



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2011년03월24일
(11) 등록번호 10-1023066
(24) 등록일자 2011년03월10일

(51) Int. Cl.

C12N 15/70 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-7007467

(22) 출원일자(국제출원일자) 2005년09월08일

심사청구일자 2007년11월27일

(85) 번역문제출일자 2007년03월30일

(65) 공개번호 10-2007-0059130

(43) 공개일자 2007년06월11일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2005/054450

(87) 국제공개번호 WO 2006/029985

국제공개일자 2006년03월23일

(30) 우선권주장

04022201.0 2004년09월17일

유럽특허청(EPO)(EP)

(56) 선행기술조사문헌

Nucleic Acids Research 23:1691-1695 (1995)

WO2002029067 A1

전체 청구항 수 : 총 22 항

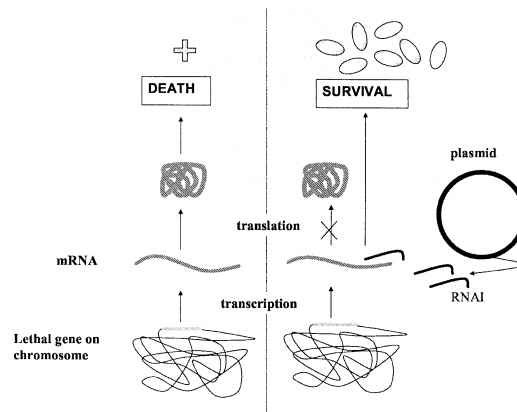
심사관 : 김정희

(54) 항생제-없는 ColE1 플라스미드 증식을 위한 숙주-벡터시스템

(57) 요약

항생물질-없는 플라스미드의 선택이 가능하게 하고 플라스미드 DNA 및 재조합 단백질의 생산에 유용한 표지 유전자의 발현을 조절하기 위하여 ColE1-형 플라스미드의 RNA-기초 카피 수 조절 메커니즘을 사용하는 숙주-벡터 시스템.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

하기 i) 및 ii)를 포함하는 비-자연발생적 박테리아 세포:

i) 상기 세포에 대해 치명적이거나 독성인 단백질을 코딩하며, 그 발현이 조절되는 외래(foreign) DNA 서열; 및 이에 작동가능하게 연결된

ii) RNA II 서열 또는 그의 일부를 모방하고, ColE1 복제기점을 갖는 플라스미드로부터 전사가 가능한 RNA I 서열에 상보적인 RNA 서열을 코딩하는 DNA 서열을 포함하며,

여기서 상기 DNA 서열 i) 및 ii)는 상기 세포의 게놈 내에 통합되어 있으며,

상기 ii)에 정의된 RNA 서열은 상기 플라스미드의 부존재시 상기 단백질의 발현을 허용하고,

상기 플라스미드가 박테리아 세포 내에 존재하는 경우, 플라스미드로부터 전사되는 RNA I 분자가 상기 ii)에 정의된 RNA 서열과 혼성화함으로써 상기 단백질의 발현이 억제된다.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 있어서, 외래 DNA 서열 i)이 유도성 프로모터의 조절하에 있는 박테리아 세포.

청구항 6

제1항에 있어서, 외래 DNA 서열 i)이 그 자체로 또는 독성 물질을 생성함에 의해 상기 세포에 대해 치명적이거나 독성인 단백질을 코딩하는 박테리아 세포.

청구항 7

제1항에 있어서, 외래 DNA 서열 i)이 상기 박테리아 세포의 성장에 필수적인 유전자의 전사를 억제하여 상기 세포에 대해 치명적이거나 독성인 리프레서 단백질을 코딩하는 박테리아 세포.

청구항 8

제7항에 있어서, 리프레서 단백질에 의해 인식되고 특이하게 결합되는 DNA 서열을 함유하는 프로모터에 상기 필수 유전자가 작동가능하게 연결되도록 설계되어 있는 박테리아 세포.

청구항 9

제8항에 있어서, 필수 유전자에 연결된 프로모터가 유도가능한 것인 박테리아 세포.

청구항 10

제9항에 있어서, 유도성 프로모터가 상기 외래 DNA 서열 i)이 연결된 유도성 프로모터와 독립적으로 유도가능한 것인 박테리아 세포.

청구항 11

제1항에 있어서, DNA 서열 ii)가 DNA 서열 i)의 리보솜의 결합 부위와 시작 코돈 사이에 삽입되어 있는 박테리아 세포.

청구항 12

제1항에 있어서, DNA 서열 i) 및 DNA 서열 ii)가 융합 단백질을 코딩하도록 연결되어 있는 박테리아 세포.

청구항 13

제1항에 있어서, DNA 서열 i) 및 DNA 서열 ii)가 번역 커플되어 있는(translationally coupled) 박테리아 세포.

청구항 14

제1항, 또는 제5항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, ColE1 복제기점을 갖는 플라스미드를 복제하는 능력이 있는 박테리아 세포.

청구항 15

제14항에 있어서, 박테리아 세포가 대장균(*Escherichia coli*) 세포인 박테리아 세포.

청구항 16

하기 a) 및 b)를 포함하는 숙주-벡터 시스템:

a) ColE1 복제기점을 갖는 플라스미드;

b) 상기 플라스미드 a)가 복제될 수 있으며 하기 i) 및 ii)를 포함하는 박테리아 숙주 세포:

i) 상기 세포에 대해 치명적이거나 독성인 단백질을 코딩하며, 그 발현이 조절되는 외래(foreign) DNA 서열; 및 이에 작동가능하게 연결된

ii) RNA II 서열 또는 그의 일부를 모방하고, 상기 플라스미드로 a)로부터 전사가가능한 RNA I 서열에 상보적인 RNA 서열을 코딩하는 DNA 서열을 포함하며,

여기서 상기 DNA 서열 i) 및 ii)는 상기 세포의 게놈 내에 통합되어 있으며,

상기 ii)에 정의된 RNA 서열은 상기 플라스미드 a)의 부존재시 상기 단백질의 발현을 허용하고,

상기 플라스미드 a)가 숙주 세포 내에 존재하는 경우, 플라스미드로부터 전사되는 RNA I 분자가 상기 ii)에 정의된 RNA 서열과 혼성화함으로써 상기 단백질의 발현이 억제된다.

청구항 17

제16항에서, 박테리아 숙주 세포 b)가 제5항 내지 제13항 중 어느 한 항에 정의된 박테리아 세포인 숙주-벡터 시스템.

청구항 18

제16항에 있어서, 외래 DNA 서열 i)이 박테리아 세포에 대해 치명적이거나 독성인 단백질을 코딩하고, ii)에 정의된 RNA 서열은 플라스미드 a)의 부존재시 치명적이거나 독성인 단백질의 발현을 허용하여 상기 숙주 세포의 성장을 완전히 또는 부분적으로 저해하고, 플라스미드 a)가 숙주 세포 내에 존재하는 경우, 플라스미드로부터 전사된 RNA I 분자는 ii)에 정의된 RNA 서열과 혼성화함으로써 치명적이거나 독성인 단백질의 발현이 억제되어 플라스미드-함유 세포중에서 완전한 또는 부분적인 성장 저해가 방지되는 숙주-벡터 시스템.

청구항 19

제16항에 있어서, 플라스미드 a)가 목적 유전자를 추가로 함유하는 숙주-벡터 시스템.

청구항 20

제19항에 있어서, 목적 유전자가 치료적 유전자인 숙주-벡터 시스템.

청구항 21

제16항에 있어서, 플라스미드가 pUC 플라스미드인 숙주-벡터 시스템.

청구항 22

- i) ColE1 복제기점을 갖고 박테리아 숙주 세포중에서 플라스미드로부터 발현되지 않는 목적 유전자를 포함하는 플라스미드로 제1항의 박테리아 숙주 세포군을 형질전환하고,
 - ii) 박테리아 숙주 세포군을 치명적이거나 독성인 단백질이 세포내에서 발현 가능한 조건하에 성장시킴으로써 단백질이 발현되어 플라스미드-없는 세포의 성장을 완전히 또는 부분적으로 저해하여, 플라스미드-함유 세포가 플라스미드-없는 세포보다 빠르게 성장하도록 하고,
 - iii) 플라스미드-함유 세포를 수확하고,
 - iv) 플라스미드 DNA를 분리하여 정제하는 단계를 포함하는,
- 플라스미드 DNA를 생산하는 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 목적 유전자가 포유류에서 발현하는 것을 허용하는 진핵 프로모터에 작동 가능하게 연결된 치료적 유전자인 방법.

청구항 24

- i) ColE1 복제기점을 갖고 박테리아 숙주 세포중에서 그 발현을 가능하게 하는 원핵 프로모터의 조절하에 있는 목적 단백질을 코딩하는 DNA 서열을 포함하는 플라스미드로 제1항의 박테리아 숙주 세포군을 형질전환하고,
 - ii) 박테리아 숙주 세포군을 치명적이거나 독성인 단백질이 세포내에서 발현가능한 조건하에 성장시킴으로써 단백질이 발현되어 플라스미드-없는 세포의 성장을 완전히 또는 부분적으로 저해하여, 플라스미드-함유 세포가 플라스미드-없는 세포보다 빠르게 성장하도록 하고,
 - iii) 목적 단백질을 수확하고,
 - iv) 그것을 분리하여 정제하는 단계를 포함하는,
- 목적 단백질을 생산하는 방법.

청구항 25

제22항 또는 제24항에 있어서, 플라스미드가 pUC 플라스미드인 방법.

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 플라스미드 증식, 특히 플라스미드 DNA 및 재조합 단백질의 생산 분야와 관련이 있다.

배경기술

[0002] 유전자 전달 매체로서의 플라스미드 DNA는 유전자 치료에 있어 널리 보급되었다.

[0003] 유전자 치료 응용에 있어, 관심 대상인 치료적 유전자를 운반하는 플라스미드를 환자에게 도입하면; 목표 세포에 있는 유전자의 일시적 발현으로 인해 목적하는 치료효과가 나타난다.

- [0004] 관심 대상인 치료적 유전자를 운반하는 재조합 플라스미드는 박테리아를 배양하여 얻어진다. 박테리아의 형질전환체를 선택하고 박테리아 숙주 세포내에서 플라스미드를 유지를 보증하기 위하여 전통적으로, 항생물질에 대한 내성 유전자가 플라스미드 백본내로 도입된다. 플라스미드의 선택은 각각의 항생제를 함유하는 배지 중에서 세포를 배양하여, 플라스미드를 함유한 세포만 자랄 수 있게 함으로써 달성된다.
- [0005] 유전자 치료에 적용되는 플라스미드를 선택하기 위해 항생물질에 대한 내성 유전자를 사용하면 심각한 문제점을 동반한다:
- [0006] 유전자 치료에 있어, 전체 플라스미드로 운반할 경우, 항생물질에 대한 내성 유전자가 치료 대상에 도입된다. 비록 이러한 유전자들이 원핵생물의 프로모터에 의해 작동되어 포유류 세포 및 조직에서는 활성화되지 않지만, 운반되는 유전자는 세포성 게놈내에 도입될 수 있고, 만약 포유류 프로모터에 근접하는 경우 전사되고 발현될 가능성이 있다.
- [0007] 항생물질에 대한 내성 유전자를 갖는 플라스미드의 두 번째 문제점으로 잔여 항생제를 갖는 최종 생성물에 의한 잠재적 오염을 들 수 있다. 가능한 면역 감작(immune sensitization)의 관점에서, 특히 베타-락탐 항생제의 경우에서 이슈가 된다.
- [0008] 이러한 위험성을 피하기 위하여, 치료용 플라스미드의 제조시 항생물질에 대한 내성 유전자가 도입되지 않도록 하는 노력이 필요하고, 대체적 선택 방법을 개발할 필요가 있다.
- [0009] 항생제가 없는 것을 선택하기 위하여, 숙주 영양요구성을 보완할 수 있는 플라스미드를 사용해왔다. 그러나 이 방법 및 모든 관련된 접근법의 가장 큰 문제점은 플라스미드상에 부가적 유전자가 필요하다는 점이다(예: Hagg 등., 2004). 또 다른 접근법으로 "리프레서 걱정"(Williams 등., 1998)이라는 개념이 있다. 이 개념에 따르면, 변형된 *E. coli* 숙주 스트레인은 *lac* 오퍼레이터/프로모터의 조절하에 *kan* 유전자(kanamycin resistance gene)를 함유한다. 유도제(IPTG 또는 알로락토즈)가 없는 경우, 스트레인은 카나마이신-함유 배지에서 자랄 수 없다. *lac* 오퍼레이터를 함유하는 높은 카피 수(high copy number)의 플라스미드로 형질전환이 되면 오퍼레이터로부터 *lacI*을 적정하여 *kan*의 발현을 이끌 수 있다. 높은 플라스미드 카피 수를 갖는 세포만이 카나마이신을 첨가한 후 생존할 수 있다. 이 개념의 가장 큰 문제점은 항생제의 사용을 피할 수 없다는 점이다.
- [0010] 본 발명의 목표는 항생제가 없는 플라스미드를 선택하기 위한 시스템을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 잠재적 문제를 해결하기 위하여 ColE1 복제기점을 갖는 플라스미드를 사용한 복제 메커니즘을 이용하였다(이하, ColE1 복제기점을 갖는 플라스미드를 "ColE1-형 플라스미드"라 한다).
- [0012] 통상 흔히 사용되는 많은 클로닝 전달체 뿐만 아니라 자연발생적으로 생기는 많은 플라스미드가 ColE1-형 플라스미드이다. 이러한 플라스미드는 두 개의 RNA 분자의 합성이 수반하거나, 이러한 분자들 서로간, 또는 템플레이트 플라스미드 DNA와 상호작용을 수반하는 통상의 메커니즘을 사용하여 그 DNA를 복제한다(Helinski, 1996; Kues and Stahl, 1989).
- [0013] ColE1-형 플라스미드의 예로 자연발생적으로 생겨난 ColE1 플라스미드 pMB1, p15A, pJHCMW1, 뿐만 아니라 통상 사용되고 상업적으로 구할 수 있는 pBR322 및 관련 벡터들, pUC 플라스미드, pET 플라스미드 및 pBluescript 벡터와 같은 클로닝 전달체가 있다(예: Bhagwat and Person, 1981; Balbas 등., 1988; Bolivar, 1979; Vieira and Messing, 1982).
- [0014] 이러한 모든 플라스미드에 대해, ColE1 복제 초기 및 복제 조절에 관한 많은 연구가 있어왔다 (예: Tomizawa, 1981, 1984, 1986, 1989, 1990; Chan et al., 1985; Eguchi et al., 1991a; Cesareni et al., 1991). ColE1 부위에 복제 조절에 수반되는 2 개의 RNA를 위한 두 개의 프로모터가 함유되어 있다. ColE1-형 플라스미드로부터의 복제는 숙주의 RNA 폴리머라제에 의해 복제 기점의 555 bp 업스트림에 위치하는 프리프라이머 RNA II의 전사로 시작한다. 신장(elongation)되면서, RNA II는 특정 헤어핀 구조로 폴딩되고, 약 550 뉴클레오티드가 폴리머화된 후 주형 DNA와 함께 하이브리드를 형성하기 시작한다. 그 결과, RNA II 프리프라이머가 RNA분해효소H에 의해 절단되어 DNA 폴리머라제 I에 접근할 수 있는 유리 3' OH 말단을 갖는 활성 프라이머를 형성하게 된다 (Lin-Chao and Cohen, 1991; Merlin and Polisky, 1995).
- [0015] ColE1-형 기점 스트랜드의 반대편에, 108 뉴클레오티드의 안티센스 RNA이고, RNA II의 5' 말단과 상보적인 RNA I가 전사된다. RNA I은 복제기점으로부터 445 bp 상류에서 전사가 시작되어 대략 RNA II의 전사가 시작되는 곳까지 전사 된다. RNA I은 프라이머가 형성되는 것을 저해하며 따라서 RNA/DNA 하이브리드가 형성되기 전에 신장되는 RNA II 분자에 결합하여 복제를 저해하게 된다.

[0016] 두 RNA의 상호작용은 단계적 과정으로 되어 있고, RNA I 및 RNA II는 몇 개의 스텝 루프를 형성한다. 그들은 초기에 그들의 상보적 루프와의 사이에서 염기-쌍 상호작용을 하면서 소위 "키싱 복합체"를 형성한다. 그 결과, RNA I는 RNA II를 따라 하이브리드화되고, 안정한 이중체(duplex)가 형성된다. 키싱 복합체의 형성은 복제 저해에 있어 중요하다. 속도제한단계이기 때문에 면밀히 연구된바 있다 (Gregorian and Crothers, 1995).

[0017] RNA I/RNA II와 별개로, ColE1의 rom/rop 전사는 RNA II 및 RNA I 사이의 복합체 형성 속도를 증가시킴에 의해 플라스미드 카피 수에 기여한다. 카피 수를 증가시키기 위해, rom/rop을 코딩하는 유전자는 예를 들면 pUC19같은 pBR322의 몇몇 유도체에서 제거되었다.

발명의 상세한 설명

[0018] 본 발명의 일면은,

[0019] i) 단백질 발현이 조절되고, 작동가능하게 연관되는 단백질을 코딩하는 DNA 서열; 및, ii) RNA II 서열 또는 그들의 부분을 모방하고, ColE1 복제기점을 갖는 플라스미드로부터 전사될 수 있는 RNA I 서열과 상보적인 RNA 서열을 코딩하는 DNA 서열;을 포함하는 비-자연발생적 박테리아 세포이다.

[0020] 본 발명의 또 다른 일면은 ColE1 복제기점을 갖는 플라스미드 및 상기 플라스미드가 복제될 수 있는 박테리아 숙주 세포를 포함하는 숙주-벡터 시스템과 관련이 있으며, 여기에서 상기 숙주-벡터 시스템은

[0021] a) ColE1 복제기점을 갖는 플라스미드, b) 상기 플라스미드는 복제될 수 있고, i) 단백질 발현이 조절되고, 작동가능하게 연관되는 단백질을 코딩하는 DNA 서열; 및, ii) RNA II 서열 또는 그들의 부분을 모방하고, 플라스미드 a)로부터 전사될 수 있는 RNA I 서열과 상보적인 RNA 서열을 코딩하는 DNA 서열;을 포함하는 박테리아 숙주 세포를 포함하는 숙주-벡터 시스템이고,

[0022] 여기에서 ii)에 정의된 상기 RNA 서열은 플라스미드 a) 부재시, 상기 단백질이 발현되게 하고 여기에서, 상기 플라스미드 a)는 숙주 세포 b) 안에 존재하며, 플라스미드로부터 전사된 RNA I 분자는 ii)에 정의된 상기 RNA 서열과 하이브리드화되고, 상기 단백질의 발현이 그것에 의해 억제된다.

[0023] 바람직한 구체예에서, DNA 서열 i)은 이질적인(foreign) DNA 서열이다.

[0024] 바람직한 구체예에서, 상기 이질적인(foreign) DNA i)에 의해 코딩되는 단백질은 숙주 세포에 대해 독성이 있거나 치명적이다.

[0025] 또 다른 일례에서, 본 발명은 ColE1 복제기점을 갖는 플라스미드 및 상기 플라스미드가 복제될 수 있는 박테리아 숙주 세포를 포함하는 숙주-벡터 시스템에 관한 것이며, 여기에서 상기 숙주-벡터 시스템은 a) ColE1 복제기점을 갖는 플라스미드, b) i) 상기 숙주 세포에 대해 치명적이거나 독성이 있는 단백질을 코딩하는 이질적인(foreign) DNA 서열, ii) RNA II 서열 또는 그들의 부분을 모방하고, 플라스미드 a)로부터 전사가 가능한 RNA I 서열에 상보적인 RNA 서열을 코딩하는 DNA 서열이 그 게놈에 통합된 것을 포함하는 비-자연발생적 박테리아 숙주 세포를 포함하는 숙주-벡터 시스템이고, 여기에서 ii)에서 정의된 상기 RNA 서열은 플라스미드 a) 부재시 상기 치명적이거나 독성이 있는 단백질이 발현되게 하며, 상기 숙주 세포의 이러한 성장은 완벽하게 또는 부분적으로 저해되고 여기에서, 상기 플라스미드 a)가 상기 숙주 세포내부에 존재할 때, 플라스미드로부터 전사된 RNA I 분자는 ii)에서 정의된 상기 RNA 서열과 하이브리드화되며, 그럼으로써, 플라스미드를 함유하는 세포에 있어서, 상기 완벽하거나 부분적인 성장 저해를 막는 것과 같이 상기 치명적이거나 독성이 있는 단백질의 발현이 억제된다.

[0026] 본 발명은 박테리아 숙주 세포에 존재하고, 바람직하게는 박테리아 게놈내에 삽입되는 하나 이상의 유전자의 발현을 조절하기 위한 ColE1-형 플라스미드의 RNA-기초 카피 수 조절 메커니즘을 사용하여 만들며, 선택 표지로 작용한다.

[0027] 이하 i)의 DNA 서열(또는 DNA와 같은 것으로부터 전사되는 RNA)를 각각 "표지 유전자"(또는 "표지 RNA")라 한다.

[0028] 상기 언급한 바와 같이 본 발명의 구체예에서, 표지 유전자는 그 자체로 치명적이거나 독성이 있는 단백질을 코딩한다. 구체예에서, 본 발명에서의 "표지 유전자"는 발현되었을 때 직접적으로 발현 생성물에 기인하지 않으나, 예를 들면 표지 유전자가 발현되었을 때 독성 물질이 생성되는 것과 같은 다른 메커니즘에 기초한 독성

효과를 나타내는 유전자를 포함한다. 간단하게 하기 위해, 표지 단백질에 의해 코딩되는 단백질은 "표지 단백질"이라 하고; 표지 단백질이 치명적이거나 독성 단백질인 경우에는 "독성 단백질"이라 한다.

- [0029] 바람직한 구체예에서, 표지 단백질은 그 자체로 치명적이거나 독성이 있는것 또는 발현될 때 독성 효과를 생성하는 것이 아니라 상기 박테리아 세포의 성장에 필수적인 유전자의 전사를 억제함에 의해 치명적이거나 독성이 있는 것이다. 이러한 표지 단백질, 또는 DNA는 각각 "리프레서" 또는 "리프레서 유전자"라 하고, 박테리아 세포의 성장에 필수적인 유전자를 "필수 유전자"라 한다.
- [0030] 이하, RNA II 서열 또는 이들 부분을 모방하는 RNA 서열을 "RNA II-유사 서열"이라 한다.
- [0031] 본 발명의 "작동가능하게 연관된"은 DNA 서열 i) 및 DNA 서열 ii)가 상기 RNA 서열 ii)(RNA II-유사 서열)에 의해 조절되는 상기 DNA 서열 i)에 의해 코딩되는 표지 단백질의 발현에 있어 서로 관련이 있는 위치에 있는 것을 의미한다.
- [0032] 본 발명의 원리는, 즉, RNA I-매개 표지 유전자 조절억제(down-regulation) 또는 발현억제(silencing)이 도 1에 도시되어 있다.
- [0033] RNA II-유사 서열은 샤인 달가노(Shine Dalgarno) 서열과 함께 배합되어 숙주의 전사상에 존재한다. 플라스미드로부터 전사된 RNA I 서열은 상기 RNA II-유사 서열에 대해 안티센스 RNA로 작용하여 표지 mRNA의 해독을 방해한다.
- [0034] 표지 유전자 발현을 유도한 후, 독성 단백질을 코딩하는 표지 유전자의 경우, 숙주는 플라스미드가 존재할 때만 생존할 수 있고, 이는 플라스미드가 RNA II-유사 서열에 대해 상보적인 RNA I 서열을 제공하여 표지 유전자 전사와 하이브리드화되고 독성 단백질의 해독을 방해하기 때문이다. 상술한 바와 같이, 시스템의 조절은 플라스미드의 RNA I 및 그들과 상보적인 RNA II-유사 서열사이의 RNA-RNA 상호작용에 기초하며, RNA II-유사 서열은 표지 유전자 서열의 리보솜의 결합 부위의 상류 또는 하류에 위치하는 한정된 길이를 가지며 보통 숙주의 mRNA 내에 존재한다.
- [0035] 리보솜의 결합 부위 및 표지 유전자의 시작 코돈에 비례하는 RNA II-유사 서열의 길이 및 그것의 거리 및 위치는 플라스미드-없는 숙주가 mRNA를 해독할 수 있는 것이어야 하며; 이는 RNA II-유사 서열이 리보솜의 결합 및 해독을 방해하지 않도록 하여야만 함을 의미한다.
- [0036] 또한, 삽입된 RNA II-유사 서열은 상보적인 서열의 RNA-RNA 상호작용이 충분할 수 있도록 디자인되고 위치하여야 하며, 플라스미드가 존재할 때 그곳에서부터 전사된 RNA I는 표지 유전자의 해독을 방해하는데 충분한 정도로 숙주의 mRNA에 결합한다. 표지 유전자의 억제를 위해 플라스미드가 존재하지 않는 세포, 그러므로 RNA I가 존재하지 않는 세포와 비교해 보았을 때, 성장에 유리한 정도로 제공되어야 한다.
- [0037] 그러므로, 박테리아 숙주는 ColE1-형 플라스미드가 부존재할 때 표지 mRNA가 표지 단백질로 해독되고, ColE1-형 플라스미드가 존재할 때 단백질의 해독이 완전히 또는 부분적으로 억제되도록 조절된다.
- [0038] 상기 mRNA가 세포 성장을 완전히 또는 부분적으로 억제하는 독성 단백질을 코딩하는 경우, 플라스미드를 함유하는 숙주는 독성에서 살아남거나 플라스미드-없는 숙주보다 더 커질 것이다.
- [0039] 본 발명에서 독성 단백질은 적어도 표지 유전자가 없는 세포가 성장유에 대해 유리한 점을 갖는 정도로 그것이 부분적으로 또는 완전히 세포의 성장을 억제한다는 면에서 독성이 있다.
- [0040] 만약 세포가 두 개의 군이 있다면, 등몰(equimolar)로 분배되어 있는 한 군은 표지 유전자가 있는 한 군, 억제된 표지 유전자를 갖거나 갖지 않는 다른 군이며, 억제된 표지 유전자가 있거나 없는 세포군은 10 세대 전에 군의 99%로 증가할 수 있다.
- [0041] 본 발명의 구체예에서, 표지 유전자의 발현은 예를 들면 유도와 같은 추가적 메커니즘에 의해 조절된다. 표지 유전자가 독성 단백질을 코딩하는 경우에, 표지 유전자는 세포 증식동안 턴오프되어 있을 필요가 있으므로, 유도성 프로모터는 전사 조절에 유용하게 사용되고, 유도제를 첨가할 때만 mRNA 전사를 촉진한다. T7-폴리머라제가 IPTG, 또는 락토즈-유도성 Lac-프로모터, 또는 아라비노스-유도성 프로모터의 조절하에 있다면 예로 T7-폴리머라제 생성 숙주의 T7 프로모터를 들 수 있다.
- [0042] 선택적으로, 단백질의 상기 표지 유전자 코드는 그 자체로 독성이 있지 않고, 예를 들면 기질을 첨가한 후 효소가 기질을 독성 기질로 변형시키는 것과 같은 간접적 메커니즘을 통해 작용한다. 예로 바실루스 서브틸리스로부터의 SacB가 있다. sacB는 레반 수크로즈라 불리는 단백질을 코딩한다. 이 단백질은 수크로즈를 박테리아에 대

해 독성을 갖는 기질인 레반(levan)으로 바꾼다.

[0043] ColE1-형 플라스미드의 RNA I 서열은 시스템에 유용성을 제공하는 필수적 특질을 나타낸다. 이것은 예를 들면 항생물질에 대한 내성 유전자와 같은 플라스미드상의 부가적 선택 표지를 사용하지 않고, 플라스미드를 함유하는 숙주에 대한 선택 기준을 제공한다. 그러므로, 본 발명은 ColE1-형 플라스미드의 항생제-없는 선택을 위한 본 시스템을 제공한다.

[0044] 본 발명의 구체예에서, 하기 구성성분이 유용하다:

[0045] 1. 숙주 세포

[0046] 그들의 복제는 숙주 조직에 의존하기 때문에, ColE1-형 플라스미드는 좁은 숙주 범위를 갖는 플라스미드이다. 복제는 *E. coli* 및 살모넬라 및 클레브시엘라(Kues and Stahl, 1989)와 같은 관련 박테리아에 한정된다. 그러므로, 숙주의 유일한 필수 특성은 ColE1 플라스미드의 복제능을 갖는 것이다. 적합한 숙주는 *E. coli* (*Escherichia coli*) 스트레인 K12 또는 B 스트레인 또는 JM108, TG1, DH5알파, 노바 블루(*Nova Blue*), XL1 블루, HMS174 or LI21 (Casali, 2003 참조)와 같은 상업적으로 구할 수 있는 관련 스트레인이 널리 이용된다.

[0047] 숙주 세포의 바람직한 유전적 특질로 플라스미드 안정성 및 온전한 재조합 단백질(intact recombinant protein)의 회수 및 질을 향상시키는 돌연변이가 있다. 바람직한 유전적 특성의 예로 *recA* (상동 재조합이 없는 것), *endA* (플라스미드 미니프레프의 질을 향상시키는 엔도뉴클레아제 I 활성이 없는 것) 또는 *ompT* (이질적인(foreign) 막 프로테아제가 없는 것), *hsdS* (특정 서열의 제한 및 메틸레이션을 파괴하는 것)이 있다.

[0048] 본 발명의 구체예에서, 그 계놈에 IPTG 유도성 T7 폴리머라제를 갖는 DE3 파지를 함유하는 숙주 스트레인 HMS174(DE3)(Novagen)이 사용되었다(Studier and Moffatt, 1986). 적합한 숙주의 다른 예로 비-유도된 상태에서 T7-프로모터의 전사활성을 감소시키기 위한 T7-리소자임 유전자를 갖는 pACYC184 플라스미드 (Cm^R)를 추가로 함유하는 HMS174(DE)pLysS가 있다.

[0049] 특히 치사 표지 단백질의 경우, 유도없이 발현을 피하는 것이 바람직하다.

[0050] 2. 숙주세포를 조작하기 위한 구성

[0051] 숙주 세포를 조작하는데 적합한 구성의 원리를 도 2에 도시하였다. 모든 구성성분들- 두 개의 상동성 암(arms) [H], 프로모터 + 오퍼레이터[P+O], RNA I 표지 서열(RNA II-유사 서열), 표지 유전자 [유전자] (구체예에서, GFP가 초기 실험에서 사용되었다)가 전사 터미네이터 및 Kan 카세트(FRP, +/- FLP 리코비나제 인식 표지 서열을 포함하는 카나마이신 내성 카세트; 선택적으로 다른 통상의 선택 표지가 사용될 수 있다)와 함께 pBluescript KS+와 같은 적합한 벡터의 다중 클로닝 부위안으로 클론된다. 계놈의 삽입을 위한 선형 조각이 PCR에 의해 증폭되거나 제한효소로 잘라진다.

[0052] 카나마이신 내성 카세트는 예를 들면 pUC4K 벡터(Invitrogen)로부터 얻을 수 있다. 이는 두 상이한 부위, 즉 전 표지 유전자 또는 후 표지 유전자에서 조각안으로 클론될 수 있다. 이것이 세밀하게(deliberately) 작동하기 전에 의도하지 않은 표지 유전자의 미성숙 전사를 피하기 위하여, 유전자를 염색체의 유전자의 반대 방향에 삽입하는 것이 바람직하다.

[0053] 바람직하게, 표지 구성은 박테리아 계놈안에 삽입된다. 이는, 예를 들면 attTN7-부위 (Rogers et al., 1986; Waddel and Craig, 1988; Craig, 1989) 또는 *recA* 부위와 같은 염색체상의 중성 부위에 대해 상동적인 측면(flanking) 서열을 갖는 선형 조각을 사용하는 것과 같은 통상의 방법으로 통합될 수 있다. 조각들은 예를 들면 플라스미드 pKD46를 함유하는 *E. coli* 스트레인들 MG1655 또는 HMS174 와 같은 숙주 안에서 변형된다(Datsenko and Wanner; 2000). 이러한 플라스미드는 생체 내에서 재조합을 촉진하는 λ 레드 기능($\gamma, \beta, \text{exo}$)를 갖는다. 선택적으로, DY378 (Yu et al., 2000), 불완전한 λ 프로파지를 갖는 *E. coli* K12 스트레인이 사용될 수 있다. MG1655 또는 DY378의 경우 발현 조각을 포함하는 염색체상 로커스가 P1 파지에 의한 형질도입을 통해 HMS174(DE3) 계놈내로 도입될 수 있다. 포지티브 클론은 카나마이신 또는 클로람페니콜에 대한 Kan 카세트를 사용하는 경우와 같이 항생제 내성에 따라 선택된다. 내성 유전자는 효모 2 마이크론 플라스미드, FLP 리코비나제 및 이의 재조합 목표 부위 FRT의 부위-특정 재조합 시스템에 근거하는 FLP 리코비나제 기능을 사용하여 후에 제거될 수 있다(Datsenko and Wanner, 2000).

[0054] 선택적으로 숙주의 계놈내에 통합된 작재물을 갖기 위하여, ColE1-형 플라스미드와 상이한 파지 또는 플라스미드 상에 존재할 수 있으며, 이것은 표지 유전자(및 대상 유전자)의 발현에 영향을 주지 않는다는 점에서 본 발

명의 시스템과 양립할 수 있다. 적합한 플라스미드 또는 파지의 예로 pACYC184(미니플라스미드 p15A의 유도체이며; Chang and Cohen, 1978 참조), R1-미니플라스미드(Diaz and Staudenbauer, 1982), F1-기초 플라스미드 또는 필라멘토스 파지 (Lin, 1984) 또는 본 발명의 실험에서 사용되는 플라스미드 pMMB67EH (Furste et al., 1986)가 있다.

[0055] 보다 자세하게, 적합한 작재물의 성분들은 하기에 설명되는 바와 같다:

[0056] 2.1. 상동성 암(Homologous arms)

[0057] 본 발명의 초기 실험에서, 구조의 양쪽에 30 bp의 상동성이 있는 경우 λ 레드 시스템에 의해 재조합하는데 충분하다는 것이 발견되었다(Yu, 2000). 그러나 더 긴 상동성을 가진 것에서 더 좋은 결과가 도출되었고, 암은 바람직하게는 50-400 bp 범위이다. 상동성 암의 구체예로 250 및 350 bp가 사용되었다.

[0058] 2.2. 프로모터

[0059] 만약 이질적인(foreign) 표지 유전자 생성물이 그 자체로 세포에 대해 독성이 있거나 치명적이라면, 또는 리프레서라면, 발현을 조절하여야 한다. 프로모터 부위는 유전자 발현을 조절하는 적합한 오퍼레이터 서열(예: Lac 오퍼레이터)을 함유하여야 한다.

[0060] 본 발명의 특정 구체예에서, T7 프로모터, tac 또는 trc 프로모터, lac 또는 lacUV5 프로모터, pBAD 프로모터 (Guzman et al., 1995), trp 프로모터(트립토판에 의해 저해됨), P₁ 프로모터(c_i 리프레서와 함께) 또는 gal 프로모터가 사용된다.

[0061] lac 오퍼레이터를 사용할 때, IPTG(이소프로필 티오갈락토시드, Lac 오페론의 인공적 유도제) 또는 락토즈가 표지 유전자를 활성화하는데 사용되기 위해 첨가된다. 유도성 시스템이 사용되면 박테리아는 유도없이 생존할 수 있으나, 유도제를 첨가하면 사멸한다.

[0062] 독성 유전자 발현을 엄격하게 조절하기 위하여, 특히 표지 단백질이 그 자체로 세포에 대해 독성이 있는 경우, 아라비노스-유도성 PBAD 프로모터(Guzman et al., 1995)같은 엄격하게 조절하는 프로모터를 사용하는 것이 바람직하다.

[0063] 표지 유전자의 발현을 조절하는 또 다른 방법으로 독성이 없거나(예. 리포터 유전자), 바실루스 서브틸리스 sacB 유전자와 같은 제한적 조건하에서만 독성이 있는 유전자와 지속적 프로모터(constitutive promoter)를 혼합하여 사용하는 방법이 있다. SacB는 수크로스가 존재할 때 *E. coli*에 대해서만 독성이 있다.

[0064] 프로모터는 표지 유전자 생성물의 효과 및 다운-레귤레이션을 위해 요구되는 효율 또는 RNA I의 발현억제 효과를 고려하여 선택된다. 예를 들면, 비-독성 또는 독성이 적은 표지 유전자를 포함하는 작재물에는 더 강한 프로모터가 바람직하다.

[0065] 2.3. RNA II-유사 서열

[0066] RNA I가 부분적인 또는 완전한 저해제로 작용하여야만 하기 때문에, RNA I(10-555 nt)에 대해 상보적인 RNA II-유사 서열은 상기 RNA II-유사 서열내에 삽입되거나(embedded) 상류, 하류에 있는 리보솜 결합 부위(샤인-달가노 서열)과 함께 표지 유전자의 상류에 존재하여야 한다. 샤인-달가노 서열(SD)은 원핵세포의 mRNA 분자상 해독 시작 부위의 상류에 있는 짧게 스트레치된 뉴클레오티드를 말하며, 리보솜 RNA에 결합하여 리보솜이 mRNA에서 개시코돈에 위치하도록 해준다. RNA II-유사 서열의 상류에 위치할 때, 바람직하게는 7 뉴클레오티드(GAAGGAG)로 구성된 SD 서열은 표지 유전자의 ATG 시작 코돈의 상류 예를 들면 7 bp와 같이 대략 4 내지 15 bp에 위치하여야 한다. 리보솜 결합 부위가 표지 유전자에 대해 상보적인 RNA I 서열내에 삽입된 경우, 이 서열은 안티센스 RNA가 RNA I와 상호작용하도록 하기 위해, 키싱 복합체를 형성하기 위해 온전하게 존재하여야 하는 변형된 스템 부위, 루프 구조 및 바람직하게 전체 2차 구조와 같은 곳에 삽입되어야 한다.

[0067] RNA II-유사 서열의 앞에 시작 코돈을 제공하는 구체예에서, 작재물은 표지 서열 및 RNA II-유사 서열을 포함하는 융합 생성물이 된다.

[0068] 또 다른 구체예에서, RNA II-유사 서열은 리보솜 결합 부위 및 시작 코돈 사이에 삽입되며; 이러한 접근법에서 해독이 되는 가능한 최대 간격의 한계는 예를 들면 15 내지 20 bp이다(만약 리보솜 결합 부위 및 시작 코돈사이의 거리가 증가하면, 해독 효율이 감소한다).

[0069] 선택적으로 RNA II-유사 서열 및 표지 유전자가 직접 융합하는 경우, RNA II-유사 서열은 표지 유전자와 커플되

어 전사가가능하게 될 수 있다. 이와 같이 만들기 위하여, 예를 들면 시작 ATG로 시작하고, 그 후에는 RNA II-유사 서열에 의하고, 추가의 리보솜 결합 부위, TGATG 같은 종결 및 시작 코돈이 오버랩된 것을 나타내는 서열, 및 표지 서열이 순서대로 작제물에 사용될 수 있다. 표지 유전자는 RNA II-유사 서열이 표지 유전자보다 먼저 그리고 표지 유전자로부터 분리되어 해독되었을 때만 해독된다. 이러한 장치의 장점은 표지 유전자에 대한 단백질 용해가 불필요하다는 점이다. 이러한 접근법은 분리 해독 옵션을 제공하며, 이는 몇 가지의 표지 단백질, 예를 들면 Tet 리프레서와 같은 몇몇 리프레서의 경우에 있어 유용할 수 있다.

[0070] 단일 RNA I/RNA II 스템 루프가 키싱 복합체를 형성할 때(Eguchi 1991b; Gregorian, 1995), 최소한 단일 루프가 형성되어야만 한다. 어떤 경우, 두 가지의 요구사항, 즉 하나는, 삽입된 루프 구조 대신 표지 mRNA의 해독, 다른 한편으로는 RNA II-유사 서열에 삽입된 루프 구조와 플라스미드상의 상보적인 RNA I사이의 효율적인 RNA-RNA 안티센스 반응이 충족될 필요가 있다.

[0071] RNA I 및 RNA II-유사 서열을 함유하는 표지 mRNA사이의 상호작용은 리보솜의 결합을 방해하여 해독을 못하게 하는 목적을 갖는다. 상기 mRNA는 유도성 프로모터(예. lac, 아라비노즈 또는 T7 프로모터)의 조절을 받아, 유도가 된 후(예. IPTG, 락토즈, 아라비노즈에 의해), 상기 표지 유전자의 발현이 다운-레귤레이션되며, 그 때마다 충분한 RNA I가 플라스미드의 복제기점에서 생산된다. 바람직하게, 표지 유전자를 적어도 어떤 정도(상술한 바와 같은)로 세포 성장을 저해하는 치명적인 단백질 또는 독성 단백질을 코딩하며; 이러한 경우, 발현이 되면 세포 사멸 또는 세포 성장의 감소가 야기되고(플라스미드-없는 세포에서), 반면 다운-레귤레이션이 되면 세포가 성장한다(플라스미드를 갖는 세포에서).

[0072] 치명적이거나 독성이 있는 단백질을 코딩하는 또 다른 표지 유전자로, 어떠한 목적이라도, 박테리아 세포의 성장 동안 발현을 조절할 수 있는 임의의 단백질을 코딩할 수 있는 표지 유전자가 있다. 특히, 표지 유전자는 하기 (2.4)에 설명되는 리포터 유전자일 수 있다.

[0073] 본 발명의 시스템에서, 플라스미드 복제를 정상적으로 다운-레귤레이션 하는 기능을 갖는 RNA I는 "유전자-발현억제"로 작용하며, 반면 복제 저해는 감소한다. 그러므로, 본 발명의 시스템을 사용하면 플라스미드 복제가 증가하게 되어 박테리아 숙주 세포의 생존에 유용하다.

[0074] 2.4. 표지 유전자

[0075] 표지 유전자에 대한 RNA I-매개 다운-레귤레이션은 본 발명의 주요한 특징이며, 이는 임의의 주어진 목적을 위한 임의의 유전자 발현의 조절에 적용될 수 있다.

[0076] 우선, RNA I-매개 다운-레귤레이션은 숙주에 대해 조건부로 치명적인 표지 유전자에 대하여 유용하다(예. Davison, 2002, for review 참조).

[0077] 그 자체로 독성이 있고 본 발명에 적합한 표지 유전자의 예로 제한 뉴클레아제를 코딩하는 유전자(예. CviAII, a restriction endonuclease originating from Chlorella virus PBCV-1; Zhang et al., 1992), EcoRI (Torres et al., 2000), Szafransky et al., 1997; Kaplan et al., 1999; Sano et al., 1995에 나와 있는 바와 같이 예를 들면 스트렙타비딘 또는 Stv13 (절단된, 쉽게 용해되는 스트렙타비딘 배리언트)와 같은 비오틴 결합 단백질 작용하고, 세포 성장에 있어 필수 단백질인 단백질과 상호작용하는 독소를 코딩하는 유전자; 막을 손상시키는 단백질을 코딩하는 유전자(FX174의 E 유전자 단백질 (Ronchel et al., 1998; Haidinger et al., 2002), *gef* (Jensen et al., 1993; Klemm et al., 1995), *relF* (Knudsen et al., 1995)); 예를 들면, *ccdB* 유전자 (Bernard and Couturier, 1992)와 같은 바실루스 서브틸리스로부터의 DNA 기라제(*gyrase*) 또는 *sacB*를 잡고 있는 F-플라스미드로부터의 강력한 세포 사멸 단백질을 코딩하는 다른 박테리아 독소를 코딩하는 유전자(Gay et al., 1983); 또는 박테리아 숙주에 대해 독성이 있는 진핵세포의 독소를 코딩하는 유전자(e.g. FUS; Crozat et al., 1993)이 있다. 독성 유전자를 사용할 때, 그들의 발현의 유도성 프로모터에 의한 조절이 필수적이다. 이러한 프로모터는 유도제가 없으면 활성화되지 않고, 유도할 때 세포 성장을 저해하기에 충분하게 발현되어야 한다.

[0078] 박테리아에서 또 다른 독성 유전자 및 본 발명에 유용한 유전자의 예는 Rawlings, 1999에 나와 있다.

[0079] 구체예에서, 표지 유전자는 제한 뉴클레아제, 스트렙타비딘을 코딩하는 유전자 또는 간접적인 독성 효과를 갖는 유전자, 예를 들면 상술한 SacB로부터 선택된다.

[0080] 바람직한 구체예에서, 독성 표지 단백질은 그 자체로 또는 발현할 때 독성 효과에 기인하여 치명적이거나 독성이 있지는 않으나, 상기 박테리아 세포의 성장에 필수적인 유전자의 전사를 억제하는 작용을 하는 리프레서 단

백질로 작용한다.

- [0081] 본 발명의 구체예에서, 플라스미드가 존재하는 경우, RNA I-매개 다운-레귤레이션은 리프레스에 영향을 준다. 이는 RNA I의 존재 및 RNA I와 리프레스 mRNA(RNA II-유사 서열)와의 상호작용은 리프레스의 저해를 야기하여 필수 유전자가 활성화되거나 업-레귤레이션되게 되고, 이는 복제되는 플라스미드의 존재시 세포의 성장이 발생하는 결과를 가져온다. 구체예에서, 필수 유전자의 프로모터는 결합 DNA 서열("오퍼레이터")의 제공에 의해 변형되는데, 바람직하게는 천연 프로모터가 완전한, 유도성 프로모터(오퍼레이터 서열은 포함하는)로 대체됨으로써, 즉 발현된 리프레스 단백질, 예를 들면 Tet 리프레스와 같은 것이 오퍼레이터에 결합할 수 있는 방법으로, murA(Tet 리프레스에 의해 발현됨에 따른)와 같은 필수 유전자의 발현을 조절하고 전사를 저해하게 된다.
- [0082] 오퍼레이터는 그것의 특정 리프레스 또는 인헨서가 결합된 DNA 서열이며, 그것에 의하여 서열 TGGAATTGTGAGCGGATAACAATT (서열 번호: 53; Gilbert and Maxam, 1973) 또는 그들의 유도체를 갖는 lac 프로모터에 위치하는 lac 오퍼레이터에 의해 인접한 유전자의 전사가 조절된다(Bahl et al., 1977). 와일드 타입 숙주에 존재하지 않는 리프레스 유전자는 예를 들면 T7, lac 또는 tac 프로모터같은 유도성 프로모터의 조절하에 게놈안으로 조작된다. 정상 성장 조건에서, 리프레스는 발현되지 않는다, 예를 들면 IPTG에 의해 유도된 후 리프레스가 발현되고 필수 유전자의 프로모터 부위에 있는 인공적으로 도입된 오퍼레이터 또는 인공적으로 삽입된 프로모터에 결합하여 각각의 필수 유전자의 발현을 저해한다. 복제되는 ColE1이 숙주안에 존재할 때는 언제나, 리프레스 mRNA에 결합할 수 있고, 따라서 변형되는 RNA I가 생산된다. 이러한 RNA-RNA 상호작용에 의해 리프레스의 해독이 저해된다(임의의 다른 독성 표지 단백질과 유사하게). 결과적으로, 필수 유전자 생성물이 생산될 수 있고 세포는 생존가능성 및 성장을 유지한다.
- [0083] 구체예에서, 박테리아 숙주는 RNA II-유사 서열 외에도, 유도성 프로모터(변형을 위해 게놈내로 조작되거나 바람직하게는 필수 유전자의 자연발생적으로 생긴 프로모터를 완전히 대체하는)의 조절하에 그것의 필수 유전자의 하나(박테리아 게놈내에 자연발생적으로 포함하고 있는)를 포함한다. 필수 유전자를 조절하는 프로모터 부위는 상기 리프레스 단백질에 의해 인식되고 특별히 결합하는 DNA 서열(오퍼레이터)를 또한 포함한다. 박테리아 염색체 내로 조작되는 리프레스 유전자는 또한 필수 유전자를 조절하는 프로모터와는 상이한 유도성 프로모터의 조절하에 있어서 독립적으로 유도성이 있다. 필수 박테리아 유전자는 예를 들면, Gerdes et al., 2002 and 2003, 및 PEC (Profiling the E. coli Chromosome) database (<http://www.shigen.nig.ac.jp/ecoli/pec/genes.jsp>) 문헌에, 예를 들면, 이소루실-tRNA 합성효소(Isoleucyl-tRNA synthetase (ileS)), ftsQ, ftsA, ftsZ, DNA 폴리머라제 III 알파 서브유닛(dnaE), murA, map, rps A (30s 리보솜 단백질 S1), rps B (30s 리보솜 단백질 S2), lyt B (글로벌 조절자) 등과 같은 세포 분열 단백질과 같은 것이 공지되어 있다.
- [0084] 리프레스는 오페론의 프로모터 내에 위치하는 오퍼레이터에 결합하는 단백질이고, 그럼으로써 상기 오페론에 위치하는 유전자(들)의 전사를 다운-레귤레이션 시킨다. 본 발명에 적합한 리프레스의 예로 테트라사이클린 리프레스(tet) 단백질 TetR이 있으며, 이는 그람-음성 박테리아에서 테트라사이클린 내성 결정소의 패밀리의 전사를 조절하고 테트라사이클린(Beck, et al., 1982; Postle et al., 1984), 트립토판 오페론의 오퍼레이터에 결합하고, 트립토판 생합성 유전자를 함유하는 트립토판 리프레스(trp)에 결합한다(Yanofski et al., 1987).
- [0085] 유도성 프로모터의 예로 전사가 기질을 첨가할 때 시작하여 환경에 따라 조절가능한 프로모터가 있는데, 예를 들면 IPTG에 의해 유도되는 lac 오퍼레이터(Jacob and Monod, 1961), 아라비노즈에 의해 유도되는 아라비노즈-프로모터(pBAD)(Guzman et al., 1995), 및 구리-유도성 프로모터(Rouch and Brown, 1997)가 있다.
- [0086] 본 발명의 구체예에서, tet-리프레스(tetR)가 리프레스 유전자로 선택되었는데, 이는 유도제 IPTG를 첨가하면 필수 박테리아 유전자를 턴-오프 시킴으로써 "독성" 표지 유전자로 작용한다.
- [0087] 리프레스 유전자 접근법을 완성하기 위하여 두 가지 타입의 카세트가 디자인되어 본 발명의 구체예(실시예 4)에서 박테리아 염색체내로 삽입되었다. 첫번째 작제물 세트는 게놈상의 특정 필수 유전자의 프로모터를 대체(또는 변형)하는 작용을 하는 카세트를 포함한다. 두번째 타입의 카세트는 컨셉을 증명하기 위한 필수 유전자 대신 GFP를 도입한 시험 작제물을 제공한다. GFP 시험 작제물을 사용하는 실험의 목적은 조절 단계반응, 프로모터 세기를 평가하기 위함이며, 그럼으로써 시스템의 모든 상호작용하는 구성성분들을 조정하기 위함이다.
- [0088] 그러므로, 다른 구체예에서, 표지 유전자는 예를 들면, GFP(그린 형광 단백질), hSOD (인간 슈퍼옥시드 디스뮤타제), CAT (클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제) 또는 루시페라제(luciferase)와 같은 리포터 유전자이다.
- [0089] 리포터 유전자는 ColE1-형 플라스미드가 숙주 세포내에 또는 플라스미드 카피수에 존재 또는 부존재하는지에 대한 정보가 필요할 때 배양 과정에서 유용하다. 이러한 정보는 발효과정이 플라스미드 카피수의 조절로 최적화되

있을 때 특히 유용하다.

- [0090] 또한 리포터 유전자는 독성 표지 유전자 대신 작용할 수 있고, 그러므로 유전자-조절 또는 발현억제를 위한 작재물 기능 제공 및 독성 표지 유전자에 미치는 그들의 영향을 측정하기 위하여 실험에 사용될 수 있다.
- [0091] 박테리아 숙주를 조작하기 위해 디자인된 작재물의 기능을 평가하기 위하여, 독성 표지 유전자의 발현은 본 발명의 초기 실험 모델로 사용된 ColE1-형 플라스미드, 리포터 유전자, 그린 형광 단백질(GFP)에 의해 조절될 수 있다. 이것의 자동-형광(Tsien, 1998) 에 기인하여, GFP는 초기 실험에서 표지 유전자의 대체물 또는 필수 유전자로 각각 적합하다고 생각된다.
- [0092] 본 발명의 구체예에서, 표지 유전자는 내생 숙주 유전자일 수 있는데, 이는 조절되는 것이 의도되는 임의의 중요한 유전자일 수 있다. 이러한 경우, 숙주 세포는 2.3.에 상술한 바와 같이 상응하는 숙주 유전자와 작동가능하게 연관된 RNA II-유사 서열을 코딩하는 서열로 조작된다.
- [0093] 3. ColE1-형 플라스미드
- [0094] 본 발명에서, 모든 ColE1-형 플라스미드가 예를 들면 WO 02/29067에 나와 있는 바와 같이 변형된 RNA I 및/또는 RNA II 서열 뿐만 아니라 그들의 천연 RNA I/RNA II 쌍과 함께 사용될 수 있다.
- [0095] 상술한 바와 같이, 유용한 ColE1-형 플라스미드의 예로, 자연발생적으로 생긴 ColE1 플라스미드 pMB1, p15A, pJHCMW1, 뿐만 아니라, pBR322 및 관련 벡터, pUC 플라스미드, pET 플라스미드, pBluescript 벡터와 같은 통상 사용되는 상업적으로 입수가능한 클로닝 전달체들이 있다.
- [0096] 플라스미드 서열에는 항생물질 내성 유전자가 포함될 필요가 없다. 필수적 성분으로서, 플라스미드는 기본적으로 ColE1 복제기점 및 관심대상 유전자를 유전자 발현 카세트만을 포함한다.
- [0097] 플라스미드상의 중요한 유전자 및 이것의 프로모터는 적용 타입에 의존하며; 본 발명은 예를 들면 치료용 유전자와 같은 중요한 유전자와 관련하여 임의의 방법에 한정되지 않는다. 유전자는 유전자 치료에 적용하기 위하여 예를 들면 CMV 프로모터와 같은 진핵 프로모터와 작동가능하게 연관될 수 있다.
- [0098] 본 발명의 적용:
- [0099] 본 발명은 최첨단 발효 분야, 플라스미드 DNA 생산 및 재조합 단백질의 생산 분야 모두에 널리 사용될 수 있다.
- [0100] 본 발명에 적용하기에 유용한 pDNA를 발효하기 위한 몇 가지 접근법이 나와 있다. 플라스미드 DNA 생산 방법은 발효에 영향을 미치는 다양한 요소들 및 세포에 주어진 조절 레벨에 따라 상이하다:
- [0101] 실험실 스케일로 pDNA를 생산하기 위하여, 웨이크 플라스크 중에서 플라스미드를 갖는 세포를 배양하는 것은 가장 간단한 방법이다(O'Kennedy et al., 2003; Reinikainen et al., 1988; O'Kennedy et al., 2000; US 6,255,099).
- [0102] 더 많은 양의 플라스미드를 얻기 위하여, 모든 영양분을 초기에 제공하고, 배양동안에는 영양소를 첨가하지 않는 소위 "배취 발효(batch fermentation)"조건에서 세포를 조절된 발효기로 배양할 수 있다. 이러한 타입의 배양은 탄소 및 질소 소스로 소위 "복합체 구성성분"이라 불리는 배양 배지를 사용하여 할 수 있는데, 이는 예를 들면 O'Kennedy et al., 2003, 및 Lahijani et al., 1996, 및 WO 96/40905, US 5,487,986 및 WO 02/064752에 나와 있다. 다르게는, 합성 배지가 pDNA 생산에 사용될 수 있으며, 예를 들면 pDNA 생산을 위해 특별히 디자인된 배양 배지는 (Wang et al., 2001; WO 02/064752)에 정의된 바 있다.
- [0103] 본 발명은 *E.coli*를 하나 이상의 영양소를 배지에 섭식(feeding)으로 공급하는 페드 배취 발효(fed batch fermentation)에 또한 사용될 수 있으며, 정의된 세트 포인트에 공정 파라미터를 조절하기 위한 섭식 영양소에 의한 피드백 조절 알고리즘을 보통 사용한다. 피드백 조절은 발효를 통한 세포 활성화에 직접 관계가 있다. 발효의 피드백 조절에 사용될 수 있는 조절 파라미터들로 pH치, 온라인 측정된 세포 밀도(on line measured cell density) 또는 용존산소텐전(dissolved oxygen tension (DOT))이 포함된다. 정의된 세트 포인트에서의 섭식물에 의한 용존산소텐전을 조절하는 피드백 알고리즘은 WO 99/61633에 나와 있다.
- [0104] 다르게는, 더욱 복잡한 알고리즘에서는 DOT 및 pH치 모두를 피드백 배양 방법에 대한 조절 파라미터로 사용한다 (US 5,955,323; Chen et al., 1997).
- [0105] 다르게는, 섭식 모드는 지수 함수에 따른 섭식 배지 공급에 기초한다. 섭식율은 목적하는 비성장률(specific growth rate) μ 에 기초하여 조절된다. WO 96/40905 및 O'Kennedy et al., 2003에 플라스미드 DNA 생산을 위한

지수적 페드-배취 공정을 사용한 방법이 나와 있다. Lahijani et al., 1996에는 플라스미드 복제의 온도-조절성 증진(temperature-controllable enhancement)과 지수적 섭식의 결합이 나와 있다.

- [0106] 다르게, 본 발명은 플라스미드 DNA를 생산하는 공정에 적용될 수 있으며 이는, E.coli 세포를 먼저 전배양 과정에서 배양하고, 그 후 배취 상 및 섭식 상을 포함하는 페드-배취 공정인 주 배양단계에서 발효시키는 것이다. 배취 상의 배양 배지 및 섭식 상동안 첨가되는 배양 배지는 화학적으로 정의되며, 섭식 상의 배양 배지는 성장-제한 기질(growth-limiting substrate)을 포함하며 주어진 지수 함수(pre-defined exponential function)에 따른 섭식율로 첨가되어, 그 결과 주어진 값으로 비성장물을 조절한다.
- [0107] 표지 유전자가 유도성 프로모터의 조절하에 있을 때, 유도제를 초기 및/또는 펄스방식으로 배취에 첨가할 수 있다. 섭식 상동안, 유도제를 펄스 방식으로 또는 연속적으로 첨가할 수 있다.
- [0108] 발효 공정의 마지막에, 세포를 수집하고(harvest) 플라스미드 DNA를 분리하여 예를 들면 US 5,981,735에 나와 있는 음이온 교환 및 겔 투과 크로마토그래피에 기초한 방법 또는 US 6,197,553에 기재된 두 가지 크로마토그래피 단계, 즉 음이온 교환 크로마토그래피를 처음 단계에서, 역상 크로마토그래피를 두번째 단계에서 사용하는 것과 같은 이 기술분야에 공지된 공정에 따라 정제한다. 플라스미드 DNA를 제조하는 또 다른 적합한 방법으로 WO 03/051483에 기재된 방법이 있으며, 단일체 지지(monolithic support)와 결합된 두 가지 다른 크로마토그래피 단계를 사용한다.
- [0109] 본 발명을 유전자 치료 적용을 위한 플라스미드 생산과 같은 플라스미드 생산에 응용하는 것 뿐만 아니라, 본 발명은 재조합 단백질 생산에 또한 유용하다.
- [0110] 재조합 단백질 생산에 관해서는, 대체로, E. coli 중의 중요한 유전자, 특히 ColE1 형 플라스미드로부터의 중요한 유전자를 발현하는데 유용하다고 증명된 임의의 방법이 사용될 수 있다(Jonasson et al., 2002; Balbas, 2001 참조). 단백질은 배취 발효 또는 바람직하게는 페드-배취 배양을 통해 복합적인, 합성 또는 반합성 배지를 사용하여 세포간(intracellularly)에서(완전하게 또는 부분적으로 가용성이거나 봉입체로써) 또는 분비(세포 배양 배지 또는 원형질막 공간(periplasmic space) 내에서)에 의해 얻을 수 있다.
- [0111] 플라스미드 DNA 생산, 보통 유전자 치료 응용을 위한 플라스미드 DNA에서, 중요한 유전자는 박테리아 숙주 세포에서 발현되지 않는다. 결국 발현되는 곳인 포유류, 바람직하게는 인간에 이를 응용한다는 관점에서, 중요한 유전자는 보통 진핵 프로모터와 작동가능하게 연관된다. 반면, E. coli에서 단백질의 재조합 생산에서는 중요한 유전자는 숙주내에서 발현되어야 하고, 따라서 원핵 프로모터의 조절을 받는다.
- [0112] 재조합 단백질 생산을 위하여 두 가지 프로모터, 즉, 표지 유전자를 조절하는 프로모터 및 중요한 유전자를 조절하는 프로모터가 둘 중 하나의 발현을 방해하는 작용이 일어나지 않는 한 상이하거나 동일할 수 있다.
- [0113] 유리하게, 그들의 활성이 시간-포인트 및 전사 레벨 면에서 각각 독립적이기 때문에, 프로모터는 다르게 조절된다. 바람직하게, 표지 유전자를 조절하는 프로모터는 발효 공정의 시작단계에서 활성이 있고, 적당한 양의 mRNA를 생산하는 반면, 관심 대상 유전자의 프로모터는 다소 강력하여 발효과정 중의 선택된 시간-포인트에서 활성화된다. 만약 유도성 프로모터가 중요한 유전자 및 표지 유전자 모두에 사용된다면, 그들이 다른 유도제에 의해 턴온(turn-on)되는 방식으로 보통 선택된다. 다르게는, 표지 유전자는 유도성인 및 지속적 프로모터(constitutive promoter)인 중요한 유전자일 수 있거나 그 역일 수 있다. 이는 표지 유전자 작재물이 박테리아 숙주 계능내에 통합되는 방법 및 표지 유전자 작재물이 상술한 플라스미드 또는 파지내에 함유되는 방법에 모두 적용된다.
- [0114] 발효의 여러 상에 있어서의 프로모터 유도와 관련하여, 상술한 플라스미드 DNA 생산의 원리에 적용된다.
- [0115] 본 발명은 모든 복제된 플라스미드가 항생물질에 대한 내성 유전자를 가지지 않는 장점이 있고 그러므로 또한 유전자 치료 적용에 있어서도 예를 들면, 인간 및 동물의 식량 생산 또는 재조합 식물 발생을 위한 재조합 이스트 스트레인의 생성과 같은 항생물질에 대한 내성 유전자의 부재가 요구되거나 바람직한 모든 응용례에 대해 적합하다.
- [0116] 실시예 1 및 2에서, 표 1에 도시된 올리고뉴클레오타이드가 사용되었다:

[0117] 표 1:

서열번호	프라이머	길이	서열
1	T7 rbs@st-loop2+1	159 mer	5'GAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAA CAAAAAAACCACCGCTACCGCGGTGGT TTGTTTGCCTCTAGTTTCTAGTACCAACTG AAGGAGAGAATACATATGGCTAAAGGA GAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAA TTCTTGTGAATTAGATGGT 3'
2	T7-atg-loop2-sbulge	161 mer	5'GAAATTAATACGACTCACTATAGGGCC TCTAGAAAATAATTTTGTGTTAACTTTAAGA AGGAGATATACATATGCGGATCAAGAGC TACCAACTCTTGTTCGGATGGCTAAAGG AGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCA ATTCTTGTGAATTAGATGGT 3'
3	T7Prom-sRNA I_ColE1-back	45mer	5'GAAATTAATACGACTCACTATAGGGACA GTATTGGTATCTGCGC 3'
4	asRNA I_ColE1-for	20mer	5' AACAAAAAACCACCGCTAC 3'
5	T7Prom-RNA IIse_ColE1-back	45mer	5'GAAATTAATACGACTCACTATAGGGGCA AACAAAAAACCACCGC 3'
6	RNA IIse_ColE1-for	20mer	5' ACAGTATTTGGTATCTGCGC 3'
7	oligo-T7prom-p11a-back	23mer	5'GAAATTAATACGACTCACTATAG 3'
8	oligo-GFP-for	23mer	5'ACCATCTAATTCAACAAGAATTG 3'

[0118]

[0119] T7 프로모터 및 리보솜 결합 부위와 함께 콘텍스트 내에 RNA-I 상보적인 서열을 포함하는 서열 번호:1 및 2의 올리고뉴클레오타이드, 및 GFP cDNA의 처음의 60 뉴클레오타이드는 서열 번호: 7 및 8의 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 증폭되고, T7 폴리머라제에 의한 시험관내 전사에 사용된다(실시예 1 참조). 서열 번호:1의 올리고뉴클레오타이드는 RNA I의 루프 1 및 루프 2(도.4의 III과 동일)를 포함하며, 서열 번호:2의 올리고뉴클레오타이드는 RNA I의 루프 2(도.4의 II와 동일)를 포함한다.

[0120]

서열 번호: 3 및 4의 올리고뉴클레오타이드는 ColE1 플라스미드로부터 RNA I(110 bp)를 증폭하기 위하여 사용되며, 시험관내 전사를 위한 T7 프로모터를 통합하는(incorporate) 데에 사용된다. 서열 번호:5 및 6의 올리고뉴클레오타이드는 ColE1 플라스미드로부터 RNA II_{180nt}를 증폭 및 시험관내 전사를 위한 T7 프로모터를 통합하기 위하여 사용된다. 서열 번호: 7 및 8의 올리고뉴클레오타이드는 또한 주형으로서의 pet11aGFP로부터 음성대조군을 위한 DNA를 생산하기 위하여 사용된다(도.4의 I과 동일). 음성대조군은 콘텍스트 내에 T7 프로모터 및 리보솜 결합 부위를 갖는 녹색 형광 단백질 mRNA의 조각이다.

실시예

[0131]

실시예 1

[0132]

체내에서 전사되는 작재물로의 하이브리드화 실험

[0133]

하이브리드화에 의해 해독이 저해되는 mRNA 분자내의 RNA I (RNA II-유사 서열)에 대해 상보적인 서열의 바람직

한 길이 및 위치를 선택하기 위해 시험관내 안티센스 실험을 수행하였다. 다른 합성 RNA 및 RNA II와 RNA I의 RNA 하이브리드는 겔 쉬프트 분석을 하였다.

- [0134] 마지막으로, RNA II-유사 서열을 포함하는 인공적으로 디자인된 GFP 작재물을 시험관내에서 전사시키고 시험관내에서 전사된 RNA I와 함께 배양하였다. 하이브리드화가 음성 RNA-폴리아크릴아미드 겔상에서 검출되었다.
- [0135] 합성 RNA(RNA I 및 그의 5' 말단에 RNA II 헤어핀 구조를 갖는 합성 작재물들)는 시험관내 전사를 통해 얻어진다(Ampliscribe, T7-Flash Transcription Kit; Epicentre) (도 2). 메타비온(Metabion)으로부터 얻어지는 pBR322 ori 및 올리고뉴클레오타이드(올리고뉴클레오타이드 서열 번호: 1 및 2) 각각으로부터의 110 bp의 RNA I 및 RNA II는 PCR로 증폭되며 시험관내 전사에 있어 선형 DNA 주형으로 작용한다.
- [0136] RNA I 및 RNA II-목표 상호작용을 확인하기 위하여, 겔 쉬프트 실험이 수행되었다. 루프-루프 복합체가 저해되는 것이 시각화되었다.
- [0137] RNA를 하이브리드화에 앞서 개별적으로 가열하였다. 겔은 75 mm 두께, 5%(w/v) 폴리아크릴아미드(60:1)이고 빙냉수(ice cold water)로 냉각한 미니 단백질 겔 장치(Pharmacia)에 런하였다. 러닝 버퍼는 5 mM MgCl₂를 포함하는 1x 트리스-보레이트(89 mM 트리스 (pH 8.3), 89 mM 보르산)이다. 밴드를 에티디움 브로마이드로 염색하고 UV 트랜스일루미네이터(UV transilluminator)를 사용하여 관찰하였다.
- [0138] RNA II 서열이 있는 경우 및 없는 경우 RBS 및 시작 코돈을 포함하는 GFP mRNA의 60 nt를 RNAI와 함께 배양하였고, 그 결과를 도.3에 도시하였다.
- [0139] 도. 3의 겔 1은 양성(RNAII_{108 nt}, 완전한 RNAI 서열 및 음성대조군에 상응)이었다. 두 개의 RNA사이에 반응이 일어난 경우, (표지된)RNAI 밴드가 약하게 나타났고 이는 저해되었기 때문이다.
- [0140] 겔 1:
- [0141] 1 음성대조군 RNA
- [0142] 2. RNAI + 음성대조군 RNA
- [0143] 3 RNAII_{108nt}
- [0144] 4 RNAI + RNAII_{108nt} (배양전에 가열(90℃에서 3분))
- [0145] 5 RNAI + RNAII_{108nt}
- [0146] 6 RNAI (배양전에 가열(90℃에서 3분))
- [0147] 7 RNAI
- [0148] 도 3의 8,9 및 10레인의 겔 2에서는 RNAI 밴드만이 나타났다. 하나의 RNAII 루프를 갖는 전사와 함께 배양하였을 때 반응이 매우 약하게 보였고 반면 두 개의 루프를 갖는 전사의 경우 강한 반응을 나타냈다.
- [0149] 겔 2:
- [0150] 8 RNAI
- [0151] 9 RNAI (+RNAII 루프2)
- [0152] 10 RNAI (+RNAII 루프1 및 2)
- [0153] 루프2GFP(라인 9)는 음성대조군과 비교할 때 RNAI 밴드가 다소 약하게 나타났으며, 반면 루프1 + 2GFP(라인 10)은 RNA I 밴드가 현저하게 약하게 나타났으며, 이는 키싱 복합체가 형성되었다는 것을 가리킨다. 이러한 결과들은 오직 하나의 루프가 존재하는 경우 RNA-RNA 상호작용이 효과적이라는 것을 나타낸다.
- [0154] 겔 상에서 키싱 복합체를 형성하는 것을 나타내는 루프 작재물은-약한 것이라도-pMMB67EH 및 pBluescriptII KS+ 내로 클로닝하였고, GFP 발현을 테스트하였다. 두 개의 헤어핀 루프를 포함하는 표지를 갖는 RNA I의 상호작용이 강하기 때문에 작재물은 생체내 실험을 위한 좋은 재료로 생각된다.
- [0155] 실시예 2

[0156] 유전자 발현 및 유전자 발현억제를 테스트하기 위한 생체내 분석

[0157] 시험되기 위한 작제물내에, 하나 또는 두개의 RNA II 스템 루프를 발현 벡터내로 클로닝하였다. 전사의 2차 구조 및 적합한 폴딩을 컴퓨터 프로그램 RNA폴드((Gene Quest, Vienna RNA folding procedure; see Zuker, 1999)를 사용하여 확인하였다. 이 실험을 위하여 비-ColE1 기원인 발현 벡터, 예를 들면 pMMB67EH (Furste et al., 1986)이 플라스미드 내에서 RNA I-목표 상호작용을 회피하기 위하여 유용하다고 생각되며, GFP 발현이 리보솜 결합 부위에 근접한 부가적 서열이 존재함에 따라 방해되는지 여부를 결정하는데 유용하다고 생각된다. 이는 리보솜 트랙 가까이 또는 리보솜 트랙 상에 있는 부가적 서열 및 2차 구조가 보통 유전자 발현이 감소하거나 완전히 저해되기 때문에 중요한 포인트라고 생각된다(Malmgren, 1996; Ringquist, 1993).

[0158] 음성 RNA 겔에서 얻어진 결과에 기초하여(실시예 1 참조), 두 개의 GFP와 RNA II-유사 서열의 융합체가 형성되었다(도 4). 두 개의 상이한 RNA II-유사 서열이 T7 프로모터 및 lac 오퍼레이터의 통제하에 GFP 코딩 서열의 상류에 삽입되었다.

[0159] gfp 유전자가 프라이머 NheI-GFP-back 및 BamHI-GFP-for (for 프라이머 서열은 표2 참조)에 의해 pGFPmut3.1로부터 증폭되었다. T7/lacO 프로모터는 -RNAII 루프/RBS 배합체가 있는 경우 및 없는 경우-프라이머(HindIII-T7GFP-back)로 완전하게 합성되었고, gfp를 증폭 또는 올리고(T7al3-oligo alc T7L12ras -oligo)를 합성하기 위하여 하기 위하여 사용되는 BamHI-GFP-for와 함께 NheI 제한 부위에 의해 증폭된 gfp로 융합된다. 전체 조각을 BamHI 및 HindIII 제한에 의하여 pMMB67EH내로 클로닝하였다(프라이머 및 올리고는 표 2 참조).

[0160] 표 2: 선택된 작제물

서열번호 :	프라이머/올리고	서열
9	NheI-GFP-back	5' GAT GAT GCT AGC AAA GGA GAA GAA C 3'
10	BamHI-GFP-for	5' GAT GAT GGA TCC TTA TTT GTA TAG TTC 3'
11	T7al3-oligo	5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG AAT TGT GAG CGG ATA ACA ATT CCC CTC TAG AAA TAA TTT TGT TTA ACT TTA AGA AGG AGA TAC ATA TGG GTA ACT GGC TTC AGC AGA GCG CAG ATA CCA TG 3'
12	Nhe-ATG-loop3-for	5' ATC ATC GCT AGC CAT GGT ATC TGC GCT CTG CTG 3'
13	T7L12ras -oligo	5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG AAT TGT GAG CGG ATA ACA ATT CCC CAA CAA AAA AAC CAC CGC TAC CAG CGG TGG TTT GTT TGC CTC TAG TTC AGC TAC CAA CTG AAG GAG AGA ATA CAT ATG 3'
14	Nhe-ras2 for	5' ATC ATC GCT AGC CAT ATG TAT TCT CTC CTT C 3'
15	HindIII-T7GFP-back	5' GAT GAT AAG CTT TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG AAT TGT GAG CGG ATA ACA ATT CCC CTC TAG AAA TAA TTT TGT TTA ACT TTA AGA AGG AGA TAT ACA TAT GGC TAG CAA AGG AGA AG 3'
16	HindIII-T7-back	5'GAT GAT AAG CTT TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3'
17	XhoI-T7term-for	5' GAT GAT CTC GAG CAA AAA ACC CCT CAA GAC C 3'
18	EcoRI-T7term-for	5' AGT AGT GAA TTC CAA AAA ACC CCT CAA GAC C 3'

[0161]

[0162] 리보솜 결합 부위에 근접한 부가적 서열대신 GFP 발현을 확인하기 위하여 작재물을 pMMB67EH 벡터 내로 클로닝 하였다. 양 작재물은 GFP를 생산하였으나, 헤어핀 루프가 없는 작재물과 비교하였을 때 매우 낮게 발현되었다. 두 작재물이 염색체 내에 전체 카세트를 통합하는 가능성을 갖는 숙주를 선택하기 위한 Tn7 상동체 및 카나마이신 내성 유전자를 함유하는 벡터 pBluescript내로 클로닝되었다. GFP 카세트를 상술한 박테리아 염색체에 삽입 하였다.

[0163] 도 4:는 pMMB67EH내로 클로닝된 작재물 및 HMS174(DE3)의 계능내로 삽입된 작재물을 또한 나타낸다. 카세트는, I) HMS174(DE3)T7GFP =IS5, II) HMS174(DE3)T7a13GFP = IS11 and III) HMS174(DE3)T7112rasGFP = IS13이다.

[0164] T7a13GFP 및 T7112rasGFP는 pMMB67EH내로 클로닝되었을 때 GFP 발현을 나타내며, 이러한 발현 카세트를- 및 음성대조군으로는 T7GFP를-그들의 안티센스 RNAI를 목표포로 작용하는 능력을 테스트하기 위한 박테리아 염색체내로 삽입하였다. 작재물을 BamHI 및 HindIII 제한 부위로 벡터 pBluescript KSII+내로 클로닝하였다. Tn7 상동체를 상동체 1에 대한 프라이머 NotI-Tn7/1-back 및 EcoRI-Tn7-for 및 상동체 2에 대한 XhoI-Tn7/2-back 및 KpnI-Tn7-for와 함께 *E. coli* HMS174(DE3) 콜로니로부터 증폭시켰다(for 프라이머 서열은 표 3 참조). 염색체 내에 삽입된 전체 카세트를 갖는 숙주를 선별하기 위한 카나마이신 내성 카세트를 위해 pUC4K로부터 EcoRI 조각이 사용되었다. T7 터미네이터를 프라이머 XhoI-T7term-for 및 EcoRI-T7 term-for를 사용하여 발현 벡터 pET11a로부터 증폭시켰다(표 2). 전체 플라스미드를 카세트를 위해 NotI 및 KpnI로 분해하고 플라스미드 골격체의 분해를 위해 Alw44I를 사용하였다. 선형 카세트로 정제된 겔을 레드 헬퍼 플라스미드 pKD46을 갖는 MG1655의 박테리아 염색체 상에 삽입하였다. 삽입된 조각을 갖는 염색체 부분을 P1 형질도입을 통해 HMS174(DE3)로 전달 하였다.

[0165] 발현 카세트가 제대로 삽입되었는지를 PCR로 확인하였다(이질적인(foreign) 프라이머(표 3) 및 내부 프라이머).

[0166] 표 3. 스트레인 IS 5, IS 11 및 IS 13에 대한 Tn7을 위한 프라이머

서열번호 :	프라이머	서열
19	NotI-Tn7/1-back	5' GAT GAT GCG GCC GC G TTG CGA CGG TGG TAC G 3'
20	EcoRI-Tn7/1-for	5' GAT GAT GAA TTC TAT GTT TTT AAT CAA ACA TCC TG 3'
21	XhoI-Tn7/2-back	5' GAT GAT CTC GAG GCA TCC ATT TAT TAC TCA ACC 3'
22	KpnI-Tn7/2-for	5' GAT GAT GGT ACC TGA AGA AGT TCG CGC GCG 3'
23	TN7/1 extern	5' ACC GGC GCA GGG AAG G 3'
24	TN7/2 extern	5' TGG CGC TAA TTG ATG CCG 3'

[0167]

[0168] 염색체의 삽입 부위로 attTn7이 선택되었으며(deBoy and Craig, 2000), 이는 *gImS*의 전사의 터미네이터 내에 있는 *gImS* 및 *phoS* 유전자 사이에 있는 코딩되지 않는 부위에 위치한다. 특정 Tn7 프라이머에 의해 이 전사의 터미네이터만이 카세트에 의해 대체된다(Yu 등은 염색체 내에 선형 조각이 삽입되는데에는 40 bp의 상동성이면 충분하다고 하였다(Yu et al., 2000)). 더 긴 상동성을 가지면 더 나은 결과가 얻어지는데, 한쪽을 300 bp로 다른 한쪽을 240 bp로 연장한다. HMS174(DE3)는 레드 헬퍼 플라스미드에 의한 선형 DNA의 직접적 삽입에 적합하다고 생각되지 않으며, MG1655는 초기 삽입에 사용되며, P1 형질도입에 의하여 재조합 염색체 부분이 HMS174(DE3)내로 전달된다. 결과의 스트레인 HMS174(DE3)T7a13GFP =IS5, HMS174(DE3)T7GFP = IS11 및 HMS174(DE3)T7112rasGFP = IS13는 각각 RNA II 루프 구조가 있거나 없는 T7 프로모터의 조절하에 GFP를 포함한다. 발현 카세트가 제대로 삽입되었는지를 PCR로 확인하였다. 얻어진 스트레인을 I) IS5, II) IS11 및 III) IS13로 지정하고, 웨이크 플라스크 실험을 통해 GFP 발현 및 RNAI-매개유전자 발현억제 효과를 테스트하였다. 웨이크 플라스크 실험을 위하여 하룻밤간 배양한 것을 1:100으로 희석하고 OD₆₀₀~0.5까지 성장시켰다. 그 다음 유도를 위하여 IPTG를 첨가하였다. 마이크로플레이트 리더 SPECTRAmax DeminiXS 및 소프트웨어, SOFTmax Pro(Molecular devices)로 여기 파장 488 nm 및 방출 530 nm에서 515 nm 컷오프 필터로 형광도를 측정하였다.

[0169] IPTG의 유도가 있고 없는 조건에서 GFP를 측정한 결과, pBR322가 존재할 때 분명한 유전자 발현억제 효과를 나타냈다(도 5). IS13은 낮은 GFP 발현을 나타냈고, IS11 및 GFP 발현의 저해는 적었으나, 반면 IS11은 높은 GFP 발현을 나타냈고 현저한 유전자 발현 억제 효과는 우리의 컨셉이 작동한다는 증거를 제공한다.

- [0170] RNA II-유사 서열이 *GFP*-유전자의 상류(IS5)에 존재하지 않는 경우, 유전자 발현억제가 나타나지 않았다(도 6).
- [0171] 플라스미드와 계놈의 유전자 발현사이의 바람직하지 않은 상호작용을 체크하기 위하여 IS5를 pET11a, pET3d, pMMB67EH 및 pBR322를 포함하는 다른 플라스미드로 형질전환하였다(도 6). *GFP* mRNA가 RNA II-유사 서열을 포함하고 예를 들면 T7 프로모터 또는 *lac* 오퍼레이터와 같은 계놈상에 카세트에 대한 상동성 서열을 함유하지 않는 ColE1 플라스미드가 사용되었을 때에만 정의된 유전자 발현억제 효과가 관찰될 수 있었다. 유전자 치료에 보통 사용되는 pBR322 관련 플라스미드를 사용하였을 때 숙주 및 플라스미드사이에서는 안티센스 반응을 방해하는 간섭작용이 없었다.
- [0172] 도 5는 pBR322가 있는 경우 및 없는 경우, IS11 및 IS13 스트레인을 비교하여 보여준다. Rfu/OD는 광학밀도와 관련있는 형광 유니트이다. 1.5시간의 간격으로 유도한 후 *GFP* 형광이 증가하는 것이 관찰되었다.
- [0173] 도 6은 다양한 플라스미드를 함유하는 IS5로 웨이크 플라스크 실험한 결과를 나타낸다. pBR322 및 관련 플라스미드(유전자 치료 분야에 사용되는)는 숙주 및 플라스미드사이에 간섭작용을 나타내지 않았다.
- [0174] 실시예 3
- [0175] 발효동안의 표지 유전자의 발현/억제
- [0176] *E. coli* 스트레인 IS11 및 IS5를 페드-배취 발효 공정동안 플라스미드 pBR322의 존재 및 부존재인 경우에 대해 분석하였다. 표 4는 네 가지 페드-배취 발효의 실험 셋업을 요약한 것이다. 각 스트레인을 pBR322의 존재 및 부존재 조건에서 성장시켰다.

[0177] 표 4. 페드-배취 발효

[0178]

실험	숙주 스트레인	pBR322
AS1	IS 11	-
AS2	IS 11	+
AS3	IS 5	-
AS4	IS 5	+

- [0179] 모든 네 가지 배양균은 온라인 신호 즉, CO₂, O₂, 염기소비 또는 염기 기능성(base capacity)에 있어 매우 유사한 경향을 나타내었고, 총 BDM 코스 또한 도 7a 및 도 7b에 도시된 바와 같이 측정평균치로부터 $\pm 10\%$ 보다 작은 매우 좁은 범위에서만 달라졌다. 도 7a는 pBR322가 존재 및 부존재하는 경우의 IS11의 박테리아 건조 질량(BDM) 및 *GFP* 발현을 나타낸다. 총 BDM이 양 발효에서 동일한 경우, *GFP* 농도는 pBR322가 존재할 때 현저하게 감소하였다 (50%). *GFP* 측정치 곡선 양상을 보면, *GFP* 해독이 플라스미드의 존재에 의해 강력하게 저해되고, 따라서 복제도 저해되며, *GFP* 상호작용하는 RNA I 및 변형된 mRNA가 그럼으로써 해독을 방해한다는 가정을 확인해준다 (도 7a). pBR322가 그 자체로 재조합 단백질 발현 효과를 가지는 것을 배제하기 위하여, 플라스미드 증식이 있는 경우 또는 없는 경우, IS5를 사용하여 페드-배취 실험을 더 수행하였다. 도 7b에 도시된 바와 같이, *GFP* 발현 또는 세포 성장에 차이점은 없었다: pBR322가 숙주내에 존재 또는 부존재하거나 *GFP*의 전사나 해독에는 검출되는 영향이 없었다. 이 실험에서 모든 *GFP* 발현은 스트레인 IS11이 사용되었을 때보다 높았고, 이는 음성 mRNA의 충분한 해독에 기인한 것이다. 비록 IS11에 있는 리보솜 결합 부위 가까이에 안정한 RNA 루프 구조가 존재함에 의하여 단백질 발현이 감소하였으나, pBR322가 존재할 때 발현이 저해되었다. 그러므로 ColE1 복제조절 시스템이 억제 표지 유전자 발현에 사용될 수 있는 독성 표지를 대리하여 *GFP*를 사용할 수 있음을 증명한다.

- [0180] 실시예 4
- [0181] 필수 유전자의 발현을 조절하기 위한 리프레서의 사용
- [0182] a) 필수 유전자의 작재물의 생성

- [0183] 테스트되기 위한 첫번째 필수 유전자는 메티오닌 아미노펩티다제를 위한 유전자인 *map*(Li et al., 2004)으로, *E. coli* 염색체의 min 4에 위치하며, *rpsB-tsf* 오페론으로부터의 357 염기쌍 및 T44-RNA 유전자로부터의 201 bp이다. 이는 필수 유전자의 프로모터가 전체가 제거되기 위한 것이고 선택된 리프레서에 특이한 유도성 프로모터로 대체되므로 중요하다. Chang et al, 1989에는 *map* 유전자를 갖는 조건적으로 치명적인 뮤텐트 스트레인이 *lac* 프로모터에 의해 조절된다고 나와 있다. *map* 카세트에 의해, 67 bp 염색체부분이 *map* 프로모터를 함유하는 것으로 대체된다(Chang et al, 1989). 계놈으로부터 가능한 전사물을 회피하기 위하여 두 가지의 강력한

터미네이터인 *rrnB* 오페론으로부터의 T1 및 T2를 통합 카세트에 첨가하였다.

- [0184] 테스트된 두번째 유전자는 *murA*(Brown et al, 1995)로, 필수 *E. coli* 유전자로 알려져 있다. 박테리아 세포벽 생합성 첫번째 단계에서의 UDP-N-아세틸글루코사민 에놀피로빌 트랜스퍼라제 효소를 코딩하는 *murA*는 *E. coli* 염색체 69.3 min에 위치하며 Herring 및 Blattner는 *map* 및 *murA* 뮤텐트들 가운데, 몇몇 조건적으로 치명적인 앰버 뮤텐트의 사멸곡선과 비교한 바 있다(Herring and Blattner, 2004). 그러나 모든 변이중에 *murA*가 비-허용 배지(non-permissive medium)중에서 가장 크고 빠른 사멸속도를 나타내는 가장 큰 살균성을 보였다.
- [0185] 도 8은 필수 유전자 프로모터의 대체를 포함하는 필수 유전자에 근거한 작재물의 원리를 도시한 것이다.
- [0186] 게놈의 통합을 위한 작재물을 다시 pBluescript KSII+ 내로 클로닝하였다. 필수 유전자 호몰로지들, 각 ~300 bp 가 *map* 호몰로지에 대한 SacI-*map1*-for / NotI-*map1*-back 및 XhoI-*map2*-back / KpnI-*map2*-for 프라이머 쌍 및 *murA* 호몰로지에 대한 SacI-*murA1*-for / NotI-*murA1*-back 및 XhoI-*murA2*-back / KpnI-*murA2*-for과 함께 MG1655 콜로니로부터 증폭되었다(프라이머 서열은 표 5 참조).
- [0187] 락토즈 프로모터 및 오퍼레이터(plac)을 포함하는 조각은 프라이머 BamHI-plac0-back 및 NotI-plac0-for에 의해 pBluescriptKSII+로부터 증폭된다. 클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라제(cat)에 대한 유전자는 프라이머 HindIII-SalI-Cat-back 및 XhoI-Cat-for에 의해 pLys (pACYC184)로부터 증폭된다. *rrnBT12* 터미네이터는 프라이머 BamHI-T12-for 및 HindIII-T12-back에 의해 pBAD로부터 증폭된다. 집합된 벡터 pBSKmap<plac-T12-Cat> 및 pBSKmurA<plac-T12-Cat>는 SacI 및 KpnI에 의해 분해되고, 선형화된 카세트가 상술한 MG1655의 게놈에 삽입된다. 제대로 카세트에 통합된 것은 PCR 콤파이닝 이질적인(foreign) 프라이머(*map1* extern, *map2* extern, *murA1* extern, *murA2* extern; 표 5)로 확인하였다.
- [0188] 필수 및 테스트 유전자 작재물에 대한 프라이머는 표 5에 도시하였다.

[0189] 표 5:

서열번호 :	프라이머 :	서열
25	Not-map1-back	5' ATG ATG ATG GCG GCC GCA CCG ACG CTG ATG GAC AGA ATT AAT GG 3'
26	SacI-map1-for	5' GCT GCT GAG CTC CCA TCT TTG ATT ACG GTG AC 3'
27	XhoI- map2-back	5' ATG ATG CTC GAG CGC CAA ACG TGC CAC TG 3'
28	KpnI- map2-for	5' GCT GCT GGT ACC GAA GTG AAC ACC AGC CTT G 3'
29	map2 extern	5' TTC GGG TTC CAG TAA CGG G 3'
30	map1extern	5' TTT CGA GGT ATC GCC GTG G 3'
31	SacI-murA1- for	5' GCT GCT GAG CTC CAA AGC GCG CTA CCA GCG 3'
32	NotI-murA1- back	5' ATG ATG ATG GCG GCC GCT TAA CTG AGA ACA AAC TAA ATG G 3'
33	XhoI- murA2- back	5' ATG ATG CTC GAG GCT CAA AAG CCG TTC AGT TTG 3'
34	KpnI- murA2- for	5' GCT GCT GGT ACC TGC CAG CGC AAC TTT GCT C 3'
35	murA1 extern	5' GTA CAA CCG CCA GGT AGT G 3'
36	murA2 extern	5' GTC TGA TTT ATC AGC GAG GC 3'
37	HindIII-SalI-Cat- back	5' GCT GCT AAG CTT GTC GAC AGC CAC TGG AGC ACC TC 3'
38	XhoI-Cat-for	5' ATG ATG CTC GAG ACG GGG AGA GCC TGA GC 3'
39	BamHI-T12-for	5' ATG ATG GGA TCC AAA AGG CCA TCC GTC AGG 3'
40	HindIII-T12- back	5' GTC GTC AAG CTT ATA AAA CGA AAG GCT CAG TC 3'
41	BamHI-placO- back	5' GCT GCT GGA TCC GCG CCC AAT ACG CAA ACC 3'
42	NotI-placO-for	5' ATG ATG ATG GCG GCC GCT GTG AAA TTG TTA TCC GCT C 3'

[0190]

[0191]

호몰로지 프라이머가 제대로 선택된다면, 콜로니는 이후 IPTG가 존재하는 경우에만 계층 통합될 것이 예상된다. 가능한 한 정상적인 유전자 발현 패턴을 유지하기 위하여 카세트에 의하여 네이티브 RBS를 대체하지 않는 것이 의도되며, 프라이머 NotI-map/murA-for에는 리보솜 결합 부위(RBS)가 제공되지 않는다. 그러므로, 목표는 어떤 프로모터를 필수 유전자 앞에 대체하여 완전한 네이티브 RBS를 유지하는 것이다.

[0192]

map 또는 *murA* 뮤턴트는 형질전환 후에는 LB-CM 플레이트에서 성장하지 못하고, LB-CM 플레이트 및 0.1 mmol IPTG/L이 포함된 액상 배지에서 적당히 성장하였는데, 이는 프라이머가 제대로 선택되었고 *plac* 및 터미네이터가 적당하게 기능하였음을 의미한다. 그러나, 또 다른 *map* 뮤턴트 배양결과에서는 플레이트 및 IPTG가 없는 액상 배지에서 약하게 성장하는 것이 관찰되었다. *murA* 뮤턴트가 비-허용 배지에서 성장하지 않는 것으로 나타났기 때문에 *murA* 작재물은 선택 시스템에 기초하여 선택된 것으로 보인다.

[0193]

b) 필수 유전자에 대한 대리로서의 GFP를 억제하기 위한 테스트 작재물의 생성

[0194]

pBluescriptKSII+를 예로 들어 작재물의 원리를 도 9에 도시하였다.

[0195]

플라스미드 pBSKTn7<pLtetOgfp-T7aL3tetR-Cat>는 각각의 조각을 함유하는 시작 벡터 및 중간체 플라스미드로서의 pBSKTn7<T7aL3GFP>로부터 몇몇 연속적인 클로닝 단계중에 구성된다. Tn7 호몰로지 1은 프라이머 SacI-Tn7/1-back and EcoRI-Tn7/1-for를 이용하여 박테리아 주형으로부터 증폭되고, Tn7 호몰로지 2는 프라이머 XhoI-Tn7/2-back and KpnI-Tn7/2-for를 사용하여 증폭되며, *rrnBT12* 터미네이터는 프라이머 EcoRI-T12-back 및 HindIII-SalI-T12 for를 사용하여 증폭되고, *cat* 유전자는 프라이머 HindIII-SalI-Cat-back 및 XhoI-Cat-for를

사용하여 증폭된다(표 5). 테트라사이클린 리프레서 유전자(*tetR*)는 프라이머 *NheI*-*tetR*-back 및 *BamHI*-*tetR*-for에 의해 Tn10을 포함하는 테트라사이클린 내성 스트레인 IS1(HMS174(DE3) *ilv500::Tn10*)으로부터 증폭된다. *tet*-유도성 *pLtet0* 프로모터는 *gfp*를 증폭하기 위하여 사용되는 프라이머 *EcoRI*-GFP-for와 함께 프라이머 (*HindIII*-*PLtet0*-*NotI*-RBS-GFP back)상에서 전체가 합성된다. 게놈의 통합을 위하여 집합된 벡터 *pBSKTn7<pLtet0gfp-T7a13tetR-Cat>*를 *SacI* 및 *NotI*로 다시 분해하여 목적하는 발현 카세트를 방출시켰다.

표 6: 테스트 작재물을 위한 부가적 프라이머

서열번호 :	프라이머	서열
43	<i>EcoRI</i> -T12-back	5' GCT GCT GAA TTC ATA AAA CGA AAG GCT CAG TC 3'
44	<i>HindIII</i> -SalI-T12 for	5' GCT GCT AAG CTT GTC GAC AAA AGG CCA TCC GTC AGG 3'
45	<i>EcoRI</i> -Tn7/1-for	5' GAT GAT GAA TTC TAT GTT TTT AAT CAA ACA TCC TG 3'
46	<i>SacI</i> -Tn7/1-back:	5' GAT GAT GAG CTC GTT GCG ACG GTG GTA CG 3'
47	<i>XhoI</i> -Tn7/2-back	5' GAT GAT CTC GAG GCA TCC ATT TAT TAC TCA ACC 3'
48	<i>KpnI</i> -Tn7/2-for	5' GAT GAT GGT ACC TGA AGA AGT TCG CGC GCG 3'
49	<i>NheI</i> - <i>tetR</i> -back	5' GCT GCT GCT AGC ATG ATG TCT AGA TTA GAT AAA AG 3'
50	<i>BamHI</i> - <i>tetR</i> -for	5' GCT GCT GGA TCC TTA AGA CCC ACT TTC ACA TTT AAG 3'
51	<i>EcoRI</i> GFP for	5' GTC GTC GAA TTC TTA TTT GTA TAG TTC ATC CAT GC 3'
52	<i>HindIII</i> - <i>PLtet0</i> - <i>NotI</i> -RBS-GFP back	5' GCT GCT AAG CTT TCC CTA TCA GTG ATA GAG ATT GAC ATC CCT ATC AGT GAT AGA GAT ACT GAG CAC ATC GCG GCC GCT TTA AGA AGG AGA TAT ACA TAT GCG TAA AGG AGA AGA AC 3'

c) HMS174(DE3)(=K12) 게놈내로 삽입된 테스트 작재물의 웨이크 플라스크 실험

*pBR322*가 있는 조건 및 없는 조건에서 하룻밤동안 배양한 HMS174(DE3)Tn7::*pLtet0gfpT7aL3tetRCat* (HMS-GTC)를 반합성 배지중에서 1:100으로 희석하고 유도제 IPTG가 있는 조건 및 없는 조건의 두 가지 병렬적 웨이크 플라스크 배양액에 나누었다. 배양액을 37℃에서 흔들면서 배양하였다. 웨이크 플라스크가 OD_{600nm} 치가 0.7이상에 다다르면 *gfp*-ELISA를 위한 샘플링을 시작한다.

합성 프로모터 *pLtet0*가 작동하는지 및 그것의 N-말단상의 작은 융합 펩티드 (루프3)이 있는 *tetR*이 오퍼레이터-결합에 있어 여전히 효과적인지를 테스트하기 위하여 HMS-GTC를 사용한 웨이크 플라스크 실험을 수행하였다.

유도된 배지는 0.1 mmol IPTG를 포함하며, OD 0.5에서 0.5 mmol IPTG로 증가하였다. IPTG의 양이 증가한 것은 유도된 플라스크의 성장 저해의 원인이다(도 10). IPTG 첨가로 *gfp* 유전자의 전사가 일어나지 않는데 이는 반응 단계가 적당히 기능하는 것을 가리킨다. 유도된 플라스크중의 낮은-및 일정한-기초 GFP 레벨은 외관상으로는 IPTG가 없는 조건에서 하룻밤동안 배양한 것으로부터 남은 GFP에 의한 것이다.

[0202] HMS-GTC 셰이크 플라스크 결과를 같은 숙주 및 플라스미드 pBR322를 포함하는 MG1655-GTC의 셰이크 플라스크 실험과 비교하였다. MG1655에는 DE3 프로파지 및 T7-폴리머라제가 결핍되어 있어서 음성대조군으로 작용한다.

[0203] pBR322가 존재하는 경우에는 항상 증가된 GFP 발현이 나타난다. 표 7에서, 셰이크 플라스크 중의 ng GFP/OD의 평균치(플라스미드/플라스미드가 없는 경우)를 측정하여 상이한 유도 특성 뿐만 아니라 카세트의 염색체의 카피를 포함하는 양 숙주를 비교하였다.

[0204] 표 7:

숙주	유도	평균비율 [ng GFP/OD] (+플라스미드/ -플라스미드)	결과
MG1655-GTC	유도 안됨	1.43	-
HMS-GTC	배양초기 유도됨 유도됨	1.44	효과없음
	OD = 0.5에서 유도됨	2.69	플라스미드 효과
	유도 안됨	2.29	플라스미드 효과

[0205]

[0206] HMS-GTC를 함유하는 플라스미드가 배양 초기에 유도되었을 때, 플라스미드가 없는 플라스크의 경우와 비교하여 측정된 GFP 발현이 소폭 증가되었다(팩터 1.44). 그러나, 이러한 소폭의 증가(팩터 1.43)가 MG1655-GTC에서도 측정되었는데, 이는 GFP 축적이 RNAI-안티센스 반응이 아니라 플라스미드에 의해 야기되는 것이라는 사실을 시사한다.

[0207] IPTG를 OD_{600nm}가 0.5에 도달했을 때 첨가한 경우 완전히 상이한 결과가 얻어졌다. 비록 기초 GFP 레벨은 높았지만, pBR322가 세포내에 존재할 때, GFP 발현에 있어 분명한 증가가 있었다. 여기에서 RNAI 및 RNAII의 루프3과의 그것의 안티센스 반응은 유도제 IPTG의 길항제이다. 그러나, IPTG는 강력한 유도제이고 RNAI-루프3 안티센스 반응은 비교적 약하다.

[0208] 또한, 유도가 없는 조건에서 HMS-GTC pBR322중에서 GFP가 2배 이상 증가(팩터 2.29)하는 것으로 측정되었다(표 7). 이는 T7 시스템의 누설성에 의해 설명될 수 있고(Studier and Mofatt, 1986), 안티센스 반응의 간접적 증거도 된다. T7-폴리머라제의 기초 레벨에 기인하여, 소량의 TetR만이 세포내에 존재하게 된다. 그리고 TetR이 강하고 효율적인 리프레서 분자이기 때문에 소량이라도 GFP 발현을 2.29의 팩터로 억제하는 데에 충분하다. pBR322로부터의 RNAI가 존재한다면, 소수의 tetR mRNA 분자를 "조절"할 수 있고, GFP 레벨은 증가한다.

[0209]

참고문헌

- Balbas, P., Soberon, X., Bolivar, F. and Rodriguez, R.L.: The plasmid, pBR322. Biotechnol 10, 5-41 (1988)
- Balbas, P., (2001). Understanding the Art of Producing Protein and Nonprotein Molecules in *Escherichia coli*. Mol. Biotechnol. Nov;19(3):251-67.
- Bahl., C. P., Wu, R., Stawinsky, J., Narang, S. A. (1977) Minimal length of the lactose operator sequence for the specific recognition by the lactose repressor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 966-970.
- Beck, C. F., Mutzel, R. Barbe', J., Müller, W. A. (1982) A multifunctional gene (tetR) controls Tn10-encoded tetracycline resistance. J. Bacteriol. 150, 633-642.
- Bernard, P., Couturier, M. (1992). Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA topoisomerase II complexes. J Mol Biol., Aug 5, 226:3 735-45
- Bhagwat, A.S. and Person, S.: Structure and properties of the region of homology between plasmids pMB1 and ColE1. Mol Gen Genet 182, 505-507 (1981)
- Bolivar, F.: Molecular cloning vectors derived from the CoLE1 type plasmid pMB1. Life Sci 25, 807-817 (1979)
- Brosius J, Ullrich A, Raker MA, Gray A, Dull TJ, Gutell RR, Noller HF(1981).: Construction and fine mapping of recombinant plasmids containing the rrnB ribosomal RNA operon of *E. coli*. Plasmid. Jul;6(1):112-8.

[0210]

- Brown, E.D., Vivas, E.I., Walsh C.T., Kolter, R. (1995): MurA (MurZ), the enzyme that catalyzes the first committed step in peptidoglycan biosynthesis, is essential in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, Vol. 177, No. 14, 4194-4197.
- Casali, N., (2003), *Escherichia coli* host strains. Methods Mol. Biol. 253, 27-48.
- Cesare ni, G., Helmer-Citterich, M., Castagnoli, L. (1991). Control of ColE1 plasmid replication by antisense RNA. Trends Genet. Jul 7:7, 230-5
- Chan, P.T., Ohmori, H., Tomizawa, J., Lebowitz, J. (1985). Nucleotide sequence and gene organization of ColE1 DNA. J Biol Chem, 1985, Jul 25, 260:15, 8925-35
- Chang, A. C. Y.,and Cohen, S. N. Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. Journal J. Bacteriol. Vol. 134, 1141 1156, (1978)
- Chang SY, McGary EC, Chang S. (1989). Methionine aminopeptidase gene of *Escherichia coli* is essential for cell growth. J Bacteriol. Jul;171(7):4071-2
- Chen, W., Graham, C., and Ciccarielli, R.B. (1997). Automated fed-batch fermentation with feed-back controls based on dissolved oxygen (DO) and pH for production of DNA vaccines. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 18, 43-48.
- Craig, N.L: Transposon TN7. In Berg, D.E and Howe, M.H. (Eds.), Mobile DNA. American Society of Microbiology, Washington DC, (1989), 211-225.
- Crozat, A., Aman, P., Mandahl, N., Ron, D. (1993). Fusion of CHOP to a novel RNA binding protein in human myxoid liposarcoma. Nature 363, 640-644
- Datsenko, K., and Wanner, B. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. PNAS. June 6, Vol. 97, No. 12, 6640-6645.

[0211]

- Davison, J. (2002). Towards safer vectors for the field release of recombinant bacteria. *Environ. Biosafety Res.* 1:9-18.
- DeBoy RT and Craig NL. (2000), Target site selection by Tn7: attTn7 transcription and target activity. *J Bacteriol.* 2000 Jun;182(11):3310-3.
- Diaz, R. and Staudenbauer, W. L.: Origin and direction of mini-R1 plasmid DNA replication in cell extracts of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* (1982) June; 150(3): 1077-1084
- Eguchi, Y., Itoh, T., Tomizawa, J. (1991a). Antisense RNA. *Annu Rev Biochem* 60:631-52.
- Eguchi, Y., and Tomizawa, J. (1991b). Complexes formed by complementary RNA stem loops: Their formations, structures and interaction with ColE1 Rom protein. *J Mol Biol* 220:831-842.
- Fürste, J., Pansegrau, W., Frank, R., Blöcker, H., Scholz, P., Bagdasarian, M., Lanka, E. (1986). Molecular cloning of the plasmid RP4 primase region in a multi-host-range tacP expression vector. *Gene*, 48:119-131.
- Gay, P., Le Coq, D., Steinmetz, M., Ferrari, E., Hoch, J. A. (1983). Cloning structural gene sacB, which codes for exoenzyme levansucrase of *Bacillus subtilis*: expression of the gene in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.*, Mar;153(3):1424-31.
- Gerdas S.Y., Scholle M.D., D'Souza M., Bernal A., Baev M.V., Farrell M., Kurnasov O.V., Daugherty M.D., Mseeh F., Polanuyer B.M., Campbell J.W., Anantha S., Shatalin K.Y., Chowdhury S.A.K., Fonstein M.Y., Osterman A.L. (2002). From genetic footprinting to antimicrobial drug targets: Examples in cofactor biosynthetic pathways. *Journal of Bacteriology*, Aug. 2002, Vol. 184, No. 16, pp 4555-4572.

[0212]

Gerdes SY, Scholle MD, Campbell JW, Balazsi G, Ravasz E, Daugherty MD, Somera AL, Kyrpides NC, Anderson I, Gelfand MS, Bhattacharya A, Kapatral V, D'Souza M, Baev MV, Grechkin Y, Mseeh F, Fonstein MY, Overbeek R, Barabasi AL, Oltvai ZN, Osterman AL. (2003) Experimental determination and system level analysis of essential genes in *Escherichia coli* MG1655. *J Bacteriol.* 185, 5673-84.

Gilbert, W. and Maxam, A. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 3581-3584.

Gregorian, R., and Crothers, D. (1995). Determinants of RNA Hairpin Loop-Loop Complex Stability. *J Mol Biol* 248:968-984.

Guzman, L.M., Belin, D., Carson, M., Beckwith, J. (1995). Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose pBAD Promoter. *Journal of Bacteriology*. Vol. 177, 14: 4121-4130.

Hägg, P., Wa de Pohl, J., Abdulkarim, F., Isaksson, L. (2004) A host/plasmid system that is not dependent on antibiotic resistance genes for stable plasmid maintenance in *Escherichia coli*. *J. Biotechnology* 111, 17-30.

Haidinger, W., Szostak, M.P., Jechlinger, W., Lubitz, W. Online monitoring of *Escherichia coli* ghost production. *Appl. Environ. Microbiol.* Jan 2002, 468-474.

Helinski, Toukdarian, A. and Novick, R.: Replication control and other stable maintenance mechanisms of plasmids. In: *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and Molecular Biology. Ed: Neidhardt F., American Society for Microbiology Press, Washington, DC, 2295-2324 (1996)

Herring, C.D., Blattner, F.R. (2004). Conditional lethal amber mutations in essential *Escherichia coli* genes. *Journal of Bacteriology*, Vol. 186, No. 9, 2673-2681.

Jacob, F., Monod, J. (1961) Genetic regulatory mechanism in the synthesis of proteins. *Journal of Molecular Biology* 3, 318-356.

- Jensen, L.B., Ramos, J.L., Kaneva, Z., Molin, S. (1993). A substrate-dependent biological containment system for *Pseudomonas putida* based on the *Escherichia coli* *gef* gene. *Appl Environ Microbiol.*, Nov 59:11, 3713-7
- Jonasson, P., et al., (2002). Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 35, 91-105
- Kaplan, D.L., Mello, C., Sano, T., Cantor, C., Smith, C. (1999). Streptavidin-based containment systems for genetically engineered microorganisms. *Biomol Eng* 1999, Dec 31 16:1-4 135-40.
- Klemm, P., Jensen, L.B., Molin, S. (1995). A stochastic killing system for biological containment of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* Feb 61:2, 481-6.
- Knudsen, S., Saadbye, P., Hansen, L.H., Collier, A., Jacobsen, B.L., Schlundt, J., Karlstrom, O.H. (1995). Development and testing of improved suicide functions for biological containment of bacteria. *Appl Environ Microbiol.*, Mar 61:3 985-91.
- Kues, U. and Stahl, U. (1989): Replication of plasmids in gram negative bacteria. *Microbiol Rev* 53, 491-516
- Lahijani, R., Hulley, G., Soriano, G., Horn, N.A., and Marquet, M. (1996). High-yield production of pBR322-derived plasmids intended for human gene therapy by employing a temperature-controllable point mutation. *Hum. Gene Ther.* 7, 1971-1980.
- Li JY, Chen LL, Cui YM, Luo QL, Gu M, Nan FJ, Ye QZ. Characterization of full length and truncated type I human methionine aminopeptidases expressed from *Escherichia coli*. (2004) *Biochemistry* 43, 7892-8.

[0214]

- Lin, E.C.C., *Bacteria, Plasmids, and Phages: An Introduction to Molecular Biology*. (1984). Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press, 11-18.
- Lin-Chao, S., and Cohen, S.N. (1991). The rate of processing and degradation of antisense RNA I regulates the replication of ColE1-type plasmids in vivo. *Cell*. Jun 28, 65:7 1233-42.
- Malmgren, C., Engdahl, H., Romby, B., Wagner, G. (1996). An antisense/target RNA duplex or a strong intramolecular RNA structure 5' of a translation initiation signal blocks ribosome binding: The case of plasmid R1. *RNA* 1: 1022-1032.
- Merlin, S., and Polisky, B. (1995). Assessment of quantitative models for plasmid ColE1 copy number control. *J Mol Biol.*, Apr 28, 248:2, 211-9
- O'Kennedy, R.D., Baldwin, C., and Keshavarz-Moore, E., (2000). Effects of growth medium selection on plasmid DNA production and initial processing steps. *J. Biotechnol.* 76, 175-183.
- O'Kennedy et al., (2003). Effects of fermentation strategy on the characteristics of plasmid DNA production. *Biotechnol Appl. Biochem.* 34, 83-90.
- Postle, K., Nguyen, T. T., Bertrand, K. P. (1984) Nucleotide sequence of the repressor gene of the TN10 tetracycline resistance determinant. *Nucleic Acids Res.* 12, 4849-4863.
- Rawlings, D.E. (1999) Proteic toxin-antitoxin, bacterial plasmid addiction systems and their evolution with special reference to the pas system of pTF-FC2. *FEMS Microbiology Letters*, 176, 269 277.
- Reinikainen, P., Korpela, K., Nissinen, V., Olkku, J., Söderlund, H., and Markkanen, P. (1988). *Escherichia coli* plasmid production in Fermenter. *Biotech. Bioeng.* 33, 386-393.

[0215]

- Ringquist, S., MacDonald, M., Gibson, T., Gold, L. (1993). Nature of the ribosomal mRNA track: Analysis of ribosome-binding sites containing different sequences and secondary structures. *Biochemistry*. 32:10254-10262.
- Rogers, M., Ekaterinaki, N., Nimmo, E., Sherratt, D., Analysis of Tn7 transposition. *Mol Gen Genet* (1986), Dec 205:3 550-6
- Ronchel, M.C., Molina, L., Witte, A., Lubitz, W., Molin, S., Ramos, J.I., Ramos, C. (1998), Characterization of cell lysis in *Pseudomonas putida* induced upon expression of heterologous killing genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4904-4911.
- Rouch, D. A., Brown N. L. (1997) Copper-inducible transcriptional regulation at two promoters in the *Escherichia coli* copper resistance determinant *pco*. *Microbiology* 143, 1191-1202.
- Sano, T., Pandori, M., Chen, X., Smith, C., Cantor, C. (1995). Recombinant core streptavidins. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 270, 47: 28204-28209.
- Studier, F.W., Moffatt, B.A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol.*, May 5, 189:1 113-30.
- Szafranski, P., Mello, C.M., Sano, T., Smith, C.L., Kaplan, D.L., Cantor, C.R. (1997). A new approach for containment of microorganisms: dual control of streptavidin expression by antisense RNA and the T7 transcription system. *Proc Natl Acad Sci USA*. Feb 18, 94:4 1059-63.
- Tomizawa, J. and Itoh, T. (1981). Plasmid ColE1 incompatibility determined by interaction of RNA I with primer transcript. *Proc Natl Acad Sci USA* 78, 6096-6100

[0216]

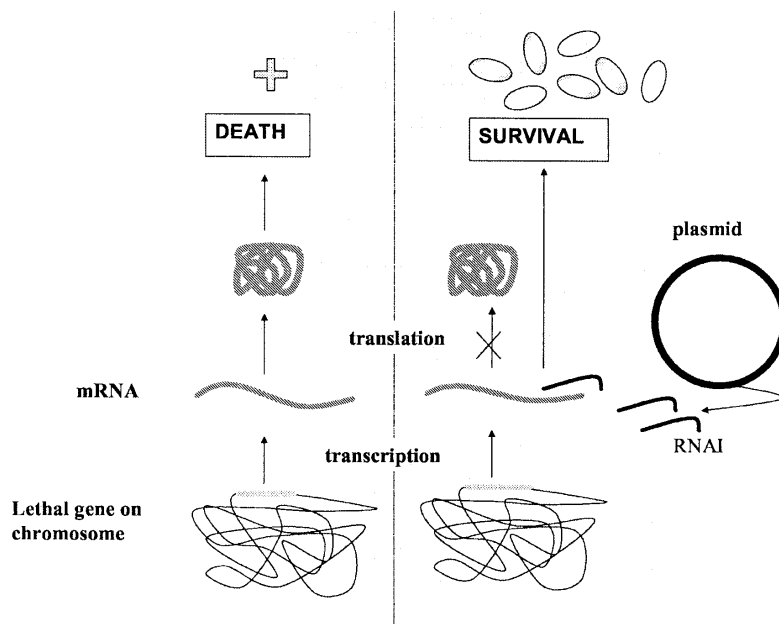
- Tomizawa, J. (1984). Control of ColE1 plasmid replication: the process of binding of RNA I to the primer transcript. *Cell* 38, 861-870
- Tomizawa, J. (1986). Control of Plasmid Replication: Binding of RNA I to RNA II and Inhibition of Primer Formation. *Cell*. 47:89-97.
- Tomizawa, J. (1989). Control of ColE1 Plasmid Replication: Intermediates in the binding of RNA I and RNA II. *J Mol Biol* 212:683-694.
- Tomizawa J. (1990). Control of ColE1 plasmid replication. Interaction of Rom protein with an unstable complex formed by RNA I and RNA II. *J Mol Biol.* Apr 20; 212(4):695-708
- Torres, B., Jaenecke, S., Timmis, K.N., Garcia, J.L., Diaz, E. (2000). A gene containment strategy based on a restriction-modification system. *Environ Microbiol.*, Oct 2:5, 555-63.
- Tsien, R.Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem.*, 67:509-44
- Vieira, J. and Messing, J.: The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* 19, 259-268 (1982)
- Waddell, C.S.,and Craig, N.L. (1988), Tn7 transposition: two transposition pathways directed by five Tn7-encoded genes. *Genes Dev*, Feb 2:2, 137-49
- Wang, et al. (2001). Medium design for Plasmid DNA based on stoichiometric model. *Proc. Biochem.* 36, 1085-1093.
- Williams, S., Cranenburgh, R., Weiss, A. Repressor titration: a novel system for selection and stable maintenance of recombinant plasmids. *Nucleic Acids Research*, (1998), Vol 26, No. 9; 2120-2124
- Yanofski, C., Crawford, I. P. (1987) The tryptophan operon. In Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L., Low, K. B., Magasanik, B., Schaechter, M., Umberger, H. E., editors: Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L., Low, K. B., Magasanik, B., Schaechter, M., Umberger, H. E. *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology*. Washington DC, American Society for Microbiology, pp1453-1472.
- Yu, D., Ellis, H., Lee, C., Jenkins, N., Copeland, N., Court, D. (2000). An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *PNAS*. May 23, Vol. 97, No. 11, 5978-5983.
- Zhang, Y., Nelson, M., Nietfeldt, J., Burbank, D.E., Van Etten, J.L. (1992). Characterization of Chlorella virus PBCV-1 CviAII restriction and modification system. *Nucleic Acids Research*, Vol. 20, 20: 5351-5356.
- Zuker, M., Mathews, D., Turner, D. (1999), Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A Practical Guide. In *RNA Biochemistry and Biotechnology*, J. Barciszewski & B.F.C. Clark, eds., NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers.

도면의 간단한 설명

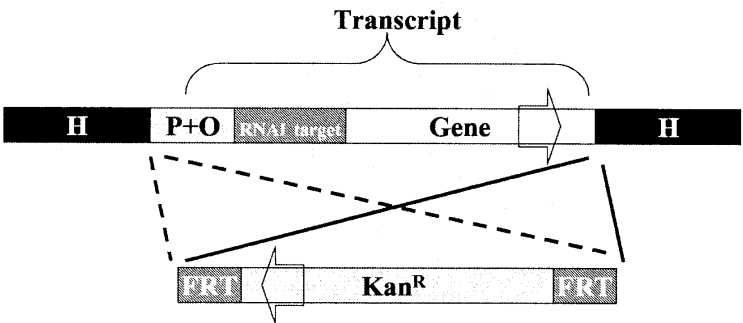
- [0121] 도 1: RNA I-매개 표지 유전자 다운-레귤레이션 또는 발현억제의 원리
- [0122] 도 2: 조작된 숙주 세포의 작재물
- [0123] 도 3: 생체내에서 전사된 작재물로 하이브리드화시킨 실험의 결과
- [0124] 도 4: 표지 유전자 및 RNA II-유사 서열을 함유하는 작재물
- [0125] 도 5: pBR322가 존재할 때 유전자의 다운-레귤레이션 효과
- [0126] 도 6: 다양한 플라스미드의 유전자 다운-레귤레이션 효과
- [0127] 도 7: 발효동안 표지 유전자의 발현/억제
- [0128] 도 8: 필수 유전자 프로모터의 대체를 포함하는 필수 유전자에 기초하는 작재물의 원리
- [0129] 도 9: GFP를 억제하기 위한 필수 유전자를 대신하는 시험 작재물
- [0130] 도 10: HMS174(DE3) 계통내에 삽입된 시험 작재물을 이용한 셰이크 플라스크 실험의 결과

도면

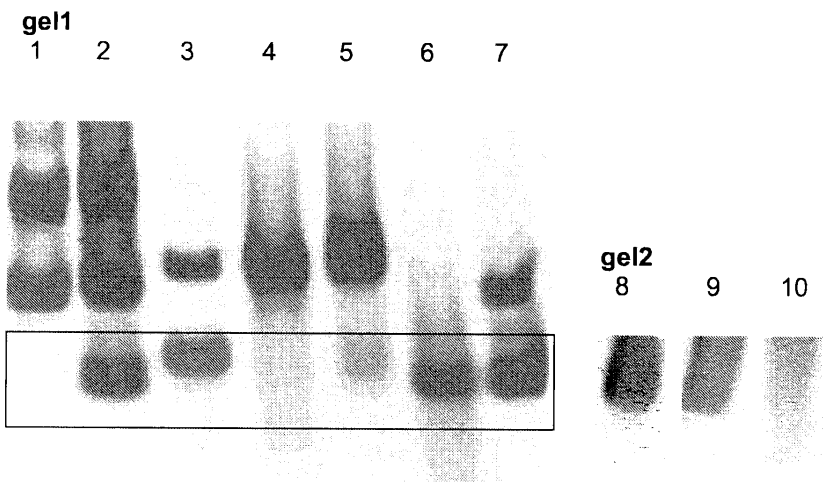
도면1



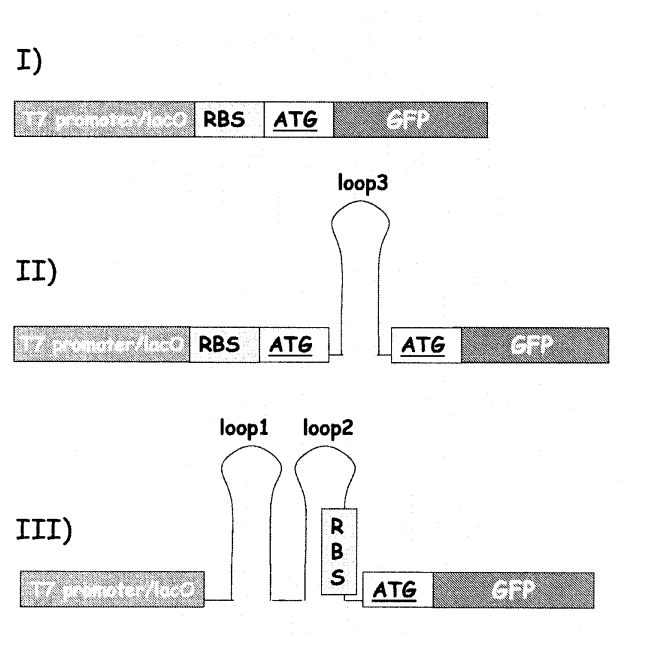
도면2



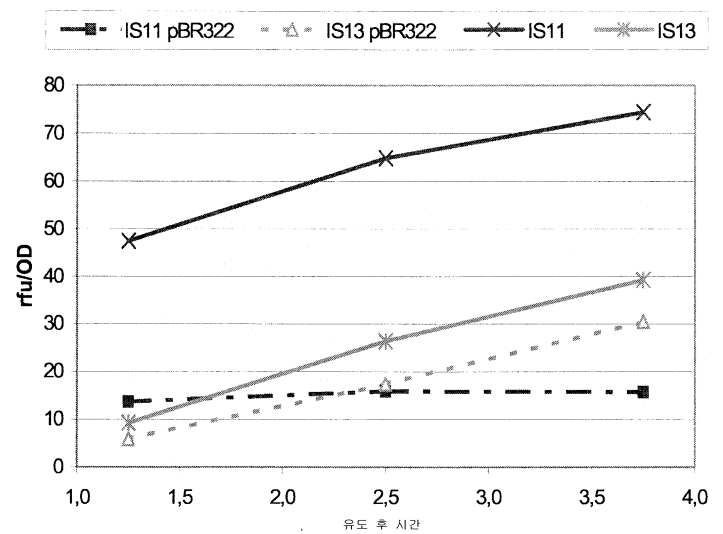
도면3



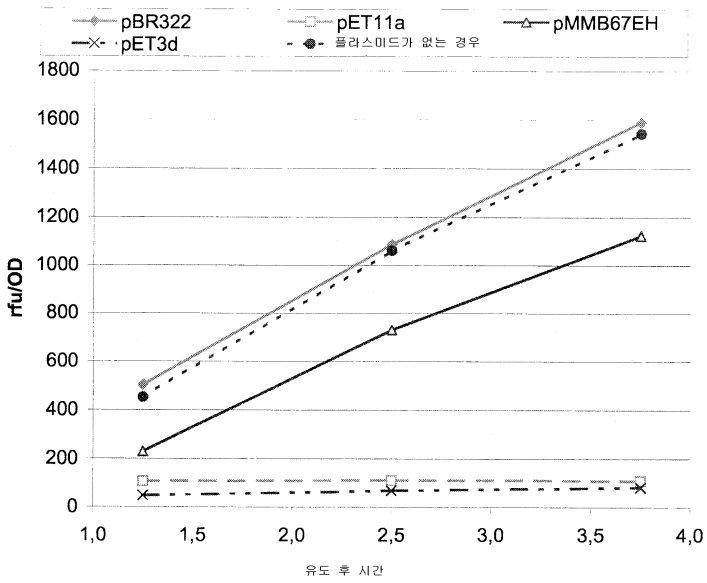
도면4



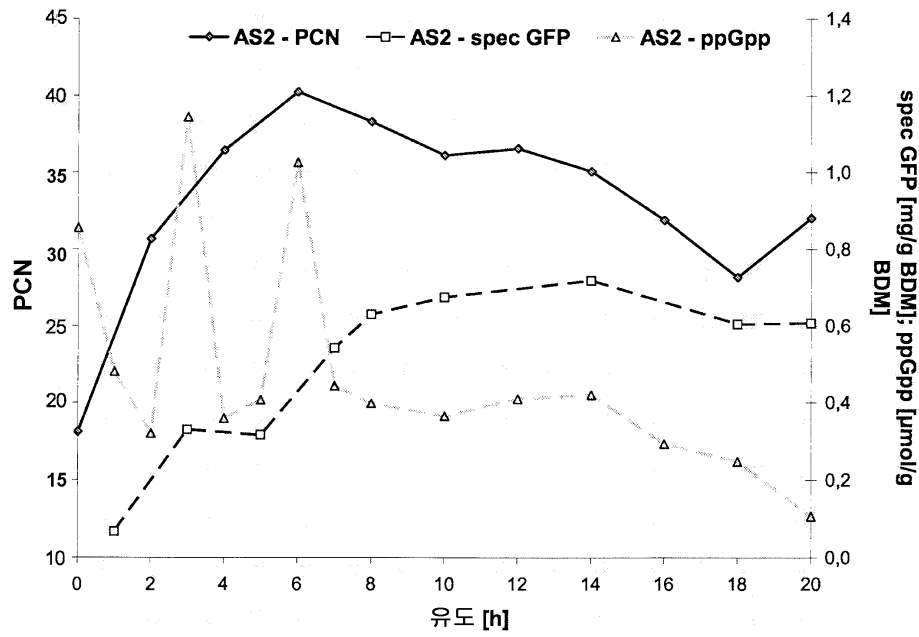
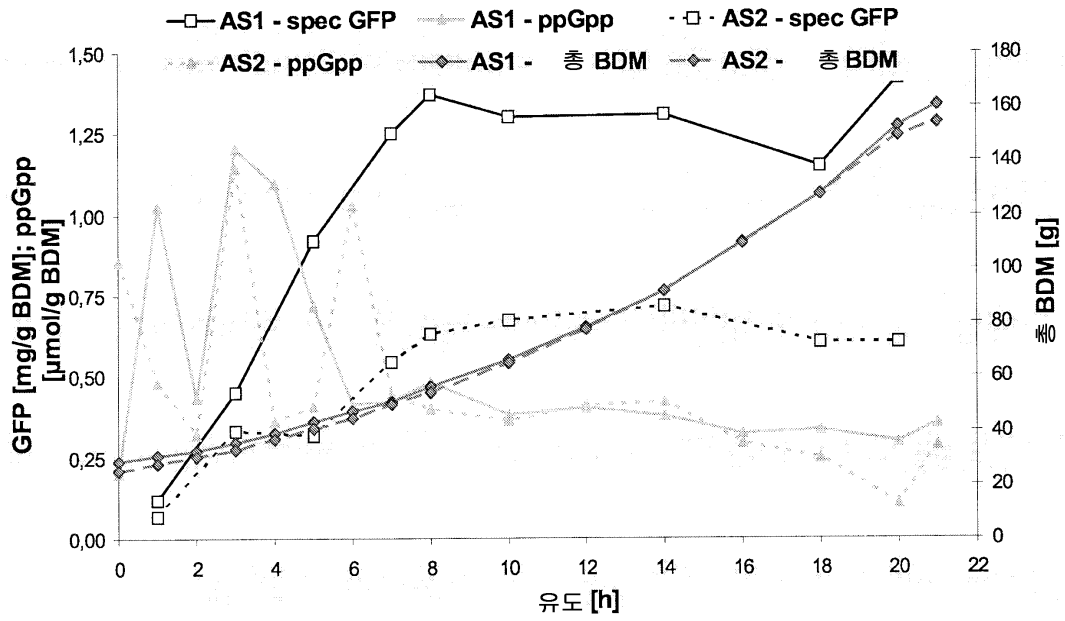
도면5



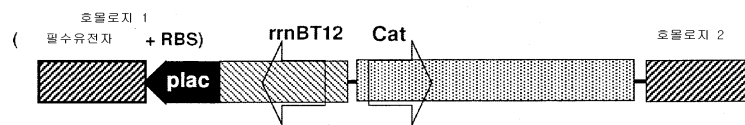
도면6



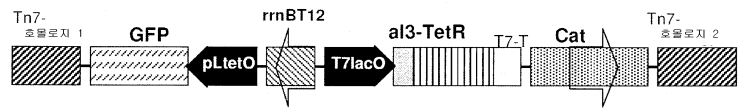
도면7



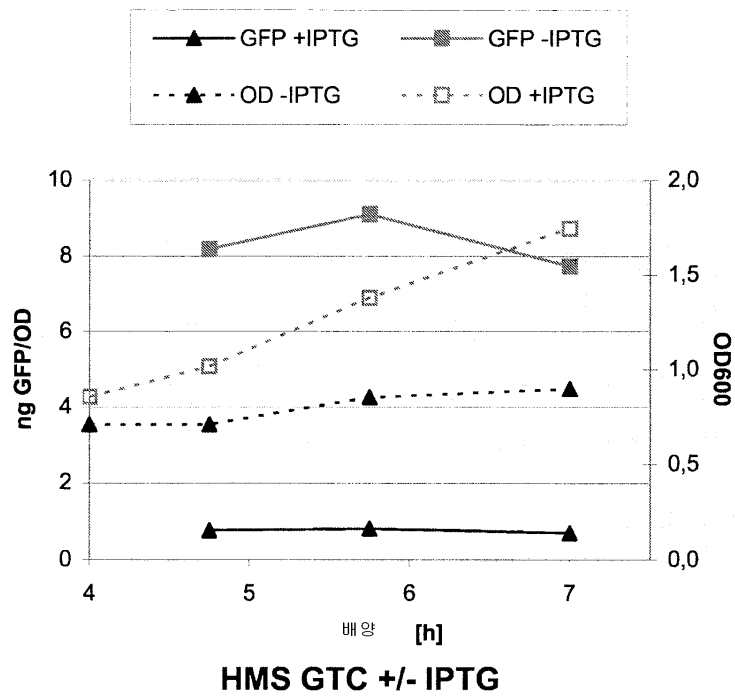
도면8



도면9



도면10



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Boehringer Ingelheim Austria GmbH
<120> Host-vector system for antibiotic-free ColE1 plasmid propagation
<130> 12-0233-PCT

<160> 53
<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 159
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<223> Primer

<400> 1
gaaattaata cgactcacta tagggaacaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt 60

tgcctctagt tcagctacca actgaaggag agaatacata tggctaaagg agaagaactt 120

ttcactggag ttgtcccaat tcttgttgaa ttagatggt 159

<210> 2
<211> 161
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<223> Primer

<400> 2
gaaattaata cgactcacta tagggcctct agaaataatt ttgtttaact ttaagaagga 60

gatatacata tgcggatcaa gagctaccaa ctcttgttcc gatggctaaa ggagaagaac 120

ttttcactgg agttgtccca attcttgttg aattagatgg t 161

<210> 3
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<223> Primer

<400> 3
gaaattaata cgactcacta tagggacagt atttggatc tgcgc 45

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<223> Primer

<400> 4

aacaaaaaaa ccaccgtac 20

<210> 5
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer

<400> 5
 gaaattaata cgactcacta taggggcaaa caaaaaaac accgc 45

<210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer

<400> 6
 acagtatttg gtatctgcgc 20

<210> 7
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer

<400> 7
 gaaattaata cgactcacta tag 23

<210> 8
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer

<400> 8

accatctaatt tcaacaagaa ttg 23

<210> 9
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer

<400> 9
 gatgatgcta gcaaaggaga agaac 25

<210> 10
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer

<400> 10
 gatgatggat ccttatttgg atagttc 27

<210> 11
 <211> 122
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer

<400> 11
 taatacgact cactataggg gaattgtgag cggataacaa ttccctcta gaaataattt 60
 tgtttaactt taagaaggag atacatatgg gtaactggct tcagcagagc gcagatacca 120
 tg 122

<210> 12
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer

<400> 12

atcatcgcta gccatggat ctgcgtctg ctg 33

<210> 13
 <211> 123
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer

<400> 13
 taatacgaact cactatagg gaattgtgag cggataacaa ttccccaaca aaaaaaccac 60
 cgctaccagc ggtggtttgt ttgcctctag ttcagctacc aactgaagga gagaatacat 120
 atg 123

<210> 14
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer

<400> 14
 atcatcgcta gccatatgta ttctctcctt c 31

<210> 15
 <211> 119
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer

<400> 15
 gatgataagc tttaatacga ctactatag gggaattgtg agcggataac aattccctc 60
 tagaataat ttgtttaac tttaagaagg agatatacat atggctagca aaggagaag 119

<210> 16
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>

<223> Primer

<400> 16

gatgataagc tttaatacga ctactatag gg

32

<210> 17

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer

<400> 17

gatgatctcg agcaaaaaac ccctcaagac c

31

<210> 18

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer

<400> 18

agtagtgaat tcaaaaaaac ccctcaagac c

31

<210> 19

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer

<400> 19

gatgatgcgg ccgcgttgcg acggtggtac g

31

<210> 20

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer

<400> 20

gatgatgaat tctatgtttt taatcaaaca tcctg

35

<210> 21

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer

<400> 21

gatgatctcg aggcatccat ttattactca acc

33

<210> 22

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer

<400> 22

gatgatggta cctgaagaag ttcgcgcgcg

30

<210> 23

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer

<400> 23

accggcgcag ggaagg

16

<210> 24

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer

<400> 24

tggcgctaatt gatgccg

18

<210> 25

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer

<400> 25

atgatgatgg cggccgcacc gacgctgatg gacagaatta atgg

44

<210> 26

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer

<400> 26

gtgctgagc tccatcttt gattacgggtg ac

32

<210> 27

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer

<400> 27

atgatgctcg agcgccaaac gtgccactg

29

<210> 28

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer

<400> 28

gctgctggta ccgaagtgaa caccagcctt g

31

<210> 29

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer

<400> 29

ttcgggttcc agtaacggg

19

<210> 30

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer

<400> 30

tttcgaggta tcgccgtgg

19

<210> 31

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer

<400> 31

gctgctgagc tccaaagcgc gctaccagcg

30

<210> 32

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer

<400> 32

atgatgatgg cggccgctta actgagaaca aactaaatgg

40

<210> 33

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer

<400> 33

atgatgctcg aggctcaaaa gccgttcagt ttg

33

<210> 34

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer

<400> 34

gctgctggta cctgccagcg caactttgct c

31

<210> 35

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer

<400> 35

gtacaaccgc caggtagtg

19

<210> 36

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>		
<223> Primer		
<400> 36		
gtctgattta tcagcgaggc	20	
<210> 37		
<211> 35		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Primer		
<400> 37		
gctgctaagc ttgtcgacag ccactggagc acctc	35	
<210> 38		
<211> 29		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Primer		
<400> 38		
atgatgctcg agacggggag agcctgagc	29	
<210> 39		
<211> 30		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Primer		
<400> 39		
atgatgggat ccaaaggcc atccgtcagg	30	
<210> 40		
<211> 32		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		

<223> Primer

<400> 40

gtcgtcaagc ttataaaacg aaaggtcag tc

32

<210> 41

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer

<400> 41

gctgctggat ccgcgcccaa tacgcaaacc

30

<210> 42

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer

<400> 42

atgatgatgg cggccgctgt gaaattgtta tccgctc

37

<210> 43

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer

<400> 43

gctgctgaat tcataaaacg aaaggtcag tc

32

<210> 44

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer

<400> 44

gctgctaagc ttgtcgacaa aaggccatcc gtcagg

36

<210> 45

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer

<400> 45

gatgatgaat tctatgtttt taatcaaaca tcctg

35

<210> 46

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer

<400> 46

gatgatgagc tcgttgcgac ggtggtacg

29

<210> 47

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer

<400> 47

gatgatctcg aggcattcat ttattactca acc

33

<210> 48

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer

<400> 48
gatgatggta cctgaagaag ttcgcgcgcg 30

<210> 49
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<223> Primer

<400> 49
gctgctgcta gcatgatgtc tagattagat aaaag 35

<210> 50
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<223> Primer

<400> 50
gctgctggat ccttaagacc cactttcaca ttttaag 36

<210> 51
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<223> Primer

<400> 51
gtcgtcgaat tcttatttgt atagttcatc catgc 35

<210> 52
<211> 116
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<223> Primer

<400> 52
 gctgctaagc ttccctatc agtgatagag attgacatcc ctatcagtga tagagatact 60
 gagcacatcg cggccgcttt aagaaggaga tatacatatg cgtaaaggag aagaac 116

<210> 53
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli
 <220>
 <223> Lac operator

<400> 53
 tggaattgtg agcggataac aatt 24