



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년04월19일
(11) 등록번호 10-2241682
(24) 등록일자 2021년04월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/70 (2006.01) C07K 14/245 (2006.01)
C12N 9/04 (2006.01) C12P 7/18 (2006.01)
C12P 7/42 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/70 (2013.01)
C07K 14/245 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0071339
(22) 출원일자 2019년06월17일
심사청구일자 2019년06월17일
(65) 공개번호 10-2020-0080106
(43) 공개일자 2020년07월06일
(30) 우선권주장
1020180169381 2018년12월26일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
GenBank: CP34426.1(2018. 12. 14.)*
US20110076730 A1
KR1020150075967 A
KR1020180035297 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
명지대학교 산학협력단
경기도 용인시 처인구 명지로 116 (남동, 명지대학교)
(72) 발명자
정육진
경기도 성남시 분당구 내정로 186, 102동 1306호 (수내동, 파크타운대림아파트)
크리스 발데후에사
경기도 용인시 처인구 명지로 116 명지대학교 (뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 천지

전체 청구항 수 : 총 13 항

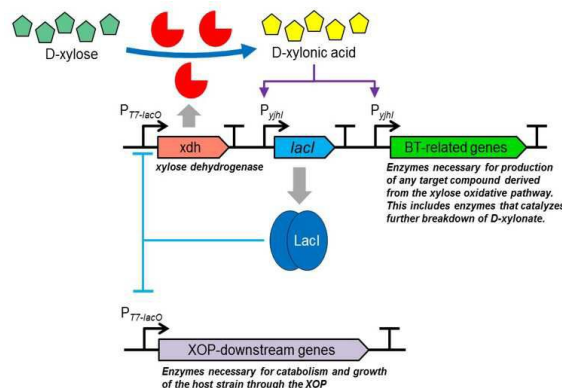
심사관 : 김재현

(54) 발명의 명칭 D-자일론산 반응성 프로모터, 이를 포함하는 D-자일론산 감지용 재설계 유전자 회로 및 이를 이용한 D-자일론산의 감지방법

(57) 요약

본 발명은 D-자일론산 반응성 프로모터, 이를 포함하는 D-자일론산 감지용 재설계 유전자 회로 및 이를 이용한 D-자일론산의 감지방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 프로모터는 D-자일론산에 대한 반응성이 높아 대장균에서 D-자일론산을 감지하기 위한 합성 회로에 적용할 경우, D-자일론산 축적을 조절함으로써 pH 조절을 통해 최종 산물의 생산 수율을 증가시킬 수 있다.

대표도 - 도10



- (52) CPC특허분류
C12N 9/0006 (2013.01)
C12P 7/18 (2013.01)
C12P 7/42 (2013.01)

그레이스 니솔라
 경기도 용인시 처인구 명지로 116 명지대학교
이원근
 경기도 용인시 처인구 명지로 116 명지대학교

- (72) 발명자
안젤로 바네레스
 경기도 용인시 처인구 명지로 116 명지대학교
크리스틴 라모스
 경기도 용인시 처인구 명지로 116 명지대학교

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2009-0093816
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	대학중점연구소지원사업
연구과제명	에너지환경융합기술연구소(3단계)-바이오매스기반 바이오화학제품 생산공정 요소기술 개발
기여율	70/100
과제수행기관명	명지대학교
연구기간	2015.09.01 ~ 2018.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2015H1D3A1062172
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	해외우수신진연구자유치사업
연구과제명	폐바이오매스 유래 탄수화물의 효율적 활용 기술을 이용한 바이오에너지/화학제품 생산용 생합성 공정기술 개발
기여율	15/100
과제수행기관명	명지대학교
연구기간	2015.11.01 ~ 2020.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2016R1C1B1013252
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	신진연구자지원사업
연구과제명	제조업 미생물 균주를 이용한 C5 xylose 기반 C2 및 C4 플랫폼 케미컬 생산 기술 개발
기여율	15/100
과제수행기관명	명지대학교
연구기간	2016.06.01 ~ 2019.05.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

서열번호 1의 염기서열로 표시되는 D-자일론산 반응성 프로모터를 포함하는 발현 벡터.

청구항 3

서열번호 1의 염기서열로 표시되는 D-자일론산 반응성 프로모터를 포함하는 발현 벡터로 형질전환된 숙주세포.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 숙주세포는 대장균(*Escherichia coli*)인 것을 특징으로 하는 숙주세포.

청구항 5

서열번호 1의 염기서열로 표시되는 D-자일론산 반응성 프로모터를 포함하는 발현 벡터로 형질전환된 숙주세포를 함유하는 D-자일론산을 감지하기 위한 바이오 센서.

청구항 6

상기 제5항에 따른 바이오 센서를 D-자일론산에 노출시킨 후, 자일론산 반응성 프로모터의 작동에 의한 단백질의 광학적, 전기화학적 또는 생화학적 발현정도를 측정하여 D-자일론산을 감지하는 방법.

청구항 7

다음을 포함하는 D-자일론산 감지용 재설계 유전자 회로:

- i) 적색 형광 단백질을 코딩하는 리포터 유전자;
- ii) 하류의 적색 형광 단백질의 발현을 조절하는 프로모터;
- iii) 락토오스 단백질을 코딩하는 *lacI* 유전자;
- iv) 녹색 형광 단백질을 코딩하는 리포터 유전자; 및
- iv) D-자일론산을 감지하여 하류의 *lacI* 유전자 및 하류의 녹색 형광 단백질을 코딩하는 리포터 유전자의 발현을 유도하는 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 프로모터.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 적색 형광 단백질은 mCherry이고, 녹색 형광 단백질은 sfGFP인 것을 특징으로 하는 D-자일론산 감지용 재

설계 유전자 회로.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 유전자회로는 D-자일론산이 감지되지 않을 경우 sfGFP 및 lacI는 억제되고 mCherry는 지속적으로 발현되어 적색 형광을 생성하고, D-자일론산이 감지되는 경우 sfGFP 및 lacI가 발현되어 녹색 형광을 생성하는 것을 특징으로 하는 D-자일론산 감지용 재설계 유전자 회로.

청구항 10

다음을 포함하는 D-자일론산 감지용 재설계 유전자 회로:

- i) 자일로오스 탈수소효소 단백질을 코딩하는 *xdh* 유전자; 및
- ii) 락토오스 단백질의 발현에 따라 하류의 *xdh* 유전자의 발현을 조절하는 프로모터;
- iii) 락토오스 단백질을 코딩하는 *lacI* 유전자; 및
- iv) D-자일론산을 감지하여 하류의 *lacI* 유전자의 발현을 유도하는 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 프로모터.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 iv)의 프로모터는 자일론산의 농도가 최소 5mM일 때, *lacI* 유전자의 발현을 유도하는 것을 특징으로 하는 D-자일론산 감지용 재설계 유전자 회로.

청구항 12

제10항에 있어서,

lacI 유전자의 발현은 *xdh* 유전자의 발현을 억제하여 자일로오스 탈수소효소의 생성을 중단함으로써 D-자일론산 축적을 일시적으로 중단시키는 것을 특징으로 하는 D-자일론산 감지용 재설계 유전자 회로.

청구항 13

제10항의 유전자 회로를 함유하는 D-자일론산 감지용 재조합 미생물.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 미생물은 대장균인 것을 특징으로 하는 D-자일론산 감지용 재조합 미생물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 D-자일론산 반응성 프로모터, 이를 포함하는 D-자일론산 감지용 재설계 유전자 회로 및 이를 이용한 D-자일론산의 감지방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 미생물에서 D-자일로오스(D-xylose)의 대사를 위한 세 가지 경로가 있다. 먼저, 자일로오스 이성질화효소 경로(Xylose isomerase pathway; XIP)는 D-자일루로스(D-xylulose)를 유리시키는 이성질화 단계에서 시작된다. 이 중간체는 오탄당 인산 경로(pentose phosphate pathway; PPP)를 통해 더 대사된다. 다음으로, 옥소-환원 경로(oxo-reductive pathway; ORP)는 D-자일루로스를 중간체로 생산하지만 D-자일로오스를 줄이고 자일리톨을 산화시키는 경로로 시작한다. 자일로오스 산화 경로(XOP)라고 불리는 세번째 경로는 D-자일론산(D-xylic acid)을 형성하는 D-자일로오스의 산화에 의해 시작된다. 이 중간체는 탈수되어 두 가지 경로로 나뉘는 2-케토 3-데옥시 D-펜토네이트(2-keto 3-deoxy D-pentionate)를 형성하며, 이는 피루베이트(pyruvate) 및 글리콜 알데히드(glycolaldehyde)를 형성하는 알돌라아제(aldolase) 반응 또는 2-케토글루타이트 세미알데하이드(2-ketoglutarate semialdehyde)를 형성하는 또 다른 탈수 반응이다. 전자는 Dahms 경로라고 불리며, 후자는 Weimberg 경로라고 한다.
- [0004] 자일로오스 산화 경로(XOP)는 1,2,4-부탄트리올(1,2,4-butanetriol), 자일론산(xylic acid), 에틸렌 글리콜(ethylene glycol), 글리콜산(glycolic acid), 감마-아미노부티르산(gamma-aminobutyric acid) 및 3,4-디하이드록시부티르산(dihydroxybutyric acid)과 같은 다양한 가치있는 화합물을 생산할 수 있는 재조합 균주의 개발에 사용되었다(Liu et al. 2012; Liu et al. 2013; Valdehuesa et al. 2014; Cabulong et al. 2017; Wang et al. 2017; Zhao et al. 2017; Cabulong et al. 2018). 그러나, 이러한 균주에서 XOP를 사용하는 것은 두 가지 단점을 나타낸다. 첫 번째로, Dahms 경로가 이용될 때 알돌(aldol) 절단 단계로 인해 모든 표적 생성물에 대한 탄소 수율이 낮으며, 두 번째로, 중간체인 D-자일론산이 배지에 축적되어 pH가 감소한다는 것이다. 이전의 연구는 경로에 대한 최적의 유전자 및 각각의 발현 강도를 확인함으로써 이러한 문제를 해결하기 위한 시도를 해왔다(Cabulong et al. 2017; Cabulong et al. 2018).
- [0005] 재조합 균주 개발의 현재 추세는 합성 생물학 도구의 통합을 포함하는 것이다. 이는 변이 형질에 대한 어느 정도의 예측 가능성을 허용하는 합성 회로 또는 네트워크를 구축하기 위해 유전 요소 또는 부품을 사용한다. 이러한 합성 유전 회로를 만드는데 사용되는 부분은 프로모터(promoter), 오퍼레이터(operator), 조절자(regulator) 또는 유도 분자 및 리포터 단백질이다. 기본적인 목표는 유도 분자 또는 외력의 존재가 숙주 미생물에 의한 반응을 일으키는 조건을 생성하는 것이다. 이 반응은 간단한 바이오 센싱에서 보다 복잡한 유전자 조절에 이르기까지 다양하다. XOP, 특히 대장균(Escherichia coli)의 Dahms 경로의 경우에는 현재 합성 유전 도구에 대한 연구가 제한적이다.
- [0006] 이에, 본 발명자들은 상기 종래기술들의 문제점들을 극복하고, D-자일론산 반응에 관여하는 새로운 프로모터 요소를 확인한 결과, 본 발명에 따른 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 프로모터는 D-자일론산에 대한 반응성이 높아 대장균에서 D-자일론산을 감지하기 위한 합성 회로에 적용할 경우, D-자일론산 축적을 조절함으로써 pH 조절을 통해 최종 산물의 생산 수율을 증가시킬 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명의 주된 목적은 D-자일론산에 대한 반응성을 갖는 D-자일론산 반응성 프로모터를 제공하는데 있다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 D-자일론산 반응성 프로모터를 포함하는 발현 벡터, 상기 발현 벡터로 형질전환된 숙주세포 및 상기 숙주세포를 함유하는 D-자일론산을 감지하기 위한 바이오 센서를 제공하는데 있다.
- [0010] 본 발명의 다른 목적은 상기 D-자일론산 반응성 프로모터를 포함하는 D-자일론산 감지용 재설계 유전자 회로 및 상기 유전자 회로를 함유하는 D-자일론산 감지용 재조합 미생물을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 D-자일론산 반응성 프로모터를 제공한다.
- [0013] 본 발명에서 용어 "프로모터"는 폴리머라아제(polymerase)에 대한 결합 부위를 포함하고 프로모터 하위 유전자의 mRNA로의 전사 개시활성을 가지는, 암호화 영역의 상류(upstream)의 비해독된 핵산 서열을 의미한다. 본 발명과 관련한 프로모터는 대장균의 게놈정보를 토대로 RNA 중합 효소 및 전사 시작 부위의 결합에 가능한 하나의

사이트(site)를 확인하고, P_{y_{jh1}}의 필수 부분 및 P_{y_{jh1}}의 염기를 다르게 줄인 형태에서의 mCherry 발현을 확인함으로써 D-자일론산 반응성 프로모터의 염기서열을 확인하였다.

- [0014] 본 발명의 프로모터를 코딩하는 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.
- [0015] 발명에서 용어, "상동성"이란 천연형(wild type)의 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 프로모터 영역을 코딩하는 핵산 서열과 바람직하게는 70% 이상, 보다 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상 동일한 핵산 서열을 포함한다.
- [0016] 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. 프로모터 핵산 서열은 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합으로 서열상의 변이를 유도할 수 있다. 이러한 서열 변이를 통하여 천연 프로모터와 동일한 활성을 나타낼 수도 있으나, 바람직하게는 활성이 증가된 프로모터, 유도제에 대한 특이성이 증가된 프로모터 등 목적에 적합하게 프로모터의 기능을 개선시킬 수 있다.
- [0017] 상기 모든 범주의 프로모터를 코딩하는 핵산 분자는 목적 유전자의 발현을 유도하는 발현 벡터의 프로모터 성분으로 제공되고, 상기 프로모터를 이용한 다양한 벡터의 변형은 본 발명의 범주에 포함된다.
- [0018] 본 발명의 다른 한 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 D-자일론산 반응성 프로모터를 포함하는 발현 벡터를 제공한다.
- [0019] 본 발명에서 용어 "발현 벡터"란 적당한 숙주세포에서 목적 유전자가 발현할 수 있도록 프로모터 등의 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 의미한다. 본 발명과 관련된 발현 벡터는 프로모터가 D-자일론산 반응성 프로모터인 벡터로서, 프로모터는 목적 유전자의 발현을 유도하도록 작동가능하게 연결되어 있으며 벡터는 숙주세포의 게놈내로 통합되어 있는 형태일 수도 있다.
- [0020] 본 발명에서 "작동가능하게 연결된(operably linked)"는 일반적 기능을 수행하도록 D-자일론산 반응성 발현조절 서열과 목적하는 유전자를 코딩하는 뉴클레오티드 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 말한다. 재조합 벡터와의 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.
- [0021] 본 발명의 발현벡터는 조절 요소로 D-자일론산 반응성 프로모터를 필수적으로 포함하고, 단백질의 발현에 영향을 미칠 수 있는 발현 조절 서열, 예를 들어, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널, 인헨서, 막 표적화 또는 분비를 위한 신호서열 등을 포함할 수 있다.
- [0022] 본 발명의 다른 한 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 D-자일론산 반응성 프로모터를 포함하는 발현 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다.
- [0023] 본 발명의 발현 벡터로 형질전환된 숙주세포에 있어서, 벡터로 형질전환 가능한 숙주세포는 재조합 단백질을 생산하는 숙주세포로서 공지된 것이라면 어떠한 것이든 이용가능하다. 숙주세포로는 박테리아, 효모, 곰팡이 등이 가능하나, 이에 제한되는 것은 아니며, 바람직하게는 대장균(*Escherichia coli*)인 것을 특징으로 한다.
- [0024] 본 발명의 다른 한 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 D-자일론산 반응성 프로모터를 포함하는 발현 벡터로 형질전환된 숙주세포를 함유하는 자일론산을 감지하기 위한 바이오 센서를 제공한다.
- [0025] 본 발명의 다른 한 양태에 따르면, 본 발명은 상기 바이오센서를 D-자일론산에 노출시킨 후, 자일론산 반응성 프로모터의 작동에 의한 형광 단백질의 광학적, 전기화학적 또는 생화학적 발현정도를 측정하여 D-자일론산을 감지하는 방법을 제공한다.
- [0026] 본 발명에 따른 바이오센서를 이용하여 D-자일론산을 감지하는 방법은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 적절히 선택하여 수행할 수 있다. 예를 들어, 서열번호 1의 핵산분자 서열을 가진 프로모터로 형질전환된 대장균을 사용하는 경우에는, 바이오센서 세포와 접촉시키는 장치 및 세포의 광출력을 측정하는 장치를 사용하여 D-자일론산을 감지할 수 있다.
- [0027] 본 발명의 다른 한 양태에 따르면, 본 발명은 i) 적색 형광 단백질을 코딩하는 리포터 유전자; ii) 하류의 적색 형광 단백질의 발현을 조절하는 프로모터; iii) 락토오스 단백질을 코딩하는 *lacI* 유전자; iv) 녹색 형광 단백질

질을 코딩하는 리포터 유전자; 및 iv) D-자일론산을 감지하여 하류의 *lacI* 유전자 및 하류의 녹색 형광 단백질을 코딩하는 리포터 유전자의 발현을 유도하는 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 프로모터를 포함하는 D-자일론산 감지용 재설계 유전자 회로를 제공한다.

[0028] 본 발명의 D-자일론산 감지용 재설계 유전자 회로는 락토오스 단백질을 코딩하는 *lacI* 유전자와 녹색 형광 단백질을 코딩하는 리포터 유전자 및 D-자일론산을 감지하여 상기 *lacI* 유전자 및 녹색 형광 단백질을 코딩하는 리포터 유전자의 발현을 유도하는 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 프로모터로 구성되며, D-자일론산의 농도에 비례하여 이와 반응한 프로모터가 *lacI* 유전자의 발현 및 녹색 형광 단백질을 코딩하는 유전자의 발현을 유도함으로써, D-자일론산 축적의 조절이 가능한 재설계 유전자 회로라고 할 수 있다. 도 9a 내지 도 9c에 나타낸 바와 같이, D-자일론산을 본 발명에서 제작한 D-자일론산 감지용 유전자 회로에 의해 정량적인 형광 분석을 할 수 있다. 이는 본 발명의 유전자 회로가 특정 농도 이상으로 존재하는 D-자일론산을 감지하여 D-자일론산의 축적을 조절함으로써 pH 조절을 통해 최종 산물의 생산 수율을 증가시킬 수 있음을 시사한다(실시예 3 및, 도 9a 내지 도 9c 참조).

[0029] 본 발명의 D-자일론산 감지용 재설계 유전자 회로에 있어서, 상기 적색 형광 단백질은 mCherry이고, 녹색 형광 단백질은 sfGFP인 것을 특징으로 한다.

[0030] 본 발명의 D-자일론산 감지용 재설계 유전자 회로에 있어서, 상기 유전자 회로는 D-자일론산이 감지되지 않을 경우 sfGFP 및 *lacI*는 억제되고 mCherry는 지속적으로 발현되어 적색 형광을 생성하고, D-자일론산이 감지되는 경우 sfGFP 및 *lacI*가 발현되어 녹색 형광을 생성하는 것을 특징으로 한다. 즉, 본 발명에 따른 유전자 회로는 D-자일론산의 생성을 녹색 형광 단백질의 발현 정도에 따라 확인할 수 있다.

[0031] 본 발명의 다른 한 양태에 따르면, 본 발명은 i) 자일로오스 탈수소효소 단백질을 코딩하는 *xdh* 유전자; ii) 락토오스 단백질의 발현에 따라 하류의 *xdh* 유전자의 발현을 조절하는 프로모터; iii) 락토오스 단백질을 코딩하는 *lacI* 유전자; 및 iv) D-자일론산을 감지하여 하류의 *lacI* 유전자의 발현을 유도하는 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 프로모터를 포함하는 D-자일론산 감지용 재설계 유전자 회로를 제공한다.

[0032] 본 발명의 D-자일론산 감지용 재설계 유전자 회로는 락토오스 단백질을 코딩하는 *lacI* 유전자와 D-자일론산을 감지하여 하류의 *lacI* 유전자의 발현을 유도하는 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 프로모터로 구성되며, D-자일론산의 농도에 비례하여 이와 반응한 프로모터가 *lacI* 유전자의 발현을 유도하여 D-자일로오스를 D-자일론산으로 형성시키는 자일로오스 탈수소효소(*xdh*)의 생성을 억제함으로써, D-자일론산 축적의 조절이 가능한 재설계 유전자 회로라고 할 수 있다. 도 10에 나타낸 바와 같이, 자일로오스 탈수소효소(*xylose dehydrogenase*; *xdh*)는 *LacI*가 억제 할 수 있는 프로모터인 $P_{T7-lacO}$ 하류(downstream)에 위치한다. *xdh*는 D-자일로오스에서 D-자일론산을 생산하며, 축적된 D-자일론산의 특정 농도에서 *LacI*가 발현되어 *Xdh* 생산을 효과적으로 억제함으로써 D-자일론산 축적을 일시적으로 중단시킴과 동시에 D-자일론산을 이용하는 하류(downstream) 유전자가 활성화된다. 이는, 본 발명의 유전자 회로가 특정 농도 이상으로 존재하는 D-자일론산을 감지하여 D-자일론산의 축적을 조절함으로써 pH 조절을 통해 최종 산물의 생산 수율을 증가시킬 수 있음을 시사한다(실시예 4 및, 도 10 참조).

[0033] 본 발명의 D-자일론산 감지용 재설계 유전자 회로에 있어서, 상기 iv)의 프로모터는 자일론산의 농도가 최소 5mM일 때, *lacI* 유전자의 발현을 유도할 수 있으며, 상기 이상의 농도 범위에서도 감지 가능한 것을 특징으로 한다.

[0034] 본 발명의 D-자일론산 감지용 재설계 유전자 회로에 있어서, 상기 *lacI* 유전자의 발현은 *xdh* 유전자의 발현을 억제하여 자일로오스 탈수소효소의 생성을 중단함으로써 D-자일론산 축적을 일시적으로 중단시키는 것을 특징으로 한다.

[0035] 본 발명의 다른 한 양태에 따르면, 본 발명은 상기 유전자 회로를 함유하는 D-자일론산 감지용 재조합 미생물을 제공한다.

[0036] 본 발명의 D-자일론산 감지용 재조합 미생물에 있어서, 상기 미생물은 재조합 단백질을 생산하는 미생물로서 공지된 것이라면 어떠한 것이든 이용가능하다. 미생물로서는 박테리아, 효모, 곰팡이 등이 가능하나, 이에 제한되는 것은 아니며, 바람직하게는 대장균인 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0038] 전술한 바와 같이, 본 발명에 따른 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 프로모터는 D-자일론산에 대한 반응성이 높아 대장균에서 D-자일론산을 감지하기 위한 합성 회로에 적용할 경우, D-자일론산 축적을 조절함으로써 pH 조

절을 통해 결론적으로는 최종 산물의 생산 수율을 증가시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0040] 도 1은 대장균 W3110에서 D-자일론산 축적 대사 과장을 나타내는 모식도이다.
- 도 2는 대장균 W3110에서 yag 및 yjh 유전자의 상대적인 유전자 발현을 확인한 결과이다((2a)M9 배지, (2b)D-자일로오스가 있는 M9 배지).
- 도 3은 대장균 W3110의 yag 및 yjh 유전자의 정량적 PCR 분석 결과이다.
- 도 4는 D-자일론산 반응성 프로모터를 유전 요소로 포함하는 플라스미드 맵이다.
- 도 5는 D-자일론산(도 5a), D-자일로오스(도 5b) 및 D-글루코오스(도 5c)에 대한 프로모터 반응을 보여주는 결과이다.
- 도 6은 박테리아 프로모터를 예측하기 위하여 BPROM를 이용하여 프로모터를 분석한 결과이다.
- 도 7은 NNPP를 이용하여 프로모터를 분석한 결과이다.
- 도 8은 P_{yjhI}의 특성 분석 결과이다((8a)2 개의 crp 결합 부위 예측결과, (8b)P_{yjhI}의 염기를 다르게 줄인 형태에서 mCherry발현을 확인한 결과, (8c) D-자일론산에 대한 P_{yjhI}의 용량 반응 결과).
- 도 9는 프로모터 유전 요소로서 P_{yjhI}를 사용하여 D-자일론산-반응성 유전자 회로(9a) 및 상기 유전자 회로의 D-자일론산 반응 결과((9b)D-자일론산을 포함하지 않는 배지, (9c)D-자일론산을 포함하는 배지)를 나타낸다.
- 도 10은 자일로오스 산화 경로 (XOP)를 통한 D-자일로오스 대사의 자율적 조절에서 D-자일론산 반응 프로모터인 P_{yjhI}를 응용한 유전자 회로를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0041] 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.
- [0042] 본 발명은 D-자일론산을 감지하기 위한 재설계 유전자 회로를 구축하기 위하여 D-자일론산에 반응하는 구조 유전자 및 프로모터를 확인하고, D-자일론산을 감지하기 위한 새로운 유전자 회로를 구축하였다. 구체적인 실험방법 및 설계방법은 아래와 같다.

[실험방법]

[0045] DNA의 조작(manipulation)

[0046] 표준 기술은 모든 유전자 조작 실험에 사용되었으며(Green and Sambrook 2012), 깁슨(Gibson) 등은 조립 전략은 DNA 조립에 사용되었다(Gibson et al. 2009). 본 발명에서 사용된 재조합 플라스미드 및 대장균 균주 목록은 표 1에 나타내었다. 플라스미드 sfGFP-pBAD는 Michael Davidson 및 Geoffrey Waldo(Addgene plasmid # 54519) (Pédelacq et al. 2006)로부터 기증받았으며, sfGFP 유전자를 위한 재료로 이용하였다. 플라스미드 pETmCherryLIC은 Scott Gradia(Addgene plasmid # 29769)로부터 기증받아, mCherry 유전자의 공급원으로 사용되었다. 모든 PCR 반응은 표 2에 기재된 적절한 올리고 뉴클레오타이드를 사용하여 Phusion High-fidelity DNA 중합 효소를 사용하여 수행되었다. 본 발명에서 사용된 유전자 요소와 유전자의 전체 목록은 표 3에 나타내었다. 1 단계 TSS(형질 전환 및 저장 용액) 프로토콜을 사용하여 플라스미드 형질 전환을 수행 하였다.

표 1

[0048]

Names	Relevant Characteristics	Source
<i>Plasmids</i>		
pET28A	pBR322 <i>ori</i> , P _{T7} , Kan ^R	Invitrogen
pRSET-A	pUC <i>ori</i> , P _{T7} , Amp ^R	Invitrogen
sfGFP-pBAD	P _{pBAD} - <i>sfGFP</i> (Addgene #54519)	*

pET mCherry LIC	P_{T7} -mCherry, (Addgene #29769)	**
pET28A-T7	pET28A derivative; P_{T7} -mCherry	This work
pET28-PyagE	pET28A derivative; P_{yagE} -mcherry	This work
pET28-PyjhI	pET28A derivative; P_{yjhI} -mcherry	This work
pRSET-A-XAS	P_{T7} -mcherry, P_{yjhI} -lacI, P_{yjhI} -sfGFP	This work
<i>Strains</i>		
MG1655	<i>E. coli</i> MG1655 (DE3)	This work
MGMC0	MG1655 pET28A	This work
MGMC1	MG1655 pET28A-T7	This work
MGMC2	MG1655 pET28-PyagE	This work
MGMC3	MG1655 pET28-PyjhI	This work
MGMC4	MG1655 pRSET-A-XAS	This work

[0049] * 플라스미드 sfGFP-pBAD는 Michael Davidson 및 Geoffrey Waldo (Addgene plasmid # 54519) 로부터 기증받음.

[0050] ** pET mCherry LIC cloning vector (u-mCherry)는 Scott Gradia (Addgene plasmid # 29769)로부터 기증받음.

표 2

[0052]

서열 번호	이름	서열 (5' →3')*
8	T7MC-F	CTTTAAGAAGGAGATATACATGGCCATCATCAAGGAGTTC
9	T7MC-R	CAGTGGTGGTGGTGGTGGTGCCTACTTGTACAGCTCGTCCATG
10	PyagEMC1-F	CGTCCGGCGTAGAGGATCGAAAACGGGTTCTTATGCCTTAGTTG
11	PyagEMC1-R	TGATGGCCATGAGATCTCCTTGTCTGAATCATTTTGTTC
12	PyagEMC2-F	AGGAGATCTCATGGCCATCATCAAGGAGTTC
13	PyagEMC2-R	AGTGGTGGTGGTGGTGGTGCCTACTTGTACAGCTCGTCCATG
14	PyjhIMC1-F	CGTCCGGCGTAGAGGATCGATAAGTAAGTTCATTCGAGAGGGATTCAAG
15	PyjhIMC1-R	TGATGGCCATAATGGCTCCTCCTTGTCTCATG
16	PyjhIMC2-F	AGGAGCCATTATGGCCATCATCAAGGAGTTC
17	PyjhIMC2-R	AGTGGTGGTGGTGGTGGTGCCTACTTGTACAGCTCGTCCATG
18	T7SF-F	ACTTTAAGAAGGAGATATACATGGTGAAGCAAGGGCGAGGAG
19	T7SF-R	AGTGGTGGTGGTGGTGGTGCCTTGTACAGCTCGTCCATGCC
20	PyagESF1-F	CGTCCGGCGTAGAGGATCGAAAACGGGTTCTTATGCCTTAGTTG
21	PyagESF1-R	TGCTCACCATGAGATCTCCTTGTCTGAATCATTTTGTTC
22	PyagESF2-F	AGGAGATCTCATGGTGAAGCAAGGGCGAGGAG
23	PyagESF2-R	AGTGGTGGTGGTGGTGGTGCCTTGTACAGCTCGTCCATGCC
24	PyjhISF1-F	GTCCGGCGTAGAGGATCGATAAGTAAGTTCATTCGAGAGGGATTCAAG
25	PyjhISF1-R	TGCTCACCATAATGGCTCCTCCTTGTCTCATG
26	PyjhISF2-F	AGGAGCCATTATGGTGAAGCAAGGGCGAGGAG
27	PyjhISF2-R	AGTGGTGGTGGTGGTGGTGCCTTGTACAGCTCGTCCATGCC
28	pRSETXAS-F	CCCTATAGTAGTTCGATTAATAATTTTCGCGGGATCGAGATCC
29	pRSETXAS-R	AGACCACAACGGTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCGG
30	lacO-mCherry-T7T F	TAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATCCCCTCTAGAAATAATTTTG
31	lacO-mCherry-T7T R	GAACCCGTTTATCCGGATATAGTTCCTCCTTTCAGCAAAAAACCCCTCAAG
32	XAS yjhIp F	ATATCCGGATAAACGGGTTCTTATGCCTTAGTTGTAAGTGTCTACCATGTC
33	XAS yjhIp R	CTGGTTTCACGAGATCTCCTTGTCTGAATCATTTTGTCTACATTATAGAACAG
34	lacI F	AGGAGATCTCGTAAACCAGTAACGTTATACGATGTCGAGAGTATGCCG
35	lacI R	AACTTACTACTAGATTTTCAGTGAATTTATCTCTTCAAATGTAGCACCTGAAG
36	yjhIp-sfGFP-T7T F	TGAAATCTAGTAAGTAAGTTCATTCGAGAGGGATTTCAGCAAAAAAATCAATGG
37	yjhIp-sfGFP-T7T R	GAGGGAAACCGTTGTGGTCTATCCGGATATAGTTCCTCCTTTCAGCAAAAAACCCCTCAAG

표 3

서열 번호	이름	서열 (5' →3')
1	P _{yjhi}	TAAGTAAGTT CATTGAGAG GGATTCAAG CAAAAATAAT CAATGGCACC CAATAGAAAA TATTGGCGAT GCGCTCGAAC GAATAAAGAA GCTCTAGGCG CAATCCACAC ACTACGATGT TGCAACAACA CGCCATCTAC TTTTATTCT CATTACTAA ATGTGGCTGT TCTGGATTCA TTATTCAAAG TGTGTACAAG ATCACATTTA ATCACATCAT TACGGTTCAG CATGCTGAAC AAAGCATATT TTCCACTATG TAATGCCGAT ACCATTTATT CCATGAGCAA GGAGGAGCCA TT
2	P _{yagE}	AAACGGGTTT TTATGCCTTA GTTGTAAAGT TCTACCATGT CCCCAGACAA GTGTTCACTA TGTCCCGGA CCGTACACCC CAAAGGGGAG AGGGGACTGC ACCGAGCCAT CTTTTCCCC TCGCCCTTT GGGGAGAGGG CCGGGGTGAG GGGCAATATG TGATCCAGCT TAAATTTCCC GCACTCCCTC TTCCCTCCG ATTTACCTCT CCTGTGTTCTG CGTCATAGTA TGATCGITAA ATAAACGAAC GCTGTTCTAT AATGTAGAAC AAAATGATTC AGCAAGGAGA TCTC
3	mCherry	ATGGCCATCA TCAAGGAGTT CATGCGCTT C AAGGTGCACA TGGAGGGCTC CGTGAACGGC CACGAGTTCG AGATCGAGGG CGAGGGCGAG GGCCGCCCTT ACGAGGGCAC CCAGACCGCC AAGCTGAAGG TGACCAAGGG TGGCCCCCTG CCCTTCGCCT GGGACATCCT GTCCCTCAG TTCATGTACG GCTCCAAGGC CTACGTGAAG CACCCGCGG ACATCCCCGA CTACTTGAAG CTGTCTTCC CCGAGGGCTT CAAGTGGGAG CGCGTGATGA ACTTCGAGGA CGGCGCGGTG GTGACCGTGA CCCAGGACT CTCCTCCAG GACGGCGAGT TCATCTACAA GGTGAAGCTG CGCGGCACCA ACTTCCCTC CGACGGCCCC GTAATGCAGA AGAAGACCAT GGGCTGGGAG GCCTCCTCCG AGCGGATGTA CCCCAGGAC GGCGCCCTGA AGGGCGAGAT CAAGCAGAGG CTGAAGCTGA AGGACGGCGG CCACTACGAC GCTGAGGTCA AGACCACCTA CAAGCCAAG AAGCCCGTGC AGCTGCCCGG CGCCTACAAC GTCAACATCA AGTTGACAT CACCTCCAC AACGAGGACT ACACCATCGT GGAACAGTAC GAACGCGCGG AGGGCCGCCA CTCCACCGG GGCATGGACG AGCTGTACAA G
4	sfGFP	ATGGTGAGCA AGGGCGAGGA GCTGTTACC GGGGTGGTGC CCATCCTGCT CGAGCTGGAC GGCGACGTAA ACGGCCACAA GTTCAGCGTG CGCGGCGAGG GCGAGGGCGA TGCCACCAAC GGCAAGCTGA CCCTGAAGTT CATCTGCACC ACCGGCAAGC TGCCCGTGCC CTGGCCACC CTCGTGACCA CCCTGACCTA CGGCGTGCAG TGCTTCAGCC GCTACCCCGA CCACATGAAG CGCCACGACT TCTTCAAGTC CGCCATGCC GAAGGCTACG TCCAGGAGCG CACCATCAGC TTCAAGGACG ACGGCACCTA CAAGACCCGC GCCGAGGTGA AGTTCGAGGG CGACACCCTG GTGAACCGCA TCAGACTGAA GGGCATCGAC TTCAAGGAGG ACGGCAACAT CCTGGGGCAC AAGTGGAGT ACAACTTCAA CAGCCACAAC GTCTATATCA CCGCCGACAA GCAGAAGAAC GGCATCAAAG CCAACTTCAA GATCCGCCAC AACGTGGAGG ACGGCAGCTG GCAGCTCGCC GACCACTACC AGCAGAACAC CCCCATCGGC GACGGCCCCG TGCTGCTGCC CGACAACCAC TACCTGAGCA CCCAGTCCGT GCTGAGCAA GACCCCAACG AGAAGCGCGA TCACATGGTC CTGCTGGAGT TCGTGACCGC CGCCGGGATC ACTACGGCA TGGACGAGCT GTACAAG
5	P _{yjhi} -sfGFP- T ₁₇	TAAGTAAGTT CATTGAGAG GGATTCAAG CAAAAATAAT CAATGGCACC CAATAGAAAA TATTGGCGAT GCGCTCGAAC GAATAAAGAA GCTCTAGGCG CAATCCACAC ACTACGATGT TGCAACAACA CGCCATCTAC TTTTATTCT CATTACTAA ATGTGGCTGT TCTGGATTCA TTATTCAAAG TGTGTACAAG ATCACATTTA ATCACATCAT TACGGTTCAG CATGCTGAAC AAAGCATATT TTCCACTATG TAATGCCGAT ACCATTTATT CCATGAGCAA GGAGGAGCCA TTATGGTGAG CAAGGGCGAG GAGCTGTTC A CCGGGTGGT GCCATCCTG GTCGAGCTGG ACGGCGACGT AAACGGCCAC AAGTTCAGCG TGCGCGGCGA GGGCGAGGGC GATGCCACCA ACGGCAAGCT GACCCTGAAG TTCATCTGCA CCACCGCAA GCTGCCGTG CCTGGCCCA CCCTCGTGAC CACCCTGACC TACGGGTGC AGTGCTTCAG CCGTACCCC GACCACATGA AGCGCCACGA CTCTTCAAG TCCGCCATGC CCGAAGGCTA CGTCCAGGAG CGCACCATCA GCTTCAAGGA CGACGGCACC TACAAGACCC GCGCCGAGGT GAAGTTCGAG GGCACACCC TGGTGAACCG CATCGAGCTG AAGGGCATCG ACTTCAAGGA GGACGGCAA ATCTGGGGC ACAAGCTGGA GTACAACCTC AACAGCCACA ACGTCTATAT CACCGCCGAC AAGCAGAAGA ACGGCATCAA GGCCAACCTC AAGATCCGCC ACAACGTGGA GGACGGCAGC GTGCAGCTCG CCGACCACTA CCAGCAGAAC ACCCCATCG GCGACGGCCC CGTGCTGCTG CCCGACAACC ACTACCTGAG CACCCAGTCC GTGCTGAGCA AAGACCCCAA CGAGAAGCGC GATCACATGG TCCTGTGGA GTTGTGACC GCCGCCGGGA TCACTACGG CATGGACGAG CTGTACAAGT CGAGCACCAC CACCACCACC ACTGAGATCC GGCTGCTAAC AAAGCCGAA AGGAAGCTGA GTTGGCTGCT GCCACCCTG AGCAATAACT AGCATAACCC CTTGGGGCCT CTAACGGGT CTTGAGGGGT TTTTGTGTA AAGGAGGAAC TATATCCGGA T

[0054]

6	P _{T7-1ac0} ⁻ mCherry -T ₇	GGAATGTGA	GCGATAACA	ATTCCCCTCT	AGAAATAATT	TTGTTTAACT	TTAAGAAGGA		
		GATATACATG	GCCATCATCA	AGGAGTTCAT	GCGCTTCAAG	GTGCACATGG	AGGGCTCCGT		
		GAACGGCCAC	GAGTTCGAGA	TCGAGGGCGA	GGGCGAGGGC	CGCCCCACG	AGGGCACCCA		
		GACCGCAAAG	CTGAAGGTGA	CCAAGGGTGG	CCCCCTGCC	TTCGCTGGG	ACATCCTGTC		
		CCCTCAGTTC	ATGTACGGCT	CCAAGGCCTA	CGTGAAGCAC	CCC GCCGACA	TCCCGACTA		
		CTTGAAGCTG	TCCTTCCCCG	AGGGCTTCAA	GTGGGAGCGC	GTGATGAAC	TCCAGGACGG		
		CGGCGTGGTG	ACCGTGACCC	AGGACTCCTC	CCTCCAGGAC	GGCGAGTCA	TCTACAAGGT		
		GAAGCTGCGC	GGCACCAACT	TCCCCCGGA	CGGCCCGTA	ATGCAGAAGA	AGACCATGGG		
		CTGGGAGGCC	TCCTCCGAGC	GGATGTACCC	CGAGGACGGC	GCCCTGAAG	GCGAGATCAA		
		GCAGAGGCTG	AAGCTGAAGG	ACGGCGGCCA	CTACGACGCT	GAGGTCAAGA	CCACCTACAA		
		GGCCAAGAAG	CCCGTGCAGC	TGCCCGGCGC	CTACAACGTC	AACATCAAGT	TGGACATCAC		
		CATCCACAAC	GAGGACTACA	CCATCGTGG	ACAGTACGAA	CGCGCCGAG	GCCGCCACTC		
		CCCGGCTGTA	ACAAAGCCCG	AAAGGAAGCT	GAGTTGGCTG	CTGCCACCGC	TGAGCAATAA		
		CTAGCATAAC	CCCTTGGGGC	CTCTAAACGG	GTCTTGAGGG	GTTTTTTGCT	GAAAGGAGGA		
		ACTATATCCG	GAT						
		7	lacI	GTGAAACCAG	TAACGTTATA	CGATGTCGCA	GAGTATGCCG	GTGTCTCTTA	TCAGACCGTT
				TCCCGCGTGG	TGAACCAGGC	CAGCCACGTT	TCTGCGAAAA	CGCGGGAAAA	AGTGAAGCGG
				GCGATGGCGG	AGCTGAATTA	CATTCCCAA	CGGCGTGCGA	CAACAACCTGG	CGGGCAAACA
				GTGCTTGCTG	ATTGGCGTTG	CCACCTCCAG	TCTGGCCCTG	CACGCGCCGT	CGCAAATTGT
				CGCGGCGATT	AAATCTCGCG	CCGATCAACT	GGTGCCAGC	GTGGTGGTGT	CGATGGTAGA
ACGAAGCGGC	GTCGAAGCCT			GTAAGCGGC	GGTGACAAT	CTTCTCGCGC	AACGCGTCAG		
TGGGCTGATC	ATTAACATC			CGCTGGATGA	CCAGGATGCC	ATTGCTGTGG	AAGCTGCCTG		
CACTAATGTT	CCGGCGTTAT			TTCTTGATGT	CTCTGACCAG	ACACCCATCA	ACAGTATTAT		
TTTCTCCCAT	GAAGACGGTA			CGCGACTGGG	CGTGGAGCAT	CTGGTGCAT	TGGGTACCA		
GAAATCGCG	CTGTTAGCGG			GCCCATTAAG	TTCTGTCTCG	GCGCGTCTGC	GTCTGGCTGG		
CTGGCATAAA	TATCTCACTC			GCAATCAAAT	TCAGCCGATA	GCGGAACGGG	AAGGCGACTG		
GAGTGCCATG	TCCGGTTTTT			AACAACCAT	GCAATGCTG	AATGAGGGCA	TCGTTCCAC		
TGCGATGCTG	GTGCGAACG			ATCAGATGGC	GCTGGGCGCA	ATGCGGCCCA	TTACCGAGTC		
CGGGCTGCGC	GTGGGTGCGG			ACATCTCGGT	AGTGGGATAC	GACGATACCG	AAGACAGCTC		
ATGTTATATC	CCGCCGTTAA			CCACCATCAA	ACAGGATTTT	CGCCTGCTGG	GGCAAACCAG		
CGTGGACCGC	TTGCTGCAAC			TCTCTCAGGG	CCAGGCGGTG	AAGGGCAATC	AGCTGTTGCC		
CGTCTCACTG	GTGAAAAGAA			AAACCACCCT	GGCGCCAAT	ACGCAAACCG	CCTCTCCCCG		
CGCGTTGGCC	GATTCATTAA			TGCAGCTGGC	ACGACAGGTT	TCCCGACTGG	AAAGCGGGCA		
GTGAGCGCAA	CGCAATTAAT			GTAAGTTAGC	TCACTCATTA	GGCACCGGGA	TCTCGACCGA		
TGCCCTTGAG	AGCCTTCAAC			CCAGTCAGCT	CCTTCCGGTG	GGCGCGGGGC	ATGACTAACA		
TGAGAATTAC	AACTTATATC	GTATGGGGCT	GACTTCAGGT	GCTACATTTG	AAGAGATAAA				
TTGCACTGAA	ATCTAG								

[0056] 플라스미드의 배양

[0057] 플라스미드 증식 및 유지는 LB 배지 또는 적절한 항생제(50 µg/mL 카나마이신(kanamycin) 또는 100 µg/mL 암피실린(ampicillin))가 보충된 한천 배지에서 성장한 대장균 DH5 α를 사용하여 수행 하였다. 33.7mM Na₂HPO₄, 22.0mM KH₂PO₄, 8.55mM NaCl, 9.35mM NH₄Cl, 1.0mM MgSO₄, 0.5g/L 효모 추출물 및 1.0g/L 펩톤을 함유하는 변형된 M9(MM9) 배지를 실험 전반에 걸쳐 사용 하였다. M9 배지는 시험 조건에서 요구되는대로 선택된 기질을 적절한 농도로 변형시켜 사용 하였다. Real-Time PCR 연구를 위해 10mM의 D-자일로오스(D-xylose), D-글루코오스(D-glucose), D-자일론산(D-xylonic acid) 또는 이들의 조합을 사용하였다. 용량 반응 시험을 위해 0 내지 100mM 범위의 D-자일론산을 사용하여 mCherry 발현을 유도하였고, 최적 반응을 유도하기 위해 20mM D-자일론산을 최적 농도로 사용하였다. 유전자 스위치 실험을 위해, 20mM D-자일론산을 유도제 농도로 사용 하였다.

[0059] 실시간 정량 PCR(Quantitative real-time PCR)

[0060] 야생형 대장균 W3110 균주를 qRT-PCR 분석을 위해 선택 하였다. 배양은 적절한 기질(들)로 5mL MM9를 포함한 50mL 튜브에서 수행하고, 37 °C에서 3시간 동안 배양하였다. MM9 배지에서만 자란 균주를 대조군으로 선택 하였다. 시험 조건은 D-자일로오스(X), D-글루코오스(G), D-자일론산(XA) 또는 이들 기질의 임의의 조합에서 성장하는 균주를 포함한다. 성장 세포의 총 mRNA는 RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germany)을 사용하여 제조사가 제공한 프로토콜을 수정하여 정제하였다. 구체적으로, 배양 시료로부터의 세포를 수거하고 라이소자임(lysozyme)을 함유하는 Tris-EDTA 완충액에 재현탁시켰다. RLT 완충액(키트에 포함됨) 및 에탄올을 첨가하기 전에 혼합물을 실온에서 5분 동안 인큐베이션 시켰다. RNA 정제를 위한 나머지 단계는 제조업체가 제공한 프로토콜(퀵-스타트 프로토콜 RNeasy Mini Kit, 파트 1의 3 단계부터 시작)에 따라 수행하였다. Thermo Scientific(Waltham, MA, USA)의 NanoDrop 1000 분광 광도계와 아가로즈겔 전기 영동을 사용하여 분리된 RNA를 확인하였다. 게놈 DNA를

제거하는 단계를 포함하는 프로토콜에 따라 QuantiTect Reverse Transcription kit(Qiagen, Germany)를 사용하여 RNA를 cDNA로 전환시켰다. qPCR 반응은 QuantiFast® SYBR® Green PCR Kit (Qiagen, Germany)를 사용하여 수행하였다. 각 반응은 1µM의 최종 농도를 갖는 적절한 qPCR 프라이머(표 4)를 포함한다. 참조 유전자 rrsB, mdoG 및 cysG를 사용하여 표적 유전자의 발현 수준을 적절하게 정상화시켰다. qPCR 반응은 Rotor-Gene Q (Qiagen, Germany)를 사용하여 95 °C에서 변성을 40 사이클, 62 °C에서 10 초 동안 어닐링 및 신장(extension)시켰다. qPCR 로우(raw) 데이터는 REST 2009 소프트웨어의 RG 모드를 통해 처리하였다.

표 4

[0062]

서열번호	이름	서열 (5' →3')	타겟 유전자
38	RTyagA-F	GTCGCTTCGGCATTTCAC	yagA
39	RTyagA-R	CAGGTTATGGACGGTGCTG	yagA
40	RTyagE-F	AAGTGTCCGGAAGCGAACC	yagE
41	RTyagE-R	CGATGGTGTCTTTGATGCC	yagE
42	RTyagF-F	GACCTGCGATAAAGGGCT	yagF
43	RTyagF-R	AGGGAGAGTTCGTGGTTGG	yagF
44	RTyagI-F	TCGCCTATTCACGCATCG	yagI
45	RTyagI-R	CTCGTTCTCTTCGCTGTCC	yagI
46	RTyjhU-F	TGAGAATGGTGATGTGCTGG	yjhU
47	RTyjhU-R	TAGCGGATTTGCGATGAGG	yjhU
48	RTyjhG-F	CCTTATTCGCTCTCTGCC	yjhG
49	RTyjhG-R	GCCGTTGTCTCTCCATCC	yjhG
50	RTyjhH-F	CTACTACTGGAAGTCGCACC	yjhH
51	RTyjhH-R	TACGCAAGTGACCAACGC	yjhH
52	RTyjhI-F	GGAAGACACGAGAAGAAGCTG	yjhI
53	RTyjhI-R	TCGCCAGAAAGTGAGATTG	yjhI
54	RTrrsB-F	TACCCGAGAAGAAGCACC	rrsB*
55	RTrrsB-R	CGCATTTCACCGCTACACC	rrsB*
56	RTcysG-F	GCGTTTATTCCACAGTTCACC	cysG*
57	RTcysG-R	GTTACAGAAGATGCGACGAG	cysG*
58	mdoG-F	ATACACCATCACCTTCAGCC	mdoG*
59	mdoG-R	CGTGCTTCAACTATCTCACC	mdoG*

[0064]

형광 분석(fluorescence analysis)

[0065]

세포를 LB 배지에서 밤새 배양하고 각 샘플 1ml를 21206xg에서 2 분간 원심 분리하고 상등액을 버렸다. 펠릿을 500 µl의 M9 최소 배지로 재현탁시킨 다음 이들을 1g^L⁻¹ 펩톤 및 0.5g^L⁻¹ 효모 추출물을 갖는 M9 배지로 옮겨 100 ml 용량 플라스크에 넣었다. 샘플을 37 °C에서 격렬하게 흔들며 주면서 0.3 ~ 0.4 흡광도에 도달할 때까지 배양했다. 당(sugar) 기질을 보충하기 전에 각 배지에서 시료를 채취하였다. 각 샘플에서 수집된 양은 OD600 흡광도에 따라 달라진다. 수집 후, 각 배지에 20 mM의 당 기질, 즉 제1 배지에 대한 포도당, 제2 배지에 대한 자일로오스 및 최종 배지에 대한 자일론산을 보충하였다. 양성 대조군의 경우, 0.1mM의 IPTG를 첨가 하였다. 수집된 샘플을 21206xg에서 2 분간 원심 분리하고 상등액을 버리고 물 1ml를 각 샘플에 첨가 하였다. 세포를 OD600에서의 흡광도에 기초하여 표준화 하였다. 형광 분광계 FluoroMate FS-2 (Scinco, Korea)를 사용하여 세포를 형광 분석 하였다. 형광 분광기는 sfGFP의 경우, 587nm excitation, 610nm emission, mCherry의 경우 485 excitation, 507 emission으로 설정하였다.

[0067]

바이오인포메틱스(bioinformatics) 분석

[0068]

대장균의 yag 및 yjh 오페론에 관련된 효소의 유전자 및 단백질 서열을 Clustal O online databas를 사용하여 분석 하였다(Sievers et al. 2011). Blastp 분석은 UNIPROT의 blast 기능을 사용하여 수행하였고, phylogram은 CLC Sequence Viewer (Qiagen)를 사용하여 생성 하였다. 프로모터 서열은 세균 프로모터(Solovyev and Salamov 2011; Umarov and Solovyev 2017) 및 NNPP(Neural Network Promoter Prediction) (Reese 2001)의 온라인 툴 BPROM 예측을 사용하여 분석 하였다.

[0070]

실시예 1: D-자일론산-반응성 유전자 요소의 스크리닝

- [0071] 실시시간 PCR을 통해 유전자 발현 분석을 수행하여 구조 유전자 및 조절 유전자의 발현 프로파일에 대한 정보를 취득하였다. 트랜스포터-코딩 유전자는 분석에서 제외하였다. 실시시간 PCR은 기질이 없는 MM9 배지(대조군) 및 하나 이상의 기질이 있는 MM9(실시예) 조건 하에서 8 개의 유전자(yagA, yagE, yagF, yagI, yjhG, yjhH, yjhI, yjhU)에 대해 수행하였으며, 그 결과를 도 2 및 도 3에 나타내었다.
- [0072] 도 2는 대장균 W3110에서 yag 및 yjh 유전자의 상대적인 유전자 발현을 확인한 결과로서, 세포가 M9 배지에서만(도 2a) 또는 D-자일로오스가 있는 M9 배지에서(도 2b) 성장한 세포와 비교하여 D-자일론산이 첨가되었을 때 배수변환 값을 측정하였다. 배수변환 값은 비교 CT를 사용하여 계산하였다.
- [0073] 그 결과, 도 2에서 확인할 수 있듯이, 구조 유전자 yjhG와 yjhH는 대조군에 비해 D-자일론산으로 처리했을 때 발현이 2배 이상 증가했으며(도 2a), D-자일로오스에서 성장한 균주와 비교했을 때도 동일하게 나타났다(도 2b).
- [0074] 또한, 도 3은 D-자일론산, D-자일로오스, D-글루코오스(도 3a 및 도 3c) 또는 조합(도 3b 및 도 3d)으로 보충된 대장균 W3110의 yag(도 3a 및 도 3b) 및 yjh(도 3c 및 도 3d) 유전자의 정량적 PCR 분석 결과로서, 개질된 M9 배지(1g/L 펩톤 및 0.5g/L 효모 추출물을 갖는 M9 염) 상에서 성장한 균주를 대조군으로 사용하였다. 도 3에서 D-자일로오스, D-자일론산 및 D-글루코오스는 각각 X, XA 및 G로 표시하였다. 양측 T-검사 통계 분석은 대조군과 비교하여 유의한 차이가 있는 값을 *로 표기 하였다($p < 0.05$, $n \geq 3$).
- [0075] 그 결과, 도 3에서 확인할 수 있듯이, 정량적으로 yjh 오페론과 yagE 및 yagF 유전자의 유전자는 D-자일론산에 노출되었을 때만 발현 수준이 증가하는데 반해 D-자일로오스 또는 D-글루코오스로 처리했을 때 mRNA 수준에 유의한 차이는 관찰되지 않았다(도 3a 내지 도 3d 참조).
- [0076] 상기 RT-PCR 결과를 통해 구조 유전자 yagE, yagF, yjhH 및 yjhG 및 조절 유전자 yjhI가 D-자일론산에 노출될 때 발현 수준이 증가한다는 것을 확인하였다. 또한, 표 3 및 도 1b에서 확인할 수 있듯이 yagE 및 yagF 유전자는 공통 프로모터로서 P_{yagE} 를 가지고, yjhH, yjhG 및 yjhI는 공통 프로모터로서 P_{yjhI} 를 갖는 것을 확인할 수 있다.
- [0077] 따라서, 이러한 공통 프로모터(유전 요소)가 D-자일론산에 대한 반응을 이끌어 낼 수 있는지를 확인하기 위해 도 4와 같이 리포터 유전자 mCherry를 상류에 클로닝하여 적색 형광으로 표시하였다. 그 다음 상기 제작한 플라스미드를 숙주 E.coli W3110에 도입하고 D-자일로오스, D-글루코오스 및 D-자일론산의 3 가지 상이한 당류로 처리 하였으며, 그 결과를 도 5에 나타내었다.
- [0078] 도 5는 D-자일론산(도 5a), D-자일로오스(도 5b) 및 D-글루코오스(도 5c)에 대한 프로모터 반응을 보여주는 결과이다. OD600이 0.4 흡광도 단위에 도달 할 때 20mM의 유도 분자(또는 당 기질)를 배양물에 첨가 하였다.
- [0079] 그 결과, 도 5에서 확인할 수 있듯이, P_{yagE} 는 D-자일로오스, D-글루코오스 및 D-자일론산을 처리하였을 때, mCherry에 대한 높은 발현 수준을 나타내었다. 이에 반해, P_{yjhI} 에서 D-자일론산 처리는 IPTG 유도성 T7 프로모터를 사용하는 대조군주와 유사하게 mCherry 생산을 증가시켰다. 반면에 D-자일로오스 및 D-글루코오스에 노출될 때 어떠한 반응도 보이지 않았다. 이러한 결과는, P_{yjhI} 는 기저 발현이 낮고 D-자일론산에 대한 반응이 우수하다고 할 수 있다. 이러한 결과를 토대로 다음과 같은 특성 분석을 추가적으로 진행하였다.
- [0081] **실시예 2: 프로모터 요소의 특성 분석**
- [0082] P_{yjhI} 의 DNA 서열의 부분 특성 분석은 BPROM과 NNPP 온라인 데이터베이스를 사용하여 수행하였다(도 6, 도 7). 도 6은 박테리아 프로모터를 예측하기 위하여 BPROM를 이용하여 프로모터를 분석한 결과이고, 도 7은 NNPP를 이용하여 프로모터를 분석한 결과이다.
- [0083] 그 결과, 도 6 및 도 7에서 확인할 수 있듯이, BPROM 분석을 통해 RNA 중합 효소 및 전사 시작 부위의 결합에 5 개의 가능한 필수 사이트(site)를 확인하였으며(컷오프는 0.80으로 설정 됨)(도 6), NNPP를 통한 두 번째 분석을 통해 BPROM에 의해 예측된 한 사이트와 일치하는 -10 및 -35에 대한 하나의 가능한 사이트(site)를 확인하였다(도 7).
- [0084] 또한, 생물 정보학 연구 및 데이터베이스에 기초하여 2 개의 crp 결합 부위를 예측하였다(도 8a). 도 8을 참조하면, 도 8a는 생물 정보학 연구 및 데이터베이스에 기초하여 P_{yjhI} 의 필수 부분을 표시한 것이고, 도 8b는 P_{yjhI} 의 염기를 다르게 줄인 형태에서 mCherry발현을 확인한 것이다. T7 프로모터의 조절하에 mCherry를 양성 대조군

(T7 + IPTG)으로 사용하였다. 전체 및 전체(+XA)는 mCherry의 P_{yjh1} 업스트림의 전체 길이를 나타낸다. 도 8b에서 (+XA)는 20 mM D-자일론산에 의해 유도되었음을 보여준다. P_{yjh1} 의 염기를 다르게 줄인 형태(Δ 기호 및 제거된 염기의 수)의 제어하에 mCherry를 발현은 20mM D-자일론산에 의해 유도되었음을 보여준다. 도 8c는 D-자일론산에 대한 P_{yjh1} 의 용량 반응 결과로서, 샘플은 24 시간의 배양 후 채취 하였다.

[0085] 구체적으로, 생물 정보학 분석 예측(도 8a)에 기초하여, 염기가 줄어든 형태의 프로모터 서열을 mCherry ORF의 상류에 위치시켰다. 약 50 bp를 단계적으로 제거하고 D-자일론산에 의해 유도되는 mCherry 생산을 모니터링 하였다(도 8b). 그 결과, 200bp의 염기서열이 프로모터 서열로부터 제거되었을 때, 형광이 매우 감소되는 것을 확인하였다. 이 절단된 버전의 프로모터는 예측된 -10 및 -35 서열을 효과적으로 제거함으로써, 이 영역이 필수적이고 RNA 폴리머라아제의 잠재적 결합 부위임을 나타낸다. 또한, P_{yjh1} 의 전체 302bp 염기 서열을 사용하여 D-자일론산 염의 농도가 증가함에 따른 용량 반응을 시험한 결과(도 8c), D-자일론산 염 농도가 낮은 농도(0 내지 20 mM) 일 때 형광 증가 정도가 급격히 증가하는 것을 확인하였다. 반면에 30 mM 이상의 농도에서 형광의 증가 정도는 낮았다. 이는 P_{yjh1} 가 D-자일론산에 민감하므로 D-자일론산 염의 농도가 낮을 때에도 양호한 검출 반응을 보일 수 있음을 시사한다.

[0087] **실시예 3: 새로운 D-자일론산 반응성 합성 유전 회로 설계**

[0088] 프로모터 유전 요소로서 P_{yjh1} 를 사용하여 D-자일론산-반응성 유전자 회로를 도 9a와 같이 설계하였다. 구체적으로, 적색 형광 단백질인 mCherry는 $P_{T7-lac0}$ (숙주 균주는 LacI 유전자가 결핍되어 있음) 하류(downstream)에서 구성적으로 발현되는 반면에 sfGFP 및 *lacI*는 P_{yjh1} 하류(downstream)에 위치한다. D-자일론산이 없으면 sfGFP와 *lacI*가 억제되는 동안 mCherry가 지속적으로 발현된다. 일단 D-자일론산이 도입되면, *lacI* 및 sfGFP가 생성되어 녹색 형광을 생성한다. LacI 단백질은 mCherry 단백질의 생성을 멈추고 적색 형광을 감소시키는 lacO에 결합한다. 상기 합성 회로의 유전 요소는 pRSET-A 벡터에서 만들어져 플라스미드 pRSET-XAS를 만든다(도 4). 그 다음, 상기 플라스미드 pRSET-XAS를 표적 숙주에 도입하고, 두 개의 다른 조건의 배지에 배양한다; (1)성장을 지지하기 위한 글루코오스를 포함하는 MM9 배지(도 9b) 및 (2)성장을 지지하는 글루코스 및 sfGFP 발현을 유도할 D-자일론산을 포함하는 MM9 배지(도 9c). 그 결과, D-자일론산 염을 첨가하기 전에 적색 형광이 두 조건에서 모두 관련되었다. 12 시간 후, 도 9c와 같은 조건에서는 증가된 녹색 형광이 관찰되었고 적색 형광은 현저하게 감소했다. 반면 sfGFP는 증가하지 않았지만 적색 형광은 도 9b와 같은 조건에서 더 증가했다. 이것은 D-자일론산의 존재에 대한 합성 유전자 회로가 잘 작동함을 시사한다.

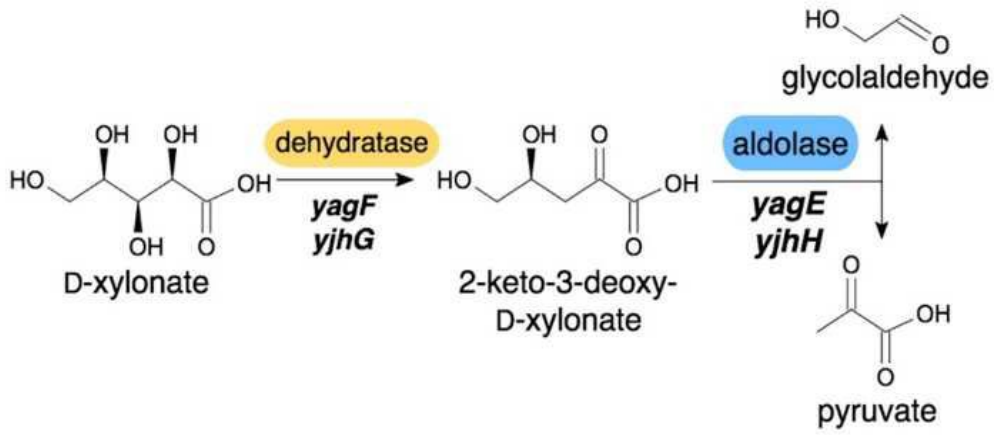
[0090] **실시예 4: 자일로오스 산화 경로의 조절을 위한 합성 회로의 응용**

[0091] 프로모터 P_{yjh1} 를 재조합 박테리아에서 자일로오스 산화 경로의 자율적 조절에 통합시킨다(도 10). 경로의 첫 번째 효소인 자일로오스 탈수소효소(xylose dehydrogenase; xdh)는 LacI가 억제 할 수 있는 프로모터인 $P_{T7-lac0}$ 의 하류(downstream)에 위치시킨다. xdh는 D-자일로오스에서 D-자일론산을 생산하며, 축적된 D-자일론산 염의 특정 농도에서 LacI가 발현되어 Xdh 생산을 효과적으로 억제함으로써 D-자일론산 축적을 일시적으로 중단시킴과 동시에 D-자일론산을 이용하는 하류(downstream) 유전자가 활성화된다.

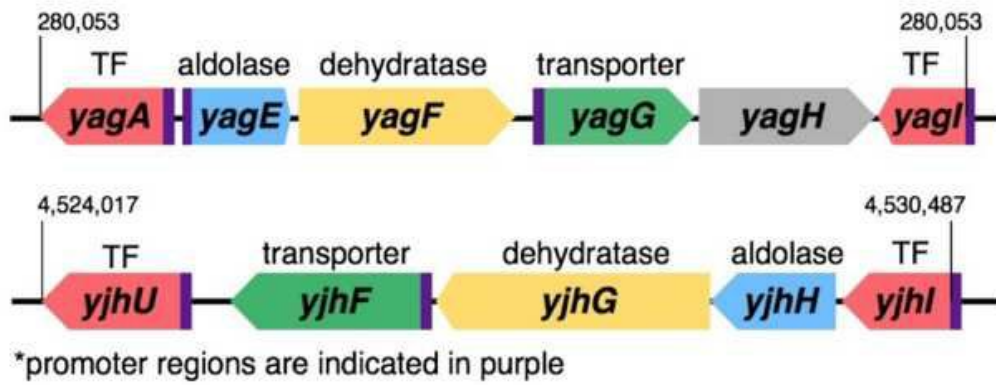
[0092] P_{yjh1} 를 적용한 또다른 응용은 호스트 재조합 균주가 D-자일로오스에서 성장하도록 하는 구성적 발현하에 모든 XOP 유전자를 놓는 것이다. 축적된 D-자일론산 염의 특정 농도에서 LacI의 활성화는 전체 XOP를 억제하고 에틸렌글리콜, 글리콜산, 1,2,4-부탄트리올 또는 1,4-부탄디올과 같은 표적 화합물의 생산으로 전환을 활성화시킬 수 있다.

도면

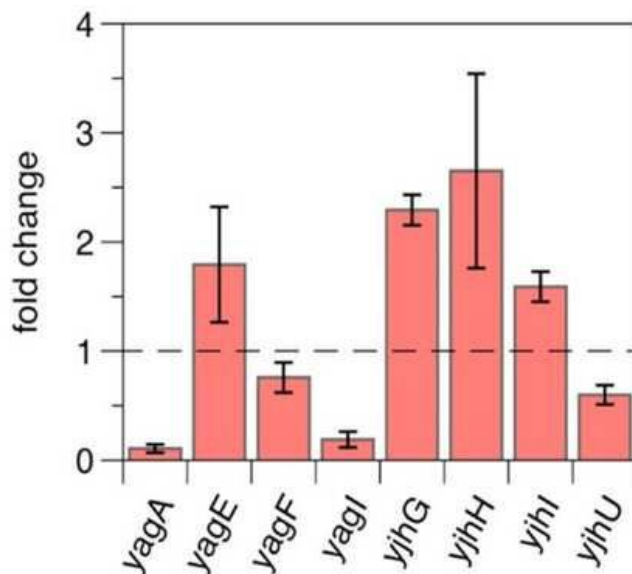
도면1a



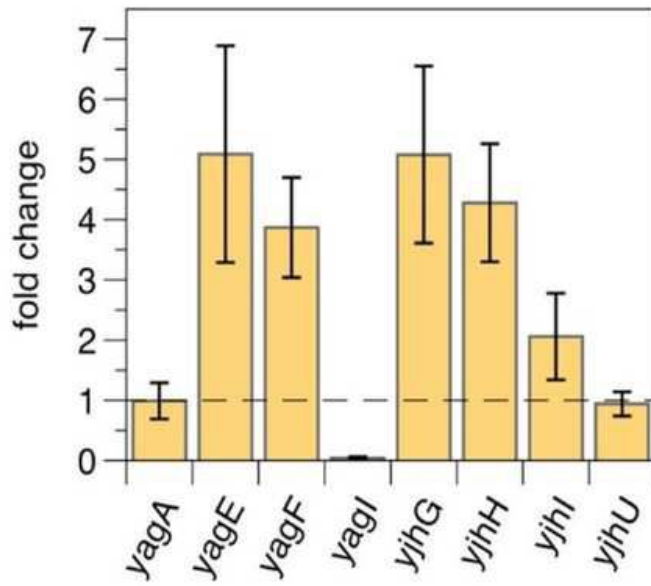
도면1b



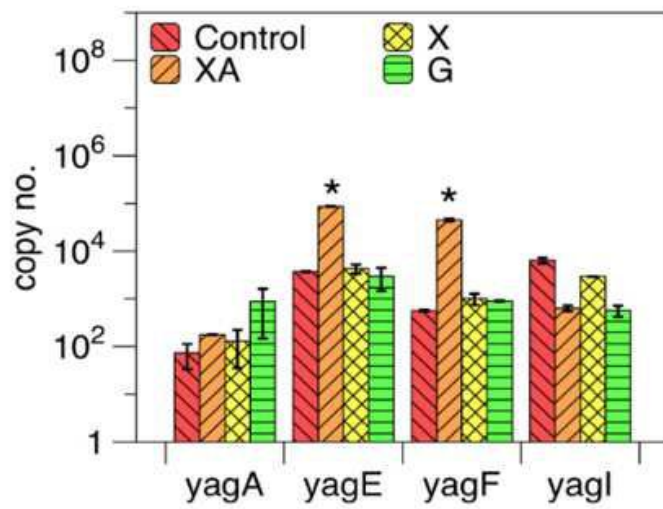
도면2a



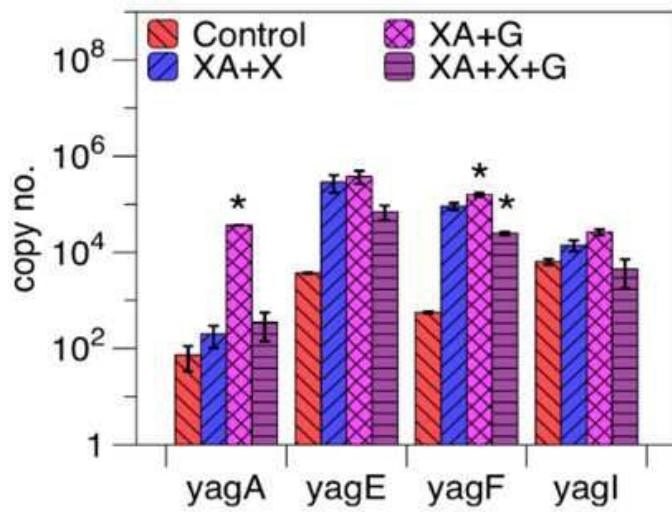
도면2b



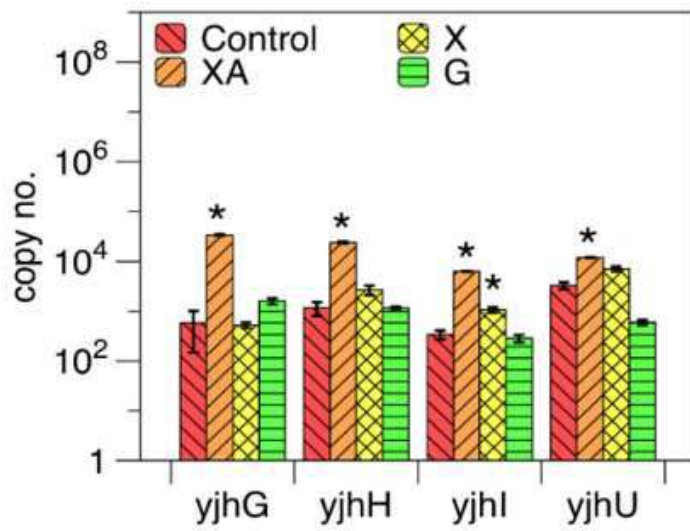
도면3a



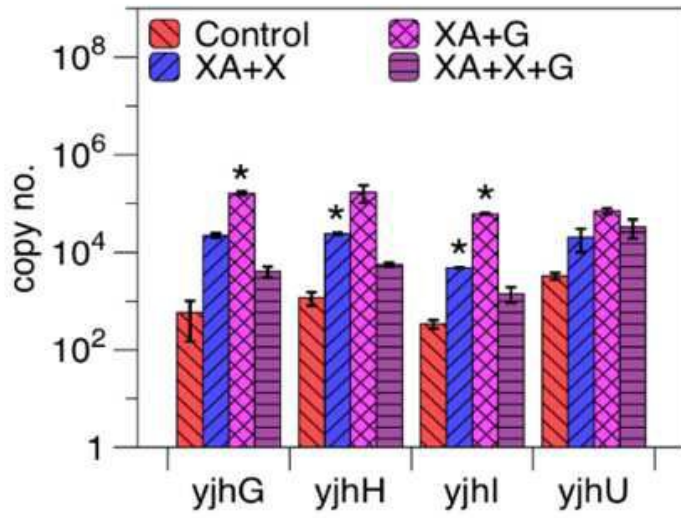
도면3b



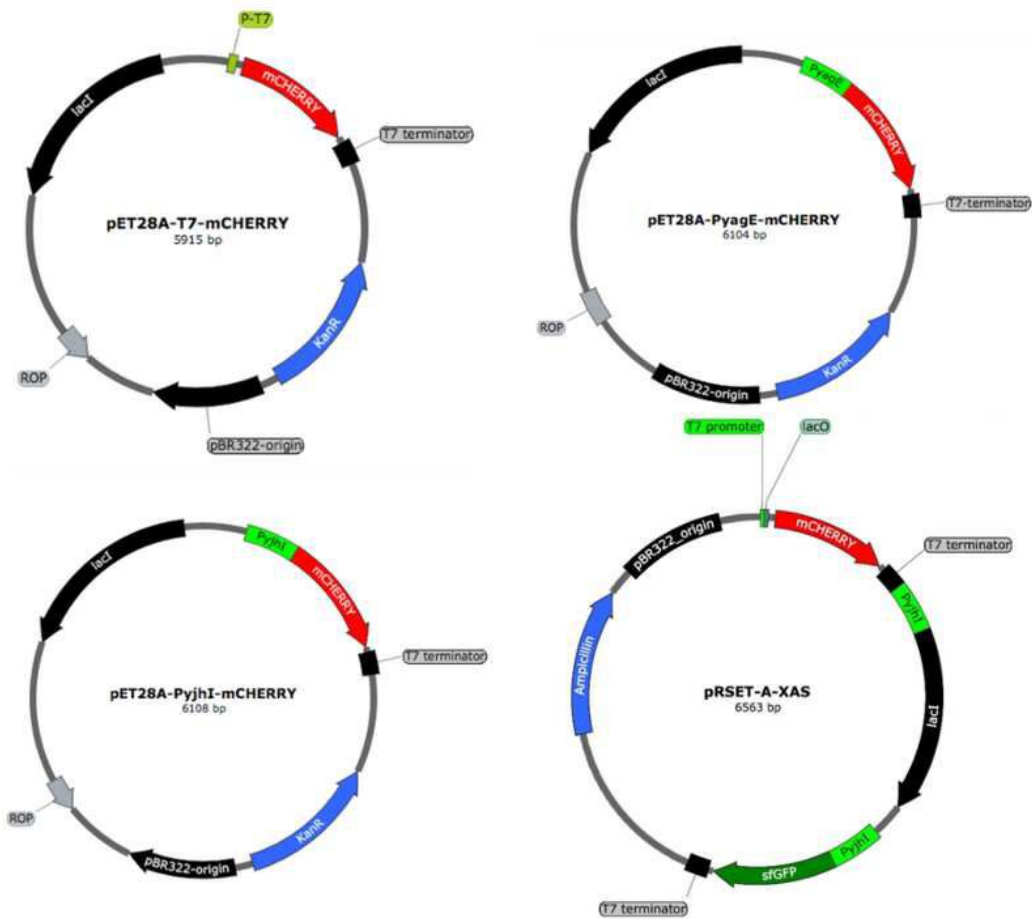
도면3c



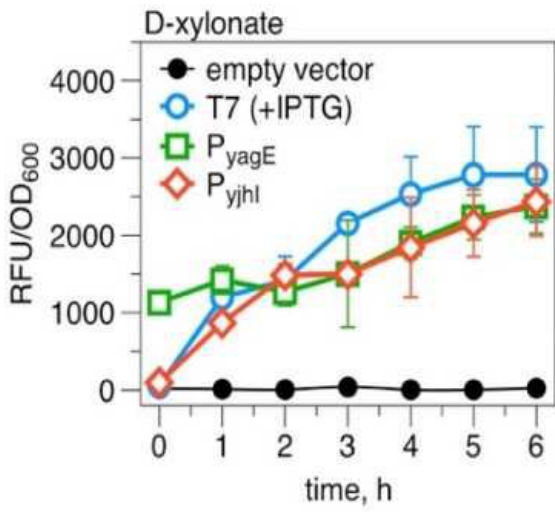
도면3d



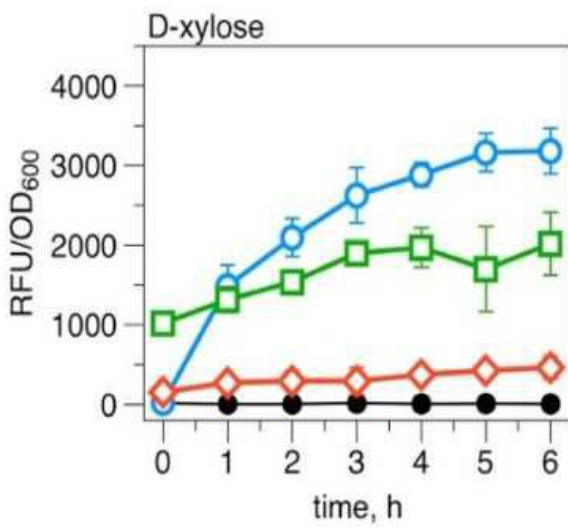
도면4



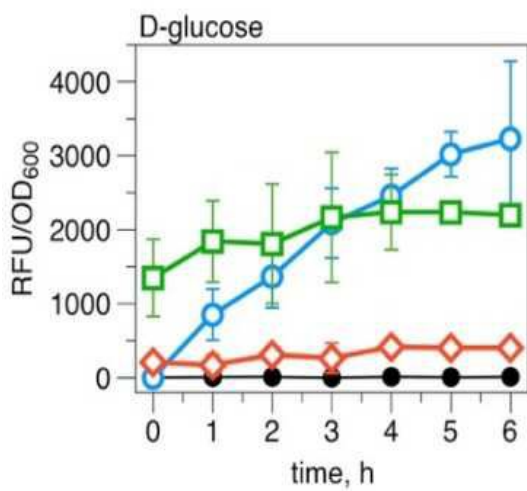
도면5a



도면5b



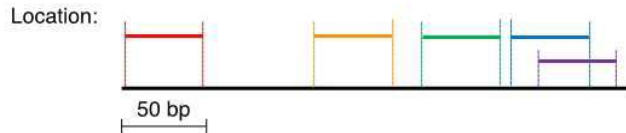
도면5c



도면6

Promoter predictions for P_{yjhI}

Start	End	Score	Promoter Sequence (5'→3')
6	51	0.86	AAGTTCATTTCGAGAGGGATTTC AAGCAAAAATAATCAATG G CACCCAATA
114	159	0.92	ACGATGTTGCAACAACACGCCATCTACTTTT TATTCTCAT T CACTAAATG
178	223	0.97	TCATTATTCAAAGTGTGTACAAGATCACATTTAATCACAT C ATTACGGTT
230	275	0.81	GCATGCTGAACAAAGCATATTTTCCACTATGTAATGCCGA T ACCATTTAT
246	291	0.87	ATATTTTCCACTATGTAATGCCGATACCATTTATTCCATG A GCAAGGAGG



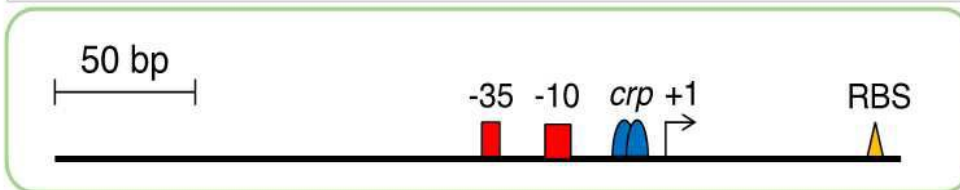
도면7

```

Length of sequence - 302
Threshold for promoters - 0.20
Number of predicted promoters - 1

Promoter Position: 191 (LDF - 4.39)
-10 box at pos. 176 ATTCATTAT Score 41
-35 box at pos. 153 TTCACT Score 41

Oligonucleotides from known TF binding sites:
For promoter at pos. 191:
    crp: AGATCACA at position 199 Score - 14
    crp: TCACATTT at position 202 Score - 12
    
```



도면8a

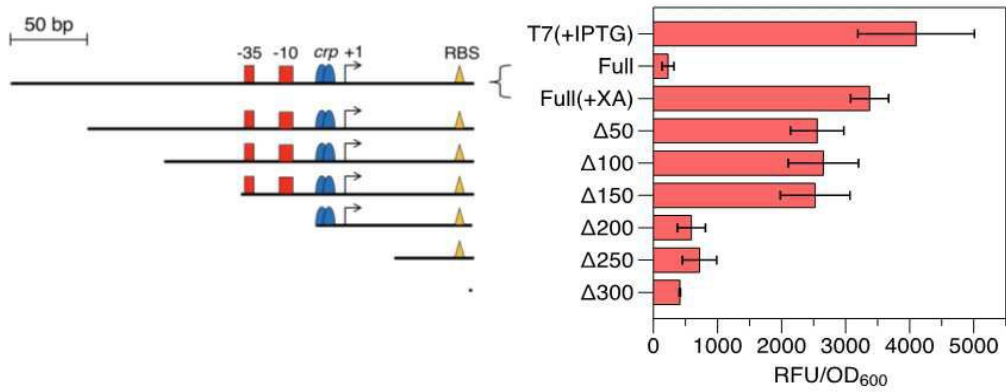
```

                -35                -10
145 TATTCTCA TT CACT AAATGT GGCTGTTCTG CATTCATTAT 184

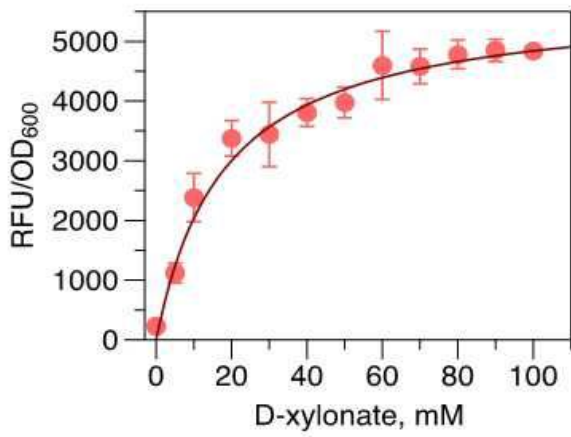
                Crp binding site                +1
185 TCAAAGTGTG TACA AGATCA CATT AATCA CAT CATTACG 224

                RBS
275 TTTATTCCAT GAGCA AGGAG GAGCCATT 302
    
```

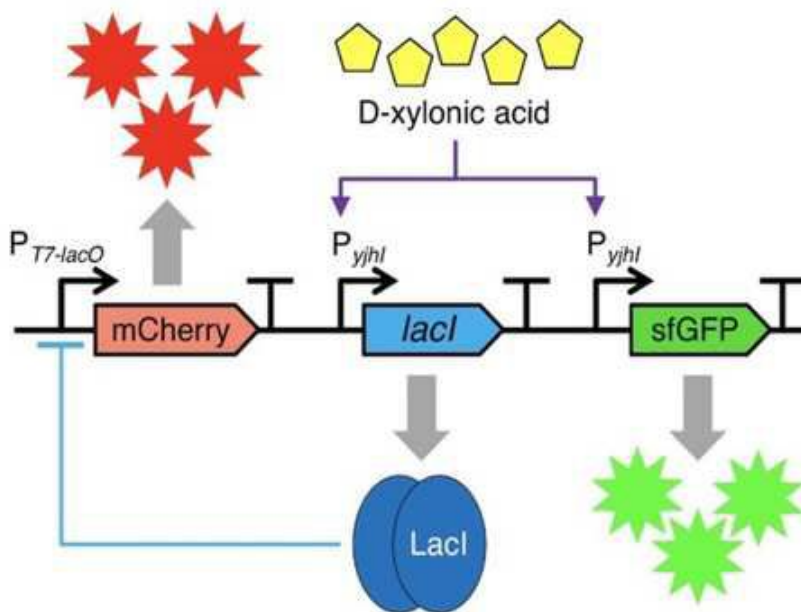
도면8b



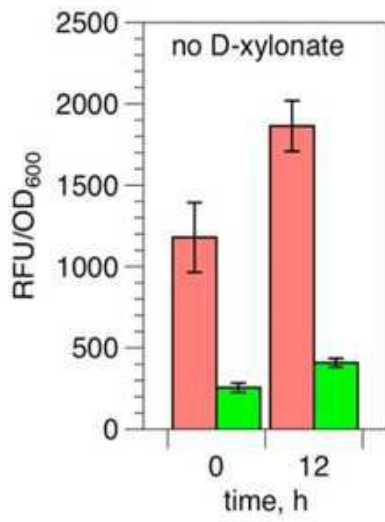
도면8c



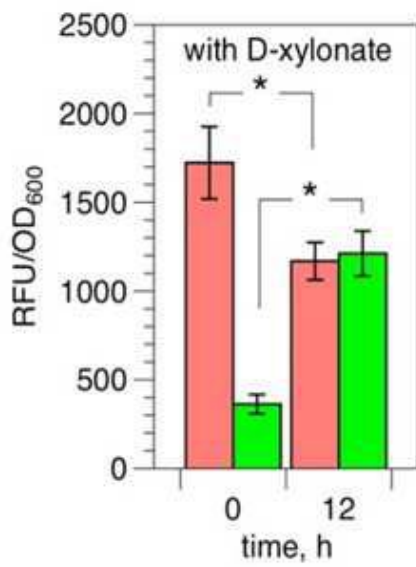
도면9a



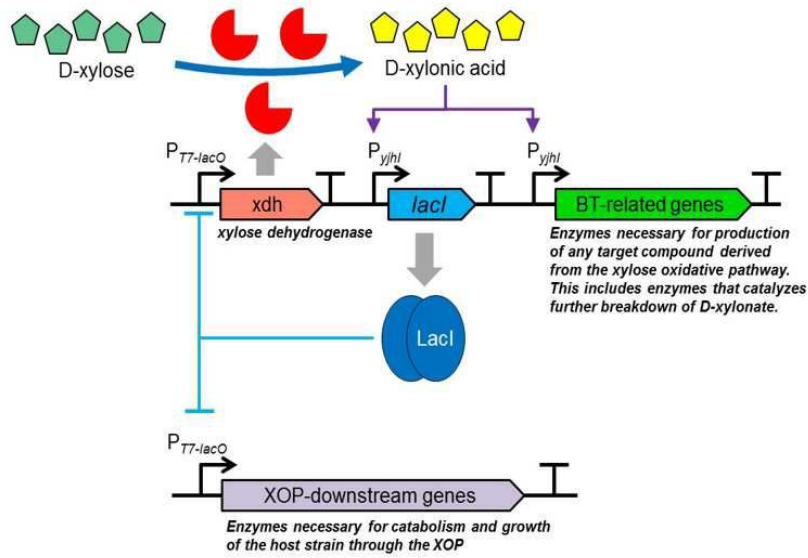
도면9b



도면9c



도면10



서열목록

- <110> MYONGJI UNIVERSITY INDUSTRY AND ACADEMIA COOPERATION FOUNDATION
 - <120> D-XYLONATE-RESPONSIVE PROMOTER, ARTIFICIAL GENETIC CIRCUITS
COMPRISING D-XYLONATE-RESPONSIVE PROMOTER AND METHOD FOR
DETECTION OF D-XYLONATE USING ARTIFICIAL GENETIC CIRCUIT
 - <130> P19-0013/MJU
 - <150> KR 2018/0169381
 - <151> 2018-12-26
 - <160> 59
 - <170> KoPatentIn 3.0
 - <210> 1
 - <211> 302
 - <212> DNA
 - <213> Artificial Sequence
 - <220><223> Nucleotide sequence of Promoter yjhl

 - <400> 1
- | | |
|---|-----|
| taagtaagtt cattcgagag ggatttcaag caaaaataat caatggcacc caatagaaaa | 60 |
| tattggcgat gcgctcgaac gaataaagaa gctctaggcg caatccacac actacgatgt | 120 |
| tgcaacaaca cgccatctac tttttattct cattcactaa atgtggctgt tctggattca | 180 |
| ttattcaaag tgtgtacaag atcacattta atcacatcat tacggttcag catgctgaac | 240 |

aaagcatatt ttccactatg taatgccgat accatttatt ccatgagcaa ggaggagcca 300
 tt 302
 <210> 2
 <211> 294
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Nucleotide sequence of Promoter yagE
 <400> 2
 aaacgggttc ttatgcctta gttgtaagtg tctaccatgt ccccgaacaa gtgttcacta 60
 tgtccccgga ccgtacaccc caaaggggag aggggactgc accgagccat cttttcccc 120
 tcgccctttt ggggagaggg ccggggtgag gggcaatag tgatccagct taaatttccc 180
 gcactccctc ttccttccg atttacctct ccttgttctg cgtcatagta tgatcgtaa 240
 ataaacgaac gctgttctat aatgtagaac aaaatgattc agcaaggaga tctc 294
 <210> 3
 <211> 681
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Nucleotide sequence of reporter gene mCherry
 <400> 3
 atggccatca tcaaggagtt catgcgcttc aaggtgcaca tggagggctc cgtgaacggc 60
 cacgagttcg agatcgaggg cgagggcgag ggccgcccct acgagggcac ccagaccgcc 120
 aagctgaagg tgaccaaggg tggccccctg cccttcgcct gggacatcct gtccccctcag 180
 ttcatgtacg gtcccaaggg ctacgtgaag caccccccg acatccccga ctacttgaag 240
 ctgtccttcc ccgagggctt caagtgggag cgcgtgatga acttcgagga cggcggcgtg 300
 gtgaccgtga cccaggactc ctccctccag gacggcgagt tcatctacaa ggtgaagctg 360
 cgcggcacca acttcccctc cgacggcccc gtaatgcaga agaagacat gggtgggag 420
 gcctcctccg agcggatgta ccccgaggac ggcgcctga agggcgagat caagcagagg 480
 ctgaagctga aggacggcgg ccactacgac gctgaggtca agaccaccta caaggccaag 540
 aagcccgtgc agctgcccgg cgcctacaac gtcaacatca agttggacat cacctcccac 600
 aacgaggact acaccatcgt ggaacagtac gaacgcgccg agggccgcca ctccaccggc 660
 ggcatggacg agctgtacaa g 681

<210> 4
 <211> 717
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Nucleotide sequence of reporter gene sfGFP
 <400> 4

```

atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac      60
ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg cgcggcgagg gcgagggcga tgccaccaac      120
ggcaagctga cctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc      180
ctcgtgacca cctgacctc cggcgtgcag tgcttcagcc gctaccccga ccacatgaag      240
cgccacgact tcttcaagtc cgccatgcc gaaggctacg tccaggagcg caccatcagc      300

ttcaaggacg acggcaccta caagaccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg      360
gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac      420
aagctggagt acaacttcaa cagccacaac gtctatatca ccgccgacaa gcagaagaac      480
ggcatcaagg ccaacttcaa gatccgccac aacgtggagg acggcagcgt gcagctcgcc      540
gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac      600
tacctgagca cccagtcggt gctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcga tcacatggtc      660
ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actcacggca tggacgagct gtacaag      717
    
```

<210> 5
 <211> 1181
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Nucleotide sequence of promoter yjH1, reporter gene sfGFP and TT7
 <400> 5

```

taagtaagtt cattcgagag ggatttcaag caaaaataat caatggcacc caatagaaaa      60
tattggcgat gcgctcgaac gaataaagaa gctctaggcg caatccacac actacgatgt      120
tgcaacaaca cgccatctac tttttattct cattcactaa atgtggctgt tctggattca      180
ttattcaaag tgtgtacaag atcacattta atcacatcat tacggttcag catgctgaac      240
aaagcatatt ttccactatg taatgccgat accatttatt ccatgagcaa ggaggagcca      300

ttatggtgag caagggcgag gagctgttca ccggggtggt gcccatcctg gtcgagctgg      360
acggcgacgt aaacggccac aagttcagcg tgcgcggcga gggcgagggc gatgccacca      420
acggcaagct gaccctgaag ttcatctgca ccaccgcaa gctgcccctg ccttgccca      480
    
```

ccctcgtgac caccctgacc tacggcgtgc agtgcctcag ccgctacccc gaccacatga 540
 agcgccacga cttcttcaag tccgccatgc ccgaaggcta cgtccaggag cgcacatca 600
 gcttcaagga cgacggcacc tacaagacc gcgccgaggt gaagttcgag ggcgacacc 660
 tggtaaccg catcgagctg aaggcatcg acttcaagga ggacggcaac atcctggggc 720

acaagctgga gtacaacttc aacagccaca acgtctatat caccgccgac aagcagaaga 780
 acggcatcaa ggccaacttc aagatccgcc acaacgtgga ggacggcagc gtgcagctcg 840
 ccgaccacta ccagcagaac accccatcg gcgacggccc cgtgctgctg cccgacaacc 900
 actacctgag caccagtcc gtgctgagca aagaccccaa cgagaagcgc gatcacatgg 960
 tctgctgga gticgtgacc gccgccggga tcaactcacgg catggacgag ctgtacaagt 1020
 cgagcaccac caccaccacc actgagatcc ggctgctaac aaagcccga aggaagctga 1080
 gttggtgct gccaccgctg agcaataact agcataaccc cttggggcct ctaaacgggt 1140

cttgaggggt ttttgctga aaggaggaac tatatccgga t 1181

<210> 6

<211> 913

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleotide sequence of promoter T7-lacOI, reporter gene mCherry
 and TT7

<400> 6

ggaattgtga gcggataaca attcccctct agaataaatt ttgtttaact ttaagaagga 60
 gatatacatg gccatcatca aggagtcat gcgcttcaag gtgcacatgg agggctccgt 120
 gaacggccac gatttcgaga tcgagggcga gggcgagggc cgcccctacg agggcaccca 180
 gaccgccaag ctgaaggatga ccaaggggtg ccccctgccc ttcgcctggg acatcctgtc 240

ccctcagttc atgtacggt ccaaggccta cgtgaagcac cccgccgaca tccccgacta 300
 ctggaagctg tcttccccg agggcttcaa gtgggagcgc gtgatgaact tcgaggacgg 360
 cggcgtggtg accgtgacc aggactctc cctccaggac ggcgagttca tctacaaggt 420
 gaagctgcgc ggcaccaact tcccctccga cgccccgta atgcagaaga agaccatggg 480
 ctgggaggcc tctccgagc ggatgtacc cgaggacggc gccctgaagg gcgagatcaa 540
 gcagaggctg aagctgaagg acggcggcca ctacgacgt gaggtcaaga ccacctaaa 600
 ggccaagaag cccgtgcagc tgccccggcg ctacaacgtc aacatcaagt tggacatcac 660

ctcccacaac gaggactaca ccatcgtgga acagtacgaa cgcgccgagg gccgccactc 720

caccggcggc atggacgagc tgtacaagta gtcgagcacc accaccacca cactgagat 780
 cgggtgcta acaaagcccg aaaggaagct gagttgctg ctgccaccgc tgagcaataa 840
 ctagcataac cccttggggc ctctaaacgg gtcttgaggg gtttttctgct gaaaggagga 900
 actatatccg gat 913

<210> 7

<211> 1275

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleotide sequence of lacI

<400> 7

gtgaaaccag taacgttata cgatgtcgca gagtatgccg gtgtctctta tcagaccgtt 60
 tcccgcgtgg tgaaccaggc cagccacgtt tctgcgaaaa cgcgggaaaa agtggaagcg 120
 gcgatggcgg agctgaatta cattccaac cgcgtggcac aacaactggc gggcaaacag 180
 tcgttgctga ttggcgttgc cacctccagt ctggccctgc acgcgccgtc gcaaattgtc 240
 gcggcgatta aatctcgcgc cgatcaactg ggtgccagcg tgggggtgtc gatggtagaa 300
 cgaagcggcg tcgaagcctg taaagcggcg gtgcacaatc ttctcgcga acgcgtcagt 360
 gggctgatca ttaactatcc gctggatgac caggatgcca ttgctgtgga agctgcctgc 420

actaatgttc cggcgttatt tcttgatgtc tctgaccaga cacccatcaa cagtattatt 480
 ttctcccatg aagacggtac gcgactgggc gtggagcadc tggtcgcatt gggtcaccag 540
 caaatcgcgc tgitagcggg cccattaagt tctgtctcgg cgcgtctcgc tctggctggc 600
 tggcataaat atctcactcg caatcaaat cagccgatag cggaacggga aggcgactgg 660
 agtgccatgt ccggttttca acaaaccatg caaatgctga atgagggcat cgttcccact 720
 gcgatgctgg ttgccaacga tcagatggcg ctgggcgcaa tgcgcgccat taccgagtcc 780
 gggctgcgcg ttggtgcgga catctcgta gtgggatagc acgataccga agacagctca 840

tgttatatec cgccgttaac cacccatcaa caggattttc gcctgctggg gcaaaccagc 900
 gtggaccgct tgctgcaact ctctcagggc caggcgggtga agggcaatca gctgttgccc 960
 gtctcactgg tgaagagaaa aaccacctg gcgccaata cgaaaccgc ctctccccgc 1020
 gcgttggcgg attcattaat gcagctggca cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag 1080
 tgagcgaac gcaattaatg taagttagct cactcattag gcaccgggat ctgaccgat 1140
 gcccttgaga gccttcaacc cagtcagctc ctccgggtgg gcgcggggca tgactaacat 1200
 gagaattaca acttatatcg tatgggctg acttcaggtg ctacatttga agagataaat 1260

tgcactgaaa tctag 1275
 <210> 8
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> T7MC(forward primer)
 <400> 8
 ctttaagaag gagatataca tggccatcat caaggagttc 40
 <210> 9
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> T7MC(reverse primer)
 <400> 9
 cagtgggtgt ggtgggtgtg cctacttgta cagctcgtcc atg 43
 <210> 10
 <211> 44
 <212>
 > DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PyagEMC1(forward primer)
 <400> 10
 cgtccggcgt agaggatcga aaacgggttc ttatgcctta gttg 44
 <210> 11
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PyagEMC1(reverse primer)
 <400> 11
 tgatggccat gagatctcct tgctgaatca ttttgttc 38
 <210> 12
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PyagEMC2(forward primer)

<400> 12

aggagatctc atggccatca tcaaggagt c 31

<210> 13

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PyagEMC2(reverse primer)

<400> 13

agtgggtggtg gtgggtggtgc ctacttgtac agctcgtcca tg 42

<210> 14

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PyjhIMC1(forward primer)

<400> 14

gtcctggcgt agaggatcga taagtaagtt cattcgagag ggatttcaag 50

<210> 15

<211>

> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PyjhIMC1(reverse primer)

<400> 15

tgatggccat aatggctcct ccttgctcat g 31

<210> 16

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PyjhIMC2(forward primer)

<400> 16

aggagccatt atggccatca tcaaggagt c 31

<210> 17

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> PyjhIMC2(reverse primer)

<400> 17
 agtgggtggg ggtgggtgc ctactgtac agctcgtcca tg 42
 <210> 18
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> T7SF(forward primer)
 <400> 18
 actttaagaa ggagatatac atgggtgagca agggcgagga g 41
 <210> 19
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> T7SF(reverse primer)
 <400> 19
 agtgggtggg ggtgggtgc cttgtacagc tcgtccatgc c 41
 <210> 20

 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PyagESF1(forward primer)
 <400> 20
 cgtccggcgt agaggatcga aaacgggttc ttatgcctta gttg 44
 <210> 21
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PyagESF1(reverse primer)
 <400> 21
 tgctcaccaat gagatctcct tgctgaatca ttttgttc 38
 <210> 22

<211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PyagESF2(forward primer)

 <400> 22
 aggagatctc atggtgagca agggcgagga g 31
 <210> 23
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PyagESF2(reverse primer)
 <400> 23
 agtgggtggtg gtgggtggtgc cttgtacagc tgcgccatgc c 41
 <210> 24
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PyjhISF1(forward primer)
 <400> 24
 gtccggcgta gaggatcgat aagtaagttc attcgagagg gatttcaag 49
 <210>
 > 25
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PyjhISF1(reverse primer)
 <400> 25
 tgctcacat aatggctcct cttgctcat g 31
 <210> 26
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PyjhISF2(forward primer)
 <400> 26

aggagccatt atggtgagca agggcgagga g	31
<210> 27	
<211> 41	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PyjhISF2(reverse primer)	
<400> 27	
agtgggtgtg gtgggtgtgc cttgtacagc tcgtccatgc c	41
<210> 28	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> pRSETXAS(forward primer)	
<400> 28	
ccctatagtg agtcgtatta atttcgctgg atcgagatcc	40
<210> 29	
<211> 67	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> pRSETXAS(reverse primer)	
<400> 29	
agaccacaac ggtttccctc tagaaataat tttgtttaac ttaagaagg agatatacat	60
atgcggg	67
<210> 30	
<211> 63	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> lac0-mCherry-T7T(forward primer)	
<400> 30	
taatacgact cactataggg ggaattgtga gcggataaca attcccctct agaaataatt	60
ttg	63
<210> 31	
<211> 51	

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> lacO-mCherry-T7T(reverse primer)
 <400> 31
 gaaccggttt atccgatgat agttcctcct ttcagcaaaa aaccctcaa g 51
 <210>
 > 32
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> XAS yjhIp(forward primer)
 <400> 32
 atatccggat aaacgggttc ttatgcctta gttgtaagtg tctaccatgt c 51
 <210> 33
 <211> 53
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> XAS yjhIp(reverse primer)
 <400> 33
 ctggtttcac gagatctcct tgctgaatca tttgttcta cattatagaa cag 53
 <210> 34
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> lacI(forward primer)
 <400> 34
 aggagatctc gtgaaaccag taacgttata cgatgtcgca gagtatgccg 50
 <210> 35
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> lacI(reverse primer)
 <400> 35
 aacttactta ctagatttca gtgcaattta tctcttcaaa tgtagcacct gaag 54

<210> 36
 <211> 56
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> yjhIp-sfGFP-T7T(forward primer)
 <400> 36
 tgaaatctag taagtaagtt cattcgagag ggatttcaag caaaaataat caatgg 56
 <
 210> 37
 <211> 61
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> yjhIp-sfGFP-T7T(reverse primer)
 <400> 37
 gagggaaacc gttgtggtct atccggatat agttcctcct ttcagcaaaa aaccctcaa 60
 g 61
 <210> 38
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RTyagA(forward primer)
 <400> 38
 gtcgcttcgg catttcac 18
 <210> 39
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RTyagA(reverse primer)
 <400> 39
 caggttatgg acggtgctg 19
 <210> 40
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> RTyagE(forward primer)
 <400> 40
 aagtgtcgga agcgaacc 18
 <210> 41
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RTyagE(reverse primer)
 <400>
 > 41
 cgatggtgtc tttgatgcc 19
 <210> 42
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RTyagF(forward primer)
 <400> 42
 gacctgcgat aaaggct 18
 <210> 43
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RTyagF(reverse primer)
 <400> 43
 agggagagtt cgtggttg 19
 <210> 44

 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RTyagI(forward primer)
 <400> 44
 tcgcctatc acgcatcg 18
 <210> 45
 <211> 19

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RTyagI(reverse primer)
 <400> 45
 ctcgttctct tcgetgtcc 19
 <210> 46
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RTyjhU(forward primer)
 <400>
 > 46
 tgagaatggt gatgtgctgg 20
 <210> 47
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RTyjhU(reverse primer)
 <400> 47
 taggcgattt gcgatgagg 19
 <210> 48
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RTyjhG(forward primer)
 <400> 48
 ccttattcgc tcctcgecc 19
 <210> 49

 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RTyjhG(reverse primer)
 <400> 49
 gccgttgtct tctccatcc 19

<210> 50
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RTyjhH(forward primer)
 <400> 50
 ctactactgg aaagtcgcac c 21
 <210> 51
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RTyjhH(reverse primer)
 <400>
 > 51
 tacgcaagtg accaacgc 18
 <210> 52
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RTyjhI(forward primer)
 <400> 52
 ggaagacacg agaagaactg 20
 <210> 53
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RTyjhI(reverse primer)
 <400> 53
 tcgccagaaa gtgagattg 19
 <210> 54
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RTrrsB(forward primer)

<400> 54
 taccgcgaga agaagcacc 19
 <210> 55
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RTrrsB(reverse primer)
 <400> 55
 cgcatttcac cgetacacc 19
 <210> 56
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RTcysG(forward primer)
 <400>
 > 56
 gcgtttattc cacagttcac c 21
 <210> 57
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RTcysG(reverse primer)
 <400> 57
 gttacagaag atgcgacgag 20
 <210> 58
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> mdoG(forward primer)
 <400> 58
 atacaccatc accttcagcc 20
 <210> 59
 <211> 21
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mdoG(reverse primer)

<400> 59

cgtgctttca actatctcac c

21