



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0086790
(43) 공개일자 2024년06월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 14/245 (2006.01) A61K 35/74 (2015.01)
A61K 38/00 (2006.01) A61K 47/64 (2017.01)
A61K 49/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01) C12N 15/70 (2006.01)
C12N 15/74 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 14/245 (2013.01)
A61K 35/74 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-0168743

(22) 출원일자 2022년12월06일

심사청구일자 2022년12월06일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

한국과학기술연구원

서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)

(72) 발명자

이효진

대전광역시 유성구 노은서로250번길 69-9(지족동)

전홍진

대전광역시 서구 복수서로 50, 105동 301호(복수동, 삼익목화아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김원준

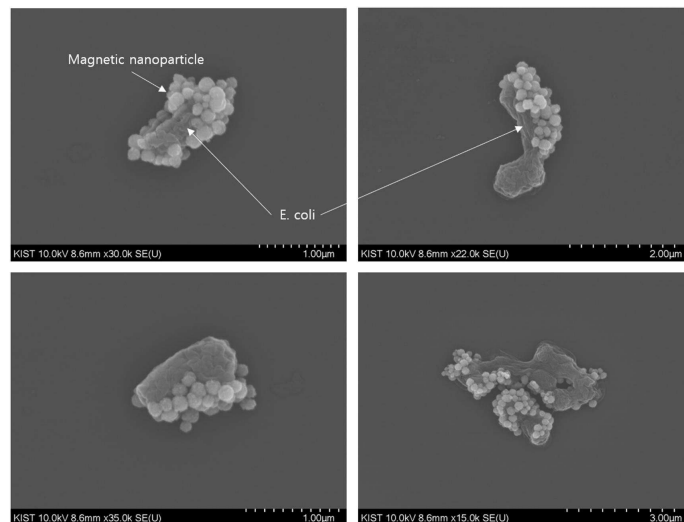
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 strep-tag 결합물질에 대한 결합능을 가지는 융합단백질을 암호화하는 유전자 구조물 및 이를 함유하는 발현벡터, 재조합 균주 및 항암 조성물

(57) 요약

본 발명은 종양세포에 표적화되는 균주에서 'strep-tag 결합물질'에 대한 결합능을 가지는 융합단백질을 암호화하는 유전자 구조물과, 이를 포함하는 재조합 발현벡터, 재조합 균주 등에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 그람 음성 박테리아의 curli 관련 CsgA 유전자(서열1)의 C-말단에 strep-tag 유전자(서열2)가 연결되어 'strep-tag 결합물질'에 대한 결합능을 가지는 융합단백질을 암호화하는 유전자 구조물에 관한 것이다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A61K 38/00 (2013.01)
A61K 47/64 (2017.08)
A61K 49/0056 (2013.01)
A61K 49/0097 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
C12N 15/62 (2013.01)
C12N 15/70 (2013.01)
C12N 15/74 (2013.01)
C07K 2319/22 (2013.01)

김세훈

서울특별시 성북구 화랑로14길 5

(72) 발명자

서승범

서울특별시 성북구 화랑로14길 5

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711173147
과제번호	2022M3H4A1A03085355
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	나노소재기술개발
연구과제명	(2022M3H4A1A03076638) 종양 저산소증 표적 유전자 변형 박테리아 셔틀 개발
기 여 율	25/100
과제수행기관명	충남대학교
연구기간	2022.04.21 ~ 2023.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465036177
과제번호	HR20C0025040022
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	연구중심병원 육성 R&D
연구과제명	암대사 리프로그래밍 · 유전자 · 면역 치료 플랫폼 구축
기 여 율	25/100
과제수행기관명	충남대학교병원
연구기간	2020.07.16 ~ 2028.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711173552
과제번호	2022M3H4A1A03076638
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	나노소재기술개발
연구과제명	박테리아 셔틀 유도 나노소재 및 펩타이드 광원 기반 차세대 항암 기술 개발
기 여 율	50/100
과제수행기관명	한국과학기술연구원
연구기간	2022.04.21 ~ 2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

그람 음성 박테리아의 curli 관련 CsgA 유전자의 C-말단에 strep-tag 유전자가 연결되어 strep-tag 결합물질에 대한 특이적 결합능을 가지는 융합단백질을 암호화하는 유전자 구조물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 strep-tag 결합물질은 biotin, avidin, streptavidin 및 strep-tactin을 포함하는 것을 특징으로 하는 유전자 구조물.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 CsgA 유전자와 strep-tag 유전자는 직접 연결되어 있거나, 링커를 통하여 연결된 것을 특징으로 하는 유전자 구조물.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

strep-tag 유전자는 연속하여 또는 소정의 링커를 매개로 복수개 결합되는 것을 특징으로 하는 유전자 구조물.

청구항 5

청구항 1에 의한 유전자 구조물을 함유하는 재조합 발현벡터.

청구항 6

청구항 4에 있어서,

상기 유전자 구조물에 대한 유도성 프로모터를 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 재조합 발현벡터.

청구항 7

청구항 5 또는 6에 의한 재조합 발현벡터로 형질전환되어 세포외막 표면에 융합단백질을 발현하는 재조합 균주.

청구항 8

청구항 7에 있어서,

상기 균주는 종양세포에 표적화되는 균주인 것을 특징으로 하는 재조합 균주.

청구항 9

청구항 7에 있어서,

상기 균주는 csgA-his-streptag2-pBad18-asd+/살모넬라 aroA aroD asd- [수탁번호 KCTC15224BP]인 것을 특징으로 하는 재조합 균주.

청구항 10

청구항 8에 의한 재조합 균주와,

strep-tag 결합물질과 결합된 항암제를 포함하는 항암 어쥬버트.

청구항 11

청구항 8에 의한 재조합 균주와,

strep-tag 결합물질과 결합된 조영제를 포함하는 종양 영상화 어쥬버트.

청구항 12

(A) 암 의심 환자 또는 항암 치료 중인 환자에 청구항 7에 의한 재조합 균주를 투여하는 단계;

(B) 상기 재조합 균주가 유도성인 경우 상기 융합단백질의 발현을 유도하는 단계;

(C) 상기 환자에게 strep-tag 결합물질과 결합된 조영제를 투여하는 단계; 및

(D) 상기 조영제를 검출하여 영상화하는 단계;를

포함하는 암 진단 또는 암 진행상황 진단을 위한 정보 제공 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 종양세포에 표적화되는 균주에서 'strep-tag 결합물질'에 대한 결합능을 가지는 융합단백질을 암호화하는 유전자 구조물과, 이를 포함하는 재조합 발현벡터, 재조합 균주 등에 관한 것으로서, 재조합 균주 자체가 항암 활성을 나타낼 뿐 아니라 strep-tag에 특이적으로 결합하는 'strep-tag 결합물질'로 표지된 항암물질 또는 조영제와 함께 종양세포의 진단과 치료에 유용하게 사용될 수 있는 항암제, 항암 어쥬버트 및 종양의 영상화 보조제에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 암은 세포의 증식 활동이 멈추지 않아 주변 조직으로 파고들어 정상세포를 파괴하는 것에 의해 결국에는 생명을 위협하는 질환이다.

[0003] 질병의 치료에 가장 효과적인 대응 체계는 면역력을 강화하는 것이나, 암세포는 외부 침입자가 아니기 때문에 인체의 면역반응을 유발하지 않고 회피한다. 특정 바이러스 또는 박테리아는 정상세포보다 암세포에 더 많이 감염되고, 감염된 박테리아가 면역세포의 공격대상이 될 수 있다. 이에 일부러 특정 바이러스 또는 박테리아를 감염시켜 인체 면역반응을 자극하는 항암치료 방법들이 제시되었다.

[0004] 시겔라(Shigella), 콜레라균(Vibrio cholera), 대장균(E.coli), 비피도박테리움(Bifidobacterium)과 같은 균주들은 살모넬라균과 마찬가지로 장관의 세포에 침투하며 암세포에 표적화되는 특성을 지닌다. 이들 균주는 병원

성이 낮기 때문에 패혈증에 대한 우려없이 안전하게 사용할 수 있다는 장점이 있다. 이에 암을 진단하거나, 항암치료에 도움이 되는 물질들을 발현 또는 억제시킬 수 있는 균주들을 개발하고, 이를 항암치료에 이용하고자 하는 연구들이 이루어지고 있다(특허문헌 참조).

[0005] Leschner 등(비특허문헌1)은 표지된 살모넬라균을 항암면역치료에 효과적으로 사용할 수 있음을 시사하였다. 미국 예일대학 연구팀은 살모넬라를 유전자 조작하면 종양을 공격하는 특성은 유지하면서 독성만 제거하여 약독화할 수 있으며, 상기 약독화된 살모넬라의 주입을 통해 면역 자극을 유도하여 종양을 억제할 수 있다고 발표하였다.

[0006] *E.coli* Nissle (EcN)은 1917년에 알프레드 니슬(Alfred Nissle, 1874~1965) 박사에 의해 발견되었는데, 100여 년 간의 다양한 안전성 시험을 통해서 장 독소(Shiga toxins, Heat-stable ant heat-labile toxins), 세포독소, 침윤성, 병원성 점착인자, 용혈액, 혈청 내성, 항생제 내성 유전자 등이 없음이 밝혀져 있다. 이 균주의 비병원성은 유전자 단위까지 해독이 되어 있어 다양한 용도로 안전하게 활용되고 있다.

[0007] 공개특허 제10-2022-0058461호는 암에 표적화하는 숙주세포(대장균, 살모넬라)에 스트렙타비딘을 암호화하는 유전자를 도입하여 암 진단에 이용할 수 있음을 게시하였다. 그러나 상기 특허에서는 스트렙타비딘 유전자만을 도입하는 경우에는 그 발현량이 낮고, 발현을 증가시키기 위해서 말토오즈 결합 단백질을 추가로 도입하는 경우에는 바이오틴과의 결합력이 약화되어 특정 구조의 유전자 구조물에 의해서만 스트렙타비딘의 발현량을 증가시키면서 바이오틴과의 결합능이 유지되었다. 또한 해당 유전자 구조물에 의하면 숙주세포의 주변세포질(periplasm)에 머물러 있는 것이고, 분비되는 것은 아니었다. 그러나 스트렙타비딘이 균주의 내부에만 머무는 경우, 균주에 흡수된 바이오틴 함유 물질과만 결합하므로 오히려 활용성이 저하되며 특히 항암 어쥬번트로 사용되는 경우 외부에서 투여된 항암 물질이 종양세포에 타겟팅되는 것이 아닌 숙주세포 내부에 타겟팅되므로 항암 효능을 발휘하기 어려운 문제가 있다. 또한 발현된 스트렙타비딘이 분비되지 못하고 숙주세포에 축적됨에 따라 숙주세포의 생존에도 영향을 미칠 수 있다.

[0008] 필러스(pilus, 복수는 pili)는 박테리아 부착 및 집락화, 숙주 감염 등에 관여한다. 위에서 언급된 살모넬라, 시겔라, 콜레라, 대장균, 비피도박테리움 등은 그람 음성 박테리아로서, 세포외막 표면에 고도로 집적된 pilus의 일종인 curli fiber를 가지고 있다. curli 관련 유전자는 CsgA, CsgB, CsgC, CsgD, CsgE, CsgF 및 CsgG 등이 있는데, 이 중 CsgA는 curli 단백질의 주요 하위 단위로서 세포외막 표면에 결합된 CsgB에 CsgA들이 차례로 결합하여 세포외막 표면에 fiber를 형성하는 것으로 알려져 있다(도 1 참조, 비특허문헌2 참조).

[0009] strep-tag는 streptavidin의 코어에 특이적으로 결합할 수 있도록 개발된 8개의 아미노산으로 구성된 펩타이드로서, biotin, avidin, streptavidin, strep-tactin(결합력이 대폭 증대된 streptavidin 개량 단백질) 등과 결합 속도가 매우 빠르고, 결합력 또한 매우 강력하여 pH나 온도, 유기용매에 의한 영향이 적기 때문에 특정 단백질의 검출 또는 정제 등에 유용하게 사용되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 공개특허 제10-2022-0058461호

비특허문헌

[0011] (비특허문헌 0001) 비특허문헌1 : J. Mol. Med. 2010, 88, 763-773

(비특허문헌 0002) 비특허문헌2 : J Bacteriol, 191 (2): 608-615

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명은 종래기술의 문제를 해결하기 위하여, biotin, avidin, streptavidin, strep-tactin 등에 대한 결합능을 갖는 융합 막단백질을 안정적으로 발현 및 분비할 수 있도록 하는 유전자 구조물을 제공하는 것을 목적으

로 한다.

- [0013] 본 발명의 다른 목적은 암세포에 표적화되는 균주로서 상기 구조물에 의해 형질전환된 암세포 표적화 재조합 균주 및 이 재조합 균주를 함유하는 항암 조성물을 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 재조합 균주 및 biotin, avidin, streptavidin, strep-tactin 등과 결합된 항암물질 또는 조영제를 종양 부위로 표적화시켜 항암효능 또는 영상화 효능을 향상시킬 수 있는 항암 어쥬번트(adjuvant) 또는 종양 영상화 어쥬번트를 제공하는 것이다.
- [0015] 본 발명은 또한 상기 종양 영상화 어쥬번트를 이용한 암 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0016] 전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은, 그람 음성 박테리아의 curli 관련 CsgA 유전자(서열1)의 C-말단에 strep-tag 유전자(서열2)가 연결되어 'strep-tag 결합물질'에 대한 결합능을 가지는 융합단백질을 암호화하는 유전자 구조물인 것을 특징으로 한다. 본 발명에서 상기 'strep-tag 결합물질'은 strep-tag에 특이적으로 결합하는 단백질로서 biotin, avidin, streptavidin 및 strep-tactin을 포함하며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0017] 본 발명의 유전자 구조물에서 상기 CsgA 유전자와 strep-tag 유전자는 직접 결합되어 있거나, 혹은 링커를 통하여 연결될 수 있다. 하기 실시예에서는 GGSS-HIS*6-SSGG로 이루어진 아미노산 서열을 암호화하는 유전자 서열 앞에 AAAAAA가 붙어있는 서열(이하 단순히 'HIS', 'HIS*6' 또는 'H6'이라 표현하기도 함; 서열3)을 갖는 링커를 매개로 CsgA 유전자와 strep-tag 유전자가 결합된 구조물(도 1a, 1b 참조)을 예시하였으나, 링커가 이에 한정되는 것은 아니다. 더 우수한 발현 효율을 나타내도록 추가적인 링크 최적화가 이루어질 수 있음은 당연하며, 당업자라면 링커의 길이나 서열을 적절하게 변형하는 것은 용이할 것이다.
- [0018] 본 발명의 유전자 구조물에서 상기 strep-tag 유전자는 하나 또는 복수개일 수 있는데, 복수개일 경우 소정의 링커가 개재될 수 있다. 하기 실시예에서는 strep-tag 유전자가 하나인 예와, 아미노산 서열 GGSS를 암호화하는 유전자 서열의 링커(GGCGGCAGCAGC; 서열4)를 매개로 두 개가 연결된 예가 제시되었다. strep-tag 유전자의 수나 링커의 길이나 서열은 최적화를 위해서 적절하게 변형될 수 있을 것이다.
- [0019] 발현 효율을 향상시키기 위하여 본 발명의 유전자 구조물의 전단에 샤인-달가노(shine-dalgarno) 서열을 배치할 수 있다. 또한 본 발명의 유전자 구조물을 벡터에 도입할 수 있도록 전단과 후단에 적절한 제한효소를 배치할 수 있음은 당연하다. 하기 실시예에서는 유전자 구조체의 앞뒤에 클로닝을 위한 NheI 사이트와 HindIII 사이트를 삽입하였다.
- [0020] 본 발명은 또한 상기 유전자 구조물을 함유하는 재조합 발현 벡터에 관한 것이다. 본 발명에서 "벡터"는 적합한 숙주내에서 본 발명의 융합단백질을 발현시킬 수 있도록 작동가능하게 연결된 DNA로, 플라스미드, 파지 입자 또는 잠재적 게놈 삽입물일 수 있다. 본 발명의 명세서에서 플라스미드와 벡터는 때로 호환적으로 사용된다. 상기 발현 벡터는 유전자 구조물의 서열에 따라 효율이 높은 것을 선택하여 사용할 수 있음은 당연하다. 본 발명의 하기 실시예에서 플라스미드는 유도성 프로모터를 가지고 있어 상기 융합단백질의 발현을 제어할 수 있도록 하였지만, 필요에 따라서 구성적 프로모터를 가지고 있는 플라스미드를 이용하여 융합단백질이 상시적으로 발현되도록 하는 것도 가능할 것이다.
- [0021] 아울러, 본 발명은 상기 재조합 발현벡터로 형질전환되어 세포외막 표면에 융합단백질을 발현하는 재조합 균주에 관한 것이다. 이때 상기 균주는 종양세포에 표적화되어 면역 항암 활성을 나타내, 인체에 무해한 균주일 수 있다. 이러한 균주의 예로는 대장균이나 약독화 살모넬라균, 시겔라, 아시네토박터균, 녹농균, 리스테리아, 클로스트리디움 또는 장내미생물(유익균), 프로바이오틱스 등을 들 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 하기 실시예에서는 무해 대장균과 약독화 살모넬라균을 숙주 균체로 사용하였으며, 이 중에서 csgA-his-streptag2-pBad18-asd+/살모넬라 aroA aroD asd-를 기탁하여 수탁번호 KCTC15224BP를 부여받았다.
- [0022] 본 발명은 또한 상기 재조합 균주를 유효성분으로 함유하는 항암 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 항암 재조합 균주는 그 자체로 종양 부위에 표적화되어 면역 항암 활성을 나타내기 때문에 항암 조성물로 사용될 수 있다.
- [0023] 나아가 본 발명은 상기 항암 재조합 균주와, strep-tag 결합물질과 결합된 항암제를 포함하는 항암 어쥬번트에 관한 것이다.

[0024] 진술한 바와 같이 본 발명의 균주는 종양 세포에 표적화되고, 상기 융합단백질이 발현(구성적 발현 또는 유도적 발현)되어 균주 세포외막 표면에 존재하게 된다. 따라서 상기 균주와 'strep-tag 결합물질과 결합된 항암제'를 함께 투여하는 경우—하기 실시예에서처럼 플라스미드가 유도성인 경우 적절한 시점에 유도제도 투여— 상기 항암제를 종양 세포에 표적화시킬 수 있다. 따라서 다른 장기에 미치는 항암제의 부작용을 최소화하고 항암 활성을 증가시킬 수 있으며, 더 적은 용량으로도 항암활성을 나타낼 수 있도록 하여 부작용으로 인한 환자들의 부담을 줄일 수 있다.

[0025] 항암제로는 그 자체로 종양 세포에 표적화되는 능력이 없거나 적으면서 항암활성을 나타내는 나노입자, 항체, 항암단백질 또는 소분자 물질로서 상기 융합단백질과 특이적으로 결합하는 'strep-tag 결합물질'로 표시될 수 있다면 어떤 것이든 무방하다.

[0026] 한편, 본 발명에서 'strep-tag 결합물질'로 표시된 항암제는 상기 융합단백질에 결합되어 항암제의 배출(결합해체 종양 세포로 투입)이 적절하게 조절되므로 서방성 제제로 작용할 수도 있을 것이다.

[0027] 본 발명은 또한 상기 재조합 균주와, strep-tag 결합물질과 결합된 조영제를 포함하는 종양 영상화 어쥬먼트에 관한 것이다. 상기 재조합 균주와, 'strep-tag 결합물질과 결합된 형태의 조영제'와 병용 투여되면 조영제가 종양 부위에 표적화되는 것에 의해 종양 조직의 영상화 효능을 향상시킬 수 있는 종양 영상화 어쥬먼트로 사용될 수 있다. 상기 조영제로는 방사성 핵종, 형광 표지, 효소 표지, 화학 발광 마커, 금 제제 및 자성제제로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 사용할 수 있으며, 조영제의 종류에 따라 영상화 방식을 결정하는 것은 당업자에게는 용이할 것이다. 본 발명의 종양 영상화 어쥬먼트는 단순히 종양의 영상화 효율을 향상시키는 데 그치지 않고 그 자체로 항암 활성을 나타내기 때문에 암 환자들에게 더욱 유익한 효과를 나타낼 수 있다.

[0028] 본 발명의 종양 영상화 어쥬먼트는 암 진단을 위한 정보 제공에 유용하게 사용될 수 있다. 예를 들어 암 진단을 위한 정보 제공은 (A) 암 의심 환자 또는 항암 치료 중인 환자에 종양 표적화 특성을 가진 상기 재조합 균주를 투여하여 종양세포에 표적화하는 단계; (B) 상기 재조합 균주가 유도성인 경우 상기 융합단백질의 발현을 유도하는 단계; (C) 상기 환자에게 strep-tag 결합물질과 결합된 조영제를 투여하는 단계; 및 (D) 상기 조영제를 검출하여 영상화하는 단계;를 포함하는 방법에 의해 이루어질 수 있다.

발명의 효과

[0029] 이상과 같이 본 발명의 유전자 구조물에 의하면, 종양세포에 표적화되어 면역 항암 활성을 나타내는 항암 균주에 도입되어 'strep-tag 결합물질'과 특이적으로 결합하는 융합단백질을 세포외막 표면에 발현되도록 할 수 있다.

[0030] 따라서 본 발명의 유전자 구조물이 도입된 항암 재조합 균주는 그 자체로 항암 활성을 나타낼 수 있을 뿐 아니라, 항암제 또는 조영제를 종양에 표적화시킬 수 있어 항암 어쥬먼트 또는 종양 영상화 어쥬먼트로 사용되어 항암 효능 및 종양 영상화 효능을 향상시키게 된다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1은 curli fiber를 구성하는 개략적 유전자 지도 및 이들의 발현과 fiber를 형성하는 과정 등을 보여주는 개념도 및 사진.

도 2a, 2b는 본 발명의 실시예에서 디자인된 csgA-HIS-Streptag1과 csgA-HIS-Streptag2의 염기서열.

도 3은 본 발명의 실시예에서 제작된 플라스미드의 개열지도.

도 4는 본 발명의 실시예에서 제작된 *E.coli* 형질전환체 균주 표면에 strep-tag가 충분히 발현됨을 보여주는 SEM 이미지.

도 5는 본 발명의 실시예에서 제작된 *E.coli* 형질전환체 균주 표면에 strep-tag가 충분히 발현됨을 보여주는 형광 이미지.

도 6은 본 발명의 실시예에서 제작된 살모넬라 형질전환체 균주 표면에 strep-tag가 충분히 발현됨을 보여주는 SEM 이미지.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 이하 첨부된 도면과 실시예를 들어 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 이러한 도면과 실시예는 본 발명의

기술적 사상의 내용과 범위를 쉽게 설명하기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 한정되거나 변경되는 것은 아니다. 이러한 예시에 기초하여 본 발명의 기술적 사상의 범위 안에서 다양한 변형과 변경이 가능함은 당업자에게는 당연할 것이다.

[실시예]

1. Strep-tag 발현을 위한 플라스미드의 제작

먼저 csgA와 strep-tag의 융합단백질을 발현시킬 수 있는 유전자를 디자인하였다.

대장균 MG1655 K-12(야생종)의 csgA 유전자의 염기서열(NCBI)을 바탕으로 csgA 유전자(서열1)의 C-말단에 strep-tag 유전자(서열2)를 1개(csgA-HIS-Streptag1) 및 2개(csgA-HIS-Streptag2) 삽입한 두 개의 유전자 구조체를 합성하였다. 이때, 유전자 구조체의 앞뒤에 클로닝을 위한 NheI 사이트와 HindIII 사이트를 삽입하였다. 또한 csgA 유전자의 발현을 높이기 위해 shine dalgarno 서열(AGGAGGTTTGATCCT)을 csgA 구조유전자 앞에 삽입하였다. 이상의 유전자 합성은 (주)코스모진텍에 의뢰하여 수행되었다. 도 2a, 2b에 각각 상기 과정을 통해 디자인된 csgA-HIS-Streptag1과 csgA-HIS-Streptag2의 염기서열(각각 서열5와 서열6)을 첨부하였다.

위에서 합성한 csgA-his-streptag1 plasmid와 합성한 csgA-his-streptag2 plasmid를 NheI(쥬다카라)과 SacI(쥬다카라) 10U씩을 사용하여 37℃에서 2시간 반응시켰다. 반응산물을 전기영동하고 Gel extraction kit(Qiagen)로 각각의 gel에서 약 550bp과 590bp의 DNA를 추출하여 csgA-his-streptag1 insert(이하 '인서트1'이라 함) 및 csgA-his-streptag2 insert(이하 '인서트2'라 함)를 얻었다.

pBad18+ asd 플라스미드(충남대 임현만 교수님 연구실에서 분양)와 NheI 및 SacI 효소 각각 10U를 37℃에서 2시간 반응시킨 후, 반응산물을 PCR purification kit(Qiagen)로 정제하여 벡터 DNA를 얻었다. 벡터 DNA를 각각 인서트1 및 2와 25℃에서 30분간 각각 ligation(쥬IInvitron)시키고, DH5a 컴피턴트 세포(충남대 임현만 교수님 연구실로부터 분양)에 형질전환시켰다. 형질전환된 세포를 LB amp 고체 배지에 도말하고 37℃에서 배양하여 항생제 내성을 갖는 콜로니를 각각 6개씩을 선별하였다.

선별된 콜로니를 NheI(쥬다카라)과 HindIII(쥬다카라) 각각 10U와 37℃에서 1시간 반응시킨 후 전기영동을 통해 500-600bp band의 생성을 확인하였다. candidate의 염기서열을 분석((주)코스모진텍에 의뢰)하여 각각 인서트1 및 인서트2 유전자가 정상적으로 삽입된 csgA-his-streptag1-pBad18-asd+plasmid(이하 '플라스미드1'이라 함) 및 csgA-his-streptag2-pBad18-asd+plasmid(이하 '플라스미드2'이라 함)를 완성하였다. 도 3에 완성된 플라스미드의 개열지도를 도시하였다.

2. Strep-tag를 발현하는 형질전환체 제작

(1) *E.coli* 형질전환

위에서 획득한 플라스미드1 및 플라스미드2를 *E.coli* Nissle 1917 asd- (충남대 임현만 교수님으로부터 분양) 균주에 형질전환시키고 LB amp 고체배지에 도말하여 csgA-his-streptag1-pBad18-asd+/ *E.coli* Nissle 1917 asd-와 csgA-his-streptag2-pBad18-asd+/ *E.coli* Nissle 1917 asd- 콜로니를 각각 선별하였다.

(2) 살모넬라 형질전환

E.coli Nissle 1917 asd- 균주 대신 약독화 살모넬라 균주인 aroA aroD asd- 균주(충남대 임현만 교수로부터 분양)를 사용한 것을 제외하고는 위 (1)과 동일한 방식으로 csgA-his-streptag1-pBad18-asd+/살모넬라 aroA aroD asd-와 csgA-his-streptag2-pBad18-asd+/살모넬라 aroA aroD asd- 콜로니를 각각 선별하였다. 이 중 csgA-his-streptag2-pBad18-asd+/살모넬라 aroA aroD asd-를 기탁하여 수탁번호 KCTC15224BP를 부여받았다.

3. 형질전환체 균주 표면에 strep-tag의 발현 검증

형질전환된 균주의 표면에 strep-tag가 발현되는지를 확인하였다.

(1) 나노입자 결합으로 *E.coli* 형질전환체의 strep-tag의 발현 확인

상기 2에서 제작된 csgA-his-streptag1-pBad18-asd+/ *E.coli* Nissle 1917 asd- 및 csgA-his-streptag2-pBad18-asd+/ *E.coli* Nissle 1917 asd- 균주의 단일 콜론 각각을 20 mL LB amp 액체 배지에 넣고 37℃에서 16시간 배양하였다. 신선한 LB amp 액체배지 20 mL에 상기 배양액 200 μ L를 넣어 희석한 후, 37℃에서 OD600이 0.4~0.6이 되도록 2시간 가량 추가로 배양하였다. 이후, 발현유도를 위해 L+아라비노스 20% (w/v)을 200 μ L를 넣어 최종 농도가 0.2%가 되도록 한 후 37℃에서 6시간 동안 배양하였다. 대조군에는 동일한 양의 3차증류수를

넣어주었다. 배양 6시간 후 OD600 1.0인 배양 시료 2 mL를 취하여 배지(Motility Medium; 150 mM NaCl, 2 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.9 mM KH_2PO_4 , 0.1 mM EDTA, 0.01 mM L-methionine, and 10 mM DL-lactate)로 3회 세척(원심분리 4200 rpm, 5분)하여 OD600 1.0의 1.0 mL 박테리아 시료를 준비하였다.

[0049] 이와 별도로 아비딘이 코팅된 산화철(iron oxide) 나노입자(200 nm 직경, 한밭대학교 최진실 교수님 제공) 0.25mg을 1 mL PBS에 현탁하여 나노입자 용액을 준비하였다.

[0050] 위에서 준비한 박테리아 시료 50 μL 와 나노입자 용액 50 μL 를 상온에서 30분 동안 볼텍스 믹서를 사용하여 600 rpm에서 혼합하였다. 볼텍스 믹서를 사용하여 600 rpm에서 30분간 혼합한 후 4200rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 펠렛에 4% glutaraldehyde 0.1 mL를 넣고 풀어준 후 냉장고에 밤새 방치하여 고정시켰다.

[0051] 고정된 박테리아 용액 4 μL 를 웨이퍼에 적가하고 37°C 진공에서 2시간 건조한 후 10 mA에서 20초간 플라티늄 코팅하여 FE-SEM(Regulus8230)으로 관측하였다(도 4). 도면에서 볼 수 있듯이 csgA-his-streptag2-pBad18-asd+/ *E.coli* Nissle 1917 asd- 균주에 나노입자가 코팅된 SEM 이미지로 나노입자가 대부분(>85%)의 박테리아 표면에 결합된 것을 확인할 수 있다. 이는 Induction을 통한 박테리아 표면의 pili에 strep-tag가 발현되어 접합기능을 발휘하고 있음을 보여주는 것이다. 이에 반하여, csgA-his-streptag-pBad18-asd+/ *E.coli* Nissle 1917 asd- 균주에서는 나노입자의 결합이 10% 미만이었으며(도시 생략), strep-tag가 표면에 활성화 되어있지 않은(arabinose induction을 하지 않은 경우) 균주(대조군)의 경우 나노입자와의 접합을 거의 볼 수 없었다(도시 생략).

[0052] **(2) 형광 분석에 의한 *E.coli* 형질전환체의 strep-tag의 발현 확인**

[0053] 박테리아 표면(pili)에 strep-tag를 활성화 시키는 균주의 활성화 여부를 확인하기 위해 strep-tag와 결합이 잘 이루어지는 streptavidin이 coating 되어 있는 DAPI dye (Invitrogen, S11222 (streptavidin pacific blue))를 staining하여 strep-tag 활성화 성능을 분석하였다.

[0054] 상기 3(1)에서와 동일하게 OD600 1.0의 1.0 mL 박테리아 시료를 준비하였다.

[0055] 이와 별도로 streptavidin이 coating 되어 있는 DAPI dye 0.25mg/mL를 PBS에 현탁하여 염색 용액을 준비하였다.

[0056] 위에서 준비한 박테리아 시료 50 μL 와 염색 용액 50 μL 를 상온에서 30분 동안 볼텍스 믹서를 사용하여 600 rpm에서 혼합하였다. 볼텍스 믹서를 사용하여 600 rpm에서 30분간 혼합한 후 4200rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 펠렛에 Motility Medium; 0.1 mL를 넣고 풀어주어 최종 관찰 시료를 준비하였다.

[0057] 슬라이드글라스에 관찰 시료 4 μL 를 떨어뜨려 관찰 슬라이드를 제작하고 동일한 관찰 슬라이드로 박테리아 형광 영역인 cy5와 dye의 형광영역인 DAPI-cy5 영역(붉은색)의 형광현미경으로 찍힌 박테리아와 DAPI를 찍은 파란색 영역의 형광현미경으로 찍은 부분-로 촬영하고 이를 겹쳐서 형광 일치 여부를 확인하였다(도 5). 도 4에서 볼 수 있듯이 대부분의 박테리아(빨간색, cy5 형광 사진)와 DAPI dye (파란색, DAPI 형광 사진)의 위치가 일치하는 것으로 보아, 박테리아 표면에 strep-tag가 활성화 되어 streptavidin과 잘 결합하였음을 확인하였다.

[0058] **(3) 나노입자 결합으로 살모넬라 형질전환체의 strep-tag의 발현 확인**

[0059] csgA-his-streptag2-pBad18-asd+/ *E.coli* Nissle 1917 asd- 균주 대신 csgA-his-streptag2-pBad18-asd+/살모넬라 aroA aroD asd- 균주를 사용한 것을 제외하고는 위 3(1)과 동일한 방식으로 형질전환 살모넬라에서 strep-tag가 잘 발현되는지 확인하였다(도 6). 그 결과 형질전환 *E.coli*와 유사하게 대부분(>85%)의 박테리아에서 나노입자 접합이 있었는데, 이는 살모넬라에서도 본 발명의 방법에 따라 strep-tag가 발현되어 접합기능을 발휘하고 있음을 보여주는 것이다.

수탁번호

[0060]

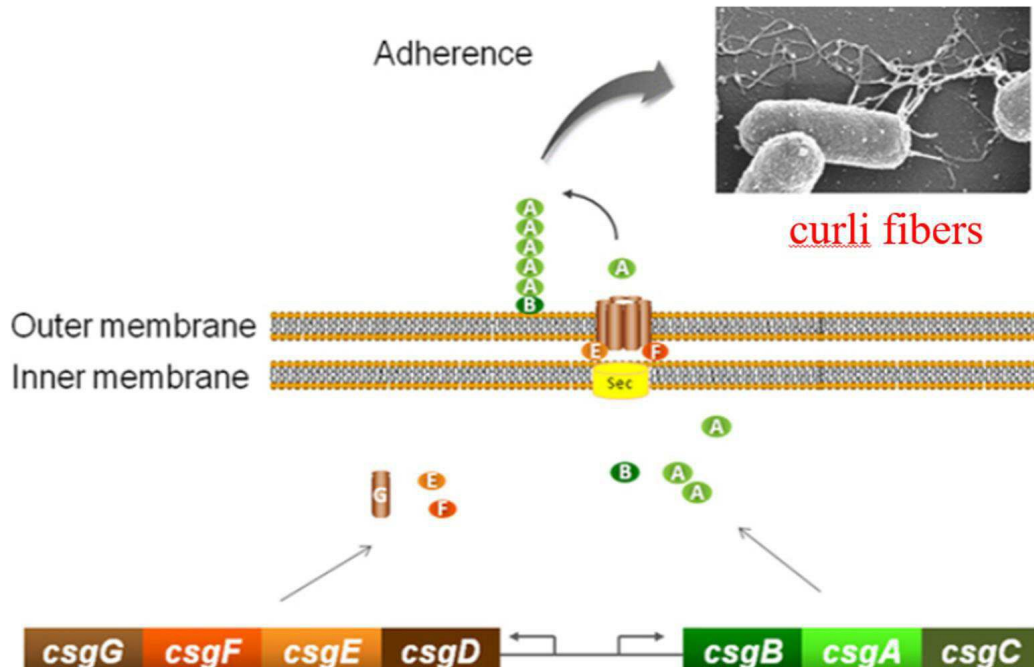
기탁기관명 : 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)

수탁번호 : KCTC15224BP

수탁일자 : 20221205

도면

도면1



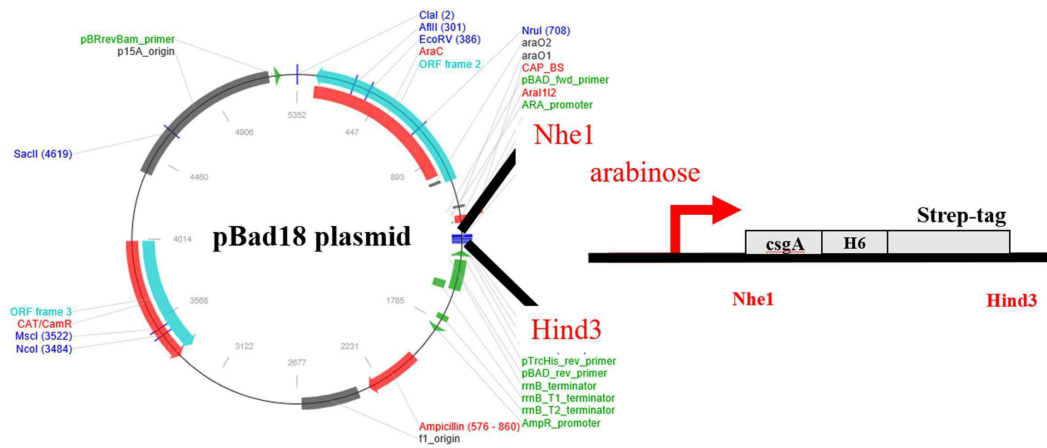
도면2a

GCTAGCAGGAGGTTTGATCCTatgaaactttttaaagtagcagcaattgcagcaatcgattctccggtagcgctctggcaggtgttggttcctcagtagcgcgcgcggtgaaccacggtggtggcggttaataatagcgcccaaattctgagctgaacatttaccagtagcggtggcggttaactctgcacttgctctgcaaactgatgcccgttaactctgacttgactattaccagcatggcgcggttaatggtgcagatgttggtcagggtctcagatgacagctcaatcgatctgacccaacgtggcttcggtaacagcgctactcttgatcagtggaacggcaaaaattctgaaatgacggttaaacagttcgggtggtggcaacggtgctgcagttgaccagactgcatctaactcctccgtcaacgtgactcaggttggttttgtaacaacgacgacctcatcagtagcAA
AAAAGCGGCAGCAGCCATCACCATCACCATCACAGCAGCGGCGGCTGGAGCCACCCGCAGTTC
GAGAAAtaaAAGCTT

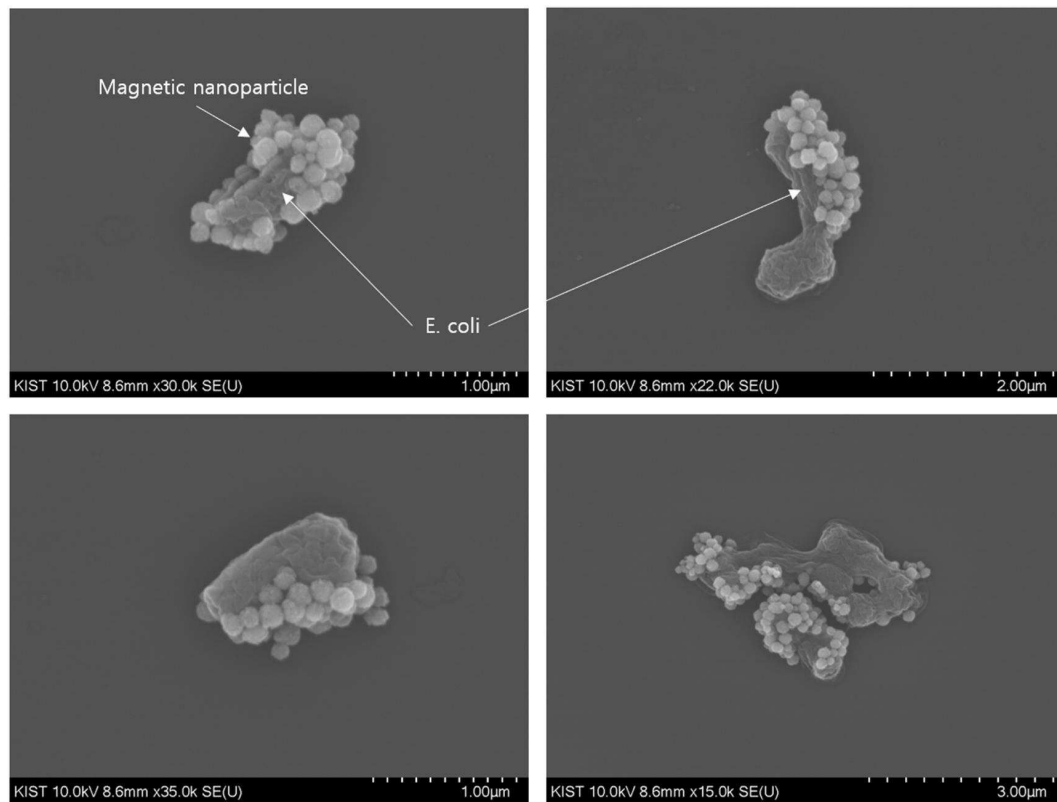
도면2b

GCTAGCAGGAGGTTTGATCCTatgaaactttttaaagtagcagcaattgcagcaatcgtattctccgg
tagcgctctggcaggtgttggttcctcagtagcgggcggtgtaaccacggtggtggcggttaataata
gcgggccaaattctgagctgaacatttaccagtagcgtggcggttaactctgcacttgctctgcaaact
gatgccgtaactctgacttgactattaccagcatggcggtgtaatggtgcagatgttggtcaggg
ctcagatgacagctcaatcgatctgaccaacgtggcttcggttaacagcgctactcttgatcagtga
acggcaaaaattctgaaatgacggttaaacagttcggttggtggcaacggtgctgcagttgaccagact
gcatctaactcctccgtcaacgtgactcaggttggtttggttaacaacgcgaccgctcatcagtagAA
AAAAGGCGGCAGCAGCCATCACCATCACCATCACAGCAGCGGCGGC**TGGAGCCACCCGCAGTTC**
GAGAAAAGGCGGCAGCAGCTGGAGCCACCCGCAGTTCGAGAAAtaaAAGCTT

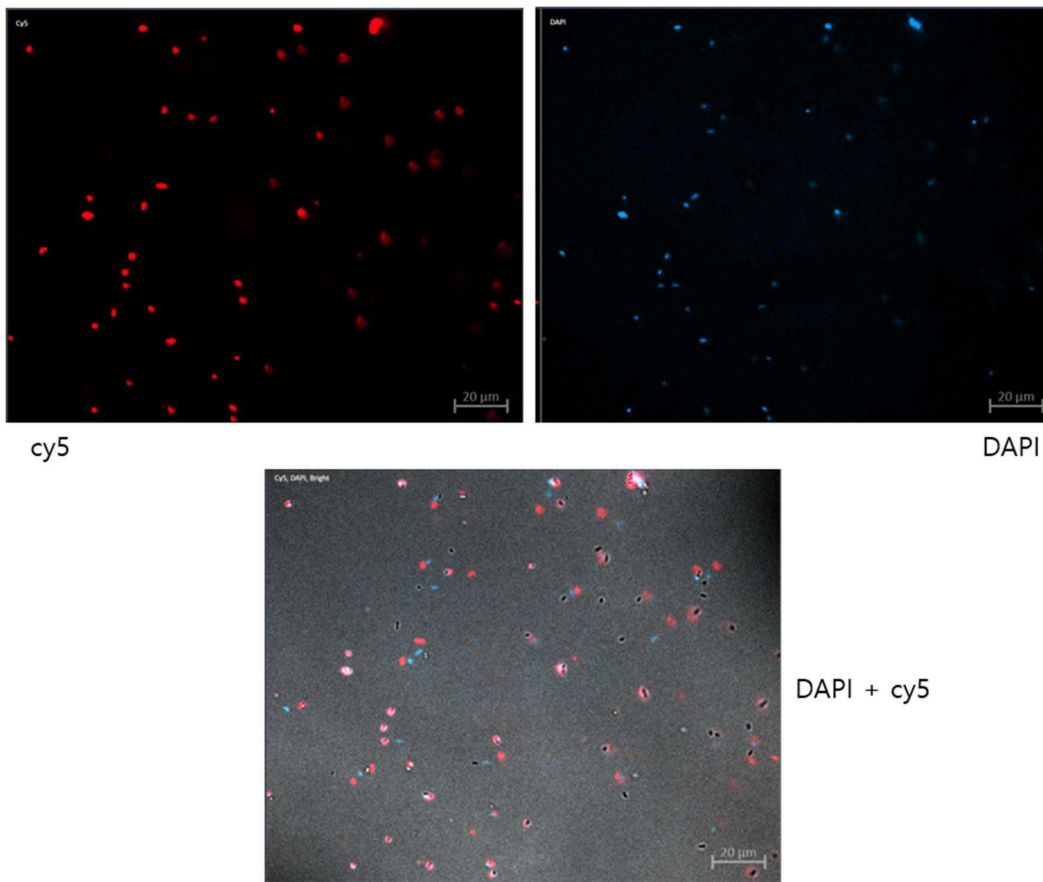
도면3



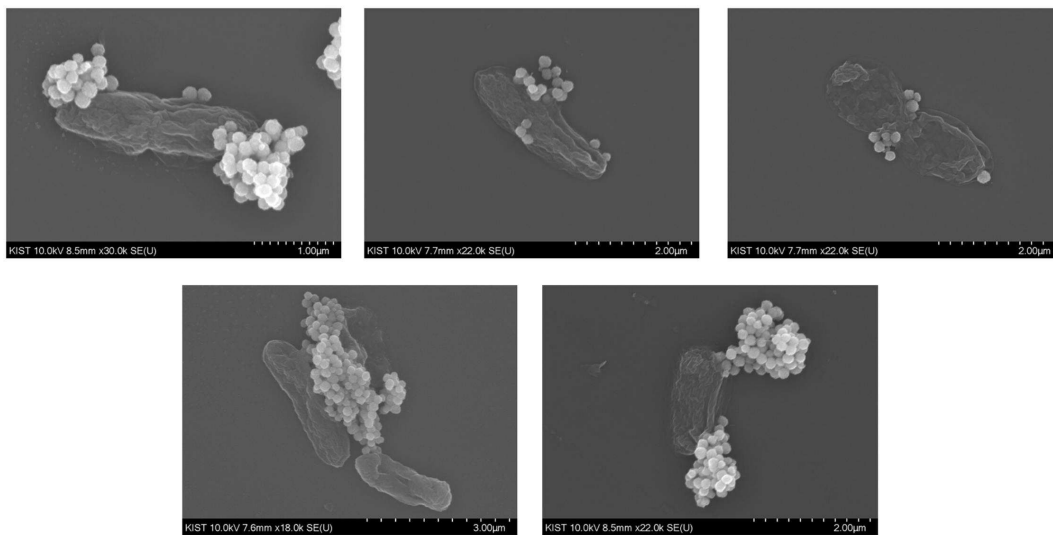
도면4



도면5



도면6



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.