



등록특허 10-2111178



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년05월15일
(11) 등록번호 10-2111178
(24) 등록일자 2020년05월08일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/22 (2006.01) *C12N 9/99* (2006.01)
C12Q 1/68 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2014-7024472
- (22) 출원일자(국제) 2013년02월18일
심사청구일자 2018년02월01일
- (85) 번역문제출일자 2014년09월01일
- (65) 공개번호 10-2014-0135962
- (43) 공개일자 2014년11월27일
- (86) 국제출원번호 PCT/GB2013/050387
- (87) 국제공개번호 WO 2013/121228
국제공개일자 2013년08월22일
- (30) 우선권주장
1202768.6 2012년02월17일 영국(GB)
1216029.7 2012년09월07일 영국(GB)
- (56) 선행기술조사문현
WO2011010094 A1
US20090047705 A1
US20080160528 A1
US20020172972 A1

- (73) 특허권자
바이오텍 파마콘 에이에스에이
노르웨이 트롬소 9019 포르스카닝스파르켄 스케후
스베이엔 23
- (72) 발명자
라네스, 오라브
노르웨이, 엔-9007 트롬쇠, 크벨드로베겐 12
하브다렌, 린다
노르웨이, 엔-9008 트롬쇠, 스키펠가타 21비
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인이룸리온, 특허법인이룸

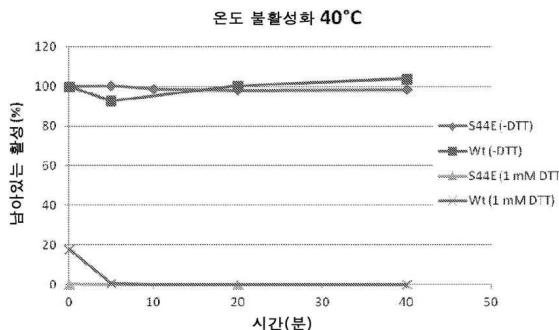
전체 청구항 수 : 총 22 항

심사관 : 김정아

(54) 발명의 명칭 엔도뉴클레아제

(57) 요 약

본 발명은 서열 번호 4의 서열을 갖거나, 상기 서열 번호 4의 서열과 적어도 70% 동일한 서열을 가지며, FYCGC 웨타펩타이드 모티프의 직접적인 N-말단인 아미노산 잔기는 음으로 하전된 잔기로 치환된 엔도뉴클레아제 I 또는 이의 효소적 활성 단편 및, 이를 효소들을 암호화하는 핵산 분자들 및 이를 효소를 사용하여 시료로부터 오염시키는 폴리뉴클레오타이드들을 제거하는 방법을 제공한다.

대 표 도 - 도6a

(72) 발명자

솔스타드, 테레세

노르웨이, 엔-9100 크발뢰위슬레타, 링셀베이엔 10

로렌트젠, 마리트

노르웨이, 엔-9022 크로켈프달렌, 스카이텔스티엔
3비

알터마크, 브존

노르웨이, 엔-9014 트롬쇠, 원스톤 쳐쥘스 버그 85

레이로스, 인가

노르웨이, 엔-9017 트롬쇠, 잘스테인엔 15비

헬란드, 론니

노르웨이, 엔-9020 트롬스달렌, 홀메스레트베이엔
14

명세서

청구범위

청구항 1

엔도뉴클레아제 I으로서,

상기 엔도뉴클레아제 I은 비브리오(*Vibrio*) 엔도뉴클레아제 I이고, 서열 번호 4의 서열을 포함하거나, 상기 서열 번호 4의 서열과 적어도 90% 동일한 서열을 포함하며, FYCGC 웬타펩타이드 모티프의 직접적인 N-말단인 아미노산 잔기가 음으로 하전된 잔기로 치환되고, 상기 음으로 하전된 잔기는 글루탐산, 아스파르트산, 4-플루오로-DL-글루탐산, γ-카복시-DL-글루탐산 및 D-2-아미노아디프산으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 엔도뉴클레아제 I.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 음으로 하전된 잔기가 글루탐산인, 엔도뉴클레아제 I.

청구항 4

제1항에 있어서, 비브리오 살모니키다(*Vibrio salmonicida*)로부터 유래된, 엔도뉴클레아제 I.

청구항 5

제1항에 있어서, 0.5mM TCEP의 존재 하에서 50°C에서 30분 동안 항온처리하고 0.5mM TCEP의 존재하에 잔류 활성 평가시, 실질적으로 불활성화인 것인, 엔도뉴클레아제 I.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 엔도뉴클레아제 I이 0.5M 염화나트륨의 농도에서, 이의 최적 염 농도에서 나타낸 촉매 활성의 60% 이상의 촉매 활성을 갖는, 엔도뉴클레아제 I.

청구항 7

시료를 제1항 및 제3 내지 제6항 중의 어느 한 항의 정의에 따른 엔도뉴클레아제 I와 접촉시키는 것을 포함하는 시료로부터 오염시키는 폴리뉴클레오타이드들을 제거하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 시료를 상기 엔도뉴클레아제 I과 내부의 임의의 폴리뉴클레오타이드의 분해를 허용하는 조건들 하에서 접촉시킨 다음 상기 시료 및 엔도뉴클레아제 혼합물을 불활성화 첨가제와 상기 엔도뉴클레아제를 불활성화시키기에 충분한 시간 및 온도로 접촉시키는, 방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 시료가 재조합적으로 생산된 관심 단백질을 함유하는 제제(preparation)인, 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 단백질이 효소인, 방법.

청구항 11

제7항에 있어서, 상기 시료가 관심 분석물 단백질을 함유하는, 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 시료가 세포 용해물, 조직 시료 또는 체액으로부터 유래된, 방법.

청구항 13

제7항에 있어서, 상기 시료가 항체 또는 항체 단편을 포함하는, 방법.

청구항 14

제7항에 있어서, 상기 시료가 DNA 결합 단백질 또는 용액 중에서 핵산들과 결합하는 단백질을 포함하는, 방법.

청구항 15

제7항에 있어서, 상기 시료가 폴리뉴클레오타이드 분석 기술에 사용될 수 있는 시약 용액인, 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오타이드 분석 기술이 PCR 또는 DNA/RNA 서열분석인, 방법.

청구항 17

제8항에 있어서, 상기 불활성화 첨가제가 금속 이온 칼레이트제 또는 이황화물 결합 환원제인, 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 첨가제(agent)가 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA), 디티오트레이톨(DTT), 2-머캅토에탄올, 2-머캅토에틸아민-HCl, TCEP(트리스(2-카복시에틸)포스핀) 및 N-에틸말레이미드로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 19

제1항 및 제3항 내지 제6항 중의 어느 한 항의 정의에 따른 엔도뉴클레아제 I을 암호화하거나 상기 엔도뉴클레아제 I을 포함하는 단백질을 암호화하는, 핵산 분자.

청구항 20

제1항 및 제3항 내지 제6항 중의 어느 한 항의 정의에 따른 엔도뉴클레아제 I을 적합한 숙주 세포 내에서 발현시키는 단계, 및 상기 숙주 세포들 및/또는 상기 세포들이 배양된 배지들로부터 상기 엔도뉴클레아제를 후속적으로 분리하는 단계를 포함하는, 엔도뉴클레아제 I을 분리 및 정제하는 방법.

청구항 21

제1항 및 제3항 내지 제6항 중의 어느 한 항의 엔도뉴클레아제 I 및 제2 엔도뉴클레아제 I을 포함하는, 조성물.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 제2 엔도뉴클레아제 I이 서열 번호 5의 서열을 포함하는, 조성물.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 제2 엔도뉴클레아제 I이 비브리오 콜레라(*Vibrio cholerae*)로부터 유래된, 조성물.

발명의 설명**기술 분야**

[0001] 본 발명은 특히 열불안정성(thermolabile) 특성을 나타내는, 온화한 처리 조건들에 의해 불활성화된 엔도뉴클레아제들에 관한 것이다. 본 발명은 또한 이러한 엔도뉴클레아제의 사용을 통해 생물학적 제제(preparation)로부터, 오염시키는 폴리뉴클레오타이드들을 제거하는 것을 포함한다. 본 발명은 또한 엔도뉴클레아제의 사용을 통해 핵산 증폭 반응들, 특히 폴리머라제 연쇄 반응(PCR) 설정(set up)을 포함하는 증폭 반응들에서 거짓 양성

결과들을 방지하는 것에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

핵산들 및 특히 계놈성 DNA는 시료 속에서 점도를 생성하거나 정제, 하부 분석(downstream analysis) 또는 적용들을 방해하므로 흔히 세포 배양물들, 세포 용해물들(cell lysates) 및 단백질 정제 및 분석에서 문제점을 지닌다. DNA 및 핵산의 제거는 물리적으로, 화학적으로 또는 효소적으로 수행할 수 있다. DNA 및 RNA의 효소적 제거는 뉴클레아제들을 침가함으로써 달성할 수 있다. 그러나, 뉴클레아제들은, DNA가 효소적 분해(degradation)로부터 이를 보호하는 단백질들 또는 다른 분자들에 결합하고 있으므로, 흔히 복합 생물학적 시료들에서 DNA를 분해하는데 실패한다. 염화나트륨이 흔히 대표적인 세포 분해 완충액들에 첨가되어 단백질-DNA 상호작용들을 제한시킴으로써, 하부 단백질 정제시 DNA의 제거를 촉진한다. 불행하게도, 대부분의 뉴클레아제들은 보통의 염 농도들에서 고도로 억제되거나 불활성화되어, 흔히 효소 제거를 불충분하게 한다. 따라서, 모든 미량들(traces)의 DNA를 단백질들, 시약들 또는 생물학적 시료들로부터 제거하는 것은 흔히 골칫거리이다.

[0003]

세포 용해물들, 단백질 정제 및 분석 단계들 전에 벤조나제[세라티아 마르케스켄스(*Serratia marcescens*) 뉴클레아제], 옴니클레이브(Omnicleave) (Epicentre) 또는 DNase I과 같은 몇가지 상업적인 대안들이 핵산들을 효소적으로 제거하기 위해 존재한다. 그러나, 보통의 열-처리에 의해 불활성화될 수 있는 선택사항은 존재하지 않는다. 사용 후 상기 효소를 제거하기 위해서는, 각종 수지들, 억제제들 또는 컬럼 정제 단계들이 전형적으로 요구된다. 이는, 추가적인 시약(reagent) 또는 정제 단계가 사용 후 상기 뉴클레아제를 제거하는데 요구되기 때문에 효소적 방법을 사용하기에 보다 골칫거리가 되도록 한다. 이는 보다 더 시간 소모적이며 관심 단백질의 보다 적은 수율을 생성할 수 있다.

[0004]

단백질 정제 시 또는 시약들로부터 미량들의 DNA를 제거하는 것과 관련된 문제들은 시판되는 폴리머라제들 및 마스터 혼합물들(master mixes)에서 흔히 발견된 내인성(endogenous) DNA에서 명백하다. 나아가, 분자 생물학적용들(예를 들면, PCR 및 서열분석) 및 분자 진단들을 위한 시약들은 오염시키는 DNA 및 뉴클레아제들 둘다 없어야 한다. 사용 후 위에서 기술한 뉴클레아제들을 제거하는 것과 관련된 곤란성들은, 이들을 DNA 기술들을 위해 사용된 시약들을 세정하는데 덜 적합하도록 한다.

[0005]

PCR과 같은 핵산 증폭 기술들은 생물공학에서 이용 가능한 가장 강력한 도구들 중 하나이며, 소량의 핵산만을 함유하는 시료로부터 표적 서열의 다수의 카피들을 제조하도록 한다. PCR의 경우, 이중 가닥(double strand) 표적 서열의 이들 각각의 단일 가닥(single strand)들과 상보성인 올리고뉴클레오타이드 프라이머들은 표적 서열 및 유리된 뉴클레오타이드들을 함유하는 반응 혼합물에 첨가된다. DNA 폴리머라제의 존재하에서 열 주기(thermal cycling)는 프라이머들 사이의 서열의 증폭을 생성한다. PCR 공정에 의해 생성된 증폭된 단편들의, 후속적인 PCR 주기들을 위한 주형들로서 작용하기 위한 능력은 표적 서열의 상당한 양의 신속한 생산을 생성한다.

[0006]

핵산 오염의 유해한 효과들에 대한 특수한 민감성의 증폭 반응들은 정량적 PCR(quantitative PCR, qPCR) 기술들인데, 이는, 이들이 반응 시 DNA 서열의 20개 미만의 카피들을 정량화하는 능력을 가지고 있기 때문이다. 따라서, 심지어 최저 수준(level)들의 핵산 오염으로도 qPCR 기술들에서 거짓 결과들을 제공할 수 있다. 또한, 상기 방법들은 필연적인 배경 신호(background signal)를 초과하는 상기 증폭된 표적 핵산들로부터의 신호들을 검출하는 것을 필요로 한다. 오염시키는 핵산은 이러한 배경 신호에 기여할 수 있으므로 상기 기술의 민감성을 감소시킨다. 그 자체로, 오염시키는 핵산을 최소화하는 것은 정량적 PCR 실험의 민감성을 극대화시킨다. 소수들의 표적 핵산들의 카피들이 검출되는 실험들, 예를 들면, 정량적 PCR-계 병원체 진단들 및 병원체 부하 정량화에서, 정량적 PCR의 민감성을 극대화시키고 거짓 양성들을 최소화하는 것이 중요하다. qPCR 기술들에 의해 표적화되는 고도로 보존된 세균성 DNA의 단편들(segments)이(예를 들면, 16SrRNA 또는 23SrRNA 유전자들) 세균 동정(identification) 및 진단들의 분야에서, DNA 폴리머라제 제제(이는 세균들 및 세균 별현 시스템들로부터 전형적으로 수득된다)로부터 생성되는 핵산 오염은 주요 문제이다. DNA 폴리머라제 제제들로부터 세균성 핵산 오염들을 효율적으로 제거하는 방법들이 요구된다. 특히, 하부증폭 반응(downstream amplification reaction)들에 유해한 영향을 미치지 않고 폴리머라제를 손상시키지 않으면서 이를 달성할 수 있는 방법들이 고려된다.

[0007]

개개의 PCR 반응 혼합물들을 표적 서열 내부를 절단시키는 엔도뉴클레아제들을 사용하여 표적 DNA 및 Taq DNA 폴리머라제의 첨가 전에 처리함으로써, 오염시키는 DNA의 증폭을 방지할 수 있음이 제안되어 왔다(참조: Furrer et al. Nature. Vol. 346 page 324, 1990). 상기 방법은 30분의 탈오염 시간을 필요로 하고 탈오염 후 엔도뉴클레아제를 불활성화시키기 위하여 반응 혼합물을 비등시키는(boiled) 것을 필요로 한다. 상기 비등 단계로 인하여, 오염 후 DNA 폴리머라제를 첨가하는 것이 필수적이다. 물론, 이는 예비-증폭 혼합물 내로 결과물(carry-

over)의 도입에 대한 추가적인 위험성을 나타내며, DNA 폴리머라제 자체의 탈오염을 배제한다.

[0008] DNA를 특이적으로 파괴하는 열불안정성 엔도뉴클레아제들(DNases)이 개시되어 왔다. WO 제99/007887호는 94°C에서 2분 후 실질적으로 비가역적으로 불활성화되는 판달루스 보레알리스(*Pandalus borealis*)로부터 분리된 DNase를 개시하고 있다. 이러한 동일한 효소는 또한 65°C에서 15분 후 실질적으로 비가역적으로 불활성화된다. 그러나, 상기 온도들은 특정 적용들의 경우 너무 높으며 오염시키는 RNA 및 단일가닥 DNA(ssDNA)를 제거하기 위한 요구가 또한 존재한다.

[0009] 엔도뉴클레아제 I은, RNA 및 DNA 둘 다를 서열 의존적 방식으로 절단하는 것으로 알려진 약 25 kDa의 주변세포질 또는 세포외, 단량체성 효소이다. 이는 많은 다양한 프로테오박테리아 및 피브로박터(*Fibrobacter*)에서 발견된다. 상기 구조는 9개의 베타 가닥들, 5개의 짧은 나선들 및 5개의 긴 나선들을 함유하는 혼합된 알파/베타 위상(*topology*)을 갖는다. 이는 플라스미드들과 ssDNA를 절단할 수 있다. 이는 포스포디에스테르 결합의 3' 말단에서 절단한다.

[0010] 열불안정성인 엔도뉴클레아제들은 당해 기술 분야에서 문헌[참조: Altermark et al., FEBS Journal; 2007, 274: 252 내지 263]에 기술되어 있다. 이들은 호냉(*psychrophilic*) 세균 비브리오 살모니키다(*Vibrio salmonicida*)로부터 분리된 엔도뉴클레아제 I(VsEndA, 서열 번호 1)을 개시하고 있다. 상기 효소는 중온성(*mesophilic*) 세균 비브리오 콜레라(*Vibrio cholerae*)로부터 분리된 엔도뉴클레아제 I(VcEndA, 서열 번호 3)에서 발견된 동일한 조건들 하에서의 거의 100% 활성과 비교하여, 50°C의 온도에서 20% 미만의 활성(당해 효소의 최적 활성에 대한 비교)인 효소 활성을 갖는 것으로 밝혀졌다. 더욱이, 70°C에서 비가역성 언폴딩(unfolding) 비율은 VsEndA의 경우 VcEndA보다 더 높았다.

[0011] 세균 V. 살모니키다(*V. Salmonicida*) 및 V. 콜레라(*V. cholerae*)의 중간의 호염성(*halophilic*) 특성들로 인하여, 위에서 기술된 VsEndA 및 VcEndA는 고 염분 용액들 속에서 효소적으로 보다 더 활성인 것으로 보고되고 있다. 니이라넨(Nirinanen) 등의 문헌(참조: FEBS Journal; 2008, 275: 1593 내지 1605)은, 촉매 상수(*kcat*)가 VcEndA 및 VsEndA 효소들 각각에 대해 0.25M 및 0.5M의 염 농도에서 최대임을 나타낸다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 온화한 온도들에서 불활성화될 수 있고 단백질의 활성에 유해하게 영향을 미치지 않는 엔도뉴클레아제, 또는 제조시 다른 관심 분자는 생물학적 제제로부터 오염시키는 폴리뉴클레오타이드들을 제거하기 위한 매우 효과적이고 효율적인 방법을 제공할 수 있다. 이상적으로, 상기 엔도뉴클레아제는, DNA 단백질 상호작용들을 제한하고 엔도뉴클레아제의 첨가 후 보다 순수한 단백질 시료를 생산하기 위해 염화나트륨이 흔히 제제들에 첨가되므로, 높은 수준의 염도를 함유하는 제제들을 견딜 수 있다. 그러나, 이를 특성들을 지닌 현재 이용가능한 엔도뉴클레아제는 존재하지 않는다.

[0013] 온도에서의 변화들에 의해 가역적이지 않은 뉴클레아제의 불활성화는 실온에서 수행될 수 있는 추가적인 방법들에서 사용되어야 하거나 실온 성분과의 주기들을 포함하는 제제들의 경우 특히 중요하다. 단순한 열불안정성, 즉, 기존의 효소들보다 낮은 온도에서의 언폴딩은 충분하지 않다. 온화한 조건들, 예를 들면, 저온들 하에서의 불활성화는 유용한 효소를 제공하기 위해 초기 합성시 정확하게 폴딩된 단백질의 충분한 수율과 조합(combine d)할 필요가 있다.

[0014] 본 발명자들은, 놀랍게도 VsEndA 효소의 아미노산 서열 내 단일 점 돌연변이가 심지어 고 염분의 제제들 속에서도 효소적으로 활성을 유지하며, 여전히 온화한 조건들 하에서 불활성화될 수 있음을 발견하였다. 잔기의 치환은 놀랍고도 유리한 물성을 갖는 효소를 생성하며, 상기 잔기는 44번 위치에서 발견된 세린 잔기이다. 상기 세린 잔기는 고도로 보존된 웨타펩타이드 모티프(motif)의 직접적인 N-말단에 위치한다(페닐알라닌-타이로신-시스테인-글리신-시스테인, 또는 Phe-Tyr-Cys-Gly-Cys, 또는 FYCGC). 야생형(wild-type, wt) VsEndA의 서열은 서열 번호 1로 나타내며 도 1에 나타낸다. 번호매김(44)은 세포질로부터 주변세포질로 수송 동안 절단되는 N 말단 신호 웨타이드를 포함한다. 신호 서열은 도 3 및 4에 나타내지 않으며 이를 도면들에서 번호매김은 상응하게 조절된다.

[0015] 알터마크(Altermark) 등의 문헌(참조: Biological Crystallography; 2006, D62, 1387 내지 1391)의 발견들로부터

터, 상기 세린 잔기가 묻힌(buried) 클로라이드 이온과의 복합체의 부분을 형성함이 입증되었다. 상기 세린 잔기는, 엔도뉴클레아제 I 효소가 유래된 세균들의 종들에 따라 다양한 위치들에서 발견될 수 있다(예를 들면, VcEndA내 등가의(equivalent) 세린 잔기는 42번 위치에서 발견되며, V. 불니피кус(V. vulnificus)로부터 유래된 엔도뉴클레아제 I은 41번 위치에서 발견된다). 비브리오 속(genus)들의 다양한 세균들로부터 유래된 엔도뉴클레아제들의 서열들을 연구하는 것으로부터, 40 내지 50번 서열 위치에서 클로라이드 이온과 상호작용하는 아미노산은 항상 세린이 아님이 밝혀져 왔다. V. 푸르니씨이(V. furnissii)로부터 유래된 엔도뉴클레아제에서, 예를 들면, 등가의 아미노산은 트레오닌이다.

[0016] 본 발명자들은, 음으로 하전된 상기 세린 잔기 또는 또 다른 극성 잔기의 치환은 상기 특성을 지닌 효소를 생성함을 발견하였다.

[0017] 따라서, 본 발명에 따르면, 엔도뉴클레아제 I 또는 이의 효소적 활성 단편이 제공되며, 서열 번호 1의 서열을 갖거나, 상기 서열 번호 1의 서열과 적어도 60% 동일한 서열을 가지지만, FYCGC 펜타펩타이드 모티프의 직접적인 N-말단인 아미노산 잔기가 음으로 하전되거나 극성인 잔기로 치환되고, 상기 엔도뉴클레아제 I 또는 이의 효소적 활성 단편은 10mM 디티오토레이톨(DTT)의 존재 하에서 15분 동안 30°C에서 항온처리하는 경우 실질적으로(비가역적으로) 불활성화된다.

[0018] 대안적으로, 본 발명은 엔도뉴클레아제 I 또는 이의 효소적 활성 단편을 제공하며, 서열 번호 1의 서열을 갖거나, 상기 서열 번호 1의 서열과 적어도 60% 동일한 서열을 가지지만, FYCGC 펜타펩타이드 모티프의 직접적인 N-말단인 아미노산 잔기가 음으로 하전되거나 극성인 잔기로 치환되고, 상기 엔도뉴클레아제 I 또는 효소적 활성 단편은 10mM DTT 또는 10mM 트리스(2-카복시에틸)포스핀(TCEP)의 존재하에 6시간 동안 4°C에서 항온처리하는 경우 실질적으로(비가역적으로) 불활성화된다. 적절한 불활성화 조건들은 온도, 항온처리 시간 및 어떠한 침가된 화학적 탈안정화제들의 농도의 반영임이 인식된다. 상기 조건들은 본 발명의 효소들을 정의하는 시험들을 제공하며, 조건들의 추가적인 세트들 및 완전한 분석(assay) 프로토콜들은 실시예들에 기술되어 있다.

과제의 해결 수단

[0019] 대안적으로 고찰할 때, 본 발명은 첫번째로, 10mM DTT의 존재하에 30°C에서 15분 동안 항온처리하거나, 10mM DTT 또는 10mM TCEP의 존재하에 4°C에서 6시간 동안 항온처리시, 엔도뉴클레아제 I 또는 이의 효소적 활성 단편을 제공한다.

[0020] 따라서, 불활성화를 제공하는 조건들이 변할 수 있지만, 바람직한 치환의 본질(nature)은 동일하므로, 대안적으로 고찰할 때, 본 발명은 서열 번호 1 또는 4와 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 90%, 95% 또는 98% 동일하지만, FYCGC 펜타펩타이드 모티프의 직접적인 N-말단인 아미노산 잔기가 음으로 하전되거나 극성인 잔기로 치환된 엔도뉴클레아제 I 또는 이의 효소적 활성 단편을 제공한다.

[0021] 음으로 하전되거나 극성인 잔기는 유전적으로 암호화되거나 비-유전적으로 암호화될 수 있다. 바람직하게는, 도입된 아미노산은 음으로 하전된다. 아미노산들 및 특히 이들의 측쇄 관능기(functional group)들과 관련하여 극성 및 전하는 당해 기술 분야에서 잘 이해되며 전형적으로 정상의 생리학적 조건들 하에서 평가된다.

[0022] FYCGC 펜타펩타이드 모티프의 직접적인 N-말단인 아미노산 잔기의 "치환"에 의해, 상기 잔기가 다른 아미노산에 의해 치환되는 것을 의미하며, 상기 잔기는 전형적으로 유전적으로 암호화되지만 가능하게는 비-유전적으로 암호화된 아미노산 또는 아미노산 유도체이다. 바람직하게는, 전형적으로 세린인 잔기는 글루탐산 또는 아스파르트산과 같은 음으로 하전된 아미노산, 또는 트레오닌, 아스파라긴 또는 글루타민과 같은 또 다른 극성 아미노산으로 치환된다. 대안적으로, 상기 아미노산 잔기는 음으로 하전되거나 극성인 비-유전적으로 암호화된 아미노산으로 치환된다. 바람직한 비-유전적으로 암호화된 아미노산들은 4-플루오로-DL-글루탐산, γ-카복시-DL-글루탐산 및 D-2-아미노아디프산과 같은 글루탐산 유도체들이다. 가장 바람직한 구현예에서, FYCGC 펜타펩타이드 모티프의 직접적인 N-말단인 아미노산 잔기는 글루탐산으로 치환된다.

[0023] 바람직한 구현예에서, 본 발명의 엔도뉴클레아제 I 또는 이의 효소적 활성 단편은 0.5mM의 TCEP의 존재하에 50°C에서 30분 동안 항온처리하는 경우 실질적으로 불활성화되며 잔류 활성은 0.5mM의 TCEP의 존재하에 평가되고; 바람직하게는 엔도뉴클레아제 I 또는 이의 효소적 활성 단편은 이를 조건들하에서 비가역적으로 불활성화된다.

[0024] 추가적인 양태에서, 본 발명은 위에서 기술한 엔도뉴클레아제를 사용함을 포함하여 시료로부터 오염시키는 폴리뉴클레오타이드들을 제거하는 방법을 포함한다. 상기 방법은 시료를 상기 정의에 따른 엔도뉴클레아제와 접촉

시키는 것을 전형적으로 포함할 것이다.

[0025] 바람직한 구현예에서, 시료는 관심 단백질, 예를 들면 재조합적으로 생산된 관심 단백질, 예를 들면, 효소를 함유하는 제제이다. 대안적으로, 관심 단백질은 출발 물질로부터 정제하는 것이 바람직한 분석물(analyte) 또는 다른 단백질일 수 있다. 상기 제제는 세포 용해물 또는 조직 시료 또는 체액일 수 있거나 이로부터 유래될 수 있다.

[0026] 관심 단백질은 항체 또는 항체 단편일 수 있다. 단백질(예를 들면, 항체)는 진단 또는 치료학적 방법들에서 유용할 수 있다. 따라서, 위에서 기술한 방법은, 진단 또는 치료 단백질이 오염시키는 폴리뉴클레오타이드들을 함유하지 않음으로써 안전하게 투여될 수 있음을 보장하기 위하여 사용될 수 있다.

[0027] 관심 단백질은 DNA 결합 단백질이거나 용액 속에서 핵산과 결합하는(associated with) 다른 단백질일 수 있다. 특히, 이러한 단백질에 대한 염은 핵산으로부터 관심 단백질을 분리하기 위해, 편리하게 사용되어 염의 존재하에서 본 발명의 기능에 대한 엔도뉴클레아제의 관찰된 능력을 제공할 수 있다.

[0028] 본 발명의 엔도뉴클레아제는 50mM 내지 1M, 바람직하게는 약 500mM의 염(예를 들면, 염화나트륨 또는 염화칼륨) 농도들에서 특히 효과적일 수 있다. 많은 뉴클레아제들이 세포 용해물 및 정제 완충액들 내에 전형적으로 가해진 높은 염화나트륨 농도들에서 억제되며 본 발명의 엔도뉴클레아제들의 염 내성은 특히 유리하다. 바람직하게는, 본 발명의 엔도뉴클레아제들은 0.5M의 염화나트륨 또는 염화칼륨에서 최적의 촉매 활성(본원에서 평가된 바와 같음) 또는 최적의 염 농도에서 나타낸 활성의 60% 이상, 바람직하게는 75% 이상인, 상기 염 농도에서의 활성을 갖는다. "최적의 염 농도"는, 효소가 이의 최대 촉매 활성을 갖는 염화나트륨의 농도이다. 달리 고찰할 때, 본 발명의 엔도뉴클레아제들은, 염화나트륨의 농도가 0.35 내지 0.65M, 바람직하게는 0.45 내지 0.55M, 보다 바람직하게는 대략 0.5M인 경우 최적의 촉매 활성을 갖는다.

[0029] 다른 구현예에서, 생물학적 제제는 예를 들면, PCR, DNA/RNA 서열분석 또는 마이크로어레이들(microarrays)과 같은 폴리뉴클레오타이드 분석 기술에서 사용된 시약 용액이다. 시약 용액은 PCR 마스터 혼합물(master mix) 또는 완충 용액과 같은 비-단백질 성분 또는 혼합물을 포함하거나 이로 이루어질 수 있다. 위에서 기술된 엔도뉴클레아제는 시약으로부터 임의의 폴리뉴클레오타이드 오염물을 제거하여, 불활성화시키는데 사용될 수 있으며, 이후 상기 시약은 관심 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 시료에 적용됨으로서 상기 시약의 첨가를 통해 시료에 도입되는 오염 경향성을 감소시킬 수 있다.

[0030] 본 발명은 폴리뉴클레오타이드들에 의한 오염을 방지하거나 제한하고 특히 거짓 양성 결과들을 방지하거나 감소시키는 데 유용성을 가지며, 증폭 시약들 및 효소들에서 내인성 폴리뉴클레오타이드들로 인한 배경(양성의 주형이 없는 대조군들)을 감소시키는데 있어서의 유용성을 갖는다.

[0031] 본 발명의 엔도뉴클레아제들은 증폭 반응들에서 내인성 DNA의 제거 또는 감소 시 사용하기에 적합하다. 이는, 엔도뉴클레아제의 불활성화 온도가 낮을수록 증폭 공정 동안 이를 불활성화하기가 보다 용이하며 불활성화 단계에서 사용된 임의의 소정의(given) 온도에서 달성될 수 있는 불활성화 정도가 보다 더 크기 때문이다.

[0032] 본 발명의 엔도뉴클레아제는 따라서 증폭 반응 혼합물 속에 존재하는 비-표적 폴리뉴클레오타이드들 또는 이의 개개 성분들, 예를 들면, 폴리미라제를 분해(degrading)시키는데 사용된다. 이에 의해, 비-특이적인 증폭이 감소되거나 피해질 수 있다.

[0033] 본 발명의 엔도뉴클레아제는 저온들에서 불활성화될 수 있으므로, 하나의 바람직한 구현예에서, 엔도뉴클레아제는 관심 단백질 또는 시약을 함유하는 용액으로부터 오염시키는 폴리뉴클레오타이드들을 제거하는데 사용되며, 상기 단백질 또는 시약은 37°C(엔도뉴클레아제가 효소적으로 활성인 온도) 초과의 온도들에서 자체적으로 열불 안정성이다.

[0034] 본 발명의 엔도뉴클레아제의 불활성화는 전형적으로 엔도뉴클레아제를 불활성화 첨가제와 함께 항온처리하는 것을 전형적으로 포함할 것이다. 상기 불활성화 첨가제는 엔도뉴클레아제를 탈안정화시키는데, 즉, 소정의 온도에서 이것이 언폴딩에 대해 보다 민감하도록 한다. 엔도뉴클레아제 I은 조정된(coordinated) Mg^{2+} 및 다종 이황화물 결합들을 함유하며 당업자는 이를 탈안정화시키는 효소의 이들 또는 다른 특성들을 표적화할 수 있는 제제들을 인식할 것이다.

[0035] 엔도뉴클레아제 내의 조정된 Mg^{2+} 이온으로 인하여, Mg^{2+} 이온들의 농도는 엔도뉴클레아제의 활성에 있어서 중요할 수 있다. 이러한 이유로, 1 내지 20mM, 바람직하게는 5 내지 10mM의 Mg^{2+} 또는 Mn^{2+} 이온들의 농도를 본 발

명의 방법들에서 사용할 수 있다. PCR 또는 단백질 정제 완충액은 전형적으로 염화마그네슘의 형태의 5mM의 Mg^{2+} 이온 농도를 갖는다.

[0036] 불활성화 첨가제는 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA)과 같은, 금속 이온 칠레이트제(chelating agent)일 수 있다. 불활성화 첨가제는 또한 이황화물 결합 환원제(즉, 단백질 내 2개 이상의 시스테인 잔기들 사이의 이황화물 결합들을 억제하고/하거나 파괴하는 제제)일 수 있다. 이러한 제제들의 예들은 DTT, 2-머캅토에탄올(또한 β -머캅토에탄올로 공지됨), 2-머캅토에틸아민-HCl, TCEP(트리스(2-카복시에틸)포스핀) 및 N-에틸말레이미드를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. TCEP 및 DTT가 바람직하며, TCEP가 특히 바람직하다. 당업자는 불활성화를 개선시킬 수 있지만 그의 하부 반응들에 유해하지 않을 수 있는 그의 요구들을 위한 이황화물 결합 환원제의 적절한 농도들을 측정할 수 있다. 예를 들어, DTT는 0.05 내지 50 mM의 농도에서 불활성화 단계로 편리하게 혼입될 수 있다.

[0037] 바람직하게는, 본 발명의 방법들에서 엔도뉴클레아제의 불활성화는 0.5 내지 50mM, 보다 바람직하게는 1 내지 20mM, 예를 들면, 5 내지 20mM의 불활성화 첨가제(예를 들면, DTT)의 농도에서 발생한다.

[0038] 따라서, 바람직하게는 불활성화 첨가제는 적어도 1mM의 농도에서 존재한다.

[0039] 실시예들에 나타낸 바와 같이, 불활성화를 위해 요구되는 조건들은 항온처리 온도 및 시간의 유연한 조합 및 불활성화 첨가제 농도를 나타낸다. 따라서, 불활성화는 5 내지 10분의 항온처리 후 40°C에서 1mM TCEP를 사용하여, 또는 30°C에서 10mM DTT를 사용하여 15분 동안 달성할 수 있다. 처리될 생물학적 제제의 본질 및 이의 후속적인 용도들에 따라서, 조건들의 임의의 조합이 적절한지는 당해 기술 분야의 당업자에게 명백할 것이다. 본 발명의 엔도뉴클레아제들은 열불안정성이지만 이를 불활성화시키기 위해 효소를 가열하는 것이 필수적이지 않을 수 있다는 것이 앞서의 내용으로부터 인식되어야 한다.

[0040] 따라서, 추가적인 양태에서, 본 발명은 본 발명의 엔도뉴클레아제와, 내부의 어떠한 폴리뉴클레오타이드의 분해(digestion)도 허용하는 조건들 하에 시료와 엔도뉴클레아제를 접촉시킨 후 상기 시료 및 엔도뉴클레아제 혼합물을 불활성화 첨가제와 상기 엔도뉴클레아제를 불활성화시키기에 충분한 시간 및 온도로 접촉시키는 것을 포함하여, 시료로부터 핵산(오염물)을 제거하는 방법을 제공한다.

[0041] 2회의 접촉 단계들은 전형적으로 항온처리들일 수 있으며 본원, 특히 실시예들에 설명되어 있다. 시료 속에서 핵산들의 분해를 달성하기에 적합한 항온처리 조건들은 당해 기술 분야에 공지되어 있으며 편리하게는 10 내지 50°C, 예를 들면, 대략 35 내지 37°C에서 5 내지 30분, 예를 들면, 10 내지 20분, 바람직하게는 대략 15분 동안의 항온처리를 포함할 수 있다.

[0042] 본원에 또한 설명된 바와 같이, 불활성화를 위한 항온처리 조건들은 10°C 미만의 온도에서 현저히 변할 수 있으며 항온처리는 1 내지 24 시간 동안일 수 있고, 10 내지 30°C의 온도에서 항온처리는 10분 내지 2시간일 수 있으며 30°C 초과의 온도(예를 들면 30 내지 70°C, 보다 바람직하게는 40°C)에서, 항온처리는 전형적으로 5 내지 30분일 것이다. 본원의 실시예들에 나타낸 바와 같이, 불활성화 첨가제의 농도 및 선택은 또한 항온처리 시간들/온도에 영향을 미칠 것이다. 불활성화 첨가제들은 바람직하게는 앞서 언급한 낮은 항온처리 온도들에서 사용될 것이다.

발명의 효과

[0043] 달리 고찰한 것으로서, 본 발명의 당해 양태는 증폭 반응 혼합물 또는 시약으로부터 핵산 오염물을 제거하는데 있어서 본 발명의 엔도뉴클레아제의 용도를 제공한다.

[0044] 추가적인 양태에서, 본 발명은 또한 핵산 증폭 반응들에서의 결과물(carry-over)로 인한 거짓 양성 결과들을 방지하거나 감소시키는 방법을 제공하며, 상기 방법은 본 발명의 엔도뉴클레아제를 사용하여 증폭 반응 혼합물 또는 이의 개개 성분들 속에 존재하는 비-표적 폴리뉴클레오타이드들의 결과물을 분해함을 포함한다.

[0045] 본 발명의 엔도뉴클레아제를 또한 사용하여 DNA 폴리머라제 제제들로부터 핵산 오염물질들을 제거하고 또한 DNA 폴리머라제를 포함하는 증폭 반응 혼합물들로부터 핵산 오염물질들을 제거하는데 사용할 수 있다. 본 발명의 엔도뉴클레아제의 낮은 불활성화 온도는, 탈오염 후 엔도뉴클레아제의 불활성화가 폴리머라제에 대해 유해한 영향없이 달성될 수 있음을 의미한다.

[0046] 용어 "핵산 증폭 반응"은 핵산의 표적 서열의 카피들의 수를 증가시키기 위한 시험관 내 임의의 수단들을 말한

다. 바람직하게는, 방법들은 "열 주기(thermal cycling)", 즉, 고온 주기를 포함할 것이다. 증폭 방법들은 PCR 및 이에 대한 변형들, 3SR, SDA, LAR 또는 LCR 및 LAMP 및 이에 대한 변형들을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. PCR, LAMP 및 LCR 및 이들의 변형들은 열 주기 방법들이다. 방법들은 표적 서열의 카피들의 수에 있어서 선형 또는 대수적 증가를 생성할 수 있다. "변형들"은 실시간(real-time) 증폭, 정량적 및 반-정량적 증폭, 경쟁적 증폭 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0047] 표적 핵산은 선택된 증폭 방법에 따라 DNA 또는 RNA일 수 있다. 예를 들면, PCR의 경우 역 전사 단계와 조합되는 경우 표적이 RNA 서열인 것으로 고려될 수 있지만, 표적은 DNA이다. 3SR은 RNA 표적 서열들을 직접 증폭시킨다.

[0048] 용어 "증폭 반응 혼합물"은 표적 핵산을 증폭시키는데 사용된 각종 시약들을 포함하는, 일반적으로 수성의 임의의 용액을 말한다. 이들은 효소들, 수성 완충액들, 엔터 및 뉴클레오사이드 트리포스페이트들을 포함한다. 상기 용어는 성공적인 증폭 반응을 수행하기 위한 모든 필수적인 성분들을 함유하는 혼합물들 및 불완전하고, 필요한 성분들 중의 일부만(예를 들면, 적어도 2, 3 또는 4개)을 함유하는 혼합물들을 말한다. 용어 "완전한(complete)"으로 시작하는 경우, 반응 혼합물은 증폭에 필수적인 성분들 모두를 함유한다.

[0049] 용어 "결과물(carry over)"은 반응 혼합물 내로 우연히 또는 의도되지 않게 도입된 임의의 핵산, 특히 앞서의 증폭 반응들로부터의 표적 서열들 결과물을 설명하는데 사용된다.

[0050] 용어 "거짓 양성 결과"는 조사 하에서 핵산 시료가 표적 서열을 함유하지만 상기 증폭된 생성물이 결과물로부터 유래함을 나타내는 것으로 여겨지는 결과를 말한다. 명백하게, 본 발명이 제공하는 오염시키는 DNA의 감소는 법의학 및 진단 분야들에서 특히 유리하다. 본 발명의 방법들은 증가될 핵산 증폭의 특이성 및 민감성을 가능하도록 한다.

[0051] 용어 "엔도뉴클레오파제"는 폴리뉴클레오파제 끌격 내 포스포디에스테르 결합을 가수분해하고 뉴클레오파제 서열에 특이적이지 않은 효소를 말한다. 본 발명의 "엔도뉴클레오파제 I"은 ds 및 ss 폴리뉴클레오파제들, DNA 및 RNA를 절단할 수 있다.

[0052] 용어 "폴리뉴클레오파제"는 뉴클레오파제들의 임의의 가닥을 말한다. 이들 폴리뉴클레오파제들은 RNA 또는 DNA일 수 있고, 이중 가닥 또는 단일 가닥일 수 있다. 가닥들은 또한 선형이거나 또는 초-나선(super-coiled)일 수 있다.

[0053] 용어 "염"은 산 및 염기의 중화 반응으로부터 생성되는 임의의 이온성 화합물을 말한다. 관심 염들은 DNA-단백질 상호작용들을 제한 및 엔도뉴클레오파제의 첨가 후 보다 순수한 단백질 시료를 생산하는 데 흔히 사용되며, 당업자는 이를 염들을 인식할 수 있다. 염들 또는 특히 중요한 것은 염화나트륨 및 염화칼륨이다.

[0054] "실질적으로 불활성화된"은, 효소가 적어도 95% 불활성화되고, 바람직하게는 98% 불활성화되며, 보다 바람직하게는 효소가 100% 불활성화됨을 의미한다. DNA 시료(예를 들면, 500 bp PCR 생성물)를 불활성화된 엔도뉴클레오파제 또는 비-활성화된 엔도뉴클레오파제와 함께 적합한 완충액(예를 들면, 트리스, HEPES, PBS) 속에서 3시간 동안 37°C로 항온처리하고; 에티디움 브로마이드 아가로스 겔 위에서 전기영동에 의해 반응 생성물들을 분리하고 UV 광하에서 관련 DNA 밴드들의 형광성의 상대적인 강도들을 측정함으로써 불활성화 페센트를 편리하게 측정할 수 있다. 대체 방법들은, 당업자에 의해 불활성화되고 비-불활성화된 엔도뉴클레오파제들의 상대적 활성들에 대해 측정하기 위해 다양화될 수 있다. 예를 들어, DNA 시료들을 함유하는 SYBR 그린의 형광성에 있어서 상대적인 변화들이 사용될 수 있다. 추가적인 방법들은 쿠니츠 분석(Kunitz assay)(참조: Kunitz, M; 1950, S. Gen Physiol, 33:363 및 WO 2011/010094) 및 야마모토(Yamamoto)에 의해 다양화된 변형된 쿠니츠 분석(참조: Yamamoto, M; 1971, Biochem Biophys Acta, 228:95 및 WO 2011/010094)이다. 적합한 방법들은 본원의 실시예들에 설명되어 있다.

[0055] "비가역적" 불활성화의 잊점은, 엔도뉴클레오파제의 촉매적 기능이 온도에 있어서의 변화들에 의해 재획득될 수 없으므로, 여전히 불활성화된 엔도뉴클레오파제를 함유할 수 있는 처리된 시료가 관심 핵산의 분해없이 이러한 핵산과 접촉시킴을 포함하는 추가적인 공정 또는 적용들에서 사용될 수 있다는 것이다. 따라서, 엔도뉴클레오파제는 이의 활성을 회복하지 못하며 실질적으로 잔류 활성이 없는; 구체적으로, 5% 미만, 바람직하게는 2% 미만, 가장 바람직하게는 검출가능한 엔도뉴클레오파제 활성이 남아있지 않다. 본 발명의 효소들은 이러한 "비가역적" 불활성화(여러한 불활성화를 제공하는 조건들은 본원에 기술되어 있다)될 수 있으므로 불활성화는 바람직하게는 비가역적 불활성화이다. 불활성화는 불활성화 첨가제(agent), 예를 들면, 금속 이온 칠레이트제(chelating agent) 또는 환원제의 지속된 존재에 의존하는 경우에도 "비가역적"인 것으로 고려될 수 있다.

- [0056] 열 변화 내성("비가역적") 불활성화를 포함하는 불활성화는, 상기 정의한 바와 같이 여전히 엔도뉴클레아제를, 불활성화 첨가제와 접촉시키는 것이 요구될 수 있다. 상기 내용으로부터 달리 명백해지지 않는 한, 본원에 기술된 잔류 활성들은 불활성화 첨가제, 예를 들면, 적어도 0.1, 바람직하게는 적어도 0.2 mM의 첨가제, 예를 들면, TCEP의 지속된 존재로 추정되며; 보다 약한 환원제들(예를 들면, DTT)은 보다 높은 농도들, 예를 들면 적어도 0.5 또는 1mM을 필요로 할 수 있다. 전형적으로 10mM 이하, 바람직하게는 5mM 이하가 요구되거나 존재한다.
- [0057] 특정의 적용들의 경우, 불활성화 첨가제가 존재하지 않거나 필수적으로 존재하지 않는 경우에도 불활성인 엔도뉴클레아제 I을 갖는 것이 바람직할 수 있다. 불활성화제를 제거하는 방법들은 당해 기술 분야에 공지되어 있으며 투석 및, 탈염 또는 완충액 교환 컬럼들의 사용을 포함한다. 본 발명의 효소들은, 적절하게 처리되는 경우 이러한 정도로 불활성화될 수 있다. 적합한 조건들은 실시예 8에 설명되어 있다. 적절한 조건들은 (i) 사용된 불활성화 첨가제의 선택, (ii) 엔도뉴클레아제에 첨가된 불활성화 첨가제의 농도, (iii) 엔도뉴클레아제가 가열되는 불활성화 온도(불활성화 첨가제의 존재 하에서), (iv) 엔도뉴클레아제가 불활성화 온도에서 항온처리되는 시간, (v) 엔도뉴클레아제가 불활성화 온도(불활성화 첨가제의 존재 하에서)로부터 냉각 후 저장되는 온도 및 (vi) 엔도뉴클레아제가 저장 온도에서 항온처리되는 시간에 의존할 것이다.
- [0058] 당업자는, 불활성화 첨가제의 농도에 있어서의 증가와 같이, 불활성화를 선호하는 매개변수들(parameters) 중의 일부에 대한 변경들이, 비가역적 불활성화가 일어나도록 하기 위하여 엔도뉴클레아제가 저장 온도에서 불활성화 첨가제의 존재 하에서 저장되기에 필요한 시간과 같은 다른 매개변수들에 영향을 미칠 수 있다.
- [0059] 예로서, 본 발명자들은, VsEndA_S44E가, 10mM의 TCEP를 첨가하고 엔도뉴클레아제가 50°C로 60분 동안 가열된 후, 2일 동안 실온에서 저장(이후, TCEP는 제거된다)되는 경우 불활성화제의 부재 하에서조차 불활성화될 수 있음을 발견하였다.
- [0060] 대안적으로, 1mM의 TCEP를 엔도뉴클레아제에 가하고 상기 엔도뉴클레아제를 50°C로 60분 동안 다시 가열하지만 저장 온도를 37°C로 증가시키는 경우, 비가역적 불활성화를 위해 필요한 저장 시간은 1일로 감소된다.
- [0061] 온도에서의 임의의 초기 증가없이 이러한 불활성화를 달성하는 것이 가능하다. 예를 들면, VsEndA_S44E의 경우 불활성화는 이를 10mM TCEP와 함께 1일 동안 37°C에서 또는 실온에서 4일 동안 저장함으로써 달성될 수 있다. 이들 경우들에서, 본 발명자들은, TCEP를 투석으로 제거하는 경우에도, 효소가 불활성화된 상태로 잔존함을 발견하였다.
- [0062] 상기 기술한 불활성화 조건들의 변화는, 본 발명이 제공하는 엔도뉴클레아제들의 융통성을 나타낸다. 관심 시료가 불활성화 첨가제에 의해 영향받지 않는 것으로 알려진 경우, 당업자는 불활성화 시간 또는 온도를 감소시킬 수 있도록, 시료 속의 첨가제를 유지하도록 선택할 수 있다. 한편, 당업자가 불활성화 첨가제를 제거하는 것을 원하는 경우, 그 또는 그녀는 시료를 보다 긴 시간 동안 불활성화 첨가제와 함께 항온처리하거나 보다 높은 불활성화 온도로 적용시킬 수 있다.
- [0063] 실질적인 불활성화는 바람직하게는 약 30°C의 온도, 예를 들면, 28 내지 32°C의 온도에서 불활성화 첨가제의 존재 하에 15분의 항온처리 내에 일어난다. 본 발명의 엔도뉴클레아제는 보다 낮은 온도들 또는 보다 짧은 기간들 동안 실질적으로 불활성화될 수 있지만, 본 발명에 따라서, DTT의 존재 하에 약 30°C에서 약 15분 동안 가열하는 것이 바람직하게는 효소를 실질적으로 불활성화시키기에 충분하다. 당업자는 이들 2개의 매개변수들 중의 하나에 대한 조정(adjustment)들이 다른 것을 조절함으로써 절충될 수 있음을 용이하게 인식할 것이다. 예를 들어, 불활성화 온도를 증가시키는 것은 항온처리 기간이 감소되는 것을 허용할 수 있다. 역으로, 항온처리 기간을 증가시키는 것은 보다 낮은 불활성화 온도를 사용하도록 한다. 물론, 당업자에게 역시 용이하게 명백하고 실시예들에 나타난 바와 같이, 본 발명의 엔도뉴클레아제를 본 발명의 방법들에서 사용하는 경우, 15분보다 긴 항온처리 기간들이 사용될 수 있으며 약 30°C보다 높은 불활성화 온도가 사용될 수 있다.
- [0064] 엔도뉴클레아제에 대한 불활성화 온도들 및 시간들은, 대표적인 PCR 또는 단백질 정제 완충액(예를 들면, 25 mM 트리스/HCl, pH 8.5, 5 mM MgCl₂)을 모사하는(mimic) 용액 속에서 엔도뉴클레아제를 항온처리하여 평가하여야 한다. 엔도뉴클레아제는 약 0.1 U/μl 내지 100 U/μl, 바람직하게는 1 내지 50 U/μl, 예를 들면, 25 내지 30 U/μl에서 존재하여야 한다. 적합한 프로토콜들은 실시예들에 설명된다.
- [0065] 반응 혼합물은 바람직하게는 관심 시료 또는 단백질이 안정한 pH에서 존재한다. 7.0 내지 9.5, 바람직하게는 대략 8.5의 pH가 본 발명의 엔도뉴클레아제의 효소 활성과 관련하여 특히 적합하다. 8.5의 pH도 또한 대표적인 PCR 또는 단백질 정제 완충액에 적합할 수 있다.

[0066] 유리하게는, 본 발명의 열불안정성 엔도뉴클레아제는 완전한 증폭 반응 혼합물에서 완전히 기능성이며, 표준 시험관내 증폭 시약들 및 조건들과 호환성이다. 상기 효소는 또한 오염시키는 폴리뉴클레오타이드들 및/또는 반응 혼합물로부터의 결과물의 적합한 함량들, 일반적으로 fg- 또는 pg-수준들 그러나 바람직하게는 1ng 이하를 제거할 수 있어야 한다. 바람직하게는, 엔도뉴클레아제는 37°C에서 60분 내에, 보다 바람직하게는 30분 내에, 가장 바람직하게는 15분 내에 모든 결과물을 분해할 수 있다.

[0067] 또한, 본 발명의 엔도뉴클레아제들의 효소적 활성 단편들은 본 발명의 영역(scope) 내에 포함되며, 촉매 활성은 불완전(truncated) 및 다른 변이체들에서 유지될 수 있는 것으로 인식된다. 실시예들은 엔도뉴클레아제 활성의 적합한 분석을 제공한다.

[0068] 본 발명은 VsEndA에 대한 바람직한 S44E 돌연변이에 의해 예시되며 보다 일반적으로, VsEndA의 변형된 버전들이 본 발명의 엔도뉴클레아제들의 바람직한 구현예들이다. 세린은 Glu(E) 이외의 잔기들, 특히 비-유전적으로 암호화된 Glu의 동족체들(homologous)에 의해 또는 트레오닌, 아스파라긴 또는 글루타민에 의해 치환될 수 있다. 다른 엔도뉴클레아제 I 서열들 내 세린 44에 대해 등가인 잔기가 치환될 수 있다. VsEndA내 세린 44에 대해 등가인 잔기는 도 3 및 4의 서열 정렬들에서 다른 종들에 대해 나타낸다. 하기 표들은 각종 비브리오 종들의 서열 동질성 퍼센트(identity percentage)(표 1) 및 서열 번호 1(VsEndA)을 지닌 다른 세균들의 선택(표 2)를 나타낸다. 이들 표들 및 상응하는 도면들에서 엔도뉴클레아제들은 본 발명의 교시에 따른 변형을 위한 바람직한 엔도뉴클레아제들이며 수득되는 효소들은 본 발명의 바람직한 엔도뉴클레아제들이다.

표 1

서열 1	서열 2	동질성 %
V. 살모니키다(V. salmonicida)	V. 피스체리(V. fischeri)	91
V. 살모니키다	V. 우다니스(V. wodanis)	91
V. 살모니키다	V. 스플렌디두스(V. splendidus)	78
V. 살모니키다	V. 콜레라(V. cholerae)	71
V. 살모니키다	V. 하르베이(V. harveyi)	77
V. 살모니키다	V. 로티페리아누스(V. rotiferianus)	77
V. 살모니키다	V. 투비아쉬이(V. tubiashii)	73
V. 살모니키다	V. 시날로엔시스(V. sinaloensis)	74
V. 살모니키다	V. 불니피쿠스(V. vulnificus)	74
V. 살모니키다	V. 푸르니씨이(V. furnissii)	70
V. 살모니키다	V. 앙구릴라룸(V. anguillarum)	71

표 2

서열 1	서열 2	동질성 %
V. 살모니키다	V. 콜레라(V. cholerae)	71
V. 살모니키다	오세아니모나스 아종 (Oceanimonas sp.)	64
V. 살모니키다	살모넬라 아종(Salmonella sp.)	65
V. 살모니키다	엔테로박터 아종(Enterobacter sp.)	65
V. 살모니키다	요케넬라 아종(Yokenella sp.)	66
V. 살모니키다	클렙시엘라 아종(Klebsiella sp.)	65

V. 살모니키다	에스케리키아 콜라이 (Escherichia coli)	65
V. 살모니키다	쉬겔라 아종(Shigella sp.)	64
V. 살모니키다	시트로박터 아종 (Citrobacter sp.)	66
V. 살모니키다	크로노박터 아종 (Cronobacter sp.)	68
V. 살모니키다	라넬라 아종(Rahnella sp.)	63
V. 살모니키다	에르위니아 아종(Erwinia sp.)	62
V. 살모니키다	예르시니아 아종(Yersinia sp.)	63
V. 살모니키다	세라티아 아종(Serratia sp.)	62
V. 살모니키다	슈도모나스 아종 (Pseudomonas sp.)	51

[0071] 바람직하게는. 본 발명의 엔도뉴클레아제는 비브리오 엔도뉴클레아제이거나 이로부터 유래된다. 본 발명에 따른 추가적으로 특히 바람직한 변형된 엔도뉴클레아제는 비브리오 콜레라(Vibrio cholerae)(VcEndA)로부터 유래하며, 예를 들면, 여기서 펜타펩타이드 모티프에 인접한 세린은 글루탐산으로 치환된다.

[0072] 바람직한 엔도뉴클레아제들은 N 말단 신호 펩타이드를 결여한, 즉, 서열 번호 4 또는, 서열 번호 4에 대해 적어도 60%, 바람직하게는 적어도 70%, 80%, 90%, 95% 또는 98% 동일한 서열들로 나타낸 것들이다. 본 발명의 성숙한 엔도뉴클레아제는 내용으로부터 달리 명확하지 않는 한, 신호 펩타이드를 결여하고 있으며, 서열 번호 1에 대한 본원의 임의의 참조도 또한 서열 번호 4에 대한 참조로 고려될 수 있다. 서열 번호 4는 도 3 및 4 둘 다에서 인용된 제1 서열이다.

[0073] 본 발명의 바람직한 엔도뉴클레아제들은 서열 번호 1, 3, 4 또는 5의 서열을 가지지만, FYCGC 펜타펩타이드 모티프의 직접적인 N-말단인 아미노산 잔기는 음으로 하전되거나 극성인, 바람직하게는 음으로 하전된 잔기로 치환되어 있다. 44번 위치에서 세린이 글루탐산으로 치환된 서열 번호 1 또는 4의 엔도뉴클레아제들이 가장 바람직하다.

[0074] 본 발명의 추가로 바람직한 엔도뉴클레아제들은 비브리오 종들로부터 수득가능한 엔도뉴클레아제 I의 서열을 가지지만, FYCGC 펜타펩타이드 모티프의 직접적인 N-말단인 아미노산 잔기는 음으로 하전되거나 극성인, 바람직하게는 음으로 하전된 잔기로 치환된다.

[0075] 본원에 논의된 바와 같이, 확인된 펜타펩타이드 모티프의 잔기 N 말단을 치환하는 아미노산은 소수성이지 않아야 한다. 변형된 효소 VsEndA_S44A(알라닌)이 제조되었지만 수율은 S44E를 사용하여 달성된 것의 단지 5%이었으며 이는 매우 불안정하고 모든 촉매 활성을 신속하게 상실하였다.

[0076] 본 발명에 따른 서열 동질성 퍼센트는 디폴트 매개변수들(default parameters)[DNA 캡 개방 패널티(Gap Open Penalty) = 15.0; DNA 캡 연장 패널티(Gap Extension Penalty) = 6.66; DNA 매트릭스 = 동질성; 단백질 캡 개방 패널티 = 10.0; 단백질 캡 연장 패널티 = 0.2; 단백질 매트릭스 = Gonnet; 단백질/DNA ENDGAP = -1; 단백질/DNA GAPDIST = 4)을 사용하는 임의의 광범위하게 이용가능한 알고리즘들(예를 들면, Clustal W2 multiple sequence alignment program (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalW2>)을 이용하여 계산할 수 있다.

[0077] 엔도뉴클레아제들 내의 FYCGC 펜타펩타이드 모티프의 직접적인 N-말단인 아미노산 잔기(즉, 클로라이드 이온을 지닌 복합체의 부분을 형성하는 극성 잔기)의 정확한 위치는 도 3 및 4에 나타낸 것과 같은 정렬들을 생산하기 위해, Clustal W2와 같은 표준 서열 정렬 기술들을 사용함으로써 용이하게 확인할 수 있다. 서열이 완전히 보존된 FYCGC 모티프를 결여하는 경우, 이는 이를 서열 정렬의 기술들을 사용하여 서열 번호 1 내 세린 44에 대해 등가인 잔기를 확인하는 것이 여전히 가능할 것이다.

[0078] 본 발명의 엔도뉴클레아제들을 암호화하는 핵산 분자들 및 이의 단편들은 본 발명의 추가적인 양태를 구성하며, 서열 번호 2 및 상기 서열 번호 2 와 적어도 80 또는 90% 동일한 서열들이 바람직하다.

[0079] 본 발명은 또한 핵산을 증폭시키는 방법들에서 탈오염제로서 상기 기술한 특정 엔도뉴클레아제의 용도를 제공한

다. 본원에 기술된 탈오염 방법들에서 위에서 기술한 특수 엔도뉴클레아제들의 용도는 본 발명의 특히 바람직한 구현예를 나타낸다.

[0080] 위에서 기술한 바와 같은 엔도뉴클레아제 또는 이의 효소적 활성 단편의 분리 및 정제 방법은 본 발명의 추가적인 양태를 나타낸다. 따라서, 당해 양태에서 본 발명은 이러한 방법을 제공하며, 상기 방법은 엔도뉴클레아제 또는 이의 단편을 적합한 숙주 세포(예를 들면, 피카아 파스토리스; 에스케리키아 콜라이; 에스. 세레비키아에, 바콜로바이러스 감염된 곤충 세포들) 속에서 발현시키는 단계, 및 후속적으로 상기 숙주 세포들 및/또는 상기 세포들이 배양된 배지로부터 엔도뉴클레아제를 분리하는 단계를 포함한다. 상기 엔도뉴클레아제 또는 이의 단편의 발현은 적합한 숙주 세포 내로 상기 엔도뉴클레아제 또는 이의 단편을 암호화하는 발현 벡터를 혼입시켜 달성할 수 있다. 이를 발현 카세트들(cassettes) 및 핵산 분자들을 포함하는 숙주 세포들은 본 발명에 포함된다.

[0081] 엔도뉴클레아제 효소는 당해 기술 분야에 공지되고 문헌에 광범위하게 기술된 정제 기술들 중 임의의 것 또는 이의 임의의 조합을 사용하여 숙주 세포들/배양 배지들로부터 나누거나 분리할 수 있다. 이러한 기술들은 예를 들면, 침전, 한외여과, 투석, 각종 크로마토그래피 기술들, 예를 들면, 젤 여과, 이온-교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 전기영동, 원심분리 등을 포함할 수 있다.

[0082] 유사하게, 숙주 세포들의 추출은 또한 당해 기술 분야에 잘 알려진 기술들, 예를 들면, 균질화, 유리-해동 등을 사용하여 제조할 수 있으며 상기 추출물로부터 본 발명의 엔도뉴클레아제들이 정제될 수 있다.

[0083] 이온 교환 크로마토그래피 및 친화성 크로마토그래피의 조합(예를 들면, 세파로즈 컬럼, 예를 들면, 레드 세파로즈(Red sepharose)(제조원: 스웨덴 소재의 Pharmacia Biotech) 또는 블루 세파로즈(Blue sepharose)(제조원: GE Healthcare))을 기준으로 한 정제 프로토콜이 효소를 분리하는데 용이하게 사용될 수 있는 것으로 밝혀졌다.

[0084] 보다 특히, 추출물을 이온-교환 크로마토그래피에 적용시키고 단백질을 NaCl 구배로 용출시킬 수 있다. 엔도뉴클레아제 활성을 함유하는 분획들을 투석한 후 NaCl로 최종 용출시키기 전에 친화성 컬럼에 적용시킬 수 있다.

[0085] 본 발명의 엔도뉴클레아제들의 수율들은 예외적으로 우수하므로 달리 고찰할 때, 본 발명은 펜타펩타이드 모티프 FYCGC의 직접적인 N-말단의 잔기를 음으로 하전되거나 극성인 잔기로 치환시킴을 포함하는 재조합적으로 발현된 엔도뉴클레아제 I의 수율을 증가시키는 방법을 제공한다. 이러한 방법으로 변형될 수 있는 적합한 엔도뉴클레아제들은 본원에 기술되어 있고 예를 들면, 도 3 및 4에 예시되어 있다. 적합한 발현 방법들은 위에 기술되어 있다.

[0086] 본 발명은 또한 적어도 본 발명에 따른 엔도뉴클레아제를 포함하는 키트들을 제공한다. 상기 키트들은 또한 핵산 증폭 반응들을 수행하기 위한 필수적인 시약들, 완충액들, 효소들 등 중의 일부 또는 모두를 함유할 수 있다. 보다 특히, 상기 키트들은 뉴클레오타이드 트리포스페이트들[각각 대체 증폭을 위한 α -티올 그룹을 함유하는 dATP(dATP α S)를 함유함], 올리고뉴클레오타이드 프라이머들, 바람직하게는 약 30°C에서 기능화할 수 있는 것들, DNA 폴리머라제들, 바람직하게는 열안정성 폴리머라제 예를 들면, Taq 폴리머라제 또는 Bst 폴리머라제(및 이의 열-출발(heat-start) 버전들) 또는, LAR의 경우에, DNA 리가제[바람직하게는 열안정성 DNA 리가제, 예를 들면, Ampligase[®] 또는 피로코쿠스 푸리오수스(Pyrococcus furiosus)로부터 분리된 미국 제6280998호에 개시된 것] 또는 제한 효소(바람직하게는 BsoB1과 같은 열안정성 제한 효소)를 함유할 수 있다. 엔도뉴클레아제는 하나의 구획 속에 역 전사 효소, DNA 폴리머라제, 각각 대체 폴리머라제 또는 LCR 리가제와 함께 제공될 수 있다.

[0087] 키트들은 본 발명에 관련된 과정들을 수행하는 방법에 대한 안내(guidance)로서 기재된 물질들을 함유할 수 있다. 특히 불활성화 조건들에 대한 안내가 제공될 수 있다. 적합한 조건들은 본원의 어딘가에 설명되어 있지만, 키트 또는 효소와 함께 또한 제공될 수 있는, 추가적인 일반적인 실시예로서, 표 3은 Ser44Glu 돌연변이(VsEndA_S44E)를 지닌 비브리오 살모니키다로부터 유래된 엔도뉴클레아제의 불활성화에 적합한 불활성화 첨가제의 존재하에 제안된 항온처리 조건들을 제공한다.

표 3

온도(°C)	디티오프레이탈(DTT)의 농도/ 시간	트리스(2-카복시에틸)포스핀(TCEP)의 농도/ 시간
25	20 mM/60분	15 mM/60분

40	10 mM/30분	5 mM/30분
50	1 mM/30분 또는 10 mM/15분	0.5 mM/30분
60	1 mM/30분	0.5 mM/30분 또는 10 mM/15분
65	1 mM/30분	1 mM/30분
70	1 mM/30분	1 mM/30분

[0089] 본 발명은 또한 본 발명의 엔도뉴클레아제 및 핵산 증폭 및 방법들을 수행하는데 필수적인 시약들 중 하나 이상, 예를 들면, 위에서 기술한 성분들을 포함하는 조성물들을 제공한다. 전형적으로 이러한 조성물들은 수성이며 트리스, HEPES 등과 같은 표준 완충액으로 완충될 것이다.

[0090] 추가적인 양태에서, 본 발명은 본원에 정의된 바와 같은 엔도뉴클레아제 I 또는 이의 효소적 활성 단편과 함께 제2 엔도뉴클레아제 I 또는 이의 효소적 활성 단편을 포함하는 조성물을 제공한다. 바람직하게는, 제2 엔도뉴클레아제 I 또는 이의 효소적 활성 단편은 서열 번호 5의 서열 또는 상기 서열 번호 5의 서열과 적어도 80% 동일한 서열을 갖는다. 제2 효소는, 이를 보다 용이하게 불활성화시키는 예를 들면, 천연의 비브리오 콜레라 서열에 대한 돌연변이들을 혼입시킬 수 있다. 이러한 조합들은, 조성물이 전체로서 보다 높은 범위의 pH 및/또는 염 농도 및/또는 온도에서 효과적인 엔도뉴클레아제 활성을 제공하도록 한다.

도면의 간단한 설명

[0091] 본 발명을 이제 다음의 도들을 참조로 하여 비-제한적 실시예들로 설명할 것이며 여기서:

도 1은 각각 비브리오 살모니키다(VsEndA) 및 V. 콜레라 EndA(VcEndA)로부터 유래된 엔도뉴클레아제들의 아미노산 서열들(신호 펩타이드 포함), 서열 번호 1 및 서열 번호 3의 얼라인먼트(alignment)를 나타낸다.

도 2는 각각 Ser44Glu 돌연변이를 지닌 VsEndA(VsEndA_S44E)의 핵산 서열 및 아미노산 서열(신호 펩타이드 포함), 서열 번호 2 및 서열 번호 6을 나타낸다.

도 3은 다양한 상이한 속(genus)들로부터의 세균들로부터 유래된 야생형 엔도뉴클레아제 I의 아미노산 서열들(신호 펩타이드들 배제)의 서열 얼라인먼트 데이터를 나타낸다.

도 4는 비브리오 속의 각종 세균들로부터 유래된 야생형 엔도뉴클레아제 I의 아미노산 서열들(신호 펩타이드들 배제)의 서열 얼라인먼트 데이터를 나타낸다.

도 5는 pPIC9K-VsEndA_S44E 및 야생형 발현 카세트들 각각을 함유하는 피키아 파스토리스 숙주 세포들에서 VsEndA_S44E 돌연변이체(Ser44Glu 돌연변이를 지닌 VsEndA 엔도뉴클레아제) 및 야생형 VsEndA 효소(서열 번호 1)의 발현 수준들을 나타낸다.

도 6은 1mM DTT의 존재 및 부재 하에서 40°C(6a) 및 50°C(6b)에서 VsEndA 및 VsEndA_S44E 의 둘 다의 불활성화의 비율을 나타낸다.

도 7은 다음의 불활성화 첨가제들: DTT, 트리스(2-카복시에틸)포스핀(TCEP) 및 2-머캅토에탄올 중 하나의 1mM의 존재 하에서 40°C에서 VsEndA_S44E 불활성화의 비율을 나타낸다.

도 8은 50°C(도 8a), 40°C(도 8b), 30°C(도 8c) 또는 25°C(도 8d)의 온도에서 1mM, 10mM 또는 20mM의 농도에서 15, 30 또는 60분 동안 DTT의 존재하에서 불활성화된 VsEndA_S44E 및 야생형 VsEndA의 엔도뉴클레아제 활성을 나타내는 아가로스 겔들의 사진들을 나타낸다. 결과들을 효소의 부재(음성 대조군) 또는 6 U 야생형 VsEndA(양성 대조군)에 대해 비교하였다.

도 9는 4°C에서 6 또는 18 시간 동안 DTT(도 9a) 또는 TCEP(도 9b)의 존재 하에 1mM, 10mM 또는 20mM의 농도에서 4°C에서 항온처리한 VsEndA_S44E 및 야생형 VsEndA의 엔도뉴클레아제의 활성을 나타내는 아가로스 겔들이 사진들을 나타낸다. 결과들은 효소의 부재(음성 대조군) 또는 6 U 야생형 VsEndA(양성 대조군)에 대해 비교하였다.

도 10은 VsEndA_S44E 돌연변이체를 사용하여 시판되는 AccuStart™ Taq DNA 폴리머라제(도 9a) 또는 GoTaq® Hot

Start 폴리미라제(도 9b)로부터 스파이크된(spiked) DNA의 제거 정도를 나타낸다.

도 11은 VsEndA_S44E 돌연변이체를 사용하여, 시판되는 Maxima qPCR 마스터 혼합물로부터 스파이크된 DNA의 제거 정도를 나타낸다.

도 12는 0.5M 염화나트륨(도 11a) 또는 1M 염화나트륨(도 11b)을 함유하는 용액 속에서 VsEndA_S44E 돌연변이체를 사용하여, 시판되는 TEMPase DNA 폴리미라제로부터 스파이크된 세균 게놈 DNA의 제거 정도를 나타낸다.

도 13은 다양한 염화나트륨 용액들(0M, 0.25M, 0.5M, 0.75M 및 1.0M) 속에서 VsEndA_S44E 돌연변이체를 사용하여, 재조합적으로 발현된 단백질을 함유하는 *E. coli* 세포 용해물 용액으로부터 스파이크된 세균 게놈 DNA의 제거 정도를 나타낸다.

도 14는 고 염분 용액들 속에서 VsEndA_S44E 돌연변이체의 최적 활성을 나타낸다. 상기 활성은 다양한 농도의 염화나트륨 및 염화칼륨을 지닌, 25mM 트리스-HCl 완충액, pH 8.5, 5mM 염화마그네슘 속에서 시험하였다. 수득된 최대 활성은 100%로 설정되었다.

도 15는 다양한 온도들에서 VsEndA_S44E 돌연변이체의 활성을 나타낸다. 상기 활성은 5mM 염화마그네슘 및 0.5M 염화나트륨을 함유하는 25mM 트리스-HCl 완충액, pH 8.5 속에서 시험하였다.

도 16은 시판되는 벤조나제(세라티아 마르케스켄스) 뉴클레아제와 비교하여, 다양한 수준들의 pH 및 염화나트륨 농도들에서 DNA를 분해하는 VsEndA_S44E 돌연변이체의 능력을 나타낸다. 반응들을 7.5, 8.0 또는 8.5의 pH 및 0.25M 또는 0.5M(도 16a) 또는 0.75M 또는 1.0M(도 16b)의 염화나트륨 농도에서 수행하였다. 반응 혼합물들은 5mM 염화마그네슘, 50 μ g 송아지 가슴샘(calf thymus) DNA 및 300 U의 VsEndA_S44E 또는 벤조나제가 들어있는 100 μ L의 트리스-HCl 완충액을 함유하였다. 반응 혼합물들을 37°C에서 30분 동안 항온처리하였다. 반응들을 EDTA를 함유하는 로딩 완충액을 사용하여 중지시키고 1% 아가로스 겔 위에서 수행하였다.

도 17은 DNA 결합 단백질을 함유하는 *E. coli* 용해물을 속에서 DNA를 분해하는 VsEndA_S44E 돌연변이체의 능력을 나타낸다. VsEndA_S44E를 다양한 염화나트륨 농도들에서 *E. coli* 용해물들에 가하고 37°C에서 30분 동안 항온처리하였다. 대조군은 염화나트륨을 함유하지 않는다.

여기서

서열 번호 1은 신호 펩타이드를 포함하는 야생형 비브리오 살모니키다 엔도뉴클레아제 I의 cDNA 뉴클레오타이드 서열의 해독된 부위의 아미노산 서열이다.

서열 번호 2는 신호 서열을 포함하는 돌연변이체 비브리오 살모니키다 엔도뉴클레아제 I(TCC가 GAG로 돌연변이된 VsEndA)의 cDNA 뉴클레오타이드 서열이다.

서열 번호 3은 신호 펩타이드를 포함하는, 야생형 비브리오 콜레라 엔도뉴클레아제 I의 cDNA 뉴클레오타이드 서열의 해독된 부위의 아미노산 서열이다.

서열 번호 4는 신호 펩타이드의 부재 하에서, 야생형 비브리오 살모니키다 엔도뉴클레아제 I의 cDNA 뉴클레오타이드 서열의 해독된 부위의 아미노산 서열이다.

서열 번호 5는 신호 펩타이드의 부재 하에서, 야생형 비브리오 콜레라 엔도뉴클레아제 I의 cDNA 뉴클레오타이드 서열의 해독된 부위의 아미노산 서열이다.

서열 번호 6은 신호 서열을 포함하는, 돌연변이체 비브리오 살모니키다 엔도뉴클레아제 I(글루탐산 및 44번 위치에서의 치환된 세린 잔기를 지닌 VsEndA)의 아미노산 서열이다.

서열 번호 7 내지 서열 번호 20은 표 2 및 도 3에 설명된 바와 같이 각종의 상이한 속들로부터의 세균들로부터 유래된, 신호 펩타이드가 없는 엔도뉴클레아제 I 아미노산 서열들이다.

서열 번호 21 내지 서열 번호 30은 표 1 및 도 4에서 설명한 바와 같이 비브리오 속의 각종 세균들로부터 유래된, 신호 펩타이드가 없는 엔도뉴클레아제 I 아미노산 서열들이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0092] [실시예]

[0093] 실시예 1 - 클로닝 및 돌연변이유발

[0094] 비브리오 살모니키다 엔도뉴클레아제 I에 대한 유전자를 상기 유전자를 함유하는 벡터로부터 PCR 증폭시키고 피카아 파스토리스용 pPIC9K 발현 벡터 내로 클로닝한다. V. 살모니키다 엔도뉴클레아제 I의 천연의(native) 신호 서열은 발현 벡터내에서 제외시켜 발현 플라스미드에 의해 암호화된 α-교배 인자(mating factor) 이후 V. 살모니키다 엔도뉴클레아제 I의 아미노산 서열이 APPSSF가 되도록 하였다.

[0095] QuikChangeTM 돌연변이유발 키트(제조원: Agilent)를 사용하여 V. 살모니키다 엔도뉴클레아제 I(VsEndA)을 44 번 잔기에서 세린(Ser)으로부터 글루탐산(Glu)으로 제조사(manufacturer)의 지시들에 따라 돌연변이시켰다. 불완전(truncated) VsEndA 서열을 함유하는 pPIC9K 벡터를 주형으로 사용하였다. 돌연변이유발 반응들 후 정확한 서열을 DNA-서열분석으로 입증하였다.

실시예 2 - 발현 및 정제

[0097] pPIC9K-VsEndA_S44E 벡터를 SacI를 사용하여 선형화하고 피카아 파스토리스 GS115 내로 피카아 파스토리스 발현 키트(제조원: Life Technologies)에 대한 매뉴얼에 기술된 바와 같이 형질전환시켰다. V. 살모니키다 S44E_엔도뉴클레아제 I (VsEndA_S44E)을 피카아 발현 키트에 기술된 바와 같이 필수적으로 진탕 플라스크들(shake flasks) 속에서 발현시켰다. BMGY 배지 속에서 VsEndA_S44E를 함유하는 GS115 균주의 50ml의 예비배양물을 밤새 30°C에서 배양하였다. 상기 세포들을 원심분리하고 250 ml의 BMMY 속에 재현탁하고 72시간 동안 20°C에서 발현을 수행하였다. 메탄올을 0.5%의 최종 농도로 첨가하는 것을 24시간마다 수행하였다. 세포들을 원심분리로 제거하고 상청액(supernantant)을 정제를 위한 출발 물질로서 사용하였다. VsEndA_S44E를 양이온 교환 크로마토그래피를 사용하여 정제하였다. 상청액(250ml)을 5cm/분의 유동(flow)을 사용하여 25mM 트리스/HCl, pH 8.3, 5mM MgCl₂ 속에서 평형화시킨 SP-세파로즈 FF(1.6/3) 컬럼 상에 적용하였다. 상기 컬럼을 상기 완충액 중 250ml의 0.4M NaCl을 사용하여 세척하였다. VsEndA_S44E의 용출을 25mM 트리스/HCl, pH 8.3, 5mM MgCl²⁺ 1M NaCl을 사용하여 수행하였다. VsEndA_S44E 활성을 함유하는 분획들을 풀링(pooling)시키고 최종적으로 농축시켰다.

실시예 3 - 뉴클레아제 활성을 측정

[0099] 뉴클레아제 활성을 쿠니츠(Kunitz)의 과정(참조: Kunitz, M., 1950, Crystalline Deoxyribonuclease, II, Digestion of Thymus Nucleic Acid. The Kinetics of Reaction. J. Gen. Physiol., 33, 363-377)에 따라 분석할 수 있다. 이의 변형된 조성물을 사용하여 뉴클레아제 활성을 측정하여 왔다. 10 μl의 효소 제제를 25mM 트리스/HCl, pH 8.5, 0.5M NaCl, 5mM MgCl₂ 중 50μg의 송아지 가슴샘 DNA에 1ml의 최종 용적으로 가한다. 혼합물을 37°C에서 항온처리하고 흡광도에 있어서의 증가를 260nm에서 측정하였다. 1U = 0.01 OD₂₆₀ 증가 x min⁻¹.

[0100] VsEndA_S44E 돌연변이체의 활성을 다양한 온도에서(환경제의 부재 하에) 평가하는 연구를 수행하였다. 도 15는, VsEndA_S44E가 약 35°C에서 최적의 활성을 가지지만, 낮은 온도 범위(10°C 및 50°C에서 20% 활성)에 걸쳐 작용함을 나타낸다.

실시예 4 - VsEndA_S44E 대 야생형(VsEndA)의 발현 수준의 비교

[0102] pPIC9K-VsEndA_S44E 발현 카세트를 함유하는 GS115 균주의 50ml의 예비배양물을 야생형 발현 카세트를 함유하는 균주와 비교하였다. 2개의 균주들을 밤새 30°C에서 BGMY 배지 속에서 배양하였다. 세포들을 원심분리하고 250ml의 BMMY 속에 재현탁시키고 20°C에서 72시간 동안 발현을 수행하였다. 메탄올의 0.5%의 최종 농도로의 첨가를 각각 24시간째에 수행하고 뉴클레아제 활성을 설명한 바와 같이 측정하였다.

[0103] 도 5는, VsEndA_S44E 돌연변이체가 세포-상청액 속에서 U/ml로 측정된 활성 발현된 효소의 측면에서 야생형 VsEndA 효소보다 피카아 파스토리스에서 보다 높은 발현 수준을 제공함을 나타낸다. VsEndA_S44E 돌연변이체는 도면의 범례들에서 "S44E"로 축약되고, 야생형 VsEndA는 "wt"로 축약되었다.

[0104] 위에서 설명한 바와 같이(실시예 2) 정제한 후, VsEndA_S44E의 특이적 활성은 표 4에 나타낸 바와 같이 VsEndA 보다 약 20% 더 높은 것으로 측정된다.

표 4

엔도뉴클레아제	활성 (U/ml)	단백질 농도 (mg/ml)	특이 활성 (U/mg)
VsEndA_S44E	1.69 x 10 ⁷	0.69	2.4 x 10 ⁷

VsEndA	1.12×10^7	0.56	2.0×10^7
--------	--------------------	------	-------------------

[0106] 실시예 5 - VsEndA와 비교한 VsEndA_S44E의 온도 안정성

[0107] 야생형(VsEndA) 효소의 반감기는 70°C에서 대략 2시간이고 60°C에서 5시간이다(데이터는 나타내지 않음).

[0108] 효소들, VsEndA_S44E 및 VsEndA를 25mM 트리스/HCl, pH 8, 5mM MgCl₂, 150mM NaCl, 0.01% 트리톤 X-100, 및 1mM 디티오토레이톨(DTT)을 함유하는 완충액 속에서 200,000 U/ml의 농도로 희석시켰다. 6 x 100 μl의 용적을 상이한 에펜도르프튜브들(eppendorf tubes)에 이전시켰다. 시료들을 40°C 또는 50°C에서 0 내지 40분 동안 항온처리한 후 빙상에 후속적으로 위치시켰다. 나머지 활성을 변형된 쿠니츠 분석(Kunitz assay)을 사용하여 실시예 3에 기술된 바와 같이 측정하였다. 도 6에 나타낸 데이터로부터, VsEndA_S44E 및 VsEndA 둘 다의 경우, DTT의 첨가는 열-불활성화를 위해 요구됨이 명백하다. DTT의 첨가 시 효소들은 보다 신속한 속도에서 불활성화된다. 도면의 범례들에서 VsEndA_S44E 돌연변이체는 "S44E"로 축약하고 야생형 VsEndA은 "wt"로 축약하였다.

[0109] 실시예 6 - 상이한 환원제들을 사용한 온도 불활성화

[0110] DTT, 트리스(2-카복시에틸)포스핀(TCEP) 및 2-머캅토에탄올을 포함하는 불활성화 첨가제들의 범위를 사용하여 불활성화될 VsEndA_S44E의 능력을 40°C의 온도에서 시험하였다.

[0111] 도 7에 나타낸 데이터를 도 6a의 것과 비교하는 경우, 불활성화 첨가제들 모두가 불활성화를 촉진하였음이 측정될 수 있다. DTT 및 TCEP는 2-머캅토에탄올과 비교하여 불활성화 첨가제들보다 더 효과적이 밝혀졌다. 도면의 범례들에서 VsEndA_S44E 돌연변이체는 "S44E"로 축약하고 야생형 VsEndA는 "wt"로 축약하였다.

[0112] 실시예 7 - 열 불활성화 실험들

[0113] 온도 안정성을 실험하고 열을 사용하여 VsEndA_S44E를 완전히 불활성화시킬 수 있는지를 측정하기 위하여, 열 불활성화된 효소의 존재하에 정제된 PCR-생성물의 온전성(integrity)을 평가하였다. 이는 온도를 감소시킴에 따라 불활성화가 가역성인지 또는 비가역성인지를 시험할 수 있으므로, 실시예 3에 기술된 변형된 쿠니츠 분석과 비교하여 보다 민감한 분석을 제공한다.

[0114] 25mM 트리스/HCl pH 8.5, 0.5M NaCl, 5mM MgCl₂ 완충액 중 효소 (VsEndA_S44E 또는 야생형, VsEndA, 130U/μl)를 에펜도르프튜브들에 총 50 μl의 용적으로 이전시켰다. 새로이 제조한 디티오토레이톨(DTT)을 1, 10 또는 20mM의 최종 농도로 가하였다. 시료들을 각종 온도들에서 15, 30 또는 60분 동안 열 불활성화시켰다. 튜브들을 불활성화 단계 후 빙상에 두었다.

[0115] 잔류 활성을 측정하기 위한 분석을, 5 μl의 열-불활성화된 효소를 25mM 트리스/HCl pH 8.5, 5mM MgCl₂ 및 0.5M NaCl로 이루어진 완충액 중 500ng의 500bp PCR-생성물에 가하여 수행하였다. 시료들을 37°C에서 3시간 동안 항온처리하였다. DTT를 불활성화용 효소 제제에 가하는 경우, 이는 또한 잔류 활성에 대한 분석시 존재하였다.

[0116] 최종적으로, PCR-생성물의 어떠한 분해도 측정하기 위하여, 시료들을 1% 아가로스 젤 위에서 분석하였다. 음성 대조군(효소 없음) 및 양성 대조군(6U wt-효소 함유)을 상기 반응들에서와 동일한 방식으로 시험하였다.

[0117] 도 8은 50°C, 40°C, 30°C 및 25°C에서 야생형 VsEndA 효소와 비교하여 VsEndA_S44E 돌연변이체의 열-불활성화 실험들을 요약한다. 음성 대조군은 완전한 PCR-생성물을 나타내는 반면, 양성 대조군은 대략 1%의 잔류 활성의 효과를 나타낸다. 50°C에서, VsEndA_S44E 돌연변이체 효소는 1mM DTT의 존재하에서 15분 후 완전히 불활성화되는 것으로 밝혀졌지만, 야생형은 단지 부분적으로 불활성화되었다. 40°C에서, 1mM DTT는 VsEndA 효소를 부분적으로 불활성화시키는데 요구되는 10mM과 비교하여, 15분 후 VsEndA_S44E 돌연변이체를 부분적으로 불활성화시킬 수 있었다. 25°C에서, 20mM 이하의 농도에서 DTT는 60분 후 VsEndA 효소를 완전히 불활성화시킬 수 없었지만, 10mM의 DTT는 60분 후 VsEndA_S44E 돌연변이체를 완전히 불활성화시킬 수 있었으며, 이는, 치환의 효과를 입증한다. 적어도 10mM DTT의 첨가는 30°C에서 VsEndA_S44E 돌연변이체 효소의 완전한 불활성화에 필수적이다. 도면의 범례들에서 VsEndA_S44E 돌연변이체는 "S44E"로 축약하였고 야생형 VsEndA는 "wt"로 축약하였다.

[0118] 추가적인 열-불활성 실험에서, VsEndA_S44E 돌연변이체를 4°C에서, DTT 또는 TCEP의 존재 하에 1mM, 10mM 또는 20mM의 농도에서, 위에서 기술한 동일한 대조군들을 사용하여 야생형 VsEndA 효소와 비교하였다. 도 9에 나타낸 바와 같이, 이러한 낮은 온도에서도, 10mM의 DTT 또는 TCEP의 존재는 6시간 후 VsEndA_S44E 돌연변이체를 완전히 불활성화시킬 수 있었다. 비교하여, 심지어 20mM DTT도 18시간의 항온처리 후 야생형 VsEndA 효소를 불활

성화시킬 수 없었다. TCEP는 상기 온도에서 10mM 이상의 농도에서의 18시간의 항온처리 후 또는 20mM의 농도에서의 6시간의 항온처리 후 VsEndA 효소를 완전히 불활성화시킴이 밝혀졌다.

[0119] 실시예 8 - 열 불활성화 실험들 - TCEP의 부재하에서 잔류 활성

본 실시예에서, 본 발명자들은, VsEndA_S44E의 불활성화가 불활성화 첨가제의 제거 후에도 여전히 관찰되는 조건들을 측정하였다.

본 실시예는, 불활성화 첨가제 TCEP를 연구하고, 불활성화가 일어난 후, TCEP를 푸르-A-라이저(Pur-A-Lyzer) 투석 투브들(제조원: Sigma)을 사용하는 투석에 의해 제거하는 것을 제외하고는 실시예 7과 유사한 방식으로 수행하였다. 완충액을 2일의 투석 동안 1회 교환하였다. 잔류 활성의 측정은 실시예 7에 설명된 바와 같이 1% 아가로스 겔을 사용하여 수행하였다.

상기 연구로부터 측정한 최적의 불활성화 매개변수들의 선택은 표 5에 나타낸다.

표 5

매개변수				
(i) (mM)	(ii) (°C)	(iii) (min)	(iv) (°C)	(v) (일)
10	50	60	RT	2
10	N/A	N/A	37	1
10	N/A	N/A	RT	4
1	50	60	37	1

[0124] VsEndA_S44E에서 불활성화를 달성하는데 요구된 매개변수들

매개변수 (i) - 엔도뉴클레아제에 첨가된 불활성화 첨가제 TCEP의 농도(mM), 매개변수 (ii) - 가열(불활성화 첨가제의 존재하에)된 엔도뉴클레아제의 불활성화 온도(°C), 매개변수 (iii) - 엔도뉴클레아제가 불활성화 온도에서 항온처리된 시간(분), 매개변수 (iv) - 엔도뉴클레아제가 불활성화 온도(불활성화 첨가제의 존재하에)로부터 냉각 후 저장된 온도(°C 또는 실온의 경우 "RT") 및 매개 변수 (v) 엔도뉴클레이제가 저장 온도에서 항온처리된 시간(일). 매개변수들 (ii) 및 (iii)에 대한 "N/A"는 VsEndA_S44E가 불활성화 온도까지 가열되지 않은 경우 적용된다.

[0126] 실시예 9 - DNA 폴리머라제 제제로부터 오염시키는 DNA의 제거

대표적인 폴리머라제 완충액 속에서 시판되는 DNA 폴리머라제들로부터 오염시키는 세균 계놈성 DNA를 제거하는 VsEndA_S44E의 능력을 시험하였다. 0.14 U/μl 아큐스타트(Accustart)(제조원: Quanta Biosciences), 템파제(VWR) 또는 GoTaq(제조원: Promega)을 10mM 트리스-HCl, 111mM KC1, 5.6mM MgCl₂로 이루어진 완충액 속에서 28 U/μl VsEndA_S44E로 37°C에서 15분 동안 처리하였다. 37°C에서 15분 동안 항온처리한 후, DTT를 10mM의 최종 농도로 가하고 시료들을 40°C에서 30분 동안 항온처리하여 VsEndA_S44E 돌연변이체를 불활성화시켰다. 최종적으로, 프라이머들, 프로브들(probes) 및 dNTP들을 가하였으며 폴리머라제 반응 혼합물 중의 성분들의 최종 농도는 10mM 트리스-HCl, 20mM KC1, 5mM MgCl₂로 구성된 완충액 속에서 25mU/μl DNA 폴리머라제, 300nM의 각각의 프라이머, 200nM 프로브, 100 μM의 dATP, dCTP, dGTP 및 200 μM의 dUTP이었다.

[0128] 다음의 대조군들을 포함시켰다: a) VsEndA_S44E 대신 완충액을 함유하는 시료들, b) 완충액 및 *E. coli* 계놈 DNA를 함유하는 시료들, c) *E. coli* 계놈성 DNA가 VsEndA_S44E 불활성화 전에 첨가된 시료들, 및 d) *E. coli* 계놈성 DNA가 VsEndA_S44E 불활성화 후 첨가된 시료들. qPCR을 스트라타젠(Stratagene) Mx3500P(제조원: Agilent technologies) 속의 20 μl의 반응물을 속에서 수행하였으며 열 주기 조건들은 DNA 폴리머라제들의 제조사들에 의해 추천된 바와 같았다.

[0129] VsEndA_S44E는 시험된 모든 폴리머라제들로부터의 오염시키는 세균 계놈성 DNA를 제거할 수 있었다. 도 10은 아쿠스타트 및 GoTaq 폴리머라제들의 VsEndA_S44E 처리의 효과를 나타낸다. 도면의 범례들에서 VsEndA_S44E 돌연변이체는 "S44E"로 축약되었다. 오염시키는 세균 DNA의 수준은 감소되었으며 스파이크된 *E. coli* 계놈성 DNA는 제거되었다. VsEndA_S44E 처리 후 폴리머라제 기능의 손상은 없거나 최소이다.

[0130] 실시예 10 - PCR 마스터 혼합물로부터 오염시키는 DNA의 제거

시판되는 정량적 PCR(qPCR) 마스터 혼합물들은 미량의 오염시키는 세균 계놈성 DNA를 함유하는 것으로 밝혀져

왔다. 당해 실시예에서, 시판되는 qPCR 마스터 혼합물들로부터 세균 게놈성 DNA 오염물질들을 제거하기 위한 VsEndA_S44E의 능력을 시험하였다. 최대 qPCR 마스터 혼합물(제조원: Fermentas) 또는 발현 qPCR 슈퍼믹스 유니버설(Supermix Universal)(제조원: Invitrogen)을 25U/μl VsEndA_S44E으로 37°C에서 15분 동안 처리하였다. S44E_End I를 10mM DTT(1-4 디티오토레이탈)을 가하고 40°C에서 30분 동안 항온처리하여 불활성화시켰다. 폴리머라제로부터 오염시키는 DNA의 제거시 VsEndA_S44E 처리의 효과를 시험하기 위하여, 1개의 S44E_End I 처리된 시료를 다음 대조군들과 동시에 분석하였다: a) VsEndA_S44E 대신 완충액을 함유하는 시료들, b) *E. coli* 게놈성 DNA가 완충액 전 첨가된 시료들, c) *E. coli* 게놈성 DNA가 완충액 후에 첨가된 시료들, d) *E. coli* 게놈성 DNA가 VsEndA_S44E 불활성화 전 첨가된 시료들, 및 e) *E. coli* 게놈성 DNA가 VsEndA_S44E 불활성화 후 첨가된 시료들. 최종적으로, 프라이머들 및 프로브를 각각 300nM 및 200nM의 최종 농도로 가하였다. 프라이머들 및 프로브를 *E. coli*의 16S rRNA 유전자에 대해 카를레스(Corless) 등이 기술한 바와 같이(참조: J Clin Microbiol. 2000, 38(5):1747-52) 표적화하였다. 열 주기 조건들은 다음과 같았다: 50°C에서 2분 동안, 95°C에서 10분 동안에 이어 95°C에서 30초 동안, 60°C에서 30초 동안 및 72°C에서 30초 동안의 45 주기들. qPCR을 스트라타젠(Stratagene) Mx3500P(제조원: Agilent technologies) 속의 20μl의 반응물들 속에서 수행하였다.

[0132]

도 11에 나타낸 바와 같이, VsEndA_S44E는 막시마(Maxima) qPCR 마스터 혼합물 속에서 오염시키는 게놈성 세균 DNA의 수준을 감소시킬 수 있다. 도면의 범례들에서 VsEndA_S44E 돌연변이체는 "S44E"로 축약되었다. 또한, *E. coli* DNA로 스파이크된 마스터 혼합물에 대한 VsEndA_S44E의 첨가는 VsEndA_S44E 처리된(스파이크되지 않은) 마스터 혼합물과 동일한 QC-값을 생성한다. S44E_End I는 또한 마스터 혼합물 속에 함유된 세균 DNA 오염물질들 중 일부를 제거할 수 있다. 폴리머라제-반응은 VsEndA_S44E 처리에 영향받지 않는다. 따라서, VsEndA_S44E는 오염시키는 DNA를 제거할 수 있으며, 완전히 불활성화될 수 있고 불활성화된 VsEndA_S44E는 폴리머라제의 수행능을 악화시키지 않는다. 유사한 결과들이 익스프레스(Expression) qPCR 슈퍼믹스 유니버설(Supermix Universal)(제조원: Life Technologies)로 수득되었다(데이터는 나타내지 않음).

[0133]

실시예 11 - 고 염도 폴리머라제 용액들로부터 세균 게놈성 DNA의 제거

[0134]

VsEndA_S44E 처리는, VsEndA_S44E의 불활성화가 용이하게 달성될 수 있으므로 뉴클레아제 활성이 없어야만 하는 단백질들의 정제들에 있어 특히 유용하다. 나아가, DNA에 결합하는 단백질들의 정제 시, 염 활성 뉴클레아제의 사용은, 염이 단백질 제제들에 첨가되어 DNA-단백질 상호작용들을 제한할 수 있으므로 편리하다. 당해 실시예에서, 본 발명자들은 0.5 및 1.0M 염화나트륨의 용액 속에서 DNA 폴리머라제로부터 DNA 오염물질들을 제거하는 VsEndA_S44E의 능력을 시험하였다.

[0135]

25mM 트리스-HCl, 5mM MgCl₂ 및 0.5M 또는 1.0M NaCl 중 TEMPase Hot Start DNA 폴리머라제(VWR)를 25U/μl VsEndA_S44E로 37°C에서 15분 동안 처리하였다. 다음의 대조군들을 상기 시료와 동시에 분석하였다: a) VsEndA_S44E 대신에 완충액을 함유하는 시료들, b) 20pg의 *E. coli* 게놈성 DNA가 완충액 전에 첨가된 시료들, 및 c) 20pg의 *E. coli* 게놈성 DNA가 VsEndA_S44E 불활성화 전에 첨가된 시료들. VsEndA_S44E를 10mM DTT를 첨가하고 40°C에서 30분 동안 항온처리하여 불활성화시켰다. 불활성화 단계 후 시료들의 완충액을 폴리머라제-완충액으로 7K의 컷 오프(cutoff)로 ZebaTM Spin 탈염 컬럼들(제조원: Thermo Scientific)을 사용하여 제조사의 지시들에 따라 폴리머라제-완충액으로 변화시켰다. 최종적으로, 프라이머들 및 프로브를 가하고 폴리머라제 완충액의 성분들은 다음과 같았다: 10mM 트리스-HCl, 20mM KCl, 5mM MgCl₂, 100 μM의 dATP, dCTP, dGTP 및 200 μM의 dUTP, 300 nM의 각각의 프라이머 및 200nM의 프로브. 열 주기 조건들은 다음과 같았다: 95°C에서 15분 동안에 이어서 95°C에서 30초 동안 및 60°C에서 30초 동안의 45 주기들. qPCR을 스트라타젠 Mx3500P(제조원: Agilent technologies) 속에서의 20μl의 반응물들 속에서 수행하였다.

[0136]

도 12는, 0.5M 및 1.0M 염화나트륨을 함유하는 폴리머라제 용액들 속에서 VsEndA_S44E 처리를 나타낸다. 도면의 범례들에서 VsEndA_S44E 돌연변이체는 "S44E"로 축약되었다. 이를 도면들은, 폴리머라제 용액으로부터 스파이크된 *E. coli* DNA를 제거하는 VsEndA_S44E 돌연변이체의 능력이 고 염도에 의해 영향받지 않음을 나타낸다.

[0137]

별도의 연구에서, VsEndA_S44E 돌연변이체의 활성을 광범위한 상이한 염화나트륨 및 염화칼륨 농도들에 대하여 평가하였다. 도 14는, VsEndA_S44E가 약 0.5M 염화나트륨에서 최적 활성을 가지지만, 광범위한 염화나트륨 및 염화칼륨 농도들에서 작동함을 나타낸다.

[0138]

추가적인 연구에서, 변화하는 염화나트륨 농도들 및 pH 수준들의 범위에서 송아지 가슴샘 DNA의 분해시 VsEndA_S44E 돌연변이체의 효소 활성을 시판되는 벤조나제(세라티아 마르케스켄스) 뉴클레아제의 활성과 비교하였다. 도 16은, VsEndA_S44E가 벤조나제와 비교하여 보다 광범위한 범위의 pH 수준들 및 염화나트륨 농도들에

서 DNA를 분해함을 나타낸다.

[0139] 추가적인 연구에서, 변화하는 염화나트륨 농도들의 범위에서 *E. coli* 세포 용해물로부터 DNA를 분해하는데 있어서 VsEndA_S44E 돌연변이체의 효소 활성을 평가하였다. 도 17은, VsEndA_S44E 돌연변이체가 0.25M 내지 1.0M의 염화나트륨 농도에서 활성이었음을 나타낸다.

실시예 12 - 단백질 정제 제제로부터 DNA를 제거하는 S44E_EndA의 용도

[0141] VsEndA_S44E는 단백질 정제 반응들(schemes), 특히 뉴클레아제 활성 및 오염시키는 DNA가 유리되어야 하는 DNA-결합 단백질들의 정제 시 유용할 수 있으므로, 본 발명자들은 재조합적으로 발현된 DNA-결합 단백질을 함유하는 *E. coli* 추출물로부터 계놈성 DNA를 제거하는 VsEndA_S44E의 용도를 시험하였다.

[0142] 당해 실시예에서 재조합적으로 발현된 단백질은 우라실을 함유하는 DNA로부터 우라실의 제거를 촉매하는 코드(cod) 우라실-DNA 글리코실라제(cod UNG)였다. 코드 UNG를 함유하는 *E. coli* 세포들을 수거하고, 세척한 후 라이소자임을 함유하는 트리스/HCl 완충액(25mM 트리스/HCl pH 8.0, 10mM NaCl, 1mM EDTA, 1% 글리세롤) 속에서 초음파처리하여 분해하였다. 세포 추출물을 원심분리하고 상청액을 수집하였다. 상청액의 pH를 다음의 농도들의 NaCl을 가하기 전에 8.5로 조절하였다: 0M, 0.25M, 0.5M, 0.75M 또는 1.0M. MgCl₂을 또한 50U/μL VsEndA_S44E로 37°C에서 30분 동안 처리하기 전에 10mM에서 가하였다. 이후에, VsEndA_S44E을 10mM DTT을 가한 후 40°C에서 30분 동안 항온처리하여 불활성화시켰다. 처리되지 않은 대조군들을 또한 포함시켰다. VsEndA_S44E 처리된 상청액(1 μl)을 앞서 실시예 10에 설명된 바와 동일한 PCR 완충액 조성 및 열 주기 조건들을 사용하여 템파제 핫 스타트(TEMPase Hot Start) DNA 폴리머라제(VWR)를 함유하는 50 μl의 qPCR 반응물에 가하였다.

[0143] 도 13에 나타낸 바와 같이, VsEndA_S44E은, 유의적인 양의 DNA가 여전히 용해물 속에 남아 있지만, 0.5M 이상의 NaCl을 함유하는 시료들 속에서 계놈성 *E. coli* DNA의 대부분(>99.5%)을 제거할 수 있었다. 비교적 낮은 염도(0M 및 0.25M NaCl)의 시료들 속에서, Cq 값들은 처리되지 않은 및 VsEndA_S44E-처리된 시료들 둘 다에 대해 동일한 것으로 밝혀졌다. 이는, 시료 내의 DNA가 단백질과 상호작용하여, 이를 VsEndA_S44E 효소 및 폴리머라제 둘 다에 대해 이용가능하지 않게 함을 제안한다. 비교하여, 보다 높은 NaCl 농도들(0.5M, 0.75M 및 1.0M)에서 DNA 수준들에 있어서의 명확한 차이가 처리되지 않은 시료들과 VsEndA_S44E 돌연변이체를 함유하는 시료들 사이에서 관찰되며, 이는, NaCl이 DNA를 VsEndA_S44E 및 폴리머라제 둘 다에 대해 보다 이용가능하게 함을 제안한다. 당해 실시예는, VsEndA_S44E가 재조합적으로 발현된 DNA-결합 단백질들을 함유하는 세포 추출물들로부터 DNA를 제거하는데 이상적임을 입증한다. 염들의 첨가는 단백질-DNA 상호작용들을 감소시켜 DNA가 염-활성 VsEndA_S44E에 대해 이용가능하도록 한다. 또한, VsEndA_S44E는 용이하게 비가역적으로 불활성화될 수 있으며, 이러한 특징은, DNA-결합 단백질들이 일반적으로 뉴클레아제-활성을 지닐 필요가 없으므로 중요하다.

실시예 13 - PCR 품질에 있어서 불활성화 첨가제 TCEP의 효과

[0145] 본 실시예에서, 본 발명자들은 PCR 효능에 있어서 템파제 폴리머라제 및 템파제 주요 완충액에서 TCEP의 효과를 나타낸다.

[0146] 변화하는 농도들의 TCEP를 PCR 성분들의 나머지를 첨가하기 전에, PCR 스트립들에 가하였다. *E. coli* gDNA(100fg)를 23S 프라이머/프로브 세트용 주형으로서 사용하였다. 모든 시료들을 2회 수행하고 모든 qPCR 반응들의 총 용적은 20 μl이었다. 템파제 주요 완충액 및 "악틱 완충액(Arctic buffer)"(최종 농도: 10 mM 트리스 HCl pH 8.3, 10mM KCl 및 5mM MgCl₂) 중 템파제 폴리머라제(VWR) 뿐만 아니라 아질린트 브릴리안트(Agilent Brilliant) III 마스터믹스(mastermix)(제조원: Agilent Technologies)도 시험하였다.

[0147] 상기 연구로부터의 결과들은, 2.5mM 이하의 TCEP 농도가 PCR 효능에 있어서 주목할만한 효과를 가지지 않음을 나타낸다(데이터는 나타내지 않음).

실시예 14 - Taq 폴리머라제 세정들에 있어서 VsEndA_S44E 불활성화의 안정성

[0149] TCEP의 존재는 불활성화 과정들을 수행한 후 VsEndA_S44E를 불활성으로 유지시키기 위해 필요할 수 있다. 이러한 이유로, 본 발명자들은 VsEndA_S44E의 불활성화를 유지하기 위한 TCEP의 장기간 능력을 평가하였다.

[0150] 2 μL의 템파제 주요 완충액(Tempase Key buffer), 0.8 μL의 dNTP/dUTP (2.5/5mM), 0.2 μL의 템파제(5U/μL), 1 μL의 VsEndA_S44E 저장-완충액/VsEndA_S44E(10U/μL) 및 1 μL의 물을 포함하는 완충액을 17.5 x 용적 속에 혼합하고 37°C에서 25분 동안 항온처리하였다. DNA 탈오염화 단계 후에, VsEndA_S44E를 1x rx 당 1 μL의 50mM

TCEP를 첨가하고 37°C에서 25분 동안 항온처리하여 불활성화시켰다. 불활성화 후, 혼합물을 4°C(8.3mM TCEP의 유효 농도에서)에서 14일 동안 저장하였다. 이후에, 처리된 혼합물을 qPCR 스트립들 속에 분산시키고 *E. coli* 23S 프라이머들/프로브를 가하고 주형(200fg의 *E. coli* gDNA 또는 주형 부재)을 14 μL 속에 용해하였다. 각각의 qPCR 혼합물의 총 용적은 20 μl이었다. 상기 희석은, TCEP의 농도가 2.5mM로 감소되도록 보증하였으며, 실시예 13의 결과들로부터 PCR 효능에 영향을 미치지 않는 것으로 공지되었다. 상기 스트립들을 qPCR을 수행하기 전에 재활성화된 VsEndA_S44E에 의해 유발된 주형의 어떠한 손실도 검출하기 위해, 4°C에서 4시간 동안 저장하였다. qPCR을 스트라타젠 Mx3500P(제조원: Agilent technologies) 속에서 수행하고 열 주기 조건들은 다음과 같았다: 50°C에서 2분 동안, 95°C에서 10분 동안에 이어서, 95°C, 60°C에서 30초 동안 및 72°C에서 30초 동안의 45 주기들.

[0151] 결과들은, 8.3mM의 농도에서 불활성화 첨가제 TCEP의 존재하에서 저장하는 경우 4°C에서 적어도 2주의 기간에 걸쳐 VsEndA_S44E의 유의적인 재활성화가 없었음을 나타낸다(데이터는 나타내지 않음).

[0152] 실시예 15 - 염화나트륨 농도들 및 pH들이 변하는 완충액들 속에서 VsEndA_S44E 및 VcEndA(야생형)의 배합물의 수행능

[0153] VsEndA_S44E는 8.5의 pH-최적 및 425mM의 염화나트륨 농도-최적을 갖는다. 비브리오 콜레라로부터 수득된 야생형 비브리오 살모니키다-유래된 엔도뉴클레아제(VsEndA)의 동족체를 본원에서 VcEndA로 언급하며, 이는 광범위한 pH 범위와, 7.5의 pH 최적 및 175mM의 염화나트륨 농도-최적을 갖는다. 따라서, 본 발명자들은 이것이 양호한 불활성화 특성들과 함께, 광범위한 pH 및 염화나트륨 농도 작용 범위를 지닌 뉴클레아제 생성물을 생성할 수 있는지를 측정하기 위하여, VsEndA_S44E 및 VcEndA를 조합하였다. 여기서, 본 발명자들은 pH들 및 염화나트륨 농도들이 변화하는 트리스-완충액들 속에서 상기 효소 조성물의 수행능을 시판되는 선도의 비-특이적 뉴클레아제인, 벤조나제의 수행능에 대해 시험하였다.

[0154] 5mM MgCl₂을 함유하는 총 20개의 25mM 트리스-완충액들을 표 6에 나타낸 매트릭스에 묘사한 바와 같은 상이한 pH들 및 염화나트륨 농도들의 조합물을 사용하여 제조하였다.

표 6

	0 M NaCl	0.25 M NaCl	0.5 M NaCl	0.75 M NaCl	1.0 M NaCl
pH 7	1	2	3	4	5
pH 7.5	6	7	8	9	10
pH 8.0	11	12	13	14	15
pH 8.5	16	17	18	19	20

[0155] VsEndA_S44E 및 VcEndA의 배합물을 효소들을 1:1(w/w)로 혼합하여 제조하고 활성을 250mM 염화나트륨을 함유하는 25mM 트리스-HCl-완충액 pH 8 속에서 측정하였다. 50μg의 송아지 가슴샘 DNA를 함유하는 100 μl의 완충액 속에서, 300U 효소를 가하고 반응물을 37°C에서 30분 동안 항온처리하였다. 반응물을 EDTA를 함유하는 로딩 염료를 가하여 정지시키고 시료들을 1% 아가로스-겔 위에서 로딩하였다.

[0156] 결과들은, 0M 내지 1M의 염화나트륨 농도 범위에서 VsEndA_S44E/VcEndA 조성물의 유의적인 저하를 나타내지 않았다. 비교시, 벤조나제는 0.25M 이상에서 활성의 일부 손실을 나타내었다(데이터는 나타내지 않음). 또한, VsEndA_S44E 및 VcEndA를 포함하는 조성물은 20mM DTT 또는 TCEP와 함께 4°C에서 6시간 동안 저장 후에도 완전한 불활성화를 나타낸 반면, 야생형 VsEndA 및 VcEndA를 포함하는 조성물은 이들 조건들 하에서 유사한 불활성화 특성들을 나타내지 않았다(데이터는 나타내지 않음).

도면

도면1

VsEndA	MKLIRLVIISLIAVSFTVNVMAAPPSSFSKAKKEAVKIYLDYPTSFYCGCDITWKNKKGI	60
VcEndA	MMIFRFVTT-LAASPLLLTFAAP-ISFSHAKNEAVKIVRDHPVSFYCGCEIRWQGKK-GI	57
	* * * * * *** *** *** ***** * * ***** * * * *	
VsEndA	PELESCGYQVRKQEKRASRIEWEHVVPAWQFGHQRCWQKGRKNCTRNDKQFKSMEADL	120
VcEndA	PDLESCGYQVRKNENRASRIEWEHVVPAWQFGHQLCWQQGRKNCTRSPEFNQMEADL	117
	* ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * *****	
VsEndA	HNLVPAIGEVNGDRSNFRFSQWNGSKGAFYGCQCAFVKDFKGRVAEPPAQSRGAIARTLY	180
VcEndA	HNLTPAIGEVNGNRNSFSQWNGIDGVTYGQCEMQVNFKERTAMP PERARGAIARTLY	177
	*** ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * *****	
VsEndA	MNNEYKFNLSSKAQRQLMEAWNKQYPVSTWECTRDERIAKIQGNHNQFVYKACTK	234
VcEndA	MSEQYGLRLSSKAQNQLMQAWNNQYPVSEWCVRDQKIEKVQGNNSNRFVREQCPN	231
	* * ***** * * * * * * * * * * * * * * * *	

도면2

1	ATG AAA TTA ATT CGC TTA GTT ATC AGT CTT ATT GCT GTC AGT TTC	45
1	M K L I R L V I S L I A V S F T V N V M A A P P S S F S K A K K E A V K I Y L D Y P T S F Y C G C D I T W K N K K G I	15
46	ACT GTT AAC GTA ATG GCA GCA CCT CCT TCT TCT TTC TCA AAA GCA	90
16	T V N V M A A P P S S F S K A	30
91	AAA AAA GAA GCC GTC AAA ATC TAT CTT GAT TAC CCA ACC GAG TTT	135
31	K K E A V K I Y L D Y P T E F	45
136	TAT TGT GGC TGT GAC ATT ACG TGG AAA AAT AAA AAG AAA GGG ATC	180
46	Y C G C D I T W K N K K K G I	60
181	CCT GAA TTA GAA AGC TGC GGA TAC CAA GTC CGT AAA CAA GAA AAA	225
61	P E L E S C G Y Q W H V P A W Q F G H Q L Q C W Q Q G R N C T R S P E F N Q M E A D L	75
226	CGA GCC AGT CGT ATT GAA TGG GAG CAT GTT GTT CCA GCA TGG CAA	270
76	R A S R I E W E H V V P A W Q F G H Q L Q C W Q Q G R N C T R S P E F N Q M E A D L	90
271	TTT GGT CAT CAA CGT CAA TGT TGG CAA AAA GGT GGG CGT AAA AAT	315
91	F G H Q R Q C W Q K G G R K N	105
316	TGC ACT AGA AAC GAC AAG CAA TTC AAA TCA ATG GAA GCC GAC TTA	360
106	C T R N D K Q F K S M E A D L	120
361	CAT AAT CTA GTG CCT GCG ATT GGT GAA GTA AAC GGG GAC AGA TCC	405
121	H N L V P A I G E V N G D R S N F R F S Q W N G I D G V T Y G Q C E M Q V N F K E R T A M P P E R A R G A I A R T L Y	135
406	AAC TTC CGA TTC TCA CAA TGG AAT GGA AGC AAA GGC GCT TTC TAT	450
136	N F R F S Q W N G S K G A F Y	150
451	GGC CAA TGT GCT TTT AAA GTC GAC TTC AAA GGC CGT GTT GCC GAG	495
151	G Q C A F K V D F K G R V A E	165
496	CCA CCA GCA CAA TCT CGT GGT GCC ATT GCC CGA ACG TAT CTT TAT	540
166	P P A Q S R G A I A R T Y L Y	180
541	ATG AAC AAC GAA TAT AAA TTT AAC TTA TCA AAA GCA CAG CGA CAA	585
181	M N N E Y K F N L S K A Q R Q L M Q A W N N Q Y P V S E W C V R D Q K I E K V Q G N S N R F V R E Q C P N	195
586	CTT ATG GAA GCA TGG AAC AAA CAG TAT CCA GTA TCA ACT TGG GAA	630
196	L M E A W N K Q Y P V S T W E C T R D E R I A K I Q G N H N Q F V Y K A C T K	210
631	TGT ACT CGT GAT GAA CGT ATA GCA AAA ATC CAA GGC AAT CAT AAT	675
211	C T R D E R I A K I Q G N H N	225
676	CAA TTT GTT TAT AAA GCA TGC ACT AAA TAA	705
226	Q F V Y K A C T K *	

도면3a

보이. 살모니키다	AP—PSSFSKAKKEAVKIYLDYPT	S FYCGCDITWKNNKKGIP 40
브이. 콜레라에	—A—PISFSHAKNEAVKIYRDHPV	S FYCGCEIRWQGKK—GIP 38
오세아니모나스 아종	—GE—AMSFRQAKKVAPGIYNDNLK	T FYCGCNIDTQGKK—LVP 39
살모넬라 아종	—DG—INNFSQAKAAASVKVNADAPG	S FYCGCQIRWQGKK—GVV 39
엔테로박ter 아종	—DG—INSFSQAKAAGGVVNADVPG	D FYCGCKIHWQGKK—GIV 39
요케넬라 아종	—EG—INSFSQAKAAGGVVNADVAG	D FYCGCKIHWQGKK—GVV 39
클렙시엘라 아종	—AG—INSFSQAKAAGGVVNADVPG	D FYCGCKIDWQGKK—GVI 39
이. 콜라이	—EG—INSFSQAKAVAKVHADAPG	T FYCGCKIDWQGKK—GVV 39
시겔라 아종	—EG—INSFSQAKAAAAVKVHADAPG	T FYCGCKINWQGKK—GVV 39
시트로박ter 아종	—EG—INSFSQAKAAGGVVNADAPG	D FYCGCKINWQGKK—GVV 39
크로노박ter 아종	—ASC—IHSFSQAKAAGGVKINADAPG	D FYCGCPITWQGKK—GIP 40
라넬라 아종	I GALVPLSAFSQSGNTIINNFSQAKAAA AVKINQGAP	T FYCGCNIRWQGKK—GTP 52
에르위니아 아종	—FPPLFCHALSQGNYYQQNNFSQAKAWAAQIHHDAFP	T FYCGCKIDWQGKK—GVP 52
예르시니아 아종	—HG—INNFSQAKAVAAKIHQDAPG	S FYCGCQIDWQGKK—GIP 39
세라티아 아종	—HG—INNFSQAKAAA AKINQDAPG	S FYCGCKINWHGKK—GLP 39
슈도모나스 아종	—AQAPRFTSEAKKVAWGLYAPQST	E FYCGCKY—TGKR—V 38

보이 살모니키다	ELESCGYQVRKQEKRASRIEWEHVVPAWFQFGHQRCWQKGGRKNCTRNDKQFKSMEADLH	100
보이. 폴레 라에 아종	DLES CGYQVRKNENRASRIEWEHVVPAWFQFGHQLCWQGGGRKNCTRISPEFNMQMEADLH	98
오세아니노나스 아종	DLAGCGYQVRKQQQRASRIEWEHVVPAWEFGHQRCWQGGGRKNCTRKLDEFRQMEGDLH	99
살모넬라 아종	DLES CGYQVRKNENRASRIEWEHVVPAWFQFGHQRCWQDGGRKNCNAK-DPVYRKMESDMH	98
엔 토 박터 아종	DLES CGYQVRKNENRASRIEWEHVVPAWFQFGHQRCWQDGGRKNCNAK-DPVYRKMESDMH	98
요게넬라 아종	DLES CGYQVRKNENRASRIEWEHVVPAWFQFGHQRCWQDGGRKNCNAK-DPVYRKMESDMH	98
웹시엘라 아종	DLES CGYQVRKNENRASRIEWEHVVPAWFQFGHQRCWQDGGRKNCNAK-DPVYRKMESDMH	98
이. 콜라이	DLES CGYQVRKNENRASRIEWEHVVPAWFQFGHQRCWQDGGRKNCNAK-DPVYRKMESDMH	98
시질리아 아종	DLQSCGYQVRKNENRASRVEWEHVVPAWFQFGHQRCWQEGGGRKNCAK-DPVYRKMESDMH	98
시트로 박터 아종	DLQSCGYQVRKNENRASRVEWEHVVPAWFQFGHQRCWQDGGRKNCNAK-DPVYRKMESDMH	98
크로노 박터 아종	DLES CGYQVRKNENRASRIEWEHVVPAWFQFGHQRCWQDGGRKNCNAK-DPVYRKMESDMH	98
나렐라 아종	DLKACGYQVRKNENRASRIEWEHVVPAWFQFGHQRCWQNGGGRKNCDK-DPVYRREMETDLH	99
에르위니아 아종	DLQSCGYAVRKSELRASRIEWEHVVPAWFQFGHQMCWQDGGRKNCNAK-NADYRQVETDLH	111
에르시니아 아종	DLTSCGYQVRKNENRASRIEWEHVVPAWFQFGHQRCWQDGGRKNCVK-DPVYRKMESDLH	111
세라티아 아종	DLNSCGYQPRKNAARARIEWEHVVPAWFQFGHQRCWQGGGRKNCAK-DPVYRQIETDLH	98
수도모나스 아종	DLNACGYQPRKNAQGRAGRIEWEHVVPAWFQFGHQLCWQDGGRKNCNAK-DPVYRQIETDLH	98
	DLACCGYVPRKSARRASRIEWEHIVPAWFQIGHLRQCWQNGGGRKNCTSDPVYKRAEADLH	98

보이. 살로니키다	NLVPAGEVNGDRSNFRSQWNGSKGAFYQCAFVKDFKGRVAEPPAQSRRGAIARTYLYM	160
보이. 폴리라에	NLTLPAGEVNGNRNSFSFQSQWNG1DGVTYQGCEMQVNFKERTAMPPERARAGAIARTYLYM	158
오세아니아노나스 아종	NLVPAVGEVNGDRSNRNFMSYSEWNG-KPVGQYQCAMVDFGKRKVQPPESRRGAIARTYLYM	158
살모넬라 아종	NLQPAIGEVNGDRCNFMYSQWNG-GEQGYQGQCAMKVFDFKLAEPPARAGAIARTYFYM	157
엔테로박ter 아종	NLQPAVGEVNGDRCNFMYSQWNG-GEGQYQGQCGMKVDFKEVKAEPPARARGSIARTYFYM	157
요코넬라 아종	NLQPAVGEVNGDRCNFMYSQWNG-GEQGYQGQCAMKVFDFKGVKAEPPARAGAIARTYFYM	157
웹시밀라 아종	NLQPAVGEVNGDRCNFMYSQWNG-GEQGYQGQCAMKVFDFKLAEPPARAGAIARTYFYM	157
이. 폴라이	NLQPSVGEVNGDRCNFMYSQWNG-GEQGYQGQCAMKVFDFKLAEPPARAGAIARTYFYM	157
시질리 아종	NLQPSVGEVNGDRCNFMYSQWNG-GEGQYQGQCAMKVFDFKEKAAEPPARAGAIARTYFYM	157
시트로박ter 아종	NLQPAVGEVNGDRANFMYSQWNG-GEGQYQGQCAMKVFDFKEVKAEPPARAGAIARTYFYM	157
크로노박ter 아종	NLQPAVGEVNGDRCNFLYSQWRG-GEQGYQGQCAMKVFDFKNAQEPPARAGAIARTYFYM	158
라넬라 아종	NLQPAVGEVNGDRCNFLYSQWRG-GEQGYQGQCAMKVFDFKNAQEPPARAGAIARTYFYM	158
에르위니아 아종	NLEPAIGEVNGDRNNFMYSQWNG-GEQGYQGRCEMKIDFKAKAAEPPARAGAIARTYFYM	170
에르시니아 아종	NLQPAIGEVNGDRNFMYSQWNGSG-GEQGYQGQCAMVDFKPNLAEPPARAGAIARTWYFM	170
세라티아 아종	NLQPAIGEVNGDRNNFMYSQWNG-GSGQYQGQCAMKVFDFKNKLAEPVRAGAIARTYFYM	157
수도모나스 아종	NLQPAIGEVNGDRNNFMYSQWRC-GEQGYQGQCAMPKVFDFKHQKAEPPARAGAIARTYFYM	157
	NLVPSIGEVNGDRSNFSFGWVPE-QKGQYGSCLTQVDFKAKKVMPPRSIRGMIARTYFYM	157

도면3b

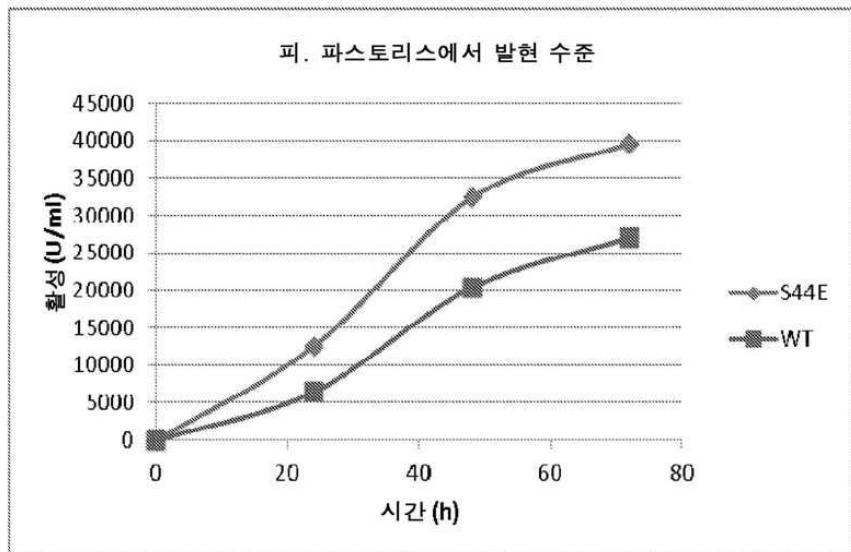
보이 살모니커다	NNEYKFNLSKAQQLRMLMEAWNQKYPVSTWECTRDERIAKIQGNHNQFVYKACTK-----	213
보이. 콜레라에	SEQYGLRLSKAQNLQM QA WNNQY PV SE WEC VRD DKI EKV QGNS NR VRE QCPN-----	211
오세 아니모나스 아종	QQQYRLK IAR QQ QKL FEA NW RQ Y P A S P WEC ERD NRI SIR QG NH NP VY QEQ CKN YAY TPNP-----	218
살모넬라 아종	RDQYQLK LSR QQT QL FN VWD KQ Y PV TAE CER DARI AKV QG NH NP VY QRA C QARKS-----	213
언데로박터 아종	RDRYLNLSR QQT QL FN AWN KQ Y PV TE WEC QRD ER IAR VQ G NH NP VY QRA C QAKS-----	213
요케넬라 아종	RDRYQ LAL SRSR QQT QL FN AWD KQ Y PV SE WEC ER DER IA KY QG NH NP VY QRA C QAKS-----	213
클렘시엘라 아종	RDRYQ LNL SRSR QQT QL FT AWN KQ Y PV TAE CER DER IA KV QG NH NP VY QRA C QAKS-----	213
이. 콜리아	RDQYN LTL SRSR QQT QL FN AWN KMP VTD WEC ER DER IA KV QG NH NP VY QRA C QARKS-----	213
시겔라 아종	RDQYN LTL SRSR QQT QL FN AWN KMP VTD WEC ER DER IA KV QG NH NP VY QRA C QARKS-----	213
스티로박터 아종	RDQY S LTL SRSR QQT QL FN AWN KQ Y PV TDE WEC ER DER IA KV QG NH NP VY QRA C QAKS-----	213
크로노박터 아종	RDKYQ LNL SRSR QQT QL FN AWN KQ Y PV TDE WEC ER DER IA KV QG NH NP VY QRA C QAKS-----	213
라넬라 아종	RDKYQ LNL SRSR QQT QL FT AWD KQ Y PV TDE WEC ER DER IA KV QG NH NP VY QRA C QAKS-----	214
에트워니아 아종	RDQY KLN L SRSR QQT QL FT AWD KQ Y PV TDE WEC ER DER IA KV QG NH NP VY QRA C QQRKS-----	226
에트시니아 아종	RDQY QLSMSK QQT QL FT AWD KQ Y PV TDE WEC ER DER IA KV QG NH NP VY QRA C QQR-----	223
세라티카 아종	RDQYQ LRL SS QQS K QL FG VWD KQ Y PV TDE WEC RL DR DER IA KV QG NH NP VY QRA C QRPKS-----	213
슈도모나스 아종	RDRYH LRL SRSR QQT QL FE WNR KQ Y PV SWE C REAR IA KV QG NR NP VY I QQA C QRK G-----	213
슈도모나스 아종	SKQYLNRLSRSR QQT QL OY QAW DKT Y PPO I WE BOR NO QO VAC VM GR GN EF VGP VL KACK-----	213

도면4

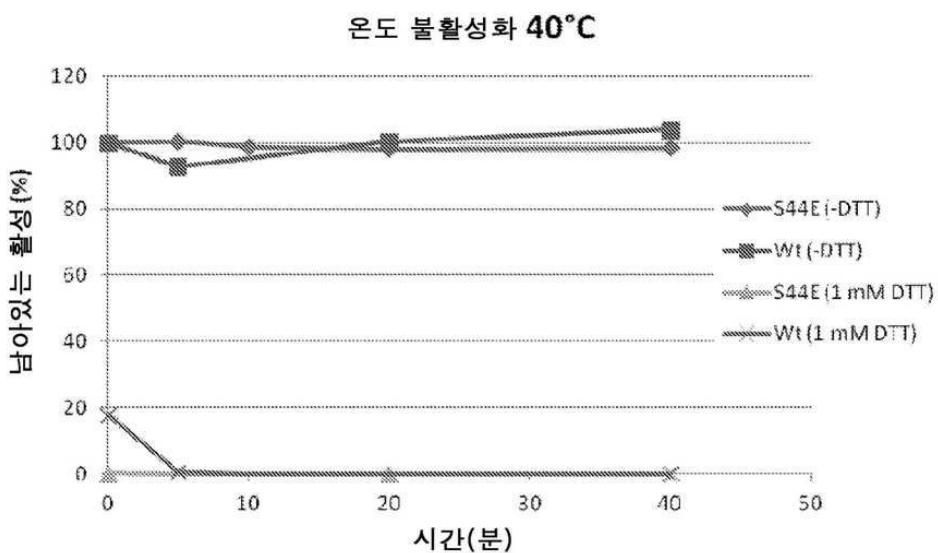
↓

브이. 살모니키다	APPSSFSKAKKEAVKIYLDYPT S FYCGCDITWKNKKKGipeLESCGYQVRKQEKRASRIE 60
브이. 피스체리	APPSSFSKAKKEAVKIYLDHPT S FYCGCDITWKDKKGIPDLQSCGYNVRKQEKRASRIE 60
브이. 우다니스	APPSSFSKAKKLAVKIFYLDHPT S FYCGCDITWKDKKGIPDLESCGYEVRKQEKRASRIE 60
브이. 스플렌디두스	APPSSFSKAKKEAVKIYLDHPT S FYCGCDITWKDKKGIPDLDGCGYQVRKQQKRASRIE 60
브이. 콜레라에	-APISFSHAKNEAVKIRDHPV S FYCGCEIRWQGKK-GIPDLESCGYQVRKNENRASRIE 58
브이. 하르베이이	APPSSFSAAKREAVKIFYADHPT S FYCGCDIKWQGKK-GIPDLASCYQVRKQEKRASRIE 59
브이. 로티페리아누스	APPSSFSAAKREAVKIFYADHPT S FYCGCDIKWQGKK-GIPDLESCGYQVRKQEKRASRIE 59
브이. 투비아쉬이	APPSSFSKAKKEAVKIYADHPT S FYCGCNISWQGRK-GIPDLESCGYQVRKQQKRASRIE 59
브이. 시날로엔시스	APPSSFSKAKKEAIKYADHPS S FYCGCDITWQGRK-GTPDLNSCGYQVRKQEKRASRIE 59
브이. 불니피쿠스	APPSSFSAAKQQAVKIFYQDHPI S FYCGCDIEWQGKK-GIPNLETGYQVRKQQTRASRIE 59
브이. 푸르니씨이	-APASFQSQAKREAVKIFYQDHPV T FYCGCDIQWQGKK-GTPDLKGCGYQVRKQEKRASRIE 58
브이. 안구일라룸	APPASFQSQAKKEALKIYHDHPV S FYCGCDIAWQGKK-GTPDLQACGYQVRKQQTRASRIE 59
* * * * *	
브이. 살모니키다	WEHVVPAWFQGHQRQCWCQKGRKNCTRNDKQFKSMEADLHNLPAGEVNGDRSNFRFSQ 120
브이. 피스체리	WEHVVPAWFQGHQRQCWDQDGRKNCCTRNDKQFKLMEADLHNLPAGEVNGDRSNFRFSQ 120
브이. 우다니스	WEHVVPAWFQGHQRQCWCQDGRKNCTRNDKQFKMMEADLHNLPAGEVNGDRSNFRFSQ 120
브이. 스플렌디두스	WEHVVPAWFQGHQRQCWDQDGRKNCCTRNDKVFKSMEADLHNLPAGEVNGDRSNYNFSQ 120
브이. 콜레라에	WEHVVPAWFQGHQRQCWCQDGRKNCNTRTSPEFNQMEADLHNLTAPAIGEVNGNRSNFNSQ 118
브이. 하르베이이	WEHVVPAWFQGHQRQCWCQNGGRKNCCTRNDNVFKSMEADLHNLTAPAIGEVNGDRSNYNFSQ 119
브이. 로티페리아누스	WEHVVPAWFQGHQRQCWCQNGGRKNCCTRNDKVFKSMEADLHNLTAPAIGEVNGDRSNYNFSQ 119
브이. 투비아쉬이	WEHVVPAWFQGHQRQCWCQNGGRKNCCTRNDKVFKSMEADLHNLTAPAIGEVNGDRSNYNFSQ 119
브이. 시날로엔시스	WEHVVPAWFQGHQRQCWCQNGGRKNCNTRDVKFMSMEADLHNLTAPAIGEVNGDRSNYNFSQ 119
브이. 불니피쿠스	WEHVVPAWFQGHQRQCWCQNGGRKNCNTRDVKFMSMEADLHNLTAPAIGEVNGDRSNYNFSQ 119
브이. 푸르니씨이	WEHVVPAWFQGHQLQCWCQGGGRKQCSRHTAFKRMEMADLHNLTAPAIGEVNGDRSNLNFSQ 118
브이. 안구일라룸	WEHVVPAWFQGHQRQCWCQGGGRKNCNTRDVKFMSMEADLHNLTAPAIGEVNGDRSNYNFSQ 119
* * * * *	
브이. 살모니키다	WNGSKGAFYGCQCAFVKDFKGRVAEPPAQSRGAIARTYLMMNEYKFNLNSKAQRQLMEAWN 180
브이. 피스체리	WNGNKAGYYGCQCAFVKDFKGRVAEPPAQSRGAIARTYLMMQNQEYRFNLNSKSQRQLMNAWD 180
브이. 우다니스	WNGSKGANYGQCAFVKDFKGRVAEPPAQSRGAIARTYMMNKEYRFNLNSKAQRQLMEAWN 180
브이. 스플렌디두스	WNSMDGVSYGCQEMQVNFKQRKVMPDRAKGSIAARTYLMSQEYGFKLSKQQTNLMMMAWN 180
브이. 콜레라에	WNGIDGVTYGCQEMQVNFKERTAMPPEARGAIAARTYLMSSEQYGLRLSKAQNQLMQAWN 178
브이. 하르베이이	WNGMDGVSYGRCEMQVNFKQRKVMPDRAKGSIAARTYLMSKEYGFKLSKQQTQLMSAWN 179
브이. 로티페리아누스	WNGMDGVSYGRCEMQVNFKQRKVMPDRAKGSIAARTYLMSKEYGFKLSKQQTQLMSAWN 179
브이. 투비아쉬이	WNGIDGVSYGRCEMQVNFKHRKVMPDRAKGSIAARTYLMSQEYGFRLSKQQTQLMNAWN 179
브이. 시날로엔시스	WNGVDGVSYGRCEMQVNFKQRKVMPDRAKGSIAARTYLMSKEYGFRLSKQQTQLMTAWN 179
브이. 불니피쿠스	WNGMDGVSYGRCEMQVNFKQRKVMPDRAKGSIAARTYLMSQEYGFQLSKQQQQLMQAWN 179
브이. 푸르니씨이	WHGIDGATYGCIEQVNFFQRKVMPPERARGAIAARTYLMSQEYGFRLSKSQTQLMVWN 178
브이. 안구일라룸	WNGVEGESYGRCEMQVDFKQRKVMPDRAKGSIAARTYLMSQNYGFQLSKSQTQLMQAWN 179
* * * * *	
브이. 살모니키다	KQYPVSTWECTRDERIAKIQGNHNQFVYKACTK- 213
브이. 피스체리	KQYPVSEWECKERDKRIAKIQGNHNQFVYKACRK- 213
브이. 우다니스	KQYPVSAECERDQRIAKIQGNHNQFVFKACTK- 213
브이. 스플렌디두스	KQFPVNEWECTRDERIFIAKIQGNHNPFVYQACK- 212
브이. 콜레라에	NQYPVSEWECEVRDOKIEVKVQGNNSRFVREOCPN- 211
브이. 하르베이이	KSYPVDKWECKERDERIAKIQGNHNPFVQEACRA- 212
브이. 로티페리아누스	KTYPVDKWECKERDERIAKIQGNHNPFVQEACRA- 212
브이. 투비아쉬이	KQFPVDHWECEREQRIFKVFQGNHNPVHVHQACQAL 213
브이. 시날로엔시스	KQFPVDEWECKERDKRIFKVFQGNHNP----- 204
브이. 불니피쿠스	KSYPVDEWECTRDDRIAKIQGNHNPFVQQSCTVR 213
브이. 푸르니씨이	RQYPVDSWECKERDQRIAKVQGNHNPVVRQOCSS- 211
브이. 안구일라룸	RQYPADEWECKRDQRIAKVQGNHNPVQQCRS- 212
* * * * *	

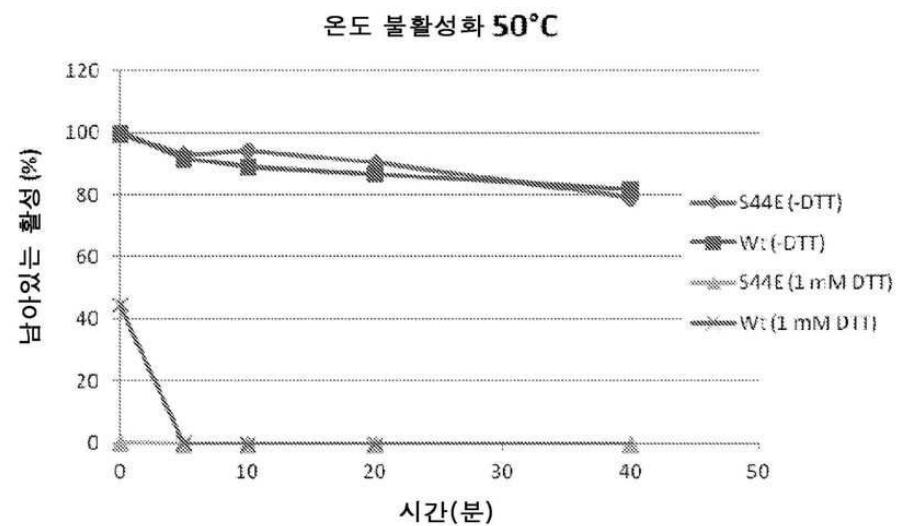
도면5



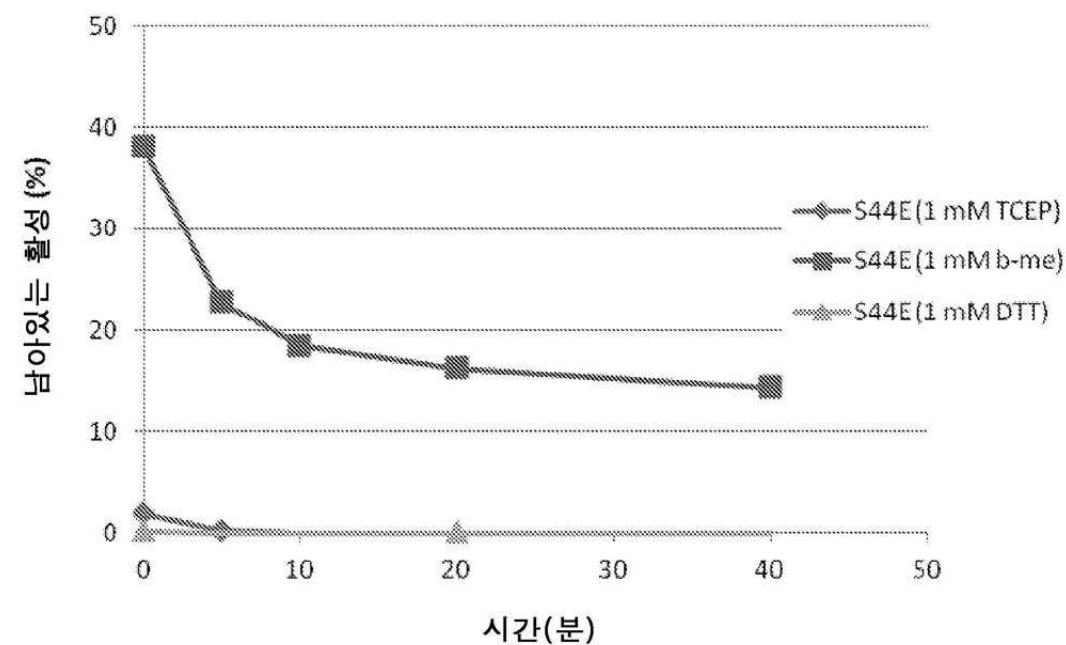
도면6a



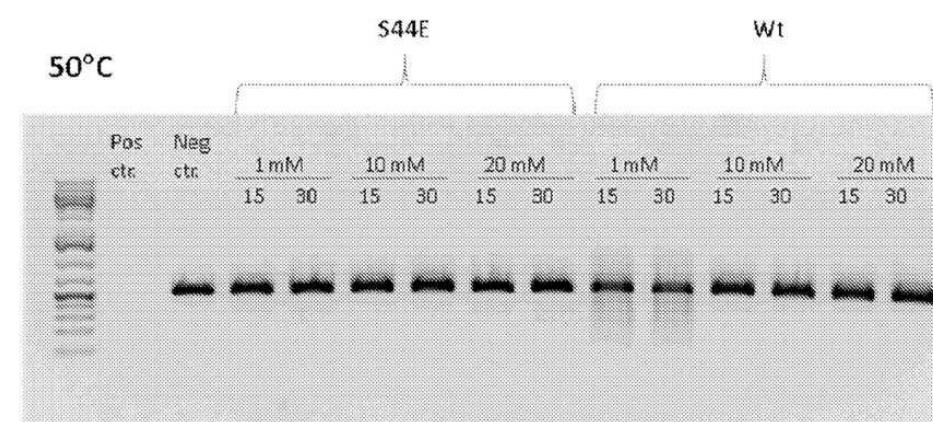
도면6b



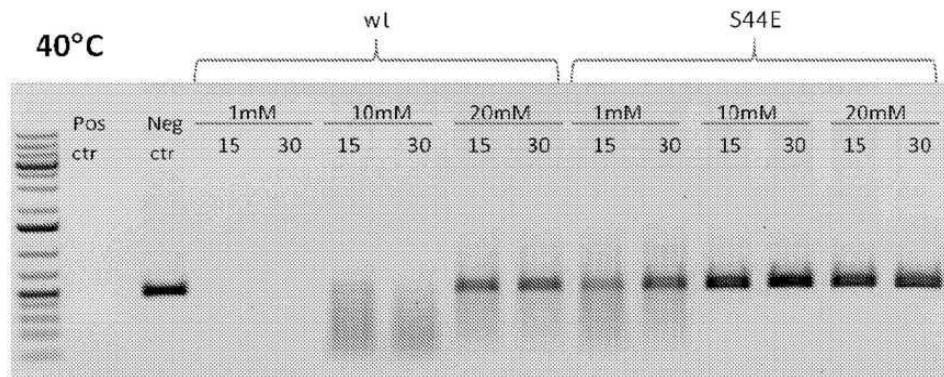
도면7



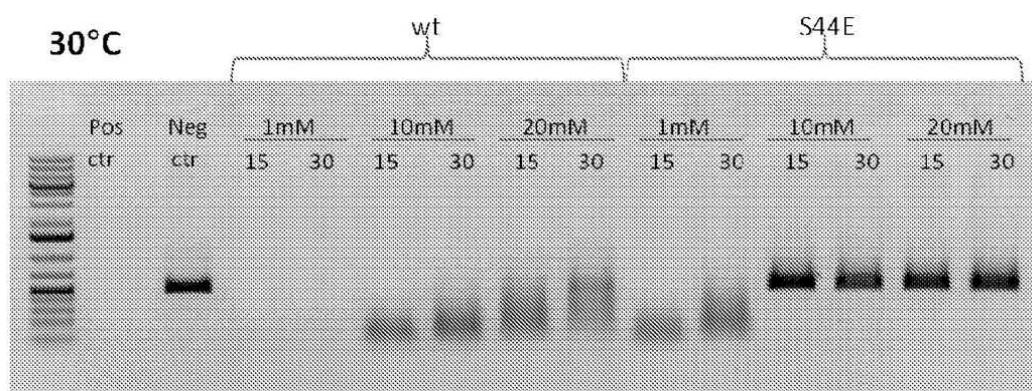
도면8a



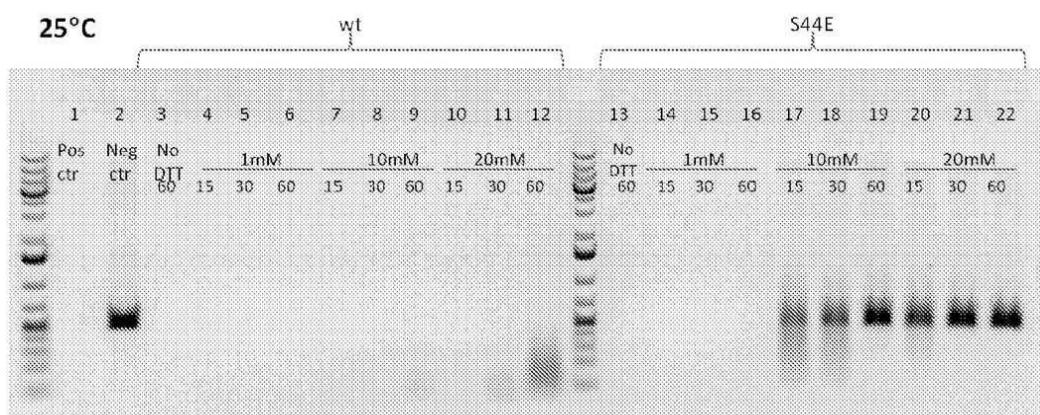
도면8b



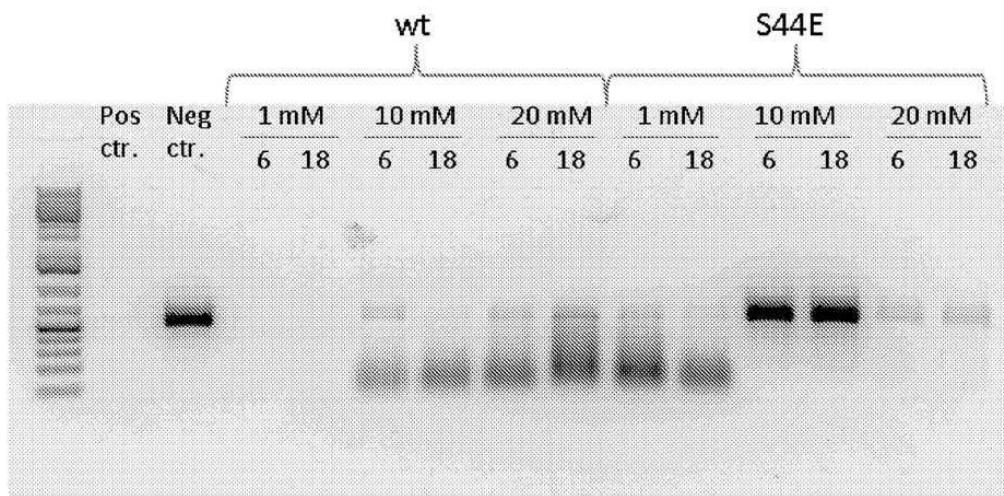
도면8c



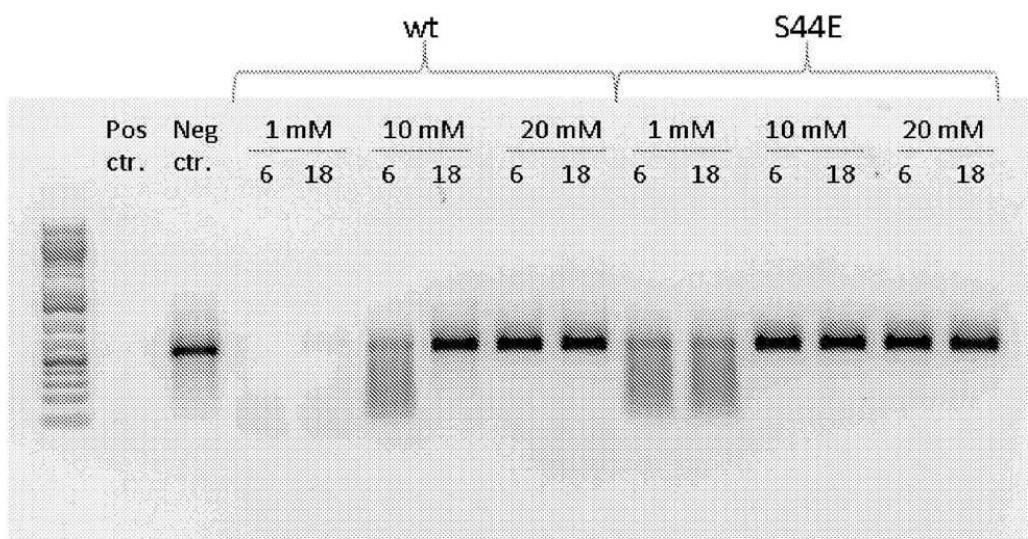
도면8d



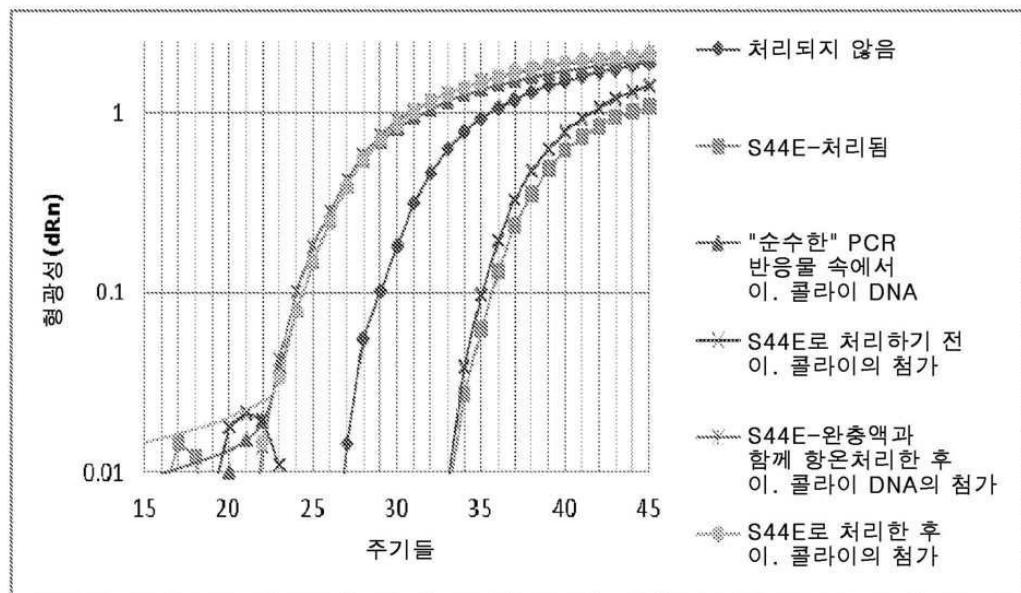
도면9a



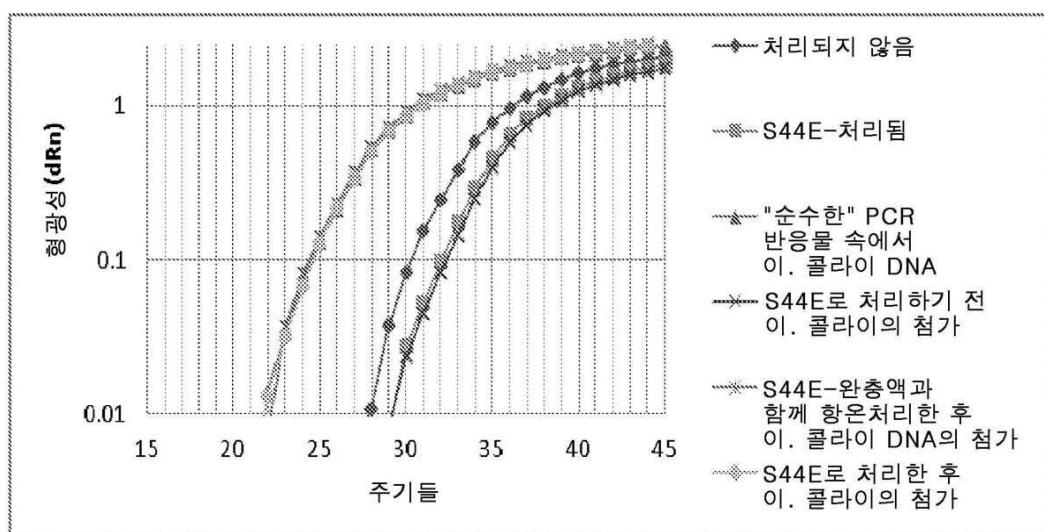
도면9b



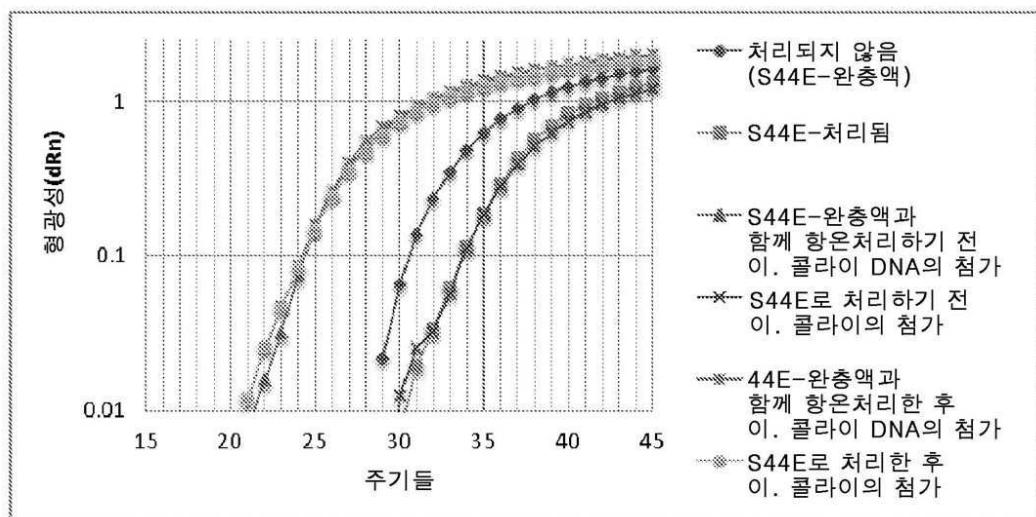
도면10a



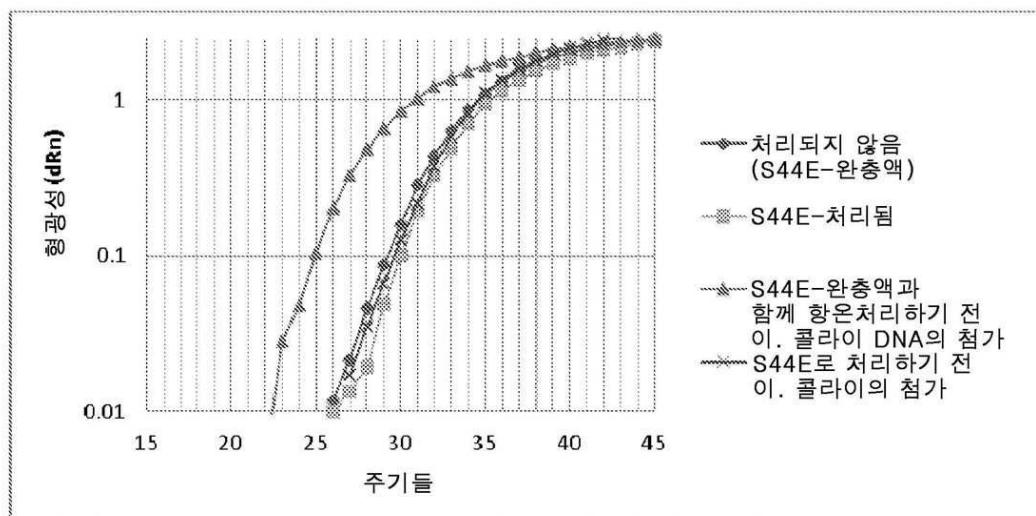
도면10b



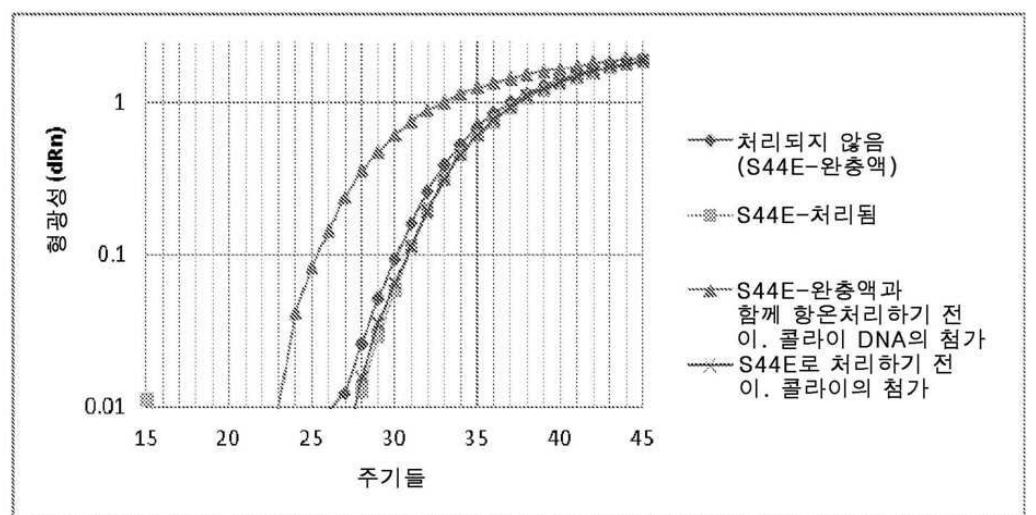
도면11



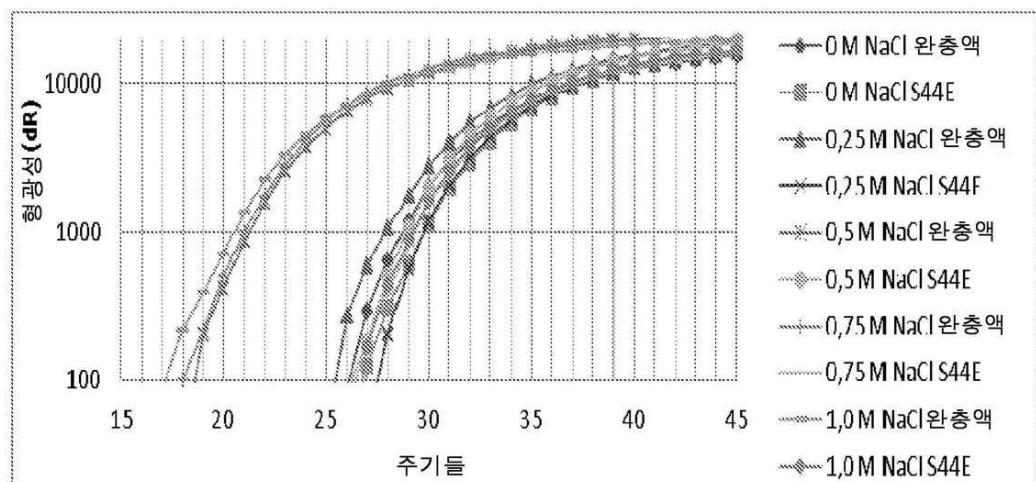
도면12a



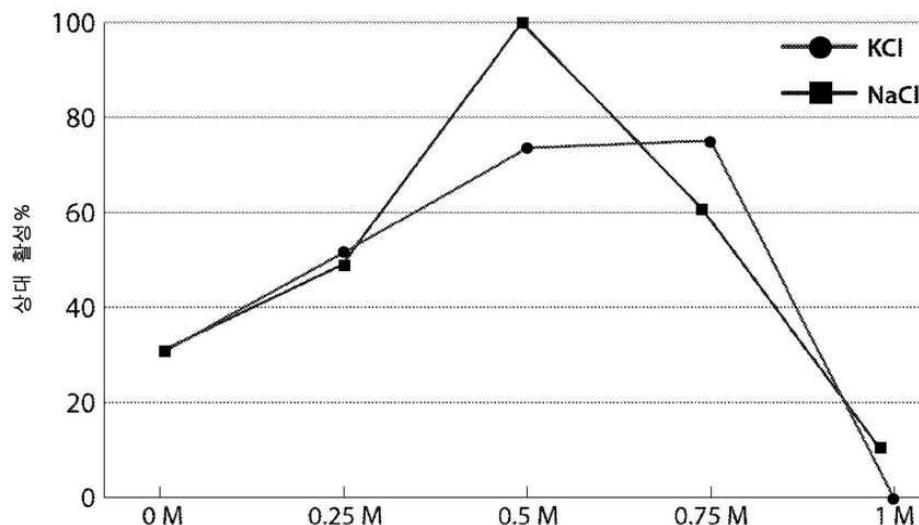
도면12b



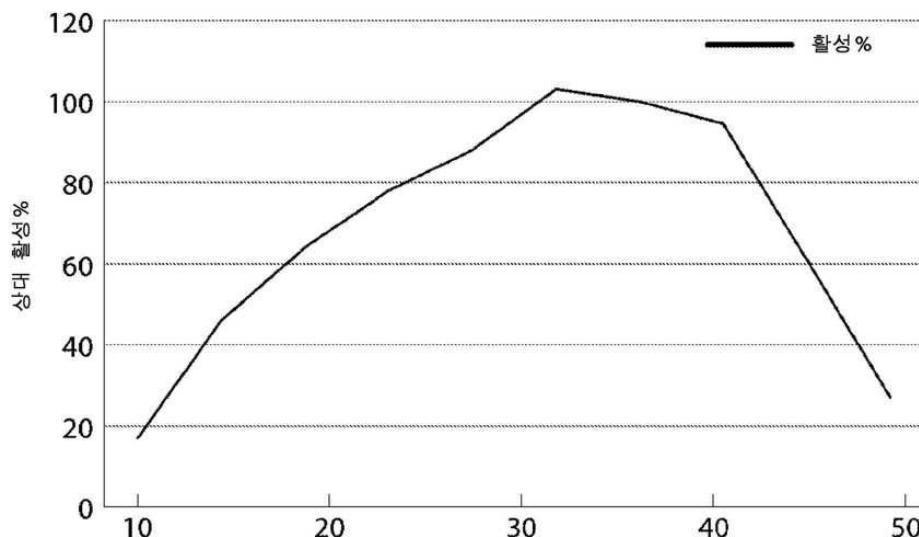
도면13



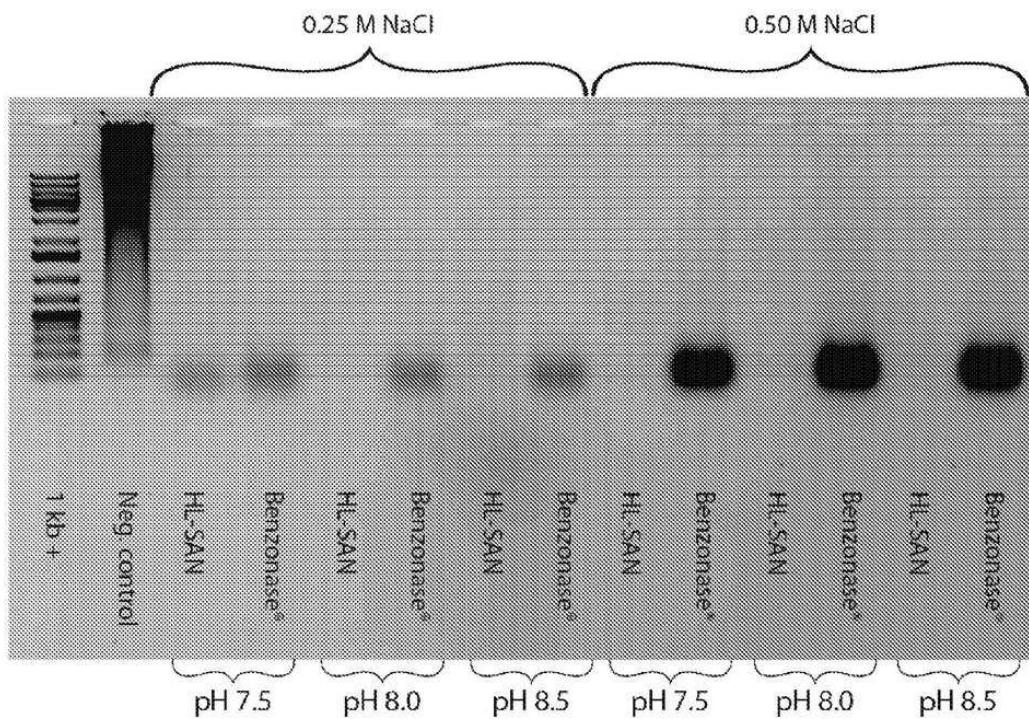
도면14



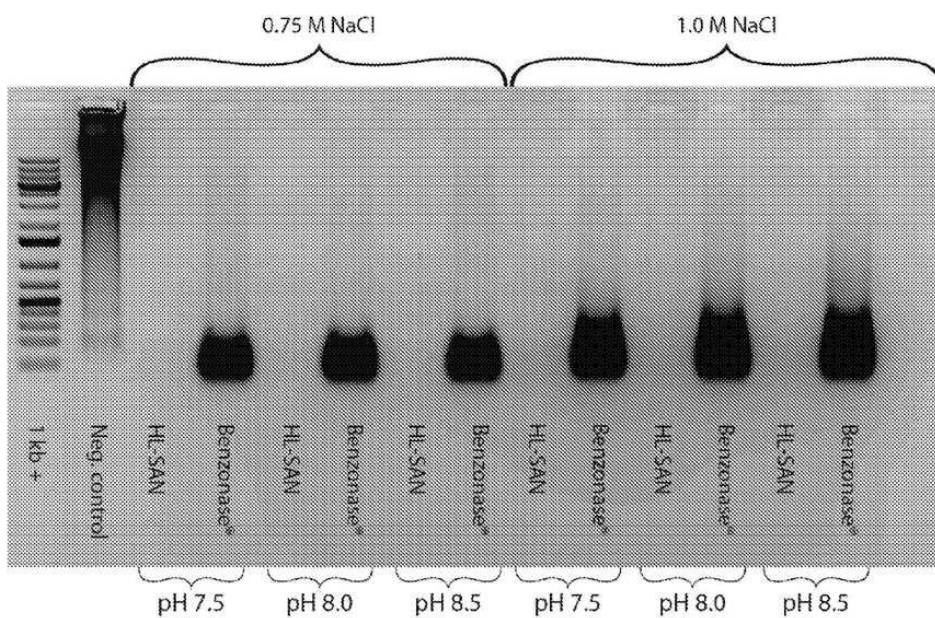
도면15



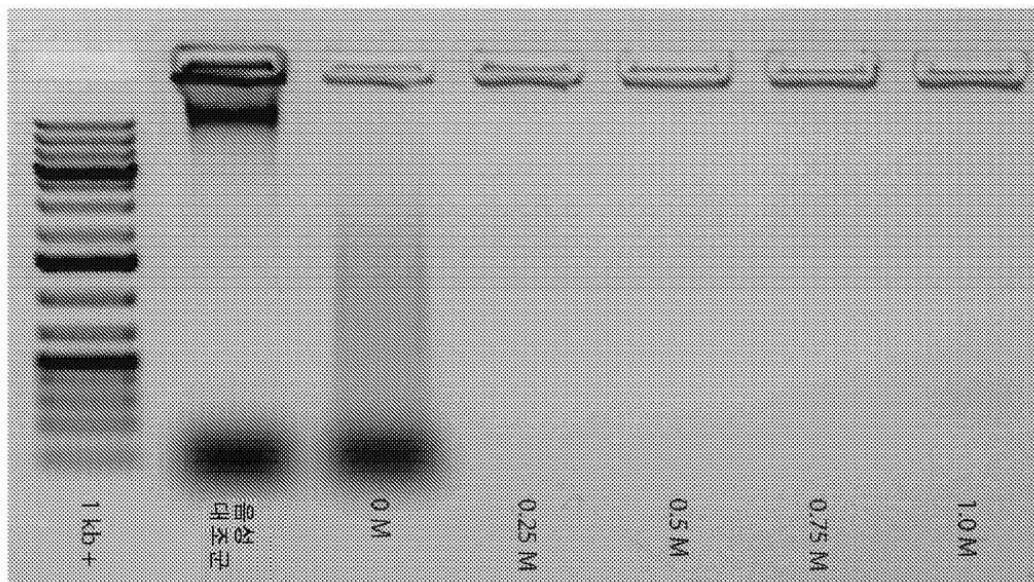
도면 16a



도면 16b



도면17



서 열 목 록

<110> Biotech Pharmacon ASA

<120> Endonucleases

<130> PIB02191GB

<140> PCT/GB2013/050387

<141> 2013-02-18

<150> GB 1202768.6

<151> 2012-02-17

<150> GB 1216029.7

<151> 2012-09-07

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 234

<212> PRT

<213> Vibrio salmonicida

<400> 1

Met Lys Leu Ile Arg Leu Val Ile Ser Leu Ile Ala Val Ser Phe Thr

1 5 10 15

Val Asn Val Met Ala Ala Pro Pro Ser Ser Phe Ser Lys Ala Lys Lys

20	25	30
Glu Ala Val Lys Ile Tyr Leu Asp Tyr Pro Thr Ser Phe Tyr Cys Gly		
35	40	45
Cys Asp Ile Thr Trp Lys Asn Lys Lys Gly Ile Pro Glu Leu Glu		
50	55	60
Ser Cys Gly Tyr Gln Val Arg Lys Gln Glu Lys Arg Ala Ser Arg Ile		
65	70	75
Glu Trp Glu His Val Val Pro Ala Trp Gln Phe Gly His Gln Arg Gln		
85	90	95
Cys Trp Gln Lys Gly Arg Lys Asn Cys Thr Arg Asn Asp Lys Gln		
100	105	110
Phe Lys Ser Met Glu Ala Asp Leu His Asn Leu Val Pro Ala Ile Gly		
115	120	125
Glu Val Asn Gly Asp Arg Ser Asn Phe Arg Ser Gln Trp Asn Gly		
130	135	140
Ser Lys Gly Ala Phe Tyr Gly Gln Cys Ala Phe Lys Val Asp Phe Lys		
145	150	155
Gly Arg Val Ala Glu Pro Pro Ala Gln Ser Arg Gly Ala Ile Ala Arg		
165	170	175
Thr Tyr Leu Tyr Met Asn Asn Glu Tyr Lys Phe Asn Leu Ser Lys Ala		
180	185	190
Gln Arg Gln Leu Met Glu Ala Trp Asn Lys Gln Tyr Pro Val Ser Thr		
195	200	205
Trp Glu Cys Thr Arg Asp Glu Arg Ile Ala Lys Ile Gln Gly Asn His		
210	215	220
Asn Gln Phe Val Tyr Lys Ala Cys Thr Lys		
225	230	
<210> 2		
<211> 705		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> cDNA		

<400> 2

atgaaattaa ttgcgttagt tatcagtctt attgctgtca gtttcactgt taacgtaatg	60
gcagcacctc ctcttcctt ctc当地aaagca aaaaaagaag ccgtcaaaat ctatcttgat	120
tacccaaccg agtttattt tggctgtgac attacgtgga aaaataaaaaa gaaaggatc	180
cctgaattag aaagctgcgg ataccaagtc cgtaaacaag aaaaacgagc cagtcgtatt	240

gaatgggagc atgttgtcc agcatggcaa ttgggtcatc aacgtcaatg ttggcaaaaa	300
ggtgtggcgta aaaattgcac tagaaacgac aagcaattca aatcaatgga agccgactta	360
cataatctag tgccctgcgtat tggtgaagta aacggggaca gatccaactt ccgattctca	420
caatggaatg gaagcaaagg cgctttctat ggccaatgtg ctttaaagt cgacttcaaa	480
ggccgtgttg ccgagccacc agcacaatct cgtggtgcca ttgcccgaac gtatcttat	540
atgaacaacg aatataaatt taacttatca aaagcacagc gacaacttat ggaagcatgg	600
aacaaacagt atccagtagtc aacttggaa tgtactcgat atgaacgtat agcaaaaatc	660

caaggcaatc ataatcaatt tgtttataaa gcatgcacta aataa	705
---	-----

<210> 3

<211> 231

<212> PRT

<213> Vibrio cholerae

<400> 3

Met Met Ile Phe Arg Phe Val Thr Thr Leu Ala Ala Ser Leu Pro Leu

1 5 10 15

Leu Thr Phe Ala Ala Pro Ile Ser Phe Ser His Ala Lys Asn Glu Ala

20 25 30

Val Lys Ile Tyr Arg Asp His Pro Val Ser Phe Tyr Cys Gly Cys Glu

35 40 45

Ile Arg Trp Gln Gly Lys Gly Ile Pro Asp Leu Glu Ser Cys Gly

50 55 60

Tyr Gln Val Arg Lys Asn Glu Asn Arg Ala Ser Arg Ile Glu Trp Glu

65 70 75 80

His Val Val Pro Ala Trp Gln Phe Gly His Gln Leu Gln Cys Trp Gln

85 90 95

Gln Gly Gly Arg Lys Asn Cys Thr Arg Thr Ser Pro Glu Phe Asn Gln

100	105	110
-----	-----	-----

Met Glu Ala Asp Leu His Asn Leu Thr Pro Ala Ile Gly Glu Val Asn

115	120	125
-----	-----	-----

Gly Asn Arg Ser Asn Phe Ser Phe Ser Gln Trp Asn Gly Ile Asp Gly

130	135	140
-----	-----	-----

Val Thr Tyr Gly Gln Cys Glu Met Gln Val Asn Phe Lys Glu Arg Thr

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Ala Met Pro Pro Glu Arg Ala Arg Gly Ala Ile Ala Arg Thr Tyr Leu

165	170	175
-----	-----	-----

Tyr Met Ser Glu Gln Tyr Gly Leu Arg Leu Ser Lys Ala Gln Asn Gln

180	185	190
-----	-----	-----

Leu Met Gln Ala Trp Asn Asn Gln Tyr Pro Val Ser Glu Trp Glu Cys

195	200	205
-----	-----	-----

Val Arg Asp Gln Lys Ile Glu Lys Val Gln Gly Asn Ser Asn Arg Phe

210	215	220
-----	-----	-----

Val Arg Glu Gln Cys Pro Asn

225	230	
-----	-----	--

<210> 4

<211> 213

<212> PRT

<213> Vibrio salmonicida

<400> 4

Ala Pro Pro Ser Ser Phe Ser Lys Ala Lys Lys Glu Ala Val Lys Ile

1	5	10	15
---	---	----	----

Tyr Leu Asp Tyr Pro Thr Ser Phe Tyr Cys Gly Cys Asp Ile Thr Trp

20	25	30
----	----	----

Lys Asn Lys Lys Gly Ile Pro Glu Leu Glu Ser Cys Gly Tyr Gln

35	40	45
----	----	----

Val Arg Lys Gln Glu Lys Arg Ala Ser Arg Ile Glu Trp Glu His Val

50	55	60
----	----	----

Val Pro Ala Trp Gln Phe Gly His Gln Arg Gln Cys Trp Gln Lys Gly

65 70 75 80

Gly Arg Lys Asn Cys Thr Arg Asn Asp Lys Gln Phe Lys Ser Met Glu

85 90 95

Ala Asp Leu His Asn Leu Val Pro Ala Ile Gly Glu Val Asn Gly Asp

100 105 110

Arg Ser Asn Phe Arg Phe Ser Gln Trp Asn Gly Ser Lys Gly Ala Phe

115 120 125

Tyr Gly Gln Cys Ala Phe Lys Val Asp Phe Lys Gly Arg Val Ala Glu

130 135 140

Pro Pro Ala Gln Ser Arg Gly Ala Ile Ala Arg Thr Tyr Leu Tyr Met

145 150 155 160

Asn Asn Glu Tyr Lys Phe Asn Leu Ser Lys Ala Gln Arg Gln Leu Met

165 170 175

Glu Ala Trp Asn Lys Gln Tyr Pro Val Ser Thr Trp Glu Cys Thr Arg

180 185 190

Asp Glu Arg Ile Ala Lys Ile Gln Gly Asn His Asn Gln Phe Val Tyr

195 200 205

Lys Ala Cys Thr Lys

210

<210> 5

<211> 211

<212> PRT

<213> Vibrio cholerae

<400> 5

Ala Pro Ile Ser Phe Ser His Ala Lys Asn Glu Ala Val Lys Ile Tyr

1 5 10 15

Arg Asp His Pro Val Ser Phe Tyr Cys Gly Cys Glu Ile Arg Trp Gln

20 25 30

Gly Lys Lys Gly Ile Pro Asp Leu Glu Ser Cys Gly Tyr Gln Val Arg

35 40 45

Lys Asn Glu Asn Arg Ala Ser Arg Ile Glu Trp Glu His Val Val Pro

50 55 60

Ala Trp Gln Phe Gly His Gln Leu Gln Cys Trp Gln Gln Gly Gly Arg
 65 70 75 80
 Lys Asn Cys Thr Arg Thr Ser Pro Glu Phe Asn Gln Met Glu Ala Asp
 85 90 95

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

 Gln Tyr Gly Leu Arg Leu Ser Lys Ala Gln Asn Gln Leu Met Gln Ala
 165 170 175
 Trp Asn Asn Gln Tyr Pro Val Ser Glu Trp Glu Cys Val Arg Asp Gln
 180 185 190
 Lys Ile Glu Lys Val Gln Gly Asn Ser Asn Arg Phe Val Arg Glu Gln
 195 200 205
 Cys Pro Asn
 210