(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2007-0098343
(43) 공개일자 2007년10월05일

(51) Int. Cl.
C12N 9/22 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2006-0029875
(22) 출원일자 2006년03월31일
심사청구일자 2006년03월31일

(71) 출원인
세종대학교산학협력단
서울 광진구 군자동 98 세종대학교
(72) 발명자
채영기
서울 광진구 군자동 98번지 세종대학교
문원재
서울 광진구 군자동 98번지 세종대학교
조재용
강원 원주시 우산동 660번지 상지대학교
(74) 대리인
이원희

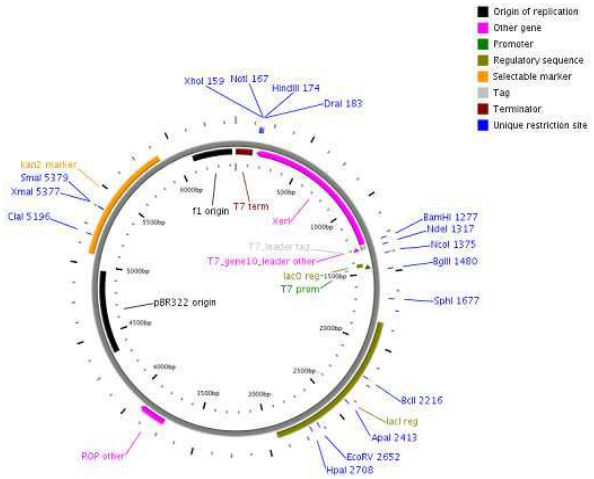
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 잔토모나스속 균주의 엔도뉴클레아제인 Ｘｏｒ Ｉ의 발현및 정제방법

(57) 요 약

본 발명은 잔토모나스속 균주(Xanthomonas oryzae pv. oryzae, Xoo)의 엔도뉴클레아제인 Xor I의 발현 및 정제방법에 관한 것으로, 구체적으로 잔토모나스 균주에 존재하는 엔도뉴클레아제인 Xor I를 재조합 발현벡터를 이용하여 발현 및 정제하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 Xor I 발현 및 정제방법은 널리 상용화되고 있는 아이소스키조머(isoschizomer)인 Pst I을 대체할 수 있는 Xor I 제한효소를 낮은 비용으로 대량생산할 수 있다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

잔토모나스 균주(Xanthomonas oryzae pv. oryzae, Xoo)로부터 유래한 Xor I 엔도뉴클레아제.

청구항 2

제 1항에 있어서, 서열번호 1로 기재되는 것을 특징으로 하는 Xor I 엔도뉴클레아제.

청구항 3

제 1항의 엔도뉴클레아제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 4

제 3항에 있어서, 서열번호 2로 기재되는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 5

제 3항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터.

청구항 6

제 5항에 있어서, 제 3항의 폴리뉴클레오티드에 히스티딘 태그를 코딩하는 염기서열이 연결된 것을 특징으로 하는 발현벡터.

청구항 7

제 5항 또는 제 6항의 발현벡터가 도입된 형질전환체.

청구항 8

제 7항에 있어서, 수탁번호가 KACC95047P로 기탁된 것을 특징으로 하는 형질전환체.

청구항 9

1) 제 7항의 형질전환체를 배양하여 Xor I 단백질을 발현시키는 단계;

2) 단계 1에서 발현된 단백질이 포함된 균주 배양액을 원심 분리하여 펠렛을 수득한 후, 이를 완충액에 현탁하는 단계;

3) 단계 2의 완충액으로 크로마토그래피를 실시하는 단계; 및

4) 단계 3에서 크로마토그래피를 실시한 컬럼을 용출하는 단계를 포함하는 재조합 단백질 Xor I의 대량생산방법.

청구항 10

제 9항에 있어서, 단계 1의 발현시 IPTG의 최종농도가 0.1 내지 1.0 mM이 되도록 첨가하는 것을 특징으로 하는 재조합 단백질 Xor I의 대량생산방법.

청구항 11

제 9항에 있어서, 단계 3의 크로마토그래피는 고정 금속 친화성 크로마토그래피인 것을 특징으로 하는 재조합 단백질 Xor I의 대량생산방법.

청구항 12

제 6항에 있어서, 단계 4의 용출시, 최적의 용출 완충용액의 이미다졸 농도는200 mM 내지 600 mM인 것을 특징으로 하는 재조합 단백질 Xor I의 대량생산방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<25> 본 발명은 잔토모나스 균주(Xanthomonas oryzae pv. oryzae, Xoo)의 엔도뉴클레아제인 Xor I의 발현 및 정제방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 잔토모나스 균주에 존재하는 엔도뉴클레아제인 Xor I를 재조합 발현벡터를 이용하여 발현 및 정제하는 방법에 관한 것이다.

<26> 제한효소(Restriction endonuclease)는 거의 모든 세균 내에 존재하고 있으며, DNA에 존재하는 특정한 염기서열을 인식 및 인식한 서열부위 또는 그 근처에 존재하는 특정부위를 절단하는 효소로 알려져 있다. 이러한 제한효소는 원래 세균이 자신의 세포 내로 침입해 들어오는 바이러스와 같은 외부 DNA를 제거하기 위하여 방어기전으로 가지고 있는 것이며, 자신의 DNA는 절단부위의 염기(아데닌 또는 사이토신)를 메틸화시켜서 자신의 제한효소가 자신의 DNA를 자를 수 없게 보호하고 있다.

<27> 일반적으로, 제한효소(restriction endonuclease)는 크게 타입 I, II 및 III제한효소로 나눌 수 있다. 타입 I 제한효소(Type I restriction endonuclease)는 DNA의 특정부위를 인식하긴 하지만 인식된 부위가 아닌 다른 부위를 절단하는 효소이다. 즉, 인식부위는 특이성을 가지지만 그로부터 약 1,000 bp 정도 떨어진 부위를 절단하기 때문에 원하는 부위를 선택하여 자를 수 없는 특징을 가지고 있다.

<28> 반면, 타입 II 제한효소(Type II restriction endonuclease)는 특이적인 인식부위 및 절단부위를 가지는 제한효소로서 분자생물학 분야에 폭넓게 이용되고 있다. 대부분의 타입 II 제한효소는 4개 내지 8개의 palindrome (앞으로 읽으나 뒤로 읽으나 염기서열이 같은 모양) 염기쌍을 인식하는 서열을 가지고 있으며, 이러한 많은 효소들은 동일한 염기서열을 인식 및 절단하는 특징으로 인하여 아이소스키조머(isoschizomer)라고 불리고 있다.

<29> 타입 III 제한효소(Type III restriction endonuclease)는 인식한 DNA 부위에서 어느 정도 떨어진 부위를 절단하는 효소로서 분자생물학 연구에서는 잘 이용되고 있지 않다.

<30> 이러한 많은 제한효소 중, 타입 II 제한효소(type II restriction endonuclease)는 DNA 구조분석 및 DNA 구조의 재구성에 있어서 중요한 재료로 사용되고 있으며 DNA 조작방법의 다양성을 증대시킴으로써 통상적으로 많이 사용되고 있는 타입으로 본 발명의 제한효소 Xor I도 이에 속한다.

<31> 본 발명의 잔토모나스 균주(Xanthomonas oryzae pv. oryzae, Xoo)는 두 개의 타입 II 제한효소 즉, Xor I 및 Xor II를 가지고 있으며 각각 Pst I 및 Pvu I의 아이소스키조머(isoschizomer)로서 이러한 서열 특이적인 효소는 부분적으로 잔토모나스 균주로부터 직접 분리할 수 있다고 보고되었다(Wang, R. Y., et al., Biochim. Biophys. Acta., 606, 371-385, 1980).

<32> 그러나, 상기 문헌은 잔토모나스 균주를 직접 배양하여 파쇄한 후 수용성 부분에 들어있는 Xor I을 전통적인 크로마토그래피 방법인 포스포셀룰로오즈 컬럼(phosphocellulose column) 및 수산화인회석 컬럼(hydroxyapatite column)을 사용함으로써 부분적으로 분리하는 데는 성공했지만, 본 발명에서와 같이 Xor I을 고순도 및 대량생산하는 방법에 대해서는 기술하고 있지 않다.

<33> 또한, 지금까지 보고된 Xor I에 관한 문헌들은 주로 잔토모나스속 균주에 존재하는 Xor I 및 Xor II의 phenotype에 따른 분포양상(Choi, S. H., et al., Appl. Environ. Microbiol., 64, 1663-1668, 1998), 잔토모나스속 균주 또는 그 유사체(vsr)로부터 Xor II 메칠트렌스퍼라제의 동정(Choi, S. H. 및 Leach, J. E., Mol. Gen. Genet., 244, 383-390, 1994), 소의 파르보바이러스(parbovirus) 게놈상에 존재하는 두 개의 제한효소 부위의 동정(Burd, P. R., et al., J. Gen. Viol., 64, 2521-2526, 1983), 단순포진 바이러스(Herpes simplex virus) 게놈에 존재하는 35 kDa의 폴리펩티드를 코딩하는 부위의 위치 측정(Suh, M., et al., J. Gen. Viol., 64, 2079-2085, 1983), Kilham 랫트 바이러스 종 171의 단일 가닥으로된 DNA 게놈의 제한효소 지도(Banerjee, P. T., et al., J. Viol., 40, 118-125, 1981), Proteus vulgaris로부터 분리된 두 개의 엔도뉴클라제(Gingeras, T. R., et al., Nucleic Acids Res., 9, 4525-4536, 1981), 부위 특이적인 엔도뉴클라제의 반응성(Hinsch, B. 및 Kula, M. R., Nucleic Acids Res., 9, 3159-3174, 1981) 및 콜리파지(Coliphage) M13 클로닝 벡터의 구성 및 특성(Hines, J. C. 및 Ray, D. S., Gene, 11, 207-218, 1980) 등 Xor I 및 Xor II와 유사한 부

위의 특성 또는 부분적인 분리방법에 관한 것일 뿐, 본 발명과 같은 순수한 Xor I의 대량생산 및 정제방법에 관한 보고는 전무하다.

<34> 이에, 본 발명자들은 잔토모나스 균주(Xanthomonas oryzae pv. oryzae, Xoo)로부터 수득한 게놈 DNA로부터 Xor I 유전자의 코딩 부위를 증폭, 분리하여 재조합 발현벡터를 제작하고 이를 Xor I 효소를 대량으로 발현할 수 있는 형질전환체에 도입함으로써 제한효소 Xor I를 대량으로 생산하는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<35> 본 발명의 목적은 Pst I를 대체할 수 있는 우수한 특성을 갖는 신규한 잔토모나스 균주(Xanthomonas oryzae pv. oryzae, Xoo)의 엔도뉴클라제 Xor I 및 이를 대량생산하는 방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

<36> 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 잔토모나스 균주(Xanthomonas oryzae pv. oryzae, Xoo)로부터 유래한 엔도뉴클레아제 Xor I을 제공한다.

<37> 또한, 본 발명은 상기 엔도뉴클레아제 Xor I을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

<38> 또한, 본 발명은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터를 제공한다.

<39> 아울러, 본 발명은 재조합 단백질 Xor I의 대량생산방법을 제공한다.

<40> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

<41> 본 발명은 잔토모나스 균주(Xanthomonas oryzae pv. oryzae, Xoo)로부터 유래한 Xor I 유전자, 이를 포함하는 발현벡터 및 형질전환체를 제공한다.

<42> 잔토모나스 균주(Xanthomonas oryzae pv. oryzae, Xoo)는 2개의 서열 특이적인 제한효소(Xor I 및 Xor II) 중 Pvu I과 아이소스키조머(isoschizomer)인 Xor II를 생산하는 대표적인 균주로 알려져 있는데, 이는 잔토모나스 균주가 Xor II 효소에 대한 높은 생산량, 간단한 분리 방법 및 상대적으로 안정성이 높은 Xor II를 생산하기 때문인 것으로 보고되었다(Wang, R. Y., et al., Biochim. Biophys. Acta., 606, 371-385, 1980).

<43> 최근, 잔토모나스 균주(Xanthomonas oryzae pv. oryzae, Xoo)의 게놈 프로젝트의 결과로부터 상기 균주의 염기서열이 밝혀지게 되었는데 구체적으로 어떤 부위의 염기서열이 각각의 유전자를 코딩하는지는 알려져 있지 않았다.

<44> 이에, 본 발명자들은 상기 균주(Xoo)의 게놈 DNA를 주형으로 PCR 방법을 이용하여 Xor I 유전자를 증폭한 후, 이를 발현벡터(예:pET-28a)에 도입하여 재조합 발현벡터를 제작하였다(도 1 참조). 또한, 상기의 발현벡터에 의한 Xor I의 코돈 사용시 발생할 수 있는 발현 문제점을 최소화할 수 있도록 Rosetta(DE3)/pLysS 균주에 도입하였는데, Rosetta(DE3)/pLysS는 lon 및 ompT 프로테아제가 결핍되어 있으며, 유도 인자인 IPTG로 유도하지 않은 경우 목적 단백질의 유전자 전사활성을 보다 엄격하게 억제할 수 있도록 pLysS 벡터(자연형의 T7 RNA 폴리머라제의 억제제인 T7 리소자임을 코딩하는 유전자)를 포함하고 있는 특징을 가지고 있는 숙주로 알려져 있다.

<45> 상기 과정을 통하여 수득한 재조합 형질전환체를 Rosetta(DE3)/pLysS/pET28a/Xor I이라 명명하였고, 이를 2006년 3월 17일부로 한국 농업미생물 지원센터(Korean Agricultural Culture Collection, KACC)에 기탁하였다(수탁번호 : KACC95047P).

<46> 또한, 본 발명은

<47> 1) Xor I 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터가 도입된 형질전환체를 배양하여 Xor I 단백질을 발현시키는 단계;

<48> 2) 단계 1에서 발현된 단백질이 포함된 균주 배양액을 원심 분리하여 펠렛을 수득한 후, 이를 완충액에 현탁하는 단계;

<49> 3) 단계 2의 완충액으로 크로마토그래피를 실시하는 단계; 및

<50> 4) 단계 3에서 크로마토그래피를 실시한 컬럼을 용출하는 단계를 포함하는 재조합 단백질 Xor I의 대량생산방법을 제공한다.

<51> 본 발명에서는 상기 형질전환체를 이용하여 대량으로 생산된 제한효소 Xor I을 고순도로 분리 및 정제하기 위하

여 하기와 같은 단계로 진행하였다.

<52> 본 발명자들은 배양한 상기의 형질전환체에 IPTG를 첨가한 후, 다시 배양하고 원심 분리하여 수득한 펠렛을 완충용액에 현탁하였다. 이에 고정 금속 친화성 크로마토그래피를 실시한 후, 연속적 농도를 갖는 용출 완충용액으로 용출하여 가장 적합한 용출액의 농도를 알아본 결과, 1 M 이미다졸(imidazole)을 100 내지 600 mM로 용출용액에 첨가할 때, 바람직하게는 400 mM로 용출용액에 첨가할 때 가장 많은 양의 Xor I 단백질을 정제할 수 있음을 확인하였다(도 2 참조). 상기 결과에 따라, 본 발명의 재조합 발현벡터, 형질전환체 및 정제방법을 이용하여 제한효소인 Xor I을 고순도로 대량으로 생산할 수 있음을 확인하였다.

<53> 아울러, 본 발명은 상기 방법으로 수득한 Xor I 제한효소를 제공한다.

<54> 본 발명자들은 상기 방법으로 수득한 Xor I 효소의 활성도를 조사하였다. 구체적으로, 상기 Xor I과 아이소스키조머(isoschizomer)인 Pst I(Madison, WI, USA)을 양성 대조군으로 하여 비교하였고, NEB 완충용액 1, 2, 3, 4, NEB 완충용액 BamHI 및 NEB 완충용액 SalI 중에서 가장 활성도가 우수한 용액을 선별하였다.

<55> 그 결과, 도 3에서와 같이 제한효소 Xor I을 NEB 용액 1(레인 4)과 반응한 경우에 활성도가 가장 우수함을 보였으며 이러한 활성도는 기존에 널리 이용되고 있는 Pst I의 활성도와 비교했을 때에도 대등한 결과를 나타내었는데(도 3 참조), 이러한 결과는, 본 발명의 제한효소 Xor I이 질적 및 양적으로 기존의 Pst I 효소를 대체할 수 있는 효소임을 의미하는 것이다.

<56> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

<57> 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

<58> **<실시예 1> pET-28a/Xor I 발현벡터의 제조**

<59> 본 발명에서는, 잔토모나스속 균주(Xoo)에 존재하는 Xor I 유전자를 PCR 방법으로 증폭하기 위하여, 우선 상기 균주(Xoo)의 게놈프로젝트(농촌진흥청 완성)의해 밝혀진 전체 유전자 서열에서 각각의 ORF(open reading frame)가 어떤 기능의 단백질을 코딩하는지 조사하였다. 이러한 과정에서, 제한 및 변형 시스템에 관여하는 22개 정도의 유전자를 스크리닝할 수 있었고, 이 중에서 메틸라제(methylase) 및 타입 I 엔도뉴클라제(endonuclease)를 제외한 8개의 후보 유전자를 선별하였다. 특히, 본 발명에서는 Xor I 유전자 서열에 상응하는 단백질이 공지되어 있지 않음을 확인한 다음, 여러 번의 상동성 정렬 시도를 통해 Pst I과 크기나 서열이 어느 정도 유사한 부위를 선정하여 상기 Xor I 유전자를 코딩할 수 있는 프라이머를 제작하였다.

<60> 구체적으로, 잔토모나스속 균주(Xoo; KACC10331, 농촌진흥청으로부터 입수)의 게놈 DNA를 주형으로 Xor I을 증폭하기 위하여, 서열번호 3(5'-gggcccggat tcgtgagcttgcctccctacgtc-3') 및 서열번호 4(5'-gggccccctcgagttaaacgccgtgcatcaacgt-3')로 기재되는 프라이머를 이용하여 Xor I 유전자를 PCR 방법으로 증폭하였다. 상기 PCR 반응은 DNA 폴리머라제(Pfu polymerase, Omega사)를 상기에 기재된 프라미어 쌍과 주형에 첨가하여 94℃에서 1분 동안 변성시킨 다음, 94℃에서 30초, 55℃에서 30초 및 72℃에서 2분간 35회 반응시키고, 72℃에서 7분간 증폭시켰다. 특히, 이때 사용된 각각의 프라이머는 상기 증폭된 Xor I 유전자를 발현벡터 pET-28a(Novagen)의 Bam HI 및 Xho I 부위에 클로닝할 수 있도록 5' 말단에 Bam HI 및 3' 말단에 Xho I의 효소 부위(enzyme site)를 갖도록 제작하였다.

<61> 이어, 본 발명에서는 상기와 같은 방법으로 클로닝한 유전자를 형질전환능 세포(TOP 10, Invitrogen)에 도입하여 본 발명의 발현 플라스미드를 제작하였으며, 상기 발현 플라스미드를 pET-28a/Xor I으로 명명하였다.

<62> **<실시예 2> DE3/pLysS 발현 숙주세포의 선별 및 이용**

<63> 본 발명자들은 상기의 발현벡터에 존재하는 목적 단백질인 Xor I을 대장균 내에서 형질전환 및 대량생산할 수 있는 숙주세포를 선별하였다. 구체적으로, 목적 단백질인 Xor I의 과발현에 필수적인 T7 프로모터를 이용하기 위하여 염색체에 T7 RNA 폴리머라제 유전자가 포함된 균주를 이용하였고, 대장균이 아닌 다른 박테리아의 단백질을 생산해야 하기 때문에 코돈 사용빈도(codon usage)가 다를 수 있다는 판단 하에 보통의 대장균보다 전달 RNA(transfer RNA, tRNA)를 더 많이 가지고 있는 Rosetta(DE3)를 선별하였으며, T7 RNA 폴리머라제를 보다 잘 제어할 수 있도록 pLysS 플라스미드를 포함시켰다. 그 결과, 상기의 목적 단백질인 Xor I을 특이적으로 발현 및 대량생산할 수 있는 숙주세포인 Rosetta(DE3)/pLysS(Novagen, Madison, WI, USA)를 선별하여 이용하였다.

<64> 이어, 상기 발현 숙주세포인 Rosetta(DE3)/pLysS에 본 발명의 목적 단백질을 가진 pET-28a/Xor I을 열충격 및 염화칼슘을 이용한 형질전환법을 이용하여 도입하였고, 이를 2006년 3월 17일부로 한국 농업미생물 지원센터

(Korean Agricultural Culture Collection, KACC)에 기탁하였다(수탁번호 : KACC95047P).

<65> **<실시예 3> Xor I 제한효소의 발현 및 정제**

<66> 본 발명자들은 상기 실시예 2의 형질전환체에서 Xor I 재조합 유전자가 정상적으로 발현되는지 확인하기 위하여, 50 ㎍/ml의 카나마이신 및 34 ㎍/ml의 클로람페니콜이 첨가된 100 ml의 LB 배양액에 상기 실시예 2의 형질전환체를 접종한 후, 37℃에서 밤새도록 진탕 배양하였다. 이를 상기와 같은 농도의 항생제를 첨가한 1 리터의 LB 배양액과 혼합하여 다시 37℃에서 배양하다가, 목적 단백질인 Xor I의 생산을 유도할 수 있도록 흡광도(OD_{600})가 1이 되는 시점에서 IPTG(Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranoside)를 최종농도가 0.5 mM이 되도록 첨가하였다.

<67> 이어, 상기 세포를 3시간 동안 다시 진탕 배양한 후 4℃, 5000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 세포를 수집하였으며, 이를 50 ml의 Tris-HCL(10 mM, pH 8.0)에 현탁시킨 다음 동결 및 해동(freezing and thawing) 방법으로 상기 세포를 분쇄하였고, 이 파쇄 용액을 4℃, 15,000 rpm으로 30분간 원심 분리하여 상층액을 수득한 다음 이를 5 ml의 HiPrep Chelate 컬럼(GE Healthcare)에 적재한 후 50 ml의 세척용액(10 mM Tris-HCl, pH 7.5; 300 mM NaCl; 10 mM 이미다졸)으로 세척하였고, 이 컬럼에 결합한 단백질을 200 mM, 300 mM, 400 mM, 600 mM, 800 mM 및 100 mM의 이미다졸(imidazole)이 첨가된 20 ml의 용출 완충용액(10 mM Tris-HCl, pH 7.5; 300 mM NaCl; 1 M imidazole)으로 단계적으로 정제하였다.

<68> 그 결과, 상기의 방법으로 분리 및 정제된 Xor I 제한효소는 대부분 봉입체(inclusion body)를 형성하는 단백질임을 확인하였고, 400 mM의 이미다졸이 첨가된 용출 완충용액으로 정제한 컬럼에서 가장 많이 추출되었으며 그 순도 역시 높았다(도 2 참조).

<69> 상기 과정을 통하여 수득된 Xor I 단백질을 4000 rpm으로 2시간 동안 초원심 분리한 다음 2×저장용액(100 mM Tris-HCl, pH 8.0; 200 mM NaCl; 2 mM DTT; 0.2 mM EDTA, 0.1% Triton X-100)으로 완충용액을 치환하고 2 ml까지 농축한 후, 2 ml의 글리세롤을 첨가하여 냉동 보관하였다.

<70> **<실시예 4> Xor I 제한효소의 활성 측정**

<71> 본 발명자들은 상기 실시예 3으로부터 분리 및 정제된 제한효소 Xor I의 활성을 조사하기 위하여, Yep24라는 기질을 절단하는 비율로 측정하여 이 효소와 아이소스키조머(isoschizomer)인 Pst I의 효소 활성도를 비교하였다. 구체적으로, 도 3에서와 같이 어떠한 제한효소도 첨가하지 않은 경우(레인 2), Pst I(Promega, Madison, WI, 미국)을 첨가한 경우(레인 3), Xor I+NEB 용액 1(레인 4), Xor I+NEB 용액 2(레인 5), Xor I+NEB 용액 3(레인 6), Xor I+NEB 용액 4(레인 7), Xor I+NEB 용액 Bam HI(레인 8), Xor I+NEB 용액 Sal I(레인 9)이 첨가된 NEB 용액으로 각각 Yep24 기질을 절단하기 위하여 37℃에서 1시간 동안 반응시킨 다음 이 절단된 DNA 단편을 1% 아가로스 겔에 전기 영동하였다.

<72> 그 결과, 제한효소 Xor I을 NEB 용액 1에 첨가시켰을 때(레인 4)가 다른 NEB 용액을 사용한 경우와 비교해서 가장 우수한 효소 활성을 나타냄을 확인할 수 있었다(도 3 참조). 또한, Yep24 기질에 대한 제한효소 Xor I의 절단 양상은 Pst I과 매우 유사함을 관찰할 수 있었다.

<73> 따라서, 본 발명에서 분리 및 정제한 제한효소 Xor I은 기존의 아이소스키조머와 마찬가지로 활성이 매우 우수한 효소임을 확인하였다.

발명의 효과

<74> 상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 재조합 발현벡터 및 숙주를 이용한 생산방법은 Pst I과 아이소스키조머(isoschizomer)에 있는 Xor I 효소를 높은 순도로 안정적으로 대량 생산할 수 있으며, 이렇게 생산된 Xor I 제한효소는 상업적 또는 유전공학적으로 광범위하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

<1> **도 1**은 잔토모나스 균주(Xoo)로부터 분리한 제한효소 Xor I을 포함하는 발현벡터(pET-28a/Xor I)의 개열지도이다.

<2> **도 2**는 용출용액에 첨가되는 1 M 이미다졸(imidazole)을 최종농도가 200 mM, 300 mM, 400 mM, 600 mM, 800 mM 및 1000 mM이 되도록 농도를 순차적으로 높여 Xor I을 정제하는 과정을 나타낸 그림이다:

<3> 레인 1 : 마커;

<4> 레인 2 : IPTG를 처리하지 않고 얻은 전체 세포 파쇄액;

<5> 레인 3 : IPTG를 첨가하여 얻은 전체 세포 파쇄액;

<6> 레인 4 : 상기의 레인 3 파쇄액을 4℃, 15,000 rpm에서 30분간 원심 분리하여 수득한 상층액의 단백질;

<7> 레인 5 : 상기의 레인 3 파쇄액을 4℃, 15,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 수득한 불용성의 단백질;

<8> 레인 6 : 상기의 레인 4 상층액 단백질 중 컬럼에 붙지 않고 빠져나온 단백질;

<9> 레인 7 : 상기의 레인 4 상층액 단백질 중 세척 용액에 의해 컬럼에서 빠져나온 단백질;

<10> 레인 8 : 상기의 레인 4 상층액 단백질 중 컬럼에 붙은 후 200 mM 이미다졸이 첨가된 용출용액에 의해 빠져나온 단백질;

<11> 레인 9 : 상기의 레인 4 상층액 단백질 중 컬럼에 붙은 후 400 mM 이미다졸이 첨가된 용출용액에 의해 빠져나온 단백질;

<12> 레인 10 : 상기의 레인 4 상층액 단백질 중 컬럼에 붙은 후 600 mM 이미다졸이 첨가된 용출용액에 의해 빠져나온 단백질;

<13> 레인 11 : 상기의 레인 4 상층액 단백질 중 컬럼에 붙은 후 800 mM 이미다졸이 첨가된 용출용액에 의해 빠져나온 단백질; 및

<14> 레인 12 : 상기의 레인 4 상층액 단백질 중 컬럼에 붙은 후 1000 mM 이미다졸이 첨가된 용출용액에 의해 빠져나온 단백질.

<15> **도 3**은 Xor I의 효소활성을 아가로스-겔에 전기 영동하여 나타낸 그림이다:

<16> 레인 1 : Lambda DNA 마커;

<17> 레인 2 : 제한효소로 처리하지 않은 Yep24 기질;

<18> 레인 3 : Pst I으로 처리한 Yep24 기질;

<19> 레인 4 : (Xor I + NEB 용액 1)으로 처리한 Yep24 기질;

<20> 레인 5 : (Xor I + NEB 용액 2)으로 처리한 Yep24 기질;

<21> 레인 6 : (Xor I + NEB 용액 3)으로 처리한 Yep24 기질;

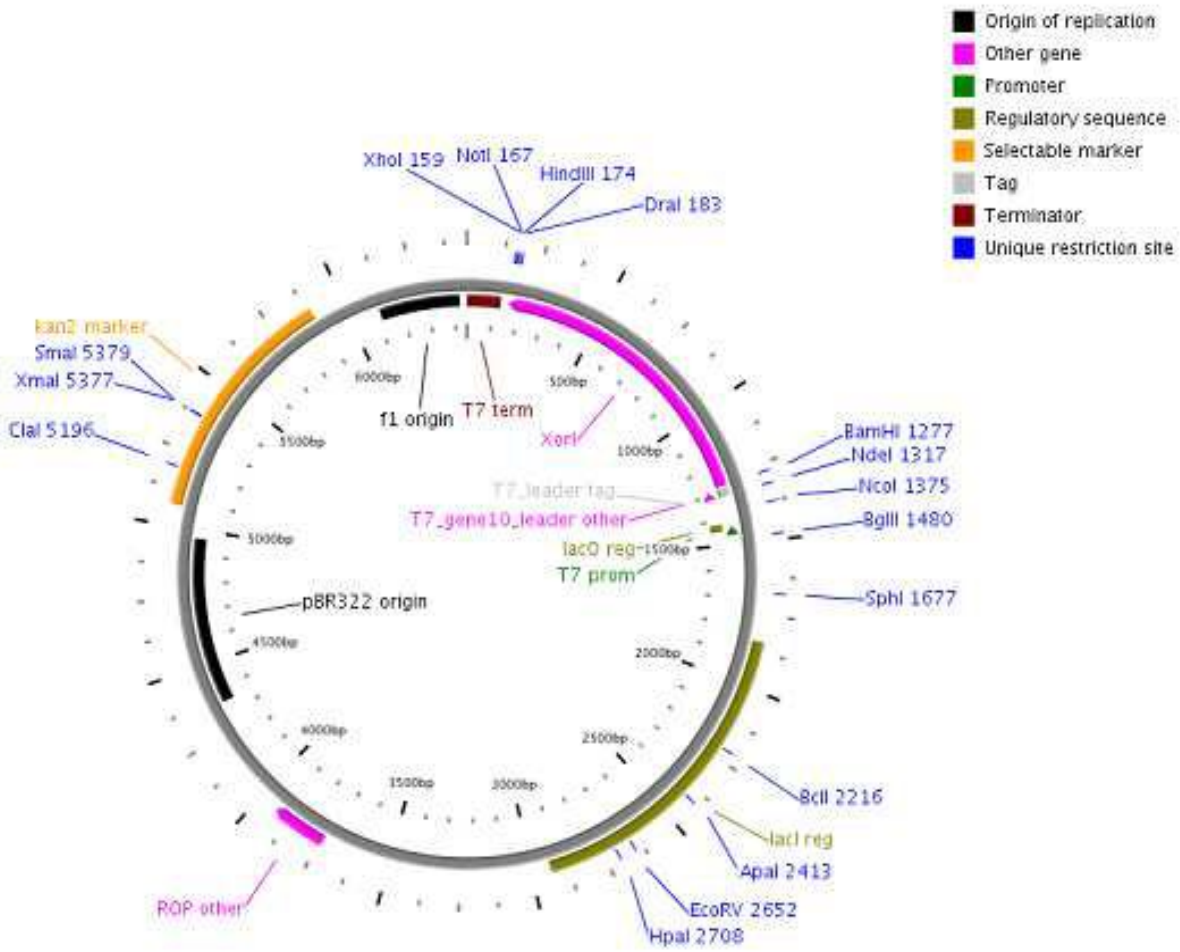
<22> 레인 7 : (Xor I + NEB 용액 4)으로 처리한 Yep24 기질;

<23> 레인 8 : (Xor I + NEB 용액 BamHI)으로 처리한 Yep24 기질; 및

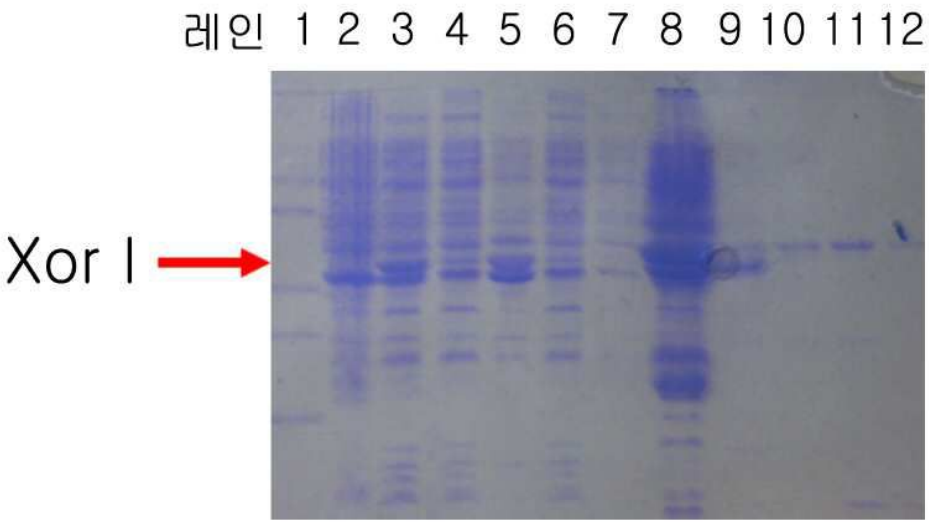
<24> 레인 9 : (Xor I + NEB 용액 SalI)으로 처리한 Yep24 기질.

도면

도면1

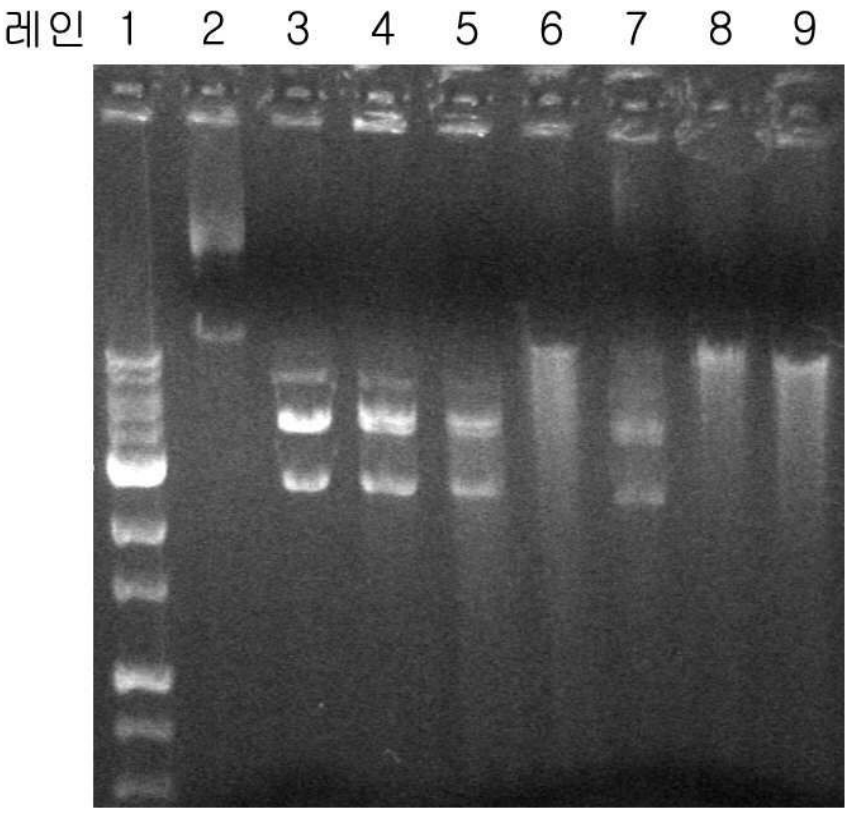

Origin of replication
Other gene
Promoter
Regulatory sequence
Selectable marker
Tag
Terminator
Unique restriction site
XhoI 159
NotI 167
HindIII 174
DraI 183
kan2 marker
SmaI 5379
XmaI 5377
ClaI 5196
f1 origin
T7 term
XorI
BamHI 1277
NdeI 1317
NcoI 1375
BglII 1480
T7_leader tag
T7_gene10_leader other
lacO reg
T7 prom
SphI 1677
pBR322 origin
BclI 2216
lacI reg
ApaI 2413
EcoRV 2652
HpaI 2708
ROP other

도면2



레인 1: 마커
레인 2: 비유도된 분쇄액
레인 3: 유도된 분쇄액
레인 4: 상층액
레인 5: pellet
레인 6: flow-through
레인 7: 세척
레인 8: 정제 용액 (200 mM 이미다졸 첨가)
레인 9: 정제 용액 (400 mM 이미다졸 첨가)
레인 10: 정제 용액 (600 mM 이미다졸 첨가)
레인 11: 정제 용액 (800 mM 이미다졸 첨가)
레인 12: 정제 용액 (1000 mM 이미다졸 첨가)

도면3



레인 1: 1 kb 마커
레인 2: 자르지 않음
레인 3: Pst I으로 자름
레인 4: Xor I + NEB 용액 1
레인 5: Xor I + NEB 용액 2
레인 6: Xor I + NEB 용액 3
레인 7: Xor I + NEB 용액 4
레인 8: Xor I + NEB Bam HI
레인 9: Xor I + NEB Sal I

서열목록

<110> sejong university

<120> A method to expression and purification of Xor I, the endonuclease of Xanthomonas oryzae pv. oryzae

<130> 6P-03-10

<160> 4

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 398

<212> PRT

<213> Amino acid sequence of the Xor I

<400> 1

Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
1 5 10 15

Arg Gly Ser His Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg
20 25 30

Gly Ser Val Ser Leu Pro Pro Tyr Val Asp Arg Leu Thr Ile His Gln
35 40 45

Arg Leu Pro Leu Ile Phe Gln Asp Gly Thr Pro Asn Arg Asn Tyr Cys
50 55 60

Ile Arg Glu Met Ala Ala Ser Ala Val Phe Val Met Leu Tyr Ile Gly
65 70 75 80

Ala Val Glu Gly Thr Asp Arg Trp Leu Ala Pro Lys His Val Met Arg
85 90 95

Met Thr Val Glu Gln Ala Leu Leu Ser Asp Asp Ala Val Arg Glu Ala
100 105 110

Tyr Gly Phe Gly Ala Met Lys Pro Gly Phe Arg Val Ala Gly Gln Arg
115 120 125

Trp Tyr Glu Glu Asn Ser Arg Glu Pro Leu Arg Asp Glu Thr Leu Arg
130 135 140

Gln Gly Phe Ile Thr Asn Asn Ala Val Val Glu Arg Ala Gly Leu Pro
145 150 155 160

Thr Thr Ser Gly Leu Pro Arg Tyr Ala Leu Lys Thr Asp Phe Ala Ala
165 170 175

```
Leu Phe Asp Pro Ala Leu Ala Gly Asp Asp Leu Ala Ala Ser Ile Thr
            180                 185                 190

Ala Trp Gln Glu Ala His Leu Ser Ala Ser Ala Met Ala Arg Val Ala
        195                 200                 205

Leu Val Arg Arg Gly Ala Val Thr Thr Gly Asp Asp Val Ile Val Thr
    210                 215                 220

Phe Pro Asn Arg Glu Thr Arg Arg Met Ala Pro Gly Pro Ser Ser Val
225                 230                 235                 240

Ile Ser Lys Gly Val Ile Glu Glu Phe Ala Ala Arg Phe Leu Thr Gln
                245                 250                 255

Pro Ala Val Leu Trp Val Ser Glu Ser Gly Ala Lys Val Val Ala Arg
            260                 265                 270

Asp Asp Glu Leu Ala Lys Ser Leu Asn Leu Lys Ile Thr Ala Asp Arg
        275                 280                 285

Asn Leu Pro Asp Ile Ile Leu Val Asp Leu Gly Gly Gly Gly Ala Pro
    290                 295                 300

Gly Phe Leu Leu Val Phe Ile Glu Val Val Ala Thr Asp Gly Pro Ile
305                 310                 315                 320

Thr Met Gln Arg Gln Glu Ala Phe Met Gln Ile Ala Ala Asp Ala Gly
                325                 330                 335

Phe Lys Pro Asp Thr Val Ala Phe Val Thr Ala Tyr Leu Asp Arg Ser
            340                 345                 350

Asn Ala Ala Phe Lys Lys Thr Ile Ala Glu Leu Ala Trp His Ser Phe
        355                 360                 365

Ala Trp Phe Ala Ser Glu Pro Glu His Ile Ile Ala Leu His Asn Gly
    370                 375                 380

Ala Thr Ser Pro Leu Pro Leu Ser Thr Leu Met His Gly Val
385                 390                 395
```

<210> 2

<211> 1095

<212> DNA

<213> Sequence of the Xor I

<400> 2

gtgagcttgc ctccctacgt cgaccggcta accattcacc agcgtctgcc cctcatcttt 60

caggacggca ctcccaatcg caactattgc attcgggaaa tggccgcctc ggcggtgttt 120

gtgatgctat acatcggggc agtcgaaggc actgaccgat ggcttgcgcc gaaacatgtg 180

atgcgtatga cggtcgagca agcactgctg agtgacgatg cagtgcgaga agcctacggc 240

ttcggagcca tgaagccggg gtttcgagta gctgggcaac gttggtacga ggaaaacagt 300

cgcgagcccc ttcgcgacga gactttgcgc caaggattta tcacgaataa cgctgtggta 360

gagcgggcag ggttgccaac aacctctggc ctgccgcgct atgcgctcaa gactgacttc 420

gcagcgttat ttgaccctgc acttgctgga gacgacctgg ccgcatccat cactgcttgg 480

caggaagctc acctttcagc atcggcgatg gcgcgcgtcg cacttgtgcg gcgtggtgct 540

gtgacaacag gtgatgatgt aatagtgacc tttccaaacc gcgaaacgcg ccggatggca 600

cccggcccga gctcagtcat ctcgaaaggg gtcattgaag aatttgccgc tcgcttcctc 660

acgcagccag ccgttttatg ggtgagcgag agcggcgcga aagtcgtcgc tagagacgat 720

gaacttgcca agtctctgaa cttaaaaatt acagccgacc gcaacttgcc agacatcatc 780

cttgtagacc taggcggtgg tggcgcaccg ggcttccttc tggtgttcat cgaagttgtc 840

gcgaccgatg ggccaatcac gatgcaacgg caagaagcct tcatgcagat tgcagccgat 900

gccggtttca agccggacac ggtagccttc gtgacggcct atctagaccg ctccaacgcg 960

gctttcaaaa agacaatagc cgagctcgct tggcactcct tcgcttggtt tgcttccgag 1020

cccgagcaca tcatcgcctt gcacaacgga gcgacctcgc cgcttccgtt gagcacgttg 1080

atgcacggcg tttaa 1095

<210> 3

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer for the Xor I

<400> 3
gggcccggat tcgtgagctt gcctccctac gtc 33

<210> 4

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse primer for the Xor I

<400> 4
gggcccctcg agttaaacgc cgtgcatcaa cgt 33