

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2025 年 6 月 26 日 (26.06.2025)



(10) 国际公布号
WO 2025/129707 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 9/12 (2006.01) *C12Q 1/686* (2018.01)
C12N 15/52 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2023/141294

(22) 国际申请日: 2023 年 12 月 22 日 (22.12.2023)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 深圳华大生命科学研究院 (BGI SHENZHEN) [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼 518083 (CN)。

(72) 发明人: 丁孙家 (DING, Sunjia); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼 518083 (CN)。张晓红 (ZHANG, Xiaohong); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼 518083 (CN)。谢庆庆 (XIE, Qingqing); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼 518083 (CN)。郑越 (ZHENG, Yue); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼 518083 (CN)。

董宇亮 (DONG, Yuliang); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼 518083 (CN)。章文蔚 (ZHANG, Wenwei); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼 518083 (CN)。

(74) 代理人: 北京康信知识产权代理有限公司 (KANGXIN PARTNERS, P.C.); 中国北京市海淀区知春路甲48号盈都大厦A座16层 100098 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,

(54) Title: DNA POLYMERASE MUTANT AND USE THEREOF

(54) 发明名称: DNA聚合酶突变体及其应用

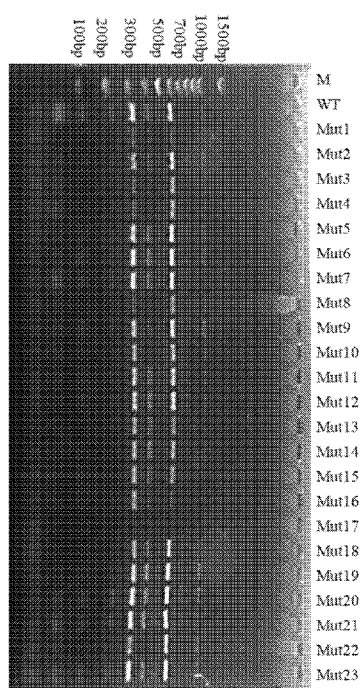


图 1

(57) Abstract: The present invention provides a DNA polymerase mutant and a use thereof. The DNA polymerase mutant has DNA polymerization activity, and comprises an amino acid sequence having at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 95%, or at least 99% homology with the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 1. The invention can solve the problem of low polymerization activity of wild-type DNA polymerases in the prior art, and is applicable in the field of DNA polymerases.

(57) 摘要: 本发明提供了一种DNA聚合酶突变体及其应用。其中, 上述DNA聚合酶突变体具有DNA聚合酶活性, 包括与SEQ ID NO: 1所示的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%同源性的氨基酸序列。能够解决现有技术中野生型DNA聚合酶聚合活性低的问题, 适用于DNA聚合酶领域。

NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚
(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE,
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR,
HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO,
PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN,
TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

DNA 聚合酶突变体及其应用

技术领域

本发明涉及 DNA 聚合酶领域，具体而言，涉及一种 DNA 聚合酶突变体及其应用。

背景技术

PCR 技术是现代分子生物学的重要基石，而 Taq DNA 聚合酶是 PCR 技术的经典主力军。Taq DNA 聚合酶属于 A 家族 DNA 聚合酶，具有良好的热稳定性，被广泛用于 PCR 技术相关的领域。Taq 聚合酶缺乏 3'-5'校正活性，但具有 5'-3'外切活性和末端加 A 的特点，广泛应用于分子生物学领域，如直接 PCR、等位基因检测、Sanger 测序、荧光定量 PCR、TA 克隆等。目前，PCR 是分子生物学应用市场增长最快的技术之一。PCR 的新应用和 PCR 的新技术正在开发并用于研究和诊断领域，随着 PCR 技术的普遍应用，对 Taq DNA 聚合酶性质的研究日渐重要。但 Taq DNA 聚合酶也存在一些不足之处，扩增活性、耐抑制能力等仍然有待进一步提高，仍然需要进一步改进的 DNA 聚合酶变体，兼具各方面性能以满足 DNA 扩增、合成、检测、测序以及其他重要技术的需要。

发明内容

本发明的主要目的在于提供一种 DNA 聚合酶突变体及其应用，以解决现有技术中野生型 DNA 聚合酶聚合活性低的问题。

为了实现上述目的，根据本发明的第一个方面，提供了一种 DNA 聚合酶突变体，该 DNA 聚合酶突变体具有 DNA 聚合酶活性，包括与 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%或至少 99%同源性的氨基酸序列。

进一步地，DNA 聚合酶突变体相对于 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列具有以下至少一个位点的氨基酸替换：D488、S577、S543、E388、E400、E397、T544、L549、V586、L670、L678、T664 和 G59。

进一步地，D488 位点的氨基酸替换包括 D488H、D488R 或 D488K；S543 位点的氨基酸替换包括 S543T；S577 位点的氨基酸替换包括 S577T；E388 位点的氨基酸替换包括 E388K；E400 位点的氨基酸替换包括 E400R；E397 位点的氨基酸替换包括 E397Q；T544 位点的氨基酸替换包括 T544Y、T544D、T544K、T544S、T544W 或 T544F；L549 位点的氨基酸替换包括 L549F、L549I、L549D 或 L549K；V586 位点的氨基酸替换包括 V586F；L670 位点的氨基酸替换包括 L670F；L678 位点的氨基酸替换包括 L678Y、L678W、L678I、L678F、L678K 或 L678D；T664 位点的氨基酸替换包括 T664F；G59 位点的氨基酸替换包括 G59W。

进一步地，DNA 聚合酶突变体的突变包括如下任意一种氨基酸突变组合：D488H、D488R、D488K、S577T、G59W、E388K、E397Q、E400R、S543T、T544Y、T544D、T544K、T544S、

T544W、T544F、L549F、L549I、L549D、L549K、V586F、T664F、L670F、L678Y、L678K、L678D、L678I、L678F、G59W+E388K、G59W+E400R、G59W+D488K、G59W+S543T、G59W+S577T、E388K+E397Q、E388K+E400R、E388K+D488K、E388K+S543T、E388K+T544Y、E388K+L549F、E388K+S577T、E388K+L670F、E388K+T664F、E388K+L678Y、E397Q+D488K、E397Q+T664F、E400R+D488K、E400R+T664F、D488K+S543T、D488K+T544Y、D488K+L549F、D488K+S577T、D488K+V586F、D488K+T664F、D488K+L670F、D488K+L678Y、S543T+T664F、S577T+T664F、V586F+T664F、T664F+L670F、T664F+L678W、T664F+L678Y、G59W+D488K+S543T 或 G59W+D488K+L549F；优选地，DNA 聚合酶突变体的突变包括如下任意一种氨基酸突变组合：G59W、D488K、G59W+D488K、S543T、E388K、E400R、E397Q、L549F、T664F、G59W+D488K+L549F、G59W+S577T、G59W+E388K、G59W+E400R、E400R+D488K、D488K+L549F、E388K+E397Q、E388K+T664F、S543T+T664F、E400R+T664F、L678I 或 E388K+L549F，DNA 聚合酶突变体的 DNA 聚合活性优于 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列的 DNA 聚合活性；优选地，DNA 聚合酶突变体的突变包括如下任意一种氨基酸突变组合：G59W+D488K、S543T、E400R、T544Y、L549F、G59W+D488K+L549F、G59W+S543T、G59W+S577T 或 G59W+E400R，DNA 聚合酶突变体的多重扩增能力优于 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列的多重扩增能力；优选地，DNA 聚合酶突变体的突变包括如下任意一种氨基酸突变组合：G59W、G59W+D488K、S543T、S577T、E400R、L549F、T664F、G59W+D488K+S543T、G59W+D488K+L549F、G59W+S577T、G59W+E388K、S543T+T664F、L678I、E388K+L549F、G59W+D488K、G59W+D488K+L549F、G59W+S577T 或 G59W+E388K，DNA 聚合酶突变体的耐 PCR 抑制剂能力优于 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列的耐 PCR 抑制剂能力。

为了实现上述目的，根据本发明的第二个方面，提供了一种 DNA 分子，该 DNA 分子包含编码上述 DNA 聚合酶突变体的多核苷酸。

为了实现上述目的，根据本发明的第三个方面，提供了一种重组载体，该重组载体包含有上述 DNA 分子。

为了实现上述目的，根据本发明的第四个方面，提供了一种宿主细胞，该宿主细胞内含有上述 DNA 分子或上述重组载体。

进一步地，宿主细胞包括原核细胞或真核细胞；优选地，原核细胞包括大肠杆菌。

为了实现上述目的，根据本发明的第五个方面，提供了一种 PCR 试剂盒，该 PCR 试剂盒包括上述 DNA 聚合酶突变体。

进一步地，PCR 试剂盒中还包括如下任意一种或多种成分：1) 用于提供 PCR 扩增环境的缓冲液；2) PCR 引物；3) 用于提取目标 DNA 的试剂。

为了实现上述目的，根据本发明的第六个方面，提供了一种 PCR 方法，该 PCR 方法包括：利用上述 DNA 聚合酶突变体或上述 PCR 试剂盒，对目标 DNA 进行 PCR 扩增。

进一步地，PCR 包括多重 PCR 扩增；优选地，PCR 的体系中含有 PCR 抑制剂；更优选地，PCR 抑制剂包括血红素、腐殖酸、单宁酸、EDTA、肝素、苯酚、十二烷基磺酸钠、氯高铁血红素、尿素、植物多糖、胆酸盐、聚苯乙烯、聚丙烯、蛋白酶、胆红素、溴酚蓝、钙离子和铁离子中的一种或多种。

DNA 聚合酶的活性是提高 PCR 扩增效率的关键因素之一，应用本发明的技术方案，上述 DNA 聚合酶突变体相较于野生型 Taq DNA 聚合酶，具有更高的活性。

附图说明

构成本申请的一部分的说明书附图用来提供对本发明的进一步理解，本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明，并不构成对本发明的不当限定。在附图中：

图 1 示出了根据本发明实施例 4 的琼脂糖凝胶电泳结果图。

图 2 示出了根据本发明实施例 4 的琼脂糖凝胶电泳结果图。

图 3 示出了根据本发明实施例 4 的琼脂糖凝胶电泳结果图。

图 4 示出了根据本发明实施例 5 的琼脂糖凝胶电泳结果图。

具体实施方式

需要说明的是，在不冲突的情况下，本申请中的实施例及实施例中的特征可以相互组合。下面将结合实施例来详细说明本发明。

如背景技术所提到的，随着 PCR 技术的普遍应用，对 DNA 聚合酶性质的研究日渐重要。但 DNA 聚合酶也存在一些不足之处，聚合活性难以满足实际应用的需求，亟待对 DNA 聚合酶进行改进，从而提高 DNA 聚合速率。聚合速率，或单位时间内掺入的核苷酸数量（在指定的反应条件下，包括温度、pH、离子强度等），受到许多参数的影响，包括底物的结合亲和力（dNTP、引物）和催化效率（核苷酸转移速率、焦磷酸盐释放和易位步骤）。在本申请中发明人尝试开发一种新型的 DNA 聚合酶突变体，具有增强的聚合活性，因而提出了本申请的一系列保护方案。

在本申请第一种典型的实施方式中，提供了一种 DNA 聚合酶突变体，该 DNA 聚合酶突变体具有 DNA 聚合酶活性，包括与 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%或至少 99%同源性的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 1:

MRGMLPLFEPKGRVLLVDGHHLAYRTFHALKGLTTSRGEPVQAVYGFAKSLLKALKED
GDAVIVVFDKAPSFRHEAYGGYKAGRPTPEDFPRQLALIKELVDLLGLARLEVPGYEAD
DVLASLAKKAEKEGYEVRILTADKDLYQLLSDRIHVLHPEGYLITPAWLWEKYGLRPDQWA
DYRALTGDESDNLPGVKGIGECTARKLLLEWGSLEALLKNLDRCLKPAIREKILAHMDDLKLS

WDLAKVRTDLPLEVDFAKRREPDRERLRAFLERLEFGSLLHEFGLLESPKALEEAPWPPPEG
AFVGFVLSRKEPMWADLLALAAARGGRVHRAPEPYKALRDLKEARGLLAKDLSVLALREG
LGLPPGDDPMLLAYLLDPSNTTPEGVARRYGGEWTEEAGERAALSERLFANLWGRLEGEER
LLWLYREVERPLSAVLAHMEATGVRLDVAYLRALSLEVAEEIARLEAEVFRLAGHPFNLNSR
DQLERVLFDELGLPAIGKTEKTGKRSTSAVLEALREAHPIVEKILQYRELTKLKSTYIDPLPD
LIHPRTGRLHTRFNQTATATGRLSSSDPNLQNIPVRTPLGQRIRRAFIAEEGWLLVALDYSQIEL
RVLAHLSGDENLIRVFQEGRDIHTETASWMFGVPREAVDPLMRRAAKTINFGVLYGMSAHR
LSQELAIPEYEEAQAFIERFQSFQKVRWIEKTLEEGRRRGYVETLFGRRRYVPDLEARVKSV
REAAERMAFNPVQGTAAADLMKLMVKLFPRLEEMGARMLLQVHDELVLAPKERAEEAV
ARLAKEVMEGVYPLAVPLEVEVGIGEDWLSAKE。

在一种优选的实施例中，上述 DNA 聚合酶突变体且相对于 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列具有以下至少一个位点的氨基酸替换：D488、S577、S543、E388、E400、E397、T544、L549、V586、L670、L678、T664 和 G59。

在一种优选的实施例中，D488 位点的氨基酸替换包括 D488H、D488R 或 D488K；S543 位点的氨基酸替换包括 S543T；S577 位点的氨基酸替换包括 S577T；E388 位点的氨基酸替换包括 E388K；E400 位点的氨基酸替换包括 E400R；E397 位点的氨基酸替换包括 E397Q；T544 位点的氨基酸替换包括 T544Y、T544D、T544K、T544S、T544W 或 T544F；L549 位点的氨基酸替换包括 L549F、L549I、L549D 或 L549K；V586 位点的氨基酸替换包括 V586F；L670 位点的氨基酸替换包括 L670F；L678 位点的氨基酸替换包括 L678Y，L678W，L678I，L678F，L678K 或 L678D；T664 位点的氨基酸替换包括 T664F；G59 位点的氨基酸替换包括 G59W；其中，数字前字母代表原始氨基酸，数字后字母代表突变氨基酸。

在一种优选的实施例中，DNA 聚合酶突变体的突变（替换）包括如下任意一种氨基酸突变组合：

G59W、E388K、E397Q、E400R、D488H、D488R、D488K、S543T、T544Y、T544D、T544K、T544S、T544W、T544F、L549F、L549I、L549D、L549K、S577T、V586F、T664F、L670F、L678Y、L678K、L678D、L678I、L678F、G59W+E388K、G59W+E400R、G59W+D488K、G59W+S543T、G59W+S577T、E388K+E397Q、E388K+E400R、E388K+D488K、E388K+S543T、E388K+T544Y、E388K+L549F、E388K+S577T、E388K+L670F、E388K+T664F、E388K+L678Y、E397Q+D488K、E397Q+T664F、E400R+D488K、E400R+T664F、D488K+S543T、D488K+T544Y、D488K+L549F、D488K+S577T、D488K+V586F、D488K+T664F、D488K+L670F、D488K+L678Y、S543T+T664F、S577T+T664F、V586F+T664F、T664F+L670F、T664F+L678W、T664F+L678Y、G59W+D488K+S543T 或 G59W+D488K+L549F；

优选地，DNA 聚合酶突变体的突变包括如下任意一种氨基酸突变组合：G59W、D488K、G59W+D488K、S543T、E388K、E400R、E397Q、L549F、T664F、G59W+D488K+L549F、G59W+S577T、G59W+E388K、G59W+E400R、E400R+D488K、D488K+L549F、E388K+E397Q、E388K+T664F、S543T+T664F、E400R+T664F、L678I 或

E388K+L549F。

上述 DNA 聚合酶突变体的聚合酶活性的提高，能够在单位时间内获得相较于野生型 DNA 聚合酶（SEQ ID NO: 1）更多的双链 DNA 产物。

优选地，DNA 聚合酶突变体的突变包括如下任意一种氨基酸突变组合：G59W+D488K、S543T、E400R、T544Y、L549F、G59W+D488K+L549F、G59W+S543T、G59W+S577T 或 G59W+E400R。

多重 PCR 是指通过一次 PCR 反应同时对多个靶标进行扩增，结合一定的检测手段对扩增产物进行检测从而实现了对多个靶标进行诊断的技术。多重 PCR 技术的优势在于它的高效性，通过一次扩增反应即可实现对多种病原体进行检测和鉴别，相较于多个单重检测而言成本显著降低，广泛应用于科学研究和疾病诊断等领域，是临床应用最广泛的多重核酸检测技术，目前主要用于细菌、病毒的检测与定量、单核苷酸多态性（single nucleotide polymorphism, SNP）分型、疾病突变基因、启动子甲基化的检测。自 Chamberlain 于 1988 年首次提出这个概念以来，多重 PCR 技术迅速发展，ThermoFisher 公司的多重 PCR 试剂盒能够实现 20 重扩增；PrimerPlex、iCubate2.0 等软件可以实现多重 PCR 引物与探针的设计与优化，从而降低非特异性扩增的可能；Liao 等利用荧光探针熔解曲线技术成功地对 15 种高危型 HPV 的分型以及实现了对 48 种人类单核苷酸多态性的分型和分析。

多重 PCR 基本原理与常规 PCR 相同，区别在于多重 PCR 反应体系加入两对及以上的引物，各对引物分别结合在模板相对应部位，同时扩增出多个核酸片段的 PCR 反应。但多重 PCR 实验并不是简单的将多对特异性引物混合成一个反应体系，其难点在于体系中各靶标的均衡扩增。多重 PCR 中可能多个靶点之间扩增条件不兼容，及多引物下可能存在的非特异扩增。为使每个靶标能均衡扩增，一般会对引物、反应条件、反应体系等进行优化。DNA 聚合酶作为多重 PCR 应用中的核心原料，除了具有常规的 PCR 性能外，还需要具有扩增均一性，对各种引物具有相等的偏好性，否则就会出现部分产物量非常多能够被很容易的检测到，而有部分产物彻底沦为背景的结果。

上述 DNA 聚合酶突变体相较于野生型 DNA 聚合酶（SEQ ID NO: 1），具有较好的多重扩增能力，即满足了多重 PCR 中对于扩增速率的要求，又具有扩增均一性，能够对不同的引物和目标片段进行偏好相同的 PCR 扩增，从而实现在一次 PCR 反应中实现同时对多个靶标进行扩增的效果。

优选地，突变包括如下任意一种氨基酸突变组合：G59W、G59W+D488K、S543T、S577T、E400R、L549F、T664F、G59W+D488K+S543T、G59W+D488K+L549F、G59W+S577T、G59W+E388K、S543T+T664F、L678I、E388K+L549F、G59W+D488K、G59W+D488K+L549F、G59W+S577T 或 G59W+E388K。

PCR 作为目前分子生物学研究领域最重要的工具之一，除了对提纯的 DNA 模板进行扩增外，还会有各式各样的复杂模板。大部分野生型聚合酶受到扩增模板中 PCR 抑制剂的限制，扩增能力受到影响，例如土壤中的腐殖酸、血清中的各种成分、动植物组织等。这一局限性

阻碍了 PCR 更高效、更广泛地应用于多种领域。

一些基于 PCR 的方法技术，如：临床诊断、环境检测、法医鉴定等，会用到各种类型的复杂样本，常用的有血液、血卡、口腔黏膜细胞（口腔拭子）、土壤、植物组织等。这些样本中都存在着可以干扰 PCR 的抑制物质，从而引起假阴性反应或灵敏度的降低。血液样本的 PCR 分析在临床上较为常用，包括用于诊断遗传疾病、病毒和微生物感染、血型和安全血库的人类健康相关测试。为了减少血液中抑制剂对 PCR 检测的影响，研究人员已经开发了各种实验室程序对样本进行预处理。适用于 PCR 的 DNA 纯化方法包括透析、Chelex 100 树脂、用细胞裂解液稀释、离心回收、用 NaOH 洗涤并添加牛血清蛋白等。而这些预处理步骤十分耗时且繁琐，对不同的样本还需使用不同的方法，而预处理过程中还会损失部分宝贵的核酸样品且无法完全去除抑制剂。在 PCR 体系中添加添加剂是改善复杂样品 PCR 结果的策略之一，其可以减小样品中 PCR 抑制剂的影响。例如，添加牛血清蛋白或单链 DNA 结合蛋白可以增强某些聚合酶的扩增能力。

而对 DNA 聚合酶本身进行改造也是一种可行的用于提高 DNA 聚合酶在复杂样品中进行 PCR 能力的策略。对于一些复杂样本，使用耐抑制能力好的聚合酶可以免于样本预处理步骤，节省劳动力，避免交叉污染，并实现对复杂样本的直接扩增。上述 DNA 聚合酶突变体对血红素、腐殖酸或单宁酸等常见的抑制物质具有耐受能力，利用上述 DNA 聚合酶能够实现对于上述含有抑制物质的样本中的 DNA 进行直接 PCR，减少前处理所需的时间、成本和对于 DNA 的损失和破坏。

本领域技术人员能够灵活在上述 DNA 聚合酶突变体上增加现有技术中常用元件，上述元件包括但不限于调控转录翻译水平的启动子，用于纯化蛋白的分子标签，用于定位蛋白的信号肽等现有技术中的已知的蛋白序列。上述元件不影响 DNA 聚合酶突变体的活性，包括但不限于聚合能力、耐抑制能力或多重 PCR 能力中的一种或多种。

上述氨基酸突变均在本申请实施例中进行试验探究，相较于具有 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列的母本，均具有 DNA 聚合酶活性。与上述氨基酸序列具有 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或 99.9%或以上同源性、且具有相同提高酶活性作用能力的蛋白质。

本说明书中的同源性（Identity）是指氨基酸序列之间的“同一性”，即氨基酸序列中的种类相同的氨基酸残基的比率的总计。氨基酸序列的同源性可以利用 BLAST（Basic Local Alignment Search Tool）、FASTA 等比对程序来确定。

与上述提供的蛋白具有 70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%以上（比如 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、98.5%、99%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%以上，甚至 99.9%以上）同源性且具有相同功能的蛋白质，其活性位点、活性口袋、活性机制、蛋白结构等均和上述蛋白质大概率相同，为通过氨基酸突变获得的同源蛋白。

具有上述同源性序列的获得，可以通过氨基酸的取代、替换等来实现。取代、替换等规则，一般情况下，性质类似的氨基酸之间相互替换后的效果也类似。为方便描述，此处先将氨基酸残基缩写罗列如下：丙氨酸（Ala；A）、天冬酰胺（Asn；N）、天冬氨酸（Asp；D）、精氨酸（Arg；R）、半胱氨酸（Cys；C）、谷氨酸（Glu；E）、谷氨酰胺（Gln；Q）、甘氨酸（Gly；G）、组氨酸（His；H）、异亮氨酸（Ile；I）、亮氨酸（Leu；L）、赖氨酸（Lys；K）、蛋氨酸（Met；M）、苯丙氨酸（Phe；F）、脯氨酸（Pro；P），丝氨酸（Ser；S）、苏氨酸（Thr；T）、色氨酸（Trp；W）、酪氨酸（Tyr；Y）和缬氨酸（Val；V）。

氨基酸的取代或替换，例如，在上述同源蛋白中，可发生保守的氨基酸替换。“保守的氨基酸替换”包括但不限于：

疏水性氨基酸（Ala、Cys、Gly、Pro、Met、Val、Ile、Leu）被其他疏水性氨基酸取代；

侧链粗大的疏水性氨基酸（Phe、Tyr、Trp）被其他侧链粗大的疏水性氨基酸取代；

侧链带正电的氨基酸（Arg、His、Lys）被其他侧链带正电的氨基酸取代；

侧链有极性不带电的氨基酸（Ser、Thr、Asn、Gln）被其他侧链有极性不带电的氨基酸取代。

本领域技术人员也可以根据现有技术中的“blosum62 评分矩阵”等本领域技术人员熟知的氨基酸替换规则对氨基酸进行保守替换。

在本申请第二种典型的实施方式中，提供了一种 DNA 分子，该 DNA 分子包含编码上述 DNA 聚合酶突变体的多核苷酸。

优选地，DNA 分子包括 SEQ ID NO：2 所示的核苷酸序列。

SEQ ID NO：2：

```
atgcgtggcatgctgccgctgttcgagccgaagggctgtgtgctggtgacggccaccacctggcgctaccgtaccttcacgcgtg
aagggtctgaccaccagccgtggcgaaccggtgcaggcgggttatggtttcgcgaaaagcctgctgaaggcgctgaaagaggacggcgatgc
ggtgatcgtggtttcgtatgcgaaggcggcgagctttcgtcacgaagcgtacggtggctataaagcgggtcgtgcgccgaccccgaggacttt
ccgcgtcaactggcgctgattaaagaactggtgatctgctgggtctggcgctctggaagtgccgggctacgaagcggacgatgttctggcga
gcctggcgaagaagcgggagaaggaaggttacgaagtgcgtatcctgaccgcgacaaagatctgtatcagctgctgagcgaccgtatccac
gttctgcacccggagggttatctgattacccggcggtgctgtgggaaaagtacggcctgcgtccggaccaatggcgaggattatcgtgcgtga
ccggtgacgagagcgataacctgccggcggttaaaggtattggcgaaaaaacgcgcgtgaagctgctggagggaatggggtagcctggaagc
gctgctgaaaaacctggatcgtctgaagccggcgatccgtgagaaaattctggcgacatggacgatctgaagctgagctgggacctggcgaa
agtgcgtaccgacctgccgtggaagtggatttcgcgaagcgtcgtgagccggatcgtgaacgtctgcgtgcgttcctggagcgtctggaatttg
gtagcctgctgcacgagtttggcctgctggaagcccgaaaggcgtggaggaaagcggcgtggccggccgagagggtgcgttcgtgggcttt
gttctgagccgtaaagaaccgatgtggcgggacctgctggcgctggcgggcgcgctggtggccgtgtgcaccgtgcgcgggagccgtaca
aggcgctgcgtgacctgaaagaagcgcgtggtctgctggcgaaagatctgagcgttctggcgctgcgcgaaggctggtggtctgcccggggtg
acgatccgatgctgctggcgtacctgctggatccgagcaacaccacccggagggtgtggcgcgctgttatggtggcgaatggaccgaggaa
gcggggcgagcgtgcggcgctgagcgaacgtctgttcgcgaacctgtgggggtcgtctggaggcgaggaacgtctgctgtggctgtaccgtga
ggtggaacgtccgctgagcgcggttctggcgacatggaagcgaccggtgtgcgtctggacgttgcgtatctgcgtgcgtgagcctggaagt
```

ggcggaggaaatcgcgctctggaggcggaagtttccgtctggcgggccaccggttaacctgaacagccgtgaccagctggagcgtgttctgtttgatgaactgggtctgccggcgattggcaagaccgaaaaaacggcaagcgtagcaccagcgcgcggtgtgaggcgctgcgtgaa gcgcacccgatcgttgagaagattctgcagtaccgtgaactgaccaagctgaaaagcacctatcgcaccgctgccggtatctgattcaccgc glaccggctcgtctgcacaccggttcaacaaaccgcgaccgcgaccggctcgtctgagcagcagcagccgaacctgcagaacatccgggtgcgtaccccgctgggtcaacgtatccgtcgtcgtttattgcggaggaaggctggctgctggttgcgtggattacagccagattgagctgcgtgtt ctggcgacactgagcgggtgacgaaaacctgatccggttttccaagaggggccgtgatattcacaccgaaaccgcgagctggatgtttggtgtgcc gcgtgaggcggttgaccgctgatgcgtcgtcggcggaagaccatcaacttcggtgtgtgtatggcatgagcgcgccaccgtctgagccagga gctggcgatcccgctacgaggaagcgagcggtttattgaacgttatttcaaaagcttccgaagggtcgtgctggattgagaaaacctggagg aaggtcgtcgtcgttggttacgtgaaacctgttcggtcgtcgtcgttacgttccggtatctggaggcgcggtgtgaaaagcgttcgtgaggcgcg gaacgtatggcgttcaacatgccggtgcagggtaccgcggcgacactgatgaaactggcgatggttaagctgtttccgcgtctggaggaaatgg gcgcgcgtatgctgctgcaagtgcacgatgagctggttctggaagcgccgaaggagcgtgcggaagcgggtggcgctctggcgaagaggt gatggaaggtgttaccgctggcggttccgctggaagttgaggtgggtatcggcgaggactggctgagcgcgaaagaataa。

进一步地，本领域技术人员能够灵活在上述 DNA 分子附近增加用于表达现有技术中常用元件的核酸序列，上述元件包括但不限于调控转录翻译水平的启动子，用于纯化蛋白的分子标签，用于定位蛋白的信号肽等现有技术中的已知的序列。

在本申请第三种典型的实施方式中，提供了一种重组载体，该重组载体包含有上述 DNA 分子。

上述 DNA 能够编码上述 DNA 聚合酶突变体，并能够连接在重组载体上形成环状 DNA。上述 DNA 和重组载体均能在 RNA 聚合酶、核糖体、tRNA 等的作用下，进行转录、翻译，获得上述 DNA 聚合酶突变体。针对 DNA 分子或重组载体的不同的宿主种类，可以利用现有技术灵活对核苷酸序列进行密码子优化，从而获得转录、翻译效率更高的核苷酸序列。

在本申请第四种典型的实施方式中，提供了一种宿主细胞，该宿主细胞内含有上述 DNA 分子或重组载体。

在一种优选的实施例中，宿主细胞包括原核细胞或真核细胞；优选地，原核细胞包括大肠杆菌。

利用上述宿主细胞，能够在宿主细胞中进行重组载体的复制，也能够将重组载体上携带的 DNA 分子进行转录、翻译，获得大量 DNA 聚合酶突变体。利用现有技术，对宿主细胞进行破碎、破碎后蛋白纯化或其他方式，能够获得 DNA 聚合酶突变体。该宿主细胞为非植物来源或非动物来源的宿主细胞，该宿主细胞不具有发育全能性。

在本申请第五种典型的实施方式中，提供了一种 PCR 试剂盒，该 PCR 试剂盒包括上述 DNA 聚合酶突变体。

在一种优选的实施例中，PCR 试剂盒中还包括如下任意一种或多种成分：1) 用于提供 PCR 扩增环境的缓冲液；2) PCR 引物；3) 用于提取目标 DNA 的试剂。

上述 PCR 引物，包括但不限于用于扩增特定目标 DNA 的通用引物，包括但不限于针对原核细菌的 16S 通用扩增引物、针对真核细菌的 18S 通用扩增引物、针对真菌的 ITS 通用扩增引物或其他对于特定生物或特定目标片段设计的 PCR 引物。

上述缓冲液即现有技术中常见的 PCR buffer，用于提供适合上述 DNA 聚合酶突变体的反应条件。本申请的 DNA 聚合酶突变体与野生型的 Taq DNA 聚合酶类似，能够在现有技术的 PCR buffer 中进行 PCR 反应，本领域技术人员也可以对上述 PCR buffer 中的成分进行灵活优化，从而获得更适宜此种 DNA 聚合酶突变体的缓冲液。

上述用于提取目标 DNA 的试剂，能够从目标样本中提取获得 DNA，为后续的 PCR 反应提供扩增模板。

在本申请第六种典型的实施方式中，提供了一种 PCR 方法，该 PCR 方法包括：利用上述 DNA 聚合酶突变体或上述试剂盒，对目标 DNA 进行 PCR 扩增。

在一种优选的实施例中，PCR 扩增包括多重 PCR 扩增；优选地，PCR 体系中含有 PCR 抑制剂；更优选地，PCR 抑制剂包括但不限于血红素、腐殖酸、单宁酸、EDTA、肝素、苯酚、十二烷基磺酸钠、氯高铁血红素、尿素、植物多糖、胆酸盐、聚苯乙烯、聚丙烯、蛋白酶、胆红素、溴酚蓝、钙离子和铁离子中的一种或多种。

利用上述 DNA 聚合酶突变体、上述试剂盒和上述 PCR 方法中的任一种，均能对含有多种抑制剂的反应体系进行 PCR 反应。

下面将结合具体的实施例来进一步详细解释本申请的有益效果。

通过定点突变 PCR 的手段构建了含有编码不同 DNA 聚合酶突变体序列的质粒，详情见实施例 1。然后将构建好的含有编码不同 DNA 聚合酶突变体序列的质粒转入 *E.Coli* 中进行培养并诱导表达，最后通过热处理、亲和层析的方法对 DNA 聚合酶进行纯化，从而得到含有不同突变的 Taq DNA 聚合酶，具体见实施例 2。对所得突变体进行聚合酶活性、耐抑制和多重 PCR 测试，获得了性能提升的优势突变体。同时，对优势突变位点进行组合叠加并获得性能提升的组合突变体。

对野生型 Taq DNA 聚合酶改造，获得优势突变体，其酶活/耐抑制能力/多重 PCR 能力较野生型显著提升。聚合酶活性的提高能够提高聚合速率，快速获得大量产物；耐抑制能力的提升允许其对复杂模板进行直扩，不需对模板进行预处理，节省工序，操作简单；多重扩增能力的提升允许单轮 PCR 同时对多个靶标进行扩增，提高效率。

实施例1 Taq DNA聚合酶及其突变体表达质粒的构建

具体实施步骤如下：

(1) 野生型 Taq DNA 聚合酶表达质粒的构建

野生型的 Taq DNA 聚合酶的基因序列如 SEQ ID NO:2 所示，其编码的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示。

SEQ ID NO: 2:

atgcgtggcatgctgccgctgttcgagccgaagggtcgtgtgctgctgggtgacggccaccacctggcgctaccgtacctttcacgcgtg
aagggtctgaccaccagccgtggcgaaccggtgcaggcgggttatggtttcgcgaaaagcctgctgaaggcgtgaaagaggacggcgatgc
ggtgatcgtggttttcgatgcgaaggcggcagctttcgtcacgaagcgtacgggtggctataaagcgggtcgtgcgccgacccggaggacttt
ccgcgtcaactggcgctgattaaagaactggtgatctgctgggtctggcgctctggaagtccgggctacgaagcggacgatgttctggcga
gcctggcgaagaaagcggagaagggaaggttacgaagtgcgtatcctgaccgcgacaaagatctgtatcagctgctgagcgaccgtatccac
gttctgcacccggagggttatctgattacccggcggtggtgtgggaaaagtacggcctgcgtccggaccaatggcgaggattatcgtgcgtga
ccggtgacgagagcgalaacctgccggcggttaaagggtatggcgaaaaaacgcgcgtgaagctgctggagggaatggggtagcctggaagc
gctgctgaaaaacctggatcgtctgaagccggcgatccgtgagaaaattctggcgacatggacgatctgaagctgagctgggacctggcgaa
agtgcgtaccgacctgccgtggaagtggatttcgcgaagcgtcgtgagccgatcgtgaacgtctcgtgctgttcctggagcgtctggaattg
gtagcctgctgcacgagtttggcctgctggaaagcccgaaggcgtggaggaaagcggcgtggccgcccagagggtgcgttcgtgggcttt
gttctgagccgtaaagaaccgatgtggcgggacctgctggcgctggcgggcgcgctgggtggccgtgtgcaccgtgcggcgagccgtaca
aggcgctgcgtgacctgaaagaagcgcgtggtctgctggcgaaagatctgagcgttctggcgctgcgcgaaggctggtgctgcccgggtg
acgatccgatgctgctggcgctacctgctggtatccgagcaacaccacccggagggtgtggcgctgctgtatggtggcgaatggaccgaggaa
gcgggagagcgtgcggcgctgagcgaacgtctgttcgcgaacctgtggggctgctgtggaggcgaggaaacgtctgctgtggctgtaccgtga
gggtggaacgtccgctgagcgcgggttcgtggcgacatggaagcgaccgggtgtgcgtctggacgttgcgtatctcgtgctgagcctggaagt
ggcgaggaaatcgcgctgctggaggcggaagtttccgtctggcgggccaccggttaacctgaacagccgtgaccagctggagcgtgttct
gtttgatgaactgggtctgccggcgattggcaagaccgaaaaaacggcaagcgtagcaccagcgcggcggtgctggaggcgtgcgtgaa
gcgcacccgatcgttgagaagattctgcagtaccgtgaactgaccaagctgaaaagcacctatatcgaccgctgccggtatctgattcaccgc
gtaccggctgctgcacacccgtttcaacaaaccgcgaccgcgaccggctgctgagcagcagcagccgaacctgcagaacatcccggtg
cgtaccccgctgggtcaacgtatccgtcgtgctgttatttcggaggaaggtggtgctggttgcgtggtgattacagccagattgagctgcgtgtt
ctggcgacactgagcgggtgacgaaaacctgatccgtgtttccaagagggccgtgatattcacaccgaaaccgcgagctggatgtttggtgtgc
cggtgaggcggttgaccgctgatgcgtcgtgcggcggaagaccatcaacttcggtgtgctgtatggcatgagcgcgaccgctgagccagga
gctggcgatcccgtacgaggaaagcgcaggcggttattgaacgttatttccaaagcttccgaagggtcgtgctggattgagaaaacctggagg
aaggctgctgctggttacgtgaaacctgttcggtcgtcgtgttacgttcggatctggaggcgcgtgtgaaaagcgttcgtgagcgggcg
gaacgtatggcgttaacatgccggtgcagggtaccgcggcgaccgtgatgaaactggcgatggttaagctgtttccgctcgtggaggaaatgg
gcgcgctatgctgctgcaagtcacgatgagctgggtcgtggaagcgcgaaggagcgtgcggaaagcgtggtgcgtctggcgaaaagaggt
gatggaaggtgttaccgctggcggttcgctggaagttgaggtgggtatcggcgaggactggctgagcgcgaaagaataa。

SEQ ID NO: 1:

MRGMLPLFEPKGRVLLVDGHHLAYRTFHALKGLTTSRGEVPQAVYGFAKSLLKALKE
DGDAVIVVFDKAPSRHEAYGGYKAGRPTPEDFPRQLALIKELVDLLGLARLEVPGYEA
DDVLASLAKKAEKEGYEVRILTADKDL YQLSDRIHVLHPEGYLITPAWLWEKYGLRPDQ
WADYRALTGDESDNLPGVKGIGECTARKLLEEWGSLEALLKNLDRLKPAIREKILAHMDD
LKLSWDLAKVRTDLPLEVDFAKRREPDRERLRAFLERLEFGSLLHEFGLLESPKALEEAPWP
PPEGAFVGVLSRKEPMWADLLALAAARGGRVHRAPEPYKALRDLKEARGLLAKDLSVLA
LREGLGLPPGDDPMLLAYLLDPSNTTPEGVARRYGGEWTEEAGERAAALSERLFANLWGRL
EGEERLLWLYREVERPLSAVLAHMEATGVRLDVAYLRALSLEVAEEIARLEAEVFRLAGHP
FNLNSRDQLERVLFDLGLPAIGKTEKTGKRSTSAVLEALREAHPIVEKILQYRELTKLKST
YIDPLPDLIHPRTGRLHTRFNQTATATGRLSSSDPNLQNIPTPLGQRIRRAFIAEEGWLLVA
LDYSQIELRVLAHLSGDENLIRVFQEGRDIHTETASWMFGVPREAVDPLMRRAAKTINFGVL
YGMSAHRLSQELAIPIYEEAQAFIER YFQSFPKVRWIEKTLEEGRRRGYVETLFGRRRYVPD

LEARVKSVDREAERMAFNMPVQGTAAADLMKLMVKLFPRLEEMGARMLLQVHDELVL
APKERAEAVARLAKEVMIEGVYPLAVPLEVEVGIGEDWLSAKE。

含有野生型 Taq DNA 聚合酶编码序列的表达质粒 pET-28a (+)-Taq 委托北京六合华大基因科技有限公司进行基因合成和载体构建。其中，氨基酸序列的 N 端融合了 6 个组氨酸残基 (6×His) 以利于蛋白的纯化。

(2) 突变体 Taq DNA 聚合酶表达质粒的构建

根据理性设计筛选的突变位点设计正反向突变引物对，引物序列如下表 1 所示。

表 1

SEQ ID NO:	引物名称	引物序列 (5'-3')
3	G59W-F	gcgctgaaagaggactgggatgcggatgatcgtg
4	G59W-R	cacgatcaccgcacccagtcctctttcagcgc
5	E388K-F	caccccgaaaggtgtggcgcgctcg
6	E388K-R	gccacacccttcgggggtggtgtg
7	E397Q-F	tggtggccagtggaccgaggaagcg
8	E397Q-R	cggctccactggccaccataacgacg
9	E400R-F	atggaccctgaagcgggcgagcg
10	E400R-R	ccgcttcacgggtccattcggcacc
11	D488H-F	aacctgaacagccgtcaccagctggagc
12	D488H-R	gtccagctggtgacggctgttcaggtt
13	D488R-F	taacctgaacagccgtcggcagctggagcgtg
14	D488R-R	cacgctccagctggcgacggctgttcaggtta
15	D488K-F	taacctgaacagccgtaagcagctggagcgtgttc
16	D488K-R	gaacacgctccagctgcttacggctgttcaggtta
17	S543T-F	tgaaaaccacctatcgacccgctgc
18	S543T-R	taggtggttttcagcttggtcagttcac
19	T544Y-F	tgaaaagctattatcgacccgctgc
20	T544Y-R	gtcgatataatagcttttcagcttggtc
21	T544W-F	tgaaaagctggtatcgacccgctgc
22	T544W-R	gtcgatataccagcttttcagcttggtc
23	T544F-F	tgaaaagctttatcgacccgctgc
24	T544F-R	gtcgatataaaagcttttcagcttggtc
25	T544S-F	tgaaaagcagctatcgacccgctgc
26	T544S-R	gtcgatatagctgcttttcagcttggtc
27	T544K-F	tgaaaagcaaatatcgacccgctgc
28	T544K-R	gtcgatataattgcttttcagcttggtc
29	T544D-F	tgaaaagcgactatcgacccgctgc
30	T544D-R	gtcgatatagtcgcttttcagcttggtc
31	L549F-F	tcgaccggtcccgatctgattcacc
32	L549F-R	agatccgggaacgggtcgatataaggtg
33	L549W-F	tcgaccggtggccgatctgattcacc
34	L549W-R	agatccggccacgggtcgatataaggtg

35	L549Y-F	tcgacccgtatccggatctgattcacc
36	L549Y-R	agatccggatacgggtcgatataaggtg
37	L549I-F	tcgacccgatcccggatctgattcacc
38	L549I-R	agatccggtagcgggtcgatataaggtg
39	L549K-F	tcgacccgaaaccggatctgattcacc
40	L549K-R	agatccggtttcgggtcgatataaggtg
41	L549D-F	tcgacccggacccggatctgattcacc
42	L549D-R	agatccgggtccgggtcgatataaggtg
43	S577T-F	gcagcaccgacccgaacct
44	S577T-R	gggtcgggtgctgctcagacg
45	T664F-F	cggcgaagttcatcaactcggtgt
46	T664F-R	aagttgatgaactcgcgcacgac
47	L678W-F	cgcaccgttgagccaggagctgg
48	L678W-R	tcctggctccaacgggtgcgcgctc
49	L678Y-F	cgcaccgttatagccaggagctgg
50	L678Y-R	tcctggctataacgggtgcgcgctc
51	L678F-F	cgcaccgttttagccaggagctgg
52	L678F-R	tcctggctaaaacgggtgcgcgctc
53	L678K-F	cgcaccgtaaaagccaggagctgg
54	L678K-R	tcctggcttttacgggtgcgcgctc
55	L678D-F	cgcaccgtgacagccaggagctgg
56	L678D-R	tcctggctgtcacgggtgcgcgctc
57	L670F-F	tcgggtgtgttctatggcatgagcgc
58	L670F-R	atgccataggacacaccgaagttgatgg
59	L490F-F	gtgaccagttcagcgtgttctgttt
60	L490F-R	acacgctcggactgggtcaaggct
61	V586F-F	acatcccggtccgtaccccgctggg
62	V586F-R	ggggtacggaacgggatgttctgcag
63	D488K/L490F-F	agcagtttgagcgtgttctgttt
64	D488K/L490F-R	gtcctaaactgcttacggctg

构建的单点或组合突变体如下表 2 所示。

表 2

编号	突变类型	编号	突变类型
Mut1	G59W	Mut34	D488K+T664F
Mut2	D488H	Mut35	E388K+S543T
Mut3	D488R	Mut36	E388K+S577T
Mut4	D488K	Mut37	E388K+E400R
Mut5	G59W+D488K	Mut38	E388K+E397Q
Mut6	S543T	Mut39	E388K+T544Y
Mut7	S577T	Mut40	E388K+L670F
Mut8	E388K	Mut41	E388K+L678Y
Mut9	E400R	Mut42	E388K+T664F
Mut10	E397Q	Mut43	S543T+T664F

Mut11	T544Y	Mut44	S577T+T664F
Mut12	L549F	Mut45	E400R+T664F+
Mut13	V586F	Mut46	E397Q+T664F+
Mut14	L490F	Mut47	T664F+L678W
Mut15	L670F	Mut48	T664F+L670F
Mut16	L678Y	Mut49	T664F+L678Y
Mut17	T664F	Mut50	T544D
Mut18	G59W+D488K+S543T	Mut51	T544K
Mut19	G59W+D488K+L549F	Mut52	T544S
Mut20	G59W+S543T	Mut53	T544W
Mut21	G59W+S577T	Mut54	T544F
Mut22	G59W+E388K	Mut55	L549I
Mut23	G59W+E400R	Mut56	L549D
Mut24	D488K+S543T	Mut57	L549K
Mut25	D488K+S577T	Mut58	L678I
Mut26	E388K+D488K	Mut59	L678F
Mut27	E400R+D488K	Mut60	L678K
Mut28	E397Q+D488K	Mut61	L678D
Mut29	D488K+T544Y	Mut62	D488K+L490F
Mut30	D488K+L549F	Mut63	E388K+L549F
Mut31	D488K+V586F	Mut64	E388K+L490F
Mut32	D488K+L670F	Mut65	V586F+T664F+
Mut33	D488K+L678Y		

单位点突变体使用 Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (购自 New England Biolabs 公司, 货号 M0491V) 在野生型 Taq DNA 聚合酶表达质粒的基础上以上述引物对通过 PCR 扩增引入定点突变, 具体的反应体系如下表 3 所示。

表 3

反应组分	体积 (μL)
5×Q5 Reaction Buffer	5
10 mM dNTPs	0.5
10 μM 正向引物	1.25
10 μM 反向引物	1.25
50 ng/μL 模板	1
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	0.25
无核酸酶 H ₂ O	15.75

PCR 反应条件如下表 4 所示。

表 4

温度	时间	循环数
98℃	30s	1
98℃	20s	25
64℃	20s	
72℃	4min	
72℃	5min	1
4℃	∞	1

反应结束后，加入 1 μL *DpnI* (NEB, 货号 R0176V) 于 37℃ 消化 2 h，然后取 5 μL 消化后的产物转化到 *E. Coli* 感受态细胞 DH5 α (购自天根生物科技有限公司, 货号 CB101)。然后从平板上挑取单克隆进行培养后提取质粒，质粒寄送到北京六合华大基因科技有限公司进行 Sanger 测序，再通过测序比对分析得到的突变体是否正确。

组合突变指相对于野生型的 Taq DNA 聚合酶有两或多个位点发生突变的突变体。组合突变的构建是利用相应引物先进行一个突变位点的定点突变，获得突变产物后再对该突变产物进行第二个定点突变，以此类推直至得到相较于野生型 Taq DNA 聚合酶的多位点突变体。PCR 反应体系配制和 PCR 反应条件如上，对于部分引物可根据引物的 T_m 值调整退火温度。

实施例2 Taq DNA聚合酶及其突变体的诱导表达和纯化

野生型及突变体质粒转化到 BL21 (DE3) 感受态细胞 (购自天根生物科技有限公司, 货号 CB105)，然后挑取单菌落于 2 mL 含卡那霉素抗性 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) LB 培养基中，于 37℃ 在 200 rpm/min 的转速下过夜培养。次日取 200 μL 菌液转接于 10 mL 含卡那霉素抗性 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 LB 培养基中，于 37℃ 在 200 rpm/min 的转速下培养至 OD_{600} 在 0.6~0.8，按照终浓度为 0.5 mM 的量加入诱导剂 IPTG，并继续在 37℃ 200 rpm/min 转速下培养 4h 进行诱导表达。培养液最后使用 8000 rpm/min 的条件离心 5 min 收集诱导后的菌体。

收集的菌体使用细胞重悬液 (50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 5% Glycerol (甘油), pH7.8) 进行重悬。在重悬菌体中加入 100 μL 10 mg/mL 溶菌酶于 37℃ 孵育 30 min，再转至 75℃ 热处理 40 min。14000 rpm 离心 10 min，收集上清液。

使用 His SpinTrap 柱 (购自 Cytiva, 货号 28401353) 进行纯化。将上清液每次 500 μL 加入至 His SpinTrap 柱中，100g 离心 30s，弃过滤液。加入等同于上清液体积的 Wash buffer 1 (50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 5% Glycerol, 30 mM Imidazole, pH7.8)，100g 离心 30s，弃过滤液。加入等同于上清液体积的 Wash buffer 2 (50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 5% Glycerol, 50 mM Imidazole (咪唑), pH7.8)，100g 离心 30s。弃过滤液。加入 Elution buffer (50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 5% Glycerol, 500 mM Imidazole, pH7.8) 进行洗脱，每次 200 μL ，洗脱 2 次，收集洗脱液。收集的洗脱液合并后用 0.5 mL 50 KDa 超滤管 (购自 Millipore, 货号 UFC505096) 进行浓缩换液。7000 rpm 离心 5min，弃滤液。加入 500 μL Dialysis Buffer (40 mM Tris-HCl, 200 mM KCl, 2 mM DTT, 0.2 mM EDTA- Na_2 , 5% Glycerol, pH7.8)，7000 rpm 离心 3~5min，弃滤液，重复 5-6 次，收集内管酶液。蛋白定量后进行酶储 (含 50%

Glycerol), 酶储浓度 0.1 mg/mL。之后制备成浓度为 0.05 mg/mL 的热启动形式, 用于后续的测定和分析。热启动抗体及使用方法参考专利申请 CN114685671A。

实施例3 Taq DNA聚合酶及其突变体的聚合活性测定及分析

对纯化得到的野生型 Taq DNA 聚合酶及其突变体进行聚合酶活性的测定。活性测定使用结合有引物的 M13 ssDNA (NEB, 货号 N4040S) 为模板-引物复合体。在 DNA 聚合酶的作用下发生 DNA 链的延伸, 得到延长的双链 DNA 产物。通过检测生成的双链 DNA 量来计算 DNA 聚合酶的活性。其中结合的引物序列为: 5'-AGCGAACCTCCCGACTTGCGGGAGG-3' (SEQ ID NO: 65)。本发明中所用的 10×PCR 缓冲液的配方均为: 100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 25% Glycerol, 0.5 mg/mL BSA (牛血清白蛋白)。

Taq DNA 聚合酶活性检测的反应体系如下表 5 所示。

表 5

反应组分	体积 (μL)
10× PCR 缓冲液	2.5
10 mM dNTPs	1
50 nM M13ssDNA 模板-引物复合体	2
2.5 ng/μL 非热启动 Taq DNA 聚合酶及其突变体	2
2 mM MgCl ₂	1
无核酸酶 H ₂ O	16.5

将上述配好的反应体系置于PCR仪中, 72℃反应5 min后加入0.5 μL的0.5 M EDTA终止反应, 然后用Qubit dsDNA HS Assay Kit (购自赛默飞公司, 货号Q32854) 检测双链DNA的量, 通过计算得到突变体相对于野生型的聚合活性 (以野生型的聚合活性为1) 如表6所示。

表6

编号	相对活性	编号	相对活性
Mut1	1.24	Mut34	0.13
Mut2	0.55	Mut35	0.71
Mut3	0.18	Mut36	0.22
Mut4	1.32	Mut37	0.42
Mut5	1.67	Mut38	1.19
Mut6	1.36	Mut39	0.60
Mut7	0.91	Mut40	0.65
Mut8	1.80	Mut41	0.06
Mut9	2.58	Mut42	1.03
Mut10	1.22	Mut43	2.15
Mut11	0.42	Mut44	0.17
Mut12	2.44	Mut45	1.06
Mut13	0.06	Mut46	0.26
Mut14	0.54	Mut47	0.97
Mut15	0.38	Mut48	0.32

Mut16	0.11	Mut49	0.00
Mut17	1.28	Mut50	0.00
Mut18	0.88	Mut51	0.15
Mut19	2.54	Mut52	0.23
Mut20	0.84	Mut53	0.35
Mut21	1.30	Mut54	0.32
Mut22	1.97	Mut55	0.28
Mut23	2.63	Mut56	0.01
Mut24	0.28	Mut57	0.30
Mut25	0.18	Mut58	1.66
Mut26	0.53	Mut59	0.28
Mut27	1.46	Mut60	0.03
Mut28	0.31	Mut61	0.00
Mut29	0.06	Mut62	0.19
Mut30	1.79	Mut63	2.31
Mut31	0.01	Mut64	0.03
Mut32	0.09	Mut65	0.01
Mut33	0.05		

活性测试结果显示，相对酶活数值大于1的表明相较于野生型的Taq DNA聚合酶，突变型Taq DNA聚合酶的聚合活性提高。突变体Mut1(G59W)、Mut4(D488K)、Mut5(G59W+D488K)、Mut6(S543T)、Mut8(E388K)、Mut9(E400R)、Mut10(E397Q)、Mut12(L549F)、Mut17(T664F)、Mut19(G59W+D488K+L549F)、Mut21(G59W+S577T)、Mut22(G59W+E388K)、Mut23(G59W+E400R)、Mut27(E400R+D488K)、Mut30(D488K+L549F)、Mut38(E388K+E397Q)、Mut42(E388K+T664F)、Mut43(S543T+T664F)、Mut45(E400R+T664F)、Mut58(L678I)、Mut63(E388K+L549F)聚合活性较野生型具有不同程度的提高。

实施例4 Taq DNA聚合酶及其突变体的多重PCR测试及分析

为了获得能够应用于多重PCR扩增的DNA聚合酶突变体，分别对纯化得到的野生型Taq DNA聚合酶及其突变体进行8重的人源持家基因扩增测试。

8重扩增的模板为人的基因组DNA(人gDNA)，使用DNA提取试剂盒(购自天根生化科技有限公司，货号DP304-02)从Expi293F™细胞(购自赛默飞世尔科技公司，货号A14527)中提取获得，扩增引物及目的片段大小如下表7所示。

表 7

基因	扩增引物 (5'-3')		目的片段大小(bp)
CYB5A	F	ggcaacgccttagactctgtgtg (SEQ ID NO: 66)	998
	R	ctgcccttggcctaactaacct (SEQ ID NO: 67)	
PRPH	F	gttcctcaagaagctgcacgag (SEQ ID NO: 68)	744
	R	cgttagactctggatctggcgt (SEQ ID NO: 69)	

GABARAPL2	F	ccagccaattcatgagtcggtg (SEQ ID NO: 70)	595
	R	cctgacaactcgcaagtagcac (SEQ ID NO: 71)	
ACTG1	F	gctcaatggggtaacttcagggt (SEQ ID NO: 72)	485
	R	gtggacgttacgtaaaaggccc (SEQ ID NO: 73)	
NDUFA7	F	tgctctggatgtgaagatcca (SEQ ID NO: 74)	405
	R	ttccaggtaaatccagcccagg (SEQ ID NO: 75)	
UQCRC1	F	cagccagtcagcatcatccaac (SEQ ID NO: 76)	315
	R	gaaagccggattgcggtacat (SEQ ID NO: 77)	
MYC	F	ggatagctctgcaaggggagag (SEQ ID NO: 78)	214
	R	tcgtcgcagtagaaatacggt (SEQ ID NO: 79)	
MIF	F	agaagtcaggcacgtagctcag (SEQ ID NO: 80)	113
	R	ggcacgttggtgtttacgatga (SEQ ID NO: 81)	

人源持家基因8重扩增的PCR反应体系如下表8所示。

表8

反应组分	体积 (μL)
10× PCR 缓冲液	2.5
10 mM dNTPs	0.5
5 μM Primer Mix	1
10 ng/μL 人 gDNA	1
0.05mg/mL 热启动 Taq DNA 聚合酶或其突变体	1
无核酸酶 H ₂ O	19

人源持家基因8重扩增的PCR条件如下表9所示。

表9

温度	时间	循环数
95℃	3min	1
95℃	10s	30
64℃	30s	
72℃	1min	
72℃	5min	1
4℃	∞	1

人源持家基因8重扩增完成后，加入5 μL 6x DNA Loading Buffer（60 mM Tris-HCl, 60 mM EDTA, 60% Glycerol, 0.15% (m/V) OrangeG）后充分混匀后用2%的琼脂糖胶进行电泳分析，挑选出能扩增出所有条带或条带较野生型多、或产量提高、或均一性提高的突变体。而图中有些条带出现了拖尾现象，是由于存在某些非特异性扩增的现象，和DNA聚合酶的多重扩增能力没有关系，可以不必考虑。具体结果见图1、图2和图3，图中WT表示野生型DNA聚合酶（SEQ ID NO: 1）对应的条带，M为marker条带。

图1、图2和图3结果表明，琼脂糖凝胶电泳图的扩增条带较亮或者扩增条带增多，表明相较于野生型的DNA聚合酶，突变型DNA聚合酶的多重扩增能力增强。突变体Mut5（G59W+D488K）、Mut6（S543T）、Mut9（E400R）、Mut11（T544Y）、Mut12（L549F）、

Mut19 (G59W+D488K+L549F)、Mut20 (G59W+S543T)、Mut21 (G59W+S577T) 和 Mut23 (G59W+E400R) 应用于多重PCR中, 扩增效果明显改善。

实施例5 Taq DNA聚合酶及其突变体的耐抑制能力测试

为了获得耐抑制能力提高的 DNA 聚合酶突变体, 对纯化得到的野生型 Taq DNA 聚合酶及其突变体在含抑制剂的体系中进行 PCR 测试。PCR 体系含抑制剂(12 μM 血红素或 1.6 μg/mL 腐殖酸或 1.2 μg/mL 单宁酸)。PCR 体系具体成分如下表 10 所述。

表 10

反应组分	体积 (μl)
10× PCR 缓冲液	2.5
10 mM dNTPs	0.5
10 μM CYB5A-F	1
10 μM CYB5A-R	1
10 ng/μL 人 gDNA	1
0.05 mg/mL 非热启动 Taq DNA 聚合酶或其突变体	1
无核酸酶 H ₂ O + 抑制剂	18

PCR反应条件如下表11所示。

表11

温度	时间	循环数
95℃	3min	1
95℃	10s	30
58℃	30s	
72℃	1min	
72℃	5min	1
4℃	∞	1

扩增完成后, 加入5 μL 6x DNA Loading Buffer后充分混匀后用2%的琼脂糖胶进行电泳分析, 挑选出能扩增出目标条带的突变体。具体结果见附图4。其中, WT进行两组实验, 一组不含抑制剂, 一组同其他突变体一样含抑制剂。图中有些条带出现了拖尾现象, 是由于存在某些非特异性扩增的现象, 和DNA聚合酶的耐抑制能力没有关系, 可以不必考虑。

图4结果表明, 琼脂糖凝胶电泳图中出现扩增条带的, 表明相较于野生型的Taq DNA聚合酶, 突变型Taq DNA聚合酶的耐抑制能力增强。突变体Mut1 (G59W)、Mut5 (G59W+D488K)、Mut6 (S543T)、Mut7 (S577T)、Mut9 (E400R)、Mut12 (L549F)、Mut17 (T664F)、Mut18 (G59W+D488K+S543T)、Mut19 (G59W+D488K+L549F)、Mut21 (G59W+S577T)、Mut22 (G59W+E388K)、Mut43 (S543T+T664F)、Mut58 (L678I)、Mut63 (E388K+L549F) 对至少一种抑制剂的耐受性提高。其中, Mut5(G59W+D488K)、Mut19(G59W+D488K+L549F)、Mut21 (G59W+S577T)、Mut22 (G59W+E388K) 对三种抑制剂的耐受性均提高。

从以上的描述中, 可以看出, 本发明上述的实施例实现了如下技术效果:

本申请中公开的 Taq DNA 聚合酶突变体，具有增强的聚合活性；具有增强的耐抑制性能可以进行混有抑制物质模板的 PCR 反应，免于 PCR 反应前的模板提取、纯化等处理；上述 DNA 聚合酶突变体还能够进行多重 PCR。利用上述 DNA 聚合酶突变体，相同时间内可以获得更多的产物，或进行混有抑制物质模板的 PCR 反应，免于 PCR 反应前的模板提取、纯化等处理，或进行多重 PCR。此种突变体相较于野生型在 DNA 聚合活性、耐抑制能力、多重扩增方面显著提高。

以上所述仅为本发明的优选实施例而已，并不用于限制本发明，对于本领域的技术人员来说，本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内，所作的任何修改、等同替换、改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

权利要求书

1. 一种 DNA 聚合酶突变体，其特征在于，所述 DNA 聚合酶突变体具有 DNA 聚合酶活性，包括与 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95% 或至少 99% 同源性的氨基酸序列。
2. 根据权利要求 1 所述的 DNA 聚合酶突变体，其特征在于，所述 DNA 聚合酶突变体相对于 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列具有以下至少一个位点的氨基酸替换：

D488、S577、S543、E388、E400、E397、T544、L549、V586、L670、L678、T664 和 G59。

3. 根据权利要求 2 所述的 DNA 聚合酶突变体，其特征在于，

D488 位点的氨基酸替换包括 D488H、D488R 或 D488K；

S543 位点的氨基酸替换包括 S543T；

S577 位点的氨基酸替换包括 S577T；

E388 位点的氨基酸替换包括 E388K；

E400 位点的氨基酸替换包括 E400R；

E397 位点的氨基酸替换包括 E397Q；

T544 位点的氨基酸替换包括 T544Y、T544D、T544K、T544S、T544W 或 T544F；

L549 位点的氨基酸替换包括 L549F、L549I、L549D 或 L549K；

V586 位点的氨基酸替换包括 V586F；

L670 位点的氨基酸替换包括 L670F；

L678 位点的氨基酸替换包括 L678Y、L678W、L678I、L678F、L678K 或 L678D；

T664 位点的氨基酸替换包括 T664F；

G59 位点的氨基酸替换包括 G59W。

4. 根据权利要求 3 所述的 DNA 聚合酶突变体，其特征在于，所述 DNA 聚合酶突变体的突变包括如下任意一种氨基酸突变组合：

D488H、D488R、D488K、S577T、G59W、E388K、E397Q、E400R、S543T、T544Y、T544D、T544K、T544S、T544W、T544F、L549F、L549I、L549D、L549K、V586F、T664F、L670F、L678Y、L678K、L678D、L678I、L678F、G59W+E388K、G59W+E400R、G59W+D488K、G59W+S543T、G59W+S577T、E388K+E397Q、E388K+E400R、E388K+D488K、E388K+S543T、E388K+T544Y、E388K+L549F、E388K+S577T、E388K+L670F、E388K+T664F、E388K+L678Y、E397Q+D488K、

E397Q+T664F、E400R+D488K、E400R+T664F、D488K+S543T、D488K+T544Y、D488K+L549F、D488K+S577T、D488K+V586F、D488K+T664F、D488K+L670F、D488K+L678Y、S543T+T664F、S577T+T664F、V586F+T664F、T664F+L670F、T664F+L678W、T664F+L678Y、G59W+D488K+S543T 或 G59W+D488K+L549F；

优选地，所述 DNA 聚合酶突变体的突变包括如下任意一种氨基酸突变组合：G59W、D488K、G59W+D488K、S543T、E388K、E400R、E397Q、L549F、T664F、G59W+D488K+L549F、G59W+S577T、G59W+E388K、G59W+E400R、E400R+D488K、D488K+L549F、E388K+E397Q、E388K+T664F、S543T+T664F、E400R+T664F、L678I 或 E388K+L549F，所述 DNA 聚合酶突变体的 DNA 聚合活性优于所述 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列的所述 DNA 聚合活性；

优选地，所述 DNA 聚合酶突变体的突变包括如下任意一种氨基酸突变组合：G59W+D488K、S543T、E400R、T544Y、L549F、G59W+D488K+L549F、G59W+S543T、G59W+S577T 或 G59W+E400R，所述 DNA 聚合酶突变体的多重扩增能力优于所述 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列的所述多重扩增能力；

优选地，所述 DNA 聚合酶突变体的突变包括如下任意一种氨基酸突变组合：G59W、G59W+D488K、S543T、S577T、E400R、L549F、T664F、G59W+D488K+S543T、G59W+D488K+L549F、G59W+S577T、G59W+E388K、S543T+T664F、L678I、E388K+L549F、G59W+D488K、G59W+D488K+L549F、G59W+S577T 或 G59W+E388K，所述 DNA 聚合酶突变体的耐 PCR 抑制剂能力优于所述 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列的所述耐 PCR 抑制剂能力。

5. 一种 DNA 分子，其特征在于，所述 DNA 分子包含编码权利要求 1 至 4 中任一项所述的 DNA 聚合酶突变体的多核苷酸。
6. 一种重组载体，其特征在于，所述重组载体包含有权利要求 5 所述的 DNA 分子。
7. 一种宿主细胞，其特征在于，所述宿主细胞内含有权利要求 5 所述的 DNA 分子或权利要求 6 所述的重组载体。
8. 根据权利要求 7 所述的宿主细胞，其特征在于，所述宿主细胞包括原核细胞或真核细胞；

优选地，所述原核细胞包括大肠杆菌。

9. 一种 PCR 试剂盒，其特征在于，所述 PCR 试剂盒包括权利要求 1 至 4 中任一项所述的 DNA 聚合酶突变体。
10. 根据权利要求 9 所述的 PCR 试剂盒，其特征在于，所述 PCR 试剂盒中还包括如下任意一种或多种成分：

1) 用于提供 PCR 扩增环境的缓冲液；

2) PCR 引物；

3) 用于提取目标 DNA 的试剂。

11. 一种 PCR 方法，其特征在于，所述 PCR 方法包括：利用权利要求 1 至 4 中任一项所述的 DNA 聚合酶突变体或权利要求 9 或 10 所述的 PCR 试剂盒，对目标 DNA 进行 PCR 扩增。
12. 根据权利要求 11 所述的 PCR 方法，其特征在于，所述 PCR 包括多重 PCR 扩增；

优选地，所述 PCR 的体系中含有 PCR 抑制剂；

更优选地，所述 PCR 抑制剂包括血红素、腐殖酸、单宁酸、EDTA、肝素、苯酚、十二烷基磺酸钠、氯高铁血红素、尿素、植物多糖、胆酸盐、聚苯乙烯、聚丙烯、蛋白酶、胆红素、溴酚蓝、钙离子和铁离子中的一种或多种。

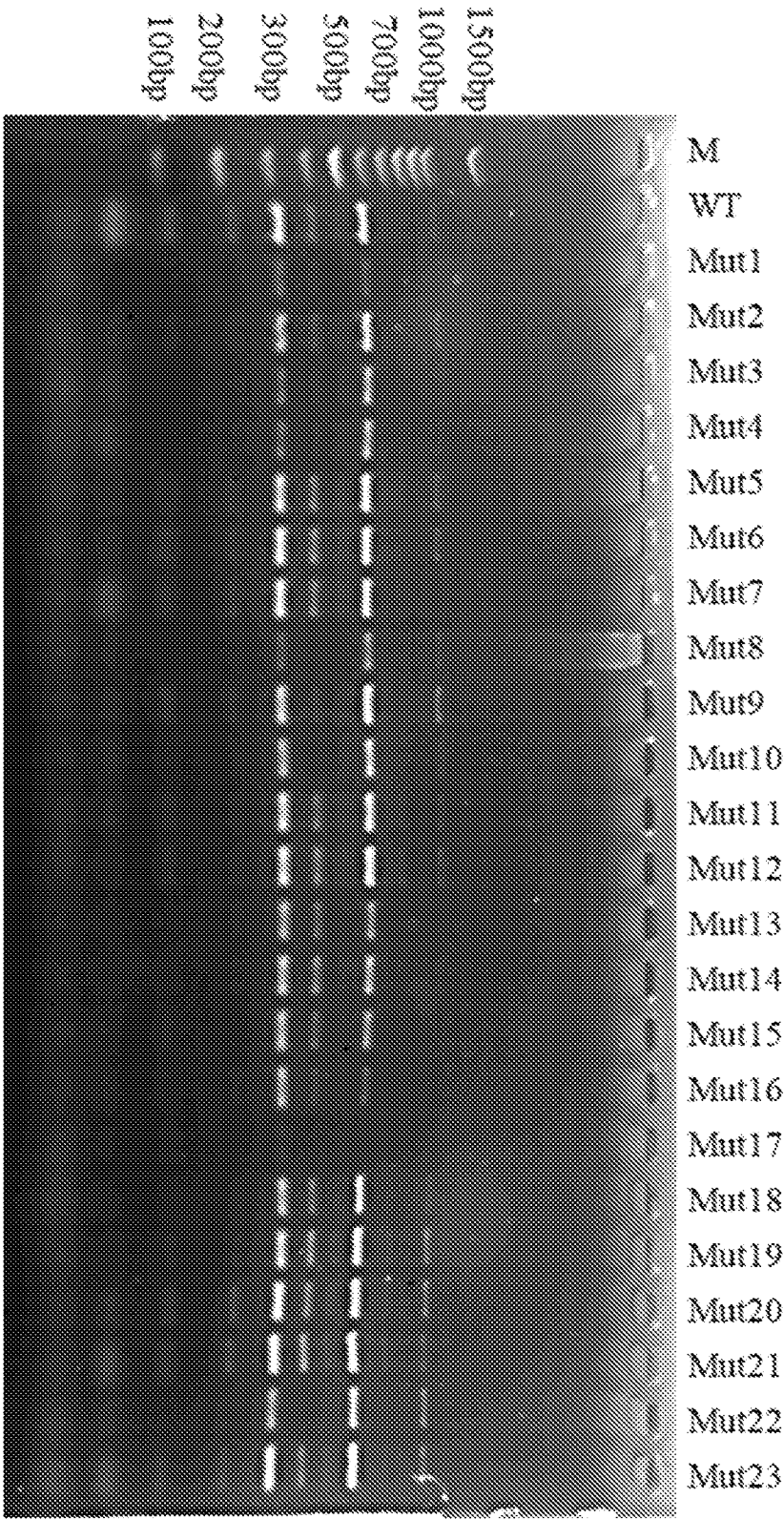


图 1

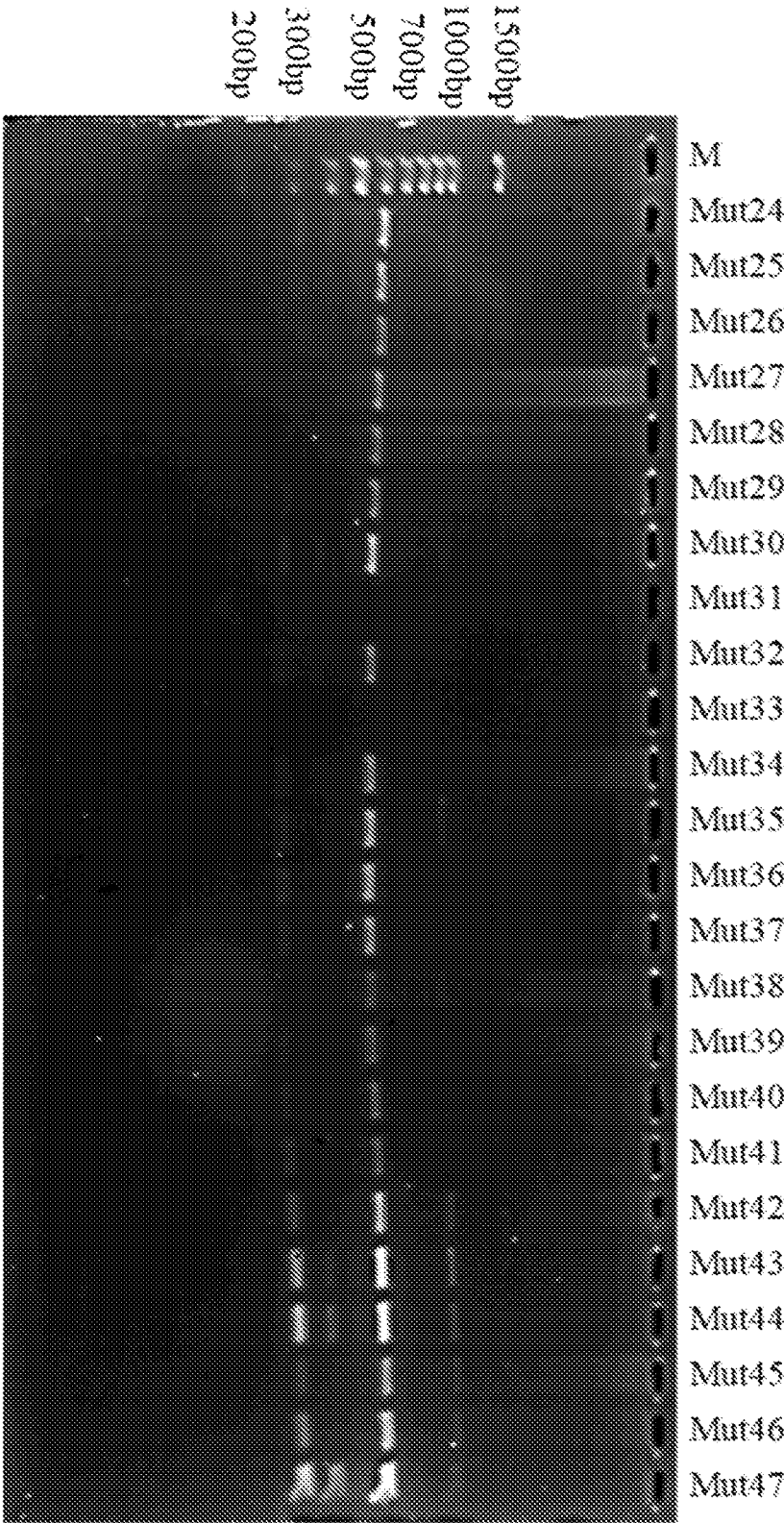


图 2

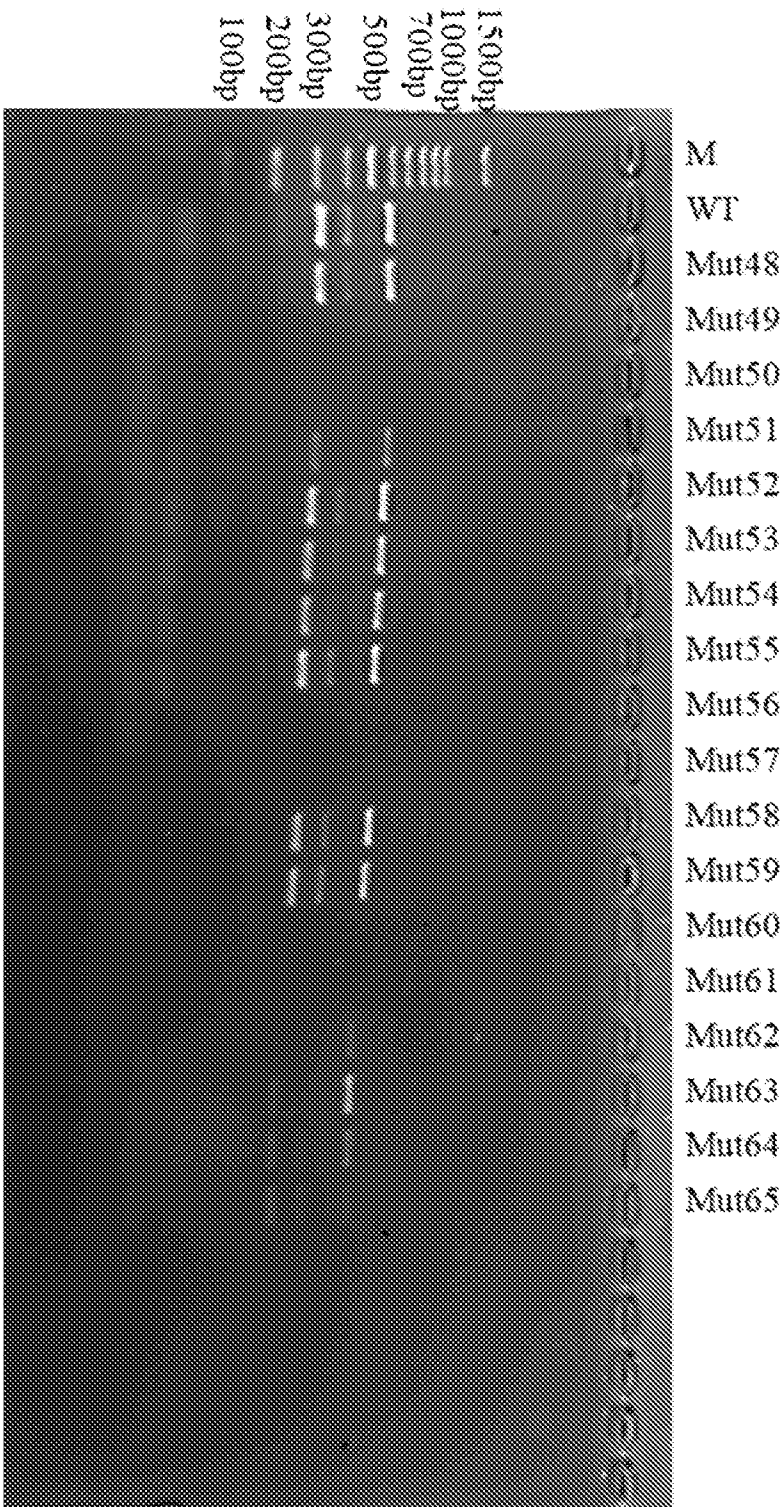


图 3

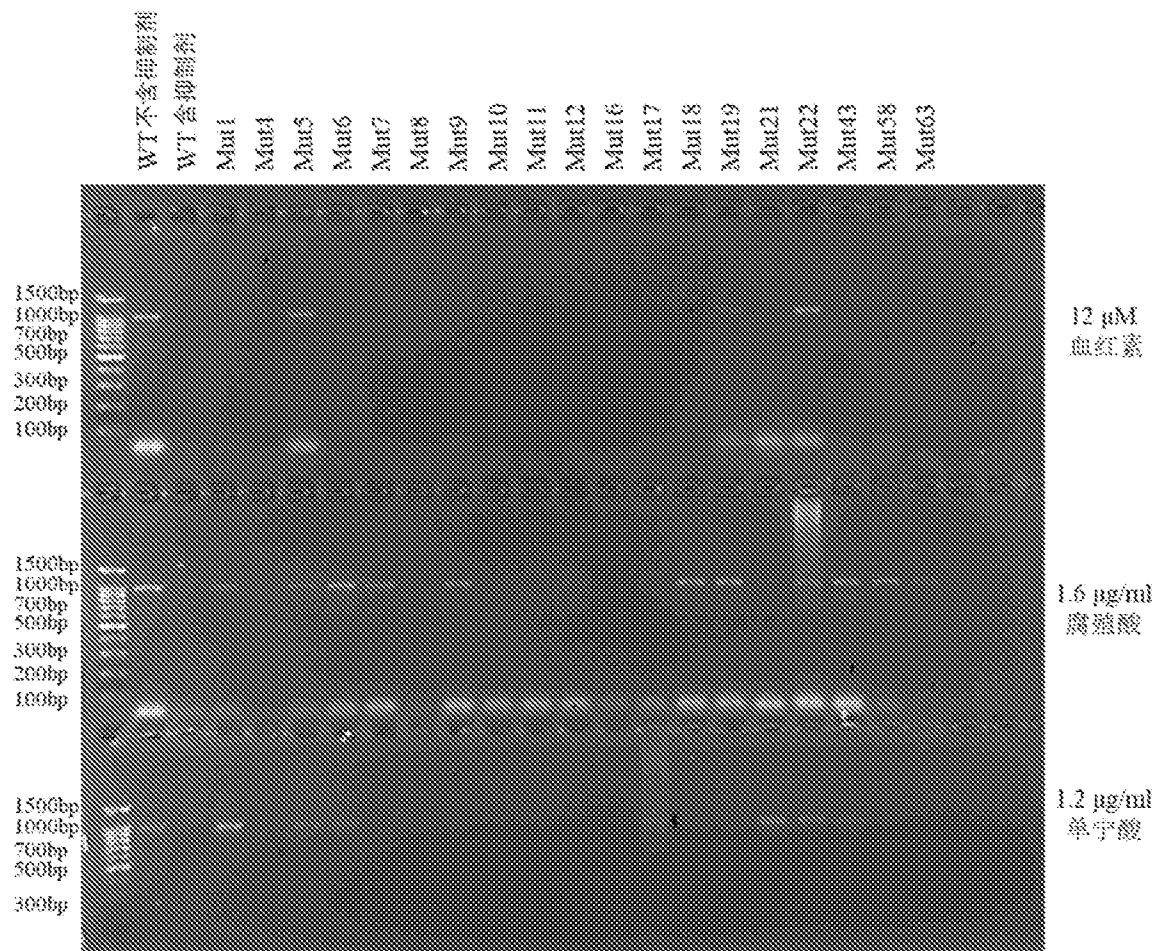


图 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/141294

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N9/12(2006.01)i; C12N15/52(2006.01)i; C12Q1/686(2018.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC:C12N,C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Databases: VCN, VEN, WPABSC, ENTXT, OETXT, CNKI, PubMed, Elsevier Science, ISI WEB of Science; GenBank+E
 MBL; 中国专利生物序列检索系统, China Patent Biological Sequence Search System search terms: 对SEQ ID NO: 1进行检
 索, search for SEQ ID NO: 1, D488, D490, 488, DNA聚合酶, Taq聚合酶, DNA polymerase, Taq polymerase, 突变, mutant+

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 103003418 A (HOFFMANN LA ROCHE) 27 March 2013 (2013-03-27) see claim 1, and SEQ ID NO: 1	1-12 (all in part)
A	CN 114008215 A (NUCLERA NUCLEICS LTD.) 01 February 2022 (2022-02-01) see description, paragraphs 136-138	1-12 (all in part)
A	CN 113597468 A (ABCLONAL SCIENCE, INC.) 02 November 2021 (2021-11-02) see description, paragraph 7, and table 1	1-12 (all in part)
A	CN 113286877 A (ABCLONAL SCIENCE, INC.) 20 August 2021 (2021-08-20) see claim 1	1-12 (all in part)
A	GenBank. "DNA polymerase [Thermus aquaticus]" GenBank: AAA27507.1, 26 April 1993 (1993-04-26), see amino acid sequence and related information	1-12 (all in part)



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 “D” document cited by the applicant in the international application
 “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
 “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 September 2024

Date of mailing of the international search report

20 September 2024

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
 CN)
 China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District,
 Beijing 100088

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/141294

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Group 1: claims 1-12 (all in part) relate to a DNA polymerase mutant comprising an amino acid substitution at position D488 relative to the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO: 1; and a DNA molecule encoding same, a recombinant vector containing the DNA molecule, a host cell, a PCR kit containing the mutant, and a PCR method using same.

Groups 2-13: claims 1-12 (all in part) relate to DNA polymerase mutants respectively comprising amino acid substitutions at positions S577, S543, E388, E400, E397, T544, L549, V586, L670, L678, T664 and G59 relative to the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO: 1; and DNA molecules encoding same, recombinant vectors containing the DNA molecules, host cells, PCR kits containing the mutants, and PCR methods using same.

The above 13 groups of inventions respectively relate to different amino acid mutation sites. The prior art CN 113597468 A (publication date: 02 November 2021) has disclosed performing site mutation on a wild-type Tag polymerase as shown in SEQ ID NO: 4 (having 100% identity to SEQ ID NO: 1 of the present application). Therefore, the above 13 groups of inventions do not share a same or corresponding special technical feature, and therefore do not comply with the requirement of unity of invention (PCT Rule 13.1).

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: **Claims 1-12 (all in part), which relate to a DNA polymerase mutant comprising an amino acid substitution at position D488 relative to the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO: 1; and a DNA molecule encoding same, a recombinant vector containing the DNA molecule, a host cell, a PCR kit containing the mutant, and a PCR method using same.**

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/141294

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	103003418	A	27 March 2013	JP	2013530692	A	01 August 2013
				JP	5926247	B2	25 May 2016
				CA	2801997	A1	22 December 2011
				CA	2801997	C	31 May 2016
				WO	2011157432	A1	22 December 2011
				US	2011318785	A1	29 December 2011
				US	8722378	B2	13 May 2014
				EP	2582801	A1	24 April 2013
				EP	2582801	B1	22 April 2015
				US	2018142220	A1	24 May 2018
				US	10647966	B2	12 May 2020
				US	2016160191	A1	09 June 2016
				US	9896669	B2	20 February 2018
				US	2014295499	A1	02 October 2014
				US	9290747	B2	22 March 2016
CN	114008215	A	01 February 2022	EP	3973075	A1	30 March 2022
				GB	201907209	D0	03 July 2019
				WO	2020234605	A1	26 November 2020
CN	113597468	A	02 November 2021	US	2021079365	A1	18 March 2021
				US	11821010	B2	21 November 2023
				WO	2020185702	A2	17 September 2020
				WO	2020185702	A3	19 November 2020
				US	2024124854	A1	18 April 2024
				US	2020291455	A1	17 September 2020
				US	10865441	B2	15 December 2020
CN	113286877	A	20 August 2021	WO	2020228757	A1	19 November 2020
				US	2020362320	A1	19 November 2020
				US	11613738	B2	28 March 2023

A. 主题的分类

C12N9/12(2006.01)i; C12N15/52(2006.01)i; C12Q1/686(2018.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC:C12N,C12Q

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

数据库: VCN, VEN, WPABSC, ENTXT, OETXT, CNKI, PubMed, Elsevier Science, ISI WEB of Science; GenBank+EMBL; 中国专利生物序列检索系统 检索词: 对SEQ ID NO: 1进行检索, D488, D490,488, DNA聚合酶, Taq聚合酶, DNA polymerase, Taq polymerase, 突变, mutant+

C. 相关文件

类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 103003418 A (霍夫曼—拉罗奇有限公司) 2013年3月27日 (2013 - 03 - 27) 参见权利要求1, SEQ ID NO:1	1-12 (均为部分)
A	CN 114008215 A (纽克莱生物科技有限公司) 2022年2月1日 (2022 - 02 - 01) 参见说明书第136-138段	1-12 (均为部分)
A	CN 113597468 A (武汉爱博泰克生物科技有限公司) 2021年11月2日 (2021 - 11 - 02) 参见说明书第7段、表1	1-12 (均为部分)
A	CN 113286877 A (武汉爱博泰克生物科技有限公司) 2021年8月20日 (2021 - 08 - 20) 参见权利要求1	1-12 (均为部分)
A	GenBank. "DNA polymerase [Thermus aquaticus]" GenBank: AAA27507.1, 1993年4月26日 (1993 - 04 - 26), 参见氨基酸序列及相关信息	1-12 (均为部分)

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"D" 申请人在国际申请中引证的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

"X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

"Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2024年9月13日

国际检索报告邮寄日期

2024年9月20日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

授权官员

邵旭倩

电话号码 (+86) 010-62411298

PCT/ISA/210 表(第2页) (2022年7月)

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列表进行的:

- a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:
- b. ☐ 为国际检索的目的在国际申请日之后提交(细则13之三.1(a)),
☐ 附有说明序列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。

2. ☐ 本报告是在没有收到符合WIPO ST.26标准的序列表的情况下,考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列,在可进行有意义检索的范围内做出的。

3. 补充意见:

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：

第1组发明：权利要求1-12（均为部分），涉及包含相对于SEQ ID NO：1所示的氨基酸序列具有D488位的氨基酸替换的DNA聚合酶突变体，及编码其的DNA分子、含有DNA分子的重组载体、宿主细胞、含有突变体的PCR试剂盒、使用其的PCR方法。

第2-13组发明：权利要求1-12（均为部分），涉及分别包含相对于SEQ ID NO：1所示的氨基酸序列具有S577、S543、E388、E400、E397、T544、L549、V586、L670、L678、T664和G59位的氨基酸替换的DNA聚合酶突变体，及编码其的DNA分子、含有DNA分子的重组载体、宿主细胞、含有突变体的PCR试剂盒、使用其的PCR方法。

上述13组发明分别涉及包含不同的氨基酸突变位点，现有技术CN113597468A（公开日2021年11月02日）已经公开了对SEQ ID NO：4（与本申请SEQ ID NO：1具有100%同一性）所示的野生型Tag聚合酶进行点突变。因此上述13组发明之间没有相同或者相应的特定技术特征，因此，不符合PCT实施细则13.1有关单一性的规定。

1. ☐ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。
2. ☐ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何加费。
3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求，具体地说，是权利要求：
4. ☒ 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是：权利要求1-12（均为部分），涉及包含相对于SEQ ID NO：1所示的氨基酸序列具有D488位的氨基酸替换的DNA聚合酶突变体，及编码其的DNA分子、含有DNA分子的重组载体、宿主细胞、含有突变体的PCR试剂盒、使用其的PCR方法。

对异议的意见

- ☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。
- ☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。
- ☐ 缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/141294

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	103003418	A	2013年3月27日	JP	2013530692	A	2013年8月1日
				JP	5926247	B2	2016年5月25日
				CA	2801997	A1	2011年12月22日
				CA	2801997	C	2016年5月31日
				WO	2011157432	A1	2011年12月22日
				US	2011318785	A1	2011年12月29日
				US	8722378	B2	2014年5月13日
				EP	2582801	A1	2013年4月24日
				EP	2582801	B1	2015年4月22日
				US	2018142220	A1	2018年5月24日
				US	10647966	B2	2020年5月12日
				US	2016160191	A1	2016年6月9日
				US	9896669	B2	2018年2月20日
				US	2014295499	A1	2014年10月2日
				US	9290747	B2	2016年3月22日
CN	114008215	A	2022年2月1日	EP	3973075	A1	2022年3月30日
				GB	201907209	D0	2019年7月3日
				WO	2020234605	A1	2020年11月26日
CN	113597468	A	2021年11月2日	US	2021079365	A1	2021年3月18日
				US	11821010	B2	2023年11月21日
				WO	2020185702	A2	2020年9月17日
				WO	2020185702	A3	2020年11月19日
				US	2024124854	A1	2024年4月18日
				US	2020291455	A1	2020年9月17日
				US	10865441	B2	2020年12月15日
CN	113286877	A	2021年8月20日	WO	2020228757	A1	2020年11月19日
				US	2020362320	A1	2020年11月19日
				US	11613738	B2	2023年3月28日