



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년07월08일
 (11) 등록번호 10-1416097
 (24) 등록일자 2014년07월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/10 (2006.01) *C12N 15/54* (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2013-7000005
 (22) 출원일자(국제) 2013년05월14일
 심사청구일자 2013년01월02일
 (85) 번역문제출일자 2013년01월02일
 (65) 공개번호 10-2013-0030799
 (43) 공개일자 2013년03월27일
 (86) 국제출원번호 PCT/KR2010/003074
 (87) 국제공개번호 WO 2011/142492
 국제공개일자 2011년11월17일
 (56) 선행기술조사문헌
 W02007043769 A1

(73) 특허권자
한국해양과학기술원
 경기도 안산시 상록구 해안로 787 (사동, 한국해양연구원)
 (72) 발명자
이정현
 경기 성남시 분당구 불정로 219, 116동 101호 (정자동, 한솔마을청구아파트)
강성균
 경기 안산시 상록구 감골로 59, 702동 1502호 (사동, 상록수타운월드아파트)
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
윤여강

전체 청구항 수 : 총 6 항

심사관 : 김남경

(54) 발명의 명칭 **롱 PCR이 가능한 DNA 중합효소 및 이의 유전자들**

(57) 요약

본 발명은 롱(long) PCR이 가능한 돌연변이 DNA 중합효소 및 이의 유전자들에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 씨모코커스 속 (*Thermococcus* sp.) 균주로부터 유래하고 야생형 TNA1_pol DNA 중합효소를 돌연변이화 하여 긴 (long) PCR 중합반응에 유용한 DNA 중합효소, 상기 돌연변이 DNA 중합효소를 암호화하는 유전자 및 이를 이용한 중합효소 제조방법에 관한 것이다. 본 발명의 돌연변이 DNA 중합효소는 기존의 야생형이나 돌연변이형에 비해 긴 (long) 사슬의 DNA에 대한 PCR에 있어서 월등한 성능을 나타냄으로써 인간의 유전체 분석 등 긴 사슬의 증폭이 필요한 다양한 분야에 널리 응용될 수 있다.

(72) 발명자

김상진

서울 서초구 남부순환로 2183, 201동 1903호 (방배동, 방배래미안타워)

권개경

경기 안산시 상록구 부곡로5길 29, 2층 (부곡동)

이현숙

경기 안산시 상록구 감골로 59, 702동 1502호 (사동, 상록수타운월드아파트)

김윤재

경기 안산시 상록구 향호2길 18, 203호 (사동)

배승섭

경기 안산시 상록구 천문4길 19, 402호 (사동)

임재규

경기 시흥시 봉우재로36번길 11, 203호 (정왕동)

전정호

인천 부평구 부흥북로84번길 23, 302호 (부평동, 광미리치빌)

조요나

경기 용인시 기흥구 보정로 30, 121동 201호 (보정동, 동아솔레시아아파트)

황영욱

경기 안산시 상록구 감골2로 58, 104동 202호 (사동, 선경아파트)

차선신

경기 안산시 상록구 해양로 16, 905동 1001호 (사동, 안산고잔9차푸르지오)

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 DNA 중합효소.

청구항 2

서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 DNA 중합효소 유전자.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 DNA 중합효소 유전자는 서열번호 1인 것을 특징으로 하는 DNA 중합효소 유전자.

청구항 4

제 2 항의 DNA 중합효소 유전자를 포함하는 재조합백터.

청구항 5

제 4 항의 재조합백터로 형질전환된 숙주세포.

청구항 6

제 5 항의 숙주세포를 배양하고 재조합 단백질의 발현을 유도하여 중합효소 단백질을 분리하는 것을 특징으로 하는 중합효소 제조방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 롱 PCR을 수행할 수 있는 돌연변이 DNA 중합효소 및 이를 암호화하는 유전자 서열, 제조방법 및 이를 이용한 PCR 중합반응에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 씨모코커스 속(*Thermococcus sp.*) NA1으로부터 유래하고 특정 부위에 돌연변이화를 유발시킨 DNA 중합효소, 이의 아미노산 서열, 상기 돌연변이 DNA 중합효소를 암호화하는 유전자 및 이를 이용한 중합효소 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 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 생명공학 분야에서 열에 강한 효소라는 특성을 가지기 때문에 많은 관심을 받고 있으며, 다양한 열 안정적 효소가 생명공학적인 목적으로 개발되고 있다.

[0003] 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 씨모코커스 속 (*Thermococcus sp.*) 균주들로부터 B 패밀리 DNA 중합효소가 분리되어 널리 사용되었다. 그렇지만, 높은 충실도의 중합효소는 DNA 신장 능력 (elongation ability)에 있어 낮기 때문에 상기 장점에도 불구하고 많은 개선이 요구된다.

[0004] 본 발명자들은 이미 PACMANUS 필드의 심해 열수 분출구 지역으로부터 새로운 고호열성 균주를 분리하고 16S rDNA 서열을 분석하여 씨모코커스 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 특허등록한 바 있었다 (대한민국 특허등록 제10-0777227호 참조).

[0005] 이에 본 발명자들은 대한민국 특허등록 제10-0777227호의 야생형 TNA1_pol DNA 중합효소를 이용하여, 롱 PCR 중

합반응에 적당한 DNA 중합효소를 개발하기 위하여 노력을 계속한 결과, 써모코커스 속 (*Thermococcus* sp.) 균주로부터 분리된 DNA 중합효소를 돌연변이화시켜 롱(long) PCR 중합반응에 적당한 DNA 중합효소들을 선발하였고, 이들이 인간유전체 연구 등에서의 긴(long) 사슬의 DNA 증폭 반응에 유용하다는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 롱 PCR이 가능한 돌연변이 DNA 중합효소, 이의 유전자들을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기한 목적을 위하여, 본 발명은 써모코커스 속 (*Thermococcus* sp.) 균주로부터 유래하고 대한민국 특허등록 제10-0777227호의 야생형 TNA1_poi DNA 중합효소를 돌연변이화 하여 긴(long) PCR 중합반응에 유용한 DNA 중합효소를 제공한다.

[0008] 본 발명의 제1의 형태는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 DNA 중합효소를 제공한다.

[0009] 본 명세서에서 사용된 "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.

[0010] 본 발명의 돌연변이 DNA 중합효소에는 그의 "기능적 동등물"도 포함될 수 있다. 여기서 기능적 동등물은 돌연변이 DNA 중합효소의 아미노산 서열들 중에서 일부 또는 전부가 치환되거나 아미노산의 일부가 결실 또는 부가된 아미노산 서열 변형체가 포함된다. 이때 아미노산의 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, 이때 아미노산의 결실은 DNA 중합효소의 활성에 직접 관여하지 않는 부분에 위치하는 것이 바람직하다.

[0011] 본 발명의 제2의 형태는 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 DNA 중합효소 유전자를 제공한다. 상기 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화 하는 DNA 중합효소 유전자는 유전의 퇴화(degeneration)에 의하여 다양한 형태의 서열을 가질 수 있다. 상기 유전자 서열은 바람직하게는 서열번호 1로 표시되는 DNA 중합효소 유전자이다. 본 발명의 기술분야에 속하는 당업자는 서열번호 2의 DNA 중합효소 서열에 대한 기능적 동등물을 제조할 수 있으며, 본 발명의 범위는 상기 기능적 동등물을 암호화 하는 유전자 서열들을 포함한다.

[0012] 본 발명의 제3의 형태는 상기 DNA 중합효소 유전자를 포함하는 재조합백터를 제공한다.

[0013] 본 발명에서 사용되는 벡터라는 용어는 다른 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. 상기 벡터는 플라스미드, 코스미드, 파지미드, 파지, 바이러스 형태의 벡터일 수 있다. 상기 벡터를 이용하여 본 발명의 DNA 중합효소 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 만드는 방법은 당업계에 공지되어 있다.

[0014] 본 발명의 제4의 형태는 상기 재조합백터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다. 본 발명에서 사용되는 '형질전환'이란 용어는 외래 DNA 또는 RNA가 세포에 흡수되어 세포의 유전형이 변화되는 것을 말한다.

[0015] 본 발명의 제5의 형태는 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 DNA 중합효소 유전자를 포함하는 재조합백터로 형질전환된 숙주세포를 배양하고 재조합 단백질의 발현을 유도하여 중합효소 단백질을 분리하는 것을 특징으로 하는 중합효소 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0016] 본 발명의 돌연변이 DNA 중합효소는 기존의 야생형이나 돌연변이형에 비해 긴(long) 사슬의 DNA에 대한 PCR에 있어서 월등한 성능을 나타냄으로써 인간의 유전체 분석 등 긴 사슬의 증폭이 필요한 다양한 분야에 널리 응용

될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 야생형 중합효소, 돌연변이형 중합효소 및 본 발명의 돌연변이 DNA 중합효소의 인간 게놈 DNA에 대한 PCR 증폭을 비교한 결과를 나타낸 것이다. M, 표준 마커; 레인 1, hprt 2.7kb; 레인 2, hprt 6.25kb; 레인3, hprt 10.4kb; 레인 4, β-글로빈 13.5kb; 레인 5, 미토콘드리아 16.2kb; Ex Taq, 일반적인 Taq 중합효소; TNA1, 야생형 중합효소; TLA, 돌연변이형 중합효소; U7, 본 발명의 돌연변이 DNA 중합효소를 나타낸 것이다.

도 2는 재조합 플라스미드 벡터의 개열지도를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 이하, 실시예에 의하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0019] 참고예 1. 야생형 중합효소 TNA1_pol 유전자의 클로닝 및 일차적 서열 분석

[0020] 썬모코커스 속 (*Thermococcus* sp.) NA1 균주는 과퍄아뉴기니 서태평양 영역의 심해 열수 분출구로부터 분리되었다. YPS 배지가 썬모코커스 속 NA1 균주를 배양하여 DNA 조작하기 위하여 사용되었고, 썬모코커스 속 NA1의 배양 및 균주 유지는 표준적인 방법에 의하여 행하여졌다. 썬모코커스 속 NA1 종균 배양을 준비하기 위하여, 25 ml 혈청용기에 들어있는 YPS 배지에 파타겔 플레이트 (phytagel plate) 위에 형성된 단일 콜로니를 접종하였고, 20시간 동안 90℃에서 배양하였다. 종균 배양은 혐기적 단지 (jar)에서 YPS 배지 700 ml을 접종하는데 사용되었고, 20시간 동안 90℃에서 배양되었다.

[0021] 실시예 1. 야생형 중합효소 TNA1_pol 유전자의 제조 및 이의 돌연변이화

[0022] 썬모코커스 속 (*Thermococcus* sp.) NA1 균주의 중합효소 TNA1_pol 유전자를 포함하는 플라스미드 증식 및 핵산 서열분석을 위해 대장균 *E. coli* DH5 α 균주가 사용되었다. 대장균 BL21-Codonplus(DE3)-RIL 세포 (스트라타진, 라졸라, 캘리포니아) 및 플라스미드 pET-24a(+) (노바젠, 메이디슨, 위스콘신)이 유전자 발현을 위해 사용되었다. 대장균 균주는 37℃에서 루리아-베르타니(Luria-Bertani) 배지를 사용하여 배양되었고, 카나마이신이 최종 농도 50µg/ml이 되도록 배지에 첨가되었다.

[0023] 또한, DNA 조작은 샘플북 및 러셀에 의해 기술된 바와 같이 표준적인 방법으로 행하여졌다. 썬모코커스 속의 게놈 DNA는 표준적인 방법으로 분리되었다. 제한효소 및 다른 변형 효소는 프로메가 (메이디슨, 위스콘신)로부터 구매하였다. 대장균 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)를 사용하여 행하여졌다.

[0024] 게놈 서열을 분석한 결과, 1,308개의 아미노산으로 구성된 단백질을 암호화하는 오픈 리딩 프레임 (3,927 bp)이 발견되었고, B 패밀리 타입 DNA 중합효소와 매우 높은 유사성을 보였다. 유추되어진 아미노산 서열로부터 얻어진 단백질의 분자량은 151.9 kDa 이었고, 이것은 평균적인 열안정적 DNA 중합효소에 대하여 예측되는 크기보다 훨씬 컸다. 또한 서열 분석을 통하여 상기 DNA 중합효소 유전자가 추정된 3'-5' 엑소뉴클레아제 도메인, α-유사 DNA 중합효소 도메인 및 진핵생물 및 고세균의 α-유사 DNA 중합효소 사이에 보존된 중간지역 (Pol III)에 위치한 1605 bp (535 아미노산)의 하나의 인프레임된 서열 (intervening sequence)을 포함하는 것을 확인하였다. 또한, 유추된 인테인 (intein)의 아미노산 서열은 다른 고세균 중합효소의 인테인과 매우 유사한 점도 보였고, pol_1 인테인 1 (*Thermococcus* sp. strain GE8로부터 유래한 DNA 중합효소 기원 537개 아미노산들, AJ25033)에 81.0%의 상동성, IVS-B (KOD DNA 중합효소 기원 537개 아미노산들, D29671)에 69.0% 상동성 및 인테인 (Deep vent DNA 중합효소 기원 537개 아미노산들, U00707)에 67.0%의 상동성을 보였다.

[0025] 또한, 인테인의 스플라이싱 부위는 인테인의 N-말단에서의 Cys 또는 Ser 및 C-말단 스플라이스 연결부에서 His-Asn-Cys/Thr가 잘 보존되어 있어서 서열 분석에 의하여 예측될 수 있었다. 따라서, 인테인을 포함하지 않는 성숙한 형태의 중합효소 TNA1_pol의 유전자가 예상되어질 수 있고, 이것은 773개 아미노산 잔기들로 구성된 단백질을 암호화하는 2,322 bp 일 것으로 판단되었다. 중합효소 TNA1_pol의 추정된 서열은 다른 DNA 중합효소의 것들과 비교되었다. 페어와이즈 어라인먼트에서, 유추되어진 성숙한 중합효소 TNA1_pol 아미노산 서열은 KOD DNA 중합효소 (gi:52696275)와 91.0% 상동성, 딥 벤트 DNA 중합효소(gi:436495)와 82.0% 상동성 및 pfu DNA 중합효소(gi:18892147)와 79.0% 상동성을 보였다. PCR 증폭에 있어서 중합효소 TNA1_pol의 성능을 확인하기 위하여,

TNA1_{pol} DNA 는 상기 언급한 바와 같이 중합효소 전장 길이로부터 인테인을 제거하여 제조되었다.

[0026] 인테인 (intein)을 포함하지 않는 DNA 중합효소의 성숙한 형태는 다음과 같이 제조되었다. 오버랩핑 서열을 포함하도록 디자인된 프라이머를 이용하여, TNA1-pol의 N-말단 부분 및 C-말단 부분을 각각 증폭하였다. 그 다음, 제한효소 *NdeI* 및 *XhoI* 부위에 의해 플랭크 (flank)된 성숙한 TNA1_{pol} 유전자의 전장 길이가 두 개의 프라이머 및 주형으로서 상기 N-말단 및 C-말단 부분 증폭된 PCR 분질의 혼합물을 이용하여 증폭되었다. 증폭된 서열은 제한효소 *NdeI* 및 *XhoI*으로 소화되었고, 제한효소 *NdeI* 및 *XhoI* 으로 소화된 플라스미드 벡터 pET-24a(+)에 연결되었다. 연결물 (ligate)은 대장균 DH5 α에 형질전환되었다. 정확한 구조체를 가진 후보자들이 제한효소에 의하여 확인되었고, 클론의 DNA 서열을 분석하여 성숙된 DNA 중합효소의 유전자를 함유하는 것이 확인하여 야생형의 DNA 중합효소 TNA1_{pol}를 제조하였다. 상기 TNA_{pol}의 특정부위를 돌연변이화 시키기 위하여, 기존의 프로토콜에 따라 각각의 특정 부위에 해당하는 다양한 합성 프라이머들을 사용하여 중합효소 연쇄반응 (PCR)을 이용하여 특정 부위에 돌연변이화 (site-directed mutagenesis)를 유도하였다. 상기 돌연변이 된 DNA 중합효소의 활성을 검증하여 긴(long) 사슬 증폭이 가능한 DNA 중합효소를 탐색하여, 서열번호 2의 DNA 중합효소를 발명하였다.

[0027] 실시예 2. 긴(long) PCR 활성 검증

[0028] 본 발명에 따라 제조된 DNA 중합효소의 활성을 검증하기 위하여 인간의 게놈 DNA PCR에 하기 표1의 프라이머를 이용하여 DNA 중합활성을 검증하였다.

표 1

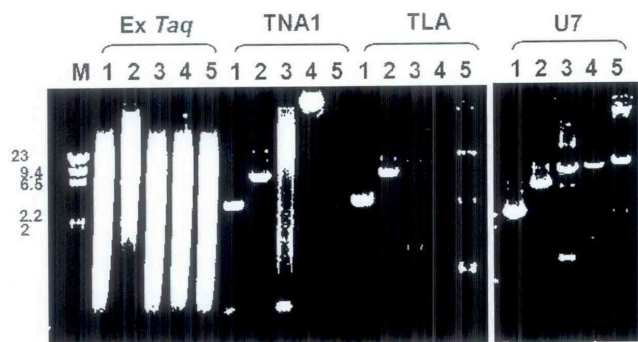
Top	Bottom	Size
HpbF(서열번호 5)	HpeR(서열번호 6)	2.7
HpaF(서열번호 3)	HpeR(서열번호 6)	6.25
HpbF(서열번호 5)	HpgR(서열번호 7)	10.4
RH1098F(서열번호 4)	HpeR(서열번호 6)	15.4
RH1022F(서열번호 8)	RH1053R(서열번호 9)	13.5

[0029] 이의 검증 결과 도 1에 나타난 바와 같이 본 발명의 DNA 중합효소가 긴(long) 사슬의 인간 유전체의 증폭에 효과적인 것을 확인하였다.

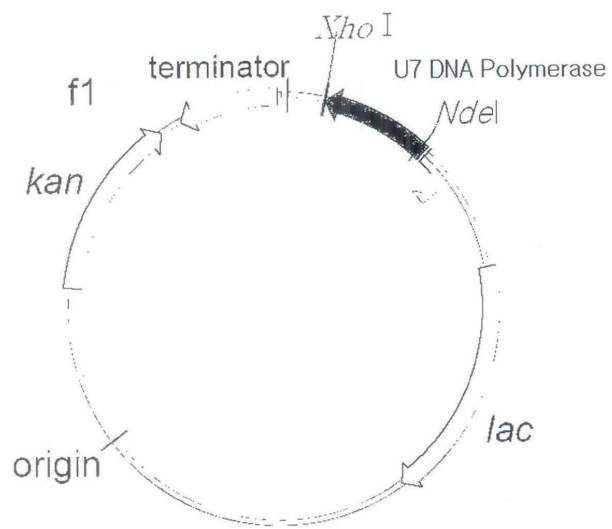
[0030] 이의 검증 결과 도 1에 나타난 바와 같이 본 발명의 DNA 중합효소가 긴(long) 사슬의 인간 유전체의 증폭에 효과적인 것을 확인하였다.

도면

도면1



도면2



서열 목록

[서열목록 전자파일 첨부](#)