



- (51) 국제특허분류:
C12Q 1/00 (2006.01) C12N 1/12 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2015/003217
- (22) 국제출원일: 2015 년 3 월 31 일 (31.03.2015)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2014-0038634 2014 년 4 월 1 일 (01.04.2014) KR
- (71) 출원인: 인하대학교 산학협력단 (INHA-INDUSTRY PARTNERSHIP INSTITUTE) [KR/KR]; 402-751 인천시 남구 인하로 100, Incheon (KR).
- (72) 발명자: 이철균 (LEE, Choul Gyun); 137-930 서울시 서초구 신반포로 270 (반포동, 반포자이아파트) 104 동 801 호, Seoul (KR). 김동명 (KIM, Dong Myung); 302-841 대전시 서구 둔산로 223 (둔산동, 청솔아파트) 7 동 303 호, Daejeon (KR). 홍성주 (HONG, Seong Joo); 402-

818 인천시 남구 인하로 47 번길 156-3 (용현동, 덕수베스트빌) B 동 402 호, Incheon (KR).

- (74) 대리인: 한윤호 (HAN, Yun Ho); 137-876 서울시 서초구 사임당로 28 나이스빌딩 2층 올민국제특허법률사무소, Seoul (KR).

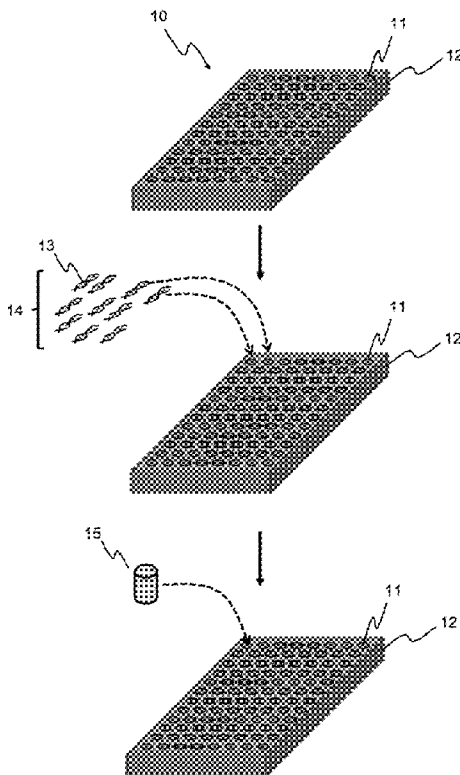
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: HIGH-PERFORMANCE EMPIRICAL ANALYSIS OF METABOLIC PATHWAYS IN MICROALGAE USING CELL-FREE SYSTEM

(54) 발명의 명칭 : 무-세포 시스템을 이용한 미세조류에서의 고성능 대사회로 실증 분석



(57) Abstract: The present invention provides a method of empirical analysis of metabolic pathways using a cell-free system of microalgae for a more efficient and high-performance gene function analysis of the microalgae, the method comprising: a microalgae homogenate preparation step for preparing a microalgae homogenate; a step of treating an effector molecule after loading the microalgae homogenate in a reaction vessel; and a step of comparing the effector molecule with an untreated control group and measuring biological effects according to the treatment of the effector molecule.

(57) 요약서: 본 발명은 보다 효율적이고 고성능인 미세조류의 유전자 기능 분석을 위해, 미세조류 균질액을 준비하는 미세조류 균질액 준비단계; 상기 미세조류 균질액을 반응용기에 담지한 후 효과분자(effector molecule)를 처리하는 단계; 및 상기 효과분자를 처리하지 않은 대조군과 비교하여, 상기 효과분자의 처리에 따른 생물학적 효과를 측정하는 단계를 포함하는, 미세조류 무-세포 시스템을 이용한 대사회로 실증분석방법을 제공한다.



TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, **공개:**

ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,

MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,

SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,

GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

명세서

발명의 명칭: 무-세포 시스템을 이용한 미세조류에서의 고성능 대사회로 실증 분석

기술분야

- [1] 본 발명은 대사회로 분석에 관한 것으로서, 더 상세하게는 무-세포 시스템을 이용한 미세조류에서의 고성능 대사회로 실증 분석에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 합성생물학(synthetic biology)은 생명과학적 이해의 바탕에 공학적 관점을 도입한 학문으로 자연 세계에 존재하지 않는 생물 구성요소와 시스템을 설계제작하거나 자연 세계에 존재하는 생물 시스템을 재설계제작하는 두 가지 분야를 포괄하는데 후자의 의미로 더 많이 사용되고 있다. 생명체를 구성하는 유전자, 단백질 등을 합성하여 고성능, 고효율의 생물학적 시스템을 생산하기 위해 여러 공학기술에서 적용하는 부품화, 표준화, 모듈화라는 개념을 도입하고 있는데, 유전자의 표준화는 다량의 유전자를 사용하는 합성생물학에서 필수과정이다. 유전자의 표준화란 특정 유전체의 특정 종으로 이식가능성과 이식했을 때의 성능을 미리 검증하여 정보체계를 구축하는 것으로 다른 종에서 유래한 유전자를 이식하기 위해 매번 실험 필요가 없어 시간과 비용을 굉장히 단축할 수 있다. 아울러, 게놈 프로젝트에 이은 기능유전체학(functional genomics), 단백질체학(proteomics) 및 대사체학(metabolomics) 등의 발달과 함께 생체 내의 특정 대사에 관여하는 요소들의 네트워크 및 이들의 조절 기전들이 규명되고 있어, 이러한 네트워크 상의 특정 대사회로의 변형, 차단 또는 우회에 의해 해당 대사 양상의 변화를 예측함으로써 보다 고효율적인 생물시스템을 구축하려는 시도가 증가하고 있다.
- [3] 결국 이러한 합성생물학의 성패는 생체 내 존재하는 유전자의 기능에 대한 정확한 이해 여부에 달려 있기 때문에, 특정 생명체에서의 유전자의 정확한 기능을 이해하는 연구는 불가결한 요소이다. 일반적으로 유전자 기능분석을 위해 사용되는 방법은 해당 유전자를 클로닝한 후, 이를 숙주세포에 형질전환시켜 해당 유전자에 의해 암호화되는 단백질을 과발현시키거나 숙주의 내재적 유전자를 킥아웃(knock-out) 또는 킥다운(knock-down)시키는 방법 등이 존재한다. 또는 특정 대사체(metabolite)나 저해제(inhibitor) 등의 조절물질 또는 특정 유전자에 대한 안티센스 올리고뉴클레오티드(antisense oligonucleotide) 또는 siRNA 등의 핵산 분자를 세포내로 형질도입함으로써 대사회로를 변형시켜 그 효과를 분석하는 방법 등을 사용하기도 한다. 유전자의 킥아웃의 경우 통상적으로 무작위적 돌연변이 유발 후 해당 유전자의 기능이 상실된 돌연변이를 선별하거나, 상동성 재조합(homologous recombination)을 이용하여 목적 유전자에 대한 선택적 돌연변이를 유도하는 방법을 사용하는데 최근에는

효율성을 고려하여 후자의 방법이 선호된다.

- [4] 그러나 이와 같은 전통적인 방법들은 세포내로 유전 물질을 전달하기 위해, 형질전환(transformation) 또는 형질감염(transfection)과 같은 유전자 세포내 전달방법에 의존해야 하고, 특히 유전자 녹아아웃의 경우 그 효율이 매우 떨어질 뿐만 아니라, 비교적 게놈이 간단한 원핵생물이나 특정 유전자의 카피수가 낮은 덜 복잡한 진핵세포에서는 매우 유용한 도구이나, 게놈이 복잡한 생명체나 염색체나 미토콘드리아와 같은 세포내 소기관에 존재하는 유전자의 분석에는 적합하지 않다는 단점이 있다. 특히 미세조류의 경우 게놈 염기서열에 대한 정보가 부족하고, 성장속도가 박테리아보다 낮고, 형질전환 효율이 매우 떨어지며, 게놈이 복잡하고(크기 면에서 가장 작게는 2 Mb부터 100 Mb를 초과하기도 하고, 카피 수가 1부터 40을 초과하기도 함) 게놈정보에 대한 기반지식이 불완전하기 때문에 모델링 및 신규 고안(*de novo design*)에 한계가 있다.
- [5] 미세조류에 대하여 외래 유전자를 염색체 내에 안정하게 전달하는 기술들이 개발되고 있으나(US5,661,017, US8,119,859 등), 이들 방법들은 제한된 종에만 특이적으로 적용되거나, 높은 카피수를 갖는 미세조류의 경우 모든 염색체의 동일 위치에 외래 유전자를 삽입하는 것이 현실적으로 불가능하여, 삽입된 외래유전자가 계대를 거듭함에 따라 상실되는 문제점이 발생하곤 한다. 뿐만 아니라, 이렇게 형질전환된 미세조류의 경우 한 번에 하나의 외래 유전자만을 미세조류에 도입할 수 있기 때문에, 복수의 유전자의 도입에 따른 효과를 연구하는 데는 제한이 따른다.
- [6] 따라서, 다양한 종의 미세조류에 범용으로 적용되면서도 미세조류 내의 유전자의 기능 및 이와 관련된 대사회로를 고속대량(high-throughput) 방식으로 실증분석할 수 있는 새로운 접근방법이 요구되고 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 포함하여 여러 문제점들을 해결하기 위한 것으로서, 미세조류에서 유전자의 기능을 고성능으로 분석할 수 있는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다. 그러나 이러한 과제는 예시적인 것으로, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

과제 해결 수단

- [8] 본 발명의 일 관점에 따르면,
- [9] 미세조류 균질액을 준비하는 미세조류 균질액 준비단계;
- [10] 상기 미세조류 균질액을 반응용기에 담지한 후 효과분자를 처리하는 단계; 및
- [11] 상기 효과분자를 처리하지 않은 대조군과 비교하여, 상기 효과분자의 처리에 따른 생물학적 효과를 측정하는 단계를 포함하는 미세조류 무-세포 시스템을 이용한 대사회로 실증분석방법이 제공된다.

- [12] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면,
- [13] 미세조류 균질액을 준비하는 미세조류 균질액 준비단계;
- [14] 상기 미세조류 균질액을 다중웰 반응용기에 담지한 후 효과분자 라이브러리를 처리하는 단계;
- [15] 상기 효과분자의 처리에 따른 생물학적 효과를 측정하는 단계; 및
- [16] 효과분자를 처리하지 않은 대조군과 비교하여 상기 생물학적 효과를 유의하게 변화시킨 효과분자를 선별하는 단계를 포함하는 미세조류 무-세포 시스템을 이용한 고성능 대사회로 실증분석방법이 제공된다.
- [17] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면,
- [18] 미세조류 균질액을 포함하는 미세조류의 고성능 대사회로 실증분석용 키트가 제공된다.

발명의 효과

- [19] 상기한 바와 같이 이루어진 본 발명의 일 실시예에 따르면, 미세조류 세포로의 유전자 전달이나 게놈 내재 유전자의 녹아웃과 같은 복잡하고 비효율적인 유전자 조작 작업 없이, 효과분자를 미세조류 균질액(microbial homogenate)에 단순히 첨가만 함으로써, 신속하게 미세조류 유전자 기능 및 이와 관련된 대사회로에 대한 보다 효율적인 고속대량(high-throughput) 분석을 구현함으로써, 미세조류 합성생물학에 큰 기여를 할 수 있다. 물론 이러한 효과에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

도면의 간단한 설명

- [20] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 미세조류 유전자 분석용 키트를 개략적으로 도시한 개요도이다.
- [21] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 미세조류 유전자 분석방법 또는 효과분자 스크리닝 방법의 공정들을 도식적으로 나타낸 개요도이다.
- [22] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따라 분석이 가능한 아스타잔틴 생합성 대사회로를 개략적으로 나타낸 개요도이다.
- [23] 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따라 분석이 가능한 아스타잔틴 생합성의 전구경로인 테르페노이드(terpenoid) 생합성 경로를 개략적으로 나타낸 개요도이다.
- [24] 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 지방산 메틸 에스테르(FAME)의 생합성 대사회로를 개략적으로 나타낸 개요도이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [25] 용어의 정의:
- [26] 본 문서에서 사용되는 용어 '균질액(homogenate)'는 세포를 파쇄하여 얻은 현탁액을 의미하며, 여기에는 미토콘드리아, 세포핵, 엽록체 등 특정한 세포소기관이 손상되지 않고 포함될 수 있으며, 이들 세포내 소기관까지도 파쇄가 된 것도 포함된다.

- [27] 본 문서에서 사용되는 용어 '효과분자(effector molecule)'은 피검대상이 되는 분자로서 세포 균질액에 첨가할 경우 특정 생물학적 효과가 기대가 되는 분자를 의미한다. 이러한 분자로는 세포 균질액에 첨가시 세포 균질액 내의 전사관련 인자 및 번역관련 인자를 통해 단백질로 발현이 가능한 유전자 컨스트럭트나 특정 유전자의 발현을 억제할 수 있는 안티센스 올리고뉴클레오티드, siRNA, shRNA, miRNA, CRISPRs(clustered regularly interspaced short palindromic repeats) 뉴클레오티드, 또는 TALEN(transcription activator-like effector nuclease) 뉴클레오티드(nucleotide)와 같은 핵산분자나, 특정 단백질의 기능을 억제할 수 있는 항체, 그의 기능성 단편, 앵타머, 또는 작은 화합물일 수 있고, 특정 단백질이 효소일 경우에는 당해 효소의 기질과 유사한 구조를 가지고 있으나, 당해 기질과 경쟁적 또는 비경쟁적으로 당해 효소의 기능을 억제할 수 있는 기질 유사체일 수도 있다. 또는 상기 효과분자는 메타게놈으로부터 유래한 유전자일 수도 있다. 상기 효과분자는 아직 그 생물학적 효과가 검증되지 아니한 분자라는 의미에서 효과분자 후보물질(effector molecule candidate)라는 용어로 대체가 가능하다.
- [28] 본 문서에서 사용되는 용어 "효과분자 라이브러리"는 둘 이상의 동일 계열의 효과분자 또는 효과분자 후보물질의 집합을 의미한다. 이와 같은 라이브러리에는 게놈 라이브러리, cDNA 라이브러리, 앵타머 라이브러리, 항체 라이브러리, 소화합물 라이브러리, 파지 디스플레이 라이브러리 등이 존재한다. 이들 라이브러리에 속한 효과분자 후보물질들을 개별적으로 본 발명의 일 실시예에 따른 스크리닝 방법에 적용시킬 경우, 요구되는 특성을 가진 효과분자 후보물질을 선별할 수 있다.
- [29] 본 문서에서 사용되는 용어 "CRISPR"은 "clustered regulatory interspaced short palindromic repeat)의 약어로서, 핵산서열의 짧은 반복을 포함하는 DNA 좌위를 의미하는데, 2013년 Ran 등에 의해 유전자 편집을 위한 CRISPR/Cas 시스템이 개발되었다(Ran *et al.*, *Cell* 154(6): 1380-1389, 2013). CRISPR/Cas 시스템을 사용하면 Cas9 단백질과 적절한 가이드 RNA를 세포 내로 전달함으로써 생체 내의 게놈 DNA의 원하는 위치를 절단할 수 있다.
- [30] **발명의 상세한 설명:**
- [31] 이하 본 발명을 보다 상세히 설명하기로 한다:
- [32] 본 발명의 일 관점에 따르면,
- [33] 미세조류 균질액을 준비하는 미세조류 균질액 준비단계;
- [34] 상기 미세조류 균질액을 반응용기에 담지한 후 효과분자(effector molecule)를 처리하는 단계; 및
- [35] 상기 효과분자를 처리하지 않은 대조군과 비교하여, 상기 효과분자의 처리에 따른 생물학적 효과를 측정하는 단계를 포함하는, 미세조류 무-세포 시스템을 이용한 대사회로 실증분석방법이 제공된다.
- [36] 상기 방법에 있어서, 상기 미세조류는 *Nostoc* 속, *Anabaena* 속, *Crocospaera* 속,

Cyanothece 속, *Trichormus* 속, *Richella* 속 또는 *Calothrix* 속, 또는 *Botryococcus* 속, *Chlorella* 속, *Cryptocodinium* 속, *Arthrospira* 속, *Cylindrotheca* 속, *Dunaliella* 속, *Isochrysis* 속, *Monallanthus* 속, *Nannochloris* 속, *Nannochloropsis* 속, *Neochloris* 속, *Nitzschia* 속, *Phaeodactylum* 속, *Schizochytrium* 속, *Tetraselmis* 속, 또는 *Haematococcus* 속에 속할 수 있다.

- [37] 상기 방법에 있어서, 상기 미세조류 균질액은 살아 있는 미세조류를 비드비터(bead beater), 균질기(homogenizer), 분쇄기(warring blender) 또는 초음파 분쇄기(sonicator)로 균질화한 후 원심분리에 의해 세포벽 성분을 제거하거나, 셀룰라아제 및/또는 헤미셀룰라아제와 같은 세포벽 분해 효소를 이용하여 세포벽을 분해시킴으로써 제조될 수 있다. 아울러, 상기 미세조류는 핵, 미토콘드리아 및 엽록체와 같은 세포내 소기관도 같이 분쇄시킨 것일 수 있고, 목적에 따라 이들 전부 또는 일부를 보전하거나, 외부로부터 이들 전부 또는 일부를 첨가해 줄 수도 있다. 상기와 같은 미세조류 균질액은 유전자의 전사 및 번역 그리고 번역후 수식은 물론 각종 효소에 의한 대사회로가 그대로 재현될 수 있기 때문에, 형질전환(transformation), 형질감염(transfection), 또는 상동성 재조합(homologous recombination)과 같은 복잡하고 비효율적인 유전자 조작 없이도, 특정 유전자나 저해제 등 효과분자의 세포 내에서의 기능 및 이를 통한 대사회로의 제어모형을 구축하는데 매우 편리하게 사용될 수 있다. 특히, 상기 미세조류 균질액은 광합성 효율성의 연구를 위해서 무손상 엽록체(intact chloroplast)를 포함하고 있을 수 있다. 상기 세포내 소기관은 비중의 차이로 인해 원심분리 또는 초원심분리(ultracentrifugation) 등의 방법으로 분리할 수 있음이 잘 알려져 있다(Michelsen *et al.*, *Methods Enzymol.*, 463: 305-328, 2009; Dashek, W. V., *Methods in Plant Microscopy and Cytochemistry*, 161-167, 2000).

- [38] 상기 방법에 있어서, 상기 효과분자는 특정 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 미세조류에서 작동하는 프로모터에 작동가능하게 연결된 유전자 컨스트럭트, 미세조류에 내재하는 특정 유전자의 발현 또는 기능을 억제할 수 있는 siRNA, shRNA, miRNA, CRISPRs(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, Horvath and Barrangou, *Science*, 327(5962): 167-170, 2010) 뉴클레오티드, 또는 TALEN(transcription activator-like effector nuclease, Boch, *Nat. Biotech.*, 29(2):135-136, 2011) 뉴클레오티드(nucleotide) 또는 안티센스 뉴클레오티드일 수 있고, 미세조류 세포내 단백질의 기능을 저해하는 항체 또는 그의 기능성 단편, 또는 작은 화합물인 저해제일 수 있으며, 미세조류 세포 내 효소의 기질 또는 저해제로 작용하는 기질 유사체일 수 있다.

- [39] 상기 방법에 있어서, 상기 생물학적 효과는 처리된 효과분자의 특성에 따라 적절하게 설정될 수 있다. 예를 들어, 상기 대사회로가 아스타잔틴 생합성 대사경로이고, 상기 처리된 효과분자가 아스타잔틴(astaxanthin)과 같은 색소의 생합성에 관여하는 효소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 유전자 컨스트럭트일 경우(도 3 참조), 상기 생물학적 효과는 아스타잔틴의 생산량의

변화가 될 수 있고, 이 경우 아스타잔틴의 생산량의 변화는 아스타잔틴의 특정 파장(예를 들어, 유용한 생물학적 활성을 갖는 (3S, 3'S)13-trans-astaxanthin의 경우 478.8 nm)에서의 흡광도를 측정함으로써 확인할 수 있으며, 처리된 효과분자가 지질 합성에 관여하는 효소의 조절 후보물질일 경우, 상기 생물학적 효과는 지질 생산량의 변화가 될 수 있고, 이 경우, 지질의 생산량의 Listenberger 등이 보고한 방법을 이용한 형광검출을 이용하여 수행할 수 있다(Listenberger *et al.*, *Curr. Protoc. Cell Biol.*, 2007, Chapter 24, Unit 24.2). 만일 상기 미세조류가 수소 생산 균주이고, 분석 대상 대사회로가 수소 생산 관련 대사회로일 경우, 상기 생물학적 효과는 수소 생산량의 변화로서, 다양한 수소 검출 센서를 통해 수소 생산량의 변화를 확인할 수 있다(Li *et al.*, *Nanoscale Res. Lett.*, 9(1): 118, 2014; Al-Hinai *et al.*, *Faraday Discuss.*, 164: 71-91, 2013). 상기 분석 대상 대사회로가 ATP 생성과 관련된 대사회로일 경우, ATP의 생산량의 변화가 상기 생물학적 효과가 되며, ATP 생산량의 변화는 루시페린과 루시페라아제를 반응용기에 처리한 후 발광계측기(luminometer)로 생물발광정도를 측정함으로써 확인할 수 있다.

- [40] 상기 방법에 있어서, 상기 반응용기는 단일 테스트튜브(single test tube)이거나, 6-웰, 12-웰, 24-웰, 48-웰, 96-웰, 192-웰, 또는 384-웰 마이크로플레이트일 수 있다. 마이크로플레이트에서 수행되는 경우, 동시에 다양한 유전자를 표적으로 하여 고성능 방식(high-throughput)으로 수행될 수 있으며, 더 나아가 마이크로어레이나 미세유체 반응 챔버(microfluidic reaction chamber)를 이용하여 보다 신속하고 고성능 방식으로 수행될 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 따른 방법은 상기와 같이 반응용기에서 반응을 수행함과 동시에 또는 이후에 UV-VIS 분광광도계(spectrophotometer), 형광계측기(flourometer), 또는 발광계측기(luminometer)와 같은 검출장치를 이용하여 바로 상기 생물학적 효과를 확인할 수 있다는 장점을 가지고 있다.
- [41] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면,
- [42] 미세조류 균질액을 준비하는 미세조류 균질액 준비단계;
- [43] 상기 미세조류 균질액을 다중웰 반응용기에 담지한 후 효과분자 라이브러리를 처리하는 단계;
- [44] 상기 효과분자의 처리에 따른 생물학적 효과를 측정하는 단계; 및
- [45] 효과분자를 처리하지 않은 대조군과 비교하여 상기 생물학적 효과를 유의하게 변화시킨 효과분자를 선별하는 단계를 포함하는, 미세조류 무-세포 시스템을 이용한 고성능 대사회로 실증분석방법이 제공된다.
- [46] 상기 스크리닝 방법에 있어서, 상기 미세조류는 *Nostoc* 속, *Anabaena* 속, *Crocospaera* 속, *Cyanothece* 속, *Trichormus* 속, *Richella* 속 또는 *Calothrix* 속, 또는 *Botryococcus* 속, *Chlorella* 속, *Cryptocodinium* 속, *Arthrospira* 속, *Cylindrotheca* 속, *Dunaliella* 속, *Isochrysis* 속, *Monallanthus* 속, *Nannochloris* 속, *Nannochloropsis* 속, *Neochloris* 속, *Nitzschia* 속, *Phaeodactylum* 속, *Schizochytrium*

속, *Tetraselmis* 속, 또는 *Haematococcus* 속에 속할 수 있다.

- [47] 상기 스크리닝 방법에 있어서, 상기 미세조류 균질액은 살아 있는 미세조류를 비드비터(bead beater), 균질기(homogenizer), 분쇄기(warring blender) 또는 초음파 분쇄기(sonicator)로 균질화한 후 원심분리에 의해 세포벽 성분을 제거하거나, 셀룰라아제 및/또는 헤미셀룰라아제와 같은 세포벽 분해 효소를 이용하여 세포벽을 분해시킴으로써 제조될 수 있다. 아울러, 상기 미세조류는 핵, 미토콘드리아 및 엽록체와 같은 세포내 소기관을 분쇄시킨 것일 수 있고, 목적에 따라 이들 전부 또는 일부를 보전하거나, 외부로부터 이들 전부 또는 일부를 첨가해 줄 수도 있다. 특히, 상기 미세조류 균질액은 광합성 효율성의 연구를 위해서 무손상 엽록체(intact chloroplast)를 포함하고 있을 수 있다..

- [48] 상기 스크리닝 방법에 있어서, 상기 효과분자 라이브러리는 특정 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 미세조류에서 작동하는 프로모터에 작동가능하게 연결된 유전자 컨스트럭트 라이브러리, 외부에서 첨가된 RNA 중합효소에 의해 작동하는 프로모터를 가진 유전자 컨스트럭트, 외부에서 전사되어 준비된 mRNA 라이브러리, 미세조류에 내재하는 특정 유전자들의 발현 또는 기능을 억제할 수 있는 siRNA, shRNA, miRNA, 안티센스 뉴클레오티드, CRISPRs(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, Horvath and Barrangou, Science, 327(5962): 167-170, 2010) 뉴클레오티드, 또는 TALEN(transcription activator-like effector nuclease, Boch, Nat. Biotech., 29(2):135-136, 2011) 뉴클레오티드(nucleotide) 라이브러리일 수 있고, 미세조류 세포내 단백질의 기능을 저해하는 항체 또는 그의 기능성 단편, 또는 작은 화합물인 저해제의 라이브러리일 수 있으며, 미세조류 세포 내 효소의 기질 라이브러리 또는 저해제로 작용하는 기질 유사체의 라이브러리일 수 있다. 아울러, 상기 효과분자 라이브러리는 종래에 핵산서열이 알려진 유전자의 무작위 돌연변이체 또는 위치지정 돌연변이체 라이브러리일 수도 있고, 메타게놈(metagenome)으로부터 클로닝된 EST(expressed sequence tag) 라이브러리일 수 있다. 특히 이러한 메타게놈 유래 EST 라이브러리의 경우 난배양 또는 배양 불가능 미세조류가 가지고 있는 다양한 유전정보를 활용할 수 있다는 측면에서 본 발명의 일 실시예에 따른 스크리닝 방법에 적용될 경우, 요구되는 특성을 가진 형질전환 미세조류의 제조는 물론 특정 대사회로에 대한 이해와 미세조류 합성생물학의 발전에 큰 기여를 할 수 있다.

- [49] 상기 스크리닝 방법에 있어서, 상기 생물학적 효과는 상기 처리된 효과분자라이브러리의 특성에 따라 적절하게 설정될 수 있다. 예를 들어, 상기 처리된 효과분자 라이브러리가 아스타잔틴(astaxanthin)과 같은 색소의 생합성에 관여하는 효소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 유전자 컨스트럭트의 라이브러리일 경우, 상기 생물학적 효과는 아스타잔틴의 생산량의 변화가 될 수 있고, 이 경우 아스타잔틴의 생산량의 변화는 아스타잔틴의 특정 파장(예를 들어, 유용한 생물학적 활성을 갖는 (3S,

3'S)13-trans-astaxanthin의 경우 478.8 nm)에서의 흡광도를 측정함으로써 확인할 수 있으며, 상기 처리된 효과분자 라이브러리가 지질 합성에 관여하는 효소의 조절 후보물질일 경우, 상기 생물학적 효과는 지질 생산량의 변화가 될 수 있고, 이 경우, 지질의 생산량의 Listenberger 등이 보고한 방법을 이용한 형광검출을 이용하여 수행할 수 있다(Listenberger *et al.*, *Curr. Protoc. Cell Biol.*, 2007, Chapter 24, Unit 24.2). 만일 상기 미세조류가 수소 생산 균주이고, 분석 대상 유전자가 수소 생산 관련 유전자일 경우, 상기 생물학적 효과는 수소 생산량의 변화로서, 다양한 수소 검출 센서를 통해 수소 생산량의 변화를 확인할 수 있다(Li *et al.*, *Nanoscale Res. Lett.*, 9(1): 118, 2014; Al-Hinai *et al.*, *Faraday Discuss.*, 164: 71-91, 2013). 상기 분석 대상 대사회로가 ATP 생성과 관련된 대사회로일 경우, ATP의 생산량의 변화가 상기 생물학적 효과가 되며, ATP 생산량의 변화는 루시페린과 루시페라아제를 반응용기에 처리한 후 발광계측기(luminometer)로 생물발광정도를 측정함으로써 확인할 수 있다.

- [50] 상기 스크리닝 방법에 있어서, 상기 반응용기는 단일 테스트튜브(single test tube)이거나, 6-웰, 12-웰, 24-웰, 48-웰, 96-웰, 192-웰, 또는 384-웰 마이크로플레이트일 수 있다. 마이크로플레이트에서 수행되는 경우, 동시에 다양한 유전자를 표적으로 하여 고성능 방식(high-throughput)으로 수행될 수 있으며, 더 나아가 마이크로어레이나 미세유체 반응 챔버(microfluidic reaction chamber)를 이용하여 보다 신속하고 고성능 방식으로 수행될 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 따른 방법은 상기와 같이 반응용기에서 반응을 수행함과 동시에 또는 이후에 UV-VIS 분광광도계(spectrophotometer), 형광계측기(flourometer), 또는 발광계측기(luminometer)와 같은 검출장치를 이용하여 바로 상기 생물학적 효과를 확인할 수 있다는 장점을 가지고 있다.
- [51] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 미세조류 균질액을 포함하는 미세조류 유전자의 기능분석용 키트가 제공된다.
- [52] 상기 키트에 있어서, 상기 미세조류는 *Nostoc* 속, *Anabaena* 속, *Crocospaera* 속, *Cyanothece* 속, *Trichormus* 속, *Richella* 속 또는 *Calothrix* 속, 또는 *Botryococcus* 속, *Chlorella* 속, *Cryptocodinium* 속, *Arthrospira* 속, *Cylindrotheca* 속, *Dunaliella* 속, *Isochrysis* 속, *Monallanthus* 속, *Nannochloris* 속, *Nannochloropsis* 속, *Neochloris* 속, *Nitzschia* 속, *Phaeodactylum* 속, *Schizochytrium* 속, *Tetraselmis* 속, 또는 *Haematococcus* 속에 속할 수 있다.
- [53] 상기 키트에 있어서, 상기 미세조류 균질액은 살아 있는 미세조류를 비드비터(bead beater), 균질기(homogenizer), 분쇄기(warring blender) 또는 초음파 분쇄기(sonicator)로 균질화한 후 원심분리에 의해 세포벽 성분을 제거하거나, 셀룰라아제 및/또는 헤미셀룰라아제와 같은 세포벽 분해 효소를 이용하여 세포벽을 분해시킴으로써 제조될 수 있다. 아울러, 상기 미세조류는 핵, 미토콘드리아 및 엽록체와 같은 세포내 소기관을 분쇄시킨 것일 수 있고, 목적에 따라 이들 전부 또는 일부를 보전하거나, 외부로부터 이들 전부 또는 일부를

첨가해 줄 수도 있다.

[54] 상기 키트는 효과분자 라이브러리를 추가로 포함할 수 있다.

[55] 상기 효과분자 라이브러리는 특정 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 미세조류에서 작동하는 프로모터에 작동가능하게 연결된 유전자 컨스트럭트 라이브러리, 미세조류에 내재하는 특정 유전자들의 발현 또는 기능을 억제할 수 있는 siRNA, shRNA, miRNA, 안티센스 뉴클레오티드, CRISPRs(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, Horvath and Barrangou, Science, 327(5962): 167-170, 2011) 뉴클레오티드, 또는 TALEN(transcription activator-like effector nuclease, Boch, *Nat. Biotech.*, 29(2):135-136, 2011) 뉴클레오티드(nucleotide)라이브러리일 수 있고, 미세조류 세포내 단백질의 기능을 저해하는 항체 또는 그의 기능성 단편, 또는 작은 화합물인 저해제의 라이브러리일 수 있으며, 미세조류 세포 내 효소의 기질 라이브러리 또는 저해제로 작용하는 기질 유사체의 라이브러리일 수 있다. 아울러, 상기 효과분자 라이브러리는 종래에 핵산서열이 알려진 유전자의 무작위 돌연변이체 또는 위치지정 돌연변이체 라이브러리일 수도 있고, 메타게놈(metagenome)으로부터 클로닝된 EST(expressed sequence tag) 라이브러리일 수 있다.

[56] 이하, 첨부된 도면들을 참조하여 본 발명의 실시예를 상세히 설명하면 다음과 같다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있는 것으로, 이하의 실시예는 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이다. 또한 설명의 편의를 위하여 도면에서는 구성 요소들이 그 크기가 과장 또는 축소될 수 있다.

[57] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 미세조류 유전자 분석용 키트(10)를 개략적으로 도시한 개요도이다. 미세조류 균질액(11)이 반응용기(12)에 담지된 채로 제공이 되거나, 별도로 제공된 미세조류 균질액(11)을 사용자가 필요에 따라 적절한 양으로 반응용기(12)에 사용직전에 분주하여 사용할 수 있다.

[58] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 미세조류 유전자 분석방법 또는 효과분자 스크리닝 방법의 공정들을 도식적으로 나타낸 개요도이다. 미세조류 균질액(11)을 96-웰 마이크로플레이트인 반응용기(12)에 분주한 후, 분석대상이 되는 효과분자(13) 또는 효과분자 라이브러리(14) 내의 각각의 효과분자(13)를 반응용기(12)의 각 웰에 첨가하여 대사반응을 수행한 후, 필요할 경우 생물학적 변화를 확인하기 위한 반응시약(15)을 처리한 후, 시약에 의한 반응 결과를 각종 계측기 또는 센서를 이용하여 검출한다. 반응산물 자체가 형광을 띄거나 특정 파장에서의 흡광도를 갖는 물질일 경우에는 상기와 같은 별도의 시약(15)의 처리 없이 반응이 종료된 후 곧바로 반응산물의 생성정도를 정량평가할 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

[59] 이하, 본 발명을 실시예를 통해 보다 상세히 설명한다. 그러나, 하기 실시예는

본 발명의 개시를 보다 완벽하게 하고 본 발명에 속한 기술분야의 통상의 기술자에게 본 발명을 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 그에 제한되는 것은 아니다.

[60] **실시예 1: 아스타잔틴 생성 효소 라이브러리의 탐색**

[61] 아스타잔틴 생합성 대사회로는 도 3과 같다. FPP가 *crtE* 및 *crtB*에 의해 라이코펜으로 전환된 후, 라이코펜은 *crtY*에 의해 베타-카로틴으로 전환되며, 베타-카로틴은 *crtZ* 및 *crtW*에 의해 제아잔틴을 거쳐 최종적으로 아스타잔틴이 생성된다. 진핵생물의 경우 상기와 같이 베타-카로틴 및 아스타잔틴 생합성에 관여하는 유전자는 오페론 단위로 조절된다. 따라서, 환경에 존재하되 종래에 분리동정이 되지 않은 미생물에 아스타잔틴 생합성 유전자가 포함되어 있을 가능성이 매우 높다. 이에 종래에 핵산서열이 알려진 아스타잔틴 생합성 관련 유전자들 중 보존도가 높은 부위를 이용하여 메타게놈으로부터 유전자 라이브러리를 구축할 수 있다. 상기와 같이 구축된 메카게놈 유전자 라이브러리에 속한 유전자 중 미세조류에 도입되었을 때 아스타잔틴 생산 수율을 증가시킬 수 있는 유전자를 탐색하기 위해 본 발명의 일 실시예에 따른 스크리닝 방법을 사용할 수 있다.

[62] 구체적으로, 해수로부터 채취한 샘플로부터 아스타잔틴 관련 메타게놈을 추출하여 플라스미드, 포스미드 또는 BAC 벡터에 구축된 라이브러리 DNA 100 ng을 준비한다.

[63] 무균상태에서 아스타잔틴 생합성 미세조류인 *Haematococcus pluvialis* 균주를 배양한 후 원심분리기로 세포를 회수하고 초산마그네슘(magnesium acetate), 초산칼륨(potassium acetate)가 포함된 완충용액에 재부유하고 원심분리과정을 통해 세포를 세척한다. 상기 과정은 3회 반복된다. 세척된 세포를 원심분리를 통해 회수한 후 분쇄기(french press)를 이용하여 세포를 파쇄한다. 세포 파쇄액은 원심분리하여 침전물이 제거된 세포 균질액을 제조한다. 상기에서 준비된 라이브러리가 담긴 96웰 플레이트 2개(대조구 및 실험구)에 상기 세포 균질액 40 μ l를 균일하게 주입하고 무세포합성 시스템을 위한 반응액{HEPES-KOH(최종농도 30 mM, pH 7.6, Merck, USA), $Mg(OAc)_2$ (최종농도 2.5 mM), KOAc(최종농도 75 mM), 아미노산(최종농도 100 μ M), spermidine(최종농도 0.25 mM) 및 에너지재생 요소(최종농도 1.75 mM ATP, 최종농도 0.3 mM GTP, 최종농도 0.3 mM CTP, 최종농도 0.3 mM UTP)} 60 μ l를 추가한다(Stech *et al.*, *PLoS One*, 9(5): e96635, 2014). 대조구에는 아스타잔틴 합성을 위한 전구체로 글리세르알데히드 3-인산(glyceraldehyde 3-phosphatge), 피루브산(pyruvate), 아세틸 CoA(acetyl CoA) 및 메발로네이트(mevalonate)와(도 4), 유기탄소원으로 에너지원{글루코스, 글루코스-6-인산, 프럭토스-1,6-이인산(fructose-1,6-bisphosphate), 3-포스포글리세레이트(3-phosphoglycerate), 포스포페놀 피루베이트(phosphophenol pyruvate) 또는 소듐 피루베이트(sodium pyruvate),

최종농도 33 mM}을 첨가하고, 실험구에는 고광도($1,000 \mu\text{Emol/m}^2/\text{s}$)의 빛과 무기탄소원인 2% 이산화탄소(또는 중탄산나트륨 1 g/L)을 추가한 후 25°C에서 4시간 동안 반응시킨다. 반응을 종료시킨 이후, UV-VIS 분광광도계에서 478.8 nm에서의 흡광도를 측정한다. 이때 상기 흡광도는 DNA 라이브리리를 첨가하지 않은 대조군에서의 흡광도를 제한 상대 흡광도이다. 아스타잔틴의 농도는 아스타잔틴 생합성능이 제거된 돌연변이 *Haematococcus pluvialis* 군주의 균질액에 아스타잔틴을 순차 희석한 표준용액을 이용하여 정량한다.

[64] **실시예 2: 지질 생산 관련 유전자의 탐색**

[65] 미세조류가 생성하는 다양한 지방산으로 바이오디젤을 제조하면, 지방산의 길이나 포화도에 따라 제조된 바이오디젤의 저온유동성, 산화안정성이 달라지게 되며, 에너지밀도도 달라지게 된다. 따라서, 같은 양의 에너지를 이용하여 이들 지방산을 생산할 때, 장소나 계절에 따라 최적의 지방산이 달라질 수 있다. 이들 최적의 지방산을 주요 지방산으로 포함하는 지질을 세포내에 다량 축적하는 미세조류의 선별이나 기존 미세조류의 지질대사 기전을 유전자 조작을 통해 인위적으로 변경함으로써 유용 지방산의 함량을 높이는 방법이 요구된다. 본 발명의 일 실시예에 따른 유전자 분석방법은 지질 대사에 관여하는 다양한 유전자 중 어느 것의 발현을 강화하고 어느 것의 발현을 억제할 경우 유용 지방산의 함량이 높아지고 절대적인 지질의 생산량이 증가하는지 확인하는데 유용하게 사용될 수 있다.

[66] 구체적으로 지질 대사 관련 유전자의 기능을 억제할 수 있는 siRNA 라이브리리를 구축한다. 그런 다음 무균상태에서 무균상태에서 *Chlamydomonas reinhardtii* 군주를 배양한 후 원심분리기로 세포를 회수하고 초산 마그네슘(magnesium acetate), 초산 칼륨(potassium acetate)이 포함된 완충용액에 재부하고 원심분리과정을 통해 세포를 세척한다. 이 과정을 3회 이상 반복한다. 이후, 세척된 세포를 원심분리를 통해 회수한 후 분쇄기(french press)를 이용하여 세포를 파쇄한다. 파쇄액을 원심분리하여 침전물이 제거된 세포 균질액을 제조한다. 세포 균질액 40 μl 와 상기 실시예 1에서 사용된 무세포합성 시스템을 위한 반응액 60 μl 를 상기 구축된 siRNA 라이브리리가 담지된 96 웰 플레이트 2개(대조구, 실험구)에 균일하게 주입한다. 대조구에는 지질 합성을 위한 전구체로 글리세르알데히드 3-인산(glyceraldehyde 3-phosphate), 피루브산(pyruvate), 아세틸 CoA(acetyl CoA) 및 메발로네이트(mevalonate)와(도 5), 유기탄소원으로 에너지원{글루코스, 글루코스-6-인산, 프럭토스-1,6-이인산(fructose-1,6-bisphosphate), 3-포스포글리세레이트(3-phosphoglycerate), 포스포페놀 피루베이트(phosphophenol pyruvate) 또는 소듐 피루베이트(sodium pyruvate), 최종농도 33 mM}을 첨가하고, 실험구에는 40 $\mu\text{Emol/m}^2/\text{s}$ 의 빛과 무기탄소원인 2% 이산화탄소(또는 중탄산나트륨 1 g/L)을 추가한 후 25°C에서 4시간 동안 반응시킨다(도 3). 반응액에 지질과 반응하는 형광시약(Bodipy 또는 Nile red)를

첨가한 후 상온에서 10분동안 반응시키고 형광검출기(Bodipy: 여기파장 488 nm, 방출파장 515 nm; Nile red: 여기파장 530 nm, 방출파장 575 nm)를 이용하여 siRNA가 담지되지 않은 대조군과 형광강도를 비교하여 상대값을 정량한다. 정량은 GC-MS를 이용한 microassay를 통해 수행된다.

[67] **실시예 3: 광합성 효율 개선 관련 유전자의 탐색**

[68] 미세조류는 광합성 명반응을 이용하여 생체에너지 생산하고, 광합성 암반응을 통해 무기탄소원인 CO₂를 유기탄소원 C3 화합물로 합성한다. 따라서, 광합성 효율이 개선되면 무기탄소원으로부터 유기탄소원의 합성이 증가되며 미세조류의 성장성을 높이거나 유용물질의 합성을 증가시킬 수 있다. 이들 광합성 관련 대사경로의 재설계나 효소의 최적화를 유전자 조작을 통해 인위적으로 변경함으로써 광합성 효율을 높이는 방법이 요구된다. 본 발명의 실시예에 따른 대사회로 실증분석방법은 지질 대사에 관여하는 다양한 유전자의 삽입과 제거를 통해 어느 것의 발현을 강화하고 어느 것의 발현을 억제할 경우 미세조류의 생물량이 높아지고 절대적인 광합성 효율이 증가하는지 확인하는데 유용하게 사용될 수 있다.

[69] 구체적으로 광합성 관련 유전자의 기능을 억제 혹은 향상시킬 수 있는 CRISPR(clustered regularly interspaced short palindromic repeats) 라이브러리를 구축한다(Ran *et al.*, *Cell* 154(6): 1380-1389, 2013). 이어, 무균상태에서 *Dunaliella tertiolecta* 균주를 배양 후 원심분리기로 세포를 회수하고 초산 마그네슘(magnesium acetate), 초산 칼륨(potassium acetate)가 포함된 완충용액에 재현탁 및 원심분리과정을 통해 세포를 세척한다. 이 과정을 3회 이상 반복한다. 세척된 세포를 원심분리를 통해 회수한 후 분쇄기(sonicator 등)를 이용하여 세포를 파쇄한다. 파쇄액을 원심분리하여 침전물이 제거된 세포 균질액을 제조한다. CRISPR 플라스미드 라이브러리가 담긴 96 웰 플레이트 2개(대조군 및 실험군)에 세포 균질액 40 µl를 균일하게 주입한 후 상기 실시예 1의 무세포합성 시스템을 위한 반응액 60 µl를 추가한 후 40 µEmol/m²/s의 빛과 무기탄소원인 이산화탄소(또는 중탄산 나트륨 1 g/L)을 추가하고 25°C에서 4시간 반응시킨다. 그런다음 형광검출기를 이용하여 반응액내 엽록체의 형광강도(여기파장 460 nm, 방출파장 698 nm ~ 708nm 또는 730 nm ~ 740 nm)를 측정한다.

[70] **실시예 4: 미세조류 이용 지방산 메틸에스테르(fatty acids methyl ester, FAME) 생산 및 광자가영양/타가영양 조건에 따른 생산성 비교**

[71] 본 발명의 일 실시예에 따른 미세조류 무세포 시스템은 미세조류를 이용한 바이오디젤 생산시 다양한 조건 또는 유전자의 조절에 따른 생산성의 향상 연구에 사용될 수 있다.

[72] 구체적으로, *Synechocystis* sp. 균주를 유리 지방산에서 메틸 에스테르로 생산가능한 *M. marinum* 및 *M. smegmatis* 등 유래의 지방산 메틸기전이효소(fatty acid methyltransferase, FAMT, 도 5) 유전자를 포함한 플라스미드로 형질전환하여 *Synechocystis* sp.의 유전체에 상동재조합을 이용하여 삽입한다(Nawabi *et al.*,

Appl. Environ. Microbiol., 77(22): 80528061, 2011). 형질전환된 *Synechocystis* sp. 균주를 배양 후 원심분리기로 세포를 회수하고 초산 마그네슘(magnesium acetate), 초산 칼륨(potassium acetate)이 포함된 완충용액에 재부하고 원심분리과정을 통해 세포를 세척한다. 이 과정을 3회 이상 반복한다. 세척된 세포를 원심분리를 통해 회수한 후 분쇄기(french press 등)를 이용하여 세포를 파쇄한다. 파쇄액을 원심분리하여 침전물이 제거된 세포 균질액을 제조한다. 無-RNase 원심분리 튜브 2개(대조구, 실험구)에 세포균질액이 포함된 무세포합성 시스템을 위한 반응액[1.2 mM ATP, GTP, UTP, 및 CTP 각각 0.85 mM, 34.0 µg/mL L-5-formyl-5,6,7,8-tetrahydrofolic acid(folinic acid), 170.0 µg/mL tRNA 혼합물, 130 mM 글루탐산 칼륨(potassium glutamate), 10 mM 글루탐산 암모늄(ammonium glutamate), 12 mM 글루탐산 마그네슘(magnesium glutamate), 20 아미노산 각각 2 mM, 0.33 mM 니코틴아마이드 아데닌 이핵산(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD), 0.27 mM 코엔자임-A(Co-A), 1.5 mM 스퍼미딘(spermidine), 1 mM 푸트레신(putrescine), 4 mM 옥살산 나트륨(sodium oxalate), 100 µg/mL T7 RNA 중합효소, 에너지 재생 요소{포스포에놀피루브산(phosphoenolpyruvate), 폴리인산(polyphosphate), 크레아틴-인산(creatine-phosphate) 등} 및 27% v/v 세포균질액)] 15 µl를 추가한다. 대조구에는 아스타잔틴 합성을 위한 전구체와 유기탄소원으로 에너지원{글루코스, 글루코스-6-인산, 프럭토스-1,6-이인산(fructose-1,6-bisphosphate), 3-포스포글리세레이트(3-phosphoglycerate), 포스포페놀 피루베이트(phosphophenol pyruvate) 또는 소듐 피루베이트(sodium pyruvate), 최종농도 33 mM}을 첨가하고, 실험구에는 20 µEmol/m²/s의 빛과 무기탄소원인 2% 이산화탄소(또는 중탄산나트륨 1 g/L)을 추가한 후 30°C에서 4시간 동안 반응시킨다(도 5). 최종적으로 가스 크로마토그래피(GC)를 이용하여 균질액 내 FAME 함량을 측정한다.

- [73] 상술한 바와 같이, 본 발명의 일 실시예에 따른 실증분석 방법 및 이를 위한 키트는 세포내로의 유전자 전달을 위한 시약의 사용이 필요 없고, 세포막의 수용체에 결합하여 세포내로 신호를 전달하는 리간드 외에 세포 내에서 작용하는 다양한 효과분자를 세포막을 통과할 수 있는지 여부와 무관하게, 미세조류 균질액에 직접 처리함으로써 해당 효과분자의 생물학적 효과를 신속하고 대량으로 분석하는 것이 가능하며, 다양한 효과분자를 조합처리함으로써, 다중 요인 분석이 용이하기 때문에, 종래에 통상적인 유전공학적인 접근방법에 의해 연구하기 어려웠던 미세조류의 대사회로 관련 연구 및 미세조류 합성생물학의 연구에 큰 기여를 할 수 있을 것이다.
- [74] 본 발명은 도면에 도시된 실시예를 참고로 설명되었으나 이는 예시적인 것에 불과하며, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 다른 실시예가 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서 본 발명의

진정한 기술적 보호 범위는 첨부된 특허청구범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.

산업상 이용가능성

- [75] 본 발명의 일 실시예에 따른 무-세포 시스템을 이용한 미세조류에서의 고성능 대사회로 실증 분석방법은 합성생물학을 위한 분석도구로 사용될 수 있으며, 바이오디젤 생산을 위한 미세조류의 개량 등에 사용될 수 있다.

청구범위

- [청구항 1] 미세조류 균질액을 준비하는 미세조류 균질액 준비단계;
상기 미세조류 균질액을 반응용기에 담지한 후 효과분자(effector molecule)를 처리하는 단계; 및
상기 효과분자를 처리하지 않은 대조군과 비교하여, 상기 효과분자의 처리에 따른 생물학적 효과를 측정하는 단계를 포함하는, 미세조류 무-세포 시스템을 이용한 대사회로 실증분석방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 미세조류는 *Nostoc* 속, *Anabaena* 속, *Crocospaera* 속, *Cyanothece* 속, *Trichormus* 속, *Richella* 속 또는 *Calothrix* 속, 또는 *Botryococcus* 속, *Chlorella* 속, *Cryptocodinium* 속, *Arthrospira* 속, *Cylindrotheca* 속, *Dunaliella* 속, *Isochrysis* 속, *Monallanthus* 속, *Nannochloris* 속, *Nannochloropsis* 속, *Neochloris* 속, *Nitzschia* 속, *Phaeodactylum* 속, *Schizochytrium* 속, *Tetraselmis* 속, 또는 *Haematococcus* 속의 미세조류인, 미세조류 무-세포 시스템을 이용한 대사회로 실증분석방법.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 미세조류 균질액은 살아 있는 미세조류를 비드비터(bead beater), 균질기(homogenizer), 분쇄기(warring blender) 또는 초음파 분쇄기(sonicator)로 균질화한 후 원심분리에 의해 세포벽 성분을 제거하거나, 셀룰라아제 및/또는 헤미셀룰라아제와 같은 세포벽 분해 효소를 이용하여 세포벽을 분해시킴으로써 제조되는, 미세조류 무-세포 시스템을 이용한 대사회로 실증분석방법.
- [청구항 4] 제3항에 있어서,
상기 효과분자는 특정 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 미세조류에서 작동하는 프로모터에 작동가능하게 연결된 유전자 컨스트럭트, 미세조류에 내재하는 특정 유전자의 발현 또는 기능을 억제할 수 있는 siRNA, shRNA, miRNA, CRISPRs 뉴클레오티드, TALEN 뉴클레오티드 또는 안티센스 뉴클레오티드, 또는 미세조류 세포내 단백질의 기능을 저해하는 항체 또는 그의 기능성 단편, 작은 화합물인 저해제, 또는 미세조류 세포 내 효소의 기질 또는 저해제로 작용하는 기질 유사체인, 미세조류 무-세포 시스템을 이용한 대사회로 실증분석방법.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 반응용기는 단일 테스트튜브(single test tube), 6-웰, 12-웰, 24-웰, 48-웰, 96-웰, 192-웰, 또는 384-웰 마이크로플레이트,

마이크로어레이 또는 미세유체 챔버인, 미세조류 유전자의 기능분석 방법.

[청구항 6]

미세조류 균질액을 준비하는 미세조류 균질액 준비단계;
상기 미세조류 균질액을 다중웰 반응용기에 담지한 후 효과분자 라이브러리를 처리하는 단계;
상기 효과분자의 처리에 따른 생물학적 효과를 측정하는 단계; 및
효과분자를 처리하지 않은 대조군과 비교하여 상기 생물학적 효과를 유의하게 변화시킨 효과분자를 선별하는 단계를 포함하는, 미세조류 무-세포 시스템을 이용한 고성능 대사회로 실증분석방법.

[청구항 7]

제6항에 있어서,
상기 미세조류는 *Nostoc* 속, *Anabaena* 속, *Crocospaera* 속, *Cyanothece* 속, *Trichormus* 속, *Richella* 속 또는 *Calothrix* 속, 또는 *Botryococcus* 속, *Chlorella* 속, *Cryptocodinium* 속, *Arthrospira* 속, *Cylindrotheca* 속, *Dunaliella* 속, *Isochrysis* 속, *Monallanthus* 속, *Nannochloris* 속, *Nannochloropsis* 속, *Neochloris* 속, *Nitzschia* 속, *Phaeodactylum* 속, *Schizochytrium* 속, *Tetraselmis* 속, 또는 *Haematococcus* 속의 미세조류인, 미세조류 무-세포 시스템을 이용한 고성능 대사회로 실증분석방법.

[청구항 8]

제6항에 있어서,
상기 미세조류 균질액은 살아 있는 미세조류를 비드비터(bead beater), 균질기(homogenizer), 분쇄기(warring blender) 또는 초음파 분쇄기(sonicator)로 균질화한 후 원심분리에 의해 세포벽 성분을 제거하거나, 셀룰라아제 및/또는 헤미셀룰라아제와 같은 세포벽 분해 효소를 이용하여 세포벽을 분해시킴으로써 제조되는, 미세조류 무-세포 시스템을 이용한 고성능 대사회로 실증분석방법.

[청구항 9]

제6항에 있어서,
상기 효과분자 라이브러리는 특정 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 미세조류에서 작동하는 프로모터에 작동가능하게 연결된 유전자 컨스트럭트 라이브러리, 외부에서 첨가된 RNA 중합효소에 의해 작동하는 프로모터를 가진 유전자 컨스트럭트, 외부에서 전사되어 준비된 mRNA 라이브러리, 미세조류에 내재하는 특정 유전자들의 발현 또는 기능을 억제할 수 있는 siRNA, shRNA, miRNA, CRISPRs 뉴클레오티드, TALEN 뉴클레오티드 또는 안티센스 뉴클레오티드 라이브러리, 미세조류 세포내 단백질의 기능을 저해하는 항체 또는 그의 기능성 단편의 라이브러리, 또는 작은 화합물인 저해제의 라이브러리, 미세조류

세포 내 효소의 기질 라이브러리 또는 저해제로 작용하는 기질 유사체의 라이브러리 또는 공지의 유전자의 무작위 돌연변이체 또는 위치지정 돌연변이체 라이브러리 또는 메타게놈(metagenome)으로부터 클로닝된 EST(expressed sequence tag) 라이브러리를, 미세조류 무-세포 시스템을 이용한 고성능 대사회로 실증분석방법.

[청구항 10]

제6항에 있어서,
상기 반응용기는 단일 테스트튜브(single test tube), 6-웰, 12-웰, 24-웰, 48-웰, 96-웰, 192-웰, 또는 384-웰 마이크로플레이트, 마이크로어레, 또는 미세유체 반응 챔버(microfluidic reaction chamber)인, 미세조류 무-세포 시스템을 이용한 고성능 대사회로 실증분석방법.

[청구항 11]

미세조류 균질액을 포함하는 미세조류 무-세포 시스템을 이용한 고성능 대사회로 실증분석용 키트.

[청구항 12]

제11항에 있어서,
상기 미세조류는 *Nostoc* 속, *Anabaena* 속, *Crocospaera* 속, *Cyanothece* 속, *Trichormus* 속, *Richella* 속 또는 *Calothrix* 속, 또는 *Botryococcus* 속, *Chlorella* 속, *Cryptocodinium* 속, *Arthrospira* 속, *Cylindrotheca* 속, *Dunaliella* 속, *Isochrysis* 속, *Monallanthus* 속, *Nannochloris* 속, *Nannochloropsis* 속, *Neochloris* 속, *Nitzschia* 속, *Phaeodactylum* 속, *Schizochytrium* 속, *Tetraselmis* 속, 또는 *Haematococcus* 속의 미세조류인, 미세조류 무-세포 시스템을 이용한 고성능 대사회로 실증분석용 키트.

[청구항 13]

제11항에 있어서,
상기 미세조류 균질액은 살아 있는 미세조류를 비드비터(bead beater), 균질기(homogenizer), 분쇄기(warring blender) 또는 초음파 분쇄기(sonicator)로 균질화한 후 원심분리에 의해 세포벽 성분을 제거하거나, 셀룰라아제 및/또는 헤미셀룰라아제와 같은 세포벽 분해 효소를 이용하여 세포벽을 분해시킴으로써 제조되는, 미세조류 무-세포 시스템을 이용한 고성능 대사회로 실증분석용 키트.

[청구항 14]

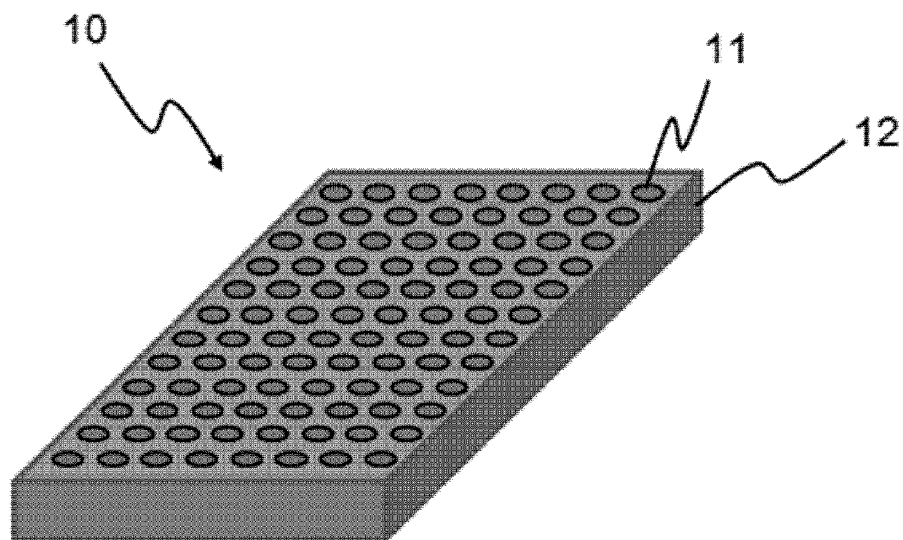
제11항에 있어서,
효과분자 라이브러리를 추가로 포함하는, 미세조류 무-세포 시스템을 이용한 고성능 대사회로 실증분석용 키트.

[청구항 15]

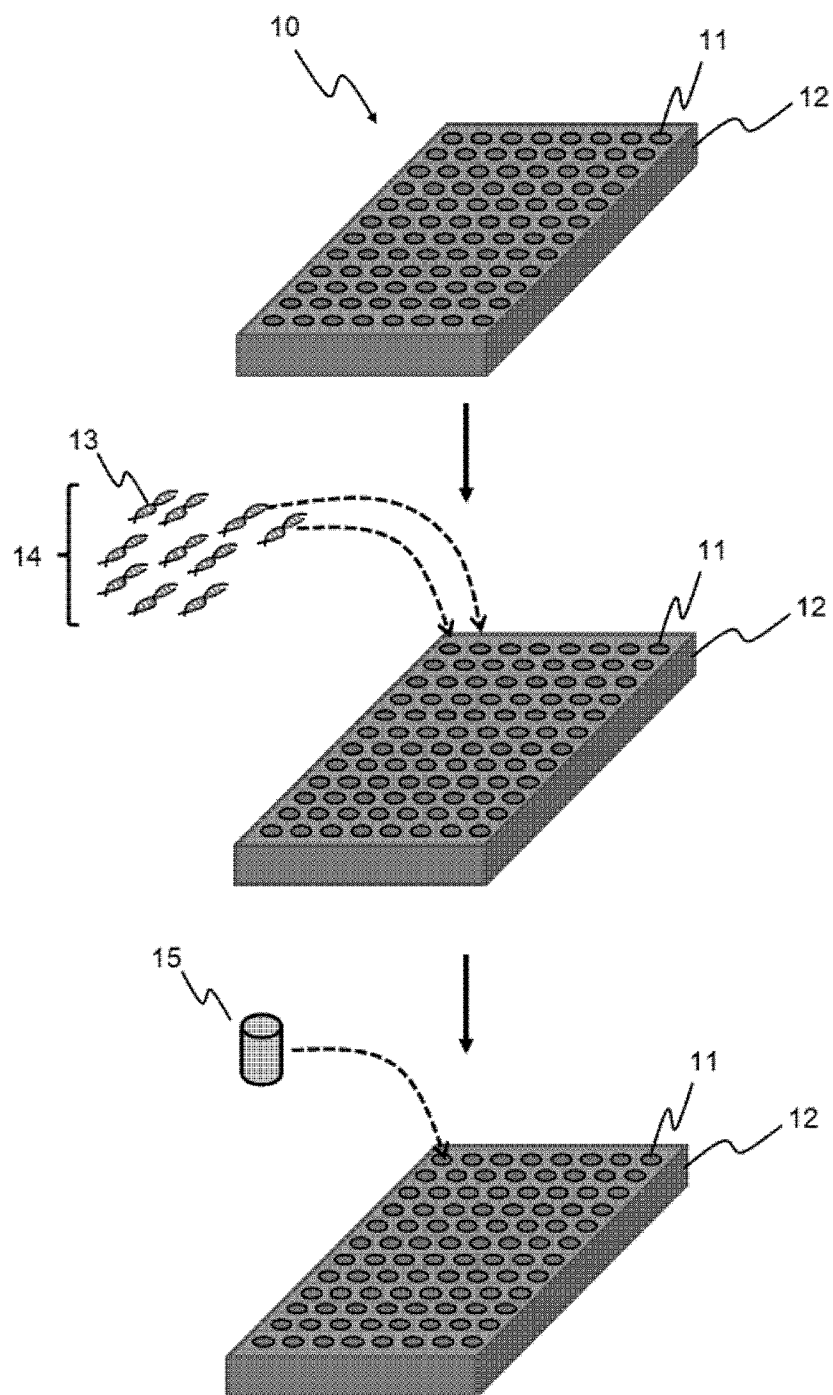
제14항에 있어서,
상기 효과분자 라이브러리는 특정 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 미세조류에서 작동하는 프로모터에 작동가능하게 연결된 유전자 컨스트럭트 라이브러리, 미세조류에

내재하는 특정 유전자들의 발현 또는 기능을 억제할 수 있는 siRNA, shRNA, miRNA, CRISPRs 뉴클레오티드, TALEN 뉴클레오티드 또는 안티센스 뉴클레오티드 라이브러리, 미세조류 세포내 단백질의 기능을 저해하는 항체 또는 그의 기능성 단편의 라이브러리, 또는 작은 화합물인 저해제의 라이브러리, 미세조류 세포 내 효소의 기질 라이브러리 또는 저해제로 작용하는 기질 유사체의 라이브러리 또는 공지의 유전자의 무작위 돌연변이체 또는 위치지정 돌연변이체 라이브러리 또는 메타게놈(metagenome)으로부터 클로닝된 EST(expressed sequence tag) 라이브러리인, 미세조류 유전자의 기능분석용 키트.

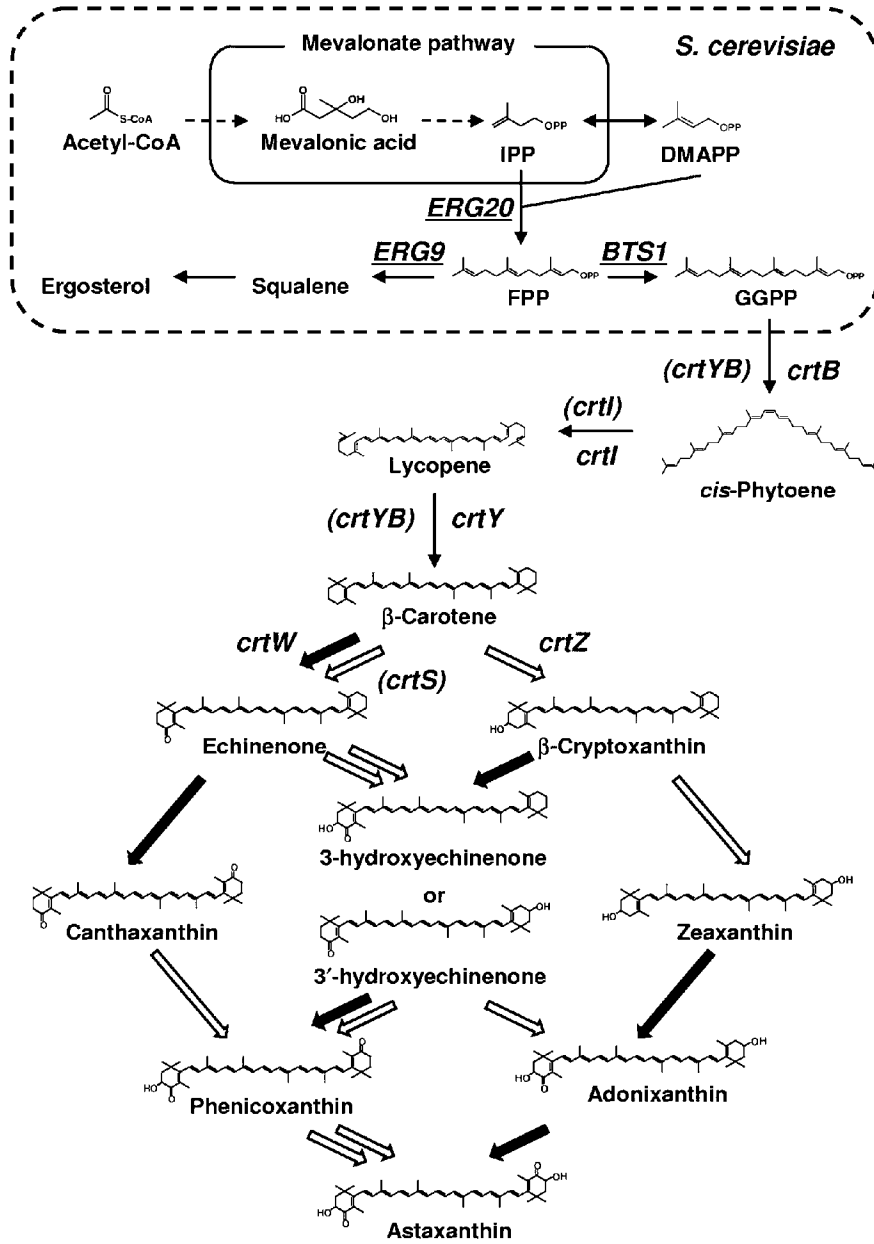
[도1]



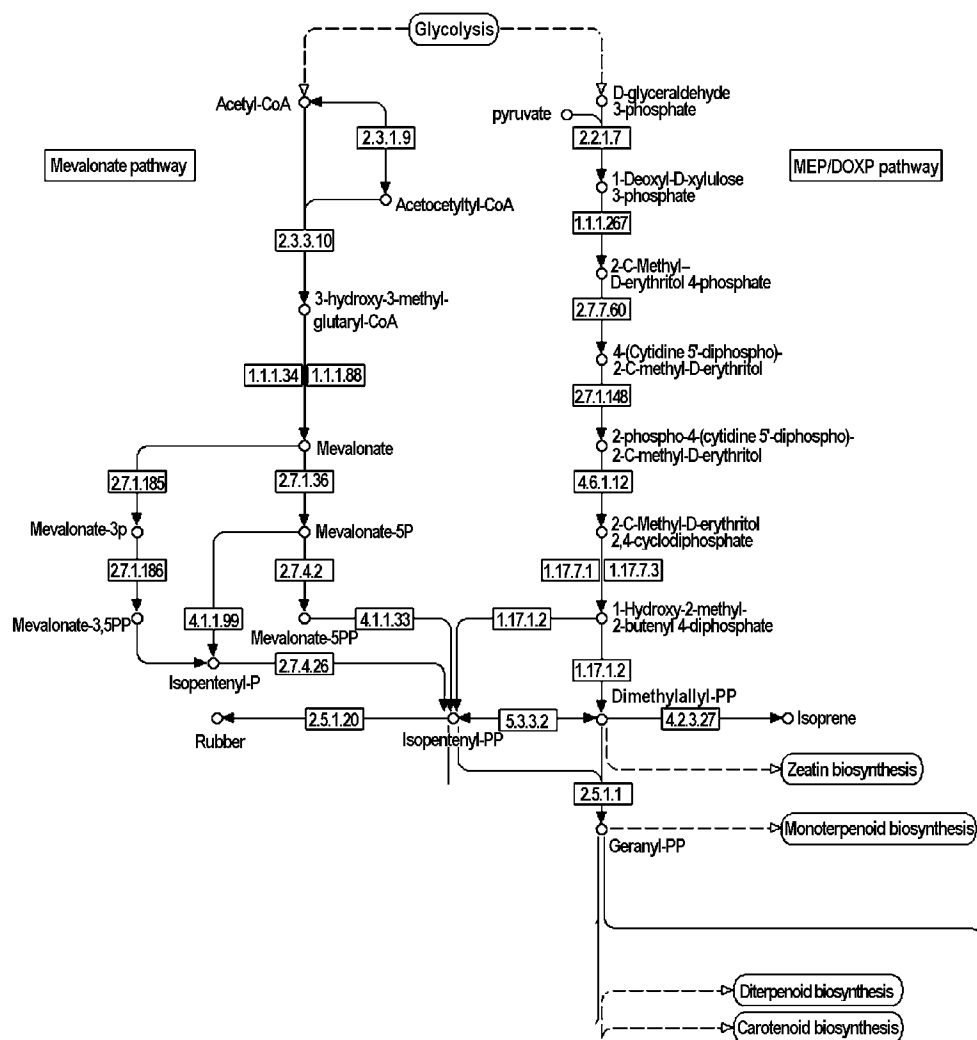
[도2]



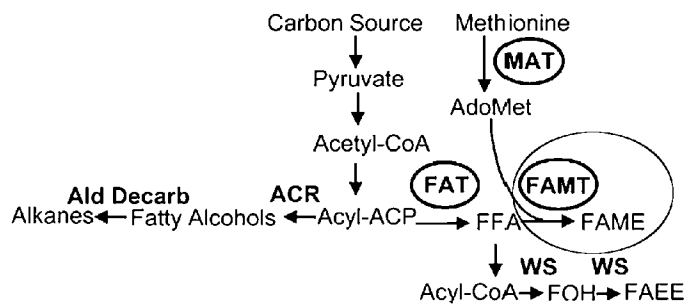
[도3]



[도4]



[도5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/003217**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12Q 1/00(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i, C12N 1/12(2006.01)i***

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q 1/00; C12P 7/08; C10L 1/02; C12Q 1/04; G01N 33/24; C12N 1/12; C12P 5/00; C12P 7/64; C12Q 1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: microalgal homogenate, effector molecule, metabolic pathway empirical analysis**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SONG et al., "The comparison of promoter activity, using a simplified microalgal in vitro transcription" The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering, Proceedings of Current Biotechnology and Bioengineering(XXVIII), Vol. 2011, No. 1, pp. 257 (2011) See page 257.	1-15
A	WO 2013-028952 A2 (RUTGERS, THE STATE UNIVERSITY OF NEW JERSEY) 28 February 2013 See abstract; and claims 1-14.	1-15
A	KR 10-2013-0022694 A (INDUSTRY FOUNDATION OF CHONNAM NATIONAL UNIVERSITY) 07 March 2013 See abstract; and claims 1-9.	1-15
A	KR 10-2013-0000887 A (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCI) 03 January 2013 See the entire document.	1-15
A	KR 10-2000-0000842 A (KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 15 January 2000 See the entire document.	1-15
A	KR 10-2000-0000843 A (KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 15 January 2000 See the entire document.	1-15



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

09 JUNE 2015 (09.06.2015)

Date of mailing of the international search report

09 JUNE 2015 (09.06.2015)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/003217

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2013-028952 A2	28/02/2013	US 2014-0303386 A1 WO 2013-028952 A3	09/10/2014 08/05/2014
KR 10-2013-0022694 A	07/03/2013	KR 10-1280894 B1	05/07/2013
KR 10-2013-0000887 A	03/01/2013	KR 10-1424855 B1	01/08/2014
KR 10-2000-0000842 A	15/01/2000	KR 10-0320786 B1	13/05/2002
KR 10-2000-0000843 A	15/01/2000	NONE	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12Q 1/00(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i, C12N 1/12(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12Q 1/00; C12P 7/08; C10L 1/02; C12Q 1/04; G01N 33/24; C12N 1/12; C12P 5/00; C12P 7/64; C12Q 1/68

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 미세조류 균질액, 효과분자, 대사회로 실증분석

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	SONG 외, 'The comparison of promoter activity, using a simplified microalgal in vitro transcription' 한국생물공학회, 생물공학의 동향(XXVIII), Vol.2011, No.1, pp.257 (2011) 페이지 257 참조.	1-15
A	WO 2013-028952 A2 (RUTGERS, THE STATE UNIVERSITY OF NEW JERSEY) 2013.02.28 요약; 및 청구항 1-14 참조.	1-15
A	KR 10-2013-0022694 A (전남대학교산학협력단) 2013.03.07 요약; 및 청구항 1-9 참조.	1-15
A	KR 10-2013-0000887 A (한국생명공학연구원) 2013.01.03 전체 문헌 참조.	1-15
A	KR 10-2000-0000842 A (한국과학기술연구원) 2000.01.15 전체 문헌 참조.	1-15
A	KR 10-2000-0000843 A (한국과학기술연구원) 2000.01.15 전체 문헌 참조.	1-15

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2015년 06월 09일 (09.06.2015)

국제조사보고서 발송일

2015년 06월 09일 (09.06.2015)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

김승범

전화번호 +82-42-481-3371



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2013-028952 A2	2013/02/28	US 2014-0303386 A1 WO 2013-028952 A3	2014/10/09 2014/05/08
KR 10-2013-0022694 A	2013/03/07	KR 10-1280894 B1	2013/07/05
KR 10-2013-0000887 A	2013/01/03	KR 10-1424855 B1	2014/08/01
KR 10-2000-0000842 A	2000/01/15	KR 10-0320786 B1	2002/05/13
KR 10-2000-0000843 A	2000/01/15	없음	