



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년08월18일
 (11) 등록번호 10-1768770
 (24) 등록일자 2017년08월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01) *C12N 15/81* (2006.01)
C12Q 1/02 (2017.01)
 (52) CPC특허분류
C12Q 1/68 (2013.01)
C12N 15/81 (2013.01)
 (21) 출원번호 10-2015-0107272
 (22) 출원일자 2015년07월29일
 심사청구일자 2015년07월29일
 (65) 공개번호 10-2017-0015607
 (43) 공개일자 2017년02월09일
 (56) 선행기술조사문헌
 US6682885 B1
 (뒷면에 계속)

(73) 특허권자
 배재대학교 산학협력단
 대전광역시 서구 배재로 155-40 (도마동)
 (72) 발명자
 채순기
 대전광역시 유성구 엑스포로 488, 208동 1304호
 (전민동, 엑스포아파트)
 고선기
 인천광역시 남동구 호구포로 924, 112동 2001호
 (만수동, 햇빛마을벽산아파트)
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
 특허법인이룸리온, 특허법인이룸

전체 청구항 수 : 총 3 항

심사관 : 이준혁

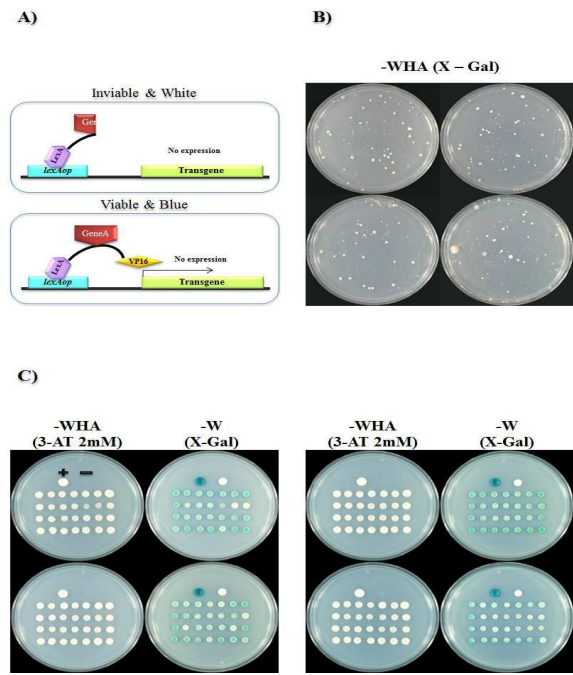
(54) 발명의 명칭 **효모 및 재조합 벡터를 이용한 해독물 돌연변이 및 종결 돌연변이가 없는 합성유전자의 선택적 선별방법**

(57) 요약

본 발명은 단백질 발현을 위한 유전자 합성과정에서 의도하지 않는 해독물 변형 염기오류, 즉 염기의 결손 및 삽입과 종결코돈의 돌연변이가 포함되지 않는 클론을 선택적으로 선별하기 위한 것이다.

이를 위하여 효모를 이용하여 본 발명에서 제조된 E. coli-Yeast shuttle vector에 존재하는 대장균의 LexA 단 (뒷면에 계속)

대표도 - 도6



백질 중 DNA 결합부위 (LexA DBD, LexA DNA Binding Domain)와 전사활성화 단백질인 VP16 사이에 합성 유전자를 일상적인 제한효소와 리가아제의 사용없이 효모의 in vivo cloning을 통하여 삽입하고, 해독틀 변이 및 종결 돌연변이가 없는 유전자가 존재할 경우에만 VP16이 생성되게 함으로써, 숙주 효모에 존재하며 LexA DBD와 결합하는 operator를 포함하고 있는 HIS3, ADE2의 리포터 유전자들을 발현시켜 히스티딘 및 아데닌 영양요구성 숙주 효모가 최소배지에서 성장할 수 있게 함으로써 합성 유전자의 클로닝과 동시에 해독틀 변이 및 종결코돈 돌연변이가 없는 유전자를 선택적으로 선별하는 방법이다.

(52) CPC특허분류

C12Q 1/02 (2013.01)

(72) 발명자

송광용

대전광역시 유성구 엑스포로 488, 406동 905호 (전민동, 엑스포아파트)

곽준용

충청남도 천안시 서북구 직산읍 남산3길 121 (남산리)

이근우

세종특별자치시 노을3로 14, 111동 1902호 (한솔동, 첫마을아파트1단지)

전미향

대전광역시 유성구 봉산로 39, 202동 1004호 (송강동, 송강마을아파트)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020010016649 A

US20100297642 A1

W02010143871 A2

Protein Expr Purif. 2013 Apr;88(2):235-42

Am. J. Pathol., Vol. 159, No. 4, pp. 1239-1245 (2001.10.)*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 C0199277

부처명 중소기업청

연구관리전문기관 (사)한국산학연합회

연구사업명 2014년 도약기술개발사업

연구과제명 고효율적인 DNA 염기오류 제거 방법 개발을 통한 인공유전자 합성 최적화 시스템 구축

기여율 1/1

주관기관 배재대학교

연구기간 2014.06.01 ~ 2015.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

효모 및 재조합 벡터를 이용한 해독틀 돌연변이 (Frameshift Mutation) 및 종결 돌연변이 (Nonsense mutation)가 없는 합성유전자의 선택적 선별 방법으로서,

상기 효모의 유전형은 *MATa*, *trp1-901*, *leu2-3, 112*, *ura3-52*, *his3Δ200*, *ade2*, *LYS2::(lexAop)4 -HIS3*, *URA3::(lexAop)8 -LacZ*, 및 *ADE2::(lexAop)8 -ADE2 GAL4* 를 포함하고, 및

상기 재조합 벡터는 TRP1, AMP^r, ADH1 프로모터, LexA, VP16, 상기 LexA 및 VP16 사이에 위치한 제한효소 EcoR1 인식부위, 및 CYC1 터미네이터를 포함하는, 합성 유전자의 선택적 선별 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 벡터는 도 4의 pGS-TRP 인 것을 특징으로 하는, 합성유전자의 선택적 선별 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 합성유전자의 선택적 선별 방법은

상기 재조합 벡터를 제한효소 EcoR1으로 절단하는 단계;

상기 절단된 벡터와 직선의 합성 유전자를 상기 효모에 형질 전환시키는 단계;

상기 효모를 트립토판(W), 아데닌(A) 및 히스티딘(H)의 영양분이 포함되지 않은 최소배지에 배양하여 콜로니들을 성장시키는 단계; 및

상기 형질전환체에서 발현된 단백질과 결합능력이 있는 *LacZ* 의 발현을 조사하는 단계; 를 포함하는 것을 특징으로 하는,

합성유전자의 선택적 선별 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 특정한 단백질 발현을 위하여 인공적으로 유전자를 합성하는 과정에서 의도하지 않은 염기의 결손, 삽입 및 종결코돈의 염기변화 오류가 없는 염기서열을 가진 합성 유전자만을 효모를 이용하여 선택적으로 선별 (Positive screening)하는 방법에 대한 것이다.

배경 기술

- [0002] 생명체의 유전정보는 차세대염기서열 분석법이 개발되면서 데이터화 되어 인류의 공동재산으로 누구나 필요한 유전자를 유전공학 기법으로 추출하여 사용할 수 있다. 유전자 합성 기술은 유전자나 유전체 길이의 DNA를 화학적으로 합성하는 기술이며 1 kb 이상 유전자 수준의 DNA를 빠르고 높은 정확도 그리고 저비용으로 합성한다는 면에서 일반 올리고 뉴클레오티드의 합성과는 구분된다. 합성 유전자 기술은 유전자의 확보가 어렵거나, 특정한 부위에 유전자 변이 유도, 키메라 유전자 제작, 특정 제한효소 자리의 도입 및 제거, 프로모터 배열의 최적화, 발현양이 적은 단백질을 발현계의 적합한 코돈으로 변환하여 발현 양을 증가시키고자 하는 경우 등에 유용하게 사용된다.
- [0003] 현재 1 kb 이상의 유전자를 생체외(*in vitro*)에서 인공적으로 합성하기 위해서는 많은 수의 올리고 뉴클레오티드가 필요하다. 올리고 뉴클레오티드는 합성할 유전자의 염기서열에 근거하여 일반적으로 한 개당 약 40~50 개의 염기를 가지고 있다. 또한 인접된 염기서열을 포함하는 올리고 뉴클레오티드는 상호 약 20 개의 서로 상보적인 염기서열을 가지고 있으며, 특히 냉각 복원 온도가 같아야 된다. 유전자 합성에 사용되는 올리고 뉴클레오티드가 상기 조건을 충족하도록 디자인하여 순수화학적 방법으로 제작한다.
- [0004] 올리고 뉴클레오티드를 이용하여 1 kb이상의 인공 합성 유전자는 다양한 방법을 수행하여 이루어질 수 있지만 크게 어셈블리 중합효소연쇄반응(assembly PCR), 융합 중합효소연쇄반응(fusion PCR), 및 DNA 리가아제연결 반응(Ligation chain Reaction) 방법 등이 사용된다.
- [0005] 많은 경우 인공적인 유전자의 합성에서는 올리고 뉴클레오티드 합성과정에서 발생하는 염기서열 오류 (특히 염기의 결손)와 올리고 뉴클레오티드를 이용하여 수행되는 PCR 과정 중에 발생하는 염기서열 오류로 인해 정확한 염기서열을 가진 합성 유전자는 최종적으로 염기서열 결정을 통해 확인 및 선택하여야 한다. 합성유전자는 한 개의 염기오류가 존재하더라도 사용할 수 없으며, 특히 단백질 발현을 목적으로 하는 유전자 합성의 경우에는 해독틀 (Open Reading Frame)을 변형하는 염기의 결손이나 삽입 및 해독틀 내에 종결코돈을 생성하는 오류의 경우는 합성된 유전자로 정확한 단백질을 생성할 수 없다.
- [0006] 현재 일반적인 합성유전자의 정확성 확인은 최종 DNA 산물을 클로닝 한 뒤 염기서열 분석에 전적으로 의존하여 진행되며 염기서열이 다른 합성 유전자는 폐기하고, 정확한 염기서열의 합성 유전자가 확보될 때까지 반복적인 합성을 해야 하므로 많은 시간, 비용 및 노력이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명은 상기한 문제점을 해결하기 위한 것으로, 특히 단백질 발현을 목적으로 하는 유전자 합성의 경우에 있어서 해독틀 변형 (염기의 결손 및 삽입) 및 종결코돈으로의 돌연변이를 가지고 있지 않은 합성유전자를 선택적으로 선별하여, 전적으로 많은 수의 염기서열 분석에 의존하여 정확한 합성 유전자를 선별하는 기존의 방식과 차별되게 합성 유전자의 제조에 사용되는 시간, 비용과 노력을 감소시키고자 하는 목적이다.

과제의 해결 수단

- [0008] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 효모 및 재조합 벡터를 이용하여 해독틀 돌연변이 (Frameshift Mutation)와 종결 돌연변이 (Nonsense mutation)가 없는 합성유전자의 선택적 선별 방법을 제공한다.
- [0009] 또한, 본 발명은 상기 효모의 유전형은 *MATa*, *trp1-901*, *leu2-3, 112*, *ura3-52*, *his3Δ200*, *ade2*, *LYS2::(lexAop)4-HIS3*, *URA3::(lexAop)8-LacZ*, 및 *Leu2::(lexAop)8-ADE2 GAL4* 를 포함하는 것을 특징으로 하는, 합성유전자의 선택적 선별 방법을 제공한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 도 4의 벡터 pGS-TRP 인 것을 특징으로 하는, 합성유전자의 선택적 선별 방법을 제공한다.
- [0011] 또한, 본 발명은 상기 벡터가 TRP1, AMP^R, ADH1 프로모터, LexA DBD (DNA binding domain), VP16, 상기 LexA 및 VP16 사이에 위치한 제한효소 *EcoR1* 인식부위, 및 CYC1 터미네이터를 포함하는 것을 특징으로 하는, 합성유전자의 선택적 선별 방법을 제공한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 상기 벡터를 제한효소 *EcoR1*으로 절단하는 단계; 상기 절단된 벡터와 직선의 합성 유전자를 상기 효모에 형질전환시키는 단계; 상기 효모를 영양분 트립토판, 히스티딘, 아데닌(WHA)이 포함되지 않은 최소배지에 배양하여 성장하는 콜로니들을 선별하는 단계; 및 상기 형질전환체의 재조합 벡터에서 발현된 단백질의

LexA DBD 부위가 결합할 수 있는 오퍼레이터(operator)를 보유한 LacZ 의 발현을 조사하는 단계; 를 포함하는 것을 특징으로 하는, 합성 유전자의 선택적 선별 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 이러한 발명으로 단백질 발현을 목적으로 하는 합성 유전자에 염기 결손 (deletion) 및 삽입 (insertion) 으로 해독틀 변형이 발생하였거나 종결코돈이 생성된 경우가 완전히 제거된 합성유전자만을 선택적 선별(Positive screening)할 수 있게 된다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 유전자 A의 합성에서 assembly PCR로 제조된 4 조각 DNA를 Fusion PCR로 연결하여 제조된 유전자 A 최종 생산물을 확인한 전기영동 결과를 나타낸 것이다. 서로 다른 3 개 증합효소, Dp (Doctor protein사 Pfu DNA polymerase), En (Enzynomic사, npfu-Forte) 그리고 Ta (TaKaRa사 PrimeSTAR HS Premix)를 각각 이용하여 수행된 assembly PCR 및 뒤이은 Fusion PCR의 생성물 (1,851 bp)로 M은 size marker 이다.

도 2는 유전자 A의 합성 모식도를 나타낸 것이다.

도 3은 유전자 A를 3개사의 DNA 증합효소 A) Doctor protein Pfu DNA polymerase, B) Enzynomics npfu-Forte, C) TaKaRa PrimeSTAR HS Premix를 이용하여 합성하고 일상적인 클로닝과 염기서열 결정을 통한 결과의 분석을 나타낸 것이다.

도 4는 pGS-TRP 벡터를 나타낸 것이다.

도 5는 양 끝에 pGS-TRP 벡터와 상보적인 염기서열을 보유한 합성 유전자와 EcoRI으로 직선화한 pGS-TRP 벡터를 효모에 동시 형질전환하여 두 개의 직선 DNA가 Gap repair에 의하여 환영의 DNA로 재조합 되는 모식도를 나타낸 것으로, 상기의 경우에만 형질전환체가 트립토판이 생략된 최소배지에서 성장할 수 있다.

도 6은 숙주효모에 존재하는 LexA 오퍼레이터를 가진 리포터 유전자의 발현을 이용한 히스티딘과 아데닌이 생략되었고 도5의 목적으로 트립토판이 함께 생략된 최소배지에서의 성장여부 및 LexA 오퍼레이터를 가진 LacZ 리포터 발현 여부에 따른 Blue/white 선별을 나타낸 것이다.

A) LexA DBD-합성유전자-VP16의 융합단백질 발현에 따른 숙주 내 리포터 유전자의 전사적 활성 모식도

B) WHA 영양물질이 없으며 X-gal을 포함한 최소배지에서 선별한 형질전환체들

C) 트립토판과 아데닌 그리고 히스티딘이 없으며 1mM 3-AT가 첨가된 최소배지에서의 형질전환체 성장여부와 트립토판이 없으며 X-gal을 첨가한 최소배지에서 LacZ 발현에 따른 형질전환체의 Blue 콜로니 확인

도 7은 개발된 효모 시스템을 이용하여 합성유전자에서 염기 결손 (deletion) 및 삽입 (insertion) 으로 해독틀 변형이 발생하였거나 종결코돈이 생성 합성유전자가 완전히 제거되어 선별되는지를 염기서열 결정을 통해 확인하고 서열의 비교를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 그러나 하

[0016] 기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시

[0017] 예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

본 발명의 실시예는 하기와 같은 조건 및 방법으로 수행되었다.

인공 유전자합성을 위한 primer 제조

[0021] Oligonucleotide는 Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) 또는 Gene2oligo (<http://berry.engin.umich.edu/gene2oligo/>)를 이용하여 디자인하였다.

PCR 및 Assembly PCR

[0024] 본 연구에 사용된 PCR 기기는 Applied Biosystems사의 Veriti thermal cycler를 사용하였으며, DNA 증합효소는 TaKaRa사의 PrimeSTAR[®] HS Premix (cat# R040A)를 사용하였다. Assembly PCR은 Applied Biosystems

의 Veriti thermal cycler를 사용하였으며, DNA polymerase는 TakaRatk의 PrimeSTAR[®] HS Premix (cat# R040A), (주)Enzynomics사의 nPfu-Forte DNA polymerase (cat# P410) 그리고 Doctor protein사의 Pfu DNA polymerase (cat# DR00402) 제품을 사용하였다.

[0026] Molecular Cloning 및 염기서열 결정

[0027] 본 연구에 사용된 효소는 (주)Enzynomics사의 제한효소와 DNA 리가아제 (Cat# DP004S)를 사용하였다. 제한효소를 이용하여 PCR 생산물과 벡터의 MCS의 특이적 인식부위를 절단하였다. 선 형태인 PCR 생산물과 벡터를 DNA 리가아제를 이용하여 환 형태로 연결하여 주고, 전기 충격하여 대장균 (XL1-Blue)에 형질전환을 실시하여 항생제 (ampicillin 0.1 mg/ml)배지에서 선별하였다. 형질전환체는 추가적으로 제한효소를 이용하여 예측되는 크기로 확인하였다.

[0028] Gel extraction은 agarose gel에 확인된 PCR 생산물 회수를 위하여 (주)코스모진텍의 LaboPass[™] Gel and PCR kit (cat# CMA0112)를 사용하였다. *E. coli* 형질전환체로부터 plasmid DNA의 추출을 위하여 (주)코스모진텍의 LaboPass[™] Plasmid Mini kit (cat# CMP0112)를 사용하였다. DNA 염기서열 결정은 (주)코스모진텍에 의뢰를 하였다. Sequencer는 Applied Biosystems의 Automatic Sequencer ABI 3730x1를 사용하였으며, Sequencing 반응에는 Applied Biosystems의 BioDye[™] Terminator version 3.1을 사용하였다.

[0030] 효모 형질전환

[0031] 본 연구에 사용한 효모는 YPD 액체배지 10 ml에 접종하여 진탕 배양한 뒤(30 °C, 200 rpm, 12 hr) 새로운 YPD 액체배지로 옮겨 OD 600 = 0.6 되도록 배양하였다. 원심분리기로 (1,500 rpm, 5 min) 침전된 균주를 회수하고, 침전물에 멸균된 증류수 (20 배)를 넣어준다. 50 % PEG/1M LiOAc/carrier DNA (240 μl : 36 μl : 25 μl)에 균주 100 μl 그리고 직선화된 pGS-TRP vector DNA와 합성유전자 DNA 각 10 μg을 넣어 1분간 교반한다. 혼합액은 42 °C에서 45 분간 반응하였고, 원심분리기로 (1,500 rpm, 5 min) 균주를 침전하고 상층액을 제거하였다. 이곳에 0.9 % NaCl 200 μl를 넣어 침전된 균주를 섞고 최소배지에 도말하였다. 이 형질전환체의 선별을 위한 배지는 30 °C에서 48 시간 배양하였다. 효모의 유전형은 표 1에 나타내었다.

표 1

이름	유전형
NMY 51	<i>MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3Δ200, ade2</i> <i>LYS2::(lexAop)4 -HIS3, URA3::(lexAop)8 -LacZ, ADE2::(lexAop)8 -ADE2 GAL4</i>

[0033] LacZ 발현을 확인하기 위한 X-gal 배지

[0034] 증류수 800 ml에 YNB 1.7 g, ammonium sulfate 5 g, agar 20 g을 넣고 20X dropout solution 50 ml와 필요에 따라 100X의 특정 아미노산 stock 용액을 첨가하였고 이를 멸균한 후 적당히 식힌 후 10X BU salt 용액 100 ml, 40% glucose 50 ml, X-gal solution 4 ml을 최소배지에 첨가하였다.

[0035] X-gal stock 용액 : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-galactopyranoside (X-gal, USB)를 N,N-dimethyl-formamide (DMF, Sigma)에 20 mg/ml 농도로 녹인 후, 호일에 싸서 -20°C에 보관하여 사용하였다.

[0036] 10X BU salt 용액 (pH7.0) : Na₂HPO₄ 30 g, NaH₂PO₄ 70 g을 1 l 가 되게 증류수에 녹여 멸균하여 상온에 보관하여 사용하였다.

[0038] **실시예 1. 1,851bp 길이의 유전자 A 합성**

[0039] 실시예로 약 1.8 kb의 뉴클레오티드로 구성된 유전자 A의 DNA를 합성하기 위하여 1.8 Kb 목표유전자를 약 500 bp로 구성된 4부위로 나누었고 assembly PCR을 이용하여 4조각의 1차 합성을 각각 실시하였다.

[0040] 각 조각별 유전자 합성을 위하여 각 조각에 맞게 제조된 30~50bp의 올리고 뉴클레오티드를 첨가하여 중합효소 연쇄반응을 실시하였다 (pre-denaturation 95 °C 3분, denaturation 95 °C 30초, annealing 55 °C 30초, extension 72 °C 30초 과정을 5 cycle 반복 하였으며, final-extension은 72 °C에서 5분을 하였다). 이 과정에서는 서로 다른 3개 회사로부터 생산된 proof-reading 기능을 가진 DNA polymerase를 사용하여 따로 반응하였다. 이 후 각 조각의 말단부위에 상보적인 올리고 뉴클레오티드 primer set를 이용하여 중합효소 연쇄

반응을 실시하였다. 반응은 pre-denaturation 95℃ 3분, denaturation 95℃ 30초, annealing 58℃ 30초, extension 72℃ 30초 과정을 25 cycle 반복하였으며, final-extension은 72℃에서 5분을 하였다. 최종적으로 각 조각의 assembly PCR 생성물을 1% agarose gel에서 확인하였다.

[0041] Assembly PCR로 합성된 각 조각별 4개의 생산물은 이웃하는 조각부위와 말단 부위가 동일한 염기서열을 가지고 있으며, 이 네 조각을 연결하여 1.8 Kb의 유전자 A를 합성하기 위하여 유전자 A의 5' 말단과 3' 말단에 상보적인 올리고 뉴클레오티드 primer set를 이용하여 fusion PCR을 수행하였다. 이때 fusion PCR은 pre-denaturation 95℃ 3분, denaturation 95℃ 30초, annealing 58℃ 30초, extension 72℃ 2분 과정을 25 cycle 반복 하였으며, final-extension은 72℃에서 5분을 하였다. Fusion PCR의 최종 생성물을 1% agarose gel에서 확인하였고 도 1에 나타내었다. 1.8 kb 유전자 A의 합성을 위한 모식도는 도 2에 제시하였다.

[0043] 실시예 2. 합성된 유전자 A의 일상적인 클로닝과 염기서열 결정

[0044] 실시예 1의 결과로 합성된 유전자 A 생성물을 pBluescript II-SK(pBS)를 제한효소 (*Xba*I / *Bam*HI)를 이용하여 각각의 말단이 서로 상보적인 염기를 가진 선형으로 만들어 준다. 이후 DNA 리가아제 반응으로 연결하고, 전기충격으로 대장균에 형질전환하였다. pBS의 항생제 저항 유전자인 Amp^r을 이용하여 앰피실린 항생제가 포함된 배지에서 형질전환체를 선별하였고, 제한효소 *Eco*RI을 처리한 뒤 1% agarose gel에서 확인하였다.

[0045] 염기서열 확인은 sequencing primer T3과 T7을 이용하여 (주)코스모진텍에 의뢰를 하였다. 염기서열 결과의 분석은 온라인 툴인 ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)를 이용하여 분석하였다. 분석결과 Doctor protein Pfu DNA polymerase, Enzymomics npfu-Fort 그리고 TaKaRa PrimeSTAR HS Premix의 3개 회사 DNA 증합효소를 이용한 유전자 A의 합성에서 염기 오류의 종류 및 오류율을 표 2에 나타내었다. 오류율은 오류 염기수/총 염기수로 계산되어 진다.

표 2

합성에 사용된 DNA 증합효소	클로닝 이름	염기서열 결정 (bp)	염기 오류 종류			염기오류 총합 수	오류율 (%)
			치환	결손	삽입		
Doctor protein Pfu DNA polymerase	Do - 01	1863	0	0	1	1	
	Do - 02	1863	0	0	1	1	
	Do - 03	1863	1	1	0	2	
	Do - 04	1863	0	2	0	2	
	Do - 05	1863	1	0	0	1	
	Do - 06	1863	0	0	0	0	
	Do - 07	1863	1	1	1	3	
	Do - 08	1863	0	0	0	0	
	총합	14904	3	4	3	10	0.067
Enzymomics npfu-Forte	Ez - 01	1863	0	1	0	1	
	Ez - 02	1863	0	0	0	0	
	Ez - 03	1863	1	1	2	4	
	Ez - 04	1863	0	0	1	1	
	Ez - 05	1863	2	0	0	2	
	Ez - 06	1863	1	2	0	3	
	Ez - 07	1863	0	0	0	0	
	Ez - 08	1863	0	1	0	1	
	총합	14904	4	5	3	12	0.080
TaKaRa PrimeSTAR HS Premix	Ta - 01	1863	2	1	0	3	
	Ta - 02	1863	2	0	0	2	
	Ta - 03	1863	0	3	1	4	
	Ta - 04	1863	0	0	0	0	
	Ta - 05	1863	0	1	0	1	
	Ta - 06	1863	0	2	2	4	
	Ta - 07	1863	0	2	0	2	
	Ta - 08	1863	1	0	0	1	
	총합	14904	5	9	3	17	0.114
총합		44712	13	18	8	39	0.087

[0046]

[0047] 실시예 3 : 효모를 이용한 *in vivo* cloning과 동시에 해독틀 변이 및 종결코돈 돌연변이가 없는 클론의 선택적

선별과 염기서열 결정

- [0048] 본 실시예에서는 효모를 이용한 합성유전자의 in vivo cloning과 동시에 해독틀 변형과 종결코돈으로의 오류가 포함되지 않은 합성유전자의 선택적 선별을 수행하였다.
- [0049] 이를 위하여 pGS-TRP 벡터를 제조하였고, pGS-TRP는 효모의 영양요구성 표지인 *TRP1*과 대장균에서 항생제 저항성 표지인 *Amp^r*을 가지며, 효모 복제 origin으로 2u를 포함하여 효모 세포 안에서 자가 복제가 가능하다. 그리고 대장균 *LexA*의 DNA 결합부위(LexA DBD)와 전사활성화를 유도할 수 있는 VP16 단백질이 융합하여 발현될 수 있도록 LexA DBD:VP16을 삽입하였고 이는 *ADHI* promoter와 *CYC1* terminator에 의해 발현이 조절되게 하였다. pGS-TRP의 직선화를 위하여 또한 LexA DBD와 VP16 사이에 합성유전자를 삽입하기 위하여 제한효소 *EcoRI* 인식 부위를 삽입하였다. pGS-TRP 벡터는 도 4에 나타내었다.
- [0050] 실시예 1에서 합성유전자 제작에 있어 fusion PCR을 수행할 시 pGS-TRP 벡터의 *EcoRI*을 기준으로 양쪽 근처의 염기서열을 기준으로 상보적인 약 25개의 염기서열을 양끝의 primer에 각각 추가하여 최종 유전자 A의 산물에 pGS-TRP와 상보적인 염기서열을 합성한 유전자 A 양쪽 말단에 보유하도록 제조하였다.
- [0051] 제한효소 *EcoRI*으로 절단된 pGS-TRP와 직선의 인공 합성유전자를 효모에 동시에 형질 전환하여, 두 생산물의 상동 염기서열을 이용하여 gap repair를 유도한다. 재조합은 두 개 직선의 DNA가 다시 환형으로 연결되어 효모 내에서 안정화를 이루어 pGS-TRP 벡터에 존재하는 TRP1 유전자의 발현으로 최소배지에서 자라게 된다. 이의 모식도를 도 5에 나타내었다.
- [0052] 합성유전자 DNA PCR product와 *EcoRI*으로 직선화된 pGS-TRP vector를 효모 숙주로 동시에 LiAc 방법으로 형질 전환하여 트립토판(W), 아데닌 (A) 및 히스티딘 (H)이 들어있지 않은 최소배지에 배양하여 성장하는 colony들을 선별하였다.
- [0053] 형질전환체들이 최소배지에서 자라기 위해서는 i) 형질전환시 넣어준 직선화된 두 개의 DNA가 상동재조합에 의하여 환형의 재조합 DNA로 변경되어 효모 내에서 안정화 되어 pGS-TRP의 선별표지인 TRP1 유전자의 발현이 있어야 하며, ii) 재조합된 합성유전자에 해독틀 돌연변이가 포함되어 있지 않아서 LexA DBD-합성유전자-VP16의 융합단백질이 정상적으로 만들어 져야 한다.
- [0054] LexA DBD-합성유전자-VP16의 융합단백질은 효모 내에 삽입된 LexA가 결합할 수 있는 오퍼레이터를 보유한 reporter 유전자인 ADE2 및 HIS3의 발현을 유도할 수 있어 영양분 WHA가 제외된 최소배지에서 성장하게 된다. 특히 숙주의 히스티딘 영양요구성 돌연변이의 leaky한 형질을 보완하고 false positive가 선별되는 것을 억제하기 위하여 1 mM 3-AT (3-Amino- 1,2,4-triazole)가 첨가된 최소배지를 이용하였다. 형질전환체는 LexA DBD-합성유전자-VP16의 융합단백질을 발현하고 이 단백질이 결합할 수 있는 또 다른 reporter인 *LacZ* (β -갈락토시드 가수분해효소)의 발현을 조사하여 false positive를 제거하였다. *LacZ* reporter 유전자의 발현은 배지에 첨가된 X-gal을 이용한 blue/white 선별이 가능하며, X-gal을 분해하여 blue color를 띄게 한다. 위 과정은 도 6에 나타내었다.
- [0055] 상기 방법으로 선발된 효모 형질전환체에 포함된 합성유전자의 염기서열 확인은 primer SeqF와 SeqR를 이용하였고, 총 50개의 유전자 A 염기서열 분석을 (주)코스모진텍에 의뢰를 하였다. 분석은 온라인 툴인 ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)를 이용하여 분석하였고 이를 도 7에 나타내었다.
- [0056] 오류율은 오류 염기수/총 염기수로 계산된다. 실시예 2에 제시한 일상적인 클로닝에 의한 합성유전자 확인에서는 46, 575개중 40개의 오류로 8.6×10^{-4} 의 오류율을 보이고, 실시예 3에서 효모를 이용하여 본 연구에서 개발된 인공 합성유전자 오류제거 시스템은 92,550개중 16개의 오류로 1.7×10^{-4} 의 오류율을 확인하였다.
- [0057] 실시예 2에서 일상적인 클로닝에 의하여 선별된 합성유전자 클론 중에 포함된 염기 오류는 올리고 합성에서 가장 문제가 되는 결손 및 삽입 오류가 많이 포함되어 있는 반면에 개발된 효모를 이용한 시스템을 사용하여 선별된 합성유전자 클론들에는 결손과 삽입의 오류와 nonsense mutation은 한 건도 확인되지 않았다.
- [0058] 염기서열 결정 군집수(Colony)를 기준으로 인공 합성 유전자의 성공률을 계산하였다. 성공률은 성공클론/확인클론으로 계산하였다. 일상적인 클로닝에 의하여 선별된 합성유전자 클론은 총 25개중 5개가 오류가 없는 클론으로 20%의 성공률을 보였고, 개발된 효모를 이용한 새로운 인공 합성유전자 클론은 총 50개중 38개가 오류가 없는 클론으로 76%의 성공률을 보였고, **개발된 효모 시스템을 이용한 의한 합성유전자 오류 분석 및 비교**를 표 3에 나타내었다.

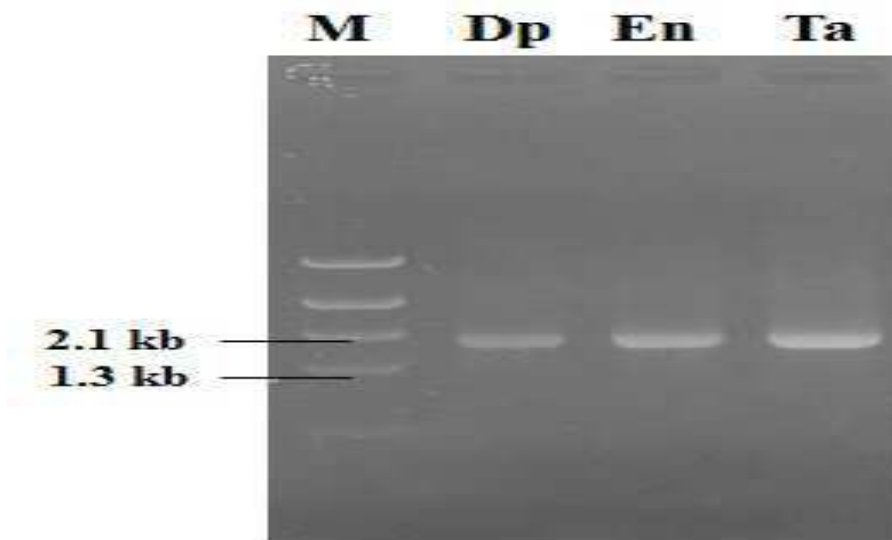
표 3

인공 합성 방법	염기서열 결정을 수행한 총 수		확인된 오류			오류 총수	성공 클론수	성공률 (%)
	클론수	염기수	치환	결손	삽입			
기존 합성유전자 확인 시스템	25	46,275	12	19	9	40	5	20
개발된 효모를 이용한 합성유전자 확인 시스템	50	92,400	16	-	-	16	38	76

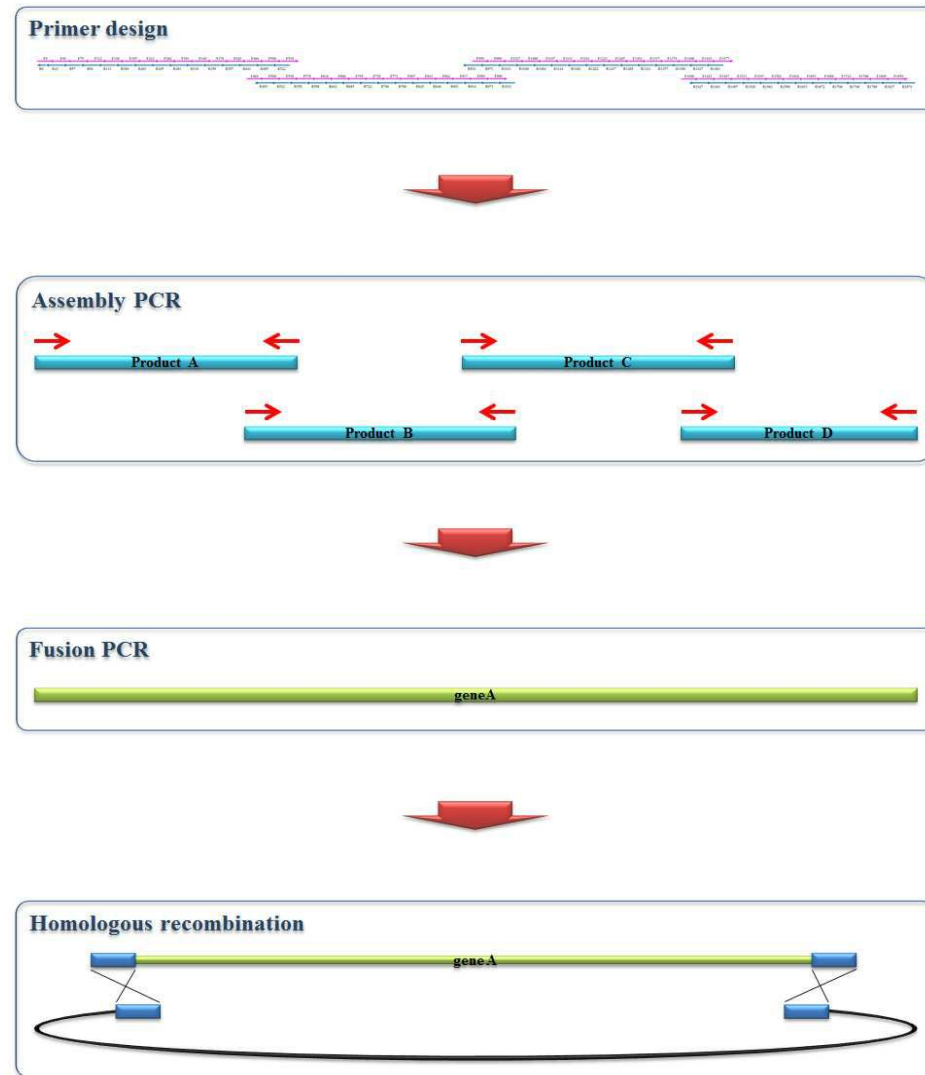
[0059]

도면

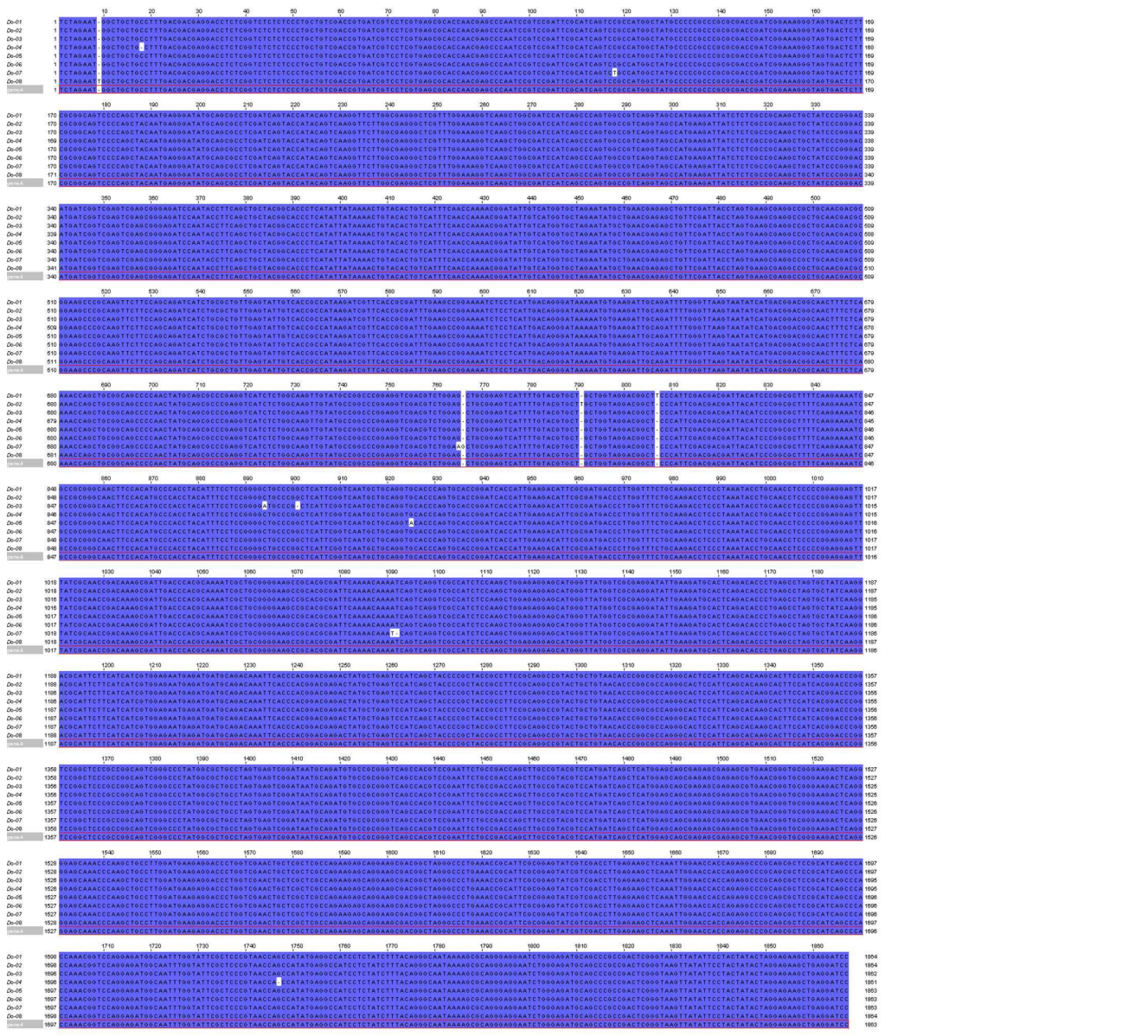
도면1



도면2

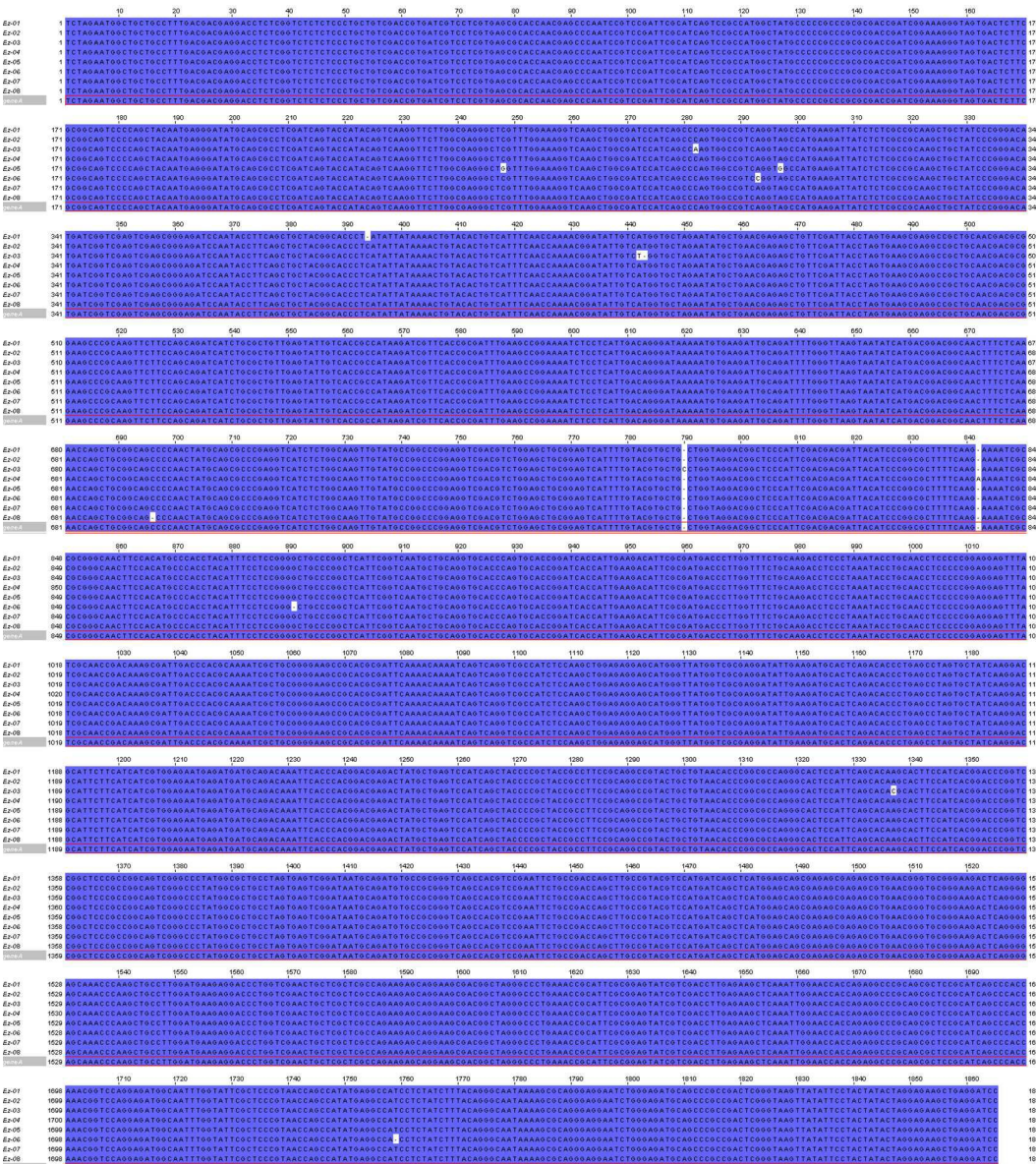


도면3a



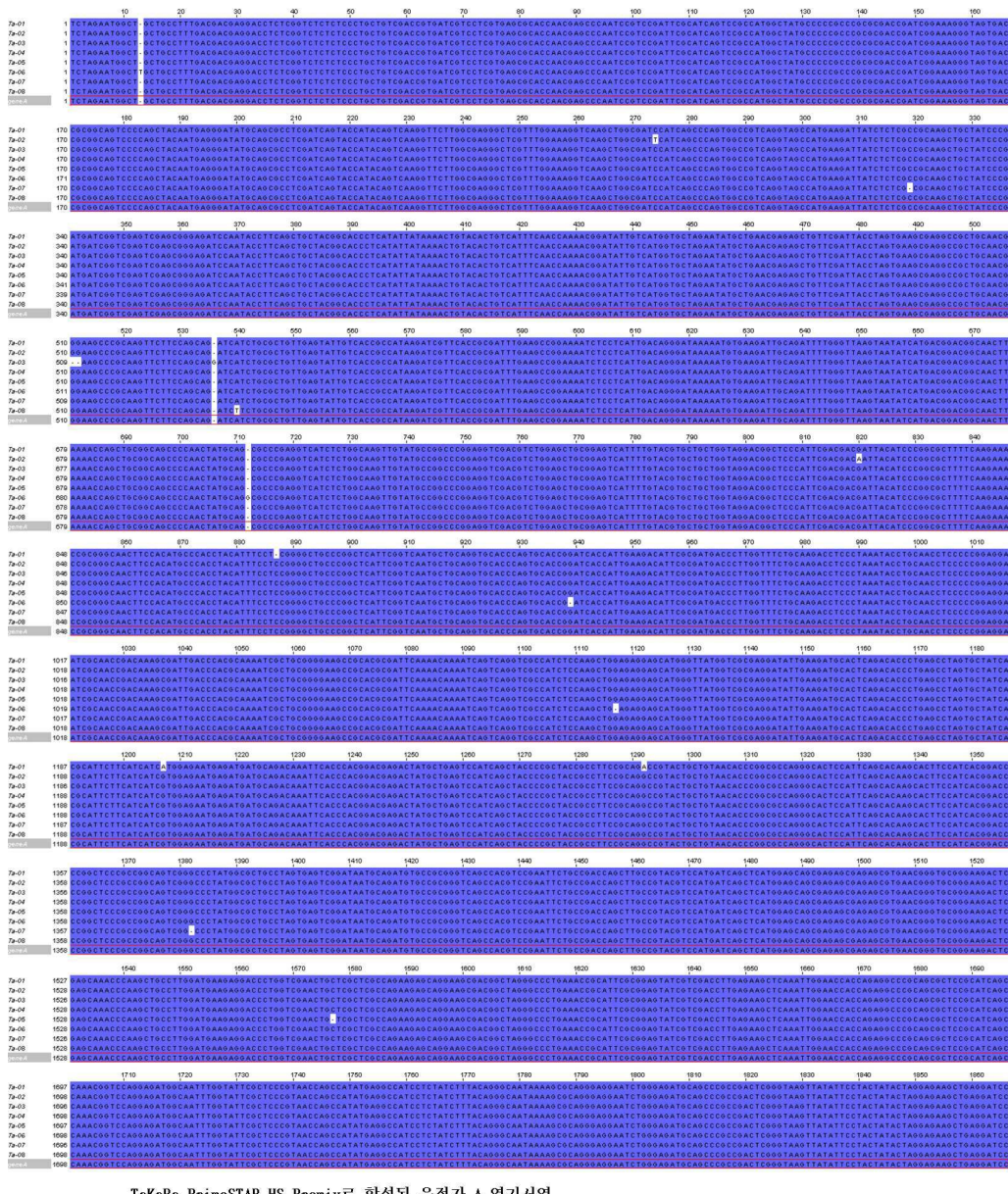
Doctor protein 사 *Pfu* DNA polymerase로 합성된 유전자 A 염기서열 분석
 (14,904의 염기 확인결과 오류는 10개는 치환 3개, 결손 4개, 삽입 3개이다. 완벽한 유전자 합성은 8개중 2개가 합성되었음)

도면3b



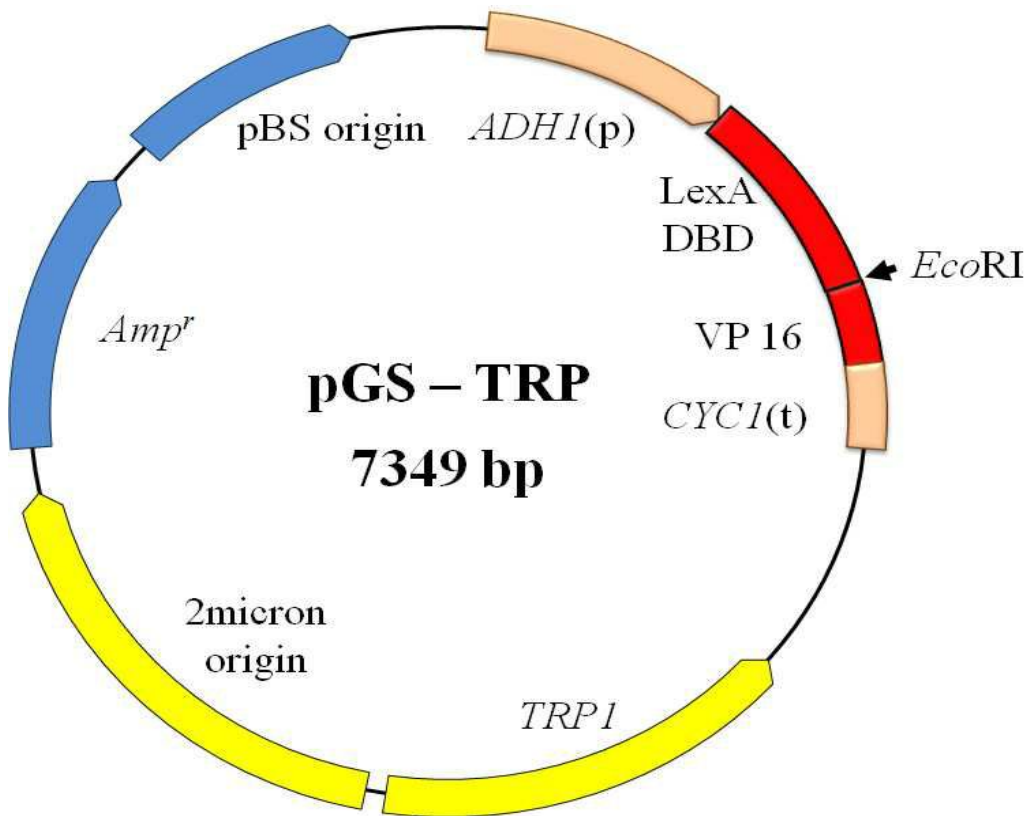
Enzymomics 사 *nprF* Forte 에 합성된 유전자 A 염기서열 (14,904의 염기 확인결과 오류는 12개는 치환 4개, 결손 5개, 삽입 3개이다. 완벽한 유전자 합성은 8개중 2개가 합성되었음)

도면3c

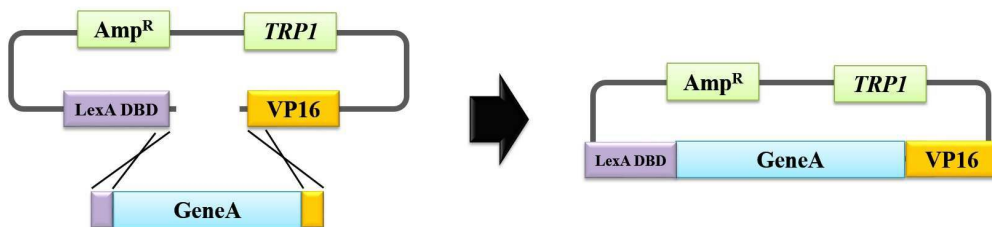


Takara PrimeSTAR HS Premixor 합성된 유전자 A 염기서열 (14,904의 염기 확인결과 오류는 17개는 치환 5개, 결손 9개, 삽입 3개이다. 완벽한 유전자 합성은 8개중 1개가 합성되었음)

도면4

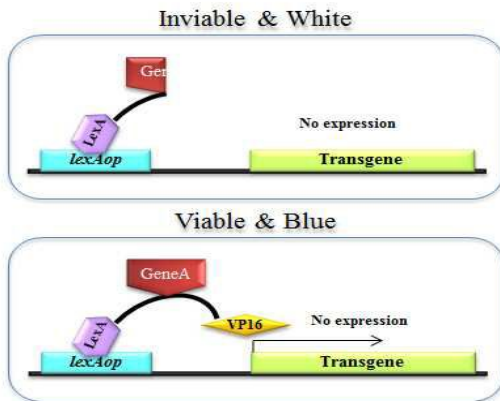


도면5

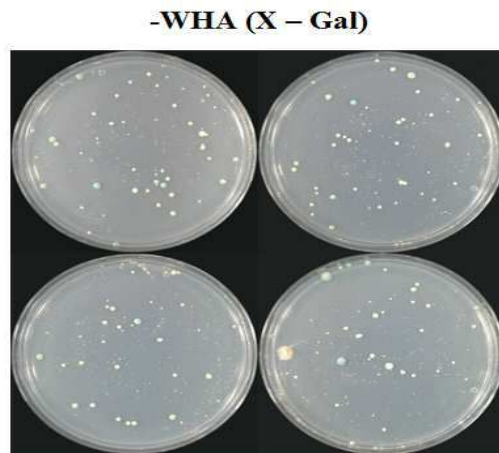


도면6

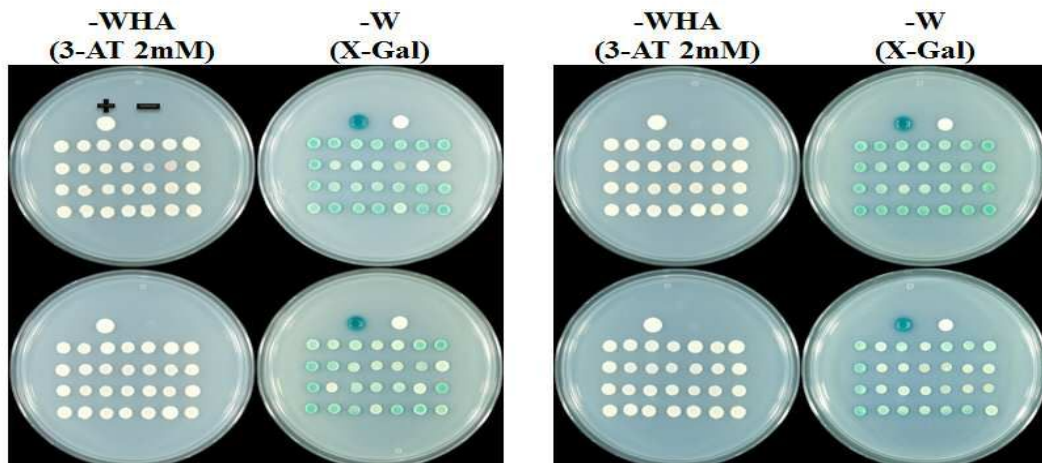
A)



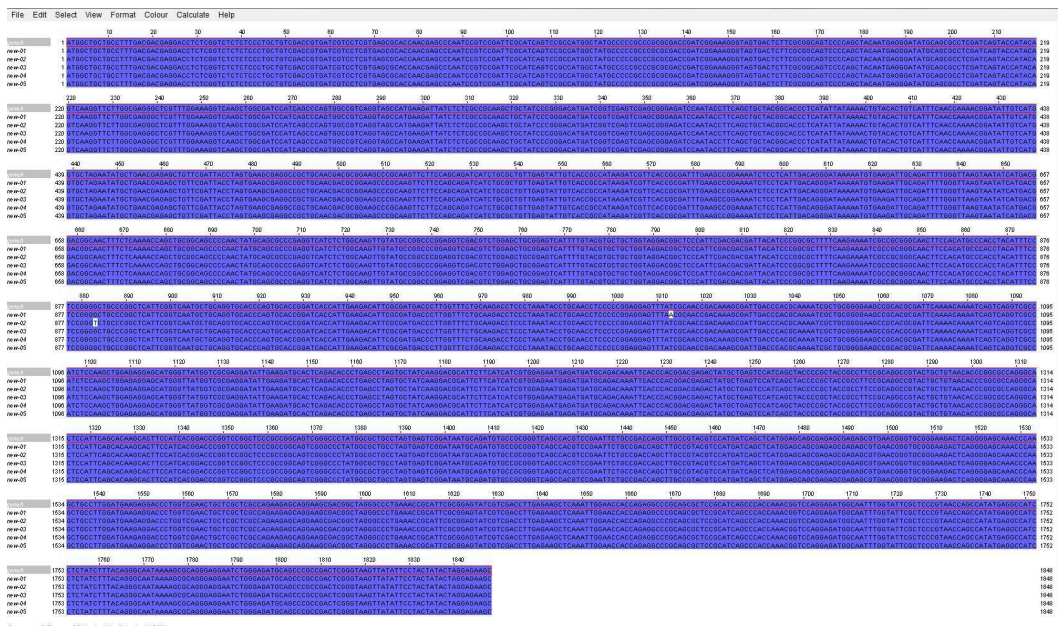
B)



C)



도면7a



도면7b

