



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년10월19일
(11) 등록번호 10-1910281
(24) 등록일자 2018년10월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/79 (2006.01) C12N 15/64 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/79 (2013.01)
C12N 15/64 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0082725
(22) 출원일자 2017년06월29일
심사청구일자 2017년06월29일
(56) 선행기술조사문헌
US20130171721 A1*
KR1020000075076 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
김성룡
경기도 고양시 일산동구 일산로 205 (마두동, 백
마마을2단지아파트) 212-1003
(74) 대리인
윤대웅, 공병욱

전체 청구항 수 : 총 7 항

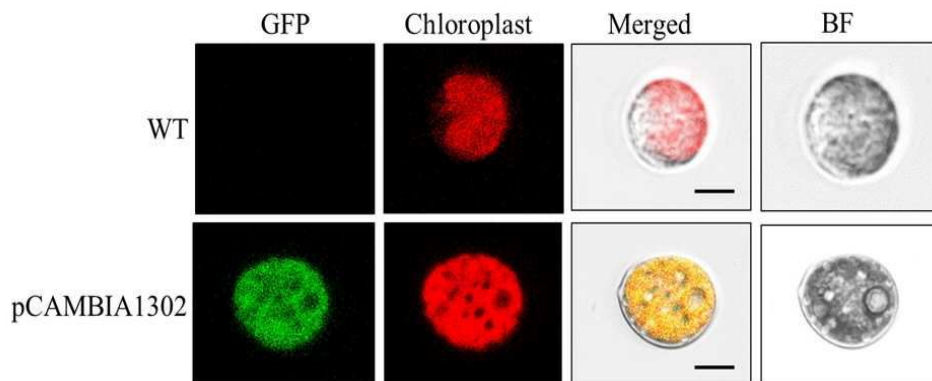
심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 클로렐라 불가리스의 형질전환 방법

(57) 요약

본 발명은 클로렐라 불가리스의 형질전환 방법을 제공한다. 본 발명의 형질전환 방법은 기보고된 효율과 비교하여 현저한 형질전환 효율을 가지므로, 클로렐라 불가리스의 산업적 활용도를 향상시킬 수 있다.

대표도 - 도8a



(52) CPC특허분류

C12Y 302/01014 (2013.01)

C12N 2800/10 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

다음의 단계를 포함하는 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*)의 형질전환 방법:

(a) 클로렐라 불가리스에 리소자임(lysozyme) 0.7 내지 1.5 mg/ml, 설페타아제(sulfatase) 0.7 내지 1.5 mg/ml 및 키티나아제(chitinase) 0.2 내지 0.5 mg/ml 를 포함하는 효소 혼합물을 2 내지 24시간 동안 접촉시켜 원형질을 제조하는 단계; 및

(b) 상기 원형질체에 유전자 전달체(gene carrier)를 접촉시키고 전기천공(electroporation)을 가하여 형질전환을 유도하는 단계.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (a)의 클로렐라 불가리스는 1×10^6 내지 1×10^8 cells/ml의 농도인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (a)의 클로렐라 불가리스는 1.0 내지 3.0의 흡광도를 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (b)의 원형질체는 1×10^5 내지 1×10^7 cells/ml의 농도인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (b)의 유전자 전달체는 플라스미드인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (b)의 전기천공은 100 내지 2000 V 범위의 전압(voltage)를 가하여 실시하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (b)의 전기천공은 1 내지 6 ms(milli second) 범위의 펄스 너비(pulse width)로

가하여 실시하는 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 클로렐라 불가리스의 형질전환 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 클로렐라(*Chlorella*)는 모든 배양 조건에 쉽게 적응하고 빠르게 자라는 단세포 녹조류로, 지질, 단백질 및 색소와 같은 풍부한 생물 활성 성분을 포함하고 있다. 클로렐라는 양식업, 대체 재생 가능 에너지원, 약효식품, 탄소 고정 및 폐수 처리에 적용되는 중요한 조류로 알려져 있다. 클로렐라는 식용 백신 또는 백신 항원 및 기타 기능적으로 중요한 단백질과 같은 적절히 폴딩되고 경제적으로 중요한 가치 있는 단백질을 생산하는 조류 모델로도 사용될 수 있다.

[0004] 클로렐라 불가리스는 다음과 같은 분류에 속하는, 가장 주목할 만한 녹조류 중 하나이다: 역(domain): Eukaryota, 계(kingdom): Protista, 문(division): Chlorophyta, 문(class): Trebouxiophyceae, 목(order): Chlorellales, 과(family): Chlorellaceae, 속(genus): *Chlorella*, 종(species): 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*). 네덜란드 연구자 인 Martinus Willem Beijerinck에 의해 1890년에 잘 정의된 핵을 가진 최초의 미세 조류로 발견되었다(Beijerinck *et al.*, 1890). 클로렐라라는 이름은 초록색을 뜻하는 그리스 단어 '*chloros*'와 작은 미세한 크기를 나타내는 라틴어 '*ella*'에서 유래한다.

[0005] 종래 연구에 따르면, 클로렐라 불가리스는 면역 조절 및 항암 작용을 하는 것으로 보고되어 치료 용도로 소비되고 있다. 또한, 클로렐라 불가리스는 조혈 작용에 대한 보호 성질, 고혈압 및 백내장; 심혈관 질환과 같은 연령 관련 질병을 예방하고 죽상 동맥 경화증의 위험을 낮추며 피부 콜라겐 합성을 촉진 효과 등이 밝혀져 있다. 클로렐라 불가리스는 또한 질소 기아(nitrogen starvation) 이후에 바이오 디젤 생산에 적합한 지방산 프로필의 중요한 양의 지질을 축적할 수 있다.

[0006] 클로렐라를 형질전환하기 위한 글래스 비드법(Kim *et al.*, 2002), 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) 매개법 (Cha *et al.*, 2012, Lin *et al.*, 2013), PEG 매개 원형질체 형질 전환법(Yang *et al.*, 2015) 및 전기천공법(Niu *et al.*, 2011; Chien *et al.*, 2012; Bai *et al.*, 2013)과 같은 다수의 방법이 개발되었다. 이 중 전기천공법은 선호되고 효율적인 방법이다. 이 방법은 클라미도모나스 레인하티(*Chlamydomonas reinhardtii*, Jeon *et al.*, 2013), 세네데스머스 오블리퀴스(*Scenedesmus obliquus*, Guo *et al.*, 2013) 및 난노클로롭시스 종(*Nannochloropsis* sp., Kilian *et al.*, 2011)과 같은 다양한 미세 조류의 형질 전환에도 적용되었다.

[0008] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0010] (비특허문헌 0001) Bai LL, Yin WB, Chen YH, Niu LL, Sun YR, Zhao SM, Yang FQ, Wang RRC, Wu Q, Zhang XQ, Hu ZM (2013) A new strategy to produce a defensin: stable production of mutated NP-1 in nitrate reductase-deficient *Chlorella ellipsoidea*. PLoS One 8: e54966

(비특허문헌 0002) Berrios H, Zapata M, Rivas M (2016) A method for genetic transformation of *Botryococcus braunii* using a cellulase pretreatment. J Appl Phycol 28: 201-208

(비특허문헌 0003) Cha TS, Yee W, Aziz A (2012) Assessment of factors affecting *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of the unicellular green alga, *Chlorella vulgaris*. World J Microbiol Biotechnol 28:1771-1779

- (비특허문헌 0004) Chien LF, Kuo TT, Liu BH, Lin HD, Feng TY, Huang CC (2012) Solar-to-bioH₂ production enhanced by homologous overexpression of hydrogenase in green alga *Chlorella* sp. DT. *Int J Hydrog Energy* 37:17738-17748
- (비특허문헌 0005) Guo SL, Zhao XQ, Tang Y, Wan C, Alam MA, Ho SH, Bai FW, Chang JS (2013) Establishment of an efficient genetic transformation system in *Scenedesmus obliquus*. *J Biotechnol* 163:61-68
- (비특허문헌 0006) Jeon K, Suresh A, Kim YC (2013) Highly efficient molecular delivery into *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation. *Korean J Chem Eng* 30:1626-1630
- (비특허문헌 0007) Kilian O, Benemann CS, Niyogi KK, Vick B (2011) High-efficiency homologous recombination in the oil-producing alga *Nannochloropsis* sp. *Proc Natl Acad Sci* 108:21265-21269
- (비특허문헌 0008) Kim D, Kim YT, Cho JJ, Bae J, Hur S, Hwang I, Choi T (2002) Stable integration and functional expression of flounder growth hormone gene in transformed microalga, *Chlorella ellipsoidea*. *Mar Biotechnol* 4:63-73
- (비특허문헌 0009) Lin HD, Liu BH, Kuo TT, Tsai HC, Feng TY, Huang CC, Chien LF (2013) Knockdown of *PsbO* leads to induction of *HydA* and production of photobiological H₂ in the green alga *Chlorella* sp. DT. *Bioresour Technol* 143:154-162
- (비특허문헌 0010) Liu L, Wang Y, Zhang Y, Chen X, Zhang P, Ma S (2013) Development of a new method for genetic transformation of the green alga *Chlorella ellipsoidea*. *Mol Biotechnol* 54:211-219
- (비특허문헌 0011) Liu Z, Zhang L, Pu Y, Liu Z, Li Z, Zhao Y, Qin S (2014) Cloning and expression of a cytosolic HSP90 Gene in *Chlorella vulgaris*. *Bio. Med. Res. Int.*, p. 11
- (비특허문헌 0012) Murray HG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight DNA. *Nucleic Acids Res* 8: 4321-4325
- (비특허문헌 0013) Niu YF, Zhang MH, Xie WH, Li JN, Gao YF, Yang WD, Liu JS, Li HY (2011) A new inducible expression system in a transformed green alga, *Chlorella vulgaris*. *Genet. Mol. Res.* 10:3427-3434
- (비특허문헌 0014) Run C, Fan g L, Fan J, Fan C, Luo Y, Hu Z et al (2016) Stable nuclear transformation of the industrial alga *Chlorella pyrenoidosa*. *Algal Res.* 17:196-201
- (비특허문헌 0015) Siemering KR, Golbik R, Sever R, Haseloff J (1996) Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein. *Curr. Biol.* 6:1653-1663
- (비특허문헌 0016) Yang B, Liu J, Liu B, Sun P, Ma X, Jiang Y, Wei D, Chen F (2015) Development of a stable genetic system for *Chlorella vulgaris*-a promising green alga for CO₂ biomitigation. *Algal Res.* 12:134-141
- (비특허문헌 0017) Yamamoto M, Fujishita M, Hirata A, Kawano S (2004) Regeneration and maturation of daughter cell walls in the autospore-forming green alga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *J. Plant Res.* 117:257-64

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명자는 산업적 이용 가치가 높은 클로렐라 불가리스의 형질전환 방법을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 클로렐라 불가리스에 효소를 전처리하여 세포벽을 제거한 후 전기천공을 가하여 형질전환을 실시하는 경우, 공지된 방법과 비교하여 형질전환 효율이 현저히 높음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0012] 따라서, 본 발명의 목적은 클로렐라 불가리스의 형질전환 방법을 제공하는 데 있다.

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

과제의 해결 수단

[0016] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 클로렐라 불가리스의 형질전환 방법을 제공한다:

[0017] (a) 클로렐라 불가리스에 리소자임(lysozyme) 및 설파타아제(sulfatase)를 포함하는 효소 혼합물을 접촉시켜 원형질체를 제조하는 단계; 및

[0018] (b) 상기 원형질체에 유전자 전달체(gene carrier)를 접촉시키고 전기천공(electroporation)을 가하여 형질전환을 유도하는 단계.

[0020] 본 발명의 클로렐라 불가리스의 형질전환 방법을 단계별로 설명한다:

[0021] 단계 (a): 효소 처리

[0022] 먼저, 클로렐라 불가리스에 리소자임 및 설파타아제를 포함하는 효소 혼합물을 접촉시켜 원형질체를 제조한다.

[0023] 본 발명은 효소 분해를 통해 클로렐라 불가리스의 세포벽을 분해하여 원형질체를 제조한다.

[0024] 본 발명의 효소 혼합물에 포함되는 리소자임은 뮤라미다아제(muramidase) 또는 N-아세틸뮤라마이드 글리칸하이드롤라아제(N-acetylmuramide glycanhydrolase)로도 알려져 있다. 상기 리소자임은 글리코사이드 하이드롤라아제(glycoside hydrolase)로, 세포벽의 주요 구성 성분인 펩티도글리칸의 N-아세틸뮤람산(N-acetylmuramic acid) 및 N-아세틸-D-글루코사민(N-acetyl-D-glycosamine)의 1, 4-베타 결합을 가수분해한다.

[0025] 상기 효소 혼합물에 포함되는 리소자임은 0.1 내지 5.0 mg/mL, 0.3 내지 4.0 mg/mL, 0.5 내지 3.0 mg/mL, 0.7 내지 2.0 mg/mL 또는 0.7 내지 1.5 mg/mL의 농도를 갖는다.

[0026] 본 발명의 효소 혼합물에 포함되는 설파타아제는 설페이트 에스테르를 가수분해하는 에스테라아제이다.

[0027] 상기 효소 혼합물에 포함되는 설파타아제는 0.1 내지 5.0 mg/mL, 0.3 내지 4.0 mg/mL, 0.5 내지 3.0 mg/mL, 0.7 내지 2.0 mg/mL 또는 0.7 내지 1.5 mg/mL의 농도를 갖는다.

[0028] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 효소 혼합물은 키티나아제(chitinase)를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0029] 상기 키티나아제가 효소 혼합물에 포함되는 경우, 상기 키티나아제는 0.05 내지 2.00 mg/mL, 0.10 내지 1.50 mg/mL, 0.15 내지 1.00 mg/mL 또는 0.20 내지 0.50 mg/mL의 농도를 갖는다.

[0030] 하기 실시예에서 입증된 바와 같이, 상기 효소 혼합물이 키티나아제를 추가적으로 포함하는 경우, 포함하지 않는 경우와 비교하여 형질전환 효율을 약 19배 증가시킬 수 있다.

[0031] 상기 효소 혼합물로 클로렐라 불가리스의 세포벽을 분해할 수 있다.

[0032] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 클로렐라 불가리스는 1×10^6 내지 1×10^8 cells/ml의 농도이다. 구체적으로는, 상기 클로렐라 불가리스는 1.2×10^6 내지 8×10^7 cells/ml, 1.4×10^6 내지 6×10^7 cells/ml, 1.6×10^6 내지 4×10^7 cells/ml 또는 1.8×10^6 내지 2×10^7 cells/ml이다.

[0033] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 클로렐라 불가리스는 1.0 내지 3.0의 흡광도를 갖는다. 구체적으로는, 1.2 내지 2.8, 1.4 내지 2.6, 1.6 내지 2.4 또는 1.8 내지 2.2의 흡광도를 갖는다.

[0034] 상기 클로렐라 불가리스를 효소 혼합물과 접촉시켜 원형질체를 제조할 수 있다.

[0035] 상기 원형질체는 클로렐라 불가리스의 세포벽이 완전하게 제거된 프로토플라스트(protoplast)뿐 아니라, 세포벽이 부분적으로 제거된 스페로플라스트(spheroplast)도 포함한다.

[0036] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 원형질체를 제조하는 단계 (a)는 2 내지 24시간 동안 실시한다. 구체적으로는, 4 내지 22시간, 6 내지 20시간, 8 내지 18시간 또는 10 내지 16시간 동안 실시할 수 있다.

[0037] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 단계 (a)는 10 내지 30℃, 12 내지 28℃, 14 내지 26℃, 16 내지 24℃ 또는 18 내지 22℃의 온도조건에서 실시할 수 있다.

- [0038] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 단계 (a)는 암(dark) 조건에서 실시할 수 있다.
- [0039] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 단계 (a)는 회전 조건 하에 실시할 수 있다. 구체적으로는 10-200 rpm, 20-160 rpm, 30-120 rpm 또는 40-80 rpm의 회전 조건 하에 실시할 수 있다.
- [0041] 단계 (b): 형질전환 유도
- [0042] 다음, 상기 원형질체에 유전자 전달체를 접촉시키고 전기천공을 가하여 형질전환을 유도한다.
- [0043] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 원형질체는 1×10^5 내지 1×10^7 cells/ml의 농도이다. 구체적으로는, 2×10^5 내지 8×10^6 cells/ml, 4×10^5 내지 6×10^6 cells/ml, 6×10^5 내지 4×10^6 cells/ml 또는 8×10^5 내지 4×10^6 cells/ml의 농도이다.
- [0044] 상기 유전자 전달체는 당업계에 공지된 다양한 유전자 전달체를 이용할 수 있으며, 예컨대, 플라스미드, 코스미드, 파아지(phage) 등을 포함한다.
- [0045] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 유전자 전달체는 플라스미드이다. 구체적으로는, 상기 플라스미드는 발현 벡터이다.
- [0046] 본 명세서에서 용어 "발현 벡터"는 목적한 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 일반적으로, 발현 벡터는 프로모터-유전자-전사 종결서열의 발현 컨스트럭트를 포함한다.
- [0047] 본 발명의 발현벡터로 이용 가능한 벡터는 pCAMBIA1302, pSK397, pBI121, pPTN ST108, pROKII, pET21, pLSAGPT, pUC, pGEM 및 pHellsgate를 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0048] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 발현 벡터는 pCAMBIA1302 또는 pSK397이다.
- [0049] 상기 발현 컨스트럭트에서 이용가능한 프로모터는 CaMV 35S 프로모터, lac 프로모터, NOS 프로모터, MAS 프로모터, T3 프로모터, T7 프로모터를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0050] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 프로모터는 CaMV 35S 프로모터 또는 lac 프로모터이다.
- [0051] 상기 발현 컨스트럭트에서 이용가능한 전사 종결서열은 NOS 터미네이터, MAS 터미네이터, OCS 터미네이터, HSP 터미네이터를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0052] 본 발명의 바람직한 일 따르면, 상기 전사 터미네이터는 NOS 터미네이터 또는 MAS 터미네이터이다.
- [0053] 본 발명에서 제작되는 발현 벡터는 선별 작업을 용이하게 하기 위하여, 선택마커를 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 선택 마커는 하이그로마이신 또는 G418일 수 있다.
- [0054] 하기 실시예에서 입증된 바와 같이, 유전자 전달체로 pCAMBIA1302를 사용하는 경우, 하이그로마이신을 이용하여 형질전환체를 선별할 수 있다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 형질전환체를 선별하기 위한 하이그로마이신의 농도는 10-200 $\mu\text{g/ml}$, 20-180 $\mu\text{g/ml}$, 20-160 $\mu\text{g/ml}$, 30-140 $\mu\text{g/ml}$, 40-120 $\mu\text{g/ml}$, 50-100 $\mu\text{g/ml}$ 또는 50-90 $\mu\text{g/ml}$ 이다.
- [0055] 하기 실시예에서 입증된 바와 같이, 유전자 전달체로 pSK397을 사용하는 경우, G418을 이용하여 형질전환체를 선별할 수 있다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 형질전환체를 선별하기 위한 G418의 농도는 10-100 $\mu\text{g/ml}$, 20-90 $\mu\text{g/ml}$, 30-80 $\mu\text{g/ml}$, 40-70 $\mu\text{g/ml}$ 또는 40-60 $\mu\text{g/ml}$ 이다.
- [0056] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 유전자 전달체는 1-20 ng/ml의 농도를 처리한다. 구체적으로는, 상기 유전자 전달체는 1-18 ng/ml, 1-16 ng/ml, 1-14 ng/ml, 1-12 ng/ml, 1-10 ng/ml, 2-10 ng/ml 또는 4-10 ng/ml을 처리한다.
- [0057] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 유전자 전달체와 함께 불필요한 DNA(예컨대, 초음파처리된 연어 정자 DNA, 소 효선 DNA 등)를 처리하여 세포의 핵산 분해 효소로부터 목적하는 유전자 전달체의 분해를 최소화할 수 있다.
- [0059] 상기 유전자 전달체를 원형질체에 접촉시키고 전기천공을 가하여 형질전환을 유도한다.
- [0060] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 전기천공은 100 내지 2000 V 범위의 전압(pulse voltage)을 가하여 실시한다. 구체적으로는, 200 내지 1800 V, 300 내지 1600 V, 400 내지 1400 V, 500 내지 1200 V, 500 내지 1000 V

또는 500 내지 800 V 범위의 전압을 가하여 실시한다.

[0061] 본 명세서에서 용어 "전압"은 전기적인 포텐셜 차이로 물리에서 위치에너지에서의 변위로, 1 C(coulomb)의 전하가 1 J의 에너지를 얻거나 잃을 때의 전위차를 1 V로 정의한다.

[0062] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 전기천공은 1 내지 6 ms(milli second) 범위의 펄스 너비(pulse width)로 가하여 실시한다. 구체적으로는, 1 내지 5 ms, 1 내지 4 ms, 2 내지 6 ms, 2 내지 5 ms 또는 2 내지 4 ms 범위의 펄스 너비로 가하여 실시한다.

[0063] 본 명세서에서 용어 "펄스 너비"는 펄스의 상승시간과 하강시간에서 진폭이 1/2이 되는 시간의 간격을 의미하며, "펄스 길이(pulse length)"와 동일한 의미를 갖는다.

발명의 효과

[0065] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0066] (a) 본 발명은 클로렐라 불가리스의 형질전환 방법을 제공한다.

[0067] (b) 본 발명은 기보고된 방법과 비교하여 현저한 형질전환 효율을 나타낸다.

도면의 간단한 설명

[0069] 도 1은 pSK397 벡터의 컨스트럭트를 나타낸다.

도 2a 내지 2c는 클로렐라 불가리스의 성장 특징을 나타낸다. 도 2a는 BG11 액체배지에서의 클로렐라 불가리스의 성장 곡선을 나타낸다. 세포를 250 플라스크에서 60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 의 일정한 조명, 150 rpm 및 25°C 조건으로 배양하였다. 도 2b는 클로렐라 불가리스 성장 동안의 pH 변화를 나타낸다. 도 2c는 흡광도에 반응하는 BG11 배지 1 ml 당 세포의 수를 나타낸다.

도 3a 내지 3d는 클로렐라 불가리스의 선별을 최적화한 결과를 나타낸다. 도 3a는 하이그로마이신의 농도(0, 30, 50, 70, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 달리한 BG11 아가 배지의 클로렐라 불가리스를 선별한 결과를 나타낸다. 도 3b는 하이그로마이신의 0, 30, 50, 70 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 클로렐라 불가리스를 선별한 결과를 나타낸다. 도 3c는 G418의 농도(0, 20, 30, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 달리한 BG11 아가 배지의 클로렐라 불가리스를 선별한 결과를 나타낸다. 도 3d는 G418의 0, 10, 30, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 클로렐라 불가리스를 선별한 결과를 나타낸다.

도 4a 내지 4d는 클로렐라 불가리스의 형질전환에 사용된 플라스미드의 개략도를 나타낸다. 도 4a는 GFP를 발현하는 벡터인 pCambia1302의 개략적인 맵을 나타낸다. 화살표는 제한효소 *SpeI* 및 *BamHI*의 위치를 나타낸다.

도 4b는 pCambia1302의 제한효소 처리 결과를 나타낸다. 화살표는 잘리지 않은 플라스미드(10.5 kb) 및 *BamHI/SpeI* 잘린 플라스미드(9.7 및 0.8 kb)를 가리킨다. 도 4c는 *CrCFP*를 발현하는 벡터인 pSK397의 개략적인 맵을 나타낸다. 화살표는 제한효소 *NotI*, *HIII*, *KpnI* 및 *EcoRI*의 위치를 나타낸다. 도 4c는 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 내지 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 다른 농도의 G418이 첨가된 BG11 아가 배지에서 배양된 클로렐라 불가리스의 선별 결과를 나타낸다. 도 4d는 pSK397 벡터의 제한효소 처리 결과를 나타낸다. 화살표는 *NotI/KpnI* (7.7 및 5.5 Kb 분획) 및 *HIII/EcoRI* 컷 플라스미드(11 및 2 Kb 분획)을 나타낸다.

도 5a 내지 5c는 세포벽의 효소처리 및 형질전환 클로렐라 불가리스의 생상을 나타낸다. 도 5a는 클로렐라 불가리스의 세포벽에 대한 효소 혼합물의 영향을 공초점 이미지로 나타낸다. 도 5b는 70 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 하이그로마이신이 첨가된 BG11 아가 배지 상의 형질전환 콜로니의 성장을 나타낸다. 도 5c는 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418이 첨가된 BG11 아가 배지 상의 형질전환 콜로니의 성장을 나타낸다. 도 5c는 기보고된 연구에 대한 형질전환 효율의 비교결과를 나타낸다.

도 6a 내지 6d는 지노믹 DNA의 PCR을 통해 형질전환체를 확인한 결과를 나타낸다. 도 6a는 클로렐라 불가리스 형질전환체의 성장 콜로니를 픽킹하여 하이그로마이신 선별 배지에서 배양한 결과를 나타낸다. 도 6b는 클로렐라 불가리스 형질전환체(예컨대, pCambia1302) 및 야생형 클로렐라 불가리스의 지노믹 DNA의 하이그로마이신 내성 유전자인 *hph* 및 GFP 유전자인 *mGFP*의 PCR 증폭결과를 나타낸다. 양성 대조군으로 플라스미드 DNA를 이용하였다. 도 6c는 클로렐라 불가리스 형질전환체의 성장 콜로니를 픽킹하여 G418 선별 배지에서 배양한 결과를 나타낸다. 도 6d는 클로렐라 불가리스 형질전환체(예컨대, pSK397) 및 야생형 클로렐라 불가리스의 지노믹 DNA의 CFP 유전자인 *crCFP*의 PCR 증폭결과를 나타낸다. 양성 대조군으로 플라스미드 DNA를 이용하였다.

도 7a 및 7b는 클로렐라 불가리스 형질전환체의 RT-PCR 결과를 나타낸다. 도 7a는 RT-PCR을 이용하여 *mGFP*의

GFP 발현을 확인한 결과이다. 도 7b는 RT-PCR을 이용하여 *crCFP*의 CFP 발현을 확인한 결과이다. 클로렐라 불가리스의 액틴 유전자인 *CAct1*을 내부 대조군으로 사용하였다.

도 8a 및 8b는 클로렐라 불가리스 형질전환체의 표현형 특성을 나타낸다. 도 8a는 *mGFP*를 발현하는 세포의 공촛점 이미지를 나타낸다. 도 8b는 *CrCFP*를 발현하는 세포의 공촛점 이미지를 나타낸다. 'BF'는 명시야(bright field)를 의미하고 바(bars)는 5 μm 이며, 'WT'는 야생형을 의미한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0070] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.
- [0071] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 "%"는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (중량/중량) %, 고체/액체는 (중량/부피) %, 그리고 액체/액체는 (부피/부피) %이다.
- [0073] **실시예**
- [0074] **실험 재료 및 실험 방법**
- [0075] **균주 및 성장 조건**
- [0076] 서강대 학교 기계 공학과 이승엽 교수로부터 한국 해양미세조류 배양센터(KMCC)의 클로렐라 불가리스(*C. vulgaris*, UTEX-26) 균주를 수득하였다. 상기 클로렐라 불가리스를 BG11(BlueGreen Eyela FLI-2000 배양기, Tokyo rikakikai, Japan)에서 회전식 진탕(150 rpm)의 일정한 조명($50\text{--}60 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) 및 25°C 조건 하에 배양하였다. 본 연구진이 형질전환에 사용한 세포는 초기 성장 단계의 세포이다.
- [0078] **클로렐라 불가리스의 항생제 민감성**
- [0079] 다양한 농도의 하이그로마이신(hygromycin) 또는 G418를 포함하는 평판배지에 세포를 스프리딩(spreading)하여 하이그로마이신 및 G418에 대한 클로렐라 불가리스의 민감성을 결정하였다. 하이그로마이신 민감성을 결정하기 위해 30, 50, 70 및 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 하이그로마이신이 첨가된 고체 BG11 플레이트를 사용하였다. G418 민감성의 경우 20, 30 및 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ G418이 첨가된 고체 BG11 플레이트를 사용하였다. 상기 BG11 플레이트를 아이라(Eyela) FLI-2000 배양기 챔버에서 25°C 의 온도 및 약 $60 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 의 일정한 조명 하에서 거꾸로 배양하였다. 약 15일 동안 플레이트 내 세포의 성장을 지속적으로 모니터링하였다.
- [0081] **플라스미드 컨스트럭션**
- [0082] 본 연구진은 녹조류의 형질전환을 위해 35S 프로모터 조절하에 *eGFP*를 발현하는 pCambia1302, 및 hsp70 프로모터 조절하에 *CrCFP*를 발현하는 pSK397의 두 개의 벡터를 사용하였다. pCambia1302 벡터는 선별 마커로 하이그로마이신-내성 유전자인 *HygR*를 갖고, pSK397 벡터는 선별 마커로서 *nptII* 유전자를 갖는다. 대략 10 kb 크기를 갖는 pCambia1302는 녹색 형광 단백질(GFP)을 갖는 발현 벡터로 일반적으로 사용된다(Siemering *et al.*, 1996). 본 발명진은 29B HS70-CFP(7.9 kb, 한국생명공학연구원의 정원중 교수 제공)를 pBI101의 *BamHI* 및 *EcoRI* 부위에 클로닝하여 CFP 단백질 발현을 위한 pSK397 벡터를 컨스트럭트하였다. 플라스미드 구성의 세부 사항은 도 1에 나타내었다.
- [0084] **효소 처리**
- [0085] 본 연구진은 4°C 의 멸균수 10 ml에 0.6 M 소르비톨, 0.1% MES(2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid), 50 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.0 mg/mL 리소자임(lysozyme), 1.0 mg/mL 설페타아제(Sulfatase) 및 0.25 mg/mL 키틴나아제(chitinase), 또는 리소자임 및 설페타아제의 효소 조합을 포함하는 세포벽 분해를 위한 효소 혼합물을 제조하였다. 상기 효소 혼합물을 냉장실에서 용해시켰다. 완전히 용해된 후, 용액을 0.22 μm 필터를 사용하여 여과하였다. 총 1×10^7 cells/ml($\text{OD}_{680}=2.0$)의 지수기 세포, 10 ml을 분해하기 위해 사용하였다. 세포를 암실에서 실온, 50 rpm의 조건 하에 15시간 동안 부드럽게 배양하여 원형질체(protoplast)의 손상을 최소화하였다. 클로렐라 불가리스의 세포벽을 레이저 공초점 현미경(Olympus, USA)을 이용하여 9시간까지 매시간마다, 그 이후는 15시간까지 3시간마다 확인하였다.
- [0087] **전기천공법에 의한 형질전환**

[0088] 전기천공법은 공지된 방법(Bai *et al.*, 2013 및 Run *et al.*, 2016)을 수정하여 실시하였다. 클로렐라 불가리스의 원형질체(1×10^6 cells/ml)를 형질전환에 사용하였다. 수확된 세포에 미리 냉각된 삼투압 완충액(0.2 M 만니톨 및 0.2 M 소르비톨) 45 μ l를 첨가하고, 현탁액을 얼음 중에서 40분 동안 항온반응 시켰다. 다시 현탁액에 45 μ l의 사전 냉각된 전기천공 완충액(0.2 M 만니톨, 0.2 M 소르비톨, 0.08 M KCl, 0.005 M CaCl₂ 및 0.01 M HEPES; pH 7.2)을 첨가하였다. pCambia1302 및 pSK397의 60 ng 원형 플라스미드를 150 μ g/mL 초음파 처리된 연어 정자 DNA와 함께 현탁액에 즉시 첨가하였다. 형질전환 플라스미드는 뉴클레오스핀 플라스미드 키트(Macherey-Nagel, Germany)를 사용하여 추출 및 정제 하였다; 플라스미드-세포 현탁 혼합물(~100 μ L)을 0.2 cm의 무균 사전 냉각된 전기 천공 큐벳으로 옮기고 10분 동안 얼음 수조에서 정치하였다. Bio-Rad Gene Pulser Xcell™ 전기 천공 시스템(Bio-Rad, USA)을 사용하여 형질전환 클로렐라 불가리스를 제조하였다. 1 펄스의 간격은 3.4 펄스 너비(pulse width)이고, 655 볼트 전계(electric field)를 사용하였다. 전기천공 후, 세포를 10분 동안 얼음에 보관하고 1.5 ml BG11 배지를 포함하는 12-웰 플레이트에 옮겨 24시간 동안 25°C의 암실에서 배양하였다. 배양한 세포를 수확하여 200 μ l BG11 배지에 현탁하고 pCambia1303 형질전환 세포를 선별하기 위한 70 μ g/ml 하이그로마이신 및 pSK397 형질전환 세포를 선별하기 위한 50 μ g/ml G418을 포함하는 BG11 아가배지에 도말하였다. 2 종류의 선별 아가 플레이트 배양물을 60 μ mol/m²/s의 지속적 형광등 및 25°C의 조건 하에 15일 동안 배양하였다.

[0090] 클로렐라 불가리스 형질전환의 PCR 검출

[0091] 상기 플레이트 배양물로부터 수득한 형질전환체 콜로니를 10 μ g/mL 하이그로마이신 및 30 μ g/mL G418을 함유하는 액체 BG11 배지에 접종하였다. 배양물을 배양하고 CTAB 방법(Murray and Thompson, 1980)을 사용하여 게놈 DNA를 분리하였다. 형질전환체의 도입유전자 gDNA의 통합을 확인하기 위해, 형질전환체의 gDNA를 PCR에 사용하였다. pCambia1302 형질전환체는 표 1에 나타난 바와 같이 *hph* 및 *mGFP* 유전자에 대한 프라이머를 사용하였고, pSK397 형질전환체는 *CrCFP* 유전자에 대한 프라이머를 사용하였다. 야생형 클로렐라 불가리스로부터 분리한 DNA를 음성 대조군으로 사용하고, 형질전환에 사용된 플라스미드 DNA를 양성 대조군으로 사용하였다. 통합된 유전자의 발현을 분석하기 위해, 역전사 (reverse transcription; RT)-PCR을 수행하였다. Trizol RNA 추출 과정(Invitrogen, USA)을 통해 분리된 2 μ g RNA를 사용하여 cDNA를 제조하였다. 이어서, TOPscript™ cDNA 합성 키트(Enzymomics, Korea)를 이용하여 제조자의 지시에 따라 cDNA를 합성하였다. *mGFP* 및 *CrCFP*에 대한 각각의 프라이머를 pCambia1302 형질전환체 및 pSK397 형질전환체를 검출하는데 사용하였다(표 1). 액틴 프라이머 *Act1*을 내부 대조군으로 사용하였다(Liu *et al.*, 2014).

표 1

프라이머 명	서열(5'-3')	용도	산물 크기	서열목록
<i>hphF</i>	CGACGTCGTCGAGAAGTTT	gD-PCR	411 bp	제1서열
<i>hphR</i>	TGTATTGACCGATTCCITGC	gD-PCR	411 bp	제2서열
<i>mGFPF</i>	TCATATGAAGCGGCACGACT	gD-PCR, RT-PCR	266 bp	제3서열
<i>mGFPR</i>	AGTTGGCTTTGATGCCGTTTC	gD-PCR, RT-PCR	266 bp	제4서열
<i>CrCFPF</i>	GACCACATGAAGCAGCACGA	gD-PCR, RT-PCR	382 bp	제5서열
<i>CrCFPR</i>	TGGACAGGTAGTGGTTGTCG	RT-PCR, RT-PCR	382 bp	제6서열
<i>Act1F</i>	ATGCTTTGCCACATGCCATC	RT-PCR	327 bp	제7서열
<i>Act1R</i>	TTGTGTCGTGGATGCCGTT	RT-PCR	327 bp	제8서열

[0094] *mGFP* 및 *CrCFP* 유전자 발현의 검출

[0095] 각각의 배지에서 성장한 pCambia1302 및 pSK397 형질전환체를 음성 대조군으로서 야생형 클로렐라 불가리스와 함께 형광 분석하였다.

[0096] 공초점 레이저 현미경 Leica DMI4000(Leica Microsystems, Germany)을 사용하여 *mGFP* 및 *CrCFP* 발현을 분석하였다. 공초점 레이저 현미경의 435 nm 및 488 nm 여기(excitation)의 레이저 빛을 사용하여 *CrCFP* 및 *mGFP*의 각각의 이미지를 촬영하였다. *CrCFP*는 426~446 nm, *mGFP*는 495~556 nm, 클로렐라 불가리스의 엽록체 자체-형광은 685~735 nm 범위에서 검출하였다.

[0098] 결과

- [0099] *클로렐라 불가리스*의 성장률
- [0100] 2일 마다 OD₆₈₀을 측정하여 액체 BG11 배지에서의 *클로렐라 불가리스*의 성장 속도를 계산하였다. *클로렐라 불가리스*의 성장 곡선은 꾸준히 증가하여 4일 후에 유도기(lag phase)에서 증식기(exponential phase)에 진입하였다. 증식기의 초기, 중간 및 후기는 각각 4일에서 8일까지, 8일부터 12일까지, 12일부터 16일까지 발생하였다(도 2a). *클로렐라 불가리스*의 배양 세포가 16일 후에 정상기(stationary phase)에 진입하였다. *클로렐라 불가리스*의 성장으로 용액의 pH도 증가하였다(도 2b). pH는 6에서 시작하여 성장 16 일에 pH 9.33에 도달하였다. 또한, 배양물 1 ml 당 세포의 수를 OD₆₈₀으로 계산하였다(도 2c).
- [0102] *클로렐라 불가리스* 형질전환체의 선별을 위한 조건 최적화
- [0103] 형질전환체를 선별하기 위한 조건을 최적화하기 위해, 증식 중인 *클로렐라 불가리스*의 하이그로마이신 및 G418에 대한 민감성을 시험하였다. 플레이트 내 *클로렐라 불가리스* 형질전환체의 선별을 최적화하기 위해, 30, 50, 70 및 100 µg/ml 하이그로마이신이 첨가된 BG11 한천 플레이트를 사용하였고(도 3a), 30, 50, 70 및 100 µg/ml 하이그로마이신이 첨가된 BG11 한천 플레이트에서 선별되었다(도 3b). 플레이트 내 *클로렐라 불가리스* 형질전환체의 선별을 위해 20, 30, 50 µg/ml G418이 첨가된 BG11 아가 플레이트를 사용하였고(도 3c), 10, 30 및 50 µg/ml G418이 첨가된 BG11에서 선별되었다(도 3d). *클로렐라 불가리스*를 다른 농도의 하이그로마이신 및 G418이 첨가된 BG11에서 15일 동안 배양한 후에, 콜로니를 확인하였다. 액체 BG11 배지에서 OD₆₈₀을 측정하고 항생제 선별 배지의 최적 농도를 확인하여 형질전환체의 스크리닝 방법을 결정하였다. 하이그로마이신 선별의 경우, 야생형 *클로렐라 불가리스*가 성장할 수 없는 70 µg/ml 농도의 아가 BG11 배지 및 30 µg/ml 농도의 BG11 배지가 결정되었다. G418 선별의 경우, 야생형 *클로렐라 불가리스*가 성장할 수 없으므로 50 µg/ml 농도의 아가 BG11 배지 및 10-20 µg/ml 액체 BG11 배지가 결정되었다.
- [0105] *플라스미드의 컨스트럭션*
- [0106] eGFP 발현 벡터 pCambia1302는 일반적으로 세포에서 GFP의 발현을 확인하는 벡터이다(Siemering *et al.*, 1996). 이는 35S 프로모터의 조절 하에 eGFP를 발현한다(도 4a). 본 연구진은 *Bam*HI 및 *spe*I로 플라스미드를 분해하여 카세트를 확인하였다. 분해 후, 10.5 kb의 절단되지 않은 밴드 크기에 상응하는 9.7 kb 및 0.7 kb 밴드가 생성되었다(도 4b). *CrCFP* 발현 벡터에 대하여 우리는 hsp70 프로모터의 조절 하에 pSK397 벡터를 클로닝하였고, 상기 벡터는 선택 마커로서 G418을 갖는다. 본 연구진은 29B HSP70P-CFP 삽입물을 pBI101 벡터의 *Bam*HI 및 *Eco*RI 부위에 클로닝하여 pSK397 벡터를 제조하였다(Jefferson *et al.*, 1987)(도 4c). pSK397 벡터 컨스트럭션의 세부 사항은 도 1에 나타내었다.
- [0107] pSK397 벡터를 *Not*I/*Kpn*I로 분해하여 7.7 및 5.5 kb 분획이 생성됨을 확인하고, *H*III/*Eco*RI로 분해하여 11 및 2 kb의 분획이 생성됨을 확인함으로써 pSK397의 13 kb 크기에 상응하는 두 분획의 조합을 확인하였다(도 4d).
- [0109] 효소 처리 및 형질전환에 의한 *클로렐라 불가리스* 세포벽의 회석 시간의 최적화
- [0110] *클로렐라*에 있어서, 어떤 균주는 약한 세포벽을 가지고 있어 외부 DNA가 쉽게 안으로 들어가도록 변형시킬 수 있다(Run *et al.*, 2016). 그러나, *클로렐라 불가리스*의 매우 두껍고 성숙시 약 17-21 nm에 이른다(Yamamoto *et al.*, 2004; Safi *et al.*, 2014). 외부 DNA가 침투하기 위해서는 *클로렐라 불가리스*의 세포벽을 약하게 하는 것이 중요하다.
- [0111] *클로렐라 불가리스*의 두꺼운 세포벽을 소화시키기 위해 효소 처리를 실시하였다. 리소자임(lysozyme), 설파타아제(sulfatase) 및 키틴아제(chitinase), 또는 리소자임 및 설파타아제를 포함하는 효소 혼합물이 세포 벽에 미치는 영향을 분석하기 위해 세포벽 형태를 공초점 현미경으로 15 시간까지 분석하였다(도 5a). 리소자임 1 mg/mL, 설파타아제 1 mg/mL 및 키틴아제 0.25 mg/mL를 사용하여 세포벽을 분해하였다. *클로렐라 불가리스*의 세포벽은 효소 처리 5시간 후에 분해되기 시작하여 및 효소 처리 9 시간 후에 형질전환용 원형질체로 사용하기 충분한 수준으로 분해되었다.
- [0112] 외부 DNA를 침투시키기 위한 효소처리 후, *클로렐라 불가리스*의 형질전환 효율을 분석하기 위해, 앞서 기재한 재료 및 방법 대로 전기천공법을 이용하여 효소 처리된 세포($1-2 \times 10^6$ cells/ml)을 pCambia1302 및 pSK397 플라스미드로 형질전환하였다. pCambia1302 형질전환체를 위한 70 µg/ml 하이그로마이신 및 pSK397 형질전환체를 위한 50 µg/ml G418이 첨가된 플레이트 상에서 항생제 내성을 갖는 형질전환체를 선별하였다. 10일 후부터 형질전환된 콜로니가 생성되었다(도 5의 1b 내지 1c). 본 연구의 형질전환 효율(표 2)은 최고 $1.67 \times 10^4 \pm$

0.083 cfu/μg 플라스미드로, 이는 기보고된 연구의 형질전환 효율보다 우수한 효율을 보여주었다(Liu *et al.*, 2013; Berrios *et al.*, 2016; Run *et al.*, 2016).

표 2

-	형질전환 효율(cfu/ug)	사용된 세포의 수
Run <i>et al.</i> 2016	$1.01 \times 10^2 \pm 0.07/\text{ug}$ 플라스미드	5×10^6 cells/ml
리소자임+설파타아제+키티나아제	$1.67 \times 10^4 \pm 0.083/\text{ug}$ 플라스미드	2×10^6 cells/ml
리소자임+설파타아제	$8.83 \times 10^2 \pm 0.08/\text{ug}$ 플라스미드	1×10^6 cells/ml

클로렐라 불가리스 계놈의 형질전환 확인

형질전환된 콜로니를 30 μg/ml 하이그로마이신 및 20 μg/ml G418이 첨가된 새로운 선별 액체 BG11 배지에 접종하였다(도 6a 내지 6c). 형질전환 세포는 선별 배지에서 성장하는 반면, pseudo-형질전환 세포는 성장할 수 없다. PCR 분석을 통해 클로렐라 불가리스로 이식 유전자 *mGFP*의 통합을 확인하였다. 3종 하이그로마이신-내성 균주의 지놈 DNA(gDNA)의 *hph* 유전자 단편(411 bp) 및 *mGFP* 단편(266 bp)을 각각 *hph*-F/R 프라이머 및 *mGFP*-F/R 프라이머를 이용하여 PCR 증폭하였다(도 6b). G418-내성 균주의 경우, *CrCFP* 유전자(382 bp)의 단편을 *CrCFP*-F/R 프라이머를 사용하여 증폭시켰다(도 6c). 프라이머 리스트는 표 1에 기재하였다.

mGFP 및 *CrCFP* 유전자의 발현 분석

gDNA PCR 분석으로 확인된 3개의 *mGFP* 및 *CrCFP* 유전자 양성 균주를 RT-PCR에 의해 *mGFP* 및 *CrCFP*의 발현을 분석하기 위해 선택하였다. 도 7a는 형질전환 균주에서 *mGFP* 전사체가 3개의 발현되고, 야생형 균주에서는 발현되지 않음을 보여준다. *CrCFP* 유전자 발현의 경우도 유사하였다(도 7b). 내부 대조군으로 클로렐라 불가리스의 액틴(*CAct1*)을 사용하였다.

*mGFP*의 형광은 *CrCFP*의 녹색 및 시안(cyan)색이고 엽록체의 자가 형광은 빨간색이기 때문에 형질전환 세포와 야생형 세포를 쉽게 구분할 수 있었다. 도 8은 양성 형질전환체에 상응하는 색을 나타내고 야생형 세포에는 색이 없음을 나타낸다. 모든 세포에서 엽록체의 자가 형광이 빨간색으로 관찰되었다. 병합된 이미지는 형질전환체와 야생형 세포 간에 명확한 차이를 나타낸다. 형광은 공초점 이미지(도 8a 및 8b)로 측정하였다. 이 수치는 *mGFP* 및 *CrCFP*가 클로렐라 불가리스 세포에서 성공적으로 발현됨을 보여준다.

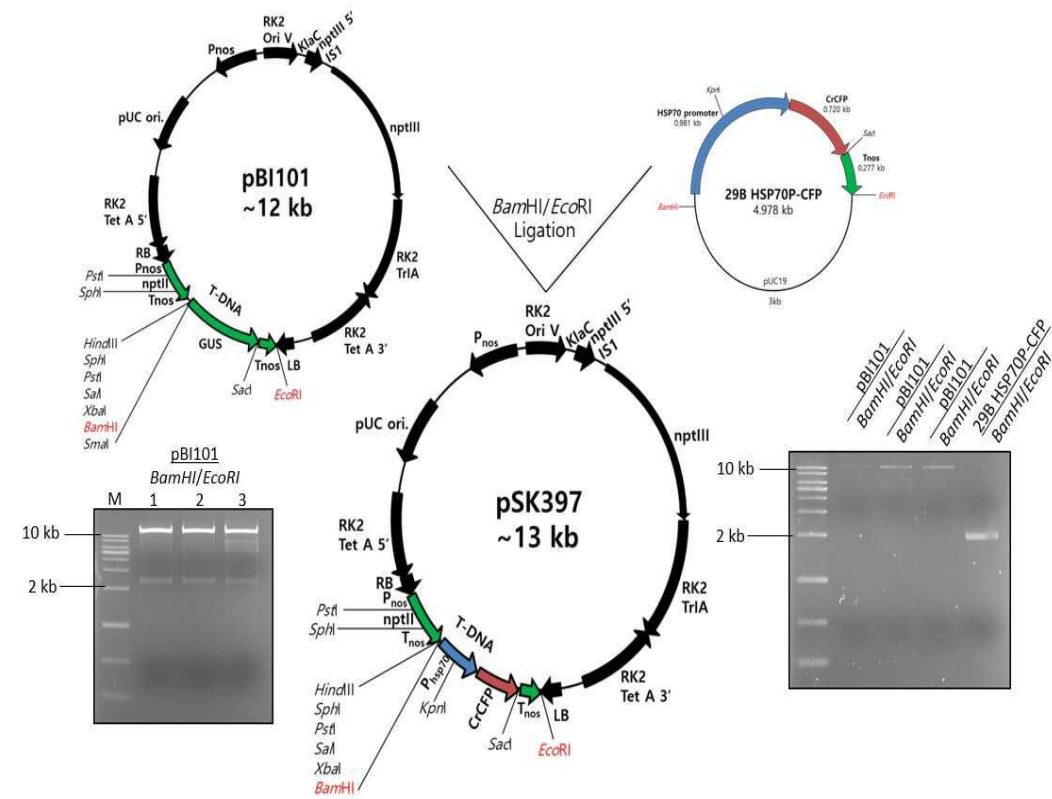
결론

미세조류를 영양 성분 화합물의 후보 공급원으로 적절히 활용하기 위해서는 다양한 생명공학적 툴이 개발하여야 한다. 따라서, 다른 단백질과 함께 중요한 항생제 및 지질의 생산을 증가시킬 수 있는 특정 대사 경로의 유전자 조절을 조작하기 위한 유전자 공학적 툴이 개발되어야 한다. 하이그로마이신 및 *nptII* 유전자는 일반적으로 사용되는 신뢰할 수 있는 선택 마커이다. 클로렐라 불가리스의 세포벽을 분해하기 위한 효소의 전처리 세포는 본 연구의 중요한 구성으로, 이는 클로렐라 불가리스의 형질전환 효율을 증가시키는 효과를 갖는다. 따라서, 세포벽을 분해시킨 후 전기천공을 통해 형질전환 시키는 방법은 클로렐라 불가리스의 효과적인 형질전환 방법이다.

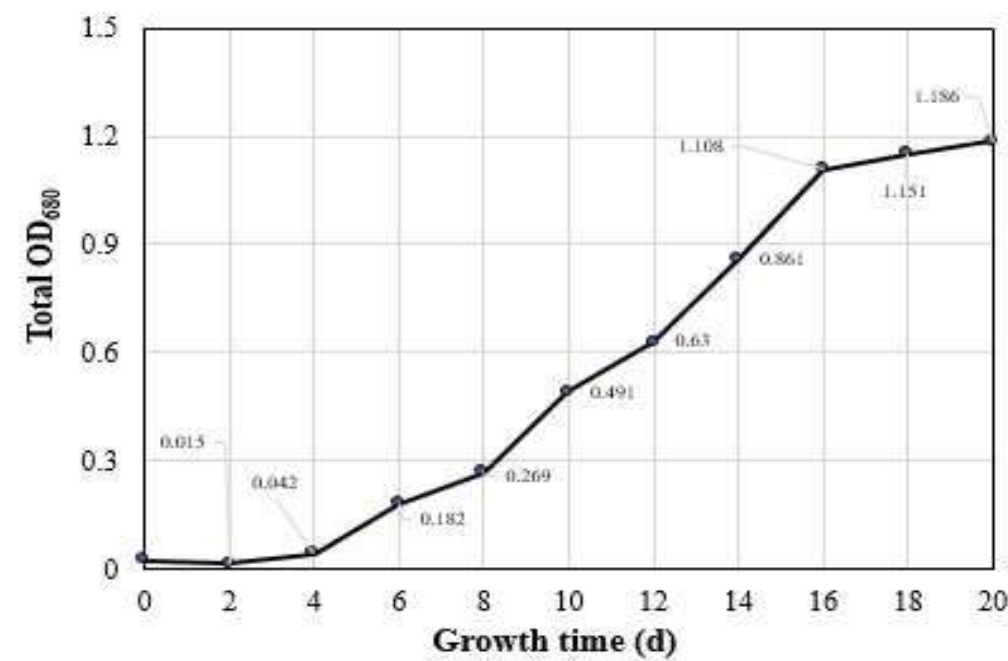
이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

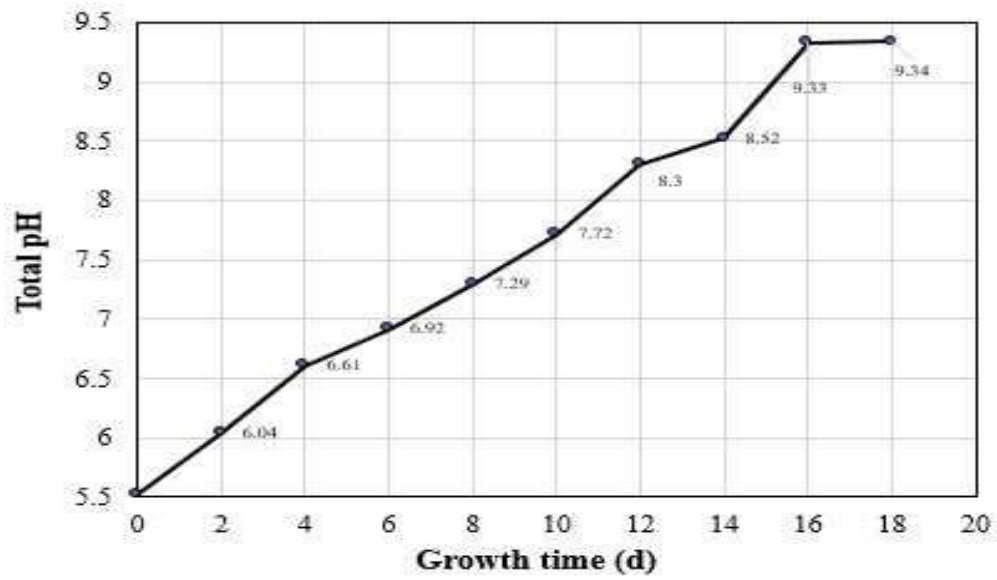
도면1



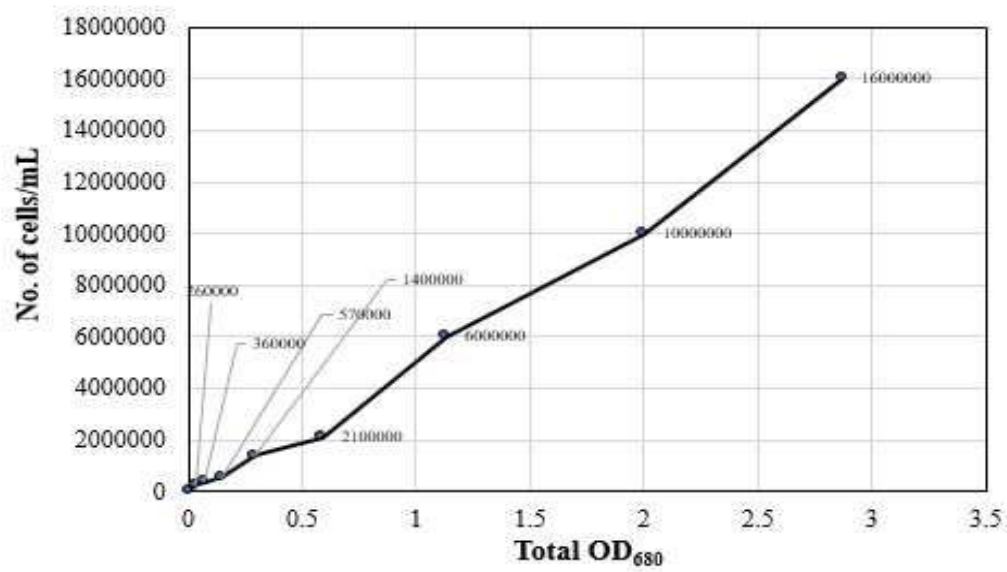
도면2a



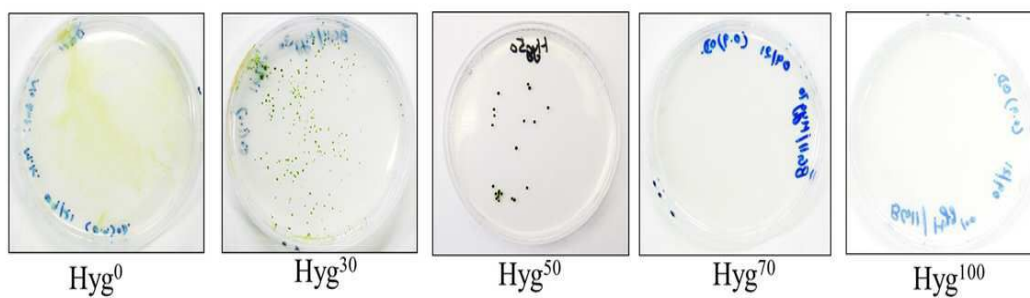
도면2b



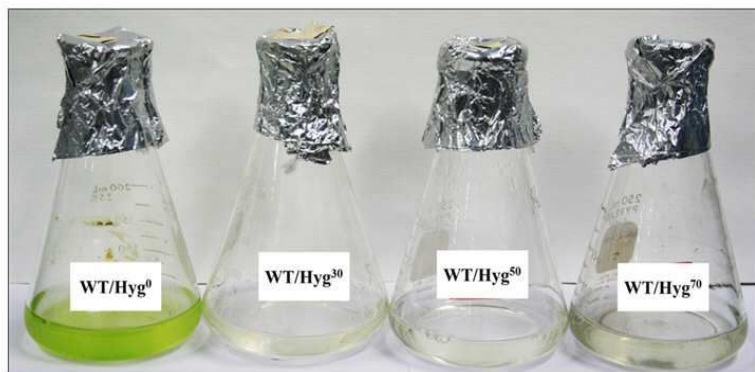
도면2c



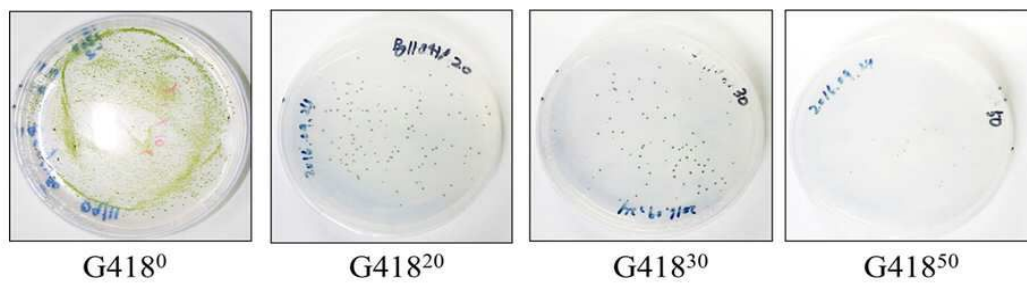
도면3a



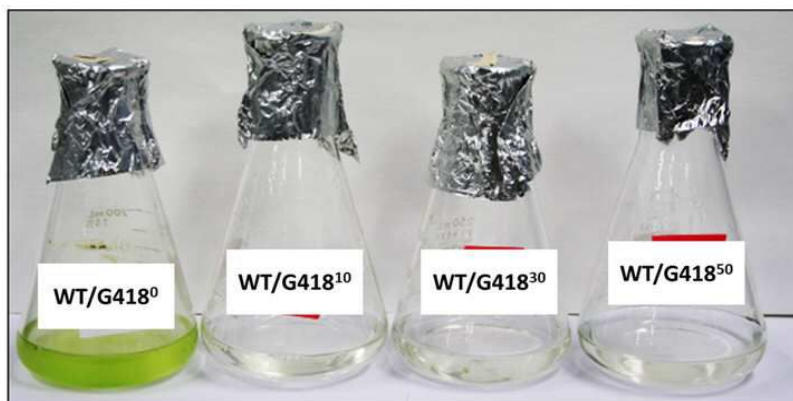
도면3b



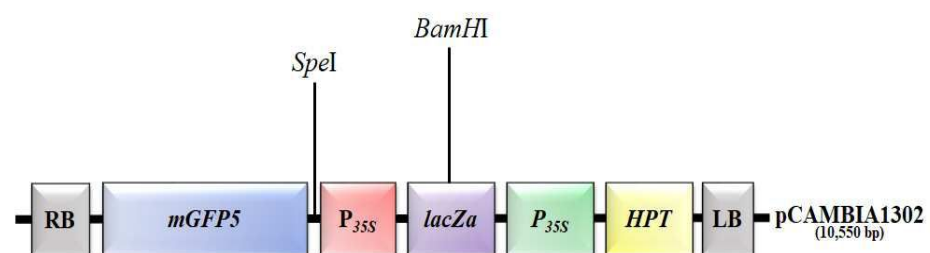
도면3c



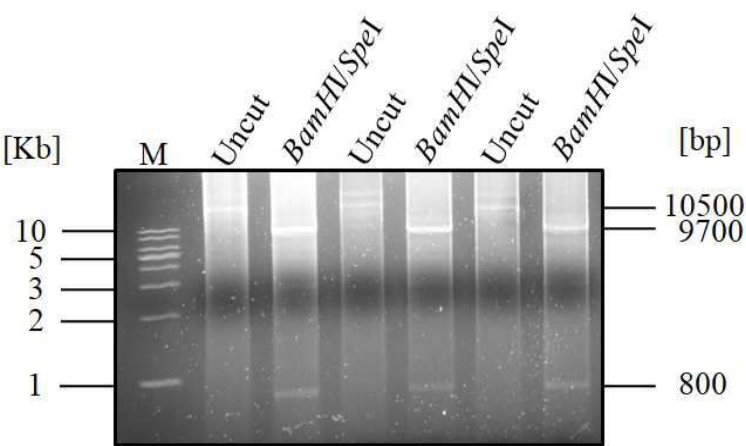
도면3d



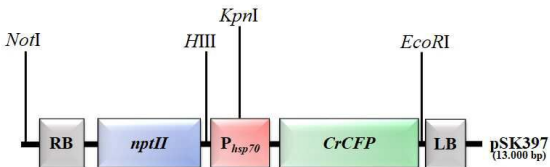
도면4a



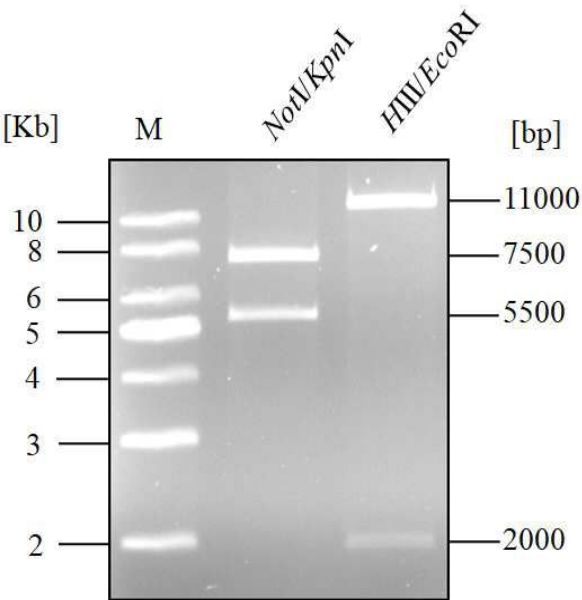
도면4b



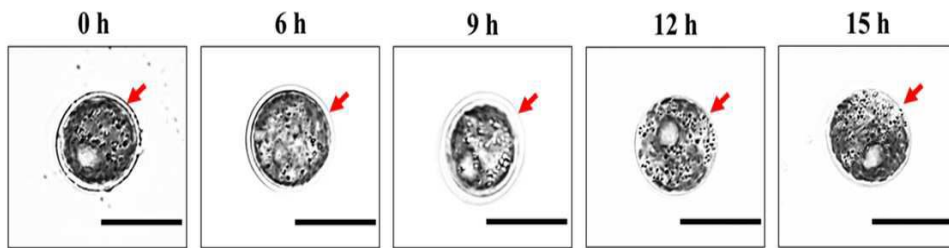
도면4c



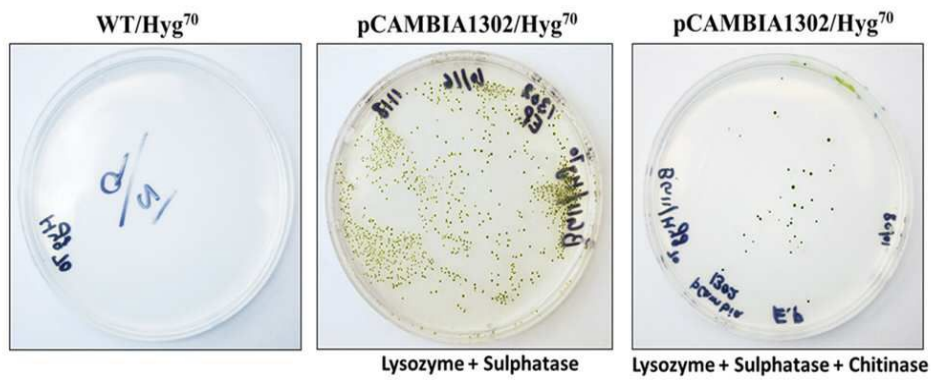
도면4d



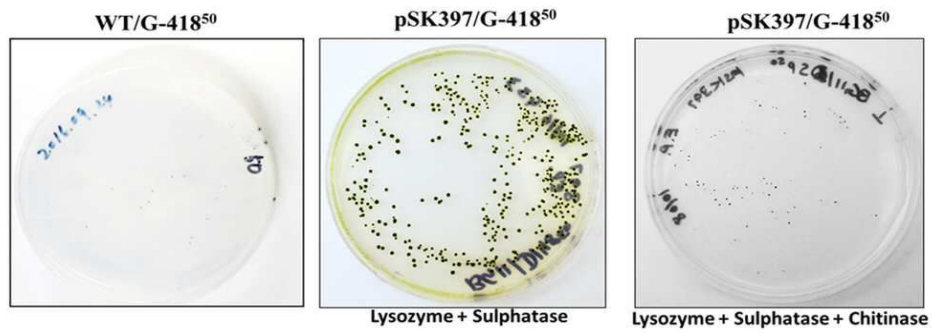
도면5a



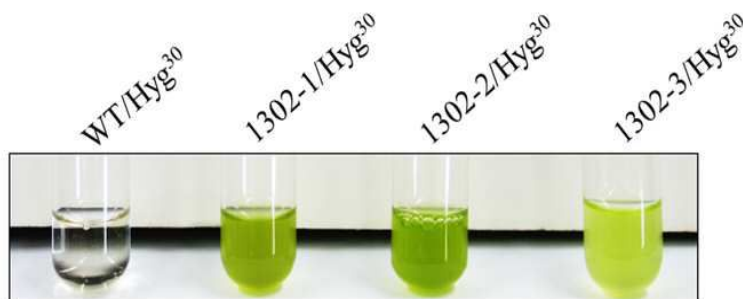
도면5b



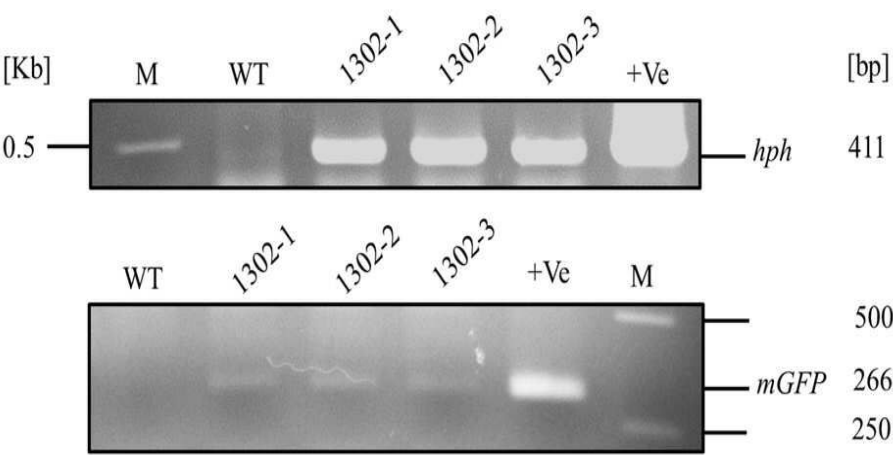
도면5c



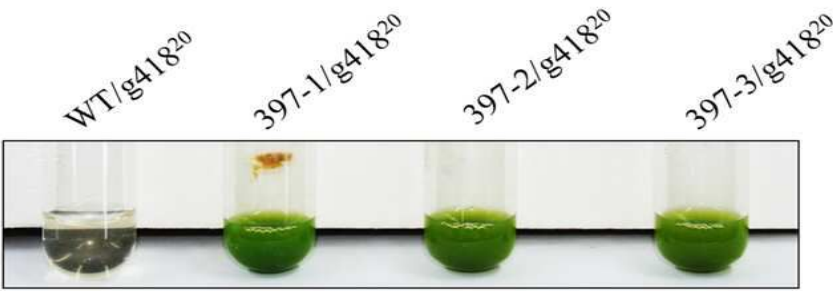
도면6a



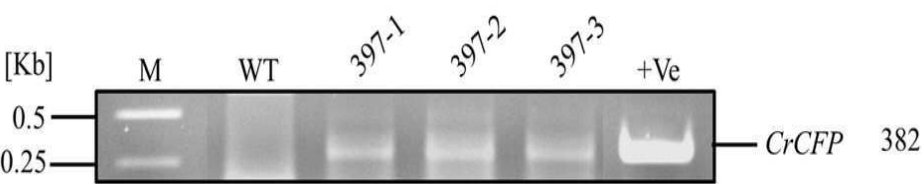
도면6b



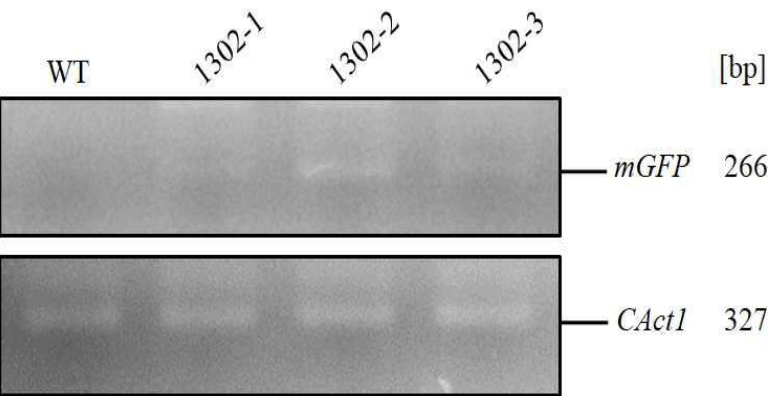
도면6c



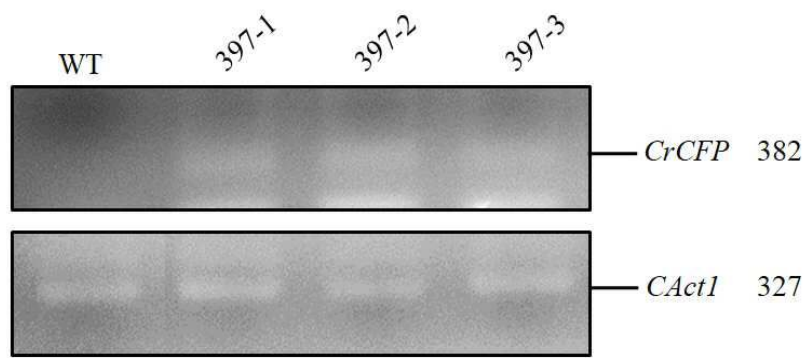
도면6d



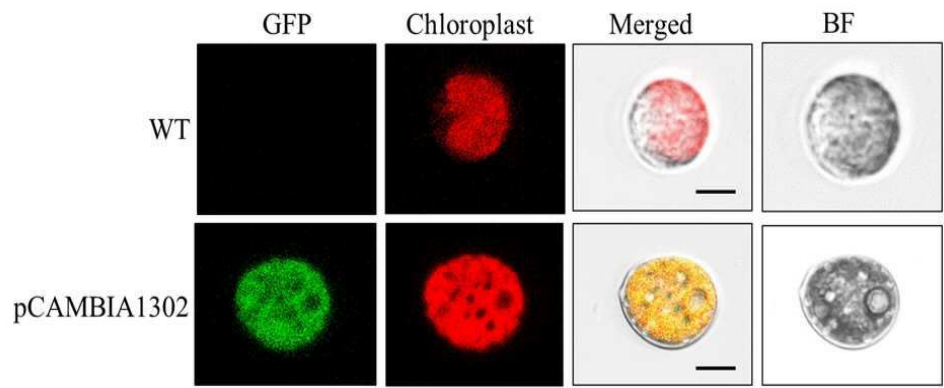
도면7a



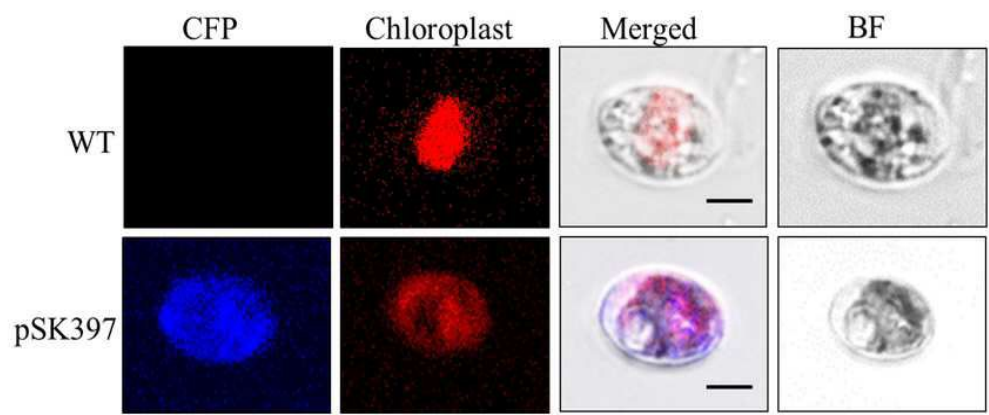
도면7b



도면8a



도면8b



서열 목록

- <110> SOGANG UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION
- <120> Method for Preparing Chlorella vulgaris Transformants
- <130> PN170143
- <160> 8

<170> KoPatent In 3.0
 <210> 1
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hphF
 <400> 1
 cgacgtctgt cgagaagttt 20
 <210> 2
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hphR
 <400> 2
 tgtattgacc gattccttgc 20
 <210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> mGFPF
 <400> 3
 tcatatgaag cggcagcact 20
 <210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> mGFPR
 <400> 4
 agttggcttt gatgccgttc 20
 <210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CrCFPF
 <400> 5

gaccacatga agcagcacga 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CrCFPR

<400> 6

tggacaggta gtggttgcg 20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CAct1F

<400> 7

atgctttgcc acatgccatc 20

<210> 8

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CAct1R

<400> 8

ttgtgtcgtg gatgccgtt 19