

YEp 및 YIp 벡터에 의한 *Saccharomyces cerevisiae* 의 Cotransformation

李承範·李麟九

慶北大學校 農科大學 農化學科

Cotransformation of *Saccharomyces cerevisiae* with YIp and YEp Vectors

Lee, Sung Bum · Rhee, In Koo

Dept. of Agricultural Chemistry Coll. of Agric., Kyungpook Natl. Univ.

Summary

The transformation of *Saccharomyces cerevisiae* with YIp26, YRp7 and YEp13 was investigated. Transformation frequencies of YIp5, YIp26, YRp7 and YEp13 in *Escherichia coli* HB101 was 5.1×10^{-4} , 1.5×10^{-3} , 1.3×10^{-3} , 3×10^{-3} , respectively. When plasmids were used in covalently closed circular form, transformation frequency of YEp13 was 1.2×10^{-4} in *S. cerevisiae* DBY747 and 3.3×10^{-4} in *S. cerevisiae* MC16 and that of YRp7, YIp26 was 3×10^{-6} , below 6×10^{-8} respectively in *S. cerevisiae* DBY747 by the method of Ito.

Cotransformation of YIp26 and YEp13 in linear form increased the frequency of transformation with efficiencies 270-fold higher than transformation of YIp26 only in *S. cerevisiae* DBY747. In cotransformation of YIp5 + YEp13 and YIp26 + YRp7 with *S. cerevisiae* DBY747 by Beggs' method. Expression frequency of YIp5 + YEp13 and YIp26 + YRp7 was 4×10^{-6} , 1.5×10^{-6} , respectively. The recombinant plasmid of cotransformant was thought that YIp26 and YEp13, YIp5 and YEp13, and YIp26 and YRp7 were ligated *in vivo* in *S. cerevisiae* DBY747.

緒 論

*Saccharomyces cerevisiae*의 形質轉換은 Hinnen (1978)에 의해 酵母를 原形質體 狀態로 하여 形質轉換하는 方法이 開發된 이래 Beggs (1978)는 그 方法을 改善했으며 Struhl (1978)은 *Escherichia coli* 와 *S. cerevisiae*의 셔틀 벡터 YIp, YRp, YEp를 개발하여 酵母形質轉換은 더욱 發展되어 왔다. Kimura (1981)는 Triton X, Iimura (1983)는 염화칼슘을 사용해서 그리고 最近 Ito (1983)는 여러가지 알카리 금속 이온을 處理하여 生細胞 그 自體에다 酵母形質轉換한 結果가 報告되었다. 原形質體 狀態의 形質轉換 頻도와 差異가 거의 없었다고 報告되었다. 종래의 모든 形質轉換에서는 環狀의 플

라스미드 DNA 또는 外來 DNA 단편과 試驗管内에서 ligation한 環狀의 DNA로 形質轉換을 했으나 最近 Imai (1983)는 플라스미드 DNA에 處理하여 線狀 DNA로 Beggs (1978)의 方法을 使用하여 形質轉換했다. 環狀型보다 더 높은 頻度の 形質轉換이 報告되었다. Suzuki (1983)는 制限酵素를 處理한 플라스미드 DNA 단편들을 서로 다른 線狀 플라스미드 DNA와 混合하여 cotransformation을 하였을때 生體內 ligation이 되어 形質發現이 酵母에서 일어났다고 報告했다.

그래서 이 方法들이 더욱 發展되면 試驗管에서 ligation하여 酵母에 形質轉換하는 번거로움이 없이 必要한 遺傳子를 벡터 DNA와 섞어 酵母形質轉換하여 酵母細胞내에서 生體內 ligation이 可能할 것이

라 생각된다. 그래서 본 실험에서 이를 위한基礎作業으로 여러가지 서플 벡터를 사용하여 原形質體化하지 않고 Li^+ 을處理한 生酵母를 쓰는 Ito (1983)의 方法으로 cotransformation을 試圖하였다. 아울러 Beggs (1978)의 方法에 따라 原形質體化한 受容細胞에서의 cotransformation 結果도 比較 檢討하였다.

材料 및 方法

1. 使用菌株

本 실험에서 使用한 菌株은 *E. coli*와 *S. cerevisiae*이며 벡터는 *E. coli*와 *S. cerevisiae*의 서플 벡터인 YIp, YRp, YEp 系列로서 表 1 과 같다.

Table 1. The microbial strains and vectors used

Strain and vector	Genotype or phenotype	Reference
<i>S. cerevisiae</i>		
DBY747	α , his3, leu2, ura3, trp1	
MC16	α , ade2, lys1, leu2, his4	
<i>E. coli</i>		
HB101	F^- , Hsds20 (r^- , m^-), recA13, ara-14, lacY1, galk2, rpsL20 (Sm^r), proA2, xyl-5, mtl-1, supE44,	Boyer and Roulland-Dussoix (1969)
C600	F^- , thi-1, thr-1, leuB6, lacY1, tonA21, supE44,	Appleyard (1954)
Plasmid		
Yip5	Amp^r , Tet^r , PyrF; Ura3 ⁺	Struhl (1979)
Yip26	Amp^r , $LeuB$, PyrF; $Leu2^+$, Ura3 ⁺	Botstein (1979)
YRp7	Amp^r , Tet^r , TrpC; Trp1 ⁺	Struhl (1979)
YEp13	Amp^r , Tet^r , $LeuB$; $Leu2^+$	Broach (1979)

2. 使用培地 및 培養

本 실험에 使用된 培地는 L. broth와 YEPD培地로서 그 組成은 다음과 같다.

*E. coli*의 培養에는 tryptone 1%, yeast extract 0.5%, sodium chloride 0.5% 組成의 LB培地를 使用하였고 *S. cerevisiae*의 培養에는

peptone 2%, yeast extract 1%, dextrose 2% 組成의 YEPD培地를 使用하였다. *S. cerevisiae*에서 形質轉換細胞를 選抜하기 위한 選擇培地는 表 2와 같다.

*E. coli*의 培養은 한천사면培地로 부터 LB培地에 菌 한 白金耳를 接種하여 37°C에서 120 stroke/min로 振盪培養하였고 *S. cerevisiae*는 YEPD培地에서 30°C에서 같은 方法으로 培養하였다.

3. 플라스미드의 抽出 및 精製

*E. coli*로부터 플라스미드의 抽出은 Birnboim (1979)의 方法으로 行하였다. 環狀 플라스미드 DNA의 精製는 McDonell (1977)의 電氣泳動抽出法으로 하였다.

4. 플라스미드의 分析 및 電氣泳動

서플 벡터 DNA를 環狀形으로 하기 위해 制限酵素 BamHI을 DNA μ g 당 3 unit 되게 加하여 Boehringer社의 處方に 따라 37°C에서 3時間 反應시킨 後 70°C에서 10分間 處理하여 反應을 停止시켰다.

電氣泳動은 0.7% agarose gel, TAE 緩衝液 (0.04 M tris-acetate, 0.002 M EDTA, pH 7.6)을 使用하여 8 volt/cm로 1時間 電氣泳動한 後 ethidium bromide 용액 (10 μ g/ml)에 15~20 分間 染色하여 UV-transilluminator 上에서 띠 (band)를 確認하였다.

5. 形質轉換

*E. coli*의 形質轉換은 Mandel (1970)法에 따라 行하였다.

*S. cerevisiae*의 形質轉換은 Ito (1983)法에 따라 生酵母를 使用하여 다음과 같이 行하였다. YEPD培地 20 ml에 受容細胞를 $O.D_{610} = 2 \sim 3$ 되게 30°C에서 12時間 振盪培養한 培養液 5 ml를 取하여

Table 2. Selection medium of yeast transformants

	(unit : %)					
	A	B	C	D	E	F
Yeast nitrogen base	0.67	0.67	0.67	-	-	-
Yeast nitrogen base (w/o)	-	-	-	0.67	0.67	0.67
Dextrose	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
L-Histidine	-	-	-	0.003	0.003	0.003
L-Leucine	-	-	0.003	-	0.003	0.003
Uracil	-	0.001	-	-	-	0.001
Bacto agar	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5

遠心分離하고 TE 緩衝液(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 1회 洗滌한 다음 200mM CH₃COOLi (or LiCl)와 TE緩衝液을 1:1 (V/V)비로 한 溶液으로 10⁷~10⁸/ml 되게 현탁한 다음 30°C에 1시간 振盪시킨다. 이 competence 된 細胞 100 μl에 플라스미드 DNA 2~4 μg (50 μl)을 넣고 混合시켜 30°C에 30分間 放置한 後에 70% polyethylene glycol 4,000 (PEG 4,000)을 同量 넣고 잘 현탁한 다음 30°C에 1시간 放置한다. 그리고 42°C에 5分間 處理시킨 後 室溫으로 冷却하여 殺菌 蒸溜수로 1~2회 洗滌한 다음 蒸溜수 1 ml에 菌體를 현탁 酵母選擇培地에 稀釋 塗沫하여 2~3日間 30°C에 培養한 後 콜로니를 計測하였다.

또 酵母에서 原形質體 形質轉換은 Beggs (1978) 法을 使用하였으며 培地는 YEPD에 uracil을 10 μg/ml 되게 添加한 YPDU 培地 50 ml에 受容細胞를 한 白金耳 接種하여 30°C에서 14時間 振盪培養하였다. 培養後 50 ml를 遠心分離하고 殺菌蒸溜수로 2회 洗滌한 다음 前 處理緩衝液(1.2 M sorbitol - 25 mM EDTA - 50 mM D. T. T (pH 8.0))을 처음 體積의 1/3 vol이 되게 넣고 zymolyase를 0.2 mg/ml 되게 添加하여 잘 混合한 다음 30°C에서 60分間 천천히 振盪하면서 原形質體化시킨다. 이 原形質體 受容細胞를 다시 1.2 M sorbitol에 2회 洗滌한 다음 1.2 M sorbitol - 10 mM CaCl₂을 10⁸ cell/ml이 되게 넣고 잘 현탁하여 이 細胞 0.1 ml에 플라스미드 DNA 2 μg 넣고 室溫에 15分間 放置하였다. 여기에 20% PEG 4,000 - 10 mM CaCl₂ - 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) 溶液을 細胞와 DNA 混合液의 10 vol을 添加한 다음 室溫에 15分間 放置한다. 이것을 遠心分離하여 菌體를 1.2 M sorbitol - 10 mM CaCl₂ - Leu(20 μg/ml) 溶液 0.1 ml에 현탁한 다음 YPDU - 1.2 M sorbitol을 50 μl 添加하고 30°C에 20分間 放置하였다. 이것을 1.2 M sorbitol에 適當히 稀釋하여 45°C의 選擇培地 7 ml (agar 농도 3%)에 잘 混合하여 1.2 M sorbitol이 포함된 選擇平板培地에 부어서 30°C 恒溫器에서 3~4日 培養하였다.

6. 使用試藥 및 酵素

本 實驗에 使用한 試藥으로 sodium dodesyl sulfate와 agarose는 Sigma Co., PEG 4,000, li-

thium chloride 및 lithium acetate는 Fluka Co.의 特級을 使用하였다.

酵素로 lysozyme은 日本 生化學工業社, zymolase 6000은 Kirin Brewery Co., pancreatic ribonuclease A는 Sigma Co., BamHI는 Boehringer Co.의 것을 使用하였으며 그 外의 試藥은 市販特級을 使用하였다.

結果 및 考察

1. 大腸菌의 形質轉換

E. coli HB 101을 受容細胞로 하고 서플 벡터인 YIp5, YIp26, YRp7, YEp13을 供與 DNA로 하여 Mandel 法으로 形質轉換한 結果는 表3과 같다. 이때 選擇培地는 amp 50 μg/ml, tet 15 μg/ml을 함유한 LB 한천平板培地를 使用하였다.

Table 3. Transformation frequency of E.C-S.C shuttle vector in *E. coli* HB 101

Plasmid DNA	Transformant (amp ^r , tet ^r)	Viable cell	Frequency
YIp5	5.1 x 10 ⁴	1 x 10 ⁸	5.1 x 10 ⁻⁴
YIp26*	1.5 x 10 ⁵	1 x 10 ⁸	1.5 x 10 ⁻³
YEp13	3.0 x 10 ⁵	1 x 10 ⁸	3.0 x 10 ⁻³
YRp7	1.3 x 10 ⁵	1 x 10 ⁸	1.3 x 10 ⁻³

* Ampicillin resistant only.

*E. coli*와 *S. cerevisiae* 서플 벡터들이 *E. coli*에서의 形質轉換 頻度는 YIp5, YIp26, YRp7 및 YEp13에서 각각 5.1 × 10⁻⁴, 1.5 × 10⁻³, 1.5 × 10⁻³, 3 × 10⁻³으로 매우 높은 것으로 나타난다.

YIp5, YIp26, YEp13, YRp7으로 形質轉換시킨 大腸菌 HB 101 (amp^r, tet^r)에서 플라스미드를 Birnboim 法으로 抽出하고 變形시킨 McDonell 法으로 精製하여 電氣泳動으로 確認한 結果는 그림1과 같다.

뒤의 그림에서 形質轉換細胞에서 抽出한 각각의 플라스미드 DNA를 電氣泳動하여 크기를 알아보기 위해 制限酵素 자리가 하나인 BamHI으로 切斷하여 Hind III로 切斷한 λDNA와 比較했을 때 그 크기들이 Bostein (1979), Broach (1979)에 의해 밝힌 크기와 같았고 공여 DNA로 使用한 플라스미드 크기와도 同一하였다.

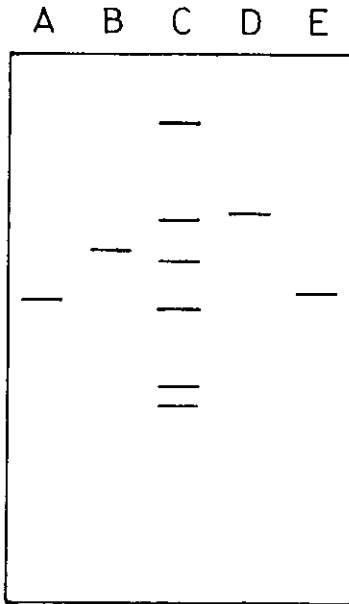


Fig. 1. Electrophoretic pattern of transformant plasmid DNA digested with Bam HI.

A, YIp5; B, YIp26; C, λ -HindIII; D, YEp13; E, YRp7.

2. 酵母의 形質轉換

酵母의 受容細胞로써 *S. cerevisiae* MC16, DBY 747 을 使用해서 YEp13 (Leu⁺)으로 形質轉換한 結果는 表4와 같다.

Table 4. Transformation of YEp13 in *S. cerevisiae*

Recipient	Frequency (Leu ⁺ transformant)
MC 16	3.3×10^{-4}
DBY747	1.2×10^{-4}

表4에서 보여 주듯이 MC 16이 DBY 747 보다 受容細胞로써 더 좋았으며 그 頻도가 각각 3.3×10^{-4} , 1.2×10^{-4} 이었는데 Broach (1979)는 酵母形質轉換 頻도에서 $10^{-3} \sim 10^{-4}$ 으로 報告하고 있다. Ito (1983)는 YEp가 生酵母 形質轉換일 경우 原形質體化한 形質轉換 보다 그 頻도가 크게 떨어지는 경우도 있다고 報告했으며 菌株에 따라 또는 形質轉換 方法에 따라 多少 큰 差異를 보이는 경우도 있다고 報告하기도 한다.

DBY747을 受容細胞로 하여 YRp 7과 YIp 26을 形質轉換시킨 結果는 表5와 같다.

表5의 結果로서 YIp 26은 매우 낮은 頻도로서

Table 5. Transformation of YRp 7 and YIp 26 in *S. cerevisiae* DBY747

Plasmid	Frequency
YRp7	3×10^{-6}
YIp26	$< 6 \times 10^{-8}$

形質轉換되었다. 이는 YIp 26이 ARS나 2μ DNA와 같은 酵母의 複製起點이 없으므로 染色體 DNA에 integration 되어야만 發現되기 때문인 것으로 생각된다 (Bostein, 1979).

3. YIp와 YEp 벡터의 cotransformation

DBY 747을 受容細胞로 하여 YIp26과 YEp 13을 制限酵素 Bam HI으로 切斷하여 線狀으로 한 後에 두 種의 플라스미드를 섞어서 Ito (1983)法으로 Li⁺ 처리한 生酵母를 使用하여 cotransformation을 시켰다. 그 結果 表6과 같다.

表6에서와 같이 YIp26의 發現頻도가 270배 이상 增加하였다. 이러한 發現頻도의 增加는 YIp 26과 YEp 13이 서로 *in vivo* ligation된 때문인 것으로 생각된다. 이러한 *in vivo* ligation에 대해서

Table 6. Cotransformation of closed circular YIp26 and YEp13 in *S. cerevisiae* DBY747

Plasmid	Marker	Transformant/ 10 μ g DNA	Frequency
YIp26+YEp13	Leu ⁺ , Ura ⁺	552	1×10^{-5}
YIp26	Leu ⁺ , Ura ⁺	2	$< 10^{-7}$
YEp13	Leu ⁺	2254	5×10^{-5}

는 Suzuki (1983)가 報告한 바 있다. 즉 플라스미드 벡터를 制限酵素로 切斷하여 여러 단편들을 다른 벡터와 서로 混合하여 cotransformation하여 再組合된 플라스미드를 만들어 낸 것을 報告하였다.

또 DBY747을 受容細胞로 하여 YIp5, YRp7, YIp26, YEp13을 Bam HI으로 分解하여 線狀으로 한 後에 YIp5와 YEp13을 混合하고 YIp26 YRp7을 混合하여 原形質體化하는 Beggs法으로 cotransformation시켰다. 그 結果는 表7, 表8과 같다.

表7과 表8에서와 같이 YIp5는 59배, YIp26은 36배 이상 그 發現頻도가 增加하였다. 이러한 發現頻도의 增加 역시 앞의 경우처럼 發現頻도가 낮은 YIp5와 YIp26이 生體 내에서 ligation된 것으로 생각된다.

形質轉換 方法에 따라 약간의 差異가 있으나 큰 差異는 없었고 發現頻도가 낮은 YIp系列의 플라스

Table 7. Cotransformation of linear YIp 5 and YEp13 digested with BamHI in *S. cerevisiae* DBY747

Plasmid	Marker	Transformant / 10 μ g DNA	Frequency
YIp5+YEp13	Leu ⁺ , Ura ⁺	59	4 x 10 ⁻⁶
YIp5	Ura ⁺	1	< 7 x 10 ⁻⁸
YEp13	Leu ⁺	272	1.7 x 10 ⁻⁵

Table 8. Cotransformation of linear YIp26 and YRp7 digested with BamHI in *S. cerevisiae* DBY747

Plasmid	Marker	Transformant / 10 μ g DNA	Frequency
YIp26+YRp7	Leu ⁺ , Ura ⁺ , Trp ⁺	36	1.5 x 10 ⁻⁶
YIp26	Leu ⁺ , Ura ⁺	1	< 5 x 10 ⁻⁸
YRp7	Trp ⁺	125	6 x 10 ⁻⁶

미드는 효모細胞内에서 獨自의으로 複製할 수 있는 YRp7 과 YEp13의 도움으로 그 頻도가 增加하였다는 事實을 알 수 있었다.

摘 要

大腸菌과 효모의 서플 벡터인 YIp, YRp, YEp를 *S. cerevisiae* MC 16, DBY 747에 形質轉換시켰다.

이들 벡터들을 大腸菌에 形質轉換시켰을 때 그 頻도가 YIp 5, YIp 26, YEp 13, YRp7에서 각각 5.1×10^{-4} , 1.5×10^{-3} , 3×10^{-3} , 1.3×10^{-3} 으로 나타났다. YEp 13을 MC 16과 DBY747에 Ito 法으로 形質轉換시켰을 때 MC 16, DBY747에서의 頻도 각각 3.3×10^{-4} , 1.2×10^{-4} 으로 나타났다. DBY 747을 受容細胞로 하여 YRp7과 YIp26을 環狀으로 각각 形質轉換시켰을 때 그 頻도는 각각 3×10^{-6} , 6×10^{-8} 이하로 나타났다. DBY 747을 受容細胞로 하여 YEp 13과 YIp 26을 線狀으로 절단하여 Li⁺處理한 *S. cerevisiae*에 cotransformation을 하였을 때 YIp26 + YEp13 (Leu⁺, Ura⁺)의 cotransformant는 1×10^{-5} 頻도가 나왔으며 YIp26과 YEp13에 대한 각각의 頻도는 10^{-2} 이하, 5×10^{-5} 頻도로 나타났다.

또 YIp5와 YEp13, YIp26과 YRp7을 原形質體化한 *S. cerevisiae* DBY747에 cotransformation 하였을 때 頻도는 YIp5 + YEp13은 4×10^{-6} 으로 나오고 YIp26 + YRp7에서 1.5×10^{-6} 으로 나타났다.

引 用 文 獻

- Appleyard, R. K. : 1954, Segregation of new lysogenic types during growth of a doubly lysogenic strain derived from *Escherichia coli* K12, Genetics, 39 : 440.
- Beggs, J. D. : 1978, Transformation of yeasts by a replicating hybrid plasmid, Nature, 275 : 104-109.
- Birnboim, H. C. and J. Doly : 1979, A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, Nucleic Acid Research, 7(6) : 1513-1523.
- Bostein, D., S. C. Falco, S. E. Stewart, M. Brennan, S. Scherer, D. T. Stinchcomb, K. Struhl and R. W. Davis : 1979, Sterile host yeast (SHY) ; A eukaryotic system of biological containment for recombinant DNA experiment, Gene, 8 : 17-24.
- Broach, J. R., J. M. Strathern and J. B. Hicks : 1979, Transformation in yeast ; Development of a hybrid cloning vector and isolation of the CAN1 gene, Gene, 8 : 121-133.
- Boyer, H. W. and D. Roulland-Dussoix : 1969, A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*, J. Mol., Biol., 41 : 459.
- Hinnen, A., J. B. Hicks and G. R. Fink : 1978, Transformation of yeast, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75(4) : 1929-1933.
- Iimura, Y., K. Gotoh, K. Ouchi and T. Nishiyama : 1983, Yeast transformation without the spheroplasting process, Agri. Biol. Chem., 47(4) : 897-901.
- Imai, Y., K. Suzuki, I. Yamashita and S. Fukui : 1983, High frequency transforma-

- tion of *Saccharomyces cerevisiae* with linear deoxyribonucleic acid, *Agri. Biol. Chem.*, 47(4): 915 - 918.
10. Ito, H., Y. Hukuda, K. Murada and A. Kimura: 1983, Transformation of intact yeast cell treated with alkali cations, *J. Bacteriol.*, 153(1): 163 - 168.
 11. Mandel, M. and A. Higa: 1970, Calcium-dependent bacteriophage DNA infection, *J. Mol. Biol.*, 53 : 159.
 12. McDonnell, M.W., M. N. Simon and F.W. Studier : 1977, Analysis of restriction fragments of T₇ DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels, *J. Mol. Biol.*, 110 : 119.
 13. Struhl, K., D. T. Stinchcomb, S. Scherer and R.W. Davis : 1978, High - frequency transformation of yeast ; Autonomous replication of hybrid DNA molecules, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 76 : 1035 - 1039.
 14. Suzuki, K., Y. Imai, I. Yamashita and S. Fukui : 1983, In vivo ligation of linear DNA molecules to circular form in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Bacteriol.*, 155(2): 747 - 754.