



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0078034
(43) 공개일자 2013년07월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/81 (2006.01) *C12N 1/19* (2006.01)

C12N 15/65 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0146746

(22) 출원일자 2011년12월30일

심사청구일자 2011년12월30일

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

(72) 발명자

최원자

서울특별시 서대문구 대현동 11-1, 이화여자대학교 자연과학대학 생명과학전공

김완기

경기도 수원시 영통구 원천동 산 5번지 아주대학교 의과대학 의과학연구소 분자생물학실

(74) 대리인

양부현

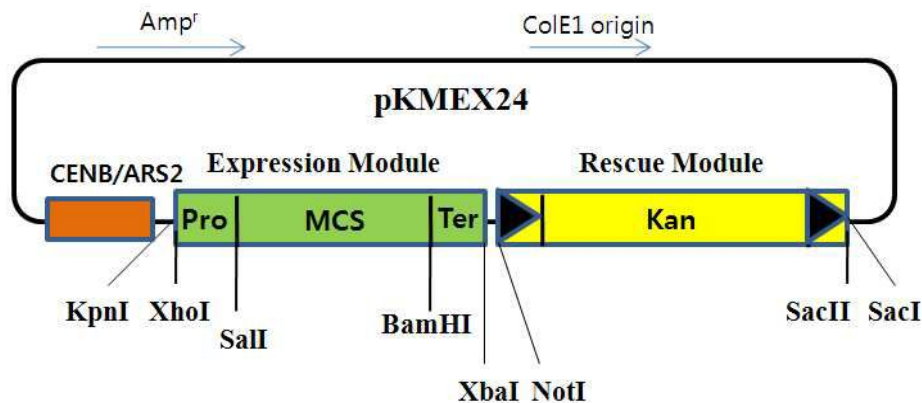
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 안정적인 에피솜 효모 발현 벡터 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 (a) 자가복제 서열(autonomous replicating sequence); (b) (i) KmPCLP3(*Kluyveromyces maxianus* purine-cytosine-like-permease 3) 프로모터(PCLP_{pro}), (ii) 멀티 클로닝 위치(multiple cloning site, MCS) 및 (iii) KmPCLP3 터미네이터(terminator; PCLP_{ter})를 포함하는 발현 모듈(expression module); 및 (c) (i) 선택 마커(selection marker); 및 (ii) 상기 선택 마커의 양쪽 말단에 결합된 loxP 서열을 포함하는 레스큐 모듈(rescue module; loxP-selection marker-loxP)을 포함하는 효모 발현벡터(yeast expression vector) 및 이를 이용한 형질전환 방법에 관한 것이다. 본 발명의 벡터를 이용한 형질전환 방법은 목적 유전자를 세대를 거듭하여도 안정적으로 세포 내에서 발현시킬 수 있을 뿐 아니라, 목적 유전자 단편의 플랭킹 서열(flanking sequence)를 추가적으로 포함시킴으로써 하나 이상의 목적 유전자의 유발시키는 연속적인 형질전환이 가능함에 따라, 소망하는 산물들(바이오매스)의 산업적 생산에 매우 유용하게 적용될 수 있다.

대표도 - 도8



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345072522

부처명 교육과학기술부

연구사업명 미래유망파이오니아사업

연구과제명 미생물 오닉스 융합기반 바이오에너지 생산 및 온실가스 저감 기술 개발 연구

주관기관 이화여자대학교

연구기간 2008.07.01 ~ 2014.02.28

특허청구의 범위

청구항 1

(a) 자가복제 서열(autonomous replicating sequence); (b) (i) KmPCLP3(*Kluyveromyces maxianus* purine-cytosine-like-permease 3) 프로모터(PCLPpro), (ii) 멀티 클로닝 위치(multiple cloning site, MCS) 및 (iii) KmPCLP3 터미네이터(terminator; PCLPter)를 포함하는 발현 모듈(expression module); 및 (c) (i) 선택 마커(selection marker); 및 (ii) 상기 선택 마커의 양쪽 말단에 결합된 loxP 서열을 포함하는 레스큐 모듈(rescue module; loxP-selection marker-loxP)을 포함하는 효모 발현벡터(yeast expression vector).

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 자가복제 서열은 ARS2인 것을 특징으로 하는 효모 발현벡터.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 선택 마커는 kanMX인 것을 특징으로 하는 효모 발현벡터.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 발현벡터는 Cre 리코비나제(recombinase)에 의해 레스큐되는 것을 특징으로 하는 효모 발현벡터.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 발현벡터는 상기 발현 모듈의 업스트림 및 레스큐 모듈의 다운스트림에 목적 유전자 단편의 플랭킹 서열(flanking sequence)과 상동적인 서열을 추가적으로 포함하여 염색체 상의 상기 목적 유전자 단편과의 상동재조합(homologous recombination)을 통해 염색체 상으로 통합될 수 있는 것을 특징으로 하는 효모 발현벡터.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 효모는 클루이베로미세스 종(*Kluyveromyces* spp.), 사카로마이세스 종(*Saccharomyces* spp.), 시조사카로마이세스 종(*Schizosaccharomyces* spp.), 피키아 종(*Pichia* spp.), 파피아 종(*Paffia* spp.), 칸디다 종(*Candida* spp.), 탈라로미세스 종(*Talaromyces* spp.), 브레타노미세스 종(*Brettanomyces* spp.), 파키솔렌 종(*Pachysolen* spp.) 또는 데바리오미세스 종(*Debaryomyces* spp.)인 것을 특징으로 하는 효모 발현벡터.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 효모는 클루이베로미세스 종 또는 사카로마이세스 종인 것을 특징으로 하는 효모 발현벡터.

청구항 8

(a) 센트로미어 서열(centromere sequence); (b) 목적 유전자의 업스트림 플랭킹 서열(upstream flanking sequence)과 상동적인 서열; (c) (i) KmPCLP3(*Kluyveromyces maxianus* purine-cytosine-like-permease 3) 프

로모터(PCLPpro), (ii) 멀티 클로닝 위치(multiple cloning site, MCS) 및 (iii) KmPCLP3 터미네이터(terminator; PCLPter)를 포함하는 발현 모듈(expression module); 및 (d) (i) 선택 마커(selection marker); 및 (ii) 상기 선택 마커의 양쪽 말단에 결합된 loxP 서열을 포함하는 레스큐 모듈(rescue module; loxP-selection marker-loxP); (e) 목적 유전자의 다운스트림 플랭킹 서열과 상동적인 서열을 포함하는 염색체 통합용 효모 발현벡터(yeast expression vector).

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 센트로미어 서열은 CENB인 것을 특징으로 하는 효모 발현벡터.

청구항 10

제 8 항에 있어서, 상기 선택 마커는 kanMX인 것을 특징으로 하는 효모 발현벡터.

청구항 11

제 8 항에 있어서, 상기 발현벡터는 Cre 리코비나제(recombinase)에 의해 레스큐되는 것을 특징으로 하는 효모 발현벡터.

청구항 12

제 8 항에 있어서, 상기 발현벡터는 상기 발현 모듈의 업스트림 및 레스큐 모듈의 다운스트림에 존재하는 목적 유전자 단편의 플랭킹 서열(flanking sequence)과 상동적인 서열과 염색체 상의 상기 목적 유전자 단편과의 상동재조합(homologous recombination)을 통해 상기 발현 모듈 및 레스큐 모듈이 염색체 상으로 통합될 수 있는 것을 특징으로 하는 효모 발현벡터.

청구항 13

제 8 항에 있어서, 상기 효모는 클루이베로미세스 종, 사카로마이세스 종, 시조사카로마이세스 종, 피키아 종, 파피아 종, 칸디다 종, 탈라로미세스 종, 브레타노미세스 종, 파키슬렌 종 또는 데바리오미세스 종인 것을 특징으로 하는 효모 발현벡터.

청구항 14

제 13 항에 있어서, 상기 효모는 클루이베로미세스 종 또는 사카로마이세스 종인 것을 특징으로 하는 효모 발현벡터.

청구항 15

다음의 단계를 포함하는 효모에서 하나 이상의 목적 뉴클레오타이드 서열들의 연속적 형질전환 방법:

- (a) 제 8 항의 벡터의 MCS(multiple cloning site)에 목적 뉴클레오타이드 서열을 클로닝하는 단계;
- (b) 상기 벡터를 효모에 형질전환시키는 단계;
- (c) 상기 형질전환된 효모에서 Cre 리코비나제에 의한 레스큐를 유도하는 단계; 및
- (d) 상기 단계 (a) 내지 (c)를 다른 목적 뉴클레오타이드 서열로 반복적으로 실시하는 단계.

청구항 16

제 15 항에 있어서, 상기 형질전환은 클루이베로미세스 종, 사카로마이세스 종, 시조사카로마이세스 종, 피키아 종, 파피아 종, 칸디다 종, 탈라로미세스 종, 브레타노미세스 종, 파키슬렌 종 및 데바리오미세스 종으로 구성된 군으로부터 선택된 효모 스트레인에서 실시하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제 16 항에 있어서, 상기 형질전환은 클루이베로미세스 종 또는 사카로마이세스 종에서 실시하는 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 안정적인 에피솜 효모 발현 벡터 및 이의 용도에 대한 것이다.

배경기술

[0002] 유전자 기능을 연구하기 위한 추가적인 대사공학(metabolic engineering)으로서, 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*)에서 이중 또는 자가 유전자 발현이 대량으로 경제적 가치를 가지는 물질의 생산하거나 또는 숙주세포의 물리화학적 특성을 증진시킬 수 있다(Nevoigt, 2008). 이것은 다른 영양요구 돌연변이체(auxotrophic mutants) 및 목적 유전자가 다양한 프로모터의 조절 하에 위치하여 자가적으로 복제하는 적합한 선택마커를 가진 플라스미드가 유용하기 때문에 실험실 스트레인들에서 용이한 일이다. 잘-알려진 프로모터를 포함하는 플라스미드의 이용과 관련된 문제들 중 하나는 효모 생리학에 따른 에피솜 발현벡터(episomal expression vectors)의 소실(세대를 거듭함(증식)에 따라 에피솜 플라스미드의 소실)이다. 따라서, 상기 소실을 극복하여 목적 유전자의 안정적인 발현 및 유지에 시급히 해결되어야 할 문제이다.

[0003] 또한, 산업적 적용에서 효모 배양을 위해 임의대로 선택할 수 없는 선택 압력(selection pressures)의 지속적인 존재에도 불구하고 카피 수를 조절할 수 없음으로 인해 야기되는 발현 상에 세포-세포 이질성(cell-cell heterogeneity)이다. 따라서, 선택 압력의 부재(즉, 상동 재조합에 의한 염색체로의 통합) 하에서 유전자의 안정적인 발현 및 유지도 극복해야 할 문제이다.

[0004] 유전자 통합은 rRNA 유전자(Lopes et al., 1969; Fujii et al., 1990) 및 시그마(Kudla et al., 1992) 또는 텔타 서열(Sakai et al., 1990; Lee et al., 1997; Ekino et al., 2002; Oliveira et al., 2007) 같은 지놈 상의 특정 위치로 타겟팅된다. 상기 서열들이 효모 지놈 전반에 걸쳐서 많은 곳에서 존재하기 때문에, 여러 카피의 삽입된 유전자를 포함하는 스트레인이 발생할 수 있다. 세포-세포 이질성을 회피했을 지라도, 이 전략은 삽입된 유전자의 카피 수를 조절하여 시작부터 발현 레벨을 조절하는 데 유사한 문제를 일으킬 수 있는데, 예를 들어 적정 레벨로 삽입된 유전자를 발현시키는 클론의 추가적인 선택이 필요하다. 더욱이, 발현된 단백질 레벨이 항상 유전자 카피 수와 상관관계를 가지지 않는다(Moriya et al., 2006). 이런 점으로 인해, 삽입된 유전자의 단백질 산물이 양적 또는 기능적으로 상응하는 야생형 유전자의 단백질보다 크게 우세하지 않는다면 변형된 유전자들(예컨대, 돌연변이)에 대한 기능 분석이 어려운 것이다. 이런 측면에서 유전자 대체(replacement)는 간결한 방식으로 원하는 위치로의 정밀한 통합 타겟팅(integrative targeting)하기 위한 선택 수단일 수 있다. 최근에, 특정 유전자의 고유의 프로모터가 다른 유전자의 다른 강도를 가지는 유전적으로 변형되거나 또는 천연의 프로모터로 대체되어 졌다(Verstrepen et al., 2004; Nevoigt et al., 2006).

[0005] 상술한 바와 같이, 변형된 유전자의 ORF(open reading frame; 또는 다른 강도의 프로모터와 함께)를 대체함으로써 변형된 형태만의 효과를 조사하는 것이 바람직하다. 대부분의 경우, 통합된 클론들의 선택은 통합 벡터에 의해 제공되는 특정 영양성분(nutrients)의 부재 하에서 성장하는 세포의 능력에 의존한다. 이론적으로, 많은 유전자 통합은 여러 영양요구 돌연변이를 가진 스트레인에서 획득될 수 있다. 하지만, 특별한 경우 산업적 미생물에 영양요구 돌연변이를 도입함으로써 얻어질 수 있는데, 이러한 돌연변이가 필요한 영양성분을 보충하는 필요한 증가된 배양 비용 이외에도 세포 생리상태(physiology)에 영향을 미칠 수 있기 때문이다. 따라서, 재생산할 수 있는 통합 벡터는 단일 영양요구 돌연변이를 가진 산업적 미생물에서 상술한 목적을 달성하기 위한

강력한 수단이다.

[0006] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명자들은 효모에서 목적 유전자를 안정적으로 발현하고 형질전환시킬 수 있는 고효율 발현 시스템을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 (a) 자가복제서열(autonomous repeating sequence); (b) 목적 유전자를 형질전환시킬 수 있는 발현 모듈(expression module); 및 (c) loxP-kanMX-loxP로 이루어진 레스큐 모듈로 이루어진 신규한 이중 모듈 플라스미드(dual module plasmids)를 제작하였으며, 이를 이용하여 효모(바람직하게는, 클루이베로미세스 막시아누스)에서 목적 유전자를 안정적으로 발현시킬 수 있다는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0008] 따라서, 본 발명의 목적은 효모 발현벡터(yeast expression vector)를 제공하는 데 있다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 벡터를 이용한 효모에서 하나 이상의 목적 뉴클레오타이드 서열들의 연속적 형질전환 방법을 제공하는 데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 자가복제 서열(autonomous replicating sequence); (b) (i) KmPCLP3(*Kluyveromyces maxianus* purine-cytosine-like-permease 3) 프로모터(PCLP_{pro}), (ii) 멀티 클로닝 위치(multiple cloning site, MCS) 및 (iii) KmPCLP3 터미네이터(terminator; PCLP_{ter})를 포함하는 발현 모듈(expression module); 및 (c) (i) 선택 마커(selection marker); 및 (ii) 상기 선택 마커의 양쪽 말단에 결합된 loxP 서열을 포함하는 레스큐 모듈(rescue module; loxP-selection marker-loxP)을 포함하는 효모 발현벡터(yeast expression vector)를 제공한다.

[0012] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 센트로미어 서열(centromere sequence); (b) 목적 유전자의 업스트림 플랭킹 서열(upstream flanking sequence)과 상동적인 서열; (c) (i) KmPCLP3(*Kluyveromyces maxianus* purine-cytosine-like-permease 3) 프로모터(PCLP_{pro}), (ii) 멀티 클로닝 위치(multiple cloning site, MCS) 및 (iii) KmPCLP3 터미네이터(terminator; PCLP_{ter})를 포함하는 발현 모듈(expression module); 및 (d) (i) 선택 마커(selection marker); 및 (ii) 상기 선택 마커의 양쪽 말단에 결합된 loxP 서열을 포함하는 레스큐 모듈(rescue module; loxP-selection marker-loxP); (e) 목적 유전자의 다운스트림 플랭킹 서열과 상동적인 서열을 포함하는 염색체 통합용 효모 발현벡터(yeast expression vector)를 제공한다.

[0013] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 효모에서 하나 이상의 목적 뉴클레오타이드 서열들의 연속적 형질전환 방법을 제공한다: (a) 상술한 벡터의 MCS(multiple cloning site)에 목적 뉴클레오타이드 서열을 클로닝하는 단계; (b) 상기 벡터를 효모에 형질전환시키는 단계; (c) 상기 형질전환된 효모에서 Cre 리코비나제에 의한 레스큐를 유도하는 단계; 및 (d) 상기 단계 (a) 내지 (c)를 다른 목적 뉴클레오타이드 서열로 반복적으로 실시하는 단계.

[0014] 본 발명자들은 효모에서 목적 유전자를 안정적으로 발현하고 형질전환시킬 수 있는 고효율 발현 시스템을 개발

하고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 (a) 자가복제서열; (b) 목적 유전자를 형질전환시킬 수 있는 발현 모듈; 및 (c) loxP-kanMX-loxP로 이루어진 레스큐 모듈로 이루어진 신규한 이중 모듈 플라스미드를 제작하였으며, 이를 이용하여 효모(바람직하게는, 클루이베로미세스 막시아누스)에서 목적 유전자를 안정적으로 발현시킬 수 있다는 것을 확인하였다.

[0015] 효모는 경제적으로 관심을 끄는 외래 단백질 및 다른 산물들의 생산에 폭넓게 이용되어 왔다. 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*)는 오랜 기간 동안 산업적으로 이용되어져 왔으며, 이 외에도 다른 효모들이 소망하는 산물들의 생산에 보다 더 적합할 수 있는 장점들을 가진다. 또한, 생명공학적 방법을 위해 유익한 특징들을 가지고 있는 속이 클루이베로미세스(*Kluyveromyces*) 효모종이다. K. 락티스(*Kluyveromyces lactis*) 및 K. 막시아누스(*Kluyveromyces marxianus*) 효모는 GRAS(Generally Recognized As Safe)로서 분류되어 사카로마이세스와 동일한 안정성을 가지고 이용될 수 있다.

[0016] 본 발명의 벡터는 자가복제서열, 발현 모듈(expression module) 및 레스큐 모듈을 포함한다.

[0017] 본 발명의 벡터는 자가복제서열을 통해 목적 유전자를 안정적으로 효모 세포에서 발현시킬 수 있다.

[0018] 자가복제서열(ARS)은 효모 게놈의 복제 기원을 포함한다. 상기 효모 게놈의 복제 기원은 4개의 부위(A, B1, B2 및 B3)를 포함하며, 플라스미드의 안정성을 부여한다. 일반적으로, 자가복제서열은 A-T 풍부 서열을 가지며, 상기 복제 기원이 돌연변이가 되거나 또는 소실된 경우, 복제가 개시되지 않는다. 특히, 엘리먼트 A는 매우 높은 보존성을 가지며(보존 서열, 5'- T/A T T T A Y R T T T T/A 3'; Y는 피리미딘계 염기 및 R은 퓨린계 염기) 돌연변이가 발생하는 경우에 자가복제서열의 복제 개시능이 완전히 사라진다. 또한, 엘리먼트 B1, B2 및 B3에서 돌연변이가 발생하는 경우, 자가복제서열의 복제 개시능이 감소한다.

[0019] 또한, 효모 게놈에서 자가복제서열은 센트로미어 서열과 병치되어 존재하기 때문에, 센트로미어 서열을 포함하는 본 발명의 발현벡터는 효모 생리학에 기초한 에피솜 벡터의 소실의 문제점도 해결할 수 있다.

[0020] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 벡터가 적용될 수 있는 효모는 클루이베로미세스 종(*Kluyveromyces* spp.), 사카로마이세스 종(*Saccharomyces* spp.), 시조사카로마이세스 종(*Schizosaccharomyces* spp.), 피키아 종(*Pichia* spp.), 파피아 종(*Paffia* spp.), 칸디다 종(*Candida* spp.), 탈라로미세스 종(*Talaromyces* spp.), 브레타노미세스 종(*Brettanomyces* spp.), 파키솔렌 종(*Pachysolen* spp.) 또는 데바리오미세스 종(*Debaryomyces* spp.)을 포함하며, 보다 바람직하게는 클루이베로미세스 종 또는 사카로마이세스 종을 포함하고, 가장 바람직하게는 클루이베로미세스 막시아누스 또는 사카로마이세스 세레비지애를 포함한다.

[0021] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 발현벡터는 (i) KmPCLP3(*Kluyveromyces marxianus* purine-cytosine-like-permease 3) 프로모터(PCLP_{pro}), (ii) 멀티 클로닝 위치(multiple cloning site, MCS) 및 (iii) KmPCLP3 터미네이터(terminator; PCLP_{ter})를 포함하는 발현 모듈(expression module); 및 (c) (i) 선택 마커(selection marker); 및 (ii) 상기 선택 마커의 양쪽 말단에 결합된 loxP 서열을 포함하는 레스큐 모듈(rescue module; loxP-selection marker-loxP)을 포함한다.

[0022] 보다 상세하게는, 본 발명의 벡터는 (i) 발현대상물질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열; (ii) 상기 (i)의 뉴클레오타이드 서열에 작동적으로 연결되며 동물세포, 바람직하게는 효모세포에서 작용하여 RNA 분자를 형성시키는 프로모터를 포함하며, 보다 더 바람직하게는 (i) 발현대상물질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열; (ii) 상기 (i)의 뉴클레오타이드 서열에 작동적으로 연결되며 동물세포, 바람직하게는 효모세포에서 작용하여 RNA 분자를 형성시키는 KmPCLP3의 프로모터; 및 (iii) 상기 동물세포, 바람직하게는 효모세포에서 작용하여 상기 RNA 분자의 3'-말단의 폴리아데닐화를 야기시키는 3'-비-해독화 부위, 바람직하게는 KmPCLP3의 터미네이터를 포함하는 발현벡터, 또는 (i) 발현대상물질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열; (ii) 상기 (i)의 뉴클레오타이드 서열에 작동적으로 연결되며 동물세포, 바람직하게는 효모세포에서 작용하여 RNA 분자를 형성시키는 KmPCLP3의 프로모터; 및 (iii) 상기 동물세포, 바람직하게는 효모세포에서 작용하여 상기 RNA 분자의 3'-말단의 폴리아데닐화를 야기시키는 3'-비-해독화 부위, 바람직하게는 KmPCLP3의 터미네이터를 포함하는 발현벡터를 포함한다.

[0023] 본 발명의 벡터에서, 상기 멀티 클로닝 위치는 발현대상물질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 클로닝하는 위치로 기능하며, 바람직하게는 3개의 제한효소 위치(*Sa*II, *Eco*RI 및 *Bam*HI)를 포함한다.

[0024] 본 명세서에서 용어 "프로모터"는 코딩 서열 또는 기능적 RNA의 발현을 조절하는 DNA 서열을 의미한다. 본 발명의 제조합 발현벡터에서 발현대상물질-코딩 뉴클레오타이드 서열은 상기 프로모터에 작동적으로 연결된다. 본 명세서에서 용어 작동적으로 결합된(operatively linked)은 핵산 발현 조절 서열(예: 프로모터 서열, 시그널

서열, 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열 사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 번역을 조절하게 된다.

[0025] 본 발명의 레스큐 모듈은 효모 선택마커로서 기능하는 항생제 저항성 유전자(예를 들어, NPTII 유전자)를 포함한다. 본 발명에 따르면, 본 발명의 벡터를 이용한 형질전환에 있어서 선택마커로서 loxP-kanMX-loxP 컨스트럭트를 이용한다. 따라서, 본 발명의 벡터로 형질전환된 효모 스트레인은 항생제(예를 들어, G418)-포함 배지에서 성장할 수 있다. 즉, 본 발명의 벡터가 효모 내로 형질전환됨에 따라 형질전환된 효모 스트레인이 항생제-포함 배지에서 선택된다.

[0026] 또한, 본 발명의 벡터는 목적 유전자의 업스트림 및 다운스트림 플랭킹 서열(upstream flanking sequences)과 상동적인 서열을 이용하여 본 발명의 목적 유전자를 효모 염색체 상에 연속적으로 통합(integration)시킬 수 있다. 보다 상세하게는, 본 발명의 발현벡터 내 발현 모듈의 업스트림과 레스큐 모듈의 다운스트림에 목적 유전자 단편의 플랭킹 서열(flanking sequence)을 추가적으로 포함시킨다. 상기 플랭킹 서열과 상보적인 서열은 염색체 상의 상기 목적 유전자 단편과의 상동재조합(homologous recombination)을 통해 염색체 상으로 본 발명의 이중 모듈 컨스트럭트(발현 모듈 및 레스큐 모듈; 바람직하게는, 목적 유전자 및 loxP-kanMX-loxP 컨스트럭트)를 통합시킨다. 상기 컨스트럭트가 통합된 효모 스트레인을 레스큐 모듈 내에 존재하는 선택 마커(바람직하게는, G418에 대한 저항성)에 따라 분리/동정한 후, 상기 2개의 loxP 서열을 인지하여 loxP 서열 사이의 부위를 제거하는 Cre 리코비나제(recombinase) 활성을 이용하여 레스큐 모듈을 제거한다. 따라서, 상기 목적 유전자가 아닌 다른 목적 유전자를 포함하는 본 발명의 벡터를 이용하여 상기 형질전환된 효모 스트레인의 염색체 상에 다른 위치의 목적 유전자를 타겟팅하는 형질전환을 실시할 수 있다. 그 결과, 서로 다른 2개의 목적 유전자를 연속적으로 변형시킨 형질전환 효모 스트레인을 제조할 수 있다. 상술한 바와 같이, Cre 리코비나제를 이용한 레스큐 과정을 반복적으로 실시함으로써, 하나 이상의 목적 유전자를 변형시킨 형질전환 효모 스트레인을 제조할 수 있다.

[0027] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 벡터는 Cre 리코비나제(recombinase)에 의해 레스큐된다.

[0028] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 발현벡터는 상기 발현 모듈의 업스트림 및 레스큐 모듈의 다운스트림에 존재하는 목적 유전자 단편의 플랭킹 서열(flanking sequence)과 상동적인 서열과 염색체 상의 상기 목적 유전자 단편과의 상동재조합(homologous recombination)을 통해 발현 모듈 및 레스큐 모듈이 염색체 상으로 통합된다.

[0029] 본 발명의 효모 선택마커 유전자는 당업계에서 공지된 다양한 선택마커 유전자를 이용할 수 있으며, 예를 들어, NPTII(Neomycin phosphotransferase II), UAR3, LEU2, HIS3, TRP1, ADE2 및 LYS2 같은 영양요구성(auxotrophic) 선택마커 유전자를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 가장 바람직하게는, 효모 선택마커 유전자는 NPTII이다. 선택적으로, 본 발명은 효모 선택마커로서 이용될 수 있는 숙주세포 상에 약물 저항성(drug resistance)을 부여하는 단백질을 인코딩하는 유전자를 이용할 수 있고, 예를 들어 CAN1 및 CYH2를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0030] 또한, 본 발명의 발현벡터가 진핵세포, 바람직하게는 효모 세포에 적용되는 경우, 이용될 수 있는 프로모터는, 본 발명의 발현대상물질의 전사를 조절할 수 있는 것으로서, 효모 세포에서 유래된 프로모터, 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 및 포유동물 세포의 지놈으로부터 유래된 프로모터를 포함하며, 예컨대, 효모(*K. marxianus*) PCLP3(purine-cytosine-like permease 3) 프로모터, 효모(*S. cerevisiae*) TDH3(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 3)의 프로모터, 효모(*S. cerevisiae*) GAPDH(Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) 프로모터, 효모(*S. cerevisiae*) GAL1 내지 GAL10 프로모터, 효모(*Pichia pastoris*) AOX1 또는 AOX2 프로모터, CMV(cytomegalo virus) 프로모터, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, HSV의 *tk* 프로모터, RSV 프로모터, EF1 알파 프로모터, 메탈로티오닌 프로모터, 베타-액틴 프로모터, 인간 IL-2 유전자의 프로모터, 인간 IFN 유전자의 프로모터, 인간 IL-4 유전자의 프로모터, 인간 림포톡신 유전자의 프로모터 및 인간 GM-CSF 유전자의 프로모터를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 가장 바람직하게는, 효모 PCLP3의 프로모터이다.

[0031] 바람직하게는, 본 발명에 이용되는 발현 카세트는 폴리 아데닐화 서열을 포함한다(예: PCLP3 터미네이터, ADH1 터미네이터, 소성장 호르몬 터미네이터 및 SV40 유래 폴리 아데닐화 서열).

[0032] 본 발명의 벡터를 숙주 세포 내로 운반하는 방법은 당업계에서 공지된 다양한 방법들을 이용할 수 있으며, 예를 들어 숙주 세포가 원핵 세포인 경우, CaCl₂ 방법(Cohen, S.N. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 9:2110-

2114(1973)), 하나한 방법(Cohen, S.N. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 9:2110-2114(1973); 및 Hanahan, D., *J. Mol. Biol.*, 166:557-580(1983)) 및 전기 천공 방법(Dower, W.J. et al., *Nucleic Acids Res.*, 16:6127-6145(1988)) 등에 의해 실시될 수 있으며, 진핵세포인 경우, 트랜스덕션(transduction), 전기천공법(electroporation), 리포펙션(lipofection), 마이크로인젝션, 유전자총(particle bombardment), YAC에서 이용되는 효모 구형질체/세포 융합, 식물세포에서 이용되는 아그로박테리움-매개된 형질전환 등을 이용하여 실시할 수 있다. 이때, 박테리아 복제 개시점은 긴 DNA 삽입물(inserts)의 안정적인 박테리아 복제에 유용한 당업계에 잘 알려진 복제 개시점들로부터 선택될 수 있으며, ColE1, F-인자(F-factor) 및 P1 레플리콘(replicon)을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 박테리아 선택마커는 당업계에 알려진 박테리아 선택마커 유전자를 이용할 수 있다. 예를 들어, 박테리아 선택마커 유전자는 암피실린, 카나마이신, 테트라사이클린, 제오신, 네오마이신, 하이그로마이신 및 클로람페니콜 같은 항생제에 대한 저항성을 부여하는 유전자들을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0033] 본 발명의 벡터를 이용하여 형질전환된 효모 세포의 제조는 당업계에 통상적으로 공지된 유전자 전이방법에 의해 실시될 수 있다. 예를 들어, 전기천공법(electroporation), 리튬 아세테이트/DMSO 방법(Hill, J., et al., (1991), DMSO-enhanced whole cell yeast transformation. *Nucleic Acids Res.* 19, 5791), 리포솜-매개 전이방법(Wong, et al., 1980), 레트로바이러스-매개 전이방법(Chen, H.Y., et al., (1990), *J. Reprod. Fert.* 41:173-182; Kopchick, J.J. et al., (1991) Methods for the introduction of recombinant DNA into chicken embryos. In *Transgenic Animals*, ed. N.L. First & F.P. Haseltine, pp.275-293, Boston; Butterworth-Heinemann; Lee, M.-R. and Shuman, R. (1990) *Proc. 4th World Congr. Genet. Appl. Livestock Prod.* 16, 107-110) 등을 이용하여 실시할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0034] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상술한 형질전환은 클루이베로미세스 종(*Kluyveromyces* spp.), 사카로마이세스 종(*Saccharomyces* spp.), 시조사카로마이세스 종(*Schizosaccharomyces* spp.), 피키아 종(*Pichia* spp.), 파피아 종(*Paffia* spp.), 칸디다 종(*Candida* spp.), 탈라로미세스 종(*Talaromyces* spp.), 브레타노미세스 종(*Brettanomyces* spp.), 파키솔렌 종(*Pachysolen* spp.) 또는 데바리오미세스 종(*Debaryomyces* spp.) 효모 스트레인에서 실시하며, 보다 바람직하게는 클루이베로미세스 종 또는 사카로마이세스 종에서 실시하고, 가장 바람직하게는 클루이베로미세스 막시아누스 또는 사카로마이세스 세레비지애에서 실시한다.

발명의 효과

[0035] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0036] (a) 본 발명은 신규한 이중 모듈 효모 발현 벡터(dual module expression vector) 및 이를 이용한 목적 뉴클레오타이드 서열의 형질전환 방법에 관한 것이다.

[0037] (b) 본 발명의 발현 모듈은 멀티 클로닝 위치(multiple cloning site, MCS), 적합한 프로모터 및 터미네이터(terminator)를 포함하는 발현 모듈(expression module) 및 레스큐 모듈(rescue module)을 포함한다.

[0038] (c) 본 발명의 벡터는 효모, 바람직하게는 클루이베로미세스 막시아누스(*Kluyveromyces marxianus*) 또는 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)에서 목적 유전자를 안정적으로 발현시킬 수 있다.

[0039] (d) 본 발명의 벡터를 이용한 형질전환 방법은 목적 유전자를 안정적으로 염색체로 통합시킨 형질전환 효모 스트레인을 제작한 후 상기 효모 스트레인에 또 다른 목적 유전자의 변형을 유발시키는 연속적인 형질전환이 가능함에 따라, 소망하는 산물들(바이오매스)의 산업적 생산에 매우 유용하게 적용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0040] 도 1은 pKMEX11 벡터 맵을 도식적으로 나타내는 도면이다. 상기 플라스미드 pKMEX11은 pBluescript SKII(Stratagene)의 백본에서 구축되었으며, 자가복제서열(autonomous repeating sequence, ARS2)와 멀티 클로닝 위치(multicloning site) 내 제한효소 위치를 포함한다.

도 2는 pKMEX12 벡터 맵을 도식적으로 나타내는 도면이다. 발현 모듈은 상기 pKMEX11의 XhoI과 NotI 사이트에 삽입되었다. 약어: Pro, 프로모터; CS, 목적 뉴클레오타이드 클로닝 사이트; 및 Ter, 터미네이터.

도 3은 pKMEX13 벡터 맵을 도식적으로 나타내는 도면이다. 레스큐 모듈(rescue module; loxP-kanMX-loxP)은 상기 pKMEX11의 NotI과 SacII 사이트에 삽입되었다.

도 4는 pKMEX14 벡터 맵을 도식적으로 나타내는 도면이다. 상기 플라스미드 pKMEX14는 pKMEX12로부터 얻어진 발현 모듈 단편을 pKMEX13에 삽입함으로써 제조하였다.

도 5는 pKMEX21 벡터 맵을 도식적으로 나타내는 도면이다. 상기 플라스미드 pKMEX11은 pBluescript SKII(Stratagene)의 백본에서 구축되었으며, 센트로미어 서열(centromere sequence, CENB/ARS2)와 멀티 클로닝 위치(multicloning site) 내 제한효소 위치를 포함한다.

도 6은 pKMEX22 벡터 맵을 도식적으로 나타내는 도면이다. 발현 모듈은 상기 pKMEX21의 XhoI과 NotI 사이트에 삽입되었다. 약어: Pro, 프로모터; MCS, 목적 뉴클레오타이드 멀티클로닝 사이트; 및 Ter, 터미네이터.

도 7은 pKMEX23 벡터 맵을 도식적으로 나타내는 도면이다. 레스큐 모듈(rescue module; loxP-kanMX-loxP)은 상기 pKMEX21의 NotI과 SacII 사이트에 삽입되었다.

도 8은 pKMEX24 벡터 맵을 도식적으로 나타내는 도면이다. 상기 플라스미드 pKMEX24는 pKMEX22로부터 얻어진 발현 모듈 단편을 pKMEX23에 삽입함으로써 제조하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0041] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0042] 실시예

[0043] 실험재료 및 실험방법

[0044] pKMEX11 벡터의 구축

[0045] 클루비베로미세스 막시아누스(*Kluyveromyces marxianus*)의 자가복제서열(autonomous replicating sequence; KmARS2)은 K. 막시아누스 게놈 DNA를 템플레이트로 Pfu DNA 폴리머라제로 증폭되었으며, 이때 이용된 프라이머 서열(PvuII 위치 포함)은 다음과 같다: 센스 프라이머, 5'-CAGCTGGATCCAAGTCTGAAGGTTGGTTTGGC-3'; 안티센스 프라이머, 5'-CAGCTGGCTGGTAAGCCATCTTCATAGAGGG-3'. 상기 PCR-증폭된 863 bp 단편을 정제하여 pGem-T easy 벡터(Promega)에 클로닝한 후, 시퀀싱하였다. KmARS2 DNA는 PvuII 절단을 통해 상기 플라스미드로부터 제조되었다. 한편, 530 및 975번째 뉴클레오타이드에 PvuII 위치를 포함하는 pBluescript II SK 벡터(Stratagene)를 PvuII로 불완전하게 절단시켜 단일-컷된 2,958 bp 단편을 정제하였다. 상기 2개의 단편들(KmARS2 DNA 및 단일-컷된 단편)을 서로 라이게이션시켰다. KmARS2이 530번째 뉴클레오타이드 위치에 삽입된 클론을 pKMEX11 벡터(3.85 kb)로 명명되었다(도 1). 상기 벡터를 기능적으로 우수한 유전자들의 클로닝에 이용될 수 있다. 상기 벡터에서, 멀티클로닝 위치(multicloning site)는 순서적으로 KpnI, XhoI, SalI, HindIII, EcoRV, EcoRI, SmaI, BamHI, XbaI, NotI, SacII 및 SacI I로 이루어져있다.

[0046] pKMEX12 벡터의 구축

[0047] pKMEX12 벡터는 pKMEX11 벡터로부터 유래된 플라스미드로, 프로모터, 클로닝 위치 및 터미네이터로 이루어진 발현 모듈(expression module)이 pKMEX11 벡터로 삽입된 벡터이다. 상기 발현 모듈 내 프로모터 및 터미네이터는 K. 막시아누스(*K. marxianus*)의 PCLP3(purine-cytosine-like permease)의 프로모터 및 터미네이터가 이용되었다. 프로모터 단편(PCLP3_{pro})은 K. 막시아누스 게놈 DNA를 템플레이트로 Pfu DNA 폴리머라제로 증폭되었으며, 이때 이용된 프라이머 서열은 다음과 같다: 센스 프라이머(XhoI 위치 포함), 5'-CTCGAGGTATTTGATTAAGCTTCGATC-3'; 안티센스 프라이머(SalI 위치 포함), 5'-GTCGACCTCGAGATATTATTCTGTAATC-3'. 상기 PCR-증폭된 단편을 정제하여 pGem-T easy 벡터에 클로닝하고 시퀀싱하여 확인한 후, 상기 벡터를 Xho I 및 Sal I으로 절단하여 얻은 단편을 XhoI/SalI-절단된 pKMEX11 단편에 재-클로닝하였다. 이후, 터미네이터 단편(PCLP3_{ter})은 K. 막시아누스 게놈 DNA를 템플레이트로 Pfu DNA 폴리머라제로 증폭되었으며, 이때 이용된 프라

이며 서열은 다음과 같다: 센스 프라이머(BamHI 위치 포함), 5'-GGATCCTGCGTATCGCATAATGATGG-3'; 안티센스 프라이머(XbaI 위치 포함), 5'-TCTAGATCCGGGTAACAGACAGTGA-3'. 상기 PCR-증폭된 단편을 정제하여 상기 프로모터 단편이 클로닝된 BamHI/XbaI-절단된 벡터에 클로닝하여 4.31 kb의 pKMEX12 벡터를 제조하였다(도 2). 발현될 목적 DNA 단편은 SalI, EcoRI 또는 BamHI에 클로닝될 수 있다. 서로 다른 선택 마커를 가지는 다양한 플라스미드들이 발현 모듈의 한쪽, 바람직하게는 SacII 및 SacI 사이에 마커 유전자를 삽입시킴으로써 구축될 수 있다.

[0048] pKMEX13 벡터의 구축

[0049] 야생형 또는 산업적인 스트레인을 조작하는데 중요한 인자들 중 하나는 이용된 벡터에 존재하는 양성 선택 마커이다. 여러 양성 선택 마커 중에서, loxP 위치를 양쪽에 플랭킹 서열로 가지는 kanMX 컨스트럭트를 포함하는 DNA 단편을 이용하였으며, 상기 kanMX는 K. 막시아누스를 포함하는 효모에서 G418에 대한 저항성을 제공한다(Ribeiro et al., 2007). 상기 2개의 loxP 위치는 Cre 리코비나제(recombinase)에 의해 선택 마커를 레스큐하는 데 이용될 수 있기 때문에(Gueldener et al., 2002), 상기 loxP-kanMX-loxP 서열은 레스큐 모듈로 불려진다. 상기 레스큐 모듈은 pUG6를 템플레이트 및 프라이머(센스 프라이머(NotI 위치 포함), 5'-GCGGCCGCGCTTCGTACGCTCGAGCTCGACAAC-3'; 안티센스 프라이머(SacII 위치 포함), 5'-CCGCGGCTAGTGGATCTGATATCACCTAATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATTAAGGGTCTCGACAGCTCGTTTTC-3')로 Pfu-증폭되었다. 프라이머 쌍을 디자인하는 데 있어서, 원(original) 벡터 내 존재하는 SacI, SalI 및 XhoI 위치를 단일 염기 변화를 통해 제거되었는데, 이는 이후 플라스미드 구축에 유용하다. 1,609 bp의 PCR 단편이 pGem-T easy 벡터에 클로닝되고 시퀀싱된 후, NotI 및 SacII 절단하여 얻어진 단편을 NotI/SacII-절단된 pKMEX11 단편에 클로닝함으로써 5.45 kb의 pKMEX13 벡터를 제조하였다(도 3). 즉, pUG6 벡터로 실시한 바와 같이 pKMEX13은 유전자 파괴를 위해 이용될 수 있다. 선택적으로, pKMEX13은 유전자 파괴를 위한 추가적인 전략을 제공한다: 레스큐 모듈의 업스트림(KpnI, XhoI, SalI, HindIII, EcoRV, EcoRI, SmaI, BamHI, XbaI, 및 NotI 중 2개의 위치를 이용) 및 레스큐 모듈의 다운스트림(SacII와 SacI 사이)을 이용하여 보다 긴 DNA 단편들이 클로닝될 수 있으며, 상기 레스큐 모듈은 효과적인 통합(integration)을 빈번하게 촉진시킨다. 상기 경우에, 형질전환을 위해 선택 DNA 단편들이 업스트림 위치의 상기 2개의 제한효소 중 한 효소 위치와 SacI를 이용한 절단에 의해 제조된다.

[0050] pKMEX14 벡터의 구축

[0051] 하나의 플라스미드 내 발현 모듈 및 레스큐 모듈의 동시 존재는 선택 마커로서 G418을 가지는 발현 벡터를 제조할 수 있게 한다. 발현 모듈은 XhoI와 XbaI의 절단을 통해 pKMEX12 벡터로부터 얻어 XhoI/XbaI-절단된 pKMEX13에 클로닝하여 5.92 kb의 pKMEX14 벡터를 제조하였다(도 4). PCLP3 프로모터는 XhoI과 SalI 사이에 클로닝함으로써 다른 프로모터로 대체될 수 있다. 에피솜(episomal) 유전자 발현 이외에도, pKMEX14의 레스큐 모듈은 XbaI과 NotI 위치만이 더 긴 DNA 단편의 업스트림 클로닝을 위해 유용하다는 점을 제외하고는 상술한 pKMEX13 벡터와 동일한 방식으로 유전자 파괴에 이용될 수 있다. SalI과 EcoRI 또는 BamHI 사이에 목적 유전자의 ORF(open reading frame)가 클로닝된 벡터로부터 유전자 통합을 위한 추가적인 2개의 PCR 단편들이 제조되었다: 프로모터로부터 kanMX의 말단까지를 포함하는 하나의 PCR 단편; 및 ORF로부터 kanMX의 말단까지를 포함하는 또 다른 PCR 단편. 올바르게 통합된 경우, 전자의 PCR 단편은 상기 유전자의 고유 프로모터가 PCLP3 프로모터로 대체된다. 발현 모듈의 차단 시스템으로 인해, 다양한 상동(homologous) 또는 이종(heterologous) 프로모터들이 이용될 수 있다. ORF가 돌연변이된 후자의 PCR 단편의 계층 통합에서, 야생형 ORF가 돌연변이 형태로 대체된다. 상기 단편이 통합된 세포가 단일-카피 유전자를 가지는 반수성 스트레인(haploid strain)으로 대체 후에 생존이 가능하다면, 돌연변이 ORF의 효과는 새로이 획득된 표현형(즉, 야생형 ORF의 부재로 인한 표현형)을 통해 간편하게 검출될 수 있다. 하지만, 증폭될 거대한 크기의 서열은 다음과 같은 문제를 가진다. 즉, PCLP3 프로모터로부터 kanMX 말단까지의 서열은 2,193 bp의 길이로 목적 ORF이 클로닝되는 경우에는 더 큰 크기의 서열이 된다. pKMEX14 벡터의 이용은 상술한 증폭 문제를 다음과 같이 회피할 수 있다: 발현 모듈의 앞 쪽에 존재하는 KpnI/XhoI 위치 및 레스큐 모듈 뒤의 SacII/SacI 위치를 각각 더 긴 DNA 단편들의 업스트림 및 다운스트림 클로닝에 이용한다(또는 방향성이 유지되는 한 역도 가능하다). 따라서, pKMEX14 벡터는 프로모터, ORF, 또는 양자의 대체를 효과적으로 촉진할 수 있는 신규한(unprecedented) 구조를 가진다. 또한, 리보솜 DNA 또는 트랜스포존으로부터 유래된 반복 서열들이 업스트림(KpnI/XhoI) 및 다운스트림(SacII/SacI) 클로

닝 위치에 클로닝 된다면, 기능적으로 유용한 유전자가 무해한 유전자 위치(loci)로 통합될 수 있다. 더 나아가, 상기 통합은 kanMX 마터가 레스큐되는 한 모든 경우에서 반복적으로 실시될 수 있다.

[0052] pKMEX21-24 벡터의 구축

[0053] 일과성 발현을 위한 문제가 없을 지라도, 에피솜 발현을 위한 pKMEX14 벡터의 이용 상에서 발생될 수 있는 하나의 문제는 사카로마이세스 세레비자에(*Saccharomyces cerevisiae*)의 생리학에 기초하여 세포들이 센트로미어(centromere)의 부재로 인해 상기 pKMEX14 벡터를 잃어버리는 것이다. 이에, 본 발명자들은 센트로미어 서열이 도입된 일련의 pKMEX 벡터를 제조하였다. K. 막시아누스에는 2개의 센트로미어-유사 서열이 존재하며, 상기 서열은 ARS(autonomously replicating sequence)과 병치되어 존재한다: (a) ARS1와 존재하는 CENA(Genbank No. Z31562); 및 (b) ARS2와 존재하는 CENB(Genbank No. Z31563).

[0054] 상술한 pKMEX11 시리즈의 구축과 유사하게, CENB/ARS2 서열이 K. 막시아누스 게놈 DNA를 템플레이트로 Pfu DNA 폴리머라제로 증폭되었으며, 이때 이용된 프라이머 서열(PvuII 위치 포함)은 다음과 같다: 센스 프라이머, 5'-CAGCTGGATCCAAGTCTGAAGTTGGTTTGGC-3'; 안티센스 프라이머, 5'-CAGCTGCTTAGTTCACCTTAAACACTCACCGACG-3'. 상기 PCR-증폭된 1,176 bp 단편을 정제하여 pGem-T easy 벡터에 클로닝한 후, 시퀀싱하였다. 상기 서열-확인된 단편이 벡터로부터 PvuII로 절단된 후, 불완전하게 PvuII-절단된 pBluescript II SK 벡터에 클로닝하여 pKMEX21 벡터를 제조하였다(도 5). 상기 제조된 pKMEX21 벡터를 모 플라스미드(parental plasmid)로 하여, pKMEX22, 23 및 24 벡터가 각각 pKMEX12, 13 및 14 벡터에서처럼 동일한 방식으로 제조되었다(도 6 내지 도 8). pKMEX21 벡터 시리즈의 특징은 CENB의 존재를 제외하고는 pKMEX11 벡터 시리즈의 특징과 동일한데, 상기 pKMEX21-24 벡터들은 저-카피 상태의 에피솜으로 유지 및 기능하고 다음 세대로 전달될 것으로 예상된다.

[0055] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술 하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0056] 참고문헌

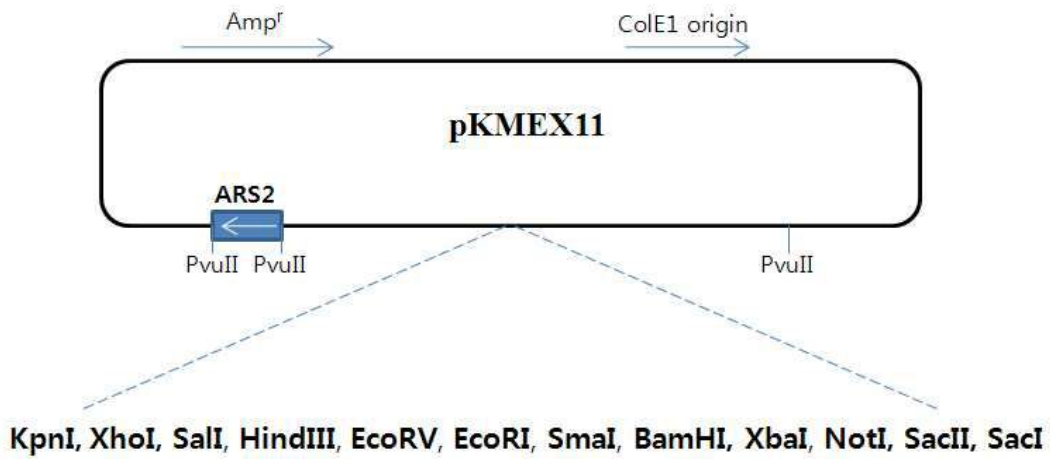
[0057] Guldener, U., Heck, S., Fielder, T., Beinhauer, J. and Hegemann, J. H. A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res.* 24, 25192524(1996).

[0058] Guldener, U., Heinisch, J., Koehler, G. J., Voss, D. and Hegemann, J. H. A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. *Nucleic Acids Res.* 30, e23(2002).

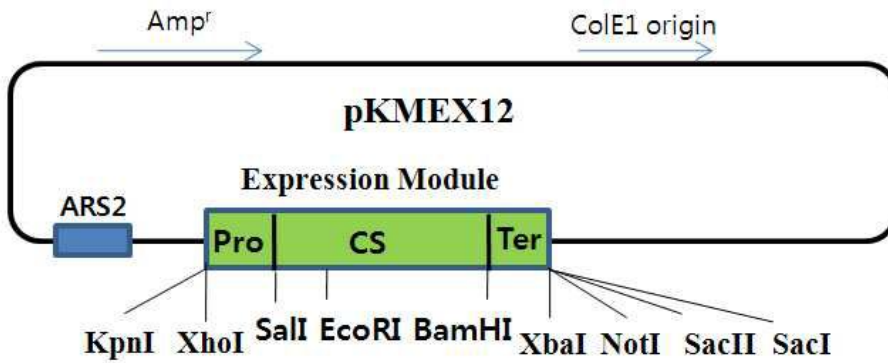
[0059] Ribeiro O., Gombert A. K., Teixeira J. A. and Domingues L. Application of the Cre-loxP system for multiple gene disruption in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *J Biotechnol* 131:2026(2007).

도면

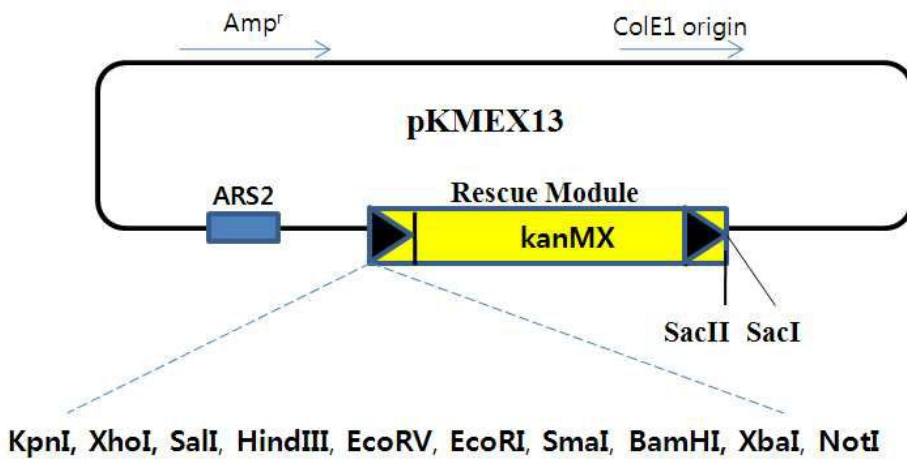
도면1



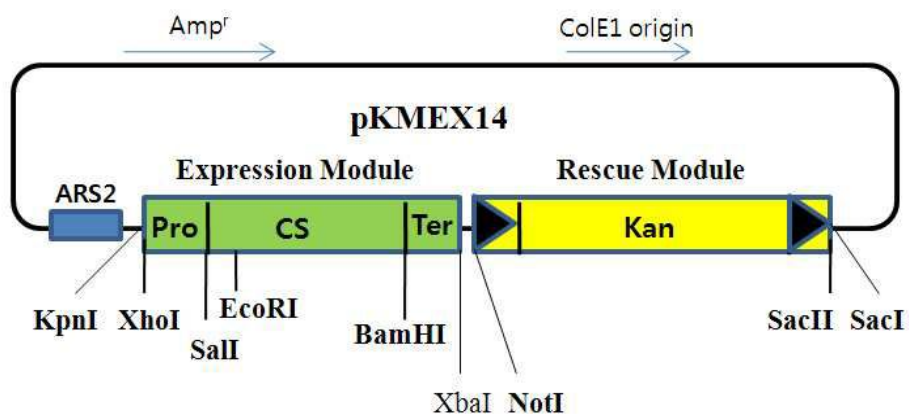
도면2



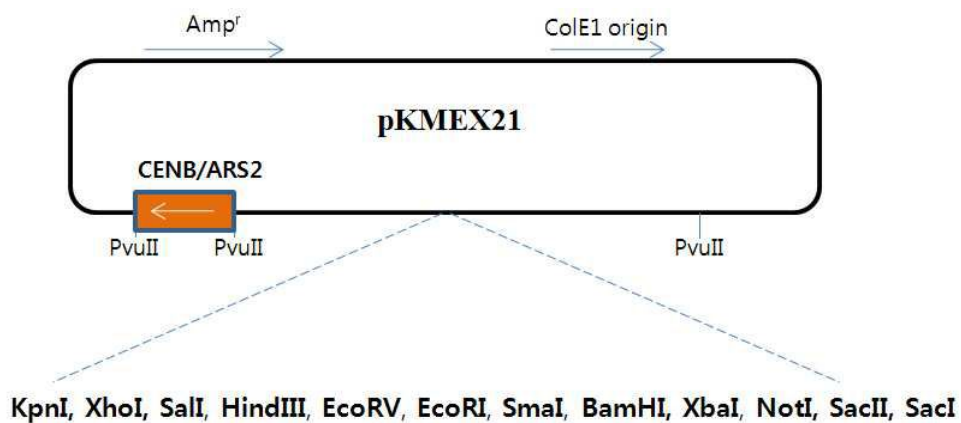
도면3



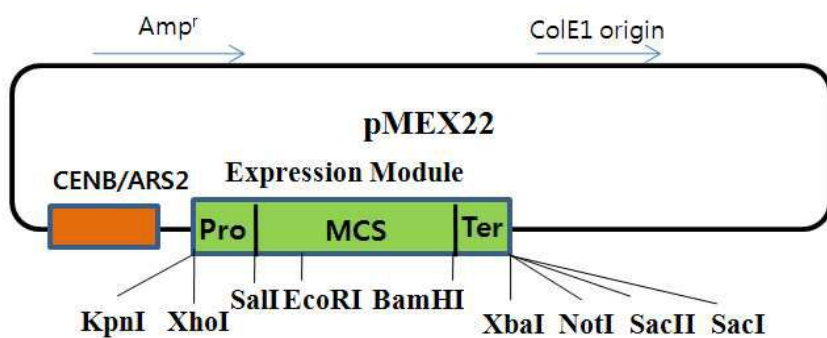
도면4



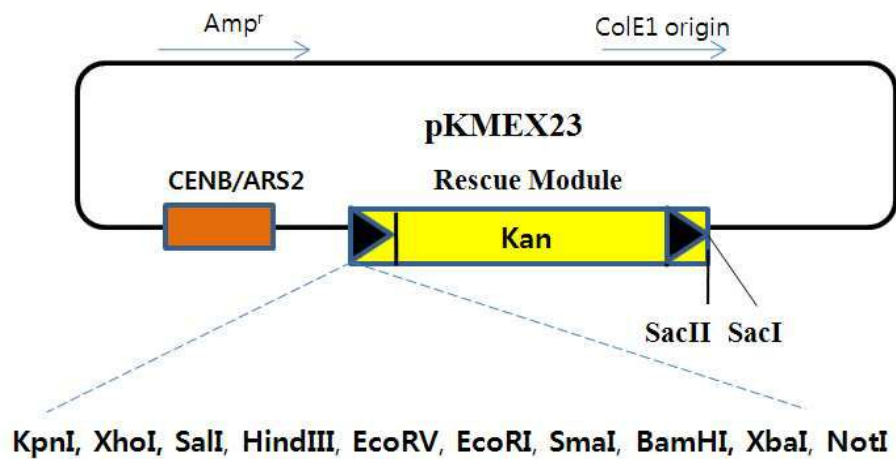
도면5



도면6



도면7



도면8

