

고효율 효모 유전자 운반체의 개발

김태국·최철용·노현모*

서울대학교 자연과학대학 동물학과 분자유전학교실

Construction of the Stable and High Copy Number Yeast Vectors

Kim, Tae Kook, Cheol Yong Choi, and Hyune Mo Rho*

Laboratory of Molecular Genetics, Department of Zoology,
Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors were constructed by combination of various functional segments such as autonomous replicating sequence (ARS1), centromere region (CEN3), origin of replication of 2 μ m plasmid (2 μ m OR). Transformation efficiency, stability and copy number of constructed vectors were analyzed in yeast strains, SHY4(cir⁺) containing 2 μ m plasmid and NNY1(cir^o) without it. The results showed that centromere containing plasmids were very stable and existed at one copy per cell; fused replication system (2 μ m OR and ARS1) containing plasmids were more stable and higher copy number than one replicon containing plasmids; presence of endogenous 2 μ m plasmid influenced on stability and copy number of 2 μ m based plasmids.

분자생물학적 연구에 많이 사용되는 유전자 제조 기술에는 형질전환 시키는 기술과 각 숙주세포에 적합한 유전자 운반체를 제작하는 것이 매우 중요하다. 지금까지 개발되어온 효모 유전자 운반체의 공통된 특성은 형질전환된 효모와 대장균을 선별하는데 필요한 식별 유전자인 LEU2, URA3, TRP1 antibiotic marker 등을 각각 가지고 있으며 효모 뿐만 아니라 대장균내에서도 높은 수로 복제가능하다는 것이다.

본 연구에서는 효모와 고등생물의 유전자에 대해 분자생물학적인 측면에서 연구할 목적으로 효모를 숙주세포로 이용하는 좀 더 유용한 유전자 운반체를 개발하기 위해 YEp(1), YRp(2), YCp(3) 유형의 유전자 운반체에서 각 유형을 특징지우는 2 μ m OR (yeast plasmid의 origin of replication), ARS1 (autonomous replicating sequences), 그리고 CEN3(centromere)의 DNA 절편을 각각 갖고 있으며, 공통으로 대장균에서 분열할 수 있는 pBR322의 복제원점 및 표지 유전자 Ap(ampicillin)와 효모에서 표지되는 TRP1(tryptophane) 유전자를 갖고 있는

4개의 다른 유전자 운반체를 만들었다. 이들 4개의 유전자 운반체의 특성 및 유용성을 조사하기 위하여 효모의 자연 플라스미드가 이미 들어있는 세포주(SHY4)와 들어있지 않은 세포주(NNY1)내에서 유전자 운반체의 형질전환력과 안정성 그리고 플라스미드수를 각각 연구하였다.

재료 및 방법

사용균주

대장균 균주로서 HB 101(F⁻, r⁻, m⁻, recA 13)은 재조합 플라스미드에 사용하였다. 특히, JA 300(thr, leuB6, thi, thyA, trpC 1117, hsrk, hsmk, str)은 trp 선별에 사용했다.

S. cerevisiae 균주로서 SHY4(a, ste-Vc9, ura3-52, trp1-289, leu2-3, leu2-112, his3- Δ 1)(cir⁺)와 NNY1(α , trp1, ura3-52, his3-1, gal 2, gal 10)(cir^o)를 각 유전자 운반체의 형질전환 숙주세포로 사용하였다.

Key words: Yeast, vector, ARS1, CEN3, 2 μ m OR.

* Corresponding author

세포배양

대장균 균주인 HB 101와 JA 300은 LB 배양액(1% bactotryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl)에서 배양했다. 형질전환된 개체를 선별하기 위해 ampicillin (50 µg/ml) 또는 tetracycline (12.5 µg/ml)을 첨가했다. JA 300의 형질전환된 개체를 선별하는데 사용한 배양액은 1×Vogel's minimal salts, glucose(2mg/ml), thiamine(2 µg/ml), threonine (50 µg/ml) thymine(50 µg/ml), leucine(50 µg/ml)과 1.5% agar로 구성되어 있다. 50×Vogel's salts는 1L당 10g MgSO₄·7H₂O, 100g citric acid monohydrate, 500g K₂HPO₄, 175g NaH₂PO₄·H₂O를 각각 넣어 만들었다. 효모 균주인 SHY4와 NNY1은 YEPD 배양액(2% bactopectone, 1% yeast extract, 2% dextrose)에서 배양했으며 형질전환된 개체의 선별을 위해 trp⁻ 최소배양액을 사용했다.

DNA 분리

대장균의 플라스미드 DNA는 alkaline lysis method를 이용하여 분리했다(4). 효모의 플라스미드 DNA는 Devenish 등에 의한 방법으로 분리했다(5). agarose gel로부터 DNA 분리는 CSH Lab에서 개발한 방법을 이용했다.

형질전환

대장균과 효모의 형질전환은 각각 kushner(6)와 Ito 등(7)의 방법으로 했다. 대장균의 형질전환은 대장균을 A500에서 OD 0.6 정도까지 배양하고 이를 원심분리로 모은 다음 50 mM CaCl₂와 10 mM RbCl이 들어있는 완충용액으로 닦은 다음 dimethylsulfoxide를 처리하고 유전자 운반체 DNA를 넣은 다음 heat shock 등의 과정으로 형질전환 시켰다. 효모를 형질전환시키는 방법을 간단히 살펴보면, mid-log phase의 효모 세포를 0.2M lithium acetate에 의해 형질전환이 용이한 상태를 만들고 DNA를 넣은 후에 PEG-4000과 heat shock에 의해 형질전환 시켰다.

안정도 조사

형질전환된 효모세포를 2×10⁷ 세포/ml이 될 때까지 trp⁻ 최소 배양액에서 배양한 다음 세포를 희석시켜 trp⁻ 최소배지와 영양배지에 각각 뿌렸다. 동시에 배양세포들을 4×10⁴ 세포/ml 정도로 희석시켜 영양배양액과 trp⁻ 최소 배양액에 옮겨 심었다. 옮겨 심은 세포들의 상태가 exponential phase를 유지하도록 세포수를 계속 관찰하면서, 10 hrs마다 trp⁻ 최소배지와 영양배지에 배양한 세포들을 뿌려 선별

된 환경과 선별되지 않은 환경하에서의 각 유전자 운반체의 소실율을 구하였다. 돌연변이율은 본 실험에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 판단되었다. 각 플라스미드의 형질전환된 세포는 둘 이상 선정하여 실험은 3회 이상 반복 실시하였다.

플라스미드수 측정

각 플라스미드 DNA가 형질전환된 효모세포를 trp⁻ 최소 배양액에서 배양한 다음 전체 DNA를 분리하였다. 분리된 DNA를 전기영동 시킨 다음 염색하여 Polaroid type 665 pos/Neg 필름으로 현상 인화하였다. 각 DNA band의 상대적 농도를 microdensitometer로 결정했다. 이로부터 플라스미드수를 아래의 공식을 통해 구하였다(9).

$$\text{플라스미드수} = \frac{(\text{플라스미드의 농도}) \times (\text{리보솜 DNA의 길이})}{(\text{리보솜 DNA의 농도}) \times (\text{플라스미드의 길이})} \times 100$$

결 과

유전자 운반체 제작

pYJ3는 Fig.1에 나타난 것처럼 pTRI, pORI 그리

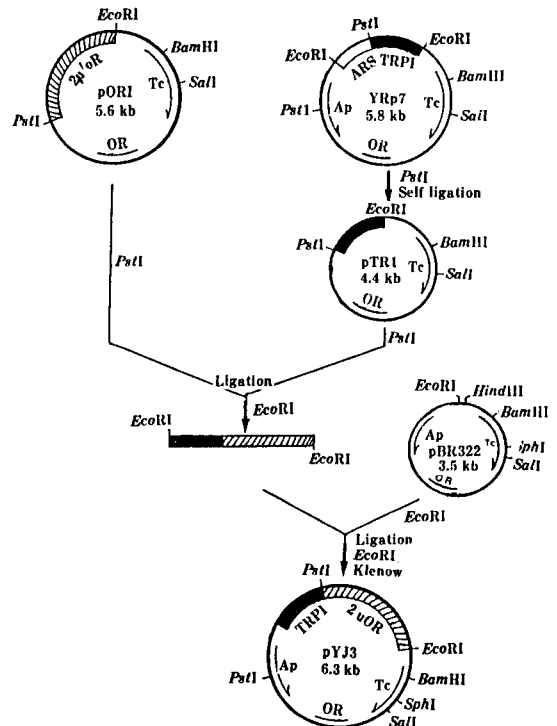


Fig. 1. Strategy for the construction of pYJ3.

고 pBR 322Δ (10)로부터 만들었다. 먼저 YRp7의 변형체인 pTRI를 만드는 과정을 살펴보면, YRp7을 Pst I로 자른 후 self-ligation 시켜서 대장균 균주인 JA 300에 형질전환시켜 antibiotics tetracycline과 ampicillin으로 일단 선별했다. 그 다음에 선별된 형질전환된 개체를 trpC 1117 돌연변이의 보완과 제한효소에 의한 분석에 의해 screening했다. pTRI의 TRP1 유전자는 EcoRI과 Pst I로 함께 잘랐을 때, 0.8 kb DNA 절편으로 나타남을 확인했다. 효모 2 μm 플라스미드의 복제원점을 소유하고 있는 pORI은 다음 방법으로 만들었다. 2 μm 플라스미드의 복제원점은 YEp 24를 Pst I과 EcoRI으로 잘라 2.0 kb의 DNA 조각을 electroelution 시켜서 얻은 다음 Pst I과 EcoRI으로 잘라 직선화된 pBR 322에 이 조각을 ligation 시켰다. 이 ligation시킨 DNA를 대장균 균주인 HB 101에 형질전환시켜 tetracycline과 ampicillin으로 선별하여 cracking에 의해 유전자 운반체를 확인하였다. EcoRI의 2 μm 플라스미드 복제원점은 EcoRI과 Pst I으로 잘랐을 때, 2.0 kb DNA 조각으로 나타남을 확인했다. TRP1 유전자와 2 μm 플라스미드 복제원점을 ligation 시키기 위해서

pTRI과 pORI을 각각 Pst I으로 자른 후 ligation 시켰고 이를 phenol/chloroform으로 추출하고 에탄올로 침전시킨 후 EcoRI으로 잘라 pBR 322Δ의 EcoRI 부위에 ligation 시켰다. ligation mixture를 JA 300에 형질전환시켜 ampicillin과 tetracycline으로 선별한 후, trpC 1117 돌연변이의 보완에 의해 screening 했다. EcoRI을 클로닝에 이용하기 위해 TRP1 유전자와 ampicillin resistance 유전자 사이의 EcoRI이 작용하는 부위를 제거하기로 했다. 먼저 ampicillin resistance 유전자 방향으로 TRP1 유전자가 들어간 플라스미드는 부분적으로 EcoRI으로 자른 후 klenow 조각을 처리한 다음 22°C에서 6시간 동안 blunt end ligation을 하였다. 이렇게 만들어진 DNA를 형질전환시켜 봄으로써 확인했다. 이상과 같이 제한효소를 이용한 분석에 의해 2 μm 플라스미드 복제원점과 대장균 복제원점, ampicillin resistance, tetracycline resistance, TRP1 유전자를 소유하는 pYJ3가 만들어졌음을 확인했다(Fig. 2).

pYER 제작은 pORI과 YRp7을 EcoRI으로 각각 자른 후 서로 ligation 시켰다(Fig. 3). ligation시킨 DNA를 JA 300에 형질전환시켜 ampicillin과 tetra-

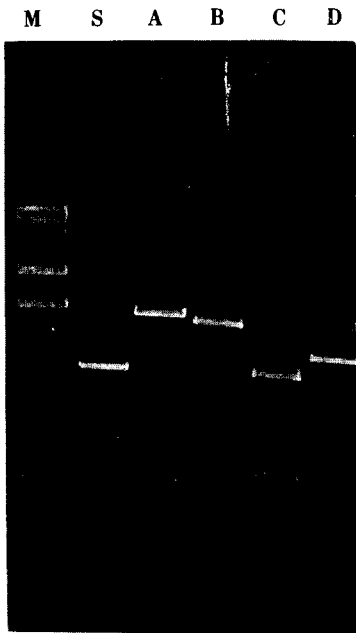


Fig. 2. Characterization of pYJ3.
 Lane M; DNA + HindIII
 Lane S ; Supercoil form of pYJ3
 Lane A ; pYJ3 + EcoRI
 Lane B ; pYJ3 + EcoRI and BamHI
 Lane C ; pYJ3 + HindIII
 Lane D ; pYJ3 + PstI

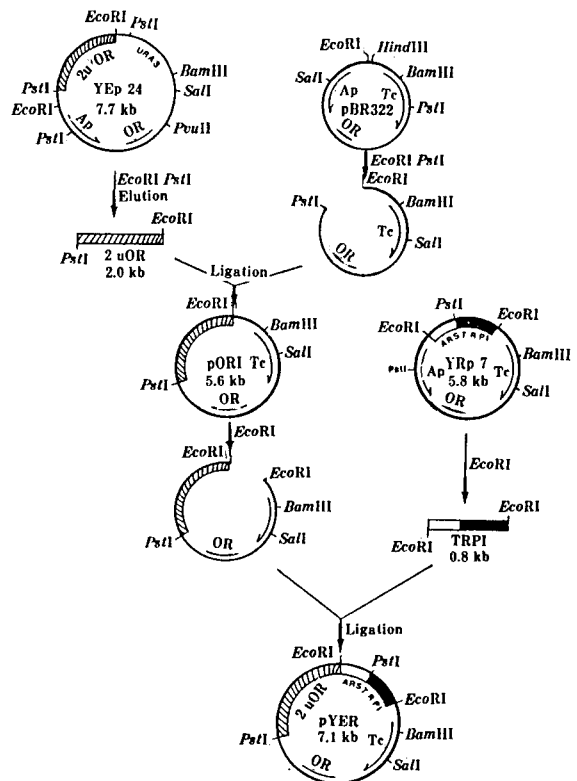


Fig. 3. Strategy for the construction of pYER.

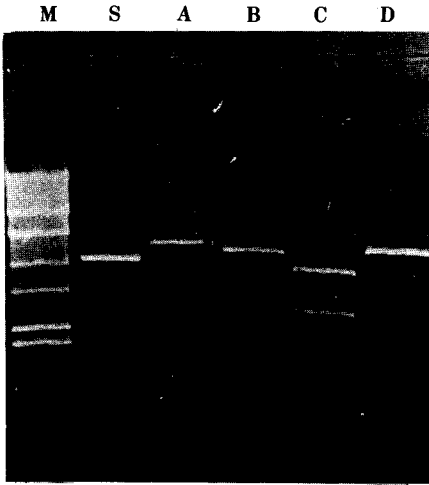


Fig. 4. Characterization of pYER.
 Lane M; DNA + *Hind*III and pBR322 + *Hinc*II
 Lane S; Supercoil form of pYER
 Lane A; pYER + *Eco*RI
 Lane B; pYER + *Eco*RI and *Bam*HI
 Lane C; pYER + *Pst*I (Partial)
 Lane D; pYER + *Hind*III

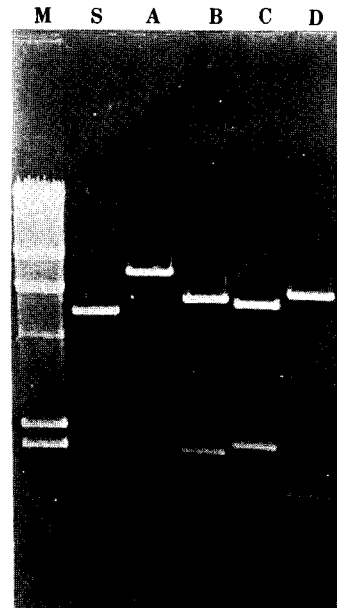


Fig. 6. Characterization of pYEC.
 Lane M; DNA + *Hind*III
 Lane S; Supercoil form of pYEC
 Lane A; pYEC + *Eco*RI
 Lane B; pYEC + *Hind*III
 Lane C; pYEC + *Eco*RI and *Bam*HI
 Lane D; pYEC + *Pst*I

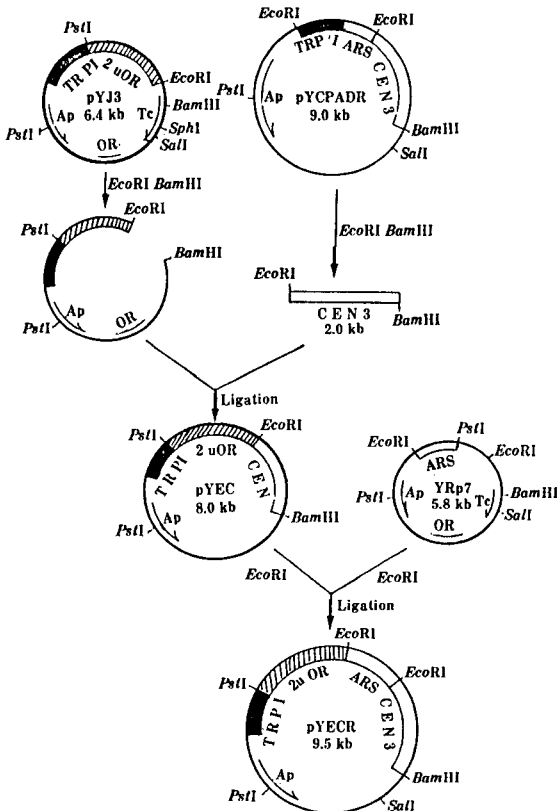


Fig. 5. Strategy for the construction of pYEC and pYECR.

cycline으로 선별한 후 cracking 하여 플라스미드를 확인하면서 재선별했다. 만들어진 DNA를 *Eco*RI으로 잘랐을 때 1.4kb의 TRP1 및 ARS1 유전자 조각이 나타남을 본 후 여러 제한효소에 의한 확인으로 2 μ m 플라스미드 복제원점, 대장균 복제원점, ampicillin resistance, tetracycline resistance, ARS1, TRP1을 소유하는 pYER이 만들어졌음을 확인했다(Fig. 4).

pYEC를 만드는 과정(Fig. 5)을 살펴보면 먼저 pYJ3와 pYCPADR를 각각 *Eco*RI과 *Bam*HI으로 자른 후 ligation 시켰다. ligation DNA를 JA 300에 형질전환시켜 ampicillin과 tetracycline으로 일단 선별하고 cracking에 의해 screening했다. 만들어진 DNA를 *Eco*RI과 *Bam*HI으로 잘랐을 때 CEN3 DNA 조각이 나타남을 보아 pYJ3에 pYCPADR의 CEN3가 subcloning된 pYEC가 만들어졌음을 확인했다(Fig. 6).

pYECR을 만드는 과정(Fig. 5)은 pYEC와 YRp7을 *Eco*RI으로 각각 자른 후 서로 ligation 시켜서 JA 300에 형질전환시켜 ampicillin과 tetracycline으로 일단 선별했다. cracking에 의해 screening했다. 9.5 kb 정도의 DNA를 제한효소에 의한 분석에 의해

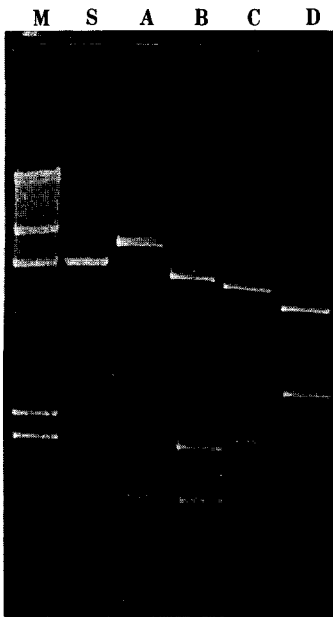


Fig. 7. Characterization of pYECR.

Lane M; DNA + *Hind*III
 Lane S ; Supercoil form of pYECR
 Lane A ; pYECR + *Eco*RI
 Lane B ; pYECR + *Eco*RI and *Bam*HI
 Lane C ; pYECR + *Hind*III
 Lane D ; pYECR + *Hind*III

Table 1. Composition of constructed yeast-*E. coli* shuttle vectors

Vector	Composition*
pYECR	pBR322 , TRP1, 2 μm OR, CEN3, ARS1
pYER	pBR322 , TRP1, 2 μm OR, ARS1
pYEC	pBR322 , TRP1, 2 μm OR, CEN3
pYJ3	pBR322 , TRP1, 2 μm OR

*pBR322 , *E. coli* plasmid pBR322 derivative; TRP1, yeast tryptophane marker gene; 2 um OR, origin of replication of yeast endogenous natural plasmid; CEN3, centromere isolated from yeast chromosome 3; ARS1, autonomous replicating sequence isolated from yeast chromosome 4.

2 μm 복제원점, 대장균 복제원점, ampicillin resistance, tetracycline sensitive, TRP1, ARS1, CEN3 유전자를 가진 pYECR이 만들어졌음을 확인했다(Fig. 7).

지금까지 새로 제작된 유전자 운반체의 구성은 Table 1과 같다.

형질전환력

Table 2. Transformation efficiencies of constructed vectors in yeast

Plasmid	Size (kilobases)	Strain	Transformation efficiencies (transformants/μg)
pYECR	9.5	SHY4(cir+)*	450
		NNY1(cir ⁰)#	200
pYER	7.1	SHY4(cir+)	400
		NNY1(cir ⁰)	200
pYEC	8.0	SHY4(cir+)	400
		NNY1(cir ⁰)	500
pYJ3	6.3	SHY4(cir+)	300
		NNY1(cir ⁰)	200
YRp7	5.8	SHY4(cir+)	350
		NNY1(cir ⁰)	300
pYCPADR	9.0	SHY4(cir+)	150
		NNY1(cir ⁰)	470

Transformation was carried out using yeast recipient strains SHY4(cir+) and NNY1(cir⁰) by Alkali Cation method as described in Materials and Methods.

*; Yeast strain containing 2 μm plasmid.

#; Yeast strain containing no 2 μm plasmid.

만들어진 몇가지 유전자 운반체와 기존 유전자 운반체인 YRp7과 pYCPADR을 각각 일정량씩 효모 균주인 SHY4(cir+)와 NNY1(cir⁰)에 형질전환시킨 후 trp⁻ 최소배지에 뿌릴 때 TRP1 돌연변이의 보완에 의해 2~4일 후 배지에 나타나는 colony 수를 헤아려 형질전환력을 조사했다. Table 2에서 보는 바와 같이 1-2×10⁷개의 세포들을 사용했을 때 DNA 1 μm당 보통 200-400개 정도의 형질전환된 개체가 나타났다. 또한 2 μm 플라스미드를 균주내에 가지는 효모인 SHY4에서는 pYECR과 pYEC가 2 μm 플라스미드를 가지지 않는 효모인 NNY1에서는 pYCPADR과 YRp7, pYEC가 다른 유전자 운반체에 비해 형질전환력이 높은 것을 알 수 있다. 형질전환을 더 확인하기 위하여 trp⁺의 형질전환된 효모로부터 플라스미드 DNA를 뽑아 대장균에 역 형질전환시킨 후 플라스미드 DNA를 분리하여 유전자 운반체의 존재를 확인했다. SHY4와 NNY1의 형질전환된 개체에서 각각 뽑은 플라스미드 DNA가 형질전환에 사용한 각 유전자 운반체와 크기가 동일함을 보아 형질전환이 옳게 되었음을 알 수 있었다.

안정도

형질전환된 개체를 선별하기 위한 최소 배양액에서 집단내에 플라스미드 DNA를 소유하는 개체정도

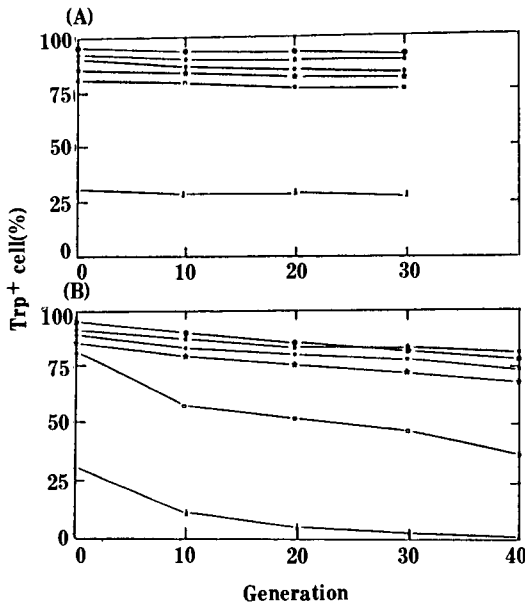


Fig. 8. Stability of constructed vectors in yeast strain SHY4 (cir⁺).

Mitotic stability is expressed as both the percentage of cell in a selected population containing the plasmid and percentage of plasmid lost per generation, when selection is removed. (A) Selective condition; (B) Nonselective condition. pYECR(●), pYCPADR(★), pYEC(■), pYER(☆), pYJ3(□) and YRp7(▲).

를 구한 후 각각 배양액과 최소 배양액에 옮겨 심어 배양하면서 시간에 따른 각 유전자 운반체의 소실율을 조사하였다. 형질전환된 각 개체의 trp⁻ 최소 배양액과 영양배양액에서의 doubling time은 각각 3시간 20분-4시간과 1시간 40분-1시간 50분으로 나타났다. SHY4에서 선별된 환경과 선별되지 않은 환경 하에서 조사한 안정도의 결과는 Fig. 8에 나타난 바와 같다. 선별을 위한 최소 배양액에서는 pYECR이 가장 높은 비율로 90% 이상이 플라스미드를 가지고 있었다. 영양배지에서는 pYCPADR과 pYECR, pYEC, pYER이 다른 유전자 운반체에 비해 낮은 소실율을 가진 것으로 나타났다. NNY1에서는 Fig. 9에 나타난 바와 같이 pYCPADR과 pYECR이 영양배지에서 가장 안정한 것으로 나타났다. 두 효모 균주에서의 결과를 정리 비교해보면 영양배양액에서는 trp⁻ 최소 배양액에 비해 한 세대가 지남에 따라 0.8-6% 정도로 플라스미드를 소실하였다. 또한 선별된 환경하에서 보통 75%-90% 정도의 효모세포가 플라스미드를 소유하고 있음을 알 수 있다. 특히 YRp7은 30% 정도에 불과하고 영양배양액 내에서의 소실을 또한 15% 이상을 나타내어 매우 불안정하다

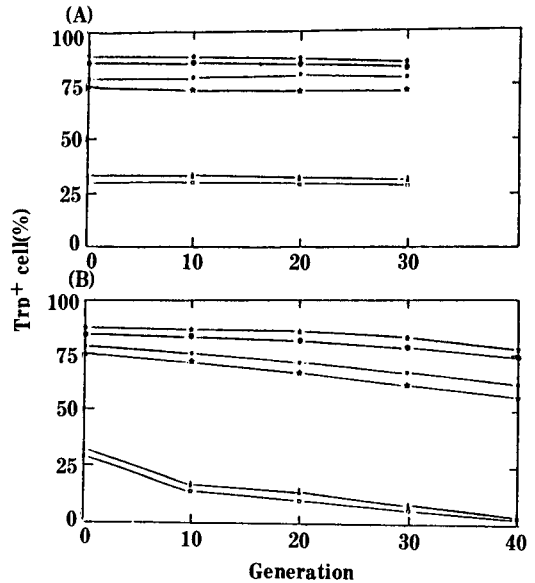


Fig. 9. Stability of constructed vectors in yeast strain NNY1 (cir⁰).

Mitotic stability is expressed as both the percentage of cells in a selected population containing the plasmid and percentage of plasmid lost per generation, when selection is removed. (A) Selective condition; (●), pYEC(■), pYER(☆), pYJ3(□) and YRp7(▲).

Table 3. Copy number of constructed vectors in yeast

Plasmid	Copies/cell	
	SHY4(cir ⁺)*	NNY1(cir ⁰)#
pYECR	2	1
pYER	22	20
pYEC	1	1
pYJ3	20	13
YRp7	20	17
pYCPADR	1	1

*; Yeast strain containing 2 μm plasmid.

#; Yeast strain containing no 2 μm plasmid.

고 할 수 있다. SHY4와 NNY1의 두 효모 균주에서 모두 pYCPADR과 pYECR이 다른 유전자 운반체보다 안정한 것으로 나타났다. 2 μm 플라스미드 복제 원점을 유전자 운반체내에 가지는 것이 2 μm 플라스미드를 균주내에 가지는 SHY4(cir⁺)에서 2 μm 플라스미드를 가지지 않은 NNY1(cir⁰)에서 보다 대체로 더 안정하다는 것을 알 수 있다.

플라스미드수

형질전환된 개체내의 플라스미드수는 전체 DNA를

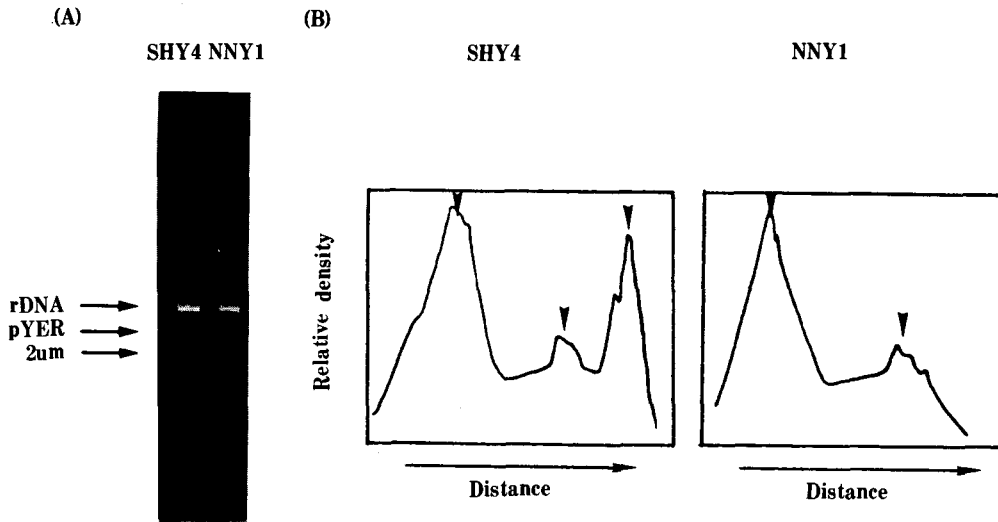


Fig. 10. Determination of copy number of pYER.

(A) Total DNA isolated from SHY4 and NNY1, which was digested with *Sma*I plus *Sal*I and fractionated by electrophoresis on a 0.8% agarose; (B) Relative densities of bands (Plasmid and rDNA) determined by scanning with microdensitometer.

분리하여 리보솜 DNA와 각 플라스미드의 상대적인 농도로 결정했다(Table 3, Fig. 10). 이 결과로부터 다음의 사항을 알 수 있다. 2 µm 복제원점을 가지는 pYJ3는 2 µm 플라스미드를 균주내에 가지는 SHY4(*cir*⁺)에서 가지지 않는 NNY1(*cir*⁰)보다 더 많이 존재한다. 2 µm 복제원점과 ARS1을 동시에 가지는 pYER은 SHY4(*cir*⁺)와 NNY1(*cir*⁰)에서 공히 높은 플라스미드수로 존재한다. CEN3을 가지는 pYCPADR, pYEC, pYECR은 균주내에서 언제나 하나의 수로 존재한다.

고 찰

이미 만들어져 연구되어 오고 있는 효모를 숙주세포로 하는 유전자 운반체로써 YRp, YEp, YCp 등등 여러가지 종류가 알려져 있다. YRp 유형의 운반체는 형질전환력이 높고 세포내에 비교적 많은 수로 복제되어 존재하는 등의 장점을 가지나 안정도가 매우 낮아 소실율이 높고 선별을 위한 최소 배지에서는 플라스미드를 가지는 비율이 30-50%에 불과하다. YRp 유형의 유전자 운반체는 형질전환력과 안정성이 높고 세포내에 많은 수로 존재하나 2 µm 플라스미드를 가지는 효모 균주에 형질전환시켰을 경우 균주가 가지고 있는 2 µm 플라스미드와의 재조합에 의해 chromatin 분석 등을 비롯한 균주내의 유전자 연구를 어렵게 한다. 이러한 문제점을 개선하고 기존 여러 유형의 유전자 운반체들의 장점을 최

대한 활용하기 위해 각 유전자 운반체를 특정 지우는 DNA 조각인 ARS1과 2 µm 복제원점과 CEN3 유전자의 조합과 표식유전자로서 TRP1 유전자를 가지는 pYJ3, pYECR, pYER, pYEC를 만들어 보았다.

만든 유전자 운반체들을 기존 유전자 운반체인 YRp7과 pYCPADR과 함께 플라스미드를 균주 내에 가지는 SHY4와 가지지 않는 NNY1에 각각 형질 전환시킨 결과 SHY4(*cir*⁺)에선 pYECR과 pYEC가 NNY1(*cir*⁰)에선 pYCPADR, YRp7, pYEC가 다른 유전자 운반체에 비해 형질전환력이 높은 것으로 나타났다. 크기가 가장 큰 pYECR과 pYCPADR이 SHY4와 NNY1에서 형질전환력이 제일 높고, 형질 전환시 lithium acetate가 중요한 역할을 한다는 사실을 미루어 단순한 세포막의 재구성 뿐만 아니라 H⁺ 이온에 의해 세포막을 경계로 하여 electrochemical potential의 차이에 의해 확실치는 않지만 DNA의 도입이 일어난다는 가설을 생각할 수도 있다.

안정도에 대한 조사에서는 pYCPADR은 선별을 위한 *trp*⁻ 최소 배지에서 85% 이상이 플라스미드를 소유하고 영양 배지에서의 소실율도 1% 미만인 것으로 나타나 매우 안정함을 알 수 있다. pYECR은 최소 배지에서는 90% 이상이 *trp*⁺형 세포인 것으로 나타나 조사한 유전자 운반체중 제일 높았고 영양 배지에서도 pYCPADR 보다는 약간 떨어지나 비교적 안정하다는 것을 알 수 있다. pYER, pYEC도

YE_p 유형의 일종으로 본 연구에서 만든 pYJ3와 YRp 유형인 YRp7보다 안정한 것으로 나타났다. 위의 결과로부터 ARS1과 CEN3를 조합하여 pYCPADR과 2 μm 복제원점을 가지는 DNA 조각에 CEN3를 더해 만든 pYEC가 유사 분열시 복제된 DNA의 분리가 불안정한 YRp7보다 안정한 것으로 보아 CEN3가 염색체의 적절한 분리를 조절하는데 중요한 역할을 하여 유전자 운반체로 하여금 하나의 작은 염색체와 같은 구실을 하게끔 한다는 사실을 알 수 있다. 두 종류의 복제원점인 ARS1과 2 μm 복제원점을 가지는 pYER이 각각 한종류씩만 가지는 pYJ3와 YRp7보다 안정함을 미루어 복제원점을 여러 개 가짐으로써 보다 더 원활한 복제가 일어나 안정성이 증가되는 효과가 생기는 것을 짐작할 수 있다. ARS1, CEN3, 2 μm 복제원점을 모두 소유하는 pYECR이 다른 4가지 유전자 운반체 보다는 안정하기는 하나 pYCPADR 보다는 덜 안정한 것으로 보아 각 특정 DNA 조각이 더해짐으로써 안정도가 상대적으로 증가되나 크기의 증가와 유사한 염기배열의 증가로 인한 재조합의 가능성 또한 증가되어 안정도에 영향을 줄 수 있다.

플라스미드수에 대한 조사에서는 CEN3를 가지는 pYCPADR, pYEC, pYECR은 세포당 하나의 플라스미드수로 존재함을 알 수 있다. 안정도 결과에서도 알았듯이 CEN(centromere)에 의해 적절한 분리가 일어났다고 설명 가능하다(11). 그러나 본 연구에서 재조합된 pYEC와 pYECR은 매우 활발한 복제기작을 가지는 2 μm 복제 원점을 소유하므로 위의 이론으로는 설명할 수 없다. 가능한 기작으로는 centromere가 후기, 즉 딸 염색사가 분리될 때까지 복제를 방해한다고 제시할 수 있다(12). 균주내에 2 μm 플라스미드 유무에 따른 유전자 운반체의 안정도와 수에의 영향을 고려해 볼 때 SHY4(cir⁺)에서 2 μm 복제원점을 가지는 유전자 운반체들의 안정도가 NNY1(cir^o)보다 높은 것으로 보아 균주내에 존재하는 DNA 플라스미드에서 만들어진 산물 등이 유전자 운반체 내의 2 μm 복제원점의 기능을 보다 원활히 수행하게끔 함을 추정할 수 있다.

이 연구결과로 2 μm 복제원점과 ARS1를 동시에 가지는 pYER은 대장균내에서 힘든 고등생물의 유전자 연구와 외래 유전자의 보다 많은 발현을 위한 효모 유전자 운반체로 사용 가능하리라 생각된다.

요 약

효모 유전자 운반체의 유형을 특징지우는 ARS1

(autonomous replicating sequence), CEN3 (centromere), 2 μm OR(yeast plasmid의 origin of replication)의 DNA 절편을 재조합하여 만든 유전자 운반체들의 형질전환력, 안정도 및 운반체 수를 효모 균주 SHY4(cir⁺)와 NNY1(cir^o)에서 비교 조사하였다. CEN3를 갖는 유전자 운반체는 매우 안정하나 세포당 수가 하나로 매우 낮으며 2 μm OR과 ARS1을 동시에 갖는 유전자 운반체는 안정할 뿐만 아니라 세포당 수도 높으며 균주내에 존재하는 2 μm 플라스미드는 2 μm OR을 가지는 유전자 운반체의 복제에 영향을 준다는 사실을 알 수 있었다.

사 사

본 연구는 문교부 학술연구조성비로 수행되었으며 본 연구에 많은 도움을 주신 과기원 유전공학센터 고영희 박사님께 감사드립니다.

참고문헌

1. Broach, J.R.: *Cell*, **28**, 203 (1982).
2. Struhl, K., D.T. Stinchomb, S. Scherer, and R.W. Davis: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**, 1035 (1979).
3. Clarke, L., and J. Carbon: *Nature*, **287**, 504 (1980).
4. Birnboim, H.C., and J. Doly: *Nucleic Acids Res.*, **7**, 1513 (1979).
5. Devenish, R.J., and C.S. Newlon: *Gene*, **18**, 277 (1982).
6. Kushmer, S.R.: *Genetic engineering*, (Boyer, H.W., S. Nicosia, ed.) Elsevier, Amsterdam, Vol. 2, 151 (1987).
7. Ito, H., Y. Fukuda, K. Murata, and A. Krimura: *J. Bacteriol.*, **153**, 163 (1983).
8. Struhl, K.: *Nature*, **305**, 391 (1983).
9. Broach, J.R.: *Methods in Enzymology*, (Ray Wu, Kivie M., ed.) Academic Press, London, Vol. 101, 307 (1983).
10. Kim, S.H., Y.S. Kim, M.Y. Choi, and H.M. Rho: *Kor. J. Zoology*, **28**, 166 (1985).
11. Ray Ng, J. Carbon: *Yeast Cell Biology*, (Hicks, J., ed.) Alan R. Liss, Inc., New York, Vol. 33, 225 (1986).
12. Gary Tschumper, and J. Carbon: *Gene*, **18**, 277 (1982).

(Received October 11, 1988)