



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 24 924 T2** 2006.02.16

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 972 836 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 24 924.4**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 110 008.2**

(96) Europäischer Anmeldetag: **21.05.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **19.01.2000**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **27.04.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **16.02.2006**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/55** (2006.01)

C12N 9/22 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12P 21/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

14186198 22.05.1998 JP

(84) Benannte Vertragsstaaten:

DE, FR, GB

(73) Patentinhaber:

Riken, Wako, Saitama, JP

(72) Erfinder:

**Morishima, Nobuhiro, Wako-shi, Saitama
351-0198, JP; Shibata, Takehiko, Wako-shi,
Saitama 351-0198, JP; Mizumura, Hikaru,
Fujimi-shi, Saitama 354-0004, JP**

(74) Vertreter:

Vossius & Partner, 81675 München

(54) Bezeichnung: **Verfahren zum Spalten von DNS**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung**GEBIET DER ERFINDUNG**

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Spalten von DNA, umfassend das Reagieren der DNA mit einer ortsspezifischen Endonuclease, die eine spezifische Nucleotidsequenz erkennt.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Die Endonuclease ist eine Nuclease (Nucleinsäure abbauendes Enzym), das die Phosphodiesterbindung einer Polynucleotidkette hydrolysiert. Die Endonuclease erkennt und bindet an eine spezifische Nucleotidsequenz entlang von DNA-Molekülen, wobei die Moleküle innerhalb der Erkennungssequenz gespalten werden.

[0003] Die Endonuclease ist ein notwendiges Enzym für die heutigen fortschrittlichen gentechnischen Verfahren zur Clonierung und Analyse von Genen.

[0004] Von einer ortsspezifischen Endonuclease Endo. SclI (hier nachstehend auch als „SclI“ bezeichnet) aus einem eukaryontischen Mikroorganismus (z.B. Hefe) ist bekannt, dass sie ein Heterodimer ist, die Untereinheiten mit 75 kDa und 50 kDa besitzt. Die Untereinheiten von SclI sowie Gene, die die Untereinheiten codieren, wurden cloniert, und deren Nucleotidsequenzen wurden bestimmt (für die 75 kDa-Untereinheit vgl. Morishima, N. et al., J. Biol. Chem. 265, 15189–15197 (1990) und für die 50 kDa-Untereinheit vgl. JP-B-7-77556).

[0005] Um die vorstehend beschriebene Endonuclease zur künstlichen Modifikation eines biochemischen Mittels, eines Gens oder dergleichen in großem Maßstab zu nutzen, muss eine Massenproduktion der Endonuclease mit einem Genexpressionssystem erfolgen. Die Endonuclease funktioniert erst, wenn sie eine spezifische Nucleotidsequenz erkennt, d.h. die Endonuclease muss für die zu erkennende Nucleotidsequenz spezifisch sein.

[0006] Die 50 kDa-Untereinheit der vorstehend beschriebenen Endonuclease SclI wird von den Mitochondriumgenomen der Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) codiert. Ein Gen eines Hefe-Mitochondriumgenoms enthält für Mitochondrien einzigartige Codons, die sich von den Aminosäurecodons (Universalcodons) unterscheiden, die in Genexpressionssystemen aus Organismen verwendet werden, die im Allgemeinen zur Proteinexpression (*E. coli*, Baculovirus, Hefe etc.) im großem Maßstab verwendet werden. Falls dieses Gen des Mitochondriumgenoms direkt verwendet wird, produziert das Proteinexpressionssystem kaum ein Protein einer ursprünglichen Aminosäuresequenz. Während beispielsweise TGA als Universalcodon ein Stoppcodon ist, ist es in Mitochondrien ein unterschiedliches Codon, das eine andere Aminosäure (Trp) codiert. Ein Gen kann in Mitochondrien normal exprimiert werden, aber die Expression desselben Gens kann aufgrund einer vom Stoppcodon verursachten unvollständigen Übersetzung in einem allgemeinen Expressionssystem wie *E. coli* zu einem unvollständigen Protein führen.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0007] Die vorliegende Erfindung zielt auf die Bereitstellung eines Verfahrens zum Spalten von DNA ab, umfassend das Reagieren der DNA mit einer ortsspezifischen Endonuclease, die eine spezifische Nucleotidsequenz erkennt.

[0008] Die hier genannten Erfinder haben intensive Studien betrieben, um die vorstehend beschriebenen Probleme zu lösen. Sie waren folglich bei der Bereitstellung eines Verfahrens zum Spalten von DNA erfolgreich, das das Reagieren der DNA mit einer ortsspezifischen Endonuclease umfasst, die eine spezifische Nucleotidsequenz erkennt, wobei die vorliegende Erfindung vollendet wurde.

[0009] Demzufolge betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Spalten von DNA, die die Sequenz aus 26 Nucleotiden: GCCCAGACATATCCCTGAATGATACC umfasst, umfassend das Reagieren der DNA mit:

- (i) einem Endonucleaseprotein, das die in SEQ ID NR: 3 dargestellte Aminosäuresequenz umfasst; oder
- (ii) einem Endonucleaseprotein, das eine von SEQ ID NR: 3 durch Substitution von Gly mit Lys bei Aminosäure 217 und Asn mit Asp bei Aminosäure 346 abgeleitete Aminosäuresequenz umfasst,

wobei die DNA innerhalb der Sequenz aus 26 Nucleotiden: GCCCAGACATATCCCTGAATGATACC gespalten wird, um gestufte Enden zu erzeugen. Die Beschreibung der vorliegenden Erfindung verwendet eine Endonu-

lease, die die Nucleotidsequenz: GCCCAGACATATCCCTGAATGATACC erkennen kann.

[0010] Ferner wird in der Beschreibung auch ein rekombinantes Protein von entweder (a) oder (b) beschrieben:

- (a) ein Protein, das die in SEQ ID NR: 3 dargestellte Aminosäuresequenz umfasst; oder
- (b) ein Protein mit einer Endonucleaseaktivität zur Erkennung der Nucleotidsequenz: GCCCAGACATATCCCTGAATGATACC, wobei das Protein mindestens eine Deletion, Substitution oder Addition der Aminosäure in der in SEQ ID NR: 3 dargestellten Aminosäuresequenz umfasst.

[0011] Außerdem wird in der Beschreibung auch ein Gen beschrieben, das das rekombinante Protein von entweder a oder b codiert:

- (a) ein Protein, das die in SEQ ID NR: 3 dargestellte Aminosäuresequenz umfasst; oder
- (b) ein Protein mit einer Endonucleaseaktivität zur Erkennung der Nucleotidsequenz: GCCCAGACATATCCCTGAATGATACC, wobei das Protein mindestens eine Deletion, Substitution oder Addition der Aminosäure in der in SEQ ID NR: 3 dargestellten Aminosäuresequenz umfasst.

[0012] Zudem wird in der Beschreibung ein Gen beschrieben, das DNA von entweder (c) oder (d) enthält:

- (c) DNA, das eine in SEQ ID NR: 2 dargestellte Nucleotidsequenz umfasst; oder
- (d) DNA, die ein Protein mit einer Endonucleaseaktivität zur Erkennung der Nucleotidsequenz: GCCCAGACATATCCCTGAATGATACC codiert, wobei die DNA unter stringenten Bedingungen mit DNA hybridisieren kann, die die in SEQ ID NR: 2 dargestellte Nucleotidsequenz umfasst.

[0013] Außerdem wird in der Beschreibung ein rekombinanter Vektor beschrieben, der das vorstehend beschriebene Gen umfasst.

[0014] Zusätzlich wird in der Beschreibung eine Transformante beschrieben, die den vorstehend beschriebenen rekombinanten Vektor umfasst.

[0015] Außerdem wird in der Beschreibung ein Verfahren zur Herstellung der Endonuclease beschrieben, umfassend die Schritte der Züchtung der vorstehend beschriebenen Transformante; und das Gewinnen einer Endonuclease aus einer Kultur, die die Nucleotidsequenz: GCCCAGACATATCCCTGAATGATACC erkennen kann.

[0016] In der Beschreibung wird auch eine Endonuclease beschrieben, die durch das Verfahren hergestellt wird.

[0017] Schließlich wird in der Beschreibung ein Kit beschrieben, der die Endonuclease und/oder das rekombinante Protein und/oder das Gen und/oder den rekombinanten Vektor und/oder die vorstehend erwähnte Transformante umfasst.

[0018] Die Bestandteile des Kits können in Behältern wie Phiolen, fakultativ in Puffern und/oder Lösungen, verpackt werden. Gegebenenfalls können ein oder mehrere Bestandteile in ein und denselben Behälter verpackt werden.

[0019] Es sollte angemerkt werden, dass ausschließlich das Verfahren, wie in Patentanspruch 1 definiert, Teil der Erfindung ist.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0020] [Fig. 1](#) stellt die Aminosäuresequenz einer Endonuclease vor und nach der Modifikation dar;

[0021] [Fig. 2](#) stellt die Schritte zur Konstruktion von Plasmid pY673L dar;

[0022] [Fig. 3](#) stellt die Schritte zur Konstruktion der Plasmide pEN1.7 und pEN0.5 dar;

[0023] [Fig. 4](#) stellt die Nucleotidsequenz des Gens der 50 kDa-Untereinheit von Scl dar, das modifiziert wurde, so dass sie mit dem Universalcode übereinstimmt;

[0024] [Fig. 5A](#) und [Fig. 5B](#) sind Photos der Elektrophorese, die die sequenzspezifischen Endonucleaseaktivitäten der 50 kDa-Untereinheit der modifizierten Scl^I zeigen;

[0025] [Fig. 6A](#) und [Fig. 6B](#) stellen den Substitutionsort der 50 kDa-Untereinheit aus *Saccharomyces uvarum* und die für die Substitution verwendeten Oligonucleotide dar; und

[0026] [Fig. 7A](#) und [Fig. 7B](#) sind Photos der Elektrophorese, die die sequenzspezifischen Endonucleaseaktivitäten der 50 kDa-Untereinheit aus *Saccharomyces uvarum* zeigen.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG

[0027] Die DNA des Mitochondriumgenoms, das die kleinere Untereinheit (50 kDa) einer Endonuclease aus Hefe codiert, kann in großem Maßstab exprimiert werden, indem ein Proteinexpressionssystem wie *E. coli* oder Hefe verwendet wird. Bei der Vollendung dieses Ziels können die für Mitochondrien einzigartigen Codons in Universalcodons in einem Gen, das eine Aminosäuresequenz der kleineren Untereinheit codiert, modifiziert werden. In der Beschreibung wird eine derartige modifizierte, kleinere Untereinheit erwähnt, die 26 Basenpaare der spezifischen Nucleotidsequenz erkennen und spalten kann.

[0028] Eine Endonuclease, wie hier beschrieben (d.h. die 50 kDa-Untereinheit einer Endonuclease aus Hefe, hier nachstehend auch als „Endo. Scl^I-50 kDa“ bezeichnet), wird wie folgt hergestellt.

(1) Konstruktion der mutierten Aminosäure und Einführung der Mutation

[0029] Die kleinere Untereinheit der Endonuclease Scl^I aus *Saccharomyces cerevisiae* oder die kleinere Untereinheit der Endonuclease Suvl aus *Saccharomyces uvarum* wird als Ziel zur Einführung einer Mutation verwendet. Die kleineren Untereinheiten sowohl von Scl^I als auch von Suvl besitzen ein Molekulargewicht von 50 kDa. Jedoch unterscheiden sie sich dadurch voneinander, dass sie zwei unterschiedliche Aminosäuren besitzen ([Fig. 6A](#)).

[0030] Das Gen, das die Untereinheit (50 kDa) von Scl^I (hier nachstehend als „ENS2“ bezeichnet) codiert, wird von einem Mitochondriumgenom codiert und enthält daher genetische Codes, die für Mitochondrien einzigartig sind (Tabelle 1).

Tabelle 1

Unterschied zwischen dem Mitochondriumcode und Universalcode

Codon	Aminosäure, die translatiert werden soll	
	Universalcode	Mitochondriumcode
TGA	STOP	Trp
ATA	Ile	Met
CTA oder CTT	Leu	Thr

[0031] Die Nucleotidsequenz von ENS2 ist bekannt (JP-B-7-77556; Nakagawa, K., Morishima, N. und Shibata, T., J. Biol. Chem. 266, 1977–1984 (1991)). Wenn ENS2 in einem allgemeinen Expressionssystem wie *E. coli* nach dem Universalcode exprimiert wird, wird die Translation bei TGA unterbrochen, das als Stoppcodon gelesen wird, wie aus Tabelle 1 ersichtlich ist (beispielsweise schließt die in JP-B-7-77556 beschriebene ENS2 ein TGA-Stoppcodon an den Nucleotiden 97–99 ein). Während ATA nach dem Universalcode als Ile gelesen wird, wird es nach dem Mitochondriumcode als Met gelesen.

[0032] Um ein Expressionssystem im normalen Maßstab für ENS2 zu konstruieren, ist es notwendig, den genetischen Code von ENS2 zu modifizieren, so dass die Aminosäuresequenz, die bei der Expression in einem allgemeinen Expressionssystem (z.B. *E. coli*) erhalten wird, mit einer Aminosäuresequenz identisch ist, wie sie in einem Mitochondrium-Expressionssystem exprimiert wird. Daher wird ein Codon für Trp (TGA) nach dem Mitochondriumcode (Tabelle 1) durch ein Codon (TGG) substituiert, das nach dem Universalcode in Trp translatiert wird. Eine derartige Substitution wird auch bei ATA sowie CTA und CTT angewandt, die nach dem Universalcode in Ile bzw. Leu translatiert werden (Tabelle 1). Es gibt keinen Bedarf, andere degenerierende Co-

dons zu substituieren, die nach dem Universalcode Ile oder Leu codieren.

[0033] Grundsätzlich gibt es innerhalb der Aminosäuresequenz der kleineren Untereinheit von Scel (476 Aminosäuren) 37 Aminosäuren als Kandidaten für Modifikationen. Ihre Positionen sind in [Fig. 1](#) und Tabelle 2 dargestellt. Was die Endonuclease aus *Saccharomyces uvarum* (SuvI) anbelangt, sind Gly bei 217 und Asn bei 346 ([Fig. 1](#)) zusätzlich durch Lys bzw. Asp substituiert, so dass insgesamt 39 Aminosäuren modifiziert sind. Es ist nicht notwendig, alle der vorstehenden 37 oder 39 Aminosäuren zu substituieren. Die Anzahl der Substitutionen kann 36 oder 35 oder weniger betragen. Translationen in Codons, die für Mitochondrien einzigartig sind, können unvollständig sein, solange die nachstehend erwähnten 26 Nucleotide (SEQ ID NR: 1) von der Nuclease erkannt werden. Die Positionen der Substitution sind nachstehend in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2

Position der Substitution	Zu translatierende Aminosäure vor der Modifikation	Zu translatierende Aminosäure nach der Modifikation
33, 54, 247, 320, 433	STOP	Trp
35, 40, 45, 48, 65, 80, 86, 92, 107, 109, 111, 123, 154, 163, 168, 171, 177, 248, 313, 335, 347, 399, 465	Ile	Met
49, 99, 130, 135, 222, 267, 276, 395, 426	Leu	Thr

[0034] Die Substitution der Aminosäuren erfolgt durch Substitution der Nucleotidsequenz des Gens, das die Aminosäuren codiert, durch eine andere Nucleotidsequenz (ortsgerichtete Mutagenese). Beispiele der Mutagenese schließen ein, sind aber nicht eingeschränkt auf das Verfahren der ortsgerichteten Mutagenese von T. Kunkel (Kunkel, T. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82, 488–492 (1985)) und das Gapped-Duplex-Verfahren. Es gibt auch eine modifizierte Version des Kunkel-Verfahrens, bei dem gleichzeitig maximal 16 Oligonucleotide zur Modifikation verwendet werden (anstatt der Verwendung von 1 oder 2 Oligonucleotiden wie beim herkömmlichen Kunkel-Verfahren), um eine Vielzahl von Positionen effizient zu substituieren. Eine Mutation kann unter Verwendung eines Kits zur Einführung von Mutationen (beispielsweise Mutant-K (Takara Shuzo, Co., Ltd.) oder Mutant-G (Takara Shuzo, Co., Ltd.)), der die ortsgerichtete Mutagenese nutzt, oder unter Verwendung eines in vitro-LA-PCR-Mutagenesereihen-Kits (Takara Shuzo, Co., Ltd.) eingeführt werden.

[0035] Die Oligonucleotide werden unter Verwendung der Nucleotidsequenz von ENS2 als Matrize (1431 Basenpaare: Nakagawa, K. et al., J. Biol. Chem. 266, 1977–1984 (1991); JP-B-7-77556) konstruiert und synthetisiert, so dass mindestens eine Base, die mit der Mutation eingeführt werden soll, von etwa 8 bis 30 Basen flankiert wird (wobei jedes Oligonucleotid insgesamt etwa 18 bis 60 Basen besitzt). Die Oligonucleotide können durch chemische Synthese unter Verwendung eines herkömmlichen Synthesegeräts erhalten werden.

(2) Herstellung des Endonucleasesgens, das mit der Mutation eingeführt wurde

[0036] Jedes der, wie vorstehend in (1) beschrieben, erhaltenen Oligonucleotide ist am 5'-Ende phosphoryliert, wird unter Verwendung von ENS2 als Matrize synthetisiert und Ligierungsreaktionen unterzogen. Diese Reaktionen können unter Verwendung von T4-Polynucleotidkinase (Takara Shuzo, Co., Ltd.), T4 DNA-Polymerase (Takara Shuzo, Co., Ltd.), T4-DNA-Ligase (Takara Shuzo, Co., Ltd.) oder dergleichen erfolgen.

[0037] Die Nucleotidsequenz der so erhaltenen DNA wird bestimmt. Die Bestimmung der Nucleotidsequenz kann nach einem bekannten Verfahren wie dem chemischen Maxam-Gilbert-Modifikationsverfahren oder einem Didesoxykettenabbruchverfahren unter Verwendung des M13-Phagen durchgeführt werden. Im Allgemeinen wird die Sequenz unter Verwendung eines automatischen Nucleotidsequenziergeräts (z.B. ALF (Pharmacia), 373A-DNA-Sequenziergerät (Perkin-Elmer) etc.) bestimmt.

[0038] Die SEQ ID NR: 2 und 3 geben die Nucleotidsequenz eines Gens, das eine Endonuclease codiert, und die Aminosäuresequenz einer Endonuclease beispielhaft an, die im Verfahren der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Die Endonuclease erlangt die wesentliche Funktion der Endonuclease Scel oder SuvI, d.h. die

Funktion, die Consensussequenz „CANRYNNANNCYYGTTW“ und eine dazu ähnliche Sequenz zu erkennen, indem sie an die größere Untereinheit der natürlichen Endonuclease bindet. Die Endonuclease übt die Funktion der kleineren Einheit der natürlichen Endonuclease aus und kann die 26 Basen spezifisch erkennen, die durch GCCCAGACATATCCCTGAATGATACC (SEQ ID NR: 1) dargestellt werden.

[0039] Die Endonuclease kann die Mutationen Gly217Lys und Asn346Asp einschließen und immer noch die vorstehenden 26 Basen (SEQ ID NR: 1) erkennen.

[0040] Der Ausdruck „kann erkennen“, wie hier verwendet, bezieht sich auf die Funktion der Endonuclease, an eine Stelle der 26 Basen innerhalb des Gens zu binden und das Gen zu spalten, so dass die 26 Basenpaare in zwei Fragmente mit gestuften Enden getrennt werden.

[0041] Die DNA, die mit dem vorstehenden Gen (SEQ ID NR: 2) unter stringenten Bedingungen hybridisieren kann, kann auch in das Gen eingeschlossen werden, das die Endonuclease codiert. Die stringenten Bedingungen sind beispielsweise eine Natriumkonzentration von 15 bis 900 mM und eine Temperatur von 37 bis 70°C, vorzugsweise 68°C.

(3) Herstellung und Transformation des rekombinanten Vektors

(i) Herstellung des rekombinanten Vektors

[0042] Ein rekombinanter Vektor kann erhalten werden, indem das Gen, das die Endonuclease codiert, in einen geeigneten Vektor ligiert (eingebaut) wird. Der Vektor zum Einbau des Gens ist nicht auf einen Spezifischen begrenzt, solange er in einer Wirtszelle replizierbar ist. Beispiele eines derartigen Vektors schließen ein, sind aber nicht auf Plasmid-DNA und Phagen-DNA begrenzt.

[0043] Die Plasmid-DNA ist beispielsweise ein Plasmid aus *E. coli* (z.B. pRSET, pTZ19R, pBR322, pBR325, pUC118, pUC119 etc.), ein Plasmid aus *Bacillus* (z.B. pUB110, pTP5 etc.) oder ein Plasmid aus Hefe (z.B. YEp13, YEp24, YCp50 etc.). Die Phagen-DNA ist beispielsweise der λ -Phage oder dergleichen. Auf ähnliche Weise kann ebenfalls ein tierischer Virusvektor wie ein Retrovirus- oder Vacciniavirus-Vektor oder ein Insektenvirusvektor wie ein Baculovirusvektor verwendet werden.

[0044] Um das die Endonuclease codierende Gen in den Vektor einzubauen, wird die gereinigte DNA mit einem geeigneten Restriktionsenzym gespalten. Dann wird das gespaltene Fragment in die Restriktionsstelle oder eine Multiclonierungsstelle der geeigneten Vektor-DNA eingebaut.

[0045] Das Gen sollte in den Vektor eingebaut werden, so dass das Gen funktionieren kann. Falls gewünscht, kann der Vektor andere Gene als das Gen und den Promotor einschließen, beispielsweise ein cis-Element (z.B. ein Enhancerelement), ein Spleiß-Signal, ein Poly(A)-Schwanz-Signal, einen Selektionsmarker und eine Ribosomen-bindende Sequenz (SD-Sequenz). Beispiele des Selektionsmarkers schließen das Dihydrofolatreduktasegen, das Ampicillin-Resistenzgen und das Neomycin-Resistenzgen ein.

(ii) Herstellung der Transformante

[0046] Eine Transformante kann erhalten werden, indem der rekombinante Vektor in eine Wirtszelle so eingeführt wird, dass das Gen von Interesse exprimiert werden kann. Die Wirtszelle ist nicht auf eine Spezifische eingeschränkt, solange sie die Endonuclease codierende DNA exprimieren kann. Als Beispiele sind Bakterien wie die Gattung *Escherichia* (z.B. *Escherichia coli*), die Gattung *Bacillus* (z.B. *Bacillus subtilis*), die Gattung *Pseudomonas* (z.B. *Pseudomonas putida*), die Gattung *Rhizobium* (z.B. *Rhizobium meliloti*), Hefe wie *Schizosaccharomyces pombe*, tierische Zellen (z.B. COS- und CHO-Zellen) und Insektenzellen (z.B. Sf9 und Sf21) angegeben.

[0047] Wenn ein Bakterium wie *E. coli* als Wirt verwendet wird, wird bevorzugt, dass sich der rekombinante Vektor autonom replizieren kann und einen Promotor, eine ribosomale Bindungsstelle, das Gen und eine Transkriptionsterminationssequenz einschließt. Der rekombinante Vektor kann auch ein Gen zur Kontrolle des Promotors einschließen.

[0048] Für *E. coli* sind *E. coli* K12 und DH1 als Beispiele angegeben und für *Bacillus* sind *Bacillus subtilis* MI 114 und 207-21 als Beispiele angegeben.

[0049] Als Promotor kann jeder Promotor verwendet werden, solange er in der Wirtszelle wie *E. coli* exprimiert werden kann. Beispielsweise kann ein Promotor, der von *E. coli* oder einem Phagen stammt, z.B. der *trp*-Promotor, *lac*-Promotor, p_L -Promotor oder p_R -Promotor, verwendet werden. Künstlich konstruierte und modifizierte Promotoren wie der *tac*-Promotor können ebenfalls verwendet werden.

[0050] Der rekombinante Vektor kann in das Bakterium nach jedem Verfahren zur Einführung von DNA in ein Bakterium eingeführt werden. Beispielsweise können das Calciumionen-Verfahren (Cohen, S. N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 69: 2110–2114 (1972)) und ein Elektroporationsverfahren verwendet werden.

[0051] Eine Hefe wie *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces uvarum*, *Schizosaccharomyces pombe* oder *Pichia pastoris* kann ebenfalls als Wirt verwendet werden. In diesem Fall kann der Promotor jeder Promotor sein, der in der Hefe exprimiert werden kann. Beispiele eines derartigen Promotors schließen ein, sind jedoch nicht begrenzt auf, den *gal1*-Promotor, *gal10*-Promotor, Hitzeschockprotein-Promotor, MF 1-Promotor, PHO5-Promotor, PGK-Promotor, GAP-Promotor, ADH-Promotor und AOX1-Promotor.

[0052] Der rekombinante Vektor kann in die Hefe durch jedes Verfahren zur Einführung von DNA in eine Hefe eingeführt werden. Beispielsweise können das Elektroporationsverfahren (Becker, D. M. et al., Methods Enzymol., 194, 182–187 (1990)), das Sphäroblastenverfahren (Hinnen, A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 75, 1929–1933 (1978)) oder das Lithiumacetatverfahren (Itoh, N., J. Bacteriol., 153, 163–168 (1983)) verwendet werden.

[0053] Eine tierische Zelle wie die Affenzelle COS-7, Vero, die chinesische Hamsteroovarienzelle (CHO-Zelle), die Maus-L-Zelle, die Ratten-GH3- oder menschliche FL-Zelle können ebenfalls als Wirt verwendet werden. Als Promotor kann beispielsweise der SR-Promotor, SV40-Promotor, LTR-Promotor oder CMV-Promotor verwendet werden. Andere Promotoren als diese, beispielsweise ein früher Gen-Promotor des menschlichen Cytomegalievirus können ebenfalls verwendet werden.

[0054] Der rekombinante Vektor kann in die tierische Zelle beispielsweise durch ein Elektroporationsverfahren, ein Calciumphosphatverfahren oder ein Lipofektionsverfahren eingeführt werden.

[0055] Eine Insektenzelle wie die Sf9-Zelle, Sf21-Zelle oder dergleichen kann ebenfalls als Wirt verwendet werden. Der rekombinante Vektor kann in die Insektenzelle beispielsweise durch ein Calciumphosphatverfahren, ein Lipofektionsverfahren oder ein Elektroporationsverfahren eingeführt werden.

(5) Herstellung der Endonuclease

[0056] Die Endonuclease kann durch Züchtung der vorstehend beschriebenen Transformante und durch Gewinnen der Endonuclease aus der Kultur davon erhalten werden. Der Begriff „Kultur“, wie hier verwendet, bezieht sich auf einen Kulturüberstand, eine gezüchtete Zelle oder mikrobielle Zelle oder eine Zelle oder mikrobielle Zelltrümmer.

[0057] Die Transformante wird nach einem allgemeinen Verfahren gezüchtet, das zur Züchtung des Wirts verwendet wird.

[0058] Ein Medium zur Züchtung der Transformante, die von einem Wirtsmikroorganismus wie *E. coli* oder Hefe erhalten wird, kann entweder ein natürliches oder ein synthetisches Medium sein, solange es Kohlenstoffquellen, Stickstoffquellen, anorganische Salze und dergleichen enthält, die vom Mikroorganismus assimilierbar sind, und solange damit eine effiziente Züchtung der Transformante erfolgen kann.

[0059] Als Kohlenstoffquellen können Kohlenwasserstoffe wie Glucose, Fructose, Saccharose, Stärke; organische Säuren wie Essigsäure, Propionsäure; und Alkohole wie Ethanol und Propanol verwendet werden.

[0060] Als Stickstoffquellen können Ammoniak, Ammoniumsalze anorganischer oder organischer Säuren wie Ammoniumchlorid, Ammoniumsulfat, Ammoniumacetat, Ammoniumphosphat, andere stickstoffhaltige Verbindungen; Pepton, Fleischextrakt, Maisquellwasser und dergleichen verwendet werden.

[0061] Als anorganische Substanzen können Kaliumdihydrogenphosphat, Dikaliumhydrogenphosphat, Magnesiumphosphat, Magnesiumsulfat, Natriumchlorid, Eisen(II)-Sulfat, Mangansulfat, Kupfersulfat, Calciumcarbonat und dergleichen verwendet werden.

[0062] Die Züchtung erfolgt im Allgemeinen 12 bis 18 Stunden bei 37°C unter aeroben Bedingungen wie Schütteln oder Rühren mit Belüftung. Während der Züchtung wird der pH-Wert bei 6,5 bis 7,5, vorzugsweise bei 7,0, gehalten. Der pH-Wert wird mit anorganischer oder organischer Säure, einer alkalischen Lösung oder dergleichen reguliert.

[0063] Während der Züchtung können dem Medium gegebenenfalls Antibiotika wie Ampicillin, Tetracyclin oder dergleichen zugegeben werden.

[0064] Bei der Züchtung eines Mikroorganismus, der mit einem Expressionsvektor unter Verwendung eines induzierbaren Promotors transformiert wurde, kann dem Medium bei Bedarf ein Induktor zugesetzt werden. Wenn beispielsweise ein Mikroorganismus, der mit einem Expressionsvektor unter Verwendung des lac-Promotors oder trp-Promotors transformiert wurde, gezüchtet wird, kann dem Medium Isopropyl-1-thio- β -D-galactosid (IPTG) bzw. Indolessigsäure (IES) zugegeben werden.

[0065] Eine Transformante, die unter Verwendung von tierischen Wirtszellen erhalten wurde, kann in einem allgemein verwendeten Medium wie RPM11640-Medium oder DMEM-Medium oder einem Medium gezüchtet werden, das durch Ergänzen des allgemein verwendeten Mediums mit fötalem Rinderserum und dergleichen erhalten wird.

[0066] Die Züchtung erfolgt im Allgemeinen 1 bis 3 Tage bei 37°C unter 5% CO₂. Während der Züchtung kann dem Medium ein Antibiotikum wie Kanamycin, Penicillin oder dergleichen zugegeben werden.

[0067] Nach der Züchtung, bei der eine mikrobielle Zelle oder eine andere Zelle intrazellulär Endonuclease produziert, wird die Endonuclease durch Aufschluss der mikrobiellen Zelle oder der anderen Zelle extrahiert. Wenn eine mikrobielle Zelle oder eine andere Zelle Endonuclease extrazellulär produziert, wird die Kulturlösung direkt verwendet. Alternativ wird die mikrobielle Zelle oder die andere Zelle über Zentrifugation oder dergleichen entfernt, bevor die Endonuclease aus der Kultur über ein allgemeines biochemisches Verfahren zur Proteinisolierung und -reinigung wie Ammoniumsulfatpräzipitation, Gelchromatographie, Ionenaustauschchromatographie, Affinitätschromatographie oder eine Kombination davon isoliert und gereinigt wird.

BEISPIELE

Beispiel 1: Herstellung der einzelsträngigen Matrizen-DNA, die die Untereinheit von Scl codiert und Desoxyuracil enthält

[0068] Das Gen der Endo. Scl-50 kDa-Untereinheit ENS2 (1431 Basenpaare; Nakagawa, K., Morishima, N. und Shibata, T., J. Biol. Chem. 266, 1977–1984 (1991)) wurde gleichzeitig in zwei Genbereichen modifiziert, d.h. innerhalb der stromaufwärtsliegenden Einheit mit 1,0 Kilobasenpaaren und der stromabwärtsliegenden Einheit mit 0,4 Kilobasenpaaren.

[0069] Für diesen Zweck wurden das EcoRI/EcoRI-Fragment (1671 Basenpaare), enthaltend das Gen der 50 kDa-Untereinheit mit der gesamten Länge (Nakagawa, K., Morishima, N. und Shibata, T. J., Biol. Chem. 266, 1977–1984 (1991)), und das PstI/EcoRI-Fragment (534 Basenpaare), enthaltend die stromabwärtsliegende Einheit des Gens der 50 kDa-Untereinheit, getrennt in das Phagmid pUC118 (Takara Shuzo, Co., Ltd.) cloniert und als Plasmide pEN1.7 bzw. pEN0.5 bezeichnet ([Fig. 3](#)). Diese Phagmide wurden zur Transformation in die E. coli-Stämme CJ236 (Takara Shuzo, Co., Ltd.) eingeführt. Die E. coli-Transformanten-Stämme wurden 12 Stunden oder länger bei 37°C einer Schüttelkultur unterzogen, um Vorkulturlösungen herzustellen. 20 μ l jeder Vorkulturlösung wurden 2 ml 2 \times YT-Kulturmedium zugegeben, enthaltend Ampicillin (100 μ g/ml) (Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T., Molecular Cloning: a laboratory Manual, Zweite Ausgabe, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989)) und 1 Stunde bei 37°C gezüchtet. Jedem Medium wurde der Helferphage M13KO7 (2,0 \times 10¹² plaquebildende Einheit (PBE); Takara Shuzo, Co., Ltd.) zugegeben, so dass er 0,4 Vol.-% des Mediums ausmachte, und das Ergebnis wurde 1 Stunde bei 37°C gezüchtet. Danach wurde Kanamycin (100 μ g/ml) zugegeben und das Ergebnis wurde 14 Stunden bei 37°C gezüchtet. Die während der Züchtung aus E. coli in das Medium freigesetzten Phagenpartikel wurden gewonnen. Genau gesagt wurden 1,5 ml jeder Kulturlösung in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert (14,000 UpM, 5 min). 1,2 ml Überstand wurden gesammelt und unter denselben Bedingungen zentrifugiert, um die Zellen vollständig zu entfernen, so dass 1,0 ml Überstand erhalten wurde. Das anschließende Verfahren zur Herstellung der DNA erfolgte nach der in der Versuchsanleitung von J. Sambrook et al. (Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T., Molecular Cloning: a laboratory Manual, Zweite Ausgabe, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989)) zusammengefassten DNA-Reinigung des Bakteriophagen M13.

Beispiel 2: Synthese der Oligonucleotide zur Einführung der ortsgerichteten Mutation

(i) Synthese des Einzelstanges

[0070] Das Gen der 50 kDa-Untereinheit ENS2 wird vom Mitochondriumgenom codiert und schließt daher den genetischen Code ein, der für Mitochondrien einzigartig ist (Tabelle 1). Um ENS2 einem allgemeinen Expressionssystem in großem Maßstab zu unterziehen, müssen diese einzigartigen Codons substituiert werden, damit sie mit dem Universalcode übereinstimmen. Nach Beispiel 2 werden die Basen unter Verwendung eines modifizierten Verfahrens von T. Kunkel (Kunkel, T. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 488–492 (1985)) substituiert. Während beim allgemeinen Kunkel-Verfahren nur ein oder zwei Oligonucleotide zur Modifikation verwendet werden, werden beim vorliegenden Verfahren maximal 16 Oligonucleotide zur effizienten Substitution an multiplen Positionen verwendet.

[0071] Es wurden 33 Oligonucleotide konstruiert, die jeweils die zu substituierende Base enthielten, die von etwa 10 bis 15 Basen flankiert wurde (Tabelle 3).

Tabelle 3

1.	AAAAGACTGGATTATAGAA (A)	(SEQ ID NR : 6)
2.	TGAATATATGTATAAATTT (A)	(SEQ ID NR : 7)
3.	TATTAAATGGGATAATAAT (A)	(SEQ ID NR : 8)
4.	TATTAGATATGTATTATAATG (A)	(SEQ ID NR : 9)
5.	TACACCTATGTCTAATAAA (A)	(SEQ ID NR : 10)
6.	AAAATATTATGGATTATAAA (A)	(SEQ ID NR : 11)
7.	TTTTATATTTTAAATAAAATGAAAATGGAAATGGATAATTATAATAATA (A) (A) (A)	(SEQ ID NR : 12)
8.	AAAATATTATGAATAATTTAA (A)	(SEQ ID NR : 13)
9.	ACTATCTAATATTGAACTAATTTATCTAATAATTT (CT)	(SEQ ID NR : 14)
10.	TTATTTAATGGATAAATAT (A)	(SEQ ID NR : 15)
11.	ATAAATATATGAAATATTTAG (A)	(SEQ ID NR : 16)
12.	ATAATTATATGTTTAATAATA (A)	(SEQ ID NR : 17)
13.	GGAGGTATTACAATTACTAATCATGCTAATGAT (CTA)	(SEQ ID NR : 18)
14.	TTTtagTAGAAAAATGGATGGATACTTTAAAAGATA (A) (A)	(SEQ ID NR : 19)
15.	AGCTAAAGAAAAGATTTTACTAATATTTATAATAATTA (CT)	(SEQ ID NR : 20)
16.	AAATATTATGGATATTAAA (C)	(SEQ ID NR : 21)
17.	TAATTATTGGTTATCTGG (A)	(SEQ ID NR : 22)
18.	ATCATCTATGTATAATCCT (A)	(SEQ ID NR : 23)
19.	TTAAAAATATGAGACCTAG (A)	(SEQ ID NR : 24)
20.	GATGAATTAATGAAATTTATTTA (A)	(SEQ ID NR : 25)
21.	ATTAAATTTAGATTTAATACTTTTATTAAATCATATAAT (CTA)	(SEQ ID NR : 26)
22.	TATAATAAATATATTAATATGCATAATGCACGTAAACC (A)	(SEQ ID NR : 27)
23.	TAAATTTTAAATAAATAATATGACTTGTTTTATTAAATGgGA (ACTA)	(SEQ ID NR : 28)
24.	AAGATTAATGAATTCAAAA (A)	(SEQ ID NR : 29)
25.	GATTATAAATTATTATATACTTATTTTATATTTTAAAT (CT)	(SEQ ID NR : 30)
26.	GAATAATTTAAATTATAAACTTCTAATATTGAAacTA	(SEQ ID NR : 31)

	(CTA)	
27.	TTCTCTATTAATATTAAACTAATTAGCTAAAGAAA	(SEQ ID :32)
	(CT)	
28.	AAATTATTTACCAGAACTACTGATGAATTAATgAAATT	(SEQ ID :33)
	(CT)	
29.	CATATAATTGGAATAATAGA	(SEQ ID :34)
	(A)	
30.	AATTTTAAATGAATAATATg	(SEQ ID :35)
	(A)	
31.	TTTAGATATGTTAAATATg	(SEQ ID :36)
	(A)	
32.	ATATgTTAAATATGATTCCTAATAA	(SEQ ID :37)
	(A)	
33.	CTGgATTATGGAATATGAAT	(SEQ ID :38)
	(A)	

[0072] In Tabelle 3 stellt/stellen die Base(n) in Klammern unter jeder Sequenz die ursprüngliche(n) Base(n) dar, die durch die unterstrichene(n) Base(n) substituiert wurde(n). Die in Kleinbuchstaben dargestellten Basen stellen diejenigen dar, bei denen bereits das ursprüngliche Oligonucleotid substituiert wurde.

[0073] Die Längen der Oligonucleotide variieren innerhalb des Bereiches von 18 bis 52 Basen, und sie schließen die Mutation von einem bis maximal 4 Resten ein. Diese Oligonucleotide wurden zur Substitution von 50 Basenpaaren des 1431 bp großen Gens der 50 kDa-Untereinheit verwendet, um 37 Codons zu modifizieren. Das 5'-Ende jedes Oligonucleotids wurde phosphoryliert, so dass die später beschriebene DNA-Ligase-Reaktion erfolgen konnte. Die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches für die Phosphorylierung ist nachstehend dargestellt:

100 mM Tris-HCl (pH 8,0)
 10 mM Magnesiumchlorid
 7 mM Dithiothreitol
 1 mM ATP, 1 µM Oligonucleotid
 T4-Polynucleotidkinase (15 Einheiten)
 Gesamtmenge 30 µl

[0074] Das Reaktionsgemisch wurde einer 15-minütigen Phosphorylierungsreaktion bei 37°C unterzogen, und dann wurde das Enzym durch eine 10-minütige Behandlung bei 70°C inaktiviert.

(ii) Synthese des Komplementärstranges

[0075] Die in (i) erhaltenen Oligonucleotide wurden wie folgt behandelt, um Doppelstränge zu erhalten. Die Zusammensetzungen des Anlagerungspuffers und des Verlängerungsreaktionspuffers sind nachstehend dargestellt.

Anlagerungspuffer

200 mM Tris-HCl (pH 8,0)
 100 mM Magnesiumchlorid
 500 mM Natriumchlorid
 10 mM Dithiothreitol

Verlängerungsreaktionspuffer

50 mM Tris-HCl (pH 8,0)
 5 mM Dithiothreitol
 60 mM Ammoniumacetat
 jeweils 0,5 mM dNTPs (A, C, T, G)
 5 mM Magnesiumchlorid
 1 mM Nicotinamidadenindinucleotid

[0076] Zu 1 µl Anlagerungspuffer und 0,2 pMol der einzelsträngigen Matrizen-DNA wurde destilliertes Wasser gegeben, was zu einer Gesamtmenge von 10 µl führte. 1 µl der Lösung wurde dispergiert, so dass sie mit 1 µl der phosphorylierten Oligonucleotidlösung gemischt wurde. Das sich ergebende Gemisch wurde 15 min bei 65°C und dann 15 min bei 37°C stengelassen, wobei sich das Oligonucleotid an die einzelsträngige DNA anlagerte. Der Lösung wurden 25 µl Verlängerungspuffer, 60 Einheiten E. coli-DNA-Ligase und 1 Einheit T4-DNA-Polymerase zugegeben und 2 Stunden bei 25°C stengelassen, so dass ein Komplementärstrang synthetisiert wurde. 3 µl 0,2 M Ethylendiamintetraessigsäuretetranatriumsalz (pH 8,0) wurden zugegeben, um die Enzymreaktion zu beenden, nach der das Enzym durch 5-minütige Behandlung bei 65°C inaktiviert wurde. Diese Reaktionslösung wurde direkt für die nachstehende Transformation verwendet.

Beispiel 3: Transformation

[0077] E. coli BMH71-18-mutS (Takara Shuzo, Co., Ltd.) wurde so verwendet, dass die Nucleotidsequenz des Wildtyp-DNA-Stranges (die einzelsträngige DNA, die mit CJ236 hergestellt wurde) in der doppelsträngigen Plasmid-DNA, die durch Komplementärstrangsynthese erhalten wurde, durch einen Mutantentyp substituiert wurde. In diesem E. coli-Stamm wurde Desoxyuracil, das in der mit CJ236 hergestellten einzelsträngigen DNA enthalten war, durch das Enzym Uracil-DNA-Glycosylase hydrolysiert und dann unter Verwendung des DNA-Stranges erneut synthetisiert, der die substituierte Base als Matrize enthielt (Lindahl, T., Ann. Rev. Biochem. 51, 61–87 (1982)).

[0078] Das gesamte Reaktionsgemisch mit dem synthetisierten Komplementärstrang wurde der 100 µl-Lösung zugegeben, die die kompetenten Zellen von BMH71-18 mutS enthielt. Kompetente E. coli-Zellen wurden nach dem Verfahren von H. Inoue et al. (Inoue, H., Nojima, H. und Okayama, H., Gene 96, 23–28 (1990)) hergestellt.

[0079] Der Lösung wurde Medium zugegeben und 1 Stunde bei 37°C stengelassen. Dann wurden 30 µl des Helferphagen (a. a. O.) zugegeben und weitere 30 min bei 37°C stengelassen, damit die Infektion stattfand. 40 µl der BMH71-18-Kulturlösung, die intrazellulär sowohl den Helferphagen als auch das Plasmid enthielt, wurde fraktioniert und 2 ml des 2 × YT-Mediums, enthaltend Ampicillin (100 µg/ml) und Kanamycin (100 µg/ml), zugegeben. Das sich ergebende Medium wurde 16 bis 20 Stunden bei 37°C einer Schüttelkultur unterzogen, um einen Phagen herzustellen.

[0080] Die mikrobielle Zelle wurde durch Zentrifugation (14.000 UpM, 5 min) entfernt. Der Überstand, der den Phagenpartikel enthielt, der die einzelsträngige DNA des Plasmids mit der substituierten Base einbaut, wurde entfernt. Mit 20 µl Überstand wurden 80 µl des Stammes MV1184 (Takara Shuzo, Co., Ltd.) gemischt, der 12 Stunden oder länger gezüchtet worden war, und man ließ ihn 10 min bei 37°C stehen, damit die einzelsträngige DNA des Phagen in die Zelle injiziert wurde.

[0081] Der Stamm MV1184, der das sich aus der Replikation der integrierten einzelsträngigen DNA ergebende Plasmid enthielt, wurde zur Selektion auf einem LB-Agarmedium, enthaltend 100 µg/ml Ampicillin, angeimpft (Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T., Molecular Cloning: a laboratory Manual, Zweite Ausgabe, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor New York (1989)). Die Nucleotidsequenzen der Gene der 50 kDa-Untereinheit wurden bei einigen Clonen mit einem automatischen Sequenziergerät ALF (Pharmacia) analysiert, um den Einbau der vorbestimmten Substitutionen zu bestätigen. Der Fluoreszenzprimer für die Analyse der Nucleotidsequenz wurde von Pharmacia (Uppsala, Schweden) erworben. Die DNA-Sequenzierungsreaktion basierte auf dem Sanger-Verfahren (Sanger, F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 74, 5463–5467 (1977)) nach der Vorschrift von Pharmacia.

[0082] Für das Ausgangsmaterial, Plasmid pEN1.7, wurden 40 Nucleotidsubstitutionen mittels 9 Zyklen des Mutageneseverfahrens durchgeführt, während 10 Nucleotidsubstitutionen für pEN0.5 mittels 4 Zyklen eines derartigen Verfahrens durchgeführt wurden.

[0083] Waren einmal alle Substitutionen bestätigt, wurden die stromaufwärtsliegenden und stromabwärtsliegenden Einheiten an die PstI-Schnittstelle gebunden, so dass ein Gen erhalten wurde, das die 50 kDa-Untereinheit mit vollständigen Substitutionen codiert ([Fig. 4](#), SEQ ID NR: 2).

Beispiel 4: Konstruktion des Expressionsplasmids für die 50 kDa-Untereinheit

[0084] Um die Bindung zwischen dem modifizierten Gen der 50 kDa-Untereinheit und dem Vektor zur Induktion ihrer Expression zu ermöglichen, wurden die Restriktionsschnittstellen in die 5'- und 3'-Enden des modifizierten Gens über die Polymerasekettenreaktion (PCR) eingeführt. Die Reaktion erfolgte unter Verwendung von Taq-DNA-Polymerase (Takara Shuzo, Co., Ltd.) nach der Vorschrift des Herstellers. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind nachstehend dargestellt.

5' - CCGGATCCATGAAAAAAC - 3' (SEQ ID NR : 4)

5' - GGGTCGACTTATTTAATGTATCC - 3' (SEQ ID NR : 5)

[0085] Die unterstrichenen Teile sind die neu eingeführten BamHI- und Sall-Erkennungssequenzen. Die Reaktion erfolgte mit 25 Zyklen: 1 min bei 94°C; 2 min bei 45°C; und 3 min bei 72°C.

[0086] Das durch PCR amplifizierte DNA-Fragment (1447 Basenpaare) wurde über (0,8%) Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. Molecular Cloning: a laboratory Manual, Zweite Ausgabe, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989)) aufgetrennt und zur Bestätigung mit Ethidiumbromid gefärbt. Das Fragment wurde aus dem Agarosegel unter Verwendung des Geneclean-Kits (BIO101, Kalifornien, USA) gewonnen.

[0087] Das gewonnene DNA-Fragment wurde mit BamHI und Sall behandelt und in pRSET (Invitrogen Corp.) und pTZ19R (Pharmacia) subcloniert, so dass pSC50 bzw. pTZSC50 erhalten wurde. Das Plasmid pSC50 wurde zur Induktion der Expression verwendet. Plasmid pTZSC50 wurde einer DNA-Sequenzierung unter Verwendung des Fluoreszenzprimers (a. a. O.) unterzogen, so dass bestätigt wurde, dass keine zusätzliche Mutation während der PCR eingeführt worden war.

Beispiel 5: Einführung der Expression der 50 kDa-Untereinheit

[0088] Das Expressionsplasmid pSC50 wurde in kompetente E. coli BL21 (DE3) pLysS-Zellen (Invitrogen Corp.) eingeführt. Die Transformantenzelle wurde über Nacht bei 37°C über eine Schüttelkultur in einem flüssigen LB-Medium, enthaltend Ampicillin (150 µg/ml) und Chloramphenicol (34 µg/ml) vorgezchtet (Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T., Molecular Cloning: a laboratory Manual, Zweite Ausgabe, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989)). Die vorgezchtete Lösung (4 Vol.-% einer sich ergebenden Kultur) wurde zentrifugiert (2.500 × g, 10 min), um die mikrobielle Zelle zu gewinnen. Dieses Präzipitat wurde in einer kleinen Menge frischem Medium suspendiert, das dann einem flüssigen Medium zugegeben wurde. Die Schüttelkultur (37°C) erfolgte, bis der Suspensionsspiegel von etwa 0,5 bei 600 Nanometer (nm) (OD600) erhalten wurde. Anschließend wurde die Schüttelkultur bei 18°C fortgesetzt. Wenn die OD600 etwa 0,8 erreichte, wurde Isopropyl-1-thio-β-D-galactosid (IPTG) bis zur Endkonzentration von 0,4 mM zugegeben, um die Induktion der Expression der 50 kDa-Untereinheit zu initiieren. Nachdem E. coli weiteren 12 Stunden einer Schüttelkultur bei 18°C unterzogen wurde, wurde er durch Zentrifugation rückgewonnen, schnell mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Beispiel 6: Reinigung der 50 kDa-Untereinheit aus E. coli.

[0089] Die bei -80°C gelagerte mikrobielle Zelle wurde bei Raumtemperatur aufgetaut. Die anschließenden Behandlungen wurden bei 4°C oder auf Eis durchgeführt. Die mikrobielle Zelle wurde in Puffer A (20 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8,0), 500 mM Natriumchlorid, 5 mM Imidazol, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF; Sigma Aldrich Japan K. K., Tokio, Japan), 0,1% NP-40 (Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan)) suspendiert. Die sich ergebende Suspension wurde schnell mit flüssigem Stickstoff eingefroren und unter laufendem Wasser aufgetaut, um E. coli aufzuschließen. Die Suspension wurde 5-mal 30 sec mit einem Ultraschallgerät (UR-200P, Tomy Seiko Co., Ltd., Tokio, Japan) bei maximaler Leistung behandelt.

[0090] Die behandelte Lösung wurde bei 4°C (39.000 × g, 20 min) zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde durch einen 0,45 µm-Myllex-Filter (Millipore, Massachusetts, USA) filtriert. Die Probe wurde auf eine Säule (ø10 mm, 2,0 ml) aufgetragen, die mit Probond Nickelchelat-Resin (Invitrogen Corp.) beladen war, das mit Puffer A äquilibriert worden war. Dann wurde die Probe mit 20 ml Puffer A (10-faches Volumen des Harzes) gewaschen. Nach einem weiteren Waschschriff mit 12 ml Puffer A, enthaltend 60 mM Imidazol (6-faches Volumen des Harzes), wurde das Ergebnis einer Gradientenelution mit 60–50 mM Imidazol enthaltendem Puffer A (Gesamtmenge 80 ml) unterzogen. Die eluierte Fraktion wurde einer Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-gelelektrophorese (Laemmli, U. K. Nature, 227, 680–685 (1970)) unterzogen und mit Coomassie Brilliantblau gefärbt, um das Vorliegen der 50 kDa-Untereinheit zu bestätigen. Die 50 kDa-Untereinheit enthaltende Fraktion wurde gegen Puffer B (20 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,5), 300 mM Natriumchlorid, 1 mM Ethylendiamintetraessigsäuretetranatriumsalz, 1 mM Dithiothreitol) dialysiert. Das gereinigte Protein wurde unter Verwendung eines Mittels zum Proteintest (Bio-Rad, Kalifornien, USA) nach dem Mikrottestverfahren des Herstellers quantifiziert. Als Standardprotein wurde Rinderserumalbuminlösung (Sigma Aldrich Japan K. K.) verwendet. Infolgedessen wurden 300 µg gereinigtes Protein aus 25 g (Nassgewicht) der mikrobiellen Zelle erhalten.

Beispiel 7: Messung der Endonucleaseaktivität

[0091] Ein Substrat zur Messung einer Endonucleaseaktivität der 50 kDa-Untereinheit wurde wie folgt hergestellt. Ein EcoRI/EcoRI-Fragment, das den oli2-Bereich auf Mitochondrium-DNA enthielt, von dem bekannt ist, dass Endo. Scl darin spaltet (1671 Basenpaare; Nakagawa, K. et al., EMBO J. 11, 2707–2715 (1992)), wurde in das Phagemid pUC119 (Takara Shuzo, Co., Ltd.) subcloniert, wobei das Ergebnis als pY673L ([Fig. 2](#)) bezeichnet wurde. Plasmid pBR322 (Takara Shuzo, Co., Ltd.) wurde als Kontroll-DNA-Substrat verwendet. Die Plasmide pY673L und pBR322 wurden verwendet, um E. coli zu transformieren. Dann wurden die Plasmide aus E. coli extrahiert und unter Verwendung einer Qiagen-Säule gutgereinigt (Qiagen Japan, Tokio, Japan).

[0092] Die Zusammensetzung der für die Messung der Endonucleaseaktivität der 50 kDa-Untereinheit verwendeten Reaktionslösung ist nachstehend dargestellt.

50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8,0)

50 mM Natriumchlorid

100 mM Magnesiumchlorid

1 mM Dithiothreitol

25 ng Substrat-DNA (pY673L oder pBR322, das mit dem Restriktionsenzym

Scl linearisiert wurde ([Fig. 2](#)))

0,4 bis 60 ng 50 kDa-Untereinheit

Gesamtvolumen 30 µl

[0093] Nach Durchführung der 30-minütigen DNA-Spaltungsreaktion bei 37°C wurden Ethylendiamintetraessigsäuretetranatriumsalz und Natriumdodecylsulfat bis zu Endkonzentrationen von 10 mM bzw. 0,3% zugegeben, um die Reaktion zu beenden. Die gespaltene DNA wurde einer 0,8%-igen Agaroseelektrophorese entweder direkt oder nach der Konzentrierung der DNA durch Phenolextraktion und Ethanolpräzipitation unterzogen.

[0094] Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit Ethidiumbromid (Sigma Aldrich Japan K. K.) oder SYBR-Green (Takara Shuzo, Co., Ltd.) gefärbt, um die Spaltung der DNA zu bestätigen. Die DNA wurde unter Verwendung eines FMBIO Imaging-Gerätes (Takara Shuzo, Co., Ltd.) nachgewiesen, um die DNA-Spaltung zu bestimmen.

Beispiel 8: Nachweis der sequenzspezifischen Endonuclease

[0095] Die dimere Endo. Scl erkennt und spaltet in vivo und in vitro 26 Basenpaare, die der Consensussequenz innerhalb des oli2-Genbereichs auf der Mitochondrium DNA ähneln (Nakagawa, K., Morishima, N. und Shibata, T., EMBO J. 11, 2707–2715 (1992)) ([Fig. 2](#)). Die gereinigte 50 kDa-Untereinheit von Endo. Scl spaltete eine spezifische Sequenz selbst (SEQ ID NR: 1).

[0096] Die spezifische Spaltung von oli2 mit der 50 kDa-Untereinheit unter Verwendung von Plasmid pY673L,

das oli2 als Substrat enthält, wurde bestätigt ([Fig. 5A](#)). Bezugnehmend auf [Fig. 5A](#) sind die Spuren 1 bis 8 die Ergebnisse, die mit 0,5, 1,0, 2,0, 4,0, 8,0, 16,0, 32,0 bzw. 64,0 ng der 50 kDa-Untereinheiten erhalten wurden. Mit 64 ng der 50 kDa-Untereinheit wurden 60% von pY673L (25 ng) in der Reaktionslösung sequenzspezifisch bei 37°C innerhalb von 30 min gespalten, wobei DNA-Fragmente mit 3,4 und 1,4 Kilobasen nachgewiesen wurden.

[0097] Die DNA wurde nicht mit der 50 kDa-Untereinheit unter Verwendung von Plasmid pBR322 als Substrat gespalten, und es wurde kein Spaltungsfragment nachgewiesen. Bezugnehmend auf [Fig. 5B](#) sind die Spuren 1 bis 7 die Ergebnisse, die mit 2,3, 4,5, 9,0, 18,0, 36,0, 72,0 bzw. 144 ng der 50 kDa-Untereinheiten erhalten wurden. Bei Verwendung einer Überschussmenge (200 ng) der 50 kDa-Untereinheit fand man keine Spaltung bei pBR322 oder anderen DNAs (Mitochondrium-DNA (80 Kilobasenpaare) aus einem knospenden Hefestamm, DNA des E. coli-Phagen λ (47 Kilobasenpaare) und DNA des Bacillus-Phagen ϕ 105 (38 Kilobasenpaare), die keine spezifische Sequenz (26 Basenpaare) innerhalb des oli2-Genbereichs enthielten.

Beispiel 9: Massenproduktion der 50 kDa-Untereinheit aus *Saccharomyces uvarum* und Nachweis ihrer Aktivität

[0098] Die Endo. Suvl-50 kDa-Untereinheit, ein homologes Protein der Endo. Scel-50 kDa-Untereinheit aus *Saccharomyces cerevisiae* liegt in *Saccharomyces uvarum* vor (Nakagawa, K., Morishima, N. und Shibata, T., J. Bio. Chem. 266, 1977–1984 (1991)). Beide Untereinheiten besitzen 476 Aminosäurereste, aber auf der Aminosäureebene gibt es zwei Unterschiede zwischen ihnen. Die Unterschiede bei den Aminosäuren zwischen der Endo. Scel- und der Endo. Suvl-50 kDa-Untereinheit sind in [Fig. 6A](#) dargestellt.

[0099] Für die Endo. Suvl-50 kDa-Untereinheit wurde ein Gen zur Expression in großem Maßstab durch Einführung zweier zusätzlicher Modifikationen in das modifizierte Gen für die Endo. Scel-50 kDa-Untereinheit hergestellt. Die für die Substitutionen verwendeten Oligonucleotide der Aminosäuren für die Endo. Suvl-50 kDa-Untereinheit sind in [Fig. 6B](#) dargestellt. Bezugnehmend auf [Fig. 6B](#) entsprechen die Basen in Klammern der Nucleotidsequenz der Endo. Scel-50kDa-Untereinheit. Für diesen Zweck wurden zwei Oligonucleotide neu synthetisiert, um Mutationen nach dem vorstehend beschriebenen Genmodifikationsverfahren einzuführen. Die Mutation wurde durch DNA-Sequenzierung bestätigt. Das modifizierte Gen wurde in den pRSET-Vektor (Invitrogen Corp.) subcloniert, der dann durch das Transformationsverfahren in E. coli BL21 (DE3) pLys eingeführt wurde.

[0100] Die Endo. Suvl-50 kDa-Untereinheit wurde nach dem vorstehend beschriebenen Verfahren exprimiert und gereinigt, das für die Endo. Scel-50 kDa-Untereinheit angewandt wurde. Die gereinigte Endo. Suvl-50 kDa-Untereinheit wurde verwendet, um Plasmid pY673L spezifisch zu spalten.

[0101] Folglich war die Endo. Suvl-50 kDa-Untereinheit bei der sequenzspezifischen Spaltung der Schnittstelle für die Endo. Scel-50 kDa-Untereinheit auf Plasmid pY673L ähnlich wirksam ([Fig. 7A](#)).

[0102] Dagegen spaltete die Endo. Suvl-50 kDa-Untereinheit das Plasmid pBR322 überhaupt nicht ([Fig. 7B](#)). Auch andere DNAs (Mitochondrium-DNA von knospender Hefe, DNA des Bacillus-Phagen ϕ 105 und DNA des E. coli-Phagen λ , die den oli2-Genbereich nicht enthielten) wurden von der Endo. Suvl-50 kDa-Untereinheit nicht gespalten.

[0103] In den [Fig. 7A](#) und [Fig. 7B](#) sind die Spuren 1 bis 7 die Ergebnisse, die mit 2,3, 4,5, 9,0, 18,0, 36,0, 72,0 bzw. 144 ng der 50 kDa-Untereinheiten erhalten wurden.

[0104] Dementsprechend werden eine ortsspezifische Endonuclease, die eine spezifische Nucleotidsequenz erkennen kann, ein die Nucleotidsequenz codierendes Gen, ein rekombinanter, das Gen enthaltender Vektor, eine den Vektor enthaltende Transformante und ein Verfahren zur Herstellung der Endonuclease bereitgestellt. Da die Endonuclease eine spezifische Sequenz aus 26 Basen erkennen kann, ist sie bei der Modifikation und Kartierung von DNA in einem großen Anwendungsbereich, d.h. Plasmid bis Genom, auf dem Gebiet der Gentechnik und Biochemie nützlich.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> The Institute of Physical and Chemical Research

<120> Endonuclease

<130> PH-651

<140>

<141>

<150> JP98/141861

<151> 1998-05-22

<160> 38

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 26

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetische DNA

<400> 1

gcccagacat atccctgaat gatacc

26

<210> 2

<211> 1431

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1428)

<400> 2

atg aaa aaa caa aat tta aat tct att tta tta atg tat att aat tat 48
 Met Lys Lys Gln Asn Leu Asn Ser Ile Leu Leu Met Tyr Ile Asn Tyr
 1 5 10 15
 att att aat tat ttt aat aat att cat aaa aat caa tta aaa aaa gac 96
 Ile Ile Asn Tyr Phe Asn Asn Ile His Lys Asn Gln Leu Lys Lys Asp
 20 25 30
 tgg att atg gaa tat gaa tat atg tat aaa ttt tta atg aat aat atg 144
 Trp Ile Met Glu Tyr Glu Tyr Met Tyr Lys Phe Leu Met Asn Asn Met
 35 40 45
 act tgt ttt att aaa tgg gat aat aat aaa att tta tta tta tta gat 192
 Thr Cys Phe Ile Lys Trp Asp Asn Asn Lys Ile Leu Leu Leu Leu Asp
 50 55 60
 atg tat tat aat gta tta tat aac tat cat aaa caa cgt aca cct atg 240
 Met Tyr Tyr Asn Val Leu Tyr Asn Tyr His Lys Gln Arg Thr Pro Met
 65 70 75 80
 tct aat aaa aga tta atg aat tca aaa aat att atg gat tat aaa tta 288
 Ser Asn Lys Arg Leu Met Asn Ser Lys Asn Ile Met Asp Tyr Lys Leu
 85 90 95
 tta tat act tat ttt tat att tta aat aaa atg aaa atg gaa atg gat 336
 Leu Tyr Thr Tyr Phe Tyr Ile Leu Asn Lys Met Lys Met Glu Met Asp
 100 105 110
 aat tat aat aat aat aat aat aat att tca tta aaa tat aat gaa tta 384
 Asn Tyr Asn Asn Asn Asn Asn Asn Ile Ser Leu Lys Tyr Asn Glu Leu
 115 120 125
 tta aaa aat att atg aat aat tta aat tat aaa act tct aat att gaa 432

Leu Lys Asn Ile Met Asn Asn Leu Asn Tyr Lys Thr Ser Asn Ile Glu
 130 135 140
 act aat tta tct aat aat ttt tat tta atg gat aaa tat tta att aat 480
 Thr Asn Leu Ser Asn Asn Phe Tyr Leu Met Asp Lys Tyr Leu Ile Asn
 145 150 155 160
 aaa tat atg aaa tat tta gat atg tta aat atg att cct aat aat tat 528
 Lys Tyr Met Lys Tyr Leu Asp Met Leu Asn Met Ile Pro Asn Asn Tyr
 165 170 175
 atg ttt aat aat att aat tat aaa ggt aaa tta aat att aaa aca gta 576
 Met Phe Asn Asn Ile Asn Tyr Lys Gly Lys Leu Asn Ile Lys Thr Val
 180 185 190
 tta gat tta aat aat aat gaa ttt tat gat tat tta tca ggg tta att 624
 Leu Asp Leu Asn Asn Asn Glu Phe Tyr Asp Tyr Leu Ser Gly Leu Ile
 195 200 205
 gaa ggt gat ggt tat att ggt cct gga ggt att aca att act aat cat 672
 Glu Gly Asp Gly Tyr Ile Gly Pro Gly Gly Ile Thr Ile Thr Asn His
 210 215 220
 gct aat gat gta tta aat act atc ttt att aat aaa aga att aaa aat 720
 Ala Asn Asp Val Leu Asn Thr Ile Phe Ile Asn Lys Arg Ile Lys Asn
 225 230 235 240
 agt att tta gta gaa aaa tgg atg gat act tta aaa gat aat cct tat 768
 Ser Ile Leu Val Glu Lys Trp Met Asp Thr Leu Lys Asp Asn Pro Tyr
 245 250 255
 ttt gtt aat gct ttc tct att aat att aaa act aat tta gct aaa gaa 816
 Phe Val Asn Ala Phe Ser Ile Asn Ile Lys Thr Asn Leu Ala Lys Glu
 260 265 270

aag att ttt act aat att tat aat aaa tta tat agt gat tat aaa att 864
Lys Ile Phe Thr Asn Ile Tyr Asn Lys Leu Tyr Ser Asp Tyr Lys Ile
275 280 285
aat caa att aat aat cat atc cct tat tat aat tat tta aaa att aat 912
Asn Gln Ile Asn Asn His Ile Pro Tyr Tyr Asn Tyr Leu Lys Ile Asn
290 295 300
aat aaa tta cct att aaa aat att atg gat att aaa aat aat tat tgg 960
Asn Lys Leu Pro Ile Lys Asn Ile Met Asp Ile Lys Asn Asn Tyr Trp
305 310 315 320
tta gct ggt ttt aca gct gca gat ggt tct ttt tta tca tct atg tat 1008
Leu Ala Gly Phe Thr Ala Ala Asp Gly Ser Phe Leu Ser Ser Met Tyr
325 330 335
aat cct aaa gat aca tta tta ttt aaa aat atg aga cct agt tat gtt 1056
Asn Pro Lys Asp Thr Leu Leu Phe Lys Asn Met Arg Pro Ser Tyr Val
340 345 350
att tca caa gtt gaa aca cgt aaa gaa tta att tat tta att caa gaa 1104
Ile Ser Gln Val Glu Thr Arg Lys Glu Leu Ile Tyr Leu Ile Gln Glu
355 360 365
tct ttt gat tta tct att tct aat gtt aaa aaa gtt ggt aat aga aaa 1152
Ser Phe Asp Leu Ser Ile Ser Asn Val Lys Lys Val Gly Asn Arg Lys
370 375 380
tta aaa gat ttt aaa tta ttt acc aga act act gat gaa tta atg aaa 1200
Leu Lys Asp Phe Lys Leu Phe Thr Arg Thr Thr Asp Glu Leu Met Lys
385 390 395 400
ttt att tat tat ttt gat aaa ttt tta cct tta cat gat aat aaa caa 1248
Phe Ile Tyr Tyr Phe Asp Lys Phe Leu Pro Leu His Asp Asn Lys Gln

405	410	415	
ttt aat tat att aaa ttt aga ttt aat act ttt att aaa tca tat aat	1296		
Phe Asn Tyr Ile Lys Phe Arg Phe Asn Thr Phe Ile Lys Ser Tyr Asn			
420	425	430	
tgg aat aat aga gta ttt ggt tta gta tta tct gaa tat atc aat aat	1344		
Trp Asn Asn Arg Val Phe Gly Leu Val Leu Ser Glu Tyr Ile Asn Asn			
435	440	445	
att aaa att gat aat tat gat tat tat tat aat aaa tat att aat	1392		
Ile Lys Ile Asp Asn Tyr Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Asn Lys Tyr Ile Asn			
450	455	460	
atg cat aat gca cgt aaa cct aaa gga tac att aaa taa	1431		
Met His Asn Ala Arg Lys Pro Lys Gly Tyr Ile Lys			
465	470	475	

<210> 3

<211> 476

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 3

Met Lys Lys Gln Asn Leu Asn Ser Ile Leu Leu Met Tyr Ile Asn Tyr
1 5 10 15
Ile Ile Asn Tyr Phe Asn Asn Ile His Lys Asn Gln Leu Lys Lys Asp
20 25 30
Trp Ile Met Glu Tyr Glu Tyr Met Tyr Lys Phe Leu Met Asn Asn Met
35 40 45

Thr Cys Phe Ile Lys Trp Asp Asn Asn Lys Ile Leu Leu Leu Leu Asp
 50 55 60
 Met Tyr Tyr Asn Val Leu Tyr Asn Tyr His Lys Gln Arg Thr Pro Met
 65 70 75 80
 Ser Asn Lys Arg Leu Met Asn Ser Lys Asn Ile Met Asp Tyr Lys Leu
 85 90 95
 Leu Tyr Thr Tyr Phe Tyr Ile Leu Asn Lys Met Lys Met Glu Met Asp
 100 105 110
 Asn Tyr Asn Asn Asn Asn Asn Asn Ile Ser Leu Lys Tyr Asn Glu Leu
 115 120 125
 Leu Lys Asn Ile Met Asn Asn Leu Asn Tyr Lys Thr Ser Asn Ile Glu
 130 135 140
 Thr Asn Leu Ser Asn Asn Phe Tyr Leu Met Asp Lys Tyr Leu Ile Asn
 145 150 155 160
 Lys Tyr Met Lys Tyr Leu Asp Met Leu Asn Met Ile Pro Asn Asn Tyr
 165 170 175
 Met Phe Asn Asn Ile Asn Tyr Lys Gly Lys Leu Asn Ile Lys Thr Val
 180 185 190
 Leu Asp Leu Asn Asn Asn Glu Phe Tyr Asp Tyr Leu Ser Gly Leu Ile
 195 200 205
 Glu Gly Asp Gly Tyr Ile Gly Pro Gly Gly Ile Thr Ile Thr Asn His
 210 215 220
 Ala Asn Asp Val Leu Asn Thr Ile Phe Ile Asn Lys Arg Ile Lys Asn
 225 230 235 240
 Ser Ile Leu Val Glu Lys Trp Met Asp Thr Leu Lys Asp Asn Pro Tyr
 245 250 255

Phe Val Asn Ala Phe Ser Ile Asn Ile Lys Thr Asn Leu Ala Lys Glu
 260 265 270
 Lys Ile Phe Thr Asn Ile Tyr Asn Lys Leu Tyr Ser Asp Tyr Lys Ile
 275 280 285
 Asn Gln Ile Asn Asn His Ile Pro Tyr Tyr Asn Tyr Leu Lys Ile Asn
 290 295 300
 Asn Lys Leu Pro Ile Lys Asn Ile Met Asp Ile Lys Asn Asn Tyr Trp
 305 310 315 320
 Leu Ala Gly Phe Thr Ala Ala Asp Gly Ser Phe Leu Ser Ser Met Tyr
 325 330 335
 Asn Pro Lys Asp Thr Leu Leu Phe Lys Asn Met Arg Pro Ser Tyr Val
 340 345 350
 Ile Ser Gln Val Glu Thr Arg Lys Glu Leu Ile Tyr Leu Ile Gln Glu
 355 360 365
 Ser Phe Asp Leu Ser Ile Ser Asn Val Lys Lys Val Gly Asn Arg Lys
 370 375 380
 Leu Lys Asp Phe Lys Leu Phe Thr Arg Thr Thr Asp Glu Leu Met Lys
 385 390 395 400
 Phe Ile Tyr Tyr Phe Asp Lys Phe Leu Pro Leu His Asp Asn Lys Gln
 405 410 415
 Phe Asn Tyr Ile Lys Phe Arg Phe Asn Thr Phe Ile Lys Ser Tyr Asn
 420 425 430
 Trp Asn Asn Arg Val Phe Gly Leu Val Leu Ser Glu Tyr Ile Asn Asn
 435 440 445
 Ile Lys Ile Asp Asn Tyr Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Asn Lys Tyr Ile Asn
 450 455 460

Met His Asn Ala Arg Lys Pro Lys Gly Tyr Ile Lys

465

470

475

<210> 4

<211> 18

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetische DNA

<400> 4

ccggatccat gaaaaaac

18

<210> 5

<211> 23

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetische DNA

<400> 5

gggtcgactt atttaatgta tcc

23

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetische DNA

<400> 6

aaaagactgg attatagaa

19

<210> 7

<211> 19

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetische DNA

<400> 7

tgaatatatg tataaattt

19

<210> 8

<211> 19

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetische DNA

<400> 8

tattaaatgg gataataat

19

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetische DNA

<400> 9

tattagatat gtattataat g

21

<210> 10

<211> 19

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetische DNA

<400> 10

tacacctatg tctaataaa

19

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetische DNA

<400> 11

aaaatattat ggattataaa

20

<210> 12

<211> 52

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetische DNA

<400> 12

ttttatatatt taaataaaat gaaaatggaa atggataatt ataataataa ta

52

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetische DNA

<400> 13

aaaatattat gaataattta a

21

<210> 14

<211> 36

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetische DNA

<400> 14

actatctaata attgaaacta atttatctaa taattt

36

<210> 15

<211> 19

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetische DNA

<400> 15

ttattttaatg gataaatat

19

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetische DNA

<400> 16

ataaatatat gaaatattta g

21

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetische DNA

<400> 17

ataattatat gtttaataat a

21

<210> 18

<211> 33

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetische DNA

<400> 18

ggaggtatta caattactaa tcatgctaata gat 33

<210> 19

<211> 36

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetische DNA

<400> 19

ttttagtaga aaaatggatg gatactttaa aagata 36

<210> 20

<211> 39

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetische DNA

<400> 20

agctaaagaa aagattttta ctaatatatta taataatta

39

<210> 21

<211> 19

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetische DNA

<400> 21

aaatattatg gatattaaa

19

<210> 22

<211> 18

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetische DNA

<400> 22

taattattgg ttatctgg

18

<210> 23

<211> 19

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetische DNA

<400> 23

atcatctatg tataatcct

19

<210> 24

<211> 19

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetische DNA

<400> 24

ttaaaaatat gagacctag

19

<210> 25

<211> 23

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetische DNA

<400> 25

gatgaattaa tgaaatttat tta 23

<210> 26

<211> 39

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetische DNA

<400> 26

attaaattta gatttaatac tttattataa tcatataat 39

<210> 27

<211> 38

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetische DNA

<400> 27

tataataaat atattaatat gcataatgca cgtaaacc 38

<210> 28

<211> 42

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetische DNA

<400> 28

taaattttta ataaataata tgacttggtt tattaaatgg ga 42

<210> 29

<211> 19

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetische DNA

<400> 29

aagattaatg aattcaaaa

19

<210> 30

<211> 39

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetische DNA

<400> 30

gattataaat tattatatac ttatttttat attttaaat

39

<210> 31

<211> 38

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetische DNA

<400> 31

gaataattta aattataaaa cttctaatat tgaaacta

38

<210> 32

<211> 37

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetische DNA

<400> 32

ttctctatta atattaaaac taatttagct aaagaaa

37

<210> 33

<211> 38

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetische DNA

<400> 33

aaattattta ccagaactac tgatgaatta atgaaatt

38

<210> 34

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetische DNA

<400> 34

catataattg gaataataga

20

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetische DNA

<400> 35

aatttttaat gaataatâtg

20

<210> 36

<211> 19

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetische DNA

<400> 36

tttagatatg ttaaataatg

19

<210> 37

<211> 25

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetische DNA

<400> 37

ataigttaaa tatgattcct aataa

25

<210> 38

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetische DNA

<400> 38

ctggattatg gaatatgaat

20

Patentansprüche

1. Verfahren zum Spalten von DNA umfassend, die Sequenz aus 26 Nucleotiden: GCCCAGACATATC-CCTGAATGATACC (SEQ ID NO: 1), wobei das Verfahren umfasst:

Reagieren der DNA mit:

(i) einem Endonuclease-Protein, das die in SEQ ID NO: 3 dargestellte Aminosäuresequenz umfasst; oder
(ii) einem Endonuclease-Protein, das eine von SEQ ID NO: 3 durch Substitution von Gly mit Lys bei Aminosäure 217 und Asn mit Asp bei Aminosäure 346 abgeleitete Aminosäuresequenz umfasst,
wobei die DNA innerhalb der Sequenz aus 26 Nucleotiden: GCCCAGACATATCCCTGAATGATACC gespalten wird, um gestufte Enden zu erzeugen.

Es folgen 7 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIG. 1

Obere Reihe	Vor der Modifikation	Untere Reihe	Nach der Modifikation	
	MKKQNLNSIL	LMYINYIINY	FNNTHKNQLIK	33 35 40 45 4849
	MKKQNLNSIL	LMYINYIINY	FNNTHKNQLIK	50
54	FIK.DNNKIL	LLDIYYNVL	YNYHKQRTPI	80
111	FIKWDNNKIL	LLDMYYNVL	YNYHKQRTPM	123 130
171	IDNYNNNNNN	ISLKYNELIK	NIINNLNYKL	135
177	MDNYNNNNNN	ISLKYNELIK	NIINNLNYKT	154
171	IIPNNYIFNN	INYKGKLNIL	TVLDLNNNEF	217
171	MIPNNYMFNN	INYKGKLNIL	TVLDLNNNEF	222
	TIFINKRIKN	SILVEK.IDT	LKDNPFYFVNA	247 248
	TIFINKRIKN	SILVEKWMDT	LKDNPFYFVNA	267
	INNHIPIYYNY	LKINNKLPIK	NIIDIKNNY	276
	INNHIPIYYNY	LKINNKLPIK	NIIDIKNNY	276
	YVISQVETR	ELIYLIQESF	BLSTISNVKKV	313 320
	YVISQVETR	ELIYLIQESF	BLSTISNVKKV	335 346 347
	LHDNKQFNVI	KRFNLFIKS	YN.NNRVFGL	395 399
	LHDNKQFNVI	KRFNLFIKS	YN.NNRVFGL	400
	PKGYIK.			410
	PKGYIK.			470

FIG. 2

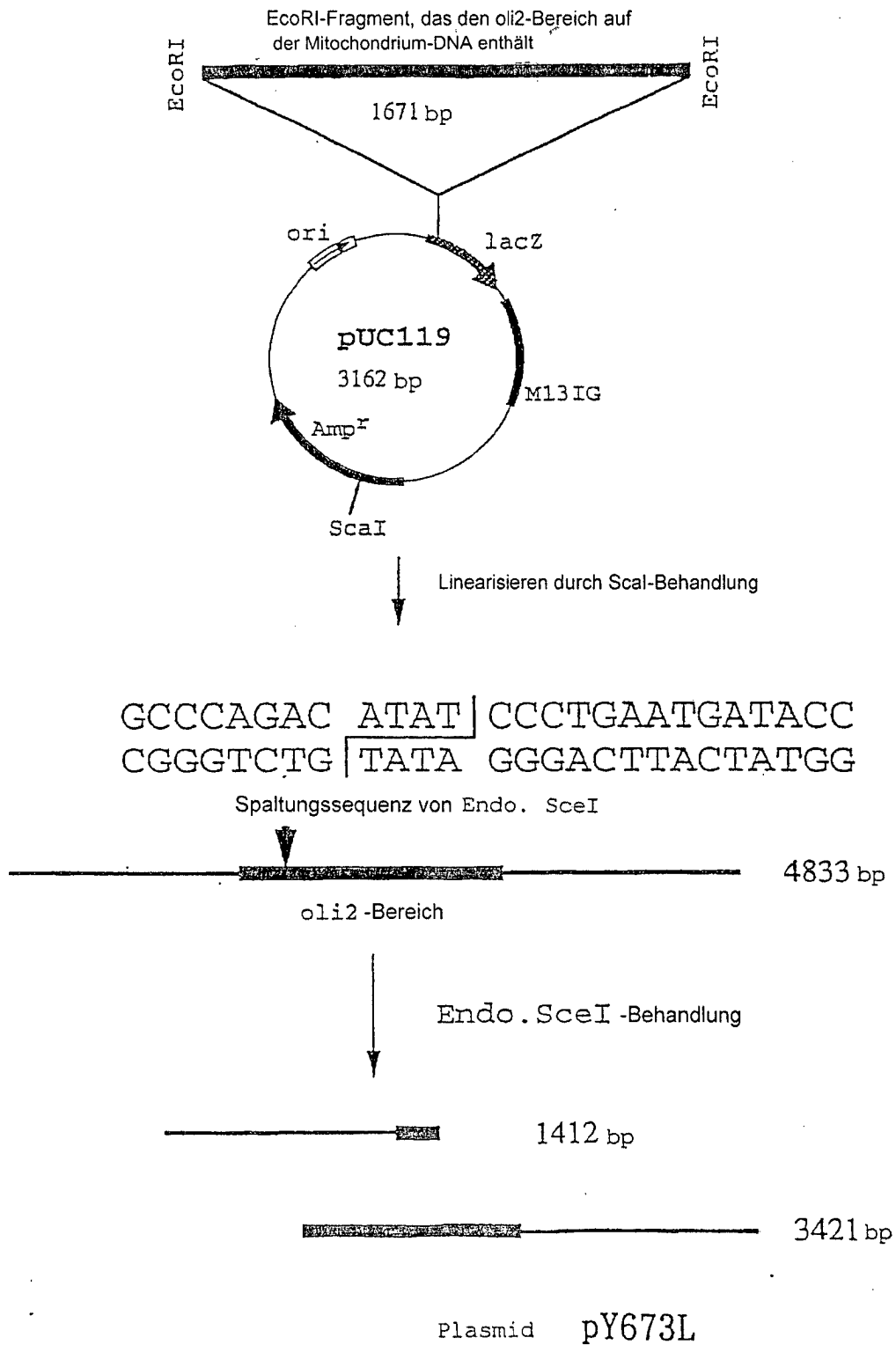
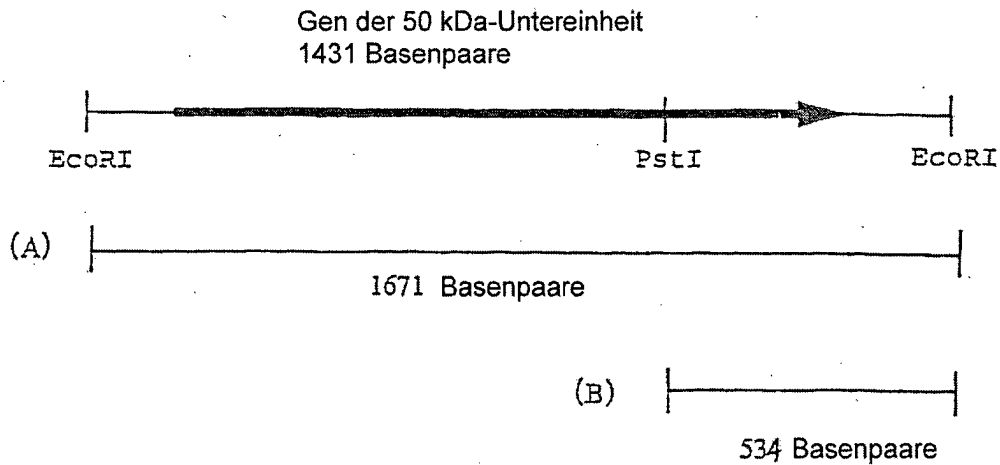
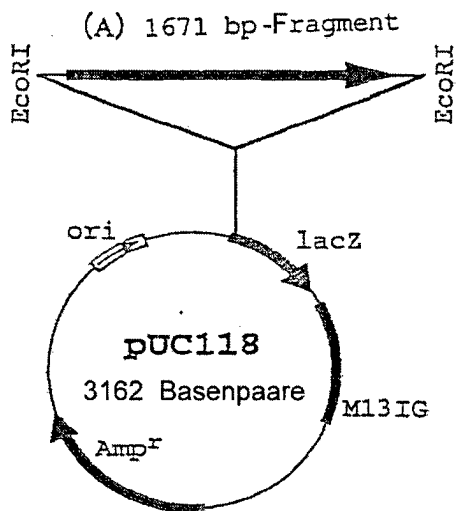


FIG. 3

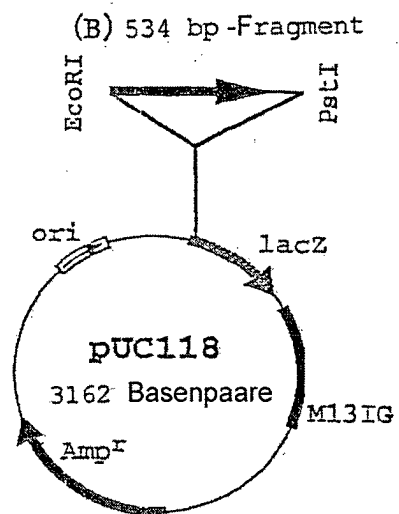


pEN1.7



(A) Clonieren des 1671 bp-Fragments
in die EcoRI-Schnittstelle von pUC118

pEN0.5



(B) Clonieren des 534 bp-Fragments
in die EcoRI/PstI-Schnittstelle von
pUC 118

Plasmide pEN1.7 und pEN0.5

FIG. 4

```

ATGAAAAACAAAAATTAAATCTATTTTATTATGTATATTAATTATATTATTAATTATTTTAAATAATA 70
TTCATAAAAAATCAATTAAAAAAGACTGGATTATGGAATATGAATATATGTATAAAATTTTAAATGAATAA 140
      A      A      A      A
TATGACTTGTCTTTTATTAAATGGGATAATAATAAAATTTTATTATTATTAGATATATGTTATAATGTATTA 210
ACTA      A      A
TATAACTATCATAAACAACGTACACCTATGTCTAATAAAAGATTAAATGAATTCAAAAAATATTATGGATT 280
      A      A      A
ATAAATTATTATATACCTTATTTTATATTTTAAATAAAATGAAATGGAAATGGATAATTATAATAATAA 350
CT      A      A      A
TAATAATAATATTTCATTAAATATAATGAATTATTAAAAATATTATGAATAATTAAATTATAAAACT 420
      A      CTA
TCTAATATTGAACTAATTTATCTAATAATTTTATTAAATGGATAAATATTAAATTAATAATATATGA 490
CT      A      A
AATATTTAGATATGTTAAATATGATTCCTAATAATTATATGTTTAAATAATTAAATTATAAAGGTAAATT 560
      A      A      A
AAATATTAAAAACAGTATTAGATTTAAATAATAATGAATTTTATGATTATTTATCAGGGTTAATTGAAGGT 630
GATGGTTATATTGGTCTCTGGAGCTATTACAATTACTAATCATGCTAATGATGTATTAAATACTATCTTTA 700
      CTA
TTAATAAAAGAATTAAAAATAGTATTTTAGTAGAAAAATGGATGGATACTTTAAAAGATAATCCTTATTT 770
      A      A
TGTAAATGCTTTCTCTATTAAATATTAAAACTAATTTAGCTAAAGAAAAGATTTTACTAATATTATAAT 840
CT      CT
AAATTATATAGTGATTATAAAATTAATCAAATTAATAATCATATCCCTTATTATAATTATTTAAAAATTA 910
ATAATAAATTACCTATTAAAAATATTATGGATATTAAAAATTAATTATTGGTTAGCTGGTTTACAGCTGC 980
      A      A
AGATGGTCTTTTTTATCATCTATGTATAATCCTAAAGATACATTATTATTAAAAATATGAGACCTAGT 1050
      A      A
TATGTTATTTTCAAGTTGAAACACGTAAAGAATTAAATTTATTTAATTCAAGAATCTTTTGATTATCTA 1120
TTTCTAATGTTAAAAAGTTGGTAATAGAAAAATTAAAGATTTTAAATTATTTACCAGAACTACTGATGA 1190
      CT
ATTAATGAAATTTATTTATATTTTGATAAATTTTACCTTTACATGATAATAACAATTTAATTATATT 1260
A
AAATTTAGATTTAATACTTTTATTAAATCATATAATTGGAAATAATAGAGTATTTGGTTTAGTATTATCTG 1330
CTA      A
AATATATCAATAATATTAAAAATTGATAATTATGATTATTATTATTATAATAAATATATTAAATATGCATAA 1400
      A
TGCACGTAAACCTAAAGGATACATTAAATAA 1431

```

Nucleotidsequenz des Gens der 50 kDa-Untereinheit, die modifiziert wurde, so dass sie mit dem Universalcode übereinstimmt (Nucleotide unter der Sequenz stellen diejenigen vor der Substitution dar)

Sequenzspezifische Endonucleaseaktivität
der Endo-SceI-50 kDa-Untereinheit

FIG. 5 A Substrat pY673L

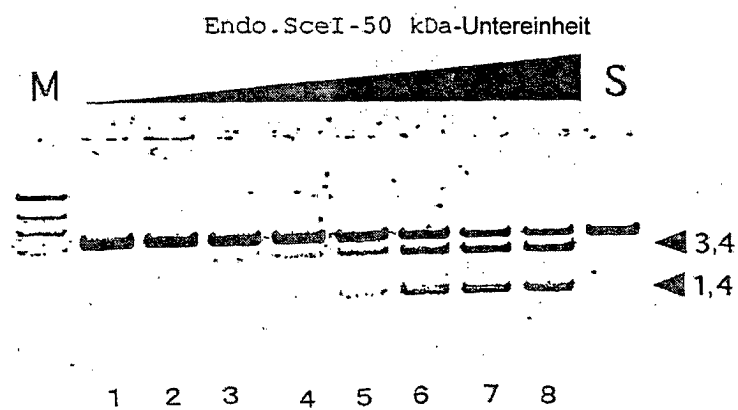
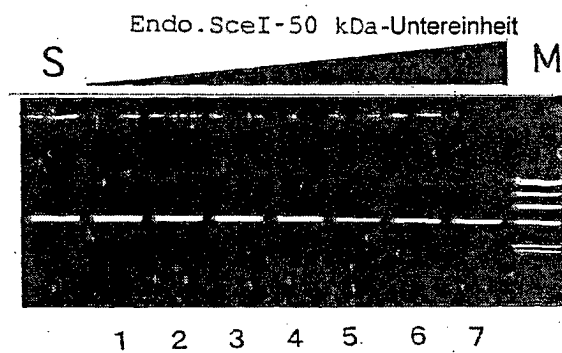


FIG. 5 B Substrat pBR322



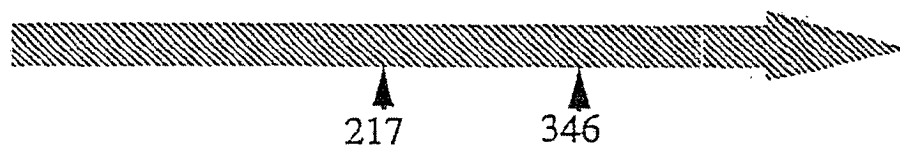
M ; λ DNA Hind III-Marker

S ; Nur Substrat-DNA

50 kDa -Untereinheit aus *Saccharomyces uvarum*

FIG. 6A

50 kDa -Untereinheit (476-Aminosäurereste)



	217	346
<i>S. cerevisiae</i> Endo. <i>SceI</i>	Gly	Asn
<i>S. uvarum</i> Endo. <i>SuvI</i>	Lys	Asp.

FIG. 6 B

35 GTTATATTGGTCCTAAAGGTATTACAAATTA
(GG)

36 ATTATTTAAAGATATGAGA
(A)

Sequenzspezifische Endonucleaseaktivität
der Endo.SuvI-50 kDa-Untereinheit

FIG. 7A

Substrat pY673L

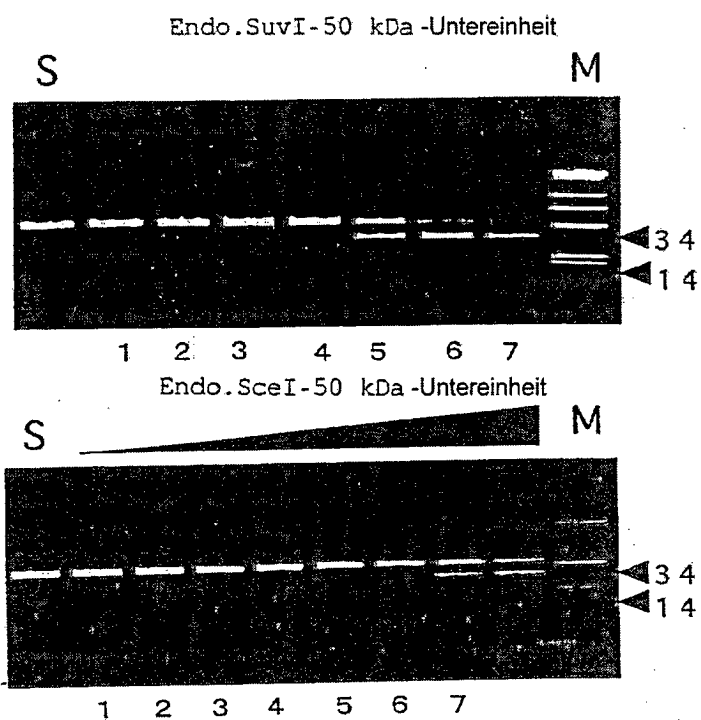
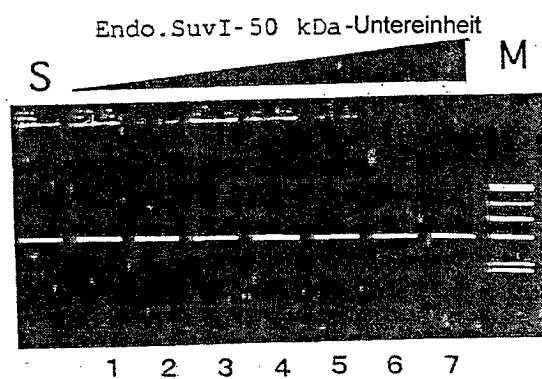


FIG. 7 B

Substrat pBR322



M ; λ DNA Hind III- Marker

S ; Nur Substrat-DNA