

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0020313

(43) 공개일자 2024년02월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 1/12 (2006.01) A23K 10/10 (2017.01)

A23K 50/80 (2016.01) C07K 14/46 (2006.01)

C12N 15/79 (2006.01) C12R 1/89 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 1/125 (2021.05)

A23K 10/10 (2016.05)

(21) 출원번호 10-2022-0097097

(22) 출원일자 2022년08월04일

심사청구일자 2022년08월04일

(71) 출원인

국립부경대학교 산학협력단

부산광역시 남구 용소로 45, 부경대학교내 (대연동)

(72) 발명자

최태진

부산광역시 남구 분포로 111, 139동 601호(용호동, 엘지메트로시티)

김성현

경상남도 김해시 분성로 155, 321동 702호(외동, 한국2차아파트)

김민정

부산광역시 해운대구 선수촌로208번길 112(반여동)

(74) 대리인

최규환

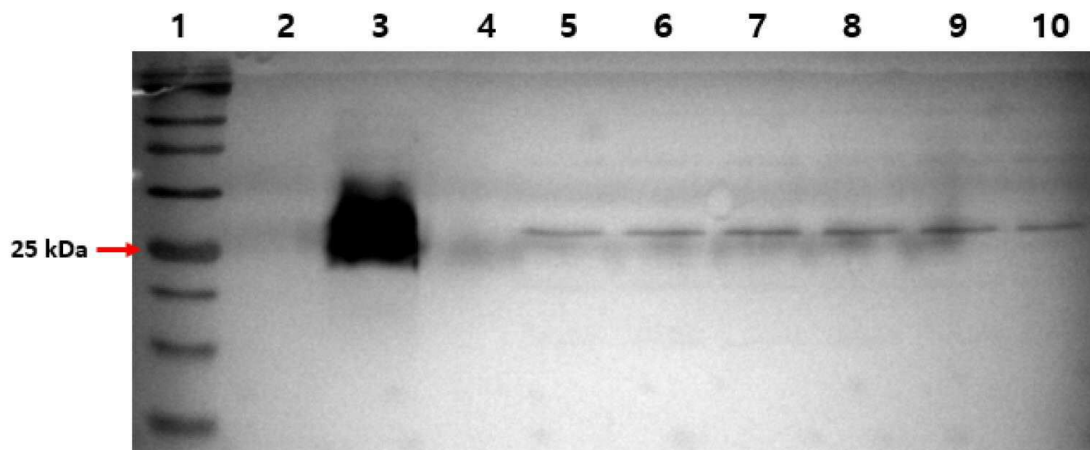
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **넙치 성장호르몬을 고발현하는 클로렐라 균주 및 이의 용도**

(57) 요약

본 발명은 기탁번호가 KCTC14988BP이고, 넙치 성장호르몬 단백질을 발현하는 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*) PKVL7422-TF1 균주 및 이의 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

A23K 50/80 (2016.05)
C07K 14/461 (2013.01)
C12N 15/79 (2013.01)
C12R 2001/89 (2021.05)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1525012271
과제번호	202102922
부처명	해양수산부
과제관리(전문)기관명	해양수산과학기술진흥원
연구사업명	해양수산기술창업기업Scale-up지원사업
연구과제명	형질전환 클로렐라를 이용한 어류 재조합 성장호르몬의 대량생산 및 활용 기술 개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	부경대학교산학협력단
연구기간	2020.04.16 ~ 2022.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711172979
과제번호	2022M3E5E6079747
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오위해평가원팀리노베이션
연구과제명	넙치 성장호르몬 발현 유전자변형 클로렐라 실용화를 위한 고도화 및 바이오 위해성
평가 연구	
기 여 율	1/2
과제수행기관명	부경대학교
연구기간	2022.06.01 ~ 2024.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

기탁번호가 KCTC14988BP이고, 넙치 성장호르몬 단백질을 발현하는 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*) PKVL7422-TF1 균주.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 균주는 발현된 전체 수용성 단백질 중 36~37%(w/w)가 넙치 성장호르몬 단백질인 것을 특징으로 하는 클로렐라 불가리스 PKVL7422-TF1 균주.

청구항 3

제1항의 균주를 배양하는 단계를 포함하는, 재조합 넙치 성장호르몬 단백질의 생산방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 배양은 0.001~0.003 mM의 염화마그네슘 EDTA($\text{Na}_2\text{Mg EDTA}$), 0.01~0.03 mM의 구연산철암모늄(ferric ammonium citrate), 0.02~0.04 mM의 구연산·수화물, 0.02~0.04 mM의 황산마그네슘·7수화물($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0.20~0.24 mM의 제1인산칼륨·수화물($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), 0.1~0.3 mM의 염화칼슘·2수화물($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 0.16~0.20 mM의 탄산나트륨(Na_2CO_3), 220~270 mM의 염화나트륨, 2.8~2.9 mg/ℓ의 붕산(H_3BO_3), 1.7~1.9 mg/ℓ의 염화망가니즈·4수화물($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), 0.1~0.3 mg/ℓ의 황산아연·7수화물($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0.07~0.09 mg/ℓ의 황산구리·5수화물($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), 0.04~0.06 mg/ℓ의 염화코발트·6수화물($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 0.3~0.5 mg/ℓ의 몰리브덴산 나트륨·2수화물($\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 16~24 mM의 인산이암모늄($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) 및 0.4~0.6 %(w/v)의 글루코스로 이루어진 배지에서 배양하는 것을 특징으로 하는 재조합 넙치 성장호르몬 단백질의 생산방법.

청구항 5

제1항의 균주 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는, 양식어류용 사료 첨가제.

청구항 6

제5항의 사료 첨가제를 배합한 양식어류용 사료조성물.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 넙치 성장호르몬을 고발현하는 클로렐라 균주 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 소득 수준이 향상되면서 몸에 좋은 고도불포화 지방산(DHA, EPA), 타우린 등 우수한 영양성분을 많이 함유하고 있는 웰빙 식품으로, 그리고 풍부한 단백질원으로 수산물의 소비는 매년 증가하고 있다.

[0003] 1980년대부터 시작된 우리나라 넙치 양식은 1990년대 들어 생활수준의 향상에 따른 소비확대와 생산량 증대 위주의 기술 개발에 힘입어 넙치 양식 생산량의 비약적인 증가를 보이며 본격적인 산업으로 성장하게 되었다. 그러나 2000년대에 접어들면서 수출 감소 및 수입 수산물 증가 등으로 성장이 정체되고 있지만 양식넙치는 우리나라 해산양식어류 소비의 65%를 차지하고, 생산량의 50%를 차지하는 비중있는 어종이다. 최근에는 잦은 질병 발생으로 폐사가 빈번하게 일어나 질병 치료에 소요되는 경비 및 인건비가 가중되어 양식 생산 단가가 높아지고 있으며, 항생제의 오남용으로 양식 수산물에 대한 소비자의 불신이 가중되고 있는 실정이다. 이러한 어려운 상황을 극복하고 근본적으로 넙치 양식 산업의 생산성을 높여 세계적인 경쟁력을 갖기 위해서는 우량 품종의

개발, 사료 및 첨가제의 개발 등이 필요하다.

[0004] 미세조류, 특히 녹조류(*Chlorophyta*)는 광독립영양생물로 태양에너지와 이산화탄소를 이용해 유기물로 변환시키는 진핵생물의 일종이다. 녹조류는 태양에너지를 사용하여 이산화탄소를 고정화하는 탄소동화기능을 이용하여 바이오매스 및 다양한 유용물질을 생산하므로 이산화탄소의 저감과 유용물질 생산이라는 장점으로 주목받고 있다. 또한 상기 언급한 미세조류의 바이오매스에 포함되어 있는 다량의 탄화수소는 대체에너지인 바이오디젤 등으로 전환이 가능하며 일부 미세조류는 균체 내에 다량의 전분을 축적하는데 이들을 분해하여 에탄올 생산이 가능하므로 대체 에너지 측면에서도 유용성이 높아 주목을 받고 있다. 최근 미국과 중국을 중심으로 형질전환 미세조류를 이용하여 다양한 치료용 단백질 및 백신 등의 생산에 관한 연구가 이루어지고 있으며, 미세조류의 여러 장점 때문에 앞으로 미세조류를 이용한 재조합 단백질의 생산이 늘어날 것으로 예상된다. 미세조류의 형질전환 기술은 클라미도모나스 레인하르티(*Chlamydomonas reinhardtii*)를 대표 모델로 하여 개발되고 있으나, 최근 클로렐라 등 다양한 미세조류를 대상으로 한 형질전환 기술들이 보고되고 있다.

[0005] 한편, 한국공개특허 제2022-0082527호에는 'VHSV 당단백질을 발현하는 형질전환 미세조류를 유효성분으로 포함하는 VHS의 예방 또는 개선용 사료첨가제 조성물 및 이의 용도'가 개시되어 있고, 한국공개특허 제2014-0063045호에는 '형질전환 클로렐라를 이용한 젖소 락토페린 발현'이 개시되어 있으나, 본 발명의 '넙치 성장호르몬을 고발현하는 클로렐라 균주 및 이의 용도'에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자는 야생형 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*) PKVL7422를 CaMV 35S 프로모터(Cauliflower mosaic virus 35S promoter)의 조절 하에 넙치 성장호르몬 유전자를 연결한 재조합 벡터를 활용하여 넙치 성장호르몬 단백질을 발현하는 형질전환체들을 생성하였다. 그 후 각 개체들의 넙치 성장호르몬 단백질 발현 수준을 정량화한 결과 넙치 성장호르몬을 고발현하는 클로렐라 불가리스 PKVL7422-TF1 (기탁번호 KCTC 14988BP) 균주를 확보함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 기탁번호가 KCTC14988BP이고, 넙치 성장호르몬 단백질을 발현하는 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*) PKVL7422-TF1 균주를 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 균주를 배양하는 단계를 포함하는, 재조합 넙치 성장호르몬 단백질의 생산방법을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 균주 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는, 양식어류용 사료 첨가제를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 사료 첨가제를 배합한 양식어류용 사료조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명의 넙치 성장호르몬 고발현 형질전환 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*) PKVL7422-TF1는 BGPK 배지, 광배양 조건 하에서 넙치 성장호르몬을 고발현하는 특성을 가진다. 본 발명에 따른 클로렐라 불가리스 PKVL7422-TF1 균주를 첨가한 사료 첨가제를 적용할 경우, 어류의 성장 촉진 효과를 기대할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 본 발명의 클로렐라 불가리스 PKVL7422-TF1 (기탁번호 KCTC 14988BP) 균주에 도입된, 클로렐라 불가리스의 코돈에 최적화된 넙치 성장호르몬 유전자의 서열을 보여준다. 빨간색으로 표시된 부분은 진핵생물의 전사를 위한 Kozak 서열이고, 파란색과 초록색으로 표시된 부분은 각각 *Bam*HI 및 *Xho*I 제한효소 서열이다.

도 2는 본 발명에서 사용된 재조합 벡터의 모식도로, 선행 연구(한국등록특허 10-1985345)에서 사용된 야생형 클로렐라 불가리스 PKVL7422의 질산염 환원 효소 암호화 유전자의 5' 말단과 3' 말단 사이에 프로모터-삽입 유전자-터미네이터가 클로닝된 미세조류 형질전환용 벡터를 활용하여 제작하였다.

도 3은 본 발명의 재조합 벡터(도 2)를 활용하여 형질전환한 클로렐라 개체를 염소산 이온(chlorate ion, ClO_3^-)이 포함된 BGPK 고체배지 상에서 배양한 결과이다. 형질전환된 개체는 질산환원효소가 기능하지 못하므로, 염

소산 이온을 아염소산 이온으로 환원시킬 수 없어, 염소산 이온이 함유된 배양액에 대해 저항성을 가지게 되어, 비형질전환체와 달리 염소산염이 함유된 배양액에서 생장이 가능하다.

도 4는 넘치 성장호르몬 형질전환 개체의 넘치 성장호르몬 유전자 삽입 유무를 확인하기 위해 실시한 PCR 결과이다. 각 아가로스 겔에 대하여, 레인 1 및 레인 20: DNA Ladder Marker, 레인 2 및 레인 21: CVnr(1kb)-35S-fGH 플라스미드, 레인 3 및 레인 22: 야생형 클로렐라 불가리스 PKVL7422 균주의 게놈 DNA, 레인 4 내지 19 및 레인 23 내지 36: 넘치 성장호르몬 유전자가 도입된 형질전환 클로렐라 불가리스 균주의 게놈 DNA.

도 5는 넘치 성장호르몬 형질전환 클로렐라 개체 중 넘치 성장호르몬을 고발현하는 개체의 발현 수준을 저발현 개체와 비교하여 보여주는 웨스턴 블랏 결과이다. 레인 1: Protein ladder marker, 레인 2: 야생형 클로렐라 불가리스 PKVL7422의 전체 단백질, 레인 3: 클로렐라 불가리스 PKVL7422-TF1의 전체 단백질, 레인 4: 2X Protein Sample Buffer (ELPIS BIO, Korea), 레인 5-10: 넘치 성장호르몬 저발현 형질전환 클로렐라 불가리스의 전체 단백질.

도 6은 넘치 성장호르몬을 고발현하는 클로렐라 불가리스 PKVL7422-TF1의 넘치 성장호르몬 발현량을 정량하기 위한 웨스턴 블랏 결과이다. 레인 1: Protein Ladder Marker, 레인 2 내지 9: 대장균 BL21에서 발현 및 순수분리한 넘치 성장호르몬 단백질을 희석한 시료로 순서대로 100, 50, 25, 10, 5, 2.5, 1, 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 넘치 성장호르몬, 레인 10: 클로렐라 불가리스 PKVL7422-TF1의 전체 단백질.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 기탁번호가 KCTC14988BP이고, 넘치 성장호르몬 단백질을 발현하는 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*) PKVL7422-TF1 균주를 제공한다.
- [0014] 본 발명의 상기 클로렐라 불가리스 PKVL7422-TF1 균주는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 넘치 성장호르몬 코딩 서열을 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 균주로, 발현된 전체 수용성 단백질 중 36~37%(w/w)가 넘치 성장호르몬 단백질인 것이 특징인 균주이다.
- [0015] 용어, "형질전환"이란 외래핵산 단편이 유기체의 내부로 이동하여 염색체의 인자로서 또는 염색체 통합 완성에 의해 복제 가능하게 되는 것으로 외래 핵산을 세포 내로 도입하여 인위적으로 유전적인 변화를 일으키는 현상을 말한다. 상기의 형질전환에 의해 목적 단백질을 코딩하는 외래 핵산 또는 이를 포함하는 재조합 벡터를 숙주로 도입함으로써 유용한 성분을 만들어 내는 형질전환체(transformant)를 획득할 수 있다.
- [0016] 본 발명에 있어서, 상기 서열번호 1의 염기서열은 넘치(*Paralichthys olivaceus*) 유래 성장호르몬 유전자를 클로렐라 불가리스의 코돈에 최적화한 것으로, 용어 "코돈 최적화"는 코딩된 단백질이 유기체에서 보다 효율적으로 발현되도록 특정 유기체에서 우선적으로 사용되는 것으로 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 코돈을 변화시키는 것을 의미한다. 대부분의 아미노산이 "동의어" 또는 "동의" 코돈이라고 하는, 몇몇 코돈에 의해 표시된다는 점에서, 유전자 코드가 축퇴적이지만, 특정 유기체에 의한 코돈 용법은 임의적이지 않고 특정 코돈 트리플렛에 편향적이다. 이러한 코돈 용법 편향성은 소정 유전자, 공통 기능 또는 조상 기원의 유전자, 고도로 발현되는 단백질 내 낮은 복제수 단백질, 및 유기체 계능의 집합적 단백질 코딩 영역과 관련하여 더 높을 수 있다.
- [0017] 본 발명은 또한, 상기 기탁번호가 KCTC14988BP인 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*) PKVL7422-TF1 균주를 배양하는 단계를 포함하는, 재조합 넘치 성장호르몬 단백질의 생산방법을 제공한다.
- [0018] 본 발명에 따른 생산방법에 있어서, 상기 배양은 0.001~0.003 mM의 염화마그네슘 $\text{EDTA}(\text{Na}_2\text{Mg EDTA})$, 0.01~0.03 mM의 구연산철암모늄(*ferric ammonium citrate*), 0.02~0.04 mM의 구연산·수화물, 0.02~0.04 mM의 황산마그네슘·7수화물($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0.20~0.24 mM의 제1인산칼륨·수화물($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), 0.1~0.3 mM의 염화칼슘·2수화물($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 0.16~0.20 mM의 탄산나트륨(Na_2CO_3), 220~270 mM의 염화나트륨, 2.8~2.9 mg/ℓ의 붕산(H_3BO_3), 1.7~1.9 mg/ℓ의 염화망가니즈·4수화물($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), 0.1~0.3 mg/ℓ의 황산아연·7수화물($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0.07~0.09 mg/ℓ의 황산구리·5수화물($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), 0.04~0.06 mg/ℓ의 염화코발트·6수화물($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 0.3~0.5 mg/ℓ의 몰리브덴산 나트륨·2수화물($\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 16~24 mM의 인산이암모늄($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) 및 0.4~0.6 %(w/v)의 글루코스로 이루어진 배지에서 배양되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0019] 또한, 상기 배지 조건에서 18~22℃ 및 2,500 lux 조건으로 7~8일간 광배양하는 것이 바람직하다.
- [0020] 또한, 본 발명의 재조합 넘치 성장호르몬 단백질 생산방법은, 넘치 성장호르몬 단백질이 발현된 클로렐라 불가

리스 PKVL7422-TF1 균주로부터 단백질을 분리 및 정제하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 분리 방법은 예를 들어 원심분리, 여과, 추출, 분무 건조, 증발 또는 침전을 포함하는 통상적인 방법에 의해서 배지로부터 분리될 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 더 나아가 분리된 단백질은 크로마토그래피(예를 들면 이온 교환, 친화성, 소수성 및 크기별 배제), 투석, 전기영동, 분별 용해(예를 들면 암모늄 설페이트 침전), SDS-PAGE 또는 추출을 포함하는 공지된 다양한 방법을 통해서 정제될 수 있다.

[0021] 본 발명은 또한, 상기 기탁번호가 KCTC14988BP인 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*) PKVL7422-TF1 균주 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는, 양식어류용 사료 첨가제를 제공한다.

[0022] 본 발명에서 확보한 넙치 성장호르몬 고발현 형질전환 클로렐라 불가리스 PKVL7422-TF1 균주는 동결건조하여 불활성화한 세포 자체 또는 필터로 여과한 세포 파쇄액을 사료 첨가제로 활용할 수 있다.

[0023] 본 발명에 따른 사료 첨가제에 있어서, 상기 양식어류는 이에 한정되는 것은 아니나, 넙치, 우럭, 민어, 송어, 능성어, 광어 또는 조피볼락일 수 있으며, 바람직하게는 넙치일 수 있다.

[0024] 본 발명의 일 구현 예에서, 상기 사료 첨가제는 넙치 성장호르몬 단백질을 발현하는 형질전환 클로렐라 외에, 추가적으로 양식어류에 허용되는 담체를 함유할 수 있다. 본 발명에 있어서, 상기 사료 첨가제는 그대로 또는 공지의 담체, 안정제, 보조제(adjutant) 등을 가할 수 있으며, 필요에 따라 비타민, 아미노산류, 미네랄 등의 각종 양분, 항산화제, 항생물질, 항균제 및 기타의 첨가제 등을 가할 수도 있으며, 그 형상으로는 분체, 과립, 펠릿, 현탁액 등의 적당한 상태일 수 있다.

[0025] 또한, 본 발명의 사료 첨가제는 하나 이상의 효소 제제를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어 리파제와 같은 지방 분해효소, 피틴산(phytic acid)을 분해하여 인산염과 이노시톨인산염을 만드는 파이타제(phytase), 녹말과 글리코젠 등에 포함되어 있는 알파-1,4-글리코시드 결합(α -1,4-glycoside bond)을 가수분해하는 효소인 아밀라제, 유기인산에스테르를 가수분해하는 효소인 포스파타제(phosphatase), 말토오스를 두 분자의 글루코스로 가수분해하는 말타제 및 사카로스를 가수분해하여 글루코스-프룩토스 혼합물을 만드는 전환효소 등을 포함할 수 있다.

[0026] 본 발명의 사료 첨가제는 양식어류에게 단독으로 투여되거나 식용 담체 중에서 다른 사료 첨가제와 조합되어 투여될 수 있다. 통상적으로, 당업계에 잘 알려진 바와 같이 단독 일일 섭취량 또는 분할 일일 섭취량을 사용할 수 있다.

[0027] 본 발명은 또한, 상기 사료 첨가제를 배합한 양식어류용 사료조성물을 제공한다.

[0028] 본 발명의 일 구현 예에서, 상기 사료 첨가제는 넙치 성장호르몬 단백질을 발현하는 형질전환 클로렐라를 포함하는 것으로, 사료 첨가제를 양식어류용 사료조성물 100 중량부에 대하여 0.01~10 중량부로 배합할 수 있으며, 바람직하게는 2~8 중량부로 배합할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 4~6 중량부로 배합할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0029] 상기 사료조성물에는 탄수화물, 단백질, 지방, 무기질, 비타민, 광물질 및 물과 같은 사료에 통상적으로 첨가되는 성분들이 포함될 수 있다. 이러한 각 성분의 종류에 있어서 특별히 제한되는 바가 없으며, 당 분야에서 통상적으로 사용되는 것은 모두 사용 가능하다.

[0031] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0033] **실시예 1. 넙치 성장호르몬 유전자를 포함하는 클로렐라 불가리스 PKVL7422 (*Chlorella vulgaris* PKVL7422) 형질전환용 재조합 벡터 제작**

[0034] 본 발명에 사용된 재조합 벡터는 선행 연구에서 이용된 야생형 클로렐라 불가리스 PKVL7422의 질산염환원효소 암호화 유전자의 5' 말단과 3' 말단 사이에 프로모터-삽입 유전자-터미네이터가 클로닝된 미세조류 형질전환용 벡터 (CVnr(1kb)-35S-vGopti)를 활용하여 제작되었으며, 클로렐라 불가리스의 코돈에 최적화한 넙치 성장호르몬 유전자(서열번호 1)는 바이오니아(Bioneer cooperation, Korea)에 의뢰하여 합성하였다. 선행 연구에서 이용된 CVnr(1kb)-35S-vGopti 벡터의 VHSV 당단백질 유전자를 *Bam*HI 과 *Xho*I 제한효소를 처리하여 제거하였으며, 1% 아가로즈겔에서 분리하여 회수하였다. 삽입 유전자가 제거된 벡터와 넙치 성장호르몬 유전자 단편은 16℃에서

Ligation mix (TaKaRa, Japan)를 통해 연결되었으며, 연결된 재조합 벡터를 첨가한 대장균 DH5 α를 42℃에서 1분간 열충격을 가하여 형질전환하였다. 상기 형질전환 대장균 DH5 α는 50 μg/ml 농도의 암피실린이 포함된 LB 고체배지에서 선별되었으며, PCR 및 유전자 서열 분석을 통해 서열의 정확성을 확인하였다. 서열의 정확성을 확인한 후, 최종적으로 선별된 형질전환 대장균 DH5 α를 37℃에서 16시간 진탕배양하였으며, DokDo-prep plasmid mini-prep Kit (ELPIS BIO, Korea)를 이용하여 CVnr(1kb)-35S-fGH 재조합 벡터(도 2)를 추출하였다.

실시예 2. 클로렐라 불가리스 PKVL7422 형질전환용 DNA 단편 증폭

상기 CVnr(1kb)-35S-fGH 벡터를 활용하여 클로렐라 불가리스 상동 재조합 부위를 증폭하였다. 해당 부위는 클로렐라 불가리스의 질산염환원효소 유전자의 5' 말단과 3' 말단에 특이적으로 결합하는 프라이머(표 1)를 이용한 PCR에 의해 증폭되었으며, PCR 조건은 다음과 같다: 95℃에서 5분 동안 전변성(pre-denaturation) → 95℃에서 20초 동안 변성, 55.3℃에서 20초 동안 결합(annealing) 및 72℃에서 2분 동안 신장(extension)의 과정을 35회 반복 → 72℃에서 10분 동안 최종 신장. PCR 증폭 산물은 1% 아가로스 겔 상에서 분리하였으며, DokDo-Prep Gel extraction Kit (ELPIS BIO, Korea)로 회수하였다.

표 1

클로렐라 불가리스 질산염환원효소 유전자 특이적 프라이머

표적	프라이머명	프라이머 염기 서열	예상 크기
질산염 환원 효소 유전자 5' 말단 및 3' 말단	NRF (59)	5'-TTGAGCCGCATCATGAAGCG-3' (서열번호 2)	3,731 bp
	NRR (59)	5'-AATACAGGCGGAGCCCAAAC-3' (서열번호 3)	

실시예 3. 클로렐라 불가리스 PKVL7422 형질전환 및 형질전환체 선별

클로렐라 불가리스 PKVL7422 (*Chlorella vulgaris* PKVL7422) 형질전환 방법은 한국등록특허 10-2242665에 기술된 방법을 토대로 진행되었다. 클로렐라 불가리스 PKVL7422 (*Chlorella vulgaris* PKVL7422)을 BG-11 액체배지(표 2)에서 2×10^7 cell/ml까지 배양한 후, 3,500 rpm에서 30분간 원심분리하여 세포를 회수하였다.

표 2

BG-11 배지 조성표

성분		농도
Na ₂ Mg · EDTA		0.002 mM
Ferric ammonium citrate		0.02 mM
Citric acid · H ₂ O		0.03 mM
MgSO ₄ · 7H ₂ O		0.03 mM
K ₂ HPO ₄		0.22 mM
CaCl ₂ · 2H ₂ O		0.2 mM
Na ₂ CO ₃		0.18 mM
Microelements stock (1 ml/L)	H ₃ BO ₃	2.86 g/L
	MnCl ₂ · 4H ₂ O	1.81 g/L
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.222 g/L
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.079 g/L
	CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.05 g/L
	NaMoO ₄ · 2H ₂ O	0.391 g/L
NaNO ₃		17.6 mM
C ₆ H ₁₂ O ₆		0.5% (w/v)

[0043] 세포를 1 ml의 세포보존 버퍼(200 mM mannitol, 200 mM sorbitol)로 재현탁하여 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후, 7,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하였다. 세포 펠렛을 1 ml의 전기천공(electroporation) 버퍼(200 mM mannitol, 200 mM sorbitol, 800 mM KCl, 5 mM CaCl₂, 10 mM Hepes)로 재현탁하고 상기에서 증폭한 형질전환용 DNA 단편 10 µg을 첨가하여 4℃에서 10분간 반응시켰다. 상기 반응액을 0.2 cm 전기 천공 큐벳으로 옮기고 1 kV, 400 Ω 그리고 25 µF 조건에서 5초간 Gene Pulser[®] II Electroporation System (BIORAD, USA)를 이용하여 전기 천공하여 형질전환하였다. 형질전환된 클로렐라 불가리스를 염소산칼륨(KClO₃)이 미첨가된 BGPK 액체배지 (표 3)에서 암조건으로 24시간 동안 안정화하였다. 안정화된 형질전환 클로렐라 불가리스를 200 mM 농도의 KClO₃가 포함된 1% BGPK 고체배지에 도말하고 배양하여 형질전환체를 선별하였다. ClO₃⁻가 첨가된 BGPK 고체배지 상에서 질산염 환원능을 상실하여 유독한 ClO₂⁻를 생성하지 못한 개체만이 성장하여 콜로니를 형성하였다(도 3).

표 3

[0044] BGPK 배지 조성표

성분		농도
Na ₂ Mg · EDTA		0.002 mM
Ferric ammonium citrate		0.02 mM
Citric acid · H ₂ O		0.03 mM
MgSO ₄ · 7H ₂ O		0.03 mM
K ₂ HPO ₄		0.22 mM
CaCl ₂ · 2H ₂ O		0.2 mM
Na ₂ CO ₃		0.18 mM
NaCl		250 mM
Microelements stock (1 ml/L)	H ₃ BO ₃	2.86 g/L
	MnCl ₂ · 4H ₂ O	1.81 g/L
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.222 g/L
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.079 g/L
	CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.05 g/L
	NaMoO ₄ · 2H ₂ O	0.391 g/L
(NH ₄) ₂ HPO ₄		17 mM
C ₆ H ₁₂ O ₆		0.5% (w/v)

[0046] 실시예 4. 형질전환 클로렐라 불가리스의 넵치 성장호르몬 유전자 삽입 확인

[0047] 30개의 콜로니를 무작위로 선택하여 KClO₃가 미첨가된 BGPK 액체배지에 접종하고 14일 동안 20℃, 2,500 lux 광 조건 하에서 배양한 후, 세포를 회수하고 5min Plant DNA Extraction Kit (SCINOMICS, Korea)를 이용하여 게놈 DNA(gDNA)를 추출하였다. 추출한 gDNA를 주형으로 하고 넵치 성장호르몬 유전자에 특이적인 프라이머 세트 (표 4)를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 다음과 같다: 95℃에서 5분 동안 전변성 → 95℃에서 20초 동안 변성, 53.5℃에서 20초 동안 결합 그리고 72℃에서 2분 동안 신장의 과정을 35회 반복. PCR 결과, 도 4에 개시된 바와 같이 500 bp 근처에서 476 bp의 크기로 예상하였던 증폭 산물의 밴드를 확인할 수 있었다.

표 4

[0048] 형질전환 클로렐라 개체의 넵치 성장호르몬 유전자 삽입 판별용 프라이머

표적	프라이머명	염기서열	예상 크기
넵치 성장호르몬 유전자	fGHF	5'-AGCCTATCACGGAGAACCAG-3' (서열번호 4)	476 bp
	fGHR	5'-GGTCAGGTACGTCTCAACCT-3' (서열번호 5)	

[0050] 실시예 5. 웨스턴 블롯(Western blot)을 통한 넵치 성장호르몬 발현 수준 확인

[0051] PCR을 통해 넵치 성장호르몬 유전자의 삽입이 확인된 형질전환 클로렐라 불가리스 개체들을 $KClO_3$ 가 미첨가된 BGPK 액체배지에서 14일 동안 배양한 후, 세포를 회수하고, 회수된 세포를 3 ml의 cOmplete™, EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche, Switzerland)이 포함된 RIPA 버퍼로 재현탁하여 4℃에서 30분간 반응하였다. 세포는 JY92-IIN sonicator (KBTBIO, Korea)를 이용하여 300 W, 2초 작동/2초 휴식, 5분 파쇄마다 4℃에서 5분 휴식 조건으로 총 20분 동안 파쇄하였다. 파쇄된 용액을 3,500 rpm에서 30분 동안 원심분리하여 상층액을 회수하여 이를 전체 단백질 용액으로 이용하였다.

[0052] 추출한 전체 단백질 용액을 5× protein sample buffer (ELPIS BIO, Korea)와 1:4의 비율로 혼합하여 100℃에서 10분간 반응시킨 후, 4℃에서 5분간 안정화하였다. 안정화된 전체 단백질 시료를 15% 폴리아크릴아마이드 겔 상에서 분리하고 PVDF 막으로 단백질 밴드를 옮겼다. 단백질 밴드가 옮겨진 PVDF 막은 5% skim milk가 포함된 PBST를 이용하여 블로킹하였으며, PVDF 막을 세척한 후 넵치 성장호르몬 단백질에 특이적인 1차 항체(제약항체, (주)중검, 1 : 4,000)와 4℃에서 16시간 동안 반응시켰다. 그 후 PVDF 막을 세척하고 2차 항체(cat # 1706515, BIORAD, 1 : 40,000)와 실온에서 1시간 반응시켰고, WESTSAVE STAR™ (YOUNG IN FRONTIER, Korea)에 1분간 반응시킨 다음 iBright™ CL1500 (ThermoFisher, USA)를 이용하여 넵치 성장호르몬 단백질을 확인하였다. 그 결과 도 5에 개시된 바와 같이 레인 4의 넵치 성장호르몬 저발현 개체와 비교하여 레인 5의 넵치 성장호르몬 고발현 개체(클로렐라 불가리스 PKVL7422-TF1)의 넵치 성장호르몬 발현 수준이 확연히 높은 것을 확인할 수 있었다.

[0054] 실시예 6. 넵치 성장호르몬 발현 수준 정량

[0055] 형질전환 클로렐라 불가리스의 넵치 성장호르몬 발현 수준을 정량용 검량선을 제작하기 위해 대장균에서 넵치 성장호르몬을 클로닝하여 발현시킨 후 분리정제하여 비교군으로 이용하였다. 넵치 성장호르몬 유전자(서열번호 1)를 pET-25b 벡터에 클로닝한 후 이를 대장균 BL21에 열 충격 방법을 통해 클로닝하였다. 형질전환된 대장균 BL21을 TB (Terrific broth) 배지(표 5)에 접종하여 600 nm에서의 흡광도 값이 0.75가 도달할 때까지 배양한 후, Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)를 0.5 mM 농도로 첨가하였다. 30℃에서 16시간 동안 배양한 후, 6,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 세포만을 회수하였다. 세포 펠렛을 25 ml의 solution buffer(표 6)로 재현탁하여 JY92-IIN sonicator (KBTBIO, Korea)를 이용하여 300 W, 2초 작동/2초 휴식 조건으로 10분 동안 세포를 파쇄하였다. 3,500 rpm에서 30분 동안 원심분리하여 펠렛을 25 ml의 용해 버퍼(표 7)로 재현탁하고 DNase I 과 라이소자임(Lysozyme)을 처리하여 실온에서 1시간 동안 교반하며 반응시켰다. 3,500 rpm에서 30분 동안 원심분리하여 20 ml의 Triton-X가 포함된 세척 버퍼(표 8)로 재현탁하고 상기의 원심분리 조건으로 원심분리하였다. 펠렛을 20 ml의 Triton-X가 미첨가된 세척 버퍼(표 9)로 재현탁하여 JY92-IIN sonicator (KBTBIO, Korea)를 이용하여 300 W, 2초 작동/2초 휴식 조건으로 10분 동안 초음파 충격을 가하였고, 상기의 조건으로 원심분리하였다. 상기의 Triton-X가 미첨가된 세척 버퍼를 이용한 세척 과정을 2번 더 반복하였다. 펠렛을 3 ml의 단백질 샘플 버퍼(1×) (ELPIS BIO, Korea)로 재현탁하여 100℃에서 10분간 반응시켰다. 4℃에서 5분간 안정화시키고 상기의 웨스턴 블롯(Western blotting) 방법을 토대로 넵치 성장호르몬의 발현 수준을 확인하였다.

표 5

[0056] TB (Terrific broth) 배지 조성표

성분	농도
Yeast extract	24 g/L
Tryptone	20 g/L
Glycerol	4 mL/L
K ₂ HPO ₄	17 mM
KH ₂ PO ₄	72 mM

표 6

Solution buffer 조성표

성분	농도
Tris-HCl	50 mM
Sucrose	25% (w/v)
Na · EDTA	1 mM
Dithiothreitol (DTT)	10 mM

표 7

용해 버퍼 조성표

성분	농도
Tris-HCl	50 mM
Triton X-100	0.1% (v/v)
Sodium deoxycholate	1% (w/v)
NaCl	100 mM
Dithiothreitol (DTT)	10 mM

표 8

Triton X-100이 첨가된 세척 버퍼 조성표

성분	농도
Tris-HCl	50 mM
Triton X-100	0.5% (v/v)
Na · EDTA	1 mM
NaCl	100 mM
Dithiothreitol (DTT)	1 mM

표 9

Triton X-100이 미첨가된 세척 버퍼 조성표

성분	농도
Tris-HCl	50 mM
Na · EDTA	1 mM
NaCl	100 mM
Dithiothreitol (DTT)	1 mM

발현 수준이 확인된 단백질 시료(넙치 성장호르몬 단백질이 확인된 대장균 총 단백질 시료)를 15% 폴리아크릴아마이드 겔 상에서 분리하여 염화구리(II) 용액으로 20분간 염색하였다. 넙치 성장호르몬 단백질 밴드만을 잘라 1× PBS로 세척하고 1× SDS 로딩 버퍼가 들어있는 Spectra/Por[®] 3.5kDa Cut-Off Dialysis Tubing (Spectrum Chemical, USA)에 넣었다. 전기영동기에서 4시간 동안 전류를 흘려보내 폴리아크릴아마이드 겔에서 넙치 성장호르몬 단백질이 외부로 빠져나오도록 한 후, 튜빙 내부의 넙치 성장호르몬 단백질이 포함된 버퍼를 회수하였다. 회수된 시료를 새로운 Spectra/Por[®] 3.5kDa Cut-Off Dialysis Tubing에 넣고 수크로스(sucrose)를 이용한 삼투압 원리를 통해 넙치 성장호르몬 단백질을 농축하였다. 농축된 시료를 회수하여 새로운 Spectra/Por[®] 3.5kDa Cut-Off Dialysis Tubing에 넣고 교반기 위에서 16시간 동안 1× PBS로 버퍼를 교환하였다. 버퍼 교환된 시료를 브래드포드 시약(ThermoFisher Scientific, USA)를 이용하여 단백질 정량화 하였으며, 농도 측정된 넙치 성장호르몬 단백질을 희석하여 실시예 5의 방법에 따라 웨스턴 블롯을 수행하였다. 그 후, ThermoFisher Scientific사

의 iBright Analysis 소프트웨어를 이용하여 각 시료별 밴드의 강도(intensity)를 분석하여 넙치 성장호르몬 단백질의 농도별 검량선을 제작하였다. 제작된 넙치 성장호르몬 단백질 검량선을 토대로 형질전환 클로렐라 불가리스 PKVL7422-TF1 균주의 넙치 성장호르몬 발현량을 정량하였다. 그 결과, 클로렐라 불가리스 PKVL7422-TF1 균주는 배양액 1L 당 156 mg의 넙치 성장호르몬 단백질을 발현하는 것으로 정량되었으며, 이는 전체 수용성 단백질 1 mg 당 0.364 mg의 넙치 성장호르몬 단백질을 발현하는 것으로 환산되므로, PKVL7422-TF1 균주에서 발현된 전체 수용성 단백질 중 36.438%가 넙치 성장호르몬 단백질임을 알 수 있다.

[0062] 본 발명자는 상기 넙치 성장호르몬 단백질을 고발현하는 클로렐라 불가리스 PKVL7422-TF1 균주를 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)에 2022년 6월 2일자로 기탁하였다(기탁번호 KCTC14988BP).

수탁번호

[0063]

기탁기관명 : 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)

수탁번호 : KCTC14988BP

수탁일자 : 20220602

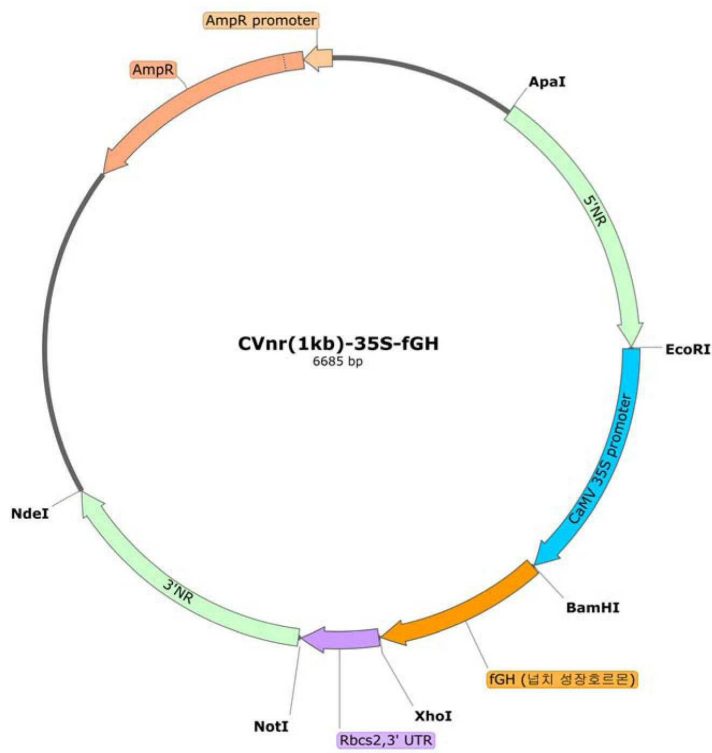
도면

도면1

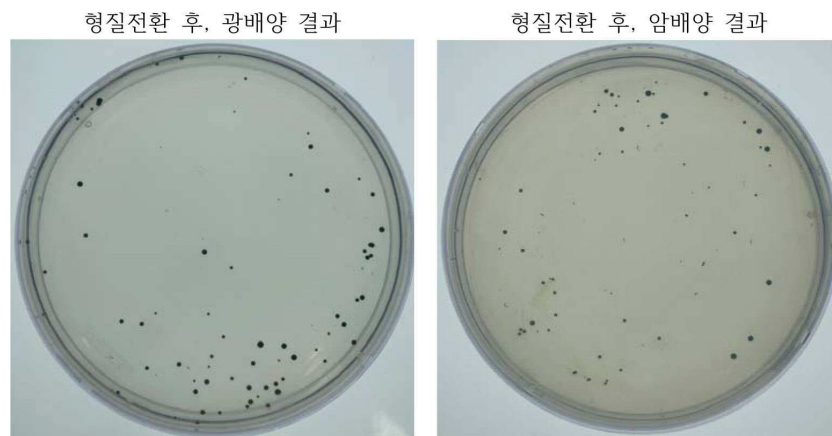
```

1      GGATCCCGGGTGGTCAGTGCCAAGATGGCGAACCGCGTCATCCTGCTGC
51     TGAGCGTCATGTGCGTGGGCGTGTCTCCAGCCTATCACGGAGAACCAG
101    CGCCTGTTCTCCATTGCGGTGGGCCGCGTGCAGTACCTCCACCTGGTCGC
151    AAAGAAGCTCTTTTCTGACTTTGAGAACTCCCTCCAGCTGGAGGACCAGA
201    GGCTTCTCAACAAGATCGCATCCAAGGAGTTCTGCCACTCCGATAATTTT
251    TTGTCGCCAATCGACAAGCACGAGACACAGGGCAGCTCGGTTTCAGAAGCT
301    GCTGTCGGTGAGCTACCGCCTGATCGAGTCCTGGGAGTTCTTCAGTCGCT
351    TCTTGGTCGCATCCTTTGCTGTGCGGACCCAGGTCACTTCCAAGCTGTCC
401    GAGCTGAAGATGGGCCTCCTGAAGCTTATTGAAGCGAACCAGGACGGTGC
451    GGGGGGATTTCAGCGAGTCATCGGTGCTCCAGCTCACCCCGTACGGCAACA
501    GCGAGCTGTTTCGCCTGCTTTAAGAAGGACATGCACAAGGTTGAGACGTAC
551    CTGACCGTGGCCAAGTGCCGCCTGTTCCCCGAGGCCAACTGCACCCTGGA
601    TATCCACCACCACCACCACCTAGCTCGAG
    
```

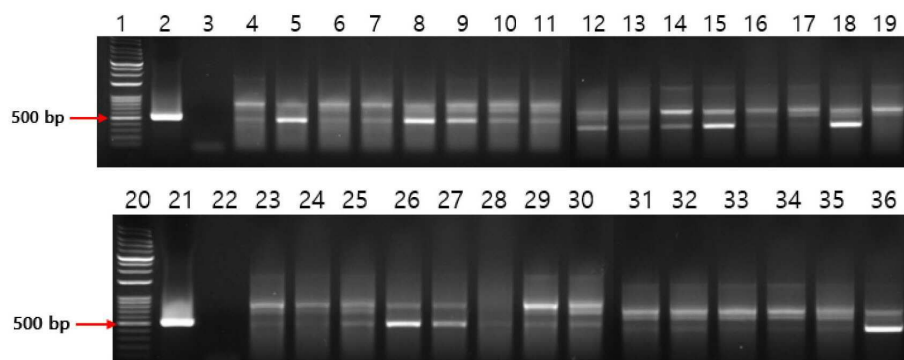
도면2



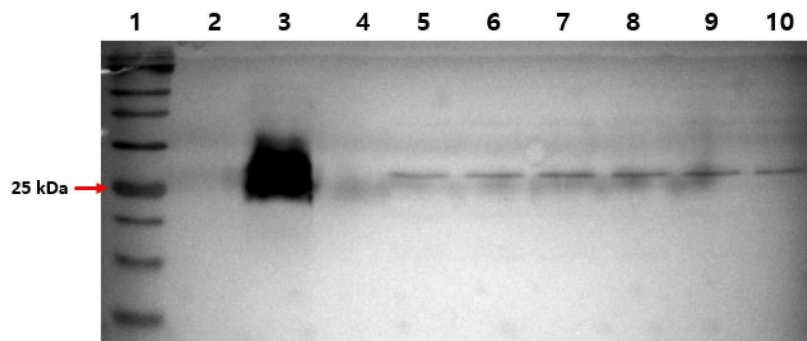
도면3



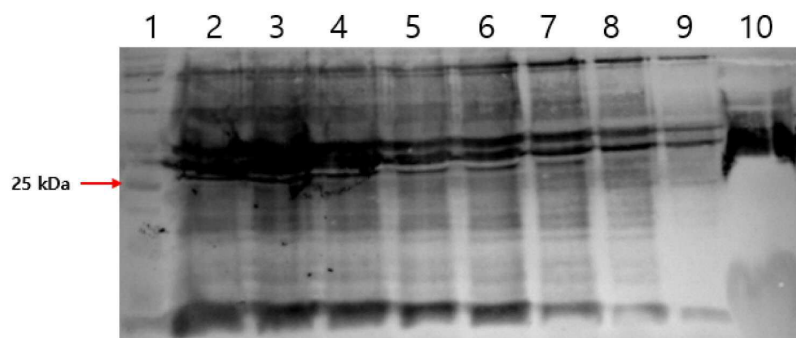
도면4



도면5



도면6



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.