

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2016-0099275 (43) 공개일자 2016년08월22일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 15/63 (2006.01) C12N 15/70 (2006.01) C12R 1/19 (2006.01) C12R 1/225 (2006.01)	(71) 출원인 충남대학교산학협력단 대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)	
(52) CPC특허분류 C12N 15/63 (2013.01) C12N 15/635 (2013.01)	(72) 발명자 임현만 대전광역시 유성구 엑스포로123번길 46-15 윤상훈 대전광역시 유성구 노은서로210번길 32 열매마을 4단지, 412동 1903호 (뒷면에 계속)	
(21) 출원번호 10-2015-0021527	(74) 대리인 특허법인충정	
(22) 출원일자 2015년02월12일 심사청구일자 없음		

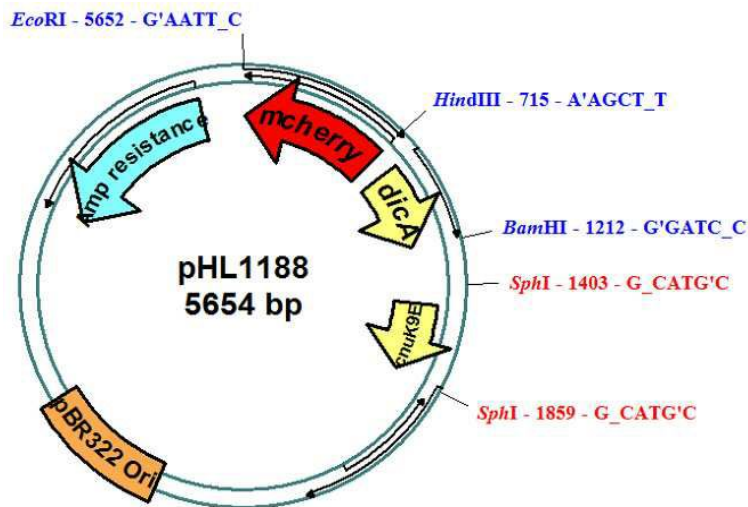
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 온도를 유도인자로 이용하는 유전자 발현용 재조합벡터

(57) 요약

본 발명은 온도를 유도인자로 이용하는 유전자 발현용 재조합벡터에 관한 것으로, 상세하게는 dicA/C 프로모터; dicA 유전자; cnuK9E 유전자 프로모터; cnuK9E 유전자; 및 dicC 유전자위에 삽입되는 목적 유전자를 포함하는 재조합벡터, 및 이를 포함하는 대장균 형질전환체에 관한 것이다. 본 발명의 유전자 발현용 벡터 시스템은 25℃에서 발현이 억제되고 37℃에서 발현이 증가하므로 온도를 높게 유지할 필요가 없어 산업적으로 매우 유용하게 쓰일 수 있을 것이다.

대표도 - 도11



(52) CPC특허분류

C12N 15/70 (2013.01)

C12R 1/19 (2013.01)

C12R 1/225 (2013.01)

(72) 발명자

박동녕

대전광역시 유성구 유성대로720번길 50, 202호

이연호

충청북도 옥천군 안내면 안내보은로 94-9

명세서

청구범위

청구항 1

양쪽 방향으로 전사되는 프로모터로서 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 dicA/C 프로모터;
 상기 dicA/C 프로모터의 dicA 전사방향으로 삽입되고 서열번호 2의 염기서열로 표시되는 dicA 유전자;
 상기 dicA 유전자의 다운 스트림 방향에 삽입되는 cnuK9E 유전자에 대한 프로모터;
 상기 cnuK9E 프로모터에 의해 발현이 조절되고 서열번호 4의 염기서열로 표시되는 cnuK9E 유전자; 및
 상기 dicA/C 프로모터의 dicC 전사방향으로서 dicC 유전자위(loci)에 삽입되는 목적 유전자(target gene)를 포함하는 재조합백터.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 cnuK9E 유전자에 대한 프로모터는 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 재조합백터.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 재조합백터는 pBR322 백터를 기본 골격으로 하여 제작된 도 11의 개열지도를 갖는 pHL1188 백터인 것을 특징으로 하는 재조합백터.

청구항 4

제 1항에 따른 재조합백터로 형질전환된 대장균 형질전환체.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 대장균은 *E. coli* MG1655인 것을 특징으로 하는 세포주.

청구항 6

제 4항에 따른 대장균 형질전환체에 온도를 변화시킴으로써 목적 단백질의 생산량을 조절하는 것을 특징으로 하는 단백질의 생산방법.

청구항 7

제 6항에 있어서, 25℃ 온도 조건에서는 목적 유전자의 발현이 억제되고, 37℃ 온도 조건에서는 목적 유전자의 발현이 유도되는 것을 특징으로 하는 단백질의 생산방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 온도를 유도인자로 이용하는 유전자 발현용 재조합백터에 관한 것으로, 상세하게는 dicA/C 프로모터;

[0001]

dicA 유전자; cnuK9E 유전자 프로모터; cnuK9E 유전자; 및 dicC 유전자위에 삽입되는 목적 유전자를 포함하는 재조합벡터, 및 이를 포함하는 대장균 형질전환체에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 유전공학이 발달함에 따라, 목적하는 유전자의 발현을 조절할 수 있는 다양한 방법들이 등장하고 있다. 주로, 특정한 유도물질들을 이용하여 발현을 조절하는 방법이 활발히 개발되었는데, 예를 들어, IPTG (Bell, C. E. et al. 2000 *Nature structural biology* 7, 209-14; Daber, R. et al. 2007 *Journal of molecular biology* 370, 609-19), 아라비노오스(arabinose) (Kolodrubetz D, et al. 1981 *J Mol Biol.* 151, 215227)와 같은 유도물질은 일반적으로 단가가 높기 때문에, 대안적인 유전자 조절 시스템의 필요성이 증가하고 있다. 많은 연구자들이 온도, 빛 등을 활용하여 목적 유전자를 조절하는 유전공학적 방법들을 연구하고 있다.
- [0003] 한편, 온도로 유전자를 조절할 수 있는 방법 중 현재까지 개발된 방법은 모두 상대적으로 고온의 환경에서, 구체적으로는 주변 온도를 37℃에서 42℃ 정도로 상승시킴으로써, 목적 유전자의 발현이 증대되는 시스템이며, 37℃에서 발현이 증가하고, 25℃에서 발현이 억제되는 조절 방법은 아직 개발되지 않았다. 상온과 유사한 25℃ 조건을 만족하는 시스템은 온도를 높게 유지할 필요가 없으므로, 산업 현장에서 더욱 유용하게 쓰일 수 있을 것이다.
- [0004] 이에 본 발명자들은, 상대적으로 저온인 환경에서 목적 유전자를 발현시키는 시스템을 개발하고자 예의 연구 노력한 결과, 단백질 cnuK9E 유전자와 양쪽 방향으로 전사되는 프로모터 dicA/C 프로모터를 이용하여 온도로 유전자 발현을 조절할 수 있는 새로운 벡터 시스템을 구성하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0005] 따라서 본 발명의 목적은, 온도를 높게 유지할 필요가 없어 다루기 쉽고 경제적인 장점을 갖는, 온도를 유도인자로 이용하는 유전자 발현용 재조합벡터를 제공하는데 있다.
- [0006] 본 발명의 다른 목적은, 상기 재조합벡터로 형질전환된 대장균 형질전환체를 제공하는데 있다.
- [0007] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 대장균 형질전환체에 온도를 변화시킴으로써 목적 단백질의 생산량을 조절하는 것을 특징으로 하는 단백질의 생산방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

- [0008] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 양쪽 방향으로 전사되는 프로모터로서 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 dicA/C 프로모터; 상기 dicA/C 프로모터의 dicA 전사방향으로 삽입되고 서열번호 2의 염기서열로 표시되는 dicA 유전자; 상기 dicA 유전자의 다운 스트림 방향에 삽입되는 cnuK9E 유전자에 대한 프로모터; 상기 cnuK9E 프로모터에 의해 발현이 조절되고 서열번호 4의 염기서열로 표시되는 cnuK9E 유전자; 및 상기 dicA/C 프로모터의 dicC 전사방향으로서 dicC 유전자위(loci)에 삽입되는 목적 유전자(target gene)를 포함하는 재조합벡터를 제공한다.
- [0009] 본 발명에서, 상기 “Cnu 단백질”은 71개의 아미노산을 갖는 분자량 8,400 Da 크기의 작은 단백질이며 본 발명자들에 의하여 처음 발견되었다 (Kim MS, et al. 2005 *J Bacteriol* 187: 6998-7008). Cnu 단백질은 항상 H-NS(histone-like nucleoid structuring protein) 단백질과 복합체를 이루고 있다. 또한 Cnu-H-NS 복합체는 대장균의 염색체 DNA의 복제시점(oriC)의 약 26 bp되는 DNA에 붙는 것으로 밝혀졌으며, 대장균 염색체의 개수에 영향을 준다. H-NS 또한 DNA 결합 단백질이며 중합체 형성이 일어나지만 기능이 가능하므로, Cnu 단백질과의 상호작용, 그리고 상호작용의 결과인 복합체의 형성은 여러 가지 기초과학적 호기심을 유발하고 있다.
- [0010] 본 발명자들은, 이전 연구에서 상기 Cnu 단백질의 돌연변이 연구 중 아주 흥미로운 돌연변이체를 발견하였다

(Yun SH, et al. 2012 *PLoS ONE* 7(9): e45236). 이 변이체는 9번째 Lys이 Glu로 치환된 것이었으며 “CnuK9E”라고 명하였다. CnuK9E가 발현되면 대장균 세포는 액체 배지에서 정상적인 세포 분열을 하지 못하고 filamentous 형태로 자라게 된다. 흥미롭게도 이러한 비정상적인 세포 분열은 온도 의존적이었다. 즉 25℃에서는 정상적으로 자라지만 37℃에서는 filamentous 형태로 자라게 된다. filamentous 형태로 자라는 이유는 세포를 2개로 나누는 역할을 하는 Septal Ring의 형성을 DicB라는 단백질이 방해하는 것으로 나타났다. 즉 CnuK9E가 존재하면 37℃에서만 DicB의 양이 증가하기 때문이라는 것이 밝혀졌다. 이는 dicB 유전자의 전사억제 인자인 DicA라는 단백질의 발현이 감소하기 때문인 것으로 밝혀졌다. 종합하여 보면, CnuK9E와 H-NS의 복합체는 온도 의존적으로 dicA 유전자의 발현을 억제 하는 것이다. dicA 유전자의 발현 또한 흥미롭다. dicA 유전자의 프로모터는 약 90 bp로 구성되어 있으며 반대쪽으로 dicC 유전자의 발현에도 관여한다. 그러나 전사는 항상 한 쪽 방향으로 이루어져 dicA 유전자와 dicC 유전자의 발현은 동시에 이루어지지 않는다. DicA 단백질은 dicA 유전자에는 전사 활성인자로 또 dicC, dicB 유전자에는 전사 억제인자로 작동하게 된다. DicA 단백질의 dicA 프로모터에 binding 역시 온도 의존적이며 37℃ 보다 25℃에서 더 잘 붙게 된다.

- [0011] 따라서 본 발명은, 이러한 dicA, dicC 및 CnuK9E 유전자 사이의 발현 조절 메커니즘을 이용하고 dicC 유전자위(loci)에 목적 유전자를 삽입하여 온도 조절을 통해 유전자의 발현을 조절하는 벡터 시스템을 제공하는데 그 기술적 특징이 있다.
- [0012] 본 발명의 재조합벡터에서, 상기 dicA/C 프로모터는 서열번호 1의 염기서열을 가질 수 있으며, 또한 상기 dicA 유전자는 서열번호 2의 염기서열을 가질 수 있다.
- [0013] 본 발명의 재조합벡터에서, 상기 cnuK9E 유전자에 대한 프로모터는 cnuK9E 유전자와 작동가능하게 연결하여 발현을 유도할 수 있는 공지의 프로모터, 예를 들어 구성적 프로모터(constitutive promoter)인 CMV 프로모터, T7, Plac, Ptac, Pant 프로모터 등을 사용할 수 있으나, 바람직하게는 상기 cnuK9E 프로모터는 서열번호 3의 염기서열을 가질 수 있다. 또한 cnuK9E 유전자는 서열번호 4의 염기서열을 가질 수 있다.
- [0014] 본 발명에 있어서, 상기 재조합벡터는 대장균 세포로 형질전환이 용이한 공지의 발현용 벡터, 예를 들어 pBR322 벡터, pCC1BAC 벡터 등을 사용하여 제조될 수 있다. 이러한 발현용 벡터는 유전자의 발현을 위해 필요한 조절 요소를 포함할 수 있다. 이러한 요소는, 예를 들면, 프로모터, 개시 코돈, 정지 코돈 및 폴리아데닐화 신호를 추가로 포함할 수 있다. 본 발명이 속하는 기술분야에 공지된 바와 같이, 이들 요소는 바람직하게는 각 유전자 서열에 작동적으로 연결되며, 조절 요소는 바람직하게는 이들이 투여될 종에서 작동될 수 있도록 선택된다.
- [0015] 본 발명에 따른 상기 구성 요소들을 포함하는 재조합벡터는 pBR322 벡터를 기본 골격으로 하여 제작된 도 11의 개열지도도를 갖는 pHL1188 벡터일 수 있다. 이러한 pHL1188 재조합벡터의 전체 서열 정보는 서열번호 5 에 표시되어 있다.
- [0016] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 재조합벡터로 형질전환된 대장균 형질전환체를 제공한다.
- [0017] 본 발명에 따른 재조합벡터를 형질전환시키는 방법으로는 당업계에 공지된 방법, 예를 들어 이에 한정되지는 않으나, 일시적 형질감염(transient transfection), 미세주사, 형질도입(transduction), 세포융합, 칼슘 포스페이트 침전법, 리포좀 매개된 형질감염(liposome-mediated transfection), DEAE 텍스트란-매개된 형질감염(DEAE Dextran-mediated transfection), 폴리브렌-매개된 형질감염(polybrene-mediated transfection), 전기천공법(electroporation), 유전자 총(gene gun) 및 세포 내로 DNA를 유입시키기 위한 다른 공지의 방법에 의해 숙주세포 내로 도입할 수 있다 (Wu et al., 1992 *J. Bio. Chem.* 267: 963-967; Wu and Wu, 1998 *J. Bio. Chem.* 263:14621-14624).
- [0018] 상기 형질전환체는 온도 조건에 따라 목적 유전자의 발현이 조절될 수 있는데, 대장균의 성장 온도인 37℃에서는 목적 유전자의 발현이 유도되고 상온과 가까운 25℃에서는 목적 유전자의 발현이 억제되는 특징을 갖는다.
- [0019] 구체적으로, 본 발명에서 사용된 유전자들과 프로모터들은 다음과 같은 특징을 가지고 있다. dicA 유전자는 dicC 유전자와 서로 반대 방향으로 암호화 되어있고, dicA 유전자의 발현 산물인 dicA 단백질은 dicC 유전자의 발현을 억제시키는 동시에 dicA 유전자, 즉 자기 자신의 발현을 증가시키는 단백질이다. CnuK9E 단백질은 세포 내에서 과량 존재할 때, 또 오직 그 경우에 한해서 37℃일 때, dicA 단백질과 dicA 프로모터의 상호작용을 저해함으로써, dicA 유전자의 발현을 억제시킨다. 이러한 유전자들의 특징을 가진 재조합벡터와 대장균 야생형 숙주 MG1655를 발현 시스템으로 이용하여, 온도로 인한 유전자의 발현 조절을 이룩하였다.

[0020] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 대장균 형질전환체에 온도를 변화시킴으로써 목적 단백질의 생산량을 조절하는 것을 특징으로 하는 단백질의 생산방법을 제공한다.

[0021] 본 발명의 단백질 생산방법은 상술한 바와 같이, 25℃ 온도 조건에서는 목적 유전자의 발현이 억제되고, 37℃ 온도 조건에서는 목적 유전자의 발현이 유도되는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0022] 본 발명에 따르면, 본 발명은 온도를 유도인자로 사용하여 유전자를 발현할 수 있도록 개량된 재조합백터와, 이를 형질전환시킨 숙주 미생물로 이루어진 유전자 발현 시스템에 관한 것이다. 본 발명의 유전자 발현 시스템은 25℃에서 발현이 억제되고 37℃에서 발현이 증가하기 때문에 상대적으로 온도를 높게 유지할 필요가 없으므로, 산업 현장에서 더욱 유용하게 쓰일 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 pHL1121 백터의 개념도이다.

도 2는 pHL1121 백터로 형질전환된 대장균에서 37℃ 온도 조건에서 유전자 발현을 확인한 결과이다.

도 3은 pHL1163 백터의 개념도이다.

도 4는 pHL1163 백터로 형질전환된 대장균에서 37℃ 온도 조건에서 유전자 발현을 확인한 결과이다.

도 5는 pHL1169 백터의 개념도이다.

도 6은 pHL1169 백터로 형질전환된 대장균에서 37℃ 온도 조건에서 유전자 발현을 확인한 결과이다.

도 7은 pHL1178 백터의 개념도이다.

도 8은 pHL1178 백터로 형질전환된 대장균에서 37℃ 온도 조건에서 유전자 발현을 확인한 결과이다.

도 9는 pHL1188 백터의 개념도이다.

도 10은 pHL1188 백터로 형질전환된 대장균에서 각각 27℃와 37℃ 온도 조건에서 유전자 발현을 확인한 결과이다.

도 11은 본 발명에 따른 pHL1188 백터의 개열지도이다.

도 12는 도 11의 pHL1188 백터의 전체 염기서열로서 mcherry, dicA/C promoter, dicA, cnuK9E promoter, cnuK9E가 포함된 서열을 표시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0025] 실시예 1. pHL1121 백터의 제조

[0026] 상용화 백터인 pBR322 백터(Cloning vector; Amp^rTet^r; Bolivar F, et al. 1977. *Gene* 2:95113)의 HindIII 제한효소 절단부위와 EcoRV 제한효소 절단부위 사이에 대장균의 dicA/C 프로모터 부위를 dicA 프로모터의 전사방향이 EcoRV 제한효소 절단부위쪽으로 되도록 삽입하고, EcoRV 제한효소 절단부위와 BamHI 제한효소 절단부위에 EGFP 유전자를, EcoRI 제한효소 절단부위와 HindIII 제한효소 절단부위 사이에 mCherry 유전자를 각각 삽입하여, pHL1121 백터라 명명하였다 (도 1 참조).

[0027] 구체적인 과정은 다음과 같다.

[0028] 상용화 벡터인 pmcherry-N1(Clontech, USA)의 mcherry 유전자 ORF를 PCR을 이용해 증폭하기 위해 EcoRI-mcherry primer (5' -GAATTCCTACTTGTACAGCTCG-3')와 HindIII-mcherry primer (5' -AAGCTTATGGTGAGCAAGGGCG-3')를 이용하였고, 증폭된 mcherry 유전자를 EcoRI, HindIII 제한효소로 처리한 DNA를 pBR322 벡터에 삽입하였다. 그리고 대장균의 genomic DNA에서 *dicA/C* 프로모터를 증폭하기 위해 HindIII-PdicAC primer (5' -AAGCTTTTAAACACCTTTATTG-3')와 EcoRV-PdicAC primer (5' -GATATCGTTAAATTTTTTGTTC-3')를 이용하여 PCR로 증폭하였고, HindIII, EcoRV 제한효소로 처리한 후 mcherry가 삽입된 벡터 DNA에 삽입하였다. 마지막으로 EGFP 유전자를 삽입하기 위하여 상용화 벡터인 pEGFP(Novagen, Germany)를 주형 DNA로 EcoRV-EGFP primer (5' -GATATCATGGTGAGCAAGGG-3')와 BamHI-EGFP primer (5' -GGATCCTTACTTGTACAGCTCG-3')를 이용하여 증폭한 DNA를 EcoRV와 BamHI으로 처리한 후 mcherry와 PdicAC가 삽입된 벡터 DNA에 삽입한 후 pHL1121로 명명하였다. 모든 DNA 삽입과정에서 염기서열 분석을 통하여 정확한 DNA 삽입을 확인하였다.

[0029] 상기 pHL1121 벡터는 단백질 [CnuK9E]를 암호화하고 있지 않으므로, 37℃에서 *dicA*의 유전자위에 치환된 GFP가 발현될 것이라고 예상하고, 대장균 숙주 MG1655 *dicFB-* (*dicF*, *dicB* 유전자를 제거한 균주: pBR322에 삽입한 CnuK9E가 과발현 되었을 때, 대장균이 분열하지 못하고 길어지는 filamentous growth 현상을 막기 위해 사용)에 형질전환 하여, 37℃ 온도 조건에서 형광단백질의 발현 정도를 확인하였다.

[0030] 그 결과 도 2에서와 같이, 모든 개체에서 mCherry 유전자가 발현되어, 결과가 예상과 맞지 않음을 확인하였다.

[0031] 실시예 2. pHL1163 벡터의 제조

[0032] 본 발명자들은 pHL1121 벡터가 작동하지 않는 원인을 *dicA* 프로모터와 DicA 단백질 간의 비율적 불균형에 있을 것이라고 보고, 대장균 세포 내에서 Single Copy로 존재하는 pCC1BAC 벡터 (Epicentre, USA) 의 EcoRI 제한효소 절단부위와 BamHI 제한효소 절단부위 사이에 EGFP 유전자와, mCherry 유전자 및, *dicA/C* 프로모터를 pHL1121 과 같은 구조로 형질전환한 벡터를 제조하여 pHL1163이라 명명하였다 (도 3 참조). pHL1163 벡터를 대장균 MG1655 숙주에 형질전환 하여, 37℃ 온도 조건에서 형광단백질의 발현 정도를 확인하였다.

[0033] 그 결과 도 4에서와 같이, EGFP 유전자가 발현되는 것을 확인하였다.

[0034] 실시예 3. pHL1169 벡터의 제조

[0035] 본 발명자들은 pHL1163 벡터의 SphI 제한효소 절단부위에 단백질 [CnuK9E] 유전자를 그 자신의 프로모터 부위와 함께 삽입하여 pHL1169 라고 명명하였다 (도 5 참조). CnuK9E 유전자를 삽입하기 위하여 CnuK9E 유전자가 삽입되어 있는 pCnuK9E 플라스미드 DNA를 주형으로 SphI-Pcnu 프라이머 (5' -GCATGCGCATGTTTCACTTGTCGG-3')와 SphI-cnu 프라이머 (5' -GCATGCTTATTGGACATAGTGCCAGACG-3')를 이용하여 CnuK9E 유전자를 증폭하였다. 증폭한 DNA와 pHL1163을 SphI으로 처리 하여 CnuK9E 유전자를 삽입하였다. 상기 pHL1169 벡터는 단백질 [CnuK9E]의 발현으로 인해 37℃에서 *mCherry* 유전자가 발현되고, 25℃에서 EGFP 유전자가 발현될 것이라고 기대되었다. 상기 벡터를 대장균 숙주 MG1655에 형질전환하여 37℃ 온도 조건에서 형광 단백질의 발현정도를 확인하였다.

[0036] 그 결과 도 6에서와 같이, EGFP 유전자가 발현됨을 확인하였다.

[0037] 실시예 4. pHL1178 벡터의 제조

[0038] 본 발명자들은 기존의 생각을 수정하여, pHL1121 벡터에서 EGFP 유전자를 *dicA* 유전자로 치환시킨 벡터를 제조하여 pHL1178이라 명명하였다 (도 7 참조). *dicA* 유전자를 삽입하기 위하여 대장균의 genomic DNA를 주형으로 HindIII-PdicAC primer (5' -AAGCTTTTAAACACCTTTATTG-3') 와 BamHI-*dicA* primer (5' -GGATCCTTATCTTTTATTGTCCG-3')를 이용하여 PCR로 증폭한 DNA를 HindIII, BamHI으로 처리하였고, 동일 처리한 pHL1121 벡터에서 EGFP 유전자를 *dicA* 유전자로 치환하였다. 이 시스템에서는 두 유전자의 교환 발현이 아닌 *dicC* 유전자위에 치환된 mCherry 유전자가 온도 조건에 따라 발현이 조절되는 모습을 기대했다. pHL1178 벡터를 대장균 숙주 MG1655에 형질전환하여, 37℃ 온도 조건에서 mCherry 유전자의 발현을 관찰하였다.

[0039] 그 결과 도 8에서와 같이, mCherry 유전자가 발현되지 않는 것을 확인하여, 기대에 만족하는 것을 확인하였다.

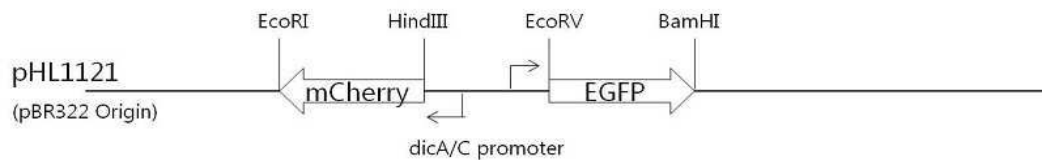
[0040] 실시예 5. pHL1188 벡터의 제조

[0041] 이에 본 발명자들은 단백질 [cnuK9E]의 효과를 확인하고자, 상기 pHL1178 벡터의 SphI 제한효소 절단부위에 단백질 [cnuK9E] 유전자를 그 자신의 프로모터와 함께 삽입한 벡터를 제조하고, pHL1188이라 명명하였다 (도 9 참조). pHL1188 벡터를 MG1655 숙주에 형질전환 하였을 때, 37℃ 온도 조건에서 mCherry 유전자가 발현되고, 25℃ 온도 조건에서 mCherry 유전자가 발현되지 않음을 확인하여 37℃ 온도 조건에서 목적유전자를 발현시키고, 25℃ 에서 상기 목적유전자를 억제시키는 특성을 가지는 형질전환용 플라스미드 벡터를 제작하였다 (도 10 참조).

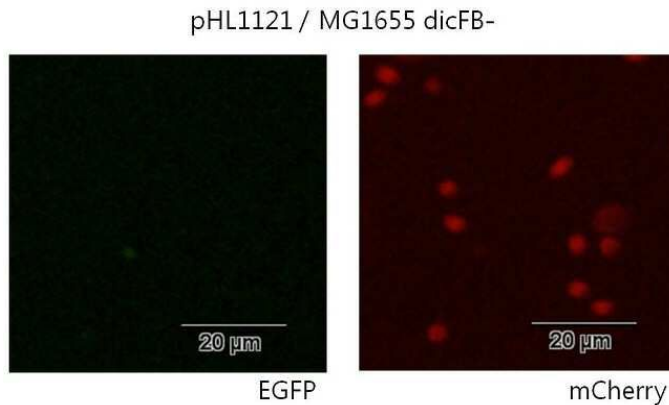
[0042] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

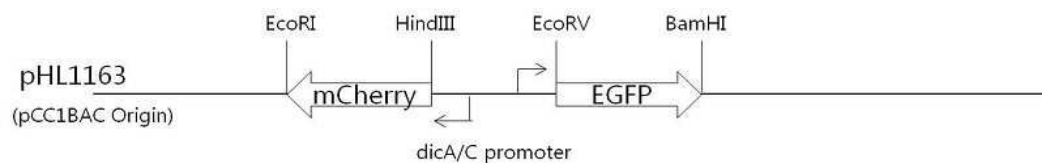
도면1



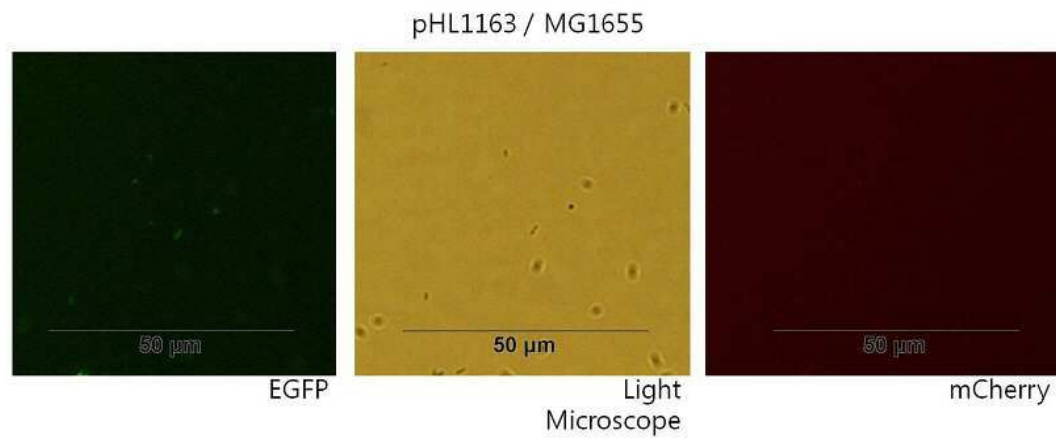
도면2



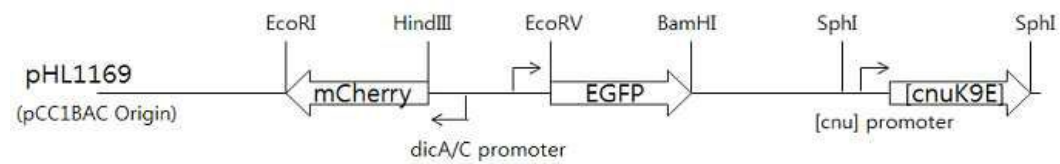
도면3



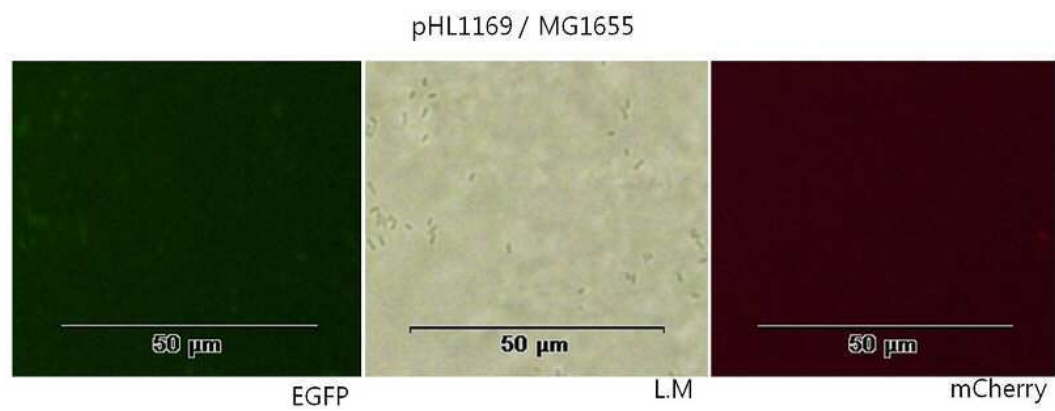
도면4



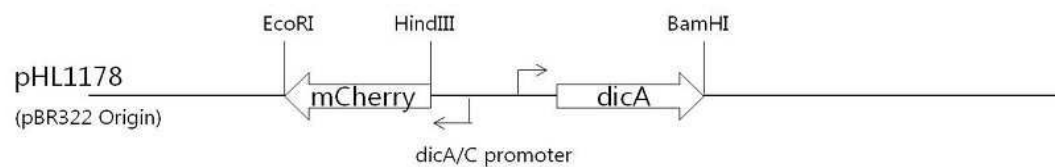
도면5



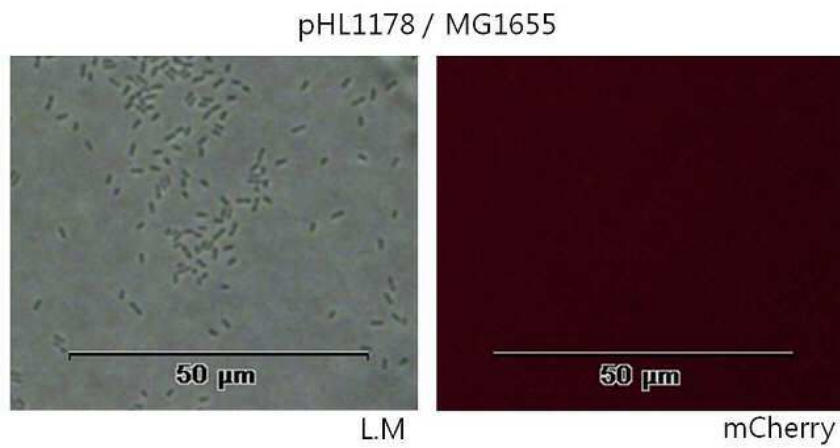
도면6



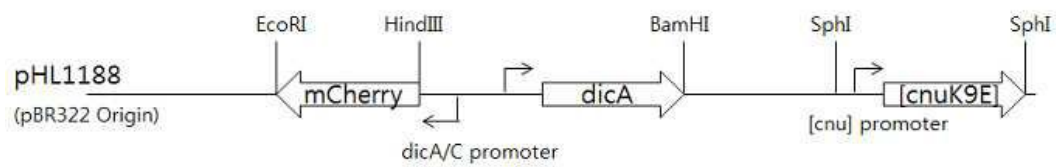
도면7



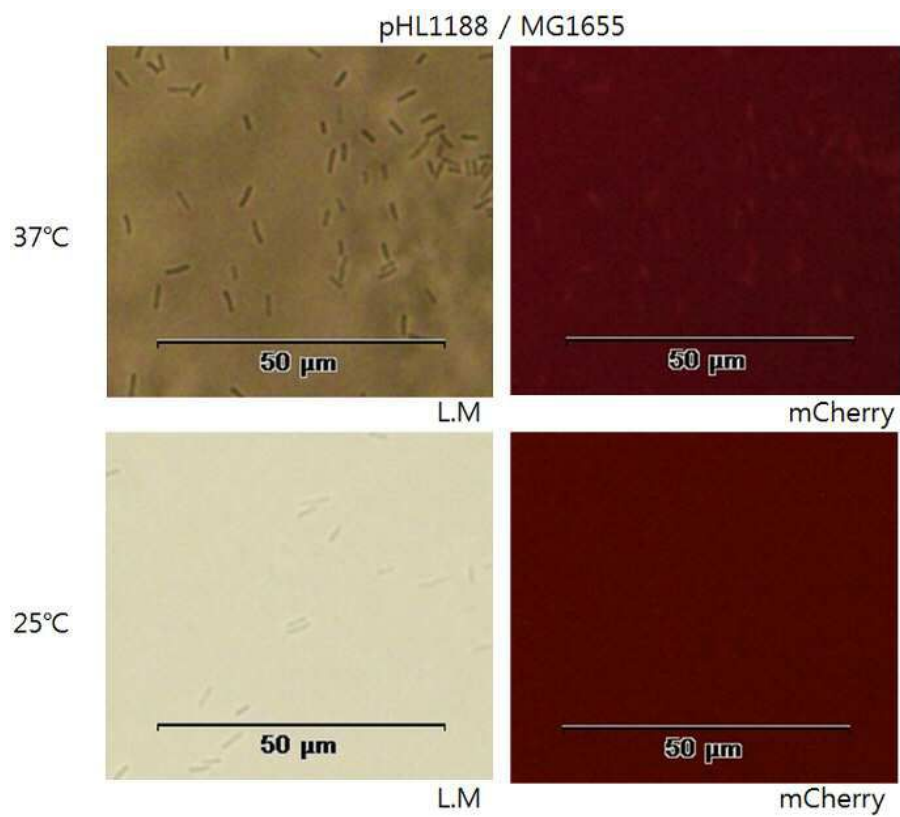
도면8



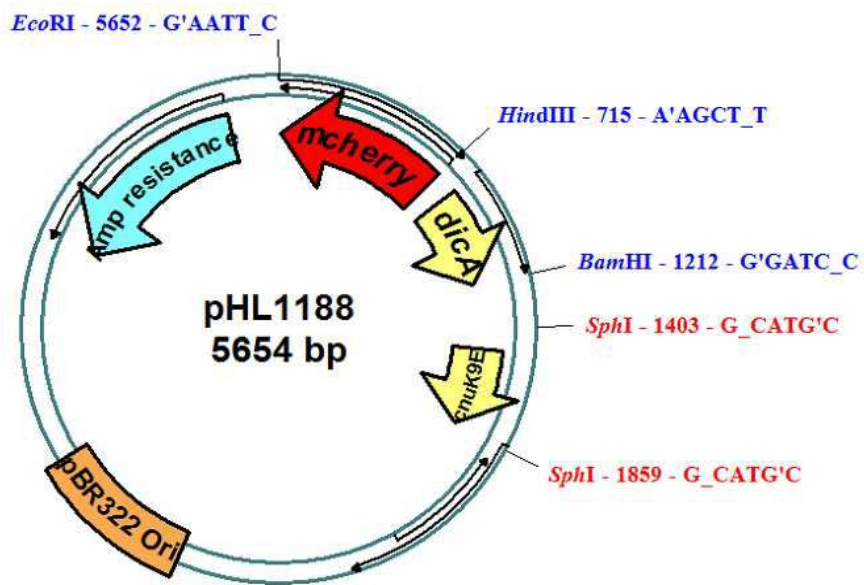
도면9



도면10



도면11



도면12

[illegible]

서 열 목 록

- | | |
|-------|---|
| <110> | The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC) |
| <120> | Recombinant vector for gene expression using temperature as a inducer |
| <130> | NP14-1344 |
| <160> | 5 |
| <170> | Kopatent In 2.0 |
| <210> | 1 |
| <211> | 82 |

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 1

taaaacacct ttattgtag tcataactaa caagatagat gttaacaaaa acatagtcaa 60

tacgatttag cattagctaa ct 82

<210> 2

<211> 408

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 2

atggaaacaa aaaatttaac tatcggcgaa cgcatacagg atcgtcggaa aaacctcaaa 60

cacacccaaa ggctctctgc taaagccctg aaaatctccc atgtgtctgt atcacaatgg 120

gaacgggggtg atagtgaacc tacagggaag aacctttttg ccctcagtaa agtattgcaa 180

tgctcaccaa catggattct atttggcgat gaagacaagc aaccaacacc acctgttgag 240

aagccagttg ccttatcccc caaagaacta gagctccttg agctgtttaa tgcactgcc 300

gaatcagaac aggataccca gctcgccgaa atcgagctc gagtaaaaaa cttcaataaa 360

ctctttgaag aattactaaa agcccgtcag cggacaaata aaagataa 408

<210> 3

<211> 234

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 3

gcatgttttc actgtcggaa tattaacca ggaatttatt atcttggtcg atgttgttgg 60

tgattgtcag ggatagtaaa gcgcgttact cttttcagag cagtttttca tccctgaata 120

tttgccatca gcgcattctt attattgtaa taacacaagc gttcactttt ggtgaaattt 180

tatcatcact aataatacct acccctttgg tattaattat tttatggacc tttt 234

<210> 4

<211> 216

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 4

atgactgttc aggactactt attagaattt cgcaaaatca gttcactcga aagtctggaa 60

aaactctacg accatcttaa ttacacctg acggacgatc aggaactgat caatatgtat	120
cgtgctgccg atcacctcg cgcagagctg gttcttgccg ggcgtttgtt tgacctcgcc	180
caggtaccga agtccgtctg gcactatgtc caataa	216
<210> 5	
<211> 5654	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> pHL1188	
<400> 5	
ttcctacttg tacagctcgt ccatgccgcc ggtggagtgg cggccctcgg cgcgttcgta	60
ctgttccacg atggtgtagt cctcgttggt ggaggtgatg tccaacttga tgttgacgtt	120
gtaggcgccg ggcagctgca cgggcttctt ggcctttag gtggtcttga cctcagcgtc	180
gtagtggccg ccgtccttca gcttcagcct ctgcttgatc tcgcccttca gggcgccgtc	240
ctcggggtag atccgctcgg aggaggcctc ccagcccatg gtcttcttct gcattacggg	300
gccgtcggag gggaagtgg tgcgcgcag cttcaccttg tagatgaact cgccgtcctg	360
caggaggag tcctgggtca cggtcaccac gccgccgtcc tcgaagtcca tcacgcgtc	420
ccacttgaag ccctcgggga aggacagctt caagtagtcg gggatgtcgg cggggtgctt	480
cacgtaggcc ttggagccgt acatgaactg aggggacagg atgtcccagg cgaaggcag	540
ggggccacc ttggtcacct tcagcttggc ggtctgggtg ccctcgtagg ggcggccctc	600
gccctcgccc tcgatctga actcgtggcc gttcacggag ccctccatgt gcaccttgaa	660
gcgcatgaac tccttgatga tggccatgtt atcctcctcg cccttgctca ccataagctt	720
ttaaacacc ttattgtta gtcataacta acaagataga tgttaacaaa aacatagtca	780
atacattta gcattagcta actatggaaa caaaaaattt aactatcgcc gaacgcatca	840
ggtatcgtcg gaaaaacctc aaacacacc aaaggtctct tgctaaagcc ctgaaaatct	900
cccatgtgtc tgtatcaca tgggaacggg gtgatagtga acctacagg aagaaccttt	960
ttgccctcag taaagtattg caatgctcac caacatggat tctatttggc gatgaagaca	1020
agcaaccaac accacctgtt gagaagccag ttgccttate ccccaaagaa ctagagctcc	1080
ttgagctgtt taatgactg ccagaatcag aacaggatac ccagctcgcc gaaatgcgag	1140
ctcgagtaaa aaacttcaat aaactctttg aagaattact aaaagccgt cagcggacaa	1200
ataaaagata aggatcctct acgccggacg catcgtggcc ggcatcaccg gcgccacagg	1260
tcggttgct ggcgcctata tcgccgacat caccgatggg gaagatcggg ctgccactt	1320

cgggctcatg agcgcttgtt tcggcgtggg tatggtggca ggccccgtgg cggggggact	1380
gttgggcgcc atctccttgc atgcgcatgt tttcacttgt cggatattaa accaggaatt	1440
tattatcttg ttcatgttg ttggtgattg tcagggatag taaagcgcgt tactcttttc	1500
agagcagttt ttcatccctg aatatttgcc atcagcgcat tcttattatt gtaataacac	1560
aagcgttcac ttttggtgaa attttatcat cactaataat acctaccct ttggtattaa	1620
ttattttatg gaccttttat gactgttcag gactacttat tagaatttcg caaaatcagt	1680
tcactcgaaa gtctggaaaa actctacgac catcttaatt acaccctgac ggacgatcag	1740
gaactgatca atatgtatcg tgctgccgat caccgtcgcg cagagctggt ttctggcggg	1800
cgtttgtttg acctcggcca ggtaccgaag tccgtctggc actatgtcca ataagcatgc	1860
accattcctt gcggcggcgg tgctcaacgg cctcaaccta ctactgggct gcttcctaat	1920
gcaggagtgc cataaggagg agcgtcgacc gatgcccttg agagccttca acccagtcag	1980
ctccttccgg tgggcgcggg gcatgactat cgtcgccgca cttatgactg tcttctttat	2040
catgcaactc gtaggacagg tgccggcagc gctctgggtc atttctggcg aggaccgctt	2100
tcgttgagc gcgacgatga tcggcctgtc gcttgcggta ttcggaatct tgcacgccct	2160
cgctcaagcc ttcttactg gtcccgcac caaacgtttc ggcgagaagc aggccattat	2220
cgccggcatg gcggccgacg cgctgggcta cgtcttctg gcgttcgca cgcgaggctg	2280
gatggccttc cccattatga ttcttctgc ttccggcggc atcgggatgc ccgcgttgca	2340
ggccatgctg tccaggcagg tagatgacga ccatcaggga cagcttcaag gatcgctcgc	2400
ggctcttacc agcctaactt cgatcactgg accgtgatc gtcacggcga tttatgccgc	2460
ctcggcgagc acatggaacg ggttggcatg gattgtaggc gccgccctat accttgtctg	2520
cctccccgcg ttgcgtcgcg gtgcatggag ccgggccacc tcgacctgaa tggagccgg	2580
cggcacctcg ctaacggatt caccactcca agaattggag ccaatcaatt ctgctggaga	2640
actgtgaatg cgcaaaccac cccttggcag aacatatcca tcgctccgc catctccagc	2700
agccgcacgc ggcgcatctc gggcagcgtt gggtcctggc cacgggtgcg catgatcgtg	2760
ctcctgtcgt tgaggaccgg gctaggctgg cggggttgcc ttactggtta gcagaatgaa	2820
tcaccgatac gcgagcgaac gtgaagcgac tgctgtgca aaacgtctgc gacctgagca	2880
acaacatgaa tggctctcgg tttccgtgtt tcgtaaagtc tggaaacgcg gaagtcagcg	2940
ccctgcacca ttatgttccg gatctgcac gcaggatgct gctggctacc ctgtggaaca	3000
cctacatctg tattaacgaa gcgctggcat tgaccctgag tgatttttct ctggtcccgc	3060
cgcattcata ccgccagtig ttaccctca caacgttcca gtaaccgggc atgttcatca	3120
tcagtaacct gtatcgtgag catctctct cgtttcatcg gtatcattac ccccatgaac	3180

agaaatcccc cttacacgga ggcatcagtg accaaacagg aaaaaaccgc ccttaacatg	3240
gccccgttta tcagaagcca gacattaacg cttctggaga aactcaacga gctggacgcg	3300
gatgaacagg cagacatctg tgaatcgctt cacgaccacg ctgatgagct ttaccgcagc	3360
tgccctcgcg gtttcgggtg tgacggtgaa aacctctgac acatgcagct cccggagacg	3420
gtcacagctt gtcgtgaagc ggatgccggg agcagacaag cccgtcaggg cgcgtcagcg	3480
ggtgttggcg ggtgtcgggg cgcagccatg acccagtcac gtagcgatag cggagtgtat	3540
actggcttaa ctatgcggca tcagagcaga ttgtactgag agtgcacat atgcggtgtg	3600
aaataccgca cagatgcgta aggagaaaaat accgcatcag gcgctcttcc gcttcctcgc	3660
tcactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct cactcaaagg	3720
cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaag	3780
gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc cataggctcc	3840
gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga aacccgacag	3900
gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct cctgttccga	3960
ccctgccgct taccggatac ctgtccgctt ttctcccttc gggaagcgtg gcgctttctc	4020
atagctcacg ctgtaggtat ctcatgttcg ttaggtcgt tcgctccaag ctgggctgtg	4080
tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct gcgccttacc cggtaaactat cgtcttgagt	4140
ccaacccggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac aggattagca	4200
gagcgaggta tgtaggcgtt gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac tacggctaca	4260
ctagaaggac agtatttggg atctgcgctc tgcgaagcc agttaccttc ggaaaaagag	4320
ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cggtggtttt ttgtttgca	4380
agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc ttttctacgg	4440
ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gtaagggat tttggtcatg agattatcaa	4500
aaaggatctt cacctagatc cttttaaat aaatatgaag ttttaaatca atctaaagta	4560
tatatgagta aacttggctt gacagttacc aatgcttaat cagtaggca cctatctcag	4620
cgatctgtct atttcgttca tccatagttg cctgactccc cgtcgtgtag ataactacga	4680
tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac ccacgtcac	4740
cggctccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc agaagtggtc	4800
ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattgttg ccgggaagct agagtaagta	4860
gttcgccagt taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc tgcaggcatc gtggtgtcac	4920
gctcgtcgtt tggtatggct tcattcagct ccggttccca acgatcaagg cgagttacat	4980
gatcccccat gttgtgcaaa aaagcgggtt gtccttcgg tcctccgatc gttgtcagaa	5040

gtaagttggc cgcagtgtta tcactcatgg ttatggcagc actgcataat tctcttactg	5100
tcattgccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagta ctcaaccaag tcattctgag	5160
aatagtgtat gggcgaccg agttgctctt gcccggcgtc aacacgggat aataccgcgc	5220
cacatagcag aactttaaaa gtgctcatca ttggaaaacg ttcttcgggg cgaaaactct	5280
caaggatctt accgctgttg agatccagtt cgatgtaacc cactcgtgca cccaactgat	5340
cttcagcatc ttttactttc accagcgttt ctgggtgagc aaaaacagga aggcaaatg	5400
ccgcaaaaaa ggggaataagg gcgacacgga aatgttgaat actcatactc ttcctttttc	5460
aatattattg aagcatttat cagggttatt gtctcatgag cggatacata ttgaaatgta	5520
tttagaaaaa taaacaata ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagtg ccacctgacg	5580
tctaagaaac cattattatc atgacattaa cctataaaaa taggcgtatc acgaggccct	5640
ttcgtcttca agaa	5654