(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년02월27일
(11) 등록번호 10-1237255
(24) 등록일자 2013년02월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/25 (2006.01) *C12Q 1/02* (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01) *C12R 1/34* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0102388
(22) 출원일자 2011년10월07일
심사청구일자 2011년10월07일
(56) 선행기술조사문헌
Enzyme Microb Technol, Vol. 12, No. 9, pp. 653-655 (1990.09.)

(73) 특허권자
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
신성재
대전광역시 중구 문화로 266, 충남대학교 의학전문대학원 미생물학교실 (문화동)
황제익
대전광역시 중구 문화로 266, 충남대학교 의학전문대학원 (문화동)
김화중
대전광역시 중구 문화로 266, 충남대학교 의학전문대학원 미생물학교실 (문화동)
(74) 대리인
김순웅

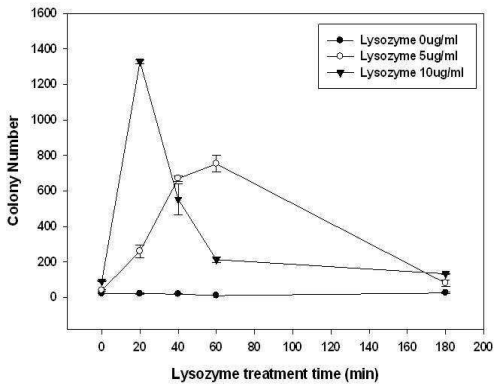
전체 청구항 수 : 총 6 항 심사관 : 김남경

(54) 발명의 명칭 **라이소자임을 사용한 마이코박테리아의 열충격 형질 전환방법**

(57) 요 약

본 발명은 마이코박테리아(*Mycobacterium*)를 형질전환시키는 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로 본 발명은 라이소자임(lysozyme)을 균체에 처리하여 세포벽을 용해시키고, 이후 열충격(heat-shock) 처리하는 단계를 포함하는 마이코박테리아를 효과적으로 형질 전환 시키는 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도3



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2011-0006228
부처명	교육과학기술부
연구사업명	기초의과학 연구센터
연구과제명	감염신호네트워크응용연구센터
주관기관	충남대학교 산학협력단
연구기간	2011.03.01 ~ 2012.02.28

특허청구의 범위

청구항 1

마이코박테리아를 형질 전환시키는 방법에 있어서,

(1) 라이소자임(lysozyme)을 균체에 처리하고 방치하는 단계; 및

(2) 방치된 균체에 열충격을 가한 후 배양하는 단계; 를 포함하는 마이코박테리아 형질 전환 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 라이소자임은 5 내지 10㎍/ml 로 처리되는 것을 특징으로 하는 마이코박테리아 형질 전환 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 열충격은 5분 이상 15분 이하로 처리되는 것을 특징으로 하는 마이코박테리아 형질 전환 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 마이코박테리아는 마이코박테리아 스메그마티스 인 것을 특징으로 하는 마이코박테리아 형질 전환 방법.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 라이소자임은 5분 이상 60분 이하로 처리되는 것을 특징으로 하는 마이코박테리아 형질전환 방법.

청구항 6

제1항 또는 제3항에 있어서, 상기 열충격은 35℃이상 45℃이하로 가해지는 것을 특징으로 하는 마이코박테리아 형질 전환 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 마이코박테리아를 형질 전환시키는 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로 본 발명은 종래의 전기천공법이 아닌 열 충격 방법을 이용한 (1) 라이소자임(lysozyme)을 균체에 처리하고 방치하는 단계;및 (2) 방치된 균체에 열충격을 가한 후 배양하는 단계;를 포함하는 마이코박테리아 형질 전환 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 형질전환은 미생물의 돌연변이 생성을 비롯한 유전공학의 기본적인 기술이다. 형질전환 기술은 동식물의 개량, 생산성 향상 및 산업 의학적으로 유용한 산물을 얻기 위하여 외래 유전자를 인위적인 방법으로 생물의 염색체상에 전이시켜 발현시키는 기술과 내인성 유전자의 과발현을 유도, 조작하는 기술 및 염색체상의 특정 유전자의 기능을 삭제함으로써 그 유전자의 발현에 따른 표현형의 변화와 유전자의 기능을 규명하는 등의 일련의 기술을

총칭한다. 생물체에 외래유전자를 전이하는 기술은 형질전환 동물의 경우, 수정란에 미세주입기를 통한 미세주입방법, 여러 가지 형태의 바이러스를 이용하는 방법, 전자기장을 이용하는 방법, 지질 등의 화합물을 이용하는 방법 등 추구하는 목적에 따라 이용방법이 다양하다. 외래유전자의 발현을 유도하는 프로모터에 따라 특정 조직, 즉 유선, 간, 혈액 등에 국한되게 발현시키거나 생물체의 발달 단계에 따라 외래유전자의 발현 유도가 가능하다.

[0003] 유전학적 연구에 균체의 유전형질을 변화시키는 방법은 여러 가지가 있다. 유전 형질 변화를 위한 방법을 보다 구체적으로 사용되는 유전자의 종류에 따라서 바이러스를 이용하는 방법과 플라스미드 DNA를 사용하는 방법으로 나눌 수 있으며 이 중에 가장 일반적으로 사용되는 방법은 플라스미드 DNA의 삽입에 의한 형질전환 기법이다. 플라스미드 DNA를 균체에 삽입하는 방법 중에서 물리력을 이용한 대표적인 두 가지 방법이 전기천공(Electroporation)(Shimamoto K. et al., Nature, 338: 274-276, 1989;Rhodes C.A. et al., Science, 240: 204-207, 1989)에 의한 방법과 열충격을 이용한 방법이다. 이들 중 전기천공법은 미생물의 유전적 연구를 위해 형질전환을 수행하기 위한 유용한 기술로 많이 이용되어 왔다(Trevors and Starodub, Enzyme Microb. Technol. 12, 653-655, 1990).

[0004] 마이코박테리아 스메그마티스(*Mycobacterium smegmatis*)는 비감염성 균으로서 빠른 성장을 보이는 마이코박테리아(rapid growth mycobacteria, RGM)이다. 결핵균과 매우 유사한 유전적 특징과 세포벽의 구조를 가지고 있으며 결핵균을 연구하는데 있어 매우 유용한 대체 균주로 사용되고 있다.

[0005] 마이코박테리아 스메그마티스를 포함한 다른 마이코박테리아의 형질전환 방법은 현재까지 전기 천공법에 의한 형질전환 방법이 알려져 있으며 유일하게 사용되고 있다. 전기 천공법에 의한 형질전환 방법은 고효율의 형질전환이라는 장점이 있으나 고가의 장비인 전기천공기(electroporator)와 고가의 소모품인 전기천공큐벳(electroporation cuvette)이 반드시 필요한 단점이 있다. 또한 형질전환의 효율을 위해서 형질 전환성 균체를 10% gelycorl로 여러 번 씻어내야 하고, 플라스미드 DNA역시 순수 증류수에 용해시켜야 하는 제약이 따른다

[0006] 열충격에 의한 형질전환 방법은 일반적으로 가장 흔하게 사용되는 물리적 형질전환 방법으로서 보통 대장균의 형질전환에 이용되는 방법이다. 박테리아의 세포벽을 완충용액으로 처리하여 양의 전하를 띄게 만들고 열충격을 가하여 세포막을 이완시켜고 플라스미드 DNA가 균체 내부로 확산되도록 한 후에 저온으로 균체의 환경을 전환시키고 세포막을 수축시켜 삽입된 플라스미드가 균체 내부에 존재하도록 만드는 형질전환 방법이다. 그러나 열충격을 이용한 형질전환 방법은 균체의 막구조에 따라 적용될 수 있는 균체가 제한적이다. 보통 마이코박테리아의 경우 점액당류가 균체의 막 외부를 감싸고 있기 때문에 단순 열충격 방법으로는 형질전환이 불가능하기 때문에 마이코박테리아의 경우 전기천공법을 유일한 형질전환 방법을 사용하고 있다.

[0007] 라이소자임(lysozyme)은 동물의 눈물, 침, 계란의 흰자 등에 존재하는 항균성 효소로서 세균의 세포벽에 존재하는 다당류를 분해하는 역할을 수행한다. 균체의 유전학적 연구에 있어서도 균막의 용해와 세포질의 추출의 과정에 흔히 사용되는 효소이다. 마이코박테리아 연구에 있어서도 세포막을 용해시켜 세포질을 분리하는 등의 연구에 사용되고 있으나, 형질전환에 적용된 예는 없다.

[0008] 본 발명에서는 마이코박테리아를 형질 전환 시키는데 있어서, 종래와 같은 전기 천공법에 아닌 리이소자임을 처리한 열충격 방법을 이용하여 형질 전환이 가능하도록 하였으며, 라이소자임의 처리 농도와 시간 열충격이 가해지는 시간의 세가지 조건을 조합하여 가장 고효율의 형질전환 방법을 확립하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 마이코박테리아를 형질 전환시키는 방법에 있어서, 종래 유일하게 사용되었던 전기 천공법을 대체하기 위한 새로운 형질 전환 방법을 제공하는데 있다.

[0010] 보다 구체적으로 본 발명의 목적은 마이코박테리아를 형질 전환시키는 방법에 있어서, (1) 라이소자임(lysozyme)을 균체에 처리하고 방치하는 단계;및 (2) 방치된 균체에 열충격을 가한 후 배양하는 단계; 를 포함하는 마이코박테리아 형질 전환 방법을 통해 좀 더 효율적인 형질 전환 방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 마이코박테리아를 형질 전환시키는 방법에 있어서 (1) 라이소자임(lysozyme)을 균체에 처리하고 방치하는 단계;및 (2) 방치된 균체에 열충격을 가한 후 배양하는 단계; 를 포함하는 마이코박테리아 형질 전환 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명에 따르면, 종래 유일한 방법으로 사용되었던 전기천공법의 단점을 보완한 새로운 형질 전환 방법을 통하여 일반적인 실험실 환경에서 간편하게 마이코박테리아를 형질 전환할 수 있어 마이코박테리아를 이용한 생물학적인 연구에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 라이소자임의 처리 농도에 따른, 형질전환된 마이코박테리아 스메그마티스 균체의 콜로니 수를 나타낸 그래프이다.

도 2는 형질전환 후에 평판 도말하여 배양한 균체를 도시한다.

(A: 라이소자임을 처리하지 않은 균체, (B): 5㎍/ml 라이소자임 처리 균체, C: 10㎍/ml 라이소자임 처리 균체)

도 3은 라이소자임의 처리 농도를 0㎍/ml, 5㎍/ml, 10㎍/ml 세가지 조건으로 달리하여, 처리시간 별 형성된 콜로니 개수를 그래프로 도시한다.

도 4는 라이소자임을 0㎍/ml, 10㎍/ml 농도로 처리하고, 열충격 지속시간 별 콜로니 형성 개수를 그래프로 나타냄으로써 열충격 지속 시간의 최적 조건을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 본 발명은 마이코박테리아를 형질 전환시키는 방법에 있어서, (1) 라이소자임(lysozyme)을 균체에 처리하고 방치하는 단계; 및 (2) 방치된 균체에 열충격을 가한 후 배양하는 단계; 를 포함하는 마이코박테리아 형질 전환 방법을 제공한다.

[0015] 본 발명의 마이코박테리아는 *Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium africanum, Mycobacterium bovis, Mycobacterium microti, Mycobacterium leprae* 등의 마이코박테리아 속에 속하는 균들이 제한없이 포함될 수 있으며, 바람직하게는 마이코박테리아 스메그마티스(*Mycobacterium smegmatis*)일 수 있다.

[0016] 본 발명의 마이코박테리아 형질 전환 방법에 있어서, 라이소자임은 1내지 20㎍/ml로 처리되어 마이코박테리아 균의 세포벽을 용해시킬 수 있으며, 보다 바람직하게는 5㎍/ml 내지 10㎍/ml로 처리할 수 있다.

[0017] 마이코박테리아 형질 전환 방법에 있어서, 라이소자임은 5분 이상 60분 이하로 처리되는 것이 바람직하며, 보다 구체적으로 37℃에서 20분 동안 처리되는 것이 바람직하다. 본 방법에 있어서 라이소자임이 1시간을 초과하여 처리될 경우 형질 전환 효율이 떨어질 수 있다.

[0018] 또한 본 발명은 형질전환 방법으로써 방치된 균체에 열충격을 가하는 단계를 포함하며, 상기 열충격은 바람직하게는 5분 이상 15분 이하로 처리될 수 있다. 열충격은 10분 이상 지속되는 것이 바람직하나 15분이 초과되어 지속되는 경우 형질 전환 효율이 떨어질 수 있다.

[0019] 또한 본 발명에 있어서, 상기 열충격은, 35℃이상 45℃이하로 가해지는 것이 바람직하며, 가장 바람직하게는 37℃로 처리 될 수 있다.

[0020] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0021] **실시예 1. 형질전환성 마이코박테리아 스메그마티스 균체 제조**

[0022] 마이코박테리아 스메그마티스는 2ml의 7H9OADC 액상배지에 16시간 배양하고 이 중 500μl을 50ml 동일배지에 접종하여 20~24시간을 배양하였다. 균체의 농도가 OD600nm=0.6 가량 되었을 때에 3000rpm으로 20분간 원심 분리하여 균체를 회수하였다. 회수된 균체를 100mM lithium acetate TE 완충용액 30ml에 부유한 후에 37℃에서 20분간 방치하였다. 방치 후 균체를 3000rpm, 20분간 원심분리하고 상등액을 제거한 후에 동일 완충액 2ml에 재 부유하여 형질전환성 균체를 준비하였다.

[0023] **실시예 2. 라이소자임(lysozyme)의 처리**

[0024] 라이소자임은 1000μg/ml 부터 연속 희석하여 1000μg/ml, 500μg/ml, 250μg/ml, 100μg/ml, 50μg/ml, 25μg/ml 농도로 각각 희석하고, 희석된 라이소자임 용액을 10ul씩 준비된 마이코박테리아 스메그마티스 균체 90μl에 첨가하여 첨가 후에 농도가 10배 희석되도록 첨가하였다. 농도 별로 라이소자임이 첨가된 균체를 37℃에서 10분간 처리하고 0℃에서 5분간 방치하였다.

[0025] **실시예 3. 열충격 형질전환**

[0026] 마이코박테리아 스메그마티스의 형질전환에 사용된 플라스미드는 Kim 등이 제시한 방법으로 제작되었다 (Kim et al., Med Microbiol Immunol. 2011, 200(3):177-91). 마이코박테리아 재조합단백질 발현벡터인 pVV16 플라스미드를 NdeⅠ, HindⅢ 제한효소로 절단부위에 동일 효소로 처리된 RFP(붉은형광단백)를 클로닝하여 붉은형광단백을 과발현 할 수 있는 pVV16-RFP 플라스미드를 제작하였다. 방치된 각 균체에 1μg의 pVV16-RFP플라스미드와 70ul의 DMSO, 600μl의 50% PEG가 첨가된 100mM lithium acetate TE 완충액을 첨가하고 섞어준 다음 42℃에서 15분간 열충격을 가하고 다시 0℃에서 5분간 방치하였다. 이후 균체를 원심 분리하여 상등액을 제거하고 분리된 균체를 100μl의 7H10OADC 배양액에 부유한 후 하이그로마이신이 50μg/ml 농도로 첨가된 7H10OADC평판배지에 도말하고 37℃에서 배양하였다. 배양 2~3일 후 배지에 형성된 마이코박테리아 스메그마티스 균체의 콜로니 수를 정량하여 도1에 타나내었으며 가장 높은 효율을 보이는 균체는 10μg/ml의 농도로 라이소자임을 처리한 균체임을 확인 할수 있었다. 또한 도2에서와 같이 라이소자임을 처리하지 않은 균체 (a)비하여 5μg/ml 농도(b)와 10μg/ml(c)농도로 처리한 균체에서 형질전환 효율이 증가하는 것을 확인 할 수 있다.

[0027] **실시예 4. 형질전환 최적 조건의 탐색**

[0028] **4.1 라이소자임의 최적 처리시간 탐색**

[0029] 라이소자임의 최적 처리시간을 탐색하기 위하여 라이소자임을 0μg/ml, 5μg/ml, 10μg/ml의 농도로 37℃에서 5, 10, 15, 30분간 각각 처리한 후 실시예 3의 방법으로 열충격 형질 전환을 실시하였다.

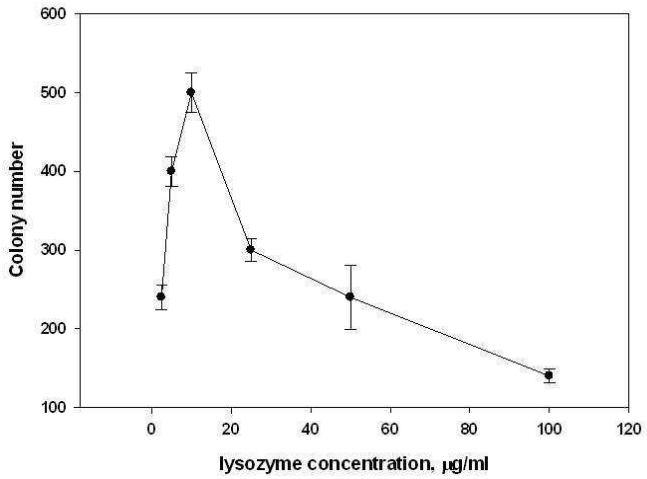
[0030] 2~3일간 동일 조성의 평판배지에서 배양한 후 형성된 콜로니의 수를 정량하여 도3에 나타내었다. 도3에 나타난 결과로서 최적의 라이소자임 처리조건은 농도 10μg/ml의 농도로 37℃ 온도에서 20분간 처리 했을 경우 가장 높은 효율의 형질전환이 이루어짐을 알 수 있다. 농도 5μg/ml의 경우 최적 처리시간은 60분이지만 10μg/ml의 최적 처리 조건에 비해 콜로니 개수가 절반밖에 되지 못함을 확인하였다.

[0031] **4.2 열충격 최적 시간 탐색**

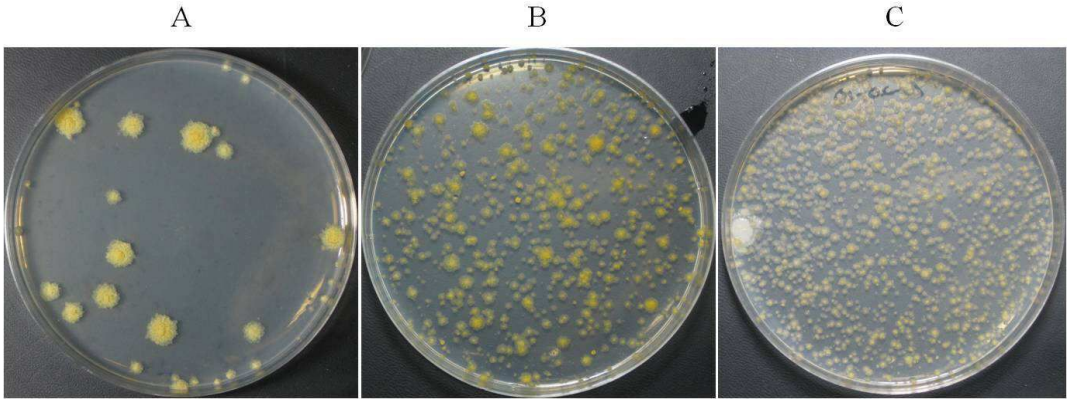
[0032] 라이소자임의 처리농도를 0μg/ml, 10μg/ml 처리하고 열충격 지속시간을 15분에서 5, 10, 15, 30분으로 각각 처리시간을 변경한 후 열충격 형질 전환을 실시하였다. 그 결과 도4에서 나타낸 것처럼 열충격을 10분간 지속할 경우 가장 높은 효율의 형질전환을 확인 할 수 있었으며, 열충격 지속시간이 15분을 초과하는 경우 형질 전환의 효율이 매우 떨어지는 것을 확인할 수 있었다.

도면

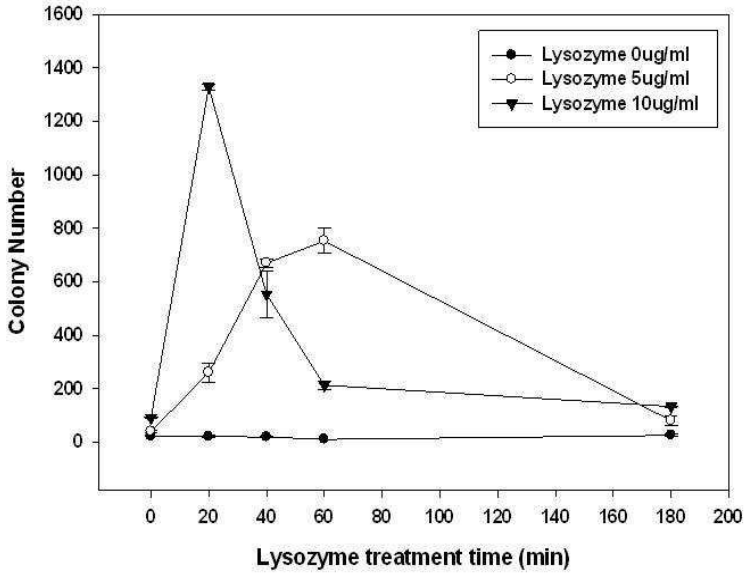
도면1


600
500
400
300
200
100
Colony number
0
20
40
60
80
100
120
lysozyme concentration, μg/ml

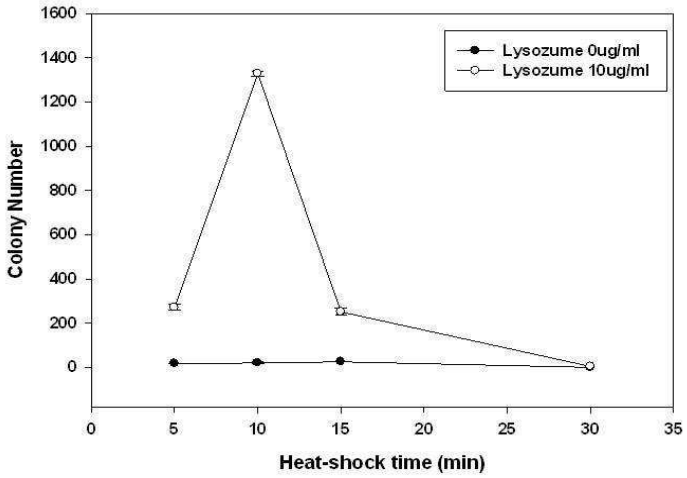
도면2


A
B
C

도면3


Lysozyme 0ug/ml
Lysozyme 5ug/ml
Lysozyme 10ug/ml
Colony Number
Lysozyme treatment time (min)
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
1600
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
200

도면4


Lysozume 0ug/ml
Lysozume 10ug/ml
Colony Number
Heat-shock time (min)
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
1600
0
5
10
15
20
25
30
35