

*Aspergillus nidulans*의 무성포자를 이용한 PCR 조건의 최적화

박범찬 · 박윤희 · 양소영 · 박희문*

충남대학교 자연과학대학 미생물학과

사상균류의 세포 자체로부터 직접 PCR을 하는 방법은 세포벽 파괴의 어려움 때문에 모든 곰팡이에 적용될 수 없다. 극초단파 조사는 사상균류의 DNA를 추출함에 있어서 그 유용함이 이미 검증된 바 있는데, 본 논문에서는 극초단파 조사를 이용하여 *Aspergillus nidulans*의 포자로부터 손쉽게 주형 DNA를 얻어 PCR 증폭하는 방법을 소개하고자 한다. 본 실험에서는 극초단파 조사시간과 PCR에 필요한 주형 DNA의 양 등을 최적화하였으며, 이렇게 수행된 PCR 결과는 single copy 유전자를 대상으로도 약 3 kb 크기의 산물까지 증폭 가능하여, 형질전환체를 선별하기에 충분한 크기의 산물들도 효과적으로 얻어짐을 보여주었다. 따라서 이 방법은 *A. nidulans*의 형질전환체를 보다 손쉽게, 시간을 절약하여 선별할 수 있는 효과적인 방법이라 생각된다.

Key words □ conidiospore, *Aspergillus nidulans*, microwave irradiation, PCR

PCR 법은 염색체 상 특정 유전자와 도입 유전자간의 상동성 재조합(homologous recombination)에 의해 얻어진 형질전환체를 선별함에 있어 간단하고 효과적인 방법 중의 하나이다. 이를 위해서는 주형 DNA인 개별 형질전환체의 genomic DNA의 분리 과정이 선행되어야 한다. 그러나 현재 곰팡이의 DNA 추출과정은 대부분 균사체의 물리적인 파괴에 뒤이은 유기용매의 사용, 그리고 여러 번의 원심분리 과정을 필요로 하는 등 많은 시간과 비용, 그리고 노동력이 소모된다. 특히 상동성 재조합의 효율이 낮기 때문에 좀 더 많은 수의 형질전환체를 조사해야 하므로 이러한 노력은 배가된다.

이상과 같은 단점을 보완하기 위해 개발된 것이 세포 자체로부터 직접 PCR을 수행하는 방법으로, 원핵 세포와 효모류에서 광범위하게 사용되는 콜로니 PCR이 그것이다(7,9). 콜로니 PCR은 주형 DNA의 추출 없이 고형배지 상에 자란 콜로니 일부를 직접 반응액과 혼합하여 PCR을 수행하는 것으로 간편하게 효율적인 결과를 얻을 수 있기 때문에 대장균이나 효모 등에서 형질전환체의 선별에 많이 이용되고 있다. 한편 곰팡이들은 좀더 복잡하고 두꺼운 세포벽을 갖고 있어 파괴시키기 어렵기 때문에, 전혀 적용 불가능한 것은 아니나, 세포를 직접 PCR에 이용하는 위와 같은 방법은 적용하기가 상대적으로 힘들다. 몇몇 곰팡이에서는 PCR 초기 과정인 94°C 변성 과정을 늘림으로써 포자로부터 직접 PCR을 수행하기도 하고(1), 포자를 저온에서 얼린 후 PCR을 수행하는 등의 과정들이 이용되기도 하였다(10). 그러나 대부분의 곰팡이 포자는 이러한 방법이 적용되지 않아 일부 곰팡이류에만 국한되어 적용되었을 뿐이다.

전자레인지의 무성포자 조사는 많은 원핵생물에서

DNA 추출과 바이러스의 DNA 검출과정에서도 이용되었으며, Southern hybridization에서 조직의 고정 등에도 사용되어 왔다(2,3,8). 한편 Goodwin 등(6)이 곰팡이를 비롯한 식물, 원핵생물과 같은 많은 진핵생물에도 성공적으로 적용하여, 빠르고 쉽게 DNA를 추출하는 한 가지 방법으로 인식되었다. 즉, 극초단파 조사가 세포벽이나 세포막에 변형을 일으켜 세포의 DNA를 외부로 쉽게 방출시키는 역할을 하는 것으로 보인다. 그러나 전통적으로 분자생물학적, 유전학적 연구가 많이 된 *Aspergillus nidulans*에서는 이 방법이 적용된 사례가 없으며, 아직도 기존의 유기용매를 이용한 DNA 추출법에 의존하고 있다.

본 연구는 가정용 전자레인지의 극초단파 조사를 응용하여 *A. nidulans*로부터 주형 DNA를 얻는 방법을 보다 간편하게 최적화하였으며, 증폭 가능한 크기를 알아봄으로써 형질전환체의 일차 선별을 용이하게 하고자 하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양조건

실험과정에 사용된 균주는 *Aspergillus nidulans* FGSC A4이며, CM (0.15% yeast extract, 0.15% casamino acid, 1% glucose, 1 × mineral salt stock solution, 1 × vitamin solution) 한천배지에서 4 일간 배양하여 충분히 무성분화가 일어나도록 하였다.

50X mineral salt stock solution의 조성은 152 g/l NaNO₃, 26 g/l MgSO₄ · 7H₂O, 152 g/l KH₂PO₄, 26 g/l KCl, 4 g/l (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 0.4 g/l ZnCl₂, 0.008 g/l MnCl₂ 0.032 g/l CuSO₄ 그리고 0.127 g/l FeCl₂이며, 100X vitamin solution은 100 mg/l riboflavin, 500 mg/l p-aminobenzoic acid, 500 mg/l pyridoxin-HCl, 500 mg/l thiamine-HCl, 2 mg/l biotin, 500 mg/l ascorbic acid와 500 mg/l folic acid이다.

*To whom correspondence should be addressed.

Tel: 042-821-6417, Fax: 042-822-7367

E-mail: hmpark@cnu.ac.kr

전자레인지리를 이용한 극초단파의 조사 및 DNA 추출

한천배지로부터 무성포자를 loop로 살짝 긁어(약 10⁵~10⁶ conidia) 빈 미량원심분리기(microcentrifuge)용 튜브에 넣는다. 튜브 뚜껑을 닫은 다음 가정용의 전자레인지(LG전자 MR-216MR, Seoul, Korea)에 넣고 1 분 내지 수분간 최대전력(700 W)으로 극초단파를 조사하였다. 극초단파가 조사되는 동안 오븐의 손상을 막기 위해 물이 담긴 비이커를 함께 오븐 안에 넣어 두었다. 조사가 끝난 튜브에 70 μl의 TE (10 mM Tris · Cl, pH 8.0, 1 mM EDTA)를 첨가한 뒤, vortexing하고, 14,000×g로 5 분 동안 원심분리하였다. 상등액은 포자가 떨어져오지 않도록 조심스럽게 새 튜브로 옮겼고, 만일 포자가 떨어져왔을 때에는 재차 원심 분리하여 순수한 상등액만을 얻었으며 이를 일부 덜어 PCR에 사용하였다.

PCR 조건

얻어진 포자 DNA 추출액에서 1 μl를 덜어서 PCR에 사용하였으며, 그 외 PCR 반응액의 조성은 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 40 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.25 mM dNTP와 2.5 unit의 Taq DNA polymerase (Bioneer, Chungwon, Korea)였으며 각 primer는 0.03 mM씩 첨가되었다. 사용된 primer들의 염기서열을 표 1에 나타냈다. PCR 조건은 무성포자를 직접 반응액에 넣는 경우를 제외하고 모두 94°C, 5 분간 열 변성 후 94°C, 40 초, 58°C, 40 초, 그리고 72°C 2 분의 주기를 35 회 반복하였고, 마지막으로 72°C에서 10 분 더 반응하였다. 무성포자 PCR의 경우는 초기 94°C의 열변성 시간을 5 분에서 15 분으로 늘렸다. 증폭 산물은 0.8% agarose gel에서 전기영동으로 분리되었으며, ethidium bromide (EtBr) 염색 후 UV등으로 확인하였다.

결과 및 고찰

*Aspergillus nidulans*의 무성포자로부터 전자레인지리를 이용하여 DNA를 추출하는 것이 가능한지 확인하고자 고형배지에서 얻은 무성포자에 1 분부터 10 분까지 시간을 달리하여 극초단파를 조사하였다. 이로부터 얻어진 각각의 추출액의 일부를 agarose gel에서 전기영동하여 DNA를 분리하고자 하였으나 EtBr 염색결과 가시적인 DNA 밴드를 관찰할 수 없었으며, 정량 결과 역시 fluorometer로는 검출할 수 없을 정도의 극미량이었다.

따라서 얻어진 포자 DNA 추출액을 어느 정도 주형 DNA로 사용하여야 할 지 조건을 조사하였다. 이때 사용한 PCR primer 쌍으로는 키턴 합성 효소 유전자중 하나인 *chsC*의 내부 약 300 bp를 증폭할 수 있는 ChsC2847F와 ChsC3124R을 사용하였고, 포자에 5 분간 극초단파를 조사한 뒤 얻은 추출액을 주형으로 사용하였다. 그 결과 추출액 중 1 μl 이하를 주형 DNA로 했을 때 산물이 확인되었으며, 그보다 많은 추출액을 주형으로 PCR 하였을 경우에는 아무런 산물도 확인할 수 없었다(자료 생략). 아마도 얻어진 추출액에 DNA 이외에 포자의 색소를 비롯하여 세포에서 유래된 당류들이 다량 함유되어, 이 추출액을 많이 사용할수록 이러한 물질들이 반응액에 많이 들어가 Taq poly-

merase의 활성을 오히려 떨어뜨린 것으로 보인다(4).

다음으로 극초단파의 조사시간과 PCR 반응의 상관관계를 조사하고자 고형배지에서 얻은 포자나 액상 배양된 균사에 1 분부터 10 분까지 시간을 달리하여 극초단파를 조사하였다(Fig. 1A). 사용된 primer는 앞서와 동일한 ChsC2847F와 ChsC3124R이었으며 포자에 극초단파를 조사한 뒤 얻은 추출액 1 μl를 주형으로 사용하였다. 그 결과 균사체에 극초단파를 조사한 경우(Fig. 1A, lane 1~3)는 조사 시간에 상관없이 아무런 산물이 확인되지 않았으나, 무성포자의 경우(Fig. 1A, lane 4~6)에는 모든 조사 시간에 효과적으로 PCR 산물을 얻을 수 있었다. 따라서 전자레인지리

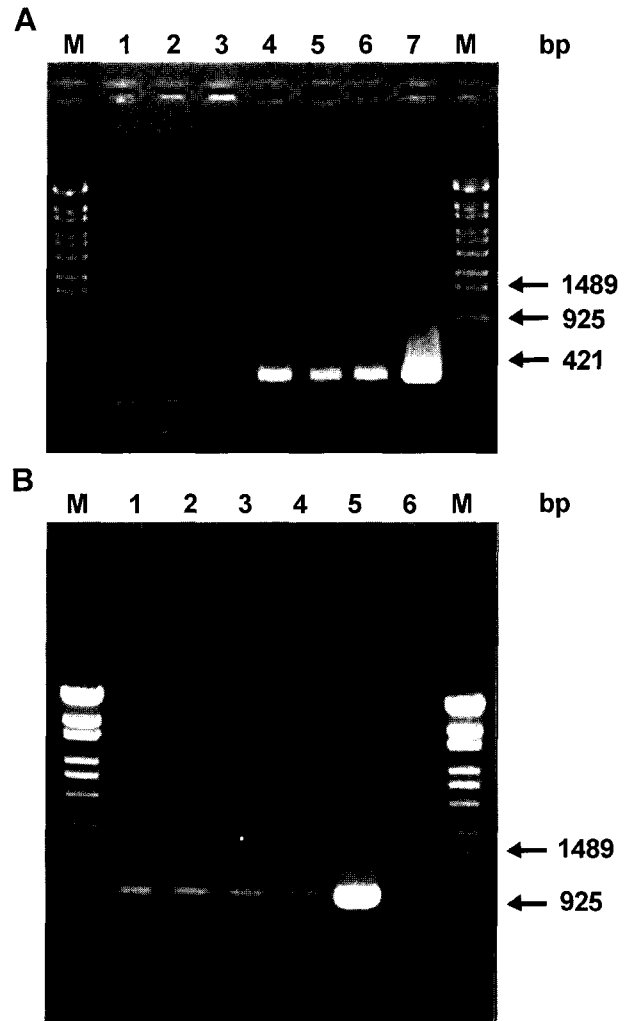


Fig. 1. One min irradiation is enough to amplify PCR products from *A. nidulans* conidiospores. A) Effect of microwave irradiation time on mycelia (lane 1~3) and conidiospores (lane 4~6). M, lambda DNA/StyI marker; 1 and 4, 1 min irradiation; 2 and 5, 5 min irradiation; 4 and 6, 10 min irradiation; 7, PCR products from phenol:chloroform-extracted DNA. B) *A. nidulans* conidiospores cannot be directly amplified after a prolonged initial step at 94°C in the PCR. M, lambda DNA/StyI marker; 1, 1 min irradiation; 2, 3 min irradiation; 3, 5 min irradiation; 4, 10 min irradiation; 5, PCR products from phenol:chloroform-extracted DNA; 6, Direct conidia PCR.

Table 1. Primers used in this study

Primer	Oligonucleotide sequence (5' to 3')
ChsC103F	CCAGACTGCCCTGATTACA
ChsC255R	CCAAGCTGCTGATGTTTCTC
ChsC845F	CCGGCTGAACAAGGTCTAT
ChsC1672F	GGGGACCCATGGATGTACAT
ChsC1825R	TCGGAGTTAGGCGTATCACA
ChsC2221R	TGGGCGACCCCTTCGAGATTCCT
ChsC2847F	GAGAGAATCCCGCAGTCGTA
ChsC3128R	GGCAATTGTCATGTCCTCCT
ChsC5623R	GCTGAACCTGCAGGAATCGACAA

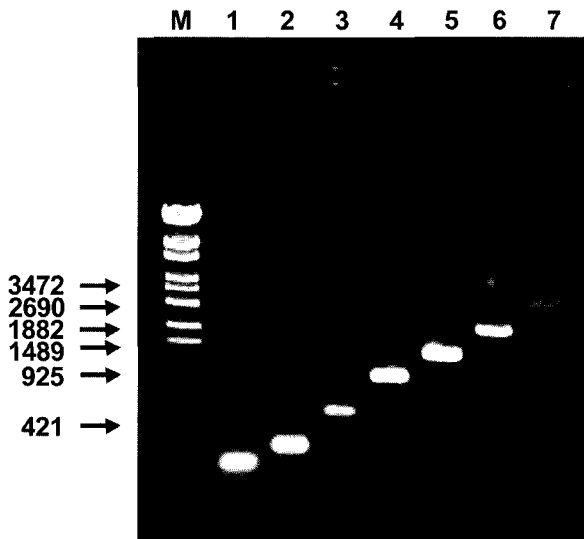


Fig. 2. PCR with a variety of different primers specific to internal regions of the *chsC* gene using *A. nidulans* conidiospores after 1 min microwave treatment. M, lambda DNA/*StyI* marker; 1, 0.15 kb (ChsC103F and ChsC255R); 2, 0.3 kb (ChsC2847F and 3128R); 3, 0.55 kb (ChsC1672F and ChsC2221R); 4, 1.0 kb (ChsC845F and ChsC1825R); 5, 1.4 kb (ChsC845F and ChsC2221R); 6, 2.0 kb (ChsC103F and ChsC2221R); 7, 3.0 kb (ChsC103F and ChsC3128R).

의한 DNA 추출법이 균사보다는 건조한 포자에 보다 효율적이며 조사시간도 1 분이면 충분함을 알 수 있었다. 한편 Aufauvre-Brown 등(1)은 *Aspergillus fumigatus*의 무성포자를 직접 PCR 반응액에 넣고 초기 열 변성 과정을 늘림으로써 PCR을 성공적으로 수행한 바 있는데, 형태발생과정이 비슷한 *A. nidulans*에서도 이와 같은 결과를 얻을 수 있는지 확인하여 보았다(Fig. 1B). 이때 사용된 PCR primer는 ChsC845F와 ChsC1825R이었다. 그러나 Fig. 1B의 lane 6의 결과에서 보는 것처럼 직접 포자로부터 PCR을 수행한 경우 아무런 증폭 산물도 얻을 수 없었으나, 전자 레인지의 극초단파를 조사한 시료(Fig. 1B, lane 1~4)에서는 조사시간에 상관없이 성공적으로 결과를 얻을 수 있었다.

위의 결과들을 토대로 1 분 동안 조사된 포자의 추출액 1 μ l를

PCR 반응에 사용하고, Table 1에 나열된 *chsC* 유전자 내부의 다양한 primer 세트르 PCR을 수행하였다. 그 결과 150 bp부터 3 kb까지의 산물들이 성공적으로 증폭이 된 반면(Fig. 2), 3 kb 이상의 크기는 증폭되지 않았다(자료 생략). 증폭된 산물도 크기가 클수록 다소 감소하는 결과를 보였는데 이는 사용된 primer 쌍의 차이에서 기인한 것일 수도 있으나, 아마도 극초단파의 조사로 인한 효과로 보인다. 즉, 극초단파 조사는 세포벽을 변형시켜 세포내의 DNA가 세포 밖으로 나올 수 있게 함과 동시에 포자 밖으로 추출된 DNA를 절단하는 것으로 보인다.

이상의 결과에서 보듯 *A. nidulans*의 포자로부터 전자레인지를 이용하여 DNA를 추출하는 것은 특별한 준비나 복잡한 과정이 필요 없는 간편한 기법일 뿐 아니라, 10 분내에 DNA 추출 전과정을 완결할 수 있는 간편하고 빠른 방법이며, 얻어진 시료는 PCR을 위한 주형 DNA의 재료로도 충분하다. 특히 이를 통해 계층 당 한 개 존재하는(single copy) 유전자를 대상으로 약 3kb 크기의 산물까지도 증폭 가능하므로 이 기법을 잘 활용한다면 형질전환체의 선별을 보다 빠르고 쉽게 수행할 수 있으리라 기대된다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 목적기초사업(특정기초: R01-1998-00053)의 지원에 의하여 수행되었습니다.

참고문헌

1. Aufauvre-Brown, A., C.M. Tang, and D.W. Holden. 1993. Detection of gene-disruption events in *Aspergillus transformants* by polymerase chain reaction direct from conidiospores. *Curr. Genet.* 24, 177-178.
2. Bollet, C., M. Gevaudan, X. de Lamballerie, C. Zandotti, and P. de Micco. 1991. A simple method for the isolation of chromosomal DNA from Gram positive or acid-fast bacteria. *Nucleic Acids Res.* 19, 1955.
3. Cheyrou, A., C. Guyomarc'h, P. Jasserand, and P. Blouin. 1991. Improved detection of HBV DNA by PCR after microwave treatment of serum. *Nucleic Acids Res.* 19, 4006.
4. Fang, G., S. Hammar, and R. Grumet. 1992. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. *Biotechniques* 13, 52-54, 56.
5. Ferreira, A.V.B. and N. Glass. 1996. PCR from fungal spores after microwave treatment. *Fungal Genet. Newslett.* 43, 25-26.
6. Goodwin, D.C. and S.B. Lee. 1993. Microwave miniprep of total genomic DNA from fungi, plants, protists and animals for PCR. *Biotechniques* 15, 438-444.
7. Güssow, D. and T. Clackson. 1989. Direct clone characterization from plaques and colonies by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* 17, 4000.
8. Hsu, H. C., S.Y. Peng, and C.T. Shun. 1991. High quality DNA retrieved for Southern blot hybridization from microwave-fixed, paraffin-embedded liver tissues. *J. Virol. Methods* 31, 251-262.
9. Liang, Q. and T. Richardson. 1992. A simple and rapid method for screening transformant yeast colonies using PCR. *Biotechniques*

13, 730-735.

10. Xu, J.R. and J.E. Hamer. 1995. Assessment of *Magnaporthe grisea* mating type by spore PCR. *Fungal Genet. Newslett.* 42, 80.

(Received May 23, 2002/Accepted June 11, 2002)

ABSTRACT : Optimization of PCR Condition with Conidiospore for Primary Screening of *Aspergillus nidulans* Transformants

Bum-Chan Park, Yun-Hee Park, So-Young Yang and Hee-Moon Park (Department of Microbiology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea)

Direct PCR from intact fungal cells is not readily suitable to all fungi mainly because of difficulties in rupturing the cell walls. Microwave irradiation has been proven to be useful in fungal DNA extraction protocol. Here we describe a fast template preparation method for PCR amplification from *Aspergillus nidulans* conidiospores using microwave irradiation. We optimized the duration for microwave irradiation, and the amount of template DNA for PCR. Amplification from samples prepared in this manner was so efficient that we could get PCR products with size enough to identify transformants. We believe that this is a time-saving procedure for screening true transformants of *A. nidulans*.