

|                                                                                                               |                                    |                                                    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------------------------|
|                              | (19) 대한민국특허청(KR)<br>(12) 공개특허공보(A) | (11) 공개번호 10-2012-0087026<br>(43) 공개일자 2012년08월06일 |
| (51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br>C12N 15/31 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)<br>C12N 1/21 (2006.01) C12N 1/15 (2006.01) |                                    | (71) 출원인<br>고려대학교 산학협력단<br>서울 성북구 안암동5가 1          |
| (21) 출원번호                                                                                                     | 10-2011-0008463                    | (72) 발명자                                           |
| (22) 출원일자                                                                                                     | 2011년01월27일                        | 김재진                                                |
| 심사청구일자                                                                                                        | 2011년01월27일                        | 서울특별시 강남구 삼성로69길 35, 302호 (대치동)                    |
|                                                                                                               |                                    | 김규혁                                                |
|                                                                                                               |                                    | 서울특별시 강남구 남부순환로395길 30, 국제@3-703 (대치동)             |
|                                                                                                               |                                    | 김용일                                                |
|                                                                                                               |                                    | 서울특별시 강서구 강서로 532, 대아아파트 107동 1001호 (가양동)          |
|                                                                                                               |                                    | (74) 대리인                                           |
|                                                                                                               |                                    | 특허법인이지                                             |

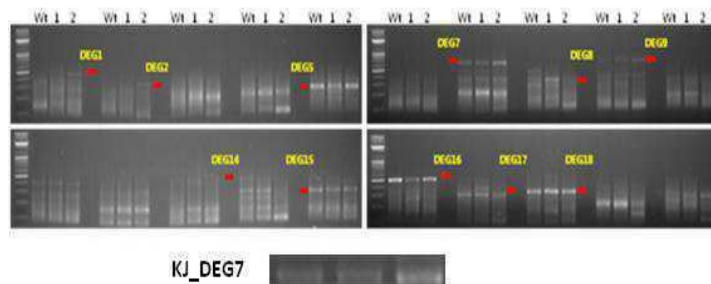
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 중금속 처리 목재의 부후를 야기하는 균에서 발현된 특이 유전자

### (57) 요약

본 발명은 중금속 처리 목재를 부후시키는 목재부후균에서 발현되는 신규 유전자 및 이를 포함하는 벡터와 형질 전환체에 관한 것이다. 본 발명에 따른 유전자, 벡터 또는 이를 포함하는 형질전환체를 이용하면 중금속에 오염된 목재 바이오매스의 분해와 재활용에 유용하게 사용될 수 있다. 이는 석유 의존도를 저감하여 석유화학공정을 대체하고, 바이오매스 활용범위 확대 및 바이오화학 원천기술을 확보하는데 매우 중요하며, 한정된 자원의 재활용 측면에서 중요한 효과를 갖는다. 뿐만 아니라 이산화탄소 배출량을 감소시키고 자원을 재활용하는 환경친화적 산업으로의 전환에 있어서도 매우 중요하게 작용할 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 S121010L110120

부처명 산림청

연구사업명 산림과학기술개발사업

연구과제명 [세부] 국내 수집 목재미생물의 기초 특성 조사

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2010.04.01 ~ 2011.03.31

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

서열번호 1의 염기서열을 갖는, 중금속 처리 목재의 부후를 야기하는 균에서 발현된 특이 유전자.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 중금속 처리는 중금속 함유 방부제로 처리하는 것임을 특징으로 하는 유전자.

### 청구항 3

제2항에 있어서, 상기 중금속 함유 방부제는 CCA(Chromated Copper Arsenate)인 것을 특징으로 하는 유전자.

### 청구항 4

제1항의 유전자를 포함하는 벡터.

### 청구항 5

제4항에 있어서, 상기 벡터는 프로모터 및 목적유전자를 추가적으로 포함하는 벡터.

### 청구항 6

제4항 또는 제5항의 벡터를 포함하는 형질전환체.

### 청구항 7

제6항에 있어서, 상기 형질전환체는 박테리아 또는 균류(fungi)인 것을 특징으로 하는 형질전환체.

### 청구항 8

제6항에 있어서, 상기 형질전환체는 폴리포르목(Polyporales sp.) 또는 섬유소분해세균(Cellulose Decomposing Bacteria sp.)인 것을 특징으로 하는 형질전환체.

### 청구항 9

제8항에 있어서, 상기 섬유소 분해세균은 사이토파제(Cytophage), 스포로사이토파제(Sporocytophage), 폴리안지움(Polyangium), 슈도모나스(Pseudomonas), 비브리오(Vibrio), 바실러스(Bacillus), 에르위니아(Erwinia), 셀룰로-모나스(Cellulo-monas), 스트렙토마이세스(Streptomyces), 마이크로모노-스포라(Micromono-spora), 스트렙토도포란지움(Streptodporangium), 노르카디아(Nocardia), 클로스트리디움(Clo-stridium), 박테리오테스(Bacteroides), 루미노커스(Rumi-noccus), 유박테리움(Eubacterium) 및 부티리브리오(Butyribrio)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 형질전환체.

## 청구항 10

제4항의 벡터를 제조하는 단계;

상기 제조된 벡터를 도입하여 형질전환체를 제조하는 단계; 및

상기 형질전환체를 배지에서 배양하는 단계

를 포함하는 목재부후능의 검증방법.

## 명세서

### 기술분야

[0001] 본 발명은 중금속 처리 목재의 부후를 야기하는 균에서 발현된 특이 유전자 및 이를 포함하는 벡터와 형질전환체에 관한 것이다.

### 배경기술

[0002] 생명체가 각기 다른 환경 또는 스트레스 등의 외부환경에 처하게 되면, 유전자는 이에 대해 특징적인 발현 프로필을 나타낸다. 유전자 DEG(Differentially Expressed Gene)는 비교대상 시료 간에 mRNA의 발현차이를 보이는 유전자들을 일컫고, GeneFishing DEG 기술은 2개 이상의 샘플에서 확실한 DEG를 확인할 수 있는 기술이다. GeneFishing기술은 어닐링 조절 프라이머(Annealing Control Primer, ACP)기술을 이용한 무작위 PCR을 통해 두 가지 또는 그 이상의 샘플 간에 mRNA 발현 차이를 보이는 DEG를 쉽게 발굴할 수 있게 해준다. DEG 발굴을 위한 기존 방법인 DD-PCR, SAGE 등은 10-14nt의 짧은 비특이 프라이머(arbitrary primer)를 사용하고, 일반적으로 낮은 온도에서 유전자를 증폭하기 때문에 위양성산물(false positive product)이 많이 생기는 단점을 가지고 있다. 반면에 GeneFishing은 독창적인 ACP기술을 사용하여 프라이머의 어닐링 온도를 조절함으로써, 높은 온도에서 프라이머가 주형(template)의 원하는 특정 부위에만 결합할 수 있게 한다. 따라서, 10nt의 짧은 염기서열을 사용하더라도 오히려 특이성을 향상시켜 위양성이 아닌 확실한 DEG만을 발굴할 수 있다.

[0003] 본 발명에서 사용된 GeneFishing DEG는 ACP 미지의 유전자 증폭에서도 높은 특이도를 유지하고, 비교 샘플 수량 및 샘플 종류에 제한이 없으며, 동위 원소를 사용하지 않고 아가로스 젤 상에서 DEG를 쉽게 구분할 수 있다. 현재 질병 관련 유전자 연구, 발생단계에서의 유전자 연구, 화합물, 호르몬 등 처리에 반응하는 유전자 연구 및 약물표적 유전자 발굴, 세포 분화성장 및 노화와 관련된 유전자 연구, 생물학적 신호 전달 관련 유전자 연구, 세포사멸 (apoptosis) 관련 유전자 연구, 기능이 알려진 유전자를 트랜스팩션하여 발현을 유도한 후 이로 인해 발현 수준이 변화되는 유전자 연구, 형질전환체 및 녹아아웃(knock-out) 모델에서 유전자를 연구, 진단마커 연구 등 그 외 다양한 연구에 사용되고 있다.

[0004] 기타 GeneFishing DEG 성공연구 사례로는 정상 조직과 폐암 상피 세포에서의 유전자 발현 차이 규명, 침윤성 유방암 조직에 관여하는 신규 성장조절인자 수용체(novel growth factor receptor)활성에 의해 유도되는 유전자 탐색, 정상 조직에서의 DNA 손상 시약에 의한 세포주기 조절과 관련된 유전자 탐색, 마우스의 지방세포 분화와 관련된 유전자 연구, 알츠하이머를 유도한 랫(rat)에 특정 약물 투여 후 유전자 발현 양상 분석, 특정 조건에서의 식물 개화와 관련된 유전자 탐색, 항산화효소(Anti-oxidative enzyme)에 의한 식물 유전자 연구, 병원체 감염에 의한 식물 방어 메커니즘, 다이옥신의 영향을 받은 제브라피시(Zebrafish) 배아에서의 유전자 발현 패턴 분석 및 효모에서의 스트레스, pH 변화에 따른 유전자 발현 패턴 분석 을 들 수 있다.

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

[0005] 이와 같은 기술적 배경하에서, 본 발명자들은 중금속 처리 목재를 보다 친환경적이고 효율적으로 처리할 수 있는 방법을 개발하기 위해 예의 노력한 결과, 미기록종 구멍장이과 균류로부터 GeneFishing DEG법을 이용하여 중금속이 함유된 방부제로 처리한 목재를 부후시킬 때, 특이적으로 과발현되는 유전자를 분리해 내었으며, 이 특이 유전자를 이용할 경우 중금속 방부제가 처리된 목재를 보다 효율적으로 분해할 수 있는 가능성을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0006] 결국, 본 발명의 목적은 서열번호 1의 염기서열을 갖는, 중금속 처리 목재를 부후시키는 균에서 동정된 신규 유

전자를 제공하는데 있다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 유전자를 포함하는 벡터를 제공하는 데 있다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 벡터를 포함하는 형질전환체를 제공하는 데 있다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 형질전환체를 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 목재부후능의 검증방법을 제공하는 데 있다.

### 과제의 해결 수단

[0010] 본 발명의 일 측면에 따르면, 서열번호 1의 염기서열을 갖는, 중금속 처리 목재의 부후를 야기하는 균에서 발현된 특이 유전자가 제공될 수 있다.

[0011] 일 실시예에 따르면, 상기 중금속 처리는 중금속 함유 방부제로 처리하는 것일 수 있다.

[0012] 일 실시예에 따르면, 상기 중금속 함유 방부제는 CCA(Chromated Copper Arsenate)일 수 있다.

[0013] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 유전자를 포함하는 벡터가 제공될 수 있다.

[0014] 일 실시예에 따르면, 상기 벡터는 프로모터 및 목적유전자를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0015] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 상기 벡터를 포함하는 형질전환체가 제공될 수 있다.

[0016] 일 실시예에 따르면, 상기 형질전환체는 박테리아 또는 균류(fungi)일 수 있다.

[0017] 일 실시예에 따르면, 상기 형질전환체는 폴리포르목(Polyporales sp.) 또는 섬유소분해세균(Cellulose Decomposing Bacteria sp.)일 수 있다.

[0018] 일 실시예에 따르면, 상기 섬유소 분해세균은 사이토파제(Cytophage), 스포로사이토파제(Sporocytophage), 폴리안지움(Polyangium), 슈도모나스(Pseudomonas), 비브리오(Vibrio), 바실러스(Bacillus), 에르위니아(Erwinia), 셀룰로-모나스(Cellulo-monas), 스트렙토마이세스(Streptomyces), 마이크로모노-스포라(Micromono-spora), 스트렙토도포란지움(Streptodporangium), 노르카디아(Nocardia), 클로스트리디움(Clo-stridium), 박테리오테스(Bacteroides), 루미노커스(Rumi-noccus), 유박테리움(Eubacterium) 및 부티리브리오(Butyribrio)로 이루어진 균에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.

[0019] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 상기 벡터를 제조하는 단계; 상기 제조된 벡터를 도입하여 형질전환체를 제조하는 단계; 및 상기 형질전환체를 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 목재부후능의 검증방법이 제공될 수 있다.

### 발명의 효과

[0020] 본 발명에 따른 유전자, 벡터 또는 이를 포함하는 형질전환체를 이용하면 중금속 처리 목재, 특히 방부제에 오염된 목재 바이오매스의 분해와 재활용에 유용하게 사용될 수 있다. 이는 석유 의존도를 저감하여 석유화학공정을 대체하고, 바이오매스 활용범위 확대 및 바이오화학 원천기술을 확보하는데 매우 중요하며, 한정된 자원의 재활용 측면에서 중요한 효과를 갖는다. 뿐만 아니라 이산화탄소 배출량을 감소시키고 자원을 재활용하는 환경친화적 산업으로의 전환에 있어서도 매우 중요하게 작용할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 WT(Wild type)과 다르게 ACQ와 CCA에서 과발현되는 DEG(Difference expressed gene)를 GeneFishing의 ACPs(Annealing Control Primers)로 증폭하여 전기영동을 통해 확인한 결과이다.

도 2는 CCA의 주성분인 As와 Cu에서 균사 성장에 영향을 주는 적정농도를 알아보기 위해 일별 균사의 생장량을 측정한 결과이다.

도 3은 목재의 방부제 효능을 검증하는 AWP E10 방법에 의거한 부후 테스트(Decay test)를 실시하여 무처리, 적정량의 ACQ와 CCA가 처리된 목재시편을 만들고, 이를 기반으로 중금속 목재시편 배지를 만드는 방법을 단계별로 나타낸 결과이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [0023] 본 발명의 "유전자"는 코딩서열, 비코딩서열, 프로모터 서열, 계놈서열, cDNA 서열 등 유전정보를 형성하는 각기 다른 핵산의 일부 양태에 국한되지 않으며, 핵산으로 이루어진 분자, 즉 "핵산 분자"를 통칭하는 의미로 사용된다.
- [0024] 본 발명의 중금속 처리는 다양한 방법을 통해 중금속 그 자체, 또는 중금속이 함유된 화학물질, 중금속을 포함하는 목재용 시약 또는 방부제 등 원래 목재에 존재하지 않거나 자연상태로 존재하는 양을 초과하는 중금속이 목재에 존재하도록 하는 모든 인위적인 활동을 의미한다.
- [0025] 본 발명에서 사용되는 "부후(wood-rotting)"는 목재를 분해하여 무기물과 기타의 산물로 전환시키는 생분해를 의미한다.
- [0026] 본 발명의 목재의 부후를 야기하는 균은 상기 부후를 야기할 수 있는 목재부후균을 의미한다.
- [0027] 본 발명에서 사용되는 "목재부후균"은 박테리아 또는 균류(fungus)를 포함하는 미생물을 통칭하는 것이다. 예를 들면, 상기 균류에는 구멍장이버섯과 등의 경질균(硬質菌)이 많으며, 표고 등과 같은 연질(軟質)균이 포함될 수 있다.
- [0028] 본 발명에서 사용되는 "목재부후능"은 목재를 부후할 수 있는 능력을 의미한다.
- [0029] 본 발명에 사용된 발현된 특이 유전자는 특정 조건이 형성되면 그렇지 않은 정상상태에 비해 그 발현양이 증가하거나 감소하는 유전자를 의미한다. 즉, 특정 조건에 특이적으로 반응하는 양상을 나타내는 유전자를 의미한다.
- [0030] 본 발명에서 사용되는 ACQ는 목재에 사용되는 ACQ(Alkaline Copper Quaternary) 방부제를 의미한다.
- [0031] 본 발명에서 사용되는 CCA는 목재에 사용되는 CCA(Chromated Copper Arsenate) 방부제를 의미한다.
- [0032] 본 발명자들은 구멍장이버섯과 균류로부터 GeneFishing DEG법을 이용하여 중금속 처리 목재를 부후시킬 때, 특이적으로 과발현되는 유전자를 분리해 내었으며, 이 특이 유전자를 이용할 경우 중금속 방부제가 처리된 목재를 보다 효율적으로 분해할 수 있는 가능성을 확인하고 본 발명을 완성하였다.
- [0033] 본 발명의 신규 유전자(도 1의 KJ\_DEG7 및 서열목록 1 참조)는 구멍장이과 균에서 분리할 수 있다. 제조된 유전자를 당 분야에 공지된 미생물 발현용 벡터에 삽입하여 발현 벡터를 제조한 후 이를 적절한 균류, 예를 들어, 목재부후균으로 알려진 다양한 구멍장이과 균류에 도입시킬 수 있다. 이와 같이 형질전환된 균주를 이용하여 본 발명의 유전자의 DNA를 대량으로 복제하거나 단백질을 대량 생산할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 일 측면에 따르면, 서열번호 1의 염기서열을 갖는, 중금속 처리 목재의 부후를 야기하는 균에서 발현된 특이 유전자가 제공될 수 있다.
- [0035] 상기 유전자는 표준 분자 생물학 기술을 이용하여 분리 또는 제조할 수 있다. 예를 들어 적절한 프라이머 서열을 이용하여 숙주로부터 분리 또는 제조할 수 있다. 또한, 자동화된 DNA 합성기를 이용하는 표준 합성기술을 이용하여 제조할 수도 있다. 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 목재부후능을 갖는 유전자를 분리하기 위해, 서열목록 2 및 3과 같은 프라이머를 도입한 PCR 방법을 이용하였다.
- [0036] 일 실시예에 따르면, 상기 중금속 처리는 중금속 함유 방부제로 처리하는 것일 수 있다.
- [0037] 일 실시예에 따르면, 중금속 함유 방부제는 CCA(Chromated Copper Arsenate) 또는 ACQ(Alkaline Copper Quaternary)일 수 있으며, 보다 바람직하게는 CCA일 수 있다.
- [0038] 일 실시예에 따르면, 상기 중금속은 비소(As), 구리(Cu), 및 크롬(Cr)으로 이루어진 균에서 선택된 하나 이상일 수 있으며, 보다 바람직하게는 비소일 수 있다.
- [0039] 도 2는 CCA의 주성분인 As와 Cu에서 균사 성장에 영향을 주는 적정농도를 알아보기 위해 일별 균사의 성장량을 측정한 결과이다. 비소(Arsenic, As)처리균의 0.2 mg/ml 및 구리(Copper, Cu) 처리균의 2 mg/ml의 농도에서 비슷한 균사의 성장곡선이 나타나고 있다. 특히 비소의 경우에는 0.5 mg/ml 이상의 농도에서는 목재부후균의 균사가 성장할 수 없는 것으로 나타나고 있다. 비소(74.9g/mol)와 구리(63.546g/mol)의 원자량 차이를 고려하더라도, 비소가 구리에 비해 목재부후균에 대해 월등한 독성을 나타내고 있음을 알 수 있다.

- [0040] 따라서, 비소에 대하여 특이적으로 발현되는 목재부후균의 유전자는 중금속 처리 목재, 특히 방부제에 오염된 목재 바이오매스의 분해와 재활용에 유용하게 사용될 수 있다. 또한, 이는 석유 의존도를 저감하여 석유화학공정을 대체하고, 바이오매스 활용범위 확대 및 바이오화학 원천기술을 확보하는데 매우 중요하게 작용할 수 있다.
- [0041] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 유전자를 포함하는 벡터가 제공될 수 있다.
- [0042] 상기 벡터는 프로모터 및 목적유전자를 추가적으로 포함할 수 있으며, 상기 프로모터는 본 발명의 상기 서열목록 1의 염기서열과 작동가능하게 결합한 것일 수 있다. 또한, 본 발명의 상기 염기서열이 단백질로 전환된 경우에 이를 검지하거나 순화할 수 있도록 통상의 분자생물학적 방법으로 사용되는 표지 태그 및 기타의 표지물질의 코딩하는 부가적인 유전자가 더 삽입될 수도 있다.
- [0043] 본 발명 다른 측면에 따르면, 상기 벡터를 포함하는 형질전환체가 제공될 수 있다. 이때, 상기 형질전환체는 목재부후능을 나타낼 수 있는 것이든 어느 것이든 무방하다. 특히 본 발명에 따른 상기의 벡터로 형질전환이 가능하고, 그러한 벡터에 작동가능하게 연결된 프로모터가 작동할 수 있는 전사시스템을 갖는 생물체이면 어느 것이든 무방하다. 이러한 생물체는 단일 세포를 포함하여 다세포 군집 또는 기관 또는 조직을 갖는 다세포 생물체 등 어느 것이든 무방하나, 보다 바람직하게는 상기 형질전환체는 박테리아 또는 균류(fungi)일 수 있고, 가장 바람직하게는 다른 구멍장이파 균류일 수 있다.
- [0044] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 벡터를 제조하는 단계; 상기 제조된 벡터를 도입하여 형질전환체를 제조하는 단계; 및 상기 형질전환체를 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 목재부후능의 검증방법이 제공될 수 있다. 이때, 상기 목재부후능을 검증하기 위한 배지는 도 3에 나타나 있다. 도 3은 목재의 방부제 효능을 검증하는 AWP A E10 방법에 의거한 부후 테스트(Decay test)를 실시한 결과이다. 무처리, 적정량의 ACQ와 CCA가 처리된 목재시편을 만들고, 이를 기반으로 중금속 목재시편 배지를 만드는 방법을 단계별로 나타낸 결과이다.
- [0045] 이하에서는 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 다만, 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다 할 것이다.
- [0046] **실시예 1. 균주 배양 및 총 RNA의 분리**
- [0047] 목재부후균은 서울 소재의 청계산 임야의 폐목재로부터 채집하였다. 채집한 균은 실험실에서 통상의 분류학적 기법(형태학적 분석 및 16S rDNA의 분석을 포함하는 분자생물학 기법)을 활용하여 동정하였다. 그 결과, 분리된 목재부후균은 Polyporales로 분류되었으며, 실험실 명명기준에 따라 KUC9061로 명명하였다. 총 RNA의 분리를 위하여 MEA배지의 13곳에 상기 균을 배양하고, 100ppm의 CCA와 ACQ를 처리한 목재시편과 이를 처리하지 않은 무처리 목재시편을 올려놓았다. 10일 배양 후, 시편을 덮은 형태로 생장한 균사를 조심스럽게 분리하여 4℃로 유지된 2ml 에펜도르프 튜브(E-tube)에 모았다. 상업적으로 판매되는 TRIZOLReagent(Invitrogen, U.S.A.)을 사용하여 상기에서 얻은 균사로부터 총 RNA를 추출하였다.
- [0048] **실시예 2. RT-PCR 및 Genefishing**
- [0049] 상기에서 얻은 총 RNA를 상업적으로 판매되는 Superscript III First-strand synthesis system(Invitrogen, U.S.A.)를 이용하여 단일가닥 DNA(sDNA)를 얻고, GeneFishing(Seegene, Korea)을 사용하여 도 1의 KJ\_DEG7을 포함하여 특이적으로 발현되는 유전자를 증폭하였다.
- [0050] **<2-1> Genefishing DEG PCR 진행**
- [0051] 먼저, 상기 실시예 1에서 얻은 총 RNA 31씩을 주형으로 하고 10uM dT-ACP1 2ul, 10mM dNTP 1ul, RNase-free water를 넣어 총 10ul을 만들어 79~80℃에서 3분간 denaturation시켰다. 이후 열음에 2분간 식히고 cDNA Synthesis mix(10X RT buffer 2ul, 25mM MgCl<sub>2</sub> 4ul, 0.1M DTT 1ul, RNase OUT 1ul, Superscript III RT 1ul)를 넣었다. 이를 50℃에서 50분간 반응하여 cDNA를 합성한 후, 합성을 끝내기 위해 85℃에서 5분간 반응시켰다. 반응 완료 후 RNA를 제거하기 위해 1ul의 RNase H를 넣고 37℃에서 20분간 더 반응시켰다. 이어서 서열번호 2의

동일한 고정 프라이머 dT-ACP1 및 무작위 5' 프라이머인 DEG-1~20(Genefishing 101&102 kit, Seegene, Korea) 중 하나인 서열번호 3으로 기재되는 dT-ACP7 프라이머를 사용하여 역전사를 수행하였다. PCR 반응의 조건은 94℃에서 40초 반응 후 65℃에서 40초, 72℃에서 40초를 40회 반응시키며 최종 연장(final extension)을 위하여 72℃에서 5분간 더 반응시켰다.

[0052] 도 1은 WT(Wild type)과 다르게 ACQ와 CCA에서 과발현되는 DEG(Difference expressed gene)를 GeneFishing의 ACPs(Annealing Control Primers)로 증폭하여 전기영동을 통해 확인한 결과이다. 도 1 하단의 KJ\_DEG7은 CCA로 처리하였을 때 특이적으로 발현이 증가하는 유전자임을 나타내고 있다.

## [0053] <2-2> DEG 확인 및 cDNA 순화

[0054] 상기 방법으로 증폭된 PCR 단편을 6% 폴리아크릴아미드 시퀀싱 겔에 전기영동을 수행한 후 자외선 사진을 이용하여 서로 다른 발현(differentially expressed) 정도를 보이는 밴드의 위치를 확인하였다. 건조된 시퀀싱 겔로부터 150 bp 크기의 밴드(명칭: KJ\_DEG7) cDNA 단편을 도려내고 이를 상업적으로 판매되는 Power Gel Extraction Kit(Dynebio, Korea)로 제조사의 지침에 따라 순수한 DNA를 분리하였다.

## [0055] 실시예 3. 동정된 핵산의 클로닝

[0056] 상기에서 얻은 핵산(KJ\_DEG7) 산물을 TOPO TA Cloning Kit(Invitrogen, USA)을 사용하여 제조사의 지침에 따라 pCR 2.1-TOPO 벡터에 삽입하였다.

[0057] 그 과정은 다음과 같다. 상기 실시예 2에서 얻은 KJ\_DEG7 산물 2ul(20ng/ul), TOPO 벡터 1ul, salt solution 1ul을 PCR tube에 넣고 총 6ul가 되도록 한 다음, 이를 태핑(Tapping)하여 스핀다운(spin down)한 후에 22℃에서 30분간 반응하였다. 그런 다음, 상기 TOPO Cloning reaction sample 2ul를 형질전환용 대장균(Competent cell)이 들어있는 튜브에 넣고 얼음에서 20분 동안 안정화시켰다. 그 후 42℃에서 30초 동안 열충격(Heat-shock)을 가한 다음, 상온의 S.O.C medium 250ul을 넣고, 1시간 동안 교반하였다(37℃, 200rpm).

[0058] 상기 반응 1시간 뒤, Sample을 꺼내어 LB plate(Amp+, X-gal+) 두 개에 200ul, 50 ul를 각각 넣었다. 그 후 건조될 때까지 도말(Spreading)한 후, 뒤집어서 37℃에 12~15시간 배양하였다. 배양결과 형질전환된 콜로니는 흰색으로 나타났다. 형질전환 세균의 배양을 위해 4ml의 LB broth를 15ml 튜브(conical tube)에 넣고 50mg/ml 암피실린(Ampicillin) 4ul를 넣었다. 형질전환이 확인된 콜로니를 튜브(conical tube)에 넣고 배양(37℃, 200rpm)한 다음, 아큐프렙 플라스미드 추출 키트(AccuPrep Plasmid Extraction Kit(Bioneer, Korea))를 이용하여 제조사의 지침에 따라 플라스미드를 추출하였다.

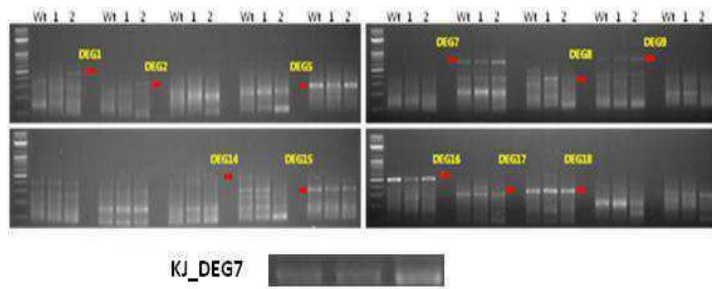
[0059] 상기 추출한 플라스미드에 삽입된 DNA(CCA 처리시 발현이 증가하는 상기 KJ\_DEG7)의 염기서열을 분석하여 서열 목록 1에 나타내었다.

[0060] 상기 유전자, 벡터 또는 이를 포함하는 형질전환체를 이용하면 중금속 처리 목재, 특히 방부제에 오염된 목재 바이오매스의 분해와 재활용에 유용하게 사용될 수 있다. 이는 석유 의존도를 저감하여 석유화학공정을 대체하고, 바이오매스 활용범위 확대 및 바이오화학 원천기술을 확보하는데 매우 중요하며, 한정된 자원의 재활용 측면에서 중요한 효과를 갖는다. 뿐만 아니라 이산화탄소 배출량을 감소시키고 자원을 재활용하는 환경친화적 산업으로의 전환에 있어서도 매우 중요하게 작용할 수 있다.

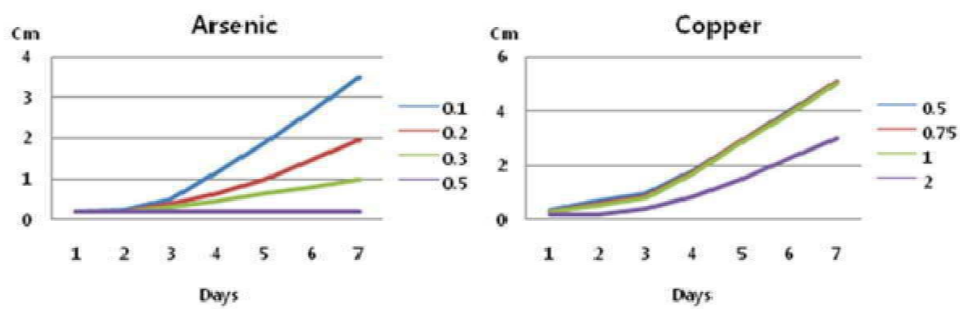
[0061] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

## 도면

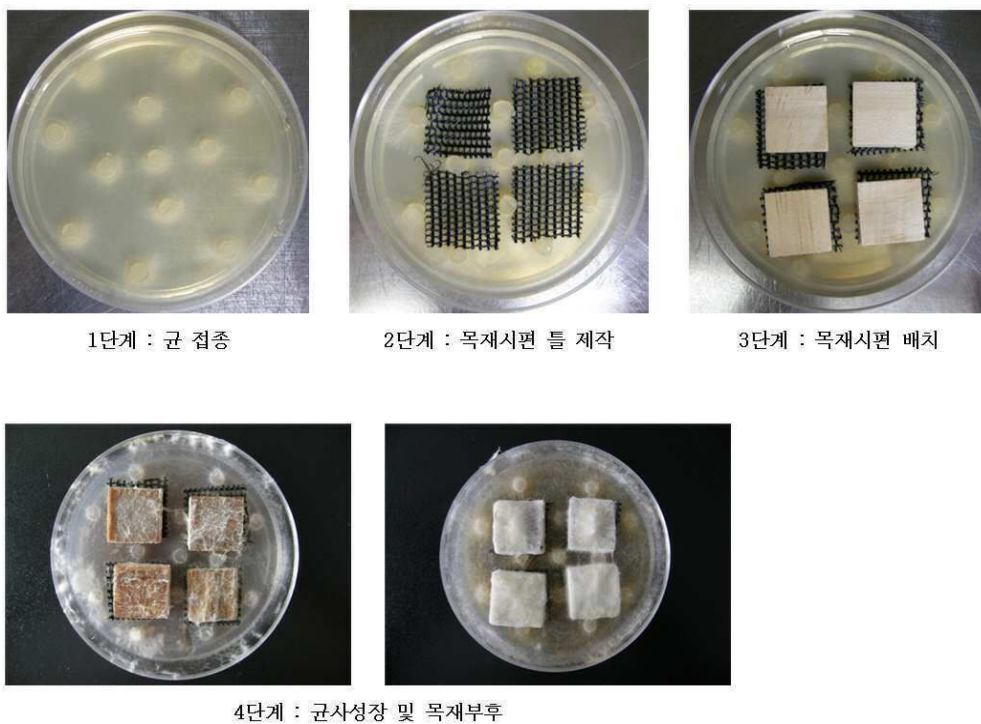
### 도면1



### 도면2



### 도면3



## 서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Korea University Research and Business Foundation

<120> Differentially expressed gene in a new fungus rotting heavy metal treated wood

<130> NPF18999

<160> 3

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 651

<212> DNA

<213> polyporales sp.

<400> 1

```
gtctaccagg cattcgcttc atgggggctg cggatcgacg aggtccaggg caagaactgc      60
ctcaccaact tccacggcat gtcgttctcc tccgacaage tccgtccctt tgtccgcaag      120
tggcagaccc tcatcgagge ccacgtcgac gtcaaaacca cgcacggcta ctttctccga      180

ctgttcgcca tcggtttcac caagcgccgc ccatcgcagg tgaagaagac gacgtacgcg      240
cagtcgagtc agatccggga gattcggcgg aaaatgttcg agatcatgac gagggaggcg      300
acgtcgtgcg atctcaagga gtcgtgacg aagttcgtac ctgaggccat cggccgtgag      360
atcgagaagg cagcacgtag catctaccct ctccagaacg tctacgtcca caaggctaag      420
atcctcaagg cgccaaagtt tgacatggcg aagttacttg agtccacgg cgagtctacg      480
gatgagactg gcacgcgggt cgtgaaggac ttccaggagc ctgagattct cgactctgta      540
taatgcatct tctttgtgtc tacctgtatt caccatgcac ttttctctac aacatcgggt      600

atgacagctt atgctctatt gcaaaagtaa aatgtaaaaa aaaaaaaaaa a          651
```

<210> 2

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer for GeneFishing

<220><221> misc\_feature

<222> (23)..(27)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 2

gtctaccagg cattcgcttc atnnnnngcc atcgacc 37

<210> 3

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer for GeneFishing

<220><221> misc\_feature

<222> (23)..(27)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 3

gtctaccagg cattcgcttc atnnnnnctg cggatcg 37