

*Coprinus congregatus*에서 선형으로 전환한 plasmid DNA를 사용하여 phosphinothricin 저항성에 대한 형질전환

임영은 · 김순자 · 최형태*

강원대학교 생명과학부 미생물학전공, 서울대학교 분자미생물학연구소

*Coprinus congregatus*에서 laccase를 과량생성하는 변이주를 대상으로 phosphinothricin 저항성을 선택표지로 사용하여 형질전환을 수행하였다. 항생물질에 대한 저항성을 부여하는 plasmid DNA(pBARGEM 7-1)를 제한효소로 가수분해하여 원형질체에 형질전환을 수행한 결과 plasmid DNA 1 µg 당 약 500여개의 형질전환체를 얻었다. 도입된 plasmid는 형질전환체의 chromosomal DNA에 삽입되어 있음을 Southern blot으로 확인하였다.

KEY WORDS □ *Coprinus congregatus*, transformation, phosphinothricin

Coprinus congregatus Fries는 버섯을 만드는 분화과정에서 2종류의 laccase 동위효소를 생성한다. 본 연구실에서는 laccase의 다양한 기능을 밝히고자 이 효소를 분리정제하였고(3), 산성액체 배양조건에서 세포막연관 laccase가 대량 생성분비됨을 확인하였으며(2), 산성환경에서 laccase가 배지를 중화시키며 자신은 물리화학적 특성이 변화됨을 보고하였다(1). 나아가 laccase의 생성조절 및 기능에 대한 분자생물학수준의 연구를 수행하기 위하여 형질전환 방법의 확립이 요구되었다.

형질전환은 특정 유전자를 도입하거나 null mutation을 유도하여 특정유전자의 기능을 연구하는데에 필요한 방법으로 여러 균류를 대상으로 hygromycin B phosphotransferase(*hpt*) gene을 선택표지로 사용한 보고가 있다(8, 12, 13, 17). 본 연구실에서 *hpt* gene을 가지는 pAN 7-1 vector를 사용하여 *C. congregatus*를 대상으로 형질전환을 수행하였으나 선택배지에서 자란 형질전환체를 비선택배지에서 2회 이상 계대배양할 경우 모두 저항성을 잃어버렸다(미발표 연구결과). 이와 같은 현상이 *Coprinus cinereus*(7)와 *Schizophyllum commune*(11)에서도 보고된 바 있다. 이러한 이유로 새로운 선택표지를 사용하는 형질전환 방법을 개발하는 것이 매우 중요한 과제가 되었다.

Phosphinothricin(basta, bialaphos로 불림)은 glutamine synthetase의 강력한 저해물질로서 제조제로 개발되었다(16). 이 항생물질은 최소배지에서 많은 균류의 성장을 억제하므로 이 항생물질에 대한 저항성 유전자는 균류를 대상으로 형질전환시 선택표지로 사용되었으며(5), *C. congregatus*를 대상으로 형질전환을 수행한 결과를 보고하고자 한다.

본 실험에 사용한 균주는 laccase를 과량 생성분비하는 변이주(9)의 하나인 CL14(a1 mating type)으로 YpSs 사면배지(3)에 접종하여 25°C에서 배양한 후 4°C에서 보관하였다. YpSs 액체배지(100 ml)에서 5일간 진탕배양한 후 Waring

blendor를 사용하여 균체를 갈고 이를 동일한 배지에 접종(10%, v/v)하였다. 이를 1일간 배양하고 균체를 모아 Novozyme 234(0.2%, 최종농도)를 사용하여 최와 Ross(4)의 방법에 따라 원형질체를 분리하였다.

원형질체($5 \times 10^7/400 \mu\text{l}$ STC 완충용액: sorbitol 0.55 M, CaCl₂ 10 mM, Tris 10 mM, pH 7.0)를 100 µl의 40% polyethylene glycol(PEG) 4,000(CaCl₂ 25 mM, Tris 25 mM, pH 7.5) 및 5 µl의 dimethylsulfoxide와 혼합하여 -70°C에 3시간 보관하였다. Phosphinothricin 저항성 유전자를 가진 pBARGEM 7-1 vector(Fig. 1) 5 µg을 *EcoRI* 제한효소로 3시간 동안 처리하여 선형(linear form)으로 만들었다. Deep freezer에서 꺼내어 실온에서 녹인 원형질현탁액 100 µl에 선형으로 자른 plasmid(20 µl)를 Eppendorf tube에 섞은 후 30분간 얼음속에서 보관하여 형질전환을 수행하였다. PEG 1 ml을 더하여 실온에서 20분간 반응시킨 후 100 µl의 형질전환체 현탁액을 200 µg/ml의 항생물질과 0.55 M sorbitol을 더한 coprinus 최소배지(0.8% agar)와 혼합하였다. 이를 동일배지(1.6% agar)를 부어 만든 평판배지 위에 덮고 25°C에서 10일간 배양 후 생성된 colony를 새로운 배지로 옮겼다. 이 방법으로 pBARGEM 7-1 vector DNA 1 µg 당 약 500개의 형질전환체를 얻었다. 이 결과는 hygromycin B 저항성 유전자를 선택표지로 사용한 *Aspergillus nidulans*와 *A. niger*에서 DNA 1 µg 당 5-20 형질전환체를 얻은 것(13)과, *Agaricus bisporus*에서 1-5 형질전환체를 얻은 것(17)과 비교하면 매우 높은 수율이다. 그러나 *S. commune*의 경우 1,000개의 형질전환체를 얻은 것(15)에 비하면 약 절반의 수율에 해당한다. 식물병원성 진균류의 하나인 *Magnaporthe grisea*의 경우 원형 plasmid와 선형 plasmid를 형질전환에 각각 사용한 결과 선형 plasmid의 경우 2-10배의 형질전환 수율을 얻었다(14). 본 실험에서도 선형 plasmid에 의한 형질전환을 수행한 결과 상당히 높은 수율을 얻었다고 판단된다.

선택배지에서 생성된 형질전환체 중에서 50종을 분리하여 보관하였고, 가장 생장이 우수한 CL14bar3를 coprinus 최

*대표저자.

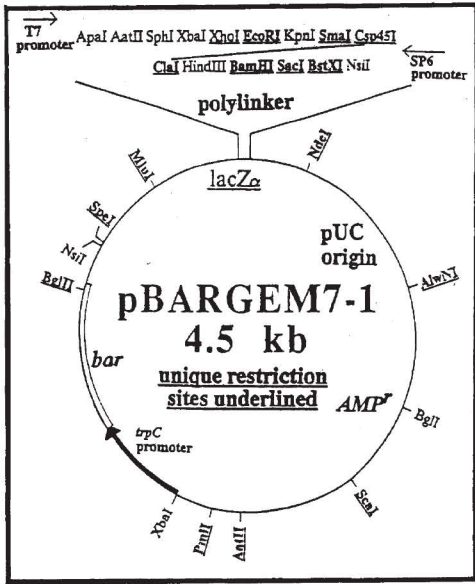


Fig. 1. Map of pBARGEM 7-1 which has the phosphinothricin resistance gene (*bar*), and *trpC* promoter of *Aspergillus nidulans*.

소배지 및 항생물질을 더한 최소배지에 접종하여 그 성장 정도와 Cc13(a2 mating type)과 교배하여 버섯생성을 확인하였다. 최소배지에서는 CL14과 동일한 성장을 보였고(Fig. 2A), phosphinothricin을 더한 최소배지에서는 CL14bar3만이 성장을 보였다(Fig. 2B). Cc13과 교배한 결과 버섯원기를 생성였으므로(Fig. 2C) mating 능력을 유지하고 있는 것으로 확인되었다.

CL14bar3를 YpSs 액체배지에 진탕배양하고 Moller 등의 방법(10)에 따라 염색체 DNA를 분리한 후 *EcoRI*과 *BamHI* 제한효소로 분해하고 전기영동방법으로 분리하였다. DNA를 nylon membrane으로 옮기고 pBARGEM 7-1을 주형으로 사용하여 random hexamer에 의한 probe(DIG DNA labelling kit, Boeringer Mannheim)를 준비한 후 이를 이용하여 68°C에서 10시간 동안 Southern hybridization을 수행하였다. 이를 disodium 2-chloro-5-(4-methoxy Spiro{1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decan}-4-yl)-1-phenylphosphate를 기질로 사용한 chemiluminescence로 분석한 결과 각각 2개의 band가 확인되었다(Fig. 3). 형질전환시 제한효소가 함께 존재할 경우 생성된 형질전환체의 염색체에 있는 제한효소의 위치 1-2곳에 plasmid가 삽입되는 경우가 가장 흔하며, 이때 사용했던 제한효소로 염색체를 분해할 경우 plasmid와 동일한 크기의 band가 나타나거나 더 큰 band가 나타난다. 이와 같은 현상이 *M. grisea*(14)와 *Ustilago maydis*(6)의 형질전환에서 보고되었다. CL14bar3는 비선택배지인 YpSs 환천배지에서 10회 계대배양한 후에도 phosphinothricin에 대한 저항성을 보였으며 염색체에 삽입된 plasmid DNA가 확인되었으므로 매우 안정적으로 유전자가 발현된다고 판단된다. 효모균과 분열효모를 제외한 대부분 균류에서의 형질전환

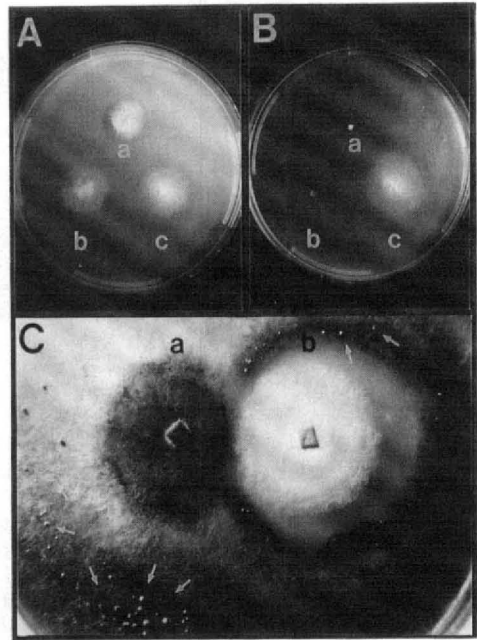


Fig. 2. A; Comparison of growth of a wild type (Cc16, a) with the recipient cell(CL14, b) and the transformant (CL14bar3, c) on coprinus minimal medium. B; Same as A, but on the minimal plate containing phosphinothricin (400 µg/ml). C; Primordia formation (arrows) on the dikaryon Cc13(a)×CL14bar3(b).

은 DNA염색체상에 형질전환 vector가 삽입되어 유전자가 발현되는 것(8, 12-15, 17)과 같이 *C. congregatus*에서도 염색체상에서 안정되게 유지되었다.

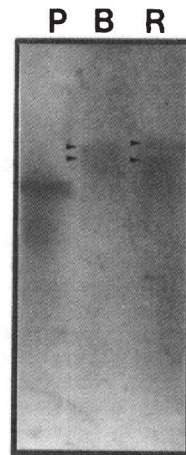


Fig. 3. Southern hybridization of the chromosomal DNA digested with restriction endonucleases. Lanes P; pBARGEM 7-1 digested by *EcoRI*. B; chromosomal DNA digested by *BamHI*. R; chromosomal DNA digested by *EcoRI*.

감사의 말

이 논문은 강원대학교 학술진흥재단의 연구비와 서울대학교 분자미생물학 연구센터를 통한 과학재단 우수연구센터 지원 연구비로 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 김순자, 임영은, 최형태. 1997. *Coprinus congregatus*에서 산성액체배지에서의 laccase 역할. 미생물학회지 **33**, 27-30.
2. 김순자, 최형태, 강사육, 하영철. 1991. *Coprinus congregatus*의 세포막 연관 laccase의 세포의 분비. 미생물학회지 **29**, 267-269.
3. 최영욱, 김순자, 최형태. 1995. *Coprinus congregatus*가 분비하는 laccase의 분리 정제 및 특성. 미생물과산업 **21**, 351-358.
4. 최형태, Ian K. Ross. 1990. 저온액화성 응고제를 사용한 고체배지에서 자란 *Coprinus congregatus*의 phenoloxidase들의 localization. 미생물학회지 **28**, 274-277.
5. Avalos, J., R.F. Geever and M.E. Case. 1989. Bialaphos resistance as a dominant selectable marker in *Neurospora crassa*. *Curr. Genet.* **16**, 369-372.
6. Bölker, M., H.U. B hert, K.H. Braun, J. Görl and R. Kahmann. 1995. Tagging pathogenicity genes in *Ustilago maydis* by restriction enzyme-mediated integration (REMI). *Mol. Gen. Genet.* **248**, 547-552.
7. Casselton, L.A. and A. de la Fuente Herce. 1989. Heterologous gene expression in the basidiomycete fungus *Coprinus cinereus*. *Curr. Genet.* **16**, 35-40.
8. Glumoff, V., O. Kappeli, A. Fiechter and J. Reiser. 1989. Genetic transformation of the filamentous yeast, *Trichosporon cutaneum*, using dominant selectable marker. *Gene* **84**, 311-318.
9. Kim, S.J. and H.T. Choi. 1995. Selection of laccase over-secreting mutant in *Coprinus congregatus*. *J. Microbiol.* **33**, 146-148.
10. Moller, E.M., G. Bahnweg, H. Sandermann and H.H. Geiger. 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nuc. Acids Res.* **20**, 6115-6116.
11. Mooibroek, H., A. Kuipers, J.H. Sietsma, P.J. Punt and J.G.H. Wessels. 1990. Introduction of hygromycin B resistance into *Schizophyllum commune*: preferential methylation of donor DNA. *Mol. Gene. Genet.* **222**, 41-48.
12. Peng, M., C.R. Cooper Jr. and P.J. Szanislo. 1995. Genetic transformation of the pathogenic fungus *Wangiella dermatitidis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**, 444-450.
13. Punt, P.J., R.P. Oliver, M.A. Dingemans, P.H. Pouwels and C.A.M.J.J. van de Hondel. 1987. Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene* **56**, 117-124.
14. Shi, Z., D. Christian and H. Leung. 1995. Enhanced transformation in *Magnaporthe grisea* by restriction enzyme mediated integration of plasmid DNA. *Phytopathol.* **85**, 329-333.
15. Specht, C.A., A. Munoz-Riva, C.P. Novotny and R.C. Ullrich. 1988. Transformation of *Schizophyllum commune*: An analysis of parameters for improving transformation frequencies. *Exp. Mycol.* **12**, 357-366.
16. Tachibana, K. 1986. Pesticide science and biotechnology. In: Proceedings of the Sixth IVP Congress of Pesticide Chemistry (Greenhalgh, R. and T.R. Roberts Eds.). Blackwell Scientific Publications, p. 145-148.
17. Van de Rhee, M.D., P.M.A. Graca, H.J. Huizing and H. Mooibroek. 1996. Transformation of cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*, to hygromycin B resistance. *Mol. Gen. Genet.* **250**, 252-258.

(Received December 4, 1997/Accepted December 29, 1997)

ABSTRACT: Transformation of *Coprinus congregatus* with a Linearized Plasmid Vector to Phosphinothricin Resistance

Young-Eun Leem, Soon-ja Kim and Hyung-Tae Choi* (Microbial Physiology lab, Division of Biological Sciences, Kangwon National University, Chunchon 200-701, and Research Center for Molecular Microbiology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea)

Transformation of *Coprinus congregatus* with a linearized plasmid has been successfully carried out using phosphinothricin resistance gene as a dominant selectable marker. The transforming frequency was about 500 transformants per microgram of DNA using the protoplast-CaCl₂ method. The transforming vector pBARGEM 7-1 which had the phosphinothricin resistance gene was detected in the restriction enzyme fragments of chromosomal DNA from a transformant by Southern hybridization.