



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년12월12일

(11) 등록번호 10-1685712

(24) 등록일자 2016년12월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/10 (2006.01) C12P 19/34 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-7003986

(22) 출원일자(국제) 2008년07월31일

심사청구일자 2013년04월10일

(85) 번역문제출일자 2010년02월23일

(65) 공개번호 10-2010-0045494

(43) 공개일자 2010년05월03일

(86) 국제출원번호 PCT/US2008/071771

(87) 국제공개번호 WO 2009/018449

국제공개일자 2009년02월05일

(30) 우선권주장

60/953,171 2007년07월31일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

Ralf D. Kirsch 등. Nucleic acids Research. Vol. 26, No. 7, 페이지 1848-1850 (1998.)

Holly H. Hogrefe 등. Biotechniques. Vol. 33, No. 5, 페이지 1158-1165

JP2004507243 A

US07202086 B2

(73) 특허권자

비피 코포레이션 노쓰 아메리카 인코포레이티드

미국 77079 텍사스주 휴스턴 웨스트레이크 파크
불러바드 501

(72) 발명자

탄 주퀴우

미국 92130 캘리포니아주 샌 디에고 칼 마르 드
아모니아 4562

(74) 대리인

김태홍, 김진희

전체 청구항 수 : 총 27 항

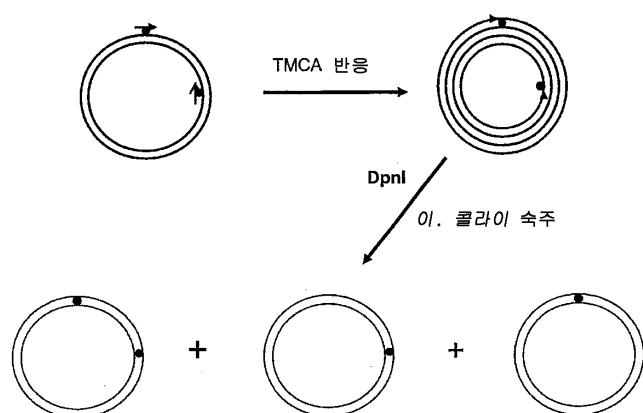
심사관 : 퇴_이영기

(54) 발명의 명칭 맞춤형 멀티사이트 조합 어셈블리

(57) 요 약

본 발명은, 단일 반응 혼합물의 이중 가닥 주형 폴리뉴클레오티드에 2종 이상 또는 3종 이상의 프라이머를 첨가하는 단계로서, 상기 프라이머는 중복되지 않고 상기 프라이머 각각은 다른 프라이머와 상이한 하나 이상의 돌연변이를 포함하며, 1종 이상의 프라이머는 상기 주형의 마이너스 가닥에 어닐링할 수 있는 정방향 프라이머이고,

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도3

1종 이상의 프라이머는 상기 주형의 플러스 가닥에 어닐링할 수 있는 역방향 프라이머인 단계, 및 상기 반응 혼합물에 대해 폴리머라제 연장 반응을 실시하여, 상기 3종 이상의 프라이머로부터 복수의 연장된 변형 폴리뉴클레오티드를 생성하는 단계를 포함하는, 맞춤형 멀티사이트 조합 어셈블리에 의해 복수의 위치에 각종 돌연변이의 다양한 조합을 갖는 복수의 변형 폴리뉴클레오티드를 제조하기 위한 신규한 방법을 제공한다. 이 방법은 상기 연장된 변형 폴리뉴클레오티드로 세포를 형질전환시키기 전에 결찰 단계를 이용하지 않고서 수행될 수 있다. 세포를 형질전환시키기 전에 주형 폴리뉴클레오티드를 파괴하기 위해 상기 복수의 연장된 변형 폴리뉴클레오티드를 효소로 처리할 수 있다.

명세서

청구범위

청구항 1

폴리뉴클레오티드 당 1개보다 많은 돌연변이를 갖는, 복수의 변형 폴리뉴클레오티드의 제조 방법으로서,

(a) 단일 반응 혼합물 내 이중 가닥 주형 폴리뉴클레오티드에 3종 이상의 프라이머를 첨가하는 단계로서, 상기 3종 이상의 프라이머는 중복되지 않고, 상기 3종 이상의 프라이머 각각은 다른 프라이머와 상이한 하나 이상의 돌연변이를 포함하며, 1종 이상의 프라이머는 상기 주형의 마이너스 가닥에 어닐링할 수 있는 정방향 프라이머이고, 1종 이상의 프라이머는 상기 주형의 플러스 가닥에 어닐링할 수 있는 역방향 프라이머인 것인 단계,

(b) 상기 반응 혼합물에 대해 폴리머라제 연장 반응을 실시하여, 상기 3종 이상의 프라이머로부터 폴리뉴클레오티드 당 1개보다 많은 돌연변이를 갖는 복수의 연장된 변형 폴리뉴클레오티드를 생성하는 단계로서, 상기 변형 폴리뉴클레오티드는 주형 폴리뉴클레오티드에 대해 가능한 모든 조합의 돌연변이를 포함하는 것인 단계,

(c) 상기 복수의 연장된 변형 폴리뉴클레오티드를 효소로 처리하여, 주형 폴리뉴클레오티드를 파괴시키는 단계,

(d) 리가제로 처리되지 않은 상기 처리한 연장된 변형 폴리뉴클레오티드로 세포를 형질전환시키는 단계,

(e) 형질전환된 세포로부터 복수의 연장된 변형 폴리뉴클레오티드를 회수하는 단계, 및

(f) 관심있는 돌연변이를 포함하는 복수의 연장된 변형 폴리뉴클레오티드를 선별하는 단계로서, 상기 폴리뉴클레오티드는 폴리뉴클레오티드 당 1개보다 많은 돌연변이를 포함하며, 상기 변형 폴리뉴클레오티드는 주형 폴리뉴클레오티드에 대해 가능한 모든 조합의 돌연변이를 포함하는 것인 단계

를 포함하는 제조 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서, 복수의 연장된 변형 폴리뉴클레오티드를 분석하는 단계를 더 포함하는 제조 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 분석 단계는 복수의 연장된 변형 폴리뉴클레오티드 중 하나 이상을 발현시키고, 이로부터 발현된 폴리펩티드를 분석하는 것을 포함하는 것인 제조 방법.

청구항 6

삭제

청구항 7

제1항에 있어서, 단계 (a) 전에, 상기 주형 폴리뉴클레오티드의 서열 정보를 얻는 단계, 및 상기 주형 폴리뉴클레오티드를 따라 위치하는 관심 있는 3개 이상의 돌연변이를 확인하는 단계를 더 포함하는 제조 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 폴리머라제 연장에 의해 생성된 복수의 연장된 변형 폴리뉴클레오티드를 분석하는 단계를 더 포함하는 제조 방법.

청구항 9

삭제

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 세포가 이. 콜라이(*E. coli*) 세포인 제조 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 효소가 제한 효소인 제조 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 제한 효소가 DpnI 제한 효소이고, 상기 세포가 이. 콜라이 세포인 제조 방법.

청구항 13

제1항에 있어서, 4종 이상의 프라이머를 첨가하는 것인 제조 방법.

청구항 14

제1항에 있어서, 5종 이상의 프라이머를 첨가하는 것인 제조 방법.

청구항 15

제1항에 있어서, 6종 이상의 프라이머를 첨가하는 것인 제조 방법.

청구항 16

제1항에 있어서, 8종 이상의 프라이머를 첨가하는 것인 제조 방법.

청구항 17

제1항에 있어서, 12종 이상의 프라이머를 첨가하는 것인 제조 방법.

청구항 18

제1항에 있어서, 각각의 프라이머가 단일 점 돌연변이를 포함하는 것인 제조 방법.

청구항 19

제1항에 있어서, 2종 이상의 정방향 프라이머가 주형 폴리뉴클레오티드 상의 동일한 위치에서 상이한 돌연변이를 포함하는 것인 제조 방법.

청구항 20

제1항에 있어서, 2종 이상의 역방향 프라이머가 주형 폴리뉴클레오티드 상의 동일한 위치에서 상이한 돌연변이를 포함하는 것인 제조 방법.

청구항 21

제1항에 있어서, 1종 이상의 프라이머가 주형 폴리뉴클레오티드 상의 상이한 위치에서 2개 이상의 돌연변이를 포함하는 것인 제조 방법.

청구항 22

제1항에 있어서, 1종 이상의 프라이머가 주형 폴리뉴클레오티드 상의 상이한 위치에서 2개 이상의 돌연변이를 포함하고, 2종 이상의 정방향 프라이머 또는 2종 이상의 역방향 프라이머가 주형 폴리뉴클레오티드 상의 동일한 위치에서 상이한 돌연변이를 포함하는 것인 제조 방법.

청구항 23

제1항에 있어서, 상기 하나 이상의 돌연변이가 하나 이상의 뉴클레오티드 또는 코딩된 아미노산 서열에서의 변경, 삽입 및 결실로 구성된 군에서 선택되는 것인 제조 방법.

청구항 24

제1항에 있어서, 상기 주형 폴리뉴클레오티드가 원형 이중 가닥 DNA인 제조 방법.

청구항 25

제1항에 있어서, 1종 이상의 프라이머가 각각 축퇴 위치를 포함하는 축퇴 프라이머의 세트이고, 관심있는 돌연변이가 축퇴 위치에서의 다른 다양한 뉴클레오티드인 제조 방법.

청구항 26

제1항에 있어서, 1종 이상의 프라이머가 상기 주형 폴리뉴클레오티드의 하나 이상의 코돈에 상응하는 하나 이상의 축퇴 코돈 및 상기 주형 폴리뉴클레오티드의 코돈에 인접한 서열에 상동성인 하나 이상의 인접 서열을 포함하는 축퇴 프라이머의 세트인 제조 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 축퇴 코돈이 천연 아미노산을 코딩하는 N,N,N인 제조 방법.

청구항 28

제26항에 있어서, 상기 축퇴 코돈이 20종 미만의 천연 아미노산을 코딩할 수 있는 것인 제조 방법.

청구항 29

제1항에 있어서, 상기 정방향 프라이머를 정방향 그룹으로 그룹화(grouping)하고 상기 역방향 프라이머를 역방향 그룹으로 그룹화하고, 상기 정방향 그룹의 프라이머와 상기 역방향 그룹의 프라이머를, 서로 독립적으로, 주형 폴리뉴클레오티드 상의 위치에 관계없이, 해당 그룹에서 동일한 농도가 되도록 정규화하며, 상기 정규화 후 동일한 양의 정방향 프라이머와 역방향 프라이머를 반응에 첨가하는 것인 제조 방법.

청구항 30

제1항에 있어서, 단계 (b) 전에,

상기 프라이머를 상기 주형 폴리뉴클레오티드 상에서의 그 위치에 따라 복수의 그룹으로 편성하는 단계로서, 상기 주형 상의 동일한 특정 영역을 커버하는 프라이머가 한 그룹에 속하는 것인 단계,

각 그룹 내의 그룹화된 프라이머를 동일한 농도가 되도록 정규화하는 단계,

한 그룹 내의 정방향 프라이머를 정방향 그룹으로 합하고(pooling) 각각의 정방향 프라이머 그룹 간의 농도가 동일하게 되도록 정규화하는 단계,

한 그룹 내의 역방향 프라이머를 역방향 그룹으로 합하고 각각의 역방향 프라이머 그룹 간의 농도가 동일하게 되도록 정규화하는 단계, 및

동일한 양의 합한 정방향 프라이머와 역방향 프라이머를 반응에 첨가하는 단계

를 더 포함하는 제조 방법.

청구항 31

제1항에 있어서, 단계 (a) 및 (b)를 2회 수행하고, 1회차에서 제조된 폴리뉴클레오티드를 2회차에서 주형 폴리뉴클레오티드로서 사용하는 것을 더 포함하는 제조 방법.

청구항 32

삭제

발명의 설명

기술 분야

- [0001] [관련 출원에 대한 상호 참조]
- [0002] 본 출원은 2007년 7월 31일에 출원된 미국 가출원 제60/953,171호를 기초로 우선권을 주장하며, 이 가출원의 내용은 본원에서 참고로 포함한다.
- [0003] [발명의 분야]
- [0004] 본 발명은, 일반적으로 복수의 자손(progeny) 폴리뉴클레오티드를 제조하고, 유전자에 특정한 변경을 생성하고, 복수 위치의 돌연변이 또는 변경을 채어샘블링하는 방법으로서의 맞춤형 멀티사이트 조합(tailored multi-site combinatorial assembly: "TMCA") 방법에 관한 것이다. 상기 돌연변이 또는 변경은 짧은 올리고뉴클레오티드에 대해 디자인하고 합성한다. 상기 올리고뉴클레오티드는 야생형 유전자를 포함하는 주형 DNA에 어닐링한다. DNA 폴리미라제를 사용하여 전체 DNA를 증폭시킨다. 얻어진 증폭 DNA를 숙주로부터 회수한다. 이 방법의 장점은 속도가 빠르고 기술적으로 단순하며 어셈블리 제어 능력이 있다는 점이다.

배경 기술

- [0005] 유전자에 변경을 가하는 공개된 방법은, 예를 들어, 오류 빈발 PCR, Invitrogen의 유전자 맞춤형 위치 지정 돌연변이 유발 키트(Gene Tailor site-directed Mutagenesis Kit)TM, Stratagene의 콜체인지 돌연변이 유발 키트(QuickChange Mutagenesis Kit)TM, 중복 PCR 및 PCR에 기초한 결찰/제조합을 이용한다. 공지된 방법을 검토해 보면, 이들 방법은 단일 위치/인접 영역에 돌연변이 및/또는 변형을 생성하는 것이 어렵다는 주된 문제점에 직면하는 경향이 있고/있거나, 다중 영역에 변형을 생성하기 위해서는 노동력이 많이 든다는 것을 알 수 있다.
- [0006] 미국 특허 제7,202,086호("086호 특허")는 돌연변이된 유전자의 라이브러리를 생성하기 위해 중복되거나 중복되지 않은 5개 이상의 올리고뉴클레오티드 및 dsDNA(플라스미드)를 사용하는 돌연변이 유발 방법을 청구하며, 이때 각각의 돌연변이는 평균적으로 라이브러리 내 유전자의 1/5 미만으로 존재한다. 상기 '086호 특허는, '086호 특허가 하나의 DNA 문자 내의 "파잉 돌연변이"를 방지하기 위해 돌연변이 빈도를 제어할 것을 요하기 때문에 (컬럼 5, 28~45행), 개시된 발명이 선행 기술의 것과는 다르다고 기재하고 있다. 각각 하나의 돌연변이를 포함하는 돌연변이체를 얻는 것이 바람직하다. 이 목적을 달성하기 위해, 각각의 돌연변이 올리고뉴클레오티드의 양과 주형의 양 사이의 비는 0.01~100이어야 한다(컬럼 5, 28~45행). 이러한 특징은 선행 기술의 것과는 구별되는데, 이때 몇 개의 올리고뉴클레오티드를 동시에 사용하는 것은 각각의 프라이머의 도입 수준을 75% 초과가 되도록 한다(컬럼 5, 28~45행). 상기 '086호 특허는 하나의 DNA 문자에 "파잉 돌연변이"가 발생하는 것을 방지하고 각각 하나의 돌연변이를 포함하는 돌연변이체를 생성하기 위해 돌연변이 빈도를 제어할 것을 요한다.
- [0007] 미국 특허 제7,132,265호("265호 특허") 및 미국 특허 출원 공개 제2003/0064516호는 프라이머를 어닐링하는 단계, DNA 가닥을 합성하는 단계 및 상기 DNA 문자를 분해하는 단계를 포함하는 단일 가닥 DNA("ssDNA") 문자로 돌연변이를 도입하는 방법을 청구한다. 상기 TCMA 방법은 이중 가닥 DNA("dsDNA")를 주형으로 사용한다. 상기 '265호 특허는 돌연변이 유발 프로토콜을 위한 출발 기질로서 ssDNA를 사용하는 것과 dsDNA를 사용하는 것 간의 명백한 구별을 짓는다(컬럼 6, 45~55행 참조).
- [0008] 미국 출원 공개 제2003/0194807호는 단백질의 돌연변이체가 정해진 영역의 하나 이상의 위치에 하나의 특정한 아미노산을 포함하고, 상기 정해진 영역이 3개 이상의 아미노산인 라이브러리에 관한 것이다. 한 위치에 하나의 변경만이 허용되며, 즉, 특정 아미노산 위치에서의 축퇴 변경은 배제된다.
- [0009] 미국 출원 공개 제2006/0051748호; 제2006/0134624호; 제2004/0248131호; 및 제2002/0083488호; 및 미국 특허 제6,673,610호; 제6,335,160호; 및 제5,354,670호는 각각 돌연변이를 갖는 자손 원형 DNA를 생성하기 위해 합성된 DNA를 결찰시킬 것을 요한다.
- [0010] 또한, 미국 출원 공개 제2006/0051748호는 플랩 엔도뉴클레아제(flap endonuclease)를 사용하는 것과 동일한 DNA 가닥에 모든 프라이머를 어닐링할 것을 요한다. 미국 출원 공개 제2006/0134624호는 2개의 프라이머를 연속적으로(즉, 하나의 반응에서가 아니라) 사용할 것을 요한다. 미국 출원 공개 제2004-0248131호에서는, 2개의 가닥에 프라이머를 어닐링하는데, 이때 상기 프라이머는 2~4개의 상보성 염기쌍을 포함하여야 한다. 미국 특허 제6,673,610호 및 미국 출원 공개 제2002/0083488호는, 형질전환에 사용되는 원형 DNA를 얻기 위해 메가프라이머로서 모 DNA 가닥을 분해함으로써 생성한 단편을 사용할 것을 요한다. 미국 특허 제6,335,160호는 중복 단편으로부터의 유전자 어셈블리 및 제조합 라이브러리의 생성에 관한 것이다. 마지막으로, 미국 특허 제5,354,670

호는 2개의 형질전환 단계 및 제한 효소를 사용한 중간 처리 단계를 필요로 한다.

[0011] 미국 특허 제7,176,004호; 제6,713,285호; 제6,391,548호; 및 제5,932,419호; 및 미국 출원 공개 제2004/0253729호 및 제2003/0032037호는 각각, 상보성 영역을 가지고, 반대 방향으로의 증폭을 개시하기 위해 2개의 상이한 가닥에 어닐링할 수 있는 2개의 프라이머(즉, 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머)를 필요로 한다. 미국 특허 제7,078,389호 및 제5,935,830호는, 프라이머가, 삼중 가닥 분자가 형성되도록 주형과 상호작용하는 돌연변이 유발원(예를 들어, 소랄렌)을 포함할 것을 요한다.

[0012] 미국 출원 공개 제2006/0228786호는 2개의 상이한 반응으로 2개의 상이한 프라이머를 사용한 두 가닥의 중합을 수행한 후 합성된 ssDNA 분자를 어닐링할 것을 요한다. 미국 출원 공개 제2003/0077613호는 유전자 어셈블리 및 라이브러리 생성 방법에 관한 것으로서, 이 방법에서는 어셈블링된 유전자(ssDNA)를 스캐폴드 DNA와 어닐링하여 캡을 충전하고 dsDNA를 생성하여, 이것을 벡터로 서브클로닝한다.

[0013] 미국 출원 공개 제2004/0002057호는, 돌연변이 유발을 포함하지 않는, 시료 중의 리간드를 검출하는 방법을 기재한다. 미국 출원 공개 제2004/0002057호는 배양된 세포에서 돌연변이 유발원을 사용하여 돌연변이 이. 콜라이 균주를 구축하는 방법을 개시한다. 미국 출원 공개 제2006/0199222호는, 돌연변이된 DNA로 특정 바실러스 (*Bacillus*) 균주를 형질전환시키는 방향적 진화의 일반 방법에 관해 기재한다.

[0014] 그러나 특정한 유전자 변이체 및 조합 유전자 라이브러리를 효율적이고 신속하게 생성하기 위한 더 우수하고 더 효과적인 방법이 여전히 요구되고 있다.

발명의 내용

과제의 해결 수단

[0015] 특별히 정의하지 않는다면, 본원에서 사용된 모든 기술 용어 및 과학 용어는 기술 내용을 제공하는 분야, 예를 들어 화학, 생화학, 세포 생물학, 분자 생물학 또는 의과학의 당업자가 그 내용을 볼 때 일반적으로 이해하는 의미를 갖는다.

[0016] 따라서, 본 발명의 한 가지 목적은 맞춤형 멀티사이트 조합 어셈블리에 의해 복수의 위치에 각종 돌연변이의 다양한 조합을 갖는 복수의 변형 폴리뉴클레오티드를 제조하는 방법을 제공하는 것이다. 본 발명에 의하면, 유전자에 특정한 변경을 생성하고 이 유전자의 복수 위치의 돌연변이 또는 변경을 재어셈블링하는 것이 가능하다. 본 발명의 이와 같은 목적은 바람직한 실시형태에 대한 이하의 상세한 설명을 참조할 때 더욱 명백할 것이며, 이 목적은

[0017] (a) 단일 반응 혼합물의 이중 가닥 주형 폴리뉴클레오티드에 3종 이상의 프라이머를 첨가하는 단계로서, 상기 3종 이상의 프라이머는 중복되지 않고 상기 3종 이상의 프라이머 각각은 다른 프라이머와 상이한 하나 이상의 돌연변이를 포함하며, 1종 이상의 프라이머는 상기 주형의 마이너스 가닥에 어닐링할 수 있는 정방향 프라이머이고, 1종 이상의 프라이머는 상기 주형의 플러스 가닥에 어닐링할 수 있는 역방향 프라이머인 단계, 및

[0018] (b) 상기 반응 혼합물에 대해 폴리머라제 연장 반응을 실시하여, 상기 3종 이상의 프라이머로부터 복수의 연장된 변형 폴리뉴클레오티드를 생성하는 단계

[0019] 를 포함하는 방법의 발견에 의해 달성되었다.

[0020] 또 다른 실시형태에서, 관심있는 돌연변이를 포함하는 복수의 변형 폴리뉴클레오티드를 제조하는 방법은

[0021] (a) 단일 반응 혼합물의 이중 가닥 주형 폴리뉴클레오티드에 2종 이상의 프라이머를 첨가하는 단계로서, 상기 2종 이상의 프라이머는 중복되지 않고 상기 2종 이상의 프라이머 각각은 다른 프라이머(들)와 상이한 하나 이상의 돌연변이를 포함하며, 1종 이상의 프라이머는 상기 주형의 마이너스 가닥에 어닐링할 수 있는 정방향 프라이머이고, 1종 이상의 프라이머는 상기 주형의 플러스 가닥에 어닐링할 수 있는 역방향 프라이머인 단계,

[0022] (b) 상기 반응 혼합물에 대해 폴리머라제 연장 반응을 실시하여, 상기 2종 이상의 프라이머로부터 복수의 연장된 변형 폴리뉴클레오티드를 생성하는 단계,

[0023] (c) 상기 복수의 연장된 변형 폴리뉴클레오티드를 효소로 처리함으로써 상기 주형 폴리뉴클레오티드를 파괴하는 단계,

[0024] (d) 리가제로 처리하지 않은 상기 처리한 연장된 변형 폴리뉴클레오티드로 세포를 형질전환시키는 단계,

- [0025] (e) 상기 세포로부터 상기 복수의 연장된 변형 폴리뉴클레오티드를 회수하는 단계, 및
- [0026] (f) 관심있는 돌연변이를 포함하는 복수의 연장된 변형 폴리뉴클레오티드를 선별하는 단계
- [0027] 를 포함한다.
- [0028] 본 발명의 하나 이상의 실시형태의 상세 사항은 후술하는 상세한 설명에 기재한다. 본원에 기재된 방법 및 재료와 유사하거나 동등한 임의의 방법 및 재료가 본 발명의 실시 또는 테스트에 사용될 수 있지만, 이하에서는 바람직한 방법 및 재료에 관해 설명한다. 본 발명의 다른 특징, 목적 및 이점은 상세한 설명 및 특허청구범위로부터 명백해질 것이다. 명세서 및 첨부된 특허청구범위에서, 명백히 다른 것을 지시하지 않는다면 단수 형태의 표현은 복수의 표현을 포함한다. 명백히 달리 명시하지 않는다면, 본원에서 사용되거나 고려되는 기법은 당업자에게 잘 알려져 있는 표준 방법이다. 실시형태의 예는 단지 예시를 목적으로 한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0029] 첨부된 도면을 함께 고려하여 이하의 상세한 설명을 참조할 경우, 본 발명 및 본 발명에 수반되는 이점의 다수가 보다 완전하게 쉽게 이해될 것이다.

도 1. GSSMSM의 모식도.

도 2. 진화-GSSMSM 과정 플로우의 모식도.

도 3. 맞춤형 멀티사이트 조합 어셈블리의 모식도.

도 4 A~D. TMCA 반응에 사용된 프라이머의 조합.

도 5. 6개 돌연변이 어셈블리에서의 프라이머 어닐링 맵.

도 6. 6개 돌연변이 위치를 갖는 가능한 조합의 분포. 표준: 이상적 상황하에서의 계산된 변이체 분포; 1A: 이. 콜라이 균주 XL1-블루를 이용한 반응 조건 1; 7A: 이. 콜라이 균주 XL1-블루를 이용한 반응 조건 2; 13A: 이. 콜라이 균주 XL1-블루를 이용한 반응 조건 3; 합계: 1A, 7A 및 13A로부터의 데이터 합계; 0×: 돌연변이 없음; 1×: 하나의 돌연변이; 2×: 2개의 돌연변이; 3×: 3개의 돌연변이; 4×: 4개의 돌연변이; 5×: 5개의 돌연변이; 6×: 6개의 돌연변이.

도 7. 6개 돌연변이 어셈블리에서의 통계적 계산치 대 실험 데이터.

도 8. 4개 돌연변이 어셈블리에서의 프라이머 어닐링 맵.

도 9. 4개 돌연변이 위치를 갖는 가능한 조합의 분포. 표준: 이상적 상황하에서의 계산된 변이체 분포; 2A: 이. 콜라이 균주 XL1-블루를 이용한 반응 조건 1; 8A: 이. 콜라이 균주 XL1-블루를 이용한 반응 조건 2; 14A: 이. 콜라이 균주 XL1-블루를 이용한 반응 조건 3; 합계: 2A, 8A 및 14A로부터의 데이터 합계; 0×: 돌연변이 없음; 1×: 하나의 돌연변이; 2×: 2개의 돌연변이; 3×: 3개의 돌연변이; 4×: 4개의 돌연변이.

도 10. 4개의 위치를 갖는 가능한 조합의 분포. 표준: 이상적 상황하에서의 계산된 변이체 분포; 2B: 이. 콜라이 균주 Stbl2를 이용한 반응 조건 1; 8B: 이. 콜라이 균주 Stbl2를 이용한 반응 조건 2; 14B: 이. 콜라이 균주 Stbl2를 이용한 반응 조건 3; 합계: 2B, 8B 및 14B로부터의 데이터 합계; 0×: 돌연변이 없음; 1×: 하나의 돌연변이; 2×: 2개의 돌연변이; 3×: 3개의 돌연변이; 4×: 4개의 돌연변이.

도 11. 3개 돌연변이 어셈블리에서의 프라이머 어닐링 맵.

도 12. 3개 돌연변이 위치를 갖는 가능한 조합의 분포. 표준: 이상적 상황하에서의 계산된 변이체 분포; 15A: 이. 콜라이 균주 XL1-블루를 이용한 반응 조건 3; 9B: 이. 콜라이 균주 Stbl2를 이용한 반응 조건 2; 15B: 이. 콜라이 균주 Stbl2를 이용한 반응 조건 3; 합계: 15A, 9B 및 15B로부터의 데이터 합계; 0×: 돌연변이 없음; 1×: 하나의 돌연변이; 2×: 2개의 돌연변이; 3×: 3개의 돌연변이.

도 13. 13개 돌연변이체 및 5개 돌연변이 위치를 갖는 프라이머 어닐링 맵.

도 14a, 14b, 14c. 5개 돌연변이 위치 및 13개 프라이머 어셈블리에서의 독특한 변이체 조합. TMCA 1회차에서의 변이체 파괴(a), 2회차 후의 변이체 파괴(b), 프라이머 어닐링 맵(c).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030]

TMCA 방법은 복수의 변경을 포함하는 특정한 유전자 변이체 또는 조합 유전자 라이브러리를 효율적이고 신속하게 생성할 수 있고; 최소한의 비용과 노력만을 요하며; "요구"에 따라 바이어스(bias)된 조합 라이브러리를 제조할 수 있도록 맞춤형으로 할 수 있다. 상기 TMCA 방법은 결찰 단계를 이용하지 않고 수행될 수 있고, 따라서, 다중 돌연변이를 생성하는 과정을 단순화한다. 특정 라이브러리의 "요구"는 실험에 따라 달라진다. 잠재적 돌연변이 위치 - "요구" - 는, 예를 들어, 1) 합리적으로 디자인된 아미노산 변경, 또는 2) 효소에 대해 원하는 효과를 생성하기 위해 실험에 의해 결정된(GSSMSM 및 스크리닝 작업에 의해 결정된) 개개의 아미노산 변경일 수 있다. 각각의 라이브러리는 특정한 수의 잠재적 돌연변이 위치를 갖도록 생성된다. 잠재적 돌연변이 위치에 다소의 돌연변이를 갖는 자손에 대해 바이어스된 라이브러리를 생성하는 것이 바람직할 수 있다. 또한, 특정 돌연변이 또는 돌연변이 위치 쪽으로 또는 이에 반하여 바이어스가 존재하는 라이브러리를 생성하는 것이 바람직할 수 있다.

[0031]

본원에 기재된 방법 및 재료와 유사하거나 동등한 모든 방법 및 재료가 본 발명의 실시 또는 테스트에 사용될 수 있으나, 적절한 방법 및 재료를 본원에 기재하였다. 본원에 언급된 모든 간행물, 특히 출원, 특히 및 기타 참고 문헌은 그 전체가 본원에 참고로 포함된다. 또한, 재료, 방법 및 예는 달리 명시하지 않는다면 단지 예시를 위한 것으로서 한정을 의도한 것이 아니다.

[0032]

본 출원에서, 본 발명자들은 도 3에 개괄적으로 예시된 맞춤형 멀티사이트 조합 어셈블리 방법을 설계하였다. 비교를 위해, 도 1 및 도 2는, 각각의 돌연변이 위치가 상이한 아미노산에 대해 2종 이상의 돌연변이를 포함할 수 있는 진화-유전자 위치 포화 돌연변이 유발(evolution-Gene Site Saturated Mutagenesis: "GSSM")을 예시한다. 진화-GSSMSM은 특정한 유전자로 뉴클레오티드 변경을 도입하고 오픈 리딩 프레임의 각각의 코돈을 하나 이상의 잔기에 대해 모든 다른 아미노산으로 한 번에 돌연변이시키는 데 사용될 수 있다. 이로써, GSSMSM 라이브러리가 생성되고, 이때 1개의 클론은 1개의 변경을 갖는 DNA를 포함하는 반면, TMCA 방법에 의해 생성된 라이브러리 내 자손 폴리펩티드는 복수의 돌연변이, 바람직하게는, 2개 이상, 더 바람직하게는 3개 이상, 더 바람직하게는 4개 이상, 5개 이상, 6개 이상, 8개 이상, 10개 이상, 더 바람직하게는 12개 이상의 돌연변이를 포함할 수 있다.

[0033]

GSSMSM 기법을 이용할 경우, 1개 잔기가 한 번에 변경되어 20종 아미노산을 모두 커버한다. 이 라이브러리를 스크리닝하고 상류 돌연변이체(up-mutants)를 확인한다. 상기 TMCA 반응은 1개 분자의 복수의 위치에 돌연변이를 생성하도록 설계된다. 상기 TMCA 반응은 GSSMSM 라이브러리로부터 확인된 상류 돌연변이체를 조합하기 위해 사용될 수 있다. TMCA 반응 조건하에서는, 다중 PCR 생성물의 형성이 예상될 것이다. 상기 PCR 생성물은 세포로 형질전환되어 증폭될 것으로 예상되지 않는다.

[0034]

본 발명의 내용에 있어서, 본원에서 사용되는 "아미노산"이란 용어는 아미노기(-NH₂) 및 카복실기(-COOH)를, 바람직하게는 자유기로서 또는 대안으로 축합 후에 펩티드 결합의 일부로서 포함하는 임의의 유기 화합물을 의미한다. "20종의 천연 아미노산"은 당업계에서 이해되고 있으며, 알라닌(ala 또는 A), 아르기닌(arg 또는 R), 아스파라긴(asn 또는 N), 아스파르트산(asp 또는 D), 시스테인(cys 또는 C), 글루탐산(glu 또는 E), 글루타민(gln 또는 Q), 글리신(gly 또는 G), 히스티딘(his 또는 H), 이소루신(ile 또는 I), 루신(leu 또는 L), 라이신(lys 또는 K), 메티오닌(met 또는 M), 페닐알라닌(phe 또는 F), 프롤린(pro 또는 P), 세린(ser 또는 S), 트레오닌(thr 또는 T), 트립토파인(trp 또는 W), 타이로신(tyr 또는 Y) 및 발린(val 또는 V)을 말한다.

[0035]

"증폭"("폴리머라제 연장 반응")이란 용어는 폴리뉴클레오티드의 카피수가 증가되는 것을 의미한다.

[0036]

본원에서 "~에 상응한다"란 표현은 폴리뉴클레오티드 서열이 참조 폴리뉴클레오티드 서열의 전부 또는 일부에 상동성이거나(즉, 동일하나 염격하게 진화적으로 관련되어 있지는 않음), 또는 폴리펩티드 서열이 참조 폴리펩티드 서열과 동일하다는 것을 의미하는 것으로 사용된다. 대조적으로, 본원에서 "~에 상보적인"이란 표현은 상보성 서열이 참조 폴리뉴클레오티드 서열의 전부 또는 일부에 상동성임을 의미하는 것으로 사용된다. 예를 들면, 뉴클레오티드 서열 "TATAC"는 참조 "TATAC"에 상응하며, 참조 서열 "GTATA"에 상보적이다.

[0037]

본원에서 "프라이머"는 주형 핵산에 어닐링할 수 있고 DNA 증폭을 위한 출발 지점으로서의 역할을 하는 핵산으로서 정의된다. 프라이머는 주형 폴리뉴클레오티드의 특정한 영역에 완전히 또는 부분적으로 상보성일 수 있다. 본원에서 비상보성 뉴클레오티드는 불일치(mismatch)로서 정의된다. 불일치는 프라이머 내에 또는 프라이머의

어느 한쪽의 말단에 위치할 수 있다. 바람직하게는, 단일 뉴클레오티드 불일치, 더 바람직하게는 2개, 더 바람직하게는, 3개 이상의 연속 또는 불연속 뉴클레오티드 불일치가 프라이머 내에 위치한다. 프라이머는 6~200개 뉴클레오티드, 바람직하게는, 20~80개 뉴클레오티드, 더 바람직하게는, 43~65개 뉴클레오티드를 갖는다. 더 바람직하게는, 프라이머는 10개, 15개, 20개, 25개, 30개, 35개, 40개, 45개, 50개, 55개, 60개, 65개, 70개, 75개, 80개, 85개, 90개, 95개, 100개, 105개, 110개, 115개, 120개, 125개, 130개, 135개, 140개, 145개, 150개, 155개, 160개, 165개, 170개, 175개, 180개, 185개 또는 190개 뉴클레오티드를 갖는다. 본원에서 정의된 "정방향 프라이머"는 주형 폴리뉴클레오티드의 마이너스 가닥에 상보성인 프라이머이다. 본원에서 정의된 "역방향 프라이머"는 주형 폴리뉴클레오티드의 플러스 가닥에 상보성인 프라이머이다. 바람직하게는, 상기 정방향 프라이머와 상기 역방향 프라이머는 중복되는 뉴클레오티드 서열을 포함하지 않는다. 본원에서 정의된 "중복되는 뉴클레오티드 서열을 포함하지 않는다"라는 표현은 정방향 프라이머와 역방향 프라이머가, 플러스 가닥과 마이너스 가닥이 서로 상보성인 주형 폴리펩티드의, 각각 마이너스 가닥 영역과 플러스 가닥 영역에 어닐링하지 않는다는 것을 의미한다. 주형 폴리뉴클레오티드의 동일한 가닥에 어닐링하는 프라이머에 대해서, "중복되는 뉴클레오티드 서열을 포함하지 않는다"라는 표현은 프라이머가 주형 폴리뉴클레오티드의 동일한 가닥의 동일한 영역에 상보성인 서열을 포함하지 않는다는 것을 의미한다.

[0038] 상기 플러스 가닥은 센스 가닥과 동일하고 코딩 또는 비주형 가닥이라 칭할 수도 있다. 이것은 mRNA와 동일한 서열을 갖는 가닥이다(단, 이것은 U 대신에 T를 갖는다). 주형, 마이너스 또는 안티센스 가닥이라 불리는 다른 가닥은 mRNA에 상보성이다.

[0039] 본원에서 "주형 폴리뉴클레오티드의 동일한 특정 영역을 커버하는 프라이머"는 각각 하나 이상의 축퇴 위치를 포함하는 축퇴 프라이머의 세트로서 정의되며, 이때 관심있는 돌연변이는 축퇴 위치의 다른 다양한 뉴클레오티드, 또는 주형 폴리뉴클레오티드의 하나 이상의 코돈에 상응하는 하나 이상의 축퇴 코돈을 포함하는 축퇴 프라이머의 세트이거나, 이들의 조합이다. 예를 들어, 3개 코돈 돌연변이 Y276F/S282L, H, P, R, 또는 C/L284F에 대한 가능한 모든 조합에 대한 프라이머 세트(예를 들어, 도 4, 15 또는 16 참조)는 주형의 동일한 영역을 커버하는 프라이머이다. "주형 폴리뉴클레오티드의 동일한 특정 영역을 커버하는 프라이머"는 또한, 예를 들어, 특정한 프라이머의 조합일 수 있다.

[0040] DNA의 "분해"는 DNA의 특정 서열에만 작용하는 제한 효소를 사용한 DNA의 촉매적 절단을 말한다. 본원에서 사용되는 각종 제한 효소는 상업적으로 입수가 가능하고, 그 반응 조건, 보조 인자 및 기타 요건은 당업자가 알고 있는 바와 같이 사용되었다. 분석 목적을 위해서는, 일반적으로 약 20 μ l의 완충액 중에서 1 μ g의 플라스미드 또는 DNA 단편이 약 2 유닛의 효소와 함께 사용된다. 플라스미드 작제를 위해 DNA 단편을 단리하기 위해서는, 일반적으로 더 큰 용량으로 5~50 μ g의 DNA를 20~250 유닛의 효소로 절단한다. 특정 제한 효소에 대한 적절한 완충액 및 기질의 양은 제조업자에 의해 정해진다. 통상적으로 37°C에서 약 1시간 동안의 항온처리 시간이 이용되나, 공급업자의 설명서에 따라 달라질 수 있다. 분해 후, 반응물을 겔 상에서 전기영동할 수 있다.

[0041] "재조합" 효소란 재조합 DNA 기법에 의해 제조된, 즉 원하는 효소를 코딩하는 외인성 DNA 구성체에 의해 형질전환된 세포로부터 제조된 효소를 말한다. "합성" 효소란 화학적 합성에 의해 제조된 효소이다.

[0042] "제한 위치"란 용어는 제한 효소의 작용의 발현에 필요한 인식 서열을 말하며, 촉매적 절단 위치를 포함한다. 절단 위치는 모호성(ambiguity)이 적은 서열(즉, 제한 위치 발생 빈도의 주요 결정인자를 포함하는 서열)을 포함하는 제한 위치의 일부 내에 포함될 수도 있고 포함되지 않을 수도 있는 것으로 이해된다. 따라서, 많은 경우, 관련된 제한 위치는 내부 절단 위치(예를 들어, EcoRI 위치 내의 G/AATTC) 또는 바로 인접한 절단 위치(예를 들어, EcoRII 위치 내의 /CCWGG) 내에 단지 저모호성 서열만을 포함한다. 다른 경우, 관련된 제한 효소(예를 들어, Eco57I 위치 또는 CTGAAG(16/14))는 (예를 들어, Eco57I 위치의 N₁₆ 부분 내의) 외부 절단 위치를 갖는 저모호성 서열(예를 들어, Eco57I 위치 내의 CTGAAG 서열)을 포함한다. 효소(예를 들어, 제한 효소)가 폴리뉴클레오티드를 "절단한다"고 할 때, 제한 효소가 폴리뉴클레오티드의 절단을 촉진하거나 용이하게 한다는 것을 의미하는 것으로 이해된다.

[0043] 제한 위치에 있어서의 "모호성 염기 요건"이란 완전한 정도로 특정되지 않은, 즉 특정한 염기(예컨대 비한정적인 예로서 A, C, G 및 T로부터 선택되는 특정한 염기)가 아니지만, 적어도 2개 이상의 염기 중 어느 하나일 수 있는 뉴클레오티드 염기 요건을 말한다. 염기에 있어서의 모호성을 나타내기 위해 당업계뿐만 아니라 본원에서 사용되는 일반적으로 인정되는 약어는 하기의 것들을 포함한다: R=G 또는 A; Y=C 또는 T; M=A 또는 C; K=G 또는 T; S=G 또는 C; W=A 또는 T; H=A 또는 C 또는 T; B=G 또는 T 또는 C; V=G 또는 C 또는 A; D=G 또는 A 또는 T; N=A 또는 C 또는 G 또는 T.

- [0044] "참조 서열"이란 서열 비교를 위한 기초로서 사용되는 정의된 서열이다. 참조 서열은 더 큰 서열의 하위 집합, 예를 들어 서열 목록에 제시된 전체 길이 cDNA 또는 유전자 서열의 분절일 수 있거나, 완전한 cDNA 또는 유전자 서열을 포함할 수 있다. 일반적으로, 참조 서열은 길이가 20개 이상의 뉴클레오티드, 흔히 그 길이가 25개 이상의 뉴클레오티드, 대개 그 길이가 50개 이상의 뉴클레오티드이다. 2개 폴리뉴클레오티드가 각각 (1) 2개 폴리뉴클레오티드 사이에 유사한 서열(즉, 완전한 폴리뉴클레오티드 서열의 일부)을 포함할 수 있고, (2) 2개 폴리뉴클레오티드 사이에 상이한 서열을 더 포함할 수 있기 때문에, 2개(또는 그 이상의) 폴리뉴클레오티드 간의 서열 비교는 일반적으로 서열이 유사한 국부적 영역을 확인하고 비교하기 위해 "비교 윈도우" 상에서 2개 폴리뉴클레오티드의 서열을 비교함으로써 수행된다.
- [0045] 본원에서 사용되는 "비교 윈도우"는 20개 이상의 연속 뉴클레오티드 위치의 개념적 분절을 말하며, 여기서 폴리뉴클레오티드 서열은 20개 이상의 연속 뉴클레오티드로 이루어진 참조 서열과 비교될 수 있고, 상기 비교 윈도우 내의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 2개 서열의 최적 정렬을 위해 참조 서열(추가 또는 결실을 포함하지 않음)과 비교할 때 20% 이하의 추가 또는 결실(즉, 갭)을 포함할 수 있다. 비교 윈도우를 정렬하기 위한 서열의 최적 정렬은 Smith의 국부적 상동성 알고리즘(Smith and Waterman, Adv Appl Math, 1981; Smith and Waterman, J Theor Biol, 1981; Smith and Waterman, J Mol Biol, 1981; Smith et al, J Mol Evol, 1981)에 의해, Needleman의 상동성 정렬 알고리즘(Needleman and Wuncsch, 1970)에 의해, Pearson의 유사성 검색 방법(Pearson and Lipman, 1988)에 의해, 이러한 알고리즘의 전산화 실행(미국 위스콘신주 메디슨 사이언스 드라이브 575 소재의 Genetices Computer Group의 위스콘신 유전학 소프트웨어 패키지 릴리스 7.0의 GAP, BESTFIT, FASTA 및 TFASTA)에 의해, 또는 조사에 의해 수행될 수 있으며, 다양한 방법에 의해 생성된 최상의 정렬(즉, 비교 윈도우 상에서 최고의 상동성 비율을 산출하는 정렬)이 선택된다.
- [0046] "보존적 아미노산 치환"이란 유사한 측쇄를 갖는 잔기의 상호교환성을 의미한다. 예를 들어, 지방족 측쇄를 갖는 아미노산 군은 글리신, 알라닌, 발린, 루신 및 이소루신이고; 지방족 하이드록실 측쇄를 갖는 아미노산 군은 세린 및 트레오닌이며; 아미드 함유 측쇄를 갖는 아미노산 군은 아스파라긴 및 글루타민이고; 방향족 측쇄를 갖는 아미노산 군은 페닐알라닌, 타이로신 및 트립토판이며; 염기성 측쇄를 갖는 아미노산 군은 라이신, 아르기닌 및 히스티딘이고; 황 함유 측쇄를 갖는 아미노산 군은 시스테인 및 메티오닌이다. 바람직한 보존적 아미노산 치환 군은 발린-루신-이소루신, 페닐알라닌-타이로신, 라이신-아르기닌, 알라닌-발린 및 아스파라긴-글루타민이다.
- [0047] 참조 폴리펩티드를 언급할 때 "단편", "유도체" 및 "유사체"란 용어는 참조 폴리펩티드의 것과 적어도 실질적으로 동일한 하나 이상의 생물학적 기능 또는 활성을 보유하는 폴리펩티드를 포함한다. 또한, "단편", "유도체" 또는 "유사체"란 용어는 "전구 형태" 문자, 예컨대 현저히 더 큰 활성을 갖는 성숙한 효소가 생성되도록 절단에 의해 변형될 수 있는 저활성 전구단백질(protein)으로 예시된다.
- [0048] "유전자"란 용어는 폴리펩티드체를 생성하는 데 관여하는 DNA 분절을 의미하며; 이것은 코딩 영역 앞뒤에 위치하는 영역(리더 및 트레일러)뿐만 아니라 개개의 코딩 분절(액손) 사이의 개재 서열(인트론)을 포함한다.
- [0049] "이종성"이란 용어는 하나의 단일 가닥 핵산 서열이 다른 단일 가닥 핵산 서열 또는 그 상보 서열에 하이브리드화할 수 없음을 의미한다. 따라서, 이종성 부위는 폴리뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드 부위가 그 서열 내에 다른 핵산 또는 폴리뉴클레오티드에 하이브리드화할 수 없는 부위 또는 영역을 가지고 있음을 의미한다. 이러한 부위 또는 영역은, 예를 들어 돌연변이 부위이다.
- [0050] "상동성" 또는 "부분 상동성(homeologous)"이란 용어는 하나의 단일 가닥 핵산 서열이 상보성 단일 가닥 핵산 서열에 하이브리드화할 수 있음을 의미한다. 하이브리드화 정도는 서열 간의 동일성 정도 및 하이브리드화 조건(예컨대 이하에 기재하는 것과 같은 온도 및 염 농도)을 비롯한 다수의 요인에 따라 달라질 수 있다. 바람직하게는, 동일성 영역은 약 5 bp보다 더 크고, 더 바람직하게는 동일성 영역은 10 bp보다 더 크다.
- [0051] "동일한" 또는 "동일성"이란 용어는 2개의 핵산 서열이 동일한 서열 또는 상보성 서열을 갖는다는 것을 의미한다. 따라서, "동일성 부위"는 폴리뉴클레오티드의 영역 또는 부위, 또는 전체 폴리뉴클레오티드가 다른 폴리뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드 부위와 동일하거나 그에 상보성임을 의미한다.
- [0052] "단리된"이란 용어는 물질이 그 본래의 환경(예를 들어, 이 물질이 천연의 것이라면 천연 환경)으로부터 분리된 것을 의미한다. 예를 들어, 살아있는 동물에 존재하는 천연 폴리뉴클레오티드 또는 효소는 단리된 것이 아니라, 동일한 폴리뉴클레오티드 또는 효소가 자연계에 공존하는 물질의 일부 또는 전부로부터 분리되었다면 이것은 단리된 것이다. 이러한 폴리뉴클레오티드는 벡터의 일부일 수 있고/있거나, 이러한 폴리뉴클레오티드 또는 효소는

조성물의 일부일 수 있으며, 이러한 벡터 또는 조성물이 그 자연 환경의 일부가 아니라는 점에서 이 역시 단리된 것이다.

[0053] "단리된 핵산"이란, 이것이 유래된 유기체의 자연 발생 계놈에 존재할 때에는 정상적으로는 바로 인접해 있는 5' 및 3' 측면 서열과 바로 인접해 있지 않은 핵산, 예를 들어, DNA 또는 RNA 분자를 의미한다. 따라서, 이 용어는, 예를 들어 플라스미드 또는 바이러스 벡터와 같은 벡터로 도입되는 핵산; 이종성 세포의 계놈(또는 동종성 세포의 계놈, 그러나 자연 발생 지점과는 다른 지점)으로 도입되는 핵산; 및 별개의 분자로서 존재하는 핵산, 예를 들어 PCR 증폭 또는 제한 효소 분해에 의해 생성된 DNA 단편, 또는 시험관내 전사에 의해 생성되는 RNA 분자를 말한다. 이 용어는 또한, 예를 들어 융합 단백질의 제조에 사용될 수 있는 추가적인 폴리펩티드 서열을 코딩하는 하이브리드 유전자의 일부를 형성하는 재조합 핵산을 의미하는 것이다.

[0054] "결찰"이란 핵산 가닥 사이에 포스포디에스테르 결합을 형성하는 과정을 말한다(Sambrook et al, 1982, p. 146; Sambrook, 1989). DNA 리가제는 단일 가닥 과괴(DNA의 양쪽 상보성 가닥에서의 과괴)를 갖는 2개의 DNA 가닥을 서로 연결할 수 있다. 그 외에, 이중 가닥 과괴는 주형으로서 상보성 가닥을 사용하여 상이한 유형의 DNA 리가제에 의해 수복되나, DNA를 완벽하게 수복하기 위해서는 최종 포스포디에스테르 결합을 형성하기 위해 여전히 DNA 리가제를 필요로 한다. 달리 제시되지 않는다면, 결찰은 공지된 완충액 및 결찰시키고자 하는 대략 등물량의 DNA 단편 0.5 μ g당 10 유닛의 T4 DNA 리가제("리가제")를 사용하는 조건을 이용하여 수행할 수 있다. "생성물을 결찰하지 않는다"란 프라이머를 사용하여 전체 원형 이중 가닥 주형 폴리뉴클레오티드를 증폭시키는 것에 의해 얻어지는 핵산 말단 사이에 포스포디에스테르 결합을 형성하지 않는다는 것을 의미한다.

[0055] "돌연변이"란 용어는 야생형 또는 모 핵산 서열에 있어서의 변경 또는 펩티드 서열에 있어서의 변경으로서 정의된다. 이러한 돌연변이는 전위(transition) 또는 전환(transversion)과 같은 점 돌연변이일 수 있다. 돌연변이는 하나 이상의 뉴클레오티드 또는 코딩된 아미노산 서열에 대한 변경일 수 있다. 상기 돌연변이는 결실, 삽입 또는 중복일 수 있다.

[0056] 본원에서 사용될 때, 축퇴 "N,N,N" 뉴클레오티드 서열이란 3염기(triplet)를 말하며, 여기서 "N"은 A, C, G 또는 T일 수 있다.

[0057] 본원에서 물질과 관련하여 사용될 때 "천연"이란 용어는 물질을 자연에서 발견할 수 있다는 사실을 말한다. 예를 들어, 자연의 공급원으로부터 단리할 수 있으며 실험실에서 인간에 의해 의도적으로 변형되지 않은 유기체(바이러스 포함) 내에 존재하는 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 서열은 천연의 것이다. 일반적으로, "천연"이란 용어는, 해당 종에 대해 일반적인 것과 같이, 물질이 비병리적(비질병) 개체 내에 존재하는 것을 의미한다.

[0058] 본원에서 사용될 때, "핵산 분자"란 이것이 각각 단일 가닥이든 이중 가닥이든 간에 하나 이상의 염기 또는 하나의 염기쌍으로 이루어진다. 또한, 핵산 분자는 이하의 핵산 분자, 즉, RNA, DNA, 계놈 핵산, 비계놈 핵산, 천연 및 비천연 핵산 및 합성 핵산의 군으로 예시되나 이들에 한정되지 않는 뉴클레오티드 함유 분자의 임의의 군에 독점적으로 또는 조합적으로 속할 수 있다. 이는, 비한정적인 예로서, 임의의 세포 소기관, 예컨대 미토콘드리아, 리보솜 RNA와 관련된 핵산, 및 천연 성분과 함께 자연적으로 발생하지 않는 하나 이상의 성분의 조합으로 이루어진 핵산 분자를 포함한다. 또한, "핵산 분자"는 아미노산 및 당으로 예시되나 이들에 한정되지 않는 하나 이상의 비뉴클레오티드계 성분을 부분적으로 포함할 수 있다. 따라서, 예를 들어, 일부는 뉴클레오티드계이고 일부는 단백질계인 리보자임은 "핵산 분자"로 간주되나, 이들에 한정되지 않는다. 그 밖에도 비한정적인 예로서 방사성 표지 또는 대안으로 비방사성 표지와 같은 검출 가능한 부분으로 표지된 핵산 분자 역시 "핵산 분자"로 간주된다.

[0059] 특정 단백질 또는 폴리펩티드를 "코딩하는 핵산 서열" 또는 "코딩하는 뉴클레오티드 서열" 또는 특정 단백질 또는 폴리펩티드의 "서열을 코딩하는 DNA"란 표현은 적절한 조절 서열 제어하에 배치될 때 단백질 또는 폴리펩티드로 전사되고 번역되는 DNA 서열을 말한다. "프로모터 서열"은 세포 내에서 RNA 폴리머라제에 결합하여 하류(3' 방향) 코딩 서열의 전사를 개시할 수 있는 DNA 조절 영역이다. 프로모터는 DNA 서열의 일부이다. 이 서열은 그 3' 말단에 출발 코돈을 갖고 있다. 프로모터 서열은 전사를 개시하는 데 필요한 요소가 배경보다 높은 검출 가능한 수준일 경우 최소한의 수의 염기를 포함한다. 그러나, RNA 폴리머라제가 서열에 결합하고 출발 코돈(프로모터를 갖는 3' 말단)에서 전사가 개시되고 나면, 전사는 3' 방향의 하류로 진행된다. 프로모터 서열 내에는 전사 개시 부위(편리하게는 뉴클레아제 S1을 사용한 맵핑에 의해 규정됨)뿐만 아니라, RNA 폴리머라제의 결합에 관여하는 단백질 결합 도메인(일치 서열)이 존재한다.

- [0060] "단백질 또는 펩티드를 코딩하는 핵산" 또는 "단백질 또는 펩티드를 코딩하는 DNA" 또는 "단백질 또는 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드"란 표현 및 다른 동의어는 단백질 또는 펩티드에 대한 코딩 서열만을 포함하는 폴리뉴클레오티드뿐만 아니라 추가적인 코딩 및/또는 비코딩 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드도 포함한다.
- [0061] 따라서, 비한정적인 실시형태에서, "핵산 라이브러리"는 하나 이상의 핵산 분자의 벡터계 집합체로 이루어진다. 또 다른 바람직한 실시형태에서, "핵산 라이브러리"는 핵산 분자의 비벡터계 집합체로 이루어진다. 또 다른 바람직한 실시형태에서, "핵산 라이브러리"는 일부는 벡터계이고 일부는 비벡터계인 핵산 분자의 조합 집합체로 이루어진다. 바람직하게는, 라이브러리를 포함하는 분자의 집합체는 개개의 핵산 분자 종에 따라 검색될 수 있고 분리될 수 있다.
- [0062] "올리고뉴클레오티드"(또는 동의어로 "올리고")는 화학적으로 합성될 수 있는 단일 가닥 폴리데옥시뉴클레오티드 또는 2개의 상보성 폴리데옥시뉴클레오티드 가닥을 말한다. 이러한 합성 올리고뉴클레오티드는 5' 포스페이트를 가질 수도 있고 갖지 않을 수도 있다. 5' 포스페이트를 갖지 않는 것은 키나제 존재하에 ATP와 함께 포스페이트를 첨가하지 않을 경우 다른 올리고뉴클레오티드에 결찰하지 않는다. 합성 올리고뉴클레오티드는 탈인산화되지 않은 단편에 결찰한다.
- [0063] 본원에서 사용될 때 "모 폴리뉴클레오티드 세트"란 용어는 하나 이상의 상이한 폴리뉴클레오티드 종으로 이루어진 세트이다. 일반적으로 이 용어는 바람직하게는 모 세트의 돌연변이 유발에 의해 얻어지는 자손 폴리뉴클레오티드 세트를 지칭할 때 사용되며, 이 경우, "모", "출발" 및 "주형"이란 용어는 상호 교환적으로 사용된다.
- [0064] 본원에서 사용될 때 "생리적 조건"이란 표현은 생존 가능한 유기체와 양립성이고/하거나 생존 가능한 배양 효모 세포 또는 포유동물 세포의 세포내에 일반적으로 존재하는 온도, pH, 이온 강도, 점도 등의 생화학적 파라미터를 의미한다. 예를 들어, 전형적인 실험실 배양 조건하에 배양된 효모 세포에서의 세포내 조건은 생리적 조건이다. 시험관내 전사 칵테일에 대한 적절한 시험관내 반응 조건은 일반적으로 생리적 조건이다. 일반적으로, 시험관내 생리적 조건은 50~200 mM NaCl 또는 KCl, pH 6.5~8.5, 20~45°C 및 0.001~10 mM 2가 양이온(예를 들어, Mg⁺⁺, Ca⁺⁺); 바람직하게는 약 150 mM NaCl 또는 KCl, pH 7.2~7.6, 5 mM 2가 양이온을 포함하며, 대개 0.01~1.0% 비특이적 단백질(예를 들어, BSA)을 포함한다. 비이온성 계면활성제(Tween, NP-40, Triton X-100)이 종종 통상적으로 약 0.001~2%, 전형적으로 0.05~0.2%(v/v)로 포함될 수 있다. 특정 수성 조건은 통상적인 방법에 따라 당업자가 선택할 수 있다. 일반적인 지침에 있어서는, 하기 완충 수성 조건이 적용될 수 있다: 10~250 mM NaCl, 5~50 mM Tris-HCl, pH 5~8, 2가 양이온(들) 및/또는 금속 칼레이터 및/또는 비이온성 계면활성제 및/또는 막 분획 및/또는 소포제 및/또는 신틸레이션제를 경우에 따라 첨가함.
- [0065] 본원에서는 이중 가닥 폴리뉴클레오티드의 서열을 언급하는 데 표준 관행(5'→3')을 이용한다.
- [0066] "관련된 폴리뉴클레오티드"란 용어는 폴리뉴클레오티드의 영역 또는 부위가 동일하고 폴리뉴클레오티드의 영역 또는 부위가 이종성임을 의미한다.
- [0067] 본원에서 "특이적 하이브리드화"는 제1 폴리뉴클레오티드와 제2 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 제1 폴리뉴클레오티드와 상이하나 그 서열이 실질적으로 동일한 폴리뉴클레오티드) 사이의 하이브리드의 형성으로서 정의되며, 이때 실질적으로 관련이 없는 폴리뉴클레오티드 서열은 혼합물 중에서 하이브리드를 형성하지 않는다.
- [0068] "엄격한 하이브리드화 조건"은 서열 간에 90% 이상의 동일성, 바람직하게는 95% 이상의 동일성, 가장 바람직하게는 97% 이상의 동일성이 존재할 경우에만 하이브리드화가 발생하는 것을 의미한다. 본원에서 그 전체가 참고로 포함되는 문헌[Sambrook et al, 1989]을 참조할 수 있다.
- [0069] "야생형"이란 용어는 폴리뉴클레오티드가 어떠한 돌연변이도 포함하지 않음을 의미한다. "야생형" 단백질은 단백질이 자연에서 발견되는 활성 수준으로 활성을 나타내고 자연에서 발견되는 아미노산 서열을 포함하는 것을 의미한다.
- [0070] 본래의 폴리뉴클레오티드의 공급원은 개개의 유기체("분리주")로부터 단리되거나, 규정 배지에서 증식시킨 유기체의 집합체("농축 배양물")로부터 단리되거나, 가장 바람직하게는, 비배양 유기체("환경 시료")로부터 단리될 수 있다. 환경 시료로부터 신규한 생물 활성을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 얻기 위한 배양 독립적 방법의 사용이 생물 다양성의 미개발 자원에 접근할 수 있도록 한다는 점에서 가장 바람직하다.
- [0071] 폴리뉴클레오티드를 제조하는 데 사용될 수 있는 미생물로는 원핵 미생물, 예컨대 진정세균 및 고세균과, 하등 진핵 미생물, 예컨대 진균, 일부 조류 및 원생생물을 들 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 환경 시료로부터 단리될 수 있으며, 이 경우 유기체를 배양하지 않고 핵산을 회수하거나 하나 이상의 배양 유기체로부터 핵산을 회수할

수 있다. 일 양태에서, 이러한 미생물은 극한 미생물, 예컨대 호열성 세균, 호냉성 세균, 내냉성 세균, 호염성 세균, 호압성 세균 및 호산성 세균일 수 있다.

[0072] 전술한 바와 같이 선택되고 단리된 폴리뉴클레오티드는 적절한 숙주 세포로 도입된다. 선택된 폴리뉴클레오티드는 적절한 조절 서열을 포함하는 벡터 내에 이미 포함되어 있는 것이 바람직하다. 상기 숙주 세포는 고등 진핵 세포, 예컨대 포유동물, 또는 하등 진핵 세포, 예컨대 효모 세포일 수 있거나, 또는 바람직하게는, 상기 숙주 세포는 원핵 세포, 예컨대 박테리아 세포일 수 있다. 숙주 세포로의 구성체의 도입은 인산칼슘 형질감염, DEAE-덱스트란 매개 형질감염 또는 전기천공에 의해 행할 수 있다(Davis et al, 1986).

[0073] 적절한 숙주의 대표적인 예로서 박테리아 세포, 예컨대 이. 콜라이 및 슈도모나스 플루오레센스(*Pseudomonas fluorescens*); 박테리오파지; 진균 세포, 예컨대 효모, 퍼키아 파스토리스(*Pichia pastoris*) 및 아스페질러스 나이거(*Aspergillus niger*); 곤충 세포, 예컨대 드로소필라(*Drosophila*) S2 및 스포톱테라(*Spodoptera*) Sf9; 동물 세포, 예컨대 CHO, COS 또는 보우스(Bowes) 흑색종 세포; 아데노바이러스; 및 식물 세포를 들 수 있다. TMCA 라이브러리는, 예를 들어, 이. 콜라이 세포에서 플라스미드 형태로 제조될 수 있고, 그 후 상기 라이브러리는 추가로 다른 숙주에 도입될 수 있다. 적절한 숙주의 선택은 본원의 교시 내용에 비추어 당업계의 기술 범위 내에 있는 것으로 생각된다.

[0074] 제조합 단백질을 발현시키는 데 이용될 수 있는 다양한 포유동물 세포 배양 시스템을 구체적으로 언급할 때, 포유동물 발현 시스템의 예로는 문헌["SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants" (Gluzman, 1981)]에 기재된 원숭이 신장 섬유아세포의 COS-7 세포주 및 상용성 벡터를 발현시킬 수 있는 다른 세포주, 예를 들어, C127, 3T3, CHO, HeLa 및 BHK 세포주를 들 수 있다. 포유동물 발현 벡터는 복제 기점, 적절한 프로모터 및 인핸서를 포함하며, 또한, 임의의 필요한 리보솜 결합 부위, 폴리아데닐화 부위, 스플라이스 도너 및 어셉터 부위, 전사 종결 서열 및 5' 측면 비전사 서열을 포함한다. SV40 스플라이스로부터 유도된 DNA 서열 및 폴리아데닐화 부위가 필요한 비전사 유전자 요소를 제공하는 데 사용될 수 있다.

[0075] 관심있는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포는, 프로모터를 활성화하거나 형질전환체를 선별하거나 유전자를 증폭시키기에 적합하도록 변형시킨 통상적인 영양 배지에서 배양할 수 있다. 온도, pH 등과 같은 배양 조건은 발현을 위해 선택된 숙주 세포와 함께 종래에 사용되었던 것이며 당업자에게 명백할 것이다.

[0076] 사용될 수 있는 발현 벡터의 대표적인 예로는 바이러스 입자, 배클로바이러스, 파지, 플라스미드, 파지미드, 코스미드, 포스미드, 박테리아 인공 염색체, 바이러스 DNA(예를 들어, 백시니아, 아데노바이러스, 계두 바이러스, 위광견병 바이러스 및 SV40의 유도체), P1에 기초한 인공 염색체, 효모 플라스미드, 효모 인공 염색체 및 관심 있는 특정 숙주에 특이적인 임의의 다른 벡터(예컨대 바실러스, 아스페질러스 및 효모)를 들 수 있다. 따라서, 예를 들어, DNA는 폴리펩티드를 발현시킬 수 있는 각종 발현 벡터 중 어느 하나에 포함될 수 있다. 이러한 벡터는 염색체, 비염색체 및 합성 DNA 서열을 포함한다. 다수의 적절한 벡터가 당업자에게 공지되어 있고 상업적으로 입수가 가능하다. 하기 벡터를 예로서 제시한다; 박테리아: pQE 벡터(Qiagen), pBluescript 플라스미드, pNH 벡터, 람다-ZAP 벡터(Stratagene); ptrc99a, pKK223-3, pDR540, pRIT2T(Pharmacia); 진핵 생물: pXT1, pSG5(Stratagene), pSVK3, pBPV, pMSG, pSVLSV40(Pharmacia). 그러나, 임의의 다른 플라스미드 또는 다른 벡터도 이들이 숙주에서 복제 가능하고 생존 가능하다면 사용될 수 있다. 저카페수 또는 고카페수 벡터가 본 발명에 사용될 수 있다.

[0077] 본 발명에 사용하기에 바람직한 유형의 벡터는 f-인자 복제 기점을 포함한다. 이. 콜라이에서의 상기 f-인자(또는 생식 인자)는 접합 중에 자신을 높은 빈도로 이전시키고 박테리아 염색체 자체는 적은 빈도로 이전시키는 플라스미드이다. 특히 바람직한 실시형태는 "포스미드" 또는 박테리아 인공 염색체(BAC) 벡터로서 칭해지는 클로닝 벡터를 사용하는 것이다. 이들은 게놈 DNA의 대형 분절을 안정하게 통합시킬 수 있는 이. 콜라이 f-인자로부터 유도된다. 혼합 비배양 환경 시료 유래의 DNA와 함께 통합될 경우, 이것은 안정한 "환경 DNA 라이브러리"의 형태로 대형 게놈 단편을 얻는 것을 가능하게 한다.

[0078] 본 발명에 사용하기 위한 또 다른 바람직한 유형의 벡터는 코스미드 벡터이다. 코스미드 벡터는 본래 게놈 DNA의 대형 분절을 클로닝하여 증폭시키고자 설계되었다. 코스미드 벡터로의 클로닝에 대해서는 문헌["Molecular Cloning: A laboratory Manual" (Sambrook et al, 1989)]에 상세히 기재되어 있다.

[0079] 발현 벡터 내의 DNA 서열은 RNA 합성을 지시하기 위한 적절한 조절 서열(들)(프로모터)에 작동 가능하게 연결된다. 특정 명칭의 박테리아 프로모터로는 lacI, lacZ, T3, T7, gpt, 람다 P_R, P_L 및 trp를 포함한다. 진핵 생물 프로모터로는 CMV 즉시 초기 프로모터, HSV 티미딘 키나제 프로모터, 초기 및 후기 SV40 프로모터, 레트로

바이러스 유래의 LTR 및 마우스 메탈로티오네인-I 프로모터를 들 수 있다. 적절한 벡터 및 프로모터의 선택은 당업계의 일반적 기술 수준 내에 속한다. 상기 발현 벡터는 또한 번역 개시를 위한 리보솜 결합 부위 및 전사 종결 서열을 포함한다. 상기 벡터는 또한 발현을 증폭시키기 위한 적절한 서열을 포함할 수 있다. 프로모터 영역은 선별 마커를 갖는 CAT(클로람페니콜 트랜스페라제) 벡터 또는 다른 벡터를 사용하여 임의의 원하는 유전자로부터 선택할 수 있다.

[0080] 또한, 상기 발현 벡터는 바람직하게는 형질전환된 숙주 세포의 선별을 위한 표현형 특징, 예컨대 진핵 세포 배양의 경우 디하이드로풀레이트 리덕타제 또는 네오마이신 내성, 또는 이. 콜라이에서는, 예컨대 테트라사이클린 또는 암피실린 내성을 제공하기 위한 하나 이상의 선별 마커 유전자를 포함한다.

[0081] 일반적으로, 재조합 발현 벡터는 복제 기점 및 숙주 세포의 형질전환을 가능하게 하는 선별 마커, 예를 들어, 이. 콜라이의 암피실린 내성 유전자 및 에스. 세레비시아 TRP 1 유전자, 및 하류 구조 서열의 전사를 지시하는 고발현 유전자의 프로모터를 포함한다. 이러한 프로모터는 특히 3-포스포글리세레이트 키나제(PGK), α-인자, 산 포스파타제 또는 열 충격 단백질과 같은 당분해 효소를 코딩하는 오페론으로부터 유래된 것일 수 있다. 이종성 구조 서열은 번역 개시 및 종결 서열과 함께 적절한 단계에서 어셈블링되며, 바람직하게는 리더 서열은 번역된 단백질의 주변세포질 공간 또는 세포의 배지로의 분비를 지시할 수 있다.

[0082] 클로닝법은 벡터 유래 프로모터와 내인성 프로모터 둘 다를 통한 발현을 가능하게 하며; 벡터 프로모터 촉진은 내인성 프로모터가 이. 콜라이에서 기능하지 않는 유전자의 발현에 있어서 중요할 수 있다.

[0083] 미생물로부터 단리되거나 미생물로부터 유래된 DNA는 바람직하게는 선택된 DNA에 대해 프로빙하기 전에 벡터 또는 플라스미드로 삽입할 수 있다. 이러한 벡터 또는 플라스미드는 바람직하게는 프로모터, 인핸서 등을 비롯한 발현 조절 서열을 포함하는 것이다. 이러한 폴리뉴클레오티드는 벡터 및/또는 조성물의 일부일 수 있으며, 이러한 벡터 또는 조성물이 자연 환경의 일부가 아니라는 점에서, 역시 단리된 것일 수 있다. 특히 바람직한 과자 또는 플라스미드 및 이들로의 도입 방법 및 패키징 방법은 본원에 기재된 프로토콜에 상세히 기재되어 있다.

[0084] 정제된 형태의 임의의 핵산 공급원이 출발 핵산("주형 폴리뉴클레오티드"로도 정의됨)으로서 이용될 수 있다. 따라서, 이 과정은 메신저 RNA를 비롯한 RNA 또는 DNA를 이용할 수 있으며, 상기 DNA 또는 RNA는 단일 가닥일 수 있고, 바람직하게는 이중 가닥일 수 있다. 또한, 각각 한 가닥씩 포함하는 DNA-RNA 하이브리드가 이용될 수 있다. 상기 핵산 서열은 돌연변이시키고자 하는 핵산 서열의 크기에 따라 다양한 길이가 될 수 있다. 바람직하게는, 특정한 핵산 서열은 50~50,000 염기쌍, 더 바람직하게는 50~11,000 염기쌍일 수 있다.

[0085] 핵산은 임의의 공급원으로부터, 예를 들어, pBR322와 같은 플라스미드로부터, 클로닝된 DNA 또는 RNA로부터, 또는 박테리아, 효모, 바이러스 및 고등 유기체(예컨대 식물 또는 동물)를 비롯한 임의의 공급원 유래의 천연 DNA 또는 RNA로부터 얻을 수 있다. DNA 또는 RNA는 혈액 또는 조직물로부터 추출할 수 있다. 주형 폴리뉴클레오티드는 폴리뉴클레오티드 연쇄 반응(PCR, 미국 특허 제4,683,202호 및 미국 특허 제4,683,195호 참조)을 이용하여 증폭에 의해 얻을 수 있다. 대안으로, 폴리뉴클레오티드는 세포 내에 존재하는 벡터 내에 존재할 수 있고, 세포를 배양하여 당업계에 공지된 방법에 의해 세포로부터 핵산을 추출하여 충분한 핵산을 얻을 수 있다.

[0086] 돌연변이를 갖는 특정한 핵산 서열의 초기 소집단은 다종 다양한 방법에 의해 생성할 수 있다. 돌연변이는 오류 빈발 PCR에 의해 생성할 수 있다. 오류 빈발 PCR은 긴 서열에 대해 낮은 수준의 점 돌연변이를 무작위적으로 도입하기 위해 저충실도 중합 조건을 이용한다. 대안으로, 돌연변이는 올리고뉴클레오티드 지정 돌연변이 유발에 의해 주형 폴리뉴클레오티드로 도입될 수 있다. 올리고뉴클레오티드 지정 돌연변이 유발의 경우, 짧은 폴리뉴클레오티드 서열을 제한 효소 분해를 이용하여 폴리뉴클레오티드로부터 제거하고, 본래의 서열로부터 다양한 염기가 변경된 합성 폴리뉴클레오티드로 대체한다. 상기 폴리뉴클레오티드 서열은 화학적 돌연변이 유발을 이용하여 생성할 수 있다. 화학적 돌연변이 유발원으로는, 예를 들어, 중아황산나트륨, 아질산, 하이드록실아민, 하이드라진 또는 포름산을 들 수 있다. 뉴클레오티드 전구체의 유사체인 다른 제제로는 니트로소구아닌, 5-브로모우라실, 2-아미노퓨린 또는 아크리딘을 들 수 있다. 일반적으로, 이를 제제는 뉴클레오티드 전구체 대신에 PCR 반응에 첨가되어 서열의 돌연변이를 유발한다. 프로플라빈, 아크리플라빈, 퀴나크린 등과 같은 삽입성 물질(intercalating agent)도 사용될 수 있다. 폴리뉴클레오티드 서열의 무작위 돌연변이 유발은 X선 또는 자외광의 조사에 의해서 실시할 수도 있다. 일반적으로, 이렇게 돌연변이된 플라스미드 폴리뉴클레오티드를 이. 콜라이에 도입하고 하이브리드 플라스미드의 풀(pool) 또는 라이브러리(library)로서 증폭시킨다.

[0087] 대안으로, 특정한 핵산의 작은 혼합 집단은, 이들의 동일한 유전자 또는 상이한 관련된 종의 동일한 유전자(즉, 동족체 유전자)의 상이한 대립유전자로 이루어질 수 있다는 점에서 자연에 존재하는 것일 수 있다. 또는, 이들

은 한 종에 존재하는 관련된 DNA 서열, 예를 들어 면역글로불린 유전자일 수 있다.

[0088] 특정한 핵산 서열의 혼합 집단이 생성되면, 폴리뉴클레오티드를 바로 사용하거나 당업계에 공지된 기법을 이용하여 적절한 클로닝 벡터에 삽입할 수 있다.

[0089] 벡터의 선택은 폴리뉴클레오티드 서열의 크기 및 본 발명의 방법에 사용될 수 있는 숙주 세포에 따라 달라진다. 본 발명의 주형은 플라스미드, 파지, 코스미드, 파지미드, 바이러스(예를 들어, 레트로바이러스, 파라인플루엔자바이러스, 허파스바이러스, 레오바이러스, 파라믹소바이러스 등), 또는 이들의 특정한 일부분(예를 들어, 코트 단백질, 스파이크 단백질, 캡시드 단백질)일 수 있다. 예를 들어, 코스미드 및 파지미드가 바람직하며, 이 경우, 이들 벡터는 큰 폴리뉴클레오티드를 안정하게 증폭시킬 수 있기 때문에, 돌연변이시킬 수 있는 특정 핵산 서열이 더 크다.

[0090] 간략함을 위해, 이하에서는 본 발명의 TMCA 방법을 6개의 상이한 위치의 6개의 점 돌연변이를 어셈블링하기 위한 목적으로 설명한다.

[0091] 첫째, 6종의 프라이머를 디자인하여 합성한다. 각각의 프라이머는 야생형 서열에 비해 점 돌연변이를 포함한다. 3종의 올리고를 정방향 프라이머로서 디자인하고 3종의 올리고를 역방향 프라이머로서 디자인하여 유전자에 어널링한다(도 5). 6종의 모든 올리고를 함께 혼합하여, 실시예에 상세히 기재되어 있는 조건하에 TMCA 반응을 개시하는 데 이용한다. 그 후, 완료된 TMCA 반응을 아가로스 젤로 확인하여 반응이 성공적인지를 확인한다. DpnI 제한 효소를 TMCA 반응에 첨가하여 주형 원형 DNA를 파괴한다. DpnI이 작동하도록 하기 위해, 상기 주형 DNA는 DNA를 메틸화할 수 있는 이. 콜라이로부터 유래되어야 한다. DpnI 처리 반응물로 이. 콜라이 세포를 형질전환시켜, 원하는 돌연변이를 갖는 DNA를 회수한다. 이 형질전환체는 서열결정 또는 소정의 분석을 통해 스크리닝한다.

[0092] 본 발명의 방법은 6개 위치에 한정되지 않는다. 더 많은 수 또는 더 적은 수의 위치가 이 방법에 의해 어셈블링 될 수 있다. 또한, 한 위치의 단일 변경에만 한정되지 않는다. 각 프라이머 상에 단일 변경을 갖도록 하여, 동일 위치에서의 상이한 변경을 커버하도록 복수의 프라이머를 디자인할 수 있다. 입증을 위해 이. 콜라이가 사용되어 왔으나, 다른 박테리아 숙주도 이 방법에 유효할 것이다. 본 발명의 방법은 점 돌연변이를 도입할 수 있을 뿐만 아니라, 축퇴 프라이머를 사용하여 다중 돌연변이 또는 삽입 또는 결실을 도입할 수 있다.

[0093] 다양한 위치의 변경을 어셈블링하는 방식을 제어하기 위해, 상기 TMCA 반응을 프라이머 농도, 프라이머 Tm(주형 예의 어널링 온도), DNA 폴리머라제, 주형 농도, 프라이머 조합 및 다양한 숙주를 사용하여 변경할 수 있다.

[0094] 상기 어셈블리는 시험관내 또는 생체내 또는 이들의 조합에서 수행될 수 있다. 도 5는 유전자에 어널링하는 프라이머의 맵을 예시한다. 본 발명 방법의 주요 용도는 GSSMSM 상류 돌연변이체의 조합 채어셈블리에 사용되는 용도이다. 그러나, 본 발명의 방법은, 예를 들어, 이하에 기재하는 임의의 다른 용도에도 사용될 수 있다.

[0095] 1. TMCA는 돌연변이, 결실 및 삽입을 비롯한 유전자에 대한 특정한 변경을 생성하는 데 사용될 수 있다.

[0096] 2. TMCA는 야생형 유전자에 기초한 특정한 유전자 변이체를 제조하는 데 사용될 수 있다.

[0097] 3. TMCA는 돌연변이, 결실 또는 삽입을 조합하는 데 사용될 수 있다.

[0098] 4. TMCA는 돌연변이, 결실 또는 삽입의 조합 라이브러리를 제어 가능한 방식으로 제조하는 데 사용될 수 있다.

[0099] 5. TMCA는 조합 멀티사이트 GSSMSM 라이브러리를 제조하는 데 사용될 수 있다.

[0100] 일반적으로, 본 발명은 복수의 위치에 각종 돌연변이의 다양한 조합을 갖는 복수의 자손 폴리뉴클레오티드를 제조하는 방법을 제공한다. 이 방법은 부분적으로 하기 단계 중 적어도 하나 이상의 조합에 의해 수행될 수 있다:

[0101] 폴리뉴클레오티드("제1 서열" 또는 "주형")의 서열 정보를 얻는 단계. 예를 들어, 상기 서열은 야생형, 돌연변이된 야생형, 또는 비천연 서열일 수 있다. 서열 정보는 완전한 폴리뉴클레오티드 또는 관심있는 일부 영역, 예컨대 결합, 결합 특이성, 촉매 작용 또는 기질 특이성을 위한 부위를 코딩하는 서열의 서열 정보일 수 있다. 상기 폴리뉴클레오티드는, 신호 또는 분비 서열을 갖거나 갖지 않는, 오픈 리딩 프레임과 같은 서열, 유전자, 폴리펩티드 코딩 서열, 또는 효소 코딩 서열을 포함할 수 있다.

[0102] 관심있는 3개 이상의 돌연변이를 확인하는 단계. 3개, 4개, 5개, 6개, 8개, 10개, 12개, 20개 또는 그 이상의 위치에서의 돌연변이와 같은 폴리뉴클레오티드 서열을 따라 위치하는 관심있는 3개 이상의 돌연변이를 확인한다. 이 돌연변이는 폴리뉴클레오티드 서열 수준에서의 돌연변이, 또는 폴리뉴클레오티드 서열, 예를 들어

코돈에 의해 코딩되는 아미노산 서열에 대한 돌연변이일 수 있다. 상기 위치는 절대 위치에 의해, 또는 주변 잔기의 환경 또는 상동성에 의해 미리 결정할 수 있다. 돌연변이 위치의 어느 한쪽에서 측면에 위치하는 서열은 알고 있는 것이 바람직하다. 각각의 돌연변이 위치는, 예컨대 상이한 아미노산에 대해 2개 이상의 돌연변이를 포함할 수 있다. 이러한 돌연변이는 상기에 기재되어 있고 미국 특허 제6,171,820호, 제6,562,594호 또는 제6,764,835호에 기재된 것과 같은 유전자 위치 포화 돌연변이 유발(GSSM)을 이용하여 확인할 수 있다.

[0103] 주형 서열에 비해 관심있는 돌연변이를 포함하는 프라이머를 제공하는 단계. 상기 프라이머는 합성 올리고뉴클레오티드일 수 있다. 바람직하게는, 관심있는 각각의 돌연변이에 대해 프라이머를 제공한다. 상기 돌연변이는 하나 이상의 뉴클레오티드 또는 코딩된 아미노산 서열에 있어서의 변경, 삽입 또는 결실일 수 있다. 따라서, 관심있는 3개의 돌연변이를 갖는 위치는 그 위치에 3종의 프라이머를 사용할 수 있다. 상기 프라이머는 또한, 관심있는 돌연변이가 임의의 뉴클레오티드 또는 천연 아미노산의 범위, 또는 그 범위의 하위 집합에 속하도록 축퇴 위치를 포함하는 프라이머의 풀로서 제공될 수 있다. 예를 들어, 지방족 아미노산 잔기의 돌연변이를 촉진하는 프라이머의 풀이 제공될 수 있다.

[0104] 상기 프라이머는 정방향 프라이머 또는 역방향 프라이머로서, 바람직하게는 1종 이상의 정방향 프라이머와 1종 이상의 역방향 프라이머로서, 더 바람직하게는 비교적 균형잡힌 수의 각각의 프라이머(예를 들어, 3종의 정방향 프라이머와 4종의 역방향 프라이머)로서 제조될 수 있다. 3종의 정방향 프라이머는 상대적으로 인접하도록, 유사하게 역방향 프라이머도 인접하게(예를 들어, 1F, 2F, 3F, 4R, 5R, 6R, 7R) 선택될 수 있다. 돌연변이가 서로 가까이 위치할 경우, 1개보다 많은 위치에 돌연변이를 포함하거나 복수의 위치에 상이한 조합의 돌연변이를 포함하는 프라이머를 사용하는 것이 편리할 수 있다.

[0105] 주형 폴리뉴클레오티드를 포함하는 폴리뉴클레오티드를 제공하는 단계. 상기 폴리뉴클레오티드는 바람직하게는 원형, 더 바람직하게는 수퍼 코일형의, 예컨대 클로닝, 서열결정 또는 발현을 위한 플라스미드 또는 벡터이다. 상기 폴리뉴클레오티드는 단일 가닥("ssDNA"), 바람직하게는 이중 가닥("dsDNA")일 수 있다. 예를 들어, 상기 TCMA 방법은 수퍼 코일형("sc") dsDNA 주형에 대해 95°C에서 1분 동안의 가열 단계를 실시하며, 상기 주형은 ssDNA가 되지 않는다(문헌[Levy, NAR, 28(12):e57(i-vii) (2000)] 참조, 이 문헌은 sc dsDNA를 95°C로 5분 동안 가열하는 것이 ssDNA 분자를 생성하지 않으며, 분자가 가열 후 냉각될 경우 가역적임을 개시함(ii-iii면, 도2)).

[0106] 프라이머가 주형 폴리뉴클레오티드에 어닐링할 수 있도록 하는 조건하에 반응 혼합물 중 주형 폴리뉴클레오티드에 프라이머를 첨가하는 단계. 바람직하게는, 상기 프라이머를 단일 반응 혼합물 중의 폴리뉴클레오티드에 첨가하나, 실험 계획에 따라 복수의 반응에 첨가될 수도 있다.

[0107] 바람직하게는, 연장이 원형 주형 분자 둘레로 완전히 진행될 수 있도록 프라이머의 폴리머라제 연장을 수행하는 단계. 연장 생성물(본원에서 "자손" 또는 "변형 연장된 폴리뉴클레오티드"로 정의됨)은 통상의 방법으로 증폭시킬 수 있다.

[0108] 상기 생성물은 길이, 서열, 원하는 핵산 특성에 대해 분석되거나, 또는 폴리뉴클레오티드 및/또는 폴리펩티드로서 발현될 수 있다. 다른 분석 방법으로는 인시추 하이브리드화, 서열 스크리닝 또는 발현 스크리닝을 들 수 있다. 분석은 원하는 특성에 대한 1회차 이상의 스크리닝 및 선별을 포함할 수 있다.

[0109] 또한, 상기 생성물로 세포 또는 다른 발현 시스템, 예컨대 세포 비함유 시스템을 형질전환시킬 수 있다. 상기 세포 비함유 시스템은 DNA 복제, 수복, 재조합, 전사 또는 번역과 관련된 효소를 포함할 수 있다. 대표적인 숙주로는 박테리아, 효모, 식물 및 동물 세포와 세포주를 포함하며, 이. 콜라이, 슈도모나스 플루오레센스, 피키아 파스토리스 및 아스퍼자일리스 나이거를 포함한다. 예를 들어, 이. 콜라이의 XL1-블루 또는 Stbl2 균주가 숙주로서 사용될 수 있다. 이. 콜라이를 DpnI(반응 후 원치않는 주형을 제거하기 위해 사용될 수 있음)과 함께 사용할 경우, 상기 주형 DNA는 이 DNA를 메틸화할 수 있는 이. 콜라이 숙주로부터 유래된 것일 수 있다. 상기 세포는 자손 폴리뉴클레오티드의 발현에 사용될 수 있다.

[0110] 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 발현 생성물을 세포로부터 회수하는 단계. 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 발현 생성물을 세포로부터 회수하여, 길이, 서열, 원하는 핵산 특성에 대해 분석하거나, 폴리펩티드로서 발현시킬 수 있다. 상기 분석은 원하는 특성에 대한 1회차 이상의 스크리닝 및 선별을 포함할 수 있다.

[0111] 본 발명의 방법은, 상이한 조합 또는 수의 돌연변이를 갖는 생성물을 촉진하는 다양한 반응 조건하에, 예컨대 하기 실시예에 예시된 조건 1A, 7A 및 13A 등의 조건하에, 동일하거나 상이한 프라이머와 함께 이용될 수 있다.

[0112] 전술한 방법을 수행함으로써, 본 발명은 또한 이 방법에 의해 제조된 1종 이상의 폴리뉴클레오티드를 제공하며,

이 폴리뉴클레오티드는 원하는 특성에 대해 스크리닝 또는 선별될 수 있다. 자손 폴리뉴클레오티드 중 하나 이상을 폴리펩티드로서 발현시키고, 경우에 따라 원하는 특성에 대해 스크리닝 또는 선별을 수행할 수 있다. 따라서, 본 발명은 본 발명의 방법에 의해 제조된 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드뿐만 아니라, 이러한 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드의 라이브러리를 제공한다. 본 발명은, 1종 이상의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드를 얻기 위해, 스크리닝에 의해 상기 라이브러리를 스크리닝하거나 상기 라이브러리를 선별하는 것을 더 제공한다.

[0113] 본 발명의 일 양태에서, 복수의 변형 폴리뉴클레오티드를 제조하기 위한 바람직한 방법은

[0114] (a) 단일 반응 혼합물의 이중 가닥 주형 폴리뉴클레오티드에 3종 이상의 프라이머를 첨가하는 단계로서, 상기 3종 이상의 프라이머는 중복되지 않고 상기 3종 이상의 프라이머 각각은 다른 프라이머와 상이한 하나 이상의 돌연변이를 포함하며, 1종 이상의 프라이머는 상기 주형의 마이너스 가닥에 어닐링할 수 있는 정방향 프라이머이고, 1종 이상의 프라이머는 상기 주형의 플러스 가닥에 어닐링할 수 있는 역방향 프라이머인 단계, 및

[0115] (b) 상기 반응 혼합물에 대해 폴리머라제 연장 반응을 실시하여, 상기 3종 이상의 프라이머로부터 복수의 연장된 변형 폴리뉴클레오티드를 생성하는 단계

[0116] 를 포함한다.

[0117] 본 발명의 또 다른 양태에서, 세포를, 리가제로 처리하지 않은 복수의 연장된 생성물로 형질전환시킨다. 본 발명의 또 다른 양태에서, 상기 복수의 연장된 변형 폴리뉴클레오티드를 세포로부터 회수한다. 또 다른 실시형태에서, 상기 회수된 복수의 연장된 변형 폴리뉴클레오티드를, 예를 들어 복수의 연장된 변형 폴리뉴클레오티드 중 하나 이상을 발현시키고 이로부터 발현된 폴리펩티드를 분석함으로써 분석한다. 또 다른 실시형태에서, 관심 있는 돌연변이를 포함하는 복수의 연장된 변형 폴리뉴클레오티드의 선별을 실시한다.

[0118] 일 실시형태에서, 상기 주형 폴리뉴클레오티드는 원형 DNA, 예를 들어, 플라스미드 또는 벡터 DNA이다. 또 다른 실시형태에서, 상기 원형 DNA는 수퍼 코일형 DNA이다.

[0119] 또 다른 양태에서, 상기 주형 폴리뉴클레오티드에 대한 서열 정보를 얻을 수 있고, 상기 주형 폴리뉴클레오티드를 따라 위치하는 3개 이상의 관심있는 돌연변이를 확인할 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 상기 폴리머라제 연장에 의해 얻은 생성물을, 복수의 연장된 변형 생성물로 세포를 형질전환시키기 전에 분석할 수 있다.

[0120] 본 발명의 또 다른 양태에서, 상기 폴리머라제 연장에 의해 얻은 생성물을 효소, 바람직하게는 제한 효소, 더 바람직하게는 DpnI 제한 효소로 처리하여, 주형 폴리뉴클레오티드 서열을 파괴한다. 처리된 생성물로 세포를, 바람직하게는, 이. 콜라이 세포를 형질전환시킨다.

[0121] 또 다른 실시형태에서, 적어도 2종, 바람직하게는 적어도 3종, 더 바람직하게는, 적어도 4종, 적어도 5종, 적어도 6종, 적어도 7종, 적어도 8종, 적어도 9종, 적어도 10종, 적어도 11종, 적어도 12종, 또는 그 이상의 프라이머를 사용할 수 있다. 일 실시형태에서, 각각의 프라이머는 단일 점 돌연변이를 포함한다(도 4A). 또 다른 실시형태에서, 2종의 정방향 프라이머 또는 2종의 역방향 프라이머는 주형 폴리뉴클레오티드 상의 동일한 위치에 상이한 변경을 포함한다(도 4B). 본 발명의 또 다른 양태에서, 1종 이상의 프라이머는 주형 폴리뉴클레오티드 상의 상이한 위치에 2개 이상의 변경을 포함한다(도 4C). 또 다른 실시형태에서, 1종 이상의 프라이머는 주형 폴리뉴클레오티드 상의 상이한 위치에 2개 이상의 변경을 포함하고, 2종 이상의 정방향 프라이머 또는 2종 이상의 역방향 프라이머는 주형 폴리뉴클레오티드 상의 동일한 위치에 상이한 변경을 포함한다(도 4D).

[0122] 일 실시형태에서, 상기 정방향 프라이머를 정방향 그룹으로 그룹화(grouping)하고 상기 역방향 프라이머를 역방향 그룹으로 그룹화하고, 상기 정방향 그룹의 프라이머와 상기 역방향 그룹의 프라이머를, 서로 독립적으로, 주형 폴리뉴클레오티드 상의 위치에 관계없이, 해당 그룹에서 동일한 농도가 되도록 정규화하며, 상기 정규화 후 동일한 양의 정방향 프라이머와 역방향 프라이머를 반응에 첨가한다. 상기 정규화 방법에 있어서, 동일 위치의 조합이 바이어스될 수 있다. 이 바이어스는, 예를 들어 복수의 프라이머를 포함하는 위치와 비교하여 단일 프라이머를 포함하는 한 위치에서의 비교적 낮은 프라이머 농도에 기인한 것일 수 있다. "위치 바이어스(positional bias)"란 생성된 폴리뉴클레오티드가 그 정방향 또는 역방향 프라이머 그룹 내에서 다른 위치에 비해 한 위치에 프라이머를 도입하는 것에 강한 선호도를 나타내는 것을 의미한다. 이로 인해 단일 프라이머 위치 내에 높은 비율(%)의 돌연변이를 보유하나 그 정방향 또는 역방향 프라이머 그룹 내의 또 다른 위치에 낮은 비율(%)의 돌연변이를 보유할 수 있는 변형 폴리뉴클레오티드의 조합이 생성된다. 이러한 바이어스는 TMCA의 목적이 주형에 대한 가능한 모든 변경의 조합을 포함하는 자손 폴리뉴클레오티드를 생성하는 것일 경우 바람직하지 않다. 이러한 바이어스는, 예를 들어 각각의 위치에서의 풀로서의 프라이머를 동일하게 정규화함으로써 보정할 수 있다. TMCA 방법을 2회 수행하면, 주형에 대해 복수의 변경을 포함하는 원하는 자손 폴리뉴클레오티드의 수율을 증가시킬

수 있으며, 이때 2회차에서는 1회차로부터 얻은 변이체 중 일부를 사용한다.

[0123] 또 다른 실시형태에서, 프라이머 정규화는, 상기 프라이머를 주형 폴리뉴클레오티드 상의 그 위치에 따라 복수의 그룹으로 편성하는 단계로서, 상기 주형 상의 동일한 특정 영역을 커버하는 프라이머가 한 그룹에 속하는 것인 단계; 각 그룹 내의 그룹화된 프라이머를 동일한 농도가 되도록 정규화하는 단계; 한 그룹 내의 정방향 프라이머를 정방향 그룹으로 합하고(pooling) 각각의 정방향 프라이머 그룹 간의 농도가 동일하게 되도록 정규화하는 단계; 한 그룹 내의 역방향 프라이머를 역방향 그룹으로 합하고 각각의 역방향 프라이머 그룹 간의 농도가 동일하게 되도록 정규화하는 단계; 및 동일한 양의 합한 정방향 프라이머와 역방향 프라이머를 반응에 첨가하는 단계에 의해 수행한다. 위치 조합에 대해서는 바이어스가 관찰되지 않았다.

[0124] 일 실시형태에서, 각각 축퇴 위치를 포함하는 축퇴 프라이머 세트가 제공되며, 이때 관심있는 돌연변이는 축퇴 위치에서의 다른 다양한 뉴클레오티드이다. 또 다른 실시형태에서, 주형 폴리뉴클레오티드의 하나 이상의 코돈에 상응하는 하나 이상의 축퇴 코돈 및 이 주형 폴리뉴클레오티드 서열의 코돈에 인접한 서열에 상동성인 하나 이상의 인접 서열을 포함하는 축퇴 프라이머 세트가 제공된다. 또 다른 실시형태에서, 상기 축퇴 코돈은 N,N,N이고, 20종의 천연 아미노산 중 임의의 것을 코딩한다. 또 다른 실시형태에서, 상기 축퇴 코돈은 20종 미만의 천연 아미노산을 코딩한다.

[0125] 또 다른 실시형태에서, 관심있는 돌연변이를 포함하는 복수의 변형 폴리뉴클레오티드를 제조하기 위한 바람직한 방법은

[0126] (a) 단일 반응 혼합물의 이중 가닥 주형 폴리뉴클레오티드에 2종 이상의 프라이머를 첨가하는 단계로서, 상기 2종 이상의 프라이머는 중복되지 않고 상기 2종 이상의 프라이머 각각은 다른 프라이머(들)와 상이한 하나 이상의 돌연변이를 포함하며, 1종 이상의 프라이머는 상기 주형의 마이너스 가닥에 어닐링할 수 있는 정방향 프라이머이고, 1종 이상의 프라이머는 상기 주형의 플러스 가닥에 어닐링할 수 있는 역방향 프라이머인 단계,

[0127] (b) 상기 반응 혼합물에 대해 폴리머라제 연장 반응을 실시하여, 상기 2종 이상의 프라이머로부터 복수의 연장된 변형 폴리뉴클레오티드를 생성하는 단계,

[0128] (c) 상기 복수의 연장된 변형 폴리뉴클레오티드를 효소로 처리함으로써 주형 폴리뉴클레오티드를 파괴하는 단계,

[0129] (d) 리가제로 처리하지 않은 상기 처리한 연장된 변형 폴리뉴클레오티드로 세포를 형질전환시키는 단계,

[0130] (e) 상기 세포로부터 복수의 연장된 변형 폴리뉴클레오티드를 회수하는 단계, 및

[0131] (f) 관심있는 돌연변이를 포함하는 복수의 연장된 변형 폴리뉴클레오티드를 선별하는 단계

[0132] 를 포함한다.

[0133] 하기 실시예는 주형 또는 유전자의 복수의 위치에서의 단일 돌연변이가 단순한 단일 반응 혼합물에서 성공적으로 조합될 수 있음을 보여주며, 이것은 공지된 돌연변이 유발 방법에 기초할 때 예기치 못했던 것이다. 실험으로부터 얻은 가능한 모든 조합의 분포는 통계적 계산으로부터 얻은 분포 패턴을 가깝게 표현한다. 반응은 요구에 기초하여 바이어스된 조합을 생성하도록 조정될 수 있다.

[0134] GSSMSM 기법에서는, TMCA 기법이 주형 폴리뉴클레오티드의 플러스 가닥 및 마이너스 가닥에 어닐링하는 상보성 프라이머를 이용하지 않는다. 이 TMCA 발명에 대해 기재된 프라이머를 포함하는 열적 사이클링 연장(단일 열적 사이클 반응에서의 정방향 및 역방향 그룹)으로부터 얻은 합리적인 예상은, 개개의 정방향 프라이머와 역방향 프라이머의 쌍에 의해 정해지는 증폭된 선형 폴리뉴클레오티드만으로 이루어진 집합체이다. TMCA 조건 설정은 표준 PCR 조건과 거의 동일하다. TMCA 반응으로 복수의 PCR 생성물을 제조할 수 있음을 예상할 수 있으며, 이때 각각의 생성물은 단일 반응에 사용되는 프라이머 세트가 포함하는 완전한 돌연변이 세트보다 더 적은 돌연변이를 포함하고, 예를 들어, 6종의 프라이머가 사용되고 각각의 프라이머가 하나의 돌연변이를 포함할 경우 6개 미만의 돌연변이를 포함한다. 또한, 상기 PCR 생성물은 세포로 형질전환되어 증폭될 수 없는 것으로 예상된다. 놀라운 점은, TMCA 방법이 한 문자에 복수의 변경을 포함하는 특정한 유전자 변이체를 생성할 수 있고, 결찰 단계를 이용하지 않고서 수행될 수 있으며, 따라서, 복수의 돌연변이 생성 과정을 간소화한다는 것이다.

[0135] [실시예]

[0136] 실시예 1

[0137] TMCA 방법의 대표적인 프로토콜을 이하에 제시한다:

[0138] TMCA 반응

[0139] ↓

[0140] DpnI 처리

[0141] ↓

[0142] 속주로의 형질전환

[0143] ↓

[0144] 스크리닝

[0145] 1. TMCA 반응 개시

[0146] 조건 1

[0147] Pfu 10× 완충액 2.5 $\mu\ell$

[0148] DMSO 2.5 $\mu\ell$

[0149] dNTP(10 mM) 0.5 $\mu\ell$

[0150] 주형 DNA(25 ng/ $\mu\ell$) 1 $\mu\ell$

[0151] PfuTurbo 0.5 $\mu\ell$

[0152] 물 14 $\mu\ell$

[0153] 정방향 프라이머(5 μ M) 2 $\mu\ell$

[0154] 역방향 프라이머(5 μ M) 2 $\mu\ell$

[0155] 합계 25 $\mu\ell$

[0156] 조건 2

[0157] Pfx Accu 완충액 5 $\mu\ell$

[0158] 주형 DNA(25 ng/ $\mu\ell$) 1 $\mu\ell$

[0159] Pfx Accuprime 0.4 $\mu\ell$

[0160] 물 37.6 $\mu\ell$

[0161] 정방향 프라이머(5 μ M) 3 $\mu\ell$

[0162] 역방향 프라이머(5 μ M) 3 $\mu\ell$

[0163] 합계 50 $\mu\ell$

[0164] 조건 3

[0165] Pfx Accu 완충액 2.5 $\mu\ell$

[0166] 주형 DNA(25 ng/ $\mu\ell$) 1 $\mu\ell$

[0167] Pfx Accuprime 0.2 $\mu\ell$

[0168] 물 17.3 $\mu\ell$

[0169] 정방향 프라이머(5 μ M) 2 $\mu\ell$

[0170] 역방향 프라이머(5 μ M) 2 $\mu\ell$

[0171] 합계 25 $\mu\ell$

[0172] 사이클링

[0173]	<u>Robocycler</u>		<u>Perkin-Elmer</u>																																												
[0174]	초기 변성	95°C; 1 min	95°C; 33 min																																												
[0175]	변성	95°C; 45 sec	95°C; 45 sec																																												
[0176]	어닐링	50°C; 1 min	50°C; 45 sec 20 사이클																																												
[0177]	연장	68°C; 2 min/kb	68°C; 2 min/kb																																												
[0178]	폴리시	68°C; 5 min	68°C; 5 min																																												
[0179]		4°C; 무기한	4°C; 무기한																																												
[0180]	2. 아가로스 겔 상에 TMCA 반응물 5 μ l를 러닝하여, 반응이 성공적인지를 확인한다.																																														
[0181]	3. 물 3 μ l 및 완충액 4(New England Biolab) 1 μ l 중에 DpnI 제한 효소 1 μ l를 희석시킨다. 희석된 효소 5 μ l를 각각의 TMCA 반응에 첨가한다. 37°C에서 4~8시간 동안 항온처리한다.																																														
[0182]	4. 표준 형질전환 프로토콜을 이용하여 DpnI 처리된 반응물로 이. 콜라이 세포를 형질전환시킨다.																																														
[0183]	5. 생성된 콜로니를 서열결정 또는 소정의 분석법으로 스크리닝하였다.																																														
[0184]	<u>실시예 2</u>																																														
[0185]	1차 실험에서는, 조합을 위해 유전자 상의 6개 위치를 선택하였다(도 5). 3개 위치에 대해서는 정방향 프라이머를, 나머지 3개 위치에 대해서는 3종의 역방향 프라이머를 사용하여 반응을 개시시켰다. 반응으로부터 얻은 변이체를 서열결정을 통해 확인하였다. 64개의 상이한 조합이 가능하였다. 조건 1에서는, 돌연변이 위치 수가 더 적은 변이체가 더 많이 선호되었다(도 6). 조건 2 및 3에서는, 돌연변이 위치 수가 더 많은 변이체가 더 많이 선호되었다(도 6). 합계 데이터(합계)로부터 얻은 가능한 모든 조합의 분포는 통계적 계산으로부터 얻은 분포 패턴과 유사하였다(도 6). 도 7에서의 한 곡선은 변이체의 예상 커버율(%)을 보여주고, 또 다른 곡선은 0~600 개의 클론을 스크리닝할 경우의 완전 커버 확률을 보여준다. 예상 커버율(%) 곡선 상의 원(즉, 78%, 95%, 99% 및 100%)은 96개, 192개, 288개 또는 384개 클론을 스크리닝할 경우의 예상 커버율을 보여준다. 예상 커버율(%) 곡선 아래의 사각형(즉, 70%, 91%, 95% 및 98%)은 실험 데이터로부터 얻은 실제 커버율을 보여준다. 이 데이터는 예상 커버율 대 실제 커버율이 거의 완벽하게 일치함을 보여준다.																																														
[0186]	[표 1]																																														
[0187]	6개 돌연변이 어셈블리																																														
[0188]	<table border="1"> <thead> <tr> <th>조건</th> <th>스크리닝</th> <th>특이 클론</th> <th>특이 클론(-1x)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1A</td> <td>1.5x</td> <td>69% (44/64)</td> <td>69% (44/64)</td> </tr> <tr> <td>1A</td> <td>3x</td> <td>80% (51/64)</td> <td>80% (51/64)</td> </tr> <tr> <td>7A</td> <td>1.5x</td> <td>63% (40/64)</td> <td>75% (42/64)</td> </tr> <tr> <td>13A</td> <td>1.5x</td> <td>61% (39/64)</td> <td>67% (43/64)</td> </tr> <tr> <td>13A</td> <td>3x</td> <td>76% (49/64)</td> <td>80% (51/64)</td> </tr> <tr> <td>1A + 7A</td> <td>3x</td> <td>91% (58/64)</td> <td>91% (58/64)</td> </tr> <tr> <td>1A + 7A</td> <td>4.5x</td> <td>94% (60/64)</td> <td>94% (60/64)</td> </tr> <tr> <td>1A + 13A</td> <td>3x</td> <td>91% (58/64)</td> <td>91% (58/64)</td> </tr> <tr> <td>1A + 13A</td> <td>4.5x</td> <td>95% (61/64)</td> <td>95% (61/64)</td> </tr> <tr> <td>1A + 13A</td> <td>6x</td> <td>98% (63/64)</td> <td>98% (63/64)</td> </tr> </tbody> </table>	조건	스크리닝	특이 클론	특이 클론(-1x)	1A	1.5x	69% (44/64)	69% (44/64)	1A	3x	80% (51/64)	80% (51/64)	7A	1.5x	63% (40/64)	75% (42/64)	13A	1.5x	61% (39/64)	67% (43/64)	13A	3x	76% (49/64)	80% (51/64)	1A + 7A	3x	91% (58/64)	91% (58/64)	1A + 7A	4.5x	94% (60/64)	94% (60/64)	1A + 13A	3x	91% (58/64)	91% (58/64)	1A + 13A	4.5x	95% (61/64)	95% (61/64)	1A + 13A	6x	98% (63/64)	98% (63/64)		
조건	스크리닝	특이 클론	특이 클론(-1x)																																												
1A	1.5x	69% (44/64)	69% (44/64)																																												
1A	3x	80% (51/64)	80% (51/64)																																												
7A	1.5x	63% (40/64)	75% (42/64)																																												
13A	1.5x	61% (39/64)	67% (43/64)																																												
13A	3x	76% (49/64)	80% (51/64)																																												
1A + 7A	3x	91% (58/64)	91% (58/64)																																												
1A + 7A	4.5x	94% (60/64)	94% (60/64)																																												
1A + 13A	3x	91% (58/64)	91% (58/64)																																												
1A + 13A	4.5x	95% (61/64)	95% (61/64)																																												
1A + 13A	6x	98% (63/64)	98% (63/64)																																												
[0189]	<u>실시예 3</u>																																														
[0190]	2차 실험에서는, 조합을 위해 유전자 상의 4개 위치를 선택하였다(도 8). 2개 위치에 대해서는 정방향 프라이머를, 나머지 2개 위치에 대해서는 2종의 역방향 프라이머를 사용하여 반응을 개시시켰다. 반응으로부터 얻은 변이체를 서열결정을 통해 확인하였다. 16개의 상이한 조합이 가능하였다. 1차 실험과 유사하게, 조건 1에서는, 돌연변이 위치 수가 더 적은 변이체가 더 많이 생성되었고, 조건 2 및 3에서는, 돌연변이 위치 수가 더 많은 변이체를 더 많이 생성되었다(도 9 및 10). 합계 데이터(합계)로부터 얻은 가능한 모든 조합의 분포는 통계적 계산으로부터 얻은 분포 패턴과 유사하였다(도 9 및 10).																																														
[0191]	[표 2]																																														

[0192]

4개 돌연변이 어셈블리

조건	스크리닝	특이 클론	비특이 클론 (-1x)
2A	2x	75% (12/16)	81% (13/16)
8A	2x	62% (10/16)	87% (14/16)
14A	2x	68% (11/16)	75% (12/16)
2A + 8A	4x	93% (15/16)	100% (16/16)
2A + 14A	4x	93% (15/16)	93% (15/16)
2B	2x	75% (12/16)	75% (12/16)
8B	2x	50% (8/16)	68% (11/16)
14B	2x	75% (12/16)	87% (14/16)
2B + 8B	4x	81% (13/16)	81% (13/16)
2B + 14B	4x	87% (14/16)	87% (14/16)

[0193]

실시예 4

[0195]

3차 실험에서는, 조합을 위해 유전자 상의 3개 위치를 선택하였다(도 11). 2개 위치에 대해서는 정방향 프라이머를, 세 번째 위치에 대해서는 1종의 역방향 프라이머를 사용하여 반응을 개시시켰다. 반응으로부터 얻은 변이체를 서열결정을 통해 확인하였다. 이 경우, 8개의 상이한 조합이 가능하였다. 9B 조건하에서는, 24개의 클론을 서열결정하여 총 8종의 변이체를 회수하였다. 도 12 참조.

[0196]

실시예 5

[0197]

열 안정성을 개선시키고 리파제의 비활성을 증가시키기 위해 13종의 GSSMSM 상류 돌연변이체를 선택하였다(5개 위치)(도 13). 3개 위치(N168S, N171E 및 M176W)를 함께 그룹화하여, 하나의 프라이머에 포함시켰다. 라이브러리 크기는 $6 \times 6 \times 2 \times 2 \times 2 = 288$ 이었다. 상기 반응은 하기 방법을 이용하여 개시시켰다: 정방향 프라이머를 정방향 그룹으로 그룹화하고 역방향 프라이머를 역방향 그룹으로 그룹화하고, 상기 정방향 그룹의 프라이머와 상기 역방향 그룹의 프라이머를, 서로 독립적으로, 주형 폴리뉴클레오티드 상의 위치에 관계없이, 해당 그룹에서 동일한 농도가 되도록 정규화하며, 상기 정규화 후 동일한 양의 정방향 프라이머와 역방향 프라이머를 반응에 첨가하였다. 위치 1과 위치 2의 조합은 바이어스되었다(도 13 및 14a, 14b, 14c). 위치 1과 위치 3의 조합 또는 위치 2와 위치 3의 조합에 비해 위치 1과 위치 2의 조합에 있어서 가능한 특이 변이체의 비율(%)이 더 적었다. TMCA 반응은 2회 수행하였다. 2회차에서는, 1회차로부터 얻은 변이체 중 일부를 사용하였다. 720개 클론(라이브러리의 $2.5 \times$ 커버율)에 대해 서열결정을 실시한 후, 1회차의 288개 특이 변이체의 46%를 얻었다. $1 \times$ 커버율은 서열결정된 변이체(자손)의 수가 가능한 특이 변이체의 수와 동일함을 의미하며, 따라서, $2.5 \times$ 커버율은 서열결정된 변이체(자손)의 수가 특이 변이체의 가능한 수(288)의 2.5배임을 나타낸다. TMCA 반응은 2회 수행하였다. 2회차에서는, 1회차로부터 얻은 변이체 중 일부를 주형 폴리뉴클레오티드로서 사용하였다. 1회차에서 얻지 못한 변이체를 얻을 수 있도록, 2회차에서의 각각의 TMCA 반응에 사용된 프라이머를 조정하였다. 2회차 후, 288개의 특이 변이체의 95.5%가 얻어졌다. 스크리닝 후 이 라이브러리로부터 10종의 상류 돌연변이체를 얻었다(도 14a, 14b, 14c).

[0198]

본 실시예는, TMCA 방법에 의해 조합 라이브러리를 효율적으로 제조할 수 있음을 보여준다. 돌연변이 위치에 의해 약간의 제약이 발생하지만, 이러한 제약을 극복하기 위해 다른 방안이 계획될 수 있다. 이러한 신규한 개선된 변형은 바이어스를 현저히 감소시킨다. 바이어스를 어느 정도 극복하기 위해 TMCA 반응을 여러회 수행할 수 있다. TMCA 방법은 복수의 효소 및 백터 시스템에 있어서 유효한 것으로 확인된다. 백터 크기 제약은 길이 11 kb일 수 있다.

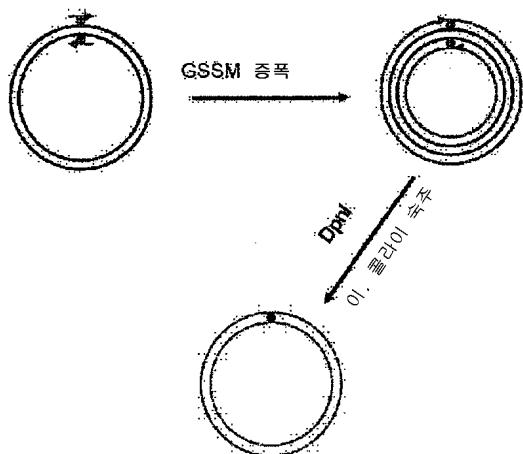
[0199]

상기 교시에 비추어 볼 때 본 발명의 다수의 변형 및 변경 형태가 가능함이 명백하다. 따라서, 첨부된 특허청구 범위 내에서, 본원에 구체적으로 기재된 것과 달리 본 발명이 실시될 수 있음이 이해되어야 한다.

도면

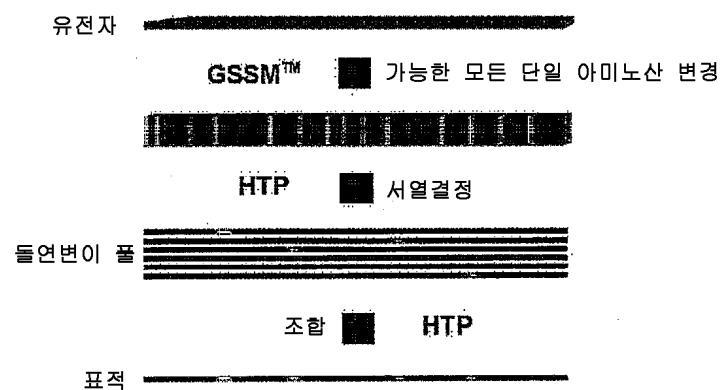
도면1

진화 - GSSM™ (1)

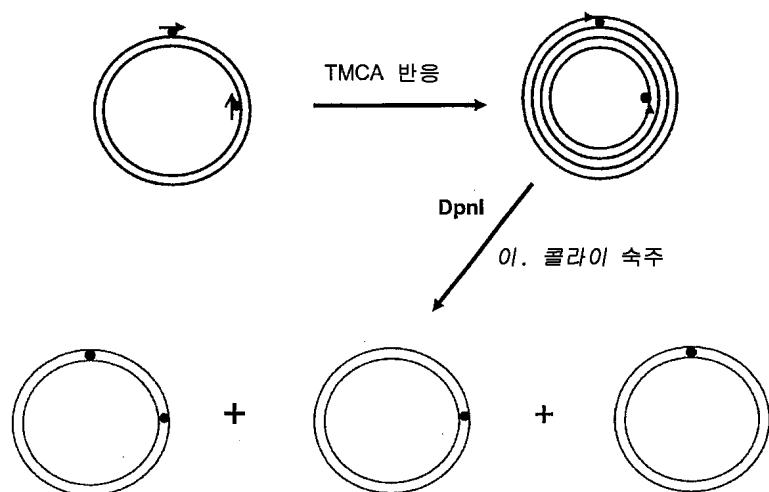


도면2

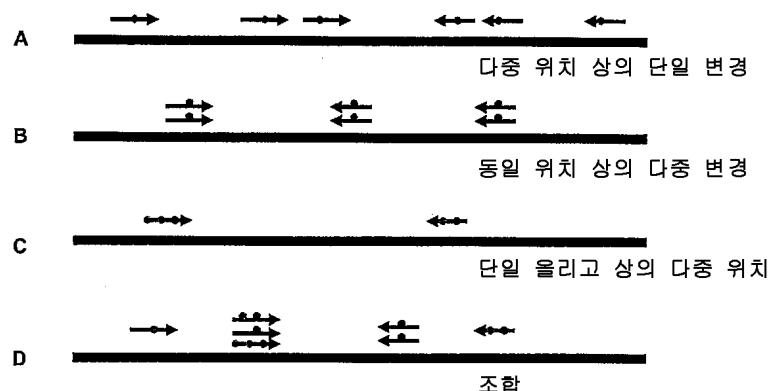
진화 - GSSM™ (2)



도면3

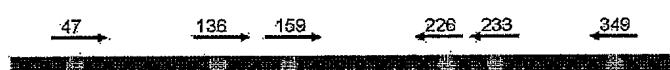


도면4



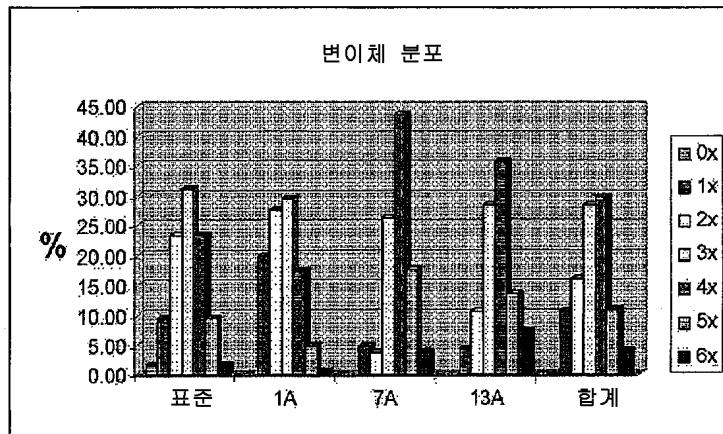
도면5

6개 돌연변이 어셈블리



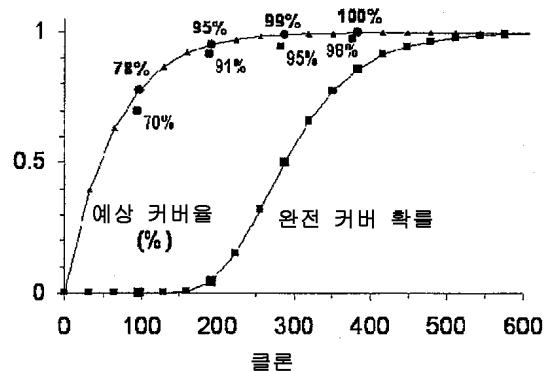
도면6

6개 돌연변이 어셈블리



도면7

6개 돌연변이 어셈블리



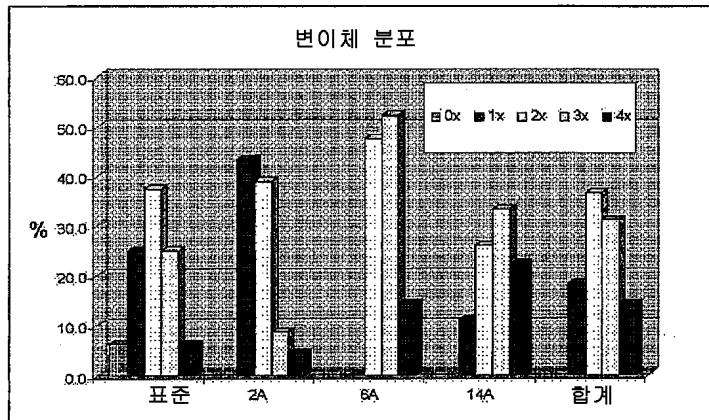
도면8

4개 돌연변이 어셈블리



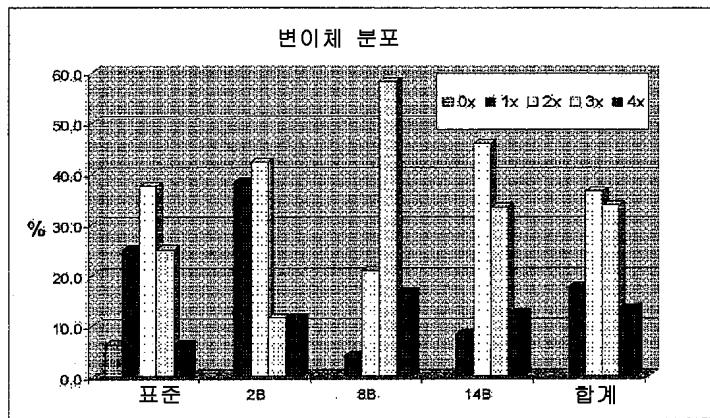
도면9

4개 돌연변이 어셈블리



도면10

4개 돌연변이 어셈블리



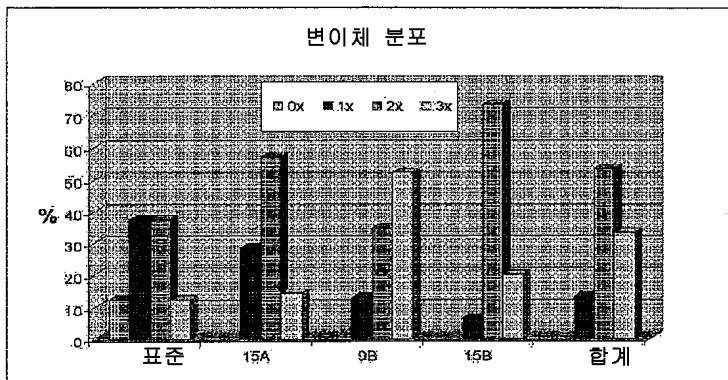
도면11

3개 돌연변이 어셈블리



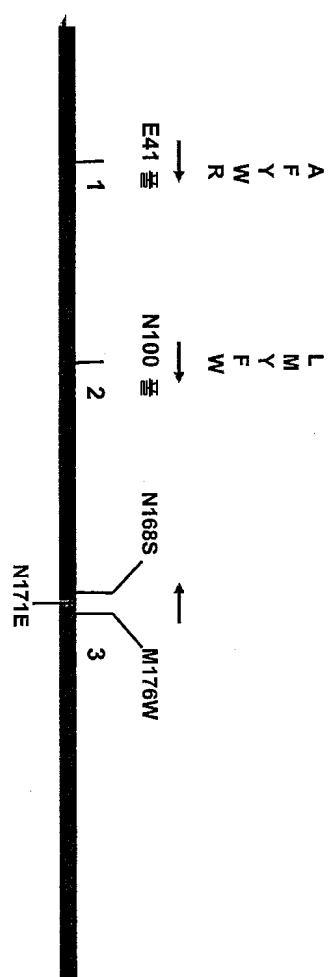
도면12

3개 돌연변이 어셈블리

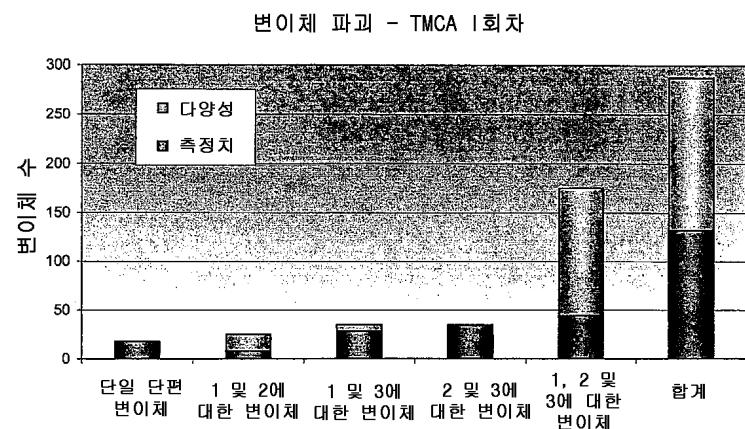


도면13

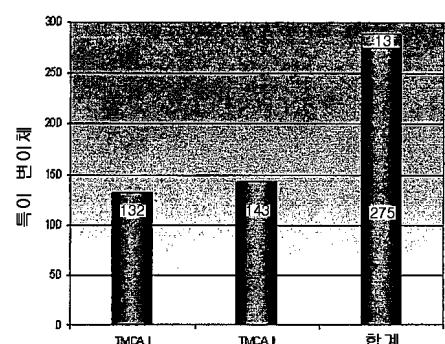
라이브러리 크기
 $6 \times 6 \times 2 \times 2 \times 2 = 288$



도면14a



도면14b



도면14c

