

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl. (11) 공개번호 10-2006-0082206
C12N 15/74 (2006.01) (43) 공개일자 2006년07월18일

(21) 출원번호 10-2005-0002471

(22) 출원일자 2005년01월11일

(71) 출원인 고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자 김세현
서울 강남구 청담동 삼익 APT 10동 1201호
유승권
경기 용인시 성북동 성남마을 벽산 APT 503동 405호
오세중
광주 서구 치평동 쌍용금호APT 209동 1001호
한경식
서울 중랑구 묵동 171-28
김영훈
경기 남양주시 도농동 2-1 부영아파트 203동 1401호

(74) 대리인 윤여강

심사청구 : 있음

(54) 락토바실러스 균종을 위한 형질전환 방법 및 외래 단백질 발현 벡터

요약

본 발명은 유산균 세포내 외래 단백질 발현 벡터 및 이를 이용한 락토바실러스 균종의 형질전환방법에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 락토바실러스 애시도필러스의 높은 형질전환 효율을 위한 전기천공법 (electroporation)의 조건을 설정하고 형질전환체를 빠르게 선별할수 있는 PCR 프라이머를 제조하였으며 GFP 단백질을 세포내에서 발현할 수 있는 유산균용 벡터 pKU::slpA-GFP를 제조하고, 이를 락토바실러스 애시도필러스 ATCC 43121 (*Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121)에 형질전환시켜 보고유전자로써 GFP의 가능성을 제시하는 것이다. 본 발명의 형질전환 방법과 발현 벡터를 이용하여 유산균을 형질전환하면 원래의 특성을 변화시키지 않으며 재조합 단백질을 세포내에서 안정하게 발현시킬 수 있다.

대표도

도 5

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 전기충격의 세기와 횟수에 따른 락토바실러스 애시도필러스 43121의 형질전환 효율을 나타낸 것이고 (●-: 7.5kV/cm, ○-: 10kV/cm, ▼-: 12.5kV/cm),

도 2는 형질전환시 사용된 pNZ123 박터의 농도에 따른 락토바실러스 애시도필러스 43121의 형질전환 효율을 나타낸 것이며 (black bar: 100ms, grey bar: 500ms, dark-grey bar: 1000ms),

도 3은 다양한 락토바실러스 균종에 대한 형질전환 효율을 나타낸 것이고,

도 4는 형질전환된 형질전환체를 확인하기 위한 pNZ123의 클로람페니콜 저항성 유전자를 PCR 증폭한 것이며,

레인 1 : 1kb plus DNA ladder

레인 2 : pNZ123을 대상으로 PCR한 결과

레인 3 : 와일드타입의 락토바실러스 애시도필러스 43121

레인 4 : 와일드타입의 락토바실러스 애시도필러스 30SC

레인 5 : 락토바실러스 애시도필러스 43121의 형질전환체

레인 6 : 락토바실러스 애시도필러스 30SC의 형질전환체

도 5은 본 발명의 실시예에 따른 유산균 세포내 GFP 발현 벡터 pKU::slpA-GFP의 제조과정을 개략적으로 나타낸 것이고,

도 6은 유산균 세포내 발현 벡터 pKU::slpA-GFP에서 삽입여부를 확인하기 위해 *EcoR* I 과 *Hind*III으로 절단한 결과를 나타낸 것이며,

레인 1 : 1kb DNA 마커

레인 2 : pKU::slpA-GFP를 *EcoR* I 과 *Hind*III으로 절단한 결과

도 7은 유산균 세포내 발현 벡터 pKU::slpA-GFP로 형질전환시킨 형질전환체에서 플라스미드를 추출한 결과를 나타낸 것이고,

레인 1 : λ /*Hind*III 마커

레인 2 : 1kb plus DNA ladder

레인 3, 4 : 유산균 세포내 발현 벡터 pKU::slpA-GFP로 형질전환시킨 형질전환체에서 플라스미드 추출

도 8은 pKU::slpA-GFP로 형질전환시킨 형질전환체의 플라스미드 안정성을 나타낸 것이며,

도 9는 pKU::slpA-GFP로 형질전환시킨 형질전환체의 콜레스테롤 저하능력 유지를 나타낸 것이고,

레인 1 : 형질전환되지 않은 락토바실러스 애시도필러스 ATCC 43121

레인 2, 3 : 형질전환된 락토바실러스 애시도필러스 ATCC 43121

도 10은 pKU::slpA-GFP로 형질전환시킨 형질전환체에서 GFP의 발광을 형광현미경으로 확인한 것이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 유산균 세포내 외래 단백질 발현 벡터 및 이를 이용한 락토바실러스 균종의 형질전환방법에 관한 것이다.

유산균 (Lactic acid bacteria)은 동서양을 막론하고 낙농제품, 채소류, 육류의 발효균주로서 광범위하게 사용되어온 미생물이다. 이러한 유산균은 비병원성 세균이며 내독소를 합성하지 않으므로 가축사료의 생균제로서, 또한 인체에서도 정장제로 활용되고 있다. 또한 발효과정에서 식품의 맛을 개선하는 풍미를 부여함과 동시에 식품의 부패를 방지하고 항균물질을 생성하여 유해세균을 억제하는 작용을 한다. 일부 유산균은 동물실험에서 높은 항암효과를 나타낸다고 보고 되어지고 있다. (Goldin 등, 1980; 배 등, 1993)

최근들어 생명공학기법들을 이용하여 유산균 원래의 특성 이외에 새로운 기능을 가진 유산균을 개발하기 위한 연구가 계속해서 진행되고 있다. 초기 유산균의 유전공학적 연구는 대부분 유산구균에 집중되었다. 이러한 결과로 인해 대장균의 형질전환의 수준까지 발전하였으며 몇몇 유산구균의 전체 염기서열이 밝혀졌다. 또한 이러한 연구와 더불어 유산간균에 대한 연구도 활발히 진행되어 락토바실러스 카제이, 플란타럼, 가세리, 애시도필러스, 사케이 등 다양한 균종에서 형질전환에 대한 보고가 이루어지고 있다.

초기 락토바실러스 균종의 형질전환은 conjugation이나 protoplast 방법이 사용되었으나 이는 낮은 형질전환 효율을 나타낼 뿐만 아니라 시간 소모적이고 재현성이 떨어지는 문제점을 가지고 있었다. 그러나 최근 들어 전기천공법 (electroporation) 방법이 개발되고 Chassy 등 (1987)이 전기천공법을 이용하여 락토바실러스 카제이에 플라스미드와 파지 DNA를 높은 효율로 형질전환한 것이 보고되면서 락토바실러스 균종의 전기천공 형질전환법과 (electrotransformation) 관련된 연구가 활발하게 이루어지고 있다.

이러한 electroporation 방법의 효율은 (1) 균체의 회수 시기 (2) 세척시 사용되는 버퍼와 전기천공시 사용되는 버퍼의 성분 (3) 전기 충격시 전압의 세기, 전압의 충격시간 등의 조건, 그리고 (4) 외래 플라스미드 DNA의 성질 (5) 모세포의 특이성 등의 변화에 따라 크게 달라진다고 한다. 많은 실험자들이 이와 관련하여 최근까지 락토바실러스 헬베티커스, 락토바실러스 카제이, 그리고 락토바실러스 사케이 등을 대상으로 최적의 효율을 나타내는 여러가지 유산균을 대상으로 전기천공법이 보고되고 있다 (Bhowmik and steele, 1996; Luchansky 등, 1988; Berthier 등, 1996). 하지만 이러한 많은 연구에도 불구하고 아직까지 락토바실러스 균종에 있어서 전기천공법의 최적 조건을 명확하게 확립한 보고는 없다.

특히, 이들 락토바실러스 종은 전통적으로 과거에서부터 식품의 소재로 사용되어 GRAS (Generally recognized as safe) 로써 세포벽 외 단백질분해효소의 낮은 활력으로 외래 단백질을 세포외로 분비하는데 좋은 특징을 가짐으로 소화기관내 특정 부위에 질병을 치료할 수 있는 백신의 전달 시스템 (delivery system)의 운반체로서의 가능성이 보고 되어 지면서 이 부분에 관한 많은 연구가 이루어지고 있다.

이러한 형질전환에 필수적인 요소가 바로 외래 유전자를 전달할 수 있는 운반체, 즉 벡터이다. 이러한 벡터는 외래 단백질을 효과적으로 발현시킬 수 있는 강력한 프로모터가 필요하다. 많은 연구자들에 의해 락토바실러스종에서 효과적으로 외래 단백질을 발현할 수 있는 프로모터들이 개발되었다. 최근 들어 유산균 세포외부에 존재하는 세포표면 단백질 (S-layer protein)에 대해 클로닝이 이루어지고 염기서열이 밝혀지면서 이를 이용한 유산균 벡터들이 개발되고 있다. 이러한 세포표면 단백질을 전사하는 프로모터는 다른 프로모터들과 비교했을 때 강력하게 작용한다고 보고되었다. (McCracken 등, 2000)

이제까지 유산균에서 형질전환을 실시할 때 가장 문제화되었던 점은 이들 형질전환체를 선별하는 것이었다. 이들을 선별하기 위해 지금까지는 클로람페니콜, 카나마이신, 암피실린, 테트라마이신 등 대장균 유래의 항생제 저항 유전자를 사용해 왔으나 이들은 식품에 적용하였을때 인체 내로 전이될 수 있는 위험성을 지니고 있으며 많은 경우 복귀변이주를 생성하기 때문에 원하는 형질전환체만을 선별하기 어려운 점이 있다. 따라서 형질전환체를 보다 편리하고 빠르게 선별하기 위한 방법을 찾기 위한 노력이 계속되어 왔다. GFP는 해파리의 일종인 아쿠어리아 빅토리아에서 발현되는 238개의 아미노산으로 구성된 비교적 작은 크기의 형광단백질로써 다른 선별 보고자들과 비교했을 때 열과 pH에 안정하며 보조인자나 외부 기질의 첨가 없이 안정된 형광을 나타내어 유전자 발현의 보고자로서의 유용성이 제기 되어 왔다. 실제로 대장균, 균류, 식물세포 및 동물세포에 많은 연구에서 보고자로서의 작용이 보고 되었다.

본 발명자들은 락토바실러스 균종에서 전기천공법을 이용하여 높은 형질전환을 나타낼 수 있는 조건을 설정하였고 형질전환체를 빠르게 선별할 수 있는 PCR 프라이머를 개발하였다. 또한 형질전환시 유산균내에서 안정하게 발현되며, 원래의 형질에는 영향을 주지 않는 유산균 벡터용 프로모터와 종결 시퀀스를 탐색하였으며 여기에 외래 단백질 발현을 위해 최근들어 보고 유전자로 사용되고 있는 GFP를 삽입하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

따라서, 본 발명의 주된 목적은 락토바실러스 균종을 대상으로 전기천공법을 이용하여 높은 형질전환 효율을 나타낼 수 있는 최적 조건과 형질전환체를 빠르고 손쉽게 선별할 수 있는 PCR 프라이머를 제공하는데 있다.

또한, 본 발명의 다른 목적은 기존의 유산균의 생균제로서의 특성을 유지하면서 또한 세포내에서 안정적으로 외래 단백질을 발현할 수 있는 유산균용 발현 벡터를 제공하는 것이다.

또한, 본 발명의 또 다른 목적은 상기 제조된 벡터에 GFP를 삽입하고 형질전환시켜 유산균의 보고 유전자의 가능성을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 그람 양성균의 복제원점 (ori), 복제유도단백질 유전자 (repA), 선별유전자인 클로람페니콜 (chloramphenicol) 저항성 유전자(cm^r), *slpA* 프로모터, 삽입 외래 유전자 서열, 및 종결 시퀀스를 포함하는 외래 단백질을 발현할 수 있는 도 5의 개열지도를 갖는 유산균용 발현 벡터(pKU::*slpA*-GFP)를 제공한다.

본 발명의 유산균용 발현 벡터에 있어서, 상기 *slpA* 프로모터 및 종결 시퀀스는 락토바실러스종에 존재하는 세포표면 단백질 (S-layer protein) 유전자의 프로모터와 종결 시퀀스이다. 본 명세서에서, *slpA* 프로모터의 염기서열은 서열번호 1로 나타내었고, 종결 시퀀스의 염기서열은 서열번호 2로 나타내었다.

본 발명의 유산균용 발현 벡터에 있어서, 상기 외래 유전자는 유산균내에서 그 단백질의 발현을 요하는 어떤 유전자도 될 수 있으나, 바람직하게는 GFP(green fluorescent protein) 또는 GFP 융합 유전자인 것을 특징으로 한다. 본 발명의 명세서에서는 편의상 외래 유전자가 포함된 발현벡터도 pKU::*slpA*-GFP로 표시하였으나, 이는 외래 유전자의 대표자로서 GFP를 표시한 것 뿐이고, 상기 GFP외의 어떤 외래 유전자가 포함된 것도 본 발명에 포함되는 것으로 해석된다. 본 명세서에서, GFP 유전자의 염기서열은 서열번호 3으로 표시된다.

본 발명에서, 상기 GFP(green fluorescent protein)은 보고유전자로서 생체내 락토바실러스 균종의 우점 분포를 측정할 수 있다. 또한, 외래 유전자를 GFP와 융합하여 발현 할 수도 있으며, 이 경우 GFP의 발현에 의해 외래 유전자의 삽입여부를 알 수 있으며, 필요한 경우 적당한 프로테아제로 외래 단백질과 GFP를 절단하여 사용할 수도 있다.

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 *slpA* 프로모터 (제한효소 *EcoR* I 과 *Xba* I)와 종결시퀀스 (한효소 *Pst* I 과 *Hind*III)를 락토바실러스의 염색체 (chromosome) DNA를 주형으로 하여 PCR 증폭하는 단계, 외래 유전자 (제한효소 *Xba* I 과 *Pst* I)를 준비하는 단계, 각각의 유전자 단편들을 연속적으로 대장균 형질전환 벡터인 pUC18의 제한효소 자리(*EcoR* I, *Xba* I, *Pst* I 과 *Hind*III)에 삽입하여 재조합벡터 pUC18::*slpA*-GFP-T.T를 제조하는 단계, 상기 재조합 벡터를 *EcoR* I 과 *Hind*III로 절단하는 단계, 및 동일한 제한효소 *EcoR* I 과 *Hind*III로 절단된 pNZ123에 연결하는 단계를 포함하는 재조합 벡터(pKU::*slpA*-GFP)의 제조방법을 제공한다.

본 발명의 제조방법에 있어서, 상기 유전자 단편들은 NCBI(www.ncbi.nlm.nih.gov)에서 얻은 유전자 서열의 양말단에 괄호안의 해당 제한효소자리를 첨가한 프라이머쌍을 사용하여 PCR 증폭함으로써 얻을 수 있다. 외래 유전자가 GFP인 경우 pEGFP-N2를 주형으로 하여 PCR 증폭할 수 있다.

본 발명의 제조방법에서, 상기 pNZ123(de Vos and Simon, 1994)은 당업계에 잘 알려진 lactococcal 클로닝 벡터 (2.8kb)로서, *Streptococcus lactis* 플라스미드 pSH71에서 유래된 복제 기원(ori)과 클로람페니콜(chloramphenicol) 내성 유전자(Cm^r)를 포함하며, 상기 ori와 Cm^r 사이에 멀티클로닝사이트(XhoI, HindIII, XbaI, EcoRI, ScaI, Sau3A)를 가지고 있다. 상기 pNZ123은 de Vos의 실험실뿐만 아니라 이를 인용한 논문의 저자 실험실에서 쉽게 구할 수 있다.

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 락토바실러스 균종의 형질전환에 있어서, 컴피턴트 락토바실러스를 전기충격 전압 12-13 kV/cm, 전기충격 횟수 8-12회, 전기충격의 시간간격 400-600 ms, 플라스미드의 농도 20-30 ng/ul의 조건으로 전기천공하는 것을 특징으로 하는 락토바실러스 균종의 전기천공법을 제공한다.

본 발명의 전기천공법에 있어서, 상기 컴피턴트 락토바실러스는 수크로우즈와 마그네슘 클로라이드를 포함하는 종래 알려진 전기천공버퍼로 락토바실러스를 현탁하여 쉽게 제조될 수 있으며, 상기 전기천공은 electro square porator BTX 830 (Genetronics, USA)와 같은 상업적으로 구입가능한 전기천공장치를 이용하여 실시할 수 있다.

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 상기 본 발명의 유산균용 발현 벡터로 형질전환된 락토바실러스 균종을 제공한다.

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 pNZ123 유래의 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체에서 클로람페니콜 저항 유전자가 들어있는 pNZ123 유래의 재조합벡터의 빠른 선별을 위한 PCR 프라이머 서열(서열번호 4 및 5)을 제공한다.

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

먼저, 본 발명은 본 발명은 락토바실러스 균종을 대상으로 전기천공법을 이용하여 높은 형질전환 효율을 나타낼 수 있는 최적 조건과 형질전환체를 빠르고 손쉽게 선별할 수 있는 PCR 프라이머를 제공한다.

락토바실러스 균종에서 최대 형질전환 효율을 나타낼 수 있는 조건을 탐색하기 위해 전기충격시 전압의 세기, 전압의 충격시간, 외래 플라스미드 DNA의 농도, 형질전환체 선별을 위해 항생제의 농도, 모세포간의 차이점 등의 조건을 변화시켜 전기천공법에 의한 형질전환 효율을 비교하였다. 또한 형질전환체의 빠르고 손쉬운 선별을 위해 클로람페니콜 저항유전자에 특이적으로 반응할 수 있는 프라이머를 제조하였다.

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 그람 양성균의 복제원점 (ori), 복제유도 단백질 (repA), 선별유전자인 클로람페니콜 저항성 유전자, 외래 단백질 발현을 위한 *slpA* 프로모터, 삽입서열, 종결 시퀀스, GFP 유전자를 포함하는 유산균용 발현 벡터를 제공한다.

실험에 사용한 pNZ123는 2.8kb 크기의 클로람페니콜 저항성 유전자를 지니며 비교적 넓은 host 범위를 가지는 이콜라이-락토바실러스 셔틀 플라스미드 벡터이다(De Vos, W. M. 1987. Gene cloning and expression in lactic streptococci. FEMS Microbiol. Rev. 46:281-295). 본 벡터를 기본체로 하여 락토바실러스 애시도필러스 4356의 *slpA*의 프로모터와 종결 시퀀스를 삽입하였다. 본 발명에 사용된 유산균벡터의 *slpA*의 프로모터는 유산균의 S-layer 단백질을 발현시 관련되는 프로모터로써 다른 프로모터와 비교했을 때 우수한 효과를 보인다고 보고 되어 있다 (McCracken 등, Arch Microbiol., 173:383-389, 2000)

또한, 본 발명의 다른 목적에 의해 달성된 GFP를 발현하는 형질전환체를 제공한다. 상기 제조된 유산균 발현 벡터의 삽입서열에 pEGFP-N2에서 PCR 증폭된 단편을 시작코돈 서열에 맞추어 삽입하여 유산균용 벡터 pKU::*slpA*-GFP를 제조하고, 상기에 설정된 최적 형질전환 조건에 의해 전기천공법으로 형질전환을 실시하였다. 선별된 형질전환체에서 유산균용 벡터 pKU::*slpA*-GFP는 클로람페니콜 항생제가 존재하지 않은 MRS 배지에서도 높은 안정성을 나타내었으며 기존의 락토바실러스 애시도필러스 43121이 지니고 있는 콜레스테롤 저하능력도 유지할수 있는 것을 확인하였다. 최종적으로 형광 현미경으로 pKU::*slpA*-GFP가 존재하는 형질전환체가 형광을 나타내는 것을 확인하였다.

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

(실시예 1) 유산균주의 배양과 플라스미드

락토바실러스 균주는 고려대학교 식품미생물학 실험실(김세현 교수님)에 보관중인 균주(Table. 1)를 사용하였으며 모든 균은 37°C, MRS 배지 (Difco, USA)에서 배양되었으며 사용전 3회 계대 배양을 실시하고 사용하였다. 실험에 사용된 락토바실러스 균주와 플라스미드는 아래 표 1과 같다. 본 발명에 사용된 pNZ123의 대량생산을 위해 대장균 JM109 균주 (Promega, USA; *endA1*, *recA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17* ($r_{k^{-}}$, $m_{k^{+}}$), *relA1*, *supE44*, $\Delta(lac-proAB)$, [F', *traD36*,

proAB, *laqIqZ*△M15])를 이용하였으며 형질전환은 Sambrook 등 (1998)의 heat shock 방법으로 실시하였다. 형질전환 후 pNZ123이 삽입된 대장균 JM109는 DNA 추출키트 (Promega, USA)로 플라스미드를 추출하여 확인하였으며 -20℃에 저장하면서 시료로 사용하였다.

(실시예 2)

(2-1) 컴피턴트 세포 (competent cell)의 제조

락토바실러스 균주의 컴피턴트 세포의 제조 방법은 Wei 등 (1995)의 방법을 보완하여 사용하였다. 우선 실험에 사용된 모든 락토바실러스 균주를 정지기 (16~18시간)까지 배양하고 다시 1% 글라이신 (glycine)을 함유하는 MRS 배지에 2%를 접종한 후 37℃에서 배양을 실시하였다. 세포는 대수성장 초기 (O.D₆₆₀ 0.2~0.3)에 도달하였을 때 회수하였으며 5분 가량 얼음에 정치후 동량의 5mM 소듐 포스페이트 (sodium phosphate), 1mM 마그네슘 클로라이드 (MgCl₂), pH 7.4로 구성된 차가운 세척용 버퍼 로 2회 세척하였다. 그리고 0.9M 수크로오즈 (sucrose), 3mM 마그네슘 클로라이드 (MgCl₂), pH 7.4로 구성된 차가운 전기천공 버퍼를 원래 MRS 배지 부피의 1%로 현탁하여 유산균 전기천공용 컴피턴트 세포를 제조하였고 제조된 컴피턴트 세포는 2시간 이내로 전기천공에 사용하였다.

[표 1] 본 발명에 사용된 박테리아 균주와 플라스미드

Bacteria and plasmid	Source/Characteristics	Transformation efficiency (cfu/ml) ^d
Bacterial strains		
<i>E. coli</i> JM109	Propagation host	-
<i>L. acidophilus</i> 43121	ATCC ^a	$1.84 \pm 0.13 \times 10^4$
<i>L. acidophilus</i> 4356	ATCC	$3.60 \pm 0.70 \times 10^4$
<i>L. acidophilus</i> NCFM	Rhodia. Inc.	$9.32 \pm 0.54 \times 10^4$
<i>L. acidophilus</i> 30SC	Oklahoma State Univ.	$1.38 \pm 0.02 \times 10^4$
<i>L. acidophilus</i> A4	Oklahoma State Univ.	$1.42 \pm 0.43 \times 10^4$
<i>L. acidophilus</i> 107A	Oklahoma State Univ.	$6.06 \pm 0.96 \times 10^4$
<i>L. acidophilus</i> GP4A	Oklahoma State Univ.	$3.92 \pm 1.93 \times 10^4$
<i>L. helveticus</i> KU107	Lab. Isolate	$1.04 \pm 0.02 \times 10^5$
<i>L. brevis</i> 3102	KCTC ^b	$3.79 \pm 0.22 \times 10^4$
<i>L. plantarum</i> EH2	Lab. Isolate	ND ^e
<i>L. plantarum</i> CS1	Culture Systems. Inc.	ND
<i>L. casei</i> 393	ATCC	ND
<i>L. casei</i> M5	Lab. Isolate	ND
<i>L. rhamnosus</i> 7469	ATCC	ND
Plasmid		
pNZ123	Cm ^r ^c , pSH71	-

^a ATCC, American Type Culture Collection; ^b KCTC, Korean Collection for Type Culture; ^c Cm^r, chloramphenicol resistance gene; ^d Transformation efficiency are shown as means standard error (n=3); ^e ND, not detected

(2-2) 전기천공법을 이용한 락토바실러스 균주의 형질전환

우선 pNZ123 플라스미드와 제조된 락토바실러스 균주 컴피턴트 세포 50ul과 잘 섞은 후 0.2cm 큐벳 (Genetronics, USA)에 옮기고 얼음에 5분간 정치하였다. 이후 pNA123 플라스미드와 제조된 락토바실러스 균주 컴피턴트 세포의 혼합물은 다양하게 변화시킨 조건에서 전기천공법을 실시하였으며 그 조건은 아래 표 2와 같다.

[표 2] 전기천공법의 다양한 형질전환 파라미터들

Transformation parameters	Range of parameters
Pulse strength (kV/cm)	7.5, 10, 12.5

Number of pulse	1, 2, 4, 6, 8, 10, 15
Pulse interval (ms)	100, 500, 1000
Plasmid DNA concentration (ng/ml)	25, 50, 500, 750, 1000, 2000
Chloramphenicol concentration (ug/ml)	3, 5, 10

전기천공법은 electro square porator BTX 830 (Genetronics, USA)을 이용하여 실시하였다. 전기천공을 실시한 후 바로 혼합물에 1ml의 MRS를 분주하고 37℃에서 3시간 배양을 실시함으로 전기충격후 세포의 회복시간을 주었다. 이후 3, 5, 그리고 10ug/ml 클로람페니콜을 함유한 MRS agar에 도말을 실시하였다. Agar 플레이트는 37℃에서 혐기 배양을 실시하였고 72시간에서 콜로니를 조사하여 형질전환 효율을 측정하였다. 최초 락토바실러스 애시도필러스 ATCC 43121을 대상으로 최적조건을 측정하였을 때 전기충격 전압은 12.5 kV/cm, 전기충격 횟수는 10회, 전기충격의 시간간격은 500 ms, 플라스미드의 농도는 25 ng/ul에서 1.84×10^4 cfu/ug DNA의 가장 높은 형질전환 효율이 결정되었으며 다른 락토바실러스 균주도 이러한 조건을 이용하여 형질전환을 실시하였을때 10^4 cfu/ug DNA이상의 높은 형질전환 효율을 관찰할 수 있었다 (표 1).

도 1은 전기충격의 세기와 횟수에 따른 락토바실러스 애시도필러스 43121의 형질전환 효율을 나타낸 것이고 (●-: 7.5kV/cm, ○-: 10kV/cm, ▼-: 12.5kV/cm), 도 2는 형질전환시 사용된 pNZ123 백터의 농도에 따른 락토바실러스 애시도필러스 43121의 형질전환 효율을 나타낸 것이며 (black bar: 100ms, grey bar: 500ms, dark-grey bar: 1000ms), 도 3은 다양한 락토바실러스 균종에 대한 형질전환 효율을 나타낸 것이다.

(실시예 3) 형질전환체의 확인

락토바실러스 균주의 플라스미드 추출은 O'Sullivan 과 Klaenhemmer (1993)의 방법을 보완하여 실시하였다. 명확한 형질전환체의 확인을 위하여 pNZ123에 존재하는 클로람페니콜 저항유전자를 증폭할 수 있는 프라이머인 5'-ACTGGTTACAATAGCGACGG-3' (Forward, 서열번호 4)와 5'-CCAGTCATTAGGCCTATCTG-3' (Reverse, 서열번호 5)를 제조하였다. PCR은 Perkin-Elmer 9600 device (PE Biosystems, USA)를 이용하였으며 standard protocol에 따라 실시하였다. PCR 반응의 생성물은 1% 아갈로우스 (agarose)를 사용하여 전기영동을 실시하고 UV 파장을 이용하여 관찰하였을 때 440bp 정도의 밴드를 확인할 수 있었다.

도 4는 형질전환된 형질전환체를 확인하기 위한 pNZ123의 클로람페니콜 저항성 유전자를 PCR 증폭한 것이다. (레인 1 : 1kb plus DNA ladder, 레인 2 : pNZ123을 대상으로 PCR한 결과, 레인 3 : 와일드타입의 락토바실러스 애시도필러스 43121, 레인 4 : 와일드타입의 락토바실러스 애시도필러스 30SC, 레인 5 : 락토바실러스 애시도필러스 43121의 형질전환체, 레인 6 : 락토바실러스 애시도필러스 30SC의 형질전환체)

(실시예 4) 유산균 세포내 발현 벡터 pKU::slpA-GFP의 제조

락토바실러스 애시도필러스 ATCC 43121에서 발현시킬 재조합 벡터를 제조하기 위하여, slpA promoter (제한효소 *EcoR* I 과 *Xba* I)와 종결시퀀스 (제한효소 *Pst* I 과 *Hind* III)는 락토바실러스 애시도필러스 ATCC 4356의 크로모솜 (chromosome) DNA를 템플로 하여 하기 프라이머쌍들을 사용하여 PCR 증폭되었다.

slpA primers:

forward 5'-GGCGGAATTTCGGTAAGCGGTAGGTGAA-3' (서열번호 6)

reverse 5'-GCGCTCTAGATGGTCTTTTCCTCCTTG-3' (서열번호 7)

Terminal sequence primers:

forward 5'-GCAACTGCAGTAATAAGTCGTAGCACTAAC-3' (서열번호 8)

reverse 5'-GGCCAAGCTTCAGAAGATCCTATTAGAACT-3' (서열번호 9)

GFP (제한효소 *Xba* I 과 *Pst* I)는 pEGFP-N2(Invitrogen, USA)를 템플로 하여 하기 프라이머쌍을 사용하여 PCR 증폭되었다.

GFP primers:

forward 5'-GGCGCTCTAGAATGGGTAAAGGAGAAGAAC-3' (서열번호 10)

reverse 5'-GCAACTGCAGCAGTTATCTAGATCCGGACT-3' (서열번호 11)

상기 PCR 증폭된 각각의 단편들은 해당 제한효소쌍을 이용하여 연속적으로 대장균 형질전환 벡터인 pUC18(Amersham Pharmacia, Sweden)의 삽입서열에 삽입되어 *slpA*-GFP-종결시퀀스가 완전하게 연결되어 삽입된 단편을 제조하였다. 제조된 *slpA*-GFP-종결시퀀스 단편을 *EcoR* I 과 *Hind*III 절단하고, 동일한 제한효소로 절단된 pNZ123(de Vos and Simon, 1994)에 연결함으로써 3.9 kb의 크기를 가지는 재조합 벡터 pKU::*slpA*-GFP를 제조하였다. 발현 벡터 pKU::*slpA*-GFP의 제조과정은 도 5에 표시되어 있다.

도 5은 본 발명의 실시예에 따른 유산균 세포내 GFP 발현 벡터 pKU::*slpA*-GFP의 제조과정을 개략적으로 나타낸 것이고, 도 6은 유산균 세포내 발현 벡터 pKU::*slpA*-GFP에서 삽입여부를 확인하기 위해 *EcoR* I 과 *Hind*III으로 절단한 결과를 나타낸 것이다 (레인 1 : 1kb DNA 마커, 레인 2 : pKU::*slpA*-GFP를 *EcoR* I 과 *Hind*III으로 절단한 결과). 도 6에서 *slpA*-GFP-종결시퀀스 단편에 해당하는 1.1 kbp 정도의 밴드를 확인할 수 있었다.

(실시예 5) 전기천공법을 이용한 벡터 pKU::*slpA*-GFP의 형질전환

상기 실시예 2에서 설정된 최적 형질전환 조건으로 컴피턴트 세포 제조와 전기천공을 실시하였다. 이때 나타난 형질전환의 효율은 1.80×10^4 cfu/ug DNA로 나타났다.

(실시예 6) pKU::*slpA*-GFP의 유산균내 삽입여부 확인

상기 실시예 3에서 사용된 프라이머를 사용하여 재조합 형질전환체를 확인하였다. 상기에 나타난 결과와 동일하게 440 bp에서 밴드를 확인할 수 있었다.

도 7은 유산균 세포내 발현 벡터 pKU::*slpA*-GFP로 형질전환시킨 형질전환체에서 플라스미드를 추출한 결과를 나타낸 것이다 (레인 1 : λ /*Hind*III 마커, 레인 2 : 1kb plus DNA ladder 마커, 레인 3, 4 : 유산균 세포내 발현 벡터 pKU::*slpA*-GFP로 형질전환시킨 형질전환체에서 플라스미드 추출).

(실시예 7) 유산균내로 삽입된 벡터의 안정성 및 콜레스테롤 저하 능력 유지 확인

유산균내로 삽입된 벡터 pKU::*slpA*-GFP의 안정성 (stability)은 Gory 등 (2001)의 방법을 토대로 측정하였다. 플라스미드의 생존율은 5회 동안 연속하여 배양을 실시하여 세포세대수를 대략 100세대까지 배양한 후 클로람페니콜이 함유된 MRS 배지와 클로람페니콜이 함유되지 않은 MRS, 두가지 형태의 플레이트에 도말하여 균수의 변화를 측정하였다. 이때 5회까지 연속계대하는 동안 클로람페니콜이 함유된 MRS 배지와 함유되지 않은 MRS 배지 모두에서 거의 동일한 균수를 나타내었다. 따라서 본 발명에 사용된 벡터 pKU::*slpA*-GFP는 생체같은 항생제가 존재하지 않는 조건에서도 높은 생존율을 나타낼 것으로 생각된다. 또한 형질전환 되기전의 형태와 형질전환된 형태, 2종의 락토바실러스 애시도필러스 ATCC 43121의 콜레스테롤 저하 능력은 Gilliland 등 (1985)의 방법대로 측정하였다. 형질전환 되기전 락토바실러스 애시도필러스 ATCC 43121와 비교했을 때 형질전환된 형질전환체는 60% 수준의 콜레스테롤 저하 능력을 유지하고 있었다.

도 8은 pKU::*slpA*-GFP로 형질전환시킨 형질전환체의 플라스미드 안정성을 나타낸 것이며, 도 9는 pKU::*slpA*-GFP로 형질전환시킨 형질전환체의 콜레스테롤 저하능력 유지를 나타낸 것이다 (레인 1 : 형질전환되지 않은 락토바실러스 애시도필러스 ATCC 43121, 레인 2, 3 : 형질전환된 락토바실러스 애시도필러스 ATCC 43121)

(실시예 8) GFP 발현 확인

GFP 단백질의 확인을 위하여 재조합된 형질전환체의 균체를 슬라이드 글라스에 도말한후 4℃에서 1시간 건조하였다. 이를 FITC 필터 (excitation 490nm; emission 510nm)를 이용하여 형광현미경 (Olympus BX51, Japan)으로 발광을 확인하였을 때 형광성 균체를 확인할 수 있었다.

도 10은 pKU::*slpA*-GFP로 형질전환시킨 형질전환체에서 GFP의 발광을 형광현미경으로 확인한 것이다.

발명의 효과

이상 설명한 바와 같이, 유산균 세포내 외래 단백질 발현 벡터 및 이를 이용한 락토바실러스 균종의 형질전환방법에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 락토바실러스 에시도필러스의 높은 형질전환 효율을 위한 전기천공법의 조건을 설정하고 형질전환체를 빠르게 선별할 수 있는 PCR 프라이머를 제조하였다. 또한, GFP 단백질을 세포내에서 발현할 수 있는 유산균 용 벡터 pKU::*slpA*-GFP를 제조하고, 이를 락토바실러스 에시도필러스 ATCC 43121에 형질전환시켜 보고유전자로써 GFP의 가능성을 제시하였다. 본 발명의 형질전환 방법과 발현 벡터를 이용하여 유산균을 형질전환하면 원래의 특성을 변화시키지 않으며 재조합 단백질을 세포내에서 안정하게 발현시킬 수 있을 것이다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

그람 양성균의 복제원점 (ori), 복제유도단백질 유전자 (repA), 선별유전자인 클로람페니콜 (chloramphenicol) 저항성 유전자(cm^r), *slpA* 프로모터, 삽입 외래 유전자 서열, 및 종결 시퀀스를 포함하는 외래 단백질을 발현할 수 있는 도 5의 배열지도를 갖는 유산균용 발현 벡터(pKU::*slpA*-GFP).

청구항 2.

제 1항에 있어서, 상기 외래 유전자는 GFP(green fluorescent protein) 또는 GFP 융합 유전자인 것을 특징으로 하는 유산균용 발현 벡터.

청구항 3.

slpA 프로모터 (제한효소 *EcoR* I 과 *Xba* I)와 종결시퀀스 (제한효소 *Pst* I 과 *Hind*III)를 락토바실러스의 염색체 (chromosome) DNA를 주형으로 하여 PCR 증폭하는 단계, 외래 유전자 (제한효소 *Xba* I 과 *Pst* I)를 준비하는 단계, 각각의 유전자 단편들을 연속적으로 대장균 형질전환 벡터인 pUC18의 제한효소자리(*EcoR* I, *Xba* I, *Pst* I 과 *Hind*III)에 삽입하여 재조합벡터 pUC18::*slpA*-GFP-T.T를 제조하는 단계, 상기 재조합 벡터를 *EcoR* I 과 *Hind*III로 절단하는 단계, 및 동일한 제한효소 *EcoR* I 과 *Hind*III로 절단된 pNZ123에 연결하는 단계를 포함하는 재조합 벡터(pKU::*slpA*-GFP)의 제조방법.

청구항 4.

락토바실러스 균종의 형질전환에 있어서, 컴피턴트 락토바실러스를 전기충격 전압 12-13 kV/cm, 전기충격 횟수 8-12회, 전기충격의 시간간격 400-600 ms, 플라스미드의 농도 20-30 ng/ul의 조건으로 전기천공하는 것을 특징으로 하는 락토바실러스 균종의 전기천공법.

청구항 5.

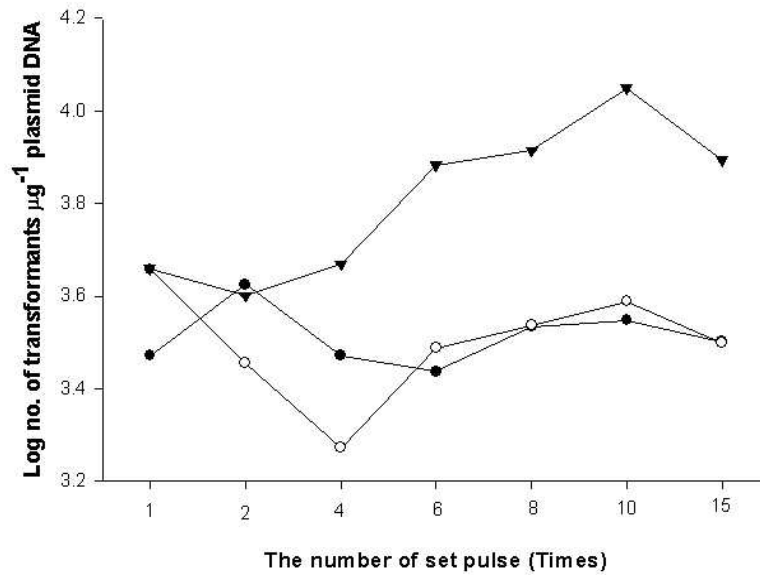
제 1항의 유산균용 발현 벡터로 형질전환된 락토바실러스 균종.

청구항 6.

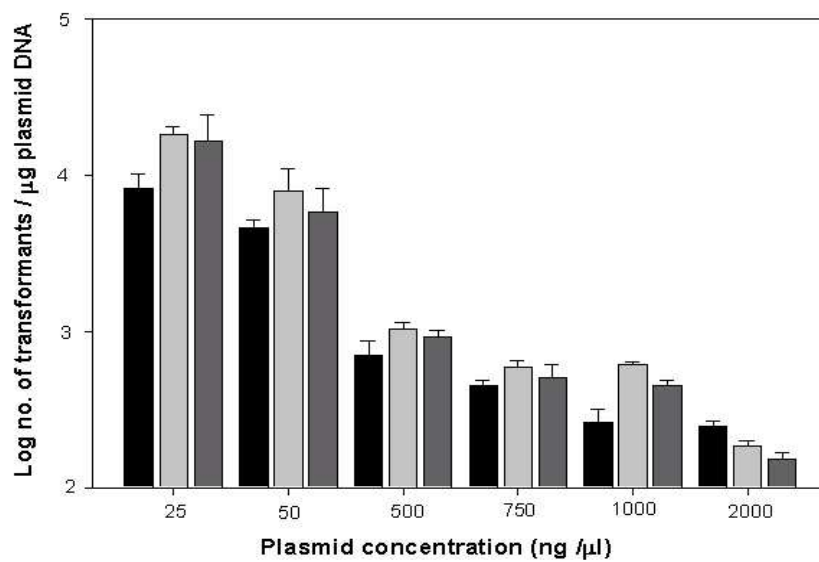
서열번호 4 또는 5의 염기서열을 갖는 pNZ123 유래의 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체에서 클로람페니콜 저항 유전자가 들어있는 pNZ123 유래의 재조합벡터의 빠른 선별을 위한 PCR 프라이머.

도면

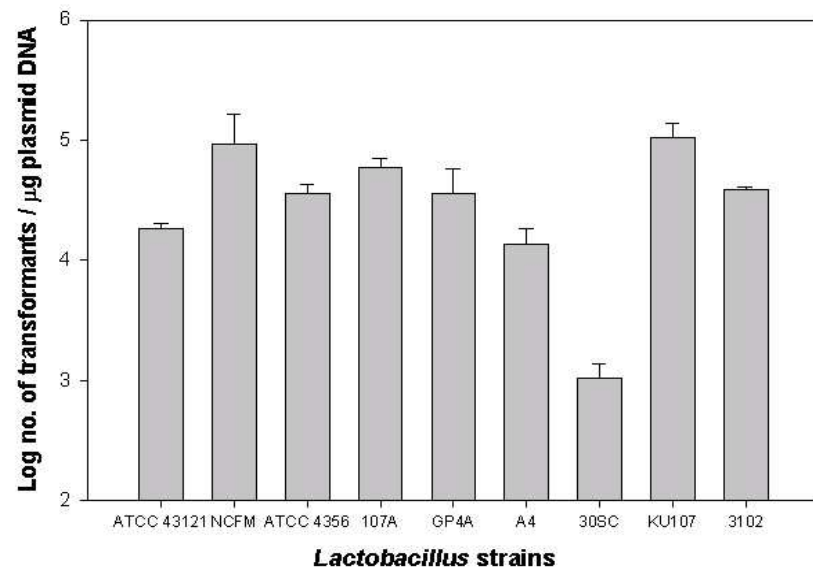
도면1



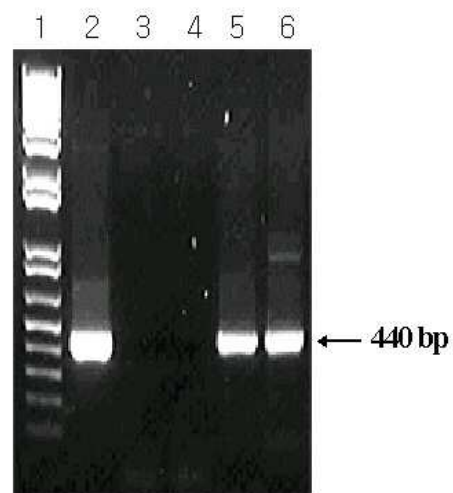
도면2



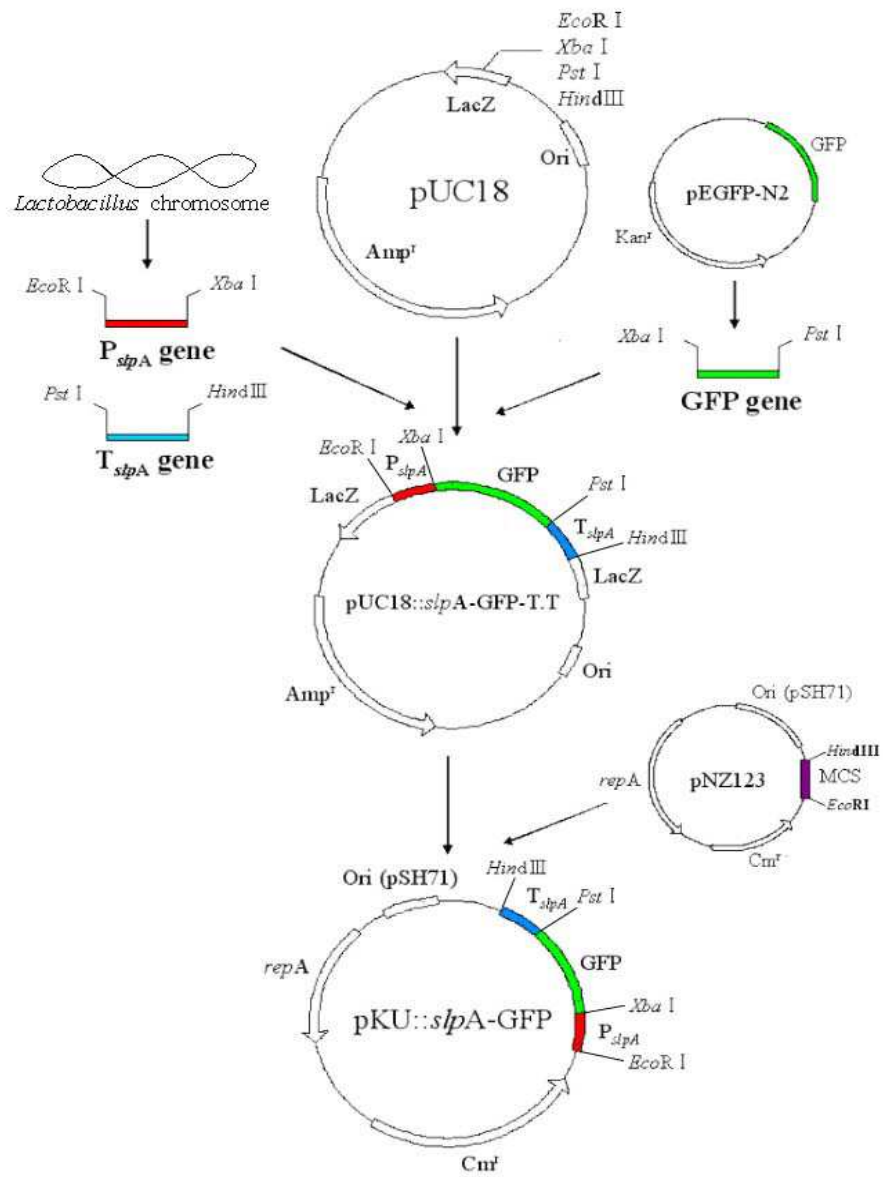
도면3



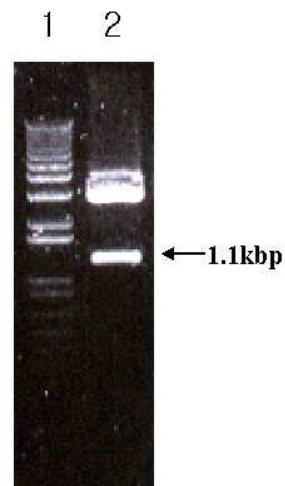
도면4



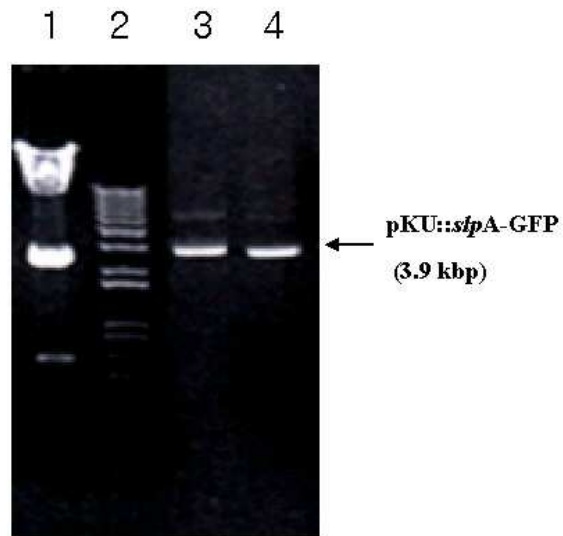
도면5



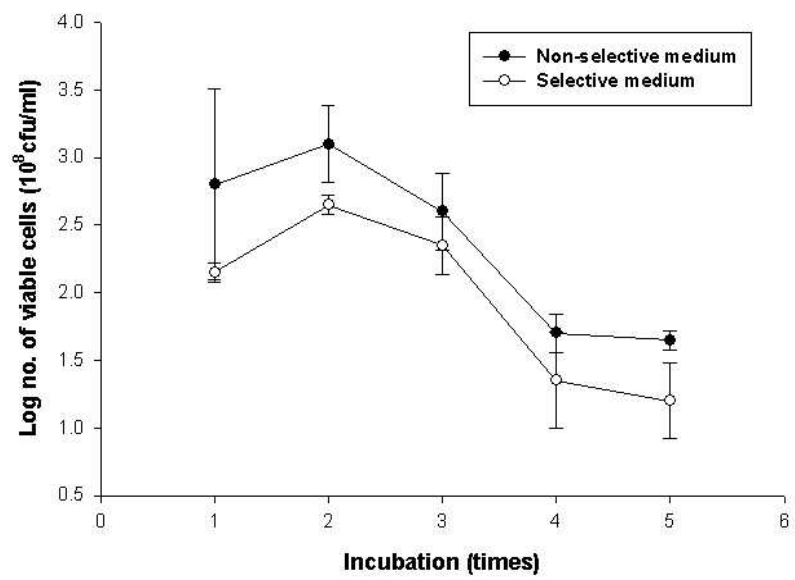
도면6



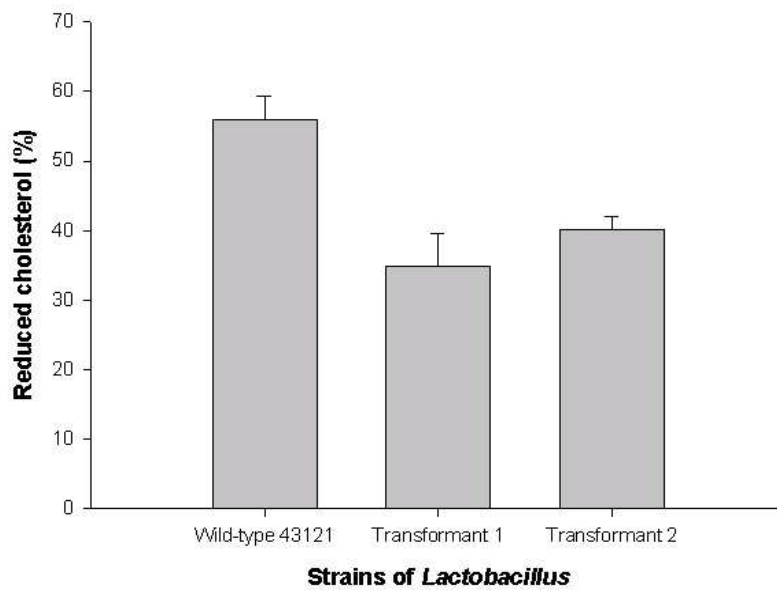
도면7



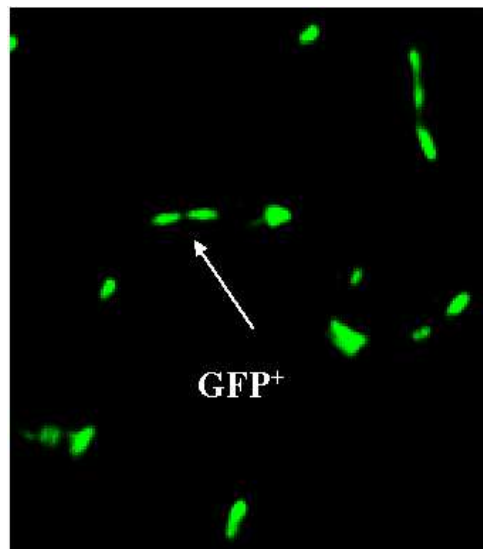
도면8



도면9



도면10



서열목록

- <110> Korea University Industry and Academy Cooperation Foundation
- <120> Transformation method and expression vector for *Lactobacillus* species
- <130> PM00005
- <160> 11
- <170> KopatentIn 1.71

<210> 1
 <211> 281
 <212> DNA
 <213> Lactobacillus

<220>
 <221> promoter
 <222> (1) .. (281)
 <223> slpA promoter

<400> 1
 ggtaagcggg aggtgaaata ttacaaatag tatttttcgg tcattttaac ttgctatttc 60
 ttgaagaggt tagtacaata tgaatcgtgg taagtaatag gacgtgcttc aggcgtgttg 120
 cctgtacgca tgctgattct tcagcaagac tactacctca tgagagttat agactcatgg 180
 atcttgcttt gaagggtttt gtacattata ggctcctatc acatgctgaa cctatggcct 240
 attacatttt tttatatattc aaggaggaaa agaccacatg a 281

<210> 2
 <211> 118
 <212> DNA
 <213> Lactobacillus

<220>
 <221> terminator
 <222> (1) .. (118)
 <223> Terminator sequence

<400> 2
 taataagtcg tagcactaac gctaacaaaa tgaaaaaggc agagcgaaag ctctgtcttt 60
 ttttgtgttt taaattttta tttcacttct aaacatacag ttctaataagg atcttctg 118

<210> 3
 <211> 732
 <212> DNA
 <213> Unknown

<220>
 <223> GFP gene of pEGFP-N2

<400> 3
 atgggtaaag gagaagaact tttcactgga gttgtcccaa ttcttggtga attagatggt 60

gatgttaatg ggcacaaatt ttctgtcagt ggagaggggtg aaggtgatgc aacatacgga	120
aaacttacc ttaaatttat ttgcactact ggaaaactac ctgttccatg gccaacactt	180
gtcactactt tctcttatgg tgttcaatgc ttttcaagat acccagatca tatgaaacgg	240
catgactttt tcaagagtgc catgccccgaa gggttatgtac aggaagaac tatatttttc	300
aaagatgacg ggaactacaa gacacgtgct gaagtcaagt ttgaaggatga tacccttggt	360
aatagaatcg agttaaaagg tattgatttt aaagaagatg gaaacattct tggacacaaa	420
ttggaataca actataactc acacaatgta tacatcatgg cagacaaaca aaagaatgga	480
accaaagtta acttcaaaat tagacacaa attgaagatg gaagcgttca actagcagac	540
cattatcaac aaaataactcc aattggcgat ggccctgtcc ttttaccaga caaccattac	600
ctgtccacac aatctgccct ttcgaaagat cccaacgaaa agagagacca catggtcctt	660
cttgagtttg taacagctgc tgggattaca catggcatgg atgaactata caagtccgga	720
tctagataac tg	732

<210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR primer

<400> 4	
actggttaca atagcgacgg	20

<210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR primer

<400> 5	
ccagtcatta ggctatatctg	20

<210> 6

<211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR primer

<400> 6
 ggcggaattc ggtaagcggg aggtgaa 27

<210> 7
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR primer

<400> 7
 gcgctctaga tggctcttttc ctccttg 27

<210> 8
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR primer

<400> 8
 gcaactgcag taataagtcg tagcactaac 30

<210> 9
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR primer

<400> 9
 ggccaagctt cagaagatcc tattagaact 30

<210> 10

<211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR primer

<400> 10
 ggcgctctag aatgggtaaa ggagaagaac 30

<210> 11
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR primer

<400> 11
 gcaactgcag cagttatcta gatccggact 30