(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0079204
(43) 공개일자 2022년06월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/70 (2006.01) *C07K 14/245* (2006.01)
C12N 15/90 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/70 (2013.01)
C07K 14/245 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0168736
(22) 출원일자 2020년12월04일
심사청구일자 2020년12월04일

(71) 출원인
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(72) 발명자
로버트 제임스 미첼
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
장효찬
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
리앤목특허법인

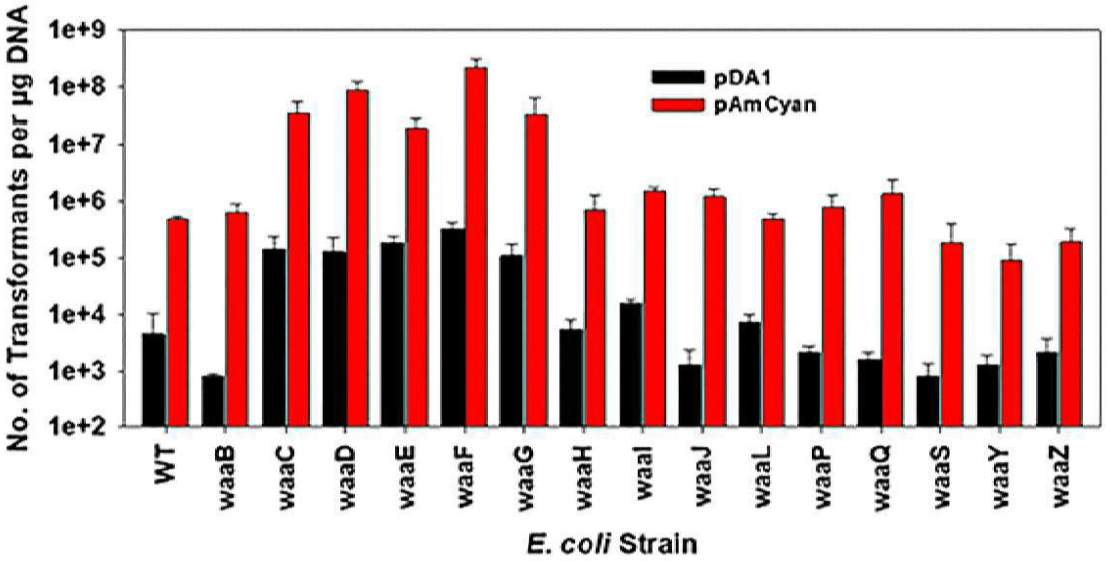
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **형질전환 효율이 증가한 재조합 대장균 및 이를 이용한 방법**

(57) 요 약

모세포보다 형질전환 효율이 증가한 재조합 대장균, 상기 재조합 대장균을 제조하는 방법 및 재조합 대장균의 형질 전환 효율을 증가시키는 방법에 관한 것이다. 일 양상에 따른 LPS의 내부 코어 관련 유전자인 waaC, waaD, waaE, waaF, 및 waaG로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 유전자를 불활성화시키는 경우, 재조합 대장균은 형질전환 효율이 상승하여, 더 나은 품질의 수용성 세포(competent cell)로의 제조가 가능하다. 따라서, 상기 재조합 대장균을 활용하는 경우 대장균에 있어서 전기천공을 포함한 형질전환 방법의 효율을 종래 대비 약 70 내지 450배 이상 효과적으로 증진시킬 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12N 15/90 (2013.01)
(72) 발명자
최성열
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
소 마베쿠 산드린
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711107849
과제번호	2020R1A2C2012158
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	포식미생물을 이용한 CRE 병원균의 제거와 항생제 내성 DNA, 단백질 분해
기 여 율	1/1
과제수행기관명	울산과학기술원
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

지질 다당류(lipopolysaccharide)의 내부 코어(Inner core) 관련 유전자가 불활성화된, 모세포보다 벡터의 형질전환 효율이 증가한 재조합 대장균.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 내부 코어 관련 유전자는 *waaC*, *waaD*, *waaE*, *waaF*, 및 *waaG*로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것인 재조합 대장균.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 형질전환은 화학적(chemical), 또는 물리적(physical) 방법에 의한 것인 재조합 대장균.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 화학적 방법은 인산 칼슘($CaPO_4$) 침전, 염화 칼슘($CaCl_2$) 침전, 폴리에틸렌글리콜(PEG), 덱스트란 설페이트, 또는 리포펙타민의 첨가에 의한 것이고, 상기 물리적 방법은 전기천공법(electroporation), 전자총(particle bombardment), 또는 온도 쇼크(heat shock)에 의한 것인 재조합 대장균.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 벡터는 플라스미드(plasmid), 파지미드(phagemid) 및 코스미드(cosmid)로 이루어진 군에서 선택된 것인 재조합 대장균.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 벡터는 1 내지 20kb의 크기를 가진 것인 재조합 대장균.

청구항 7

지질 다당류(lipopolysaccharide)의 내부 코어(Inner core)와 관련된 *waaC*, *waaD*, *waaE*, *waaF*, 및 *waaG*로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 유전자를 대장균에 불활성화시키는 단계를 포함하는 형질전환 효율이 증가한 재조합 대장균을 제조하는 방법.

청구항 8

지질 다당류(lipopolysaccharide)의 내부 코어(Inner core) 관련 유전자의 활성이 불활성화된 대장균에 벡터를 도입하는 단계를 포함하는 재조합 대장균의 형질 전환 효율을 증가시키는 방법.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 상기 내부 코어 관련 유전자는 *waaC*, *waaD*, *waaE*, *waaF*, 및 *waaG*로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것인 방법.

청구항 10

청구항 8에 있어서, 상기 재조합 벡터는 1 내지 20kb의 크기를 가진 벡터를 이용하는 것인 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 모세포보다 형질전환 효율이 증가한 재조합 대장균, 상기 재조합 대장균을 제조하는 방법 및 재조합 대장균의

형질 전환 효율을 증가시키는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 형질전환(transformation)은 박테리아에 플라스미드와 같은 외래 DNA를 도입하는 기술을 말하며, 유전자 조작의 기본 과정이다. 일반적으로 이용되는 박테리아 형질전환 방법은 DNA가 침투할 수 있도록 박테리아의 세포벽을 처리하는 방법에 따라 화학적(chemical), 및 물리적(physical) 형질전환 방법으로 분류할 수 있는 것으로 알려져 있다.

[0003] 일반적으로 대부분의 미생물은 자연 상태에서 형질전환이 이루어지지 않기 때문에, 인위적으로 외부의 DNA를 받아들일 수 있도록 물리적 화학적 처리를 통해 형질전환이 가능한 세포로 만들어 주는 것이 필요하다. 이 때, 형질전환이 가능한 상태로 만든 세포를 수용성 세포(competent cell)이라고 한다.

[0004] 그 중 전기천공법을 통한 형질전환 효율이 높은 수용성 세포를 만들기 위한 필요성이 대두되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 일 양상은 모세포보다 형질전환 효율이 증가한 재조합 대장균을 제공한다.

[0006] 다른 양상은 형질전환 효율이 증가한 재조합 대장균을 제조하는 방법을 제공한다.

[0007] 또 다른 양상은 재조합 대장균의 형질 전환 효율을 증가시키는 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0008] 일 양상은 지질 다당류(lipopolysaccharide: LPS)의 내부 코어(Inner core) 관련 유전자의 활성을 불활성화시키는 벡터를 포함하는, 모세포보다 형질전환 효율이 증가한 재조합 대장균을 제공한다.

[0009] 상기 지질다당류는 그람음성 세균의 세포벽 구성성분 중 하나를 의미하며, 상기 용어 "재조합 대장균(recombinant microorganism)"은 유전적으로 조작된 대장균일 수 있다. 유전공학에 의해 제조된 대장균, 예를 들면 유전공학 방법에 의해 대장균 내로 외인성(exogenous) 핵산이 도입되거나, 대장균의 내인성(endogenous) 유전자의 서열 또는 위치가 변형된 것일 수 있다.

[0010] 상기 용어, "형질전환(transformation)"은 원하는 유전자가 삽입된 벡터를 대장균으로 도입하여 게놈 외 인자로서 또는 게놈에 삽입되어 원하는 유전자가 복제 가능하도록 유도하는 방법을 의미한다.

[0011] 상기 “모세포”는 일 양상에 따른 내부 코어(Inner core) 관련 유전자의 활성을 불활성화되도록 인위적인 조작을 수행하지 않은 대장균 세포로서, 아무런 처리를 수행하지 않은 대장균 세포 및 단순히 이를 배양한 대장균 세포를 의미한다.

[0012] 용어, "벡터"는 목적 유전자나 DNA를 발현시킬 수 있도록 적합한 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 상기 목적 유전자나 DNA 서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미하며, 다시 말해 이를 숙주세포로 전달하여 많은 수로 복제되거나, 단백질로 발현될 수 있도록 하는 운반체를 의미한다.

[0013] 본 명세서에서 사용된 용어 "불활성화"는 대장균 중의 언급된 유전자 또는 단백질이 전혀 발현되지 않거나, 또는 발현되더라도 전혀 활성을 가지지 않는 것 또는 내재적 활성에 비해 약화된 것을 의미한다. 즉 재조합 대장균에 있어서 LPS의 내부 코어(Inner core) 관련 유전자의 발현 또는 활성이 본래 조작되지 않은 대장균의 발현 또는 활성보다 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 40% 이상, 약 50% 이상, 약 55% 이상, 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 75% 이상, 약 80% 이상, 약 85% 이상, 약 90% 이상, 약 95% 이상, 또는 약 100% 감소된 것일 수 있다. LPS의 내부 코어(Inner core) 관련 유전자의 발현 또는 활성이 감소된 유전적으로 조작된 재조합 대장균은 당업계에 공지된 임의의 방법을 사용하여 확인될 수 있다. 상기 LPS의 내부 코어(Inner core) 관련 유전자의 발현 또는 활성이 감소되는 것은 상기 LPS의 내부 코어(Inner core) 관련 유전자를 코딩하는 유전자의 일부 또는 전부가 변이, 치환, 삽입된 벡터에 의하여 삭제되거나 상기 유전자에 하나 이상의 염기가 삽입되는 것에 의한 것일 수 있으며, LPS의 내부 코어(Inner core) 관련 유전자 교정 수단에 의할 수 있다.

[0014] 상기 내부 코어(Inner core) 관련 유전자의 활성이 불활성화되는 것은 상기 내부 코어에 존재하는 유전자의 변이, 제거 또는 파괴에 의한 것일 수 있다. 상기 "유전자의 변이, 제거 또는 파괴"는 유전자가 발현되지 않거나

발현량이 감소되거나 발현되어도 단백질 또는 효소의 활성을 나타내지 않거나 활성이 감소되도록, 유전자의 일부 또는 전부가, 또는 그 프로모터, 그 터미네이터 영역 등의 조절인자의 일부 또는 전부가 변이, 치환, 삭제되거나 유전자에 하나 이상의 염기가 삽입되는 것을 말한다. 상기 유전자의 제거 또는 파괴는 상동재조합과 같은 유전자 조작, 돌연변이 유발, 분자 진화를 통해 달성될 수 있다. 세포가 복수개의 같은 유전자를 포함하거나 2개 이상의 다른 폴리펩티드 동종 상동유전자(paralog)를 포함하는 경우, 하나 또는 그 이상의 유전자가 제거 또는 파괴될 수 있다.

[0015] 상기 내부 코어 관련 유전자는 불활성화되는 경우, LPS의 외부 코어 LPS를 제거시킬 수 있는 활성을 가지거나, 대장균의 외막 및/또는 내막의 막 투과성(membrane permeability)을 증진시키는 유전자이면 제한 없이 포함 가능할 수 있으며, 예를 들면 waaC, waaD, waaE, waaF, 및 waaG로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것일 수 있다. 명세서 내 일 구체예에서는 상기 LPS의 내부 코어 관련 유전자를 불활성화, 예를 들면 결락, 또는 낙아웃 시킨 대장균을 활용하였다. 일 양상에서는 대장균 BW25113의 waaC, waaD, waaE, waaF, 및 waaG로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 유전자를 불활성화 시킨 대장균 균주일 수 있다.

[0016] 또한 상기 형질전환은 화학적(chemical), 또는 물리적(physical) 방법에 의한 것일 수 있으며, 상기 형질전환 방법에 있어서 화학적 방법은 인산 칼슘(CaPO4) 침전, 염화 칼슘(CaCl2) 침전, 폴리에틸렌글리콜(PEG), 덱스트란 설페이트, 또는 리포펙타민의 첨가에 의한 것이고, 상기 물리적 방법은 전기천공법(electroporation), 전자총(particle bombardment), 또는 온도 쇼크(heat shock)에 의한 것일 수 있다.

[0017] 상기 벡터는 플라스미드(plasmid), 파지미드(phagemid) 및 코스미드(cosmid)로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있고, 또한 상기 벡터는 예를 들면 약 1 내지 100kb, 1 내지 50 kb, 1 내지 40 kb, 5 내지 35 kb, 5 내지 30 kb, 5 내지 25 kb, 5 내지 20 kb, 또는 5 내지 25 kb 의 크기를 가진 것일 수 있다.

[0018] 다른 양상은 지질 다당류(lipopolysaccharide)의 내부 코어(Inner core)와 관련된 waaC, waaD, waaE, waaF, 및 waaG로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 유전자를 대장균에 불활성화시키는 단계를 포함하는 형질전환 효율이 증가한 재조합 대장균을 제조하는 방법을 제공한다.

[0019] 상기 방법을 통하여 제조된 재조합 대장균은 외막 및/또는 내막의 막 투과성(membrane permeability)을 증진될 수 있다.

[0020] 또 다른 양상은 지질 다당류(lipopolysaccharide)의 내부 코어(Inner core) 관련 유전자의 활성이 불활성화된 대장균에 벡터를 도입하는 단계를 포함하는 재조합 대장균의 형질 전환 효율을 증가시키는 방법을 제공한다.

[0021] 상기 방법은 예를 들면 waaC, waaD, waaE, waaF, 및 waaG로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 지질 다당류(lipopolysaccharide)의 내부 코어(Inner core) 관련 유전자를 불활성화 시키는 방법을 포함할 수 있다.

[0022] 상기 형질전환은 화학적(chemical), 또는 물리적(physical) 방법에 의한 것일 수 있으며, 상기 형질전환 방법에 있어서 화학적 방법은 인산 칼슘(CaPO4) 침전, 염화 칼슘(CaCl2) 침전, 폴리에틸렌글리콜(PEG), 덱스트란 설페이트, 또는 리포펙타민의 첨가에 의한 것이고, 상기 물리적 방법은 전기천공법(electroporation), 전자총(particle bombardment), 또는 온도 쇼크(heat shock)에 의한 것일 수 있다. 일 구체예에서는 전기천공법을 활용하였다.

[0023] 또한 형질전환 시 사용할 수 있는 벡터는 약 1 내지 20kb, 1 내지 15 kb, 3 내지 12 kb 의 크기를 가진 벡터일 수 있다. 아울러, 상기 재조합 벡터는 플라스미드(plasmid), 파지미드(phagemid) 및 코스미드(cosmid)로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다.

발명의 효과

[0024] 일 양상에 따른 LPS의 내부 코어 관련 유전자인 waaC, waaD, waaE, waaF, 및 waaG로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 유전자를 불활성화시키는 경우, 재조합 대장균은 형질전환 효율이 상승하여, 더 나은 품질의 수용성 세포(competent cell)로의 제조가 가능하다. 따라서, 상기 재조합 대장균을 활용하는 경우 대장균에 있어서 전기천공을 포함한 형질전환 방법의 효율을 종래 대비 약 70 내지 450배 이상 효과적으로 증진시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 두 플라스미드, 즉 pAmCyan (3.3kb) 및 pDA1 (11.3kb) (n = 3)로 테스트 한 각기 다른 대장균 균주 각각에 대한 형질 전환 결과를 나타낸 도이다.

도 2는 각 균주에 대한 형질 전환체 수와 사용된 플라스미드를 기반으로 한 상대적 형질 전환 효율을 확인한 결과를 나타낸 도롯, 5가지 돌연변이 균주, 즉 ΔwaaC, ΔwaaD, ΔwaaE, ΔwaaF 및 ΔwaaG (n = 3)에서 높은 형질 전환 효율이 나타남을 확인하였다.

도 3은 LPS 분자의 생합성에서 다른 단백질의 역할을 나타낸 모식도이다.

도 4는 야생형 E. coli BW25113 및 몇몇 돌연변이체의 제타 포텐셜을 확인한 결과를 나타낸 도이다. (n = 3).

도 5는 전기 천공 후 각 균주 별 생존력을 확인한 결과를 나타낸 도이다 (n = 3).

도 6은 플라스미드 DNA 결합 분석을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 7은 내부 코어 돌연변이체의 외부 막 투과성을 확인하기 위하여 NPN 형광을 확인한 결과이다.

도 8은 ATP 풀 분석을 수행한 결과로서, WC는 전체 세포; Sup, 상청액; C, 미처리 대조군; E, 전기 천공을 수행한 군을 나타낸다 (n = 3).

도 9는 ΔwaaF 및 ΔwaaG 돌연변이체의 세포질 막 누출로 인한 주변 배지로의 ATP 손실 정도를 확인한 결과를 나타낸 도이며, 이 플롯은 (E)의 대조군 샘플에 대한 상대 값이다(n = 3).

도 10은 전기 천공 후 남아있는 ATP 풀의 백분율을 확인한 결과를 나타낸 도로서, 상기 값은 각 경우에 대해 전체 셀 컨트롤과 비교하여 계산되었다 (n = 3).

도 11은 생존율과 전기 천공 후 남은 세포 내 ATP 비율을 비교하여, 이 두 결과 사이의 강한 상관 관계를 확인한 결과를 나타낸 도이다 (n = 3).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 본 발명의 여러 실시예들의 각각 특징들이 부분적으로 또는 전체적으로 서로 결합 또는 조합 가능하며, 당업자가 충분히 이해할 수 있듯이 기술적으로 다양한 연동 및 구동이 가능하며, 각 실시예들이 서로에 대하여 독립적으로 실시 가능할 수도 있고 연관 관계로 함께 실시 가능할 수도 있다.

[0027] 구성요소를 해석함에 있어서, 별도의 명시적 기재가 없더라도 오차 범위를 포함하는 것으로 해석한다.

[0028] 본 발명의 실시예를 설명하기 위한 도면에 개시된 형상, 크기, 비율, 각도, 개수 등은 예시적인 것이므로 본 발명이 도시된 사항에 한정되는 것은 아니다. 또한, 본 발명을 설명함에 있어서, 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명은 생략한다. 본 명세서상에서 언급된 '포함한다', '갖는다', '이루어진다' 등이 사용되는 경우 '~만'이 사용되지 않는 이상 다른 부분이 추가될 수 있다. 구성요소를 단수로 표현한 경우에 특별히 명시적인 기재 사항이 없는 한 복수를 포함하는 경우를 포함한다.

[0029] 이하 실시예 및 실험예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예 및 실험예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

[0030] **실험예 1. 박테리아 균주 및 성장 환경**

[0031] 실험에 사용된 E. coli 균주는 표 1에 나타내었다. 각각의 균주를 37℃에서 밤새 LB(lysogeny broth: LB) 한천 플레이트에서 25 % 글리세롤 스톡 (-80 ℃)에서 성장시켰다. 이후 단일 콜로니를 수득해 4ml 소량의 LB 배지에 접종하고 250rpm 및 37 ℃에서 배양시켰다.

표 1

[0032]

균주	유전자형	단백질 기능
BW25113	Wild-type	
JW3603	E. coli BW25113 ΔwaaB	UDP-D-galactose:(glucosyl)lipopolysaccharide-1,6-D-galactosyltransferase
JW3596	E. coli BW25113 ΔwaaC	ADP-heptose:LPS heptosyltransferase I
JW3594	E. coli BW25113 ΔwaaD	ADP-L-glycero-D-mannoheptose 6-epimerase
JW3024	E. coli BW25113 ΔwaaE	Fused heptose 7-phosphate kinase/heptose 1-phosphate adenyltransferase
JW3595	E. coli BW25113 ΔwaaF	ADP-heptose:LPS heptosyltransferase II
JW3606	E. coli BW25113 ΔwaaG	Lipopolysaccharide glucosyltransferase I

JW3818	E. coli BW25113 ΔwaaH	UDP-glucuronate:LPS(HepIII) glycosyltransferase
JW3602	E. coli BW25113 ΔwaaI	UDP-D-glucose:(glucosyl)LPS α-1,3-glucosyltransferase
JW3601	E. coli BW25113 ΔwaaJ	UDP-glucose:(glucosyl)LPS α-1,2-glucosyltransferase
JW3597	E. coli BW25113 ΔwaaL	Surface polymer:lipid A-core ligase
JW3605	E. coli BW25113 ΔwaaP	Lipopolysaccharide core heptose (I) kinase
JW3607	E. coli BW25113 ΔwaaQ	Lipopolysaccharide core heptosyltransferase III
JW3604	E. coli BW25113 ΔwaaS	Lipopolysaccharide core biosynthesis protein
JW3600	E. coli BW25113 ΔwaaY	Lipopolysaccharide core heptose (II) kinase
JW3599	E. coli BW25113 ΔwaaZ	Lipopolysaccharide core biosynthesis protein

[0033] **실험예 2. 형질전환**

[0034] E. coli 균주를 37 ℃에서 LB 한천 플레이트에서 밤새 성장시켰다. 이후 콜로니를 600 nm에서 광학 밀도 5.0으로 차가운 멸균수에 재현탁시켰다. 1ml 분취량을 수득하여 세포를 16,000 x g 로 2분간 원심분리시켜 펠릿화하였다. 차가운 멸균수 1ml로 세포를 세척한 후, 동일한 조건으로 한번 더 펠렛화하고, 마지막으로 200ng의 플라스미드 DNA를 함유하는 냉멸균수 100μl에 재현탁시켰다. 0.1cm 큐벳으로 1.8mV로 설정된 BioRad 2510 전기 천공기 시스템을 사용하여 총 50μl의 균주 샘플을 전기 천공 프로토콜을 활용하여 형질전환시켰다. 세포에 전기 충격을 가한 후, 1ml의 LB 배지와 혼합하고 37 ℃에서 90분 동안 흔들었다. 세포 현탁액을 신선한 LB 배지에 연속 희석하고 100μg/ml의 암피실린을 함유하는 LB 한천 플레이트에 플레이팅 하였다. 형질 전환 효율은 24 시간 후 성장한 콜로니의 수를 기반으로 계산하였다.

[0035] **실험예 3. 제타 포텐셜의 측정**

[0036] 제타 포텐셜은 입자의 전기 영동 이동성을 측정하여 수득하였다. 입자가 이동함에 따라 산란된 빛은 위상 이동되는데, 이 위상 이동은 입자의 제타 포텐셜에 비례한다. E. coli 균주를 37 ℃로 LB 한천 플레이트에서 밤새 배양하였다. 개별 콜로니를 액체 LB 배지에 접종하고 밤새 배양한 다음 0.5의 광학 밀도 (OD)로 계대 배양하였다. 이어서 박테리아를 3000 x g 로 5분간 원심 분리하여 수집한 이후, 세척하고 20mM 의 인산염 완충액(pH 7.0)에서 최종 OD 0.5로 재현탁시켰다. 제타 포텐셜은 투명한 일회용 제타셀 (Malvern, DTS1070)로 25 ℃의 조건에서 Nano ZS (Malvern) Zetasizer를 사용하여 동적 광산란에 의해 측정하였다.

[0037] **실험예 4. 전기 천공으로 인한 생존력의 변화**

[0038] 전기 천공으로 인한 생존력의 변화를 측정하기 위해 세포 현탁액 샘플을 전기 천공 직전 또는 직후에 채취하였다. 이를 위해 10μl의 세포 현탁액 (상기 실시예에서 준비한 100μl 부피에서)을 수득하여 1ml LB 배지로 희석하였다. 마찬가지로, 전기 천공 직후의 200μl LB-혼합 샘플을 수득하여 0.8ml의 LB로 희석하였다. 이 부피는 위의 프로토콜을 기반으로 한 10μl 샘플과 동일한 수의 세포를 포함하였다. 이들 샘플 각각을 LB 배지를 사용하여 희석하고 항생제없이 LB 한천에 플레이 팅하였다. 콜로니 수를 24 시간 후에 결정하였고 전기 천공이 생존력에 중대한 영향을 미치는지 여부를 결정하기 위해 비교하였다. 야생형 및 ΔwaaG 균주의 생존력을 비교하여 획득된 형질전환체 돌연변이체 수의 증가를 설명할 수 있는지를 확인하였다.

[0039] **실험예 5. DNA-바인딩 분석**

[0040] 박테리아 세포에 부착된 세포 외 DNA의 양을 결정하기 위해, 각 균주를 LB 배지에서 37 ℃로 밤새 성장시키고 16000 x g 로 2분간 원심 분리하여 수득하고, 25mM의 HEPES 완충액(pH 7.4)으로 세척하고 600nm 에서 0.1의 OD로 재현탁 시켰다. 각 샘플을 4 개의 튜브로 나뉘어 다음과 같이 사용하였다. 두 개의 샘플은 DNase I의 처리없이, 37 ℃에서 30분 동안 배양하였다. 내인성 세포 외 DNA를 제거하기 위해 DNase I 효소 (Ambion ™ DNase I (RNase-free))를 완충액과 함께 다른 두 튜브에 첨가하고 부드럽게 혼합한 다음 37 ℃로 설정된 수조에서 30 분 동안 배양하였다. 4 개의 튜브를 모두 배양한 후, 박테리아 세포를 HEPES 완충액으로 세척하고 재현탁시켰다. 전기 천공에 사용된 플라스미드 (pAmCyan)를 각 조건에서 대조군 또는 실험군 두 개의 튜브에 최종 농도 17ng / ml 로 첨가하고, 네 개의 튜브 모두 10 분 동안 얼음에서 배양하였다.

[0041] 표준 곡선을 설정하기 위해 플라스미드를 96 웰 블랙 플레이트에서 HEPES 버퍼를 활용하여 최종 농도 범위 0-1μg/ml 로 희석하였다. HEPES 및 상기 실시예에서 제조된 박테리아 세포 현탁액인 각 테스트 샘플 50μl를 플레이트에 첨가하고 HEPES 완충액(1:200)에 희석된 100μl의 PicoGreen 염료 (Quant-iT ™ PicoGreen ™ dsDNA Assay Kit)를 첨가하였다. 각 웰을 200 μl의 최종 부피로 설정하였다. 각 플레이트를 어둠 속에서 5 분 동안 배양하고 Tecan Infinite M200에서 각각 485 및 520 nm의 방출 및 여기 파장을 사용하여 형광을 판독하였다.

[0042] **실험예 6. (N-페닐-1-나프틸아민) NPN을 이용한 외막 투과성 측정**

[0043] NPN 흡수 측정을 위해, 중간 로그 (OD 0.5) 상 세포를 펠릿화하고, 1-mM 아지드화 나트륨을 함유하는 pH 7.2의 5-mM HEPES 완충액에서 2 회 세척한 다음 동일한 완충액에 동일한 OD로 재현탁시켰다. 세포 현탁액을 분석 전에 30 분 동안 실온에 두었다. NPN 스톡을 아세톤에 500μM 농도로 용해시킨 화학 물질을 첨가하여 준비하였다. 이후 20μl를 세포 현탁액 1ml에 첨가하여 최종 농도 10μM을 수득하였다. 10 초 동안 잠시 혼합시킨 후, NPN 형광을 각각 350 및 420 nm의 여기 및 방출 파장을 사용하여 측정하였다. 형광 측정을 슬릿폭이 5nm인 형광계 (Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer, Agilent, South Korea)를 사용하여 수행하였다.

[0044] **실험예 7. ATP 분석**

[0045] 키트 내의 다양한 구성 요소 (ENLITEN® ATP Assay System, Promega)를 제조업체의 지시에 따라 준비하였다. 형질전환 시킨 실험군과 형질전환시키지 않은 대조군 샘플의 결과를 분석하였다. 각각의 세포를 10,000×g 의 조건으로 30초간 원심분리하여 펠릿화하고 상청액을 분석하기 위해 다른 튜브로 옮겼다. 이후 300μl 의 각 샘플에 5μl 의 60 % TCA를 첨가하고 튜브를 얼음 위에서 1 시간 동안 배양하였다. 이후 샘플을 NaOH를 사용하여 pH 7.5로 중화시키고 100 μl를 분석에 사용하였고, 동시에 표준 샘플을 준비하고 분석하였다. 생물 발광을 측정하기 위해 100μl 샘플을 흰색 96 웰 플레이트 (Greiner, USA)의 웰로 옮기고 값을 Promega GloMax 플레이트 판독기 (미국)를 사용하여 판독하였다.

[0046] **실시예 1. LPS를 절단하는 경우에 형질전환율의 상승의 확인**

[0047] LPS의 내부 코어 유전자를 결락시킨 균주가 형질전환율이 상승할 수 있는지를 확인하는 실험을 수행하였고, 이를 도 1 및 도 2에 나타내었다. 도 1 및 도 2에서 확인한 바와 같이, pAmCyan (3.3 kb) 또는 pDA1 (11.3 kb) 플라스미드를 사용하여 서로 다른 상기 표 1의 E. coli 균주를 형질 전환하였고, 이중 5개의 유전자를 낙아웃시킨 경우에서 형질전환 효율이 높아진다는 것을 확인하였다. 즉, JW3596 (ΔwaaC), JW3594 (ΔwaaD), JW3024 (ΔwaaE), JW3595 (ΔwaaF) 및 JW3606 (ΔwaaG) 에서 전기천공으로 인한 형질전환 효율이 상승한다는 사실을 확인하였다. 특히 waaF 유전자를 낙아웃시킨 ΔwaaF 돌연변이체가 형질전환 효율이 가장 높다는 것을 확인할 수 있었다. 도 3에서 확인한 바와 같이, 상기 형질전환 효율이 높아진 돌연변이 각각을 LPS에 매핑시킨 경우, 상기 5개 유전자가 모두 LPS 내부 코어의 생합성 과정에 관여하는 유전자임을 확인할 수 있었다. 따라서, 상기 LPS 내부 코어 유전자인 waaC, waaD, waaE, waaF 및 waaG를 낙아웃시킨 경우, 전기천공으로 인한 형질전환 효율이 상승하는 것을 확인할 수 있었다.

[0048] **실시예 2. 내부 코어 돌연변이의 형질전환 효율의 상승의 검증**

[0049] 상기 실시예 1에서 확인한 전기천공 형질전환 효율이 상승한 균주의 특성을 확인하기 위한 실험을 수행하였고, 야생형 E. coli BW25113 및 몇몇 돌연변이체의 제타 포텐셜을 확인한 결과를 도 4에, 전기 천공 후 각 균주 별 생존력을 확인한 결과를 도 5에, 플라스미드 DNA 결합 분석을 확인한 결과를 도 6에, 내부 코어 돌연변이체의 외부 막 투과성을 확인하기 위하여 NPN 형광을 확인한 결과를 도 7에, ATP 풀 분석을 수행한 결과를 도 8에, ΔwaaF 및 ΔwaaG 돌연변이체의 세포질 막 누출로 인한 주변 배지로의 ATP 손실 정도를 확인한 결과를 도 9에, 전기 천공 후 남아있는 ATP 풀의 백분율을 확인한 결과를 도 10에, 생존율과 전기 천공 후 남은 세포 내 ATP 비율을 비교한 결과를 도 11에 나타내었다.

[0050] 도 4에서 확인할 수 있듯, 5개 균주의 제타 포텐셜을 확인한 결과, 전기천공 형질전환 효율의 상승은 제타 포텐셜의 변화와는 관련이 없음을 확인할 수 있었다. 5 개의 돌연변이체 모두의 제타 포텐셜은 야생형 균주 (E. coli BW25113)보다 약간 더 음의 값을 나타냈지만, 2 개만이 유의할 정도의 값의 변화가 나타나는 것을 확인하였다. 증가된 전기천공 형질전환 효율 상승이 전기천공을 수행한 이후, 돌연변이의 더 나은 생존률 증가가 영향을 미치는 것인지를 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 이를 평가하기 위해 두 개의 돌연변이체 (JW3595로 ΔwaaF의; 및 JW3606로 ΔwaaG)를 선택하고 세포에 전기충격을 가한 직후의 생존율을 측정하였다. 그림 도 5에서 확인할 수 있듯, 생존율은 야생형 E. coli BW25113의 생존율과 크게 다르지 않았고, 돌연변이체 각각은 생존율이 약 50%로 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 돌연변이가 야생형 보다 더 잘 생존하는 것은 아니기 때문에, 더 많은 플라스미드 DNA가 대장균에 결합하고 있는지를 평가하여, 형질전환 효율의 상승을 설명할 수 있는지를 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 도 6에서 확인한 바와 같이, 플라스미드 pAmCyan의 첨가는 박테리아가 표면 결합 DNA 분자를 감소시키기 위해 DNase I로 전처리 된 경우에도 어떤 균주에서도 결합 DNA 농도를 증가시키지 않음을 확인할 수 있었다. 이는 플라스미드가 야생형 E. coli BW25113보다 돌연변이체를 더 잘 코팅하지 않음을 보여주는 결과로서, 각 배양 균주는 DNase I로 처리되지 않았거나 (-) 처리 (+)되거나 플라스미드 DNA에 노출되

었다. 세포와 관련된 DNA의 양은 DNase I 처리 후 감소했지만 플라스미드 첨가 후에는 증가하지 않았다. 이것은 플라스미드 DNA 결합성이 돌연변이체와 함께 개선되지 않았으며, 이는 우수한 돌연변이체의 형질 전환 효율을 설명할 수 없음을 입증하는 결과이다.

[0051] 형질전환 효율이 상승하는 돌연변이체에서 야생형 균주 사이의 명백한 차이점을 확인하기 위하여 각 균주 개체의 외막 투과성을 확인하는 실험을 수행하였다. 도 7에서 확인한 바와 같이, 돌연변이체 5개 모두 야생형보다 약 2배 이상의 외막투과성이 상승하는 것을 확인할 수 있었다.

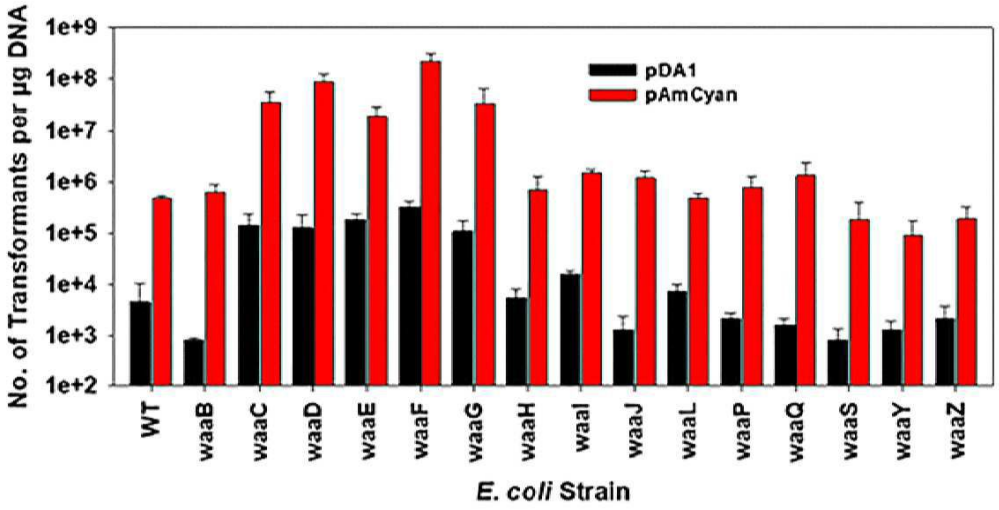
[0052] 두개의 추가적인 LPS 돌연변이체인 JW3600 (ΔwaaY) 및 JW3597 (ΔwaaL)를 무작위로 선별하고, 실험한 결과, 돌연변이체의 막 투과성과 도 1에서 확인한 바와 같은 형질전환 수준을 비교한 경우 야생형 *E. coli*BW25113과 크게 다르지 않은 것을 확인할 수 있었다. 따라서 이와 같은 결과를 통하여 막 투과성의 증가로 인한 증가된 형질전환 효율의 증가는 5개의 내부 코어 돌연변이 균주인 JW3596 (ΔwaaC), JW3594 (ΔwaaD), JW3024 (ΔwaaE), JW3595 (ΔwaaF), 및 JW3606 (ΔwaaG)에서 나타나는 것임을 확인할 수 있었다. 다만 이와 같은 실험결과는 플라스미드가 외막을 가로 지르는 움직임을 설명하는 데 도움을 주지만, 형질 전환이 나타나기 위해 필요한 내막을 어떻게 통과를 설명할 수 없어 추가적인 실험을 수행하였다.

[0053] 이를 해결하기 위해 내부 막 안정성이 이러한 돌연변이에서 마찬가지로 영향을 받는지 평가하는 실험을 수행하였다. 이와 같은 특성은 JW3595 (ΔwaaF) 및 JW3606 (ΔwaaG)에서 유출된 ATP 풀을 측정하여 수행하였다. 도 8에서 확인할 수 있듯이, 세포 ATP 풀은 야생형 균주에서 JW3595에서는 4.2 배로 나타나 3.4 배로 나타나는 JW3606보다 상당히 높은 것을 확인할 수 있었다. 이는 동종 돌연변이체가 ATP 생산 수준을 유지하는 것에 어려움을 겪고 있음을 시사한다. 또한 도 9에서 확인할 수 있는 바와 같이, 돌연변이는 훨씬 더 높은 상층액 ATP 풀을 가지게 되는 것을 확인할 수 있었다. 특히 도 9에 나타난 바와 같이, 전체 세포 ATP는 돌연변이 균주에서 약 3 배 더 낮지만, 상층액에서 2 ~ 3.4 배 더 높은 것을 확인하였다. 따라서, 돌연변이체는 내부 막 안정성 또한 부분적으로 손상되었음을 확인할 수 있었다. 또한 도 8에서 확인한 바와 같이, 전기 천공 후 ATP 풀을 분석한 결과 모든 세포에서 세포 내 농도가 떨어 졌다는 것을 발견했습니다 상층액 ATP 농도는 야생형 세포 샘플에서 유의하게 증가했지만 돌연변이체에서는 크게 다르지 않은 것을 확인할 수 있었다.

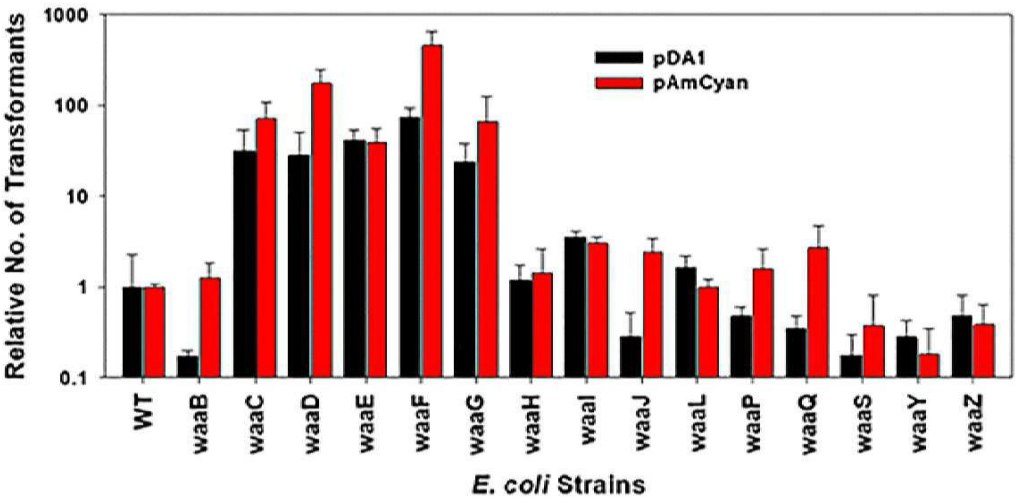
[0054] 아울러 도 10에서 확인할 수 있는 바와 같이, 세포 내 ATP 풀은 모두 평균 약 50 % 감소한 반면 야생형 배양에 대한 세포 외 ATP 풀은 23 %로 증가한 것을 확인할 수 있었다. 도 5에서 확인할 수 있는 생존율과 도 10의 세포 내 ATP 풀을 비교를 통하여 도 11에서 나타나는 상관관계를 확인할 수 있었으며, 측정된 세포 ATP 풀은 전기 천공에서 살아남은 세포에서 나온 것임을 확인할 수 있었다.

도면

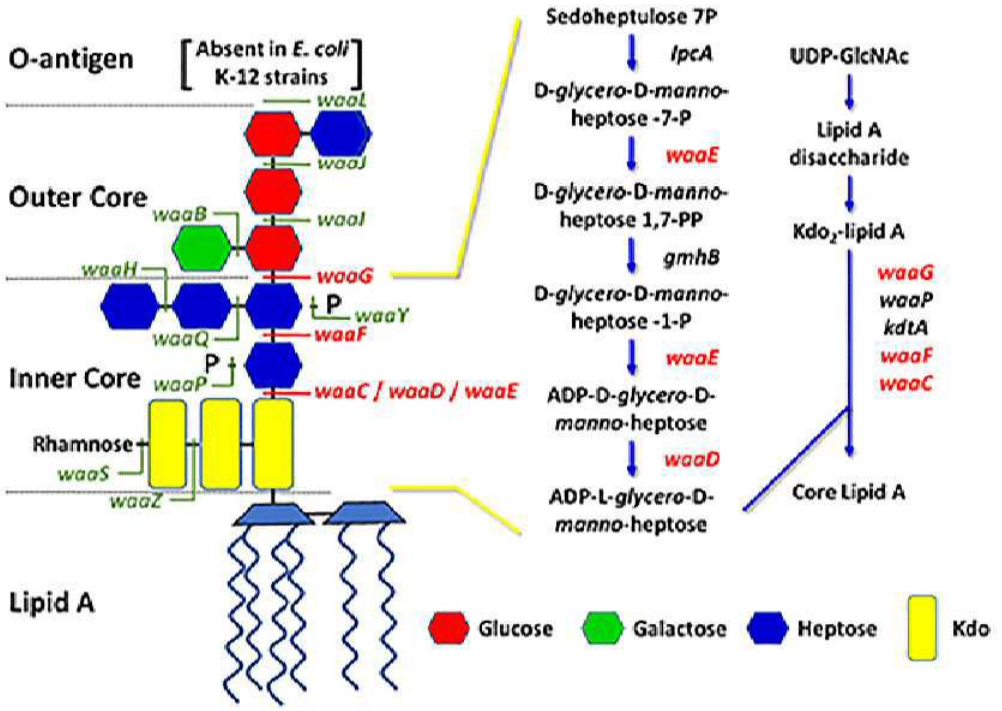
도면1



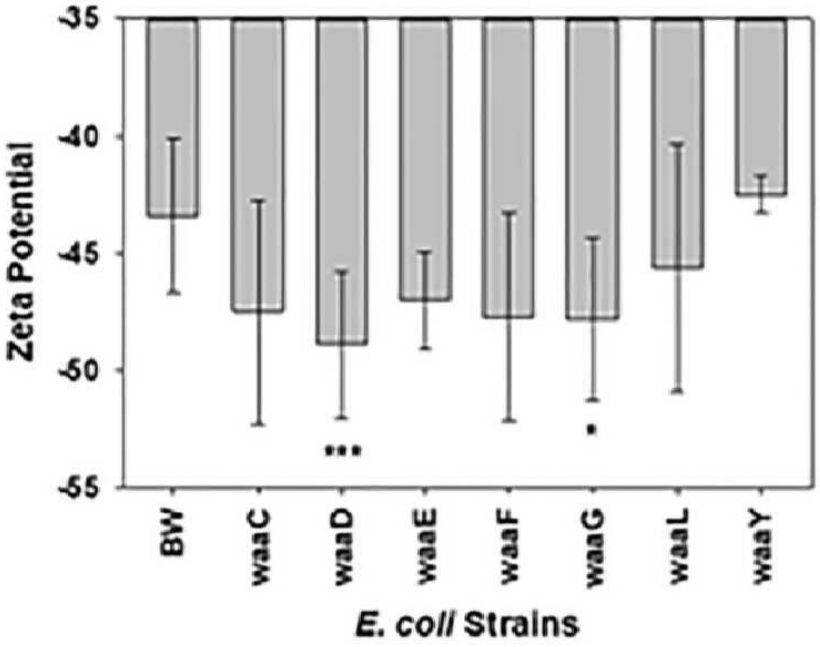
도면2


Relative No. of Transformants
1000
100
10
1
0.1
pDA1
pAmCyan
WT
waaB
waaC
waaD
waaE
waaF
waaG
waaH
waaI
waaJ
waaL
waaP
waaQ
waaS
waaY
waaZ
E. coli Strains

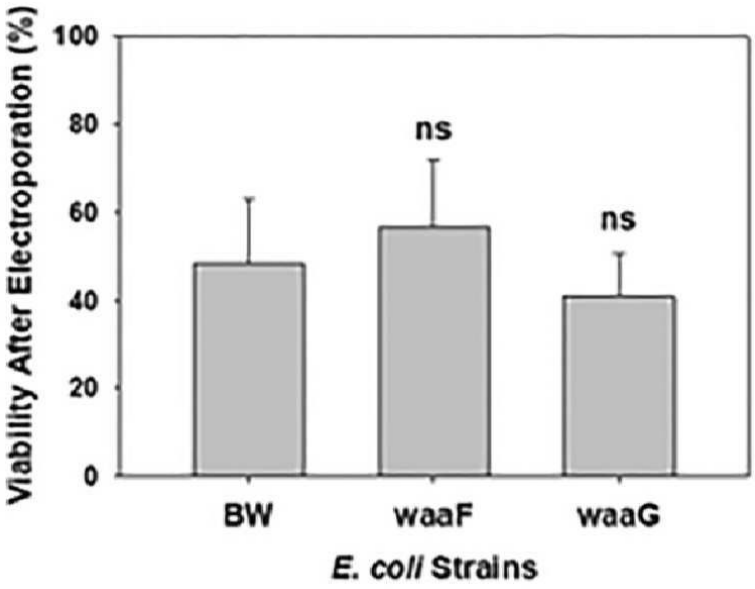
도면3


O-antigen
Absent in E. coli K-12 strains
waaL
waaJ
Outer Core
waaB
waaI
waaH
waaG
P
waaY
waaQ
waaF
Inner Core
P
waaP
waaC / waaD / waaE
Rhamnose
waaS
waaZ
Lipid A
Sedoheptulose 7P
IpcA
D-glycero-D-manno-heptose -7-P
waaE
D-glycero-D-manno-heptose 1,7-PP
gmh8
D-glycero-D-manno-heptose -1-P
waaE
ADP-D-glycero-D-manno-heptose
waaD
ADP-L-glycero-D-manno-heptose
UDP-GlcNAc
Lipid A disaccharide
Kdo2-lipid A
waaG
waaP
kdtA
waaF
waaC
Core Lipid A
Glucose
Galactose
Heptose
Kdo

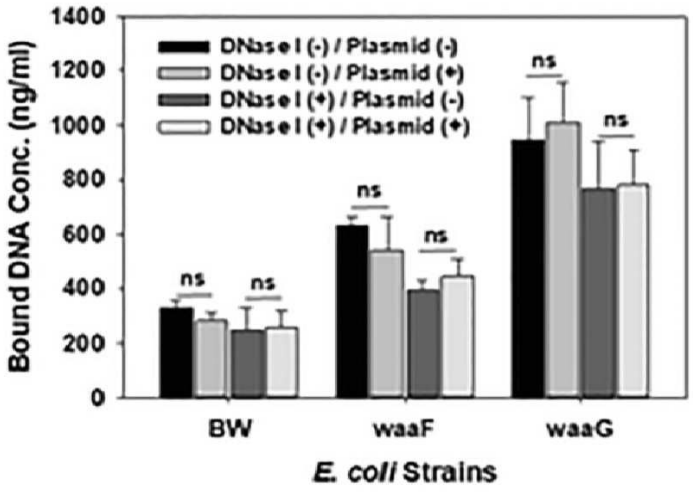
도면4


-35
-40
-45
-50
-55
Zeta Potential
BW
waaC
waaD
waaE
waaF
waaG
waaL
waaY
E. coli Strains

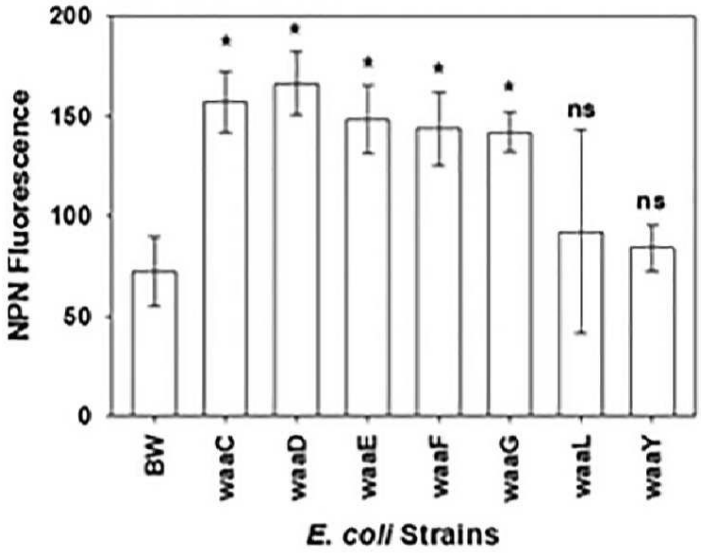
도면5


100
80
60
40
20
0
Viability After Electroporation (%)
ns
ns
BW
waaF
waaG
E. coli Strains

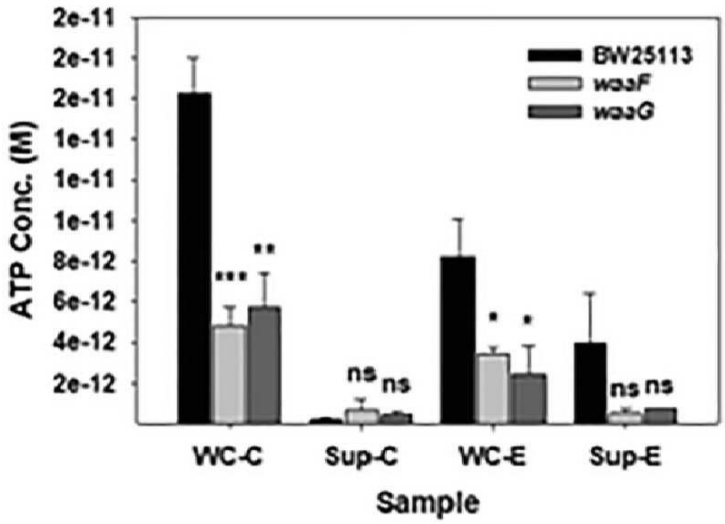
도면6


Bound DNA Conc. (ng/ml)
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
DNaseI (-) / Plasmid (-)
DNaseI (-) / Plasmid (+)
DNaseI (+) / Plasmid (-)
DNaseI (+) / Plasmid (+)
ns
BW
waaF
waaG
E. coli Strains

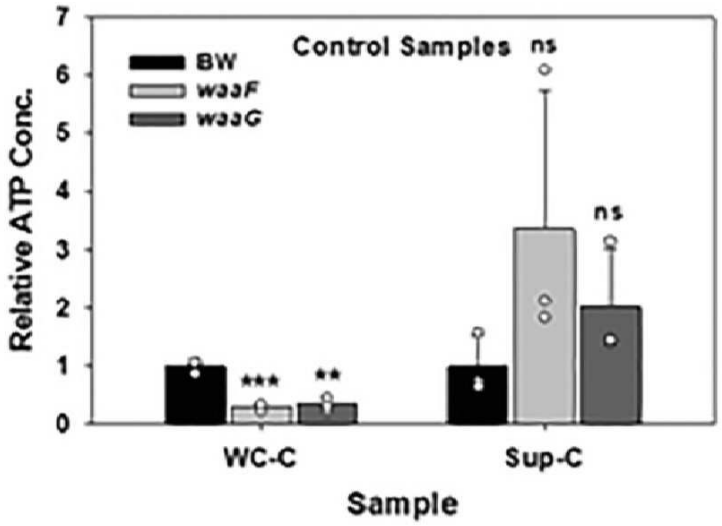
도면7


NPN Fluorescence
200
150
100
50
0
*
ns
BW
waaC
waaD
waaE
waaF
waaG
waaL
waaY
E. coli Strains

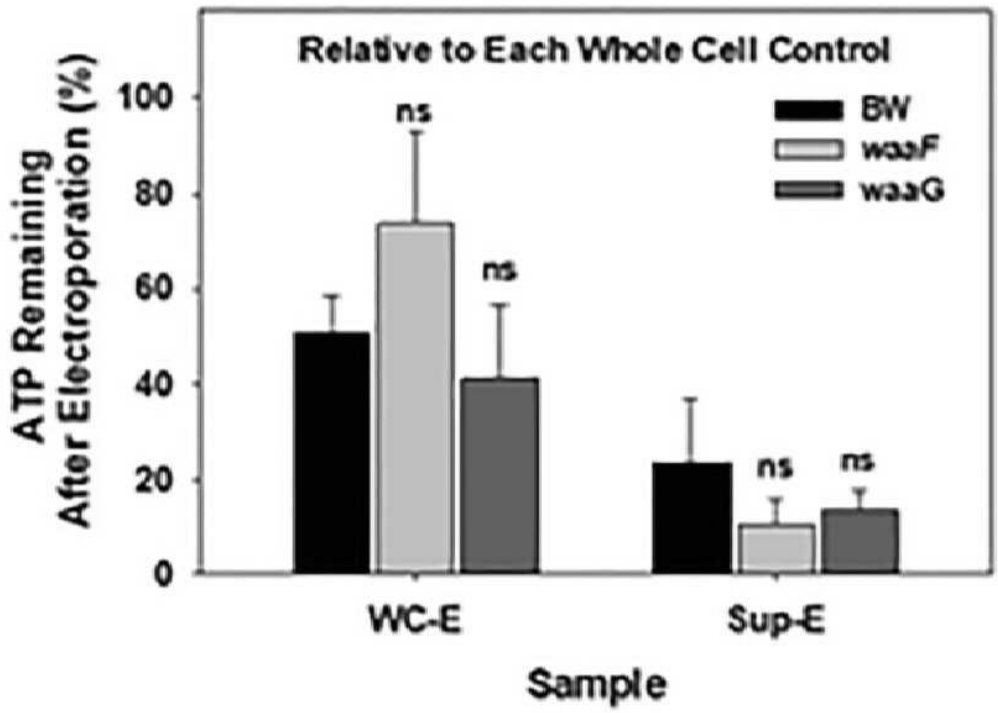
도면8


ATP Conc. (M)
2e-11
2e-11
2e-11
1e-11
1e-11
1e-11
8e-12
6e-12
4e-12
2e-12
BW25113
waaF
waaG
***
**
*
ns
WC-C
Sup-C
WC-E
Sup-E
Sample

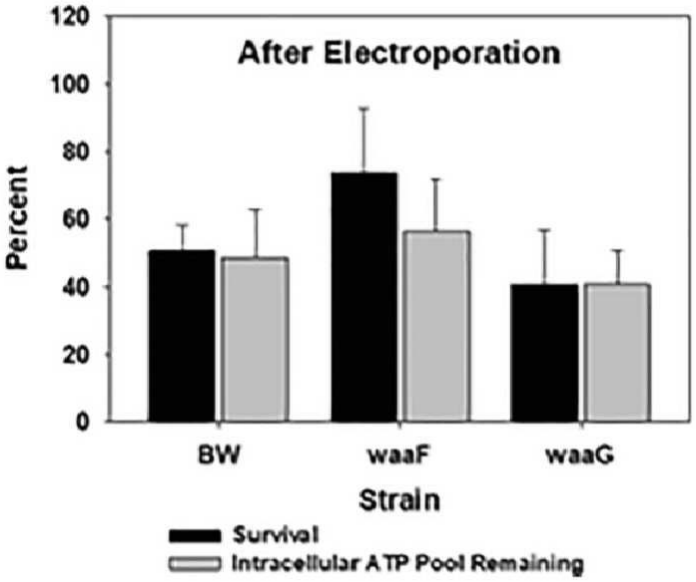
도면9


Control Samples
BW
waaF
waaG
Relative ATP Conc.
0
1
2
3
4
5
6
7
***
**
ns
ns
WC-C
Sup-C
Sample

도면10


Relative to Each Whole Cell Control
BW
waaF
waaG
ATP Remaining
After Electroporation (%)
0
20
40
60
80
100
ns
ns
ns
ns
WC-E
Sup-E
Sample

도면11


After Electroporation
120
100
80
60
40
20
0
Percent
BW
waaF
waaG
Strain
Survival
Intracellular ATP Pool Remaining