



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0066977
(43) 공개일자 2014년06월03일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/22 (2006.01) C07K 19/00 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2013-7032517
- (22) 출원일자(국제) 2012년06월07일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2013년12월06일
- (86) 국제출원번호 PCT/PL2012/050019
- (87) 국제공개번호 WO 2012/169916
국제공개일자 2012년12월13일
- (30) 우선권주장
61/494,481 2011년06월08일 미국(US)
(뒷면에 계속)

- (71) 출원인
미에즈지나로도위 인스티투트 바이오로지 모레쿠
라네지 아이 코모르코웨즈
폴란드, 02-109 와르스자와, 트로즈테나4, 케이에
스. 울
- (72) 발명자
부즈니키, 자누스즈 마레크
PL-02-593 와르스자와, 스타니스라와 자리나
7/100, 울
수레즈, 아가타 아그니에스즈카
PL-01-960 와르스자와, 프르지 아고르제 17/85,
울
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
김태선

전체 청구항 수 : 총 26 항

(54) 발명의 명칭 **서열-특이적 조작된 리보뉴클레아제 H 및 DNA-RNA 하이브리드 결합 단백질의 서열 선호도를 측정하는 방법**

(57) 요약

본 발명의 주제는 DNA-RNA 하이브리드 내에 RNA 가닥을 절단하는 리보뉴클레아제에 관한 것으로, 상기 리보뉴클레아제는 RNase HI(RNase HI) 또는 그것의 유도체의 촉매활성 도메인과 징크 핑거 DNA-RNA 하이브리드 결합 도메인의 융합 단백질을 포함하고, 상기 징크 핑거 결합 도메인은 DNA-RNA 하이브리드 내의 특이적 서열에 결합하는 능력을 갖는다.

본 발명은 또한 DNA-RNA 하이브리드 결합 단백질(들) 또는 그것의 도메인(들)의 서열 선호도를 측정하는 새로운 방법에 관한 것으로, DNA-RNA 하이브리드 내의 서열 특이적 결합 단백질에 의해 인식된 서열의 측정이 가능하다.

대표도 - 도1

프라이머 명칭	서열	SEQ ID No
Bheatf	GACGCATATGGCAAAGAGGAGATTATTTGGG	SEQ ID No:11
Bheatr	GTGGTACCTTTTCTCCCGTAATCGGC	SEQ ID No:12
BhZf	GGTCTGGTGACCCGGG	SEQ ID No:13
Kmf	GGGATCGCAGTGGTGAGTAAC	SEQ ID No:14
Kmr	CGGGAAAACAGCATTCCAGGTATTAG	SEQ ID No:15
K81Ar	CCGTCTGGGAATCAGAATAGATC	SEQ ID No:16
K81Af	CAATCGCATGGGTGAAGGATAAAAAAG	SEQ ID No:17
K89Er	CTGCTTTTTTATCCTTCACCC	SEQ ID No:18
K89Ef	CAATCGCATGGGTGAAGGATAAAAAAG	SEQ ID No:19
K123Ar	TAAGATGGGCGTTTCATAGGTATG	SEQ ID No:20
K123Af	GCATGGCAGACCGATAAGTG	SEQ ID No:21
del11f	GGCTCCGGCCAGCACGCGTGCCCGG	SEQ ID No:22
del11r	AGAACCGCTCCCGTAATCGGCCTTAATTCC	SEQ ID No:23
del5f	CAAAAAACAGCACGCGTGCCC	SEQ ID No:24
del5r	CCCCCGTAATCGGCCTTAATTCCC	SEQ ID No:25

(72) 발명자

스코우로네크, 크리즈토프 저지

PL-05-080 호르노웨크, 피에트키에웁자 39, 울

노우트니, 마르신

PL-00-18- 와르스자와, 인플란카 15/208, 울

(30) 우선권주장

61/494,494 2011년06월08일 미국(US)

P.395179 2011년06월08일 폴란드(PL)

P.395180 2011년06월08일 폴란드(PL)

특허청구의 범위

청구항 1

DNA-RNA 하이브리드 내의 RNA 가닥을 절단하는 리보뉴클레아제로서, 상기 리보뉴클레아제는 징크 핑거 DNA-RNA 하이브리드 결합 도메인과 리보뉴클레아제 HI (RNase HI)의 촉매활성 도메인 또는 그것의 유도체를 포함하는 융합 단백질이고, 상기 징크 핑거 결합 도메인은 DNA-RNA 하이브리드 내의 특이적 서열에 결합할 수 있는 능력을 지니는 것인, 리보뉴클레아제.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 RNase HI의 촉매활성 도메인의 유도체는 RNase HI 하이브리드 결합 도메인의 결실을 포함하는 것인, 리보뉴클레아제.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 RNase HI의 촉매활성 도메인은 바람직하게는 SEQ ID No:1에 나타난 *rnhA* 유전자의 뉴클레오티드 175 내지 588에 의해 암호화되는 폴리펩티드를 포함하는, 바람직하게는 바실러스 할로두란스로부터 유래되는 것인, 리보뉴클레아제.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 RNase HI의 촉매활성 도메인은 K81A, K89E 및 K123A로부터 선택되는 기질 결합 영역 내의 하나의 아미노산 잔기의 적어도 하나의 치환을 포함하고, 바람직하게는 모든 치환체 K81A, K89E 및 K123A를 함유하는 것인, 리보뉴클레아제.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 징크 핑거 도메인은 징크 핑거 ZfQQR의 유도체이고, 바람직하게는 SEQ ID No.2로 나타난 서열 ZfQQR의 19 내지 303의 뉴클레오티드에 의해 암호화되는 폴리펩티드인 것인, 리보뉴클레아제.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

SEQ ID No.4에 나타난 융합 단백질 catAEA-ZfQQR를 포함하는 것인, 리보뉴클레아제.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

SEQ ID No.6에 나타난 융합 단백질 GQ를 포함하는 것인, 리보뉴클레아제.

청구항 8

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

SEQ ID No.8에 나타난 융합 단백질 GGKKQ를 포함하는 것인, 리보뉴클레아제.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 리보뉴클레아제를 포함하는 조성물.

청구항 10

DNA-RNA 하이브리드 내의 RNA 가닥의 절단을 위한 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 리보뉴클레아제 및 제9항에 따른 조성물의 용도.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 DNA-RNA 하이브리드 내의 RNA 가닥의 절단은 징크 핑거를 위한 절단 부위에서 떨어진, 2-16 뉴클레오티드, 바람직하기는 5-7 뉴클레오티드에 위치하는 것인, 용도.

청구항 12

DNA-RNA 하이브리드 내의 RNA 가닥을 절단하는 RNase HI의 조작된 변이체를 얻는 방법으로서,

- a) 기질에 결합하지 않으나 촉매 활성을, 바람직하기는 결합 도메인의 제거 및/또는 기질 결합에 관여하는 아미노산의 치환에 의해 보유하는 RNase HI 촉매활성 도메인을 얻는 단계;
- b) 단계 a)에서 얻어진 RNase HI 촉매활성 도메인과 DNA-RNA 하이브리드 내의 특이적 서열에 결합하는 능력을 가진 결합 도메인, 바람직하기는 징크 핑거 DNA-RNA 하이브리드 결합 도메인을 포함하는 융합 단백질을 제조함으로써 조작된 RNase HI을 얻는 단계를 포함하는 것인, 방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 징크 핑거 도메인은 징크 핑거 ZfQQR의 유도체, 바람직하기는 SEQ ID No.2로 나타낸 서열 ZfQQR의 19 내지 303의 뉴클레오티드에 의해 암호화되는 폴리펩티드인 것인, 방법.

청구항 14

제12항 또는 제13항에 있어서,

상기 RNase HI의 촉매활성 도메인은 바람직하기는 SEQ ID No:1에 나타낸 *rnhA* 유전자의 뉴클레오티드 175 내지 588에 의해 암호화되는 폴리펩티드를 포함하는, 바람직하기는 B. 할로두란스로부터 유래되는 것인, 방법.

청구항 15

제12항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 RNase HI의 촉매활성 도메인은 기질 결합 영역 내에, 바람직하기는 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 치환, 결실 또는 삽입으로부터 선택되는, 변이를 포함하는 것인, 방법.

청구항 16

DNA-RNA 하이브리드 결합 단백질(들) 및 그것의 도메인(들)의 서열 선호도를 측정하는 방법으로,

- a) 정제된 단백질 또는 그것의 도메인을, DNA-RNA 하이브리드 기질의 혼합물과 접촉시키는 단계로서 여기서 DNA-RNA 하이브리드 기질은 바람직하기는 고정된 연결 서열로, 9 또는 10 개의 뉴클레오티드 서열 위치에서 랜덤화된, 중심부에 랜덤 서열을 포함함으로써, 친화도를 갖는 서열에 시험 단백질 또는 그것의 도메인의 결합을 가능하게 하고;
- b) 수지, 바람직하기는 글루타티온 아가로스에, 결합된 DNA-RNA 하이브리드를 사용하여, 단백질 또는 그것의 도메인의 고정화에 의한 비결합 DNA-RNA 하이브리드를 분리하는 단계;
- c) 비결합된 하이브리드를 제거하는 단계;
- d) 재조합 단백질을, 결합된 DNA-RNA 하이브리드와 함께, 바람직하기는 글루타티온을 함유하는 완충액을 첨가함으로써 분리하는 단계;
- e) PCR, 바람직하기는 RT-PCR을 사용하여 분리된 하이브리드를 증폭하는 단계로서, 증폭 반응시 랜덤 영역을 연결하는 불변 서열에 상보적인 프라이머가 사용되고, 프라이머 중 하나에서의 PCR 반응 동안 RNA 폴리머라제 프로

모터의 서열이 첨가되어 RNA 폴리머라제로 인 비트로 전사를 위한 이중-가닥 DNA를 획득하는 단계;

f) RNase H 활성을 포함하지 않는 역전사효소 및 RNA 템플레이트의 3' 말단에 상보적인 DNA 프라이머를 사용하여 역전사반응을 수행함으로써 DNA-RNA 하이브리드를 획득하는 단계를 포함하고, 상기 단계 a) 내지 f)는 바람직하기는 반복되는 것인, 방법.

청구항 17

제16항에 있어서,

상기 프로모터 서열은 T7 RNA 폴리머라제를 위한 프로모터 서열을 포함하고, RNA 폴리머라제는 T7 RNA 폴리머라제인 것인, 방법.

청구항 18

제16항 또는 제17항에 있어서,

상기 단백질 또는 그것의 도메인은 재조합 단백질 또는 재조합 도메인인 것인, 방법.

청구항 19

제16항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 단백질 또는 그것의 도메인은 징크 핑거(들)를 포함하는 것인, 방법.

청구항 20

제16항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 단백질 또는 그것의 도메인은 징크 핑거 도메인과 글루타티온 S-트랜스퍼라제 도메인(GST)의 융합체, 바람직하기는 SEQ ID No:37에 의해 암호화되는 징크 핑거 도메인과 GST의 융합체를 포함하는 것인, 방법.

청구항 21

제16항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 단백질 또는 그것의 도메인은 징크 핑거와 RNase HI 또는 유도체의 융합체이고, 바람직하기는 RNase HI는 B. 할로두란스, 바람직하기는 SEQ ID No:1에 타나낸 *rnhA* 유전자의 뉴클레오티드 175 내지 588에 의해 암호화되는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것인, 방법.

청구항 22

제16항 내지 제19항 및 제21항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 징크 핑거는 DNA-RNA 하이브리드 내의 특이적 서열에 결합하는 능력을 지니는 것인, 방법.

청구항 23

제16항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 징크 핑거는 ZFQR이고, 바람직하기는 SEQ ID No.2에 나타난 서열 ZFQR의 19 내지 303의 뉴클레오티드에 의해 암호화되는 서열을 갖는 것인, 방법.

청구항 24

DNA-RNA 하이브리드의 라이브러리를 얻는 방법으로,

a) RNA 폴리머라제의 프로모터 서열을 포함하는, 불변 서열에 의해 연결된, 중심 위치에 있는 축퇴성 서열을 함유하는 DNA 올리고뉴클레오티드의 라이브러리를 PCR 증폭하는 단계;

b) 템플레이트로서 단계 a)에서 얻어진 이중 가닥 DNA 상에 RNA 폴리머라제를 사용하여 RNA 가닥을 합성하는 단계,

c) 리보뉴클레아제 H 활성을 가지고 있지 않은 역전사효소를 사용하여 단계 b)에서 얻어진 RNA의 3' 말단에 존

재하는 불변 서열에 상보적인 프라이머를 역전사하는 단계로서, 역전사 단계 동안, RNA 가닥은 분해되지 않고, 상보적인 RNA 및 DNA 가닥으로 이루어진 하이브리드 핵산 분자가 얻어지는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 25

제24항에 있어서,

상기 올리고뉴클레오티드는 랜덤 9 또는 10 뉴클레오티드 위치를 포함하는 중심 위치 내에 축퇴성 서열을 함유하는 것인, 방법.

청구항 26

제24항 또는 제25항에 있어서,

상기 프로모터 서열은 T7 RNA 폴리머라제를 위한 프로모터 서열을 포함하고 RNA 폴리머라제는 T7 RNA 폴리머라제인 것인, 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 징크 핑거 도메인과 조작된 리보뉴클레아제 HI (RNase HI) 도메인의 융합체를 포함하는, 서열-특이적 리보뉴클레아제 H에 관한 것이다. 본 발명은 유전학에 적용가능하다. DNA-RNA 하이브리드에 작용하는 서열-특이적 리보뉴클레아제는 어느 적용에도 유용한 것으로, DNA-RNA 하이브리드 내의 RNA 가닥의 절단, 예를 들면 핵산의 인비트로 조작, 특히 특이적 서열을 갖는 DNA-RNA 하이브리드에서 수행될 수 있다. 인비트로 사용 외에도, 서열 특이적 방법으로 DNA-RNA 하이브리드를 절단하는 효소가 RNA 템플레이트 상에 DNA 가닥을 일시적으로 형성함으로써 인 비보에서 형성되는 다른 DNA-RNA 하이브리드를 절단하기 위해 복제하는, 특정 RNA 바이러스 감염 (예를 들면, 중앙원성 바이러스, 레트로바이러스 B형 감염, 인플루엔자)의 치료에 사용될 수 있음이 발견되었다.

[0002] 본 발명은 또한 DNA-RNA 하이브리드 결합 단백질(들) 또는 그것의 도메인(들)의 서열 선호도의 측정 방법에 관한 것으로, 상기 측정에 의해 서열은 DNA-RNA 하이브리드 결합 단백질에 의해 인식된다. 본 범위에서, 본 발명은 유전학에 적용가능하다. DNA-RNA 하이브리드 결합 단백질의 서열 선호도의 측정 방법은 DNA-RNA 하이브리드 내의 특정 서열에 결합하는 임의의 단백질 또는 그것의 도메인의 서열 선호도를 측정시 이용가능하고, 상기 측정에 의해, 서열은 DNA-RNA 하이브리드 결합 단백질(들) 또는 그것의 도메인에 의해 인식된다. 본 방법은 그러한 단백질의 특이적인 조작 기술에 상호보완적으로 적용될 수 있다. 서열-특이적 DNA-RNA 하이브리드 결합 단백질은 DNA 가닥 RNA 템플레이트의 생성을 위한 변이에 의해 복제되는, 특정 RNA 바이러스 (예를 들면, 중앙원성 바이러스, 레트로바이러스, B형 감염, 인플루엔자)의 진단에 사용될 수 있다. 그러한 도메인은 또한 뉴클레아제, RNA 변이 또는 DNA 변이 효소 등과 같은 효소활성 도메인을 갖는 DNA-RNA 결합 단백질 융합체와 같은 새로운 특이성을 갖는 효소를 얻기 위한 단백질 조작기술에 적용될 수 있다.

배경 기술

[0003] 특정 위치 내의 핵산의 절단은 종종 많은 유전자 조작 기술에서 사용되고 있다. 광범위하게 사용되는 상업적으로 이용가능한 제한 효소를 포함하는, DNA 분자를 단편화하기 위한 많은 방법이 존재한다. 많은 RNA 가공 효소들이 알려져 있지 않지만, 그들의 대부분은 낮은 서열 특이도 또는 그것의 완전한 부재를 특징으로 한다.

[0004] WO 2010076939 A1는 키메라 징크 핑거 뉴클레아제를 사용하여 표적 유전자 재조합 또는 돌연변이를 위한 조성물 및 방법을 기술한다. WO 03087341 A2는 인간 낭포성 섬유증 트랜스막 전도도 조절자 유전자 편집을 위한 징크 핑거 뉴클레아제의 용도를 기술하는 것으로, 낭포성 섬유증의 잠재적 치료 방법을 제공한다. WO 2009146179 A1는 인간 세포 내의 몇몇 유전적 부위의 DNA 서열을 변형할 수 있는 징크 핑거 뉴클레아제를 제조하기 위하여 공개적으로 이용가능한 징크 핑거를 사용하여 고효율적이고 실시하기 쉬운 모듈식 조립 방법의 개발을 기술한다. WO 2010076939 A1, WO 03087341 A2 또는 WO 2009146179 A1 중 어느 것도 징크 핑거, 특히 ZfQQR와 RNase HI 또는 그것의 부분의 융합의 용도를 기술하거나 암시하고 있지 않을 뿐만 아니라, DNA-RNA 하이브리드의 표적화된 절단의 가능성 또는 임의의 단백질에 의한 DNA-RNA 하이브리드의 표적화된 절단의 유형

을 개시하거나 암시하고 있지 않다. WO2007014181A2 및 WO2007014182A2의 기재내용으로부터, 표적화된 게놈의 편집을 용이하게 하는 많은 징크 핑거 도메인 및 FokI 뉴클레아제의 융합체가 알려져있다. 그러나, 종래의 경우에서와는 달리, 천연 단백질 단독, RNase HI 및 징크 핑거의 융합은 서열-특이적 효소 야기하지 않는다.

[0005] DNA-RNA 하이브리드 결합 단백질(들) 또는 그것의 도메인(들)의 서열 선호도의 측정 및 상기 측정에 의해 DNA-RNA 하이브리드 결합 단백질에 인식되는 서열의 측정 방법은 SELEX 과정의 변형이다. SELEX는 기하급수적인 풍부도를 갖는 리간드의 체계적 진화를 나타낸다. 본 방법의 원리는 리간드에 대해 높은 친화도를 나타내는 핵산 서열의 크게 분기된 라이브러리로부터 분자의 반복적인 선택도 및 풍부도를 기반으로 한다. 풍부도 단계는 리간드로의 핵산의 결합 및 비결합된 서열의 제거에 의해 달성된다. 본 방법은 DNA 또는 RNA 결합 단백질의 서열 선호도를 측정하기 위하여 (문헌 [Blackwell TK & Weintraub H. 1990. Science 250:1104-1110] 참고), 높은 친화도를 갖는 리간드에 결합하는 RNA 및 DNA 압타머를 획득하기 위해 꽤 사용되고 있지만 (문헌 [Ellington, A.D., Szostak, J.W., 1990. Nature 346, 818-822; Huizenga DE, Szostak JW. 1995. Biochemistry 34(2):656-65]), DNA-RNA 하이브리드에 결합하는 단백질에는 사용되고 있지 않다. SELEX의 공지된 변형에서 사용되는 기술된 올리고뉴클레오티드 라이브러리는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 (RNA, ssDNA, 변경된 RNA 또는 변경된 ssDNA, PNA) 또는 이중 가닥 DNA (dsDNA)로 이루어져 있지만, DNA-RNA 하이브리드 라이브러리의 사용을 특징으로 하지는 않는다.

[0006] WO 2010076939는 키메라 징크 핑거 뉴클레아제를 사용하여 표적화된 유전자 재조합 또는 돌연변이를 수행하기 위한 조성물 및 방법을 기술한다. WO 03087341 A2는 인간 낭포성 섬유증 트랜스막 전도도 조절자의 표적 편집을 위한 징크 핑거 뉴클레아제의 용도를 기술하는 것으로, 낭포성 섬유증을 위한 잠재적 치료법을 제공한다. WO2009146179 A1는 인간 세포 내의 몇몇의 게놈 위치의 DNA 서열을 변경할 수 있는 징크 핑거 뉴클레아제를 제조하기 위한 공개적으로 이용가능한 징크 핑거를 사용하여 높은 효율로 쉽게 실시할 수 있는 모듈-어셈블리 방법의 개발을 기술한다. 상기 기술된 어떠한 문헌도 DNA-RNA 하이브리드 결합 단백질의 기질 선호도를 측정하기 위한 SELEX 방법의 이용 및 DNA-RNA 하이브리드 내의 특이적 서열의 결합을 위한 징크 핑거의 이용 또는 특히 상기 목적을 위한 ZfQQR의 이용에 대해서는 기술하고 있지 않다.

[0007] 문헌 [Herskovitz M.A. et al., Mol Microbiol. 2000 Dec;38(5):1027-33, "Endoribonuclease RNase III is essential in Bacillus subtilis"]는 Bs-RNase III (rncS) 발현이 온도-민감성 플라스미드로부터의 rncS의 전사에 의존적이고, 허용되지 않는 온도에서 90-95%의 세포 죽음을 야기하고, 사실상 생존한 모든 세포들이 rncS-발현 플라스미드를 보유하고 있는 균주의 성장을 기술하고 있다. 따라서, 상기 저자는 rncS가 B. 서브틸리스에 필수적인 것으로 결론을 맺고 있다. 문헌 [Dasgupta S. et al., Mol Microbiol. 1998; 28 (3): 629-40, "Genetic uncoupling of the dsRNA-binding and RNA cleavage activities of the *Escherichia coli* endoribonuclease RNase III--the effect of dsRNA binding on gene expression"]은 RNase III를 암호화하는 유전자인, rnc 내의 점 돌연변이를 가지고 있는 박테리아의 표현형을 기술하고 있다. 문헌 [Karen Shahbadian et al., The EMBO Journal (2009) 28, 3523-3533, "RNase Y, a novel endoribonuclease, initiates riboswitch turnover in *Bacillus subtilis*"]는 SAM-결합 압타머 도메인의 상류 5'-모노포스포릴화된 yitJ 리보스위치(riboswitch)의 인비트로 우선적인 절단을 할 수 있는 신규한 엔도리보뉴클레아제 (현재 RNase Y라 함)로 확인된, 초기 비공개된 기능을 갖는 필수적 단백질, YmdA를 기술한다. 상기 문헌 [Herskovitz M.A. et al.], 문헌 [Dasgupta S. et al.] 또는 문헌 [Karen Shahbadian et al.] 중 어느 것도 DNA-RNA 하이브리드 결합 단백질의 기질 선호도를 측정하기 위한 SELEX 방법의 이용 또는 DNA-RNA 하이브리드에 결합 하는 징크 핑거 또는 DNA-RNA 하이브리드의 생성 방법에 대해 언급하거나 암시하고 있지 않다.

[0008] US 2006057590는 유전자의 전체 전사 영역을 실질적으로 가지고 있는 이중 가닥 RNA 분자의 발생 및 이미 표지화되거나 이후에 표지화될 수도 있는 작은 RNA 분자를 생성하기 위해 RNA 엔도리보뉴클레아제를 사용하는 상기 분자의 절단에 대해 기술하고 있다. JP54059392 특허는 이중-가닥 데옥시리보핵산의 DNA 사슬 중 하나의 단일 사슬 분리 영역을 공격하고, 이와 상보적인 영역에서 다른 DNA 사슬을 실질적으로 절단하는 새로운 뉴클레아제 B-1을 기술하고 있다. 상기 US 2006057590 및 JP54059392는 DNA-RNA 하이브리드 결합 단백질의 기질 선호도를 측정하기 위한 SELEX 방법의 이용 또는 DNA-RNA 하이브리드 내의 특이적 서열에 결합하기 위한 징크 핑거의 이용 또는 특히 상기 목적을 위한 ZfQQR의 이용에 대해서는 언급하고 있지 않다.

[0009] 따라서, 특정 위치에서 DNA-RNA 하이브리드의 RNA 가닥을 절단하는 리보뉴클레아제에 대한 필요성이 존재하고 있다. 또한, DNA-RNA 하이브리드 결합 단백질의 기질 선호도를 측정하는 새롭고 개선된 방법 또는 DNA-RNA 하이브리드 내의 특이적 서열에 결합하기 위한 징크 핑거의 이용 또는 특히 상기 목적을 위한 ZfQQR의 이용에 대한

필요성이 존재하고 있다.

발명의 내용

- [0010] 상기 최신 기술을 고려하여, 본 발명의 목적은 상기 지적인 단점을 극복하고 특정 위치에서 DNA-RNA 하이브리드의 RNA 가닥을 절단하는 리보뉴클레아제를 제공하기 위한 것이다. 따라서, 본 발명의 목적은 DNA-RNA 하이브리드 내의 서열을 인식하는 RNase HI의 촉매활성 도메인 및 징크 핑거 도메인의 조합을 기초로 하여 조작된 효소를 제공하고 DNA-RNA 하이브리드의 RNA 가닥 만을 절단하는 서열-특이적 효소를 생성하기 위한 것이다.
- [0011] 본 발명의 다음 목적은 랜덤 서열을 갖는 DNA-RNA 하이브리드의 라이브러리를 얻는 새롭고, 개선된 방법 및 징크 핑거에 의해, 더 바람직하기는 ZfQQR에 의해 결합하기 위한 DNA-RNA 하이브리드 결합 단백질의 서열 신호도를 측정하기 위한 그것의 용도를 제공하기 위한 것이다. 상기 방법은 DNA-RNA 하이브리드 라이브러리를 스크리닝하기 위해 효과적으로 사용될 수 있다. 본 발명의 다음 목적은 DNA-RNA 하이브리드의 라이브러리를 얻는 새롭고 개선된 방법을 제공하기 위한 것이다.
- [0012] 본 발명자들은 특정 위치에서 DNA-RNA 하이브리드의 RNA 가닥을 절단하는 서열-특이적 조작된 리보뉴클레아제 H가 징크 핑거 결합 도메인이 DNA-RNA 하이브리드 내의 특정 서열에 결합할 수 있는 능력을 가지는, 징크 핑거 DNA-RNA 하이브리드 결합 도메인과 RNase HI의 촉매활성 도메인 또는 그것의 유도체를 융합하는 것에 의해 얻어질 수 있다는 것을 우연히 발견하였다.
- [0013] 일 측면에서, 본 발명은 DNA-RNA 하이브리드 내의 RNA 가닥을 절단하는 리보뉴클레아제를 제공하는 것으로, 여기서 상기 리보뉴클레아제는 징크 핑거 DNA-RNA 하이브리드 결합 도메인과 RNase HI의 촉매활성 도메인 또는 그것의 유도체를 포함하는 융합 단백질이고, 여기서 상기 징크 핑거 결합 도메인은 DNA-RNA 하이브리드 내의 특정 서열에 결합하는 능력을 가진다. 바람직한 리보뉴클레아제는 RNase HI 하이브리드 결합 도메인의 결실을 포함하는 RNase HI의 촉매활성 도메인의 유도체이고, 바람직하기는 상기 RNase HI의 촉매활성 도메인은 바실러스 할로도란스로부터 유래하고, 더 바람직하게는 SEQ ID No:1에 나타낸 *rnhA* 유전자의 뉴클레오티드 175 내지 588에 의해 암호화되는 폴리펩티드를 포함한다. 상기 리보뉴클레아제에서, RNase HI의 바람직한 촉매활성 도메인은 K81A, K89E 및 K123A로부터 선택되는 기질 결합 영역 내의 하나의 아미노산의 치환을 포함하고, 바람직하기는 모든 치환 K81A, K89E 및 K123A를 함유한다.
- [0014] 바람직한 리보뉴클레아제에서, 상기 징크 핑거 도메인은 징크 핑거 ZfQQR의 유도체, 바람직하기는 SEQ ID No.2에 나타낸 서열 ZfQQR의 19 내지 303으로부터의 뉴클레오티드에 의해 암호화되는 폴리펩티드이다. 상기 리보뉴클레아제는 바람직하기는 SEQ ID No.4에 나타낸 융합 단백질 catAEA-ZfQQR를 포함한다. 상기 리보뉴클레아제는 바람직하기는 SEQ ID No.6에 나타낸 융합 단백질 GQ를 포함한다. 상기 리보뉴클레아제는 바람직하기는 또한 SEQ ID No.8에 나타낸 융합 단백질 GGKKQ를 포함한다.
- [0015] 다음 측면에서, 본 발명은 본 발명에 따른 리보뉴클레아제를 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0016] 본 발명은 또한 DNA-RNA 하이브리드 내의 RNA 가닥의 절단을 위한 본 발명에 따른 리보뉴클레아제 또는 본 발명에 따른 조성물의 용도에 관한 것이다. 상기 용도에서, DNA-RNA 하이브리드 내의 RNA 가닥의 바람직한 절단은 징크 핑거를 위한 결합 부위에서 떨어져 있는, 2-16 뉴클레오티드, 바람직하게는 5-7 뉴클레오티드에 위치한다.
- [0017] 본 발명은 또한 DNA-RNA 하이브리드 내의 RNA 가닥을 절단하는, 조작된 RNase HI를 얻는 방법을 제공하기 위한 것으로, 상기 방법은,
- [0018] a) 바람직하게는 결합 도메인의 제거 및/또는 기질 결합에 관여하는 아미노산의 치환에 의해, 기질에 결합하지는 않지만 촉매 활성을 유지하는, RNase HI를 얻는 단계;
- [0019] b) DNA-RNA 하이브리드 내의 특정 서열에 결합하는 능력을 갖는 결합 도메인, 바람직하게는 징크 핑거 DNA-RNA 하이브리드 결합 도메인과 단계 a) 에서 얻어진 RNase HI 촉매활성 도메인을 포함하는 융합 단백질을 제조하여 조작된 RNase HI를 얻는 단계를 포함한다. 조작된 RNase HI를 얻는 바람직한 방법에서, 상기 징크 핑거 도메인은 징크 핑거 ZfQQR의 유도체, 바람직하기는 SEQ ID No.2에 나타낸 서열 ZfQQR의 19 내지 303 뉴클레오티드에 의해 암호화되는 폴리펩티드이다. 그러한 방법에서, RNase HI의 촉매활성 도메인은 B. 할로두란스로부터 유래하고, 바람직하기는 SEQ ID No:1에 나타낸 *rnhA* 유전자의 뉴클레오티드 175 내지 588에 의해 암호화되는 폴리펩티드를 포함한다. RNase HI의 촉매활성 도메인은 바람직하기는 기질 결합 영역에 변이를 포함하는 것으로, 이는 바람직하기는 하나 이상의 아미노산의 치환, 절단 및/또는 삽입으로부터 선택된다.

[0020] 본 발명의 DNA-RNA 하이브리드의 RNA 가닥을 절단하는 리보뉴클레아제는 RNase HI 또는 그것의 유도체와 DNA-RNA 하이브리드 결합 징크 핑거의 융합체를 함유하는 것으로, 여기서 RNase HI는 B. 할로두란스로부터 유래하고 상기 징크 핑거는 하이브리드 DNA-RNA 내의 특정 서열에 결합하는 능력을 가진다. 바람직하게는, 본 발명에 따른, 상기 리보뉴클레아제는 B. 할로두란스로부터의 RNase HI의 유도체, 촉매활성 도메인 폴리펩티드, 더욱 바람직하게는 SEQ ID NO: 1에 나타난 *rnhA* 유전자의 뉴클레오티드 175 내지 588에 의해 암호화되는 폴리펩티드를 포함하는 것을 특징으로 한다. 특히 바람직하게는, 본 발명에 따른 리보뉴클레아제는 DNA-RNA 하이브리드 결합 도메인의 결실을 함유하는, 천연 RNase HI의 유도체인 것을 특징으로 한다. 바람직하게는, 본 발명에 따른, 상기 리보뉴클레아제는 기질 결합 영역: K81A, K89E 및 K123A 내에 아미노산 치환을 함유하는, 촉매활성 도메인 유도체 RNase HI 인 것을 특징으로 한다. 가장 바람직하게는, 본 발명에 따른 상기 리보뉴클레아제는 SEQ ID No. 1에 나타난 *rnhA* 유전자의 뉴클레오티드 175 내지 588에 의해 암호화되는 폴리펩티드의 융합체, 징크 핑거 ZfQQR의 유도체인 징크 핑거 도메인, 바람직하게는 SEQ ID No. 2에 나타난 19 내지 303 징크 핑거 ZfQQR의 뉴클레오티드를 암호화하는 폴리펩티드인 것을 특징으로 한다.

[0021] 서열-특이적 리보뉴클레아제 H는 RNA의 변이에 대한 연구를 포함하는, RNA 질량 분석기를 위한 핵산의 특이적 및 국소적 단편화에서 사용될 수 있다. 본 발명은 제3세대 시퀀싱을 위한 RNA의 단편을 생성하기 위해 사용될 수 있다. 서열-특이적 조작 RNase H는 특이적 서열로 바이러스 RNA를 검출하거나 맵핑하기 위해 사용될 수 있는 것으로, 여기서 단일-가닥 RNA는 DNA로 어닐링되고, 생성된 하이브리드가 절단된다. 본 발명은 mRNA의 단편화 및 리게이션을 재편성(shuffling)함으로써 단백질의 조작에 사용될 수 있는 것으로, 여기서 단편은 특이적으로 조작된 리보뉴클레아제 H로 분해하여 얻어진다. 본 발명은 또한 인비보에서 지속적 DNA-RNA 하이브리드의 부위-특이적 절단을 야기하기 위해 사용될 수 있다.

[0022] 새로운 특징들을 갖는 효소는 다른 기능성을 갖는 몇몇 도메인의 융합을 건설함으로써 얻어질 수 있다. 서열-의존적 방법으로 DNA-RNA 하이브리드의 RNA 가닥을 절단하는 리보뉴클레아제의 조작은 2개의 단백질 도메인: 조작된 RNase HI와 DNA-RNA 하이브리드 결합 징크 핑거의 융합을 기초로 한다. B. 할로두란스로부터의 RNase HI는 서열-비의존적 방법으로 DNA-RNA 하이브리드 내의 RNA 가닥을 가수분해하는 효소이다. 징크 핑거 ZfQQR는 DNA-RNA 하이브리드 내의 잘-정의된 서열에 결합하는 능력을 가진다. 융합 효소의 구현에 중 하나에서, DNA-RNA 하이브리드 내의 RNA 가닥에 대한 리보뉴클레아제 활성을 나타내는 도메인은 촉매활성 도메인 (cat이라 함)을 암호화하는 B. 할로두란스 *rnhA*로부터의 유전자의 단편이다. 그것은 B. 할로두란스로부터의 천연 단백질 RNase HI의 59 내지 196 아미노산 잔기 영역에 해당하는, 175 내지 588 뉴클레오티드 *rnhA* 유전자로부터의 단편이다. 천연 유전자로부터, 상기 하이브리드 결합 도메인 (HBD)을 암호화하는 단편은 그것의 서열 비의존적 DNA-RNA 하이브리드 결합 능력으로 인해, 제거된다. ZfQQR과 촉매활성 도메인의 융합체를 cat-ZfQQR라 명명하였다. 조작된 촉매활성 도메인은 기질 결합 영역: K81A, K89E 및 K123A 내에 도입된 3개의 아미노산 치환을 가진다. 상기 치환은 공지된 기질 결합 영역에 가까이 위치하는, 양전하 리신을 포함한다. 결합 부위 내의 치환은 효소의 비활성화를 의도하지는 않지만, 추가적인 DNA-RNA 하이브리드 결합 도메인의 존재에 의존하는 효소의 기질 결합을 야기한다. 융합 효소의 서열 특이성을 부여하는, 도메인은 징크 핑거 ZfQQR이다. 융합 효소에서, 단백질의 아미노산 잔기 7 내지 101 영역에 해당하는, 19 내지 303 뉴클레오티드의 징크 핑거 ZfQQR를 암호화하는 유전자 단편이 사용되었다. 추가적으로, 융합 효소의 인터도메인 링커 영역은 GQ 및 GGKKQ로 불리는, 2개의 변이체를 생성하기 위해 변성된다. GQ는 융합 효소의 위치 138-148 내의 아미노산을 암호화하는 단편이 결핍된 ZfQQR와 K81A, K89E 및 K123A 내의 치환을 갖는 촉매활성 도메인의 융합이다. GGKKQ는 융합 효소의 위치 138-139 및 141-146 내의 아미노산을 암호화하는 단편이 결합된 ZfQQR와 K81A, K89E 및 K123A 내의 치환을 갖는 촉매활성 도메인의 융합이다. 생성된 구조체에 대한 설명을 표 1에 요약하였다.

표 1

[0023] 표 1. 구조체에 대한 설명, 실시예에서 사용되는 약어 및 서열번호(SEQ ID NO) 참고

설명	약어	SEQ ID NOs의 참고
B. 할로두란스로부터의 RNase HI의 촉매활성 도메인	cat	SEQ ID No:1의 뉴클레오티드 175-188에 의해 코딩되는 단편
ZfQQR와 촉매활성 도메인의 융합	cat-ZfQQR	SEQ ID No:1의 뉴클레오티드 175-588 및 SEQ ID No:2의 뉴클레오티드 19-303에 의해 코딩되는 단편
ZfQQR와 K81A, K89E 및 K123A 내에 치환을 갖는 촉매활성 도메인의 융합	catAEA-ZfQQR	SEQ ID No: 3 (뉴클레오티드 서열) 및 SEQ ID No: 4 (아미노산 서열)에 의해 코딩되는 구조체

징크 핑거 ZfQQR 및 위치 138-148 내의 아미노산을 암호화하는 단편에 의해 단축된 인터도메인 링커와 위치 K81A, K89E 및 K123A의 단백질의 아미노산 서열에 변이를 도입하기 위한 치환을 갖는 촉매활성 도메인의 융합	GQ	SEQ ID No: 5 (뉴클레오티드 서열 및 SEQ ID No: 6 (아미노산 서열)에 의해 코딩되는 구조체
징크 핑거 ZfQQR 및 위치 138-139 및 141-146 내의 아미노산을 암호화하는 단편에 의해 단축된 인터도메인 링커와 위치 K81A, K89E 및 K123A 내에 단백질의 아미노산 서열에서의 변이를 도입하기 위한 치환을 갖는 촉매활성 도메인의 융합	GGKKQ	SEQ ID No: 7 (뉴클레오티드 서열) 및 SEQ ID No: 8 (아미노산 서열)에 의해 코딩되는 구조체

- [0024] 다음 측면에서, 본 발명은 또한 DNA-RNA 하이브리드 결합 단백질(들) 또는 그것의 도메인(들)의 기질 선호도를 측정하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 단백질(들) 또는 그것의 도메인(들)에 의해 인식되고 및/또는 DNA-RNA 하이브리드 내의 단백질 도메인에 의해 결합된 바람직한 서열을 측정하는 것을 가능하게 한다.
- [0025] 본 발명은 DNA-RNA 하이브리드 결합 단백질(들) 또는 그것의 도메인(들)의 서열 선호도를 측정하는 방법을 제공하는 것으로, 상기 방법은:
- [0026] a) DNA-RNA 하이브리드 기질의 라이브러리의 혼합물과, 정제된 단백질 또는 그것의 도메인을 접촉시키는 단계로서 여기서 DNA-RNA 하이브리드 기질은 바람직하기는 고정된 연결(flanking) 서열로, 9 또는 10 개의 뉴클레오티드 위치가 랜덤화된, 중심부 내의 랜덤 서열을 포함하여 시험된 단백질 또는 그것의 도메인을 서열을 사용하여 친화도를 갖는 곳에 결합시키는 단계;
- [0027] b) 수지, 바람직하기는 글루타티온 아가로오스에, 비결합된 DNA-RNA 하이브리드를 사용하여, 단백질 또는 그것의 도메인의 고정화하여 비결합된 DNA-RNA 하이브리드를 분리하는 단계;
- [0028] c) 비결합된 하이브리드를 제거하는 단계;
- [0029] d) 결합된 DNA-RNA 하이브리드와 함께, 바람직하기는 글루타티온을 함유하는 완충액을 첨가함으로써, 재조합 단백질을 단리하는 단계;
- [0030] e) PCR, 바람직하기는 RT-PCR을 사용하여 단리된 하이브리드를 증폭시키는 단계로서, 여기서 증폭 반응시, 랜덤 영역의 연결 서열 상의 공지된 서열에 상보적인 프라이머가 사용되고, 프라이머 중 어느 하나에서의 PCR 반응 동안 RNA 폴리머라제 프로모터의 서열을 첨가하여 RNA 폴리머라제로 인비보 전사를 위한 이중-가닥 DNA를 얻는 단계;
- [0031] f) RNase H 활성을 보유하지 않는 역전사효소 및 RNA 템플레이트의 3' 말단에 상보적인 DNA 프라이머를 사용하여 역전사를 수행함으로써 DNA-RNA 하이브리드를 얻는 단계를 포함하고, 바람직하기는 상기 단계 a) 내지 f)는 반복된다.
- [0032] 본 방법의 바람직한 구현예에서, 프로모터 서열은 T7 RNA 폴리머라제를 위한 프로모터 서열을 포함하고, RNA 폴리머라제는 T7 RNA 폴리머라제를 포함한다. 바람직하기는, 단백질 또는 그것의 도메인은 재조합 단백질 또는 재조합 도메인이다. 단백질 또는 그것의 도메인은 바람직하게는 징크 핑거(들)를 포함한다. 바람직한 구현예에서, 상기 단백질 또는 그것의 도메인은 징크 핑거 도메인과 GST의 융합체, 바람직하기는 SEQ ID No:37에 의해 암호화되는 징크 핑거 도메인 및 GST의 융합체이다. 바람직한 단백질 또는 그것의 도메인은 징크 핑거와 RNase HI 또는 그것의 유도체의 융합체이고, 바람직하기는 RNaseHI는 B. 할로두란스로부터 유래되고, SEQ ID No:1에 나타낸 *rnhA* 유전자의 뉴클레오티드 175 내지 588에 의해 암호화되는 폴리펩티드를 포함한다. 징크 핑거는 바람직하기는 DNA-RNA 하이브리드 내의 특정 서열에 결합하는 능력을 가지고, 적합한 징크 핑거는 ZfQQR, 바람직하기는 SEQ ID No.2에 나타낸 서열 ZfQQR의 뉴클레오티드 19 내지 303에 의해 암호화되는 서열이다.
- [0033] 추가 측면으로서, 본 발명은 DNA-RNA 하이브리드의 라이브러리를 얻는 방법을 제공하는 것으로, 상기 방법은,
- [0034] a) RNA 폴리머라제를 위한 프로모터 서열을 포함하는, 불변 서열에 의해 연결되는, 중심 위치에 있는 촉퇴성 서열을 함유하는 DNA 올리고뉴클레오티드의 라이브러리를 PCR 증폭하는 단계,
- [0035] b) 템플레이트로서 단계 a)에서 생성된 이중 가닥 DNA 상에 RNA 폴리머라제를 사용하여 RNA 가닥을 합성하는 단계,
- [0036] c) RNase H 활성을 보유하지 않는 역전사효소를 사용하여 단계 b)에서 얻어진 RNA의 3' 말단에 존재하는 불변

서열에 상보적인 프라이머의 역전사하는 단계로서, 상기 역전사 동안 RNA 가닥은 분해되지 않고 완전히 상보적인 RNA와 DNA 가닥으로 이루어진 하이브리드가 얻어지는 단계를 포함한다. 바람직하기는, 그러한 방법에서, 올리고뉴클레오티드는 랜덤 9 또는 10개의 뉴클레오티드 위치를 포함하는 중심 위치에서 축퇴성 서열을 함유한다. 더 바람직하기는, 상기 프로모터 서열은 T7 RNA 폴리머라제를 위한 프로모터 서열을 포함하고 RNA 폴리머라제는 T7 RNA 폴리머라제이다.

[0037] 서열-특이적 DNA-RNA 하이브리드 결합 단백질에 의해 인식되는 서열의 전체 영역 및 DNA-RNA 하이브리드 결합 단백질(들) 또는 그것의 도메인(들)의 기질 선호도를 측정하기 위하여, 본 발명에 기술된 바와 같이, DNA-RNA 하이브리드에서, 단백질에 의해 우선적으로 결합되는 DNA-RNA 하이브리드 서열의 선택의 반복적 사이클이 가능한, SELEX 방법의 변경이 개발되었다 (도 10). 본 과정의 새로운 요소는 다음 사이클에서 사용되기 위한, DNA-RNA 하이브리드의 라이브러리의 증폭 및 재생 방법이다. RNA 폴리머라제, 바람직하기는 T7 RNA 폴리머라제를 위한 프로모터 서열을 포함하는, 불변 서열에 의해 연결된, 중심 위치에 있는 축퇴성 서열을 함유하는 DNA 올리고뉴클레오티드의 라이브러리의 PCR 증폭을 사용하는 것을 포함한다. 이는 생성되는 이중 가닥 DNA는 RNA 폴리머라제, 바람직하게는 T7 RNA 폴리머라제를 사용하여 RNA 가닥의 합성을 위한 템플레이트로서 사용된다. 단일-가닥 RNA의 풀이 생성되고 DNA-RNA 하이브리드의 라이브러리를 얻기 위하여 역 전사를 위한 템플레이트로서 역할을 한다. 역전사효소는 RNA의 3' 말단에 위치하는 불변 서열에 상보적인 프라이머를 확장시킨다. 제거된 리보뉴클레아제 H 활성을 갖는 효소 (리보뉴클레아제 H 활성을 포함하지 않는 역전사효소)에 의한 역전사 동안, RNA 가닥은 분해되지 않고, 완전히 상보적인 RNA 및 DNA 가닥으로 이루어진 하이브리드의 생성을 가능하게 한다. 템플레이트 RNA는 서열의 중심부에서 이중이기 때문에, DNA-RNA 하이브리드의 라이브러리가 상기 방법으로 얻어진다. SELEX 방법의 개발된 변형의 효능성은 DNA-RNA 하이브리드에 결합하는, 리간드로서 징크 핑거 ZfQQR를 사용하여 확인되었다. ZfQQR가 조작의 결과로서 얻어지고 DNA-RNA 하이브리드의 DNA 가닥에서 5'GGGAAGAA-3' 서열에 결합한다 (문헌 [Shi and Berg, Specific DNA-RNA hybrid binding by zinc finger proteins. 1995. Science, vol. 268] 참고). 예를 들면, 글루타티온 S-트랜스퍼라제 도메인 (GST라 불림)과 ZfQQR 융합체가 사용되었다. 본 명세서에서 인용된 모든 간행물 및 참조 및 그들의 참조는 그 전체내용을 참고자료로서 본 명세서에 통합된다.

도면의 간단한 설명

[0038] 본 발명의 더 나은 이해를 위하여, 본 발명의 구현예에 대한 몇몇 예들을 도면에 예시하였다.

도 1은 징크 핑거 ZfQQR와 유전자 융합 *rnhA* 유전자의 최종 DNA 구조물의 제조 및 B. 할로두란스 유전자 서열로부터의 RNase HI 내의 치환의 제조에 사용되는 SEQ ID No:11-25의 프라이머의 서열을 나타낸다.

도 2는 특정 기질로서 분해 검정법(digestion assay)에 사용되는, 징크 핑거 ZfQQR를 위한 결합 부위를 함유하는 SEQ ID No:9 (도 2 (A) - RNA 가닥) 및 SEQ ID No:10 (도 2 (B) - DNA 가닥)에 나타난 DNA-RNA 하이브리드 서열을 나타낸다.

도 3은 징크 핑거를 위한 결합 부위를 함유하는 기질 DNA-RNA 하이브리드의 절단으로부터 분해 생성물, 및 마그네슘 및 아연 이온의 존재시 절단의 의존성을 나타낸다. 레인 1-14에 나타난 분해 반응은 방사성 표지된 기질 0.05 μ m, 비-표지된 기질 0.5 μ m, 25 mM Tris (pH 8.0), 100 mM KCl, 2 mM DTT로 30분 동안 37 °C에서 하기에 기술될 다른 효소의 존재 또는 부재 하에 및 5 mM MgCl₂ 및/또는 20 μ m ZnSO₄ 의 존재 하에 수행하였다. 레인 1: 비절단된 기질, 레인 2: B. 할로두란스로부터의 RNase HI 12.5 nM, 5 mM MgCl₂, 20 μ m ZnSO₄, 레인 3: 625 nM의 cat, 5 mM MgCl₂, 20 μ m ZnSO₄, 레인 4: 5 nM cat-ZfQQR, 5 mM MgCl₂, 20 μ m ZnSO₄, 레인 5: 25 nM catAEA-ZfQQR, 5 mM MgCl₂, 20 μ m ZnSO₄, 레인 6: 12.5 nM의 B. 할로두란스로부터의 RNase HI, 5 mM MgCl₂, 레인 7: 625 nM의 cat, 5 mM MgCl₂, 레인 8: 5 nM cat-ZfQQR, 5 mM MgCl₂, 레인 9: 25 nM의 catAEA-ZfQQR, 5 mM MgCl₂, 레인 10: B. 할로두란스로부터의 12.5 nM RNase HI, 20 μ m ZnSO₄, 레인 11: 625 nM의 cat, 20 μ m ZnSO₄, 레인 12: 5 nM의 cat-ZfQQR, 20 μ m ZnSO₄, 레인 13: 25 nM의 catAEA- ZfQQR, 20 μ m ZnSO₄, 레인 14: 마커 크기 10-100 뉴클레오티드 단일-가닥 RNA 방사성 표지된 동위원소 인 33 (USB) 여기서 별표 (*)는 독특한 절단 부위를 나타낸다.

도 4는 징크 핑거를 위한 결합 부위를 함유하는, 기질 DNA-RNA 하이브리드의 절단으로부터의 분해 생성물, 및 마그네슘 및 아연 이온의 존재시 catAEA- ZfQQR의 변이체 GQ에 의한 절단 의존성을 나타낸다. 레인 1-14에 나타난 분해 반응은 50 nM의 GQ 변이체, 0.05 μ m의 방사성 표지된 기질, 0.5 μ m의 비-표지된 기질, 25 mM Tris

(pH 8.0), 20 μ m ZnSO₄, 100 mM KCl, 2 mM DTT을 사용하여 30분 동안 37 °C에서 하기와 같이 다양한 MgCl₂의 농도로 수행되었다. 레인 1: 비절단된 기질, 레인 2: 0.05 mM MgCl₂, 레인 3: 0.1 mM MgCl₂, 레인 4: 0.2 mM MgCl₂, 레인 5: 0.5 mM MgCl₂, 레인 6: 1 mM MgCl₂, 레인 7: 2 mM MgCl₂, 레인 8: 5 mM MgCl₂, 레인 9: 10 mM MgCl₂, 레인 10: 마커 크기 10-100 뉴클레오티드 단일-가닥 RNA 방사성 표지된 동위원소 인 33 (USB).

도 5는 징크 핑거를 위한 결합 부위를 함유하는 기질 DNA-RNA 하이브리드의 절단으로부터 생성된 분해 생성물, 및 마그네슘 및 아연 이온의 존재 하에 catAEA-ZfQQR의 변이체 GGKKQ에 의한 절단 의존성을 나타낸다. 레인 1-14에 나타난 분해 반응은 50 nM GGKKQ 변이체, 0.05 μ m의 방사성 표지된 기질, 0.5 μ m의 비-표지된 기질, 25 mM Tris (pH 8.0), 20 μ m ZnSO₄, 100 mM KCl, 2 mM DTT를 사용하여 30 분 동안 37 °C에서 하기와 같이 다양한 MgCl₂의 농도로 수행되었다. 레인 1: 비절단된 기질, 레인 2: 0.05 mM MgCl₂, 레인 3: 0.1 mM MgCl₂, 레인 4: 0.2 mM MgCl₂, 레인 5: 0.5 mM MgCl₂, 레인 6: 1 mM MgCl₂, 레인 7: 2 mM MgCl₂, 레인 8: 5 mM MgCl₂, 레인 9: 10 mM MgCl₂, 레인 10: 마커 크기 10-100 뉴클레오티드 단일-가닥 RNA 방사성 표지된 동위원소 인 33 (USB).

도 6은 징크 핑거 ZfQQR를 위한 절단 부위를 함유하는 DNA-RNA 하이브리드의 기질 가닥 RNA 상의 catAEA-ZfQQR, GQ 변이체 및 GGKKQ 변이체에 의해 발생된 절단 부위의 맵핑을 나타낸다. 레인 1-14에 나타난 분해 반응은 0.05 μ m의 방사성 표지된 기질, 0.5 μ m의 비-표지된 기질, 25 mM Tris (pH 8.0), 100 mM KCl, 2 mM DTT를 사용하여 30분 동안 37 °C에서 하기에 나타낸 바와 같이 다른 효소의 존재 또는 부존재 및 적절한 농도의 MgCl₂ 및/또는 20 μ m ZnSO₄의 존재 하에 수행되었다. 레인 1: 비절단된 기질, 레인 2: 35 nM의 catAEA-ZfQQR, 20 μ m ZnSO₄, 레인 3: 50 nM의 GQ 변이체, 1mM MgCl₂, 20 μ m ZnSO₄ 레인 4: 50 nM의 GGKKQ 변이체, 2 mM MgCl₂, 20 μ m ZnSO₄, 레인 5: ssRNA의 리보뉴클레아제 T1 절단, 레인 6: ssRNA 기질의 알칼리 가수분해.

도 7은 catAEA-ZfQQR에 의한 징크 핑거 ZfQQR를 위한 절단 부위를 함유하는 기질 DNA-RNA 하이브리드의 절단 위치를 나타내는 것으로, 상기 서열을 화살표로 나타내었는바, 크고 검정색의 화살표는 주요 절단 부위를 나타내고, 작은 화살표는 추가적인 부위 (상부 가닥 RNA, 하부 가닥 DNA, 박스로 표시된 ZfQQR를 위한 절단 부위)를 나타낸다.

도 8은 catAEA-ZfQQR의 GQ 변이체에 의한 징크 핑거 ZfQQR를 위한 절단 부위를 함유하는 기질 DNA-RNA 하이브리드의 절단 위치를 예시하는 것으로, 상기 서열을 화살표로 나타내었는바, 크고 검정색의 화살표는 주요 절단 부위를 나타내고, 작은 화살표는 추가적인 부위(상부 가닥 RNA, 하부 가닥 DNA, 박스로 표시된 ZfQQR를 위한 절단 부위)를 나타낸다 .

도 9는 catAEA-ZfQQR의 GGKKQ 변이체에 의한 징크 핑거 ZfQQR를 위한 절단 부위를 함유하는 기질 DNA-RNA 하이브리드의 절단 위치를 예시하는 것으로, 상기 서열을 화살표로 나타내었는바, 크고 검정색 화살표는 주요 절단 부위를 나타내고, 작은 화살표는 추가적인 부위를 나타낸다 (상부 가닥 RNA, 하부 가닥 DNA, 박스로 표시된 ZfQQR를 위한 절단 부위).

도 10은 본 발명에 따라 변형된 SELEX 과정의 한 라운드에 대한 다른 단계를 나타내는 도식이다.

도 11은 박테리오파지 T7 RNA 폴리머라제를 사용한 인 비트로 전사의 과정에서 단일-가닥 RNA를 얻기 위한 DNA 올리고뉴클레오티드 템플레이트의 서열을 나타낸다. 템플레이트 A (SEQ ID No:26)는 징크 핑거 ZfQQR를 위한 절단 부위를 함유한다. 템플레이트 B (SEQ ID No:27)는 징크 핑거 ZfQQR를 위한 절단 부위를 함유하지 않으며 제한 효소 XhoI를 위한 독특한 절단 부위를 가진다. 템플레이트 9N (SEQ ID No:28)는 9개의 뉴클레오티드 축퇴성 영역 (단일 축퇴성 뉴클레오티드는 "N"로 표시함)을 나타낸다.

도 12는 DNA-RNA 하이브리드를 얻는 과정을 나타낸다. DNA 단편은 6 M 우레아를 함유하는 15% 변성 폴리악릴아미드 겔에서 분해되었다. 55 뉴클레오티드 길이 DNA 올리고뉴클레오티드의 5' 말단 및 프라이머 2를 방사성 동위원소 인 33으로 표지되었다. 레인 1: 0.5 pmol의 표지된 프라이머 2, 레인 2: 0.25 pmol의 역 전사 산물, 레인 3: 0.25 pmol의 55 nt 표지된 DNA 올리고뉴클레오티드.

도 13은 DNA-RNA 하이브리드를 얻는 과정을 예시한다. DNA 단편은 15% 천연 폴리악릴아미드 겔에서 분해되었다. 55 뉴클레오티드 길이 DNA 올리고뉴클레오티드의 5' 말단 및 프라이머 2는 방사성 동위원소 인 33으로 표지되었다. 레인 1: 0.5 pmol의 표지된 프라이머 2, 레인 2: 0.25 pmol의 역전사 생성물, 레인 3: 5 단위의 리보뉴클레아제 H를 분해한 0.25 pmol의 역 전사 생성물, 레인 4: 리보뉴클레아제 H의 단위를 분해한 0.25 pmol의 역

전사 생성물, 레인 5: 0.25 pmol의 55 nt 표지된 DNA 올리고뉴클레오티드.

도 14는 SELEX 과정의 연속적인 라운드에서 (A) 징크 핑거 ZfQQR를 위한 절단 부위를 함유하는 이중-가닥 DNA 및 (B) ZfQQR를 위한 절단 부위를 함유하지 않는 이중-가닥 DNA 사이의 비율의 변화를 나타내는 막대 그래프이다 ("0"은 하이브리드 A와 B의 혼합물을 1:10000로 비율로 시작한, 입력을 나타내고, I-V는 연속적인 라운드의 수를 나타낸다).

도 15는 WebLogo를 사용하여 40 서열로부터 유도된 시퀀스 로그를 나타낸다.

도 16은 징크 핑거 ZfQQR를 위한 K_D 정수를 결정하는데 사용되는 DNA-RNA 하이브리드 서열을 나타내고, 여기서 도 16A는 본 명세서에서 기술된 절단 부위를 함유하는 DNA-RNA 하이브리드이고, 도 16B는 SELEX를 5회 라운드한 이후에 서열 공통성을 갖는 DNA-RNA 하이브리드이다.

도 17은 반응 혼합물 내의 징크 핑거 ZfQQR의 농도에 따른, 니트로셀룰로오스 필터 상에 보유된 방사성 표지된 기질의 양의 변화를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0039] 하기의 실시예는 본 발명을 예시하고 특정 구현예를 설명하기 위한 것으로, 이는 본 발명을 제한하는 것을 의도하지 않으므로, 첨부된 특허청구범위에 정의된 전체 범위로 동일시하여서는 안된다.

[0040] 하기의 실시예에서, 달리 지시하지 않으면, 표준 물질 및 방법은 문헌 [Sambrook J. et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition, 1989]에 기술된 것을 사용하였다. 콜드 스프링 하브 출판물(Cold Spring Harbor, N.Y.) 또는 특정 물질 및 방법을 위한 제조사의 권장사항에 따라 진행된다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 달리 지시하지 않으면, 아미노산 및 뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드를 위한 표준 약어가 사용된다.

[0041] 실시예 1 발현 벡터 pET 30b로의 바실러스 할로두란스로부터의 *rnhA* 유전자 단편의 클로닝

[0042] *rnhA* 유전자(SEQ ID NO:1)를 가지고있는 벡터 pET15a (SEQ ID NO:1은 B. 할로두란스로부터의 *rnhA* RNase HI (유전자 ID 893801, BH0863)의 DNA 서열이고 개인적인 소스로부터 얻었다). 각 프라이머 Bhcatr (SEQ ID No:12) 및 Bhcacf (SEQ ID No:11) (도 1 참조) 50 pmol를 사용하여 cat를 암호화하는 유전자의 단편(촉매활성 도메인)을 템플레이트로서 *rnhA* 유전자를 가지고있는 pET15a 상에서 수행된 표준 조건으로 PCR 기술 및 1 U of Phusion 폴리머라제 (New England Biolabs)에 의해 증폭하고, 175-588 뉴클레오티드 175-588에 해당하는 *rnhA* 유전자 단편을 암호화하는 DNA 및 벡터 DNA pET 30b (Novagen company)를 NdeI 및 KpnI (Fermentas)로 분해하였다. DNA 를 함유하는 반응 혼합물을 TAE 완충액 내의 0.7% 아가로스 겔 상에서 분리하고, 예상되는 크기 430 bp 및 5313 bp에 해당하는 단편들을 각각 재단리를 위한 키트 (Gel out, A & A Biotechnology)를 사용하여 겔로부터 재단리하였다. 그 다음, 50 ng의 재단리된 *rnhA* 유전자 단편 및 25 ng의 절단 벡터 pET 30b를 박테리오파지 T4 DNA 리가아제 (Fermentas)로 처리하고, 상기 리가아제를 가열하여 불활성화시켰다. 그 다음, 상기 리게이션 혼합물을 박테리아 세포 형질전환을 위해 사용하였다. E. 콜리 반응능(competent) 박테리아(Top10 (Invitrogen)를 리게이션 혼합물로 형질전환하였다 (50 μ l의 박테리아 세포당 20 - 200 ng). 형질전환체를 30 μ g/ml 카나마이신을 보충한 LB-아가 플레이트 상에 선별하였다. 원하는 재조합체를 함유하는 형질전환체의 선별은 제한 맵에 대한 분석을 기초로 한 후, 상기 샘플을 시퀀싱하여 구조체의 서열을 확인하였다.

[0043] 실시예 2 발현 벡터 pET28b로의 징크 핑거 ZfQQR를 암호화하는 유전자의 클로닝

[0044] 징크 핑거 ZfQQR를 암호화하는 유전자의 합성을 문헌 [Shi Y, Berg JM. Specific DNA-RNA hybrid binding proteins. Science. 1995. vol. 268, 282-284]으로부터의 아미노산 서열을 기초로하여 Epoch's Life Sciences (징크 핑거 ZfQQR 유전자의 합성된 DNA의 서열인 SEQ ID No:2 참조)로부터의 주문하였다. ZfQQR를 암호화하는 DNA 및 DNA 벡터 pET28b (Novagen company)를 제한 효소 NcoI 및 XhoI (효소들은 Fermentas Company로부터 구입하였고, 반응은 37°C에서 1시간 동안 1mg DNA 당 1 단위로, 제조사의 지시에 따라 완충액 2X Yellow에서 수행하였다)로 분해하였다. 상기 반응 혼합물을 TAE 완충액 내의 0.7% 아가로스 겔 상에 분리하고 실시예 1에서와 같이 처리하였다. 그 다음, 재단리된 ZfQQR 유전자 50 ng 및 분해된 벡터 pET28b 25 ng를 1 시간 동안 실온에서 T4 DNA 리가아제 (Fermentas, 본 반응은 제조사에 의해 공급된 완충액에서 수행되었다)로 리게이션하였다. 리가아제를 10분 동안 75°C에서 배양하는 것에 의해 가열하여 불활성화시켰다. 그 다음, 상기 리게이션 혼합물을 사용하여 실시예 1에서와 같이 박테리아 세포를 형질전환하였다.

[0045] **실시예 3 바실러스 할로두란스 *rnhA*로부터의 유전자의 단편을 함유하는 발현 벡터 pET 30b로의 징크 핑거 ZfQQR를 암호화하는 유전자의 클로닝**

[0046] 벡터 pET28b로부터의 ZfQQR를 암호화하는 유전자의 단편을 PCR 기술에 의해 증폭하였다. 상기 반응을 템플레이트로서 ZfQQR 유전자 및 1 U의 Phusion 폴리머라제 (New England Biolabs)를 지니는 pET28b 상에서 각각의 프라이머 BhZf (SEQ ID No:13) 및 Kmr (SEQ ID No:15) 50 pmol를 사용하여 표준 조건 하에 수행하였다 (도 1 참고). 벡터 pET 30b 내의 RNase HI의 촉매활성 도메인을 암호화하는 유전자의 단편을 PCR 기술에 의해 증폭하였다. 상기 반응을 템플레이트로서 cat 유전자 및 1 U의 Phusion 폴리머라제 (New England Biolabs)를 지니는 pET 30b 상에서 각각의 프라이머 Kmf (SEQ ID No:14) 및 Bhcatr (SEQ ID No:12) (도 1 참고) 50 pmol를 사용하여 표준 조건 하에서 수행하였다. 정제된 PCR 생성물을 박테리오파지 T4 폴리뉴클레오티드 키나아제 (Fermentas)로 인산화하였다. 두 반응으로부터의 DNA(20 ng)를 결합시키고 리게이션한 후 리게이션 혼합물을 실시예 1에서와 같이 박테리아 세포에 형질전환하였다.

[0047] **실시예 4 위치 K81A, K89E 및 K123A에 아미노산 치환을 도입하는 융합 효소를 암호화하는 유전자의 돌연변이화**

[0048] 실시예 3에서 발생된 단편의 리게이션에 의해, 시작 부분에는 오픈 리딩 프레임, 말단에는 cat를 암호화하는 유전자의 일부 및 ZfQQR를 암호화하는 유전자 단편을 함유하는 구조물을 생성하였다. 상기 생성된 DNA 구조물은 템플레이트로서 역할을 하며 단백질의 위치 81, 89 및 123에서 아미노산 잔기를 암호화하는 뉴클레오티드 내에 PCR 기술을 사용하여 치환을 도입하기 위한 것이다. 치환체를 단계에서 도입하였는바, 우선 잔기 81 (라이신의 알라닌으로의 치환) 및 89 (글루타민산으로의 라이신의 치환)를 암호화하는 뉴클레오티드를 치환하고, 상기 구조물을 얻은 바로 직후에, PCR을 수행하여 위치 123 내의 잔기를 암호화하는 뉴클레오티드 (알라닌으로의 라이신의 치환)로 전환하였다. 상기 PCR 반응은 템플레이트로서 cat-ZfQQR 유전자 및 1 U의 Phusion 폴리머라제 (New England Biolabs)를 지니는 pET30b 상에서 각각의 프라이머 K81Af (SEQ ID No:17), K81Ar (SEQ ID No:16), K89Ef (SEQ ID No:19), K89Er (SEQ ID No:18), K123Af (SEQ ID No:21) 및 K123Ar (SEQ ID No:20) (도 1 참고) 50 pmol를 사용하여 표준 조건에 따라 수행하였다.

[0049] 정제된 PCR 산물을 실시예 1에서와 같이 처리하고 리게이션 혼합물을 박테리아 세포로 형질전환하였다. catAEA-ZfQQR를 암호화하는 유전자의 최종 서열을 SEQ ID No:3에 나타내고, 단백질 서열의 아미노산 서열을 SEQ ID No:4에 나타내었다.

[0050] **실시예 5 인터도메인 링커 영역의 길이를 단축시키는 위치 K81A, K89E 및 K123A에서 아미노산 치환을 갖는 융합 효소를 암호화하는 유전자의 돌연변이화**

[0051] 실시예 4에서 발생된 구조물은 말단에 catAEA-ZfQQR를 암호화하는 오픈 리딩 프레임을 가지고 있고, 템플레이트로서 역할을 하여 SEQ ID No:3 상에 유전자 내의 인터도메인 링커 409-449를 암호화하는 영역에서 PCR 기술을 사용하여 인터도메인 링커를 단축시켰다. PCR 반응은 템플레이트로서 catAEA-ZfQQR 유전자 및 1 U의 Phusion 폴리머라제 (New England Biolabs)를 지니는 pET30b 상에서 각각의 프라이머 del11f (SEQ ID No:22) 및 del11r (SEQ ID No:23) (GQ라 불리는 변이체를 생성하기 위해 사용됨) 또는 프라이머 del15f (SEQ ID No:24) 및 del15r (SEQ ID No:25) (GGKKQ라 불리는 변이체를 생성하기 위해 사용됨) 50 pmol를 각각 사용하여 표준 조건 하에서 수행하였다 (프라이머 서열은 도 1 참고).

[0052] 정제된 PCR 생성물을 실시예 1에서와 같이 처리하고 리게이션 혼합물을 박테리아 세포로 형질전환하였다. 위치 138-148 내의 아미노산을 암호화하는 단편에 의해 단축된 인터도메인 링커를 갖는 catAEA-ZfQQR인 변이체 GQ를 암호화하는 유전자의 최종 서열을 SEQ ID No:5에 나타내고, 생성된 단백질의 아미노산 서열을 SEQ ID No:6에 나타내었다. 위치 138-139 및 141-146 내의 아미노산을 암호화하는 단편에 의해 단축된 인터도메인 링커를 갖는 catAEA-ZfQQR인 변이체 GGKKQ를 암호화하는 유전자의 최종 서열을 SEQ ID No:7에 나타내고, 생성된 단백질의 아미노산 서열을 SEQ ID No:8에 나타내었다.

[0053] **실시예 6 이온 교환 크로마토그래피에 의한 단백질의 발현 및 정제**

[0054] B. 할로두란스로부터의 전체 길이 RNase HI를 암호화하는 유전자를 갖는 플라스미드 pET15a, cat를 암호화하는 유전자를 갖는 pET, catAEA-ZfQQR를 암호화하는 유전자를 갖는 pET 30b 및 변이체 GQ를 암호화하는 유전자를 갖는 pET 30b 및 변이체 GGKKQ를 암호화하는 유전자를 갖는 pET30를 E. 콜라이 균주 ER2566 (New England Biolabs)로 각각 형질전환하였다. 단백질 발현을 IPTG로 유도하고 단백질을 Ni-NTA 수지 (Sigma Aldrich) 상에서 표준 프로토콜에 따라 정제하였다.

[0055] **실시예 7 용합 효소의 뉴클레아제 활성 검정법**

[0056] B. 할로두란스로부터의 전체 길이 RNase HI, cat, cat-ZfQQR 및 catAEA-ZfQQR의 효소 활성 및 친화도에 미치는 반응시 마그네슘 및 아연 이온의 존재의 효과를 시험하였다. 활성 검정법은 5 mM MgCl₂ 및/또는 20 μm ZnSO₄의 존재를 포함하였다. 기질 DNA-RNA 하이브리드 내의 RNA 가닥의 5' 말단을 반응성 동위원소 인 33로 표지하였다. 분해 반응은 0.05 μm 방사성표지된 기질 및 0.5 μm 비표지된 기질:

RNA:

AGAACUAGUGGAUCAACCGGGCUGCAGGAAUUCGAUAUCAAGCUUAUCGAUACC
GUGGCGGUUCUCCCCAAGCC (SEQ ID No:9)

DNA:

GCTTGGGGAAGAACCGCCACGGTATCGATAAGCTTGATAATCGAATTCCTGCAGCCC
GGTTGATCCACTAGTTCT (SEQ ID No:9)

[0057] 및 25 mM Tris (pH 8.0), 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂ 및/또는 20 μm ZnSO₄, 2 mM DTT를 함유하였다. 함유된 반응: [0058] B. 할로두란스로부터의 전체 길이 RNase HI 12,5 nM, 625 nM의 cat, 5 nM의 cat-ZfQQR 또는 25 nM의 catAEA-ZfQQR.

[0059] 분해 반응을 37°C에서 수행하고, 포름아미드를 최종 농도 50%까지 첨가함으로써 30분 이후에 종료하였다. 분해 생성물을 6 M 우레아를 함유하는 12% 변성 폴리아크릴아미드 겔에서 분해하였다 (도 3 참조). 겔을 진공 건조기 상에서 건조시키고 Storage Phosphor Screens (GE Healthcare)에 하룻밤 노출시켰다. 오디오라디오그램 (autoradiogram)을 Typhoon Trio scanner (GE Healthcare) 상에 스캐닝하였다. 20 μm ZnSO₄의 존재 및 MgCl₂의 부재 하에 catAEA-ZfQQR에 의한 기질 분해는 독특한 크기를 갖는 생성물을 발생하였다. 이 위치에서의 절단은 상기 기질이 B. 할로두란스로부터의 전체 길이 RNase HI, cat 및 cat-ZfQQR에 의해 분해되는 경우 발생하지 않았다.

[0060] 변이체 GQ 및 GGKKQ에 의한 기질 절단의 특이도에 미치는 링커 길이 감소의 효과를 측정하였다. 검정된 조건은 반응시 아연 이온의 존재 하에 마그네슘 이온 농도의 범위를 포함하였다. 활성 검정법은 0.05 mM 내지 10 mM MgCl₂ 범위 및 20 μm ZnSO₄ 및 상기한 바와 같은 완충액 조성물의 존재를 포함하였다. 기질 DNA-RNA 하이브리드 내의 RNA 가닥의 5' 말단을 방사성 동위원소 인 33으로 표지하였다. 분해 반응은 0.05 μm 방사성표지된 기질 및 0.5 μm 비표지된 기질 (도 2), 25 mM Tris (pH 8.0), 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂ 및 20 μm ZnSO₄, 2 mM DTT를 함유하였다. 반응에서, 변이체 GQ 50 nM 및 변이체 GGKKQ 50 nM를 사용하였다. 분해 반응은 상기한 바와 같이 수행하고 그 결과를 GQ의 경우 도 4에 및 GGKKQ의 경우 도 5에 나타내었다. 링커를 갖는 GQ 변이체의 경우, 반응시 Mg²⁺의 최적의 농도는 1 mM이고, GGKKQ 변이체의 경우 2 mM이었다.

[0061] catAEA-ZfQQR 및 그것의 GQ 및 GGKKQ 변이체에 의해 발생된 징크 핑거 ZfQQR를 위한 절단 부위를 함유하는 DNA-RNA 하이브리드 기질 내의 절단 부위를 정확하게 측정하기 위하여, 절단 생성물을 하나의 뉴클레오티드에 의해 달라지는 단편의 분리를 가능하게 하는 해상도로 폴리아크릴아미드 겔에서 분리하였다. 기질 DNA-RNA 하이브리드 내의 RNA 가닥의 5' 말단을 방사성 동위원소 인 33으로 표지하였다. 분해 반응은 0.05 μm 방사성표지된 기질 및 0.5 μm 비표지된 기질, 25 mM Tris (pH 8.0), 100 mM KCl, 20 μm ZnSO₄, 1 mM MgCl₂ (변이체 GQ의 경우) 및 2 mM MgCl₂ (변이체 GGKKQ의 경우) 및 2 mM DTT를 함유하였다 (도 2 참조). 반응은 0.1 μm catAEA-ZfQQR, 50 nM의 변이체 GQ 및 50 nM의 변이체 GGKKQ를 함유하였다. 분해 반응은 37°C에서 수행하고 1 시간 이후에 포름아미드를 최종 농도 50%까지 첨가함으로써 종료하였다. 하나의 뉴클레오티드에 의해 달라지는 단편을 갖는 크기 마커를 Ambion의 권장사항(www.ambion.com)에 따라 얻었다. 분해 생성물을 6 M 우레아를 함유하는 12% 변성 폴리아크릴아미드 겔에서 분해하였다 (도 6 참조). 확인된 서열 길이를 갖는 생성된 단편을 기질의 서열 상에 맵핑하고 catAEA-ZfQQR를 위한 절단의 주요 생성물이 54 뉴클레오티드의 길이를 갖는지를 확인하였다 (도 7). 징크 핑거 ZfQQR를 위한 절단 부위로부터 떨어진 반대 가닥 7 뉴클레오티드 상에 위치하였다. GQ 및 GGKKQ의 경우, 절단의 주요 생성물은 56 뉴클레오티드의 길이를 가졌고 (GQ의 경우 도 8 및 GGKKQ의 경우 도 9 참조) 징크 핑거 ZfQQR를 위한 절단 부위로부터 떨어진 반대편 가닥 5 뉴클레오티드 상에 위치하였다.

[0062] 본 발명의 새로운 리보뉴클레아제는 DNA-RNA 하이브리드 내의 RNA 가닥을 절단하고 징크 핑거 DNA-RNA 하이브리

드 결합 도메인을 갖는 리보뉴클레아제 HI (RNase HI)의 촉매활성 도메인을 포함하는바, 여기서 상기 징크 핑거 결합 도메인은 DNA-RNA 하이브리드 내의 특이적 서열에 결합하는 능력을 가진다. 바람직하게 얻어진 융합 단백질은 catAEA-ZfQQR, GQ, GGKKQ이다.

[0063] 서열 특이적 조작된 RNase H가 RNase HI 도메인 및 징크 핑거의 융합체에 의해 생성될 수 있는지 여부는 기질에 결합시 뉴클레아제 도메인이 기질의 몇몇 장소에서 수회 절단하는 진행반응성(processive) 효소이기 때문에 명확한 것은 아니다. 더욱이, 상기 기술한 바와 같이, 미변이 RNase H의 징크 핑거로의 융합이 서열-특이적 효소를 얻게 하지 않을 뿐만 아니라 RNase HI의 cat 단편의 융합도 서열-특이적 효소를 얻지 않게 한다. 임의의 이론에 구애됨이 없이, 이를 위한 약간의 가능한 이유가 존재한다 - RNase HI는 언제나 여러번 절단하는 진행반응성 효소이고, 다른 도메인과의 융합시 징크 핑거는 DNA-RNA 하이브리드 내의 그것의 결합 서열을 결합하지 않고, 절단 조건은 최적이지 않고, cat 도메인은 징크 핑거의 존재와 관계없이 기질에 결합하고 상기 모두는 중요한 것이다.

[0064] 더욱이, 기질 결합 영역: cat의 K81A, K89E 및 K123A 내의 치환은 서열-특이적 효소를 야기 하는지 여부가 명확하지 않다. 특이성을 갖지 않는 것에 대한 설명을 제공할 수도 있는 몇몇 가설이 있는바: cat 도메인은 아연 도메인의 존재와 관계없이 기질에 결합할 수 있고, 또는 결합 영역 내의 치환은 효소의 촉매작용에 영향을 미칠 수 있고 불활성인 변이체를 생성할 수도 있고, 또는 단백질 내의 아미노산의 치환은 적절하게 폴딩하지 않으므로 불용성인 변이체를 야기할 수 있다. cat 도메인의 의한 결합의 불안정성이 절단 부위로부터 정의된 거리 내에서 절단하는 효소를 얻는 것을 가능하게 하는지를 확실하게 하는 종래의 이용가능한 데이터 또는 암시는 존재하지 않는다.

[0065] **실시예 8 기질 DNA-RNA 하이브리드의 제조**

[0066] 3개의 78 뉴클레오티드 긴 단일-가닥 DNA를 합성하고 각각 하기와 같이 명명하였다: 템플레이트 A (SEQ ID No:26), 템플레이트 B (SEQ ID No:27) 및 템플레이트 9N (SEQ ID No:28). 이러한 올리고뉴클레오티드를 템플레이트로 사용하고 PCR 기술을 하용하여 이중-가닥 DNA를 생성하였다. 본 발명은 약 0.1 pmol 템플레이트 및 1 단위의 Phusion 폴리머라제 (New England Biolabs) 상에서 10 pmol의 각 프라이머 1 및 2:

[0067] 프라이머 1: AATTTAATACGACTCACTATAGGGCTCTAGATCTCACTAAGCATAG (SEQ ID No:33)

[0068] 프라이머 2: GAGATCTAGACGGAACATG (SEQ ID No:34)를 사용하여 표준 조건 하에 수행하였다.

[0069] 프라이머 1 및 2를 PCR에서 이중-가닥 DNA의 증폭에 사용하고 프라이머 2를 또한 역 전사 반응에서 사용하였다. 반응 조건: 초기 변성 온도 98℃ 1분, 그 다음 15 변성 98℃, 15초 15사이클, 72℃ 재생 (최종 온도 58℃까지 각 사이클마다 1℃의 재생의 온도의 감소℃) 및 72℃에서 2초 확장, 그 다음 98℃에서 비변성 15초 10 사이클, 58℃에서 15회 재생 및 72℃에서 2초 확장. 반응 혼합물을 페놀로 추출하고 수거된 액체상을 0.5 M 소듐 아세테이트 pH 4.5 및 에탄올로 침전시켰다. 침전물을 공기로 건조시키고 물에 재부유하였다. 단일-가닥 RNA 전사체를 전사 MEGAshortscript™ T7 (Ambion)를 위한 키트를 사용하여 박테리오파지 T7 RNA 폴리머라제를 위한 프로모터 서열을 사용하여 이중-가닥 DNA 템플레이트 상에서 얻었다. 반응을 200-500 ng의 DNA를 사용하여 표준 조건 하에 수행하였다. 전사 반응은 6M 우레아 및 TBE 완충액을 함유하는 15% 변성 폴리아크릴아미드 겔에서 분해하고 UN 광의 존재 하에 에티디움 브로마이드를 사용하여 시각화하였다. 55 뉴클레오티드의 길이에 해당하는 밴드를 실행하고 겔로부터의 RNA 용출을 Costar Spin X 컬럼 (Corning Life Sciences)를 사용하여 표준 과정에 따라 수행하였다.

[0070] DNA-RNA 하이브리드를 제거된 RNase H 활성을 갖는 역전사효소를 사용하여 단일-가닥 RNA의 템플레이트상에서 얻었다. 프라이머 2 (SEQ ID No:34) 200 pmol 및 단일-가닥 RNA 200 pmol를 70℃에서 2분 동안 배양한 다음, 아이스 상에서 2분 동안 두었다. 제조된 템플레이트에 대해 역전사를 수행하였다. 42℃에서 2시간 동안 최종 농도 1 mM dNTP mix, 200 pmol의 프라이머 어넬링된 템플레이트, 40 단위 RiboLock (Fermentas) 및 400 단위 RevertAid H 마이너스 역전사효소를 사용하여, 제조사에 의해 공급된 완충액 내의 40 μl로 반응을 수행하였다. 표준 과정으로 G-25 수지 (Sigma Aldrich)를 사용함으로써 반응 혼합물로부터 DNA-RNA 하이브리드를 완충액 및 dNTP로부터 분리하였다.

[0071] 개발된 프로토콜이 상보적인 DNA-RNA 하이브리드의 형성을 야기하는지를 확인하기 위하여, 역전사를 동위원소인 33 프라이머 2(SEQ ID No:34)를 갖는 방사성 표지를 사용하여 (상술한 바와 같이) 수행하였다. DNA의 적절한 크기의 합성 (예상되는 길이는 55 뉴클레오티드이다)를 생성된 DNA와 대조 55 뉴클레오티드 긴 DNA 올리고뉴클레오티드의 크기를 비교함으로써 확인하였다. 샘플을 TBE 완충액 내에 6 M 우레아를 함유하는 15% 변성 폴리아

크릴아미드 겔 내에 분해하였다 (도 12 참고). 겔을 진공 건조기로 건조시키고 하룻밤 Storage Phosphor Screens (GE Healthcare)에 노출시켰다. 오디오라디오그램(audioradiogram)을 Typhoon Trio scanner (GE Healthcare)로 스캔하였다. DNA-RNA 하이브리드의 생성은 리보뉴클레아제 H에 의한 역 전사의 생성물을 분해하고 반응 생성물과 대조 55 뉴클레오티드 긴 DNA 올리고뉴클레오티드를 TBE 완충액 내의 15% 천연 폴리아크릴아미드 겔 내에서의 움직임을 비교함으로써 확인하였다 (도 13). DNA-RNA 하이브리드의 RNA 가닥의 분해를 37°C에서 30분 동안 제조사에 의해 공급된 완충액 내의 10 μ l 및 RNase H (Fermentas)의 5 단위에서 수행하였다.

[0072] **실시예 9 징크 핑거 ZfQQR로 GST 융합 단백질의 클로닝, 발현 및 정제**

[0073] GST와의 징크 핑거 도메인의 융합을 얻기 위하여, ZFQQR를 암호화하는 유전자를 발현 벡터 pGEX-4T-1 (Amersham)로 클로닝하였다. 징크 핑거 ZfQQR를 암호화하는 유전자의 합성을 문헌Shi Y, Berg JM. Specific DNA-RNA hybrid binding proteins. Science. 1995. vol. 268, 282-284]로부터의 아미노산 서열을 기초로하여 Epoch's Life Sciences로부터 주문하였다. ZfQQR를 암호화하는 DNA를 PCR 기술을 사용하여 증폭하였다. 프라이머 ZFf 및 ZFr를 합성하고 GST 도메인 및 징크 핑거 ZfQQR를 암호화하는 유전자의 융합을 갖는 DNA 구조체의 제조에 사용하였다. 상기 반응은 표준 조건 하에 1 단위의 Phusion 폴리머라제 (New England Biolabs)로 50 pmol의 각각의 프라이머 ZFf 및 ZFr:

[0074] ZFf: GGTTCCTGGTGACCCGGG (SEQ ID No:35)

[0075] ZFr: CGGGAAAACAGCATTCCAGGTATTAG (SEQ ID No:36)를 사용하여 수행하였다.

[0076] 징크 핑거 ZfQQR를 암호화하는 DNA 및 벡터 pGEX-4T-1 DNA를 제한 효소 SmaI 및 XhoI (Fermentas)를 사용하여 분해하였다. SmaI 분해는 제조사의 권장사항에 따라 buffer 1X Yellow에서 수행하였다. 이후에, 반응물에 완충액을 37°C에서 1 시간 동안 최종 농도 2X Yellow까지 첨가하고 1 mg DNA를 위한 효소 XhoI의 1 단위를 첨가하였다. 본 반응을 TAE 완충액 내의 0.7% 아가로오스 겔 상에서 분리하고 예상되는 크기에 해당하는 단편을 아가로스 겔로부터의 재단리를 위한 키트 (Gel Out, A & A Biotechnology)를 사용하여 겔로부터 재단리하였다. 그 다음, 징크 핑거 ZfQQR를 암호화하는 재단리된 DNA 50 ng 및 절단 벡터 pGEX-4T-1 25 ng를 박테리오파지 T4 DNA 리가아제 (Fermentas, 본 반응은 제조사 공급 완충액에서 수행하였다)로 실온에서 1시간 동안 리게이션하였다. 리가아제는 10분 동안 75°C에서 배양하여 가열에 의해 불활성화하였다. 그 다음, 리게이션 혼합물을 박테리아 균주 E. 콜리 Top10 F (Invitrogen)으로 형질전환을 위해 사용하였다. 형질전환체를 100 μ g/ml 암피실린 상에 분리하였다. 원하는 재조합체를 함유하는 적합한 형질전환체의 분리는 제한 맵핑의 분석을 기초로하여 수행한 다음 클론을 시퀀싱하여 구조체의 서열을 확인하였다.

[0077] 징크 핑거 ZfQQR를 암호화하는 플라스미드 pGEX-4T-1 유전자를 E. 콜리 균주 BL21 (DE3): (Promega)로 형질전환하였다. 하룻밤 배양으로부터 형질전환체를 100 mg/ml 암피실린을 사용하여 액체 LB로 접종시키고 2시간 동안 37°C에서 배양하였다. 이후에, IPTG를 (최종 농도 1 mM)를 첨가하고 배양을 추가 5시간 동안 25°C에서 교반함으로써 배양하였다. 유도 이후에 배양물을 10분 동안 4°C에서 4000 rpm에서 원심분리하고 STE 2 ml로 세정하고 10분 동안 10,000g으로 원심분리하였다. 배양물로부터 생성된 펠렛을 35 ml PBS에 재부유한 다음 박테리아 세포를 1360 대기하에서 French press (Constant Systems LTD)를 통해 단일 통과에 의해 구별하였다. 용해물을 20분 동안 4°C에서 20,000g에서 초원심분리기로 원심분리하여 분리하였다. 단백질을 표준 과정에 따라 글루타티온 세파로스 수지 (GE Healthcare) 상에서 정제하였다.

[0078] **실시예 10 DNA-RNA 하이브리드로의 단백질의 결합, 비결합된 하이브리드의 분리 및 수지로부터의 단백질- DNA-RNA 하이브리드 복합체의 용출**

[0079] 징크 핑거 ZfQQR로의 DNA-RNA 하이브리드의 결합 반응을 40 μ l로 수행하고, 이는 :

[0080] 200 pmol의 DNA-RNA 하이브리드, 1 pmol의 징크 핑거 ZfQQR와의 GST 융합체, 25 mM Tris pH 8.0, 100 mM KCl, 20 μ M ZnSO₄, 2 mM DTT. 반응을 10분 동안 실온에서 수행하였다. 그 다음, 반응물을 7.5 μ l의 글루타티온 세파로스 수지에 첨가하고 교반(1,400 rpm)하에 22 °C에서 Thermomixer compact (Eppendorf)에서 30분 동안 배양하였다. 다음 단계에서, 수지를 3회 100 μ l 완충액 P (25 mM Tris pH 8.0, 100 mM KCl, 20 μ M ZnSO₄, 2 mM DTT)으로 세정하고, 샘플을 실온에서 2분 동안 1000 g에서 원심분리하면서 부유물을 제거하였다. 그 다음 용출 단계로서, 30 μ l 완충액 E으로 2회 세정하고 10분 동안 실온에서 배양하였다. 각 배양 이후에, 샘플을 실온에서 2분 동안 1000 g에서 원심분리하고, 부유물을 튜브에 옮겼다. DNA-RNA 하이브리드와 관련된 징크 핑거를 갖는 GST 융합체를 함유하는 용출액 5 μ l를 PCR을 사용하여 증폭시킨 후 이중-가닥 DNA를 얻은 다음 RNA를 번역시키고

DNA-RNA 하이브리드를 실시예 8에서와 같이 역전사에 의해 합성하였다. 얻어진 DNA-RNA 하이브리드를 SELEX의 다음 라운드 동안 출발 물질로 하였다.

[0081] **실시예 11 대조 SELEX**

[0082] SELEX 방법의 대조를 징크 핑거 ZfQQR를 위한 절단 부위를 함유하는 DNA-RNA 하이브리드(하이브리드 A, 템플레이트 A SEQ ID No:26상에서 수행함) 및 XhoI 제한 부위 대신에, 절단 부위를 갖지 않는 하이브리드 (B 하이브리드, 템플레이트 B SEQ ID No:27로 생성함)의 혼합물로 수행하였다. SELEX의 5번 라운드를 하이브리드 A 및 B 혼합물을 1:10000 비율로 함유하는 대조 풀 상에서 수행하였다. 2개의 서열을 구별하기 위하여, 각 라운드 이후에 용출액의 PCR 증폭으로부터 생성된 DNA 100 ng 을 37°C에서 16시간 동안 효소 XhoI 2단위로 분해하였다. 분해 생성물을 TBE 완충액 내에서 15% 천연 폴리아크릴아미드 겔 상에서 분리하였다. 겔을 최종 농도 0.5 µg/ml에서 에티디움 브로마이드 용액에서 2분 동안 배양하였다. 밴드를 이미지 MultiImager Fluoro-S (BioRad)를 획득하는 디지털 CCD 카메라를 이용하여 UV 하에 시각화하였다. 비절단된 DNA의 크기에 해당하는 밴드(78 bp) 및 분해 생성물 (55 및 23 염기쌍)의 강도를 Quantity One (BioRad)를 사용하여 측정하고 각 라운드 이후에 DNA-RNA 하이브리드의 템플레이트 상에 얻어진 DNA의 상대적 비율을 계산하였다 (도 14 참고). GST와 징크 핑거 ZfQQR의 혼합물로 선택의 5 라운드 이후에, ZfQQR를 위한 절단 부위를 가지고 있는 DNA 및 그러한 서열이 없는 DNS의 비율은 1:1.7로 변화하였다. 이는 SELEX 과정을 수행함으로써 대조 서열의 풀이 ZfQQR에 의해 서열특이적으로 결합함으로써 8500배 풍부해졌음을 의미한다.

[0083] **실시예 12 SELEX 라이브러리 RNA-DNA 하이브리드**

[0084] 다음 단계에서, 중심 랜덤 서열(템플레이트 N - SEQ ID No:28 상에 발생됨)을 함유하는 DNA-RNA 하이브리드의 라이브러리를 사용하여 SELEX 과정을 수행하고 실시예 1에서와 같이 징크 핑거 ZfQQR의 서열 선호도를 측정하였다. 선택된 하이브리드의 서열을 측정하기 위하여, 5 라운드의 SELEX 이후에 용출액의 템플레이트 상에 얻어진 DNA PCR 생성물 500 ng를 제조사에 의해 공급된 완충액 내에서 XbaI 효소 (Fermentas) 5 단위로 분해하였다. 분해 생성물을 TBE 완충액 내의 15% 천연 폴리아크릴아미드 겔 상에서 분리하였다. 43 염기 쌍의 단편 길이에 해당하는 밴드를 실행하여 표준 과정에 따라 겔로부터 단리하였다. concatamer를 얻기 위하여 분해된 DNA 단편 100 ng을 3 시간 동안 실온에서 제조사에 의해 공급된 완충액 내에서 박테리오파지 T4 DNA 리가아제 (Fermentas)를 사용하여 리게이션하였다. 리가아제를 10분 동안 75°C에서 배양하는 것에 의해 열 불활성화시켰다. DNA 플라스미드 벡터 pUC18 (Fermentas) 200 ng를 37°C에서 3 시간 동안 제조사에 의해 공급된 완충액 내의 XbaI 효소를 사용하여 분해하였다. 반응 혼합물을 TAE에서 0.7% 아가로스 겔 상에서 분리하고 예상되는 크기에 해당하는 단편을 아가로스 겔로부터의 재단리를 위한 키트 (Gel out, A & A Biotechnology)를 사용하여 겔로부터 재단리하였다. 상기 제조된 벡터 및 concatamer를 리게이션한 후 박테리아 균주 내로 형질전환하였다. 원하는 재조합체를 함유하는 적합한 형질전환체의 선별은 콜로니 색채에 대해 SQNSTJR을 기반으로 하여 12개의 클론을 시퀀싱하여 표 2에 나타난 SELEX 과정에 의해 얻어진 총 42 단편을 함유하는 것으로 발견되었다.

표 2

[0085] 표 2. 징크 핑거 ZfQQR 상에 수행된 변형 SELEX 과정의 5 라운드 종료시 DNA-RNA 하이브리드의 템플레이트 상에 얻어진 DNA를 시퀀싱한 이후에 얻어지는 SELEX 과정 내에 생성된 서열 및 9개의 뉴클레오티드 축퇴성 영역을 함유하는 서열의 라이브러리

번호	라이브러리 서열	번호	라이브러리 서열
1	TGGGGACGC	22	GTCAGATGT
2	AGTGCTCGA	23	GAGATCAGT
3	GACGCATGG	24	GCCGAGCGG
4	GGTCTGGAG	25	GCTCGGTGA
5	GAGCGGGAA	26	CGTAGGGAA
6	TCGTTGCAT	27	GTCGGATGG
7	CTAGCGGGT	28	CAGCGGGGT
8	GCCAGCGAG	29	GGGGGAGG
9	AGAGGGGCA	30	TCGGCCAAG
10	TGGCAGGTT	31	CATGTGTTG
11	GGGTGGGAG	32	GACTGTAGA
12	GGTCCGGGC	33	CTGCCTGAA
13	CTCCGATCA	34	CGGCGGAGA

14	GCAAATGAA	35	CGTACAAGG
15	GGGCGGCGT	36	GGTGGTTGA
16	ACTCTGAGA	37	ATCAGGGGG
17	TGGGAATGG	38	TTGGCGGGG
18	AGCGGAGGG	39	GGGGTCCGA
19	GGATGGAAA	40	GAGAGAGCG
20	GGGCTGTCA	41	TGGCAGCTT
21	ACTCCTGAG	42	CGAGATGGA

[0086] 이를 기초로, ZFQR 결합 공통 서열 5'-GGNCGNGGG-3'(도 15)를 WebLogo을 사용하여 획득하였다 (문헌 [Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE WebLogo: A sequence logo generator, Genome Research, 14:1188-1190, (2004), Schneider TD, Stechens RM. 1990. Sequence Logos: A New Way to Display Consensus Sequences. Nucleic Acids Res. 18:6097-6100] 참고).

[0087] **실시예 13 SELEX 공통 서열에 징크 핑거 ZfQR의 결합**

[0088] SELEX의 라운드 이후에 얻어진 공통 서열이 징크 핑거에 의해 결합되는지를 확인하기 위하여, 상수 K_D 를 니트로셀룰로오스 필터 결합 방법을 사용하여 측정하였다. 본 검정법은 문헌에 기술된 방사성 표지된 기질 (LDNA, LRNA) 및 공통 서열 (CDNA, CRNA)을 사용하여 수행하였다 (도 16 참고):

- LDNA: TCACTGGGGAAGAAGAATCCTC (SEQ ID No:29)**
- LRNA: GAGGAUUCUUCUCCCCAGUGA (SEQ ID No:30)**
- CDNA: TCACTGGTCGGTGGGAATCCTC (SEQ ID No:31)**
- CRNA: GAGGAUCCCCACCGACCAGUGA (SEQ ID No:32)**

[0089] 결합 반응물은 2 nM의 표지된 기질, 비특이적 경쟁자로서 2 μ g의 폴리 dI-dC, 25 mM Tris pH 8.0, 100 mM KCl, 20 μ M ZnSO₄, 2 mM DTT를 함유하였다. 결합 반응물을 실온에서 30분 동안 배양한 후 니트로셀룰로오스 필터를 통해 즉시 여과한 다음 반응 완충액 25 mM Tris pH 8.0, 100 mM KCl, 20 μ M ZnSO₄, 2 mM DTT의 8 부피를 사용하여 세정하였다. 방사성 표지된 기질의 보유에 의해 발생하는 신호의 강도의 측정은 Typhoon Trio scanner and ImageQuant TL software를 사용하여 니트로셀룰로오스 필터의 오디오라디오그램 상에서 이루어졌다. K_D 결합 상수를 측정하였는바, 두 기질에서 비슷하였고 문헌 내에 기술된 기질이 결합한 경우 188 \pm 38 mM 및 SELEX 공통 서열의 경우 155 \pm 32 nM이었다 (도 17 참고).

[0091] 발명의 상세한 설명에서 확인된 서열 리스트:

[0092] SEQ ID No:1 - B. 할로두란스로부터의 유전자 (전체 길이) *rnhA* 리보뉴클레아제 HI (유전자 ID 893801, BH0863)의 DNA 서열;

[0093] SEQ ID No:2 - 징크 핑거 ZfQR의 뉴클레오티드 서열;

[0094] SEQ ID No:3 - catAEA-ZfQR로 명명된 징크 핑거 ZfQR와 치환체 K81A, K89E 및 K123A를 갖는 B. 할로두란스로부터의 리보뉴클레아제 HI의 단편을 함유하는 융합체의 아미노산 서열;

[0095] SEQ ID No:4 - catAEA-ZfQR로 명명된 치환체 K81A, K89E, K123A 및 징크 핑거 ZfQR와 B. 할로두란스로부터의 리보뉴클레아제 HI를 함유하는 융합체의 아미노산 서열;

[0096] SEQ ID No:5 - catAEA-ZfQR의 GQ 변이체를 암호화하는 유전자의 뉴클레오티드 서열 (위치 138-148에서 아미노산을 암호화하는 단편에 의해 단축된 징크 핑거 ZfQR 인터도메인 링커와 위치 K81A, K89E 및 K123A 내의 단백질의 아미노산 서열에 변이를 도입하는 치환을 갖는 B. 할로두란스로부터의 리보뉴클레아제 HI의 단편을 함유하는 효소 융합체);

[0097] SEQ ID No:6 - catAEA-ZfQR의 GQ 변이체의 아미노산 서열 효소 융합체- GQ로 명명;

[0098] SEQ ID No:7 - catAEA-ZfQR의 GGKKQ 변이체의 뉴클레오티드 서열 (위치 138-139 및 141-146 내의 아미노산을 암호화하는 단편에 의한 인터 도메인 링커를 갖는 징크 핑거 ZfQR와 위치 K81A, K89E 및 K123A 내의 단백질의 아미노산 서열에 변이를 도입하는 치환체를 갖는 B. 할로두란스로부터의 리보뉴클레아제 HI의 단편을 함유하

는 효소 융합체) - GGKKQ로 명명함;

- [0099] SEQ ID No:8 - GGKKQ로 명명된 - 효소 융합체의 GGKKQ 변이체에 대한 아미노산 서열;
- [0100] SEQ ID No:9 - ZfQQR를 위한 결합 서열을 함유하는 기질의 RNA 가닥;
- [0101] SEQ ID No:10 - ZfQQR를 위한 결합 서열을 함유하는 기질의 DNA 가닥;
- [0102] SEQ ID No:11 - Bhcatf 프라이머의 뉴클레오티드 서열;
- [0103] SEQ ID No:12 - Bhcatr 프라이머의 뉴클레오티드 서열;
- [0104] SEQ ID No:13 - BhZf 프라이머의 뉴클레오티드 서열;
- [0105] SEQ ID No:14 - Kmf 프라이머의 뉴클레오티드 서열;
- [0106] SEQ ID No:15 - Kmr 프라이머의 뉴클레오티드 서열;
- [0107] SEQ ID No:16 - K81Ar 프라이머의 뉴클레오티드 서열;
- [0108] SEQ ID No:17 - K81Af 프라이머의 뉴클레오티드 서열;
- [0109] SEQ ID No:18 - K89Er 프라이머의 뉴클레오티드 서열;
- [0110] SEQ ID No:19 - K89Ef 프라이머의 뉴클레오티드 서열;
- [0111] SEQ ID No:20 - K123Ar 프라이머의 뉴클레오티드 서열;
- [0112] SEQ ID No:21 - K123Af 프라이머의 뉴클레오티드 서열;
- [0113] SEQ ID No:22 - del11f 프라이머의 뉴클레오티드 서열;
- [0114] SEQ ID No:23 - del11r 프라이머의 뉴클레오티드 서열;
- [0115] SEQ ID No:24 - del15f 프라이머의 뉴클레오티드 서열;
- [0116] SEQ ID No:25 - del15r 프라이머의 뉴클레오티드 서열;
- [0117] SEQ ID No:26 - ZfQQR를 위한 절단 부위를 함유하는 SELEX QDKQJQDML 대조를 위해 사용된 기질에 대한 DNA 가닥의 서열 (템플레이트 A);
- [0118] SEQ ID No:27 - XhoI 제한 부위 대신에, ZfQQR를 위한 절단 부위를 갖지 않는, SELEX 방법의 대조를 위해 사용된 기질의 DNA 가닥의 서열 (템플레이트 B);
- [0119] SEQ ID No:28 - 중심 뉴클레오티드 랜덤 서열을 함유하는 DNA-RNA 하이브리드의 라이브러리의 구조에 사용하기 위한 기질의 DNA 가닥의 서열 (템플레이트 9N);
- [0120] SEQ ID No:29 - K_D 를 측정하기 위해 사용되는 ZfQQR 결합 서열을 함유하는 DNA-RNA 하이브리드의 DNA 가닥에 대한 뉴클레오티드 서열;
- [0121] SEQ ID No:30 - K_D 를 측정하기 위해 사용되는 ZfQQR 결합 서열을 함유하는 DNA-RNA 하이브리드의 RNA 가닥에 대한 뉴클레오티드 서열;
- [0122] SEQ ID No:31 - K_D 를 측정하기 위해 사용되는 SELEX로부터 추정된 공통 서열을 함유하는 DNA-RNA 하이브리드의 DNA 가닥에 대한 뉴클레오티드 서열;
- [0123] SEQ ID No:32 - K_D 를 측정하기 위해 사용되는 SELEX로부터 추정된 공통 서열을 함유하는 DNA-RNA 하이브리드의 RNA 가닥에 대한 뉴클레오티드 서열;
- [0124] SEQ ID No:33 - 프라이머 1 - PCR 반응에서 템플레이트 A, B 및 9N의 DNA 증폭에 사용되는 프라이머;
- [0125] SEQ ID No:34 - 프라이머 2 - PCR 반응에서 템플레이트 A, B 및 9N의 DNA 증폭에 사용되는 프라이머;
- [0126] SEQ ID No:35 - 프라이머 ZFf - GST 도메인을 암호화하는 융합 유전자 및 징크 핑거 Zf-QQ를 암호화하는 유전자의 DNA 구조체의 제조를 위한 PCR에 사용되는 프라이머;

[0127] SEQ ID No:36 - 프라이머 ZFr - GST 도메인을 암호화하는 융합체 유전자 및 징크 핑거 Zf-Q를 암호화하는 유전자의 DNA 구조체의 제조에 사용되는 프라이머;

[0128] SEQ ID No:37 - GST 도메인과 징크 핑거 ZfQQR를 암호화하는 유전자의 융합체를 암호화하는 유전자의 뉴클레오티드 서열 (융합체 GST-ZfQQR).

도면

도면1

프라이머 명칭	서열	SEQ ID No
Bheatf	GACGCATATGGCAAAAGAGGAGATTATTTGGG	SEQ ID No:11
Bheatr	GTGGTACCTTTTCTCCCGTAATCGGC	SEQ ID No:12
BhZf	GGTTCGGTGACCCGGG	SEQ ID No:13
Kmf	GGGATCGCAGTGGTGAGTAAC	SEQ ID No:14
Kmr	CGGGAAAACAGCATTCCAGGTATTAG	SEQ ID No:15
K81Ar	CCGTCIGGGAATCAGAATAGATC	SEQ ID No:16
K81Af	CAATCGCATGGGTGAAGGATAAAAAAG	SEQ ID No:17
K89Er	CTGCTTTTTTATCCTTCACCC	SEQ ID No:18
K89Ef	CAATCGCATGGGTGAAGGATAAAAAAG	SEQ ID No:19
K123Ar	TAAGATGGGCGTTTCATAGGTATG	SEQ ID No:20
K123Af	GCATGGCAGACCGATAAGTG	SEQ ID No:21
del11f	GGCTCCGGCCAGCACGCGTGCCCGG	SEQ ID No:22
del11r	AGAACCCTCCCGTAATCGGCCTTAATTCC	SEQ ID No:23
del5f	CAAAAAACAGCACGCGTGCCC	SEQ ID No:24
del5r	CCCCCGTAATCGGCCTTAATTCC	SEQ ID No:25

도면2

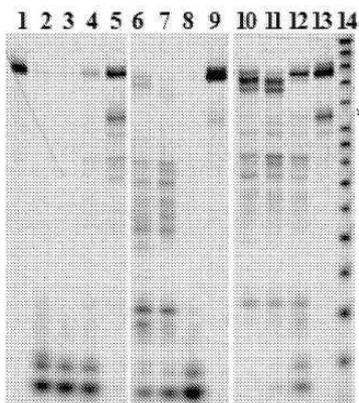
(A) RNA:

AGAACUAGUGGAUCAACCGGGCUGCAGGAAUUCGAUAUCAAGCUUAUCGAUA
CCGUGGCGGUUCUUCCTCAAGCC (SEQ ID No:9)

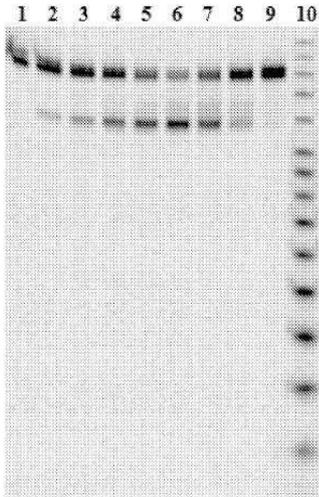
(B) DNA:

GCTTGGGGAAGAACCGCCACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAG
CCCGTTGATCCACTAGTTCT (SEQ ID No:10)

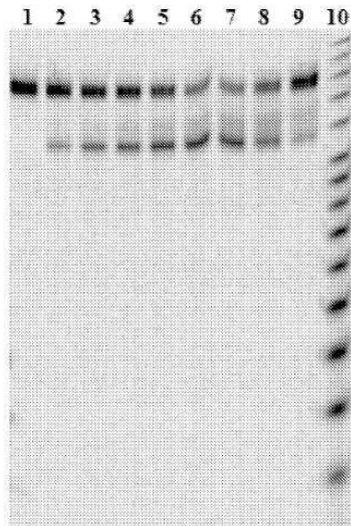
도면3



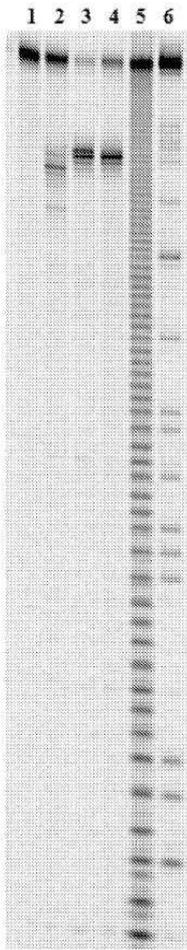
도면4



도면5



도면6



도면7



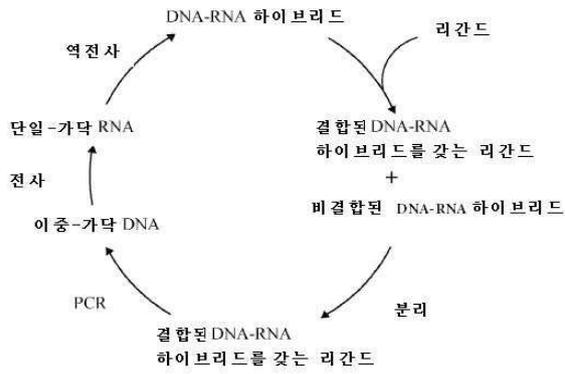
도면8



도면9



도면10



도면11

템플레이트 A:

GAGATCTAGACGGAACATGAAGGGGAAGAATTCTATGCTTAGTGAGATCTAGAGCC
CTATAGTGAGTCGTATTAAT (SEQ ID No:26)

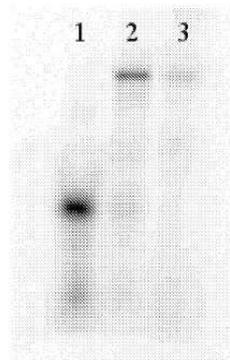
템플레이트 B:

GAGATCTAGACGGAACATGAAGCTCGAGCCTTCTATGCTTAGTGAGATCTAGAGCC
CTATAGTGAGTCGTATTAAT (SEQ ID No:27)

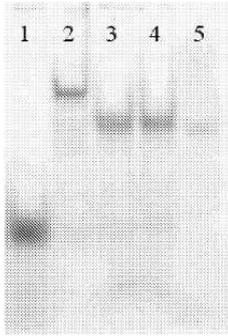
템플레이트 9N:

GAGATCTAGACGGAACATGTANNNNNNNNTACTATGCTTAGTGAGATCTAGAGCC
CTATAGTGAGTCGTATTAAT (SEQ ID No:28)

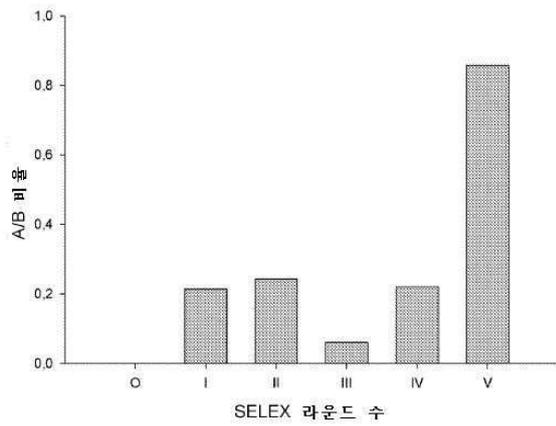
도면12



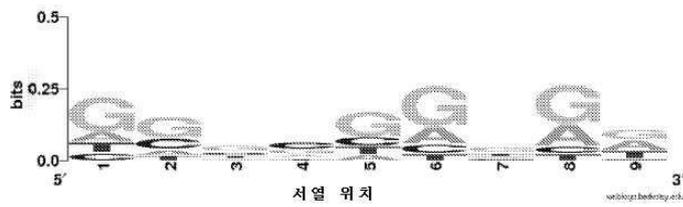
도면13



도면14



도면15



도면16

A)

LDNA: TCACTGGGGAAGAAGAATCCTC (SEQ ID No:29)
 LRNA: GAGGAUUCUUCUCCCCAGUGA (SEQ ID No:30)

B)

CDNA: TCACTGGTCGGTGGAATCCTC (SEQ ID No:31)
 CRNA: GAGGAUCCCACCGACCAGUGA (SEQ ID No:32)

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> IBMIK

<120> Sequence-specific engineered ribonuclease H and the method for determining the sequence preference of DNA-RNA hybrid binding proteins

<130> PZ/1574/AGR/PCT

<160> 37

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 688

<212> DNA

<213> Bacillus halodurans

<400> 1

atggcaaagt caaatacta tgctgatgg aatggacgga agcccggcat ttatacgagc 60

tggctctgcat gtgaagctca agtaaaagga tataccggcg ccaaatttaa atcctatcct 120

tccaaggaag aagcagaggc tgcttttaga ggagaagagg caacaccgaa gcttgcaaaa 180

gaggagatta tttgggagag cctgtctgta gatgttggca gccaagggaa tcccgaatt 240

gtggaatata aaggcgttga tacgaaaacg ggagaagtcc ttttgaacg agageccgatt 300

ccgatcggga caacaatat gggtagtctt ctgcgatcg ttcacgggct tcgttacctt 360

aaggaacgga acagtcgtaa gccgatctat tctgattccc agacggcaat caaatgggtg 420

aaggataaaa aagcaaaatc gacctcgtg cgcaatgaag aaacagcgct tatttgaag 480

ctttagatg aagcggagga gtggctaac actcatacct atgaaacgcc catcttaaaa 540

tggcagaccg ataagtgggg ggaaattaag gccgattacg ggagaaaagg taccgacgac 600

gacgacaagg ccatggcgat atcggatccg aattcgagct ccgtcgacaa gcttgcggcc 660

gcactcgagc accaccacca ccaccact 688

<210> 2

<211> 305

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> ZfQQR nucleotide sequence

<400> 2

ccatggaaaa actgcgtaac ggttctgggtg acccgggtaa aaaaaaacag cacgcgtgcc 60
 cggaatgcgg taaatctttc tctcagtcct ctaacctgca gaaacaccag cgtaccaca 120
 ccggtgaaaa accgtacaaa tgtccagaat gtggcaaaag ctttagtcaa agtttctaatc 180

ttcaaaaaca tcaacgcacg cataccggcg agaagccata taagtgtccg gagtgcggca 240
 aaagcttctc ccgctctgat cacctccagc gtcacacagc cactcatcag aacaaaaaac 300
 tcgag 305

<210> 3

<211> 720

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> fusion catAEA-ZfQQR - nucleotide sequence

<400> 3

atggcaaaag aggagattat ttgggagagc ctgtctgtag atgttggcag ccaaggaat 60
 cccggaattg tggaatataa aggcgttgat acgaaaacgg gagaagtctt ttttgaacga 120
 gagccgattc cgatcgggac aaacaatatg ggtgagtttc tcgcatcgt tcacgggctt 180

cgttacctta aggaacggaa cagtcgtaag ccgatctatt ctgattccca gacggcaatc 240
 gcatgggtga aggataaaaa agcagaatcg accctcgtgc gcaatgaaga aacagcgctt 300
 atttgaagc ttgtagatga agcggaggag tggtctaaaca ctcataccta tgaaacgcc 360
 atcttagcat ggcagaccga taagtggggg gaaattaagg ccgattacgg gagaaaaggt 420
 tctggtgacc cgggtaaaaa aaaacagcac gcgtgcccg aatgcggtaa atctttctct 480
 cagtcttcta acctgcagaa acaccagcgt acccacaccg gtgaaaaacc gtacaaatgt 540
 ccagaatgtg gcaaaagctt tagtcaaagt tctaattctt aaaaacatca acgcacgcat 600

accggcgaga agccatataa gtgtccggag tgcggcaaaa gcttctccc ctctgatcac 660
 ctccagcgtc atcagcgcac tcatcagaac aaaaaactcg agcaccacca ccaccaccac 720

<210> 4

<211> 240

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> amino acid sequence of fusion catAEA-ZfQQR

<400> 4

Met Ala Lys Glu Glu Ile Ile Trp Glu Ser Leu Ser Val Asp Val Gly

1 5 10 15

Ser Gln Gly Asn Pro Gly Ile Val Glu Tyr Lys Gly Val Asp Thr Lys
 20 25 30

Thr Gly Glu Val Leu Phe Glu Arg Glu Pro Ile Pro Ile Gly Thr Asn
 35 40 45

Asn Met Gly Glu Phe Leu Ala Ile Val His Gly Leu Arg Tyr Leu Lys
 50 55 60

Glu Arg Asn Ser Arg Lys Pro Ile Tyr Ser Asp Ser Gln Thr Ala Ile
 65 70 75 80

Ala Trp Val Lys Asp Lys Lys Ala Glu Ser Thr Leu Val Arg Asn Glu
 85 90 95

Glu Thr Ala Leu Ile Trp Lys Leu Val Asp Glu Ala Glu Glu Trp Leu
 100 105 110

Asn Thr His Thr Tyr Glu Thr Pro Ile Leu Ala Trp Gln Thr Asp Lys
 115 120 125

Trp Gly Glu Ile Lys Ala Asp Tyr Gly Arg Lys Gly Ser Gly Asp Pro
 130 135 140

Gly Lys Lys Lys Gln His Ala Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser
 145 150 155 160

Gln Ser Ser Asn Leu Gln Lys His Gln Arg Thr His Thr Gly Glu Lys
 165 170 175

Pro Tyr Lys Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser Gln Ser Ser Asn
 180 185 190

Leu Gln Lys His Gln Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Tyr Lys Cys
 195 200 205

Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Gln Arg His
 210 215 220

Gln Arg Thr His Gln Asn Lys Lys Leu Glu His His His His His His
 225 230 235 240

<210> 5

<211> 687

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> fusion of variant GQ of catAEA-ZfQR nucleotide sequence

<400> 5

atggcaaaag aggagattat ttgggagagc ctgtctgtag atgttggcag ccaagggaat 60
 cccggaattg tggataataa aggcgttgat acgaaaacgg gagaagtcct ttttgaacga 120
 gagccgattc cgatcgggac aaacaatatg ggtgagtffc tgcgatcgt tcacgggctt 180
 cgttacctta aggaacggaa cagtcgtaag ccgatctatt ctgattcca gacggcaatc 240

 gcatgggtga aggataaaaa agcagcatcg accctcgtgc gcaatgaaga aacagcgctt 300
 atttggaagc ttgtagatga agcggaggag tggctaaaca ctcataccta tgaaacgccc 360
 atcttagcat ggcagaccga taagtggggg gaaattaagg ccgattacgg gcagcacgcg 420
 tgcccgaat gcggtaaate tttctctcag tcttctaacc tgcagaaaca ccagcgtacc 480
 cacaccggtg aaaaaccgta caaatgtcca gaatgtggca aaagctttag tcaaagttct 540
 aatcttcaa aacatcaacg cacgcatacc ggcgagaagc catataagtg tccggagtgc 600
 ggcaaaagct tctcccctc tgatcacctc cagcgtcacc agcgcactca tcagaacaaa 660

 aaactcgagc accaccacca ccaccac 687

<210> 6

<211> 229

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> fusion of variant GQ of catAEA-ZfQR amino acid sequence

<400> 6

Met Ala Lys Glu Glu Ile Ile Trp Glu Ser Leu Ser Val Asp Val Gly
 1 5 10 15
 Ser Gln Gly Asn Pro Gly Ile Val Glu Tyr Lys Gly Val Asp Thr Lys
 20 25 30
 Thr Gly Glu Val Leu Phe Glu Arg Glu Pro Ile Pro Ile Gly Thr Asn

 35 40 45
 Asn Met Gly Glu Phe Leu Ala Ile Val His Gly Leu Arg Tyr Leu Lys
 50 55 60
 Glu Arg Asn Ser Arg Lys Pro Ile Tyr Ser Asp Ser Gln Thr Ala Ile
 65 70 75 80
 Ala Trp Val Lys Asp Lys Lys Ala Ala Ser Thr Leu Val Arg Asn Glu

85 90 95
 Glu Thr Ala Leu Ile Trp Lys Leu Val Asp Glu Ala Glu Glu Trp Leu

100 105 110
 Asn Thr His Thr Tyr Glu Thr Pro Ile Leu Ala Trp Gln Thr Asp Lys

115 120 125
 Trp Gly Glu Ile Lys Ala Asp Tyr Gly Gln His Ala Cys Pro Glu Cys

130 135 140
 Gly Lys Ser Phe Ser Gln Ser Ser Asn Leu Gln Lys His Gln Arg Thr

145 150 155 160
 His Thr Gly Glu Lys Pro Tyr Lys Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe

165 170 175
 Ser Gln Ser Ser Asn Leu Gln Lys His Gln Arg Thr His Thr Gly Glu

180 185 190
 Lys Pro Tyr Lys Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser Arg Ser Asp

195 200 205
 His Leu Gln Arg His Gln Arg Thr His Gln Asn Lys Lys Leu Glu His

210 215 220
 His His His His His

225

<210

> 7

<211> 696

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> fusion of variant GGKKQ of catAEA-ZfQR nucleotide sequence

<400> 7

atggcaaaag aggagattat ttgggagagc ctgtctgtag atgttggcag ccaagggaaat 60

cccggaattg tggaatataa aggcgttgat acgaaaacgg gagaagtccct ttttgaacga 120

gagccgattc cgatcgggac aaacaatatg ggtgagtffc tccgatcgt tcacgggctt 180

cgttacctta aggaacggaa cagtcgtaag ccgatctatt ctgattcca gacggcaatc 240

gcatgggtga aggataaaaa agcagcatcg accctcgtgc gcaatgaaga aacagcgctt 300

atttgaagc tttagatga agcggaggag tggctaaca ctcataccta tgaacgccc 360

atcttagcat ggcagaccga taagtggggg gaaattaagg ccgattacgg gggcaaaaa 420
 cagcacgcgt gcccggaatg cggtaaatct ttctctcagt cttctaacct gcagaaacac 480
 cagcgtacc acaccggtga aaaaccgtac aatgtccag aatgtggcaa aagctttagt 540
 caaagttcta atcttcaaaa acatcaacgc acgcataccg gcgagaagcc atataagtgt 600
 cgggagtgcg gcaaaagctt ctcccgtct gatcacctcc agcgcacatca gcgcactcat 660
 cagaacaaaa aactcgagca ccaccaccac caccac 696

<210> 8

<211> 232

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> fusion of variant GGKKQ of catAEA-ZfQR amino acid sequence

<400> 8

Met Ala Lys Glu Glu Ile Ile Trp Glu Ser Leu Ser Val Asp Val Gly

1 5 10 15

Ser Gln Gly Asn Pro Gly Ile Val Glu Tyr Lys Gly Val Asp Thr Lys

20 25 30

Thr Gly Glu Val Leu Phe Glu Arg Glu Pro Ile Pro Ile Gly Thr Asn

35 40 45

Asn Met Gly Glu Phe Leu Ala Ile Val His Gly Leu Arg Tyr Leu Lys

50 55 60

Glu Arg Asn Ser Arg Lys Pro Ile Tyr Ser Asp Ser Gln Thr Ala Ile

65 70 75 80

Ala Trp Val Lys Asp Lys Lys Ala Ala Ser Thr Leu Val Arg Asn Glu

85 90 95

Glu Thr Ala Leu Ile Trp Lys Leu Val Asp Glu Ala Glu Glu Trp Leu

100 105 110

Asn Thr His Thr Tyr Glu Thr Pro Ile Leu Ala Trp Gln Thr Asp Lys

115 120 125

Trp Gly Glu Ile Lys Ala Asp Tyr Gly Gly Lys Lys Gln His Ala Cys

130 135 140

Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser Gln Ser Ser Asn Leu Gln Lys His

145 150 155 160

Gln Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Tyr Lys Cys Pro Glu Cys Gly
 165 170 175

Lys Ser Phe Ser Gln Ser Ser Asn Leu Gln Lys His Gln Arg Thr His
 180 185 190

Thr Gly Glu Lys Pro Tyr Lys Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser
 195 200 205

Arg Ser Asp His Leu Gln Arg His Gln Arg Thr His Gln Asn Lys Lys
 210 215 220

Leu Glu His His His His His His
 225 230

<210> 9

<211> 75

<212> RNA

<213> Artificial

<220><223> RNA strand that contains the binding sequence for ZfQQR

<400> 9

agaacuagug gaucAACCGG gcugcaggaa uucgauauca agcuuauCGA uaccgugGCG 60

guucuucCCC aagCC 75

<210> 10

<211> 74

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> DNA strand of the substrate that contains the binding sequence
 for ZfQQR

<400> 10

gcttggggaa gaaccGCCAC ggtatCGATA agcttgATAT cgaattcCTG cagcccGTT 60

gatccactag ttct 74

<210> 11

<211> 32

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> primer

<400> 11
gacgcatatg gcaaaagagg agattatttg gg 32
<210> 12
<211> 26
<212> DNA
<213> artificial
<220><223> primer
<400> 12
gtggtacctt ttctcccgta atcggc 26
<210> 13
<211> 17
<212> DNA
<213> artificial
<220><223> primer
<400> 13
ggttctggtg acccggg 17
<210> 14
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial
<220><223> primer
<400> 14
gggatcgag tggtagtaa c 21
<210> 15
<211> 26
<212> DNA
<213> artificial
<220><223> primer
<400> 15
cgggaaaaca gcattccagg tattag 26
<210> 16
<211> 23
<212> DNA
<213> artificial

<220><223> primer
 <400> 16
 ccgtctggga atcagaatag atc 23
 <210> 17
 <211> 27
 <212> DNA
 <213>
 artificial
 <220><223> primer
 <400> 17
 caatcgc atg ggtgaaggat aaaaaag 27
 <210> 18
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> artificial
 <220><223> primer
 <400> 18
 ctgctttttt atccttcacc c 21
 <210> 19
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> artificial
 <220><223> primer
 <400> 19
 caatcgc atg ggtgaaggat aaaaaag 27
 <210> 20
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> artificial
 <220>
 ><223> primer
 <400> 20
 taagatgggc gtttcatagg tatg 24
 <210> 21
 <211> 20

<212> DNA
 <213> artificial
 <220><223> primer
 <400> 21
 gcatggcaga ccgataagtg 20
 <210> 22
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> artificial
 <220><223> primer
 <400> 22
 ggctcggcc agcacgctg cccgg 25
 <210> 23
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> artificial
 <220><223> primer
 <
 400> 23
 agaaccgctc ccgtaatcgg ccttaatttc c 31
 <210> 24
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> artificial
 <220><223> primer
 <400> 24
 caaaaaacag cacgcgtgcc c 21
 <210> 25
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> artificial
 <220><223> primer
 <400> 25
 cccccgtaat cggccttaat ttccc 25
 <210> 26

<211> 78
 <212> DNA
 <213> artificial
 <220><223> contains the binding site for ZfQQR

<400> 26
 gagatctaga cggaacatga aggggaagaa ttctatgctt agtgagatct agagccctat 60
 agtgagtcgt attaaatt 78
 <210> 27
 <211> 78
 <212> DNA
 <213> artificial
 <220><223> do not contain a binding site for ZfQQR

<400> 27
 gagatctaga cggaacatga agctcgagcc ttctatgctt agtgagatct agagccctat 60
 agtgagtcgt attaaatt 78
 <210> 28
 <211> 78
 <212> DNA
 <213> artificial
 <220><223> template with nonanucleotide random sequence

<220><221> misc_feature
 <222> (22)..(30)
 <223> n is a, c, g, or t

<400> 28
 gagatctaga cggaacatgt annnnnnnnn tactatgctt agtgagatct agagccctat 60
 agtgagtcgt attaaatt 78
 <210> 29
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> artificial
 <220><223> DNA strand of the DNA-RNA hybrid

<400> 29
 tcactgggga agaagaatcc tc 22

<210> 30
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> artificial
 <220><223> RNA strand of the DNA-RNA hybrid

<400> 30
 gaggauucuu cuucccagu ga 22
 <210> 31
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> artificial
 <220><223> DNA strand of the DNA-RNA hybrid

<400> 31
 tcactggtcg gtgggaatcc tc 22
 <210> 32
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> artificial
 <220><223> RNA strand of the DNA-RNA hybrid

<400> 32
 gaggauucc accgaccagu ga 22
 <210> 33
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> artificial

<220><223> starter

<400> 33
 aatttaatac gactcactat agggetctag atctcaactaa gcatag 46
 <210> 34
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> artificial
 <220><223> starter

<400> 34	
gagatctaga cggaacatg	19
<210> 35	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> starter	
<400> 35	
ggttctggtg acccggg	17
<210> 36	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> starter	
<400> 36	
cgggaaaaca gcattccagg tattag	26
<210> 37	
<211> 975	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> fusion of the GST domain and zinc finger ZfQQR	
<400> 37	
atgtccccta tactaggtta ttggaaaatt aaggccttg tgcaaccac tegacttctt	60
ttggaatadc ttgaagaaaa atatgaagag catttgtatg agcgcgatga aggtgataaa	120
tggcgaaaaca aaaagtttga attgggtttg gagtttccca atcttcctta ttatatgat	180
ggtgatgtta aattaacaca gtctatggcc atcatacgtt atatagctga caagcacaac	240
atgttgggtg gttgtccaaa agagcgtgca gagatttcaa tgcttgaagg agcggttttg	300
gatattagat acggtgttcc gagaattgca tatagtaaag actttgaaac tctcaaagtt	360
gattttctta gcaagctacc tgaaatgctg aaaatgttcg aagatcgttt atgtcataaa	420
acatatttaa atggtgatca tgtaacccat cctgacttca tgttgtatga cgctcttgat	480
gttgttttat acatggacce aatgtgcctg gatgcgttcc caaaattagt ttgttttaaa	540
aaacgtattg aagctatccc acaaattgat aagtactga aatccagcaa gtatatagca	600

tggcctttgc agggctggca agccacgttt ggtggtggcg accatcctcc aaaatcggat	660
ctggttccgc gtggatcccc ggaattcccg ggtaaaaaaaa aacagcacgc gtgcccggaa	720
tgcggtaaata ctttctctca gtcttctaac ctgcagaaac accagcgtac ccacaccgt	780
gaaaaaccgt acaaatgtcc agaattggc aaaagcttta gtcaaagttc taatcttcaa	840
aaacatcaac gcacgcatac cggcgagaag ccatataagt gtcgggagtg cggcaaaagc	900
ttctcccgt ctgateacct ccagegteat cagcgactc atcagaacaa aaaactcgag	960
cggccgcatac gtgac	975