



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0065856
(43) 공개일자 2019년06월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/74 (2006.01) C12N 9/00 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/74 (2013.01)
C12N 9/1055 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0165420
(22) 출원일자 2017년12월04일
심사청구일자 2017년12월04일

(71) 출원인
단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단
충청남도 천안시 동남구 단대로 119, 단국대학교 천안캠퍼스내(안서동)
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
경북대학교 산학협력단
대구광역시 북구 대학로 80 (산격동, 경북대학교)
(72) 발명자
오만환
충청남도 천안시 서북구 두정동 한성3차 빌하우스 101동 804호
이제철
대구광역시 달서구 도원동 롯데캐슬아파트 101동 803호
최철희
대구광역시 수성구 상록로 41 범어태왕아너스 10 2동 2103호
(74) 대리인
손민

전체 청구항 수 : 총 9 항

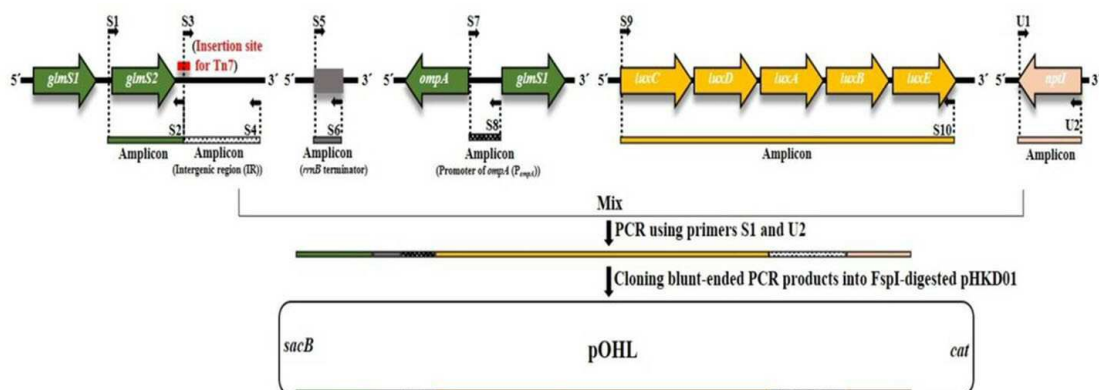
(54) 발명의 명칭 미생물 염색체에서 발광단백질을 상시 생산하기 위한 자살백터

(57) 요약

본 발명은 항생제 선별인자와 플라스미드 카피 수에 영향을 받지 않고 미생물 염색체에서 단일 카피 형태로 발광단백질을 상시 생산하는 미생물의 제조용 자살백터에 관한 것으로, 구체적으로 표적 유전자의 5' 말단과 상동인 핵산 영역, *rrnB* 종결자, *OmpA* 프로모터, *luxCDABE* 오페론 및 표적 유전자의 3' 말단과 상동인 핵산 영역을 순차적으로 포함하는 발광미생물의 제조용 자살백터, 상기 자살백터를 포함하는 발광미생물의 제조용 키트, 상기 자살백터를 이용하여 발광미생물을 제조하는 방법, 및 상기 제조방법으로 제조된 발광미생물에 관한 것이다.

본 발명에서 제공하는 발광미생물 제조용 자살백터 또는 발광미생물 제조용 키트를 이용하면, 항생제 저항성 마커나 백터의 카피 수에 영향을 받지 않고 발광단백질 유전자만을 안정적으로 상시 발현하는 미생물을 제작할 수 있으므로, 본 발명은 병원균 미생물 저해 물질의 유효성 평가, 효능 검증 등에 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 9/1096 (2013.01)

C12N 9/93 (2013.01)

C12Y 204/0101 (2013.01)

C12Y 206/01016 (2013.01)

C12Y 603/04 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI14C0257

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 보건의료기술연구개발사업(질환극복기술개발사업)

연구과제명 병원성인자를 표적으로 한 다제내성 *Acinetobacter baumannii* 균 감염차단 물질 개발

기 여 율 1/1

주관기관 경북대학교 산학협력단

연구기간 2014.06.01 ~ 2017.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

표적 유전자의 5' 말단과 상동인 핵산 영역, *rrnB* 종결자, *OmpA* 프로모터, *luxCDABE* 오페론 및 표적 유전자의 3' 말단과 상동인 핵산 영역을 순차적으로 포함하는, 발광미생물의 제조용 자살벡터.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 표적 유전자는 *glmS2* 유전자인 것인, 발광미생물의 제조용 자살벡터.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 자살벡터는 *nptI* 유전자를 추가로 포함하는 것인, 발광미생물의 제조용 자살벡터.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 자살벡터는 *nptI* 유전자 뒤에 *sacB* 유전자를 추가로 포함하는 것인, 발광미생물의 제조용 자살벡터.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 *nptI* 유전자는 미생물 내에 삽입되지 않는 것을 특징으로 하는, 발광미생물의 제조용 자살벡터.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 미생물은 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*)인 것인, 발광미생물의 제조용 자살벡터.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 자살벡터는 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것인, 발광미생물의 제조용 자살벡터.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 자살벡터는 도 2의 B에 도시된 개열지도를 갖는 것인, 발광미생물의 제조용 자살벡터.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 발광단백질 발현용 자살벡터를 포함하는, 발광미생물의 제조용 키트.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 항생제 선별인자와 플라스미드 카피 수에 영향을 받지 않고 미생물 염색체 내에서 단일 카피 형태로 발광단백질을 상시 생산하는 미생물의 제조용 자살백터에 관한 것으로, 구체적으로 표적 유전자의 5' 말단과 상동인 핵산 영역, *rrnB* 종결자, *OmpA* 프로모터, *luxCDABE* 오페론 및 표적 유전자의 3' 말단과 상동인 핵산 영역을 순차적으로 포함하는 발광미생물의 제조용 자살백터, 상기 자살백터를 포함하는 발광미생물의 제조용 키트, 상기 자살백터를 이용하여 발광미생물을 제조하는 방법, 및 상기 제조방법으로 제조된 발광미생물에 관한 것이다.

배경기술

[0003] 반딧불에서 흔히 볼 수 있는 자연적 생물발광현상(bioluminescence)은 루시페라제(luciferase) 효소와 이의 기질인 루시페린(luciferin)에 의해 발생한다. 루시페린이 효소의 작용으로 산화되면서 방출되는 에너지가 빛에너지의 형태로 체외로 발산되어 빛을 내게 된다. 반딧불 외에도 수많은 생물에서 생물발광이 발생한다고 알려져 있으며, 미생물에서도 약 70종의 생물이 발광 특성이 있는 것으로 알려져 있다.

[0005] 미생물의 발광반응은 대표적인 예로, 5개의 유전자(*luxCDABE*)로 구성되는 *lux* 유전자 카세트(gene cassette)에 의해 발생한다. 상기 유전자를 이용하여 발광미생물을 제조하는 연구가 활발하게 진행되고 있으며, 이들은 다양한 산업 분야에서 이용되고 있다. 예를 들어, 동물이나 식물의 성장 시 유전자 발현을 연구하는데 이용되며, 여러 질병의 감염 경로를 관찰하거나 감염 질병의 치료제 개발에도 사용되고 있다. 또한, 공해물질, 폭발물, 화학물질 등의 측정에 이용되기도 하는데, 이와 관련해서는 미생물을 이용한 중금속 탐지 바이오센서가 개발된바 있다(한국 등록특허공보 제10-1724015호). 이러한 미생물은 빛을 통해 육안으로 직접 관찰할 수 있다는 점에서 그 이용 가치가 높아지고 있다.

[0007] 그러나, 상술한 바와 같은 다양한 이용 가능성에도 불구하고, 기존의 방법으로 발광미생물을 제조하는 경우, 발광단백질 유전자가 백터의 자가복제 특성에 의해 카피 수(copy number)에 영향을 받아 해당 미생물 내에서 발현량이 불안정해지는 문제점이 있었다. 따라서, 기존의 일반적인 백터를 사용하여 제조한 미생물들은 이들의 행동을 지속적으로 관찰해야 하는 연구 등에는 적합하지 않았다. 또한, 백터 내 포함된 항생제 저항성 마커에 의해 미생물이 특정 항생제에 대해 저항성을 갖게 되어, 미생물에 대한 다양한 저해 물질의 개발에도 한계점이 있었다.

[0009] 이에 따라, 본 발명자들은 플라스미드의 카피 수 및 항생제 저항성 마커에 영향을 받지 않고, 미생물의 게놈 내에서 단일 카피 형태로 발광단백질을 발현하는 미생물을 개발하고자 예의노력 연구한 결과, 미생물 내에서 복제되지 않는 자살백터에 발광단백질을 암호화하는 유전자, 상기 유전자의 발현을 상시적으로 촉진하는 유전자, 및 상기 유전자들과 미생물의 게놈 DNA의 상동재조합을 촉진하는 유전자 등을 포함하는 자살백터를 개발하였으며, 상기 자살백터를 이용하여 제조된 미생물은 발광단백질을 안정적으로 상시 발현하며 나아가 항생제 저항성 유전자가 결실되는 것을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 하나의 목적은 표적 유전자의 5' 말단과 상동인 핵산 영역, *rrnB* 종결자, *OmpA* 프로모터, *luxCDABE* 오페론 및 표적 유전자의 3' 말단과 상동인 핵산 영역을 순차적으로 포함하는, 발광미생물 제조용 자살백터를 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 발광단백질 발현용 자살백터를 포함하는, 발광미생물 제조용 키트를 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 자살백터를 이용하여, 발광미생물 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 제조방법으로 제조된, 발광미생물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0016] 본 발명자들은 병원균에 대한 저해 물질의 개발 수단으로써 발광미생물을 제조하고자 하였다. 특히, 어느 항생제에 대해서도 저항성을 갖지 않아 다양한 저해 물질을 시험해볼 수 있는 미생물을 제작하고자 하였으며, 나아가 모든 각각의 미생물이 일정하고 균일한 강도로 발광하도록 하여 저해 물질에 대한 미생물의 영향을 용이하게 관찰하고자 하였다. 이에 따라, 전술한 바와 같은 발광미생물을 제작하고자 발광단백질을 암호화하는 유전자(이하, '발광단백질 유전자'로 명명함)를 포함하는 자살백터를 개발하였다.

[0017] 본 발명에 따른 자살백터는 미생물 안에서 스스로 복제되지 않고, 이에 포함된 발광단백질 유전자, 항생제 저항성 유전자 등의 유전자 단편이 스스로 발현되지도 않는 것을 특징으로 한다. 또한, 상기 유전자 단편이 상동재조합을 통해 미생물의 염색체 내에 삽입되는 경우 목적하는 발광단백질 유전자만 삽입되며, 항생제 저항성 유전자는 삽입되지 않는 것을 특징으로 한다.

[0018] 즉, 본 발명의 자살백터를 이용하면 발광단백질을 발현하는 미생물을 제조할 수 있는데, 상기 미생물이 균체 내에 다중 카피(multiple copy)의 자살백터를 포함하고 있더라도 발광단백질의 발현양 및 이에 따른 발광량이 많아지는 것은 아니며 염색체 내에 도입된 단일 카피(single copy)의 발광단백질 유전자에 의해서만 발광단백질이 발현되므로 모든 미생물이 일정한 양으로 발광하게 된다. 또한, 상기 미생물은 항생제 저항성이 없으므로, 발광의 강도 및 위치 등을 관찰함으로써 상기 발광미생물을 다양한 저해 물질의 개발에 유용하게 활용할 수 있다.

[0020] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 하나의 양태는 표적 유전자의 5' 말단과 상동인 핵산 영역, *rrnB* 종결자, *OmpA* 프로모터, *luxCDABE* 오페론, 표적 유전자의 3' 말단과 상동인 핵산 영역을 순차적으로 포함하는, 발광 미생물 제조용 자살백터를 제공한다.

[0022] 본 발명의 용어, "발광미생물"은 스스로 빛을 내는 미생물을 의미한다. 미생물이 포함하는 루시페라제(luciferase), 녹색형광단백질(green fluorescent protein) 등의 발광단백질에 의해 발광 현상이 나타날 수 있는데, 미생물의 위치, 양, 이동 여부 등을 빛을 통해 육안으로 쉽게 관찰할 수 있으므로, 미생물에 의한 감염 질병의 치료제 등의 개발에 유용하게 활용된다.

[0023] 본 발명에서, 상기 발광미생물의 종류는, 발광을 통해 미생물의 활동을 관찰할 수 있고, 이에 대한 저해물질의 개발에 활용될 수 있는 한, 특별히 제한되지 않는다. 구체적으로, 상기 미생물은 병원균(pathogenic bacteria)일 수 있으며, 더욱 구체적으로 악티노미세스(*Actinomyces*) 속, 바실러스(*Bacillus*) 속, 보렐리아(*Borrelia*) 속, 클라미디아(*Chlamydia*) 속, 클로스트리듐(*Clostridium*) 속, 엔테로코커스(*Enterococcus*) 속, 에세르시아(*Escherichia*) 속, 헬리코박터(*Helicobacter*) 속, 클렙시엘라(*Klebsiella*) 속, 리지오넬라(*Legionella*) 속, 미코박테리움(*Mycobacterium*) 속, 슈도모나스(*Pseudomonas*) 속, 살모넬라(*Salmonella*) 속, 시젤라(*Shigella*) 속, 스타필로코커스(*Staphylococcus*) 속, 스트렙토코커스(*Streptococcus*) 속, 비브리오(*Vibrio*) 속 또는 아시네토박터(*Acinetobacter*) 속 미생물일 수 있고, 가장 구체적으로 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*, *A. baumannii*)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0025] 본 발명의 용어 "자살백터(suicide vector)"는 숙주 미생물의 게놈 DNA에 DNA 단편(유전자 단편)을 전달하기 위한 전달매체가 되는 도입백터의 일종으로서, 특정 숙주 안에서 복제되지 않고, 이에 포함된 DNA 단편이 발현되지도 않는 플라스미드 또는 파자지를 의미한다. 따라서, 상기 자살백터에 의해 제조된, 본 발명의 발광미생물이 방출하는 발광량은 백터의 수와는 관련이 없으며, 백터에 포함된 유전자(DNA 단편)가 염색체 안에 상동재조합을 통해 도입되는 경우에만 발광단백질이 발현되어 발광하게 된다. 즉, 상기 자살백터를 이용하면 제조된 발광미생물의 발광량은 백터의 카피 수와는 관련이 없으며, 발광미생물의 수에 비례하게 된다.

[0026] 한편, 본 명세서에서 "DNA 단편", "유전자 단편" 및 "유전자"는 동일한 의미로 혼용되어 사용될 수 있고, 또한

"자살벡터" 및 "제조합벡터"도 동일한 의미로 혼용되어 사용될 수 있다.

- [0028] 본 발명의 발광미생물 제조용 자살벡터는 표적 유전자의 5' 말단과 상동인 핵산 영역, *rrnB* 종결자, *OmpA* 프로모터, *luxCDABE* 오페론, 표적 유전자의 3' 말단과 상동인 핵산 영역을 순차적으로 포함하는 것일 수 있다.
- [0029] 상기 표적 유전자의 5' 말단과 상동인 핵산 영역, *rrnB* 종결자, *OmpA* 프로모터, *luxCDABE* 오페론 및 표적 유전자의 3' 말단과 상동인 핵산 영역은 숙주 미생물의 게놈 DNA에 도입되는 DNA 단편을 의미하며, 숙주 미생물의 게놈 DNA에 발광단백질 유전자를 삽입시키고, 상기 유전자를 발현시킬 목적으로 사용된다.
- [0031] 본 발명의 목적상, 상기 발광미생물은 발광단백질 유전자의 발현 및 이에 따른 발광단백질의 발현에 의해 발광 현상을 나타내는 것일 수 있다.
- [0032] 구체적으로, 상기 발광단백질 유전자는 *luxCDABE* 오페론일 수 있다.
- [0033] 본 발명의 용어, "*luxCDABE* 오페론"은 루시페라제를 암호화하는 유전자(LuxA 및 LuxB의 이중이량체)와 상기 루시페라제의 기질인 루시페린(tetradecanal)을 암호화하는 유전자(LuxC, LuxD 및 LuxE)를 모두 포함하고 있는 DNA 단편이다. 발광물질인 루시페린(luciferin)이 발광세포 내에서 ATP에 의해 활성화되어 활성루시페린으로 변환되고, 활성루시페린이 발광효소인 루시페라아제(luciferase)의 작용에 의해 산화되어 산화루시페린으로 되면서 화학에너지를 빛에너지로 전환시켜 빛을 발하게 된다. 따라서, 상기 *luxCDABE* 오페론을 포함하는 본 발명의 자살벡터는 발광미생물의 제조용으로 사용될 수 있다.
- [0035] 본 발명의 용어, "표적 유전자"는 본 발명의 자살벡터를 도입하려는 미생물의 게놈 내 위치를 의미하며, 구체적으로 상기 표적 유전자의 5'- 및 3'- 말단에 본 발명의 발광단백질 제조용 자살벡터가 도입되어, 상기 자살벡터를 포함하는 발광 미생물이 제조될 수 있다. 구체적으로, 상기 표적 유전자는 *glmS2* 유전자일 수 있으나, 상기 *luxCDABE* 오페론이 미생물의 게놈 DNA에 도입되게 할 수 있는 한, 이에 제한되지 않는다.
- [0036] 본 발명의 용어, "표적 유전자의 5' 말단과 상동인 핵산 영역" 및 "표적 유전자의 3' 말단과 상동인 핵산 영역"은 상기 표적 유전자의 각 말단과 상동성을 갖는 핵산 서열을 의미하며, 구체적으로 상동성에 의한 상동재조합을 통해 미생물의 게놈 내 정해진 위치에 본 발명의 자살벡터를 도입하는 목적의 서열일 수 있다. 이때, 상기 상동성은 70% 이상, 보다 구체적으로 80% 이상, 더욱 구체적으로 90% 이상일 수 있으나, 상동재조합이 일어날 수 있는 한, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 핵산 영역은 500 내지 1500 bp, 더욱 구체적으로 700 내지 1300 bp, 가장 구체적으로 900 내지 1100 bp일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0038] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 표적 유전자인 *glmS2* 유전자의 5' 말단과 상동인 핵산 영역으로서 *attTn7*의 상위부분 및 표적 유전자인 *glmS2* 유전자의 3' 말단과 상동인 핵산 영역으로서 *attTn7*의 하위부분을 상기 *luxCDABE* 오페론을 숙주 미생물의 게놈 DNA에 삽입시키는 목적으로 사용하였다(실시예 1 및 도 1).
- [0039] 상기 용어, "*attTn7*의 상위부분" 및 "*attTn7*의 하위부분"은 미생물의 트랜스포존(transposon) Tn7이 삽입되는 미생물 내 위치를 의미하는데, 본 발명에서는 미생물의 게놈 DNA에 상기 *luxCDABE* 오페론이 삽입될 수 있도록 상동재조합을 유도하는 목적으로 사용될 수 있다. 또한, *attTn7*의 상위부분은 *glmS2* 유전자를 의미할 수 있으며, *attTn7*의 하위부분은 *glmS2* 유전자의 하위에 위치한 유전자간 영역을 의미할 수 있다.
- [0041] 또한, *rrnB* 종결자 및 *OmpA* 프로모터는 상기 *luxCDABE* 오페론에 의해 암호화되는 발광단백질의 발현을 용이하게 할 목적으로 사용될 수 있다.
- [0042] 본 발명의 용어, "*rrnB* 종결자"(*rrnB* terminator)는 *rrnB* 유전자의 끝을 표시하는 핵산 서열을 의미하는데, 본 발명에서는 상기 자살벡터에서 *luxCDABE* 오페론의 앞 부분에 존재하는 표적 유전자의 5' 말단과 상동인 핵산 영역(*attTn7*의 상위부분), 즉 *glmS* 유전자의 발현을 방지하기 위하여 사용될 수 있다.
- [0043] 본 발명의 용어, "*OmpA* 프로모터"는 외막 단백질 A(Outer membrane protein A) 단백질을 암호화하는 *OmpA* 유전자의 프로모터 서열을 의미하며, 본 발명에서는 *luxCDABE* 오페론을 상시적으로 발현하기 위하여 사용될 수

있다.

- [0045] 또한, 본 발명의 발광단백질 발현용 자살백터는 미생물을 선별하기 위한 유전자를 추가로 포함할 수 있다.
- [0046] 상기 미생물 선별을 위한 유전자는 *nptI* 유전자, *bla* 유전자(ampicillin resistance gene) 또는 *cat* 유전자(chloramphenicol resistance gene)가 될 수 있고, 보다 구체적으로 *nptI* 유전자일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0047] 본 발명의 용어, "*nptI* 유전자"는 네오마이신 인산전달효소(Neomycin phosphotransferase) 단백질을 암호화하는 유전자를 의미한다. 상기 유전자는 미생물에 카나마이신(kanamycin), 네오마이신(neomycin), 겐타마이신(geneticin; G418), 파로모마이신(paromomycin) 등의 항생제에 대한 저항성을 부여하므로, 본 발명에서는 상기 자살백터를 포함함으로써 형질전환된, 발광미생물의 선별 마커로서 사용될 수 있다.
- [0049] 본 발명의 목적상, 상기 발광미생물 제조용 자살백터는 상기 자살백터 내 포함된 항생제 저항성 유전자, 예를 들어 *nptI* 유전자가 미생물 내에 삽입되지 않도록 하는 것을 특징으로 하며, 상기 항생제 저항성 유전자가 미생물 내에 삽입되지 않는 경우, 상기 미생물은 항생제 저항성을 잃게 된다.
- [0051] 또한, 상기 발광미생물 제조용 자살백터는 *nptI* 유전자 뒤에 *sacB* 유전자를 추가로 포함할 수 있다.
- [0052] 본 발명의 용어, "*sacB* 유전자"는 수크로스를 분해하는 효소로 알려진 수크라제를 암호화하는 유전자(DNA 단편)를 의미하는데, 본 발명에서는 상기 *sacB* 유전자에 의해 *nptI* 유전자가 미생물 내에 삽입되지 않을 수 있다.
- [0053] 구체적으로, 상기 자살백터를 포함하는 미생물을 수크로스가 포함된 배지에서 배양하는 경우, 상기 *sacB* 유전자에 의해 발현된 수크라제는 수크로스를 분해하여 미생물에게 독성을 나타내는 산물을 생성하게 되며, 이는 숙주 미생물의 게놈 DNA에서 단일교차 재조합을 유발한다. 전술한 바와 같은 단일교차 재조합이 유발되면, 백터의 DNA 단편 전체를 포함하는 영역이 미생물의 게놈 DNA에서 제거되어 야생형 다제내성 미생물로 복귀하거나, 또는 백터의 DNA 단편 중에서도 *nptI* 유전자만을 포함하는 영역이 제거될 수 있다. 따라서, *sacB* 유전자를 포함하는 본 발명의 자살백터를 이용하는 경우 항생제 저항성이 없는 미생물을 제조할 수 있다.
- [0055] 한편, 본 발명의 유전자의 구체적인 염기 서열 및 단백질 정보는 NCBI의 GeneBank 등의 공지된 데이터베이스, 문헌 등에서 얻을 수 있다.
- [0057] 상술한 바와 같은 표적 유전자의 5' 말단과 상동인 핵산 영역(*attTn7*의 상위부분), *rrnB* 종결자, *OmpA* 프로모터, *luxCDABE* 오페론, 표적 유전자의 3' 말단과 상동인 핵산 영역(*attTn7*의 하위부분) 및 *nptI* 유전자, 및 *sacB* 유전자로 구성된 DNA 단편을 포함하는 본 발명의 자살백터를 미생물에 도입하면, 상기 자살백터에 포함된 *attTn7*의 상위부분의 5'-영역 및 *attTn7*의 하위부분의 3'-영역에서 1차 단일교차 재조합이 유발되어, 상기 자살백터에 포함된 DNA 단편 전체가 미생물의 게놈 DNA에 삽입된 형질전환체를 제조할 수 있다. 상기 형질전환체의 제조 성공여부는 *nptI* 유전자에 의한 항생제 저항성에 의해 확인할 수 있다.
- [0058] 이어서, 상기 제조된 형질전환체를 과량의 수크로스가 포함된 배지에 접종하고 배양하면, 자살백터에 포함된 *sacB* 유전자로부터 발현된 수크라제에 의해 수크로스를 분해하고, 이로부터 생성되는 독성산물로 인하여 상기 재조합백터가 삽입된 게놈 DNA 내에서 2차 단일교차 재조합이 유발될 수 있다. 상기 2차 단일교차 재조합이 유발되면, 백터의 DNA 단편 전체를 포함하는 영역이 미생물의 게놈 DNA에서 제거되어 야생형 미생물로 복귀하거나, 또는 백터의 DNA 단편 중에서도 *nptI* 유전자만을 포함하는 영역이 제거될 수 있다.
- [0059] 따라서, 본 발명의 자살백터를 이용하는 경우 형광단백질 유전자가 미생물의 게놈 DNA에 삽입되어 형광단백질을 발현하는 발광미생물을 제조할 수 있으며, 나아가 상기 발광미생물을 수크로스가 포함된 배지에서 배양하는 경우 항생제 저항성 유전자의 DNA 단편이 제거되어 항생제 저항성이 없는 발광미생물을 제조할 수 있다. 목적하는 발광미생물의 제조 성공여부는 최종적으로 생산된 미생물의 기능 또는 게놈 DNA 크기를 비교하여 확인할 수 있다.

- [0060] 특히, 상기 자살백터는 미생물 내에서 복제되지 않는 특징을 가지므로, 미생물 내 포함된 백터의 수에 의해 미생물의 발광 강도가 정해지는 것은 아니며, 염색체 내에 도입된 단일 카피(single copy)의 발광단백질 유전자에 의해서만 발광단백질이 발현되므로 상기 자살백터에 의해 형질전환된 모든 발광미생물은 일정한 양으로 발광할 수 있다.
- [0062] 본 발명에서, 상기 자살백터는 도 2의 B에 도시된 개열지도를 가질 수 있고, 또한 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다.
- [0063] 또한, 상기 자살백터에 포함된 표적 유전자의 5' 말단과 상동인 핵산 영역(*attTn7*의 상위부분), *rrnB* 종결자, *OmpA* 프로모터, *luxCDABE* 오페론, 표적 유전자의 3' 말단과 상동인 핵산 영역(*attTn7*의 하위부분) 및 *nptI* 유전자 등은 야생형 서열 뿐만 아니라, 동일한 기능을 나타내는 한, 이들과 상동성을 나타내는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 또는 그의 단편이 사용될 수 있다.
- [0064] 본 발명에서 이용되는 폴리뉴클레오티드 서열은, 생물학적으로 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 서열목록에 기재된 서열과 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기 용어, '실질적인 동일성'은 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인(align)하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 60%의 상동성, 더욱 구체적으로 70%의 상동성, 더더욱 구체적으로 80%의 상동성, 가장 구체적으로 90%의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다.
- [0065] 따라서, 상기 서열번호 1로 표시되는 폴리뉴클레오티드 서열과 높은 상동성을 갖는 서열, 예를 들면 그 상동성이 70% 이상, 구체적으로 80% 이상, 더욱 구체적으로 90%이상의 높은 상동성을 갖는 폴리뉴클레오티드 서열도 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.
- [0067] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 발광미생물 제조용 자살백터를 포함하는, 발광미생물 제조용 키트를 제공하는 것이다.
- [0068] 이때, 상기 용어 "발광미생물" 및 "자살백터"에 대한 설명은 전술한 바와 같다.
- [0070] 본 발명의 키트는 미생물의 게놈 DNA에 상기 자살백터 및 이에 포함된 유전자를 도입하는데 사용될 수 있으며, 상기 자살백터 뿐만 아니라 발광미생물의 제작에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치가 포함될 수 있다. 또한, 미생물의 배양에 필요한 배양액, 배양 용기 등을 포함할 수 있다.
- [0072] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 상기 자살백터를 이용하여, 발광미생물을 제조하는 방법을 제공한다.
- [0074] 구체적으로, 상기 발광미생물을 제조하는 방법은 표적 유전자의 5' 말단과 상동인 핵산 영역, *rrnB* 종결자, *OmpA* 프로모터, *luxCDABE* 오페론 및 표적 유전자의 3' 말단과 상동인 핵산 영역을 순차적으로 포함하는 발광미생물 제조용 자살백터를 미생물에 도입하여 형질전환체를 수득하는 단계를 포함한다.
- [0076] 본 발명에서, 상기 발광미생물의 제조방법은 본 발명에 따른 발광미생물 제조용 자살백터를 이용한다.
- [0077] 이때, 상기 발광미생물 제조용 자살백터는 *nptI* 유전자를 추가로 포함할 수 있고, 상기 *nptI* 유전자 뒤에 *sacB* 유전자를 추가로 포함할 수 있다. 또한, 상기 자살백터는 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것일 수 있고, 도 2의 B에 도시된 개열지도를 갖는 것일 수 있다.
- [0078] 상기 자살백터를 미생물에 도입하면, 표적 유전자의 5' 말단과 상동인 핵산 영역(*attTn7*의 상위부분, 5'-영역) 및 표적 유전자의 3' 말단과 상동인 핵산 영역(*attTn7*의 하위부분, 3'-영역)에서 1차 단일교차 재조합이 유발되어 상기 자살백터가 미생물의 게놈 DNA에 포함된 형질전환체를 수득할 수 있다. 아울러, 상기 수득한 형질전환체는 자살백터에 포함된 항생제 저항성 마커 단백질에 의하여 저항성을 나타내는 항생제를 포함하는 배지에서

배양함으로써 선별할 수 있다.

- [0080] 본 발명에서, 상기 자살백터를 미생물에 도입하여 형질전환체를 획득하는 방법은, 핵산을 세포 내로 도입하는 어떤 방법도 포함되며, 숙주세포에 따라 당 분야에서 공지된 바와 같이 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 예를 들어, 전기천공법(electroporation), 인산칼슘(CaPO_4) 침전, 염화칼슘(CaCl_2) 침전, 미세주입법(microinjection), 폴리에틸렌글리콜(PEG)법, DEAE-텍스트란법, 양이온 리포솜법, 및 초산 리튬-DMSO법 등이 있다.
- [0081] 본 발명의 용어 "형질전환"은 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체의 인자로서 또는 염색체 통합완성에 의해 복제가 가능하게 되는 것을 의미한다. 본 발명의 형질전환체는 백터가 숙주 세포 내로 형질전환된 후, 백터 내의 *luxCDABE* 핵산 분자 서열이 숙주 세포 게놈 상의 내생적(endogeneous) 유전자 부위의 서열과 상동 재조합을 일으키며 염색체 내로 삽입되거나, 플라스미드 형태로 보유할 수 있다.
- [0083] 본 발명의 목적상, 상기 발광미생물의 제조방법은 상기 형질전환체를 수크로스를 포함하는 배지에서 배양하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0084] 상기 단계는 상기 수득한 형질전환체의 게놈 DNA에서 단일교차 재조합에 의하여 항생제 저항성 유전자가 결실된 형질전환체를 제조하는 단계로서, 자살백터에 포함된 *sacB* 유전자에서 발현된 수크라제와 수크로스를 포함하는 배지를 사용함으로써 수행될 수 있다.
- [0085] 즉, 상기 수득한 형질전환체를 과량의 수크로스를 포함하는 배지에 접종하여 배양하면, 형질전환체의 게놈 DNA에 삽입된 *sacB* 유전자에서 발현된 수크라제에 의하여 상기 수크로스가 분해되고, 이에 따라 수크로스의 분해산물로서 독성산물이 발생되는데, 상기 독성산물은 게놈 DNA 내에서 2차 단일교차 재조합이 발생할 수 있는 환경을 조성한다.
- [0086] 게놈 DNA에 도입된 자살백터로 인하여, 형질전환체의 게놈 DNA에는 표적 유전자의 5' 말단 및 3' 말단과 상동인 핵산 영역(*attTn7*의 상위부분 및 하위부분)의 5'-영역 및 3'-영역이 중복으로 포함되므로, 상기 1차 단일교차 재조합이 발생할 수 있는 환경이 조성되며, 이에 따라 상기 5'-영역 및 3'-영역에서 2차 단일교차 재조합이 발생할 수 있다. 상기 5'-영역 및 3'-영역에서 2차 단일교차 재조합이 발생하면 미생물의 게놈 DNA에서 항생제 저항성 유전자가 결실된 미생물이 제조될 수 있는데, 한편으로 앞서 게놈 DNA에 도입된 재조합백터가 그대로 결실되어 야생형 미생물이 제조될 수도 있다. 항생제 저항성 유전자만이 결실된 목적 미생물의 제조 성공 여부는 항생제 저항성 유전자의 발현여부를 검사하거나, 게놈 DNA의 크기를 비교하거나, 또는 발광단백질의 발현 여부를 비교함으로써, 2차 단일교차 재조합이 수행되지 않거나 수행되어 오히려 야생형 미생물로 회귀된 미생물과 비교적 용이하게 구별하여 선별할 수 있다.
- [0088] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 상기 제조방법으로 제조된, 발광미생물을 제공한다.
- [0089] 이때, 상기 용어 "발광미생물"에 대한 설명은 전술한 바와 같다.
- [0091] 본 발명의 자살백터를 이용하여 제조한 미생물은, 염색체 내에 도입된 단일 카피의 발광단백질 유전자에 의해서만 발광단백질이 발현되므로 모든 미생물이 일정한 양으로 발광하며, 또한 항생제 저항성이 없으므로 이에 대한 다양한 저해 물질의 개발에 유용하게 활용될 수 있다.

발명의 효과

- [0093] 본 발명에서 제공하는 발광미생물 제조용 자살백터 또는 발광미생물 제조용 키트를 이용하면, 항생제 저항성 마커나 백터의 카피 수에 영향을 받지 않고 발광단백질 유전자만을 안정적으로 상시 발현하는 미생물을 제작할 수 있으므로, 본 발명은 병원균 미생물 저해 물질의 유효성 평가, 효능 검증 등에 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0095] 도 1은 본 발명의 발광미생물 제조용 자살백터 pOHL의 제조방법을 보여주는 개략도이다.
- 도 2는 상기 자살백터 pOHL의 구성에 관한 것으로, A는 자살백터 pOHL을 Bgl II 제한효소로 처리한 후 전기영동한 결과를 보여주는 이미지이고, B는 상기 자살백터 pOHL의 개열지도이다.
- 도 3은 상기 자살백터 pOHL를 이용하여 발광단백질을 발현하는 미생물을 제조하는 방법을 보여주는 개략도이다.
- 도 4는 상기 미생물의 발광 여부를 확인한 것으로, A는 야생형 미생물의 발광 강도, 및 B는 *abaR* 유전자가 결여된 돌연변이 미생물의 발광 강도를 보여주는 이미지이다. 이때, 발광단백질의 강도는 미생물의 수를 의미한다.
- 도 5는 마우스에 접종된 상기 미생물의 발광 강도를 확인한 이미지로서, 접종 당시, 24시간 후, 48시간 후, 및 72시간 후에 확인하였다. 이때, 발광 강도는 미생물의 수를 의미하며, WT는 야생형 미생물, *abaR*은 *abaR* 유전자가 결여된 돌연변이 미생물, 및 *abaR*-com은 결여된 *abaR* 유전자의 기능이 회복된 돌연변이 미생물을 의미한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0096] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0098] 실시예 1. 발광단백질 유전자가 특이적으로 재조합된 자살백터(pOHL)의 제작

- [0100] 발광미생물을 제작하기 위하여, 먼저 발광단백질을 암호화하는 유전자(이하, '발광단백질 유전자'로 명명함)가 특이적으로 재조합되어 발광단백질을 안정적으로 상시 발현될 수 있게 하는 자살백터를 제작하고자 하였다.

- [0101] 구체적으로, 도 1에 나타낸 바와 같이, 아세트박터 바우마니(*A. baumannii*) 미생물의 *attTn7*의 상위부분(*glmS2* 유전자, 934 bp), *rrnB* 종결자(356 bp), *ompA* 프로모터(constitutive promoter, 381 bp), 루시페라제(luciferase) 발광단백질을 암호화하고 있는 *luxCDABE* 오페론(6,009 bp), *attTn7*의 하위부분(*glmS2* 유전자의 하위에 위치한 유전자간 영역(intergenic region; IR), 951 bp) 및 카나마이신(kanamycin) 항생제 내성유전자(*nptI*, 1,233 bp)가 순차적으로 결합된 평활말단(9,864 bp)을 두 단계의 overlap extension PCR 기법을 이용하여 제작하였다. 이때, PCR에는 하기 표 1에 나타낸 바와 같은 프라이머를 이용하였다.

- [0102] 한편, *rrnB* 종결자는 *luxCDABE* 오페론의 상위부분에 존재하는 *glmS* 유전자의 발현을 방지하기 위한 것이며, *ompA* 프로모터는 아세트박터 바우마니 내 *luxCDABE* 오페론이 상시적으로 발현될 수 있도록 하기 위하여 사용하였다.

표 1

명명	프라이머 서열 (5'→3')	용도
S1	TGGTTTGAGCAATTGACTTGG (서열번호 2)	<i>attTn7</i> 상위부분 증폭
S2	GCCTTAATAATGATCTTTTTGAATTACT (서열번호 3)	
S3	ATCACCTGCTTTAATAATTGATTGATTA (서열번호 4)	<i>attTn7</i> 하위부분 증폭
S4	GCAACACCTTCTTCACGAGGCAGACAGTCGGTTTTAGCAGACCGTAC (서열번호 5)	
S5	ATTCAAAAAGATCATTATTAAGGCATAAAACAGAATTTGCTGGCG (서열번호 6)	<i>rrnB</i> 종결자 증폭
S6	TTTATACATATTAAGGTTTTTAGAGTTGTAGAAACGCAAAAGGC (서열번호 7)	
S7	TAAAAACCTTAATATATGTATAAATAGAGCAAT (서열번호 8)	<i>ompA</i> 프로모터 증폭

S8	GGATATCCTCCAGAGATAACAATTG (서열번호 9)	
S9	CAATTGTTATCTCTGGAGGATATCCATGACTAAAAAATTCATTCAATTATTAACG (서열번호 10)	<i>luxCDABE</i> 오페론 증폭
S10	TCAATCAATTATTAAAGCAGGTGATTCAACTATCAAACGCTTCGGTTAAG (서열번호 11)	
U1	GTCTGCCTCGTGAAGAAGGTG (서열번호 12)	<i>nptI</i> 유전자 증폭
U2	GATCCGTCGACCTGCAGG (서열번호 13)	

[0106] 먼저, 첫 번째 단계로는, 상기 표 1에 기재한 6쌍의 프라이머 세트(S1/S2, S3/S4, S5/S6, S7/S8, S9/S10, U1/U2)를 이용하여, *attTn7* 상위부분 및 하위부분, *rrnB* 종결자, *ompA* 프로모터, *luxCDABE* 오페론, *nptI*을 증폭하였다. 이때, 각 증폭산물이 순차적으로 결합되게 하기 위하여, *rrnB*를 증폭할 때 사용한 S5/S6 프라이머 세트는 *attTn7* 상위부분과 *ompA* 프로모터 부위에 각각 상동성이 있는 25개 염기를 추가하여 제작하였으며, *luxCDABE* 오페론을 증폭할 때 사용한 S9/S10은 *ompA* 프로모터 *attTn7* 하위부분에 각각 상동성이 있는 25개 염기를 추가하여 제작하였고, *attTn7*을 증폭할 때 사용한 S4는 *nptI*에 상동성이 있는 25개 염기를 추가하여 제작하였다. *attTn7*의 상위영역 및 하위영역, 및 *ompA* 프로모터 부위는 아세트박터 바우마니의 게놈 DNA를 주형으로 하고, *rrnB* 종결자와 *luxCDABE* 오페론은 pSE380 벡터(Invitrogen 사)와 pGEN-*luxCDABE* 벡터(Lane MC, Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104:16669-16674)를 주형 DNA로 하여 증폭하였다. 이후, gel extraction kit를 사용하여 각 증폭산물을 정제하였다.

[0107] 두 번째 단계로는, 상기 첫 번째 단계를 통해 정제된 각각의 증폭산물을 순차적으로 결합하였다. 각 증폭산물을 주형 DNA로 하여 첫 번째 단계에서 사용한 S1/U2 프라이머를 이용하여 overlap extension PCR을 수행하였다. 이후, 각 증폭산물이 순차적으로 결합된 평활말단 DNA 절편은 제한효소 FspI으로 절단시킨 pHKD01 벡터(Oh MH, Appl. Environ. Microbiol., 2015, 81: 3357-3368.)에 직접적으로 연결하였고, 상기 재조합 벡터를 대장균 (*Escherichia coli*) S17-1 lambda pir 미생물에 형질전환하였다. 상기 재조합벡터를 갖는 대장균은 카나마이신 항생제가 첨가된 배지를 이용하여 선별하였으며, 선별된 균으로부터 벡터를 분리한 후 Bgl II 제한효소를 처리하여 제작이 잘 되었는지 확인하였다(도 2의 A). 또한, DNA 시퀀싱을 통해 각 증폭산물이 잘 연결되었는지 확인하였으며, 상기의 방법으로 새롭게 구축한 자살벡터는 pOHL이라 명명하였다(도 2의 B).

[0109] 실시예 2. 자살벡터(pOHL)가 도입된 발광미생물의 제작

[0110] 상기 실시예 1에서 제작한 자살벡터 pOHL를 이용하여, 발광단백질을 상시적으로 발현할 수 있는 발광미생물을 제작하고자 하였고, 특히 항생제 선별인자와 플라스미드(벡터)의 카피 수(plasmid copy number)에 영향을 받지 않고 단일 카피(single copy) 형태로써 세균 염색체 내 도입된 발광단백질 유전자를 상시 발현하는 발광미생물을 제작하고자 하였다.

[0111] 구체적으로, 도 3에 나타낸 바와 같이, 상기 pOHL 자살벡터를 아세트박터 바우마니 야생형 미생물 또는 세포밀도 인식(quorum sensing) 조절자가 결여된 *abaR* 돌연변이 미생물에 상동성 재조합(homologous recombination)을 통하여 삽입하였다. 삽입에 의하여 표적 유전자의 5'-말단 부분(*glmS2* 유전자)에서 1차 단일교차 재조합(first single cross-over recombination)이 발생하면, 상기 자살벡터의 *glmS2* 유전자가 상기 아시네토박터 바우마니의 염색체에 포함된 정상적인 표적 유전자 *glmS2*와 교차되며, 상기 자살벡터는 아시네토박터 바우마니의 염색체 내부에 '*rrnB -luxCDABE- nptI*' 형태로 도입된다. 이때, 1차 단일교차 재조합에 의해 상기 자살벡터가 도입된 아시네토박터 바우마니 형질전환체는 카나마이신이 포함된 배지를 사용하여 선별하였다.

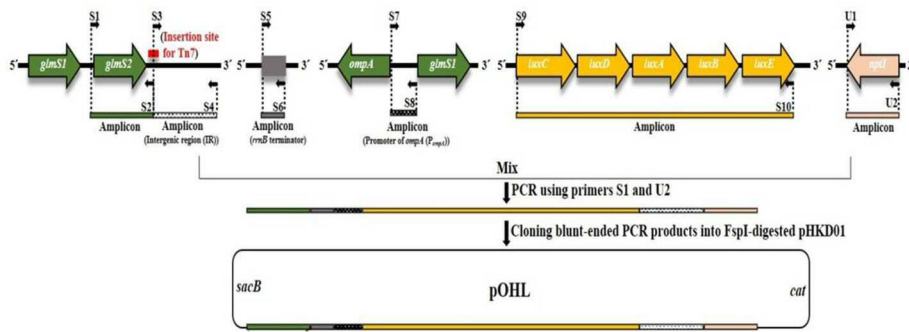
[0112] 이어서, 상기 형질전환체를 수크로스(sucrose)가 포함된 배지에서 배양하여 상동 재조합을 유도하였다. 수크로스에서 배양하는 경우, 상기 아시네토박터 바우마니의 염색체에 도입된 *sacB* 유전자에서 발현된 수크라제(sucrase)에 의해 수크로스가 분해되면서 독성부산물을 형성하고, 이로 인하여 상기 상동 재조합벡터가 도입된 염색체 내의 표적 유전자의 3'-말단 부분(*attTn7*의 하위부분; *glmS2* 유전자의 하위에 위치한 유전자간 영역(IR))에서 2차 단일 교차 상동재조합(second single cross-over recombination)이 발생한다. 그 결과, 자살백

터로부터 유래된 IR의 뒤에 위치한 카나마이신 저항성 유전자인 *npt I* 유전자 및 클로람페니콜(chloramphenicol) 저항성 유전자인 *cat* 유전자(Cm^R)는 염색체로부터 제거되어, 최종적으로는 항생제 저항성 유전자는 결실되고 발광단백질 유전자인 *luxCDABE* 오페론만을 포함하는 아시네토박터 바우마니 미생물을 제조할 수 있다.

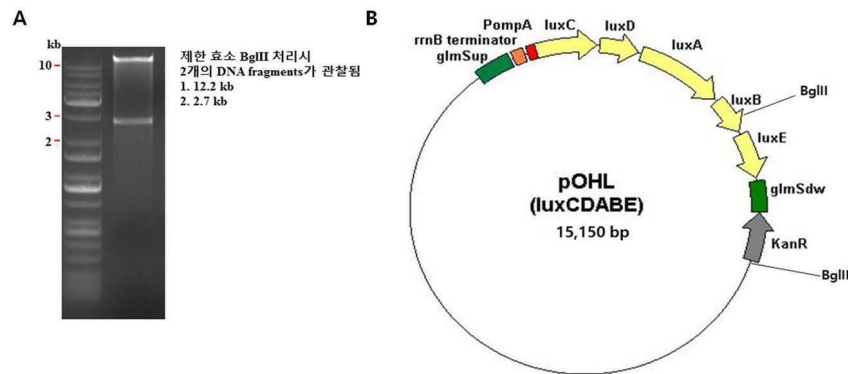
- [0113] 즉, 상기 자살백터 pOHL은 1차 상동재조합을 통해 상기 자살백터를 포함하는 미생물의 선별을 간편하게 하고, 2차 상동재조합을 통해 상기 미생물의 염색체 내에 항생제 저항성 유전자가 삽입되지 않도록 하므로, 상기 자살백터 pOHL가 도입된 미생물은 항생제 저항성 특성이 제거되고, 발광하는 특성을 새로 얻게 된다.
- [0115] 상기의 1차 및 2차 단일 교차 상동 재조합을 통해, 항생제 저항성 특성이 제거되고, *luxCDABE* 오페론에 의해 발광단백질을 발현하는 아시네토박터 바우마니 발광미생물(야생형 및 *abaR* 돌연변이)를 제조하였고, 상기 발광미생물에서 발현되는 발광량(RLU 값)을 측정하였다.
- [0116] 한편, 세포밀도 인식은 미생물이 자기와 동종인 미생물의 밀도를 인지하는 현상으로 각 미생물이 분비하는 신호 물질을 인지함으로써 일어난다. 신호 물질의 농도가 특정 밀도에 이르면 발광단백질 등의 특정 단백질이 분비되거나 다른 곳으로 이동하는 등의 미생물의 행동이 변화하게 된다.
- [0117] 그 결과, 도 4에서도 볼 수 있듯이, *luxCDABE* 오페론을 포함하지 않는 야생형 미생물의 RLU 값은 4.6×10 , *luxCDABE* 오페론을 포함하는 야생형 미생물의 RLU 값은 4.3×10^6 , *luxCDABE* 오페론을 포함하는 *abaR* 돌연변이 미생물의 RLU 값은 4.3×10^6 임을 확인하였다.
- [0118] 즉, 상기 결과를 통해, 상기 자살백터 pOHL를 이용하는 경우 발광단백질이 안정적이고 많은 양으로 발현되어 안정적으로 발광하는 발광 미생물을 제조할 수 있으며, 특히 항생제 저항성이 결여된 발광미생물을 제조할 수 있음을 알 수 있었다.
- [0120] 나아가, 항생제 저항성이 결여된 상기 야생형 및 *abaR* 돌연변이 아세토박터 바우마니 발광미생물을 면역억제제(cyclophosphamide)가 처리된 호중구 감소 마우스(neutropenic mouse)에 접종한 후, 시간적 추이에 따른 발광 미생물의 생존 및 다른 장기로의 이동(dissemination)을 동물생체영상분석기(동물용형광발광분석기; IVIS, optical *in vivo* imaging system)를 이용하여 확인하였다.
- [0121] 그 결과, 도 5에서 볼 수 있듯이, 야생형 발광미생물은 접종 24시간 후 마우스의 폐에 군락화(colonization)하는 것을 확인하였으며, 시간이 지남에 따라 미생물의 수가 증가하는 것을 확인하였다. 또한, 접종 72시간 후에는 폐뿐만 아니라 비장에서도 미생물이 이동한 것을 확인하였다.
- [0122] 그러나, 상기 *abaR* 돌연변이 발광미생물은 상기 야생형 발광미생물에 비해 마우스의 폐에 군락화한 미생물의 양이 현저히 감소된 것을 확인하였으며, 다른 장기로 이동하지 않는 것을 확인하였다.
- [0123] 즉, 이는 발광미생물에 포함된 상기 발광단백질의 발현은 미생물에 포함되어 있는 자살백터에 의한 것이 아니라, 자살백터에 의해 염색체에 삽입된 *luxCDABE* 오페론에 의한 발현임을 알 수 있었다. 따라서, 발광단백질은 미생물 내에 포함되어 있는 자살백터의 카피 수와 상관없이 염색체에 삽입된 *luxCDABE* 오페론에 의해 발현되는 것이므로 실제 발광단백질의 발현량, 즉 발광의 강도와 미생물의 수는 비례한다는 것을 알 수 있었다.
- [0124] 결론적으로, 본 발명의 자살백터 pOHL를 이용하여 제조한 발광미생물은 항생제 선별인자와 플라스미드(백터)의 카피 수에 영향을 받지 않고, 염색체 내 삽입된 유전자에 의해 발광단백질을 안정적으로 발현하므로, 상기 발광미생물이 나타내는 발광의 정도를 통해 이들의 양 및 이동 등을 용이하게 관찰할 수 있다.
- [0126] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

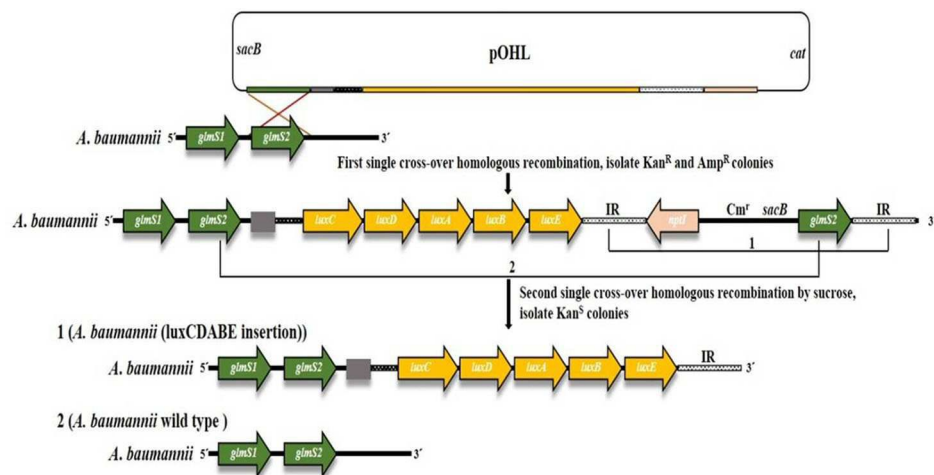
도면1



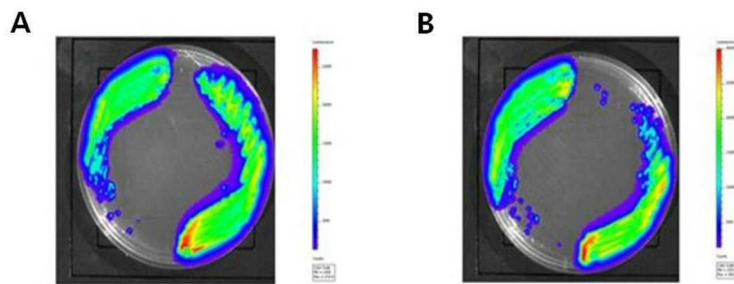
도면2



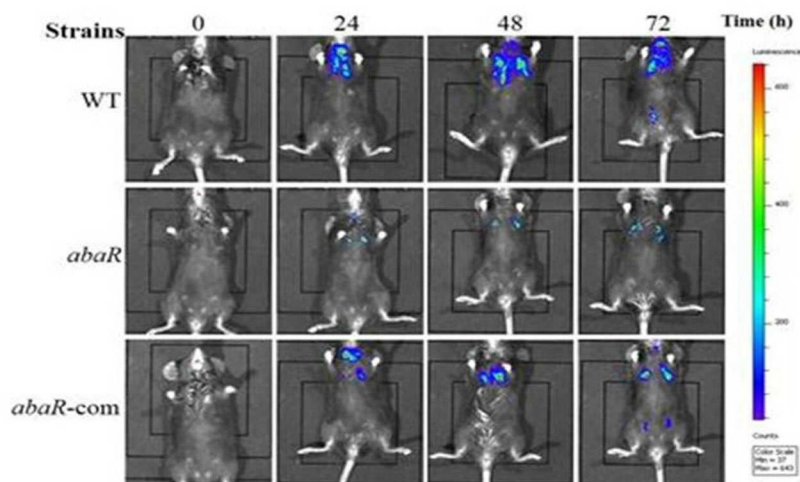
도면3



도면4



도면5



서열 목록

<110> Dankook University Cheonan Campus Industry Academic Cooperation Foundation

Kyungpook National University Industry-Academic Cooperation Foundation

The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University

<120> Suicide vector for constitutive production of luminescent protein
from the chromosome of microorganism

<130> KPA170926-KR

<160> 13

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 14969

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<

220><223> pOHL

<400> 1

ccatgtcagc cgtaaagtgt tctgtgtca ctcaaaattg cttgagagg ctctaagggc

60

ttctcagtgc gttacatccc tggcttgttg tccacaaccg ttaaacctta aaagctttaa	120
aagccttata tattcttttt tttcttataa aacttaaaac cttagaggct atttaagttg	180
ctgatttata ttaattttat tgttcaaaca tgagagctta gtacgtgaaa catgagagct	240
tagtacgtta gccatgagag cttagtagct tagccatgag ggtttagttc gttaaacatg	300
agagcttagt acgttaaaca tgagagctta gtacgtgaaa catgagagct tagtacgtac	360
tatcaacagg ttgaactgct gatcttcaga tctctacgc cggacgcac gtggccggat	420
ccagccgacc aggcctttcca cgcccgcgtg ccgtccatg tcgttcgcgc ggttctcgga	480
aacgcgtgc cgcgtttcgt gattgtcacg ctcaagcccg tagtcccgtt cgagcgtcgc	540
gcagaggta gcgaggcgc ggtaggcccg atacggctca tggatgggt ttcgggtcgg	600
gtgaatcttg ttgatggca tatggatgtg caggttgtcg gtgtcgtgat gcacggcact	660
gacgcgtga tgcctcgca agccaagccc agcgcagatg cggctctcaa tcgcgcgcaa	720
cgtctccgcg tcgggcttct ctcccgcgcg gaagctaacc agcaggatg aggtcttgtc	780
ggcctcggaa cgggtgttc cgtgctgggt cgccatcacc tcggccatga cagcgggcag	840
gggtgttgcc tcgcagttcg tgacgcgcac gtgaccagg cgctcggct tgccttgctc	900
gtcggatgat tacttcacca gctccgcgaa gtgcgtcttc ttgatggagc gcatggggac	960
gtgcttgga atcacgcga cccccggcc gttttagcgg ctaaaaaagt catggctctg	1020
ccctcggcg gaccacgcc atcatgacct tgccaagctc gtctgtctc tcttcgatct	1080
tcgccagcag ggcgaggatc gtggcatcac cgaaccgcgc cgtgcgcggg tcgtcggatga	1140
gccagagttt cagcaggccg cccaggcggc ccaggtcgcc attgatgcgg gccagctcgc	1200
ggacgtgctc atagtccacg acgcccgtga tttttagacc ctggccgac gccagcaggt	1260
aggccgacag gctcatgccg gccgccgcg cttttctc aatcgtctt cgttcgtctg	1320
gaaggcagta caccttgata ggtgggctgc ctttctggt tggttgggt tcatcagcca	1380
tccgttgcc ctcatctgtt acgccggcgg tagccggcca gcctgcaga gcaggattcc	1440
cgttagcac gccaggtgc gaataaggga cagtgaagaa ggaacaccg ctgcgggtg	1500
ggcctacttc acctatctg cccggctgac gccgttggat acaccaagga aagtctacac	1560
gaaccctttg gcaaaatcct gtatatctg cgaaaaagga tggatatacc gaaaaatcg	1620
ctataatgac cccaagcag ggttatgcag cggaaaagcg ctgcttcct gctgtttgt	1680
ggaatatcta ccgactggaa acaggcaa atgcaggaaat actgaactga ggggacaggc	1740
gagagacgat gccaaagagc tacaccgacg agctggccga gtgggttgaa tcccgcgcgg	1800
ccaagaagcg ccggcgtgat gaggtgcgg ttgcgttctt ggcggtgagg gcggtgtcg	1860
aggcggcgtt agcgtccgcg tatgcgtcg tcaccatttg ggagcacatg cgggaacagg	1920

ggaaggtcaa gtctctctac gagacgttcc gctcgcacgc caggcggcac atcaaggcca	1980
agccccccga tgtccccga ccgcaggcca aggctgcgga acccgcgccg gcaccaaga	2040
cgccggagcc acggcggccg aagcaggggg gcaaggctga aaagccggcc cccgctgcgg	2100
ccccgaccgg cttcaccttc aaccaaacac cggacaaaaa ggatcctcta cgccggacgc	2160
atcgtggccg gcatcacccg gccacaaagt gcggttgctg gcgcctatat cgccgacatc	2220
accgatgggg aagatcgggc tcgccacttc gggctcatga gcgcttggtt cggcgtgggt	2280
atggtggcag gccccgtggc cgggggactg ttgggcgcca tctccttgct gcctcgcgcg	2340
tttcggtgat gacggtgaaa acctctgaca catgcagctc ccggagacgg tcacagcttg	2400
tctgtaagcg gatgccggga gcagacaagc ccgtcagggc gcgtcagcgg gtgttgccgg	2460
gtgtcggggc gcagccatga cccgggaatt acgccccgcc ctgccactca tcgcagtact	2520
gttgtaattc attaagcatt ctgccgacat ggaagccatc aaaaacggca tgatgaacct	2580
gaatcggcag cggcatcagc accttgctgc ctgcgtata atattgccc atggtgaaaa	2640
cgggggcgaa gaagtgtcc atattggcca cgtttaaatc aaaactggtg aaactcacc	2700
agggattggc tgagacgaaa aacatattct caataaaccc tttagggaag taggccaggt	2760
tttcaccgta acacgccaca tcttgcaaat atatgtgtag aaactgccgg aaatcgtcgt	2820
ggtattcact ccagagcgat gaaaacgttt cagtttctc atggaaaacg gtgtaacaag	2880
ggtgaacact atcccatatc accagctcac cgtctttcat tgccatacgg aattccggat	2940
gagcattcat caggcgggca agaattgtaa taaaggccgg ataaaacttg tgcttatttt	3000
tctttacggt ctttaaaaag gccgtaatat ccagctgaac ggtctggtta taggtacatt	3060
gagcaactga ctgaaatgcc tcaaaatgtt ctttacgatg ccattgggat atatcaacgg	3120
tggatatacc agtgattttt ttctccattt tagcttctt agctcctgcc ctatgggatt	3180
cacctttatg ttgataagaa ataaaagaaa atgccaatag gatatcggca ttttcttttg	3240
cgtttttatt tgtaactgt taattgtcct tgttcaagga tgctgtcttt gacaacagat	3300
gttttcttgc ctttgatgtt cagcaggaag ctggcgcaa acgttgattg ttgtctgcg	3360
tagaatcctc tgtttgcat atagcttgta atcacgacat tgtttccttt cgcttgaggt	3420
acagcgaagt gtgagtaagt aaaggttaca tcgttaggat caagatccat ttttaacaca	3480
aggccagttt tgctcagcgg cttgtatggg ccagttaaag aattagaaac ataaccaagc	3540
atgtaaatat cgtagacgt aatgccgtca atcgtcattt ttgatccgcg ggagtcagt	3600
aacaggtacc atttgccgtt cattttaag acgttcgcgc gttcaatttc atctgttact	3660
gtgttagatg caatcagcgg ttctcatcact tttttcagtg tgtaatcacc gtttagctca	3720

atcataccga gagcgccgtt tgctaactca gccgtgcgtt ttttatcgct ttgcagaagt	3780
ttttgacttt cttgacggaa gaatgatgtg cttttgccat agtatgcttt gttaaataaa	3840
gattcttcgc cttggtagcc atcttcagtt ccagtgtttg cttcaaatac taagtatttg	3900
tggcctttat ctctacgta gtgaggatct ctacagctat ggttgtcgcc tgagctgtag	3960
ttgccttcac cgatgaactg ctgtacattt tgatacgttt ttccgtcacc gtcaaagatt	4020
gatttataat cctctacacc gttgatgttc aaagagctgt ctgatgctga tacgttaact	4080
tgtgcagttg tcagtgtttg tttgccgtaa tgtttaccgg agaaatcagt gtagaataaa	4140
cggatttttc cgtcagatgt aaatgtggct gaacctgacc attcttgtgt ttggtctttt	4200
aggatagaat catttgcac gaatttgtcg ctgtctttta agacgcggcc agcgtttttc	4260
cagctgtcaa tagaagtttc gccgactttt tgatagaaca tgtaaatacga tgtgtcatcc	4320
gcatttttag gatctccggc taatgcaaag acgatgtggt agccgtgata gtttgcgaca	4380
gtgccgtcag cgttttgtaa tggccagctg tcccaaactg ccaggccttt tgcagaagag	4440
atatttttaa ttgtggacga atcgaattca ggaacttgat atttttcatt tttttgctgt	4500
tcagggtatt gcagcatatc atggcgtgta atatgggaaa tgccgtatgt ttccttatat	4560
ggcttttggt tcgtttcttt cgcaaacgtt tgagtgtgcg ctcttgccag cagtgcggtg	4620
gtaaaggtta atactgttc ttgttttgca aacttttga tgttcacgt tcatgtctcc	4680
ttttttatgt actgtgttag cggctgtctt ctccagccc tccgtttga agatggcaag	4740
ttagttagc acaataaaaa aagacctaaa atatgtaagg ggtgacgcca aagtatacac	4800
tttgccttt acacatttta ggtcttgctt gctttatcag taacaaaccc gcgcgattta	4860
cttttcgacc tcattctatt agactctctg ttggattgca actggcttat tttctcttt	4920
tgtttgatag aaaaataaaa aaggatttgc agactacggg cctaaagaac taaaaaatct	4980
atctgtttct tttcattctc tgtatttttt atagtttctg ttgcatgggc ataaagtgc	5040
ctttttaac acaattcaga aaatatcata atatctcatt tcactaaata atagtgaacg	5100
gcaggatat gtgatgggtt aaaaaggatc gatcctctag agtcgacctg cagttttctg	5160
cagtgtcgtt ttgagcaatt gacttgggtg gccttgccaa gttgagattg cgagtgaatt	5220
ccgttatcgc tcaccagtga ttgtggaaaa tacactttac atctgtattt cacaatcagg	5280
cgaacacgcg gataccttag ctgcactacg tgaactcaa aaacgtgcta aagcaaataa	5340
tatcgatatt cagactttta cgatctgtaa cgtcgcaact tcttcaatgg tgcgtgaaac	5400
tgatcaccac ttattgacgc ttgcaggccc agagattggg gttgcatcaa caaaagcgtt	5460

cagactcag ctgtctgcat taatgttgtt aatcttgaaa attggtcaag tgaaacagcg	5520
tattagcaat gtgatgattg aagagcttgc tcgtgaattg tggcatagcc cgaaagtgat	5580
tcttgataca cttagaatg atccagaaat ttacgttta tcagaattgt tcgttgaaaa	5640
acaacactgt ttattcttag gccgtggcac acactatcca atcgctttgg aaggtgcatt	5700
aaagcttaaa gaaatttcat atattcacgc agaaggttat gcagctgggt agttgaaaca	5760
cggccattg gcacttgtg atactgaaat gccaatcgtg attcttgcac caaatgacga	5820
aatgcttgat aagcttaagt caaatatgga agaagttcag gctcgtggcg gtgaattatt	5880
cgtttctgct gatgaaaata gtggtgtagt tgaaaaagac cgtcaacatg tcgttcatat	5940
tccagcagta aacgaatggc ttgcaccaat catatatagc gtaccagttc agttattgtc	6000
ttatcacgtt gctgtattac gtggtacaga cgttgaccag ccacgtaact tggcgaagtc	6060
agtaactgta gagtaattca aaaaagatca ttattaaggc ataaaacaga atttgcctgg	6120
cggcagtagc gcggtgggtc cacctgaccc catgccgaac tcagaagtga aacgccgtag	6180
cgccgatggt agtgtgggtt ctcccatgc gagagtaggg aactgccagg catcaataa	6240
aacgaaaggc tcagtcgaaa gactgggcct ttcgttttat ctgttgtttg tcggtgaacg	6300
ctctctgag taggacaaat ccgccgggag cggatttgaa cgttcgaag caacggcccc	6360
gagggtggcg ggcaggacgc ccgccataaa ctgccaggca tcaaattaag cagaaggcca	6420
tcctgacgga tggccttttt gcgtttctac aaactctaaa aaaccttaat atatgtataa	6480
atagagcaat ttatgtttt ctgacaatga ttatatattt tttttataat gaggaacac	6540
aaaattaaat aagggttatt agtcggctag aatactggta aatcacggc aagcgaaca	6600
aagaagtgtt tcatatttgc tagttgggtt aaaaattacc gaattacaac ggaaattgta	6660
agtaattttg tcaataattt acttgattaa aattatcaag cacttggaat gtctatcaag	6720
tgtttgtatg attcaaatgt gaatagctta aaaataatac tggggtaaaa aaatatctca	6780
ggggccaata aatttaggct gagcttgaa acaattgtt atctctggag gatatccatg	6840
actaaaaaaaa ttcatctcat tattaacggc caggttgaaa tctttcccga aagtgatgat	6900
ttagtcaat ccattaattt tgggtataat agtgtttacc tgccaatatt gaatgactct	6960
catgtaaaaa acattattga ttgtaatgga aataacgaat tacggttgca taacattgtc	7020
aattttctct atacggtagg gcaaagatgg aaaaatgaag aatactcaag acgcaggaca	7080
tacattcgtg acttaaaaaa atatatggga tattcagaag aaatggctaa gctagaggcc	7140
aattggatat ctatgatttt atgttctaaa ggcggccttt atgatgtgt agaaaatgaa	7200
cttggttctc gccatcatat ggatgaatgg ctacctcagg atgaaagtta tgttcgggct	7260
tttccgaaag gtaaatctgt acatctgttg gcaggtaatg ttccattatc tgggatcatg	7320

tctatattac gcgcaatttt aactaagaat cagtgtatta taaaaacatc gtcaaccgat	7380
ccttttaccg ctaatgcatt agcgtaagt tttattgatg tagaccctaa tcatccgata	7440
acgcgctctt tatctgttat atattggccc caccaagggtg atacatcact cgcaaaagaa	7500
attatgcgac atgcggatgt tattgtcgct tggggagggc cagatgcgat taattgggcg	7560
gtagagcatg cgccatctta tgctgatgtg attaaatttg gttctaaaaa gagtctttgc	7620
attatcgata atcctgttga tttagcgtcc gcagcgacag gtgcggctca tgatgtttgt	7680
ttttacgac agcgagcttg tttttctgcc caaaacatat attacatggg aaatcattat	7740
gaggaattta agttagcgtt gatagaaaaa cttaatctat atgcgcatat attaccgaat	7800
gccaaaaaag attttgatga aaaggcggcc tattcttttag ttcaaaaaga aagcttggtt	7860
gctggattaa aagtagaggt ggatattcat caacgttga tgattattga gtcaaatgca	7920
ggtgtggaat ttaatcaacc acttggcaga tgtgtgtacc ttcacacgt cgataatatt	7980
gagcaaatat tgccttatgt tcaaaaaaag aagacgcaa ccatatctat ttttccttgg	8040
gagtcacat ttaaatatcg agatgcgtta gcattaaaag gtgcggaaag gattgtagaa	8100
gcaggaatga ataacatatt tcgagttggt ggatctcatg acggaatgag accgttgcaa	8160
cgattagtga catatatttc tcatgaaagg ccatctaact atacggctaa ggatgttgcg	8220
gttgaaatag aacagactcg attccttgga gaagataagt tccttgtatt tgtccataa	8280
taggtaaaaa gtatggaaaa tgaatcaaaa tataaaacca tcgaccacgt tatttgtgtt	8340
gaaggaaata aaaaaattca tgtttgggaa acgctgccag aagaaaacag cccaaagaga	8400
aagaatgcca ttattattgc gtctggtttt gcccgcagga tggatcattt tgctggtctg	8460
gcggaatatt tatcgcgga tggatttcat gtgatccgt atgattcgt tcaccacgtt	8520
ggattgagtt cagggacaat tgatgaattt acaatgtcta taggaaagca gagcttgta	8580
gcagtgggtg attggttaac tacacgaaaa ataaataact tcggtatgtt ggcttcaagc	8640
ttatctgcgc ggatagctta tgcaagccta tctgaaatca atgcttcgtt tttaatcacc	8700
gcagtcggtg ttgttaactt aagatattct ctgaaagag ctttagggtt tgattatctc	8760
agtctaccca ttaatgaatt gccggataat ctagattttg aaggccataa attgggtgct	8820
gaagtctttg cgagagattg tcttgatttt ggttgggaag atttagcttc tacaattaat	8880
aacatgatgt atcttgatat accgtttatt gcttttactg caaataacga taattgggtc	8940
aagcaagatg aagtatcac attgttatca aatattcgta gtaatcgatg caagatatat	9000
tctttgttag gaagtgcga tgacttgagt gaaaatttag tggctcctgc caatttttat	9060
caatcggtta cgaaagccgc tatcgcatg gataatgatc atctggatat tgatgttgat	9120
attactgaac cgtcatttga acatttaact attgcgacag tcaatgaacg ccgaatgaga	9180

attgagattg aaaatcaagc aatttctctg tcttaaaatc tattgagata ttctatcact	9240
caaatagcaa tataaggact ctctatgaaa ttgggaaact ttttgcttac ataccaacct	9300
ccccaatttt ctcaaacaga ggtaaatgaaa cgtttggtta aattaggctg catctctgag	9360
gagtgtgggt ttgataccgt atggttactg gagcatcatt tcacggagtt tggtttgctt	9420
ggtaaccctt atgtcgtcgc tgcataatta ctggcgcgca ctaaaaaatt gaatgtagga	9480
actgccgcta ttgttcttcc cacagcccat ccagtacgcc aacttgaaga tgtgaattta	9540
ttggatcaaa tgtcaaaagg acgatttcgg ttgggtatgt gccgagggct ttacaacaag	9600
gactttcgcg tattcggcac agatatgaat aacagtcgcg ccttagcgga atgctggtac	9660
gggctgataa agaatggcat gacagaggga tatatggaag ctgataatga acatatcaag	9720
ttccataagg taaaagtaaa ccccgcgcg ttagcagag gtggcgccacc ggtttatgtg	9780
gtggctgaat cagcttcgac gactgagtgg gctgctcaat ttggcctacc gatgatatta	9840
agttggatta taataactaa cgaaaagaaa gcacaacttg agctttataa tgaagtggct	9900
caagaatatg ggcacgatat tcataatatc gaccattgct tatcatatat aacatctgta	9960
gatcatgact caattaaagc gaaagagatt tgccggaaat ttctggggca ttggtatgat	10020
tcttatgtga atgctacgac tatttttgat gattcagacc aaacaagagg ttatgatttc	10080
aataaagggc agtggcgtga ctttgtatta aaaggacata aagatactaa tcgccgtatt	10140
gattacagtt acgaaatcaa tcccggtgga acgccgagg aatgtattga cataattcaa	10200
aaagacattg atgctacagg aatatcaaat atttgtgtg gatttgaagc taatggaaca	10260
gtagacgaaa ttattgcttc catgaagctc ttccagtctg atgtcatgcc atttcttaaa	10320
gaaaaacaac gticgctatt atattagctc aggagaaaga aatgaaattt ggattgttct	10380
tccttaactt catcaattca acaactgttc aagaacaaag tatagtctgc atgcaggaaa	10440
taacggagta tgttgataag ttgaattttg aacagatttt agtgtatgaa aatcattttt	10500
cagataatgg tgttgtcggc gctcctctga ctgtttctgg ttttctgctc ggtttaacag	10560
agaaaattaa aattggttca ttaaatacaca tcattacaac tcatcatcct gtcgccatag	10620
cggaggaagc ttgcttattg gatcagttaa gtgaaggag atttatttta gggtttagtg	10680
attgcgaaaa aaaagatgaa atgcattttt ttaatcgccc ggttgaatat caacagcaac	10740
tatttgaaga gtgttatgaa atcattaacg atgctttaac aacaggctat tgtaatccag	10800
ataacgattt ttatagcttc cctaaaatat ctgtaaatcc ccatgcttat acgccaggcg	10860
gacctcgga ataatgaaca gcaaccagtc atcatattgt tgagtggcg gccaaaaaag	10920

gtattcctct catctttaag tgggatgatt ctaatgatgt tagatatgaa tatgctgaaa	10980
gataaaagc cgttgcggat aaatatgacg ttgacctatc agagatagac catcagttaa	11040
tgatattagt taactataac gaagatagta ataaagctaa acaagagacg cgtgcattta	11100
ttagtgatta tgttcttgaa atgcacccia atgaaaattt cgaaaataaa cttgaagaaa	11160
taattgcaga aaacgctgtc ggaaattata cggagtgtat aactgcggct aagttggcaa	11220
ttgaaaagtg tggatgcgaaa agtgtattgc tgtcctttga accaatgaat gatattgatga	11280
gccaaaaaaa tgtaatcaat attgttgaig ataattataa gaagtagcac atggaatata	11340
cctaatagat ttcgagttgc agcgaggcgg caagtgaacg aatccccagg agcatagata	11400
actatgtgac tggggtgagt gaaagcagcc aacaaagcag cagcttgaaa gatgaagggt	11460
ataaaagagt atgacagcag tgctgccata ctttctaata ttatcttgag gagtaaaaca	11520
ggtatgactt catatgttga taaacaagaa attacagcaa gctcagaaat tgatgatttg	11580
atTTTTtCGa gCGatccatt agtTgtgtct tacgacgagc aggaaaaaat cagaaagaaa	11640
ctTgtgcttg atgcatttcg taatcattat aaacattgtc gagaatatcg tcactactgt	11700
caggcacaca aagtagatga caatattacg gaaattgatg acatacctgt attccaaca	11760
tCGgttttta agtttactcg cttattaact tctcaggaaa acgagattga aagttggttt	11820
accagtagcg gcacgaatgg tttaaaaagt caggTggcgc gtgacagatt aagtattgag	11880
agactcttag gctctgtgag ttatggcatg aaatatgttg gtagttggtt tgatcatcaa	11940
atagaattag tcaatttggg accagataga tttaatgctc ataattttg gtttaaatat	12000
gttatgagtt tggTggaatt gttatatect acgacattta ccgtaacaga agaacgaata	12060
gattttgtta aaacattgaa tagtcttgaa cgaataaaaa atcaagggaag agatctttgt	12120
cttattgggt cgccatactt tatttattta ctctgccatt atatgaaaga taaaaaatc	12180
tcattttctg gagataaaag cttttatatc ataaccggag gcggttgga aagttacgaa	12240
aaagaatctc tgaacgtga tgatttcaat catcttttat ttgatacttt caatctcagt	12300
gatattagtc agatccgaga tatatttaac caagttgaac tcaacacttg tttctttgag	12360
gatgaaatgc agcgtaaaca tgttccgccg tgggtatatg cgcgagcgt tgatcctgaa	12420
acgttgaaac ctglacctga tggaaacgccg gggttgatga gttatatgga tgcgtcagca	12480
accagttatc cagcatttat tgttaccgat gatgtcggga taattagcag agaatatggt	12540
aagtatcccg gcgtgctcgt tgaaatttta cgtcgcgtca atacaggagc gcagaaaggg	12600
tgtgctttaa gcttaaccga agcgtttgat agttgaatca cctgctttaa taattgattg	12660
attaagcccc atatgcatta attgcctatt gggctttttt attgccttca tatcgtaca	12720
cagaagcttt cctacgaaag aaaatagaga actctgctta ggtccccgtg tcacaacgga	12780

ctttttactt ttgcgctgat ttaaagtttg agagatcatt gcgacacaga gataaagaag	12840
ctaagcgaac ttagtcatt ttatTTTTgt cgcagcgttg aatgctgctg aacaagttag	12900
gggcaaagtc ctgtgggaga acaggacttt gcaaaactggt gtgttttaaa cgttgtacgg	12960
tttgagggtga atacacctgt gcaagctgtt ggcaaacaca attacaactg gcttacatgt	13020
gttcacctga caaacaatt cttttaatt cctgctgagc attggcatca tcatttgtaa	13080
tactgtaagc accgaccaca aggttttaaaa tcaatataaa tttatgaagt ttcataattat	13140
tctcatgatt atttataaat ttaataaaaa taaaaatatg gttcaattaa atattaaaat	13200
aattttttta ataataatta atcctccac aaacatagga aaataaaata attaaaaatt	13260
taaaatagaa ataatttata aatttaaaaa aacaggtcgc aaaaaacca aattttaaat	13320
aaataaaata gttaactaaa agagaaaatg agttttaata atggcatggc caactcctta	13380
aaaatggagt tctaccacca gattaccgcg aactaattta gggtggtaga acgaaagagg	13440
gttagcagac tgacctagcg accagcacgc gcgaacgcgt ccccttccg ccctaccata	13500
gagaaaaagg gggcacaaag gttccacacg ggtaatactg aggaagtata acccgacacg	13560
ctagggtacg gtctgctaaa accgactgtc tgcctcgtga agaaggtgtt gctgactcat	13620
accaggcctg aatcgcccca tcatccagcc agaaagttag ggagccacgg ttgatgagag	13680
ctttgttgta ggtggaccag ttggtgattt tgaacttttg ctttgccacg gaacggtctg	13740
cgttgtcggg aagatgcgtg atctgatect tcaactcage aaaagttcga tttattcaac	13800
aaagccgccg tcccgtaag tcagcgtaat gctctgccag tgttacaacc aattaaccaa	13860
ttctgattag aaaaactcat cgagcatcaa atgaaactgc aatttattca tatcaggatt	13920
atcaatacca tatTTTTgaa aaagccgttt ctgtaatgaa ggagaaaact caccgaggca	13980
gttccatagg atggcaagat cctggtatcg gtctgcgatt ccgactcgtc caacatcaat	14040
acaacctatt aatttccct cgtcaaaaat aaggttatca agtgagaaat caccatgagt	14100
gacgactgaa tccggtgaga atggcaaaag ctatgcatt tctttccaga cttgttcaac	14160
aggccagcca ttacgtcgt catcaaaatc actcgcatca accaaaccgt tattcattcg	14220
tgattgcgcc tgagcgagac gaaatacgcg atcgctgtta aaaggacaat tacaacagg	14280
aatcgaatgc aaccggcgca ggaacactgc cagcgcatca acaatatttt cacctgaatc	14340
aggatattct tctaatactt ggaatgctgt tttccgggg atcgagtgg tgagtaacca	14400
tgcacatca ggagtacgga taaaatgctt gatggtcgga agaggcataa attccgtcag	14460
ccagtttagt ctgacctct catctgtaac atcattggca acgctacctt tgccatgttt	14520
cagaaacaac tctggcgcat cgggttccc atacaatga tagattgtcg cacctgattg	14580
cccgacatta tcgcgagccc atttatccc atataaatca gcatccatgt tggaatttaa	14640

tcgcggcctc gagcaagacg ttccccgttg aatatggctc ataacacccc ttgtattact 14700

gtttatgtaa gcagacagtt ttattgttca tgatgatata tttttatctt gtgcaatgta 14760

acatcagaga ttttgagaca caacgtggct ttcccccccc ccctgcagg tcgacggatc 14820

gcagcggccg cagatctcct cgaagactgc aggtcgacgg atcccaagct tcttctagag 14880

gtaccgatg cgatatcgag ctctcccgagg aattccacaa attgttatcc gtcacaatt 14940

ccacatgtgg aattccacat gtggaattc 14969

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S1

<400> 2

tggtttgagc aattgacttg g 21

<210> 3

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S2

<400> 3

gccttaataa tgatcttttt tgaattact 29

<210> 4

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S3

<400> 4

atcacctgct ttaataattg attgatta 28

<210> 5

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S4

<400> 5

gcaacacctt cttcacgagg cagacagtcg gttttagcag accgtac	47
<210> 6	
<211> 47	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> S5	
<400> 6	
attcaaaaaa gatcattatt aaggcataaa acagaatttg cctggcg	47
<210> 7	
<211> 49	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> S6	
<400> 7	
tttatacata tattaagggtt ttttagagtt ttagaaacg caaaaaggc	49
<210> 8	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> S7	
<400> 8	
taaaaaacct taatatatgt ataaatagag caat	34
<210> 9	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> S8	
<400> 9	
ggatatacctc cagagataac aattg	25
<210> 10	
<211> 56	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> S9

<400> 10

caattgttat ctctggagga tatccatgac taaaaaatt tcattcatta ttaacg 56

<210> 11

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S10

<400> 11

tcaatcaatt attaaagcag gtgattcaac tatcaaacgc ttcggttaag 50

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> U1

<400> 12

gtctgcctcg tgaagaaggt g 21

<210> 13

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> U2

<400> 13

gatccgtcga cctgcagg 18