

(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
2024 年 12 月 5 日 (05.12.2024)



(10) 国际公布号
WO 2024/244010 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 9/12 (2006.01) *C12Q 1/68* (2018.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2023/098118

(22) 国际申请日: 2023 年 6 月 2 日 (02.06.2023)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 武汉华大智造科技有限公司 (**WUHAN MGI TECH CO., LTD.**) [CN/CN]; 中国湖北省武汉市东湖新技术开发区高新二路 388 号光谷加速器 3.1 期 24 栋, Hubei 430075 (CN)。深圳华大智造科技股份有限公司 (**MGI TECH CO., LTD.**) [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼及 11 栋 2 楼, Guangdong 518083 (CN)。

(72) 发明人: 刘芬 (**LIU, Fen**); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼及 11 栋 2 楼, Guangdong 518083 (CN)。黄思谦 (**HUANG, Siqian**); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼及 11 栋 2 楼, Guangdong 518083 (CN)。杨丽媛 (**YANG, Liyuan**); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼及 11 栋 2 楼, Guangdong 518083 (CN)。高静 (**GAO, Jing**); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼及 11 栋 2 楼, Guangdong 518083 (CN)。白佳琨 (**BAI, Jiakun**); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼及 11 栋 2 楼, Guangdong 518083 (CN)。肖阳 (**XIAO, Yang**); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼及 11 栋 2 楼, Guangdong 518083 (CN)。杨涓 (**YANG, Juan**); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼及 11 栋 2 楼, Guangdong 518083 (CN)。苏香 (**SU, Xiang**); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼及 11 栋 2 楼, Guangdong 518083 (CN)。刘月鹏 (**LIU, Yuepeng**); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼及 11 栋 2 楼, Guangdong 518083 (CN)。宋承威 (**SONG,**

Chengwei); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼及 11 栋 2 楼, Guangdong 518083 (CN)。

(74) 代理人: 北京知帆远景知识产权代理有限公司 (**ZHIFAN & PARTNERS**); 中国北京市海淀区阜成路 73 号裕惠大厦 B 座 805, Beijing 100142 (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, 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))。

(54) **Title:** DNA POLYMERASE MUTANT FOR SEQUENCING

(54) 发明名称: 用于测序的 DNA 聚合酶突变体

(57) **Abstract:** Provided is a DNA polymerase mutant for sequencing. The DNA polymerase mutant comprises: compared with a *Pyrococcus abyssi* DNA polymerase *exo*-mutant, at least three amino acid mutations in the following four sites or functionally equivalent sites: position 409, position 410, position 411, and position 486. The *Pyrococcus abyssi* DNA polymerase *exo*-mutant has an amino acid sequence as shown in SEQ ID NO: 1.

(57) 摘要: 提供用于测序的 DNA 聚合酶突变体。所述 DNA 聚合酶突变体包括: 与 *Pyrococcus abyssi* DNA 聚合酶 *exo*-突变体相比, 在以下四个位点或功能等同位点中具有至少三个氨基酸突变: 第 409 位、第 410 位、第 411 位、第 486 位; 所述 *Pyrococcus abyssi* DNA 聚合酶 *exo*-突变体具有如 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列。



WO 2024/244010 A1

用于测序的 DNA 聚合酶突变体

技术领域

本发明涉及生物技术领域，具体的，本发明涉及用于测序的 DNA 聚合酶突变体，特别涉及一种 DNA 聚合酶突变体、核酸分子、表达载体、重组细胞、重组菌株、DNA 聚合酶突变体的方法、复合物、核酸测序的方法、核酸测序试剂盒及其用途和制备用于催化 DNA 扩增或核酸测序相关产品中的用途。

背景技术

核酸序列对于理解基因的功能至关重要，在基因分析中具有广泛应用，而 DNA 测序方法是基因分析中重要的工具。基于边合成边测序（Sequencing by Synthesis, SBS）的第二代高通量 DNA 测序方法是现在应用最广泛的测序技术。相比于一代测序，具有以下几个优势：测序速度快，通量高，可以在短时间内完成大规模的基因组测序；测序成本低，每个碱基的测序价格远低于一代测序；测序准确性高，可以检测出低频的变异和杂合位点；测序灵活性高，可以应用于不同的目标区域和样本类型。二代测序在生物医学领域有广泛的应用，例如，转录组测序、表观遗传学测序、全基因组关联分析、药物耐药检测及其他应用（如遗传鉴定、法医分析、遗传咨询、医学诊断）等。

测序聚合酶作为二代测序中最重要的组分之一，在测序过程中起着重要的作用。二代测序的原理是边合成边测序，即在 DNA 复制过程中通过捕捉新添加的碱基所携带的特殊标记（一般为荧光分子标记）来确定 DNA 的序列。测序聚合酶就是负责将带有标记的碱基与模板链配对并连接起来，形成互补的 DNA 链。在这种测序方法中，添加和检测人工修饰的核苷酸或核苷酸类似物（例如，带有荧光标记的可逆终止子的 DNA 聚合酶）至关重要。在 DNA 聚合中，最大的限制因素是现有的天然聚合酶对人工修饰的核苷酸或核苷酸类似物的聚合能力较低。有鉴于此，增强聚合酶对人工修饰的核苷酸或核苷酸的聚合能力是此类测序方法中的关键步骤。

根据大肠杆菌聚合酶 I、II 和 III 的氨基酸序列差异，DNA 聚合酶分为三个家族，分别称为 A、B 和 C。虽然 A 和 B 聚合酶的核苷酸结合位点在结构上相似，但不同家族聚合酶的基序明显不同，相应地代表了核苷酸及其类似物的识别机制。其中，来自嗜热古细菌的热稳定 B 家族聚合酶对各种核苷酸类似物的掺入性能最好，其突变体被广泛应用于各种二代测序方法中。嗜热古细菌的热稳定 B 家族聚合酶包括 KOD（*Thermococcus kodakaraensis*）、9°N（*Thermococcus sp. 9°N*）、TGO（*Thermococcus gorgonarius*）、TOK（*Desulfurococcus sp. Tok*）、Vent DNA 聚合酶（*Thermococcus litoralis*）、JDF-3 和 pfu DNA 聚合酶（*Pyrococcus furiosus*）等，它们的 DNA 聚合酶活性位点的主要氨基酸序列是保守的，但这些保守的酶活性位点也容易改变，可以在保持 DNA 活性的同时加入非天然特异性 dNTP 聚合酶。

发明内容

本发明旨在至少在一定程度上解决现有技术中存在的技术问题至少之一。

针对现有测序酶的聚合速度及测序质量（如，Lag（影响测序信号和质量），链偏等问题）存在的问题。发明人通过对嗜热古细菌的热稳定 B 家族聚合酶相关活性位点进行酶工程改造，获得新的 DNA 聚合酶突变体，可以很好的提高聚合酶对特定的非天然 dNTP 的掺入效率，进而提高边合成边测序（SBS）方法的测序速度及测序质量。

为此，在本发明的一个方面，本发明提出了一种 DNA 聚合酶突变体。根据本发明的实施例，所述突变体包括：与 *Pyrococcus abyssi* DNA 聚合酶 *exo*-（去除 3'-5' 外切酶校正活性）突变体相比，在以下四个位点或功能等同位点中具有至少之三个氨基酸突变：第 409 位、第 410 位、第 411 位、第 486 位；所述 *Pyrococcus abyssi* DNA 聚合酶 *Exo*-突变体具有如 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列。本发明实施例所述的 DNA 聚合酶突变体，可以有效提高聚合酶对特定的非天然 dNTP 的掺入效率，进而改善 SBS 测序方法的测序速度及测序质量方面具有重要意义。

MIIDADYITEDGKPIIRIFKKEKGEFKVEYDRTPYIYALLKDDSAIDEVKKITAERHGKIVRITEVE
KVQKKFLGRPIEVWKLYLEHPQDVPAIREKIREHPAVVDIFEYDIPFAKRYLIDKGLTPMEGNEELTFLAV
AIATLYHEGEEFGKGPIIMISYADEEGAKVITWKSIDLPHYVEVVSSEREMIKRLVKVIREKDPDVIITYNG
DNFDFPYLLKRAEKLGIKLPGRDNSEPKMQRMGDSLAVEIKGRIHFDLFPVIRRTINLPTYTLEAVYEA
IFGKSKEKVYAHEIAEAWETGKGLERVAKYSMEDAKVTFELGKEFFPMEAQLARLVGQPVDVSRSS
TGNLVEWFLLRKAYERNELAPNKPDEREYERRLRRESYEGGYVKEPEKGLWEGIVSLDFRSLYPSIIITHN
VSPDTLNRENCKEYDVAPQVGHRFCKDFPGFIPSLGNLLEERQKIKKRMKESKDPVEKKLLDYRQRA
IKILANSYYGYGYAKARWYCKECAESVTAWGRQYIDLVRRELESRGFKVLYIDTDGLYATIPGAKHEE
IKEKALKFVEYINSKLPGLLELEYEGFYARGFFVTKKKYALIDEEGKIVTRGLEIVRRDWSEIAKETQAK
VLEAILKHGNVDEAVKIVKEVTEKLSKYEIPPEKLVIIYEQITRPLSEYKAIGPHVAVAKRLAAKGVKVKP
GMVIGYIVLRGDGPISKRAIAIEEFDPKKHKYDAEYYIENQVLPAPERILRAFGYRKEDLKYQKTKQVG
LGAWLKF（SEQ ID NO: 1）。

需要说明的是，本申请所述 DNA 聚合酶突变体的氨基酸序列中的氨基酸位置参照野生型 *Pyrococcus abyssi* DNA 聚合酶或野生型 *Pyrococcus abyssi* DNA 聚合酶 *exo*-突变体的氨基酸序列中氨基酸的位置进行定位。

根据本发明的实施例，上述 DNA 酶突变体可以进一步包括下列附加技术特征至少之一：

根据本发明的实施例，所述 DNA 聚合酶突变体与所述 *Pyrococcus abyssi* DNA 聚合酶 *exo*-突变体具有至少 90% 的同一性。

根据本发明的实施例，突变体具有以下突变：

- (1) 第 409 位氨基酸 L 突变为 A 或 V 或 Y 或 H 或 F 或 Q;
- (2) 第 410 位氨基酸 Y 突变为 A 或 G;
- (3) 第 411 位氨基酸 P 不突变或突变为 V 或 G 或 C 或 S;
- (4) 第 486 位氨基酸 A 突变为 I 或 K 或 L 或 M 或 W 或 F。

5 根据本发明的实施例, 所述突变体具有以下 (1) - (2) 任意一种组合突变:

(1) 第 410 位氨基酸 Y 突变为 A, 第 409 位氨基酸 L 突变为 A 或 V 或 Y 或 H 或 F 或 Q, 第 411 位氨基酸 P 突变为 V 或 G 或 C 或 S 或不突变, 第 486 位氨基酸 A 突变为 I 或 K 或 L 或 M 或 W 或 F;
或

(2) 第 410 位氨基酸 Y 突变为 G, 第 409 位氨基酸 L 突变为 A 或 V 或 Y 或 H 或 F 或 Q, 第 411 位氨基酸 P 突变为 V 或 G 或 C 或 S 或不突变, 第 486 位氨基酸 A 突变为 I 或 K 或 L 或 M 或 W 或 F。

根据本发明的实施例, 所述突变体具有以下 (1) - (7) 任意一种组合突变:

(1) 第 410 位氨基酸 Y 突变为 A, 第 409 位氨基酸 L 突变为 A, 第 411 位氨基酸 P 突变为 G 或 C 或 S 或不突变, 第 486 位氨基酸 A 突变为 I 或 K 或 L 或 M 或 W 或 F; 或

(2) 第 410 位氨基酸 Y 突变为 A, 第 409 位氨基酸 L 突变为 V, 第 411 位氨基酸 P 突变为 V 或 G 或 C 或不突变, 第 486 位氨基酸 A 突变为 I 或 L 或 W 或 F; 或

(3) 第 410 位氨基酸 Y 突变为 A, 第 409 位氨基酸 L 突变为 Y, 第 411 位氨基酸 P 突变为 V 或 G 或不突变, 第 486 位氨基酸 A 突变为 L; 或

(4) 第 410 位氨基酸 Y 突变为 A, 第 409 位氨基酸 L 突变为 H, 第 411 位氨基酸 P 突变为 V 或 G 或不突变, 第 486 位氨基酸 A 突变为 L; 或

(5) 第 410 位氨基酸 Y 突变为 A, 第 409 位氨基酸 L 突变为 F, 第 411 位氨基酸 P 突变为 V 或 G 或不突变, 第 486 位氨基酸 A 突变为 L; 或

(6) 第 410 位氨基酸 Y 突变为 A, 第 409 位氨基酸 L 突变为 Q, 第 411 位氨基酸 P 突变为 G 或不突变, 第 486 位氨基酸 A 突变为 L; 或

(7) 第 410 位氨基酸 Y 突变为 G, 第 409 位氨基酸 L 突变为 V, 第 411 位氨基酸 P 不突变, 第 486 位氨基酸 A 突变为 I 或 K 或 M 或 F。

根据本发明的一些具体实施例, 不同的突变位点产生的测序重组酶 (由本发明所述 DNA 聚合酶突变体获得) 相对活性不同, 可以为实际生产需要提供更多的选择。

根据本发明的实施例, 所述突变体具有 (1) - (36) 任意一种组合突变:

(1) 第 409 位的 L 突变为 A, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 不突变, 第 486 位的 A 突变为 I; 或

(2) 第 409 位的 L 突变为 V, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 不突变, 第 486 位的 A 突变为

为 L; 或

(3) 第 409 位的 L 突变为 A, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 不突变, 第 486 位的 A 突变为 W; 或

(4) 第 409 位的 L 突变为 V, 第 410 位的 Y 突变为 G, 第 411 位的 P 不突变, 第 486 位的 A 突变为 K; 或

(5) 第 409 位的 L 突变为 V, 第 410 位的 Y 突变为 G, 第 411 位的 P 不突变, 第 486 位的 A 突变为 I; 或

(6) 第 409 位的 L 突变为 A, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 不突变, 第 486 位的 A 突变为 M; 或

(7) 第 409 位的 L 突变为 V, 第 410 位的 Y 突变为 G, 第 411 位的 P 不突变, 第 486 位的 A 突变为 F; 或

(8) 第 409 位的 L 突变为 V, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 突变为 V, 第 486 位的 A 突变为 L; 或

(9) 第 409 位的 L 突变为 A, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 不突变, 第 486 位的 A 突变为 F; 或

(10) 第 409 位的 L 突变为 A, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 突变为 G, 第 486 位的 A 突变为 I; 或

(11) 第 409 位的 L 突变为 A, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 突变为 C, 第 486 位的 A 突变为 I; 或

(12) 第 409 位的 L 突变为 Y, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 不突变, 第 486 位的 A 突变为 L; 或

(13) 第 409 位的 L 突变为 A, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 突变为 S, 第 486 位的 A 突变为 K; 或

(14) 第 409 位的 L 突变为 Y, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 突变为 G, 第 486 位的 A 突变为 L; 或

(15) 第 409 位的 L 突变为 Y, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 突变 V, 第 486 位的 A 突变为 L; 或

(16) 第 409 位的 L 突变为 H, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 不突变, 第 486 位的 A 突变为 L; 或

(17) 第 409 位的 L 突变为 F, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 不突变, 第 486 位的 A 突变为 L; 或

(18) 第 409 位的 L 突变为 A, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 不突变, 第 486 位的 A 突变为 L; 或

(19) 第 409 位的 L 突变为 A, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 突变为 C, 第 486 位的 A 突变为 M; 或

5 (20) 第 409 位的 L 突变为 V, 第 410 位的 Y 突变为 G, 第 411 位的 P 不突变, 第 486 位的 A 突变为 M; 或

(21) 第 409 位的 L 突变为 A, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 突变为 G, 第 486 位的 A 突变为 W; 或

10 (22) 第 409 位的 L 突变为 A, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 突变为 G, 第 486 位的 A 突变为 M; 或

(23) 第 409 位的 L 突变为 V, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 不突变, 第 486 位的 A 突变为 W; 或

(24) 第 409 位的 L 突变为 V, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 突变为 C, 第 486 位的 A 突变为 L; 或

15 (25) 第 409 位的 L 突变为 Q, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 突变为 G, 第 486 位的 A 突变为 L; 或

(26) 第 409 位的 L 突变为 H, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 突变为 G, 第 486 位的 A 突变为 L; 或

20 (27) 第 409 位的 L 突变为 A, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 突变为 S, 第 486 位的 A 突变为 F; 或

(28) 第 409 位的 L 突变为 V, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 不突变, 第 486 位的 A 突变为 I; 或

(29) 第 409 位的 L 突变为 H, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 突变为 V, 第 486 位的 A 突变为 L; 或

25 (30) 第 409 位的 L 突变为 A, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 突变为 S, 第 486 位的 A 突变为 I; 或

(31) 第 409 位的 L 突变为 A, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 突变为 S, 第 486 位的 A 突变为 M; 或

30 (32) 第 409 位的 L 突变为 F, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 突变为 G, 第 486 位的 A 突变为 L; 或

(33) 第 409 位的 L 突变为 V, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 突变为 G, 第 486 位的 A

突变为 L；或

(34) 第 409 位的 L 突变为 V，第 410 位的 Y 突变为 A，第 411 位的 P 不突变，第 486 位的 A 突变为 F；或

5 (35) 第 409 位的 L 突变为 A，第 410 位的 Y 突变为 A，第 411 位的 P 突变为 G，第 486 位的 A 突变为 F；或

(36) 第 409 位的 L 突变为 F，第 410 位的 Y 突变为 A，第 411 位的 P 突变为 V，第 486 位的 A 突变为 L。

根据本发明的实施例，所述突变体具有以下突变：

10 (1) 第 409 位的 L 突变为 V，第 410 位的 Y 突变为 G，第 411 位的 P 不突变，第 486 位的 A 突变为 I；或

(2) 第 409 位的 L 突变为 A，第 410 位的 Y 突变为 A，第 411 位的 P 不突变，第 486 位的 A 突变为 I；或

(3) 第 409 位的 L 突变为 A，第 410 位的 Y 突变为 A，第 411 位的 P 不突变，第 486 位的 A 突变为 M；或

15 (4) 第 409 位的 L 突变为 A，第 410 位的 Y 突变为 A，第 411 位的 P 不突变，第 486 位的 A 突变为 L；或

(5) 第 409 位的 L 突变为 V，第 410 位的 Y 突变为 A，第 411 位的 P 不突变，第 486 位的 A 突变为 I；或

20 (6) 第 409 位的 L 突变为 A，第 410 位的 Y 突变为 A，第 411 位的 P 突变为 C，第 486 位的 A 突变为 F。

根据本发明的一些具体实施例，不同的突变位点产生的测序重组酶（由本发明所述 DNA 聚合酶突变体获得）相对活性不同，可以为实际生产提供更多的选择。

需要说明的是，上述突变体氨基酸序列均在 SEQ ID NO: 1 序列基础上突变获得。

25 根据本发明的一些具体实施例，当所述 DNA 聚合酶突变体的氨基酸序列具有上述突变时，相对于现有突变获得的重组聚合酶的相对活性更强，能够有效将含有荧光标记的 3'-O-可逆终止子非天然 dNTP 添加到 DNA 链中，提高测序速度及测序质量。

需要说明的是，基于野生型 *Pyrococcus abyssi* DNA 聚合酶无法将特定（如，非天然 dNTP 含有 3'-O-可逆终止子）的非天然 dNTP 加入到 DNA 链中，因此，发明人通过设计 *Pyrococcus abyssi* DNA 聚合酶突变体，进而将特定的非天然 dNTP 添加到 DNA 链中。

30 在本发明的第二方面，本发明提出了一种核酸分子。根据本发明的实施例，所述核酸分子编码本发明第一方面所述的 DNA 聚合酶突变体。所述核酸分子编码的 DNA 聚合酶突变体可在体内或体外进行

大量获得。

在本发明的第三方面，本发明提出了一种表达载体。根据本发明的实施例，所述表达载体包括本发明第二方面所述的核酸分子。

需要说明的是，所述表达载体也可进一步包括启动子，所述启动子与所述核酸分子可操作的连接。

5 根据本发明的实施例，所述表达载体为非致病性病毒载体，所述非致病性病毒载体包括腺病毒载体或逆转录病毒载体。

在本发明的第四方面，本发明提出了一种重组细胞。根据本发明的实施例，所述重组细胞携带本发明第二方面所述的核酸分子以及本发明第三方面所述的表达载体。所述重组细胞用于表达或分泌本发明第一方面所述的 DNA 聚合酶突变体。

10 根据本发明的实施例，所述重组细胞选自大肠杆菌、酵母或哺乳动物细胞。

在本发明的第五方面，本发明提出了一种重组菌株。根据本发明的实施例，所述重组菌株表达本发明第一方面所述的 DNA 聚合酶突变体。通过培养所述重组菌株可以快速大量获得 DNA 聚合酶突变体。

在本发明的第六方面，本发明提出了一种获得 DNA 聚合酶突变体的方法。根据本发明的实施例，所述方法包括将本发明第四方面所述的重组细胞或第五方面所述的重组菌株在适于蛋白表达的条件下
15 进行培养处理，以便获得所述 DNA 聚合酶突变体。

在本发明的第七方面，本发明提出了一种复合物。根据本发明的实施例，所述复合物包括本发明第一方面所述 DNA 聚合酶突变体和小分子化合物或大分子，所述 DNA 聚合酶突变体和小分子化合物或大分子通过化学键偶联。

根据本发明的实施例，所述小分子化合物或大分子包括荧光标记、荧光素或抗体等。

20 在本发明的第八方面，本发明提出了一种核酸合成方法。根据本发明的实施例，所述方法包括：将核酸模板、扩增引物、dNTP 与本发明第一方面所述 DNA 聚合酶突变体的混合产物在适于核酸扩增的条件下进行扩增处理，以便获得所述核酸。利用前述核酸合成方法可以对核酸模板进行高效快速扩增。

需要说明的是，本申请所述 DNA 聚合酶突变体对所有的 dNTP（包括有荧光标记或无荧光标记的 dNTP）均有聚合活性。

25 在本发明的第九方面，本发明提出了一种核酸测序的方法。根据本发明的实施例，所述方法包括：将待测核酸模板与本发明第一方面所述的 DNA 聚合酶突变体和带有荧光标记的 3'-O-可逆终止子非天然 dNTP 的混合产物在适于核酸扩增的条件下进行扩增处理和荧光信号检测处理；以及基于检测获得的荧光信号，确定所述待测核酸的核酸序列。

示例性的，所述核酸测序方法包括将待测核酸模板与所述 DNA 聚合酶突变体、带有荧光标记的 3'-O-可逆终止子非天然 dNTP 进行混合处理，DNA 聚合酶突变体负责将所述带有荧光标记的 3'-O-可逆终止子非天然 dNTP 与核酸模板进行匹配，最后通过检测多种荧光标记信号，基于获得的荧光标记信号获得
30

的核酸序列进而得到待测核酸的核酸序列，以上聚合反应和荧光标记反应可以根据测序模板长度进行多个循环。

在本发明的第十方面，本发明提出了一种核酸测序试剂盒。根据本发明的实施例，所述核酸测序试剂盒包括第一方面所述的 DNA 聚合酶突变体或第七方面所述的复合物。本发明所述的试剂盒用于高效、准确、快速进行核酸测序。

在本发明的第十一方面，本发明提出了一种第九方面所述核酸测序试剂盒在测序中的用途。根据本发明的实施例，所述试剂盒可用于测序，包括但不限于边合成边测序（SBS）。

在本发明的第十二方面，本发明提出了一种第一方面所述 DNA 聚合酶突变体、第二方面所述核酸分子、第三方面所述表达载体、第四方面所述重组细胞、第五方面所述重组菌株或第七方面所述复合物在制备用于催化 DNA 扩增或核酸测序相关产品中的用途。根据本发明的实施例，所述 DNA 聚合酶突变体、核酸分子、表达载体、重组细胞、重组菌株或复合物可以单独或者组合制备用于催化 DNA 扩增或核酸测序相关产品。

应理解，在本发明范围内中，本发明的上述各技术特征和在下文（如实施方案）中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合，从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅，在此不再一一累述。

附图说明

本发明的上述和/或附加的方面和优点从结合下面附图对实施例的描述中将变得明显和容易理解，其中：

图 1 显示了本发明实施例 1 所述 *Pyrococcus abyssi* exo-型 DNA 聚合酶融合蛋白电泳图。

具体实施方式

下面详细描述本发明的实施例，所述实施例的示例在附图中示出。下面通过参考附图描述的实施例是示例性的，旨在用于解释本发明，而不能理解为对本发明的限制。

定义与说明

此外，术语“第一”、“第二”仅用于描述目的，而不能理解为指示或暗示相对重要性或者隐含指明所指示的技术特征的数量。由此，限定有“第一”、“第二”的特征可以明示或者隐含地包括至少一个该特征。在本发明的描述中，“多个”的含义是至少两个，例如两个，三个等，除非另有明确具体的限定。

本申请中，所述如 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列为野生型 *Pyrococcus abyssi* DNA 聚合酶第 141 位氨基酸 D 突变为 A，第 143 位氨基酸 E 突变为 A 获得。所述野生型 *Pyrococcus abyssi* DNA 聚合酶无核酸外切酶活性。

在本申请中，除非另有说明，术语“同一性”与“同源性”表示含义一致。

本发明的目的是提供一种可提高测序质量的 B 家族重组聚合酶。该酶是基于古菌 *Pyrococcus abyssi* 的 DNA 聚合酶 (Erauso, Gaël, et al. "Pyrococcus abyssi sp. nov., a new hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent." Archives of microbiology 160 (1993): 338-349), 具有高活性及高耐热性的特点, 但野生型的聚合酶不能有效掺入带有荧光标记及 3'-可逆终止子(3'-reversible terminator)的非天然 dNTP。需要通过对相关活性位点的酶工程改造及筛选, 才能提高酶对特定的非天然 dNTP 的掺入效率, 以用于 SBS 测序方法中。

DNA 聚合酶突变体

本发明提出了一种 DNA 聚合酶突变体。本发明的实施例提出的 DNA 聚合酶突变体, 与野生型 *Pyrococcus abyssi* DNA 聚合酶 *exo*-突变体具有至少 90%同源性的氨基酸序列, 且具有以下至少之三位置的突变: 第 409 位、第 410 位、第 411 位、第 486 位。

本申请所述的 DNA 聚合酶突变体具有高活性, 高耐热性的优势, 具有提高聚合 3'-可逆终止子非天然 dNTP 性能, 进而提高测序速度及质量。

核酸分子

根据本发明一些具体的实施方案, 本发明提供一种核酸分子, 所述核酸分子编码前述的 DNA 聚合酶突变体。

需要说明的是, 对于本发明说明书和权利要求书中所提及的核酸, 本领域技术人员应当理解, 实际包括互补双链的任意一条, 或者两条。为了方便, 在本说明书和权利要求书中, 虽然多数情况下只给出了一条链, 但实际上也公开了与之互补的另一条链。另外, 本申请中的核酸序列包括 DNA 形式或 RNA 形式, 公开其中一种, 意味着另一种也被公开。

表达载体

本发明提出了一种表达载体, 包含前面所述的核酸分子。这里的表达载体的类型并不受特别限制, 只要能够在宿主细胞中复制表达相应的突变体即可。

重组细胞

本发明提出了一种重组细胞, 携带前面所述的核酸分子、表达载体或表达 DNA 聚合酶突变体。所述重组细胞是通过转染或者转化所述表达载体获得的。根据本发明一些具体的实施方案, 所述重组细胞在合适条件下可高效表达上述 DNA 聚合酶突变体。

重组菌株

本发明提出了一种重组菌株, 表达前述 DNA 聚合酶突变体。所述重组菌株可以在短时间内进行大量繁殖, 高效制备 DNA 聚合酶突变体。

获得 DNA 聚合酶突变体的方法

本发明提出的获得 DNA 聚合酶突变体的方法, 通过将前述的重组细胞在适于蛋白表达的条件下进

行培养处理，以便获得所述 DNA 聚合酶突变体。

复合物

本发明提出了一种复合物，所述复合物包括前述 DNA 聚合酶突变体和小分子化合物或大分子，所述 DNA 聚合酶突变体和小分子化合物或大分子通过化学键偶联。在基因测序领域中，通过检测复合物中的小分子化合物（荧光标记）或大分子（抗体、荧光素）进而确定待测核酸序列。

下面参考具体实施例，对本发明进行描述，需要说明的是，这些实施例仅是描述性的，而不以任何方式限制本发明。

实施例 1

根据本发明实施例，基于 *Pyrococcus abyssi* *exo*-型（深海火球菌 *exo*-突变体）进行 DNA 聚合酶及其突变体的制备与粗酶活性筛选。具体步骤如下：

1.1 重组表达载体的构建及转化

生工生物工程（上海）股份有限公司合成融合 C 端 6x His 标签的 *Pyrococcus abyssi* *exo*-型 DNA 聚合酶基因（SEQ ID NO: 1）的 pD441-WT 载体质粒及 409，410，411，485 位点的定点突变引物。

其中，引物设计方式为：5'-反向互补区域（15~21 bp）-非互补区域（至少 15 bp）。使用 Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase（Phanta Max 超保真 DNA 聚合酶）对目标质粒进行扩增。

409，410，411，485 位点突变为如下氨基酸：

L409 突变至 A、F、H、L、Q、S、V、Y；

Y410 突变至 A、G；

P411 突变至 A、C、E、F、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、Y；

A485 突变至 F、I、L、K、M、W；

对目前已知在其他 B 家族聚合酶中（9°N、Pfu、Vent 等）具有较佳的聚合 3'-可逆终止子非天然 dNTP 活性的突变体位点组合为 9°N 聚合酶的 L409A-Y410A-P411I-A486L 等（专利 EP1664287B1、US8460910B2）。此突变体组合将作为 *Pyrococcus abyssi* 聚合酶筛选实验的对照突变位点组合（SEQ ID NO: 2）；

MIIDADYITEDGKPIIRIFKKEKGEFKVEYDRTFRPYIYALLKDDSAIDEVKKITAERHKGKIVRITEV
EKVQKKFLGRPIEVWKLYLEHPQDVPAIREKIREHPAVVDIFEYDIPFAKRYLIDKGLTPMEGNEELTFLA
VAIATLYHEGEEFGKGPIIMISYADEEGAKVITWKSIDLPHYVEVVSSEREMIKRLVKVIREKDPDVIITYN
GDNFDFPYLLKRAEKLGIKLPLGRDNSEPKMQRMGDSLAVEIKGRIHFDLFPVIRRTINLPTYTLEAVYE
AIFGKSKEKVYAHEIAEAWETGKGLERVAKYSMEDAKVTFELGKEFFPMEAQLARLVGQPVWDVSRS
STGNLVEWFLLRKAYERNELAPNKPDEREYERRLRESYEGGYVKEPEKGLWEGIVSLDFRSAAISIIITH

NVSPDTLNRNCKEYDVAPQVGHRFCKDFPGFIPSLGNNLEERQKIKKRMKESKDPVEKKLLDYRQR
LIKILANSYYGYGYAKARWYCKECAESVTAWGRQYIDLVRRELESRGFKVLYIDTDGLYATIPGAKHE
EIKEKALKFVEYINSKLPGLLELEYEGFYARGFFVTKKKYALIDEEGKIVTRGLEIVRRDWSEIAKETQA
KVLEAILKHGNVDEAVKIVKEVTEKLSKYEIPPEKLVIIYEQITRPLSEYKAIGPHVAVAKRLAAKGVKVK
5 PGMVIGYIVLRGDGPISKRAIAIEEFDPKKHKYDAEYYIENQVLPAPERILRAFGYRKEDLKYQKTKQV
GLGAWLKF (SEQ ID NO: 2)。

酶突变体中 4 个位点的一部分突变组合如 1 所示，其中对照突变体 Mut1 组合为 L409A-Y410A-P411I-A486L。

表 1:

突变体 (Mutant)	L409	Y410	P411	A486	相对活性 (Relative Vmax/Km)
WT	L	Y	P	A	0.00
Mut1	A	A	I	L	1.00
Mut655	A	A	P	I	2.26
Mut600	V	A	P	L	2.15
Mut654	A	A	P	W	2.05
Mut705	V	G	P	K	2.00
Mut704	V	G	P	I	1.91
Mut657	A	A	P	M	1.88
Mut707	V	G	P	F	1.85
Mut601	V	A	V	L	1.82
Mut658	A	A	P	F	1.78
Mut665	A	A	G	I	1.52
Mut670	A	A	C	I	1.51
Mut612	Y	A	P	L	1.48
Mut676	A	A	S	K	1.46
Mut614	Y	A	G	L	1.43
Mut613	Y	A	V	L	1.42
Mut616	H	A	P	L	1.40
Mut620	F	A	P	L	1.40
Mut83	A	A	P	L	1.32
Mut672	A	A	C	M	1.32
Mut706	V	G	P	M	1.31
Mut664	A	A	G	W	1.29
Mut667	A	A	G	M	1.28
Mut708	V	A	P	W	1.28
Mut603	V	A	C	L	1.26
Mut610	Q	A	G	L	1.25
Mut618	H	A	G	L	1.25
Mut678	A	A	S	F	1.22
Mut709	V	A	P	I	1.22
Mut617	H	A	V	L	1.17

Mut675	A	A	S	I	1.17
Mut677	A	A	S	M	1.17
Mut622	F	A	G	L	1.14
Mut602	V	A	G	L	1.11
Mut712	V	A	P	F	1.09
Mut668	A	A	G	F	1.05
Mut621	F	A	V	L	1.03
Mut671	A	A	C	K	0.94
Mut619	H	A	C	L	0.86
Mut673	A	A	C	F	0.86
Mut623	F	A	C	L	0.82
Mut611	Q	A	C	L	0.71
Mut75	A	A	Q	L	0.63
Mut669	A	A	C	W	0.52
Mut84	A	A	N	L	0.28
Mut87	A	A	H	L	0.05
Mut50	A	A	W	L	0.00
Mut82	A	A	Y	L	0.00
Mut80	A	A	F	L	0.00

由于扩增产物中包含原始模板质粒，为防止其在转化后形成假阳性转化子，必须在进行重组环化之前进行 Dpn I 消化，去除甲基化模板质粒。

将重组聚合酶突变体表达载体导入大肠杆菌 BL21 感受态细胞中，涂抹抗性平板（含卡那 50 µg/ml）筛选阳性菌落。过夜培养后挑取实验组的单菌落，于 5 ml LB（含卡那 50 µg/ml）培养基中，37℃，200 rpm/min，过夜培养。次日按 1:100 稀释量，转接于含 150 µl 新鲜 LB（含卡那 50 µg/ml）培养基 96 孔细胞板中 37℃，220 rpm 振荡培养至 OD600=0.6。

1.2 重组蛋白诱导表达和菌体裂解

在步骤 1.1 的 96 孔板中，按终浓度 0.5 mM 加入 IPTG（异丙基硫代半乳糖苷），25℃，220 rpm/min，培养 12-16 h，诱导表达。之后加入 1 µL 100 mM PMSF（蛋白酶抑制剂），另加 5 µL 10 mg/ml 溶菌酶，用枪头轻轻吹打，混匀，于 37℃ 反应 10 min，获得菌体裂解粗酶液。

1.3 FRET 重组蛋白和非天然 dNTP 掺入效率测试

在步骤 1.2 获得的粗酶液中加入 AF532 荧光染料标记的 3'-O-阻断修饰的 dATP（华大智造 US10988501B2 专利）和 Cy5 荧光染料标记的 DNA 链（生工生物工程（上海）股份有限公司），序列信息为：

F: Cy5-CGTGTATGCGTAATAGGATCCCGACTCACTATGGACG;
R: Cy5- CGTGTATCGTCCATAGTGAGTCGGGATCCTATTACGC。

模拟高通量测序过程中掺入修饰核苷酸，利用酶标仪来检测聚合酶突变体的相对反应速率，计算粗酶活性，具体实验方法如下：

反应缓冲液：20 mM Tris-HCl、10 mM (NH₄)₂SO₄、10 mM KCl、2 mM MgSO₄ pH 8.5@25℃；

反应体系为：步骤 1.2 中得到的不同的 1 μg 聚合酶蛋白分别与含有 2 μM 修饰 dATP 和 1 μM 的 DNA-Cy5 的反应液混合；

反应液配方：20 mM Tris-HCl、10 mM (NH₄)₂SO₄、10 mM KCl、2 mM MgSO₄、2 uM 的 3'阻断

5 修饰的 dATP 和 1 μM 的 DNA-Cy5，余量为水，pH 8.5；

反应温度：60℃；

反应时间：1h。

反应完成后导出数据表格和酶活性曲线，计算粗酶对比对照酶突变体 P1 的相对活性 Relative Vmax/Km。部分结果如表 1 所示，*Pyrococcus abyssi* *exo*-型 DNA 聚合酶野生型 P0 (WT-Exo-) 不能掺入带 AF532 荧光染料标记的 3'-O-阻断修饰的 dATP，而部分突变体蛋白可以掺入，产生了荧光信号值。从实验结果可以看出，不同的突变体对修饰的 3'阻断的 dNTP 有不同聚合活性，表明在不同位点进行了有效突变和位点组合，列表中 Relative Vmax/Km 值高于对照的突变位点组合均可视为能高效掺入 3'阻断 dNTP 的突变体。表明这些突变体在高通量测序中具有很大应用前景。

15 实施例 2

根据本发明的实施例，基于 *Pyrococcus abyssi* *exo*-型（深海火球菌 *exo*-突变体）进行 DNA 聚合酶突变体融合蛋白的表达和纯化。具体步骤如下：

1) 挑取突变体的 BL21/pD441 单菌落，于 50 ml LB 液体培养集中（含卡那 50 μg/ml）中，37℃，220 rpm/min，过夜培养。次日按 1:100 稀释量，转接于 1000 ml LB 液体培养基中（含卡那 50 μg/ml），20 37℃，220 rpm/min 振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.5-0.8，加入终浓度为 0.5 mM 的 IPTG，25℃过夜诱导培养，收集诱导后 BL21/pD441 菌液。同时设不加 IPTG 作为空白对照，收集未诱导 BL21/pD441 菌液。

2) 将步骤 1) 诱导后的 BL21/pD441 菌液，在转速为 8000 rpm/min 离心 10 min，弃上清，收集沉淀菌体，重悬菌体细胞于缓冲液 1（50 mM KPO₄，500 mM NaCl，10 mM imidazole(咪唑)，5% Glycerol(甘油)，pH 7.0) 中，另加入 PMSF（终浓度 0.5 mM）、Triton X-100（终浓度 0.5%）、Lysozyme（溶菌酶，25 终浓度 0.25%），后室温孵育 30 min，12000 rpm/min、4℃离心 30 min，冰浴，超声破碎细胞；再以 12000 rpm/min 的转速离心 30 min，将离心所得上清液于 75℃水浴 20 min，期间注意定时混匀，使受热均匀；12000 rpm/min，4℃离心 30 min，将上清液用 0.22 μm 滤膜过滤，即得融合蛋白粗提物。

3) 将步骤 2) 获得融合蛋白粗提物以适当流速上样进行 Ni 柱亲和层析（亲和层析预装柱 HisTrap FF，5 ml, 17-5255-01, GE healthcare），上样后利用缓冲液 1 平衡 5 CV（柱体积）；3%缓冲液 2（50 mM KPO₄，30 1 M NaCl，5% Glycerol，pH 7.0）洗脱 5 CV；50%缓冲液 2 洗脱 5 CV，收集大于等于 100 mAU 峰值对应的 Ni 柱亲和层析洗液。

4) 将大于等于 100 mAU 峰值对应的洗脱液按一定的流速上样进行离子交换层析(离子交换预装柱 HiTrap Q HP, 5 ml, 17-1154-01, GE healthcare), 上样后利用缓冲液 2 平衡 5 CV, 0%缓冲液 2→60% 缓冲液 2 线性洗脱, 收集大于等于 100 mAU 峰值对应的离子交换层析洗脱液。

5) 将大于等于 100 mAU 峰值对应的离子交换层析洗脱液进行凝胶层析(凝胶层析预装柱 HiPrep Sephacryl S-100HR, 26 mm, 17-1194-01, GE healthcare), 先用 20%乙醇洗 3 CV, 水洗 3 CV, 利用 100%缓冲液 3 (20 mM Tris, 200 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 10%Glycerol, pH 7.4) 平衡 3 CV 后上样, 再用缓冲液 3 洗脱 1.5 CV, 收集洗脱液即为纯化后野生型 DNA 聚合酶融合蛋白。

6)将 *Pyrococcus abyssi* *exo*-型 DNA 聚合酶融合蛋白进行 SDS-PAGE(浓缩胶为 5%分离胶为 12%), 结果如图 1 所示, 1 泳道为蛋白 Marker (PageRuler Prestained Protein Ladder, 26616, Thermo Scientific), 2 泳道为 1ul 融合蛋白粗提物上清液, 3 泳道为 1 μl 1 mg/ml Ni 柱亲和层析纯化后的 *Pyrococcus abyssi* *exo*-型 DNA 聚合酶突变体融合蛋白。可以看出, 泳道 2 和泳道 3 中蛋白大小约 90 KDa, 与文献(Dietrich, J., Schmitt, P., Zieger, M., Preve, B., Rolland, J. L., Chaabihi, H., & Gueguen, Y. (2002). PCR performance of the highly thermostable proof-reading B-type DNA polymerase from *Pyrococcus abyssi*. *FEMS microbiology letters*, 217(1), 89-94.) 报道分子量一致。对电泳后的蛋白胶利用 Quantity one 软件分析蛋白纯度, 纯化后 DNA 聚合酶突变体融合蛋白纯度能达到 85%或以上。未诱导 BL21/pD441 菌液未得到约 90 KDa 大小的目的蛋白。

实施例 3

根据本发明的实施例, 基于 *Pyrococcus abyssi* *exo*-型(深海火球菌 *exo*-突变体)进行 DNA 聚合酶突变体纯化酶在测序仪中的实际测序性能测试。其中, 优势突变体的纯化酶在华大的 MGISEQ-2000 测序仪上进行了测序尝试, 并且对测序结果进行了分析, 具体实验步骤如下:

测序文库: Ecoli.fa 文库 (Part No.1000005038,MGI Tech co.,Ltd);

测序条件: 聚合时间 90 秒, 切除 60 秒。

使用相同的测序文库 Ecoli.fa 文库和测序条件, 挑选了对照 P1 突变体以及其中 5 个在酶活测试中表现不一的突变体进行上机测试, 这些突变体在 MGISEQ-2000 测序仪上进行了 100 个循环的测序测试 (SE100)。测试结果如表 2 所示, 表明优势突变体的纯化酶再实际测序中性能更佳。

表 2:

Items	Mut1	Mut83	Mut655	Mut657	Mut673	Mut704	Mut709
Q30(%)	89.94	92.05	91.60	94.10	88.39	95.30	93.50
AvgErrorRate(%)	0.47	0.26	0.33	0.24	0.65	0.19	0.29
Lag(%)	0.24	0.13	0.10	0.12	0.20	0.07	0.18
Runon(%)	0.08	0.06	0.04	0.04	0.10	0.05	0.06

TotalReads(M)	531.96	543.67	425.26	506.04	523.59	533.46	555.07
Q30 decrease	15.54	7.24	3.22	3.10	15.48	1.70	8.26

在本说明书的描述中，参考术语“一个实施例”、“一些实施例”、“示例”、“具体示例”、或“一些示例”等的描述意指结合该实施例或示例描述的具体特征、结构、材料或者特点包含于本发明的至少一个实施例或示例中。在本说明书中，对上述术语的示意性表述不必须针对的是相同的实施例或示例。而且，

5 描述的具体特征、结构、材料或者特点可以在任一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。此外，在不相互矛盾的情况下，本领域的技术人员可以将本说明书中描述的不同实施例或示例以及不同实施例或示例的特征进行结合和组合。

尽管上面已经示出和描述了本发明的实施例，可以理解的是，上述实施例是示例性的，不能理解为对本发明的限制，本领域的普通技术人员在本发明的范围内可以对上述实施例进行变化、修改、替换和

10 变型。

权利要求书

1、一种 DNA 聚合酶突变体，其特征在于，

与 *Pyrococcus abyssi* DNA 聚合酶 *exo*-突变体相比，在以下四个位点或功能等同位点中具有至少三个氨基酸突变：

5 第 409 位、第 410 位、第 411 位、第 486 位；

所述 *Pyrococcus abyssi* DNA 聚合酶 *exo*-突变体具有如 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列。

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 聚合酶突变体与所述 *Pyrococcus abyssi* DNA 聚合酶 *exo*-突变体具有至少 90% 的同一性。

3、根据权利要求 1 所述的 DNA 聚合酶突变体，其特征在于，所述突变体具有以下突变：

10 (1) 第 409 位氨基酸 L 突变为 A 或 V 或 Y 或 H 或 F 或 Q；

(2) 第 410 位氨基酸 Y 突变为 A 或 G；

(3) 第 411 位氨基酸 P 不突变或突变为 V 或 G 或 C 或 S；

(4) 第 486 位氨基酸 A 突变为 I 或 K 或 L 或 M 或 W 或 F。

4、根据权利要求 3 所述的 DNA 聚合酶突变体，其特征在于，所述突变体具有以下 (1) - (2) 任意一种组合突变：

(1) 第 410 位氨基酸 Y 突变为 A，第 409 位氨基酸 L 突变为 A 或 V 或 Y 或 H 或 F 或 Q，第 411 位氨基酸 P 突变为 V 或 G 或 C 或 S 或不突变，第 486 位氨基酸 A 突变为 I 或 K 或 L 或 M 或 W 或 F；或

20 (2) 第 410 位氨基酸 Y 突变为 G，第 409 位氨基酸 L 突变为 A 或 V 或 Y 或 H 或 F 或 Q，第 411 位氨基酸 P 突变为 V 或 G 或 C 或 S 或不突变，第 486 位氨基酸 A 突变为 I 或 K 或 L 或 M 或 W 或 F。

5、根据权利要求 3 所述的 DNA 聚合酶突变体，其特征在于，所述突变体具有以下 (1) - (7) 任意一种组合突变：

(1) 第 410 位氨基酸 Y 突变为 A，第 409 位氨基酸 L 突变为 A，第 411 位氨基酸 P 突变为 G 或 C 或 S 或不突变，第 486 位氨基酸 A 突变为 I 或 K 或 L 或 M 或 W 或 F；或

25 (2) 第 410 位氨基酸 Y 突变为 A，第 409 位氨基酸 L 突变为 V，第 411 位氨基酸 P 突变为 V 或 G 或 C 或不突变，第 486 位氨基酸 A 突变为 I 或 L 或 W 或 F；或

(3) 第 410 位氨基酸 Y 突变为 A，第 409 位氨基酸 L 突变为 Y，第 411 位氨基酸 P 突变为 V 或 G 或不突变，第 486 位氨基酸 A 突变为 L；或

30 (4) 第 410 位氨基酸 Y 突变为 A，第 409 位氨基酸 L 突变为 H，第 411 位氨基酸 P 突变为 V 或 G 或不突变，第 486 位氨基酸 A 突变为 L；或

(5) 第 410 位氨基酸 Y 突变为 A，第 409 位氨基酸 L 突变为 F，第 411 位氨基酸 P 突变为 V 或 G

或不突变, 第 486 位氨基酸 A 突变为 L; 或

(6) 第 410 位氨基酸 Y 突变为 A, 第 409 位氨基酸 L 突变为 Q, 第 411 位氨基酸 P 突变为 G 或不突变, 第 486 位氨基酸 A 突变为 L; 或

(7) 第 410 位氨基酸 Y 突变为 G, 第 409 位氨基酸 L 突变为 V, 第 411 位氨基酸 P 不突变, 第 486

5 位氨基酸 A 突变为 I 或 K 或 M 或 F。

6、根据权利要求 4 所述的 DNA 聚合酶突变体, 其特征在于, 所述突变体具有 (1) - (36) 任意一种组合突变:

(1) 第 409 位的 L 突变为 A, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 不突变, 第 486 位的 A 突变为 I; 或

10 (2) 第 409 位的 L 突变为 V, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 不突变, 第 486 位的 A 突变为 L; 或

(3) 第 409 位的 L 突变为 A, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 不突变, 第 486 位的 A 突变为 W; 或

15 (4) 第 409 位的 L 突变为 V, 第 410 位的 Y 突变为 G, 第 411 位的 P 不突变, 第 486 位的 A 突变为 K; 或

(5) 第 409 位的 L 突变为 V, 第 410 位的 Y 突变为 G, 第 411 位的 P 不突变, 第 486 位的 A 突变为 I; 或

(6) 第 409 位的 L 突变为 A, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 不突变, 第 486 位的 A 突变为 M; 或

20 (7) 第 409 位的 L 突变为 V, 第 410 位的 Y 突变为 G, 第 411 位的 P 不突变, 第 486 位的 A 突变为 F; 或

(8) 第 409 位的 L 突变为 V, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 突变为 V, 第 486 位的 A 突变为 L; 或

25 (9) 第 409 位的 L 突变为 A, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 不突变, 第 486 位的 A 突变为 F; 或

(10) 第 409 位的 L 突变为 A, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 突变为 G, 第 486 位的 A 突变为 I; 或

(11) 第 409 位的 L 突变为 A, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 突变为 C, 第 486 位的 A 突变为 I; 或

30 (12) 第 409 位的 L 突变为 Y, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 不突变, 第 486 位的 A 突

变为 L; 或

(13) 第 409 位的 L 突变为 A, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 突变为 S, 第 486 位的 A 突变为 K; 或

(14) 第 409 位的 L 突变为 Y, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 突变为 G, 第 486 位的 A 突变为 L; 或

(15) 第 409 位的 L 突变为 Y, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 突变为 V, 第 486 位的 A 突变为 L; 或

(16) 第 409 位的 L 突变为 H, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 不突变, 第 486 位的 A 突变为 L; 或

(17) 第 409 位的 L 突变为 F, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 不突变, 第 486 位的 A 突变为 L; 或

(18) 第 409 位的 L 突变为 A, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 不突变, 第 486 位的 A 突变为 L; 或

(19) 第 409 位的 L 突变为 A, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 突变为 C, 第 486 位的 A 突变为 M; 或

(20) 第 409 位的 L 突变为 V, 第 410 位的 Y 突变为 G, 第 411 位的 P 不突变, 第 486 位的 A 突变为 M; 或

(21) 第 409 位的 L 突变为 A, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 突变为 G, 第 486 位的 A 突变为 W; 或

(22) 第 409 位的 L 突变为 A, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 突变为 G, 第 486 位的 A 突变为 M; 或

(23) 第 409 位的 L 突变为 V, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 不突变, 第 486 位的 A 突变为 W; 或

(24) 第 409 位的 L 突变为 V, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 突变为 C, 第 486 位的 A 突变为 L; 或

(25) 第 409 位的 L 突变为 Q, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 突变为 G, 第 486 位的 A 突变为 L; 或

(26) 第 409 位的 L 突变为 H, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 突变为 G, 第 486 位的 A 突变为 L; 或

(27) 第 409 位的 L 突变为 A, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 突变为 S, 第 486 位的 A

突变为 F; 或

(28) 第 409 位的 L 突变为 V, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 不突变, 第 486 位的 A 突变为 I; 或

(29) 第 409 位的 L 突变为 H, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 突变为 V, 第 486 位的 A 突变为 L; 或

(30) 第 409 位的 L 突变为 A, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 突变为 S, 第 486 位的 A 突变为 I; 或

(31) 第 409 位的 L 突变为 A, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 突变为 S, 第 486 位的 A 突变为 M; 或

(32) 第 409 位的 L 突变为 F, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 突变为 G, 第 486 位的 A 突变为 L; 或

(33) 第 409 位的 L 突变为 V, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 突变为 G, 第 486 位的 A 突变为 L; 或

(34) 第 409 位的 L 突变为 V, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 不突变, 第 486 位的 A 突变为 F; 或

(35) 第 409 位的 L 突变为 A, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 突变为 G, 第 486 位的 A 突变为 F; 或

(36) 第 409 位的 L 突变为 F, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 突变为 V, 第 486 位的 A 突变为 L。

7、根据权利要求 1 所述的 DNA 聚合酶突变体, 其特征在于, 所述突变体具有以下突变:

(1) 第 409 位的 L 突变为 V, 第 410 位的 Y 突变为 G, 第 411 位的 P 不突变, 第 486 位的 A 突变为 I; 或

(2) 第 409 位的 L 突变为 A, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 不突变, 第 486 位的 A 突变为 I; 或

(3) 第 409 位的 L 突变为 A, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 不突变, 第 486 位的 A 突变为 M; 或

(4) 第 409 位的 L 突变为 A, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 不突变, 第 486 位的 A 突变为 L; 或

(5) 第 409 位的 L 突变为 V, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 不突变, 第 486 位的 A 突变为 I; 或

(6) 第 409 位的 L 突变为 A, 第 410 位的 Y 突变为 A, 第 411 位的 P 突变为 C, 第 486 位的 A 突变为 F。

8、一种核酸分子, 其特征在于, 所述核酸分子编码权利要求 1~7 任一项所述的 DNA 聚合酶突变体。

5 9、一种表达载体, 其特征在于, 包含权利要求 9 所述的核酸分子。

10、根据权利要求 9 所述的表达载体, 其特征在于, 所述表达载体为非致病性病毒载体;

所述非致病性病毒载体包括腺病毒载体或逆转录病毒载体。

11、一种重组细胞, 其特征在于, 携带权利要求 9 所述的核酸分子或权利要求 10 所述的表达载体。

12、根据权利要求 11 所述的重组细胞, 其特征在于, 所述重组细胞选自大肠杆菌、酵母或哺乳动物细胞。

13、一种重组菌株, 其特征在于, 所述重组菌株表达权利要求 1~7 任一项所述的 DNA 聚合酶突变体。

14、一种获得 DNA 聚合酶突变体的方法, 其特征在于, 包括: 将权利要求 11~12 任一项所述的重组细胞或权利要求 13 所述的重组菌株在适于蛋白表达的条件下进行培养处理, 以便获得所述 DNA 聚合酶突变体。

15、一种复合物, 其特征在于, 包括权利要求 1~7 任一项所述 DNA 聚合酶突变体和小分子化合物或大分子, 所述突变体和小分子化合物或大分子通过化学键偶联。

16、根据权利要求 15 所述的复合物, 其特征在于, 所述小分子化合物或大分子包括荧光标记、荧光素或抗体。

20 17、一种核酸合成方法, 其特征在于, 包括:

将核酸模板、扩增引物、dNTP 与权利要求 1~7 任一项所述 DNA 聚合酶突变体的混合产物在适于核酸扩增的条件下进行扩增处理, 以便获得所述核酸。

18、一种核酸测序的方法, 其特征在于, 包括:

25 将待测核酸与权利要求 1~7 任一项所述 DNA 聚合酶突变体和带有荧光标记的 3'-O-可逆终止子非天然 dNTP 的混合产物在适于核酸扩增的条件下进行扩增处理和荧光信号检测处理; 以及

基于检测获得的荧光信号, 确定所述待测核酸的核酸序列。

19、一种核酸测序试剂盒, 其特征在于, 包括权利要求 1~7 任一项所述的 DNA 聚合酶突变体或权利要求 15 或 16 所述的复合物。

20、权利要求 19 所述核酸测序试剂盒在测序中的用途。

30 21、权利要求 1~7 任一项所述的 DNA 聚合酶突变体、权利要求 8 所述的核酸分子、权利要求 9~10

任一项所述表达载体、权利要求 11~12 任一项所述的重组细胞、权利要求 13 所述的重组菌株或权利要求 15~16 任一项所述的复合物在制备用于催化 DNA 扩增或核酸测序相关产品中的用途。

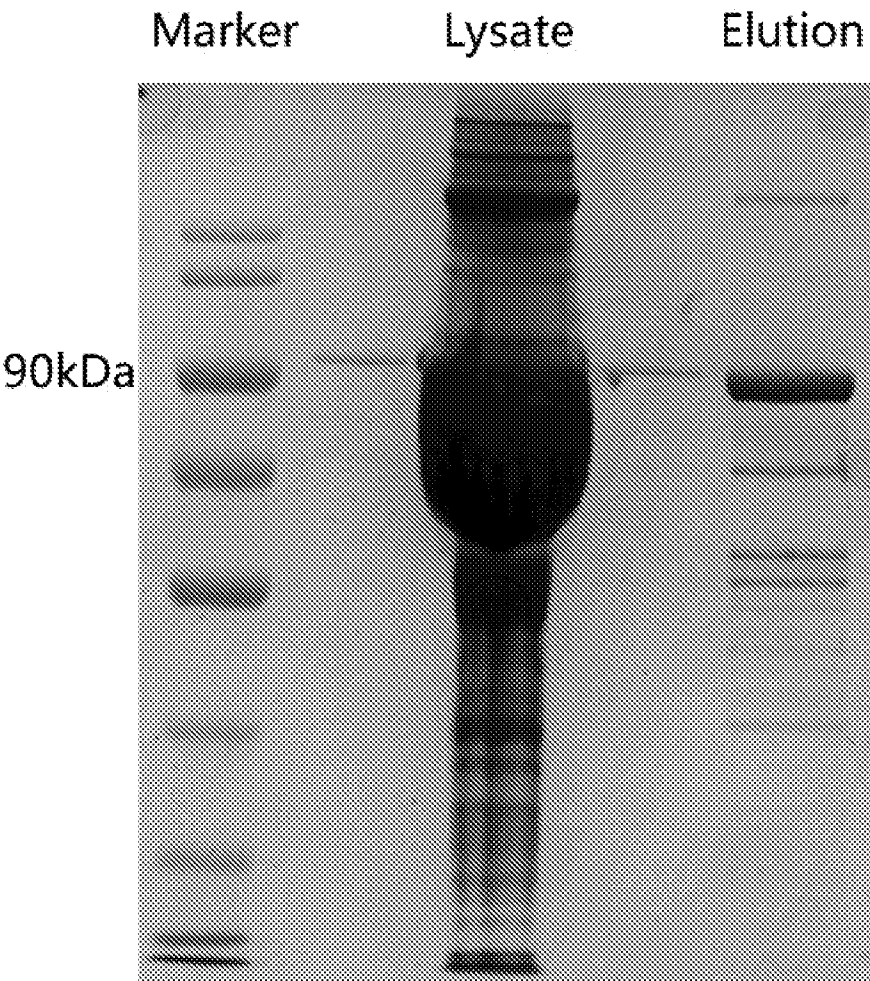


图 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/098118

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N9/12(2006.01)i; C12Q1/68(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)

CJFD, DWPI; CNABS; CNTXT; CNKI; WOTXT; USTXT; EPTXT; ENTXTC; ENTXT; 万方, WANFANG; 百度学术, BAIDU SCHOLAR; BING; Pubmed; ISI web of knowledge; Elsevier Science Direct; Springerlink; NCBI; 中国专利生物序列检索系统, China Patents Biological Sequence Search System; STN; Pyrococcus abyssi, DNA聚合酶, 409, 410, 411, 486, SEQ ID NO: 1, L409, Y410, P411, A486, DNA sequencing

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 11136565 B2 (SINGULAR GENOMICS SYSTEMS, INC.) 05 October 2021 (2021-10-05) abstract, claims 1-20, and description, columns 7-8, 36, 40-41, 62-63 and 84-85, tables 1 and 7, and embodiments 1 and 5	1-21
X	CN 112673098 A (ILLUMINA, INC. et al.) 16 April 2021 (2021-04-16) claims 1-85	1-21
X	US 2022145272 A1 (ISOPLEXIS CORP.) 12 May 2022 (2022-05-12) claims 1-11	1-21
X	WO 2018148723 A1 (QIAGEN WALTHAM INC.) 16 August 2018 (2018-08-16) claims 1-11	1-21
X	US 2022127587 A1 (ISOPLEXIS CORP.) 28 April 2022 (2022-04-28) abstract, and claims 1-12	1-21
A	US 2004191825 A1 (MJ BIOWORKS, INC.) 30 September 2004 (2004-09-30) claims 1-14	1-21



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

28 November 2023

Date of mailing of the international search report

14 December 2023

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/CN2023/098118**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2011301041 A1 (LIFE TECHNOLOGIES CORP.) 08 December 2011 (2011-12-08) claims 1-15	1-21
A	US 2018119115 A1 (PERSONAL GENOMICS, INC.) 03 May 2018 (2018-05-03) claims 1-20	1-21
A	WO 0132887 A1 (STRATAGENE, INC.) 10 May 2001 (2001-05-10) claims 1-84	1-21
A	WO 2008083393 A2 (STRATAGENE CALIFORNIA) 10 July 2008 (2008-07-10) claims 1-29	1-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/098118

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 13ter.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:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/098118

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	11136565	B2	05 October 2021	US	2020080065	A1	12 March 2020
				WO	2020056044	A1	19 March 2020
				US	2023011240	A1	12 January 2023
				US	2022282230	A1	08 September 2022
				EP	3850110	A1	21 July 2021
				EP	3850110	A4	08 June 2022
CN	112673098	A	16 April 2021	US	2022056424	A1	24 February 2022
				US	11560552	B2	24 January 2023
				JP	2022503427	A	12 January 2022
				ZA	202007838	B	26 April 2023
				CA	3103719	A1	07 May 2020
				WO	2020092830	A1	07 May 2020
				AU	2019374098	A1	07 January 2021
				MX	2020013347	A	28 April 2021
				IL	299237	A	01 February 2023
				KR	20210084349	A	07 July 2021
				US	2023212534	A1	06 July 2023
				BR	112020026658	A2	10 August 2021
				IL	279422	A	31 January 2021
				IL	279422	B1	01 January 2023
				IL	279422	B2	01 May 2023
				EP	3874036	A1	08 September 2021
				US	2020131484	A1	30 April 2020
				US	11104888	B2	31 August 2021
				SG	11202012493	WA	28 January 2021
US	2022145272	A1	12 May 2022	EP	3580352	A1	18 December 2019
WO	2018148723	A1	16 August 2018	None			
US	2022127587	A1	28 April 2022	EP	3580350	A1	18 December 2019
				EP	3580350	B1	18 November 2020
US	2004191825	A1	30 September 2004	US	2013203119	A1	08 August 2013
				US	8895283	B2	25 November 2014
				CA	2409417	A1	06 December 2001
				CA	2409417	C	09 December 2014
				US	2019078066	A1	14 March 2019
				US	10954495	B2	23 March 2021
				US	6627424	B1	30 September 2003
				EP	1283875	A1	19 February 2003
				EP	1283875	A4	29 December 2004
				EP	1283875	B1	25 July 2007
				ES	2291322	T3	01 March 2008
				US	2017198267	A1	13 July 2017
				US	10066218	B2	04 September 2018
				WO	0192501	A1	06 December 2001
				US	2003148330	A1	07 August 2003
				US	7919296	B2	05 April 2011
				JP	2003534796	A	25 November 2003
				JP	4405725	B2	27 January 2010
				DE	60129549	D1	06 September 2007
				DE	60129549	T2	24 April 2008

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/098118

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)	
				AU	2001275039	B2	13 July 2006
				JP	2010000089	A	07 January 2010
				ATE	368104	T1	15 August 2007
				US	2015218536	A1	06 August 2015
				US	9453208	B2	27 September 2016
				US	2014038237	A1	06 February 2014
				US	8900846	B2	02 December 2014
				US	7670808	B2	02 March 2010
				AU	7503901	A	11 December 2001
				US	2003162173	A1	28 August 2003
				US	7541170	B2	02 June 2009
				DK	1283875	T3	26 November 2007
				US	2011165654	A1	07 July 2011
				US	8415129	B2	09 April 2013

US	2011301041	A1	08 December 2011	None			

US	2018119115	A1	03 May 2018	US	10662413	B2	26 May 2020
				TW	201817872	A	16 May 2018
				TWI	658139	B	01 May 2019

WO	0132887	A1	10 May 2001	EP	1226255	A1	31 July 2002
				EP	1226255	B1	29 March 2006
				US	6946273	B1	20 September 2005
				AU	1239901	A	14 May 2001
				US	2005158730	A1	21 July 2005
				ATE	321867	T1	15 April 2006
				DE	60027040	D1	18 May 2006
				DE	60027040	T2	23 November 2006
				JP	2004500052	A	08 January 2004
				JP	4949585	B2	13 June 2012

WO	2008083393	A2	10 July 2008	JP	2010514453	A	06 May 2010
				JP	5386367	B2	15 January 2014
				EP	2097523	A2	09 September 2009
				EP	2097523	A4	03 February 2010
				EP	2097523	B1	29 October 2014
				US	2008227159	A1	18 September 2008
				US	9085762	B2	21 July 2015
				WO	2008083393	A3	09 October 2008

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:

A. 主题的分类 C12N9/12(2006.01)i; C12Q1/68(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)) CJFD,DWPI,CNABS,CNXTX;CNKI;WOTXT;USTXT;EPTXT;ENTXTC;ENTXT;万方;百度学术;BING;Pubmed;ISI web of knowledge;Elsevier Science Direct;Springerlink;NCBI;中国专利生物序列检索系统;STN;Pyrococcus abyssi,DNA聚合酶, 409,410,411,486, SEQ ID NO:1,L409,Y410,P411,A486,DNA sequencing		
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
X	US 11136565 B2 (SINGULAR GENOMICS SYSTEMS,INC.) 2021年10月5日 (2021 - 10 - 05) 摘要、权利要求1-20、说明书7-8、36、40-41、62-63、84-85栏、表1和表7、实施例1、5	1-21
X	CN 112673098 A (亿明达股份有限公司 等) 2021年4月16日 (2021 - 04 - 16) 权利要求1-85	1-21
X	US 2022145272 A1 (ISOPLEXIS CORPORATION) 2022年5月12日 (2022 - 05 - 12) 权利要求1-11	1-21
X	WO 2018148723 A1 (QIAGEN WALTHAM INC.) 2018年8月16日 (2018 - 08 - 16) 权利要求1-11	1-21
X	US 2022127587 A1 (ISOPLEXIS CORPORATION) 2022年4月28日 (2022 - 04 - 28) 摘要、权利要求1-12	1-21
A	US 2004191825 A1 (MJ BLOWWORKS,INC.) 2004年9月30日 (2004 - 09 - 30) 权利要求1-14	1-21
☒ 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 2023年11月28日		国际检索报告邮寄日期 2023年12月14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 周茂新 电话号码 (+86) 010-53961922

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	US 2011301041 A1 (LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION) 2011年12月8日 (2011 - 12 - 08) 权利要求1-15	1-21
A	US 2018119115 A1 (PERSONAL GENOMICS,INC.) 2018年5月3日 (2018 - 05 - 03) 权利要求1-20	1-21
A	WO 0132887 A1 (STRATAGENE) 2001年5月10日 (2001 - 05 - 10) 权利要求1-84	1-21
A	WO 2008083393 A2 (STRATAGENE CALIFORNIA) 2008年7月10日 (2008 - 07 - 10) 权利要求1-29	1-21

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/098118

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)
US	11136565	B2	2021年10月5日	US	2020080065	A1	2020年3月12日
				WO	2020056044	A1	2020年3月19日
				US	2023011240	A1	2023年1月12日
				US	2022282230	A1	2022年9月8日
				EP	3850110	A1	2021年7月21日
				EP	3850110	A4	2022年6月8日
CN	112673098	A	2021年4月16日	US	2022056424	A1	2022年2月24日
				US	11560552	B2	2023年1月24日
				JP	2022503427	A	2022年1月12日
				ZA	202007838	B	2023年4月26日
				CA	3103719	A1	2020年5月7日
				WO	2020092830	A1	2020年5月7日
				AU	2019374098	A1	2021年1月7日
				MX	2020013347	A	2021年4月28日
				IL	299237	A	2023年2月1日
				KR	20210084349	A	2021年7月7日
				US	2023212534	A1	2023年7月6日
				BR	112020026658	A2	2021年8月10日
				IL	279422	A	2021年1月31日
				IL	279422	B1	2023年1月1日
				IL	279422	B2	2023年5月1日
				EP	3874036	A1	2021年9月8日
				US	2020131484	A1	2020年4月30日
				US	11104888	B2	2021年8月31日
				SG	11202012493	WA	2021年1月28日
US	2022145272	A1	2022年5月12日	EP	3580352	A1	2019年12月18日
WO	2018148723	A1	2018年8月16日	无			
US	2022127587	A1	2022年4月28日	EP	3580350	A1	2019年12月18日
				EP	3580350	B1	2020年11月18日
US	2004191825	A1	2004年9月30日	US	2013203119	A1	2013年8月8日
				US	8895283	B2	2014年11月25日
				CA	2409417	A1	2001年12月6日
				CA	2409417	C	2014年12月9日
				US	2019078066	A1	2019年3月14日
				US	10954495	B2	2021年3月23日
				US	6627424	B1	2003年9月30日
				EP	1283875	A1	2003年2月19日
				EP	1283875	A4	2004年12月29日
				EP	1283875	B1	2007年7月25日
				ES	2291322	T3	2008年3月1日
				US	2017198267	A1	2017年7月13日
				US	10066218	B2	2018年9月4日
				WO	0192501	A1	2001年12月6日
				US	2003148330	A1	2003年8月7日
				US	7919296	B2	2011年4月5日
				JP	2003534796	A	2003年11月25日
				JP	4405725	B2	2010年1月27日
				DE	60129549	D1	2007年9月6日
				DE	60129549	T2	2008年4月24日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/098118

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)
				AU	2001275039	B2	2006年7月13日
				JP	2010000089	A	2010年1月7日
				ATE	368104	T1	2007年8月15日
				US	2015218536	A1	2015年8月6日
				US	9453208	B2	2016年9月27日
				US	2014038237	A1	2014年2月6日
				US	8900846	B2	2014年12月2日
				US	7670808	B2	2010年3月2日
				AU	7503901	A	2001年12月11日
				US	2003162173	A1	2003年8月28日
				US	7541170	B2	2009年6月2日
				DK	1283875	T3	2007年11月26日
				US	2011165654	A1	2011年7月7日
				US	8415129	B2	2013年4月9日
US	2011301041	A1	2011年12月8日	无			
US	2018119115	A1	2018年5月3日	US	10662413	B2	2020年5月26日
				TW	201817872	A	2018年5月16日
				TWI	658139	B	2019年5月1日
WO	0132887	A1	2001年5月10日	EP	1226255	A1	2002年7月31日
				EP	1226255	B1	2006年3月29日
				US	6946273	B1	2005年9月20日
				AU	1239901	A	2001年5月14日
				US	2005158730	A1	2005年7月21日
				ATE	321867	T1	2006年4月15日
				DE	60027040	D1	2006年5月18日
				DE	60027040	T2	2006年11月23日
				JP	2004500052	A	2004年1月8日
				JP	4949585	B2	2012年6月13日
WO	2008083393	A2	2008年7月10日	JP	2010514453	A	2010年5月6日
				JP	5386367	B2	2014年1月15日
				EP	2097523	A2	2009年9月9日
				EP	2097523	A4	2010年2月3日
				EP	2097523	B1	2014年10月29日
				US	2008227159	A1	2008年9月18日
				US	9085762	B2	2015年7月21日
				WO	2008083393	A3	2008年10月9日