(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년04월21일
(11) 등록번호 10-2242665
(24) 등록일자 2021년04월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/405 (2006.01) *A23K 10/16* (2017.01)
A23K 50/80 (2016.01) *C12N 15/79* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/405 (2013.01)
A23K 10/16 (2016.05)
(21) 출원번호 10-2019-0155554
(22) 출원일자 2019년11월28일
심사청구일자 2019년11월28일
(56) 선행기술조사문헌
JOURNAL OF APPLIED PHYCOLOGY (2018) VOL.30, P.1735-1745
[HTTPS://DOI.ORG/10.1007/S10811_018_1396_3]
(뒷면에 계속)
전체 청구항 수 : 총 8 항

(73) 특허권자
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 용소로 45, 부경대학교내 (대연동)
(72) 발명자
최태진
부산광역시 남구 분포로 111, 139동 601호 (용호동, 엘지메트로시티)
김민정
부산광역시 해운대구 선수촌로208번길 112
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최규환

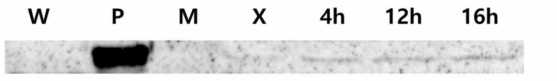
심사관 : 김정아

(54) 발명의 명칭 **클로렐라 불가리스 HSP70 유래의 열 유도성 프로모터 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*) HSP70 (Heat shock protein 70) 유래의 열(heat) 유도성 프로모터 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 프로모터는 미세조류를 이용한 재조합 단백질 생산 등에 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

대 표 도 - 도10



(52) CPC특허분류
A23K 50/80 (2016.05)
C12N 15/79 (2013.01)
(72) 발명자
김수현
부산광역시 남구 우암로154번길 57, 102동 103호
김예린
경상남도 창녕군 유어면 승계새마길 88

(56) 선행기술조사문헌
NCBI REFERENCE SEQUENCE: XM_005850002.1
US20110045593 A1
KR1020120092647 A
JOURNAL; WORLD JOURNAL OF MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY (2019) 35:141

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1525008637 (세부과제번호: 201600722)
부처명	해양수산부
과제관리(전문)기관명	해양수산과학기술진흥원
연구사업명	수산실용화기술개발(R&D)
연구과제명	형질전환 미세조류를 이용한 VHSV 재조합 백신 대량생산 기술개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	부경대학교산학협력단
연구기간	2019.01.01 ~ 2019.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 염기서열로 이루어진 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*) HSP70 (Heat shock protein 70) 유래의 열(heat) 유도성 프로모터.

청구항 2

제1항의 프로모터를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 프로모터의 하류(downstrem)에 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 작동 가능하게 연결시켜 제조된 재조합 벡터.

청구항 4

제3항의 재조합 벡터로 형질전환된 미세조류.

청구항 5

제4항의 형질전환된 미세조류를 배양하는 단계를 포함하는 목적 단백질을 생산하는 방법.

청구항 6

제2항의 재조합 벡터에 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 재조합하는 단계; 및

상기 재조합된 벡터로 미세조류를 형질전환시키는 단계;를 포함하는 목적 단백질을 코딩하는 유전자가 열 스트레스 조건에서 발현되는 형질전환 미세조류의 제조방법.

청구항 7

제6항의 제조방법으로 제조된 목적 단백질을 코딩하는 유전자가 열 스트레스 조건에서 발현되는 형질전환 미세조류.

청구항 8

제7항에 따른 형질전환 미세조류의 배양액을 유효성분으로 포함하는 어류용 사료 첨가제.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 클로렐라 불가리스 HSP70 유래의 열 유도성 프로모터 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 재조합 단백질 분야의 진보는 다양한 살아있는 유기체를 위한 발현 시스템의 개발에 기초하고 있다. 세균, 효모, 포유동물 세포, 식물 및 미세조류 등과 같은 발현 시스템들이 재조합 단백질 생산을 위해 사용되어왔다. 이러한 시스템들은 단백질의 종류, 조작의 난이도, 생산비용, 안정성 등에 따라 각각의 장점과 단점이 있다. 최근 미세조류는 아래에 언급된 이유로 새로운 플랫폼으로서 주목받고 있다: 미세조류는 다양한 서식지를 가지며, 광합성을 통해 화학에너지를 생성하는 광 영양 유기체이고, 건조 중량의 최대 45%의 단백질 함유량과, 스트레스 조건에서 최대 55%의 지질 축적 능력이 있다. 상기와 같은 이유로 미세조류는 천연 염색 안료 등 많은 유용한 물질을 생산하기 위해 산업적으로 사용되어 왔다. 또한, 최근에는 고등 식물의 단순 모델로 주목받고 있다 (Yang, Liu, Jiang, & Chen, 2016, Biotechnology journal, 11(10):1244-1261).

[0003] 클로렐라는 직경이 5~10㎛인 구형의 단세포 진핵생물이다. 클로렐라는 다양한 조건에서 잘 자라는 녹색의 미세조류로, 광합성에 의해 독립 영양을 할 뿐만 아니라 포도당과 같은 유기 물질을 사용하여 종속 영양도 가능하다. 클로렐라는 간단한 탄소 및 에너지원으로 높은 생산성을 가지며, 진핵생물이므로 번역 후 변형을 통해 진핵 생물 단백질을 생산할 수 있다. 따라서 클로렐라 발현 시스템은 이종 단백질을 위한 효율적인 플랫폼일 수 있다. 그러나, 유전공학 측면에서 가지는 상기의 몇가지 장점과 달리, 클로렐라 발현 시스템은 다른 발현 시스템보다 이종 단백질 생산량이 적다는 단점이 있다. 낮은 이종 단백질 수율에 의해 클로렐라 발현 시스템의 사용이 제한되는데, 이는 프로모터, 인핸서, 코돈편중, 단백질 분해작용 및 유전자 침묵을 비롯한 여러 가지 요인 때문이다.

[0004] 프로모터는 이종 유전자의 발현에서 가장 중요한 요소 중 하나이다. 대표적인 콜리 플라워 모자이크 바이러스 35S (Cauliflower mosaic virus 35S, CaMV 35S)는 가장 널리 사용되는 프로모터이며 클로렐라를 사용한 여러 연구에 사용되었다. 그러나 일부 이종 단백질은 숙주세포가 거부하여 단백질 분해가 일어난다. 따라서, 짧은 시간에 유전자를 발현할 수 있는 유도성 프로모터가 필요하다. 유도성 프로모터는 특정 시간 내에 특정 조건에서 정확히 유전자 산물을 생산하도록 개발되었다. 이러한 시스템은 이종 단백질의 생명공학 생산에 적용될 수 있으며, 종종 단백질의 발현 수준을 증가시키기 위해 사용되어 왔다. 유도성 프로모터는 또한 클로렐라에서 효율적이고 엄격하게 제어된 유전자 발현의 촉진에 관여한다.

[0005] 열 충격 단백질 (Heat shock protein, HSP)은 거의 모든 진핵생물에서 발견된다. 이것은 핵산과 단백질의 변성, 단백질 복합체의 분리, 막 구조의 불안정화로 이어질 수 있는 주요 환경 스트레스 요인인 고온과 싸우는 데 도움이 된다. 클라미도모나스(*Chlamydomonas*)에서는 온도 및 빛 스트레스 조건에서 HSP70 프로모터를 이용하여 이종 단백질의 생산이 증가됨이 보고되었다. 이를 바탕으로 HSP70 프로모터를 이용한 형질전환 실험이 연구되었다. 본 발명에서는 이종 단백질의 발현 수준을 증가시키기 위해 유도성 프로모터에 초점을 맞추고 클로렐라의 내인성 프로모터인 HSP70 프로모터를 조사하였다.

[0006] 한편, 한국등록특허 제0758815호에는 '넙치의 HSP60과 HSP10을 암호화하는 신규한 유전자 및 그의 양방향 프르모터'가 개시되어 있고, 한국등록특허 제1301560호에는 '테트라히메나 열 유도성 프로모터 및 그의 용도'가 개시되어 있으나, 본 발명의 클로렐라 불가리스 HSP70 유래의 열 유도성 프로모터 및 이의 용도에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로, 본 발명자는 야생형 클로렐라 불가리스 유래의 열충격 단백질 70 유전자로부터 상류에 위치한 프로모터 지역을 클로닝하여 해당 서열을 포함하는 클로렐라 발현용 벡터를 제조하였다. 그 후, 본 발명자는 상기 열충격 단백질 70 유래 프로모터의 하류에 목적 단백질의 코딩 서열을 융합하여 재조합 벡터를 제작하고, 상기 재조합 벡터로 클로렐라를 형질전환한 후, 형질전환 세포에 열충격(44℃, 30분)을 가한 후, 20℃에서 배양하며 목적 단백질의 발현을 분석한 결과, 열 충격을 가하지 않은 형질전환체에서는 목적 단백질의 발현이 유도되지 않은 반면, 열 충격이 가해진 형질전환체에서는 목적 단백질의 발현이 시간이 경과함에 따라 증가된 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*) HSP70 (Heat shock protein 70) 유래의 열(heat) 유도성 프로모터를 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 프로모터를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터로 형질전환된 미세조류를 배양하는 단계를 포함하는 목적 단백질을 생산하는 방법을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터에 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 재조합하는 단계; 및 상기 재조합된 벡터로 미세조류를 형질전환시키는 단계;를 포함하는 목적 단백질을 코딩하는 유전자가 열 스트레스 조건에서 발현되는 형질전환 미세조류의 제조방법을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 제조방법으로 제조된 목적 단백질을 코딩하는 유전자가 열 스트레스 조건에서 발현되는

형질전환 미세조류를 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 형질전환 미세조류의 배양액을 유효성분으로 포함하는 어류용 사료 첨가제를 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명에 따른 클로렐라 유래의 신규 프로모터는 열 스트레스 조건에서 프로모터 하류에 연결된 외래 단백질 코딩 유전자의 발현을 강하게 유도하는 특성이 있으며, 내인성 프로모터로 미세조류가 자체적으로 가지는 전사인자 등이 작동가능하여 외인성 프로모터에 비해 더욱 효과적인 전사가 이루어질 수 있는 장점이 있다. 또한, 열 처리에 의한 발현 유도 전에는 외래 단백질의 발현량이 적어 형질전환체의 성장이 억제되지 않기 때문에 형질전환체를 충분히 배양한 후 외래 단백질의 발현을 유도함으로써 외래 단백질의 발현량을 증가시킬 수 있는 특성이 있어, 미세조류를 이용한 재조합 단백질 생산 등에 유용하게 활용될 수 있을 것이다. 또한, 외래 단백질로 어류 병원성 미생물 또는 바이러스 유래의 항원 단백질을 선택할 경우, 상기 항원 단백질을 발현하는 미세조류 배양액을 그대로, 혹은 건조 또는 분말화하여 백신 보조제 또는 사료 첨가제로 사용할 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 클로렐라 불가리스 HSP70 유래 프로모터의 서열을 보여준다. 빨간색: 프라이머 결합 부위, 파란색: 각각 *EcoR*I 및 *BamH*I 제한 효소 서열.

도 2는 본 발명에서 사용된 플라스미드 DNA의 벡터 모식도로, (a)는 선행 연구에 사용되었던 CVnr(1kb)-35S-vGopti 벡터의 모식도이고, (b)는 HSP70 프로모터를 삽입하여 만든 새로운 미세조류 형질전환 벡터인 CVnr(1kb)-HSP70-vGopti 벡터의 모식도를 나타낸다.

도 3은 클로렐라 불가리스 유래 *HSP70* 유전자를 참조 서열과 정렬한 결과의 모식도이다.

도 4는 클로렐라 불가리스 HSP70 유래 프로모터를 분석한 결과로, 각각의 박스는 결합 가능한 전사인자의 유형을 나타낸다. 개시 부위는 빨간색 글자 및 밑줄로 표시하였다.

도 5는 염소산염(ClO_3)이 포함된 배지에서 형질전환체를 선별한 결과로, A는 야생형 클로렐라 불가리스(*C. vulgaris*) PKVL7422 균주를 도말한 결과이고, B는 CVnr(1kb)-HSP70-vGopti 벡터에 의해 형질전환된 클로렐라 불가리스 PKVL7422 균주를 도말한 결과이고, C는 CVnr(1kb)-HSP70-vGopti PCR product에 의해 형질전환된 클로렐라 불가리스 PKVL7422 균주를 도말한 결과이다.

도 6은 형질전환체에서 삽입된 유전자를 확인하기 위해 수행한 PCR 결과이다. N: Negative control, W: 야생형 *C. vulgaris* PKVL7422, M: DM3200 DNA marker (SMOBIO), P1~3: PCR product로 형질전환된 형질전환체, 1~7 : Plasmid로 형질전환된 형질전환체.

도 7은 야생형 클로렐라 불가리스(*C. vulgaris*) PKVL7422 균주의 열 스트레스에 따른 살아있는 세포 또는 죽은 세포에 대한 분석 히스토그램으로, 왼쪽의 피크는 살아있는 세포를, 오른쪽의 피크는 죽은 세포를 의미한다. (A): 무처리 야생형. (B) 내지 (P)는 각기 다른 온도 및 처리 시간으로 열 스트레스를 준 야생형으로, 각각 온도:시간으로 표시하였다: (B) 42:20, (C) 42:40, (D) 42:60, (E) 44:20, (F) 44:40, (G) 44:60, (H) 46:20, (I) 46:40, (J) 46:60, (K) 48:20, (L) 48:40, (M) 48:60, (N) 50:20, (O) 50:40, (P) 50:60.

도 8은 야생형 클로렐라 불가리스(*C. vulgaris*) PKVL7422 균주의 열 스트레스에 따른 살아있는 세포 또는 죽은 세포에 대한 밀도 점적을 나타낸 것으로, 왼쪽의 집단은 살아있는 세포를, 오른쪽의 집단은 죽은 세포를 의미한다. 각 집단은 밀도에 따라 밀도가 낮은곳부터 높은곳까지 파란색, 초록색, 노란색, 빨간색의 순으로 표시된다. (A): 무처리 야생형. (B) 내지 (P)는 각기 다른 온도 및 처리 시간으로 열 스트레스를 준 야생형으로, 각각 온도:시간으로 표시하였다: (B) 42:20, (C) 42:40, (D) 42:60, (E) 44:20, (F) 44:40, (G) 44:60, (H) 46:20, (I) 46:40, (J) 46:60, (K) 48:20, (L) 48:40, (M) 48:60, (N) 50:20, (O) 50:40, (P) 50:60.

도 9는 열 스트레스에 따른 *HSP70*의 전사체 수준을 분석하기 위한 real-time PCR 결과이다. 18s rRNA의 전사체 수준을 내부 대조군으로 사용하였으며, 세로축은 아무런 처리하지 않은 야생형 불가리스 클로렐라 PKVL7422의 HSP70 전사체의 양을 1로 하였을 때 각 처리군의 상대적인 *HSP70* 전사체 양을 의미한다. 가로축은 '온도, 처리 시간(분), 처리 후 배양시간(시)'을 나타낸다.

도 10은 열 충격에 의한 형질전환체의 단백질 발현 수준을 분석한 웨스턴 블랏 결과이다. W: 야생형 클로렐라 불가리스 PKVL7422, P: 양성대조군 (VHSV), M: DM3200 DNA marker (SMOBIO), X: 열 처리하지 않은 형질전환체,

4h: 열처리 후 4시간 배양한 형질전환체, 12h: 열처리 후 12시간 배양한 형질전환체, 16h: 열처리 후 16시간 배양한 형질전환체.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*) HSP70 (Heat shock protein 70) 유래의 열(heat) 유도성 프로모터를 제공한다.

[0017] 본 발명에 따른 열 유도성 프로모터는 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*)에서 분리된 것으로, 열 스트레스 조건에서 발현이 상향 조절되는 HSP70 유전자로의 상류(upstream) 지역에서 유래한 것이다.

[0018] 또한, 본 발명은 상기 열 유도성 프로모터 서열의 상동체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 상동체는 염기서열은 변화되지만, 서열번호 1의 염기서열과 유사한 기능적 특성을 갖는 염기서열이다. 구체적으로, 상기 프로모터는 서열번호 1의 염기서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제를 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.

[0019] 프로모터(promoter)는 구조유전자(gene)의 상부 쪽에 연결되어 있는 유전체(genome) 부위로서, 이에 연결된 구조유전자가 mRNA로 전사(transcription)되도록 조절하는 역할을 한다. 프로모터에는 여러 일반전사인자(general transcription factor)들이 결합함으로써 활성화(activation)되는데, 보편적으로 유전자 발현을 조절하는 TATA box, CAT box 등의 염기서열을 가지고 있다. 생체의 기본대사에 필요한 단백질들은 세포 내에서 일정 농도를 유지하여야 하므로 이들의 유전자에 연결된 프로모터는 일반전사인자의 작용만으로도 항시 활성화되어 있다. 이에 반하여 평시에는 역할이 없고 특수한 상황 하에서만 기능이 요구되는 단백질들은 해당 구조유전자의 발현을 유도하는 유도성 프로모터(inducible promoter)가 연결되어 있다. 즉 유도성 프로모터에는 생물체의 발달과정에서, 또는 주변으로부터의 환경적 요인에서 오는 외부 자극에 의해 활성화된 특이 전사인자(specific transcription factor)가 결합함으로써 활성화된다. 일반적으로 프로모터는 RNA 중합효소가 결합하여 전사개시를 유도하는 부분을 포함하며 프로모터의 염기서열에 따라 RNA 합성 정도가 결정되기 때문에 프로모터에 따라 유전자의 발현 강도가 다를 수 있다.

[0020] 본 발명은 또한, 상기 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 열 유도성 프로모터를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

[0021] 본 발명의 재조합 벡터는 바람직하게는 미세조류용 발현 벡터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 발현벡터는 통상적으로 전사를 가능하게 하는 프로모터, 목적 단백질을 발현하는 유전자, 미생물 내에서 자기 복제하여 증폭할 수 있는 유전자 및 목적하는 벡터를 선별하기 위한 항생물질의 선택마커 유전자가 최소한 필요하며, 목적 유전자를 제외한 상기 유전자들은 벡터의 백본(backbone) 및 선택된 숙주에 따라 달라질 수 있다. 벡터 제작에 있어서 상기 최소한으로 필요한 유전자들은 당업자에게는 널리 알려져 있으며, 유전자 발현 조건 및 목적에 따라 용이하게 선택할 수 있다.

[0022] 본 발명의 일 구현 예에 따른 재조합 벡터는 본 발명에 따른 열 유도성 프로모터의 하류(downstream)에 목적 단백질을 암호화하는 유전자를 작동가능하게 연결시켜 제조된 것일 수 있다. 본 발명에서, "작동가능하게 연결된"은 이종 단백질을 발현하기 위한 단위로서 기능하는 발현 카세트의 성분을 말한다. 예를 들면, 단백질을 코딩하는 이종 DNA에 작동가능하게 연결된 프로모터는 이종 DNA에 해당하는 기능적 mRNA의 생산을 촉진한다.

[0023] 상기 '목적 단백질' 또는 '외래 단백질'은 상기 단백질을 발현하는 형질전환된 숙주세포에서는 정상적으로는 존재할 수 없는 단백질을 의미한다. 상기 목적 단백질은 모든 종류의 단백질일 수 있으며, 예컨대 효소, 호르몬, 항체, 사이토카인 등의 의학적 활용성이 있거나, 어류를 포함한 동물의 건강을 증진시킬 수 있는 영양성분을 다량 축적할 수 있는 단백질 등일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0024] 본 발명은 또한, 상기 재조합 벡터에 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 재조합하는 단계; 및 상기 재조합된 벡터로 미세조류를 형질전환시키는 단계;를 포함하는 목적 단백질을 코딩하는 유전자가 열 스트레스 조건에서 발현되는 형질전환 미세조류의 제조방법 및 상기 제조방법으로 제조된 목적 단백질이 열 스트레스 조건에서 발현되는 형질전환 미세조류를 제공한다.

[0025] 본 발명의 제조방법에 있어서, 상기 재조합 벡터로 미세조류를 형질전환한 다음 형질전환체만을 선별하는 방법

은 항생물질을 사용하지 않는 방법으로 바람직하게는, 한국등록특허 제1985345호에 명시된 방법과 같다. 구체적으로는, 본 발명의 재조합 벡터는 클로렐라 불가리스의 질산환원효소의 N-말단 코딩 폴리뉴클레오티드 및 C-말단 코딩 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하고 있어, 형질전환된 미세조류의 게놈 내 질산환원효소 코딩 유전자간의 상동재조합에 의해 외래 유전자가 도입되고, 형질전환체는 게놈 내의 질산환원효소 유전자가 결손되어 질산환원효소의 기능을 상실하게 된다. 질산환원효소는 질산 이온(NO_3^-)을 아질산 이온(NO_2^-)으로 환원시키는 기능 뿐만 아니라, 염소산 이온(chlorate ion, ClO_3^-)을 독성이 있는 아염소산 이온(chlorine dioxide, ClO_2^-)으로 환원시키는 기능이 있다. 따라서, 본 발명의 재조합 벡터에 의해 형질전환된 미세조류는 질산환원효소가 기능하지 못하므로, 염소산 이온을 아염소산 이온으로 환원시킬 수 없어, 염소산 이온이 함유된 배양액에 대해 저항성을 가지게 되어, 비형질전환체와 달리 염소산염이 함유된 배양액에서 성장이 가능하므로, 이를 통해 형질전환체를 선별할 수 있는 것이다. 재조합 벡터를 미세조류에 형질전환시키는 방법은 당업계에 공지된 기술을 이용할 수 있다.

[0026] 본 발명의 일 구현 예에 따른 제조방법에 있어서, 상기 미세조류는 클로렐라(*Chlorella*), 세네데스무스(*Scenedesmus*), 두날리엘라(*Dunaliella*), 스피룰리나(*Spirulina*) 및 난노클로롭시스(*Nannochloropsis*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으며, 바람직하게는 클로렐라(Chlorella)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 클로렐라는 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*), 클로렐라 엘립소이데아(*C. ellipsoidea*), 클로렐라 피레노이도사(*C. pyrenoidosa*) 또는 클로렐라 레귤라리스(*C. regularis*)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0027] 본 발명에 따른 형질전환 미세조류는 열 처리 조건에서 목적 단백질의 발현이 증가되는 것을 특징으로 한다.

[0028] 본 발명은 또한, 상기 형질전환 미세조류의 배양액을 유효성분으로 포함하는 어류용 사료 첨가제를 제공한다. 본 발명의 형질전환용 미세조류는 그 자체가 어류의 사료 보조제 소재로 활용될 수 있으며, 목적 단백질로 어류 병원체의 단백질을 발현시킬 경우 면역증강용 사료 첨가제로 이용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0029] 본 발명의 사료첨가제에는 아미노산, 무기염류, 비타민, 항생물질, 항균물질, 항산화, 항곰팡이 효소, 다른 생균 형태의 미생물 제제 등과 같은 보조제 성분; 곡물, 예를 들면 분쇄 또는 파쇄된 밀, 귀리, 보리, 옥수수 및 쌀; 식물성 단백질 사료, 예를 들면 평지, 콩 및 해바라기를 주성분으로 하는 것; 동물성 단백질 사료, 예를 들면 혈분, 육분, 골분 및 생선분; 당분 및 유제품, 예를 들면 각종 분유 및 유장 분말로 이루어지는 건조성분; 지질, 예를 들면 가열에 의해 임의로 액화시킨 동물성 지방 및 식물성 지방 등과 같은 주성분; 영양보충제, 소화 및 흡수향상제, 성장촉진제, 질병 예방제와 같은 첨가제가 추가로 포함될 수 있다.

[0030] 본 발명의 사료첨가제는 분말 또는 액체 상태의 제제 형태일 수 있으며, 사료 첨가용 부형제를 포함할 수 있다. 사료 첨가용 부형제로는 예를 들어, 탄산칼슘, 말분, 제올라이트, 옥분 또는 미강 등을 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0031] 본 발명의 사료첨가제는 하나 이상의 효소 제제를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어 리파제와 같은 지방 분해효소, 피틴산(phytic acid)을 분해하여 인산염과 이노시톨인산염을 만드는 파이타제(phytase), 녹말과 글리코겐 등에 포함되어 있는 알파-1,4-글리코시드 결합(α-1,4-glycoside bond)을 가수분해하는 효소인 아밀라제, 유기인산에스테르를 가수분해하는 효소인 포스파타제(phosphatase), 말토오스를 두 분자의 글루코스로 가수분해하는 말타제 및 사카로스를 가수분해하여 글루코스-프룩토스 혼합물을 만드는 전환효소 등을 포함할 수 있다.

[0032] 본 발명의 사료첨가제는 어류에게 단독으로 투여되거나 식용 담체 중에서 다른 사료첨가제와 조합되어 투여될 수 있다. 통상적으로, 당업계에 잘 알려진 바와 같이 단독 일일 섭취량 또는 분할 일일 섭취량을 사용할 수 있다.

[0033] 또한, 동결건조에 의한 미세조류 불활성화 방법을 사용하면 본 발명의 형질전환된 미세조류로부터 단백질이 추출 및 정제과정 없이 사료첨가제로 바로 사용가능할 수 있다.

[0034] 본 발명은 또한, 본 발명에 따른 열 유도성 프로모터의 하류(downstream)에 목적 단백질을 암호화하는 유전자를 작동가능하게 연결시켜 제조된 재조합 벡터로 형질전환된 미세조류를 배양하는 단계를 포함하는, 목적 단백질을 생산하는 방법을 제공한다.

[0035] 본 발명의 단백질을 생산하는 방법은 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포(형질전환체)를 공지된 기술을 이용하여 재조합 단백질의 생산에 적합한 배지에서 배양하는 것일 수 있다. 예를 들어, 세포들은 적합한 배지와 단백

질이 발현 및/또는 분리되는 것을 허용하는 조건 하에 실시된 실험실 또는 산업용 발효기에서 소규모 또는 대규모 발효, 쉐이크 플라스크 배양에 의해서 배양될 수 있다. 배양은 공지기술을 사용하여 탄소, 질소원 및 무기염을 포함하는 적합한 배지에서 일어난다. 적합한 배지는 상업적으로 입수하거나 예를 들면, ATCC(American Type Culture Collection)의 카탈로그와 같은 간행물에 기재된 성분 및 조성비에 따라 제조할 수 있다.

[0036] 본 발명의 일 구현 예에 따른 목적 단백질 생산 방법에 있어서, 상기 배양은 열 유도성 프로모터 하류에 연결된 목적 단백질의 발현 유도를 위해 배양 배지에 열 충격을 처리하는 것을 특징으로 한다. 상기 열 충격은 40~45℃의 온도로 20~60분 동안 처리되는 것일 수 있고, 바람직하게는 44℃의 온도로 30~60분 동안 처리되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0037] 또한, 상기 생산방법에서는 발현된 단백질을 당업계에 공지된 단백질 분리방법을 이용하여 회수할 수 있다. 예를 들어 단백질은 원심분리, 여과, 추출, 분무 건조, 증발 또는 침전을 포함하는 통상적인 방법에 의해서 영양 배지로부터 분리될 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 더 나아가 단백질은 크로마토그래피(예를 들면 이온 교환, 친화성, 소수성 및 크기별 배제), 전기영동, 분별용해(예를 들면 암모늄 설페이트 침전), SDS-PAGE 또는 추출을 포함하여 공지된 다양한 방법을 통해서 정제될 수 있다.

[0039] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0041] **재료 및 방법**

[0042] **1. HSP70 서열 찾기**

[0043] 본 발명자는 *C. vulgaris* PKVL7422로 명명되는 클로렐라 불가리스를 획득하였다. 이 조류는 빠른 성장과 쉬운 배양 및 암(dark) 조건에서 잘 자라는 특성을 가지고 있다. 클로렐라 불가리스 PKVL7422는 52 μmol photons/m^2/s의 광원 및 BG-11 배지에서 20℃로 배양하였다. 클로렐라 불가리스 PKVL7422의 HSP70 partial DNA 서열은 이전의 연구(출원번호 10-2019-0149259)에서 수행한 전사체 분석의 결과에서 얻었다. cDNA 라이브러리 결과의 *HSP70* 유전자를 미국 국립생물정보센터(National Center for Biotechnology Information, NCBI)의 GenBank로부터 참조 유전자로 다운로드한 클로렐라 불가리스(*C. vulgaris*) UTEX395 유전체 서열(LDKB00000000)에 정렬시켰다.

표 1

BG-11 배지 성분표

0.002 mM $Na_2MGEDTA$		
0.02 mM Ferric ammonium citrate		
0.03 mM Citric acid • $1H_2O$		
0.03 mM $MgSO_4$ • $7H_2O$		
0.22 mM K_2HPO_4		
0.2 mM $CaCl_2$ • $2H_2O$		
0.18 mM Na_2CO_3		
Microelements (1 ml/L)	H_3Bo_3	2.86 g/L
	$MnCl_2$ • $4H_2O$	1.81 g/L
	$ZnSO_4$ • $7H_2O$	0.222 g/L
	$CuSO_4$ • $5H_2O$	0.079 g/L
	$COCl_2$ • $6H_2O$	0.050 g/L
	$NaMoO_4$ • $2H_2O$	0.391 g/L
Nitrogen sources	17.6 mM $NaNO_3$	
Carbone sources	0.5% (w/v) Glucose	

[0044]

[0046] **2. 야생형 클로렐라 불가리스 PKVL7422에 대한 열 충격 조건**

[0047] 열 충격에 대한 생존 임계점을 파악하기 위해 야생형의 클로렐라 불가리스 PKVL7422에 대해 열 충격 시험을 하였다. BG-11 배지에서 키워 3~5×10^7 cell/㎖의 세포 밀도를 가진 클로렐라 불가리스 PKVL7422를 사용하였다. 열 충격 시험은 배양된 클로렐라 불가리스 PKVL7422 1.5㎖을 시험관 튜브에 넣고, 상기 튜브를 히팅 블럭에 넣어 42~50℃의 온도 범위에서 매 2℃ 마다 각각 20분, 40분, 60분간 열처리를 함으로써 수행되었다. 이후 20℃, 광 조건에서 24시간 배양한 후 유세포분석기용 튜브에 옮기고, 1㎕의 SYTOX™ Green Nucleic Acid Stain (ThermoFisher, USA)을 넣고 혼합한 후 실온에서 15분 동안 반응시키고, 유세포분석기 (FACSVerse™ Flow Cytometer, BD Bioscience, USA)를 이용하여 분석하였다.

[0049] **3. HSP70 프로모터 조사**

[0050] 확인된 *HSP70* 유전자와, 클로렐라 불가리스 UTEX395 유전체의 *HSP70* 서열을 기초로 중합효소연쇄반응(PCR)에 사용할 프라이머를 제조하였다. 역방향 프라이머를 만들기 위해, cDNA 라이브러리의 *HSP70* 유전자의 엑손을 사용하였고, 정방향 프라이머는 역방향 프라이머로부터 약 1,000bp 염기서열 앞 부분의 클로렐라 불가리스 UTEX395 유전체를 사용하였다(표 2).

표 2

[0051] HSP70 프로모터 획득을 위한 프라이머 정보

표적	프라이머 명	염기서열	예상 크기
HSP70 promoter	CV-HS-pr-F1	5'-GCCTGTCGCTGTTCTGCAC-3' (서열번호 2)	1,025 bp
	CV-HS-R	5'-TAGGAGGGCGTGGTGCGGTTTCCCTG-3' (서열번호 3)	

[0052] 표적 유전자는 HiPi Plus 5x PCR Master Mix (ELPIS BIO, Korea)를 사용하여 다음 PCR 조건에 의해

증폭되었다; 95℃에서 7분간 전변성(pre-denaturation); 95℃에서 10초간 DNA 변성(denaturation), 60℃에서 10초간 프라이머 결합(annealing), 72℃에서 1분간 신장(extension) 과정을 35회 반복. PCR 산물을 1% 아가로스 겔에서 절단하여 GEL SV Kit (Gene All, Korea)를 사용하여 겔에서 분리시켰다. 정제된 PCR 산물을 pMD19 T-Vector (Takara, Japan)에 삽입하고, 열 충격 방법에 의해 대장균 DH5α에 클로닝하고 진탕 배양기에서 37℃에서 16시간 동안 배양 하였다. 배양된 세포를 3,500rpm, 4℃에서 30분간 원심분리하여 펠렛을 얻었다. 그 후, Exprep™ Plasmid SV, mini Kit (Gene All)를 사용하여 펠렛으로부터 플라스미드 DNA를 추출하였다. Plasmid DNA는 BIONICS (Korea)에서 서열 분석되었다. 확인된 *HSP70* 프로모터 서열은 PlantCARE를 사용하여 전사 인자 결합 부위를 확인하였고 (http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/), softberry (http://www.softberry.com/)의 Plant prom 프로그램을 이용하여 전사 시작 부위가 확인되었다.

[0054] **4. HSP70 프로모터 서열의 준비**

[0055] HSP70 프로모터 서열이 삽입된 plasmid DNA를 Heat_*EcoR*Ⅰ, Heat_*BamH*ⅠR의 프라이머 세트를 사용하여 PCR을 수행하였다.

표 3

[0056] HSP70 프로모터의 제한효소자리 추가를 위한 프라이머 정보

표적	프라이머 명	염기서열	예상 크기
HSP70 promoter	Heat_EcoR I	5'-AAAAAAGAATTCGCCTGTCGCT GTTCTGCACGG-3' (서열번호 4)	631 bp
	Heat_ BamH I R	5'-AAAAAAAGGATCCGGTCCGTGG ACGACTTTTTCACTGGC-3' (서열번호 5)	

[0057] PCR 산물을 1% 아가로스겔에서 절단하여 GEL SV Kit를 사용하여 겔에서 분리시켰다. 정제된 PCR 산물을 pMD19 T-Vector에 삽입하고, 열 충격 방법에 의해 대장균 DH5α에 클로닝하고 진탕 배양기에서 37℃에서 16시간 동안 배양 하였다. 배양된 세포를 3,500rpm, 4℃에서 30분간 원심분리하여 펠렛을 얻었다. 그 후, Exprep™ Plasmid SV, mini Kit를 사용하여 펠렛으로부터 플라스미드 DNA를 추출하였다. 추출된 플라스미드 DNA는 *EcoR*Ⅰ, *BamH*Ⅰ 제한효소에 의해 절단되고, 1% 아가로스겔에서 100V, 30분 조건에서 전기영동시킨 후, GEL SV Kit를 사용하여 획득되었다.

[0059] **5. 미세조류 형질전환 벡터 제작**

[0060] 선행 연구에서 사용된 CVnr-35S-vGopti 벡터(도 2a)를 변형하여 미세조류 형질전환 벡터를 제작하였다. CVnr-35S-vGopti 벡터의 35S 프로모터 부위는 *EcoR*Ⅰ, *BamH*Ⅰ 제한효소로 절단하여 제거되었으며, 벡터 부위는 1% 아가로즈겔에서 분리되었다. 벡터 부위는 HSP70 프로모터와 연결되어 대장균 DH5α에 클로닝하고 진탕 배양기에서 37℃에서 16시간 동안 배양하였다. 배양된 세포를 3,500rpm, 4℃에서 30분간 원심분리하여 펠렛을 얻었다. 그 후, Exprep™ Plasmid SV, mini Kit를 사용하여 펠렛으로부터 새로운 미세조류 형질전환용 벡터(도 2b)를 얻었다. CVnr-35S-vGopti 벡터는 한국등록특허 제1985345에 개시된 미세조류 형질전환용 재조합 벡터와 원리가 유사한 것으로, CVnr-35S-vGopti 벡터 내 질산환원효소 유전자 유래 DNA 단편과 형질전환된 미세조류의 게놈 상의 질산환원효소 유전자간의 상동재조합을 통해 외래 유전자를 도입할 수 있게 되는 것이다.

[0062] **6. 삽입 유전자의 증폭**

[0063] 삽입 유전자의 증폭은 미세조류 형질전환 벡터(CVnr-35S-vGopti)의 상동 재조합 부위인 질산염환원효소 유전자(Nitrate reductase gene, NR gene) 5'과 3'에 결합하는 특이적인 프라이머 세트에 의해 수행되었다(표 4).

표 4

[0064] 형질전환에 사용될 삽입 유전자 증폭을 위한 프라이머 정보

표적	프라이머 명	염기서열	예상 크기
Whole length of insert gene	1kb UF_28	5'-AACAAGATGTCGTAGGTTCAAATCCTAT-3' (서열번호 6)	4,470 bp
	1kb DR_28	5'-AACAAGATGTCGTAGGTTCAAATCCTAT-3' (서열번호 7)	

[0065] 삽입 유전자는 HiPi Plus 5x PCR Master Mix (ELPIS BIO, Korea)를 사용하여 다음 PCR 조건에 의해 증폭되었다; 95℃에서 7분간 전변성; 95℃에서 15초간 DNA 변성, 60℃에서 10초간 프라이머 결합, 72℃에서 3분간 신장의 과정을 35회 반복. PCR 산물을 1% 아가로스 겔에서 절단하여 GEL SV Kit를 사용하여 겔에서 분리시켜 정제하였다.

[0067] **7. 미세조류 형질전환**

[0068] 클로렐라 불가리스 PKVL7422로의 형질전환은 선행 연구(Kim, 2019)에서 일부 수정된 방법이 사용되었다. 1~3×10^6 cell/㎖ 만큼 성장한 클로렐라 불가리스 PKVL7422를 3,500rpm, 4℃에서 30분 원심분리하여 상층액을 제거하고 10^7 cell 만큼 얻었다. 펠렛을 1㎖의 Osmosis buffer(고압 증기 멸균 후 0.2㎛ 필터에 여과, 200 mM D-sorbitol, 200 mM D-mannitol)에 재현탁 시키고 실온에서 1시간 방치 후 다시 원심분리하여 펠렛을 형성하였다. 이후, 펠렛을 400㎕의 electroporation buffer(고압 증기 멸균 후 0.2㎛ 필터에 여과, 200 mM D-sorbitol, 200 mM D-mannitol, 20 mM Hepes, 5m M $CaCl_2$, 5 mM KCl; pH7.2)에 재현탁 시킨 후, PCR 증폭된 삽입 유전자 10㎍을 첨가하고 10분간 얼음 위에 두었다. 상기 혼합물을 0.2㎝ 전기 천공 큐벳으로 옮기고 1kV, 400Ω, 25㎌ 조건에서 Gene Pulser® Ⅱ Electroporation System (BIO-RAD, USA)를 사용하여 전기천공시켰다. 형질전환 후, 형질전환체를 5㎖의 BGNK 배지(표 5)를 넣은 6-웰 플레이트로 옮겨 20℃, 암 조건에서 18시간 동안 배양하였다. 그런 다음 BGNK 1% 고체배지에 도말하여 20℃ 광 조건과 암 조건에서 14일간 배양하였다.

표 5

BGNK 배지 성분표

0.002 mM $Na_2MGEDTA$		
0.02 mM Ferric ammonium citrate		
0.03 mM Citric acid • $1H_2O$		
0.03 mM $MgSO_4$ • $7H_2O$		
0.22 mM K_2HPO_4		
0.2 mM $CaCl_2$ • $2H_2O$		
0.18 mM Na_2CO_3		
Microelements (1 ml/L)	H_3Bo_3	2.86 g/L
	$MnCl_2$ • $4H_2O$	1.81 g/L
	$ZnSO_4$ • $7H_2O$	0.222 g/L
	$CuSO_4$ • $5H_2O$	0.079 g/L
	$COCl_2$ • $6H_2O$	0.050 g/L
	$NaMoO_4$ • $2H_2O$	0.391 g/L
Nitrogen sources	17 mM NH_4Cl	
Carbone sources	0.5% (w/v) Glucose	
Chlorate sources	200 mM $KClO_3$	

[0069]

[0071] **8. DNA 추출**

[0072] 14일 동안 생장시킨 형질전환된 클로렐라 불가리스 PKVL7422 균집을 BGPK 배지(표 6)를 함유하는 웰 플레이트로 옮겨 약 7일간 광 조건에서 배양하였다. 5×10^7 cell/㎖ 이상으로 성장한 1㎖의 형질전환 세포 배양액을 DNA 추

출에 사용하였다. 13,000rpm, 1분간 원심분리하여 얻은 펠렛을 Accuprep® Genomic DNA Extraction Kit에서 변형된 용해 방법을 사용하였고, 변형된 용해방법은 180㎕의 용해버퍼, 20㎕의 proteinase K 및 10㎕의 RNase A를 넣고 60℃에서 1시간 반응시켰다. 이후 과정은 제조사의 매뉴얼에 따라 실시되었다.

표 6

BGPK 배지 성분표

0.002 mM $Na_2MGEDTA$		
0.02 mM Ferric ammonium citrate		
0.03 mM Citric acid • $1H_2O$		
0.03 mM $MgSO_4$ • $7H_2O$		
0.2 mM $CaCl_2$ • $2H_2O$		
0.18 mM Na_2CO_3		
Microelements (1 ml/L)	H_3Bo_3	2.86 g/L
	$MnCl_2$ • $4H_2O$	1.81 g/L
	$ZnSO_4$ • $7H_2O$	0.222 g/L
	$CuSO_4$ • $5H_2O$	0.079 g/L
	$COCl_2$ • $6H_2O$	0.050 g/L
	$NaMoO_4$ • $2H_2O$	0.391 g/L
Nitrogen sources	17 mM $(NH_4)_2HPO_4$	
Carbone sources	0.5% (w/v) Glucose	
Chlorate sources	200 mM $KClO_3$	

[0073]

[0075] **9. 유전자 삽입 확인을 위한 PCR**

[0076] 삽입 유전자 확인을 위해 클로렐라 불가리스 PKVL7422의 유전체 DNA를 PCR로 확인하였다. PCR은 GF2, GR2 프라이머(표 7)가 사용되었다.

표 7

[0077] 유전자 삽입 확인을 위한 프라이머 정보

표적	프라이머 명	염기서열	예상 크기
HSP70 promoter to VHSV G gene	GF2	5'-GAGCATCGACCTCTACAGCC-3' (서열번호 8)	506 bp
	GR2	5'-GCGGAGTTGTAGTTGATGGAG-3' (서열번호 9)	

[0078] PCR은 rTaq Plus 5x PCR Master Mix (ELPIS BIO, Korea)를 사용하여 다음의 조건으로 수행되었다: 95℃에서 7분간 전변성; 95℃에서 10초간 DNA 변성, 60℃에서 10초간 프라이머 결합, 72℃에서 10초간 신장 과정을 총 35회 반복. PCR 산물을 1% 아가로스 겔에서 분석하였다. 확인된 형질전환 클로렐라 불가리스 PKVL7422를 20㎖의 BGPK 배지를 함유하는 플라스크로 옮기고 7일 동안 배양하였다.

[0080] **10. 형질전환체의 열 충격 조건 탐색**

[0081] PCR에 의해 확인되고 BGPK 배지에서 3~6×10^7 cell/㎖로 성장한 형질전환체는, 야생형에 대한 열 충격 시험 결과와 real-time PCR 결과에 기초하여 열 충격 시험이 수행되었다. 열 충격 처리는 44℃에서 각각 30분간 수행되

었고 이후 20℃에서 0시간, 4시간, 12시간, 16시간 배양되었다. 열 충격 후 배양된 형질전환체로부터 단백질을 추출하여 웨스턴 블롯을 실시하였다.

[0083] **11. HSP70 전사체의 열 충격 유도 발현 확인**

[0084] 5×10^7 cell/mℓ 이상으로 성장한 1.5mℓ의 야생형 클로렐라 불가리스 PKVL7422를 테스트 튜브에 옮겨서 히팅 블록에 넣어 열 충격을 주었다. 열 충격 조건은 44℃, 42℃에서 각각 30분, 60분간 열충격이 가해졌다. 열 충격이 가해진 클로렐라 불가리스 PKVL7422를 20℃, 광조건에서 0시간, 2시간, 4시간 동안 배양하였다. 20℃에서 각각의 시간동안 배양된 클로렐라 불가리스 PKVL7422는 13,000rpm에서 1분 동안 원심분리하여 수득하였고, 총 RNA는 TRIzol® (Thermo Fisher Scientific, USA)을 사용하여 제조사 매뉴얼에 따라 추출하였다. 추출된 총 RNA는 Reverse Transcription Premix (EBT-1514, 엘피스바이오텍)를 사용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 역전사하여 cDNA를 확보하였다. 앞의 과정에서 확인된 cDNA 서열을 기준으로 프라이머를 제작하고, 18s rRNA서열을 참조 유전자로 하여 real-time PCR을 실시하였다.

표 8

[0085] real-time PCR을 위한 프라이머 정보

표적	프라이머 명	염기서열 (5'→3')	예상 크기
cDNA of 18S rRNA for *C. vulgaris* PKVL7422	CV-18S-RT F	ACTTTTGATGGTAGGATAGAGGC (서열번호 10)	138 bp
	CV-18S-RT R	GTCAGGATTGGGTAATTTGCG (서열번호 11)	
cDNA of HSP70 for *C. vulgaris* PKVL7422	HSP70-RT F	TGGTGCTGGTGAAGATGAAAG (서열번호 12)	100 bp
	HSP70-RT R	CGCTGCGAGTCGTTGAAATA (서열번호 13)	

[0087] **12. 단백질 추출**

[0088] 형질전환된 미세조류를 13,000rpm에서 1분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거한 다음 cOmplete Tablets EDTA-free, EASY pack, protease inhibitor cocktail tablets (Roche, Switzerland)와 혼합된 1mℓ의 RIPA buffer (BIOBASIC, Canada)에 재현탁하여 얼음 위에서 1시간 반응시켰다. 초음파분쇄기 (JY92-IIN, KBTBIO, Korea)를 사용하여 200W에서 5분간 2초 작동, 2초 정지의 주기로 세포를 파쇄하였다.

[0090] **13. 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동(SDS-PAGE) 및 웨스턴 블롯**

[0091] 추출된 단백질의 1/4 양의 5X sample buffer (ELPIS BIO, Korea)를 넣고 10분간 끓인 후 1분간 얼음 위에 방치한 다음 13,000rpm에서 1분간 원심분리하여 세포 찌꺼기를 가라앉힌다. 상층액을 SDS-PAGE의 10% 폴리아크릴아마이드 겔에 로딩하고 전기영동한 뒤, PVDF 막으로 옮겼다. 단백질이 전달된 막을 5%의 탈지유를 포함한 PBST 용액으로 처리하고, 발현된 유전자인 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스 (Viral hemorrhagic septicemia virus, VHSV)의 당 단백질에 대해 1차 항체를 반응시키고, 2차 항체를 반응하였다. PVDF 막은 WESTSAVE STARTM (YOUNG IN FRONTIER, Korea)를 사용하여 1분간 반응시킨 후 iBrightTM CL1000 (ThermoFisher, USA)를 사용하여 확인하였다.

[0093] **실시예 1. *HSP70* 유전자의 정렬**

[0094] 클로렐라 불가리스 *HSP70* 유전자와 참조 유전자인 클로렐라 불가리스 UTEX395를 정렬시켰고, 확인된 참조 유전자는 Scaffold_86 (LDKB1000077.1)이었다. 총 13개의 단편이 시작 위치로부터 배열되었고, HSP70 유전자의 첫 번째 염기서열부터 마지막 염기서열까지의 서열번호는 참조 유전자의 49,938 ~ 54,193 번째 염기서열로, 총 4,256bp의 염기서열이 확인되었다. 13개의 일치하는 유전자 단편의 위치를 엑손으로 표시하였다(도 3). 인트론을 제외하고 클로렐라 불가리스 PKVL7422의 *HSP70* 유전자와 재배열시켜 유사도를 확인한 결과, 총 1,929개의 서열 중 1,873개의 서열이 일치하였으며, 유사성은 97.1%로 확인되었다.

[0096] **실시예 2. 클로렐라 불가리스 PKVL7422의 HSP70 프로모터 분석**

[0097] PlantCARE를 사용하여 분석한 결과 클로렐라 불가리스 PKVL7422의 HSP70 프로모터는 11가지 유형의 전사 인자와 결합 가능성이 있음을 확인하였다(도 4). 전사 인자 결합 부위는 200~500bp 사이에 밀집되어 있었다. HSP70 프로모터는 TATA box가 없는 프로모터였으며, PlantCARE에 의한 전사 개시 부위는 확인되지 않았다. 전사 개시 부위는 softberry의 PlantProm 데이터를 사용하여 분석하였고 전사는 529번째 염기서열에서 시작될 것으로 예측되

었다.

[0099] **실시예 3. 형질전환체의 선별**

[0100] 형질전환체는 200mM의 ClO_3가 포함된 BGNK 배지에서 선별되었다. 그 결과, 도 5에 개시된 것과 같이 야생형 클로렐라 불가리스를 도말한 배지에서는 군집이 확인되지 않았으며(도 5A), CVnr(1kb)-HSP70-vGopti 벡터 또는 CVnr(1kb)-HSP70-vGopti PCR product에 의해 형질전환된 형질전환 클로렐라 불가리스를 도말한 결과에서는 형질전환된 집락이 확인되었다(도 5B 및 도 5C). 상기 선별된 형질전환체로부터 DNA를 추출하여 삽입 유전자에 대한 확인을 표 7에 개시된 프라이머 세트를 사용하여 PCR 방법으로 검증한 결과 5개의 형질전환체에서 삽입 유전자에 대한 예상된 크기의 밴드가 확인되었다(도 6).

[0102] **실시예 4. 야생형 클로렐라 불가리스 PKVL7422를 이용한 열 충격 조건 분석**

[0103] 도 7 및 도 8은 서로 다른 온도 및 시간으로 열 충격을 처리한 야생형 클로렐라 불가리스 PKVL7422의 살아있는 세포와 죽은 세포의 크기 및 밀도의 변화를 나타낸다. 그래프의 왼쪽 집락을 살아있는 세포, 오른쪽의 집락을 죽은 세포로 구분하였다. 야생형의 클로렐라 불가리스 PKVL7422의 살아있는 세포와 죽은 세포의 비율에서 비교적 작은 변화를 갖는 온도 및 시간 범위는 각각 42℃ 및 44℃에서 20분, 40분 및 60분의 조건이었다. 46℃ 이상의 온도에서는 살아있는 세포의 밀도가 감소하거나, 죽은 세포 집락의 특정 부분의 히스토그램 크기가 증가하였다. 온도 또는 시간이 증가하고 길이가 길어짐에 따라 히스토그램이 오른쪽의 죽은 세포로 점진적인 이동이 있었으며 이는 세포의 생존 임계 값 온도에 도달했음을 나타내었다.

[0105] **실시예 5. 열 충격에 의한 *HSP70* 전사체 발현 수준 분석**

[0106] 야생형 클로렐라 불가리스 PKVL7422에 대한 열 충격 결과, *HSP70* 전사체는 44℃에서 30분의 열충격을 가하고, 20℃에서 4시간 배양하였을 때 가장 높게 나타난 것을 확인하였다(도 9). 따라서, 해당 조건에서 열 충격에 의한 열 충격 인자 들이 가장 활발하게 활성화 되고, 이러한 인자들이 *HSP70* 프로모터에 붙어서 전사량을 증가시키는 것으로 예측되었다.

[0108] **실시예 6. 열 충격에 의한 단백질 발현 수준 분석**

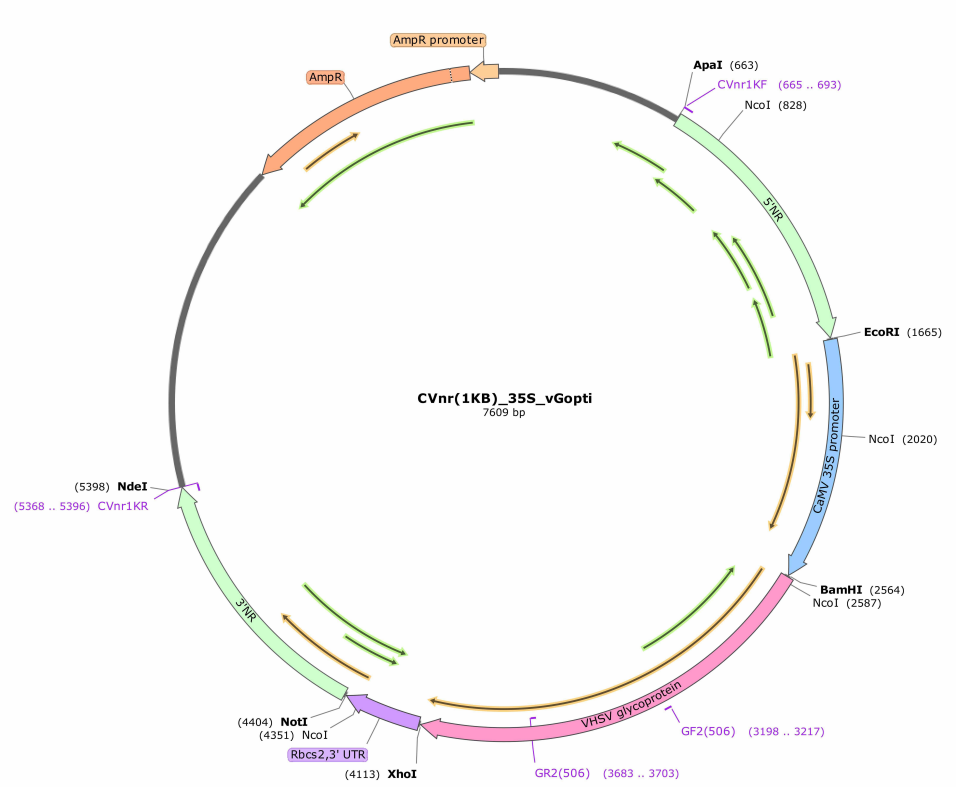
[0109] 클로렐라 불가리스 PKVL7422 유래 HSP70 프로모터 하류에 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스 (Viral hemorrhagic septicemia virus, VHSV)의 당 단백질 코딩 서열을 작동가능하게 연결시켜 제조한 미세조류 형질전환용 벡터의 PCR 산물로 형질전환된 클로렐라 불가리스 형질전환체(도 6의 P2)에서 열 충격에 따른 삽입 외래 단백질의 발현 확인을 웨스턴 블랏을 통해 분석하였다. 외래 단백질의 발현 유도에 사용된 열 충격 조건은 *HSP70*의 전사체 양이 많이 증가한 조건을 사용하였다. 44℃, 30분 열 충격을 가한 후 20℃에서 4시간 이상 배양한 형질전환체에서 단백질의 발현량 증가가 확인되었다(도 10). 상기 결과를 통해, 본 발명의 클로렐라 불가리스의 HSP70 유래 프로모터가 열 충격 조건에 의해 하류에 연결된 단백질의 발현을 유도할 수 있음을 확인할 수 있었다.

도면

도면1

```
5′    AAAAAAGAATTCGCCTGTCGCTGTTCTGCACGGCCACGGCGCTGGCGCTGACGGCGTACAACG
TGCTGGGCAGTGCCATGAGCCTGCTGGGCGGGCTCGCCTCCATATCCTGCAGCCTGCTGCTGCCGACG
GCATTTTACGCCCGCTTGGCATGGCACGGTCTGCGGCCGCTCGCCCGGACCGGCCTGGTTGCGCTGCT
GGCCCTGGGCGCTGTGCTTGTATGCCTTGTCACAGCCACTAATCTGCGCGACCTGTCGGCTCGCTGTC
GTGCTTAAATCATGTCACAAATGTGTTCAAATGTGCCTGTAACCGATCGAGCTGCTGTGCTGCGGCGG
CGGGAGAGGCGGCGGCGGGAGGCGGCGGCGACGGGAGTGGCGGCATCCTGGCCATCATCGCCGCCTGC
CGCCCCCTGTTCATTTGGAAGCCAGCATAAAAAAAAGGGTTCACGAAAAGAGGGTTCACGACGGTCCG
CCAGTTTTCTGGGATTCTCCTTTTGGTGCATTTAGTGTGGTTTCTCGCGCACTCGTCCCTCATTTTTC
TTGATTTCTCACTACTCGCACACGCCCCCGCGCACTCTCAGACGCCAAAGAACACGAGTTCTGCTTAA
ACGCCTGCCTGCCAGTGAAAAAGTCGTCCACGGACCGGATCCTTTTTTT 3′
```

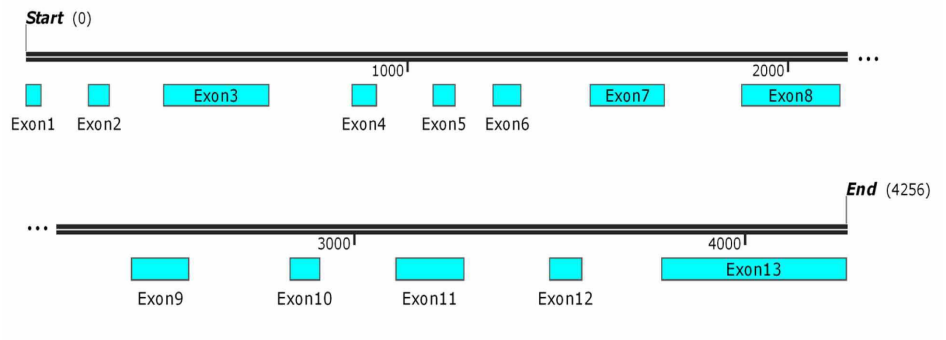
도면2a



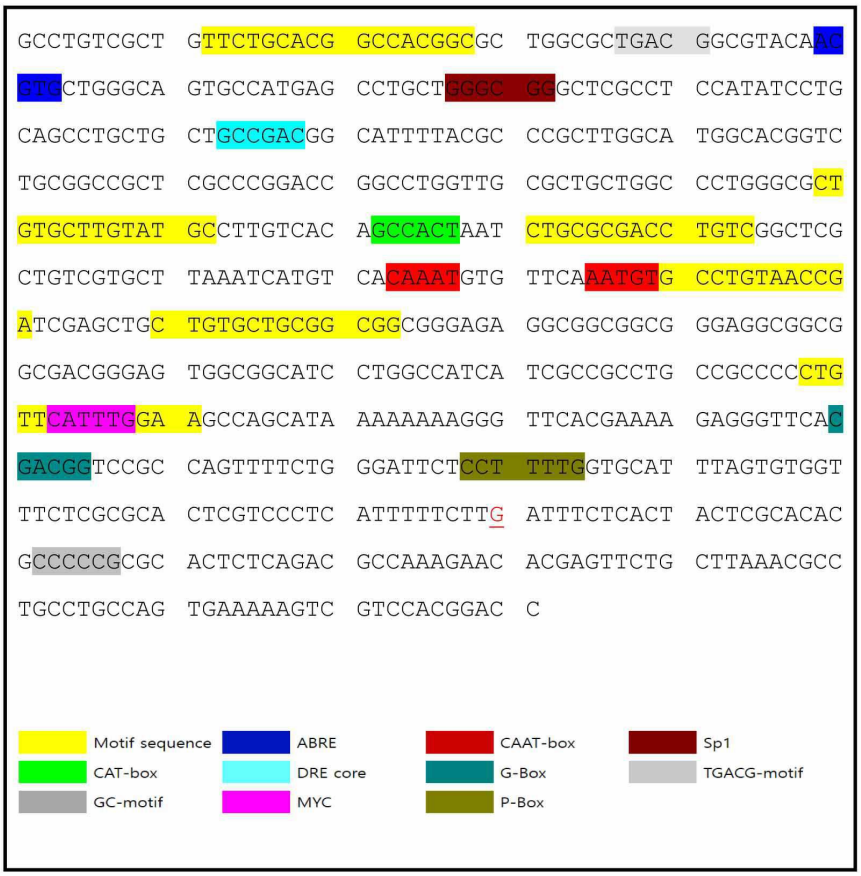
도면2b


AmpR promoter
AmpR
ApaI (663)
CVnr1KF (665 .. 693)
NcoI (828)
5' Out of NR
EcoRI (1665)
NotI (1823)
HeatF(423) (1915 .. 1934)
Heat shock 70 prmoter
Kozak sequence
BamHI (2302)
Heat_BamH I R (2276 .. 2307)
NcoI (2325)
VHSV glycoprotein
GR(+605) (2845 .. 2864)
GF2(506) (2936 .. 2955)
GR2(506) (3421 .. 3441)
XhoI (3851)
Rbcs2,3' UTR
NotI (4142)
NcoI (4089)
3' NR
NdeI (5136)
CVnr1KR (5106 .. 5134)
CVnr(1KB)_HSP70_vGopti
7347 bp

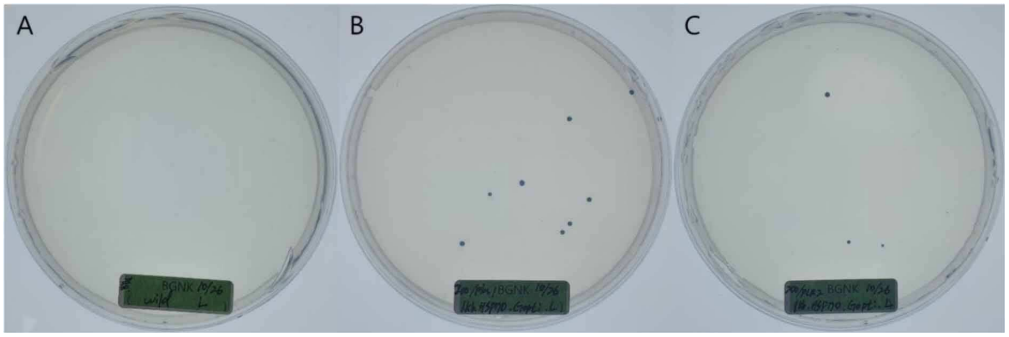
도면3


Start (0)
1000
2000
Exon1
Exon2
Exon3
Exon4
Exon5
Exon6
Exon7
Exon8
End (4256)
3000
4000
Exon9
Exon10
Exon11
Exon12
Exon13

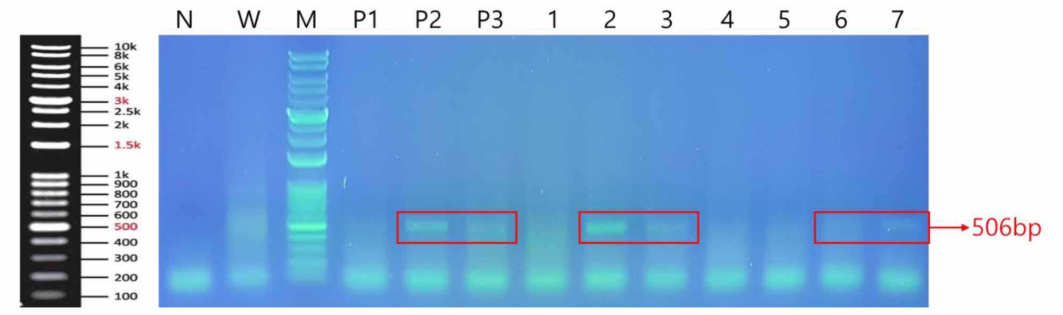
도면4


GCCTGTCGCT GTTCTGCACG GCCACGGCGC TGGCGCTGAC GGCGTACAAC
GTGCTGGGCA GTGCCATGAG CCTGCTGGGC GGGCTCGCCT CCATATCCTG
CAGCCTGCTG CTGCCGACGG CATTTTACGC CCGCTTGGCA TGGCACGGTC
TGCGGCCGCT CGCCCGGACC GGCCTGGTTG CGCTGCTGGC CCTGGGCGCT
GTGCTTGTAT GCCTTGTCAC AGCCACTAAT CTGCGCGACC TGTCGGCTCG
CTGTCGTGCT TAAATCATGT CACAAATGTG TTCAAATGTG CCTGTAACCG
ATCGAGCTGC TGTGCTGCGG CGGCGGGAGA GGCGGCGGCG GGAGGCGGCG
GCGACGGGAG TGGCGGCATC CTGGCCATCA TCGCCGCCTG CCGCCCCCTG
TTCATTTGGA AGCCAGCATA AAAAAAAGGG TTCACGAAAA GAGGGTTCAC
GACGGTCCGC CAGTTTTCTG GGATTCTCCT TTTGGTGCAT TTAGTGTGGT
TTCTCGCGCA CTCGTCCCTC ATTTTTCTTG ATTTCTCACT ACTCGCACAC
GCCCCCGCGC ACTCTCAGAC GCCAAAGAAC ACGAGTTCTG CTTAAACGCC
TGCCTGCCAG TGAAAAAGTC GTCCACGGAC C
Motif sequence
ABRE
CAAT-box
Sp1
CAT-box
DRE core
G-Box
TGACG-motif
GC-motif
MYC
P-Box

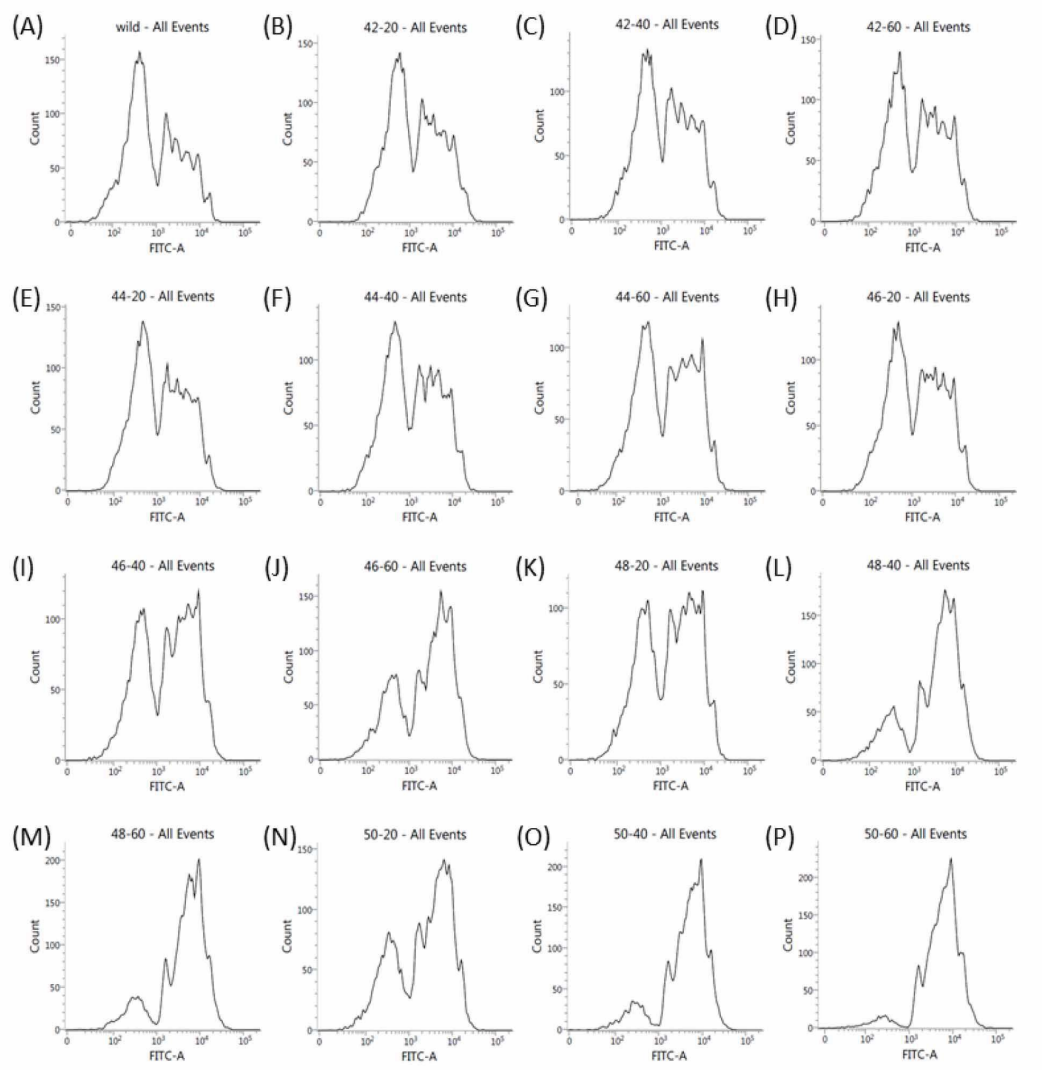
도면5


A
B
C

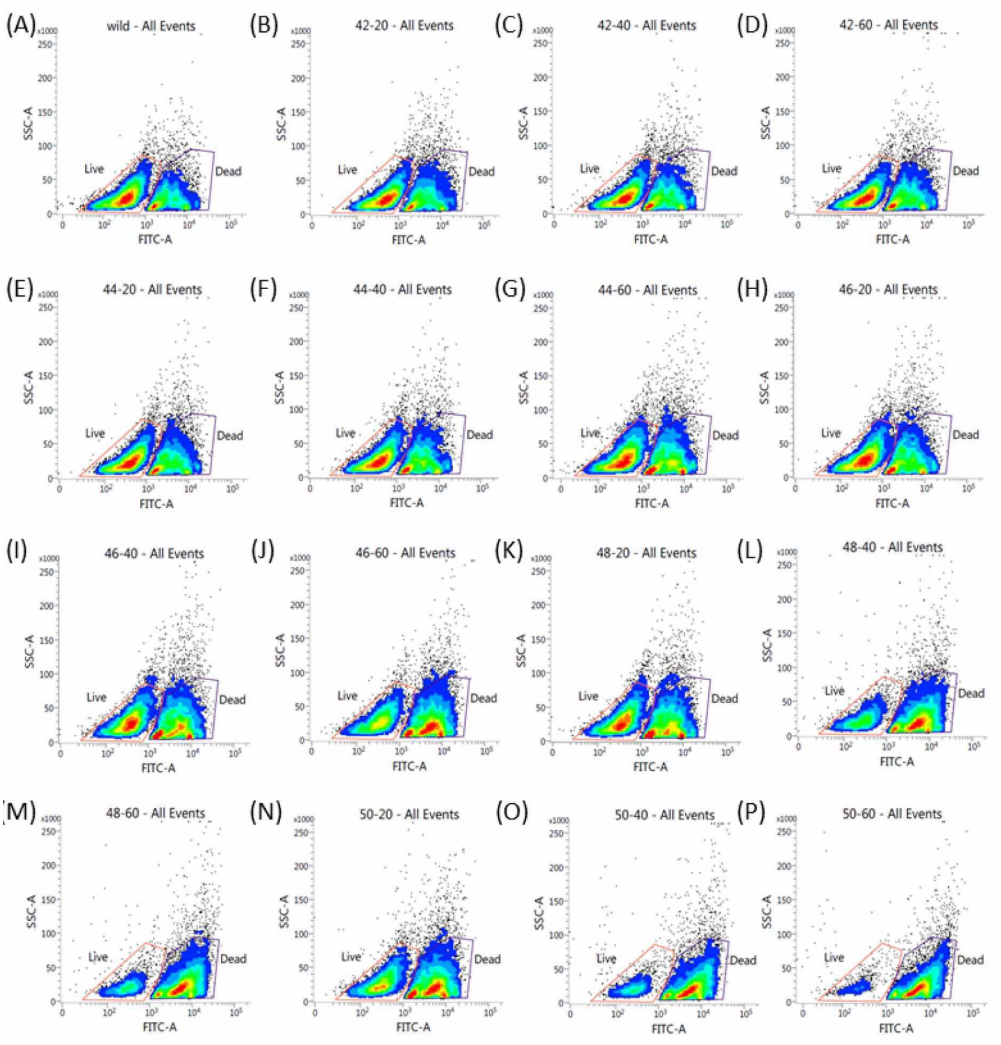
도면6


N
W
M
P1
P2
P3
1
2
3
4
5
6
7
10k
8k
6k
5k
4k
3k
2.5k
2k
1.5k
1k
900
800
700
600
500
400
300
200
100
506bp

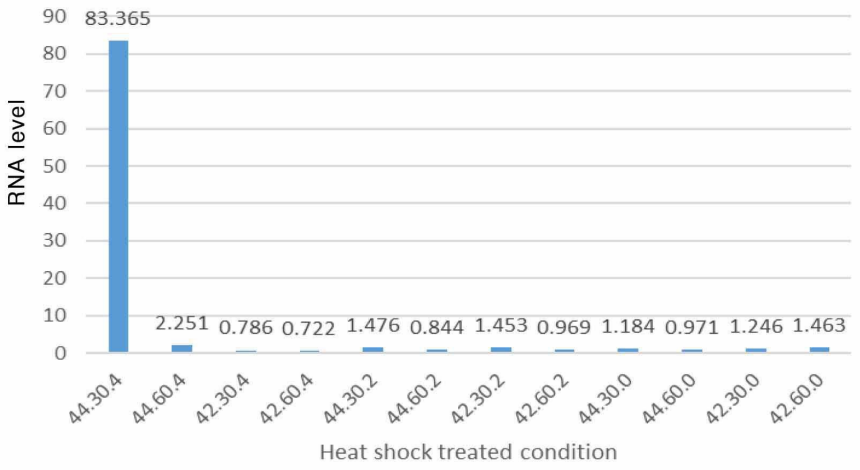
도면7


(A)
wild - All Events
(B)
42-20 - All Events
(C)
42-40 - All Events
(D)
42-60 - All Events
(E)
44-20 - All Events
(F)
44-40 - All Events
(G)
44-60 - All Events
(H)
46-20 - All Events
(I)
46-40 - All Events
(J)
46-60 - All Events
(K)
48-20 - All Events
(L)
48-40 - All Events
(M)
48-60 - All Events
(N)
50-20 - All Events
(O)
50-40 - All Events
(P)
50-60 - All Events
Count
FITC-A

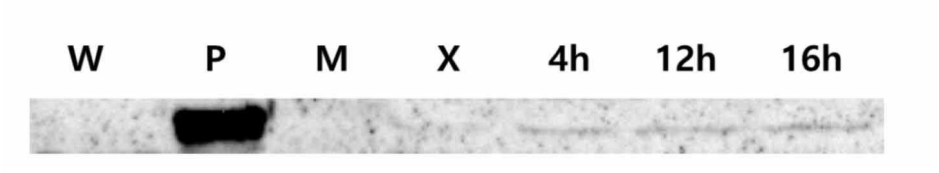
도면8


(A) wild - All Events
(B) 42-20 - All Events
(C) 42-40 - All Events
(D) 42-60 - All Events
(E) 44-20 - All Events
(F) 44-40 - All Events
(G) 44-60 - All Events
(H) 46-20 - All Events
(I) 46-40 - All Events
(J) 46-60 - All Events
(K) 48-20 - All Events
(L) 48-40 - All Events
(M) 48-60 - All Events
(N) 50-20 - All Events
(O) 50-40 - All Events
(P) 50-60 - All Events
SSC-A
FITC-A
Live
Dead

도면9


RNA level
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
83.365
2.251
0.786
0.722
1.476
0.844
1.453
0.969
1.184
0.971
1.246
1.463
44.30.4
44.60.4
42.30.4
42.60.4
44.30.2
44.60.2
42.30.2
42.60.2
44.30.0
44.60.0
42.30.0
42.60.0
Heat shock treated condition

도면10



서 열 목 록

<110> Pukyong National University Industry-University Cooperation Foundation

<120> Heat inducible promoter from Chlorella vulgaris HSP70 and uses thereof

<130> PN19414

<160> 13

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 631

<212> DNA

<213> Chlorella vulgaris

<400> 1

gcctgtcgct gttctgcacg gccacggcgc tggcgctgac ggcgtacaac gtgctgggca 60

gtgccatgag cctgctgggc gggctcgcct ccatatcctg cagcctgctg ctgccgacgg 120

cattttacgc ccgcttggca tggcacggtc tgcggccgct cgcccggacc ggcctggttg 180

cgctgctggc cctgggcgct gtgcttgtat gccttgtcac agccactaat ctgcgcgacc 240

tgtcggctcg ctgtcgtgct taaatcatgt cacaaatgtg ttcaaatgtg cctgtaaccg 300

atcgagctgc tgtgctgcgg cggcgggaga ggcggcggcg ggaggcggcg gcgacgggag 360

tggcggcatc ctggccatca tcgccgcctg ccgccccctg ttcatttgga agccagcata 420

aaaaaaaggg ttcacgaaaa gagggttcac gacggtccgc cagttttctg ggattctcct 480

tttggtgcat ttagtgtggt ttctcgcgca ctcgtccctc atttttcttg atttctcact 540

actcgcacac gcccccgcgc actctcagac gccaaagaac acgagttctg cttaaacgcc 600

tgcctgccag tgaaaaagtc gtccacggac c 631

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2

gcctgtcgct gttctgcac 19

<210> 3

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

taggagggcg tggtgcggtt tccctg 26

<210> 4

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

aaaaaagaat tcgcctgtcg ctgttctgca cgg 33

<210> 5

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 5

aaaaaaagga tccggtccgt ggacgacttt ttcactggc 39

<210> 6

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 6

aacaagatgt cgtaggttca aatcctat 28

<210> 7

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 7

aacaagatgt cgtaggttca aatcctat 28

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 8

gagcatcgac ctctacagcc 20

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 9

gcggagttgt agttgatgga g 21

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 10

acttttgatg gtaggataga ggc 23

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 11

gtcaggattg ggtaatttgc g 21

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 12

tggtgctggt gaagatgaaa g 21

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 13

cgctgcgagt cgttgaaata 20