



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2007-0101892
(43) 공개일자 2007년10월18일

(51) Int. Cl.

C12N 9/14 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2006-0033297

(22) 출원일자 2006년04월12일

심사청구일자 2006년04월12일

(71) 출원인

한국해양연구원

경기 안산시 상록구 사동 1270번지

(72) 발명자

이정현

경기 성남시 분당구 정자동 한솔청구아파트
116-101

이현숙

경기 안양시 동안구 평촌동 75-2 대우아파트
112-506

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이문섭, 양부현, 윤여강

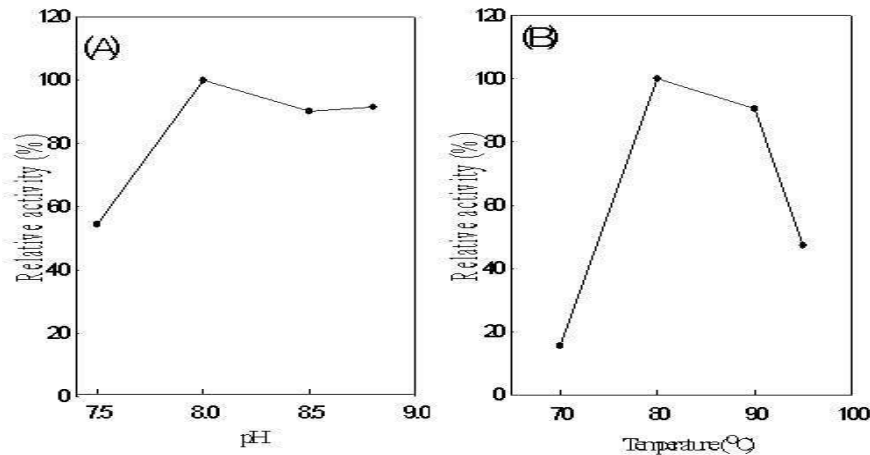
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 고호열성 디유티피아제 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 고호열성 디유티피아제(dUTPase) 및 이의 제조방법에 관한 것으로서, *Thermococcus* sp. 균주로부터 분리되어진 신규의 고호열성 dUTPase 및 이의 기능적 동등물, 이들의 아미노산 서열을 가진 단백질 및 고호열성 dUTPase 생산방법을 제공한다. 본 발명에 따른 dUTPase는 고호열성이며, PCR 반응시 첨가가 가능하며, PCR 반응액에 존재하는 dUTP로 인한 높은 충실도 DNA 증합효소의 정지현상을 줄여서, 정밀한 PCR이 요구되는 정밀분석, 정밀진단, 동정 등에 매우 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

강성균

경기 안양시 동안구 평촌동 75-2 대우아파트
112-506

조요나

경기 용인시 구성읍 보정리 동아아파트 121-201

김윤재

경기 안산시 상록구 사동 1579-2 301호

배승섭

경기 안산시 상록구 사동 1519-12 402호

전정호

경기 안산시 상록구 사동 1579-2 301호

임재규

경기 시흥시 정왕동 1575-9 203호

김상진

경기 안산시 상록구 사2동 월드아파트 707-904

권개경

경기 안산시 상록구 일동 579-3 2층

특허청구의 범위

청구항 1

Thermococcus sp. 균주로부터 분리되어진 고히열성 디유티피아제 및 이의 기능적 동등물.

청구항 2

서열번호의 2의 아미노산 서열을 가진 단백질.

청구항 3

서열번호 1의 유전자.

청구항 4

서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 유전자.

청구항 5

제 1 항에 따른 상기 고히열성 디유티피아제를 암호화하는 핵산서열.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 핵산서열이 서열번호 1인 것을 특징으로 하는 디유티피아제를 암호화 하는 DNA 핵산서열.

청구항 7

제 5 항에 있어서, 상기 고히열성 디유티피아제를 암호화하는 DNA 핵산서열이 서열번호 1과 코돈 축퇴성에 의한 등가인 것을 특징으로 하는 핵산서열.

청구항 8

제 1 항에 따른 고히열성 디유티피아제가 서열번호 2를 가지는 것을 특징으로 하는 디유티피아제.

청구항 9

제 1 항에 따른 고히열성 디유티피아제가 서열번호 2와 기능적으로 동등한 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 디유티피아제.

청구항 10

제 5 항 내지 제 7 항의 어느 한 항에 따른, 핵산서열을 포함하는 재조합벡터.

청구항 11

제 11 항에 있어서, 상기 재조합벡터가 도 9에 기재된 개열지도를 가지는 것을 특징으로 하는 플라스미드.

청구항 12

제 10 항에 따른 재조합 벡터로 형질전환된 세포.

청구항 13

균주 *Thermococcus* sp. NA1. 또는 제 12 항에 따른 형질전환된 세포를 배양하고, 상기 배양된 세포로부터 디유티피아제를 분리하는 것을 특징으로 하는 고히열성 디유티피아제 생산방법.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <10> 게놈의 연구의 최근의 진보는 막대한 양의 서열 정보를 생산했다. 종래의 유전자 공학 및 게놈의 연구 기술의 일반적인 조합과 함께, 몇몇의 고히열성 미생물의 게놈 서열은 생물 공학 분야에서 열에 강한 효소 때문에 관심을 받고 있으며, 많은 매우 열안정적 효소가 생물 공학의 목적으로 개발되고 있다. "디유티피아제(dUTPase)"는 dUTP를 dUMP 및 이인산염으로 가수분해한다. 이 반응에 의해 세포내 dUTP 수준을 제한함으로써 복제 및 수선 동안에 DNA로 dUMP가 잘못 들어가는 것을 막아 주는 것으로 믿어진다. 보다 정밀한 PCR을 위해서는 반응액내에 dUTP의 수준을 낮추어줄 필요가 있고, PCR의 반응 동안에도 활성이 유지되기 위해서는 고온성의 디유티피아제의 개발이 필요하였다.
- <11> 본 발명자들은, PACMANUS 필드의 심해 열수 분출구 지역으로부터 새로운 고히열성 균주를 분리했다. 이것은 16S rDNA 서열 분석결과 *Thermococcus*의 하나로 밝혀졌다. 이로부터 열안정적인 효소를 찾기 위하여 전체 게놈(genome) 서열 분석이 수행되고 있다. 게놈 정보의 분석으로 상기 균주가 디유티피아제를 가지고 있음을 보였다. 본 발명자는 상기 균주로부터 디유티피아제에 상응하는 유전자를 클론하였고, 대장균에서 발현시키는 데 성공하였다. 또한 재조합 디유티피아제를 분리하여 효소적 특성에 대하여 조사하였다.
- <12>
- <13> 이에 본 발명자는 고히열성 고세균 *Thermococcus* sp. NA1으로부터 디유티피아제효소를 분리 제조하여 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

- <14> 본 발명은 고히열성인 디유티피아제(dUTPase)를 제공하는 것이다.
- <15> 본 발명은 높은 온도에서도 활성을 유지하여, PCR의 고온에서도 활성이 유지되어서, 정밀한 PCR이 가능하게 하는 고히열성인 디유티피아제 효소를 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

- <16> 본 발명은 디유티피아제 및 이를 제조하는 방법을 제공한다. 상기 제조방법은 이에 제한되는 것은 아니나, 바람직하게는 유전공학적 방법에 의한 제조방법이다.
- <17> 본 발명은 디유티피아제를 암호화하는 분리된 DNA 서열 및 이를 함유하는 재조합 벡터를 제공한다.
- <18> 제 1 양태로, 본 발명은 고온에서 안정한 디유티피아제를 암호화하는 핵산서열 및 상기 서열에 등가의 핵산서열을 제공한다. 상기 핵산서열들은 보다 구체적으로는 서열번호 1이다.
- <19> 본 명세서에서 사용된 "디유티피아제(dUTPase)"는 dUTP를 dUMP 및 이인산염으로 가수분해한다. 이 반응에 의해 세포내 dUTP 수준을 제한함으로써 복제 및 수선 동안에 DNA로 dUMP가 잘못 들어가는 것을 막아 주는 것으로 믿어진다. dUMP는 dTTP의 생합성에 사용되어진다. 세포내 높은 dTTP:dUTP 비율은 DNA로 우라실 도입을 피하는데 필수적이다. 우라실이 DNA 사슬이 끼어들어가게 되면 사슬이 깨지고 세포사멸을 가져올 수 있다.
- <20> 본 명세서에서 "등가의 핵산서열"은 상기 디유티피아제 서열의 코돈 축퇴성 서열을 포함한다.
- <21> "코돈 축퇴성 서열"이란 상기 자연 발생의 서열과는 상이하나 본 발명에 개시된 자연 발생의 디유티피아제와 동일한 서열의 폴리펩타이드를 코드하는 핵산서열을 의미한다.
- <22> 제 2 양태로, 본 발명은 디유티피아제를 제공한다. 보다 상세하게는 서열번호 2로 표시되는 디유티피아제 및 이의 기능적 동등물을 제공한다.
- <23> 본 발명의 "기능적 동등물"에는 서열번호 2의 디유티피아제 중 일부 또는 전부가 치환되거나, 아미노산의 일부가 결실 또는 부가된 아미노산 서열 변형체가 포함된다. 아미노산의 치환은 바람직하게는 보존적 치환이다. 천연에 존재하는 아미노산의 보존적 치환의 예는 다음과 같다; 지방족 아미노산(Gly, Ala, Pro), 소수성 아미노산(Ile, Leu, Val), 방향족 아미노산(Phe, Tyr, Trp), 산성 아미노산(Asp, Glu), 염기성 아미노산(His, Lys, Arg, Gln, Asn) 및 황함유 아미노산(Cys, Met). 아미노산의 결실은 바람직하게는 디유티피아제의 활성에 직접 관여하지 않는 부분에 위치한다.

- <24> 본 발명은, 제 3 양태로는 상기 디유티피아제를 코딩하는 분리된 DNA 분질을 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.
- <25> 본 발명에서 사용되는 벡터라는 용어는 또다른 핵산을 그것에 결합시켜 이송시킬 수 있는 핵산 분자를 의미한다. 발현벡터란 용어는 상기 벡터에 의해 운반되는 각 재조합형 유전자에 의해 암호화되는 단백질을 합성시킬 수 있는 플라스미드, 코스미드 또는 파아지를 포함한다. 바람직한 벡터는 그것이 결합된 핵산을 자기 복제 및 발현시킬 수 있는 벡터이다.
- <26> 본 발명의 제 4 양태로는, 상기 재조합벡터로 형질전환된 세포를 제공한다.
- <27> 본 발명에서 사용되는 '형질전환'이란 용어는 외래 DNA 또는 RNA가 세포에 흡수되어 세포의 유전형이 변화되는 것을 말한다.
- <28> 적합한 형질전환세포로는 원핵생물, 곰팡이, 식물, 동물세포 등이 포함되나, 이들로 제한되는 것은 아니다. 가장 바람직하게는 대장균을 이용한다.
- <29> 본 발명의 제 5 양태로는 상기 형질전환 세포, 또는 상기 *Thermococcus* sp.를 이용하여 디유티피아제를 생산하는 방법을 제공한다.
- <30> 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것으로 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- <31> [실시예 1] TNA1_UTPase 유전자의 일차적 구조 및 재조합 효소의 발현
- <32> (1) 균주 및 성장 조건
- <33> *Thermococcus* sp. NA1은 이스트 마누스 바신(East Manus Basin)의 심해 열수 분출구로부터 분리되었다. YPS 배지가 DNA 조작을 위해서 *Thermococcus* sp. NA1을 배양하기 위하여 사용되었고, *Thermococcus* sp. NA1의 배양 및 균주 유지는 표준적인 방법에 의하여 행하여졌다. *Thermococcus* sp. NA1 시드(seed) 배양을 준비하기 위하여, 25ml 혈청 병에 있는 YPS 배지에 파타겔 플레이트(phytagel plate) 위에 형성된 단일 콜로니를 접종하였고, 20시간 동안 90°C에서 배양하였다. 시드 배양은 혐기적 단지(jar)에서 YPS 배지 700ml을 접종하는데 사용되었고, 20시간동안 90°C에서 배양되었다.
- <34> *E. coli* DH5a가 플라스미드 증식 및 핵산 서열분석을 위해 사용되었다. *E. coli* BL21-Codonplus(DE3)-RIL 세포(스트라타진, 라졸라, 캘리포니아) 및 플라스미드 pET-24a(+)(노바젠, 메이디슨, 위스콘신)이 유전자 발현을 위해 사용되었다. *E. coli* 균주는 37°C에서 루리아-베르타니(Luria-Bertani) 배지 안에서 배양되었고, 카나마이신이 최종농도 50µg/ml이 되도록 배지에 첨가되었다.
- <35> (2) DNA 조작 및 서열분석
- <36> DNA 조작은 샘플 및 러셀에 의해 기술된 것처럼 표준적인 방법으로 행하여졌다. *Thermococcus* sp.의 게놈 DNA는 표준적인 방법으로 분리되었다. 제한효소 및 다른 변형시키는 효소는 프로메가(메이디슨, 위스콘신)으로부터 구매하였다. *E. coli* 세포로부터 플라스미드 DNA의 적은 양의 제조는 플라스미드 미니 키트(퀴아젠, 힐덴, 독일)을 이용하여 행하여졌다. DNA 서열분석은 빅다이 터미네이터 키트(PE Applied Biosystems, 포스터 시, 캘리포니아)를 이용하여 자동 서열분석기(AB3100)로 행하여졌다.
- <37> (3) 디유티피아제 암호화 유전자의 클로닝 및 발현
- <38> *NdeI* 및 *SaI*I에 의해 플랭크(f flank)된 *Thermococcus* sp. NA1(TNA1_UTPase)의 디유티피아제의 유전자의 전장 길이는 게놈 DNA와 두 개의 프라이머(센스 [5' - Cg ACC Cgg CAT ATG CTC CTC CCG GAC TGG AAA ATT AG -3'] (서열번호 3) 및 안티센스 [5' -CT CCA CAT GTC GACCTT TTT CCT CCT CTT CGA CAG CG-3'] (서열번호 4); 상기 센스 프라이머 안에 밀줄친 서열이 *NdeI* 사이트이고, 안티센스 프라이머 안에 밀줄친 서열이 *SaI*I이다)을 이용하여 증폭되었다. 증폭되어진 서열은 *NdeI* 및 *SaI*I로 다이제스트되었고, *NdeI/SaI*I 다이제스트된 pET-24a(+)에 연결되었다. 연결물(ligate)는 *E. coli* DH5a에 형질전환되었고, 결과적으로 나온 플라스미드는 서열분석 및 발현을 위해 *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL 및 *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS로 각각 형질전환되었다. 유전자의 과량발현은 이소프로필-β-D-티오갈락토피라노사이드(IPTG)를 중간 기하급수적 성장기에 첨가하고, 37°C에서 3시간 동안 항온 배양함으로써 유도되었다. 세포는 원심분리(4°C에서 20분간 6,000 x g)를 통하여 얻어졌고, 0.1M KCl 및 10% 글리세롤을 포함하는 50mM 트리스-HCl 완충용액(pH 8.0)에서 재현탁시켰다. 세포는 초음파에 의해서 분쇄되어지고, 원심분리(4°C에서 30분간 20,000 x g)에 의해서 분리되었다. 얻어진 상등액은 TALON™ 금

속 친화성 레진(BD Bioscience Clontech, 파우로 알토, 캘리포니아)의 컬럼에 처리되고, 0.1 M KCl 및 10% 글리세롤을 포함하는 50mM 트리스-HCl 완충용액(pH 8.0)안의 10mM 이미다졸(시그마, 세인트 루이스, 미주리)로 세척되었고, 완충용액내의 300mM으로 용출되었다. 모아진 분획은, 다음으로, 센트리콘 YM-10(밀리포어, 베드포드, 메사추세츠)을 이용하여 10% 글리세롤이 포함되어 있는 50mM 트리스-HCl(pH 8.0) 완충용액으로 완충용액교환이 되어졌다.

<39> 단백질 농도는 브래드포드(Bradford, 1976)의 방법으로 측정되었다. 단백질의 정제도는 표준 방법으로 수행되어진 소듐 도데실 설페이트-폴리아크릴아마이드 겔 전기영동(SDS-PAGE) 분석에 의해서 조사되었다(Laemmli, 1970).

<40> (4) TNA1_UTPase 암호화 유전자의 일차 구조 및 재조합 효소의 발현

<41> *Thermococcus* sp. NA1의 게놈 염기서열 분석에서, 본 발명의 발명자들은 468 bp 로 구성되어 있고, 155 아미노산으로 구성된 17,679 Da의 암호화 유전자의 오픈 리딩 프레임(ORF)을 발견하였다. 일차 구조는 다른 디유티피아제의 서열과 비교분석결과 디유티피아제의 활성화에 필요한 모티프 I-V가 존재하는 것을 확인하였다(도 1). 디유티피아제는 메탈로프로테인(metalloprotein)으로서 모티프 1의 Asp20, 모티프 2의 Lys 56이 인산 결합에 관여하여 중요한 것으로 알려졌다. 모티프2의 Ser63, 모티프 5의 Phe135도 활성화에 중요한 역할을 하며, 인간의 디유티피아제의 경우는 C-말단 15 아미노산의 결실이 활성화에 중요한 사실이 알려져 있고 이러한 아미노산 서열이 보존되어 있는 것을 확인하였다.

<42> TNA1_UTPase 유전자의 전장 길이가 PCR에 의하여 pET-24a(+) 벡터에 클론되었고 대장균 BL21-Codonplus(DE3)-RIL에 형질전환되어서 발현되었다. SDS-PAGE에서, 95%이상 순수분리된 효소는 아미노산 서열로부터 추정된 17 kDa이외에 이중체로 보이는 34kDa에서도 관찰되었다(도 2)

<43> (5) UTPase 활성 측정방법

<44> *Thermococcus* sp. NA1 UTPase(TNA1_UTPase)의 활성도는 5nM 효소와 1 μmol의 dUTP 혹은 dCTP를 이용하여 측정하였다. 50mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM MgCl₂, 1 μmol의 dUTP 혹은 dCTP, 5nM 디유티피아제로 이루어진 200 μl에서 반응이 이루어졌으며, 5분간 80°C에서 반응후 10000 x g 에서 10분동안 원심분리하였다. 이후 반응액을 모노 큐 에이치알 5/5 컬럼(Mono Q HR 5/5 column)에 장전 한후 0 부터 0.35M NaCl 농도경사를 이용하여 용출하고 (이동상, 50mM 포타슘 포스페이트 완충용액(pH 7.5); 흐름 속도, 0.3ml/분), A₂₅₄의 흡광도를 측정하였다.

<45> 최적 pH는 7.5, 8.0, 8.5, 8.8 조건에서 디유티피아제의 활성을 측정하여 결정하였으며, 열 안정성은 5nM 디유티피아제를 95°C에서 30분, 60분, 120분, 240분, 300분 반응한 후 남아있는 디유티피아제 활성을 측정하였다. 디유티피아제에 대한 MgCl₂의 효과를 보기 위해, 1mM, 5mM, 10mM, 25mM의 MgCl₂를 반응액에 첨가한후 앞에서 기술된 조건에서 측정하였다. KCl (10mM, 60mM), (NH₄)₂SO₄ (6mM, 30mM), BSA (0.001%), 트리톤 X-100 (0.1%)의 영향도 같은 방법으로 측정되었다. 최적 활성온도를 결정하기 위해 70°C, 80°C, 90°C, 95°C에서 활성을 측정하였다.

<46> (6) TNA1_UTPase의 생화학적 특성 분석

<47> TNA1_UTPase는 80°C에서 최적 활성을 보였으며, 95°C에서도 최대 활성의 40%를 나타내었다(도 3). 상기 효소에 대한 최적 pH는 8.0-8.8(도 3)로 결정되어 대부분의 높은 충실도(high fidelity) DNA 중합효소의 PCR 증폭이 적용되는 pH 조건에서 최적 활성을 나타내었다. 열안정성은 95°C에서 효소를 일정시간동안 항온 반응함으로써 측정되었고 결과적으로 TNA1_UTPase는 95°C에서 약 3시간의 반감기(t_{1/2})를 가지고 있는 것으로 뛰어난 열 안정성을 나타내었다(도 4). KCl, 암노니움 설페이트는 활성화에 영향이 없었고, 트리톤X-100은 10%정도의 활성 증가, BSA는 활성감소 효과를 나타내었다. MgCl₂는 1-5mM에서 최적의 활성을 나타내었다(도 5).

<48> 디유티피아제는 30분안에 1 μmol의 dUTP를 모두 분해하는 것으로 나타났으며, dCTP는 120분에 1 μmol의 70%정도가 분해되는 것으로 나타나 dCTP에 대한 분해활성도 나타내었지만 그 정도는 크지 않았다(도 6).

<49> (6) 디유티피아제의 PCR에 적용

<50> 디유티피아제의 높은 충실도 DNA 중합효소의 UTP 존재시의 중합화 정지(polymerization stalling) 현상을 극복함으로써 PCR 수율을 향상시키는 효과를 살펴보기 위해 50 나노그램의 TNA1_UTPase를 다양한 높은 충실도 DNA

중합효소 (TNA1_pol, *Ex Taq* (Takara), *pfu Turbo*(Stratagene), KOD (Novagene) DNA 중합효소)의 PCR 반응에 참가하였다. PCR 반응은 2.5U DNA 중합효소, 주형으로서 *Thermococcus* sp. NA1의 50 ng 의 게놈 DNA, 10 pmol 프라이머, 200 μ M dNTPs, PCR 반응 완충용액으로 구성되었다. 프라이머는 500 bp 에서 8kb를 증폭하기 위해 제안되었다.

- <51> 프라이머 리스트 :
- <52> 500bp : LF [5'-CCTGCTCTGCCGCTTCACGC-3'] (서열번호 5)
- <53> L0.5R [5'-TCCGATAAAAAACGTCGATGACATTTGC-3'](서열번호 6),
- <54> 2kb : 0_1f [5'-ACTAAATTGGTGATACCGTTATGAG-3'] (서열번호 7)
- <55> 0_2kbr [5'-GGAACATAAAATGTAAGGGACTTC'] (서열번호 8),
- <56> 4kb : 0_4kbr [5'-GTCTCTGATGCTCATGATGTAGTTC-3'](서열번호 9),
- <57> 6kb : 0_6kbr [5'- GACTGATTATGAAGGCATCGTCAC-3'] (서열번호 10),
- <58> 8kb : 0_8kbr [5'- GAGGAGCTCTTTAGAATTCTCAAGC-3'] (서열번호 11)
- <59> PCR산물은 0.8 % 아가로스 젤에서 분석하였다.

<60> 높은 충실도 DNA 중합효소는 UTP 결합 포켓의 존재로 인해 용액이나 DNA 주형에 존재하는 UTP에 의해 PCR 증폭이 저해되는 특성이 있다. PCR 증폭에서 UTP는 CTP의 탈아미노화에 의해 자동적으로 생성되는 경향이 있어 높은 충실도 DNA 중합효소의 PCR 수율을 낮추는 주요한 원인중의 하나로 여겨지고 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 TNA1_UTPase를 다양한 높은 중합도 DNA 중합효소의 PCR 반응에 참가하여 효과를 고찰하고자 하였다.

<61> 도 7에서와 같이 높은 충실도 DNA 중합효소 NA1의 PCR 반응시 dUTP와 TNA1_UTPase를 첨가했을때, dUTP 만 첨가된 경우보다 TNA1_UTPase를 동시에 첨가했을때 2kb의 타겟 DNA를 효과적으로 증폭할 수 있었다. 0.1% dUTP의 첨가의 경우는 차이가 명확하게 확인할 수 있었다. 이러한 사실로부터 첨가된 TNA1_UTPase의 dUTP의 저해활성을 극복하는 효과를 확인할 수 있었다(도 7). 외부에서 첨가된 dUTP가 아닌 PCR 반응도중 생성된 dUTP에 의한 PCR 반응 저해를 TNA1_UTPase로 극복하기 위해 NA1, KOD, Pfu등의 여러 가지 높은 충실도 DNA 중합효소를 이용한 0.5kb-8kb의 다양한 타겟 DNA 의 증폭에서 TNA1_utp의 효과를 고찰하였다. 도 8과 같이 6kb, 8kb의 비교적 큰 타겟 사이즈에서는 PCR 수율이 높아지는 효과를 확인할 수 있었다. 이러한 효과는 주형이나 용액에 존재하는 dUTP를 UTPase가 효과적으로 제거함으로써 발생할 수 있는 정지 현상을 제거하여, 효과적인 PCR 증폭이 일어나기 때문인 것으로 생각된다(도 8).

발명의 효과

<62> 본 발명에 따른 디유티피아제는 고호열성인 신규한 디유티피아제다. 본 발명에 따른 디유티피아제는 PCR 반응용액내 dUTP를 dUMP 및 이인산염으로 전환하여줌으로써, 생체 또는 반응용액내의 dUTP의 수준을 낮추어준다. 낮아진 dUTP 수준은 DNA 중합효소의 충실도를 더 높이며, 더 넓은 수행범위를 가지게 한다. 특히, 고온에서도 안정적으로 활성이 유지되어서, 정밀분석, 정밀진단, 동정 등이 요구되는 PCR 반응에 매우 유용하게 사용될 수 있다. 기타 높은 dUTP 수준으로 인하여 발생하는 문제점을 해결하는데 응용가능하다.

도면의 간단한 설명

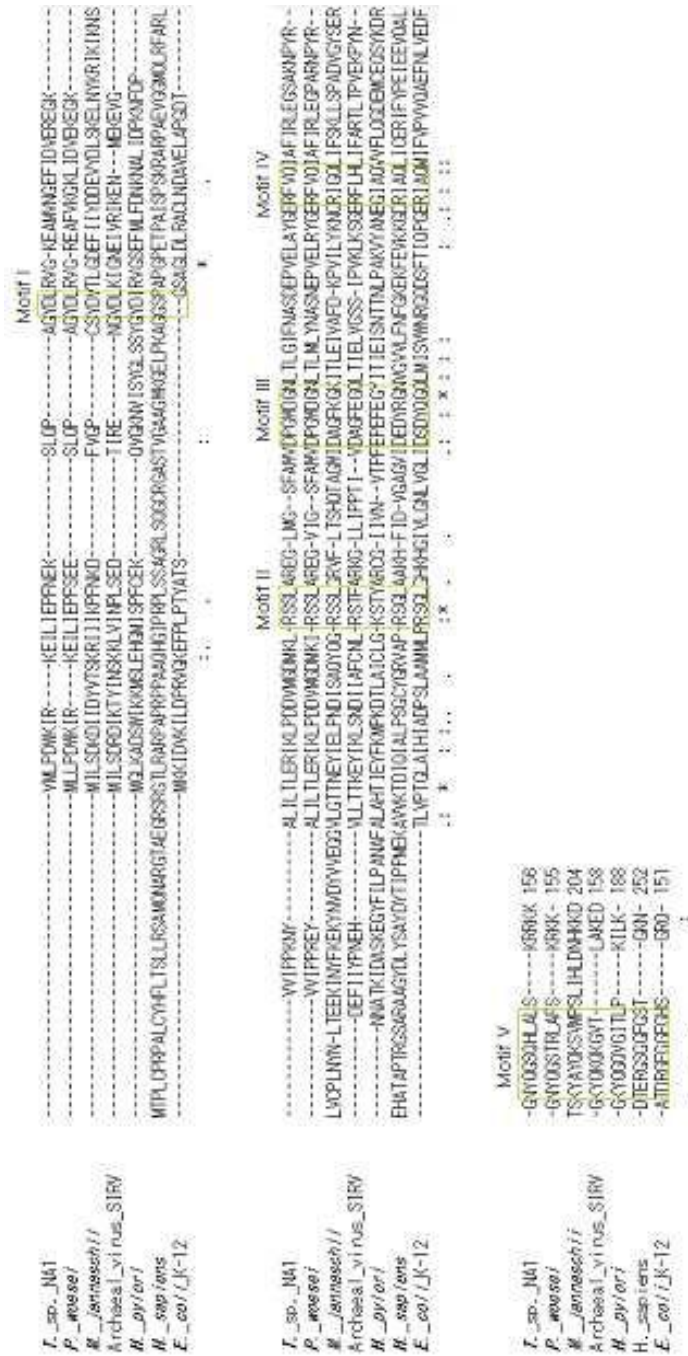
- <1> 도 1은 *Thermococcus* sp. NA1 (TNA1), *P. woesei*, *M jannaschii*, Archaeal virus SIRV, *H. pylori*, *H. sapiens*, 및 *E. coli* K-12로부터의 디유티피아제의 아미노산 서열 비교한 것을 보인다. 대시는 갭(gap)을 나타내고, 오른쪽의 숫자는 원래 서열안에 있는 마지막 잔기의 번호를 나타낸다. 7개의 효소 사이에 같은 잔기는 *로 나타내었고 보존적 치환을 가진 잔기 및 반-보존적으로 치환된 것은 : 으로 나타내었다.
- <2> 도 2는 재조합 His₆-태그된 디유티피아제의 SDS-PAGE 분석결과이다. 레인 M: 저분자 범위의 표준시료(Bio-Rad); 레인 1: His태그된 친화성 크로마토그래피에 의해 분리된 디유티피아제; 레인 2: 5분동안 95℃에서 가열처리된 디유티피아제; 레인 3: 1mM EDTA로 처리된 디유티피아제; 레인 4: 1mM DTT로 처리된 디유티피아제; 레인 5: 100% TCA로 처리된 디유티피아제.
- <3> 도 3은 디유티피아제에 대한 pH (A) 및 온도 (B)의 영향을 보인다. 상기 효소의 최적조건을 결정하기 위하여, 분리된 5nM 디유티피아제가 여러 pH 조건들(7.5, 8.0, 8.5, 8.8) 또는 여러 온도 (70℃, 80℃, 90℃, 95℃)에

서 각각 5분동안 80℃에서 항온 반응되었다. 반응 혼합물은 최종 200 μ l의 부피에 50mM Tris-HCl, pH 8.0, 5mM MgCl₂, 1 μ mole dUTP 및 5nM 디유티피아제를 포함하고 있다.

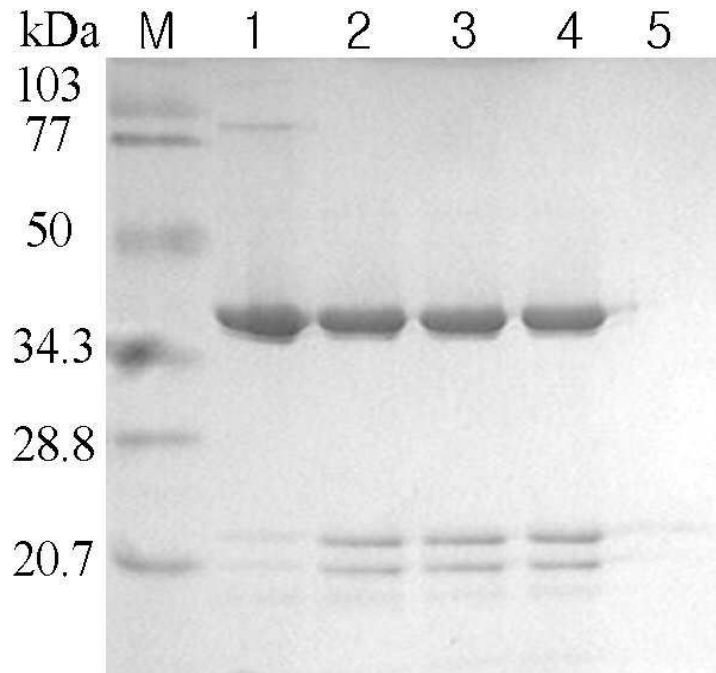
- <4> **도 4**는 디유티피아제의 열안정성을 보인다. 5nM 디유티피아제가 50mM 트리스-HCl, 5mM MgCl₂ 및 5nM 디유티피아제로 구성된 반응완충액에서 각각 0h, 1h, 2h, 4h 및 5h 동안 95℃에서 항온반응되었다. 1 μ mole의 dUTP가 반응완충액에 첨가되었고, 5분동안 80℃에서 항온반응되었다.
- <5> **도 5**는 dUTP 또는 dCTP에 대한 디유티피아제의 가수분해 활성도를 보인다. 1 μ mol의 dUTP (흑색 원) 또는 dCTP (열린 원)는 최종 부피 200 μ l에 50mM 트리스-HCl(pH 8.0), 5mM MgCl₂, 1 μ mole dUTP 또는 dCTP, 및 5nM 디유티피아제를 포함하는 반응 혼합액에서 5분동안 80℃에서 항온반응되었다.
- <6> **도 6**은 디유티피아제에 대한 마그네슘이온의 효과를 보인다. 5nM 디유티피아제는 여러 농도의 MgCl₂ (1mM, 5mM, 10 mM 및 25mM)로 5분 동안 80℃에서 항온반응 되었다. 반응 혼합물은 200 μ l의 최종 부피에 50 mM 트리스-HCl(pH 8.0), 1 μ mole의 dUTP, 및 5nM 디유티피아제를 포함하였다.
- <7> **도 7**은 PCR 증폭에서 디유티피아제(50ng)는 dUTP의 억제 효과를 극복하였다. 2kb 타겟은 디유티피아제의 부존재(1-4 라인) 또는 존재하에서 TNA_1 DNA 중합효소를 이용해 증폭되었다. PCR 반응에 첨가된 dUTP의 양은 표시되었고, TNA_1 게놈 DNA가 주형으로 사용되었다.
- <8> **도 8**은 여러 가지 DNA 중합효소에 의한 넓은 범위 PCR 증폭에서 디유티피아제 첨가효과를 보인다. PCR 증폭을 디유티피아제(50ng)의 존재 또는 부존재에서 (A) KOD1, 및 (B) TNA1_pol DNA 중합효소로 행했다. PCR 생성은 각각 효소의 추천된 완충용액에서 행했고, *Thermococcus* sp NA 게놈 DNA가 주형으로 사용되었다
- <9> **도 9**은 본 발명에 따른 제조합 디유티피아제 TNA1-UTPase을 가지고 있는 pETNAPm 제조합플라스미드의 개열지도를 보인다.

도면

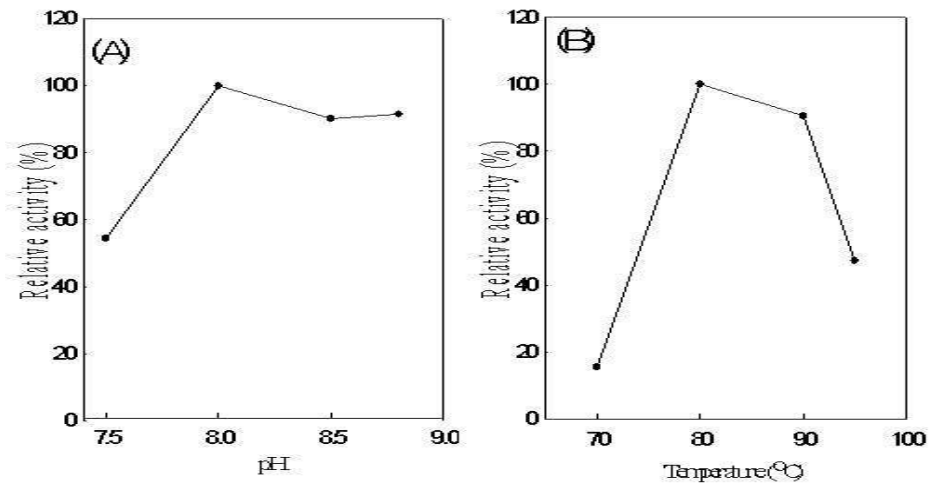
도면1



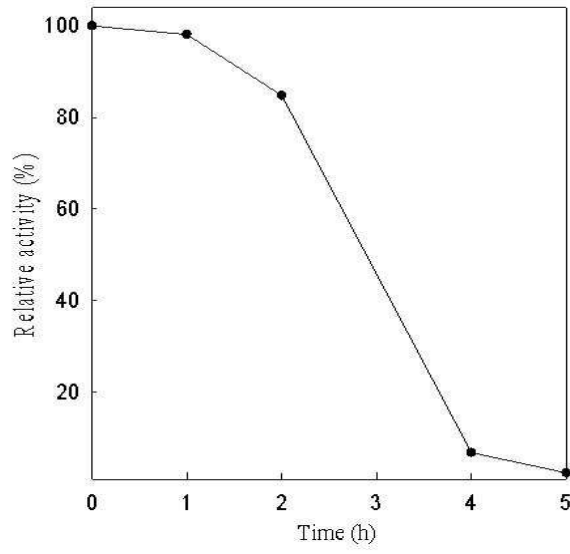
도면2



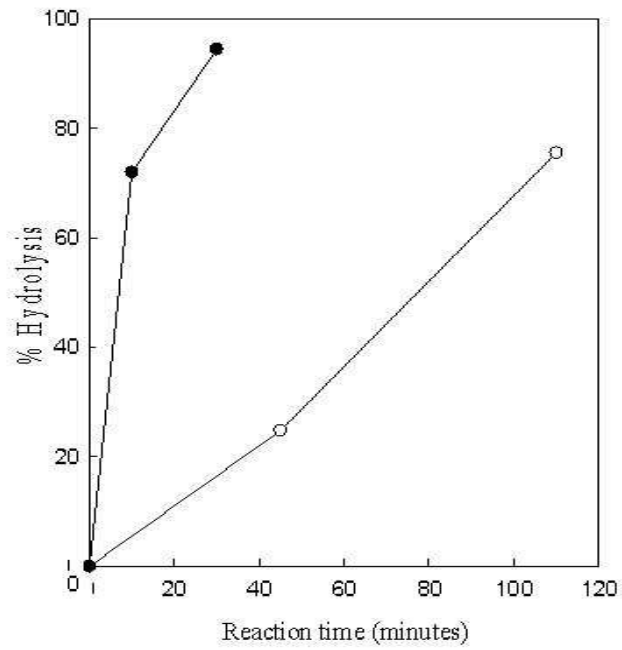
도면3



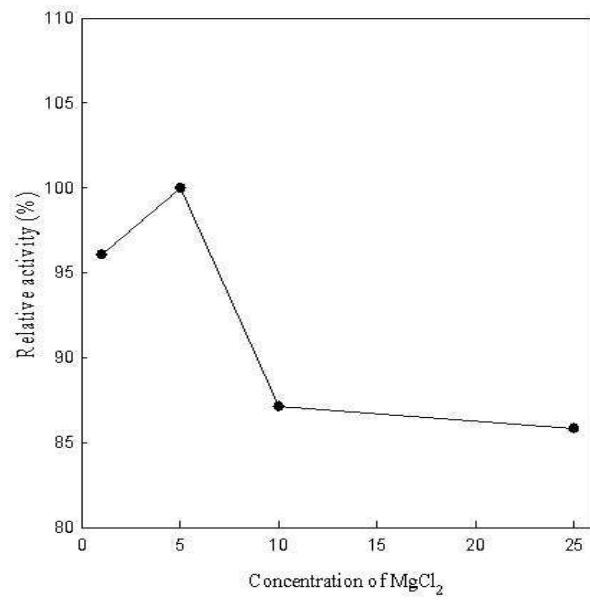
도면4



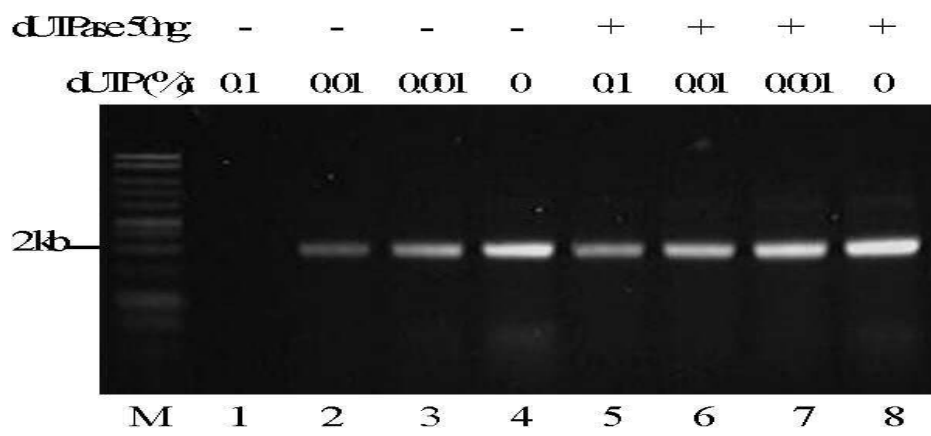
도면5



도면6



도면7



서열목록

<110>	KOREA OCEAN RESEARCH AND DEVELOPMENT INSTITUTE	
<120>	Hyperthermophilic dUTPase and Methods of Preparation Thereof	
<160>	11	
<170>	KopatentIn 1.71	
<210>	1	
<211>	468	
<212>	DNA	
<213>	Thermococcus sp.	
<400>	1	
	atgctcccgg actggaaaat tagaaaggag attctaatcg agcccttcaa cgagaaatcc	60
	cttcagccgg cggctacga cttaaggggtt ggaaaggagg caatggtgaa cggagagttc	120
	atagacgttg agagggaagg gaaggttgta atccctccca agaactatgc tctcattcta	180
	acgcttgaga ggataaagct ccccgatgac gtcatgggtg acatgaagct caggagcagt	240
	ctcgcaagag aaggactgat gggctccttc gctgggtag atcccggtg ggatggcaac	300
	ctcacctcg gaatctttaa cgcctctgac gaaccggttg agctggctta cggagaacgc	360
	tttgttcaga tagcgttcat ccggttgaa gggcttgcaa agaaccgta caggggcaac	420
	tatcagggaa gccagcattt agcgctgtcg aagaggagga aaaagtga	468
<210>	2	
<211>	155	
<212>	PRT	
<213>	Thermococcus sp.	
<400>	2	
	Met Leu Pro Asp Trp Lys Ile Arg Lys Glu Ile Leu Ile Glu Pro Phe	

1 5 10 15
 Asn Glu Lys Ser Leu Gln Pro Ala Gly Tyr Asp Leu Arg Val Gly Lys
 20 25 30
 Glu Ala Met Val Asn Gly Glu Phe Ile Asp Val Glu Arg Glu Gly Lys
 35 40 45
 Val Val Ile Pro Pro Lys Asn Tyr Ala Leu Ile Leu Thr Leu Glu Arg
 50 55 60
 Ile Lys Leu Pro Asp Asp Val Met Gly Asp Met Lys Leu Arg Ser Ser
 65 70 75 80
 Leu Ala Arg Glu Gly Leu Met Gly Ser Phe Ala Trp Val Asp Pro Gly
 85 90 95
 Trp Asp Gly Asn Leu Thr Leu Gly Ile Phe Asn Ala Ser Asp Glu Pro
 100 105 110
 Val Glu Leu Ala Tyr Gly Glu Arg Phe Val Gln Ile Ala Phe Ile Arg
 115 120 125
 Leu Glu Gly Ser Ala Lys Asn Pro Tyr Arg Gly Asn Tyr Gln Gly Ser
 130 135 140
 Gln His Leu Ala Leu Ser Lys Arg Arg Lys Lys
 145 150 155

<210> 3

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> dUTPase sense primer

<400> 3

cgaccggca tatgctctc ccggactgga aaattag

37

<210> 4
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> dUTPase antisense primer

 <400> 4
 ctccacatgt cgacctttt cctcctcttc gacagcg 37

 <210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> 500bp forward primer

 <400> 5
 cctgctctgc cgcttcacgc 20

 <210> 6
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> 500bp backward primer

 <400> 6
 tccgataaaa aacgtcgatg acatttgc 28

<210> 7
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> 2kb forward primer

 <400> 7
 actaaattgg tgataccgtt atgag 25

 <210> 8
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> 2kb backward primer

 <400> 8
 ggaacataaa atgtaaggga cttc 24

 <210> 9
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> 4kb backward primer

 <400> 9
 gtctctgatg ctcatgatgt agttc 25

<210> 10
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 6kb backward primer

<400> 10
gactgattat gaagcatcg tcac 24

<210> 11
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 8kb backward primer

<400> 11
gaggagctct ttagaattct caagc 25