



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년11월04일
 (11) 등록번호 10-1437925
 (24) 등록일자 2014년08월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 C12N 1/13 (2006.01) C12N 13/00 (2006.01)
 C12N 15/87 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2013-0060689
 (22) 출원일자 2013년05월28일
 심사청구일자 2013년05월28일
 (56) 선행기술조사문헌
 KR1020090112023 A
 KR1020000024893 A

(73) 특허권자
 한국생명공학연구원
 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
 (72) 발명자
 김희식
 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
 조대현
 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
 손민

전체 청구항 수 : 총 15 항

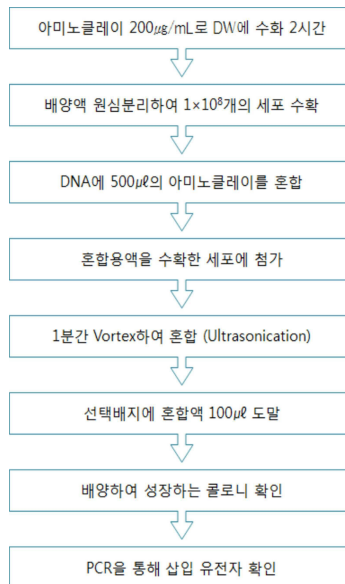
심사관 : 김정아

(54) 발명의 명칭 **아미노클레이를 이용한 미세조류 형질전환 방법**

(57) 요약

본 발명은 아미노클레이(aminoclay), 외래핵산, 및 미세조류를 혼합하는 단계를 포함하는 미세조류의 형질전환 방법이다. 또한, 본 발명은 아미노클레이를 포함하는 미세조류 형질전환용 조성물 및 형질전환용 키트에 관한 것이다. 본 발명의 미세조류 형질전환 방법은 기존의 방법들에 비해 공정이 간소하고, 효율적이라는 것이 특징이다. 또한, 본 발명에서 사용되는 아미노클레이는 안전성이 우수하며, 가격이 낮아 경제적이다. 특히, 본 발명의 미세조류 형질전환 방법은 다양한 종류의 미세조류에 응용이 가능하므로, 신재생에너지사업, 식량산업, 고부가 유용물질 및 화장품원료 생산을 위한 유용균주의 개발 등에 유용하게 이용할 수 있다.

대표도 - 도4



(72) 발명자
김소라
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
이영철
경남 의령군 용덕면 덕암로4길 33-5,

신현재
전라남도 화순군 도곡면 원하리 77-1
오희목
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 KGM3151312
부처명 교육과학기술부
연구관리전문기관 기초기술연구회
연구사업명 주요사업(연구개발과제)
연구과제명 바이오매스/에너지 세포공장 개발
기 여 율 1/1
주관기관 한국생명공학연구원
연구기간 2013.01.01 ~ 2013.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

아미노클레이, 외래핵산, 및 미세조류를 혼합하는 단계를 포함하는, 미세조류의 형질전환 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 미세조류는 녹조식물문(chlorophyta), 운조식물문(charophyta), 유글레나식물문(euglenophyta), 황갈조식물문(chrysophyta), 및 황적조식물문(pyrrrophyta)으로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 아미노클레이는 수화된 것인, 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기의 혼합하는 단계는 와류혼합 전처리(vortexing) 또는 초음파 전처리(ultrasonication)을 통해서 이루어지는 것인, 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 와류혼합 전처리는 30 내지 120 초 동안 이루어지는 것인, 방법.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 초음파 전처리는 10 내지 60 초 동안 이루어지는 것인, 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기의 혼합하는 단계 이후에 혼합물을 배양하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 혼합물을 배양하는 단계는, 상기 혼합물을 평판배지에 도말하는 단계를 포함하는 것인, 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 평판배지는 1.5 내지 4% 한천을 포함하는 것인, 방법.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 도말은 0.5 내지 0.8 kgf의 강도로 수행하는 것인, 방법.

청구항 11

제8항에 있어서, 상기 도말되는 혼합물의 부피는 50 내지 200 μ l인 것인, 방법.

청구항 12

제7항에 있어서, 상기의 혼합물을 배양하는 단계 이후에 형질전환된 미세조류를 선별하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 방법.

청구항 13

아미노클레이를 포함하는, 미세조류 형질전환용 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 미세조류는 녹조식물문(chlorophyta), 윤조식물문(charophyta), 유글레나식물문(euglenophyta), 황갈조식물문(chrysophyta), 및 황적조식물문(pyrrrophyta)으로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 조성물.

청구항 15

아미노클레이를 포함하는, 미세조류 형질전환용 키트.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 아미노클레이(aminoclay), 외래핵산, 및 미세조류를 혼합하는 단계를 포함하는 미세조류의 형질전환 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 아미노클레이를 포함하는 미세조류 형질전환용 조성물 및 형질전환용 키트에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 미세조류(microalgae)는 광합성 색소를 가지고 광합성을 하는 진핵 단세포 생물의 일종이다. 최근 지구온난화와 같은 환경문제와 화석연료의 고갈이 국제적인 문제로 대두되고 있는 가운데, 미세조류는 식물과 마찬가지로 태양에너지를 이용하여 이산화탄소를 고정하는 방법으로 바이오매스 및 여러가지 유용물질을 생산하는 원료로서 학계와 산업계에 주목을 받아 왔다. 특히, 미세조류가 생산하는 바이오매스에 포함되어 있는 다량의 탄화수소는 화석연료를 대체할 수 있는 바이오디젤 등으로 전환이 가능하며, 일부 미세조류는 에탄올로 분해가 가능한 다량의 전분을 체내에 축적한다. 이러한 미세조류의 특성은 에너지 자원 또는 미래 식량 자원으로써 그 유용성이 높은 관심을 받아 왔지만, 야생형 미세조류의 경우에는 바이오매스 및 유용물질의 생산에 있어 경제성 있는 수율을 기대하기 어렵기 때문에, 유전공학적 방법을 비롯한 생명공학기법을 토대로 산업적 응용 가능성이 높은 균주의 개발이 활발하게 진행되고 있다.

[0003] 유용성 있는 기대 물질에 대한 수율이 높은 균주의 개발에 있어, 응용되는 유전공학적 방법에는 형질전환 방법이 대표적인데, 미세조류의 경우 식물과 유사한 생리학적 특성을 가지고 있으므로 식물에 적용되는 여러가지 형질전환 방법이 이용되어 왔다. 이러한 형질전환 방법으로는 충격법(bombardment), 전기천공법(electroporation), 유리 구슬(glass bead) 또는 실리콘 섬유(silicon fibers) 교반법, 아그로박테리움

(Agrobacterium)에 의한 형질전환 등이 사용되어 왔다. 그러나, 기존의 전기천공법은 원형질체에서 분화를 유도하는 과정이 복잡하고 시간이 오래 걸리며 숙련된 기술이 요구된다는 단점이 있고, 유전자총을 이용하는 방법은 원형질체 뿐만 아니라 염색체 등과 같은 다른 세포 소기관에도 무작위적인 형질전환이 이루어지며, 복제 수를 조절하기 힘들고 형질전환체 분석과 선별에 많은 시간과 노력이 소모되는 단점이 있다. 또한, 유리 구슬법은 세포벽이 결손 또는 분해된 균주에서만 특이성이 높은 단점이 있고, 실리콘 섬유 교반법은 세포상해로 인해 효율이 낮은 것이 단점으로 지적되어 왔다. 또한, 기존의 클라미도모나스속 녹조류에 응용하여 왔던 자가분해효소를 이용한 방법은 재현성이 낮고, 형질전환 후의 생존률이 높지 않은 단점이 있어 왔다.

[0004] 이에 본 발명자들은 방법이 간편하고 재현성이 높아 산업적으로 응용 가능한 새로운 형질전환 방법을 개발하고자 노력한 결과, 물리적 방법으로 아미노클레이를 이용하여 재현성이 높고 형질전환 후 생존률이 우수한 본 미세조류 형질전환 방법을 개발하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 하나의 목적은 아미노클레이(aminoclay), 외래핵산, 및 미세조류를 혼합하는 단계를 포함하는, 미세조류의 형질전환 방법을 제공하는 것이다.

[0006] 본 발명의 다른 하나의 목적은 아미노클레이를 포함하는, 미세조류 형질전환용 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 또 다른 목적은 아미노클레이를 포함하는, 미세조류 형질전환용 키트를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 아미노클레이(aminoclay), 외래핵산, 및 미세조류를 혼합하는 단계를 포함하는, 미세조류의 형질전환 방법을 제공한다.

[0009] 본 발명에서 용어, "아미노클레이"란 점토모방 소재로서 오가노클레이(organo clay)의 한 종류이다. 구체적으로는 금속성 양이온(Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Al^{3+} , 및 Fe^{3+})과 (3-아미노프로필)트리에톡시실란[(3-aminopropyl)triethoxysilane, APTES]의 졸-겔 반응(sol-gel reaction)으로 생성되는 물질이며, 금속성 양이온(Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Al^{3+} , 및 Fe^{3+})이 중심부에 위치하고, 공유결합으로 연결된 아민기(amine group)에 의해 2:1 삼·팔면체 구조(ctahedral structure)로 둘러싸여 있거나 또는 1:1 이중팔면체 구조(dioctahedral structure)로 짝을 이룬 구조를 갖는 물질을 말한다. 본 발명에서, 아미노클레이는 $[H_2N(CH_2)_3]_nMg_6Si_8O_{16}(OH)_4$ 의 화학성분으로 이루어질 수 있으며, 도 1의 형태를 이루는 것일 수 있다. 이와 같은 아미노클레이는 물리적 방법에 의해 외래핵산을 미세조류로 도입하는 효율을 높이고, 형질전환 후에도 생존율이 높게 유지될 수 있게 한다. 상기의 아미노클레이는 상업적으로 판매되는 것, 또는 제조한 것을 사용할 수 있다.

[0010] 본 발명의 일 실시예에 의하면, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 에 (3-아미노프로필)트리에톡시실란을 혼합하여 수용성 아미노클레이를 제작하였다(실시예 1, 도 1).

[0011] 본 발명에서 용어, "외래핵산"이란 내생성이 아닌 DNA 또는 RNA 분자를 포괄적으로 의미한다. 구체적으로는 핵산분자의 기본 구성 단위인 뉴클레오티드를 포함하는 화합물을 말하며, 특히, 유기체의 형질을 변화시키기 위해서 외부에서 조작된 핵산분자를 의미할 수 있다. 본 발명의 목적상 외래핵산은 도입된 미세조류의 형질 또는 성질을 변화시킬 수 있는 핵산일 수 있으며, 바람직하게는 도입된 미세조류의 유용성을 높이거나, 성장 촉진, 적절치 못한 환경에서의 성장을 증가시킬 수 있는 핵산일 수 있다.

[0012] 본 발명의 외래핵산은 이에 제한되지는 않으나, 바람직하게는 프로모터, 형질전환용 핵산 또는 유전자, 항생제 내성 유전자 등이 작동 가능하게 연결된 벡터일 수 있다.

[0013] 상기의 "작동 가능하게 연결"은 발현 조절 서열이 형질전환용 핵산 등의 구성 요소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열의 전사 및 해독을 조절하도록 연결된 것을 말하며, 프로모터를 포함하는 발현 조절 서열에 의해 코딩되

는 형질전환용 핵산 등의 구성 요소가 생성되도록 정확한 해독 프레임을 유지시키는 것을 포함할 수 있다. 또한, 상기의 "백터"는 적절한 숙주 세포에서 목적하는 단백질을 발현할 수 있도록 하는 작동 가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 핵산 작제물을 말한다. 또한, 상기의 "항생제 내성 유전자"는 형질전환시에 외래핵산의 삽입 여부를 판단하고 선별하기 위해 형질전환용 핵산과 연결하여 발현되도록 하는 구성 요소를 말하며, 이에 제한되지는 않으나 당업자는 상기의 목적에 따라 적절한 항생제 내성 유전자를 사용할 수 있다.

- [0014] 본 발명의 일 실시예에 의하면, *Streptomyces hygrosopicus* aminoglycoside phosphotransferase(*aph7*) 유전자를 포함하고 있어 하이그로마이신 B(hygromycin B)에 대한 저항성을 나타내는 pCR102 백터를 *KpnI* 제한효소로 절단하여 선형 DNA로 전환한 외래핵산을 형질전환에 이용하였다(도 2).
- [0015] 본 발명에서 용어, "미세조류"란 광합성 색소를 가지고 광합성을 하는 단세포생물들을 말한다. 구체적으로는 물속에 살면서 엽록소를 가지고 있어 동화작용을 할 수 있는 식물을 말한다. 상기 미세조류는 일반적으로 크기가 수 마이크로미터에서 수백 마이크로미터인 단세포생물일 수 있으며, 대사산물로서 단백질, 지방질, 및 당질 등의 유용한 성분들을 만들어 내는 유기체일 수 있다.
- [0016] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 미세조류 형질전환에 많이 활용되는 클라미도모나스 레인하티(*Chlamydomonas reinhardtii*) 2 종[CC-124(UTEX 2243) 및 CC-125(UTEX 2244)]을 UTEX로부터 분양받아 형질전환 실험에 사용하였다.
- [0017] 본 발명에서 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 백터를 숙주로 도입함으로써 유용한 성분을 만들어 내는 형질전환체(transformant)를 획득할 수 있다.
- [0018] 본 발명의 일 실시예에 의하면, TAP 배지에서 배양된 상기의 클라미도모나스 세포를 수확하여, 상기의 외래핵산인 pCR102 백터에 수화된 아미노클레이 500 μ l를 혼합하고, 이의 혼합용액을 수확한 세포에 첨가하여 와류혼합 전처리 또는 초음파 전처리를 이용하여 혼합하였다.
- [0019] 본 발명의 미세조류는 녹조식물문(chlorophyta), 윤조식물문(charophyta), 유글레나식물문(euglenophyta), 황갈조식물문(chrysophyta), 및 황적조식물문(pyrophyta)으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0020] 상기의 "녹조식물문"은 엽록소를 가지고 있고 이화작용을 하는 식물로서 담녹조류, 녹조류, 차축조류, 이끼류, 및 유관속식물류를 포함하는 식물군이다. 상기의 "윤조식물문"은 담수에 생육하는 분지성 사상체 식물로서 셀룰로오스성 세포막에 탄산칼슘이 덮혀 있어서 돌말이라고 부르기도 한다. 상기의 "유글레나식물문"은 운동성 단세포인 편모조류로서 녹조류가 함유하는 색소와 유사한 색소를 함유하지만 소화도(gullet)를 갖는 특성이 있고, 피막(lorica)이라는 막구조를 갖는 것도 있다. 상기의 "황갈조식물문"은 세포벽을 갖지 않고 베타-카로틴이나 크산토폴을 다량으로 함유하며, 황록색 또는 황갈색을 띠는 황갈조강, 규조강, 및 황녹조강을 포함하는 식물군이다. 상기의 "황적조식물문"은 엽록소, 카로틴, 및 수종의 크산토폴을 함유하고 있으며 두 개의 편모 구조를 갖는 외형적 특징을 지니고, 휴지기에도 염색체를 볼 수 있는 분자생물학적 특성을 갖는 식물군이다.
- [0021] 또한, 본 발명의 아미노클레이는 수화된 것일 수 있다. 본 발명에서 용어, "수화"란 용매가 물인 경우에 용질분자 또는 이온분자가 용매에 둘러싸여 하나의 분자처럼 행동하는 현상을 나타내는 경우를 말한다. 구체적으로는 물속에 분산되어 있는 입자, 수용액 속의 용질, 이온, 또는 콜로이드 분자가 물분자를 끌어당겨 집단적 성질을 나타내고 있는 상태를 말한다.
- [0022] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기의 아미노클레이를 200 μ g/ml의 농도로 증류수에서 2시간 동안 혼합하여 수화하였다.
- [0023] 본 발명에 있어 혼합하는 단계는 와류혼합 전처리(vortexing) 또는 초음파 전처리(ultrasonication)을 통해서 이루어지는 것일 수 있다.
- [0024] 본 발명에서 용어, "와류혼합 전처리"란 대상 용액에 외부진동, 자석막대 등을 이용하여 와류를 유발하는 방법으로 혼합 처리하는 것을 의미하며, "초음파 전처리"란 대상 용액에 가청주파수 또는 그 이상의 음파를 이용하여 미세진동을 유발하는 방법으로 혼합 처리하는 것을 의미한다.
- [0025] 상기 와류혼합 전처리는 30 내지 120 초 동안 이루어지는 것일 수 있으며, 상기 초음파 전처리는 10 내지 60 초 동안 이루어지는 것일 수 있다.

- [0026] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기의 아미노클레이를 이용한 미세조류의 형질전환 방법에 있어, 아미노클레이, 외래핵산, 및 미세조류를 혼합하는 단계에서 와류혼합 전처리를 30 내지 120 초의 범위에서, 또는 초음파 전처리를 10 내지 60 초 범위에서 각각 수행하였다(도 5b).
- [0027] 상기의 혼합하는 단계 이후에 혼합물을 배양하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.
- [0028] 상기 혼합물을 배양하는 단계는, 상기 혼합물을 평판배지에 도말하는 단계를 포함하는 것일 수 있다.
- [0029] 본 발명에서 용어, "평판배지"란 액체배지를 한천 또는 젤라틴 등을 이용하여 평면으로 굳힌 고체배지를 의미한다.
- [0030] 본 발명에서 용어, "도말"이란 미생물을 고체배지 위에 접종하는 한가지 방법으로서 획선도말(streaking) 또는 평면도말(spreading) 방법에 의해서 접종액을 고체배지에 스며들도록 하는 것을 말한다. 상기 평판배지는 1.5 내지 4% 한천을 포함하는 것일 수 있다. 상기 도말은 0.5 내지 0.8 kgf의 강도로 수행하는 것일 수 있다. 상기 도말되는 혼합물의 부피는 50 내지 200 μ l인 것일 수 있다. 바람직하게는 상기 평판배지는 3.5 내지 4.5%의 한천을 포함하는 것일 수 있으며, 상기 도말은 0.6 내지 0.8 kgf의 강도로 수행하는 것일 수 있으며, 상기 도말되는 혼합물의 부피는 80 내지 150 μ l인 것일 수 있다. 본 발명의 도말은 이에 제한되지는 않으나, 당업자는 상기의 목적에 따라 적절한 평판배지의 한천 농도, 도말 강도, 및 도말되는 혼합물의 부피를 선택하여 사용할 수 있다.
- [0031] 본 발명에서 형질전환 방법은 목적하는 외래 핵산을 수화된 아미노클레이와 혼합하고, 혼합한 용액을 미세조류 세포에 첨가한 후 와류혼합 전처리 또는 초음파 전처리하여 평판배지에 도말하는 과정을 포함하는 것일 수 있다.
- [0032] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기의 아미노클레이, 외래핵산, 및 미세조류를 와류혼합 전처리 또는 초음파 전처리를 통해 혼합한 용액 100 μ l를 4% 농도의 한천배지에 도말 강도 0.7 kgf로 도말하여 4 내지 5 일간 배양하였다.
- [0033] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 아미노클레이를 이용한 형질전환 방법의 효율을 기존의 미세조류 형질전환 방법과 비교하기 위해, 기존의 각 방법에 대한 대표적인 문헌을 토대로 하여 유리 구슬법(Kindle., Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Feb;87(3):1228-32.), 충격법(Kindle. et al., J Cell Biol. 1989 Dec;109(6 Pt 1):2589-601.), 및 전기천공법(Shimogawara. et al., Genetics. 1998 Apr;148(4):1821-8.)에 대해서도 형질전환 효율 및 형질전환된 콜로니를 확인하기까지 걸린 시간을 각각 확인하였다(실시예 8, 표 10). 표 10에 나타난 바와 같이, 아미노클레이를 이용한 형질전환 효율 및/또는 형질전환 소요 시간이 다른 기존의 형질전환 방법들에 비해 우수한 것을 확인할 수 있었다. 아미노클레이를 이용한 형질전환 방법은 유리구슬법 및 충격법에 비해 형질전환 효율 및 시간에 있어 우수한 것으로 나타났으며, 전기천공법의 경우 전체 형질전환에 소요되는 시간이 상대적으로 길고, 형질전환에 이용되는 DNA의 총량이 다소 많은 것이 단점이다. 결론적으로, 아미노클레이를 이용한 형질전환 방법이 기존의 유리 구슬법, 충격법, 및 전기천공법을 이용한 형질전환 방법에 비해 효율 및 시간의 측면에서 우수함을 알 수 있었다.
- [0034] 상기의 혼합물을 배양하는 단계 이후에 형질전환된 미세조류를 선별하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.
- [0035] 본 발명에서 용어, "형질전환된 미세조류를 선별하는 단계"란 형질전환을 수행하고 그 결과로서 외래핵산이 온전히 삽입된 형질전환체를 외래핵산의 발현을 검출함으로써 골라내는 단계를 의미한다.
- [0036] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기의 한천배지에서 배양된 형질전환된 미세조류 콜로니를 연속계대 방법을 이용하여, 하이그로마이신 B가 포함된 액상배지에 계대하여 하이그로마이신 B에 내성이 있는 형질전환체를 선택하였다(도 7). 형질전환 시에 삽입된 *aph7* 유전자를 확인하기 위해 PCR로 유전자를 증폭하였으며, 전기영동법으로 겔에서 확인(도 8)하는 동시에 유전자 서열을 분석하였다(표 8).
- [0037] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 아미노클레이를 포함하는, 미세조류 형질전환용 조성물을 제공한다.
- [0038] 상기의 용어, 아미노클레이, 미세조류, 및 형질전환에 대해서는 전술한 바와 동일하다.
- [0039] 본 발명에서 미세조류 형질전환용 조성물은 아미노클레이를 이용한 미세조류의 형질전환을 위해 필요한 증류수, 제한효소 반응 완충액, 제한효소 또는 평판배지 조성물 등을 추가로 포함하는 조성물일 수 있다.

- [0040] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 아미노 클레이를 포함하는, 미세조류 형질전환용 키트를 제공한다.
- [0041] 상기의 용어, 아미노클레이, 미세조류, 및 형질전환에 대해서는 전술한 바와 동일하다.
- [0042] 본 발명에서 키트는 아미노클레이를 이용한 미세조류의 형질전환을 위해 필요한 증류수, 제한효소 반응 완충액, 제한효소 또는 평판배지 조성물 등을 추가로 포함하는 키트일 수 있다.

발명의 효과

- [0043] 본 발명의 아미노클레이를 이용한 미세조류 형질전환 방법은 공정이 간소하고, 효율적이라는 것이 특징이다. 또한, 본 발명에서 사용되는 아미노클레이는 안전성 우수하며, 가격이 낮아 경제적이다. 특히, 본 발명의 방법은 다양한 종류의 미세조류에 응용이 가능하다. 따라서, 본 발명의 미세조류 형질전환 방법은 신재생에너지사업, 식량산업, 고부가 유용물질 및 화장품원료 생산을 위한 유용균주의 개발에 유용하게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0044] 도 1은 아미노클레이의 구조를 나타낸 도이다.
- 도 2는 형질전환에 사용된 벡터를 나타낸 도이다.
- 도 3은 미세조류 자동 도말장치이다.
- 도 4는 본 발명에서 확립된 최적의 형질전환 과정을 나타낸 모식도이다.
- 도 5a는 도말강도에 따른 형질전환 결과를 나타내는 도이다.
- 도 5b는 전처리 방법에 따른 형질전환 결과를 나타내는 도이다.
- 도 5c는 평판배지의 한천 농도에 따른 형질전환 결과를 나타내는 도이다.
- 도 6a은 형질전환 전의 세포를 투과전자현미경을 이용하여 관찰한 도이다.
- 도 6b는 형질전환 후의 세포를 투과전자현미경을 이용하여 관찰한 도이다.
- 도 7a는 하이그로마이신 B가 포함된 TAP 고체배지에서 형질전환체를 확인한도이다.
- 도 7b는 하이그로마이신 B가 포함된 TAP 액체배지에서 형질전환체를 확인한도이다.
- 도 8은 *aph7^r* 유전자를 전기영동 방법에 의해 확인한 도이다(M은 마커; NC는 음성대조군; PC는 양성대조군; T는 형질전환체를 나타냄.).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0045] 이하, 본 발명을 하기 실시예에서 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0046] 실시예 1. 아미노클레이의 제작

- [0047]
- [0048] MgCl₂ · 6H₂O에 APTES[(3-aminopropyl)triethoxysilane]을 혼합하여, 40~100 nm의 크기를 갖는 수용성의 아미노 클레이를 제작하였다. 제작된 아미노클레이는 [H₂N(CH₂)₃]₈Mg₆Si₈O₁₆(OH)₄의 화학식을 갖는다(도 1). 분말형태의 아미노클레이는 DW에 200 μg/ml의 농도로 최소 2시간 이상 수화시킨 후 사용하였다.

[0049] 실시예 2. 형질전환 대상균주 및 배양 조건

[0050]

[0051] 형질전환의 대상균주로 미세조류 형질전환에 많이 활용되는 클라미도모나스 레인하티(*Chlamydomonas reinhardtii*)를 대표적인 형질전환 대상균주로 이용하였다. 실험을 위해 UTEX로부터 2개의 균주 CC-124(UTEX 2243), CC-125(UTEX 2244)를 분양받아 사용하였다. 클라미도모나스 배양을 위해 TAP 배지를 사용하였고, 이를 25°C, 100 rpm, 광량자량(PAR) 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 하에서 배양하였다.

[0052] **실시예 3. 형질전환 벡터 및 형질전환**

[0053] 형질전환에 사용된 pCR102 벡터는 클라미도모나스 형질전환용 벡터로서 *Streptomyces hygroscopicus* aminoglycoside phosphotransferase(*aph7^r*) 유전자를 포함하고 있어 하이그로마이신 B(hygromycin B)에 대한 저항성을 특징으로 한다(도 2). 추출된 pCR102 원형 DNA의 형질전환 효율을 높이기 위해, *KpnI* 제한효소 (TaKaRa, Japan)로 pCR102의 한 지점만 절단하여 선형 DNA로 전환하였다. *KpnI*의 반응 조건은 하기와 같다.

표 1

[0054]

반응 혼합물의 조성	
DNA	2 μl
10X 반응 완충액	1 μl
제한효소 <i>KpnI</i>	0.5 μl
dH ₂ O	6.5 μl
총 부피 10 μl	

[0055] 형질전환을 위해, 아미노클레이를 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 증류수에서 2시간 동안 수화하고, 상기 실시예 2에서 배양된 클라미도모나스 배양액을 원심분리하여 1×10^8 개의 세포를 수확하였다. 상기의 *KpnI* 제한효소에 의해 선형 DNA로 전환된 pCR102 벡터에 500 μl 의 수화된 아미노클레이를 혼합하고, 이의 혼합용액을 수확한 세포에 첨가하여 와류혼합 또는 초음파 처리를 이용하여 혼합하였다. 상기의 혼합된 용액을 선택배지에 도말하여 성장하는 콜로니를 확인하고, PCR을 통해 pCR102 벡터의 삽입여부를 확인하였다.

[0056] **실시예 4. 형질전환 조건의 최적화**

[0057] 형질전환 조건의 최적화를 위해 균주의 종류, 세포 성장주기, 도말 강도, 전처리 조건, 전처리 시간, 평판배지의 한천 농도, DNA 농도, 및 아미노클레이 농도를 대상으로 형질전환 조건을 검토하였다. 각각의 조건에 대한 범위는 표 2에 나타내었다.

표 2

[0058]

형질전환 조건	범위
와류혼합 전처리 (초)	10~60
초음파 전처리 (초)	5~20
도말 강도 (kgf)	0.5~0.9
도말 부피 (μl)	50~200
아미노클레이 농도($\mu\text{g}/\text{ml}$)	50~200
배양 시간 (일)	4~6
한천 농도 (%)	1.5~4

[0059] DNA 농도는 30 ng/ml을 사용하였고 클라미도모나스 균체량은 1.0×10^3 이 되도록 농축하여 준비하였다. 미세조류 균체를 도말하는 힘을 정량적으로 조절하기 위해 자동 도말장치를 제작하였다(도 3). 실험진행은 도 4의 순서에 따라 각 조건의 범위를 조절하여 진행하였다.

[0060] **실시예 5. 최적 조건 탐색을 위한 통계 분석**

[0061] 상기 실시예 4에서 수행한 형질전환의 최적 조건을 분석하기 위해 통계 분석을 수행하였다. 각각의 조건에 대해 피어슨 상관관계 분석(pearson correlation test)을 수행하였다. 각 조건들의 범위와 단위를 통일하기 위해 Z-변환(평균=0, 표준편차=1)을 적용하였다. 각각의 Z-스코어를 이용하여 피어슨 선형 상관계수를 계산하였다(SPSS ver 18.0, USA).

표 3

형질전환 조건 인자	범위	피어슨 선형 상관계수	p 값	N
와류혼합 전처리 (초)	10~60	0.191	0.180	25
초음파 전처리 (초)	5~20	0.247	0.117	25
도말 강도 (kgf)	0.5~0.9	0.531	<0.0001	100
도말 부피 (μ l)	50~200	-0.055	0.293	100
배양 시간 (일)	4~6	-0.034	0.396	100
한천 농도 (%)	1.5~4	0.443	<0.0001	100

[0063] 분석에 사용된 조건 가운데 도말 강도는 피어슨 선형 상관계수 0.531로 분명한 정적 상관(positive correlation)을 보여주었고(P <0.0001), 고체 평판배지에 사용된 한천의 농도 또한 피어슨 선형 상관계수 0.443으로 분명한 정적 상관이라는 것을 확인할 수 있었다(P <0.0001). 상관관계가 있는 다른 조건으로는 전처리를 위해 사용된 와류혼합과 초음파 처리가 각각 피어슨 선형 상관계수 0.191(P <0.180), 0.247(P <0.117)로 약한 정적 상관을 나타내었다(표 3). 상관관계를 나타낸 조건들의 실험 결과는 도 5와 같다.

[0064] 위의 결과들을 통해 형질전환 최적 조건을 확립할 수 있었다. 전처리의 경우는 초음파 처리 방법이 최대값을 보였지만 와류혼합 방법에 비해서 공정이 번거롭고 기기비가 비싸다는 단점을 가지고 있고, 도말 강도의 경우는 0.9 kgf에서는 평판배지가 부서지는 결과를 보이기도 하였다. 도말 부피를 300 μ l로 하였을 경우는 도말 시간이 너무 오래 걸린다는 단점을 드러내었다. 이러한 문제들을 고려한 빠르고 간편한 형질전환 방법으로 최적방법이 제시되었다(표 4).

표 4

형질전환 조건 인자	최적 조건
전처리	와류혼합 60 초 / 초음파처리 20 초
도말 강도	0.7 kgf
도말 부피	100 μ l
한천 농도	4 %

[0066] **실시예 6. 투과전자현미경(transmission electron microscope, TEM)을 이용한 형질전환 확인**

[0067] DNA와 아미노클레이의 세포 내 유입을 확인하기 위해 투과전자현미경을 이용하여 형질전환 이전의 세포, 전처리 세포 그리고 형질전환된 세포의 이미지를 분석하였다. 투과전자현미경을 위한 전처리와 투과전자현미경 실험은 한국생명공학연구원 전자현미경 분석실에 의뢰하여 분석하였다(도 6). 그 결과 형질전환을 하지 않은 세포와 형질전환 과정을 거친 세포 사이에 차이점을 확인할 수 있었다. 형질전환 전의 세포는 완전한 세포벽의 모양을 갖

추고 있으나, 형질전환 과정을 거친 세포에서는 일부 세포벽이 허물어진 것을 확인할 수 있었다. 또한, 실과 같은 형태의 물질을 형질전환 전의 세포에서는 발견할 수 없으나, 형질전환 과정을 마친 세포에서는 실과 같은 형태의 물질이 세포 안과 밖에 존재하는 것을 확인하였다. 이 실과 같은 형태의 구조물은 아비나쉬 등이 발표한 아미노클레이와 DNA의 결합물의 투과전자현미경 사진과 일치한다(NANO KETTERS, 2007 Vol.7, No.9, 2660-2665). 이러한 결과를 토대로 아미노클레이를 이용한 형질전환 방법을 이용하면, 아미노클레이와 DNA가 결합하여 세포 내로 유입된다는 것이 증명되었다.

[0068] **실시예 7. aph7" 유전자의 확인**

[0069] 형질전환체를 확인하기 위해, 연속계대 방법 및 PCR증폭 방법을 이용하였다. 연속계대 방법으로는 하이그로마이신 B(hygromycin B)가 포함된 고체평판배지에 발생한 콜로니를 하이그로마이신 B가 포함되어 있는 액상배지에 계대하여 하이그로마이신 B에 내성이 있는 형질전환체를 선택하였다(도 7).

[0070] aph7" 유전자(AM238632)의 확인을 위해 aph7" 유전자 1300 bp를 증폭할 수 있는 프라이머를 제작하였다. 제작된 프라이머의 염기서열은 하기의 표 5과 같다. 형질전환체로 예상되는 균주에서 i-genomic DNA extraction kit for plant(Intron Co., korea)을 이용하여 클라미도모나스에서 DNA를 추출하였다. 추출한 DNA는 상기의 제작된 프라이머를 이용하여 아래의 조건으로 PCR을 진행하였다(표 6, 7). DNA 증폭 후, 아가로스겔에 DNA를 로딩하여 DNA 밴드를 확인하였다. 그 결과 야생형에서는 밴드를 확인할 수 없지만 형질전환체에서는 1300 bp의 DNA 밴드를 확인할 수 있었다(도 8). 이 DNA밴드에서 DNA를 DNA Clean-up kit(Promega, USA)를 이용하여 추출하고, 솔젬트에 의뢰하여 DNA 염기서열 분석을 진행하였다. 분석된 DNA 염기서열은 NCBI blast search를 통해 동정하였다. 동정의 결과, 증폭한 DNA밴드는 Streptomyces hygroscopicus aminoglycoside phosphotransferase(aph7") 유전자 인 것을 확인하였다(표 8).

표 5

[0071]

프라이머	서열	서열번호
hpt204-F	5'-AGCGAGCTACCAAAGCCATA-3'	1
hpt1579-R	5'-TACCGCTTCAGCACTTGAGA-3'	2

표 6

[0072]

반응 혼합물의 조성	
DNA	1 µl
hpt204-F 프라이머 (12.5 pmol)	1 µl
hpt1579-R 프라이머 (12.5 pmol)	1 µl
10mM dNTP 혼합물	1 µl
10x PCR 완충액	2.5 µl
보빈 시럼 알부민 (BSA)	0.5 µl
Taq DNA 중합효소 (Takara, 일본)	0.5 µl
dH ₂ O	14.0 µl
DMSO	1 µl
5M Betaine	2.5 µl
총 부피 25 µl	

표 7

[0073]

단계	온도 (°C)	시간 (분)	반복 횟수 (cycle)
초기 변성 (pre-denaturation)	95	5	1
변성 (denaturation)	94	1	35
결합 (annealing)	59	1	
확장 (extension)	72	1	

최종 신장 (post-elongation)	72	7	1
-------------------------	----	---	---

표 8

[0074]

Accession number	설명	식별
AM238632	하이그로마이신 B 포스포트랜스퍼라아제의 합성 구조 <i>hvg</i> 유전자	100%

[0075]

실시예 7. 아미노클레이의 독성 평가

[0076]

아미노클레이가 미세조류의 성장에 미치는 영향을 확인하기 위해, 10~400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 희석하여 미세조류의 성장을 확인하였다. 6일 배양 후, 클라미도모나스의 성장을 평가한 결과 10~400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 범위에서는 아미노클레이가 미세조류 성장에 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다(표 9).

표 9

[0077]

Mg-APTES 농도 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	0	10	20	30	40	50	100	200	400
성장 여부	++	++	++	++	++	++	++	++	++

[0078]

실시예 8. 형질전환 효율 평가

[0079]

아미노클레이를 이용한 형질전환 방법의 효율을 기존의 미세조류 형질전환 방법과 비교하기 위해, 기존의 각 방법에 대한 대표적인 문헌을 토대로 하여 유리 구슬법(Kindle., Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Feb;87(3):1228-32.), 충격법(Kindle. et al., J Cell Biol. 1989 Dec;109(6 Pt 1):2589-601.), 및 전기천공법(Shimogawara. et al., Genetics. 1998 Apr;148(4):1821-8.)에 대해서도 형질전환 효율 및 형질전환된 콜로니를 확인하기까지 걸린 시간을 각각 확인하였다(표 10). 상기의 형질전환 효율은 하기의 식을 이용하여 계산하였다.

[0080]

$$\text{형질전환 효율 (형질전환체}/\mu\text{g}) = \{(\text{플레이트 상의 콜로니의 갯수})/(\text{도말된 DNA의 양 ng})\} \times (1000 \text{ ng}/\mu\text{g})$$

[0081]

표 10에 나타낸 바와 같이, 아미노클레이를 이용한 형질전환 효율 및/또는 형질전환 소요 시간이 다른 기존의 형질전환 방법들에 비해 우수한 것을 확인할 수 있었다. 아미노클레이를 이용한 형질전환 방법은 유리구슬법 및 충격법에 비해 형질전환 효율 그리고 실험 소요시간 및 콜로니 형성시간을 포함한 시간적 측면에 있어 우수한 것으로 나타났다. 한편, 전기천공법의 경우 형질전환 효율은 아미노클레이를 이용한 방법보다 높으나, 콜로니 형성시간을 포함한 전체 형질전환에 소요되는 시간이 상대적으로 길고, 형질전환에 이용되는 DNA의 총량이 다소 많은 것이 단점이다. 결론적으로, 아미노클레이를 이용한 형질전환 방법이 기존의 유리 구슬법, 충격법, 및 전기천공법을 이용한 형질전환 방법에 비해 효율 및 시간의 측면에서 우수함을 알 수 있었다.

표 10

[0082]

방법	DNA 총량 (μg)	혼합물 부피 (μl)	도말되는 DNA 양 (μg)	콜로니 개수 (개)	형질전환 효율	실험 소요시간 (시간)	콜로니 형성시간 (일)
유리 구슬법 (glass bead)	2.0	250~300	1.0	42	4.20E+01	2	14
충격법 (bombardment)	0.8	400	0.8	2.5	3.13E+00	0.5	10

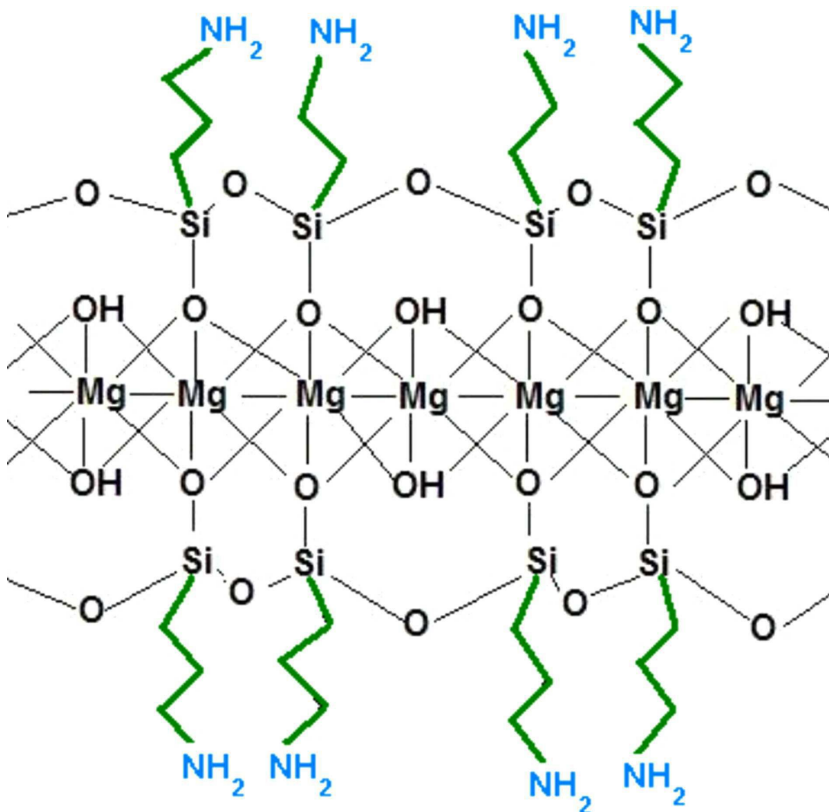
전기천공법 (electrophoration)	2.5	250	1.0	1200	1.20E+03	2	10
아미노클레이 (aminoclay)	1.5	500	0.3	151	5.03E+02	< 0.5	7

[0083] 상기의 결과들을 종합해 볼 때, 본 발명의 아미노클레이를 이용한 미세조류의 형질전환 방법은 혼합물의 전처리 방법, 한천 배지에 도달하는 도달 강도, 혼합물의 부피, 및 한천 농도에 의존적이며, 상기의 인자들을 상기 실시예에 개시된 바와 같이 최적화하였을 경우, 기존의 미세조류 형질전환 방법에 비해 우수한 결과를 나타낸다는 것을 알 수 있다. 또한, 형질전환된 미세조류는 항생제 내성 벡터를 이용함으로써 PCR 등의 방법으로 쉽게 선별할 수 있다는 점 또한 본 발명에서 입증하였다.

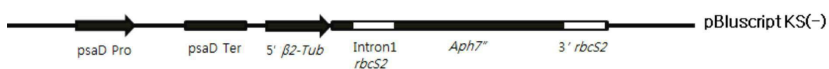
[0084] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

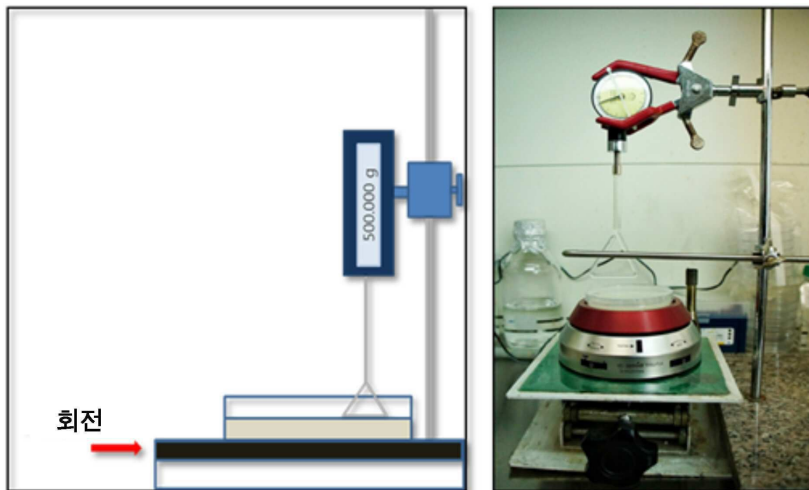
도면1



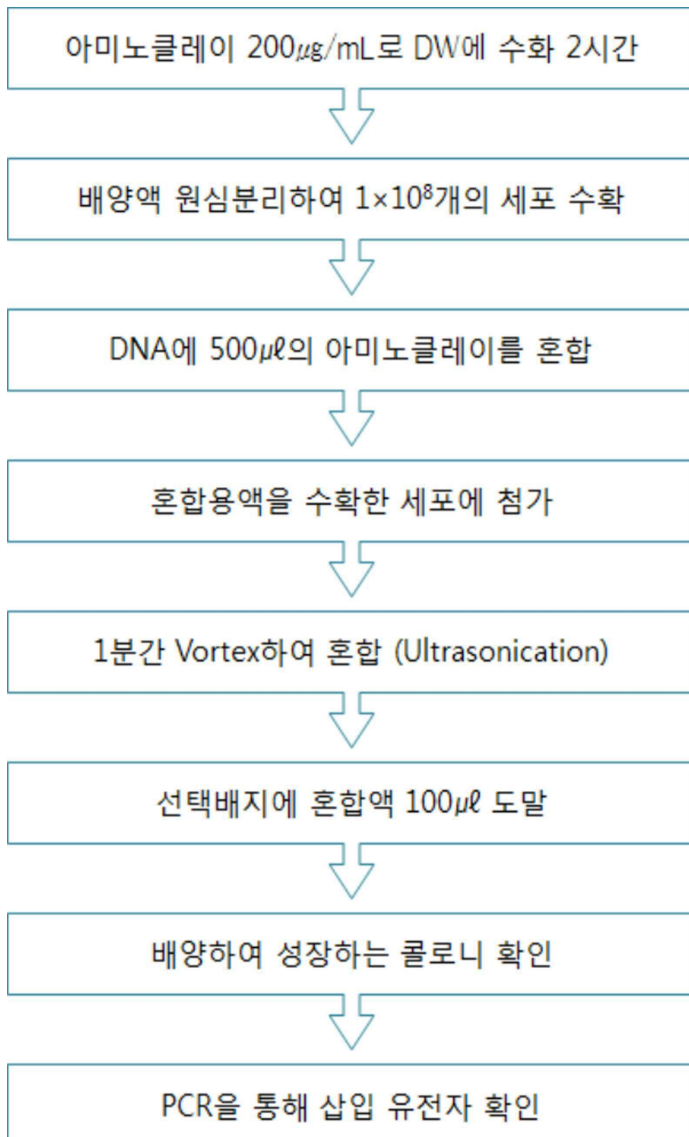
도면2



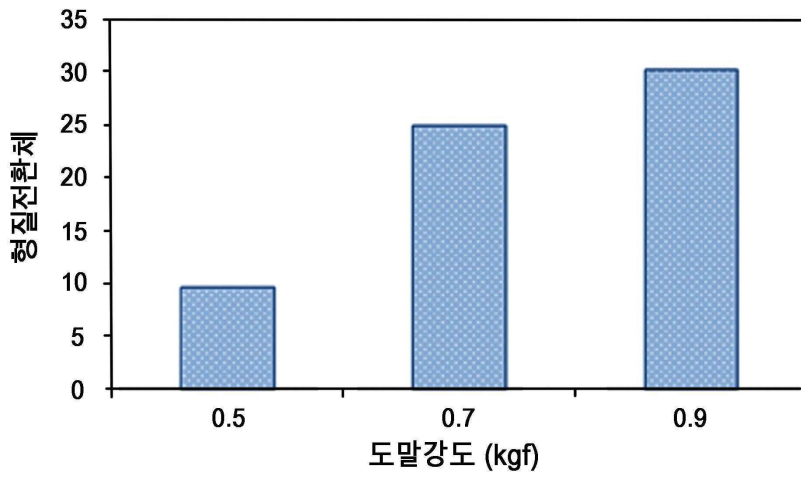
도면3



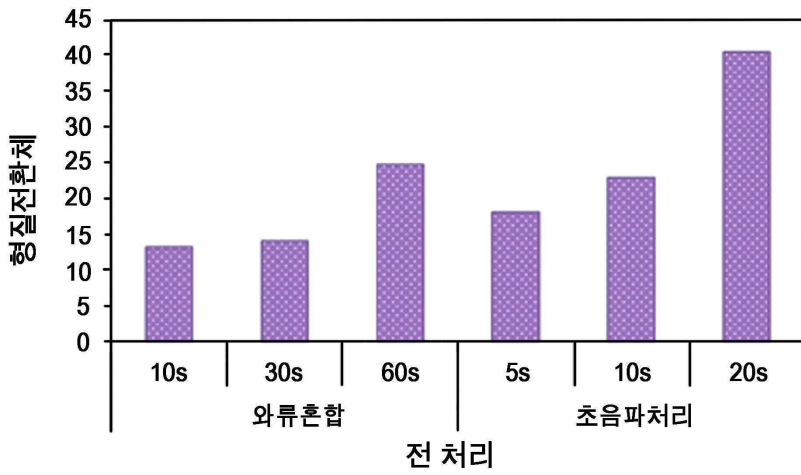
도면4



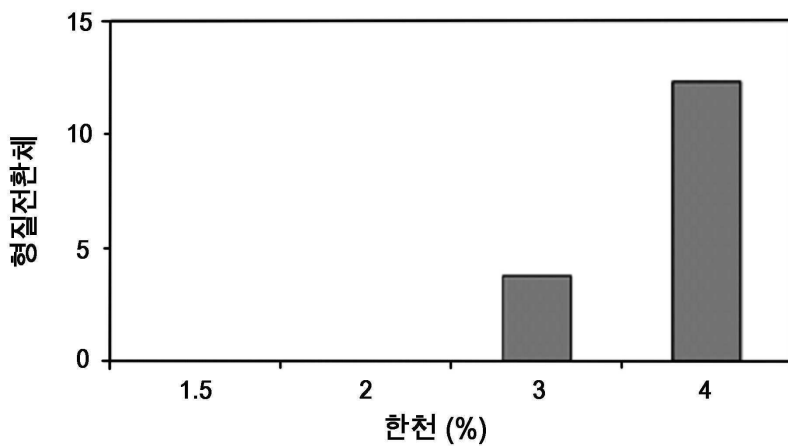
도면5a



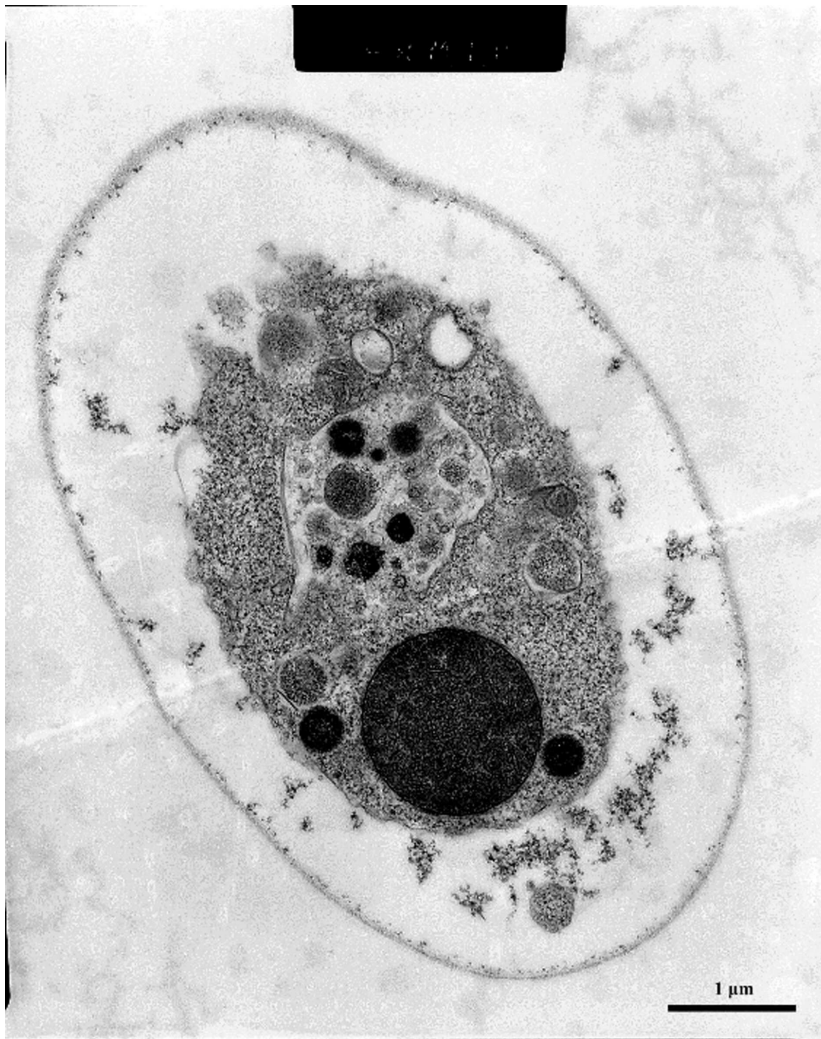
도면5b



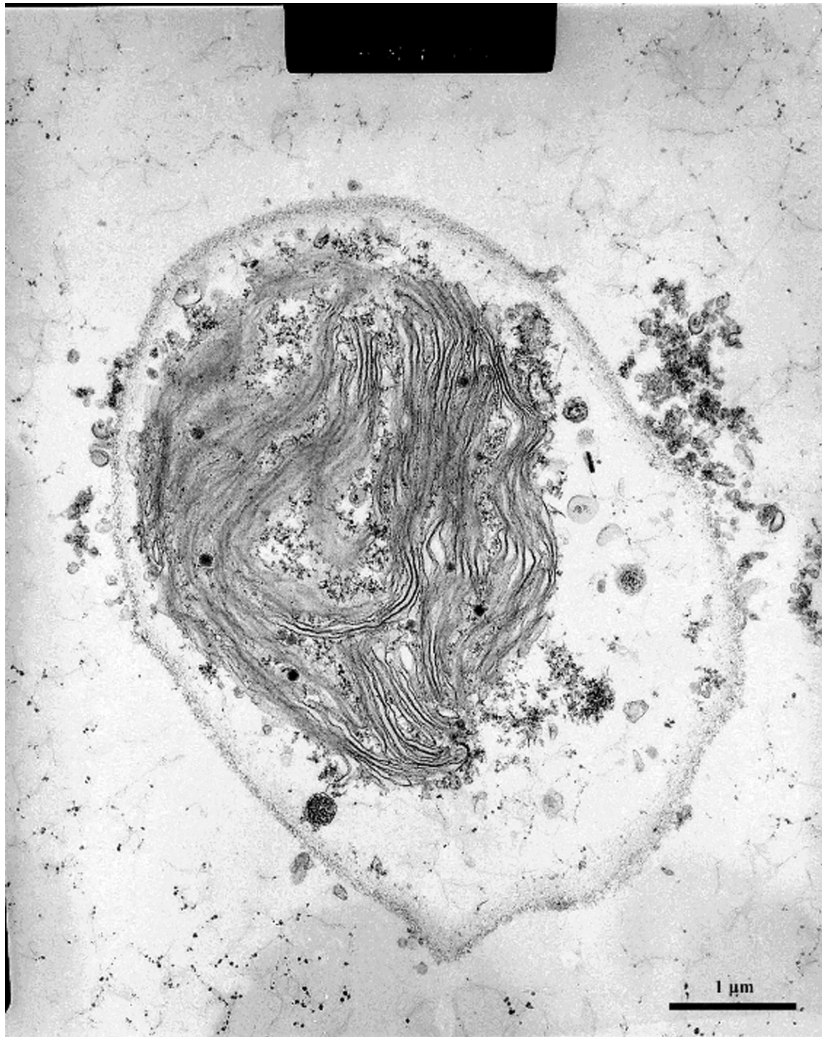
도면5c



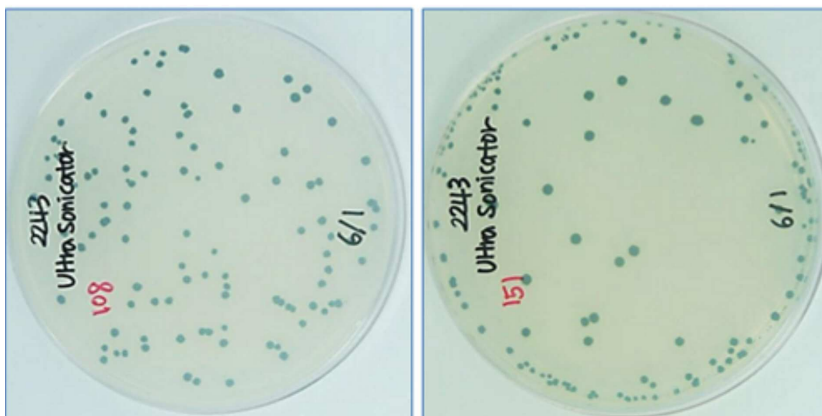
도면6a



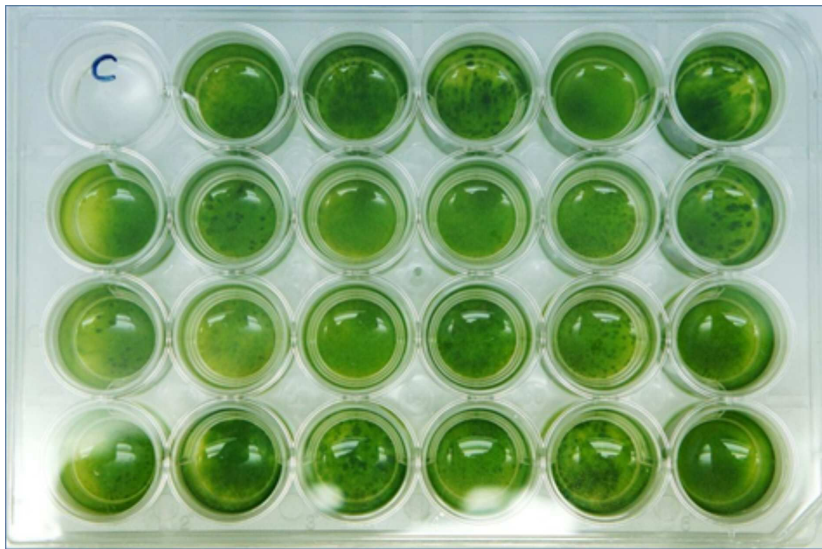
도면6b



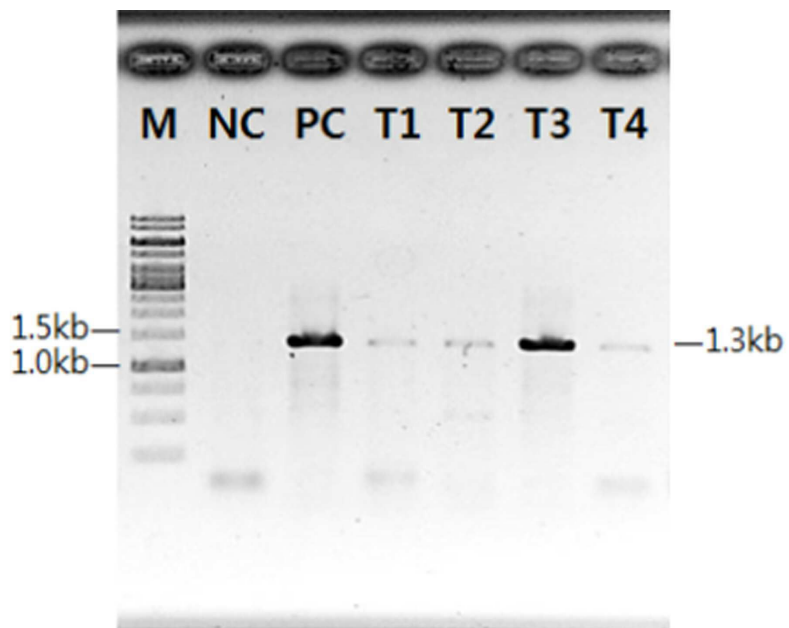
도면7a



도면7b



도면8



서열목록

- <110> Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology
- <120> Methods for genetic transformation of microalgae using aminoclay
- <130> PA130369KR
- <160> 2
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220><223> hpt204-Forward primer
<400> 1
agcgagctac caaagccata 20
<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> hpt1579-Reverse primer

<400> 2
taccgcttca gcacttgaga 20

【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 13, 청구항 15

【변경전】

아미노 클레이

【변경후】

아미노클레이