



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년12월09일
 (11) 등록번호 10-1684489
 (24) 등록일자 2016년12월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/74 (2006.01) *C12P 21/00* (2006.01)
C12P 3/00 (2006.01)
 (52) CPC특허분류
C12N 15/74 (2013.01)
C12P 21/00 (2013.01)
 (21) 출원번호 10-2015-0071782
 (22) 출원일자 2015년05월22일
 심사청구일자 2015년05월22일
 (65) 공개번호 10-2016-0137829
 (43) 공개일자 2016년12월01일
 (56) 선행기술조사문헌
 GenBank Accession Number CP000855
 (2014.01.31.)*
 KR101401603B1
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
 한국해양과학기술원
 경기도 안산시 상록구 해안로 787 (사동)
 (72) 발명자
 이정현
 경기도 성남시 분당구 불정로 219
 한솔청구아파트116-101
 강성균
 경기도 안산시 상록구 감골로 59 702동 1502호 (사동, 월드아파트)
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
 윤여강

전체 청구항 수 : 총 12 항

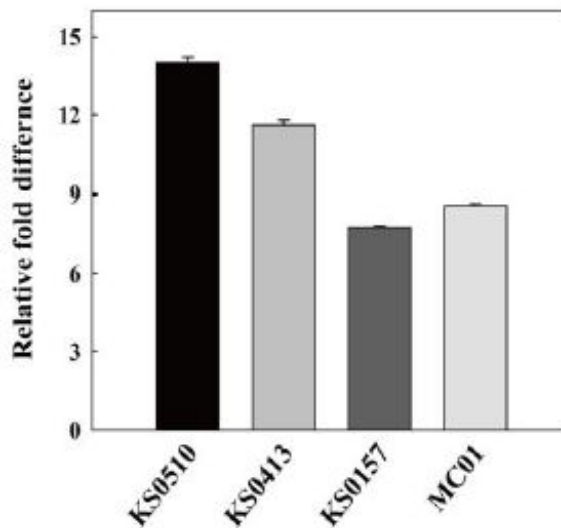
심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 **신규한 프로모터 및 이를 이용한 수소 생산 방법**

(57) 요약

본 발명은 신규한 프로모터 및 이를 이용한 수소 생산 방법에 관한 것으로서, RNA sequencing을 사용한 전사체 해석(transcriptome analysis)을 통하여 우리는 새로운 내생성의 강한 프로모터를 제공한다. 본 발명은 또한 상기 프로모터를 이용한 단백질 생산방법을 제공한다. 본 발명은 또한 상기 프로모터를 포함하는 재조합벡터 및 상기 재조합벡터로 치환된 숙주세포를 제공한다. 본 발명은 상기 숙주세포를 이용한 수소 생산 방법을 제공한다. 본 발명에 따른 프로모터는 종래에 알려진 어떠한 프로모터 보다 더 강력하다. 따라서 본 발명에 따른 프로모터로 치환된 균주는 수소 생산능력에서 종래의 야생형 대비 현저하게 높은 수소생산율을 가진다. 따라서 본 발명에 따라 제조된 돌연변이 *Thermococcus onnurineus* NA1는 높은 수소생산율 뿐만 아니라 높은 균주생장율을 가지고 있어 수소 생산효율이 크게 증가된 균주이다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

C12P 3/00 (2013.01)

(72) 발명자

이현숙

경기도 안산시 상록구 감골로 59 702동 1502호 (사동, 월드아파트)

권개경

경기도 안산시 상록구 성호로5길 7, 2층

이성혁

경기도 안산시 상록구 성안2길 34, 301호

김윤재

경기도 안산시 상록구 성안2길 34, 301호

최애란

경기도 안산시 상록구 성안2길 39, 204호

김민식

경기도 안산시 상록구 장화2길 26, 202호

김태완

경기도 안산시 상록구 삼리2길 17, 203호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1525003951

부처명 해양수산부

연구관리전문기관 한국해양과학기술진흥원

연구사업명 해양수산생명공학기술개발

연구과제명 해양 초고온 고세균 이용 바이오수소 생산기술 개발

기여율 1/2

주관기관 한국해양과학기술원

연구기간 2014.07.01 ~ 2015.06.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 E99314

부처명 해양수산부

연구관리전문기관 한국해양과학기술원

연구사업명 해양극한 유전자의 신기능 발굴 및 활용기술 개발

연구과제명 해양극한 유전자의 신기능 발굴 및 활용기술 개발

기여율 1/2

주관기관 한국해양과학기술원

연구기간 2015.01.01 ~ 2015.12.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

서열번호 1의 프로모터.

청구항 3

서열번호 1의 프로모터가 삽입된 재조합 벡터.

청구항 4

서열번호 1의 프로모터가 삽입된 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포.

청구항 5

프로모터 서열이 서열번호 1의 프로모터로 치환된 프로모터를 포함하는 숙주세포.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 숙주세포는 고세균인 것을 특징으로 하는 숙주세포.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 고세균은 *Thermococcus* 속 균주인 것을 특징으로 하는 숙주세포.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 상기 *Thermococcus* 속 균주는 *Thermococcus onnurineus* KCTC 12774BP인 것을 특징으로 하는 숙주세포.

청구항 9

서열번호 1의 프로모터를 이용한 유전자 발현 방법.

청구항 10

서열번호 1의 프로모터를 이용하여 목적 유전자를 발현시키고, 이를 이용하여 단백질을 생산하는 것을 특징으로 하는 단백질 생산 방법.

청구항 11

서열번호 1을 포함하는 재조합 벡터를 이용하여 목적 유전자를 발현시키고, 이를 이용하여 단백질을 생산하는 것을 특징으로 하는 단백질 생산 방법.

청구항 12

프로모터 서열이 서열번호 1로 치환된 프로모터를 포함하는 *Thermococcus* 속 균주를 이용한 수소 생산 방법.

청구항 13

제 12 항에 있어서, 상기 *Thermococcus* 속 균주는 *Thermococcus onnurineus* KCTC 12774BP인 것을 특징으로 하는 수소 생산 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 고세균에서 수소 생산성을 향상시키는 프로모터 및 이를 이용한 수소 생산 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 대사공학은 세포내에서 유전 조절 과정을 최적화하여 다양한 유용 물질의 생산성을 향상시키는 것이다. 프로모터 공학은 프로모터를 조절함으로써 대상 유전자의 전사를 조절하기 위한 적절한 대사공학의 전략 중 하나이고, 다양한 프로모터들은 대장균(*E. coli*), 카울로박터 크레센투스(*Caulobacter crescentus*), 트리코더마 리세이(*Trichoderma reesei*), 바실루스 계통(*Bacillus* strains), 스트렙토마이세스(*Streptomyces*), 고호열성 고세균(Hyperthermophilic archaea) 등 몇몇 유기체에서 특징적으로 활용된다.

[0003] 적합한 프로모터를 선별하는 것은 대사공학에서 중요한 요소이고, 이에 대한 다양한 접근방식이 개발되어 왔다. 이의 일환으로 특정 유전자에 삽입되어 그 유전자가 발현되면 형광 등의 표시로 발현을 나타내는 리포터유전자를 활용할 수 있는데, 프로모터와 리포터유전자를 접합하면 해당 프로모터의 발현량을 알 수 있다. 이러한 프로모터-리포터유전자 분석은 프로모터를 선별하고 프로모터의 활성을 측정하는 데 표준적인 접근방식으로 여겨져 왔으며, 그 적용범위는 게놈-광발현 분석(genome-wide expression assay) 영역으로 확장되었다. 일반적으로 사용되는 리포터 유전자들은 클로람페니콜 아세틸기전이효소(chloramphenicol acetyltransferase(*cat*)), 베타-갈락토시다아제(β -galactosidase(*lacZ*)), 아미노글리코사이드 인산기전이효소(aminoglycoside phosphotransferase(*aph*)), 알파-아밀라아제(α -amylase(*amy*)), 녹색형광단백질(green fluorescent protein(*gfp*))들을 암호화한다. 전사체학(transcriptomics)이나 단백질체학(proteomics)같은 유전자 발현 탐사(gene expression profile) 분석 기술은 방대한 게놈의 규모(genome wide scale)에서 효율적인 프로모터 선별 방법에 사용되어져 왔다. 전사체 탐사(transcriptome profiling)에서 마이크로어레이(microarray) 분석법은 상대적 전사 수준(relative transcript level)의 대용량 탐지가 가능하게 하였다. 마이크로어레이 데이터는 전사 수준에서의 프로모터의 강도를 의미하지만, 상대적으로 제한된 전사 수준의 탐지에 대한 다이نام릭 레인지 때문에 추가적인 확인도 필요하다. 최근 차세대 대용량 시퀀싱 기술이 전사체 측정 전분야에서 가능해졌다. RNA 시퀀싱은 막대한 수의 전사 시작 지점의 측정을 가능하게 하였고, 그 결과 유망한 프로모터의 로컬라이제이션(localization)과 프로모터 활성 측정도 가능하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 고호열성 고세균(hyperthermophilic archaeon)인 써모코쿠스 온누리네우스 NA1(*Thermococcus onnurineus* NA1)은 게놈분석(genomic analysis)을 통해 발견된 유전자군에 의해 암호화되는 일산화탄소 탈수소효소(CODH), 수소화효소(hydrogenase), Na^+/H^+ 역수송체(antiporter) 효소체계의 도움으로, 일산화탄소(CO)를 활용하여 수소(H_2)를 생산할 수 있는 것으로 알려졌다. 하지만 보다 향상된 수소 생산성을 갖는 균주의 개발이 필요하였다.

[0005] 이에 본 발명은 수소(H_2) 생산성을 높일 수 있는 프로모터의 제공을 목적으로 한다. 본 발명의 또 다른 목적은 상기 프로모터를 포함하는 재조합 벡터와 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공하는 것이다.

[0006] 본 발명은 또한 상기 프로모터 및 숙주세포를 이용한 유전자 발현 방법, 단백질 생산 방법 및 수소 생산 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명의 제 1 의 형태로 서열번호 1을 포함하는 프로모터를 제공한다.

[0008] 본 발명의 제 2 의 형태로 서열번호 1의 프로모터를 제공한다.

- [0009] 본 발명의 제 3 의 형태로 서열번호 1의 프로모터가 삽입된 재조합 벡터를 제공한다.
- [0010] 본 발명의 제 4 의 형태로 서열번호 1의 프로모터가 삽입된 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다.
- [0011] 본 발명의 제 5 의 형태로 프로모터 서열이 서열번호 1로 치환된 프로모터를 포함하는 숙주세포를 제공한다. 상기 숙주세포에 있어서, 숙주세포는 고세균, 보다 바람직하게는 *Thermococcus* 속 균주, 보다 더 바람직하게는 *Thermococcus onnurineus*이다.
- [0012] 본 발명의 제 6 의 형태로 서열번호 1의 프로모터를 이용한 유전자 발현 방법을 제공한다.
- [0013] 본 발명의 제 7 의 형태로 서열번호 1의 프로모터를 이용하여 목적 유전자를 발현시키고 이를 이용하여 단백질을 생산하는 것을 특징으로 하는 단백질 생산 방법을 제공한다.
- [0014] 본 발명의 제 8 의 형태로 서열번호 1을 포함하는 재조합 벡터를 이용하여 목적 유전자를 발현시키고 이를 이용하여 단백질을 생산하는 것을 특징으로 하는 단백질 생산 방법을 제공한다.
- [0015] 본 발명의 제 9 의 형태로 프로모터 서열이 서열번호 1로 치환된 프로모터를 포함하는 *Thermococcus* 속 균주를 이용한 수소 생산 방법을 제공한다.
- [0016] 상기 수소 생산 방법에 있어서, 상기 *Thermococcus* 속 균주는 *Thermococcus onnurineus*일 수 있다.

발명의 효과

- [0017] 본 발명에 따른 프로모터는 (1) 종래의 야생형에 포함되어져 있는 프로모터 보다 약 14배의 수준으로 전사효율이 높았으며, (2) 번역 정도는 야생형과 비교하여 1.5배 내지 1.9배 증가하여서 종래에 알려진 어떠한 프로모터 보다 더 강력하다. 상기 프로모터를 *Thermococcus onnurineus* NA1 의 CODH 유전자군 앞에 삽입하였을 때에는 야생형 대비 약 5 배의 수소생산율을 보였다. 따라서 본 발명에 따른 프로모터로 치환 된 균주는 수소 생산능력에서 종래의 야생형 대비 현저하게 높은 수소생산율을 가졌다. 또한 본 발명에 따른 *Thermococcus onnurineus* NA1 는 일산화탄소를 공급되는 조건에서 종래의 야생형 대비 균주 성장속도가 증가하였다. 따라서 본 발명에 따라 제조된 돌연변이 *Thermococcus onnurineus* NA1는 높은 수소생산율 뿐만 아니라 높은 균주성장율을 가지고 있어 수소 생산효율이 크게 증가된 균주이다.

도면의 간단한 설명

- [0018] **도 1**은 씨모코쿠스 균주의 가설 유전자의 프로모터 구역의 예상되는 모습으로서, 가설 유전자의 100bp 부터 1bp 의 상위부분이다. BRE는 TFIIB 인식 요소; TATA는 TATA-box; RBS는 리보솜 부착 부위; Start는 번역 개시 부위를 나타낸다.
- 도 2**는 돌연변이 균주 KS0510 (수탁번호: KCTC 12774BP) 의 제작 방법을 보여준다. 야생형 균주의 CODH 유전자군의 TON_1016를 P_{TN0510}으로 대체하였다. *P. furiosus*의 3-하이드록시-3-메틸글루타린 조효소 A(HMG-CoA) 환원효소 유전자를 마커로 사용하였다. 도면의 어두운 회색은 카본모노옥사이드 디하이드로게나아제(carbon monoxide dehydrogenase)를, 회색은 하이드로게나아제(hydrogenase)를, 밝은 회색은 Na⁺/H⁺ 역수송체(Na⁺/H⁺ antiporter)를 암호화하는 유전자군을 나타낸다.
- 도 3**은 KS0510 돌연변이주 (수탁번호: KCTC 12774BP)의 CODH 유전자군의 유전자 발현 수준을 나타낸다. TON_1018(67.7 kDa), TON_1023(61.7 kDa)이 암호화하는 단백질의 웨스턴 블롯팅 분석이다. M은 분자질량 표지(molecular mass marker)를, WT는 야생형을 나타낸다.

도 4는 KS0510 돌연변이주 (수탁번호: KCTC 12774BP)와 다른 돌연변이주의 CODH 유전자의 발현 수준을 나타낸다. KS0510(PTN0150 프로모터), KS0413(PTN0413 프로모터), KS0157(PTN0157 프로모터), MC01(PTK_gdh 프로모터) 돌연변이의 TON_1018 유전자의 mRNA 양을 RT-PCR을 통해 측정하였다. 상대적인 배수 차이(Relative fold difference)를 야생형의 값과 비교하였다.

도 5는 KS0510 돌연변이주 (수탁번호: KCTC 12774BP)와 다른 돌연변이주의 CODH 유전자의 발현 수준을 나타낸다. TON_1018이 암호화하는 단백질의 웨스턴 블롯팅 결과이다. M은 분자질량 표지(molecular mass marker)를, WT는 야생형을 나타낸다.

도 6은 CO가 240ml/분의 유량으로 공급될 때 야생형(검은 원)과 KS0510(흰 원)의 균주의 성장 속도를 나타낸다. 세포 성장은 600nm에서의 광학밀도(OD₆₀₀)를 측정하여 모니터링 하였다. CO는 초기 유량은 40ml/분이었고 OD₆₀₀이 약 0.3에 근접했을 때부터 240ml/분으로 공급하였다.

도 7은 CO가 240ml/분의 유량으로 공급될 때 야생형(검은 원)과 KS0510(흰 원)의 균주의 수소 생산율을 나타낸다. CO는 초기 유량은 40ml/분이었고 OD₆₀₀이 약 0.3에 근접했을 때부터 240ml/분으로 공급하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 본 발명의 제 1의 형태는 서열번호 1을 포함하는 프로모터이다. 본 설명 및 청구범위에서 "포함하는"이라는 용어가 사용될 때, 이는 다른 요소 또는 단계를 배제시키지 않는다. 본 발명의 목적을 위해, "~으로 이루어진"이라는 용어는 "포함하는"이라는 용어의 바람직한 실시양태인 것으로 간주된다. 본 발명에서 "프로모터"라는 용어는, 폴리머라아제에 대한 결합부위를 포함하고, 프로모터 하류(downstream) 유전자의 mRNA로의 전사개시 활성을 갖는, 코딩 영역의 상류(upstream)의 비해독된 뉴클레오티드 서열을 의미한다. 또한, 본 발명에서 "작동 가능하게 연결된"이라는 용어는, 프로모터 활성을 갖는 핵산 서열이 효소를 코딩하는 목적 유전자의 전사 개시 및 프로모터 서열과 유전자 서열의 기능적 연결, 즉 발현 이 필요한 유전자와 이의 조절 서열이 서로 기능적으로 결합되어 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결되는 것을 의미한다. 상기 서열번호 1을 포함하는 프로모터는 서열번호 1만으로 구성된 프로모터 뿐만 아니라 서열번호 1과 기능적으로 동등한 서열의 프로모터를 포함하는 것이다. 상기 '기능적으로 동등'하다는 것은 본 발명에 따른 서열번호 1의 프로모터와 100% 일치되지 않아도 RNA 중합효소에 의해 인지되어서 전사되어질 수 있는 프로모터를 말한다. 이와 같은 기능적으로 동등한 프로모터는 비록 이에 제한되는 것은 아니지만 핵산서열이 90% 이상 서열번호 1과 유사한 서열을 가진 프로모터일 수 있다. 보다 바람직하게는 핵산서열이 95% 이상 서열번호 1과 유사한 서열을 가진 프로모터 일 수 있고, 보다 더 바람직하게는 핵산서열이 98% 이상 서열번호 1과 유사한 서열을 가진 프로모터 일 수 있다.

[0020] 본 발명의 제 2의 형태는 서열번호 1의 프로모터이다. 상기 서열번호 1의 프로모터는 프로모터의 서열이 서열번호 1의 서열만으로 이루어진 프로모터이다.

[0021] 본 발명의 제 3의 형태는 서열번호 1의 프로모터가 삽입된 재조합 벡터이다. 본 발명에서 "벡터"라는 용어는, 적당한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 발현 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동 가능하게 연결된 필수적인 조절요소를 포함하는 유전자 제조물을 뜻한다. 상기 에서 "조절요소"는 전사를 수행하기 위한 프로모터, 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열, 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다. 또한, 본 발명에서 "숙주세포"라는 용어는, 벡터가 숙주세포에 형질전환됨으로서 숙주세포 내에서 다양한 유전 적 또는 분자적 영향을 미치게 되는 세포를 의미한다. 또한, 본 발명에서 "형질전환"이라는 용어는, DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체외의 인자로서 또는 염색체로 의 삽입에 의해 복제 가능하게 되는 것을 의미한다.

[0022] 본원에서 사용되는 바, "발현 벡터"라는 용어는 1개 이상의 "발현 카세트"의 존재를 특징으로 하는 핵산 비히클 (플라스미드)을 의미한다. 본원에서 사용되는 바, "발현 카세트"라는 용어는 관심 핵산 서열 (즉, "이중" 핵산 서열)의 유전자 발현을 허용할 수 있는 유전적 구축물을 의미한다. 상기 발현 카세트는 전사 및/또는 번역 조절에 관한 정보를 포함하는 조절 서열 요소를 포함하여야 하고, 상기 조절 서열은 관심 핵산 서열에 "작동 가능하게 연결"되어야 한다. 작동가능한 연결이란, 유전자 발현이 이루어질 수 있도록 하는 방식으로 조절 서열 요소와 발현시키고자 하는 핵산 서열이 이어지는 연결이다.

[0023] 본 발명의 발현 벡터는, 예컨대 플라스미드, 코스미드, 파지미드, 인공 염색체, 또는 유전 공학에서 통상 사용되는 또 다른 비히클일 수 있다. 상기 기술된 조절 서열을 포함하는 하나 이상의 "발현 카세트" 외에도, 상기

발현 벡터는 전형적으로는 핵산 서열의 삽입 및/또는 제거를 촉진시키기 위하여 하나 이상의 다중 클로닝 부위를 포함한다. 다중 클로닝 부위는 상기 기술된 발현 카세트의 상류 및 하류에 위치할 수 있으며, 이로써 전체 카세트의 대체가 이루어질 수 있다. 다중 클로닝 부위는 또한 상기 발현 카세트 내에서 프로모터 조절 서열의 하류, 및 3'-조절 서열의 상류에 위치할 수 있으며, 이로써 발현시키고자 하는 핵산 서열의 삽입 또는 대체가 이루어질 수 있다. 안정적인 형질감염을 위해 (하기 참조), 발현 벡터는 숙주 세포의 게놈에서 재조합 및 안정적인 통합을 촉진시키기 위하여 부위-특이적 인테그라제 또는 레콤비나제에 대한 인식 서열을 추가로 포함할 수 있다.

[0024] 재조합 발현 벡터를 디자인하고/거나 변형시키는 데 사용될 수 있는 다수의 방법이 관련 기술분야에 잘 확립되어 있다 (예컨대, Sambrook, J., and Russel, D.W. (2001), *Molecular cloning: A laboratory manual* (3rd Ed.) Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F.M. *et al.* (2001) *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley & Sons, Hoboken, NJ, USA 참조). 다수의 적합한 고세균을 위한 발현 벡터 또한 상업적으로 이용가능하며, 또한 어떤 벡터가 주어진 환경에서 관심 핵산 분자를 발현시키는 데 적합한지를 결정할 수도 있는 통상의 기술자에게 주지되어 있다.

[0025] 본 발명의 발현 벡터를 사용함으로써 발현시키고자 하는 핵산 서열은 모노시스트론 (즉, 단일의 폴리펩티드 또는 융합 단백질을 비롯한 단백질 코딩) 또는 폴리시스트론 (즉, 2개 이상의 개별 폴리펩티드 또는 단백질 코딩)일 수 있다.

[0026] 본 발명의 제 4의 형태는 서열번호 1의 프로모터가 삽입된 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포이다. 상기 숙주 세포는 고세균이며, 바람직하게는 *Thermococcus* 속 균주이며, 더 바람직하게는 *Thermococcus onnurineus*이나 이에 한정되지는 않는다.

[0027] 본 발명의 제 5의 형태는 프로모터 서열이 서열번호 1로 치환된 프로모터를 포함하는 숙주세포이다. 상기 숙주 세포는 고세균이며, 바람직하게는 *Thermococcus* 속 균주이며, 더 바람직하게는 *Thermococcus onnurineus*이나 이에 한정되지는 않는다.

[0028] 본 발명의 제 6의 형태는 서열번호 1의 프로모터를 이용한 유전자 발현 방법이다.

[0029] 상기 프로모터를 이용하는 것은 프로모터를 목적 유전자의 상위구역(upstream region)에 삽입될 수 있다. 수소를 생산하기 위하여서는 상기 프로모터를 *Thermococcus onnurineus* NA1 균주의 CODH 유전자의 상위구역에 삽입할 수 있다. 상기 프로모터를 삽입하면서 마커로 사용하여 삽입될 수 있다. 상기마커는 다양하게 선택되어 질 수 있고, 바람직하게는 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A(HMG-CoA) 환원효소 유전자이다.

[0030] 본 발명의 제 7의 형태는 서열번호 1의 프로모터를 이용한 목적 유전자를 발현시키고, 이를 이용하여 단백질을 생산하는 것을 특징으로 하는 단백질 생산 방법이다.

[0031] 본 발명의 제 8의 형태는 서열번호 1을 포함하는 재조합 벡터를 이용하여 목적 유전자를 발현시키고 이를 이용하여 단백질을 생산하는 것을 특징으로 하는 단백질 생산 방법이다.

[0032] 본 발명의 제 9의 형태는 프로모터 서열이 서열번호 1로 치환된 프로모터를 포함하는 *Thermococcus* 속 균주를 이용한 수소 생산 방법이다. 상기 *Thermococcus* 속 균주는 *Thermococcus onnurineus*인 것이 바람직하나 이에 제한되지 않는다.

[0033] 이하, 본 발명의 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예들은 본 발명을 예시하는 것으로 본 발명의 내용이 실시예에 한정되는 것은 아니다.

- [0034] [실시예 1]
- [0035] RNA-seq에 의한 새로운 강한 프로모터의 선별
- [0036] 균주, 배지와 배양 조건
- [0037] *T. onnurineus* NA1(KCTC10859)의 야생형 균주와 이의 돌연변이인 KS0157, KS0413, MC01을 효모추출 펩톤-황(yeast extract-peptone-sulfur; YPS) 배지에서 배양하였다. CO가 공급되는 조건에서 배양하기 위해, 수정(modified medium; MM)배지 1에 100% CO 가스를 공급했다(MM1-CO 배지). 전체 RNA 분리(total RNA extract)와 웨스턴 블롯팅(western blotting)을 위해, 작업용량을 80℃에서 80ml로 맞춘 125ml 혈청 보틀에서, 대수증식기(exponential growth phase)까지 균주를 배양했다. 생물반응기(bioreactor)에서의 회분배양(batch culture)을 위해, 균주를 3리터 생물반응기(Fermentec, Cheongwon, Korea)에서 배양하였고, 이것의 작업용량은 2리터로 맞추었고, MM1에는 1% 효모 추출물과 10배 이상의 홀덴(Holden) 미량 원소/Fe-EDTA 용액(Holden et al. 2001)을 첨가하였다. 교반속도는 300rpm이었고 pH는 3.5% NaCl 상태에서 6.1에서 6.2 사이가 되도록 0.2M NaOH를 이용하여 조절하였다. 100% CO의 주입가스가 매쓰 플로우 컨트롤러(mass flow controller; MKPrecision, Seoul, Korea)를 사용하여 240ml/분의 공급률로 공급되었다. 배지를 무산소의 가스 혼합물(N₂:H₂:CO₂, 90:5:5)로 채운 무산소 챔버(Coy Laboratory Products, Grass Lake, USA)에 둬으로써, 클러스터(cluster)는 무산소상태를 유지시켰고, 생물반응기에는 마이크로파저(microsparger)로 순 아르곤 가스를 살포했다.
- [0038] 돌연변이 제작
- [0039] *T. onnurineus* NA1의 P_{TN0510} 프로모터는, P_{TN0510_F}/P_{TN0510_R} 프라이머 세트의 게놈 DNA를 사용하여 TON_0510의 시작 코돈의 100bp짜리 상위구역(upstream region)을 증폭시킴으로써 얻어냈다. 도 1에 나타난 *T. onnurineus* NA1의 P_{TN0510} 프로모터의 서열은 다음과 같다.
- [0040] *T. onnurineus* NA1 P_{TN0510} 프로모터 : 5'-
TTCCACAGTATTGAGGGTCTTTTCCTAAGTTTGGGGAGAAAGCTATATAAGCTTTTTCAGTGCATTAATGTATGAAGTAATCCCACGGAGGTGAAGAAA-
3' (서열번호 1)
- [0041] pUC118_P_{TN0510}_HMG_{pfu} 플라스미드는 pUC118_P_{TN0413}_HMG_{pfu} 플라스미드에서 P_{TN0413}을 제거하고 Ivs_pUC118_P_{TN0413}_HMG_F/Ivs_pUC118_P_{TN0413}_HMG_R 프라이머 쌍을 이용한 인버스(inverse) PCR과 원-스텝 SLIC(sequence and ligation independent cloning) 법으로 P_{TN0510}을 걸찰하여 제작하였다.
- [0042] pUC118_P_{TN0413}_HMG_{pfu} 플라스미드는 Ivs_pUC118_F/Ivs_pUC118_R 프라이머 쌍을 이용한 인버스(inverse) PCR로 pUC118_P_{gdh}_HMG_{pfu} 플라스미드에서 P_{gdh}를 제거하고 원-스텝 SLIC법(sequence and ligation independent cloning method)으로 P_{TN0413}을 걸찰하여 제작하였다.
- [0043] pUC118_P_{gdh}_HMG_{pfu} 플라스미드는 *T. kodakarensis* KOD1으로부터 얻은 글루탐산 탈수소효소(glutamate dehydrogenase)와 *P. furiosus* (HMG)로부터 얻은 HMG-CoA 환원효소 유전자를 이용하여 제작되었다.
- [0044] *T. onnurineus*의 P_{gdh} 프로모터는 P_{TN0157_F}/P_{TN0157_R} 프라이머 세트의 게놈 DNA를 사용하여 TON_0157의 300bp의 시작코돈의 상위구역을 증폭시킴으로써 얻었다.
- [0045] pUC118_P_{TN0510}_HMG_{pfu} 플라스미드로 *T. onnurineus* NA1 야생형 균주를 형질전환 하였고, 선택적 표지(selection marker)로서 10 μM의 심바스타틴(simvastatin)이 있는 상태에서 배양했다. *T. kodakarensis* KOD1에 사용된 유전자파괴 체계(gene disruption system)를 적용함으로써 KS0515 돌연변이주가 제작되었는데, CODH 유전자군의 TON_1016를 P_{TN0510}으로 대체하였다. 그 과정에서 D1016_confirm_F/D1016_confirm_R 프라이머 쌍을 사용한 PCR로 상동성 재조합체(homologous recombinants)를 확인하였다.

[0046] 상기 프라이머들의 염기서열은 다음 표 1과 같다.

표 1

[0047]

프라이머	염기서열
P _{TN0510} _F	5'-ctcctctatttccattttcttcacctccgtgggat-3' (서열번호 2)
P _{TN0510} _R	5'-tgagtgatggttgggtccacagtattgagggtct-3' (서열번호 3)
Ivs-pUC118_P _{TN0413} _HMG_F	5'-cccaacctactcaataact-3' (서열번호 4)
Ivs_pUC118_P _{TN0413} _HMG_R	5'-atggaaatagaggagattata-3' (서열번호 5)
D1016_confirm_F	5'-gaggtagtcacgcttgagc-3' (서열번호 6)
D1016_confirm_R	5'-ttgttggcgtaaggacaac-3' (서열번호 7)

[0048] RNA 분리(RNA extraction)와 RNA 시퀀싱(RNA sequencing)

[0049]

RNA는 TRIzol 시약(Invitrogen, Caelsbad, USA)으로 준비했는데 제작사의 지시를 따르되 약간의 수정을 가하였고, 전체 RNA의 양과 질은 RNA 일렉토그램(Agilent 2100 Bioanalyzere, Palo Alto, USA)과 RIN(RNA Integrity Number)(Schroeder *et al.* 2006)으로 측정하였다. 각 샘플에서 RIN 값이 8.0이 넘는 전체 RNA 중 10 μ g을 시재료로서 주입하였고 세균을 위한 rRNA 제거 키트 Ribo-Zero(Epicentre, Madison, USA)를 처리하였다. 그 결과로 얻은 mRNA 샘플의 시퀀싱 라이브러리(Sequencing library) 작업을 제작사의 사용법에 따라 TruSeq Stranded Total RNA Sample Prep Kit(Illumnia, San Diego, USA)으로 진행했다. 시퀀싱 작업은, 방향성이 있는 100 base pair의 paired-end reads를 만들기 위해 HiSeq 2500(Illumnia, San Diego, USA)으로 수행했다. 양질의 필터처리된 reads(Quality-filtered reads)는 GLC Genomic Workbench 6.5(CLC bio, Arhus, Denmark)를 이용하여 표준 유전체 시퀀싱(reference genome sequence(NCBI Bioproject ID PRJNA59043))에 맵핑(mapping)을 하였다. 상대적 전사비(relative transcript abundance)는 RPKM 단위(kilobase당과 백만reads당 총 sequencing에 대한 reads수)로 계산하였다.

[0050]

정량 RT-PCR과 western blotting

[0051]

전체 RNA 시료에서 genomic DNA를 제거하기 위해, 8 μ g의 RNA에 RNase가 없는 DNase I(Thermo Scientific Fermentas, St. Leon-Rot, Germany) 8unit을 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 배양하였고, 클로로포름 추출물과 에탄올 침전물로 정제하였다. RNA는 NanoDrop 2000 UV-Vis spectrophotometer(Thermo Scientific, West Palm Beach, USA)로 정량하고, cDNA는 1 μ g의 RNA를 40unit의 Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase(Thermo Scientific Fermentas, St. Leon-Rot, Germany)와 5 μ M의 랜덤 헥사머(random hexamer)와 1mM의 삼인산 디옥시뉴클레오시드(deoxynucleoside triphosphate(dNTP))와 함께 역전사 버퍼에서 37 $^{\circ}$ C로 1시간 동안 배양하여 만들었다. 반응산물은 순차적으로 RT-PCR에 적절한 농도로 희석됐고, 샘플은 SYBR green real-time PCR master mix(Toyobo, Osaka, Japan)을 사용해 증폭했다. 증폭신호는 StepOnePlus system(Applied Biosystems, Foster City, USA)을 사용해 감지됐다. RT-qPCR에 사용된 프라이머의 서열은 다음과 같다.

[0052]

codh_F : 5'-gttcgagaatcctgctggtctt-3' (서열번호 8)

[0053]

codh_R : 5'-agcaactggcaagtctgaaatg-3' (서열번호 9)

[0054]

mch_F : 5'-tgccatcttctcggtttg-3' (서열번호 10)

[0055]

mch_R : 5'-gctctgctatgtccattatgtattctct-3' (서열번호 11)

[0056]

mnh_F : 5'-ccgtaggaaccagatgtacttt-3' (서열번호 12)

[0057]

mnh_R : 5'-ccgtcaaatcggaagattaa-3' (서열번호 13)

[0058]

각 유전자의 상대적인 양은 상응하는 16S rRNA의 양에 따라 표준화한 후 상대적인 표준곡선을 사용한 C_T(cycle

threshold) 값으로부터 도출했다.

[0059] 웨스턴 블롯(Western blot)은 Immun-Star horseradish peroxidase chemiluminescent kit(Bio-Rad, Hercules, USA)이 포함된 화학발광성의 염색시료를 사용하여 수행됐다. 다클론 항체(polyclonal antibodies)는 각각 TON_1018과 TON_1023에 의해 암호화된 단백질에 저항을 갖도록 토끼에서 배양되었다. 그 단백질은 Rosetta(DE3)pLysS의 대장균(*Escherichia coli*)에서 과발현되었는데, His-Bind 수지(Vovagen, Madison, USA)로 정제되었고 상응하는 토끼 항체(custom rabbit antibody)를 생산하기 위해 면역처치와 혈청 채취(serum-collection) 과정이 이어졌다.

[0060] **분석 방법**

[0061] 세포 성장은 BioPhotometer plus UV-Vis 분광광도계(Eppendorf, Hamburg, Germany)를 이용하여 600nm(OD₆₀₀)에서 광학밀도를 측정함으로써 모니터 됐다. 선형 상관관계를 알아내기 위해 생체량의 단백질 함량과 광학밀도 사이의 간격을 측정하면서, DC protein assay kit(Bio-Rad, Hercules, USA)을 사용하여 세포 용해물에서의 세포 단백질의 양을 측정함으로써 세포건조무게(DCW, dry cell weight)를 간접적으로 계산하였는데, 단백질이 세포건조무게의 약 50%를 구성한다는 가정에 근거한 것이다. OD₆₀₀의 단위값은 0.361g/리터에 해당했다. 생물반응기 실험에서의 H₂ 생산율은 가스에서의 H₂의 함유량에 근거하여 계산되었는데, 가스유량은 습식 가스 미터(Shinagawa, Tokyo, Japan)로 측정되었다. H₂의 총량은 Molsieve 5A column(Supelco, Bellefonte, USA)과 Porapak N column(Supelco)과 열전도성 감지기와 불꽃 이온화 검출기를 갖춘 YL6100 가스 크로마토그래프(GC)(YL Instrument Co., Anyang, Korea)로 측정하였다. 아르곤은 30ml/분 가스유량의 운반가스로 사용되었다.

[0062] 글루탐산 탈수소효소나 s층 단백질 같은 잘 알려진 강한 프로모터를 CODH 유전자군 앞에 치환함으로써, CO나 제 공기장의 배기가스로부터 H₂ 생산이 향상됨을 측정했다.

[0063] rRNA를 감소시킴으로써 모든 전사체의 RNA를 풍부하게 한 후에, HiSeq 2500 sequencer(Illumina)를 사용하여 두 개의 생물 복제품에 대해, 100% CO 상태에서 배양된 *T. onnurineus* NA1으로부터 추출된 RNA 샘플에서 새로운 강한 프로모터를 발견하기 위해 RNA-seq를 수행했다. 시퀀싱은 각 샘플에서 3600만 리드(reads)와 4130만 리드를 생산했고, 그것들의 85%는 게놈(genome)으로 맵핑(mapping)이 가능했다. 이 리드 중 65%가 rRNA나 tRNA에 맵핑이 된 반면, 16%는 코딩 시퀀스(coding sequence)에 맵핑되었고, 4%는 유전자사이지역(intergenic region)에 맵핑되었다.

[0064] 강한 프로모터를 동정하기 위한 시도로써, 각 RNA 전사체의 상대적 전사비(relative transcript abundance)는 RPKM 단위로 계산되어졌는데, 상위 20개의 고 RPKM값을 갖는 프로모터를 선별하였다(표 2). 그것들은 포름산 염이나 탄수화물 대사, 산화 스트레스 방어나 산화반응 등과 관련된 유전자에 상응했다. TON_0510를 암호화하는 유전자는 두 번째로 높은 RPKM 값을 갖는다.

표 2

[0065]

순위	발현유전자	단백질	RPKM 지수
1	TON_0868	과산화물 환원효소 (Superoxide reductase)	50926.0
2	TON_0510	가설 단백질 (Hypothetical protein)	30811.9
3	TON_0544	알콜 탈수소효소 (Alcohol dehydrogenase)	30770.2
4	TON_1564	4Fe-4S 결합 단백질 (4Fe-4S binding protein)	30277.6
5	TON_1573	포름산 운송체 (formate transporter)	26101.1
6	TON_0847	알킬 히드رو과산화물 환원효소 서브유닛 C (Alkyl hydroperoxide reductase subunit C)	26024.7
7	TON_0829	페록시레독신 (Peroxiredoxin)	24470.3
8	TON_1563	포름산 탈수소효소 서브유닛 알파 (Formate dehydrogenase subunit alpha)	21601.5
9	TON_0157	글루탐산 탈수소효소 (Glutamate dehydrogenase)	20969.4
10	TON_0594	당 결합 단백질 (Sugar binding protein)	14619.1
11	TON_0747	가설 단백질 (Hypothetical protein)	13634.5
12	TON_0413	S층 단백질 (S-layer protein)	11037.7

13	TON_1510	전사조절체 (Transcriptional regulator)	9162.2
14	TON_0659	당-인산 뉴클레오티드전달효소 (Sugar-phosphate nucleotidyltransferase)	7654.8
15	TON_0867	루브레독신 (Rubredoxin)	6857.6
16	TON_0234	가설 단백질 (Hypothetical protein)	6842.7
17	TON_1426	단백질분해효소체 서브유닛 2 (Proteasome subunit 2)	6192.5
18	TON_0577	가설 단백질 (Hypothetical protein)	5957.1
19	TON_1058	막 단백질분해효소 서브유닛 (Membrane protease subunit)	5648.4
20	TON_0866	루브레리쓰린 (Rubrerythrin)	5351.2

[0066] 국립 생명공학 정보센터(NBCI, national center for biotechnology information)의 단백질 데이터베이스상의 BLASTP 프로그램(Altschul *et al.* 1997)을 이용한 상동 염기서열 조사는 TON_0510 유전자가 *Thermococcales* strains, *Thermococcus* sp. 4557(WP_014012107.1, 78% identity), *Thermococcus* sp. CL1(WP_014788026.1, 74%), *Thermococcus zilligii*(WP_029550986.1, 66%), *Thermococcus* sp. A501(AIU70382.1, 67%), *Thermococcus nautilus*(AHL22042.1, 60%)로부터 가설단백질을 암호화하는 몇몇 유전자와 상응함을 밝혀냈다.

[0067] 본 발명자들은 *Thermococcus* sp. 4557과 *Thermococcus* sp. CL1 유전자의 ATG 번역 시작 코돈에서 1bp부터 100bp까지의 상위 구역(upstream region)을 검색할 수 있었다. 염기서열 배열은 TFIIB 인식 요소(BRE), TATA-box와 리보솜 부착 부위(ribosome binding site, RBS)가 보존되어있음을 밝혀냈다(도 1).

[0068] [실시예 2]

[0069] 강한 프로모터에 의한 유전자 발현

[0070] TON_0510 유전자 프로모터의 세기를 확인하기 위해, 전사조절인자(transcriptional regulator)를 암호화하는 TON_1016의 개방형 해독틀(open reading frame(ORF))을 100bp 상위 구역인 P_{TON0510}로 대체함으로써, P_{TON0510}를 CODH 유전자 집단의 상위 구역(upstream region)에 복제하였다(도 2). 이로 KS0510 돌연변이 균주 (수탁번호: KCTC 12774BP)를 제작하였다. 상기 균주는 2015년 3월 27일 한국생명공학연구원에 수탁번호 KCTC 12774BP로 수탁되었다. 각각 CODH와 다수의 수소화효소 하부구조와 Na⁺/H⁺ 역수송체의 하부구조를 암호화하는 TON_1018, TON_1023, TON_1031 세 유전자는 CODH 유전자 군에 존재하는데, 그 발현 정도는 정량 RT-PCR과 웨스턴 블롯팅에 의해 측정되었다. 정량 RT-PCR 분석은 KS0510의 TON_1018, TON_1023, TON_1031 유전자가 wild type보다 각각 14배, 6.6배, 4배 더 많이 발현한다는 것을 밝혀냈다. 전사 데이터와 일치하게, TON_1018과 TON_1023의 번역 정도는 wild type과 비교하여 KS0157 돌연변이주에서 각각 1.9배와 1.5배 증가했다(도 3). 이 결과는 P_{TON0510}이 원래의 유전자형보다 강한 프로모터로서 기능함을 나타낸다. CODH 유전자군 상위에서 강한 프로모터를 갖는 것으로 알려진 KS0413과 KS0157 같은 다른 균주와 비교했을 때, KS0510 돌연변이 (수탁번호: KCTC 12774BP)는 전사와 번역 모두에서 더 높은 TON_1018의 발현 수준을 보였고(도 4), RNA-시퀀싱 자료에서도 확인되었다(도 5).

[0071] [실시예 3]

[0072] KS0510 돌연변이의 성장과 H₂ 생산의 분석

[0073] KS0510 돌연변이 (수탁번호: KCTC 12774BP)의 CODH 유전자군의 전사와 번역 정도에 기초했을 때, 돌연변이주의 CO에 대한 H₂ 생산성과 성장의 증가는 예견된 것이었고, 이를 100% CO가 240ml/min의 유속으로 공급된 생물반응기에서 실험하였다. 돌연변이주는 wild type 보다 최대 5배의 생물질 생산량 증가를 보이며 훨씬 더 잘 성장했다(도 6). 배양 시간 내내, 돌연변이주는 야생형 보다 최대 5배 더 높은 H₂ 생산성을 보였다(도 7). 표 3에서 보는 바와 같이, KS0510 돌연변이 (수탁번호: KCTC 12774BP)는 야생형이나 강한 프로모터로 대체된 다른 돌연변이

이주와 비교하여, 최대 비성장속도(specific growth rate)과 최대 H₂ 생산율과 생물질 생산량과 최대 비수소생산율과 수소생산량의 매우 향상된 동역학 지표를 보였다 (표 3). 이는 RNA-seq를 통한 새로운 강한 프로모터의 선택은 목적 단백질 생산의 향상에 매우 효과적인 접근방법임을 보여준 것이다.

표 3

동역학 지표	Wild type	KS0510	KS0413	KS0157	MC01
최대비성장속도(/h)	0.31	0.88	0.85	0.83	0.72
최대 수소생산율(mmol/liter · h)	31.8	155.1	61.9	81.6	123.5
생물질 생산량	0.09	0.25	0.14	0.18	0.23
최대 비수소생산율(mmol/g · h)	93.4	245.1	171.0	124.2	194.7
수소 생산율(mmol/liter · h)	30.2	131.2	103.3	70.9	102.6

수탁번호

기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC12774BP

수탁일자 : 20150327

도면

도면1

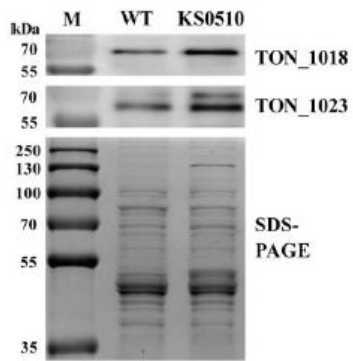
```

                BRE   TATA
Thermococcus sp. 4557 TTCCGCAGTATTTGTGGGGCATCTCCCTAAATTTGGGGAGAAAGCTATATAAGCTTTTTTCG
Thermococcus sp. CLI TTCCGCAGTATTTGGGGGCTTCCCTTAAATTTGGGCAGAAAGCTATATAAGCTTTTTTCG
T. onnurineus NA1 TTCCACAGTATTTGAGGGTCTTTTCCCTTAAAGTTTGGGGAGAAAGCTATATAAGCTTTTTTCA
                ***** ** *:* ** ***,***** *****
                RBS      Start
GTGCAITTTAIGTATGAAGTAATCCTTTGGAGGTGGATAACATG
GTGGATATTGGTATGAAGTAATCCTTTGGAGGTGGATAACATG
GTGCAITTAATGTATGAAGTAATCCACGGAGGTGAAGAAAATG
*** **::: ***** ***** : *****,* **,***
    
```

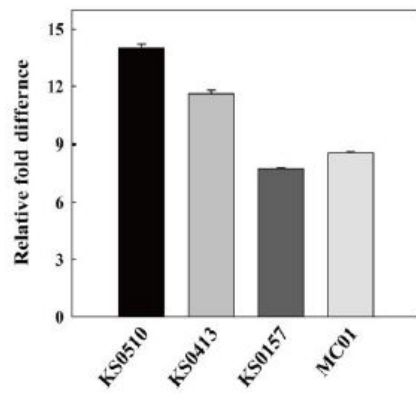
도면2



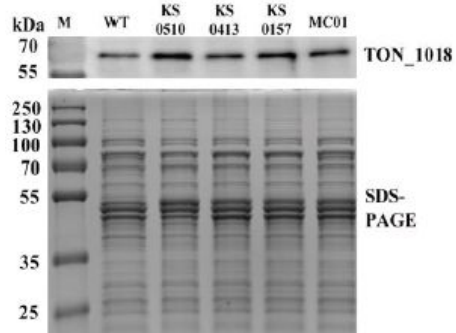
도면3



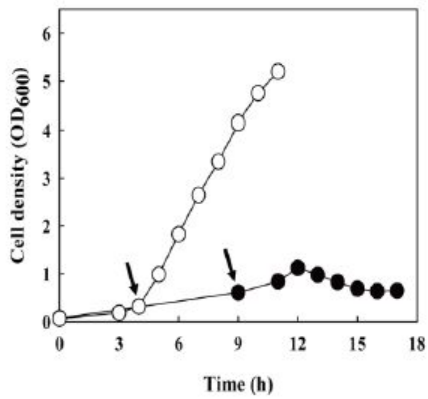
도면4



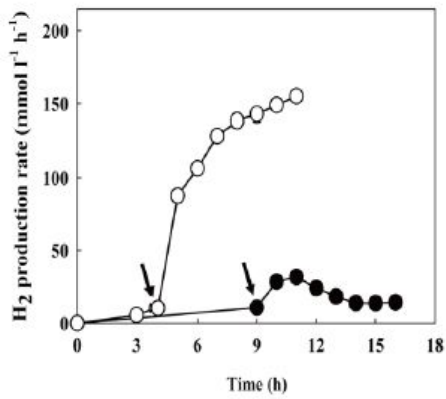
도면5



도면6



도면7



서열 목록

- <110> Korea Institute of Ocean Science and Technology
- <120> Novel Promoter and Methods of production of hydrogen using thereof
- <130> PN140043
- <160> 13
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 100
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> T. onnurineus NA1 PTN0510 promoter
- <400> 1

ttccacagta ttgagggtct tttccttaag tttggggaga aagctatata agctttttca 60

gtgcattaat gtatgaagta atcccacgga ggtgaagaaa 100

<210> 2

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> T. onnurineus NA1 PTN0510_F primer

<400> 2

ctcctctatt tccattttct tcacctccgt gggat 35

<210> 3

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> T. onnurineus NA1 PTN0510_R primer

<400> 3

tgagtgatgg ttgggttcca cagtattgag ggtct 35

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> T. onnurineus NA1 Ivs-pUC118_PTNO413_HMG_F primer

<400> 4

cccaaccatc actcaaatac t 21

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> T. onnurineus NA1 Ivs-pUC118_PTNO413_HMG_R primer

<400> 5

atggaaatag aggagattat a 21

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> T. onnurineus NA1 D1016_confirm_F primer

<400> 6
gagtagtcc agccttgagc 20

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> T. onnurineus NA1 D1016_confirm_R primer
<400> 7
ttgttggcgt taaggacaac 20
<210> 8
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> T. onnurineus NA1 codh_F primer
<400> 8
gttcgagaat cctgctggtc tt 22
<210> 9
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> T. onnurineus NA1 codh_R primer
<400> 9
agcaactggc aagtctgaaa tg 22
<210> 10
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> T. onnurineus NA1 mch_F primer
<400> 10
tgccatcttc tcggctttg 19
<210> 11
<211> 28
<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> T. onnurineus NA1 mch_R primer
 <400> 11
 gctctgctat gtccattatg tattctct 28

<210> 12
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> T. onnurineus NA1 mnh_F primer
 <400> 12
 ccgtaggaac cacgatgtac ttt 23

<210> 13
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> T. onnurineus NA1 mnh_R primer
 <400> 13
 ccgtcaaadc ggcaagatta a 21