

윤진호 교수지도

석사학위 청구논문

*Aspergillus nidulans*에서 유성분화  
초기에서 얻은 EST 유전자의  
결실돌연변이 제조

2007

성신여자대학교 교육대학원

생물교육

전지영

*Aspergillus nidulans*에서 유성분화  
초기에서 얻은 EST 유전자의  
결실돌연변이 제조

윤진호 교수지도

이 논문을 석사학위논문으로 제출함

2007년 5월

성신여자대학교 교육대학원

생물교육

전지영

# 인 준 서

전지영의 석사학위 논문으로 인준함.

심사위원\_\_\_\_\_인

심사위원\_\_\_\_\_인

심사위원\_\_\_\_\_인

성신여자대학교 교육대학원

## 논문개요

사상성 진균류인 *Aspergillus nidulans*의 유성분화에 관여하는 유전자들의 조절 network을 규명하고자, 유성분화 초기의 균사체로부터 expressed sequence tag(EST)을 얻은 바 있다. 이렇게 얻은 EST들을 *Aspergillus nidulans*의 genomic DNA sequence와 비교하여 EST를 포함하는 유전자들을 알아내었으며, 이들 중에서 특정 motif를 갖고 있거나 기능이 전혀 알려지지 않아 분화에 관여할 가능성이 있는 14개의 유전자를 선별하였다.

본 연구에서는 이 유전자들이 분화에 어떤 영향을 미치는지를 알아보고자 각각의 결실돌연변이주 제작하였다. 먼저, 선별마커로 *argB* 유전자를 넣은 deletion constructs를 DJ-PCR (Double Joint - Polymerase Chain Reaction)을 이용하여 제조하여 야생형 균주에 형질전환시켰다. 이렇게 얻은 형질전환체들로부터 genomic DNA를 추출하여 PCR과 Southern blotting을 실시하여 각각의 결실돌연변이를 확인하였다. 그 결과 14개의 유전자 중 8개의 결실돌연변이를 각각 확인 · 분리하였다.

# 목 차

논문개요

I. 서론 .....	1
II. 실험재료 및 방법	
A. 실험재료.....	4
1. 사용균주	
2. 배지 및 배양조건	
3. 실험에 사용된 효소 및 시약	
B. 실험방법 .....	12
1. Double joint PCR (DJ-PCR)을 이용한 knockout mutant 제조 .....	12
2. <i>A. nidulans</i> 의 형질전환 .....	12
3. Transformants의 획득 및 확인 .....	13
4. <i>A. nidulans</i> 로부터의 genomic DNA 추출.....	13
5. Transformants의 PCR 확인 .....	13
6. Southern 분석 .....	14
III. 결과.....	24
IV. 결론.....	41

참고문헌

영문초록

## 도 표 목 차

Table 1. Strains used in this study .....	10
Table 2. EST used in this study .....	11
Table 3. PCR primer used in this study.....	15
Table 4. <i>A. nidulans esd</i> deletion PCR conditions for DJ-PCR .....	19
Table 5. PCR condition for confirmation of disruptants by PCR.....	21
Table 6. Southern Blot analysis using restriction enzyme and Transformant size of <i>esd</i> genes .....	23

## 그림 목 차

Figure 1. Life cycle of <i>Aspergillus nidulans</i> .....	3
Figure 2. DJ-PCR (Double Joint PCR) step .....	22
Figure 3. <i>Esd</i> gene deletion by DJ-PCR.....	25
Figure 4. Confirmation of <i>esd</i> gene disruption by PCR .....	28
Figure 5 Confirmation by Southern blot analysis .....	33

# I. 서론

사상성 진균류인 *Aspergillus nidulans*는 전통적으로 유전학적 연구의 좋은 재료로 활용되어 왔다. 이는 진핵생물이면서 증식이 비교적 빠르고 간단한 합성배지에서 잘 자라는 등 미생물이 갖는 여러 가지 장점을 지닌다.

*A. nidulans*는 하등한 진핵생물이지만 무성생활사(asexual life cycle)와 유성생활사(sexual life cycle)를 모두 가지고 있으며, 계통발생학적 위치로 미루어 볼 때, 원핵생물의 원시적인 조절기작 뿐만 아니라 고등한 진핵생물의 정교한 조절체계도 가지고 있을 것으로 사료된다 (Fig. 1). 또한 간단한 합성배지에서도 잘 성장하고, 성장 중 잘 분화된 구조물을 형성하는 비교적 단순한 생활사를 가진다. 특히 무성과 유성생활사 외에도 독특한 준유성생활사(para-sexual life cycle)를 가지고 있어 유전학적, 생화학적 분석이 용이하다. 이러한 장점에 더하여 분자생물학적 기술의 도입으로 최근에 *A. nidulans*의 무성과 유성분화에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

단수체의 (haploid) 생물인 *A. nidulans*는 체세포 분열을 통하여 무성포자(conidia)를 생성하는 무성생식 과정과 감수분열에 의해 자낭포자(ascospore)를 생성하는 유성생식 과정, 그리고 독특한 준유성생식 과정의 생활사를 가지며, 각각의 포자를 형성하는 과정에서 독특한 형태 발생이 이루어진다 (Smith *et al.*, 1977; Zonneveld, 1977).

Human Genome project가 시작한 후 거대한 유전자를 어떻게 효율적으로 전체 염기서열을 분석할 것인지에 대해 관심이 모아졌다. 비용과 시간을 줄이기 위해 전체 유전자를 작은 조각으로 나누고 그 작은 조각들의 염색체 상에서의 순서를 정하는 일(mapping)이 진행되어야 했으며 mapping이 이루어진 후 염기서열을 결정하는 순으로 일을 시작할 때, 유전학자들이 2,300여 개의 유전자들로 map을 작성하였는데, 더 자세한 map이 필요하게 되었다. 따라서

유전자에 의한 map의 작성과 병행하여 더 효율적이고 빠른 방법이 필요하게 되었는데 그것이 Sequence Tagged Sites(STSs)의 도입이었다. STS에 의한 map의 작성은 인체 유전자를 적당한 제한효소로 절단하여 얻은 DNA 조각을 in situ hybridization에 의해 microscope로 조사하여 전체 염색체 중 어느 위치에 있는가를 조사하여 만들어졌다. 그런데 STS는 genomic 옴의 조각으로부터 얻어지기 때문에 polymorphism이나 virus 등의 유전자의 변이가 생긴 부분에 의한 착오를 피할 수 없다는 단점이 있다. 이를 극복하기 위해 발현이 일어나는 유전자에 의한 map의 작성이 시도되었는데 그것이 바로 Expressed sequence taggings(ESTs)이다.

즉, EST는 특정 조직에서 발현된 mRNA로부터 cDNA를 합성하고 만들어진 cDNA의 염기서열을 분석하여 얻어지는데 얻어진 EST를 가지고 STS와 동일한 과정을 거쳐 염색체 지도를 작성한다. EST를 이용함으로써 얻는 장점은 위에서 언급한 STS의 단점을 극복하는 것 외에도 각 조직마다 유전자 발현양상을 알 수 있는 부가적인 정보를 얻게 된다는 것이다.

본 연구는 *Aspergillus nidulans*의 유성분화에 관여하는 유전자들의 조절 network를 규명하고자 하는 목표 달성을 위하여 유성분화 초기의 균사체로부터 expressed sequence tag(EST)을 얻은 바 있다. 본 연구에서는 단기 목표를 이들 EST들로부터 분화 조절에 관여할 가능성이 있는 EST들을 대상으로 완전한 크기의 유전자를 분리하고, 이들 유전자 각각의 결실 돌연변이주를 제조하여 분화 관련 형질을 관찰함으로써 유성분화에 관여하는 유전자를 다수 얻어내고자 한다.

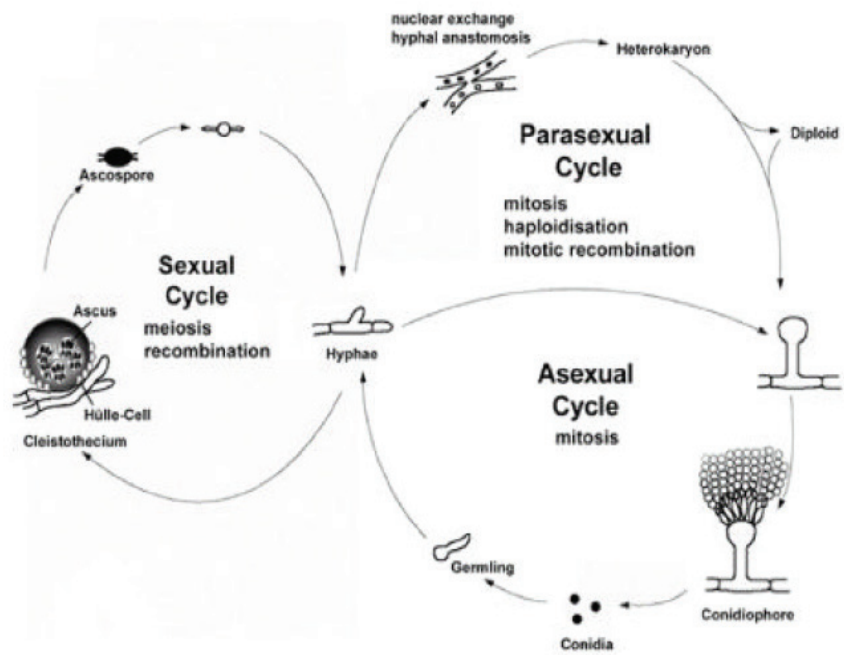


Figure 1. Life cycle of *Aspergillus nidulans* (Adams and Yu., 1993)

## II. 실험재료 및 방법

### A. 실험재료

#### 1. 사용 균주

본 실험에서 사용된 *Aspergillus nidulans* 균주로는 *A. nidulans*의 야생형 균주인 FGSC4를 사용하였다. 유전자의 결손 돌연변이체를 만들기 위한 균주로는 HSY2를 사용하였다 (Table 1). 결손돌연변이를 제작하고자 한 14개의 EST들은 Table 2에 정리하였다.

#### 2. 배지와 배양 조건

본 실험에서 *A. nidulans*의 배양에 사용된 완전 배지(CM), 최소배지(MM)는 Scott and Kafer의 방법을 사용하였다. 균주의 배양온도는 37°C로 하여 완전배지에서 3일간 배양하였으며, 유전학적 분석을 위해서는 영양요구들이 첨가된 최소 배지를 사용하였다. 액체 배양시에는 분생포자를 3일간 배양한 배양접시로부터 0.08% Tween 80으로 수확한 후 적당한 접종수( $10^7 \sim 10^6$ /ml)로 희석하여 CMR broth 100 ml 배양액에 접종하였다. *Aspergillus nidulans* 배양에 사용된 배지 및 사용된 Chemical들은 Difco, Q-Bio, Sigma와 MP 제품을 사용하였다. 배지의 조성은 다음과 같다.

#### \* CMRK

1% Glucose  
0.15% Yeast Extract  
0.15% Casein Hydrolysate  
100X Vitamine solution  
50X Minimal Salt  
10x Arginine  
KCl  
100X Thiamine HCl

**\* CMR**

1% Glucose  
0.15% Yeast Extract  
0.15% Casein Hydrolysate  
10% Arginine  
0.25% (100X) Vitamin Solution  
100X Thiamin HCl  
50X Minimal Salt

**\* CM**

1% Glucose  
0.15% Yeast Extract  
0.15% Casein Hydrolysate  
100X Vitamin Solution  
100X Thiamin HCl  
50X Minimal Salt

**\* MMK + Thiamin HCl**

1.0% Glucose  
2.0% agar  
4.47% KCl  
100X Thiamine HCl  
50X Minimal Salt

**\* 50X Minimal Salt stock**

15.2% NaNO<sub>3</sub>  
2.6% MgSO<sub>4</sub>  
15.2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
2.6% KCl  
0.4% (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>  
0.04% ZnCl<sub>2</sub>  
8 x 10<sup>-4</sup>% MnCl<sub>2</sub>  
3.2 x 10<sup>-3</sup>% CuSO<sub>4</sub>  
1.27 x 10<sup>-3</sup>% FeSO<sub>4</sub>

**\* 100X Vitamine solution stock (500 mL)**

Riboflavin 50 mg  
p-Aminobenzoic acid 250 mg  
pyridoxine-HCl 250 mg  
Biotin 2ml  
Ascorbic acid 250 mg  
Folic acid 250 mg  
Thiamine 250 mg  
Nicotine acid 50 mg

**\* 100X Thiamin HCl (100 ml)**

TDW 100 ml  
Thiamin 0.15 g  
filter-strilized with 0.45  $\mu$ l

**3. 실험에 사용된 효소 및 시약**

실험에 사용한 PCR primer 는 GNOTECH 에서, Taq polymerase 는 GENENMED 의 Nova Taq polymerase 를 사용하였다. PCR clean up kit 와 Gel extraction kit 는 QIAGEN 제품을 이용하였다.

Southern blotting 에 사용한 제한효소는 New England Biolabs (NEB) 에서 구입하였으며 ECL (Enhanced Chemiluminescence labeling and detection) kit 는 Amersham Life Science 사의 것을 사용하였다.

**1) *A. nidulans* 형질전환에 사용된 시약**

\* 등장완충용액(Osmotic buffer)

0.6 M KCl, 10 mM NaCl

\* STC 완충용액

1.2 M sorbitol  
10 mM Tris-HCl(pH7.5)  
10 mM CaCl<sub>2</sub>

\* Polyethylene glycol (PEG)용액

25% PEG 8000  
50% Polyethylene glycol  
in LiAc-TE solution

\* KC 용액

0.6 M KCl  
50mM CaCl<sub>2</sub>

\* Soft agar

1% Glucose  
1.7% Bacto-agar  
100X thiamine-HCl  
4.48% KCl  
50X Minimal Salt

\* GlucaneX

GlucaneX 1g  
Osmotic buffer 10 ml  
filter-sterilized with 0.45  $\mu$ l

\* BSA (Bovine Serum Albumin)

BSA 0.2 g

Osmotic buffer 10 ml

filter-sterilized with 0.45  $\mu$ l

## 2) *A. nidulans* genomic DNA 추출에 사용된 시약

\* Breaking buffer

2% Triton X-100,

1% SDS,

100 mM NaCl

10 mM Tris-HCl, pH 8.0

1 mM EDTA, pH 8.0

\* Phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1)

\* RNase A (Amersco, cat# 0675)

10 mM Sodium acetate

(pH 5.2) 9.1 ml

RNase 100 mg

1 M Tris-HCl (pH 7.5) 900  $\mu$ l

## 3) Southern Blotting 에 사용된 시약

\* Depurination solution      20 N HCl

* Denaturation solution	1.5 M sodium chloride 0.5 M sodium hydroxide
* Neutralizing solution	1.5 M sodium chloride 0.5 M tris-HCl(pH7.5)
* 20X SSC	0.3 M sodium citrate 3 M sodium chloride
* Primary wash buffer	6 M Urea 0.4% SDS 0.5X SSC

Table 1. *A.nidulans* strains used in this study

Strains	Genotype
FGSC 4	Wild type, <i>veA</i> <sup>+</sup>
HSY2	<i>pabaA1, anA1; ΔargB::trpC; trpC801 veA</i> <sup>+</sup>

Table 2. EST used in this study

EST	protein number & name	domain
esd183	(AN8714.2) hypothetical protein	/
esd184	(AN7123.2) hypothetical protein	/
esd203	(AN4501.2) 1433_TRIHA 14-3-3 PROTEIN HOMOLOG (TH1433)	14-3-3 proteins
esd206	(AN3600.2) hypothetical protein	/
esd210	(AN6716.2) hypothetical protein	/
esd211	(AN4172.2) hypothetical protein	/
esd218	(AN0641.2) hypothetical protein	Translationally controlled tumor protein
esd232	(AN9297.2) hypothetical protein	/
esd234	(AN3756.2) conserved hypothetical protein	proteasome A-type and B-type
esd239	(AN7036.2) hypothetical protein	Cation efflux family
esd247	(AN1493.2) hypothetical protein	/
esd248	(AN4051.2) hypothetical protein	/
esd252	(AN2425.2) hypothetical protein	putative phosphatase regulatory subunit
esd508	(AN7501.2) hypothetical protein	/

## B. 실험방법

### 1. DJ-PCR을 이용한 knockout mutant 제조

Deletion mutant 제조를 위해 5', 3' flanking region 각 부분과 각각의 *esd*(early sexual development) gene의 ORF 부분을 대체 시킬 selection marker *argB*의 primer를 제작하였다. 5' For, 3' Rev or 3' For, 5' Rev 는 *argB* maker tail을 붙여서 primer를 제작하였다. Knockout construct PCR은 Double joint PCR(DJ-PCR) 방법을 이용하였다(Yu et al., 2004). First PCR 에서는 5' For + marker tail 과 5' Rev, 3' For 와 3' Rev + marker tail, marker gene(*argB*)을 각각을 증폭한 후 전기영동으로 확인 한 다음 QIAGEN PCR clean up kit를 이용하여 purify하였다. First PCR에서 얻어진 product들을 5' flanking amplicon : marker gene(*argB*) : 3' flanking amplicon 1:3:1의 비율로 섞어서 second PCR을 수행하였다. second PCR product를 template로 5' , 3' Nest primer를 이용하여 최종적으로 third PCR을 진행하였다. PCR 후 전기영동으로 확인 한 다음 gel elution 하여 QIAGEN gel extraction kit를 이용하여 purify하였다. DJ-PCR 각 단계마다의 PCR mixture와 reaction 은 Table 4에 정리하였다.

### 2. *A. nidulans*의 형질전환

CMRK에서 3일간 strain을 배양하여 5 ml로 0.0008% Tween80으로 harvest하여  $10^7 \sim 10^6$  cells/ml 정도의 conidia를 CMR broth에 접종하여 37°C에서 16시간 진탕배양하고 Miracloth로 수확하여 osmotic buffer로 두 번 세척하고 물기를 제거하여 0.5 g GlucanX를 녹인 20 ml osmotic buffer에 BSA 0.2 g을 첨가한 것에 넣고 30°C 에서 80 rpm으로 2시간 동안 반응시킨 후 protoplast를 Miracloth에 통과시켜 수확하였다. 4°C 2,000 rpm으

로 2분간 원심분리하여 침전시킨 후 상층액을 제거한 후 24 ml의 STC buffer로 두 번 세척해주었다. 500 ml의 STC buffer를 가하여 침전된 protoplast를 녹이고 microfuge tube에 10  $\mu$ l의 DNA와 100  $\mu$ l의 protoplast 용액 그리고 25% PEG 8000 15  $\mu$ l을 같이 넣은 후 얼음에서 20 분간 방치한 다음 500  $\mu$ l 의 25% PEG 8000을 넣고 실온에서 15분간 방치 하였다. 여기에 KC buffer 1 ml을 첨가하고 MMK plate에 soft agar 5 ml과 섞어 도말한 후 37°C에서 3일간 배양하였다.

### 3. Transformants의 획득 및 확인

3일간 배양한 형질전환체의 표현형을 현미경으로 관찰하며 이들 colony를 wild type과 함께 CM plate에 picking하여 3일간 배양한 후 표현형을 관찰한다. 그 후 MMK plate에 streaking하여 실험에 필요한 colony를 얻었다.

### 4. *A. nidulans*로부터의 genomic DNA 추출

*A. nidulans* genomic DNA는 다음과 같이 분리하였다. 2 ml CM broth에 conidia를 가하여 16시간 동안 배양 후 loop를 이용하여 균사체를 수확한다. 그 후 Breaking buffer 500 ml, silica bead 300  $\mu$ l, 그리고 Phenol : Chlorophorm : isoamy lalcohol 500 ml를 가한 후 bead beater로 깨준다.

13,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 400  $\mu$ l의 상층액을 취한다. 취한 상층액에 2배의 에탄올을 가하여 DNA를 침전시키고 침전된 DNA를 RNase A가 들어간 TE 50  $\mu$ l에 녹인다.

### 5. Transformants의 확인

Genomic DNA isolation에 의해 얻어진 transformants를 For, Rev primer와 argB1, argB2 primer를 이용하여 확인하였다.

PCR mixture와 reaction은 Table 4에 정리하였다.

## 6. Southern 분석

유전자가 정확히 disruption 되었는지 확인하기 위해 Amersham ECL nonisotopic method 를 사용하여 Southern blotting 을 수행하였다. Genomic DNA 를 Table 6 과 같이 제한효소로 처리 후 DNA 절편을 size marker 와 같이 1% low EEO agarose gel 에서 전기영동 하여 분리한 후, depurination 용액에서 15 분, denaturation 용액에서 40 분 그리고 neutralization 용액에서 40 분간 처리하였다. 이어 gel 상의 DNA 단편들을 reverse transfer 방법으로 Schleicher & Schuell 용기를 이용하여 20X SSC 내에서 Hybond-N<sup>+</sup> membrane 으로 4 시간 동안 이동시켰고 UV 로 cross-link(0.15J/cm<sup>2</sup>)하여 membrane 에 고정하였다.

Prehybridization 은 42°C에서 1 시간 동안 ECL hybridization solution 으로 하였고, Probe labeling 은 100 ng/ $\mu$ l의 probe DNA 2.5  $\mu$ l에 TDW 7.5  $\mu$ l를 섞어 준 후 5 분 동안 boiling 시켜 denaturation 시킨 다음 ice 에 재빨리 넣어주었다. Labeling reagent 와 glutaraldehyde 를 10  $\mu$ l씩 넣고 잘 섞어 준 후 37°C에서 10 분간 incubation 한 다음 Prehybridization 한 solution 과 잘 섞어 주고 Hybridization 은 42°C for 16 시간 동안 진행하였다. Primary Wash Buffer 로 membrane 을 wash 하고 2X SSC 로 다시 wash 한 후 ECL DNA detection reagent 를 이용하여 detection 수행한 다음, chemi-doc 에서 Quantity one (Bio-Rad) program 을 이용하여 signal 을 확인하였다.

Table 3. PCR primer used in this study

Primer name	Primer sequence (5' → 3' )
5For183	AGCCAAGGTAGATCCAGGCCTAACACACGGATGAGAACA GAAAGATACTG
5Rev183	CGACCAAGTCATTTGCCAGGACG
3For183	GCCTACTTGTCAGCATGAAGTAC
3Rev183	AGTCAAATGAGGCCTCTAAACTGGTCAGGCATCGCTATT AGCTGAAATAG
5Nest183	GTGTAGGTCCATTTGTGCGG
3Nest183	AGCTCTGAACGGGTCAGCAG
5For184	AGCCAAGGTAGATCCAGGCCTAACACAGATTAGACTACG GAGACCCTGTG
5Rev184	GTCTGATTGGTTCTAATGACGGC
3For184	GTTAGTGCCTCAACATAGTCCGC
3Rev184	AGTCAAATGAGGCCTCTAAACTGGTCAGGAGATGTCTGG ATACTTCCTGG
5nest184	ATGCTTGCTCAAATTTGAGG
3nest184	TGACGGGATTCTCACGTCAT
5For203	GTAGAATCACCTCGTTATAGAGG
5Rev203	AGTCAAATGAGGCCTCTAAACTGGTCAGCACATTCGTTG GCAAGGACTCG
3For203	AGCCAAGGTAGATCCAGGCCTAACACAATGGATGCTAGA CCAATCATTGG
3Rev203	CAACTCAGAGACCGCAGATATCG
5nest203	AGACAAGTAGCGTGCCTCGC
3nest203	GTCAGGTCACGTATAACATG
5For206	AGCCAAGGTAGATCCAGGCCTAACACAGGTACGGTTCAA TCGTCAAGCTC
5Rev206	CTAGCTCGGTGTACCTACGTTAG
3For206	GTCGAGCTTCGACATACTCCAAG
3Rev206	AGTCAAATGAGGCCTCTAAACTGGTCAGGTGTTCTGGTA AGGATGACAAG

Table 3. PCR primer used in this study (continued)

Primer name	Primer sequence (5' → 3' )
5nest206	CAGGCCAAGTTCCACAAGGA
3nest206	ACGAGATTCACGAAACGAGT
5For210	AGATCTGAGGCTTGAATTCCTCG
5Rev210	AGTCAAATGAGGCCTCTAAACTGGTCATATGAAGAAT GCGTGCTGTCTTC
3For210	AGCCAAGGTAGATCCAGGCCTAACACAACGATATGATC GCCATCTGGATC
3Rev210	AGTCCAACAAGCTCCCACGACAG
5nest210	CCATAGCCGTTTCATATCCTC
3nest210	CCAATGAACACAGGATTGCC
5For211	GCAGAAGAGATTCGCGTGGTATG
5Rev211	AGTCAAATGAGGCCTCTAAACTGGTCACTGACAGGTTG CCTTAGGCCTAG
3For211	AGCCAAGGTAGATCCAGGCCTAACACACATGGTGCCAC ATAACTTTGGTC
3Rev211	CGCGAACTAGCACGTCAGTTGTC
5nest211	ATGAAGAGGATTGATCAATG
3nest211	CGGTCAGATCACGAATATGG
5For218	GTTAACTTCGTGTATAACCGCTG
5Rev218	AGTCAAATGAGGCCTCTAAACTGGTCAGATGGATTGGC ACACGGCTGGAG
3For218	AGCCAAGGTAGATCCAGGCCTAACACACAACGATCAGG CCTCGAGTTCGC
3Rev218	CCTACACTCACCTGTACTCATTC
5nest218	GACGAGAAGGCAATCGTGTG
3nest218	CAATATGCCTCATCCTCAAC
5For232	TGATTCTGCACCTGTTGCAATGG
5Rev232	AGTCAAATGAGGCCTCTAAACTGGTCACATATGCTTAT GGCTGCCGGATG
3For232	AGCCAAGGTAGATCCAGGCCTAACACACCGTAACTCGT AGTGTTAGCTCG
3Rev232	GGATGTCTAATGATCCGAATTGC

Table 3. PCR primer used in this study (continued)

Primer name	Primer sequence (5' → 3' )
5nest232	CGGTATAGGTTCGCCTTG TG
3nest232	CACTACTGCAAGGGCAGTGG
5For234	AGCCAAGGTAGATCCAGGCCTAACACAGACCATAGTGT TTGCTAGGAGTG
5Rev234	CGTAACCACGATACTCCAAGATC
3For234	GAAAGCAGATGAACGACGGTGAG
3Rev234	AGTCAAATGAGGCCTCTAAACTGGTCAGCGGTGAGCAA TGATCATATCTC
5nest234	GGCAGCCCAGGTAGTCTTGC
3nest234	GCCTCGATAGCCAGCAAGTG
5For239	CGTCAGGTACGGTAGTTCTCCAC
5Rev239	AGTCAAATGAGGCCTCTAAACTGGTCACAGAAGACGGT GCTGGAAGCTGC
3For239	AGCCAAGGTAGATCCAGGCCTAACACAATCAGTTCATG TCGCTATGCTGG
3Rev239	GTCCATCACATTCAGCTGGTCTG
5nest239	AGCCTCACCTCCACTTACGG
3nest239	GGACTGCTCAAGGATATACT
5For247	AGCCAAGGTAGATCCAGGCCTAACACAATGATCT GGTAGCGACTGTAGAG
5Rev247	TAGTACGGACTCTCAACGTTAGG
3For247	TGACCGTGATAGTGCCCTATTGC
3Rev247	AGTCAAATGAGGCCTCTAAACTGGTCATTCTGGC ATGGCATACTATAACCG
5nest247	TGCGTATTATAGAGGGCAAG
3nest247	CAGGTCAAAGATCCGGACTA
5For248	AGCCAAGGTAGATCCAGGCCTAACACATCTCAAG TGAGTAGAGTATCGAG
5Rev248	ACTTGAGAGAACTGCTCCGATCC
3For248	TGCTAGTGAGCCACTCATATGAG

Table 3. PCR primer used in this study (continued)

Primer name	Primer sequence (5' → 3' )
3Rev248	AGTCAAATGAGGCCTCTAAACTGGTCACGGGTATGATA AAGCATTGCAGG
5nest248	CATAACAGAGTCTGGCTTCT
3nest248	GATAAAGCTGGCCGTTAACA
5For252	GCCATCGTCGTTTCAGATGCCTTG
5Rev252	AGTCAAATGAGGCCTCTAAACTGGTCACAGCGGTAGAG ACCACGAAGAG
3For252	AGCCAAGGTAGATCCAGGCCTAACACACTATCCGTTAC GTGTGATCGCTC
3Rev252	GTCATGTGACCAGGAACATCAAC
5nest252	CGTTGTGTTTCCTCAGTTGGC
3nest252	ACCATCTACAAAGACTACTG
5For508	AGCCAAGGTAGATCCAGGCCTAACACATGCTTGCTGAA CTGTCAAGTGC
5Rev508	AATCCTGCAACGCGTTAGACCTC
3For508	AGCTAGAGCTAATCTACTTGGAG
3Rev508	AGTCAAATGAGGCCTCTAAACTGGTCAGCGTGTACATG CTTATACAGACC
5nest508	CCAGTGACTTCACAATTTCC
3nest508	CAGTCATAGACTTTGTCAGA
argB OF	GACCAGTTTAGAGGCCTCATTTGAC
argB DR	GTGTTAGGCCTGGATCTACCTTGGC
argB 1	ATCGTCCTACCTCTCGCTTCATC
argB 2	TCGCACCCGGTGACTTTCACATG

Table 4. *A. nidulans esd* deletion PCR conditions for DJ-PCR

First PCR: amplification of 5' , 3' flanking regions and marker

PCR mixture (final 40 $\mu$ l)		PCR reaction	
<b>5' flanking region</b>			
Template DNA (FGSC4)	2 $\mu$ l		
5 For primer	1 $\mu$ l		
5 Rev primer	1 $\mu$ l		
dNTP	4 $\mu$ l		
10X Buffer	4 $\mu$ l		
Taq polymerase	0.4 $\mu$ l		
TDW	27.6 $\mu$ l		
		94°C	3 min
		94°C	30 sec
		55°C	30 sec
		72°C	1 min
		72°C	5 min
		4°C	$\infty$
			30 cycle
<b>3' flanking region</b>			
Template DNA (FGSC4)	2 $\mu$ l		
3 Rev primer	1 $\mu$ l		
3 For primer	1 $\mu$ l		
dNTP	4 $\mu$ l		
10X Buffer	4 $\mu$ l		
Taq polymerase	0.4 $\mu$ l		
TDW	27.6 $\mu$ l		
<b>argB</b>			
Template DNA (PILJ16)	2 $\mu$ l		
argB OF primer	1 $\mu$ l		
argB DR primer	1 $\mu$ l		
dNTP	4 $\mu$ l		
10X Buffer	4 $\mu$ l		
Taq polymerase	0.4 $\mu$ l		
TDW	27.6 $\mu$ l		

Table 4. *A. nidulans esd* deletion PCR conditions for DJ-PCR (continued)

Second PCR: fusion of three fragments mix

PCR mixture (final 25 $\mu$ l)		PCR reaction		
5' flanking amplicon	1 $\mu$ l			
3' flanking amplicon	1 $\mu$ l	94°C	2 min	
argB amplicon	3 $\mu$ l	94°C	30 sec	] 10 cycle
dNTP	2 $\mu$ l	58°C	20 min	
10X Buffer	2.5 $\mu$ l	72°C	5 min	
Taq polymerase	0.25 $\mu$ l	72°C	10 min	
TDW	15.25 $\mu$ l	4°C	$\infty$	

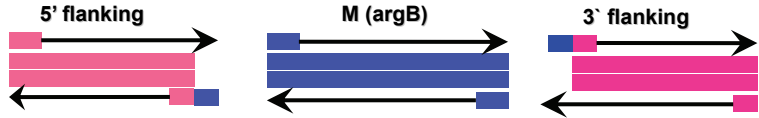
Third PCR: amplification of the fused knockout constructs

PCR mixture (final 100 $\mu$ l)		PCR reaction		
Template DNA (2 <sup>nd</sup> PCR product)	0.5 $\mu$ l	94°C	2 min	
5 Nest primer	1 $\mu$ l	94°C	30 sec	] 25cycle
3 Nest primer	1 $\mu$ l	55°C	1 min	
dNTP	10 $\mu$ l	72°C	2 min	
10X Buffer	10 $\mu$ l	72°C	5 min	
Taq polymerase	1 $\mu$ l	4°C	$\infty$	
TDW	76.5 $\mu$ l			

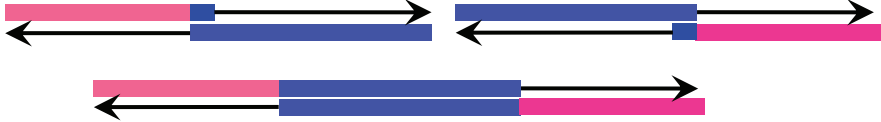
Table 5. PCR condition for confirmation of the disruptants by PCR

PCR mixture (final 40 $\mu$ l)		PCR reaction		
Template DNA	1 $\mu$ l			
Primer( For or Rev)	1 $\mu$ l	94 $^{\circ}$ C	2min	
Primer(argB1 or argB2)	1 $\mu$ l	94 $^{\circ}$ C	30 sec	} 35 cycle
dNTP	4 $\mu$ l	58 $^{\circ}$ C	30 min	
10X Buffer	4 $\mu$ l	72 $^{\circ}$ C	1 min	
Taq polymerase	0.3 $\mu$ l	72 $^{\circ}$ C	5 min	
TDW	28.7 $\mu$ l	4 $^{\circ}$ C	$\infty$	

First Round PCR



Second Round PCR



Third Round PCR



Figure 2. DJ-PCR (Double Joint PCR) step

Table 6. Restriction enzymes used in Southern Blot analysis and estimated size of fragments cut by each restriction enzymes

Esd	Enzyme	Transformants size (bp)	Wild type size (bp)
183	<i>Sac</i> I	2321/2103	3028
184	<i>Sac</i> I	1794/3378	5983
203	<i>EcoRV</i>	2067/1981	3406
206	<i>Sac</i> I	2268/2235	4110
210	<i>Sph</i> I	2861/4216	6476
211	<i>EcoR</i> I	4626	6189
218	<i>Cla</i> I / <i>Spe</i> I	3386	1665/2590
232	<i>Sac</i> I / <i>Spe</i> I	2626/731	3671
234	<i>Pf</i> M I	2791/3973	5968
239	<i>Sal</i> I	2148/2235	6048
247	<i>Kpn</i> I	4711	3764
248	<i>EcoRV/Sac</i> II	2043/3895	5302
252	<i>Bgl</i> II	2518/2690	6146
508	<i>Sac</i> I	2765/2386	5181

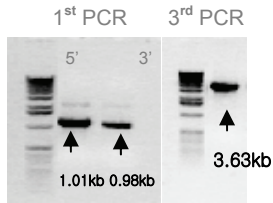
### Ⅲ. 결과

#### 1. DJ-PCR을 이용한 knockout construct 제조

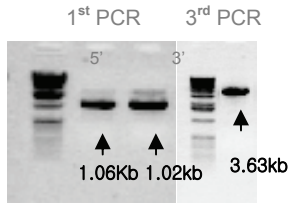
*Aspergillus nidulans* 유성분화에 있어서 *esd*(early sexual development) 유전자의 기능을 알아내기 위하여, DJ-PCR 방법을 사용하여 Knockout constructs를 만들었다. DJ-PCR을 위한 Primer는 5' For (50mer), 5' Rev (23mer), 3' For (23mer), 3' Rev (50mer)의 4개의 primer를 만들었다. 디자인 시 특이한 점은 5' For와 3' Rev에 marker로 대체될 *argB* 유전자 일부분(27mer)을 첨가한다는 것이다. DJ-PCR은 3단계의 PCR을 수행하여 construct를 제조 하는 것으로 First PCR 에서는 5' , 3' , marker gene 각 부분을 증폭하여 PCR products를 얻은 후, Second PCR에서는 First PCR products들의 농도를 고려하여 적당한 비율로 섞어서 증폭한 다음 second PCR product를 template로 5' , 3' Nest primer를 이용하여 최종적으로 third PCR을 진행했다.

First PCR 과정에서 5' flanking region은 각 유전자 별로 5For-5Rev primer를 이용해서 증폭한 PCR products의 size를 확인하였고, 3' flanking region은 3Rev-3For primer를 이용해서 증폭한 PCR products의 size를 확인하였다. Marker gene으로 사용한 *argB* 유전자도 *argB* OF-*argB* DR primer를 이용하여 증폭한 1736bp의 products를 확인하였다. Second PCR 은 5' flanking amplicon, marker gene(*argB*), 3' flanking amplicon을 1:3:1의 비율로 섞어서 증폭한 다음 second PCR products를 template로 5' , 3' Nest primer를 이용, 최종적으로 third PCR을 진행하여 14개의 각각의 knockout constructs를 제조하였다. 이렇게 제조된 knockout constructs를 gel elution 하여 정제하였다 (Fig 6).

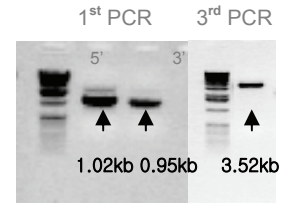
**1. esdD 183**



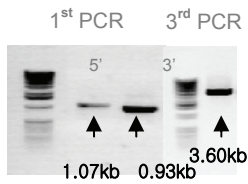
**2. esdD 184**



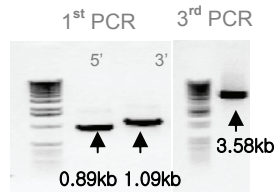
**3. esdD 203**



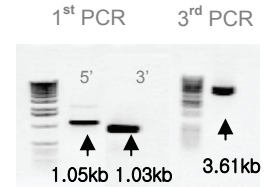
**4. esdD 206**



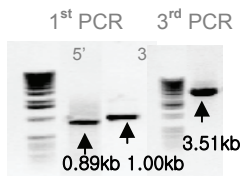
**5. esdD 210**



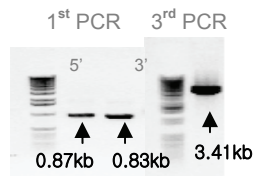
**6. esdD 211**



**7. esdD 218**



**8. esdD 232**



**9. esdD 234**

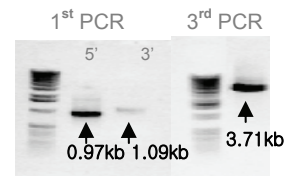
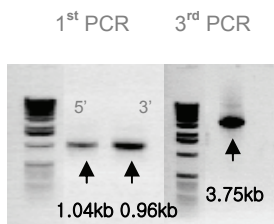
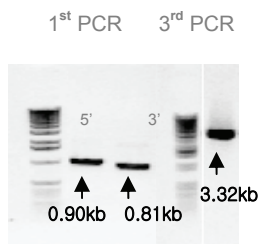


Figure 3. Construction of *Es*d gene deletion cassettes by DJ-PCR

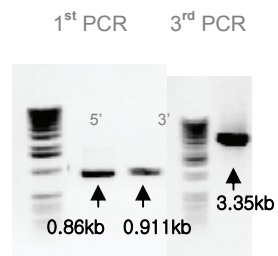
**10. esdD 239**



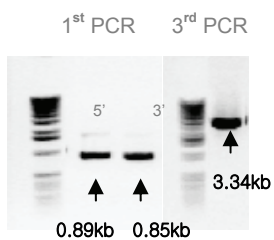
**11. esdD 247**



**12. esdD 248**



**13. esdD 252**



**14. esdD 508**

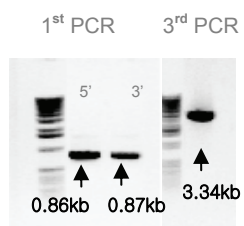


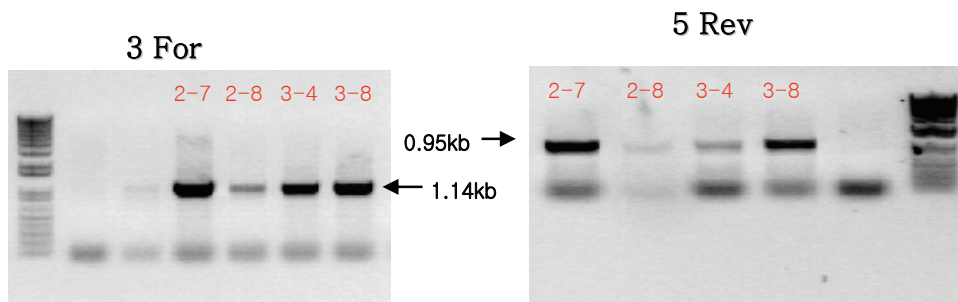
Figure 3. *Esd* gene deletion by DJ-PCR (continued)

## 2. PCR을 통한 transformants의 확인

CMRK plate에 *Aspergillus nidulans* 의 *argB* gene을 가지고 있지 않은 HSY2 strain을 사용하여 DJ-PCR에 의해 만들어진 14개의 knock products를 transformation하였다. Transformation 결과 생성된 colony를 CMRK배지에 배양하여 표현형을 관찰한 뒤 MMK배지에 picking 하였다.

DJ-PCR을 통해 생성된 knockout construct을 정확히 분리해내기 위하여 transformation 결과 후 나온 colony들을 다시 MMK배지에 streaking하여 genomic DNA를 분리하였다. 분리된 각각의 DNA들은 For-*argB1* primer, Rev-*argB2* primer를 이용하여 PCR을 수행한 뒤 8개(*esd* 183, *esd* 184, *esd* 203, *esd* 206 , *esd* 232, *esd* 239, *esd* 252, *esd* 508)의 *esd*에서 transformants를 확인하였다. (Fig 4)

1. Esd 183



2. Esd 184

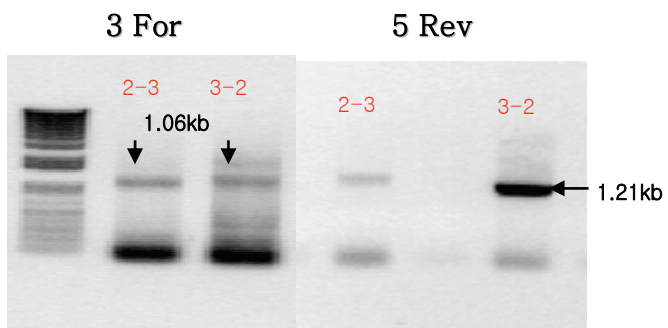
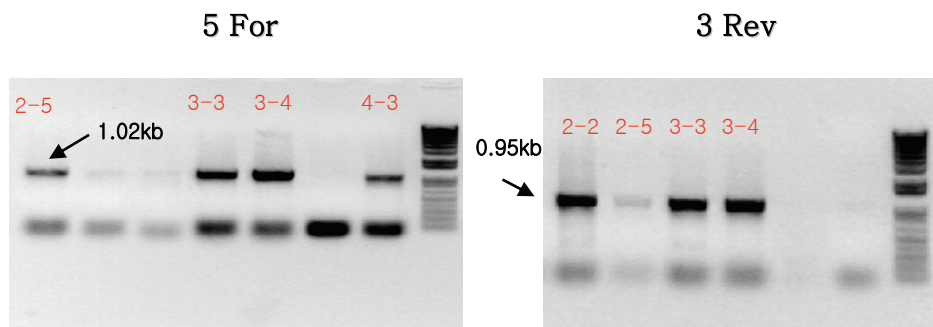


Figure 4. Confirmation of the disruptants by PCR. (continued)

### 3. Esd 203



### 4. Esd 206

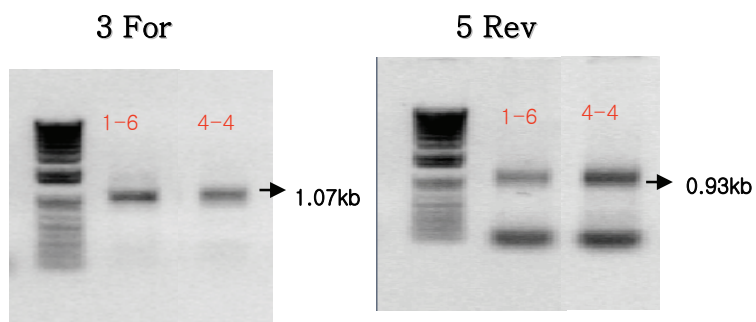
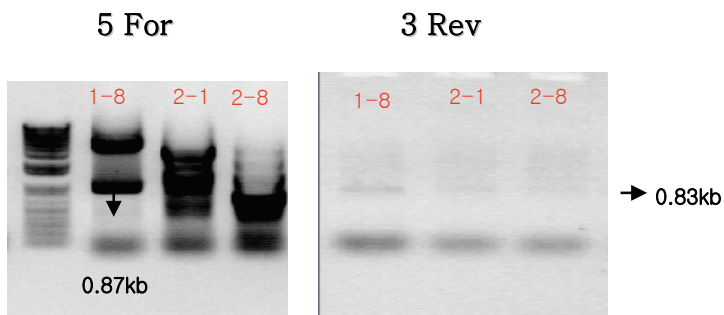


Figure 4. Confirmation of the disruptants by PCR. (continued)

5. Esd 232



6. Esd 239

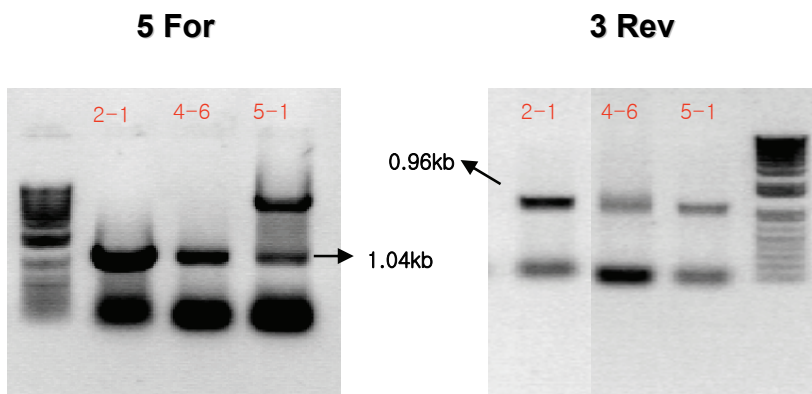
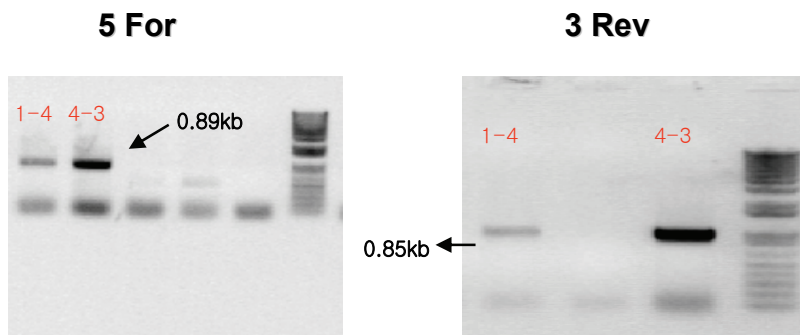


Figure 4. Confirmation of the disruptants by PCR. (continued)

7. Esd 252



8. Esd 508

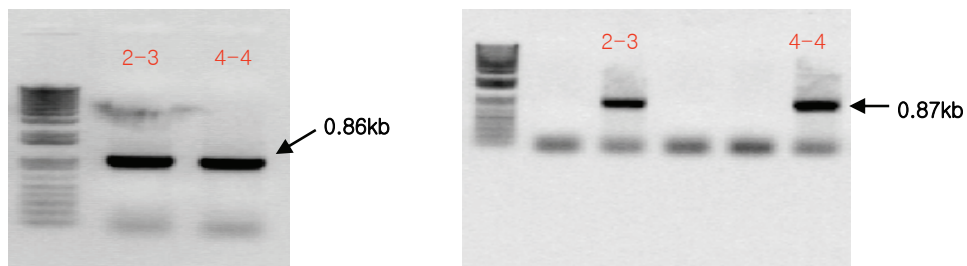
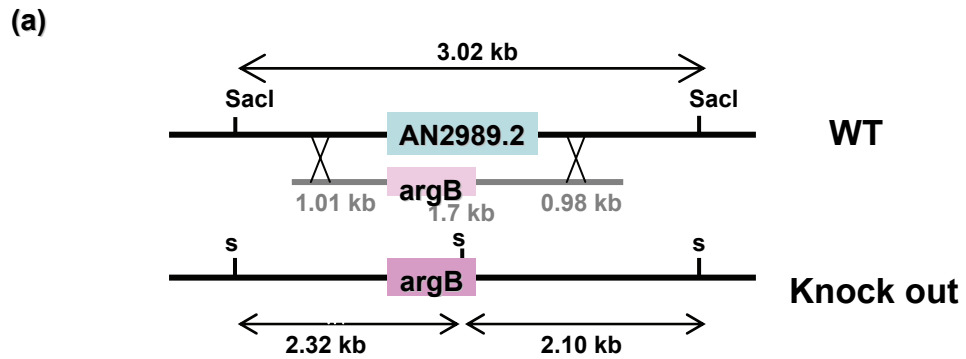


Figure 4. Confirmation of the disruptants by PCR. (continued)

### 3. Southern blotting을 이용한 확인

만들어진 knock mutant를 각각의 제한효소를 처리하여 *argB* probe를 이용하여 Southern 분석을 수행하였다. 결과 각각의 candidate에서 우리가 원하는 band를 확인할 수 있었다. 실험한 14개의 *esd* 중에서 8개(*esd* 183, *esd* 184, *esd* 203, *esd* 206, *esd* 232, *esd* 239, *esd* 252, *esd* 508)의 완전히 만들어진 deletion mutant를 찾아내었다. (Fig. 5)

# Esd 183



## (b) Southern Blot

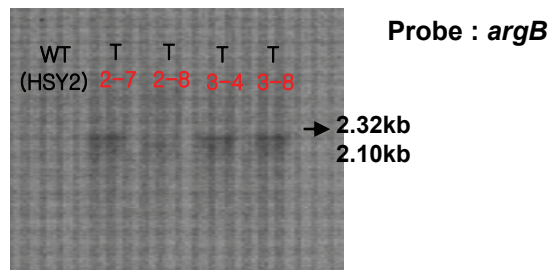
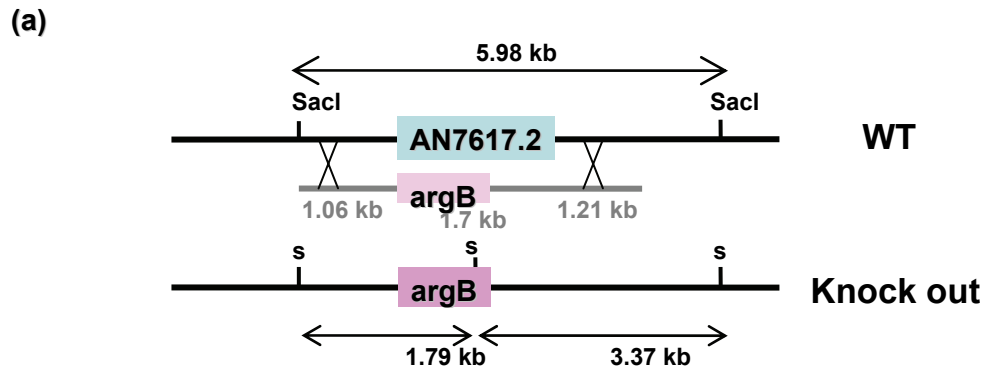


Figure 5. Confirmation by Southern blot analysis. Confirmation of *esd* gene disruption by Southern hybridization probed with *argB*.

Esd 184



(b) Southern Blot

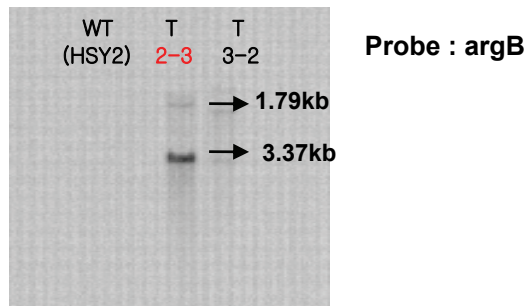
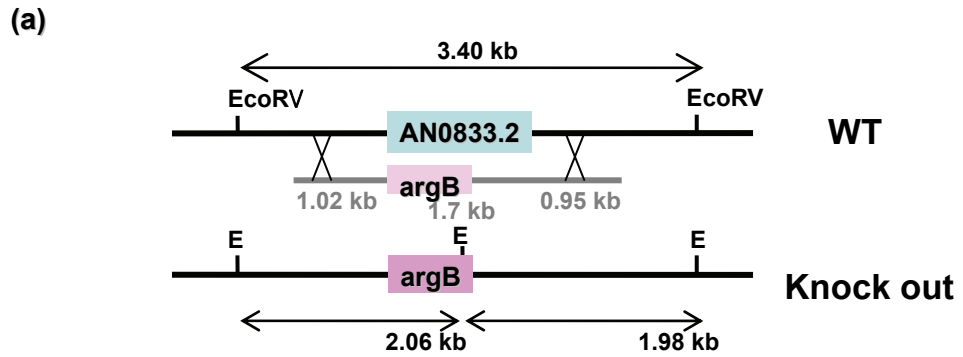


Figure 5. Confirmation by Southern blot analysis. Confirmation of *esd* gene disruption by Southern hybridization probed with *argB*. (continued)

# Esd 203



(b) Southern Blot

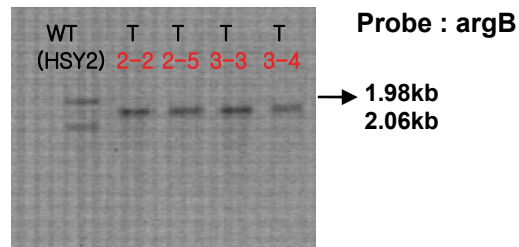
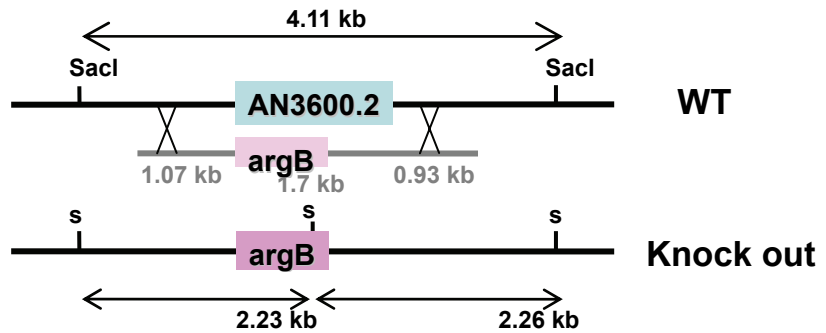


Figure 5. Confirmation by Southern blot analysis. Confirmation of *esd* gene disruption by Southern hybridization probed with *argB*. (continued)

# Esd 206

(a)



(b) Southern Blot

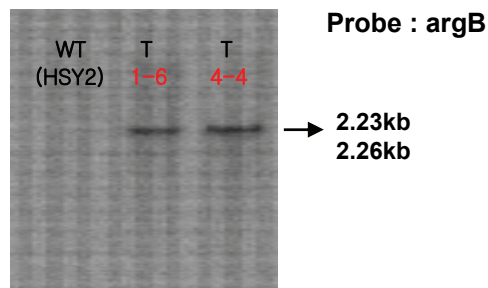
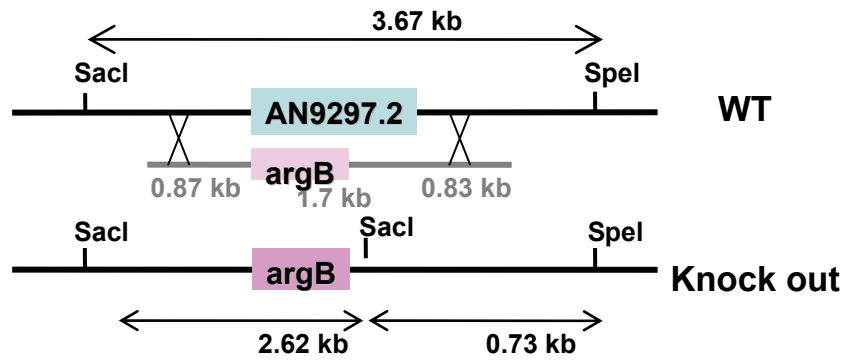


Figure 5. Confirmation by Southern blot analysis. Confirmation of *esd* gene disruption by Southern hybridization probed with *argB*. (continued)

# Esd 232

(a)



(b) Southern Blot

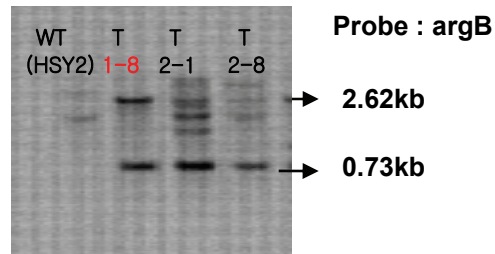
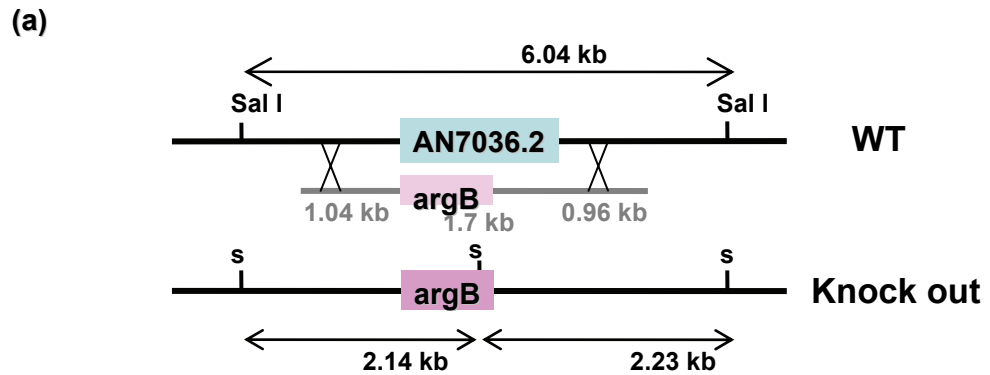


Figure 5. Confirmation by Southern blot analysis. Confirmation of *esd* gene disruption by Southern hybridization probed with *argB*, (continued)

# Esd 239



## (b) Southern Blot

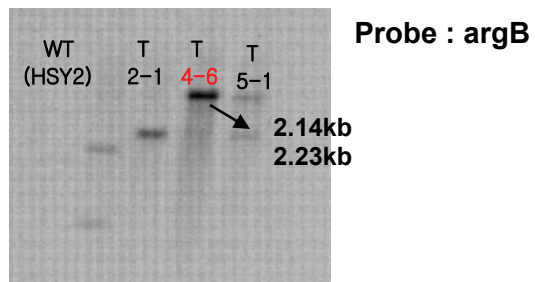
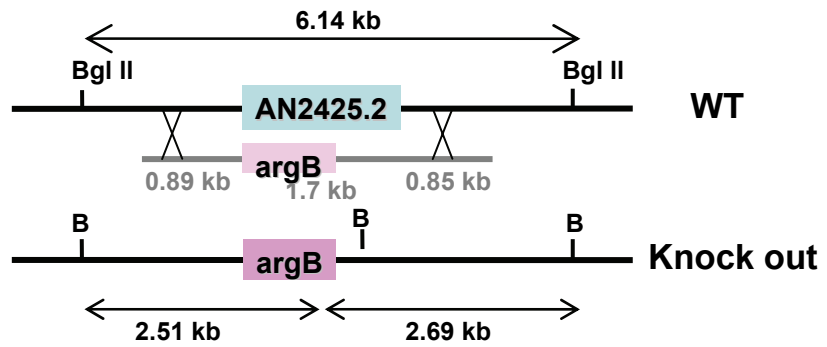


Figure 5. Confirmation by Southern blot analysis. Confirmation of *esd* gene disruption by Southern hybridization probed with *argB*. (continued)

Esd 252

(a)



(b) Southern Blot

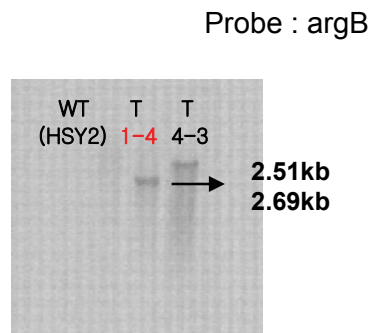
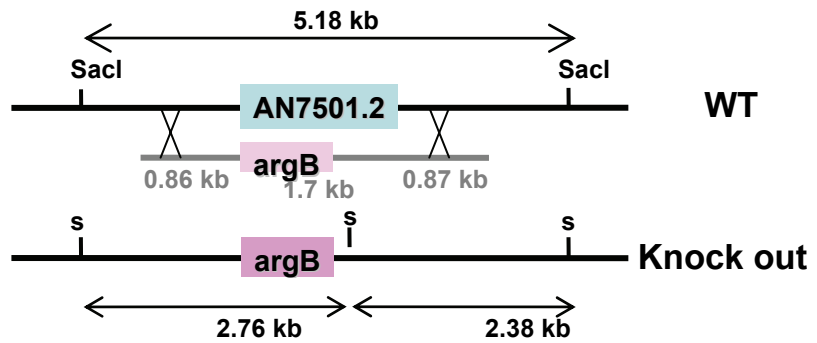


Figure 5. Confirmation by Southern blot analysis. Confirmation of *esd* gene disruption by Southern hybridization probed with *argB*. (continued)

# Esd 508

(a)



(b) Southern Blot

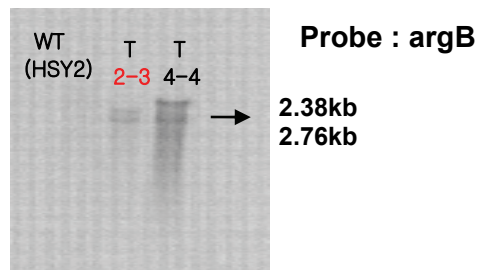


Figure 5. Confirmation by Southern blot analysis. Confirmation of *esd* gene disruption by Southern hybridization probed with *argB*. (continued)

## IV. 결론

*Aspergillus nidulans*는 genome project가 끝나 전체 nucleotide sequence가 공개되어 있고 각 유전자의 ORF가 assign되어 있어 다수의 유전자를 분리하는 것이 그리 어려운 일이 아니다. 또한 특정 유전자를 deletion 시키기 위한 방법도 DJ-PCR이라는 방법이 개발되어 있어 14개의 유전자를 손쉽게 deletion 시킬 수 있다.

이에 따라 유성분화에 관여하는 유전자가 있다면 그것을 찾아 낼 수 있으며 유전자의 기능 및 발현 조절 기작을 밝혀 낼 수 있다.

*Aspergillus nidulans*의 유성분화에 관여하는 유전자들의 조절 network을 규명하고자 유성분화 초기의 균사체로부터 expressed sequence tag(EST)을 얻은 바 있다. 본 연구에서는 단기 목표를 이들 EST들로부터 분화 조절에 관여할 가능성이 있는 EST들을 대상으로 완전한 크기의 유전자를 분리하고, 이들 유전자 각각의 결실 돌연변이주를 제조하였다. 이들 deletion construct가 제대로 만들어졌는가 확인하기 위해 PCR과 Southern blotting을 수행하여 분리해 내었다.

본 연구에서는 앞으로 제작된 deletion mutant를 가지고 분화 관련 형질을 관찰하여 유성분화에 관여하는 유전자를 얻어 내고 더 나아가 이들 유전자와 기존에 알려진 유전자와의 발현 조절 관계를 규명하는 연구가 필요하다.

## 참고 문헌

- Adams , M. D., Soares , M.B., Kerav age, A.R., Fields , C., and VentJ .C. (1993) 3,400 new expressed sequence tags identify diversity of transcript in human brain . *Nature Genet.* 4 , 373– 380.
- Adams , T. H., Boylan, M. T., and Timberlake, W. E. (1988) *brlA* is necessary and sufficient to direct conidiophore development in *Aspergillus nidulans*. *Cell* 54, 353–362.
- Aguirre, J. (1993) Spatial and temporal controls of the *Aspergillus brlA* developmental regulatory gene. *Mol. Microbiol.* 8, 211–218.
- Arlette, C. F. (1960) A system of cytoplasmic variation in *Aspergillus nidulans*. *Heredity* 15, 377–388.
- Bradshaw RE, Dixon SW, Raitt DC, Pillar TM. (1993) Isolation and nucleotide sequence of the 5-aminolevulinate synthase gene from *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet.* 23, 501–507.
- Barratt RW, Johnson GB, Ogata WN. (1965) Wild-Type and Mutant Stocks of *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 52, 233–246
- Benjamin, C. R. (1955) Ascocarps of *Aspergillus* and *Penicillium*, *Mycologia* 47, 669–687.

Boylan, M. T., Mirabito, P. M., Willet, C. E. Zimmermann, C. R., and Timberlake, W. E. (1987) Isolation and physical characterization of three essential conidiation genes from *Aspergillus nidulans*. *Mol. Cell Biol.* 7, 3113–3118.

Butnick, N. Z., Yager, L. N., Hermann, T. E., Kurtz, M. B., and Champe, S. P. (1984a) Mutants of *Aspergillus nidulans* blocked at an early stage of sporulation secrete an unusual metabolite. *J. Bacteriol.* 160, 533–540

Butnick, N. Z., Yager, L. N., Hermann, T.E., Kurtz, M. B., and Champe, S.P. (1984b) Genetic analysis of mutants of *Aspergillus nidulans* blocked at an early stage of sporulation. *J.Bacteriol.* 160, 541–545.

Chae, K. - S., Kim, J. H., Choi, Y. H., Han. D. M., and Jahng, K. Y. (1995) Isolation and characterization of a genomic DNA fragment complementing an *nsdD* mutation of *Aspergillus nidulans*. *Mol.Cells* 5, 146–150.

Chakrabarti, D., Reddy, G.R., Dame, J. B., Almira, E. C., Laipis, P. J., Ferl, R. J., Yang, T. P., Rowe, T. C., and Schuster, S. M. (1994) Analysis of expressed sequence tags from *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 66, 97–104.

Champe, S. P., and El-Zayat, A. A. E. (1989) Isolation of sexual sporulation hormone from *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol.* 171, 3982–

3988.

Champe. S. P., Rao, P., and Chang, A. (1987) An endogenous inducer of sexual development in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 133, 1383–1387.

Clutterbuck, A. J. (1969) A mutational analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 63, 317–327

Clutterbuck, A. J. (1977) in *Genetics and Physiology of Aspergillus* (Smith, J. E., and Pateman, J. A. eds.) 305–317, *Academic Press, London*.

Cullen, D., Leong, S. A., Wilson, L. J., and Henner, D. J. (1987) Transformation of *Aspergillus nidulans* with the hygromycin–resistance gene, *hph*. *Gene* 57, 21–26

Ellis, T. T., Reynolds, D. R., and Alexopoulos, C. J. (1973) Hüll cell development in *Emericella nidulans*. *Mycologia* 65, 1028–1035.

Elrod SL, Jones A, Berka RM, Cherry JR. (2000) Cloning of the *Aspergillus oryzae* 5–aminolevulinate synthase gene and its use as a selectable marker. *Curr Genet.* 38, 291–298.

Han, D. M., Han, Y. J., Lee, Y. H., Jahng, K. Y., Jahng, S. H., and Chae, K - S. (1990) Inhibitory conditions of asexual development and their application for the screening of mutants defective in sexual development.

*Kor. J. Mycol.* 18, 225–232

Han, D. M., Han, Y. J., Kim, J. H., Jahng, K. Y., Chung, Y. S., Chung, J. H., and Chae, K - S. (1994) Isolation and characterization of NSD mutants in *Aspergillus nidulans*. *Kor. J. Mycol.* 22, 1–7.

Hyo - young Jeong. (1999) Identification and characterization of highly expressed gene in early sexual stage in *Aspergillus nidulans*. Thesis

John, M. A., and Perberdy, JJ. F. (1984) Transformation of *Aspergillus nidulans* using the *argB* gene. *Enzyme and Microbial Technology* 6, 386–389.

Johnstone, I. L., Hughes, S.G., Clutterbuck, A. J. (1985) Cloning an *Aspergillus nidulans* developmental gene by transformation. *EMBO J.* 4, 1307–1311.

Käfer, E. (1965) Origins of translocations in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 52, 217–232.

Lee, B. N., and Adams, T. H. (1994a) The *Aspergillus nidulans fluG* gene is required for production of an extracellular developmental signal. *Genes Dev.* 8, 641–651.

Lee, D. W., Lee, S. H., Hwang, H - A., Kim, J. H., and Chae, K - S. (1996)

Quantitative analysis gene expression in sexual structures of *Aspergillus nidulans* by sequencing of 3' - directed cDNA clones. *FEMS MicroBiol. Lett.* 138, 71–76

Liew, C. C., Hwang, D. M., Fung, Y. W., Laurensen, C., Cukerman, E., Tsui, S., and Lee, C. Y. (1994) A catalogue of genes in the cardiovascular system as identified by expressed sequence tags. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 10645 - 10649.

Martinelli, S. D., and Clutterbuck, A. J. (1971) A quantitative survey of conidiation mutants in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 69, 2261–2268.

Mirabito, P. M., Adams, T. H., and Timberlake, W. E. (1989) Interactions of three sequentially expressed genes control temporal and spatial specificity in *Aspergillus* development. *Cell* 57, 859–868.

O Hara, E. B., and Timberlake, W. E. (1989) Molecular characterization of the *Aspergillus nidulans* *yA* locus. *Genetics* 129, 249–254.

Oliver, P. T. P. (1972) Conidiophore and spore development in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 73, 45–54.

Park, Y -D., Lee, D. W., Lee, S. J., Kim, J. H., and Chae, K - S. (1996)

Quantitative analysis gene expression patterns *Aspergillus nidulans* mycelia by sequencing of 3' -directed cDNA clones. *Jour. Microbiol.* 34, 23–29.

Pontecorvo G, Roper JA, Hemmons IM, Macdonald KD, bufton AW. (1953) The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv Genet.* 5, 141–238.

Timberlake, W. E (1980) Developmental gene regulation in *Aspergillus nidulans*. *Dev. Biol.* 78, 497–510

Yager, L. N. (1992) in *Aspergillus biology and industrial applications: Early developmental events during asexual and sexual sporulation in Aspergillus nidulans* (Bennett, J. W., and Klich, M. A. eds.) 19–41, Butterworth - Heinemann, Bostone.

Yelton MM, Hamer JE, de Souza ER, Mullaney EJ, Timberlake WE. (1983) Developmental regulation of the *Aspergillus nidulans trpC* gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80, 7576–80.

J-H. Yu *et al.* (2004) Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genetics and Biology* 41, 973–981

Zonneveld, B. J. (1977) in *Genetics and Physiology of Aspergillus* (Smith, J. E. and Pateman, J. A. eds.) 59–80, Academic press. London.

## Abstract

### Construction of deletion mutants, in which each gene for ESTs obtained from early sexual development stage were disrupted in *Aspergillus nidulans*

Ji young Chun

Department of Biology Education

Graduate School of Education

Sungshin Women' s University

For identification of a regulatory network of genes involved in sexual development of filamentous fungi *Aspergillus nidulans*, hundreds of ESTs (expressed sequence tags) have been obtained from mycelia at the early sexual developmental stage.

In this study, 14 ESTs were chosen to make deletion mutations for further analysis because these encode mostly hypothetical proteins annotated in *A. nidulans* genome project and is thought to be possibly involved in sexual development.

First, deletion cassettes containing a *argB* gene as a selection marker were constructed systematically by DJ(Double Joint)-PCR(Polymerase Chain Reaction) and transformed into wild-type strain. Genomic DNA were isolated from the transformants and deletion mutants were confirmed by PCR and Southern blotting. At the end, each deletion mutants for eight genes among 14 were isolated.

## \* 감사의 글 \*

\*.....\*

하나님을 사랑하는 자 곧 그 뜻대로 부르심을 입은 자들에게는

모든 것이 협력하여 선을 이루느니라,

Romans 8 : 28

.....\*

가장 먼저 모든 것의 근원되시며 저를 만드시고 항상 이끄시는 하나님께 감사 드립니다.

본 논문이 완성되기까지 지도를 아끼지 않으신 윤진호 지도교수님께 진심으로 감사드리며, 바쁘신 중에도 논문심사를 맡아 조언해 주신 이승복 교수님과 한영훈 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 더불어 생물학과 모든 교수님들께 감사드립니다.

함께 실험하며 든든한 언니가 되어 주었던 선배 손임언니, 함께 수고한 지혜, 늘 웃음과 기쁨을 주던 후배 덕경, 진아, 현진, 늘 챙겨주던 은강언니, 재희 그 외 다른 여러 실험실원들에게도 고마움을 전합니다.

늘 먼 곳에서 기도해 주시는 고마운 안성국 목사님, 부족한 손장이지만 잘 따라주는 소중한 손원들, 함께 봉사하는 찬양대, 금요 철야팀, 모두 감사드립니다.

늘 든든한 힘이 되어 주는 나의 소중한 친구 은미, 이랑, 윤정, 지아, 소영, 은정, 경령, 쿠짱, 희근... 그 외 많은 친구들... 든든한 나의 언니 정옥오빠, 교사의 꿈을 더욱 키워 준 소중한 2-4반 친구들, 늘 신경 써주는 준호, 모두 고맙습니다.

마지막으로 오늘까지도 이 부족한 딸을 위해 모든 것을 희생하시며 뒷바라지해 주신 부모님과 가족들에게 감사드립니다. 늘 믿음으로 지켜봐 주시고 도와주시는 사랑하는 아빠, 엄마, ^^ 열심히 훈련 받고 있을 내 하나밖에 없는 소중한 동생 환용이, 조용히 저를 위해 기도해 주시는 할아버지, 할머니께 감사드립니다.

모두들 감사하며 사랑합니다~♡

2년 반이라는 대학원 생활을 마치면서 아직도 좀 더 열심히 생활할 걸 이라는 미련과 후회가 남습니다. 이제 졸업이라는 하나의 계단을 올라왔습니다. 아직도 제가 올라갈 많은 계단이 기다리고 있습니다. 이제 또 하나의 계단을 오르기 위해 또 노력하고자 합니다. 하나님께서 제게 주신 능력으로 조그마한 빛이 될 수 있는 사람이 될 수 있도록 가고자 합니다. 나의 발걸음을 인도하시는 하나님께 기도하며 이제 그 다음 계단을 위한 준비를 시작하겠습니다. 모두들 축복하고 사랑합니다. ♡