(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0046912
(43) 공개일자 2021년04월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/52 (2006.01) *C12N 9/02* (2006.01)
C12N 9/04 (2006.01) *C12N 9/10* (2006.01)
C12N 9/88 (2006.01) *C12P 5/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/52 (2013.01)
C12N 9/0006 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0130147
(22) 출원일자 2019년10월18일
심사청구일자 2019년10월18일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
이은열
서울특별시 강남구 광평로34길 55, 104동 802호(수서동, 강남데시앙포레아파트)
뉴엔 덕 안
경기도 용인시 기흥구 서그내로16번길 1, 2-2호(서천동, 진영빌라 4동)
이옥경
경기도 수원시 영통구 봉영로1517번길 27, 907동 402호(영통동, 벽적골9단지 주공아파트)
(74) 대리인
위병갑

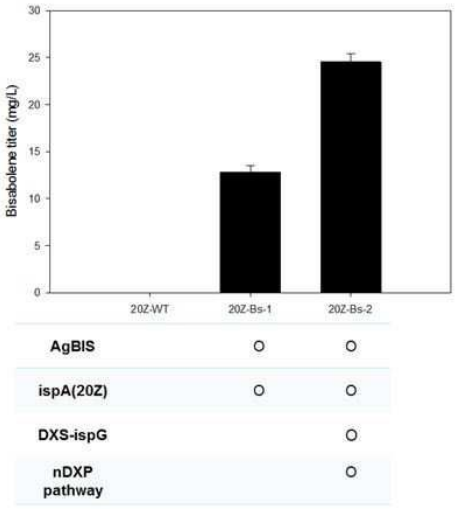
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **α-bisabolene 생산용 형질전환 메탄자화균 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 알파-비사볼렌의 생산능을 가지는 형질전환 메탄자화균 및 이를 이용한 알파-비사볼렌의 생산 방법에 관한 것으로서, 본 발명의 형질 전환 메탄자화균은 메탄으로부터 알파-비사볼렌을 생산할 수 있으므로 친환경적이고 경제적으로 알파-비사볼렌을 생산함으로서 산업 전반에 활용 가능하다.

대 표 도 - 도4



(52) CPC특허분류
C12N 9/0093 (2013.01)
C12N 9/1022 (2013.01)
C12N 9/1085 (2013.01)
C12N 9/88 (2013.01)
C12P 5/002 (2013.01)
C12Y 101/01267 (2013.01)
C12Y 117/07001 (2013.01)
C12Y 202/01007 (2013.01)
C12Y 205/0101 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2015M3D3A1A01064882
부처명	한국연구재단
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	C1 가스리파이너리 사업
연구과제명	메탄-메탄올 전환 플랫폼 균주 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교
연구기간	2019.01.01 ~ 2019.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

전나무(*Abies hrandis*) 유래의 알파-비사볼렌 합성효소(α-bisabolene synthaes, agBs), 파네실 디포스페이트 합성 효소(farnesyl diphosphate synthase, *ispA*)를 코딩하는 유전자가 도입 또는 증폭되어, 알파-비사볼렌(α-bisabolene) 생산능을 가지는 형질전환된 메탄자화균.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 알파-비사볼렌 합성효소(α-bisabolene synthaes, agBs)는 서열번호 1의 염기서열; 파네실 디포스페이트 합성 효소(farnesyl diphosphate synthase, *ispA*)는 서열번호 2의 염기서열을 가지는 것을 특징으로 하는 형질전환된 메탄자화균.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 형질전환된 메탄자화균은 1-데옥시-덱실룰로스-5-포스페이트 합성효소 (1-deoxy-Dxylulose-5-phosphate synthase : *dxs*), (E)-4-하이드록시-3-메틸부트-2-에닐-디포스페이트 합성효소 ((E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl-diphosphate synthase, *ispG*), nDXP 효소 (RibB-G108S) 및 링커 DSAGSAGSAG와 결합된 1-데옥시-D-자일룰로스-5-포스페이트 환원효소(1-deoxy-D-xylulos 5-phosphate reductase, *ispC*)를 코딩하는 유전자가 추가로 도입 또는 증폭되어, MEP 경로가 강화된 것을 특징으로 하는 형질전환된 메탄자화균.

청구항 4

제 3항에 있어서,

1-데옥시-덱실룰로스-5-포스페이트 합성효소 (1-deoxy-Dxylulose-5-phosphate synthase : *dxs*)는 서열번호 3의 염기서열; (E)-4-하이드록시-3-메틸부트-2-에닐-디포스페이트 합성효소 ((E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl-diphosphate synthase, *ispG*)는 서열번호 4의 염기서열; nDXP 효소 (RibB-G108S)는 서열번호 5의 염기서열; 및 링커 DSAGSAGSAG와 결합된 1-데옥시-D-자일룰로스-5-포스페이트 환원효소(1-deoxy-D-xylulos 5-phosphate reductase, *ispC*)는 서열번호 6의 염기서열을 가지는 것을 특징으로 하는 형질전환된 메탄자화균.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 메탄자화균은 메틸로마이크로비움 속 미생물인 것을 특징으로 하는 메탄자화균.

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 메탄자화균은 메틸로마이크로비움 알칼리필리움 20Z(*Methylomicrbium alcaliphilum* 20Z)인 것을 특징으로 하는 메탄자화균

청구항 7

제 1항 내지 제6항 어느 한 항의 메탄자화균 또는 이의 배양액을 포함하는 알파-비사볼렌(α-bisabolene) 생산용 조성물.

청구항 8

제 7항에 있어서,

상기 조성물은 1 내지 50 부피%의 메탄 또는 0.1 내지 1 중량%로 메탄올을 기질로 포함하는 것을 특징으로 하는 알파-비사볼렌(α-bisabolene) 생산용 조성물.

청구항 9

제1항 내지 6항 중 어느 한 항의 메탄자화균을, 메탄 또는 메탄올이 포함된 배지에서 배양하여, 메탄기질로부터의 알파-비사볼렌(α-bisabolene) 생산 방법.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 생합성 반응은 배양액에 1 내지 50 부피%의 메탄 또는 0.1 내지 1 중량%의 메탄올을 첨가하여 수행하는 것인 알파-비사볼렌(α-bisabolene)의 생산 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 메탄으로부터의 알파-비사볼렌(α-bisabolene) 생산성을 향상시킨 메탄자화균 개발에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 D2 바이오디젤로 사용되는 비사볼란 (bisabolane)의 직접 전구체인 비사볼렌(bisabolene)을 생산하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 최근, C1 화합물의 바이오전환을 통한 화학물질 및 연료 생산에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 이는 향후 산업 현장에서 화학물질 및 연료 생산 방법의 변화를 가져올 것으로 기대된다. 특히, 메탄자화균(Methanotrophs)은 메탄을 유일 탄소원 및 에너지원으로 사용하는 미생물로써 메탄의 생물학적 전환을 위한 유망한 생물촉매로 평가받고 있다.

[0003] 메탄자화균(Methanotrophs)을 이용하여 다양한 고부가치 화합물을 생산하려는 시도가 꾸준히 있어 왔으나, 메탄자화균(Methanotrophs)의 생리학적 특성에 대한 이해 부족, 낮은 성장 속도 및 유전자 도구의 부족 등은 메탄자화균을 산업용 균주로 발전시키는데 한계점으로 작용하였다. 그러나 최근, 몇몇 연구를 통해 type I 메탄자화균에 대하여 대사공학적 개량이 가능해졌고, 이를 이용하여 젖산, 2,3-부탄디올 등이 성공적으로 생산되었으나 역가 및 생산성은 여전히 낮아 개선이 필요하다.

[0004] 이소프레노이드(Isoprenoides)란 자연계에 존재하는 가장 방대한 탄화수소 화합물 군으로 의약품, 화장품 및 바이오 연료에 광범위하게 적용할 수 있다. 이소프레노이드 중, C15계열 세스퀴터펜(sesquiterpenes)인 비사볼렌(Bisabolene)은 대부분 레몬유, 라임유, 베르가모트유, 캄퍼유, 솔잎유, 대회향유, 장유, 백단향유와 같은 천연 식물성 유지류에 포함되어 있다. D2 바이오디젤로 사용되는 비사볼란 (bisabolane)의 직접 전구체인 알파-비사볼렌(α-bisabolene)은 화학적 합성 이외에 다양한 미생물을 이용한 바이오 생합성이 연구 중에 있으나, 아직까지 메탄자화균을 이용한 생합성 방법은 공지된 바 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) KR 10-2019-0049575 A

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은, 전나무(Abies hrandis) 유래의 알파-비사볼렌 합성효소(α-bisabolene synthaes, agBs), 파네실 디포스페이트 합성 효소(farnesyl diphosphate synthase, *ispA*)를 코딩하는 유전자가 도입 또는 증폭되어, 알파-비사볼렌(α-bisabolene) 생산능을 가지는 형질전환된 메탄자화균을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 형질전환된 메탄자화균을 1-데옥시-덱실룰로스-5-포스페이트 합성효 (1-deoxy-Dxylulose-5-phosphate synthase : *dxs*), (E)-4-하이드록시-3-메틸부트-2-에닐-디포스페이트 합성효소 ((E)-4-

hydroxy-3-methylbut-2-enyl-diphosphate synthase, IspG), nDXP 효소 (RibB-G108S) 및 링커 DSAGSAGSAG와 결합된 1-데옥시-D-자일룰로스-5-포스페이트 환원효소(1-deoxy-D-xylulos 5-phosphate reductase, ispC)를 코딩하는 유전자를 추가로 도입 또는 증폭시켜, MEP 경로가 강화된 것을 특징으로 하는 형질전환된 메탄자화균을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 형질전환 메탄자화균을 메탄이 포함하는 배양액에서 배양하여 알파-비사볼렌(α-bisabolene) 생산용 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목정은 상기 형질전환 메탄자화균을 이용한 메탄기질로부터 알파-비사볼렌(α-bisabolene)의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 알파-비사볼렌 합성효소(α-bisabolene syntase, *agBs*); 파네실 디포스페이트 합성 효소(farnesyl diphosphate synthase, *ispA*); 1- 데 옥시-덱실룰로스-5-포스페이트 합성효소(1-deoxy-Dxylulose-5-phosphate synthase : *dxs*), (E) -4- 하이드 록시 -3- 메틸부트 -2-에닐-디포스페이트 합성효소 ((E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl-diphosphate synthase, IspG); nDXP 경로 효소 (*ribB*) 및 1- 데 옥시 -D- 자일룰로스 -5- 포스페이트 환원 효소 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase, IspC) 활성이 강화된 메탄알파-비사볼렌(α-bisabolene) 생산용 형질전환 메탄자화균을 제공한다.

[0012] 더욱 상세하게는, 야생형 메탄자화균, *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z내에 전나무(Abies hrandis) 유래의 알파-비사볼렌 합성효소(α-bisabolene synthaes, agBs)와 파네실 디포스페이트 합성 효소(farnesyl diphosphate synthase, *ispA*)의 활성이 강화된 알파-비사볼렌 생산용 형질전환 메탄자화균을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은, 상기 알파-비사볼렌 합성효소(α-bisabolene synthaes, agBs)와 파네실 디포스페이트 합성 효소의 활성이 강화된 형질전환 메탄자화균의 알파-비사볼렌(α-bisabolene)의 상위 전구체 1- 데옥시-덱실룰로스-5-포스페이트 (1-deoxy-Dxylulose-5-phosphate)의 풀을 향상시키기 위하여 1- 데 옥시-덱실룰로스-5-포스페이트 합성효소(1-deoxy-Dxylulose-5-phosphate synthase : *dxs*), (E)-4-하이드록시-3-메틸부트-2-에닐-디포스페이트 합성효소 ((E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl-diphosphate synthase, IspG)의 활성이 강화된, 오탄당 대사경로의 대사물질인 리브로즈-5-포스페이트(ribose-5-phosphate, Ru5P)로부터 1- 데옥시-덱실룰로스-5-포스페이트 (1-deoxy-Dxylulose-5-phosphate, DXP)를 직접 전환하는 nDXP 효소(RibB, G108S) 및 링커 DSAGSAGSAG를 붙인 1-데옥시-D-자일룰로스-5-포스페이트 환원효소(1-deoxy-D-xylulos 5-phosphate reductase, ispC)의 활성이 강화된 형질 전환 메탄자화균을 제공한다

[0014] 또한, 본 발명은, 상기 형질전환된 메탄자화균(Methanotrophs)을 이용하여 알파-비사볼렌(α-bisabolene)의 생산용 조성물을 제공한다. 상기 알파-비사볼렌(α-bisabolene) 생산용 조성물은, 1 내지 50 부피%의 메탄을 탄소원으로 포함할 수 있다.

[0015] 또한, 본 발명은, 1 내지 50 부피%의 메탄을 포함하는 배양배지에서, 상기 형질전환된 메탄자화균을 이용한 알파-비사볼렌 생산 방법을 제공한다.

[0017] 이하, 본 발명에서 사용한 용어를 설명한다.

[0018] 본 발명에서 사용되는 용어 “메탄자화균(Methanotrophs)”은 메탄을 주요 탄소원 또는 에너지원으로 사용하는 세균을 의미하며, 상기 메탄자화균은 본 발명에서 형질전환의 대상이 되는 숙주 균주를 의미한다.

[0019] 본 발명에서 사용되는 용어 “벡터”는 DNA 재조합 실험에 있어서, 목적하는 DNA 단편을 숙주균 등에 도입시켜 증폭할 수 있는 원형의 DNA로서, 클로닝 운반체를 의미한다.

[0020] 본 발명에서 사용되는 용어 “형질전환”은 미생물이 외부로부터 주어진 DNA를 받아들여 미생물의 유전적 성질이 변하는 것을 의미한다.

[0021] 본 발명에서 사용되는 용어 “대사경로”는 효소 매개 생화학 반응으로 단백질, 핵산 아미노산 등과 같은 유기분자를 생합성하는 동화작용과 유기분자를 분해하는 이화작용을 유도하는 일련의 과정을 의미한다.

[0022] 본 발명에서 사용되는 용어 “조성물”은 목적 물질을 생산하기 위한 다양한 물질을 혼합한 것으로서, 미생물 배양배지, 탄소원, 미량 원소 및 미생물 종균이 포함된 것을 의미한다.

[0024] 이하, 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

[0026] 상기 본 발명의 메탄자화균(Methanotroph)은 배양 시 메탄(혹은 메탄올)을 탄소원 혹은 영양원으로 사용하는 세균을 말하는 것으로서, 본 발명에 사용된 상기 메탄자화균은 이에 제한되는 것은 아니나, 메틸로모나스 속(Methylomonas), 메틸로마이크로비움 속(Methylomicrobium), 메틸로박터 속(Methylobacter), 메틸로코커스 속(Methylococcus), 메틸로스페라 속(Methylosphaera), 메틸로칼덤 속(Methylocaldum), 메틸로글로버스 속(Methyloglobus), 메틸로사르시나 속(Methylosarcina), 메틸로프로펀더스 속(Methyloprofundus), 메틸로썰머스 속(Methylothermus), 메틸로할로비우스 속(Methylohalobius), 메틸로게아 속(Methylogaea), 메틸로마리넘 속(Methylomarinum), 메틸로벌럼 속(Methylovulum), 메틸로마리노범 속(Methylomarinovum), 메틸로러브럼 속(Methylorubrum), 메틸로파라코커스 속(Methyloparacoccus), 메틸로시너스 속(Methylosinus), 메틸로시스티스 속(Methylocystis), 메틸로셀라 속(Methylocella), 메틸로캡사 속(Methylocapsa), 메틸로퍼룰라 속(Methylofurula), 메틸아시디필럼 속(Methylacidiphilum) 및 메틸아시디마이크로비움 속(Methylacidimicrobium)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있으며, 보다 바람직하게는 메틸로마이크로비움 속(Methylomicrobium)일 수 있다. 본 발명의 실시예에서는 메틸로마아크로비움 알칼리필리움 20Z(*Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z)를 이용하여 실험하였으나, 반드시 이에 제한되는 것은 아니다.

[0027] 본 발명의 상기 메탄자화균(Methanotrophs)은, 알파-비사볼렌(α-bisabolene) 생산을 위하여, 전나무(Abies hrandis) 유래의 알파-비사볼렌 합성효소(α-bisabolene synthaes, agBs, 서열번호 1)와 파네실 디포스페이트 합성 효소(farnesyl diphosphate synthase, *ispA*, 서열번호 2)를 과발현시켜 형질전환 메탄자화균 20Z-Bs-1를 얻었다.

[0028] 또한, 형질전환 메탄자화균 20Z-Bs-1의 알파-비사볼렌(α-bisabolene)의 상위 전구체인 1- 데옥시-덱실룰로스-5-포스페이트 (1-deoxy-Dxylulose-5-phosphate, DXP)의 풀을 향상시키기 위하여, 1- 데 옥시-덱실룰로스-5-포스페이트 합성효소(1-deoxy-Dxylulose-5-phosphate synthase : *dxs*, 서열번호 3), (E)-4-하이드록시-3-메틸부트-2-에닐-디포스페이트 합성효소 ((E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl-diphosphate synthase, *ispG*, 서열번호 4), 오탄당 대사경로의 대사물질인 리브로즈-5-포스페이트(ribose-5-phosphate, Ru5P)로부터 1- 데옥시-덱실룰로스-5-포스페이트 (1-deoxy-Dxylulose-5-phosphate, DXP)를 직접 전환하는 nDXP 효소(RibB, G108S, 서열번호 5) 및 링커 DSAGSAGSAG를 붙인 1-데옥시-D-자일룰로스-5-포스페이트 환원효소(1-deoxy-D-xylulos 5-phosphate reductase, ispC, 서열번호 6)를 과발현시킨 형질전환 메탄자화균 20Z-Bs-2 균주를 얻었다.

발명의 효과

[0030] 본 발명은 알파-비사볼렌(α-bisabolene)의 생산능을 가지는 형질전환된 메탄자화균 및 이를 이용한 알파-비사볼렌(α-bisabolene)의 생산 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로 메탄을 탄소원으로 이용하는 형질전환 메탄자화균을 이용하여 알파-비사볼렌(α-bisabolene)을 생산하는 방법으로써, 경제성과 효율성이 향상된 알파-비사볼렌(α-bisabolene)의 생산 방법은 산업 전반에 활용 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0032] 도 1은 야생형 메탄자화균 20Z-WT와, agBs 및 ispA가 과발현된 형질전환된 형질전환 메탄자화균 20Z-Bs-1 균주을 이용한 알파-비사볼렌(α-bisabolene) 생산 유무를 가스크로마토그래피-질량분석기(gas chromatograph mass, GC-MS)를 통해 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 야생형 메탄자화균 20Z-WT와, 형질전환 메탄자화균 20Z-Bs-1의 알파-비사볼렌(α-bisabolene) 생성량을 비교한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 MEP 경로와 nDXP경로의 효소들을 과발현시킨 형질전환 메탄자화균 20Z-Bs-2의 알파-비사볼렌(α-

bisabolene) 생합성 경로를 나타낸 것이다.

도 4는 야생형 메탄자화균(20Z-WT), agBs 및 ispA가 과발현된 형질전환 메탄자화균(20Z-Bs-1) 및 MEP 경로와 nDXP경로의 효소들을 과발현시킨 형질 전환 메탄자화균(20Z-Bs-2)에서 알파-비사볼렌 생성량을 비교한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0033] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0034] **<실험 방법>**

[0035] **(1) 균주의 준비 및 배양 조건**

[0036] 본 발명에서 사용한 균주는 하기 표 1에 나타내었다. *M. alcaliphilum* 20Z 균주는 500 ml의 베플 플라스크(baffled flask)에서 50 ml NMS를 제공하고 스크류 캡을 이용하여 입구가 밀봉된 상태로 배양되었다. 탄소원으로는 가스치환기를 이용하여 배양배지의 1 내지 50 부피%로 메탄을 첨가하였으며, 바람직하게는 25 내지 50 부피%, 더욱 바람직 하게는 45 내지 50 부피%로 첨가 된다. 메탄의 대체제로는 메탄올을 배양배지의 0.1 내지 1 중량%로 첨가 가능하며, 바람직하게는 0.5 내지 1 중량%, 더욱 바람직 하게는 0.9 내지 1 중량%로 첨가되어 진다. 상기와 같은 배양 배지 및 탄소원의 농도로, 30℃, 230 rpm으로 진탕배양하였다. 세포배양액은 1.5 ml의 큐벳을 이용하여 흡광도를 측정하였으며, 측정된 흡광도를 이용하여 세포농도를 확인하였다. 배양된 균주는 카나마이신이 50 μg/ml의 농도로 포함된 평판 배지에 접종하여, 재조합 플라스미드를 함유하는 메탄자화균 및 대장균을 선택하였다.

표 1

[0037]

균주	특성	참조
Escherichia coli		Novagen
M. alcaliphilum 20Z	주 사용 균주	DMSZ
20Z-Bs-1	agBs 도입 및 ispA 과발현	본 발명
20Z-Bs-2	ispC-DSAG-RibB(G108S) 및 ispA, dxs, ispG, agBs 과발현	본 발명

[0039] **(2) 형질전환을 위한 재료 및 도구**

[0040] *M. alcaliphilum* 20Z의 gDNA는 Wizard Genomic DNA Purification kit(Promega)를 이용하여 분리하였고, 표 2의 프라이머와 Lamp Pfu polymerase (BioFACT)를 사용하여 PCR을 수행하였으며, PCR 정제 키트 및 겔 추출 키트는 Gene all 제품을 사용하였다. 올리고머 합성 및 DNA 서열 분석은 Macrogen에 의뢰하여 합성하였다.

표 2

[0041]

프라이머	염기서열	특징
pAWP89-For	TAGTTGTCGGGAAGATGCGT	For amplifying pAWP89 backbone which contained P_{tac} promoter and SD sequence
pAWP89-Rev	AGCTGTTTCCTGTGTGAATA	
agB.s-For	TTCACACAGGAAACAGCTATGGCGGGTGTTTCTGCG	For construction of pBS01 vector. AgB.s and ispA from 20Z were amplified and ligated into pAWP89 backbone
agB.s-Rev	ACTCAGATCTTACAGCGGCAGCGGTTC	
ispA-20Z-For	CCGCTGTAAGATCTGAGTACCTCTAGAAAATAAGGA	
ispA-20Z-Rev	GCATCTTCCCGACAACTATTAATGATCTCGCTGGATAA	

ribB-KpnI-For	CTGGTCTGTTTGTGGTACAGGAAACAGCTATGAATCAGACGCTACTTTCCTCT	For construction of ribB-G108S via site-directed mutagenesis
ribB-KpnI-Rev	CGTAGATCTTCTAGAGGTACTCAGCTGGCTTTACGCTCAT	
ribB-G108S-Rev	GGCAGAAACCGAGGTAGTCA	
ribB-G108S-For	TGACTACCTCGGTTTCTGCC	
ispG-For	TTGCGCGTGATACGCGTACAGCAATAGAGAATATAAACACTAAGGAGGTCAAACATGTCAATCAGCCCAAGAAA	For construction of pBS02 vector, ispG, dxs, ribB-G108S and ispC were amplified and ligated into pBS01 vector. ribB-108S and ispC was fused by DSAGSAGSAG linker)
ispG-Rev	CCGGTGAGCTCGCATGCACTACTGAGCTGTGGTTCCGT	
dxs-20Z-For	GAGATCATTAATACGCGTACAATCCCCATATCTCACAAAATATATAAGGAGGTCAACATGAAAATCACAGGAAATTTCCCCC	
dxs-20Z-Rev	CCGGTGAGCTCGCATGCATCACGCGCAAAATTGCTCG	
ribB-89-For	CGGAACCACAGCCAGTAGAGGAAACAGCTATGAATCAGACGCTACTTTC	
ribB-DSAG-Rev	ACCAGCACTACCAGCACTACCAGCACTATCGCTGGCTTTACGCTCATGTG	
ispC-DSGA-For	GATAGTGCTGGTAGTGCTGGTAGTGCTGGTAAAGGTATTTGTATTTTGGGCGC	
ispC-89-Rev	GCATCTTCCCGACAACTATTAACGCTTAAGTTCTTCGACGA	

[0042] **(3) *M. alcaliphilum* 20Z의 전기천공법 기반 유전자 조작 방법**

[0043] 50 ml의 배양액을 OD_{600}= 0.4 내지 0.6 정도로 배양하고 배양된 균주는 5000 ×g, 4℃에서 10분 동안 원심분리하여 회수된 세포는 50ml의 멸균수로 재현탁하였다 (2회 반복). 회수된 세포 펠렛은 100 μL의 멸균주로 재현탁시키고 50㎕ 의 세포 현탁액에 500ng DNA 플라스미드를 넣어 혼합한 후 전기침공법을 이용한 형질전환을 실시하였다. Gene Pulser Xcell ™ 전기 천공 시스템 (Bio-Rad)을 사용하여 1.3kV, 25 μF 및 200Ω에서 전기천공을 수행하였다. 전기천공 후 즉시, 1ml의 NMS를 세포에 첨가하여 회수된 세포를 0.1 % 메탄올을 함유하는 10ml NMS 배지옮겨 30℃에서 24시간 배양한 후, 세포를 원심분리기 5000g에서 10분동안 원심분리하여 얻은 세포를 항생제가 첨가된 NMS 한천 배지에 평판 도말하였다.

[0045] **(3) 분석 방법**

[0046] 알파-비사볼렌의 분석은 HP-5MS 컬럼이 장착된 GC-MS(gaschromatograph-mass spectrometer, Agilent, USA)를 이용하였다. 이동상은 헬륨을 사용하였으며 분할비는 8:1로 사용하였으며, 유속은 2.2 ml/분였다. 주입구 및 검출기 온도는 250℃였으며, 오븐온도는 초기 3분 80℃로 유지, 분당 16℃/분의 속도로 240℃까지 승온시킨 후, 240℃에서 2분간 유지하였다. 정량을 위해 표준품 알파-비사볼렌(α-bisabolene)을 사용하였다.

[0048] **실험예 1. 알파-비사볼렌 생산을 위한 *M. alcaliphilum* 20Z의 대사공학**

[0049] *M. alcaliphilum* 20Z은 자연적으로 프레닐 포스페이트(FPP)를 생산하여 알파-비사볼렌 합성효소의 이종 발현을 통해 알파-비사볼렌을 생산할 수 있다. 프레닐 포스페이트(FPP)는 두 분자의 이소펜테닐 피로포스페이트(isopentenyl pyrophosphate, IPP)와 한 분자의 디메틸 아릴 피로포스페이트에(dimethylallyl pyrophosphate, DMAPP)가 ispA에 의해 축합되어 생성됨으로, IPP 및 DMAPP의 형성 또한 MEP 대사경로에서 중요한 중간체이다. *M. alcaliphilum* 20Z를 숙주로 사용하여 알파-비사볼렌(α-bisabolene)을 생합성하기 위해, 전나무(Abies hrandis) 유래의 알파-비사볼렌(α-bisabolene) 합성효소를 *M. alcaliphilum* 20Z에 적합하도록 코돈 최적화시킨 agBs (α-bisabolene synthaes, agBs)와 ispA가 도입된 pBS01 벡터 구축하고 이를 야생형 균주에 형질전환시켜 20Z-Bs-1를 얻었다.

[0050] 탄소원으로 메탄이 제공된 배양 배지에 20 중량%의 도데칸(dodecane)을 첨가하여 이상계 시스템으로 비사볼렌

생성을 확인하였다. 야생형 균주와 형질전환 메탄자화균 20Z-Bs-1균주를 배양하여 GC-MS로 분석한 결과, 형질전환된 균주에서만 알파-비사볼렌이 생성되는 것을 확인하였고 (도 1 및 도 2), 생성된 알파-비사볼렌은 12.8 mg/L 였다 (도 2).

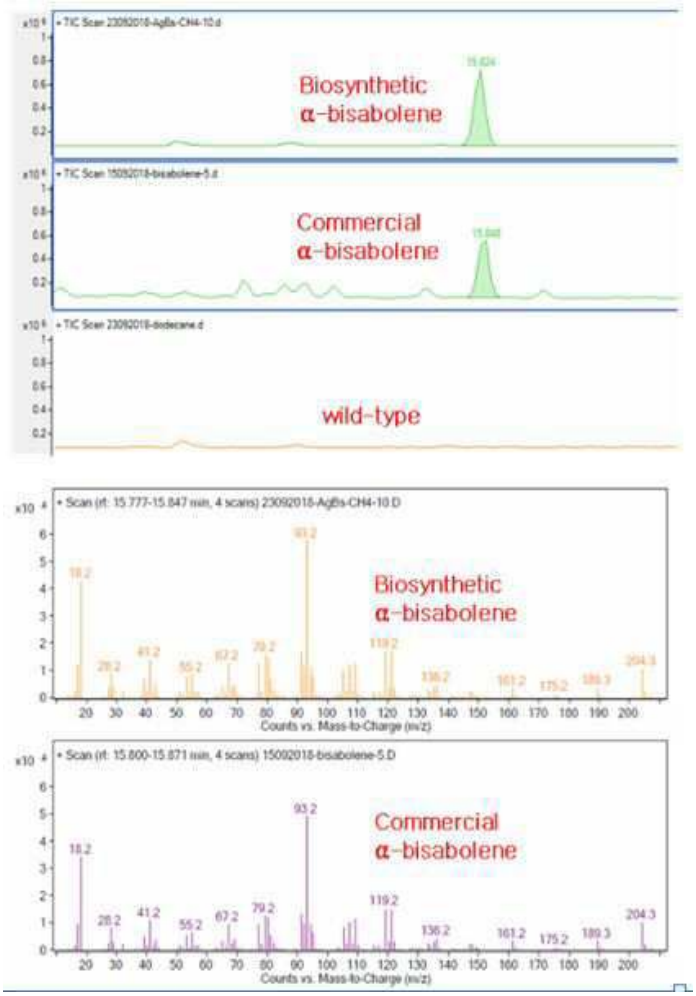
[0052] **실험예 2. 알파-비사볼렌 생산성 향상을 위한 MEP 경로 재설계 및 nDXP 경로의 도입**

[0053] 1-deoxy-Dxylulose-5-phosphate synthase (Dxs)는 프레닐 포스페이트에(FPP) 의해서 전사 및 번역이 억제되는 것으로 알려져 있어, 이소프레노이드의 전구체인 FPP로 인해 전사 및 번역이 억제되는 것을 막기 위해 Dxs 및 MEP 경로를관련 효소를 과발현키고자 하였다. 또한, 오탄단 경로의 대사물질인 Ru5P로부터1-deoxy-Dxylulose-5-phosphate (DXP)로의 직접 전환이 가능한 nDXP 경로의 도입을 통하여 효소는 상기와 같은 억제문제를 해결하고자 하였다.

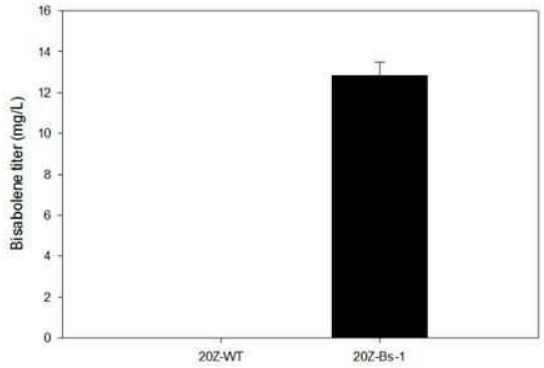
[0054] 도 3에 나타낸 것과 같이, 본 발명은 MEP경로와 관련된 dxs, lspG와 RibB(G108S) 유전자 및 링커 DSAGSAGSAG를 붙인 ispC 유전자를 pBS01 벡터에 추가 도입한 후, 이를 야생형 메탄자화균에 형질전환시켜 형질전환 메탄자화균 20Z-Bs-2를 얻었다. 형질전환 메탄자화균 20Z-Bs-2의 알파-비사볼렌 생산성은 20Z-Bs-1 균주보다 2배 증가하여 24.55 mg/L의 알파-비사볼렌을 생산하였다(도 4).

도면

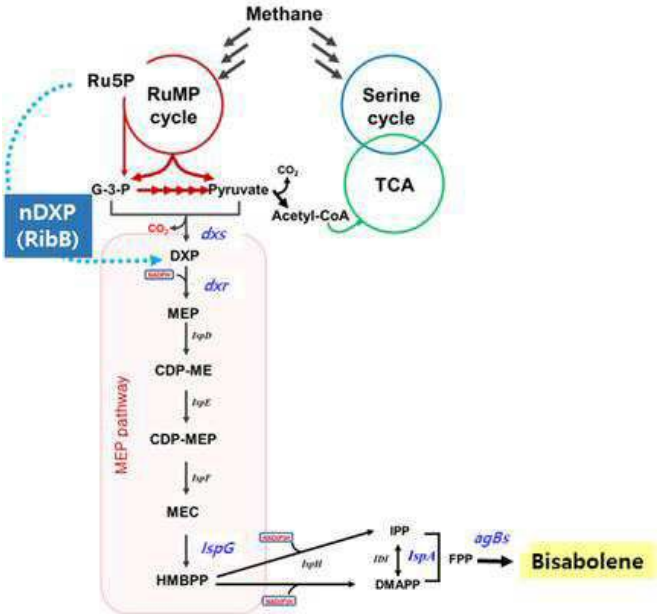
도면1



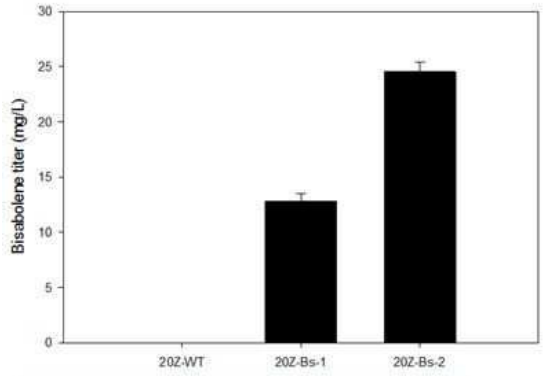
도면2



도면3



도면4



AgBIS	O	O
ispA(20Z)	O	O
DXS-ispG		O
nDXP pathway		O

서 열 목 록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

<120> Transformed methanotrophs for producing alpha bisabolene production from methane and uses thereof

<130> PN1910-469

<160> 24

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 2454

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> A. grandis agBs gene

<400> 1

atggcgggtg tttctgcggt ttctaaagtt tcttctctgg tttgcgacct gtcttctacc 60

tctggtctga tccgtcgtac cgcgaacccg cacccgaacg tttggggtta cgacctggtt 120

cactctctga aatctccgta catcgactct tcttaccgtg aacgtgcgga agttctggtt 180

tctgaaatca aagcgatgct gaacccggcg atcaccggtg acggtgaatc tatgatcacc 240

ccgtctgcgt acgacaccgc gtgggttgcg cgtgttccgg cgatcgacgg ttctgcgcgt 300

ccgcagttcc cgcagaccgt tgactggatt ctgaaaaacc agctgaaaga cggttcttgg 360

ggtatccagt ctcacttcct gctgtctgac cgtctgctgg cgaccctgtc ttgcgttctg 420

gttctgctga aatggaacgt tggtgacctg caggttgaac agggtatcga gttcatcaaa 480

tctaacctgg aactggttaa agacgaaacc gaccaggact ctctggttac cgacttcgaa 540

atcatcttcc cgtctctgct gcgtgaagcg cagtctctgc gtctgggtct gccgtacgac 600

ctgccgtaca tccacctgct gcagaccaaa cgtcaggaac gtctggcgaa actgtctcgt 660

gaagaaatct acgcggttcc gtctccgctg ctgtactctc tggaaggtat ccaggacatc 720

gttgaatggg aacgtatcat ggaagttcag tctcaggacg gttctttcct gtcttctccg 780

gcgtctaccg cgtgcgtttt catgcacacc ggtgacgcga aatgcctgga gttcctgaac 840

tctgttatga tcaaattcgg taacttcgtt ccgtgcctgt acccggttga cctgctggaa 900

cgtctgctga tcgttgacaa catcgttcgt ctgggtatct accgtcactt cgaaaaagaa 960

atcaaagaag cgctggacta cgtttaccgt cactggaacg aacgtggtat cggttggggt 1020

cgtctgaacc cgatcgcgga cctggaaacc accgcgctgg gtttccgtct gctgcgtctg 1080

caccgttaca acgtttctcc ggcgatcttc gacaacttca aagacgcgaa cggtaaattc 1140

atctgctcta ccggtcagtt caacaaagac gttgcgtcta tgctgaacct gtaccgtgcg 1200

tctcagctgg cgtttccggg tgaaaacatc ctggacgaag cgaaatcttt cgcgaccaaa 1260

tacctgcgtg aagcgctgga aaaatctgaa acctcttctg cgtggaacaa caaacagaac 1320

ctgtctcagg aaatcaaata cgcgctgaaa acctcttggc acgcgtctgt tccgcgtgtt 1380

gaagcgaaac gttactgcca ggtttaccgt ccggactacg cgcgtatcgc gaaatgcgtt 1440

tacaaactgc cgtacgttaa caacgaaaaa ttcctggaac tgggtaaact ggacttcaac 1500

atcatccagt ctatccacca ggaagaaatg aaaaacgtta cctcttggtt ccgtgactct 1560

ggtctgccgc tgttcacctt cgcgcgtgaa cgtccgctgg agttctactt cctggttgcg 1620

gcgggtacct acgaaccgca gtacgcgaaa tgccgtttcc tgttcaccaa agttgcgtgc 1680

ctgcagaccg ttctggacga catgtacgac acctacggta ccctggacga actgaaactg 1740

ttcaccgaag cggttcgtcg ttgggacctg tctttcaccg aaaacctgcc ggactacatg 1800

aaactgtgct accagattta ctacgacatc gttcacgaag ttgcgtggga agcggaaaaa 1860

gaacagggtc gtgaactggt ttctttcttc cgtaaaggtt gggaagacta cctgctgggt 1920

tactacgaag aagcggaatg gctggcggcg gaatacgttc cgaccctgga cgaatacatc 1980

aaaaacggta tcacctctat cggtcagcgt atcctgctgc tgtctggtgt tctgatcatg 2040

gacggtcagc tgctgtctca ggaagcgctg gaaaaagttg actatccggg tcgtcgtgtt 2100

ctgaccgaac tgaactctct gatctctcgt ctggcggacg acaccaaaac ctacaaagcg 2160

gaaaaagcgc gtggtgaact ggcgtcttct atcgaatgct acatgaaaga ccacccggaa 2220

tgcaccgaag aagaagcgct ggaccacatc tactctatcc tggaaccggc ggttaaagaa 2280

ctgacccgtg agttcctgaa accggacgac gttccgttcg cgtgcaaaaa aatgctgttc 2340

gaagaaaccc gtgttactat ggttatcttc aaagacggtg acggtttcgg tgtttctaaa 2400

ctggaagtta aagaccacat caaagaatgc ctgatcgaac cgctgccgct gtaa 2454

<210> 2

<211> 897

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> M. alcaliphilum 20Z ispA gene

<400> 2

atgagtaacg cactgaaaga ctatctctcc ttttgtcaaa accgtgtcga aagagccttg 60

gaagcccgac tgccaagcga aaaccaaatt ccgacaaaat tgcacgaagc gatgcgctat 120

tgcgtgctgg acggcggtaa acgcatgcgt ccgatgctaa cctactgtac aggaaaagcc 180

gtgggcattg caccggaaga tttagatggc gcggcctgtg cggttgaatt cattcatgtt 240

tattcgttga tacatgacga tttgccggcc atggacgacg acgacctcag acgcggaaag 300

ccgacctgtc atatcgctta tgatgaagcg accgccattt tgaccggcga cgctttacaa 360

gcattggcat tcaaggtctt ggctgacgac cctaccatcc gagccgatgc cgaaagccgt 420

ctaaaaatga ttacgttgct ggctaaggct agcggctctc aaggcatggt cggcggccaa 480

gccatcgatt tagaatcggt cggcacgatg ctgacgctgc ctcagcttga aaatatgcat 540

atccacaaga ccggagcgtt aattcgagcc agcgtcaaca tggcgacgtt aacgagaccc 600

gatatcgacc cgaaacaggc cgaagggctc gatcattacg caaaatgcat cggcctatcc 660

ttccaagtca aggatgatat tttggacgaa gaaagcgata ccgcaacact cggcaaaacc 720

caaggcaagg acaaagacaa cgacaagccg acttaccctg ccttactcgg cttggccggc 780

gcaaagcaaa aagctcagga acttcatgag caagccattg aaagcttaaa cggattcggc 840

cccgaagccg atctgcttcg tgacttgtcg ctttatatta tccagcgaga tcattaa 897

<210> 3

<211> 1863

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> M. alcaliphilum 20Z dxs gene

<400> 3

atgaaaatca caggaaattt ccccctacta gacagcatca agctcccctc cgaccttaga 60

aaactgccaa aggaacgatt aaaaccgctt gccaaagaac ttcgcgagtt tctgacccac 120

acagtcagta tttccggcgg gcatttttcg gcaggcctcg gcaccgtaga gttgactgtg 180

gcgctgcatt acgtattcga cacgccgcgc gatcaattgg tttgggatgt cggccatcag 240

gcctatccgc ataagatcct gaccggacgc aaggagcgca tgacgacaat tcgcacccgc 300

gacggctttt gcccctttcc aaaccgttcc aagagcgaat acaatgcctt cggcgtcggc 360

cattcgagca cgtcaattag cgcggcctta ggcatggcga tcgcatccgg tttacgcggc 420

gaggacaagc actgtgtcgc gatcattggc gacggcagca tcaccggcgg catggccttc 480

aaagcaatga accatgccgg tgcgatcgat gcaaatctgt tggtgatctt gaacgacaac 540

aatttgtcaa tttctccaaa tgtcggcccg ttgaaaaatt atctgactaa aattctgtcg 600

agtaaaattt attcttcggt acgcgaaaaa agcaaaaaag ctctcaccag catgccaagc 660

gtctgggagc tggcgcgcaa aaccaaaaag cacatgaaag gcatggtcgt gcccggcacc 720

ttgttcaagg aaatggggtt caattatatc ggtccaatcg acggccatga cctggacatg 780

ctggtgtcaa ccctggaaaa tctaaaaacac atttccggcc cgcgtttctt gcatatcgtc 840

accaagaaag gcaagggcta tgcgccggcc gagaaagacc cgctcgccta tcacggcgtg 900

ccggccttcg acccgagccg cgattgtctg ccgaaatcgg ccccttctcc gcacccgacg 960

tatacgcagg tattcggaca atggctctgc gacatggccg agcaggacga gcgcttgttg 1020

ggcattaccc cggcaatgcg cgaaggctcg ggcctggtcg ctttttccga acgctttccg 1080

aagcgttatt tcgatgtcgc catcgccgag cagcatgccg tgaccttagc ggcgggcctg 1140

gcctgcgagg gcggcaaacc ggtcgtcgcg atctattcaa ccttcttaca acgcggctac 1200

gatcaattga tacacgatgt ggtcttgcag gacctggacg tattgtttgc gctcgaccgc 1260

gcaggtttag tcggcccgga cggcccgacc catgccggca gtttcgatta cacctacatg 1320

cgctgcctgc cgaacatgct aatcatggca ccggccgacg agaacgaatg ccggcagatg 1380

ctctataccg gttatctgca taaaggcccg gcttcggtac gctatccgcg cggcaaaggc 1440

ccgggcgtgc cggtcgattg caccatgacc gcgctaccga tcggcaaggc cgaattgcgc 1500

catcaaggcg gccgcatcgc gattctggcg ttcggcagca tggttacgcc gtcggtcgag 1560

gtcggtaagc agctcggcgc gaccgtcgtc aatatgcgct tcgtcaagcc gctcgatgaa 1620

gcgttgattc tggaactggc caagagtcac gatatcatcg tcacggtcga agaaaacgtc 1680

attgccggcg gcgccggcag cgcggtcaac gaatttctgc aggcacaaag aatcgtgatg 1740

ccggtcttga atatcggtct gcccgatgcc ttcatcgaac aaggcacgcg cgaagaatta 1800

ctgagttttt gcggattaga tacccaaggc atattgcaga gcatcgagca attttgcgcg 1860

tga 1863

<210> 4

<211> 1227

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> M. alcaliphilum 20Z ispG gene

<400> 4

atgtcaatca gcccaagaaa aattacccat caagttcaaa tcggcgacat caaagtgggc 60

ggcggcgcgc caatcgtcgt tcaatcaatg accaataccg ataccgccga tatcaaagca 120

acagtcaacc aagtcatgga actgtcgaag gccggatcgg aaatcgtccg tattaccgtc 180

aactccgaag acgcggctaa agccgttcct gaaatccgca accaactcaa tcaaaaaggc 240

tttaccgttc cgatcgtcgg cgatttccat tttaacggac ataaattact cgaaaaatac 300

cccgcctgcg ccgaagcctt agataaatat cgcatcaatc ccggaaatgt cggacgaggt 360

aaaaaccgcg atccacaatt tcaacaaatg atcgagttcg cttgccgcta cgacaagccc 420

gttcgaatcg gcgttaacgg cggtagcctg gatcaagcgg ttttaacgcg ccttttggat 480

gaaaacagac aaaaagaaaa tccggacgaa ctacctgccg ttactcgaga agcaatcatc 540

gtttcggcac tcgaaagcgc ggcccgcgcc gaagaaatag gcctacccgc caacaaaatt 600

ttattgtctt gtaaaatcag caacgttcag gaattgatca gaatttatca agatctaagt 660

aaacgctgcg attacgcgtt acacctcggc ctaaccgaag ccggcatggg ctcgaaaggc 720

atcgtggcat cttcggccgc tctatccgtg cttatgcaac agggcatcgg agacacgatt 780

cgcatctcgc taacaccgga acccggcacg gccagaaccc aagaagttgt agtcgcacag 840

gaaatcttgc aaaccatggg ctttcgttcc tttactccga tggttatcgc ctgcccaggc 900

tgcggccgaa caaccagcga ctatttccaa aaattggcga tggaaattca aaattatcta 960

cgcgtcagta tgccgtcttg gcgcactaaa tatcccggcg tcgaagaaat ggaagtcgcg 1020

gtcatgggtt gtgtcgtcaa tggtcccgga gaaagtaaga atgccagcat cggcatcagc 1080

ttgcccggca ccggagaaac cccggttgct ccggtttatg aagacggtgt caaaacagtg 1140

accttgaaag gcgatcatat agccgaagaa tttcaagcgc tggtcgaacg ctatattgaa 1200

acgcactacg gaaccacagc tcagtag 1227

<210> 5

<211> 654

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Mutated ribB encoding RibB-G108S gene

<400> 5

atgaatcaga cgctactttc ctcttttggt acgcctttcg aacgtgttga aaatgcactg 60

gctgcgctgc gtgaaggacg cggtgtaatg gtgcttgatg atgaagaccg tgaaaacgaa 120

ggtgatatga tcttcccggc agaaaccatg actgttgagc agatggcgct gaccattcgc 180

cacggtagcg gtattgtttg cctgtgcatt actgaagatc gccgtaaaca actcgatctg 240

ccaatgatgg tagaaaataa caccagcgcc tatggcaccg gttttaccgt gaccattgaa 300

gcagctgaag gtgtgactac cggtgtttct gccgctgacc gtattacgac cgttcgcgca 360

gcgattgccg atggcgcaaa accgtcagat ctgaatcgtc ctggccacgt tttcccactt 420

cgcgctcagg caggtggtgt actgacgcgt ggcggtcata ctgaagcaac tattgatctg 480

atgacgctgg caggctttaa accggctggt gtactgtgtg agctgactaa tgacgatggc 540

acgatggcgc gtgcaccaga gtgtattgag tttgccaata aacacaatat ggcgctcgtg 600

actattgaag acctggtggc ataccgtcag gcacatgagc gtaaagccag ctga 654

<210> 6

<211> 1181

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> M. alcaliphilum 20Z ispC gene

<400> 6

atgaaaggta tttgtatttt gggcgcgacc ggttctatcg gtgtcagcac gctggatgtg 60

gttgctcgcc attcgaatcg gtatagagtc gttgcgttga ccgcgaacaa taatatcgac 120

ctgctgtacg accaatgcat cgtccatcgt cctgactatg ttgtcgtggt tgatgaaaat 180

aaggctaaac aatttgcaga gcgcattgct acatcgccgg tatccgatat aaaggtgtta 240

tcgggagccg aatcgttgca gcaagtagct acactggata gtgttgattc ggtaatggcg 300

gcaatcgtcg gcgcggctgg tctattacca actttggcgg ctgctaaagc cggtaaaacc 360

gtattgctgg caaataaaga agcgttggtg atgtccggcg atatttttat gaaagcggtt 420

accgagtccg gtgcccattt gctgccgatc gatagcgagc ataatgccat ttttcaatgc 480

atgccggcag attactgtgc gggtcaagag gctaaggagg cgcggcgaat tttgttgact 540

gcctcgggtg gcccgttcag aactaagccg gtagaagagt tggtcgatgt cactccggat 600

caagccgtcg cgcatccgaa ttgggatatg gggcgtaaga tttctgtcga ttctgcgacg 660

atgatgaata aagggcttga attgattgaa gcctgtttat tgttcaatat gtcgccggat 720

aaaattcagg tggtgatcca tccgcaaagc gtgattcatt caatggtcga ttatgtcgac 780

ggcactgtgt tggcgcaaat gggtaacccc gatatgcgaa tacccattgc gcatgcgatg 840

gcgtggccgg aacgcttcga ctccggtgcg gcgccgctga atatattcga cgttaagcac 900

atggatttcg aacaacccga tcttcagcgt ttcccttgtt tacgcttggc gattgaagcc 960

gtcgaggcag gcggtattat gccggctgtg ttaaatgccg ctaatgaaat cgcggttgct 1020

gccttttgg acgagaaagt ccgttttacc gacatccctt acattattga acggagcatg 1080

catcaattcg aagccgatcc ggcggatacg ctggatattg tattggcagc cgatagcaaa 1140

gcccgggaag tggctgagcg tatcgtcgaa gaacttaagg t 1181

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> pAWP89-For

<400> 7

tagttgtcgg gaagatgcgt 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> pAWP89-Rev

<400> 8

agctgtttcc tgtgtgaata 20

<210> 9

<211> 36

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> agB.s-For

<400> 9

ttcacacagg aaacagctat ggcgggtgtt tctgcg 36

<210> 10

<211> 27

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> agB.s-Rev

<400> 10

actcagatct tacagcggca gcggttc 27

<210> 11

<211> 36

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> ispA-20Z-For

<400> 11

ccgctgtaag atctgagtac ctctagaaaa taagga 36

<210> 12

<211> 38

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> ispA-20Z-Rev

<400> 12

gcatcttccc gacaactatt aatgatctcg ctggataa 38

<210> 13

<211> 53

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> ribB-KpnI-For

<400> 13

ctggtctgtt tgtggtacag gaaacagcta tgaatcagac gctactttcc tct 53

<210> 14

<211> 40

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> ribB-KpnI-Rev

<400> 14

cgtagatctt ctagaggtac tcagctggct ttacgctcat 40

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> ribB-G108S-Rev

<400> 15

ggcagaaacc gaggtagtca 20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> ribB-G108S-For

<400> 16

tgactacctc ggtttctgcc 20

<210> 17

<211> 74

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> ispG-For

<400> 17

ttgcgcgtga tacgcgtaca gcaatagaga atataaacac taaggaggtc aaacatgtca 60

atcagcccaa gaaa 74

<210> 18

<211> 38

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> ispG-Rev

<400> 18

ccggtgagct cgcatgcact actgagctgt ggttccgt 38

<210> 19

<211> 82

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> dxs-20Z-For

<400> 19

gagatcatta atacgcgtac aatccccata tctcacaaaa tatataagga ggtcaacatg 60

aaaatcacag gaaatttccc cc 82

<210> 20

<211> 37

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> dxs-20Z-Rev

<400> 20

ccggtgagct cgcatgcatc acgcgcaaaa ttgctcg 37

<210> 21

<211> 49

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> ribB-89-For

<400> 21

cggaaccaca gccagtagag gaaacagcta tgaatcagac gctactttc 49

<210> 22

<211> 50

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> ribB-DSAG-Rev

<400> 22

accagcacta ccagcactac cagcactatc gctggcttta cgctcatgtg 50

<210> 23

<211> 53

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> ispC-DSGA-For

<400> 23

gatagtgctg gtagtgctgg tagtgctggt aaaggtattt gtattttggg cgc 53

<210> 24

<211> 41

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> ispC-89-Rev

<400> 24

gcatcttccc gacaactatt aacgcttaag ttcttcgacg a 41