



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년04월25일  
(11) 등록번호 10-0825279  
(24) 등록일자 2008년04월21일

(51) Int. Cl.

C07K 14/195 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2006-0119613  
(22) 출원일자 2006년11월30일  
심사청구일자 2006년11월30일

(56) 선행기술조사문헌  
KR1019970010965 A  
KR1019977007297 A  
KR1020070039418 A

(73) 특허권자

한국해양연구원

경기 안산시 상록구 사동 1270번지

(72) 발명자

이정현

경기 성남시 분당구 정자동 한솔청구아파트  
116-101

강성균

경기 안양시 동안구 평촌동 72-1 대우아파트 112  
동 506호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양부현, 윤여강, 이문섭

전체 청구항 수 : 총 12 항

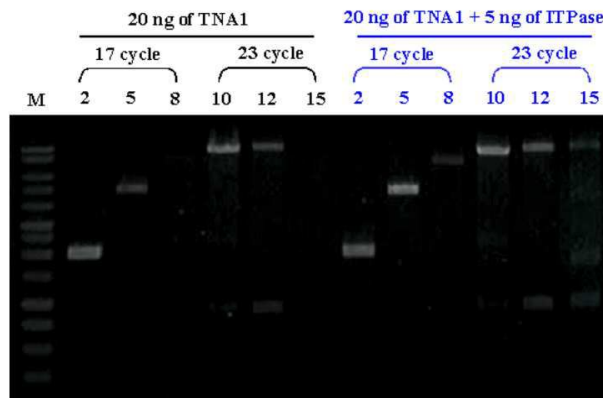
심사관 : 신원혜

(54) DNA 중합효소 활성 증가 단백질 및 이를 암호화 하는유전자

(57) 요약

본 발명은 DNA 중합효소 활성 증가 단백질 및 이를 암호화 하는 유전자에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 *Thermococcus* sp. NA1으로부터 유래되어진 DNA 중합효소 활성 증가 단백질에 관한 것이다. 본 발명은 또한, 상기 단백질을 암호화하는 분리되어진 유전자 단편을 제공하며, 이를 포함하는 재조합 벡터, 상기 재조합벡터로 형질 전환된 숙주 세포 및 상기 숙주세포를 이용한 DNA 중합효소 활성 증가 단백질 생산방법에 관한 것이다.

대표도 - 도4



(72) 발명자

**김상진**

경기 안산시 상록구 사2동 월드아파트 707-904

**권개경**

경기 안산시 상록구 일동 579-3 2층

**이현숙**

경기 안양시 동안구 평촌동 72-1 대우아파트 112동  
506호

**김윤재**

경기 안산시 상록구 사동 1579-2 301호

**유용구**

서울 영등포구 여의도동 금호리첸시아 A-1803

**배승섭**

경기 안산시 상록구 사동 1519-12 402호

**임재규**

경기 시흥시 정왕동 1575-9 203호

**전정호**

경기 안산시 상록구 사동 1579-2 301호

**조요나**

경기 용인시 구성읍 보정리 동아아파트 121-201

**정인순**

경남 창원시 사파동 56-16

**권석태**

경기 수원시 팔달구 화서동 656 한진현대아파트  
107-2002

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

서열번호 1을 가지는 단백질.

### 청구항 2

제 1 항의 단백질을 암호화 하는 핵산서열.

### 청구항 3

제 2 항에서 있어서, 상기 핵산서열이 서열번호 2인 핵산서열.

### 청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 단백질이 DNA 중합 진행도(processivity)를 증가시키는 것을 특징으로 하는 DNA 중합 증가용 단백질.

### 청구항 5

제 1 항 또는 제 4 항의 단백질을 이용하여 DNA 중합효소에 의한 DNA 중합을 증가시키는 방법.

### 청구항 6

서열번호 2의 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

### 청구항 7

제 6 항의 재조합벡터로 형질전환된 숙주세포.

### 청구항 8

제 7 항의 숙주세포를 이용한 서열번호 1의 단백질을 생산하는 방법.

### 청구항 9

DNA 중합효소와 서열번호 1의 단백질을 혼합하여 사용하는 것을 특징으로 하는 DNA 복제 증가방법.

### 청구항 10

DNA 중합효소와 서열번호 1의 단백질을 혼합하여 사용하는 것을 특징으로 하는 중합효소 연쇄 반응(Polymerase Chain Reaction; PCR) 방법.

### 청구항 11

제 9 항 또는 제 10 항 중 어느 한 항에 있어서, 서열번호 1의 단백질을 DNA 중합효소와 동시(同時) 또는 이시(異時)적으로 반응액에 첨가하는 것을 특징으로 하는 DNA 복제 증가 방법.

### 청구항 12

서열번호 1의 단백질을 주입하여 제조되는 것을 특징으로 하는 서열번호 1의 단백질 특이적 항체.

## 명세서

### 발명의 상세한 설명

#### 발명의 목적

#### 발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<6> 본 발명은 DNA 중합효소 활성 증가 단백질 및 이를 암호화 하는 유전자에 관한 것으로서, 보다 상세하게는

*Thermococcus* sp. NA1으로부터 유래되어진 DNA 중합효소 활성 증가 단백질에 관한 것이다.

- <7> 최근 게놈 연구의 진보로 인하여 막대한 양의 유전자 서열 정보가 획득되어 왔다. 종래의 유전자 공학 및 게놈 연구 기술의 일반적인 조합과 함께, 몇몇의 고호열성 미생물의 게놈 서열은 생물공학 분야에서 열에 강한 효소라는 특성을 가지기 때문에 많은 관심을 받고 있으며, 다양한 열 안정적 효소가 생물공학적인 목적으로 개발되고 있다.
- <8> 이러한 열 안정적인 호열성 DNA 중합효소와 이를 이용한 중합효소 연쇄반응 (PCR)은 단백질 및 유전자 연구에서 중요한 기여를 하고 있으며, 현재 생물학의 응용 분야에서 널리 사용되고 있다. 실제로 50개 이상의 DNA 중합효소 유전자들이 호열성 생물 및 고세균을 포함한 다양한 생물체로부터 클론되었으며, 최근에는 일반적인 *Taq* 중합효소 보다 프루프리딩 (proofreading) 활성도에 기초하여 PCR 에서 높은 충실도 (fidelity)를 가지는 고호열성 세균인 파이로코커스 속 (*Pyrococcus* sp.) 및 써모코커스 속 (*Thermococcus* sp.) 균주들로부터 B 패밀리의 DNA 중합효소가 분리되어 널리 사용되었다. 그렇지만, 높은 충실도의 중합효소는 DNA 신장 능력 (elongation ability)에 있어 낮기 때문에 상기 장점에도 불구하고 많은 개선이 요구된다.
- <9> 본 발명자들은 이미 PACMANUS 필드의 심해 열수 분출구 지역으로부터 새로운 고호열성 균주를 분리하고 16S rDNA 서열을 분석하여 써모코커스 속 (*Thermococcus* sp.) 균주로 동정한 다음, 이 균주로부터 열 안정적인 효소를 찾기 위하여 전체 게놈 (genome) 서열을 분석한 바 있었다. 상기 게놈 정보를 분석한 결과 상기 균주가 B 타입의 DNA 중합효소를 가지고 있는 것을 확인하고, 상기 균주로부터 DNA 중합효소에 해당하는 유전자를 클론하고 이 유전자를 대장균에서 발현시켰으며, 재조합 DNA 중합효소를 순수 분리하여 고-신장 능력 및 고-충실도를 가지는 DNA 중합효소에 대해 특허출원한 바 있었다 (대한민국 특허출원 제 2005-0094644호 참조). 그러나, 고-충실도 DNA 중합효소는 강한 엑소뉴클레아제 활성과 낮은 진행도(processivity) 때문에 다양한 PCR에 적용하기에는 많은 개선이 필요하다.
- <10> 이에 본 발명자들은 DNA 중합효소와 함께 사용되어질 때, DNA 중합효소의 진행도(processivity)를 증가시키는 HAM-1 유사 단백질을 써모코커스 속 (*Thermococcus* sp.)에서 분리하였다. 본 발명의 HAM-1 유사 단백질은 DNA 중합이 이루어지는 모든 반응에 사용이 가능하다. 특히, 중합효소 연쇄반응에 있어서, DNA 중합효소의 활성을 보조하여서 높은 민감도와 신속성이 요구되는 DNA 증폭 반응에 본 발명의 단백질을 이용할 수 있다는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

**발명이 이루고자 하는 기술적 과제**

- <11> 본 발명은 신규한 DNA 중합효소 증가 단백질 및 이를 암호화 하는 유전자를 제공하는 것을 목적으로 한다. 또한 본 발명 상기 유전자를 삽입하여 제조한 재조합 벡터를 제공하고, 이를 이용하여 형질전환된 숙주세포를 이용한 DNA 중합효소 활성 증가제 생산방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

**발명의 구성 및 작용**

- <12> 상기한 목적을 위하여, 본 발명의 제 1 태양은 서열번호 1를 가지는 단백질 및 기능적 동등물을 제공한다. 보다 상세하게는 DNA 중합 진행도(processivity)를 증가시키는 것을 특징으로 하는 DNA 중합 증가용 단백질 및 이의 기능적 동등물을 제공한다. 본 발명의 "기능적 동등물"에는 구체적으로 서열 번호 1에 기재된 아미노산 서열을 함유하는 DNA 중합 증가 단백질, 또는 이 단백질의 DNA 중합 증가 활성 및/또는 DNA 중합 증가 활성을 실질적으로 경감시킴이 없이 하나 이상의 아미노산이 첨가, 치환 또는 제거된 상기 단백질의 작용성 증가 유사체를 포함한다.
- <13> 또한, 본 발명은 전술한 단백질의 공개된 아미노산 서열로부터 시험관내에서 합성된 전술한 단백질을 포함한다.
- <14> 또한, 본 발명은 본 발명에 기재된 서열번호 1의 단백질의 아미노산 서열과 55% 이상 유사한 아미노산 서열을 갖고 있는 정제 단백질을 포함한다. 바람직하게는 유사성이 60% 이상인 것이고, 보다 바람직하게는 유사성이 70%이상인 것이며, 가장 바람직하게는 유사성이 80% 이상인 것이다. 본 발명에 있어서 유사성이 55% 이상인 아미노산 서열이란, 적절하게 배열시켰을때 동일한 위치의 아미노산이 55% 이상 동일하거나 유사한 것으로, 4개 이하의 갭을 허용하되 총 10개 이하의 아미노산 잔기가 영향을 받음을 의미한다.
- <15> 아미노산 서열들 중에서 일부 또는 전부가 치환은 보존적인 치환이 되는 것이 바람직하다. 천연에 존재하는 아미노산의 보존적 치환의 예를 들면 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 황 함유 아미노산(Cys, Met). 또한, 이 때 아미노산의 결실은 DNA 중합 활성 증가에 직접 관여하지 않는 부분에 위치하는 것이 바람직하다.

- <16> 본 발명의 제 2 태양은 서열번호 1의 단백질을 암호화 하는 핵산서열을 제공한다. 상기 핵산서열은 구체적으로 서열번호 2이다.
- <17> 핵산서열의 퇴화에 따라서, 상기 서열번호 1를 암호화하는 핵산서열은 다양하게 제조될 수 있다. 상기 "핵산서열"이란 용어는 선택적 발현성이 확인된 천연의 mRNA, 그에 상보적인 cDNA 서열 및 이에 등가의 핵산서열을 포함한다.
- <18> "등가의 핵산서열"에는 본 명세서에서 제공하는 서열과 알릴(allelic)변형에 의한 서열, 종(species)간의 변이에 의한 서열 또는 코돈 축퇴성 서열을 포함한다.
- <19> "코돈 축퇴성 서열"이란 상기 자연 발생의 서열과는 상이하나 본 발명에 개시된 서열번호1의 폴리펩타이드와 동일한 서열의 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산서열을 의미한다.
- <20> "알릴(allelic) 변형에 의한 서열" 또는 "종(species)간 변형에 의한 서열"은 상기 자연 발생의 핵산서열과는 상이하나 본 명세서에 개시된 상기 폴리펩타이드들과 실질적으로 동일한 기능적 성질을 보유하는 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산서열을 의미한다.
- <21> 본 발명의 제 3 태양은 상기 단백질을 이용하여, DNA 중합효소에 의한 DNA 중합을 증가시키는 방법을 제공한다.
- <22> 본 발명의 "DNA 중합효소"는 상보적인 주형 DNA 가닥과 프라이머를 이용하여 뉴클레오타이드를 자라는 3'하이드록시 그룹에 연속적으로 첨가함으로써 데옥시뉴클레오타이드 트리포스페이트로부터 5' -> 3'방향으로 DNA 를 합성하는 효소이다. 주형 가닥이 왓슨-크릭 염기쌍에 의해 첨가되어지는 뉴클레오타이드의 순서를 결정한다.
- <23> 본 발명에 따른 서열번호 1의 단백질과 DNA 중합효소를 혼합하여 사용하는 경우에는 DNA 복제물이 증가한다. 따라서 상기 서열번호 1의 단백질과 DNA 중합효소를 혼합물을 중합효소 연쇄 반응(Polymerase Chain Reaction; PCR) 방법에 사용할 경우 보다 효율적으로 목적 DNA를 증폭할 수 있다. DNA 중합효소와 서열번호 1의 단백질을 혼합하는 방법은 동시 또는 이식적으로 혼합되어질 수 있다. 즉 PCR 반응액에 DNA 중합효소와 서열번호 1의 단백질 혼합액을 먼저 넣어준 후 목적 DNA 절편을 넣고 중합효소 연쇄 반응을 수행할 수 있고, DNA 중합효소가 포함된 프리믹스에 목적 DNA를 넣어준 후 추가적으로 서열번호 1의 단백질을 공급해 중합효소 연쇄반응을 수행할 수도 있다.
- <24> 본 발명의 제 4 태양은 서열번호 1의 유전자를 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 5 태양은 상기 재조합벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다.
- <27> 본 발명에서 사용되는 '형질전환'이란 용어는 외래 DNA 또는 RNA가 세포에 흡수되어 세포의 유전형이 변화되는 것을 말한다
- <28> 숙주세포는 이에 제한 되는 것은 아니나, 원핵세포, 효모세포, 곤충세포를 포함한다. 바람직하기는 원핵세포 중에 대장균이 가장 바람직하다. 대장균을 배양하는 방법은 당업계에서 통상적으로 사용되는 대장균의 배양법을 의미한다.
- <29> 본 발명의 제 6 태양은 상기 숙주세포를 이용한 서열번호 2의 단백질을 생산하는 방법을 제공한다. 발현하고자 하는 임의의 재조합 단백질이란 인간의 단백질을 포함하여, 질병 치료에 사용되거나 또는 산업상 이용가능한 모든 단백질을 의미한다.
- <30> 본 발명의 제 7 태양은 서열번호 2의 단백질을 주입하여 제조되는 것을 특징으로 하는 서열번호 2의 단백질 특이적 항체를 제공한다.
- <31> 이하, 실시예에 의하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다.
- <32> 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<33> 실시예 1. TNA1 HAM-1 유전자의 클로닝 및 재조합 효소의 발현

<34> 균주 및 배양 조건

<35> 씨모코커스 속 NA1(*Thermococcus* sp. NA1)을 이스트 마누스 바신(East Manus Basin)의 심해 열수 분출구로부터 분리하였다. 씨모코커스 속 NA1(*Thermococcus* sp. NA1)을 배양하여 DNA를 조작하기 위해서 YPS 배지를 사용하였고, 씨모코커스 속 NA1(*Thermococcus* sp. NA1)의 배양 및 균주 유지는 표준적인 방법에 의하여 행하여졌다. 씨모코커스 속 NA1(*Thermococcus* sp. NA1) 균주의 시드(seed) 배양을 준비하기 위하여, 25ml 혈청 병에 들어 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, 20시간 동안 90°C에서 배양되었다.

<36> 플라스미드 증식 및 핵산 서열분석을 위하여 *E. coli* DH5 α를 사용하였다. *E. coli* BL21-Codonplus(DE3)-RIL 세포(스트라타진, 라졸라, 캘리포니아) 및 플라스미드 pET-24a(+)(노바젠, 메이디슨, 위스콘신)가 유전자 발현을 위해 사용되었다. *E. coli* 균주는 37°C에서 루리아-베르타니(Luria-Bertani) 배지 안에서 배양되었고, 카나마이신이 최종농도 50µg/ml이 되도록 배지에 첨가되었다.

<37> DNA 조작 및 서열분석

<38> DNA 조작은 샘플북 및 러셀에 의해 기술된 것처럼 표준적인 방법으로 행하였다. 씨모코커스 속 (*Thermococcus* sp.)의 게놈 DNA는 표준적인 방법으로 분리되었다. 제한효소 및 다른 변형시키는 효소는 프로메가(메이디슨, 위스콘신)로부터 구매하였다. *E. coli* 세포로부터 플라스미드 DNA의 적은 양의 제조는 플라스미드 미니 키트(퀴아젠, 힐텐, 독일)를 이용하여 수행하였다. DNA 서열분석은 빅다이 터미네이터 키트(PE Applied Biosystems, 포스터 시, 캘리포니아)를 이용하여 자동 서열분석기(AB3100)로 수행하였다.

<39> TNA1 HAM-1 암호화 유전자의 클로닝 및 발현

<40> *NdeI* 및 *SaI*I에 의해 플랭크(flank)된 씨모코커스 속 NA1(*Thermococcus* sp. NA1) HAM-1의 유전자의 전장 길이는 게놈 DNA와 두 개의 프라이머를 이용하여 증폭하였다. 센스 프라이머는 5' - CG ACC CGG CAT ATG AGG CTG GCG TTC ATC ACT TC-3' (서열번호 3)이고, 안티센스 프라이머는 5' -CT CCA CAT CTC GAG TTT AAG GTT TTC CTT TAG CCA C-3' (서열번호 4)이다. 상기 센스 프라이머에 밑줄 친 서열이 *NdeI* 사이트이고, 안티센스 프라이머에 밑줄 친 서열이 *XhoI*이다. 증폭되어진 서열을 *NdeI* 및 *XhoI*로 다이제스트 하였고, *NdeI/XhoI* 다이제스트 된 pET-24a(+)에 연결하였다. 연결물(ligate)을 *E. coli* DH5 α에 형질전환 하였고, 결과적으로 나온 플라스미드는 서열분석 및 발현을 위해 *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL 및 *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS로 각각 형질전환 하였다. 유전자의 과량발현은 이소프로필-β-D-티오갈락토피라노사이드(IPTG)를 중간 기하급수적 성장기에 첨가하고, 37°C에서 3시간 동안 항온 배양함으로써 유도하였다. 세포는 원심분리(4°C에서 20분간 6,000 x g)를 통하여 얻었고, 0.1M KCl 및 10% 글리세롤을 포함하는 50mM 트리스-HCl 완충용액(pH 8.0)에서 재현탁시켰다. 세포를 초음파에 의해서 분쇄하였고, 원심분리(4°C에서 30분간 20,000 x g)에 의해서 분리하였다. 얻어진 상등액은 TALON™ 금속 친화성 레진(BD Bioscience Clontech, 파우로 알토, 캘리포니아)의 컬럼에 처리하였고, 0.1 M KCl 및 10% 글리세롤을 포함하는 50mM 트리스-HCl 완충용액(pH 8.0)안의 10mM 이미다졸(시그마, 세인트 루이스, 미주리)로 세척하였고, 완충용액내의 300mM으로 용출하였다. 다음으로, 모아진 분획은 Centricon YM-10(밀리포어, 베드포드, 메사추세츠)을 이용하여 10% 글리세롤이 포함되어 있는 50mM 트리스-HCl(pH 8.0) 완충용액으로 완충용액교환이 되었다.

<41> 브래드포드(Bradford, 1976)의 방법으로 단백질 농도를 측정하였다. 표준 방법으로 수행되어진 소듐 도데실 설페이트-폴리아크릴아마이드 겔 전기영동(SDS-PAGE) 분석에 의해서 단백질의 정제도를 조사하였다(Laemmli, 1970).

<42> 결과

<43> 씨모코커스 속 NA1(*Thermococcus* sp. NA1)의 게놈 염기서열 분석에서, 본 발명의 발명자들은 555 bp로 구성되고, 184 아미노산으로 구성된 21 kDa의 암호화 유전자의 오픈 리딩 프레임(ORF)을 발견하였다. 일차 구조를 다른 HAM-1 유사유전자의 서열과 비교 분석하였다(도 1). 그 결과 씨모코커스 속 OGL-20P(*Thermococcus* sp. OGL-20P)의 HAM-1 유전자(AAP45001)와 79%, 씨모코커스 코다카라엔시스 KOD1(*Thermococcus kodakaraensis* KOD1)의 HAM-1 유전자(YP\_184524)와 78%, 메타노칼도코커스 야나시(*Methanocaldococcus jannaschii* DSM 2661)의 mj0226 유전자와 46%의 상동성을 보였다.



<44> TNA1 HAM-1 유전자를 PCR에 의하여 pET-24a(+) 벡터에 클로닝하였고 대장균 BL21-Codonplus(DE3)-RIL에 형질전환해서 발현하였다. SDS-PAGE에서, 95%이상 순수분리된 효소는 아미노산 서열로부터 추정된 21 kDa에서 단일 밴드로 관찰되었다(도 2)

<45> 실시예 2. TNA1 HAM-1 단백질의 PCR 적용

<46> TNA1 HAM-1 단백질을 이용하여 고 충실도(high fidelity) DNA 중합효소의 이노신 트리포스페이트(Inosine triphosphate; ITP) 존재시 PCR 전해활성을 극복함으로써 PCR 수율을 향상시키는 효과를 살펴보았다. 50 ng의 TNA1 HAM-1 단백질을 다양한 고 충실도(high fidelity) DNA 중합효소(TNA1\_pol1)의 PCR 반응에 첨가하였다. PCR 반응은 2.5U DNA 중합효소, 주형으로 써모코커스 속 NA1(*Thermococcus* sp. NA1)의 150 ng 게놈 DNA, 10 pmol 프라이머, 200 μM dNTPs, PCR 반응 완충용액으로 구성되었다. 프라이머는 2kb에서 15kb를 증폭하기 위해 제안되었다(표 1).

<47> <표1> 본 발명에 사용되어진 PCR 프라이머 서열

대상	포워드프라이머	백워드프라이머
2kb	CCTGCTCTGCCGCTTCACGC(서열번호 5)	CCATGATTCAGTGTGCCCGTCTGG(서열번호 6)
5kb	CCTGCTCTGCCGCTTCACGC(서열번호 5)	CGAACGTCGCGCAGAGAACAGG(서열번호 7)
8kb	CCTGCTCTGCCGCTTCACGC(서열번호 5)	GCCTCGTTGCGTTTGTTCACG(서열번호 8)
10kb	CCTGCTCTGCCGCTTCACGC(서열번호 5)	GCACAGAAGCTATTATGCGTCCCAGG(서열번호 9)
12kb	CCTGCTCTGCCGCTTCACGC(서열번호 5)	TCTTCTCGTGCATCGAGCTATTCGG(서열번호 10)
15kb	CCTGCTCTGCCGCTTCACGC(서열번호 5)	CTTGTTCTTTGCCGCGAGAATGG(서열번호 11)

<49> 우선 고 충실도 DNA 중합효소는 비교적 낮은 농도의 dITP의 존재에 의해 PCR 증폭이 저해된다는 것을 확인할 수 있었다(도 3). PCR 증폭에서 dITP는 dATP의 탈아미노화(deamination)에 의해 자동적으로 생성될 수 있으며, 고 충실도 DNA 중합효소의 PCR 효율을 낮추는 주요한 원인으로 보인다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 TNA1 HAM-1 단백질을 고 충실도 DNA 중합효소의 PCR 반응에 첨가하여 효과를 확인하였다.

<50> 도 4에서와 같이 고 충실도 DNA 중합효소의 PCR 반응에 TNA1 HAM-1 단백질을 첨가한 경우가 첨가하지 않은 경우보다 전체적으로 타겟 DNA를 효과적으로 증폭할 수 있었다. 이러한 효과는 TNA1 HAM-1 단백질이 용액 내에 존재하는 dITP를 효과적으로 제거함으로써, 스톨링(stalling) 현상이 발생하는 것을 막아 효과적인 PCR 증폭이 일어났기 때문인 것으로 보인다.

**발명의 효과**

<51> 본 발명에 따른 HAM-1 유사 단백질은 DNA 중합효소와 함께 사용되어질 때, DNA 중합효소의 진행도(processivity)를 증가시킨다. 따라서, 본 발명의 HAM-1 유사 단백질은 DNA 중합이 이루어지는 모든 반응에 사용이 가능하다. 특히, 중합효소 연쇄반응에 있어서, DNA 중합효소의 활성을 보조하여서 높은 민감도와 신속성이 요구되는 DNA 증폭 반응에 본 발명의 단백질을 이용할 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

<1> 도 1은 HAM-1 유사 유전자들 및 디엔티피아제 피로포스파타아제(dNTPase pyrophosphatase)와 TNA1 HAM-1 사이의 서열유사성을 나타낸다.

<2> 도 2는 재조합 히스 태그된(His<sub>6</sub>-tagged) TNA1 HAM-1의 SDS-PAGE를 나타낸다. 레인 1, 저분자 범위 표준(Bio-Rad); 레인 2, 히스 태그된 친화 크로마토그래피에 의해 분리된 TNA1 HAM-1

<3> 도 3은 다양한 DNA 중합효소들의 PCR 증폭에서 dITP의 영향을 나타낸다. (A) dITP 농도(0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2mM)에 따른 rTaq과 TNA1 DNA 중합효소의 PCR 증폭, (B) dITP가 존재하지 않은 경우(dITP X)와 dITP가 존재하는 경우(0.05mM dITP)에 다양한 DNA 중합효소들의 PCR 증폭

<4> 도 4는 다양한 DNA 중합효소들의 PCR 증폭에서 TNA1 HAM-1의 영향을 나타낸다.

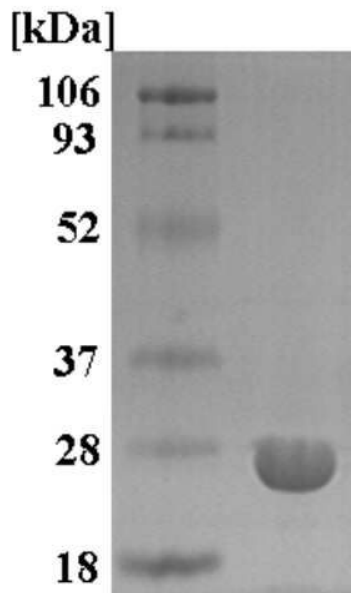
<5> 도 5는 재조합 플라스미드 벡터의 개열지도를 나타낸 것이다.

도면

도면1

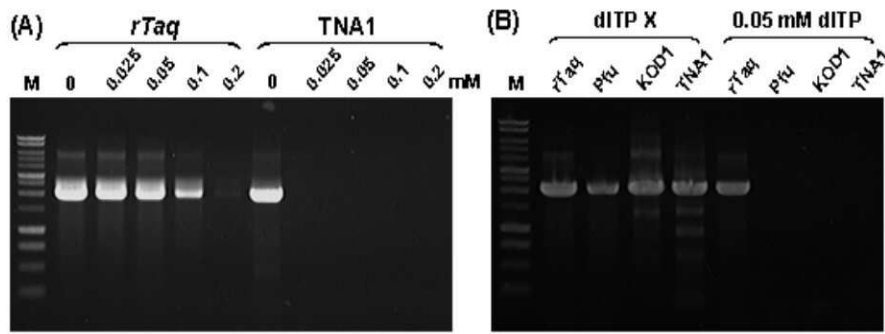
AAP45001	-----MRLAFITSNPGKVEEAKKYFEPLG-VEVYQLRVEYPEIQADSLEEVALFGLG 51
TNA1	-----MRLAFITSNPGKVEEARKYFEPLG-VEVYQLKVEYPEIQADTLEEVALFGLG 51
YP_184524	-----MRLAFVTSNPGKVEEARKYFEPLG-VEVYQLKVSYPEIQADTLEEVAEYGAK 51
mj0226	MQRTLGEIMKIYFATGNPNKIKEANIILKDLKDVEIEQIKISYPEIQG-TLEEVAEFGAK 59
	*::* * *.**.*::** . : : * ** : *:::*****. :***** :* :
AAP45001	WLARKIDGPFLLDSDGLFIDALGGFPGVYSAYYRITLGI GGILKLM DGLDRNAHFRSVI 111
TNA1	WLSRKIDEPFFLDDSGLFYEALKGFPVYSAYYKTLGVDGLLKLMEGVENRRAYFKSVI 111
YP_184524	WLAQRVDGPFLLDSDGLFYEALKGFPVYSAYYKTI GYQGILKLLQGEKNRKAHFKSVI 111
mj0226	WVYNILKRPVIVEDSGFFYEALNGFPGTYSKFVQETIGNEGILKLLQGEKDNRNAYFKTVI 119
	*: . : . * : : : ** : * : : ** * * * * . ** : * : * * : * * * : : * : * : : * * :
AAP45001	AYWDG-EAHIFTGRVDGEITTSPPWGS-GFGDPIFRPRGFNI TFAEMTTEQKNVISHRG 169
TNA1	AYWDG-EAHIFTGIVEGEI IHEKRGNM-GFGDVPVFKPSGDRTF AEMTTTEKNKISHRG 169
YP_184524	AYWDG-ELHIFTGRVDGKIATEPRGS-GFGDPIFIPEGFDRTF AEMTTEKNRISHRG 169
mj0226	GYCDENGVRLFKGIVKGRVSEERISKGYGFAYDSIFIP EEEERTFAEMTTEESQISHRK 179
	. * * : : * * * * . : . . ** : * : * * : * * * * * : * : * * * * :
AAP45001	RALKAFADWLKENLK 184
TNA1	LALKAFSEWLKENLK 184
YP_184524	RALREFANWLKENLK 184
mj0226	KAFEEFKFLLDRI- 193
	*: . * : * : :

도면2

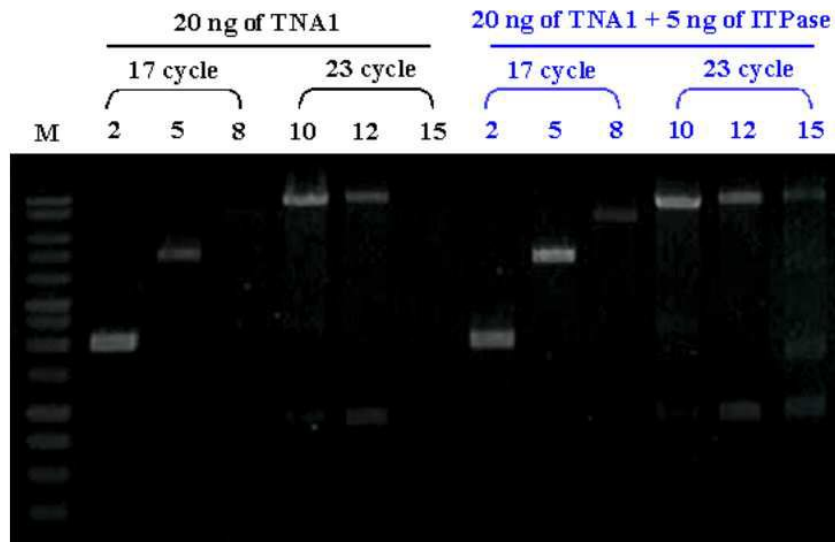




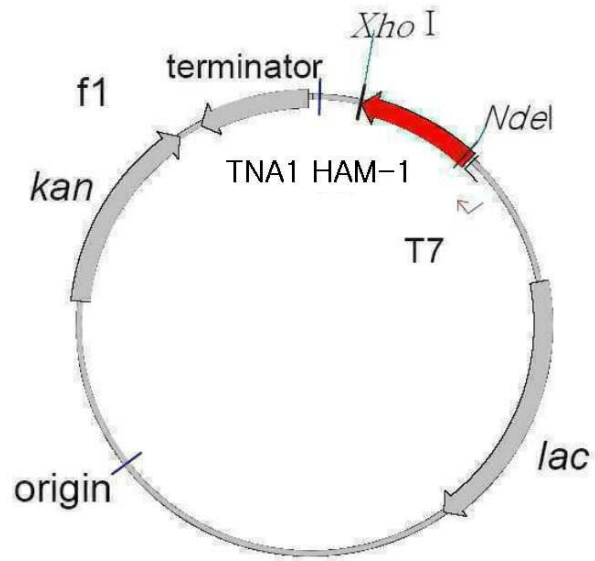
도면3



도면4



도면5



서열목록

[서열목록 전자파일 첨부](#)