

의학 석사학위 논문

이중 *loxP* 간 재조합  
반응 산물에서의  
spacer 부위 염기 서열 분석

아주대학교 대학원

의학과

손종남

이중 *loxP* 간 재조합  
반응 산물에서의  
spacer 부위 염기 서열 분석

지도교수 권 명 희

이 논문을 의학 석사학위 논문으로 제출함.

2006년 8월

아 주 대 학 교 대 학 원

의 학 과

손 중 남

손종남의 의학 석사학위 논문을  
인준함.

심사위원장      권명희인

심사위원      박선인

심사위원      이광인

아주대학교대학원

2006년 6월 22일

## 이중 *loxP* 간 재조합 반응 산물에서의 spacer 부위 염기 서열 분석

**목적 :** 부위특이적 재조합 (site-specific recombination) 방법의 하나인 Cre-*loxP* 시스템에서, mutant *loxP* 간의 재조합 반응 시 spacer region 염기 서열을 분석한다. 또한 heterologous (mutant) *loxP* 간의 반응 시 spacer region의 염기 서열 분석을 통하여 Cre 매개 재조합 메커니즘의 이해를 넓힌다.

**재료 및 방법 :** 두 *lox* site 사이의 Cre 매개 재조합 반응으로 나타나는 spacer region의 염기 서열 분석을 위하여 새로운 벡터 pFGB를 제작하였다. 2272, M2, M3, M7, M11으로 총 25개의 pFGB-*lox1/lox2* 조합을 구성했다. Cre를 발현하는 BS1365 박테리아 내로 이 plasmid들을 형질전환하고 37°C에서 하룻밤 배양한 후, BS1365로부터 plasmid DNA를 분리하였다. 분리된 DNA를 JM109 박테리아에 형질전환하고 ampicillin, X-gal, IPTG를 포함하는 LB agar plate에 도말하여 배양하였다. 그 중 청색 콜로니만 선별하여 염기 서열 분석을 통해 *lox* site의 spacer region 염기 서열을 확인했다.

**결과 :** pFGB 벡터 내로 2272, M2, M3, M7, M11을 클로닝 하여 25개 pFGB-*lox1/lox2*를 얻었다. Cre를 발현하는 박테리아 BS1365를 이용하여 생긴 재조합 산물의 염기 서열을 각각 10개씩 확인하였다. 염기 서열을 확인한 재조합 산물 중 우리가 예측하지 않았던 특이한 재조합물 (aberrant recombinant)을 선별하였다.

**결론 :** 총 25개의 mutant/mutant 조합 (2272, M2, M3, M7, M11)으로 heterologous *loxP* 간 재조합 산물의 'spacer region' 염기 서열을 분석하였다.

분석 결과, 재조합 메커니즘에 의해 예측되어지는 재조합 산물 외에 자기 *lox* site의 spacer region 옆기 서열을 보이는 재조합 산물이 관찰되어졌다. 이 재조합 산물의 발생 원인에 대한 메커니즘 연구가 필요하며, 재조합 산물 중 TGATACCA, AGATACCT, AGATACCC의 결과는 돌연변이 (mutation)으로 추정한다.

---

핵심되는 말 : Cre-*lox* 재조합, Cre 재조합 효소, *lox* 사이트, heterologous *loxP*, 비정상적 재조합물 (aberrant recombinant)

# 차 례

국문요약 .....	i
차례 .....	iii
그림 차례 .....	iv
표 차례 .....	v
I. 서론 .....	1
II. 연구 방법 .....	9
A. 분자 내 재조합 염기 서열 확인을 위한 벡터 제작 .....	9
1. $\beta$ -galactosidase 유전자 클로닝 .....	9
2. <i>Lax</i> sequence 클로닝 .....	9
B. Cre 발현하는 박테리아를 이용한 <i>in vivo</i> 재조합 .....	13
C. 재조합 산물 확인 .....	13
D. 재조합된 <i>lax</i> site의 spacer region 염기 서열 확인 .....	14
III. 결과 .....	15
A. 분자 내 재조합 염기 서열 확인을 위한 벡터 클로닝 .....	15
B. Cre를 발현하는 박테리아 내에서의 재조합 확인 및 염기 서열 분석 ...	16
IV. 고찰 .....	27
V. 결론 .....	29
참고문헌 .....	30
ABSTRACT .....	36

## 그림 차례

<b>Fig. 1.</b> wild-type <i>loxP</i> site. ....	5
<b>Fig. 2.</b> <i>Physical consequences of recombination.</i> ....	6
<b>Fig. 3.</b> The branch migration model for integrase family site-specific recombination. ....	7
<b>Fig. 4.</b> <i>LoxP</i> sequences. ....	11
<b>Fig. 5.</b> Construction of the pFGB vector. ....	12
<b>Fig. 6.</b> Schematic diagram representing the plasmid structure and its recombinant products. ....	19
<b>Fig. 7.</b> Sequence of spacer region by Holliday junction intermediate. ...	21

## 표 차 례

**Table 1.** *PCR primers for the construction of plasmid vectors* ..... 10

**Table 2.** *Sequence of spacer region observed in the recombined  
plasmids.* ..... 20



## I. 서론

Cre-*lox* 재조합 (Cre-*lox* recombination)은 부위특이적 재조합 (site-specific recombination)의 하나로, Cre 재조합 효소 (Cre recombinase)가 *lox* site에 결합하여 다양한 재조합 산물을 생성한다 (Sternberg 등, 1981). Cre 재조합 효소는 bacteriophage *P1* 유래의 38.5 kDa의 단백질로서 (Austin 등, 1981; Hoess 등, 1982; Craig 등, 1988) bacteriophage  $\lambda$  유래의 Int (Landy, 1989)와 *Saccharomyces cerevisiae* 유래의 FLP (Babineau 등, 1985)와 동일한 integrase family에 속하는 효소이다. Cre 재조합 효소는 재조합 반응에 있어 에너지 및 보조 인자를 필요로 하지 않다는 장점 때문에 지금까지 *in vitro* 및 *in vivo* 즉, 박테리아, 식물 및 동물세포에서 유전자 조작과 발현 조절에 널리 이용되어왔다 (Hoess 등, 1990; Sauer 등, 1987; Sauer 등, 1988; Sauer 등, 1989; Sauer 등, 1990).

*Lox* site는 34 bp의 DNA 단편으로 이루어져 있으며, 양끝에 두개의 13 bp 'inverted repeat'와 중간에 8 bp 'spacer region'으로 구성되어 있다. 13 bp 'inverted repeat'는 Cre 재조합 효소가 인식, 결합하는 부위이고, 8 bp 'spacer region'은 재조합 반응 동안 DNA 가닥 교환 (strand exchange)이 일어나는 부위로서 *lox* site의 방향성을 결정한다 (Hoess 등, 1982; Fig. 1.). Cre에 의한 두 *lox* site 간의 재조합은 *lox* site의 방향에 따라서 반응이 각각 다르게 나타난다. 즉 단일 DNA 상의 두 *lox* site가 같은 방향으로 위치할 때는 DNA 결실 (deletion)이, 서로 반대 방향으로 위치할 때는 역위 (inversion)가 일어난다. 한편, *lox* site가 다른 DNA 분자상에 하나씩 존재할 때는 삽입 (insertion)이 일어난다 (Daniel 등, 1999; Stephen 등, 2002; Fig. 2.).

Cre 재조합 효소에 의한 *lox* site 간 재조합 반응은 크게 절단 (cleavage), 교환 (exchange), 재접합 (religation)의 3 단계로 이루어진다. 먼저 두 *lox* site는 각각 2개씩 4개의 Cre 재조합 효소의 결합을 통해 (*lox* site)<sub>2</sub>-(Cre)<sub>4</sub> 재조합 시냅시스 (recombination synapsis)를 형성한다. 시냅시스를 형성한 4개의 Cre 재조합 효소 중 2개는 324번째 아미노산 잔기의 친염기성 (nucleophile) 타이로신 곁사슬 (tyrosine side chain)을 이용해 각각 *lox* site의 top strand A1과 T2 (또는 bottom strand C7과 G8) 사이의 염기를 절단한다. Cre 재조합 효소의 타이로신 곁사슬과 DNA 절단 3'-말단은 3'-phosphotyrosine linkage 공유결합을 형성하고, DNA 절단 5'-말단은 5'-hydroxyl group으로 남는다. 5'-hydroxyl group은 DNA 가닥 회복을 위해 절단부위 (nick)를 다시 붙일 수 있는데 topoisomerase-I 유형의 절단 (cleavage), 재접합 (religation) 과정을 통해 처음 DNA 가닥이 회복된다. 또한 5'-hydroxyl group은 상대 3'-phosphotyrosine linkage와 결합하여 한 쌍의 DNA 가닥 교환의 HJ 중간체 (Holliday junction intermediate)를 형성한다. 그리고 DNA는 2번에서 7번까지의 crossover region 염기를 통해 가닥 이동 (branch migration)이 이루어지고, 다음 HJ 중간체는 두 번째 bottom strand C7과 G8 (또는 top strand A1과 T2)의 절단, 결합을 통해 DNA 가닥 교환의 최종 재조합 산물을 형성하게 된다 (Craig, 1988; Fig. 3.). 또한 Cre 재조합 효소는 재조합 사이트 사이의 crossover region 염기 서열에 따라 반응 효율이 달라질 수 있다. 가닥 이동이 일어나는 이 crossover region의 염기 상동성은 HJ 중간체 형성에 큰 영향을 미친다. 만일 염기 서열의 일치 정도가 낮다면 에너지 장벽에 의해 가역 반응의 유도가 저해되고, 그로 인해 HJ 중간체 형성이 낮아지며 전체 재조합 효율이 낮아진다. 이뿐 아니라 서로 일치하지 않는 염기 서열이 어느 위치인지에 따라 재조합 효율이 큰 차이를 보인다고 한다 (Weisberg 등, 1983;

Stark 등, 1989; Nunes-Duby, 1995).

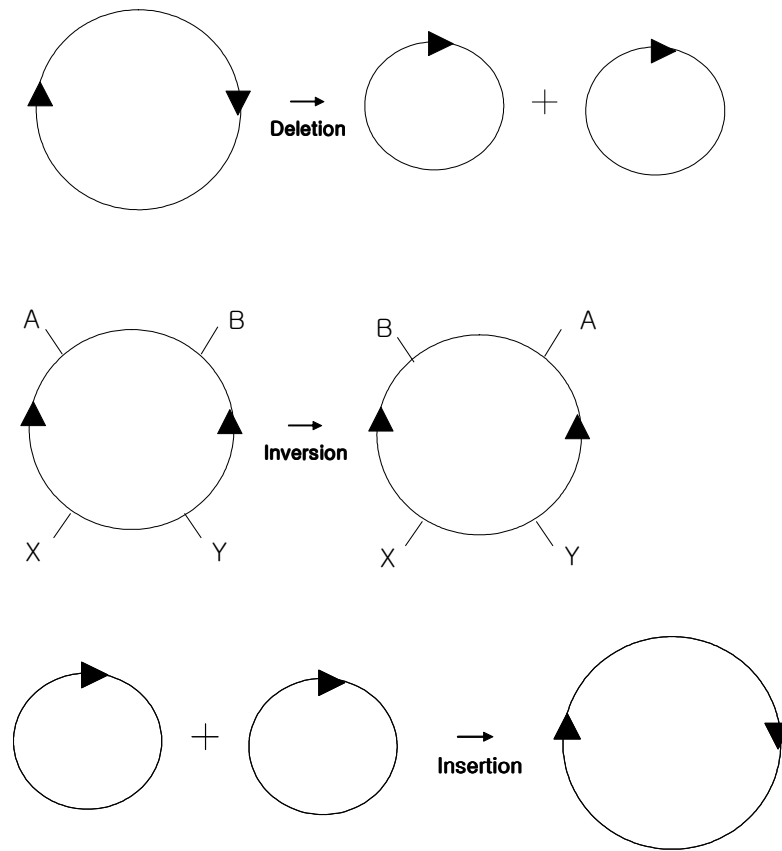
Cre-*lox* 시스템은 재조합 효율의 증대와 응용 범위의 확대를 목적으로 *lox* site에 대한 연구가 이루어져 왔는데 크게 두 가지 방법으로 수행되어졌다. 첫째, 13 bp ‘inverted repeat’의 염기서열 변형으로, 13 bp ‘inverted repeat’ 중 left element (LE) 부위의 염기를 치환한 *lox71*과 right element (RE) 부위의 염기를 치환한 *lox66*이 그 예이다 (Albert 등, 1995). *lox71*과 *lox66*은 서로 상보적 회문 구조 (complementary palindromic structure)를 가지는 mutant *lox* site로서, *lox66*과 *lox71* 사이에 재조합이 일어나면, 정상적인 13 bp ‘inverted repeat’를 갖는 wild-type *lox* site와 동시에 LE 및 RE 모두 변형된 (double mutant arm) *lox* site가 생성된다 (Bethke B 등, 1997). Cre 재조합 효소는 더 이상 double mutant arm을 인식할 수 없어서 재조합 반응이 비가역적이 되므로, 특정 염색체 위치에 안정적인 유전자 삽입을 위해 사용된 바 있다 (Bethke B 등, 1997).

둘째, *lox* site의 방향성과 특이성을 결정하는 8 bp ‘spacer region’ 내의 염기 서열의 치환으로, 다른 두 DNA 분자에 존재하는 유전자의 효율적인 상호 교환, 즉 분자간 재조합 (intermolecular recombination) 효율을 높이기 위한 연구이다. 재조합 효소에 의한 분자간 유전자 교환을 RMCE (Recombinase Mediated Cassette Exchange)라고 한다. Cre에 의한 RMCE 원리는 서로 재조합 반응이 일어나지 않는 *lox* site 한 쌍을 각기 다른 DNA 분자에 위치시키고 Cre 효소를 첨가 또는 (*in vitro*) 발현시키면 (*in vivo*) 각 DNA 분자의 *lox* site 사이에 있는 유전자가 서로 교환되는 것이다. 지금까지 Cre에 의한 RMCE 효율을 높이기 위하여 많은 ‘spacer region’ 돌연변이 형태의 *lox* site들이 보고되어 왔다. ‘Spacer region’이 변형된 *lox* site의 예로는 *lox2272*, M2, M3, M7, M11 등이 있으며, 이들은 모두 wild-type *loxP*와 재조합 반응이 거의 일어나지 않는 반면, 자기 자신

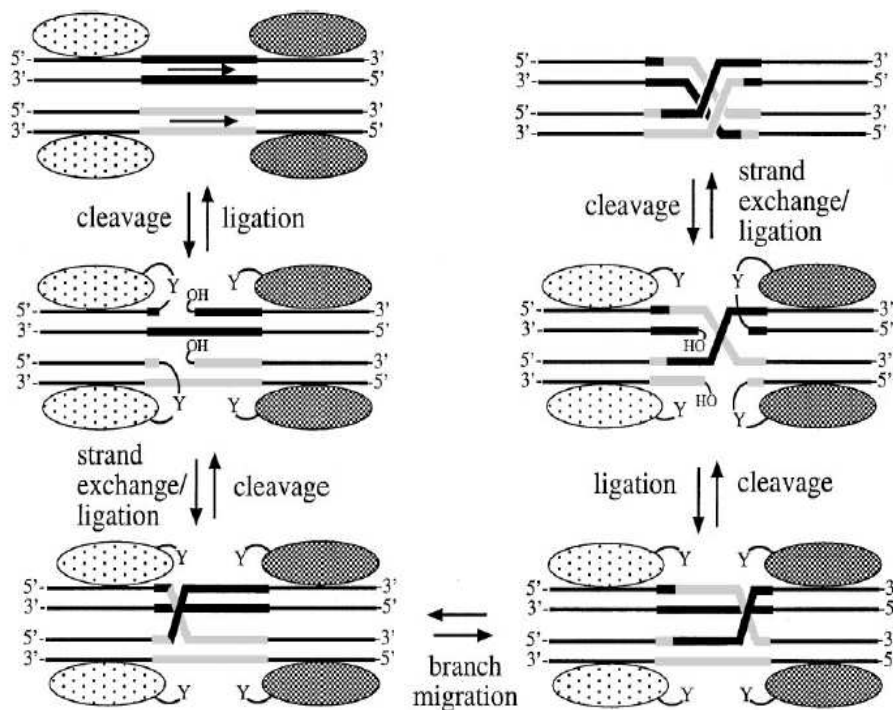
의 mutant *loxP*와는 높은 재조합 반응 효율을 나타내는 것으로 알려져 있다 (Hoess 등, 1986; Guo 등, 1997). Wild-type *loxP* WT (ATGTATGC)와 ‘spacer region’의 염기 하나가 바뀐 mutant *loxP* 511 (ATGTATAC)의 경우에 있어서는 511/511 간은 재조합 효율이 100%인 반면, 511/WT 간 효율은 0%-10% 보고되었으며 (Robert 등, 2001), 실제로 511을 이용한 RMCE가 조합성 파아지 항체 라이브러리 (combinatorial phage antibody library)의 제작에 사용된 예가 있다 (Hoess 등, 1986; Griffiths 등, 1994; Sblattero와 Bradbury, 2000).

지금까지 ‘spacer region’ 돌연변이 형태의 *lox* site (*lox*2272, M2, M3, M7, M11 등)들에 관한 연구는 wild-type *loxP*와 ‘spacer region’ 돌연변이 mutant *loxP* 사이의 (heterologous *loxP*) 재조합 산물 생성 정도에 기초한 재조합 효율에만 초점이 맞추어져 왔고, 아직 heterologous *loxP* 간의 재조합 산물에서의 ‘spacer region’의 염기 서열 분석은 보고된 것은 없다. 따라서 본 연구에서는 heterologous *loxP* 간의 재조합 산물에서의 ‘spacer region’의 염기 서열을 분석하고자 하였으며, 두 wild-type *loxP* 간의 재조합 연구를 통해 제시되어온 기존의 메카니즘이 ‘spacer region’이 서로 다른 heterologous *loxP* 간의 재조합 경우에도 적용되는지 알아보려고 하였다. 그리고 더 나아가 재조합 염기 서열 분석을 통한 재조합 메카니즘의 이해도 그 목적을 두었다.





**Fig. 2. Physical consequences of recombination.** Recombination sites are shown as arrows whose direction indicates the orientation of the recombination site. Recombination of a substrate circle containing directly repeated sites results in the formation of two product circles; this reaction is variously called resolution, deletion, or excision. Recombination of a substrate circle containing inverted sites results in the inversion of the DNA segment between the sites. Recombination results in the fusion (or insertion) of two substrate DNA circles to form a single product circle.



**Fig. 3. The branch migration model for integrase family site-specific recombination.** Two recombinase-bound sites associate to form a recombination synapse (top left). Two subunits cleave the DNA substrates with conserved tyrosine side chains to form 3'-phosphotyrosine linkages and release free 5'-hydroxyl groups (middle left). The 5'-hydroxyl groups undergo intermolecular attack of the partner phosphotyrosine to complete the exchange of one pair of DNA strands between the two substrates and form a Holliday junction intermediated (lower left). The branch point of the junction starts at the site of initial strand exchange and then migrates through the crossover region to the second set of cleavage sites. The second pair of subunits is then activated and/or positioned for cleavage of the bottom substrate strands, which are exchanged to form recombinant products. Heterology between crossover sequences would block efficient branch migration and prevent the

reaction from proceeding to the second strand exchange. For simplicity, the DNA sites are shown associating in a *parallel* orientation in this figure. The same mechanism can also be described with an *antiparallel* alignment of sites (Craig, 1988).

## II. 연구 방법



## A. 분자 내 재조합 염기 서열 확인을 위한 벡터 제작

### 1. $\beta$ -galactosidase 유전자 클로닝

본 실험에서 사용한 벡터 pFGB는 기존에 확보하고 있는 벡터인 pRGA, pRGB를 변형시켜 제작하였다. pRGA를 주형으로 하여  $\beta$ -galactosidase 유전자 일부 (6번째-56번째)를 PCR로 증폭하였다. PCR에 사용한 5' primer는 *SpeI* site가 포함되도록 디자인하였고 3' primer는 *MluI* site가 포함되도록 설계하였다. PCR 산물 (200 bp)을 *SpeI*과 *MluI*으로 처리한 후, 동일 제한효소로 처리한 pRGB (5.1 kb)에 ligation하였다 (Table 1.).

*Lox* site간에 재조합이 일어날 경우 *lac* promoter의 부분과 *lox* site를 사이에 두고 떨어져있던  $\beta$ -galactosidase의 구조유전자의 결합으로 인해  $\beta$ -galactosidase가 활성을 갖게 된다.  $\beta$ -galactosidase 유전자의 reading frame을 맞추기 위하여 *SpeI*의 upstream에 염기 두 개 (CC)를 첨가하였다 (Table 1.).

### 2. *Lox* sequence 클로닝

$\beta$ -galactosidase 유전자가 클로닝된 pFGB 벡터의 두 *lox* site에 각각의 mutant *loxP*들을 클로닝하였다 (Fig. 4.).

Table 1. PCR primers for the construction of plasmid vectors

NAME	SEQUENCE
Gal3'F	G ACTAGT AATTCACTGGCCGTCGTTTTAC <i>SpeI</i>
Gal3'R	GC ACGCGT TTATCTCCATTCGCCATTC <i>MluI</i>
NheI-2272F	CTA GCTAGC ATAACTTCGTATA <u>AGGTATCCT</u> TATACGAAGTTATCTG <i>NheI</i>
NheI-M2F	CTA GCTAGC ATAACTTCGTATA <u>AGAAACCAT</u> TATACGAAGTTATCTG <i>NheI</i>
NheI-M3F	CTA GCTAGC ATAACTTCGTATATA <u>AATACCAT</u> TATACGAAGTTATCTG <i>NheI</i>
NheI-M7F	CTA GCTAGC ATAACTTCGTATA <u>AGATAGAAT</u> TATACGAAGTTATCTG <i>NheI</i>
NheI-M11F	CTA GCTAGC ATAACTTCGTATAC <u>GATACCA</u> TATACGAAGTTATCTG <i>NheI</i>
NotI-DV <sub>1</sub> R	GAGTCATTCTCGACTT GCGGCCGC TTTTATTTCCAGCTTGG <i>NotI</i>
SpeI-2272R	G ACTAGT <u>CCATAACTTCGTATAGGATACCT</u> TATACGAAGTTATAGT <i>SpeI</i>
SpeI-M2R	G ACTAGT <u>CCATAACTTCGTATATGGTTTCT</u> TATACGAAGTTATAGT <i>SpeI</i>
SpeI-M3R	G ACTAGT <u>CCATAACTTCGTATATGGTATTAT</u> TATACGAAGTTATAGT <i>SpeI</i>
SpeI-M7R	G ACTAGT <u>CCATAACTTCGTATATTCTATCT</u> TATACGAAGTTATAGT <i>SpeI</i>
SpeI-M11R	G ACTAGT <u>CCATAACTTCGTATATGGTATCGT</u> TATACGAAGTTATAGT <i>SpeI</i>
NdeI-EtagF	GGAATTC CATATG AATTTTCTATTGATTGT <i>NdeI</i>

13 bp inverted repeat
8 bp spacer
13 bp inverted repeat

12345678

**WT**        ATAACTTCGTATA ATGTATGC TATACGAAGTTAT

**2272**       ATAACTTCGTATA AGGTATCC TATACGAAGTTAT

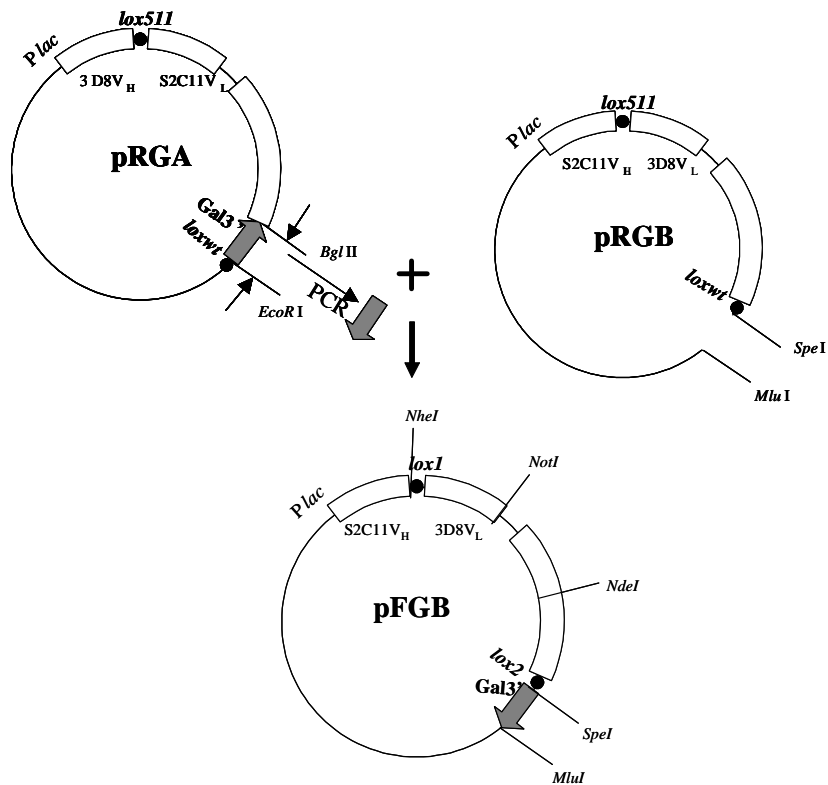
**M2**        ATAACTTCGTATA AGAAACCA TATACGAAGTTAT

**M3**        ATAACTTCGTATA TAATACCA TATACGAAGTTAT

**M7**        ATAACTTCGTATA AGATAGAA TATACGAAGTTAT

**M11**       ATAACTTCGTATA CGATACCA TATACGAAGTTAT

**Fig. 4. *LoxP* sequences.** The *loxP* site contains two 13 bp inverted repeats flanking an asymmetric 8 bp spacer region that gives the *loxP* site an apparent directionality. The 13 bp inverted repeats are underlined with the 8 bp asymmetric spacer region numbered.



**Fig. 5. Construction of the pFGB vector.** The pFGB vector was constructed by introducing the Gal3' structural gene amplified from pRGA into the 3' end of *lox wt* of pRGB. *Lac* promoter and Gal3' structural gene are connected by recombination between *lox* sites, and this event results in the expression of  $\beta$ -galactosidase. Activity of  $\beta$ -galactosidase was detected by appearance blue colony after X-gal staining.

*Lox1*의 위치에 2272, M2, M3, M7, M11을 클로닝하였다. 이때 사용한 5' primer는 *NheI* site와 각각의 mutant *loxP*를 포함하도록 디자인하였고 3' primer는 *NotI* site를 포함하도록 디자인 하였다. PCR 후, PCR 산물 (400 bp)을 *NheI*과 *NotI*로 처리하고 pFGB에 ligation 함으로써 pFGB-*lox1/lox2*을 제작하였다. 또한 *lox2*도 *SpeI*과 *NdeI* site를 갖는 primer를 이용하여 각 mutant *loxP*들 (2272, M2, M3, M7, M11)을 증폭하여 클로닝함으로써 pFGB-*lox1/lox2*를 완성하였다 (Fig. 5.).

## B. Cre 발현하는 박테리아를 이용한 *in vivo* 재조합

Mutant *loxP*간의 재조합 반응을 위해 Cre 재조합 효소를 발현하는 박테리아 (BS1365)를 사용하였다. Mutant *loxP*를 포함하고 있는 pFGB-*lox1/lox2* 벡터를 BS1365로 형질전환하였다. Competent cell (BS1365)을 얼음에서 5분간 녹인 후, 20 ng의 pFGB-*lox1/lox2*을 넣고 얼음에서 1시간 동안 정치하였다. 항온수조 (37°C)에서 90초간 처리한 후 (heat shock), 4°C에서 1-2분간 정치한 뒤 37°C 배양기에서 250 rpm, 20-30분간 배양하였다. 형질전환 된 박테리아를 kanamycin (50 µg/ml)과 ampicillin (100 µg/ml)이 포함된 LB 배지에 도말 후, 37°C에서 하룻밤 배양함으로써 이 동안에 재조합이 일어나도록 하였다.

## C. 재조합 산물 확인

BS1365 콜로니를 액체 배지에서 배양한 후, plasmid DNA prep kit (LaboPass<sup>TM</sup> Mini prep kit)을 이용하여 분리하여, α-complementation이 가능한

JM109 박테리아에 형질전환 하였다. 형질전환 된 박테리아를 *nitrocellulose* membrane이 덮혀진 SOBAG 배지에 도말 후, 37°C에서 하룻밤 배양하였다. 콜로니가 자란 membrane을 X-gal (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), IPTG (1 mM)와 ampicillin (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )을 포함하는 LB 평판 배지로 옮겨 실온에서 배양하면서 콜로니 색을 관찰하였다. 그리고 재조합 산물을 나타내는 청색 콜로니를 액체 배지에 다시 배양하여 plasmid DNA를 분리하였다.

#### D. 재조합된 *lox* site의 spacer region 염기 서열 확인

각각 10개씩 청색 콜로니만 선별하여 분리된 plasmid DNA를 벡터 내 upstream의 *g3p leader* 부분의 S1 primer를 이용해 재조합 *lox* site의 spacer region 염기 서열을 확인하였다.

### III. 결 과

#### A. 분자 내 재조합 염기 서열 확인을 위한 벡터 클로닝

완성된 pFGB 벡터는 S2C11 V<sub>H</sub> gene (SV<sub>H</sub>)과 3D8 V<sub>L</sub> gene (DV<sub>L</sub>) 사이에 *lox1*이 있고 3D8 V<sub>L</sub> gene의 downstream에는 g3p와 E-tag을 클로닝하는 유전자가 순서대로 위치해 있다. E-tag과  $\beta$ -galactosidase 유전자의 사이에 *lox2*가 위치하고 있다. 또한 V<sub>H</sub> gene의 upstream에는 *lac promoter*가 있는데  $\beta$ -galactosidase는 5번째와 6번째 아미노산이 떨어져 있어도(약 400 bp) 활성이 유지되는 특징이 있으므로  $\beta$ -galactosidase 유전자의 1번째 아미노산부터 5번째 아미노산까지 포함되도록 하였다.

pFGB 벡터는 두 *lox* site 사이에 재조합이 일어날 경우, SV<sub>H</sub> gene, *lox1*, DV<sub>L</sub> gene, g3p 그리고 *lox2*를 사이에 두고 떨어져 있던  $\beta$ -galactosidase 유전자의 5번째와 6번째 아미노산의 거리가 약 400 bp로 가까워진다. 이때 5번째와 6번째 아미노산 사이에는 SV<sub>H</sub> gene (~400 bp)이 존재하지만  $\beta$ -galactosidase 유전자의 특징에 의해  $\beta$ -galactosidase 유전자의 활성화는 유지된다. 따라서 재조합이 일어날 경우에는 X-gal 염색에 의해서 청색 콜로니가 나타나게 된다.

완성된 pFGB 벡터에 5개의 mutant *loxP*들, 즉 2272, M2, M3, M7, M11을 각각 *lox1* site와 *lox2* site에 클로닝함으로써 총 25개 조합의 pFGB-*lox1/lox2* 벡터를 완성하였다 (Fig. 5.).

## B. Cre를 발현하는 박테리아 내에서의 재조합 확인 및 염기 서열 분석

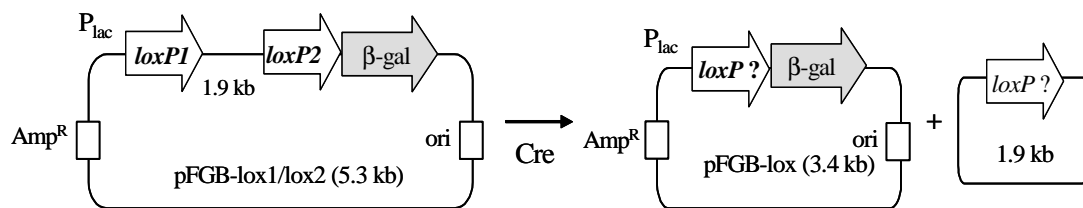
총 25개 heterologous *loxP* (mutant/mutant) 조합의 pFGB-*lox1/lox2* 벡터를 이용하여 Cre 발현 박테리아에서 분자 내 재조합 반응을 일으켰다. 그리고 X-gal 염색에 의해 재조합 여부를 나타내는 청색 콜로니의 plasmid DNA를 분리하여 *lox* site의 spacer region 염기 서열을 확인하였다. 이 벡터 시스템에 의해 생성되는 재조합물은 5.3 kb의 pFGB-*lox1/lox2*에서 분리된 1.9 kb의 DNA와 3.4 kb DNA로 두 산물이다. 이 중  $\beta$ -galactosidase 유전자가 포함된 3.4 kb 재조합 산물이 청색 콜로니를 나타내고 그 콜로니에서 분리된 plasmid DNA의 염기 서열을 분석하였다 (Fig. 6).

Heterologous *loxP* 조합으로 재조합 양상을 ‘spacer region’ 염기 서열로 확인하였다. 기존에 알려진 Holliday 모델 메커니즘에 의해 생성되어지는 재조합물들의 경우를 관찰하였고 (각 *lox* site의 1번 또는 8번 위치의 염기가 바뀐 4가지 종류의 재조합물과, 간혹 원래 두 *lox* site의 염기 서열로 ‘spacer region’이 형성됨), 그리고 기존 메커니즘으로는 설명이 안 되지만 모든 조합에서 일관성이 나타나는 자기 염기 서열의 ‘spacer region’ 재조합물과, 그 외 돌연변이 (mutation)이라고 밖에 설명할 수 없는 몇 가지 특이한 ‘spacer region’ 재조합물을 관찰하였다. M2/2272는 재조합 반응에 의해 40%의 AGGTATCC (2272 자체), 30%의 AGAAACCA (M2 자체), 30%의 AGAAACCC (Fig. 7에서 ①로 표시) 재조합 산물을 관찰하였다. 2272/M2는 90% AGAAACCA (M2 자체), 10% AGGTATCA (Fig. 7에서 ④로 표시)을 관찰하였다. M3/2272는 30% AGGTATCC (2272 자체), 10% TGGTATCC (Fig. 7에서 ②로 표시), 60% TAATACCC (Fig. 7에서 ①로 표시), 2272/M3는 90% TAATACCA (M3 자체),



10% AGGTATCA (Fig. 7에서 ④로 표시)을 관찰하였다. M7/2272는 60% AGGTATCC (2272 자체), 20% AAGATAGAA (M7 자체), 10% AGATACCT (Fig. 7에서 ?로 표시), 10% AGATACCC (Fig. 7에서 ?로 표시), 2272/M7은 100% AGATAGAA (M7 자체)을 관찰하였다. M11/2272는 80% AGGTATCC (2272 자체), 10% CGATACCA (M11 자체), 10% CGATACCC (Fig. 7에서 ①로 표시), 2272/M11은 10% AGGTATCC (2272 자체), 20% AGGTATCA (Fig. 7에서 ④로 표시), 70% CGATACCA (M11 자체)을 관찰하였다. M3/M2는 40% TAATACCA (M3 자체), 10% TGATACCA (Fig. 7에서 ?로 표시), 50% TGAAACCA (Fig. 7에서 ②로 표시), M2/M3은 90% AGAAACCA (M2 자체), 10% AAATACCA (Fig. 7에서 ③로 표시)을 관찰하였다. M7/M2는 100% AGAAACCA (M2 자체), M2/M7은 100% AGATAGAA (M7 자체)을 관찰하였다. M11/M2는 70% CGATACCA (M11 자체), 30% CGAAACCA (Fig. 7에서 ②로 표시), M2/M11은 90% AGAAACCA (M2 자체), 10% AGATACCA (Fig. 7에서 ③로 표시)을 관찰하였다. M7/M3와 M3/M7은 전혀 재조합물이 관찰되지 않았다. M11/M3은 100% CGATACCA (M11 자체), M3/M11은 40% TAATACCA (M3 자체), 60% TGATACCA (Fig. 7에서 ③로 표시)을 관찰하였다. M11/M7은 100% CGATAGAA (Fig. 7에서 ②로 표시), M7/M11은 80% CGATACCA (M11 자체), 20% AGATACCA (Fig. 7에서 ③로 표시)을 관찰하였다 (Table 2.; Fig. 7.). 그리고 2272/2272, M2/M2, M3/M3, M7/M7, M11/M11의 homologous *loxP* 사이에서는 각각 100%의 자기 'spacer region'의 염기 서열을 관찰하였다. 하지만 heterologous *loxP* 사이에서는 기존의 메카니즘으로 설명할 수 없는 두 *lox* site 중 하나의 염기 서열을 그대로 유지한 'spacer region' 재조합물이 관찰되었다. 이것은 아마 설명 못하는 Cre-*lox* 재조합 메카니즘이 아닌

가 추측한다. 기존에 보고된 1번과 2번 (또는 7과 8) 염기 사이의 절단이 아니라 1번 앞 (또는 8번 뒤) 염기 사이의 절단일 가능성도 추론할 수 있다. 또한 M3/M2의 TGATACCA와 M7/2272의 AGATACCT와 AGATACCC의 염기 서열은 특별한 규칙성도 없고 빈도가 낮은 것으로 보아 DNA 복제 (replication) 과정에서 돌연변이 (mutation)가 생긴 것이 아닌가 추정한다.



**Fig. 6. Schematic diagram representing the plasmid structure and its recombinant products.** Two *loxP* sites are in a directly repeated orientation so that recombination between the *loxP* sites would excise the 400 bp intervening DNA fragment from the plasmids. Therefore 5.3 kb plasmid is cleaved at 1.9 kb of circular DNA with single *loxP* site and 3.4 kb of recombined plasmids with single *loxP* site.

**Table 2. Sequences of spacer region observed in the recombined plasmids.**

<i>lox2</i>	2272	M2	M3	M7	M11
-------------	------	----	----	----	-----

<i>lox1</i>	AGGTATCC	AGAAACCA	TAATACCA	AGATAGAA	CGATACCA
<b>2272</b> <b>AGGTATCC</b>	AGGTATCC(10) <sup>a</sup>	AGAAACCA(9) AGGTATCA(1)	<i>TAATACCA</i> <sup>b</sup> (9) AGGTATCA(1)	AGATAGAA(10)	<i>AGGTATCC</i> <sup>b</sup> (1) AGGTATCA(2) <i>CGATACCA</i> <sup>b</sup> (7)
<b>M2</b> <b>AGAAACCA</b>	AGGTATCC(4) <i>AGAAACCA</i> <sup>b</sup> (3) AGAAACCC(3)	AGAAACCA(10)	AGAAACCA(9) AAATACCA(1)	AGATAGAA(10)	AGAAACCA(9) AGATACCA(1)
<b>M3</b> <b>TAATACCA</b>	<i>AGGTATCC</i> <sup>b</sup> (3) TGGTATCC(1) TAATACCC(6)	TAATACCA(4) <i>TGATACCA</i> <sup>c</sup> (1) TGAAACCA(5)	TAATACCA(10)	No recombination	TAATACCA(4) TGATACCA(6)
<b>M7</b> <b>AGATAGAA</b>	AGGTATCC(6) <i>AGATAGAA</i> <sup>b</sup> (2) <i>AGATACCC</i> <sup>c</sup> (1) <i>AGATACCT</i> <sup>c</sup> (1)	AGAAACCA(10)	No recombination	AGATAGAA(10)	<i>CGATACCA</i> <sup>b</sup> (8) AGATACCA(2)
<b>M11</b> <b>CGATACCA</b>	<i>AGGTATCC</i> <sup>b</sup> (8) <i>CGATACCA</i> <sup>b</sup> (1) CGATACCC(1)	CGATACCA(7) CGAAACCA(3)	CGATACCA(10)	CGATAGAA(10)	CGATACCA(10)

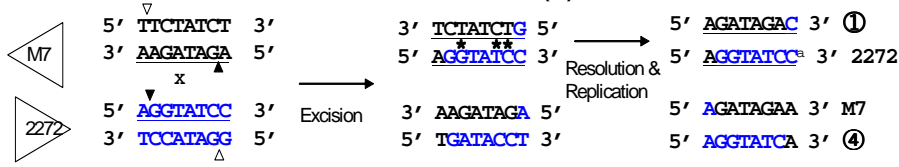
<sup>a</sup>The numbers in bracket indicates the number of the spacer sequences observed after intramolecular recombination between two *loxP* sites. Spacer regions of ten recombined plasmids were analyzed for each pair of recombination. <sup>b</sup>The unexpected parental spacer sequences derived from the recombination between two *loxP* sites (*italic*). <sup>c</sup>The unexpected non-parental spacer sequence derived from the recombination between *loxP* sites (*italic*).

A.



**M7 x 2272 (1<sup>^</sup>2 & 7<sup>^</sup>8 cleavage)**

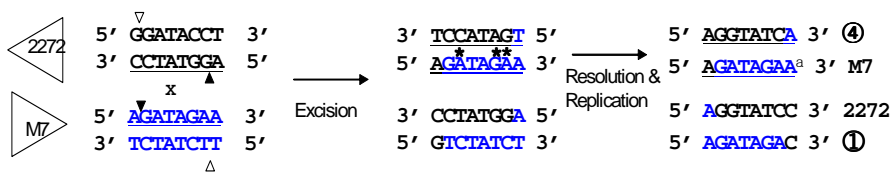
**Antiparallel synopsis**



AGGTATCC<sup>a</sup> (6) 2272  
 AGATAGAA<sup>b</sup> (2) M7  
 AGATACCT<sup>c</sup> (1) ?  
 AGATACCC<sup>c</sup> (1) ?

**2272 x M7 (1<sup>^</sup>2 & 7<sup>^</sup>8 cleavage)**

**Antiparallel synopsis**

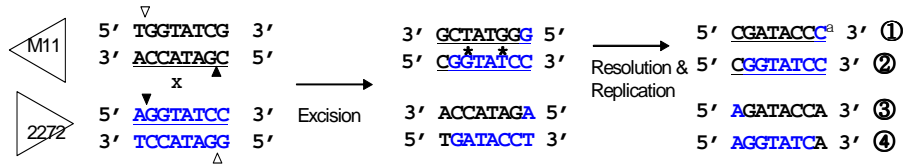


AGATAGAA<sup>a</sup> (10) M7

D.

**M11 x 2272 (1<sup>^</sup>2 & 7<sup>^</sup>8 cleavage)**

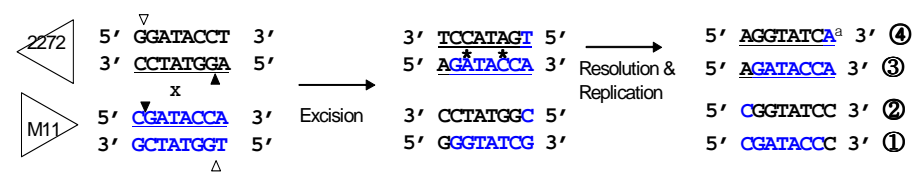
**Antiparallel synopsis**



AGGTATCC<sup>b</sup> (8) 2272  
 CGATACCA<sup>b</sup> (1) M11  
 CGATACCC<sup>a</sup> (1) 1

**2272 x M11 (1<sup>^</sup>2 & 7<sup>^</sup>8 cleavage)**

**Antiparallel synopsis**



AGGTATCC<sup>b</sup> (1) 2272  
 AGGTATCA<sup>a</sup> (2) 4  
 CGATACCA<sup>b</sup> (7) M11

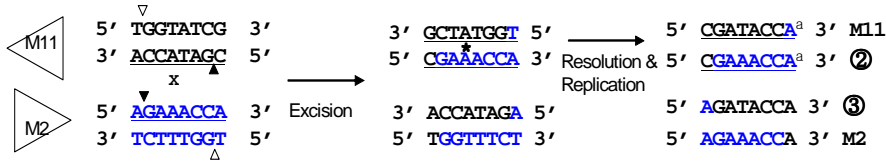
E.



**M11 x M2 (1<sup>Δ</sup>2 & 7<sup>Δ</sup>8 cleavage)**

CGATACCA<sup>a</sup> (7) M11  
CGAAACCA<sup>a</sup> (3) ②

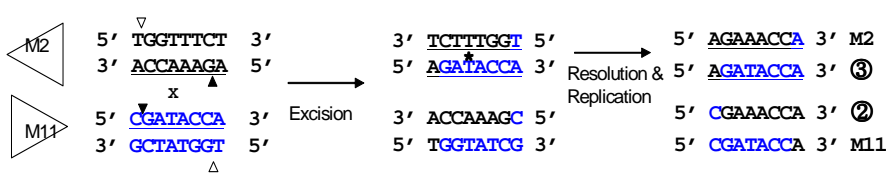
**Antiparallel synopsis**



**M2 x M11 (1<sup>Δ</sup>2 & 7<sup>Δ</sup>8 cleavage)**

AGAAACCA<sup>a</sup> (9) M2  
AGATACCA<sup>a</sup> (1) ③

**Antiparallel synopsis**

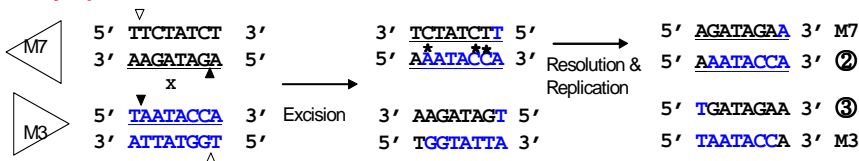


H.

**M7 x M3 (1<sup>Δ</sup>2 & 7<sup>Δ</sup>8 cleavage)**

No recombination

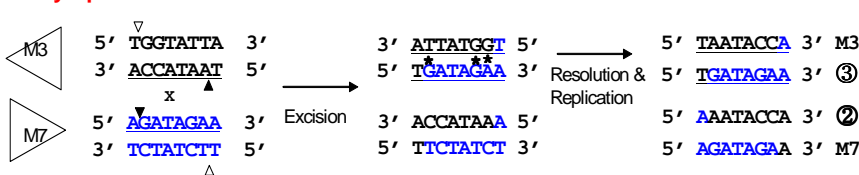
**Antiparallel synopsis**



**M3 x M7 (1<sup>Δ</sup>2 & 7<sup>Δ</sup>8 cleavage)**

No recombination

**Antiparallel synopsis**



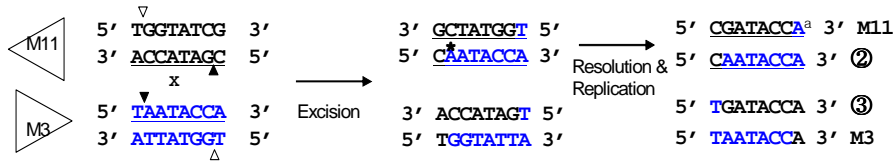
I.



**M11 x M3 (1<sup>^</sup>2 & 7<sup>^</sup>8 cleavage)**

CGATACCA<sup>a</sup> (10) M11

**Antiparallel synopsis**



**M3 x M11 (1<sup>^</sup>2 & 7<sup>^</sup>8 cleavage)**

TAATACCA<sup>a</sup> (4) M3  
 TGATACCA<sup>a</sup> (6) ③

**Antiparallel synopsis**

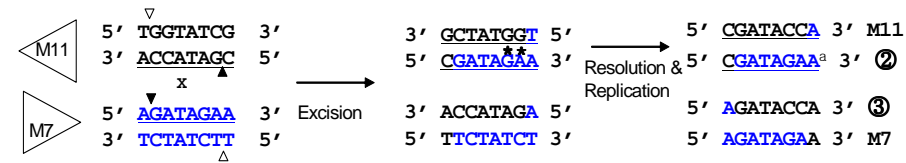


J.

**M11 x M7 (1<sup>^</sup>2 & 7<sup>^</sup>8 cleavage)**

CGATAGAA<sup>a</sup> (10) ②

**Antiparallel synopsis**



**M7 x M11 (1<sup>^</sup>2 & 7<sup>^</sup>8 cleavage)**

CGATACCA<sup>b</sup> (8) M11  
 AGATACCA<sup>a</sup> (2) ③

**Antiparallel synopsis**

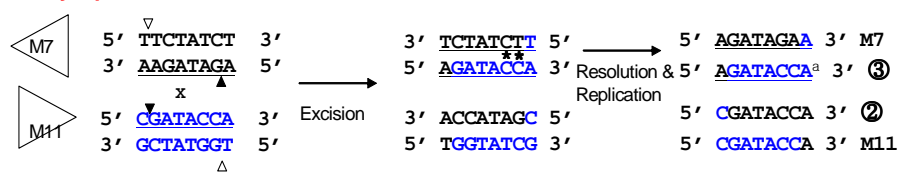


Fig. 7. Sequence of spacer region by Holliday junction intermediate.

Favored antiparallel (top-top, bottom-bottom) between direct repeated two mutant *loxPs*. Positions for strand exchange between top (open arrowheads) and bottom strands (filled arrowheads) are apart from 6 bp. Mismatched base pairs in reaction intermediates are marked with an asterisk (\*). With respect to our study, spacer sequences in replicable plasmids (3.4 kb) are underlined and the actually observed spacer sequences are underlined and expressed in single-stranded DNA. <sup>a</sup>expected spacer, <sup>b</sup>unexpected parental spacer (*italic*), <sup>c</sup>unexpected non-parental spacer (*italic*). M2/2272, 2272/M2 (A), M3/2272, 2272/M3 (B), M7/2272, 2272/M7 (C), M11/2272, 2272/M11 (D), M3/M2, M2/M3 (E) M7/M2, M2/M7 (F), M11/M2, M2/M11 (G), M7/M3, M3/M7 (H), M11/M3, M3/M11 (I), M11/M7, M7/M11 (J).

#### IV. 고찰

지금까지 ‘spacer region’ 돌연변이 형태의 *lox* site는 재조합 효율을 높이는 방향으로 연구가 이루어져 왔는데, heterologous (mutant) *loxP* 간 재조합 산물에서의 메카니즘 연구를 위한 ‘spacer region’의 염기 서열 분석은 많이 미비하다. 하지만 여기 heterologous *loxP* 간 재조합 산물의 분석을 통해 몇 가지 메카니즘의 특징을 관찰할 수 있었다.

첫 번째, 재조합 반응 중 M7/M3 또는 M3/M7의 경우 재조합 효율이 0%로 (incompatible) 나타났다 (Fig. 7H). 이 경우 HJ 중간체에서 crossover 중심 부위 2번, 7번 위치의 염기가 둘 다 일치하지 않는 (mismatch) 것으로 관찰되어졌다. 이것은 아마 재조합 반응의 가닥 이동 중심 crossover 부위에서 2번, 7번 위치의 두 염기 상동성이 재조합 시냅시스 형성에 큰 영향을 주며 재조합 효율에 결정적인 요소가 아닐까 생각한다. 이러한 경우는 다른 incompatible *lox* site 조합 (WT/2272, WT/M2, WT/M3, WT/M7, WT/M11)에서도 관찰되어지는데 HJ 중간체의 crossover 중심 부위 2번, 7번 위치의 염기가 둘 다 일치하지 않고 (mismatch) 재조합 효율이 0%였다 (incompatible) (data not shown). 또한 3, 4, 5, 6번 위치의 염기 서열 상동성도 일반화된 규칙성은 없지만 heterologous (mutant) *loxP* 간 재조합 산물 분석 결과 재조합 효율에 약간의 영향을 미치는 것이라 생각한다 (data not shown).

두 번째, 재조합 반응에 의해 생성되는 *lox* site 중 기존의 메카니즘으로는 만들어 질 수 없는 자기 염기 서열의 ‘spacer region’이 관찰됐다. 잘 설명은 되지 않지만 어느 정도의 일관성과 빈도가 나타나는 것으로 보아 기존에 밝혀진 메카니즘 외의 것이 있지 않을까 추측한다. 아마 상보적 회문 구조의 ‘inverted repeat’와 방향성 결정 ‘spacer region’ 사이에서 절단 및 결합이 일어난 것이 아닐까 추론한다. 하지만 M3/M2의 TGATACCA와 M7/2272의 AGATACCT와

AGATACCC는 DNA 복제 (replication) 과정상에서 발생한 돌연변이 (mutation)가 아닐까 추정한다.

마지막으로 재조합 반응 시 일정한 비율의 재조합 산물이 기대될 거라 생각하지만 이상하게도 특정 재조합 산물이 많이 나타나거나 각각 다른 경우의 재조합 산물이 나타나는 것이 아직 의문으로 남아있다. 예를 들어, 2272/M2에서는 M2가 90%, 재조합물 ④가 10%, 2272/M7은 M7만 100%, M11/M7은 재조합물 ②가 100% 나타났는데 그 재조합 비율의 규칙성은 전혀 찾아 볼 수 없었다.

이렇듯 Cre-*lox* 재조합 메카니즘은 아직도 완벽하게 설명되지 않는 부분도 있었으며 규칙성, 일관성 면에서도 정확히 일치하는 면을 볼 수 없었다. 이와 같이 재조합 메카니즘에 대한 깊은 이해와 조사를 통해서 보다 정확한 메카니즘 규명이 수행되어야 할 것이다. 끝으로 heterologous *loxP* 간의 재조합 산물에서의 'spacer region'의 염기 서열 분석이 *in vivo* 외에도 *in vitro*에서의 관찰을 통해 보다 정확한 결과물을 볼 수 있을 거라 기대한다.

## V. 결 론

총 25개의 mutant/mutant 조합 (2272, M2, M3, M7, M11) pFGB-*lox1/lox2* 벡터를 이용하여 Cre 발현 박테리아에서 분자 내 재조합 반응을 일으켜 heterologous *loxP* 간의 재조합 산물에서의 ‘spacer region’의 염기 서열을 분석하였는데, 재조합 메커니즘에 의해 예측되어진 재조합 산물 외에 메커니즘으로 설명이 어려운 자기 *lox* site의 ‘spacer region’ 염기 서열이 그대로 유지되는 재조합 산물 데이터를 얻었다. M2/2272에서는 AGAAACCA (M2), M3/2272에서 AGGTATCC (2272), 2272/M3에서 TAATACCA (M3), M7/2272에서 AGATAGAA (M7), M11/2272에서 AGGTATCC (2272), CGATACCA (M11), 2272/M11은 AGGTATCC (2272), CGATACCA (M11), M7/M11에서 CGATACCA (M11) 등이 기존 메커니즘으로 설명이 어려운 특이할 만한 산물이다. 이 데이터 결과의 의미에 대해 더 조사할 필요가 있으며, 어떤 기작에 의해 생성되는 재조합물인가에 대해 이해가 필요할 것이다. 그리고 M3/M2의 TGATACCA와 M7/2272의 AGATACCT와 AGATACCC의 결과에 대해서는 특별한 규칙성도 없고 빈도가 낮은 것을 보아 단지 *E. coli*에서 DNA 복제 (replication) 과정의 돌연변이 (mutation)일거라 추정한다.

## 참고문헌

1. Araki K, Araki M, Yamamura K: Site-directed integration of the cre gene mediated by Cre recombinase using a combination of mutant lox site. *Nucleic Acids Res* 30: 3067-3077, 2002
2. Aranda M, Kanellopoulou C, Christ N, Peitz M, Rajewsky K, Droge P: Altered directionality in the Cre-loxP site-specific recombination pathway. *J Mol Biol* 311: 453-459, 2001
3. Austin S, Ziese M, Sternberg N: A novel role for site-specific recombination in maintenance of bacteria replicons. *Cell* 25: 729-736, 1981
4. Babineau D, Vetter D, Andrews BJ, Gronostajski RM, Proteau GA, Beatty LG, Sadowski PD: The FLP protein of the 2-micron plasmid of yeast. Purification of the protein from *Escherichia coli* cells expressing the cloned FLP gene. *J Biol Chem* 260: 12313-12319, 1985
5. Craig NL: The mechanism of conservative site-specific recombination. *Annu. Rev. Genet.* 22: 77-105
6. Daniel M, Robert F: Engineering the mouse genome by site-specific recombination. *Current Opinion in Biotechnology* 10: 470-476, 1999

7. Feng YQ, Seibler J, Alami R, Eisen A, Westerman KA, Leboulch P, Fiering S, Bouhassira EE: Site-specific chromosomal integration in mammalian cells: highly efficient CRE recombinase-mediated cassette exchange. *J Mol Biol* 292: 779-785, 1999
8. Gu H, Marth JD, Orban PC., Mossmann, H, Rajewsky K: Deletion of a DNA polymerase  $\beta$  gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* 265: 103-106, 1994
9. Guo F, Gopaul DN, Van Duyne GD: Structure of cre recombinase complexed with DNA in a site-specific recombination synapse. *Nature* 389: 40-46, 1997
10. Guo F, Gopaul DN, Van Duyne GD: Asymmetric DNA bending in the Cre-*loxP* site-specific recombination synapse. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:7143-7148, 1999
11. Hoess RH, Ziese M, Sternberg N: P1 site-specific recombination: nucleotide sequence of the recombining sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 3398-3402, 1982
12. Hoess RH, Abremski K, Sternberg N: The nature of the interaction of the P1 recombinase Cre with the recombining site *loxP*. *Cold*

*Spring Harbor Symp Quant Biol* 49: 761-768, 1984

13. Hoess RH, Wierzbicki A, Abremski K: The role of the *lox* spacer region in *P1* site-specific recombination. *Nucleic Acids Res* 14: 2287-2300, 1986
14. Hoess RH, Wierzbicki A, Abremski K: Isolation and characterization of intermediates in site-specific recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 6840-6844, 1987
15. Hoess RH, Wierzbicki A, Abremski K: Synapsis in the Cre-*lox* site specific recombination system. In *Structure and Methods* (Sarma RH & Sarma MH, eds), 1: 203-213, 1990
16. Hoess RH, Abremski K: The Cre-*lox* recombination system. *Nucleic Acids and Molecular Biology* 4: 99-109, 1990
17. Landy, A: Dynamic structural and regulatory aspects of  $\lambda$  site-specific recombination. *Annu Rev Biochem* 58: 913-949, 1989
18. Langer SJ, Ghafoori AP, Byrd M, Leinwand L: A genetic screen identifies novel non-compatible *loxP* sites. *Nucleic Acids Res* 30: 3067-3077, 2002



19. Lee G, Saito I: Role of nucleotide sequence of *loxP* spacer region in Cre-mediated recombination. *Gene* 216: 55-65, 1998
20. Lee L, Sadowski PD: Sequence of the *loxP* site determines the order of strand exchange by the cre recombinase. *J Mol Biol* 326: 397-412, 2003
21. Martin SS, Pulido E, Chu VC, Lechner TS, Baldwin EP: The order of strand exchanges in Cre-*loxP* recombination and its basis suggested by the crystal structure of a Cre-*loxP* holliday junction complex. *J Mol Biol* 319: 107-127, 2002
22. Prost S, Sheahsn S, Rannine D, Harrison DJ: Adenovirus-mediated Cre deletion of floxed sequences in primary mouse cells is an efficient alternative for studies of gene deletion. *Nucleic Acids Res* 29: e80, 2001
23. Qin M, Bayley C, Stockton T, Ow DW: Cre recombinase-mediated site-specific recombination between plant chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91, 1706-1710: 1994
24. Ronald H, Hoess, Anna Wierbicki, Kenneth Abremski: The role of

- the *loxP* spacer region in *P1* site-specific recombination. *Nucleic Acids Res* 14: 2287-2300, 1986
25. Sauer B: Functional expression of the *cre-lox* site-specific recombination system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 7:2087-2096, 1987
26. Sauer B, Henderson N: Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage *P1*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5166-5170, 1988
27. Sauer B, Henderson N: Cre-stimulated recombination at *loxP*-containing DNA sequences placed into the mammalian genome. *Nucleic Acids Res.* 17: 147-161, 1989
28. Sauer B, Henderson N: Targeted insertion of exogenous DNA into the eukaryotic genome by the Cre recombinase. *New Biol.* 2: 441-449, 1990
29. Sauer B: Inducible gene targeting in mice using the *Cre-lox* system. *Methods* 14: 381-392, 1998
30. Siegel RW, Jain R, Bradbury A: Using an *in vivo* phagemid system

to identify non-compatible *loxP* sequences. *FEBS Letter* 505: 467-473, 2001

31. Shaikh AC, Sadowski PD: Trans complementaion of variant Cre protein for defects in cleavage and synapsis. *J Biol Chem* 275: 30186-30195, 2000
32. Stephen J, Langer A, Paiman Ghafoori, Marshall Byrd, Leslie Leinwand: A genetic screen identifies novel non-compatible *loxP* sites. *Nucleic Acids Res* 30: 3067-3077, 2002
33. Sternberg N, Hamilton D (1981): Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between *loxP* sites. *J. Mol. Biol.* 150: 467-486
34. Vergunst AC, Jansen LE, Fransz PF, de Jong JH, Hooykaas PJ: Cre/*lox*-mediated recombination in Arabidopsis: evidence for transmission of a translocation and a deletion event. *Chromosoma* 109: 287-297, 2000

**-ABSTRACT-**

## **Analysis of Spacer Region derived from Recombination**

## between Heterologous *loxPs*

Jong-nam Sohn

Department of Medical Sciences  
The Graduate school, Ajou University

(Supervised by Instructor Myung-hee Kwon)

**Purpose :** In order to understand the recombination mechanism, the spacer region sequences were analyzed by Cre-mediated recombination between heterologous *loxPs*.

**Materials & Methods :** A new vector (pFGB) to analyze Cre-mediated recombination mechanism between heterologous *loxPs* was constructed. The combinations of mutant *loxP* and mutant *loxP* that are 2272, M2, M3, M7, M11 were cloned into a pFGB vector, resulting in 25 pFGB-*lox1/lox2* constructs. These constructs were transformed into Cre-expressing BS1365 bacterial cells and grown at 37°C overnight respectively. Plasmid DNA was isolated from the culture of each BS1365 colony. The purified DNAs were plated out on LB agar containing ampicillin, X-gal, and IPTG. The sequence of spacer region was measured by the sequencing of blue colony.

**Results:** Combinatorial cloning of mutant *lox* sites that are 2272, M2, M3, M7 into pFGB vector resulted in 25 pFGB-*lox1/lox2* constructs. The results obtained from the recombination in Cre-expressing BS1365 bacterial cells between heterologous *loxPs*. Here, we analyzed the nucleotide compositions of the spacers in the recombinant products. I found the unexpected *loxP* sites with aberrant spacers in several recombinant product, suggesting possibility that heterologous *loxP* sites would have not undergone typical Cre-*loxP* recombination.

**Conclusion:** Our results might give new insights into strand cleavage sites during *in vivo* Cre-*loxP* recombination.

---

Key words : Cre-*lox* recombination, Cre recombinase, *lox* site, heterologous *loxP* sites, aberrant recombinant