



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0092461
(43) 공개일자 2023년06월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/47 (2006.01) C12N 15/70 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/47 (2013.01)
C12N 15/70 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0181867
(22) 출원일자 2021년12월17일
심사청구일자 2021년12월17일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(주)메디엔진
서울특별시 성북구 안암로 145, 산학관 308호(안암동5가)
(72) 발명자
신민정
서울특별시 강남구 영동대로 230, 3동 101호(대치동, 우성1차아파트)
정인혁
서울특별시 성북구 고려대로 22, 3층
박찬
경기도 의정부시 백석로 30, 102동 908호
(74) 대리인
특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 코돈 최적화된 ATP1F1 폴리뉴클레오티드 및 이를 포함하는 재조합 벡터

(57) 요약

본 발명은 코돈 최적화된 ATP1F1 폴리뉴클레오티드 및 이를 포함하는 재조합 벡터에 관한 것으로 상기 폴리뉴클레오티드를 사용하면 ATP1F1 (IF1) 단백질의 발현을 증가시킬 수 있고, 수용성 발현 경향 또한 증가시킬 수 있다.

대표도 - 도1

전연형(Original)/코돈 최적화(Optimized) ATP1F1 유전자 서열 비교

Optimized	1	GGTAGCGACACAGACGAGAACGTGGATCGTCGCGGCGAGCATTCGTGAGCGGGTGGC
Original	1	GGCTCGGATCACTCCGAGAAATGTCGACCGGGGCGCGGCTCCATCCGGGAAGCCGGTGGG
Optimized	61	GCCTTTGGTAAACGTGAACAACGCGAGGAAGCGTTACTTCGTGCGCAGAGCCGTGAA
Original	61	GCCTTCGGAAGAGAGAGACAGCGCTGAAGAGGAACGATATTTCCGAGCACAGAGTAGAGAA
Optimized	121	CAACTGGCGGCGCTGAAGAAACACACGAGAGAGGAATCGTTCACCAAGAAAGAGATT
Original	121	CAACTGGCAGCTTTGAAAAAACCATGAAGAAAGAAATCGTTCATCATAAGAGAGAGATT
Optimized	181	GAAAGTCTGCAGAAAGAGATCGAACGTCACAAAGCAAAATTAAGATGCTGAAGCAGAC
Original	181	GAGCGTCTGCAGAAAGAAATTGAGCGCCATAAAGCAGAGATCAAAATGCTAAACATGAT
Optimized	241	GAT
Original	241	GAT

전연형(Original)/코돈 최적화(Optimized) 변이형 ATP1F1 유전자 서열 비교

Optimized	1	GGTAGCGACACAGACGAGAACGTGGATCGTCGCGGCGAGCATTCGTGAGCGGGTGGC
Original	1	GGCTCGGATCACTCCGAGAAATGTCGACCGGGGCGCGGCTCCATCCGGGAAGCCGGTGGG
Optimized	61	GCCTTTGGTAAACGTGAACAACGCGAGGAAGCGTTACTTCGTGCGCAGAGCCGTGAA
Original	61	GCCTTCGGAAGAGAGAGACAGCGCTGAAGAGGAACGATATTTCCGAGCACAGAGTAGAGAA
Optimized	121	CAACTGGCGGCGCTGAAGAAACACAAAGAGAGGAATCGTTCACCAAGAAAGAGATT
Original	121	CAACTGGCAGCTTTGAAAAAACCATGAAGAAAGAAATCGTTCATCATAAGAGAGAGATT
Optimized	181	GAAAGTCTGCAGAAAGAGATCGAACGTCACAAAGCAAAATTAAGATGCTGAAGCAGAC
Original	181	GAGCGTCTGCAGAAAGAAATTGAGCGCCATAAAGCAGAGATCAAAATGCTAAACATGAT
Optimized	241	GAT
Original	241	GAT

(52) CPC특허분류
C12N 2800/22 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1425156227
과제번호	S3172032
부처명	중소벤처기업부
과제관리(전문)기관명	중소기업기술정보진흥원
연구사업명	창업성장기술개발(R&D)
연구과제명	인체유래 단백질을 이용한 대사성 질환 치료제 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	(주)메디엔진
연구기간	2021.08.01 ~ 2023.07.31

명세서

청구범위

청구항 1

ATP 합성효소 억제 인자 서브유닛 1 (ATP synthase inhibitory factor subunit 1, ATPIF1) 코딩 서열을 코돈 최적화한, 서열번호 1의 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 서열번호 1의 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2 또는 서열번호 3의 서열을 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 3

제1항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 4

제3항의 재조합 벡터가 도입된 재조합 숙주세포.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 재조합 숙주세포는 미생물, 곤충세포 및 동물세포로 이루어진 군에서 선택되는, 재조합 숙주세포.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 미생물은 대장균(*Escherichia coli*)인, 재조합 숙주세포.

청구항 7

제4항의 재조합 숙주세포를 배양하는 단계를 포함하는 ATP 합성효소 억제 인자 서브유닛 1의 생산 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 코돈 최적화된 ATPIF1 폴리뉴클레오티드 및 이를 포함하는 재조합 벡터에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] ATPIF1 (ATP synthase inhibitory factor subunit 1) 유전자로부터 발현되는 IF1 단백질은 미토콘드리아 막에 존재하는 전자전달계의 한 구성요소인 F-type의 ATPase에 결합하여 회전(rotation)을 방해함으로써 ATP의 합성 혹은 분해를 저해하며, 이에 따른 미토콘드리아 기능성 및 세포 생존에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 이를 토대로 대부분의 연구는 IF1 단백질의 병태생리학적 기능을 규명하기 위해 유전자 조작을 통한 세포 내 IF1의 발현에 중점을 두고 있으나, 인체 내에 분비되어 존재하는 IF1 단백질에 대한 분자생리학적 연구는 진척이 없다.

[0004] 특히 인간 IF1 단백질은 재조합 단백질로 발현시키면 불용성 형태로 발현되는 경우가 많아 연구에 어려움이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 1. 국내등록특허 제10-2276379호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 종래 기술상의 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로 본 발명자들은 IF1 코딩 서열의 약 25.9%를 최적화한 결과 대부분의 재조합 단백질이 수용성 분획에서 발견되는 것을 확인하였다.

[0008] 따라서, 본 발명은 IF1 코딩 서열을 코돈 최적화한, 서열번호 1의 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명의 일 양상은 ATP 합성효소 억제 인자 서브유닛 1 (ATP synthase inhibitory factor subunit 1, ATPIF1) 코딩 서열을 코돈 최적화한, 서열번호 1의 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[0011] 본 명세서에서, "ATP 합성효소 억제 인자 서브유닛 1 (ATP synthase inhibitory factor subunit 1, ATPIF1)" 유전자는 ATP 합성효소 억제 인자 서브유닛 1, 즉 IF1 단백질을 코딩하는 유전자이다. IF1 단백질은 미토콘드리아 막에 존재하는 전자전달계의 한 구성요소인 F-type의 ATPase에 결합하여 ATP의 합성 혹은 분해를 저해하며, 이에 따른 미토콘드리아 기능성 및 세포 생존에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.

[0012] 본 발명자들은 인간 ATPIF1 유전자의 염기서열 (Gene bank accession no: NM_016311.5) 중에서 성숙한 펩타이드(mature peptide) 코딩 서열을 포함하는 136-378 bp (243 bp 길이; 서열번호 4)의 염기서열에 대해 코돈 최적화를 수행하여 약 25.9%의 염기를 교체하였다 (도 1).

[0013] 또한, 본 발명자들은 pH에 의한 영향을 덜 받도록 천연형 IF1 단백질 코딩 서열(서열번호 4)에서 145-147번 염기를 CAT(H)에서 AAG(K)로 변경하여 코돈 최적화한 돌연변이 IF1 서열(서열번호 3) 또한 고안하였다.

[0014] 상기 코돈 최적화된 서열(서열번호 1 내지 3)은 천연형 IF1 단백질 대비 발현량이 우수하고, 수용성 발현 경향 또한 증가하는 장점을 가진다 (도 4 및 5).

[0015] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 서열번호 1의 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2 또는 서열번호 3의 서열을 포함한다. 서열번호 1의 서열에서 145-147번 염기는 "MAS"로 M은 시토신(C) 또는 아데닌(A)을 의미하고, S는 시토신(C) 또는 구아닌(G)을 의미한다. 따라서, 서열번호 2의 서열에서 145-147번 염기는 "CAC"이고, 서열번호 3의 서열에서 145-147번 염기는 "AAG"이다.

[0017] 본 발명의 다른 양상은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

[0018] 본 명세서에 있어서, "벡터(vector)"는 세포 내로 전달되는 DNA 단편, 핵산 분자 등을 의미하며, 상기 벡터는 DNA를 복제시키고, 숙주세포에서 독립적으로 재제조될 수 있다. 용어 "전달체"와 호환하여 사용될 수 있다.

[0019] 용어, "발현 벡터"는 목적인 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 본 발명의 재조합 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파아지 벡터, 바이러스 벡터 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 적합한 재조합 벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서 같은 발현 조절 엘리먼트 등을 포함할 수 있으며, 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 상기 프로모터는 바람직하게는 대장균에서 단백질을 발현하는데 사용되는 프로모터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0020] 본 명세서에 있어서, "작동가능하게 연결된(operably linked)"이란 일반적 기능을 수행하도록 핵산 발현조절 서열과 목적하는 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결(functional linkage)되어 있는 상태를

의미한다. 예를 들어 프로모터와 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 작동가능하게 연결되어 코딩서열의 발현에 영향을 미칠 수 있다.

[0021] 상기 폴리뉴클레오타이드와 발현 벡터와의 작동적 연결은 본 발명이 속하는 기술분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용할 수 있다.

[0023] 본 발명의 또 다른 양상은 상기 재조합 벡터가 도입된 재조합 숙주세포를 제공한다.

[0024] 본 발명에서, 상기 재조합 숙주세포는 미생물, 곤충세포 및 동물세포로 이루어진 군에서 선택될 수 있으며, 상기 미생물은 세균, 효모 또는 곰팡일 수 있다.

[0025] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 미생물은 대장균일 수 있다.

[0026] 숙주세포에 상기 재조합 벡터를 도입하는 방법은 특정의 방법으로 반드시 한정되는 것은 아니고, 통상적으로 당업계에서 널리 사용되는 방법을 사용할 수 있다. 예를 들어, 전기충격 또는 열충격 방법을 사용할 수 있고, 동물세포에 재조합 벡터를 도입할 때는 상업적으로 판매되는 형질주입(transfection) 시약을 사용할 수 있다.

[0028] 본 발명의 또 다른 양상은 상기 재조합 숙주세포를 배양하는 단계를 포함하는 ATP 합성효소 억제 인자 서브유닛 1의 생산 방법을 제공한다.

[0029] 상기 숙주세포를 배양하는 단계에는 당업계에서 통상적으로 널리 사용되는 방법을 사용할 수 있다. 숙주세포가 곤충세포 및 동물세포이면 상업적으로 판매되는 세포 배양 배지를 사용할 수 있으며, 세포 배양에 필요한 기타 물질을 첨가할 수 있다. 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 생산 방법은 재조합 숙주세포가 재조합 미생물인 경우, 재조합 미생물을 LB 배지(Luria-Bertani broth)에서 배양하는 단계; 및 재조합 미생물이 일정 수준으로 성장하면 재조합 단백질 발현을 유도하는 단계;를 포함할 수 있다. 재조합 단백질의 발현 유도는 통상적으로 당업계에서 널리 사용되는 방법을 사용할 수 있으며, 예를 들어, 배양 배지에 IPTG를 첨가하여 단백질 발현을 유도할 수 있다.

발명의 효과

[0031] 본 발명의 코돈 최적화된 ATPIF1 폴리뉴클레오타이드 및 이를 포함하는 재조합 벡터를 사용하면 ATPIF1 (IF1) 단백질의 발현을 증가시킬 수 있고, 수용성 발현 경향 또한 증가시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0033] 도 1은 천연형 ATPIF1 유전자 서열, 코돈 최적화된 ATPIF1 유전자 서열 및 코돈 최적화된 ATPIF1 변이형 유전자 서열을 비교, 정렬한 결과를 나타낸다 (Original: 천연형 ATPIF1 유전자 서열; 및 Optimized: 코돈 최적화된 ATPIF1 유전자 또는 변이형 유전자 서열).

도 2는 유전자 삽입과 재조합 단백질 생산에 사용한 pET-28a 벡터의 개략적인 구조를 나타낸다.

도 3은 코돈 최적화된 ATPIF1 유전자 또는 변이형 유전자 서열을 포함하는 벡터를 전기영동한 결과이다: 3A는 pET-28a 벡터의 전기영동 결과(M: 전기영동 마커), 3B는 코돈 최적화된 ATPIF1 서열을 포함하는 pET-28a-ATPIF1 최적화 벡터를 그대로(레인 2) 또는 제한효소를 처리한 후(레인 1) 전기영동한 결과, 3C는 코돈 최적화된 변이형 ATPIF1 서열을 포함하는 pET-28a-ATPIF1 변이형 벡터를 그대로(레인 2) 또는 제한효소를 처리한 후(레인 1) 전기영동한 결과, 3D는 pET-28a 벡터(레인 1) 및 천연형 ATPIF1 서열을 포함하는 pET-28a-ATPIF1 벡터의 T7 프로모터 증폭 산물을 전기영동한 결과이다.

도 4는 pET-28a-ATPIF1 최적화 벡터(A), pET-28a-ATPIF1 변이형 벡터(B) 및 pET-28a-ATPIF1 벡터(C)를 대장균에 형질전환시킨 후 단백질 발현 정도를 확인한 결과이다: M-SDS-PAGE 단백질 표준 마커; 1-대장균 파쇄물; 2-대장균 파쇄물의 수용성 분획; 및 3-대장균 파쇄물의 불용성 분획).

도 5는 pET-28a-ATPIF1 최적화 벡터(A), pET-28a-ATPIF1 변이형 벡터(B) 및 pET-28a-ATPIF1 벡터(C)를 대장균에 형질전환 시키고, 상이한 배양 온도 및 IPTG 농도에서 단백질 발현을 유도한 후 단백질 발현 정도를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0034] 이하 하나 이상의 구체예를 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0036] **실시예 1: 코돈 최적화된 서열을 포함하는 벡터의 제조 및 분석**
- [0037] 인간(human) ATPIF1 유전자의 염기서열 (Gene bank accession no: NM_016311.5) 중에서 성숙한 펩타이드(mature peptide) 코딩 서열을 포함하는 136-378 bp (243 bp 길이)의 염기서열에 대해 코돈 최적화를 수행하였다. 변이형 ATPIF1은 이 중 145-147번 서열을 CAT에서 AAG로 변경하여 대장균에서 인간 ATPIF1을 발현하기 위한 코돈 최적화 과정을 수행하였다. 코돈 최적화를 통해 천연형(wild type) ATPIF1 유전자의 염기서열에서 약 25.9%의 염기를 교체하였다 (도 1).
- [0038] 코돈 최적화 서열을 포함하는 벡터는 pET-28a 벡터의 NdeI과 XhoI 제한효소 부위에 코돈 최적화 서열을 삽입하여 코돈 최적화된 벡터를 제작하였다. 대조군으로 사용한 천연형 인간 ATPIF1 유전자 서열 또한 pET-28a 벡터의 NdeI과 XhoI 제한효소 부위에 삽입하여 벡터를 얻었다.
- [0039] 이하에서는 외래 코딩 서열이 도입되지 않은 기본적인 pET-28a 벡터는 "pET-28a 벡터", 천연형 ATPIF1 서열을 포함하는 벡터는 "pET-28a-ATPIF1 벡터", 코돈 최적화된 ATPIF1 서열을 포함하는 벡터는 "pET-28a-ATPIF1 최적화 벡터" 및 코돈 최적화된 변이형 ATPIF1 서열을 포함하는 벡터는 "pET-28a-ATPIF1 변이형 벡터"로 기재한다.
- [0040] DNA 전기영동을 시행하여 획득한 벡터를 분석하였다. 1% 아가로스 젤(agarose gel)에 DNA 사이즈 마커, pET-28a 벡터, pET-28a-ATPIF1 최적화 벡터 및 pET-28a-ATPIF1 변이형 벡터를 로딩한 후 전기영동을 진행하여 벡터 크기를 관찰하였다.
- [0041] 또한, pET-28a-ATPIF1 최적화 벡터 및 pET-28a-ATPIF1 변이형 벡터에는 MluI과 XhoI 제한효소를 30분 동안 처리한 후 전기영동을 진행하여 정상적인 효소 반응이 일어나는지 추가적으로 확인하였다. pET-28a 벡터와 pET-28a-ATPIF1 벡터는 T7 프로모터 부위를 타겟으로 하는 프라이머로 해당 서열을 증폭하여 추가로 확인하였다. 사용한 프라이머 서열은 다음과 같다: Sense: 5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG G -3' (서열번호 4); Antisense: 5'- GCT AGT TAT TGC TCA GCG G -3' (서열번호 5).
- [0042] 전기영동 결과, 5.4 kb 크기인 pET-28a 벡터는 5,000-7,000 bp 사이에서 DNA 밴드가 나타나는 것을 알 수 있었다 (도 3A). 제한효소를 처리하지 않은 pET-28a-ATPIF1 최적화 벡터 및 pET-28a-ATPIF1 변이형 벡터 또한 다양한 플라스미드 형태(nick, linear, supercoiled 및 circular form)에 해당하는 밴드를 확인할 수 있었다 (도 3B 및 3C에서 레인 2). 제한효소를 처리한 pET-28a-ATPIF1 최적화 벡터 및 pET-28a-ATPIF1 변이형 벡터는 4,000-5,000 bp 사이와 1,000 bp 상단에서 두 개의 밴드를 확인하여 제한효소가 벡터에 작용한 것을 알 수 있었다 (도 3B 및 3C에서 레인 1).
- [0043] 또한, T7 프로모터 부위의 증폭 산물을 확인한 결과 pET-28a 벡터에서는 T7 프로모터에 해당하는 밴드를 400-500 bp 사이에서 확인할 수 있었고 (도 3D에서 레인 1), pET-28a-ATPIF1 벡터에서는 T7 프로모터+ATPIF1 코딩 서열에 해당하는 밴드를 확인할 수 있었다 (도 3D에서 레인 2)
- [0045] **실시예 2: 형질전환 대장균 세포의 제조 및 재조합 단백질의 제조**
- [0046] 실시예 1에서 제작한 pET-28a-ATPIF1 최적화 벡터 및 pET-28a-ATPIF1 변이형 벡터와 pET-28a-ATPIF1 벡터(대조군)를 재조합 단백질 발현용 대장균 균주인 BL-21(DE3)과 BL-21-Codon Plus(DE3)-RIPL에 삽입하여 형질전환을 시행하였다.
- [0047] 각 대장균 균주를 LB 배지에서 37℃로 2시간 동안 배양하고, 1 mM의 IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)를 처리하여 25℃에서 12시간 추가로 배양하였다. 재조합 단백질을 포함한 세포는 먼저 세포 파쇄 (sonication) 과정과 원심분리를 통해 수용성 분획과 불용성 분획으로 분리하였고, 각 분획을 4-20%

SDS (sodium dodecyl sulfate) 겔에 로딩하여 단백질 발현 정도를 확인하였다. 단백질 분자량은 킬로달톤 (kilodaltons; kDa)으로 표시하였다.

[0048] 확인 결과, pET-28a-ATPIF1 최적화 벡터 및 pET-28a-ATPIF1 변이형 벡터에서 발현된 단백질은 대부분 수용성 분획에서 관찰되었으나 (도 4A 및 4B), pET-28a-ATPIF1 벡터에서 발현된 단백질은 대부분 불용성 분획에서 관찰되었다 (도 4C). 이 결과는 코돈 최적화에 의해 재조합 단백질의 수용성 발현 경향이 증가되었다는 것을 의미한다.

[0049] 도 4에서 각 레인은 다음을 의미한다: M-SDS-PAGE 단백질 표준 마커; 1-대장균 파쇄물; 2-대장균 파쇄물의 수용성 분획; 및 3-대장균 파쇄물의 불용성 분획.

[0050] 또한, 코돈 최적화 유무에 따른 단백질의 발현량 변화를 상이한 배양 온도 및 IPTG 농도에서 확인하였다. 그 결과, IPTG를 첨가한 모든 샘플에서 농도와 무관하게 pET-28a-ATPIF1 벡터(도 4C)와 비교하여 pET-28a-ATPIF1 최적화 벡터 및 pET-28a-ATPIF1 변이형 벡터에서 발현된 단백질의 발현량(각각 도 4A 및 4B)이 높은 것을 알 수 있었다. 구체적으로, 코돈 최적화에 따라 단백질 발현량이 약 89% 증가한 것을 관찰하여 코돈 최적화에 의한 재조합 단백질의 발현도 증가를 확인하였다.

도면

도면1

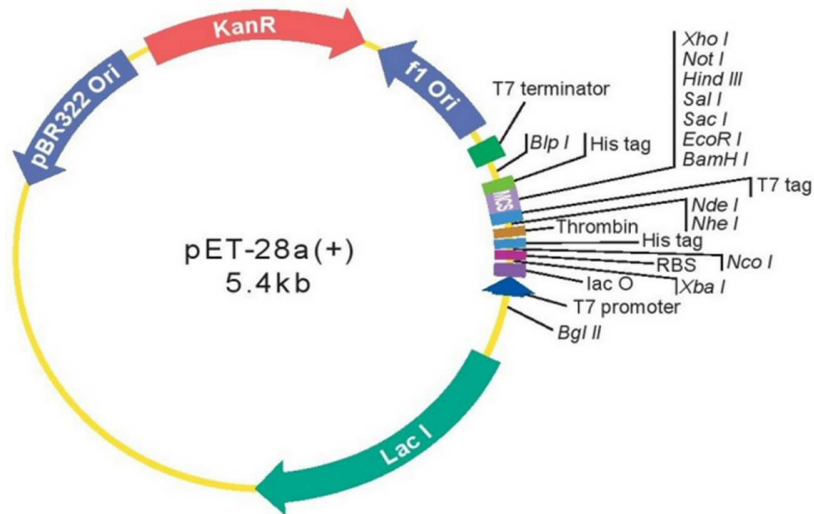
천연형(Original)/코돈 최적화(Optimized) ATPIF1 유전자 서열 비교

Optimized	1	GGTAGCGACCAGAGCGAGAACGTGGATCGTCGT GCGGGC AGCATTCTGAGGCGGGTGGC
Original	1	GGCTCGGATCAGTCCGAGAATGTCGACCGGGGCGCGGGCTCCATCCGGAAGCCGGTGGG
Optimized	61	CGGTTTGGTAAACGTGAACAAGCGGAGGAAGAGCGTTACTTTCTGTCGCAGAGCCGT GAA
Original	61	GCCTTCGGAAAGAGAGAGCAGGCTGAAGAGGAACGATATTTCCGAGCACAGAGTAGAGAA
Optimized	121	CAACTG GCGGCGCTGAAG AAACAC CACGAA GAG GAAATCGTT CACCACAAGAAA GAGATT
Original	121	CAACTGGCAGCTTTGAAAAAACACCATGAAGAAAGAAATCGTTCATCATAAGAAGGAGATT
Optimized	181	GAA CGTCTGCAGAAA GAGATCGAACGT CACAAG CAAAAAATTAAGATGCTGAAGCACGAC
Original	181	GAGCGTCTGCAGAAAGAAATTGAGCGCCATAAAGCAGAAGATCAAAATGCTAAAACATGAT
Optimized	241	GAT
Original	241	GAT

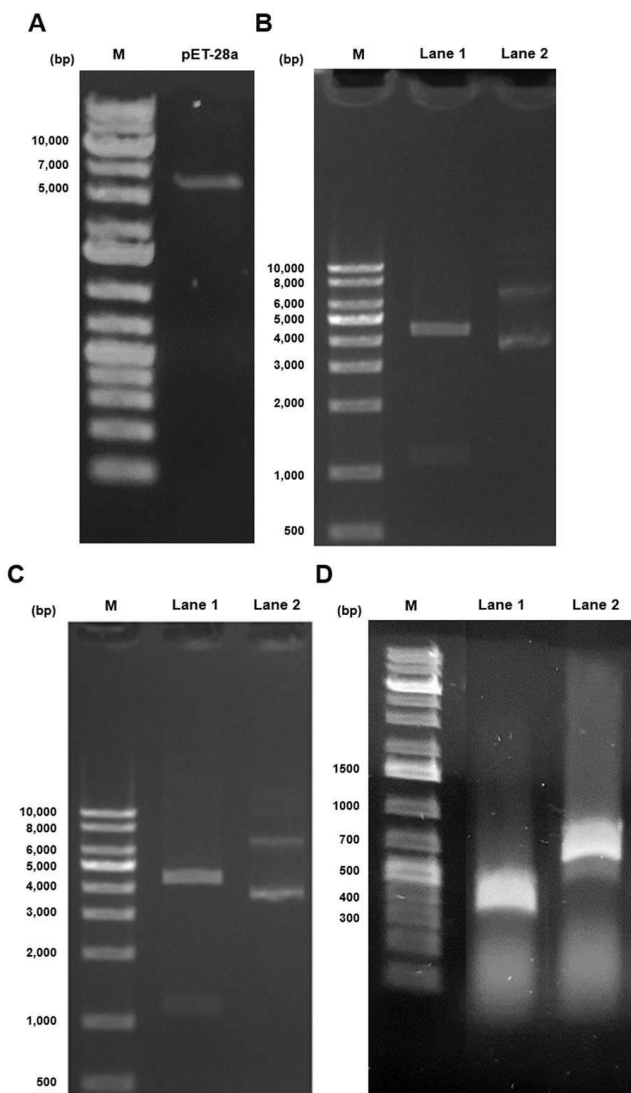
천연형(Original)/코돈 최적화(Optimized) 변이형 ATPIF1 유전자 서열 비교

Optimized	1	GGTAGCGACCAGAGCGAGAACGTGGATCGTCGT GCGGGC AGCATTCTGAGGCGGGTGGC
Original	1	GGCTCGGATCAGTCCGAGAATGTCGACCGGGGCGCGGGCTCCATCCGGAAGCCGGTGGG
Optimized	61	CGGTTTGGTAAACGTGAACAAGCGGAGGAAGAGCGTTACTTTCTGTCGCAGAGCCGT GAA
Original	61	GCCTTCGGAAAGAGAGAGCAGGCTGAAGAGGAACGATATTTCCGAGCACAGAGTAGAGAA
Optimized	121	CAACTG GCGGCGCTGAAG AAACAC AGGAA GAG GAAATCGTT CACCACAAGAAA GAGATT
Original	121	CAACTGGCAGCTTTGAAAAAACACCATGAAGAAAGAAATCGTTCATCATAAGAAGGAGATT
Optimized	181	GAA CGTCTGCAGAAA GAGATCGAACGT CACAAG CAAAAAATTAAGATGCTGAAGCACGAC
Original	181	GAGCGTCTGCAGAAAGAAATTGAGCGCCATAAAGCAGAAGATCAAAATGCTAAAACATGAT
Optimized	241	GAT
Original	241	GAT

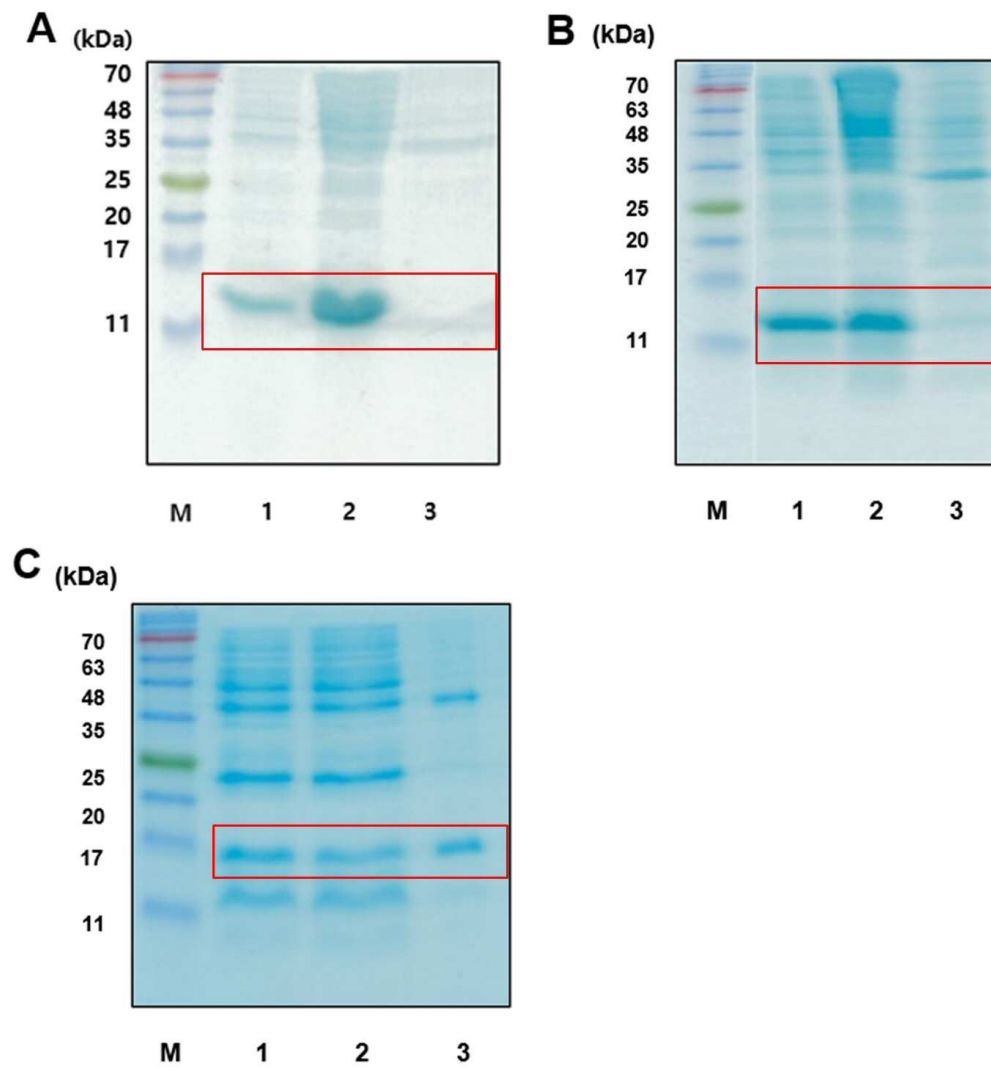
도면2



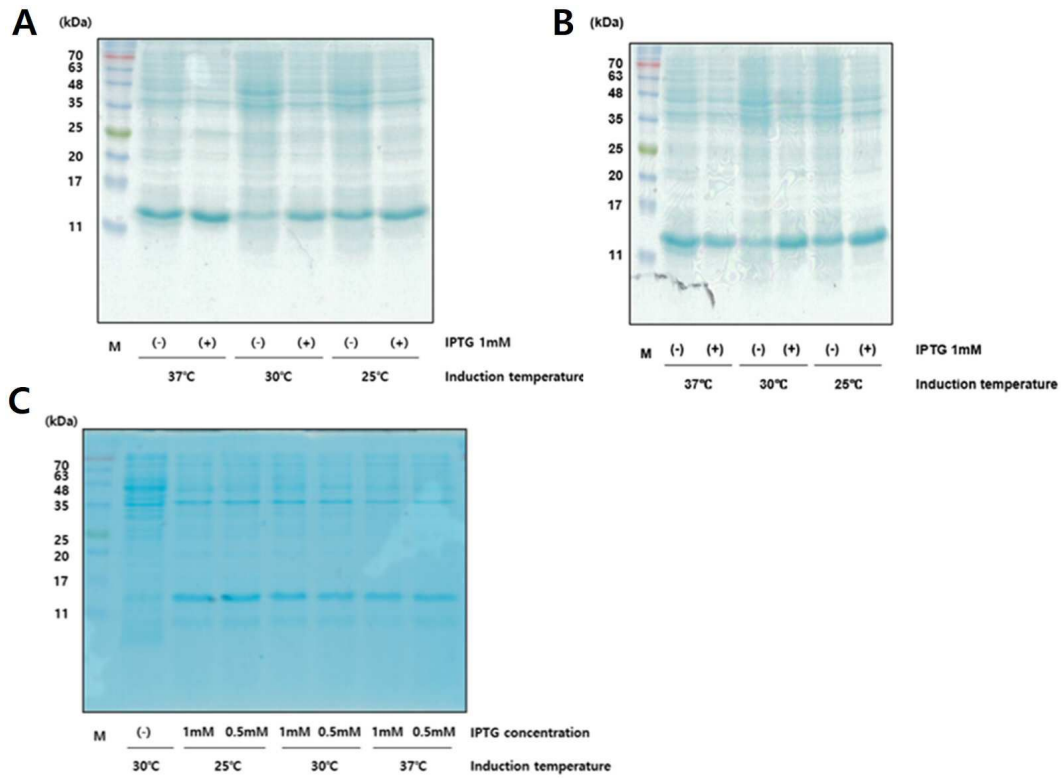
도면3



도면4



도면5



서열 목록

<110> Korea University Research and Business Foundation
MEDI&GENE

<120> CODON OPTIMIZED ATP1F1 POLYNUCLEOTIDE AND RECOMBINANT VECTOR
COMPRISING THE SAME

<130> P21U13C1653

<160> 4

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 243

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> codon optimized ATP1F1

<400> 1

ggtagcgacc agagcgagaa cgtggatcgt cgtgcgggca gcattcgtga ggccgggtggc 60

gcgtttggta aacgtgaaca agcggaggaa gacggttact ttcgtgcgca gagccgtgaa 120

caactggcgg cgctgaagaa acacmasgaa gaggaaatcg ttcaccacaa gaaagagatt 180

gaacgtctgc agaaagagat cgaacgtcac aagcaaaaaa ttaagatgct gaagcacgac 240

gat	243
<210> 2	
<211> 243	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> codon optimized ATP1F1	
<400> 2	
ggtagcgacc agagcgagaa cgtggatcgt cgtgcgggca gcattcgtga ggcgggtggc	60
gcgttttgta aacgtgaaca agcggaggaa gagcgttact ttcgtgcgca gagccgtgaa	120
caactggcgg cgctgaagaa acaccacgaa gaggaaatcg ttcaccacaa gaaagagatt	180
gaacgtctgc agaaagagat cgaacgtcac aagcaaaaaa ttaagatgct gaagcacgac	240
gat	243
<210> 3	
<211> 243	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> codon optimized mutated ATP1F1	
<400> 3	
ggtagcgacc agagcgagaa cgtggatcgt cgtgcgggca gcattcgtga ggcgggtggc	60
gcgttttgta aacgtgaaca agcggaggaa gagcgttact ttcgtgcgca gagccgtgaa	120
caactggcgg cgctgaagaa acacaaggaa gaggaaatcg ttcaccacaa gaaagagatt	180
gaacgtctgc agaaagagat cgaacgtcac aagcaaaaaa ttaagatgct gaagcacgac	240
gat	243
<210> 4	
<211> 245	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 4	
ggctcggatc agtccgagaa tgtcgaccgg ggcgcgggct ccatccggga agccggtggg	60
gccttcggaa agagagagca ggctgaagag gaacgatatt tccgagcaca gagtagagaa	120
caactggcag ctttgaaaaa acaccatgaa gaaagaaatc gttcatcata agaaggagat	180
tgagcgtctg cagaaagaaa ttgagcgcca taaagcagaa gatcaaaatg ctaaaacatg	240

atgat

245