

**(19) 대한민국특허청(KR)**
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0092381

(43) 공개일자 2025년06월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/6897 (2018.01) *C12N 15/74* (2006.01)*C12P 7/44* (2006.01) *C12Q 1/04* (2017.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6897 (2018.05)*C12N 15/74* (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0182222

(22) 출원일자 2023년12월14일

심사청구일자 2023년12월14일

(71) 출원인

인천대학교 산학협력단

인천광역시 연수구 갯벌로 27, 인천대학교 이노베이션센터(송도동)

제주대학교 산학협력단

제주특별자치도 제주시 제주대학로 102 (아라일동, 제주대학교)

(72) 발명자

양성호

인천광역시 연수구 원인재로 180, 210동 2101호(연수동, 연수우성2차아파트)

양진아

제주특별자치도 제주시 제주대학로 64-29, E동 415호(아라일동, 아라인빌아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

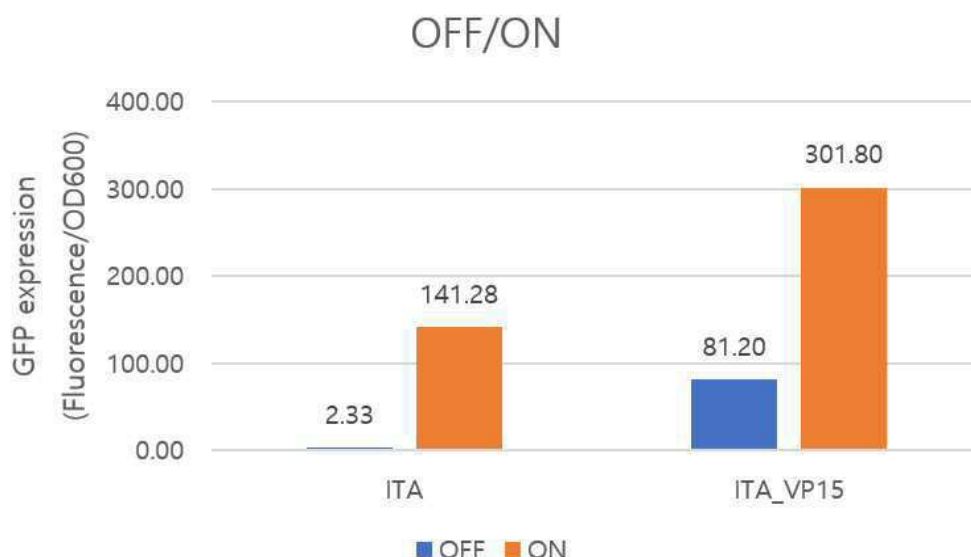
특허법인지평

전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 이타콘산 생산을 감지하는 비브리오속 미생물용 전사인자 기반 바이오센서 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 이타콘산 생산을 감지하는 비브리오속 미생물용 전사인자 기반 바이오센서 및 이의 용도에 관한 것이다. 본 발명에 따른 비브리오 속 미생물용 전사인자 기반 이타콘산 검출용 바이오센서는 비브리오 속 미생물의 성장속도가 매우 빠르고 호기성 및 혐기성 조건에서 포도당 흡수율이 매우 높아, 상기 바이오센서를 비브리오 속 미생물에 도입하는 경우, 이타콘산 생산 균주를 매우 신속하게 검출 가능할 뿐 아니라, 이타콘산 처리 전후에 따른 형광 감도 차이가 현저히 높고 형광 발현량 또한 매우 높아, 이타콘산 생산 균주를 정확하게 검출 가능한 장점이 있다.

대표도 - 도7

(52) CPC특허분류

C12P 7/44 (2013.01)

C12Q 1/04 (2013.01)

(72) 발명자

홍창환

경기도 수원시 장안구 울전로101번길 73, 106동
304호(울전동, 성균관대역 동문 디 이스트)

이현진

경기도 김포시 김포한강2로 362, 603동 1502호(장
기동, 청송마을중흥에스-클래스)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1525014435

과제번호 20220258

부처명 해양수산부

과제관리(전문)기관명 해양수산과학기술진흥원

연구사업명 해양바이오 산업소재 국산화 기술개발

연구과제명 석유화학 소재 대체 친환경 해양바이오 플라스틱 소재 개발

기 여 율 1/2

과제수행기관명 인천대학교 산학협력단

연구기간 2022.04.01 ~ 2026.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1525014085

과제번호 20220258

부처명 해양수산부

과제관리(전문)기관명 해양수산과학기술진흥원

연구사업명 해양바이오 산업소재 국산화 기술개발

연구과제명 석유화학 소재 대체 친환경 해양바이오 플라스틱 소재 개발

기 여 율 1/2

과제수행기관명 제주대학교 산학협력단

연구기간 2022.04.01 ~ 2026.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

전사억제자 ItcR 암호화 서열; 및
리포터 유전자;를 포함하는 비브리오속 미생물용 전사인자 기반 이타콘산 검출용 바이오센서.

청구항 2

제1항에 있어서,
상기 바이오센서는 토홀드 스위치 암호화 서열;을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 비브리오속 미생물용 전사인자 기반 이타콘산 검출용 바이오센서.

청구항 3

제2항에 있어서,
상기 토홀드 스위치 암호화 서열은 서열번호 13의 뉴클레오타이드 서열로 표시되는 토홀드 RNA 및 서열번호 11의 뉴클레오타이드 서열로 표시되는 트리거 RNA를 포함하는 것을 특징으로 하는, 비브리오속 미생물용 전사인자 기반 이타콘산 검출용 바이오센서.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 ItcR은 서열번호 8의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 하는, 비브리오속 미생물용 전사인자 기반 이타콘산 검출용 바이오센서.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 리포터 유전자는 GFP(green fluorescent protein), CFP(cyan fluorescent protein), BFP(blue fluorescent protein), YFP(yellow fluorescent protein) 및 RFP(red fluorescent protein)로 구성된 군에서 선택되는 1 이상의 리포터 단백질을 암호화하는 유전자인 것을 특징으로 하는, 비브리오속 미생물용 전사인자 기반 이타콘산 검출용 바이오센서.

청구항 6

제3항에 있어서, 상기 토홀드 RNA 암호화 서열 및 상기 리포터 서열은 서열번호 9의 뉴클레오타이드 서열로 표시되는 P_{cc1} 프로모터에 작동 가능하게 연결된 것을 특징으로 하는, 비브리오속 미생물용 전사인자 기반 이타콘산 검출용 바이오센서.

청구항 7

제3항에 있어서, 상기 트리거 RNA 암호화 서열은 서열번호 12의 뉴클레오타이드 서열로 표시되는 VP15 프로모터에 작동 가능하게 연결된 것을 특징으로 하는, 비브리오속 미생물용 전사인자 기반 이타콘산 검출용 바이오센서.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 바이오센서를 포함하는 비브리오 속 미생물용 재조합 벡터.

청구항 9

제8항의 재조합 벡터가 도입된 비브리오 속 재조합 미생물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 비브리오 속 재조합 미생물은 재조합 *Vibrio* sp. dhg 인 것을 특징으로 하는, 비브리오 속 재조합 미생물.

청구항 11

다음 단계를 포함하는, 이타콘산 고생산 균주 스크리닝 방법:

- (a) 이타콘산을 생산하는 것으로 예측되는 균주, 상기 균주의 파쇄물, 또는 상기 균주의 배양액을 제9항의 비브리오 속 재조합 미생물에 처리하는 단계; 및
- (b) 상기 비브리오 속 재조합 미생물의 형광 발현량이 대조군 대비 100% 이상 증가하는 경우, 상기 균주를 이타콘산 고생산 균주로 판별하는 단계.

청구항 12

다음 단계를 포함하는, 이타콘산 고생산 균주의 선별적 제조 방법:

- (a) 제9항의 비브리오 속 재조합 미생물에 변이를 유도하는 단계; 및
- (b) 상기 변이가 유도된 비브리오 속 재조합 미생물의 형광 발현량이 대조군 대비 100% 이상 증가하는 경우, 상기 균주를 이타콘산 고생산 균주로 판별하는 단계.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 변이는 화학적 변이법에 의한 변이, UV 처리에 따른 변이 또는 유전공학에 의한 변이인 것을 특징으로 하는, 이타콘산 고생산 균주의 선별적 제조 방법.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 유전공학에 의한 변이는 상기 비브리오 속 재조합 미생물에 이타콘산 발현 카세트를 도입하여 제조된 것을 특징으로 하는, 이타콘산 고생산 균주의 선별적 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 이타콘산 생산을 감지하는 비브리오속 미생물용 전사인자 기반 바이오센서 및 이의 용도에 관한 것으로, 더 상세하게는 전사억제자 ItcR 암호화 서열; 및 리포터 유전자;를 포함하는 비브리오속 미생물용 전사인자 기반 바이오센서 또는 상기 바이오센서에 토ehold 스위치를 추가로 포함하는 비브리오속 미생물용 전사인자 기반 바이오센서 및 상기 바이오센서를 이용하여 이타콘산 생산이 가능한 균주를 효율적으로 선별하기 위한 용도에

[0001]

관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 이타콘산(Itaconic acid, ITA)은 불포화 디카르복실산으로 면역 반응에 관여하고, 메틸렌기의 이중 결합을 통해 고분자 합성에 유용한 대사산물로 합성되기 때문에 생명공학 및 화학산업 분야에서 중요한 역할을 한다. 최근에는 코팅, 접착제, 플라스틱, 수지, 섬유 및 폴리머 분야 등 광범위한 응용분야에서 이타콘산의 수요가 증가하고 있어, 이를 효과적으로 생산하는 공정에 대한 관심이 집중되고 있다.
- [0004] 생명공학 기반으로 이타콘산을 생산하는 기술은 1960년대에 최초로 확립된 이래, 현재는 주로 곰팡이 균주인 *Aspergillus terreus*에 의해 생산되고 있다. *A. terreus*에 의해 이타콘산을 생산하는 경우, polysaccharide 보다 monosaccharide로부터 이타콘산을 생산하는 것이 생산 수율이 높은 것으로 확인되었고, 글루코오스로부터 가장 높은 수율로 이타콘산이 생산되는 것으로 나타났다.
- [0005] *A. terreus*에서 글루코오스 기반 배지로부터 이타콘산을 생산하는 경우, 13일간 최대 90g/L까지 생산 가능한 것으로 보고되었고, 그 외 비트 및 사탕수수, 당밀이나 옥수수 기반 배지로부터 이타콘산을 생산하는 경우, 50g/L의 이타콘산 생산이 가능하다. 그밖에도 *Ustilago maydis*, *Helicobasidium mompa*, 유전적으로 변형된 *Candida* 및 *Escherichia coli*를 이용하여 이타콘산을 생산하고자 하는 다양한 시도가 있어 왔으나, 이들은 *A. terreus*보다 현저히 낮은 이타콘산 생산 수준을 보여주었다(Juliana Cunha da Cruz et al. 3 Biotech. 2018. 8(3): 138).
- [0006] 이처럼, 이타콘산을 생산하기 위한 다양한 제조합 미생물들이 개발되고 있으나, 이들 제조합 균주들이 이타콘산을 얼마나 효과적으로 생산하는지 신속하고 정확하게 스크리닝 할 수 있는 방법에 대한 개발은 아직 미비한 실정이다.
- [0007] 이러한 이유로, 대사 산물을 인식하는 생체 분자로 구성된 유전적으로 암호화된 바이오 센서가 개발되고 있다 (Dietrich et al., Annu. Rev. Biochem. 79, 563, 2010; Fowler et al., Chem. Biol. 17, 756, 2010; Jang et al., Methods Enzymol. 550, 341, 2015; Liu et al., Metab. Eng. 31, 35, 2015; Michener and Smolke, Metab. Eng. 14, 306, 2012; Yang et al., Nat. Commun. 4, 1413, 2013). 이 중 하나는 분자 리간드에 반응하여 전사 결과를 조절하는 전사인자-프로모터 쌍을 사용하는 것이다(Canton et al., Nat. Biotechnol. 26, 787, 2008; Dietrich et al., ACS Synth. Biol. 2, 47, 2013; Voigt, Curr. Opin. Biotechnol. 17, 548, 2006). 전사인자 기반의 바이오 센서는 최근의 많은 대사 공학적 접근법에 기여해왔다 (Liu et al., Metab. Eng. 31, 35, 2015; Liu et al., ACS Synth. Biol. 6, 837, 2017; Mahr and Frunzke, Appl. Microbiol. Biotechnol. 100, 79, 2016). 이 경우, 리포터 유전자 또는 선별 마커 유전자를 하위(downstream)에 갖는 전사인자의 동족 프로모터는 대사 산물이 축적되는 경우, 이를 형광 또는 성장-결합 반응으로 전환시킬 수 있어, 고효율 스크리닝에 이용할 수 있다. 그러나 대다수의 대사 산물 반응성 전사인자-프로모터는 대사 산물 생산 균주와 다른 균주로부터 기인하는 경우가 많기 때문에 숙주의 생산성에 영향을 줄 수 있는 성장 억제와 같은 세포 내 대사 부담으로 인한 방해를 최소화 하기 위한 최적의 재설계가 필요하다 (Mahr and Frunzke, Appl. Microbiol. Biotechnol. 100, 79, 2016).
- [0008] 최근 *E. coli* 에서 작동하는 이타콘산 반응 전사인자(ItrR) 기반의 바이오 센서가 보고된 바 있다 (Erik K. R. Hanko et al., ACS Synth. Biol. 7, 1436, 2018).
- [0009] 본 발명자들은 *E. coli* 보다 더 신속하고 정확하게 이타콘산 생산을 감지하는 바이오센서를 개발하고자 예의 노력한 결과, 이타콘산-반응 전사인자(ItrR) 및 선택 마커로 형광 단백질을 포함하는 바이오센서가 비브리오 속 미생물에서 이타콘산에 효과적으로 반응할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0011] (비특허문헌 0001) Dietrich et al., Annu. Rev. Biochem. 79, 563, 2010;
(비특허문헌 0002) Fowler et al., Chem. Biol. 17, 756, 2010;

- (비특허문헌 0003) Jang et al., Methods Enzymol. 550, 341, 2015;
- (비특허문헌 0004) Liu et al., Metab. Eng. 31, 35, 2015;
- (비특허문헌 0005) Michener and Smolke, Metab. Eng. 14, 306, 2012;
- (비특허문헌 0006) Yang et al., Nat. Commun. 4, 1413, 2013;
- (비특허문헌 0007) Canton et al., Nat. Biotechnol. 26, 787, 2008;
- (비특허문헌 0008) Dietrich et al., ACS Synth. Biol. 2, 47, 2013;
- (비특허문헌 0009) Voigt, Curr. Opin. Biotechnol. 17, 548, 2006
- (비특허문헌 0010) Liu et al., ACS Synth. Biol. 6, 837, 2017;
- (비특허문헌 0011) Mahr and Frunzke, Appl. Microbiol. Biotechnol. 100, 79, 2016;
- (비특허문헌 0012) Erik K. R. Hanko et al., ACS Synth. Biol. 7, 1436, 2018

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0012] 본 발명은 이타콘산을 신속하고 정확하게 검출할 수 있는 신규한 이타콘산 검출 시스템을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 전사억제자 ItcR 암호화 서열; 및 리포터 유전자;를 포함하는 비브리오 속 미생물용 전사인자 기반 이타콘산 검출용 바이오센서를 제공한다.
- [0014] 본 발명에 있어서, 상기 바이오센서는 토홀드 스위치 암호화 서열;을 추가로 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0015] 본 발명에 있어서, 상기 토홀드 스위치 암호화 서열은 서열번호 13의 뉴클레오티드 서열로 표시되는 토홀드 RNA 및 서열번호 11의 뉴클레오티드 서열로 표시되는 트리거 RNA를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0016] 본 발명에 있어서, 상기 ItcR은 서열번호 서열번호 8의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0017] 본 발명에 있어서, 상기 리포터 유전자는 GFP(green fluorescent protein), CFP(cyan fluorescent protein), BFP(blue fluorescent protein), YFP(yellow fluorescent protein) 및 RFP(red fluorescent protein)로 구성된 군에서 선택되는 1 이상의 리포터 단백질을 암호화하는 유전자인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0018] 본 발명에 있어서, 상기 토홀드 RNA 암호화 서열 및 상기 리포터 서열은 서열번호 9의 뉴클레오티드 서열로 표시되는 PccI 프로모터에 작동 가능하게 연결된 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0019] 본 발명에 있어서, 상기 트리거 RNA 암호화 서열은 서열번호 12의 뉴클레오티드 서열로 표시되는 VP15 프로모터에 작동 가능하게 연결된 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0020] 본 발명은 또한, 상기 바이오센서를 포함하는 비브리오 속 미생물용 재조합 벡터를 제공한다.
- [0021] 본 발명은 또한, 상기 재조합 벡터가 도입된 비브리오 속 재조합 미생물을 제공한다.
- [0022] 본 발명에 있어서, 상기 비브리오 속 재조합 미생물은 재조합 *Vibrio* sp. dhg 인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0023] 본 발명은 또한, 다음 단계를 포함하는, 이타콘산 고생산 균주 스크리닝 방법을 제공한다:
- [0024] (a) 이타콘산을 생산하는 것으로 예측되는 균주, 상기 균주의 파쇄물, 또는 상기 균주의 배양액을 상기 비브리오 속 재조합 미생물에 처리하는 단계; 및
- [0025] (b) 상기 비브리오 속 재조합 미생물의 형광 발현량이 대조군 대비 100% 이상 증가하는 경우, 상기 균주를 이타콘산 고생산 균주로 판별하는 단계.

- [0026] 본 발명은 또한, 다음 단계를 포함하는, 이타콘산 고생산 균주의 선별적 제조 방법을 제공한다:
- [0027] (a) 상기 비브리오 속 재조합 미생물에 변이를 유도하는 단계; 및
- [0028] (b) 상기 변이가 유도된 비브리오 속 재조합 미생물의 형광 발현량이 대조군 대비 100% 이상 증가하는 경우, 상기 균주를 이타콘산 고생산 균주로 판별하는 단계.
- [0029] 본 발명에 있어서, 상기 변이는 화학적 변이법에 의한 변이, UV 처리에 의한 변이 또는 유전공학에 의한 변이인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0030] 본 발명에 있어서, 상기 유전공학에 의한 변이는 상기 비브리오 속 재조합 미생물에 이타콘산 발현 카세트를 도입하여 제조된 것을 특징으로 할 수 있다.

발명의 효과

- [0031] 본 발명에 따른 비브리오 속 미생물용 전사인자 기반 이타콘산 검출용 바이오센서는 비브리오 속 미생물의 성장 속도가 매우 빠르고 호기성 및 혐기성 조건에서 포도당 흡수율이 매우 높다는 점에 기인하여, 비브리오 속 미생물에 도입하는 경우, 이타콘산 생산 균주를 매우 신속하게 검출 가능할 뿐 아니라, 이타콘산 처리 전후에 따른 형광 감도 차이가 현저히 높고 형광 발현량 또한 매우 높아, 이타콘산 생산 균주를 정확하게 검출 가능한 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

- [0033] 도 1은 CloDF13_ItrC_sfGFP 플라스미드 맵을 나타낸다.
- 도 2는 CloDF13_ItrC_sfGFP 플라스미드를 *Vibrio* sp. dhg로 형질전환한 후, 이타콘산 처리에 따른 형광 발현을 확인한 결과이다.
- 도 3은 ItrC의 조절 프로모터에 Toehold 스위치 시스템 도입을 위한 일부 프라이머 구조를 보여주는 모식도이다.
- 도 4는 ItrC의 조절 프로모터에 Toehold 스위치 시스템 도입을 위한 일부 프라이머 구조를 보여주는 모식도이다.
- 도 5는 CloDF13_ItrC_Trigger_VP15_Toehold_sfGFP 플라스미드 맵을 나타낸다.
- 도 6은 각각 CloDF13_ItrC_sfGFP 플라스미드가 형질전환된 *Vibrio* sp. dhg (ITA) 및 CloDF13_ItrC_Trigger_VP15_Toehold_sfGFP 플라스미드가 형질전환된 *Vibrio* sp. dhg(ITA_VP15)에서 이타콘산 처리에 따른 형광 발현 변화를 각각 3개의 균주에서 확인한 결과이다.
- 도 7은 각각 CloDF13_ItrC_sfGFP 플라스미드가 형질전환된 *Vibrio* sp. dhg (ITA) 및 CloDF13_ItrC_Trigger_VP15_Toehold_sfGFP 플라스미드가 형질전환된 *Vibrio* sp. dhg(ITA_VP15)에서 이타콘산 처리에 따른 형광 발현 변화를 OD 값을 기준으로 환산한 결과이다.
- 도 8은 각각 CloDF13_ItrC_sfGFP 플라스미드가 형질전환된 *Vibrio* sp. dhg (ITA) 및 CloDF13_ItrC_Trigger_VP15_Toehold_sfGFP 플라스미드가 형질전환된 *Vibrio* sp. dhg(ITA_VP15)에서 이타콘산 처리에 따른 형광 발현 변화를 폴드 변화로 비교한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0034] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법 및 이하에 기술하는 실험 방법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0036] 이타콘산은 고분자 물질 합성에 유용하며 산업적으로 다양한 곳에 활용이 가능하기 때문에, 이를 효율적으로 생산하기 위한 다양한 시도가 있어왔으며, 최근에는 다양한 공급원으로부터 원료 공급이 가능하여 상대적으로 저렴한 비용으로 생산이 가능하고 환경보호 측면에서도 유리한 미생물 발효에 기초한 이타콘산 생산에 관한 연구

가 매우 활발하다.

- [0037] 미생물 발효에 기초한 이타콘산 생산에 있어서, 자연적으로 이타콘산을 고효율로 생산하는 균주를 선별하는 방법이 있을 수 있으며, 기타 화학적, 물리적 변이에 의해 이타콘산을 고효율로 생산하는 균주를 개발하거나, 유전공학적 방법으로 이타콘산을 고효율로 생산하는 균주를 개발할 수 있을 것이다. 이처럼, 상기한 방법에 의해 이타콘산을 고효율로 생산하는 균주를 개발하는 경우, 이타콘산 생산 효율이 우수한 균주를 선별해내는 과정이 필수적인 절차 중 하나라 할 수 있다.
- [0038]
- [0039] 이에, 본 발명에서는, 미생물 발효에 기초하여 이타콘산을 생산하는 과정에서 이타콘산 생산 효율이 우수한 균주를 효과적으로 선별할 수 있는 방법을 개발하고자 하였다. 특히, 본 발명에서는 대장균보다 빠른 성장 속도를 가지고 호기성 및 혐기성 조건에서 포도당 흡수율이 높은 비브리오 속 미생물을 chassis 균주로 사용할 수 있는 방법을 모색하였다.
- [0040] 그 결과, 본 발명에 따른 바이오센서는 비브리오 속 미생물을 chassis 균주로 하여 이타콘산 생산을 신속하고 정확하게 검출할 수 있음을 확인할 수 있었으며, 흥미롭게도 이러한 특징은 이타콘산 특이적이었는데, 예컨대, Lactic acid를 본 발명과 유사한 시스템(Lactic acid에 반응하는 전사인자 LldR 및 토홀드 스위치 이용)으로 비브리오 속 미생물을 chassis 균주로 하여 검출하고자 한 시도에서는 Lactic acid를 효과적으로 검출할 수 없는 것으로 나타났다.
- [0042] 따라서, 본 발명은 일 관점에서 전사억제자 ItcR 암호화 서열; 및 리포터 유전자;를 포함하는 비브리오속 미생물용 전사인자 기반 이타콘산 검출용 바이오센서에 관한 것이다.
- [0043] 본 발명에 있어서, 상기 바이오센서는 토홀드 스위치 암호화 서열;을 추가로 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0044] 본 발명에서, 토홀드 스위치(Toehold switch)는 루프(loop)와 돌기(bulge)에 리보솜 결합 부위(ribosome binding site; RBS) 및 개시 코돈(AUG)을 갖는 RNA 헤어핀 구조 및 이의 앞부분에 단일가닥의 토홀드 영역(Toehold region)이 연결되어 있다. 상기 토홀드 영역은 토홀드 스위치의 작동을 자극하는 트리거 RNA(trigger RNA)와 결합하며, 이에 의해 상기 헤어핀 구조가 열리면서 상기 RBS 서열이 노출되면 리보솜이 상기 인식 서열에 결합하고 헤어핀 구조의 뒷부분에 연결된 마커 단백질의 번역이 시작된다(AA Green et al., Cell, 2014, 159, 925-39).
- [0045] 본 발명에 있어서, 상기 토홀드 스위치 암호화 서열은 서열번호 13의 뉴클레오티드 서열로 표시되는 토홀드 RNA 및 서열번호 11의 뉴클레오티드 서열로 표시되는 트리거 RNA를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0046] 본 발명에서, ItcR은 박테리아(*Yersinia pseudotuberculosis*)에서 유래한 단백질로, 이타콘산에 특이적으로 결합하는 능력을 가지고 있으며, 구조적으로는 N-말단 DNA 결합 helix-turn-helix 모티프와 C-말단 이타콘산 결합 도메인(IBC)을 가지고 있다. 본 발명에 있어서, 상기 ItcR은 서열번호 8의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0047] 본 발명에 있어서, 상기 ItcR 발현을 위한 프로모터는 비브리오 속 미생물에서 작동 가능한 프로모터는 제한 없이 사용 가능하며, 일 양태로서, 본 발명에서는 서열번호 7의 뉴클레오티드 서열로 표시되는 J23106 프로모터를 사용하였다.
- [0048] 본 발명에 있어서, 상기 리포터 유전자는 GFP(green fluorescent protein), CFP(cyan fluorescent protein), BFP(blue fluorescent protein), YFP(yellow fluorescent protein) 및 RFP(red fluorescent protein)로 구성된 군에서 선택되는 1 이상의 리포터 단백질을 암호화하는 유전자인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않으며, 일 양태로서, 본 발명에서는 서열번호 10의 아미노산 서열로 표시되는 sfGFP를 사용하였다.
- [0049] 본 발명에 있어서, 상기 토홀드 RNA 암호화 서열 및 상기 리포터 서열은 서열번호 9의 뉴클레오티드 서열로 표시되는 P_{cc1} 프로모터에 작동 가능하게 연결된 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0050] 본 발명에 있어서, 상기 트리거 RNA 암호화 서열은 서열번호 12의 뉴클레오티드 서열로 표시되는 VP15 프로모터에 작동 가능하게 연결된 것을 특징으로 할 수 있다.

- [0051] 본 발명에서, 용어 “바이오센서”는 특정 물질에 대한 인식기능을 갖는 생물학적 수용체를 광학적 변환기와 결합시켜 생물학적 상호작용 및 반응을 광학적 신호로 바꾸어 주는 센서로서, 본 발명에서는 바이오센서는 유전자 구축물일 수 있으며, 이는 *in vitro* translation system과 접목되어 작동되거나, 비브리오 속 미생물에 도입되어 작동될 수 있다.
- [0052] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 바이오센서를 포함하는 비브리오 속 미생물용 재조합 벡터에 관한 것이다.
- [0053] 본 발명에서, 용어 “벡터 (vector)”는 적합한 숙주 내에서 DNA를 발현시킬 수 있는 적합한 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 DNA 서열을 함유하는 DNA 제작물을 의미한다. 벡터는 플라스미드, 파지 입자, 또는 간단하게 잠재적 게놈 삽입물 일 수 있다. 적당한 숙주로 형질전환되면, 벡터는 숙주 게놈과 무관하게 복제하고 기능할 수 있거나, 또는 일부 경우에 게놈 그 자체에 통합될 수 있다. 플라스미드가 현재 벡터의 가장 통상적으로 사용되는 형태이므로, 본 발명의 명세서에서 “플라스미드 (plasmid)” 및 “벡터 (vector)”는 때로 상호 교환적으로 사용된다. 그러나, 본 발명은 당업계에 알려진 또는 알려지게 되는 바와 동등한 기능을 갖는 벡터의 다른 형태를 포함한다.
- [0054] “발현 조절 서열 (expression control sequence)”이라는 표현은 특정한 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열의 발현에 필수적인 DNA 서열을 의미한다. 그러한 조절 서열은 전사를 실시하기 위한 프로모터, 그러한 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다. 예를 들면, 원핵생물에 적합한 조절 서열은 프로모터, 임의로 오퍼레이터 서열 및 리보솜 결합 부위를 포함한다. 진핵세포는 프로모터, 폴리아데닐화 시그널 및 인헨서가 이에 포함된다. 플라스미드에서 유전자의 발현 양에 가장 영향을 미치는 인자는 프로모터이다.
- [0055] 핵산은 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 배치될 때 “작동가능하게 연결 (operably linked)”된다. 이것은 적절한 분자 (예를 들면, 전사 활성화 단백질)은 조절 서열(들)에 결합될 때 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결된 유전자 및 조절 서열(들)일 수 있다. 예를 들면, 전서열(pre-sequence) 또는 분비 리더 (leader)에 대한 DNA는 폴리펩타이드의 분비에 참여하는 전단백질로서 발현되는 경우 폴리펩타이드에 대한 DNA에 작동가능하게 연결되고; 프로모터 또는 인헨서는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩서열에 작동가능하게 연결되거나; 또는 리보솜 결합 부위는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결되거나; 또는 리보솜 결합 부위는 번역을 용이하게 하도록 배치되는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로, “작동가능하게 연결된”은 연결된 DNA 서열이 접촉하고, 또한 분비 리더의 경우 접촉하고 리딩 프레임 내에 존재하는 것을 의미한다. 그러나, 인헨서 (enhancer)는 접촉할 필요가 없다. 이들 서열의 연결은 편리한 제한 효소 부위에서 라이게이션(연결)에 의해 수행된다. 그러한 부위가 존재하지 않는 경우, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터 (oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용한다.
- [0056] 본원 명세서에 사용된 용어 “발현 벡터”는 통상 이중의 DNA의 단편이 삽입된 재조합 캐리어 (recombinant carrier)로서 일반적으로 이중 가닥의 DNA의 단편을 의미한다. 여기서, 이중 DNA는 숙주 세포에서 천연적으로 발견되지 않는 DNA인 이형 DNA를 의미한다. 발현 벡터는 일단 숙주 세포내에 있으면 숙주 염색체 DNA와 무관하게 복제할 수 있으며 벡터의 수 개의 카피 및 그의 삽입된 (이중) DNA가 생성될 수 있다.
- [0057] 당업계에 주지된 바와 같이, 숙주세포에서 형질감염 유전자의 발현 수준을 높이기 위해서는, 해당 유전자가, 선택된 발현 숙주 내에서 기능을 발휘하는 전사 및 해독 발현 조절 서열에 작동가능하도록 연결되어야만 한다. 바람직하게는 발현 조절서열 및 해당 유전자는 세균 선택 마커 및 복제 개시점 (replication origin)을 같이 포함하고 있는 하나의 발현 벡터 내에 포함되게 된다. 본 발명에서는 ItcR, 트리거 영역, 토홀드 영역이 발현 조절 서열로 작동할 수 있다.
- [0058] 바람직한 일 양태로서, 본 발명에 따른 벡터는 비브리오 속 미생물을 숙주로 하여 DNA를 발현시킬 수 있는 벡터 일 수 있으나, 상기 벡터를 클로닝하는 과정에서 사용하는 벡터는 기타 *E. coli* 등과 같은 다른 미생물에서 작동하는 벡터 일 수 있다.
- [0060] 상술한 발현 벡터에 의해 형질전환 또는 형질감염 된 숙주 세포는 본 발명의 또 다른 측면을 구성한다. 본원 명세서에 사용된 용어 “형질전환”은 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체의 인자로서 또는 염색체 통합완성에 의해 복제가능하게 되는 것을 의미한다. 본원 명세서에 사용된 용어 “형질감염”은 임의의 코딩 서열이 실제로 발현되는 아니든 발현 벡터가 숙주 세포에 의해 수용되는 것을 의미한다.

- [0061] 물론 모든 벡터와 발현 조절 서열이 본 발명의 DNA 서열을 발현하는데 모두 동등하게 기능을 발휘하지는 않는다는 것을 이해하여야만 한다. 마찬가지로 모든 숙주가 동일한 발현 시스템에 대해 동일하게 기능을 발휘하지는 않는다. 그러나, 당업자라면 과도한 실험적 부담없이 본 발명의 범위를 벗어나지 않는 채로 여러 벡터, 발현 조절 서열 및 숙주 중에서 적절한 선택을 할 수 있다. 예를 들어, 벡터를 선택함에 있어서는 숙주를 고려하여야 하는데, 이는 벡터가 그 안에서 복제되어야만 하기 때문이다. 벡터의 복제 수, 복제 수를 조절할 수 있는 능력 및 당해 벡터에 의해 코딩되는 다른 단백질, 예를 들어 항생제 마커의 발현도 또한 고려되어야만 한다. 발현 조절 서열을 선정함에 있어서는, 여러 가지 인자들을 고려하여야만 한다. 예를 들어, 서열의 상대적 강도, 조절 가능성 및 본 발명의 DNA 서열과의 상용성 등, 특히 가능성있는 이차 구조와 관련하여 고려하여야 한다. 단세포 숙주는 선정된 벡터, 본 발명의 DNA 서열에 의해 코딩되는 산물의 독성, 분비 특성, 단백질을 정확하게 폴딩시킬 수 있는 능력, 배양 및 발효 조건들, 본 발명 DNA 서열에 의해 코딩되는 산물을 숙주로부터 정제하는 것의 용이성 등의 인자를 고려하여 선정되어야만 한다. 이들 변수의 범위내에서, 당업자는 본 발명의 DNA 서열을 발효 또는 대규모 동물 배양에서 발현시킬 수 있는 각종 벡터/발현 조절 서열/숙주 조합을 선정할 수 있다. 발현 클로닝에 의해 목적단백질의 cDNA를 클로닝 하려고 할 때의 스크리닝법으로서 바인딩법(binding법), 페닝법(panning법), 필름에멀션법(film emulsion 법)등이 적용될 수 있다.
- [0062] 따라서, 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 재조합 벡터가 도입된 비브리오 속 재조합 미생물에 관한 것이다.
- [0063] 본 발명에 있어서, 상기 비브리오 속 재조합 미생물은 재조합 *Vibrio* sp. dhg 인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0064] 본 발명에 따른 재조합 미생물은 이에 한정되지는 않으나, 다양한 양태로 이타콘산 고생산 균주를 스크리닝 하는 방법에 활용될 수 있다.
- [0065] 따라서, 본 발명은 또 다른 관점에서, 다음 단계를 포함하는, 이타콘산 고생산 균주 스크리닝 방법에 관한 것이다:
- [0066] (a) 이타콘산을 생산하는 것으로 예측되는 균주, 상기 균주의 과쇄물, 또는 상기 균주의 배양액을 상기 비브리오 속 재조합 미생물에 처리하는 단계; 및
- [0067] (b) 상기 비브리오 속 재조합 미생물의 형광 발현량이 대조군 대비 100% 이상 증가하는 경우, 상기 균주를 이타콘산 고생산 균주로 판별하는 단계.
- [0068] 다른 양태로서, 상기 (b) 단계는 형광 발현량이 대조군 대비 약 10% 이상, 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 40% 이상, 약 50% 이상, 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상, 약 100%, 이상, 약 110% 이상, 약 120% 이상, 약 130% 이상, 약 140% 이상, 약 150% 이상, 약 160% 이상, 약 170% 이상, 약 180% 이상, 약 190% 이상, 약 200% 이상, 약 210% 이상, 약 220% 이상, 약 230% 이상, 약 240% 이상, 약 250% 이상, 약 260% 이상, 약 270% 이상, 약 280% 이상, 약 290% 이상 또는 약 300% 이상 증가하는 경우, 상기 균주를 이타콘산 고생산 균주로 판별하는 것일 수 있다.
- [0069] 본 발명은 또 다른 관점에서, 다음 단계를 포함하는, 이타콘산 고생산 균주의 선별적 제조 방법을 제공한다:
- [0070] (a) 상기 비브리오 속 재조합 미생물에 변이를 유도하는 단계; 및
- [0071] (b) 상기 변이가 유도된 비브리오 속 재조합 미생물의 형광 발현량이 대조군 대비 100% 이상 증가하는 경우, 상기 균주를 이타콘산 고생산 균주로 판별하는 단계.
- [0072] 본 발명에 있어서, 상기 변이는 화학적 변이법에 의한 변이, UV 처리에 의한 변이 또는 유전공학에 의한 변이인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0073] 본 발명에 있어서, 상기 유전공학에 의한 변이는 상기 비브리오 속 재조합 미생물에 이타콘산 발현 카세트를 도입하여 제조된 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0074] 본 발명에서, 상기 이타콘산 고생산 균주란 대조군과 비교하여 이타콘산 생산량이 약 10% 이상, 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 40% 이상, 약 50% 이상, 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상, 약 100%, 이상, 약 110% 이상, 약 120% 이상, 약 130% 이상, 약 140% 이상, 약 150% 이상, 약 160% 이상, 약 170% 이상, 약 180% 이상, 약 190% 이상, 약 200% 이상, 약 210% 이상, 약 220% 이상, 약 230% 이상, 약 240% 이상, 약 250% 이상, 약 260% 이상, 약 270% 이상, 약 280% 이상, 약 290% 이상 또는 약 300% 이상 증가된 균주일 수 있다.
- [0075] 본 발명에 있어서, 상기 대조군은 이타콘산을 생산하는 것으로 알려진 임의의 균주일 수 있으며, 바람직하게는

16S rRNA 서열이 95% 이상 일치하는 유사한 종의 균주일 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 다른 양태로서, 상기 대조균은 본 발명에서 변이 균주를 선별하는 경우라면 야생형 균주 또는 숙주 균주일 수 있다.

[0077] 본 명세서에서, "약(about)"이라는 용어는 일반적으로 특정 값의 위 또는 아래에서 0.5 % -10 % 범위 내의 변화를 지칭하고, 예를 들어 0.5 %, 1 %, 1.5 %, 2 %, 2.5 %, 3 %, 3.5 %, 4 %, 4.5 %, 5 %, 5.5 %, 6 %, 6.5 %, 7 %, 7.5 % 범위 내의 변동, 8 %, 8.5 %, 9 %, 9.5 % 또는 10 %가 지정된 값보다 높거나 낮다.

[0079] **실시예**

[0081] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0083] **실시예 1. CloDF13_ItrR_sfGFP 플라스미드 제작**

[0085] CloDF13_ItrR_sfGFP 플라스미드(도 1) 제작을 위하여, pCDF_ITAsensor_SmR (포항공과대학교, Ye, Dae-yeol, et al. "Kinetic compartmentalization by unnatural reaction for itaconate production." Nature Communications 13.1 (2022): 5353.) <https://www.nature.com/articles/s41467-022-33033-1>를 주형으로 CloDF13, Promoter_ItrR, PccI_sGFP를 포함하는 단편(서열번호 1)을 프라이머 1(서열번호 2)과 프라이머 2(서열번호 3)을 이용하여 PCR로 증폭하고(표 1, 표 2 참조), pRSF Duet-1 플라스미드(Novagen)에서 포함된 Kan^R 단편을 PCR 증폭한 후(표 3, 표 4 참조), pCDF Duet (Novagen)에 겹친 어셈블리로 클로닝하였다.

[0087] CloDF13-Promoter_ItrR-PccI_sGFP 단편 (서열번호 1)

[0088] gaagcatttatcagggttatgtctcatgagcggatacatatgtgaatgtatttagaaaaataaacaatagctagctcactcggtcgctacgctccgggcgttgagactgcgccggcgctgcgacacatacaaaagttaccacagattccgtggataagcaggggactaacatgtgaggcaaaacagcaggccgcgcgggtggcggttttccataggctccgccctcctgccagagttcacataaacagacgcttttccgggtgcatctgtgggagccgtgaggctcaaccatgaatctgacagtacgggcgaaaaccgacaggacttaaagatccccaccgtttccggcggtcgctccctcttgcgctctcctgttccgacctgccgtttaccggatacctgttccgcctttctcccttacgggaagtgtggcgctttctcatagctcacacactggtatctcggtcggtgtaggctggttcgctccaagctgggctgtaaagcaagaactccccgttcagcccgactgctgcgccttatccggttaactgttcaacttgagtccaaccggaaaagcacggtaaaacgccactggcagcagccattggttaactgggagttcgagaggatttgtttagctaaacacgcgggttgccttgaagtgtgcgcaaaagtccggctacactggaaggacagatttggttgctgtgcttctgcgaaagccagttaccacggttaagcagttccccaactgacttaaccttcgatcaaaccacctccccagggtgggtttttcggttacagggcaaaagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctactgaaccgctctagatttcagtgcatttatctcttcaaatgtagcacctgaagtcagccccatacgateaagtgtataattctcatgttagtcatgccccgcgcccaccggaaggagctgactgggttgaaggctctcaagggcatcggtcgagatcccggtgcctaatgagtgagcaaaaaaaaccccgccgaagcggggtttttttgtcatgtcacttgtacagctcgtccatgccgagagtgatccggcgccgggtcacgaactccagcaggaccatgtgatcgcgcttctcgttgggggtcttggctcagcacggactgggtgctcaggtagtggttgcgggcagcagcacggggccgtcgccgatgggggtgttctgctggtagtggtcggcgagctgcacgctgccgtcctccagcttgtggcggtatctgaagttggccttgatgccgttcttctgcttgtcgcggtgatatagacgttgtggctgttgaagttgactccagcttgtgccccaggatgttgccgtcctccttgaagtcgatgcccttcagctc gatgcggttcaccagggtgtcgccctcgaacttcacctcggcgcgggtctttaggtgacctcgtccttgaagctgatggcgctcctggacgtagccttcgggcatggcgacttgaagaagtcgtgctgcttcatgtggtcggggtagcggctgaagcactgcacgccgtaggtcagggtggtcacagggtgggccagggcacgggcagcttgccggtggtgcagatgaacttcagggtcagcttgccgttggtggcatcgccctcgccctcgccgcgcacgtgaacttggccgtttacgtcgccgtccagctcgaccagatgggcaccACTCCTGTGAATAATTCTTCTCTTTACTTGCCATTGGGGATGCTCCTTTGTATGCAGAAatggttccctctccaacttcgcttagtctatggtcgccgttatcattatccaatatatgataccggtgtgttaattgcttttgatataagtttacggctagctcagttcc taggtatagtgtcagcAAAAACACAAAAAGGAGCATCTAAAATGGAATTACGCCATATCCGTTATTTCTTGGCTGTCGCTGAAGAACGCCACTTCACACGCGCTGCAGCCCGCTGGGTATCGGACAGCCACCACTGTCGCAGCAGATCAAGGACTTGAGCGCGAGCTTGCGCTCTTCTGTTTCGTCGTGTGAGCTATGGTGC GAATTGACCGAAGCTGGCATTGCGTTTCTGGACGTTGTTAAAGAAATCCCGTGATGGCGGAACGTGCCACCCAGGCCGCCAACGCGCGTTCGTGGCG

AACTTGGTGTTTTACGTGTCGGCTTCACTGCTTCGTCAGCATTC AATTCGGTGGTACCTACCGCGATTTCGCGCGTTCCGCCGTGCGTACCCCGACGTGCGCC
TGCAGTTGGAAGAGGACAATAACAACGCGTTTAGCTGACGGGTTGAACGAAGGCAGTCTGGACGTGGCCTTTTACGTCTGGGTTTCGCGGGGTGAGAGCGCT
TTCATCTGCGTATGTTATCCGAAGAGCCAATGATGATCGTCATGGCTGAAAATCACCCCGCGAGCTATGAGGAGATTAGTCTGTCGGCGTTTCGTGACG
AAACCTTTCTGTTATTTCTCGTGAAATCGGATTAACCTTGTACGACAGTGTGATCGAGTCTGCCGACTGCGGGATTGAACCTACTATTGGACAGTTAG
CGCCCCAAATTGCGAGTGTCAATTTAGTAGCAGCCGAGATGGGCGTCTCCATTGTGCCCGCGTCCATGTGCAAGTTAAAGTTATCGGTGTAGTTTATC
GTCATATTGCCGATCAGACGCCGACTGCGAAGTTAGCCTTAGCATATCGCCGCGGATAGTACTAGCCCGTGCTTCGCAACTTCGTCCTTACAGTATTTCCGT
GAtggcctGAGACctcatgatcatcatacgaaaaaaaaaccccgcttcggcggggtttttttttatgcgtagtGGTCTCtggccTGAttgctgaaacctc
aggcatttgagaagcacacgggtcacactgcttccggtagtcaataaaccggtaaacagcaatagacataagcggctatttaacgaccctgcc

- [0090] CloDF13-Promoter_ItrC-PccI_sGFP 단편 증폭 프라이머
- [0091] Forward primer (JL00263, 서열번호 2): gaagcatttatcagggttattgtc
- [0092] Reverse primer (JL00264, 서열번호 3): ggcagggtcgtaaatagc

표 1

[0094]	Template (40 ng/ μ L)	0.5 μ L
	Forward primer (10 μ M)	2.5 μ L
	Reverse primer (10 μ M)	2.5 μ L
	dNTPs (each 2.5 μ M)	1 μ L
	5X Reaction Buffer	10 μ L
	Q5 DNA polymerase	0.5 μ L
	DDW	33 μ L
	Total	50 μ L

표 2

[0096]	Initial denaturation	98 $^{\circ}$ C	30 sec
	Denaturation	98 $^{\circ}$ C	10 sec
	Annealing	62 $^{\circ}$ C	30 sec
	Extension	72 $^{\circ}$ C	2 min
	Final extension	72 $^{\circ}$ C	2 min
	Hold	8 $^{\circ}$ C	∞

- [0097] Denaturation <-> Extension 35 cycles

- [0099] Kan^R (서열번호 4)

- [0100] gctatttaacgacctgccctgaaccgacgacaagctgacgaccgggtctccgaagtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaaccctatttgtttatt
tttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgaattaattcttagaaaaactcatcgagcatcaaatgaaactgcaatttatcatatcaggattatcaa
taccatattttgaaaaagccgtttctgtaatgaaggagaaaaactcaccgagcgagttccataggatggcaagatcctggatcggctcgcgattccgactc
gtccaacatcaatacaacctatttaatttccctcgtcaaaaataaggttatcaagtgagaaatcaccatgagtgcgactgaatccggtgagaatggcaaaa
gtttatgcattttctttccagacttggtcaacaggccagccattacgctcgtcatcaaaatcactcgcatcaacaaaccgttatcatctgtgattgcgcct
gagcgagacgaaatacgcggtcgctgttaaaaggacaattacaacaggaatcgaatgcaaccggcgcaggaacactgccagcgcatcaacaatattttcac
ctgaatcaggatattcttctaatactggaatgctgttttccggggatcgagtggtgagtacatgcatcatcaggagtacggataaaatgcttgatgg
tcggaagaggcataaatccgtcagccagtttagtctgaccatctcatctgtaacatcattggcaacgctacctttgccatgtttcagaaacaactctggcg
catcgggcttccatacaatcgatagattgtcgacctgattgcccgcatttatcgcgagccatttatacccatataaatcagcatccatgttggaattta
atcgcgccctagagcaagacggttcccggtgaatatggctcatactcttctttttcaatatatttgaagcatttatcagggttatttgtc

- [0102] Kan^R 증폭 프라이머
- [0103] Forward primer (JL00261, 서열번호 5): gctattttaacgaccctgcc
- [0104] Reverse primer (JL00262, 서열번호 6): gacaataaccctgataaatgcttc

표 3

[0106]	Template (100 ng/ μ L)	0.2 μ L
	Forward primer (10 μ M)	2.5 μ L
	Reverse primer (10 μ M)	2.5 μ L
	dNTPs (each 2.5 μ M)	1 μ L
	5X Reaction Buffer	10 μ L
	Q5 DNA polymerase	0.5 μ L
	DDW	33.3 μ L
	Total	50 μ L

표 4

[0108]	Initial denaturation	98 $^{\circ}$ C	30 sec
	Denaturation	98 $^{\circ}$ C	10 sec
	Annealing	62 $^{\circ}$ C	30 sec
	Extension	72 $^{\circ}$ C	1 min
	Final extension	72 $^{\circ}$ C	2 min
	Hold	8 $^{\circ}$ C	∞

- [0109] Denaturation <-> Extension 35 cycles

- [0111] ItcR 프로모터 J23106 (서열번호 7)
- [0112] TTTACGGCTAGCTCAGTCCTAGGTATAGTGCTAGC

- [0114] ItcR (서열번호 8)
- [0115] MELRHIRYFLAVAERHFTRAAARLGIGPPLSQIKDLERELGALLFRRVSYGAELTEAGIAFLDVVKEIPVMAERATQAAQRAVRGELGVLRVGFTASSA
FNSVVPTAIRAFRRAYPDVRLQLEEDNTTRLADGLNEGSLDVAFLRPGFAGSERFHLRMLSEPPMMIVMAENHPAASYEEISLSAFRDETFLFPREIGLTL
YDSVIESCRTAGFEPTIGQLAPQIASVINLVAAEMGVSIVPASMSQVKVIGVYVRHIADQPTAKLALAYRRGDTSPVLRNFVLTVPF*

- [0117] P_{cc1} 프로모터 (서열번호 9)
- [0118] CTTCATATCCAAAAGCAATTAACACACCGGTATCATATATTGGATAAATGATAACGGCGACCATAGACTAAGCGAAGTTGGAGGAGGAACCAT

- [0120] sfGFP (서열번호 10)
- [0121] MASKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVRGEGEGDATNGKLTCLKICTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTISFK
DDGTYYKTRAEVVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNFSNHVYITADKQKNGIKANFKIRHNVEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLST
QSVLSKDPNEKRDMVLLEFVTAAGITLGMDELYK*

[0123] 실시예 2. CloDF13_ItrC_sfGFP 플라스미드의 *Vibrio* sp. dhg로의 형질전환

[0125] LBV2 아가 플레이트(LB (25 g/L Difco Luria-Bertani) supplemented with v2 salts (204 mM NaCl, 4.2 mM KCl, 23.14 mM MgCl₂), agar (1.5 % (Bacto agar)))에 *Vibrio* sp. dhg (Lim, Hyun Gyu, et al. "Vibrio sp. dhg as a platform for the biorefinery of brown macroalgae." Nature Communications 10.1 (2019): 2486. Vibrio sp. dhg as a platform for the biorefinery of brown macroalgae | Nature Communications)를 스트리킹(streaking)하고, 37℃에서 10 시간동안 배양하였다. 생성된 콜로니를 LBV2 배양액에 3 mL에 접종하여 37℃, 250 rpm에서 밤새 배양하였다. 상기 배양액을 새로운 LBV2 배양액 5 mL에 100:1로 희석하여 접종한 뒤, OD₆₀₀이 0.6이 될 때까지 배양하였다. 얼음에서 10분 동안 유지한 뒤, 4℃에서 10 분간 3600 rpm으로 원심분리하였다. 이후 상등액을 제거하고 1 mL electroporation buffer (680 mM sucrose, 7 mM K₂HPO₄, pH 7)를 분주하여 재현탁한 뒤, 1.5 mL Eppendorf tube로 옮겨주었다. 4℃에서 1 분간 10,000 rpm으로 원심분리하고 상등액을 제거하였다. 1 mL electroporation buffer (680 mM sucrose, 7 mM K₂HPO₄, pH 7)를 분주하여 재현탁한 뒤, 4℃에서 1 분간 10,000 rpm으로 원심분리하고 상등액을 제거하였다. 90 µL의 electroporation buffer를 분주하였다. 실시예 1에서 제작한 플라스미드를 1 µg 넣고 혼합한 뒤, 1 mm gap cuvette에 옮긴 후, 전압을 0.8 kV로 설정하고 electroporation을 실시하였다. Recovery buffer (LB supplemented with v2 salts (204 mM NaCl, 4.2 mM KCl, 23.14 mM MgCl₂), 680 mM sucrose)를 1mL 넣고 37℃에서 2 시간 배양하였다. 10 µg/mL의 Kanamycin이 포함된 LBV2 agar plate에 spreading하여 37℃에서 배양하였다.

[0127] 실시예 3. CloDF13_ItrC_sfGFP 플라스미드가 형질전환된 *Vibrio* sp. dhg에서의 형광 발현 확인

[0128] 이타콘산 4g/L의 수용액을 NaOH를 이용해 pH 7.0으로 중화시킨 뒤, 2X 최소 액체배지(2X liquid minimal medium)와 1:1로 희석하여 이타콘산 2 g/L가 포함된 1X 최소 액체배지(10 g/L NaCl, 5 g/L KCl, 100 mM K₂HPO₄, 100 mM KH₂PO₄, 0.5 g/L MgSO₄·7H₂O, 4 g/L glucose, 2 mL/L trace metal)를 제작하였다. 이렇게 만든 이타콘산 포함된 최소배지와 1X 최소배지를 적절한 비율로 섞어서 다양한 농도의 이타콘산이 포함된 1X 최소배지를 제조하였다.

[0129] 3 mL의 최소 액체배지에 CloDF13_ItrC_sfGFP 플라스미드가 형질전환된 *Vibrio* sp. dhg 균주의 단일 콜로니를 접종하여 37℃에서 250 rpm으로 밤새 배양하였다. 배양액을 새로운 3 mL 최소 액체배지에 100:1로 희석하여 37℃에서 배양하고, OD₆₀₀이 0.5가 되면, 최소 배지 3 mL에 OD₆₀₀이 0.05가 되는 부피를 계산하여, 1.5 mL Eppendorf tube에 분주하고 이를 4℃에서 2분간 10,000 rpm으로 원심분리하였다. 이후 상등액을 제거하고, 이타콘산이 포함된 최소 배지 1 mL을 분주하여 재현탁하였다. 24-딥 웰 플레이트에 이타콘산이 포함된 최소 배지 2 mL을 분주하고 상기 재현탁한 이타콘산 포함된 최소 배지 1 mL도 같이 분주하였다. 37℃에서 250 rpm으로 배양하며, 6 시간 후에 형광(Excitation: 485 nm, Emission: 510 nm)과 흡광(OD₆₀₀)을 측정하였다.

[0130] 그 결과, CloDF13_ItrC_sfGFP 플라스미드가 형질전환된 *Vibrio* sp. dhg에 이타콘산을 처리하는 경우, 농도 의존적으로 GFP 형광 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (도 2).

[0131] 3회 반복 실험을 통해 확인한 결과, CloDF13_ItrC_sfGFP 플라스미드가 형질전환된 *Vibrio* sp. dhg에서 이타콘산을 처리하기 전에 비해 이타콘산(2 g/L)을 처리한 결과, 형광 발현이 2.33에서 141.28로 증가하여 약 96.32배 증가하는 것을 확인하였다(도 7, 도 8).

[0133] 실시예 4. CloDF13_ItrC_sfGFP 플라스미드에 Toehold 스위치 시스템 도입

[0134] CloDF13_ItrC_sfGFP 플라스미드가 형질전환된 *Vibrio* sp. dhg에서 이타콘산 검출을 위한 형광 발현 정도를 개선하고자 하였다.

[0135] 이를 위하여, 실시예 1에서 제작한 CloDF13_ItrC_sfGFP 플라스미드의 ItrC 조절 프로모터(regulatory promoter) 부위에 트리거 서열, 트리거의 터미네이터 일부, 및 토홀드 스위치 일부 서열을 추가하고자 프라이머

(서열번호 14, 서열번호 15)를 설계하고, Overlap PCR(표 5, 표 6)을 실시하였다.

- [0137] P_{cc1} 프로모터(트리거 프로모터) (서열번호 9)
- [0138] CTTTCATATCCAAAAGCAATTAAACACACCGGTATCATATATTGGATAAATGATAACGGCGACCATAGACTAAGCGAAGTTGGAGGAGGAACCAT
- [0140] 트리거 서열 (서열번호 11)
- [0141] GCTCGATCACTAATCTGATCGAGACGAACATACCTACCTCATTATCTTACTTGT
- [0143] VP15 프로모터(토홀드 프로모터) (서열번호 12)
- [0144] TTGACAGCTAGCTCAGTCCTAGGTATAATGCTAGC
- [0146] 토홀드 서열 (서열번호 13)
- [0147] GAGTAAGATAATGAAGGTAGGTATGTTAACTTTAGAACAGAGGAGATAAAGATGAACATACCTACG
- [0149] JL00460 (서열번호 14)
- [0150] TGTAACTTTAGAACAGAGGAGATAAAGATGAACATACCTACGaacctggcggcagcgcaaaagATGGCAAGTAAAGGAGAAGAATT
- [0152] JL00462 (서열번호 15)
- [0153] GGGGTTATGCTAGACAAGTAAGATAATGAAGGTAGGTATGTTTCGCTCGATCAGATTAGTGATCGAGCATGGTTCCTCCTCCAACCTC
- [0155] JL00486 (서열번호 16)
- [0156] TACTTGCTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGAACGGTTCGTATCTCGAATGCTCGGTTGACAGCTA
- [0158] JL00488 (서열번호 17)
- [0159] CTCTGTTCTAAAGTTAACATACCTACCTTCATTATCTTACTCGCTAGCATTATACCTAGGACTGAGCTAGCTGTCAACCGAGCATTCGA

표 5

[0161]	Components	Volume
	5X Q5 Reaction buffer	5 μ L
	2.5 mM dNTPs	2 μ L
	Forward primer (JL00460, 10 μ M)	1.25 μ L
	Reverse primer (JL00462, 10 μ M)	1.25 μ L
	Q5 High Fidelity DNA polymerase	0.25 μ L
	Template (CloDF13_ItrR_sfGFP)	1 μ L (116.178 ng)
	UPW (Ultra-pure water)	14.25 μ L
	Total	25 μL

표 6

[0163]

Initial denaturation	98 °C	30 sec
Denaturation	98 °C	10 sec
Annealing	62 °C	30 sec
Extension	72 °C	2 min
Final extension	72 °C	2 min
Hold	8 °C	∞

[0165]

또한, 트리거의 터미네이터의 나머지, 토홀드의 프로모터 (VP15) 및 토홀드의 나머지 부분을 합성하기 위해 3' 쪽에 서로 상보적인 서열을 보유한 2개의 올리고머를 어닐링 버퍼(표 7)를 이용하여 어닐링 반응하여 준비하였다(표 8). 어닐링은 100°C에서 3 분 반응 후, 25°C에서 20 분 반응시켰다.

[0166]

Overlap PCR product와 어닐링 된 올리고머는 약 18~20 bp의 염기가 중복되도록 설계하였으며, 깊은 어셈블리 (표 9)로 50°C에서 60 분간 반응시켜 클로닝을 진행하였다.

표 7

[0168]

1 M Tris	1 mL
0.5 M EDTA	20 µL
5 M NaCl	1 mL
UPW	Up to 10 mL
Total	10 mL

표 8

[0170]

100 µM Forward oligomer (JL00486)	1 µL
100 µM Reverse oligomer(JL00488)	1 µL
10 X Annealing buffer	50 µL
UPW	448 µL
Total	500 µL

표 9

[0172]

Components	Volume	Final concentration
Annealed oligo mixture (0.2 pmol/ µL)	5 µL	1 pmol
Linearized vector (0.02 pmol/ µL)	2.55 µL	0.02 pmol
UPW	2.45 µL	–
NEBuilder HiFi DNA assembly Master Mix 2X	10 µL	1X
Total	50 µL	

[0174]

상기와 같은 방법으로 VP15의 Toehold의 프로모터를 가지는 플라스미드를 제작하고(도 5), *E.coli* Turbo competent cell을 이용하여 제조사의 지침에 따라 형질전환시키고, Plasmid mini prep (Cosmogenetech)을 사용

하여 제조사의 지침에 따라 플라스미드를 분리한 후, LaboPass™ Plasmid DNA Purification Kit Mini를 사용하여 제조사의 지침에 따라 정제하고, 서열분석하여 클로닝이 제대로 되었음을 확인하였다.

[0176] 실시예 5. Toehold 스위치 시스템 도입된 재조합 플라스미드의 *Vibrio* sp. dhg로의 형질전환 및 형광 발현 확인

[0178] 실시예 4에서 제작된 플라스미드를 실시예 2의 방법과 동일하게 *Vibrio* sp. dhg로 형질전환하고 이타콘산 처리에 따른 형광 발현을 확인하였다.

[0180] 그 결과, CloDF13_ItrR_Trigger_VP15_Toehold_sfGFP 플라스미드가 형질전환된 *Vibrio* sp. dhg에 이타콘산을 처리하는 경우, 농도 의존적으로 GFP 형광 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 특히, CloDF13_ItrR_sfGFP 플라스미드가 형질전환된 *Vibrio* sp. dhg와 비교할 때, Toehold 스위치 시스템이 도입된 CloDF13_ItrR_Trigger_VP15_Toehold_sfGFP 플라스미드가 형질전환된 *Vibrio* sp. dhg에서는 이타콘산을 처리하였을 때 형광 강도가 141.28에서 301.80으로 2배 이상 증가하였다(도 7).

[0181] 한편, 3회 반복 실험을 통해 확인한 결과, CloDF13_ItrR_Trigger_VP15_Toehold_sfGFP 플라스미드가 형질전환된 *Vibrio* sp. dhg에서 이타콘산을 처리하기 전에 비해 이타콘산(2 g/L)을 처리한 결과, 형광 발현이 81.20에서 301.80로 증가하여 약 3.92배 증가하는 것을 확인하였다.

[0183] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 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.

부호의 설명

[0185] CloDF13: *Vibrio* 내에서 플라스미드의 복제를 위한 replicon.

KanR: 항생제 카나마이신에 대한 내성을 위한 gene.

J23106: ItrR의 전사를 위한 상시 발현되는 프로모터.

UTR (Untranslated region): 비번역부위.

ItrR: Itaconic acid에 반응하는 repressor 단백질 합성. PccI 프로모터에 반응하여 PccI 프로모터와 그 downstream의 유전자 발현을 억제한다.

PccI: Superfolder GFP의 전사를 위한 프로모터 ItrR repressor 단백질과 반응한다.

Superfolder GFP(Green fluorescent protein): GFP 계열의 형광 단백질 중 하나로, 단백질 염색과 생물학적 이미징 연구에 널리 사용되는 형광 단백질. Superfolder GFP는 단백질 공학을 통해 개선된 GFP 변형 중 하나이며, 다른 GFP 유형보다 안정적이고 밝은 형광을 발산하는 특징을 갖고 있다.

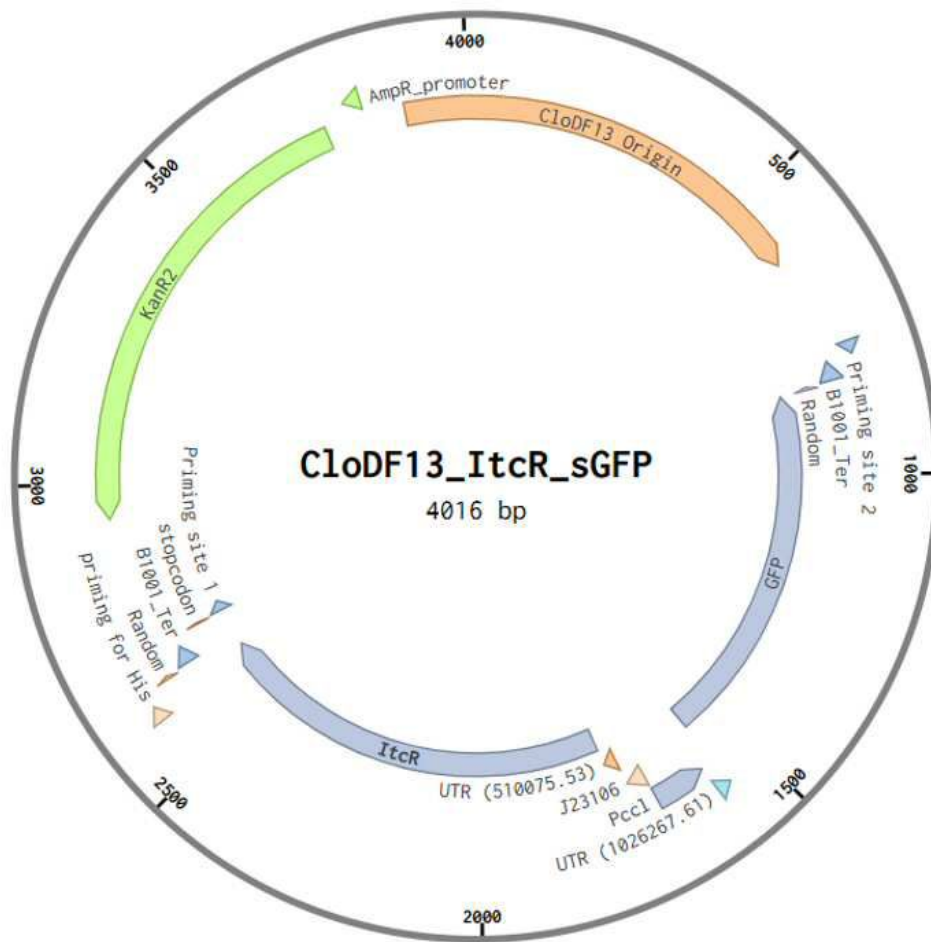
Trigger: Toehold와 상보적인 서열을 보유함. Trigger의 프로모터로 PccI 프로모터를 사용하여 ItrR repressor 단백질에 의해 trigger의 전사를 조절하도록 설계하였다. Trigger는 mRNA로 전사되어 toehold 서열과 결합한다.

VP15: Toehold의 프로모터. 프로모터의 강도에 따른 toehold와 그 downstream에 위치한 유전자(sfGFP)의 발현량을 보기 위함

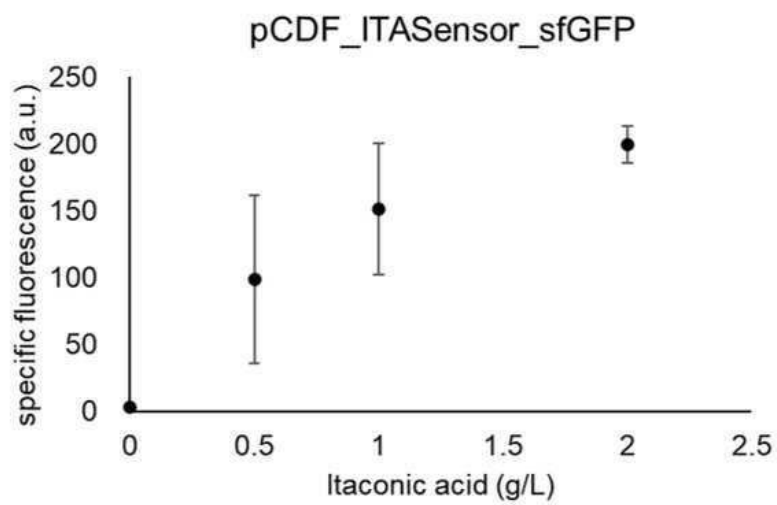
Toehold: 전사가 이루어진 trigger mRNA와 반응하여 downstream에 위치한 sfGFP의 발현을 증가시키기 위한 tool.

도면

도면1



도면2

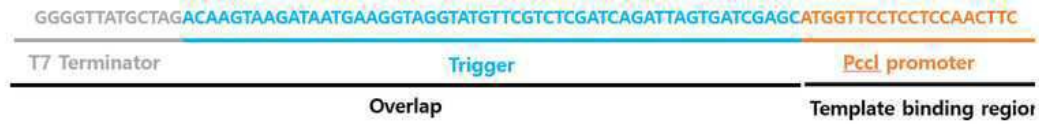


도면3

JLO0460



JLO0462



도면4

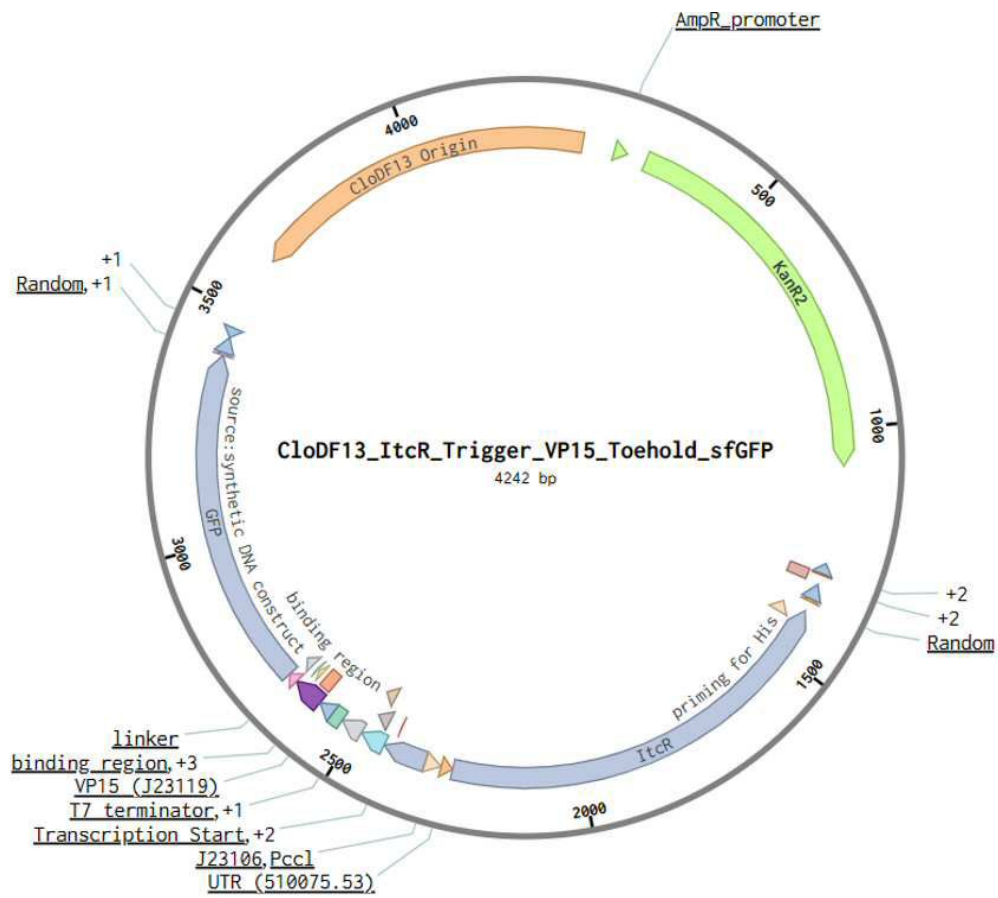
JLO0486 (Complement with JLO0488)



JLO0488 (Complement with JLO0486)



도면5



도면6

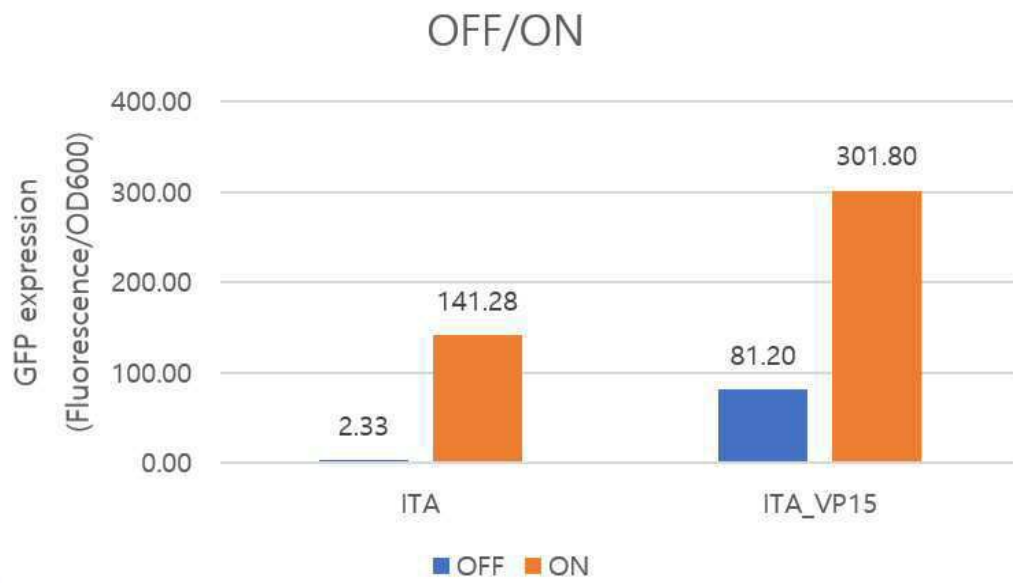
① Itaconic acid 0 g/L

	ItrC #1	ItrC #2	ItrC #3	ItrC VP15 #1	ItrC VP15 #2	ItrC VP15 #3
OD ₆₀₀	0.3983	0.4679	0.1795	0.5002	0.5284	0.4500
Fluorescence	0.914	1.132	0.410	51.775	8.315	55.955

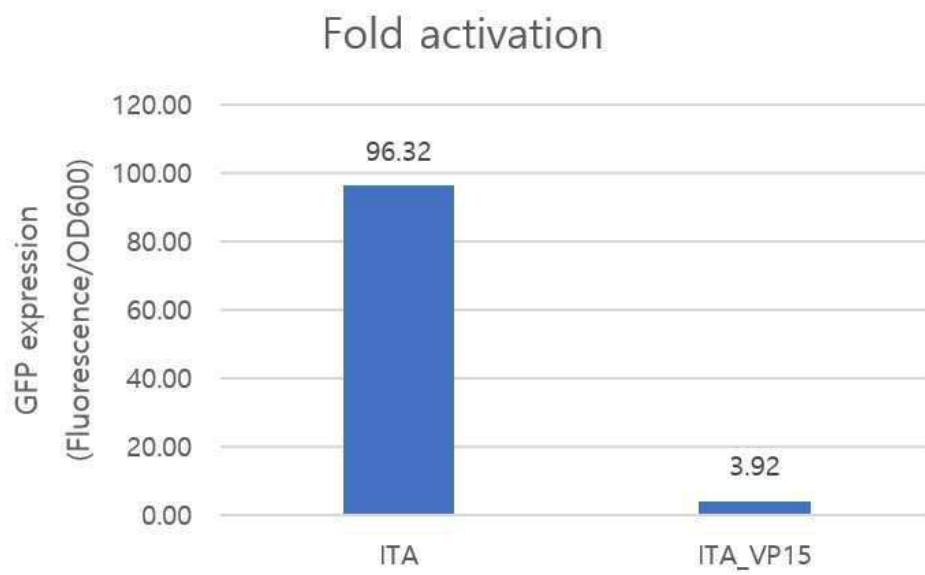
② Itaconic acid 2 g/L

	ItrC #1	ItrC #2	ItrC #3	ItrC VP15 #1	ItrC VP15 #2	ItrC VP15 #3
OD ₆₀₀	0.5481	0.6414	0.4123	0.6169	0.5744	0.4889
Fluorescence	98.695	93.815	40.205	200.065	26.935	261.165

도면7



도면8



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.