

**(19) 대한민국특허청(KR)****(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2020년02월04일

(11) 등록번호 10-2073066

(24) 등록일자 2020년01월29일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C12Q 1/48* (2006.01) *C12Q 1/25* (2006.01)  
*C12Q 1/32* (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2014-7025279
- (22) 출원일자(국제) 2013년02월08일  
 심사청구일자 2018년02월07일
- (85) 번역문제출일자 2014년09월05일
- (65) 공개번호 10-2015-0031220
- (43) 공개일자 2015년03월23일
- (86) 국제출원번호 PCT/JP2013/053146
- (87) 국제공개번호 WO 2013/118894  
 국제공개일자 2013년08월15일
- (30) 우선권주장  
 JP-P-2012-026534 2012년02월09일 일본(JP)  
 JP-P-2012-069625 2012년03월26일 일본(JP)
- (56) 선행기술조사문헌  
 US06846638 B2\*  
 US20060269915 A1\*  
 The Journal of Biological Chemistry, Vol.  
 241, pp. 839-845 (1966.)\*  
 \*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자  
 아지노모토 가부시카가이사  
 일본국 도쿄도 주오구 교바시 1쵸메15반1고  
 고리쓰다이가쿠호진 도야마켄리쓰다이가쿠  
 일본국 도야마켄 이미즈시 구로카와 5180
- (72) 발명자  
 아사노 야스히사  
 일본 도야마켄 9390398 이미즈시 쿠로카와 5180  
 도야마켄립 대학 내  
 카메야 마사후미  
 일본 도야마켄 9390398 이미즈시 쿠로카와 5180  
 도야마켄립 대학 내
- (74) 대리인  
 장훈

전체 청구항 수 : 총 11 항

심사관 : 황상필

**(54) 발명의 명칭 대상 물질의 정량 방법****(57) 요약**

아미노산으로 대표되는 대상 물질을 정량하는 방법을 제공한다. 본 발명의 방법은, 다음 공정을 포함한다: 대상 물질에, 대상 물질의 변환과 함께 아데노신 3인산(ATP)을 기질로 하여 피로인산을 생성할 수 있는 효소를 작용시켜서, 피로인산을 생성시키는 공정; 생성된 피로인산에, 아데노신-인산(AMP) 및 포스포에놀피루브산(PEP) 존재 하에, 피로인산 피루브산 디키나제(PPDK)를 작용시켜서, ATP, 인산, 및 피루브산을 생성시키는 공정; 및 생성된 피루브산을 정량하는 공정을 포함한다. 그리고, 수득된 피루브산량에 기초하여 대상 물질량을 결정한다. 본 발명에 의하여, 무기 인산이나 요소와 같은 각종 협잡 물질을 다량으로 포함하는 생체 유래의 시료 중의 아미노산을, 협잡 물질의 영향을 받지 않고 간이, 신속하게 정량할 수 있다.

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

삭제

#### 청구항 2

삭제

#### 청구항 3

삭제

#### 청구항 4

삭제

#### 청구항 5

삭제

#### 청구항 6

아미노산, 및 ATP에, 이 아미노산에 대응하는 아미노아실 tRNA 합성 효소(AARS)를, (아미노아실 AMP)-AARS 복합체 분해 시약 존재 하에 작용시켜서, 반응 생성물을 수득하는 공정 (A); 및

공정 (A)의 생성물 중 어느 하나를 정량하는 공정 (B)

을 포함하고,

수득된 생성물량에 기초하여 아미노산량을 결정하는, 아미노산을 정량하는 방법으로서,

상기 방법이 tRNA의 부재하에 수행되는 방법.

#### 청구항 7

제6항에 있어서, 복합체 분해 시약이 아민류 또는 카르바니온인, 방법.

#### 청구항 8

제7항에 있어서, 복합체 분해 시약이 하이드록실 아민, 하이드라진 또는 메틸 아민인, 방법.

#### 청구항 9

삭제

#### 청구항 10

제6항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 하나의 시료 중의 2종류 이상의 아미노산을 정량하기 위한 방법으로서,

정량 대상 아미노산의 각각에 대응하는 AARS를 준비하고,

AARS 이외의 다른 필요 성분을 포함하는 반응 시약을 준비하고,

반응 시약과 시료를 혼합하고,

혼합물을, 적어도 대상 아미노산의 종류의 수로 분할하고, 그리고,

각 분할물에 다른 AARS를 첨가하는 공정을 포함하는, 방법.

**청구항 11**

제6항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, AARS가 호열성 생물 유래이고, 공정 (A)를 50℃ 이상에서 실시하는, 방법.

**청구항 12**

제6항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 공정 (B)에서 정량되는 생성물이, 피로인산이고,

공정 (B)가, 생성된 피로인산에, AMP 및 포스포에놀피루브산(PEP) 존재 하에, 피로인산 피루브산 디키나제(PPDK)를 작용시켜서, ATP, 인산, 및 피루브산을 생성시키는 공정; 및

생성된 피루브산을 정량하는 공정

을 포함하고,

피루브산을 정량하는 공정이,

피루브산에, (i) 젓산 탈수소 효소, (ii) 피루브산 산화 효소, (iii) 피루브산 탈탄산 효소 및 알코올 탈수소 효소, 또는 (iv) 피루브산 탈탄산 효소 및 알데히드 탈수소 효소를 작용시키는 공정을 거치는 것인, 방법.

**청구항 13**

제6항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 시료 중의 아미노산을 정량하기 위한 방법이고,

공정 (B)에서 정량되는 생성물이, 피로인산이고,

공정 (B)가, 생성된 피로인산에, AMP 및 PEP 존재 하에, 피로인산 피루브산 디키나제(PPDK)를 작용시켜서, ATP, 인산, 및 피루브산을 생성시키는 공정; 및

생성된 피루브산을 정량하는 공정

을 포함하고,

시료가 ATP 또는 인산을 포함하고 있어도 좋은, 방법.

**청구항 14**

제13항에 있어서, 시료가 혈액 유래인, 방법.

**청구항 15**

삭제

**청구항 16**

삭제

**청구항 17**

삭제

**청구항 18**

제6항 내지 제8항 중 어느 한 항에 기재된 아미노산을 정량하는 방법에 사용하기 위한 키트로서, 당해 방법이,

공정 (B)에서 정량되는 생성물이, 피로인산이고,

공정 (B)가, 생성된 피로인산에, AMP 및 PEP 존재 하에, 피로인산 피루브산 디키나제(PPDK)를 작용시켜서, ATP, 인산, 및 피루브산을 생성시키는 공정; 및

생성된 피루브산을 정량하는 공정

을 포함하고,

ATP, AARS, AMP, PEP, 및 피루브산 디키나제(PPDK)를 단독으로 또는 어느 2종 이상의 혼합물로서 포함하는, 키

트.

**청구항 19**

삭제

**청구항 20**

제6항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 공정 (B)에서 정량되는 생성물이, 피로인산이고, 피로인산을 정량하는 공정이, 피로인산에, 피로인산 피루브산 디키나제(PPDK)를 작용시키는 공정을 거치는 것인, 방법.

**청구항 21**

제6항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 공정 (B)에서의 생성물의 정량이, 흡광도를 측정함으로써 행해지는, 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] **관련 출원의 상호 참조**

[0002] 본 출원은, 2012년 2월 9일에 일본국 특허청에 출원된 출원 번호·특원2012-026534 및 2012년 3월 26일에 일본국 특허청에 출원된 출원 번호·특원2012-069625에 기초한 우선권을 주장한다. 이들 출원 중의 모든 기재는 본원에 채용된다.

[0003] **기술분야**

[0004] 본 발명은, 피로인산을 피로인산 피루브산 디키나제(PPDK)에 의하여 반응시키고, 생성물인 피루브산을 정량함으로써, 아데노신 3인산(ATP)이나 무기 인산이 공존하는 반응계에 적합한 피로인산 정량법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은, 메티오닌을 아데노실메티오닌 합성 효소(AdoMetS), 시트룰린을 아르기니노숙시네이트 합성 효소(ASS), 아르기닌을 아르기닌 데이미나제(ADI)와 ASS에 의하여 반응시키고, 생성된 피로인산을 상기 피로인산 정량법으로 측정함으로써, 상기 아미노산을 정량하는 방법에 관한 것이다.

[0005] 또한, 본 발명은, 아미노산을 아미노아실 tRNA 합성 효소(AARS)와 (아미노아실AMP)-AARS 복합체 분해 시약 존재 하에 반응시키고, 이의 생성물을 정량함으로써, 시료 중의 아미노산의 함유량을 측정하는 방법에 관한 것이다.

[0006] 본 발명은, 선천성 대사 이상증의 스크리닝 등의 의료 분야, 단백질 가수분해물의 분석 등의 생화학 분야, 및 식품 또는 화장품에서의 성분 검사 등의 식품 또는 화장품 관련 분야 등에서 유용하다.

**배경 기술**

[0007] 혈중을 비롯한 생체 시료 중의 아미노산은 다양한 질병 검출을 위한 마커가 되고, 이의 정량법의 개발은 의료적 견지에서 강하게 요망되고 있다. 또한, 효소를 사용한 아미노산의 정량법은, 선택성이 높고 온화한 조건에서 신속히 실시할 수 있다는 우수한 특징을 갖고 있고, 실제의 의료 현장에서 다수의 시료에 대하여 실시하기에 적합한 수법이라고 생각되고 있다. 특히, 메티오닌은 호모시스틴뇨증 환자에서 고농도로 축적되는 것이 알려져 있어, 임상에서는 매스·스크리닝을 위한 중요한 바이오마커가 된다. 또한, 시트룰린과 아르기닌은 요소(urea) 회로 중의 대사물의 하나이며, 시트룰린뇨증이나 아르기나제 결손증을 비롯한 요소 회로 대사 이상의 바이오마커가 된다. 이들 아미노산의 간이·신속한 정량 방법은, 상기 질병 검출을 위한 매스·스크리닝으로의 적용도 기대된다.

[0008] 메티오닌의 효소적 정량법으로서는, 메티오닌 감마 리아제를 사용한 정량법(비특허문헌 1)이 알려져 있고, 또한, 기능 개변 페닐알라닌 탈수소 효소를 사용한 정량법(특허문헌 1)이 호모시스틴뇨증의 매스·스크리닝에 유효한 것이 알려져 있다. 그러나, 메티오닌 감마 리아제를 사용한 방법에서는, 암모니아도 메티오닌과 동일하게 검출된다. 혈중에서 암모니아는 일반적으로 20 내지 50 μM 존재하고 있고, 이것은 혈중 Met 농도와 동등 이상의 오더이다. 또한, 혈중 암모니아 농도는 운동이나 단백질 섭취 등에 의해서도 변동되므로, 이 수법에 의한 혈액 시험은 암모니아의 영향을 크게 받는다. 또한, 메티오닌 감마 리아제는 메티오닌 이외에도 시스테인, 호

모시스테인 등의 함황 아미노산에 대해서도 반응성을 갖는다. 이들 함황 아미노산을 갖는 샘플에서는 이 정량법에 의해 메티오닌을 선택적으로 정량하는 것은 곤란하다. 또한, 기능 개변형 페닐알라닌 탈수소 효소는 메티오닌 이외에 다른 분기쇄 아미노산과 반응성을 갖기 때문에, 분기쇄 아미노산 제거의 전처리가 필요해진다.

- [0009] 시트룰린의 정량법으로서, 시트룰린을 디아세틸모노옥심과 반응시켜서, 생성물의 발색을 검출하는 수법이 알려져 있는데(비특허문헌 2), 요소나 그 유연(類緣) 화합물도 시트룰린과 동일하게 반응하기 때문에, 요소를 다량으로 포함하는 생체 시료에 대해서는 이용할 수 없다. 또한, 산성·고온에서의 인큐베이션이란 번쇄(煩碎)한 조작을 필요로 하고, 정지법이기 때문에, 경시적인 시트룰린 생성을 모니터링할 수 없는 등의 문제를 갖고 있다. 그리고, 시트룰린의 정량을 위해 효소를 사용하는 수법은 아직 알려져 있지 않다.
- [0010] 아르기닌의 효소적 정량법으로서, 아르기나제와 우레아제를 사용한 정량법(특허문헌 2)이 알려져 있다. 이 정량법에서는, 요소나 암모니아도 아르기닌과 동일하게 검출되므로, 이것들을 포함하는 생체 시료에 대해서는 이용할 수 없다.
- [0011] 한편, 피로인산의 효소적 정량법으로서, 피로포스파타제에 의하여 피로인산으로부터 무기 인산을 생성시키고, 무기 인산을 각종 검출법으로 정량하는 수법이 있다(I-a). 이 원리를 이용한 것으로서, Invitrogen사로부터 PiPerPyrophosphate Assay Kit가, Probe사로부터 EnzChek Pyrophosphate Assay Kit가 시판되고 있다. 그러나, 이 측정법은, 무기 인산도 피로인산과 동일하게 검출되기 때문에, 무기 인산을 협잡 물질로서 포함하는 시료에 대해서는 이용할 수 없다. 또한, 피로인산의 효소적 정량법으로서, ATP 설프릴라제 또는 PPDK에 의하여 피로인산으로부터 ATP를 생성시키고, ATP를 각종 검출법으로 정량하는 수법(I-b)이 있다(특허문헌 3 및 4). 이 원리에 기초한 것으로서, Lanza Rockland사로부터 PPLight Inorganic Pyrophosphate Assay Kit가 시판되고 있다. 여기서의 ATP의 검출에는, 루시페라제에 의한 발광법, 또는 사이클링 어세이법이 사용된다. 그러나, 원리상, ATP를 협잡 물질로서 포함하는 시료에 대해서는 실시 불가능하고, 또한, 발광법에서의 검출은, 발광이 시간 경과와 함께 급격히 감소하므로, 고가의 발광 측정 기기를 사용하여 엄밀한 측정 환경에서 측정할 필요가 있다. 사이클링 어세이에 의한 검출은, 고감도인 한편으로, 흡광도를 모니터링하고, 엄밀한 반응 속도를 산출할 필요가 있는 등, 측정은 번쇄해진다. 또한, 이 원리에 기초한 측정에는, ATP를 함유하는 시료 중에서도 측정 가능하도록 개량한 수법도 알려져 있지만(특허문헌 5 참조), 이것은 전처리로서 ATP 제거를 실시하고, 그 후 피로인산 정량을 실시한다고 하는 공정을 채용하는 것이다. 따라서, 반응계로써 ATP를 제거해버려도 문제가 없는 경우라면 적용할 수 있지만, ATP를 공존시켜 두고자 하는 반응계에서는 이용할 수 없다.
- [0012] 또한, 하이포크산틴 포스포리보실 트랜스퍼라제에 의해 피로인산으로부터 하이포크산틴을 생성하고, 하이포크산틴을 정량하는 수법(I-c)도 알려져 있다(특허문헌 6). 이 수법은 반응 기질에 무기 인산 및 ATP를 포함하지 않고, 이들 화합물의 존재에 영향을 받지 않고 피로인산을 측정할 수 있다. 하지만, 이 수법에서는 피로인산 소비와 함께 ATP를 재생할 수 없다.
- [0013] 다른 한편, 아미노아실 tRNA 합성 효소(AARS)는 특정한 1종류의 아미노산과 ATP와 tRNA를 기질로 하고, 아미노아실 tRNA와 AMP와 피로인산을 생성하는 효소이다. 단백질 구성 아미노산 각각에 대응하는 AARS가 존재한다. 이하, 각 아미노산에 대응하는 AARS에 대하여, 아미노산명과 「RS」를 연결하여 표기한다. 예를 들어, 알라닌에 대응하는 AARS는 「AlaRS」, 시스테인에 대응하는 AARS는 「CysRS」라고 표기한다.
- [0014] AARS는 아미노산에 대하여 극히 높은 기질 특성을 나타내는 것이 알려져 있다. 이 효소에 의한 반응은 이하의 2단계 반응으로 이루어진다.
- [0015] [수학식 1]
- [0016] (반응식 1) 아미노산+ATP+AARS ⇌ (아미노아실 AMP)-AARS 복합체+피로인산
- [0017] (반응식 2) (아미노아실 AMP)-AARS 복합체+tRNA ⇌ 아미노아실 tRNA+AMP+AARS
- [0018] (반응 전체) 아미노산+ATP+tRNA ⇌ 아미노아실 tRNA+AMP+피로인산
- [0019] 또한, 상기 반응식과 같이, 「(아미노아실 AMP)-AARS 복합체」가 형성되는 것, 또한, 이 복합체는 강고해서, tRNA 비존재 하에서는 AARS가 복합체로서 트랩된 채로 되는 것 등은, 비특허문헌 3 등에서 알려져 있다. 또한, 비특허문헌 3에는 상기 복합체에 하이드록실 아민을 첨가하면, 복합체가 분해하여 아미노산 하이드록삼산과 AMP가 생성되는 것도 기재되어 있다.
- [0020] 비특허문헌 4에서는, 미량의 tRNA를 첨가하고, 시료 중 아미노산 중 일부를 상기 반응식 1 및 2에서 반응시키는

아미노산 정량법이 보고되어 있다.

[0021] 특허문헌 7 및 특허문헌 8에서는 tRNA는 첨가하지 않고, 시료 중 아미노산 중 일부를 상기 반응식 1에 유사한 반응만으로 반응시키는 아미노산 정량법이 보고되어 있다.

### 선행기술문헌

#### 특허문헌

[0022] (특허문헌 0001) 특허문헌 1: 일본 공개특허공보 특개2008-86312, 기능 개변 페닐알라닌 탈수소 효소를 사용한 생체 시료 중의 L-메티오닌의 분석 방법  
 (특허문헌 0002) 특허문헌 2: 일본 공개특허공보 특개평8-336399, 아르기닌 검출 방법 및 아르기닌 센서  
 (특허문헌 0003) 특허문헌 3: 일본 공개특허공보 특개2009-225784, 피로인산의 측정 방법  
 (특허문헌 0004) 특허문헌 4: 일본 공개특허공보 특개2007-097471, 염기 서열 결정 방법과 시약  
 (특허문헌 0005) 특허문헌 5: 일본 공개특허공보 특개2006-187251, 피로인산의 정량 방법  
 (특허문헌 0006) 특허문헌 6: 일본 공개특허공보 특개2003-174900, 피로인산과 핵산의 정량 방법 및 그 장치  
 (특허문헌 0007) 특허문헌 7: 2011-50357, 아미노산의 분석 방법 및 바이오센서  
 (특허문헌 0008) 특허문헌 8: 2006-166709, 아미노산 분석용 바이오센싱 장치 및 아미노산 분석용 바이오센서 및 아미노산 분석용 아미노아실 tRNA 신세타제

#### 비특허문헌

[0023] (비특허문헌 0001) 비특허문헌 1: 평성 5년도 후생성 심신 장애 연구 「매스·스크리닝 시스템의 평가 방법에 관한 연구」 pp. 237-240(1993)  
 (비특허문헌 0002) 비특허문헌 2: Boyde, T. R. & Rahmatullah, M. (1980). Optimization of conditions for the colorimetric determination of citrulline, using diacetyl monoxime. Anal Biochem 107, 424-431.  
 (비특허문헌 0003) 비특허문헌 3: Baldwin, A. N. & Berg, P. (1966). Transfer ribonucleic acid-induced hydrolysis of valyladenylate bound to isoleucyl ribonucleic acid synthetase. J Biol Chem 241, 839-845.  
 (비특허문헌 0004) 비특허문헌 4: Forbes, C. D., Myung, J., Szewczak, A. A. & Landro, J. A. (2007). A high-throughput competitive scintillation proximity aminoacyl-tRNA synthetase charging assay to measure amino acid concentration. Anal Biochem 363, 246-254.

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

[0024] 혈장을 비롯한 생체 시료 중에는, 무기 인산이나 요소를 비롯한 각종의 협잡 물질을 다량으로 포함하고, 대상 물질의 분석법은 이들 협잡 물질의 영향을 받지 않는 것이 요구된다.

[0025] 한편, 측정 대상 물질과 함께 ATP를 기질로 하여 피로인산을 생성하는 효소는, 그 기질 특이성의 높이나, 발(發) 에르곤 반응(exergonic reaction)인 ATP 가수분해에 의해 높은 반응성을 가지므로, 측정용 효소로서 매우 유망하다. ATP 가수분해에 의한 반응성의 높이는 구체적으로는, 반응이 불가역적으로 진행될 수 있는 것, 고속으로 반응이 진행될 수 있는 것, 국소적으로는 에너지적으로 불리하기 때문에 ATP 가수분해가 없으면 진행되지 않는 바와 같은 다양한 반응이 진행될 수 있는 것, 등으로 설명할 수 있다. 또한, 피로인산 생성 효소의 사용은, 피로인산의 혈중 농도는 수  $\mu\text{M}$  이하이고, 수십  $\mu\text{M}$  또는 수백  $\mu\text{M}$  오더로 존재하는 아미노산보다도 대폭 낮으므로, 검체 유래의 피로인산이 혼입되었다고 해도 아미노산 정량값에 주는 영향은 극히 작다는 이점도 있다. 그리고, 이러한 피로인산 생성 효소를 생체 시료 분석에 적용하는 전제로서 피로인산을 정량할 필요가

있고, 이 피로인산 정량을 위한 방법에는 하기가 요구된다.

[0026] · 무기 인산을 다량으로 포함하는 생체 시료에서도 실시 가능할 것.

[0027] · ATP를 기질로 하는 피로인산 생성 효소와 공역시키기 위하여, ATP의 존재 하에 실시 가능할 것.

[0028] · 효소 반응의 생성물 축적의 회피 및 기질 재생을 위해, 피로인산으로부터 ATP를 재생할 수 있을 것.

[0029] 하지만 이들 요건을 충족시키는 피로인산 정량법은 알려져 있지 않고, 따라서, 상기 피로인산 생성 효소를 이용한 아미노산의 측정이 실용화되는데에는 이르지 않고 있다.

[0030] 한편, AARS는 아미노산에 대하여 극히 높은 기질 특성을 나타내는 것이 알려져 있어, 아미노산 정량용 효소로서 유망한 효소이다.

[0031] 비특허문헌 4의 정량법은, 시료와 ATP와 tRNA와 방사성 라벨된 측정 대상 아미노산을 혼합한 후, AARS와 작용시키고, 생성된 아미노아실 tRNA를 비즈에 흡착시키고, 그 방사선량을 측정함으로써 측정 대상 아미노산을 정량하는 수법이다. 비특허문헌 4의 정량법에서는, 생성물 중에 들어간 라벨 완료 아미노산의 존재비를 산출하기 때문에, 방사성 동위체의 사용은 불가피하다. 그 때문에, 이 정량법은, 방사성 동위체의 취급이 가능한 환경에서 밖에 사용할 수 없다. 또한, 이 정량법에서는, 비즈에 의한 흡착·분리 등 번잡한 공정도 필요해진다. 또한, 이 정량법에서는, 반응액에 tRNA를 최대 0.5mg/ml라는 고농도로 첨가하고 있다. 그러나, 이것을 측정 대상 아미노산에 대응하는 tRNA의 몰 농도로 환산하면,  $30(\mu\text{g}) \div 60(\mu\text{l}) \div 30,000(\text{g/mol}) \div 20 = 0.8 \mu\text{M}$ 이 된다(tRNA의 분자량을 30,000으로 하고, 각 아미노산에 대응하는 20종의 tRNA가 등량씩 포함되어 있다고 가정한 경우). 수득된 반응 생성물의 몰 농도는 상기 농도 이하가 되지만, 방사성 동위체를 사용하지 않고 이러한 미량의 화합물을 정량하는 것은 어렵다. 따라서, 비특허문헌 4와 같이 tRNA를 첨가하는 수법에서는, 극히 미량의 반응 생성물을 검출하지 않을 수 없으므로, 방사성 동위체의 사용은 불가피하다고 할 수 있다.

[0032] 특허문헌 7 및 특허문헌 8의 정량법은, 아미노산과 ATP와 AARS만을 반응시켜(이후, 「tRNA 비첨가 조건」이라고 함), 생성물을 검출하는 수법이다. 본 정량법에서는 tRNA가 존재하지 않으므로, 상기 반응식 2는 진행할 수 없다고 생각된다.

[0033] 특허문헌 7 및 특허문헌 8에서는, 반응식 1과 같은 (아미노아실 AMP)-AARS 복합체의 존재는 논하고 있지 않고, AARS는 이하의 반응식 1'을 촉매하는 것으로서 서술되어 있다. 반응식 1'과 같이 반응이 진행되고, 또한, 평형은 완전하게 오른쪽으로 기울어져 있다고 가정한 경우, 아미노산과 동등한 몰수의 피로인산이 생성되고, 피로인산 정량에 의해 아미노산 정량이 가능하다고 생각된다. 그러나, 어느 쪽의 특허문헌에서도, 반응식 1이 아니고 반응식 1'이 진행된다는 주장의 근거는 개시되어 있지 않다.

[0034] [수학식 2]

[0035] (반응식 1') 아미노산+ATP  $\rightleftharpoons$  아미노아실 AMP+피로인산

[0036] 본 발명자들은, 특허문헌 7 및 특허문헌 8과 같이, tRNA 비첨가 조건으로 측정을 실시하였다. 그러나, 적어도 발명자들이 사용한 검출법에서는, 유의한 피로인산 생성을 검출할 수 없었다(실시예 6의 11., 하이드록실 아민 비첨가 샘플 참조). 유의한 피로인산 생성이 보이지 않은 원인으로서는, 실제로 일어나는 반응은 상기 반응식 1'이 아니라 상기 반응식 1이다라고 생각된다. 반응식 1에서는, 아미노산이 1분자 반응하는 동시에, AARS가 복합체 형성을 위해 1분자 소비된다. 그 때문에, 적어도 시료 중 아미노산 이상의 몰 농도의 AARS를 계에 첨가하지 않는 한, 시료 중 아미노산량과 동등량의 피로인산을 생성시키는 것은 원리상 불가능하다.

[0037] 본 발명자들의 실시예 6의 11.에 있어서, 반응액 중의 AARS 농도는 약 9 μM정도이고, 아미노산 농도에 비하여 현저히 낮다. 또한, 특허문헌 7 및 특허문헌 8, 비특허문헌 4에 있어서도, 측정 대상 아미노산 이상의 몰 농도의 AARS를 계에 첨가하였다는 기술은 없다. 특허문헌 2의 단락 [0024]에서는, 0 내지 100 μM 아미노산을 정량할 때의 AARS 농도는 10 μM이고, 아미노산 농도 이상의 AARS는 첨가하고 있지 않다고 할 수 있다. 따라서, 특허문헌 7 및 특허문헌 8의 수법에 있어서, 가령 반응식 1이 최대한 진행되었다고 가정해도, 시료 중 아미노산 중 극히 일부밖에 반응에 사용할 수 없고, 생성물도, 또한, 소량이라고 생각하는 것이 타당하다. 이것을 부정하는 데이터는 상기 특허문헌 중에 개시되어 있지 않다.

[0038] 시료 중 아미노산에 대하여 극히 소량의 생성물밖에 생기지 않는 경우, 특허문헌 7에서 사용되고 있는 형광법이나 센서 전극 등에 의한 고감도 검출계가 불가결해지고, 흡광도법 등 널리 사용되고 있는 검출계에서는 검출 불가능해진다. 또한, 고감도 검출계를 사용한 경우라도, 감도의 저하나 측정치의 편차, 백그라운드값의 상승 등

여러 가지 문제점의 원인이 된다.

[0039] 이상과 같이, AARS를 사용한 공지의 아미노산 정량법은 방사성 동위원체를 사용한 번잡한 공정을 필요로 하는 것, 또한, 시료 중 아미노산 중 극히 일부밖에 반응할 수 없는 것 등의 문제점을 갖고 있어, 널리 사용되는데에는 이르지 않았다.

**과제의 해결 수단**

[0040] 본 발명자들은, PPKK를 피로인산과 반응시켜 생성되는 피루브산을 피루브산 탈수소 효소 또는 피루브산 산화 효소와 반응시킴으로써 무기 인산이나 ATP의 공존에 영향을 받지 않고, 또한, ATP 재생이 가능한 피로인산 정량이 가능한 것을 발견하였다.

[0041] 또한, AdoMetS를 메티오닌과 반응시켜, 생성되는 피로인산을 상기 피로인산 정량계로 측정함으로써, 메티오닌 선택적인 정량이 전처리 없이 가능한 것을 발견하여, 메티오닌 정량계로서 완성시켰다. 또한, ASS를 시트룰린과 반응시켜, 생성되는 피로인산을 상기 피로인산 정량계로 측정함으로써, 시트룰린 선택적인 정량이 온화한 조건에서 가능한 것을 발견하여, 시트룰린 정량계로서 완성시켰다. 또한, ADI를 아르기닌과 반응시켜, 생성되는 시트룰린을 상기 시트룰린 정량계로 측정함으로써, 아르기닌 선택적인 정량이 가능한 것을 발견하여, 아르기닌 정량계로서 완성시켰다.

[0042] 또한, 본 발명자들은, tRNA 비첨가 조건 하의 AARS 반응액에서 유의한 피로인산 생성이 보이지 않는 한편으로, (아미노아실 AMP)-AARS 복합체를 분해하는 시약을 첨가함으로써, 시료 중 아미노산과 동등량의 피로인산이 생성되는 것을 찾아냈다. 그래서, 반응액 중의 거의 전량의 아미노산을 상기 반응식 1과 복합체 분해 반응으로 반응시키는 것을 특징으로 하는 고감도 및 오차가 적은 아미노산 정량이 가능한 것을 발견하여, 본 발명을 완성하였다.

[0043] [1] 대상 물질을 정량하는 방법으로서:

[0044] 대상 물질에, 대상 물질의 변환과 함께 아데노신 3인산(ATP)을 기질로 하여 피로인산을 생성할 수 있는 효소를 작용시켜서, 피로인산을 생성시키는 공정;

[0045] 생성된 피로인산에, 아데노신-인산(AMP) 및 포스포에놀피루브산(PEP) 존재 하에 피로인산 피루브산 디키나제(PPDK)를 작용시켜서, ATP, 인산, 및 피루브산을 생성시키는 공정; 및

[0046] 생성된 피루브산을 정량하는 공정

[0047] 을 포함하고, 수득된 피루브산량에 기초하여 대상 물질량을 결정하는, 대상 물질을 정량하는 방법.

[0048] [2] 대상 물질이 아미노산인, [1]에 기재된 방법.

[0049] [3] 메티오닌에, ATP 존재 하에, 아데노실메티오닌 합성 효소(AdoMetS)를 작용시켜서, 아데노실메티오닌, 및 피로인산을 생성시키는 공정;

[0050] 생성된 피로인산에, AMP 및 포스포에놀피루브산(PEP) 존재 하에, PPKK를 작용시켜서, ATP, 인산, 및 피루브산을 생성시키는 공정; 및

[0051] 생성된 피루브산을 정량하는 공정

[0052] 을 포함하고, 수득된 피루브산량에 기초하여 메티오닌량을 결정하는, 메티오닌을 정량하는 방법.

[0053] [4] 시트룰린에, 아스파라긴산 및 ATP 존재 하에, 아르기닌노숙시네이트 합성 효소(ASS)를 작용시켜서, AMP, 아르기닌노숙신산, 및 피로인산을 생성시키는 공정;

[0054] 생성된 피로인산에, AMP 및 PEP 존재 하에, PPKK를 작용시켜서, ATP, 인산, 및 피루브산을 생성시키는 공정; 및

[0055] 생성된 피루브산을 정량하는 공정

[0056] 을 포함하고, 수득된 피루브산량에 기초하여 시트룰린량을 결정하는, 시트룰린을 정량하는 방법.

[0057] [5] 아르기닌에, 아르기닌 데이미나제(ADI)를 작용시켜서, 암모니아, 및 시트룰린을 생성시키는 공정:

[0058] 생성된 시트룰린에 ASS를 작용시켜서, AMP, 아르기닌노숙신산, 및 피로인산을 생성시키는 공정;

[0059] 생성된 피로인산에, AMP 및 PEP 존재 하에, PPKK를 작용시켜서, ATP, 인산, 및 피루브산을 생성시키는 공정; 및



- [0060] 생성된 피루브산을 정량하는 공정
- [0061] 을 포함하고, 수득된 피루브산량에 기초하여 아르기닌량을 결정하는, 아르기닌을 정량하는 방법.
- [0062] [6] 아미노산, 및 ATP에, 이 아미노산에 대응하는 아미노아실 tRNA 합성 효소(AARS)를 (아미노아실 AMP)-AARS 복합체 분해 시약 존재 하에, 작용시켜서, 피로인산을 수득하는 공정 (A); 및
- [0063] 공정 (A)로부터 생성된 피로인산을 정량하는 공정 (B)
- [0064] 를 포함하고,
- [0065] 이 때, 공정 (B)가, 생성된 피로인산에, AMP 및 PEP 존재 하에, PPK를 작용시켜서, ATP, 인산, 및 피루브산을 생성시키는 공정; 및
- [0066] 생성된 피루브산을 정량하는 공정
- [0067] 을 포함하고,
- [0068] 수득된 피루브산량에 기초하여 아미노산량을 결정하는, 아미노산을 정량하는 방법.
- [0069] [7] 복합체 분해 시약이 아민류 또는 카르바미온인, [6]에 기재된 방법.
- [0070] [8] 복합체 분해 시약이 하이드록실 아민, 하이드라진 또는 메틸 아민인, [7]에 기재된 방법.
- [0071] [9] tRNA 비존재 하에 행해지는, [6] 내지 [8] 중 어느 하나에 기재된 방법.
- [0072] [10] 하나의 시료 중의 2종류 이상의 아미노산을 정량하기 위한 [6] 내지 [9] 중 어느 하나에 기재된 방법으로서,
- [0073] 정량 대상 아미노산의 각각에 대응하는 AARS를 준비하고,
- [0074] AARS 이외의 다른 필요 성분을 포함하는 반응 시약을 준비하고,
- [0075] 반응 시약과 시료를 혼합하고,
- [0076] 혼합물을 적어도 대상 아미노산의 종류의 수로 분할하고, 그리고
- [0077] 각 분할물에 다른 AARS를 첨가하는
- [0078] 공정을 포함하는, 방법.
- [0079] [11] AARS가 호열성 생물 유래이고, 공정 (A)를 50℃ 이상에서 실시하는, [6] 내지 [10] 중 어느 하나에 기재된 방법.
- [0080] [12] 피루브산을 정량하는 공정이,
- [0081] 피루브산에, (i) 젓산 탈수소 효소, (ii) 피루브산 산화 효소, (iii) 피루브산 탈탄산 효소 및 알코올 탈수소 효소, 또는 (iv) 피루브산 탈탄산 효소 및 알데히드 탈수소 효소를 작용시키는 공정을 거치는 것인, [1] 내지 [11] 중 어느 하나에 기재된 방법.
- [0082] [13] 시료 중의 대상 물질을 정량하기 위한 방법으로서, 시료가 ATP 또는 인산을 함유하고 있어도 좋은, [1] 내지 [12] 중 어느 하나에 기재된 방법.
- [0083] [14] 시료가 혈액 유래인, [13]에 기재된 방법.
- [0084] [15] [3]에 기재된 메티오닌을 정량하는 방법에 사용하기 위한 키트로서, ATP, AdoMetS, AMP, PEP, PPK를 단독으로 또는 어느 2종 이상의 혼합물로서 포함하는, 키트.
- [0085] [16] [4]에 기재된 시트룰린을 정량하는 방법에 사용하기 위한 키트로서, ATP, ASS, AMP, PEP, PPK를 단독으로 또는 어느 2종 이상의 혼합물로서 포함하는, 키트.
- [0086] [17] [5]에 기재된 아르기닌을 정량하는 방법에 사용하기 위한 키트로서, ATP, ASS, ADI, AMP, PEP, PPK를 단독으로 또는 어느 2종 이상의 혼합물로서 포함하는, 키트.
- [0087] [18] 청구항 6에 기재된 아미노산을 정량하는 방법에 사용하기 위한 키트로서, ATP, AARS, AMP, PEP, PPK를 단독으로 또는 어느 2종 이상의 혼합물로서 포함하는, 키트.

- [0088] [19] 아미노산, 및 ATP에, 이 아미노산에 대응하는 아미노아실 tRNA 합성 효소(AARS)를, (아미노아실 AMP)-AARS 복합체 분해 시약 존재 하에, 작용시켜서, 반응 생성물을 수득하는 공정 (A); 및
- [0089] 공정 (A)의 생성물 중 어느 하나를 정량하는 공정 (B)
- [0090] 를 포함하고, 수득된 생성물량에 기초하여 아미노산량을 결정하는, 아미노산을 정량하는 방법.
- [0091] 본 발명은, 또한, 이하를 제공한다:
- [0092] [1] 피로인산에, 아데노신-인산(AMP) 및 포스포에놀피루브산(PEP) 존재 하에, 피로인산 피루브산 디키나제 (PPDK)를 작용시켜서, 아데노신 3인산(ATP), 인산, 및 피루브산을 생성시키는 공정; 및
- [0093] 생성된 피루브산을 정량하는 공정
- [0094] 을 포함하고, 수득된 피루브산량에 기초하여 피로인산량을 결정하는, 피로인산을 정량하는 방법.
- [0095] [2] 피루브산을 정량하는 공정이,
- [0096] 피루브산에, (i) 젖산 탈수소 효소, (ii) 피루브산 산화 효소, (iii) 피루브산 탈탄산 효소 및 알코올 탈수소 효소, 또는 (iv) 피루브산 탈탄산 효소 및 알데히드 탈수소 효소를 작용시키는 공정을 거치는 것인, [1]에 기재된 방법.
- [0097] [3] 시료 중의 피로인산을 정량하기 위한 방법이고, 시료가 ATP 또는 인산을 함유하고 있어도 좋은, [1]에 기재된 방법.
- [0098] [4] 시료가 혈액 유래인, [3]에 기재된 방법.
- [0099] [5] 대상 물질을 정량하는 방법으로서:
- [0100] 대상 물질에, 대상 물질의 변환과 함께 ATP를 기질로 하여 피로인산을 생성할 수 있는 효소를 작용시켜서, 피로인산을 생성시키는 공정;
- [0101] 생성된 피로인산에, AMP 및 포스포에놀피루브산(PEP) 존재 하에, PPDK를 작용시켜서, ATP, 인산, 및 피루브산을 생성시키는 공정; 및
- [0102] 생성된 피루브산을 정량하는 공정
- [0103] 을 포함하고, 수득된 피루브산량에 기초하여 대상 물질량을 결정하는, 대상 물질을 정량하는 방법.
- [0104] [6] 메티오닌에, ATP 존재 하에, 아데노실메티오닌 합성 효소(AdoMetS)를 작용시켜서, 아데노실메티오닌, 및 피로인산을 생성시키는 공정;
- [0105] 생성된 피로인산에, AMP 및 포스포에놀피루브산(PEP) 존재 하에, PPDK를 작용시켜서, ATP, 인산, 및 피루브산을 생성시키는 공정; 및
- [0106] 생성된 피루브산을 정량하는 공정
- [0107] 을 포함하고, 수득된 피루브산량에 기초하여 메티오닌량을 결정하는, 메티오닌을 정량하는 방법.
- [0108] [7] 시트룰린에, 아스파라긴산 및 ATP 존재 하에, 아르기니노숙시네이트 합성 효소(ASS)를 작용시켜서, AMP, 아르기노숙신산, 및 피로인산을 생성시키는 공정;
- [0109] 생성된 피로인산에, AMP 및 PEP 존재 하에, PPDK를 작용시켜서, ATP, 인산, 및 피루브산을 생성시키는 공정; 및
- [0110] 생성된 피루브산을 정량하는 공정
- [0111] 을 포함하고, 수득된 피루브산량에 기초하여 시트룰린량을 결정하는, 시트룰린을 정량하는 방법.
- [0112] [8] 아르기닌에, 아르기닌 데이미나제(ADI)를 작용시켜서, 암모니아, 및 시트룰린을 생성시키는 공정:
- [0113] 생성된 시트룰린에 ASS를 작용시켜서, AMP, 아르기노숙신산, 및 피로인산을 생성시키는 공정;
- [0114] 생성된 피로인산에, AMP 및 PEP 존재 하에, PPDK를 작용시켜서, ATP, 인산, 및 피루브산을 생성시키는 공정; 및
- [0115] 생성된 피루브산을 정량하는 공정
- [0116] 을 포함하고, 수득된 피루브산량에 기초하여 아르기닌량을 결정하는, 아르기닌을 정량하는 방법.

- [0117] [9] [6]에 기재된 메티오닌을 정량하는 방법에 사용하기 위한 키트로서, ATP, AdoMetS, AMP, PEP, PPDK를 단독으로 또는 어느 2종 이상의 혼합물로서 포함하는, 키트.
- [0118] [10] [7]에 기재된 시트룰린을 정량하는 방법에 사용하기 위한 키트로서, ATP, ASS, AMP, PEP, PPDK를 단독으로 또는 어느 2종 이상의 혼합물로서 포함하는, 키트.
- [0119] [11] [8]에 기재된 아르기닌을 정량하는 방법에 사용하기 위한 키트로서, ATP, ASS, ADI, AMP, PEP, PPDK를 단독으로 또는 어느 2종 이상의 혼합물로서 포함하는, 키트.
- [0120] 본 발명은, 또한, 이하를 제공한다.
- [0121] [1] 아미노산, 및 아데노신 3인산(ATP)에, 이 아미노산에 대응하는 아미노아실 tRNA 합성 효소(AARS)를, (아미노아실 AMP)-AARS 복합체 분해 시약 존재 하에, 작용시켜서, 반응 생성물을 얻는 공정 (A); 및
- [0122] 공정 (A)의 생성물 중 어느 하나를 정량하는 공정 (B)
- [0123] 를 포함하고, 수득된 생성물량에 기초하여 아미노산량을 결정하는, 아미노산을 정량하는 방법.
- [0124] [2] tRNA 비존재 하에 행해지는, [1]에 기재된 방법.
- [0125] [3] 복합체 분해 시약이 아민류 또는 카르바니온인, [1] 또는 [2]에 기재된 방법.
- [0126] [4] 복합체 분해 시약이 하이드록실 아민, 하이드라진 또는 메틸 아민인, [3]에 기재된 방법.
- [0127] [5] 공정 (B)에서의 생성물의 정량이, 흡광도를 측정함으로써 행해지는, [1] 내지 [4] 중 어느 하나에 기재된 방법.
- [0128] [6] 공정 (B)에 있어서 정량되는 생성물이 피로인산이고, 피로인산의 정량이, 피로인산에, 피로인산 피루브산 디키나제(PPDK)를 작용시키는 공정을 거치는 것인, [1] 내지 [5] 중 어느 하나에 기재된 방법.
- [0129] [7] 시료 중의 아미노산을 정량하기 위하여 실시되고, 시료가 혈액 유래인, [1] 내지 [6] 중 어느 하나에 기재된 방법.
- [0130] [8] 하나의 시료 중의 2종류 이상의 아미노산을 정량하기 위한 [1] 내지 [7] 중 어느 하나에 기재된 방법으로서,
- [0131] 정량 대상 아미노산의 각각에 대응하는 AARS를 준비하고,
- [0132] AARS 이외의 다른 필요 성분을 포함하는 반응 시약을 준비하고,
- [0133] 반응 시약과 시료를 혼합하고,
- [0134] 혼합물을, 적어도 대상 아미노산의 종류의 수로 분할하고, 그리고
- [0135] 각 분할물에 다른 AARS를 첨가하는
- [0136] 공정을 포함하는, 방법.
- [0137] [9] AARS가 호열성 생물 유래이고, 공정 (A)를 50℃ 이상에서 실시하는, 청구항 1 내지 8 중 어느 한 항에 기재된 방법.

**발명의 효과**

- [0138] 본 발명의 피로인산 정량법은, 무기 인산 또는 ATP의 존재 하에서도 정량 능력에 영향을 받지 않으므로, 혈액과 같은 협잡물이 많은 시료 중에서 실시할 수 있다. 또한, PPDK를 사용하고 있으므로, ATP를 기질로 하여 피로인산을 생성하는 효소와의 공액계에서는 피로인산으로부터 ATP를 재생할 수 있다. 본 발명은, 반응 종료 후, 정량을 위한 시그널 강도의 변화가 적은 계로 할 수 있고, 또한, 흡광도 검출에 의한 계로 할 수 있으므로, 간편하게, 또한, 발광 검출기와 같은 고가의 전용 기기가 없는 측정 환경에서도 실시할 수 있다.
- [0139] 본 발명의 메티오닌 정량법은 메티오닌 이외의 아미노산 또는 암모니아를 포함하는 시료를 대상으로 하여, 전처리 없이 실시할 수 있다. 또한, 정지법이 아니고, 시료 중의 거의 모든 메티오닌을 피로인산 상당량으로서 정량할 수 있으므로, 경시적으로 메티오닌 생성을 모니터링하는 것이 용이하다.
- [0140] 본 발명의 시트룰린 정량법은, 시트룰린 이외의 아미노산 또는 요소를 포함하는 시료를 대상으로 하여, 전처리

없이 실시할 수 있다. 또한, 고온에서의 인큐베이션은 불필요하고, 또한, 경시적으로 시트룰린 생성을 모니터링하는 것이 용이하다.

- [0141] 본 발명의 아르기닌 정량법은, 아르기닌 및 시트룰린 이외의 아미노산, 요소 또는 암모니아를 포함하는 시료를 대상으로 하여, 전처리 없이 실시할 수 있다.
- [0142] 본 발명의 AARS를 사용하는 정량법은, 비특허문헌 4에 기재된 정량법과 비교하여 이하와 같이 우수한 점을 갖는다.
- [0143] · 방사성 동위체 및 이 검출 기기를 사용하지 않기 때문에, 일반적인 설비·환경에서 이용 가능하다.
- [0144] · 효소 반응 후의 비즈에 의한 흡착·분리 등의 번잡한 공정이 필요 없고, 반응액과 시료를 혼합한 후에는 그대로 측정 가능하다.
- [0145] · 비특허문헌 4에 기재된 정량법에서는, 비즈에 의한 흡착 이후의 공정을 제외해도 2시간을 필요로 하는 것에 대하여, 본 발명은 10분 정도로 측정 가능하다.
- [0146] 본 발명의 AARS를 사용하는 정량법은, 특허문헌 7 및 특허문헌 8에 기재된 정량법과 비교하여 이하와 같이 우수한 점을 갖는다.
- [0147] · 시료 중 아미노산과 동등량의 생성물이 수득되므로, 고감도·고정밀도의 정량이 가능하다.
- [0148] · 형광 시약이나 센서 전극을 사용하지 않아도, 통상의 흡광도 측정으로 검출이 가능하다.
- [0149] · 특허문헌 1의 단락 0075에서는 40분, 특허문헌 2의 단락 0024에서는 55분을 측정하는데 필요로 하는 것에 대하여, 본 발명은 10분 정도로 측정 가능하다.

**도면의 간단한 설명**

- [0150] [도 1] 도 1은, 젖산 탈수소 효소 사용시의 피로인산 검량선(흡광도계)의 그래프이다.
- [도 2] 도 2는, 젖산 탈수소 효소 사용시의 피로인산 검량선(마이크로플레이트 리더)의 그래프이다.
- [도 3] 도 3은, 피루브산 산화 효소 및 발색 색소 사용시의 피로인산 검량선의 그래프이다.
- [도 4] 도 4는, 피루브산 산화 효소 및 형광 색소 사용시의 피로인산 검량선의 그래프이다.
- [도 5] 도 5는, 인산 또는 ATP가 공존하는 반응액으로 작성한 피로인산 검량선의 그래프이다.
- [도 6] 도 6은, 생체 시료 중에서의 피로인산 첨가 시험의 그래프이다.
- [도 7] 도 7은, 메티오닌 검량선의 그래프이다.
- [도 8] 도 8은, 시트룰린 검량선의 그래프이다.
- [도 9] 도 9는, 아르기닌 검량선의 그래프이다.
- [도 10] 각 농도(0, 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000mM)의 하이드록실 아민 첨가시의 Tyr 정량 반응액의 경시적 흡광도 변화. 도면 중의 숫자(25, 50, 100, 150)는 각 반응액의 Tyr 농도( $\mu\text{M}$ )를 나타낸다. 측정 개시로 부터의 시간 경과를 가로축, Tyr 비첨가 샘플과의 흡광도 차를 세로축에 나타낸다. 각 반응액을 1샘플씩 제작·측정한 결과이다.
- [도 11] 측정 개시 20분 후의 측정값으로부터 제작한 Tyr 검량선. 도면 중의 숫자(0, 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000)는 각 검량선의 하이드록실 아민 농도(mM)를 나타낸다. 하이드록실 아민 200, 400, 600, 800, 1000mM 샘플에는 1차 근사 직선을 붙였다.
- [도 12] Tyr 농도와 흡광도 차의 상관 계수의 경시적 변화. 도면 중의 숫자(0, 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000)는 하이드록실 아민 농도(mM)를 나타낸다.
- [도 13] Thermotoga 유래 CysRS를 사용한 Cys 검량선
- [도 14] Thermotoga 유래 LysRS를 사용한 Lys 검량선
- [도 15] Thermotoga 유래 SerRS를 사용한 Ser 검량선

- [도 16] Thermotoga 유래 TyrRS를 사용한 Tyr 검량선
- [도 17] Thermus 유래 TyrRS를 사용한 Tyr 검량선
- [도 18] 폴리브덴 블루법에 의한 His 검량선
- [도 19] 폴리브덴 블루법에 의한 Pro 검량선
- [도 20] 폴리브덴 블루법에 의한 Trp 검량선
- [도 21] Thermus 유래 IleRS를 사용하고, 70℃에서 반응시킨 Ile 검량선
- [도 22] Thermus 유래 MetRS를 사용하고, 70℃에서 반응시킨 Met 검량선
- [도 23] Thermus 유래 TyrRS를 사용하고, 70℃에서 반응시킨 Tyr 검량선
- [도 24] 복합체 분해 시약으로서 하이드라진을 사용한 Tyr 검량선
- [도 25] 복합체 분해 시약으로서 메틸 아민을 사용한 Tyr 검량선

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0151] 본 발명은, 아미노산으로 대표되는 대상 물질을 정량하는 방법을 제공한다. 본 발명의 방법은 하기의 공정을 포함하는 것을 특징으로 한다:
- [0152] 대상 물질에, 대상 물질의 변환과 함께 아데노신 3인산(ATP)을 기질로 하여 피로인산을 생성할 수 있는 효소를 작용시켜서, 피로인산을 생성시키는 공정;
- [0153] 생성된 피로인산에, 아데노신-인산(AMP) 및 포스포에놀피루브산(PEP) 존재 하에, 피로인산 피루브산 디키나제(PPDK)를 작용시켜서, ATP, 인산, 및 피루브산을 생성시키는 공정; 및
- [0154] 생성된 피루브산을 정량하는 공정.
- [0155] 그리고, 본 발명의 방법에 있어서는, 수득된 피루브산량에 기초하여 대상 물질량을 결정한다. 본 발명의 방법은, 또한, 피로인산의 검출과 동시에, 제1 반응에서 소비되는 ATP가 재생된다고 하는 특징을 갖는다.
- [0156] 대상 물질과 함께 ATP를 기질로 하여 피로인산을 생성하는 효소로서는 다양한 것이 알려져 있고, EC 분류로서도 수십 종류 이상 등록되어 있다. 예를 들어, 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 합성 효소(FAD synthetase), 포스포리불로키나제(phosphoribulokinase), 스트렙토마이신 3''-아데닐산 트랜스퍼라제(streptomycin 3''-adenyltransferase), 비오틴 CoA 리가제(Biotin-CoA ligase) 및 아세트아세트산 CoA 리가제(Acetoacetate-CoA ligase)를 들 수 있다. 본 명세서에서는, 대상 물질과 함께 ATP를 기질로 하여 피로인산을 생성하는 효소로서, 특히, 아데노실메티오닌 합성 효소(AdoMetS), 아르기니노숙시네이트 합성 효소(ASS), 아르기닌 데이미나제(ADI), 및 아미노아실 tRNA 합성 효소(AARS)를 예로 설명하는 경우가 있는데, 그 설명은 당업자라면 다른 효소를 사용하는 경우에도 적절히 적용하여 이해할 수 있다.
- [0157] 대상 물질과 함께 ATP를 기질로 하여 피로인산을 생성하는 효소는, 유래, 소재(막, 세포질, 세포 외 등), 기질 특이성 및 반응 특이성, 활성 부위, 및 활성 부위 잔기 등에 기초하여 구획할 수 있다. 예를 들어, AARS를 갖지 않는 생물은 지금까지 알려져 있지 않은 한편으로, AdoMetS, ASS 또는 ADI를 갖지 않는 생물은 존재한다. 또한, AdoMetS와 ASS는 아미노산의 측쇄 부분에서 반응하고, AARS는 아미노산의 카복실기에서 반응한다.
- [0158] I. 특정의 피로인산의 정량 방법을 이용한 아미노산의 정량 방법
- [0159] 본 발명의 일 형태에서는, 특정한 피로인산의 정량 방법을 이용한 메티오닌의 정량 방법, 시트룰린의 정량 방법, 및 아르기닌의 정량 방법을 제공한다.
- [0160] 본 발명에서, 대상 물질에 관하여 「정량(한다)」라고 할 때는, 특별히 기재한 경우를 제외하고, 그 대상 물질의 양을 측정하는 것을 말하고, 그 양은 절대량 외에, 시료 중의 농도로서 측정되는 경우도 있다.
- [0161] [피로인산의 정량 방법]
- [0162] 본 발명의 피로인산의 정량 방법은:
- [0163] 피로인산에, 금속 이온, AMP 및 포스포에놀피루브산(PEP) 존재 하에, PPDK를 작용시켜서, ATP, 인산, 및 피루브

산을 생성시키는 공정 (I-A); 및

- [0164] 생성된 피루브산을 정량하는 공정 (I-B)
- [0165] 를 포함하고, 수득된 피루브산량에 기초하여 피로인산량을 결정하는 것이다.
- [0166] 공정 (I-A)는, 피검 시료 중의 피로인산을, PPK, 금속 이온, AMP 및 PEP와 함께 인큐베이션함으로써 실시할 수 있다. PPK가 촉매하는 이 반응은 이하의 반응식으로 나타난다.
- [0167] [화학식 1]
- [0168] 피로인산+PEP+AMP → 피루브산+ATP+인산
- [0169] 또한, 본 발명에서 「인산」이라고 할 때에는, 특별히 기재한 경우를 제외하고, 무기 인산(H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)을 가리킨다. 인산은 오르토인산이라고 하는 경우도 있다.
- [0170] 본 발명에 사용하는 PPK는 상기 반응에 대하여 촉매 작용을 나타내는 효소라면 유래, 효소명, EC 번호, 또는 제조 방법 등에 의해 한정되지 않는다. 예를 들어, Propionibacterium속 유래의 것, 또는 Thermoproteus속 유래의 것, 보다 특정하면, Propionibacterium freudenreichii(Pf) 유래의 것이나, 또는 Thermoproteus tenax(Tt) 유래의 것을 바람직하게 사용할 수 있다. Pf 유래의 PPK는 박테리아 유래의 것으로서 자주 연구된 효소 중 하나이다. 대장균 발현계에서의 발현량을 많이 기대할 수 있고, 또한, glycerol과 혼합한 상태에서는 4℃에서 안정적으로 보존할 수 있고, 또한, 동결 용해를 반복하여도 현저한 활성의 감소가 보이지 않는다는 점에서 우수하다. Tt 유래의 PPK는, Tt가 초호열성 생물이므로, 상온에서의 정제가 가능하고, 또한, 고온에서도 변성되지 않고 사용 가능함을 기대할 수 있는 점에서 우수하다. 보다 구체적으로는, Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii NBRC12426주 유래의 것이나, 또는 Thermoproteus tenax NBRC100435주 유래의 것을 바람직하게 사용할 수 있다.
- [0171] 사용하는 PPK의 양은, 본 발명의 피로인산의 정량을 실시할 수 있으면 특별히 한정되지 않고, 시료에 포함되는 피로인산의 존재량, 사용하는 장치, PPK의 순도나 종류에 따라 적절히 결정할 수 있다. 사용하는 PPK의 양은, 하한은 0.001U/ml 이상인 것이 바람직하고, 0.005U/ml 이상인 것이 보다 바람직하고, 0.01U/ml 이상인 것이 더욱 바람직하다. 또한, 어느 쪽의 경우에서도 상한은 10U/ml 이하인 것이 바람직하고, 5U/ml 이하인 것이 보다 바람직하고, 1U/ml 이하인 것이 더욱 바람직하다.
- [0172] 공정 (I-A)는, AMP의 존재 하에 실시된다. 존재하는 AMP의 양은, 하한은 0.01mM 이상인 것이 바람직하고, 0.025mM 이상인 것이 보다 바람직하고, 0.05mM 이상인 것이 더욱 바람직하다. 또한, 어느 쪽의 경우에서도 상한은 20mM 이하인 것이 바람직하고, 10mM 이하인 것이 보다 바람직하고, 5mM 이하인 것이 더욱 바람직하다.
- [0173] 공정 (I-A)는, 또한, PEP 등의 고에너지 인산 화합물의 존재 하에 실시된다. 존재하는 PEP의 양은, 하한은 0.01mM 이상인 것이 바람직하고, 0.025mM 이상인 것이 보다 바람직하고, 0.05mM 이상인 것이 더욱 바람직하다. 또한, 어느 쪽의 경우에서도 상한은 20mM 이하인 것이 바람직하고, 10mM 이하인 것이 보다 바람직하고, 5mM 이하인 것이 더욱 바람직하다.
- [0174] 공정 (I-A)는 금속 이온의 존재 하에 실시되는 것이 바람직하다. 금속 이온은 마그네슘 이온, 코발트 이온, 또는 망간 이온 중 어느 하나일 수 있지만, 마그네슘 이온인 것이 바람직하다. 사용하는 금속 이온의 양은, 예를 들어, 마그네슘 이온의 경우, 하한은 AMP의 농도에 대하여 0.1당량 이상인 것이 바람직하고, 0.2당량 이상인 것이 더욱 바람직하고, 0.4당량 이상인 것이 더욱 바람직하다. 또한, 어느 쪽의 경우에서도 상한은 10당량 이하인 것이 바람직하고, 5당량 이하인 것이 보다 바람직하고, 2.5당량 이하인 것이 더욱 바람직하다. 가장 바람직한 농도는 인산 공여체의 0.5 내지 2당량, 예를 들어, 1당량이다.
- [0175] 공정 (I-B)에서는, 반응계 중의 피루브산을 정량하지만, 예를 들어, 젖산 탈수소 효소 반응을 이용함으로써 실시할 수 있다. 젖산 탈수소 효소는 광범위한 생물종에 분포되는 효소이며, 하기의 반응을 촉매한다.
- [0176] [화학식 2]
- [0177] 
$$\text{피루브산} + \text{NADH} \rightarrow \text{젖산} + \text{NAD}^+$$
- [0178] 본 발명에는, 젖산 탈수소 효소로서는, 각종의 생물 유래의 것을 사용할 수 있다. 예를 들어, 토끼, 돼지, 소, 새, 유산균, 또는 효모 유래의 각종의 것이 시판되고 있고, 이들 중 어느 하나를 바람직하게 사용할 수 있다.

- [0179] 사용하는 젖산 탈수소 효소의 양은, 본 발명의 피로인산의 정량을 실시할 수 있으면 특별히 한정되지 않고, 시료에 포함되는 피로인산의 존재량, 사용하는 장치, 효소의 순도나 종류에 따라서 적절히 결정할 수 있다. 사용하는 효소의 양은, 하한은 0.002U/ml 이상인 것이 바람직하고, 0.005U/ml 이상인 것이 바람직하고, 0.01U/ml 이상인 것이 더욱 바람직하다. 또한, 어느 쪽의 경우에서도 상한은 4U/ml 이하인 것이 바람직하고, 2U/ml 이하인 것이 보다 바람직하고, 1U/ml 이하인 것이 더욱 바람직하다.
- [0180] 공정 (I-B)는, 또한, NADH의 존재 하에 실시된다. NADH 농도는 너무 낮으면 흡광도의 검출이 곤란하고, 또한, 너무 높으면 감소량 측정값의 정확성이 저하되는 등, 영향이 비교적 크다. 존재하는 NADH의 양은, 하한은 0.01mM 이상인 것이 바람직하고, 0.02mM 이상인 것이 보다 바람직하고, 0.05mM 이상인 것이 더욱 바람직하다. 어느 쪽의 경우에서도 상한은 4mM 이하인 것이 바람직하고, 2mM 이하인 것이 보다 바람직하고, 1mM 이하인 것이 더욱 바람직하다.
- [0181] 젖산 탈수소 효소를 사용하는 계에 있어서는, 340nm의 흡광도를 측정함으로써, 반응 진행에 따른 NADH 감소량을 계측하여, 피루브산 생성량이 산출된다.
- [0182] 젖산 탈수소 효소를 사용하는 공정 (I-B)는 공정 (I-A)와 동일계 내에서 동시에 진행시킬 수 있다. 반응 온도는 사용하는 효소의 최적 온도 등을 고려하여 적절히 결정되지만, 실온 내지 37℃, 예를 들어 30℃에서 바람직하게 실시할 수 있다. 반응 시간은 피검 시료에 포함되는 피로인산량 등을 고려하여 적절히 결정할 수 있지만, 반응은 신속히 진행되는 것으로, 20분 이내, 예를 들어 약 7 내지 13분으로, 시료 중의 거의 전량의 피로인산을 NADH의 산화에 사용할 수 있다. 필요하면, 20mM Imidazole-HCl(pH 7.0) 등의 적절한 완충액 중에서, 이들 공정을 실시할 수 있다. 동일계 중의 각 성분의 농도는 당업자라면 적절히 결정할 수 있지만, 예를 들어, 이하의 범위로 할 수 있다.
- [0183] MgCl<sub>2</sub>: 0.5 내지 50mM
- [0184] PEP: 0.05 내지 5mM
- [0185] AMP: 0.05 내지 5mM
- [0186] NADH: 0.05 내지 1mM
- [0187] PPDK: 0.01 내지 1U/ml
- [0188] 젖산 탈수소 효소: 0.01 내지 1U/ml
- [0189] 젖산 탈수소 효소 반응을 이용하는 형태에서는, 적어도 0 내지 200 μM의 범위에서 피로인산의 정량이 가능하다.
- [0190] 공정 (I-B)는 피루브산 산화 효소에 의한 반응을 이용하여, 과산화수소 검출계에 의해 실시할 수도 있다.
- [0191] 피루브산 산화 효소는 하기의 반응을 촉매한다.
- [0192] [화학식 3]
- [0193] 피루브산 + 인산 + O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O → 아세틸인산 + 이산화탄소 + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- [0194] 본 발명에 사용할 수 있는 피루브산 산화 효소로서는 특별히 제한은 없고, 각종 생물 유래의 것, 예를 들어, *Pseudomonas*속 유래의 것을 바람직하게 사용할 수 있다.
- [0195] 사용하는 피루브산 산화 효소의 양은 본 발명의 피로인산의 정량을 실시할 수 있으면 특별히 한정되지 않고, 시료에 포함되는 피로인산의 존재량, 사용하는 장치, 효소의 순도나 종류에 따라 적절히 결정할 수 있다. 사용하는 효소의 양은, 하한은 0.03U/ml 이상인 것이 바람직하고, 0.07U/ml 이상인 것이 보다 바람직하고, 0.15U/ml 이상인 것이 더욱 바람직하다. 어느 쪽의 경우에서도 상한은 60U/ml 이하인 것이 바람직하고, 30U/ml 이하인 것이 보다 바람직하고, 15U/ml 이하인 것이 더욱 바람직하다.
- [0196] 피루브산 산화 효소의 작용에 의해 생기는 과산화수소는 공지의 방법으로 정량할 수 있고, 예를 들어, 퍼옥시다제 반응을 사용하여 측정할 수 있다. 사용 가능한 퍼옥시다제로서는 과산화수소의 정량에 이용 가능한 효소이면 좋고, 예를 들어, 서양 고추냉이 유래 퍼옥시다제를 들 수 있다.
- [0197] 사용하는 퍼옥시다제의 양은, 본 발명의 피로인산의 정량을 실시할 수 있으면 특별히 한정되지 않고, 시료에 포함되는 피로인산의 존재량, 사용하는 장치, 효소의 순도나 종류에 따라 적절히 결정할 수 있다. 사용하는 효소의 양은, 하한은 0.03U/ml 이상인 것이 바람직하고, 0.07U/ml 이상인 것이 보다 바람직하고, 0.15U/ml 이상인

것이 더욱 바람직하다. 어느 쪽의 경우에서도 상한은 300U/ml 이하인 것이 바람직하고, 150U/ml 이하인 것이 보다 바람직하고, 75U/ml 이하인 것이 더욱 바람직하다.

[0198] 또한, 피옥시다제와 반응하는 전자 수용체는 사용하는 피옥시다제의 기질이 될 수 있는 발색제 또는 형광제이면 사용 가능하다. 발색제로서는, 예를 들어, 4-아미노안티피린:페놀 등을 들 수 있다. 서양 고추냉이 유래 피옥시다제에 의하여, 과산화수소와 상기 발색제는 이하에 나타내는 바와 같이 반응하고, 생성물인 퀴논이민 색소를 505nm의 흡광으로 검출 가능하다.

[0199] [화학식 4]

[0200]  $2H_2O_2 + 4\text{-아미노안티피린} + \text{페놀} \rightarrow \text{퀴논이민 색소} + 4H_2O$

[0201] 또한, 피옥시다제와 반응하는 형광제로서는, 10-Acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine(ADHP) 등을 들 수 있다. 서양 고추냉이 유래 피옥시다제에 의하여, 과산화수소와 ADHP의 반응에 의해 형광 물질인 resorufin이 생성되고, 590nm의 형광(여기광 530nm)으로 검출 가능하다. 4-아미노안티피린이나 ADHP 등의 발색제나 형광제는 당업자라면 사용되는 피옥시다제의 종류에 따라 적절히 선택할 수 있다. 또한, 검출을 위한 과장도, 당업자라면 사용되는 발색제나 형광제의 종류에 따라 적절히 선택할 수 있다.

[0202] 피루브산 산화 효소를 사용하는 공정 (I-B)도, 또한, 공정 (I-A)와 동일계 내에서 동시에 진행시킬 수 있다. 반응 온도는, 사용하는 효소의 최적 온도 등을 고려하여 적절히 결정되지만, 실온 내지 37°C, 예를 들어, 30°C에서 바람직하게 실시할 수 있다. 반응 시간은 피검 시료에 포함되는 피로인산량 등을 고려하여 적절히 결정할 수 있지만, 반응은 신속히 진행되는 것으로, 20분 이내, 예를 들어, 약 7 내지 13분으로, 시료 중의 거의 전량의 피로인산을 과산화수소의 생성에 사용할 수 있다. 필요하면, 20mM Imidazole-HCl(pH 7.0) 등의 적절한 완충액 중에서 이들 공정을 실시할 수 있다.

[0203] 4-아미노안티피린 및 페놀을 사용하여, 모든 공정을 동일계 중에서 실시할 경우, 각 성분의 농도는 당업자라면 적절히 결정할 수 있지만, 예를 들어, 이하의 범위로 할 수 있다.

[0204] MgCl: 2.5 내지 250mM

[0205] NH<sub>4</sub>Cl: 1 내지 100mM

[0206] PEP: 0.05 내지 5mM

[0207] AMP: 0.05 내지 5mM

[0208] PPK: 0.01 내지 1U/ml

[0209] 4-아미노안티피린: 0.1 내지 10mM

[0210] 페놀: 0.1 내지 10mM

[0211] 피루브산 산화 효소: 0.15 내지 15U/ml

[0212] 피옥시다제: 0.15 내지 75U/ml

[0213] 4-아미노안티피린 및 페놀을 사용하는 형태에서는, 적어도 0 내지 200 μM의 범위에서 피로인산의 정량이 가능하다.

[0214] ADHP를 사용하여, 모든 공정을 동일계 중에서 실시할 경우, 각 성분의 농도는 당업자라면 적절히 결정할 수 있지만, 예를 들어, 이하의 범위로 할 수 있다.

[0215] MgCl<sub>2</sub>: 0.5 내지 50mM

[0216] NH<sub>4</sub>Cl: 1 내지 100mM

[0217] PEP: 0.05 내지 5mM

[0218] AMP: 0.05 내지 5mM

[0219] PPK: 0.01 내지 1U/ml



- [0220] Na-PO<sub>4</sub>: 0.05 내지 5mM
- [0221] ADHP: 50 μM
- [0222] 피루브산 산화 효소: 0.15 내지 15U/ml
- [0223] 퍼옥시다제: 0.15 내지 75U/ml
- [0224] ADHP를 사용하는 형태에서는 적어도 0 내지 10 μM의 범위에서 피로인산의 정량이 가능하다. 이 형태에 의하여, 극미량의 피로인산을 측정할 수 있다.
- [0225] 공정 (I-B)는 상술한 2종류의 효소 이외에, 피루브산을 2,4-dinitrophenylhydrazine 등의 발색 시약과 반응시켜서, 생성물의 흡광도를 측정하는 계로서 구축해도 좋다. 이 계는 피루브산 이외의 2-옥소산에서도 동일하게 발색하는 경우가 있음에 유의하면 좋다. 공정 (I-B)는, 또한, 피루브산 탈탄산 효소와 알코올 탈수소 효소를 사용하여, NADH의 감소를 검출하는 공정으로서 구축해도 좋다. 또한, 피루브산 탈탄산 효소와 아세트알데히드 탈수소 효소를 사용하고, NADH의 생성을 검출하는 공정으로서 구축해도 좋다. 이들 공정을 실시하기 위하여 필요한 조건은 당업자라면 적절히 설계할 수 있다.
- [0226] 본 발명의 피로인산의 정량 방법은 인산이나 ATP의 공존 하에서도 실시 가능하다. 또한, ATP를 생성할 수 있다는 이점을 갖는다. 피로인산의 정량을 위한 종래법으로서는, 피로포스파타제에 의해 피로인산으로부터 무기 인산을 생성시켜서, 무기 인산을 각종 검출법으로 정량하는 수법 (I-a), ATP 설프릴라제 또는 PPK에 의해 피로인산으로부터 ATP를 생성시켜서, ATP를 각종 검출법으로 정량하는 수법 (I-b), 하이포크산틴 포스포리보실 트랜스퍼라제에 의해 피로인산으로부터 하이포크산틴을 생성하여, 하이포크산틴을 정량하는 수법 (I-c)가 존재하지만, 이러한 특징을 구비하는 것은 아니다.
- [0227] 본 발명의 방법 및 종래법에 대하여, 하기 표에 정리하였다.

**표 1**

	배정기술	배정기술	배정기술	본 발명의
	I-a	I-b	I-c	피로인산 정량 방법
무기 인산의 공존 하에서의 정량	×	○	○	○
ATP의 공존 하에서의 정량	○	×	○	○
ATP의 재생	×	○	×	○

○, . . . 가능    ×, . . . 불가능

- [0228]
- [0229] 본 발명의 피루브산의 정량 방법은 ATP 공존 하에서도 실시할 수 있으므로, 측정 대상 물질과 함께 ATP를 기질로 하여 피로인산을 생성하는 효소 반응과 공액(복수의 효소에 의한 연속 반응. 「커플링」과 같은 뜻. 특히, 한쪽의 효소의 생성물이 또 한쪽의 효소의 기질로서 사용되는 연속 반응을 가리킴.)시켜서, 대상 물질을 정량하는 방법에서 사용할 수 있다. 측정 대상 물질과 함께 ATP를 기질로 하여 피로인산을 생성하는 효소는, 그 기질 특이성의 높이나, 발 에르곤 반응인 ATP 가수분해에 의해 높은 반응성을 갖는 것으로부터, 측정용 효소로서 극히 유망하다. 측정 대상 물질로서는 메티오닌, 시트룰린, 아르기닌 등을 들 수 있다.
- [0230] 피로인산 의존적인 흡광도 감소를 측정하는 본 발명에 있어서는, 극히 약하면서 피로인산 비의존적인 흡광도 감소도 일어날 수 있다. 이 비의존적인 흡광도감소의 속도는 PPK 첨가량과 비례 관계에 있다. 따라서, 대과잉량의 PPK를 반응액 중에 첨가해버리면, 피로인산 비의존적인 흡광도 감소가 커지고, 오차의 원인이 될 수 있다. 따라서, 본 발명에 있어서는, 병용하는 효소(젖산 탈수소 효소, 후술하는 AdoMetS 등)에 비교하여, PPK의 활성량을 억제하면 좋다. 이와 같이 하면, 반응 중에서 PPK가 율속(律速) 단계가 되고, 상기 흡광도 감소의 영향이 억제되기 때문이다. 또한, PPK는 가역 반응을 촉매하는 효소이고, 단독으로 피로인산 존재 하에 반응시켜도, 피로인산을 완전히 소비하기 전에 평형에 도달할 수 있다. 하지만, 본 발명의, 동일계 내에서 동시에 진행시키는 형태에서는, 젖산 탈수소 효소(충분량의 NADH 존재 하에서는 거의 완전하게 젖산 생성 방향으로 기울음.)나, 피루브산 산화 효소(불가역 반응)라고 하는, 반응을 실질적으로 불가역적으로 촉매하는 산소와 커플링시킴으로써, 피로인산을 거의 완전하게 변환할 수 있다. 또한, 후술하는 AdoMetS, ASS, 및 ADI도, 불가역

성이 강한 효소이며, 기질을 거의 완전하게 반응시키는 것에 기여하고 있다고 생각할 수 있다.

- [0231] 또한, 이러한 관점에서는, 동일계 내에서 실시할 경우의 본 발명에 있어서는, PPKK량은 예를 들어, 젓산 탈수소 효소의 1/20 내지 1/2, 바람직하게는 1/10 내지 1/2로 할 수 있고, 또한, AdoMetS, ASS 또는 ADI의 1/10 내지 1/1.5, 바람직하게는 1/5 내지 1/1.5로 할 수 있다.
- [0232] [메티오닌의 정량 방법]
- [0233] 본 발명의 메티오닌의 정량 방법은,
- [0234] 피로인산에, AMP 및 포스포에놀피루브산(PEP) 존재 하에, PPKK를 작용시켜서, ATP, 인산, 및 피루브산을 생성시키는 공정 (II-A); 및
- [0235] 생성된 피루브산을 정량하는 공정 (II-B)
- [0236] 를 포함하고, 수득된 피루브산량에 기초하여 메티오닌량을 결정하지만, 피로인산은, 공정 (II-C), 즉, 메티오닌에, ATP 존재 하에, 아데노실메티오닌 합성 효소(AdoMetS)를 작용시켜서, 아데노실메티오닌, 및 피로인산을 생성시키는 공정에 의해 생성된 것이다.
- [0237] 공정 (II-C)는, 피검 시료 중의 메티오닌을, 아데노실메티오닌 합성 효소(AdoMetS), ATP와 함께 인큐베이션함으로써 실시할 수 있다. 이 AdoMetS가 촉매 하는 반응은 이하의 반응식으로 나타난다.
- [0238] [화학식 5]
- [0239]  $\text{메티오닌} + \text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{아데노실메티오닌} + \text{피로인산} + \text{인산}$
- [0240] 또한, 본 발명에서 「메티오닌」이라고 할 때에는, 특별히 기재한 경우를 제외하고, L-메티오닌을 말한다. 또한, 「아데노실메티오닌 합성 효소」는, 일반적으로는 「S-아데노실메티오닌 합성 효소」 또는 「메티오닌아데노실 트랜스퍼라제」로 칭하는 경우도 있다.
- [0241] 본 발명에서는, AdoMetS로서는 각종의 생물 유래의 것을 사용할 수 있다. AdoMetS는 비교적 넓은 범위의 미생물에 분포하고 있다. 예를 들어, 대장균 또는 효모 유래의 것이 알려져 있고, 이들 중 어느 하나를 바람직하게 사용할 수 있다. 대장균을 숙주로서 발현시켜서 사용할 경우에는, 숙주 유래 효소이면 보다 높은 발현량이 수득된다고 예상되므로, 대장균 유래의 것을 선택해도 좋다.
- [0242] 사용하는 AdoMetS의 양은, 메티오닌의 정량을 실시할 수 있으면 특별히 한정되지 않고, 시료에 포함되는 메티오닌의 양, 사용하는 장치, 효소의 순도나 종류에 따라 적절히 결정할 수 있다. 사용하는 효소의 양은, 하한은 0.001U/ml 이상인 것이 바람직하고, 0.005U/ml 이상인 것이 보다 바람직하고, 0.01U/ml 이상인 것이 더욱 바람직하다. 또한, 어느 쪽의 경우에서도 상한은 10U/ml 이하인 것이 바람직하고, 5U/ml 이하인 것이 보다 바람직하고, 1U/ml 이하인 것이 더욱 바람직하다.
- [0243] 앞에 기재한 공정 (I-A) 및 앞에 기재한 공정(I-B)에 관한 설명은 특별히 기재한 경우를 제외하고, 각각 공정 (II-A) 및 공정(II-B)에 해당된다.
- [0244] 공정 (II-B)는 젓산 탈수소 효소를 사용하는 계, 피루브산 산화 효소를 사용하는 계로서 구축할 수 있다. 또한, 앞에 기재한 공정 (I-B)와 같이 피루브산을 2,4-dinitrophenylhydrazine 등의 발색 시약과 반응시켜서, 생성물의 흡광도를 측정하는 공정, 피루브산 탈탄산 효소와 알코올 탈수소 효소를 사용하여, NADH의 감소를 검출하는 공정, 또는 피루브산 탈탄산 효소와 아세트알데히드 탈수소 효소를 사용하여, NADH의 생성을 검출하는 공정으로서 구축해도 좋다.
- [0245] 공정 (II-A), 공정 (II-B) 및 공정 (II-C)는, 동일계 내에서 동시에 진행시킬 수 있다. 반응 온도는, 사용하는 효소의 최적 온도 등을 고려해서 적절히 결정되지만, 실온 내지 37℃, 예를 들어, 30℃에서 바람직하게 실시할 수 있다. 반응 시간은 피검 시료에 포함되는 피로인산량 등을 고려해서 적절히 결정할 수 있지만, 반응은 신속히 진행되는 것으로, 20분 이내, 예를 들어, 약 7 내지 13분으로, 시료 중의 거의 전량의 메티오닌을 피루브산에 상당하는 양으로서 측정할 수 있다. 필요하다면, 20mM Imidazole-HCl(pH 7.0) 등의 적절한 완충액 중에서 이들 공정을 실시할 수 있다.
- [0246] 계 중의 각 성분의 농도는 당업자라면 적절히 결정할 수 있지만, 예를 들어, 이하의 범위로 할 수 있다.
- [0247]  $\text{MgCl}_2$ : 0.5 내지 50mM

- [0248] ATP: 0.1 내지 10mM
- [0249] PEP: 0.04 내지 4mM
- [0250] AMP: 0.04 내지 4mM
- [0251] NADH: 0.025 내지 2.5mM
- [0252] PPK: 0.01 내지 1U/ml
- [0253] AdoMetS: 0.01 내지 1U/ml
- [0254] 젖산 탈수소 효소: 0.01 내지 1U/ml
- [0255] 젖산 탈수소 효소 반응을 이용하는 형태에서는, 적어도 0 내지 200  $\mu$ M의 범위에서 메티오닌의 정량이 가능하다.
- [0256] 또한, 본 발명의 이 방법은, 메티오닌 이외의 단백질을 구성하는 19종류의 아미노산 및 암모니아가 협잡하는 경우이어도, 메티오닌만을 선택적으로 정량할 수 있다.
- [0257] [시트룰린의 정량 방법]
- [0258] 본 발명의 시트룰린의 정량 방법은,
- [0259] 피로인산에, AMP 및 포스포에놀피루브산(PEP) 존재 하에, PPK를 작용시켜서, ATP, 인산, 및 피루브산을 생성시키는 공정 (III-A); 및
- [0260] 생성된 피루브산을 정량하는 공정 (III-B)
- [0261] 를 포함하고, 수득된 피루브산량에 기초하여 시트룰린량을 결정하지만, 피로인산은, 공정 (III-C), 즉, 시트룰린에, 아스파라긴산(Asp) 및 ATP 존재 하에, 아르기니노숙시네이트 합성 효소(ASS)를 작용시켜서, AMP, 아르기노숙신산, 및 피로인산을 생성시키는 공정에 의해 생성된 것이다.
- [0262] 공정 (III-C)은, 피검 시료 중의 시트룰린을, ASS, ATP 등과 함께 인큐베이션함으로써 실시할 수 있다. 이 ASS가 촉매하는 반응은, 이하의 반응식으로 나타난다.
- [0263] [화학식 6]
- [0264] 시트룰린 + ATP  $\rightarrow$  아르기니노숙신산 + AMP + 피로인산
- [0265] ASS로서는, 각종의 생물 유래의 것을 사용할 수 있다. ASS는 비교적 넓은 범위의 미생물에 분포하고 있다. 예를 들어, 대장균 또는 효모 유래의 것이 알려져 있고, 이들 중 어느 하나를 바람직하게 사용할 수 있다. 대장균을 숙주로서 발현시켜서 사용하는 경우에는, 숙주 유래 효소이면 보다 높은 발현량이 수득된다고 예상되므로, 대장균 유래의 것을 선택해도 좋다.
- [0266] 사용하는 ASS의 양은, 시트룰린의 정량을 실시할 수 있으면 특별히 한정되지 않고, 시료에 포함되는 시트룰린의 양, 사용하는 장치, 효소의 순도나 종류에 따라 적절히 결정할 수 있다. 사용하는 효소의 양은, 하한은 0.001U/ml 이상인 것이 바람직하고, 0.005U/ml 이상인 것이 보다 바람직하고, 0.01U/ml 이상인 것이 더욱 바람직하다. 또한, 어느 쪽의 경우에서도 상한은 10U/ml 이하인 것이 바람직하고, 5U/ml 이하인 것이 보다 바람직하고, 1U/ml 이하인 것이 더욱 바람직하다.
- [0267] 앞에 기재한 공정 (I-A) 및 앞에 기재한 공정 (I-B)에 관한 설명은 특별히 기재한 경우를 제외하고, 각각 공정 (III-A) 및 공정 (III-B)에 해당된다.
- [0268] 공정 (III-B)는 젖산 탈수소 효소를 사용하는 계, 피루브산 산화 효소를 사용하는 계로서 구축할 수 있다. 또한, 앞에 기재한 공정 (I-B)와 같이, 피루브산을 2,4-dinitrophenylhydrazine 등의 발색 시약과 반응시켜서, 생성물의 흡광도를 측정하는 공정, 피루브산 탈탄산 효소와 알코올 탈수소 효소를 사용하여, NADH의 감소를 검출하는 공정, 또는 피루브산 탈탄산 효소와 아세트알데히드 탈수소 효소를 사용하여, NADH의 생성을 검출하는 공정으로서 구축해도 좋다.
- [0269] 공정 (III-A), 공정 (III-B) 및 공정 (III-C)는 동일계 내에서 동시에 진행시킬 수 있다. 반응 온도는 사용하는 효소의 최적 온도 등을 고려해서 적절히 결정되지만, 실온 내지 37 $^{\circ}$ C, 예를 들어, 30 $^{\circ}$ C에서 바람직하게 실시할 수 있다. 반응 시간은 피검 시료에 포함되는 피로인산량 등을 고려해서 적절히 결정할 수 있지만, 반응은 신속히 진행되는 것으로, 20분 이내, 예를 들면, 약 7 내지 13분으로, 시료 중의 거의 전량의 시트룰린을 피루브산

에 상당하는 양으로서 측정할 수 있다. 필요하다면, 20mM Imidazole-HCl(pH 7.0) 등의 적절한 완충액 중에서 이들 공정을 실시할 수 있다.

- [0270] 또한, 동일계 내에서 실시할 경우, AMP는 ASS가 관여하는 반응으로 생산되므로, 그 첨가는 이론적으로는 필수는 아니지만, AMP 비첨가인 경우, 이하와 같은 영향이 나올 가능성을 생각할 수 있다. AMP를 첨가하지 않는 경우에는, 첨가한 경우에 비하여 AMP 농도가 낮아지기(그 시점에서의 피로인산 농도와 동일 농도가 되기) 때문에, PPK 반응의 속도가 저하될 수 있다. 특히, 이 영향은 반응 종료 직전에 커진다고 생각된다. 피로인산이 반응에 의해 다 소비되려고 할 때, 피로인산 농도뿐 아니라 AMP 농도도 동등하게 저하되고, 2기질 농도의 저하에 의해 PPK 반응은 현저하게 진행되기 어려워질 가능성이 있다. 이것이 원인이 되어, 미반응의 피로인산이 많아질 가능성이 있다. 이 때, 미반응의 피로인산의 부분만큼 정량값이 작게 추산되어 버리므로, 정량값이 부정확해질 가능성이 있다.
- [0271] 계 중의 각 성분의 농도는 당업자라면 적절히 결정할 수 있지만, 예를 들어, 이하의 범위로 할 수 있다.
- [0272] MgCl<sub>2</sub>: 0.5 내지 50mM
- [0273] 아스파라긴산: 0.2 내지 20mM
- [0274] PEP: 0.02 내지 2mM
- [0275] ATP: 0.1 내지 10mM
- [0276] AMP: 0.025 내지 2.5mM
- [0277] NADH: 0.025 내지 2.5mM
- [0278] PPK: 0.01 내지 1U/ml
- [0279] ASS: 0.01 내지 1U/ml
- [0280] 젖산 탈수소 효소: U/ml
- [0281] 젖산 탈수소 효소 반응을 이용하는 형태에서는, 적어도 0 내지 200 μM의 범위에서 시트룰린의 정량이 가능하다.
- [0282] 또한, 본 발명의 이 방법은, 단백질을 구성하는 20종류의 아미노산 및 요소가 헵잡하는 경우라도, 시트룰린만을 선택적으로 정량할 수 있다. 또한, 피검 시료 중에 아스파라긴산이 헵잡하고 있는 경우라도, 시트룰린 선택적인 정량은 가능하다.
- [0283] [아르기닌의 정량 방법]
- [0284] 본 발명의 아르기닌의 정량 방법은,
- [0285] 피로인산에, AMP 및 포스포에놀피루브산(PEP) 존재 하에, PPK를 작용시켜서, ATP, 인산, 및 피루브산을 생성시키는 공정 (IV-A); 및
- [0286] 생성된 피루브산을 정량하는 공정 (IV-B)
- [0287] 를 포함하고, 수득된 피루브산량에 기초하여 아르기닌량을 결정하지만, 피로인산은, 아르기닌에 아르기닌 데이미나제(ADI)를 작용시켜서, 암모니아, 및 시트룰린을 생성시키는 공정 (IV-D): 및
- [0288] 생성된 시트룰린에 ASS를 작용시켜서, AMP, 아르기노숙신산, 및 피로인산을 생성시키는 공정 (IV-C)에 의해, 생성된 것이다.
- [0289] 공정 (IV-D)는, 피검 시료 중의 아르기닌을, 아르기닌 데이미나제(ADI)과 함께 인큐베이션함으로써 실시할 수 있다. 이 ADI가 촉매하는 반응은, 이하의 반응식으로 나타낸다.
- [0290] [화학식 7]
- [0291] 아르기닌 → 시트룰린+암모니아
- [0292] 또한, 본 발명에서 「아르기닌」이라고 할 때는, 특별히 기재한 경우를 제외하고 L-아르기닌을 말한다.
- [0293] 본 발명에는, ADI로서는, 각종의 생물 유래의 것을 사용할 수 있다. 예를 들어, *Pseudomonas aeruginosa* 또는 젖산균 유래의 것이 알려져 있고, 이들 중 어느 하나를 바람직하게 사용할 수 있다. 또한, ADI 유전자를 유지

하고 있고, 그 유전자 산물이 생리학적으로도 기능하고 있다고 여겨지고 있는 *P. aeruginosa* 유래의 것을 조제하여 사용해도 좋다.

- [0294] 사용하는 ADI의 양은 아르기닌의 정량을 실시할 수 있으면 특별히 한정되지 않고, 시료에 포함되는 아르기닌의 양, 사용하는 장치, 효소의 순도나 종류에 따라 적절히 결정할 수 있다. 사용하는 효소의 양은, 하한은 0.001U/ml 이상인 것이 바람직하고, 0.005U/ml 이상인 것이 보다 바람직하고, 0.01U/ml 이상인 것이 더욱 바람직하다. 또한, 어느 쪽의 경우에서도, 상한은 10U/ml 이하인 것이 바람직하고, 5U/ml 이하인 것이 보다 바람직하고, 1U/ml 이하인 것이 더욱 바람직하다.
- [0295] 상기 기재한 공정 (I-A) 및 상기 기재한 공정 (I-B)에 관한 설명은 특별히 기재한 경우를 제외하고, 각각 공정 (IV-A) 및 상기 기재한 공정 (IV-B)에 해당된다. 또한, 상기 기재한 공정 (III-C)에 관한 설명은 특별히 기재한 경우를 제외하고, 공정 (IV-C)에 해당된다.
- [0296] 공정 (IV-B)는, 젖산 탈수소 효소를 사용하는 계, 피루브산 산화 효소를 사용하는 계로서 구축할 수 있다. 또한, 상기 기재한 공정 (I-B)와 동일하게, 피루브산을 2,4-dinitrophenylhydrazine 등의 발색 시약과 반응시켜서, 생성물의 흡광도를 측정하는 공정, 피루브산 탈탄산 효소와 알코올 탈수소 효소를 사용하여, NADH의 감소를 검출하는 공정, 또는 피루브산 탈탄산 효소와 아세트알데히드 탈수소 효소를 사용하여, NADH의 생성을 검출하는 공정으로서 구축해도 좋다.
- [0297] 공정 (IV-A), 공정 (IV-B), 공정 (IV-C) 및 공정 (IV-D)는 동일계 내에서 동시에 진행시킬 수 있다. 반응 온도는, 사용하는 효소의 최적 온도 등을 고려하여 적절히 결정되지만, 실온 내지 37℃, 예를 들어, 30℃에서 바람직하게 실시할 수 있다. 반응 시간은, 피검 시료에 포함되는 피로인산량 등을 고려해서 적절히 결정할 수 있지만, 반응은 조속히 진행되는 것으로, 20분 이내, 예를 들어, 약 7 내지 13분으로, 시료 중의 거의 전량의 아르기닌을 피루브산에 상당하는 양으로서 측정할 수 있다. 필요하면, 20mM Imidazole-HCl(pH 7.0) 등의 적절한 완충액 중에서 이들 공정을 실시할 수 있다.
- [0298] 계 중의 각 성분의 농도는 당업자라면 적절히 결정할 수 있지만, 예를 들어 이하의 범위로 할 수 있다.
- [0299] MgCl<sub>2</sub>: 0.5 내지 50mM
- [0300] 아스파라긴산: 0.2 내지 20mM
- [0301] PEP: 0.02 내지 2mM
- [0302] ATP: 0.1 내지 10mM
- [0303] AMP: 0.025 내지 2.5mM
- [0304] NADH: 0.025 내지 2.5mM
- [0305] PPK: 0.01 내지 1U/ml
- [0306] ASS: 0.01 내지 1U/ml
- [0307] ADI: 0.01 내지 1U/ml
- [0308] 젖산 탈수소 효소: U/ml
- [0309] 젖산 탈수소 효소 반응을 이용하는 형태에서는, 적어도 0 내지 200 μM의 범위에서 아르기닌의 정량이 가능하다.
- [0310] 또한, 본 발명의 이 방법은 아르기닌 이외의 단백질을 구성하는 19종류의 아미노산, 요소 및 암모니아가 협잡하는 경우라도, 아르기닌만을 선택적으로 정량할 수 있다. 또한, 피검 시료 중에 아스파라긴산이 협잡하고 있는 경우에서도, 시트룰린 선택적인 정량은 가능하다.
- [0311] II. AARS를 이용한 아미노산의 정량 방법
- [0312] 본 발명의 다른 형태에서는, 아미노산 정량법은, 아미노산, 및 아데노신 3인산(ATP)에, 이 아미노산에 대응하는 아미노아실 tRNA 합성 효소(AARS)를, (아미노아실 AMP)-AARS 복합체 분해 시약 존재 하에, 작용시켜서, 반응 생성물을 수득하는 공정 (A); 및 공정 (A)의 생성물 중 어느 하나를 정량하는 공정 (B)를 포함하고, 수득된 생성물량에 기초하여 아미노산량을 결정하는, 아미노산을 정량하는 방법이다.
- [0313] 본 발명에 의하여, 정량할 수 있는 아미노산은, 대응하는 AARS가 존재하는 것이다. AARS가 입수 가능하면, 어

는 쪽 아미노산이라도 본 발명에서 정량할 수 있다. 예를 들어, 단백질을 구성하는 20종류의 아미노산, 즉, L-알라닌, L-시스테인, L-아스파라긴산, L-글루타민산, L-페닐알라닌, 글리신, L-히스티딘, L-이소류신, L-리신, L-류신, L-메티오닌, L-아스파라긴, L-프롤린, L-글루타민, L-아르기닌, L-세린, L-트레오닌, L-발린, L-트립토판, L-티로신은, 본 발명에 의하여 정량할 수 있는 아미노산이다. 본 발명에서는 아미노산에 관하여, 「L-」을 생략해서 기재하는 경우가 있는데, 당업자라면 AARS와의 관계를 참작하여, 이 아미노산이 L체에 한정될 것인지 아닌지를 적절히 판단할 수 있다. 또한, 본 발명에서는 통상의 표기법에 따라서, 아미노산을 3문자로 표기하는 경우가 있다.

- [0314] [공정 A]
- [0315] 본 발명의 공정 (A)에서는, 아미노산, 및 아데노신 3인산(ATP)에, 이 아미노산에 대응하는 아미노아실 tRNA 합성 효소(AARS)를, (아미노아실 AMP)-AARS 복합체 분해 시약 존재 하에, 작용시켜서 반응 생성물을 수득한다.
- [0316] 본 발명에서는 측정 대상이 되는 아미노산에 대응하는 AARS를 사용한다. 필요한 AARS는 시판되고 있으면 그것을 사용할 수 있고, 또한, 당업자라면 입수 가능한 적절한 자원을 이용하고, 유전자 실험 기술 등을 사용하여 적절히 조제할 수 있다. AARS의 유전자 실험 기술에 의한 조제는, 단백질의 조제에 관한 당업자에게 잘 알려진 일반적인 수법을 적용할 수 있고, 또한, 본 명세서의 실시예에 기재한 순서, 조건을 참고로 조제할 수 있다.
- [0317] 또한, AARS 중 대장균 유래 GlnRS, GluRS, ArgRS에 관해서는 tRNA와 결합하여, 활성화되지 않으면 상기 반응식 1이 진행되지 않는 경우가 있는 것이 알려져 있다. 이들 AARS를 사용할 때에는, 공정 (A)에서 tRNA를 첨가하면 좋다. 또한, tRNA는 측정 대상 아미노산과 동등하게 높은 몰 농도로 할 필요는 없고, AARS와 동등하게 낮은 몰 농도로 첨가하면 충분하다. tRNA 조제를 위한 방법은 당업자에게는 잘 알려져 있다(예를 들어, 『기초 생화학 실험법 제 4권 핵산·유전자 실험』 일본 생화학회편에 기재된 방법 등).
- [0318] tRNA를 사용할 경우, 정량하고자 하는 대상 아미노산에 대응하는 tRNA 이외의 이종(異種)의 tRNA, mRNA, rRNA의 혼입은 특별히 악영향을 주지 않는다고 생각할 수 있으므로, 전 RNA 추출액을 사용하는 것이 상기 3종 중 어느 AARS를 사용하는 경우에서도 유용할 것이다.
- [0319] 본 발명에서 「AARS」라고 할 때는 특별히 기재한 경우를 제외하고, 특정한 종으로부터 생산되는 것에 한정되지 않는다. 정량하고자 하는 대상 아미노산에 특이적 또는 선택적으로 작용할 수 있고, (아미노아실 AMP)-AARS 복합체를 형성할 수 있는 것이면 좋다. AARS에 관하여, 「대응하는 아미노산」이라고 할 때는, 그 AARS가 특이적 또는 선택적으로 작용하는 아미노산을 가리킨다.
- [0320] 본 발명에 사용하는 AARS는 자연계에 존재하는 천연형이어도 좋고, 유전자 개변을 실시한 개변형이어도 좋다. 또한, 본 발명에 사용하는 AARS는, AARS를 코딩하는 유전자를 대장균이나 다른 생물을 숙주로서 발현시켜서 수득된, 재조합 효소이어도 좋다.
- [0321] 본 발명에 사용할 수 있는 AARS의 조제 방법은 특별히 제한되지 않고, 화학합성에 의해 합성한 단백질이어도 좋고, 유전자 재조합 기술에 의해 작제한 재조합 단백질이어도 좋다. 재조합 단백질을 작제하는 경우에는, 당해 단백질을 코딩하는 유전자를 DNA로서 취득하고, 적당한 발현계에 도입함으로써, 상기 AARS를 생산할 수 있다. 전형적인 AARS의 조제 방법은, 적절한 생물종으로부터 추출한 게놈 DNA로부터 해당하는 유전자를 PCR에서 증폭하고, pET 또는 pUC 등의 플라스미드에 넣은 벡터를 구축한 후, 그것에 의해 BL21, JM109 등의 숙주 균주를 형질 전환하고, 배양하는 것이다. 이들 이외의 다른 공지의 방법도 적절히 사용할 수 있다.
- [0322] 본 발명에는 (아미노아실 AMP)-AARS 복합체 분해 시약을 사용한다. 본 발명에서는 이 시약을 단순히 「복합체 분해 시약」이라고 하는 경우도 있다.
- [0323] 본 발명에서 「(아미노아실 AMP)-AARS 복합체 분해 시약」 또는 「복합체 분해 시약」이라고 할 때에는, 특별히 기재한 경우를 제외하고, (아미노아실 AMP)-AARS 복합체를 분해해서 AARS를 유리형으로 재생할 수 있는 것을 말한다. 복합체 분해 시약은, 바꾸어 말하면, 아미노아실 AMP에서의 아미노산과 AMP 사이의 에스테르 결합을, 구핵 치환 반응에 의해 절단하는 화합물, 또는 아미노아실기를 AMP 이외로 전이시킬 수 있는 화합물이라고 말할 수도 있다. 바람직하게는, tRNA를 포함하지 않는 개념이며(즉, 복합체 분해 시약(tRNA를 제외함)), 구체적으로는 아민류 또는 카르바니온이고, 보다 특정한 예는, 디메틸 아민, 트리메틸 아민, 하이드록실 아민, 하이드라진 또는 메틸 아민이다.
- [0324] 본 발명에 사용되는 복합체 분해 시약의 바람직한 예의 하나는, 하이드록실 아민(NH<sub>2</sub>OH)이다. 하이드록실 아민은 본 발명에서 하기의 반응을 진행시킨다.

- [0325] [수학식 3]
- [0326] (아미노아실 AMP)-AARS 복합체 + 하이드록실 아민 → 아미노산 하이드록삼산 + AMP + AARS
- [0327] 상기 반응에 있어서 하이드록실 아민은, 아미노아실 AMP의 카복실기의 탄소에 구핵 반응함으로써, (아미노아실 AMP)-AARS 복합체의 분해를 일으킨다.
- [0328] 본 발명에 있어서는, 하이드록실 아민과 같은 반응을 일으킬 수 있고, 또한, (아미노아실 AMP)-AARS 복합체의 기질 포켓까지 액세스할 수 있는 구핵 시약이라면, 복합체 분해 시약으로서 적합하게 사용할 수 있다. 이러한 예로서, 하이드라진(H<sub>2</sub>NNH<sub>2</sub>) 및 메틸 아민(CH<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>)을 들 수 있다.
- [0329] 공정 (A)에서는 그 밖에 아데노신 3인산(ATP)을 사용한다.
- [0330] 공정 (A)에서의 반응 생성물은, 예를 들어, 피로인산이며, 상술한 바와 같이 하이드록실 아민을 사용하는 경우에는 아미노산 하이드록삼산이다.
- [0331] [공정 B]
- [0332] 본 발명의 공정 (B)에서는, 공정 (A)의 생성물 중 어느 하나를 정량한다.
- [0333] 공정 (A)의 생성물로서, 피로인산을 정량할 경우, 피로인산을 정량하기 위한 여러 방법이 본 발명을 위해 적용될 수 있다. 피로인산 측정을 위한 바람직한 형태 중 하나는 공정 (A)와 동일계 중에서 실시할 수 있는 방법이다.
- [0334] 공정 (A)와 동일계 중에서 실시할 수 있는 피로인산의 정량 방법의 예로서는, 일본 특원2012-026534 및 본 명세서의 I.의 항에 상세히 기재한 방법, 구체적으로는 피루브산 디키나제(PPDK)를 사용하여, 피로인산으로부터 피루브산을 생성하고, 피루브산을 정량하는 방법을 들 수 있다. PPDK를 사용한 피루브산의 정량 방법은, ATP 공존 하에서도 실시할 수 있으므로, 측정 대상 물질과 함께 ATP를 기질로 하여 피로인산을 생성하는 효소(구체적으로는, 여기에서는 AARS)의 반응과 공액(복수의 효소에 의한, 연속 반응. 「커플링」과 같은 뜻. 특히, 한쪽의 효소의 생성물이 또 한쪽의 효소의 기질로서 사용되는 연속 반응을 가리킴.)시킬 수 있다. 한편, AARS는 그 기질 특이성의 높이나, 발 에르곤 반응인 ATP 가수분해에 의해 높은 반응성을 갖는다. AARS와 PPDK를 공액시킨 본 발명의 형태는 이러한 메리트를 향수(享受)할 수 있다.
- [0335] 피루브산 정량 방법의 구체적인 예로서는, (1) 피루브산을 젯산 탈수소 효소(LDH)와 반응시키는 수법을 들 수 있다(실시에 6의 8. 참조). 또는, (2) 피루브산을 피루브산 산화 효소 및 피옥시다제와 반응시키는 수법을 들 수 있다. 이들 피로인산의 정량 방법은 무기 인산이나 ATP의 공존에 영향을 받지 않고, 또한, AARS의 기질인 ATP를 AMP로부터 재생할 수 있다는 특징을 갖는다. 또한, PPDK, LDH, 피루브산 산화 효소, 피옥시다제는 각각 이하에 나타내는 반응을 촉매한다.
- [0336] [수학식 4]
- [0337] PPDK: 피로인산 + 포스포에놀피루브산 + AMP → 피루브산 + ATP + 무기 인산
- [0338] LDH: 피루브산 + NADH → 젯산 + NAD<sup>+</sup>
- [0339] 피루브산 산화 효소: 피루브산 + 인산 + O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O → 아세틸인산 + 이산화탄소 + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- [0340] 피옥시다제: 2H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 4-아미노안티피린 + 페놀 → 퀴논이민 색소 + 4H<sub>2</sub>O
- [0341] 상기한 것 이외의 피로인산 정량법으로서, 피로인산을 피로포스파타제와 반응시켜서 무기 인산으로 변환하고, 무기 인산을 각종 수법으로 정량하는 방법을 들 수 있다. 무기 인산 정량법으로서, 예를 들어, 몰리브덴 블루법을 들 수 있다 (실시에 6의 9. 참조). 이것은, 인산을 산성 조건 하에 몰리브덴산 암모늄과 환원제와 반응 시킴으로써 생성되는 색소를 분광 광도적으로 정량하는 수법이다. 또한, 피로포스파타제는 이하에 나타내는 반응을 촉매한다.
- [0342] [수학식 5]
- [0343] 피로포스파타제: 피로인산 → 2×무기 인산
- [0344] 또한, 상기한 것 이외의 피로인산 정량법으로서, ATP 설프릴라제 등의 효소에 의하여 피로인산으로부터 ATP를

생성시켜서, 루시페라제 등을 사용하여 ATP를 정량하는 수법이 알려져 있다. 그러나, 이 피로인산 정량법에서는, AARS의 기질로서 첨가하고 있는 ATP에 의해, 피로인산이 과잉으로 추산되는 경우가 있고, 또한, 루시페라제 등에 의해 ATP가 고갈되어 AARS의 반응이 진행되지 않게 되는 경우가 있다. 따라서, 상기 방법과 같이 ATP 생성에 기초하는 피로인산 정량법에 대해서는, 본 발명의 AARS와의 공액계에 사용하는 경우에는, 특별한 배려가 필요할 것이다. 또한, ATP 설프릴라제는 이하에 나타내는 반응을 촉매한다.

[0345] [수학식 6]

[0346] ATP 설프릴라제: 피로인산+APS → ATP+황산

[0347] 공정 (B)에서 측정 가능한 공정 (A)의 반응액 생성물로서는, (아미노아실 AMP)-AARS 복합체의 분해 산물을 들 수 있다. 예를 들어, 복합체 분해 시약으로서 하이드록실 아민을 사용한 경우에는, 분해 산물로서 아미노산 하이드록삼산과 AMP가 생기는데, 이들 중 어느 하나를 측정해도 좋다. AMP의 정량은, 예를 들어, HPLC를 사용하는 것에 의한다. 하이드록삼산의 정량은, 예를 들어, 산성 조건 하에 염화철과 반응시켜, 540nm의 흡광도를 측정함으로써, 분광 광도적으로 실시할 수 있다.

[0348] [반응 조건]

[0349] 공정 (A)에서 사용하는 AARS의 양은, 본 발명의 피로인산의 정량을 실시할 수 있으면 특별히 한정되지 않고, 시료에 포함되는 피로인산의 존재량, 사용하는 장치, PPK의 순도나 종류에 따라 적절히 결정할 수 있다. 사용하는 AARS의 양은, 반응을 수십분 이내에 종료시키고 싶은 경우에는, 하한은 0.05mU/ml 이상인 것이 바람직하고, 0.1U/ml 이상인 것이 보다 바람직하고, 0.5mU/ml 이상인 것이 더욱 바람직하다. 반응을 보다 신속히 진행시키고 싶은 경우에는, 보다 많은 양을 사용해도 좋다. 또한, 어느 쪽의 경우에서도 상한은 경제성 등의 관점에서 정해도 좋고, 10U/ml 이하로 할 수 있고, 5U/ml 이하여도 좋고, 1U/ml 이하여도 좋다. 또한, 본 발명에 관하여, 반응계에서의 성분의 농도를 나타낼 때는, 특별히 기재한 경우를 제외하고, 그 농도값은 반응계에서의 최종 농도로서의 값이다.

[0350] 본 발명에 있어서는, 복합체 분해 시약의 사용에 의해 AARS가 재생된다. 따라서, AARS의 양은 AARS가 효소로서 기능 가능한 양이면 좋고, 정량하려고 하는 대상 아미노산의 양 미만이어도 좋다. 본 발명자들의 검토에 의하면, 2 μM의 TyrRS 존재 하에 200 μM Tyr의 정량이 가능하였다. 이것으로부터, μM 오더 이하의 AARS, 또는 아미노산에 대하여 1% 이하의 몰 농도가 비교적 적은 양의 AARS로도 본 발명은 실시 가능하다.

[0351] 공정 (A)에서는 복합체 분해 시약이 사용된다. 복합체 분해 시약으로서 하이드록실 아민을 사용하는 경우(또한, 본 발명에서 복합체 분해 시약으로서 하이드라진을 사용한다고 할 때는, 특별히 기재한 경우를 제외하고, 하이드라진을 염으로서 사용하는 경우도 포함한다. 그 밖의 복합체 분해 시약을 사용하는 경우도 동일.), 그 양은 반응을 수십분 이내에 종료시키고 싶은 경우에는, 하한은 5mM 이상인 것이 바람직하고, 50mM 이상인 것이 보다 바람직하고, 400mM 이상인 것이 더욱 바람직하다. 반응시간이 걸려도 좋다면, 보다 적은 양으로 실시할 수 있다. 또한, 어느 쪽의 경우여도 상한량은 취급상의 안전성, 경제성 등의 관점에서 정해도 좋고, 8000mM 이하로 할 수 있고, 4000mM 이하로 할 수 있고, 2000mM 이하로 할 수 있다.

[0352] 복합체 분해 시약으로서 하이드라진 또는 메틸 아민을 사용하는 경우, 본 발명자들의 검토에 의하면, 각각 반응가에서의 최종 농도가 400mM, 20mM이면, 아미노산을 정량할 수 있음이 확인된다. 따라서, 이들 복합체 분해 시약을 사용하는 경우에는, 그 유효성이 확인된 농도의 1/100배 이상, 보다 특정하면 1/10배 이상의 농도로 적합하게 실시할 수 있을 것이다. 또한, 어느 쪽의 경우에서도 상한량은 취급상의 안전성, 경제성 등의 관점에서 정해도 좋고, 8000mM 이하로 할 수 있고, 4000mM 이하로 할 수 있고, 2000mM 이하로 할 수 있다.

[0353] 또한, 복합체 분해 시약으로서 비교적 반응성이 높은 것을 선택하는 경우에는, 반응계로는 반응 직전에 혼합하는 쪽이, 악영향이 나오지 않는다고 생각된다. 당업자라면 이러한 점도 배려하여 공정 (A)를 계획하는 것이 용이할 것이다. 본 발명자들의 검토에 의하면, 하이드록실 아민을 사용한 경우, 하이드록실 아민을 다른 성분과 혼합하여, 약 10분 경과한 정도에서는, 문제가 될만한 영향은 보이지 않았다.

[0354] 공정 (A)에서 사용하는 ATP의 양은, 당업자라면 다른 성분 농도나 반응 조건을 감안하여 적절히 설계할 수 있다. 통상, 공정 (A)에서는 측정하고자 하는 아미노산의 농도 이상의 농도의 ATP를 요하므로, ATP의 농도는 적어도 본 발명에서 측정 가능한 아미노산 농도의 하한값인 5 μM 이상이다.

[0355] 한편으로, 공정 (A)와 피로인산 피루브산 디키나제(PPDK)를 사용하는 공정 (B)를 동일계 내에서 실시할 경우, 이론적으로는 그것보다 저농도의 ATP에서도 문제가 없다고 생각할 수 있다. 이 관점에서는, ATP의 농도의 하한



은 0.002mM 이상인 것이 바람직하고, 0.02mM 이상인 것이 보다 바람직하고, 0.2mM 이상인 것이 더욱 바람직하다.

- [0356] ATP의 농도의 상한은 어느 쪽의 경우에서도 200mM 이하로 할 수 있고, 20mM 이하인 것이 바람직하고, 2mM 이하인 것이 보다 바람직하다.
- [0357] 공정 (B)를 공정 (A)와 동일계 중에서의 피로인산 측정을 위한 공정으로서 실시하고, 또한, 피로인산 피루브산 디키나제(PPDK)에 의해 피로인산으로부터 피루브산을 생성시켜서, 피루브산을 젖산 탈수소 효소(LDH)와 반응시킬 경우(「공정 (B1)」로 함.), 사용하는 PPDK의 양은 본 발명의 피로인산의 정량을 실시할 수 있으면 특별히 한정되지 않고, 시료에 포함되는 피로인산의 존재량, 사용하는 장치, PPDK의 순도나 종류에 따라 적절히 결정할 수 있다. 사용하는 PPDK의 양은, 하한은 0.001U/ml 이상인 것이 바람직하고, 0.005U/ml 이상인 것이 보다 바람직하고, 0.01U/ml 이상인 것이 더욱 바람직하다. 또한, 어느 쪽의 경우에서도 상한은 10U/ml 이하인 것이 바람직하고, 5U/ml 이하인 것이 보다 바람직하고, 1U/ml 이하인 것이 더욱 바람직하다.
- [0358] 공정 (B1)은 PEP 등의 고에너지 인산 화합물의 존재 하에 실시된다. 존재하는 PEP의 양은, 하한은 0.01mM 이상인 것이 바람직하고, 0.025mM 이상인 것이 보다 바람직하고, 0.05mM 이상인 것이 더욱 바람직하다. 또한, 어느 쪽의 경우에서도 상한은 20mM 이하인 것이 바람직하고, 10mM 이하인 것이 보다 바람직하고, 5mM 이하인 것이 더욱 바람직하다.
- [0359] 공정 (B1)은 AMP의 존재 하에 실시된다. 존재하는 AMP의 양은, 하한은 0.01mM 이상인 것이 바람직하고, 0.025mM 이상인 것이 보다 바람직하고, 0.05mM 이상인 것이 더욱 바람직하다. 또한, 어느 쪽의 경우에서도 상한은 20mM 이하인 것이 바람직하고, 10mM 이하인 것이 보다 바람직하고, 5mM 이하인 것이 더욱 바람직하다.
- [0360] 공정 (B1)은 금속 이온의 존재 하에 실시되는 것이 바람직하다. 금속 이온은 마그네슘 이온, 코발트 이온, 또는 망간 이온 중 어느 하나일 수 있지만, 마그네슘 이온인 것이 바람직하다. 사용하는 금속 이온의 양은, 예를 들어, 마그네슘 이온의 경우, 하한은 AMP의 농도에 대하여 0.1당량 이상인 것이 바람직하고, 0.2당량 이상인 것이 더욱 바람직하고, 0.4당량 이상인 것이 더욱 바람직하다. 또한, 어느 쪽의 경우에서도 상한은 10당량 이하인 것이 바람직하고, 5당량 이하인 것이 보다 바람직하고, 2.5당량 이하인 것이 더욱 바람직하다. 가장 바람직한 농도는 인산 공여체의 0.5 내지 2당량, 예를 들어, 1당량이다.
- [0361] 공정 (B1)에서의 젖산 탈수소 효소의 양은, 피로인산의 정량을 실시할 수 있으면 특별히 한정되지 않고, 시료에 포함되는 피로인산의 존재량, 사용하는 장치, 효소의 순도나 종류에 따라 적절히 결정할 수 있다. 사용하는 효소의 양은, 하한은 0.002U/ml 이상인 것이 바람직하고, 0.005U/ml 이상인 것이 바람직하고, 0.01U/ml 이상인 것이 더욱 바람직하다. 또한, 어느 쪽의 경우에서도 상한은 4U/ml 이하인 것이 바람직하고, 2U/ml 이하인 것이 보다 바람직하고, 1U/ml 이하인 것이 더욱 바람직하다.
- [0362] 공정 (B1)은, 또한, NADH의 존재 하에 실시된다. NADH 농도는 너무 낮으면 흡광도의 검출이 곤란하고, 또한, 너무 높으면 감소량 측정치의 정확성이 저하되는 등, 영향이 비교적 크다. 존재하는 NADH의 양은, 하한은 0.01mM 이상인 것이 바람직하고, 0.02mM 이상인 것이 보다 바람직하고, 0.05mM 이상인 것이 더욱 바람직하다. 어느 쪽의 경우에서도 상한은 4mM 이하인 것이 바람직하고, 2mM 이하인 것이 보다 바람직하고, 1mM 이하인 것이 더욱 바람직하다.
- [0363] 공정 (B1)에서는, 340nm의 흡광도를 측정함으로써, 반응 진행에 따른 NADH 감소량을 계측하고, 피루브산 생성량이 산출된다.
- [0364] 공정 (B)를, 피로인산 측정을 위한 공정으로서 실시하고, 또한, 피로인산을 피로포스파타제와 반응시켜서 무기 인산으로 변환하고, 무기 인산을 각종 수법으로 정량하는 경우(「공정 (B2)」로 함.), 사용하는 피로포스파타제의 양은 피로인산의 정량을 실시할 수 있으면 특별히 한정되지 않고, 시료에 포함되는 피로인산의 존재량, 사용하는 장치, 피로포스파타제의 순도나 종류에 따라 적절히 결정할 수 있다. 사용하는 피로포스파타제의 양은, 하한은 0.151U/ml 이상인 것이 바람직하고, 1.5U/ml 이상인 것이 보다 바람직하고, 15U/ml 이상인 것이 더욱 바람직하다. 또한, 어느 쪽의 경우에서도 상한은 6000U/ml 이하인 것이 바람직하고, 600U/ml 이하인 것이 보다 바람직하고, 60U/ml 이하인 것이 더욱 바람직하다. 발색 시약으로서는 물과 농황산을 혼합 후,  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 를 용해한 액과, 물과 농황산을 혼합 후,  $\text{FeSO}_4$ 를 용해한 액을 사용할 수 있다(몰리브덴 블루법). 발색 시약의 예는 본 명세서의 실시예의 항을 참고로 할 수 있다.
- [0365] 공정 (A) 및 공정 (B)를 위한 반응 온도는 사용하는 효소의 최적 온도 등을 고려하여 적절히 설정할 수 있다.

본 명세서의 실시예에서 나타난 바와 같은 효소를 사용할 경우, 각 공정은 실온 내지 37℃에서 바람직하게 실시할 수 있다. 공정 (A) 및 PPK를 사용하여 피로인산을 측정하는 공정 (B)는, 동일계 내에서 동시에 진행시킬 경우에도, 반응 온도는 사용하는 효소의 최적 온도 등을 고려해서 적절히 결정되지만, 실온 내지 37℃, 예를 들어, 30℃에서 바람직하게 실시할 수 있다.

[0366] 공정 (A) 및 공정 (B)를 위한 반응 시간은 피검 시료에 포함되는 아미노산량이나 사용하는 AARS의 양에도 따르지만, 반응은 신속히 진행되는 것으로, 40분 이내, 예를 들어, 약 20분 이내로 할 수 있다.

[0367] 본 발명의 바람직한 형태의 하나에 있어서는, 공정 (A)의 AARS로서, 호열성 생물 유래의 것을 사용한다. 호열성 생물의 예는 Thermus속에 속하는 생물이다. 이러한 형태에서는, 반응을 비교적 고온에서 실시할 수 있고, 고온에서 실시함으로써, 효소 사용량을 적게 할 수 있다는 이점이 있다고 생각된다. 이러한 형태에서의 반응 온도는, 당업자라면 사용하는 AARS에 따라 적절히 설계할 수 있지만, 예를 들어, 50℃ 이상이고, 60℃ 이상인 것이 바람직하고, 65℃ 이상인 것이 더욱 바람직하다. 그리고, AARS의 사용량은 위에서 서술한 양의 1/2 이하, 보다 특정하면 1/5 이하, 더 특정하면 1/9 이하 정도일 수 있다.

[0368] 공정 (A)를 비교적 고온에서 실시할 경우, 바람직하게 조합할 수 있는 공정 (B)의 예는, 위에서 공정 (B2)로서 나타난 폴리브덴 블루법이다.

[0369] III. 본 발명의 용도 등

[0370] 메티오닌은 호모시스테인뇨증 환자에서 고농도 측정되는 것이 알려져 있으며, 임상에서는 매스·스크리닝을 위한 중요한 바이오마커가 된다. 또한, 시트룰린은 체내에 존재하는 아미노산의 일종이며, 혈류 촉진이나 면역 활성화 등에 기여하고 있다. 그 효능으로부터, 서플리먼트 등의 식품이나 의약품에서 널리 사용되고 있다. 또한, 요소 회로 중의 대사물 중 하나이기도 하고, 시트룰린뇨증을 비롯하여, 인체의 요소 회로 대사 이상을 검출하는 바이오마커로서도 중요시되고 있다. 그리고, 아르기닌은 단백질 구성 아미노산의 일종이며, 식품이나 의약품에 포함되는 중요한 구성 성분 중 하나이다. 또한, 요소 회로 중의 대사물 중 하나이기도 하고, 아르기나제 결손증을 비롯하여, 인체의 요소 회로 대사 이상을 검출하는 바이오마커로서도 중요시되고 있다. 본 발명은, 이러한 목적에서 대상 물질을 정량하기 위하여 사용할 수 있다.

[0371] 본 발명의 피로인산의 정량 방법, 메티오닌의 정량 방법, 시트룰린의 정량 방법, 및 아르기닌의 정량 방법은, 각종 생체 유래의 협잡 물질의 공존 하에서도 적절히 대상 물질을 정량할 수 있다. 따라서, 본 발명의 각 방법은 생체 유래 시료, 예를 들어, 혈액, 혈청, 혈장, 뇨, 땀에 대하여 적용할 수 있다. 본 발명은, 특히, 혈액 유래의 시료에 대하여 실시하는데 적합하다. 또한, 본 발명을, 피로인산의 정량 방법을 예로 설명하는 경우가 있는데, 그 설명은 특별히 기재한 경우를 제외하고, 메티오닌의 정량 방법, 시트룰린의 정량 방법, 및 아르기닌의 정량 방법에도 적용된다.

[0372] 본 발명의 방법은 비교적 소량의 대상 물질의 특정 또는 정량을 위해 사용할 수 있다. 본 발명의 방법은, 용량 수십 내지 수백  $\mu\text{L}$ 의 계로서 실시할 수 있다. 본 발명의 방법을 혈액 시료를 대상으로 실시하려고 하는 경우에는, 혈액 시료는 혈장이나 혈청, 건조 여과지 혈액일 수 있다. 건조 여과지 혈액을 사용하는 방법은, 예를 들어, 신생아의 발뒤꿈치로부터 채취한 혈액을 전용 채혈 여과지에 충분한 양으로 배어둘게 한 것으로 할 수 있고, 신생아의 매스·스크리닝에 있어서 특히 유용하다. 건조 여과지 혈액을 대상으로 하는 구체적인 조건은, 당업자라면 기존의 매스·스크리닝을 위한 방법을 위한 조건을 참고로 적절히 설계할 수 있다.

[0373] 본 발명은, 또한, 피로인산의 정량 방법, 메티오닌의 정량 방법, 시트룰린의 정량 방법, 및 아르기닌의 정량 방법을 위한 키트, 또는 커머셜·패키지(commercial package)를 제공한다. 본 발명의 키트 또는 패키지는 상술한 바와 같은 농도 범위의 각 성분을 단독으로 또는 어느 2개 이상의 혼합물로서 포함하는 각 유닛과, 바람직하게는 키트의 용도나 사용 방법이 기재된 것(상자, 포장, 라벨, 사용 설명서 등)을 포함한다.

[0374] 본 발명에 의하여, 적어도 메티오닌, 시트룰린 및 아르기닌의 간단하고 신속한 정량 방법이 제공된다. 복수 종류의 아미노산의 농도의 다변량 해석은, 병의 유무나 건강 상태의 검사·진단을 위해 주목받고 있다. 본 발명의 정량 방법은 이러한 해석을 위해서도 사용할 수 있다.

[0375] AARS를 사용하는 본 발명에 의하여, 5  $\mu\text{M}$  내지 200  $\mu\text{M}$ 의 아미노산의 정량이 가능하다.

[0376] 본 발명의 방법은 시료 중의 아미노산을 정량하기 위해서 사용할 수 있다. 시료는 측정 대상 아미노산을 포함할 가능성이 있는 시료라면, 어떠한 것이라도 좋고, 예를 들어, 생체 유래물, 예를 들어, 혈액, 혈청, 혈장, 뇨, 땀에 대하여 적용할 수 있다. 또한, 식품, 화장품, 의약품 등을 대상으로 적용할 수도 있다.

- [0377] 시료에는 2종류 이상의 아미노산이 포함되어 있어도 좋고, 본 발명에 의하면, 각각의 아미노산을 정량할 수 있다. 하나의 시료 중의 2종류 이상의 아미노산을 정량할 경우, 바람직한 형태에 있어서는, 본 발명은, 정량 대상 아미노산의 각각에 대응하는 AARS를 준비하고, AARS 이외의 다른 필요 성분을 포함하는 반응 시약을 준비하고, 반응 시약과 시료를 혼합하고, 혼합물을 적어도 대상 아미노산의 종류의 수로 분할하고, 그리고, 각 분할물에 다른 AARS를 첨가하는 공정을 포함한다.
- [0378] 본 발명의 방법은 다종류의 아미노산의 신속한 동시 정량을 가능하게 할 수 있다.
- [0379] 이하에 실시예를 들어 본 발명을 구체적으로 설명하겠지만 본 발명은 이것에 한정되는 것은 아니다.
- [0380] **실시예 1**
- [0381] 1. 각 효소의 조제에
- [0382] 1-1. PPDk 발현 플라스미드의 구축
- [0383] *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* NBRC12426주 유래 PPDk(PfPPDK) 및 *Thermoproteus tenax* NBRC100435주 유래 PPDk(TtPPDK)의 발현용 플라스미드를 구축하였다. 각 균체로부터 게놈 DNA를 조제하였다.
- [0384] PfPPDK에 대하여, 상기 게놈 DNA를 주형으로 하고, 데이터베이스 상의 PPDk 유전자 서열(서열번호 1)을 바탕으로 설계한 프라이머(서열번호 2, 3)를 사용하여 PCR을 실시하여, 유전자를 증폭시켰다. 증폭 산물을 pET-28a에 삽입하고, PfPPDK 발현용 플라스미드로 하였다. TtPPDK에 대하여, 상기 게놈 DNA를 주형으로 하고, 데이터베이스 상의 PPDk 유전자 서열(서열번호 4)을 바탕으로 설계한 프라이머(서열번호 5, 6)를 사용하여 PCR을 실시하여, 유전자를 증폭시켰다. 증폭 산물을 pET-28a에 삽입하고, TtPPDK 발현용 플라스미드로 하였다.
- [0385] 각 발현 플라스미드를 시퀀싱하고, 염기 서열을 확인하였다. 데이터베이스 상의 유전자와 비교하여 비동의 치환이 일어나고 있는 개소에 대해서는 QuikGene 키트에 의하여 수정하고, 데이터베이스 상과 동일한 서열의 번역 산물이 수득되도록 하였다.
- [0386] 1-2. AdoMetS 발현 플라스미드의 구축
- [0387] *Escherichia coli* W3110주 균체로부터 게놈 DNA를 조제하였다. 이것을 주형으로 하고, 데이터베이스 상의 AdoMetS 유전자 서열(서열번호 7)을 바탕으로 설계한 프라이머(서열번호 8, 9)를 사용하여 PCR을 실시하여, AdoMetS 유전자를 증폭시켰다. 증폭 산물을 pET-28a에 삽입하고, AdoMetS 발현용 플라스미드로 하였다.
- [0388] 1-3. ASS 발현 플라스미드의 구축
- [0389] 상기의 *E. coli* W3110주 게놈 DNA를 주형으로 하고, 데이터베이스 상의 ASS 유전자 서열(서열번호 10)을 바탕으로 설계한 프라이머(서열번호 11, 12)를 사용하여 PCR을 실시하여, ASS 유전자를 증폭시켰다. 증폭 산물을 pET-28a에 삽입하고, ASS 발현용 플라스미드로 하였다.
- [0390] 1-4. ADI 발현 플라스미드의 구축
- [0391] *Pseudomonas aeruginosa* PA01주 균체로부터 게놈 DNA를 조제하였다. 이것을 주형으로 하고, 데이터베이스 상의 ADI 유전자 서열(서열번호 13)을 바탕으로 설계한 프라이머(서열번호 14, 15)를 사용하여 PCR을 실시하여, AdoMetS 유전자를 증폭시켰다. 증폭 산물을 pET-28a에 삽입하고, AdoMetS 발현용 플라스미드로 하였다.
- [0392] 1-5. 각 효소의 발현, 정제
- [0393] 각 발현용 플라스미드로 대장균 BL21(DE3)주를 형질 전환하고, 대량 발현주로서 사용하였다.
- [0394] 각 발현주를 37℃의 진탕 배양으로 OD<sub>600</sub>이 0.6 내지 0.8에 도달할 때까지 배양하고, IPTG를 최종 농도 0.5mM이 되도록 첨가함으로써 발현 유도를 걸었다. 발현 유도 후, PPDk 및 ADI 발현주는 30℃, AdoMetS 및 ASS 발현주는 37℃에서 4시간 진탕 배양을 실시하고, 집균하였다. 균체를 초음파 파쇄하여, 가용성 획득에 목적 효소가 수득되었다.
- [0395] 각 발현주 파쇄액 상청을 GE 헬스케어사 제조 Ni Sepharose 컬럼에 로드하고, 20mM Tris-HCl, 50mM imidazole 용액으로 세정 후, 20mM Tris-HCl, 500mM imidazole 용액으로 용출시킴으로써 목적 효소를 정제·회수하였다. 상기의 효소액은 필요에 따라 투석이나 한외 여과(限外濾過)에 의해 imidazole의 제거 및 버퍼의 교환을 행하고 나서 사용하였다.

- [0396] 각 효소 정제액은, glycerol을 최종 농도 20%가 되도록 혼합하여 -80℃에서 동결 보존하였을 때, 안정적으로 장기 보존이 가능했다.
- [0397] **실시예 2**
- [0398] **2. 피로인산 정량예**
- [0399] **2-1. 피로인산 정량의 반응 조건예 1**
- [0400] 피로인산을 포함하는 검체와, 하기의 조성의 피로인산 정량용 반응액을 혼합하였다. 혼합액을 30℃에 두어 반응을 진행시키고, 340nm의 흡광도의 감소량을 측정하였다. 혼합액의 액량은 1ml 또는 200 μl가 되도록 하고, 전자의 경우에는 광로 길이 1cm의 큐벳과 흡광 광도계로, 후자의 경우에는 마이크로플레이트(광로 길이 부정(不定))과 마이크로플레이트 리더로 흡광도 측정을 실시하였다. 또한, 도면에서는, 광로 길이 1cm의 큐벳으로 측정했을 때의 흡광도를 Abs, 마이크로플레이트로 측정했을 때의 흡광도를 AU로 표기하였다.
- [0401] 피로인산 정량용 반응액: 20mM Imidazole-HCl(pH 7.0), 5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5mM PEP, 0.5mM AMP, 0.25mM NADH, 0.1U/ml PPK, 0.5U/ml 젖산 탈수소 효소(토끼 근육 유래, 오리엔탈 코보 가부시키가이샤 제조)(농도는 검체와의 혼합 후의 최종 농도)
- [0402] **2-2. 피로인산 정량의 반응 조건예 2**
- [0403] 피로인산을 포함하는 검체와, 하기의 조성의 피로인산 정량용 반응액을 혼합하였다. 혼합액 200 μl을 30℃에 두어서 반응을 진행시키고, 505nm의 흡광도의 증가량을 마이크로플레이트 리더로 측정하였다.
- [0404] 피로인산 정량용 반응액: 20mM Imidazole-HCl(pH 7.0), 5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM NH<sub>4</sub>Cl, 0.5mM PEP, 0.5mM AMP, 0.1U/ml PPK, 0.5mM Na-PO<sub>4</sub>, 1mM 4-아미노안티피린, 1mM 페놀, 1.5U/ml 피루브산 산화 효소(PYRUVATE OXIDASE from Microorganism(Diagnostic Reagent Grade) TOYOBO ENZYMES), 7.5U/ml 퍼옥시다제(농도는 검체와의 혼합 후의 최종 농도)
- [0405] **2-3. 피로인산 정량의 반응 조건예 3**
- [0406] 피로인산을 포함하는 검체와, 하기의 조성의 피로인산 정량용 반응액을 혼합하였다. 혼합액 200 μl을 30℃에 두어서 반응을 진행시키고, 590nm의 형광(여기광 530nm)의 증가량을 마이크로플레이트 리더로 측정하였다.
- [0407] 피로인산 정량용 반응액: 20mM Imidazole-HCl(pH 7.0), 5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM NH<sub>4</sub>Cl, 0.5mM PEP, 0.5mM AMP, 0.1U/ml PPK, 0.5mM Na-PO<sub>4</sub>, 50 μM ADHP, 1.5U/ml 피루브산 산화 효소, 7.5U/ml 퍼옥시다제(농도는 검체와의 혼합 후의 최종 농도)
- [0408] **2-4. 피로인산 정량의 검량선 작성예**
- [0409] 각종 농도의 피로인산 표준 용액을 검체로서 사용하고, 검량선이 작성 가능한지 검증하였다.
- [0410] 반응 조건을 실시예 2-1에 기재한 바와 같이 하고, 광로 길이 1cm의 큐벳과 흡광 광도계로 측정하였다. 반응은 혼합 후 10분 후에는 종료하였고, PfPPDK를 사용한 계에서는 도 1(A), TtPPDK를 사용한 계에서는 도 1(B)와 같은 검량선이 획득되었다. 검량선의 직선성은 높고, 본 수법에 의해 적어도 0 내지 200 μM의 범위에서 피로인산의 정량이 가능한 것이 나타났다. 또한, 검량선의 경사는, PfPPDK를 사용했을 때 6.0mM<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>, TtPPDK를 사용했을 때 6.4mM<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>이며, 이것은 NADH의 몰 흡광 계수(6.2mM<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>)와 동등한 값인 것으로부터, 검체 중의 피로인산의 거의 전량이 NADH 산화에 사용된 것이 나타났다.
- [0411] 반응 조건을 실시예 2-1에 기재한 바와 같이 하고, PfPPDK를 사용하고, 마이크로플레이트와 마이크로플레이트 리더로 측정을 한 경우의 결과는 도 2와 같이 되었다. 흡광도계를 사용한 경우와 마찬가지로 직선성이 높은 검량선이 획득되고, 본 계에 의한 피로인산 정량이 마이크로플레이트 리더에서도 사용 가능한 것이 나타났다.
- [0412] 실시예 2-2와 같은 반응 조건에서 PfPPDK를 사용하여 측정을 행한 결과, 도 3과 같은 검량선이 획득되었다. 실시예 2-1과 마찬가지로 직선성이 높은 검량선이 획득되고, 본 계가 4-아미노안티피린을 사용한 발색계로도 사용 가능한 것이 나타났다.
- [0413] 실시예 2-3과 같은 반응 조건에서 PfPPDK를 사용하여 측정을 행한 결과, 도 4와 같은 검량선이 획득되었다. 0

내지 10  $\mu$ M의 범위의 피로인산 농도로 높은 직선성이 수득되고, ADHP 등의 형광 색소를 사용함으로써, 저농도의 피로인산에서도 고감도로 정량 가능한 것이 나타났다.

- [0414] 2-5. 인산 또는 ATP 공존 하에서의 피로인산 정량
- [0415] 본 정량계가 인산 또는 ATP 공존 하에서도 사용 가능한지 여부를 검증하기 위해서, 하기의 3종류 중 어느 하나를 검체로서 사용하고, 피로인산의 검량선이 작성 가능한지를 검증하였다.
- [0416] · 각종 농도의 피로인산 표준 용액
- [0417] · 각종 농도의 피로인산 표준 용액과 0.3mM 인산 표준 용액(농도는 반응액과의 혼합 후 최종 농도)
- [0418] · 각종 농도의 피로인산 표준 용액과 0.3mM ATP 표준 용액(농도는 반응액과의 혼합 후 최종 농도)
- [0419] 반응 조건은 실시예 2-1과 같이 하고, PPDK에는 PfPPDK를 사용하였다. 상기 3종류의 샘플로 각각 측정을 행한 결과, 도 5와 같은 검량선이 수득되었다. 각 피로인산 농도에서의 흡광도나, 3조건에서의 검량선의 경사에 대하여, 인산 또는 ATP의 공존에 의한 현저한 차는 보이지 않았다. 따라서, 본 피로인산 정량계가 인산 또는 ATP의 공존 하에서도 영향을 받지 않고, 정량이 가능한 것이 나타났다.

[0420] 2-6. 생체 시료에서의 피로인산 첨가 회수 실시예

- [0421] 본 정량계가 실제로 생체 시료 공존 하에서도 사용 가능한지 여부를 검증하기 위해서, 하기 2종류 중 어느 하나를 검체로서 사용하고, 피로인산의 검량선이 작성 가능한지를 검증하였다.
- [0422] · 각종 농도의 피로인산 표준 용액
- [0423] · 각종 농도의 피로인산 표준 용액과 50% 인간 혈장(농도는 반응액과의 혼합 후 최종 농도)
- [0424] 반응 조건은 실시예 2-1과 같이 하고, PPDK에는 PfPPDK를 사용하였다. 상기 2종류의 샘플로 각각 측정을 행한 결과, 도 6과 같은 검량선이 수득되었다. 각 피로인산 농도에서의 흡광도나, 2조건에서의 검량선의 경사에 대하여, 인간 혈장의 공존에 의한 현저한 차는 보이지 않았다. 따라서, 본 피로인산 정량계가 인간 혈장 공존 하에서도 영향을 받지 않고, 생체 시료에 있어서도 정량이 가능한 것이 나타났다.

[0425] **실시예 3**

[0426] 3. 메티오닌 정량예

[0427] 3-1. 메티오닌 정량의 반응 조건예

[0428] 메티오닌을 포함하는 검체와, 하기의 조성의 메티오닌 정량용 반응액을 혼합하였다. 혼합액 200  $\mu$ l을 30 $^{\circ}$ C에 두어서 반응을 진행시키고, 340nm의 흡광도의 감소량을 마이크로플레이트 리더로 측정하였다.

[0429] 메티오닌 정량용 반응액: 20mM Imidazole-HCl(pH 7.0), 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM ATP, 0.5mM PEP, 0.4mM AMP, 0.25mM NADH, 0.1U/ml PfPPDK, 0.5U/ml 젖산 탈수소 효소, 0.2U/ml AdoMetS(농도는 검체와의 혼합 후의 최종 농도)

[0430] 3-2. 메티오닌 정량의 검량선 작성예

[0431] 검체로서, 반응액과의 혼합 후 최종 농도가 0 내지 100  $\mu$ M이 되도록 하는 표준 메티오닌 용액 또는 표준 피로인산 용액을 사용하였다. 각 샘플의 메티오닌 또는 피로인산 최종 농도와 흡광도 차를 플롯한 것을 도 7에 도시하였다. 메티오닌 첨가 샘플에서도 피로인산 첨가 샘플과 마찬가지로 직선성이 높은 검량선이 수득되고, 본 반응액으로 메티오닌 정량이 가능한 것이 나타났다. 또한, 메티오닌 검량선과 피로인산 검량선의 경사는 거의 일치하고 있고, 반응액 중의 메티오닌의 거의 전부가 피로인산으로 변환되어 반응에 사용된 것이 나타났다.

[0432] 3-3. 각종 아미노산 및 암모니아와의 반응성

[0433] 검체로서, 반응액과의 혼합 후 최종 농도가 200  $\mu$ M이 되도록 하는 각종 아미노산 및 NH<sub>4</sub>Cl을 사용하였다. 또한, 아미노산으로서는, 메티오닌 이외의 19종의 단백질 구성 아미노산을 사용하였다.

[0434] 측정 결과, 어느 쪽의 샘플에서도, 검체 의존적인 유의한 흡광도 변화는 보이지 않았다. 이것으로부터, 본 정량계가 메티오닌 이외의 단백질 구성 아미노산이나 암모니아와 반응성을 갖지 않고, 선택성이 높은 메티오닌 정량이 가능한 것이 나타났다.

[0435] **실시예 4**

- [0436] 4. 시트룰린 정량예
- [0437] 4-1. 시트룰린 정량의 반응 조건예
- [0438] 20mM Imidazole-HCl(pH 7.0), 5mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM 아스파라긴산, 2mM PEP, 1mM ATP, 0.25mM AMP, 0.25mM NADH, 0.1U/ml PfPPDK, 0.5U/ml 젓산 탈수소 효소, 0.2U/ml ASS, 0 내지 200 μM 시트룰린을 최종 농도로 포함하는 반응액을 조제하였다. 혼합액 200 μl을 30℃에 두어서 반응을 진행시키고, 340nm의 흡광도의 감소량을 마이크로플레이트 리더로 측정하였다.
- [0439] 4-2. 시트룰린 정량의 검량선 작성예
- [0440] 검체로서, 반응액과의 혼합 후 최종 농도가 0 내지 200 μM가 되는 표준 시트룰린 용액 또는 표준 피로인산 용액을 사용하였다. 각 샘플의 시트룰린 또는 피로인산 최종 농도와 흡광도 차를 플롯한 것을 도 8에 도시하였다. 시트룰린 첨가 샘플에서도 피로인산 첨가 샘플과 마찬가지로 직선성이 높은 검량선이 수득되고, 본 반응액으로 시트룰린 정량이 가능한 것이 나타났다. 또한, 시트룰린 검량선과 피로인산 검량선의 경사는 거의 일치하고 있고, 반응액 중의 시트룰린의 거의 전부가 피로인산으로 변환되어 반응에 사용된 것이 나타났다.
- [0441] 4-3. 각종 아미노산 및 요소와의 반응성
- [0442] 검체로서, 반응액과의 혼합 후 최종 농도가 200 μM이 되도록 하는 각종 아미노산 및 요소를 사용하였다. 또한, 아미노산으로서는, 아스파라긴산 이외의 19종의 단백질 구성 아미노산을 사용하였다.
- [0443] 측정 결과, 어느 쪽의 샘플에서도 검체 의존적인 유의한 흡광도 변화는 보이지 않았다. 이것으로부터, 본 정량계가 시트룰린 이외의 단백질 구성 아미노산이나 요소와 반응성을 갖지 않고, 선택성이 높은 시트룰린 정량이 가능한 것이 나타났다.
- [0444] 실시예 5
- [0445] 5. 아르기닌 정량예
- [0446] 5-1. 아르기닌 정량의 반응 조건예
- [0447] 20mM Imidazole-HCl(pH 7.0), 5mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM 아스파라긴산, 2mM PEP, 1mM ATP, 0.25mM AMP, 0.25mM NADH, 0.1U/ml PfPPDK, 0.5U/ml 젓산 탈수소 효소, 0.2U/ml ASS, 0.2U/ml ADI, 0 내지 200 μM 아르기닌을 최종 농도로 포함하는 반응액을 조제하였다. 혼합액 200 μL을 30℃에 두어서 반응을 진행시키고, 340nm의 흡광도의 감소량을 마이크로플레이트 리더로 측정하였다.
- [0448] 5-2. 아르기닌 정량의 검량선 작성예
- [0449] 검체로서, 반응액과의 혼합 후 최종 농도가 0 내지 200 μM이 되도록 하는 표준 아르기닌 용액 또는 표준 시트룰린 용액을 사용하였다. 각 샘플의 아르기닌 또는 피로인산 최종 농도와 흡광도 차를 플롯한 것을 도 9에 도시하였다. 아르기닌 첨가 샘플에서도 시트룰린 첨가 샘플과 마찬가지로 직선성이 높은 검량선이 수득되고, 본 반응액으로 아르기닌 정량이 가능한 것이 나타났다. 또한, 아르기닌 검량선과 시트룰린 검량선의 경사의 차는 10% 정도에 그치고, 반응액 중의 아르기닌의 거의 전부가 시트룰린으로 변환되어 반응에 사용된 것이 나타났다.
- [0450] 5-3. 각종 아미노산, 요소 및 암모니아와의 반응성
- [0451] 검체로서, 반응액과의 혼합 후 최종 농도가 200 μM이 되도록 하는 각종 아미노산, 암모니아, 및 요소를 사용하였다. 또한, 아미노산으로서는, 아르기닌과 아스파라긴산 이외의 18종의 단백질 구성 아미노산을 사용하였다.
- [0452] 측정 결과, 어느 쪽의 샘플에서도 검체 의존적인 유의한 흡광도 변화는 보이지 않았다. 이것으로부터, 본 정량계가 아르기닌이나 시트룰린 이외의 단백질 구성 아미노산이나 요소와 반응성을 갖지 않고, 선택성이 높은 아르기닌 정량이 가능한 것이 나타났다.
- [0453] 실시예 6
- [0454] 6. AARS의 발현계 구축
- [0455] *Thermotoga maritima* MSB8주(NBRC 100826) 유래 CysRS, HisRS, LysRS, ProRS, SerRS, TrpRS, TyrRS를 대장균으로 이중 발현시키기 위한 발현계를 이하와 같이 하여 구축하였다.
- [0456] NBRC로부터 분양된 *T.maritima* 유래 게놈 DNA를 주형으로서 사용하고, 데이터베이스 상의 각종 AARS 유전자 서

열(서열번호 16 내지 22)을 바탕으로 설계한 프라이머(서열번호 23 내지 36)을 사용하여 PCR을 실시하여, 각 유전자를 증폭시켰다. 증폭 산물을 pET-28a에 삽입하고, 각 AARS 발현용 플라스미드로 하였다. 또한, 프라이머 설계시에는, TyrRS 유전자에 관해서는 NdeI 사이트와 HindIII 사이트를 부가하여 N 말단에 His 태그가 붙도록 하고, 그 이외의 유전자에 관해서는 Nco I 사이트와 NotI 사이트를 부가하여 C 말단에 His 태그가 붙도록 하였다.

[0457] *Thermus thermophilus* HB8주 유래 IleRS, MetRS, TyrRS(서열번호 37 내지 39)의 대장균으로의 이중 발현을 위해서는, RIKEN BioResource Center, DNA Bank로부터 제공된 *Thermus thermophilus* 유전자 플라스미드 세트를 사용하였다.

[0458] 7. AARS의 발현, 정제

[0459] 각 발현용 플라스미드로 대장균 BL21(DE3)주를 형질 전환하고, 대량 발현주로서 사용하였다. 각 발현주를 37℃의 진탕 배양으로 OD<sub>600</sub>이 0.6 내지 0.8에 도달할 때까지 배양하고, IPTG를 최종 농도 0.5mM가 되도록 첨가함으로써 발현 유도를 걸었다. 발현 유도 후 30℃에서 4시간 진탕 배양하고, 집균하였다. 균체를 초음파 파쇄하여, 가용성 희분에 목적 효소가 수득되었다.

[0460] 상기의 파쇄액 상청을 GE 헬스케어사 제조 Ni Sepharose 컬럼에 로드하고, 20mM Tris-HCl(pH 7.0), 50mM Imidazole 용액으로 세정 후, 20mM Tris-HCl(pH 7.0), 500mM Imidazole 용액으로 용출시킴으로써 목적 효소를 정제·회수하였다. 상기의 효소액은, 필요에 따라, 투석이나 한의 여과에 의해 Imidazole의 제거나 버퍼의 교환, 농축을 실시하고 나서 사용하였다.

[0461] 8. PPK와 LDH의 공액에 의한 AARS 활성 측정법

[0462] 측정 대상 아미노산을 포함하는 검체와, 하기의 조성의 아미노산 정량용 반응액을 혼합하였다. 혼합액을 30℃에 정치하고, AARS, PPK 및 LDH 반응을 진행시켜서, 340nm의 흡광도의 감소량을 측정하였다. 혼합액의 액량은 200 μl이 되도록 하고, 96웰(well) 마이크로플레이트에 분주 후, 마이크로플레이트 리더로 흡광도를 측정하였다.

[0463] 아미노산 정량용 반응액: 20mM Tris-HCl(pH 7.0), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM NH<sub>4</sub>Cl, 0.3mM PEP, 0.3mM NADH, 0.2mM ATP, 0.2mM AMP, 70mU/ml PPK, 50U/ml LDH, AARS(농도는 검체와의 혼합 후의 최종 농도)

[0464] 9. 몰리브덴 블루 반응에 의한 AARS 활성 측정법

[0465] 측정 대상 아미노산을 포함하는 검체와, 하기의 조성의 아미노산 정량용 반응액을 혼합하였다. 혼합액을 30℃에 정치하고, AARS반응을 진행시켰다. 상기 혼합액 33 μl와 물 66 μl, 300U/ml 효모 유래 피로포스파타제 용액 1 μl를 혼합 후, 실온에서 20분간 정치하여 피로포스파타제 반응을 진행시켰다. 그 후, 하기의 조성의 발색액 A 100 μl와 발색액 B 30 μl를 혼합하고나서 5분간 실온에서 정치하고, 마이크로플레이트 리더로 700nm 또는 900nm의 흡광도를 측정하였다.

[0466] 아미노산 정량용 반응액: 20mM Tris-HCl(pH 7.0), 5mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM ATP, AARS(농도는 검체와의 혼합 후의 최종 농도)

[0467] 발색액 A: 물과 농황산을 3:1로 혼합 후, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O를 0.066g/ml 녹인 용액

[0468] 발색액 B: 물과 농황산을 10000:7로 혼합 후, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O를 145mg/ml 녹인 용액

[0469] 10. 70℃에서의 AARS 활성 측정법

[0470] 측정 대상 아미노산을 포함하는 검체와, 하기의 조성의 아미노산 정량용 반응액을 혼합하였다. 혼합액을 70℃에 정치하고, AARS 반응을 진행시켰다. 상기 혼합액 600 μl와 1M2-머캅토 에탄올 용액 60 μl, 하기의 발색액 240 μl를 혼합하고나서 20분간 실온에서 정치하고, 광로 길이 1cm의 큐벳에서 580nm의 흡광도를 흡광도계로 측정하였다.

[0471] 아미노산 정량용 반응액: 20mM HEPES-NaOH(pH 8.0), 5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5mM ATP, AARS(농도는 검체와의 혼합 후의 최종 농도)

[0472] 발색액: 물과 농황산을 6:1로 혼합 후, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O를 0.025g/ml 녹인 용액

[0473] 11. 하이드록실 아민 첨가 효과의 검증

[0474] 8.에 나타낸 AARS 활성 측정법을 사용하여, 반응액 중에 각종 농도의 하이드록실 아민을 첨가했을 때의 활성 측정을 실시하였다. AARS에는 Thermotoga 유래TyrRS를 사용하였다. 검체에는, 혼합 후의 최종 농도가 0, 25, 50, 100, 150 μM이 되도록 하는 표준 Tyr 용액을 사용하였다. 하이드록실 아민은, 혼합 후의 최종 농도가 0, 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000mM이 되도록 반응액에 첨가하였다. 또한, 이 이후의 실시예에서 사용한 하이드록실 아민은, 사전에 염산을 첨가하여 pH 7.0으로 중화한 것을 가리킨다. TyrRS는 최종 농도 125 μg/ml(10mU/ml)가 되도록 반응액에 첨가하였다. 각종 농도의 Tyr과 하이드록실 아민을 포함하는 검체·반응액을 혼합한 후 신속히 마이크로플레이트 리더에 세트하고, 340nm의 흡광도의 모니터링을 개시하였다. 각 하이드록실 아민 농도 조건의 샘플 그룹 내에서, 0mM Tyr 샘플과의 흡광도 차를 산출하여 플롯한 바, 도 10에 도시한 바와 같은 경시적 변화가 얻어졌다.

[0475] 하이드록실 아민을 50, 100, 200, 400, 600, 800mM 첨가한 조건 하에서는, Tyr 농도에 의존하여, AARS ·PPDK ·LDH의 공액 반응에 유래한다고 생각되는 흡광도 변화가 관찰되었다. 이 반응은, 샘플 혼합 후 5분 내지 1시간 이상 계속되고, 그 후에는 일정한 흡광도 차로 안정되었다. 하이드록실 아민 400mM 이하 샘플에서는, 하이드록실 아민 농도가 높은 샘플일수록 흡광도 차가 안정될 때까지의 시간이 짧았다. 하이드록실 아민 400mM 이상의 샘플에서는, 흡광도 차가 안정될 때까지의 시간에 유의한 차는 보이지 않았다.

[0476] 한편, 하이드록실 아민 비첨가 조건에서는, TyrRS ·PPDK ·LDH의 공액 반응 유래라고 생각되는 흡광도 변화는 보이지 않았다. 이 조건 하에서의 샘플 간의 흡광도 차는 아주 작고, 마이크로플레이트 웰의 오염이나 실험 조작에 의한 오차의 범주에 그친다. 따라서, TyrRS 반응의 진행을 상기 검출계에서 관찰하기 위해서는, 하이드록실 아민 첨가가 불가결한 것이 나타났다.

[0477] 본 실시예의 하이드록실 아민 비첨가 조건은, 특허문헌 1 및 특허문헌 2에서 사용되고 있는 반응 조건과 같은 원리이다. 유사한 조건임에도 불구하고, 상기 특허문헌에서는 AARS 반응에 의한 유의한 피로인산 생성이 검출된 것에 대하여, 본 실시예에서는 검출 불가능이었다. 이러한 결과의 차이의 원인은 불분명하지만, 하나로는, 검출법의 차이에 의한 것일 가능성도 생각된다. 즉, 본 실시예에서는 흡광도법에 의한 검출을 행하고 있는 것에 대하여, 상기 특허문헌에서는 센서 전극 또는 형광법에 의한 검출을 행하고 있고, 검출법의 감도의 차이에 의해 검출의 가부(可否)가 변하는 것일지도 모른다. 어쨌든, 본 실시예의 결과로부터, 적어도 본 실시예와 같은 검출계를 사용하는 경우에 있어서는, 하이드록실 아민 비첨가에서는 검출 불가능했던 AARS 반응에 의한 피로인산 생성이, 하이드록실 아민 첨가에 의해 검출 가능해짐을 밝혔다.

[0478] 도 10에서 나타낸 데이터로부터, 측정 20분 후의 흡광도 차를 세로축, Tyr 농도를 가로축으로 하고, 각 하이드록실 아민 농도마다 검량선을 작성하면, 도 11과 같이 된다. 하이드록실 아민 농도 200, 400, 600, 800, 1000mM 조건으로, 흡광도 차와 Tyr 농도 사이의 상관 계수는 각각 0.9952, 0.9998, 0.9998, 0.9988, 0.9995가 되었다. 모두 검량선으로서 높은 직선성을 갖고 있다고 할 수 있고, 본 반응계에 의해 정밀도가 높은 Tyr 정량이 가능한 것이 나타났다.

[0479] 측정 20분후 이외의 각 타임 포인트에서도 동일하게 검량선을 작성하여 상관 계수를 산출하고, 가로축을 시간으로 하여 상관 계수를 플롯하면, 도 12와 같이 되었다. 어느 하이드록실 아민 농도에서도, 시간 경과와 함께 상관 계수가 상승하여 안정되는 경향이 보였다. 상관 계수가 안정될 때까지 요하는 시간은, 400mM 이하의 하이드록실 아민 샘플에서는 고농도일수록 짧아지고, 그 이상의 농도에서는 유의한 차가 보이지 않았다. 고농도의 하이드록실 아민이 악영향을 미치지 않는 계이면, 보다 고농도의 하이드록실 아민을 첨가함으로써 신속히 반응을 완료시킬 수 있음이 나타났다.

[0480] 12. PPDK와 LDH의 공액에 의한 아미노산 검량선 작성

[0481] 8.에 기재한 AARS 활성 측정법을 사용하고, 검체로서 표준 Cys, Lys, Ser, Tyr 용액을 사용했을 때의 검량선을 작성하였다. 상기 아미노산의 농도는 최종 농도 0 내지 200 μM이 되도록 조제하였다. 하이드록실 아민 농도는, Tyr 검량선 샘플에서 200mM, Cys, Lys, Ser 검량선 샘플에서 1000mM으로 하였다. Thermotoga 유래 CysRS, LysRS, SerRS, TyrRS, Thermus 유래 TyrRS는 각각 최종 농도 0.2(7mU/ml), 0.1(10mU/ml), 0.2(8mU/ml), 0.4(40mU/ml), 0.1mg/ml이 되도록 반응액에 첨가하였다.

[0482] Thermotoga 유래 AARS를 사용했을 때, 각 아미노산에 대하여 도 13 내지 도 16과 같은 검량선이 획득되었다. 어느 검량선에서도 높은 직선성을 갖는 것이 나타났다. 이 결과로부터, 본 정량법에 의해 Tyr뿐만 아니라 Cys, Lys, Ser에 대해서도 정량 가능한 것이 명백해졌다. 또한, 어느 반응액에서도, 하이드록실 아민 비첨가시에는



유의한 흡광도 변화는 보이지 않았다.

- [0483] 상기 아미노산 대신에 피로인산을 추가한 경우도 마찬가지로 검량선을 작성할 수 있지만, Lys, Ser, Tyr 검량선의 경사(기질 mM당의 흡광도 변화량)는 피로인산 검량선의 경사의 80% 이상이 되었다. 이것은, 검체 중의 아미노산의 80% 이상이 반응에 사용되고, 동(同) 몰의 피로인산을 생성한 것을 나타내고 있다. 또한, Cys 검량선의 경사는 다른 검량선에 비하여 다소 낮지만, 이것은 검체 중의 시스테인의 일부가 공기 산화에 의해 시스틴으로 변해버려, 시스테인의 실농도가 저하되었기 때문이라고 생각된다.
- [0484] 또한, Thermus 유래 TyrRS를 사용했을 때, 도 17과 같은 검량선이 수득되었다. Thermotoga 유래 TyrRS를 사용했을 때와 마찬가지로 직선성이 높은 검량선이 수득되고, Thermotoga 이외의 생물종 유래 AARS에서도 정량이 가능한 것이 나타났다.
- [0485] 13. 몰리브덴 블루법에 의한 아미노산 검량선 작성
- [0486] 9.에 기재한 AARS 활성 측정법을 사용하여, 검체로서 표준 His, Pro, Trp 용액을 사용했을 때의 검량선을 작성하였다. 상기 아미노산의 농도는 최종 농도 0 내지 80 μM이 되도록 조제하였다. HisRS, ProRS, TrpRS는 각각 최종 농도 0.1, 0.2, 0.1mg/ml이 되도록 반응액에 첨가하였다.
- [0487] 각 아미노산에 대하여 도 18 내지 도 20과 같은 검량선이 수득되었다. 검출 한계에 가까운 저농도의 아미노산 샘플이었기 때문에 상관 계수는 도 13 내지 도 16의 계에 비하여 떨어지지만, 검량선으로서의 사용에 견디는 직선성을 나타냈다. 따라서, 본 정량법에 의해 His, Pro, Trp에 대하여도 정량 가능한 것, 또한, 8.에 기재한 피로인산 정량법 이외의 수법을 사용해도 정량 가능한 것을 명백히 하였다. 또한, 어느 반응액에서도, 하이드록실 아민 비첨가시에는 유의한 흡광도 변화는 보이지 않았다.
- [0488] 14. 70℃ 인큐베이션에 의한 아미노산 검량선 작성
- [0489] 10.에 기재한 AARS 활성 측정법을 사용하여, 검체로서 표준 Ile, Met, Tyr 용액을 사용했을 때의 검량선을 작성하였다. AARS에는, Thermus 유래 IleRS, MetRS, TyrRS를 사용하였다. 각 AARS는 각각 최종 농도 0.01, 0.08, 0.08mg/ml이 되도록 반응액에 첨가하였다. 상기 아미노산의 농도는 최종 농도 0 내지 100 μM이 되도록 조제하였다. 또한, 복합체 분해 시약으로서, 하이드록실 아민을 최종 농도 400mM 첨가하였다.
- [0490] 각 아미노산에 대하여, 도 21 내지 도 23과 같은 검량선이 수득되었다. 이 결과로부터, 본 정량법에 의해 Ile, Met에 대해서도 정량 가능한 것을 명백히 하였다. 또한, 동시에, 공정 A에서의 반응 온도는 30℃에 한정되지 않고, 70℃ 등의 고온으로도 설정 가능한 것을 명백히 하였다. 또한, 30℃에서 반응을 수행한 11.과 비교하면, Thermus 유래 TyrRS에 대해서는 1오더 낮은 효소 농도로 정량 가능해졌다. 호열성 생물 유래 AARS에 대해서는, 70℃ 등 고온 하에 반응을 수행함으로써, 효소 사용량을 적게 할 수 있다는 이점이 있다고 생각된다.
- [0491] 15. 각 AARS의 기질 특이성
- [0492] Thermotoga 유래 CysRS, HisRS, LysRS, ProRS, SerRS, TrpRS, TyrRS에 대하여, 9.에 기재한 AARS 활성 측정법을 사용하여, 검체로서 각종 아미노산의 표준 용액 중 어느 하나를 사용했을 때의 피로인산 생성의 유무를 검증하였다. 각 AARS는 각각 최종 농도 0.3(8mU/ml), 0.1, 0.2(3mU/ml), 0.2, 0.1(1mU/ml), 0.1, 0.2(20mU/ml)mg/ml가 되도록 반응액에 첨가하였다. Tyr은 최종 농도 1mM, 그 이외의 아미노산은 최종 농도 5mM이 되도록 반응액을 조제하였다. 하이드록실 아민 농도는 모두 최종 농도 1000mM이 되도록 첨가하였다.
- [0493] 또한, Thermus 유래 MetRS와 TyrRS에 대하여, 10.에 기재한 AARS 활성 측정법을 사용하고, 검체로서 각종 아미노산의 표준 용액 중 어느 하나를 사용했을 때의 피로인산 생성의 유무를 검증하였다. 각 아미노산은 최종 농도 200 μM이 되도록 반응액을 조제하였다. 하이드록실 아민은 최종 농도 400mM이 되도록 첨가하였다.
- [0494] 각 AARS와 아미노산의 조합을 포함하는 반응액에서의 활성 검출의 유무를 표 2에 기재하였다. +는 활성이 검출된 것, -는 활성이 검출되지 않은 것을 나타낸다. 각 AARS는 대응하는 1종류의 아미노산에 대해서만 활성을 나타냈다. 이 결과로부터, 이들 AARS를 사용한 정량계에 의하여 각 아미노산종에 대하여 선택성이 높은 정량이 가능함을 명백히 하였다.

표 2

각종 AARS에서의 정성 시험

	Thermotoga 유래 AARS							Thermus 유래 AARS	
	CysRS	HisRS	LysRS	ProRS	SerRS	TrpRS	TyrRS	MetRS	TyrRS
Ala	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cys	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Asp	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glu	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Phe	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gly	-	-	-	-	-	-	-	-	-
His	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Ile	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lys	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Leu	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Met	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Asn	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pro	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Gln	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arg	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ser	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Thr	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Val	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trp	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Tyr	-	-	-	-	-	-	+	-	+

+... 활성 검출    -... 활성 비검출

[0495]

[0496]

16. 각종 복합체 분해 시약의 효과

[0497]

10.에 기재한 AARS 활성 측정법을 사용하여, 복합체 분해 시약으로서 하이드라진 또는 메틸 아민을 첨가했을 때의 검량선을 작성하였다. AARS에는 Thermus 유래 TyrRS를 최종 농도 0.01mg/ml이 되도록 반응액에 첨가하였다. Tyr은 최종 농도 0 내지 100 μM이 되도록 조제하였다. 또한, 하이드라진과 메틸 아민은 각각 최종 농도 400mM, 20mM이 되도록 첨가하였다.

[0498]

측정 20분 후의 흡광도 차를 세로축, Tyr 농도를 가로축으로 하여, 각 복합체 분해 시약마다 검량선을 작성하였다. 하이드라진을 사용한 경우를 도 24에, 메틸 아민을 사용한 경우를 도 25에 도시하였다. 모두 검량선으로서 높은 직선성을 갖고 있다고 할 수 있고, 본 반응계에 의해 정밀도가 높은 아미노산 정량이 가능한 것이 나타났다.

산업상 이용가능성

[0499]

메티오닌이나 시트룰린, 아르기닌은 생체 내의 주요한 아미노산의 일종이며, 식품이나 의약품에 포함되는 중요한 구성 성분의 하나이다. 메티오닌은 필수 아미노산의 하나이며, 혈액 중 콜레스테롤이나 히스타민의 경감, 활성 산소 제거라는 효과가 알려져 있는 한편으로, 대량 투여는 지방간의 원인도 된다. 시트룰린은 혈류 촉진이나 면역 활성화 등에 기여하는 것이 알려져 있고, 그 효능으로부터, 서플리먼트 등의 식품이나 의약품으로 널리 사용되고 있다. 아르기닌은 성장기에 접종이 필요한 준필수 아미노산이며, 면역력 향상이나 피로 회복을 위해 식품이나 의약품에 사용되고 있다. 따라서, 이들 아미노산의 정량은, 식품 분석, 의약품·서플리먼트의 품질 관리, 과잉증·결핍증 시의 혈액 검사 및 효소 센서로서의 이용이 고려된다.

[0500]

또한, 메티오닌은 호모시스틴뇨증 환자에게서 고농도 축적되는 것이 알려져 있고, 임상에서는 매스·스크리닝을 위한 중요한 바이오마커가 된다. 시트룰린과 아르기닌은 요소 회로 중의 대사물의 하나이고, 시트룰린뇨증이나 아르기닌제 결손증을 비롯한 요소 회로 대사 이상의 바이오마커가 된다. 따라서, 이들 아미노산의 정량은, 상기 질병 검출의 간편한 매스·스크리닝으로서의 이용도 기대할 수 있다.

[0501]

아미노산 분석은 식품의 품질 관리나 여러 질병 검출의 마커로서 사용되어, 산업상 넓은 분야에서 수요가 있는 기술이라고 말할 수 있다. 다종류의 아미노산 분석을 행하기 위해서는, HPLC 등의 기기 분석을 이용한다는 선택지밖에 거의 없는 것이 현상이다. 그러나, 기기 분석은 고가·대규모의 분석 기기를 필요로 하고, 현장에서 신속한 측정을 행하는 것은 곤란하다. 또한, 현장에서의 측정이 아니라 의뢰 분석을 행하는 경우에는, 샘플 분

석을 비롯하여 보관이나 수송을 위해 고액의 비용을 필요로 하므로, 그 이용은 지극히 한정된 범위에 머무르고 있다.

[0502] 상기한 바와 같은 기기 분석법과 달리, 본 발명의 수법은 효소적 정량법이며, 고가의 전용 분석 기기를 필요로 하지 않는다. 또한, 방사성 동위원소나 형광법 등 고감도 검출계를 필요로 하는 종래의 효소적 정량법과도 달리, 보다 폭넓은 환경에서 용이하게 실시 가능한 정량법이라고 할 수 있다. 본 발명의 실시예에 의해, 다종류의 아미노산을 신속히 측정하는 것이 가능하다. 예를 들어, AARS 활성 측정 용액과 검체를 혼합 후에 분주하고, 각각 다른 종류의 AARS를 혼합함으로써, 다종류의 아미노산의 동시 정량을 용이하게 실시할 수 있다. 또한, 본 수법이 마이크로플레이트 리더 등의 처리 능력이 높은(high-throughput) 측정 기기에서 실시 가능한 것도, 본 명세서의 실시예에 나타나 있다.

[0503] **서열표 프리 텍스트**

[0504] 서열번호 1: PfPPDK 유전자 서열

[0505] 서열번호 2: 프라이머 서열

[0506] 서열번호 3: 프라이머 서열

[0507] 서열번호 4: TtPPDK 유전자 서열

[0508] 서열번호 5: 프라이머 서열

[0509] 서열번호 6: 프라이머 서열

[0510] 서열번호 7: AdoMetS 유전자 서열

[0511] 서열번호 8: 프라이머 서열

[0512] 서열번호 9: 프라이머 서열

[0513] 서열번호 10: ASS 유전자 서열

[0514] 서열번호 11: 프라이머 서열

[0515] 서열번호 12: 프라이머 서열

[0516] 서열번호 13: ADI 유전자 서열

[0517] 서열번호 14: 프라이머 서열

[0518] 서열번호 15: 프라이머 서열

[0519] 서열번호 16: Thermotoga 유래 CysRS

[0520] 서열번호 17: Thermotoga 유래 HisRS

[0521] 서열번호 18: Thermotoga 유래 LysRS

[0522] 서열번호 19: Thermotoga 유래 ProRS

[0523] 서열번호 20: Thermotoga 유래 SerRS

[0524] 서열번호 21: Thermotoga 유래 TrpRS

[0525] 서열번호 22: Thermotoga 유래 TyrRS

[0526] 서열번호 23: 프라이머 CysRS F

[0527] 서열번호 24: 프라이머 CysRS R

[0528] 서열번호 25: 프라이머 HisRS F

[0529] 서열번호 26: 프라이머 HisRS R

[0530] 서열번호 27: 프라이머 LysRS F

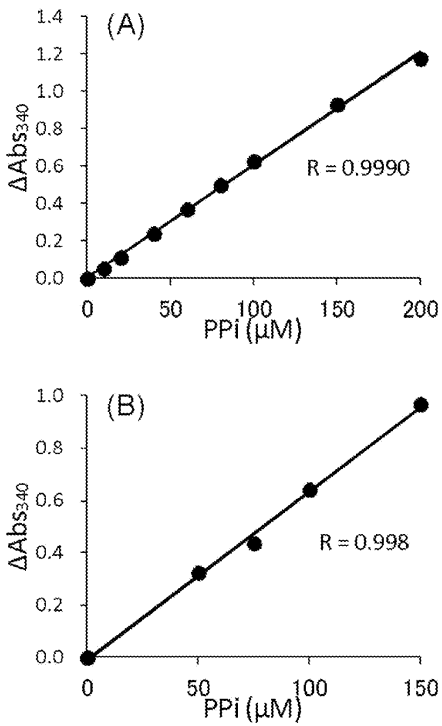
[0531] 서열번호 28: 프라이머 LysRS R

- [0532] 서열번호 29: 프라이머 ProRS F
- [0533] 서열번호 30: 프라이머 ProRS R
- [0534] 서열번호 31: 프라이머 SerRS F
- [0535] 서열번호 32: 프라이머 SerRS R
- [0536] 서열번호 33: 프라이머 TrpRS F
- [0537] 서열번호 34: 프라이머 TrpRS R
- [0538] 서열번호 35: 프라이머 TyrRS F
- [0539] 서열번호 36: 프라이머 TyrRS R
- [0540] 서열번호 37: Thermus 유래 IleRS
- [0541] 서열번호 38: Thermus 유래 MetRS
- [0542] 서열번호 39: Thermus 유래 TyrRS

**도면**

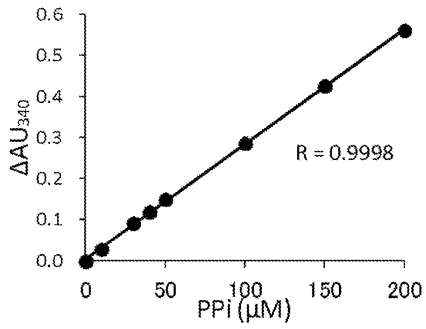
**도면1**

젖산 탈수소 효소 사용시의 피로인산 검량선(흡광도계)



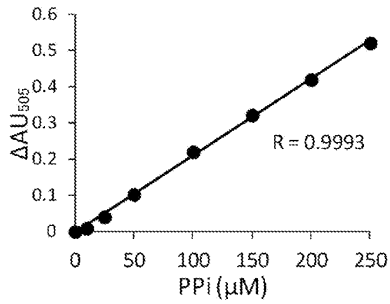
도면2

젖산 탈수소 효소 사용시의 피로인산 검량선(마이크로 플레이트 리더)



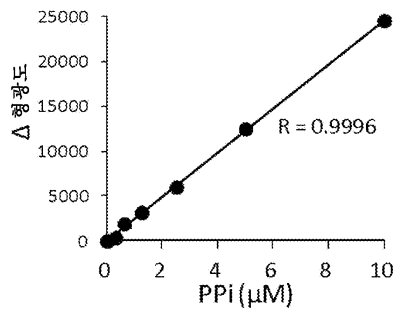
도면3

피루브산 산화 효소 및 발색 색소 사용시의 피로인산 검량선



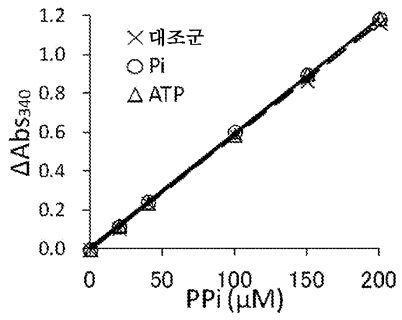
도면4

피루브산 산화 효소 및 형광 색소 사용시의 피로인산 검량선



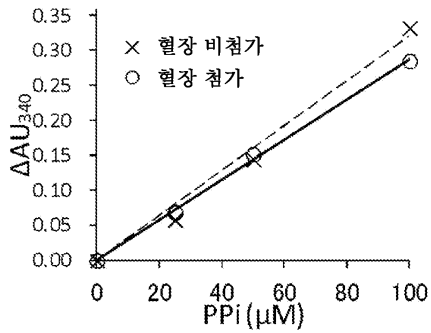
도면5

인산 또는 ATP 공존 하에서의 피로인산 검량선



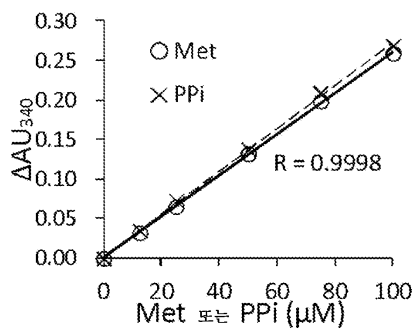
도면6

생체 시료 중에서의 첨가 회수 실험

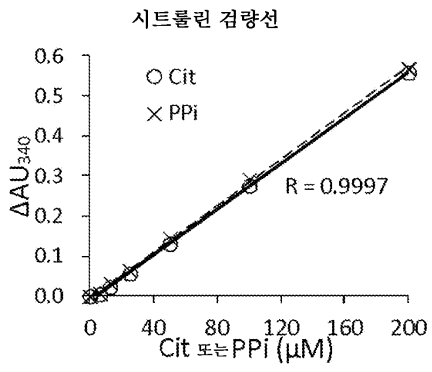


도면7

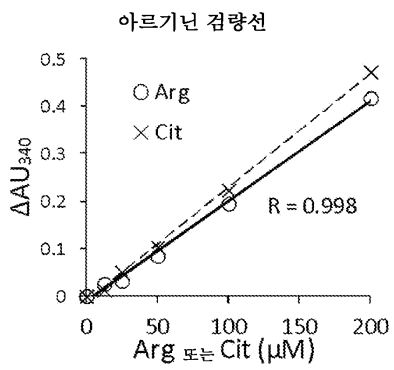
메티오닌 검량선



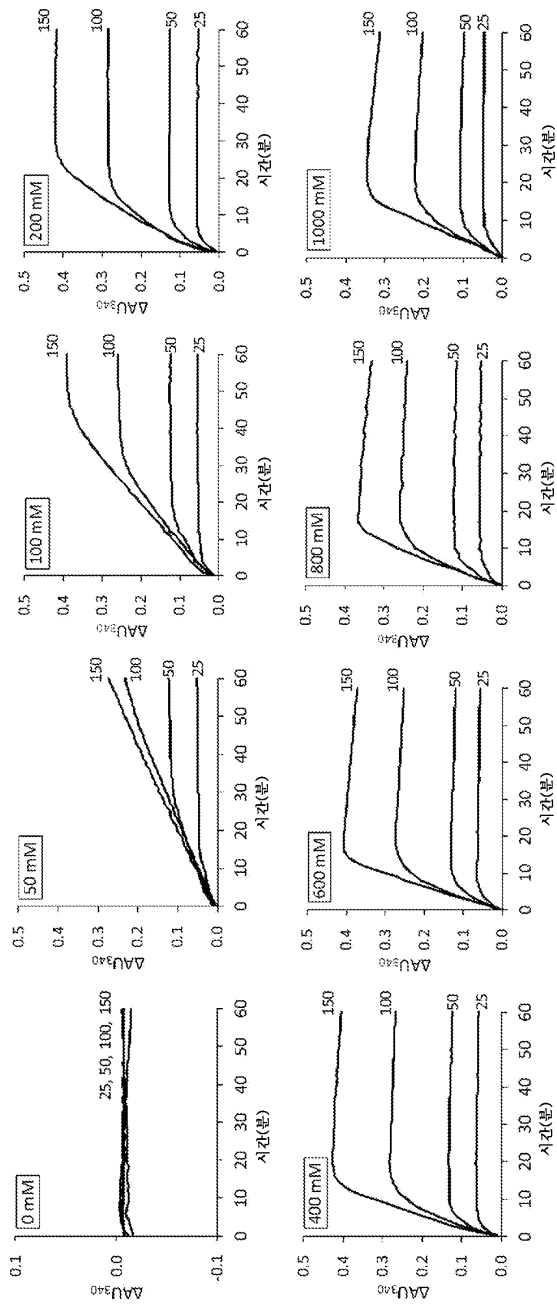
도면8



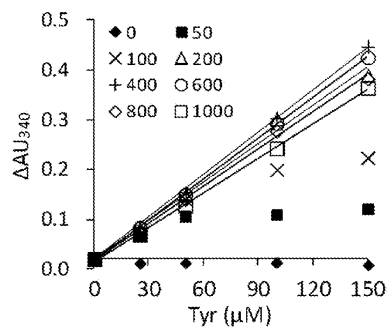
도면9



도면10

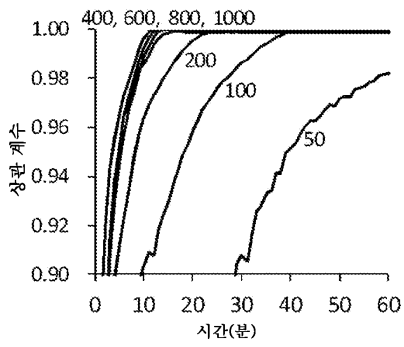


도면11

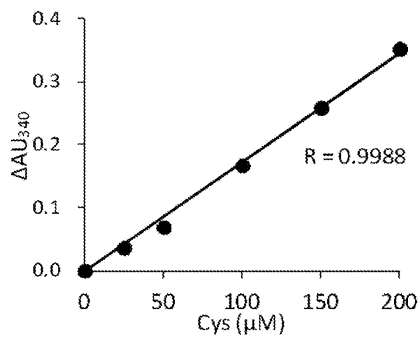




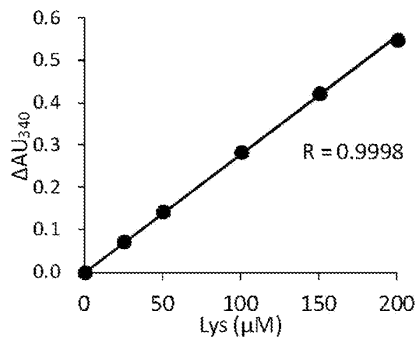
도면12



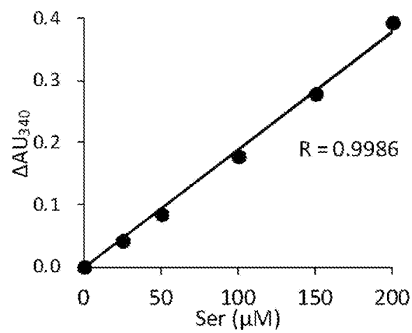
도면13



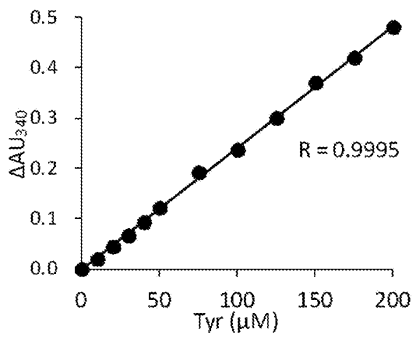
도면14



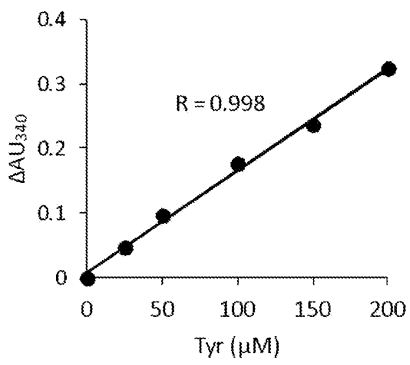
도면15



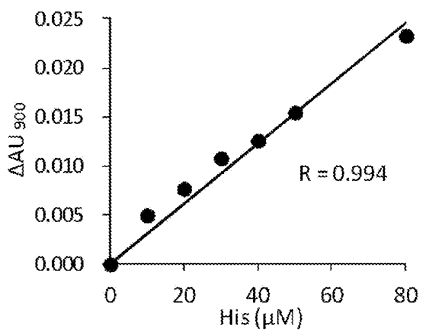
도면16



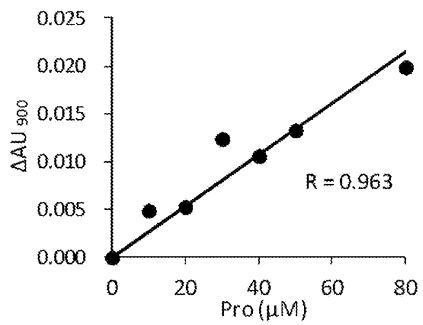
도면17



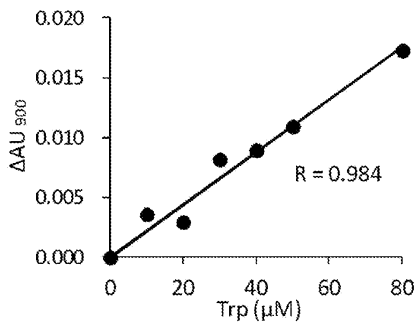
도면18



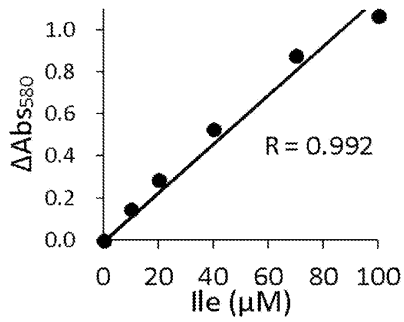
도면19



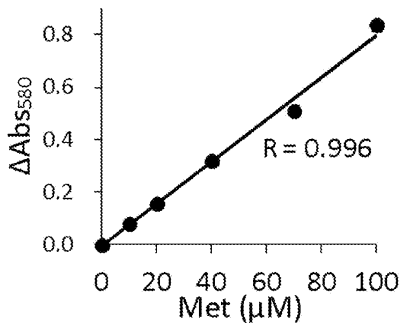
도면20



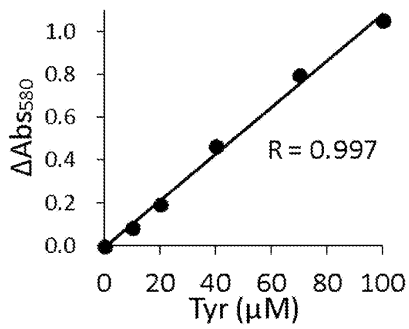
도면21



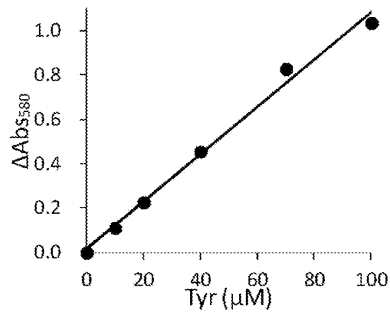
도면22



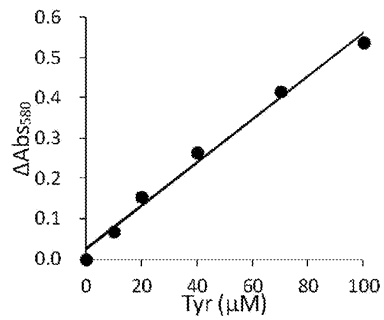
도면23



도면24



도면25



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> TOYAMA PREFECTURE;  
AJINOMOTO CO., INC.
- <120> METHOD FOR QUANTIFYING TARGET SUBSTANCE
- <130> 125259H
- <150> JP 2012-026534
- <151> 2012-02-09
- <150> JP 2012-069625
- <151> 2012-03-26
- <160> 39
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 2658
- <212> DNA
- <213> Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii NBRC12426
- <220><223> Inventor: ASANO, Yasuhisa  
Inventor: KAMEYA, Masafumi
- <400> 1

gtgagcgaga agtiacatcta cgatctgtcc gagggcgatg cctcgatgaa gtccttgctg 60

ggtggcaagg gtgccggtgt agccgagatg atcgtctggt gcgtaccggt gcccgatggc 120

tttacggtca ccacgcagge ctgcatcgag acgatgaaca atggcggcac ctggcccga 180

ggccttcgag atcagatctc tgacgcctc gcccgcttcg aggagcgtgc cggacgcaag 240

ctcggcgctt ccgagaagcc gctgctgggt tcggtgcgtt cgggtgccgt cgtgtcgatg 300

cccggcatga tggacacat cctcaacctg ggtatctccg acgagtcggt ggcccgcgtg 360

ggcggcaggg ccaacaatga gcgcttcgcc tgggactggt accggcgtt catccagatg 420

tacggcgagg tcgtcgaggg cctcgacgcg cacatctacg aggacgcct gactgccatg 480

aagcagcgca agggcgcctc gcaggacacc gacctgaccg ccgaggacct caaggaactc 540

accacggagt tcaagcagat cagcgatgac gcgttgggag gcgcctggcc ctccgaccg 600

cgtgagcagt tgatgcgcgc cgtcgaggcc gtgttcaaca gctggcagaa cccgcgcgcc 660

aaggtctacc gcaagcgaa ccatactcc gacgacctgg gcaccgcggt gaacgtgatg 720

cagatggtct tcggcaaccg cggcgagacc tccgccaccg gtgtctgctt caccgcaac 780

ccctccaccg gtgagaacgc gctgtacggc gatttctca ccaacgcga gggcgaggac 840

gtggtggcgg gcatccgcac cccgcgtccc ctgatcgaga tgaaggaggt gctgccgcag 900

gcgtacggcg agctggtcga caccatgcac aagatggaga cccactaccg cgacatgcag 960

gacatggagt tcaccgtcga gaacggcaag ctctacatgc tgcagacgcg taacggcaag 1020

cgcaccgccg ccgctgcgtt gaaggttgc tccgacctgg tggacgaggg cctcatcgac 1080

aaggaagagg ccgtgcgccg catcgagccc gaccagctcg atcagctgct gcaccggcc 1140

atcgatcccg gccagagcgc cagccgatc accaagggcc tgcggccag ccccgcgcg 1200

gccgtgggtg ccgcggtgtt cgacccgat accgccctg agcgcggcga ggccggtgag 1260

ccggtggtgt tgatccgctt cgagaccacc cctgatgaca tccatggcgt gctgcaggca 1320

cagggcgtgc tcaccgcca tggcggcatg accagccacg cggccgtggt ggcccgcggc 1380

ttcggcaage cctgcgtggc aggcgccacc gacatcaaga tcgacaccga ggccaagacg 1440

atgaccgtcg gcggcgtcac ggtgcacgag ggcgacacgc tgaccctcaa cggctccacc 1500

ggcaggtgt tcaaacggc gctgaagctg attccgccg gtctcaacga ggacttctc 1560

aaggtggtcg gttgggcca cgagatccgc gacctgggag tggaggccaa cggcacaac 1620

ggcaccgacg ccgccaaggc ccgtgagttg ggtgccgagg gcatcggcct gtgccgacc 1680

gagcacatgt tcttcggtga cgaccggctg ccggccatgc acgagatgat cctgtcggag 1740

aacgacgagc agcgtcaggt ggcgctcgac aagatcttgc cgatcgagca gagcgacttc 1800

gaggcgatct tcaccgcat gaaggcctg ccggtgacgg tgcgcctgct cgatccgccg 1860  
 ctgcacgagt tcatgccca cctggtgacc caggcgctga aggtgcagga gatggagctc 1920  
 aagggcgccg atccgaccaa gctggccgag gagcgtcgca cgctcgcgca ggtgaagaag 1980  
 ctgcacgagc agaaccgat gttgggcacc cgcggttgcc gcctcggcat gctctacccg 2040  
 cagattcccc acatgcaggc ccgtgccatc gcgcgtgccg cgttggccgt gctcgaccgc 2100  
 gagggcgaga cggttgacct gcagatcatg gtgccgttgg tgcacctgcg ccaggagctg 2160

cagcgtcagc gcgagatcgt ggtggctgcg gtggacgacg agctcgacaa ggccggccag 2220  
 aagctcgact acctggtggg cacgatgac gagctgccga gggccgcctt ggtggccgat 2280  
 cagatcgcg caggaggctga tttcttcagc ttcggcacca acgacctgac gcagaccacg 2340  
 ctgggcatca gccgcgatga cgccgagaac ggcttcctcg gttggtacga ggcgcagggc 2400  
 gtggtgaagc gtgaccggtt gcaccacgac gacgtggatg gcgtcgcca gctggtgcbc 2460  
 atgggcaccg agaaggccg ggccccaat ccgaagctgt cggggggcgt ctgcggtgag 2520  
 cacggtgggg atcccgactc gatcgcgttc ttccagtcgg tgggccttga ctatgtgctc 2580

tgctcgccgt tccggtgcc gatgccegg ttccgcccgg cgaaggccaa gctcgcccag 2640  
 gcggatgcaa gcaagtaa 2658

<210> 2  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PCR primer  
 <400> 2

tatacatatg agcgagaagt acatcta 27

<210> 3  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PCR primer  
 <400> 3

tatactcgag ttacttactt gcttgcaccc gcct 34

<210> 4

<211> 2748  
 <212> DNA

<213> Thermoproteus tenax NBRC100435

<400> 4

atgcctaaaa agtacgtctt cgatttcgat gaagccgact atcgaataa gaggctcttc 60  
 ggcggaagg gcgccagctt ggtacagatg gcgcaactgg gcctcagagt gccgccgggc 120  
 tttataataa caactgaggc gtgtaaagac ttcttcgggc ccaagaggga ggagatagcg 180  
 gagctcgagg cacaattagc cagacagccg ccgccgatg tcagagatgc gcttatcaca 240  
 aagttgttct caataataga tagcttagat ctgccacagg gactgtggga ggaggctgtg 300  
 gagcatatga agaggctaga ggacagaaca ggccgtagat tcggcgatcc gaagaatccc 360

ttgttggctt ccgtgagatc cggcgggct gtgtcgatgc ctggcatgat ggacacagtg 420  
 ctcaacctcg gcctaaacga tgagaccgtt aaaggcctcg ccgaacagac caacaacgag 480  
 tggttcgctt acgatgcata tagacgcttt attaatatgt tcggaagaat tgtattaaat 540  
 atagatgata aactattctc aaaagcatgg gatgatatta agaggaaata tggcgtaaag 600  
 gaggatccgc agatgccgat cgagggccta aaggaggcag ttgaaatatt taagaagata 660  
 gtggcagaga gcccgggagc ctccccgaa gacccttggg agcagttgaa gttggccata 720  
 aaggctgtgt ttcgatcttg ggatagccca agggctatct tctatagaat cgccgaaaag 780

ataacaagcg atatgccga ctgcaccgct gtgaatgtag tcactatggt gttcggcaac 840  
 atgggctggg acagcggaac aggcgctgct ttctcgaggg acgtggccac tggagagaac 900  
 aggctatgat gagagtttct ccctgtggct caggagagg acgttgtggc agggataagg 960  
 accccatgg atagacga attcaagaag aggtttccac atttatatga agagtatat 1020  
 aatgggttta agttattaga aaaagtaaat aaagatgtac aagacgtaga gttcactgta 1080  
 gagcgggga gactctactt cctgcagtgt cgcaacgcca aatgactcc catggcgagg 1140  
 gtcaagacgg ccgttgatat ggccaaagag ggcataataa ctaaggatga ggctctgatg 1200

aaggctctc cagagcatgt cctccagctc ctttatccgc gcatcgatcc taaggcaaac 1260  
 gcgagccca tcgcaaaagg actgcccgcg agccctggcg ccgtctcggg gcaattagtg 1320  
 ttcaatccgg acgatccgtt aaagtgggccc gcgatggaa aaaaggttgt gctcgcgaga 1380  
 gttgagaaa agcccgacga cgtccacggc ttttacgagg ccgtgggcat ttgaccaca 1440  
 agagggggtg tgacctcaca cgcgctgtt gtcgctagag ctataggcaa acctgccgtt 1500  
 gtcggagcgg aggacgctgt tgtggatgaa cagaacaagg tgttgagagc gggcggccta 1560  
 atattgaagg agggggactg ggtgactatc gatggaaca caggccttgt atatccaggt 1620

gtggtcccaa cgttggagcc agagctgata cctgagctag aggagctgtt gaggtgggcc 1680  
 gacgaagtga ggaggctcgg cgttagggcc aacgccgatc ttccagagga tgccgcata 1740

gccagaaagt tcggcgcaga ggggataggg ttgttgagga tagagcggat gttcagaaag 1800  
 cctgagcgc tcgacctct tcgtcggata attttggcag aaaatagaga ggagagaata 1860  
 aaacatctgg aacagctcta taggatgtta aaggaggatt tcaaggcgaat cttcgaata 1920  
 atggatggat tgcccgtagt agtaaggctc atagatcctc cgctccacga gttcctgccg 1980  
 aagccggagg aggtgcttca acagatatgc gaggggagga tgtcaggtaa agatgtgtcc 2040

tcattggaga ggctgtacaa tagattgaag gccctgcagg aggccaacce tatgttgggc 2100  
 catagagggt tgcgcgtggg ggtgagctac cccgaggtct actattatit gaccaaggct 2160  
 atcgcgagg ccgcctcaga gctcaagaaa gagggccgca acccggtcgt agagataatg 2220  
 atacctcagg tgagcgact aaggagatt aaatatgtaa aggaaaagg aataatgccg 2280  
 gcgctgaggg atgtggagga gagctccgga gtttaagttag atatcaagat aggcactatg 2340  
 atagagactg tgcgcgctgc gctcacgta gagaaaatag cgcgagaggt cgacttcac 2400  
 agcttcggca caaacgatct cacgcaggcc gtgttttagct tcagcagaga cgacgcagag 2460

aacaagttaa taccgcaata cctcgacctc aagatactcg acgcagatcc tttcgagacg 2520  
 ttggatccag aggggtgtgg taagetgttc gacgagctt ccaggtcggc caaggagct 2580  
 aacccggcca ttgaggttgg ggtctgcggc gaacacggcg gcgagccgaa gtccatcgc 2640  
 ctcttcagca gaatgaagat agattacgtc agcgcctcgc cgtttagggt tcctctggct 2700  
 agacttgcgg ccgctcaagc ggctatcgca agctccaaac gtgagtag 2748

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 5

tatagctagc atgcctaaaa agtacgtctt 30

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 6

tataaagctt ctactcacgt ttggagcttg 30

<210> 7



<211> 1155

<212> DNA

<213> Escherichia coli W3110

<400> 7

```

atggcaaac acctttttac gtccgagtcc gtctctgaag ggcacacctga caaaattgct      60
gaccaaattt ctgatgccgt tttagaccgc atcctcgaac aggatccgaa agcacgcgtt      120
gcttgcgaaa cctacgtaaa aaccggcatg gttttagttag gcggcgaaat caccaccagc      180
gcctgggtag acatcgaaga gatcacccgt aacaccgttc gcgaaattgg ctatgtgcat      240

tccgacatgg gctttgacgc taactcctgt gcggttctga gcgctatcgg caaacagtct      300
cctgacatca accagggcgt tgaccgtgcc gatccgctgg aacagggcgc gggtgaccag      360
ggctctgatgt ttggctacgc aactaatgaa accgacgtgc tgatgccagc acctatcacc      420
tatgcacacc gtctggtaaa gcgtcaggct gaagtgcgta aaaacggcac tctgccgtgg      480
ctgcgcccgg acgcgaaaag ccaggtgact tttcagtatg acgacggcaa aatcgttgg      540
atcgatgctg tcgtgctttc cactcagcac tctgaagaga tcgaccagaa atcgctgcaa      600
gaagcggtaa tggaagagat catcaagcca attctgcccg ctgaatggct gacttctgcc      660

accaaattct tcatcaacc gaccggctgt ttcgttatcg gtggccaat gggtgactgc      720
ggctctgactg gtcgtaaaat tategttgat acctacggcg gcatggcgcg tcacggtggc      780
ggcgcattct ctggtaaaga tccatcaaaa gtggaccgtt ccgcagccta cgcagcacgt      840
tatgtcgcga aaaacatcgt tgctgctggc ctggccgacg gttgtgaaat tcaggtttcc      900
tacgcaatcg gcgtggctga accgacctcc atcatggttag aaactttcgg tactgagaaa      960
gtgccttctg aacaactgac cctgctggta cgtgagtctc tcgacctgcg cccatacgg      1020
ctgattcaga tgctggatct gctgcaccgc atctacaaag aaaccgcagc atacggtcac      1080

tttggctcgtg aacatttccc gtgggaaaaa accgacaaag cgcagctgct gcgcgatgct      1140
gccggtctga agtaa                                           1155

```

<210> 8

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 8

```

aaactgcagc atatggcaaa acaccttttt acgtc                                     35

```

<210> 9

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 9

aagaattctt acttcagacc ggcagc 26

<210> 10

<211> 1344

<212> DNA

<213> E. coli W3110

<400> 10

atgacgacga ttctcaagca tctcccggta ggtcaacgta ttggtatcgc tttttctggc 60

ggtctggaca ccagtgccgc actgctgtgg atcgacaaa agggagcggc tccttatgca 120

tatactgcaa acctgggcca gccagacgaa gaggattatg atcgatccc tcgtcgtgcc 180

atggaatcg gcgcgagaa cgcacgtctg atcgactgcc gcaacaact ggtggccgaa 240

ggtattgccg ctattcagtg tggcgcattt cataacacca ccggcggcct gacctatttc 300

aacacgacgc cgtgggccc gcgcgtgact ggtacatgc tggttgctgc gatgaaagaa 360

gatggcgtga atatctgggg tgacgtagc acctacaaag gaaacgatat cgaacgtttc 420

tatcgttatg gtctgctgac caatgctgaa ctgcagattt acaaaccgtg gcttgatact 480

gactttattg atgaactggg cggccgtcat gagatgtctg aatttatgat tgcctgcggc 540

ttcgactaca aaatgtctgt cgaaaaagcc tactccacag actccaacat gcttggtgca 600

acgcatgaag cgaaggatct ggaatactc aactccagcg tcaaaatcgt caaccgatt 660

atgggcgtga aattctggga tgagagcgtg aagatcccgg cagaagaagt cacagtacgc 720

tttgaacaag gtcatccggt ggcgctgaac ggtaaaacct ttagcgacga ctagaaatg 780

atgctggaag ctaaccgcat cggcggctgt cacggcctgg gcatgagcga ccagattgaa 840

aaccgtatca tcgaagcga aagccgtggt atttacgaag ctccggggat ggcactgctg 900

cacattgcgt atgaacgct gttgaccggt attcacaacg aagacacat tgagcagtat 960

cacgcgatg gtcgtcagtt gggccgtctg ctgtaccagg ggcgttggtt tgactcccag 1020

gcgctgatgc tgcgtgactc tctgcaacgc tgggttgcca gccagatcac tggatgaagt 1080

acctggagc tgcgccgtgg gaacgattat tcaatcctga ataccgtctc agagaacctg 1140

acctacaagc cagagcgtct gacgatggaa aaaggcgact cgggtttctc gccagatgat 1200

cgtattggtc aattgaccat gcgtaacctg gatatactg ataccgcga gaaacttttc 1260

ggttatgcca aaactggcct gctttcctcc tctgccgctt caggcgtgcc gcaggtggag 1320

aatctggaaa acaaaggcca gtaa 1344

<210> 11

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 11

aaggatccat atgacgacga ttctcaagca tc 32

<210> 12

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 12

aaaaagctta ctggccttg ttttccag 28

<210> 13

<211> 1257

<212> DNA

<213> Pseudomonas aeruginosa PA01

<400> 13

atgagcacgg aaaaaaccaa acttggcgtc cactccgaag ccggcaaact gcgcaaagtg 60

atggtctgct cgccccgact cgcccaccag cgctgacc cgagcaactg cgacgagttg 120

ctgttcgacg acgtgatctg ggtgaaccag gccaagcgcg accacttca cttcgtcacc 180

aagatgcgcg agcgcggcat cgacgtctc gagatgcaca atctgctgac cgagaccatc 240

cagaaccgag aagcgtgaa gtggatctc gatcgcaaga tcaccgccga cagcgtcggc 300

ctgggcctga ccagcgagct gcgtcctg ctggagagcc tggagccgca caagctggcc 360

gagtacctga tcggcggcgt cgccgctgac gacctgccg ccagcgaagg cgccaacatc 420

ctcaagatgt accgagta cctgggcat tccagcttc tgctgccgcc gttgccgaac 480

accagttca cccgcgacac cacttctg atctacggcg gcgtgaccct gaaccgatg 540

tactggccgg cgcgacgaca ggaaacctg ctgaccacc ccatctaaa gttccacccc 600

gagttcgcca acgccgagtt cgagatctgg tacggcgacc cggacaagga ccacggctcc 660  
 tcgacctgga aaggcggcga cgtgatgccg atcggcaacg gcgtggctct gatcggcatg 720  
 ggcgagcgct cctcgcgcca ggccatcggc caggtcgccc agtcgctgtt cgccaagggc 780

gccgccgagc gggatgatct cgccggcctg ccgaagtccc gcgcccgcat gcacctggac 840  
 accgtgttca gcttctgcga ccgcgacctg gtcacggtct tcccgaagt ggtcaaggaa 900  
 atcgtgccct teagcctcgc ccccgatccg agcagcccct acggcatgaa catccgccgc 960  
 gaggagaaaa ccttctcga agtggtcgcc gaatccctcg gcctgaagaa actgcgcgtg 1020  
 gtcgagaccg gcggcaacg cttcggccgc gagcgcgagc aatgggacga cgtaacaac 1080  
 gtggtctgcc tggagccggg cgtggtggc ggctacgacc gcaacaccta caccaacacc 1140  
 ctgctgcgca aggccggcgt cgaggtcatc accatcagcg ccagcgaact gggtcgcggt 1200

cgccggcgcg gccactgat gacctgcccg atcgtccgcg acccgatcga ctactga 1257

<210> 14

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 14

aaactgcagc atatgagcac ggaaaaaac aaac 34

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 15

aagaattcag tagtcgatcg ggtc 24

<210> 16

<211> 1383

<212> DNA

<213> Thermotoga maritima

<220><223> Inventor: ASANO, Yasuhisa

Inventor: KAMEYA, Masafumi

<400> 16

atgagaataa ccaacacacct gacaggaaaa aaagaagaat ttgtgcctat tcaaccgggt 60  
 gttgtgagga tgtacctgtg cggaccacc gtgtacgatc tcatccacgt ggggaacgcg 120  
 agaccgcgct tggatttcga tgtgttcagg aggtacctcg agtacagggg ttacagggtc 180  
 ataatggttc agaatttcac ggatatagac gacaagatca taaacaaggc gaatcagctc 240  
 ggtgtcgatt acaagacctt ggcagatacc ttcatagccg agtactggag agacgcacat 300  
 gcgcttggtg taagaccggc gaattttcat ccaagaacca ccgatttcgt tgaagacatt 360  
 gttgagataa tagaaaaact cgtagaaaaa gggttcgcgt atcaaacgga aacgggtgtc 420

tatttcgatg tgagaaagt cgaagtac ggtgaactct ccaaaaagaa gatagaggat 480  
 ctcatcgcgg gtgccagagt cgaggtggac gaaacgaaga agtctcctct cgatttctcg 540  
 ctctggaaaa aggccaaacc cgggtgaacc tgctggaagt cccctgggg agagggaaga 600  
 ccaggttggc acatagagt tacggttatg tccgtgaaaa tctctgggaga gattttcgat 660  
 atacacgcgg gtggagaaga tctctgtttt ccgaccacg agaacgagaa ggctcaggcc 720  
 gaagccctga ccgtaaggt ttttgcgaga tactggatgc acaacggcat ggtcaggttc 780  
 ctccgtgata agatgagtaa atcgacggga aacatctca ccgtccgtga agccgtgaaa 840

agatacggca gagacggctc gagatacatg attctctcaa agcactacag gtcgccgatg 900  
 gatttctctg aagaactcct tcaggattac tccagggcgg tcaaactgt ttgggagatt 960  
 ctgggacgat acgaaaaatc tggagatc gggataccta agagaaacgc tgtttacgaa 1020  
 gagtacgtta atcgttttgt ggaagctctc gacgacgatt tcaacacacc agtagcggtg 1080  
 tccttgattt ttgagctgc aagaaacctc agcaaagcga tggatgacaa cgaccgtgag 1140  
 gatgcccttc tctactatca cctgatcaga agggagtctg gccccgttct gggacttttc 1200  
 gatctcaacg aagagaagaa agaagtttcc tctgaagaac tgctcaaact gctgatagaa 1260

gtgagagatg tcttgaggaa ggaaaaaaga tacgatcttt ctgatcgaat aagggatcgc 1320  
 ctcagggaga ttggaatcat tttgaaggat accccttcgg ggacagaata cactgtcgag 1380  
 tga 1383

<210> 17

<211> 1263

<212> DNA

<213> *Thermotoga maritima*

<400> 17

ttgaaataca gaaggataaa gggaacaaac gatatcttcg gtgaagagat atggtactgg 60  
 aggtacgtcg aggaaacctt cagaaatgtg tgcgaaagcg cgggaaataga ggagatcaga 120

actccatat tcgaacagac ggaacttttc gttagaagtg tgggagaaga atcagacatc 180  
  
 gttcagaaag agatgtacac cttccaggac aaagcgggaa ggagcatcac tctgagacca 240  
 gaaggtaccg cgcccgtcgt cagggttttt ctggagaatt ctctgataga tagggggttt 300  
 caacagagat actactacat aggtcccatg ttccgatagc aaaaaccaca atcgggggaga 360  
 ttgagacagt ttcaccagt gggtttcgag atcatcggcc ccgaatctcc aaaagcggat 420  
 ttcgaggatg tcatgctggt tgataccttc ttgagaagge tggactcac gaaatacaag 480  
 attcacctga attccatagg ctgtccggtg tgcaggaaaa actatcgcga agccctcaag 540  
 gagtattacg gtcgaatcct ggacaatctc tgtgacgact gcaaaagacg ttacgagacg 600  
  
 aacattttga gactgctcga ttgcaaggig gaccacgaat actctctgaa tgcaccaaaa 660  
 agcgtcgact atctctgiga ttctgcagg gcacactaca agaagttgaa agagtacctc 720  
 aacactttcg agatcgaata cgtggaagat cacacctgg tccgcgggct cgactactac 780  
 accagaacgg tttttgaggt gaggcacgaa ggtcttggag cccagagcgc catcgcgggt 840  
 ggtggaaggt acgatggcct ctttgcggag cttgggggct cttccgtacc cgccttgggt 900  
 tttgcaggtg gtatagagag aattatactc gctttaaaag cagagggat agaaatcccg 960  
 atgaaaaatg ttcatctgt ttacatcgca actcttgggt aaaaagcctt tatggatggt 1020  
  
 gttcggcttg cgggtgaatt gagaaagaaa ggctgagtg tggatgtgga catcatggat 1080  
 agaaagctct ccggtcagct taagcacgcc agcagaatgg gatcgaggta tgcggtcatt 1140  
 attggtgatg aagaactgga aaaaggaatc gtcattctcc gcgacctcga gacgggagac 1200  
 caggttgaaa tcgatcggga cttcggcct gactacatcg ctgaaagggt ttcaaaagat 1260  
 tga 1263  
 <210> 18  
 <211> 1509  
 <212> DNA  
 <213> *Thermotoga maritima*  
 <400> 18  
 gtgctgaaag agttcaaaga acaacgactc aaagagatac aggaacttcg ttctatgggt 60  
  
 atagagccat atccttacia attcgaaaag gaactcacgg ccagagaaat aagggaaaag 120  
 tacgactatc ttcaagctgg agaagttctt gaatctgaaa agctctcttt cgcagggaga 180  
 gtcattgctga tacgtcacca cggaaagacg gccttctttc acatgaaaga tgacacgggc 240  
 cggatccagg cttacataaaa agcagattct gttgggaagg aaaagatgga tctcttcaaa 300  
 agacacgtca aaataggatg cttttagga gtaaggagct ttccgttcaa aagcaaaacc 360

ggagagtga ccatttacgt tcaagaatac acgcttctga gcaaggctct gcggcctctg 420  
 cccgagaagt ggcacggcat aaaagataag gaaatcatat acaggcagag gtacctgaa 480  
  
 ctcatcgtga acgacgaggc tattgagagg ttcaaaaagc gattcaaggc cgtccgtgtg 540  
 atacgggaat ttctcaacag caggggattc atcgaagtgg aaacacctat tcttcattac 600  
 gtcacgggtg gtgcggaagc gaggcctttt gtgaccatc tcaacgtttt tgatatcgat 660  
 atgtatttga gaatcgcacc ggagctttac ctgaaaaggt tgatcgctcg cggttttgaa 720  
 aagatatacg agataggaaa gaacttcaga aacgaaggaa tatcttacia acacagtccc 780  
 gagttacca gcatagagat ctaccaggct tacgcggatt acaacgatat gatggatctc 840  
 actgaagagt tgatagtgga agtttgaaa agaacatgtg gcacctgaa aatctctac 900  
  
 caagcaagg agatagactt cacaccacc tggaaaagag tgagaatgag agactttctc 960  
 aaagaaaaac tcgggttga catctcga gatcccgatg aagtgttgtt gaagaagctc 1020  
 gaagaacatg ggtlagaact ggaaataaag aacagagcac acctataga caaactcaga 1080  
 gatctggtgg aagaagagct ggtgaacccc accttcataa tcgatcatcc tgtggtgatt 1140  
 tcccccttg caaaagaca ccgagaggat cctagactca cggaaaggtt cgaactcatc 1200  
 atattcgaa gagagatcgc gaacgcgttc agtgagctga acgatcccgt tgatcaatac 1260  
 cagagatttc tcgaacaggc gaaaatgaga gaagaggag atgaagaagc acacatgatg 1320  
  
 gatctcgatt ttgtgagggc cctcgagtat ggtatgcctc ccacgggagg actgggaatc 1380  
 ggtcttgaca ggctcttcat gttcatcag gattccccca caataaggga tgtgattccc 1440  
 ttccaattg tgaacccaa aaagtctgag gaagaagagg cggaattcga aggagggttt 1500  
 gaagaatga 1509  
 <210> 19  
 <211> 1734  
 <212> DNA  
 <213> *Thermotoga maritima*  
 <400> 19  
 ttgcgatga aagacctcta tgctcctact ctcaaagaaa ccccttccga tgttgagaca 60  
 gtaagccacg agtatcttct tcgaggaggc ttcataagaa aagtagccgc cggtatatac 120  
  
 acctacctcc cattaggaag aagagtgcct ctcaaaatag agaacatagt tcgagaagag 180  
 atgaacagga taggggcaca ggaaattctg atgcccaccc ttcaacctgc ggaactctgg 240  
 aaacagtcag gaaggtggga cgattacggt cccgaaatga tgaaactcaa agacaggcac 300  
 gaaagagact tcacactcgg tcccacgcac gaggagatcg tcacggacct tgtgaagaac 360

gaacttcgtt catacaaaaca gcttctctc actctgtatc agatagcgaa caagtacaga 420  
 gacgaaatca gaccacgctt cggccttctc agggcgagag aattcatcat gaaggacgct 480  
 tacagctttc acgcaagctg ggaatctctg gacgagacgt acgaacagtt caaaaaagcg 540  
  
 tactcccga tcatggaag gcttgggtg cggtacatga tcatagaggc agaaacgggt 600  
 gccatcggag ggaacgcttc ccacgagttc gtcgttctg cghaaatagg agagacgaac 660  
 gtactcttct gtgaaaagtg cggctaccag gcaagcgacg aaaaagccga atacaaaggt 720  
 gaatacactc aggaacagga agaagagaaa ccctcaaga aggttccac acccggggtg 780  
 aagacgatcg aggaagtttc agagtttctc ggtgttctc cgtcgaagat tgtgaagtcc 840  
 ctcttttaca aaggaagaga aggatcgtia atggtactta taaggggaga cctggagctc 900  
 aacgaagcga agctcaaagc acatttgaag gatcagtcgc tgagaatggc aaccacagaa 960  
  
 gaaattctga aggacttcgg agttcccgtc ggattcattg gaccatcgg tgtggatgtg 1020  
 aagaaagtgg ccgatcacag cgtcagagga ctgaaaaact tcgtcgttgg gggtatggaa 1080  
 gaggatcgc actacgtaaa cgcaaaccac ccagagatt tcaaggtgga cgagtgttac 1140  
 gatctgagaa cgggtgggga ggggtgatecc tgtcccgtct gtggtgagcc tetcaagcgc 1200  
 acaaaagga tagagcttgg tcacatcttc aaactcggca caaaatactc cgaagccatg 1260  
 aaggcctact tcatggatga aaacggtgag atgaagcctt tcatcatggg ctgttatggc 1320  
 tggggagtth ccagaacgat ggcggctgth gtggaacatt tccacgatga gaacggtatg 1380  
  
 atctggcccc ttcgatcgc cccttacacc gttgtggtgg acattctgaa catgaacgac 1440  
 gctgaacaga agcaggtggg tgagaagatt taccagttc tctcagaaaa aggagaagag 1500  
 gttgttctgg atgacagaga agtctcgcct ggtttcaaat tcaaagacgc cgatctcata 1560  
 ggctttccca taagaataaa cgtgggaaga tcctcaagg aagggttgt tgaactgaag 1620  
 aaacgtatt cgaagaact cgtcaaggtg aacatcaaaa acggtttcgg tgcgcttctg 1680  
 gagacactgg aaaagatgaa gcgggagtac gatcccaagg aggctgtcag gtga 1734  
  
 <210> 20  
 <211> 1278  
 <212> DNA  
 <213> *Thermotoga maritima*  
  
 <400> 20  
 atgatagata taaagctcat cagacaaaat cccgatttcg tgaaggaagc cctcagaaag 60  
 cgaggagagg atcccgtat aatcagatgag attttgaaga tcgacgccga ctggcgcgct 120  
 accatcacga aaaccaacga gctgagatcc agaagaacg aaatttcaa aatgtggca 180



aggttgaaaa aagaagggaa aaacgcagag gcagaggcac tcatcgagga agggaaaaga 240  
 ttaggagaag agataaaagc gttagaagaa aaagaaaag aacttcagaa gaagttaac 300  
 gatcttcttt tgatgattcc gaacatcccg catgagagtg tccccgttg agaagacgaa 360  
 tctcagaacg ttgaagtgag aagggtggga gagccgagag aattcgactt caccccgctc 420  
  
 gctcactggg acctcggacc tgcgtggggg ctcatggatt tcagcagggc gtccaagctc 480  
 agcggttcca gattcacctg tatgtatgga aaactcгаа gactcgagag ggctctgata 540  
 aacttcatgc ttgacgttca tacaaggaa cacggttaca cggaagtgtg ggttccacac 600  
 ctggtgaaaa gagaaacct caccataacc ggacagctcc ccaaattcga agaagagctt 660  
 tatcttgctg agagggatga cctgttctc attccgacgg ctgaggttcc cctcgcagcg 720  
 cttcacagtg gagagatcct cgaagagaaa gaactaccaa agaaatcgt ctcttacct 780  
 ccctgttacc gcagagaagc gggaagttac gggaaagacg tgagggggat gatcaggcag 840  
  
 catcaattcg acaaggtcga gctcgtctgg gtgaccacac cgaaagatc cttcgaagat 900  
 cttgaagagc ttgtgaaaga cgccgaaacc attcttagaa aattggagct cccttacaga 960  
 gtcgtttcgc tctgtacggg agatctcgga ttcacctccg cgaaaaccta cgatatagaa 1020  
 gtgtggcttc cttcctacaa gcatacaaa gagatatctt cctgcagtaa cgtgacggac 1080  
 tttcaggcga gaagaggaaa catgagatac agaaggagat cggatggaaa gctcgaatac 1140  
 gttcacacgt tgaacggatc gggtatcgcc gttggaaggg cactcgttgc gatactggaa 1200  
 aactaccagc aaccagacgg cagtgtgaga gtgccggagg tgctcgttcc ctacacaggg 1260  
  
 ttcgaggtga taccgtag 1278  
 <210> 21  
 <211> 987  
 <212> DNA  
 <213> *Thermotoga maritima*  
 <400> 21  
 ttgagaatac tgagcggcat gagacctacc ggaaaactcc atataggtca tctcgtggga 60  
 gctctggaaa actgggtgaa gcttcaggaa gaaggaaacg aatgtttcta ctttgtcgcg 120  
 gattggcacg ctttgaccac ccaactacgac gatgtttcga agctcaaaga atacaccgcg 180  
 gacctggtga ggggatttct cgcctgtgga atagatcctg aaaagtccgt gatTTTTgtt 240  
 cagtctggtg tcaaagagca cgctgagctt gcaactgctt tcagcatgat cgtttctggt 300  
  
 tcacgtctcg agagggttcc cacttacaaa gagataaaaa gtgagctgaa ctacaaagat 360  
 ctttccacgg ctggttttct catctatccc gttcttcagg cagccgatat tttgatctac 420

aaagctgaag gagtaccagt cggatgaagat caggtttacc acatagaact cacgagggag 480  
atcgccaggc gttttaacta tctctacgat gaagtctttc cagaaccaga agcaattctg 540  
tctcgggttc caaagcttcc aggaacggac ggccgaaaga tgagcaaaag ctatgggaac 600  
ataataaacc tagaaatctc ggaaaaagaa ctggaacaga cgatactgag gatgatgacc 660  
gatccagcga gggatgagaag gagcgaccct ggaatccgg agaactgccc cgtatggaaa 720  
  
taccaccagg cgttcgacat cagtgaagaa gagagcaaat gggatggga aggctgtaca 780  
acggccagca tccgctgtgt tgattgtaag aagtctgtgt tgaagaatat gaaacgaaaa 840  
ttggcaccga tctgggagaa cttcagaaaa atagacgaag atccacacta cgtggacgac 900  
gttataatgg aagggacgaa gaagccaga gaagtggctg ctaaacgat ggaagaagtg 960  
agaaggcca tgaacctgat gttctga 987  
  
<210> 22  
<211> 1206  
<212> DNA  
<213> *Thermotoga maritima*  
<400> 22  
atgacccgg aggaacaggt gaaaattctc aaaagaaacg ttgtgacct cataagtga 60  
  
gaagaactcc tcgacagaat aaaaagaaaa ggaaaactcc gcgtgaaact cgggtgtgat 120  
ccctcaaggc ccgatttga tctgggtcac gcggtcgttc tgaggaagtt gagagaattt 180  
caggatctcg gtcacacggt cgttctgac ataggagact tcaccgcacg tatttgtgat 240  
ccctccggaa gaaacgaaac acgcccattg ctgaccaaag aagagttctt ggagaacgca 300  
aagacctatc aggagcaggc cttcaaaata ctggatcca aaagaacgga acttcgcttc 360  
aacggtgagt ggctcgacag gatgacctc gcagatgtga tcattctggc ttcgaagtac 420  
acggttgcga ggatgctcga gagagacgat ttcgcaaaga gattcaaaga aggcatccc 480  
  
attgccatat cagagtttct gtatccgctc gcacaggcct acgattccgt tgccatccag 540  
tcagatgtgg aactcggcgg aacggatcag cttttcaacc tccttgtggg aaggaagata 600  
caggaagaat acggtcaaga gcccagatc gtcatgacga tgccgatcat cgaggaaca 660  
gacggaaaat tgaagatgag caaaagctac ggaaactaca tcgctttcaa cgatccgcc 720  
gaggagatgt acggcaaac catgtccata cctgatgaac tcatcataaa atacatgcgc 780  
cttctcacgg acatcccaga agaacggatc gaagagtacg aaagaaagat gaaggaaaa 840  
acgatcaatc cacgagactg gaagatggtt ctcgctacg agataacgcg cttcttccat 900  
  
ggtgaagaaa acgcaaagaa ggcccaggaa cacttcgtga aagtctttca aaagaagaa 960

attcctgacg agatgccggt cgttgagatt tctcaggaga agaacatcgt ggatctcctc 1020  
 gtggagatag gagctgcatc cagcaaaagt gaggctaaaa gactcgtttc tcaaggtgga 1080  
 gtgtacatcg acggagagag gatagaggac ataaaattca ctgtagaacc tgatggagag 1140  
 cgagttttga gagtggaaa gaggaagttc tacagaatat caggtggaga gacaaaaaaa 1200  
 ctttag 1206  
 <210> 23  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220><223> PCR primer CysRS F  
 <400> 23  
 tataccatgg catgagaata accaacaccc t 31  
 <210> 24  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PCR primer CysRS R  
 <400> 24  
 tatagcggcc gcctcgacag tgtattctg 29  
 <210> 25  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PCR primer HisRS F  
 <400> 25  
 tataccatgg gcttgaaata cagaaggata aa 32  
 <210> 26  
 <211> 32  
  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PCR primer HisRS R  
 <400> 26  
 tatagcggcc gcatcttttg aaaccctttc ag 32

<210> 27  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PCR primer LysRS F  
 <400> 27  
 tataccatgg tgctgaaaga gttcaaagaa 30  
 <210> 28  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PCR primer LysRS R  
 <400> 28  
 tatagcggcc gcttcttcaa accctccttc ga 32  
  
 <210> 29  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PCR primer ProRS F  
 <400> 29  
 tataccatgg gcttgcggat gaaagacctc ta 32  
 <210> 30  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PCR primer ProRS R  
 <400> 30  
 tatagcggcc gcctgacag cctccttggg at 32  
 <210> 31  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PCR primer SerRS F  
 <400> 31

tataccatgg gcatagatat aaagctcatc agacaaaatc ccgat 45

<210> 32  
 <211> 42  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PCR primer SerRS R  
 <400> 32  
 tatagcggcc gccggtatca cctcgaacc tgtgtaggga ac 42  
 <210> 33  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PCR primer TrpRS F  
 <400> 33  
 tataccatgg gcatagatat aaagctcatc agacaaaatc ccgat 45  
 <210> 34  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PCR primer TrpRS R  
 <400> 34  
 tatagcggcc gcaaacatca ggttcatgg 29  
 <210> 35  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PCR primer TyrRS F  
 <400> 35  
 tataggatcc atgacgccgg aggaacaggt g 31  
 <210> 36  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer TyrRS R

<400> 36

tataaagctt ctaaagtttt ttgtctctc cacctg 36

<210> 37

<211> 3132

<212> DNA

<213> Thermus thermophilus

<400> 37

atgttcaagg aggtcggcga gcccaacttt cccaagctgg aagaggaggt ctggccttc 60

tggaagcggg aaaagatctt caaaagagc gtggaaaacc gcaaagcggg tccccgtac 120

accgtctacg agggccctcc caccgccaac ggctcccc acgtgggcca cgcccaggcc 180

cggagctaca aggaccttt cccccgtac aagaccatgc ggggctacta cgcgccccgg 240

agggcaggct gggacacca cgggcttccc gtggagctgg aggtggagaa gaagctcggc 300

ctcaagagca agcgggagat tgaggcctac ggcattgagc gcttcaacca agcctgccgc 360

gagtcctctt tcacctaga gaaggagtgg gaggccttta ccgagcgcac gcctactgg 420

gtggacctgg agaacgccta cgccaccttg gaaccacct atattgagag catctggtgg 480

agcctgaaga acctcttga ccggggcttc ctctaccggg accacaaggt ggtgcctac 540

tcccccgct gcggcacccc cctctctcc caccaggtcg ccctgggta caaggagatc 600

caagaccctt cggctctact ccgcttccc ttgaaggagc cgaagaagct tggcctagag 660

aaggcagacc tctcatctg gaccaccacc cctggacc tgcccgggaa cgtggccgca 720

gcagtccacc cggagtacac ctaccgcc ttccaggtgg gagacgagc cctgatcctg 780

gaggaggggc tggggaggaa gcttttgggc gagggaacct cggctctcaa aaccttcccg 840

ggcaaggccc tggaaggcct cccctacacc cccccctacc cccaggcctt ggagaagggc 900

tacttctgg tctctgccga ctactgagt caagaggacg ggacgggcat cgtccaccag 960

gccccgcct tggcgccga ggacctggag acggcgaggg tctacggct tcccctctg 1020

aagaccgtgg acgaggagg gaagctctc gtggagccgt ttaaggcct ctacttccgc 1080

gaggccaacc gggcgatcct aaggacctg agggggcggg gcctccttt caaggaggaa 1140

agctacctcc acagctacc ccactgctgg cgggtctcca cccccctcat gtactacgcc 1200

acggagagct ggttcatcaa aaacacctc ttcaaggacg agctcatccg caagaaccag 1260

gagatccact gggtgcccc ccacatcaag gagggccgct acggggagtg gctcaagaac 1320

ctcgtggact gggccttaag ccgcaaccgc tactggggga caccctccc catctgggtc 1380

tgccaggcgt gcgcaagga ggaggccatc gggagcttcc aggagctcaa ggcgagggcc 1440  
 acgaagcccc tccccgagcc ctttgacccc caccgcccct acgtggacca ggtggagctc 1500  
 gcctgtgcct gcggcgggac catgcgccgc gtcccctacg tcattgacgt ctggtacgac 1560  
 tccggggcca tgccttctgc ctcccttgac tacccctttg agcacgaaga ggtgttccgg 1620  
 gagagcttcc ccgcgactt catcgccgag gggattgacc agaccgggg ctggttcaac 1680  
 tccctccacc agctcggggt gatgctcttc ggtccatcg cttcaagaa cgtgatctgc 1740  
  
 cacggcctca tcttgagca aaagggcag aagatgtcca agtccaagg gaacgtggtg 1800  
 gaccctggg acatcatccg ggagttcggg gcggacgccc tcaggtggtg catctacgtc 1860  
 tccgcccctc ccgaggccga ccggcgcttc gggcccaacc tggttcggga aacggtgcgg 1920  
 gactacttcc tcacctctg gaacgtctac agcttcttcg tgacctacgc caacctggac 1980  
 cggcccagacc tcaagaacct cctccccc gagaagcggc ccgagatgga ccgctggctc 2040  
 ctgccccga tgcaggacct catccagagg gtgacggagg ccctcgaggc ctacgacccc 2100  
 accacgagcg cccgcccct gagggacttc gtggtggagg acctctcca gtggtacgtc 2160  
  
 cgcaggaacc ggcccgctt ctggaagaac gaggacgccc tggaccggga ggccgctac 2220  
 gccaccctct acgagccct cgtcctggtg gccaccctcg ccgccccctt cacccttc 2280  
 ctgcccagg tctgtggca gaacctggtg cggagcgtcc ggcccagagc caaggagagc 2340  
 gtccacctcg ccgactggc cgagcccgac ccggccctgg ccgacgaggc cctggtggcc 2400  
 cagatcggg cgggtctca ggtggtggac ctggcccggg cggcccggg gaaaagcggg 2460  
 gtcaagacc gcaccccc tccctctc ctcgtaacc ccccaccgc cttggagcgg 2520  
 gaggggtaa agcgcttcgc ccacgagat gccgaggagc tcaacgtcaa ggaggtccgg 2580  
  
 gtctggaac ccggggagga gatctctcc tacagggtcc tgccaacct caagctctg 2640  
 gggaggaagt acggcaagct cgtcccaaa atccgggagg ccctgcaaag gaaaggag 2700  
 cgcccgcgg ccttggcgt taaggcgag gccatcccc tggaggtgga gggcgaggcc 2760  
 ctaccctcc tcccggagga ggtctctc gaggccgagg ccccaagg ctaccaggcc 2820  
 ctggagaagg acgggtacgt ggcccctc aagggtgagg tcacggaagc cctccgatg 2880  
 gagggcctcg cccgcacct catccctc ctgcagcagg cccgcaaaga catggcctc 2940  
 aaggtctcgg accggatcc ggtgggctac gaggcgagg gccctacct cgaggcctg 3000  
  
 aagcggcacg ggcctggat cgccaggag gtgctggcca ccgcttcgg ggaaggcctc 3060  
 ttcggcgggt ttgagcccg ggtggaggac gaggaggca aggcggtctt ccacctggcc 3120  
 cggcggagt ga 3132

<210> 38

<211> 1857

<212> DNA

<213> *Thermus thermophilus*

<400> 38

```

atggaaaagg tcttctactg gaccaccccc atctactacg tgaacgccga gccgcacctg    60
ggccacgcct acaccacggt ggtggcggac tttctggccc ggtggcaccg cctggacggc    120
taccgcacct tcttcctcac cggtagccgac gaggcacgggg agacggtcta cggggcggcc    180

caggcggcgg gagaggacc caagccttc gtggaccggg tctccgggcg cttcaaaagg    240
gcctgggacc tctcggcat cgcctacgac gacttcatcc gcaccacgga ggaaaggcac    300
aagaaggtgg tgcagctcgt cctaagaag gtctacgagg ccggggacat ctactacggg    360
gagtacgagg gcctctactg cgtctcctgc gaggcgtttt acacggagaa ggagctcgtg    420
gaggggcttt gcccaccca cggaaggccc gtggaaaggc ggaaggaggg gaactacttc    480
ttccgcatgg agaagtaccg cccctggctc caggagtaca tccaggaaaa tcccacctc    540
atccgccccg agggctaccg gaacgaggtc ctggccatgc tcgccgagcc catcggggac    600

ctctccatct ccaggccaaa atcccgcgtc ccctggggca tcccctccc ctgggacgag    660
aaccacgtga cctacgtctg gtttgacgcc ctctgaact acgtctccgc cctggactac    720
cccgaggggg aggcctaccg gaccttctgg cccacgcct ggacacctat cggcaaggac    780
atccttaagc cccacgcctt cttctggccc accatgctga aggcggcggg gatccccatg    840
taccgccacc tgaacgtggg agggtttttg ctggggccgg acgggcgcaa gatgtccaag    900
accctgggga acgtggtgga ccccttcgcc ctcttgaaa agtacggccg ggacgcctg    960
cgctattacc tccttaggga gatcccctac ggccaggaca ccccggtgag cgaggaggcc    1020

ctaaggacce ggtacgaggc cgacctgcc gacgacctgg gcaacctggt gcaaaggacc    1080
cgggccatgc tcttccgttt cgccgagggc cgcattcccg aaccctggc gggggaggag    1140
ctcgcggagg ggacggggct tgccgggagg ctcaggcctt tgggtcggga gctcaagttc    1200
cacgtggccc tcgaggaggc catggcctac gtcaaggcct tgaaccgta catcaacgag    1260
aagaagccct gggagctttt caagaaggag ccggaggagg cccgggccgt gctctaccgg    1320
gtggtggagg gcctgaggat gcctccatc ctctcacc cggctatgcc cgacaagatg    1380
gcggagctca ggcgggcctt ggggcttaag gaggaggtgc gcctcgagga ggccgagcgc    1440

tggggcctgg ccgagccccg ccccatccc gaggaagccc ccgtcctttt ccccaaaaag    1500
gaggccaagg tggaggccaa gcccaaggaa gaggcctgga tcggcataga ggacttcgcc    1560
aaggtggagc tcagggtggc ggaggttttg gcggcggaga agcaccgaa cgccgaccgg    1620

```



cttttggctc tcaggctctc cctggggaac gaggagcgca ccgtggtctc ggggatcgcc 1680  
 aagtgtacc ggcccaggga gctcgtgggc aagaaggtgg tcctggtggc gaacctcaag 1740  
 cccgccaagc tccggggcat tgagagccag gggatgatcc tcgccccca ggagggggag 1800  
 gccttgcccc tggtagcggc ggagggggag gtgccgcccg gggcgggtgt gaagtaa 1857

<210> 39

<211> 1299

<212> DNA

<213> *Thermus thermophilus*

<400> 39

atggcgggca ccggccacac cccggaagag gccttgccc tcctcaagcg gggggccgag 60  
 gagatcgtcc ccgaggaaga gcttctcgcc aagctcaagg aggggcggcc cctcacggtc 120  
 aagctcggag ccgacccac gaggcccgac ctgcacctgg gccacgcggt ggtcctgagg 180  
 aagatgcgcc agttccagga gctcggccac aaggtgttcc tcatcatcgg cgacttacc 240  
 gggatgatcg gggacccttc gggccgttcc aagaccggc cccccctcac cctggaggag 300  
 acccgggaga acgccaagac ctacgtggcc caggcgggga agatcctcag gcaggagccc 360

caactctttg agctccgcta caactccgag tggctggagg gcctcacctt caaggaggtg 420  
 gtgcgctca cctccctcat gaccgtggcc cagatgctgg aaaggaggga cttcaagaag 480  
 cggtagcagg cggggattcc catctccctg cacgagcttt tgtaccctt cggccaggcc 540  
 tacgactcgg tggccataag ggcccagctg gaaatggggg gcacggacca gcgcttcaac 600  
 ctctggtgg gccgggagg gcaacgggcc tacgggcaaa gccccaggt ctgcttctc 660  
 atgcccttc tcgtgggctt tgacgggcgg gagaagatga gcaagagcct ggacaactac 720  
 atcggectca ccgagcccc ggaggcgtat ttcaagaagc tcatgcggtt gccggacct 780

ctctcccga gctacttccg gcttctcac gacctggagg aggaggaaat agaggcctc 840  
 ctaaaggcgg gcccctccc cgcccaccgg gtctctgccc gcctctcac cgcggcctac 900  
 gccctgcccc agatcccc ccggatagac cgggcctttt acgaaagcct cggctacgcc 960  
 tgggaggcct tcggcggga caaggaggcg gggcccagg aggttaaggag ggcggaagcc 1020  
 cgctacgac aggtggccaa agggggaatc cccgaggaga tccccaggt caccatcccc 1080  
 gcctcggagc tgaaggaagg ccggatctgg gtggcgaggc tttttacctt agcgggcctc 1140  
 acccctcca acgccaggc gaggaggctc atccagaacc ggggcctgag gctggacggg 1200

gaggtctca ccgacccat gctccaggtg gacctctccc ggccccgcat cctgcagcgg 1260  
 ggcaaggacc gcttcgtgcg ggtgcggctt tcggactga 1299