(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 1993468 B
(45)授权公告日 2011.04.20

(21)申请号 200580026513.9

(22)申请日 2005.05.12

(30)优先权数据
166541/2004 2004.06.04 JP

(85)PCT申请进入国家阶段日
2007.02.05

(86)PCT申请的申请数据
PCT/JP2005/008711 2005.05.12

(87)PCT申请的公布数据
WO2005/118815 JA 2005.12.15

(73)专利权人 宝生物工程株式会社
地址 日本大津市

(72)发明人 佐藤好美 西胁一惠 岛田奈奈 外园成和 上森隆司 向井博之 加藤郁之进

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 郭文洁 梁谋

(51)Int.Cl.
C12N 15/54(2006.01)
C07K 16/40(2006.01)
C12N 9/10(2006.01)
C12Q 1/68(2006.01)

(56)对比文件
WO 0132887 A,2001.05.10, 全文.
WO 03054139 A,2003.07.03, 全文.
SOUTHWORTH M.W..cloning of thermostable DNA polymerases fromhyperthermophilic marine archaea withemphasis onthermococcus sp.9 degrees N-7 and mutations affection 3′ -5′ exonuclease activity.proc.acad. sci.U.S.A93 11.1996,93(11),5281-5285.

审查员 李振鹏

权利要求书 1 页 说明书 20 页 序列表 23 页
附图 2 页

(54)发明名称

具有DNA聚合酶活性的多肽

(57)摘要

一种具有高保真性DNA聚合酶活性并可用作基因工程试剂的多肽;编码该多肽的基因;生产该多肽的方法;以及通过使用该多肽扩增核酸的方法。

CN 1993468 B

1. 一种具有 DNA 聚合酶活性的多肽，其由选自下列的氨基酸序列组成：

(a) SEQ ID NO：16 的氨基酸序列；

(b) SEQ ID NO：24 的氨基酸序列；和

(c) SEQ ID NO：32 的氨基酸序列。

2. 编码权利要求 1 所定义多肽的核酸。

3. 根据权利要求 2 的核酸，其由 SEQ ID NO：15、23 或 31 的核苷酸序列组成。

4. 一种生产多肽的方法，该方法包括：

培养能生产多肽的细胞，和

从培养物中收集所述的多肽，

其中所述多肽具有 DNA 聚合酶活性，并且由选自下列的氨基酸序列组成：

(a) SEQ ID NO：16 的氨基酸序列；

(b) SEQ ID NO：24 的氨基酸序列；和

(c) SEQ ID NO：32 的氨基酸序列。

5. 一种扩增核酸的方法，该方法包括：

使用多肽扩增核酸，

其中所述多肽具有 DNA 聚合酶活性，并且由选自下列的氨基酸序列组成：

(a) SEQ ID NO：16 的氨基酸序列；

(b) SEQ ID NO：24 的氨基酸序列；和

(c) SEQ ID NO：32 的氨基酸序列。

6. 用于扩增核酸的组合物，其含有权利要求 1 所定义的多肽。

7. 含有权利要求 1 所定义的多肽的试剂盒。

8. 单克隆抗体，其特异性地识别权利要求 1 所定义的多肽，其中，该单克隆抗体是由利用权利要求 1 的多肽为抗原制备的杂交瘤产生的。

具有 DNA 聚合酶活性的多肽

技术领域

[0001] 本发明涉及用作基因工程的试剂的、具有高保真性 DNA 聚合酶活性的多肽、编码该多肽的基因、生产该多肽的方法，以及使用该多肽扩增核酸的方法。

背景技术

[0002] DNA 聚合酶是可用于基因工程的试剂、并广泛用于 DNA 测序、标记、定点诱变等等的酶。 由于聚合酶链反应 (PCR) 方法的发展，耐热的 DNA 聚合酶近来愈发受到关注。 已经开发并上市了适于 PCR 方法的多种 DNA 聚合酶。

[0003] 根据氨基酸序列相似性，通常可将当前已知的 DNA 聚合酶分成四个家族。 其中，家族 A(pol I 型酶) 和家族 B(α 型酶) 占大多数。 属于每个家族的 DNA 聚合酶通常具有相似的生化特性。 然而，详细的比较已显示各自酶在底物特异性、底物类似物的掺入、引物延伸能力的强度和速度、 DNA 合成的模式、伴随的外切核酸酶活性、最适反应条件 (温度、pH 等)、对抑制剂的敏感性等方面相互之间有不同的性能。 因此，已从目前的 DNA 聚合酶中选出并利用具有最适于实验方法的特性的 DNA 聚合酶。

[0004] 例如，来自激烈火球菌 (Pyrococcus furiosus) 的 DNA 聚合酶 (Pfu)(参见例如，专利文件 1-5) 是最耐热的 DNA 聚合酶之一。 其具有被称作校正活性的 3′ → 5′ 外切核酸酶活性，并且其在耐热酶中显示相对地高保真性。 然而，该酶也有尚待解决的问题，即如果用于 PCR 其需要长的扩增时间，并且因为其延伸速度和持续合成能力低，其不能用于长链的扩增。

[0005] 最近，可商购的称作 KOD DNA 聚合酶的聚合酶，其具有比 Pfu 来源的 DNA 聚合酶更高的 3′ → 5′ 外切核酸酶活性、更高的延伸速度和更高的持续合成能力 (参见例如，专利文件 6 和 7，非专利文件 1)。可使用该酶在短时间内进行具有高准确度的 PCR。然而，该酶有尚待解决的问题，即由于强的 3′ → 5′ 外切核酸酶活性降解引物或扩增产物，所以相对难于确定反应条件，并且不适于长链的扩增。

[0006] 此外，通过改良 KOD DNA 聚合酶已开发了两类酶。其中之一，KOD-Plus-DNA 聚合酶，能热启动 PCR 而不需要通过向 KOD DNA 聚合酶添加两种单克隆抗体以抑制在正常温度下的聚合酶活性和 3′ → 5′ 外切核酸酶活性的特殊步骤。 与 KOD DNA 聚合酶相比，通过优化反应缓冲液组合物提高扩增效率和合成长链 DNA 的能力，同时保留高保真性 (例如，专利文件 8)。然而，仍存在有待解决的问题，该酶的延伸速度比 KOD DNA 聚合酶低得多，并且降到与 Pfu 来源的 DNA 聚合酶相等的水平。

[0007] KOD Dash DNA 聚合酶是基于 Barnes 等方法制备的混合型 DNA 聚合酶 (参见例如，专利文件 9，非专利文件 2)。 通过以最佳比例将 KOD DNA 聚合酶和已使用基因工程技术从中除去 3′ → 5′ 外切核酸酶活性的修饰型的 KOD DNA 聚合酶混合，提高扩增效率和延伸能力 (参见例如，专利文件 10)。 其延伸速度象 KOD DNA 聚合酶一样高。然而，还是存在有待解决的问题，由于 3′ → 5′ 外切核酸酶活性相对降低，所以与 KOD DNA 聚合酶相比，保真性显著降低。

[0008] 专利文件 1：美国专利 No.5489523

[0009] 专利文件 2：美国专利 No.5545552

[0010] 专利文件 3：美国专利 No.5866395

[0011] 专利文件 4：美国专利 No.6489150

[0012] 专利文件 5：美国专利 No.5948663

[0013] 转录文件 6：美国专利 No.6054301

[0014] 专利文件 7：美国专利 No.6225065

[0015] 专利文件 8：美国专利公开 No.2002/0076768

[0016] 专利文件 9：美国专利 No.5436149

[0017] 专利文件 10：美国专利 No.6008025

[0018] 非专利文件 1：Barnes W.M.， Proc.Natl.Acad.Sci.USA， vol.91， No.6， p.2216-2220(1994)

[0019] 非专利文件 2：Takagi M.， 等， Appl.Environ.Microbiol.， vol.63， No.11， p.4504-4510(1997)

[0020] 发明的公开

[0021] 本发明将要解决的问题

[0022] 本发明的主要目的是提供可用于克隆、测序和核酸扩增的具有高保真性 DNA 聚合酶活性的多肽，以及编码该多肽的基因。 本发明的另一个目的是提供一种生产具有 DNA 聚合酶活性的多肽的方法以及使用具有 DNA 聚合酶活性的多肽用于扩增核酸的方法。

[0023] 解决问题的方法

[0024] 通过深入的研究，本发明人从热球菌 (Thermococcus) 属的超嗜热古细菌中发现了一种具有 DNA 聚合酶活性的新的多肽，其具有优于任何其它常规 DNA 聚合酶的性能。 此外，本发明人克隆了编码具有这种活性的多肽的基因，并且发现了生产该多肽的方法。 因此，已经完成了本发明。

[0025] 本发明的第一个方面涉及具有 DNA 聚合酶活性的多肽，其具有选自下列的氨基酸序列、或具有在所述氨基酸序列中缺失、插入、添加或取代一个或几个氨基酸的氨基酸序列：

[0026] (a) SEQ ID NO：16 的氨基酸序列；

[0027] (b) SEQ ID NO：24 的氨基酸序列；和

[0028] (c) SEQ ID NO：32 的氨基酸序列。

[0029] 本发明的第二个方面涉及一种编码第一方面的多肽的核酸。

[0030] 第二个方面的核酸可以是具有 SEQ ID NO：15、23 或 31 的核苷酸序列，或者其一部分的核酸。 其可以是编码具有 DNA 聚合酶活性的多肽的核酸，其在严格条件下和与上述核酸互补的核苷酸序列构成的核酸杂交。

[0031] 本发明的第三个方面涉及一种生产多肽的方法，该方法包括：

[0032] 培养能产生多肽的细胞，和

[0033] 从培养物中收集所述多肽，

[0034] 其中所述多肽具有 DNA 聚合酶活性，并且具有选自下列的氨基酸序列或具有在

所述氨基酸序列中缺失、插入、添加或取代一个或几个氨基酸的氨基酸序列：

[0035] (a) SEQ ID NO：16 的氨基酸序列；

[0036] (b) SEQ ID NO：24 的氨基酸序列；和

[0037] (c) SEQ ID NO：32 的氨基酸序列。

[0038] 本发明的第四个方面涉及一种扩增核酸的方法，该方法包括：

[0039] 使用多肽扩增核酸，

[0040] 其中所述多肽具有 DNA 聚合酶活性，并且具有选自下列的氨基酸序列或具有在所述氨基酸序列中缺失、插入、添加或取代一个或几个氨基酸的氨基酸序列：

[0041] (a) SEQ ID NO：16 的氨基酸序列；

[0042] (b) SEQ ID NO：24 的氨基酸序列；和

[0043] (c) SEQ ID NO：32 的氨基酸序列。

[0044] 本发明的第五个方面涉及一种含有第一方面的多肽的组合物。

[0045] 本发明的第六个方面涉及一种含有第一方面的多肽的试剂盒。

[0046] 本发明的第七个方面涉及一种结合第一方面的多肽的抗体。

[0047] 发明的效果

[0048] 本发明提供一种可用于克隆、测序和核酸扩增的具有高保真性 DNA 聚合酶活性的多肽，编码该多肽的基因，以及用于生产具有所述 DNA 聚合酶活性的多肽的方法。使用具有本发明的 DNA 聚合酶活性的多肽，即使将其用于包括许多循环的 PCR 也可获得具有较低错误率的扩增产物。因此，其可用于以低拷贝数量存在的靶核酸的分析或鉴定。

[0049] 附图简述

[0050] 图 1 说明 DNA 聚合酶活性和反应温度之间的关系。在图中，◇、△和○分别代表 Tks DNA 聚合酶、Tce DNA 聚合酶和 Tsi DNA 聚合酶的结果。

[0051] 图 2 说明 DNA 聚合酶活性和 pH 之间的关系。在图中，◇、△和○分别代表 Tks DNA 聚合酶、Tce DNA 聚合酶和 Tsi DNA 聚合酶的结果。

[0052] 完成本发明的最佳方式

[0053] 如这里所使用的，具有 DNA 聚合酶活性的多肽指根据模板 DNA 的核苷酸序列掺入四种脱氧核糖核苷三磷酸（dATP、dGTP、dCTP 和 dTTP）并且催化与模板 DNA 互补的 DNA 链聚合的多肽。

[0054] 如这里所使用的，引物延伸的适合性指擅长使用引物与单链模板 DNA 退火形成的复合物作为底物从引物合成 DNA 的能力。例如对单链 DNA 的高亲和力。预计具有对单链 DNA 高亲和力的 DNA 聚合酶使核酸扩增反应中的高灵敏度。因此，其可用于从以低拷贝数量存在的模板核酸扩增核酸的反应。DNA 聚合酶对单链 DNA 亲和力的示例性的指标是对 M13 噬菌体单链 DNA 的 Km 值。该 Km 值优选地是 2.5μg/ml 或更小，更优选地 2.0μg/ml 或更小，更优选地 1.5μg/ml 或更小。

[0055] 如这里所使用的，高保真性指在用 DNA 聚合酶的 DNA 合成反应中高度准确的核苷酸掺入。其测定方法的实例包括 Kunkel 法（J.Biol.Chem.1985 May 10；260(9)：5787-96）、测序法以及 Cline 等的方法（Nucleic Acids Res.1996Sep 15；24(18)：3546-51）。在这些方法中，测序法是最可靠的。尽管不作为对本发明的限制，例如，但是可根据下列步骤估计保真性：使用嗜热栖热菌（Thermus thermophilus）HB-8 的基因组

DNA 作为模板以及 DNA 聚合酶进行 PCR；将扩增产物克隆到载体 pUC118 中；测定多个克隆中约 500-bp 扩增片段的核苷酸序列；测定认为是错误的核苷酸的数量；以及测定总的所测核苷酸中错误核苷酸的百分率。

[0056] 在下文中，将详细描述本发明。

[0057] (1) 具有本发明的 DNA 聚合酶活性的多肽以及编码该多肽的基因

[0058] 具有本发明的 DNA 聚合酶活性的多肽是比 Pfu 来源的 DNA 聚合酶和 KOD 来源的 DNA 聚合酶更适于引物延伸，并且在 DNA 合成上非常准确的多肽。 具有本发明的 DNA 聚合酶活性的多肽在可使用 PCR 法扩增的 DNA 链长度和反应的保真性上比 Pyrobest DNA 聚合酶 (Takara Bio)（来自典型的高保真性耐热 DNA 聚合酶，Pfu 来源的 DNA 聚合酶）、KOD DNA 聚合酶、KOD dash DNA 聚合酶以及 KOD plusDNA 聚合酶（所有都来自 Toyobo）更优秀。

[0059] 本发明的 DNA 聚合酶的理化特性如下：

[0060] (i) 分子量：根据通过 SDS-PAGE 法测定，约 85-90 千道尔顿

[0061] (ii) 最适温度：75-85℃

[0062] (iii) 最适 pH：5.5-6.5(75℃)

[0063] 关于具有本发明的 DNA 聚合酶活性的多肽没有特殊限制，只要其具有上述理化特征。 例如，其可从热球菌属某种 (Thermococcus sp.)KS-1（下文称作 Tks）、Thermococcus siculi（下文称作 Tsi）和速生 热球菌 (Thermococcus celer)（下文称作 Tce）中获得。

[0064] 具有本发明的 DNA 聚合酶活性的多肽可由 SEQ ID NO：16、24 或 32 的氨基酸序列构成，或者其可以是具有基本上相同活性的功能等同物。 可在天然存在的多肽中产生突变，如氨基酸序列中氨基酸的缺失、插入、添加或取代。 这种突变可能是由于编码多肽的基因的多态性或突变，或者由于多肽在体内或在合成后的纯化期间的修饰反应所产生的。 已知这种突变的多肽可能仍然显示与无突变的多肽基本上相同的生理或生化活性即可。 本发明也包括这种尽管在结构上有差别，但在功能或活性上没有发现显著差别的功能等同物。 关于突变的氨基酸的数量没有特殊限制，只要多肽显示基本上相同的生理或生物活性。 例如可以是 1 个或以上突变（缺失、插入、添加、取代等），例如 1 到几个，更具体地 1 到 10 个核苷酸。 这可用于将这种突变人为地引入到多肽的氨基酸序列中的实例。 在这种情况中，可产生更多不同的突变体。

[0065] 当使用基因工程技术生产多肽时，经常将其表达为融合多肽。 例如，为了提高多肽的表达水平，可在目的多肽的 N 末端添加来自另一个多肽的 N 末端肽。 在另一种情况中，可在目的多肽的 N 末端或 C 末端添加适当的肽链（例如，组氨酸标签、谷胱甘肽 -S- 转移酶），然后表达多肽。 由此，通过使用具有对肽链有亲和力的载体便于目的多肽的纯化。 具有与本发明的 DNA 聚合酶部分不同的氨基酸序列的 DNA 聚合酶可作为“功能等同物”在本发明的范围内，只要其显示与本发明的 DNA 聚合酶基本等同的活性即可。

[0066] 编码具有本发明的 DNA 聚合酶活性的多肽的 DNA 包括含有编码 SEQ ID NO：16、24 或 32 的氨基酸序列，或其部分的核苷酸序列的 DNA（例如，含有 SEQ ID NO：15、23 或 31，或其部分的核苷酸序列的 DNA）。 也包括编码具有作为 DNA 聚合酶功能

的多肽的DNA，其由在SEQ ID NO：16、24或32的氨基酸序列中缺失、插入、添加或取代1个或多个，例如1到几个，更具体地1到10个氨基酸的氨基酸序列构成。同样地，编码具有DNA聚合酶功能的多肽、能在严格条件下和与这种DNA互补的核苷酸序列构成的DNA杂交的核苷酸序列也包含在本发明的范围内。例如，“严格条件”指在68℃在含有0.5％ SDS、5×Denhardt′ s和100μg/ml变性的鲑精DNA的6×SSC(1×SSC：0.15M NaCl、0.015M柠檬酸钠，pH7.0)中与探针孵育12-20小时的条件。例如，可在68℃在含有0.5％ SDS的0.1×SSC中洗涤后检测与探针杂交的DNA。

[0067] 本发明的基因可含有编码称作内含肽区的序列，其在翻译成多肽后从多肽中自动切除。本发明也包括含有这种序列的DNA，只要其编码具有DNA聚合酶活性的多肽即可。

[0068] 尽管不作为对本发明的限制，但是例如，“具有DNA聚合酶活性的多肽”优选地是显示上述各种理化特性的具有DNA聚合酶活性的多肽。

[0069] 下面解释如这里所使用的表述“含有编码氨基酸序列的核苷酸序列的DNA”。已知每个氨基酸有1-6个密码子（三个碱基的组合），其中密码子定义基因中的氨基酸。因此，根据所编码的氨基酸序列，编码一个特定的氨基酸序列的DNA可以有多个。

[0070] 此外，如果使用各种基因工程技术，那么人工产生编码同一氨基酸序列的各种基因不困难。例如，如果在编码目的多肽的原始基因中所使用的密码子在有待通过基因工程技术生产多肽的宿主中是使用率低的密码子，那么多肽的表达水平可能很低。在这种情况下，将密码子人为地转换成在宿主中经常使用的密码子，由此不改变所编码的氨基酸序列，旨在提高目的多肽的表达水平（例如，JP-B 7-102146)。如上所述，能人为地产生编码一种特定氨基酸序列的各种基因，当然，实际上可以产生。因此，本发明可包括编码这里所公开的氨基酸序列，但不具有与这里所公开的核苷酸序列相同的核苷酸序列的基因。

[0071] 本发明的具有DNA聚合酶活性的多肽适于体外引物延伸。例如，当使用引物与单链DNA退火的底物（HT引物（SEQ ID NO：33）与M13单链DNA退火的底物；下文也称作M13/HT引物底物或引物延伸型底物）测定DNA聚合酶活性时，观察到核苷酸掺入的活性高于使用通常用作活性测定的活化的DNA(DNA酶I处理的小牛胸腺DNA)时所观察到的活性。

[0072] 就使用M13/HT引物底物所测定的DNA聚合酶活性（下文也称作延伸活性）与使用活化的DNA作为底物所测定的DNA聚合酶活性（下文也称作掺入活性）的比值（延伸活性／掺入活性）而言，利用具有本发明的DNA聚合酶活性的多肽所得的比值高于利用来自激烈火球菌(Pyrococcus furiosus)(Pfu DNA聚合酶；Stratagene)、来自水生栖热菌(Thermus aquaticus)的Taq DNA聚合酶(TaKaRa Taq，Takara Bio)或者来自Thermococcus kodakaraensis的KOD DNA聚合酶(KODDNA聚合酶，Toyobo)的已知DNA聚合酶所得的比值。

[0073] 当向使用M13/HT引物底物的反应系统中添加作为竞争性底物的活化的DNA时，强烈抑制上述三种DNA聚合酶的引物延伸活性。在另一方面，仅轻微抑制具有本发明的DNA聚合酶活性的多肽，证明该多肽具有对引物延伸型底物的高亲和力。

[0074] 具有本发明的DNA聚合酶活性的多肽的M13噬菌体单链DNA的Km值为2μg/

ml 或更低的事实也表明该多肽具有对引物延伸型底物的高亲和力。

[0075] (2) 产生具有本发明的 DNA 聚合酶活性的多肽的方法

[0076] 例如，可从 Tks、 Tsi 或 Tce 株的培养物中，或者从将编码多肽的基因转移到其中的转化体中大量生产具有本发明的 DNA 聚合酶活性的多肽。

[0077] 可使用生产本发明多肽的微生物的基因组 DNA 作为起始材料，获得编码本发明多肽的 DNA。 关于制备基因组 DNA 的方法没有特殊限制。 在一个示例性的方法中，在 85℃厌氧条件下培养热球 (Thermococcus) 属的古细菌、裂解培养的细胞以及提取 DNA 并纯化。 可使用已知方法用于基因克隆的各种步骤，如用限制酶裂解所获得的 DNA 的方法。 这些方法详细描述于 J.Sambrook 等， MolecularCloning， A Laboratory Manual，3rd ed.，2001， Cold Spring HarborLaboratory。

[0078] 可在适当的培养条件下（例如，在大肠杆菌宿主的情况中，在 LB 培养基（10g/l 胰蛋白胨、5g/l 酵母提取物、5g/l NaCl，pH7.2)），通过培养用整合了编码具有 DNA 聚合酶活性的多肽的核酸（例如，非限定性的，具有 SEQ ID NO：15、23 或 31 的核苷酸序列的核酸）或其部分的重组质粒转化的转化体，在细胞中表达具有本发明的 DNA 聚合酶活性的多肽。 通过进行，例如，超声处理、加热，以及使用阳离子交换柱、亲和载体柱、凝胶过滤柱、阴离子交换柱等等的层析可从所培养的细胞中获得多肽。

[0079] 如通过 SDS-PAGE 测定，这样获得的具有本发明的 DNA 聚合酶活 性的多肽的分子量是约 85-90 道尔顿。

[0080] 具有本发明的 DNA 聚合酶活性的多肽在 75℃ Tris 缓冲液中所显示的最适 pH 为 pH5.5-6.5。 当在各种温度测定 DNA 聚合酶的酶促活性时，其显示在 75-85℃具有高度活性。 具有本发明的 DNA 聚合酶活性的多肽非常耐热。

[0081] 具有本发明的 DNA 聚合酶活性的多肽伴有 3′ → 5′ 外切核酸酶活性。 外切核酸酶活性相对于 DNA 聚合酶活性的程度超过 Pfu DNA 聚合酶的活性比，由于其高度外切核酸酶活性，已知导致在 DNA 合成上非常高的准确性。 对于具有本发明的 DNA 聚合酶活性的多肽，在所测定的 DNA 合成反应期间发生错误的频率低于来自 Pfu 的 DNA 聚合酶。 上述各种特性显示本发明的 DNA 聚合酶作为基因工程（例如，对于 PCR 法）的试剂非常优秀。

[0082] (3) 使用本发明的 DNA 聚合酶扩增核酸的方法，以及用于该方法的组合物和试剂盒

[0083] 具有本发明的 DNA 聚合酶活性的多肽的特征是，其具有高保真性并且适于引物延伸。 由此，本发明提供使用该多肽用于准确扩增、分析或鉴定靶核酸的方法，以及用于该方法的组合物和试剂盒。

[0084] 由于上述特点，具有本发明的 DNA 聚合酶活性的多肽在 PCR 方法中显示非常优良的性能。 例如，使用用于 PCR 方法的来自 Thermococcus kodakaraensis (KOD DNA 聚合酶， Toyobo) 的 DNA 聚合酶很难扩增 6k 碱基对或更长的 DNA 片段。 只有与其它 DNA 聚合酶联合使用才能扩增 15k 碱基对或更长的 DNA 片段。 单独使用本发明的 DNA 聚合酶即可扩增 15k 碱基对的 DNA 片段，而不需要添加其它酶。

[0085] 含有本发明多肽的组合物或试剂盒优于含有常规的 DNA 聚合酶或含有多个 DNA 聚合酶的组合物或试剂盒（例如，含有 KOD DNA 聚合酶的组合物或试剂盒；含有 KOD

dash DNA 聚合酶的组合物或试剂盒；或者含有 KOD plus DNA 聚合酶的组合物或试剂盒），可用于准确扩增、分析或鉴别靶核酸。

[0086] 上述组合物或试剂盒，例如可以是含有具有本发明的 DNA 聚合酶活性的多肽、优化多肽的缓冲液、四种 dNTP 以及二价阳离子的组合物或试剂盒。 其可进一步含有用于扩增和 / 或检测靶核酸的一组引物。

[0087] 本发明提供结合本发明的多肽的抗体。 关于抗体没有特别限制， 只要其能识别并特异性结合本发明的多肽即可。 其可以是多克隆抗体或单克隆抗体。 此外，本发明也包括具有与上述抗体相同的识别特征的抗体片段（例如， Fab 片段）、单链抗体等等。

[0088] 可根据已知方法， 如在 Current Protocols in Immunology，1992， John Wiley&Sons， Inc 中所描述的方法，可利用作为抗原的本发明的多肽或其部分免疫小鼠或兔制备本发明的抗体。 此外，可根据常规方法通过利用所免疫的动物中所收集的抗体生产细胞中产生杂交瘤，制备单克隆抗体。

[0089] 可使用抗体用于本发明多肽进行检测或纯化。 另外，其可用于抑制多肽的活性，如 DNA 聚合酶活性或 3′ → 5′ 外切核酸酶活性。 例如，能抑制 DNA 聚合酶活性的抗体可在 PCR 中用于在反应开始前抑制低温时从非特异性退火的引物开始的 DNA 延伸。此外，能抑制 3′ → 5′ 外切核酸酶活性的抗体，例如可在 PCR 中用于抑制反应开始前的引物的降解。

[0090] 实施例

[0091] 下列实施例更详细地举例说明本发明，但是不应当被解释为限制其范围。

[0092] 实施例 1

[0093] 根据下列方法制备用于测定实施例中 DNA 聚合酶活性的活化的 DNA。

[0094] 简要地，通过用 DNA 酶 I 处理以活化鲑精 DNA(Sigma) 或小牛胸腺 DNA(Worthington)。 该方法是基于 C.C.Richardson 在 D.R.Davis（编辑），“DNA polymerase from Escherichia coli”， pp.263-276， Harper&Row 中所描述的方法。

[0095] 根据下列方法测定 DNA 聚合酶的活性。

[0096] 简要地，将进行活性测定的标本在 74℃，在 50μl 用于活性测定的反应混合物 (20mM Tris- 盐酸缓冲液 (pH8.3)、10mM 氯化钾、6mM 硫酸铵、2mM 氯化镁、0.1％ Triton X-100、0.001％牛血清白蛋白、dATP、dGTP 和 dCTP 各 200μM、100μM dTTP、0.238μM[^{3}H]- 甲基 TTP、0.4mg/ml 活化的鲑精 DNA) 中反应 5 分钟。

[0097] 反应后，向其中添加 500μl 含有 2％ Nappi(Nacalai Tesque) 的 20％三氯乙酸 (TCA) 和 500μl 剪切的 DNA。 在冰上放置 15 分钟或更长时间后，在玻璃滤器 (Whatman) 上收集混合物。 将玻璃滤器用 5ml 含有 2％ Nappi 的 5％ TCA 洗涤七次，随后用乙醇洗涤并干燥，使用液体闪烁计数器测定放射性。 根据上述酶活性测定方法，将在 30 分钟内将总共 10nmol 的核苷酸掺入到不溶于酸的沉淀中的酶活性定义为 1U。

[0098] 实施例 2

[0099] 根据下列方法从热球菌属 (Thermococcus sp.)KS-1(JCM11816)、速生热球菌 (Thermococcus celer)(JCM8558) 和 Thermococcus siculi(DSMZ12349) 中制备基因组 DNA。

[0100] 简要地，将 10ml 所购买的培养物以 8,000rpm 离心 10 分钟。将所得的上清液以及

在上清液和沉淀之间界面上的深色层进一步以 15,000rpm 离心 10 分钟。 将所得的沉淀在 0.8ml 的 20％蔗糖、50mMTris- 盐酸缓冲液 (pH8.0) 中悬浮。 向其中添加 0.16ml 500mM EDTA(pH8.0) 和 0.08ml 10mg/ml 溶菌酶氯化物 (Nacalai Tesque) 水溶液。 将混合物在室温下反应 2 小时。

[0101] 反应后，向反应混合物中添加 6.4ml 含有 150mM NaCl、1mMEDTA 和 20mM Tris-HCl 缓冲液 (pH8.0) 的溶液，0.08ml 20mg/ml 蛋白酶 K(Takara Bio) 以及 0.4ml 10％月桂基硫酸钠水溶液。 将所得的混合物在 37℃孵育 1 小时。 然后向其中添加等体积的 100mM Tris- 盐酸缓冲液 (pH8.0) 饱和酚 / 氯仿 / 异戊醇混合物 (25 ： 24 ： 1， v/v)。将混合物轻轻混合 10 分钟，然后以 10,000xg 离心 10 分钟两次。 离心后，将这样获得的上清液进行乙醇沉淀，将沉淀溶于 0.1ml TE 缓冲液以获得基因组 DNA 溶液。

[0102] 实施例 3

[0103] (1)DNA 聚合酶中间部分的克隆

[0104] 根据各种耐热 DNA 聚合酶的氨基酸序列之间的保守部分，使用 DNA 合成仪合成寡核苷酸 TPPolBF4、TPPolBF5、TTPolBR1 和 TTPolBR4(SEQ ID NOS ： 1-4)。

[0105] 使用在实施例 2 中制备的 250ng 热球菌属 (Thermococcus sp.)KS-1 的基因组 DNA 作为模板，以及引物 (每个 50pmol)TPPolBF4 和 TTPolBR1、TPPolBF4 和 TTPolBR4，或者 TPPolBF5 和 TTPolBR1 的组合，在 100μl 的体积中进行 PCR。 根据所附的说明，使用 TaKaRa ExTaq(Takara Bio) 作为 PCR 的 DNA 聚合酶。 进行如下的 PCR 反应 ： 94℃，3 分钟 ；以及 40 个 94℃ 30 秒钟，50℃ 30 秒钟和 72℃ 2 分钟的循环。

[0106] 反应后，将反应混合物用酚处理并用 Microcon-100(Takara Bio) 除去引物并浓缩所扩增的 DNA 片段。

[0107] 通过直接测序测定浓缩的扩增片段 TPPolBF4-TTPolBR1(3kb)、TPPolBF4-TTPolBR4(2kb) 和 TPPolBF5-TTPolBR1(0.7kb) 的核苷酸序列，并且与各种耐热 DNA 聚合酶的氨基酸序列进行比较。 结果，其显示热球菌属 (Thermococcus sp.)KS-1DNA 聚合酶含有内含肽序列。

[0108] (2)DNA 聚合酶基因上游部分的克隆

[0109] 根据在实施例 3-(1) 中所测定的核苷酸序列，合成用于克隆上游部分的特异性寡核苷酸 Tks01(SEQ ID NO ： 5)。 另外，合成如在表 1 中所示的 32 个引物。 表 1 中的标签序列如 SEQ ID NO ： 6 所示。

[0110] 表 1

[0111]

5'- 标签序列 -NN-SSSSSSS-3'

(N: G、A、T 和 C 的混合物；S 代表下面的核苷酸序列)

No.	核苷酸序列	No.	核苷酸序列	No.	核苷酸序列
1	gcccaaa	13	gccgtat	25	gtggaca
2	gctcata	14	gggattt	26	gtcccaa
3	gtggcga	15	gtcaagc	27	gctgcta
4	gaaagcc	16	gcgttat	28	ggcgggc
5	gaggtag	17	gggcaag	29	gccgtcg
6	gcttttg	18	gatcatc	30	gaaccgt
7	gtatccg	19	gtagcgg	31	gttccac
8	ggacggt	20	gcgtgct	32	ggtgcag
9	gcaaaac	21	gcgttca		
10	gatcatc	22	gggcgaa		
11	gtgccgc	23	gtcttca		
12	gcgggcg	24	gggtaaa		

[0112] 在 50μl 反应混合物中进行 PCR，每个反应混合物含有在实施例 2 中制备的 1ng 热球菌属 (Thermococcus sp.) KS-1 基因组 DNA 作为模板、10pmol Tks01 和 10pmol 表 1 中所列 32 个引物之一的组合、20mMTris- 乙酸缓冲液 (pH8.5)、50mM 乙酸钾、3mM 乙酸镁、0.01% BSA、dNTP 各 300μM 以及 1.25U TaKaRa Ex Taq DNA 聚合酶 (TakaraBio)。进行如下 PCR：在 94℃孵育 3 分钟；以及 40 个 98℃ 10 秒钟，50℃ 10 秒钟和 72℃ 40 秒钟的循环。将每个 PCR 产物的部分进行琼脂糖凝胶电泳。使用 Microcon-100 (Takara Bio) 从所选的用于产生单一条带的反应混合物中除去引物并浓缩反应混合物。对浓缩物进行直接测序以筛选含有 DNA 聚合酶上游部分的片段。结果，显示约 1300-bp PCR 扩增的片段 Tks012G 含有目的 DNA 聚合酶基因的上游部分。此外，进一步证实该片段含有与实施例 3-(1) 不同的内含肽序列。

[0113] 根据 Tks012G 的序列，合成用于克隆起始密码子附近更上游部分的特异性寡核苷酸 Tks04 (SEQ ID NO：7)。使用在实施例 2 中制备的 1ng 热球菌属 (Thermococcus sp.) KS-1 基因组 DNA 作为模板，以及 10pmol Tks04 和 10pmol 表 1 中所列 32 个引物之一的组合在 50-μl 反应混合物中进行 PCR。PCR 的条件和纯化方法如上所述。将扩增的片段进行直接测序以筛选含有 DNA 聚合酶上游部分的片段。结果，显示约 1800-bp PCR 扩增片段 Tks041B 含有目的 DNA 聚合酶基因的起始密码子附近的部分。

[0114] (3) DNA 聚合酶下游部分的克隆

[0115] 根据实施例 3-(1) 中测定的核苷酸序列，合成用于克隆上游部分的特异性寡核苷酸 Tks02 (SEQ ID NO：8)。使用在实施例 2 中制备的 1ng 热球菌属 (Thermococcus sp.) KS-1 基因组 DNA 作为模板，以及 10pmolTks02 和 10pmol 表 1 中所列 32 个引物之一的组合进行 PCR。PCR 的条件如上所述。将每个 PCR 产物的部分进行琼脂糖凝胶电泳。回收约 2500-bp 的 Tks022D DNA 片段，用 T4DNA 聚合酶 (Takara Bio) 平末端化并用 T4DNA 连接酶 (Takara Bio) 连接到已用 HincII (Takara Bio) 消化的 pUC118 (Takara Bio) 上。使用该质粒转化大肠杆菌 (Escherichiacoli) JM109。培养转化体以获得具有插入约 2500-bp

DNA 片段的质粒 pTks022D，测定所插入的 DNA 片段的核苷酸序列。

[0116] (4) 表达 DNA 聚合酶的质粒的构建

[0117] 已证明在热球菌属 (Thermococcus sp.)KS-1DNA 聚合酶的序列中含有两个内含肽序列。

[0118] 然后，构建除去了内含肽序列的 DNA 聚合酶基因。

[0119] 根据实施例 3-(3) 中所测定的序列，合成寡核苷酸 TksNde、Tks1EndBg、Tks2StaBg、Tks2EndBal、Tks3StaBal 和 TksBgPs(SEQ IDNOS：9-14)。

[0120] 使用在实施例 2 中制备的 100ng 热球菌属 (Thermococcus sp.)KS-1 基因组 DNA 作为模板，以及引物（每种 20pmol)TksNde 和 Tks1EndBg(TksA)、Tks2StaBg 和 Tks2EndBal(TksB) 或者 Tks3StaBal 和 TksBgPs(TksC) 的组合，在 100μl 的体积中进行 PCR。根据所附的说明，使用 Pyrobest(Takara Bio) 作为 PCR 的 DNA 聚合酶。进行如下反应：94℃ 30 秒钟，50℃ 30 秒钟以及 72℃ 3 分钟，如此 40 个循环。然后，获得下列扩增的 DNA 片段：约 1.3-kb TksA；约 0.3-kb TksB；以及约 0.9-kb TksC。另外，在上述条件下以类似方式使用 1μl PCR 反应混合物 TksB 和 1μl PCR 反应混合物 TksC 的混合物作为模板，以及 20pmol Tks2StaBg 和 20pmol TksBgPs(TksD) 作为引物，在 100μl 体积中进行 PCR。然后，获得约 1.2-kb 扩增的 DNA 片段 TksD。

[0121] DNA 片段 TksA 用限制酶 NdeI 和 BglII 消化。DNA 片段 TksD 用限制酶 BglII 和 PstI 消化。根据常规方法将它们连接到已用限制酶 NdeI 和 PstI 消化的 pTV119Nd(pTV119N 中的 NcoI 位点转化成 NdeI 位点的质粒）中以构建质粒 pTks59。将该质粒称作并表示为 Tks59，并于 2004 年 5 月 14 日（原始保藏日期）保藏在国际专利生物保藏中心，国立高等工业科学和技术学院，AIST Tsukuba 中心 6，1-1，Higashi 1-Chome，Tsukuba-shi，Ibaraki-ken 305-8566，日本，保藏号 FERM BP-10312。

[0122] (5) 含有 DNA 聚合酶基因的 DNA 片段的核苷酸序列的测定

[0123] 根据双脱氧法测定实施例 3-(4) 中所获得的插入到 pTks59 中的 DNA 片段的核苷酸序列。

[0124] 所测定的核苷酸序列的分析显示，存在可能编码目的 DNA 聚合酶的可读框。可读框的核苷酸序列如 SEQ ID NO：15 所示。从核苷酸序列中推定的 DNA 聚合酶的氨基酸序列如 SEQ ID NO：16 所示。

[0125] (6) 热球菌属 (Thermococcus sp.)KS-1DNA 聚合酶基因的表达

[0126] 将用 pTks59 转化的大肠杆菌 (Escherichia coli)JM109 接种到含有 100μg/ml 氨苄青霉素的 5ml LB 培养基（1％胰蛋白胨、0.5％酵母提取物、0.5％氯化钠）中并在 37℃ 培养 6 小时。将 50μl 培养物接种到含有 100μg/ml 氨苄青霉素和 1mM IPTG 的 5ml LB 培养基中，在 37℃震荡过夜培养。培养后，将通过离心收集的细胞悬于 36μl 超声处理缓冲液 (50mM Tris- 盐酸 (pH 8.0)、2mM 2- 巯基乙醇、10％甘油）中并进行超声处理。将超声处理的悬液通过在 12,000rpm 离心 10 分钟所获得的上清液在 80℃加热 10 分钟，然后再次在 12,000rpm 离心 10 分钟以收集上清液作为加热过的上清液。

[0127] 根据实施例 1 中所述的方法测定加热的上清的酶活性。结果，观察到有 DNA 聚合酶活性。

[0128] (7) 纯化的 DNA 聚合酶制剂的制备

[0129] 将用实施例 3-(5) 中所获得的质粒 pTks59 转化的大肠杆菌 JM109 接种到 400ml 含有 50μg/ml 氨苄青霉素和 0.1％葡萄糖的 LB 培养基中，并在 37℃震荡过夜培养。 将整个培养物加到含有 50μg/ml 氨苄青霉素的 20 升 LB 培养基中并在 37℃培养到 OD660 为 1.0。 当 OD600 达到 1.0 时，添加 IPTG 至终浓度为 0.2mM，继续在 37℃培养 4 小时。 培养后，将通过离心收集的细胞在 732ml 缓冲液 A(50mM Tris- 盐酸缓冲液 (pH7.5)、2mM EDTA、2mM 二硫苏糖醇、1mM 苯甲基磺酰氟) 中悬浮并进行超声处理。 将超声处理过的悬液在 12,000rpm 离心 30 分钟。 向所得的上清液中添加硫酸铵至终浓度为 0.2M。 将混合物在 75℃加热 15 分钟并使其在 0℃放置 30 分钟。 将其再次在 12,000rpm 离心 30 分钟。 使用聚乙烯亚胺和硫酸铵沉淀除去上清液中的核酸，并用 2 升缓冲液 B(50mM Tris- 盐酸缓冲液 (pH7.5)、1mM EDTA、10％甘油、1mM 二硫苏糖醇、1mM 苯甲基磺酰氟) 透析 2 次，每次 2 小时并过夜透析一次。 透析后，将 200ml 酶溶液加到用缓冲液 B 平衡的磷酸纤维素 P-11 柱 (Whatman) 上。 使用 FPLC 系统 (AmershamPharmacia Biotech)，用 0-500mM 磷酸钾缓冲液 (pH7.5) 的线性梯度进行洗脱。

[0130] 将洗脱的 DNA 聚合酶级分用 1 升缓冲液 C(20mM Tris 盐酸缓冲液 (pH7.5)、0.1mM EDTA、10％甘油、0.2％ Tween 20、1mM 二硫苏糖醇) 透析 2 次，每次 2 小时并过夜透析一次。 透析后，将 100ml 的酶溶液加到用缓冲液 B 平衡的肝素 - 琼脂糖 CL-6B(PharmaciaPharmacia Biotech) 上。 使用 FPLC 系统，用 0-700mM KCl 的线性梯度进行洗脱。

[0131] 将级分用 1 升缓冲液 D(20mM Tris-HCl(pH9.0)、0.1mM EDTA、10％甘油、0.2％ Tween 20、1mM 二硫苏糖醇) 透析 2 次，每次 2 小时并过夜透析一次。 透析后，将 50ml 酶溶液加到上用缓冲液 D 平衡 的 Q- 琼脂糖 (Pharmacia Pharmacia Biotech) 上。 使用 FPLC 系统，用 0-300mM NaCl 的线性梯度进行洗脱。

[0132] 将级分用 1 升贮藏缓冲液 (50mM Tris-HCl(pH8.2)、0.1mMEDTA、10mM 氯化钠、0.1％ Tween 20、0.1％ Nonidet P-40、1mM 二硫苏糖醇、50％甘油) 透析 2 次，每次 2 小时并过夜透析一次。 将这样获得的 DNA 聚合酶用作 Tks DNA 聚合酶制剂。

[0133] 根据在实施例 1 中所描述的方法测定 Tks DNA 聚合酶制剂的活性。 结果，观察到有 DNA 聚合酶活性。

[0134] 实施例 4

[0135] (1)DNA 聚合酶基因中间部分的克隆

[0136] 根据各种耐热 DNA 聚合酶的氨基酸序列之间的保守部分，合成寡核苷酸 TPPolBF1、TPPolBF5、TTPolBR1 和 TTPolBR5(SEQ IDNOS：17、2、3、18)。

[0137] 使用在实施例 2 中制备的 250ng 速生热球菌 (Thermococcusceler) 基因组 DNA 作为模板，以及引物 (每种 50pmol)TPPolBF1 和 TTPolBR1、TPPolBF1 和 TTPolBR5 或者 TPPolBF5 和 TTPolBR1 的组合，在 100μl 体积中进行 PCR。 PCR 的条件和纯化方法如实施例 3-(1) 中所述。 通过直接测序确定扩增片段 TPPolBF1-TTPolBR1(约 2kb)、TPPolBF1-TTPolBR5(约 1kb) 以及 TPPolBF5-TTPolBR1(约 0.8kb) 的核苷酸序列。

[0138] (2)DNA 聚合酶基因的上游和下游部分的克隆

[0139] 根据实施例 4-(1) 中所测定的核苷酸序列，合成用于克隆上游部分的特异性寡核苷酸 Tce01(SEQ ID NO：19) 和用于克隆下游部分的 Tce02(SEQ ID NO：20)。

[0140] 使用在实施例 2 中制备的 1ng 速生热球菌 (Thermococcus celer) 基因组 DNA 作为模板，以及 10pmol Tce01 或 Tce02 和 10pmol 实施例 3-(2) 表 1 中所列 32 个引物之一的组合进行 PCR。 PCR 的条件和纯化方法如实施例 3-(2) 中所述。 将扩增产物进行直接测序以筛选含有目的 DNA 聚合酶上游区的片段。 结果，显示约 650-bp PCR 扩增片段 Tce013C 含有 DNA 聚合酶基因的上游部分，约 650-bp PCR 扩增片段 Tce022F 含有 DNA 聚合酶基因的下游部分。

[0141] (3) 用于表达 DNA 聚合酶的质粒的构建

[0142] 根据实施例 4-(2) 中所测定的序列合成寡核苷酸 TceNde 和 TceBgPs(SEQ ID NOS：21 和 22)。

[0143] 使用在实施例 2 中所制备的 100ng 速生热球菌 (Thermococcusceler) 基因组 DNA 作为模板，以及引物 (每种 20pmol) TceNde 和 TceBgPs 的组合，在 100μl 体积中进行 PCR。 根据所附的说明，使用 Pyrobest(Takara Bio) 作为 PCR 的 DNA 聚合酶。 进行如下的反应：94℃ 30 秒钟，50℃ 30 秒钟以及 72℃ 2 分钟，如此 40 个循环。 用限制性酶 NdeI 和 BglII(购自 Takara Bio) 消化约 2.3-kb 扩增的 DNA 片段。 在质粒载体 pTV119Nd(将 pTV119N 中的 NcoI 位点转变成 NdeI 位点的质粒) 的 NdeI 和 BamHI 位点之间整合 DNA 片段以构建质粒 pTce19。 将该质粒称作并表示为 pTce19，并在 2004 年 5 月 14 日 (原始保藏日期) 保藏在国际专利微生物保藏中心，国立高等工业科学和技术学院，AIST Tsukuba Central 6，1-1，Higashi 1-Chome，Tsukuba-shi，Ibaraki-ken 305-8566，日本，保藏号为 FERM BP-10311。

[0144] (4) 含有 DNA 聚合酶基因的 DNA 片段的核苷酸序列的测定

[0145] 根据双脱氧法测定插入到 pTce19 中的 DNA 片段的核苷酸序列。

[0146] 所测定的核苷酸序列的分析显示，存在可能编码目的 DNA 聚合酶的可读框。 可读框的核苷酸序列如 SEQ ID NO：23 所示。 从该核苷酸序列所推断的 DNA 聚合酶的氨基酸序列如 SEQ ID NO：24 所示。

[0147] (5) 速生热球菌 (Thermococcus celer) DNA 聚合酶基因的表达

[0148] 根据如实施例 3-(6) 中所述的方法，培养用 pTce19 转化的大肠杆菌 JM109。 将通过离心所收集的细胞悬浮在 64μl 超声处理缓冲液中并进行超声处理。将超声处理的悬液通过在 12,000rpm 离心 10 分钟所获得的上清液在 80℃ 加热 10 分钟，然后在 12,000rpm 再次离心 10 分钟以收获上清液作为加热的上清液。

[0149] 根据如在实施例 1 中所描述的方法测定加热的上清液的酶活性。 结果，观察到有 DNA 聚合酶活性。

[0150] (6) 纯化的 DNA 聚合酶制剂的制备

[0151] 根据实施例 3-(7) 中所描述的方法培养用 pTce19 转化的大肠杆菌 JM109。 根据如在实施例 3-(7) 中所描述的方法进行纯化直到用 0-700mM KCl 的线性梯度从肝素 - 琼脂糖 CL-6B (Pharmacia Biotech) 上洗脱的步骤。

[0152] 将洗脱的 DNA 聚合酶级分用含有 0.3M 氯化钠的 1 升缓冲液 C 透析 2 次，每次 2 小时并过夜透析一次。 透析后，将 95ml 酶溶液加到用含有 0.3M 氯化钠的缓冲液 C 平衡的 Superdex G200(PharmaciaBiotech) 上。 用含有 0.3M 氯化钠的缓冲液 C 进行洗脱。

[0153] 将洗脱的 DNA 聚合酶级分用 1 升缓冲液 D 透析 2 次，每次 2 小时并过夜透析

一次。 透析后，将 45ml 酶溶液加到用缓冲液 D 平衡的 Q- 琼脂糖 (Pharmacia Pharmacia Biotech) 上。 使用 FPLC 系统，用 0-300mM NaCl 的线性梯度进行洗脱。

[0154] 将级分用 1 升贮藏缓冲液透析 2 次，每次 2 小时并过夜透析一次。 将这样所得的 DNA 聚合酶用作 Tce DNA 聚合酶制剂。

[0155] 根据如实施例 1 中所描述的方法测定 Tce DNA 聚合酶制剂的酶活性。 结果，观察到 Tce DNA 聚合酶制剂有 DNA 聚合酶活性。

[0156] 实施例 5

[0157] (1)DNA 聚合酶基因的中间部分的克隆

[0158] 根据各种耐热 DNA 聚合酶的氨基酸序列之间的保守部分，合成寡核苷酸 TPPolBF1、 TPPolBF5、 TTPolBR1、 TTPolBR4 和 TTPolBR5(SEQID NOS ： 17、2、3、4、18)。

[0159] 使用在实施例 2 中制备的 250ng Thermococcus siculi 基因组 DNA 作为模板，以及引物 (每种 50pmol)TPPolBF1 和 TTPolBR4、 TPPolBF1 和 TTPolBR5 或者 TPPolBF5 和 TTPolBR1 的组合，在 100μl 体积中进行 PCR。 PCR 的条件和纯化方法如在实施例 3-(1) 中所述。 通过直接测序测定扩增片段 TPPolBF1-TTPolBR4(约 1.2kb)、TPPolBF1-TTPolBR5(约 1kb) 和 TPPolBF5-TTPolBR1(约 2kb) 的核苷酸序列。 结果，显示 Thermococcus siculi DNA 聚合酶含有内含肽序列。

[0160] (2)DNA 聚合酶基因的上游和下游部分的克隆

[0161] 根据在实施例 5-(1) 中所测定的核苷酸序列，合成用于克隆上游部分的特异性寡核苷酸 Tsi01(SEQ ID NO ： 25) 和用于克隆下游部分的 Tsi06(SEQ ID NO ： 26)。

[0162] 使用在实施例 2 中制备的 1ng Thermococcus siculi 基因组 DNA 作为模板，以及 10pmol Tsi01 或 Tsi06 和 10pmol 表 1 所列 32 个引物之一的组合进行 PCR。 PCR 的条件和纯化方法如实施例 3-(2) 所述。 将扩增产物进行直接测序以筛选含有目的 DNA 聚合酶的上游区的片段。 结 果，显示约 2900-bp 片段 Tsi011A 含有 DNA 聚合酶基因的上游部分，约 400-bp 片段 Tsi065B 含有 DNA 聚合酶基因的下游部分。

[0163] (3) 用于表达 DNA 聚合酶的质粒的构建

[0164] 证明在 Thermococcus siculi DNA 聚合酶的序列中含有一个内含肽序列。 然后，构建除去内含肽了序列的 DNA 聚合酶基因。

[0165] 根据在实施例 5-(2) 中所测定的序列，合成寡核苷酸 TsiNde、 TsiA、 TsiB 和 TsiBamPst(SEQ ID NOS ： 27-30)。

[0166] 使用在实施例 2 中制备的 100ng 的 Thermococcus siculi 基因组 DNA 作为模板，以及引物 (各 20pmol)TksNde 和 TsiB(TsiI) 或者 TsiA 和 TsiBamPst(TsiII) 的组合，在 100μl 体积中进行 PCR。 如在实施例 5-(2) 中所述进行 PCR 以获得 DNA 片段 TsiI(约 1.5kb) 和 TsiII(约 0.9kb)。 另外，使用 1μlPCR 反应混合物 TsiI 和 1μl PCR 反应混合物 TsiII 的混合物作为模板，以及 20pmol TsiNde 和 20pmol TsiBamPst 作为引物，在 100μl 体积中以类似方式进行 PCR。 获得约 2.4-kb DNA 片段。

[0167] 用限制性酶 NdeI 和 BamHI 消化所得的约 2.4-kb DNA 片段。 将 DNA 片段连于已用 NdeI 和 BamHI 消化的 pTV119Nd(将 pTV119N 中的 NcoI 位点转变成 NdeI 位点的质粒) 以构建质粒 pTsi16。 将该质粒称作并表示为 Tsi16，并且在 2004 年 5 月 4 日

保藏在国际专利微生物保藏中心，国立高等工业科学和技术学院， AIST Tsukuba Central 6，1-1， Higashi 1-Chome， Tsukuba-shi， Ibaraki-ken 305-8566，日本，保藏号为 FERM BP-10310。

[0168] (4) 含有 DNA 聚合酶基因的 DNA 片段的核苷酸序列的测定

[0169] 根据双脱氧法测定在实施例 5-(3) 中所获得的插入到 pTsi16 中的 DNA 片段的核苷酸序列。 所测定的核苷酸序列的分析显示，存在可能编码目的 DNA 聚合酶的可读框。 可读框的核苷酸序列如 SEQ ID NO：31 所示。 从该核苷酸序列推断的 DNA 聚合酶的氨基酸序列如 SEQ IDNO：32 所示。

[0170] (5) Thermococcus siculi DNA 聚合酶基因的表达

[0171] 根据如在实施例 3-(6) 中所述的方法培养用质粒 pTsi16 转化的大肠杆菌 JM109。 在 52μl 超声处理的缓冲液中悬浮通过离心所收集的细胞并进行超声处理。 将超声处理的悬液通过在 12,000rpm 离心 10 分钟后所获得的上清液在 80℃加热 10 分钟，然后在 12,000rpm 再次离心 10 分钟以收集上清液作为加热的上清液。

[0172] 根据如在实施例 1 中所述的方法测定加热的上清液的酶活性。 结果，观察到有 DNA 聚合酶活性。

[0173] (6) 纯化的 DNA 聚合酶制剂的制备

[0174] 根据如实施例 3-(7) 中所述的方法培养用质粒 pTsi16 转化的大肠杆菌 JM109。 根据如实施例 3-(7) 中所述的方法进行纯化。

[0175] 这样获得的 DNA 聚合酶用作 Tsi DNA 聚合酶制剂。 根据如在实施例 1 中所述的方法测定 Tsi DNA 聚合酶制剂的活性。 结果，观察到 TsiDNA 聚合酶制剂有 DNA 聚合酶活性。

[0176] 实施例 6

[0177] (1) 各 DNA 聚合酶的掺入和延伸活性

[0178] 测定 Tks、Tce 和 Tsi DNA 聚合酶的掺入和延伸活性。 使用可通过商业途径获得的产品 KOD DNA 聚合酶 (Toyobo) 作为对照。

[0179] 当测定掺入活性时，使用 1μg 活化的小牛胸腺 DNA 作为模板。 当测定延伸活性时，使用 M13/HT 引物，其中将 1μgM13 噬菌体单链 DNA 和与其互补的 1pmol HT 引物 (SEQ ID NO：33) 退火。 使用含有 1mM 氯化镁的 KOD#1 缓冲液作为缓冲液。 根据下列方法测定 DNA 聚合酶活性。

[0180] 简要地说，将含有要进行活性测定的酶标本、上述模板、40μM dNTP、0.238μM[^{3}H] 甲基 -TTP (Amersham) 以及 1mM 氯化镁的 50μlKOD#1 缓冲液在 75℃反应 5 分钟。 将 40μl 反应混合物点在 DE81 纸 (Whatman) 上。 用 5% Na_2PO_4 洗涤 4 次后，使用液体闪烁计数器测定 DE81 纸上残留的放射性。 根据上述酶活性测定方法，将导致在 30 分钟内将 10nmol dNMP 掺入到底物 DNA 中的酶量定义为 1U 的酶。 结果显示于表 2。 在表 2 中，“掺入”代表在作为模板的核酸的缺口位点处掺入的能力，“延伸”代表由于延伸从与作为模板的核酸退火的引物掺入的能力。

[0181] 表 2

[0182]

聚合酶活性 (U/μl)	掺入	延伸	延伸/掺入
Tks	9.38	11.46	1.22
Tce	10.83	13.28	1.23
Tsi	9.67	21.93	2.27
KOD	6.80	6.69	0.98

[0183] 如表 2 所示，进一步证实 Tks、Tce 和 Tsi DNA 聚合酶由引物延伸所显示出的掺入的活性高于 KOD#1 缓冲液中向模板 DNA 中掺入核酸到的活性。 此外，进一步证实与用作对照的 KOD DNA 聚合酶相比，由于引物延伸的掺入活性非常高。 基于上述结果，进一步证实本发明的 DNA 聚合酶非常适于引物延伸。

[0184] (2) 对 M13 单链 DNA 的亲和力

[0185] 检查 Tks、Tce 和 Tsi DNA 聚合酶的掺入和对 M13 单链 DNA 聚合酶的亲和力。使用 KOD DNA 聚合酶作为对照。

[0186] 使用各种浓度的 M13 单链 DNA 作为模板。 使用与其互补的 1pmolHT 引物作为引物。 使用含有 1mM 氯化镁的 KOD#1 缓冲液作为缓冲液。 根如实施例 6-(1) 中所述的方法测定 DNA 聚合酶活性。 结果如表 3 所示。

[0187] 表 3

[0188]

Tks	1.04
Tce	0.91
Tsi	1.33
KOD	2.65

[0189] 如表 3 所示，进一步证实本发明的 Tks、Tce 和 Tsi DNA 聚合酶显示对 M13 单链 DNA 的亲和力高于 KOD DNA 聚合酶。 根据上述结果，就 PCR 中的检测灵敏度而言，本发明的 DNA 聚合酶优于 KOD DNA 聚合酶。

[0190] (3) Tks 和 Tsi DNA 聚合酶的保真性

[0191] 检查 Tks 和 Tsi DNA 聚合酶的保真性。 使用 KOD DNA 聚合酶和 KOD plus DNA 聚合酶（两者均来自 Toyobo）以及 Pyrobest DNA 聚合酶（Takara Bio）作为对照。

[0192] 使用嗜热栖热菌 (Thermus thermophilus) HB8 基因组 DNA (Takara Bio) 作为模板。 另外，使用引物 c280/RG34-F 和 -R (SEQ IDNOS：34 和 35)。

[0193] 根据下列方法测定保真性。 简要地，在 50μl 体积中进行 PCR，使用 10ng 嗜热栖热菌 (Thermus thermophilus) HB8 基因组 DNA (TakaraBio) 作为模板，以及引物 c280/RG34-F 和 -R 的组合。 由于用引物扩增区域的 GC 含量高 (70％)，因此添加 2％浓度的 DMSO。 当使用 Tks、Tsi 和 KOD plus DNA 聚合酶时，根据所附的说明使用 KOD plus 缓冲液。 当使用 KOD DNA 聚合酶时，根据 KOD DNA 聚合酶所附的说明，使用 KOD#1 缓冲液。 此外，根据所附的说明，在所附的缓冲液中使用 Pyrobest DNA 聚合酶。 PCR 的条件如下：在 96℃孵育 2 分钟，随后 98℃ 5 秒钟；以及 68℃ 30 秒钟，如此 30 个循环。反应后，向其中添加等体积的 100mM Tris- 盐酸缓冲液 (pH8.0) 饱和酚 / 氯仿 / 异戊醇混合物 (25 ： 24 ： 1，v/v)。 将混合物混合，然后在 10,000xg 离心 10 分钟，两次。 离心后，将上清液与氯仿 / 异戊醇的混合物 (24 ： 1，v/v) 混合，然后在 10,000xg 离心 10 分

钟。 将这样获得的上清液进行乙醇沉淀，将沉淀溶于 20μlH_2O 中以获得约 0.5-bp DNA 片段。 根据 TaKaRa BKL 试剂盒 (Takara Bio) 的方案，对每 8μl 约 0.5-bp DNA 片段进行处理，使用每 5μl 所得的溶液转化大肠杆菌 JM109。 培养所得的转化体，测定 12-24 个插入约 500-bp DNA 片段的克隆的核苷酸序列，并且计算突变的核苷酸数与所阅读的总核苷酸数的比值以确定保真性。 结果如表 4 所示。

[0194] 表 4

[0195]

KOD plus	Tks	0.000%
	Tsi	0.021%
	KOD plus	0.082%
特殊缓冲液	Pyrobest	0.023%
KOD#1	KOD	0.022%

[0196] 如表4所示，进一步证实本发明的Tks和Tsi DNA聚合酶的突变频率低于KOD、KOD plus或Pyrobest DNA聚合酶。基于上述结果，证明它们作为用于克隆的酶比KOD、KOD plus 或 Pyrobest DNA 聚合酶更优秀。

[0197] (4) Tks 和 Tce DNA 聚合酶的保真性

[0198] 检查 Tks 和 Tce DNA 聚合酶的保真性。 使用 KOD DNA 聚合酶和 KOD plus DNA 聚合酶 (来自 Toyobo) 以及 Pyrobest DNA 聚合酶 (Takara Bio) 作为对照。

[0199] 使用嗜热栖热菌 (Thermus thermophilus) HB8 基因组 DNA (TakaraBio) 作为模板。另外，使用引物 c240/RA18-F 和 -R (SEQ ID NOS ： 36 和 37)。

[0200] 为了测定保真性，使用 10ng 嗜热栖热菌 (Thermus thermophilus) HB-8 基因组 DNA 作为模板，以及引物 c240/RA18-F 和 -R 的组合，在 50μl 体积中进行 PCR。 由于引物所扩增的区域的GC含量高 (70％)，因此添加2％浓度的DMSO。根据所附的说明，使用 KOD#1 缓冲液作为缓冲液。 PCR 的条件和计算保真性的方法如实施例 6-(3) 所述。结果显示于表 5。

[0201] 表 5

[0202]

缓冲液	酶名称	突变频率
聚合酶	Km(μg/ml)	
缓冲液	酶名称	突变频率
KOD#1	Tks	0.000%
	Tce	0.000%
	KOD	0.064%

[0203] 如表 5 所示，进一步证明本发明的 Tks 和 Tce DNA 聚合酶的突变频率低于 KOD。 也根据上述结果，证明它们作为用于克隆的酶很优秀。

[0204] 实施例 7

[0205] (1) 各自 DNA 聚合酶的最适温度

[0206] 如表 5 所示，进一步证明本发明的 Tks 和 Tce DNA 聚合酶的突变频率低于 KOD。 也根据上述结果，证明它们作为用于克隆的酶很优秀。

[0207] 实施例 7

[0208] (1) 各自 DNA 聚合酶的最适温度

[0209] 测定 Tks、Tce 和 Tsi DNA 聚合酶的最适温度。使用 20μg 活化的小牛胸腺 DNA 作为模板。使用 Pyrobest DNA 聚合酶所附的缓冲液作为缓冲液。根据下列方法测定 DNA 聚合酶活性。

[0210] 首先，制备含有 5mU（根据如实施例 6-(1) 所述掺入活性测定方法所计算的）将要进行活性测定的酶标本、上述模板、200μM dATP、200μM dGTP、200μM dCTP、100μM dTTP、0.204μM[^{3}H] 甲基 -TTP(Amersham) 和 Pyrobest DNA 聚合酶 (Takara Bio) 所附的 1x 缓冲液的 50μl 反应混合物。使用各自酶标本，在 65℃ -85℃范围的期望温度反应 5 分钟。将每种反应混合物 40μl 点到 DE81 纸 (Whatman) 上。用 5% Na_2PO_4 洗涤 4 次后，使用液体闪烁计数器测定 DE81 纸上残留的放射性。在图 1 图示根据上述活性测定方法所测定的活性和反应温度之间的关系。在图 1 中，将反应在约 80℃所观察到的活性定义为 100%。

[0211] 如图 1 所示，当使用活化的小牛胸腺 DNA 作为模板时，Tks、Tce 和 Tsi DNA 聚合酶具有 75℃ -85℃范围的最适温度。

[0212] (2) 各 DNA 聚合酶的最适 pH

[0213] 测定 Tks、Tce 和 Tsi DNA 聚合酶的最适 pH。使用 10μg 活化的小牛胸腺 DNA 作为模板。使用已在 75℃时将 pH 调至 pH 5.0-pH8.0 的期望值的 120mM Tris-HCl 缓冲液作为缓冲液。根据下列方法测定 DNA 聚合酶活性。

[0214] 首先，制备含有 0.05U（根据如实施例 6-(1) 所述掺入活性测定方法所计算的）将要进行活性测定的酶标本、上述模板、上述缓冲液、10mM KCl、6mM $(NH_4)_2SO_4$、0.1 % Triton X-100、0.001 % BSA、1mM $MgCl_2$、40μM dNTP 和 0.204μM[^{3}H] 甲基 -TTP(Amersham) 的 50μl 反应混合物。使用各自酶标本在 75℃反应 5 分钟。将每个混合物的 40μl 溶液点在 DE81 纸 (Whatman) 上。用 5% Na_2PO_4 洗涤 4 次后，使用液体闪烁计数器测定 DE81 纸上残留的放射性。在图 2 图示根据上述活性测定方法所测定的活性与 pH 之间的关系。在图 2 中，将在 pH 6.0(75℃) 时所观察到的反应的活性定义为 100%。

[0215] 如图 2 所示，当使用活化的小牛胸腺 DNA 作为模板时，Tks、Tce 和 Tsi DNA 聚合酶具有 pH 5.5-pH 6.5(75℃) 范围的最适 pH。

[0216] 实施例 8

[0217] 为了将本发明的 DNA 聚合酶在 PCR 反应中的性能与 KOD DNA 聚合酶进行比较，使用 λ-DNA 作为模板进行 PCR 反应。用 KOD plusDNA 聚合酶所附的 1x 缓冲液、200μM dNTP 和 1mM $(NH_4)_2SO_4$（对于 Tks、Tce 或 Tsi DNA 聚合酶）；或者 KOD DNA 聚合酶所附的 1x 缓冲液、200μM dNTP 和 1mM $MgCl_2$（对于 KOD DNA 聚合酶）的反应混合物组合物，制备含有 1ng/50μlλ-DNA(Takara Shuzo)、10pmol/50μl 引物 λ-1、10pmol/50μlλ-9B 和 0.625U/50μl DNA 聚合酶的 50μl 反应混合物。

[0218] 在 SEQ ID NOS：38 和 39 中分别示出引物 λ-1 和 λ-9B 的核苷酸序列。将反应混合物进行如下反应：98℃ 10 秒钟；以及 68℃ 10 分钟，如此 30 个循环。然后，将每个反应混合物的 3μl 溶液进行琼脂糖凝胶电泳，并且通过用溴化乙锭染色观察所扩增的 DNA 片段。结果，使用 KOD DNA 聚合酶没有观察到 DNA 片段的扩增。在另一个方面，使用 Tks、Tce 或 Tsi DNA 聚合酶观察到约 12k 碱基对的 DNA 片段的扩增。

[0219] 其次，将引物改变成引物 λ-1 和引物 λ-10D 进行实验。 在 SEQ IDNO：40 中引物 λ10D 的核苷酸序列。 用与上述相同的反应混合物组合物制备 50μl 含有 1ng/50μlλ-DNA(Takara Shuzo)、10pmol/50μl引物 λ-1、10pmol/50μl引物 λ-10d 和 0.625U/50μl DNA 聚合酶的反应混合物。 将反应混合物进行下列 PCR 反应：98℃ 10 秒钟；以及 68℃ 10 分钟，如此 30 个循环。 然后，将每个反应混合物的 3μl溶液进行琼脂糖凝胶电泳，并通过用溴化乙锭染色观察所扩增的 DNA 片段。 结果，使用 KOD DNA 聚合酶没有观察到 DNA 片段的扩增。 在另一个方面，使用 Tks、Tce 或 Tsi DNA 聚合酶观察到约 15k 碱基对的 DNA 片段的扩增。

[0220] 实施例 9

[0221] (1) 小鼠杂交瘤细胞系的生产

[0222] 向在实施例 3 中所制备的 210μg(100μl)Tks DNA 聚合酶制剂、在实施例 4 中所制备的 210μg(100μl)Tce DNA 聚合酶制剂，或者在实施例 5 中所制备的 200μg(100μl)Tsi DNA 聚合酶制剂添加 800μl PBS。 将每个混合物用 1ml 完全弗氏佐剂 (Difco Lab.) 乳化以获得抗原制剂。 将该抗原制剂分成相等的部分并通过腹膜内施用给 4 只 Balb/c 小鼠 (10 周龄，雌性，CREA 日本)。 在 2 和 5 周后进行下列强化免疫：通过向与上述等量的 DNA 聚合酶制剂中添加 900μl PBS 和 RIBI 佐剂 (RIBI) 制备抗原制剂，向各自小鼠腹膜内施用其相等的部分。 此外，初次抗原施用后 6 周进行下列终免疫：通过向与上述等量的 DNA 聚合酶制剂中添加 900μl PBS 制备抗原制剂，并向各自组中的小鼠腹膜内施用其相等的部分。

[0223] 终免疫后 3 天从所免疫动物中的两只中除去脾，并且在存在 50％聚乙二醇时与 P3-X63-Ag8-U1 小鼠骨髓瘤细胞进行细胞融合。 将细胞分配到 10 个 96 孔平板内并培养。

[0224] (2) 杂交瘤细胞系的筛选

[0225] 使用在实施例 9-(1) 中用作抗原的各 DNA 聚合酶制剂的溶液 (5μg/ml)，制备用 DNA 聚合酶包被的 96 孔平板。 对于在上述细胞融合中所获得的细胞，从观察到细胞生长的孔中收集上清液，在 DNA 聚合酶包被的平板上进行 ELISA 法以测定培养物上清液中是否存在抗 DNA 聚合酶抗体。 对使用 DNA 聚合酶作为抗原所获得的 900 个或更多细胞系进行该试验。 根据该方法选择鉴定为用于生产抗体的细胞系 (TksDNA 聚合酶：95 个细胞系；Tce DNA 聚合酶：103 个细胞系；Tsi DNA 聚合酶：61 个细胞系)。

[0226] 培养所选的细胞系作为原始细胞系，在 42℃使用培养物上清液检查各自 DNA 聚合酶的聚合酶活性的抑制。 根据下列方法测定抑制活性。 将已与每个杂交瘤的培养物上清液中的 IgG 结合的抗小鼠 IgG 磁珠 (Dynabeads M-280 绵羊抗小鼠 IgG，Dynal Biotech) 和 DNA 聚合酶在室温下孵育 10 分钟。 然后在 42℃测定 DNA 聚合酶活性并与单独使用 DNA 聚合酶得到的 DNA 聚合酶活性测定的结果进行比较。 结果，在下列系的培养物上清液中观察到 DNA 聚合酶活性的抑制：Tks DNA 聚合酶：18 个细胞系；Tce DNA 聚合酶：28 个细胞系；Tsi DNA 聚合酶：11 个细胞系。 通过限制性稀释分析，对这些细胞系进行克隆。

[0227] 在 42℃检查每个克隆细胞的培养物上清液中 DNA 聚合酶的聚合酶活性的抑制。选择下列系作为抑制 95％或更高的聚合酶活性的杂交瘤克隆系：Tks DNA 聚合酶：1 个

细胞系；Tce DNA 聚合酶：2 个细胞系；Tsi DNA 聚合酶：2 个细胞系。 检查由这些杂交瘤克隆系所产生的抗体的同种型。 结果，Tks 和 Tce DNA 聚合酶的抗体是 IgG2b 型，TsiDNA 聚合酶的抗体是 IgG1 和 G2b 型。 当将从杂交瘤的培养物上清液中所制备的抗体在 94℃加热 5 分钟时，完全丧失抑制 DNA 聚合酶的活性。 因此，证明这些抗体可以低温度特异性方式用于抑制耐热 DNA 聚合酶的活性。

[0228] 工业应用性

[0229] 本发明提供适于引物延伸的具有高保真性 DNA 聚合酶活性的多肽，其可用于克隆、测序和核酸扩增，编码该多肽的基因，以及用于生产具有 DNA 聚合酶活性的该多肽的方法。 使用具有本发明的 DNA 聚合酶活性的多肽，可获得具有较低错误率的扩增产物，例如，即使其用于包括多个循环的 PCR。 因此，其可用于以低拷贝数量存在的靶核酸的分析或鉴别。

[0230] 序列表自由文本

[0231] SEQ ID No：1；设计用于扩增热球菌属某种（Thermococcus sp.）基因组 DNA 的寡核苷酸引物 TPPolBF4

[0232] SEQ ID No：2；设计用于扩增热球菌属某种（Thermococcus sp.）基因组 DNA 的寡核苷酸引物 TPPolBF5

[0233] SEQ ID No：3；设计用于扩增热球菌属某种（Thermococcus sp.）基因组 DNA 的寡核苷酸引物 TTPolBR1

[0234] SEQ ID No：4；设计用于扩增热球菌属某种（Thermococcus sp.）基因组 DNA 的寡核苷酸引物 TTPolBR4

[0235] SEQ ID No：5；设计用于扩增热球菌属某种（Thermococcus sp.）KS-1 基因组 DNA 的寡核苷酸引物 Tks01

[0236] SEQ ID No：6；设计用于扩增热球菌属某种（Thermococcus sp.）基因组 DNA 的寡核苷酸标签序列区

[0237] SEQ ID No：7；设计用于扩增热球菌属某种（Thermococcus sp.）KS-1 基因组 DNA 的寡核苷酸引物 Tks04

[0238] SEQ ID No：8；设计用于扩增热球菌属某种（Thermococcus sp.）KS-1 基因组 DNA 的寡核苷酸引物 Tks02

[0239] SEQ ID No：9；设计用于扩增热球菌属某种（Thermococcus sp.）KS-1 基因组 DNA 的寡核苷酸引物 TksNde

[0240] SEQ ID No：10；设计用于扩增热球菌属某种（Thermococcus sp.）KS-1 基因组 DNA 的寡核苷酸引物 Tks1EndBg

[0241] SEQ ID No：11；设计用于扩增热球菌属某种（Thermococcus sp.）KS-1 基因组 DNA 的寡核苷酸引物 Tks2StaBg

[0242] SEQ ID No：12；设计用于扩增热球菌属某种（Thermococcus sp.）KS-1 基因组 DNA 的寡核苷酸引物 Tks2EndBal

[0243] SEQ ID No：13；设计用于扩增热球菌属某种（Thermococcus sp.）KS-1 基因组 DNA 的寡核苷酸引物 Tks3StaBal

[0244] SEQ ID No：14；设计用于扩增热球菌属某种（Thermococcus sp.）KS-1 基因组

DNA 的寡核苷酸引物 TksBgPs

[0245] SEQ ID No：17；设计用于扩增热球菌属某种 (Thermococcus sp.) 基因组 DNA 的寡核苷酸引物 TPPolBF1

[0246] SEQ ID No：18；设计用于扩增热球菌属某种 (Thermococcus sp.) 基因组 DNA 的寡核苷酸引物 TTPolBR5

[0247] SEQ ID No：19；设计用于扩增速生热球菌 (Thermococcus celer) 基因组 DNA 的寡核苷酸引物 Tce01

[0248] SEQ ID No：20；设计用于扩增速生热球菌 (Thermococcus celer) 基因组 DNA 的寡核苷酸引物 Tce02

[0249] SEQ ID No：21；设计用于扩增速生热球菌 (Thermococcus celer) 基因组 DNA 的寡核苷酸引物 TceNde

[0250] SEQ ID No：22；设计用于扩增速生热球菌 (Thermococcus celer) 基因组 DNA 的寡核苷酸引物 TceBgPs

[0251] SEQ ID No：25；设计用于扩增 Thermococcus siculi 基因组 DNA 的寡核苷酸引物 Tsi01

[0252] SEQ ID No：26；设计用于扩增 Thermococcus siculi 基因组 DNA 的寡核苷酸引物 Tsi06

[0253] SEQ ID No：27；设计用于扩增 Thermococcus siculi 基因组 DNA 的寡核苷酸引物 TsiNde

[0254] SEQ ID No：28；设计用于扩增 Thermococcus siculi 基因组 DNA 的寡核苷酸引物 TsiA

[0255] SEQ ID No：29；设计用于扩增 Thermococcus siculi 基因组 DNA 的寡核苷酸引物 TsiB

[0256] SEQ ID No：30；设计用于扩增 Thermococcus siculi 基因组 DNA 的寡核苷酸引物 TsiBamPst

[0257] SEQ ID No：33；设计用于扩增 M13 基因组 DNA 的寡核苷酸引物 HT SEQ ID No：34；设计用于扩增嗜热栖热菌 (Thermus thermophilus) HB-8 基因组 DNA 的寡核苷酸引物 c280/RG34-F

[0258] SEQ ID No：35；设计用于扩增嗜热栖热菌 (Thermusthermophilus) HB-8 基因组 DNA 的寡核苷酸引物 c280/RG34-R

[0259] SEQ ID No：36；设计用于扩增嗜热栖热菌 (Thermusthermophilus) HB-8 基因组 DNA 的寡核苷酸引物 c240/RA18-F

[0260] SEQ ID No：37；设计用于扩增嗜热栖热菌 (Thermusthermophilus) HB-8 基因组 DNA 的寡核苷酸引物 c240/RA18-R

[0261] SEQ ID No：38；设计用于扩增噬菌体 λ 的 DNA 的寡核苷酸引物 λ -1

[0262] SEQ ID No：39；设计用于扩增噬菌体 λ 的 DNA 的寡核苷酸引物 λ -9B

[0263] SEQ ID No：40；设计用于扩增噬菌体 λ 的 DNA 的寡核苷酸引物 λ -10D。

序列表

<110>TAKARA BIO INC.

<120> 具有 DNA 聚合酶活性的多肽

<130>665234

<150>JP 2004-166541
<151>2004-06-04

<160>40

<170>PatentIn version 3.1

<210>1
<211>40
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 设计用于扩增热球菌属 (Thermococcus sp.) 基因组 DNA 的寡核苷酸引物 TPPolBF4

<220>
<221> 特征
<222>(35)..(35)
<223>n 代表任何碱基

<400>1
ttaatacgac tcactatagg cacaacgtct crccngayac 40

<210>2
<211>40
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 设计用于扩增热球菌属 (Thermococcus sp.) 基因组 DNA 的寡核苷酸引物

TPPolBF5

<220>
<221> 特征
<222>(32)..(32)
<223>n 代表任何碱基
<220>
<221> 特征
<222>(35)..(35)
<223>n 代表任何碱基

<400>2
ttaatacgac tcactatagg gagagcgtta cngcntgggg 40

<210>3
<211>39
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 设计用于扩增热球菌属 (Thermococcus sp.) 基因组 DNA 的寡核苷酸引物 TTPolBR1

<400>3
gctagttatt gctcagcgga cctggttctc katrtarta 39

<210>4
<211>39
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 设计用于扩增热球菌属 (Thermococcus sp.) 基因组 DNA 的寡核苷酸引物 TTPolBR4

<400>4
gctagttatt gctcagcggg taacgctctc kgcrcaytc 39

<210>5

<211>21
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 设计用于扩增热球菌属 (Thermococcus sp.) KS-1 基因组 DNA 的寡核苷酸引物 Tks01

<400>5
cttcatcttc ttctttatct t 21
<210>6
<211>16
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 设计用于扩增热球菌属 (Thermococcus sp.) 基因组 DNA 的寡核苷酸标签序列区

<400>6
ttacgtctga cgtgtg 16

<210>7
<211>21
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 设计用于扩增热球菌属 (Thermocoocus sp.) KS-1 基因组 DNA 的寡核苷酸引物 Tks04

<400>7
attcccatac ttttctaactc 21

<210>8
<211>21
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 设计用于扩增热球菌属 (Thermococcus sp.) KS-1 基因组 DNA 的寡核苷酸引物 Tks02

<400>8
accggtcccc acgttgccgt t 21

<210>9
<211>36
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 设计用于扩增热球菌属 (Thermococcus sp.) KS-1 基因组 DNA 的寡核苷酸引物 TksNde

<400>9
gattatgggg gatgacatat gatcctcgac actgac 36

<210>10
<211>33
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 设计用于扩增热球菌属 (Thermococcus sp.) KS-1 基因组 DNA 的寡核苷酸引物 Tks1EndBg

<400>10
ggggtacaga gatctaaaat ctaggtacac tat 33

<210>11
<211>40
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 设计用于扩增热球菌属 (Thermococcus sp.) KS-1 基因组 DNA 的寡核苷酸引物 Tks2StaBg

<400>11
gtacctagat tttagatctc tgtacccctc aatcatcatc 40

<210>12
<211>33
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 设计用于扩增热球菌属 (Thermococcus sp.) KS-1 基因组 DNA 的寡核苷酸引物 Tks2EndBal

<400>12
gtagccgtag tagctgttgg ccaggatctt gat 33
<210>13
<211>40
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 设计用于扩增热球菌属 (Thermococcus sp.) KS-1 基因组 DNA 的寡核苷酸引物 Tks3StaBal

<400>13
atcaagatcc tggccaacag ctactacggt tactacggct 40

<210>14
<211>39
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 设计用于扩增热球菌属 (Thermococcus sp.) KS-1 基因组 DNA 的寡核苷酸引物 TksBgPs

<400>14
tccgctggaa aacctgcaga gatctcaagt tcccttcgg 39

<210>15

<211>2325

<212>DNA

<213> 热球菌属 (Thermococcus sp.) KS-1

<400>15

atgatcctcg acactgacta cataactgag aatggaaaac ccgtcataag gattttcaag 60
aaggagaacg gcgagtttaa gattgagtac gataggactt ttgaacccta catttacgcc 120
ctcctgaagg acgattctgc cattgaggag gtcaagaaga taaccgccga gaggcacgga 180
acggttgtaa cggttaagcg ggctgaaaag gttcagaaga agttcctcgg gagaccagtt 240
gaggtctgga aactctactt tactcaccct caggacgtcc cagcgataag ggacaagata 300
cgagagcatc cagcagttat tgacatctac gagtacgaca tacccttcgc caagcgctac 360
ctcatagaca agggattagt gccaatggaa ggcgacgagg agctgaaaat gcttgccttt 420
gatatcgaga cgctctacca tgagggcgag gagttcgccg aggggccaat ccttatgata 480
agctacgccg acgaggaagg ggccagggtg ataacgtgga agaacgcgga tctgccctac 540
gttgacgtcg tctcgacgga gagggagatg ataaagcgct tcctaaaggt ggtcaaagag 600
aaagatcctg acgtcctaat aacctacaac ggcgacaact tcgacttcgc ctacctaaaa 660
aaacgctgtg aaaagcttgg aataaacttc acgctcggaa gggacggaag cgagccgaag 720
attcagagga tgggcgacag gtttgccgtc gaagtgaagg gacggataca cttcgatctc 780
tatcctgtga taagacggac gataaacctg cccacataca cgcttgaggc cgtttatgaa 840
gccgtcttcg gtcagccgaa ggagaaggtc tacgctgagg agatagctac agcttgggag 900
agcggtgaag gccttgagag agtagccaga tactcgatgg aagatgcgaa ggtcacatac 960
gagcttggga aggagttttt ccctatggag gcccagcttt ctcgcttaat cggccagtcc 1020
ctctgggacg tctcccgctc cagcactggc aacctcgttg agtggttcct cctcaggaag 1080
gcctacgaga ggaatgagct ggccccgaac aagcccgatg aaaaggagct ggccagaaga 1140
cgacagagct atgaaggagg ctatgtaaaa gagcccgaga gagggttgtg ggagaacata 1200
gtgtacctag attttagatc tctgtacccc tcaatcatca tcacccacaa cgtctcgccg 1260
gatactctca acagggaagg atgcaaggaa tatgacgttg ccccccaggt cggtcaccgc 1320
ttctgcaagg acttcccagg atttatcccg agcctgcttg gagacctcct agaggagagg 1380
cagaagataa agaagaagat gaaggccacg attgacccga tcgagaggaa gctcctcgat 1440
tacaggcaga gggccatcaa gatcctggcc aacagctact acggttacta cggctatgca 1500
agggcgcgct ggtactgcaa ggagtgtgca gagagcgtaa cggcctgggg aagggagtac 1560
ataacgatga ccatcagaga gatagaggaa aagtacggct ttaaggtaat ctacagcgac 1620
accgacggat tttttgccac aatacctgga gccgatgctg aaaccgtcaa aaagaaggcg 1680
atggagttcc tcaagtatat caacgccaaa ctcccgggcg cgcttgagct cgagtacgag 1740
ggcttctaca aacgcggctt cttcgtcacg aagaagaagt acgcggtgat agacgaggaa 1800
ggcaagataa caacgcgcgg acttgagatt gtgaggcgcg actggagcga gatagcgaaa 1860
gagacgcagg cgagggttct tgaagctttg ctaaaggacg gtgacgtcga gaaggccgtg 1920
aggatagtca aagaagttac cgaaaagctg agcaagtacg aggttccgcc ggagaagctg 1980
gtgatccacg agcagataac gagggattta aaggactaca aggcaaccgg tccccacgtt 2040

gccgttgcca agaggttggc cgcgagagga gtcaaaatac gccctggaac ggtgataagc 2100
tacatcgtgc tcaagggctc tgggaggata ggcgacaggg cgataccgtt cgacgagttc 2160
gacccgacga agcacaagta cgacgccgag tactacattg agaaccaggt tctcccagcc 2220
gttgagagaattctgagagc ct tcggttac cgcaaggaag acctgcgcta ccagaagacg 2280
agacaggttg gtctgggagc ctggctgaag ccgaagggaa cttga 2325

<210>16
<211>774
<212>PRT
<213> 热球菌属 (Thermococcus sp.) KS-1

<400>16

```
Met Ile Leu Asp Thr Asp Tyr Ile Thr Glu Asn Gly Lys Pro Val Ile
1               5                  10                  15
Arg Ile Phe Lys Lys Glu Asn Gly Glu Phe Lys Ile Glu Tyr Asp Arg
            20                  25                  30
Thr Phe Glu Pro Tyr Ile Tyr Ala Leu Leu Lys Asp Asp Ser Ala Ile
        35                  40                  45
Glu Glu Val Lys Lys Ile Thr Ala Glu Arg His Gly Thr Val Val Thr
    50                  55                  60
Val Lys Arg Ala Glu Lys Val Gln Lys Lys Phe Leu Gly Arg Pro Val
65                  70                  75                  80
Glu Val Trp Lys Leu Tyr Phe Thr His Pro Gln Asp Val Pro Ala Ile
                85                  90                  95
Arg Asp Lys Ile Arg Glu His Pro Ala Val Ile Asp Ile Tyr Glu Tyr
            100                 105                 110
Asp Ile Pro Phe Ala Lys Arg Tyr Leu Ile Asp Lys Gly Leu Val Pro
        115                 120                 125
Met Glu Gly Asp Glu Glu Leu Lys Met Leu Ala Phe Asp Ile Glu Thr
    130                 135                 140
Leu Tyr His Glu Gly Glu Glu Phe Ala Glu Gly Pro Ile Leu Met Ile
145                 150                 155                 160
Ser Tyr Ala Asp Glu Glu Gly Ala Arg Val Ile Thr Trp Lys Asn Ala
                165                 170                 175
Asp Leu Pro Tyr Val Asp Val Val Ser Thr Glu Arg Glu Met Ile Lys
            180                 185                 190
Arg Phe Leu Lys Val Val Lys Glu Lys Asp Pro Asp Val Leu Ile Thr
        195                 200                 205
Tyr Asn Gly Asp Asn Phe Asp Phe Ala Tyr Leu Lys Lys Arg Cys Glu
```

210 215 220

Lys Leu Gly Ile Asn Phe Thr Leu Gly Arg Asp Gly Ser Glu Pro Lys
225 230 235 240

Ile Gln Arg Met Gly Asp Arg Phe Ala Val Glu Val Lys Gly Arg Ile
245 250 255

His Phe Asp Leu Tyr Pro Val Ile Arg Arg Thr Ile Asn Leu Pro Thr
260 265 270

Tyr Thr Leu Glu Ala Val Tyr Glu Ala Val Phe Gly Gln Pro Lys Glu
275 280 285

Lys Val Tyr Ala Glu Glu Ile Ala Thr Ala Trp Glu Ser Gly Glu Gly
290 295 300

Leu Glu Arg Val Ala Arg Tyr Ser Met Glu Asp Ala Lys Val Thr Tyr
305 310 315 320

Glu Leu Gly Lys Glu Phe Phe Pro Met Glu Ala Gln Leu Ser Arg Leu
325 330 335

Ile Gly Gln Ser Leu Trp Asp Val Ser Arg Ser Ser Thr Gly Asn Leu
340 345 350

Val Glu Trp Phe Leu Leu Arg Lys Ala Tyr Glu Arg Asn Glu Leu Ala
355 360 365

Pro Asn Lys Pro Asp Glu Lys Glu Leu Ala Arg Arg Arg Gln Ser Tyr
370 375 380

Glu Gly Gly Tyr Val Lys Glu Pro Glu Arg Gly Leu Trp Glu Asn Ile
385 390 395 400

Val Tyr Leu Asp Phe Arg Ser Leu Tyr Pro Ser Ile Ile Ile Thr His
405 410 415

Asn Val Ser Pro Asp Thr Leu Asn Arg Glu Gly Cys Lys Glu Tyr Asp
420 425 430

Val Ala Pro Gln Val Gly His Arg Phe Cys Lys Asp Phe Pro Gly Phe
435 440 445

Ile Pro Ser Leu Leu Gly Asp Leu Leu Glu Glu Arg Gln Lys Ile Lys
450 455 460

Lys Lys Met Lys Ala Thr Ile Asp Pro Ile Glu Arg Lys Leu Leu Asp
465 470 475 480

Tyr Arg Gln Arg Ala Ile Lys Ile Leu Ala Asn Ser Tyr Tyr Gly Tyr
485 490 495

Tyr Gly Tyr Ala Arg Ala Arg Trp Tyr Cys Lys Glu Cys Ala Glu Ser
500 505 510

Val Thr Ala Trp Gly Arg Glu Tyr Ile Thr Met Thr Ile Arg Glu Ile
515 520 525

Glu Glu Lys Tyr Gly Phe Lys Val Ile Tyr Ser Asp Thr Asp Gly Phe
530 535 540
Phe Ala Thr Ile Pro Gly Ala Asp Ala Glu Thr Val Lys Lys Lys Ala
545 550 555 560
Met Glu Phe Leu Lys Tyr Ile Asn Ala Lys Leu Pro Gly Ala Leu Glu
565 570 575
Leu Glu Tyr Glu Gly Phe Tyr Lys Arg Gly Phe Phe Val Thr Lys Lys
580 585 590
Lys Tyr Ala Val Ile Asp Glu Glu Gly Lys Ile Thr Thr Arg Gly Leu
595 600 605
Glu Ile Val Arg Arg Asp Trp Ser Glu Ile Ala Lys Glu Thr Gln Ala
610 615 620
Arg Val Leu Glu Ala Leu Leu Lys Asp Gly Asp Val Glu Lys Ala Val
625 630 635 640
Arg Ile Val Lys Glu Val Thr Glu Lys Leu Ser Lys Tyr Glu Val Pro
645 650 655
Pro Glu Lys Leu Val Ile His Glu Gln Ile Thr Arg Asp Leu Lys Asp
660 665 670
Tyr Lys Ala Thr Gly Pro His Val Ala Val Ala Lys Arg Leu Ala Ala
675 680 685
Arg Gly Val Lys Ile Arg Pro Gly Thr Val Ile Ser Tyr Ile Val Leu
690 695 700
Lys Gly Ser Gly Arg Ile Gly Asp Arg Ala Ile Pro Phe Asp Glu Phe
705 710 715 720
Asp Pro Thr Lys His Lys Tyr Asp Ala Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln
725 730 735
Val Leu Pro Ala Val Glu Arg Ile Leu Arg Ala Phe Gly Tyr Arg Lys
740 745 750
Glu Asp Leu Arg Tyr Gln Lys Thr Arg Gln Val Gly Leu Gly Ala Trp
755 760 765
Leu Lys Pro Lys Gly Thr
770

<210>17
<211>40
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 设计用于扩增热球菌属 (Thermococcus sp.) 基因组 DNA 的寡核苷酸引物 TPPolBF1

<400>17
ttaatacgac tcactatagg cgctacctca tmgayaargg 40

<210>18
<211>39
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 设计用于扩增热球菌属 (Thermococcus sp.) 基因组 DNA 的寡核苷酸引物 TTPolBR5

<400>18
gctagttatt gctcagcggg tatctggyga gacrttrtg 39

<210>19
<211>21
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 设计用于扩增速生热球菌 (Thermococcus celer) 基因组 DNA 的寡核苷酸引物 Tce01

<400>19
cgtggtaaga gggtctcgaa t 21

<210>20
<211>21
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 设计用于扩增速生热球菌 (Thermococcus celer) 基因组 DNA 的寡核苷酸引物 Tce02

<400>20
ctcaagggct ccggaaggat a 21

<210>21
<211>36
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 设计用于扩增速生热球菌 (Thermococcus celer) 基因组 DNA 的寡核苷酸引物 TceNde

<400>21
aatccaacgg gtggtcatat gatcctcgac gctgac 36

<210>22
<211>39
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 设计用于扩增速生热球菌 (Thermococcus celer) 基因组 DNA 的寡核苷酸引物 TceBgPs

<400>22
cagagaggag catgcagatc ttcacccctt ccccgcgtt 39

<210>23
<211>2325
<212>DNA
<213> 速生热球菌 (Thermococcus celer)

<400>23
atgatcctcg acgctgacta catcaccgaa gatgggaagc ccgtcgtgag gatattcagg 60
aaggagaagg gcgagttcag aatcgactac gacagggact tcgagcccta catctacgcc 120
ctcctgaagg acgattcggc catcgaggag gtgaagagga taaccgttga gcgccacggg 180
aaggccgtca gggttaagcg ggtggagaag gtcgaaaaga agttcctcaa caggccgata 240
gaggtctgga agctctactt caatcacccg caggacgttc cggcgataag ggacgagata 300
aggaagcatc cggccgtcgt tgatatctac gagtacgaca tccccttcgc caagcgctac 360

ctcatcgata aggggctcgt cccgatggag ggggaggagg agctcaaact gatggccttc 420
gacatcgaga ccctctacca cgagggagac gagttcgggg aggggccgat cctgatgata 480
agctacgccg acggggacgg ggcgagggtc ataacctgga agaagatcga cctcccctac 540
gtcgacgtcg tctcgaccga gaaggagatg ataaagcgct tcctccaggt ggtgaaggag 600
aaggacccgg acgtgctcgt aacttacaac ggcgacaact tcgacttcgc ctacctgaag 660
agacgctccg aggagcttgg attgaagttc atcctcggga gggacgggag cgagcccaag 720
atccagcgca tgggcgaccg cttcgccgtc gaggtgaagg ggaggataca cttcgacctc 780
tacccggtga taaggcgcac cgtgaacctg ccgacctaca cgctcgaggc ggtctacgag 840
gccatcttcg ggaggccaaa ggagaaggtc tacgccgggg agatagtgga ggcctgggaa 900
accggcgagg gtcttgagag ggttgcccgc tactccatgg aggacgcaaa ggttaccttc 960
gagctcggga gggagttctt cccgatggag gcccagctct cgaggctcat cggccagggt 1020
ctctgggacg tctcccgctc gagcaccggc aacctggtcg agtggttcct cctgaggaag 1080
gcctacgaga ggaacgaact ggccccgaac aagccgagcg gccgggaagt ggagatcagg 1140
aggcgtggct acgccggtgg ttacgttaag gagccggaga ggggtttatg ggagaacatc 1200
gtgtacctcg actttcgctc tctttacccc tccatcatca taacccacaa cgtctcgccc 1260
gataccctaa acagggaggg ctgtgagaac tacgacgtcg ccccccaggt ggggcataag 1320
ttctgcaaag attttccggg cttcatcccg agcctgctcg gaggcctgct tgaggagagg 1380
cagaagataaagcggaggat gaaggcctct gtggatcccg ttgagcggaa gctcctcgat 1440
tacaggcaga gggccatcaa gatactggcc aacagcttct acggatacta cggctacgcg 1500
agggcgaggt ggtactgcag ggagtgcgcg gagagcgtta ccgcctgggg cagggagtac 1560
atcgataggg tcatcaggga gctcgaggag aagttcggct tcaaggtgct ctacgcggac 1620
acggacggac tgcacgccac gatccccggg gcggacgccg ggaccgtcaa ggagagggcg 1680
aggggttcc tgagatacat caaccccaag ctccccggcc tcctggagct cgagtacgag 1740
gggttctacc tgaggggttt cttcgtgacg aagaagaagt acgcggtcat agacgaggag 1800
ggcaagataa ccacgcgcgg cctcgagata gtcaggcggg actggagcga ggtggccaag 1860
gagacgcagg cgagggtcct ggaggcgata ctgaggcacg gtgacgtcga ggaggccgtt 1920
agaatcgtca gggaggtaac cgaaaagctg agcaagtacg aggttccgcc ggagaaactg 1980
gtgatccacg agcagataac gagggatttg agggactaca aagccacggg accgcacgtg 2040
gcggtggcga agcgcctggc cgggaggggg gtaaggatac gccccgggac ggtgataagc 2100
tacatcgtcc tcaagggctc cggaaggata ggggacaggg cgattccctt cgacgagttc 2160
gacccgacta agcacaggta cgacgccgac tactacatcg agaaccaggt tctgccagcc 2220
gtcgagagga tcctgaaggc cttcggctac cgcaaggagg acctgaaata ccagaagacg 2280
aggcaggtgg gcctgggtgc gtggctcaac gcggggaagg ggtga 2325

<210>24
<211>774
<212>PRT
<213> 速生热球菌 (Thermococcus celer)

<400>24

Met Ile Leu Asp Ala Asp Tyr Ile Thr Glu Asp Gly Lys Pro Val Val
1 5 10 15
Arg Ile Phe Arg Lys Glu Lys Gly Glu Phe Arg Ile Asp Tyr Asp Arg
20 25 30
Asp Phe Glu Pro Tyr Ile Tyr Ala Leu Leu Lys Asp Asp Ser Ala Ile
35 40 45
Glu Glu Val Lys Arg Ile Thr Val Glu Arg His Gly Lys Ala Val Arg
50 55 60
Val Lys Arg Val Glu Lys Val Glu Lys Lys Phe Leu Asn Arg Pro Ile
65 70 75 80
Glu Val Trp Lys Leu Tyr Phe Asn His Pro Gln Asp Val Pro Ala Ile
85 90 95
Arg Asp Glu Ile Arg Lys His Pro Ala Val Val Asp Ile Tyr Glu Tyr
100 105 110
Asp Ile Pro Phe Ala Lys Arg Tyr Leu Ile Asp Lys Gly Leu Val Pro
115 120 125
Met Glu Gly Glu Glu Glu Leu Lys Leu Met Ala Phe Asp Ile Glu Thr
130 135 140
Leu Tyr His Glu Gly Asp Glu Phe Gly Glu Gly Pro Ile Leu Met Ile
145 150 155 160
Ser Tyr Ala Asp Gly Asp Gly Ala Arg Val Ile Thr Trp Lys Lys Ile
165 170 175
Asp Leu Pro Tyr Val Asp Val Val Ser Thr Glu Lys Glu Met Ile Lys
180 185 190
Arg Phe Leu Gln Val Val Lys Glu Lys Asp Pro Asp Val Leu Val Thr
195 200 205
Tyr Asn Gly Asp Asn Phe Asp Phe Ala Tyr Leu Lys Arg Arg Ser Glu
210 215 220
Glu Leu Gly Leu Lys Phe Ile Leu Gly Arg Asp Gly Ser Glu Pro Lys
225 230 235 240
Ile Gln Arg Met Gly Asp Arg Phe Ala Val Glu Val Lys Gly Arg Ile
245 250 255
His Phe Asp Leu Tyr Pro Val Ile Arg Arg Thr Val Asn Leu Pro Thr
260 265 270
Tyr Thr Leu Glu Ala Val Tyr Glu Ala Ile Phe Gly Arg Pro Lys Glu
275 280 285
Lys Val Tyr Ala Gly Glu Ile Val Glu Ala Trp Glu Thr Gly Glu Gly
290 295 300

Leu Glu Arg Val Ala Arg Tyr Ser Met Glu Asp Ala Lys Val Thr Phe
305 310 315 320
Glu Leu Gly Arg Glu Phe Phe Pro Met Glu Ala Gln Leu Ser Arg Leu
325 330 335
Ile Gly Gln Gly Leu Trp Asp Val Ser Arg Ser Ser Thr Gly Asn Leu
340 345 350
Val Glu Trp Phe Leu Leu Arg Lys Ala Tyr Glu Arg Asn Glu Leu Ala
355 360 365
Pro Asn Lys Pro Ser Gly Arg Glu Val Glu Ile Arg Arg Arg Gly Tyr
370 375 380
Ala Gly Gly Tyr Val Lys Glu Pro Glu Arg Gly Leu Trp Glu Asn Ile
385 390 395 400
Val Tyr Leu Asp Phe Arg Ser Leu Tyr Pro Ser Ile Ile Ile Thr His
405 410 415
Asn Val Ser Pro Asp Thr Leu Asn Arg Glu Gly Cys Glu Asn Tyr Asp
420 425 430
Val Ala Pro Gln Val Gly His Lys Phe Cys Lys Asp Phe Pro Gly Phe
435 440 445
Ile Pro Ser Leu Leu Gly Gly Leu Leu Glu Glu Arg Gln Lys Ile Lys
450 455 460
Arg Arg Met Lys Ala Ser Val Asp Pro Val Glu Arg Lys Leu Leu Asp
465 470 475 480
Tyr Arg Gln Arg Ala Ile Lys Ile Leu Ala Asn Ser Phe Tyr Gly Tyr
485 490 495
Tyr Gly Tyr Ala Arg Ala Arg Trp Tyr Cys Arg Glu Cys Ala Glu Ser
500 505 510
Val Thr Ala Trp Gly Arg Glu Tyr Ile Asp Arg Val Ile Arg Glu Leu
515 520 525
Glu Glu Lys Phe Gly Phe Lys Val Leu Tyr Ala Asp Thr Asp Gly Leu
5305 35 540
His Ala Thr Ile Pro Gly Ala Asp Ala Gly Thr Val Lys Glu Arg Ala
545 550 555 560
Arg Gly Phe Leu Arg Tyr Ile Asn Pro Lys Leu Pro Gly Leu Leu Glu
565 570 575
Leu Glu Tyr Glu Gly Phe Tyr Leu Arg Gly Phe Phe Val Thr Lys Lys
580 585 590
Lys Tyr Ala Val Ile Asp Glu Glu Gly Lys Ile Thr Thr Arg Gly Leu
595 600 605
Glu Ile Val Arg Arg Asp Trp Ser Glu Val Ala Lys Glu Thr Gln Ala

610 615 620

Arg Val Leu Glu Ala Ile Leu Arg His Gly Asp Val Glu Glu Ala Val
625 630 635 640
Arg Ile Val Arg Glu Val Thr Glu Lys Leu Ser Lys Tyr Glu Val Pro
645 650 655
Pro Glu Lys Leu Val Ile His Glu Gl nIle Thr Arg Asp Leu Arg Asp
660 665 670
Tyr Lys Ala Thr Gly Pro His Val Ala Val Ala Lys Arg Leu Ala Gly
675 680 685
Arg Gly Val Arg Ile Arg Pro Gly Thr Val Ile Ser Tyr Ile Val Leu
690 695 700
Lys Gly Ser Gly Arg Ile Gly Asp Arg Ala Ile Pro Phe Asp Glu Phe
705 710 715 720
Asp Pro Thr Lys His Arg Tyr Asp Ala Asp Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln
725 730 735
Val Leu Pro Ala Val Glu Arg Ile Leu Lys Ala Phe Gly Tyr Arg Lys
740 745 750
Glu Asp Leu Lys Tyr Gln Lys Thr Arg Gln Val Gly Leu Gly Ala Trp
755 760 765
Leu Asn Ala Gly Lys Gly
770

<210>25
<211>21
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 设计用于扩增 Thermococcus siculi 基因组 DNA 的寡核苷酸引物 Tsi01

<400>25
ctcatggtag agcgtctcaa t 21

<210>26
<211>21
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 设计用于扩增 Thermococcus siculi 基因组 DNA 的寡核苷酸引物 Tsi06

<400>26
catcagctac atcgtgctca a 21

<210>27
<211>36
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 设计用于扩增 Thermococcus siculi 基因组 DNA 的寡核苷酸引物 TsiNde
<400>27
tacccggtgt cccatatgat cctcgacacg gactac 36

<210>28
<211>33
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 设计用于扩增 Thermococcus siculi 基因组 DNA 的寡核苷酸引物 TsiA

<400>28
ctttatgcgg acactgacgg cttcttcgcg acg 33

<210>29
<211>36
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 设计用于扩增 Thermococcus siculi 基因组 DNA 的寡核苷酸引物 TsiB

<400>29
gaagccgtca gtgtccgcat aaagtacttt aaagcc 36

<210>30
<211>39

<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 设计用于扩增 Thermococcus siculi 基因组 DNA 的寡核苷酸引物 TsiBamPst

<400>30
gttcacttgc tgcagggatc ctcacccctt ccccttcgg 39

<210>31
<211>2328
<212>DNA
<213>Thermococcus siculi

<400>31
atgatcctcg acacggacta catcacggaa gatgggaaac ccgtcataag gatattcaag 60
aaagagaacg gcgagttcaa gatcgagtac gacaggactt ttgaacccta catctacgcc 120
ctcctgaagg acgactccgc gattgaggat gttaaaaaga taaccgccga gaggcacgga 180
acggtggtga aggtcaagcg cgccgaaaag gtgcagaaga agttcctagg caggccggtt 240
gaagtctgga agctctactt cacccacccc caagatgtcc cggcgataag ggacaagatt 300
aggaagcatc cagctgtaat tgacatctac gagtacgaca taccattcgc caagcgctac 360
ctcatcgaca agggcctgat tccgatggag ggtgaagaag agcttaagat gctcgccttc 420
gacattgaga cgctctacca tgagggtgag gagttcgccg aggggcctat tctgatgata 480
agctacgccg acgagagcga ggcacgcgtc atcacctgga agaaaatcga cctcccctac 540
gttgacgtcg tctcaacgga gaaggagatg ataaagcgct tcctccgcgt tgtgaaggag 600
aaagatcccg atgtcctcat aacctacaac ggcgacaact tcgacttcgc ctacctgaag 660
aagcgctgtg aaaagctttt aataaacttc ctccttggaa gggacgggag cgagccgaag 720
atccagagaa tgggtgaccg cttcgccgtt gaggtgaagg ggaggataca cttcgacctc 780
tatcctgtaa taaggcgcac gataaacctg ccgacctaca tgcttgaggc agtctacgag 840
gccatctttg ggaagccaaa ggagaaggtt tacgccgagg agatagccac cgcttgggaa 900
accggagagg gccttgagag ggtggctcgc tactctatgg aggacgcgaa ggtcacgttt 960
gagcttggaa aggagttctt cccgatggag gcccaacttt cgaggttggt cggccagagc 1020
ttctgggatg tcgcgcgctc aagcacgggc aatctggtcg agtggttcct cctcaggaag 1080
gcctacgaga ggaacgagct ggctccaaac aagccctctg gaagggaata tgacgagagg 1140
cgcggtggat acgccggcgg ctacgtcaag gaaccggaaa agggcctgtg ggagaacata 1200
gtctacctcg actataaatc tctctacccc tcaatcatca tcacccacaa cgtctcgccc 1260
gataccctca accgcgaggg ctgtaaggag tatgacgtag ctccacaggt cggccaccgc 1320
ttctgcaagg actttccagg cttcatcccg agcctgctcg gggatctcct ggaggagagg 1380
cagaagataa agaggaagat gaaggcaaca attgacccga tcgagagaaa gctccttgat 1440

tacaggcaac gggccatcaa gatccttcta aatagttttt acggctacta cggctacgca 1500
agggctcgct ggtactgcaa ggagtgtgcc gagagcgtta cggcatgggg aagggaatat 1560
atcaccatga caatcaggga aatagaagag aagtatggct ttaaagtact ttatgcggac 1620
actgacggct tcttcgcgac gattcccggg gaagatgccg agaccatcaa aaagagggcg 1680
atggagttcc tcaagtacat aaacgccaaa ctccccggtg cgctcgaact tgagtacgag 1740
gacttctaca ggcgcggctt cttcgtcacc aagaagaaat acgcggttat cgacgaggag 1800
ggcaagataa caacgcgcgg gctggagatc gtcaggcgcg actggagcga gatagccaag 1860
gagacgcagg cgcgggttct ggaggccctt ctgaaggacg gtgacgtcga agaggccgtg 1920
agcatagtca aagaagtgac cgagaagctg agcaagtacg aggttccgcc ggagaagctc 1980
gttatccacg agcagataac gcgcgagctg aaggactaca aggcaacggg accacacgtg 2040
gcgatagcga agaggttagc cgcgagaggc gtcaaaatcc gccccgggac agtcatcagc 2100
tacatcgtgc tcaagggctc cgggaggata ggcgacaggg cgattccctt cgacgagttc 2160
gaccccacga agcacaagta cgatgcagag tactacatcg agaaccaggt tctacctgcc 2220
gtcgagagga ttctgaaggc cttcggctat cgcggtgagg agctcagata ccagaagacg 2280
aggcaggttg gacttggggc gtggctgaag ccgaagggga aggggtga 2328

<210>32
<211>775
<212>PRT
<213>Thermococcus siculi

<400>32

```
Met Ile Leu Asp Thr Asp Tyr Ile Thr Glu Asp Gly Lys Pro Val Ile
1               5                  10                  15
Arg Ile Phe Lys Lys Glu Asn Gly Glu Phe Lys Ile Glu Tyr Asp Arg
            20                  25                  30
Thr Phe Glu Pro Tyr Ile Tyr Ala Leu Leu Lys Asp Asp Ser Ala Ile
        35                  40                  45
Glu Asp Val Lys Lys Ile Thr Ala Glu Arg His Gly Thr Val Val Lys
    50                  55                  60
Val Lys Arg Ala Glu Lys Val Gln Lys Lys Phe Leu Gly Arg Pro Val
65                  70                  75                  80
Glu Val Trp Lys Leu Tyr Phe Thr His Pro Gln Asp Val Pro Ala Ile
                85                  90                  95
Arg Asp Lys Ile Arg Lys His Pro Ala Val Ile Asp Ile Tyr Glu Tyr
            100                 105                 110
Asp Ile Pro Phe Ala Lys Arg Tyr Leu Ile Asp Lys Gly Leu Ile Pro
        115                 120                 125
Met Glu Gly Glu Glu Glu Leu Lys Met Leu Ala Phe Asp Ile Glu Thr
```

130 135 140

Leu Tyr His Glu Gly Glu Glu Phe Ala Glu Gly Pro Ile Leu Met Ile
145 150 155 160

Ser Tyr Ala Asp Glu Ser Glu Ala Arg Val Ile Thr Trp Lys Lys Ile
165 170 175

Asp Leu Pro Tyr Val Asp Val Val Ser Thr Glu Lys Glu Met Ile Lys
180 185 190

Arg Phe Leu Arg Val Val Lys Glu Lys Asp Pro Asp Val Leu Ile Thr
195 200 205

Tyr Asn Gly Asp Asn Phe Asp Phe Ala Tyr Leu Lys Lys Arg Cys Glu
210 215 220

Lys Leu Gly Ile Asn Phe Leu Leu Gly Arg Asp Gly Ser Glu Pro Lys
225 230 235 240

Ile Gln Arg Met Gly Asp Arg Phe Ala Val Glu Val Lys Gly Arg Ile
245 250 255

His Phe Asp Leu Tyr Pro Val Ile Arg Arg Thr Ile Asn Leu Pro Thr
260 265 270

Tyr Met Leu Glu Ala Val Tyr Glu Ala Ile Phe Gly Lys Pro Lys Glu
275 280 285

Lys Val Tyr Ala Glu Glu Ile Ala Thr Ala Trp Glu Thr Gly Glu Gly
290 295 300

Leu Glu Arg Val Ala Arg Tyr Ser Met Glu Asp Ala Lys Val Thr Phe
305 310 315 320

Glu Leu Gly Lys Glu Phe Phe Pro Met Glu Ala Gln Leu Ser Arg Leu
325 330 335

Val Gly Gln Ser Phe Trp Asp Val Ala Arg Ser Ser Thr Gly Asn Leu
340 345 350

Val Glu Trp Phe Leu Leu Arg Lys Ala Tyr Glu Arg Asn Glu Leu Ala
355 360 365

Pro Asn Lys Pro Ser Gly Arg Glu Tyr Asp Glu Arg Arg Gly Gly Tyr
370 375 380

Ala Gly Gly Tyr Val Lys Glu Pro Glu Lys Gly Leu Trp Glu Asn Ile
385 390 395 400

Val Tyr Leu Asp Tyr Lys Ser Leu Tyr Pro Ser Ile Ile Ile Thr His
405 410 415

Asn Val Ser Pro Asp Thr Leu Asn Arg Glu Gly Cys Lys Glu Tyr Asp
420 425 430

Val Ala Pro Gln Val Gly His Arg Phe Cys Lys Asp Phe Pro Gly Phe
435 440 445

Ile Pro Ser Leu Leu Gly Asp Leu Leu Glu Glu Arg Gln Lys Ile Lys
450 455 460
Arg Lys Met Lys Ala Thr Ile Asp Pro Ile Glu Arg Lys Leu Leu Asp
465 470 475 480
Tyr Arg Gln Arg Ala Ile Lys Ile Leu Leu Asn Ser Phe Tyr Gly Tyr
485 490 495
Tyr Gly Tyr Ala Arg Ala Arg Trp Tyr Cys Lys Glu Cys Ala Glu Ser
500 505 510
Val Thr Ala Trp Gly Arg Glu Tyr Ile Thr Met Thr Ile Arg Glu Ile
515 520 525
Glu Glu Lys Tyr Gly Phe Lys Val Leu Tyr Ala Asp Thr Asp Gly Phe
530 535 540
Phe Ala Thr Ile Pro Gly Glu Asp Ala Glu Thr Ile Lys Lys Arg Ala
545 550 555 560
Met Glu Phe Leu Lys Tyr Ile Asn Ala Lys Leu Pro Gly Ala Leu Glu
565 570 575
Leu Glu Tyr Glu Asp Phe Tyr Arg Arg Gly Phe Phe Val Thr Lys Lys
580 585 590
Lys Tyr Ala Val Ile Asp Glu Glu Gly Lys Ile Thr Thr Arg Gly Leu
595 600 605
Glu Ile Val Arg Arg Asp Trp Ser Glu Ile Ala Lys Glu Thr Gln Ala
610 615 620
Arg Val Leu Glu Ala Leu Leu Lys Asp Gly Asp Val Glu Glu Ala Val
625 630 635 640
Ser Ile Val Lys Glu Val Thr Glu Lys Leu Ser Lys Tyr Glu Val Pro
645 650 655
Pro Glu Lys Leu Val Ile His Glu Gln Ile Thr Arg Glu Leu Lys Asp
660 665 670
Tyr Lys Ala Thr Gly Pro His Val Ala Ile Ala Lys Arg Leu Ala Ala
675 680 685
Arg Gly Val Lys Ile Arg Pro Gly Thr Val Ile Ser Tyr Ile Val Leu
690 695 700
Lys Gly Ser Gly Arg Ile Gly Asp Arg Ala Ile Pro Phe Asp Glu Phe
705 710 715 720
Asp Pro Thr Lys His Lys Tyr Asp Ala Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln
725 730 735
Val Leu Pro Ala Val Glu Arg Ile Leu Lys Ala Phe Gly Tyr Arg Gly
740 745 750
Glu Glu Leu Arg Tyr Gln Lys Thr Arg Gln Val Gly Leu Gly Ala Trp

755 760 765

Leu Lys Pro Lys Gly Lys Gly
770 775

<210>33
<211>45
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 设计用于扩增 M13 基因组 DNA 的寡核苷酸引物 HT

<400>33
ccggaaccgc ctccctcaga gccgccaccc tcagaaccgc caccc 45

<210>34
<211>38
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 设计用于扩增嗜热栖热菌 (Thermus thermophilus)HB-8 基因组 DNA 的寡核苷酸引
物 c280/RG34-F

<400>34
atatcatatg aaagaggcct tcaaggaggccctcgccc 38
<210>35
<211>40
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 设计用于扩增嗜热栖热菌 (Thermus thermophilus)HB-8 基因组 DNA 的寡核苷酸引
物 c280/RG34-R

<400>35
atatagatct ttattacgat ggccatacca acctcctgta 40

<210>36
<211>38
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 设计用于扩增嗜热栖热菌(Thermus thermophilus)HB-8基因组DNA的寡核苷酸引
物 c240/RA18-F

<400>36
atatcatatg aaagtagagg aagtggttct tcccggcg 38

<210>37
<211>40
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 设计用于扩增嗜热栖热菌(Thermus thermophilus)HB-8基因组DNA的寡核苷酸引
物 c240/RA18-R

<400>37
atatagatct ttattagaag ctccccttca gggcctccac 40

<210>38
<211>35
<212>DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 设计用于扩增 λDNA 的寡核苷酸引物 λ-1B

<400>38
gatgagttcg tgtccgtaca actggcgtaa tcatg 35

<210>39
<211>29

<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 设计用于扩增 λDNA 的寡核苷酸引物 λ-9B

<400>39
tgtccgtcag ctcataacgg tacttcacg 29

<210>40
<211>28
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 设计用于扩增 λDNA 的寡核苷酸引物 λ-10D

<400>40
atatctggcg gtgcaatatc ggta ctgt 28
21

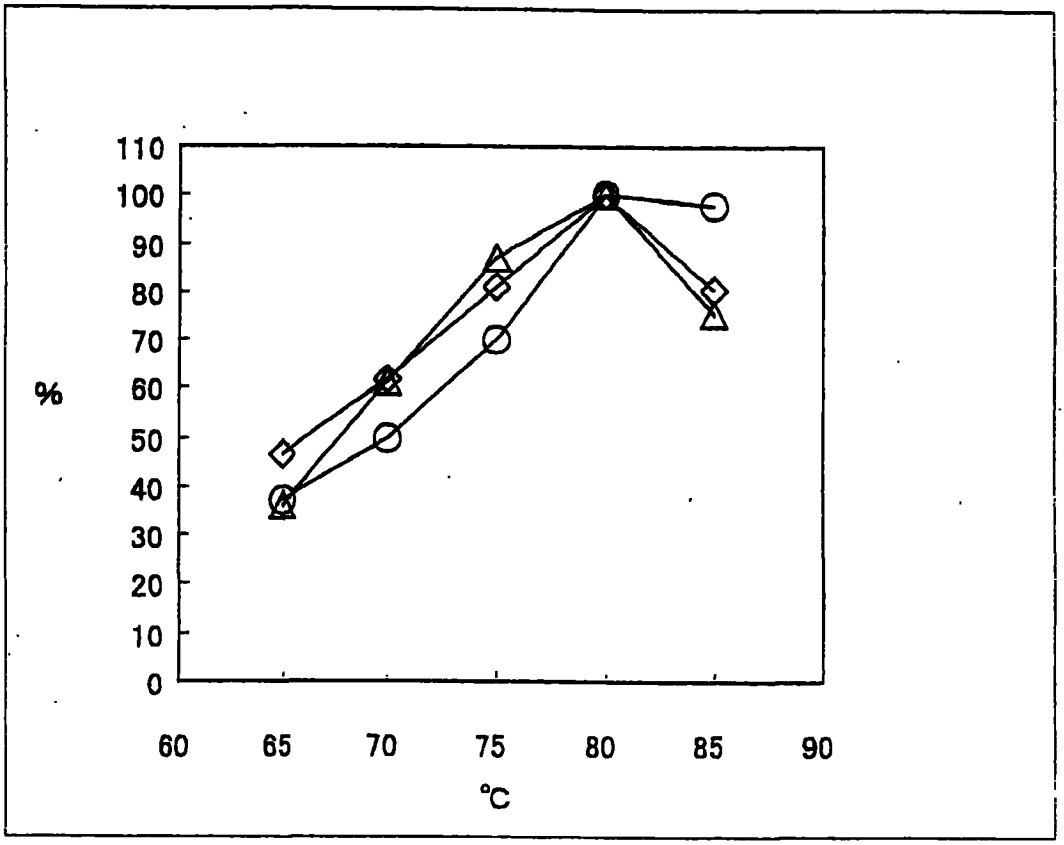


图 1

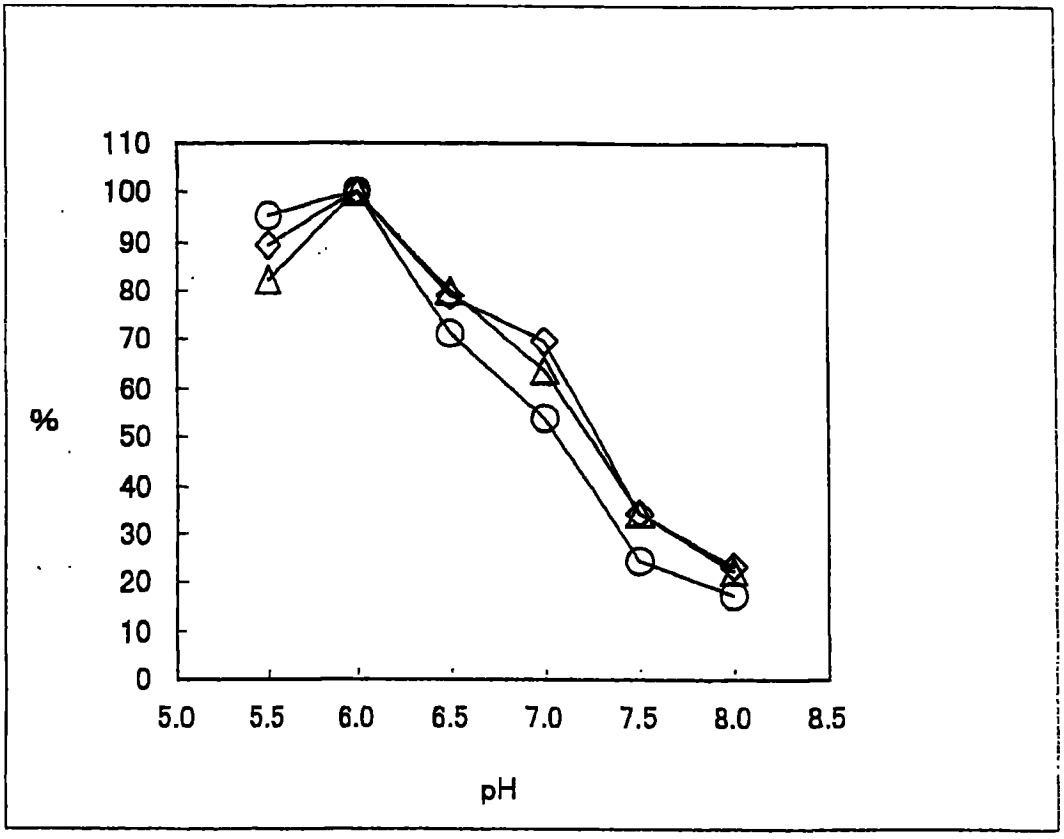


图 2