

윤진호 교수지도  
석사학위 청구논문

균사체 곰팡이 *Aspergillus nidulans*  
에서 유성분화에 관여하는 유전자의  
결실 돌연변이 제조

2007

성신여자대학교 교육대학원  
생물교육전공  
박지혜

균사체 곰팡이 *Aspergillus nidulans*에  
서 유성분화에 관여하는 유전자의  
결실 돌연변이 제조

윤진호 교수지도

이 논문을 석사학위논문으로 제출함

2007년 5월

성신여자대학교 교육대학원

생물교육전공

박지혜

# 인준서

박지혜의 석사학위 논문으로 인준함.

심사위원 윤진호



심사위원 이승복



심사위원 한영훈



성신여자대학교 교육대학원

## 논문개요

*Aspergillus nidulans*는 자낭균류에 속하는 사상성 균류 (filamentous fungi)로 진핵 생물이면서도 증식이 비교적 빠르고 간단한 합성배지에서도 잘 자라는 등의 미생물이 갖는 여러 가지 장점을 가지고 있다. 또한 무성생식과 유성생식의 분화과정을 거치는 체계적인 생활사를 갖기 때문에 유전학적, 생화학적, 생리학적인 분석이 용이하다. 계통 발생학적 위치로 볼 때 원핵 생물의 원시적 조절 기작과 함께 고등한 진핵 생물의 정교한 조절체계도 가지고 있어 원핵 생물에서는 볼 수 없는 분화와 발생단계 연구를 수행하기에 적합하다.

본 연구에서는 *Aspergillus nidulans*의 유성분화에 관여하는 유전자들의 조절 network를 규명하고자 유성분화 초기의 균사체로부터 expressed sequence tag (EST)을 얻었다. 이렇게 얻어진 EST로부터 분화 조절에 관여할 가능성이 있는 EST들을 대상으로 완전한 크기의 15개의 유전자를 분리하고 DJ-PCR에 의해 이들 유전자 각각의 deletion constructs를 제조하였다. 이렇게 제조된 deletion constructs를 *Aspergillus nidulans*의 *argB* gene을 가지고 있지 않은 HSY2 균주에 형질전환하고, 이렇게 얻은 형질전환체들을 PCR 확인을 통하여 9개의 결실 돌연변이를 선별하였다. 다시 한번 정확한 확인을 하기 위해 probe로 *argB* gene을 사용하여 Southern blotting을 수행한 결과, 3개의 결실 돌연변이를 최종적으로 확인하였다.

# 목 차

## 논문개요

### I. 서론

1. <i>Aspergillus nidulans</i> 의 특징 및 생활사 .....	1
1-1 <i>A. nidulans</i> 의 무성생식 .....	1
1-2 <i>A. nidulans</i> 의 유성생식 .....	2
1-3 <i>A. nidulans</i> 의 준유성생식 .....	3
2. <i>Aspergillus nidulans</i> 의 분자유전학 .....	3
2-1 무성생식과정 .....	4
2-2 유성생식과정 .....	6
3. Gene Signature (GS) .....	8
3-1 GS vs EST .....	8
3-2 다른 개체나 조직에서의 EST와 GS를 이용한 연구 .....	10

### II. 재료 및 방법

1. 실험재료 .....	12
1-1 균주와 EST .....	12
1-2 배지 및 배양조건 .....	12
1-3 효소 및 시약 .....	15
1-4 반응 용액 .....	16
2. 방법	
2-1 DJ-PCR (Double Joint PCR)을 이용한 <i>esd</i> gene의 replacement construct .....	28
2-2 <i>A. nidulans</i> transformation .....	33
2-3 Transformants의 획득 및 확인 .....	34

2-4 <i>A. nidulans</i> genomic DNA isolation .....	34
2-5 Transformants의 PCR확인 .....	35
2-6 Transformants의 Southern Blot 확인 .....	35
III. 결과	
1. DJ-PCR (Double Joint PCR)을 이용한 knockout construct 제조 .....	39
2. DJ-PCR (Double Joint PCR)을 이용한 knockout construct의 분석 .....	40
2-1 Transformants의 PCR 확인 .....	40
2-2 Transformants의 Southern Blot 확인 .....	40
IV. 결론 .....	50
참고문헌	
영문초록	

## 도 표 목 차

Table 1. Strains used in this study .....	20
Table 2. EST used in this study .....	21
Table 3. PCR primer used in this study.....	22
Table 4. <i>A. nidulans</i> deletion PCR conditions for DJ-PCR .....	30
Table 5. PCR condition for confirmation of the disruptants by PCR.....	37
Table 6. Southern Blot analysis using restriction enzyme .....	
and transformants size .....	38

## 그림 목 차

Figure 1. Life cycle of <i>A.nidulans</i> .....	11
Figure 2. DJ-PCR (Double Joint PCR) step .....	32
Figure 3. Gene deletion by DJ-PCR .....	42
Figure 4. Confirmation of the disruptants by PCR .....	45
Figure 5. Confirmation of the disruptants by Southern Blot probed .... with <i>argB</i> .....	47

# I. 서론

## 1. *Aspergillus nidulans* 의 특징 및 생활사

사상성 자낭균류 (Ascomycetes)에 속하는 *Aspergillus nidulans*는 진핵 생물이면서도 증식이 비교적 빠르고, 간단한 합성배지에서도 잘 자라는 등 미생물이 갖는 여러 가지 장점을 가지고 있다.

또한 무성생식과 유성생식의 분화과정을 거치는 체계적인 형태 발생을 갖기 때문에 유전학적, 생화학적, 생리학적 분석이 용이하며 계통 발생학적 위치로 볼 때 원핵 생물의 원시적 조절 기작과 함께 고등한 진핵 생물의 정교한 조절체계도 가지고 있기 때문에, 원핵 생물에서는 볼 수 없는 분화와 발생 단계 연구를 수행하기에 적합하다. 또한 무성생식의 산물인 무성포자 즉 conidia는 세포 안에 하나의 핵을 가지고 있으며, 한번 배양을 통해 다량의 포자를 수확할 수 있기 때문에 돌연변이를 쉽게 분리할 수 있는 장점이 있다. 그리고 균형적으로 조절되는 heterokaryon이 생성되기 때문에 유성생식이나 준 유성생식을 거쳐 유전자의 이동이 가능하다.

이상으로 *A. nidulans*에서는 유전자의 이동이 가능하고 또한 이동된 유전자가 안정하게 유지되므로 돌연변이, 접합 등에 의한 유전학적인 연구가 용이하며 유전학적인 모델개체로 일찍부터 연구가 이루어져 왔으며 또한 무성, 유성생식의 분화과정에 대한 연구가 진행되어 왔다.

### 1-1 *A. nidulans* 의 무성생식

자낭균류에 속하는 균류들은 일반적으로 유성 및 무성생식의 이중 생활사를 갖는다. 이들의 vegetative cell의 핵상은 단수체이고, 이배체의 핵상은 생

활사 중 유성생식과정에서만 일시적으로 나타날 뿐이다. *A. nidulans* 핵상 변화로 보면 세 종류의 생활사를 가지는데, 단수체 핵상의 변화가 없는 무성생식, 단수체에서 이배체로 되었다가 감수분열에 의해 단수체로 변하는 유성생식, 그리고 이배체가 감수분열에 의하지 않고 nondisjunction에 의해 단수체화 하는 준유성생식 (parasexual cycle) 이 그것이다 (Pontecorvo, 1953; Figure 1). 무성생식은 균사의 일부 세포 (foot cell)로부터 가지 쳐 나온 stalk가 sterigmata층인 medula로 phialide를 형성하고 그 끝에서 mitosis에 의하여 conidia를 형성하고 이 conidia가 발아한 후 균사를 만드는 생활주기를 말한다. 이 과정에서는 mitosis에 의해 증식이 일어나며 최종적으로 형성되는 conidium의 세포주기 상태는 G1이다 (Bainbridge et al., 1971).

## 1-2 *A. nidulans*의 유성생식

*A. nidulans*의 유성포자 형성은 무성포자에 비해 시기적으로 늦게 나타난다. 따라서 유성포자인 ascospore 형성과정은 이미 분화된 conidia들이 덮이기 때문에 정밀한 관찰을 하기가 어려워 자세하게 알려진 내용이 많지 않은 실정이다. 유성생식의 산물인 ascospore를 갖는 ascus는 cleistothecium 구조 안에 존재한다. 균사들이 생장을 하다가 뭉쳐져서 덩어리를 형성하면 균사간에 접합 (anastomosis)이 일어나 이배체인 세포가 만들어지고 이 세포가 ascus 세포로 발달하고 그 주위에 cleistothecium 외층이 형성되는 것으로 알려지고 있으며 (Benjamin, 1955; Ellis et al., 1973; Zonneveld, 1977), 동시에 접합이 일어나지 않은 균사 세포의 일부는 팽배되고 세포벽이 두꺼워진 후 발달하고 있는 cleistothecium의 외부를 둘러싸게 되는데 이들이 Hülle 세포이다 (Thom and Raper, 1945). 이 때 핵상의 변화를 보면 단수체의 균사가 이핵상 (dikaryon)의 ascogenous hyphae로 분화하여 핵융합

(karyogamy)이 일어나고 감수분열을 거치게 되며, 감수분열 후 mitosis에 의해 한 ascus안에 8 개의 ascospore가 생성된다. ascospore는 두 개의 핵을 가지게 되며 발아하여 균사체로 성장하면서 다시 단수체로 된다. 균사융합 후의 모든 과정은 sterile한 균사체에 의해 생성된 cleistothecium 내부에서 일어나며 한 cleistothecium안에는 약 104개의 ascospore가 들어 있고 viability의 변화 없이 아주 오랜 기간 보관할 수 있다. 그런데 이와 같은 형태적 변화를 유도하는 signal이 세포외적 환경에서 유래되는지 혹은 세포내의 어떤 변화에 의해서 초래되는지에 대해서는 알려진 것이 없다.

### 1-3 *A. nidulans*의 준유성생식

아주 낮은 빈도로 (약  $10^{-7}$ ) vegetative hyphae에서 핵융합이 일어나 이배체의 핵이 생성되는 경우가 있는데, 이 이배체의 핵을 지닌 균사는 무성 생식에 의한 생활사를 거칠 수 있다. 그러나 이배체는 불안정하기 때문에 mitosis 중 nondisjunction이 자주 일어남으로써 aneuploid가 생성되고 이 aneuploid 역시 정상적인 성장을 하지 못함으로 단수체가 될 때까지 염색체를 상실해 간다. 이렇게 하여 이배체로부터 단수체가 생성되는데 이 과정을 준유성생식이라 한다 (Pontecorvo, 1953).

## 2. *Aspergillus nidulans*의 분자유전학

1970년대 중반 진핵 생물의 유전자가 대장균에서 처음 cloning 되고 발현이 되었는데 대장균에서의 발현 시 부딪히는 문제를 해결하기 위해 자신의 연구에 적합한 개체를 형질전환 시키는 것이 절실하였다. 곰팡이를 다루는 학자들 역시 이러한 문제에 당면하게 되었는데 Hinnen 등 (1978)에 의해

*Saccharomyces cerevisiae*의 형질전환이 성공을 거두었고 이 system을 이용하여 1980년대 초기에 몇몇의 연구실에서 *A. nidulans*의 형질전환이 이루어지기 시작하였다. 그러다가 selectable marker로 1983년 Tilburn 등에 의해 *amdS* (Ballance *et al.*, 1983)가 이용되었고 곧이어 Timberlake는 *trpC* (Yelton *et al.*, 1984)를 이용하였으며 Perberdy에 의해 Poland에서 cloning된 *argB* (John *et al.*, 1984; Bereet *et al.*, 1983)가 소개되었다. 현재는 *niaD* (Unkles *et al.*, 1989)를 이용하는 vector가 개발되어 있다. 그런데 이들은 모두 insertional vector들로서 recover하는데 어려움이 있다. 최근에 plasmid의 autonomously replication을 유도하는 sequence가 발견되어 (Gems *et al.*, 1991)이를 이용한 vector를 개발 중이다.

지금까지 *A. nidulans*에서 적어도 90여 개의 유전자가 cloning되고 염기 서열이 결정되었다. 각기 밝혀진 유전자들은 nitrogen, carbon 대사에 관여하는 유전자들, pH repression에 관여하는 유전자들, 무성분화에 관여하는 여러 유전자들, mitochondrial 유전자들, tubulin 및 cell cycle에 관계하는 유전자들이다.

## 2-1 무성생식과정

*A. nidulans*의 무성포자인 conidia가 형성되는 과정은 다음과 같다.

Conidia가 발아하여 시간당 0.5 mm의 균사생장을 하다가 16 시간 정도에 이르러 aerial hyphal branch가 colony의 중앙에서부터 형성되며 이 중 일부가 conidiophore로 분화하게 된다. 무성포자의 형성은 aerial growth를 시작한 후 6시간에서 8시간 정도에 일어난다 (Champe *et al.*, 1992). 이후의 분화는 colony의 중앙에서부터 가장자리로 conidiophore의 형성이 진행된다. Colony의 중앙에서는 처음 conidiophore의 형성까지 16시간의 균사생장이

필요한데 비해 새로 합성되는 균사체에서는 1~3 시간 정도의 균사생장 후 바로 conidiophore를 형성한다. conidiophore형성은 직경 2~3  $\mu\text{m}$ 인 균사로부터 세포벽이 두꺼워진 세포 (foot cell)가 만들어지고 직경이 4~5  $\mu\text{m}$ 이고 길이가 약 100  $\mu\text{m}$ 인 conidiophore stalk이 apical extension에 의해 형성되며 conidiophore stalk의 apical extension이 멈추면 직경이 약 10  $\mu\text{m}$ 로 부풀어서 conidiophore vesicle을 형성한다. 이 때 foot cell, stalk, vesicle은 septum에 의해 분리되어 있지 않은 single unit로, vesicle의 바깥쪽 부근에 여러 개의 핵이 위치하여 synchronous budding에 의해 vesicle 바깥쪽에 primary sterigmata 층인 medullae를 형성할 수 있도록 한다 (Mims et al., 1988). Medullae는 두 번 budding하여 약 120개의 uninucleate sterigmata 층인 phialides를 형성하며 phialide의 끝에서 여러 번의 mitosis를 되풀이 하여 약 100개의 conidia를 만든다. 위와 같은 여러 가지 형태적 변화를 유전자 수준에서 설명하기 위하여 각 과정에 관여하는 유전자의 돌연변이주가 분리되었다 (Clutterbuck, 1969).

지난 수년간 이러한 돌연변이주들을 이용하여 각 돌연변이 유전자를 보완하는 유전자 중 *yeA* (O'Hara and Timberlake, 1989), *trpC* (Yelton et al., 1984), *brlA* (Boylan et al., 1987; Adams et al., 1988), *abaA* (Landschulz et al., 1988), *wetA* (Mirabito et al., 1989) 등의 유전자가 보고 되었다. 또한 최근에는 *fadA* (Yu et al., 1996) 등의 유전자가 생장 및 무성분화 과정에 관여한다고 보고되었다. 그 외에 무성포자 형성에 관한 돌연변이를 이용한 분석도 이루어졌는데 Martinelli와 Clutterbuck는 (Clutterbuck, 1969; Martinelli and Clutterbuck, 1971; Clutterbuck, 1977) 무성분화에 약 100개의 유전자가 필요하다고 하였다. 그러나 Timberlake (1980)는 무성포자를 형성하고 있는 균사체로부터 mRNA를 얻어 이에 대한 cDNA를 만들어 계산한 결과 약 1,200개의 유전자가 요구된다고 하였다. 물론 이들 유전자들이

모두 분석되어 있는 것은 아니다.

최근 무성생식에 관여하는 유전자들에 대한 비약적인 발전이 이루어졌는데 개괄적인 무성생식의 기작은 다음과 같다. 군사의 생장이 어느 정도 진행된 후 어떤 알 수 없는 signal에 의해 FluG(Lee et al., 1994a; 1996)에 의해 작은 분자량의 신호물질이 형성되고 이 신호가 FlbA (Lee et al., 1994b)에 전달되어 GTP 결합단백질인 FadA의 활성을 저해하여 군사체의 성장을 주도하는  $G\beta\gamma$ 의 유리를 저해하는 것으로 밝혀졌다. 따라서 군사의 생장이 멈추게 되고 *flbA*와 *flbA*를 경유하지 않는 다른 pathway인 *flbB*, *flbC*, *flbD*, *flbE*에 의한 신호전달이 *briA*와 다음 단계인 *abaA*까지 전해져 분화가 일어나게 되는 것으로 보고 되었다 (Yu et al., 1996).

## 2-2 유성생식과정

유성포자 형성과정의 초기 단계는 군사 집합체의 형성인데, 그 원인이 단순히 군사생장 결과 군사의 밀도가 높아져 anastomosis가 일어나게 된 것인지 아니면 Dictyostellium처럼 cAMP같은 signal 전달물질이 만들어져 군사들이 밀집하게 되는지 알려진 바가 없다. Cleistothecium layer 형성, anastomosis, Hülle 세포형성과 같은 현상이 동시에 혹은 어떤 순서로 나타나는지에 대해서도 보고 된 바 없다. 이에 대한 지식을 얻을 목적으로 cleistothecium이 형성되지 않는 돌연변이를 획득하려는 시도가 있었는데 정상적인 무성생식을 수행하는 반면 cleistothecium만을 형성하지 못하는 돌연변이를 얻지 못했다 (Arlett, 1960).

한편 Champe도 위와 유사한 실험을 시도하여 무성 및 유성포자를 형성할 수 없는 돌연변이 3종을 획득하여 분석하였는데 이들은 포자 형성과정의 초기에서 포자생성이 멈춘 것을 알았다 (Butnic et al., 1984a; 1984b). 이 세

돌연변이 중 하나인 *acoB*는 배지에 phenol 화합물을 분비하는데 이 물질은 무성포자 형성을 저해한 반면 유성포자 형성을 조기에 유발할 수 있음을 보여주었으며, 이 물질은 psi (precocious sexual inducer)이라 명명 되었고 미세한 구조적 차이를 보이는 3종이 존재하였는데, 이들은 공통적으로 lactone 고리를 갖는 분자량 278~296의 물질로 밝혀졌다 (Champe et al., 1987; Champe and El-Zayat, 1989). Champe는 유전자 *acoB*는 psi가 다음 단계의 물질을 합성하는 과정에 관여하리라 생각하고, psi는 유성생식 과정에서 sexual hormone 역할을 수행하리라 하는 가설을 제안하였다 (Champe et al., 1987).

한편, *veA* 돌연변이는 cleistothecium 형성을 지연하는 현상을 보인다는 보고가 있는데 (Käfer 1965), *veA+*와 *veA-*균주 사이에 protein의 차이를 SDS-PAGE를 통하여 분석한 결과 분자량 36,000의 단백질이 *veA-* 균주에서는 만들어지지 않는다는 사실이 밝혀졌고, 이와 같은 단백질이 conidiation 과정에도 관여하는 것으로 보아 아마도 *veA* 유전자는 초기 분화 과정에서 무성포자 형성과정과 유성포자형성과정이 나누어지는 분기점에 작용할 것이라고 생각 된다 (Champ et al., 1981).

최근에는 무성포자형성을 저해하는 배양조건에 대한 연구 결과를 바탕으로 유성포자형성을 못하거나 비정상적인 유성분화과정을 나타내는 돌연변이체들이 대량으로 분리되어 있다 (Han et al., 1990). 또한 이들 유성분화를 못하는 돌연변이를 보완하는 genomic DNA가 분리되어 분석되고 있는 중이다 (Han et al., 1994; Chae et al., 1995). 이 중 *veB*와 *nsdD*(never sexual development)는 최근 분리가 이루어져 분석이 진행되고 있는데 *veA*와 *veB*는 어느 유전자가 epistasis를 나타내는가는 아직 밝혀지지 않았으나 *nsdD*는 *ve*의 하위에서 작용하는 것으로 추정되고 있다. 그것은 균주에서 *nsdD*를 *niiA* promoter에 의해 over-expression 시켰을 때 유성생식이 일어난다는

사실에 의해 뒷받침 된다 (personal communication). 이와 더불어 *nsdD*의 하위에 있을 것으로 생각되는 *bsd* (blocked sexual development)와 *asd* (abnormal sexual development) 돌연변이 다수가 분리되어 있다 (Han et al., 1990).

야생형에서는 무성분화와 유성분화가 균형적으로 조절되는데 특정 조건, 예를 들면 carbon source, 빛의 존재, 공기의 차단 등의 성장조건에 따라 유성생식과 무성생식만을 유도할 수 있게 되어 (Han et al., 1990) 앞으로 무성분화와 같은 수준의 유성분화의 기작에 대한 연구가 활발하게 진행될 것으로 기대된다.

한편 비정상적인 conidiophore를 만드는 *stuA*와 *medA* (Clutterbuck, 1969)는 무성분화에 관계하는 것으로 생각되어 왔으나 두 유전자의 돌연변이 균주가 유성분화를 하지 못한다는 사실 (Clutterbuck, 1969)과 여러 개의 conidiophore 형성에 관여하는 유전자의 돌연변이가 유성분화를 하지 못한다는 사실 (Navarro-Bordonaba, et al., 1994; Yager, 1992)로 볼 때 무성분화와 유성분화의 기작이 어느 정도 같은 과정을 겪으리라고 가정할 수 있게 한다.

### 3. Gene Signature (GS)

#### 3-1. GS vs EST

Human Genome Project가 시작된 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 이루

어진 후 염기서열을 결정하는 순으로 일을 시작하였다.

전체 유전자 지도를 작성하기 위해 DNA marker가 필요하였는데 DNA marker로서는 유전자 또는 이미 확인된 DNA 염기서열들이 이용되었다. 처음 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 DNA의 조각으로부터 얻어지기 때문에 polymorphism이나 virus등의 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 Tags (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. 그런데 보통 random primer를 이용한 cDNA 합성에 의해 얻어지는 EST는 그 합성된 부위가 한 유전자 안에서 여러 곳이게 되므로 같은 유전자에서 만들어지는 EST일지라도 염기서열이 다르기 때문에 다른 유전자로 오인될 수 있고 염색체 지도를 작성하는데 있어서 경비와 시간의 낭비를 초래할 수 있게 되며 또한 각 조직에서의 정확한 유전자 발현양상을 조사하기 힘들다.

이러한 단점을 극복하기 위해 Gene Signatures (GSs)의 개념이 도입되

었다. GS란 mRNA의 특정부위 (e.g. 5'-end or 3'-end)만을 얻어내어 염기서열을 분석하는 것이다. 따라서 mRNA로부터 cDNA를 합성할 때 random primer를 사용하지 않고 oligo-[dT]만을 primer로 사용하여 cDNA를 합성하고 염기서열을 결정하게 되는데 현실적으로 5' -end까지 합성이 이루어지는 힘들기 때문에 주로 3' -end의 염기서열을 분석하게 된다. GS를 사용함으로써 얻는 장점은 EST와 같은 합성된 위치에 따른 중복을 피할 수 있기 때문에 유전자 발현 양상을 정확하게 조사할 수 있다는 것이다.

### 3-2. 다른 개체나 조직에서의 EST와 GS를 이용한 연구

1991년 Okubo 등은 vector primer를 이용하여 cDNA를 합성하고 제한 효소를 이용하여 GS를 얻어내는 방법을 고안하였으며 실제 인체의 각 조직과 cell line에서 3'-directed cDNA 은행을 제조하여 한 조직 당 약 1,000개의 cDNA 클론의 염기서열을 얻어 mRNA의 분포를 분석하였다 (Okubo et al., 1992, 1994; Fukushima et al., 1994).

이외에도 EST를 이용하여 사람의 뇌 (Adams et al., 1993), 심장혈관 (Liew et al., 1994), Brassica napus (Park et al., 1993), Plasmodium falciparum (Chakrabarti et al., 1994), 쥐의 자궁암세포 (Nishiguchi et al., 1994), 벼 (Sasaki et al., 1994)에서 유전자 발현양상을 조사하는 연구가 수행되었다.

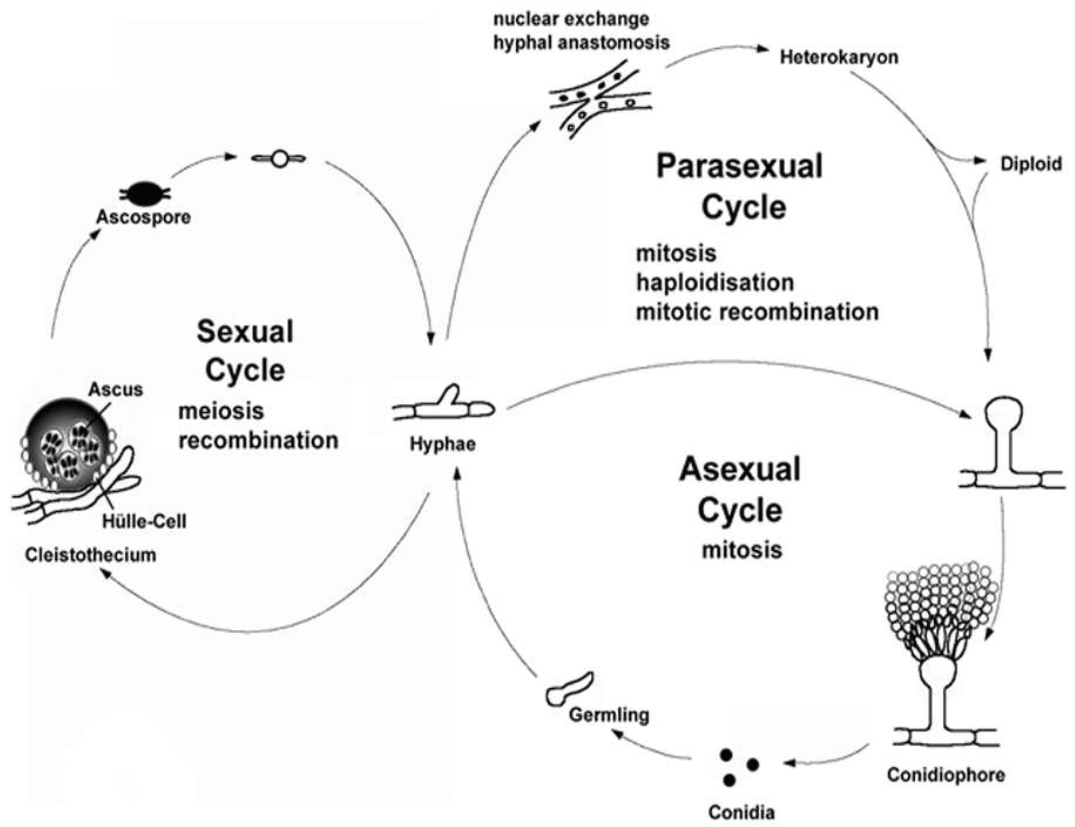


Figure 1. Life cycle of *A.nidulans*

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 실험재료

#### 1-1 균주와 EST

본 실험에 사용된 *Aspergillus nidulans* 균주의 유전형을 Table 1 에 나타내었고 사용된 EST 를 Table 2 에 나타내었다.

#### 1-2 배지 및 배양 조건

*A. nidulans*는 37°C에서 배양하였으며 배양에 사용된 배지인 완전배지 (CM), 최소배지 (MM) 는 Harsani등 (1976) 의 방법에 의해 준비하였다. 액체배양 시에 분생 포자는 3일간 배양한 배양접시로부터 0.08% tween80으로 수확한 다음  $1 \times 10^7 \sim 10^8$  세포/ 100 ml가 되도록 접종하였다. 고체 배지일 경우 2%가 되도록 agar powder를 첨가하여 사용하였다.

*A. nidulans* 배양에 사용한 배지는 Difco, Q-Bio, 사용된 Chemical들은 Sigma와 MP 제품을 사용하였다. 배지의 조성은 다음과 같다.

- CM

- 1% Glucose

- 0.15% Yeast Extract

- 0.15% Casein Hydrolysate

- (100X) Vitamin Solution

- (100X) Thiamin HCl

- (50X) Minimal Salt

- **CMR**

1% Glucose

0.15% Yeast Extract

0.15% Casein Hydrolysate

10% Arginine

0.25% (100X) Vitamin Solution

(100X) Thiamin HCl

(50X) Minimal Salt

- **CMRK**

1% Glucose

0.15% Yeast Extract

0.15% Casein Hydrolysate

0.25% (100X) Vitamin Solution

4.47% KCl

10% Arginine

(100X) Thiamin HCl

(50X) Minimal Salt

- **MM + Thiamin HCl**

1% Glucose

(100X) Thiamin HCl

(50X) Minimal Salt

- **MMK + Thiamin HCl**

1% Glucose

4.47% KCl

(100X) Thiamin HCl

(50X) Minimal Salt

- **MMR + Thiamin HCl**

1% Glucose

1% Thiamin HCl

10% Arginine

(100X) Thiamin HCl

(50X) Minimal Salt

- **(50X) Minimal Salt stock (1 l)**

$\text{NaNO}_3$  152 g

$(\text{MgSO}_4) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  26 g

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  (monobasic) 152 g

KCl 26 g

$(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24}$  (ammonium molibuden) 4 g

$\text{ZnCl}_2$  0.4 g

$\text{MnCl}_2$  0.008 g

$\text{CuSO}_4$  0.032 g

$\text{FeSO}_4$  0.127 g

- (100X) Vitamin Solution (500 ml)

Riboflavin 50 mg

p-Aminobenzoic acid 250 mg

pyridoxin-HCl 250 mg

Biotin (stock) 2 ml

Ascorbic acid 250 mg

Folic acid 250 mg

Thiamin 250 mg

Nicotinic acid 50 mg

- (100X) Thiamin HCl (100 ml)

TDW 100 ml

Thiamin 0.15 g

filter-sterilized with 0.45  $\mu$ l

### 1-3 제한효소 및 시약

PCR 에 필요한 primer 는 제노텍, Taq polymerase 는 제넨메드의 Nova Taq 을 사용하였으며, 제한효소는 New England Biolabs(NEB) 제품을 사용하였다. Southern blotting 에 사용된 ECL (Enhanced Chemiluminescence labeling and detection) kit 는 Amersham Life Science, PCR clean up kit 와 Gel extraction kit 는 QIAGEN 제품을 이용하였다.

## 1-4 반응 용액

### 1) *A. nidulans* Transformation

- Osmotic buffer

0.6 M KCl

10 mM NaCl

- STC buffer

1.2 M sorbitol

10 mM Tris-HCl (P.H 7.5) 0.5 M

10 mM CaCl<sub>2</sub>

- KC buffer

0.6 M KCl

50 mM CaCl<sub>2</sub>

- 25% PEG6000

25% PEG6000

10 mM Tris-HCl (P.H 7.5) 0.5 M

10 mM CaCl<sub>2</sub>

- Soft Agar

1% Glucose

1.7% Bacto agar

4.47% KCl

0.1% (100X) Thiamine-HCl

(50X) Minimal Salt

- **GlucaneX**

GlucaneX 1 g

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) Genomic DNA isolation

- **Breaking buffer (500 ml)**

Triton X-100 10 ml

10% SDS 50 ml

NaCl 2.92 g

Tris-HCl (PH 8.0) 10 ml

0.5 M EDTA 1 ml

- **TE (200 ml)**

1 M Tris-HCl (PH 8.0) 2 ml

0.5 M EDTA 400  $\mu$ l

- **(1000X) RNase A**  
 10 mM Sodium acetate (PH 5.2) 9.1 ml  
 RNase 100 mg  
 1 M Tris-HCl (PH 7.5) 900  $\mu$ l
  
- **RNase TE buffer**  
 TE 1 ml  
 (1000x) RNase A

### 3) Southern Blotting

- **Depurination solution**  
 20 N HCl
  
- **Denaturation solution**  
 0.5 M sodium hydroxide  
 1.5 M sodium chloride
  
- **Neutralizing solution**  
 1.5 M sodium chloride  
 0.5 M Tris-HCl (pH 7.5)
  
- **20X SSC**  
 0.3 M sodium citrate  
 3 M sodium chloride

- **Primary wash buffer**

6 M Urea

0.4% SDS

0.5X SSC

- **Secondary wash buffer**

2X SSC

- **Hybridization buffer**

0.5 M NaCl

5% blocking agent to ECL gold hybridization buffer

Table 1. Strains used in this study

Strains	Genotype
FGSC A4	Wild type, <i>veA</i> <sup>+</sup>
HSY2	<i>pabaA1, anA1; ΔargB::trpC; trpC801 veA</i> <sup>+</sup>
VER7 (PILJ16)	<i>pabaA1, anA1; ΔargB::trpC; trpC801 veA</i> <sup>+</sup> <i>argB</i> <sup>+</sup>

Table 2. EST used in this study

EST	Protein number & name	Domain
esd104	(AN2989.2) hypothetical protein	RNA recognition motif. (a.k.a RRM, RBD or RNP domain)
esd107	(AN7617.2) hypothetical protein	/
esd114	(AN0833.2) hypothetical protein	/
esd126	(AN6497.2) hypothetical protein	/
esd130	(AN8544.2) hypothetical protein	/
esd131	(AN8852.2) hypothetical protein	/
esd151	(AN7950.2) hypothetical protein	/
esd153	(AN4762.2) hypothetical protein	/
esd154	(AN3935.2) hypothetical protein	/
esd158	(AN8768.2) hypothetical protein	/
esd160	(AN3141.2) hypothetical protein	/
esd166	(AN2435.2) conserved hypothetical protein	/
esd167	(AN5695.2) hypothetical protein	/
esd178	(AN3908.2) hypothetical protein	Eukaryotic protein kinase domain
esd182	(AN6657.2) hypothetical protein	/

Table3. PCR primer used in this study (continued)

Primer name	Primer sequence (5' → 3' )
5For104	AGCCAAGGTAGATCCAGGCCTAACACATCAGGCTAGACTCG TTGAAGAG
5Rev104	GAGTAGCGCAACGATACAGTACC
3For104	GGTACAGTGTGCACTATACACCG
3Rev104	AGTCAAATGAGGCCTCTAAACTGGTCAGTGCTTGAAGTAA GATTCACGT
5nest104	GGTCTAGACAAGTTCATCGC
3nest104	GACATGCATGGTCTACATTG
5For107	CTAACAGAGTCCCAATCATCCTG
5Rev107	AGTCAAATGAGGCCTCTAAACTGGTCAAGGTCTTAGAAATG CAGCAAGTG
3For107	AGCCAAGGTAGATCCAGGCCTAACACATCTGCCTACTGCCT AACCTGCC
3Rev107	GAGAGTCCGGTGAATTATCCGTG
5nest107	CCATATTTTCGGTTCAGCTGC
3nest107	GAGAGGGCGATGAAGCGGAG
5For114	GCAGTCTGGACCTTGACAAATTG
5Rev114	AGTCAAATGAGGCCTCTAAACTGGTCAGTACTCAGAAGGCT GCCATGTCA
3For114	AGCCAAGGTAGATCCAGGCCTAACACAATCTCGACCGATTC GATTATCC
3Rev114	AGTTTATTGCAGTACCGGTAATC
5nest 114	CCGTAGACATGCAATGCAGC
3nest114	CTCGTAATGGGTAAGTTCGT

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

Primer name	Primer sequence (5' → 3' )
5For126	AGCCAAGGTAGATCCAGGCCTAACACAAGGTTGAGTTGAGT TTTCGTCG
5Rev126	GCGCAGAATATCATGACGCGTAG
3For126	GCGCAGAATATCATGACGCGTAG
3Rev126	AGTCAAATGAGGCCTCTAAACTGGTCAACAACCGGACTAGT GATGTACG
5nest126	TCTTCAGCTCTACGCTATCT
3nest126	GCAGCACCGGATCGGATGAG
5For130	AGAACTGCGTCGATCAGGAGACG
5Rev130	AGTCAAATGAGGCCTCTAAACTGGTCAGGCTGACGGTAGGA ATGCAAGTG
3For130	AGCCAAGGTAGATCCAGGCCTAACACATCAGTGCACTAGCA AGTTAATC
3Rev130	TAATAGAGGCAGTGGACATCAGC
5nest130	GCCTCTAAGTCATAACCACTG
3nest130	GCTCAAGCTCCGTATGGAGA
5For131	AGCCAAGGTAGATCCAGGCCTAACACAATAGCCAGATCTGG ACTCTCGG
5Rev131	ATGAGCCATTGTCATGTCGACAC
3For131	CGGATACGA AGCTGACGCTTGAC
3Rev131	AGTCAAATGAGGCCTCTAAACTGGTCACTTGCCACTATCAG CAGCATTC
5nest131	TTCCGTGACTTTCCTCAGAC
3nest131	CATGGAGACGGATAACACAG

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

Primer name	Primer sequence (5' → 3' )
5For151	AGCCAAGGTAGATCCAGGCCTAACACAAGTGCGTTGTTTAA GAGACGACC
5Rev151	GCCTGAGCTCATAATTGTGCTTG
3For151	CAGTAATCTTGCCGGTGTGACG
3Rev151	AGTCAAATGAGGCCTCTAAACTGGTCATCGGTGGCTAATTC CGCGAGAAG
5nest151	TGACCTCATCACACAGTGGC
3nest151	CGATGCTCTCGCTAGTGTTG
5For153	AGCCAAGGTAGATCCAGGCCTAACACAGGACGATTGCGGCA CGATCATC
5Rev153	CCTGTTCTGGTTCATTTGATCAC
3For153	GGACGCCTGCAAGCAAGTTAAGC
3Rev153	AGTCAAATGAGGCCTCTAAACTGGTCAGAGCTGGATATGAC TCAATGTTG
5nest153	CCACGATGTGCTTGC AGACG
3nest153	ACACCGACGTAAGCACTCCG
5For154	GCCCACCAATTATGATGTTGACG
5Rev154	AGTCAAATGAGGCCTCTAAACTGGTCAGCTTCTCCTGACCT GGATACTTG
3For154	AGCCAAGGTAGATCCAGGCCTAACACACCACATGACACATG ATTACCTG
3Rev154	GCCGGACGTCTCAAGGAGGTTTG
5nest154	GATTCCTTGAAGATGCATGC
3nest154	ACGGATAGAGAAGTGAGGGA

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

Primer name	Primer sequence (5' → 3' )
5For158	ACACGCCGACATTCGATATCCAG
5Rev158	AGTCAAATGAGGCCTCTAAACTGGTCAATGGGTGACTTGAT ACATGACTC
3For158	AGCCAAGGTAGATCCAGGCCTAACACACCTGACATTGACCG ACTCTTACC
3Rev158	TATGCAGAGAACGTGATTCACGG
5nest158	TGCTAGAGATAGGCTAGGCT
3nest158	TGCGTTGCTGGAGATGACAG
5For160	AGCCAAGGTAGATCCAGGCCTAACACAAGAGCGGATCTATT GAGACCAAG
5Rev160	TTAGTCCCTCGAGTCGGCAACAG
3For160	GACTCGTAATGCCACTTGGACGG
3Rev160	AGTCAAATGAGGCCTCTAAACTGGTCATCTCTGACAGCTCG GGCACTTAG
5nest160	GTA ACTTGTGACGAGTCAGC
3nest160	TAGGACAGCCTGTGAATCAG
5For166	AGCCAAGGTAGATCCAGGCCTAACACAATGACGGCGATGTA GAGTATAGG
5Rev166	AGATTCCAGGTACGAATACTCCG
3For166	AGATTCCAGGTACGAATACTCCG
3Rev166	AGTCAAATGAGGCCTCTAAACTGGTCAACTGACGAAGGTGG TATGCCTTC
5nest166	AAGCTATACGGAGTGTCAGC
3nest166	TTCTGACATGCGGTAGCCTC

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

Primer name	Primer sequence (5' → 3' )
5For167	AGCCAAGGTAGATCCAGGCCTAACACATAGTCTCGAATCTG TTACCTGG
5Rev167	CATCGCAAGGCACTATCATCCAC
3For167	TCATGCGTTCGCTTCCGGTTTCC
3Rev167	AGTCAAATGAGGCCTCTAAACTGGTCATCACCGAACAATGG CATTCCGTG
5nest167	CATCGTGACCATCGTGACCT
3nest167	TCCAAATGACGCCTGGGTCC
5For178	AGCCAAGGTAGATCCAGGCCTAACACACATGAAGGCGCTTA AAGATTATG
5Rev178	GAGGTCTTGCCATCGAGATACTG
3For178	CGTCCTCCGCAACTCAGCAGACT
3Rev178	AGTCAAATGAGGCCTCTAAACTGGTCATTCAGAAGCGGTTG CATTAGAGC
5nest178	GCAGCGATGGTTGAGTGTAG
3nest178	GCGTATACAACCGCTCCCGC
5For182	CGCCAGAATAACAGATGAATCAG
5Rev182	AGTCAAATGAGGCCTCTAAACTGGTCAGGATGAATGGAGGT CAGACCATC
3For182	AGCCAAGGTAGATCCAGGCCTAACACAGATATTATGTGGCG TTGGCATCG
3Rev182	GGATAACGAACCGCAGCAGTAAC
5nest182	GCTTGAGATTGCTTGACTCG
3nest182	AGCTCTGCACCGTATCTAGG

Table 3. PCR primer used in this study

Primer name	Primer sequence (5' → 3' )
argB OF	GACCAGTTTAGAGGCCTCATTTGAC
argB DR	GTGTTAGGCCTGGATCTACCTTGGC
argB 1	ATCGTCCTACCTCTCGCTTCATC
argB 2	TCGCACCCGGTGACTTTCACATG

## 2. 방법

### 2-1 DJ-PCR (Double Joint PCR)을 이용한 *esd* gene의 replacement construct

*Aspergillus nidulans* 유성분화에 있어서 *esd* (early sexual development) 유전자의 기능을 알아내기 위해 DJ-PCR (Double Joint PCR) 방법을 이용하여 *esd* genes을 disruption시켰다.

DJ-PCR은 3단계의 PCR을 통해 이루어지게 된다.

1st-PCR을 통하여 HS (Homology Site)를 얻기 위하여 각각의 *esd* gene의 5' 과 3' 쪽에 5For (23 mer), 5Rev (50 mer), 3For (50 mer), 3Rev (23 mer) or 5For (50 mer), 5Rev (23 mer), 3For (23 mer), 3Rev (50 mer)의 4개의 Primer를 만드는데 Primer 제작은 선별 marker로 사용될 *argB*와 중첩되는 부분이 있도록 5Rev, 3For or 5For, 3Rev 쪽에 *argB* tail sequence를 첨가하여 준다. 이를 통하여 5' , 3' 쪽에 각각 800~1000 bp의 상동부분을 얻게 되었다. 또한 선별 marker로 사용되는 *argB*도 *argB* OF, *argB* DF primer를 이용하여 1736 bp의 부분을 얻게 되었다. PCR후 elution을 함으로써 Genomic DNA를 제거 하였다.

2nd-PCR을 하기 위해 1st-PCR 후 얻은 5' HS와 3' HS를 이용하여 5' HS : *argB* : 3' HS의 DNA량을 1 : 3 : 1 로 섞어서 2nd DJ-PCR을 수행 하였다.

3rd PCR (nested PCR)은 nest primer를 사용하여 PCR을 수행하게 되는데 5' 과 3' 쪽에 5nest (20 mer), 3nest (20 mer) primer (nest primer는 Taq polymerase의 A-tailing 때문에 T (Thymine) 다음에 5' 또는 3' primer를 제작함)를 PCR을 하였다.

이러한 3단계의 PCR을 수행하고 나면 15개의 *esd* gene을 결실 시킨 Knock-out construct를 만들 수 있게 되는데 이렇게 얻은 결실 돌연변이는 양쪽에 800~1000 bp의 상동 부분과 선별 marker인 *argB* gene을 가지고 있게 된다.

DJ-PCR의 PCR mixture와 reaction 은 Table 4에 정리하고 각 단계는 Figure 2에 나타내었다.

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

**First PCR:** amplification of 5' , 3' flanking regions and of the genes of interest

PCR mixture (final 50 $\mu$ l)		PCR reaction	
<b>5' flanking region</b>			
Template DNA (FGSC4)	1 $\mu$ l		
5' For primer	1 $\mu$ l		
5' Rev primer	1 $\mu$ l		
dNTP	5 $\mu$ l		
10X Buffer	5 $\mu$ l		
Taq polymerase	0.5 $\mu$ l	94°C	3 min
TDW	36.5 $\mu$ l	94°C	30 sec
		55°C	1 min
		72°C	1 min
			25 cycle
<b>3' flanking region</b>			
Template DNA (FGSC4)	1 $\mu$ l	72°C	5 min
esd 3' Rev primer	1 $\mu$ l	4°C	$\infty$
esd 3' For primer	1 $\mu$ l		
dNTP	5 $\mu$ l		
10X Buffer	5 $\mu$ l		
Taq polymerase	0.5 $\mu$ l		
TDW	36.5 $\mu$ l		
<b>argB region</b>			
Template DNA (PILJ16)	1 $\mu$ l	94°C	2 min
argB OF primer	1 $\mu$ l	94°C	30 sec
argB DF primer	1 $\mu$ l	55°C	1 min
dNTP	5 $\mu$ l	72°C	1 min
10X Buffer	5 $\mu$ l	72°C	5 min
Taq polymerase	0.5 $\mu$ l	4°C	$\infty$
TDW	36.5 $\mu$ l		

→ Check PCR products and clean up by Qiagen Kit (or equivalent) for future use.

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

**Second PCR:** anneal and fuse 3 fragments (two flanking region and *argB*)

PCR mixture (final 25 $\mu$ l)		PCR reaction	
5' flanking amplicon	1 $\mu$ l		
3' flanking amplicon	1 $\mu$ l	94°C	2 min
<i>argB</i> amplicon	3 $\mu$ l	94°C	30 sec
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	$\infty$

} 10 cycle

→ This product does not need to be cleaned.

**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
esd 5 Nest primer	1 $\mu$ l	94°C	30 sec
esd 3 Nest primer	1 $\mu$ l	55°C	30 sec
dNTP	10 $\mu$ l	72°C	2.5 min
10X Buffer	10 $\mu$ l	72°C	5 min
Taq polymerase	0.5 $\mu$ l	4°C	$\infty$
TDW	77 $\mu$ l		

} 25cycle

→ Check PCR products and clean up by Qiagen Kit (or equivalent)

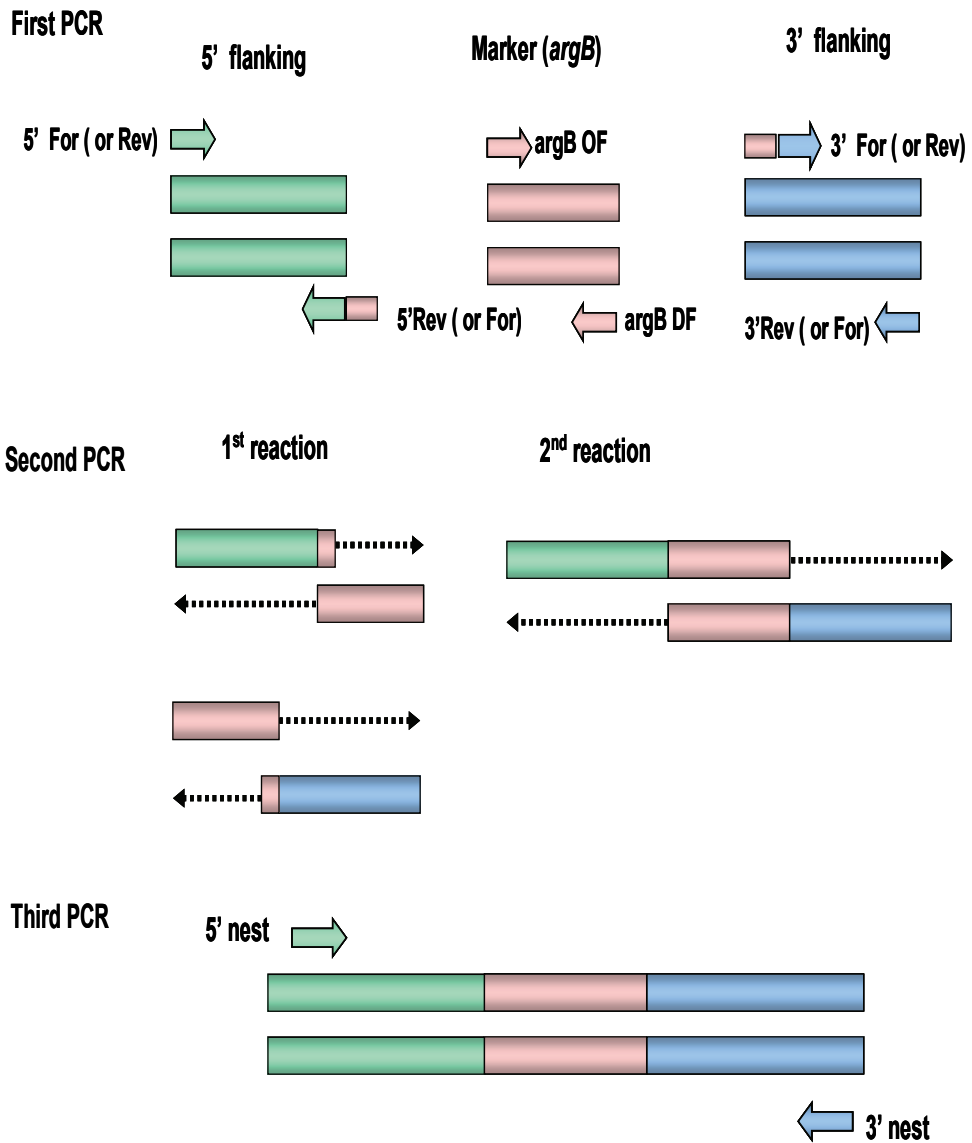


Figure 2. DJ-PCR (Double Joint PCR) step

## 2-2 *A. nidulans* Transformation

CMRK plate에서 3일간 배양한 HSY2를 0.08% Tween80으로 수확하여  $10^7$  개의 conidia를 CMR broth에 접종하여 37°C에서 16 시간 동안 진탕 배양한 mycelial ball을 멸균한 스타킹으로 거른 후 증류수와 osmotic buffer로 씻어주었다. 물기를 제거한 mycelia를 50 ml의 10 mg /ml Glucanex 200G (Novozyme, Switzerland) /osmotic buffer와 2 ml의 20 mg /ml BSA/osmotic buffer를 첨가하여 30°C에서 80 rpm으로 2 시간 동안 반응시켰다. 이것을 다시 멸균된 스타킹으로 걸러 protoplast를 수확하였다. 여과 된 용액을 2000 rpm으로 4°C에서 2 분간 원심 분리하여 protoplast를 침전시킨 후 상층액을 버리고 15 ml의 차가운 STC buffer를 첨가하여 4000 rpm으로 4°C에서 2 분간 원심분리 하였다. 상층액을 버리고 다시 한번 15 ml의 STC buffer 현탁한 후 원심분리 하였다. 상층액을 버리고 차가운 STC buffer 1 ml을 첨가하여 pellet을 조심스럽게 현탁한 다음 위와 같이 원심분리 하였다. 상층액을 버리고 각각 250  $\mu$ l의 차가운 STC buffer를 넣고 현탁하여 얼음에 10 분간 방치한 후 새로운 EP tube에 10  $\mu$ l의 DNA와 100  $\mu$ l protoplast 현탁액을 넣은 후 25% PEG6000을 각각 15  $\mu$ l씩 넣고 얼음에서 20 분간 방치한다. 각 tube에 다시 500  $\mu$ l의 25% PEG6000를 넣고 실온에서 15 분간 방치하였다. KC buffer 1 ml을 tube에 첨가한 다음 실온에서 5 분간 방치한 후 Soft-agar 5 ml에 transformants를 넣고 gentle하게 섞어 준 다음 MMK plate에 부어 도말 하여 37°C에서 3 일간 배양하였다.

## 2-3 Transformants의 획득 및 확인

형질전환을 한지 3일정도 지나면 형질전환체가 나오는데 conoly들이 섞이기 전에 wild type과 함께 CM plate에 picking하여 표현형을 관찰하고 genomic DNA isolation을 위하여 transformants를 MMK plate에 streaking하여 colony를 얻는다.

## 2-4 *A. nidulans* genomic DNA isolation

MMK plate에서 3일간 배양한 transformants를 loop로 긁어서 CM broth 2 ml에 풀어준 후 37°C에서 16 시간 정도 배양하였다 (20 시간이 넘지 않도록 배양 하여준다).

Mycelium이 CM broth 표면에 막처럼 자란 것을 loop를 이용해 떠낸 후 filter paper를 이용하여 수분을 제거하여 주고 forcep으로 잘게 찢어서 2 ml screw cup tube with an O-ring cap으로 tra하여 500  $\mu$ l breaking buffer와 500  $\mu$ l phenol: chlorophorm: isoamyl alcohol (25:24:1)와 0.5 mm zirconia/ silica beads (Biospec)를 넣어 준 후 Mini-Beads Beater-8 (Biospec)을 이용하여 highest speed로 30 sec 동안 homogenize하였다.

Homogenize한 것을 13000 rpm for 10 min at 4°C에서 원심 분리한 후 상층액만 400  $\mu$ l을 따내어 1.5 ml EP tube에 transfer한 후 이와 동량으로 phenol: chlorophorm: isoamyl alcohol (25:24:1) 넣어주고 vortexing을 15 sec하여준 후 10 min at 4°C 13000 rpm에서 원심 분리하였다 (위의 과정을 3번 반복한다).

상층액만 새로운 EP tube에 옮기고 chilled 100% Ethanol을 따낸 양의 2배 넣어 준 다음 10 min at 4°C 13000 rpm에서 원심 분리하여 준다. pellet

을 확인하고 상층액의 Ethanol을 버리고 나서 다시 원심 분리하여 pipette으로 Ethanol을 완전히 제거한 후에 70% Ethanol 1 ml을 넣어준 후 잘 섞어 주었다. 70% Ethanol 버리고 원심 분리하여 pipette으로 Ethanol을 완전히 제거하여 준 다음 2~3 분간 pellet을 air dry 하였다. DNA pellet이 말랐는지 확인한 후 RNase TE buffer을 50  $\mu$ l 넣어 DNA를 녹여 주었다. RNase TE buffer에 녹인 DNA는 1  $\mu$ l만 취하여 전기영동으로 확인하여 주었다.

## 2-5 Transformants의 PCR확인

제조된 결실돌연변이들을 확인하기 위하여 transformants들의 DNA를 isolation을 하여 결실 돌연변이의 genomic DNA를 얻었다. 얻어진 DNA를 For, Rev primer와 argB1, argB2 primer를 이용, PCR을 통해 확인하여 주었다.

PCR mixture와 reaction 은 Table 5에 정리하였다

## 2-6 Transformants의 southern Blot 확인

Transformants 가 정확히 disruption 되었는지 다시 한번 확인하기 위해 Amersham ECL nonisotopic method 를 사용하여 Southern blotting 을 수행하였다. Genomic DNA 를 제한효소로 자른 후 DNA 절편을 size marker 와 같이 1% low EEO agarose gel 에서 전기영동 하여 분리한 후, depurination 용액에서 15 분, denaturation 용액에서 45 분 그리고 neutralization 용액에서 45 분간 처리하였다. 이어 gel 상의 DNA 단편들을 reverse transfer 방법으로 Schleicher & schuell 용기를 이용하여 20X SSC

내에서 Hybond-N<sup>+</sup> membrane 으로 6 시간~8 시간 정도 이동시켰고 UV 로 cross-link (0.15 J/ cm<sup>2</sup>)하여 membrane 에 고정하였다.

Prehybridization 은 42℃에서 1 시간 동안 ECL hybridization solution 으로 하였고, Probe labeling 은 100 ng/μl 의 probe DNA 2.5 μl 에 TDW 7.5 μl 를 섞어 준 후 5 분 동안 boiling 시켜 denaturation 시킨 다음 ice 에 재빨리 넣어 5 분 동안 방치 하였다. Labeling reagent 와 glutaraldehyde 를 각각 10 μl 씩 넣고 잘 섞어 준 후 37℃에서 10 분간 incubation 한 다음 Prehybridization 한 solution 과 잘 섞어 주고 Hybridization 은 42℃ 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.

Southern blotting 을 수행하기 위한 제한 효소들과 확인을 위한 transformants 의 size 는 Table 6 에 정리하였다.

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

PCR mixture (final 40 $\mu$ l)		PCR reaction		
Template DNA (transformants)	1 $\mu$ l	94°C	3min	} 35cycle
Primer (For or Rev)	1 $\mu$ l	94°C	30sec	
Primer (argB1 or argB2)	1 $\mu$ l	62°C	30Sec	
10X dNTP	4 $\mu$ l	72°C	1min	
10X Buffer	4 $\mu$ l	72°C	5min	
Taq polymerase	0.3 $\mu$ l	4°C	$\infty$	
TDW	28.7 $\mu$ l			

Table 6. Southern Blot analysis using restriction enzyme and transformants size

EST	5For, 3Rev primer		Enzyme	Southern blotting	
	Size (b.p)			Size (b.p)	
	Wild type	Transformants		Transformants	Wild type
esd104	2732	3728	Sph I BamH I	977 / 4379	4361
esd107	2197	3475	Sac I	1779 / 3167	3773
esd114	2178	3588	Hind III	3115 / 2654	4357
esd126	2525	3687	Bgl II	2824 / 3720	5382
esd130	3906	3849	Sac I	2876 / 2920	5852
esd151	3437	3567	EcoR V	1782/ 3128	4830
esd153	2762	3689	Kpn I	5119	4192
esd154	2972	3626	Nde I Sac I	2063 / 3011	4420
esd158	3621	3625	Bgl II	1231 / 3388	5594
esd160	4501	3462	EcoR I	4148	5187
esd166	3331	3330	Sal I	2407 / 2765	5173
esd167	2796	3475	Sac II Sph I	2071 / 3549	4941
esd178	7063	3570	BamH I EcoR I	3189	6682
esd182	2575	3842	BsaA I	2958 / 3729	5465

### III. 결과

#### 1. DJ-PCR (Double Joint PCR)을 이용한 knockout construct 제조

Knockout construct를 만들기 위한 방법으로 DJ-PCR 방법을 사용하였다. DJ-PCR을 위한 Primer 디자인 시 특이한 점은 First PCR Primer 제작 시 선별 marker로 사용될 *argB*와 중첩되는 부분이 있도록 5Rev, 3For or 5For, 3Rev에 *argB* tail sequence를 첨가하여 준다는 것이다. DJ-PCR은 3 단계의 PCR을 수행하여 Knockout construct를 제조 한다.

First PCR 과정에서 5' flanking region은 5For-5Rev primer 각각을 증폭하여 PCR products을 확인하였고, 3' flanking region은 3For-3Rev primer를 이용해서 증폭하여 PCR products을 확인하였다. Marker gene으로 사용 할 *argB*도 *argB* OF, *argB* DR primer를 이용하여 1736bp의 products를 확인하였다.

Second PCR은 5' flanking amplicon: marker gene(*argB*): 3' flanking amplicon 1:3:1의 비율로 섞어서 증폭한 다음 second PCR products를 template로 5' , 3' Nest primer를 이용하여 최종적으로 third PCR을 진행하여 knockout construct를 제조하였다 (Figure 3).

이렇게 하여 총 15개의 *esd*에서 15개의 knockout construct를 얻었다.

제조된 knockout constructs 는 gel elution 하여 purify 한 후 *argB* gene를 가지고 있지 않은 *A. nidulans* 의 Wild type HSY2에 transformation하였다.

## 2. DJ-PCR (Double Joint PCR)을 이용한 knockout construct의 분석

### 2-1 Transformants의 PCR 확인

*Aspergillus nidulans*의 *argB* gene을 가지고 있지 않은 Wild type HSY2 균주에 DJ-PCR로 만든 products를 transformation한 후 CM배지에서 표현형을 관찰하고 genomic DNA isolation을 위해 MMK배지에 plating하였다.

DJ-PCR (Double Joint PCR)을 이용하여 knockout construct를 확인하기 위해 transformation 하여 나온 colony들의 genomic DNA를 분리하였다. 분리한 DNA들의 For는 For-*argB1* primer, Rev는 Rev-*argB2* primer를 이용하여 PCR을 진행하여 *esd131*을 제외한 14개의 *esd*에서 결실 돌연변이를 확인할 수 있었다.

정확한 확인을 하기 위하여 construct 전체를 For-Rev primer를 이용하여 PCR을 수행한 결과 9개 *esd*에서 9개의 결실 돌연변이를 확인할 수 있었다 (Figure 4).

(*esd 114*; 1-2, *esd 130*; 1-3, *esd 151*; 2-4, *esd 153*; 3-5, *esd 154*; 2-5, *esd 158*; 3-3, *esd 160*; 1-1, *esd 167*; 1-6, *esd 182*; 2-4)

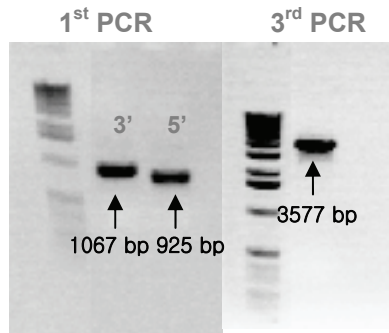
### 2-2 Transformants의 Southern Blot 확인

PCR에 의해 확인된 transformants가 정확한 knockout mutant인지 확실하게 확인하기 위하여 probe로 선별 마커인 *argB* (1736bp)를 이용하여

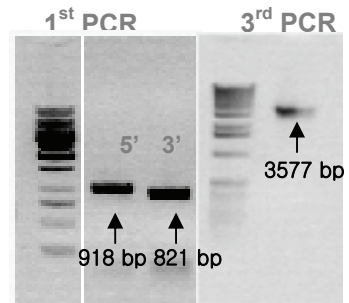
Southern Blotting을 수행한 결과 다시 3개의 *esd*에서 3개의 결실 돌연변이를 확인할 수 있었다 (Fig 5).

(*esd 151*; 2-4, *esd 154*; 2-5, *esd 158*; 3-3)

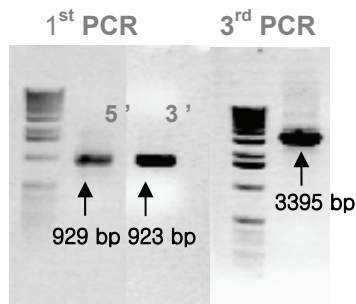
**1. esdD 104**



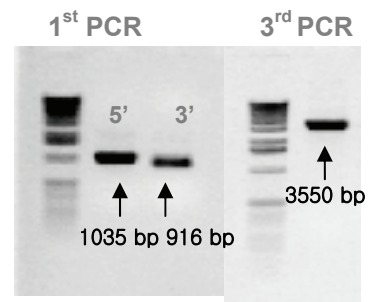
**2. esdD 107**



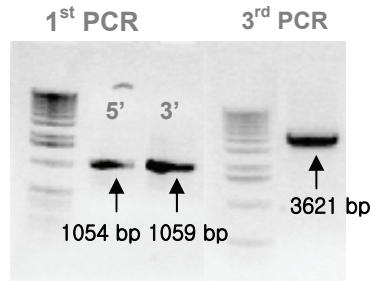
**3. esdD 114**



**4. esdD 126**



**5. esdD 130**



**6. esdD 131**

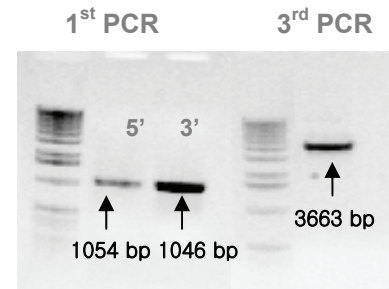
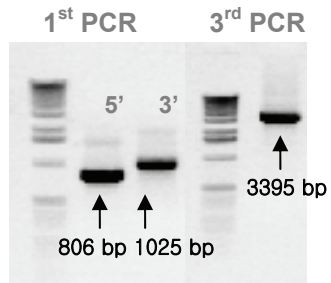
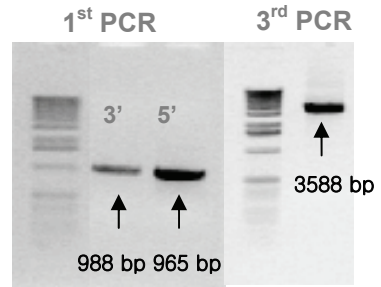


Figure 3. Gene deletion by DJ-PCR (continued)

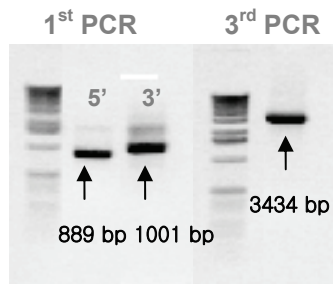
**7. esdD 151**



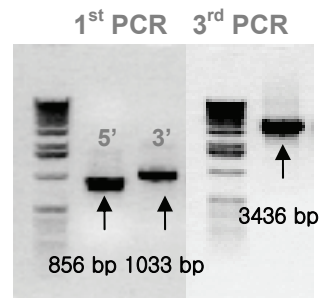
**8. esdD 153**



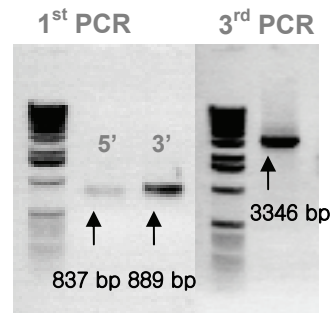
**9. esdD 154**



**10. esdD 158**



**11. esdD 160**



**12. esdD 166**

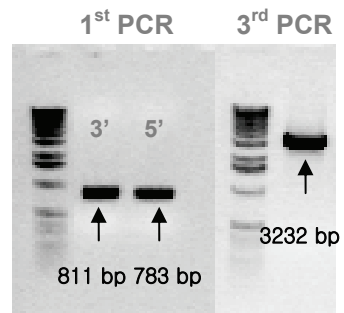
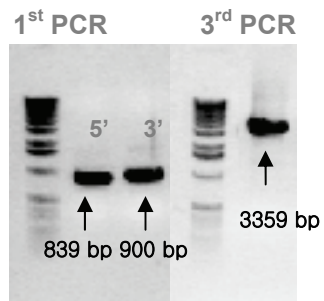
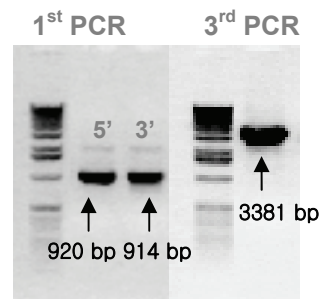


Figure 3. Gene deletion by DJ-PCR (continued)

**13. esdD 167**



**14. esdD 178**



**15. esdD 182**

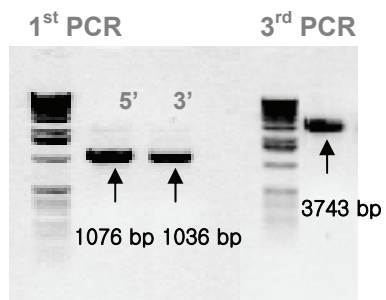


Figure 3. Gene deletion by DJ-PCR

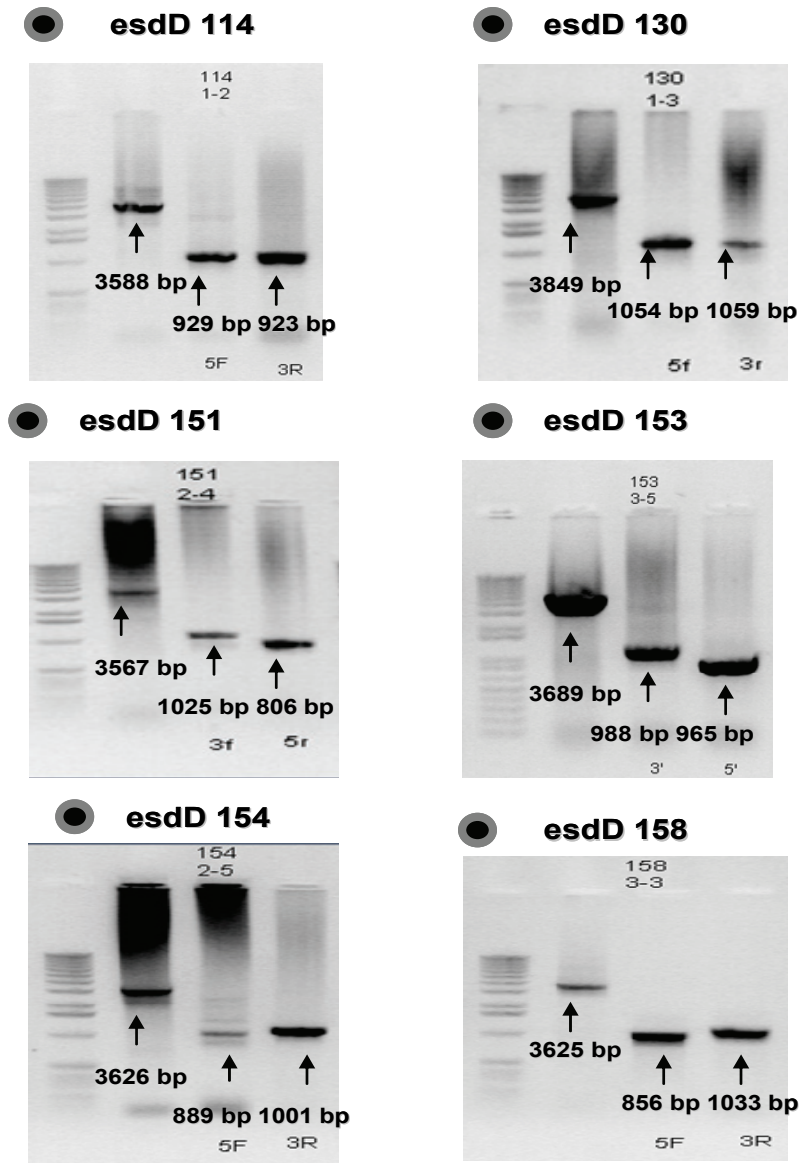
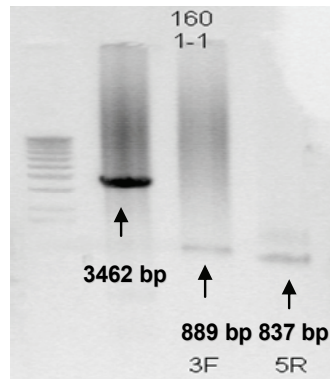
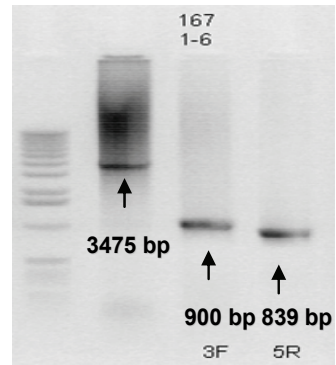


Figure 4. Confirmation of the disruptants by PCR. (continued)  
 (PCR with 5For, 3Rev, 5For and 3Rev primers)

● **esdD 160**



● **esdD 167**



● **esdD 182**

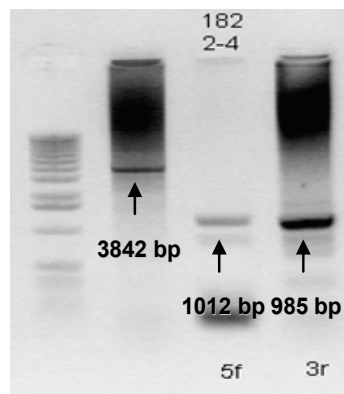
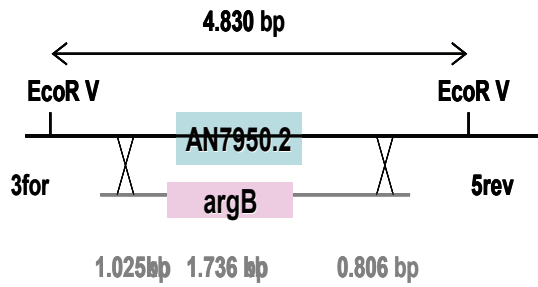


Figure 4. Confirmation of the disruptants by PCR.

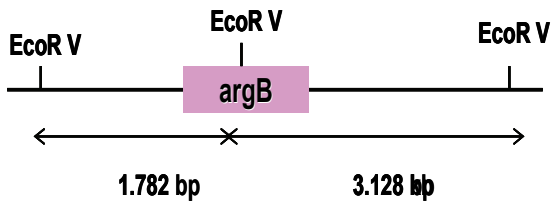
(PCR with 5For, 3Rev, 5For and 3Rev primers)

esdD 151

<WT>



<Knock Out>



Southern Blot

Probe : *argB*

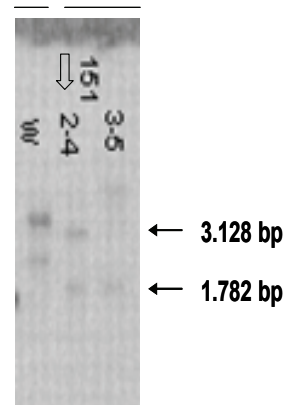
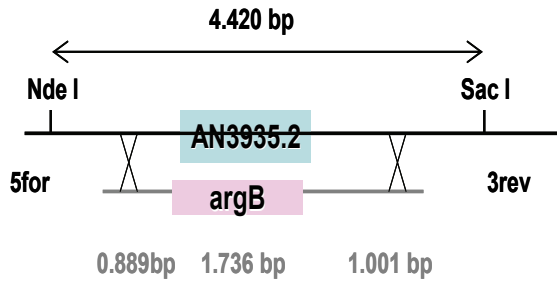


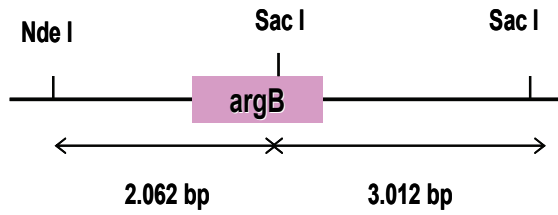
Figure 5. Confirmation of the disruptants by Southern Blot probed with *argB* (continued)

esdD 154

<WT>



<Knock Out>



### Southern Blot

Probe : *argB*

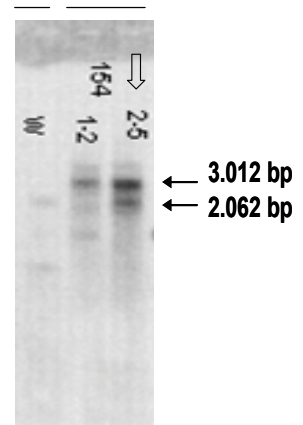
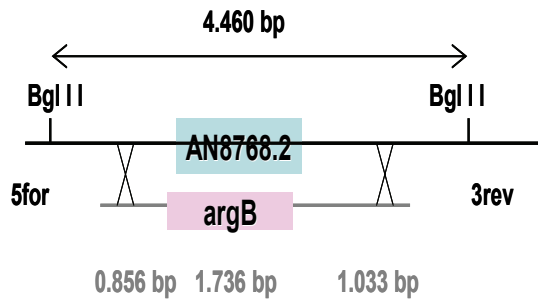


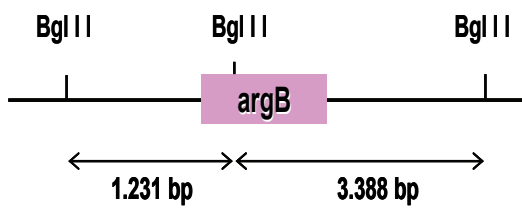
Figure 5. Confirmation of the disruptants by Southern Blot probed with *argB* (continued)

esdD 158

<WT>



<Knock Out>



### Southern Blot

Probe : *argB*

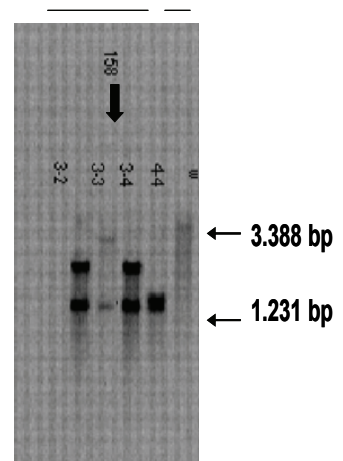


Figure 5. Confirmation of the disruptants by Southern Blot probed with *argB*

## IV. 결론

*Aspergillus nidulans*는 자낭균류 (Ascomycetes)에 속하는 사상성 균류 (filamentous fungi)로써 세 가지의 뚜렷한 생활사 (sexual life cycle, asexual life cycle, para-sexual life cycle)에 의해 성장 및 분화를 한다.

8 개의 염색체를 가지며 각 염색체에 분포하고 있는 유전자의 map이 알려져 있고, 유성생식을 하기 때문에 meiotic recombination이 일어나고 homothallic으로서 쉽게 mating이 가능하기 때문에 전통적으로 유전학적 연구의 좋은 재료로 활용되어 왔다.

*Aspergillus nidulans* 분화의 중요성은 *Aspergillus nidulans*에는 주로 식물 병원체가 많고 이런 병원체들의 감염경로는 주로 spore를 통해 전염되기 때문에 spore를 형성하는 분화과정의 연구가 중요하다. 또한 간 독으로 작용하는 aflatoxin 바로 전 단계의 mycotoxin인 sterigmatocystin (ST)을 합성한다. 여러 연구를 통해 ST 합성과 무성분화 그리고 ST 합성과 성장과의 관계가 규명되었으나 ST 합성과 유성분화와의 관계, 그리고 무성분화와 유성분화와의 관계는 규명되어 있기 때문에 유성 분화와 관여하는 유전자를 더 많이 규명할 필요가 있다.

*Aspergillus nidulans*의 유성분화에 관여하는 유전자들의 조절 network를 규명하고자 하여 유성분화 초기의 균사체로부터 expressed sequence tag (EST)을 얻고 EST로부터 분화 조절에 관여할 가능성이 있는 EST들을 대상으로 완전한 크기의 15개의 유전자를 분리하여 DJ-PCR에 의해 분리하고 분리된 이들 유전자 각각의 결실 돌연변이를 제조하고 제조된 결실 돌연변이를 확인하기 위하여 PCR 방법을 통하여 15개의 *esd* 중에서 9개의 결실 돌연변이를 확인하였다. 다시 한번 정확한 확인을 하기 위하여 결실 돌연변이 제조에 선별 marker로 사용된 *argB*를 probe로 사용하여 Southern Blotting을

수행한 결과 PCR로 확인 된 9개의 결실돌연변이 중에서 최종적으로 3개의 결실돌연변이들을 분리해 낼 수 있었다.

나아가 앞으로의 연구에서는 제조된 결실돌연변이주의 표현형 관찰을 통해 분화 관련 형질을 관찰하여 유성분화에 관여하는 유전자들을 분리해내고 결실돌연변이에 다른 돌연변이가 없는지 확인하기 위해 결실 돌연변이에 2차 선별 marker (*pyrG-*)를 도입 하여준다. 이렇게 2차 선별 marker가 도입된 균주에 완전한 유전자를 재도입하여 표현형을 관찰을 통한 유전자의 유성 분화관련을 확인하여 준다. 이렇게 확인된 유전자들을 기존의 유성분화에 관여 하는 것으로 알려진 기존의 유전자와의 관계를 규명하여 주는 것이 필요하다.

## 참고 문헌

- Adams, M. D., Soares, M.B., Keravang, A.R., Fields, C., and Venturi, J. 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.
- Andrianopoulos, A., and Timberlake, W. E. (1991) ATTS, a new and conserved DNA binding domain. *Plant Cell* **3**, 747–748.
- Arlette, C. F. (1960) A system of cytoplasmic variation in *Aspergillus nidulans*. *Heredity* **15**, 377–388.
- Aronson, J. M. (1981) Cell wall chemistry, ultrastructure and metabolism. In: Cole, G.T. (Ed.), *Biology of conidial fungi*. vol. 2, Academic Press, London, pp. 459–507.
- Bainbridge, B. W., Bull, A. T., Pirt, S. J., Rowley, B. I., and Trinci, P. J. (1971) Biochemical and structural changes in non-growing maintained and autolysing cultures of *Aspergillus nidulans*. *Trans. British Mycol. Soc.* **56**, 371–385.
- Benjamin, C. R. (1955) Ascocarps of *Aspergillus* and *Penicillium*. *Mycologia* **47**, 669–687.
- Boylan, M. T., Mirabito, P. M., Willett, C. E., Zimmerman, C. R., and Timberlake, W. E., (1987) Isolation and physical characterization

- of three essential condition genes *from Aspergillus nidulans*. *Mol Cell Biol* **7**: 3113–3118
- Berse, B., Dmochowska, A., Skrzypek, M., Weglenski, P., Bates, M. A., and Weiss, R. L. (1983) Cloning and characterization of the ornithine carbamoyltransferase gene from *Aspergillus nidulans*. *Gene* **25**, 109–117.
- 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.
- Burnette, W. N. (1981) "Western Blotting" : Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodesyl sulfate–polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radiodinated protein A. *Anal. Biochem.* **112**, 195–203
- 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.
- Brody, H., Griffith, J., Cuticchia, A.J., Arnold, J., and Timberlake, W.E. (1991) Chromosome–specific recombinant DNA libraries from

- the fungus *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Res.* **19**, 3105–3109.
- Bull, A.T. (1970) Chemical composition of wild-type and mutant *Aspergillus nidulans* cell walls. The nature of polysaccharide and melanin constituents. *J. Gen. Microbiol.* **63**, 75–94
- 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 a sexual sporulation hormone from *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol.* **171**, 3982–3988.
- Champe, S. P., Kurtz, M. B., Yager, L. N., Butnick, N. J., and Axelrod, D. E. (1981) in *The fungal spores: Morphogenic controls* (Hohl, H. R. and Turian, G. eds.) 255–276, Academic Press, New York.
- Champe, S. P., and Simon, L. D. (1992) in *Morphogenesis: An analysis of the development of biological form.* (Rossomando, E. F., and Alexander, S. eds.) 63–91, Marcel Dekker, Inc. New York.
- Champe, S. P., Rao, P., and Chang, A. (1987) An endogenous inducer of sexual development in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* **133**, 1383–1387.

- Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDonald, R. J. and Rutter, W. J. (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* **18**, 5294–5299.
- 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.
- Caro, L.H.P., Tettelin, H., Vossen, J.H., Ram, A.F., van den Ende, H., and Klis, F.M. (1997) In silico identification of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored plasma membrane and cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**, 1477–1489.
- Claverie-Martin, F., Diaz-Torres, M.R., and Geoghegan, M.J. (1988) Chemical composition and ultrastructure of wild-type and white mutant *Aspergillus nidulans* conidial walls. *Curr. Microbiol.* **16** 281–287.
- Davis, B. J. (1964) Disc electrophoresis-II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**, 404–427.
- Ellis, T. T., Reynolds, D. R., and Alexopoulos, C. J. (1973) Hüll cell development in *Emericella nidulans*. *Mycologia* **65**, 1028–1035
- Gems,

- Gems, D., Johnstone, I. L., and Clutterbuck, A. J. (1991) An autonomously replicating plasmid transforms *Aspergillus nidulans* at high frequency. *Gene* **98**, 61–67.
- 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, K. H., Han, K. Y., Yu, J. H., Chae, K. S., Jahng, K. Y., and Han, D. M., (2001) The *nsdD* gene encodes a putative GATA type transcription factor necessary for sexual development of *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **41**: 299–309
- Hinnen, A., Hicks, J. B., and Fink, G. R. (1978) Transformation of yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 1929–1933.
- Hyo-young Jeong. (1999) Identification and characterization of highly expressed gene in early sexual stage in *Aspergillus nidulans*.  
Thesis
- Hynes, M.J., and Kelly, J.M.(1977) Increased and decreased sensitivity to carbon catabolite repression of enzymes of acetate metabolism in mutants of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* **156**, 87–92.
- Jeong, H. Y., Cho, G. B., Han, K. Y., Kim, J., Han, D. M., Jahng, K. Y., and Chae, K. S. (2001) Differential expression of house-keeping genes of *Aspergillus nidulans* during sexual development. *Gene* **262**: 215–219
- John, M. A., and Perberdy, J.J. 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.
- Jeong, H.–Y., Han, D.–M., Jahng, K.–Y., and Chae, K.–S. (2000) The *rpl16a* gene for ribosomal protein L16A identified from expressed sequence tags is differentially expressed during sexual development of *Aspergillus nidulans*. *Fung. Genet. Biol.* **31**, 69–78.
- 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.
- 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.
- Mims, C. W., Richardson, E. A., and Timberlake, W. E. (1988) Ultrastructural analysis of conidiophore development in the fungus *Aspergillus nidulans* using freeze–substitution. *Protoplasma* **44**,

132–141.

- 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.
- Okubo, K., Hori, N., Matoba, R., Niiyama, T., and Matsubara, K. (1991) A novel system for large-scale sequencing of cDNA by PCR amplification. *DNA sequence* **2**, 137–144.
- Oliver, P. T. P. (1972) Conidiophore and spore development in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* **73**, 45–54.
- Park, Y. S., Kwak, J. M., Kwon, O. Y., Kim, Y. S., Lee, D. S., Cho, M. J. Lee, H. H., and Nam, H. G. (1993) Generation of expressed sequence tags of random root cDNA clones of Brassica napus by single-run partial sequencing. *Plant physiol.* **103**, 359–370.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New
- Thom, C., and Raper, K. B. (1945) in *A Manual of the Aspergillus*, Williams and Wilkins Co., Baltimore, U. S. A.
- Thomas H. Adams, Jenny K. Wieser, and Jae-Hyuk Yu (1998). Asexual Sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol Rev.* **62**(1): 35–54.
- Timberlake, W. E. (1980) Developmental gene regulation in *Aspergillus nidulans*. *Dev. Biol.* **78**, 497–510.
- Wu, J., and Miller, B. L. (1997) *Aspergillus* asexual reproduction and sexual reproduction are differentially affected by transcriptional

and translational mechanisms regulating stunted gene expression  
*Mol Cell Biol* **17**: 6191–6201

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, Boston.

Zonneveld, B.J.M. (1971) Biochemical analysis of the cell wall of *Aspergillus nidulans*. *Biochim. Biophys. Acta* **249**, 506–514.

Zonneveld, B.J.M. (1972) Morphogenesis in *Aspergillus nidulans*: the significance of  $\alpha$ -1,3-glucan of the cell wall and  $\alpha$ -1,3-glucanase for cleistothecium development. *Biochim. Biophys. Acta* **273**, 174–167

# Abstract

## Systematic deletion of genes involved in development of *Aspergillus nidulans*

Ji hye Park

Department of Biology Education

Graduate School of Education

Sungshin Women's University

A filamentous fungus, *Aspergillus nidulans*, which belongs to ascomycete, is a eukaryotic microbe that grows quickly even in the simple synthetic medium. Also *Aspergillus nidulans* is a model fungus to study sexual and asexual reproduction because this organism develops both sexual and asexual spores through complicated morphogenic processes, and because genetical, biochemical, and physiological analysis of this organism are easy and well established.

In order to clarify a regulatory network of genes involved in sexual development of *Aspergillus nidulans*, hundreds of ESTs (expressed sequence tags) have been obtained from mycelia at the early sexual developmental stage. Among them, 15 full-length genes encoding hypothetical proteins were chosen from genomic sequence data of *A. nidulans*. To make deletion mutants of these genes, deletion cassettes were constructed systematically by DJ-PCR (Double-Joint PCR) and transformed into HSY2 strain. Deletion mutant candidates

for 9 genes were selected by PCR, and three deletion mutants among nine candidates were finally confirmed by Southern blotting.