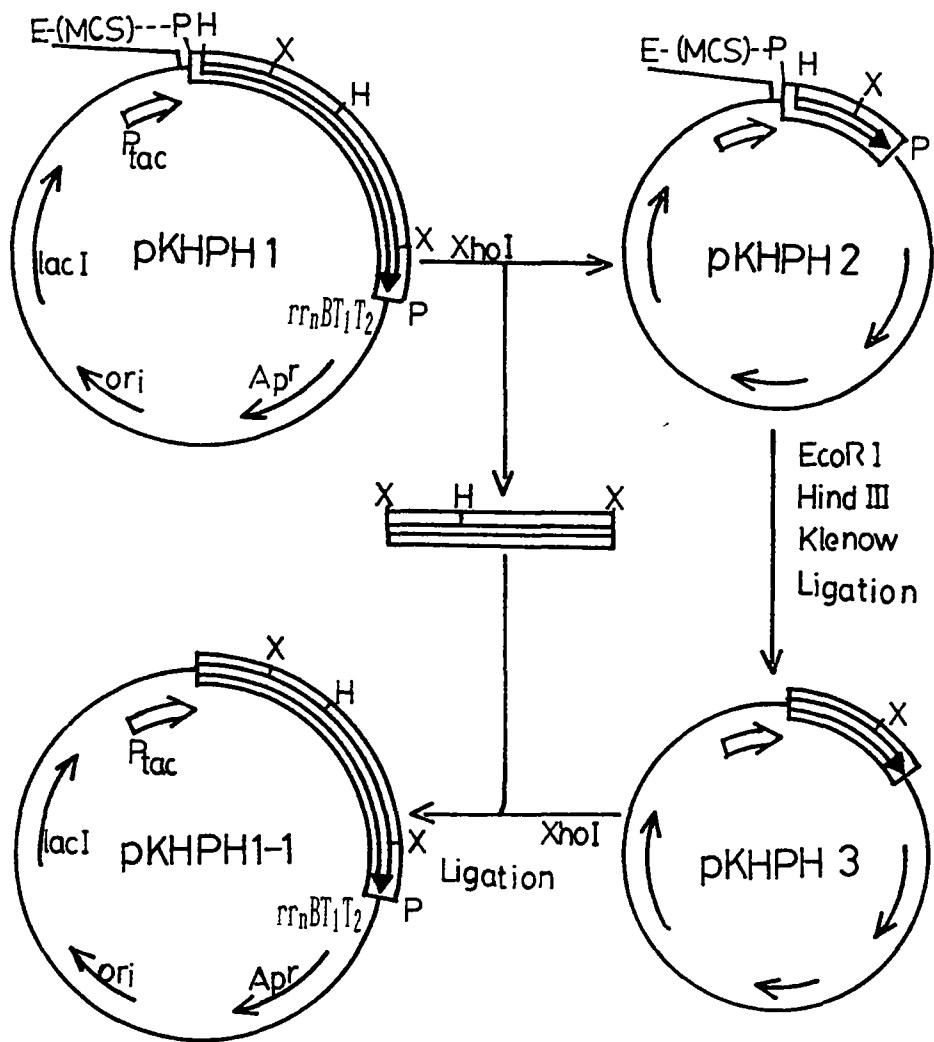


Fig. 8. Deletion of the spacer nucleotides, from pKHPH1 to pKHPH1-1.

지 줄이기로 했다. 그 과정을 그림 8에 도식하였다. pKHPH1에 일부 구축된 Taq Pol gene 내에는 Hind III site가 존재하므로 spacer nucleotide의 단축을 위해 EcoRI/ Hind III 절단시에 방해가 된다. 따라서 가장 안전한 방법으로 pKHPH1을 Xho I으로 먼저 절단하여 작은 fragment는 따로 분리하여 보관하고, 벡터 부분이 결합한 부분을 ligation하여 대장균 JM 107에 transformation한 다음 transformants들로 부터 plasmid를 분리하여 제한효소로 절단하여 pKHPH2가 구축된 것을 확인하였다(실험 data 생략).

pKHPH2를 EcoRI/ HindIII로 완전히 절단한 후, Klenow fragment를 이용하여 DNA의 3' 말단을 filling 하였다. 이것을 ligation하여 대장균 JM 107에 transformation한 다음 transformants들로 부터 plasmid를 분리하여 제한효소로 절단하여 pKHPH3가 구축된 것을 확인하였다(실험 data 생략). 이렇게 하여 spacer nucleotides를 17 bp까지 줄이는데 성공하였다. 물론 spacer nucleotides 수를 더 단축하기 위해 Klenow fragment 대신 mung bean nuclease를 이용하여 blunt ligation를 행하였지만 좋은 결과를 얻지 못했다.

pKHPH3를 Xho I으로 절단하여, 위에서 절단, 보관한 Xho I의 작은 fragment를 다시 제자리에 삽입하여 ligation한 후, 대장균 JM 107에 transformation하였다. Transformants들로 부터 plasmid를 분리하여 제한효소로 절단하여 pKHPH1-1이 구축된 것을 확인하였다(실험 data 생략). 이 pKHPH1-1이 pKHPH1와 다른 점은 spacer nucleotides 길이가 17 bp로 단축된 것이다.

E) pKTPOL 17의제조

구축된 pKHPH1-1를 Pst I으로 절단하여 alkaline phosphatase 처리한 다음, pPP1의 Pst I fragment(Taq Pol gene의 3' 영역)에 해당하는 gene fragments)를 삽입, ligation하여 pKTPOL17를 구축하였다(그림 9). 이것을 대장균 JM 107에 transformation한 다음 transformants들로 부터 plasmid를 분리하여 제한효소로 절단하여 agarose gel 전기영동 한것이 그림 10 이다. 여기에서 pKTPOL17은 완전한 Taq Pol gene를 tac promoter와 정방향으로 구축되어 있는 것을 확인하였다.

F) pKTPOL17의 대장균에서의 발현

pKTPOL17이 cloning된 대장균 JM 107를 LB 배지에 접종한 후, 37°C에서 하룻밤 배양하였다. 이것을 다시 seed로 하여 LB배지에 1% 접종하여 37°C에서 2시간 배양후 1 mM 농도의 IPTG를 첨가하여 4시간 더 배양하였다. 원심분리에 의해 균체를 회수하여 실험재료 및 방법에 기술된 방법으로 내열성 DNA polymerase 활성을 측정하였다. 그 결과 대장균 배양액 1 ml(O.D₆₆₀ 3.0 기준)당 5.0 unit를 나타내었으며, 이는 *Thermus aquaticus* YT-1의 배양액에서 측정된 값과 유사하였다. 비록 활성은 별로 높지 않지만, 내열성 DNA polymerase가 대장균에서 발현한다는 것은 정제과정의 단순화라는 점에서 산업적으로 상당한 장점을 갖고 있다.

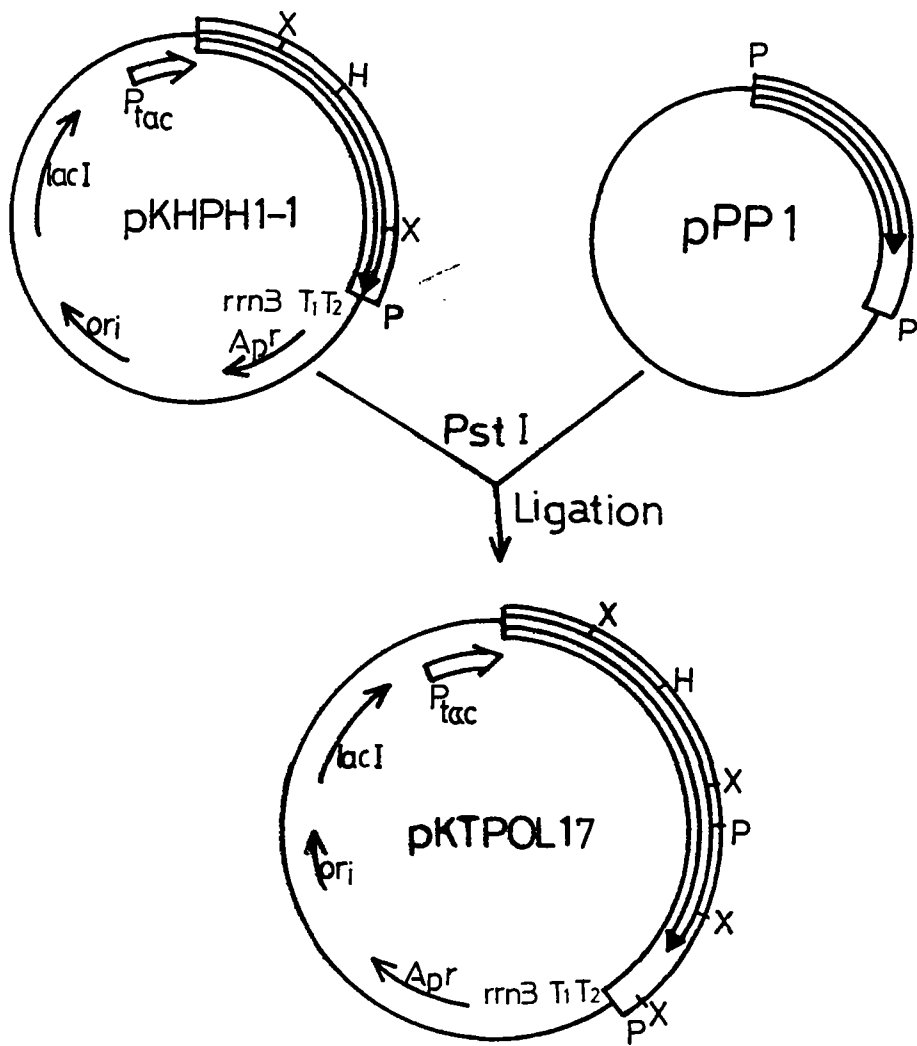


Fig.9. Expression vector, pKTPOL17, for the TAQ pol gene.

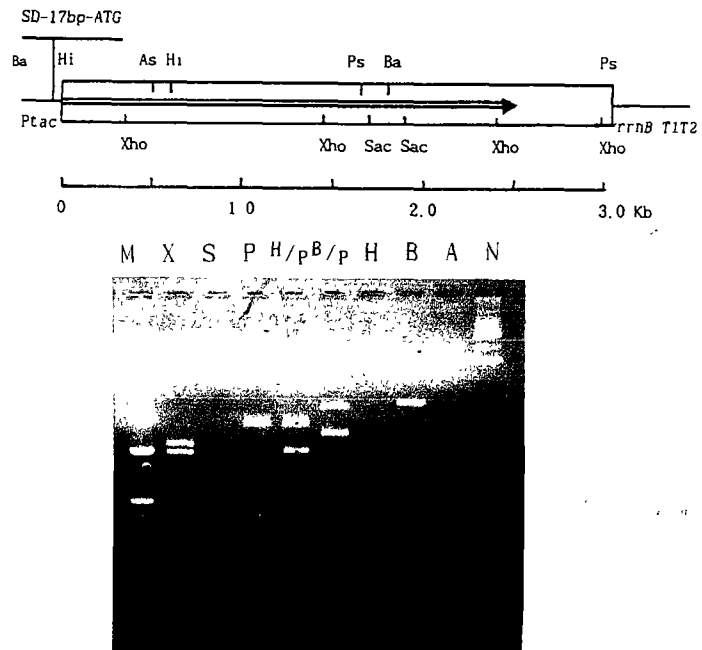
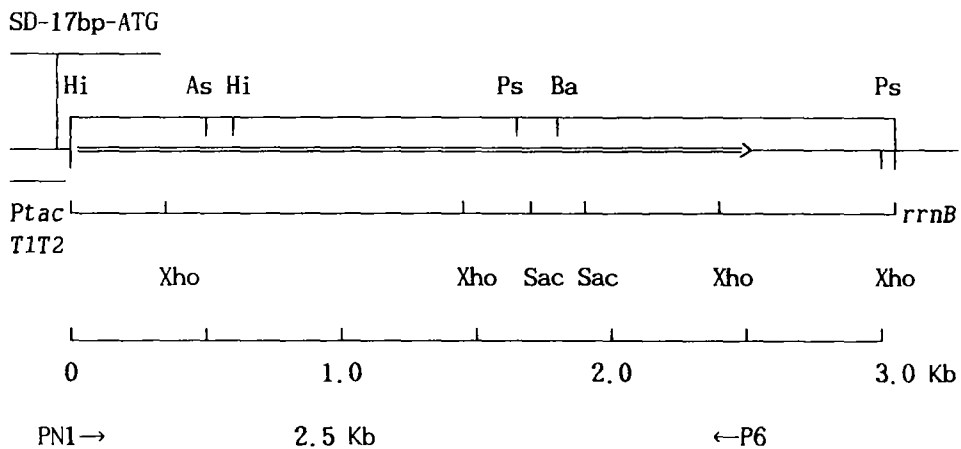


Fig.10. Restriction pattern of Taq pol gene, pKTPOL17.

5. Spacer nucleotides 길이 단축에 의한 고발현 유도

pKTPOL17의 발현율이 낮은 원인으로서는 여러가지 이유가 있지만, 여기에서는 우선 spacer nucleotides가 17 bp로서 너무 길다는 데 역점을 두고, 이 길이를 10 bp 까지 줄이는 방안을 검토하였다. 먼저 구축된 pKTPOL17내에 있는 Taq Pol gene을 template DNA로 하여, spacer nucleotides를 단축할 수 있는 새로운 primer N1과 기존에 사용한 primer 6을 선택하였다(그림 11). 여기에서 primer N1은 개시코돈(ATG) 바로 앞에 EcoRI site가 삽입되어 있으므로 발현 벡터 pKCI4의 EcoRI site에 삽입될 시에는 spacer nucleotides의 수가 10 bp가 된다. 또 primer 6은 Taq Pol gene의 종지코돈 다음에 Sal I site가 삽입되어 있다.

Primer PN1과 primer 6을 이용하여 PCR 방법으로 Taq Pol gene을 증폭시켜서 agarose gel에 전기영동한 것이 그림 12이다. 여기에서 2.5 kb 부근에 major DNA band가 보였다. 이 band를 저용점 agarose gel로 부터 분리, 회수하여 pUC18의 Sma I site에 blunt ligation하여 대장균 JM107에 cloning하였다. 다시 이 plasmid를 분리하여 EcoRI/ Sal I으로 절단하여 Taq Pol gene를 포함한 약 2.5 kb fragment를 회수하여 발현 벡터 pKCI4의 EcoRI/ Sal I site에 삽입하여 ligation하여 pKTPOL10을 구축하였다(그림 13). 이 pKTPOL10을 대장균 JM107 또는 MV1184에 transformation하였다. 약 20 여개의 transformants를 골라서 plasmid를 분리하여 제한효소 절단으로 확인하였다. 내열성 DNA polymerase활성을 측정해 본 결과 상당히 높은 결과를 보였다. pKTPOL17, pKTPOL10의 내열성 DNA polymerase 활성도를 비교한 것이 표 1이다.



Hind III

5' GAAGCTTAACATGAGGGGGATGCTGCCCTCT 3' 32 mer

Primer N1 : 5' AGGAATTCATGAGGGGGATGCTGCCCTCTTTGAGC 3' 36 mer

EcoR I

(Taq gene, -7 — 22)

그림 11. Restriction map of Taq Pol gene in pKTPOL 17 and strategy for PCR

Sac(Sac I), Bgl(Bgl I), As(Asp 718), Hi(Hind III), Ps(Pst I), Ba(BamHI),

Nh(NheI), Xho(Xho I). Primer positions of PCR are marked PN1 and P6.

The arrowed box(====>)indicate the Taq Pol gene.



Fig.12. Agarose gel analysis of PCR products.

M: 1 Kb DNA ladder, Lane 1-4:by primer N1,N6

Table 1. Thermostable DNA polymerase activity in *E. coli* and *Thermus aquaticus* YT-1 extracts

Source	Enzyme activity (units/ml)*
<i>Thermus aquaticus</i> YT-1	4.5
pKTPOL17(<i>E. coli</i> MV1184)	5.0
pKTPOL10(<i>E. coli</i> MV1184)	70.0

* Culture media

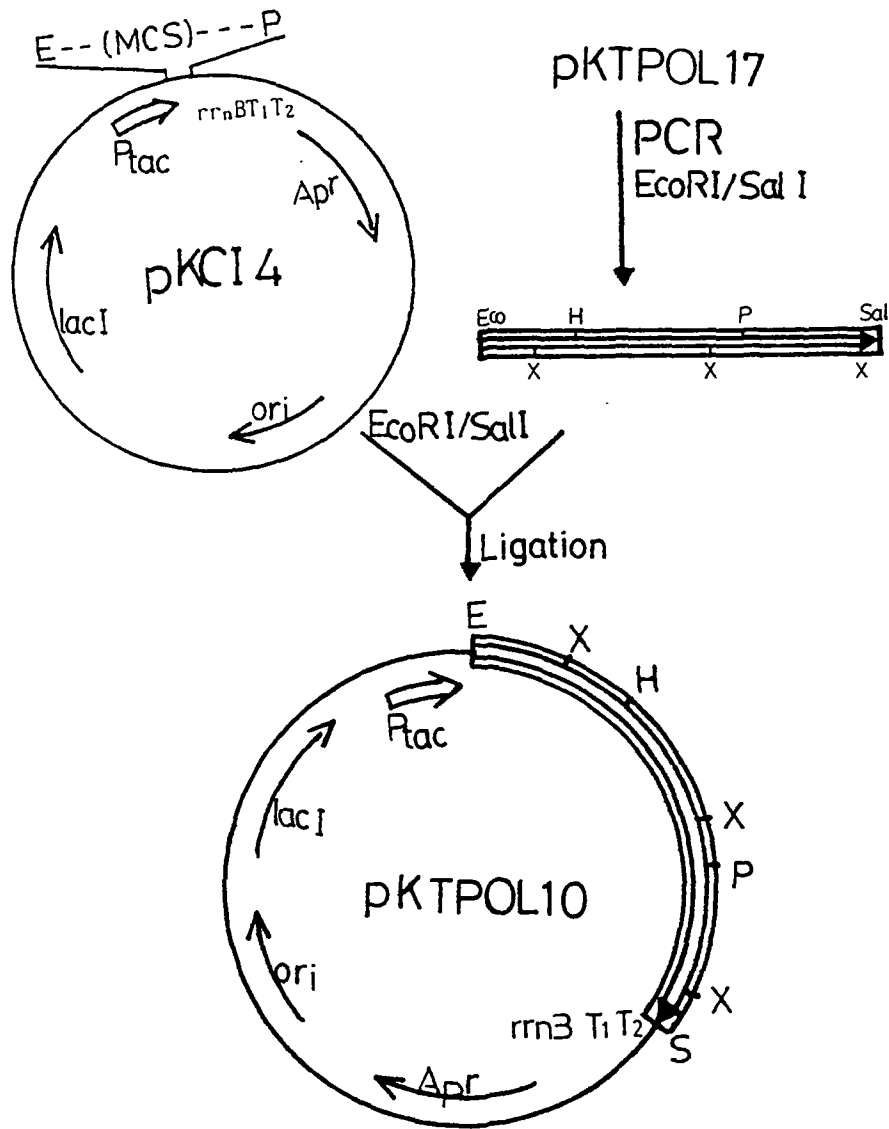


Fig.13. Expression vector, pKTPOL10, for the Taq pol gene.

여기에서 pKTPOL10은 pKTPOL17보다 약 14배 이상의 높은 내열성 DNA polymerase 활성을 나타내었다. 이는 아마 spacer nucleotides의 길이가 아

래와 같이 17 bp에서 10 bp으로 단축한데 기인한다고 본다.

S/D

pKTPOL17 : 5' AGGA AACAGAATTAGCTAAC ATG 3' (17 bp)

S/D

pKTPOL10 : 5' AGGA AACAGAATTC ATG 3' (10 bp)

EcoRI

pKTPOL10을 함유한 대장균 MV1184를 1 liter배지에 배양하여 IPTG 유도에 의해 발현 시킨 후, 열 처리하여 FPLC로 정제한 것을 그림 14이다. 또 이것을 농축하여 PCR 실험을 한것이 그림 15이다. 여기에서 gene amplification 결과는 cetus 회사의 구입한 효소와 마찬가지로 양호한 결과를 보여 주었다. 그러나, 이 FPLC과정에서 Mono Q column에 Taq polymerase가 잘 결합하지않기 때문에 손실이 많아 다른 방법을 현재 검토하고 있다.

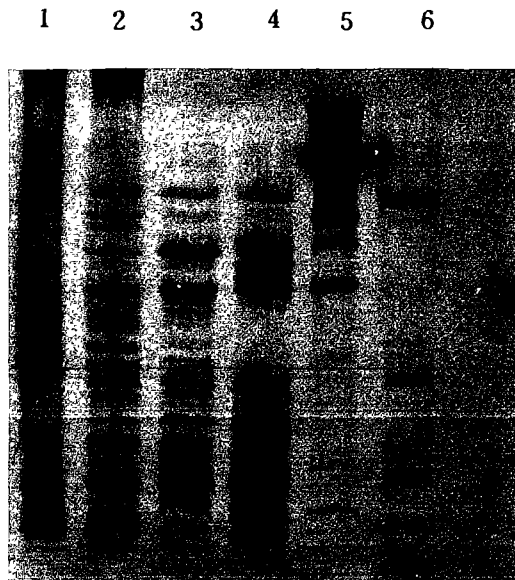


Fig.14. Partial purification of cloned Taq pol DNA polymerase
 Lane 1: *Thermus aquaticus* YT-1, lane 2: MV1184, lane 3: cell
 extract(pKTPOL10), lane 4: heat treatment (70 °C, 30 min)
 lane 5: HMW(212, 170, 116, 76, 53 KDa), lane 6: cloned Taq pol.



Fig.15. Agarose gel analysis analysis of PCR products.
 Lane 1,3: "cloned Taq, lane 2,4: AmpliTaq, lane 5: 1 Kb
 lane 6,7: native DNA.

제 4 장 결 론

본 연구에서 분자생물학 실험 및 polymerase chain reaction(PCR)에 중요한 소재인 Taq polymerase를 보다 쉬운 방법으로 대량생산하기 위해 대장균에 Taq pol gene를 cloning 했다. 또 이 유전자를 발현벡터에 넣어 대장균에서 발현시켰으며, spacer nucleotides의 단축에 의해 14 배 이상의 활성을 높이는데 성공하였다. 대장균에서 발현된 Taq polymerase는 내열성을 유지하기 때문에 대장균을 sonication하여 74°C에서 30분간 열처리하여 대장균 유래의 단백질을 변성시킬 수 있다. 그러므로, 원심분리에 의해 쉽게 80% 이상의 정제효과를 올릴 수 있으며, 1-2개의 column을 사용하면 완전 정제가 가능하다. 따라서 *Thermus aquaticus* YT-1 extracts에서 정제하는 것보다 상당한 원가절감 효과를 가져 온다. FPLC에 의해 부분 정제된 효소는 PCR 실험에서 양호한 결과를 보여 주었다. 앞으로 좀더 정제과정을 보완하면 원가면에서 상당히 경쟁력 있는 상품이 될 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Andrew, p. (1965) *Biochem. J.*, 96, 595
2. Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.*, 72, 248-254
3. Brock, T. D. (1969) *J. Bacterial.*, 98, 289
4. Catteral, J. F. (1977) *J. Bacterial.*, 129, 1110-1120
5. Chien, A. (1976) *J. Bacterial.*, 127, 1550-1557
6. Davis, B. J. (1964) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121, 404-416
7. Engleke, D. R. (1990) *Analytical Biochemistry*, 191, 396-460
8. Fabri, M. (1976) *Biochim. Biophys. Acta*, 435, 228-235
9. Hiroko, K. (1989) *Gene*, 76, 161-166
10. Innis, M. A. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 9436-9440
11. Kaledin, A. S. (1980) *Biokhimiya*, 45, 644-651
12. Kaledin, A. S. (1981) *Biokhmia*, 46, 1576-1584
13. Kaledin, A. S. (1982) *Biokhmia*, 47, 1785-1791
14. Karkas, J. P. (1973) *Pro. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 70, 3834-3838
15. Klimczak, L. J. (1985) *Ncleic Acids Res.*, 13, 5269-5282
16. Kornberg, T. (1974) *Enzymes*, 10, 119-144
18. Kwon, S. T. (1988) *Eur. J. Biochem.*, 171, 441-447

19. Laemmli, U. K. (1970) *Nature*, 227, 680-685
20. Lawyer, F. C. (1989) *J. Biol. Chem.* , 264, 6427-6437
21. Litman, R.M. (1968) *J. Biol. Chem.* , 243, 6222-6233
22. Ldeb, L. A. (1969) *Exp. Cell Res.* , 57, 298-310
23. Loeb, L. A. (1969) *J. Biol. Chem.* , 144, 1672-1681
24. Longley, M. J. (1990) *Nucleic acids Res.* , 18, 7317-7322
25. Lowry, O. H. (1951) *J. Biol. Chem.* , 193, 265-275
26. Maniats, T. (1982) Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
27. Marmur, J. (1961) *J. Mol. Biol.* 3, 208-218.
28. Mendelman, M. V. (1989) *J. Biol. Chem.* , (in press)
29. Mullis, K. B. (1987) *Methods in enzymology*, 155, 335-350
30. Petruska, J. (1988) *Biochemistry*, 27, 2988
31. Porro, M. (1982) *Analytical Biochemistry*, 127, 316-321
32. Reuben,r. (1974) *J. Virol.* , 14, 1104-1107
33. Rossi, M. (1986) *System. Appl. Microbiol.* , 7, 337-341
34. Saiki, R. D. (1985) *Science*, 230, 1350-1354
35. Saiki, Rcharf, S. J. (1986) *Science*, 233, 1076-1078
36. Sedwick, W. P. (1972) *J. Biol. Chem.* , 247, 5026-5033

37. Silhavy, R. B (1991) 분자생물학노트, (권석태 등 공저), pp. 74-90
한국과학기술연구원 유전공학연구소 발행.
38. Stenesh, J. (1972) *Biochim. Biophys. Acta.*, 272, 167-178
39. Tindall, K. R. (1988) *Biochemistry*, 27, 6008-6013.
40. Vicuna, R. (1985) *Eur. J. Biochem.*, 149, 41-46
- 41 Wallace, R. B (1979) *Nucleic. Acids Res.* 7, 2115-2136.
42. Wickner, R. B. (1972) *J. Biol. Chem.*, 247, 489-497

