

의학 석사학위 논문

새로운 벡터 시스템을 이용한  
*lox site*간 Cre-매개 재조합  
효율 측정

아주대학교 대학원

의학과

윤미영

새로운 벡터 시스템을 이용한  
*lox* site간 Cre-매개 재조합  
효율 측정

지도교수 권 명 희

이 논문을 의학 석사학위 논문으로 제출함.

2005년 2월

아주대학교 대학원

의학과

윤미영

윤미영의 의학 석사학위 논문을 인준함.

심사위원장    신 호 준 인

심사위원    박      선 인

심사위원    권 명 희 인

아 주 대 학 교 대 학 원

2004년 12월 22일

## 새로운 벡터 시스템을 이용한 *lox* site간 Cre-매개 재조합 효율 측정

**목적 :** 새로운 벡터 시스템을 이용하여 *lox* site 사이의 Cre-매개 재조합 효율을 측정하고자 하였다.

**재료 및 방법 :** 두 *lox* site 사이의 cre-매개 재조합 효율을 분석하기 위하여 새로운 벡터 (pFGB)를 제작하였다. *lox wt*, M2, M3, M7, M11, *lox 2272* 및 *lox 5171*을 사용하여 wild type과 mutant *lox* site의 조합을 새로운 벡터인 pFGB에 클로닝 41개의 pFGB-*lox/lox*를 얻었다. Cre를 발현하는 BS1365 박테리아 내로 이 plasmid들을 형질전환 하고 37°C에서 하룻밤 배양한 후, BS1365로부터 plasmid DNA를 분리하였다. 분리된 DNA를 JM109 박테리아에 형질전환 하고 ampicillin, X-gal, IPTG를 포함하는 LB agar plate에 퍼 발라 배양하였다. 전체 콜로니와 청색 콜로니의 수를 셈으로써 재조합 효율을 구하였다.

**결과 :** pFGB 벡터 내로 *lox wt*, *lox 2272*, *lox 5171*, M2, M3, M7, M11을 클로닝 하여 41개의 pFGB-*lox/lox*를 얻었다. Cre를 발현하는 박테리아 BS1365를 이용하여 재조합을 유도한 결과 *lox wt*은 *lox 2272*, *lox 5171*, M3, M7과 0.1% 이하의 재조합 효율을 보였으며 M2/M2, M7/M7, 2272/2272, 5171/5171의 동일한 sequence 사이에서의 재조합 효율은 약 99%, M3/M3는 약 46%의 재조합 효율

을 나타냈다. 서로 다른 sequence의 *lox* site들 사이의 재조합에 있어서는 *lox wt*, *lox 2272*, *lox 5171*과 *lox wt*, M3, M7 및 *lox 5171*의 두 그룹이 같은 그룹에 속하는 *lox* sites 간에 1% 이하의 재조합 효율을 보였다.

**결론** : 새로운 벡터 (pFGB)를 제작하였고 이 벡터와 BS1365 박테리아를 이용하여 다양한 *lox* site들 사이의 cre-매개 재조합 효율을 측정하였다. 재조합 효율이 1% 이하인 incompatible한 *lox* site들로는 *lox wt*, *lox 2272*, *lox 5171*과 *lox wt*, *lox 5171*, M3, M7이 있었다. 이 incompatible한 *lox site*들을 이용하여 특정 유전자의 염색체내 통합, 유전자 교체 및 결실과 같은 유전자 조작에 적용하는 연구가 진행되어야 할 것이다.

---

핵심되는 말 : Cre/*lox* 재조합 시스템, cre 재조합 효소, *lox wt*, *lox 2272*, *lox 5171*, M2, M3, M7, M11, pFGB 벡터

# 차 례

국문요약 .....	i
차례 .....	iii
그림차례 .....	iv
표차례 .....	v
I. 서론 .....	1
II. 방법	
A. 분자 내 재조합 효율 측정을 위한 벡터 제작 .....	7
1. $\beta$ -galactosidase 유전자 클로닝 .....	7
2. <i>Lox</i> sequence 클로닝 .....	7
B. Cre 재조합 효소를 발현하는 박테리아를 이용한 <i>in vivo</i> 재조합 효율 측정 .....	11
C. Cre 재조합 효소를 이용한 <i>in vitro</i> 재조합 효율 측정 .....	12
III. 결과	
A. 분자 내 재조합 효율 측정을 위한 벡터 클로닝 .....	16
B. Cre 재조합 효소를 발현하는 박테리아 내에서의 재조합 효율 .....	18
C. 청색 콜로니와 흰색 콜로니의 확인 .....	21
D. Cre 재조합 효소를 사용한 <i>in vitro</i> 재조합 효율 측정 .....	21
IV. 고찰 .....	25
V. 결론 .....	27
참고문헌 .....	28
영문요약 .....	33

## 그림 차례

<b>Fig. 1.</b> Cre/ <i>lox</i> recombination. ....	6
<b>Fig. 2.</b> <i>LoxP</i> sequence. ....	9
<b>Fig. 3.</b> Construction of the pFGB vector. ....	10
<b>Fig. 4.</b> Structure of the pFGB- <i>lox1/lox2</i> vector for the measurement of intramolecular recombination efficiency. ....	15
<b>Fig. 5.</b> DNA analysis after recombination in BS 1365. ....	18
<b>Fig. 6.</b> Analysis of the plasmids purified from blue colonies. ....	21
<b>Fig. 7.</b> Analysis of the plasmids purified from white colonies after recombination in BS1365. ....	22
<b>Fig. 8.</b> Analysis of <i>in vitro</i> recombination efficiency by the amounts of cre recombinase. ....	23
<b>Fig. 9.</b> <i>In vitro</i> recombination efficiency in the course of incubation time. ....	24

## 표 차 례

**Table 1.** PCR primers for the construction of plasmid vectors. ....8

**Table 2.** Recombination efficiency between two mutant *lox* sequences  
in BS1365. .... 17

**Table 3.** Recombination efficiency using a cre recombinase. .... 25



## I. 서론

Cre/*lox* 재조합 시스템은 cre 재조합 효소 (cre recombinase)에 의해 두 *lox* site 간에 부위특이성 (site-specific) 재조합이 일어나는 시스템이다. *Lox* site는 34 bp의 DNA 단편으로서, 양끝에 두개의 13 bp inverted repeat 부위와 중심에 8 bp spacer 부위로 구성되어 있다 (Hoess 등, 1986). 각각의 13 bp inverted repeat는 cre 재조합 효소가 인식, 결합하는 부위이고, 8 bp spacer는 재조합 반응 동안 DNA 가닥 교환 (DNA strand exchange)이 일어나는 부위로서 *lox* site의 방향성을 결정한다. Cre 재조합 효소는 bacteriophage *PI* 으로부터 분리된 것으로, bacteriophage  $\lambda$ 로부터 분리된 Int (Landy, 1989)와 *Saccharomyces cerevisiae*로부터 분리된 FLP (Babineau 등, 1985)와 동일한 integrase family에 속하고, 보조인자 없이도 *in vitro* 와 *in vivo* (박테리아 및 동, 식물 세포)에서 *lox* site 사이의 재조합을 유도할 수 있다 (Qin 등, 1994; Sauer, 1998; Feng 등, 1999; Vergunst 등, 2000; Prost 등, 2001; Araki 등, 2002).

단일 DNA 분자 내에서의 cre-매개 재조합은 *lox* site 내 spacer의 방향성에 따라 두 *lox* site사이에 위치해 있는 DNA의 결실 (deletion) 또는 역위 (inversion)를 초래할 수 있다. 즉, 한 DNA상에 두 *lox* site가 같은 방향으로 위치하고 있을 때 두 *lox* site 사이에 있는 DNA의 결실이 일어나는 반면, 두 *lox* site가 서로 반대방향으로 위치하고 있을 때는 두 *lox* site 사이의 DNA는 역위가 일어나게 된다 (Fig. 1). 단일 DNA상에 있는 두 개의 *lox* site 사이에서의 재조합인 ‘분자 내 재조합 (intramolecular recombination)’은 재조합 효율이 높은 반면, 서로 다른 DNA상에 있는 *lox* site 간의 재조합인 ‘분자 간의 재조합 (intermolecular recombination)’은 분자 내 재조합 보다 재조합 효율이 낮다. 이

는 cre 재조합효소가 재조합 반응을 일으키기 위해서는 동시에 두 *lox* site를 인식해야 하는데 다른 분자에 위치해 있는 *lox* site는 동일 분자에 위치해 있는 *lox* site에 비해 물리적으로 서로 접근하기가 어렵기 때문이다 (Stephen 등, 2002).

지금까지 *lox* site 간 재조합 효율을 높이기 위해서, 또는 가역적 재조합 반응을 비가역으로 바꾸기 위하여 ‘mutant *lox*’에 대한 연구가 돌연변이를 일으킨 부위에 따라 크게 두 방향으로 행해졌다. 첫째, *lox* site의 방향성과 특이성을 결정하는 8 bp의 spacer 내의 염기서열을 치환하는 방법이다. 두 *lox* site 사이의 재조합 효율이 높기 위해서는 spacer 부위의 염기의 동일성이 필요하다 (Hoess 등, 1986; Guo 등, 1997). *Lox wt* (wild type *lox* site: ATGTATGC)의 spacer 부위와 한 염기가 다른 *lox 511* (ATGTATaC)에 있어서 511/511간의 재조합 효율이 높은 반면 511/wt간은 낮다고 (0%-10%) 보고 되어 (Robert 등, 2001) 실제로 RMCE (Recombinase Mediated Cassette Exchange) 원리를 이용한 조합성 파아지 항체 라이브러리 (combinatorial phage antibody library)의 제작에 사용된 예가 있다 (Hoess 등, 1986; Griffiths 등, 1994; Sblattero 와 Bradbury, 2000). 그밖에 *lox 2272*, *lox 5171*, M2, M3, M7, M11은 spacer 부위의 염기서열을 치환하여 동일한 염기의 *lox* site와는 재조합이 일어나고 동일하지 않은 염기의 *lox* site와는 재조합이 일어나지 않는다고 밝혀진 mutant *lox* sequence이다. *Lox 2272*는 *lox wt*의 spacer 부위의 두 번째 염기 C를 G로, 일곱 번째 염기 A를 C로 치환한 것이고, *lox 5171*은 두 번째 염기 C를 T, 네 번째 염기 T를 C로 치환한 것이다. M2는 네 번째와 여덟 번째 염기를 제외한 나머지 염기가 치환된 것이고, M3는 네 번째와 다섯 번째 염기를 제외한 나머지 염기가 치환된 것이다. M7은 네 번째와 다섯 번째 그리고 여덟 번째 염기를 제외한 나머지 염기가 치환된 것이고, M11은 네 번째와 다섯 번째 염기를 제외한 나머지 염기만 치환된

것이다 (Fig. 2). 이 mutant *lox* site들은 자신과 동일한 *lox* site와는 재조합 효율이 100%에 가깝고, *lox* wt과는 재조합 반응이 일어나지 않는다고 보고된 바 있다.

둘째, cre 재조합 효소가 인식 및 결합하는 13 bp inverted repeat 부위의 염기서열을 치환하는 방법이다. 그 예로 *lox 71*과 *lox 66*이 있는데 *lox 71*은 13 bp inverted repeat 중 left element (LE) 부위의 염기를 치환한 것이고, *lox 66*은 right element (RE) 부위의 염기를 치환한 것으로 *lox 71*과 *lox 66*의 치환된 염기부분은 서로 상보적 회문 (complementary palindromic)구조를 가지는 mutant *lox* site이다 (Albert 등, 1995). *Lox 66*과 *lox 71* 사이에 재조합이 일어날 경우, 정상적인 13 bp inverted repeat가 있는 *lox wt*과 LE, RE 모두 염기가 치환된 (double mutant arm) *lox* site가 생긴다 (Bethke 와 Sauer 1997). Spacer 부위의 염기를 치환한 mutant *lox* site의 경우에는 재조합이 한번 일어난 후, cre 재조합 효소에 의해 다시 재조합이 일어나 재조합이 일어나기 전의 상태로 되돌아갈 수 있으나 (가역적 반응) 13 bp inverted repeat의 염기를 치환한 mutant *lox* site의 경우에는 재조합이 일어나면, cre 재조합 효소가 double mutant arm은 인식할 수 없으므로 재조합 반응이 비가역적이다.

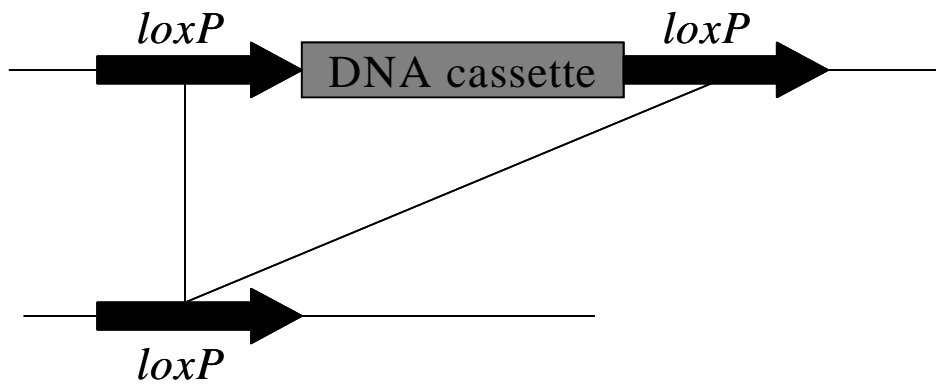
Mutational analysis를 통해 cre/*lox* 재조합 시스템이 eukaryotic genome의 *in vivo* 상에서의 조작에서 매우 유용하게 이용될 수 있음이 증명되면서 (Prost 등, 2001) yeast에서, 동물세포 및 마우스에서 (Babineau 등, 1985; Feng 등, 1999; Prost 등, 2001), 식물세포에서 (Qin 등, 1994; Sauer, 1998) 특정 유전자의 염색체내 통합 (site-specific integration), 유전자 교체 (replacement), 및 결실과 같은 유전자 조작을 위해 널리 활용되었다 (Bethke 와 Sauer, 1997). 또한 세포내에서의 cre 발현 조절을 가능하게 함으로써 원하는 시기에, 원하는 부위에

서 유전자의 활성화와 비활성화도 가능하게 되었다 (Lakso 등, 1992; Orban 등, 1992; Gu 등, 1994; Metzger 등, 1995; Prost 등, 2001). 그러나 이들 cre/lox 재조합 시스템을 이용한 연구에서는 *lox wt* 과 mutant *lox site*간의 원치 않는 재조합으로 인해 저조한 유전자 조작 효율을 보이는데, 이는 *lox wt*과 재조합이 일어나지 않는 mutant *lox site*가 사용되지 않았기 때문이다.

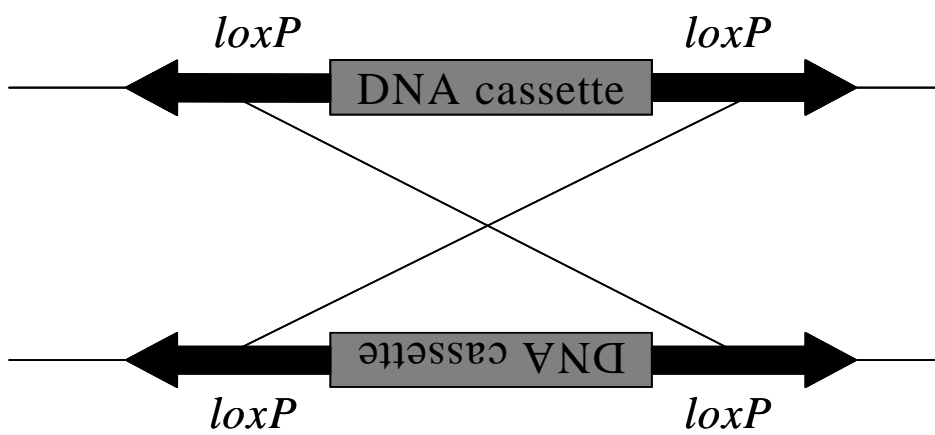
최근 여러 연구자들에 의해 자신과 동일한 염기의 *lox site*와는 재조합 효율이 높고 동일하지 않은 염기의 *lox site*와는 재조합이 일어나지 않는 'incompatible *lox site*'들 (*lox 2272*, *lox 5171*, M2, M3, M7, M11)이 선별되었다. 이들은 각기 다른 선별 시스템을 통해 incompatible *lox*로 보고된 것이다 (Kirk 등, 1986; Srephen 등, 2002). *Lox 2272*와 *lox 5171*의 경우 cre-발현 박테리아에서 재조합 후, 재조합된 plasmid를 cre를 발현하지 않는 박테리아에 형질전환하고 청색을 띠는 콜로니의 수를 세어 재조합 효율을 측정함으로써 선별된 것이며, M2, M3, M7, M11은 재조합된 plasmid의 Southern blot을 통해 재조합 효율을 관찰함으로써 선별된 것이다. 재조합 효율을 측정하는 시스템이 달라짐에 따라 재조합 효율도 다르게 나타날 수 있다. 그 예로 *lox 511*은 항생제 저항성을 통해 재조합 반응이 일어난 mutant *lox site*만을 선별하는 시스템에서 *lox wt*과 incompatible하다고 밝혀졌지만 (Ronald 등, 1986) 이후, 다른 연구자들에 의해 incompatible 하지 않은 것으로 보고 되어져 왔다. 재조합 반응 산물을 제한효소의 처리 후, 전기영동하여 DNA의 크기를 확인함으로써 재조합 효율을 확인한 시스템이나 (Lee 와 Saito, 1998), 콜로니의 색으로 확인하는 시스템 (Robert 등, 2001)에서 *lox 511 lox wt*과의 재조합 효율이 10%까지도 나타났다. 따라서 단일 시스템에서 mutant *lox site* 간의 재조합 효율을 측정하는 분석이 필요하다. 따라서 본 연구에서는 재조합 효율을 정량적으로 측정할 수 있는 새로운 벡터를 제

작하였으며 기존에 incompatible *lox* site로 알려진 mutant *lox* site들을 벡터 시스템에 클로닝하여 재조합 효율을 측정하였다.

A)



B)



**Fig. 1. Cre/*lox* recombination.** A) Cre-mediated excision of the DNA flanked with two *lox* sites that are located in the same direction. B) Cre-mediated inversion of the DNA flanked with the inverted two *lox* sites.

## II. 방법

### A. 분자 내 재조합 효율 측정을 위한 벡터 제작

#### 1. $\beta$ -galactosidase 유전자 클로닝

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

*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 두개 (CC)를 첨가하였다 (Table. 1).

#### 2. *Lox* sequence 클로닝

$\beta$ -galactosidase 유전자가 클로닝 된 pFGB 벡터의 두 *lox* site에 각각의 *lox wt* 및 mutant *lox* site를 클로닝 하였다.

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

NAME	SEQUENCE
GalF-3	G ACTAGT AATTCACTGGCCGTCGTTTTAC <i>SpeI</i>
GalF-4	GC ACGCGT TTATCTCCATTTCGCCATTC <i>MluI</i>
Add-B	G ACTAGT <u>GGATAACTTCGTATAGC</u> ATACAT <i>SpeI</i>
NheI-WT	CTAGCTAGCATAA <u>CTTCGTATAATGTATGCT</u> TATACGAAGTT <i>NheI</i> ATCTG
NheI-2272	CTAGCTAGCATAA <u>CTTCGTATAAGGTATCCT</u> TATACGAAGTT <i>NheI</i> ATCTG
NheI-m2	CTAGCTAGC-ATAA <u>CTTCGTATAAGAAACCA</u> TATACGAAGT <i>NheI</i> TATCTG
NheI-m3	CTAGCTAGC-ATAA <u>CTTCGTATATAATACCA</u> TATACGAAGTT <i>NheI</i> ATCTG
NheI-m7	CTAGCTAGC-ATAA <u>CTTCGTATAAGATAGAAT</u> TATACGAAGTTA <i>NheI</i> TCTG
NheI-m11	CTAGCTAGC-ATAA <u>CTTCGTATACGATACCA</u> TATACGAAGTTA <i>NheI</i> TCTG
NheI-5171	CTAGCTAGC-ATAA <u>CTTCGTATAATGTGTACT</u> TATACGAAGTT <i>NheI</i> ATCTG
3D8VL NotI	GAGTCATTCTCGACTTGCGGCCGCTTTTATTTCCAGCTTGG



<u><i>lox</i></u>	13 bp <u>inverted repeat</u>	8 bp spacer	13 bp <u>inverted repeat</u>
		1 2 3 4 5 6 7 8	
WT	<u>ATAACTTCGTATA</u>	GCATACAT	<u>TATACGAAGTTAT</u>
2272	<u>ATAACTTCGTATA</u>	GgATACcT	<u>TATACGAAGTTAT</u>
5171	<u>ATAACTTCGTATA</u>	GtAcACAT	<u>TATACGAAGTTAT</u>
M2	<u>ATAACTTCGTATA</u>	tggTtct	<u>TATACGAAGTTAT</u>
M3	<u>ATAACTTCGTATA</u>	tggTAtta	<u>TATACGAAGTTAT</u>
M7	<u>ATAACTTCGTATA</u>	tctTAtcT	<u>TATACGAAGTTAT</u>
M11	<u>ATAACTTCGTATA</u>	tggTAtcg	<u>TATACGAAGTTAT</u>

**Fig. 2. *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.

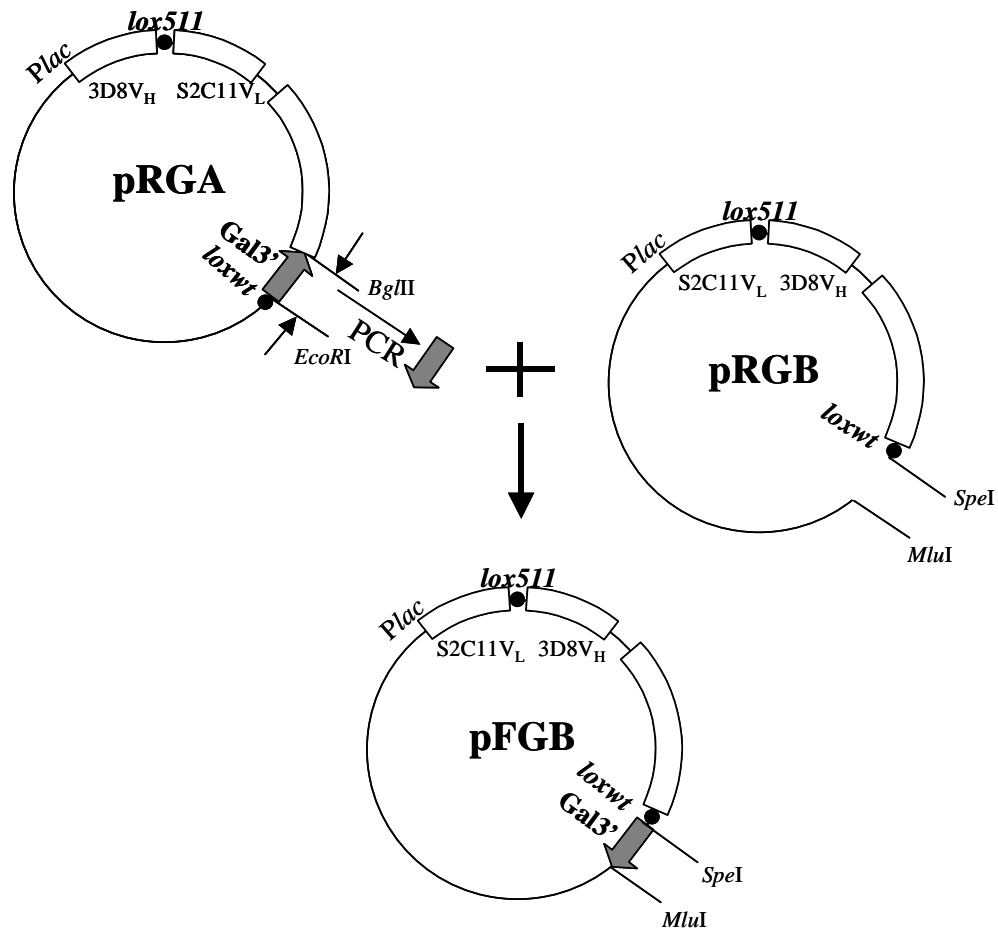


Fig. 3. Construction of the pFGB vector. The pFGB vector was constructed by introducing the Gal3' structural gene amplified from pRGA into the 3' end of *lox wt* of pRGB. *Lac* promoter and Gal3' structural gene are connected by recombination between *lox* sites, and this event results in the expression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

*Lox 1*의 위치에 *lox wt*, *lox 2272*, *lox 5171*, M2, M3, M7, M11을 클로닝 하였다. 이때 사용한 5' primer는 *NheI* site와 각각의 mutant *lox* site를 포함하도록 디자인 하였고 3' primer는 *NotI* site를 포함하도록 디자인 하였다. PCR 후, PCR 산물 (400 bp)을 *NheI*과 *NotI*로 처리하고 pFGB에 ligation 함으로써 pFGB-*lox 1/wt*을 제작하였다. 또한 *lox 2*에 *SpeI*과 *MluI* site를 갖는 primer를 이용하여 각 mutant *lox* site들을 증폭하여 클로닝 함으로써 pFGB-*lox1/lox2*를 완성하였다.

## B. Cre-발현 박테리아를 이용한 *in vivo* 재조합 효율 측정

Mutant *lox* site 간의 재조합 반응을 위해 cre 재조합 효소를 발현하는 박테리아 (BS1365)를 사용하였다. Mutant *lox* site를 포함하고 있는 pFGB-mutant/wt 벡터를 BS1365로 형질전환 하였다. Competent cell (BS1365)을 얼음에서 5분간 녹인 후, 20 ng의 pFGB-mutant/wt을 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 퍼 바른 후, 37°C에서 하룻밤 배양함으로써 이 동안에 재조합이 일어나도록 하였다. BS1365 콜로니를 액체 배지에서 배양한 후, plasmid DNA를 spin column (LaboPass™ Mini- prep kit)을 이용하여 분리하여,  $\alpha$ -complementation이 가능한 JM109 박테리아에 형질전환 하였다. 형질전환 된 박테리아를 nitrocellulose membrane이 덮혀진 SOBAG 배지에 퍼 바른 후, 37°C에서 하룻밤 배양하였다. 콜로니가 자란 membrane을 X-gal (20 µg/ml), IPTG (1 mM)와 ampicillin (100

$\mu\text{g/ml}$ )을 포함하는 LB 평판 배지로 옮겨 실온에서 배양하면서 콜로니 색을 관찰하였다. 전체 콜로니 수에 대한 청색 콜로니 비율로부터 재조합 효율을 산출하였다 (재조합 효율 = (청색 콜로니의 수/전체 콜로니의 수) $\times$ 100).

BS1365에서 재조합을 유도한 후, BS1365로부터 정제한 DNA를 *NcoI*을 처리하고 1% agarose gel에서 전기영동하여 재조합으로 인해 두 *lox* site 사이의 DNA 단편이 결실되었는지 확인하였다.

### C. Cre 재조합 효소를 이용한 *in vitro* 재조합 효율 측정

*In vitro* 재조합 효율을 측정하기 위하여 cre 재조합 효소를 사용하였다 (NEB사). pFGB-wt/wt을 250 ng에 cre 재조합 효소 1  $\mu\text{l}$  (1,000U/ml)를 첨가하고 최종 반응액이 50  $\mu\text{l}$ 가 되도록 반응완충용액 (33 mM NaCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM Tris-HCl, pH7.5) 및 증류수를 첨가하여 37 °C에서 1시간 동안 반응시킨 후, 70 °C에서 10분간 정치함으로써 cre 재조합 효소를 불활성화 시켰다. 재조합 반응액 1  $\mu\text{l}$ 를 JM109 박테리아에 형질전환한 후, 콜로니를 배양하여 plasmid DNA를 정제하였다.

Cre 재조합 효소의 양에 따른 재조합 효율과 반응 시간에 따른 재조합 효율을 각각 관찰하였다. Cre 재조합 효소의 양에 따른 재조합 효율을 측정하기 위해 pFGB-wt/wt 250 ng에 cre 재조합 효소를 0.5 U, 1 U, 2 U, 4 U를 넣고 전체 반응량을 50  $\mu\text{l}$ 로 하여 37 °C에서 1시간동안 반응 시켰다 (Fig. 8A). 더욱 정확한 재조합 효율을 보기 위해 재조합이 유도된 각각의 반응액 중 1  $\mu\text{l}$ 를 취하여 JM109 박테리아에 형질전환 한 후, 위에 기술한 X-gal 염색을 통해 콜로니 색을 관찰하였다 (Fig. 8B). 또한 반응 시간에 따른 재조합 효율을 측정하기 위하여

pFGB-wt/wt 250 ng에 cre 재조합 효소 4 U을 넣고 전체 반응양을 50  $\mu$ l로 하여 37  $^{\circ}$ C에서의 반응 시간을 1시간, 2시간, 4시간, 8시간 동안 반응시켰다 (Fig. 9).

각 mutant *lox* sequence들이 클로닝 된 pFGB-mutant/wt과 pFGB-mutant/mutant들을 대상으로 cre 재조합 효소를 이용하여 재조합 효율 측정을 하였다. DNA 250 ng, cre 재조합 효소 4 U을 넣고 반응액을 50  $\mu$ l로 하여 37  $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응 시킨 후, 70  $^{\circ}$ C에서 10분간 불활성화 시켰다. 재조합이 유도된 DNA들을 JM109 박테리아로 형질전환하고 SOBAG 배지위에 nitrocellulose membrane을 덮고 그 위에 형질전환 한 박테리아를 퍼 발랐다. 37  $^{\circ}$ C에서 하룻밤 배양한 후, 콜로니가 생긴 membrane을 X-gal (20  $\mu$ g/ml), IPTG (1 mM)와 ampicillin (100  $\mu$ g/ml)을 포함하는 LB 배지로 옮겨 실온에서 배양하면서 콜로니 색을 관찰하였다.

### III. 결과

#### A. 분자 내 재조합 효율 측정을 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 *loxP 511*이 있고 3D8 V<sub>L</sub> gene의 downstream에는 g3p와 E-tag을 클로닝하는 유전자가 순서대로 위치해 있다. E-tag과  $\beta$ -galactosidase 유전자의 사이에 *loxP wt*이 위치하고 있다. 또한 V<sub>H</sub> gene의 upstream에는 *lac* promoter가 있는데  $\beta$ -galactosidase는 5번째와 6번째 아미노산이 떨어져 있어도(약 400 bp) 활성이 유지되는 특징이 있으므로  $\beta$ -galactosidase 유전자의 1번째 아미노산부터 5번째 아미노산 까지 포함되도록 하였다 (Fig. 4).

pFGB 벡터는 두 *lox* site 사이에 재조합이 일어날 경우, SV<sub>H</sub> gene, *lox* 1, V<sub>L</sub> gene, g3p 그리고 *lox* 2를 사이에 두고 떨어져 있던  $\beta$ -galactosidase 유전자의 5번째와 6번째 아미노산의 거리가 약 400 bp로 가까워진다. 이때 5번째와 6번째 아미노산 사이에는 V<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 *lox wt*을 비롯하여 6개의 mutant *lox* sequence들, 즉 *lox 2272*, *lox 5171*, M2, M3, M7 및 M11을 각각 *lox* 1 site와 *lox* 2 site에 클로닝 함으로써 총 41개 조합의 pFGB-*lox1/lox2* 벡터를 완성하였다 (Fig. 3).

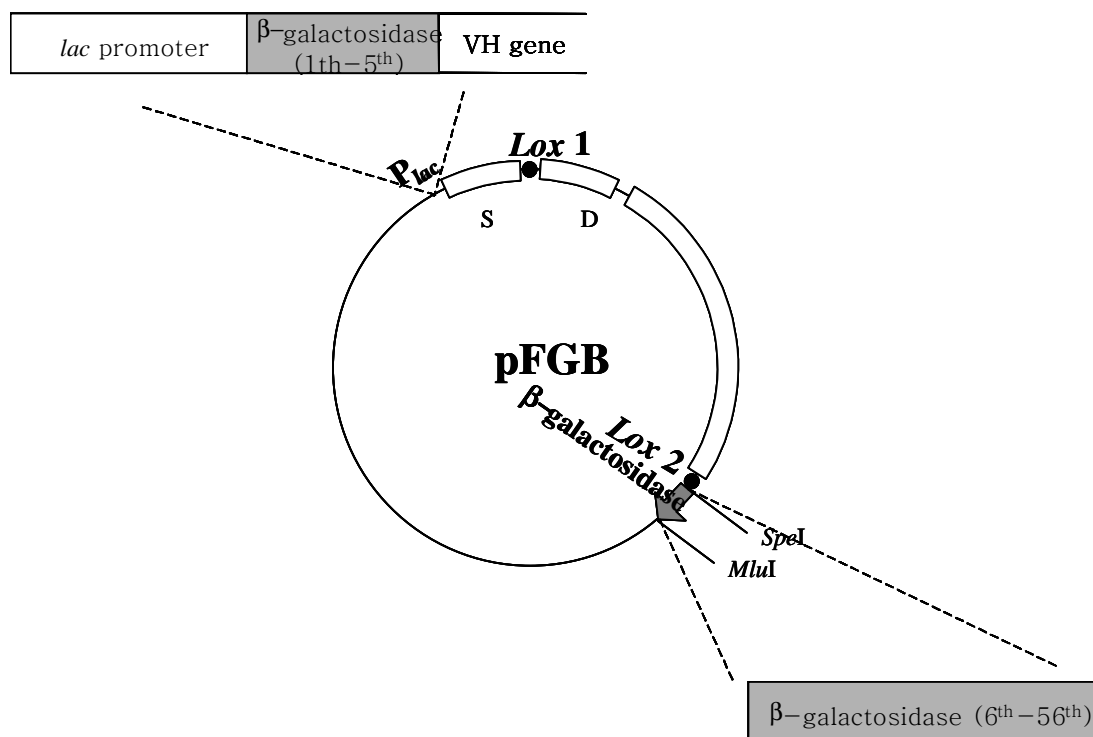


Fig. 4. Structure of the pFGB-*lox1/lox2* vector for the measurement of intramolecular recombination efficiency.

## B. Cre를 발현하는 박테리아 내에서의 재조합 효율

pFGB-*lox1/lox2* 벡터를 이용하여 cre 발현 박테리아에서 분자 내 재조합 효율을 측정하였다. 본 시스템은 X-gal 염색을 통한 콜로니의 색을 통해 재조합 여부를 확인하고 청색 콜로니의 수를 셈으로써 재조합 효율을 산출하였다 (Table. 2). 그 결과, M2의 경우 M3, M11과 100%의 재조합 효율을 나타냈으며, M3의 경우 자신과 동일한 염기에서도 50% 이하의 낮은 재조합 효율을 나타냈고 M2, M11, 2272와의 재조합에서는 100%의 높은 재조합 효율을 나타냈다. 반면, M7은 자신과는 100%의 재조합 효율을 나타냈고 5171과는 0.22%의 낮은 재조합 효율을 나타냈다. 또한 *lox* sequence의 위치가 재조합의 효율에는 큰 영향을 미치지 않는다는 것으로 나타났다 (Table. 2).

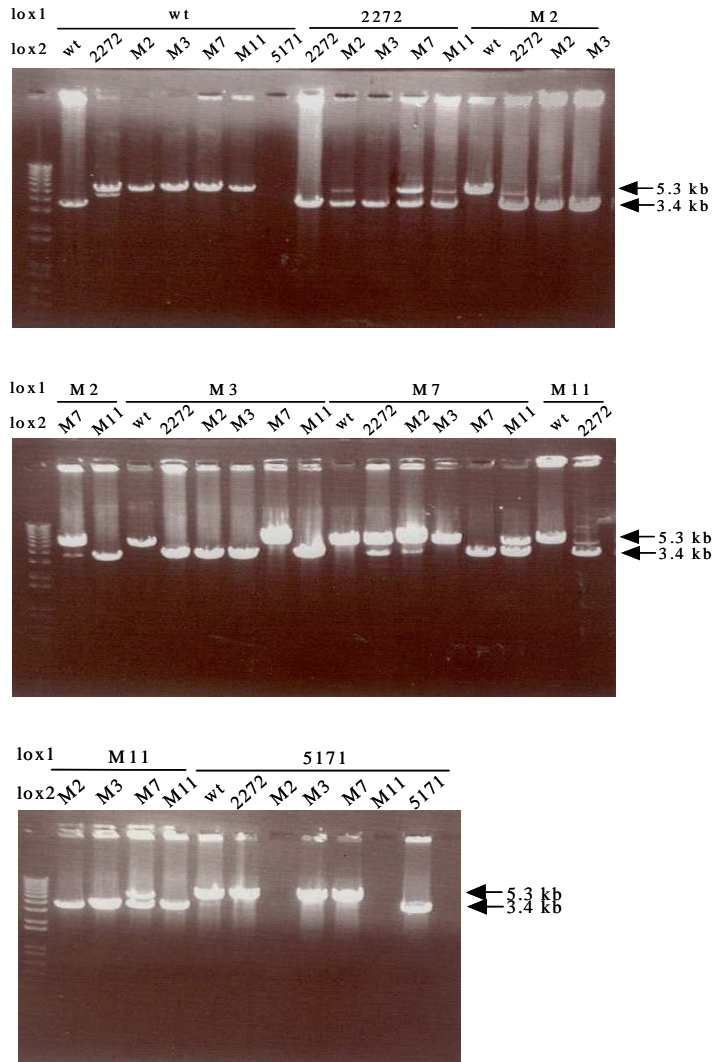
Cre 발현 박테리아 내에서의 재조합 효율을 DNA 강도 (intensity)를 확인하기 위하여 *NcoI* 처리 후, 1% agarose gel 상에서 전기영동 하였다. Gel 상에서의 DNA band를 육안으로 확인 하였을 때 wt/M2의 경우 0%로 보이지만 콜로니 색으로 측정한 재조합 효율은 0.29%로 나타났고, M2/M2의 경우도 gel 상에서 육안으로 DNA band를 확인하였을 때 100%로 보이지만 콜로니 색으로 측정한 재조합 효율은 87.63%이고, wt/M11, M7/5171의 경우도 gel 상에서 육안으로 DNA band를 확인 하였을 때 0%로 보이지만 콜로니 색으로 측정한 재조합 효율은 각각 0.11%, 0.22%를 나타냈습니다. 다른 *lox* mutant/*lox* mutant의 경우에서도 gel상에서 DNA band를 육안으로 확인한 결과와 콜로니 색으로 측정한 재조합 효율 결과의 재조합 효율은 대체로 일치하였지만 (Fig. 5) 콜로니 색으로 재조합 효율을 측정하는 시스템이 gel상에서 DNA band를 육안으로 확인한 결과보다 민감도가 높다는 것을 볼 수 있었다.



**Table 2. Recombination efficiency between two mutant *lox* sequences in BS1365.**

<i>lox2</i> \ <i>lox1</i>	wt	2272	M2	M3	M7	M11	5171
wt	100%	0%	0.29% ±0.41	0%	0%	0.11% ±0.13	
2272	0%	100%	73.86% ±2.09	100%	32.97% ±0.37	78.07% ±8.89	0%
M2	0%	83.67% ±0.89	87.63% ±1.11	100%	10.9% ±2.48	100%	
M3	0%	98.46% ±0.29	100%	46.60% ±0.92	0%	100%	0%
M7	0%	47.63% ±1.25	6.63% ±0.33	0%	100%	62.27% ±1.68	0.22% ±0.17
M11	0%	76.23% ±7.92	100%	100%	57.17% ±0.52	100%	
5171	1.79% ±0.12						100%

Recombination efficiency was calculated by the ratio of blue colony to total colony number.



**Fig. 5. DNA analysis after recombination in BS1365.** Recombination in pFGB-*lox1/lox2* vectors that have different combinations of *lox* sites was performed in cre-expressing BS1365 bacterial cells. After recombination, plasmid were purified from BS1365 and linearized by *NcoI* restriction enzyme.

### C. 청색 콜로니와 흰색 콜로니로부터 분리한 벡터의 확인

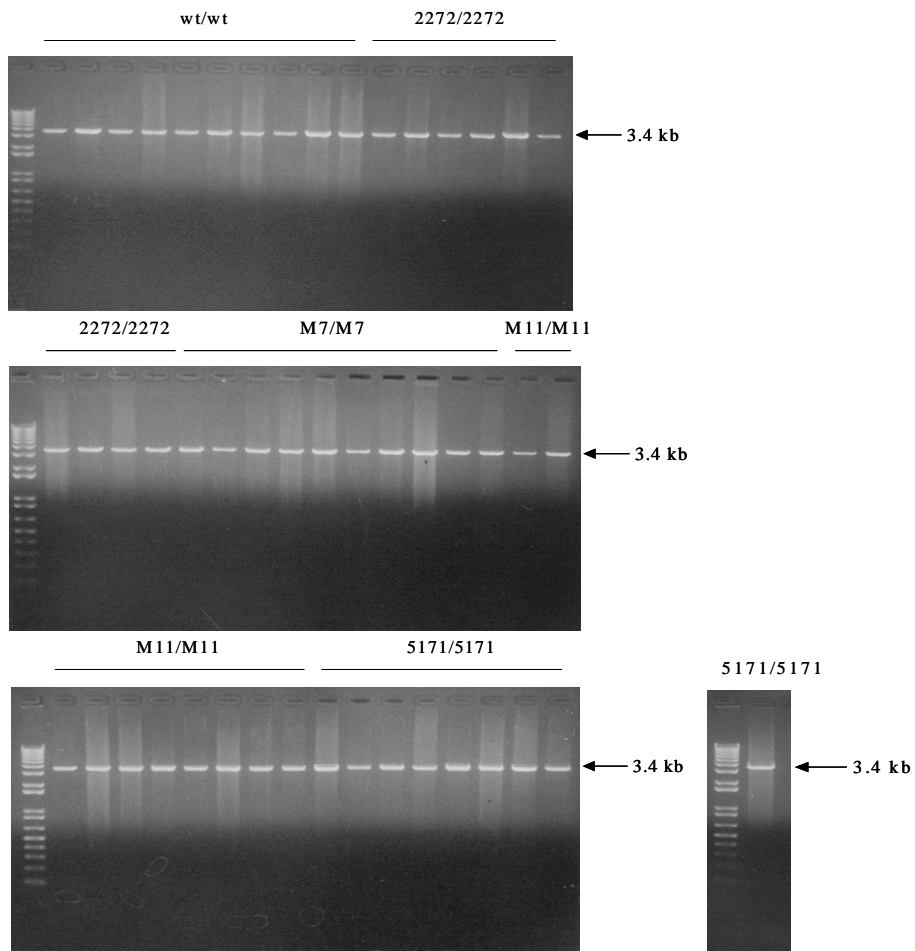
BS1365 내에서 cre 매개 재조합 반응 후, 형질전환된 plasmid DNA를 분리하여 X-gal 염색을 하면 재조합 반응이 일어난 DNA는 청색 띠게 된다. 이때 청색 콜로니가 재조합 반응의 결과로 나타난 것인지 확인하기 위하여, 반면 흰색 콜로니는 재조합이 일어나지 않은 원래의 벡터 구조를 유지하고 있는지를 확인하기 위하여 DNA를 분리 (Labo Pass kit)하고 제한효소 *NcoI*으로 처리한 후, 전기영동하였다 (Fig. 6). Mutant *lox* sequence 간에 재조합 반응이 일어나게 되면 원래의 벡터 구조에서 *lox* 1 site와 *lox* 2 site 사이에 존재하는 VL gene과 g3p의 결실이 나타나게 되어 DNA의 크기가 3.4 kb가 된다 (Fig. 6).

### D. Cre 재조합 효소를 사용한 *in vitro* 재조합 효율 측정

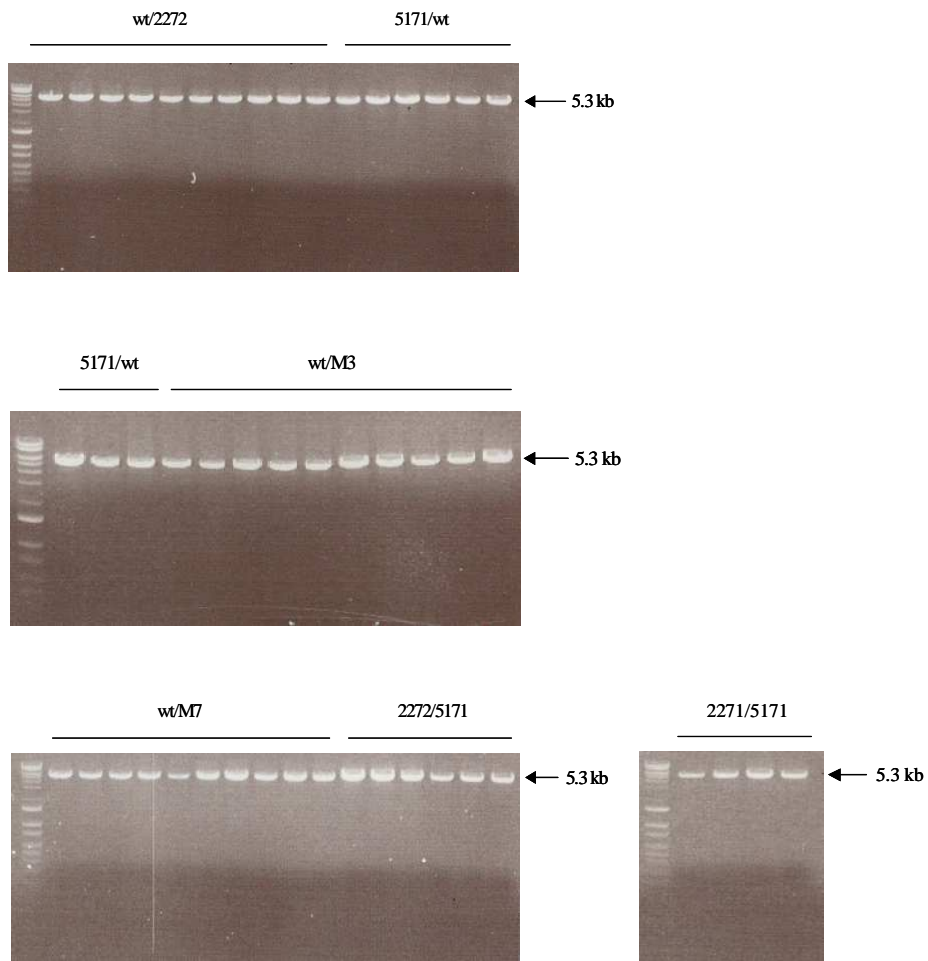
정제된 cre 재조합 효소의 양에 따른 재조합 효율의 차이 관찰에서는 gel상에서 관찰했을 때 cre 재조합 효소의 양이 증가함에 따라 재조합이 일어나서 생긴 3.4 kb의 band도 진해지는 것으로 보아 재조합 효율도 증가하는 것으로 나타났다 (Fig. 8A). 또한 X-gal 염색을 통해 콜로니의 색으로 관찰했을 경우에도 cre 재조합 효소의 양이 증가함에 따라 재조합 효율이 증가하는 것으로 나타났다 (Fig. 8B). 반응 시간에 따른 재조합 효율의 차이 관찰에서는 반응 시간을 증가 시킴에 따른 재조합 효율의 차이는 나타나지 않았다 (Fig. 9).

pFGB-*lox1/lox2* 벡터를 이용하여 정제된 cre 재조합 효소에 의한 *in vitro* 재조합 효율을 *in vivo* 재조합 효율 측정과 마찬가지로 재조합 효율을 측정하였다 (Table. 3). *In vivo*에서 100%의 재조합 효율을 나타냈던 동일한 염기의 두

*lox wt* 간의 재조합 반응은 *in vitro*에서는 35% 의 재조합 효율을 나타냈고, *lox 2272* 간의 재조합 효율은 12%, M11 간의 재조합 효율은 16%의 효율을 나타냈다. 정제된 cre 재조합 효소를 사용한 *in vitro* 재조합 반응 시스템에서는 재조합 효율이 전체적으로 상당히 낮게 나타났다 (Table. 3).



**Fig. 6.** Analysis of the plasmids purified from the blue colonies after recombination in BS1365. After recombination between homologous *loxP* sites (pFGB-wt/wt, 2272/2272, M7/M7, M11/M11, 5171/5171) in BS1365, plasmids were isolated and linearized by *Nco*I. All of plasmids showed the 3.4 kb DNA that was resulted from the excision of 1.9 kb DNA fragment flanked with two *lox* sequences.

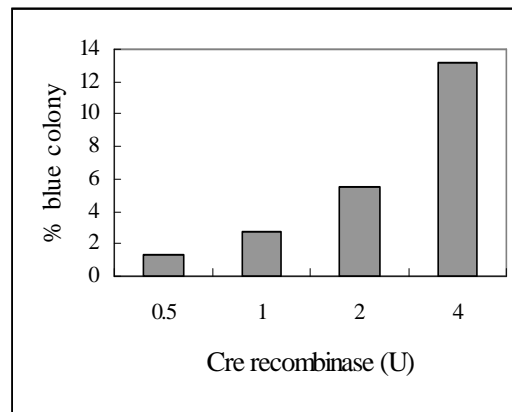
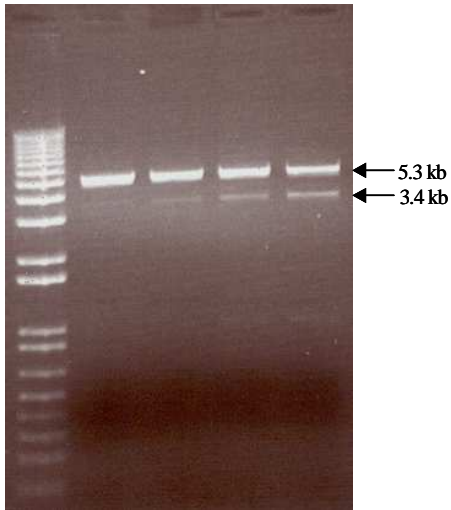


**Fig. 7.** Analysis of the plasmids purified from white colonies after recombination in BS1365. Recombination between heterologous *loxP* sites (pFGB-wt/M7, 2272/5171, wt/2272, 5171/wt and wt/M3) was followed by *NcoI*-digesion of plasmids that were isolated from the white colonies.

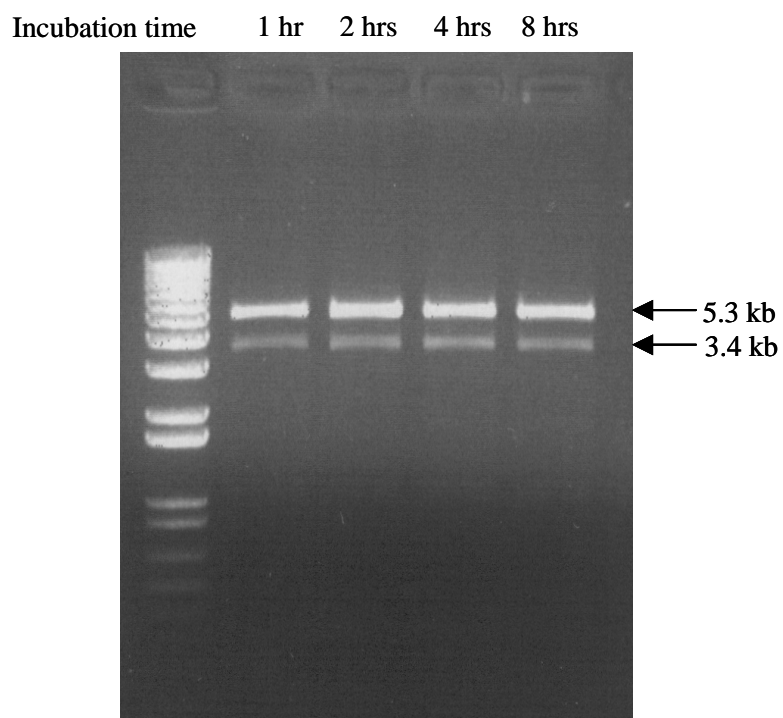
A)

B)

Cre recombinase 0.5 U 1 U 2 U 4 U



**Fig. 8. Analysis of *in vitro* recombination efficiency by amounts of cre recombinase.** Intramolecular recombination of pFGB-wt/wt (250 ng) was undergone in the presence of cre recombinase of various amounts at 37°C for 1 hr (lane 1 : 0.5 U, lane 2 : 1 U, lane 3 : 2 U, lane 4 : 4 U). (A) Agarose gel electrophoresis of reaction mixtures. (B) *In vitro* recombination efficiency. Aliquots of reaction mixture were transformed into JM109 and blue colonies appeared by X-gal staining were counted.



**Fig. 9. *In vitro* recombination efficiency in the course of incubation time.** Intarmolecular recombination of pFGB-wt/wt (250 ng) was undergone in the presence of 2.5 U cre recombinase at 37°C for 1 hr (lane 1), 2 hr (lane 2), 4 hr (lane 3) and 8 hr (lane 4).



Table 3. Recombination efficiency using a cre recombinase (*in vitro*)

<i>lox1</i> \ <i>lox2</i>	wt	2272	M2	M3	M7	M11
wt	35.57% ±4.37					
2272	0%	12.87% ±4.22				
M2	0%	0%	53.60% ±4.30			
M3	0%	0%	11.2%	37.30% ±10.10		
M7	0%	0%	0.1%	0%	19.25% ±6.75	
M11	0%	0.2%	9.5%	8.3%	0%	16.6% ±5.40

Recombination efficiency was calculated by the ratio of blue colony to total colony number.

## IV. 고찰

Cre/*lox* 재조합 시스템을 이용하여 다양한 유전자 조작의 활용범위를 넓히기 위하여 지금까지 'incompatible *lox* site'를 동정하기 위해 연구들이 진행되어왔다. 이들 연구로부터 밝혀진 *lox* sequence로서 M2, M3, M7, M11, *lox 2272*, *lox 5171* 등이 보고 되어있다 (Kirk R. 등, 1986; Srephen 등, 2002). 그러나 이들 sequence들은 각기 다른 방법에 의해 재조합 효율이 관찰된 것이다. 재조합 효율은 측정하는 시스템에 따라 다른 결과를 나타낼 수 있으므로 (Robert W. 등, 2001), 본 연구에서는 각기 다른 재조합 효율 측정 시스템에서 incompatible *lox* sequence로 알려진 6개의 mutant *lox* sequence를 대상으로 단일재조합 효율 측정 시스템에서 재조합 효율을 측정하고자 하였다. 분자 내 재조합 효율 측정을 위한 벡터 시스템을 구축한 후, 이 시스템에 mutant *lox* sequence를 클로닝, cre-매개 재조합 반응, 재조합 반응물의 형질전환의 과정을 거침으로써 재조합 효율을 측정하였다.

Stephen 등에 의한 DNA band로 재조합을 측정하는 Southern blot 방법은 재조합 반응물 (DNA)의 점적 (loading) 량에 따라 다른 결과를 보일 수 있고 정량적으로 재조합 효율을 표시할 수 없는 단점이 있다. 다른 방법으로 재조합 반응을 측정할 경우, 재조합 효율이 다르게 나타날 수 있으므로, 재조합체의 분석 양에 따른 결과의 오차가 거의 없으며 재조합 효율을 정량적으로 나타낼 수 있는 시스템을 이용하여 incompatible *lox* sequence를 동정하는 일은 중요하다. 본 연구에서 사용한 벡터는 두 *lox* sequence간에 재조합이 일어날 경우 *lac* promoter에 의해  $\beta$ -galactosidase가 활성화가 되어 X-gal 염색 시 청색을 나타내게 구성되었다.

Cre를 발현하는 박테리아인 BS1365를 이용하여 *lox wt*과 6개의 mutant *lox* sequence의 재조합 효율을 측정한 결과, 두 *lox* sequence가 동일할 때 재조합 효율은, M2와 M3를 제외하고, *lox wt*, *lox 2272*, *lox 5171*, M7 및 M11은 100%의 재조합 효율을 나타냈다 (Table 2). Stephen 등의 연구에 의하면 M3는 자신과의 재조합이 90% 이상 일어났다고 보고 하였지만 본 연구에서는 46%의 낮은 재조합 효율을 나타낸 반면, M3/M2, M3/M11의 재조합 효율은 Leinwand의 연구와 마찬가지로 100%의 높은 재조합 효율을 나타냈다 (Stephen 등, 2002). 이 결과는 Southern blot을 이용한 재조합 효율을 나타내는 시스템의 단점에 의해 나타나는 재조합 효율의 차이와 cre-발현 박테리아를 서로 다른 것으로 사용한 것도 원인이 될지 모른다고 생각한다. M11의 경우는 자신과는 100%의 높은 재조합 효율을 나타냈지만 M2, M3와도 100%의 높은 재조합 효율을 나타냈다. *Lox 5171*은 자신과는 100%의 재조합 효율을 나타낸 반면, 2272와는 0%의 재조합 효율을 나타냈고 M7도 자신과는 100%의 재조합 효율을 나타냈고 5171과는 0.22%의 낮은 재조합 효율을 나타냈다. 그 결과 wt, 2272, 5171와 wt, M7, 5171을 지금까지 한 DNA상에 두개의 *lox* site가 있는 경우만을 이용할 수 있었던 유전자 조작 시스템에서 여러 개의 incompatible *lox* site의 사용이 가능하므로 cre/*lox* 재조합 시스템을 이용한 유전자 조작 시스템의 활용을 넓힐 수 있을 것이다.

*In vitro*에서의 mutant *lox* sequence 사이의 재조합에서는 전체적으로 재조합 효율이 낮게 나타났다. 여러 번의 실험을 반복하였지만 낮은 재조합 효율을 향상시킬 수 없었고 그 원인에 대해서는 알 수 없었다. Cre 재조합 효소의 재조합 효율을 BS1365에서의 재조합 효율만큼 향상시킬 수 있다면 cre/*lox* 재조합 시스템을 이용이 훨씬 용이해질 것이므로 앞으로 cre 재조합 효소를 이용한 *in vitro*에서의 재조합 효율을 높이는 연구가 진행 되어야할 것이다.

## V. 결론

새로운 벡터 시스템을 이용하여 *lox* site 사이의 Cre-매개 재조합 효율을 측정하기 위하여 재조합 효율을 정량적으로 측정할 수 있는 새로운 벡터 pFGB를 제작하였다. *Lox wt*과 6개의 mutant *lox* site인 M2, M3, M7, M11, *lox 2272*, *lox 5171*을 사용하여 pFGB에 클로닝하여 41개의 pFGB-*lox/lox*를 얻어 이 plasmid들을 cre를 발현하는 BS1365 박테리아를 이용하여 재조합을 유도하고 plasmid DNA를 분리한 후, ampicillin, X-gal, IPTG를 포함하는 LB agar plate에 펴 바른 후, 콜로니 색을 관찰하였다. 새로운 벡터 (pFGB)와 BS1365 박테리아를 이용하여 다양한 *lox* site들 사이의 Cre-매개 재조합 효율을 측정하여 서로 다른 sequence의 *lox* site들 사이에서의 재조합이 1% 이하인 그룹이 *lox wt*, *lox 2272*, *lox 5171*과 *lox wt*, M3, M7, *lox 5171*로 나타났다. 앞으로의 연구에서는 incompatible한 *lox* site들을 이용하여 한번에 여러 개의 유전자를 교체하는 등의 특정 유전자의 염색체내 통합, 유전자 교체 및 결실과 같은 유전자 조작에 적용하는 연구가 진행되어야 할 것이다.

## 참고문헌

1. Albert H, Dale EC, Lee E, Ow DW: Site-specific integration of DNA into wild-type and mutant *lox* sites placed in the plant genome. *Plant J* 7: 649-659, 1995
2. 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
3. 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
4. Bethke B, Sauer B: Segmental genomic replacement by Cre-mediated recombination: genotoxic stress activation of the p53 promoter in sing-copy transformants. *Nucleic Acids Res* 25: 2828-2834, 1997
5. 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

6. Griffiths AD, Williams SC, Hartley O, Tomlinsom IM, Waterhouse P, Crosby WL, Kontermann RE, Jones PT, Low NM, Allison TJ, Prospero TD, Hoogenboom HR, Nissim A, Cox JPL, Harrison L, Zaccolo M, Gherardi E, Winter G: Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. *EMBO J* 13: 3245-3260, 1994
7. 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
8. 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
9. Gwang Lee, Izumu Saito: Role of nucleotide sequences of *loxP* spacer region in Cre-mediated recombination. *Gene* 216: 55-65, 1998
10. 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
11. Kirk R, Thomas, Kim R, Folger, Mario R, Capecchi: High frequency

- targeting of genes to specific sites in the mammalian genome. *Cell* 44: pp.419-428. 1986
12. Lakso M, Sauer B, Mosinger Jr, B, Lee EJ, Manning RW, Yu SH, Mulder KL, Westphal H: Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 6232-6236. 1986
  13. Landy, A: Dynamic structural and regulatory aspects of  $\lambda$  site-specific recombination. *Annu Rev Biochem* 58: 913-949, 1989
  14. Langer SJ, Ghafoori AP, Byrd M, Leinwand L: A genetic screen identifies novel non-compatible *loxP* sites. *Nucleic Acids Res* 30: 3067-3077, 2002
  15. Lee G, Saito I: Role of nucleotide sequence of *loxP* spacer region in Cre-mediated recombination. *Gene* 216: 55-65, 1998
  16. Metzger D, Clifford J, Chiba H, Chambon P: Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92: 6991-6995, 1995
  17. Orban PC, Chui D, Marth JD: Tissue- and site-specific DNA

- recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 89: 6861-6865, 1992
18. 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
  19. 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
  20. Robert W, Siegel, Raj Jain, Andrew Bradbury: Using an *in vivo* phagemid system to identify non-compatible *loxP* sequences. *FEBS Letters* 505: 467-473, 2001
  21. Ronald H, Hoess, Anna Wierbicki, Kenneth Abremski: The role of the *loxP* spacer region in *PI* site-specific recombination. *Nucleic Acids Res* 14: 2287-2300, 1986
  22. Sauer B: Inducible gene targeting in mice using the Cre-*lox* system. *Methods* 14: 381-392, 1998
  23. Sblattero D, Bradbury A: Exploiting recombination in single bacteria to



- make large phage antibody libraries. *Nature Biotechnology* 18: 75–80, 2000
24. Siegel RW, Jain R, Bradbury A: Using an *in vivo* phagemid system to identify non-compatible *loxP* sequences. *FEBS Letter* 505: 467–473, 2001
  25. 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
  26. 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
  27. Zahra DG, Vancov T, Dunn JM, Hawkins NJ, Ward RL: Selectable *in-vivo* recombination to increase antibody library size--an improved phage display vector system. *Gene* 227: 49–54, 1999

-ABSTRACT-

Measurement of Efficiency of Cre-mediated  
Recombination between *lox* Sites Using a New  
Vector System.

Mi young Yun

Department of Medicine  
The Graduate school, Ajou University

(Supervised by Instructor Myung Hee Kwon)

**Purpose** : To measure the Cre-mediated recombination efficiency between '*lox* sites' using a new vector system.

**Material and Methods** : A new vector (pFGB) to analyze Cre-mediated recombination efficiency between two *lox* sites was constructed. The combinations of wild type and mutant *lox* sites that are *lox* wt, M2, M3, M7, 2272, and 5171 were cloned into a pFGB vector, resulting in 36 pFGB-*lox/lox* 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. Recombination efficiency was measured by the ratio of the number of blue colony to total colony.

**Results** : Combinatorial cloning of mutant *lox* sites that are *lox wt*, M2, M3, M7, 2272, and 5171 into pFGBst vector resulted in 36 pFGB-*lox/lox* constructs. The results obtained from the recombination in Cre-expressing BS1365 bacterial cells showed that 2272, 5171, M3 and M7 are incompatible with *lox wt* (less than 0.1% recombination efficiency). Most Cre-mediated recombination efficiency between homologous *lox* sites (M2/M2, M7/M7, 2272/2272, and 5171/5171) was about 99%, except 46% of M3/M3. Recombination between heterologous *lox* sites revealed that both of one group of three *lox* sites (*wt*, 2272 and 5171) and another group of four-*lox* sites (*wt*, m3, m7, 5171) are incompatible each other within their same groups, having less than 1% recombination efficiency.

**Conclusion** : Using a new vector (pFGB) and BS1365 bacterial cells, the Cre-mediated recombination efficiency between various *lox* sites was measured. Incompatible *lox* sites, having less than 1% recombination efficiency, were divided into two groups; one includes *lox wt*, *lox 2272*, and *lox 5171* and the other does *lox wt*, *lox 5171*, M3, and M7. These incompatible *lox* sites would be useful for the construction of a cloning

system for gene manipulations.

---

Key words : cre/*lox* recombination system, cre recombinase, *lox wt*, *lox 2272*,  
*lox 5171*, M2, M3, M7, M11, pFGB vector