



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년08월05일
(11) 등록번호 10-2286426
(24) 등록일자 2021년07월30일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/70 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 15/70 (2013.01)
C12N 2800/101 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-0036190
- (22) 출원일자 2020년03월25일
심사청구일자 2020년03월25일
- (65) 공개번호 10-2020-0130093
- (43) 공개일자 2020년11월18일
- (30) 우선권주장
1020190055078 2019년05월10일 대한민국(KR)
- (56) 선행기술조사문헌
KR101379436 B1
(뒷면에 계속)

- (73) 특허권자
세종대학교산학협력단
서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)
- (72) 발명자
채영기
서울특별시 강남구 삼성로111길 8, 206동 1303호 (삼성동, 삼성동힐스테이트2단지아파트)
- (74) 대리인
특허법인리채

전체 청구항 수 : 총 11 항

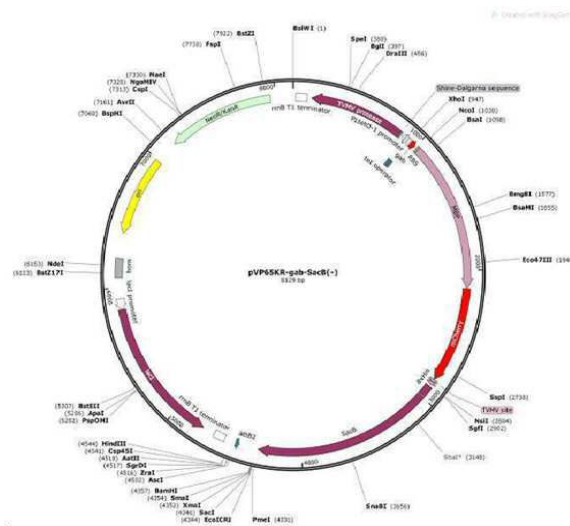
심사관 : 유성전

(54) 발명의 명칭 자동유도 플라스미드

(57) 요약

본 발명은 단백질 생산과정을 단순화하고, 특수한 변형을 사용할 필요가 없는 효율적이고 경제적인 자동유도성 플라스미드에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 2830/002 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020080067614 A

KR1020180092361 A

Methods in Enzymology 155 (1987.12.)

J. Bacteriol. 1985, 164,70-7

J. Biotechnol. 2006, 123, 273-80

EMBO J. 1987, 6, 3139-44

Biotechnol. Prog.2007,23,585-598

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 서열로 이루어진 프로모터(promoter)를 포함하는 재조합 플라스미드.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 목적 단백질을 코딩하는 유전자가 상기 프로모터와 작동가능하도록 연결된(operatively linked) 플라스미드.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 플라스미드는 작동유전자(operator)를 구비한 프로모터가 서열번호 1의 서열로 이루어진 프로모터(promoter)로 치환된 것인 플라스미드.

청구항 4

서열번호 1의 서열로 이루어진 프로모터(promoter)를 포함하는 재조합 플라스미드로 형질전환된 숙주 미생물.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 목적 단백질을 코딩하는 유전자가 상기 프로모터와 작동가능하도록 연결된(operatively linked) 미생물.

청구항 6

청구항 4에 있어서, 상기 플라스미드는 작동유전자(operator)를 구비한 프로모터가 서열번호 1의 서열로 이루어진 프로모터(promoter)로 치환된 것인 미생물.

청구항 7

청구항 4에 있어서, 상기 미생물은 대장균(E.coli), 슈도모나스(Pseudomonas), 시아노박테리아(cyanobacteria) 및 바실러스(Bacillus)로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 균주인 미생물.

청구항 8

청구항 1 내지 3 중 어느 한 항의 플라스미드 또는 청구항 4 내지 7 중 어느 한 항의 미생물을 포함하는 단백질 생산용 조성물.

청구항 9

청구항 4 내지 7 중 어느 한 항의 미생물을 배양하는 단계를 포함하는 목적 단백질의 생산방법.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 목적 단백질을 회수하는 단계를 더 포함하는 생산방법.

청구항 11

청구항 9에 있어서, 상기 배양은 TB 배지에서 이루어지는 것인 생산방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 단백질 생산과정을 단순화하고, 특수한 변형을 사용할 필요가 없는 효율적이고 경제적인 자동유도성 플라스미드에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 바실러스는 대장균 및 효모와 함께 산업적으로 유용한 단백질을 생산하는 주요한 숙주로 사용되어 왔다. 바실러스 균의 단백질 생산 숙주로서의 장점은, (1) 인체에 무해하고, (2) 많은 양의 단백질을 세포 외로 분비할 수 있으며, (3) 내독소를 생산하지 않고, (4) FDA에 의해 GRAS (generally regared as safe)로 규정되어 있으며, (5) codon bias가 없고, (6) 유전자 조작, 형질전환 및 대량배양이 용이하며, (7) 계놈정보가 알려져 있다는 점이다. 현재, 전 세계 산업효소의 약 60% 정도가 바실러스를 숙주균으로 사용하고 있으며, 인체에 무해한 GRAS(generally regarded as safe) 미생물이라는 특성으로 인해 식품용 또는 의약품용 단백질 생산에 적합하다고 알려져 있다.

[0004] 고전적으로 유용 효소 또는 단백질을 대량으로 생산하기 위하여, 돌연변이 유도물질 처리, 자외선 또는 방사선 조사 등을 통해 숙주균을 돌연변이 시키는 방법이 사용되어 왔으나, 상기 방법들은 비선택적 돌연변이로 인해 종종 숙주균의 성장속도가 저하되거나, 배지조성 및 배양조건을 최적화시키기 까다로운 경우가 많다. 또한, 돌연변이 균주의 경우에는 균주 퇴화가 일어나며, 각각의 목적 단백질 생산을 위한 숙주균을 따로 개발해야 하므로 시간과 노력이 많이 소요되는 고전적인 방법이다. 최근에는 유전공학의 발달로 인해 다양한 발현시스템이 개발되어 유용한 단백질의 생산이 시도되었다. 이 보고에 의하면, IPTG 및 당과 같은 특정 발현 유도 인자를 이용하여 발현을 인위적으로 유도하는 방법, 세포 성장 주기 의존성 프로모터에 의한 방법 및 자동유도 발현 등이 개발되었다. 그러나, 발현 유도 인자의 단가가 생산성에 영향을 미치거나, 세포 성장기에 많은 양의 단백질이 발현되어 세포성장에 영향을 주거나, 저온조건을 유지시키기 위해 생산단가가 높아지는 등 여러 문제점이 여전히 남아 있다. 아울러, 상기 여러 발현시스템이 개발되었으나, 아직 바실러스를 숙주균으로 생산된 단백질 의약품이 시장진입에 성공한 예가 없는데, 그 이유는, (1) 대장균과 비교하여 여전히 강력하고 조절 가능한 프로모터가 없고, (2) 많은 단백질 분해효소의 존재로 인해 발현된 단백질의 안정성에 문제가 있고, (3) 발현된 단백질의 세포 외 분비시 세포막에 존재하는 단백질 분해효소에 의한 분해가 일어나기 때문이라고 해석되고 있다.

[0005] 바실러스의 경우, 바실러스 서틸러스의 단백질 분해효소 aprE의 프로모터를 이용한 발현시스템, 나란한 두 종류의 프로모터를 이용한 시스템, 바실러스 쉐린겐시스 cryIIIA의 프로모터를 이용한 시스템 등이 개발되어 있다. 이러한 시스템들은 세포 성장기에도 단백질 발현이 진행되어 목적단백질의 대량발현시 세포성장에 영향을 주거나, 세포에 독성을 나타내는 단백질의 발현이 어렵다. 한편 바실러스 서틸리스 pstS 프로모터를 이용하여 세포성장 정지기에 특이적으로 발현이 가능한 시스템을 개발한 적이 있다.

[0006] 한편, 발현 숙주로 많이 사용되고 있는 대장균의 경우 발현된 단백질이 대부분 세포 내에 존재하기 때문에 물리적, 화학적 또는 효소적 세포파괴 방법이 필요하다. 따라서, 목적단백질의 대량생산을 위해서는 세포파괴를 위한 저렴한 방법이 필수적으로 요구되고 있다. 바실러스의 경우 세포성장 정지기 후반에 이르면 자동으로 세포가 파괴되어 세포내에 있던 단백질이 배지로 노출되는데, 이러한 특징은 세포 내에서 발현된 단백질의 효율적인 회수가 가능하게 한다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2007-0053765호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 단백질 생산과정을 단순화하고, 특수한 변형을 사용할 필요가 없는 효율적이고 경제적인 자동유도성 플라스미드를 제공함에 그 목적이 있다.

과제의 해결 수단

- [0011] 1. 서열번호 1의 서열로 이루어진 프로모터(promoter) 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드.
- [0012] 2. 위 1에 있어서, 목적 단백질을 코딩하는 유전자가 상기 프로모터와 작동가능하도록 연결된(operatively linked) 플라스미드.
- [0013] 3. 위 1에 있어서, 상기 플라스미드는 작동유전자(operator)를 구비한 프로모터 유전자가 서열번호 1의 서열로 이루어진 프로모터(promoter) 유전자로 치환된 것인 플라스미드.
- [0014] 4. 서열번호 1의 서열로 이루어진 프로모터(promoter) 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드로 형질전환된 숙주 미생물.
- [0015] 5. 위 4에 있어서, 목적 단백질을 코딩하는 유전자가 상기 프로모터와 작동가능하도록 연결된(operatively linked) 미생물.
- [0016] 6. 위 4에 있어서, 상기 플라스미드는 작동유전자(operator)를 구비한 프로모터 유전자가 서열번호 1의 서열로 이루어진 프로모터(promoter) 유전자로 치환된 것인 미생물.
- [0017] 7. 위 4에 있어서, 상기 미생물은 대장균(E.coli), 슈도모나스(Pseudomonas), 시아노박테리아(cyanobacteria) 및 바실러스(Bacillus)로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 균주인 미생물.
- [0018] 8. 위 1 내지 7 중 어느 한 항의 플라스미드 또는 미생물을 포함하는 단백질 생산용 조성물.
- [0019] 9. 위 4 내지 7 중 어느 한 항의 미생물을 배양하는 단계를 포함하는 목적 단백질의 생산방법.
- [0020] 10. 위 9에 있어서, 목적 단백질을 회수하는 단계를 더 포함하는 생산방법.
- [0021] 11. 위 9에 있어서, 상기 배양은 TB 배지에서 이루어지는 것인 생산방법.

발명의 효과

[0023] 본 발명의 자동유도성 플라스미드는 단백질 생산과정을 단순화하고, 특수한 변형을 사용할 필요가 없어 매우 효율적이고 경제적인 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

- [0025] 도 1은 본 발명 플라스미드(pVP65KR-gab-SacB(-))를 도식화한 것이다.
- 도 2는 LB(Luria-Bertani) 배지에서 IPTG 유도 하 성장된 Rosetta2(DE3)pLysS/pVP65KR-SacB(-)의 단백질 생산 정도를 나타내는 사진이다.
- 도 3은 TB(Terrific Broth) 배지에서 성장된 XL10-Gold/pVP65KR-gab-SacB(-)의 단백질 생산 정도를 나타내는 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0026] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0028] 본 발명은 서열번호 1의 서열로 이루어진 프로모터(promoter) 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드를 제공한다.
- [0029] 본 발명에서 용어, "프로모터"는 폴리머라제에 대한 결합 부위를 포함하고 프로모터 하위 유전자의 mRNA로의 전사 개시 활성을 가지는, 암호화 영역의 상위(upstream)의 비해독된 핵산 서열을 말한다.
- [0030] 본 발명의 프로모터 유전자 서열은 일정 정도 변형이 가능하다. 본 기술 분야의 당업자라면 이러한 인위적인 변형에 의해 70% 이상의 상동성이 유지되는 염기서열이 본 발명에서 목적하는 유전자 발현을 위한 프로모터 활성을 보유하는 한, 본 발명의 염기서열로부터 유래된 것과 균등한 것임을 쉽게 이해할 것이다.
- [0031] 본 발명에서 용어, "상동성"이란 서열번호 1의 핵산 서열과의 동일한 정도를 나타내는 것으로 상동성의 비교는 육안으로나 구입이 용이한 비교 프로그램을 이용하여 2개 이상의 서열간의 상동성을 백분율(%)로 계산할 수 있다. 본 발명의 서열번호 1의 서열과 바람직하게는 70% 이상, 보다 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상 동일한 핵산 서열을 포함한다.
- [0032] 또한, 본 발명의 프로모터는 프로모터 활성을 보유하는 한, 하나 이상의 핵산 염기가 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의해 변이된 프로모터 핵산 서열을 갖는 변이체를 포함한다. 이러한 서열 변이를 통하여 본 발명의 프로모터와 동일한 활성을 나타낼 수도 있으나, 바람직하게는 활성이 증가된 프로모터 등 목적에 적합하게 프로모터의 기능을 개선시킬 수 있다. 상기 변이는 본 발명의 분야에서 공지된 다양한 방법에 의하여 이루어질 수 있으며, 그 예는 error-prone PCR법, DNA shuffling법, site-directed mutagenesis법 등이 있다.
- [0033] 상기 모든 범주의 프로모터 유전자는 목적 단백질 유전자의 발현을 유도하는 발현 벡터의 프로모터 성분으로 제공되고, 상기 프로모터를 이용한 다양한 플라스미드의 변형은 본 발명의 범주에 포함된다.
- [0034] 본 발명에서 용어 "플라스미드"란 적당한 숙주 내에서 목적 유전자가 발현할 수 있도록 프로모터 등의 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 의미하는 것으로서, 숙주 세포 또는 미생물의 게놈내로 통합되어 있는 형태일 수도 있다.
- [0035] 본 발명에서 "작동가능하게 연결된(operably linked)"는 일반적 기능을 수행하도록 본 발명의 프로모터 또는 그의 변이체 핵산 서열과 목적하는 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 말한다. 재조합 플라스미드와의 작동적 연결은 당해 기술분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용한다.
- [0036] 본 발명에서 "조절 요소"란 단백질을 암호화하는 핵산 서열의 전사, 번역 또는 발현의 증진을 돕거나 이에 영향을 미치는 비해독화된 핵산 서열을 의미한다. 본 발명의 플라스미드는 조절 요소로 본 발명의 프로모터 또는 그의 변이체를 필수적으로 포함하고, 단백질의 발현에 영향을 미칠 수 있는 발현 조절 서열, 예를 들어, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널, 인핸서, 막 표적화 또는 분비를 위한 신호서열 등을 포함할 수 있다.
- [0037] 또한, 플라스미드는 복제가능한 발현 플라스미드인 경우, 복제가 개시되는 특정 핵산 서열인 복제원점(replication origin)을 포함할 수 있다.
- [0038] 또한, 플라스미드는 선택마커(selection marker)를 포함할 수 있다. 선택마커는 플라스미드로 형질전환된 세포 또는 미생물을 선별하기 위한 것으로, 약물 내성, 영양 요구성, 세포 독성제에 대한 내성 또는 표면 단백질의 발현과 같은 선택가능 표현형을 부여하는 마커들이 사용될 수 있다. 선택제(selective agent)가 처리된 환경에서 선별 마커를 발현하는 세포 또는 미생물만 생존하므로 형질전환된 개체를 선별 가능하다.
- [0039] 본 발명의 플라스미드는 목적 단백질을 코딩하는 유전자가 상기 프로모터와 작동가능하도록 연결된(operatively linked) 것일 수 있고, 구체적으로는 상기 프로모터의 하위 영역에 연결된 것일 수 있다.
- [0040] 상기 목적 단백질을 코딩하는 유전자로서, 의학, 산업적으로 유용한 목적 단백질에는 호르몬, 사이토카인, 효소, 응고인자, 수송 단백질, 수용체, 조절 단백질, 구조 단백질, 전사 인자, 항원, 항체 등일 수 있으며, 구체적으로, MBP(Maltose Binding Protein)를 코딩하는 유전자, mCherry 단백질을 코딩하는 유전자, 제 8인자(Factor VIII), 크리스마스 팩터(Factor IX), 조직플라스미노겐활성제(tissue plasminogen activator), 인슐린(insulin), 글루카곤(glucagon), 성장호르몬(growth hormone), 생식선자극호르몬(gonadotrophin), 적혈구생성소(erythropoietin), 콜로니자극인자(colony stimulating factor), 인터페론(interferon), 인터류킨(interleukin), 백신항원(vaccine antigen), 단클론항체(monoclonal antibody) 및 종양괴사인자(tumor

necrosis factor)로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나를 코딩하는 유전자일 수 있으나, 반드시 이에 제한되지 아니한다.

- [0041] 상기 프로모터 유전자는 숙주 성장 정지기(stationary-phase)에 활성이 유도되는 것일 수 있는데, 이는 본 발명의 플라스미드로 형질전환된 세포 또는 미생물의 성장 주기에 있어서, 최대 세포 분열 속도에 도달하는 숙주 성장 정지기(stationary-phase)에 특별한 단백질 생산 개시 물질, 예를 들면 IPTG, lactose 등을 별도로 배지상에 첨가하지 아니하여도 단백질을 자동적으로 생산할 수 있고, 단백질 생산용 별도 미생물로의 추가적 형질전환 단계를 거치지 아니하여도 우수한 효율로 단백질 생산이 가능하여 매우 경제적이고, 높은 효용가치를 지니는 주된 원인일 수 있다.
- [0042] 본 발명의 플라스미드는 기본 골격으로서 pVP, pQE, pET, pMAL, pGEX 및 pGEM으로 이루어진 군에서 선택된 하나의 벡터 골격을 사용할 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 아니하고, 본 발명의 프로모터 서열을 재조합 할 수 있는 벡터 골격이라면 당업계에 주지된 벡터 골격 어떠한 것이든 특별히 제한되지 아니한다.
- [0043] 본 발명의 플라스미드의 기본 골격으로서 상기 당업계 주지된 벡터 골격을 사용하는 경우, 이의 작동유전자(operator)를 포함하는 기존 프로모터(promoter)는 본 발명의 프로모터로 치환될 수 있고, 이러한 경우, 상기 벡터 골격의 프로모터 및 작동유전자 서열 인근에 상보적으로 결합하는 프라이머 쌍을 이용하여 본 발명의 프로모터로 치환시키는 과정에 의해 치환될 수 있다.
- [0044] 상기 치환에 있어 구체적인 예를 들자면, 당업계에 주지된 벡터 골격으로서 pVP(pVP65K)를 사용하는 경우, 이의 기본 프로모터 및 작동유전자인 T5 프로모터 및 lac 작동유전자를 본 발명의 프로모터로 치환될 수 있고, 이러한 경우, 서열번호 2 및 3의 서열로 각각 이루어진 프라이머 쌍을 이용하여 본 발명의 프로모터로 치환시킬 수 있다.
- [0046] 본 발명은 상술한 플라스미드로 형질전환된 숙주 미생물을 제공한다.
- [0047] 상기 숙주 미생물에 있어서 특별한 제한은 없는데, 이는 본 발명의 프로모터 고유의 특성으로서, 균주를 가리지 아니하고 어떠한 균주든 본 발명의 플라스미드를 포함하는 경우라면 우수한 효율로 목적 단백질을 생산할 수 있다.
- [0048] 숙주 미생물의 구체적인 예를 들자면, 대장균(E.coli), 슈도모나스(Pseudomonas), 시아노박테리아(cyanobacteria) 및 바실러스(Bacillus)로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나일 수 있으나, 상술한 바대로, 이에 제한되는 것이 아니다.
- [0049] 상기 형질전환은 당업계 통상적인 방법에 의해 실시될 수 있고, 예를 들면, 자연도입법, 열 충격법, 전기충격법 등을 통해 도입할 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.
- [0050] 상기 플라스미드와 관련한 구체적인 내용은 상술한 바와 같다.
- [0052] 본 발명은 상기 플라스미드 또는 미생물을 포함하는 단백질 생산용 조성물을 제공한다.
- [0053] 본 발명의 조성물은 목적 단백질을 우수한 효율로 생산하기 위한 보조물질을 추가적으로 포함할 수 있고, 구체적인 예를 들면, 염, 에탄올, 소르비톨 및 과산화수소수로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 약한 스트레스 처리 물질을 더 포함할 수 있으나, 반드시 이에 제한되지 않는다.
- [0054] 상기 플라스미드 및 미생물에 관련한 구체적인 내용은 상술한 바와 같다.
- [0056] 본 발명은 상술한 미생물을 배양하는 단계를 포함하는 목적 단백질의 생산방법을 제공한다.
- [0057] 또한, 본 발명의 생산방법은 목적 단백질을 회수하는 단계를 더 포함할 수 있고, 이러한 회수는 추가적인 단백질 정제 과정과 같이, 생산된 단백질을 목적 용도로 사용하기 위해 수행되는 당업계 통상의 과정과 결부되어 수행될 수 있다.
- [0058] 또한, 상기 배양에 있어서 특정 배지로 제한되지 아니하나, 바람직하게는 글리세롤을 함유하고 있어 세포의 생장의 지속성이 높고, 동부피의 배양액 대비 세포 성장효과가 우수하다는 측면에서 TB 배지에서 이루어질 수 있고, 이는 하기 실시예에서 구체적인 데이터로 제시하였다.
- [0059] 본 발명의 생산방법은 상술한 바대로, 특별한 단백질 생산 개시 물질, 예를 들면 IPTG, lactose 등을 별도로 배지상에 첨가하지 아니하여도 단백질을 자동적으로 생산할 수 있고, 단백질 생산용 별도 미생물로의 추가적 형질전환 단계를 거치지 아니하여도 우수한 효율로 단백질 생산이 가능하여 매우 경제적인 장점이 있다.

[0060] 본 발명의 생산방법은 프로모터의 세기를 조절하기 위하여 저온에서 배양하거나, 염, 에탄올, 소르비톨 및 과산화수소수로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 약한 스트레스 처리 물질을 가하여 더 포함하여 프로모터의 세기를 변화시킴에 따라, 목적 단백질의 생산 정도를 조절하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0061] 상기 미생물과 관련된 구체적인 사항은 상술한 바와 같다.

[0063] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.

[0065] **실험방법**

[0066] **1. 벡터, 유전자, 올리고뉴클레오티드 및 키트**

[0067] pVP65K 벡터는 Eukaryotic Structural Genomics (<http://www.uwstructuralgenomics.org/>) 센터에서 입수하였고, pVP80K 벡터는 DNASU (<http://www.dnasu.org>) 에서 구입하였다. MBP-mCherry-8xHis 유전자 블록은 Integrated DNA Technologies (<http://www.idtdna.com>) 에 의해 합성되었다. QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis 키트는 Agilent (<http://www.agilent.com>) 에서 구입했다. 모든 올리고 뉴클레오티드는 Cosmogenetech co, Ltd. (<http://www.cosmogenetech.com>) 에 의해 합성되었다.

[0069] **2. 대장균 균주**

[0070] Rosetta2(DE3) pLysS는 Merck KGaA (<http://www.merckmillipore.com>) 에서 구입했고, XL10-Gold는 QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis 키트에 포함되었다.

[0072] **3. 플라스미드의 설계**

[0073] pVP65K 벡터(서열번호 8)를 초기 주형으로 사용하였다. MBP-mCherry-8xHis 유전자 블록(서열번호 11)을 NcoI 및 NotI로 절단하고, 원래의 MBP(Maltose Binding Protein) 유전자를 대체하기 위해 동일한 제한효소로 미리 절단한 pVP65K와 연결시켰다. 이 유전자 블록의 3개 유전자 단편은 내부 정지 코돈이 없는 동일한 판독 영역(reading frame)을 공유하여, 바로 옆에 표적 단백질을 부착할 수 있는 단일 융합 단백질을 생성한다. 생성된 플라스미드를 pVP65KR로 명명하고, mCherry(적색 형광 단백질의 변이체)의 적색을 나타내는 "R"로 표시하였다. 이어서, pVP65KR의 바르나제(barnase) 유전자가 포함된 부분(서열번호 12)을 레반수크라아제(levansucrase, SacB) 유전자(서열번호 13)로 대체하였다. 레반수크라아제 유전자는 pVP80K 벡터로부터, 서열번호 4 및 5의 서열로 각각 이루어진 2개의 올리고뉴클레오티드를 이용하여 PCR로 증폭시켰다. 생성된 PCR 산물을 정제하고, SgfI 및 SacI로 분해하였으며, 이전의 동일한 제한효소 세트와 분해시킨 pVP65KR과 연결시켰다. 생성된 플라스미드를 pVP65KR-SacB로 명명하였다. SacB 유전자 내부의 HindIII 사이트는 서열번호 6 및 7의 서열로 각각 이루어진 2개의 돌연변이 프라이머 쌍을 갖는 QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis 키트를 사용하여 제거하였다. 생성된 플라스미드를 pVP65KR-SacB(-)로 명명하였다((-)는 고유의 HindIII의 제거를 나타낸다). pVP65KR-SacB(-)의 T5 프로모터(T5 promoter, 서열번호 9) 및 lac 작동유전자(lac operator, 서열번호 10)는, 서열번호 2 및 3의 서열로 각각 이루어진 프라이머 쌍을 갖는 QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis 키트를 사용하여, 서열번호 1의 서열로 이루어진 하이브리드 정지상 프로모터(hybrid stationary phase promoter)로 치환되었다. 생성된 플라스미드를 pVP65KR-gab-SacB(-)로 명명하였다.

[0075] **4. 대장균의 배양**

[0076] **(1) mCherry 생산 비교 실험**

[0077] 50mL의 LB 배지에 pVP65KR-SacB(-)를 함유한 Rosetta2(DE3) pLysS의 완전 성장된 LB 배양액을 접종하였다. 배양은 37°C에서 진탕 배양기로 수행하였다. IPTG를 600mM의 OD가 0.8에 도달 할 때 0.5mM의 최종 농도로 첨가하고, 배양물을 3시간 후에 수거하였다. 수확된 세포를 10 mL의 Tris · HCl pH 8.0으로 재현탁 하였다.

[0078] 50 mL의 LB 또는 TB 배지에 pVP65KR-SacB(-)가 있는 XL10-Gold LB 배양액 50 μL를 접종하고, 37°C에서 18시간 동안 진탕 배양기에서 성장시켰다.

[0079] 50 mL의 LB 배지에 Rosetta2(DE3) pLysS 세포의 50 mL LB 배양물을 밤새 별도로 성장시켰고, XL10-Gold 배양물과 섞어서 동일한 원심 튜브에서 수확하였다. 수확된 세포를 10 mL의 Tris · HCl pH 8.0으로 재현탁하였다.

[0081] **(2) MBP 생산 비교 실험**

[0082] 50 mL의 OvernightExpress® LB 배지에 pVP65KR-SacB(-)를 함유한 Rosetta2(DE3) pLysS의 완전 성장된 LB 배양액 50 μL를 접종하였다. 37°C에서 18시간 동안 진탕 배양기에서 성장시켰다. 원심분리기로 수확된 세포를 10

mL의 Tris · HCl pH 8.0으로 재현탁하였다.

[0083] 50 mL의 TB 배지에 pVP65KR-SacB(-)를 함유한 Rosetta2(DE3) pLysS의 완전 성장된 LB 배양액을 접종하였다. 배양은 37°C에서 진탕 배양기로 수행하였다. 원심분리기로 수확된 세포를 10 mL의 Tris · HCl pH 8.0으로 재현탁하였다.

[0084] 50 mL의 TB 배지에 pVP65KR-gad-SacB(-)가 있는 XL10-Gold의 완전 성장된 LB 배양액 50 μ L를 접종하고, 37°C에서 18시간 동안 진탕 배양기에서 성장시켰다.

[0085] 50 mL의 LB 배지에 Rosetta2(DE3) pLysS 세포의 50 mL LB 배양물을 밤새 별도로 성장시켰고, XL10-Gold 배양물과 섞어서 동일한 원심 튜브에서 수확하였다. 수확된 세포를 10 mL의 Tris · HCl pH 8.0으로 재현탁하였다.

[0087] **5. 세포 용해 및 단백질 정량**

[0088] mCherry 단백질 생성은 적색의 강도에 의해 질적으로 모니터링 되었다. 수확 후, 동결 및 해동에 의해 세포를 용해시켰다. 1 mg의 DNaseI를 첨가하여 DNA 분자에 의한 끈적거림을 제거했다. Triton X-100을 1%의 최종 농도로 첨가하였고, 세포 용해물을 4°C에서 30분 동안 20,000g에서 원심분리 하였다. 1 mL의 상등액을 UV 분광 광도계로 587 nm에서 흡광도를 측정하기 위해 사용하였다. 상등액에서 mCherry 단백질의 농도를 계산하기 위해 $72000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 의 흡광 계수를 사용했다.

[0089] MBP는 칼럼크로마토그래피로 정제하고 정량하였다. 50mL 배지에서 배양한 세포를 수확하고 10mL 완충용액에 재현탁하고 동결 및 해동에 의해 세포를 용해시켰다. 1 mg의 DNaseI를 첨가하여 DNA 분자에 의한 끈적거림을 제거하고, Triton X-100을 1%의 최종 농도로 첨가하였다. 세포 용해물을 4°C에서 30분 동안 20,000g에서 원심분리하여 상등액을 분리하였다. 상등액을 HisTrap 컬럼에 로딩하고 NPI-10 용액 (10mM sodium phosphate pH 7.0, 300mM NaCl, 10mM imidazole) 40mL로 세척한 후, NPI-500 (10mM sodium phosphate pH 7.0, 300mM NaCl, 500mM imidazole)의 조성비율을 점차적으로 증가시켜가면서 MBP를 용출하였다. MBP는 약 30% NPI-500에서 용출되었으며, 용출부피는 12-15mL 범위였다. MBP 단백질의 농도를 계산하기 위해 280nm에서 $66350 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 의 흡광 계수를 사용했다.

[0090] 280nm에서 흡광도를 측정하고 이를 질량으로 환산하였고, 600nm에서 흡광도를 측정하여 배양된 세포의 양으로 환산하였다.

[0092] **실험결과**

[0093] **1. 플라스미드의 설계**

[0094] 합성된 유전자 블록은 MBP, mCherry 단백질 및 8개의 히스티딘 스트레치(8xHis)에 대한 유전자를 순차적으로 포함하고 있다. 8xHis는 정제과정을 단순화하기 위해, 표적 단백질의 N- 말단에 부착되어야 한다. MBP 및 mCherry 유전자의 중지 코돈(stop codon)을 제거하여, TVMV 프로테아제에 의해 표적 단백질로 절단될 하나의 단일 융합 단백질을 생산하는, 중단없는 번역이 되도록 하였다. TVMV 프로테아제의 절단 부위는 mCherry와 8xHis 사이에 있다. TVMV 프로테아제는 동일한 플라스미드의 상류에 존재하는 동족(coognate) 유전자로부터 생산되었다. 따라서 표적 단백질과 MBP-mCherry 단편 간 일대일 비율이 유지되므로, 세포 용해물의 587 nm에서의 흡광도를 측정하여 생성된 (가용성+불용성) 표적 단백질의 양을 정량할 수 있다. 서브 클론 과정을 용이하게 하기 위해, 우리는 치사 유전자(lethal gene)를 유지하기로 결정했었고, 이는 생존한 콜로니가 표적 유전자의 정확한 삽입을 거의 보장했기 때문이었으나, 우리는 바르나제(barnase)에의 레반수크라아제(levansucrase, SacB) 유전자를 선호했다. 후자는 정확하게 구축된 플라스미드의 선택에 더 효과적인 것처럼 보이지만, 그것의 활성을 억제할 수 있는 BR610과 같은 특별한 균주와 함께 사용해야 한다. SacB 유전자는, 그 치사가 자당의 존재에 달려있기 때문에, 널리 사용되는 많은 균주와 호환이 가능하다. 플라스미드 자체의 제조를 위해, 수크로오스가 정확한 플라스미드의 선택에 추가적으로 사용되는 경우에만, 카나마이신(kanamycin)에 의해 선택될 수 있다.

[0095]

[0096] **2. mCherry 생산 비교 실험 결과**

[0097] **(1) 대장균의 배양**

[0098] T7 리소자임은 기저 수준(basal level)에서 Rosetta2(DE3) pLysS 내에서 생산되었지만, 수확된 세포를 동결 및 해동으로 간단히 용해시킬 만큼 충분했다. 우리는 이 균주를 사용하여, XL10-Gold 세포를 수확 단계에서 혼합하

고, 완충액에 재현탁한 다음, 동결 및 해동시켜 단백질을 용해시켰다. 소량의 DNaseI가 DNA 가닥을 파괴하는 데에 효과적이었으며, Triton X-100은 UV 분광 광도계로 분석할 수 있을 만큼 상등액을 투명하게 만드는 데 유용했다. 우리는 TB에서 본 발명의 자가유도 플라스미드의 효과를 비교하기 위해, LB에서 mid-log 단계에서 IPTG를 첨가하는 전형적인 유도절차를 사용했다. 우리는 동일한 양의 LB 또는 TB 배양물을 사용하여 mCherry 단백질의 전체 수율을 비교했다. 하기 표 1에서 볼 수 있듯, TB에서의 최종 세포 수는 LB에서 얻은 세포의 3배 이상이다. 숙주 균주인 Rosetta2(DE3) pLysS와 XL10-Gold는 모두 LB에서 매우 유사한 OD600을 산출했다.

(2) 단백질 정량

원심분리된 세포 용해물을 사용하여 흡광도를 측정하였다. 수확시 LB 세포 펠렛은 TB에서보다 더 강렬한 붉은색을 띠지만, 같은 양의 완충액에 재현탁한 후 후자는 더 강렬해진다. 흡광도는 mCherry의 최대 흡수인 587 nm에서 측정되었다. 우리는 독립적으로 성장한 세 가지 배지의 평균을 세우고, 하기 표 1에 세부사항을 요약했다. 하기 표 1을 참조하면, 세포는 LB보다 TB에서 더 많이 성장했다. 적색은 LB보다 TB에서 덜 강했지만, 적색의 총량은 LB보다 TB에서 더 컸다. 세포는 TB에서 더 많이 자랐지만, TB에서의 IPTG 유도는 LB보다 많거나 적은 단백질을 생성했다. 흥미롭게도, LB에서의 자가유도 플라스미드를 갖는 XL10-Gold는 원래 플라스미드 및 IPTG 유도와 같이 많은 단백질을 생산하였다. 실제로, 우리는 YT, 2xYT 및 SOC 미디어를 시도했지만 이들 중 누구도 TB에서보다 많은 단백질을 생산하지 않았다. 따라서, 우리는 TB가 본 발명의 자가유도 플라스미드의 가장 적합한 성장배지라는 결론을 내렸다.

표 1

Plasmid	Host strain	Medium	Induction method	Average OD ₆₀₀	Average mCherry concentration (mg/L)
pVP65KR-SacB(-)	Rosetta2(DE3)pLysS	LB	IPTG	2.6 ± 0.17	63 ± 16
pVP65KR-gab-SacB(-)	XL10-Gold	TB	None	8.9 ± 0.54	160 ± 47

본 발명의 자동유도(autoinducible) 플라스미드(또는 벡터)는 단백질 생산과정을 단순화할 뿐만 아니라, Rosetta2(DE3)와 같은 특수 변형을 사용할 필요가 없다. 본 발명의 플라스미드의 추가적 및 실질적인 이점은, mCherry 유전자의 발현과 강렬한 분홍색으로의 색 변화로 인해 확인할 수 있듯, 표적 단백질 유전자가 가용성 또는 천연 단백질의 생산을 보장하지는 않지만, 동일한 수준으로 발현된다는 것이다.

3. MBP 생산 비교 실험 결과

세가지 배양 조건 별로 3번 반복한 실험결과는 표 2와 같다. MBP 생산량을 세포의 양을 감안하여 OD당 평균한 결과는 비교예 1은 0.46mg, 비교예 2는 0.33mg, 실시예 1은 0.53mg 이었다.

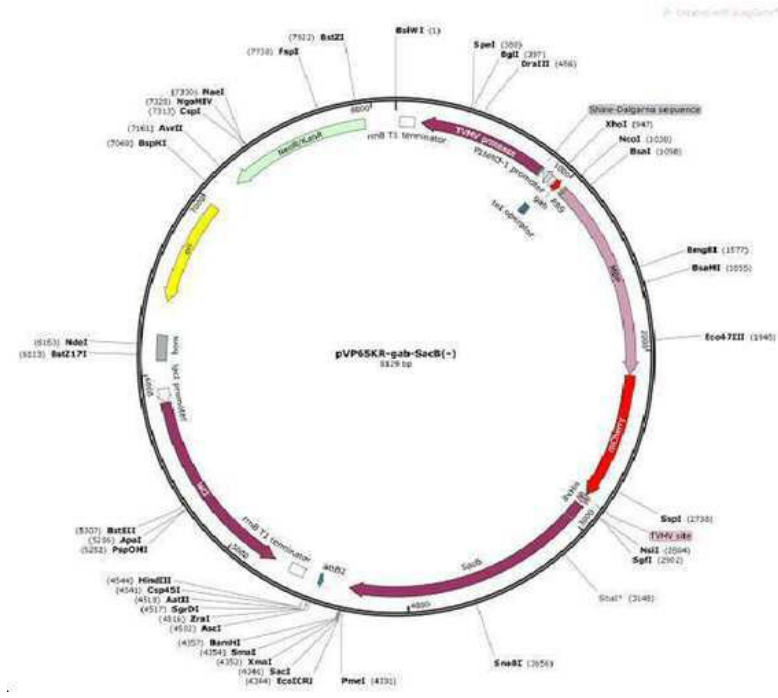
따라서, 세포당 MBP 생산량은 본 발명의 자동유도플라스미드에서 가장 높았으며, 특수 호스트나 배지를 사용하지 않기 때문에 가성비도 높다는 것을 확인하였다.

표 2

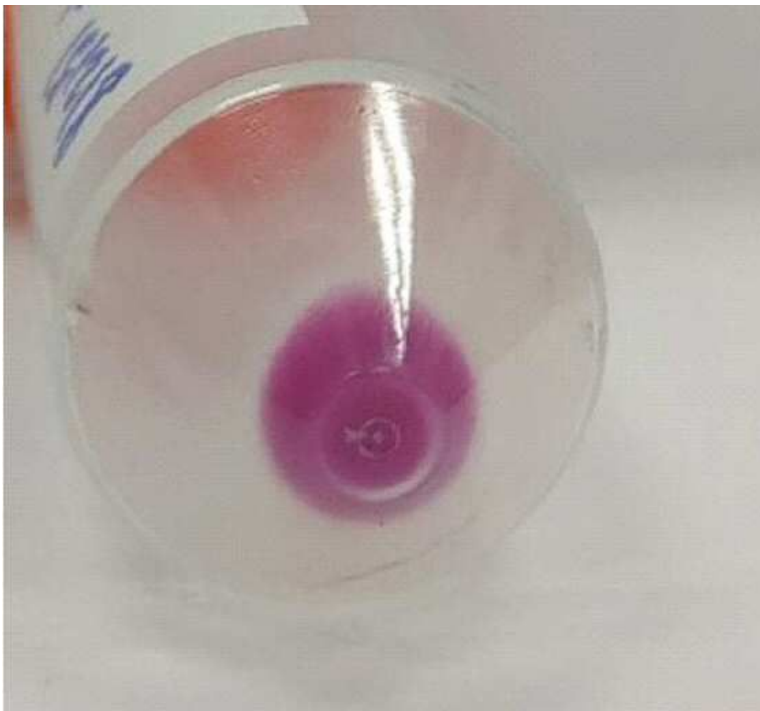
샘플	Plasmid	Host strain	Medium	Induction method	OD ₆₀₀	평균MBP (mg)
비교예 1	pVP65KR-SacB(-)	Rosetta2(DE3)pLysS	LB	IPTG	10.34	0.46
					10.56	
					10.36	
비교예 2	pVP65KR-SacB(-)	Rosetta2(DE3)pLysS	TB	None	6.24	0.33
					7.22	
					6.21	
실시예 1	pVP65KR-gab-SacB(-)	XL10-Gold	TB	None	7.23	0.53
					7.84	
					7.55	

도면

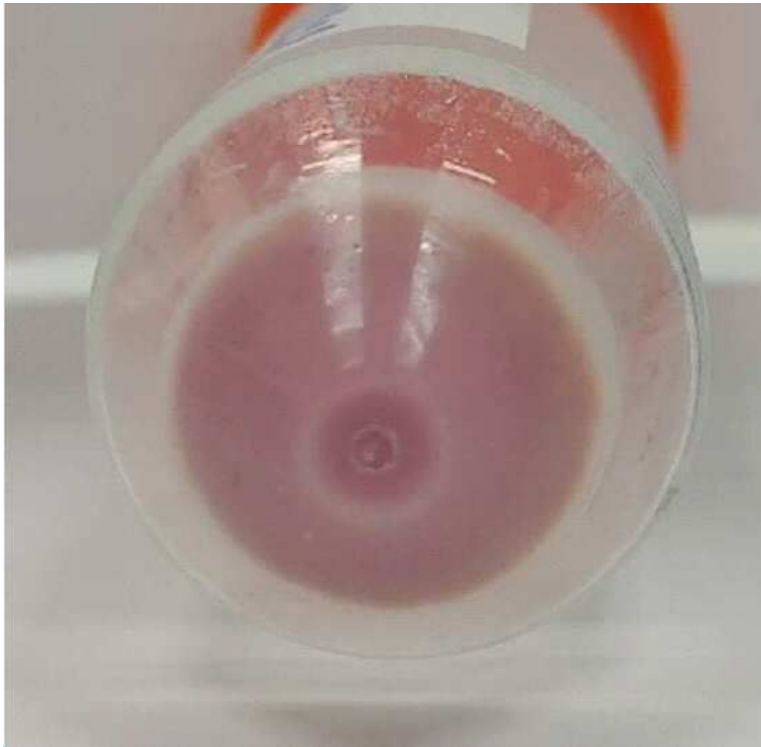
도면1



도면2



도면3



서열 목록

<110> SEJONG UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMY COOPERATION FOUNDATION

<120> Auto-induction Plasmid

<130> 20P02019

<150> KR 10-2019-0055078

<151> 2019-05-10

<160> 13

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> gab promoter sequence

<400> 1

gccttgcttc cattgcggat gtaaaagcgg ctagtattta

40

<210> 2

<211> 87

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer sequence replacing with gab promoter

<400> 2

ctatcactga tagggactcg agaaagcctt gcttccattg cggatgtaaa agcggctagt 60

atattttca cacagaattc attaaag 87

<210> 3

<211> 87

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer sequence replacing with gab promoter

<400> 3

ctttaatgaa ttctgtgga aataaatact agccgctttt acatccgcaa tggaagcaag 60

gctttctcga gtcctatca gtgatag 87

<210> 4

<211> 42

<212

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer sequence amplifying levansucrase gene

<400> 4

ggttgcatc gccatgaaca tcaaaaagtt tgcaaaaaca gc 42

<210> 5

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer sequence amplifying levansucrase gene

<400> 5

ccttgaaca ggacaattaa cagttaaca attgtttaa ctgaattcga gctcacac 58

<210> 6

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer sequence removing HindIII site

<400> 6

atgttcagca ggaagctcgg cgcaaactt gattg 35

<210> 7

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer sequence removing HindIII site

<400> 7

caatcaactt ttgcgccgag cttcctgctg aacat 35

<210> 8

<211> 7174

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pVP65K vector sequence

<400> 8

cgtactgcta ggcggcggga tttgtcctac tcaggagagc gttcaccgac aaacaacaga 60

taaaacgaaa ggcccagctt ttcgactgag ctttctgtt tatttgatgc ctctagcacg 120

cgtatcattg gatctttatt agtccatgat ggcggcaaca gtttttttgg ccatgaagtc 180

atcttccggc gcactttcaa ccagggtaaa ggaaccccag ctgattttat cgcggtgaa 240

tttcagttt ttgcaccaac catccgcggc atcgagataa gtcgccacga atttttccgg 300

aaattccacg aagtagttgc taccgttggg ggtatgagtc aggetgtgga tgcccagaat 360

gttgccatca atgatggaaa ctagtgggct gccacactgg ccatctttag tggatgacca 420

gtgctgccag aaagaagtgt cttctttatg cacaatgtga gaggattcag acaccaggct 480

ggacacgctt ttctgctgaa agtttgggga caccatgcac acacgatctt tgatggtcgg 540

ctgacggaat ttcagtttct gcgggaacgg cgggaagtct ttagccattt tgataacgat 600

aatgtcacgg cttcaaccg gtttcatctg cagctgggta gagtttttga ctttgaattc 660

accgtgcatg gttttgatgg tcagttcgcc attgttacga cgaaacagat gctggttggc 720

aatgatatac ggccaaaac caatgcaaaa cagacgttca ctatgaccat ccgaggagtt 780

ttccagcagg catagcgaag cagagatcgg attaaaatcg cgcacgcctc tcagcaaaagc 840

cttagacata tcttacctcc ttaaatcaat tcggctcagtg cgtcctgctg atgtgctcag 900

tatctctatc actgataggg atgtcaatct ctatcactga tagggactcg agaaatcata 960

aaaaatttat ttgctttgtg agcggataac aattataata gattcaattg tgagcggata 1020

acaatttcac acagaattca ttaaagagga gaaattaacc atgggtaaaa tcgaagaagg 1080

taaactggta atctggatta acggcgataa aggctataac ggtctcgctg aagtcggtaa 1140
 gaaattcgag aaagataccg gaattaaagt caccgttgag catccgata aactggaaga 1200
 gaaattccca caggttgccg caactggcga tggccctgac attatcttct gggcacacga 1260
 ccgctttggt ggctacgctc aatctggcct gttggctgaa atcaccccg acaaagcgtt 1320

 ccaggacaag ctgtatccgt ttacctggga tgcggtacgt tacaacggca agctgattgc 1380
 ttaccggate gctgttgaag cgttatcgct gatttataac aaagatctgc tgccgaacce 1440
 gccaaaaacc tgggaagaga tcccggcgct ggataaagaa ctgaaagcga aaggtaaagag 1500
 cgcgctgatg ttcaacctgc aagaacctga cttcacctgg ccgctgatg ctgctgacgg 1560
 gggttatgcg ttcaagtatg aaaacggcaa gtacgacatt aaagacgtgg gcgtggataa 1620
 cgctggcgcg aaagcgggtc tgaccttctt gttgacctg attaaaaaca aacacatgaa 1680
 tgcagacacc gattactcca tcgcagaagc tgcctttaat aaaggcgaag cagcgatgac 1740

 catcaacggc ccgtgggcat ggtccaacat cgacaccagc aaagtgaatt atggtgtaac 1800
 ggtaactgcc accttcaagg gtcaaccatc caaaccttc gttggcgtgc tgagcgcagg 1860
 tattaacgcc gccagtccga acaaagagct ggcaaaagag ttcctcgaaa actatctgct 1920
 gactgatgaa ggtctggaag cggttaataa agacaaaccg ctgggtgccg tagcgtgaa 1980
 gtcttacgag gaagagtgg cgaaagatcc acgtattgcc gccactatgg aaaacgcca 2040
 gaaagtgaa atcatgccga acatcccga gatgtccgct tcttggtatg ccgtgctac 2100
 tgcggtgatc aacgcccca gcggtcgtca gactgtcgat gaagccctga aagacgcga 2160

 gactttaat aacggcgacg gtgcccggga aaccgtcgt tccagctc atcacatca 2220
 tcacatcac catgcatccg cgatcgcggc cgcgttgaa taagtaaagg aatcacatgg 2280
 cacagttat caacacgtt gacggggttg cggattatct tcagacatat cataagctac 2340
 ctgataatta cattacaaaa tcagaagcac aagccctcgg ctgggtggca tcaaaagga 2400
 accttcaga cgtcgtccg gggaaaagca tcggcggaga catcttctca aacaaggaag 2460
 gcaaactccc gggcaaaagc ggacgaacat ggcgtgaagc ggatattaac tatacatcag 2520
 gcttcagaaa ttcagaccgg attcttact caagcgactg gctgatttac aaaacaacgg 2580

 accattatca gaccttaca aaaatcagat aattagcac cccaggcttt acactttatg 2640
 ctttcggctc gtataatgtg tggatittga gttaggatcc gtcgagattt tcaggagcta 2700
 aggaagctaa aatggagaaa aaaatcactg gatataccac cgttgatata tcccaatggc 2760
 atcglaaaga acattttgag gcatttcagt cagttgctca atgtacctat aaccagaccg 2820
 ttcagctgga tattacggcc tttttaaaga ccgtaaagaa aaataagcac aagttttatc 2880
 cggcctttat tcacattctt gccgcctga tgaatgctca tccggaattc cgtatggcaa 2940

tgaaagacgg tgagctggg ataggggata gtgttcaccc ttgttacacc gttttccatg 3000

 agcaaaactga aacgttttca tcgctctgga gtgaatacca cgacgatttc cggcagtttc 3060
 tacacatata ttcgcaagat gtggcgtgtt acggtgaaaa cctggcctat ttcctaaag 3120
 ggtttattga gaatatgttt ttcgtctcag ccaatccctg ggtgagtttc accagttttg 3180
 atttaaactg ggccaatat gacaacttct tcgccccctg tttcacgatg ggcaaatatt 3240
 atacgcaagg cgacaagggt ctgatgccgc tggcgattca ggttcatcat gccgtttgtg 3300
 atggcttcca tgcggcaga atgcttaatg aattacaaca gtactcgcgat gagtggcagg 3360
 gcggggcgta atgtttaaac gaattcgagc tcggtaccgc gggatcctct agagtcgacc 3420

 tgcaggcatg caagctgac cggtctgctaa caaagcccg aaggaagctg agttggctgc 3480
 tgccaccgct gagcaataac tagcaaacctc gtttctcgtt cagctttctt gtacaaagtg 3540
 gtgatggcgc gctgtagga cgtcgacggt accatcgata cgcgttcgaa gcttcgctg 3600
 gggtaatgac tctctagctt gaggcatcaa ataaaacgaa aggctcagtc gaaagactgg 3660
 gcctttcgtt ttatctgttg tttgtcggtg aacgctctcc tgagtaggac aaatccgcc 3720
 tctagattac gtgcagtcga tgataagctg tcaaacatga gaattgtgcc taatgagtga 3780
 gctaacttac attaattgcg ttgcgctcac tgcccgttt ccagtcggga aacctgtcgt 3840

 gccagctgca ttaatgaatc ggccaacgcg cggggagagg cggtttgct attgggcgcc 3900
 aggggtggttt ttctttcac cagttagacg ggcaacagct gattgccctt caccgcctgg 3960
 ccctgagaga gttgagcaa cgggtccacg ctggtttgcc ccagcagcgc aaaatcctgt 4020
 ttgatgggtg ttaacggcgg gatataacat gagctgtctt cggtatcgtc gtaeccact 4080
 accgagatat ccgaccaac gcgcagccc gactcggtaa tggcgcgcat tgcgccagc 4140
 gccatctgat cgttggcaac cagcatcgca gtgggaacga tgcctcatt cagcatttgc 4200
 atggtttgtt gaaaaccgga catggcactc cagtcgctt cccgttccgc tatcggtga 4260

 atttgattgc gagtgagata tttatgccag ccagccagac gcagacgcgc cgagacagaa 4320
 cttaatgggc ccgctaacag cgcgatttgc tggtagacca atgcgaccag atgctccacg 4380
 ccagtcgcg taccgtcttc atgggagaaa ataatactgt tgatgggtgt ctggtcagag 4440
 acatcaagaa ataacgccgg aacattagt caggcagctt ccacagcaat ggcacatctgg 4500
 tcatccagc gatagttaat gatcagccca ctgacgcgtt gcgcgagaag attgtgcacc 4560
 gccgctttac aggtctcgac gccgcttctg tctaccatcg acaccaccac gctggcacc 4620
 agttgatcgg cgcgagattt aatcggcgcg acaatttgcg acggcgcgtg caggccaga 4680

ctggaggatgg caacccaat cagcaacgac tgtttgcccg ccagttgttg tgccacgcgg 4740
 ttgggaatgt aattcagctc cgccatcgcc gcttccactt tttcccgcgt tttcgcagaa 4800
 acgtggctgg cctggttcac cacgcgggaa acggtctgat aagagacacc ggcatactct 4860
 gcgacatcgt ataacgttac tggtttcaca ttcaccaccc tgaattgact ctcttcgggg 4920
 cgctatcatg ccataccgcg aaaggttttg cgccattcga tgggtcggga acctagagct 4980
 gcctcgcgcg tttcggtgat gacggtgaaa acctctgaca catgcagctc ccggagacgg 5040
 tcacagcttg tctgtaagcg gatgccggga gcagacaagc ccgtcagggc gcgtcagcgg 5100

 gtgttggcgg gtgtcggggc gcagccatga cccagtcacg tagcgatagc ggagtgtata 5160
 ctggcttaac tatcgccat cagagcagat tgiactgaga gtgcaccata tgcggtgtga 5220
 aataccgcac agatgcgtaa ggagaaaata ccgcatcagg cgctcttccg ctctctcgt 5280
 cactgactcg ctgcgctcgg tcttccgct gcggcgagcg gtatcagctc actcaaagcg 5340
 ggtaatacgg ttatccacag aatcagggga taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg 5400
 ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttctg gcgtttttcc ataggctccg 5460
 cccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg 5520

 actataaaga taccaggcgt tccccctgg aagctcctc gtgcgctctc ctgttccgac 5580
 cctgccgctt accggatacc tgtccgctt tctcccttcg ggaagcgtgg cgcttttca 5640
 tagctcacgc tgiaggatc tcagttcggg ttaggtcgtt cgctccaagc tgggctgtgt 5700
 gcacgaacce cccgttcagc ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc 5760
 caaccggta agacacgact tatcggcact ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag 5820
 agcgaagtat gtaggcgggt ctacagagtt ctggaagtgg tggcctaact acggctacac 5880
 tagaaggaca gtatttgga tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg gaaaagagt 5940

 tggtagctct tgatccggca aacaaaccac cgtcggtagc ggtggttttt ttgtttgcaa 6000
 gcagcagatt acgcgagaa aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct tttctacggg 6060
 gtctgacgct cagtggaacg aaaactcacg ttaagggatt ttggtcatga gattatcaaa 6120
 aaggatcttc acctagatcc ttttaatta aaaatgaagt tttaatcaa tctaaagtat 6180
 atatgagtaa acttggctcg acagccctag gtcagaagaa ctcgtcaaga aggcgataga 6240
 aggcgatcgc ctgcgaatcg ggagcggcga tacctgaag cacaggaag cggtcagccc 6300
 attcggcgc aagctcttca gcaatcac gggtagccaa cgctatgtcc tgatagcgg 6360

 ccgccacacc cagccggcca cagtcgatga atccagaaaa gcggccattt tccacatga 6420
 tattcggcaa gcagcatcg ccatgagtca cgacgagatc ctcacatcc ggcatacgcg 6480
 cctttagcct ggccaacagt tccgctggcg cgagccctg atgctcttcg tccagatcat 6540

cctgatcgac aagaccggct tccatccgag tgcgtgctcg ctcgatgcga tgtttcgctt 6600
 ggtggtcgaa tgggcaggta gccgatcaa gcgtatgcag ccgccgcatt gcatcagcca 6660
 tgatggatac tttctcggca ggagcaaggt gagatgcag gagatcctgc cccggcactt 6720
 cgcccaatag cagccagtc cttcccgtt cagtgacaac gtcgagcaca gctgcgcaag 6780

gaacgcccgt cgtggccagc cacgatagcc gcgtgctc gtctgcagt tcattcaggg 6840
 caccggacag gtcggtcttg acaaaaagaa cggggcggcc ctgcgctgac agccggaaca 6900
 cggcggcatc agagcagccg attgtctgtt gtgccagtc atagccgaat agcctctcca 6960
 cccaagcggc cggagaacct gcgtgcaatc catcttgctc aagcatgcga aacgaccgctc 7020
 atcctgtctc ttgatcagat cttgatcccc tgcgcatca gatccttggc ggcaagaaag 7080
 ccatccagtt tactttgcag ggcttccaa ccttaccaga gggcgcccca gctggcaatt 7140
 cttttgaagc tcacgtgcc gcaagcactc aggg 7174

<210> 9

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> T5 promoter sequence in pVP65K vector

<400> 9

tcataaaaaa tttatttctt ttgtgagcgg ataacaatta taata 45

<210> 10

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> lac operator sequence in pVP65K vector

<400> 10

ttgtgagcgg ataacaa 17

<210> 11

<211> 2000

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MBP-mCherry-8xHis gene block

<400> 11

gaaattaacc atgggtaaaa tcgaagaagg taaactggta atctggatta acggcgataa 60

aggctataac ggctcgcctg aagtcggtaa gaaattcgag aaagataccg gaattaaagt 120
caccgttgag catccggata aactggaaga gaaattccca caggttgcgg caactggcga 180
tggccctgac attatcttct gggcacacga ccgctttggt ggctacgctc aatctggcct 240
gttggctgaa atcaccccg acaaagcgtt ccaggacaag ctgtatccgt ttacctggga 300
tgcggtacgt tacaacggca agctgattgc ttaccggatc gctgttgaag cgttatcgt 360

gatttataac aaagatctgc tgccgaacc gccaaaaacc tgggaagaga tcccggcgt 420
ggataaagaa ctgaaagcga aaggtaaag cgcgctgatg ttcaacctgc aagaaccgta 480
cttcacctgg ccgctgattg ctgctgacgg gggttatgcg ttcaagtatg aaaacggcaa 540
gtacgacatt aaagacgtgg gcgtggataa cgctggcgcg aaagcgggtc tgaccttct 600
ggttgacctg attaaaaaca aacacatgaa tgcagacacc gattactcca tgcagaagc 660
tgcctttaat aaaggcgaaa cagcgtatgac catcaacggc ccgtgggcat ggtccaacat 720
cgacaccagc aaagtgaatt atgggtgtaac ggtactgccg acctcaagg gtcaaccatc 780

caaaccgttc gttggcgtgc tgagcgcagg tattaacgcc gccagtccga acaaagagct 840
ggcaaaaagag ttctctgaaa actatctgct gactgatgaa ggtctggaag cggttaataa 900
agacaaaccg ctgggtgccg tagcgtgaa gtcttacgag gaagagtgg cgaagatcc 960
acgtattgcc gccactatgg aaaacgcca gaaaggtgaa atcatgccga acatcccga 1020
gatgtccgct ttctggtatg ccgtgctgac tgcggtgac aacgcccca gcggtcgtca 1080
gactgtcgat gaagccctga aagacgcgca gactatggtt tccaagggcg aggaggataa 1140
catggctatc attaaagagt tcatgcgctt caaagttcac atggagggtt ctgttaacgg 1200

tcacgagttc gagatcgaag gcgaaggcga gggccgtccg tatgaaggca cccagaccgc 1260
caaacgaaa gtgactaaag gcggcccgt gccttttgcg tgggacatcc tgagcccga 1320
atztatgtac ggttctaag cgatgttaa acaccagcg gatatcccgg actatctgaa 1380
gctgtctttt ccggaaggtt tcaagtggga acgcgtaatg aattttgaag atggtggtgt 1440
cgtgaccgtc actcaggact cctccctgca ggatggcgag ttcatctata aagttaaact 1500
gcgtggtact aattttccat ctgatggccc ggtgatgcag aaaaagacga tgggttggga 1560
ggcgtctagc gaacgcatgt atccggaaga tggcgcgctg aaaggcga taaacagcg 1620

cctgaaactg aaagatggcg gccattatga cgtgaagtg aaaaccacgt acaaagccaa 1680
gaaacctgtg cagctgcctg gcgctgataa tgtaatatt aaactggaca tcacctca 1740
taatgaagat tatacgatcg tagagcaata tgagcgcgag gaggtcgtc attctaccgg 1800
tggcatggat gagctgtaca aaggggaaac cgtgcgtttc cagtctcacc accatcatca 1860
ccatcacat gcatccgca tgcggccgc gttggaataa gtaaggaat cacatggcac 1920

aggttatcaa cacgtttgac ggggttgcgg attatcttca gacatatcat aagctacctg 1980
 ataattacat tacaaaatca 2000

<210> 12

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> barnase sequence in pVP65KR vector

<400> 12

atggcacagg ttatcaacac gtttgacggg gttgctgatt atcttcagac atatcataag 60
 ctacctgata attacattac aaaatcagaa gcacaagccc tccgctgggt ggcatacaaa 120
 gggaaccttg cacagctcgc tccggggaaa agcatcggcg gagacatctt ctcaacaag 180
 gaaggcaaac tcccgggcaa aagcggacga acatggcgtg aagcggatat taactataca 240
 tcaggcttca gaaattcaga ccgattctt tactcaagcg actggctgat ttacaaaaca 300

acggaccatt atcagacctt tacaaaaatc agataa 336

<210> 13

<211> 1421

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Levansucrase (SacB) sequence in pVP65KR vector

<400> 13

atgaacatca aaaagtttgc aaaacaagca acagtattaa ctttactac cgcactgctg 60
 gcaggaggcg caactcaagc gtttgcgaaa gaaacgaacc aaaagccata taaggaaaca 120
 tacggcattt cccatattac acgccatgat atgctgcaaa tccctgaaca gcaaaaaaat 180
 gaaaaaatc aagttcctga attcgattcg tccacaatta aaaatatctc tctgcaaaa 240

 ggcttggacg tttgggacag ctggccatta caaacgctg acggcactgt cgcaactat 300
 cacggctacc acatcgtctt tgcattagcc ggagatccta aaaatgcgga tgacacatcg 360
 atttacatgt tctatcaaaa agtcggcgaa acttctattg acagctggaa aaacgtggc 420
 cgcgtcttta aagacagcga caaattcgat gcaaatgatt ctatcctaaa agaccaaaca 480
 caagaatggt caggttcagc cacatttaca tctgacggaa aaatccgttt attctacact 540
 gatttctccg gtaaacatta cggcaaaaa acactgacaa ctgcacaagt taacgtatca 600
 gcatcagaca gcictttgaa catcaacggt gtagaggatt ataatcaat ctttgacggt 660

gacggaaaaa cgatcaaaa tgtacagcag ttcacgatg aaggcaacta cagctcaggc	720
gacaaccata cgctgagaga tcctcactac gtagaagata aaggccacaa atacttagta	780
tttgaagcaa aactggaac tgaagatggc taccaaggcg aagaatcttt atttaacaaa	840
gcatactatg gcaaaagcac atcattcttc cgcaagaaa gtcaaaaact tctgcaaagc	900
gataaaaaac gcacggctga gttagcaaac ggcgctctcg gtatgattga gctaaacgat	960
gattacacac tgaaaaaagt gatgaaaccg ctgattgcat ctaacacagt aacagatgaa	1020
attgaacgcg cgaacgtctt taaaatgaac ggcaaatggt acctgttcac tgactcccgc	1080
ggatcaaaaa tgacgattga cggcattacg tctaacgata tttacatgct tggttatggt	1140
tctaattctt taactggccc atacaagccg ctgaacaaaa ctggccttgt gttaaaaatg	1200
gatcttgatc ctaacgatgt aacctttact tactcacact tcgctgtacc tcaagcghaa	1260
ggaaacaatg tcgtgattac aagctatatg acaaacagag gattctacgc agacaaacaa	1320
tcaacgtttg cgccaagctt cctgctgaac atcaaaggca agaaaacatc tgttgtcaaa	1380
gacagcatcc ttgaacaagg acaattaaca gttacaacaaat t	1421