



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2011년06월09일
(11) 등록번호 10-1039563
(24) 등록일자 2011년06월01일

(51) Int. Cl.

C12N 15/10 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2003-7014191

(22) 출원일자(국제출원일자) 2002년04월22일

심사청구일자 2007년04월20일

(85) 번역문제출일자 2003년10월30일

(65) 공개번호 10-2004-0015216

(43) 공개일자 2004년02월18일

(86) 국제출원번호 PCT/GB2002/001861

(87) 국제공개번호 WO 2002/088387

국제공개일자 2002년11월07일

(30) 우선권주장

0110501.4 2001년04월30일 영국(GB)

(56) 선행기술조사문헌

W01994005797 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

더 세크리터리 오브 스테이트 포 디펜스

영국 윌트셔 에스피4 0제이큐 솔즈베리 포톤 다운
디에스티엘

(72) 발명자

클라크던칸로이

영국한츠지유146이에프판보로린치포드로드40세인
트알반스하우스슈트5제네시스리미티드

빈센트수잔느패트리샤

영국한츠지유146이에프판보로린치포드로드40세인
트알반스하우스슈트5제네시스리미티드

(74) 대리인

이병호, 장훈

전체 청구항 수 : 총 10 항

심사관 : 김기연

(54) 증폭 방법

(57) 요약

프라이머 신장이 발생하는 것을 방지하기 위해서 충분한 피로포스페이트 염의 존재하에서 증폭 반응 혼합물을 형성하는 단계, 피로포스파타제 효소(pyrophosphatase : PPase)로써 상기 피로포스페이트 염을 분해하는 단계, 및 상기 반응 혼합물을 증폭 반응이 진행될 수 있는 상태로 되게하는 단계를 포함하는, 핵산 증폭 반응을 실시하는 방법. 상기 방법은 "핫 스타트" 증폭으로 사용될 수 있다. 본 방법에서 사용을 위한 특히 신규한 피로포스파타제 효소가 또한 기술되고 청구되었다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

(i) 표적 핵산 서열을 함유하거나 이를 함유한다고 여겨지는 샘플, (ii) 상기 표적 서열과 하이브리드화하는 프라이머, (iii) 마그네슘 이온의 공급원, (iv) 표적 서열을 구성하는 뉴클레오티드 염기, (v) 내열성 DNA 폴리머라제, (vi) 프라이머 신장을 방지하는 양의 피로포스페이트 염 및 (vii) 50 μ l PCR 반응 혼합물 당 0.04 내지 10 단위의 내열성 피로포스파타제 효소(pyrophosphatase enzyme: PPase)를 혼합하여 폴리머라제 연쇄 반응(PCR) 혼합물을 형성하는 단계,

상기 반응 혼합물을 상기 피로포스페이트 염이 피로포스파타제 효소(PPase)에 의해 분해되도록 하는 조건에 도입하는 단계 및

일련의 변성, 프라이머 어닐링(annealing) 및 프라이머 신장 단계를 실시하여 폴리머라제 연쇄 반응을 수행하는 단계

를 포함하는 핵산 증폭 반응의 실시 방법으로서, 이때 증폭 중에 비특이적 생산물의 생산이 억제되는, 핵산 증폭 반응을 실시하는 방법.

청구항 2

(i) 표적 핵산 서열을 함유하거나 이를 함유한다고 여겨지는 샘플, (ii) 상기 표적 서열과 하이브리드화하는 프라이머, (iii) 마그네슘 이온의 공급원, (iv) 표적 서열을 구성하는 뉴클레오티드 염기, (v) 내열성 DNA 폴리머라제, (vi) 프라이머 신장을 방지하는 양의 피로포스페이트 염 및 (vii) 초호열성 아키온(archaeon)으로부터 수득될 수 있는 내열성 피로포스파타제 효소(pyrophosphatase enzyme: PPase)를 혼합하여 폴리머라제 연쇄 반응(PCR) 혼합물을 형성하는 단계,

상기 반응 혼합물을 상기 피로포스페이트 염이 피로포스파타제 효소(PPase)에 의해 분해되도록 하는 조건에 도입하는 단계 및

일련의 변성, 프라이머 어닐링(annealing) 및 프라이머 신장 단계를 실시하여 폴리머라제 연쇄 반응을 수행하는 단계

를 포함하는 핵산 증폭 반응의 실시 방법으로서, 이때 증폭 중에 비특이적 생산물의 생산이 억제되는, 핵산 증폭 반응을 실시하는 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 반응 혼합물이 썬머스 아쿠아티쿠스(*Thermus aquaticus*) 폴리머라제(*Taq*), 썬머스 썬모필루스(*Thermus thermophilus*) 폴리머라제(*Tth*), 썬머스 종 NH(*Thermus species NH*) 폴리머라제(*TspNH*), 썬머스 브로키아누스(*Thermus brockianus*) 폴리머라제(*Tbr*), 피로코쿠스 퓨리오수스(*Pyrococcus furiosus*) 폴리머라제(*Pfu*), 9° N7 엑소-DNA 폴리머라제, 및 썬모코쿠스 리테랄리스(*Thermococcus litoralis*) DNA 폴리머라제로부터 선택되는 DNA 폴리머라제를 함유하는 방법.

청구항 4

청구항 4은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

제1항 또는 제2항에 있어서, 피로포스페이트 염이 알칼리 금속 피로포스페이트인 방법.

청구항 5

청구항 5은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

제4항에 있어서, 피로포스페이트 염이 화학식 $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 의 피로인산나트륨인 방법.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 피로포스페이트 염이 0.5 mM 내지 10 mM의 농도로 반응 혼합물에 존재하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 피로포스페이트 염이 1 내지 10 mM 농도로 존재하는 방법.

청구항 8

삭제

청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서, 내열성 PPase가 선폴부스 애시디칼다리우스(*Sulfolobus acidicaldarius*) 무기 피로포스파타제(Sac PPase), 썬모코쿠스 리토랄리스(*thermococcus litoralis*) 무기 피로포스파타제 또는 애로피룸 페르닉스(*Aeropyrum pernix*) 무기 피로포스파타제인 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 내열성 PPase가 반응 혼합물의 형성중 이에 추가되는 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, PPase가 존재하는 피로포스페이트 염을 분해할 수 있도록 하기 위해서 50 °C 내지 100 °C의 온도에서 증폭 반응 전에 항온처리 단계를 포함하는 방법.

청구항 12

청구항 12은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

제2항에 있어서, PPase가 PCR 반응 혼합물 50 μ l 당 0.04 u 내지 10 u의 농도로 반응 혼합물에 추가되는 방법.

청구항 13

청구항 13은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

제1항 또는 제2항에 있어서, PPase가 PCR 반응 혼합물 50 μ l 당 0.08 u의 농도로 반응 혼합물에 추가되는 방법.

청구항 14

청구항 14은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

제13항에 있어서, PPase가 PCR 반응 혼합물 50 μ l 당 0.2 내지 10 u의 농도로 반응 혼합물에 추가되는 방법.

청구항 15

피로포스페이트 염, 및 50 μ l PCR 반응 혼합물 당 0.04 내지 10 단위를 제공하는 양의 내열성 피로포스파타제 효소를 포함하는, 제1항에 따르는 증폭 반응을 실시하기 위한 키트.

청구항 16

청구항 16은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

제15항에 있어서, (i) 표적 서열의 말단 부분에 하이브리드화되는 프라이머, (ii) 마그네슘 이온의 공급원, (iii) 표적 서열을 구성하는 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 염기 및 (iv) 내열성 DNA 폴리머라제로부터 선택된, PCR 증폭 반응의 사용에 요구되는 시약을 추가로 포함하는 키트.

청구항 17

청구항 17은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

제16항에 있어서, 특정한 표적 핵산의 증폭을 수행하기 위해서 필요한 프라이머를 추가로 포함하는 키트.

청구항 18

청구항 18은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

제15항 내지 제17항 중의 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 형광 표지된 시약을 추가로 포함하는 키트.

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

제1항 또는 제2항에 있어서, 내열성 PPase가 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 방법.

청구항 28

청구항 28은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

제18항에 있어서, 형광 표지된 시약이 인터칼레이팅(intercalating) 염료, 형광 표지된 프로브, 형광 표지된 프라이머 또는 형광 표지된 뉴클레오티드 중 하나 이상으로부터 선택되는 키트.

명세서

- [0001] 본 발명은 핵산을 증폭시키는 반응을 수행하기 위한 방법, 이들 반응을 조절하는 수단 및 당해 반응을 실시하는데 사용되는 키트(kit) 및 시약, 특히 효소에 관한 것이다.
- [0002] 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)과 같은 증폭 반응은 매우 잘 공지되었고 진단 및 검출 분야뿐 아니라 생명공학 연구 분야에서도 널리 사용되고 있다.
- [0003] PCR은 특정한 핵산 서열, 특히 DNA 서열의 많은 양을 생산하기 위한 절차이고, 염기 짝짓기 및 상보적인 DNA 쌍의 정확한 복제의 DNA 특성에 기초를 둔다. 전형적인 PCR은 세 가지 기본 단계의 순환 과정을 포함한다.
- [0004] 변성(Denaturation) : PCR 시약(DNA 또는 RNA가 될 수 있는, 복제될 핵산(주형), 각각의 뉴클레오티드 염기(A, T, G, C), 적절한 프라이머 및 폴리머라제 효소를 포함)를 함유한 혼합물을 표적 DNA의 두 쌍을 분리하기 위해 서 예정된 온도까지 가열시킨다.
- [0005] 어닐링(Annealing) : 이후에 혼합물을 다른 예정된 온도까지 냉각시키고 프라이머는 DNA 사슬상의 이들의 상보

적인 서열에 위치하여 결합한다.

- [0006] 신장(Extension) : 혼합물을 다시 추가로 예정된 온도로 가열시킨다. 폴리머라제 효소(촉매로서 작용)는 각각의 뉴클레오티드 염기를 프라이머의 종단에 연결시켜서 표적 DNA의 서열에 상보적인 DNA의 새로운 쇄를 형성하여서, 두 쇄가 서로 결합되도록 한다.
- [0007] 상기 반응은 매우 정확한 순서 및 각 단계의 조작에 요구되는 정확한 온도에서 일어나는 일련의 단계에 의존한다. 문제는, 시약이 아주 짧은 시간동안만이라도, 다른 온도에서, 예를 들면 반응 시작 전에 서로 혼합되었을 때 일어난다. 프라이머는 핵산 주형과 서로 작용하여서, 주형의 프라이머 신장을 초래한다. 이는 비특이적 생산물의 생산뿐 아니라 표적하는 생산물의 총체적 수율의 감소를 야기할 수 있다.
- [0008] 상기 문제를 극복하는 다양한 방법은 이전에 제안되어 왔다. 예를 들면, 상기 문제를 극복하기 위한 초기 시도는 시험 튜브에서 서로 각각으로 다양한 PCR 시약을 분리하는 왁스 경계를 사용하였다(예를 들어 USP 제 5,565,339호). 반응 혼합물이 초기의 변성 온도로 가열됨에 따라 왁스가 녹게 되어, 시약이 최후의 가능한 순간에 섞이도록 허용되어서, 부반응의 가능성을 최소화하였다. 상기 반응은 "핫 스타트(Hot Start)" 반응으로 공지되었다.
- [0009] 부반응의 억제를 성취하기 위한 다른 화학적 방법이 시도되어 왔다. 예를 들면, 미국 특허 제5,677,152호는 DNA 폴리머라제가 승온에서만 활성화되는 것을 보증하기 위해서 화학적으로 변형되는 방법을 기술한다. 그러나, 상기 방법을 수행하기 위해서, 활성 효소를 생산하기 위해 높은 온도에서 잠시동안 반응 혼합물을 항온 처리할 필요가 있다. 이런 지연은, 임의의 경우에는 중요하지 않지만, PCR 결과가 신속히 요구되는 경우에는 불이익이 될 수 있다. PCR 기술의 많은 적용에 있어서 최소 가능한 시간에 일련의 주기를 완성하는 것이 바람직하다. 특히 사람 및 동물 가족 소비를 위한 호흡용 공기 또는 체액또는 음식물이 오염된 것으로 추측되는 경우에는 빠른 진단 방법이 만약 건강, 심지어 생명은 아니더라도, 상당한 돈은 절약하게 할 수 있다.
- [0010] 다른 방법에서, 시그마(Sigma)사로부터 이용할 수 있는 항-Taq DNA 폴리머라제 항체와 같은, 써머스 아쿠아티쿠스(*Thermus aquaticus*)(Taq) DNA 폴리머라제에 대한 모노클로날 항체(monoclonal antibody)가 반응 혼합물에 도입되었다. 항체는 효소에 결합하여서, 주위 온도에서, 효소를 불활성화시킨다. 그러나, 항체는 증폭 주기 동안 사용된 승온에서 변성되고 효소로부터 분리되어서, 효소는 활성화된다. 그러나 상기 방법은 일부 경우에 비특이적 부생산물을 제거할 수 없는 듯하다.
- [0011] PCR 반응동안 주형의 프라이머 신장은 하기 식과 같이 나타낼 수 있다 :
- [0012] $Mg^{++} + \text{DNA 폴리머라제}$
- [0013] DNA 주형 + dNTP -----▶ DNA 주형-dNMP + PPi
- [0014] 상기식에서, dNTP는 데옥시리보핵산 트리포스페이트이고, dNMP는 상응하는 데옥시리보핵산 모노포스페이트이고 PPi는 무기 피로포스페이트이다. 상기 반응은 하기 식처럼 또한 나타낼 수 있다.
- [0015] $(\text{DNA})_n \text{ 잔기} + \text{dNTP} \leftrightarrow (\text{DNA})_{n+1} \text{ 잔기} + \text{PPi}$
- [0016] 예를 들면 DNA 서열분석 반응에서, PPi의 증가된 수준 존재는 상기한 반응을 반대 방향으로 강제로 이끄는 것으로 공지되었다. 이것은 피로인산첨가분해(pyrophosphorolysis)로 공지되어 있고 내열성 DNA 폴리머라제를 사용한 70 °C에서 DNA 서열분석에서 인식된 문제점이다. 이는 DNA 서열분석에 사용되는 DNA 폴리머라제 제형에 대하여 내열성 PPase의 부가를 통해서 극복되어 왔다.
- [0017] 본 출원인은 상기 반응이 비특이적 생산물의 생산을 최소화할 수 있는 바람직한 증폭 반응의 기초를 형성할 수 있다는 것을 발견하였다.
- [0018] 본 발명에 따르면, 프라이머 신장이 발생하는 것을 방지하기 위해서 충분한 피로포스페이트 염의 존재하에서 증폭 반응 혼합물을 형성하는 단계, 피로포스페이트의 효소적 분해 단계, 및 상기 반응 혼합물을 증폭 반응이 진행될 수 있는 상태로 되게하는 단계를 포함하는, 핵산 증폭 반응을 실시하는 방법을 제공한다.
- [0019] 본 발명의 방법을 사용하면, 우수한 특이성과 함께 빠르게 수행할 수 있는, 정확한 증폭 반응이 수행될 수 있다. 그러므로 이는 기존의 "핫 스타트" 증폭 기술에 대한 좋은 대안을 제시한다.
- [0020] 본 발명의 방법에서 사용되는 초기 증폭 반응 혼합물은 대체로, PCR 반응에서 사용되는 것과 같은 통상적인 혼합물에, 피로포스페이트 염을 부가한 것이다. 그러므로 이는 일반적으로 (i) 표적 핵산 서열을 함유하거나 이

를 함유한다고 여겨지는 샘플, (ii) 표적 서열의 말단 부분에 하이브리드화되는 하나 이상의 프라이머, (iii) 마그네슘 이온의 공급원, (iv) 표적 서열을 구성하는 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 염기(즉, DNA 증폭의 경우에는 A, T, C, G 및/또는 U 또는 RNA 증폭의 경우에는 A, U, C 및 G), 및 (v) 증폭 반응에 영향을 미치는 온도에서 내열성인 DNA 폴리머라제를 포함한다. 이는 또한 당해 분야에서 공지된 것처럼, 반응에 영향을 주기 위해서 필수적인, 완충액을 포함한다.

[0021] 특히 (iv)는 DNA 증폭에 대하여 뉴클레오타이드 A, T, G 및 C를, 그리고, RNA 증폭에 대하여는 뉴클레오타이드 A, U, C 및 G를 포함한다.

[0022] 그러나, 역 전사효소 PCR(RT-PCR)과 같은 다른 프라이머계의 증폭 반응이 실시되는 경우에는, 다른 조합이 사용될 수 있다.

[0023] 부가하여, 시약은 표지된 프로브 또는 프라이머, 및/또는 Sybr 그린, Sybr 골드, 에티뮴 브로마이드 등 또는 이의 조합물과 같은 인터칼레이팅(intercalating) 염료와 같은 다른 표지 수단을 포함할 수 있어서, 겔 상에서 생산물을 이어서 조사할 필요 없이, 검사에 적용될 수 있다. 상기 특징은 수행되는 분석 형식에 의존한다. 일반적인 인터칼레이터 방법은 증폭 과정동안 형성된 이중쇄 DNA의 증가를 조사하기 위해서 인터칼레이팅 염료를 사용한다. 이는 오직 유사-쇄-특이적이어서 쇠 특이적 검출이 요구되는 경우에 다른 표지가 요구된다.

[0024] 쇠 특이적 방법은 증폭 반응의 진행을 조사하기 위해서 부가적인 핵산 반응 성분을 이용한다. 상기 방법은 검출의 기본으로서 흔히 형광 에너지 전이(FET)를 사용한다. 하나 이상의 핵산 프로브는 형광 분자로 표지되어서, 하나는 에너지 공여체로 작용할 수 있고, 다른 것은 에너지 수용체 분자이다. 이는 때때로 레포터 분자 및 퀀처(quencher) 분자 각각으로 공지되어 있다. 공여체 분자는 여기 스펙트럼 내에 속하는 빛의 특정한 파장으로 여기되고 이어서 형광 발산 파장내에서 빛을 발산할 것이다. 수용체 분자는 또한 다양한 거리 의존 에너지 전이 기전으로 인하여 공여체 분자로부터 에너지를 수용함으로써 상기 파장에서 여기된다. 발생할 수 있는 형광 에너지 전이의 특수한 예는 형광 공명 에너지 전이 또는 "FRET"이다. 일반적으로, 수용체 분자는 이들이 밀접하게 접근한 때(예를 들면, 같은 분자상에, 또는 이웃하는 분자상에) 공여체 분자의 발산 에너지를 수용한다. 형광 에너지 전이 검출의 기본은 공여체 및 수용체 발산 파장에서 변화를 조사하는 것이다.

[0025] FET 또는 FRET 프로브의 통상적으로 사용되는 두 가지 형식이 있는데, 하나는 수용체로부터 공여체를 분리하기 위해서 핵산 프로브의 가수분해를 사용하는 것이고, 다른 하나는 공여체 및 수용체 분자의 공간적 관계를 변형하기 위해서 하이브리드화를 사용한다.

[0026] 가수분해용 프로브는 TaqManTM 프로브로서 상업적으로 이용가능하다. 이는 공여체 및 수용체 분자로 다 표지된 DNA 올리고뉴클레오타이드로 이루어져 있다. 프로브는 PCR 생산물의 단일 쇠상의 특정한 부위에 결합할 수 있도록 설계된다.

[0027] 상기 쇠에 PCR 프라이머의 어닐링 후, Taq 효소는 5'에서 3' 폴리머라제 활성 방향으로 DNA를 신장시킨다. Taq 효소는 또한 5'에서 3'의 엑소뉴클리아제 활성을 보여준다. TaqManTM 프로브는 인산화로 3' 말단에서 보호되어져 Taq 신장의 프라이밍이 방지된다. 만일 TaqManTM 프로브가 생산물 쇠에 하이브리드화되면, 신장시키는 Taq 분자는 또한 검출의 기본으로서 수용체로부터 공여체를 유리시키면서, 프로브를 가수분해시킬 수 있다. 이러한 예에서 유리된 공여체 및 수용체 분자의 농도가 증폭 반응의 각 주기와 함께 증가되면서, 신호는 누적된다.

[0028] 미국 특허 제5,491,063호는 DNA 결합 인자에 의해 표지된 단일 쇠 올리고뉴클레오타이드로부터 신호의 변형에 의지하는 형광 표지된 프로브의 용액 내 퀀칭을 위한 방법을 기술한다. 폴리머라제 연쇄 반응동안 프로브 절단(가수분해) 후에 프로브의 감소된 사슬 길이의 결과로서 발생하는 상기 신호에서 차이는 표적 핵산의 존재를 검출하는 수단을 제공하는 것으로써 제안한다.

[0029] 하이브리드화용 프로브는 다수의 형태로 이용가능하다. 분자적 표지는 헤어핀 루프(hairpin loop)를 형성하는 상보적인 5' 및 3' 서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드이다. 말단 형광 표지는 헤어핀 구조를 형성할 때 FRET가 발생하기에 밀접하게 근접한다. 상보적인 서열에 대한 분자적 표지의 하이브리드화 후, 형광 표지는 분리되어서, FRET는 발생하지 않으며, 이는 검출의 기본을 형성한다.

[0030] 표지된 올리고뉴클레오타이드 쌍이 또한 사용될 수 있다. 이는 공여체 및 수용체 분자를 서로 가져와서 PCR 생산물 쇠 상에서 밀접하게 근접시켜서 하이브리드화하여서 FRET가 발생할 수 있다. 강화된 FRET는 검출의 기본이다. 이 형태의 변이체는 단일의 근접한 프로브를 가지고 표지된 증폭 프라이머를 사용하는 것을 포함한다.

- [0031] 미국 특허 제4,868,103호는 일반적인 측면에서, 분석물의 존재를 검출하는 FRET 시스템을 기술하는데, 이는 공여체 분자로서 인터칼레이팅 염료를 사용한다. 상기 방법은 증폭 단계와 관련이 없다.
- [0032] FET 또는 FRET 검출을 사용하는 분석의 다른 예로서, WO 99/28500에서는 신호 시스템으로서 인터칼레이팅 염료 및 단일 표지 프로브의 조합을 사용하고, WO 99/28501에서는 검출될 수 있는 형광 신호를 생성하기 위해서 표지된 프라이머 및 효소의 조합을 사용하며, WO 99/42611은 신호의 기본으로서 인터칼레이팅 염료 및 형광 표지된 뉴클레오티드의 조합을 사용한다고 기술되고 있다. 그러나 표지 및 화학적 차단제를 포함하며 상보적인 복합 프라이머를 사용하는 추가적 분석은 WO 99/66071에서 실시예로 기술되어 있다.
- [0033] 본 발명의 방법에서 사용되는 반응 혼합물은 상기에 기술된 것처럼 분석을 실시하는데 필요한 임의의 표지된 시약을 포함할 수 있다. 특히, 상기 반응 혼합물은 유리하게 유전자형 분석(genotyping), 더욱 특별히 SNP 측정에서 사용될 수 있다. 상기 예에서, 본 발명의 방법은 기본 서열에 특이적인 것과 돌연변이에 특이적인, 이원적인 TaqManTM 프로브와 조합하여 사용된다. 각 프로브는 바람직하게 상이한 형광발색단을 포함하며, 따라서 상이한 신호가 유전자 존재의 다양한 형태의 양에 의존하여 생성된다. 단일 신호는 동형접합체(homozygote)로부터 생성되고 혼합 신호는 이형접합체로부터 생성된다.
- [0034] 본 발명에서 사용될 수 있는 적절한 DNA 폴리머라제의 예는 썬머스 아쿠아티쿠스(*Thermus aquaticus*) 폴리머라제(Taq), 썬머스 썬모필루스(*Thermus thermophilus*) 폴리머라제(Tth), 썬머스 종 NH(*Thermus species NH*) 폴리머라제(TspNH), 썬머스 브록키아누스(*Thermus brockianus*) 폴리머라제(Tbr)[모두 영국, 판보로(Farnborough)의 제네시스 리미티드(Genesys Limited)사로부터 획득할 수 있음], 피로코쿠스 퓨리오수스(*Pyrococcus furiosus*) 폴리머라제(Pfu)[스트라타진(Stratagene)사로부터 획득할 수 있음], 9° N7 엑소-DNA 폴리머라제, 및 썬모코쿠스 리토랄리스(*Thermococcus litoralis*) DNA 폴리머라제[VENTTM DNA 폴리머라제로서 뉴 잉글랜드 바이오랩(New England Biolabs)사로부터 획득할 수 있음]과 같은 내열성 폴리머라제이다.
- [0035] 본 발명의 방법에서 사용되는 피로포스페이트는 가용성 금속 및 비금속(예를 들면, 암모늄 염)을 포함하는 임의의 가용성 피로포스페이트이다. 상기 혼합물은 흔히 일반적으로 "무기 피로포스페이트" 또는 PPI로 공지되고 상기 명칭으로 본 명세서에서 사용되고 있다. 특히, 피로포스페이트는 피로인산이나트륨($\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$), 무수 피로인산이나트륨($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$), 피로인산나트륨 데카하이드레이트($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) 및 피로인산사칼륨(무수물)을 포함하는 피로인산 나트륨 또는 피로인산 칼륨과 같은 알칼리 금속 피로포스페이트가 될 것이다. 사용될 수 있는 다른 가용성 피로포스페이트는 피로인산철($\text{Fe}_4(\text{P}_2\text{O}_7)_3$)와 같은 철 피로포스페이트, 및 무수 트리부틸암모늄 피로포스페이트와 같은 가용성 암모늄 염을 포함한다. 다른 가용성 염은 상업용 원료로부터 이용가능하다.
- [0036] 바람직한 무기 피로포스페이트는 화학식 $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 의 피로인산나트륨이다.
- [0037] 반응 혼합물에서 사용된 피로포스페이트 농도는 프라이머 신장을 방지하기에 충분해야 한다. 이는 증폭될 서열의 특이한 특성 및 농도, 사용되는 프라이머 및 폴리머라제 뿐만 아니라 이들의 농도에 따라서 상당 부분 좌우되고, 어떠한 특정 경우라도 통상의 방법에 의해 측정될 수 있다.
- [0038] 최초로 적절하게 형성되는 반응 혼합물은 0.5 mM 이상의 농도, 적절하게 적어도 1 mM의 농도, 예를 들면 1 내지 10 mM 및 바람직하게 1 내지 5 mM 농도의 피로포스페이트를 함유한다.
- [0039] 무기 피로포스페이트의 효소적 분해는 즉각적으로 증폭 반응의 첫 단계 직전 또는 단계중에 적절하게 수행된다. 이는 피로포스파타제 효소(PPase)(무기 피로포스파타제 효소-PPiase로 공지되었을 수 있음)의 부가로 증폭 단계의 시작 직전에 성취될 수 있다.
- [0040] 그러나, 바람직하게, 효소적 분해는 승온, 예를 들어 50 °C 초과된 온도에서 활성인 내열성 PPase를 사용하여 수행된다. 바람직하게 효소는 이 승온에서만 현저하게 활성이다. 이는 PPase가 반응 혼합물 형성시 이에 포함될 수 있으나, 주위 온도에서 억제적인 피로포스페이트를 현저하게 분해하지 않거나 분해할 수 없다는 것을 의미한다. 상기 효소는 예를 들어 PCR 반응의 초기 변성 단계 동안 요구되는 바와 같이 반응 혼합물이 가열될 때만, 적당하게 활성화될 것이다. 그러나, 승온에서 짧은 예비 항온처리가, 예를 들면 50 내지 100 °C에서, 그리고 바람직하게는, 80 내지 95 °C에서, 수행될 수 있다.
- [0041] 내열성 PPase의 예로는 영국 판보로, 제네시스 리미티드사로부터 획득할 수 있는 설포부스 애시디칼다리우스(*Sulfolobus acidicaldarius*) 피로포스파타제(Sac PPase)[참고 자료 : Meyer et al. Archives of Biochem. and Biophys. (1995) 319, 1, 149-156] 또는, 뉴 잉글랜드 바이오랩사(카탈로그 제#M0296S호 및 제#M0296L호)로부

터 이용가능한 써모코쿠스 리토랄리스(*Thermococcus litoralis*) 피로포스파타제를 포함한다. 바람직하게 내열성 PPase는 영국 판보로, 제네시스 리미티드사로부터 획득할 수 있는 애로피룸 페르닉스(*Aeropyrum pernix*) 무기 피로포스파타제이다.

- [0042] 최초의 완전 호기적 초호열성 아키온(archaeon)인 애로피룸 페르닉스 K1은 일본, 코다카 라-지마(Kodaka ra-Jima) 섬의 근해 온천의 열 분기구로부터 1993년에 분리되었다[참고 : Sako et al, Int. J. Syst. Bacteriol. 46 (1996) : 1070-1077]. 이는 일본 미생물 콜렉션에, JCM 9820으로 기탁되어 있다.
- [0043] 본 출원인은 처음으로 애로피룸 페르닉스로부터 내열성 PPase를 분리하였고 이는 본 발명의 추가적인 면을 형성한다. 상기 피로포스파타제를 포함하는 게놈 서열은 서열 번호 1에서 제시되고 상응하는 아미노산 서열은 서열 번호 2(이하 도 11)에서 제시된다. 특히 본 발명의 효소는 서열 번호 25에서 제시된 바와 같이 아미노산 서열을 가지며, 이는 도 11에서 굵은 글씨로 표기된 서열 번호 1의 부위에 의해서 암호화되고, 서열 번호 26으로 또한 나타난다.
- [0044] 본 발명은, 그러므로, 서열 번호 26을 포함하는 폴리뉴클레오티드 및 이의 변이체 또는 단편을 포함한다. 예를 들면, 본 발명은 서열 번호 1의 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [0045] 본 발명은 추가로 서열 번호 25를 포함하는 아미노산 서열 및 이의 변이체 또는 단편을 포함한다. 예를 들면, 아미노산 서열은 서열 번호 2를 포함할 수 있다.
- [0046] 폴리뉴클레오티드 서열과 관련되어 여기서 사용되는 용어 "이의 단편"은 완전한 폴리뉴클레오티드 서열과 동일한 활성을 가지는 주어진 폴리뉴클레오티드 서열의 임의의 부분을 일컫는다. 단편은 적절하게 기본 서열로부터 300개 이상 및 바람직하게 450개 이상의 연속적인 염기를 포함할 것이다.
- [0047] 폴리뉴클레오티드 서열과 관련된 용어 "이의 변이체"는 폴리뉴클레오티드로에 의해서 암호화되는 결과적인 단백질 서열을 제공하는 폴리뉴클레오티드 서열로부터 또는 서열까지의 하나 이상의 핵산의 임의의 치환, 변이, 변형, 교환, 결실 또는 부가는 기본 서열로부터 암호화되는 단백질과 같이 동일한 특성을 보이는 것을 의미한다. 그러므로 상기 용어는 대립유전자 변이체를 포함하고 또한 본 발명의 폴리뉴클레오티드 서열에 대해 사실상 하이브리드화된 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 바람직하게, 상기 하이브리드화는 낮은 및 높은 엄격성(stringency) 상태에서 또는 그 사이에서 일어난다. 일반적인 용어로, 낮은 엄격성 상태는 주위 온도에서 약 55 °C까지의 3 x SSC, 높은 엄격성 상태는 약 65 °C에서 0.1 x SSC로서 정의될 수 있다. SSC는 0.15 M NaCl, 0.015 M 트리-나트륨 시트레이트의 완충액 이름이다. 3 x SSC는 SSC 등과 같은 것의 세 배 강도와 마찬가지로이다.
- [0048] 전형적으로, 변이체는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 서열에 공통적인 뉴클레오티드의 62 % 이상, 더욱 전형적으로 65 %, 바람직하게 70 %, 더욱 바람직하게 80 % 또는 85 % 및 가장 선호되는 바로는 90 %, 95 %, 98 %, 또는 99 % 이상의 동일성을 가진다.
- [0049] 동일성 정도를 측정하는 표적을 위해서 핵산 서열을 비교할 때, BESTFIT 및 GAP(위스콘신 제네틱스 컴퓨터 그룹(GCG) 소프트웨어 패키지로부터)와 같은 프로그램이 있다. 예를 들어, BESTFIT은 두 개의 서열을 비교하고 가장 유사한 절편의 최적의 정렬을 생성시킨다. GAP은 서열을 전체 길이를 따라 정렬될 수 있게 하고 어느 쪽의 서열에 적당하게 공간을 삽입함으로써 최적의 정렬을 한다. 적절하게, 핵산 서열의 동일성을 검토할 때 본 발명의 명세서 내에서, 비교는 전체 길이를 따라 서열의 정렬로써 이루어진다.
- [0050] 아미노산 서열과 관련되어 여기서 사용되는 용어 "이의 단편"은 완전한 아미노산 서열과 동일한 활성을 가진 주어진 아미노산 서열의 임의의 부분을 언급한다. 단편은 적절하게 기본 서열로부터 100개 이상 및 바람직하게 150개 이상 연속되는 아미노산을 포함할 것이다.
- [0051] 아미노산 서열과 관련되어 여기서 사용되는 용어 "이의 변이체"는 서열 내에서 하나 이상의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환되도록 유도된 서열이 기본 서열과 상이한 아미노산의 서열을 의미한다. 아미노산 치환은 아미노산이 대체로 유사한 특성을 가진 상이한 아미노산으로 치환하여 "보존적인" 것으로 간주될 수 있다. 비 보존적인 치환은 아미노산이 상이한 특성의 아미노산으로 치환된 것이다. 일반적으로, 비 보존적인 치환은 폴리펩티드의 생물학적 활성을 바꾸지 않고서는 거의 가능하지 않다. 적절한 변이체는 기본 서열에 대해서 60 % 이상, 바람직하게 75 % 이상, 가장 바람직하게 90 % 이상 동일할 것이다.
- [0052] 상기 경우에서 상동성(homology)은 예를 들어 Ktuple : 2, 갭 페널티 : 4, 갭 길이 페널티 : 12, 표준적인 PAM 스코어링 매트릭스와 함께, 립만-피얼슨(Lipman-Pearson) 알고리즘[참고 자료 : Lipman, D. J. and Pearson, W.

R., Rapid and Sensitive Protein Similarity Searches, *Science*, 1985, vol. 227, 1435-1441]을 사용하여 판단할 수 있다.

- [0053] 바람직하게, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 서열 번호 26 및 이것과 62 %이상의 동일성을 가진 서열을 포함한다.
- [0054] 상기 효소는 천연원으로부터 획득할 수 있거나, 통상의 방법을 사용하여, 이 콜라이 세포와 같은 재조합 숙주 세포에서 발현될 수 있다.
- [0055] 예를 들어, 내열성 피로포스파타제 효소(PPase)의 작용에 의해서 50 °C 초과 온도에서 피로포스페이트의 제거는 이후에 프라이머 신장(및 그 결과 증폭)이 정상적으로 진행되도록 허용한다. 상기 과정 동안, 피로포스페이트 1 몰은 무기 포스페이트(Pi) 2 몰로 전환되며, 이는 증폭 반응을 방해하지 않는다.
- [0056] 포함된 피로포스파타제의 양은 반응 혼합물에 존재하는 여분의 피로포스페이트 염을 분해할 수 있도록 충분해야만 한다. 일반적으로, 피로인산첨가분해반응(pyrophosphorolysis)을 방지하기 위해서 등가의 순환 반응에서 통상 사용되는 상기 효소의 양보다 예를 들어 5 배 이상 더 많아야 할 것이다. 정확한 양은 사용되는 특정한 효소, 피로포스페이트의 농도 등을 포함한 다양한 요소에 좌우될 것이다. 전형적으로, PPase 및 특히 내열성 PPase 효소는 50 μ l PCR 반응 혼합물 당 0.04 단위 이상의 농도로, 바람직하게 50 μ l PCR 반응 혼합물 당 0.08 단위 이상의 농도 및 더욱 바람직하게 50 μ l PCR 반응 혼합물 당 약 0.2 내지 10 단위에서 증폭 반응 혼합물에 포함될 수 있다. 이 경우에, 1 단위는 1 mM $K_4P_2O_7$, 2 mM $MgCl_2$, 50 mM 트리스-HCl, pH 9.0 (25 °C)의 반응 상태 하의 75 °C에서 1 분에 1 μ mol 피로포스페이트를 2 μ mol 오르토포스페이트로 전환을 촉매하는 효소의 양으로 정의된다.
- [0057] 본 발명의 방법에서 사용되는 효소는 사용되는 온도에 따라서, 무기 피로포스페이트의 빠른 제거를 초래할 수 있다. 일반적으로 완전한 제거는 5분 이하에서, 더욱 자주, 2분 이하 및 필요하다면 15초만큼 짧은 시간에서 이루어질 수 있다.
- [0058] 일단 무기 피로포스페이트가 반응 혼합물로부터 효소적으로 제거되면, 증폭 반응은 예를 들면, 통상적인 열의 순환 과정을 사용하여서 진행할 수 있다.
- [0059] 본 발명의 방법이 목적하는 결과를 성취하는 기전은 명확하지 않다. 과도한 피로포스페이트의 존재가 프라이머 신장 반응을 저해한다는 것은 가능성이 있다. 그러나, PCR 민감도 또는 생산물 수율에서 현저한 감소는 없다.
- [0060] 본 발명의 방법은 응용 반응을 실시하는데 임의의 통상적인 기구에서 실시될 수 있다. 이는 예를 들어 EP-A-0810030에서 기술되고 펄킨-엘머 코포레이션(Perkin-Elmer Corporation)사에 의해서 공급되는 것과 같은 통상적인 블럭 가열 기기 또는 아이다호 테크놀로지 인코포레이티드(Idaho Technologies Inc.)사로부터 래피드사이클러™(RapidCycler™) 및 라이트사이클러™(LightCycler™)와 같은 고속 증기 열 순환기 또는 WO 98/24548에서 기술된 것과 같은 열 순환기의 다른 형태를 포함한다.
- [0061] 추가적인 면에서, 본 발명은 무기 피로포스페이트, 무기 피로포스파타제 효소 및 증폭 반응의 사용에 요구되는 임의의 하나 이상의 시약을 포함하는 증폭 반응을 실시하기 위한 키트를 제공한다. 무기 피로포스페이트는, 상기에서 기술한 바와 같이, 증폭 반응을 저해하는데 충분한 양으로 적절하게 존재한다. 바람직하게 키트에 존재하는 무기 피로포스파타제 효소의 양은 상기 무기 피로포스페이트 모두를 분해하기에 충분하다.
- [0062] 하나 이상의 시약은 상기 목록에서 (ii) 내지 (v)중 임의의 한 시약을 포함하고, 또한 완충액을 포함한다. 무기 피로포스파타제 효소의 특별한 실시에는 상기 기술한 것과 같이 내열성 무기 피로포스파타제 효소이다.
- [0063] 특히, 키트는 적절하게 선택적인 부가 시약으로서, 특별한 표적 DNA 서열, 예를 들면, 특정 질환 상태 또는 샘플 내 특별한 병원균의 존재를 진단하는 서열의 증폭을 실시하는데 요구되는 하나 이상의 프라이머를 포함할 수 있다. 이 방법은 또한 유전자 분석에서 다형성(polymorphism) 또는 대립형질 변이체의 검출에 사용될 수 있다.
- [0064] 더군다나, 키트는 인터칼레이팅 염료, 또는 형광 표지된 프로브, 프라이머 또는 뉴클레오티드와 같은 하나 이상의 표지된 시약을 포함할 수 있는데, 이들은 원위치에서 증폭 반응을 검출하거나 조사하는데 유용할 수 있다.
- [0065] 추가적인 면에서, 본 발명은 상기 기술한 바와 같이 증폭 반응을 수행하는 방법에서, 상기 기술된 바와 같은 무기 피로포스페이트의 용도를 제공한다. 바람직하게, 무기 피로포스파타제 효소는 애로피룸 페르닉스에서 유래한다.

[0066] 마지막, 추가적인 면으로, 본 발명은 상기 기술한 바와 같이 증폭 반응을 수행하는 방법에서, 상기 기술한 바와 같은 무기 피로포스파타제 효소의 용도를 제공한다.

[0067] 본 발명은 하기와 같은 도해적인 도면을 참고로 하여 실시예를 통해서 상세히 기술될 수 있다.

실시예

[0084] 실시예 1

[0085] PCR상에서 PPi의 효과

[0086] Taq DNA 폴리머라제를 사용하여, 하기의 시약을 사용한 표준적인 500bp 람다(lambda) 주형 PCR은 무기 피로포스페이트, 피로인산사나트륨 테카하이드레이트(PPi)의 상이한 양의 존재하에서 실시되었다.

시약	용적	최종 농도
10 x 반응 완충액	5 μ l	1 x
25 mM MgCl ₂	3 μ l	1.5 mM
5 mM dNTPs	2 μ l	200 μ M
5' 프라이머 (10 pm/ μ l)	5 μ l	1 μ M
3' 프라이머 (10 pm/ μ l)	5 μ l	1 μ M
주형	1 ng	람다 DNA
DNA 폴리머라제 (5 u/ μ l)	0.25	1.25 u
전체 용적에 대한 물	50.0 μ l	

[0088] 람다 500bp 프라이머 서열

[0089] 5' 프라이머 GAT GAG TTC GTG TCC GTA CAA CTG G (서열 번호 14)

[0090] 3' 프라이머 GGT TAT CGA AAT CAG CCA CAG CGC C (서열 번호 15)

[0091] 1 x 반응 완충액 : 10 mM 트리스, pH 8.0, 50 mM KCl.

[0092] 분석을 위한 PCR 상태는 하기와 같다 :

[0093] i) 94 °C 3.00 분

[0094] ii) 10 초 동안 94 °C

[0095] 10 초 동안 50 °C

[0096] 30 초 동안 72 °C의 20회 순환

[0097] iii) 7분 동안 72 °C

[0098] iv) 25 °C 고정.

[0099] 반응 혼합물에서 최종 농도가 0, 1, 2, 3, 4 및 5 mM이 되도록 PPi를 부가하였다. 결과는 도 1에서 도시되었다. 이 도에서, 레인은 하기의 PPi 농도에 상응한다.

[0100] 레인

[0101] 1 + 2 0 PPi

[0102] 3 + 4 1 mM PPi

[0103] 5 + 6 2 mM PPi

[0104] 7 + 8 3 mM PPi

[0105] 9 + 10 4 mM PPi

[0106] 11 5 mM PPi

- [0107] 시험된 PPi의 모든 수준에서, PCR 생산물은 생산되지 않았다.
- [0108] 실시예 2
- [0109] 증가하는 마그네슘 이온 농도의 영향
- [0110] Mg은 PPi에 결합하고, 따라서 실시예 1의 관찰은 과량의 PPi에 의한 Mg의 킬레이트화(chelation)에 기인할 수 있다는 가능성이 있다. 이 때문에, 프라이머 신장이 진행될 수 있도록 불충분한 Mg이 존재해야 할 것이다. 상기 가능성을 제거하기 위해서, 3 mM PPi를 사용한 실시예 1의 과정을 마그네슘 이온의 다양한 농도의 존재하에서 반복하였다.
- [0111] 결과는 도 2에서 도시되었다. 상기 도에서 레인은 다음 반응을 나타낸다.
- [0112] **레인**
- [0113] 1 + 2 1.5 mM MgCl₂
- [0114] 3 + 4 5 mM MgCl₂
- [0115] 5 + 6 7.5 mM MgCl₂
- [0116] 7 + 8 10 mM MgCl₂
- [0117] 9 + 10 1.5 mM MgCl₂ + 3 mM PPi
- [0118] 11 + 12 5 mM MgCl₂ + 3 mM PPi
- [0119] 13 + 14 7.5 mM MgCl₂ + 3 mM PPi
- [0120] 15 10 mM MgCl₂ + 3 mM PPi
- [0121] 결과는 10 mM 최종 농도(1.5 mM이 PCR에서 표준이다)까지 증가시킨 Mg⁺⁺의 부가는 PCR이 실행되는 것을 허용하지 않음을 보여주며, 이는 프라이머 신장을 방해하는 것이 PPi임을 시사한다.
- [0122] 실시예 3
- [0123] PPi 및 PPase의 존재하에서 PCR 반응
- [0124] 실시예 1의 500 bp 람다 PCR이 반복 수행되나, 이 경우에는, 선폴로부스 애시도칼다리우스(*Sulfolobus acidocaldarius*) PPase (Sac PPase) 0.2 u가 피로포스페이트(PPi)를 함유한 반응물에 포함되었다. Sac PPase 0.2 u의 존재하에서 5분동안 95 °C에서 반응물을 항온처리하는 것은 피로포스페이트를 분해하기 위해서 충분하였고 PCR 반응이 진행될 수 있다.
- [0125] 결과는 레인이 하기와 같은 반응을 나타내는 도 3에 도시되었다.
- [0126] **레인**
- [0127] **윗 줄**
- [0128] 1 + 2 1 mM PPi + 0.2 u PPase
- [0129] 3 + 4 2 mM PPi + 0.2 u PPase
- [0130] 5 + 6 3 mM PPi + 0.2 u PPase
- [0131] 7 + 8 4 mM PPi + 0.2 u PPase
- [0132] 9 + 10 5 mM PPi + 0.2 u PPase
- [0133] **아랫 줄**

- [0134] 1 + 2 1 mM PPi
- [0135] 3 + 4 2 mM PPi
- [0136] 5 + 6 3 mM PPi
- [0137] 7 + 8 4 mM PPi
- [0138] 9 + 10 5 mM PPi
- [0139] 11 + 12 0 mM PPi
- [0140] PCR 생산물의 비교할 만한 수준은 PPi 및 PPase 모두가 없는 반응에 대해 비교할 때 나타났다.
- [0141] 실시예는 1 mM 이하의 PPi 농도를 사용하여서 반복 실행되었다. 결과(도시되지 않음)는 0.4 mM PPi가 완전히 PCR 반응을 억제하지 못하였으나, 0.6 mM 농도에서는 PCR이 전혀 실행되지 않았다는 것을 나타내었다.
- [0142] 실시예 4
- [0143] PCR 분석
- [0144] 본 발명의 방법은 이후에 정확한 크기의 PCR 생산물을 생성하기 위해서 "핫 스타트" 반응을 필요로 하는 분석 시스템에 적용되었다.
- [0145] 분석은 사람 안지오텐신(angiotensin) 유전자의 321 bp 단편의 증폭에 기초를 둔다. 분석은 베타인(betaine)(EP-A-0962526 - 특히 실시예 8)의 존재하에서 정확한 증폭 생산물만을 생성할 것이라고 인정되어 왔다.
- [0146] 베타인 없이 핫스타트 DNA 폴리머라제는 비-특이적 증폭 생산물을 거의 생산하지 않거나 전혀 생성하지 않은 반면에 비-핫스타트 DNA 폴리머라제 PCR은 상당 수의 비-특이적 증폭 생산물을 생성한다.
- [0147] 안지오텐신 분석에 사용되는 PCR 상태는 하기와 같이 요약될 수 있다.
- | [0148] 시약 | 용적 | 최종 농도 |
|-------------------------------------|----------------|---------------------|
| [0149] 10 x 반응 완충액 | 5 $\mu\ell$ | 1 x |
| [0150] 25 mM MgCl ₂ | 3 $\mu\ell$ | 1.5 mM |
| [0151] 5 mM dNTPs | 2 $\mu\ell$ | 200 μM |
| [0152] 5' 프라이머 (100 μM) | 0.25 | 0.5 / μM |
| [0153] 3' 프라이머 (100 μM) | 0.25 | 0.5 / μM |
| [0154] 주형 100 ng / $\mu\ell$ | 50 ng | 사람 엑소소말(xsomal) DNA |
| [0155] 5 M 베타인 | 10.0 | 1 M |
| [0156] DNA 폴리머라제(5 u/ $\mu\ell$) | 0.25 | 1.25 u |
| [0157] 전체 용적에 대한 물 | 50.0 $\mu\ell$ | |
- [0158] 안지오텐신 프라이머 서열
- [0159] 5' 프라이머 GCA ACG CCC CTC ACT ATA AA (서열 번호 16)
- [0160] 3' 프라이머 GCA CCC CGC CCT TGA AGT CC (서열 번호 17)
- [0161] 1 x 반응 완충액 : 10 mM 트리스, pH 8.0, 50 mM KCl.
- [0162] 분석을 위한 PCR 상태는 하기와 같다 :

- [0163] i) 95 °C 2.00 분 이하
- [0164] ii) 15 초 동안 95 °C
- [0165] 30 초 동안 50 °C
- [0166] 30 초 동안 72 °C의 35회 순환
- [0167] iii) 7분 동안 72 °C
- [0168] iv) 25 °C 고정.
- [0169] 반응은 실시예 3에서 기술한 것과 같이 3 mM PPi 및 0.2 u PPase의 존재하에서 PE9700 인스트루먼트를 사용하여 수행되었다.
- [0170] 결과는 레인이 하기의 반응을 나타내는 도 4에서 도시되었다.
- [0171] **레인**
- [0172] 1 표준적인 Taq 폴리머라제 PCR - 베타인 부재 - 많은 부정확한 프라이밍
- [0173] 2 표준적인 Taq 폴리머라제 PCR - 베타인 존재 - 밝은 밴드는 일부의 부정확한 프라이밍을 가진 정확한 생산물이다
- [0174] 3 표준적인 Taq 폴리머라제 PCR - 베타인 부재 및 3 mM PPi와 0.2 u Sac PPase 존재 - 부정확한 프라이밍 전혀 없음 - 95 °C에서 5분 변성
- [0175] 4 표준적인 Taq 폴리머라제 PCR - 베타인 존재 또한 3 mM PPi와 0.2 u Sac PPase 존재 - 정확한 생산물만 존재 - 95 °C에서 5분 변성
- [0176] 5 + 6 3과 동일하나 95 °C에서 2분만 변성
- [0177] 7 + 8 4와 동일하나 95 °C에서 2분만 변성
- [0178] 본 발명의 방법을 사용하여서, 효과적인 "핫스타트" 반응이 성취된다는 것은 명확하다. 명확한 단일 생산물 밴드는 베타인 존재하에서 PPi 및 Sac PPase를 사용하여서 획득할 수 있다. 게다가, 베타인 부재에서조차도 부정확한 프라이밍은 발견되지 않았다.
- [0179] 실시예 5
- [0180] 주위 온도에서 저장의 효과
- [0181] 안지오텐신 분석을 실시하기 전에 0.2 u Sac PPase 및 3 mM PPi를 함유한 PCR 혼합물을 20 °C 실온에서 다양한 시간 동안 방치하는 효과가 연구되었다. Sac PPase는 내열성 효소임에도 불구하고, 주위 온도에서 낮은 수준의 효소 활성이 있을 수 있다. 이는 DNA 폴리머라제를 억제/정지시키기에 불충분한 반응중 PPi를 유도하여 프라이머 신장 및 "핫스타트" 기능성 부족을 유도할 수 있다.
- [0182] 실시예 4의 방법이 반복되었으나 반응 혼합물은 분석을 실시하기 전에 2 시간까지의 다양한 시간동안 주위 온도에서 보관되었다.
- [0183] 결과는 하기의 내용으로 도 5에서 도시되었다 :
- [0184] 상위 줄은 제시된 시간동안 실온에서 시약의 항온처리 후 안지오텐신의 통상적인 Taq 폴리머라제 PCR(베타인 존재 및 부존재)의 결과를 제시한다 ; 그리고
- [0185] 하위 줄은 분석 혼합물이 50 μ l PCR 당 3 mM PPi 및 0.2 u PPase를 함유하는 모든 경우에서, 본 발명의 방법에 따른 분석의 유사한 세트의 결과를 제시한다.
- [0186] **레인 베타인의 존재 22 °C에서 시간(실온)**
- [0187] 1 + 2 - 0

[0188]

3 + 4

+

0

[0189]

5 + 6

-

30 분

[0190]

7 + 8

+

30 분

[0191]

9 + 10

-

60 분

[0192]

11 + 12

+

60 분

[0193]

13 + 14

-

120 분

[0194]

15 + 16

+

120 분

[0195]

두 시간 후까지도, 본 발명에 따라 실시된 분석은 예상한 것과 같이 기능하였는데, 이는 Sac PPase에 의한 PPi의 불충분한 주위 온도 분해가 있다는 것을 제시한다.

[0196]

도 5에서 도시된 결과는, PCR 전에, 실온에서 PCR 혼합물의 2 시간 항온처리는 PPi 및 Sac PPase가 사용되었다면 특이성에 대한 효과가 없었다는 것을 제시하였다.

[0197]

실시예 6

[0198]

본 발명의 방법에서 다른 내열성 PPase 효소의 사용

[0199]

실시예 4에서 기술된 분석은 Sac PPase 대신에 다른 상업적으로 이용 가능한 내열성 PPase(활성의 상이한 단위 정의를 가짐)를 사용하여 유사한 반응으로 반복 실시되었다. 결과는 레인이 하기의 반응을 나타내는 도 6에서 도시되었다 :

[0200]

레인

[0201]

1 + 2

표준적인 Taq 폴리머라제 PCR - 베타인 부재

[0202]

3 + 4

표준적인 Taq 폴리머라제 PCR - 베타인 존재

[0203]

5 + 6

표준적인 Taq 폴리머라제 PCR - 베타인 부재 그러나 3mM PPi 및 0.2 u Sac PPase 포함

[0204]

7 + 8

표준적인 Taq 폴리머라제 PCR - 베타인 존재 및 3mM PPi 및 0.2 u Sac PPase 포함

[0205]

9 + 10

표준적인 Taq 폴리머라제 PCR - 베타인 부재 그러나 3mM PPi 및 10 u* 씨모코쿠스 리토랄리스 PPase 포함

[0206]

11 + 12

표준적인 Taq 폴리머라제 PCR - 베타인 부재 및 3mM PPi 및 10 u* 씨모코쿠스 리토랄리스 PPase 포함

[0207]

상기 경우에 사용된 * 단위는 제조사에 의해서 부가되었으며 표준적인 반응 상태(50 mM 트리신[pH 8.5], 1 mM MgCl₂, 0.32 mM PPi, 0.5 ml의 반응 부피의 75 °C에 10 분 반응)하에서 분당 인산 40 나노몰을 생성할 수 있는 효소의 양으로 정의된다.

[0208]

씨모코쿠스 리토랄리스 PPase(뉴 잉글랜드 바이오랩사로부터 이용가능)는 상기 분석에서 Sac PPase와 동일한 효과를 가지는 것으로 나타난다.

[0209]

실시예 7

[0210]

본 발명의 방법에서 상이한 내열성 DNA 폴리머라제의 사용

[0211]

다양한 내열성 DNA 폴리머라제가 본 발명의 방법 및 일부 비교 분석에서 사용되었다. 이는 몇몇의 비-교정적(non-proofreading)인 씨머스 종 DNA 폴리머라제, 교정적(proofreading)인 호열성 아르킬 DNA 폴리머라제 그리고 비-교정적 및 교정적 DNA 폴리머라제의 혼합물을 포함하였다.

[0212]

실시예 1에서 기술된 것과 같이 500 bp 람다 PCR을 사용하여 모두 실험되었고(도 7a 및 도 7b), 일부는 실시예 4에서 기술된 것처럼 안지오텐신 분석을 사용하여 실험되었다(도 8a 및 도 8b).

[0213]

분석 조건의 자세한 것은 하기에 요약되었다 :

[0214] 도 7a - 씨머스 DNA 폴리머라제

[0215] 레인

[0216] 상위 줄

[0217] 1 + 2 Taq 폴리머라제, 0 mM PPi 및 PPase 부존재

[0218] 3 + 4 Taq 폴리머라제, 3 mM PPi 및 PPase 부존재

[0219] 5 + 6 Taq 폴리머라제, 3 mM PPi 및 0.2 u Sac PPase

[0220] 7 + 8 Tbr 폴리머라제, 0 mM PPi 및 PPase 부존재

[0221] 9 + 10 Tbr 폴리머라제, 3 mM PPi 및 PPase 부존재

[0222] 11 + 12 Tbr 폴리머라제, 3 mM PPi 및 0.2 u Sac PPase

[0223] 하위 줄

[0224] 1 + 2 Tth 폴리머라제, 0 mM PPi 및 PPase 부존재

[0225] 3 + 4 Tth 폴리머라제, 3 mM PPi 및 PPase 부존재

[0226] 5 + 6 Tth 폴리머라제, 3 mM PPi 및 0.2 u Sac PPase

[0227] 7 + 8 TspNH 폴리머라제, 0 mM PPi 및 PPase 부존재

[0228] 9 + 10 TspNH 폴리머라제, 3 mM PPi 및 PPase 부존재

[0229] 11 + 12 TspNH 폴리머라제, 3 mM PPi 및 0.2 u Sac PPase

[0230] 도 7b - 아르킬 교정적인 DNA 폴리머라제

[0231] 레인

[0232] 상위 줄

[0233] 1 + 2 Pfu 폴리머라제, 0 mM PPi 및 PPase 부존재

[0234] 3 + 4 Pfu 폴리머라제, 3 mM PPi 및 PPase 부존재

[0235] 5 + 6 Pfu 폴리머라제, 3 mM PPi 및 0.2 u Sac PPase

[0236] 7 + 8 9° N 엑소-폴리머라제, 0 mM PPi 및 PPase 부존재

[0237] 9 + 10 9° N 엑소-폴리머라제, 3 mM PPi 및 PPase 부존재

[0238] 11 + 12 9° N 엑소-폴리머라제, 3 mM PPi 및 0.2 u Sac PPase

[0239] 하위 줄

[0240] 1 + 2 VENT 폴리머라제, 0 mM PPi 및 PPase 부존재

[0241] 3 + 4 VENT 폴리머라제, 3 mM PPi 및 PPase 부존재

[0242] 5 + 6 VENT 폴리머라제, 3 mM PPi 및 0.2 u Sac PPase

[0243] 도 8a - PPi 및 Sac PPase의 부존재하에서 안지오텐신 분석(베타인 존재 및 부존재)

[0244] 레인

[0245] 1 + 2 Taq 폴리머라제 - 베타인 부존재

[0246]	3 + 4	Taq 폴리머라제 - 베타인 존재	
[0247]	5 + 6	아큐라제 폴리머라제 - 베타인 부존재	
[0248]	7 + 8	아큐라제 폴리머라제 - 베타인 존재	
[0249]	9 + 10	Tbr 폴리머라제 - 베타인 부존재	
[0250]	11 + 12	Tbr 폴리머라제 - 베타인 존재	
[0251]	13 + 14	Tth 폴리머라제 - 베타인 부존재	
[0252]	15 + 16	Tth 폴리머라제 - 베타인 존재	
[0253]	도 8b - PPi 및 Sac PPase를 사용한 안지오텐신 분석(베타인 존재 및 부존재)		
[0254]	대조 레인 1 - 4 (상위 줄) 및 12 - 16 (하위 줄)		
[0255]	레인		
[0256]	상위 줄		
[0257]	1 + 2	Taq 폴리머라제 - 베타인 부존재 그러나 3mM PPi 존재 -	Sac PPase 부존재
[0258]	3 + 4	Taq 폴리머라제 - 베타인 존재 그리고 3mM PPi 존재 -	Sac PPase 부존재
[0259]	하기 모두는 3mM PPi 및 0.2 u Sac PPase 존재		
[0260]	5 + 6	Taq 폴리머라제 - 베타인 부존재	
[0261]	7 + 8	Taq 폴리머라제 - 베타인 존재	
[0262]	9 + 10	아큐라제 폴리머라제 - 베타인 부존재	
[0263]	11 + 12	아큐라제 폴리머라제 - 베타인 존재	
[0264]	13 + 14	Tbr 폴리머라제 - 베타인 부존재	
[0265]	15 + 16	Tbr 폴리머라제 - 베타인 존재	
[0266]	하위 줄		
[0267]	하기 모두는 3mM PPi 및 0.2 u Sac PPase 존재		
[0268]	1 + 2	Tth 폴리머라제 - 베타인 부존재	
[0269]	3 + 4	Tth 폴리머라제 - 베타인 존재	
[0270]	5 + 6	TspNH 폴리머라제 - 베타인 부존재	
[0271]	7 + 8	TspNH 폴리머라제 - 베타인 존재	
[0272]	9 + 10	Pfu 폴리머라제 - 베타인 부존재	
[0273]	11 + 12	Pfu 폴리머라제 - 베타인 존재	
[0274]	13 + 14	Taq 폴리머라제 대조군 - 베타인 부존재 및 PPi 또는 PPase의 부존재	
[0275]	15 + 16	Taq 폴리머라제 대조군 - 베타인 존재 및 PPi 또는 PPase의 부존재	
[0276]	실험된 모든 DNA 폴리머라제는 PPi에 의해 억제되었고 상기 억제는 Sac PPase로 극복될 수 있다.		

[0277] 비교 실시예 8

[0278] 통상적인 "핫스타트" 방법론과 본 발명의 방법의 비교

[0279] 화학적으로 변형된 Taq 폴리머라제(US 특허 제5,677,152호에서 기술된 것처럼 변형)는 베타인의 부존재하에서 일부의 부정확한 PCR 생산물을 생성하지만 베타인의 존재하에서는 정확한 생산물을 생성한다는 것을 제시하는

일부 초기 결과(도 9 및 도 10)가 있다.

- [0280] 도 9 안지오텐신 분석
- [0281] **레인**
- [0282] 1 + 2 Taq 폴리머라제 - 베타인 부존재
- [0283] 3 + 4 Taq 폴리머라제 - 베타인 존재
- [0284] 5 + 6 화학적으로 변형된 Taq 폴리머라제 - 베타인 부존재
- [0285] 7 + 8 화학적으로 변형된 Taq 폴리머라제 - 베타인 존재
- [0286] 9 + 10 본 발명의 방법(3 mM PPi 및 2 u Sac PPase) 베타인 부존재
- [0287] 11 + 12 본 발명의 방법(3 mM PPi 및 2 u Sac PPase) 베타인 존재
- [0288] 상기 상황에서, 화학적으로 변형된 효소는 95 °C에서 10분 동안 활성화되기까지 불활성인 것으로 보인다. 이러한 예비적 항온처리가 없으면, 보잘것없는 양의 PCR 생산물이 생성되었다. 하지만, 베타인 부재하에서의 명백히 부정확한 프라이밍 및 잘못된 PCR 생산물의 생성은, 화학적으로 변형된 Taq가 실온에서는 불활성이므로 그 이유를 설명하기가 어렵다.
- [0289] 도 10 Taq 및 항-Taq 항체를 사용한 안지오텐신 분석
- [0290] **레인**
- [0291] 1 + 2 항-Taq 항체 + Taq 폴리머라제 - 베타인 부존재
- [0292] 3 + 4 항-Taq 항체 + Taq 폴리머라제 - 베타인 존재
- [0293] 핫스타트를 중재하는 항-Taq DNA 폴리머라제 항체에서, 부정확한 생산물의 상당수는 베타인 부존재(베타인 부존재시 표준적인 Taq 폴리머라제 PCR에 유사)에서 생성되고 소수의 부정확한 생산물 역시 베타인 존재시 정확한 생산물과 함께 생성된다.
- [0294] 본 발명의 방법은 상기의 상업용 핫스타트 방법론보다 더 특이적인 빠른 PCR 반응을 가능케 하는 것과 같다.
- [0295] 실시예 9
- [0296] 애로피룸 페르닉스로부터 무기 피로포스파타제의 분리
- [0297] 애로피룸 페르닉스는 J. C. M. 배양 컬렉션에서 획득할 수 있었다. 무기 피로포스파타제는 클로닝되어, 발현되고 정제되었다.
- [0298] 애로피룸 페르닉스로부터 무기 피로포스파타제의 클로닝 및 발현
- [0299] 애로피룸 페르닉스의 피로포스파타제 유전자를 포함하는 게놈 서열은 도 11에서 도시되었다. 사용된 프라이머는 애로피룸 페르닉스의 게놈 서열로부터 설계되었다. 이는 굵은 글씨로 나타난 제한 부위와 함께 5'에서 3'으로 제시되었다.
- [0300]
- | |
|---|
| 상위 프라이머, Nde I 위치의 도입 : (서열 번호 18) |
| TGCATGCATATGACAGGCTGCTGAAAATTG |
| 하위 프라이머, Hind III 위치의 도입 : (서열 번호 19) |
| TAAGTGT AAGCTT GACTGTGGGGCGGTGAAAG |
- [0301] 다른 피로포스페이트 유전자와 함께 게놈으로부터 추정 서열의 정렬은 나중의 ATG가 시작 메티오닌이어야 하고 정보은행(도 11에서 서열 번호 1로 이텔릭체로 도시)에서 보이는 것이 아니며 효소의 아미노산 서열은, 사실, 서열번호 25에서 도시되는 것이라는 것을 제안하였다. 그러므로 프라이머는 나중의 메티오닌(도 11에서 서열 번호 1에 굵은 글씨로 제시)에 상응하도록 설계되었다.
- [0302] PCR은 상기 프라이머 50 pM과 함께 100 μ l 부피에서 애로피룸 페르닉스 DNA 100 ng을 사용하여 작동되었다. 20회 순환이 55 °C 어닐링 및 45초 신장 시간으로 작동되었다.

- [0303] 94 ℃에서 3분의 초기 고정
- [0304] 94 ℃, 10 초, 55 ℃, 10 초, 68 ℃, 45초의 20회 순환.
- [0305] 72 ℃에서 7분의 최종 고정
- [0306] **PCR 상태**
- [0307] 50 pM 상위 프라이머 (5'..TGCATG**CATATG**ACAGGCTGTCTGAAAATTG..3' - 서열번호 18)
- [0308] 50 pM 하위 프라이머 (5'..TAAGTGT**AAGCTT**GACTGTGGGGCGGTGAAAG..3' - 서열번호 19)
- [0309] 1.5 mM MgCl₂
- [0310] 1.25 u 아큐라제 DNA 폴리머라제 (제네시스 리미티드사의 Cat. No. AC001)
- [0311] 75 mM 트리스, pH 8.8
- [0312] 20 mM 황산 암모늄
- [0313] 0.1 % (w/v) 트윈20
- [0314] 100 ng 애로피룸 페르닉스 게놈 DNA
- [0315] PCR 생산물은 도 13에서 도시한 것과 같이 686 염기 쌍의 길이이었다. PCR 생산물은 제조자가 추천한 상태에 따라서 프레파놀™ (제네시스 리미티드사의 Cat. No. P001) 침전시키고 최종적으로 10 mM 트리스, 0.1 mM EDTA에서 재현탁되었다.
- [0316] PCR 생산물은 Nde I 및 Hind III의 제한 효소에 의해 분해되고, 페놀로 추출되며, 에탄올로써 침전되고 10 mM 트리스, 0.1 mM EDTA에서 재현탁되었다.
- [0317] pTTQ18NHK 벡터(도 15에서 도시)는 또한 Nde I 및 Hind III의 제한 효소에 의해 분해되고, 페놀로 추출되며, 에탄올로써 침전되고 10 mM 트리스, 0.1 mM EDTA에서 재현탁되었다.
- [0318] 100 ng 절단된 PCR 서열은 하룻밤 동안 16 ℃에서 1 x NEB 라이게이션 완충액 10 μl의 총 부피에서 뉴 잉글랜드 바이오랩사의 T4 DNA 리가제 200 u를 사용하여서 절단된 pTTQ18NHK 벡터(도 16에서 도시) 1 μg으로 연결시켰다. 플라스미드 벡터는 유일한 Eco0109 제한 효소 위치에 삽입된 카나마이신 항생 물질의 유전자 및 원형 벡터의 EcoR I 위치 및 Hind III 위치 사이에 삽입된 대체 다중링크를 함유한 pTTQ18NHK(도 14에서 도시), 즉 pTTQ18 벡터의 변형된 형태[참고 : Stark MJ, Gene, 1987 ; 51(2-3) : 255-67]이었다.
- [0319] 물 20 μl는 첨가되고 반응물을 20분 동안 70 ℃로 가열시킨다. 3 M 아세트산 나트륨 1/10 부피, pH 5.2 및 에탄올 2 부피를 첨가하였다. 혼합되고 1시간 동안 -20 ℃에서 보관시켰다. 10분 동안 10,000g으로 마이크로원심분리 후, 상층액은 펠렛화된 DNA로부터 제거되고 DNA는 물 5 μl에 재현탁되었다.
- [0320] 0.5 μl는 이 콜라이 TOP10F' 세포 속으로 전기적으로 천공시키고 37 ℃에서 1 시간 회복기를 가진 후, 세포의 분취량을 카나마이신 루리아 브로쓰 아가 배양접시에 평판 배양시켰다. 배양접시를 37 ℃에서 하룻밤 동안 항온 처리하였다.
- [0321] 콜로니에는, 신선한 카나마이신 루리아 브로쓰 아가 배양접시 및 20 mg/ml XGAL 1 μl 및 아가 겔 ml 당 0.5 M IPTG 1 μl의 부가로 제조된 카나마이신 루리아 브로쓰 아가 배양접시(KIX 배양접시) 둘다에 이중으로 그리드(grid)를 설치하였다.
- [0322] 37 ℃에서 하룻밤 동안 항온 처리 후, KIX 배양 접시상의 흰 콜로니는 애로피룸 페르닉스 PCR 생산물에 상응하는 삽입물의 존재를 위해서 M13 정방향 및 역방향 프라이머를 가지고 PCR에 의해서 선별되었다.
- [0323] 701 bp 생산물을 함유하는 9 개의 콜로니는 100 μg/ml 카나마이신이 들어있는 20 ml LB에서 1.0 의 OD600까지 성장시키고 나서 발현은 최종적으로 0.5 mM로 되는 IPTG의 부가로 유도되었다. 세포는 추가로 4시간 동안 성장되고 나서 세포를 수거하고 -20 ℃에서 동결 보관하였다.
- [0324] 세포는 pH 7.9의 50 mM 트리스-HCl 0.5 ml, 50 mM 텍스트로스, 1 mM EDTA와 pH 7.9의 10 mM 트리스-HCl 0.5 ml, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 0.5 % (v/v) 트윈 20, 0.5 % (v/v) 노니테트-P40의 부가 및 80 ℃에서 15분동안 항

온처리에 의해서 용해되었다.

- [0325] 실온에서 10분동안 10,000 g로 원심분리 후에, 각각 용해된 세포로부터의 분취량은 12 % 겔을 사용한 SDS 폴리아크릴아미드 겔 전기영동에 의해서 분석되었다. 겔은 전기영동 이후에 쿠마시 블루 R250으로 염색되었다. 모든 샘플은 대략 23 kDa의 밴드를 나타내고 이는 추정되는 PPase의 크기에 상응한다.
- [0326] 동일한 샘플은 이후에 참고 문헌[참고 : Jukka K. Heinonen, Reijo J. Lathi. (1981) Analytical Biochemistry, Vol. 113, pp313-317]의 색체계 분석을 사용하여서 75 °C에서 PPase 활성화에 대해 분석되었다.
- [0327] 모든 샘플은 양성으로 제시되는데, 즉 발현된 단백질이 호열성 무기 피로포스파타제 활성을 갖추었다는 것을 확인해준다.
- [0328] 첫 번째 클론은 이어서 단백질의 대규모 생산에 사용되었다.

[0329] 피로포스파타제의 정제

- [0330] 상기 클론은 LB 24 리터에 보관하였다. OD₆₀₀이 대략 1.5 에 도달한 때, 배양물은 0.5 mM IPTG로써 유도되고 추가적 4시간동안 성장하도록 방치하였다. 세포는 이후에 수확되어서 세포 펠렛은 용해시킨다. 발현된 효소는 페닐-세파로스 CL4B(아메르삼 파마시아 바이오테크(Amersham Pharmacia Biotech)사), 하이드록실아파티트(바이오-레드 래보레토리스사) 및 하이-퍼포먼스 Q 세파로스(아메르삼 파마시아 바이오테크사)상에서 표준적인 칼럼 크로마토그래피에 의해서 정제되어서, 최종적으로 - 20 °C에서 pH 8.0인 20mM 트리스-HCl, 100 mM NaCl, 0.5 % (v/v) 트윈20, 0.5 % (v/v) 노니데트 P40, 0.1 mM EDTA, 1mM 디티오프레이톨 및 50 % 글리세롤에서 보관되었다.

[0331] 실시예 10

[0332] 에이. 페르닉스 무기 피로포스파타제 효소를 사용한 PCR 분석

- [0333] 본 발명의 방법은 에이. 페르닉스 무기 피로포스파타제 효소를 사용하여서 수행되었다. 분석은 사람 B-액틴 유전자의 증폭에 대해 기초를 둔다.
- [0334] 상기 분석에서, 키트는 유로젠테크 에스. 에이사[참고 : 벨지움, 4102 세라잉, 루 보이스 세인트-진 14, 파크 사이언티피크 두 사르트-틸만에 위치한 유로젠테크 에스. 에이.]로부터 획득한 것(Cat. No. RT-QP73-05)이 사용되었다. 키트에 제공된 핫스타트 Taq 폴리머라제 대신에, 표준 Taq 폴리머라제를 사용하였다.

[0335] **PCR 반응 혼합물**

- [0336] 1 x 반응 완충액
- [0337] 200 μM, dATP, dCTP, dGTP 및 400 μM dUPT
- [0338] 0.025 u/μl 변형되지 않은 Taq 폴리머라제
- [0339] 0.002 u/μl 애로피룸 페르닉스 무기 피로포스파타제
- [0340] 0.3 μM 5' 프라이머 (5' GAC TCG TCA TAC TCC TGC TTG CT 3' - 서열 번호 22)
- [0341] 0.3 μM 3' 프라이머 (5' CAT TGC CGA CAG GAT GCA GAA 3' - 서열 번호 23)
- [0342] 0.15 μM TaqMan 프로브 (FAM-ATCCACATCTGCTGGAAGGTGGACAGT-TAMRA- 서열 번호 24)
- [0343] 5 mM MgCl₂
- [0344] 2 mM NaPPi
- [0345] 비활성 참조물
- [0346] 7.5 ng (2500 복제물)을 가진 사람 유전자 DNA 시작 물질의 4 회석물 중 1

- [0347] **순환 조건**
- [0348] 94 °C에서 3분의 초기 변성
- [0349] 94 °C, 15 초 및 60 °C, 60 초의 40회 순환
- [0350] 결과는 도 19에서 도시되었다.
- [0351] 결론적으로, PCR을 억제하기 위해서 피로포스페이트를 사용하고, 이 후 예를 들어 80 °C 내지 95 °C에서 내열성 PPase의 사용에 의해서 상기 억제를 제거함으로써, 본 발명의 방법은 증가된 특이성의 부가적 이점과 함께 빠른 속도로 핫스타트 PCR과 동일한 방식으로 진행한다는 것으로 본 발명자들은 간주한다.
- [0352] 상기 명세서에서 언급된 모든 참고 자료는 여기서 참고로서 포함된다. 본 발명의 다른 변형은 본 발명의 범위 및 정신에서 벗어나지 않고 당업자에게 명백할 것이다. 본 발명이 특수하게 선호되는 양태와 관련되어 기술되었음에도 불구하고, 청구된 본 발명은 상기 특수한 양태로 지나치게 제한되어서는 안 된다고 이해되어야 한다. 실제로, 당업자에게 명백한, 본 발명을 수행하는데 기술된 양식의 다양한 변형은 하기 청구항의 범위내에 있는 것으로 의도된다.

도면의 간단한 설명

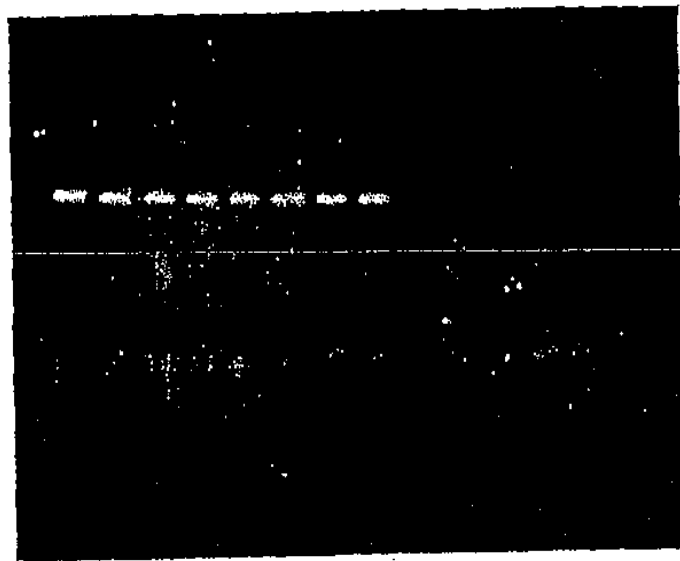
- [0068] 도 1은 PPi가 피로인산사나트륨인 PPi의 다양한 양의 존재하에서 PCR을 실시한 결과를 도시한다 ;
- [0069] 도 2는 3 mM PPi의 부재 및 존재하에서 증가하는 $MgCl_2$ 의 영향을 도시한다 ;
- [0070] 도 3은 본 발명의 방법 및 통상적인 PCR 반응을 사용하여 획득한 결과를 도시한다 ;
- [0071] 도 4는 통상적인 PCR 분석과 비교한 분석에서 본 발명의 방법을 사용하여 획득한 결과를 도시한다 ;
- [0072] 도 5는 통상적인 혼합물과 비교하여, 본 발명의 방법에서 사용한 PCR 반응 혼합물의 저장 안정성을 시험해보기 위한 실험의 결과를 도시한다 ;
- [0073] 도 6은 본 발명의 방법에서 상이한 PPase의 사용 결과를 도시한다 ;
- [0074] 도 7a 및 도 7b와 도 8a 및 도 8b는 본 발명의 방법 및 다수의 상이한 DNA 폴리머라제를 사용한 PCR 실험의 결과를 도시한다 ;
- [0075] 도 9는 본 발명의 방법과 통상적인 "핫 스타트" PCR을 비교한 실험의 결과를 도시한다 ;
- [0076] 도 10은 대안적인 통상의 PCR을 사용한 것을 제외하고는 유사한 분석을 수행하여 획득한 결과를 도시한다 ;
- [0077] 도 11은 서열 번호 1로 나타난 애로피룸 페르닉스의 유전자 서열[참고 : 진뱅크(GenBank) BA000002에 NC 000854로 기탁], 상응하는 아미노산 서열인 서열 번호 2 및 당해 효소의 서열(서열 번호 25)을 도시한다 ;
- [0078] 도 12는 서열 번호 2로 나타난 애로피룸 페르닉스의 단백질 서열을 포함하는, 상이한 PPase 서열(서열 번호 2 내지 9)의 정렬을 도시한다 ;
- [0079] 도 13은 애로피룸 페르닉스로부터 피로포스파타제 효소의 분리동안 생산된 686 염기 쌍 PCR 생산물(서열 번호 10)을 도시한다 ;
- [0080] 도 14는 애로피룸 페르닉스로부터 피로포스파타제의 분리에 사용된 다중링커 서열(서열 번호 11)을 도시한다 ;
- [0081] 도 15는 애로피룸 페르닉스로부터 피로포스파타제의 분리에 사용된 pTTQ18NHHK 벡터의 서열(서열 번호 12)을 도시한다 ;
- [0082] 도 16은 애로피룸 페르닉스로부터 피로포스파타제의 분리에 사용되는 PPase 서열(서열 번호 13)을 포함하는 pTTQ18NHHK 벡터의 서열(z = 종결점)을 도시한다 ;
- [0083] 도 17은 애로피룸 페르닉스로부터 무기 피로포스파타제를 사용한 본 발명의 방법의 결과를 도시한다.

도면

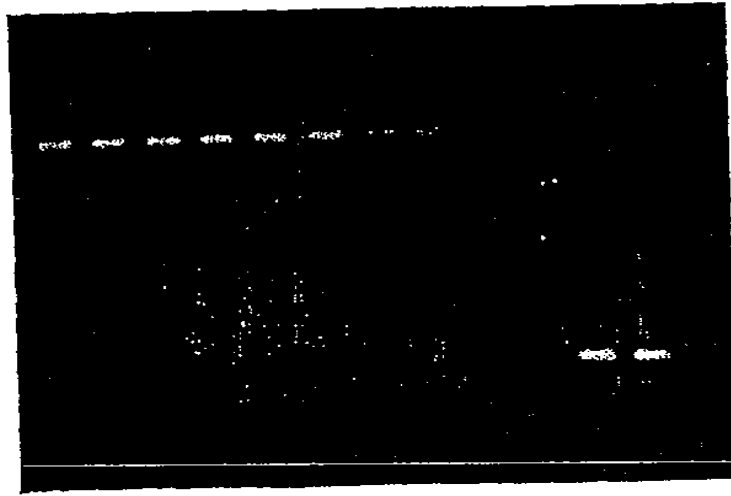
도면1



도면2



도면3



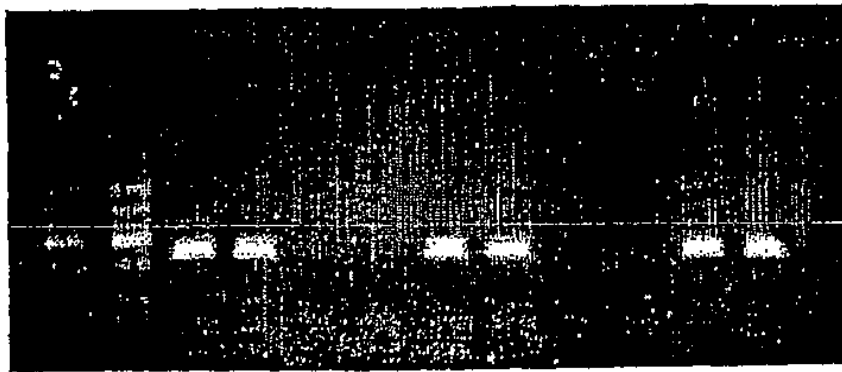
도면4



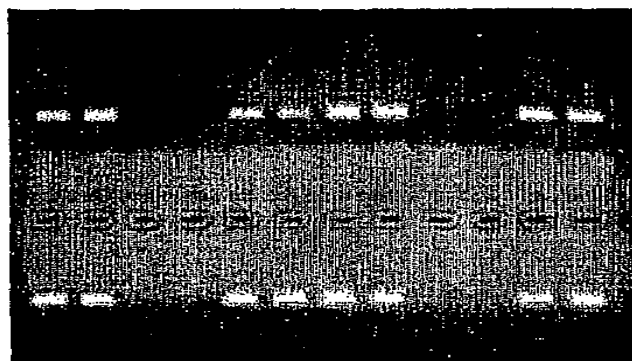
도면5



도면6



도면7a



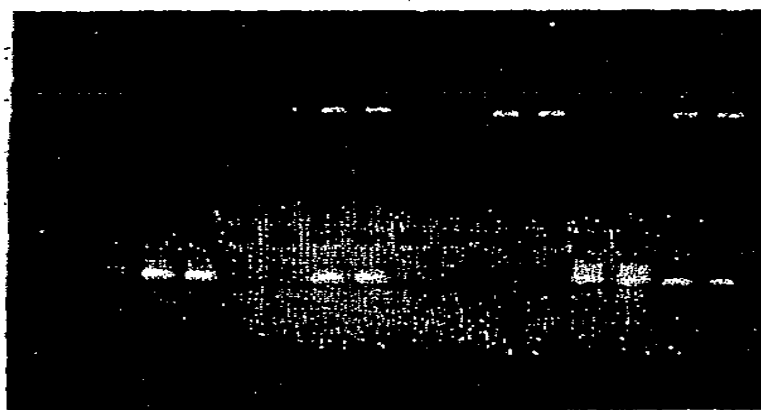
도면7b



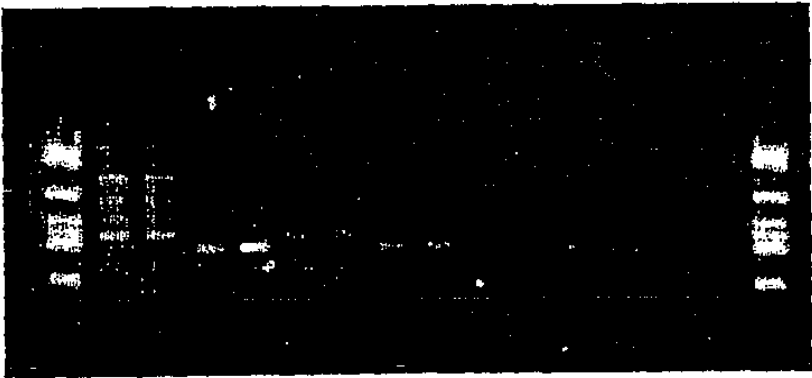
도면8a



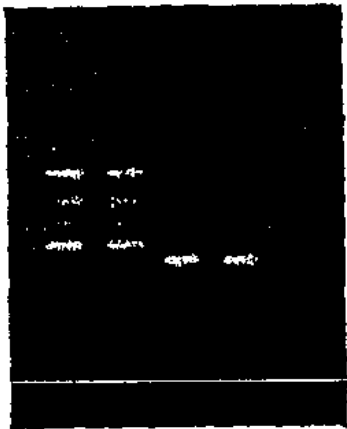
도면8b



도면9



도면10



도면11

에로피롬 페르닉스 서열

MWTILPSKTGFVNSLSFITRLAKLSVRRVHAMTGCLKIGPGDEAPDVVNVVIEIPMN
SSVKYEFDKAEACIVKVDRFLYTSMVYPFNYGFIPTGLEEDGDPVDVLVISREPVAPG
SLIEAVPVAVLDMEEDEEGPDSKVVAVPKAKLDPLFASYKDVGDIPDALKSKIKHFFE
HYKELEPGKWVRVTGWRPAADAKEIIRRAIERYKGA

(서열 번호 2)

서열 번호 1

1066801 taatcctaata tcgctttatg tggacgatcc ttcccagcaa aaccgggttt gttacagcc
1066861 ttagctttat aactcgacta gccaaactat cggtagacg ggtgcatgca atgacaggct
1066921 gtctgaaaat tggccttgga gatgaggctc cagatgttgt gaatgtcgtt atagagatac
1066981 ctatgaacag ttctgttaag tacgagttcg acaaggaggc gtgtattgtt aaggttgata
1067041 ggttccttta caccagcatg gtctacccct tcaactacgg gttcatacca ggcactctag
1067101 aggaggacgg agatcctgtt gacgttctag ttattagccg ggagcccggt gctcccggt
1067161 cgtttataga ggctgtgccc gtggcogtgt tagacatgga ggacgaggag ggtccggaca
1067221 gcaaggttgt tgcogtacct aaggccaagc tggacccctt attcgccagc tataaggacg
1067281 ttggcgacat acctgatgcc ctgaaatcca agataaagca cttcttcgag cactataagg
1067341 agctggagcc tggaaagtgg gttagagtga ctggatggag gcctgctgcc gatgcgaagg
1067401 agattataag gagggctata gagaggtata agggggcggt atgagggctt aacggctcac
1067461 gttttctggg agagtgtcgc acctttgagg gcgatcacc tcgccagcgt gcgtgtgctt
1067521 ttgtctatga ttatggctac agttcttcta gccgctttca ccgcccac agtcaataca
1067581 cttacaccta gaggttctgc gctgtatgct gtggatgtag ttgtagttaga cgccagcaca
1067641 ggatctgccc tgggtttctc ccggtttgtc gtatccgctt acagaggggg ggtcggggat
1067701 gtgggtgcta tctactcttc ggggggtctca gtatcagggt ctagtctgga aaggctgctg

MTGCLKIGPGDEAPDVVNVVIEIPMNSSVKYEFDKAEACIVKVDRFLYTSMVYPFNYG
FIPGLEEDGDPVDVLVISREPVAPGSLIEAVPVAVLDMEEDEEGPDSKVVAVPKAKL
DPLFASYKDVGDIPDALKSKIKHFFEHYKELEPGKWVRVTGWRPAADAKEIIRRAIE
RYKGA (서열 번호 25)

서열 번호 26

atgacaggct gtctgaaaat tggccttgga gatgaggctc cagatgttgt
gaatgtcgtt atagagatac ctatgaacag ttctgttaag tacgagttcg
acaaggaggc gtgtattgtt aaggttgata ggttccttta caccagcatg
gtctacccct tcaactacgg gttcatacca ggcactctag aggaggacgg
agatcctgtt gacgttctag ttattagccg ggagcccggt gctcccggt
cgcttataga ggctgtgccc gtggcogtgt tagacatgga ggacgaggag
ggtccggaca gcaaggttgt tgcogtacct aaggccaagc tggacccctt
attcgccagc tataaggacg ttggcgacat acctgatgcc ctgaaatcca
agataaagca cttcttcgag cactataagg agctggagcc tggaaagtgg
gttagagtga ctggatggag gcctgctgcc gatgcgaagg agattataag
gagggctata gagaggtata agggggcggt a

도면12

Claustal W를 사용한 PPase 서열의 정렬

Aeropyrum = 애로피룸 페르닉스	서열 번호 2
Sulfolobus = 설포로부스 설파라타리쿠스	서열 번호 3
E.coli = 에세리키아 콜라이	서열 번호 4
Aquifex = 아퀴펙스 애올리쿠스	서열 번호 5
Pho = 피로코쿠스 호리코쉬이	서열 번호 6
Pab = 피로코쿠스 아비시이	서열 번호 7
Tli = 탈모코쿠스 리토랄리스	서열 번호 8
Thermoplasma = 탈모플라즈마 아시도필룸	서열 번호 9

CLUSTAL W(1.8) 다중 서열 정렬

```

aeropyrum      MWTILPSKTFVNSLSFITRLAKLSVRRVHAMTGCLKIGP-GDEAPDVVNVVIEIPM-NS
sulfolobus      -----MKLSP-GKNAPDVVNVVIEIPQ-GS
E.coli          -----MSLLNGPA-GKDLPEDIYVVIEIPANAD
aquifex         -----MGYDQLPP-GKNPPEDIYVVIEIPQ-GS
Pho             -----MNPFDHLEP-GPNVPEVVYALIEIPK-GS
Pab             -----MNPFDHLEP-GPNVPEVVYALIEIPK-GS
Tli             -----MNPFDHLEP-GPEVPEVVYALIEIPK-GS
thermoplasma    -----MESFYHSVPVGVGPKPEEVYVIVEIPR-GS
                  . . . * : : . : *** .

aeropyrum      SVKYEFDKEACIVKDRFLYTSMVYFFNYGFIPTGLEEDGDPVDLVISREPVPAGSLIE
sulfolobus      NIKYEYDDDEGVIKVDRVLYTSMNYFFNYGFIPTGLEEDGDPDVLVITNYCLYPGSGVIE
E.coli          PIKYEIDKESGALFVDRFMSTAMFYPCNYGYINHILSLDGDVVDLVPTFPYFLOPGSVIR
aquifex         AVKYELDKDTGVIFVDRFLPTAMYYPFNYGFVPQTLADDGDPVDLVISREPVPVPGAVMR
Pho             RNKYELDKETGLLKLDRVLYTPFHYFPVDYGIIPRTWYEDGDPFDIMVIMREPTYPLTIE
Pab             RNKYELDKKTGLLKLDRVLYSPFFYPVDYGIIPRTWYDDDDPFDIMVIMREPTYPLTIE
Tli             RNKYELDKKTGLLKLDRVLYSPFFYPVDYGIIPQTWYDDDDPFDIMVIMREPTYPGVLIE
thermoplasma    RVKYEIAKDFPGMLVDRVLYSSVYFPVDYGLIPRTLYYDGDMDVMVLISQPTFGAIMK
                  *** .. : ** : : . * : * : * . * . * : * :

aeropyrum      AVPVAVLDMEDGEPDSKVAVPKAKLDPLFASAKYKDVGDIPDALKSKIKHFFEHYKELEP
sulfolobus      VRPIGILYMKDEGEDAKIVAVPKDKTDPSFSNICKINDLPQATKNTVHFFEHYKELEP
E.coli          CRPVGVLKMTDEAGEDAKLVAVPHSKLSKEYDHIKDVNDLPPELLKAQIAHFFEHYKDLK
aquifex         CRPIGMLMRDEAGIDTKVIAVPHEKLDPSYSNIKTVDNLPEIVREKIKHFFEHYKELEP
Pho             ARPIGLFFKMIDSGDKDYKVLAVPVE--DPYFKDWKDISDVPKAFLDEIAHFFKRYKELE-
Pab             ARPIGLFFKMIDSGDKDYKVLAVPVE--DPYFKDWKDISDVPKAFLDEIAHFFKRYKELE-
Tli             ARPIGLFFKMIDSGDKDYKVLAVPVE--DPYFNDWKDISDVPKAFLDEIAHFFQRYKELE-
thermoplasma    VRPIGMMKMVDQGETDNKILAVFDK--DPNVSYIKDLKDVNAHLDEIANFFSTYKILE-
                  * : : : * * . * : : * : . * : : : * : * : * :

aeropyrum      GKWVRVTGWRPAADAKEIIRRAIERYKGA-----
sulfolobus      GKYVKISGWSATEAKNRIQAIKRVSGGQZ-----
E.coli          GKWVKVEGWENAEAAKAEIVASFER-AKNKZ-----
aquifex         GKWVKVENWKLQDAIEEIKKGIENYKKNKEG---
Pho             GKEIIVEGWEGAEAAKREILRAIEYKKEFGKKEZ
Pab             GKEIIVEGWEGAEAAKREILRAIEYKKEFGSKEZ
Tli             GKEIIVEGWENAEAKQEIILRAIEYKKEFKKZ--
thermoplasma    KKETKVLGWEGKEAALKEIEVSIKMYEERYGKKNZ
                  * : . * * * . : :

```

도면13

686bp PCR 생산물(서열 번호 10)

굵은 글씨의 RE 위치, 이탤릭체의 PPase 유전자,
밑줄친 프라이머 위치

TGCATGCATATGACAGGCTGTCTGAAAATTGGTCTCGGAGATGAGGCTCCAGATGTTGTGAATGTCGTT
ATAGAGATACCTATGAACAGTTCTGTTAAGTACGAGTTCGACAAGGAGGCGTGTATTGTTAAGGTTGAT
AGGTTCCCTTTACACCAGCATGGTCTACCCCTTCAACTACGGGTTTATACCAGGCACTCTAGAGGAGGAC
GGAGATCCTGTTGACGTTCTAGTTATTAGCCGGGAGCCCGTTGCTCCCGGCTCGCTTATAGAGGCTGTG
CCCGTGGCCGTGTTAGACATGGAGGACGAGGAGGGTCCGGACAGCAAGGTTGTTGCCGTACCCAAGGCC
AAGCTGGACCCCTTATTCGCCAGCTATAAGGACGTTGGCGACATACCTGATGCCCTGAAATCCAAGATA
AAGCACTTCTTCGAGCACTATAAGGAGCTGGAGCCTGGAAAGTGGGTTAGAGTGACTGGATGGAGGCCT
GCTGCCGATGCGAAGGAGATTATAAGGAGGGCTATAGAGAGGTATAAGGGGGCGTGATGAGGSCTTAAC
GGCTCACGTTTTCTGGGAGAGTGTGCGACCTTTGAGGGCGATCACCTCGCCAGCGTGCCTGTGCTTTT
GTCTATGATTATGGCTACAGTCTTCTAGCCGCTTTCACGCCCCCACAGTCAAGCTTACACTTA

도면14

초기의 ATC부터 NdeI 위치 및 Hind III 위치까지의 pTTQ18NHK의 변형된 다중링커 서열(서열 번호 11)

Met Nde I
ATGCACCACCACCACCACCATATGGGCATGCTGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCG

ACCTGCAGGCATGCAAGCTT
 Hind III

도면15a

pTTQ18NHNK 서열(서열 번호12)

>pTTQ18NHNK 서열
 GAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAAGCTTTTCCA 60
 ATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGG 120
 CAAGAGCAACTCGGTCGCGCATACACTATTCTCAGAATCACTGGTTGAGTACTCACCAC 180
 GTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAAATTATGCAGTCTGCCATA 240
 ACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAAACGATCGGAGGACCGAAGGAG 300
 CTAACCGCTTTTTCGCAACAATGGGGGATCATGTAACTCGCCCTTGATCGTTGGGAACCG 360
 GAGCTGAATGAAGCCATACCAACGACGAGCGTGACACCAAGATGCCTGTAGCAATGGCA 420
 ACAACGTTGCGCAAACTATTAACCTGGCGAATCTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTA 480
 ATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGACGAGCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCT 540
 GGCCTGTTTATGTCTGATAAATCTGGAGCCGCTGAGCGTGGGCTCGCGGTATCATTTGCA 600
 GCACTGGGCGCAGATGCTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGAGTCA 660
 GCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGTAGGTGCTCACTGATTAAGCAT 720
 TGGTAATCTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATCTTTAGATTGATTAAACTCTCATTTT 780
 TAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTGGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAA 840
 CGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTGAGACCCCGTAGAAAAGATCAAGGATCTTCTTGA 900
 GATCCCTTTTCTGCGCTAATCTGCTGCTTGCAACAAAAAACCCGCTACCGAGCG 960
 CTGGTTTGTTCGCCGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGC 1020
 AGAGCGCAGATACCAATCTCTCTCTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAG 1080
 AACTCTGTAGCACCCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCTGTACCACTGCTGCTGCC 1140
 AGTGGCGATAAGTCTGTCTTACCGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCG 1200
 CAGCGCTCGGCTGAACGGGGGGTTCTGTCACACAGCCAGCTTGGAGCGAAGCACTTAC 1260
 ACCGAATCGAGTACCTACAGCGTGAGCATTTGAGAAAGCCACGCTTCCCGAAGGGAGA 1320
 AAGCGCGACAGGTATCCGCTAAGCGCGCAGGCTCGAAGCAGGAGCGCACGAGGGAGCTT 1380
 CCGAGGGGAAACGCTGCTATCTTTATAGTCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAG 1440
 CTCTGATTTTGTGATGCTGCTCAGGGGGCGGAGCTTATGGAAGAACGCCAGCAACGCG 1500
 GCTTTTTCAGGTTCTCTGCTCTTGTGCTGCTTTGCTCAGATGTTCTTTCTGCTGTA 1560
 TCCCCGTATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCG 1620
 AGCCGAACGACCCGAGCGCAGCGAGTCACTGAGCGAGGAGCGGAGAGCGCCCAATACGC 1680
 AATCCGCTCTCTCCCGCGCGTTGCGGATTCATTAATGCAAGATTAATTCATGTTTGA 1740
 CAGCTTATCATCGACTGACCGTGACCAATGCTTCTGGGCTCAGCGAGCATCGGAAGC 1800
 TTGGGTATGGCTGTGAGGTGTAATCACTGCATAATCTGTGCTGCTCAAGGCGCACTC 1860
 CCGTTCTGGATAATGTTTTCGCGCGACATCATACCGGTTCTGGCAATATTCTGAAAT 1920
 GAGCTGTGACAAATTAATCATCGGCTCGTATTAATGTGGAATTTGTGAGCGGATACAAAT 1980
 TTTCACAGGAAACACATATATGACACCAACCAACCAATATGGGCACTGCTGAATTCGA 2040
 GCTCGGTACCCGGGATCTCTAGAGTGCAGCTGACGAGTGAAGCTTGGCACTGGCCG 2100
 TCGTTTTCACACGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 2160
 CACATCCCCCTTTCGCGCAGCTGGCGTAATAGCGAGAGGCGCCGACCGATCGCCCTTCCC 2220
 AACAGTTGCGCAGCGTGAATGGCGAATGGCGCTGATGCGGTATTCTCTTACGCATC 2280
 TGTGCGGTATTTCACACCGCATAAATTCCTGTTTGGCGGATGAGAGAGATTTTCAGC 2340
 CTGATACAGATTAAATCAGAACGCGAGAGCGGCTCTGATAAAGCAAGATTGCTTGGCGG 2400
 AGTAGCGCGGTGGTCCCACTGACCCCATGCCGAATCAGAAAGTGAAGCGCGTAGCGCC 2460
 GATGGTAGTGTGGGCTCTCCCATGCGAGAGTAGGGAATGCCAGGCATCAAAATAAAGC 2520
 AAGGCTCAGTCGAAGACTGGGCCCTTCTGTTTATCTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTG 2580
 CTGAGTAGGACAAATCCGCGGGAGCGGATTTGAACGTTGCGAAGCAACGGCCCGGAGG 2640
 CTGGCGGCGAGGACGCCCGCATAAATGCGAGCATCAAAATTAAGCAGAGGCGCATCT 2700
 GACGGATGGCCCTTTTTCGCTTTCTACAACTCTTCTGCTCTCATATCTACAGCCATCC 2760
 CCCACAGATACGGTAAACTAGCCCTGTTTTCGATCAGGAAAGCAGGAAATTAAGTG 2820
 CACTCTCAGTACAATCTGCTGATGCGGCATAGTTAAGCCAGCCCGACACCCGCCAAC 2880
 ACCCGCTGACGCGCCTGACGGGCTGTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 2940
 GACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTCACCGTCATCACCAGAACGCGCGAG 3000
 ACCGAAAGGCGCTGATTAGAAAACCTCATCGAGCATCAATGAAGTGAATTTATTCATA 3060
 CTAGGATTATCAATACCATATTTTGAAGAAAGCCGTTCTGTAATGAAGGAGAAACTCA 3120
 CCGAGGCACTTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGCTGCGGATTCGAGTCTGCTCA 3180
 ACATCAATACAACTATTAAATTTCCCTCGTCAAAAATAAGGTTATCAGTGAGAAATCA 3240
 CCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAAATGGCAAAAGNTTATGCTTTCTTTCCAGACT 3300
 TGTTCACAGGCGCAGCCATTACGCTCGTCATCAAAATCACTCGCATCAACCAACCGTTA 3360
 TTTCAATTCGTGATTGCGCTGAGCGAGACGAATACGCGATCGCTGTTAAAGGACAAATTA 3420
 CAACAGGAATCGAATGCAACCGGCGCAGGAACACTGCCAGCGCATCAACAAATTTTCA 3480
 CCTGAATCAGGATATTCTCTAATACCTGGAATGCTGTTTCCCNNGGATCGCAGTGGTG 3540
 AATAACATGCATCATCAGGAGTACGGATAAATGCTTGTGAGTGGTGGGAAGGCGATAAT 3600
 TCCGTCAGCCAGTTTATGTCGACCATCTCATCTGTAAACATCATTTGGCAACGCTACCTTG 3660
 CCATGTTTCCAGAAACAACTCTGGCGCATCGGCTTCCCATACAAATCGATAGATTGTCGCA 3720
 CCTGATTGCCCGACATTATCGCGAGCCCATTTATACCATATAATCAGCATCCATGTTG 3780
 GAATTTATCGCGGCTCGAGCAAGACGTTTCCGTTGAATATGGCTCATACACCCCTT 3840
 GTATTACTGTTTATGTAAGCAGACGTTTATTGTTGATGATGATATATTTTATCTTGT 3900
 GCAATGTAACTACGAGGCTCGTGATACGCTATTTTATAGGTTAATGTCATGATAATA 3960

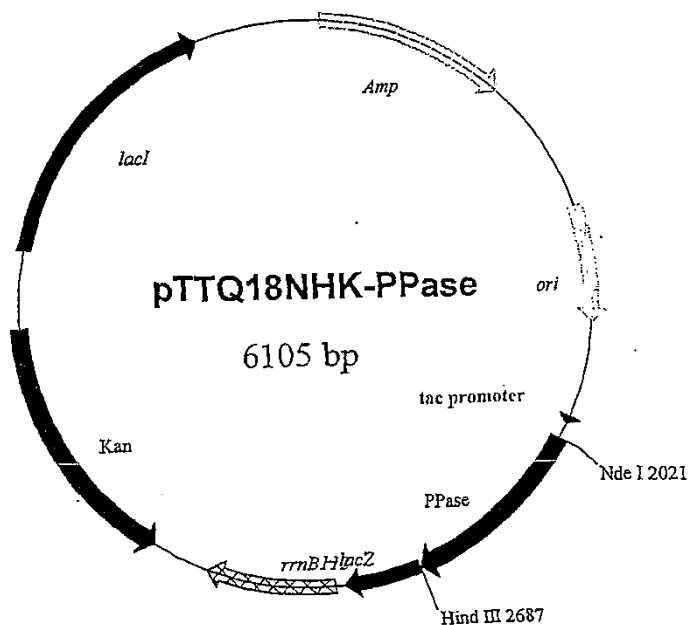
도면15b

```

ATGGTTTCTTAGACGTGAGGTTCTGTACCCGACACCATCGAATGGTGCAAAACCTTTTCGC 4020
GGTATGGCATGATAGCGCCCGGAAGAGAGTCAATTCAGGGTGGTGAATGTGAAACCAGTA 4080
ACGTTATACGATGTCGCAGAGTATGCCGGTGTCTCTTATCAGACCGTTTCCCGCGTG 4140
AACCAGGCCAGCCACGTTTCTGCGAAAACGCGGGAAAAGTGGAGCGGCGATGGCGGAG 4200
CTGAATTACATTTCCCAACCGCGTGGCACAACAACCTGGCGGGCAAACAGTCGTTGCTGATT 4260
GGCGTTGCCACCTCCAGTCTGGCCCTGCACGCGCCGTCGCAAATGTGCGGCGGATTA 4320
TCTCGCGCGGATCAACTGGGTGCCAGCGTGGTGGTGTGATGGTAGAACGAAGCGCGCTC 4380
GAAGCCTGTAAAGCGCGGCTGCACAATCTTCTCGCGCAACGCGTCAGTGGGCTGATCATT 4440
AACTATCCGCTGGATGACCAGGATGCCATGTCTGTGGAAGCTGCCTGCACTAATGTCCG 4500
GCGTTATTTCTTGATGTCTCTGACCAGACACCCATCAACAGTATTATTTTCTCCCATGAA 4560
GACGGTACGCGACTGGGCGTGGAGCATCTGGTCGCATTGGGTCAACAGCAAATCGCGCTG 4620
TTAGCGGGCCCATTAAGTTCTGTCTCGGCGCGTCTGCGTCTGGCTGGCTGGCATAAATAT 4680
CTCACTCGCAATCAAAATTCAGCCGATAGCGGAACGGGAAGGCGACTGGAGTGCCATGTCC 4740
GGTTTTCAACAAACCATGCAAATGCTGAATGAGGGCATCGTTCCCACTGCGATGCTGGTT 4800
GCCAACGATCAGATGGCGCTGGGCGCAATGCGCGCCATTACCGAGTCCGGGCTGCGCGTT 4860
GGTGGGATATCTCGGTAGTGGGATACGACGATACCGAAGACAGCTCATGTTATATCCCG 4920
CCGTTAACCACCATCAACAGGATTTTCGCCTGCTGGGGCAAACAGCGTGGACCGCTTG 4980
CTGCAACTCTCTCAGGGCCAGGCGGTGAAGGGCAATCAGCTGTTGCCCGTCTCACTGGTG 5040
AAAAGAAAAACACCCCTGGCGCCCAATACGCAAAACCGCTCTCCCGCGCGTTGGCCGAT 5100
TCATTAATGTCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGC 5160
AATTAATGTAAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGAC 5220
CTGCAAGAACCTCACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTG 5280
TTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCTGATAAAT 5340
GCTTCAATAATATTGAAAAAGGAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTAT 5400
TCCCTTTTTCGCGGCATTTTGCTTCTCTGTTTGTCTACCCAGAACGCTGGTGAAAGT 5460
AAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATC 5503
    
```

도면16a

PPase(굵은 글씨)와 클로닝된 PCR 생성물(이텔릭체)의 나머지(서열 번호 B)를 함유한 pTTQ18NHK 서열



도면16b

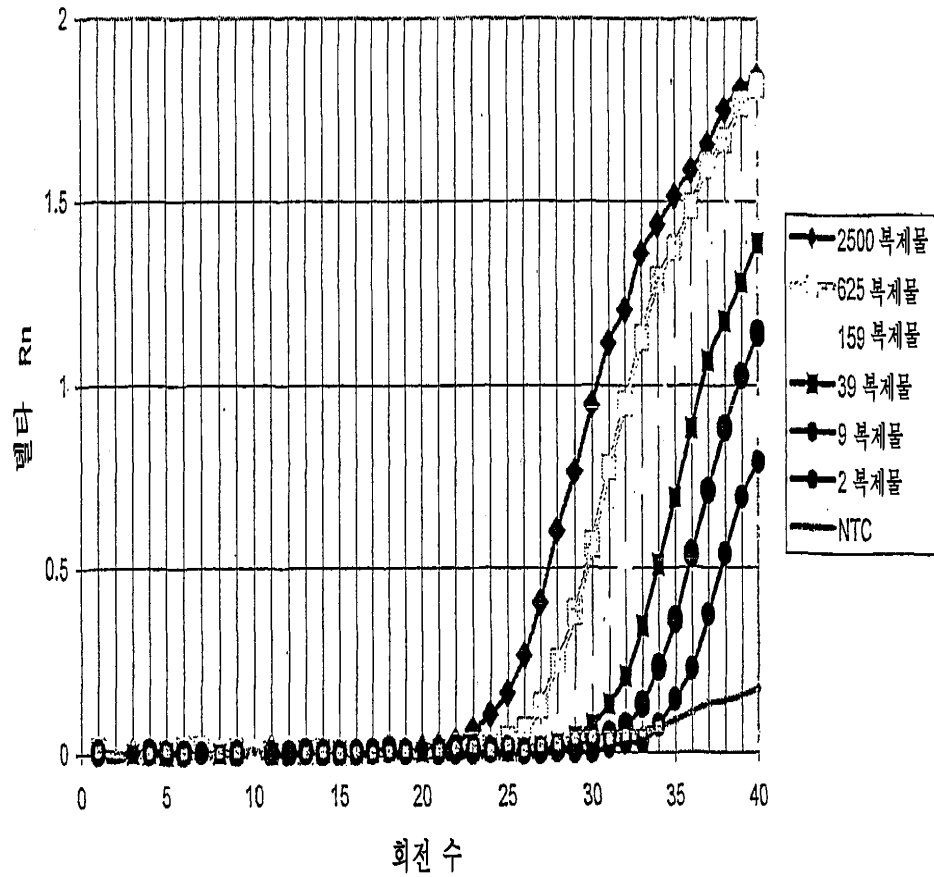
>PTTQ18NHK-PPASE 서열
GAACTGGATCTCAACAGCGGTAAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTTCCA 60
ATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGG 120
CAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTACCA 180
GTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATA 240
ACCATGAGTGATAAAGCTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAG 300
CTAACCCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAATCGCCTTGATCGTTGGGAACCG 360
GAGCTGAATGAAGCCATACCAACGACGAGCGTGACACACGATGCTGTAGCAATGGCA 420
ACAACGTTGCGCAAACTATTAAGTGGCGAATCTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTA 480
ATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCT 540
GGCTGGTTTATGCTGATAAATCTGGAGCCGCTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCA 600
GCACTGGGCGCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAG 660
GCAACTATGGATGAACGAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAGCAT 720
TGGTAAGTGTGACACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTAAACTTCATTTT 780
TAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAA 840
CGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAGGATCTTCTTGA 900
GAGCTGTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTGCAAAACAAAAAACCCCGCTACCGAGCG 960
GTGGTTTCTTGGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGC 1020
AGAGCGCAGATACCAAACTACTGTCTTCTAGTGAGCGTAGTATAGGCCACCACTTCAAG 1080
AATCTGTGATGACACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTAAACTTCATTTT 1140
AGTGGCGATAAGTCTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCG 1200
CAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAAGCACCTAC 1260
ACCGAAGTGTGACATACCTACAGCGTGAGCATGAGAAAGCGCCAGCTTCCCGAAGGGAGA 1320
AAGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCGAGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTT 1380
CCAGGGGGAAACGCCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTCCGCACCTCTGACTTGAG 1440
CGTCTGATTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGAGCCTATGGAATAACGCCAGCAACGCG 1500
GCCCTTTTACGTTTCTGCGCTTTTGCTGGCTTTTGCTCACATGTTCTTCTGCGTTA 1560
TCCCTGATTTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGC 1620
AGCGGAACGACCGGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGC 1680
AAACCGCCTCTCCCGCGCGTGGCGGATTCATTAATGAGAATTAATCTCATGTTTGA 1740
CAGCTTATCATGACTGCACGGTGCACCAATGCTTCTGGCGTCAGGCGCCATCGGAAGC 1800
TGTGCTATGGCTGTGAGGTGTAATCATGACATGATGCTGCTGCTCAAGGCGCATC 1860
CCGTTCTGATAATGTTTGTGCGCGACATCATAACGGTTCTGGCAATATCTGAAAT 1920
GAGCTGTTGACAAATTAATCATCGGCTCGTATAATGTTGGAATTTGAGCGGATAACAAT 1980
TTCAACACAGGAACACATATATGACACCAACCAACCATATGACAGGCTGTCTGAAAA 2040
TTGGTCTTGAGATGAGGCTCCAGATGTTGTGAATGTCGTTATAGAGATACCTATGAACA 2100
GTTCTGTTAAGTACGAGTTTCGACAAGGAGGCGTGTATGTTAAGGTTGATAGGTTCTTTT 2160
ACACGAGCATGTTCTACCCCTTCAACTACGGGTTCAATACAGGCACTCTAGAGGAGACG 2220
GAGATCCTGTTGACGTTCTAGTTATAGCCGGGAGCCGTTGCTCCCGGCTCGCTTATAG 2280
AGGCTGTGCCCGTGGCCGTGTTAGACATGAGGAGCAGGAGGCTCCGACAGCAAGGTTG 2340
TTGCGCTACCCCAAGGCCAAGCTGGACCCCTATTCGCCAGCTATAAGGACGTTGGCGACA 2400
TACCTGATGCCCTGAAATCCAAAGATAAAGCACTTCTTCGAGCACTATAAGGAGCTGGAGC 2460
CTGGAAAGTGGTTAGAGTGAAGTGGAGGCGCTGCTGCCGATGCCAAGGAGATTATAA 2520
GGAGGGCTATAGAGAGGTATAAGGGGGCGTGAAGGGCTTAACGGCTCACGTTTCTGG 2580
GAGAGTGTGCGACCTTTGAGGGCGATCACCTCGCCAGCGTGCCTGTGCTTTTGTCTATG 2640
ATTATGGCTACAGTTCTTCTAGCCGCTTTTACCGCCCCACAGTCAAGCTTGGCACTGGC 2700
CGTCGTTTACAAAGTCTGCTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCGAACTTAATCGCCTTGC 2760
AGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTC 2820
CCAACAGTTGGCGAGCCTGAATGGCGAATGGCGCTGATGCGGTATTTCTCTTACGCA 2880
TCTGTGCGGTATTTCAACCCGATATAATTCCTGTTTGGCGGATGAGAGAAGATTTTCA 2940
GCCTGATACAGATTAAATCAGAACGCAAGCGGCTCTGATAAACAAGAAATTTGCTGGCG 3000
CCAGTAGCGCGGTGGTCCCACTGACCCCATGCCGAAGTCAAGAGTGAACGCCGTAGCG 3060
CCGATGGTAGTGTGGGGTCTCCCATGCGAGATAGGGAACTGCCAGGCTCAAAATAAA 3120
CGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCTTTCTGTTTATCTGTTGTTGTGCGTGAACGCT 3180
CTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCGGGAGCGGATTTGAACGTTGCGAAGCAACGCCCGGA 3240
GGGTGGCGGGCAGGACGCCCGCATAACTGCCAGGCTCAAAATTAAGCAGAAGGCCATC 3300
CTGACGAGTGGCCTTTTGTGCTTCTACAACTCTTCTGCTGCTCATATCTACAGCCAT 3360
CCCCCAGAGATACGGTAAACTAGCCTCGTTTGTGATCAGGAAGCAGGGAATTTATGG 3420
TGCACTCTCAGTACAATCTGCTGCTGATGCGCATAGTTAAGCCAGCCCGACCCGCCA 3480
ACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCTCCGCTTACAGACAAGCT 3540
GTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGAGAGGTTTACCCTCATCACCGAAACGCCGCG 3600
AGACGAAGGGCTGATTAGAAAACTCATCGAGCATCAATGAATGCAATTTATTCA 3660

도면16c

TATCAGGATTATCAATACCATATTTTTGAAAAAGCGTTTCTGTATGAAGGAGAAAACT	3720
CACCGAGGCGAGTTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTTCGCGATTCCGATCGTC	3780
CACATCAATACAACCTATAATTTCCCTCGTCAAAAATAGGTTATCAAGTGAGAAAT	3840
CACCATGAGTGACGACATGAATCCGGTGAGAAATGGCAAAAGNNTTATGATTTCTTTCCAGA	3900
CTTGTTCACACAGGCCAGCCATTACCGTCTGTCATCAAAATCACTCGCATCAACCAACCGT	3960
TATTTCATTCTGATTCGCGCTTGAGCGAGACGAAATACGCGATCGCTGTAAAAGGACAAT	4020
TACAAACAGGAATCGAATGCAACCCGCGCAGGAACATGCCAGCGCATCAACATATTTT	4080
CACCTGAATCAGGATATTTCTTCTAATACCTGGAATGCTGTTTCCNNGGGATCGCAGTGG	4140
TGAGTAAACCATGCATCATCAGGAGTACGAGATAAAATGCTTGATGGTTCGGAAGAGGCATAA	4200
ATTCCGTGAGCCAGTTTGTAGTCTGACCATCTCATCTGTATACATCATTGGCGAACGCTACCTT	4260
TGCCATGTTTCAGAAACAACCTCTGGCGCATCGGGCTTCCATACAAATCGATAGATTTCGCG	4320
CACCTGATTGCCCCAGCATTTACGCGAGCCATTATACCATATAAATCAGCATCATGTG	4380
TGGAATTTAATCGCGCGCTCGAGCAAGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCATACACCCC	4440
TTGTATTACTGTTTATGTGAAGCAGACAGTTTATTGTTTCATGATGATATTTTTATCTT	4500
GTGCAATGTAAACATCAGGGCCCTCGTGATACGCTATTTTTATAGGTTAATGTTCATGATAA	4560
TAATGGTTTCTTAGACGTGAGGTTCTGTAGCCGACACCATCGAATGGTGCAAAACCTTTC	4620
CGCGTTATGGCATATAGCGCGCCGGAAGAGAGTCAATTCAGGTTGGTGAATGTGAACCGCA	4680
TAACTTTATACGATGTCGACAGAGTATCGCGGTGCTCTTTACAGACGTTTCCCGCGCTGG	4740
TGAACAGGCCGCCAGCCAGCTTTCTCGAAACCGCGGAAAAGTGAAGACGCGCATGGCGG	4800
AGCTGAATTACATTTCCCAACCCGCGTGGCACAACAACCTGGCGGGCAACAGCTGTTGCTGA	4860
TTGGCGTTGCCCATCTCAAGTCTGGCCCTGCAGCGCCGCTCGCAATTTGTCGCGCGATTA	4920
AATCTCGCGCGGATCAACTGGGTGCCAGCGTGGTGGTTCGATGGTAGAACAGAGCGGCG	4980
TGGAAGCCTGTAAAGCGCGCGGTGCCAATCTTCTCGCGCGACCGCTCAGCTGGGCTGATCA	5040
TTAACTATCGCTGGATGAGGAGGATGCCATTGCTGTGAAGCTGCTCGCATTAATGTTTC	5100
CGCGGTTATTTCTTGATGTCCTCGACGACACCCATCAACAGGATATATTTCTCCCATG	5160
AAGACGGTACGCGACTGGGCGTGGAGCATCTGGTTCGATCTGGTGGTGGTGGCATTAAT	5220
TGTTAGCGGGCCCAATTAAGTTCTGTTCTCGGCGGCTCTCGCTCTGGCTGGTGGCATAAAT	5280
ATCTCACTCGCAATCAAAATCAGCGGATAGCGGAAGCGGAAGCGGACTGGAGTGGCATGT	5340
CGGTTTTTCAACAACCATCGCAATGCTGAATGAGGGCATGTTCCCATCGCATGCTG	5400
TTGCCAAGCATCAGATGGGCGTGGGCGCAATCGCGGCCATTTACCGAGTCCGGGCTCGCG	5460
TGGTCCGGATATCTCGGTAGTGGGATACGACGATACCGAAGACAGTCTAGTGTATATCC	5520
CGCGGTTAACCAACCATCAACAGGATTTTTCGCTCTGGGCGCAAACCGAGTGGACCGCT	5580
TGCTGCAACTCTCTCAGGCGCAGGCGGTGAAGGGCAATCAGCTGTTGGCGGTCTCACTGG	5640
TGAAAAGAAAAAACCACTCGGCGCCCAATACGCAAAACCGCTCTCCCGCGCGGTTGGCG	5700
ATTCAATTAATGACGCTGGCAGCAGAGTTTCCGACATGGAAGCGGGCAGTGAGGCAAC	5760
GCAATTAATGTAAGTTAGTCACTCACTTAGGCAACCCAGGCTTACACTTTATGCTTCCG	5820
ACCTGCAAGAACCTCAGCTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAATGTCGCGGGAACCCCTATT	5880
TGTTTATTTTCTTAATACATTCAAAATGTATCGCTCATGAGACAATAACCTGATAA	5940
ATGCTTCAATAATATTGAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCACATTTCCGTGTCGCCCTT	6000
ATTCCCTTTTTCGCGCATTTGCTTCCGTGTTTGTCTCAACCGAAGACGCTGGTGAAA	6060
GTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATC	6105

도면17

사람 게놈에 대한 피로스타트 B-액틴 타크멘



서열 목록

<110> The Secretary of State for Defence
 <120> Amplification process
 <130> CG/P/133/WOD
 <140><141>

<150> GB 0110501.4
 <151> 2001-04-30
 <160> 26
 <170> KopatentIn Ver. 1.71
 <210> 1
 <211> 960
 <212> DNA
 <213> Aeropyrum pernix
 <400> 1

```

taatcctaattcgctttatgtggacgatcc ttcccagcaa aaccgggttt gttaacagcc 60
ttagctttat aactcgacta gccaaactat cggttagacg ggtgcatgca atgacaggct 120
gtctgaaaat tggctcctgga gatgaggctc cagatgttgt gaatgtcgtt atagagatac 180
ctatgaacag ttctgttaag tacgagttcg acaaggaggc gtgtattgtt aaggttgata 240
    
```

ggtttccttta caccagcatg gtctacccct tcaactacgg gttcatacca ggcactctag 300

aggaggacgg agatcctgtt gacgttctag ttattagccg ggagcccgtt gctcccggct 360
cgcttataga ggctgtgccc gtggccgtgt tagacatgga ggacgaggag ggtccggaca 420
gcaaggttgt tgcggtaccc aaggccaagc tggaccccct attcgccagc tataaggacg 480
ttggcgacat acctgatgcc ctgaaatcca agataaagca cttcttcgag cactataagg 540
agctggagcc tggaaagtgg gtttagagtga ctggatggag gcctgctgcc gatgcgaagg 600
agattataag gagggctata gagaggtata agggggcgtg atgagggctt aacggctcac 660
gttttctggg agagtgtcgc acctttgagg gcgatcacc tcgccagcgt gcgtgtgctt 720

ttgtctatga ttaatggtac agttcttcta gccgctttca cgcccccac agtcaatata 780
cttacaccta gaggttctgc gctgtatgct gtggatgtag ttgtagtaga cgccagcaca 840
ggatctgccc tgggttcttc ccggtttgtc gtatccgcct acagaggggg ggtcggggat 900
gtgggtgtta tctactcttc ggggtcttca gtatcagggt ctagtctgga aaggctgctg 960

<210> 2

<211> 207

<212> PRT

<213> Aeropyrum pernix

<400> 2

Met Trp Thr Ile Leu Pro Ser Lys Thr Gly Phe Val Asn Ser Leu Ser
1 5 10 15
Phe Ile Thr Arg Leu Ala Lys Leu Ser Val Arg Arg Val His Ala Met

20 25 30
Thr Gly Cys Leu Lys Ile Gly Pro Gly Asp Glu Ala Pro Asp Val Val
35 40 45
Asn Val Val Ile Glu Ile Pro Met Asn Ser Ser Val Lys Tyr Glu Phe
50 55 60
Asp Lys Glu Ala Cys Ile Val Lys Val Asp Arg Phe Leu Tyr Thr Ser
65 70 75 80
Met Val Tyr Pro Phe Asn Tyr Gly Phe Ile Pro Gly Thr Leu Glu Glu

85 90 95
Asp Gly Asp Pro Val Asp Val Leu Val Ile Ser Arg Glu Pro Val Ala
100 105 110
Pro Gly Ser Leu Ile Glu Ala Val Pro Val Ala Val Leu Asp Met Glu
115 120 125
Asp Glu Glu Gly Pro Asp Ser Lys Val Val Ala Val Pro Lys Ala Lys
130 135 140
Leu Asp Pro Leu Phe Ala Ser Tyr Lys Asp Val Gly Asp Ile Pro Asp

145 150 155 160
Ala Leu Lys Ser Lys Ile Lys His Phe Phe Glu His Tyr Lys Glu Leu
165 170 175
Glu Pro Gly Lys Trp Val Arg Val Thr Gly Trp Arg Pro Ala Ala Asp
180 185 190
Ala Lys Glu Ile Ile Arg Arg Ala Ile Glu Arg Tyr Lys Gly Ala
195 200 205

<210> 3

<211> 173

<212> PRT

<213>

> Sulfolobus solfataricus

<400> 3

Met Lys Leu Ser Pro Gly Lys Asn Ala Pro Asp Val Val Asn Val Leu
1 5 10 15
Val Glu Ile Pro Gln Gly Ser Asn Ile Lys Tyr Glu Tyr Asp Asp Glu

20 25 30
 Glu Gly Val Ile Lys Val Asp Arg Val Leu Tyr Thr Ser Met Asn Tyr
 35 40 45
 Pro Phe Asn Tyr Gly Phe Ile Pro Gly Thr Leu Glu Glu Asp Gly Asp

50 55 60
 Pro Leu Asp Val Leu Val Ile Thr Asn Tyr Gln Leu Tyr Pro Gly Ser
 65 70 75 80
 Val Ile Glu Val Arg Pro Ile Gly Ile Leu Tyr Met Lys Asp Glu Glu
 85 90 95
 Gly Glu Asp Ala Lys Ile Val Ala Val Pro Lys Asp Lys Thr Asp Pro
 100 105 110
 Ser Phe Ser Asn Ile Lys Asp Ile Asn Asp Leu Pro Gln Ala Thr Lys

115 120 125
 Asn Lys Ile Val His Phe Phe Glu His Tyr Lys Glu Leu Glu Pro Gly
 130 135 140
 Lys Tyr Val Lys Ile Ser Gly Trp Gly Ser Ala Thr Glu Ala Lys Asn
 145 150 155 160
 Arg Ile Gln Leu Ala Ile Lys Arg Val Ser Gly Gly Gln
 165 170

<210> 4
 <211> 176
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<400> 4
 Met Ser Leu Leu Asn Gly Pro Ala Gly Lys Asp Leu Pro Glu Asp Ile
 1 5 10 15
 Tyr Val Val Ile Glu Ile Pro Ala Asn Ala Asp Pro Ile Lys Tyr Glu
 20 25 30
 Ile Asp Lys Glu Ser Gly Ala Leu Phe Val Asp Arg Phe Met Ser Thr
 35 40 45
 Ala Met Phe Tyr Pro Cys Asn Tyr Gly Tyr Ile Asn His Ile Leu Ser
 50 55 60

Leu Asp Gly Asp Pro Val Asp Val Leu Val Pro Thr Pro Tyr Pro Leu
 65 70 75 80
 Gln Pro Gly Ser Val Ile Arg Cys Arg Pro Val Gly Val Leu Lys Met
 85 90 95
 Thr Asp Glu Ala Gly Glu Asp Ala Lys Leu Val Ala Val Pro His Ser
 100 105 110
 Lys Leu Ser Lys Glu Tyr Asp His Ile Lys Asp Val Asn Asp Leu Pro
 115 120 125

Glu Leu Leu Lys Ala Gln Ile Ala His Phe Phe Glu His Tyr Lys Asp
 130 135 140
 Leu Glu Lys Gly Lys Trp Val Lys Val Glu Gly Trp Glu Asn Ala Glu
 145 150 155 160
 Ala Ala Lys Ala Glu Ile Val Ala Ser Phe Glu Arg Ala Lys Asn Lys
 165 170 175

<210> 5
 <211> 178
 <212> PRT
 <213> Aquifex aeolicus
 <400> 5

Met Gly Tyr Asp Gln Leu Pro Pro Gly Lys Asn Pro Pro Glu Asp Ile

1 5 10 15
Tyr Val Val Ile Glu Ile Pro Gln Gly Ser Ala Val Lys Tyr Glu Leu
20 25 30
Asp Lys Asp Thr Gly Val Ile Phe Val Asp Arg Phe Leu Phe Thr Ala
35 40 45
Met Tyr Tyr Pro Phe Asn Tyr Gly Phe Val Pro Gln Thr Leu Ala Asp
50 55 60
Asp Gly Asp Pro Val Asp Val Leu Val Ile Ser Arg Glu Pro Val Val

65 70 75 80
Pro Gly Ala Val Met Arg Cys Arg Pro Ile Gly Met Leu Glu Met Arg
85 90 95
Asp Glu Ala Gly Ile Asp Thr Lys Val Ile Ala Val Pro His Glu Lys
100 105 110
Leu Asp Pro Ser Tyr Ser Asn Ile Lys Thr Val Asp Asn Leu Pro Glu
115 120 125
Ile Val Arg Glu Lys Ile Lys His Phe Phe Glu His Tyr Lys Glu Leu

130 135 140
Glu Pro Gly Lys Trp Val Lys Val Glu Asn Trp Lys Gly Leu Gln Asp
145 150 155 160
Ala Ile Glu Glu Ile Lys Lys Gly Ile Glu Asn Tyr Lys Lys Asn Lys
165 170 175

Glu Gly

<210> 6

<211> 178

<212> PRT

<213> Pyrococcus horikoshii

<400> 6

Met Asn Pro Phe His Asp Leu Glu Pro Gly Pro Asn Val Pro Glu Val

1 5 10 15
Val Tyr Ala Leu Ile Glu Ile Pro Lys Gly Ser Arg Asn Lys Tyr Glu
20 25 30
Leu Asp Lys Glu Thr Gly Leu Leu Lys Leu Asp Arg Val Leu Tyr Thr
35 40 45
Pro Phe His Tyr Pro Val Asp Tyr Gly Ile Ile Pro Arg Thr Trp Tyr
50 55 60
Glu Asp Gly Asp Pro Phe Asp Ile Met Val Ile Met Arg Glu Pro Thr

65 70 75 80
Tyr Pro Leu Thr Ile Ile Glu Ala Arg Pro Ile Gly Leu Phe Lys Met
85 90 95
Ile Asp Ser Gly Asp Lys Asp Tyr Lys Val Leu Ala Val Pro Val Glu
100 105 110
Asp Pro Tyr Phe Lys Asp Trp Lys Asp Ile Ser Asp Val Pro Lys Ala
115 120 125
Phe Leu Asp Glu Ile Ala His Phe Phe Lys Arg Tyr Lys Glu Leu Glu

130 135 140
Gly Lys Glu Ile Ile Val Glu Gly Trp Glu Gly Ala Glu Ala Ala Lys
145 150 155 160
Arg Glu Ile Leu Arg Ala Ile Glu Met Tyr Lys Glu Lys Phe Gly Lys
165 170 175

Lys Glu

<210> 7

<211> 178

<212> PRT

<213> *Pyrococcus abyssi*

<400> 7

Met Asn Pro Phe His Asp Leu Glu Pro Gly Pro Asn Val Pro Glu Val

1	5	10	15
Val Tyr Ala Leu Ile Glu Ile Pro Lys Gly Ser Arg Asn Lys Tyr Glu			
	20	25	30
Leu Asp Lys Lys Thr Gly Leu Leu Lys Leu Asp Arg Val Leu Tyr Ser			
	35	40	45
Pro Phe Phe Tyr Pro Val Asp Tyr Gly Ile Ile Pro Arg Thr Trp Tyr			
	50	55	60
Asp Asp Asp Asp Pro Phe Asp Ile Met Val Ile Met Arg Glu Pro Thr			

65	70	75	80
Tyr Pro Leu Thr Ile Ile Glu Ala Arg Pro Ile Gly Leu Phe Lys Met			
	85	90	95
Ile Asp Ser Gly Asp Lys Asp Tyr Lys Val Leu Ala Val Pro Val Glu			
	100	105	110
Asp Pro Tyr Phe Lys Asp Trp Lys Asp Ile Asp Asp Val Pro Lys Ala			
	115	120	125
Phe Leu Asp Glu Ile Ala His Phe Phe Lys Arg Tyr Lys Glu Leu Gln			

130	135	140
Gly Lys Glu Ile Ile Val Glu Gly Trp Glu Gly Ala Glu Ala Ala Lys		
145	150	155
Arg Glu Ile Leu Arg Ala Ile Glu Leu Tyr Lys Glu Lys Phe Gly Ser		
	165	170
		175

Lys Glu

<210> 8

<211> 176

<212> PRT

<213> *Thermococcus litoralis*

<400> 8

Met Asn Pro Phe His Asp Leu Glu Pro Gly Pro Glu Val Pro Glu Val

1	5	10	15
Val Tyr Ala Leu Ile Glu Ile Pro Lys Gly Ser Arg Asn Lys Tyr Glu			
	20	25	30
Leu Asp Lys Lys Thr Gly Leu Ile Lys Leu Asp Arg Val Leu Tyr Ser			
	35	40	45
Pro Phe His Tyr Pro Val Asp Tyr Gly Ile Ile Pro Gln Thr Trp Tyr			
	50	55	60
Asp Asp Asp Asp Pro Phe Asp Ile Met Val Ile Met Arg Glu Pro Thr			

65	70	75	80
Tyr Pro Gly Val Leu Ile Glu Ala Arg Pro Ile Gly Leu Phe Lys Met			
	85	90	95
Ile Asp Ser Gly Asp Lys Asp Tyr Lys Val Leu Ala Val Pro Val Glu			
	100	105	110
Asp Pro Tyr Phe Asn Asp Trp Lys Asp Ile Ser Asp Val Pro Lys Ala			
	115	120	125
Phe Leu Asp Glu Ile Ala His Phe Phe Gln Arg Tyr Lys Glu Leu Gln			

130

135

140

Gly Lys Glu Ile Ile Val Glu Gly Trp Glu Asn Ala Glu Lys Ala Lys
 145 150 155 160
 Gln Glu Ile Leu Arg Ala Ile Glu Leu Tyr Lys Glu Lys Phe Lys Lys
 165 170 175

<210> 9

<211> 179

<212> PRT

<213> Thermoplasma acidophilum

<400> 9

Met Glu Ser Phe Tyr His Ser Val Pro Val Gly Pro Lys Pro Pro Glu
 1 5 10 15

Glu Val Tyr Val Ile Val Glu Ile Pro Arg Gly Ser Arg Val Lys Tyr
 20 25 30
 Glu Ile Ala Lys Asp Phe Pro Gly Met Leu Val Asp Arg Val Leu Tyr
 35 40 45
 Ser Ser Val Val Tyr Pro Val Asp Tyr Gly Leu Ile Pro Arg Thr Leu
 50 55 60
 Tyr Tyr Asp Gly Asp Pro Met Asp Val Met Val Leu Ile Ser Gln Pro
 65 70 75 80

Thr Phe Pro Gly Ala Ile Met Lys Val Arg Pro Ile Gly Met Met Lys
 85 90 95
 Met Val Asp Gln Gly Glu Thr Asp Asn Lys Ile Leu Ala Val Phe Asp
 100 105 110
 Lys Asp Pro Asn Val Ser Tyr Ile Lys Asp Leu Lys Asp Val Asn Ala
 115 120 125
 His Leu Leu Asp Glu Ile Ala Asn Phe Phe Ser Thr Tyr Lys Ile Leu
 130 135 140

Glu Lys Lys Glu Thr Lys Val Leu Gly Trp Glu Gly Lys Glu Ala Ala
 145 150 155 160
 Leu Lys Glu Ile Glu Val Ser Ile Lys Met Tyr Glu Glu Lys Tyr Gly
 165 170 175

Lys Lys Asn

<210> 10

<211> 686

<212> DNA

<213> Aeropyrum pernix

<400> 10

tgcattgcata tgacaggctg tctgaaaatt ggtcctggag atgaggtcc agatgttgtg 60
 aatgtcgtta tagagatacc tatgaacagt tctgttaagt acgagttcga caaggaggcg 120

tgtattgtta aggttgatag gtccctttac accagcatgg tctacccctt caactacggg 180
 ttcataccag gcactctaga ggaggacgga gatcctgttg acgttctagt tattagccgg 240
 gagcccggtt ctcccggctc gcttatagag gctgtgcccg tggccgtgtt agacatggag 300
 gacgaggagg gtccggacag caaggttgtt gccgtaccca aggccaagct ggacccctta 360
 ttcgccagct ataaggacgt tggcgacata cctgatgccc tgaaatccaa gataaagcac 420
 ttcttcgagc actataagga gctggagcct ggaaagtggg ttagagtac tggatggagg 480
 cctgctgccc atgcgaagga gattataagg agggctatag agaggtataa gggggcgtga 540

tgagggtta acggctcacg ttttctggga gattgtcgca cctttgagg cgatcacct 600
 cgccagcgtg cgtgtgttt tgtctatgat tatggctaca gttcttctag ccgctttcac 660
 cgccccaca gtcaagctta cactta 686

<210> 11

<211> 89

<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Modified
 polylinker sequence of pTTQ18NHK
 <400> 11
 atgcaccacc accaccacca tatgggcatg ctgaattcga gctcgggtacc cggggatcct 60
 ctagagtcga cctgcaggca tgcaagctt 89

<210> 12
 <211> 5503
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: pTTQ18NHK
 vector
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3279, 3525)
 <223> n is a or g or c or t
 <400> 12
 gaactggatc tcaacagcgg taagatcctt gagagttttc gcccgaaga acgttttcca 60
 atgatgagca cttttaagt tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgat tgacgccggg 120
 caagagcaac tcggtcgccg catacactat tctcagaatg acttgggtga gtactacca 180
 gtcacagaaa agcatcttac ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata 240

 accatgagtg ataacactgc ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag 300
 ctaaccgctt ttttgacaaa catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg 360
 gagctgaatg aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca 420
 acaacgttgc gcaaactatt aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta 480
 atagactgga tggaggcgga taaagttgca ggaccacttc tgcgctcgcc ctttccggct 540
 ggctggttta ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcgccg tatcattgca 600
 gcactggggc cagatggtaa gccctcccgt atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag 660

 gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat 720
 tggtaaactg cagaccaagt ttactcatat atactttaga ttgattttaa acttcatttt 780
 taatttaaaa ggatctaggt gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa 840
 cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga 900
 gatccttttt ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg 960
 tlggtttgtt tgccggatca agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc 1020
 agagcgcaga taccaaatac tgtccttcta gtgtagccgt agttaggcca ccactcaag 1080

 aactctgtag caccgcctac atacctcgtc ctgctaatec tgttaccagt ggctgctgcc 1140
 agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg 1200
 cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac 1260
 accgaactga gatactaca gcgtgagcat tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga 1320
 aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt 1380
 ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag 1440
 cgtcgatttt tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg 1500

 gcctttttac ggttcttggc cttttgctgg ctttttgctc acatgttctt tcttgcgtta 1560
 tccccgtatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc 1620
 agccgaacga ccgagcgag cgagtcagtg agcgaggaag cggaagagcg cccaatacgc 1680
 aaaccgctc tccccgcggg ttggccgatt cattaatgca gaattaattc tcatgtttga 1740
 cagcttatca tcgactgcac ggtgcaccaa tgccttctggc gtcaggcagc catcggaagc 1800
 tgtggtatgg ctgtgcaggt cgtaaatcac tgcataattc gtgtcgctca aggcgcactc 1860
 ccgttctgga taatgttttt tgcgccgaca tcataacggt tctggcaaat attctgaaat 1920

gagctgttga caattaatca tcggctcgta taatgtgtgg aattgtgagc ggataacaat 1980
 ttcacacagg aaacacatat atgcaccacc accaccacca tatgggcatg ctgaattcga 2040
 gctcggtagc cggggatcct ctgagtcga cctgcaggca tgcaagcttg gcaactggcgg 2100
 tcgtttttaca acgtcgtgac tgggaaaacc ctggcggttac ccaacttaat cgccttgcag 2160
 cacatcccc tttcgccagc tggcgtaata gcgaagaggc ccgcaccgat cgcccttccc 2220
 aacagttgcg cagcctgaat ggcgaaatggc gcctgatgcg gtattttctc cttacgcatc 2280
 tgtgcggtat ttcacaccgc ataaattccc tgttttggcg gatgagagaa gattttcagc 2340

 ctgatacaga ttaaatcaga acgcagaagc ggtctgataa aacagaatit gcctggcggc 2400
 agtagcgagg tgggtcccacc tgaccccatg ccgaactcag aagtgaacg ccgtagcgcc 2460
 gatggtagt tggggtctcc ccatgcgaga gtagggaaact gccaggcatc aaataaaacg 2520
 aaaggctcag tcgaaagact gggcctttcg ttttatctgt tgtttgtcgg tgaacgctct 2580
 cctgagtagg acaaatccgc cgggagcggg tttgaacgtt gcgaagcaac ggcccgagg 2640
 gtggcgggca ggacgcccgc cataaactgc caggcatcaa attaagcaga aggccatcct 2700
 gacggatggc ctttttgcgt ttctacaaac tcttctgtc gtcatatcta caagccatcc 2760

 cccacagat acggtaaact agcctcggtt ttgcatcagg aaagcaggga atttatggtg 2820
 cactctcagt acaatctgct ctgatgccgc atagttaagc cagccccgac acccgccaac 2880
 acccgctgac gcgccctgac gggcttgtct gctcccgga tccgcttaca gacaagctgt 2940
 gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag gttttcaccg tcatcaccga aacgcgcgag 3000
 acgaaagggc ctgattagaa aaactcatc agcatcaaat gaaactgcaa tttattcata 3060
 tcaggattat caataccata tttttgaaaa agccgtttct gtaatgaagg agaaaactca 3120
 ccgaggcagt tccataggat ggcaagatcc tggtatcggt ctgcgattcc gactcgtcca 3180

 acatcaatac aacctattaa tttccctcgc tcaaaaaataa gggtatcaag tgagaaatca 3240
 ccatgagtga cgactgaatc cgggtgagaat ggcaaaaagnt tatgcatttc tttccagact 3300
 tgttcaacag gccagccatt acgctcgtca tcaaaatcac tcgcatcaac caaaccttta 3360
 ttcatctgtg attgcgcctg agcgagacga aatagcgat cgctgtttaa aggacaatta 3420
 caaacaggaa tcgaatgcaa ccggcgagcgg aacactgcca gcgcatcaac aatattttca 3480
 cctgaatcag gatattcttc taatacctgg aatgctgttt tccngggat cgcagtgggtg 3540
 agtaaccatg catcatcagg agtacggata aatgcttga tggtcggaag aggcataaat 3600

 tccgtcagcc agtttagtct gaccatctca tctgtaacat cattggcaac gctacctttg 3660
 ccatgtttca gaaacaactc tggcgcatcg ggcttcccat acaatcgata gattgtcgca 3720
 cctgattgcc cgacattatc gcgagcccat ttatacccat ataatcagc atccatgttg 3780
 gaatttaate cgggcctcga gcaagacgtt tccggttga tatggctcat aacaccctt 3840
 gtattactgt ttatgtaagc agacagtttt attgttcag atgatatatt tttatcttgt 3900
 gcaatgtaac atcagggcct cgtgatacgc ctatttttat aggttaatgt catgataata 3960
 atggtttctt agacgtgagg ttctgtaccc gacaccatcg aatggtgcaa aacctttcgc 4020

 ggtatggcat gatagcgccc ggaagagagt caattcaggg tggtagaatgt gaaaccagta 4080
 acgttatagc atgtcgaga gtatgccgtt gtctcttata agaccgtttc ccgctgggtg 4140
 aaccaggcca gccacgtttc tgcgaaaacg cgggaaaaag tggagcggc gatggcggag 4200
 ctgaattaca ttccaaccg cgtggcaca caactggcgg gcaaacagtc gttgctgatt 4260
 ggcgttgcca cctccagtct ggccctgcac gcgccgtcgc aaattgtcgc ggcgattaaa 4320
 tctcgcgccg atcaactggg tgccagcgtg gtggtgtcga tggtagaacg aagcgcgctc 4380
 gaagcctgta aagcggcggg gcacaatctt ctcgcgcaac gcgtcagtgg gctgatcatt 4440

 aactatccgc tggatgacca ggatgccatt gctgtggaag ctgcctgcac taatgttccg 4500
 gcgttatctc ttgatgtctc tgaccagaca cccatcaaca gtattatttt ctcccatgaa 4560
 gacggtagc gactggcggt ggagcatctg gtcgcatagg gtcaccagca aatcgcgctg 4620
 ttagcgggcc cattaaagt cgtctcgcg cgtctcgctc tggctggctg gcataaatat 4680
 ctactcgca atcaaatca gccgatagcg gaacgggaag gcgactggag tgccatgtcc 4740
 ggttttcaac aaacatgca aatgctgaat gagggcatcg ttccactgc gatgctggtt 4800
 gccaacgac agatggcgct gggcgcaatg cgcgccatta ccgagtcagg gctgcgcgtt 4860

 ggtgcgagata tctcggtagt gggatacgac gataccgaag acagctcatg ttatatcccg 4920

ccgttaacca ccatacaaca ggattttcgc ctgctggggc aaaccagcgt ggaccgcttg 4980
ctgcaactct ctgaggccca ggcggtgaag ggcaatcagc tgttgcccgt ctactggtg 5040
aaaagaaaaa ccacctggc gcccaatacg caaaccgcct ctecccgcg gttggccgat 5100
tcattaatgc agctggcagc acaggtttcc cgactggaaa gcgggcagtg agcgcaacgc 5160
aattaatgta agttagctca ctcataggc acccaggct ttacacttta tgcttccgac 5220
ctgcaagaac ctacgctcag gtggcacttt tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg 5280

tttatttttc taaatacatt caaatatgta tccgctcatg agacaataac cctgataaat 5340
gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat gagtattcaa catttccgtg tcgcccttat 5400
tccctttttt gcggcatttt gccttcctgt ttttgctcac ccagaaacgc tgggtgaaagt 5460
aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac atc 5503

<210> 13

<211> 6105

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: pTTQ18NHK
vector including the PPase sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (3881, 4127)

<223> n is a or g or c or t

<400> 13

gaactggatc tcaacacgcg taagatcctt gagagttttc gccccgaaga acgtttttcca 60
atgatgagca cttttaaagt tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgtat tgacgccggg 120
caagagcaac tcggtcgccg catacactat tctcagaatg acttggttga gtactcacca 180
gtcacagaaa agcatcttac ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata 240
accatgagtg ataacactgc ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag 300
ctaaccgctt ttttgacaaa catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg 360
gagctgaatg aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca 420

acaacgttgc gcaaaactatt aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta 480
atagactgga tggaggcgga taaagtigca ggaccacttc tgcgctcggc ctttccggct 540
ggctggttta ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcgcgg tatcattgca 600
gcactggggc cagatggtaa gccctcccgt atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag 660
gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat 720
tggttaactgt cagaccaagt ttactcataat atactttaga ttgattttaa acttcatitt 780
taatttaaaa ggatctaggt gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa 840

ctgtagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga 900
gatacttttt tctgcgctg aatctgctgc ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg 960
gtggtttgtt tgccggtaca agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc 1020
agagcgcaga taccaaatac tgtccttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag 1080
aactctgtag caccgcctac atacctcgt ctgctaatec tgttaccagt ggctgctgcc 1140
agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg 1200
cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac 1260

accgaactga gatacctaca gcgtgagcat tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga 1320
aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgac gagggagctt 1380
ccagggggaa acgcctgcta tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag 1440
cgtcgatttt tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg 1500
gcctttttac ggttcttggc cttttgctgg ctttttctc acatgttctt tcctgcttta 1560
tccccgtatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc 1620
agccgaacga ccgagcgacg cgagtcagtg agcgaggaag cggaagagcg cccaatacgc 1680

aaaccgcctc tccccgcggt ttggccgatt cattaatgca gaattaattc tcatgtttga 1740

cagcttatca tcgactgcac ggtgcaccaa tgccttctggc gtcaggcagc catcggaagc 1800
 tgtggatagg ctgtgcaggt cgtaaatcac tgcataattc gtgtcgctca aggcgcactc 1860
 ccgttctgga taatgttttt tgcgccgaca tcataacggt tctggcaaat attctgaaat 1920
 gagctgttga caattaatca tcggctcgta taatgtgtgg aattgtgagc ggataacaat 1980
 ttcacacagg aaacacatat atgcaccacc accaccacca tatgacaggc tgtctgaaaa 2040
 ttggtcctgg agatgaggct ccagatgttg tgaatgtcgt tatagagata cctatgaaca 2100

 gttctgttaa gtacgagttc gacaaggagg cgtgtattgt taaggttgat aggttccttt 2160
 acaccagcat ggtctacccc ttcaactacg ggttcatacc aggcactcta gaggaggacg 2220
 gagatcctgt tgacgttcta gttattagcc gggagcccggt tgcctccggc tcgcttatag 2280
 aggctgtgcc cgtggccgtg ttagacatgg aggacgagga gggctccggac agcaagggtt 2340
 ttgccgtacc caaggccaag ctggaccccc taticgccag ctataaggac gttggcgaca 2400
 tacctgatgc cctgaaatcc aagataaagc acttcttcga gcactataag gagctggagc 2460
 ctggaaagtg ggttagagtg actggatgga ggcctgctgc cgatgcgaag gagattataa 2520

 ggagggttat agagaggat aagggggcgt gatgagggt taacggctca cgttttctgg 2580
 gagagtgtcg caccttttag ggcgatcacc ctgccagcg tgcgtgtgct tttgtctatg 2640
 attatggcta cagtcttct agccgtttc accgccccca cagtcaagct tggcactggc 2700
 cgtcgtttta caacgtcgtg actgggaaaa ccttggcgtt acccaactta atcgcttgc 2760
 agcacatccc ctttcgccg gctggcgtaa tagcgaagag gcccgaccg atcgcccttc 2820
 ccaacagttg cgcagcctga atggcgaatg gcgctgatg cggatatttc tccttacgca 2880
 tctgtcgggt atttcacacc gcataaatc cctgttttgg cggatgagag aagattttca 2940

 gcctgataca gattaaatca gaacgcagaa gcggtctgat aaaacagaat ttgcctggcg 3000
 gcagtagcgc ggtgggtcca cctgaccca tgcgaactc agaagtgaat cgccgtagcg 3060
 ccgatggtag tgtgggtct ccccatgcga gtagaggaa ctgccaggca tcaataaaaa 3120
 cgaaaggctc agtcgaaaga ctgggccttt cgttttatct gttgtttgtc ggtgaacgct 3180
 ctctgagta ggacaaatcc gccgggagcg gatttgaacg ttgcgaagca acggcccgga 3240
 ggggtggcggg caggacgccc gccataaact gccaggcatc aaattaagca gaaggccatc 3300
 ctgacggatg gcctttttgc gtttctacaa actcttctg tctcatatc tacaagccat 3360

 cccccacag atacggtaaa ctagcctcgt ttttgcata ggaaagcagg gaatttatgg 3420
 tgcactctca gtacaatctg ctctgatgcc gcatagttaa gccagccccg acaccgcca 3480
 acaccgctg acgcgccctg acgggcttgt ctgctccgg catccgtta cagacaagct 3540
 gtgacctct cgggagctg catgtgtcag aggttttcac cgtcatcacc gaaacgcgcg 3600
 agacgaaagg gcctgattag aaaaactcat cgagcatcaa atgaaactgc aatttatcca 3660
 tatcaggatt atcaatacca tatttttgaa aaagccgttt ctgtaatgaa ggagaaaact 3720
 caccgaggca gttccatagg atggcaagat cctggtatcg gtctgcgatt ccgactcgtc 3780

 caacatcaat acaacctatt aatttcccct cgtcaaaaat aaggttatca agtgagaaat 3840
 caccatgagt gacgactgaa tccggtgaga atggcaaaag nttatgcatt tctttccaga 3900
 cttgttcaac aggcagacca ttacgtcgt catcaaaatc actcgcatca accaaaccgt 3960
 tattcattcg tgattgcgcc tgagcgagac gaaatacgcg atcgctgtta aaaggacaat 4020
 tacaacagg aatcgaatgc aaccggcgca ggaacactgc cagcgcatca acaatatatt 4080
 cactgaatc aggatattct tctaatacct ggaatgctgt tttccnngg atcgcagttg 4140
 tgagtaacca tgcatcatca ggagtacgga taaaatgctt gatggtcgga agaggcataa 4200

 attccgtcag ccagtttagt ctgaccatct catctgtaac atcattggca acgctacctt 4260
 tgccatgttt cagaacaac tctggcgcat cgggcttccc atacaatcga tagattgtcg 4320
 cactgattg cccgacatta tcgcgagccc atttataccc atataaatca gcatccatgt 4380
 tggaaattta tcgcggcctc gagcaagacg tttcccgttg aatatggctc ataacacccc 4440
 ttgtattact gtttatgtaa gcagacagtt ttattgttca tgatgatata tttttatctt 4500
 gtgcaatgta acatcagggc ctctgtatgc gcctattttt ataggttaat gtcagataa 4560
 taatggtttc ttagacgtga ggttctgtac ccgacacat cgaatggtgc aaaacctttc 4620

 gcggtatggc atgatagcgc ccggaagaga gtcaattcag ggtggtgaat gtgaaaccag 4680
 taacgttata cgatgtcgca gagtatgccg gtgtctctta tcagaccgtt tcccgcgtgg 4740

tgaaccaggc cagccacgtt tctgcgaaaa cgcgggaaaa agtgggaagcg gcgatggcgg 4800
agctgaatta cattccaac cgcgtggcac aacaactggc gggcaaacag tegtgtctga 4860
ttggcggttc cactccagt ctggccctgc acgcgccgtc gcaaattgtc gcggcgatta 4920
aatctcgcgc cgatcaactg ggtgccagcg tgggtgtgtc gatggtagaa cgaagcggcg 4980
tcgaagcctg taaagcggcg gtgcacaatc ttctcgcgca acgcgtcagt gggctgatca 5040

ttaactatcc gctggatgac caggatgcc a ttgtgtgga agctgcctgc actaatgttc 5100
cggcggttatt tcttgatgtc tctgaccaga caccatcaa cagtattatt ttctcccatg 5160
aagacggtac gcgactgggc gtggagcatc tggtcgcatt gggtcaccag caaatcgcgc 5220
tgttagcggg cccattaagt tctgtctcgg cgcgtctgcg tctggctggc tggcataaat 5280
atctcactcg caatcaaatt cagccgatag cggaacggga aggcgactgg agtgccatgt 5340
ccggttttca acaaaccatg caaatgctga atgaggcat cgttcccact gcgatgctgg 5400
ttgccaacga tcgatggcg ctgggcgcaa tgcgcgccat taccgagtcc gggctgcgcg 5460

ttggtgcgga tatctcgga gtgggatacg acgataccga agacagctca tgttatatcc 5520
cgccgttaac caccatcaa caggattttc gcctgctggg gcaaaccagc gtggaccgct 5580
tgctgcaact ctctcaggc caggcggtga agggcaatca gctgttgccc gtctcactgg 5640
tgaaaagaaa aaccacctg gcgccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttgccg 5700
attcattaat gcagctggca cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac 5760
gcaattaatg taagttagct cactcattag gcacccagg ctttacatt tatgcttccg 5820
acctgcaaga acctcacgtc aggtggcact ttctggggaa atgtgcgcgg aaccttatt 5880

tgtttatatt tctaaatata ttcaaatatg tatccgtca tgagacaata accctgataa 5940
atgcttcaat aatattgaaa aggaagagt atgagtattc aacatttccg tctcgccctt 6000
attccctttt ttgcggcatt ttgccttctt gtttttctc acccagaaac gctggtgaaa 6060
gtaaaagatg ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt acatc 6105

<210> 14

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 14

gatgagttcg tgtccgtaca actgg 25

<210>

15

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 15

ggttatcgaa atcagccaca gcgcc 25

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 16

gcaacgcccc tcaactataaa 20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 17
gcaccccgcc cttgaagtcc 20
<210> 18
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer
<400> 18
tgcattgcata tgacaggctg tctgaaaatt g 31
<210> 19
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer
<400> 19
taagtgtgaag cttgactgtg ggggcgggtga aag 33
<210> 20

<400> 20
000
<210> 21
<400> 21
000
<210> 22
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer
<400> 22
gactcgtcat actcctgctt gct 23
<210> 23
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer
<400> 23
cattgccgac aggatgcaga a 21
<210> 24
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Probe
<400> 24
atccacatct gctggaaggt ggacagt 27
<210> 25
<211> 176
<212> PRT
<213> Aeropyrum pernix
<400> 25
Met Thr Gly Cys Leu Lys Ile Gly Pro Gly Asp Glu Ala Pro Asp Val

1 5 10 15
Val Asn Val Val Ile Glu Ile Pro Met Asn Ser Ser Val Lys Tyr Glu
20 25 30
Phe Asp Lys Glu Ala Cys Ile Val Lys Val Asp Arg Phe Leu Tyr Thr

35 40 45
Ser Met Val Tyr Pro Phe Asn Tyr Gly Phe Ile Pro Gly Thr Leu Glu
50 55 60
Glu Asp Gly Asp Pro Val Asp Val Leu Val Ile Ser Arg Glu Pro Val
65 70 75 80
Ala Pro Gly Ser Leu Ile Glu Ala Val Pro Val Ala Val Leu Asp Met
85 90 95
Glu Asp Glu Glu Gly Pro Asp Ser Lys Val Val Ala Val Pro Lys Ala

100 105 110
Lys Leu Asp Pro Leu Phe Ala Ser Tyr Lys Asp Val Gly Asp Ile Pro
115 120 125
Asp Ala Leu Lys Ser Lys Ile Lys His Phe Phe Glu His Tyr Lys Glu
130 135 140
Leu Glu Pro Gly Lys Trp Val Arg Val Thr Gly Trp Arg Pro Ala Ala
145 150 155 160
Asp Ala Lys Glu Ile Ile Arg Arg Ala Ile Glu Arg Tyr Lys Gly Ala

165 170 175

<210> 26

<211> 531

<212> DNA

<213> Aeropyrum pernix

<400> 26

atgacaggct gtcgaaaat tggctcctgga gatgaggctc cagatgttgt gaatgtcgtt 60
atagagatac ctatgaacag ttctgttaag tacgagttcg acaaggaggc gtgtattgtt 120
aaggttgata gggtccctta caccagcatg gtctaccct tcaactacgg gttcatacca 180
ggcactctag aggaggacgg agatcctgtt gacgttctag ttattagccg ggagcccggt 240
gctcccggt cgttataga ggctgtgccc gtggccgtgt tagacatgga ggacgaggag 300

ggtcggaca gcaaggttgt tgccgtaccc aaggccaagc tggaccccct attcgccagc 360
tataaggacg ttggcgacat acctgatgcc ctgaaatcca agataaagca cttcttcgag 420
cactataagg agctggagcc tggaaagtgg gttagagtga ctggatggag gcctgctgcc 480
gatgcgaagg agattataag gagggctata gagaggtata agggggcgtg a 531