

(43) 공개일자 2023년09월26일

- (71) 출원인

세종대학교산학협력단

서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)

- (72) 발명자

채영기

서울특별시 강남구 삼성로111길 8, 206동 1303호
(삼성동, 삼성동힐스테이트2단지아파트)

- (74) 대리인

- 특허법인리채

심사청구일자 2022년03월18일

전체 청구항 수 : 총 9 항

- (54) 발명의 명칭 독성 단백질 생산용 재조합 플라스미드

(57) 요약

본 발명은 생물체에 대해 독성을 지니는 단백질을 코딩하는 유전자 및 이에 연결된 ELP를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드에 관한 것이다. 상기 재조합 플라스미드를 이용하면, ELP와의 융합으로 인해 단백질의 독성이 완화된 융합 단백질을 생물체 내에서 생산 가능하다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 15/66 (2022.05)

C12N 9/10 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711136595
과제번호	2021R1F1A1046500
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	NMR 기반 단백질-단백질 및 단백질-저해제 탐색법 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	세종대학교
연구기간	2021.06.01 ~ 2022.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

생물체에 대해 독성을 지니는 단백질을 코딩하는 유전자 및 이에 연결된 ELP(Elastin-like polypeptides)를 코딩하는 유전자를 포함하는, 재조합 플라스미드.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 생물체는 미생물인, 재조합 플라스미드.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 ELP는 전이온도가 상기 생물체의 배양온도보다 낮은, 재조합 플라스미드.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 ELP는 아미노산 Val-Pro-Gly-Ile-Gly의 반복단위를 40 내지 50회 포함하는, 재조합 플라스미드.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 서열번호 1의 서열을 포함하는 재조합 플라스미드.

청구항 6

청구항 1 내지 5 중 어느 한 항의 재조합 플라스미드를 포함하는, 생물체 내에서 독성 단백질의 생산용 조성물.

청구항 7

청구항 1 내지 5 중 어느 한 항의 재조합 플라스미드로 형질전환된 비인간 생물체.

청구항 8

청구항 1 내지 5 중 어느 한 항의 재조합 플라스미드로 형질전환된 비인간 생물체를 배양하여 생물체에 대해 독성을 지니는 단백질과 ELP의 융합 단백질을 얻는 단계를 포함하는, 생물체 내에서 독성 단백질을 생산하는 방법.

청구항 9

청구항 8에 있어서,

생물체에 대해 독성을 지니는 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 플라스미드에서 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 정지코돈을 포함하는 말단을 제1 및 제2 제한효소로 절단하는 단계; 및

상기 제1 및 제2 제한효소로 절단된 ELP를 코딩하는 유전자를 포함하는 유전자 조각을 상기 절단된 위치에 삽입하여 재조합 플라스미드를 얻는 단계를 더 포함하는, 생물체 내에서 독성 단백질을 생산하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 생물체에 대해 독성을 지니는 생물체 내에서 생산이 어려웠던 단백질의 독성을 완화하여 생물체 내에서 생산 가능하게 하는 재조합 플라스미드를 제공하는 것으로, 단백질 생산이 사용되는 분야에서 범용적으로 사용될 수 있고, 예를 들면 신약 개발 분야에서 사용될 수 있다.

배경 기술

[0002] 생물체를 재조합 단백질 생산 호스트로 사용할 때, 생산된 단백질이 생물체에 독성이 있을 경우, 생물체가 사멸하거나, 성장을 멈추거나, 단백질 생산이 저해되거나, 구조가 붕괴된 단백질이 생산될 수 있다. 이 문제를 해결하기 위해 현재까지 (1) 생물체가 어느 정도 성장할 때 까지는 생산을 강력하게 억제하거나, (2) 생산된 단백질을 세포 밖으로 분비하거나, (3) 해독 작용을 하는 또 다른 단백질을 같이 생산하는 방법이 사용되어 오고 있으나 보다 효율적인 생산 방법의 개발이 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0003] 본 발명은 생물체에 대해 독성을 지니는 단백질을 생물체 내에서 효율적으로 생산 가능하게 하는 새로운 재조합 플라스미드 및 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0004] 1. 생물체에 대해 독성을 지니는 단백질을 코딩하는 유전자 및 이에 연결된 ELP(Elastin-like polypeptides)를 코딩하는 유전자를 포함하는, 재조합 플라스미드.
- [0005] 2. 위 1에 있어서, 상기 생물체는 미생물인, 재조합 플라스미드.
- [0006] 3. 위 1에 있어서, 상기 ELP는 전이온도가 상기 생물체의 배양온도보다 낮은, 재조합 플라스미드.
- [0007] 4. 위 1에 있어서, 상기 ELP는 아미노산 Val-Pro-Gly-Ile-Gly의 반복단위를 40 내지 50회 포함하는, 재조합 플라스미드.
- [0008] 5. 위 1에 있어서, 서열번호 1의 서열을 포함하는 재조합 플라스미드.
- [0009] 6. 위 1 내지 5 중 어느 한 항의 재조합 플라스미드를 포함하는, 생물체 내에서 독성 단백질의 생산용 조성물.
- [0010] 7. 위 1 내지 5 중 어느 한 항의 재조합 플라스미드로 형질전환된 비인간 생물체.
- [0011] 8. 위 1 내지 5 중 어느 한 항의 재조합 플라스미드로 형질전환된 비인간 생물체를 배양하여 생물체에 대해 독성을 지니는 단백질과 ELP의 융합 단백질을 얻는 단계를 포함하는, 생물체 내에서 독성 단백질을 생산하는 방법.

발명의 효과

[0013] 본 발명의 재조합 플라스미드를 이용하여 생물체에 대해 독성을 지니는 단백질을 생물체 내에서 생산 가능하게 할 수 있다.

[0014] 본 발명의 재조합 플라스미드를 이용하면 단백질의 구조나 기능에 영향이 없이 단백질의 활성을 보존하면서 생물체에서 독성 단백질을 생산할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0015] 도 1은 본원 실시예에서 사용된 pVP65KR-SacB-I48 플라스미드를 도식화하여 나타낸 것이다.
- 도 2는 I48 ELP (plasmid #68937)에 제한효소 PmeI자리를 추가한 것을 도식화하여 나타낸 것이다.
- 도 3은 본원 실시예에서 사용된 pVP65KR-SacB 플라스미드를 도식화하여 나타낸 것이다.
- 도 4는 pVP65KR-SacB에 I48 조각을 삽입한 것을 도식화하여 나타낸 것이다.
- 도 5는 배양온도에 따라 각 독성 단백질 또는 융합 단백질을 생산하는 대장균의 생존을 비교하기 위해 플레이트를 촬영한 사진이다. 붉은색 데두리는 콜로니가 형성된 플레이트를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 본 발명은 생물체에 대해 독성을 지니는 단백질을 코딩하는 유전자 및 이에 연결된 ELP(Elastin-like polypeptides)를 코딩하는 유전자를 포함하는, 재조합 플라스미드에 관한 것이다.
- [0018] 상기 재조합 플라스미드가 도입된 형질전환체를 이용하면, ELP와 생물체에 대해 독성을 지니는 단백질(이하 '독성 단백질')의 융합 단백질(fusion protein)을 생산할 수 있으며, 상기 융합 단백질은 생물체에 대한 상기 단백질의 독성을 완하시킴으로써 생물체 내에서도 독성 단백질의 생산이 가능하게 한다.
- [0019] 상기 생물체는 단백질 생산을 위한 호스트로 사용될 수 있는 생물체이면 특별히 제한되지 아니하며, 동물, 식물, 곤충, 미생물 등을 포함하고, 상기 미생물은 세균, 효모 등을 포함하며, 예를 들면 단백질 생산에 주로 사용되는 미생물, 즉 대장균(E.coli), 슈도모나스(Pseudomonas), 시아노박테리아(cyanobacteria) 및 바실러스(Bacillus) 등일 수 있다.
- [0020] 상기 생물체에 대한 독성은 생물체에 질병 또는 병적인 증상을 유발하거나, 생육, 생식을 저해하거나, 사멸에 이르게 하는 등의 모든 독성을 의미한다.
- [0021] 상기와 같은 독성을 지니는 단백질은 예를 들면 EcoRI methylase, EcoRI endonuclease, galactokinase, colicin E3, transcription factor GATA-1, lysis protein of Φ X174, barnase, Bacillus subtilis의 SacB protein, E. coli의 RpsL protein, F-factor의 CcdB protein 등 일 수 있다.
- [0022] 상기 재조합 플라스미드는 적당한 숙주 내에서 목적 유전자가 발현할 수 있도록 프로모터 등의 필수적인 조절 요소를 포함하도록 재조합된 유전자 작제물을 의미하는 것으로서, 숙주 세포 또는 미생물의 게놈 내로 통합되어 있는 형태일 수도 있다.
- [0023] 상기 프로모터는 폴리머라제에 대한 결합 부위를 포함하고 프로모터 하위 유전자의 mRNA로의 전사 개시 활성을 가지는, 암호화 영역의 상위(upstream)의 비해독된 핵산 서열을 말한다.
- [0024] 또한, 상기 플라스미드는 복제가능한 발현 플라스미드인 경우, 복제가 개시되는 특정 핵산 서열인 복제원점(replication origin)을 포함할 수 있다.
- [0025] 또한, 상기 플라스미드는 선택마커(selection marker)를 포함할 수 있다. 선택마커는 플라스미드로 형질전환된 세포 또는 미생물을 선별하기 위한 것으로, 약물 내성, 영양 요구성, 세포 독성제에 대한 내성 또는 표면 단백질의 발현과 같은 선택가능 표현형을 부여하는 마커들이 사용될 수 있다. 선택제(selective agent)가 처리된 환경에서 선별 마커를 발현하는 세포 또는 미생물만 생존하므로 형질전환된 개체를 선별 가능하다.
- [0026] 상기 플라스미드는 독성 단백질을 코딩하는 유전자가 상기 프로모터와 작동가능하도록 연결된(operatively linked) 것일 수 있고, 구체적으로는 상기 프로모터의 하위 영역에 연결된 것일 수 있다.
- [0027] 상기 ELP를 코딩하는 유전자는 상기 독성 단백질을 코딩하는 유전자의 N말단 또는 C말단에 연결될 수 있다.
- [0028] 상기 ELP를 코딩하는 유전자와 상기 독성 단백질을 코딩하는 유전자 사이에는 ELP 융합에 의한 독성 완화 효과가 유지되는 범위에서 당업자에 의해 다른 유전자, 예를 들면 프로테아제 절단 부위, intein, 링커 등을 코딩하는 유전자가 적절히 포함될 수 있다.
- [0029] 상기 프로테아제 절단 부위를 코딩하는 유전자가 포함되면, ELP가 제거된 독성 단백질을 최종 생산물로 필요로 하는 경우 생성된 융합 단백질에 상기 프로테아제를 처리함으로써 ELP를 제거할 수 있다. 상기 프로테아제는 예

를 들면 human Rhinovirus (HRV) 3C protease, thrombin, TEV(Tobacco etch virus) protease일 수 있다.

- [0030] 또는 상기 ELP를 코딩하는 유전자와 상기 독성 단백질을 코딩하는 유전자 사이에 intein을 코딩하는 유전자가 포함될 수 있다. 예를 들면 독성 단백질-intein-ELP 형태로 만들어진 융합단백질을 정제 후, DTT와 같은 환원제를 첨가하면 intein이 앞부분에 있는 독성단백질을 다른 프로테아제의 도움 없이 자체적으로 끊어낼 수 있다.
- [0031] 본 발명의 플라스미드는 기본 골격으로서 pVP, pQE, pET, pMAL, pGEX 및 pGEM으로 이루어진 군에서 선택된 하나의 벡터 골격을 사용할 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 아니하고, 본 발명의 프로모터 서열을 재조합 할 수 있는 벡터 골격이라면 당업계에 주지된 벡터 골격 어떠한 것이든 특별히 제한되지 아니한다.
- [0032] 상기 ELP는 포유류의 elastin에서 유래되어 유전자 재조합법으로 합성된 폴리펩타이드로, 펜타펩티드(Val-Pro-Gly-Xaa-Gly)_n의 반복으로 구성된다. 여기서 Xaa는 게스트 잔기(guest residue)를 의미하며, Pro를 제외한 모든 아미노산일 수 있다. 상기 n은 반복 횟수를 나타낸다.
- [0033] ELP는 당업자에게 공지된 기술에 따라 다양한 구조 및 길이로 합성될 수 있고, 예를 들면 용액 및 고체상 화학 합성법 또는 단백질 재조합 방법에 의해 합성될 수 있다.
- [0034] ELP는 온도민감성 성질을 가지며, LCST(lower critical solution temperature), 즉 전이온도에 해당하는 특정 온도에서 상전이를 겪는 특성이 있다.
- [0035] 전이온도 아래에서 ELP는 무작위 코일 형태에 가깝고 잘 용매화되어 수용액에 잘 용해되나, 용액이 가열되고 전이온도에 도달하면 ELP는 불용성이 되고 육안으로 볼 수 있는 큰 마이크론 크기의 응집체를 형성한다.
- [0036] 상기 전이는 완전히 가역적이어서 온도가 다시 ELP의 전이온도 아래로 낮아지면 응집된 폴리펩타이드가 완전히 용해된다.
- [0037] 상기 ELP와 독성 단백질의 융합 단백질에서 ELP가 응집체를 형성하는 것은 융합된 독성 단백질의 구조나 활성화에 영향을 미치지 않는다.
- [0038] 본 발명의 실시예에서는 사용된 ELP의 전이온도 이상일 때, 즉 ELP와 독성 단백질의 융합 단백질에서 ELP가 응집체를 형성할 때 독성 단백질의 독성이 완화됨으로써 다른 독성 제거를 위한 처리 없이도 숙주인 생물이 생존하고 생물체 내에서 상기 융합 단백질의 생산이 가능함을 확인하였다.
- [0039] 상기 ELP의 전이온도는 0~100℃에 이르기까지 광범위하게 변화시킬 수 있고, 응용분야에 맞게 다양하게 폴리펩타이드를 구성할 수 있다. ELP의 전이온도는 ELP 용액의 pH, 농도, 이온 강도, 폴리머 구조, 길이 등의 영향을 받을 수 있다.
- [0040] 상기 ELP는 전이온도가 상기 생물체, 즉 숙주의 배양온도보다 낮은 것일 수 있다.
- [0041] 상기 배양온도는 예를 들면 일반적인 세균의 배양온도인 25~40℃, 대장균의 경우 30~40℃일 수 있다. 상기 배양온도는 상기 미생물의 최적배양온도일 수 있고, 구체적으로 대장균의 경우 36~38℃일 수 있다.
- [0042] 상기 ELP의 전이온도가 상기 생물체의 배양온도보다 낮으면, 상기 미생물의 배양온도에서 상기 융합 단백질의 ELP가 응집되어, 생물체의 사멸 없이 단백질을 생산할 수 있다.
- [0043] 상기 전이온도가 상기 생물체의 최적배양온도보다 낮으면, 생명체의 생장이 원활한 온도 조건에서 융합 단백질의 생산이 가능하므로, 효율적으로 단백질을 생산할 수 있다.
- [0044] 상기 ELP는 아미노산 Val-Pro-Gly-Ile-Gly의 반복단위를 40 내지 50회 포함하는 것일 수 있으며, 구체적으로 48회일 수 있다. 이 때 상기 ELP의 전이온도는 대장균의 최적배양온도인 37℃ 이하이므로, 대장균에서 효율적으로 독성 단백질을 생산할 수 있다.
- [0045] 상기 재조합 플라스미드는 서열번호 1의 서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [0046] 상기 서열번호 1은 독성 단백질 SacB를 포함하는 플라스미드에 ELP I48이 삽입된 플라스미드의 서열이며, I48 조각은 제한효소 PmeI 및 SacI로 절단 후 삽입되었다. 상기 I48은 [Val-Pro-Gly-Ile-Gly]₄₈ 구조의 ELP를 의미한다.
- [0047] 상기 서열번호 1의 서열로 이루어진 재조합 플라스미드를 도 1에서 도식화하였으며(pVP65KR-SacB-I48), 본원 실시예에서는 pVP65KR-SacB-I48 플라스미드를 이용해 형질전환된 대장균에서 효과적으로 독성 단백질의 독성이 완

화됨을 확인하였다.

- [0049] 또한, 본 발명은 상기 재조합 플라스미드를 포함하는, 생물체 내에서 독성 단백질의 생산용 조성물에 관한 것이다.
- [0050] 상기 재조합 플라스미드에 및 이를 이용해 생물체 내에서 독성 단백질의 생산이 가능하게 하는 구체적인 내용은 상술한 바와 같다.
- [0051] 본 발명의 조성물은 목적 단백질을 우수한 효율로 생산하기 위한 보조물질을 추가적으로 포함할 수 있고, 구체적인 예를 들면, 염, 에탄올, 소르비톨 및 과산화수소수로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 약한 스트레스 처리 물질을 더 포함할 수 있으나, 반드시 이에 제한되지 않는다.
- [0053] 또한, 본 발명은 상기 재조합 플라스미드로 형질전환된 비인간 생물체에 관한 것이다.
- [0054] 상기 재조합 플라스미드에 및 이를 이용해 생물체 내에서 독성 단백질의 생산이 가능하게 하는 구체적인 내용은 상술한 바와 같다.
- [0055] 상기 형질전환된 비인간 생물체는 독성이 완화된 ELP와 독성 단백질의 융합 단백질을 생산할 수 있다.
- [0056] 상기 비인간 생물체는 단백질 생산을 위한 호스트로 사용될 수 있는 생물체이면 특별히 제한되지 아니하며, 인간을 제외한 동물, 식물, 곤충, 미생물 등을 포함하고, 상기 미생물은 세균, 효모 등을 포함하고, 예를 들면 단백질 생산에 주로 사용되는 미생물, 즉 대장균(*E.coli*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 시아노박테리아(*cyanobacteria*) 및 바실러스(*Bacillus*) 등일 수 있다.
- [0057] 상기 형질전환은 원래의 세포가 가지고 있던 것과 다른 종류의 유전자가 포함된 DNA 사슬 조각, 플라스미드 같은 벡터가 침투되어 원래 세포에 존재하던 DNA와 결합하여 유전형질을 변화시키는 것을 말한다. 상기 형질전환은, 재조합 플라스미드를 이용하여 생물체의 세포를 형질전환하고, 상기 형질전환된 생물체 세포로부터 형질 전환 생물체 세포를 재분화하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0058] 상기 형질전환은 당업계 통상적인 방법에 의해 실시될 수 있고, 예를 들면, 자연도입법, 열 충격법, 전기충격법 등을 통해 도입할 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.
- [0060] 또한, 본 발명은 상기 재조합 플라스미드로 형질전환된 비인간 생물체를 배양하여 생물체에 대해 독성을 지니는 단백질과 ELP의 융합 단백질을 얻는 단계를 포함하는, 생물체 내에서 독성 단백질을 생산하는 방법에 관한 것이다.
- [0061] 상기 재조합 플라스미드에 및 이를 이용해 비인간 생물체를 형질전환하여 생물체 내에서 독성 단백질의 생산이 가능하게 하는 구체적인 내용은 상술한 바와 같다.
- [0062] 상기 배양은 상기 생물체의 적절한 배양온도에서 이루어질 수 있고, 예를 들면 상기 생물체의 최적배양온도일 수 있다. 상기 재조합 플라스미드의 ELP의 전이온도는 상기 생물체의 배양온도보다 낮은 것일 수 있다.
- [0063] 상기 방법은 생물체에 대해 독성을 지니는 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 플라스미드에서 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 정지코돈을 포함하는 말단을 제1 및 제2 제한효소로 절단하는 단계; 및 상기 제1 및 제2 제한효소로 절단된 ELP를 코딩하는 유전자를 포함하는 유전자 조각을 상기 절단된 위치에 삽입하여 상기 재조합 플라스미드를 얻는 단계를 포함할 수 있다.
- [0064] 상기 ELP를 코딩하는 유전자는 당업자가 입수 가능한 제품을 사용하거나 필요한 경우 제작하여 사용할 수 있다.
- [0065] 상기 제1 및 제2 제한효소는 상기 생물체에 대해 독성을 지니는 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 플라스미드에 사용 가능한 제한효소면 특별히 제한되지 아니하며, 상기 플라스미드 내의 제한효소위치를 사용하거나 제한효소위치를 삽입하여 사용할 수 있다. 상기 제한효소는 예를 들면 AsiSI, PmeI, SacI 등일 수 있다.
- [0066] 상기 방법은 생산된 단백질을 분리 또는 정제하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0067] 상기 방법은 상기 융합 단백질에서 ELP를 제거하는 단계를 포함할 수 있다.

- [0068] 상기 제거에는 당업자에 의해 융합 단백질에서 ELP를 제거하기 위한 적절한 방법이 제한 없이 사용될 수 있다.
- [0069] 예를 들면, 상기 제거는 상기 ELP와 독성 단백질을 사이에 펩티드 절단 부위가 존재하는 경우 프로테아제를 처리하여 ELP를 잘라내는 것일 수 있다. 상기 프로테아제는 예를 들면 human Rhinovirus (HRV) 3C protease, thrombin, TEV(Tobacco etch virus) protease일 수 있다.
- [0070] 또는 상기 제거는 상기 융합 단백질이 독성 단백질-intein-ELP 형태인 경우, DTT와 같은 환원제를 처리하는 것일 수 있다. DTT와 같은 환원제의 처리시 intein이 앞부분에 있는 독성 단백질을 다른 프로테아제의 도움 없이 자체적으로 끊어낼 수 있다.

[0072] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.

[0074] 실험 방법

[0075] 1. 재조합 플라스미드 제작

- [0076] 1) Addgene에서 구입한 I48 ELP (plasmid #68937, 도 2 위)에 제한효소 PmeI 자리 (GTTTAAAC)를 site-directed mutagenesis로 5' 위치에 추가함 (I48 ELP+PmeI, 도 2 아래).
- [0077] 2) I48 ELP+PmeI을 PmeI과 SacI으로 절단하고 I48 조각을 분리함
- [0078] 3) 본원 발명자가 구축한 pVP65KR-SacB (도 3 위)를 PmeI과 SacI으로 절단하고 I48 조각을 끼워넣음. 완성된 플라스미드를 pVP65KR-SacB-I48로 명명함 (I48의 중간 부분은 생략하고 양쪽 말단만 나타냄. 5' 말단: 중간, 3' 말단: 아래).

[0080] 2. I48의 lethality에 대한 효과의 온도 의존성 실험

[0081] 2.1. 온도 의존성 실험 방법

- [0082] 1) XL1-Blue chemically competent cell에 각 플라스미드 100pg을 첨가하고 42도 heat shock을 통해 transformation을 수행함. 각 플라스미드에 의해 생산되는 단백질은 barnase, barnase-I48, SacB, SacB-I48이고, pUC19은 컨트롤임.
- [0083] 2) Barnase, barnase-I48은 LB+kanamycin 플레이트, SacB, SacB-I48은 LB+kanamycin+sucrose 플레이트를 사용하여 배양함. Barnase는 추가 화합물 없이 lethality를 나타내지만, SacB는 5% sucrose 조건에서 lethality를 나타냄.
- [0084] 3) 1 세트는 37℃에서 배양하고 1 세트는 20℃에서 배양함.

[0086] 2.2. 예상 실험 결과

- [0087] 1) 37℃에서는 I48의 응집 현상 때문에, pUC19 플레이트 외에 barnase-I48과 SacB-I48을 생산하는 플레이트에서도 콜로니 형성이 관찰되지만, I48이 없는 버전은 그렇지 못할 것임.
- [0088] 2) 20℃에서는 I48이 응집하지 못하므로, pUC를 제외한 모든 플레이트에서 콜로니가 형성되지 못할 것임.
- [0089] 3) Barnase나 SacB가 대장균의 성장만 저해하고 있는 상태라면, 20℃에서 배양한 플레이트를 37℃로 옮겼을 때, 콜로니의 형성이 관찰될 것임.

[0091] 실험 결과

[0092] 1. lethality 실험 결과

- [0093] 1) 37℃에서는 barnase-I48과 SacB-I48을 생산하는 플레이트에서만 콜로니 형성이 관찰됨. I48이 fusion 된 상태에서 불용성 응집체를 형성하면 독성 효소의 움직임이 제한되기 때문에, 효율적인 lethality를 나타내기

힘듦.

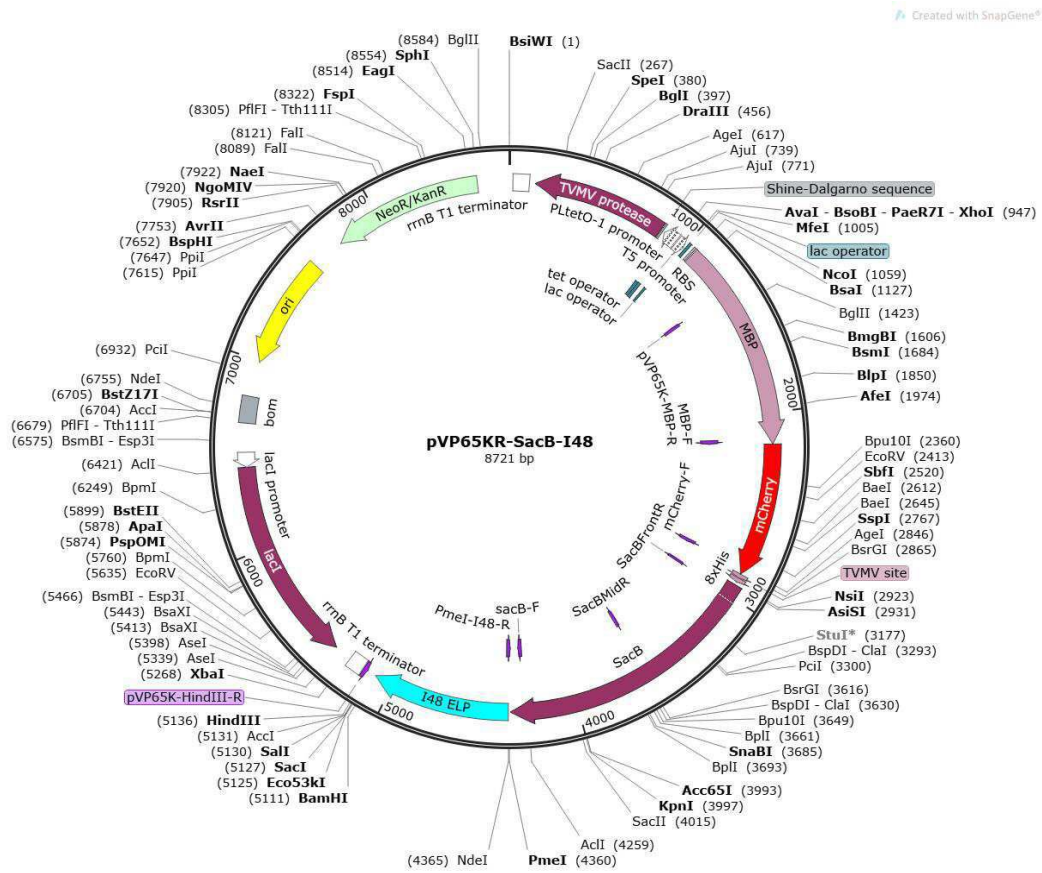
- [0094] 2) 20℃에서는 barnase-I48과 SacB-I48도 수용성 상태이기 때문에 lethality를 보임.
- [0095] 3) 20℃ 배양 후 37℃로 옮겼을 때, 콜로니가 형성되지 않은 것으로 보아, 20℃에서 배양할 때, 독성 효소에 의해 이미 대장균이 사멸하였음.
- [0096] 4) I48이 없는 버전인 barnase와 SacB는(컨트롤) 온도에 무관하게 lethality를 보였기 때문에, 이 두 유전자의 lethality는 확인됨.
- [0097] 5) pUC19 플레이트에서(컨트롤) 콜로니가 관찰되었기 때문에, transformation 실험 과정 자체에는 문제가 없음.
- [0098] 6) 도 5에서, 콜로니가 형성된 플레이트는 붉은 테두리로 표시함.

[0100] 2. I48의 새로운 특성 발견

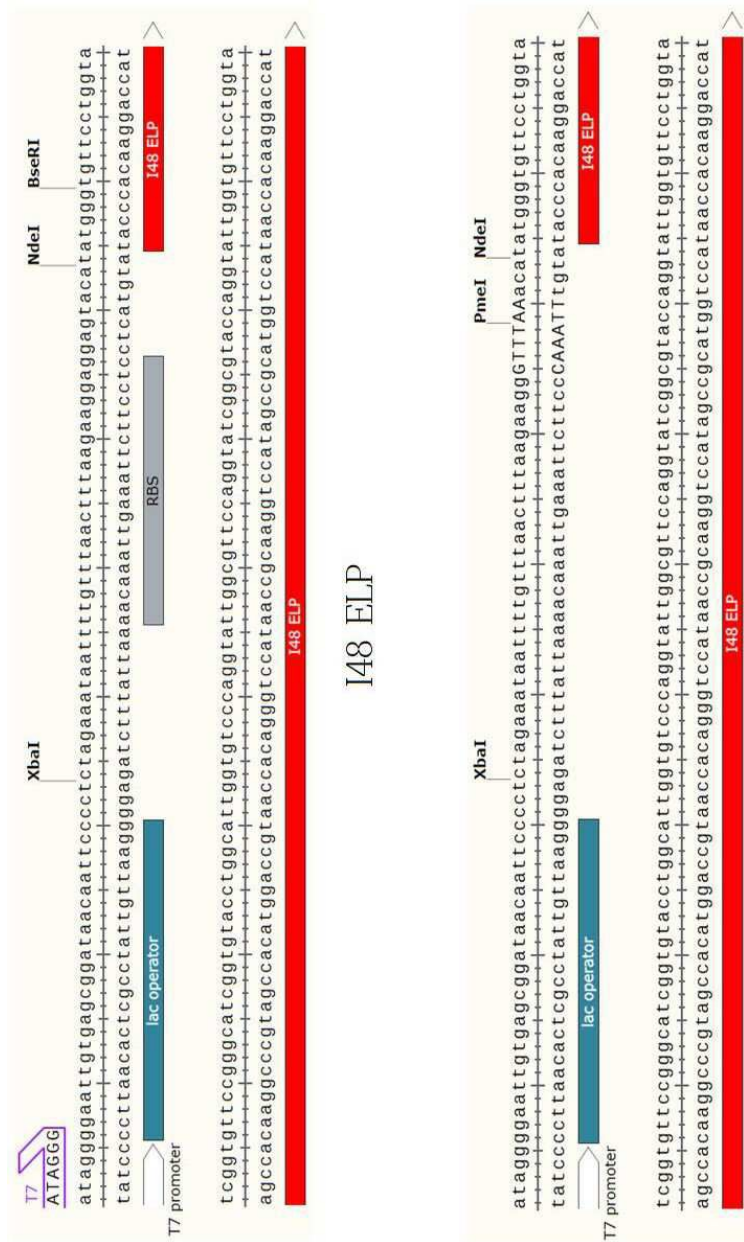
- [0101] SacB (levansucrase)는 수크로오스를 사용하여 levan 합성을 촉진하는데, 이 물질이 대장균에 치명적이라서, 클로닝 과정의 selection marker로 사용됨. Lethal gene인 sacB를 다른 유전자로 대체하면, 5% 수크로오스가 첨가된 배지에서도 대장균이 성장할 수 있기 때문에, 셀프 라이게이션을 배제할 수 있어서 클로닝이 용이해짐. 하지만, SacB가 대체되지 않은 샘플 (네가티브 컨트롤)에서도 수크로오즈 첨가 배지에서 대장균의 생장이 관찰됨. I48 ELP가 37℃에서 응집되면 SacB가 치명적인 역할을 하지 못할 것이라는 가설을 세우고, 또다른 lethal gene인 barnase를 SacB 자리에 끼워 넣음.
- [0102] Barnase는 대장균의 RNA를 분해하는 효소이기 때문에, 해독 역할을 하는 단백질 (barstar)이 없는 경우, 대장균이 사멸하게 되는데, barstar가 없는 대장균인 XL1-Blue에서 pVP65KR-barnase-I48이 성공적으로 만들어짐. 이는 I48 ELP의 응집이 치명적 유전자 혹은 독성 단백질의 기능을 억제하기 때문으로 생각됨.
- [0103] 타겟 단백질을 I48 ELP와 융합하였을 때도, I48 ELP가 타겟 단백질의 구조나 기능에 영향을 미치지 못함. 따라서, 정상적인 구조/기능을 가진 독성 단백질이 I48 ELP와 융합되고, 이 융합 단백질이 37℃에서 생산되면, I48 ELP의 응집 기능에 의해 독성이 충분히 줄어들어, 대장균이 성장할 수 있음.

도면

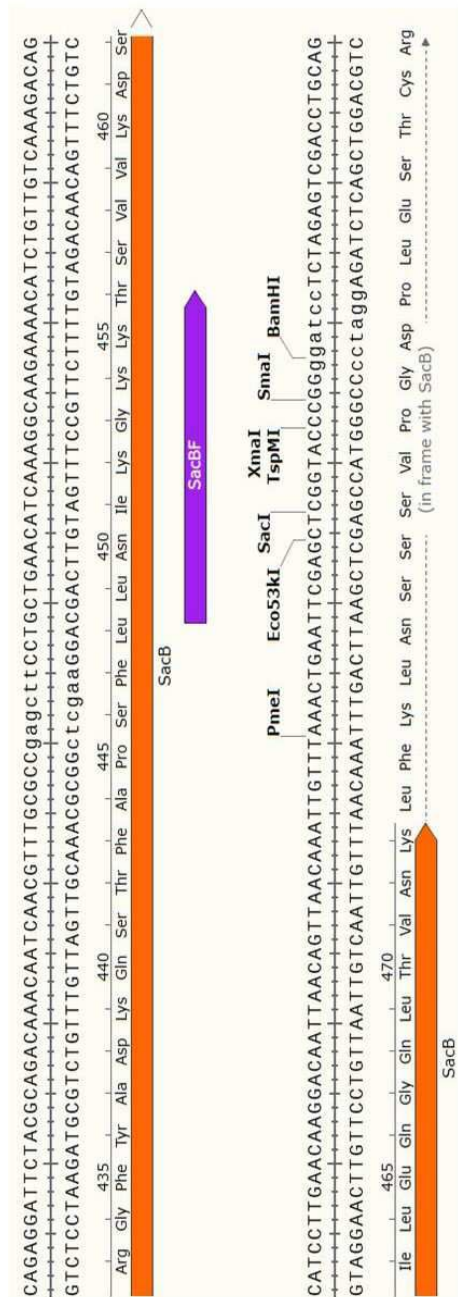
도면1



도면2

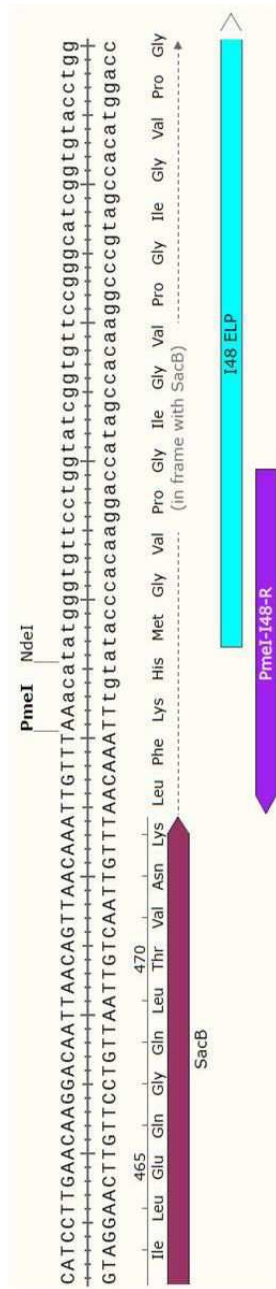


도면3

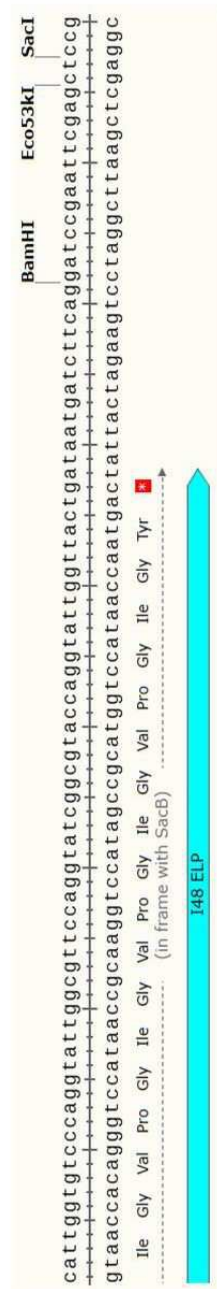


pVP65KR-SacB

도면4

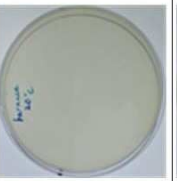
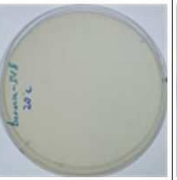
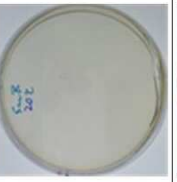
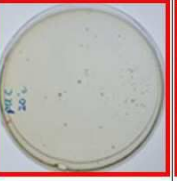
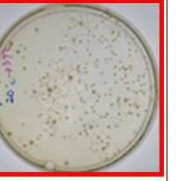


pVP65KR-SacB-I48 (I48 5' 말단)



pVP65KR-SacB-I48 (I48 3' 말단)

도면5

배양온도	barnase	barnase-I48	SacB	SacB-I48	pUC19
37도 1일					
20도 5일					
20도 5일 -> 37도 1일					

서열목록

- <110> SEJONG UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMY COOPERATION FOUNDATION
- <120> RECOMBINANT PLASMID FOR PRODUCING TOXIC PROTEIN
- <130> 22P01053
- <160> 1
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 8721
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220><223> recombinant plasmid

<400> 1

cgtagctcta gggcggcgga ttgtcctac tcaggagagc gttcaccgac aaacaacaga	60
taaaacgaaa ggcccagtc ttcgactgag cctttcggtt tatttgatgc ctctagcacg	120
cgtatcattg gatctttatt agtccatgat ggcggcaaca gtttttttgg ccatgaagtc	180
atcttcgggc gcatcttcaa ccagggtaaa ggaaccccag ctgattttat ccgcgttgaa	240
tttcagttt ttgcaccaac catccgcggc atcgagataa gtcgccacga atttttccgg	300
aaattccacg aagtagttgc taccgttggg ggtatgagtc aggcgttgga tgcccagaat	360
gttgccatca atgatggaaa ctagtgggct gccacactgg ccatctttag tggatgatcca	420
gtgctgccag aaagaagtg tttctttatg cacaatgtga gaggattcag acaccaggct	480
ggacacgctt ttctgctgaa agttgggtga caccatgcac acacgatctt tgatggtcgg	540
ctgacggaat ttcagtttct gcgggaacgg cggaagtct ttagccattt tgataacgat	600
aatgtcacgg cttcaaccg gtttcactcg cagctgggta gagtttttga ctttgaattc	660
accgtgcatg gttttgatgg tcagttcgcc attgttacga cgaaacagat gctggttggc	720
aatgatatac gggccaaaac caatgccaaa cagacgttca ctatgaccat ccgaggagtt	780
ttccagcagg catacgcaag cagagatcgg attaaaatcg cgcacgccct tcagcaaagc	840
cttagacata tcttacctcc ttaaatcaat tcggtcagtg cgtcctgctg atgtgctcag	900
tatctctatc actgataggg atgtcaatct ctatcactga tagggactcg agaaatcata	960
aaaaatttat ttgctttgtg agcggataac aattataata gattcaattg tgagcggata	1020
acaatttcac acagaattca ttaaagagga gaaattaacc atgggtaaaa tcgaagaagg	1080
taaactggta atctggatta acggcgataa aggcataaac ggtctcgctg aagtcggtaa	1140
gaaattcgag aaagataccg gaattaaagt caccgttgag catccggata aactggaaga	1200
gaaattccca caggttgccg caactggcga tggccctgac attatcttct gggcacacga	1260
ccgctttggg ggtacgctc aatctggcct gttggctgaa atcaccgccg acaaagcgtt	1320
ccaggacaag ctgtatccgt ttacctggga tgcggtacgt tacaacggca agctgattgc	1380
ttacccgatc gctgttgaag cgttatcgct gatttataac aaagatctgc tgccgaaccc	1440
gccaaaaacc tggaagaga tcccggcgt ggataaagaa ctgaaagcga aagtaagag	1500
cgcgctgatg ttcaacctgc aagaaccgta cttcacctgg ccgctgattg ctgctgacgg	1560
gggttatgcg ttcaagtatg aaaacggcaa gtacgacatt aaagacgtgg gcgtggataa	1620
cgctggcgcg aaagcgggtc tgaccttctt ggttgacctg attaaaaaca aacacatgaa	1680
tgacagaccc gattactcca tcgcagaagc tgcctttaat aaaggcgaaa cagcgatgac	1740

catcaacggc ccgtgggcat ggtccaacat cgacaccagc aaagtgaatt atggtgtaac	1800
ggtactgccg accttcaagg gtcaaccatc caaacggttc gttggcgtgc tgagcgagg	1860
tattaacgcc gccagtccga acaaagagct ggcaaaagag ttcttcgaaa actatctgct	1920
gactgatgaa ggtctggaag cggttaataa agacaaaccg ctgggtgccg tagcgctgaa	1980
gtcttacgag gaagagtgg cgaaagatcc acgtattgcc gccactatgg aaaacgccc	2040
gaaagtgaa atcatgccga acatcccga gatgtccgt ttctggtatg ccgtgcgtac	2100
tgcggtgatc aacgcccga gcggtcgtca gactgtcgat gaagccctga aagacgcga	2160
gactatggtt tccaagggcg aggaggataa catggctatc attaaagagt tcatgcgtt	2220
caaagttcac atggagggtt ctgttaacgg tcacgagttc gagatcgaag gcgaaggcga	2280
gggccgtccg tatgaaggca cccagaccgc caaactgaaa gtgactaaag gcggcccgt	2340
gccttttgcg tgggacatcc tgagcccga atttatgtac ggttctaaag cgtatgttaa	2400
acaccagcg gatatcccgc actatctgaa gctgtctttt ccggaaggtt tcaagtggga	2460
acgcgtaatg aattttgaag atggtggtgt cgtgaccgtc actcaggact cctccctgca	2520
ggatggcgag ttcatctata aagttaaact gcgtggtagt aattttccat ctgatggccc	2580
ggtgatgcag aaaaagacga tgggttggga ggcgtctagc gaacgcatgt atccggaaga	2640
tggtgcgctg aaaggcgaaa ttaaacagcg cctgaaactg aaagatggcg gccattatga	2700
cgctgaagtg aaaaccacgt acaaagccaa gaaacctgtg cagctgcctg gcgcgtacaa	2760
tgtgaatatt aaactggaca tcacctctca taatgaagat tatacgatcg tagagcaata	2820
tgagcgcgcg gagggtcgtc attctaccgg tggcatggat gagctgtaca aaggggaaac	2880
cgtgcgtttc cagtctcatc accatcatca ccatcaccat gcatccgca tcgcatgaa	2940
catcaaaaag ttgcaaaaac aagcaacagt attaaccttt actaccgcac tgctggcagg	3000
aggcgcaact caagcgtttg cgaaagaaac gaacaaaag ccatataagg aaacatacgg	3060
catttccat attacacgcc atgatatgct gcaaatccct gaacagcaaa aaaatgaaaa	3120
atatcaagtt cctgaattcg attcgtccac aattaaaaat atctcttctg caaaaggcct	3180
ggacgtttgg gacagctggc cattacaaaa cgtgacggc actgtcgaa actatcacgg	3240
ctaccacatc gtctttgcat tagccggaga tcctaaaaat gcggatgaca catcgattta	3300
catgttctat caaaaagtcg gcgaaacttc tattgacagc tggaaaaacg ctggccgcgt	3360
ctttaaagac agcgacaaat tcgatgcaaa tgattctatc ctaaaagacc aaacacaaga	3420
atggtcaggt tcagccacat ttacatctga cggaaaaatc cgtttattct acactgattt	3480

ctccggtaaa cattacggca aacaaacact gacaactgca caagttaacg tatcagcatc	3540
agacagctct ttgaacatca acggtgtaga ggattataaa tcaatctttg acggtgacgg	3600
aaaaacgtat caaaatgtac agcagttcat cgatgaaggc aactacagct caggcgacaa	3660
ccatacgtcg agagatcctc actacgtaga agataaaggc cacaataact tagtatttga	3720
agcaaacact ggaactgaag atggctacca aggcgaagaa tctttattta acaaagcata	3780
ctatggcaaa agcacatcat tcttcgtca agaaagtcaa aaacttctgc aaagcgataa	3840
aaaacgcacg gctgagttag caaacggcgc tctcggtag attgagctaa acgatgatta	3900
cacactgaaa aaagtgatga aaccgctgat tgcactaac acagtaacag atgaaattga	3960
acgcgcgaac gtctttaaaa tgaacggcaa atggtacctg ttactgact cccgcggatc	4020
aaaaatgacg attgacggca ttacgtctaa cgatatttac atgcttggtt atgtttctaa	4080
ttctttaact ggcccataca agccgctgaa caaaactggc cttgtgttaa aaatggatct	4140
tgatcctaac gatgtaacct ttacttactc acacttcgct gtacctcaag cgaaaggaaa	4200
caatgtcgtg attacaagct atatgacaaa cagaggattc tacgcagaca aacaatcaac	4260
gtttgcgccg agcttctgc tgaacatcaa aggcaagaaa acatctgttg tcaaagacag	4320
catccttgaa caaggacaat taacagttaa caaattgttt aaacatatgg gtgttcctgg	4380
tatcgggtgtt ccgggcatcg gtgtacctgg cattgggtgc ccaggatttg gcgttccagg	4440
tatcggcgta ccaggatttg gtgttcctgg tatcgggtgtt ccgggcatcg gtgtacctgg	4500
cattgggtgc ccaggatttg gcgttccagg tatcggcgta ccaggatttg gtgttcctgg	4560
tatcgggtgtt ccgggcatcg gtgtacctgg cattgggtgc ccaggatttg gcgttccagg	4620
tatcggcgta ccaggatttg gtgttcctgg tatcgggtgtt ccgggcatcg gtgtacctgg	4680
cattgggtgc ccaggatttg gcgttccagg tatcggcgta ccaggatttg gtgttcctgg	4740
tatcgggtgtt ccgggcatcg gtgtacctgg cattgggtgc ccaggatttg gcgttccagg	4800
tatcggcgta ccaggatttg gtgttcctgg tatcgggtgtt ccgggcatcg gtgtacctgg	4860
cattgggtgc ccaggatttg gcgttccagg tatcggcgta ccaggatttg gtgttcctgg	4920
tatcgggtgtt ccgggcatcg gtgtacctgg cattgggtgc ccaggatttg gcgttccagg	4980
tatcggcgta ccaggatttg gtgttcctgg tatcgggtgtt ccgggcatcg gtgtacctgg	5040
cattgggtgc ccaggatttg gcgttccagg tatcggcgta ccaggatttg gttactgata	5100
atgatcttca ggatccgaat tcgagctccg tcgacaagct tcgcctgggg taatgactct	5160
ctagcttgag gcatcaaata aaacgaaagg ctcagtcgaa agactgggcc ttctgtttta	5220

tctgttgttt gtcggtgaac gctctcctga gtaggacaaa tccgccctct agattacgtg	5280
cagtcgatga taagctgtca aacatgagaa ttgtgcctaa tgagttagct aacttacatt	5340
aattgcgttg cgctcactgc ccgctttcca gtcgggaaac ctgtcgtgcc agctgcatta	5400
atgaatcggc caacgcgcgg ggagaggcgg ttgtcgtatt gggcgccagg gtggtttttc	5460
ttttaccag tgagacgggc aacagctgat tgccttcac cgcttgccc tgagagagtt	5520
gcagcaagcg gtccacgtg gtttcccca gcaggcgaat atcctgttg atggtggtta	5580
acggcgggat ataacatgag ctgtcttcgg tatcgtcgt tccactacc gagatatccg	5640
caccaacgcg cagcccgac tcgtaaatgg cgcgcattgc gccagcgcc atctgatcgt	5700
tggcaaccag catcgcagt ggaacgatgc cctcattcag catttgcatg gtttgttgaa	5760
aaccggacat ggactccag tcgcttccc gtccgctat cggctgaatt tgattgcgag	5820
tgagatatt atccagcca gccagacgca gacgcgccga gacagaactt aatgggccc	5880
ctaacagcg gatttgctgg tgaccaatg cgaccagatg ctccacgcc agtcgcgtac	5940
cgtcttcag ggagaaaata atactgtga tgggtgtctg gtcagagaca tcaagaaata	6000
acgccggaac attagtgcag gcagcttcca cagcaatggc atcctggtca tccagcgat	6060
agttaatgat cagccactg acgcgttgcg cgagaagatt gtgcaccgcc gctttacagg	6120
cttcgacgcc gttcgttct accatcgaca ccaccacgt ggacccagt tgatcggcgc	6180
gagatttaat cgccgcgaca atttcgacg gcgcgtgcag ggccagactg gaggtggcaa	6240
cgccaatcag caacgactgt ttgcccgcca gttgtgtgc cagcggttg ggaatgtaat	6300
tcagctccg catcgcgct tccactttt ccgcgtttt cgcagaaacg tggtggcct	6360
ggttcaccac gcgggaaacg gtctgataag agacaccggc atactctgcg acatcgtata	6420
acgttactgg ttccacattc accaccctga attgactctc ttccgggcgc tatcatgcca	6480
taccgcgaaa ggttttgcgc cattcgatgg tgcggaacc tagagctgcc tcgcgcgttt	6540
cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctccc gagacggtca cagcttgtct	6600
gtaagcggat gccgggagca gacaagccc tcagggcgcg tcagcgggtg ttggcgggtg	6660
tcggggcgca gccatgacc agtcacgtag cgatagcgga gtgtatactg gcttaactat	6720
gcggcatcag agcagattgt actgagagt caccatattc ggtgtgaaat accgcacaga	6780
tcgtaagga gaaaataccg catcaggcgc tcttcgctt cctcgtcac tgactcgtg	6840
cgctcggctg ttccgctgcg gcgagcggta tcagctcact caaaggcgg aatacggta	6900
tccacagaat caggggataa cgcaggaaag aacatgtgag caaaaggcca gaaaaggcc	6960
aggaaccgta aaaaggcgc gttgtggcg tttttcata ggctccgcc ccctgacgag	7020
catcacaaaa atcgacgctc aagtcagagg tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac	7080

caggcgtttc cccctggaag ctccctcgtg cgtctcctg ttccgaccct gccgcttacc	7140
ggatacctgt ccgcctttct ccttcggga agcgtggcgc tttctcatag ctcacgtgt	7200
aggtatctca gttcggtgta ggtcgttcgc tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc	7260
gttcagcccg accgctgcgc cttatccggt aactatcgtc ttgagtcctaa cccggttaaga	7320
cacgacttat cgccactggc agcagccact ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta	7380
ggcgggtgcta cagagttctt gaagtgggtg cctaactacg gctacactag aaggacagta	7440
tttgggtatct gcgctctgct gaagccagtt accttcggaa aaagagttgg tagctcttga	7500
tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggg ggtttttttg tttgcaagca gcagattacg	7560
cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct ttgatctttt ctacggggtc tgacgtcag	7620
tggaaacgaaa actcacgtta agggattttg gtcattgagat tatcaaaaag gatcttcacc	7680
tagatccttt taaattaaaa atgaagtttt aaatcaatct aaagtatata tgagtaaact	7740
tggtctgaca gccctaggtc agaagaactc gtcaagaagg cgatagaagg cgatgcgctg	7800
cgaatcggga gcggcgatac cgtaaagcac gaggaagcgg tcagcccatt cgccgccaag	7860
ctcttcagca atatcacggg tagccaacgc tatgtctga tagcgggtccg ccacaccag	7920
ccggccacag tcgatgaatc cagaaaagcg gccattttcc accatgatat tcggcaagca	7980
ggcatcgcca tgagtcacga cgagatctc accatccggc atacgcgcct tgagcctggc	8040
gaacagttcg gctggcgca gccctgatg ctcttcgtcc agatcatcct gatcgacaag	8100
accggcttcc atccgagtc gtgctcgtc gatgcgatgt ttcgcttggt ggtcgaatgg	8160
gcaggtagcc ggatcaagcg tatgcagccg ccgcatgca tcagccatga tggatacttt	8220
ctcggcagga gcaaggtag atgacaggag atcctgcccc ggcacttcgc ccaatagcag	8280
ccagtccctt cccgcttcag tgacaacgtc gagcacagct gcgcaaggaa cgcccgtcgt	8340
ggccagccac gatagccggt ctgcctcgtc ctgcagttca ttcagggcac cggacaggtc	8400
ggtcttgaca aaaagaaccg ggcgccccctg cgctgacagc cggaacacgg cggcatcaga	8460
gcagccgatt gtctgttgtg cccagtcata gccgaatagc ctctccacce aagcggccgg	8520
agaacctgcg tgcaatccat cttgttcaag catgcgaaac gaccgtcacc ctgtctcttg	8580
atcagatctt gatccccctg gccatcagat ccttggcggc aagaaagcca tccagtttac	8640
tttgcagggc ttcccaacct taccagaggg cgcgccagct ggcaattctt ttgaagctca	8700
cgctgccgca agcactcagg g	8721