



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년05월29일

(11) 등록번호 10-1523548

(24) 등록일자 2015년05월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 1/21 (2006.01) *C12N 15/70* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0019164

(22) 출원일자 2014년02월19일

심사청구일자 2014년02월19일

(56) 선행기술조사문헌

논문 1: J BIOTECHNOL.

논문 2: MOLECULAR MICROBIOLOGY

KR1020130010873 A

KR1020030014184 A

(73) 특허권자

울산대학교 산학협력단

울산광역시 남구 대학로 93

(72) 발명자

홍순호

울산광역시 남구 굴화4길 20, 112동 601호 (무거동, 굴화주공1차아파트)

(74) 대리인

특허법인 하나

전체 청구항 수 : 총 9 항

심사관 : 김정태

(54) 발명의 명칭 **아미노산 검출용 재조합 미생물 및 그 제조 방법**

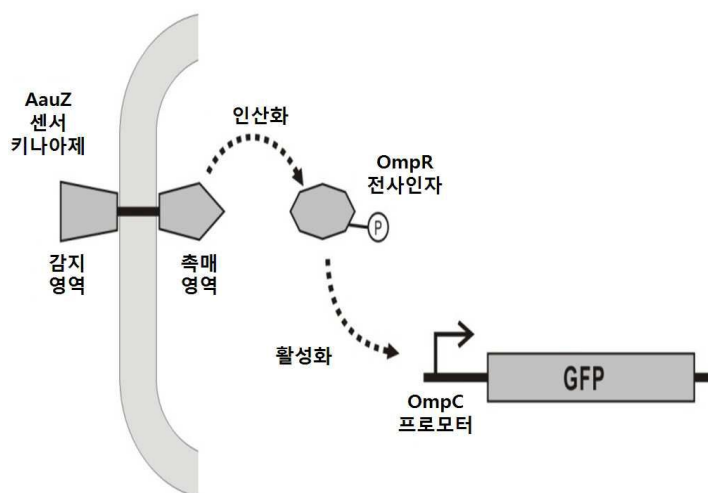
(57) 요약

본 발명의 일측면에 따르면, *AauS* 유전자 및 *EnvZ* 유전자가 융합된 *AauZ* 유전자; 및 *OmpC* 프로모터와 작동가능하게 연결된 형광 단백질(fluorescent protein)을 암호화하는 유전자;를 포함하는 아미노산 검출용 재조합 미생물이 제공된다.

본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 미생물을 배양하여, 미생물 외부의 아미노산을 검출하는 방법이 제공된다.

또한, 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, *AauS* 유전자 및 *EnvZ* 유전자가 융합된 *AauZ* 유전자를 포함하는 제1 재조합 벡터를 제조하는 단계; *OmpC* 프로모터와 작동가능하게 연결된 형광 단백질(fluorescent protein)을 암호화하는 유전자를 포함하는 제2 재조합 벡터를 제조하는 단계; 및 상기 제1 재조합 벡터 및 제2 재조합 벡터를 숙주 세포에 도입하는 단계;를 포함하는 아미노산 검출용 재조합 미생물 제조방법이 제공된다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ00954904

부처명 화학공학부

연구관리전문기관 농촌진흥청

연구사업명 차세대바이오그린21사업

연구과제명 바이오부품화와 모듈화 및 lego-like 조립을 통한 유용산물 생산용 숙주 개발

기 여 율 1/1

주관기관 울산대학교

연구기간 2013.02.01 ~ 2014.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

AauS 유전자 및 *EnvZ* 유전자가 융합된 *AauZ* 유전자; 및 *OmpC* 프로모터와 작동가능하게 연결된 형광 단백질(fluorescent protein)을 암호화하는 유전자;를 포함하는 아미노산 검출용 재조합 미생물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 *AauS* 유전자는 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*)로부터 유래하고, 상기 *EnvZ* 유전자는 대장균(*Escherichia coli*)으로부터 유래하는 아미노산 검출용 재조합 미생물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 *AauS* 유전자는 서열번호 1의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산서열을 가지고, 상기 *EnvZ* 유전자는 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산서열을 가지는 아미노산 검출용 재조합 미생물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 형광 단백질(fluorescent protein)을 암호화하는 유전자는 GFP(green fluorescent protein), EGFP(enhanced green fluorescent protein), GFPuv(cycle 3 variant of GFP), EBFP(enhanced blue fluorescent protein), ECFP(enhanced cyan fluorescent protein) 또는 YFP(yellow fluorescent protein)을 암호화하는 유전자인 아미노산 검출용 재조합 미생물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 재조합 미생물은 대장균(*Escherichia coli*)인 아미노산 검출용 재조합 미생물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 미생물을 배양하여, 미생물 외부의 아미노산을 검출하는 방법.

청구항 7

AauS 유전자 및 *EnvZ* 유전자가 융합된 *AauZ* 유전자를 포함하는 제1 재조합 벡터를 제조하는 단계;

OmpC 프로모터와 작동가능하게 연결된 형광 단백질(fluorescent protein)을 암호화하는 유전자를 포함하는 제2 재조합 벡터를 제조하는 단계; 및

상기 제1 재조합 벡터 및 제2 재조합 벡터를 숙주세포에 도입하는 단계;를 포함하는 아미노산 검출용 재조합 미

생물 제조방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 *AauS* 유전자는 서열번호 1의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산서열을 가지고, 상기 *EnvZ* 유전자는 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산서열을 가지는 아미노산 검출용 재조합 미생물 제조방법.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 형광 단백질(fluorescent protein)을 암호화하는 유전자는 GFP(green fluorescent protein), EGFP(enhanced green fluorescent protein), GFPuv(cycle 3 variant of GFP), EBFP(enhanced blue fluorescent protein), ECFP(enhanced cyan fluorescent protein) 또는 YFP(yellow fluorescent protein)을 암호화하는 유전자인 아미노산 검출용 재조합 미생물 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 외부에 존재하는 아미노산을 검출하기 위한 재조합 미생물 및 그 제조방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 미생물에 존재하는 외부환경을 인지하는 센서시스템을 유전적으로 변형시켜 아미노산을 검출하는데 유용한 재조합 미생물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 아미노산은 1909년 상업화된 이후 수 세기 동안 식품첨가물로 활용되거나, 산업적으로 이용되어 왔다. 아미노산 중 글루타메이트(glutamate), 라이신(lysine), 트립토판(tryptophan), 메티오닌(methionine) 및 트레오닌(threonine)등은 가장 많이 생산되고 있다. 특히, 글루타메이트는 생물체의 단백질을 구성하는 물질로서, 고유의 정미력과 감칠맛을 가지고 있어 가정용 및 가공식품 생산을 위한 조미료로 널리 이용되고 있다.

[0003] 매년 150만 톤의 글루타메이트가 생산되고 있으며, 아미노산의 산업적 중요성 때문에 아미노산 생산성을 개선하기 위한 다양한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 아미노산을 생산하는 박테리아의 물질대사에 대한 집중적인 연구에도 불구하고, 아미노산 생산과 관련된 다양한 기작(mechanism)은 아직 명확하게 밝혀지지 않은 실정이다.

[0004] 지속적인 시행착오를 거친 연구활동은 효율적인 아미노산 생산자의 개발을 위해 요구되며, 특히, 신속하고 정확한 스크리닝 방법은 효과적으로 아미노산 생산자를 발굴할 수 있도록 한다.

[0005] 상기 개선된 스크리닝 방법의 구현을 위해 박테리아의 센서시스템이 하나의 스크리닝 도구로서 각광 받고 있다.

[0006] 모든 생명체는 외부환경의 변화를 신속하고 정확하게 인지하고 그에 따라 유전체 발현을 조절함으로써 계속적으로 변화하는 환경에 적응하여 생명을 유지할 수 있도록 다양한 신호전달기전(signal transduction system)을 가지고 있다. 박테리아의 2개-인자 신호전달계 (two-component signal transduction system)가 대표적인 예이며, 대사, 생물막 형성, 병원성, 군밀도 조절을 포함한 거의 모든 세포 활성 조절에 관여하고 있다 (Hoch & Silhavy, 1995).

[0007] 이와 관련하여 대장균의 EnvZ-OmpR 2개-인자 신호전달계는 대표적인 박테리아 유래 시스템으로서, 각종 신호전달계의 단백질을 구성하는 도메인의 기능을 비교 연구하는 수단으로 가장 많이 활용되고 있으며, 특히 세포막을 경계로 외부 환경 또는 신호전달 물질 변화를 감지하는 감지도메인(sensing domain) 연구에 활발히 이용되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명은 글루타메이트를 포함하는 각종 아미노산(amino acid)을 검출함에 있어 유용하게 활용 가능하도록 2개-인자 신호전달계가 유전적으로 형질 전환된 재조합 미생물을 제공하고자 한다.
- [0009] 또한, 상기 형질 전환된 재조합 미생물의 제조 방법 및 상기 재조합 미생물을 이용한 아미노산 검출 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0010] 본 발명의 일 측면에 따르면, *AauS* 유전자 및 *EnvZ* 유전자가 융합된 *AauZ* 유전자; 및 *OmpC* 프로모터와 작동가능하게 연결된 형광 단백질(fluorescent protein)을 암호화하는 유전자;를 포함하는 아미노산 검출용 재조합 미생물이 제공된다.
- [0011] 일 실시예에 따르면, 상기 *AauS* 유전자는 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*)로부터 유래하고, 상기 *EnvZ* 유전자는 대장균(*Escherichia coli*)으로부터 유래할 수 있다.
- [0012] 일 실시예에 따르면, 상기 *AauS* 유전자는 서열번호 1의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산서열을 가지고, 상기 *EnvZ* 유전자는 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산서열을 가질 수 있다.
- [0013] 일 실시예에 따르면, 상기 형광 단백질(fluorescent protein)을 암호화하는 유전자는 GFP(green fluorescent protein), EGFP(enhanced green fluorescent protein), GFPuv(cycle 3 variant of GFP), EBFP(enhanced blue fluorescent protein), ECFP(enhanced cyan fluorescent protein) 또는 YFP(yellow fluorescent protein)을 암호화하는 유전자일 수 있다.
- [0014] 일 실시예에 따르면, 상기 재조합 미생물은 대장균(*Escherichia coli*)일 수 있다.
- [0015] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 미생물을 배양하여, 미생물 외부의 아미노산을 검출하는 방법이 제공된다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, *AauS* 유전자 및 *EnvZ* 유전자가 융합된 *AauZ* 유전자를 포함하는 제1 재조합 벡터를 제조하는 단계; *OmpC* 프로모터와 작동가능하게 연결된 형광 단백질(fluorescent protein)을 암호화하는 유전자를 포함하는 제2 재조합 벡터를 제조하는 단계; 및 상기 제1 재조합 벡터 및 제2 재조합 벡터를 숙주세포에 도입하는 단계;를 포함하는 아미노산 검출용 재조합 미생물 제조방법이 제공된다.
- [0017] 일 실시예에 따르면, 상기 *AauS* 유전자는 서열번호 1의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산서열을 가지고, 상기 *EnvZ* 유전자는 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산서열을 가질 수 있다.
- [0018] 일 실시예에 따르면, 상기 형광 단백질(fluorescent protein)을 암호화하는 유전자는 GFP(green fluorescent protein), EGFP(enhanced green fluorescent protein), GFPuv(cycle 3 variant of GFP), EBFP(enhanced blue fluorescent protein), ECFP(enhanced cyan fluorescent protein) 또는 YFP(yellow fluorescent protein)을 암호화하는 유전자일 수 있다.

발명의 효과

- [0019] 본 발명의 일 측면에 따른 재조합 미생물은 효율적으로 외부에 존재하는 아미노산을 인지하고 형광 발현을 통해 사용자가 검출 결과를 간단히 확인할 수 있도록 하며, 미량의 아미노산에도 민감하게 반응하므로, 낮은 농도의 아미노산도 쉽게 검출할 수 있다.
- [0020] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 특허청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

- [0021] 도 1은 일 실시예에 따른 아미노산 검출용 재조합 미생물의 기작을 도식화한 것이다.
- 도 2는 일 실시예에 따른 제1 재조합 벡터의 개열지도이다.
- 도 3은 일 실시예에 따른 제2 재조합 벡터의 개열지도이다.
- 도 4는 실험예 1에 따라 *OmpC* 유전자의 발현 정도를 측정한 결과이다.
- 도 5는 실시예 1에 따라 LB 배지에서 배양한 재조합 미생물의 글루탐산 농도에 따른 형광 발현 정도를 나타낸 것이다.
- 도 6은 실시예 2에 따라 M9 배지에서 배양한 재조합 미생물의 글루탐산 농도에 따른 형광 발현 정도를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 본 발명의 이점들과 특징들 및 이를 수행하는 방법들은 하기 실시예들에 대한 상세한 설명 및 첨부된 도면들을 참조함으로써 더욱 용이하게 이해될 수 있을 것이다. 그러나, 본 발명은 많은 다양한 형태로 실시될 수 있으며, 여기서 언급한 실시예들로만 한정되어 구성되는 것은 아니다.
- [0023] 본 발명에서 사용된 용어는 별도의 언급이 없다면 하기와 같은 의미를 갖는다. 또한, 여기에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 명세서에서 별도의 언급이 없다면 당업자에게 통상적으로 이해되는 의미를 갖는다.
- [0024] 이하 첨부된 도면을 참고하여 본 발명의 실시예를 상세히 설명한다.

[0025] 재조합 미생물

- [0026] 본 발명의 일 측면에 따르면, *AauS* 유전자 및 *EnvZ* 유전자가 융합된 *AauZ* 유전자; 및 *OmpC* 프로모터와 작동가능하게 연결된 형광 단백질(fluorescent protein)을 암호화하는 유전자;를 포함하는 아미노산 검출용 재조합 미생물이 제공된다.
- [0027] 본 명세서에서 사용된, 용어 "숙주 세포(host cell)"는 상기 발현 벡터를 위한 숙주로서 수행하는 세포로부터의 적합한 세포를 의미한다. 적합한 숙주 세포는 자연적으로 발생하거나 또는 야생형 숙주 세포일 수 있고, 또는 변화된 숙주세포일 수 있다. "야생형 숙주 세포(wild-type host cell)"은 재조합 방법을 통해 유전적으로 변화되지 않은 숙주 세포이다.
- [0028] 상기 "변화된 숙주 세포(altered host cell)"는 유전적으로 설계된 숙주 세포를 의미하며, 여기서 목적 단백질은 발현의 수준으로 생성되거나 발현의 수준보다 더 큰 수준으로 생성되거나 본질적으로 동일한 성장 조건 하에서 성장하는 미변화된 또는 야생형 숙주 세포내에서의 목적 단백질의 발현의 수준보다 큰 발현의 수준으로 발현된다. "변형 숙주 세포(modified host cell)"은 목적 단백질을 암호화하는 유전자를 과발현되도록 유전적으로 설계되는 야생형 또는 변화된 숙주 세포를 의미한다. 변형 숙주 세포는 야생형 또는 변화된 모 숙주 세포보다 더 높은 수준으로 목적 단백질을 발현할 수 있다.
- [0029] 예를 들면, 유전 물질의 부모 미생물 내로의 도입은 화학 물질을 생산하는 새롭거나 변형된 능력을 결과할 수 있다. 부모 미생물에 도입된 유전 물질은 화학 물질 생산을 위한 생합성 경로에 관여하는 하나 이상의 효소를 암호화하는 유전자 또는 유전자의 일부를 포함하고, 이들 유전자의 발현 또는 발현 조절을 위한 추가 구성요소, 예를 들면, 프로모터 서열을 포함할 수도 있다.
- [0030] 따라서, 대사 "조작된(engineered)" 또는 "변형된(modified)" 미생물은 유전 물질을 선택된 숙주 또는 부모 미생물 내로 도입하여 미생물의 세포 생리와 생화학을 변형하거나 변경함으로써 생산된다. 유전 물질의 도입을 통해, 부모 미생물은 새로운 성질, 예를 들면, 새로운 세포내 대사산물 또는 더욱 많은 양의 세포내 대사산물을 생산하는 능력을 획득할 수 있다.
- [0031] 상기 아미노산 검출용 재조합 미생물은 외부 환경 인식 시스템인 2개-인자 신호전달계가 계량되고, 형광 단백질을 발현할 수 있도록 유전적으로 변형되어 있으므로 글루탐산을 포함한 아미노산을 감지하여 발광할 수 있다.
- [0032] 상기 재조합 미생물은 박테리아, 곰팡이, 효모를 포함한 당업계에 공지된 것이라면 어느 것이나 사용될 수

있다.

- [0033] 일 실시예에 따르면, 상기 미생물은 대장균(*Escherichia coli*)일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0034] 일반적으로 박테리아는 다양한 장치를 통해 외부의 환경을 인식할 수 있으며, 2개-인자 신호전달계는 가장 효과적인 환경 인식 센서 중 하나이다.
- [0035] 상기 2개-인자 신호전달계는 센서 키나아제(sensor kinase) 및 반응 조절체(response regulator)를 기본 구성으로 포함할 수 있으며, 상기 센서 키나아제가 외부의 자극을 인식하면 대응하는 반응 조절체를 인산화시켜 활성화 한다. 상기 인산화된 반응 조절체는 외부 자극에 따라 관련된 유전자의 전사를 유도하여 특정 단백질의 발현을 조절할 수 있다.
- [0036] 상기 *AauS* 유전자는 일종의 히스티딘 키나아제(histidine kinase)를 암호화 하는 유전자로서, 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*)로부터 유래할 수 있다.
- [0037] 상기 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*)의 게놈(genome)은 적어도 50개의 상이한 2개-인자 신호전달계를 구성하는 130개 이상의 센서 키나아제(sensor kinase) 및 반응 조절체(response regulator)를 암호화 하는 것으로 알려져 있으며, 상기 신호전달계를 통해 아미노산을 포함한 여러 종류의 탄소원 및 질소원을 신진대사시킬 수 있다.
- [0038] 특히, 상기 *AauS* 유전자가 암호화하는 *AauS* 단백질은 *AauR* 단백질과 함께 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*)의 2개-인자 신호전달계를 구성할 수 있으며, 상기 *AauS* 단백질은 글루타메이트(glutamate), 아스파르테이트(aspartate), 글루타민(glutamine) 등을 인식한다고 알려져 있다. (APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Oct. 2006, p. 6569-6577)
- [0039] 즉, 상기 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*)에서 유래한 2개-인자 신호전달계는 감지 영역(sensing domain)을 이루는 상기 *AauS* 단백질 및 조절 영역(regulator domain)을 이루는 *AauR* 단백질을 포함할 수 있다.
- [0040] 이어서, 상기 *EnvZ* 유전자는 *EnvZ*-*OmpR* 2개-인자 신호전달계를 구성하는 *EnvZ* 단백질을 암호화하며, 상기 *EnvZ*-*OmpR* 2개-인자 신호전달계는 대장균(*Escherichia coli*)에서 유래할 수 있다.
- [0041] 상기 *EnvZ*-*OmpR* 2개-인자 신호전달계는 대표적인 세균 유래 시스템으로써, 상기 *EnvZ* 단백질은 용질 농도 변화에 대한 수용체 단백질이다. 상기 *EnvZ* 단백질은 막 관통 단백질로 원형질막을 관통하며 외막을 향해 주변 세포질로 뻗어나와 있으며, ATP를 분해하여 자신의 히스티딘 잔기에 붙이는 자가 인산화(autophosphorylation)를 촉매할 수 있다.
- [0042] 상기 인산화로 인해 상기 *EnvZ* 단백질은 구조가 변화하여 *OmpR* 전사인자와 결합하며, 이를 통해 *OmpR*을 인산화한다. 상기 *OmpR* 전사인자는 인산화되어 활성화되고, 활성화된 *OmpR*은 *OmpC* 전사를 촉진할 수 있다.
- [0043] 상기 *Omp* 유전자는 세포 표층에 있는 외막을 구성하는 단백질을 암호화 하는 유전자를 총칭하는 것으로, 특히 *OmpC* 단백질은 친수성 저분자물질에 대한 투과공(孔)을 형성하고 있어 그 합성은 통상적으로 삼투압을 감지하는 *EnvZ* 단백질 및 *OmpR* 전사인자에 의해 조절될 수 있다.
- [0044] 본 발명의 아미노산 검출용 재조합 미생물은 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*) 및 대장균(*Escherichia coli*)에서 유래한 2개-인자 신호전달계를 융합하여, 계 외부의 아미노산을 인식하고 이 경우 발광을 통해 식별 가능하도록 형질 전환되었다.
- [0045] 즉, 상기 *AauS* 단백질의 감지 영역 (sensing domain) 및 *EnvZ* 단백질의 촉매 영역(catalytic domain)을 융합하여 *AauZ* 센서 키나아제로 명명된 융합 단백질을 구축하였다.
- [0046] 상기 *AauZ* 단백질은 아미노산을 감지할 수 있도록 미생물 내로 도입되며, 상기 *AauZ* 단백질을 암호화하는 *AauZ* 유전자에 의해 형질 전환된 미생물은 계 외부의 아미노산을 인식하고 발광할 수 있다.
- [0047] 본 명세서에서 사용된, 용어 "형질전환된(transformed)" 또는 "안정적으로 형질전환된(stably transformed)"은 게놈 내로 통합되는 비-고유의 이중적인 폴리뉴클레오티드 서열 또는 2 이상의 세대 동안 유지되는 에피솜 플라스미드에 존재하는 이중의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 세포를 의미한다.
- [0048] 또한, 용어 "도입된(introduced)"은 핵산 서열을 상기 숙주 세포내로 옮기는 임의의 적절한 방법을 의미한다. 도입의 방법은 원형질 융합, 감염(transfection), 형질전환, 컨주게이션, 형질도입을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다(예컨대, Ferrari et al., "Genetics," in Hardwood et al.(eds.), (Bacillus), Plenum

Publishing Corp., pages 57-72, [1989] 참조).

- [0049] 일 실시예에 따르면, 상기 *AauS* 유전자는 서열번호 1의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산서열을 가지고, 상기 *EnvZ* 유전자는 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산서열을 가질 수 있다.
- [0050] 또한, 상기 융합된 *AauZ* 단백질은 서열번호 15인 아미노산 서열을 가질 수 있다.
- [0051] 본 명세서에서 상호교환적으로 사용된, 용어 "폴리뉴클레오티드(polynucleotide)" 및 "핵산(nucleic acid)"은 임의의 길이의 뉴클레오티드의 폴리머성 형태를 의미한다. 이는 단일 나선 DNA, 이중 나선 DNA, 게놈 DNA, cDNA, 또는 퓨린 및 피리미딘 염기 또는 다른 자연적, 화학적, 생화학적으로 변형, 비-자연적 또는 유도화된 뉴클레오티드 염기를 포함하는 폴리펩티드를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0052] 상기 폴리뉴클레오티드의 비제한적 예는 유전자, 유전자 단편, 염색체 단편, ESTs, 엑손, 인트론, mRNA, tRNA, rRNA, 리보자임, cDNA, 재조합 폴리뉴클레오티드, 분지형 폴리뉴클레오티드, 플라스미드, 벡터, 임의의 서열의 단리된 DNA, 임의의 서열의 단리된 RNA, 핵산 프로브, 및 프라이머를 포함한다.
- [0053] 상기 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열은 유전자 암호의 축중(degeneracy)의 결과로써 복수개가 생성될 수 있다.
- [0054] 상기 재조합 미생물은 계 외부의 아미노산 인식에 따라 발광할 수 있도록 형광 단백질(fluorescent protein)을 암호화하는 유전자를 포함할 수 있다.
- [0055] 상기 형광 단백질(fluorescent protein)을 암호화하는 유전자는 GFP(green fluorescent protein), EGFP(enhanced green fluorescent protein), GFPuv(cycle 3 variant of GFP), EBFP(enhanced blue fluorescent protein), ECFP(enhanced cyan fluorescent protein) 또는 YFP(yellow fluorescent protein)을 암호화하는 유전자일 수 있으나, 빛을 내거나 변색하는 등 외부에서 인식할 수 있도록 표현되는 유전자라면 특별히 제한되지 아니한다.
- [0056] 일 실시예에 따르면, 상기 형광 단백질을 암호화하는 유전자는 서열번호 4의 아미노산 서열을 가지는 녹색 형광 단백질(GFP)을 암호화하는 핵산서열을 가질 수 있다.
- [0057] 상기 형광 단백질(fluorescent protein)을 암호화하는 유전자는 *OmpC* 프로모터와 작동가능하게 연결될(operably linked) 수 있다.
- [0058] 상기 "작동가능하게 연결된(operably linked)"이란 하나의 핵산 단편이 다른 핵산 단편과 결합되어 그의 기능 또는 발현이 다른 핵산 단편에 의해 영향을 받는 것을 말한다. 즉, 상기 형광 단백질을 암호화하는 유전자는 벡터 내에 있는 프로모터에 의해 그 발현이 조절될 수 있도록 연결될 수 있다.
- [0059] 상기 형광 단백질을 암호화하는 유전자로는 실험자가 박테리아를 포함하는 숙주세포에서 클로닝하고자 하는 것이거나 박테리아를 포함하는 숙주세포에서 발현시키고자 하는 것이거나 혹은 박테리아를 포함하는 숙주세포에서 스크리닝하고자 하는 모든 유전자를 사용할 수 있다.
- [0060] 상기 형광 단백질을 암호화하는 유전자는 *OmpC* 프로모터와 작동가능하게 연결되어 있으므로, 상기 *AauZ* 단백질에 의해 발현이 조절될 수 있다.
- [0061] 다시 말해, 도 1에 도식화 된 바와 같이 상기 *AauZ* 단백질의 감지 영역(sensing domain)은 계 외부의 미생물을 감지하고 촉매 영역(catalytic domain)을 활성화시킨다. *EnvZ* 단백질에서 유래한 상기 촉매 영역은 *OmpR* 전사인자를 활성화시키고, 상기 활성화된 *OmpR* 전사인자는 상기 형광 단백질을 암호화하는 유전자와 작동가능하게 연결된 *OmpC* 프로모터와 결합하여 전사를 촉진시키므로, 상기 형광 단백질의 발현이 증가할 수 있다.
- [0062] 이 때, 상기 *OmpR* 전사인자를 암호화하는 유전자는 대장균(*Escherichia coli*)에서 유래할 수 있으며, 또는 상기 재조합 미생물이 본래 보유하고 있는 내인성 유전자(endogenous gene)일 수 있다.
- [0063] 또한, 상기 *OmpR* 전사인자를 암호화하는 유전자는 서열번호 16의 핵산 서열을 가질 수 있다.
- [0064] 따라서, 상기 아미노산 검출용 재조합 미생물은 외부의 아미노산을 인식하는 경우 형광 단백질의 발현이 증가하여 발광하므로, 실험자는 아미노산의 존재여부를 용이하게 식별할 수 있다.
- [0065] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 미생물을 배양하여, 미생물 외부의 아미노산을 검출하는 방법이 제공된다.
- [0066] 상기 아미노산 검출용 재조합 미생물은 계 외부의 아미노산을 인식하고, 그에 따라 발광할 수 있으므로 특정 배

지에 상기 재조합 미생물을 배양함으로써 아미노산의 존재 여부를 용이하게 판단할 수 있다.

[0067] 상기 재조합 미생물의 아미노산 농도에 따른 발광 여부는 하기 실시예에서 상세히 기술된다.

[0068] 재조합 미생물 제조방법

[0069] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, *AauS* 유전자 및 *EnvZ* 유전자가 융합된 *AauZ* 유전자를 포함하는 제1 재조합 벡터를 제조하는 단계; *OmpC* 프로모터와 작동가능하게 연결된 형광 단백질(fluorescent protein)을 암호화하는 유전자를 포함하는 제2 재조합 벡터를 제조하는 단계; 및 상기 제1 재조합 벡터 및 제2 재조합 벡터를 숙주세포에 도입하는 단계;를 포함하는 아미노산 검출용 재조합 미생물 제조방법이 제공된다.

[0070] 일 실시예에 따르면, 상기 *AauS* 유전자는 서열번호 1의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산서열을 가지고, 상기 *EnvZ* 유전자는 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산서열을 가질 수 있다.

[0071] 또한, 상기 형광 단백질(fluorescent protein)을 암호화하는 유전자는 GFP(green fluorescent protein), EGFP(enhanced green fluorescent protein), GFPuv(cycle 3 variant of GFP), EBFP(enhanced blue fluorescent protein), ECFP(enhanced cyan fluorescent protein) 또는 YFP(yellow fluorescent protein)을 암호화하는 유전자일 수 있다.

[0072] 상기 아미노산 검출용 재조합 미생물은 특정 숙주 세포를 상기 *AauZ* 유전자 및 형광 단백질을 암호화하는 유전자를 통해 형질 전환시켜 제조할 수 있다.

[0073] 상기 "벡터"는 연결되어 있는 핵산 단편을 운반하는 데 이용되는 핵산 분자를 의미한다. 이용 가능한 벡터로는 박테리아, 플라스미드, 파지, 코스미드, 에피솜, 바이러스 및 삽입가능한 DNA 단편(즉, 상동재조합에 의해 숙주세포 게놈 안으로 삽입 가능한 단편)을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0074] 벡터의 일종인 "플라스미드"는 내부에 추가적으로 DNA 단편을 연결시킬 수 있는 형태의 이중 가닥 DNA 루프를 의미한다. 또한, "바이러스 벡터"는 추가적인 DNA를 바이러스 게놈 안에 연결시킬 수 있다.

[0075] 상기 벡터는 작동가능하도록 연결된 목적 단백질을 암호화하는 유전자의 발현을 지시할 수 있는데, 이러한 벡터를 "발현 벡터"라고 한다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술의 사용에서 발현 벡터는 플라스미드 형태이므로, 용어 "플라스미드" 및 "벡터"가 상호 교환적으로 사용될 수 있다. 그러나, 바이러스 벡터와 같이 동일한 기능을 수행하는 다른 형태의 발현 벡터들도 포함할 수 있다.

[0076] 일 실시예에 따르면, 상기 제1 재조합 벡터 및 제2 재조합 벡터는 플라스미드 일 수 있다.

[0077] 상기 플라스미드의 개열지도는 도 3 및 도 4에 나타나 있다.

[0078] 상기 벡터는 상기 벡터는 숙주 세포 내로 도입되고, 상기 도입된 벡터에 의해 형질 전환된 재조합 미생물은 상기 *AauZ* 및 형광 단백질을 암호화하는 유전자에 의해 암호화된 단백질을 생산할 수 있다. 경우에 따라, 상기 벡터는 숙주 생물체에 의해 인지되는 프로모터를 포함할 수 있다.

[0079] 상기 프로모터는 GPD(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), TEF(translation elongation factor 1 α), ADH(alcohol dehydrogenase), CYC(cytochrome-c oxidase), INU1(inulinase), PGK1(phosphoglycerate kinase 1), PHO5, TRP1, GAL1, GAL10, hexokinase, pyruvate decarboxylase, phosphofructokinase, triose phosphate isomerase, phosphoglucose isomerase, glucokinase, α -mating factor pheromone, GUT2, T7, nmt, fbp1, AOX1, AOX2, MOX1 및 FMD1로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0080] 상기 벡터는 추가적인 조절 서열을 포함할 수 있다. 적절한 조절 서열의 예는 파지 MS-2의 레플리카아제 유전자의 샤인-달가노 서열 및 박테리오파지 람다의 cII의 샤인-달가노 서열이 대표적이다.

[0081] 또한, 발현 벡터는 형질전환된 숙주세포를 선별하는데 필요한 적절한 마커를 포함할 수 있다. 숙주의 형질전환은 당업계에 널리 알려진 다양한 기술 및 Sambrook의 문헌에 기술되어 있는 기술 중 하나를 사용하여 이루어질 수 있다.

[0082] 예컨대, 상기 당업계에 공지된 형질 전환 방법은 열 충격 방법(heat shock method), 칼슘 포스페이트 침전법, 전기 천공법(electroporation)등이 있으며, 이에 한정되지 않고 유전자 총(gene gun) 및 세포 내로 DNA를 유입시키기 위한 다른 공지의 방법을 이용하여 세포 내로 도입할 수 있다(Wu et al., J. Bio. Chem., 267:963-

967,1992; Wu and Wu, J. Bio. Chem., 263:14621-14624, 1988).

[0083] 이하, 실시예를 통해 본 발명을 더욱 상세히 기술한다.

[0084] 제1 재조합 벡터 제조예

[0085] AauS 감지 영역 및 EnvZ의 촉매 영역을 통합하여 AauZ로 명명된 융합 히스티딘 키나아제(chimera histidine kinase)를 제작하였다.

[0086] 상기 AauZ 융합 단백질을 제조하기 위하여, 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*)로부터 유래한 AauS 유전자 및 대장균(*Escherichia coli*)에서 유래한 EnvZ 유전자를 중합효소 연쇄 반응(PCR) [Sambrook et al, Molecular Cloning, a Laboratory Manual (1989), Cold Spring Harbor Laboratories](PCR 조건: 변성=94℃, 1분/어닐링=55℃, 1분/중합=72℃, 30초, 30회)을 이용하여 증폭하였다.

[0087] 상기 AauS 유전자 증폭을 위하여 AauSF_BamHI(CGG GAT CCA TGA GAC ATT CAT TGC CCT AC, 서열번호 5) 및 AauSR(AGA TCC ACC ACC GCC AGA GCC ACC GCC ACC CAG CGT GGA GAT TTC GTA, 서열번호 6) 프라이머를 사용하였으며, 상기 EnvZ 유전자 증폭을 위하여 EnvZF(GGC GGT GGT GGA TCT GGT GGC GGC GGT TCT ATG GCG GCT GGT GTT AAG, 서열번호 7) 및 EnvZR_HindIII(CCC AAG CTT TTA TTA CCC TTC TTT TGT CGT, 서열번호 8)를 각각 사용하였다.

[0088] 이어서, 상기 AauS 유전자 및 EnvZ 유전자를 오버랩 PCR(overlap PCR) 기법을 통해 융합(AauS-linker-EnvZ)하였으며, 상기 융합된 Aaus-EnvZ 유전자를 BamHI, HindIII 제한효소를 이용하여 pMALp4x 플라스미드에 도입하여 제1 재조합 벡터를 제작하였다.

[0089] 상기 제작된 제1 재조합 벡터의 개열지도는 도 2에 나타내었다.

[0090] 제2 재조합 벡터 제조예

[0091] 형광 단백질을 이용한 리포터 시스템을 구축하기 위하여, OmpC 프로모터와 작동가능하게 연결된 녹색 형광 단백질(GFP)을 암호화하는 유전자가 도입된 플라스미드를 제작하였다.

[0092] 이를 위해, OmpC 프로모터를 중합효소 연쇄 반응[Sambrook et al, Molecular Cloning, a Laboratory Manual (1989), Cold Spring Harbor Laboratories](PCR 조건: 변성=94℃, 1분/어닐링=55℃, 1분/중합=72℃, 30초, 30회)을 통해 증폭하였으며, pUC19 플라스미드에 EcoRI, BamHI 제한효소를 이용하여 도입하였다.

[0093] 상기 OmpC 프로모터는 대장균(*Escherichia coli*)에서 유래할 수 있으며, 서열번호 3의 핵산 서열을 가질 수 있다. 상기 OmpC 프로모터 서열을 증폭하기 위하여 OmpC proF_EcoRI(GAA TTC TTG AAT TAT TAT TGC TTG ATG, 서열번호 9) 및 OmpC proR_BamHI(GGA TCC GTT ATT AAC CCT CTG TTA TAT, 서열번호 10)를 사용하였다.

[0094] 상기 녹색 형광 단백질 유전자를 중합효소 연쇄 반응을 통해 증폭한 후 상기 pUC19 플라스미드에 BamHI, SalI 제한효소를 이용하여 도입하여 제2 재조합 벡터를 제작하였다.

[0095] 상기 녹색 형광 단백질 유전자를 증폭하기 위하여 GFP_F_BamHI (GGA TCC CAT ATG CAG TCT AAA GGA GAA, 서열번호 11) 및 GFP_R_SalI(GTC GAC CTC GAG TTA TTA ATG GTG AT, 서열번호 12)를 사용하였다.

[0096] 상기 제작된 제2 재조합 벡터의 개열지도는 도 3에 나타내었다.

[0097] 재조합 미생물 제조예

[0098] 상기 제작된 제1 재조합 벡터 및 제2 재조합 벡터는 숙주 세포인 *E.coli* BL21에 전기천공법으로 형질 전환한 후 (Appl. Microbiol. Biotechnol. (1999) 52:541-545에 의한 형질 전환법 이용), 카나마이신 (kanamycin) 25mg/L를 함유한 선별 배지에서 상기 재조합 벡터로 형질 전환된 재조합 미생물을 선별하였다.

[0099] 실시예 1

- [0100] 상기 선별된 재조합 미생물을 LB 복합배지(Trypton 10g/l, yeast extract 5g/l, NaCl 10g/l)에서 배양하였다.
- [0101] 실시예 2
- [0102] 상기 선별된 재조합 미생물을 M9 최소배지(CaCl₂ 0.015g/l, Na₂HPO₄ 6g/l, KH₂PO₄ 3g/l, NaCl 0.5g/l, NH₄Cl 1g/l, MgSO₄ 0.5g/l, Glucose 2.0g/l)에서 배양하였다.
- [0103] 실험예 1
- [0104] 상기 제조예에 따라 선별된 재조합 미생물의 *OmpC* 유전자의 전사적 활성을 확인하기 위하여 RT-PCR(reverse transcription PCR) 분석 방법을 사용하였으며, 상기 결과는 도 4에 나타난다.
- [0105] 구체적으로, 상기 재조합 미생물의 콜로니를 최소배지 M9에서 600nm에서의 광학밀도(OD₆₀₀)가 0.5에 이를 때까지 30℃에서 200rpm으로 교반하면서 배양하였다.
- [0106] 이어서, 상기 재조합 미생물 세포에 도입된 *AauZ-OmpR* 유전자의 발현 여부를 살펴보기 위해 여러 아미노산의 농도를 달리하며 4시간동안 추가적으로 배양하였다. 4시간 경과 후, 상기 세포는 RNeasy 미니 키트(Qiagen社)를 사용하여 총 RNA를 분석하기 위해 원심분리를 통해 수득되었으며, DNA 가수분해효소 처리를 하였다.
- [0107] 역전사(reverse transcription)는 random hexamer와 함께 합성 키트(applied biosystems社)를 사용하였으며, 상기 *OmpC* 유전자 및 16sRNA의 정량적 발현을 측정하기 위한 프라이머는 *OmpCRT_F*(ACG GCG GAC ACG GTA TGT, 서열번호 13) 및 *OmpCRT_R*(TTC TGC CAC GCT GTC TGT TG, 서열번호 14)를 각각 사용하였다. 상기 프라이머는 OLIGO 소프트웨어(version 5.0; Molecular Biology Insights, Cascade, CO)를 통해 설계되었다.
- [0108] 상기 RT-PCR은 SYBR GREEN PCR MASTER MIX를 사용하여 Mini Opticon detection system 상에서 수행되었으며, 더욱 정확한 결과를 산출하기 위하여 동일한 조건하에서 3번 수행된 후 평균값을 결과로 나타내었다.
- [0109] 도 4에 나타난 것과 같이 0.1mM의 글루탐산을 첨가한 경우에도, 글루탐산을 첨가하지 않은 경우와 비교하여 *OmpC* 유전자의 발현량이 약 4배 이상 증가하였다. 또한, 글루탐산의 농도를 5mM까지 증가시킨 경우 글루탐산의 농도에 따라 *OmpC* 유전자의 발현량도 함께 증가하였으며, 다만, 10mM에서는 발현량이 더 이상 증가하지 않고 다소 감소하였다.
- [0110] 또한, 아스파탐 및 글루타민을 첨가하여 *OmpC* 유전자의 발현량을 측정한 때에도 상기 글루탐산을 첨가한 경우와 유사한 결과를 나타내었다.
- [0111] 실험예 2
- [0112] 상기 실시예 1 및 실시예 2와 같이 배지의 종류를 달리하는 재조합 미생물의 글루탐산 농도에 따른 형광 발현 정도를 관찰하였다.
- [0113] 실시예 1 및 실시예 2 모두 글루탐산의 농도가 증가함에 따라, 발광 세기가 증가하였으며, 특히, 최소배지 M9를 이용한 실시예 2의 경우에도 LB 복합배지를 이용한 경우와 동일하게 글루탐산 농도가 증가함에 따라 발광 세기가 증가하였다.
- [0114] 상기 실시예 1에 따른 결과는 도 5에 나타나고 있으며, 상기 실시예 2에 따른 결과는 도 6에 나타난다.
- [0115] 즉, 측정 하고자 하는 시료에 포함된 영양분의 종류와 무관하게 글루탐산의 농도에 따라 발광 정도를 달리하므로, 상기 재조합 미생물을 활용하는 경우 시료의 성분과 무관하게 시료에 함유된 글루탐산의 농도를 용이하게 파악할 수 있다.
- [0116] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로

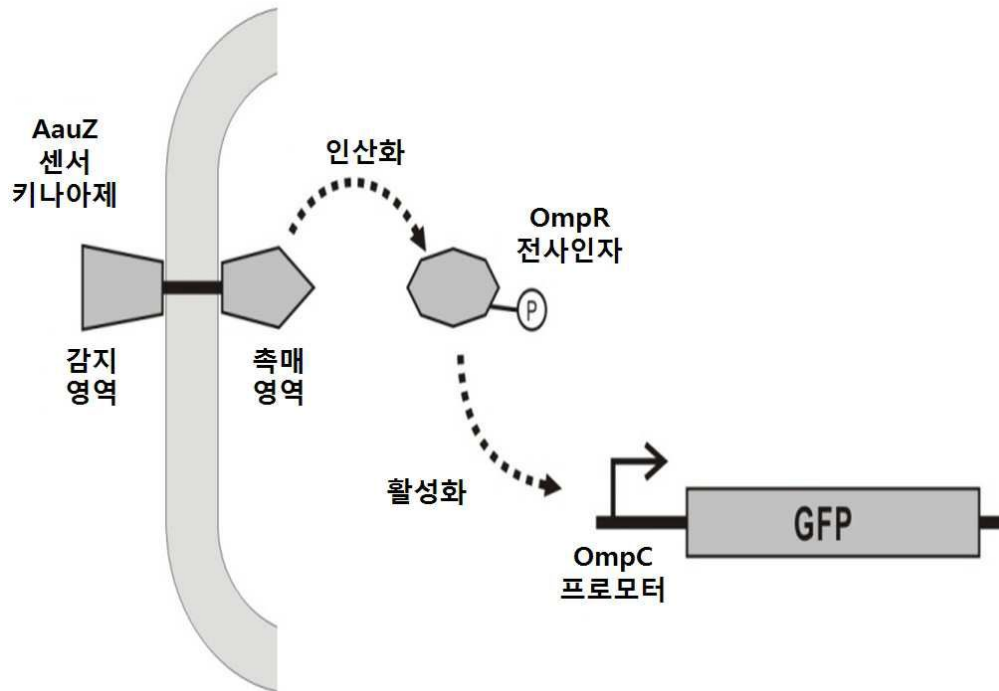
이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

[0117]

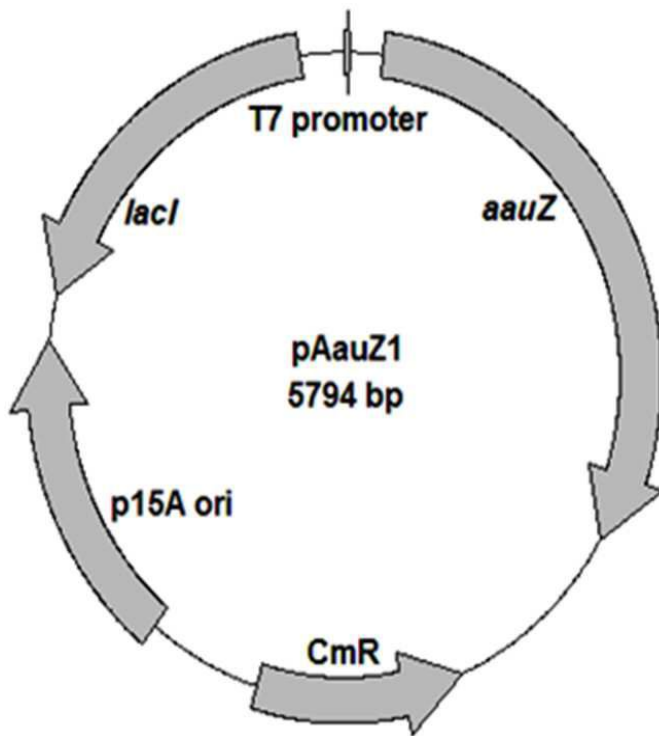
본 발명의 범위는 후술하는 특허청구범위에 의해 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

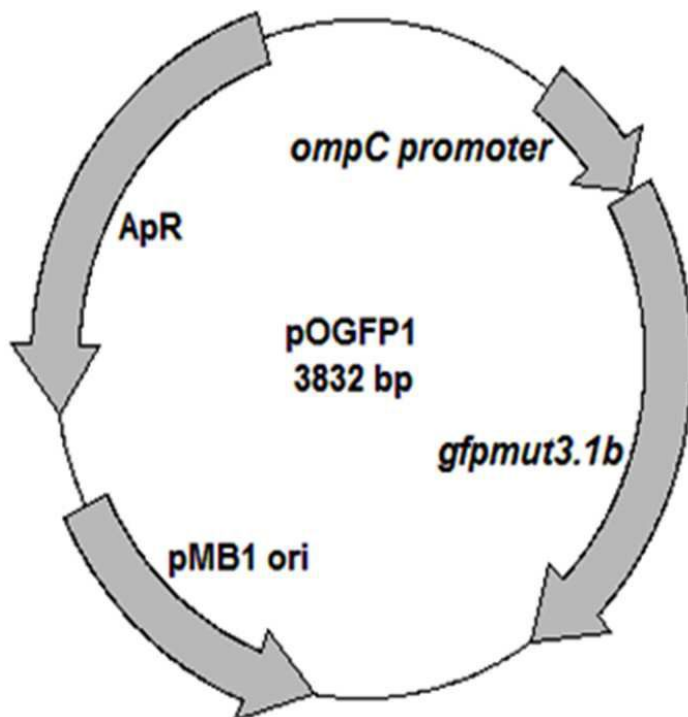
도면1



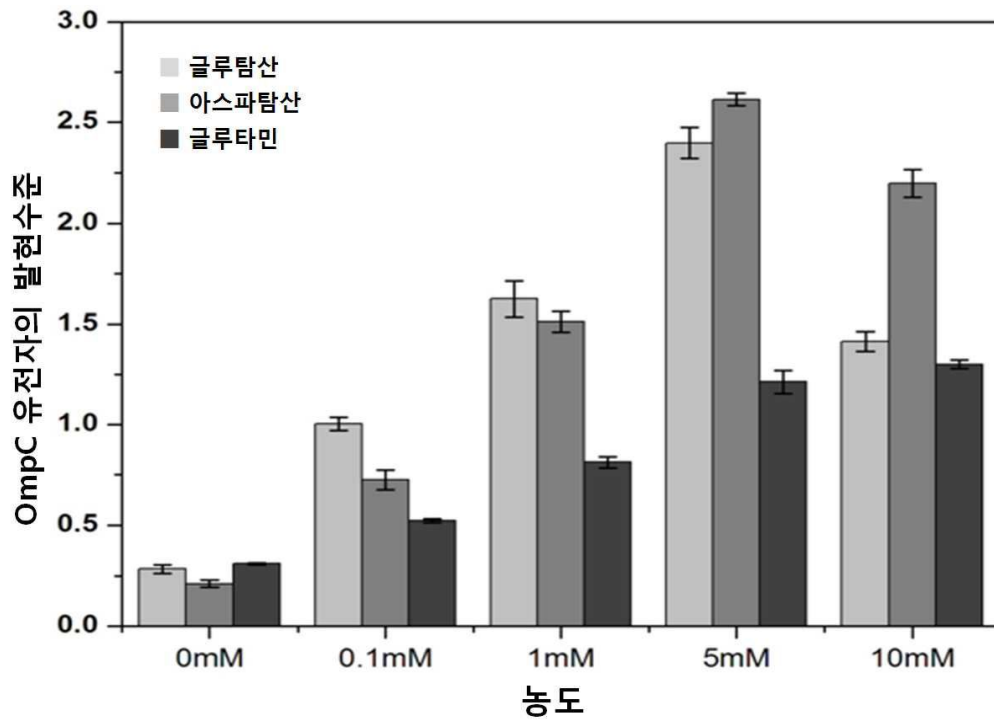
도면2



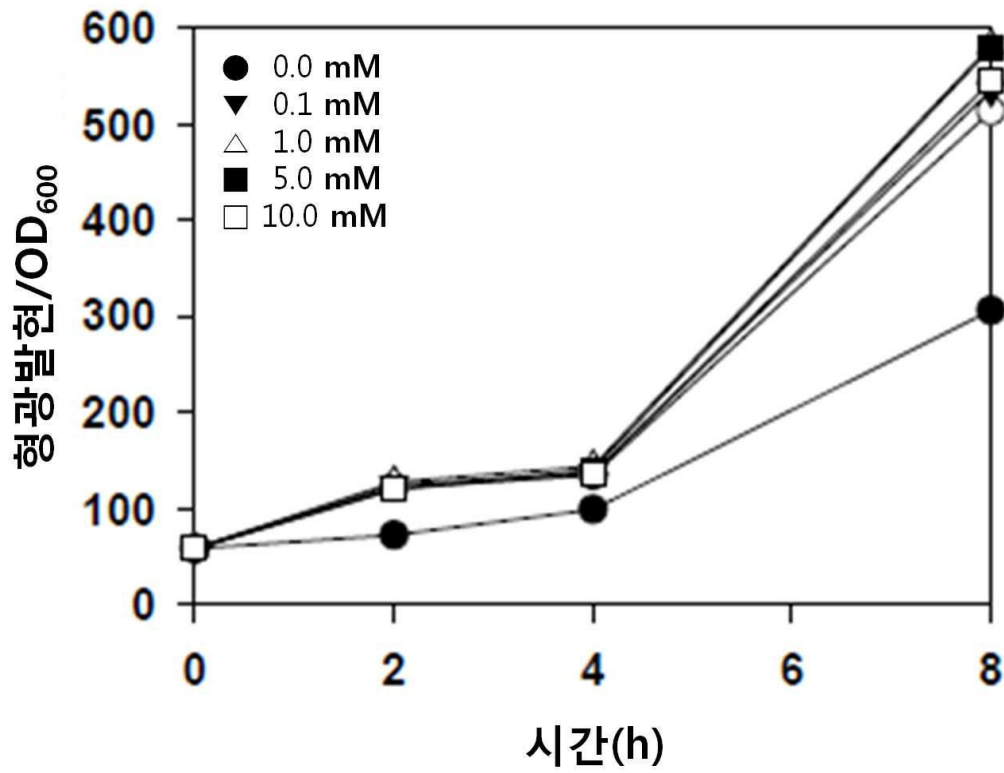
도면3



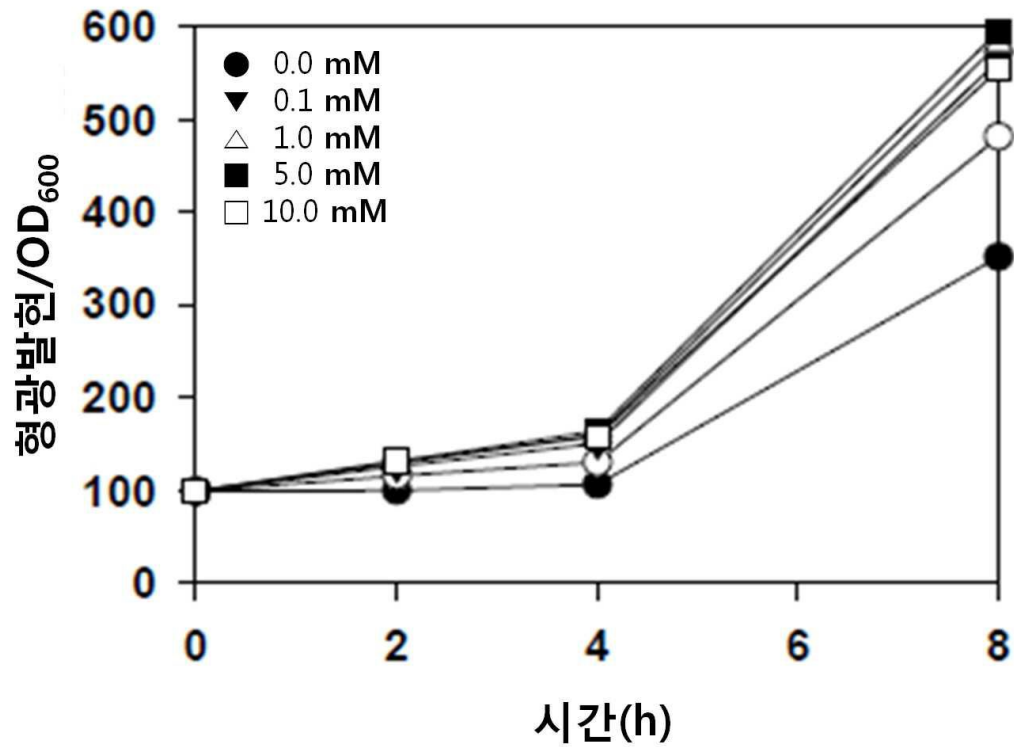
도면4



도면5



도면6



서열목록

<110> university of ulsan

<120> A recombinant microorganism for detecting amino acids, and preparation method thereof

<130> 2014-pp-30029

<160> 16

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 635

<212> PRT

<213> Pseudomonas putida

<400> 1

Met Met Lys Cys Asp Pro Ser Leu Leu Arg Pro Ala Lys Pro Ala Val

1 5 10 15

Asn Ser Arg Leu Ile Arg Gln Leu Leu Leu Pro Pro Leu Ile Ile Leu

20 25 30

Leu Met Val Gly Leu Gly Met Ala Gly Tyr Leu Ile Ser Glu Ser Asn

35 40 45

Gly Ile Arg Thr Leu Ser Glu Asn Gly Glu Arg Gln Leu Glu Leu His
 50 55 60
 Ala Arg Thr Val Glu Ser Glu Ile Ser Lys Tyr Thr Tyr Leu Pro Ser
 65 70 75 80
 Leu Leu Glu Leu Glu Asp Ser Val Ser His Leu Leu Thr Asp Pro Asp
 85 90 95
 Gly Ala Ser Arg Gln Thr Val Asn Glu Tyr Leu Glu Gly Leu Asn Arg
 100 105 110
 Arg Ser Arg Ser Arg Ala Ile Phe Val Leu Asp Thr Asn Gly Arg Val
 115 120 125
 Gln Ala Thr Ser Asn Trp Arg Asp Ala Asp Ser Phe Leu Gly Glu Asp
 130 135 140
 Leu Ser Phe Arg Ala Tyr Phe Gln Thr Ala Val Arg Gly Glu Pro Gly
 145 150 155 160
 Arg Phe Tyr Gly Ile Gly Ser Thr Thr Gly Glu Ala Gly Tyr Tyr Leu
 165 170 175
 Ala His Gly Leu Glu Glu His Gly Lys Ile Ile Gly Val Ala Val Ile
 180 185 190
 Lys Val Arg Leu Asp Thr Leu Glu Glu Arg Trp Gln Arg Ala Arg Leu
 195 200 205
 Glu Ala Phe Val Ser Asp Glu Asn Gly Ile Ile Ile Leu Ser Ser Asp
 210 215 220
 Pro Ala Arg Arg Leu Lys Ser Val Arg Pro Leu Thr Pro Gln Ile Lys
 225 230 235 240
 Glu Arg Leu Ala Arg Ser Leu Gln Tyr Tyr Trp Trp Pro Leu Asn Glu
 245 250 255
 Leu Gln Pro Leu Ala Arg Glu Thr Leu Ala Asp Gly Val Glu Lys Leu
 260 265 270
 Thr Phe Pro Ala Asn Thr Glu Thr Ala His Gly Lys Pro His Glu Val
 275 280 285
 Ala Tyr Leu Ala Gln Thr Arg Arg Leu Val Asp Thr Pro Trp His Phe
 290 295 300

Thr Leu Leu Thr Pro Leu Gln Asp Leu Arg Arg Glu Ser Met Val Gln
305 310 315 320

Gly Ile Leu Val Gly Val Ala Phe Ala Leu Leu Ala Ile Leu Gly Ile
325 330 335

Ala Trp Asn Glu Arg Arg Lys Val Ile Ala Thr Arg Leu Ala Ala Arg
340 345 350

Glu Ala Leu Glu Glu Ala Asn Ser Gln Leu Glu Arg Arg Ile Ala Glu
355 360 365

Arg Thr Ala Asp Leu Arg Ala Ser Asn Glu Arg Leu Lys Gly Gln Ile
370 375 380

Arg Glu Arg Arg His Ala Glu Gln Thr Leu Arg His Ala Gln Asp Glu

385 390 395 400

Leu Val Gln Ala Gly Lys Leu Ala Ala Ile Gly Gln Met Ser Thr Ser
405 410 415

Ile Ala His Glu Leu Asn Gln Pro Leu Ala Ala Leu Arg Thr Leu Ser
420 425 430

Gly Asn Thr Val Arg Phe Leu Glu Arg Gly Ala Leu Glu Thr Ala Ser
435 440 445

Thr Asn Leu Arg Thr Met Asn Asp Leu Ile Asp Arg Met Gly Arg Ile
450 455 460

Thr Ala Ser Leu Arg Ser Phe Ala Arg Arg Gly Asp Asp Ser Gly Gln
465 470 475 480

Ala Ser Leu Ala Lys Ala Val Glu Ala Thr Leu Gln Val Leu Ala Asn
485 490 495

Arg Ile Ser Ala Cys His Leu Gln Leu His His Gln Phe Glu Asp Gln
500 505 510

Gln Leu Ala Ile Asp Gln Thr Arg Leu Glu Gln Ile Leu Val Asn Leu
515 520 525

Ile Gly Asn Ala Leu Asp Ala Met Ala Ala Gln Pro Gln Pro Glu Leu

530 535 540

Trp Leu Glu Gly Glu Leu Gln Gly Asp Lys Tyr Arg Leu Gln Val Arg

545 550 555 560
 Asp Asn Gly His Gly Ile Asp Pro Glu Ala Arg Lys His Leu Phe Glu
 565 570 575
 Pro Phe Phe Thr Thr Lys Pro Gly Glu His Gly Leu Gly Leu Gly Leu
 580 585 590
 Thr Leu Ser Ala Ser Leu Ala Ala Ala Lys Gly Ser Leu Asn Val
 595 600 605

 Glu His Pro Val Thr Gly Gly Thr Ala Phe Val Leu Ala Leu Pro Leu
 610 615 620
 Val Ser Pro Pro Ser Glu Ser Ala Glu His Pro
 625 630 635
 <210> 2
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli
 <400> 2
 Met Arg Arg Met Arg Phe Ser Pro Arg Ser Ser Phe Ala Arg Thr Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Ile Val Thr Leu Leu Phe Val Ser Leu Val Thr Thr Tyr Leu
 20 25 30

 Val Val Leu Asn Phe Ala Ile Leu Pro Ser Leu Gln Gln Phe Asn Lys
 35 40 45
 Val Leu Ala Tyr Glu Val Arg Met Leu Met Thr Asp Lys Leu Gln Leu
 50 55 60
 Glu Asp Gly Thr Gln Leu Val Val Pro Pro Ala Phe Arg Arg Glu Ile
 65 70 75 80
 Tyr Arg Glu Leu Gly Ile Ser Leu Tyr Thr Asn Glu Ala Ala Glu Glu
 85 90 95
 Ala Gly Leu Arg Trp Ala Gln His Tyr Glu Phe Leu Ser His Gln Met

 100 105 110
 Ala Gln Gln Leu Gly Gly Pro Thr Glu Val Arg Val Glu Val Asn Lys
 115 120 125

Ser Ser Pro Val Val Trp Leu Lys Thr Trp Leu Ser Pro Asn Ile Trp
 130 135 140
 Val Arg Val Pro Leu Thr Glu Ile His Gln Gly Asp Phe Ser Pro Leu
 145 150 155 160
 Phe Arg Tyr Thr Leu Ala Ile Met Leu Leu Ala Ile Gly Gly Ala Trp
 165 170 175

 Leu Phe Ile Arg Ile Gln Asn Arg Pro Leu Val Asp Leu Glu His Ala
 180 185 190
 Ala Leu Gln Val Gly Lys Gly Ile Ile Pro Pro Pro Leu Arg Glu Tyr
 195 200 205
 Gly Ala Ser Glu Val Arg Ser Val Thr Arg Ala Phe Asn His Met Ala
 210 215 220
 Ala Gly Val Lys Gln Leu Ala Asp Asp Arg Thr Leu Leu Met Ala Gly
 225 230 235 240
 Val Ser His Asp Leu Arg Thr Pro Leu Thr Arg Ile Arg Leu Ala Thr

 245 250 255
 Glu Met Met Gly Glu Glu Asp Gly Tyr Leu Ala Glu Ser Ile Asn Lys
 260 265 270
 Asp Ile Glu Glu Cys Asn Ala Ile Ile Glu Gln Phe Ile Asp Tyr Leu
 275 280 285
 Arg Thr Gly Gln Glu Met Pro Met Glu Met Ala Asp Leu Asn Ser Val
 290 295 300
 Leu Gly Glu Val Ile Ala Ala Glu Ser Gly Tyr Glu Arg Glu Ile Asn
 305 310 315 320

 Thr Ala Leu Gln Ala Gly Ser Ile Gln Val Lys Met His Pro Leu Ser
 325 330 335
 Ile Lys Arg Ala Val Ala Asn Met Val Val Asn Ala Ala Arg Tyr Gly
 340 345 350
 Asn Cys Trp Ile Lys Val Ser Ser Gly Thr Glu Ser His Arg Ala Trp
 355 360 365
 Phe Gln Val Glu Asp Asp Gly Pro Gly Ile Lys Pro Glu Gln Arg Lys
 370 375 380

His Leu Phe Gln Pro Phe Val Arg Gly Asp Ser Ala Arg Ser Thr Ser

385 390 395 400

Gly Thr Gly Leu Gly Leu Ala Ile Val Gln Arg Ile Ile Asp Asn His

405 410 415

Asn Gly Met Leu Glu Ile Gly Thr Ser Glu Arg Gly Gly Leu Ser Ile

420 425 430

Arg Ala Trp Leu Pro Val Pro Val Ala Arg Val Gln Gly Thr Thr Lys

435 440 445

Glu Ala

450

<210> 3

<211> 250

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 3

ttgaattatt attgcttgat gttagtgct tatttcgcca ttccgcaata atcttaaaaa 60

gttccttgc atttacattt tgaacatct atagcgataa atgaacatc ttaaaagttt 120

tagtatcata ttcgtgttgg attattctgc atttttgggg agaattgact tgccgactga 180

ttaatgaggg ttaatcagta tgcagtggca taaaaaagca aataaaggca tataacagag 240

ggttaataac 250

<210> 4

<211> 750

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> green fluorescent protein

<400> 4

catatgcagt cttaaaggaga agaacttttc actggagtgg tccaattct tgttgaatta 60

gatggtgatg ttaatgggca caaatcttct gtcagtggag aggggtgaagg tgatgcaaca 120

tacggaaaac ttacccttaa atttatttgc actactggaa aactacctgt tccgtggcca 180

acacttgta ctactttcgg ttatggtgtt caatgctttg cgagataccc agatcacatg 240

aaacagcatg actttttcaa gattgccatg cccgaagggt acgtacagga aagaactata 300

tttttcaaag atgacgggaa ctacaagaca cgtgctgaag tcaagtttga aggtgatacc 360

cttgtaata gaatcgagtt aaaaggtatt gattttaag aagatggaaa cattcttgga 420

cacaaattgg aatacaacta taactcacac aatgtatata tcatggcaga caaacaaaag 480

aatggaatca aagttaactt caaaattaga cacaacattg aagatggaag cgttcaacta 540

gcagaccatt atcaacaaaa tactccaatt ggcgatggcc ctgtcctttt accagacaac 600

cattacctgt ccacacaatc tgccctttcg aaagatcca acgaaaagag agaccacatg 660

gtccttcttg agtttgaac agctgctggg attacacatg gcatggatga actatacaaa 720

caccatcacc atcaccatta ataactcgag 750

<210> 5

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AauSF_BamHI

<400> 5

cgggatccat gagacattca ttgcctac 29

<210> 6

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AauSR

<400> 6

agatccacca ccgccagagc caccgccacc cagcgtggag atttcgta 48

<210> 7

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EnvZF

<400> 7

ggcggtggtg gatctggtgg cggcggttct atggcggctg gtgttaag 48

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EnvZR_HindIII
 <400> 8
 cccaagcttt tattaccctt ctttgtcgt 30
 <210> 9
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> OmpC proF_EcoRI
 <400> 9
 gaattcttga attattattg cttgatg 27
 <210> 10
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> OmpC proR_BamHI
 <400> 10
 ggatccgtta ttaaccctct gttatat 27
 <210> 11
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GFPB_BamHI
 <400> 11
 ggatcccata tgcagtctaa aggagaa 27
 <210> 12
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GFPR_SalI
 <400> 12
 gtcgacctcg agttattaat ggtgat 26
 <210> 13
 <211> 18
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> OmpCRT_F

<400> 13

acggcggaca cggtatgt

18

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> OmpCRT_R

<400> 14

ttctgccacg ctgtctgttg

20

<210> 15

<211> 571

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fusion protein

<400> 15

Met Met Lys Cys Asp Pro Ser Leu Leu Arg Pro Ala Lys Pro Ala Val

1 5 10 15

Asn Ser Arg Leu Ile Arg Gln Leu Leu Leu Pro Pro Leu Ile Ile Leu

20 25 30

Leu Met Val Gly Leu Gly Met Ala Gly Tyr Leu Ile Ser Glu Ser Asn

35 40 45

Gly Ile Arg Thr Leu Ser Glu Asn Gly Glu Arg Gln Leu Glu Leu His

50 55 60

Ala Arg Thr Val Glu Ser Glu Ile Ser Lys Tyr Thr Tyr Leu Pro Ser

65 70 75 80

Leu Leu Glu Leu Glu Asp Ser Val Ser His Leu Leu Thr Asp Pro Asp

85 90 95

Gly Ala Ser Arg Gln Thr Val Asn Glu Tyr Leu Glu Gly Leu Asn Arg

100 105 110

Arg Ser Arg Ser Arg Ala Ile Phe Val Leu Asp Thr Asn Gly Arg Val

115	120	125	
Gln Ala Thr Ser Asn Trp Arg Asp Ala Asp Ser Phe Leu Gly Glu Asp			
130	135	140	
Leu Ser Phe Arg Ala Tyr Phe Gln Thr Ala Val Arg Gly Glu Pro Gly			
145	150	155	160
Arg Phe Tyr Gly Ile Gly Ser Thr Thr Gly Glu Ala Gly Tyr Tyr Leu			
	165	170	175
Ala His Gly Leu Glu Glu His Gly Lys Ile Ile Gly Val Ala Val Ile			
180	185	190	
Lys Val Arg Leu Asp Thr Leu Glu Glu Arg Trp Gln Arg Ala Arg Leu			
195	200	205	
Glu Ala Phe Val Ser Asp Glu Asn Gly Ile Ile Ile Leu Ser Ser Asp			
210	215	220	
Pro Ala Arg Arg Leu Lys Ser Val Arg Pro Leu Thr Pro Gln Ile Lys			
225	230	235	240
Glu Arg Leu Ala Arg Ser Leu Gln Tyr Tyr Trp Trp Pro Leu Asn Glu			
245	250	255	
Leu Gln Pro Leu Ala Arg Glu Thr Leu Ala Asp Gly Val Glu Lys Leu			
260	265	270	
Thr Phe Pro Ala Asn Thr Glu Thr Ala His Gly Lys Pro His Glu Val			
275	280	285	
Ala Tyr Leu Ala Gln Thr Arg Arg Leu Val Asp Thr Pro Trp His Phe			
290	295	300	
Thr Leu Leu Thr Pro Leu Gln Asp Leu Arg Arg Glu Ser Met Val Gln			
305	310	315	320
Gly Ile Leu Val Gly Val Ala Phe Ala Leu Leu Ala Ile Leu Gly Ile			
325	330	335	
Ala Trp Asn Glu Arg Arg Lys Val Ile Ala Thr Arg Leu Ala Ala Arg			
340	345	350	
Glu Ala Leu Glu Glu Ala Asn Ser Gly Val Ser His Asp Leu Arg Thr			
355	360	365	
Pro Leu Thr Arg Ile Arg Leu Ala Thr Glu Met Met Gly Glu Glu Asp			

370 375 380
Gly Tyr Leu Ala Glu Ser Ile Asn Lys Asp Ile Glu Glu Cys Asn Ala

385 390 395 400
Ile Ile Glu Gln Phe Ile Asp Tyr Leu Arg Thr Gly Gln Glu Met Pro

405 410 415
Met Glu Met Ala Asp Leu Asn Ser Val Leu Gly Glu Val Ile Ala Ala

420 425 430
Glu Ser Gly Tyr Glu Arg Glu Ile Asn Thr Ala Leu Gln Ala Gly Ser

435 440 445
Ile Gln Val Lys Met His Pro Leu Ser Ile Lys Arg Ala Val Ala Asn

450 455 460

Met Val Val Asn Ala Ala Arg Tyr Gly Asn Cys Trp Ile Lys Val Ser
465 470 475 480

Ser Gly Thr Glu Ser His Arg Ala Trp Phe Gln Val Glu Asp Asp Gly
485 490 495

Pro Gly Ile Lys Pro Glu Gln Arg Lys His Leu Phe Gln Pro Phe Val
500 505 510

Arg Gly Asp Ser Ala Arg Ser Thr Ser Gly Thr Gly Leu Gly Leu Ala
515 520 525

Ile Val Gln Arg Ile Ile Asp Asn His Asn Gly Met Leu Glu Ile Gly

530 535 540
Thr Ser Glu Arg Gly Gly Leu Ser Ile Arg Ala Trp Leu Pro Val Pro

545 550 555 560
Val Ala Arg Val Gln Gly Thr Thr Lys Glu Ala

565 570

<210> 16

<211> 770

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 16

tttaagaata cacgcttaca aattgttgcg aacctttggg agtacaaaca atgcaagaga

60

actacaagat tctggtggtc gatgacgaca tgcgcctgcg tgcgctgctg gaacgttatc	120
tcaccgaaca aggtttccag gttcgaagcg tcgctaatagc agaacagatg gatcgctgc	180
tgactcgtga atctttccat cttatggtac tggatttaat gttacctggt gaagatggct	240
tgtcgatttg ccgacgtctt cgtagtcaga gcaacccgat gccgatcatt atggtgacgg	300
cgaaggggga agaagtggac cgtatcgtag gcctggagat tggcgctgac gactacattc	360
caaaaccgtt taacccgcgt gaactgctgg cccgtatccg tgcggtgctg cgtcgtcagg	420
cgaacgaact gccaggcgca ccgtcacagg aagaggcggt aattgctttc ggtaagttca	480
aacttaacct cggtagcgcg gaaatgttcc gcgaagacga gccgatgccg ctcaccagcg	540
gtgagtttgc ggtactgaag gcactggtca gccatccgcg tgagccgctc tcccgcgata	600
agctgatgaa ccttgcccggt ggtcgtgaat attccgcaat ggaacgctcc atcgacgtgc	660
agatttcgcg tctgcgccgc atggtggaag aagatccagc gcacccgctg tacattcaga	720
ccgtctgggg tctgggctac gtctttgtac cggacggctc taaagcatga	770