



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0047914
(43) 공개일자 2019년05월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/79 (2006.01) C12N 15/64 (2006.01)
C12N 9/06 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/79 (2013.01)
C12N 15/64 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0142297
(22) 출원일자 2017년10월30일
심사청구일자 2017년10월30일

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 신선로 365 (용당동,
부경대학교)
(72) 발명자
최태진
부산광역시 해운대구 대천로103번길 29, 508동
1701호 (좌동, 대동아파트)
김민정
부산광역시 해운대구 선수촌로208번길 112
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최규환

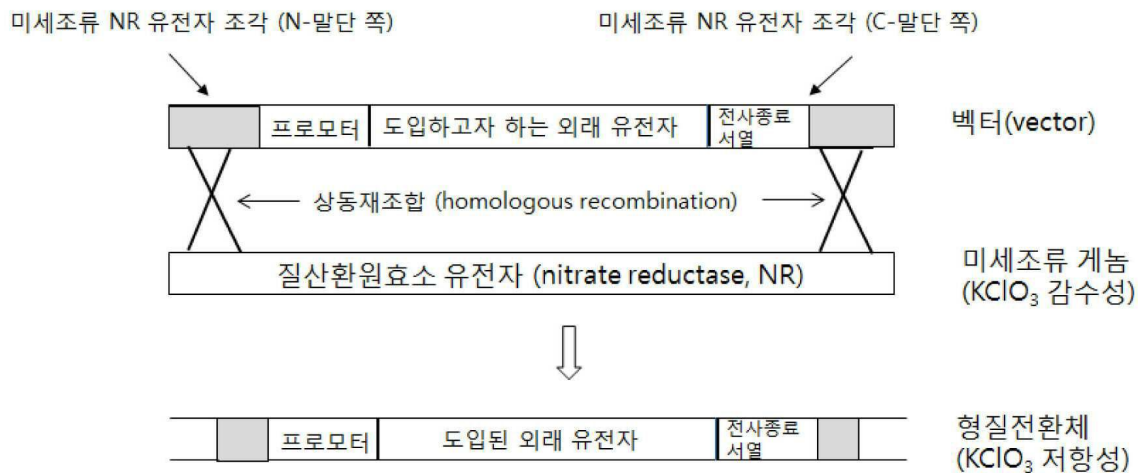
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 질산환원효소 유래 서열을 포함하는 미세조류 형질전환용 재조합 벡터 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 5'에서 3' 방향으로 질산환원효소의 N-말단 코딩 폴리뉴클레오티드, 프로모터, 외래 유전자 삽입을 위한 MCS(multiple cloning site), 터미네이터 및 질산환원효소의 C-말단 코딩 폴리뉴클레오티드가 작동가능하게 연결된 것을 특징으로 하는 미세조류 형질전환용 재조합 벡터 및 이의 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 9/0044 (2013.01)

C12Y 107/99004 (2013.01)

(72) 발명자

김태호

부산광역시 해운대구 대천로 187, 108동 1403호

임효진

부산광역시 해운대구 해운대로 253, 104동 801호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1525006470

부처명 해양수산부

연구관리전문기관 해양수산과학기술진흥원

연구사업명 수산실용화기술개발

연구과제명 형질전환 미세조류를 이용한 VHSV 재조합 백신 대량생산 기술개발

기 여 율 1/1

주관기관 부경대학교산학협력단

연구기간 2017.01.01 ~ 2017.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

5'에서 3' 방향으로 질산환원효소의 N-말단 코딩 폴리뉴클레오티드, 프로모터, 외래 유전자 삽입을 위한 MCS(multiple cloning site), 터미네이터 및 질산환원효소의 C-말단 코딩 폴리뉴클레오티드가 작동가능하게 연결된 것을 특징으로 하는 미세조류 형질전환용 재조합 벡터.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 질산환원효소의 N-말단 코딩 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 미세조류 형질전환용 재조합 벡터.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 질산환원효소의 C-말단 코딩 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 미세조류 형질전환용 재조합 벡터.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 MCS에 외래 유전자가 삽입된 것을 특징으로 하는 미세조류 형질전환용 재조합 벡터.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 재조합 벡터로 형질전환된 미세조류.

청구항 6

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 재조합 벡터에 외래 유전자를 삽입하여 외래 유전자의 재조합 벡터를 제조하는 단계;

상기 외래 유전자의 재조합 벡터로 미세조류 세포를 형질전환하는 단계; 및

상기 형질전환된 미세조류를 염소산염이 함유된 선별 배지에서 암배양하는 단계;를 포함하는, 형질전환된 미세조류의 선별 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 선별 배지는 글루코스를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 형질전환된 미세조류의 선별 방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 염소산염은 염소산칼륨, 염소산나트륨 또는 염소산리튬인 것을 특징으로 하는 형질전환된 미세조류의 선별 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 질산환원효소 유래 서열을 포함하는 미세조류 형질전환용 재조합 벡터 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 재조합 단백질 시장은 2001년 이후 매년 35%의 성장을 이루었으며, 2013년에서 2018년까지는 매년 8.83%의 성장을 이루어 2017년에는 1,410 억 달러에 달할 것으로 예측되었다. 현재 생산되어 이용되고 있는 재조합 단백질은 39%가 대장균(*Escherichia coli*), 35%가 CHO(Chinese hamster ovary) 세포, 15%가 효모, 10% 정도가 기타 포유

류 시스템을 이용하고 있으나, 최근 미국과 중국을 중심으로 형질전환 미세조류를 이용하여 다양한 치료용 단백질 및 백신 등의 생산에 관한 연구가 이루어지고 있으며, 미세조류의 여러 장점 때문에 앞으로 미세조류를 이용한 재조합 단백질의 생산이 늘어날 것으로 예상된다.

[0003] 미세조류의 형질전환 기술은 클라미도모나스 레인하르티(*Chlamydomonas reinhardtii*)를 대표 모델로 하여 개발되고 있으나, 최근 클로렐라(*Chlorella*) 등 다양한 미세조류를 대상으로 한 형질전환 기술들이 보고되고 있다. 본 발명자는 이전의 연구를 통해 미세조류인 클로렐라 엘립소이데아(*Chlorella ellipsoidea*)에 넙치의 성장 호르몬을 도입하여 형질전환한 후 이들을 브라인 쉬림프(Brine shrimp) 아르테미아(*Artemia*)에 축적시킨 후, 넙치 치어에 먹여 약 1개월 후 넙치의 성장이 대조구에 비해 25% 증가된 것을 확인한 바 있다.

[0004] 현재 개발되어 있는 미세조류 형질전환 기술에서의 문제점은 도입되는 유전자가 형질전환에 이용하는 플라스미드의 양에 따라 여러 개가 들어가 미세조류의 게놈에 무작위로 삽입되기 때문에 원래 있던 유전자의 돌연변이를 유도할 수 있다는 것이다. 더 중요한 문제점은 형질전환된 개체를 효과적으로 선별하는 방법이 매우 제한적이며, 비용이 많이 들고 환경적으로 위험하다는 것이다. 즉, 일반적으로 형질전환체의 선별을 위해서는 도입하려는 유전자와 함께 항생제 내성 유전자가 동시에 도입되도록 하고, 해당 항생제가 들어 있는 배지에서 형질전환체를 선별하는 것이다. 그러나 미세조류는 진핵생물로서 대부분의 항생제에 대한 자연적인 내성을 가지고 있어 형질전환체 선별을 위하여 사용할 수 있는 항생제가 매우 제한적이며, 각 미세조류별로 항생제 내성에도 차이가 있고, 사용할 수 있는 항생제의 경우 가격이 매우 비싸기 때문에 그 활용이 제한적이다. 예를 들어, *ble* 유전자를 가지는 형질전환체는 블레오마이신(bleomycin)을 이용하여 선별할 수 있으나 블레오마이신 50mg의 가격이 1,374,000원에 달한다.

[0005] 이에 본 발명자들은 미세조류 유래 질산환원효소의 DNA 서열 일부를 포함하는 재조합 벡터를 개발하고, 상기 질산환원효소의 DNA 서열을 통한 상동재조합을 통해 외래 유전자를 도입하며, 외래 유전자가 도입된 형질전환체를 항생제가 아닌 염소산염을 포함하는 배지에서 선별할 수 있는 방법을 개발하였다.

[0006] 한편, 한국공개특허 제2011-0090565호에는 '미세조류의 형질전환에 유용한 벡터 및 상기 벡터에 의해 형질전환된 미세조류'가 개시되어 있고, 한국등록특허 제1567308호에는 '미세조류의 바이오매스와 지질 생산성을 증가시키기 위한 재조합 벡터 및 이의 용도'가 개시되어 있으나, 본 발명의 질산환원효소 유래 서열을 포함하는 미세조류 형질전환용 재조합 벡터 및 이의 용도에 대해서는 기재된 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 클로렐라 유래 질산환원효소 코딩 유전자의 N-말단 및 C-말단 서열을 각각 프로모터 상류 및 터미네이터 하류에 연결시킨 재조합 벡터를 제작하고, 어류의 출혈성 패혈증 바이러스(VHSV)의 당단백질을 코딩하는 유전자를 도입한 재조합 벡터로 클로렐라 불가리스 균주에 형질전환시킨 후, 염소산칼륨을 함유하는 선별배지에서 암 배양한 결과, VHSV의 당단백질 코딩 유전자가 도입된 형질전환체만 상기 선별배지에서 성장하는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 5'에서 3' 방향으로 질산환원효소의 N-말단 코딩 폴리뉴클레오티드, 프로모터, 외래 유전자 삽입을 위한 MCS(multiple cloning site), 터미네이터 및 질산환원효소의 C-말단 코딩 폴리뉴클레오티드가 작동가능하게 연결된 것을 특징으로 하는 미세조류 형질전환용 재조합 벡터를 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터의 MCS에 외래 유전자가 삽입된 외래 유전자의 재조합 벡터로 형질전환된 미세조류를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터에 외래 유전자를 삽입하여 외래 유전자의 재조합 벡터를 제조하는 단계; 상기 외래 유전자의 재조합 벡터로 미세조류 세포를 형질전환하는 단계; 및 상기 형질전환된 미세조류를 염소산염이 함유된 선별 배지에서 암배양하는 단계;를 포함하는, 형질전환된 미세조류의 선별 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명의 미세조류 형질전환 방법은 재조합 벡터 내 질산환원효소 유전자 유래 DNA 단편과 게놈 상의 질산환원효소 유전자간의 상동재조합을 통해 외래 유전자를 효과적으로 도입시킬 수 있고, 상기 상동재조합으로 게놈 상

의 질산환원효소 유전자가 외래 유전자로 치환되어 질산환원효소가 기능하지 못하므로, 형질전환된 미세조류는 염소산염이 함유된 배지에서 생존할 수 있으므로, 손쉽게 형질전환체를 선별할 수 있다. 본 발명의 재조합 벡터 및 이를 이용한 미세조류의 형질전환 방법은 기존의 미세조류 형질전환법 및 형질전환체 선별과정의 문제점들을 보완할 수 있는 경제적이고 손쉬운 방법이다.

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명의 재조합 벡터를 이용한 미세조류 형질전환의 개요도이다.

도 2는 본 발명의 재조합 벡터 pSK-HR-VHSV의 모식도이다.

도 3은 야생형 클로렐라 불가리스 PKVL7422의 염소산칼륨에 대한 내성 여부를 확인하기 위해, 0, 50, 100 및 150mM의 염소산칼륨이 포함된 배지에서 균주의 성장을 확인한 결과이다.

도 4는 형질전환체 선별 배지 조건을 찾기 위해, 야생형 클로렐라 불가리스 PKVL7422 균주의 염소산칼륨 함유 배지에서의 특성을 확인한 결과로, A는 빛이 있는 조건 + 염소산칼륨 미함유 BG-11 배지, B는 빛이 없는 조건 + 글루코스 및 염소산칼륨 미함유 BG-11 배지, C는 빛이 있는 조건 + 0.5% 글루코스 및 150mM 염소산칼륨 함유 BG-11 배지, D는 빛이 없는 조건 + 0.5% 글루코스 및 150mM 염소산칼륨 함유 BG-11 배지에서의 사진이고, 각 그림 내 삽입된 원은 평판배지 정면에서의 사진을 의미한다.

도 5는 형질전환체의 선별 결과로, 전기 천공하지 않은 야생형 클로렐라 불가리스 PKVL7422(A)와 도 2에 제시된 벡터를 이용한 전기천공 후의 클로렐라 불가리스 PKVL7422(B)의 20℃, 암조건 및 선별배지 조건에서 14일 배양한 후의 사진이다.

도 6은 임의로 선별된 형질전환체로부터 도입 유전자의 여부를 PCR로 확인한 결과이다. M: 크기 마커, P: 형질전환에 이용된 벡터 DNA, N: 야생형 클로렐라 불가리스, 1~6: 임의 선별된 형질전환 클로렐라 불가리스.

도 7은 형질전환된 클로렐라 불가리스 PKVL7422의 150mM 염소산칼륨 존재 하에서의 성장 곡선이다.

도 8은 중합효소연쇄반응을 통한 외래 유전자의 도입 여부를 확인한 결과이다. M: 크기 마커, P: 형질전환에 이용된 벡터 DNA, N: 야생형 클로렐라 불가리스, T: 형질전환된 클로렐라 불가리스.

도 9는 웨스턴블랏을 이용한 목적 단백질의 발현 여부를 확인한 결과이다. M: 크기 마커, P: 순수분리된 VHSV 당단백질(당화의 차이에 의해 두 개의 밴드로 확인), N: 야생형 클로렐라 불가리스에서 추출한 전체 단백질, T: 형질전환된 클로렐라 불가리스에서 추출한 전체 단백질.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 5'에서 3' 방향으로 질산환원효소의 N-말단 코딩 폴리뉴클레오타이드, 프로모터, 외래 유전자 삽입을 위한 MCS(multiple cloning site), 터미네이터 및 질산환원효소의 C-말단 코딩 폴리뉴클레오타이드가 작동가능하게 연결된 것을 특징으로 하는 미세조류 형질전환용 재조합 벡터를 제공한다.

본 발명의 상기 재조합 벡터에 있어서, 상기 질산환원효소는 클로렐라 유래일 수 있으며, 바람직하게는 클로렐라 바리아빌리스(*Chlorella variabilis*) 유래일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

본 발명의 일 구현 예에 따른 미세조류 형질전환용 재조합 벡터에서, 상기 미세조류는 이에 한정되지 않으나, 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*), 클로렐라 아니트라타(*C. anitrata*), 클로렐라 안타르кти카(*C. antarctica*), 클로렐라 아우레오비리디스(*C. aureoviridis*), 클로렐라 캔디다(*C. candida*), 클로렐라 캡슐레이트(*C. capsulate*), 클로렐라 데시케이트(*C. desiccata*), 클로렐라 엘립소이데아(*C. ellipsoidea*), 클로렐라 에메르소니(*C. emersonii*), 클로렐라 푸스카(*C. fusca*) 등의 클로렐라, 스피루리나(*Spirulina*), 나노클로롭시스(*Nannochloropsis*), 테트라셀미스(*Tetraselmis*), 케오세로스(*Cheoceros*), 이소크리오시스(*Isochrysis*), 파블로바(*Pavlova*), 피오닥티움(*Phaeodactylum*), 스킴리토네마(*Skeletonema*), 나비쿨라(*Navicula*), 칼로네이즈(*Calonase*) 등일 수 있다.

본 발명의 상기 재조합 벡터에 있어서, 질산환원효소의 N-말단 코딩 폴리뉴클레오타이드 및 C-말단 코딩 폴리뉴클레오타이드는 미세조류 내의 질산환원효소 코딩 유전자와 상동 재조합을 할 수 있는 정도의 크기이면 충분하며 특정 크기에 한정되지 않으며, 바람직하게는 각각 서열번호 1 및 서열번호 2의 염기서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 염기서열의 상동체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 상동체는 염기서열은 변화되지만, 서열번호 1 또는 서열번호 2의 염기서열과 유사한 기능적 특성을 갖는 염기서열이다. 구체적으로,

상기 질산환원효소의 N-말단 코딩 폴리뉴클레오티드 및 C-말단 코딩 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1 및 서열번호 2의 염기 서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열 (추가 또는 삭제 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제 (즉, 갭)를 포함할 수 있다.

[0017] 용어 "재조합"은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 코딩된 단백질을 발현하는 세포를 지칭하는 것이다. 재조합 세포는 상기 세포의 천연 형태에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 단편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 재조합 세포는 천연 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으며, 그러나 상기 유전자는 변형된 것으로서 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.

[0018] 용어 "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 지칭할 때 사용된다. 벡터는 DNA를 복제시키고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. 용어 "전달체"는 흔히 "벡터"와 호환하여 사용된다.

[0019] 본 발명의 재조합 벡터는 프로모터를 포함할 수 있다. 상기 프로모터는 형질전환에 적합한 프로모터들로서, 바람직하게는 CaMV 35S 프로모터(서열번호 3), 액틴 프로모터, 유비퀴틴 프로모터, pEMU 프로모터, MAS 프로모터 또는 히스톤 프로모터일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 CaMV 35S 프로모터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 용어 "프로모터"란 구조 유전자로부터의 DNA 상류(upstream)의 영역을 의미하며 전사를 개시하기 위하여 RNA 중합효소가 결합하는 DNA 분자를 말한다.

[0020] 본 발명의 재조합 벡터는 MCS 하부에 터미네이터를 포함할 수 있다. 상기 터미네이터는 통상의 터미네이터를 사용할 수 있으며, 그 예로는 RbcS2(Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase) 터미네이터(서열번호 4), 노팔린 신타아제(NOS) 터미네이터, 베타-아말라아제 RAmY1 A 터미네이터, 파세올린(phaseoline) 터미네이터, 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)의 옥토파인(Octopine) 유전자의 터미네이터 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0021] 용어 "MCS(multiple cloning site)"란 다양한 제한효소 부위를 갖는 DNA 단편을 말하는 것으로서, 이는 특정 제한효소로 인지되어 절단되므로 절단된 MCS의 부위에 목적하는 외래 유전자의 삽입을 가능하게 한다. 본 발명의 벡터에 사용될 수 있는 MCS는 당업계에서 공지된 MCS라면 제한 없이 사용할 수 있으며, 이는 MCS를 가지고 있는 당업계에 공지된 다양한 벡터에서 얻을 수 있다. 본 발명의 일 구현 예에 따른 재조합 벡터에서, 상기 MCS는 5'→3' 방향으로 *Bam*HI 및 *Xho*I 제한효소 자리를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0022] 본 발명에서 "작동가능하게 연결된(operably linked)"이란 하나의 핵산 단편이 다른 핵산 단편과 결합되어 그의 기능 또는 발현이 다른 핵산 단편에 의해 영향을 받는 것을 말한다. 즉, 상기 외래 단백질을 코딩하는 유전자는 벡터 내에 있는 프로모터에 의해 그 발현이 조절될 수 있도록 연결될 수 있다.

[0023] 본 발명에 따른 재조합 벡터는 형질전환된 세포를 비형질전환 세포로부터 구별하기 위해, 통상의 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로 이루어진 선택성 마커를 포함하지 않는다.

[0024] 본 발명은 또한, 상기 재조합 벡터의 MCS에 외래 유전자가 삽입된 외래 유전자의 재조합 벡터로 형질전환된 미세조류를 제공한다.

[0025] 본 발명의 상기 외래 유전자는, 미세조류 내에서 발현시키고자 하는 목적 단백질을 코딩하는 유전자로, 의약품 단백질 코딩 유전자, 백신용 항원 단백질 코딩 유전자 동일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0026] 본 발명에 따른 형질전환된 미세조류는 이에 한정되지 않으나, 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*), 클로렐라 아니트라타(*C. anitrata*), 클로렐라 안타르кти카(*C. antarctica*), 클로렐라 아우레오비리디스(*C. aureoviridis*), 클로렐라 캔디다(*C. candida*), 클로렐라 캡슐레이트(*C. capsulate*), 클로렐라 데시케이트(*C. desiccata*), 클로렐라 엘립소이데아(*C. ellipsoidea*), 클로렐라 에메르소니(*C. emersonii*), 클로렐라 푸스카(*C. fusca*) 등의 클로렐라, 스피루리나(*Spirulina*), 나노클로롭시스(*Nannochloropsis*), 테트라셀미스(*Tetraselmis*), 케오세로스(*Cheoceros*), 이소크리오시스(*Isochrysis*), 파블로바(*Pavlova*), 피오닥티룸(*Phaeodactylum*), 스킨리토네마(*Skeletonema*), 나비쿨라(*Navicula*), 칼로네이즈(*Calonase*) 동일 수 있다.

[0027] 본 발명은 또한,

- [0028] 상기 재조합 벡터에 외래 유전자를 삽입하여 외래 유전자의 재조합 벡터를 제조하는 단계;
- [0029] 상기 외래 유전자의 재조합 벡터로 미세조류 세포를 형질전환하는 단계; 및
- [0030] 상기 형질전환된 미세조류를 염소산염이 함유된 선별 배지에서 암배양하는 단계;를 포함하는, 형질전환된 미세조류의 선별 방법을 제공한다.
- [0031] 본 발명의 선별 방법에 있어서, 미세조류에 재조합 벡터를 도입하기 위한 형질전환 방법은 전기천공법(electroporation), 유리 구슬(glass bead), 유전자 총(gene gun), 탄화규소 휘스커(silicon carbide whisker) 등의 방법일 수 있고, 바람직하게는 전기천공법일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0032] 본 발명의 선별 방법에 있어서, 상기 염소산염은 염소산칼륨, 염소산나트륨, 염소산리튬 등일 수 있으며, 바람직하게는 염소산칼륨일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 선별 배지 내의 염소산칼륨의 농도는 예를 들면, 120~180mM, 바람직하게는 140~160mM, 더욱 바람직하게는 150mM일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0033] 또한, 본 발명의 상기 선별 배지는 글루코스를 추가로 포함할 수 있으며, 추가된 글루코스의 농도는 0.4~0.6%(w/v)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0034] 본 발명의 선별 방법에 있어서, 상기 형질전환된 미세조류는 재조합 벡터 내의 질산환원효소의 N-말단 코딩 폴리뉴클레오티드 및 질산환원효소의 C-말단 코딩 폴리뉴클레오티드 서열과, 게놈 내 질산환원효소 코딩 유전자간의 상동재조합에 의해 외래 유전자가 도입되고, 게놈 내의 질산환원효소 유전자는 결손되어 질산환원효소가 기능을 상실한 미세조류이다. 질산환원효소는 질산 이온(NO_3^-)을 아질산 이온(NO_2^-)으로 환원시키는 기능 뿐만 아니라, 염소산 이온(chlorate ion, ClO_3^-)을 독성이 있는 아염소산 이온(chlorine dioxide, ClO_2^-)으로 환원시키는 기능이 있다. 따라서, 본 발명의 상기 형질전환된 미세조류는 질산환원효소가 기능하지 못하므로, 염소산 이온을 아염소산 이온으로 환원시킬 수 없어, 염소산 이온이 함유된 배양액에 대해 저항성을 가지게 되어, 비형질전환체와 달리 염소산염이 함유된 배양액에서 성장이 가능한 것이다. 반면, 형질전환되지 않은 미세조류는 질산환원효소가 기능하므로, 염소산 이온을 아염소산 이온으로 환원시킬 수 있어, 염소산 이온이 함유된 배양액에서 성장이 불가능한 것이다. 따라서, 배양액 내에 염소산 이온의 첨가만으로 형질전환체와 비형질전환체를 선별할 수 있는 것이므로, 별도의 항생제가 필요 없는 것이다.
- [0035] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0036] **재료 및 방법**
- [0037] **1. 형질전환 벡터의 구성**
- [0038] 본 발명에서 미세조류 형질전환에 이용한 벡터는 박테리아 형질전환용 벡터인 pBluescript SK(+)를 기본으로 제작하였으며, 제작된 벡터의 개요도는 도 2에 나타내었다. 본 발명의 벡터는 미세조류 중 클로렐라(*Chlorella*)류의 형질전환에 이용하고자, 클로렐라 바리아빌리스(*Chlorella variabilis*) NC64A의 질산환원효소(nitrate reductase, 이하 NR)의 DNA 단편을 삽입대상 유전자의 양쪽 말단에 배열하였으며, 삽입대상 유전자로는 어류의 출혈성 패혈증 바이러스(viral hemorrhagic septicemia virus, VHSV)의 당단백질(glycoprotein) 유전자를 사용하였으며, 상기 유전자의 발현에 필요한 CaMV(cauliflower mosaic virus)의 35S 프로모터와 클라미도모나스 레인하르티(*Chlamydomonas reinhardtii*)의 RbcS2(Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase) 유전자의 전사 종료자(transcription terminator)를 포함하고 있다.
- [0039] NR 유전자의 DNA 단편은, 클로렐라 바리아빌리스 NC64A의 NR 유전자 정보(GenBank Accession number: CHLNCDRAFT_56304)를 기초로 하여 (주)바이오니아(한국)에서 합성하였으며, CaMV 35S 프로모터의 앞쪽에 위치하는 NR 유전자 조각(5' NR fragment)은 상기 유전자의 1-254번째 염기에 해당하며, 5' 말단과 3' 말단에 각각 *Apa* I(GGGCCC)과 *Eco*R1(GAATTC) 제한효소 서열을 삽입하였다. *rbcs2* 유전자의 전사 종료자 뒤쪽에 위치하는 NR 유전자 조각(3' NR fragment)은 상기 유전자의 2,486-2,589번째 염기에 해당하며, 5' 말단과 3' 말단에 각각 *Not* I(GCGGCCGC)과 *Nde*1(CATATG) 제한효소 서열을 삽입하였다.

[0040] 삽입된 VHSV 당단백질 코딩 유전자는 VHSV 게놈의 염기서열(GenBank accession number: JQ651388.1)을 기초로 하여 (주)바이오니아에서 합성하였고, 상기 염기서열의 1-1,560번째 염기에 해당하며, 발현 효율을 높이기 위하여 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*)의 코돈에 최적화 하였으며, 효율적인 클로닝을 위하여 *Bam*HI(GGATCC)과 *Xho*I(CTCGAG) 제한효소 서열을 각각 삽입하였다.

[0041] 상기와 같이 제작된 벡터를 pSK-NR-VHSVG로 명명하였다.

[0042] 2. 미세조류 및 배양

[0043] 형질전환에 사용된 미세조류는 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*) PKVL7422 균주(수탁번호 : KCTC13361BP)를 이용하였으며, BG-11 배지에서 20℃의 온도 조건으로 배양하였으며, BG-11 배지의 조성은 하기 표 1과 같다.

표 1

BG-11배지 조성

Stock 1	
Na ₂ Mg EDTA	0.1g/L
Ferric ammonium citrate	0.6g/L
Citric acid . 1H ₂ O	0.6g/L
CaCl ₂ . 2H ₂ O	3.6g/L
Stock 2	
MgSO ₄ . 7H ₂ O	7.5g/L
Stock 3	
K ₂ HPO ₄	3.05g/L
Stock 4 (microelements)	
H ₃ BO ₃	2.86g/L
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0.222g/L
MnCl ₂ . 4H ₂ O	1.81g/L
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.079g/L
COCl ₂ . 6H ₂ O	0.050g/L
NaMoO ₄ . 2H ₂ O	0.391g/L
* Stock1, 2, 3, 5는 고압멸균 후 사용	
BG-11배지 (1L 기준)	
Stock 1	10 ml
Stock 2	10 ml
Stock 3	10 ml
Na ₂ CO ₃	0.02g
Stock 5	1.0 ml
NaNO ₃	1.5g
* BG-11배지는 고압멸균 후 pH 7.1로 맞추어 사용	

[0044]

[0045] 3. 형질전환 및 형질전환체의 선별

[0046] 클로렐라 불가리스 PKVL7422 균주를 BG-11 배지에서 약 15일간 배양하여 세포수가 1.0×10^7 세포/ml가 되도록 한 후, 30ml을 담아 2,700×g, 4℃, 45분간 원심분리하였다. 원심분리 후, 상층액을 제거하고 펠렛에 세포보존 용액(0.2M mannitol, 0.2M sorbitol) 1ml을 넣어 섞어준 뒤 1시간 동안 실온에서 배양하였다. 그 후, 3,300×g, 4℃, 10분간 원심분리하고 상층액을 제거한 후, 세포 펠렛에 전기천공 (electrophoration) 용액(500mM NaCl, 5mM KCl, 5mM CaCl₂, 20mM Hepes, 200mM mannitol, 200mM sorbitol; pH 7.2) 1ml을 넣어 섞어준 후, 상기에서 제조한 벡터 DNA 20μg을 넣고 얼음에서 10분간 유지하였다. 벡터 DNA를 혼합한 세포용액 1ml을 전기천공 용 큐벳에 옮긴 후 1.00kV, 400ohm의 조건에서 3~5초 동안 전기천공을 실시하였다. 전기천공된 세포용액 1ml을 5ml의 BG-11 배지와 섞은 후, 암 조건, 20℃에서 하루 저녁 배양하여 세포를 회복시켰다. 회복된 세포 용액 200 μl를 150mM 염소산칼륨(KClO₃), 0.5% 글루코스, 17mM 암모늄 이온(NH₄⁺)이 포함되어 있는 변형된 BG-11(NH₄) 배지에 고르게 도말하고 빛이 들어가지 않게 알루미늄 포일 등으로 싼 후 20℃에서 15일간 배양하였다. 변형배지 BG-11(NH₄⁺)는 형질전환 미세조류의 경우 NR 유전가가 도입 유전자에 의하여 제거되어 질산 이온(NO₃⁻)을 아질산

염 이온(NO_2^-)으로 환원하여 질소원으로 사용할 수 없기 때문에 질소원으로 염화암모늄(NH_4Cl)을 포함하고 있다. 또한, 암 상태에서의 배양을 위하여 0.5% 글루코스를 함유하고 있으며, 변형된 BG-11(NH_4) 배지의 조성은 하기 표 2와 같다.

표 2

형질전환체 선별용 배지 조성

BG11(NH_4) 150mM KClO_3 Glucose 배지(1L)	
Stock 1 (표 1 참고)	10 ml
Stock 2 (표 1 참고)	10 ml
Stock 3 (표 1 참고)	10 ml
Na_2CO_3	0.02 g
Stock 5 (표 1 참고)	1.0 ml
NH_4Cl	0.9 g
KClO_3	18.3 g
Glucose	5 g
Agar	7 g
고압멸균 후 pH 7.1로 맞추어 사용하며 한 플레이트 당 25~30ml을 부어 굳힌 후 사용.	

4. 형질전환체 선별 및 특성 조사

1) 형질전환체 선별

선별배지에서 암 조건, 20℃에서 15일간 배양한 후 집락의 형성을 확인하여 형질전환체를 선별하였다. 각 집락은 각각의 형질전환된 클로렐라 불가리스로부터 유래한 것으로 판단하며, 고유의 균주번호를 부여하였다.

2) 형질전환체 배양

상기 선별배지에서 자라난 클로렐라 불가리스 집락은 BG-11(NH_4) 액체배지에 재접종하고 20℃에서 15일간 배양하였다.

3) 중합효소연쇄반응(Polymerase chain reaction)

PCR을 위한 DNA는 형질전환된 클로렐라 및 대조군으로부터 (주)바이오니아의 유전자 추출시약을 이용하여 추출하였다. 약 1.0×10^7 세포/ml의 농도로 자란 클로렐라 배양액 1ml을 $3,300 \times g$ 로 10분간 원심분리한 후 상층액을 제거한 후 얻어진 세포 펠렛을 DNA 추출에 사용하였다. 추출된 DNA는 나노드롭을 이용하여 정량한 후 -20℃에서 보관하였다. PCR은 Gene11(한국)의 AmpONE HS taq premix 키트를 사용하여 실시하였다. Premix 10 μ l가 들어 있는 튜브에 GF 프라이머(5'-GCACCACATCAGATCACC-3'; 서열번호 5)와 GR 프라이머(5'-ACTTCCGCGAGTAGAGGTCA-3'; 서열번호 6)을 각각 1 μ l, 추출한 DNA 1 μ l, 증류수 7 μ l를 첨가한 후 PCR을 수행하였다. PCR 증폭 반응은 94℃에서 4분간 전변성시킨 후, 94℃ 30초, 58℃ 30초, 72℃ 1분 30초로 이루어진 반응을 30회 실시하고, 74℃에서 10분간 반응시켜 수행하였고, PCR 산물은 1% 아가로스 겔에 전기영동하여 검사하였다. PCR에 사용된 2개의 프라이머는 VHSV 당단백질 코딩 유전자의 일부를 증폭하며, 크기는 495bp 이다.

4) 도입 유전자로부터 단백질 발현 유도

1×10^7 세포/ml의 형질전환 클로렐라 배양액 30ml을 $2,700 \times g$ 로 45분간 원심분리하고 상층액을 완전히 제거한 후, 단백질 추출 완충액(Ripa buffer 800 μ l(ELPIS BIOTECH, 한국), protease inhibitor cocktail 200 μ l) 500 μ l을 넣고 섞어준 뒤 1.5ml 튜브에 옮겨 담고 얼음에서 30분간 유지한 후 $3,300 \times g$ 로 10분간 원심분리하고 상층액을 새로운 튜브로 옮겼다. 여기에 5X SDS 샘플 로딩 버퍼 100 μ l를 섞어준 후 90℃에서 10분간 끓인 후 얼음 위에서 5분간 유지하였다. 12% SDS PAGE에서 상기 시료들을 전기영동하여 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질들

을 50V의 조건으로 3시간 동안 PVDF 멤브레인으로 옮긴 후, 대장균에서 발현된 VHSV 당단백질을 항원으로 이용하여 토끼에서 만들어진 다클론 항체를 1차 항체로, AP(alkaline phosphate)가 결합되어 있는 rabbit anti-mouse IgG(sigma, 미국)를 2차 항체로 하여 각 1시간씩 반응시켰다. 반응 후 멤브레인은 PBST(1X PBS + 0.05% Tween 20)로 10분간 3번 세척한 후 검출 시약(Alkaline phosphatase reaction buffer 30ml, NBT 198 μ l, BCIP 99 μ l)으로 단백질 발현 유무를 확인하였다.

[0057] 실시예 1. 염소산칼륨 존재 하에서 클로렐라 불가리스 PKVL7422 균주의 성장 분석

[0058] 본 발명의 특징은 클로렐라 불가리스가 가지고 있는 NR 유전자를 도입 유전자로 대체하여 형질전환된 세포를 염소산칼륨(KClO₃)을 이용하여 선별하는 것이다. 따라서 형질전환되지 않은 야생형 클로렐라 불가리스 PKVL7422의 염소산칼륨에 대한 내성이 중요한 요소이다. 야생형 클로렐라 불가리스 PKVL7422를 0, 50, 100 및 150mM의 염소산칼륨이 포함되어 있는 BG-11 배지에서 배양한 결과, 도 3에 나타난 바와 같이 100mM 이상의 농도에서는 균주가 성장하지 않는 것이 확인되었으며, 이를 통해 100mM 이상의 염소산칼륨이 포함된 배지를 이용하면 형질전환체의 선별이 가능하다는 것을 의미하였다.

[0059] 실시예 2. 클로렐라 불가리스 PKVL7422 균주의 암배양과 형질전환체의 선별

[0060] 형질전환체를 선별한 후 발효조에서 대량 배양하기 위해서는 형질전환체는 광합성을 하지 않고도 배지에 포함되어 있는 탄소원을 이용하여 자랄 수 있어야 한다. 도 4A는 클로렐라 불가리스 PKVL7422 균주를 BG-11 배지에 접종하고 빛이 있는 조건에서 배양한 경우이며, 도 4B는 클로렐라 불가리스 PKVL7422 균주를 0.5% 글루코스가 첨가된 BG-11 배지에 접종하고 암조건에서 배양한 사진이다. 이 결과를 통해 본 발명에 이용한 클로렐라 불가리스 PKVL7422 균주가 적절한 탄소원이 있을 경우 암조건에서도 충분히 성장할 수 있음을 확인할 수 있었다. 염소산칼륨을 이용한 형질전환체의 선별조건을 확립하기 위하여 야생형 클로렐라 불가리스 PKVL7422 균주를 150mM 염소산칼륨이 들어 있는 BG-11(NH₄) 배지에 도말 접종하여 빛이 있는 조건에서 배양을 하였으나, 도 4C에 보이는 것처럼 적은 수의 집락만이 형성되었으며, 자연 돌연변이에 의하여 염소산 이온(ClO₂⁻)에 대하여 저항성을 보이는 세포가 발생함을 알 수 있었다. 상기와 같은 문제를 해결하기 위하여 150mM 염소산칼륨 및 5%의 글루코스가 들어 있는 BG-11(NH₄) 배지에 야생형 클로렐라 불가리스 PKVL7422 균주를 접종하고 암조건에서 배양한 결과 도 4D에 나타난 것과 같이 아무런 성장도 관찰되지 않아, 형질전환된 개체를 선별하기 위한 조건으로 150mM 염소산칼륨 및 0.5%의 글루코스가 들어 있는 BG-11(NH₄) 배지에서의 암배양이 적절함을 확인하였다.

[0061] 상기에서 결과를 토대로 전기천공에 의하여 형질전환을 실시한 세포는 150mM 염소산칼륨 및 0.5% 글루코스가 포함된 BG-11(NH₄) 배지에 도말한 후 빛이 들어가지 않게 알루미늄 호일로 포장한 후 20℃에서 2주일간 배양하였으며, 그 결과 도 5의 사진과 같은 집락이 형성되었으며, 형질전환하지 않은 야생형 클로렐라 불가리스 세포의 경우 아무런 성장이 관찰되지 않아, 형질전환체의 선별이 이루어진 것을 확인하였다. 또한 형질전환체 선별용 배지에 형성된 클로렐라 불가리스의 집락을 임의로 선택하여 배양한 후, 전술한 방법으로 DNA를 추출하고 GF 및 GR 프라이머를 이용하여 PCR을 수행한 결과, 선택한 모든 집락으로부터 형질전환을 통하여 도입하고자 하는 DNA가 증폭되어(도 6), 형질전환률이 100%에 이르는 매우 효율적인 형질전환법임을 확인하였다.

[0062] 실시예 3. 형질전환체의 성장 특성 분석

[0063] 형질전환된 미세조류의 성장 특성을 살펴보면 도 7에 제시한 바와 같이 광조건의 경우 150mM 염소산칼륨과 0.5% 글루코스가 포함된 BG-11(NH₄) 배지에서 7일간 천천히 성장을 하다가, 7일 이후 성장 속도가 둔화되었으며, 그 성장 정도는 염소산칼륨이 포함되지 않고 0.5% 글루코스가 포함된 BG-11 배지에서의 야생형의 1/3 수준인 것으로 확인되었다. 반면 150mM 염소산칼륨과 0.5% 글루코스가 포함된 BG-11(NH₄) 배지에서 야생형은 성장하지 않는 것으로 확인되었다.

[0064] 실시예 4. 형질전환체의 삽입 유전자 및 단백질 발현 분석

[0065] 4-1. 중합효소연쇄반응을 통한 형질전환된 미세조류에서 VHSV 유래 당단백질 유전자의 확인

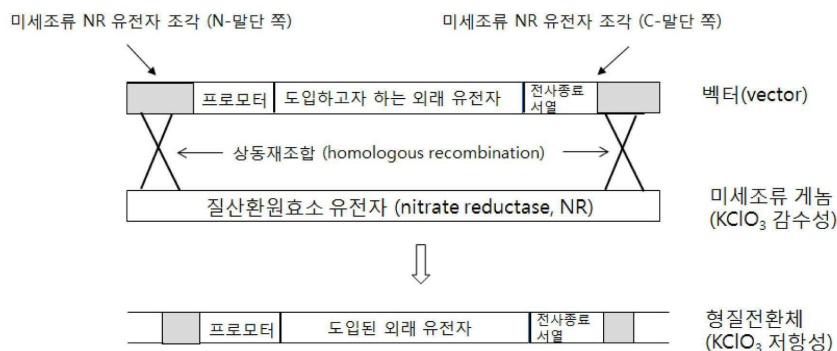
[0066] 전기천공을 통하여 미세조류 내로 들어간 벡터 DNA로부터 원하는 DNA가 미세조류의 염색체 DNA에 삽입되었는지를 알아보기 위하여, 벡터에 포함된 VHSV 유래 당단백질 유전자의 일부를 목표로 하는 프라이머를 이용하여 중합효소연쇄반응을 실시하였다. 그 결과 도 8에 나타난 바와 같이 형질전환하지 않은 야생형 클로렐라에서는 증폭 산물이 확인되지 않았으나, 선별배지에서 자라난 집락에서 유래한 형질전환 클로렐라의 DNA와 양성 대조군에서는 예상 크기의 DNA가 증폭되어 벡터 DNA로부터 원하는 DNA가 상동재조합에 의하여 클로렐라의 염색체로 삽입된 것을 확인하였다.

[0067] 4-2. 웨스턴 블랏을 통한 형질전환된 미세조류에서의 VHSV 유래 당단백질 발현 확인

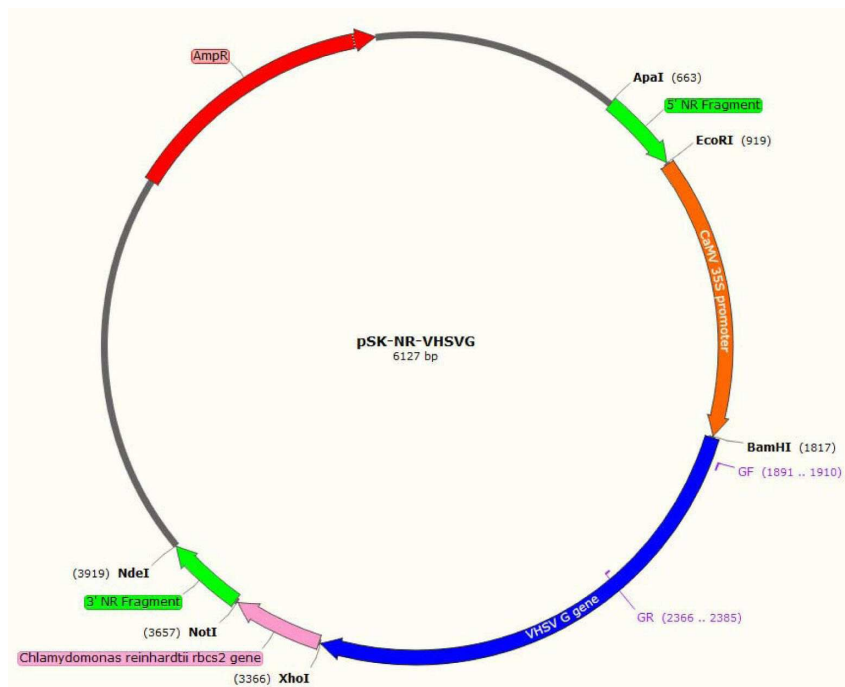
[0068] 중합효소 연쇄반응을 통하여 목적 DNA의 삽입이 확인된 형질전환 미세조류로부터 목적 단백질의 발현을 웨스턴 블랏을 이용하여 확인하였다. 야생형 및 형질전환된 클로렐라 불가리스 PKVL7422로부터 전체 단백질을 추출하고 전기영동 후 전술한 방법에 따라 웨스턴 블랏을 실시한 결과, 도 9에 나타난 바와 VHSV 당단백질 항체에 대하여 반응하는 단백질 밴드가 야생형 미세조류에서는 확인되지 않았으나 형질전환 미세조류에서는 관찰되었다. 이러한 결과는 목적인 DNA가 미세조류의 염색체 DNA에 삽입되고 이로부터 목적하는 단백질이 발현되었음을 보여주어 본 발명에서 제시한 미세조류 형질전환법에 의하여 미세조류를 효과적으로 형질전환시키고 이로부터 목적하는 재조합 단백질을 생산할 수 있음을 의미하였다.

도면

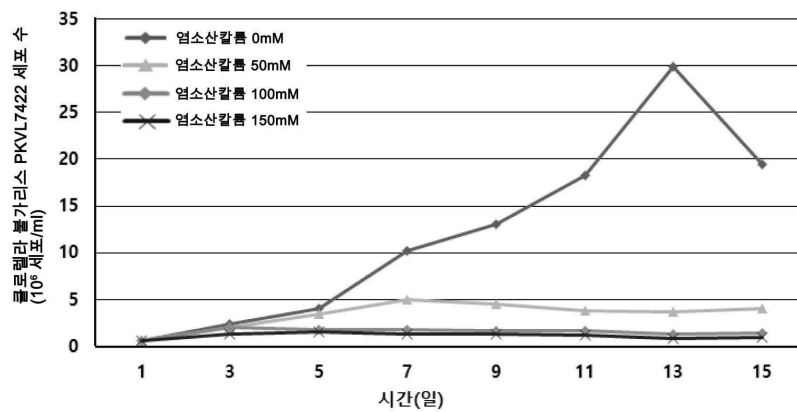
도면1



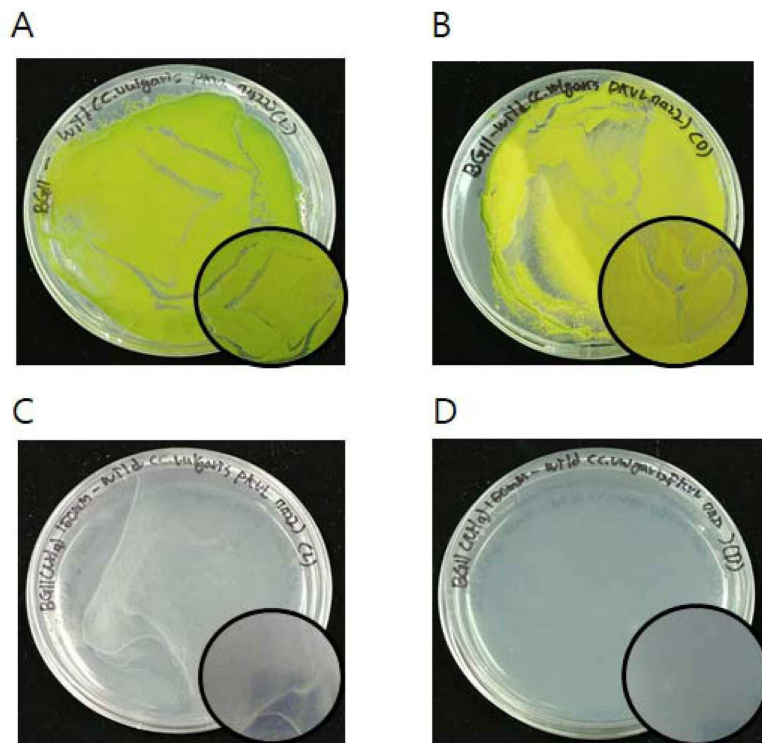
도면2



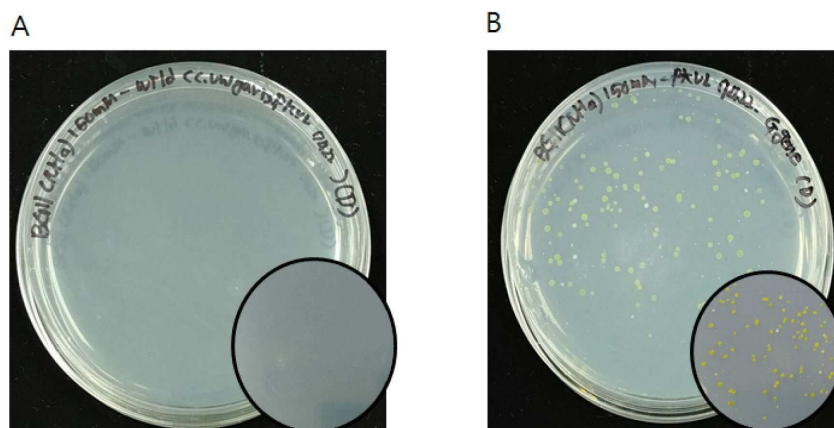
도면3



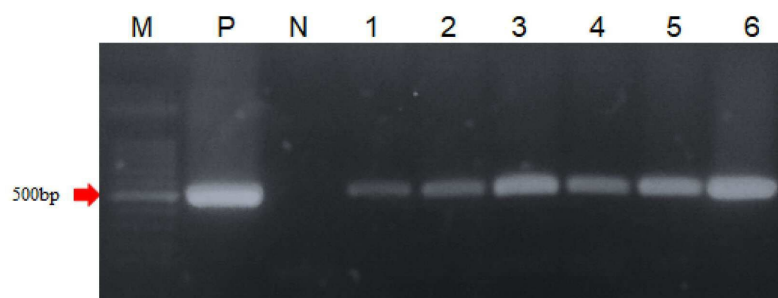
도면4



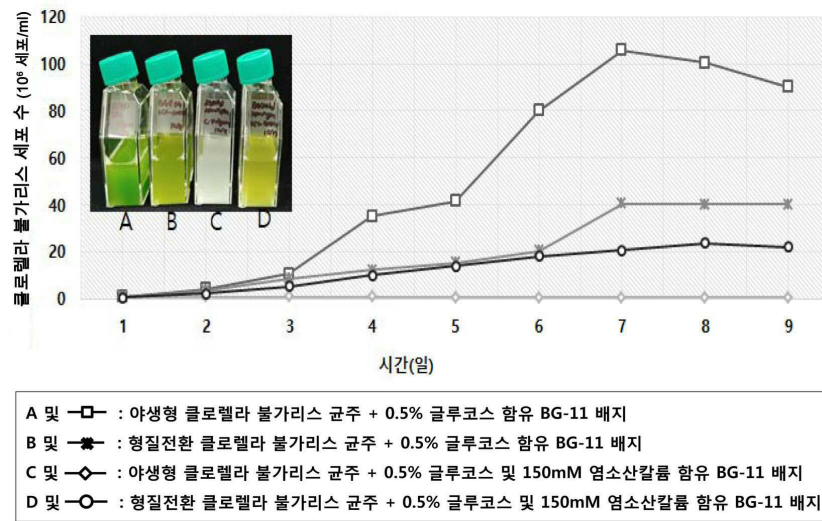
도면5



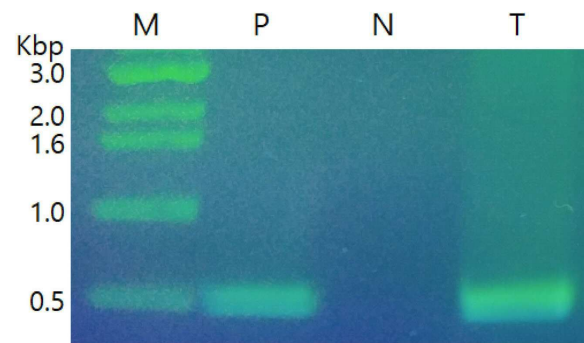
도면6



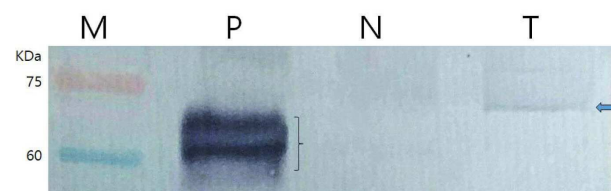
도면7



도면8



도면9



서열 목록

- <110> Pukyong National University Industry-University Cooperation Foundation
- <120> Recombinant vector for microalgae transformation comprising
sequence derived from nitrate reductase and uses thereof
- <130> PN17404
- <160> 6
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 254

<212>	DNA					
<213>	Chlorella variabilis					
<400>	1					
atgaccgtcc	tectcaacgc	cgacgactct	gcccacggca	gcagctcggc	agcgacggtc	60
atcaaagcga	atggacactg	cccggctgca	gcagggaatg	gggcgccggc	accagccctg	120
cccgcagccc	ccgcctgcgg	cccgcgcccc	cagcagcccc	cgctggagcc	cggcaccgag	180
gattacaagc	tccacctgcc	agtgtccgag	gtgctggact	tcgacaaggg	cacaaaggat	240
gactgggtgc	cacg					254
<210>	2					
<211>	254					
<212>	DNA					
<213>	Chlorella variabilis					
<400>	2					
acaccatctg	ctgcctgtgc	ggccccacccc	ccatgatcaa	gtttgcctgc	ctgccgggtga	60
ggccccgccc	gcagcaggca	tccctgctgg	ctgccccctt	gctgctgccg	cccgagccgc	120
tgccggcagg	ctggggaacc	cacggagcat	gctaagtact	gctgttgttt	ttgagtcgtc	180
ctgcctgcct	gcctgtccgc	ctgcagaacc	tggagaagct	tggctacaag	ccggagcagt	240
gcatccagtt	ctga					254
<210>	3					
<211>	892					
<212>	DNA					
<213>	Cauliflower mosaic virus					
<400>	3					
ggtgctgcta	tcgataccgt	cgaagcttgc	atgcctgcag	gtccccagat	tagccttttc	60
aatttcagaa	agaatgctaa	cccacagatg	gtagagagg	cttacgcagc	aggtctcatc	120
aagacgatct	acccgagcaa	taatctccag	gaaatcaaat	accttcccaa	gaaggttaaa	180
gatgcagtca	aaagattcag	gactaactgc	atcaagaaca	cagagaaaaga	tatatatttc	240
aagatcagaa	gtactattcc	agtatggacg	attcaaggct	tgcttcacaa	accaaggcaa	300
gtaatagaga	ttggagtctc	taaaaaggta	gttcccactg	aatcaaaggc	catggagtca	360
aagattcaaa	tagaggacct	aacagaactc	gccgtaaaga	ctggcgaaca	gttcatacag	420
agtctcttcg	actcaatgac	aagaagaaaa	tcttcgtcaa	catggtggag	cacgacacac	480
ttgtctactc	caaaaatatc	aaagatacag	tctcagaaga	ccaaagggca	attgagactt	540

ttcaacaaag ggtaatatcc ggaaacctcc tcggattcca ttgcccagct atctgtcact	600
ttattgtgaa gatagtggaa aaggaagggtg gtcctacaa atgccatcat tgcgataaag	660
gaaaggccat cgttgaagat gcctctgccg acagtgtgcc caaagatgga cccccacca	720
cgaggagcat cgtggaaaaa gaagacgttc caaccacgtc ttcaaagcaa gtggattgat	780
gtgatatctc cactgacgta agggatgacg cacaatccca ctatccttcg caagaccctt	840
cctctatata aggaagtcca ttctatttgg agagaacacg ggggactcta ga	892
<210> 4	
<211> 284	
<212> DNA	
<213> Chlamydomonas reinhardtii	
<400> 4	
ccgacgtcga gccactctag aagatccccg ctccgtgtaa atggaggcgc tcgttgatct	60
gagccttgcc cctgacgaa cggcgggtgga tggagagtac tgctctcaag tgctgaagcg	120
gtagcttagc tccccgttcc gtgctgatca gtctttttca acacgtaaaa agcggaggag	180
ttttgcaatt ttgttggttg taacgatacct ccgttgattt tggcctcttt ctccatgggc	240
gggctgggcg tatttgaagc gggtaaccgac ctccaattgt cgag	284
<210> 5	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 5	
gcaccacatc acagatcacc	20
<210> 6	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 6	
acttccgcga gtagaggtca	20