(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년03월27일
(11) 등록번호 10-1717214
(24) 등록일자 2017년03월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 11/16 (2006.01) *C12N 15/70* (2006.01)
C12N 15/74 (2006.01) *C12N 15/75* (2006.01)
C12N 15/77 (2006.01) *C12N 9/02* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 11/16 (2013.01)
C07K 14/33 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0171119
(22) 출원일자 2015년12월03일
심사청구일자 2015년12월03일
(56) 선행기술조사문헌
Environ Microbiol., Vol. 16, No. 9, pp. 2879-2890 (2014.09.)*
GenBank Accession No. WP_011154258: prepilin type IV pili [Cupriavidus necator] (2013.05.15.)*
J Bacteriol., Vol. 189, No. 13, pp. 4774-4783 (2007.07.)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
한성옥
서울특별시 성북구 길음로 119, 209동 1503호 (길음동, 길음뉴타운(대우푸르지오아파트))
현정은
서울특별시 성북구 인촌로13길 18-21, 1층 (안암동2가)
신상규
경기도 의정부시 동일로 400, 103동 807호 (장암동, 장암우성아파트)
(74) 대리인
이처영, 장제환

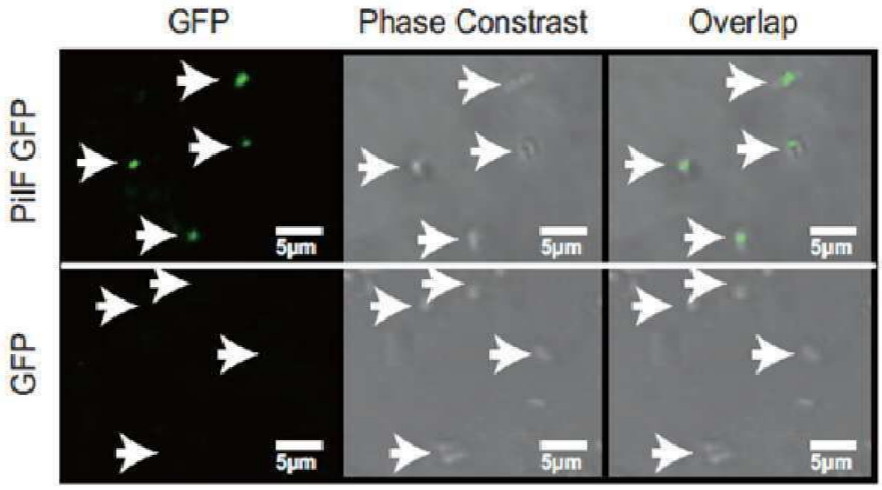
전체 청구항 수 : 총 7 항 심사관 : 퇴_김남경

(54) 발명의 명칭 **효소 복합체의 세포 표면 고정화 방법**

(57) 요 약

본 발명은 목적단백질의 세포표면 고정화 방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 (a) 표면발현 단백질을 코딩하는 유전자와 코히즌 모듈을 가지는 골격단백질을 코딩하는 유전자가 융합되어 발현되도록 연결된 유전자 구조체가 도입되어 있는 재조합 미생물을 배양하여 골격단백질을 세포표면에 고정시키는 단계; (b) 도커린 모듈이 연결된 목적단백질을 상기 재조합 미생물과 접촉시켜 세포 표면에 발현된 골격단백질과의 결합을 통해 목적단백질을 세포표면에 고정시키는 단계; 및 (c) 목적단백질이 세포표면에 고정된 재조합 미생물을 수득하는 단계를 포함하는 목적단백질의 세포표면 고정화 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
C12N 15/70 (2013.01)
C12N 15/74 (2013.01)
C12N 15/75 (2013.01)
C12N 15/77 (2013.01)
C12N 9/0008 (2013.01)
C12Y 102/99002 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 G01201506010245
부처명 산업통상자원부
연구관리전문기관 한국산업기술평가관리원
연구사업명 바이오의료기기산업핵심기술개발
연구과제명 [RCMS]코리네박테리움을 이용한 고부가 바이오플라스틱용 신규 단량체인 Heme의 생물학적 전환 및 이에 기반을 둔 Hemozoin 중합 공정 개발
기 여 율 1/1
주관기관 고려대학교산학협력단
연구기간 2015.06.01 ~ 2016.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

다음 단계를 포함하는 목적단백질의 세포표면 고정화 방법:

(a) 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 타입-IV 필리 단백질을 코딩하는 유전자와 코히즌 모듈을 가지는 골격단백질을 코딩하는 유전자가 융합되어 발현되도록 연결된 유전자 구조체가 도입되어 있는 재조합 미생물을 배양하여 골격단백질을 세포표면에 고정시키는 단계;

(b) 도커린 모듈이 연결된 목적단백질을 상기 재조합 미생물과 접촉시켜 세포 표면에 발현된 골격단백질과의 결합을 통해 목적단백질을 세포표면에 고정시키는 단계; 및

(c) 목적단백질이 세포표면에 고정된 재조합 미생물을 수득하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 코히즌 모듈을 가지는 골격단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 재조합 미생물은 대장균, 랄스토니아 속, 바실러스 속 및 코리네박테리움 속 균주로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 도커린 모듈이 연결된 목적단백질은 도커린 모듈이 연결된 일산화탄소 결합 햄 단백질과 도커린 모듈이 연결된 일산화탄소 디하이드로제네이즈 단백질이 결합되어 있는 효소복합체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 타입-IV 필리 단백질을 코딩하는 유전자와 코히즌 모듈을 가지는 골격단백질을 코딩하는 유전자가 융합되어 발현되도록 연결된 유전자 구조체가 도입되어 있는 도커린 모듈을 포함하는 목적단백질의 세포표면 고정화용 재조합 미생물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 골격단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 재조합 미생물은 대장균, 랄스토니아 속, 바실러스 속 및 코리네박테리움 속의 균주로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 목적단백질의 세포표면 고정화 방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 (a) 표면발현 단백질을 코딩하는 유전자와 코히즌 모듈을 가지는 골격단백질을 코딩하는 유전자가 융합되어 발현되도록 연결된 유전자 구조체가 도입되어 있는 재조합 미생물을 배양하여 골격단백질을 세포표면에 고정시키는 단계; (b) 도커린 모듈이 연결된 목적단백질을 상기 재조합 미생물과 접촉시켜 세포 표면에 발현된 골격단백질과의 결합을 통해 목적단백질을 세포표면에 고정시키는 단계; 및 (c) 목적단백질이 세포표면에 고정된 재조합 미생물을 수득하는 단계를 포함하는 목적단백질의 세포표면 고정화 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 세포 표면발현은 단백질이나 펩타이드 등을 적절한 표면발현 모체(anchoring motif)와 융합시켜서 그램 음성, 양성균, 곰팡이, 효모, 동물세포의 표면에 발현시키는 기술을 말한다 (Lee S. Y., et al., Trends Biotechnol., 21:4552, 2003). 최초의 세포 표면발현 기술은 1980년대 상대적으로 표면이 단순한 파이지를 이용하여 펩타이드나 작은 단백질을 필라멘터스파아지(filamentous phage)의 pIII와 융합하여 발현시켜 이를 표면발현 시스템(surface-expression system)이라고 하였다. 파아지를 이용한 세포 표면발현은 항체의 스크리닝이나, epitope, high-affinity ligand 등의 스크리닝에 사용되었으나, 파아지의 표면에 발현될 수 있는 단백질의 크기가 상대적으로 제한되어 있어서 한계점을 드러내게 되었다. 따라서, 그 대안으로 박테리아를 이용한 세포 표면발현이 개발되었다. 박테리아나 효모와 같은 미생물의 표면 단백질을 표면발현 모체(surface anchoring motif)로 사용하여 외래 단백질을 미생물 표면에 안정적으로 발현시키는 분야이다.

[0003] 특정 유기체의 외막단백질을 이용하여 외래단백질을 세포표면에 발현시키기 위해서는 적당한 표면단백질과 외래단백질을 유전자 수준에서 서로 연결하여 융합단백질이 생합성되도록 하고, 이들이 안정하게 세포내막을 통과하여 세포표면에 부착되어 유지되도록 해야 한다. 이를 위해서는 다음과 같은 성질을 갖는 단백질을 표면발현의 모체로 사용하는 것이 바람직하다: 첫째, 세포내막을 통과할 수 있는 분비신호(secretion signal)를 N-말단에 가지고 있고, 둘째, 세포 외막 표면에 안정적으로 부착될 수 있는 표적신호(targeting signal)를 가져야 하며, 셋째, 세포의 성장에 악영향을 끼치지 않는 범위 내에서 세포표면에 다량으로 발현되어 단백질의 활성이 높게 나타날 수 있으면서, 마지막으로, 단백질의 크기에 관계없이 안정적으로 발현되어 다양한 반응에 이용될 수 있어야 한다 (Georgiou et al., TIBTECH, 11:6, 1993). 이러한 표면발현 모체는 숙주세포의 표면에 외막단백질의 N-말단이나 C-말단, 또는 단백질의 중앙에 삽입되도록 유전적으로 조작할 필요도 있다(Lee et al., TIBTECH, 21:45, 2003).

[0004] 박테리아의 분비 시스템을 응용한 세포 표면발현의 응용 범위는 매우 넓다. 표면에 발현되는 단백질이나 펩타이드 등에 따라 다양한 용도로 사용될 수 있다. 특정 단백질을 표면에 발현하여 펩타이드나 항체, receptor 등의 스크리닝을 간단하게 수행할 수 있고 (Francisco, J. A. R., et al., Proc. Natl. Acad. USA., 91:10444, 1993), 항원 epitope를 세포표면에 발현시켜서 강력한 면역반응을 나타낼 수 있는 생 백신(live vaccine) 생성할 수 있다. 또한 정밀화학, 농약, 의약 등에서 요구되는 특정효소를 세포표면에 발현하여 전세포 생촉매의 용도로 사용하거나, 오염물질을 분해하거나, 금속 이온을 흡착할 수 있는 단백질을 발현하여 bioremediation에 사용할 수 있다 (Charbit, A., et al., Gene., 70:181, 1988; Sousa, C., et al., J. Bacteriol., 180:2280, 1998; Richins, R., et al., Nat. Biotechnol., 15: 984, 1997).

[0005] 현재까지 다양한 종류의 세포표면발현 모체가 보고되어있다. 그러나, 한 세포표면발현 모체로 표면발현시킬 수 있는 대상은 제한되어 다양한 단백질을 세포표면에 발현시키기 위해서는 서로 다른 세포표면 발현모체를 개발하는 것이 필요하다고 할 수 있다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 새로운 세포표면 고정화 방법을 개발하고자 예의 노력한 결과, 세포 표면 고정화 모듈과 코히즌 모듈을 가지는 골격단백질이 융합된 형태로 세포표면에 발현되는 세포에 도커린 모듈이 연결된 목적단백질을 처리하는 경우, 효과적으로 목적단백질을 세포표면에 고정화시킬 수 있다는 것을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 새로운 목적단백질의 세포표면 고정화 방법을 제공하는데 있다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 목적단백질의 세포표면 고정화용 재조합 미생물을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 타입-IV 필리 단백질을 코딩하는 유전자와 코히즌 모듈을 가지는 골격단백질을 코딩하는 유전자가 융합되어 발현되도록 연결된 유전자 구조체가 도입되어 있는 재조합 미생물을 배양하여 골격단백질을 세포표면에 고정시키는 단계; (b) 도커린 모듈이 연결된 목적단백질을 상기 재조합 미생물과 접촉시켜 세포 표면에 발현된 골격단백질과의 결합을 통해 목적단백질을 세포표면에 고정시키는 단계; 및 (c) 목적단백질이 세포표면에 고정된 재조합 미생물을 수득하는 단계를 포함하는 목적단백질의 세포표면 고정화 방법을 제공한다.

[0010] 본 발명은 또한, 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 타입-IV 필리 단백질을 코딩하는 유전자와 코히즌 모듈을 가지는 골격단백질을 코딩하는 유전자가 융합되어 발현되도록 연결된 유전자 구조체가 도입되어 있는 도커린 모듈을 포함하는 목적단백질의 세포표면 고정화용 재조합 미생물을 제공한다.

[0011]

발명의 효과

[0012] 본 발명에 따르면, 효과적으로 목적단백질을 세포표면에 고정화시킬 수 있어, 펩타이드나 항체 등의 스크리닝, 생 백신(live vaccine) 생산, 정밀화학, 농약, 의약 등에서 요구되는 특정효소를 세포표면에 발현하여 전세포 생촉매의 용도로 사용하거나, 오염물질을 분해하거나, 금속 이온을 흡착할 수 있는 단백질을 세포표면에 고정하여 bioremediation에 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 본 발명에서 랄스토니아 속 균주로부터 유래한 세포 표면 고정화 모듈 유전자와 녹색형광 단백질 유전자 및 클로스트리디움 속 균주 유래의 골격 단백질 유전자의 융합을 통해 본 발명에서 제시된 녹생형광 표지 세포 표면 고정화 모듈 PilF GFP 유전자와 세포 표면 고정화 모듈이 융합된 골격 단백질 PilF mCbpA 유전자가 삽입된 재조합 벡터 pET22(+) PilF GFP 와 pET22b(+) PilF mCbpA의 모식도를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명에서 제시된 세포 표면 고정화 모듈이 융합된 재조합 단백질 PilF GFP 가 랄스토니아 속 균주의 세포 표면에 고정화 되는 것을 형광단백질을 통하여 확인한 것을 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명에서 제시된 일산화탄소 전환 효소 복합체의 랄스토니아 속 균주 세포의 고정화를 통한 효과를 확인하기 위하여 일산화탄소를 기질로 사용하여 일산화탄소 전환 효소 복합체의 활성 분석을 실행하여 일산화탄소의 전환 효율 증대를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 본 발명에서는 세포표면 단백질과 코히즌이 융합된 단백질이 표면발현된 세포의 표면에 도커린 모듈이 연결된 목적단백질을 코히즌-도커린 결합을 이용하여 결합시켜, 효과적으로 목적단백질을 세포표면에 고정화시켰다.

[0015] 본 발명에서는 랄스토니아속 균주 유래 타입-IV 필리 단백질을 세포표면 단백질을 코딩하는 유전자와 코히즌 모듈을 가지는 클로스트리디움 속 유래의 골격단백질을 코딩하는 유전자를 연결한 유전자 구조체를 포함하는 벡터를 도입시킨 대장균을 배양하여, 타입-IV 필리 단백질과 골격단백질의 융합단백질을 대장균에서 발현시켰다. 발현이 확인 된 타입-IV 필리 단백질과 골격단백질의 융합단백질을 랄스토니아속 균주의 세포 표면에 고정화시킨 후, 상기 대장균에서 발현된 도커린 모듈이 결합된 녹색형광단백질을 처리하여, 랄스토니아속 균주 표면의 골격단백질의 코히즌과 상기 도커린 결합에 의하여, 녹색형광단백질을 세포표면에 고정화시켰다.

[0016] 따라서, 본 발명은 일관점에서, (a) 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 타입-IV 필리 단백질을 코딩하는 유전자와 코히즌 모듈을 가지는 골격단백질을 코딩하는 유전자가 융합되어 발현되도록 연결된 유전자 구조체가 도입되어 있는 재조합 미생물을 배양하여 골격단백질을 세포표면에 고정시키는 단계; (b) 도커린 모듈이 연결된 목적단백질을 상기 재조합 미생물과 접촉시켜 세포 표면에 발현된 골격단백질과의 결합을 통해 목적단백질을 세

포표면에 고정시키는 단계; 및 (c) 목적단백질이 세포표면에 고정된 재조합 미생물을 수득하는 단계를 포함하는 목적단백질의 세포표면 고정화 방법에 관한 것이다.

[0017] 본 발명에 있어서, 상기 코히즌 모듈을 가지는 골격단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0018] 본 발명에 있어서, 상기 재조합 미생물은 대장균, 랄스토니아 속, 바실러스 속, 코리네박테리움 속 등의 균주로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0019] 본 발명의 일 양태에서는 목적단백질로 도커린 모듈이 연결된 일산화탄소 결합 햄 단백질과 도커린 모듈이 연결된 일산화탄소 디하이드로제네이즈 단백질이 결합되어 있는 효소복합체를 사용하여, 상기 효소복합체가 효과적으로 재조합 대장균의 표면에 고정되는 것을 확인하였다(도 3).

[0020] 따라서, 본 발명의 상기 도커린 모듈이 연결된 목적단백질은 도커린 모듈이 연결된 일산화탄소 결합 햄 단백질과 도커린 모듈이 연결된 일산화탄소 디하이드로제네이즈 단백질이 결합되어 있는 효소복합체인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0021] 다른 관점에서, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 타입-IV 필리 단백질을 코딩하는 유전자와 코히즌 모듈을 가지는 골격단백질을 코딩하는 유전자가 융합되어 발현되도록 연결된 유전자 구조체가 도입되어 있는 도커린 모듈을 포함하는 목적단백질의 세포표면 고정화용 재조합 미생물에 관한 것이다.

[0022] 본 발명에서, “벡터 (vector)”는 적합한 숙주 내에서 DNA를 발현시킬 수 있는 적합한 조절 서열에 작동가능하게 연결된 DNA 서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 벡터는 플라스미드, 파지 입자, 또는 간단하게 잠재적 게놈 삽입물일 수 있다. 적당한 숙주로 형질전환되면, 벡터는 숙주 게놈과 무관하게 복제하고 기능할 수 있거나, 또는 일부 경우에 게놈 그 자체에 통합될 수 있다. 플라스미드가 현재 벡터의 가장 통상적으로 사용되는 형태이므로, 본 발명의 명세서에서 “플라스미드 (plasmid)” 및 “벡터 (vector)”는 때로 상호 교환적으로 사용된다. 본 발명의 목적상, 플라스미드 벡터를 이용하는게 바람직하다. 이러한 목적에 사용될 수 있는 전형적인 플라스미드 벡터는 (a) 숙주세포당 수백 개의 플라스미드 벡터를 포함하도록 복제가 효율적으로 이루어지도록 하는 복제 개시점, (b) 플라스미드 벡터로 형질전환된 숙주세포가 선발될 수 있도록 하는 항생제 내성 유전자 및 (c) 외래 DNA 절편이 삽입될 수 있는 제한효소 절단부위를 포함하는 구조를 지니고 있다. 적절한 제한효소 절단부위가 존재하지 않을지라도, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터(oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용하면 벡터와 외래 DNA를 용이하게 라이게이션(ligation)할 수 있다.

[0023] 라이게이션 후에, 벡터는 적절한 숙주세포로 형질전환 되어야 한다. 본 발명에 있어서, 선호되는 숙주세포는 원핵세포이다. 적합한 원핵 숙주세포는 *E. coli* DH5α, *E. coli* JM101, *E. coli* K12, *E. coli* W3110, *E. coli* X1776, *E. coli* XL-1Blue(Stratagene), *E. coli* B, *E. coli* B21 등을 포함한다. 그러나 FMB101, NM522, NM538 및 NM539와 같은 *E. coli* 균주 및 다른 원핵생물의 종(speices) 및 속(genera)등이 또한 사용될 수 있다. 전술한 E. coli에 덧붙여, 아그로박테리움 A4와 같은 아그로박테리움 속 균주, 바실루스 섭틸리스(*Bacillus subtilis*)와 같은 바실리(bacilli), 살모넬라 타이피뮤리움(*Salmonella typhimurium*) 또는 세라티아 마르게센스(*Serratia marcescens*)와 같은 또 다른 장내세균 및 다양한 슈도모나스(*Pseudomonas*) 속 균주가 숙주세포로서 이용될 수 있다.

[0024] 원핵세포의 형질전환은 Sambrook et al., supra의 1.82 섹션에 기술된 칼슘 클로라이드 방법을 사용해서 용이하게 달성될 수 있다. 선택적으로, 전기천공법(electroporation)(Neumann et al., EMBO J., 1:841, 1982) 또한 이러한 세포들의 형질전환에 사용될 수 있다.

[0025] 본 발명에서 “발현 조절 서열 (expression control sequence)”이라는 표현은 특정한 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열의 발현에 필수적인 DNA 서열을 의미한다. 이러한 조절 서열은 전사를 실시하기 위한 프로모터, 그러한 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보좀 결합 부위를 코딩하는 서열 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다. 예를 들면, 원핵생물에 적합한 조절 서열은 프로모터, 임의로 오퍼레이터 서열 및 리보좀 결합 부위를 포함한다. 진핵세포는 프로모터, 폴리아데닐화 시그날 및 인핸서가 이에 포함된다. 플라스미드에서 유전자의 발현 양에 가장 영향을 미치는 인자는 프로모터이다. 고 발현용의 프로모터로서 SRα 프로모터와 사이토메가로바이러스 (cytomegalovirus) 유래 프로모터 등이 바람직하게 사용된다. 본 발명의 DNA 서열을 발현시키기 위하여, 매우 다양한 발현 조절 서열중 어느 것이라도 벡터에 사용될 수 있다. 유용한 발현 조절서열에는, 예를 들어, SV40 또는 아데노바이러스의 초기 및 후기 프로모터들, lac 시스템, trp 시스템, TAC 또는 TRC 시스템, T3 및 T7 프로모터들, 파지 람다의 주요 오퍼레이터 및 프로모터 영역,

fd 코드 단백질의 조절 영역, 3-포스포글리세레이트 키나제 또는 다른 글리콜분해 효소에 대한 프로모터, 상기 포스파타제의 프로모터들, 예를 들어, Pho5, 효모 알파-교배 시스템의 프로모터 및 원핵세포 또는 진핵 세포 또는 바이러스의 유전자 발현을 조절하는 것으로 알려진 기타 다른 서열 및 이들의 여러 조합이 포함된다. T7 프로모터는 대장균에서 본 발명의 단백질을 발현시키는데 유용하게 사용될 수 있다.

[0026] 핵산은 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 배치될 때 "작동가능하게 연결 (operably linked)"된다. 이것은 적절한 분자 (예를 들면, 전사 활성화 단백질)은 조절 서열(들)에 결합될 때 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결된 유전자 및 조절 서열(들)일 수 있다. 예를 들면, 전서열(pre-sequence) 또는 분비 리더 (leader)에 대한 DNA는 폴리펩타이드의 분비에 참여하는 전단백질로서 발현되는 경우 폴리펩타이드에 대한 DNA에 작동가능하게 연결되고; 프로모터 또는 인핸서는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩서열에 작동가능하게 연결되거나; 또는 리보좀 결합 부위는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결되거나; 또는 리보좀 결합 부위는 번역을 용이하게 하도록 배치되는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로, "작동가능하게 연결된"은 연결된 DNA 서열이 접촉하고, 또한 분비 리더의 경우 접촉하고 리딩 프레임 내에 존재하는것을 의미한다. 그러나, 인핸서 (enhancer)는 접촉할 필요가 없다. 이들 서열의 연결은 편리한 제한 효소 부위에서 라이게이션(연결)에 의해 수행된다. 그러한 부위가 존재하지 않는 경우, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오티드 어댑터 (oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용한다.

[0027] 본원 명세서에 사용된 용어 "발현 벡터"는 통상 이종의 DNA의 단편이 삽입된 재조합 캐리어 (recombinant carrier)로서 일반적으로 이중 가닥의 DNA의 단편을 의미한다. 여기서, 이종 DNA는 숙주 세포에서 천연적으로 발견되지 않는 DNA인 이형 DNA를 의미한다. 발현 벡터는 일단 숙주 세포내에 있으면 숙주 염색체 DNA와 무관하게 복제할 수 있으며 벡터의 수 개의 카피 및 그의 삽입된 (이종) DNA가 생성될 수 있다.

[0028] 당업계에 주지된 바와 같이, 숙주세포에서 형질감염 유전자의 발현 수준을 높이기 위해서는, 해당 유전자가, 선택된 발현 숙주 내에서 기능을 발휘하는 전사 및 해독 발현 조절 서열에 작동가능하도록 연결되어야만 한다. 바람직하게는 발현 조절서열 및 해당 유전자는 세균 선택 마커 및 복제 개시점 (replication origin)을 같이 포함하고 있는 하나의 발현 벡터 내에 포함되게 된다.

[0029] 상술한 발현 벡터에 의해 형질전환 또는 형질감염된 숙주 세포는 본 발명의 또 다른 측면을 구성한다. 본원 명세서에 사용된 용어 "형질전환"은 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체외 인자로서 또는 염색체 통합완성에 의해 복제 가능하게 되는 것을 의미한다. 본원 명세서에 사용된 용어 "형질감염"은 임의의 코딩 서열이 실제로 발현되든 아니든 발현 벡터가 숙주 세포에 의해 수용되는 것을 의미한다.

[0030] 이하 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0031] **실시예 1: 세포표면 고정화 모듈 유전자와 GFP 유전자 및 골격단백질 유전자의 연결 및 클로닝**

[0032] 랄스토니아 속 균주 유래의 세포 표면 고정화 모듈이 융합된 녹색형광 단백질 유전자를 클로닝하기 위하여 랄스토니아 유트로파의 gDNA로부터 Type-IV Pili (T4P) 유전자의 염기서열(서열번호 3)을 참고로 하여 정방향 프라이머(Forward primer)의 5' 제한효소 EcoR I 인식서열이, 역방향프라이머(Reverse primer)의 5'에는 해파리 유래의 녹색형광 단백질 GFP 유전자의 N-terminal 부분의 10bp 크기의 서열이 삽입되도록 프라이머를 디자인하여 합성하였다. 이후 상기 합성된 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과, 514bp의 세포 표면 고정화 모듈 유전자가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인할 수 있었다.

[0033] Type-IV Pili (T4P) -F: gaattcATGGATGGCATTCTCGGGCGCCATCGTTTGGGCCTTCTCGCA(서열번호 5)

[0034] Type-IV Pili (T4P) -R: ttccggatccCTGAAACGTGAGTGTGAACGTCGAGGTGGCGCTGCATG(서열번호 6)

[0035] 또한 해파리의 게놈으로부터 녹색형광 단백질 GFP 유전자의 염기서열(서열번호 7)을 참고로 하여 정방향 프라이머(Forward primer)의 5'에는 랄스토니아 속 균주 유래의 세포 표면 고정화 모듈 유전자의 C-terminal 부분의 10bp 크기의 서열이, 역방향프라이머(Reverse primer)의 5'에는 제한효소 Hind III 인식서열이 삽입되도록 프라이머를 디자인하여 합성하였다. 이후 상기 합성된 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과 730bp의 녹색형광 단백질 GFP 유전자가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인할 수 있었다.

[0036] GFP-F: cacgtttcagGGATCCGGAATAATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGG(서열번호 8)

[0037] GFP-R: aagcttTTTGTATAGTTCATCCATGCCATGTGTAATCCCAG(서열번호 9)

[0038] 일산화탄소 전환 효소 복합체 형성을 위한 랄스토니아 속 균주 유래의 세포 표면 고정화 모듈이 융합된 클로스트리디움 속 균주 유래의 골격 단백질 유전자를 클로닝하기 위하여, 랄스토니아 유트로파의 gDNA로부터 Type-IV Pili (T4P) 유전자의 염기서열(서열번호 3)을 참고로 하여 정방향 프라이머(Forward primer)의 5' 제한효소 EcoR I 인식서열이, 역방향 프라이머(Reverse primer)의 5'에는 클로스트리디움 속 균주 유래의 골격 단백질 유전자의 N-terminal 부분의 10bp 크기의 서열이 삽입되도록 프라이머를 디자인하여 합성하였다. 이후 상기 합성된 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과, 514bp의 세포 표면 고정화 모듈 유전자가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인할 수 있었다.

[0039] T4P-F: GCGCgaattcATGGATGGCATTCTCGGGCGCCATCGTTTGGGCCTTCTCGCA(서열번호 10)

[0040] N-term-R: atgtcgctgcCTGAAACGTGAGTGTGAACGTCGAGGTGGCGCTGCATG(서열번호 11)

[0041] 또한 클로스트리디움 속 균주 유래의 골격 단백질 유전자의 염기서열(서열번호 4)을 참고로 하여 정방향 프라이머(Forward primer)의 5'에는 랄스토니아 속 균주 유래의 세포 표면 고정화 모듈 유전자의 C-terminal 부분의 10bp 크기의 서열이, 역방향프라이머(Reverse primer)의 5'에는 제한효소 Sal I 인식서열이 삽입되도록 프라이머를 디자인하여 합성하였다. 이후 상기 합성된 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과 1647bp의 클로스트리디움 속 균주 유래의 골격 단백질 유전자가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인할 수 있었다.

[0042] 골격 단백질-F:cacgtttcag GCAGCGACAT CATCAATGT(서열번호 12)

[0043] C-term-R:GCGC gtcgac TATAGGATCTCCAATATTTATTGTAA(서열번호 13)

[0044] 랄스토니아 속 균주 유래의 세포 표면 고정화 모듈 유전자와 해파리 유래의 녹색형광 단백질 유전자 GFP 및 클로스트리디움 속 균주 유래의 골격 단백질 유전자 mCbpA의 증폭산물을 0.8% 아가로스 겔 상에서 전기영동하였고 아가로스 겔 상의 DNA 절편은 Gel extraction kit (GeneAll)를 사용하여 회수하였다.

[0045] 그 후 랄스토니아 속 균주 유래의 세포 표면 고정화 모듈 유전자와 해파리 유래의 녹색형광 단백질 유전자 GFP 및 클로스트리디움 속 균주 유래의 골격 단백질 유전자 mCbpA 를 연결하기 위해 회수한 DNA 절편을 이용하여 오버랩(Overlap) PCR 반응을 수행하였다. 회수한 두 DNA 절편으로부터 정방향 프라이머(Forward primer)의 5'에는 제한효소 EcoR I, 역방향프라이머(Reverse primer)의 5'에는 제한효소 Hind III 인식서열 및 제한효소 Sal I 인식서열이 각각 삽입되도록 프라이머를 디자인하여 합성하였다. PCR 반응을 수행한 결과, 1244bp 및 2161bp의 랄스토니아 속 균주 유래의 세포 표면 고정화 모듈 유전자가 연결된 해파리 유래의 녹색형광 단백질 유전자 GFP 및 클로스트리디움 속 균주 유래의 골격 단백질 유전자 mCbpA가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인할 수 있었다.

[0046] 그 후, 세포 표면 고정화 모듈 유전자가 연결된 해파리 유래의 녹색형광 단백질 유전자는 절단한 후 대장균 발현 벡터 (*E. coli* expression vector)인 pET22b(+)에 라이게이션(ligation)시켜 EcoR I 과 Hind III 로 에스세리시아 콜라이 (대장균, *E. coli*) BL21에 형질전환을 하였다. 이어 형질전환체로부터 라이게이션(ligation)된 재조합 플라스미드 DNA를 분리하였다. 상기 재조합 벡터를 pET22b(+) PilF GFP 라 명명하였고 도 1의 A에 나타내었다. 그리고 상기 대장균 형질전환체를 BL21/PilF GFP 명명하였다.

[0047] 또한, 세포 표면 고정화 모듈 유전자가 연결된 클로스트리디움 속 균주 유래의 골격 단백질 유전자 mCbpA는 절단한 후 대장균 발현 벡터 (*E. coli* expression vector)인 pET22b(+)에 라이게이션(ligation)시켜 EcoR I 과 Sal I 으로 에스세리시아 콜라이 (대장균, *E. coli*) BL21에 형질전환을 하였다. 이어 형질전환체로부터 라이게이션(ligation)된 재조합 플라스미드 DNA를 분리하였다. 상기 재조합 벡터를 pET22b(+) PilF mCbpA라 명명하였고 도 1의 B에 나타내었다. 그리고 상기 대장균 형질전환체를 BL21/PilF mCbpA 명명하였다.

[0048] **실시예 2: 대장균 형질전환체의 세포 표면 고정화 모듈 유전자가 연결된 녹색형광 단백질 및 골격 단백질의 세포 표면 고정화**

[0049] 실시예 1에서 확보한 형질전환체의 효소 단백질의 랄스토니아 속 균주의 세포 표면 고정화 여부를 확인하기 위하여, His-Tag을 이용한 정제 후 단백질이 하나의 세포에 함께 부착되어 있는지를 녹색형광 단밸질을 이용하여 시각적으로 확인하였다. 랄스토니아 균주의 배양액에 확보한 단백질을 넣은 후 세포 표면에 고정화 됨을 형광현미경 (본 실시예에서는 confocal laser-scanning microscope LSM 5 Exciter (Carl-Zeiss, Oberkochen, Germany)를 사용하였다.)을 이용하여 확인하였으며, 하나의 세포에서 발현하는지를 상 대조 (phase contrast)그

림에서 확인할 수 있다.

[0050] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 녹색의 형광 염색이 하나의 세포 표면에 강하게 나타나는 것을 확인할 수 있다. 반면, 세포 표면 고정화 모듈이 융합되어 있지 않은 녹색형광 단백질의 경우는 상 대조 그림에서 세포가 분명하게 보이지만, 형광 염색은 전혀 되지 않은 것으로, 형광 염색약이 세포 표면에 임의로 붙어서 발광하는 것이 아님을 확인해 주었다. 이를 통해, 효소 복합체가 성공적으로 세포 표면에 고정될 수 있다는 것을 확인할 수 있다.

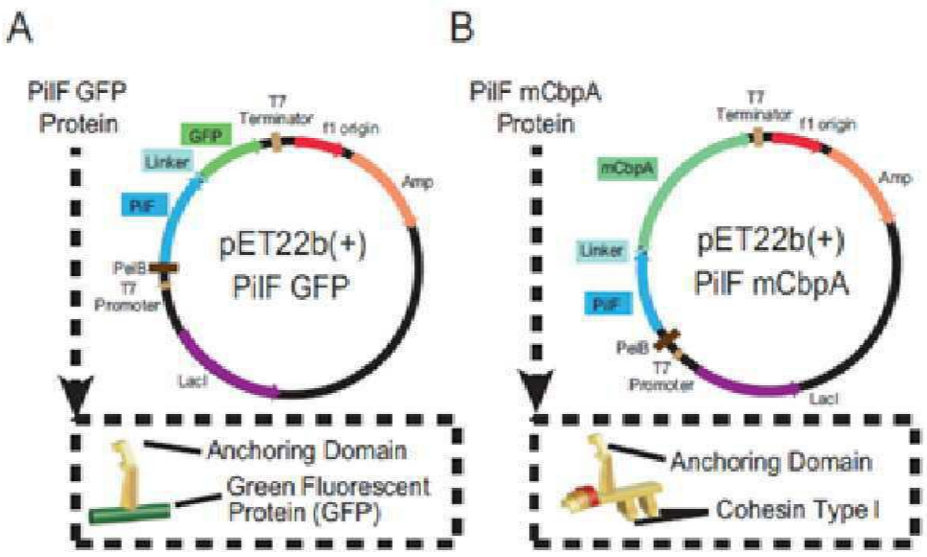
[0051] **실시예 3: 일산화탄소 전환 효소 복합체가 세포 표면에 고정된 랄스토니아 유트로파 균주의 활성 분석**

[0052] 세포 표면 고정화 모듈 유전자가 연결된 클로스트리디움 속 균주 유래의 골격 단백질과 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비 유전자의 도커린 모듈이 연결된 로도스피릴럼 속 균주로부터 유래한 일산화탄소 결합 햄 단백질과 아세토박테리움 속 균주로부터 유래한 일산화탄소 디하이드로제네이즈 단백질의 결합으로 인한 복합체가 고정화된 랄스토니아 유트로파 균주의 일산화탄소 전환 효율을 분석하기 위해 일산화탄소를 기질로 하는 활성 분석을 수행하였다. 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 일산화탄소 전환 효소 복합체가 세포표면에 고정화된 경우, 효소 복합체가 고정되지 않은 대조군에 비해 활성이 증가하는 것을 확인하였다.

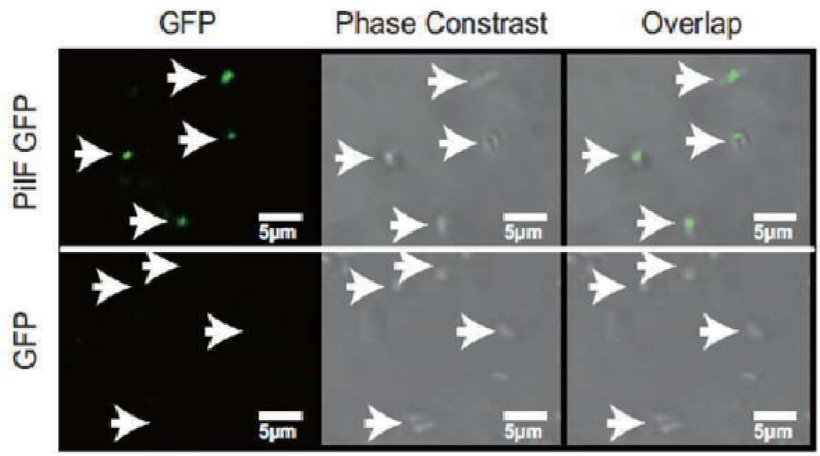
[0053] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

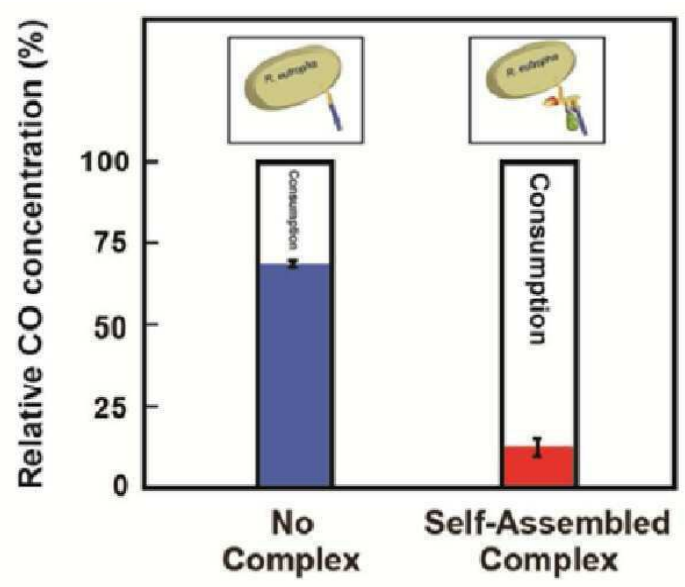
도면1



도면2



도면3



서 열 목 록

<110> Korea University Research & Business Foundation

<120> Method of Cell Surface Display of Enzyme Complex

<130> P15-B281

<160> 13

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 166

<212> PRT

<213> Ralstonia eutropha

<400> 1

Met Asp Gly Ile Leu Gly Arg Ile Val Ala Ile Val Leu Gly Leu Leu
1 5 10 15

Ala Leu Ala Gly Ile Ala Tyr Ala Gly Tyr Asn Gly Phe Gln Asn His
20 25 30

Lys Ala Ser Val Val Ala Thr Asn Ile Ala Gln Leu Ile Thr Asn Ala
35 40 45

Arg Ala Gly Phe Ser Gln Gly Asn Asn Gly Tyr Thr Asn Phe Thr Thr
50 55 60

Ala Asn Val Ala Ser Met Ile Thr Ser Gly Met Phe Pro Ser Asp Met
65 70 75 80

Val Arg Gly Thr Thr Leu Ile Asp Ser Trp Gly Asn Ala Val Thr Leu
85 90 95

Ala Ser Ala Asn Ser Gly Ser Gln Gly Val Ile Thr Phe Gly Gly Gly

100 105 110

Asn Ala Gln Thr Ala Lys Gln Cys Val Ser Thr Ala Leu Gly Leu Lys
115 120 125

Asp Tyr Val Thr Leu Ala Ile Gly Ser Thr Thr Phe Asn Gln Thr Asn
130 135 140

Leu Pro Asp Gln Ala Thr Ala Gly Ala Ala Cys Ser Ala Thr Ser Thr
145 150 155 160

Phe Thr Leu Thr Phe Gln
165

<210> 2

<211> 549

<212> PRT

<213> chlostridium sp.

<400> 2

Ala Ala Thr Ser Ser Met Ser Val Glu Phe Tyr Asn Ser Asn Lys Ser
1 5 10 15

Ala Gln Thr Asn Ser Ile Thr Pro Ile Ile Lys Ile Thr Asn Thr Ser
20 25 30

Asp Ser Asp Leu Asn Leu Asn Asp Val Lys Val Arg Tyr Tyr Tyr Thr
35 40 45
Ser Asp Gly Thr Gln Gly Gln Thr Phe Trp Cys Asp His Ala Gly Ala
50 55 60

Leu Leu Gly Asn Ser Tyr Val Asp Asn Thr Ser Lys Val Thr Ala Asn
65 70 75 80
Phe Val Lys Glu Thr Ala Ser Pro Thr Ser Thr Tyr Asp Thr Tyr Val
85 90 95
Glu Phe Gly Phe Ala Ser Gly Ala Ala Thr Leu Lys Lys Gly Gln Phe
100 105 110
Ile Thr Ile Gln Gly Arg Ile Thr Lys Ser Asp Trp Ser Asn Tyr Thr
115 120 125
Gln Thr Asn Asp Tyr Ser Phe Asp Ala Ser Ser Ser Thr Pro Val Val

130 135 140
Asn Pro Lys Val Thr Gly Tyr Ile Gly Gly Ala Lys Val Leu Gly Thr
145 150 155 160
Ala Pro Gly Pro Asp Val Pro Ser Ser Ile Ile Asn Pro Thr Ser Ala
165 170 175
Thr Phe Asp Lys Asn Val Thr Lys Gln Ala Asp Val Lys Thr Thr Met
180 185 190
Thr Leu Asn Gly Asn Thr Phe Lys Thr Ile Thr Asp Ala Asn Gly Thr
195 200 205

Ala Leu Asn Ala Ser Thr Asp Tyr Ser Val Ser Gly Asn Asp Val Thr
210 215 220
Ile Ser Lys Ala Tyr Leu Ala Lys Gln Ser Val Gly Thr Thr Thr Leu
225 230 235 240
Asn Phe Asn Phe Ser Ala Gly Asn Pro Gln Lys Leu Val Ile Thr Val
245 250 255
Val Asp Thr Pro Val Glu Ala Val Thr Ala Thr Ile Gly Lys Val Gln
260 265 270
Val Asn Ala Gly Glu Thr Val Ala Val Pro Val Asn Leu Thr Lys Val

275 280 285

Pro Ala Ala Gly Leu Ala Thr Ile Glu Leu Pro Leu Thr Phe Asp Ser

290 295 300

Ala Ser Leu Glu Val Val Ser Ile Thr Ala Gly Asp Ile Val Leu Asn

305 310 315 320

Pro Ser Val Asn Phe Ser Ser Thr Val Ser Gly Ser Thr Ile Lys Leu

325 330 335

Leu Phe Leu Asp Asp Thr Leu Gly Ser Gln Leu Ile Thr Lys Asp Gly

340 345 350

Val Phe Ala Thr Ile Thr Phe Lys Ala Lys Ala Ile Thr Gly Thr Thr

355 360 365

Ala Lys Val Thr Ser Val Lys Leu Ala Gly Thr Pro Val Val Gly Asp

370 375 380

Ala Gln Leu Gln Glu Lys Pro Cys Ala Val Asn Pro Gly Thr Val Thr

385 390 395 400

Ile Asn Pro Ile Asp Asn Arg Met Gln Ile Ser Val Gly Thr Ala Thr

405 410 415

Val Lys Ala Gly Glu Ile Ala Ala Val Pro Val Thr Leu Thr Ser Val

420 425 430

Pro Ser Thr Gly Ile Ala Thr Ala Glu Ala Gln Val Ser Phe Asp Ala

435 440 445

Thr Leu Leu Glu Val Ala Ser Val Thr Ala Gly Asp Ile Val Leu Asn

450 455 460

Pro Thr Val Asn Phe Ser Tyr Thr Val Asn Gly Asn Val Ile Lys Leu

465 470 475 480

Leu Phe Leu Asp Asp Thr Leu Gly Ser Gln Leu Ile Ser Lys Asp Gly

485 490 495

Val Phe Val Thr Ile Asn Phe Lys Ala Lys Ala Val Thr Ser Thr Val

500 505 510

Thr Thr Pro Val Thr Val Ser Gly Thr Pro Val Phe Ala Asp Gly Thr

515 520 525

Leu Ala Glu Val Gln Ser Lys Thr Ala Ala Gly Ser Val Thr Ile Asn

530 535 540

Ile Gly Asp Pro Ile

545

<210> 3

<211> 498

<212> DNA

<213> Type-IV Pili

<400> 3

atggatggca ttctcgggcg cattgtcgcc atcgtcttgg gccttctcgc actggctgga 60

attgcctatg cgggctacaa cgggttccag aaccacaagg ccagtgtggt ggcgaccaac 120

atcgcgcagc tgatcacaaa cgctcgcgcc gggttctcgc agggcaacaa cggctatacc 180

aactttacta cggcaaacgt cgcatcgatg atcacgagcg gcatgttccc gtccgacatg 240

gtgcgcggta ccacgctgat cgactcctgg ggaaatgcgg tcacgctcgc gtcggccaat 300

agcggatcgc agggggtgat caccttcggc ggcggcaatg cgcagacggc aaaacagtgt 360

gtcagcaccg cccttggcct caaggactac gtgacgctgg cgatcggatc gacgaccttc 420

aatcagacca acctgcccga ccaggccacc gcaggtgcgg catgcagcgc cacctcgacg 480

ttcacactca cgtttcag 498

<210> 4

<211> 1647

<212> DNA

<213> chlostrdium sp.

<400> 4

gcagcgacat catcaatgtc agttgaattt tacaactcta acaaatcagc acaaacaaac 60

tcaattacac caataatcaa aattactaac acatctgaca gtgatttaaa tttaaatgac 120

gtaaaagtta gatattatta cacaagtgat ggtacacaag gacaaacttt ctggtgtgac 180

catgctggtg cattattagg aaatagctat gttgataaca ctagcaaagt gacagcaaac 240

ttcgttaaag aaacagcaag cccaacatca acctatgata catatgttga atttggattt 300

gcaagcggag cagctactct taaaaaagga caatttataa ctattcaagg aagaataaca 360

aaatcagact ggtcaaacta cactcaaaca aatgactatt catttgatgc aagtagttca 420

acaccagttg taaatccaaa agttacagga tatataggtg gagctaaagt acttggtaca 480

gcaccaggtc cagatgtacc atcttcaata attaatccta cttctgcaac atttgataaa 540

aatgtaacta aacaagcaga tgttaaaact actatgactt taaatggtaa cacatttaaa 600

acaattacag atgcaaacgg tacagctcta aatgcaagca ctgattatag tgtttctgga 660

aatgatgtaa caataagcaa agcttattta gcaaaacaat cagtaggaac aactacatta 720

aactttaact ttagtgcagg aaatcctcaa aaattagtaa ttacagtagt tgacacacca 780

gttgaagctg taacagctac aattggaaaa gtacaagtaa atgctggaga aacggtagca 840

gtaccagtta acttaacaaa agttccagca gctggtttag caacaattga attaccatta 900

acttttgatt ctgcatcatt agaagtagta tcaataactg ctggagatat cgtattaaat 960

ccatcagtaa acttctcttc tacagtaagt ggaagcacaa taaaattatt attcttagat 1020

gatacattag gaagccaatt aatcactaag gatggagttt ttgcaacaat aacatttaaa 1080

gcaaaagcta taactggaac aactgcaaaa gtaacttcag ttaaattagc tggaacacca 1140

gtagttggtg atgcgcaatt acaagaaaaa ccttgtgcag ttaacccagg aacagtaact 1200

atcaatccaa tcgataatag aatgcaaatt tcagttggaa cagcaacagt aaaagctgga 1260

gaaatagcag cagtgccagt aacattaaca agtgttccat caactggaat agcaactgct 1320

gaagcacaag taagttttga tgcaacatta ttagaagtag catcagtaac tgctggagat 1380

atcgtattaa atccaacagt aaacttctct tatacagtaa acggaaatgt aataaaatta 1440

ttattcctag atgatacatt aggaagccaa ttaattagta aagatggagt ttttgtaaca 1500

ataaacttca aagcaaaagc tgtaacaagc acagtaacaa caccagttac agtatcagga 1560

acacctgtat ttgcagatgg tacattagca gaagtacaat ctaaaacagc agcaggtagc 1620

gttacaataa atattggaga tcctata 1647

<210> 5

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 5

gaattcatgg atggcattct cgggcgccat cgtttgggcc ttctcgca 48

<210> 6

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 6

ttccggatcc ctgaaacgtg agtgtgaacg tcgaggtggc gctgcatg 48

<210> 7

<211> 714

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GFP

<400> 7

atgagtaaag gagaagaact tttcactgga gttgtcccaa ttcttgttga attagatggt 60

gatgttaatg ggcacaaatt ttctgtcagt ggagagggtg aaggtgatgc aacatacgga 120

aaacttaccc ttaaatttat ttgcactact ggaaaactac ctgttccatg gccaacactt 180

gtcactactt tcgcgtatgg tcttcaatgc tttgcgagat acccagatca tatgaaacag 240

catgactttt tcaagagtgc catgcccgaa ggttatgtac aggaaagaac tatatttttc 300

aaagatgacg ggaactacaa gacacgtgct gaagtcaagt ttgaaggtga tacccttgtt 360

aatagaatcg agttaaaagg tattgatttt aaagaagatg gaaacattct tggacacaaa 420

ttggaataca actataactc acacaatgta tacatcatgg cagacaaaca aaagaatgga 480

atcaaagtta acttcaaaat tagacacaac attgaagatg gaagcgttca actagcagac 540

cattatcaac aaaatactcc aattggcgat ggccctgtcc ttttaccaga caaccattac 600

ctgtccacac aatctgccct ttcgaaagat cccaacgaaa agagagacca catggtcctt 660

cttgagtttg taacagctgc tgggattaca catggcatgg atgaactata caaa 714

<210> 8

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 8

cacgtttcag ggatccggaa taatgagtaa aggagaagaa cttttcactg g 51

<210> 9

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 9

aagctttttg tatagttcat ccatgccatg tgtaatccca g 41

<210> 10

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 10

gcgcgaattc atggatggca ttctcgggcg ccatcgtttg ggccttctcg ca 52

<210> 11

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 11

atgtcgctgc ctgaaacgtg agtgtgaacg tcgaggtggc gctgcatg 48

<210> 12

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 12

cacgtttcag gcagcgacat catcaatgt 29

<210> 13

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 13

gcgcgtcgac tataggatct ccaatattta ttgtaa 36

【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 6

【변경전】
상기 클로스트리듐 속 유래 골격단백질은
【변경후】
상기 골격단백질은

【직권보정 2】
【보정항목】 청구범위
【보정세부항목】 청구항 7
【변경전】
바실루스
【변경후】
바실러스

【직권보정 3】
【보정항목】 청구범위
【보정세부항목】 청구항 7
【변경전】
속등의
【변경후】
속의