(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0107209
(43) 공개일자 2011년09월30일

(51) Int. Cl.
C12N 1/21 (2006.01) *C12N 15/52* (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01) *C12P 7/64* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0026433
(22) 출원일자 2010년03월24일
심사청구일자 2010년03월24일

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울 마포구 신수동 1-1 서강대학교
(72) 발명자
이진원
서울특별시 송파구 방이동 89 올림픽선수촌,기자촌아파트 201동 1601호
전은영
서울특별시 중구 신당5동 165-61 21/4 동남빌라 C동 402호
(74) 대리인
양부현

전체 청구항 수 : 총 11 항

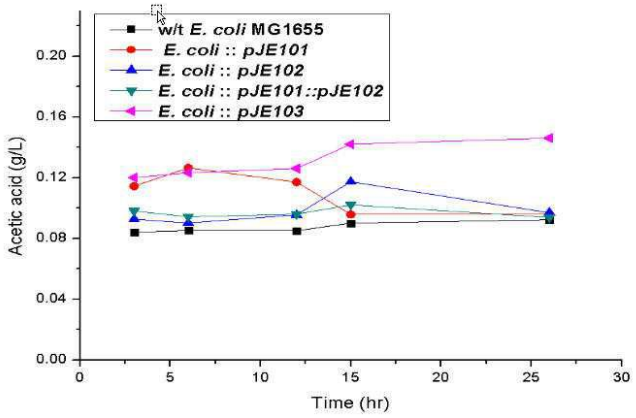
(54) 지방산 생합성 경로의 과발현용 형질전환 대장균의 제조방법 및 상기 제조방법으로 제조된 형질전환 대장균

(57) 요 약

본 발명은 (a) *aceE* 유전자 및 *accA* 유전자를 하나의 발현벡터에 삽입시키는 단계; 및 (b) 상기 *aceE* 유전자 및 *accA* 유전자가 삽입된 발현벡터로 대장균을 형질전환 시키는 단계를 포함하는 지방산 생합성 경로의 과발현용 형질전환 대장균의 제조방법 및 상기 제조방법으로 제조된 형질전환 대장균에 관한 것이다.

본 발명의 지방산 생합성 경로의 과발현용 형질전환 대장균의 제조방법은 *aceE* 유전자 및 *accA* 유전자를 하나의 발현벡터에 삽입하여, 상기 벡터로 대장균을 형질전환 시키므로, 형질전환 대장균의 유전적 안정성이 높고 지방산 생합성 경로 과발현 효과가 매우 뛰어나다.

대 표 도 - 도6a



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2008-N-B108-P-03
부처명 지식경제부
연구관리전문기관
연구사업명 신재생에너지 기술개발사업
연구과제명 당화바이오매스를 이용한 탄화수소계 바이오에너지 생산 균주 및 공정 최적화 원천기술 개발
기여율
주관기관 에너지기술평가원 신재생에너지센터
연구기간 2008년 10월 01일 ~ 2011년 07월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

다음 단계를 포함하는 지방산 생합성 경로의 과발현용 형질전환 대장균의 제조방법:

(a) *aceE*(pyruvate dehydrogenase, decarboxylase component E1) 유전자 및 *accA*(acetyl-CoA carboxylase, Carboxytransferase) 유전자를 하나의 발현벡터에 삽입시키는 단계; 및

(b) 상기 *aceE* 유전자 및 *accA* 유전자가 삽입된 발현벡터로 대장균을 형질전환시키는 단계.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 *aceE* 유전자는 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 형질전환 대장균의 제조방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 *accA* 유전자는 서열목록 제2서열의 뉴클레오타이드서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 형질전환 대장균의 제조방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 발현벡터는 프로모터 서열, *aceE* 유전자의 서열, *accA* 유전자의 서열 및 전사 터미네이터 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 형질전환 대장균의 제조방법.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 프로모터는 trc 프로모터임을 특징으로 하는 형질전환된 대장균의 제조방법.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 전사 터미네이터는 rrnB 터미네이터인 것을 특징으로 하는 형질전환된 대장균의 제조방법.

청구항 7

제 5 항에 있어서, 상기 발현벡터는 *lacI* 유전자를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 공-형질전환된 대장균의 제조방법.

청구항 8

제 5 항에 있어서, 상기 발현벡터는 서열목록 제3서열의 최소 서열로 포함하는 백본벡터에 도입된 것을 특징으로 하는 형질전환된 대장균의 제조방법.

청구항 9

제 1 항에 있어서, 상기 대장균을 형질전환시키는 단계(b)는 전기충격 방법으로 수행되는 것을 특징으로 하는 형질전환된 대장균의 제조방법.

청구항 10

상기 제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항의 방법으로 제조된 *aceE* 유전자 및 *accA* 유전자로 공-형질전환(cotransformed)된 대장균.

청구항 11

(a) 제 10 항의 공-형질전환된 대장균을 배양하여 지방산을 생합성 하는 단계; 및 (b) 상기 생합성된 지방산을 수득하는 단계를 포함하는 지방산 생합성 방법.

명 세 서

기 술 분 야

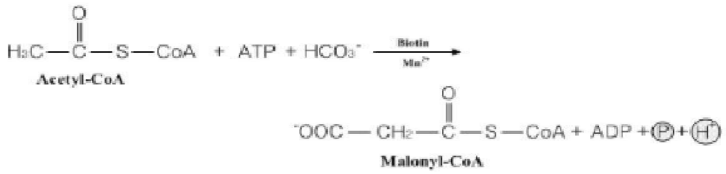
[0001] 본 발명은 지방산 생합성 경로의 과발현용 형질전환 대장균의 제조방법 및 상기 제조방법으로 제조된 형질전환 대장균에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 세계적 경제 성장에 따른 에너지 사용증가와 지속적인 가격상승을 보이는 화석연료 자원의 한정성으로 인하여 에탄올, 부탄올, 바이오디젤과 같은 바이오에너지에 대한 관심이 증가하고 있다. 언급된 종류의 바이오에너지 모두 전력생산용 또는 수송용 연료로 사용될 수 있으나, 실적용 및 생산 방법의 몇몇 단점으로 인해 새로운 신재생에너지 자원인 하이드로카본 형태의 화합물에 대한 관심이 특히 증가되고 있다. 이에 따라 장쇄 지방산을 대사산물로서 생성할 수 있는 재조합 균주에 대한 관심도 증대되고 있다.

[0003]

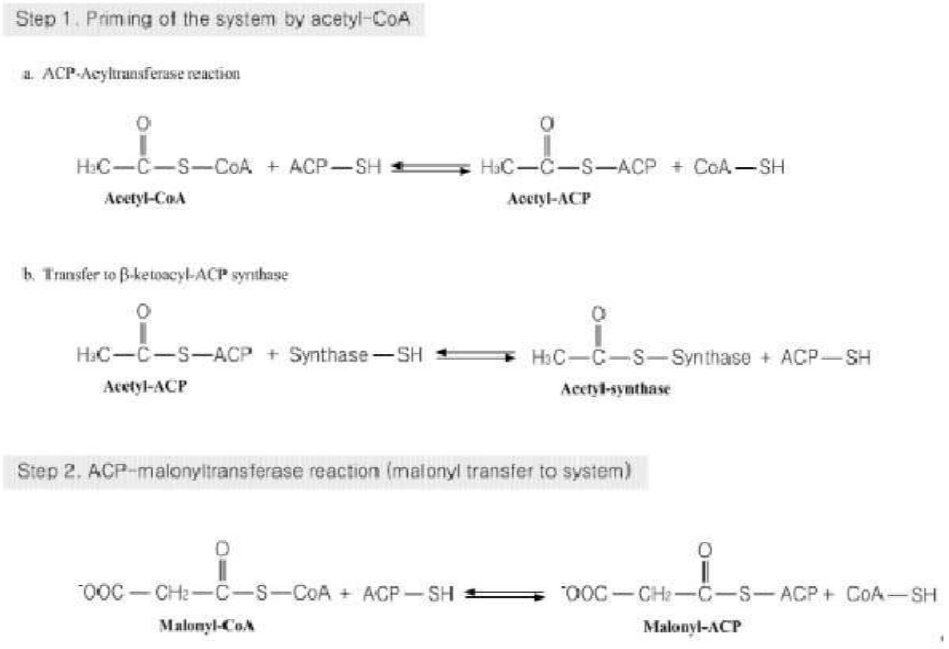
[0004] 미생물 생체 내에서의 지방산 합성은 아세틸-CoA에서 시작하여, 그 뒤 탄소원자가 한 번에 두 개의 원자씩 탄화수소사슬에 붙어 사슬이 길어지게 된다. 이화작용은 그와 반대방향으로 진행된다. 즉, 카복실 그룹에서 시작하여 아세틸-CoA로 끝나며, 탄화수소사슬의 단편과 아세틸-CoA는 대장균(*Escherichia coli*)의 시트르산 회로(TCA cycle)에서 산화되어 ATP 형태로 저장되는 에너지를 제공한다. 지방산 생합성의 첫 단계는 아세틸-CoA(지방산 합성에 필수적인 전구체)를 세포질로 운반하는 것이다. 아세틸-CoA는 지방산의 β-산화나 피루브산의 탈카복실화에 의해 생길 수 있다(특정 아미노산들이 분해되면 아세틸-CoA가 생성되기도 한다). 세포질에서 아세틸-CoA는 카복실화 되어서, 지방산 생합성에 있어 중요한 중간체가 되는 말로닐-CoA(malonyl-CoA)를 생산한다. 아래의 식에서 보여지듯이, 이 반응은 아세틸-CoA 카복실라아제 복합체에 의해 촉매되는데, 이 복합체는 세 개의 효소로 구성되어 있고, 효소 활성을 위해 ATP뿐만 아니라 Mn^{2+}과 바이오틴을 요구한다. 아세틸-CoA 카복실라아제는 세 개의 단백질인 바이오틴 카복실라아제, 바이오틴 운반 단백질, 그리고 카복실기 전달효소로 구성되어 있다.



[0005]

[0006] 지방산 생합성은 연속적으로 두 개의 탄소단위가 성장 사슬에 덧붙여지며 이루어진다. 말로닐-CoA의 말로닐 그룹에 있는 세 개의 탄소원자 중 두 개가 생합성 반응의 각 단계마다 지방산 사슬에 더해진다. 이 반응은 말

로닐-CoA 형성과 마찬가지로 세포질에 있고 막과 결합되어 있지 않는 다효소 복합체가 필요하다. 개별적인 효소들로 구성되어 있는 이 복합체는 지방산 합성효소를 말한다. 이러한 지방산 합성 효소 복합체의 일부인 아실 운반 단백질(acyl carrier protein: ACP)은 아세틸-CoA의 아세틸 그룹이 지방산의 탄소 수를 증가시키기 위한 결합에 관여한다.



[0007]

[0008] 미생물을 사용하여 지방산 합성 경로의 활발한 대사흐름을 꾀한 아세틸-CoA, 말로닐-CoA의 과발현 목적에 해당하는 시도와 노력은 끊임없이 있어왔다. 대장균은 효소 생산 시스템으로 타 생물체에 비해 많은 대사정보가 알려져 있고, 유전자에 대한 정보가 거의 다 밝혀져 재조합 단백질 생산에 널리 이용되고 있다.

[0009] 대장균의 지방산 생합성을 위한 도입단계의 대사 작용에 아세틸-CoA와 말로닐 Co-A가 중요한 역할을 한다는 것에 대해 문헌(Ethan S. James and John E. Cronan. Expression of Two *Escherichia coli* Acetyl-CoA Carboxylase Subunits Is Autoregulated, *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 279(4):25202527(2004))에 언급되어 있다. 또한, ACP 트랜스아실라제에 의해 말로닐-Co가 말로닐-ACP로 전환되어 지방산 합성을 위한 대사 네트워크가 진행된다는 것에 대해 참고 문헌에 나타나있다(Satyanrayana subrahmanyam and John E. Cronan, JR., Overproduction of a Functional Fatty Acid Biosynthetic Enzyme Blocks Fatty Acid Synthesis in *Escherichia coli*, *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 180(17):4596-4602(1998)).

[0010] 하지만 대부분의 연구는 지방산 생합성 경로의 내부 사이클, 즉 말로닐-ACP이후의 대사 경로를 중심으로 이루어졌으며, fab 계열의 유전자의 기작에 의해 지방산의 생산과 저해에 대해 논하고 있다. 그로 인해 지방산 생합성을 위한 탄소원부터 지방산 합성경로 도입부까지의 연구는 부족한 상태이다.

[0011] 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.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명자들은 안정적이고 효과적으로 지방산 생합성 경로를 과발현 시킬 수 있는 형질전환 대장균의 제조방법 개발을 위하여 예의 연구 노력하였고 그 결과 *aceE* 유전자 및 *accA* 유전자를 하나의 발현벡터에 삽입시키고 상

기 발현벡터로 대장균을 형질전환시키는 방법을 개발해 냄으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0013] 따라서 본 발명의 목적은 지방산 생합성 경로의 과발현용 형질전환 대장균의 제조방법을 제공하는 데 있다.

[0014] 본 발명의 다른 목적은 상기 방법으로 제조된 지방산 생합성 경로의 과발현용 형질전환 대장균을 제공하는 데 있다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 제조한 형질전환된 대장균을 이용하여 지방산을 생합성하는 방법을 제공하는데 있다.

[0016] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0017] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 지방산 생합성 경로의 과발현용 형질전환 대장균의 제조방법을 제공한다:

[0018] (a) *aceE*(pyruvate dehydrogenase, decarboxylase component E1) 유전자 및 *accA*(acetyl-CoA carboxylase, Carboxytransferase) 유전자를 하나의 발현벡터에 삽입시키는 단계; 및

[0019] (b) 상기 *aceE* 유전자 및 *accA* 유전자가 삽입된 발현벡터로 대장균을 형질전환시키는 단계.

[0020] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 본 발명의 방법으로 제조된 *aceE* 유전자 및 *accA* 유전자로 공-형질전환(cotransformed)된 대장균을 제공한다.

[0021] 본 발명자들은 안정적이고 효과적으로 지방산 생합성 경로를 과발현 시킬 수 있는 형질전환 대장균의 제조방법 개발을 위하여 예의 연구 노력하였고 그 결과 *aceE* 유전자 및 *accA* 유전자를 하나의 발현벡터에 삽입시키고 상기 발현벡터로 대장균을 형질전환시키는 방법을 개발해 냄으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0022] 최근, 지방산(fatty acids)은 수송용 연료를 위한 바이오 에너지로서 이용될 수 있다는 것이 보고되었다. 따라서, 본 발명은 신재생에너지에 대한 일반적 관심사로서 개선된 지방산 생합성 경로를 위한 변이 균주 개발에 대한 방법을 제시한다. 지방산(fatty acid)은 화학 또는 생화학적으로 사슬 모양의 포화 혹은 불포화 모노카르복시산을 말하며, 지방을 가수분해하면 글리세롤과 지방산이 분리되어 생기기 때문에 이러한 이름이 붙었다. 가장 단순한 지방산은 부티르산(4 carbons)이지만, 자연에 존재하는 지방산은 탄소 수가 8개(caprylic acid) 이상이며 모두 짝수의 탄소 수를 갖고 있다. 지방산은 *Escherichia coli* 생체 내에서 탄소 공급원으로부터 특정 경로를 거쳐 생합성 될 수 있으며, 본 발명은 상기 지방산 생합성(FAS) 경로의 대사 흐름을 향상시키는 방법을 제공한다. *Escherichia coli* 생체 내에서 글루코오즈에서부터 지방산까지의 지방산 생합성(FAS) 경로는 도 1에 간략히 도식화하였다.

[0023] 본 발명에서, 상기 지방산 생합성(FAS) 경로의 대사 흐름을 향상시키는 방법은 아세틸-CoA와 말로닐-CoA를 과발현함으로써 FAS(fatty acid biosynthesis)로의 흐름이 활발하도록 돕는 것이다. 이를 실현하기 위해 피루베이트를 아세틸-CoA로 전환하는 효소(pyruvate dehydrogenase)의 생산을 담당하는 *aceE* 유전자와 아세틸-CoA를 말로닐-CoA로 전환하는 효소(acetyl-CoA carboxylase)를 암호화하는 *accA*를 발현벡터에 포함시키고 상기 발현벡터를 사용하여 대장균(*Escherichia coli*)을 형질전환 시킨다.

[0024] 상기 *aceE* 및 *accA*유전자의 암호화부분은 효소의 과발현 기능을 꾀하면서 최소한의 길이를 가지도록 RBS(ribosomal binding site) 및 효소발현에 꼭 필요한 부분을 포함하는 염기서열만을 서열로 정하는 것이 바람직한데 이는 유전자의 발현에 의한 숙주세포의 대사부담(metabolic burden)을 줄이기 위해서이다.

[0025] 일 구현예에서, 상기 *aceE* 유전자는 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드서열로 이루어진 것을 특징으로 한다. 보다 바람직하게는, 상기 *aceE* 유전자는 RBS(ribosomal binding site)가 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드서열의 업스트림에 결합되어 있는 것이다.

[0026] 다른 구현예에서, 상기 *accA* 유전자는 서열목록 제2서열의 뉴클레오타이드서열로 이루어진 것을 특징으로 한다. 보다 바람직하게는, 상기 *aceA* 유전자는 서열목록 제5서열의 RBS(ribosomal binding site)가 서열목

록 제2서열의 뉴클레오타이드서열의 업스트림에 결합되어 있는 것이다.

[0027] 상기 *aceE* 및 *accA*유전자를 암호화하는 핵산은 발현 조절서열에 작동가능하게 연결되어 발현 벡터 내에 삽입될 수 있다. 상기에서 '작동 가능하게 연결된다(operably linked to)'는 것은 하나의 핵산 단편이 다른 핵산 단편과 결합되어 그의 기능 또는 발현이 다른 핵산 단편에 의해 영향을 받는 것을 말한다. 또한, '발현 조절 서열(expression control sequence)'이란 특정한 숙주 세포에서 작동 가능하게 연결된 핵산 서열의 발현을 조절하는 DNA 서열을 의미한다. 그러한 조절 서열은 전사를 개시하기 위한 프로모터, 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보좀 결합 부위를 코딩하는 서열 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다.

[0028] 본 발명에 있어서, *aceE* 및 *accA*유전자를 암호화하는 핵산에 결합된 프로모터는 강력한 발현능력을 가지는 것을 사용하며, 바람직하게는 trc 프로모터를 사용할 수 있다.

[0029] 일 구현예에서, 본 발명의 발현 벡터는 프로모터(trc promoter) 서열, aceE 및 accA 유전자의 서열 및 박테리아에서 유래된 터미네이터(rrnB terminator)서열을 포함하며, 상기 서열들이 5'-3' 순서대로 연결되는 것이 바람직하다. 이는 *aceE*와 *accA* 유전자가 대장균의 염색체 내에서의 위치에 따른 발현 순서에 해당하는 것으로, 세포성장곡선에서 아세틸-CoA가 먼저 생산되어 소비되면서 말로닐-CoA가 생산되는 생합성 경로를 적용한 것이다.

[0030] 다른 구현예에서, 상기 발현벡터는 *lac*I 유전자를 추가적으로 포함한다. *lac*I 유전자는 숙주 세포가 Lac 리프레서를 코딩하는 유전자를 포함하고 있는지 불문하고, trc 프로모터를 조절할 수 있도록 한다. 이 경우 상기 a*ceE* 및 *accA* 유전자의 발현을 유도하기 위하여, IPTG(Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)를 사용할 수 있다.

[0031] 또한 본 발명에서 '발현 벡터'라 함은 구조유전자를 암호화하는 핵산이 삽입될 수 있고, 숙주 세포 내에서 상기 핵산을 발현할 수 있는 당 분야에 공지된 플라스미드, 바이러스 벡터 또는 기타 매개체를 의미하며 바람직하게는 플라스미드 벡터일 수 있다.

[0032] 상기 플라스미드로는 대장균에서 복제 및 발현이 가능한 운반체라면 당업계에 공지된 그 어떠한 것이라도 사용할 수 있다. 예를 들면, 이에 한정되지는 않으나 pJE101, pJE102, 및 pJE103 발현 벡터(plasmid)일 수 있으며 상기 발현벡터는 바람직하게는 서열목록 제3서열의 최소 서열로 포함하는 백본벡터에 도입된 것 일 수 있다.

[0033] 본 발명의 *aceE* 및 *accA*유전자를 포함하는 발현 벡터는 당업계에 공지된 방법, 예를 들어 이에 한정되지는 않으나, $CaCl_2$ 완충액을 사용한 컴피턴트 세포를 만든 후 열충격(42℃) 방법에 의해 발현벡터를 숙주세포 내로 넣는 방법, 전기 충격에 의한 형질전환 방법, 일시적 형질감염(transient transfection), 미세주사, 세포융합, 칼슘 포스페이트 침전법, 전기침공법(electroporation) 등에 의해 숙주 세포 내로 도입할 수 있다. 형질전환체의 안정적 제조와 효율을 높이기 위해서는 전기 충격에 의한 형질전환 방법을 사용하는 것이 바람직하다.

[0034] 지방산 생합성 경로를 과발현하도록 형질전환시킬 숙주세포 대장균으로는 산업 미생물로 적용가능하고 그 기능이 뛰어난 야생종을 선정한다. 박테리아 그람 음성인 대장균(*Escherichia coli*) 속별 특징을 확인 및 비교하여 가장 그 기능이 뛰어난 야생종을 선정할 수 있다. 상기 에세리키아 속 미생물은 박테리아 그람 음성형 대장균인 *Escherichia coli*이며, 예를 들어 MG1655, W3110, DH5α, XL1-Blue 및 BL21이 포함된다. 바람직하게는 대장균 K-12 MG1655이다.

[0035] 본 발명의 아세틸-CoA와 말로닐-CoA의 생산 증대를 위한 에세리키아 속 미생물은 내재적으로 지방산 생합성 경로를 가지고 있는 것이나, 지방산(fatty acid)를 생산하기 위한 효소를 코딩하는 유전자 즉 *aceE* 및 *accA* 유전자가 추가적으로 도입되고, 상기 지방산(fatty acid)를 생산하기 위한 효소를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열이 증폭, 즉 과발현 되는 균주이다. 이와 관련하여, 용어 '증폭'은 예를 들어 강력한 프로모터를 사용하거나 활성이 높은 적절한 효소를 암호화하는 유전자를 사용하고 임의로 이들 수단을 함께 사용하여 유전자(들)의 카피수를 증가시킴으로써, 적합한 DNA에 의해 암호화되는 하나 이상의 효소의 세포 내 활성을 미생물 내에서 증가시키는 것을 기술한다.

[0036] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 상술한 본 발명의 공-형질전환된 대장균을 배양하여 지방산을 생합성 하는 단계; 및 (b) 상기 생합성된 지방산을 수득하는 단계를 포함하는 지방산 생합성 방법을 제공한다.

[0037] 본 발명의 방법은 *aceE* 유전자 및 *accA* 유전자로 공-형질전환된 본 발명의 형질전환 대장균을 이용하기 때문에,

이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.

[0038] *aceE* 유전자 및 *accA* 유전자로 공-형질전환된 형질전환 대장균의 배양은 당업계에 공지된 통상의 대장균 배양 방법에 의해 배양될 수 있다. 예를 들어, 공-형질전환된 대장균은 LB 배지에서 37℃에서 배양할 수 있다.

[0039] 바람직하게는, 단계 (a)는 발현 유도제인 IPTG의 존재 하에서 실시된다.

[0040] 상기 공-형질전환된 대장균 내에서 생합성된 지방산을 분리하는 단계는 당업계에 공지된 통상의 분리 또는 정제 방법에 따라 실시될 수 있다(참조: B. Aurousseau et al., *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 57(3):1558-9331(1980); Frank C. Magne et al., *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 34(3):127-129(1957)).

[0041] 상기 기술한 제조방법을 사용하여 제조한 공-형질전환된 대장균을 배양하는 경우 지방산 생합성 경로를 과발현하므로, 유익한 에너지 원으로 사용할 수 있는 지방산을 용이하게 얻을 수 있다.

[0042] 따라서, 본 발명에서는 지방산 생합성 대사 경로(fatty acid biosynthesis pathway)의 상위단계의 물질들의 세포 내 생산 증대를 위해 특정 대사산물을 효율적으로 생산하는 균주를 개발하기 위해서 미생물의 게놈 정보와 대사 네트워크를 이해함과 동시에 야생형 대장균에 적용하여, 표적 유전자의 삽입을 통한 재조합 균주를 개발하여 본 발명이 완성되었다.

발명의 효과

[0043] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0044] (i) 본 발명은 다음 단계를 포함하는 지방산 생합성 경로의 과발현용 형질전환 대장균의 제조방법을 제공한다:

[0045] (a) *aceE* 유전자 및 *accA* 유전자를 하나의 발현벡터에 삽입시키는 단계; 및

[0046] (b) 상기 *aceE* 유전자 및 *accA* 유전자가 삽입된 발현벡터로 대장균을 형질전환시키는 단계.

[0047] (ii) 본 발명의 지방산 생합성 경로의 과발현용 형질전환 대장균의 제조방법은 *aceE* 유전자 및 *accA* 유전자를 하나의 발현벡터에 삽입하여, 상기 벡터로 대장균을 형질전환시키므로, 형질전환 대장균의 유전적 안정성이 높고 지방산 생합성 경로 과발현 효과가 매우 뛰어나다.

도면의 간단한 설명

[0048] 도 1은 *Escherichia coli* 생체 내에서 글루코오즈에서부터 지방산 생합성(FAS) 까지의 경로를 보여주는 도식이다.

도 2는 *Escherichia coli* 와 같은 박테리아용 발현벡터인 pTrc99A에 *aceE* 유전자가 삽입되어있는 구조의 도식화이다. pJE101라 명명한다.

도 3은 *Escherichia coli* 와 같은 박테리아용 발현벡터인 pTrc99A에 *accA* 유전자가 삽입되어있는 구조의 도식화이다. pJE102라 명명한다.

도 4는 *Escherichia coli* 와 같은 박테리아용 발현벡터인 pTrc99A에 *aceE*와 *accA* 유전자가 삽입되어있는 구조의 도식화이다. pJE103라 명명한다.

도 5는 재조합 *Escherichia coli*의 생장곡선을 야생종 *Escherichia coli* 와 비교한 결과를 그린 그래프이다.

도 6은 재조합 *Escherichia coli*의 세포 외에서 분석된 아세트산(도 6a)과 말론산(도 6b)의 양을 야생종 *Escherichia coli* 의 실험 결과와 비교한 결과이다.

도 7은 pJE103을 포함하는 대장균의 세포 외에서 분석된 아세트산(도 7a)과 말론산(도 7b)의 양을, pJE101 또는 pJE102 만을 포함하는 대장균의 실험 결과와 비교한 결과이다.

도 8은 pJE103을 포함하는 대장균의 세포 외에서 분석된 아세트산(도 8a)과 말론산(도 8b)의 양을, pJE101 및 pJE102 을 모두 포함하는 대장균 실험 결과와 비교한 결과이다.

도 9는 재조합 *Escherichia coli*의 세포 내에서 분석된 아세트산(도 9a)과 말론산(도 9b)의 양을 야생종 *Escherichia coli* 의 실험 결과와 비교한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0049] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명 하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0050] **실시예**

[0051] **실시예 1: *aceE*와 *accA*의 유전자를 발현하는 플라스미드 pJE101, pJE102, 및 pJE103의 제조**

[0052] 대장균 K-12의 염색체를 주형으로 하여 아세틸-CoA와 말로닐-CoA의 생산을 위한 네 가지 효소를 암호화하는 *aceE*와 *accA*의 유전자서열(GenBank, NCBI)을 중합효소연쇄반응(PCR, DaKaRa Korea) 방법을 통해 클로닝하였다. *aceE* 및 *accA* 유전자서열 및 각각이 암호화하는 효소의 이름은 하기 표 1에 정리하였고, 각각의 유전자를 증폭하기 위해 사용한 프라이머 및 제한효소는 하기 표 2에 정리하였다.

표 1

[0053]

유전자서열 (GenBank 허가번호)	유전자	생산 효소
서열목록 제1서열 (GeneID: 944834)	*aceE*	pyruvate dehydrogenase, decarboxylase component E1
서열목록 제2서열 (GeneID: 944895)	*accA*	acetyl-CoA carboxylase, carboxytransferase, alpha subunit

표 2

[0054]

유전자		프라이머 서열	제한효소
aceE	F	5 '-CCATGGATGAACGAAACCGTTGACGGCG-3'	Nco I
	R	5 '-GAGCTCTTACGCCAGACGCGGGTTAACT-3'	Sac I
accA	F	5 '-GGATCCATGAGTCTGAATTTCCTTGATTTT-3'	BamH I
	R	5 '-TCTAGATTACGCGTAACCGTAGCTCATC-3'	Xba I

[0055] 표 1의 유전자들은 표 2에 열거된 프라이머를 사용하여 증폭하였다. 증폭된 산물을 표 2에 열거된 제한 효소를 이용하여 pTrc99A 벡터(서열번호 3, Seon-Won Kim et al., *Biotechnol. Prog.*, 23:599-605(2007))에 도입하여 각각 *aceE* 유전자, *accA* 유전자 및 *aceE*와 *accA* 유전자를 포함하는 pJE101, pJE102 및 pJE103를 제조하였다.

[0056] 도 2, 3 및 4는 상기 pJE101(*aceE* 유전자 포함), pJE102(*accA* 유전자 포함), 및 pJE103(*aceE*와 *accA* 유전자 포함)라 명명된 벡터의 지도를 나타내는 도면이다. 각각의 중합효소연쇄반응은 통상적인 반응조건(10 mM Tris-HCl(pH 9.0), 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 2 mM $MgSO_4$, *Taq* DNA 중합효소(DaKaRa))에서 95℃/5분(denaturation), 60℃/1분(annealing), 72/1분(extension)로 1회 수행한 후, 95℃/1분(denaturation), 60℃/30초(annealing), 72/1분(extension)로 30회 반복 수행하였다. 마지막 단계로 안정적인 신장을 위해 95℃/1분(denaturation), 60℃/1분(annealing), 72/5분(extension) 반응시켰다. 중합효소연쇄반응 후 증폭된 DNA는 1% 아가로즈 젤 상에서 확인 후 정제하여 제한효소반응에 이용하였다. 제한효소 처리된 각각의 DNA 조각들을 pTrc99A 벡터의 다중삽입부위(multicloning site)에 도 2, 3 및 4에 개시된 것과 같이 삽입하였다. 각 단계마다 삽입된 유전자의 삽입여부를 확인하기 위해 형질전환된 대장균(*E. coli* AG1 competent cell, Stratagene)에서 플라스미드를 추출하여 이를 다시 원래 삽입부위의 제한효소로 처리하여 잘린 DNA 조작의 크기를 1% 아

가로즈 젤 상에서 전기 영동하여 비교하는 방법을 사용하였다.

[0057] **실시예 2: 대장균 형질전환체(transformant)의 제조**

[0058] 통상적으로 클로닝용으로 많이 쓰이는 대장균의 경우 $CaCl_2$ 완충액을 사용한 컴피턴트 세포를 만든 후 열충격(42℃) 방법에 의해 플라스미드를 숙주세포 내로 넣지만, 본 발명에서는 형질전환체의 안정적 제조와 효율을 높이기 위해 전기충격에 의한 형질전환방법을 사용하였다.

[0059] 상기 전기충격에 의한 형질전환방법을 위해 16시간동안 배양된 200 ㎕의 야생종 대장균 배양액을 250 ml 플라스크에 들어있는 50 ml의 LB배지(10 g/L Tripton, 10 g/L NaCl, 5 g/L yeast extract)에 접종하여 배양액의 흡광도(absorbance)가 600 nm파장에서 0.6에 이르렀을 때, 배양액 전체에 해당하는 50 ml의 배양액은 원심분리하여 상등액과 세포를 분리하였다. 모아진 세포는 10% 글리세롤 5 ml로 2~3회 반복적으로 세척한 후, 10% 글리세롤 100~200 ㎕로 희석하였다.희석한 세포를 50 ㎕씩 분주하고 1~3 ㎕의 플라스미드를 넣어주었다.

[0060] 상기의 플라스미드가 들어있는 분주된 50 ㎕의 액체는 전기천공용 큐벳에 담아 전기충격(1800 V, 25 μF, 200Ω)을 가하였다. 미리 준비해둔 1 ml LB배지(10 g/L Tripton, 10 g/L NaCl, 5 g/L yeast extract)를 첨가한 뒤 1시간 동안 37℃에서 배양하였다. 배양된 형질전환체는 선택배지(엠피실린(50 ㎍/ml)가 첨가된 LB 고체배지)에서 단일균체가 생성될 때까지 배양하였다.

[0061] 상기 방법에 의해 도 2, 도 3 및 도 4에서 보여지는 구성의 발현벡터가 삽입된 재조합 대장균(형질전환체) 3종이 완성되었다. 또한 도 2의 pJE101과 도 3의 pJE102의 플라즈미드를 동시에 가지는 재조합 *E. coli*는 상기 위에 설명되어 있는 형질전환 방식을 사용함에 추가적으로 pJE101이 삽입된 *E. coli*를 위의 방법에 따라 확인한 후, 같은 방법에 의해 pJE102를 삽입하였다. pJE101와 pJE102를 모두 가지는 재조합 E. coli는 내부의 플라즈미드를 추출한 후, PCR primer를 사용해 확인하였으며, 또한 전기영동으로 내부에 삽입된 유전자의 사이즈를 확인하였다.

[0062] **실시예 3: 대장균의 배양 및 재조합 균주로부터 단백질의 생산**

[0063] 형질전환의 정확성이 확인된 각각의 균들을 LB배지에 12시간 배양시키고 글리세롤 농도가 25%가 되게 보관용 균액으로 만든 다음 -80℃에서 배양실험시까지 저장하였다. 배양은 상기 보관용 균액 1 ml을 10 ml 저면 튜브dp에 들어있는 엠피실린(50 ㎍/ml)이 첨가된 3 ml의 LB배지에 24시간동안 배양한 후, 이를 다시 500 ml 플라스크에 들어있는 엠피실린(50 ㎍/ml)이 첨가된 200 ml의 LB배지(10 g/L Tripton, 10 g/L NaCl, 5 g/L yeast extract)에 1/200의 전기 배양액을 접종하여 37℃, 170 rpm 상태에서 24시간 동안 배양하였다(도 5). 단백질 발현을 위해 배양액의 흡광도(absorbance)가 600 nm파장에서 0.6에 이르렀을 때 유도물질인 IPTG(isopropylthio-β-D-galactoside, sigma, USA)를 1 mM 첨가하여 재조합 단백질의 발현을 유도하였다.

[0064] 상기에 따라 배양된 재조합 대장균 4종과 야생종의 생장곡선은 도 5에 나타내었다.

[0065] **실시예 4: 재조합 대장균 세포 내외로부터의 아세트산(acetic acid) 및 말론산(malonic acid)의 측정**

[0066] 배양액 내의 아세트산과 말론산의 농도는 배양 중 특정시간마다 채취한 시료를 4℃에서 원심분리(10분, 4500rpm) 후 상등액과 세포를 분리하여 -80℃에서 보관하고, 이 중 세포는 세포 내 물질의 추출을 위해서 아래와 같은 과정을 거쳤다.

[0067] 상등액과 분리된 세포는 영하 -80℃에 넣어둔 메탄올 250 ㎕로 세포를 희석한 후, -80℃에 넣어두고 5~10분 뒤 확인하면 유동성 있는 액체로 변화된다. 이 과정을 3번 반복하여 -9℃에서 원심분리 후 상등액은 보관(-80℃)하였다. 남은 셀을 가지고 다시 위와 같은 과정을 반복하여 얻어진 용액을 합쳐, 총 500 ㎕의 샘플을 획득하였다. 이것이 인트라셀룰라 물질로서 세포 내의 메타볼라이트(metabolites)를 추출한 것이다.

[0068] 상기 배양액 50 ml로부터 분리된 상등액(엑스트라셀룰라 물질)과 세포에서 추출된 물질(인트라셀룰라 물질)은 각각 500 ㎕씩을 0.2 ㎛ 필터를 이용하여 정제한 후, 하단의 조건하에서 HPLC 정량 분석을 실시하고 그 결과를 도 6 내지 도 9에 도시하였다.

표 3

[0069] 아세트산과 말론산 분석을 위한 HPLC 조건

품 목	조 건
HPLC 모델	(영린기기, Korea), UV730D (영린기기, Korea)
컬럼	Aminex HPX-87H(Biorad, USA)
유속	0.6 ml/min
주입부피	30 ㎕
이동상	0.005N 황산
오븐 온도	50℃
작동 시간	30분
UV 검출파장	210nm

[0070] 실험 결과, 재조합 대장균은 야생종 대장균의 세포 내 및 세포 외에서 분석되는 아세트산과 말론산의 생산량과 분비 경향에 큰 차이를 보임을 알 수 있었다(도 6 내지 9).

[0071] 도 7을 보면, pJE103을 포함하는 대장균의 경우, pJE101 또는 pJE102 만을 포함하는 대장균보다 세포 외에서 분석되는 아세트산과 말론산의 양이 현저하게 증가하였음을 확인할 수 있다.

[0072] 또한 도 8을 보면, pJE103을 포함하는 대장균의 경우 pJE101 및 pJE102 을 모두 포함하는 대장균보다 세포 외에서 분석되는 아세트산과 말론산의 양이 현저하게 증가하였음을 확인할 수 있다.

[0073] 도 9를 보면, 배양이 시작된 후 12시간이 지난 이후부터 아세트산과 말론산의 생산이 야생종에서는 확인되지 않지만, 4종류의 재조합 대장균에서는 IPTG에 의한 발현유도로 아세트산과 말론산의 세포 내 생산이 유지됨을 확인할 수 있다.

[0074] **실시예 5: 재조합 대장균의 유전적 안정성(genetic stability) 비교**

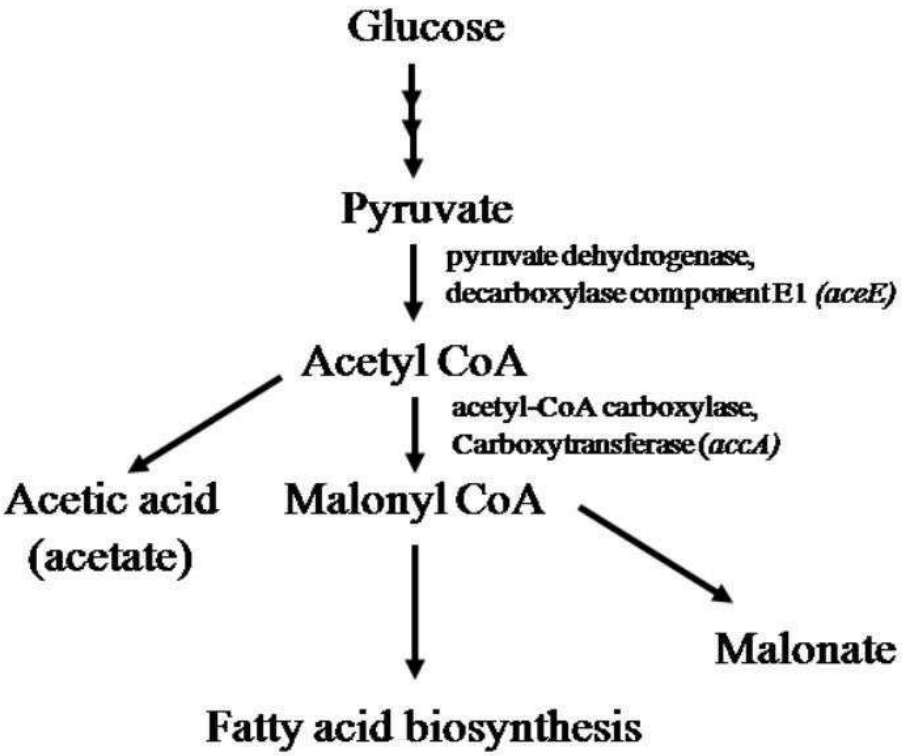
[0075] *aceE* 및 *accA* 유전자 모두로 대장균을 형질전환하는 방법은 (i) 도 3과 같이 *aceE* 및 *accA* 유전자를 모두 포함한 하나의 발현벡터(pJE103)를 대장균에 삽입하는 방법이 있고, (ii) 도 2 및 3과 같이 *aceE* 유전자를 포함한 것(pJE101)과 *accA* 유전자를 포함한 것(pJE102) 이렇게 두 개의 발현벡터를 대장균에 주입하는 방법이 있다.

[0076] (i)의 방법에 따라 pJE103(*aceE*와 *accA* 유전자 포함) 벡터로 형질전환한 대장균은 형질전환용 벡터에 대한 유전적 안정성이 높아 후손 대장균들도 선조 대장균들과 거의 동일하게 아세트산 및 말론산 생산능력을 나타내었다. 반면, (ii)의 방법에 따라 pJE101(*aceE* 유전자 포함)벡터 및 pJE102(*accA* 유전자 포함) 벡터로 형질전환한 대장균의 경우 형질전환용 벡터에 대한 유전적 안정성이 (i)의 방법에 따라 pJE103(*aceE*와 *accA* 유전자 포함) 벡터로 형질전환한 대장균에 비해 다소 낮아 후손 대장균들은 선조 대장균들과 비교하여 아세트산 및 말론산 생산능력이 약간 감소되었으나, 이는 야생종의 대장균이 생산하는 아세트산과 말론산에 비해 높은 생산성을 갖는다. (i)의 방법에 따라 pJE103(*aceE*와 *accA* 유전자 포함) 벡터로 형질전환한 대장균의 유전적 안정성의 확인을 위해 재조합체를 선택배양배지에서 24시간의 배양 후, 세포 내에 벡터를 유지하고 있는 재조합 균주의 개체 수를 확인하였을 때, 89%가 유지되었으며, (ii)의 방법에 따라 pJE101(*aceE* 유전자 포함)벡터 및 pJE102(*accA* 유전자 포함) 벡터로 형질전환한 대장균의 경우 70%로 확인되었다.

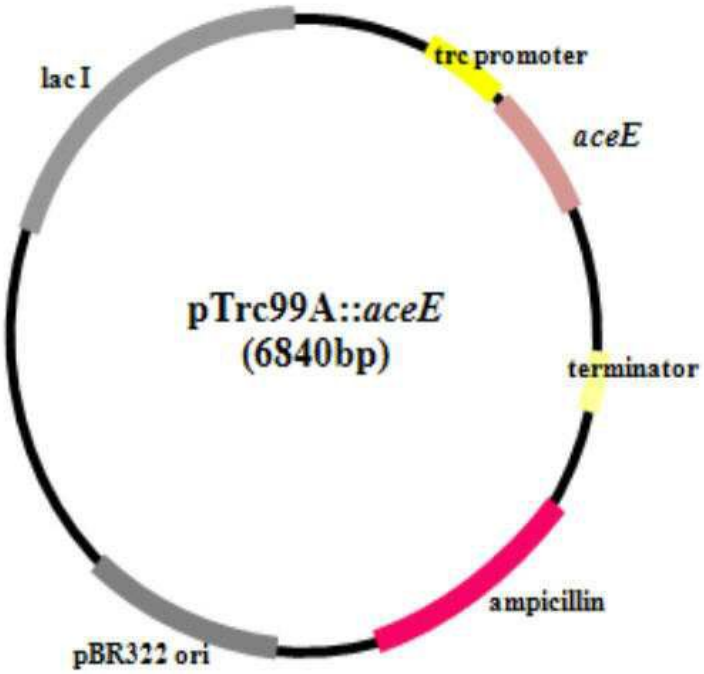
[0077] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

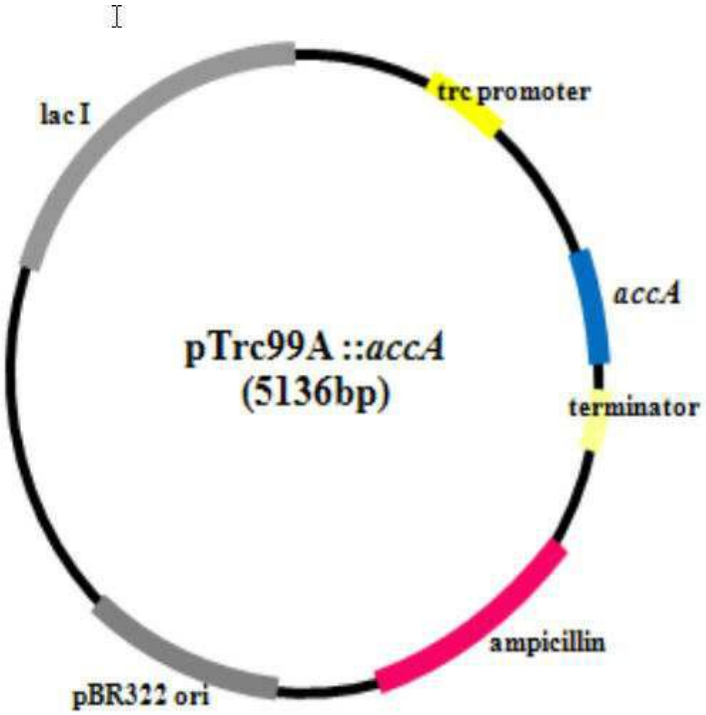
도면1


Glucose
Pyruvate
pyruvate dehydrogenase,
decarboxylase component E1 (aceE)
Acetyl CoA
acetyl-CoA carboxylase,
Carboxytransferase (accA)
Acetic acid
(acetate)
Malonyl CoA
Malonate
Fatty acid biosynthesis

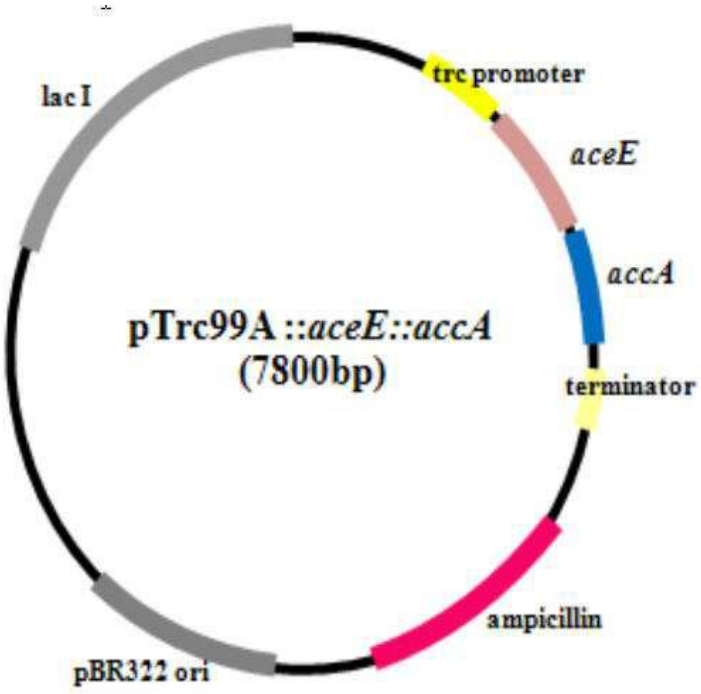
도면2


lac I
trc promoter
aceE
pTrc99A::aceE
(6840bp)
terminator
ampicillin
pBR322 ori

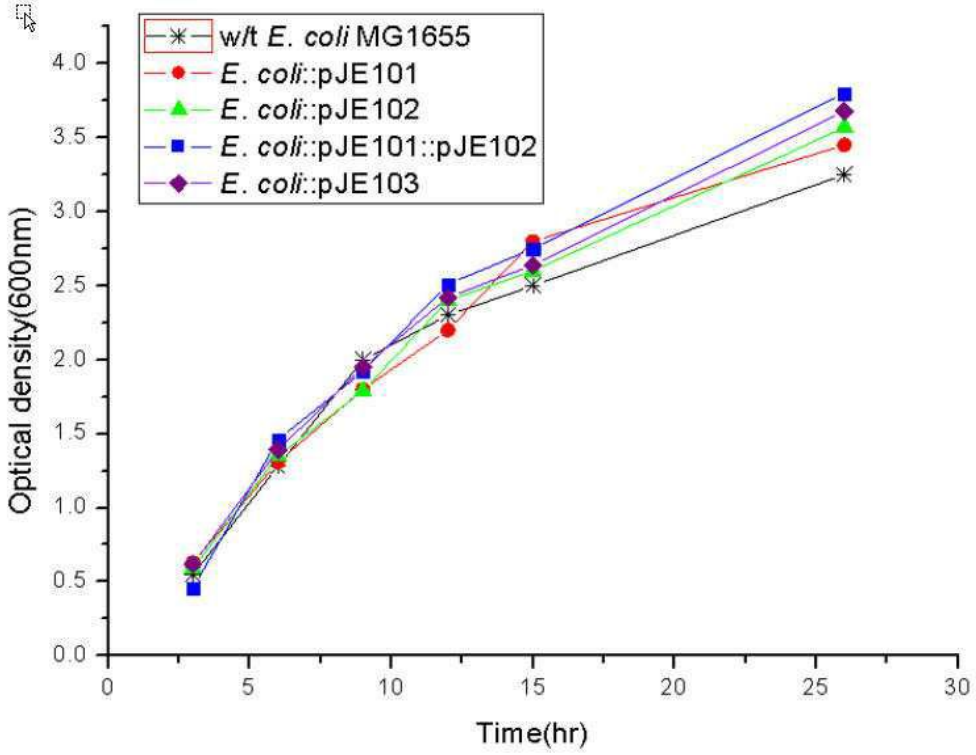
도면3


lac I
trc promoter
accA
pTrc99A ::accA
(5136bp)
terminator
ampicillin
pBR322 ori

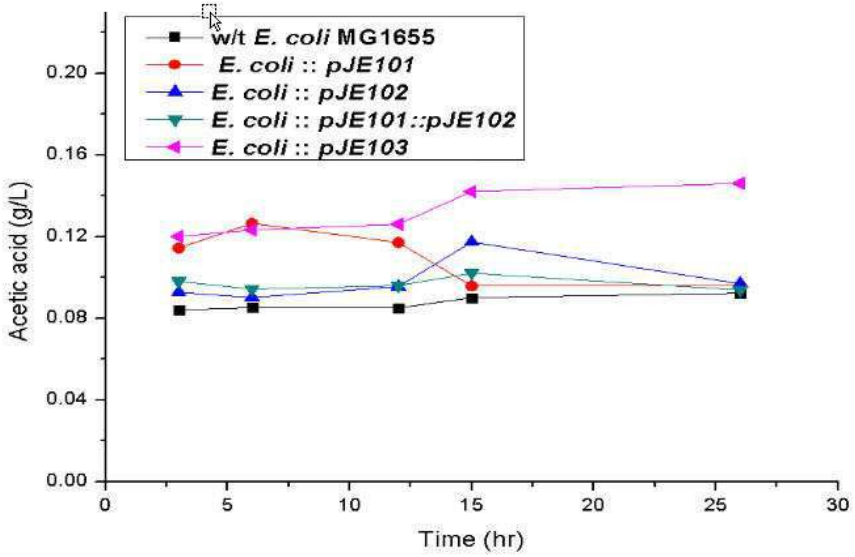
도면4


lac I
trc promoter
aceE
accA
pTrc99A ::aceE::accA
(7800bp)
terminator
ampicillin
pBR322 ori

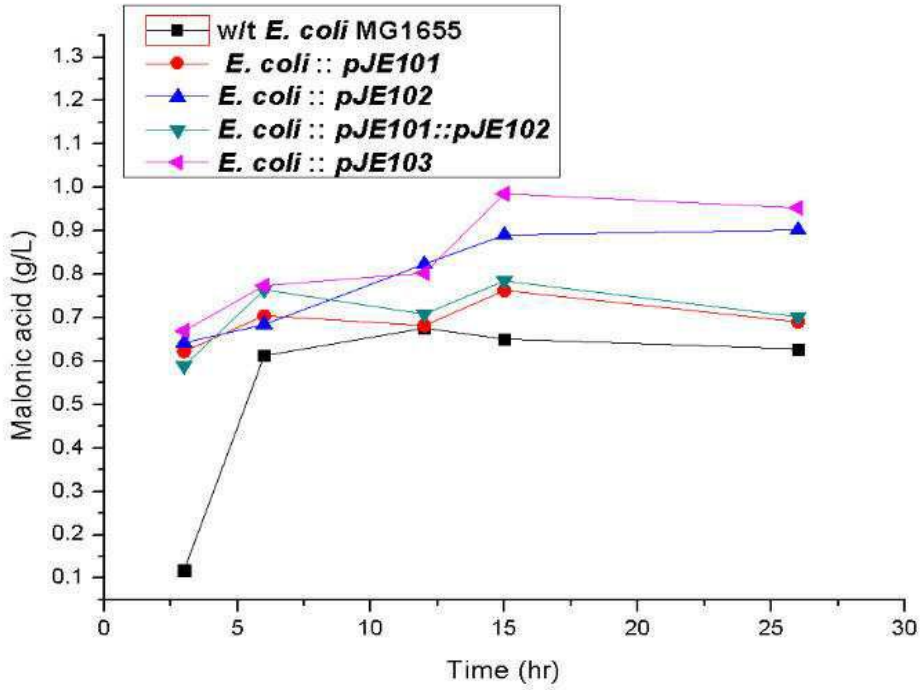
도면5


w/t E. coli MG1655
E. coli::pJE101
E. coli::pJE102
E. coli::pJE101::pJE102
E. coli::pJE103
Optical density(600nm)
Time(hr)
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
3.5
4.0
0
5
10
15
20
25
30

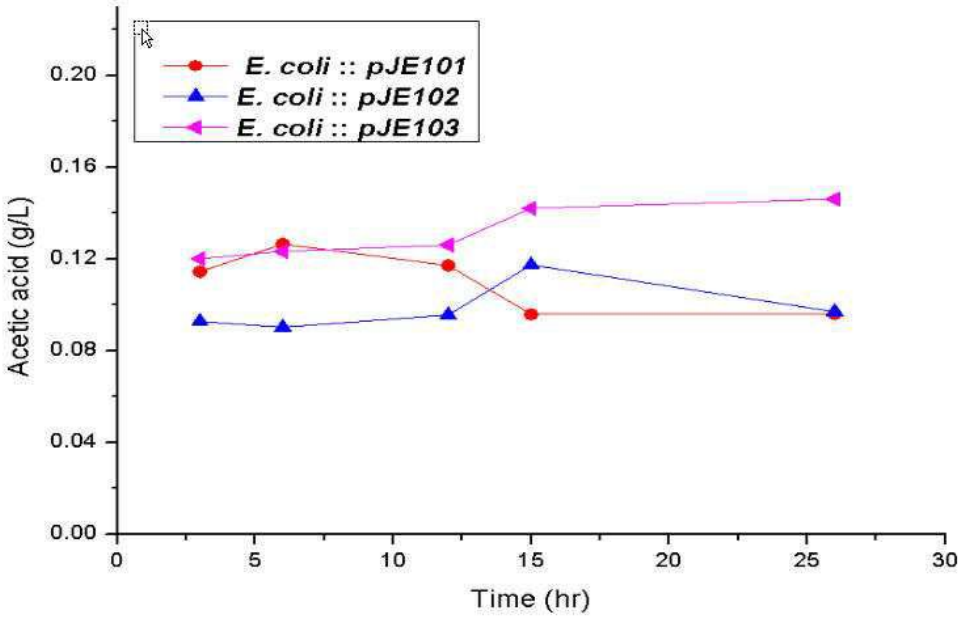
도면6a


w/t E. coli MG1655
E. coli :: pJE101
E. coli :: pJE102
E. coli :: pJE101::pJE102
E. coli :: pJE103
Acetic acid (g/L)
Time (hr)
0.00
0.04
0.08
0.12
0.16
0.20
0
5
10
15
20
25
30

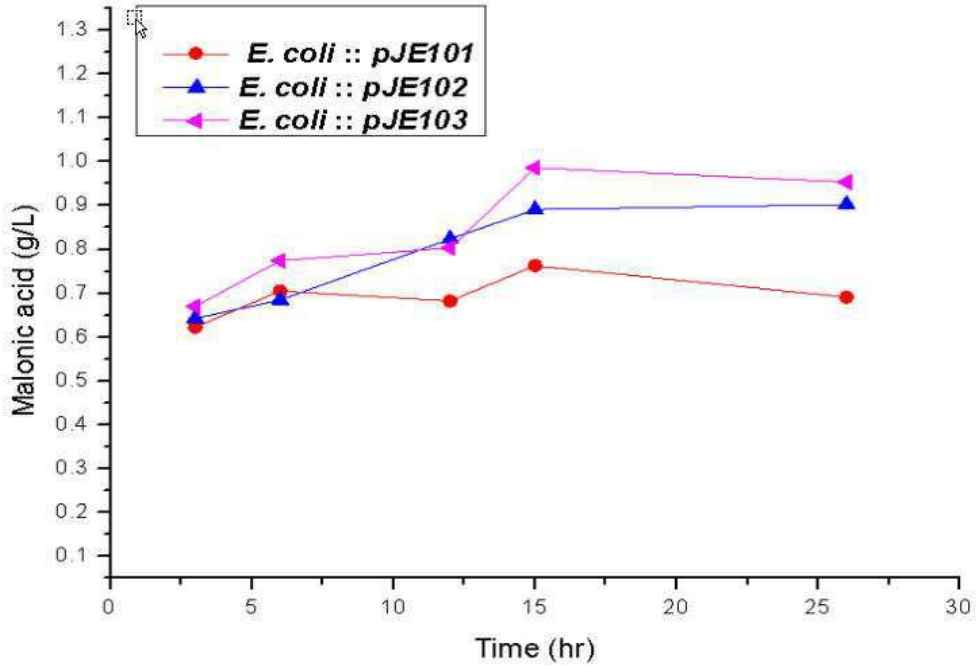
도면6b


w/t E. coli MG1655
E. coli :: pJE101
E. coli :: pJE102
E. coli :: pJE101::pJE102
E. coli :: pJE103
Malonic acid (g/L)
Time (hr)

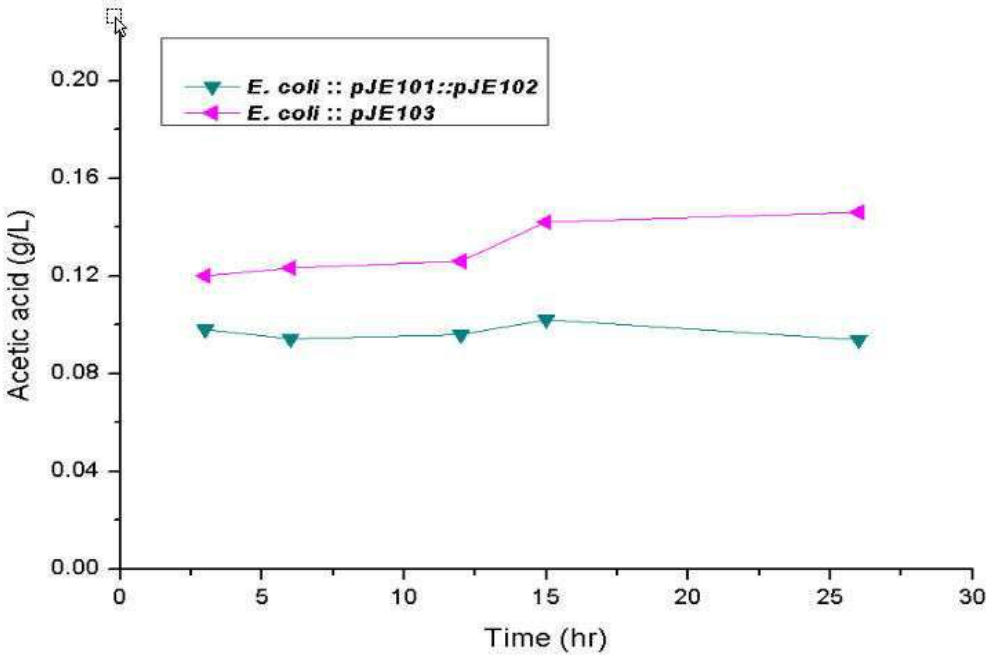
도면7a


E. coli :: pJE101
E. coli :: pJE102
E. coli :: pJE103
Acetic acid (g/L)
Time (hr)

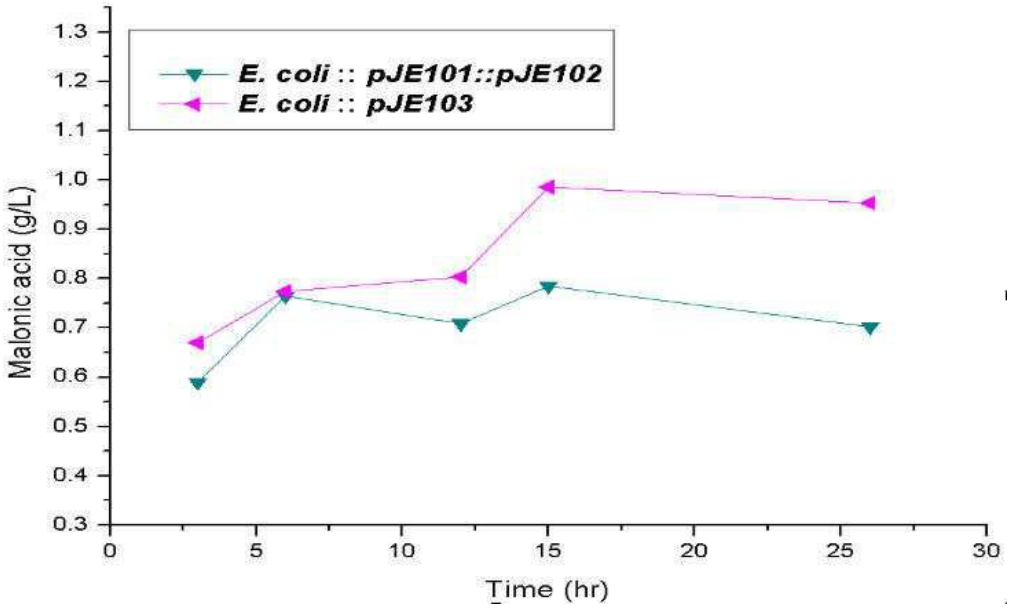
도면7b


E. coli :: pJE101
E. coli :: pJE102
E. coli :: pJE103
Malonic acid (g/L)
Time (hr)
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0.7
0.8
0.9
1.0
1.1
1.2
1.3
0
5
10
15
20
25
30

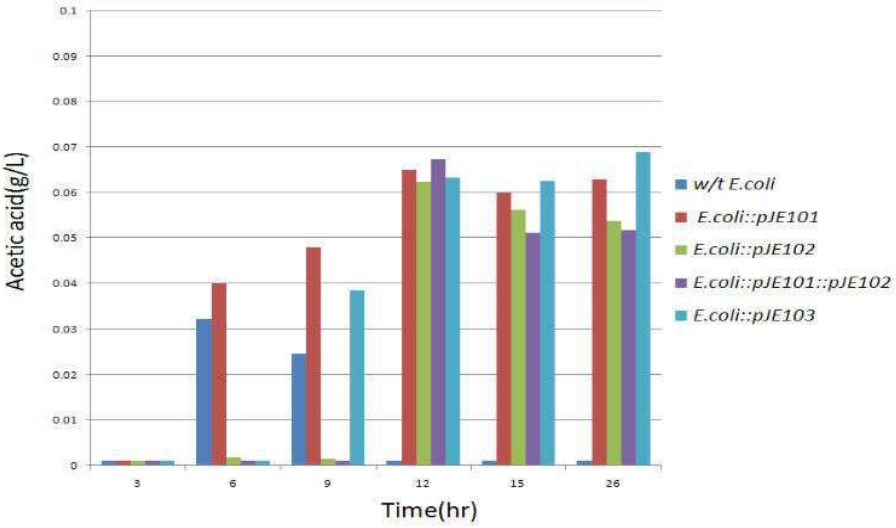
도면8a


E. coli :: pJE101::pJE102
E. coli :: pJE103
Acetic acid (g/L)
Time (hr)
0.00
0.04
0.08
0.12
0.16
0.20
0
5
10
15
20
25
30

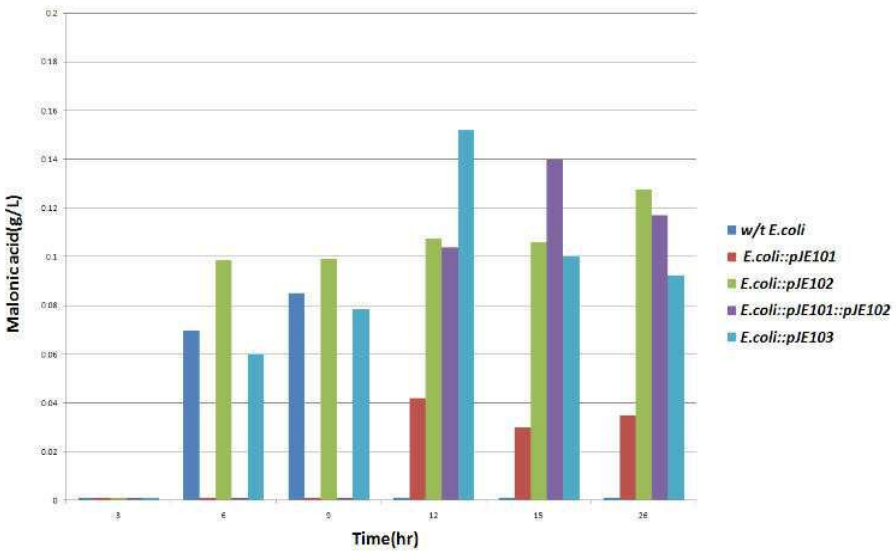
도면8b


E. coli :: pJE101::pJE102
E. coli :: pJE103
Malonic acid (g/L)
Time (hr)
1.3
1.2
1.1
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0
5
10
15
20
25
30

도면9a


Acetic acid(g/L)
Time(hr)
w/t E.coli
E.coli::pJE101
E.coli::pJE102
E.coli::pJE101::pJE102
E.coli::pJE103
0.1
0.09
0.08
0.07
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0
3
6
9
12
15
26

도면9b



서 열 목 록

<110> Industry - University Cooperation Foundation Sogang University

<120> Method for Preparing Transformed E coli for Over-expression of Fatty Acid Biosynthesis Pathway and Transformed E coli Prepared by the Same

<160> 3

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 2664

<212> DNA

<213> Escherichia coli strain K-12, aceE

<400> 1

atgtcagaac gtttcccaaa tgacgtggat ccgatcgaaa ctcgcgactg gctccaggcg 60

atcgaatcgg tcatccgtga agaaggtgtt gagcgtgctc agtatctgat cgaccaactg 120

cttgctgaag cccgcaaagg cggtgtaaac gtagccgcag gcacaggtat cagcaactac 180

atcaacacca tccccgttga agaacaaccg gagtatccgg gtaatctgga actggaacgc 240

cgtattcgtt cagctatccg ctggaacgcc atcatgacgg tgctgcgtgc gtcgaaaaaa 300

gacctcgaac tgggcggcca tatggcgtcc ttccagtctt ccgcaaccat ttatgatgtg 360

tgctttaacc acttcttccg tgcacgcaac gagcaggatg gcggcgacct ggtttacttc 420

cagggccaca tctccccggg cgtgtacgct cgtgctttcc tggaaggtcg tctgactcag 480

gagcagctgg ataacttccg tcaggaagtt cacggcaatg gcctctcttc ctatccgcac 540

ccgaaactga tgccggaatt ctggcagttc ccgaccgtat ctatgggtct gggtccgatt 600

ggtgctattt accaggctaa attcctgaaa tatctggaac accgtggcct gaaagatacc 660

tctaaacaaa ccgtttacgc gttcctcggt gacggtgaaa tggacgaacc ggaatccaaa 720

ggtgcgatca ccatcgctac ccgtgaaaaa ctggataacc tggtcttcgt tatcaactgt 780

aacctgcagc gtcttgacgg cccggtcacc ggtaacggca agatcatcaa cgaactggaa 840

ggcatcttcg aaggtgctgg ctggaacgtg atcaaagtga tgtggggtag ccgttgggat 900

gaactgctgc gtaaggatac cagcggtaaa ctgatccagc tgatgaacga aaccgttgac 960

ggcgactacc agaccttcaa atcgaaagat ggtgcgtacg ttcgtgaaca cttcttcggt 1020

aaatatcctg aaaccgcagc actggttgca gactggactg acgagcagat ctgggcactg 1080

aaccgtggtg gtcacgatcc gaagaaaatc tacgctgcat tcaagaaagc gcaggaaacc 1140

aaaggcaaag cgacagtaat ccttgctcat accattaaag gttacggcat gggcgacgcg 1200

gctgaaggta aaaacatcgc gcaccaggtt aagaaaatga acatggacgg tgtgcgtcat 1260

atccgcgacc gtttcaatgt gccggtgtct gatgcagata tcgaaaaact gccgtacatc 1320

accttcccgg aaggttctga agagcatacc tatctgcacg ctcagcgtca gaaactgcac 1380

ggttatctgc caagccgtca gccgaacttc accgagaagc ttgagctgcc gagcctgcaa 1440

gacttcggcg cgctgttgga agagcagagc aaagagatct ctaccactat cgctttcgtt 1500

cgtgctctga acgtgatgct gaagaacaag tcgatcaaag atcgtctggt accgatcatc 1560

gccgacgaag cgcgtacttt cggtatggaa ggtctgttcc gtcagattgg tatttacagc 1620

ccgaacggtc agcagtacac cccgcaggac cgcgagcagg ttgcttacta taaagaagac 1680

gagaaaggtc agattctgca ggaagggatc aacgagctgg gcgcaggttg ttcctggctg 1740

gcagcggcga cctcttacag caccaacaat ctgccgatga tcccgttcta catctattac 1800

tcgatgttcg gcttccagcg tattggcgat ctgtgctggg cggctggcga ccagcaagcg 1860

cgtggcttcc tgatcggcgg tacttccggt cgtaccaccc tgaacggcga aggtctgcag 1920

cacgaagatg gtcacagcca cattcagtcg ctgactatcc cgaactgtat ctcttacgac 1980

ccggcttacg cttacgaagt tgctgtcatc atgcatgacg gtctggagcg tatgtacggt 2040

gaaaaacaag agaacgttta ctactacatc actacgctga acgaaaacta ccacatgccg 2100

gcaatgccgg aaggtgctga ggaaggtatc cgtaaaggta tctacaaact cgaaactatt 2160

gaaggtagca aaggtaaagt tcagctgctc ggctccggtt ctatcctgcg tcacgtccgt 2220

gaagcagctg agatcctggc gaaagattac ggcgtaggtt ctgacgttta tagcgtgacc 2280

tccttcaccg agctggcgcg tgatggtcag gattgtgaac gctggaacat gctgcacccg 2340

ctggaaactc cgcgcgttcc gtatatcgct caggtgatga acgacgctcc ggcagtggca 2400

tctaccgact atatgaaact gttcgctgag caggtccgta cttacgtacc ggctgacgac 2460

taccgcgtac tgggtactga tggcttcggt cgttccgaca gccgtgagaa cctgcgtcac 2520

cacttcgaag ttgatgcttc ttatgtcgtg gttgcggcgc tgggcgaact ggctaaacgt 2580

ggcgaaatcg ataagaaagt ggttgctgac gcaatcgcca aattcaacat cgatgcagat 2640

aaagttaacc cgcgtctggc gtaa 2664

<210> 2

<211> 960

<212> DNA

<213> Escherichia coli strain K-12, accA

<400> 2

atgagtctga atttccttga ttttgaacag ccgattgcag agctggaagc gaaaatcgat 60

tctctgactg cggttagccg tcaggatgag aaactggata ttaacatcga tgaagaagtg 120

catcgtctgc gtgaaaaaag cgtagaactg acacgtaaaa tcttcgccga tctcggtgca 180

tggcagattg cgcaactggc acgccatcca cagcgtcctt ataccctgga ttacgttcgc 240

ctggcatttg atgaatttga cgaactggct ggcgaccgcg cgtatgcaga cgataaagct 300

atcgtcggtg gtatcgcccg tctcgatggt cgtccggtga tgatcattgg tcatcaaaaa 360

ggtcgtgaaa ccaaagaaaa aattcgccgt aactttggta tgccagcgcc agaaggttac 420

cgcaaagcac tgcgtctgat gcaaatggct gaacgcttta agatgcctat catcaccttt 480

atcgacaccc cgggggctta tcctggcgtg ggcgcagaag agcgtggtca gtctgaagcc 540

attgcacgca acctgcgtga aatgtctcgc ctcggcgtac cggtagtttg tacggttatc 600

ggtgaaggtg gttctggcgg tgcgctggcg attggcgtgg gcgataaagt gaatatgctg 660

caatacagca cctattccgt tatctcgccg gaaggttgtg cgtccattct gtggaagagc 720

gccgacaaag cgccgctggc ggctgaagcg atgggtatca ttgctccgcg tctgaaagaa 780

ctgaaactga tcgactccat catcccggaa ccactgggtg gtgctcaccg taacccggaa 840

gcgatggcgg catcgttgaa agcgcaactg ctggcggatc tggccgatct cgacgtgtta 900

agcactgaag atttaaaaaa tcgtcgttat cagcgcctga tgagctacgg ttacgcgtaa 960

960

<210> 3

<211> 4176

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Vector backbone pTrc99A

<400

> 3

gtttgacagc ttatcatcga ctgcacggtg caccaatgct tctggcgtca ggcagccatc 60

ggaagctgtg gtatggctgt gcaggtcgta aatcactgca taattcgtgt cgctcaaggc 120

gcactcccgt tctggataat gtttttttgcg ccgacatcat aacggttctg gcaaatattc 180

tgaaatgagc tgttgacaat taatcatccg gctcgtataa tgtgtggaat tgtgagcgga 240

taacaatttc acacaggaaa cagaccatgg aattcgagct cggtacccgg ggatcctcta 300

gagtcgacct gcaggcatgc aagcttggct gttttggcgg atgagagaag attttcagcc 360

tgatacagat taaatcagaa cgcagaagcg gtctgataaa acagaatttg cctggcggca 420

gtagcgcggt ggtcccacct gaccccatgc cgaactcaga agtgaaacgc cgtagcgccg 480

atggtagtgt ggggtctccc catgcgagag tagggaactg ccaggcatca aataaaacga 540

aaggctcagt cgaaagactg ggcctttcgt tttatctgtt gtttgtcggt gaacgctctc 600

ctgagtagga caaatccgcc gggagcggat ttgaacgttg cgaagcaacg gcccggaggg 660

tggcgggcag gacgcccgcc ataaactgcc aggcatcaaa ttaagcagaa ggccatcctg 720

acggatggcc tttttgcgtt tctacaaact ctttttgttt atttttctaa atacattcaa 780

atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct tcaataatat tgaaaaagga 840

agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc ctttttgcg gcattttgcc 900

ttcctgtttt tgctcaccca gaaacgctgg tgaaagtaaa agatgctgaa gatcagttgg 960

gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg taagatcctt gagagttttc 1020

gccccgaaga acgttttcca atgatgagca cttttaaagt tctgctatgt ggcgcggtat 1080

tatcccgtgt tgacgccggg caagagcaac tcggtcgccg catacactat tctcagaatg 1140

acttggttga gtactcacca gtcacagaaa agcatcttac ggatggcatg acagtaagag 1200

aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataacactgc ggccaactta cttctgacaa 1260

cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt ttttgcacaa catgggggat catgtaactc 1320

gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca 1380

cgatgcctac agcaatggca acaacgttgc gcaaactatt aactggcgaa ctacttactc 1440

tagcttcccg gcaacaatta atagactgga tggaggcgga taaagttgca ggaccacttc 1500

tgcgctcggc ccttccggct ggctggttta ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg 1560

ggtctcgcgg tatcattgca gcactggggc cagatggtaa gccctcccgt atcgtagtta 1620

tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag 1680

gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt ttactcatat atactttaga 1740
ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt gaagatcctt tttgataatc 1800
tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa 1860
agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaaacaa 1920
aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt tgccggatca agagctacca actcttttc 1980
cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac tgtccttcta gtgtagccgt 2040
agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac atacctcgct ctgctaatcc 2100

tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac 2160
gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca 2220
gcttggagcg aacgacctac accgaactga gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg 2280
ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag 2340
gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt 2400
ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc gtcaggggggg cggagcctat 2460
ggaaaaacgc cagcaacgcg gccttttac ggttcctggc cttttgctgg ccttttgctc 2520

acatgttctt tcctgcgtta tcccctgatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt 2580
gagctgatac cgctcgccgc agccgaacga ccgagcgcag cgagtcagtg agcgaggaag 2640
cggaagagcg cctgatgcgg tattttctcc ttacgcatct gtgcggtatt tcacaccgca 2700
tatggtgcac tctcagtaca atctgctctg atgccgcata gttaagccag tatacactcc 2760
gctatcgcta cgtgactggg tcatggctgc gccccgacac ccgccaacac ccgctgacgc 2820
gccctgacgg gcttgtctgc tcccggcatc cgcttacaga caagctgtga ccgtctccgg 2880
gagctgcatg tgtcagaggt tttcaccgtc atcaccgaaa cgcgcgaggc agcagatcaa 2940

ttcgcgcgcg aaggcgaagc ggcatgcatt tacgttgaca ccatcgaatg gtgcaaaacc 3000
tttcgcggta tggcatgata gcgcccggaa gagagtcaat tcagggtggt gaatgtgaaa 3060
ccagtaacgt tatacgatgt cgcagagtat gccggtgtct cttatcagac cgtttcccgc 3120
gtggtgaacc aggccagcca cgtttctgcg aaaacgcggg aaaaagtgga agcggcgatg 3180
gcggagctga attacattcc caaccgcgtg gcacaacaac tggcgggcaa acagtcgttg 3240
ctgattggcg ttgccacctc cagtctggcc ctgcacgcgc cgtcgcaaat tgtcgcggcg 3300
attaaatctc gcgccgatca actgggtgcc agcgtggtgg tgtcgatggt agaacgaagc 3360

ggcgtcgaag cctgtaaagc ggcggtgcac aatcttctcg cgcaacgcgt cagtgggctg 3420

atcattaact atccgctgga tgaccaggat gccattgctg tggaagctgc ctgcactaat 3480

gttccggcgt tatttcttga tgtctctgac cagacaccca tcaacagtat tattttctcc 3540

catgaagacg gtacgcgact gggcgtggag catctggtcg cattgggtca ccagcaaatc 3600

gcgctgttag cgggcccatt aagttctgtc tcggcgcgtc tgcgtctggc tggctggcat 3660

aaatatctca ctcgcaatca aattcagccg atagcggaac gggaaggcga ctggagtgcc 3720

atgtccggtt ttcaacaaac catgcaaatg ctgaatgagg gcatcgttcc cactgcgatg 3780

ctggttgcca acgatcagat ggcgctgggc gcaatgcgcg ccattaccga gtccgggctg 3840

cgcgttggtg cggatatctc ggtagtggga tacgacgata ccgaagacag ctcatgttat 3900

atcccgccgt caaccaccat caaacaggat tttcgcctgc tggggcaaac cagcgtggac 3960

cgcttgctgc aactctctca gggccaggcg gtgaagggca atcagctgtt gcccgtctca 4020

ctggtgaaaa gaaaaaccac cctggcgccc aatacgcaaa ccgcctctcc ccgcgcgttg 4080

gccgattcat taatgcagct ggcacgacag gtttcccgac tggaaagcgg gcagtgagcg 4140

caacgcaatt aatgtgagtt agcgcgaatt gatctg 4176