

(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
2020 年 6 月 25 日 (25.06.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/124481 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 9/12 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
C12N 15/54 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2018/122334

(22) 国际申请日: 2018 年 12 月 20 日 (20.12.2018)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

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

(72) 发明人: 张晓红 (ZHANG, Xiaohong); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 兰茜 (LAN, Xi); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 张周刚 (ZHANG, Zhongang); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 郑越 (ZHENG, Yue); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 董宇亮 (DONG, Yuliang); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 章文蔚 (ZHANG, Wenwei); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 徐崇钧 (XU, Chongjun); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。

(74) 代理人: 北京清亦华知识产权代理事务所 (普通合伙) (TSINGYIHUA INTELLECTUAL

PROPERTY LLC); 中国北京市海淀区清华园清华大学照澜院商业楼301室, Beijing 100084 (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, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, 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, 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 WITH IMPROVED ENZYME ACTIVITY AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 酶活性提高的DNA聚合酶及其应用

(57) Abstract: Provided are a Taq DNA polymerase with improved enzyme activity and an application thereof. Compared with the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2, the DNA polymerase has at least one of the following mutation sites: E315K, E507R, E507H, E524K, L552R, D578N, E742R, E742K, A743R, A743K, K53S/E507K, K56N/E507K, K56S/E507K, K56T/E507K, K56Q/E524K, L245M/E524K, L245M/L552R, E315K/S357C, K56Q/E507K, E57D/E507K, K56Q/E507R, K56T/E524K, E57D/E524K, E57D/E742R and L245M/E315K.

(57) 摘要: 提供的是一种酶活性提高的Taq DNA聚合酶及其应用。所述DNA聚合酶与SEQ ID NO:2所示氨基酸序列相比, 具有如下突变位点中的至少一种: E315K、E507R、E507H、E524K、L552R、D578N、E742R、E742K、A743R、A743K、K53S/E507K、K56N/E507K、K56S/E507K、K56T/E507K、K56Q/E524K、L245M/E524K、L245M/L552R、E315K/S357C、K56Q/E507K、E57D/E507K、K56Q/E507R、K56T/E524K、E57D/E524K、E57D/E742R、L245M/E315K。

WO 2020/124481 A1

酶活性提高的 DNA 聚合酶及其应用

优先权信息

无。

5

技术领域

本发明涉及酶工程领域，具体涉及一种酶活性提高的 DNA 聚合酶及其应用。

背景技术

10 聚合酶链式反应（PCR）是一种用于放大扩增特定的 DNA 片段的分子生物学技术，它不仅可用于基因分离、克隆和核酸序列分析等基础研究,还可用于疾病的诊断、测序或任何有 DNA，RNA 的地方。

PCR 反应中需要 DNA 聚合酶、模板、引物、dNTP 的参与，其中 DNA 聚合酶对 PCR 反应起着至关重要的作用，因此，关于 DNA 聚合酶改造以适用于不同应用的报道已有很多，
15 如提高扩增速率、对抑制剂的耐受程度等。

多重 PCR 较常规 PCR 的特点是其在同一 PCR 反应体系里加上二对以上引物，同时扩增出多个核酸片段，其还具有高效性、系统性以及经济简便性的特点。由于扩增多条片段，多重 PCR 不仅要求 DNA 聚合酶具有较高的活性，还需要有一定的扩增均一性，即对同一体系中不同片段的扩增均较好。

20 虽然目前有很多关于 DNA 聚合酶改造的研究，但是能否用于多重的却不明确。基于多重 PCR 应用的优越性的可预见的广泛的应用范围，急需找到一种能应用于多重 PCR 的 DNA 聚合酶。

发明内容

25 本发明旨在至少在一定程度上解决相关技术中的技术问题之一。为此，本发明的一个目的在于提出一种酶活性提高的 DNA 聚合酶，该 DNA 聚合酶的酶活性相较于野生型的 DNA 聚合酶活性，有了显著提升。该 DNA 聚合酶能够应用于多重 PCR 反应体系中。由于本发明提供的 DNA 聚合酶的高活性，可以适用于模板含量低、混有抑制物质或者长片段模板的 PCR 反应。

30 PCR过程对于DNA聚合酶的要求较高，DNA聚合酶的活性等性质直接影响到PCR过程的扩增效率。但是由于用于聚合反应的聚合酶通常均是以试剂盒的形式提供，所用到的DNA聚合酶的信息很少公开，而且通常价格较贵。限制了对于DNA聚合酶性能要求较高的反应

体系中的应用。

多重PCR是在同一PCR反应体系里加上二对以上引物，同时扩增出多个核酸片段，具有高效性、系统性以及经济简便性的特点。由于扩增多条片段，多重PCR不仅要求DNA聚合酶具有较高的活性，还需要有一定的扩增均一性，即对同一体系中不同片段的扩增均较好。

5 经研究发现，野生型的DNA聚合酶在多重PCR中的扩增均一性或产量较差，无法满足大部分应用需求，因此急需寻找开发出一种能够应用于多重PCR的DNA聚合酶。

本发明通过不同的多重PCR扩增体系及活性检测筛选出的DNA聚合酶能够有效的克服该问题，且自主研发生产能大大地降低成本。所筛选出的突变体可能不仅能应用于多重PCR，也能用于低模板投入量或含有抑制剂（如盐、血液）的PCR或长片段扩增。

10 为此，根据本发明的第一方面，本发明提供了一种DNA聚合酶，所述DNA聚合酶与SEQ ID NO:2所示氨基酸序列相比，具有如下突变位点中的至少一种：E315K、E507R、E507H、E524K、L552R、D578N、E742R、E742K、A743R、A743K、K53S/E507K、K56N/E507K、K56S/E507K、K56T/E507K、K56Q/E524K、L245M/E524K、L245M/L552R、E315K/S357C、K56Q/E507K、E57D/E507K、K56Q/E507R、K56T/E524K、E57D/E524K、E57D/E742R、
15 L245M/E315K。本发明所提供的DNA聚合酶与野生型的DNA聚合酶（SEQ ID NO:2所示氨基酸序列）相比，具有提高的聚合活性和DNA亲和力，在多重PCR反应体系中扩增效果明显改善。

根据本发明的实施例，以上所述DNA聚合酶可以进一步包括如下技术特征：

在本发明的一些实施例中，所述DNA聚合酶为Taq DNA聚合酶的突变体。

20 在本发明的一些实施例中，所述DNA聚合酶的活性与未突变的Taq DNA聚合酶活性相比，至少提高了0.5倍。

在本发明的一些实施例中，所述DNA聚合酶的活性与未突变的Taq DNA聚合酶活性相比，至少提高了1倍。

25 根据本发明的第二方面，本发明提供了一种分离的核酸分子，所述分离的核酸分子编码本发明第一方面所述的DNA聚合酶。

根据本发明的第三方面，本发明提供了一种构建体，包含本发明第二方面所述的分离的核酸分子。

在本发明的一些实施例中，所述构建体为质粒。

在本发明的一些实施例中，所述分离的核酸分子可操作地连接启动子。

30 在本发明的一些实施例中，所述启动子选自下列中的一种： λ -PL启动子、tac启动子、trp启动子、araBAD启动子和trc启动子。

根据本发明的第四方面，本发明提供了一种宿主细胞，所述宿主细胞含有本发明第三

方面所述的构建体。用来表达目的蛋白（DNA 聚合酶）的宿主细胞可以是原核细胞或者真核细胞。在至少一些实施例中，利用原核细胞表达 DNA 聚合酶，例如大肠杆菌（*Escherichia coli*）。适用于本发明的真核细胞可以是植物细胞、动物细胞（例如果蝇细胞、CHO 细胞、*C.elegans* 细胞等）、真菌细胞（例如酿酒细胞、巴斯德毕赤酵母细胞等）。

5 根据本发明的第五方面，本发明提供了一种 DNA 聚合酶的生产方法，所述 DNA 聚合酶为本发明第一方面所述的 DNA 聚合酶，所述生产方法包括：培养宿主细胞，所述宿主细胞为本发明第四方面所述的宿主细胞；将所述宿主细胞进行诱导处理，使得所述宿主细胞表达所述 DNA 聚合酶；分离获得所述 DNA 聚合酶。

在本发明的一些实施例中，所述宿主细胞为大肠杆菌。

10 根据本发明的第六方面，本发明提供了一种试剂盒，包括本发明第一方面所述的 DNA 聚合酶。含有 DNA 聚合酶的试剂盒用于 PCR 反应中，可以提高扩增的效率。

根据本发明的实施例，以上所述的试剂盒可以进一步附加如下技术特征：

在本发明的一些实施例中，所述试剂盒还包括下列中的至少一种：一种或多种核苷酸，一种或多种缓冲液，一种或多种引物，一种或多种终止剂。

15 在本发明的一些实施例中，所述终止剂为双脱氧核苷酸。

根据本发明的第七方面，本发明提供了一种扩增核酸分子的方法，所述方法包括：将至少一种核酸模板与至少一种 DNA 聚合酶混合，得到混合物，所述 DNA 聚合酶为本发明第一方面所述的 DNA 聚合酶；对所述混合物进行扩增处理，以便获得与所述至少一种核酸模板全部或部分互补的核酸分子。

20 根据本发明的实施例，以上扩增核酸分子的方法可以进一步包括如下技术特征：

在本发明的一些实施例中，所述至少一种核酸模板的最低含量为 0.001pg/μl。通常进行 DNA 扩增时，所用到的模板的含量为 0.2-2ng/μl。利用本申请提供的 DNA 聚合酶，可以显著提高聚合活性，从而能够用于低含量模板物质的扩增。例如在进行单重 PCR 扩增时，当核酸模板的核酸含量为 1pg/μl 时，进行 20 个循环，即可有明显的扩增条带；即便核酸
25 模板的核酸含量为 0.001pg/μl，进行 20 个循环，仍有较弱的条带。而当核酸模板的核酸含量为 0.001pg/μl，进行 30-40 个循环，有明显的扩增条带。

在本发明的一些实施例中，与所述至少一种核酸模板全部或部分互补的核酸分子的长度可达 10kb。由于本申请所提供的 DNA 聚合酶的高的聚合活性，因此可以应用于长片段核酸模板的扩增，所获得的扩增片段的长度可以达到 10kb。例如可以达到 2kb 以上，3kb 以上，5kb 以上，8kb 以上等等。当然应用本申请提供的 DNA 聚合酶也可以用于短片段核酸
30 模板的扩增，例如用于 100bp 以上，200bp 以上，500bp 以上的核酸模板的扩增。

根据本发明的第八方面，本发明提供了一种扩增多个核酸分子的方法，包括：将至少

两种核酸模板与至少一种 DNA 聚合酶混合，得到混合物，所述 DNA 聚合酶为本发明第一方面所述的 DNA 聚合酶；对所述混合物进行扩增处理，以便获得与所述至少两种核酸模板全部或部分互补的核酸分子。

5 本发明所取得的有益效果为：本发明所提供的突变体与相应的天然存在的DNA聚合酶相比具有提高的聚合活性和DNA亲和力，在多重PCR中的扩增效果明显改善。而且可以用于低模板物质的扩增以及长片段分子的扩增。

附图说明

10 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 是根据本发明的一个实施例提供的野生型 Taq DNA 聚合酶及其突变体的 8 重人源持家基因扩增电泳图。

图 2 是根据本发明的一个实施例提供的野生型 Taq DNA 聚合酶及其突变体的 8 重人源持家基因扩增电泳图。

15 图 3 是根据本发明的一个实施例提供的野生型 Taq DNA 聚合酶及其突变体的 8 重人源持家基因扩增电泳图。

图 4 是根据本发明的一个实施例提供的野生型 Taq DNA 聚合酶及其突变体的 5 重鼠源持家基因扩增电泳图。

20 图 5 是根据本发明的一个实施例提供的野生型 Taq DNA 聚合酶及其突变体的 5 重鼠源持家基因扩增电泳图。

图 6 是根据本发明的一个实施例提供的野生型 Taq DNA 聚合酶及其突变体的 5 重鼠源持家基因扩增电泳图。

具体实施方式

25 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，其中自始至终相同或类似的标号表示相同或类似的元件或具有相同或类似功能的元件。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。

30 为了对于本申请有更为直观的理解，下面对本申请中存在的术语进行解释和说明。本领域技术人员需要理解的是，这些解释和说明仅为了理解更为方便，不应看做是对本申请保护范围的限制。

术语“DNA聚合酶”是指表现出DNA聚合酶活性的蛋白质、多肽或者多肽片段。

术语“DNA聚合酶活性”、“聚合活性”、“DNA聚合活性”是指以DNA为模板，合

成互补DNA链的能力。

术语“突变体”、“突变”或者“突变型”等，是指相比较于野生型的 DNA 序列或者野生型的氨基酸序列，具有一个或者多个突变。当然这种突变可以发生在核酸水平上或者氨基酸水平上。

5 在本文中，当表示突变位点时，依照本领域通常的表述方式，即为“突变前氨基酸缩写+位点+突变后氨基酸缩写”，例如“E315K”，其中“E”代表突变前的氨基酸，“315”为相应的突变位点，“K”代表突变后的氨基酸。其中“E”和“K”均是采用本领域通用的当个字母缩写代表氨基酸。当表述组合突变时，两个突变之间用“/”连接，例如突变位点“K53S/E507K”代表相较于野生型，在第 53 个氨基酸和第 507 个氨基酸同时发生了突变。

10 根据本发明的实施例，本发明提供了一种 DNA 聚合酶，所述 DNA 聚合酶与 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列相比，具有如下突变位点中的至少一种：E315K、E507R、E507H、E524K、L552R、D578N、E742R、E742K、A743R、A743K、K53S/E507K、K56N/E507K、K56S/E507K、K56T/E507K、K56Q/E524K、L245M/E524K、L245M/L552R、E315K/S357C、K56Q/E507K、E57D/E507K、K56Q/E507R、K56T/E524K、E57D/E524K、E57D/E742R、
15 L245M/E315K。其中 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列即为野生型的 Taq DNA 聚合酶的氨基酸序列。本申请所提供的 DNA 聚合酶与野生型的 DNA 聚合酶的氨基酸序列相比，表现为单个位点的突变，或者两个位点的组合突变，使得 DNA 聚合酶的活性相较于野生型的 Taq DNA 聚合酶的活性，至少提高了 0.5 倍。在至少一种具体实施方式中，所述 DNA 聚合酶的活性相较于野生型的 DNA 聚合酶的活性至少提高了 1 倍。在另一种具体实施方式中，所述 DNA
20 聚合酶的活性相较于野生型的 DNA 聚合酶的活性至少提高了 2 倍。在至少一些实施中，所述 DNA 聚合酶相较于野生型的 DNA 聚合酶具有提高的扩增均一性。本文中“扩增均一性”是指同一反应体系中有多种核酸模板和多种引物时，DNA 聚合酶对于每种核酸模板和相应引物的扩增能力的一致性。

25 在本发明的至少一些实施方式中，与 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列相比，所述 DNA 聚合酶具有 E315K 突变。

在本发明的至少一些实施方式中，与 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列相比，所述 DNA 聚合酶具有 E507R 突变。

在本发明的至少一些实施方式中，与 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列相比，所述 DNA 聚合酶具有 E507H 突变。

30 在本发明的至少一些实施方式中，与 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列相比，所述 DNA 聚合酶具有 E524K 突变。

在本发明的至少一些实施方式中，与 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列相比，所述 DNA 聚

合酶具有 L552R 突变。

在本发明的至少一些实施方式中，与 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列相比，所述 DNA 聚合酶具有 D578N 突变。

在本发明的至少一些实施方式中，与 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列相比，所述 DNA 聚合酶具有 E742R 突变。

在本发明的至少一些实施方式中，与 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列相比，所述 DNA 聚合酶具有 E742K 突变。

在本发明的至少一些实施方式中，与 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列相比，所述 DNA 聚合酶具有 A743R 突变。

10 在本发明的至少一些实施方式中，与 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列相比，所述 DNA 聚合酶具有 A743K 突变。

在本发明的至少一些实施方式中，与 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列相比，所述 DNA 聚合酶具有 K53S/E507K 突变。

15 在本发明的至少一些实施方式中，与 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列相比，所述 DNA 聚合酶具有 K56N/E507K 突变。

在本发明的至少一些实施方式中，与 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列相比，所述 DNA 聚合酶具有 K56S/E507K 突变。

在本发明的至少一些实施方式中，与 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列相比，所述 DNA 聚合酶具有 K56T/E507K 突变。

20 在本发明的至少一些实施方式中，与 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列相比，所述 DNA 聚合酶具有 K56Q/E524K 突变。

在本发明的至少一些实施方式中，与 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列相比，所述 DNA 聚合酶具有 L245M/E524K 突变。

25 在本发明的至少一些实施方式中，与 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列相比，所述 DNA 聚合酶具有 L245M/L552R 突变。

在本发明的至少一些实施方式中，与 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列相比，所述 DNA 聚合酶具有 E315K/S357C 突变。

在本发明的至少一些实施方式中，与 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列相比，所述 DNA 聚合酶具有 K56Q/E507K 突变。

30 在本发明的至少一些实施方式中，与 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列相比，所述 DNA 聚合酶具有 E57D/E507K 突变。

在本发明的至少一些实施方式中，与 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列相比，所述 DNA 聚

合酶具有 K56Q/E507R 突变。

在本发明的至少一些实施方式中，与 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列相比，所述 DNA 聚合酶具有 K56T/E524K 突变。

在本发明的至少一些实施方式中，与 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列相比，所述 DNA 聚合酶具有 E57D/E524K 突变。

在本发明的至少一些实施方式中，与 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列相比，所述 DNA 聚合酶具有 E57D/E742R 突变。

在本发明的至少一些实施方式中，与 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列相比，所述 DNA 聚合酶具有 L245M/E315K 突变。

10 利用野生型 Taq DNA 聚合酶进行突变设计，来提高酶对 DNA 的亲合力，从而提高 DNA 聚合酶的活性。同时考虑到若 DNA 聚合酶的聚合活性过强，与 DNA 的亲合力过强，可能会带来一些其他的不佳影响，例如可能会导致扩增的均一性较差等等。因此，综合多种因素，设计了多个突变位点，并通过 DNA 聚合酶活性以及多重 PCR 扩增试验进行了验证。

本发明通过基因工程手段，构建了含有编码 Taq DNA 聚合酶突变体的序列，并且转化 15 *E. Coli* 进行 Taq DNA 聚合酶的表达和纯化。其中通过定点突变 PCR 的手段构建了含有编码不同 Taq DNA 聚合酶突变体序列的质粒。然后将构建好的含有编码不同 Taq DNA 聚合酶突变体序列的质粒转入 *E. Coli* 中进行培养并诱导表达，最后通过亲和层析及离子交换层析的方法对 DNA 聚合酶进行纯化提取，从而得到含有不同突变的 Taq DNA 聚合酶。

为了验证所获得的 DNA 聚合酶的酶活性。通过如下方法对突变体的酶活性进行了测定： 20 使用结合有引物的 M13 ssDNA 为模板-引物复合体，在 DNA 聚合酶的作用下发生 DNA 链的延伸，得到延长的双链 DNA 产物。将荧光分子参入反应产物，通过检测双链 DNA 量来计算 DNA 聚合酶的活性。通过该方法筛选出了聚合酶活性提高的 Taq DNA 聚合酶突变体。

对于本申请提供的突变体，利用多重 PCR 的反应体系，对突变体是否能够满足多重 PCR 反应的要求进行了验证。利用本申请提供的突变体，分别进行人源持家基因的 8 重 PCR 扩增 25 和鼠源持家基因的 5 重 PCR 扩增，比较突变体和野生型 DNA 聚合酶的聚合活性以及 PCR 扩增效果。经过实验验证，本申请所提供的突变体能够满足多重 PCR 中对于 DNA 聚合酶的要求。

下面将结合实施例对本发明的方案进行解释。本领域技术人员将会理解，下面的实施例仅用于说明本发明，而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体技术或条件的，按照本领域内的文献所描述的技术或条件或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注 30 明生产厂商者，均为可以通过市购获得的常规产品。

实施例 1 Taq DNA 聚合酶及其突变体表达质粒的构建

具体实施步骤如下：

(1) 野生型 Taq DNA 聚合酶表达质粒的构建

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

野生型Taq DNA聚合酶的核酸序列 (SEQ ID NO:1)

```
5  ATGCGTGGCATGCTGCCGCTGTTCGAGCCGAAGGGTCGTGTGCTGCTGGTTGACGGC
   CACCACCTGGCGTACCGTACCTTTCACGCGCTGAAGGGTCTGACCACCAGCCGTGGC
   GAACCGGTGCAGGCGGTTTATGGTTTTCGCGAAAAGCCTGCTGAAGGCGCTGAAAGAG
   GACGGCGATGCGGTGATCGTGGTTTTTCGATGCGAAGGCGCCGAGCTTTCGTACGAA
   GCGTACGGTGGCTATAAAGCGGGTCGTGCGCCGACCCCGGAGGACTTTCGCGCTCAA
10  CTGGCGCTGATTAAAGAACTGGTTGATCTGCTGGGTCTGGCGCGTCTGGAAGTGCCG
   GGCTACGAAGCGGACGATGTTCTGGCGAGCCTGGCGAAGAAAGCGGAGAAGGAAGG
   TTACGAAGTGCGTATCCTGACCGCGGACAAAGATCTGTATCAGCTGCTGAGCGACCG
   TATCCACGTTCTGCACCCGGAGGGTTATCTGATTACCCCGGCGTGGCTGTGGGAAAA
   GTACGGCCTGCGTCCGGACCAATGGGCGGATTATCGTGCGCTGACCGGTGACGAGAG
15  CGATAACCTGCCGGGCGTTAAAGGTATTGGCGAAAAAACCGCGCGTAAGCTGCTGGA
   GGAATGGGGTAGCCTGGAAGCGCTGCTGAAAAACCTGGATCGTCTGAAGCCGGCGAT
   CCGTGAGAAAATTCTGGCGCACATGGACGATCTGAAGCTGAGCTGGGACCTGGCGAA
   AGTGCGTACCGACCTGCCGCTGGAAGTGGATTTTCGCGAAGCGTCGTGAGCCGGATCG
   TGAACGTCTGCGTGCGTTCCTGGAGCGTCTGGAATTTGGTAGCCTGCTGCACGAGTTT
20  GGCCTGCTGGAAAGCCCGAAGGCGCTGGAGGAAGCGCCGTGGCCGCCGCCAGAGGG
   TCGTTTCGTGGGCTTTGTTCTGAGCCGTAAAGAACCGATGTGGGCGGACCTGCTGGC
   GCTGGCGGCGGCGCGTGGTGGCCGTGTGCACCGTGCGCCGGAGCCGTACAAGGCGCT
   GCGTGACCTGAAAGAAGCGCGTGGTCTGCTGGCGAAAGATCTGAGCGTTCTGGCGCT
   GCGCGAAGGTCTGGGTCTGCCGCCGGGTGACGATCCGATGCTGCTGGCGTACCTGCT
25  GGATCCGAGCAACACCACCCCGGAGGGTGTGGCGCGTCGTTATGGTGGCGAATGGAC
   CGAGGAAGCGGGCGAGCGTGCGGCGCTGAGCGAACGTCTGTTCGCGAACCTGTGGG
   GTCGTCTGGAGGGCGAGGAACGTCTGCTGTGGCTGTACCGTGAGGTGGAACGTCCGC
   TGAGCGCGGTTCTGGCGCACATGGAAGCGACCGGTGTGCGTCTGGACGTTGCGTATC
   TCGTGCGCTGAGCCTGGAAGTGGCGGAGGAAATCGCGCGTCTGGAGGCGGAAGTTT
30  TCCGTCTGGCGGGCCACCCGTTTAACCTGAACAGCCGTGACCAGCTGGAGCGTGTCT
   GTTTGATGAACTGGGTCTGCCGGCGATTGGCAAGACCGAAAAAACCGGCAAGCGTAG
   CACCAGCGCGGCGGTGCTGGAGGCGCTGCGTGAAGCGCACCCGATCGTTGAGAAGAT
```

TCTGCAGTACCGTGAAGCTGACCAAGCTGAAAAGCACCTATATCGACCCGCTGCCGGA
 TCTGATTCACCCGCGTACCGGTCGTCTGCACACCCGTTTCAACCAAACCGCGACCGCG
 ACCGGTCGTCTGAGCAGCAGCGACCCGAACCTGCAGAACATCCCGGTGCGTACCCCG
 CTGGGTCAACGTATCCGTCGTGCGTTTATTGCGGAGGAAGGCTGGCTGCTGGTTGCGC
 5 TGGATTACAGCCAGATTGAGCTGCGTGTTCTGGCGCACCTGAGCGGTGACGAAAACC
 TGATCCGTGTTTTCCAAGAGGGCCGTGATATTACACCGAAACCGCGAGCTGGATGTT
 TGGTGTGCCGCGTGAGGCGGTTGACCCGCTGATGCGTCGTGCGGCGAAGACCATCAA
 CTTCGGTGTGCTGTATGGCATGAGCGCGCACCGTCTGAGCCAGGAGCTGGCGATCCC
 GTACGAGGAAGCGCAGGCGTTTATTGAACGTTATTTCCAAAGCTTTCCGAAGGTTCTGT
 10 GCGTGGATTGAGAAAACCCTGGAGGAAGGTCGTGTCGTGGTTACGTGGAAACCCTG
 TTCGGTCGTGTCGTACGTTCCGGATCTGGAGGCGCGTGTGAAAAGCGTTCGTGAGG
 CGGCGGAACGTATGGCGTTCAACATGCCGGTGCAGGGTACCGCGGCGGACCTGATGA
 AACTGGCGATGGTTAAGCTGTTTCCGCGTCTGGAGGAAATGGGCGCGCGTATGCTGC
 TGCAAGTGCACGATGAGCTGGTTCTGGAAGCGCCGAAGGAGCGTGCGGAAGCGGTG
 15 GCGCGTCTGGCGAAAGAGGTGATGGAAGGTGTTTACCCGCTGGCGGTTCCGCTGGAA
 GTTGAGGTGGGTATCGGCGAGGACTGGCTGAGCGCGAAAGAATAA

野生型Taq DNA聚合酶的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2)

MRGMLPLFEPKGRVLLVDGHHLAYRTFHALKGLTTSRGEPVQAVYGFAKSLKALKED
 20 GDAVIVVFDKAPSRHEAYGGYKAGRPTPEDFPRQLALIKELVDLLGLARLEVPGYEA
 DDVLASLAKKAEKEGYEVRLTADKDL YQLLSDRHVLHPEGYLITPAWLWEKYGLRPD
 QWADYRALTGDESDNLPGVKGIGECTARKLLEEWGSLEALLKNLDRLKPAIREKILAHM
 DDLKLSWDLAKVRTDLPLEVDFAKRREPDRERLRAFLERLEFGSLLHEFGLLESPKALEE
 APWPPPEGAFVGFVLSRKEPMWADLLALAAARGGRVHRAPEPYKALRDLKEARGLLAK
 25 DLSVLALREGLGLPPGDDPMLLAYLLDPSNTTPEGVARRYGGEWTEEAGERAAALSERLF
 ANLWGRLEGEERLLWLYREVERPLSAVLAHMEATGVRLDVAYLRALSLEVAEEIARLEA
 EVFRLAGHPFNLNSRDQLERVLFDDELGLPAIGKTEKTGKRSTSAVLEALREAHPIVEKIL
 QYRELTKLKSTYIDPLPDLIHPRTGRLHTRFNQTATATGRLSSSDPNLQNPVRTPLGQRIR
 RAFIAEEGWLLVALDYSQIELRVLAHLSGDENLIRVFQEGRDIHTETASWMFGVPREAVD
 30 PLMRRAAKTINFGVLYGMSAHRLSQELAIPEYEEAQAFIERFYQSFPKVRAWIEKTLEEGRR
 RGYVETLFGRRRYVPDLEARVKS SVREAAERMAFNPVQGTAAADLMKLAMVKLFPRLEE
 MGARMLLQVHDEL VLEAPKERAEEAVARLAKEVMEGVYPLAVPLEVEVGIGEDWLSAKE

含有野生型 Taq DNA 聚合酶编码序列的表达质粒 pET29a-Taq 购自金斯瑞科技有限公司。其中，设计时在氨基酸序列的 N 端融合有 6 个 His 以利于后续蛋白的纯化。

(2) 突变体 Taq DNA 聚合酶表达质粒的构建

考虑到野生型 Taq DNA 聚合酶的活性，对野生型 Taq DNA 聚合酶进行突变设计，来提高酶对 DNA 的亲和力，来提高 DNA 聚合酶的活性。同时考虑到若 DNA 聚合酶的聚合活性过强，与 DNA 的亲和力过强，可能会带来一些其他的不佳影响，例如可能会导致扩增的均一性较差等等。因此，综合多种因素，发明人设计了如下突变（具体的突变位点如下表 4 所示）：

Taq DNA 聚合酶突变体为将野生型 Taq DNA 聚合酶的氨基酸序列如 E507R、E742R、E524K 等进行突变：具体通过设计正反向突变引物对，使用 pfu DNA 聚合酶进行突变延伸，所使用的引物如下表 1 所示：

表 1 构建 Taq DNA 聚合酶突变体表达质粒过程的 PCR 引物

引物名称		SEQ ID NO:	引物序列 (5' -3')	长度 (bp)
E315K	F	3	GCTTTGTTCTGAGCCGTAAAAACCGATGTGGGCG	35
	R	4	CGCCACATCGGTTTTTTACGGCTCAGAACAAAGC	35
E507K	F	5	GGCGATTGGCAAGACCAAAAAACCGGCAAGCG	33
	R	6	CGCTTGCCGGTTTTTTTGGTCTTGCCAATCGCC	33
E507R	F	7	CGGCGATTGGCAAGACCAGAAAAACCGGCAAGCGTA	36
	R	8	TACGCTTGCCGGTTTTTCTGGTCTTGCCAATCGCCG	36
E507H	F	9	GGCGATTGGCAAGACCCATAAAACCGGCAAGCGTA	35
	R	10	TACGCTTGCCGGTTTTATGGGTCTTGCCAATCGCC	35
E520K	F	11	CGGCGGTGCTGAAGGCGCTGCGT	23
	R	12	ACGCAGCGCCTTCAGCACCGCCG	23
E524K	F	13	GAGGCGCTGCGTAAAGCGCACCCGA	25
	R	14	TCGGGTGCGCTTTACGCAGCGCCTC	25
E57D	F	15	GAAGGCGCTGAAAGATGACGGCGATGCG	28
	R	16	CGCATCGCCGTCATCTTTCAGCGCCTTC	28
E57N	F	17	GCTTTGTTCTGAGCCGTAAAAACCGATGTGGGCG	35
	R	18	CGCCACATCGGTTTTTTACGGCTCAGAACAAAGC	35
E57H	F	19	GGCGATTGGCAAGACCAAAAAACCGGCAAGCG	33
	R	20	CGCTTGCCGGTTTTTTTGGTCTTGCCAATCGCC	33
E57S	F	21	CGGCGATTGGCAAGACCAGAAAAACCGGCAAGCGTA	36
	R	22	TACGCTTGCCGGTTTTTCTGGTCTTGCCAATCGCCG	36
E57T	F	23	GGCGATTGGCAAGACCCATAAAACCGGCAAGCGTA	35
	R	24	TACGCTTGCCGGTTTTATGGGTCTTGCCAATCGCC	35
E57Q	F	25	GAGGCGCTGCGTAAAGCGCACCCGA	25
	R	26	TCGGGTGCGCTTTACGCAGCGCCTC	25
E742R	F	27	GCGCGTGTGAAAAGCGTTCGTAGGGCGGCGGAAC	34

	R	28	GTTCCGCCGCCCTACGAACGCTTTTCACACGCGC	34
E742H	F	29	GCGTGTGAAAAGCGTTCGTCATGCGGCGGAAC	32
	R	30	GTTCCGCCGCATGACGAACGCTTTTCACACGCGC	32
E742K	F	31	GCGTGTGAAAAGCGTTCGTAAGGCGGCGGA	30
	R	32	TCCGCCGCCTTACGAACGCTTTTCACACGCGC	30
L552R	F	33	CGCTGCCGGATCGGATTCACCCGCG	25
	R	34	CGCGGGTGAATCCGATCCGGCAGCG	25
L245M	F	35	GCTGAGCTGGGACATGGCGAAAGTGCG	27
	R	36	CGCACTTTCGCCATGTCCCAGCTCAGC	27
L351V	F	37	GAAAGAAGCGCGTGGTGTGCTGGCGAAAGA	30
	R	38	TCTTTCGCCAGCACACCACGCGCTTCTTTC	30
G46D	F	39	CGGTGCAGGCGGTTTATGATTTCGCGAAAAGCC	33
	R	40	GGCTTTTCGCGAAATCATAAACCGCCTGCACCG	33
D488H	F	41	AACCTGAACAGCCGTCACCAGCTGGAGC	28
	R	42	GCTCCAGCTGGTGACGGCTGTTCAAGTT	28
D488R	F	43	TAACCTGAACAGCCGTCGCCAGCTGGAGCGTG	32
	R	44	CACGCTCCAGCTGGCGACGGCTGTTCAAGTTA	32
D488K	F	45	TAACCTGAACAGCCGTAAGCAGCTGGAGCGTGTTT	35
	R	46	GAACACGCTCCAGCTGCTTACGGCTGTTCAAGTTA	35
D578N	F	47	GTCTGAGCAGCAGCAACCCGAACCTGCAG	29
	R	48	CTGCAGGTTTCGGGTTGCTGCTGCTCAGAC	29
A348V	F	49	GTGACCTGAAAGAAGTGCGTGGTCTGCTGGC	31
	R	50	GCCAGCAGACCACGCACTTCTTTCAGGTCAC	31
A743R	F	51	GAAAAGCGTTCGTGAGAGGGCGGAACGTATGGCG	34
	R	52	CGCCATACGTTCCGCCCTCTCACGAACGCTTTTC	34
A743K	F	53	GAAAAGCGTTCGTGAGAAGGCGGAACGTATGGCG	34
	R	54	CGCCATACGTTCCGCCCTCTCACGAACGCTTTTC	34
A743H	F	55	GTGAAAAGCGTTCGTGAGCATGCGGAACGTATGGCGTTC	39
	R	56	GAACGCCATACGTTCCGCATGCTCACGAACGCTTTTCAC	39
K53S	F	57	GTTTCGCGAAAAGCCTGCTGAGCGCGCTGAAAGAGG	36
	R	58	CCTCTTTCAGCGCGCTCAGCAGGCTTTTCGCGAAAC	36
K53Q	F	59	GCGAAAAGCCTGCTGCAGGCGCTGAAAGAGG	31
	R	60	CCTCTTTCAGCGCCTGCAGCAGGCTTTTCGC	31
K53T	F	61	GCGAAAAGCCTGCTGTAGGCGCTGAAAGAGG	31
	R	62	CCTCTTTCAGCGCCTACAGCAGGCTTTTCGC	31
K53H	F	63	CGCGAAAAGCCTGCTGCATGCGCTGAAAGAGGACG	35
	R	64	CGTCCTCTTTCAGCGCATGCAGCAGGCTTTTCGCG	35
K56N	F	65	CCTGCTGAAGGCGCTGAATGAGGACGGCG	29
	R	66	CGCCGTCCTCATTACAGCGCCTTCAGCAGG	29
K56S	F	67	GCTGAAGGCGCTGAGCGAGGACGGCGATGC	30
	R	68	GCATCGCCGTCCTCGCTCAGCGCCTTCAGC	30
K56T	F	69	GCTGAAGGCGCTGACGGAGGACGGCGATGC	30
	R	70	GCATCGCCGTCCTCCGTCAGCGCCTTCAGC	30
K56Q	F	71	TGCTGAAGGCGCTGCAGGAGGACGGCGATGC	31

	R	72	GCATCGCCGTCCTCCTGCAGCGCCTTCAGCA	31
S357C	F	73	TGGCGAAAGATCTGTGCGTTCTGGCGCTG	29
	R	74	CAGCGCCAGAACGCACAGATCTTTCGCCA	29

具体的反应体系如下表 2 所示：

表 2 构建 Taq DNA 聚合酶突变体表达质粒过程的 PCR 体系

反应组分	体积 (μl)
10 $\times$ pfu 缓冲液 (含有 MgSO_4)	2.5
2.5mM dNTPs	2
10 μM 正向引物	0.7
10 μM 反向引物	0.7
pfu DNA 聚合酶	0.5
50ng/ μl 模板(pET29a-Ta _q 或突变体)	1
H_2O	17.6

PCR 反应条件如下表 3 所示：

5 表 3 构建 Taq DNA 聚合酶突变体表达质粒过程的 PCR 条件

95 $^{\circ}\text{C}$, 5min	
95 $^{\circ}\text{C}$, 30s	19 个循环
53 $^{\circ}\text{C}$, 30s	
68 $^{\circ}\text{C}$, 8min	
68 $^{\circ}\text{C}$, 10min	
4 $^{\circ}\text{C}$, ∞	

反应结束后，加入 1 μl DpnI 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 2h，然后取 5 μl 消化后的产物转化 *E.Coli* 感受态细胞 *DH5 α* ，观察转化结果。然后从平板上挑取单克隆进行培养后提取质粒，再通过测序比对分析得到的突变体是否正确。

所构建的突变体具体如下表 4 所示：

10 表 4 Taq DNA 聚合酶突变体突变位置及突变类型

编号	突变	编号	突变
Taq-1	G46D	Taq-26	K56N/E507K
Taq-2	K56Q	Taq-27	K56Q/E507K
Taq-3	E57D	Taq-28	K56Q/E507R
Taq-4	E315K	Taq-29	K56Q/E524K

Taq-5	A348V	Taq-30	K56S/E507K
Taq-6	L351V	Taq-31	K56S/E524K
Taq-7	D488H	Taq-32	K56S/E742R
Taq-8	D488R	Taq-33	K56T/E507K
Taq-9	D488K	Taq-34	K56T/E524K
Taq-10	E507K	Taq-35	K56T/E742R
Taq-11	E507R	Taq-36	E57D/E507K
Taq-12	E507H	Taq-37	E57D/E524K
Taq-13	E520K	Taq-38	E57D/E742R
Taq-14	E524K	Taq-39	E57H/E507K
Taq-15	L552R	Taq-40	E57N/E507K
Taq-16	D578N	Taq-41	E57S/E507K
Taq-17	E742R	Taq-42	E57T/E507K
Taq-18	E742K	Taq-43	L245M/A348V
Taq-19	A743R	Taq-44	L245M/D578N
Taq-20	A743K	Taq-45	L245M/E315K
Taq-21	G46D/E507K	Taq-46	L245M/E524K
Taq-22	K53H/E507K	Taq-47	L245M/L552R
Taq-23	K53Q/E507K	Taq-48	E742H/A743H
Taq-24	K53S/E507K	Taq-49	E57Q/E507K
Taq-25	K53T/E507K	Taq-50	E315K/S357C

表 4 中, 编号 Taq-21~Taq-50 均为组合突变, 即代表相应的突变体相对于野生型的 TaqDNA 聚合酶, 有两个位点发生突变, 这种组合突变利用表 1 中给出的应用于定点突变的引物, 先进行一个突变位点的定点突变, 获得突变产物, 然后再对该突变产物进行定点突变, 得到相较于野生型 Taq DNA 聚合酶, 发生两个位点突变的产物。

5

实施例 2 Taq DNA 聚合酶及其突变体的诱导表达和纯化

野生型 Taq DNA 聚合酶及其突变体均通过 pET28a 的启动子启动表达, 并且均在 N-端融合有 6 个 His 标签, 纯化时可利用 His 标签进行 Ni 柱亲和纯化。

野生型及突变体质粒转化 BL21 感受态细胞 (购自全式金生物科技有限公司), 然后挑取单菌落于 5ml 含卡那抗性(50μg/ml) LB 培养基中, 37℃, 200rpm/min, 过夜培养。次日按 1:100 的比例进行稀释, 分别转接于新鲜的 1500ml 含卡那抗性(50μg/ml)的 LB 培养基中,

37℃, 200rpm 振荡培养至 OD₆₀₀≈0.6, 然后按照终浓度为 0.5mM 的量加入诱导剂 IPTG, 37℃, 200rpm/min 培养 4h 诱导表达, 最后 8000rpm/min 的条件离心 10 分钟, 收集诱导后的菌液沉淀。

收集菌体沉淀后, 使用 Taq DNA 聚合酶 Ni 柱亲和 A 液 (50mM Tris, 500mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 5% Glycerol, 10mM Imidazole, pH7.8) 重悬, 在冰水浴条件下进行超声破菌, 超声条件为: 变幅杆直径 10mm, 超声强度为 40%, 超声 2s, 间歇 3s, 超声 30min。将破碎后的菌液置于 75℃ 水浴 30min, 然后在转速 13000rpm、4℃ 下离心 30min, 收集上清。

将上步准备好的样品进行亲和纯化, 具体如下:

按照 AKTA 操作流程, 用过滤脱气 MillQ 水冲洗工作泵和系统, 0.5ml/min 流速下接上预装柱 HisTrap FF 5ml, 用 H₂O 冲洗 5CV, 再用 5CV 的 Taq DNA 聚合酶 Ni 柱亲和 A 液平衡柱子, 然后将之前处理好的样品以 5ml/min 上样至层析柱。上样完毕后, 继续用 10CV 的 Taq DNA 聚合酶 Ni 柱亲和 A 液冲洗柱子, 然后在 Taq DNA 聚合酶 Ni 柱亲和 B 液 (50mM Tris, 500mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 5% Glycerol, 500mM Imidazole, pH7.8) 在占比 0-50% (10CV) 范围内线性梯度洗脱, 并收集目的蛋白。

将经亲和纯化得到的样品用 Taq 稀释液 (50mM Tris, 0.5% Triton X-100, 5% Glycerol, pH7.8) 进行 10 倍稀释。然后进行阴离子交换层析, 具体步骤如下:

按照 AKTA 操作流程, 用过滤脱气 MillQ 水冲洗工作泵和系统, 0.5ml/min 流速下接上预装柱 HisTrap FF 5ml, 用 H₂O 冲洗 5CV, 再用 5CV 的 Taq DNA 聚合酶离子 A 液 (20mM Tris, 50mM NaCl, 5% Glycerol, pH7.8) 平衡柱子, 然后将稀释处理好的样品以 5ml/min 上样至层析柱。上样完毕后, 继续用 10CV 的 Taq DNA 聚合酶离子 A 液冲洗柱子, 然后在 Taq DNA 聚合酶离子 B 液 ((20mM Tris, 1M NaCl, 5% Glycerol, pH7.8) 在占比 0-100% (15CV) 范围内线性梯度洗脱, 并收集目的蛋白。

纯化后得到的目的蛋白经过透析、储存, 用于后续的测定及分析。

实施例 3 Taq DNA 聚合酶及其突变体的聚合活性测定及分析

对经纯化得到的野生型 Taq DNA 聚合酶及其突变体进行聚合酶活性的测定。活性测定中使用结合有引物的 M13 ssDNA 为模板-引物复合体, 在 DNA 聚合酶的作用下发生 DNA 链的延伸, 得到延长的双链 DNA 产物。将荧光分子参入反应产物, 通过检测双链 DNA 量来计算 DNA 聚合酶的活性。其中结合的引物序列为 (SEQ ID NO:75): 5'- AGCGAACCTCCC GACTTGCGGGAGG-3'。本发明中所用的 10x PCR 缓冲液的配方均为: 100mM Tris, 500mM KCl, 15mM MgCl₂, 25% Glycerol, 0.5mg/mL BSA。

Taq DNA 聚合酶活性检测的反应体系如下表 5 所示:

表 5 Taq DNA 聚合酶聚合活性检测体系

反应组分	体积 (μl)
10x PCR 缓冲液	2.5
50nM M13 ssDNA 模板-引物复合体	2
10mM dNTP	1
4ng/μl Taq DNA 聚合酶及其突变体	1
H ₂ O	补足至 25μl

将上述配好的反应体系置于 PCR 仪中, 72℃ 反应 5min 后加入 0.5μl 的 0.5M EDTA 终止反应, 然后用 Qubit dsDNA HS Assay Kit 检测双链 DNA 的量, 通过计算得到突变体相对于野生型的聚合活性。

5 Taq DNA 聚合酶及其突变体的相对聚合活性如下表 6 所示:

表 6 Taq DNA 聚合酶及其突变体的相对聚合活性

编号	突变	相对活性	编号	突变	相对活性
Taq-1	G46D	0.22	Taq-26	K56N/E507K	4.28
Taq-2	K56Q	0.47	Taq-27	K56Q/E507K	3.49
Taq-3	E57D	0.33	Taq-28	K56Q/E507R	4.64
Taq-4	E315K	2.46	Taq-29	K56Q/E524K	1.37
Taq-5	A348V	0.61	Taq-30	K56S/E507K	3.67
Taq-6	L351V	0.13	Taq-31	K56S/E524K	1.30
Taq-7	D488H	0.24	Taq-32	K56S/E742R	2.43
Taq-8	D488R	0.28	Taq-33	K56T/E507K	3.54
Taq-9	D488K	0.32	Taq-34	K56T/E524K	1.18
Taq-10	E507K	4.51	Taq-35	K56T/E742R	3.25
Taq-11	E507R	4.46	Taq-36	E57D/E507K	3.78
Taq-12	E507H	2.62	Taq-37	E57D/E524K	1.51
Taq-13	E520K	4.04	Taq-38	E57D/E742R	2.28
Taq-14	E524K	2.09	Taq-39	E57H/E507K	4.10
Taq-15	L552R	3.86	Taq-40	E57N/E507K	2.46
Taq-16	D578N	3.22	Taq-41	E57S/E507K	3.17
Taq-17	E742R	5.07	Taq-42	E57T/E507K	2.43
Taq-18	E742K	6.84	Taq-43	L245M/A348V	0.74

Taq-19	A743R	5.71	Taq-44	L245M/D578N	1.21
Taq-20	A743K	5.05	Taq-45	L245M/E315K	1.39
Taq-21	G46D/E507K	4.29	Taq-46	L245M/E524K	1.24
Taq-22	K53H/E507K	4.78	Taq-47	L245M/L552R	2.88
Taq-23	K53Q/E507K	4.06	Taq-48	E742H/A743H	0.21
Taq-24	K53S/E507K	5.18	Taq-49	E57Q/E507K	3.48
Taq-25	K53T/E507K	2.26	Taq-50	E315K/S357C	2.19

从上表 6 可以看出, 相较于野生型 Taq DNA 聚合酶, 多种 DNA 聚合酶突变体的酶活性均表现出提高, 例如 DNA 聚合酶突变体 (E315K) 的聚合活性是野生型 Taq DNA 聚合酶的 2.46 倍等等。

5 实施例 4 Taq DNA 聚合酶及其突变体的多重 PCR 测试及分析

为了获得能够应用于多重 PCR 扩增的 DNA 聚合酶突变体, 分别对经纯化得到的野生型 Taq DNA 聚合酶及其突变体进行 8 重的人源持家基因和 5 重的鼠源持家基因扩增测试。

(1) 人源持家基因 8 重扩增

人源持家基因 8 重扩增的模板为人的基因组 DNA, 扩增引物及目的片段大小如下表 7

10 所示:

表 7 人源持家基因 8 重扩增引物及目的片段大小

基因	扩增引物 (5'-3')	目的片段大小 (bp)
CYB5A	GGCAACGCTTAGACTCTGTGTG (SEQ ID NO:76)	998
	CTGCCCTTGGCCTAACTAACCT (SEQ ID NO:77)	
PRPH	GTTCTCAAGAAGCTGCACGAG (SEQ ID NO:78)	744
	CGTTAGACTCTGGATCTGGCGT (SEQ ID NO:79)	
GABARAPL2	CCAGCCAATTCATGAGTCGGTG (SEQ ID NO:80)	595
	CCTGACAACCTCGCAAGTAGCAC (SEQ ID NO: 81)	
ACTG1	GCTCAATGGGGTACTTCAGGGT (SEQ ID NO:82)	485
	GTGGACGTTACGTAAAAGGCC (SEQ ID NO:83)	
NDUFA7	TGCTCTGGATGTGAAGATGCCA (SEQ ID NO:84)	405
	TTCCAGGTAAATCCAGCCCAGG (SEQ ID NO: 85)	
UQCRC1	CAGCCAGTCAGCATCATCCAAC (SEQ ID NO:86)	315

	GAAAGCCGGATTGCGGTAACAT (SEQ ID NO:87)	
MYC	GGATAGCTCTGCAAGGGGAGAG (SEQ ID NO:88)	214
	TCGTCGCAGTAGAAATACGGCT (SEQ ID NO:89)	
MIF	AGAAGTCAGGCACGTAGCTCAG (SEQ ID NO:90)	113
	GGCACGTTGGTGTTTACGATGA (SEQ ID NO:91)	

人源持家基因8重扩增的PCR反应体系如下表8所示：

表 8 人源持家基因 8 重扩增反应体系

反应组分	体积 (μl)
10× PCR Buffer	5
10mM dNTPs	1
5μM Primer Mix	2
10ng/μl YH gDNA	2
0.1mg/ml Taq	0.5
H ₂ O	39.5

人源持家基因8重扩增的PCR条件如下表9所示：

表9 人源持家基因8重扩增条件

95℃, 3min	
95℃, 10s	30 个循环
64℃, 30s	
72℃, 1min	
72℃, 5min	
4℃, ∞	

5 人源持家基因8重扩增完成后，加入10μl 6x DNA Loading Buffer (60mM Tris, 60mM EDTA, 60% Glycerol, Orange G)后充分混匀后用1.3%的琼脂糖胶进行电泳分析，挑选出能扩增出所有条带或条带较野生型多，或产量提高，或均一性提高的突变体。具体结果见附图1~图3。

10 图1到图3所示的结果来看，琼脂糖凝胶电泳图的扩增条带较亮或者扩增条带增多，表明相较于野生型的DNA聚合酶，突变型DNA聚合酶活性提高。同时相较于野生型的DNA聚合酶，有些突变型DNA聚合酶的扩增条带各条带之间均一性增强，表明突变型DNA聚合酶能够提高扩增的均一性。而图中有些条带出现了拖尾现象，是由于存在某些非特异性扩增的现象，和DNA聚合酶的聚合活性以及对提高扩增均一性没有影响，可以不必考虑。

(2) 鼠源持家基因 5 重扩增

鼠源持家基因 5 重扩增的模板来源中国仓鼠卵巢细胞 (CHO) 的 cDNA, 具体制备过程为: 从 CHO 细胞提取的 total RNA 为模板, 以含有 polyA 的序列为引物用逆转录酶 SuperScript II Reverse Transcriptase 进行逆转录, 从而得到 CHO 的 cDNA。

5 鼠源持家基因 5 重扩增引物及目的片段大小如下表 10 所示:

表10 鼠源持家基因5重扩增引物及目的片段大小

基因	扩增引物	目的片段大小 (bp)
Rpl13a	ACGGAAGGAAAAGGCCAAGATGCAC (SEQ ID NO:92)	143
	ATTGGGTTCACACCAGGAGTCCGTT (SEQ ID NO:93)	
GAPDH	AGCCTCGTCCCGTAGACAAAATGGT (SEQ ID NO:94)	243
	AGATGGTGATGGGCTTCCCGTTGAT (SEQ ID NO:95)	
Pgk1	CGGTGTTGCCAAAATGTCGCTTTCC (SEQ ID NO:96)	448
	GGCCGGCTCAGCTTTAACCTTGTTT (SEQ ID NO:97)	
B2m	ACCGGAGAATGGGAAGCCGAACATA (SEQ ID NO:98)	665
	ACAGGGTTGGGGGTGAGAATTGCTA (SEQ ID NO:99)	
β-Actin	GAGCACAGCTTCTTTGCAGCTCCTT (SEQ ID NO:100)	994
	TCCTGTCAGCAATGCCTGGGTACAT (SEQ ID NO:101)	

鼠源持家基因5重扩增的PCR反应体系如下表11所示:

表11 鼠源持家基因5重扩增反应体系

反应组分	体积 (μl)
10× PCR Buffer	5
10mM dNTPs	1
5μM Primer Mix	2
10ng/μl CHO cDNA	2
0.1mg/ml Taq	0.5
H2O	39.5

鼠源持家基因 5 重扩增的 PCR 条件如下表 12 所示:

表 12 鼠源持家基因 5 重扩增条件

95℃, 3min	
95℃, 10s	

55℃, 30s	30 个循环
72℃, 1min	
72℃, 5min	
4℃, ∞	

鼠源持家基因 5 重扩增完成后, 加入 10 μ l 6x DNA Loading Buffer (60mM Tris, 60mM EDTA, 60% Glycerol, Orange G)后充分混匀后用 1.3%的琼脂糖胶进行电泳分析, 挑选出能扩增出所有条带或条带较野生型多, 或产量提高, 或均一性提高的突变体。具体结果见附图 4~图 6。

5 图4到图6所示的结果来看, 琼脂糖凝胶电泳图的扩增条带较亮或者扩增条带增多, 表明相较于野生型的DNA聚合酶, 突变型DNA聚合酶活性提高。同时相较于野生型的DNA聚合酶, 有些突变型DNA聚合酶的扩增条带各条带之间均一性增强, 表明突变型DNA聚合酶能够提高扩增的均一性。而图中有些条带出现了拖尾现象, 是由于存在某些非特异性扩增的现象, 和DNA聚合酶的聚合活性以及对提高扩增均一性没有影响, 可以不必考虑。

10 综合不同突变型 DNA 聚合酶对于人源持家基因 8 重扩增的结果, 对于鼠源持家基因 5 重扩增的结果, 选择聚合酶活性以及扩增均一性提高的 DNA 聚合酶, 同时结合上述实施例对于不同突变型 DNA 聚合酶相对于野生型 DNA 聚合酶的聚合活性测定结果, 确定了突变: E315K、E507R、E507H、E524K、L552R、D578N、E742R、E742K、A743R、A743K、K53S/E507K、K56N/E507K、K56S/E507K、K56T/E507K、K56Q/E524K、L245M/E524K、L245M/L552R、
15 E315K/S357C、K56Q/E507K、E57D/E507K、K56Q/E507R、K56T/E524K、E57D/E524K、E57D/E742R、L245M/E315K 中的至少一种, 可以显著提高 DNA 聚合酶活性, 应用于多重 PCR 中, 扩增效果明显改善。而且可以用于低模板物质的扩增以及长片段分子的扩增。

在本发明的描述中, 术语“第一”、“第二”等仅用于描述目的, 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。

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针对的是相同的实施例或示例。而且, 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、替换和变型。

权利要求书

1、一种 DNA 聚合酶，其特征在于，所述 DNA 聚合酶与 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列相比，具有如下突变位点中的至少一种：

5 E315K、E507R、E507H、E524K、L552R、D578N、E742R、E742K、A743R、A743K、K53S/E507K、K56N/E507K、K56S/E507K、K56T/E507K、K56Q/E524K、L245M/E524K、L245M/L552R、E315K/S357C、K56Q/E507K、E57D/E507K、K56Q/E507R、K56T/E524K、E57D/E524K、E57D/E742R、L245M/E315K。

2、根据权利要求 1 所述的 DNA 聚合酶，其特征在于，所述 DNA 聚合酶为 Taq DNA 聚合酶的突变体。

3、根据权利要求 1 所述的 DNA 聚合酶，其特征在于，所述 DNA 聚合酶的活性与未突变的 Taq DNA 聚合酶活性相比，至少提高了 0.5 倍。

4、根据权利要求 1 所述的 DNA 聚合酶，其特征在于，所述 DNA 聚合酶的活性与未突变的 Taq DNA 聚合酶相比，至少提高了 1 倍。

15 5、一种分离的核酸分子，其特征在于，所述分离的核酸分子编码权利要求 1~4 中任一项所述的 DNA 聚合酶。

6、一种构建体，其特征在于，包含权利要求 5 所述的分离的核酸分子。

7、根据权利要求 6 所述的构建体，其特征在于，所述构建体为质粒。

8、根据权利要求 6 所述的构建体，其特征在于，所述分离的核酸分子可操作地连接启动子。

9、根据权利要求 8 所述的构建体，其特征在于，所述启动子选自下列中的一种： λ -PL 启动子、tac 启动子、trp 启动子、araBAD 启动子和 trc 启动子。

10、一种宿主细胞，其特征在于，所述宿主细胞含有权利要求 6~9 中任一项所述的构建体。

25 11、权利要求 1~4 中任一项所述的 DNA 聚合酶的生产方法，其特征在于，包括：培养宿主细胞，所述宿主细胞为权利要求 13 所述的宿主细胞；将所述宿主细胞进行诱导处理，使得所述宿主细胞表达所述 DNA 聚合酶；分离获得所述 DNA 聚合酶。

12、根据权利要求 11 所述的生产方法，其特征在于，所述宿主细胞为大肠杆菌。

30 13、一种试剂盒，其特征在于，包括权利要求 1~4 中任一项所述的 DNA 聚合酶。

14、根据权利要求 13 所述的试剂盒，其特征在于，还包括下列中的至少一种：一种或多种核苷酸，一种或多种缓冲液，一种或多种引物，一种或多种终止剂。

15、根据权利要求 14 所述的试剂盒，其特征在于，所述终止剂为双脱氧核苷酸。

16、一种扩增核酸分子的方法，其特征在于，所述方法包括：

将至少一种核酸模板与至少一种 DNA 聚合酶混合，得到混合物，所述 DNA 聚合酶为权利要求 1 所述的 DNA 聚合酶；

5 对所述混合物进行扩增处理，以便获得与所述至少一种核酸模板全部或部分互补的核酸分子。

17、根据权利要求 16 所述的方法，其特征在于，所述至少一种核酸模板的最低含量为 0.001pg/μl。

18、根据权利要求 16 所述的方法，其特征在于，与所述至少一种核酸模板全部或部分
10 互补的核酸分子的长度可达 10kb。

19、一种扩增多个核酸分子的方法，其特征在于，包括：

将至少两种核酸模板与至少一种 DNA 聚合酶混合，得到混合物，所述 DNA 聚合酶为权利要求 1 所述的 DNA 聚合酶；

15 对所述混合物进行扩增处理，以便获得与所述至少两种核酸模板全部或部分互补的核酸分子。

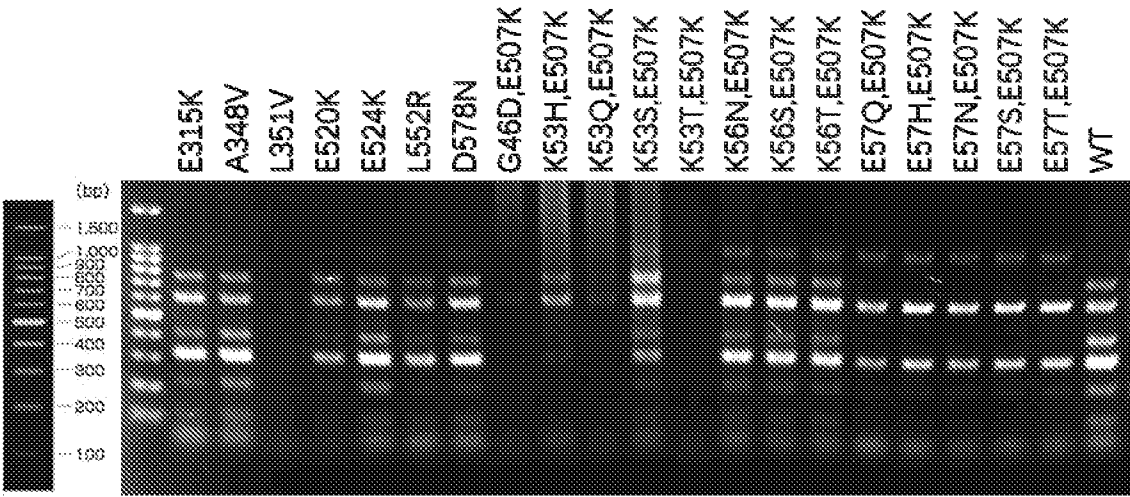


图 1

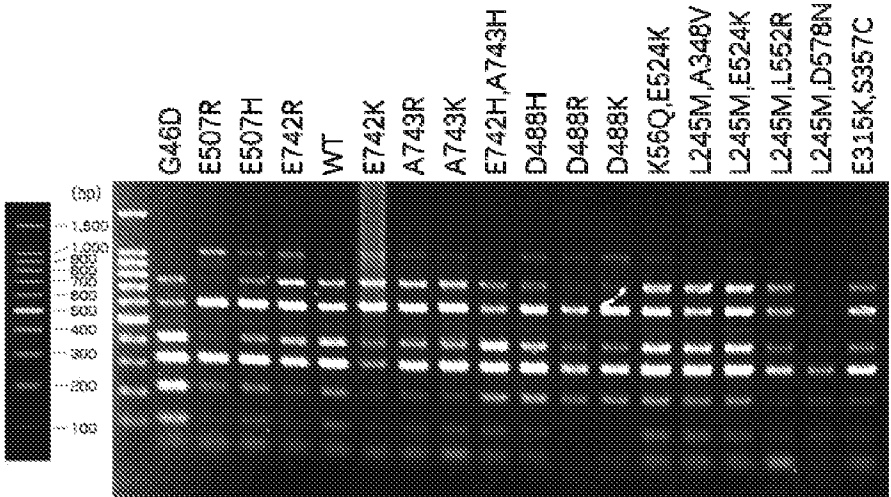


图 2

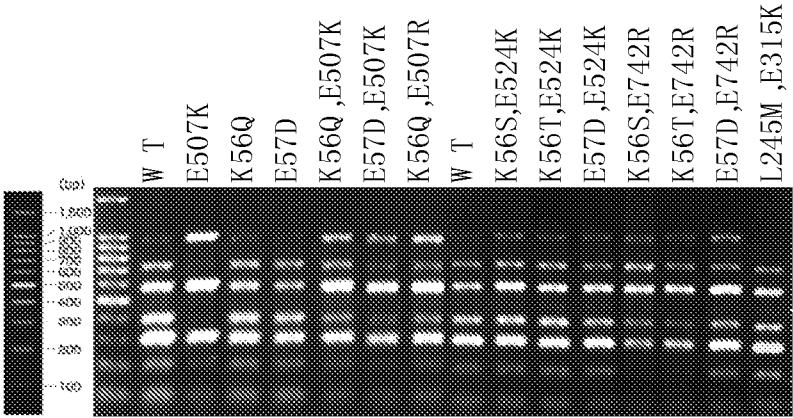


图 3

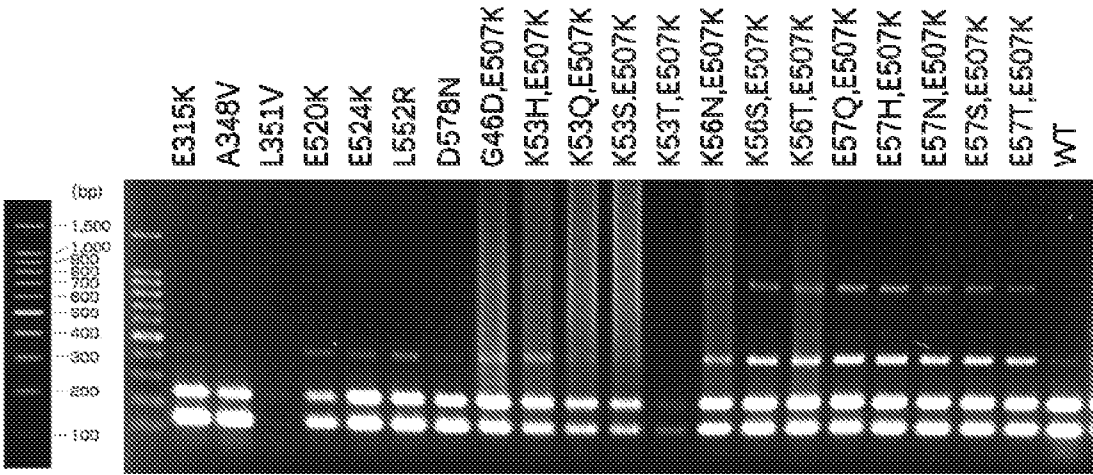


图 4

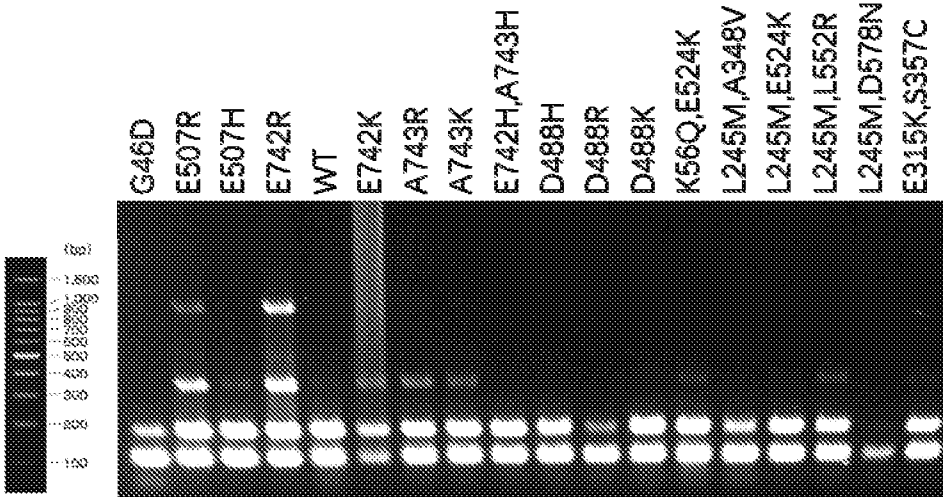


图 5

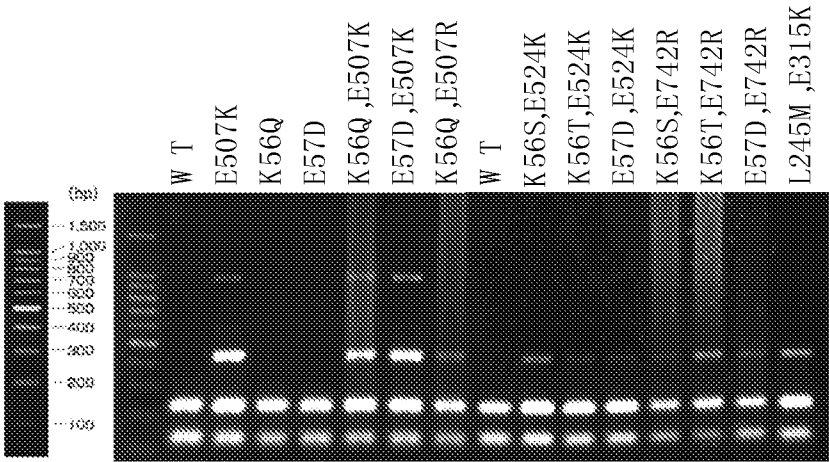


图 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/122334

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 9/12(2006.01)i; C12N 15/54(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)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)

C12N

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)

CPRSABS, CNABS, CNTXT, CNKI: Taq, DNA聚合酶, 突变, et al.; DWPI, SIPOABS, WOTXT, EPTXT, USTXT, ISI_Web of Science: Taq, dna polymerase, mutation, et al.; Genbank; EMBL; 中国专利生物序列检索系统和检索的序列: SEQ ID NO: 2, China Patents Biological Sequence Search System, search for SEQ ID NO: 2.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 102245761 A (KAPABIOSYSTEMS) 16 November 2011 (2011-11-16) claims 1-33, description, paragraphs 0007-0018, 0158-0162, and 0168, table 2, and embodiments 1-5	1-19
A	CN 104845950 A (AGILENT TECHNOLOGIES, INC.) 19 August 2015 (2015-08-19) claims 1-10	1-19

☐ 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
 “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

10 September 2019

Date of mailing of the international search report

27 September 2019

Name and mailing address of the ISA/CN

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

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2018/122334

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)
CN	102245761	A	16 November 2011	EP	3101124 B1	19 June 2019
				JP	2012507987 A	05 April 2012
				JP	5976895 B2	24 August 2016
				US	2017051326 A1	23 February 2017
				CA	2742594 A1	03 June 2010
				EP	3101124 A1	07 December 2016
				US	2011281305 A1	17 November 2011
				WO	2010062777 A2	03 June 2010
				WO	2010062777 A3	26 August 2010
				JP	5809059 B2	10 November 2015
				JP	2015171384 A	01 October 2015
				EP	2352819 A2	10 August 2011
				EP	2352819 A4	09 January 2013
				US	2019100783 A1	04 April 2019
CN	104845950	A	19 August 2015	EP	2907871 A1	19 August 2015
				JP	2015156858 A	03 September 2015
				US	9758773 B2	12 September 2017
				EP	2907871 B1	19 September 2018
				JP	6466192 B2	06 February 2019
				US	2015232821 A1	20 August 2015

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/122334

A. 主题的分类 C12N 9/12(2006.01)i; C12N 15/54(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)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) C12N 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)) CPRSABS, CNABS, CNTXT, CNKI和关键词: Taq, DNA聚合酶, 突变, 等; DWPI, SIPOABS, WOTXT, EPTXT, USTXT, ISI Web of Science和关键词: Taq, dna polymerase, mutation, 等; Genbank; EMBL; 中国专利生物序列检索系统和检索的序列: SEQ ID NO: 2											
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>CN 102245761 A (卡帕生物系统) 2011年 11月 16日 (2011 - 11 - 16) 权利要求1-33, 说明书第0007-0018、0158-0162和0168段, 表2, 实施例1-5</td> <td>1-19</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 104845950 A (安捷伦科技有限公司) 2015年 8月 19日 (2015 - 08 - 19) 权利要求1-10</td> <td>1-19</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	CN 102245761 A (卡帕生物系统) 2011年 11月 16日 (2011 - 11 - 16) 权利要求1-33, 说明书第0007-0018、0158-0162和0168段, 表2, 实施例1-5	1-19	A	CN 104845950 A (安捷伦科技有限公司) 2015年 8月 19日 (2015 - 08 - 19) 权利要求1-10	1-19
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求									
X	CN 102245761 A (卡帕生物系统) 2011年 11月 16日 (2011 - 11 - 16) 权利要求1-33, 说明书第0007-0018、0158-0162和0168段, 表2, 实施例1-5	1-19									
A	CN 104845950 A (安捷伦科技有限公司) 2015年 8月 19日 (2015 - 08 - 19) 权利要求1-10	1-19									
☐ 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 “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 2019年 9月 10日		国际检索报告邮寄日期 2019年 9月 27日									
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		授权官员 杨振宇 电话号码 86-(10)-62412204									

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/122334

检索报告引用的专利文件				公布日 (年/月/日)		同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	102245761	A	2011年 11月 16日	EP	3101124	B1	2019年 6月 19日
				JP	2012507987	A	2012年 4月 5日
				JP	5976895	B2	2016年 8月 24日
				US	2017051326	A1	2017年 2月 23日
				CA	2742594	A1	2010年 6月 3日
				EP	3101124	A1	2016年 12月 7日
				US	2011281305	A1	2011年 11月 17日
				WO	2010062777	A2	2010年 6月 3日
				WO	2010062777	A3	2010年 8月 26日
				JP	5809059	B2	2015年 11月 10日
				JP	2015171384	A	2015年 10月 1日
				EP	2352819	A2	2011年 8月 10日
				EP	2352819	A4	2013年 1月 9日
				US	2019100783	A1	2019年 4月 4日
CN	104845950	A	2015年 8月 19日	EP	2907871	A1	2015年 8月 19日
				JP	2015156858	A	2015年 9月 3日
				US	9758773	B2	2017年 9月 12日
				EP	2907871	B1	2018年 9月 19日
				JP	6466192	B2	2019年 2月 6日
				US	2015232821	A1	2015年 8月 20日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)