

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 (43) 공개일자	10-2007-0121088 2007년12월27일
(51) Int. Cl.		(71) 출원인	충남대학교산학협력단
	<i>C12Q 1/68</i> (2006.01) <i>G01N 33/53</i> (2006.01)		대전광역시 유성구 공동 220번지 충남대학교
(21) 출원번호	10-2006-0055689	(72) 발명자	김수연
(22) 출원일자	2006년06월21일		부산 진구 범전동 63-31
심사청구일자	2006년06월21일		류지연
			대전 서구 흑석1동 359번지
			(뒷면에 계속)
		(74) 대리인	권오식, 박창희, 김종관

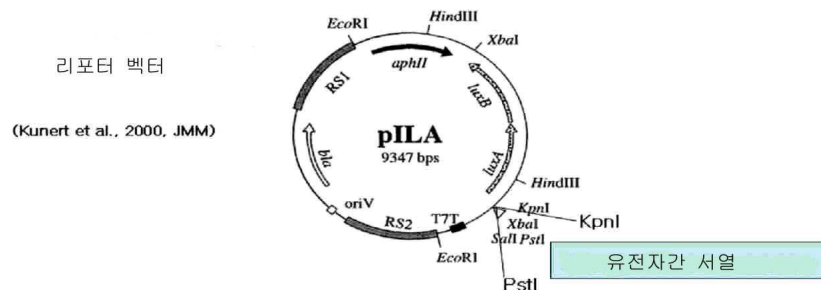
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 남세균 유래 포도당 유도성 바이오센서

(57) 요약

본 발명은 남세균 시네코시스티스 (*Synechocystis* sp.) PCC6803으로부터의 포도당 유도성 유전자의 프로모터 부위를 포함하는 미생물을 이용한, 포도당 유도성 바이오센서에 관한 것으로서, 본 발명에 따른 바이오센서는 포도당에 민감하게 반응할 뿐만 아니라, 에너지대사를 교란하는 환경독성 물질, 예를 들어, 중금속, 시안, 제초제, 유전자 전사·번역 억제제, 및 기준치 농도의 위해물질도 검출할 수 있으므로, 포도당과 같은 영양물질이나 에너지대사 교란물질을 검출하거나 유전자 발현을 억제하는 항생제의 생체감정 및 세포 어레이 제작에도 사용됨으로써, 제약산업, 항생제나 제초제와 같은 신약개발이나 수생태계 환경독성 물질 검출 및 잔류농약이나 중금속의 실시간·비파괴적 검출에 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

최도일

대전 유성구 전민동 엑스포아파트 308-1504호

박연일

대전 유성구 지족동 919 열매마을7단지 705-401

특허청구의 범위

청구항 1

atp I, ndbA, catD1, tkt, pgi, pdh, ppc 및 cydA로 구성된 그룹으로부터 선택되는, 시네코시스티스 (*Synechocystis* sp.) PCC6803으로부터의 포도당 유도성 유전자의 프로모터 부위를 포함하는 미생물을 포함하는, 포도당 유도성 바이오센서.

청구항 2

atp I, ndbA, catD1, tkt, pgi, pdh, ppc 및 cydA로 구성된 그룹으로부터 선택되는, 시네코시스티스 (*Synechocystis* sp.) PCC6803으로부터의 포도당 유도성 유전자의 프로모터 부위를 포함하는 미생물을 포함하는, 세포 어레이 제작용 포도당 유도성 리포터.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 미생물이 포도당 유도성 유전자의 프로모터 부위를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 것인, 바이오센서 또는 리포터.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 재조합 벡터가 생물발광(bioluminescent) 리포터 벡터인 바이오센서 또는 리포터.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 미생물이 시네코시스티스 PCC6803인 바이오센서 또는 리포터.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, atp I, ndbA, catD1, tkt, pgi, pdh, ppc 및 cydA 유전자가 각각 서열번호 1 내지 8의 염기서열을 갖는 바이오센서 또는 리포터.

청구항 7

제1항에 있어서, 포도당, 환경독성 물질, 유전자 전사·번역 억제제 또는 기준치 농도의 위해물질을 검출하기 위한 바이오센서.

청구항 8

제7항에 있어서, 환경독성 물질이 중금속, 시안 또는 제초제인 바이오센서.

청구항 9

제1항에 따른 바이오센서를 이용하는, 포도당, 환경독성 물질, 유전자 전사·번역 억제제 또는 기준치 농도의 위해물질의 검출방법.

청구항 10

제2항에 따른 리포터를 이용하는, 세포 어레이의 제작방법.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<6>

본 발명은 남세균 유래 포도당 유도성 바이오센서(glucose inducible biosensors)에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 남세균 시네코시스티스(*Synechocystis* sp.) PCC6803으로부터의 포도당 유도성 유전자의 프로모터 부위를

포함하는 미생물을 이용한, 포도당과 같은 영양물질, 에너지대사를 교란하는 환경독성 물질, 예를 들어 중금속, 시안, 제초제, 유전자 전사·번역 억제제, 기준치 농도의 위해물질의 검출 등을 위한, 포도당 유도성 바이오센서에 관한 것이다.

<7> 환경독성 물질은 여러 가지의 최신 분석기법과 기기를 활용하여 단시간 내에 대량으로 검출할 수 있다. 그러나 이화학적 분석법으로는 조사대상 물질의 잠재적인 생물학적 위해성 (독성 및 유전독성 등)이나 화합물의 이용률 (availability), 화학물질 간의 상승작용(synergism) 또는 길항작용(antagonism) 등에 대한 정보를 얻을 수 없다. 이러한 문제점은 생물기원 검체, 즉 바이오센서(biosensor)를 사용함으로써 해결될 수 있다 (Belkin S., *Curr. Opin. Microbiol.* 2003, 6: 206-212).

<8> 특히, 재조합 생물발광 세균 균주(recombinant bioluminescent bacterial strains)는 고감도 (high sensitivity), 선택성, 저비용, 운용의 용이성 및 단시간 내 측정이 가능하다는 점에서 바이오센서로 각광받고 있으며, 세포 어레이 바이오센서의 소재로 적합한 것으로 판단된다. 또한 동결건조 또는 고정화 기질 (immobilization matrices)을 사용하여 휴대용 독성측정용 바이오센서 (Choi S.H. and Gu M.B., *Biosens. Bioelectron.*, 2002, 17:434-440)나 고처리율 센서(high throughput sensors) (Kim B.C. and Gu M.B., *Biosens. Bioelectron.*, 2003, 18:1015-1021; Lee J.H. et al., *Biosens. Bioelectron.*, 2005, 21. 500-507)로도 개발된 바 있다.

<9> 바이오센서는 종 특이적인 특성이 있으므로 식/작물 연구, 제초제 개발 또는 자연 호소에서의 수생 생태계 독성 물질 모니터링 등에는 대장균이나 다른 세균 보다는 광합성을 수행하는 바이오센서의 개발이 필요하다. 광합성 세균 중 남세균은 원시대기에 산소(O₂)를 최초로 제공한 생물로서, 식물 엽록체의 기원이다. 대장균이 고등동물 연구의 분자유전학 모델 시스템으로 사용되어 왔듯이, 남세균은 고등식물 연구의 모델 시스템으로 간주된다. 남세균 중에서도 특히 시네코시스티스는 담수에 서식하는 세균으로서, 여러 가지 분자유전학적 기법의 사용이 가능하고 유전체 정보가 알려져 있을 뿐만 아니라 (<http://www.kazusa.or.jp/cyanbase>), 단백질, 탄수화물, 지질 및 핵산 등의 생합성과 분해에 관한 일차 대사과정, 광합성과 호흡 경로인 생체에너지 분야, 및 빛, 온도, 삼투압, 중금속, 염 등의 다양한 환경 스트레스에 대한 반응인 신호전달 캐스캐이드(signaling cascade)에 대한 연구에 널리 사용되고 있다.

<10> 야생종 남세균 또는 분리된 광계2 복합체 등이 제초제를 개발하거나 환경독성 물질의 생체이용률 (bioavailability) 측정을 위한 바이오센서로 사용되었으나, 엽록소 형광 분석기와 같은 복잡한 기기를 필요로 하고 일차 작용부위가 광합성에 국한될 뿐만 아니라 센서의 수명이 짧고 시스템이 불안정한 점 등의 여러 단점이 발견되었다.

<11> 상기 단점은 유전공학적인 기법으로 생물발광 유전자를 포함하는 남세균 (Shao C.Y. et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, 68(10):5026-5033)을 개발함으로써 개선되었다. 발광유전자인 루시페라제(luciferase) 유전자는 β -갈락토시다제와 녹색-형광 단백질 (GFP)과 더불어 일반적으로 사용되는 리포터(reporter) 유전자로서, 비브리오 (*Vibrio fischeri*, *Vibrio harvei*)와 같은 세균이나 곤충 (*Potinus pyralis*)이 사용된다. 리포터 유전자 발현은 특정 신호에 의해 유도 [라이트-온 어세이(light-on assay)]되거나 또는 억제 [라이트-오프 어세이(light-off assay)]될 수 있다 (Belkin S., *Curr. Opinion Microbiol.*, 2003, 6:206-212). 상기 Shao 등 (2002)은 반딧불이 루시페라제를 *trp*와 *lac* 프로모터의 하이브리드인 *tac* 프로모터에 융합한 후 도입하여 루시페라제를 항상적으로 (constitutively) 발현시킨 후 여러 종류의 제초제, 환경호르몬 및 기화성 물질이 발광에 미치는 억제효과를 검출하는 시스템을 개발하였다.

<12> 상기 Shao 등에 의해 개발된 라이트-오프 어세이 시스템에서 발광 세기는 루시페라제의 발현정도 뿐만 아니라 세포내 ATP 양에 의해서도 결정된다. 즉, 사용된 *tac* 프로모터가 강력하기 때문에 바이오센서 세포 내의 루시페라제의 양은 충분할 것이지만, 광독립영양(photoautotrophic) 생장조건에서는 생장율과 호흡율이 광종속영양(photoheterotrophic) 생장조건에 비해 약 3-4배 낮기 때문에 (Lee J.M. et al., *Mol Cells* 2005, 19(2):256-261), 호흡을 통해 생성되는 ATP 양은 제한적일 것으로 생각된다. 따라서, 상기 개발된 바이오센서는 에너지 대사가 낮은 상태에서 작용하므로, 광대역의 리포터로서의 바이오센서로서 적용하기에 어려움이 있다. 또한, 사용된 *tac* 프로모터는 대장균의 *trp*과 *lac* 프로모터를 재조합한 프로모터로서, 세포내 물질대사의 변화에 상관없이 항상적으로 발현되는 것이다. 따라서, 높은 대사율 조건에서 특이적으로 발현되는 시네코시스티스 고유의 프로모터를 개발함으로써, 감지능력의 획기적인 증대가 절실히 요청되고 있다.

<13> 한편, 당(sugar)은 모든 생물체에서 에너지 공급원, 삼투 조절물질, 거대분자 생합성의 전구물질로서 작용할 뿐만 아니라, 유전자 발현, 생장 및 발달에 영향을 미치는 조절신호(regulatory signal)로 작용한다. 단일세포

광합성 세균인 남세균 시네코시스티스 PCC6803에서의 포도당 감지 및 신호전달 경로는 종속영양 세균인 대장균 (*Escherichia coli*)과 상이하다 (Rolland F. et al., *Trends Biochem. Sci.* 26, 310-317). 고등식물의 경우, 포도당 감지는 1) 포도당 센서로서의 헥소키나아제(hexokinase), 2) 헥소키나아제 비의존성 포도당 신호전달, 및 3) 대사작용 의존성 포도당 감지 경로가 제안되었다 (Jang J.C. et al., *Plant Cell*, 1997, 9(1):5-19; Xiao W. et al., *Plant Mol. Biol.*, 2000, 44(4):451-461; Moore B. et al., *Science*, 2003, 300(5617):261-263). 남세균에서의 포도당 신호전달 경로에 대한 연구는 대장균이나 효모 및 고등식물에 비해 연구가 미진하다. 최근에 카로티노이드 생합성 유전자의 발현에 포도당이 관여하며, 신호전달은 세포질 pH의 증가에 의한 것으로 보고된 바 있다 (Ryu J.Y. et al., *J. Biol. Chem.*, 2004, 279(24):25320-25325). 이는 남세균이 다른 생물과 상이한 포도당 신호전달 경로를 가짐을 암시하는 것이다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

- <14> 본 발명자들은 상기 Shao 등에 의해 개발된 생물발광 바이오센서가 에너지 대사가 낮은 상태에서 작용하고, 세포 내 물질대사의 변화에 상관없이 항상적으로 발현되는 문제점을 가짐을 인식하고, 높은 대사를 조건에서 특이적으로 발현되는 시네코시스티스 고유의 프로모터를 발굴하고 이를 생물발광 바이오센서에 도입하여 감지능력을 획기적으로 증대시키기 위하여, 지속적인 연구를 수행해왔다. 그 결과, 시네코시스티스 PCC6803으로부터 8종의 포도당 유도성 프로모터를 발굴하고 이들이 상기 목적에 부합함을 확인하여, 본 발명을 완성하기에 이르렀다.
- <15> 따라서, 본 발명의 제1목적은 남세균 시네코시스티스 PCC6803으로부터의 탄수화물 대사와 호흡에 관련된 포도당 유도성 유전자의 프로모터 부위를 포함하는 미생물을 이용한, 포도당 유도성 바이오센서를 제공하기 위한 것이다.
- <16> 본 발명의 제2목적은 남세균 시네코시스티스 PCC6803으로부터의 탄수화물 대사와 호흡에 관련된 포도당 유도성 유전자의 프로모터 부위를 포함하는 미생물을 이용한, 세포 어레이 제작용 포도당 유도성 리포터를 제공하기 위한 것이다.
- <17> 본 발명의 제3목적은 상기 바이오센서를 이용하여 포도당과 같은 영양물질이나 각종 환경독성 물질을 검출하는 방법을 제공하기 위한 것이다.
- <18> 본 발명의 제4목적은 상기 리포터를 이용하여 세포 어레이를 제작하는 방법을 제공하기 위한 것이다.

발명의 구성 및 작용

- <19> 본 발명의 제1면은 *atp I*, *ndbA*, *catD1*, *tkt*, *pgi*, *pdh*, *ppc* 및 *cydA*로 구성된 그룹으로부터 선택되는, 시네코시스티스 PCC6803으로부터의 포도당 유도성 유전자의 프로모터 부위를 포함하는 미생물을 포함하는, 포도당 유도성 바이오센서에 관한 것이다.
- <20> 본 발명의 제2면은 *atp I*, *ndbA*, *catD1*, *tkt*, *pgi*, *pdh*, *ppc* 및 *cydA*로 구성된 그룹으로부터 선택되는, 시네코시스티스 PCC6803으로부터의 포도당 유도성 유전자의 프로모터 부위를 포함하는 미생물을 포함하는, 세포 어레이 제작용 포도당 유도성 리포터에 관한 것이다.
- <21> 상기 미생물은 포도당 유도성 유전자의 프로모터 부위를 포함하는 재조합 벡터, 특히 생물발광 리포터 벡터로 형질전환된 미생물, 특히 시네코시스티스 PCC6803인 것이 바람직하다. 또한, 상기 *atp I*, *ndbA*, *catD1*, *tkt*, *pgi*, *pdh*, *ppc* 및 *cydA* 유전자는 각각 서열번호 1 내지 8의 염기서열을 갖는 것이 바람직하다.
- <22> 본 발명에 따른 바이오센서는 포도당, 환경독성 물질, 예를 들어, 중금속, 시안 또는 제초제, 유전자 전사·번역 억제제 또는 기준치 농도의 위해물질을 검출하기 위해 사용될 수 있다.
- <23> 본 발명의 제3면은 상기 바이오센서를 이용하는, 포도당, 환경독성 물질, 유전자 전사·번역 억제제 또는 기준치 농도의 위해물질의 검출방법에 관한 것이다.
- <24> 본 발명의 제4면은 상기 리포터를 이용하는, 세포 어레이의 제작방법에 관한 것이다.
- <25> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- <26> 본 발명의 시네코시스티스 PCC6803은 프랑스, 파스퇴르 컬처 컬렉션 오브 시아노박테리아(Pasteur Culture Collection of Cyanobacteria) (수탁번호 6803) 또는 미합중국, 아메리칸 타입 컬처 컬렉션 (American Type Culture Collection) (수탁번호 27184)으로부터 용이하게 입수가 가능하다.

<27> 본 발명에서, 특별한 언급이 없는 한, 포도당은 생체 내에서 이용가능한 D-형태 (D-glucose)를 가리키는 것이다.

<28> 본 발명자들은 시네코스티스 PCC6803으로부터 독립영양 조건 하에서 포도당 첨가 시 발현이 증가하는 유전자 8 종을 DNA 마이크로어레이(microarray) 기법으로 선별하고, RT-PCR 기법에 의해 이들 유전자의 발현이 광 조건 하에서 포도당에 의해 현저히 증가할 뿐 아니라 포도당에 대해 특이적임을 확인하였다 (도 1 참조). 이들 포도당 유도성 유전자를 하기 표 1에 수록하였다.

표 1

<29>	카테고리	단백질	위치	유전자
	ATP 합성효소	CF(0)의 ATP 합성효소A	sl11322	<i>atpI</i>
	NADH 탈수소효소	NADH 탈수소효소	slr0851	<i>ndbA</i>
	말단 산화효소	시토크롬 c 산화효소 서브유닛 I	slr1137	<i>catD1</i>
	OPP	트랜스케툴라제	sl11070	<i>tkt</i>
	해당	포도당-6-P 이성화효소	slr1349	<i>pgi</i>
	피루베이트 탈수소효소	피루베이트 탈수소효소 E1	sl11721	<i>pdh</i>
	아세틸 CoA 대사	PEP 카르복실화효소	sl10920	<i>ppc</i>
	말단 산화효소	퀴놀 산화효소 서브유닛 I	slr1379	<i>cydA</i>

<30> 본 발명에서는, 상기 포도당 유도성 유전자의 프로모터 (서열번호 1 내지 8)를 리포터 유전자의 일종인 발광유전자 (*luxAB*) 벡터 [pILA (젠뱅크(Genbank) 등록번호 AJ251840)]에 도입시켜 재조합 벡터를 제조하고 (도 2 참조), 시네코스티스 PCC6803을 상기 재조합 벡터로 형질전환시켜, 포도당 존재 하에서 생물발광량이 현저히 증가함을 확인하였다 (도 3 참조). 나아가, 각종 중금속, 시안, 제초제 또는 유전자 발현 저해제의 존재 하에서 상기 생물발광이 현저히 억제됨을 확인함으로써 (도 4 참조), 상기 형질전환체로 라이트-온 어레이 시스템을 성공적으로 확립할 수 있음을 확인하였다. 또한, 환경부 기준농도의 위해물질의 존재 하에서 생물발광이 현저히 억제됨을 확인하여 (도 5 참조), 이것이 우리나라 수서환경 유해/오염물질을 검출하는데도 사용가능함을 확인하였다.

<31> 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의해 보다 구체적으로 설명하나, 이는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위를 어떤 식으로든 제한하고자 하는 것은 아니다.

<32> 실시예 1: 탄소 및 생체에너지 대사 관여 유전자를 포함하는 DNA 칩 제작 및 분석

<33> 광합성, 산화적 인산화, 광수확 색소계, 이산화탄소 고정, 해당, 시트르산 회로, 산화적 5탄당 인산화 경로를 포함하는 11개 분야, 총 353개의 유전자를 포함하는 DNA 마이크로어레이를 제작하였다. 프라이머는 0.5 kbp DNA 절편 크기를 갖도록 고안하였다 (제노텍(Genotech), 한국). 이 중 포도당 유도성인 것으로 선별된 유전자의 프라이머 서열은 아래와 같다.

<34> sl11322: 순방향 - ATTGGGAAATTGGGAACCTC (서열번호 9)

<35> 역방향 - ACTCGTCCGCAAGGATGTTA (서열번호 10)

<36> slr0851: 순방향 - CCATACGCCAACGAATTTTT (서열번호 11)

<37> 역방향 - AACTGGCCCACTCAAATCC (서열번호 12)

<38> slr1137: 순방향 - CGGTTGGTTACGGATGTTCT (서열번호 13)

<39> 역방향 - GTGGAAGCGGCTAAAACGTA (서열번호 14)

<40> sl11070: 순방향 - GCCTTTACCCTGTGGAACAA (서열번호 15)

<41> 역방향 - CTTGCTCACATCTTCGGTGA (서열번호 16)

<42> slr1349: 순방향 - GACAAATCCAGCGGCTCTA (서열번호 17)

<43> 역방향 - GACGTTACCAAGGAACCAT (서열번호 18)

- <44> s111721: 순방향 - TGGGAGAAGATGTGGGACTC (서열번호 19)
- <45> 역방향 - TAATGACCCGATGGGTTTTC (서열번호 20)
- <46> s110920: 순방향 - CCGAACAAGGGGAAGTGTTA (서열번호 21)
- <47> 역방향 - GGAAAGGGTCATTTCACCT (서열번호 22)
- <48> slr1379: 순방향 - GGTGGCTTTACCCAACGATA (서열번호 23)
- <49> 역방향 - GCGACTGCCGAAATAGAGAG (서열번호 24)
- <50> 전장 또는 부분 오픈 리딩 프레임 (ORF)을 PCR로 증폭한 후 세파텍스 G-50으로 정제하여 50% (v/v) 디메틸설폭사이드(DMSO) 용액에 녹였다. 정제된 DNA를 옴니그리드(OmniGrid)TM 마이크로어레이어 (진 머쉰(Gene machine), 산 카를로스, CA)에 스폿팅하였다. 이때 인간 *GAPDH*, *rrn16*, *rnpB*를 대조구로 사용하였다. 각 슬라이드를 300 mK의 자외선 (스트라타링커(Stratalinker), 스트라타진(Stratagene), 라 졸라, CA)으로 고정시킨 후 데시케이터에서 보관하였다. 포도당 처리로부터 0, 15, 30, 60 및 180 분 경과 후, 트리졸(Trisol)TM (라이프 테크놀로지스(Life Technologies), CA, USA)을 사용하여 추출하고 무-RNAase DNase (프로메가(Promega), USA)로 처리하였다. RNA (30 μ g)를 Cy-3 또는 Cy-5와 결합된 dUTP (아머삼 파마시아 바이오텍(Amersham Pharmacia Biotech), USA)로 표지하고 [Pat Brown 연구실의 방법 (cmgm.stanford.edu/pbrown/protocols/4_yeast_RNA.html)], 표지된 탐침을 혼합한 후 퀴아퀵(QIAquick) PCR 증폭 키트 (퀴아젠(Qiagen), 발렌시아, CA)로 정제하였다. 정제된 탐침을 혼성화하기 위해 10 μ l 포름아미드와 5 μ l의 4 $\times$ 혼성화 용액 (아머삼 파마시아 바이오텍, USA)과 혼합하였다. 95 $^{\circ}$ C에서 3 분간 가열하여 변성을 유도한 후, 슬라이드에서 42 $^{\circ}$ C에서 16 시간동안 방치하였다. 슬라이드를 2 $\times$ SSC/0.03% (w/v) SDS, 2 $\times$ SSC, 1 $\times$ SSC 및 0.2 $\times$ SSC로 각각 2 분간 처리하고 700 $\times$ g에서 5 분간 원심분리하였다. 슬라이드를 액손 진픽스(Axon GenePix) 4000A (액손, USA) 스캐너를 사용하여 스캔하여 TIFF 화상을 얻었다. 결과를 액손 진픽스 프로 4.0 화상분석 소프트웨어를 사용하여 분석하고, 전역 정규화를 수행하였다.
- <51> 353개의 유전자 중에서, 탄소대사, 광합성 및 호흡 전자전달 관련 유전자 158개에 대해 생장광 조건 (40 μ mol m⁻² s⁻¹, 30 $^{\circ}$ C) 하에서 10 mM 포도당 첨가 시 발현양상을 조사하였다. 그 결과, 주로 광합성과 피코빌리즘 보조 색소 및 루비스코(rubisco)는 포도당 처리에 의해 유전자 발현이 억제되는 반면, 포도당 분해에 관여하는 산화적 5탄당 인산화 경로, 아세테이트 대사, 시트르산 대사, 피루브산 대사, 호흡전자 전달에 관여하는 유전자 발현은 상향조절되는 것으로 나타났다. 탄소대사와 호흡 전자전달에 관여하는 포도당 유도성 유전자 중 발현이 2 배 이상 증가한 유전자와 발현정도를 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

시네코시스티스 PCC6803의 탄소대사 및 생체에너지 대사에 관여하는 유전자 중 생장광 조건 하에서 10 mM 포도당 첨가에 의해 발현이 2배 이상 증가한 유전자와 발현정도

카테고리	단백질	위치	유전자	유전자 발현 (배)			
				0.25 시간	0.5 시간	1.5 시간	3 시간
ATP 합성효소	CF(0)의 ATP 합성효소 A	s111322	<i>atpI</i>	1.13±0.09	1.30±0.18	2.04±0.47	2.18±0.36
NADH 탈수소효소	NADH 탈수소효소	s1r0851	<i>ndbA</i>	4.00±0.98	3.20±0.38	1.95±0.32	2.54±1.54
말단 산화효소	시토크롬 c 산화효소 서브유닛 I	s1r1137	<i>catDI</i>	1.68±0.11	2.63±0.24	2.25±0.24	1.89±0.40
OPP	트랜스케톨라제	s111070	<i>tkt</i>	1.36±0.07	1.62±0.32	1.85±0.31	1.75±0.20
해당	포도당-6-P 이성화효소	s1r1349	<i>pgi</i>	1.98±0.21	2.03±0.31	1.95±0.30	1.61±0.15
피루베이트 탈수소효소	피루베이트 탈수소효소 E1	s111721	<i>pdh</i>	1.50±0.23	1.78±0.28	2.07±0.47	2.04±0.38
아세틸 CoA 대사	PEP 카르복실화효소	s110920	<i>ppc</i>	3.28±0.55	2.58±0.29	1.76±0.35	0.83±0.05
말단 산화효소	퀴놀 산화효소 서브유닛 I	s1r1379	<i>cydA</i>	4.99±0.80	3.59±0.25	2.68±0.45	1.76±0.42

<52>

<53> 상기 표 2에 나타난 바와 같이, 8종의 선발된 포도당 유도성 유전자의 발현 양상과 변화의 추이는 서로 상이하였으나, 포도당 비처리구에 비해 최대 4배 정도까지 발현이 증가하였다.

<54> **실시예 2: RT-PCR 기법을 이용한 포도당 유도성 유전자의 확인**

<55> 상기 포도당 유도성 유전자의 발현 증가가 포도당 특이성임을 규명하고자, 포도당 (DGlc) 유도체인 L-포도당 (LGlc), O-메틸글루코스 (OMG), 2-데옥시글루코스 (2dGlc) 및 만노스 (Man) 처리 시 유전자 발현유무를 조사하였다.

<56> 먼저 칩 결과를 확인하고자, 10 mM 포도당 (D-글루코스)을 칩 실험과 동일한 조건에서 처리한 후, 상기 방법으로 RNA를 추출하였다. 1 µg의 RNA를 20 µl의 반응용액에서 역전사시켜 cDNA를 합성하였다. 이중 0.8 µl를 MJ 리서치 미니사이클(MJ Research Minicycle)을 이용하여, 95 °C에서 5 분간 초기 불활성화한 후 95 °C에서 30 초, 60 °C에서 20 초, 72 °C에서 30 초 조건으로 약 20-28회 사이클링한 후, 72 °C에서 7 분간 최종 연장하였다. mRNA 양성 대조군으로 16s rRNA를 사용하였으며 증폭 조건은 상기와 동일한 조건에서 8 사이클을 수행하였다. 상기 8종의 포도당 유도성 유전자의 프라이머는 칩 탐침 유전자와 동일한 것을 사용하였으며 16s rRNA 증폭을 위해서는 순방향 - CACACTGGGACTGAGACACG (서열번호 25), 역방향 - CCACGCCTAGTATCCATCGT (서열번호 26) 프라이머를 사용하였다. 그 결과를 도 1 (좌측)에 나타내었다. 도 1에 나타난 바와 같이, 칩 결과와 동일하게 광 조건 하에서 8종의 유전자 발현이 포도당에 의해 현저하게 증가함을 알 수 있었다.

<57> 포도당 특이성을 확인하고자, 세포를 12 시간 암 적응시켜 세포내 포도당을 고갈시킨 후, 포도당 또는 그 유도체로 30 분간 처리하였다 (Ryu J.Y., et al., *J. Biol. Chem.*, 2006, 24911). 그 결과를 도 1 (우측)에 나타내었다. 도 1에 나타난 바와 같이, 광 조건 하에서와 마찬가지로 포도당에 의해 유전자 발현이 수반되는 반면, 포도당 유도체로 처리된 4 그룹에서는 유전자 발현을 볼 수 없었다. 이로부터, 상기 8종의 포도당 유도성 유전자가 포도당에 대해 특이적으로 반응함을 알 수 있었다.

<58> **실시예 3: 포도당 유도성 유전자 프로모터가 삽입된 발광유전자 리포터 벡터 제작**

<59> 상기 선발된 8종의 포도당 유도성 유전자의 프로모터 부위를 포함하는 유전자간 염기서열 (intergenic sequences, 서열번호 1 내지 8)을 야생종 시네코시스티스 PCC6803에서 추출한 DNA (Lee J.M. et al., *Mol Cells* 2005, 19(2): 256-261)를 주형으로 하여 *Pst* I 과 *Kpn* I 링커를 붙인 프라이머를 이용하여 PCR한 후, *Pst*

I /KpnI 절단된 pILA 벡터 (젠뱅크 등록번호 AJ251840)에 클로닝하였다 (도 2 참조). 이때 사용된 프라이머의 염기서열은 아래와 같다.

- <60> sll1322: 순방향 - AACTGCAGCCTCTTTACCCCGTCAATCTCAC (서열번호 27)
- <61> 역방향 - GGGGTACCCCAAGAGGTGCAAATGTTTGCC (서열번호 28)
- <62> slr0851: 순방향 - AACTGCAGTTATCTGCTTGTTGCTTGCCAG (서열번호 29)
- <63> 역방향 - GGGGTACCGGCAAAGCCGCCCGACAATA (서열번호 30)
- <64> slr1137: 순방향 - AACTGCAGTCTGTGCTGAGTTGTGTGGTGC (서열번호 31)
- <65> 역방향 - GGGGTACCCCATGGATTCCGTTGAGCCGG (서열번호 32)
- <66> sll1070: 순방향 - AACTGCAGATAGTGGATGTAGCCCTATCCAAC (서열번호 33)
- <67> 역방향 - GGGGTACCGGCTAAAAAGCGAATGGCATTAAATA (서열번호 34)
- <68> slr1349: 순방향 - AACTGCAGTTGGTGGTTAACCACACACTGTC (서열번호 35)
- <69> 역방향 - GGGGTACCGAGGCCACCATGGTAATAAAGC (서열번호 36)
- <70> sll1721: 순방향 - AACTGCAGAGCCTTCGCCTTTGTGCCCTAAT (서열번호 37)
- <71> 역방향 - GGGGTACCCCGTCCCATTCTTCGTCAAGGG (서열번호 38)
- <72> sll0920: 순방향 - AACTGCAGAAACGCCACTATTTAGTTTTTGT (서열번호 39)
- <73> 역방향 - GGGGTACCACCATGCCATTACCAGACCAG (서열번호 40)
- <74> slr1379: 순방향 - AACTGCAGGCGTGAGTCAGCAGAAGAGGAA (서열번호 41)
- <75> 역방향 - GGGGTACCGGCAGTGACGGCAAATTGTAGC (서열번호 42)

<76> 제작된 8종의 재조합 플라스미드로 시네코시스티스를 형질전환한 후, 카나마이신으로 선별하였다. 3~4 회의 분리(segregation)를 수행한 후 하기 실시예에 사용하였다.

<77> **실시예 4: 루미노미터를 이용한 인광 측정**

<78> 상기 실시예 3에서 얻은 시네코시스티스 세포를 20 ml의 BG11 배지에서 30 °C, 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 광 조건 하에서 배양한 후, OD₇₅₀에서 0.1에 맞춰 다시 계대배양하였다. 2~3 일 경과 후 OD₇₅₀에서 0.5가 되게 세포를 수확한 후 100 μl 의 BG11 배지에 재현탁하였다. 여기에 루시페라제의 기질인 데칸올 10 μM 을 첨가하여 10 초씩 루미노미터 (20/20ⁿ, 터너 바이오시스템즈(Turner Biosystems), USA)를 사용하여 인광을 측정하였다. 포도당 첨가에 의한 발광 증가는 세포에 10 mM 포도당을 첨가하여 1 시간 동안 반응시킨 후 측정하였다.

<79> LuxA/LuxB 유전자를 포함하는 플라스미드 pILA를 갖는 균주를 대조구로 하여 pgi, cydA, ppc, atpI, ndbA, pdh, tkt 및 ctaD1의 프로모터 부위를 포함하는 균주에 각각 10 mM의 포도당을 생장광 조건 하에서 1 시간 처리한 후, 상기의 방법으로 생물발광량을 측정하고, 그 결과를 도 3에 나타내었다. 도 3에 나타낸 바와 같이, 대조구 균주에 비해 포도당 유도성 유전자의 프로모터 부위를 함유하는 균주는 적게는 2배에서 많게는 약 40배까지 포도당 처리에 의해 생물발광량이 증가하였으며, pdh와 tkt 프로모터 부위를 함유하는 균주가 가장 강력한 활성을 나타내었다. 이러한 포도당 유도성 생물발광량 증가결과는 상기 방법으로 성공적으로 포도당 유도성 프로모터를 활용한 생물검정용 바이오센서를 개발하였음을 의미하는 것이다.

<80> **실시예 5: 에너지 대사 억제제와 항생제에 대한 바이오센서의 감수성 측정**

<81> 상기 바이오센서가 ATP 생산을 억제하는 여러 가지의 대사물질에 의해 민감하게 영향을 받는지를 조사하였다. 광합성 기구의 광계2에 작용하는 제초제 디우론(diuron)의 일종인 DCMU (dichlorophenyl dimethyl urea: D), 호흡전자전달계의 NAD(P)H 탈수소효소의 작용을 억제하는 Hg²⁺ (H)와 로테논 (R), 시토크롬 b₆/f 복합체 환원을 억제하는 DBMIB (dibromothymoquinone: B), 말단 시토크롬 옥시다제를 억제하는 CN⁻ (C), 전자전달에 의한 양성자 기울기 발달을 억제하는 짝폴림인자인 CCCP (carbonylcyanide m-chlorophenylhydrazone: CP) 등 (Ryu J.Y. et al., *Mol Cells*, 2003, 15, 240-244; Ryu J. Y. et al., *J. Biol. Chem.* 2004, 279:25320-25325)을 10 mM

포도당으로 12 시간 처리된 ILA, ctaD1 및 pdh 균주에 처리하고, 그 결과를 도 4에 나타내었다. 도 4에 나타낸 바와 같이, ILA 균주에 비교하여, ctaD1 및 pdh 균주의 경우, 포도당에 의해 생물발광량이 2배 및 7배 이상 높았다 (대조구, Co). 한편, 전자전달억제제의 처리에 의해 생물발광량이 감소하였는데, 특히 DCMU와 Hg^{2+} 가 동시에 처리된 경우 (DH) 현저하게 억제되었다. 또한, mRNA 합성과 단백질 생합성 억제제인 리팜피신 (Rf)과 클로람페니콜 (CR)이 처리되었을 경우에도 각각 20%와 50%의 저해효과를 보여주었다. 유전자 발현 억제제가 대사억제제에 비해서 저해 효과가 미약한 것은 LuxA/LuxB 생물발광 시스템이 유전자 발현에 의해서보다는 세포내 ATP 함량에 더욱 민감하게 반응함을 의미한다. 이는 Shao 등에 의해서 개발된 라이트-오프 어세이 시스템이 세포내 ATP 생합성이 원활하지 못할 경우 환경 위해물질 검출에 한계가 있을 수 있음을 의미한다. 또한, ctaD1 균주보다는 pdh 균주가 각각의 저해물질에 보다 민감하게 반응함을 알 수 있었다.

<82> 실시예 6: 우리나라 수서환경 위해물질 기준치 농도에서 바이오센서로서의 효능 검증

<83> 우리나라 하천 호소 및 해역에서 유해/오염물질로 분류되는 항목 중 시안 (0.01 ppm), 수은 (0.0005 ppm), 아연 (0.1 ppm) 및 구리 (0.02 ppm)의 기준치 (환경정책기본법 제10조, 동법 시행령 제2조 <별표 1>) 조건에서 검출 유무를 조사하였다. 유해물질이 처리되지 않은 대조구 (Co)에 비해서 기준치 농도에서 각 유해물질을 각각 4 시간 처리한 후 발광을 측정하였다. 그 결과를 도 5에 나타내었다. 도 5에 나타낸 바와 같이, ctaD1과 pdh 유전자의 프로모터를 포함하는 바이오센서 모두에서 수은 (Hg^{2+}), 시안 (CN^-) 및 아연 (Zn^{2+})에 대해 약 50-70%의 억제를 보였다. 또한, pdh 바이오센서가 ctaD1 센서보다 구리 (Cu^{2+})에 보다 민감하게 반응하였다. 따라서, 포도당 유도성 프로모터를 갖는 시네코시스티스 바이오센서는 우리나라 수환경의 유해물질을 검출하는데 적용될 수 있을 것으로 판단된다.

발명의 효과

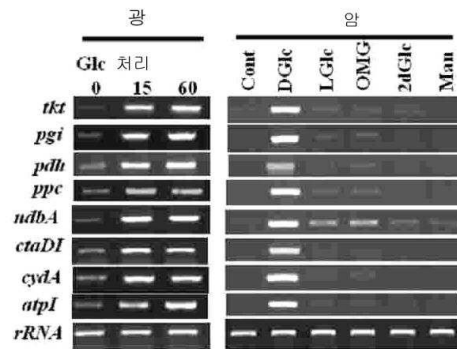
<84> 상기한 바와 같이, 본 발명에 따른 포도당 유도성 프로모터 부위를 갖는 시네코시스티스 바이오센서는 포도당을 감지하는 기능을 가지며, 특히 매우 활동적인 물질대사 상태를 유지하므로 현저히 증가된 감도를 갖는다. 또한, 바이오센서 작동에 필요한 에너지인 ATP 생산을 교란하는 환경독성 물질, 예를 들어 중금속, 시안, 제초제, 탄소원의 양적 변화에 민감하게 반응할 뿐 아니라, 포도당 유도성 유전자의 전사와 번역 억제제에도 민감하게 반응한다. 따라서, 본 발명은 포도당과 같은 영양물질이나 중금속, 시안을 검출하거나 제초제나 항생제의 생체검정에 사용될 바이오센서를 제공함으로써, 제약산업, 항생제나 제초제와 같은 신약개발이나 수생태계 환경독성 물질 검출 및 잔류농약이나 중금속의 실시간·비파괴적 검출에 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- <1> 도 1은 시네코시스티스 PCC6803으로부터 선발된 8종의 포도당 유도성 유전자의 발현이 포도당 특이적임을 광 (좌측) 및 암 (우측) 조건 하에서 RT-PCR 기법으로 분석한 결과를 보여주는 사진이고;
- <2> 도 2는 포도당 유도성 프로모터가 삽입된 재조합 Lux 리포터 벡터 (재조합 pILA)의 모식도이며;
- <3> 도 3은 포도당 처리 시 각각 pILA 및 재조합 pILA로 형질전환된 시네코시스티스의 생물발광량 측정결과를 나타낸 그래프이고;
- <4> 도 4는 중금속, 시안, 제초제 또는 유전자 발현 저해제의 존재 하에서 각각 pILA 및 재조합 pILA로 형질전환된 시네코시스티스의 생물발광량 측정결과를 나타낸 그래프이며;
- <5> 도 5는 환경부 기준농도의 위해물질의 부재/존재 하에서 재조합 pILA로 형질전환된 시네코시스티스 (ctaD1 및 pdh)의 생물발광량 측정결과를 나타낸 그래프이다.

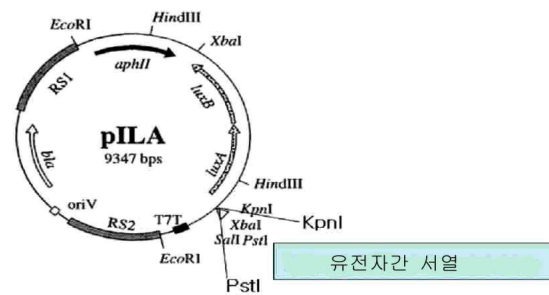
도면

도면1

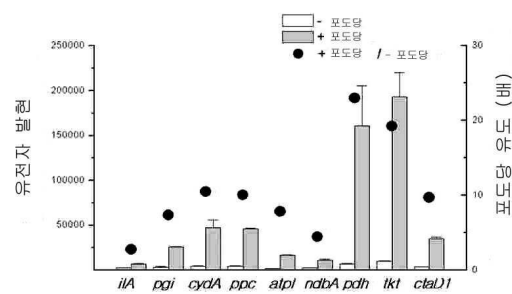


도면2

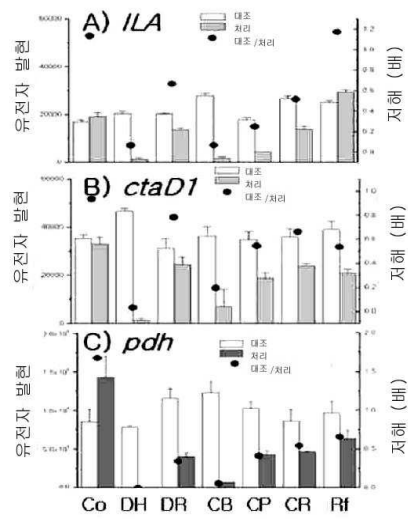
리포터 벡터
(Kunert et al., 2000, JMM)



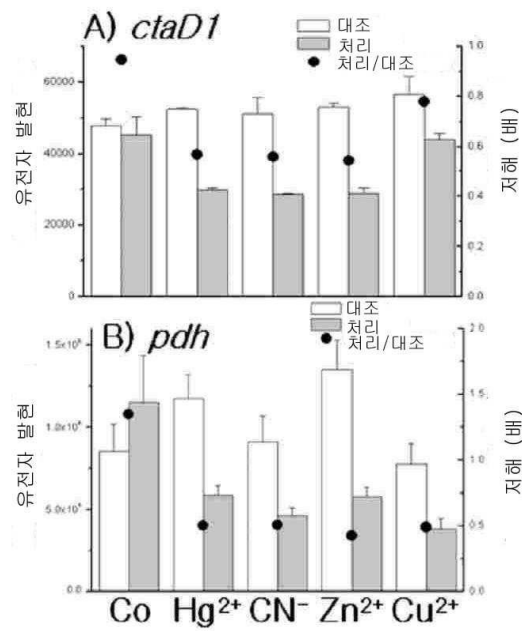
도면3



도면4



도면5



서열목록

<110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)

<120> Glucose inducible biosensors derived from cyanobacteria

<160> 42

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 168

<212> DNA

<213> Synechocystis PCC6803

<220>

<221> promoter

<222> (1)..(168)

<223> Promoter for atpI

<400> 1

aactgcagcc tctttacccc gtcaatctca ccgaataaca atgttagctg gtttgagtgt 60

tttaaatgtg tttcctctag ctgccctgga agtgggtcag cagtgggtatt gggaaattgg 120

gaacctcaaa ttacacgggc aaacatttgc aacctcttgg ggtacccc 168

<210> 2

<211> 577

<212> DNA

<213> Synechocystis PCC6803

<220>

<221> promoter

<222> (1)..(577)

<223> Promoter for ndbA

<400> 2

aactgcagtt atctgcttgg tttgcttgcc agtggctagt ttaggcttag ctccctaattt 60

cgctctggga ttgggcttga cagtgttgac tggcttaggt tttgcactct gggctggttt 120

gggcaaatTT aaacaatctt ttTaccaagg caaccccaTT cccccaagaa atattcttga 180

taaaggctaa ctgctTTTT ctgtgattaa aaacctttgc aatggagtat tgagcataat 240

tttattgccg aaagtaagac cattaaactg aatctaagag cctgtttaaa agcccccttg 300

acccccaaat ttggggggac actgactgaa agtccccag tattgccgga gccttagtga 360

gttaatttag aggatggaat aaaactttcc aaacacgttc caacgtcagg gtttgccaa 420

gaataatcga tatctttgta acaaccatta ccggtaatcc ccaaggaaat gattaccatt 480

aacaaatcgt aatattttcg ccgttgctaa tgaattcccc cactctccc cgtcgtccc 540

atgtggttat tgtcgggggc ggctttgccg gtacccc 577

<210> 3

<211> 351

<212> DNA

<213> Synechocystis PCC6803

<220>

<221> promoter

<222> (1)..(351)

<223> Promoter for catD1

<400> 3

tctgtgctga gttgtgtggt gcttaccatg ggggcatgaa atcggctctt tacgcccata 60

ccccgaaga gtatgacgac tgggtggcgg ccaatgctcc ggctccaacg gaatccatgg 120

caatgacatt gcccaaagcg accaccgcca tgaccccaa cgaatattta gcccctatg 180

cgaaagaaat gggagtacaa actgaagctt tagcccaatt aaaagatcaa acctctccgg 240

ttggagatct actctgattt ggttgaaca cctaaccttg agtcgtactg gtcagttttg 300

ctttaaaacc ctgtaaattt tgacaaattt ggtagaaaac tttttatgac t 351

<210> 4

<211> 277

<212> DNA

<213> Synechocystis PCC6803

<220>

<221> promoter

<222> (1)..(277)

<223> Promoter for tkt

<400> 4

aactgcagat agtggatgta gccctatcca actcctttgg ttttgggtggc cataacgtca 60

ccttagcttt caaaaaatat caatagccca ccgaaaaatt tcccgaaccg tgggaagatg 120

gtagcaattt ggctgcctt ggcccctacc attaccgccc cccggtggat attgacccaa 180

ttattgctag tttatttttc caaacattaa tggtcgttgc taccagtc ttagacgaac 240

tttctattaa tgccattgcg tttttagccg gtacccc 277

<210> 5

<211> 111

<212> DNA

<213> Synechocystis PCC6803

<220>

<221> promoter

<222> (1)..(111)

<223> Promoter for pgi

<400> 5

ttggttggtta accacacact gtcgccaac ttgccccatt ttgctcgcag ggaattttct 60

ggggttggtg ttgcgggaaa agccttggcg atcgcccttt tttgtcctca a 111

<210> 6

<211> 277

<212> DNA

<213> Synechocystis PCC6803

<220>

<221> promoter

<222> (1)..(277)

<223> Promoter for pdh

<400> 6

aactgcagag ccttcgcctt tgtgcctaa tcgacatcca ccttgtccc ctgactaaaa 60

tctccgctat ggtggccagc cagtgtgtca aaatactaga ttgttgtgcc ccgacgccc 120

ttgcttggtt tgcctacacc ggaccaacaa ggagagatgc ggcggcggtc taaattgtta 180

ttaaaaacta agttttcccc cagaaatcaa tggctgagac cctactgttt gccgcctac 240

gccaaaccct tgacgaagaa atgggacggg gtacccc 277

<210> 7

<211> 309

<212> DNA

<213> Synechocystis PCC6803

<220>

<221> promoter

<222> (1)..(309)

<223> Promoter for ppc

<400> 7
aaacgccact atttagtttt tgttcatctia tggttgcggt gattttggct tttagtgtcc 60

tagtccattg tcttcttctt cccctctctc caggggtttt tttctgccct aatctgggag 120

gggcatcgac aaatcgctgg ctgtagcctg ggatgcggag tgaggtaggg ataatcccgt 180

agtatcttgt acagtagcaa cgcattctgg atgttgtag cgtcaccatc ttgtcctaga 240

ggttcccata tgaacttggc agttctctga ttcgggtctt ccaactaactg gtctggtaat 300

ggcaatggt 309

<210> 8
<211> 127
<212> DNA
<213> Synechocystis PCC6803

<220>
<221> promoter
<222> (1)..(127)
<223> Promoter for cydA

<400> 8
gcgtgagtca gcagaagagg aatgtagctg acaatacaga gactttacct gggatttctg 60

ttagttttga gcaggggata ggggtgggcac aactctcttc tttttttaaa ctctaactat 120

cagaaaa 127

<210> 9
<211> 20
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Forward primer for atpI

<400> 9

attgggaaat tgggaacctc

20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Reverse primer for atpI

<400> 10

actcgtccgc aaggatgtta

20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Forward primer for ndbA

<400> 11

ccatacgcca acgaattttt

20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Reverse primer for ndbA

<400> 12

aactggccac actcaaatcc

20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Forward primer for catD1

<400> 13

cggttggtta cggatgttct

20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Reverse primer for catD1

<400> 14

gtggaagcgg ctaaacgta

20

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Forward primer for tkt

<400> 15

gcctttaccc tgtggaacaa

20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Reverse primer for tkt

<400> 16

cttgctcaca tcttcggtga

20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Forward primer for pgi

<400> 17

gacaaaatcc agcggtctta

20

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Reverse primer for pgi

<400> 18

gacgttcacc aaggaacat

20

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Forward primer for pdh

<400> 19

tgggagaaga tgtgggactc

20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Reverse primer for pdh

<400> 20

taatgaccg atgggttttc

20

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Forward primer for ppc

<400> 21

ccgaacaagg ggaagtgtta

20

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Reverse primer for ppc

<400> 22

ggaaagggtc atttcacct

20

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Forward primer for cydA

<400> 23

ggtggcttta cccaacgata

20

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Reverse primer for cydA

<400> 24

gcgactgccg aaatagagag

20

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Forward primer for 16s rRNA

<400> 25

cacactggga ctgagacacg

20

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Reverse primer for 16s rRNA

<400> 26

ccacgcctag tatccatcgt

20

<210> 27

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Forward Primer for atpI

<400> 27

aactgcagcc tctttacccc gtcaatctca c

31

<210> 28

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Reverse primer for atpI

<400> 28

ggggtacccc aagaggttgc aaatgtttgc c

31

<210> 29

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Forward primer for ndbA

<400> 29

aactgcagtt atctgcttgg ttgcttgcc ag

32

<210> 30

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Reverse primer for ndbA

<400> 30

ggggtaccgg caagccgcc cccgacaata

30

<210> 31

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Forward primer for catD1

<400> 31

aactgcagtc tgtgctgagt tgtgtggtgc

30

<210> 32

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Reverse primer for catD1

<400> 32

ggggtacccc atggattccg ttggagccgg

30

<210> 33

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Forward primer for tkt

<400> 33

aactgcagat agtggatgta gccctatcca ac

32

<210> 34

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Reverse primer for tkt

<400> 34

ggggtaccgg ctaaaaagcg aatggcatta ata

33

<210> 35

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Forward primer for pgi

<400> 35

aactgcagtt ggtggttaac cacacactgt c

31

<210> 36

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Reverse primer for pgi

<400> 36

ggggtaccga ggccaccatg gtaataaagc

30

<210> 37

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Forward primer for pdh

<400> 37

aactgcagag ccttcgcctt tgtgcctaa t

31

<210> 38

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Reverse primer for pdh

<400> 38

ggggtacccc gtccatttc ttcgtcaagg g

31

<210> 39

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Forward primer for ppc

<400> 39

aactgcagaa acgccactat ttagtttttg tt

32

<210> 40

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Reverse primer for ppc

<400> 40

ggggtaccac cattgccatt accagaccag

30

<210> 41

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Forward primer for cydA

<400> 41

aactgcaggc gtgagtcagc agaagaggaa

30

<210> 42

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Reverse primer for cydA

<400> 42

ggggtaccgg cagtgacggc aaattgtagc

30