



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0040763
(43) 공개일자 2018년04월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/74 (2006.01) C12N 1/20 (2006.01)
C12N 13/00 (2017.01) C12N 15/87 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/74 (2013.01)
C12N 1/20 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-0132124

(22) 출원일자 2016년10월12일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

서강대학교산학협력단

서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)

(72) 발명자

이진원

서울특별시 송파구 오륜동 양재대로 1218 올림픽선수기자촌아파트 201동 1601호

조재훈

서울특별시 동작구 동작대로 29길 119 사당동 극동아파트 101동 1806호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

윤대웅, 공병욱

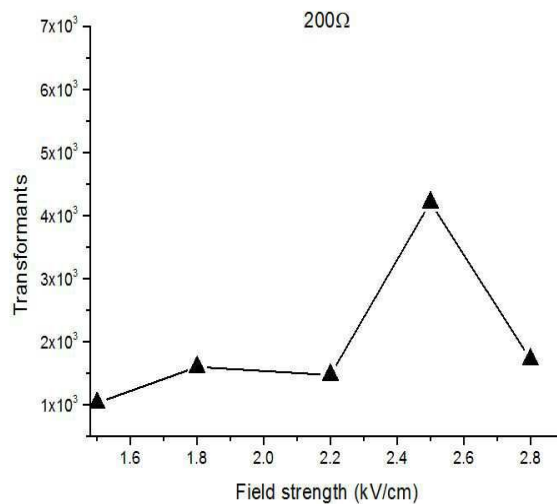
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 전기천공법을 이용한 메틸로모나스 메타니카 균주의 형질전환 방법

(57) 요약

본 발명은 전기천공법을 이용한 메틸로모나스 메타니카의 형질전환 방법 및 상기 방법에 의해 제조된 형질전환체를 제공한다. 본 발명의 전기천공법을 이용한 메틸로모나스 메타니카의 형질전환 방법은 전기장 세기, 저항값, 플라스미드 농도 및 안정화 기간의 조건을 최적화하여 높은 효율로 메틸로모나스 메타니카를 형질전환을 할 수 있으므로 메틸로모나스 메타니카에 대한 유전자 조작에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

C12N 13/00 (2013.01)

C12N 15/87 (2013.01)

(72) 발명자

김현수

서울특별시 강남구 학동로 609 12동 907호 (청담동, 삼익아파트)

조속형

경기도 고양시 덕양구 백양로 126 1108동 901호 (화정동, 은빛마을11단지아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 201632003

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 (재)한국연구재단

연구사업명 C1가스리파이너리

연구과제명 C1 가스 전환 기술 공통시험 연구

기 여 율 1/1

주관기관 서강대학교

연구기간 2016.03.01 ~ 2017.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

다음 단계를 포함하는 메틸로모나스 메타니카(*Methylobomonas methanica*)의 형질전환 방법:

- (a) 메틸로모나스 메타니카 균주를 반응능세포(competant cell)로 제조하는 단계;
- (b) 상기 반응능세포에 플라스미드를 전기천공법(electroporation)을 이용하여 도입하는 단계로서, 상기 전기천공법은 전기장의 세기 2.4 kV/cm 내지 2.6 kV/cm, 저항값 350 Ω 내지 450Ω, 플라스미드 농도 600 ng 내지 700 ng의 조건으로 실시하는 것을 특징으로 하는 단계; 및
- (c) 상기 플라스미드가 도입된 반응능세포를 배지에서 36-60시간 동안 배양하여 안정화시키는 단계.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 배지에 메탄 및 산소를 공급하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (b)의 전기장 세기는 2.5 kV/cm인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (b)의 저항값은 400 Ω인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (b)의 플라스미드 농도는 700 ng인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (c)는 48시간 동안 실시하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (c)는 28-30℃의 배양 온도에서 실시하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항의 방법에 의해 형질전환된 메틸로모나스 메타니카(*Methylobomonas methanica*) 균주.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 전기천공법을 이용한 메틸로모나스 메타니카 균주의 형질전환 조건 최적화 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 메틸로모나스 메타니카 균주를 대상으로 형질전환시 최적의 전기천공법의 조건을 설정하여 고효율로 형질전환을 수행할 수 있는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 메탄영양세균은 메탄을 단일 탄소원과 에너지원으로 이용가능한 미생물로서 C1 가스 즉 셰일 가스, 바이오 가스 및 혼합 가스에서 유래하는 탄소수가 1개인 가스를 전환할 수 있는 가능성을 지닌 균주이다. 메탄은 기초 화학원료나 수송용 연료 측면에서 석유화학의 대체품으로 여겨지고 있다. 하지만 가스 상태의 메탄은 수송 용이성이 떨어지고 이미 갖춰져 있는 산업 인프라를 활용하기 어렵다는 문제점을 지니고 있다. 따라서 현재 메탄은 연소에 의한 전력이나 열 생산에 이용하는 등의 활용에 그치고 있다. 이러한 관점에서 생물학적 전환을 통하여 메탄을 고부가가치 화합물, 예를 들면 젖산(lactate), PHB를 포함한 바이오폴리머, 엑토인(ectoine), 항균 단백질 등으로 전환하는 연구가 주목받고 있다. 하지만 메탄영양세균의 유전자 조작이 어렵다는 점이 생체계를 통한 메탄 전환의 장애물로 작용하고 있다. 메탄영양세균에서 유전자를 조작하고 효소를 발현시킬 수 있는 기술이 절대적으로 부족한 실정이다. 메탄영양균 중 유전자 조작 기술이 알려져 있는 균주는 일부에 그치며 그조차 일반적으로 논문 등의 연구에 많이 이용되는 대장균(*E. coli*)이나 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) 등에 비하면 까다롭다.

[0004] 이러한 메탄영양세균을 대표하는 미생물로는 *Methylobacterium methanica*, *Methylococcus capsulatus* Bath, 등이 있다. *Methylococcus capsulatus* Bath와 *Methylobacterium trichosporium*의 경우 *E. coli* S17-1 등의 donor strain을 이용한 컨주케이션 방법을 통해 재조합 균주 개발이 보고되었다. *Methylobacterium*속에 해당하는 일부 균주도 같은 방법으로 유전자 조작을 한 연구가 보고되었다. 이처럼 메탄영양세균에서 유전자 조작시 일반적으로 사용하는 컨주케이션 방법이 아닌 전기천공법을 통해 donor strain을 거치지 않고 간편하게 *Methylobacterium methanica* MC09 균주에 벡터를 형질전환시켜 재조합 *Methylobacterium methanica* MC09를 제작할 수 있는 방법을 개발하였다.

[0006] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 공개특허 제10-2015-0054302호
(특허문헌 0002) 등록특허 제10-1258119호
(특허문헌 0003) 등록특허 제10-1489723호

비특허문헌

[0009] (비특허문헌 0001) Korean J. Food & Nutrition Vol, 5. No. 2. 77-83(1992)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명자들은 메틸로모나스 메타니카(*Methylobacterium methanica*)의 유전자 조작을 위한 기본적 도구로서 전기천

공법을 이용한 형질전환 방법 개발을 위해 다양한 조건을 변화시키며 형질전환의 효율을 비교하였다. 그 결과, 전기장 세기, 저항값, 플라스미드 농도 및 안정화 시간이 형질전환 효율의 결정적인 요소임을 규명함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0011] 따라서, 본 발명의 목적은 메틸로모나스 메타니카의 형질전환 방법을 제공하는데 있다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 상기 방법에 의해 제조된 형질전환체를 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명 및 청구범위에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0016] 본 발명은 다음 단계를 포함하는 메틸로모나스 메타니카(*Methylobacterium methanica*)의 형질전환 방법을 제공한다:

[0017] (a) 메틸로모나스 메타니카 균주를 반응능세포(competent cell)로 제조하는 단계;

[0018] (b) 상기 반응능세포에 플라스미드를 전기천공법(electroporation)을 이용하여 도입하는 단계로서, 상기 전기천공법은 전기장의 세기 2.4 kV/cm 내지 2.6 kV/cm, 저항값 350 Ω 내지 450 Ω, 플라스미드 농도 600 ng 내지 700 ng의 조건으로 실시하는 것을 특징으로 하는 단계; 및

[0019] (c) 상기 플라스미드가 도입된 반응능세포를 배지에서 36-60시간 동안 배양하여 안정화시키는 단계.

[0021] 본 발명자들은 메틸로모나스 메타니카의 유전자 조작을 위한 기본적 도구로서 전기천공법을 이용한 형질전환 방법 개발을 위해 다양한 조건을 변화시키며 형질전환의 효율을 비교하였고 그 결과, 전기장 세기, 저항값, 플라스미드 농도 및 안정화 시간이 형질전환 효율의 결정적인 요소임을 규명하였다.

[0022] 상기 방법에 있어서, 단계 (a)의 플라스미드는 메틸로모나스 메타니카로부터 유도되는 복제원점을 가지고 외래 유전자 및 선별을 위한 내성 유전자를 포함한다.

[0023] 상기 내성 유전자는 카나마이신(kanamycin)에 내성을 지닌 유전자인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0024] 본 발명자들은 도 4의 개열지도로 표시되는 MEV 벡터를 형질전환을 위한 플라스미드로 이용하였다.

[0025] 상기 방법에 있어서, 단계 (b)의 전기천공법은 전기장의 세기 2.4 kV/cm 내지 2.6 kV/cm, 저항값 350 Ω 내지 450 Ω, 플라스미드 농도 600 ng 내지 700 ng의 조건으로 실시하는 것이 바람직하다.

[0026] 보다 바람직하게는 전기장 세기 2.5 kV/cm, 저항값 400 Ω, 플라스미드 농도 700 ng의 조건으로 전기천공법을 실시한다.

[0027] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상술한 조건으로 전기천공법을 실시하여 메틸로모나스 메타니카 반응능세포에 플라스미드를 도입하고, 반응능세포를 배지에서 40-52시간 동안 배양하여 안정화시키는 단계를 거침으로써 효율적으로 형질전환체를 얻을 수 있다. 보다 바람직하게는 배지에서 48시간 동안 배양하여 안정화시킨다.

[0028] 안정화 기간이 24시간 미만인 경우 형질전환이 아예 일어나지 않을 수 있으며, 52시간 이상 안정화 기간을 주는 경우, 우점종이 생길 수 있는 위험이 높아진다.

[0029] 상기 방법에 있어서, 단계 (c)에서 배지는 메틸로모나스 메타니카 배양에 이용 가능한 당업계에 공지된 다양한 배지를 이용할 수 있다.

[0030] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 단계 (c)의 배지로 1 ml 미량원소 용액(1L 당 500 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 400 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 mg $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 15 mg H_3BO_3 , 250 mg EDTA), 2 ml 인산염 스톡 용액(1L 당 26 g KH_2PO_4 , 62 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 및 2 ml 비타민 스톡(1×) (1L 당 2 mg 비오틴, 2 mg 엽산, 5 mg 티민 HCl, 5 mg Ca 판토텐산염, 0.1 mg 비타민 B12, 5 mg 리보플라빈, 5 mg 니코틴아마이드)를 포함하는 NMS 배지(1L 당 1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g KNO_3 , 0.2 g $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.0038 g Fe-EDTA, 0.0005 g $\text{NaMo} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)를 이용하며, 메탄 및 산소를 3:7의 비율로 배지에 공급한다.

[0031] 상기 방법에 있어서, 단계 (c)의 플라스미드가 도입된 반응능세포는 25-33℃에서 배양하는 것이 바람직하고 28-30℃에서 배양하는 것이 더욱 바람직하며, 30℃에서 배양하는 것이 가장 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0033] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 상기 방법에 의해 형질전환된 메틸로모나스 메타니카(*Methylomonas methanica*) 균주를 제공한다.

발명의 효과

[0035] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0036] (i) 본 발명은 전기천공법을 이용한 메틸로모나스 메타니카의 형질전환 방법 및 상기 방법에 의해 제조된 형질전환체를 제공한다.

[0037] (ii) 본 발명의 전기천공법을 이용한 메틸로모나스 메타니카의 형질전환 방법은 전기장 세기, 저항값, 플라스미드 농도 및 안정화 기간의 조건을 최적화하여 높은 효율로 메틸로모나스 메타니카를 형질전환을 할 수 있으므로 메틸로모나스 메타니카에 대한 유전자 조작에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0039] 도 1은 전기천공법을 이용한 메틸로모나스 메타니카의 형질전환에 있어서 전기장 세기에 따른 형질전환체 수 변화를 측정한 결과이다.

도 2는 전기천공법을 이용한 메틸로모나스 메타니카의 형질전환에 있어서 저항값에 따른 형질전환체 수 변화를 측정한 결과이다.

도 3은 전기천공법을 이용한 메틸로모나스 메타니카의 형질전환에 있어서 플라스미드 농도에 따른 형질전환체 수 변화를 측정한 결과이다.

도 4는 메틸로모나스 메타니카의 형질전환에 사용된 벡터의 맵을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0040] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0042] 실시예

[0043] 실시예 1: 전기천공법을 이용한 형질전환 방법

[0044] 메틸로모나스 메타니카 균주를 NMS 배지에서 메탄:산소=3:7로 OD₆₀₀ 0.6-0.8까지 28-30℃, 230 rpm으로 배양하였다. OD₆₀₀ 0.6-0.8에 도달하면 얼음에 꽂아 배양액을 차갑게 만든 후, 4℃에서 원심분리하여 메틸로모나스 메타니카를 수확하였다. 차가운 10% 글리세롤을 이용하여 수확한 메틸로모나스 메타니카를 세척하고, 반응능세포(competent cell)를 제조하였다. 제조한 메틸로모나스 메타니카 반응능세포에 원하는 벡터(여기서 이용한 것은 MEV 벡터)를 700 ng 넣은 후, 전기장 세기를 2.5 kv/cm로 설정하고 저항값을 600 Ω으로 설정하여 전기천공법을 실시하였다. 전기천공시킨 세포를 NMS 배지가 담긴 세럼 바틀로 옮겨 안정화시켰다. 이때 메탄:산소=3:7로 공급하고 28-30℃, 230 rpm에서 안정화하였다. 약 이틀간 안정화한 후 세포를 수확하였다. 수확한 세포를 소량의 NMS로 부유시킨 후 셀렉션마커(여기선 카나마이신)가 포함된 NMS 한천 플레이트에 도말하였다. 세포가 도말된 NMS 한천 플레이트를 28-30℃, 메탄:산소=3:7 조건에서 콜로니가 뜰 때까지 배양시켰다.

[0046] 실시예 2: 전기천공법을 이용한 재조합 균주 제작의 최적화 방법

[0047] 안정화(stabilization), 장력(field strength), 시간 상수(time constant), DNA 농도를 다양한 범위에서 테스트하여 최적의 전기천공법 효율이 나타나는 조건을 확인하였다.

[0049] 1-1. 안정화 조건(Stabilization condition)

[0050] 어떤 배지 조성에서 얼마의 기간 동안 안정화 시키는지에 따라 천공이 일어날 수도 있고 전혀 일어나지 않을 수도 있다.

[0051] 배지조성의 경우 NMS 배지(1L 당 1 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 g KNO_3 , 0.2 g $CaCl_2 \cdot H_2O$, 0.0038 g Fe-EDTA, 0.0005 g $NaMo \cdot 4H_2O$); 1 ml 미량원소 용액(1L 당 500 mg $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 400 mg $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 20 mg $MnCl_2 \cdot 7H_2O$, 50 mg $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 10 mg $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, 15 mg H_3BO_3 , 250 mg EDTA), 2 ml 인산염 스톡 용액(1L 당 26 g KH_2PO_4 , 62 g $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$), 및 2 ml 비타민 스톡(1×) (1L 당 2 mg 비오틴, 2 mg 엽산, 5 mg 티민 HCl, 5 mg Ca 판토텐산 염, 0.1 mg 비타민 B12, 5 mg 리보플라빈, 5 mg 니코틴아마이드)를 이용하였다. *Methylobacterium methanica*는 메탄과 메탄올을 다 활용할 수 있는 메타볼리즘을 지니고 있으나 메탄올을 NMS 배지에 첨가할 경우 안정화 기간에 상관없이 형질전환이 되지 않는다고 볼 수 있다. 반면에 NMS 배지를 안정화 용액으로 사용하여 세럼바틀에서 메탄:산소=3:7의 조성으로 안정화시킬 경우 형질전환이 일어난다. 안정화 기간이 하루인 경우 형질전환이 아예 안 일어나거나 100개 이상의 콜로니가 생성되는 등 편차가 심하다. 따라서 안정화 기간의 이틀로 주는 것이 적당하다(28-30℃, 230rpm). 그 이상 안정화 기간을 줄 경우 우점종이 생길 수 있는 위험이 높아진다.

표 1

[0053] 안정화 기간에 따른 형질전환체 수

	5시간	1일	2일
NMS + 0.1% MeOH	0	2	1
NMS + 1% MeOH	5	0	1
NMS + CH_4	0	0/100	+100

[0056] 1-2: 전기장의 세기(field strength)

[0057] 전기장의 경우, 0.2 mm 큐벳을 이용하여 전압을 변경시켜주며 실험하였다. 이때의 실험 결과는 도 1과 같다. 도 1은 각각 저항값을 변화시켜주어 다른 시간 상수(time constant) 환경에서 전기장의 세기를 테스트한 것이다. 실험 결과, 비슷한 경향성을 보이며 공통적으로 2.5 kv/cm에서 형질전환체가 가장 많은 것을 확인할 수 있다.

[0059] 1-3. 저항값(resistance)

[0060] 시간 상수의 경우, 저항값을 200 Ω에서 700 Ω까지 변화시켜주며 테스트하였다. 시간 상수(Time constant)=저항값(Resistance)×정전용량(Capacitance)이다. 본 실험에서는 정전용량을 고정하고 저항값을 변화시켜 시간 상수에 변화를 주었다.

표 2

[0061]

저항값(Ω)	시간 상수
200	5.0
300	7.4
400	9.9

500	12.2
600	14.5
700	16.9

[0064] 도 2는 다양한 장력 환경에서 시간은 고정하고 저항값을 달리하여 시간 상수를 변화시켰을 때의 형질전환체를 나타낸다. 동일하게 400 Ω에서 형질전환 효율이 높은 것이 확인되었다.

[0066] 1-4: DNA 농도

[0067] DNA 농도도 전기천공 시 형질전환 효율에 영향을 주는 요인임을 도 3에서 확인하였다. 100 ng에서 800 ng까지 DNA의 농도를 달리했을 때, 형질전환체의 수가 최대 2.7배 차이나는 것을 확인하였다.

[0068] 위의 결과들을 종합하여 전기장 2.5 kV/cm, 저항 400Ω, DNA 농도 700 ng의 조건으로 전기천공 시켜주는 것이 가장 높은 형질전환체 효율을 얻을 수 있는 조건이다. 이때 안정화 용액은 세럼 바틀에서 NMS+메탄을 이용하여 30℃, 230rpm에서 이틀간 안정화 시켜준다. 또한, 기체 조성은 메탄:산소=3:7이며 매일 순환시켜준다. 이틀 간 안정화 시켜준 후 선별마커인 카나마이신 50 μg/ml가 포함된 NMS 한천 플레이트에 도말하여 30℃ 인큐베이터에서 메탄과 산소를 공급하며 약 2-3주간 배양시켜 준다.

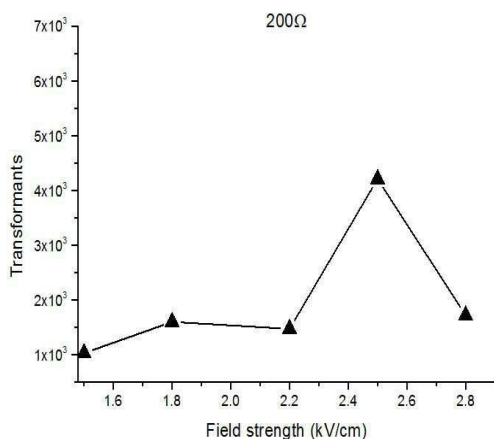
[0069] 이 실험에 이용한 벡터는 모두 MEV 벡터이다.

[0070] 이러한 실험 결과를 통해 대표적인 메탄영양균주인 *Methylobacterium methanica* MC09의 전기천공법을 통한 균주 개발 방법을 고안하였다.

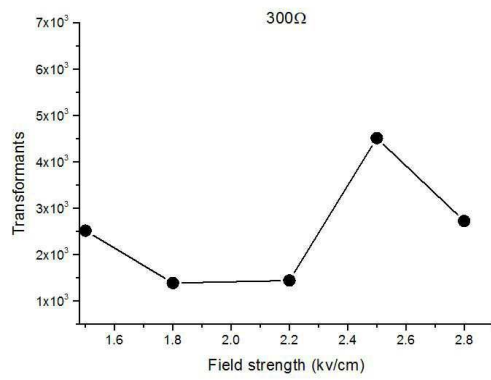
[0072] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

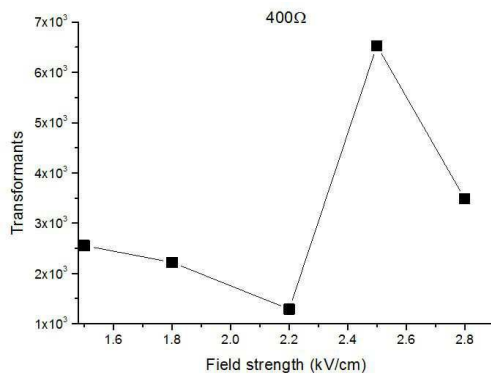
도면1a



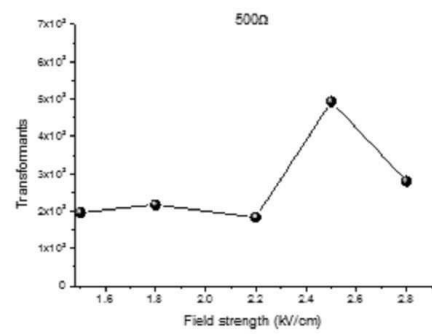
도면1b



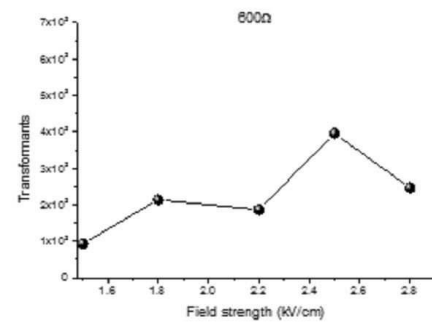
도면1c



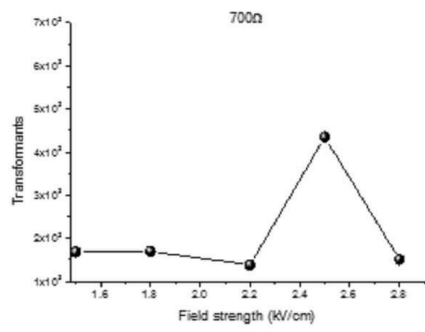
도면1d



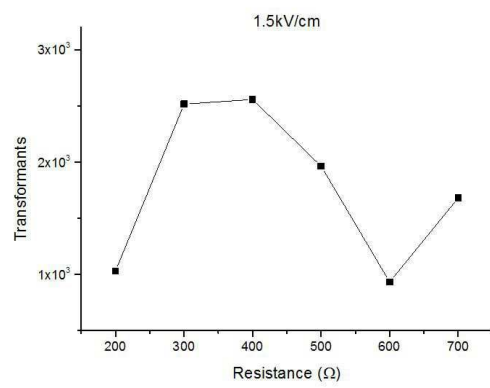
도면1e



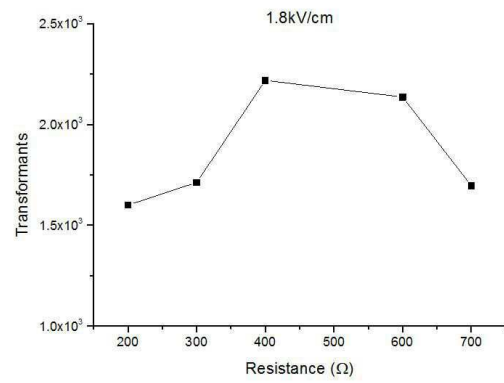
도면1f



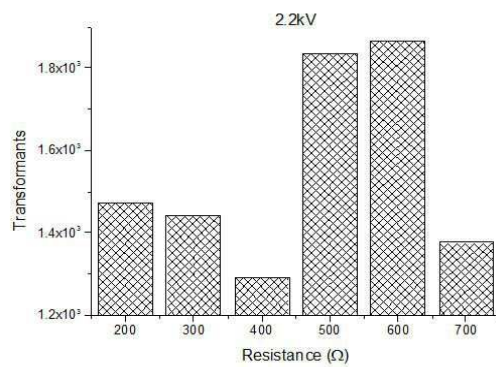
도면2a



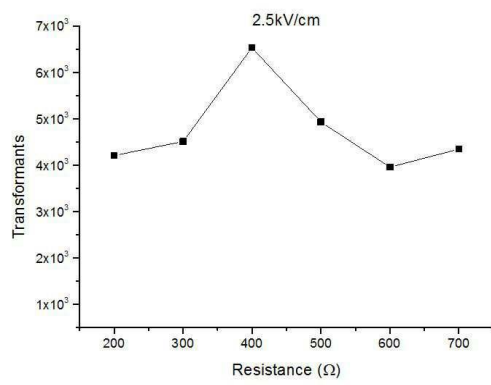
도면2b



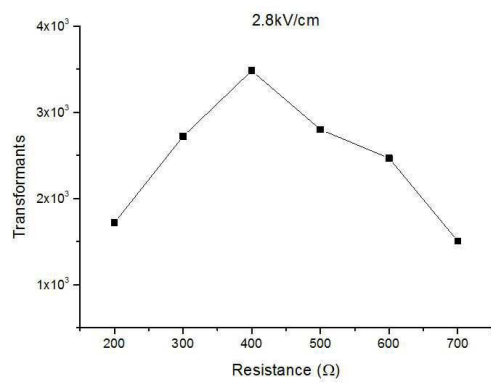
도면2c



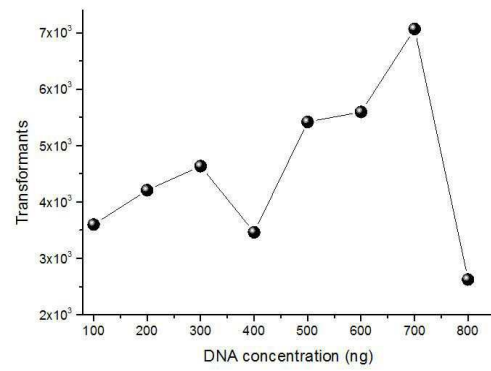
도면2d



도면2e



도면3



도면4

