

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

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



(10) 国际公布号
WO 2025/129708 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 9/12 (2006.01) *C12Q 1/6806* (2018.01)
C12N 15/54 (2006.01) *C12Q 1/6844* (2018.01)
C12P 19/34 (2006.01) *C12Q 1/6869* (2018.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2023/141295

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

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

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

(72) 发明人: 谢庆庆 (XIE, Qingqing); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼 518083 (CN)。高重亮 (GAO, Chongliang); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼 518083 (CN)。张辉 (ZHANG, Hui); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼 518083 (CN)。郑越 (ZHENG, Yue); 中国广东省深圳市盐田区盐

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

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

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

(54) Title: DNA POLYMERASE AND USE THEREOF

(54) 发明名称: DNA聚合酶及其应用

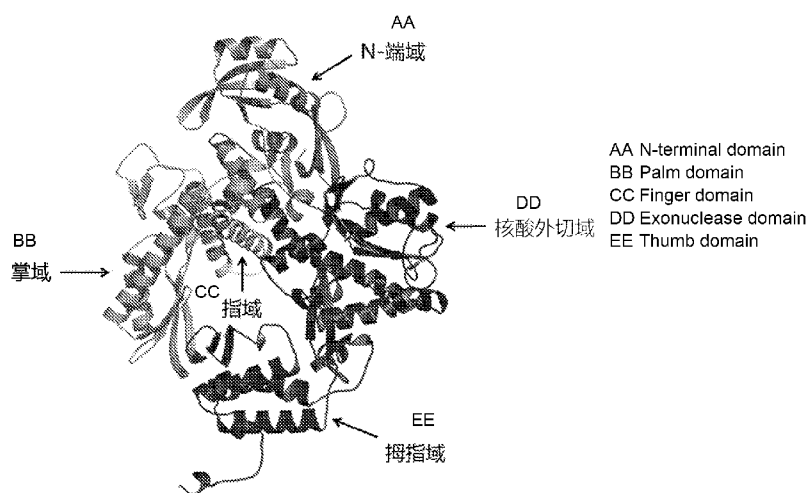


图 2

(57) Abstract: Provided in the present invention are a DNA polymerase and the use thereof. The above-mentioned DNA polymerase comprises: (a) a protein having a sequence as shown in SEQ ID NO: 1; (b) a protein having substitution, deletion, and/or addition of one or more amino acids at at least one of the following sites in the sequence as shown in SEQ ID NO: 1: D147, E149, L424, Y425, P426 and A503; or (c) a protein having at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 95%, or at least 99% or more homology to the sequence in (a) or (b), and having a DNA polymerase activity. The present invention can solve the problem of the limited types of DNA polymerases in the prior art, and is suitable for the field of DNA polymerases.

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

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

(57) 摘要: 本发明提供了一种DNA聚合酶及其应用。其中, 上述DNA聚合酶包括: (a)具有SEQ ID NO: 1所示的序列的蛋白; (b)在SEQ ID NO: 1所示的序列中, 如下至少一个位点发生取代、缺失和/或添加一个或几个氨基酸的蛋白: D147、E149、L424、Y425、P426和A503; 或(c)与(a)或(b)中的序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少99%以上同源性、且具有DNA聚合酶活性的蛋白。能够解决现有技术中的DNA聚合酶种类少的问题, 适用于DNA聚合酶领域。

DNA 聚合酶及其应用

技术领域

本发明涉及 DNA 聚合酶领域，具体而言，涉及一种 DNA 聚合酶及其应用。

背景技术

DNA 聚合酶是以 DNA 为复制模板，以 4 种脱氧核糖核苷酸为底物，由 5' 端开始复制合成一条与模板链序列互补的 DNA 新链的酶。DNA 聚合酶可以将游离脱氧核糖核苷酸添加到新形成链的 3' 端，从而实现新合成链在 5'-3' 方向的延伸。一些 DNA 聚合酶具有 3'-5' 核酸外切酶的活性，可以校正新合成 DNA 链中的错误。对于 PCR 扩增过程中产生的错配碱基，这些 DNA 聚合酶可以将错误加入的碱基进行切除、重新插入正确的碱基并继续复制，从而保证扩增的准确性。

DNA 聚合酶分为六个家族：A、B、C、D、X 以及 Y 家族。目前发现的耐热 DNA 聚合酶大部分属于 A 家族或 B 家族。属于 A 家族的耐热 DNA 聚合酶均来源于真细菌，如来源于栖热属的 Taq (*Thermus aquaticus*)、Tth (*Thermus thermophilus*)、Tca (*Thermus caldophilus*)、Tfl (*Thermus flavus*)、Tfi (*Thermus filiformis*) 以及来源于芽孢菌属的 Bst (*Bacillus stearothermophilis*)。属于 B 家族的耐热 DNA 聚合酶均来源于古细菌，如来源于高温球菌属的 Tli (*Thermococcus litoralis*)、焦热球菌属的 Pfu (*Pyrococcus furiosus*) 和 KOD1 (*Thermococcus kodakaraensis*)，以及 Pwo (*Pyrococcus woesei*)、Tgo (*Thermococcus gorgonarius*)、Pab (*Pyrococcus abyssi*) 等。

A 家族 DNA 聚合酶具有 5'-3' 聚合活性和 5'-3' 外切活性。B 家族 DNA 聚合酶具有 5'-3' 聚合活性以及 3'-5' 核酸外切活性。DNA 聚合酶的主要应用场景为聚合酶链式反应 (PCR) 技术。PCR 技术在 DNA 聚合酶催化下，以母链 DNA 为模板，以特定引物为延伸起点，通过变性、退火、延伸等步骤，体外复制出与母链模板 DNA 互补的子链 DNA。该应用对 DNA 聚合酶的关键属性提出了要求，即热稳定性、特异性、保真度和合成能力。同时，一些特殊的应用场景（如珍稀样本或特殊样本的 PCR 扩增等）对 DNA 聚合酶提出了更高的性能要求。DNA 聚合酶需要具有较高的热稳定性，能获得较高的扩增产量，还需要有更快的延伸速度、高的扩增特异性、对低量模板的扩增性能以及对特殊环境样本（如高盐等）的扩增性能。此外，基于可逆阻断修饰 dNTPs 的高通量测序还需要 DNA 聚合酶对修饰碱基具有聚合活性。

B 家族 DNA 聚合酶的结构通常分为 5 个结构域，分别为 N-端域、核酸外切域、掌域、指域及拇指域。一般认为，DNA 聚合酶活性与掌域、指域及拇指域密切相关。掌域是聚合酶的催化部位；拇指域与新合成的 dsDNA 相互作用并与引入的核苷酸相互作用；指域在模板固定和核苷酸特异性中发挥作用；核酸外切域与 3'-5' 核酸外切活性相关。DNA 聚合酶各域彼此紧密配合以完成 DNA 扩增全过程。

和 A 家族 DNA 聚合酶（如 Taq DNA 聚合酶等）相比，B 家族 DNA 聚合酶的 3'-5' 核酸外切活性（校正活性）使其具有更低的错误率，更适用于对 PCR 保真性要求较高的实验，如基因筛选、

测序、突变检测等。目前，绝大部分市售高保真DNA聚合酶均是基于Pfu DNA聚合酶或KOD DNA聚合酶开发而来，可选择性较少，难以满足现有技术中使用需求。

发明内容

本发明的主要目的在于提供一种DNA聚合酶及其应用，以解决现有技术中的DNA聚合酶种类少的问题。

为了实现上述目的，根据本发明的第一个方面，提供了一种DNA聚合酶，包括如下任一种蛋白：(a)具有SEQ ID NO: 1所示的序列的蛋白；(b)在SEQ ID NO: 1所示的序列中，如下至少一个位点发生取代、缺失和/或添加一个或几个氨基酸的蛋白：D147、E149、L424、Y425、P426和A503；或(c)与(a)或(b)中的序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少99%以上同源性、且具有DNA聚合酶活性的蛋白。

进一步地，DNA聚合酶具有热稳定性；优选地，DNA聚合酶的热稳定性优于KOD DNA聚合酶或Pfu DNA聚合酶；优选地，DNA聚合酶具有3'-5'核酸外切活性。

进一步地，(b)中，各位点取代的氨基酸类型包括以下至少一种：D147A、E149A、L424A/G/H/I/K/L/M/N/Q/S/T/V、Y425A/G/S/T/V、P426I/A/D/G/L/P/S/T/V或A503L/C/D/H/I/M/N/P/Q/R/S/T/V/Y。

进一步地，DNA聚合酶包括具有SEQ ID NO: 3所示的序列的蛋白，或与SEQ ID NO: 3所示的序列具有70%以上同源性、具有DNA聚合活性、且对修饰的脱氧核糖核苷酸具有聚合活性的蛋白；优选地，修饰包括3'-O-阻断修饰；优选地，3'-O-阻断修饰包括3'-O-叠氮甲基修饰。

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

进一步地，DNA分子具有SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 4所示的核苷酸序列。

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

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

进一步地，宿主细胞包括原核细胞或真核细胞；优选地，原核细胞包括大肠杆菌。

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

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

进一步地，缓冲液包括 9.5~10.5 mM Tris-HCl，pH 8.2~9.4，20~80 mM KCl，1.0~3.0 mM MgCl₂，35~45 mM TMAC，0.05~0.15% Triton X-100；优选地，缓冲液包括如下任意一种或多种：

9.5~10.5 mM Tris-HCl，pH 8.2~8.6，20~30 mM KCl，1.0~2.0 mM MgCl₂，35~45 mM TMAC，0.05~0.15% Triton X-100；

9.5~10.5 mM Tris-HCl，pH 8.2~8.6，70~80 mM KCl，1.0~2.0 mM MgCl₂，35~45 mM TMAC，0.05~0.15% Triton X-100；

9.5~10.5 mM Tris-HCl，pH 8.2~8.6，70~80 mM KCl，2.01~3.0 mM MgCl₂，35~45 mM TMAC，0.05~0.15% Triton X-100；

9.5~10.5 mM Tris-HCl，pH 8.61~9.0，20~30 mM KCl，1.0~2.0 mM MgCl₂，35~45 mM TMAC，0.05~0.15% Triton X-100；

9.5~10.5 mM Tris-HCl，pH 9.01~9.4，20~30 mM KCl，1.0~2.0 mM MgCl₂，35~45 mM TMAC，0.05~0.15% Triton X-100；

更优选地，缓冲液包括如下任意一种或多种：

10 mM Tris-HCl，pH 8.4，25 mM KCl，1.5 mM MgCl₂，40 mM TMAC，0.1% Triton X-100；

10 mM Tris-HCl，pH 8.4，75 mM KCl，1.5 mM MgCl₂，40 mM TMAC，0.1% Triton X-100；

10 mM Tris-HCl，pH 8.4，75 mM KCl，2.5 mM MgCl₂，40 mM TMAC，0.1% Triton X-100；

10mM Tris-HCl，pH 8.8，25 mM KCl，1.5 mM MgCl₂，40 mM TMAC，0.1% Triton X-100；

或

10 mM Tris-HCl，pH 9.2，25 mM KCl，1.5 mM MgCl₂，40 mM TMAC，0.1% Triton X-100。

为了实现上述目的，根据本发明的第六个方面，提供了一种上述 DNA 聚合酶或上述 PCR 试剂盒在 PCR 扩增、文库构建或测序中的应用。

为了实现上述目的，根据本发明的第七个方面，提供了一种 PCR 扩增方法，该 PCR 方法包括：利用上述 DNA 聚合酶或上述 PCR 试剂盒进行 PCR 扩增。

进一步地，PCR 方法包括：在扩增过程中利用 DNA 聚合酶掺入含有修饰的脱氧核糖核苷酸；优选地，修饰包括 3' -O-阻断修饰；优选地，3' -O-阻断修饰包括 3' -O-叠氮甲基修饰。

为了实现上述目的，根据本发明的第八个方面，提供了一种文库构建试剂盒，该文库构建试剂盒中包括上述 DNA 聚合酶。

进一步地，文库构建试剂盒中还包括如下任意一种或多种成分：1) 用于文库构建的接头序列；2) 用于提供文库构建环境的缓冲液；3) 用于构建文库的酶，包括 DNA 打断酶、末端修复酶或连接酶中的一种或多种；4) 含有修饰的脱氧核糖核苷酸。

为了实现上述目的，根据本发明的第九个方面，提供了一种文库构建方法，该文库构建方法包括：利用上述 DNA 聚合酶或上述文库构建试剂盒进行文库构建。

进一步地，文库构建方法包括：利用 DNA 聚合酶对连接有测序接头的待测序片段进行 PCR 扩增，获得 DNA 文库；优选地，文库构建方法还包括：在进行 DNA 扩增过程中利用 DNA 聚合酶掺入含有修饰的脱氧核糖核苷酸。

为了实现上述目的，根据本发明的第十个方面，提供了一种测序试剂盒，该测序试剂盒包括上述 DNA 聚合酶。

进一步地，测序试剂盒中还包括如下任意一种或多种成分：1) 用于与接头序列互补配对的引物；2) 双脱氧核苷酸；3) dNTPs；4) 核酸探针；5) 用于测序的酶，包括 DNA 连接酶和/或内切酶；6) 用于洗脱核酸探针和/或 dNTPs 的缓冲液；7) 含有修饰的脱氧核糖核苷酸。

为了实现上述目的，根据本发明的第十一个方面，提供了一种测序方法，该测序方法包括：利用上述 DNA 聚合酶或上述测序试剂盒进行测序。

进一步地，测序方法包括利用 DNA 聚合酶对待测序样本进行 PCR 扩增，获得 DNA 文库；利用测序技术对 DNA 文库进行测序，获得测序结果；优选地，测序方法还包括：在进行 PCR 扩增过程中利用 DNA 聚合酶掺入含有修饰的脱氧核糖核苷酸。

应用本发明的技术方案，上述 DNA 聚合酶序列新颖，可为 DNA 聚合酶不同应用场景的改造需求提供全新的酶骨架，可根据不同的应用场景进行进一步体系优化和改造，具有较大提升空间和应用潜力。

附图说明

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

图 1 示出了根据本发明实施例 1 的 22° S DNA 聚合酶、KOD DNA 聚合酶和 Pfu DNA 聚合酶的序列比对结果。

图 2 示出了根据本发明实施例 2 的 22° S DNA 聚合酶的结构域特征分析图。

图 3 示出了根据本发明实施例 3 的 22° S DNA 聚合酶纯化样品的 SDS-PAGE 电泳结果图。

图 4 示出了根据本发明实施例 5 的聚合活性检测原理示意图。

图 5 示出了根据本发明实施例 6 的 22° S DNA 聚合酶外切活性测试结果图。

图 6 示出了根据本发明实施例 7 的 22° S DNA 聚合酶 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳结果。

图 7 示出了根据本发明实施例 9 的 22° S-Mut DNA 聚合酶纯化样品的 SDS-PAGE 电泳分析结果图。

图 8 示出了根据本发明实施例 10 的 Cy3-DNA 双链模板序列。

具体实施方式

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

如背景技术所提到的，虽然基于不断提高的性能要求，越来越多的商用 DNA 聚合酶都采用了天然存在的野生型 DNA 聚合酶的工程化改造突变体，许多专利及文献已描述了多种有用的或性能提升的 DNA 聚合酶及其突变体，具有改进的催化活性、热稳定性等性能。然而，基于目前已知的 DNA 聚合酶进行进一步开发改造的空间有限。因此，寻找新型 B 家族 DNA 聚合酶具有重要的意义和价值，可以提供更多的改造模板以满足 DNA 扩增、合成、检测、测序以及其他重要的重组 DNA 技术的需要。在本申请中发明人尝试开发一种新型的 DNA 聚合酶，因而提出了本申请的一系列保护方案。

在本申请第一种典型的实施方式中，提供了一种 DNA 聚合酶，包括如下任一种蛋白：(a) 具有 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列的蛋白；(b) DNA 聚合酶突变体，上述 DNA 聚合酶突变体的氨基酸序列在 SEQ ID NO: 1 的如下至少一个位点发生取代、缺失和/或添加一个或几个氨基酸：D147、E149、L424、Y425、P426、A503，且 DNA 聚合酶突变体具有 DNA 聚合酶活性；或 (c) 与 (a) 或 (b) 中的蛋白质具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、或至少 99% 以上同源性且具有 DNA 聚合酶活性的蛋白。

上述 SEQ ID NO: 1 所示的 DNA 聚合酶，是一种深海海底热泉区沉积物来源的新型 DNA 聚合酶，将其命名为 22°S DNA 聚合酶。该 DNA 聚合酶序列和现有同类商品化 DNA 聚合酶相比序列一致性低于 45%。和现有同类酶产品相比，22°S DNA 聚合酶蛋白序列同源性较低，可改造空间大。且具有较好的热稳定性、5'-3'聚合活性及 3'-5'外切活性，且 PCR 扩增性能较好。

且上述 22°S DNA 聚合酶通过简单的突变改造获得的 DNA 聚合酶突变体，对 3'-O-阻断修饰的脱氧核糖核苷酸具有聚合活性，能够应用于基于 3'-O-阻断修饰的脱氧核糖核苷酸的高通量测序技术中。

SEQ ID NO: 1:

MRGVIVDVDHDLGNREQTIIRLYVRGEDGSVHVIRKEYTPYFYVLSENPEDTVQKIREL
SGVKSAEIVERFVRWEKKRVILVRVAHQKYINRIREKIKEMGGECREHDINVERKFLYEHGLE
PLGGIDTETLSPVETRVEPVIAAFDLEVYAKDRMPEPDRPENEIIMASWVDSTGRRVVITTKDI
ERDYVVKVETEAQIISELNRLMREVDPDIVLTYNNGDNFDLPYLRERARFLGMRIPWGRDGSE
PRIIRRGPTGNTTVDIAGRAHVDFVQIVQFMAGIGAINSIHLDLESVYEAVLGKKKVKIKHMD
IADQWRSGDLGLLADYNLQDSIACYELGMEFLPLYVELSRITVSPLPNTTTRMSASQLVEWTL

IRRAFKMVGKVVPRKPREEEVRARMETQYQGAFFVKEPVPGLHERIVVLDFRSLYPTIIISHNV
DPDTANAPYCSRENAYVSPVGHYFCKEPKGLIPGMLEEVLELRFALKDKLKKMDKDDPDY
KPLYAKQKALKIVANATYGYLGFAARWYCKVCAEAVTAWARHYIKKVMKWAEHGFVTI
YGDTSVFIKLGEDQTLLEDALAFMGWVNERLPKPMALDFDGYVVRGIFLSKRRSGKAACK
KYALIDEKGRLKITGLEYYRRDWAEIAKEVQAKVLEYVLKEGDVKKAVDYVKRVIADVRA
GKIPKEKLIITYTQIKELDRYAARGPHVAAALKAMKRGVHIEPGMIIGYIITKRGSSISDKAEL
AQFVREGDYDPEYYVEHQIIPAVLPILEELGYDERALKQDAGQRSIFDFT。

上述氨基酸突变均在本申请实施例中进行试验探究，相较于具有 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列的母本，均具有 DNA 聚合酶活性。上述突变位点包括在核酸外切域和指域（活性位点）进行的突变，此种突变能够改善蛋白的活性，对于远离活性位点的突变，对增强蛋白的活性的影响较小，因此能够获得与上述氨基酸序列具有 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5% 或 99.9% 或以上同源性、且具有相同提高比酶活性作用能力的蛋白质。

本领域技术人员能够灵活在上述 DNA 聚合酶或突变体上增加现有技术中常用元件，上述元件包括但不限于调控转录翻译水平的启动子，用于纯化蛋白的分子标签，用于定位蛋白的信号肽等现有技术中的已知的蛋白序列。上述元件不影响 DNA 聚合酶的活性，包括但不限于聚合能力或聚合阻断修饰的脱氧核糖核苷酸的能力。

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

70%、75%、80%、85%、90%、95%、99% 以上（比如 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、98.5%、99%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8% 以上，甚至 99.9% 以上）同源性且具有相同功能的蛋白质，其活性位点、活性口袋、活性机制、蛋白结构等均和 a) 序列提供的蛋白质大概率相同。

如本文所用，氨基酸残基缩写如下：丙氨酸(Ala; A)、天冬酰胺(Asn; N)、天冬氨酸(Asp; D)、精氨酸(Arg; R)、半胱氨酸(Cys; C)、谷氨酸(Glu; E)、谷氨酰胺(Gln; Q)、甘氨酸(Gly; G)、组氨酸(His; H)、异亮氨酸(Ile; I)、亮氨酸(Leu; L)、赖氨酸(Lys; K)、蛋氨酸(Met; M)、苯丙氨酸(Phe; F)、脯氨酸(Pro; P)、丝氨酸(Ser; S)、苏氨酸(Thr; T)、色氨酸(Trp; W)、酪氨酸(Tyr; Y)和缬氨酸(Val; V)。

一般情况下，根据取代、替换等规则，性质类似的氨基酸之间相互替换后的效果也类似。例如，在上述蛋白中，可发生保守的氨基酸替换。“保守的氨基酸替换”包括但不限于：

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

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

侧链带正电的氨基酸（Arg、His、Lys）被其他侧链带正电的氨基酸取代；

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

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

本申请中所用的“AlphaFold2”是 DeepMind 推出的一种基于深度学习的蛋白质结构预测模型，利用深度神经网络对蛋白质序列进行分析和预测，从而预测出蛋白质的三维结构，为蛋白质研究提供了一种全新的工具和方法。

在一种优选的实施例中，(b) 中，各位点取代的氨基酸的类型包括以下至少一种：D147A、E149A、L424A/G/H/I/K/L/M/N/Q/S/T/V、Y425A/G/S/T/V、P426I/A/D/G/L/P/S/T/V 或 A503L/C/D/H/I/M/N/P/Q/R/S/T/V/Y；其中，数字前字母代表原始氨基酸，数字后字母代表突变氨基酸；“/”表示“或”，即“Y425A/G/S/T/V”表示 Y425A、Y425G、Y425S、Y425T 或 Y425V。

在一种优选的实施例中，DNA 聚合酶突变体包括：SEQ ID NO: 3 所示的蛋白，或与 SEQ ID NO: 3 所示的蛋白具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、或至少 99% 以上同源性，具有 DNA 聚合酶活性，且对阻断修饰的脱氧核糖核苷酸具有聚合活性的蛋白；优选地，3' -O-阻断修饰包括 3' -O-叠氮甲基修饰。

SEQ ID NO: 3 所示的蛋白即为发生 D147A+E149A+L424A+Y425A+P426I+A503L 突变的蛋白，本申请中，此种 DNA 聚合酶突变体命名为 22° S-Mut DNA 聚合酶。上述突变体中，147 和 149 位点位于核酸外切域，424、425、426 和 503 位点均位于指域。

SEQ ID NO: 3:

MRGVIVDVDHDLGNREQTIIRLYVRGEDGSVHVIRKEYTPYFYVLSENPEDTVQKIREL
SGVKSAEIVERFVRWEKKRVILVRVAHQKYINRIREKIKEMGGECREHDINVERKFLYEHGLE
PLGGIDTETLSPVETRVEPVIAAFALAVYAKDRMPEPDRPENIIMASWVDSTGRRVVITTKDI
ERDYVVKVETEAQIISELNRLMREVDVPDIVLTYNGDNFDLPYLRERARFLGMRIPWGRDGSE
PRIRRGPTGNTTVDIAGRAHVDFVQIVQFMAGIGAINSIHLDLESVYEAVLGKKKVKIKHMD
IADQWRSGDLGLLADYNLQDSIACYELGMEFLPLYVELSRITVSPLPNTTRMSASQLVEWTL
IRRAFKMGKVVPKRPREEEVRARMETYYQGAFFVKEPVPGLHERIVVLDFRSAAITIISHNV
DPDTANAPYCSRENAYVSPVGHYFCKEPPKGLIPGMLEEVLELRFALKDKLKKMDKDDPDY
KPLYAKQKLLKIVANATYGYLGFARARWYCKVCAEAVTAWARHYIKKVMKWAEHGFVTI
YGD TDSVFIKLGEDQTLEDALAFMGWVNERLPKPMALDFDGYVVRGIFLSKRRSGKAAKK
KYALIDEKGRLKITGLEYYVRDWAIEAKEVQAKVLEYVLKEGDVKKAVDYVVKRVIADVRA
GKIPKEKLIYTQIQKELDRYAARGPHVAAALKAMKRGVHIEPGMIIGYIITKRGSSISDKAEL
AQFVREGDYDPEYYVEHQIIPAVLPIL EELGYDERALKQDAGQRSIFDFT。

上述 DNA 聚合酶突变体，对修饰单碱基（包括但不限于对 3' -O-阻断修饰的脱氧核糖核苷酸）具有聚合活性。利用此种 DNA 聚合酶突变体能够对普通的 DNA 聚合酶难以进行的 PCR 反应进行扩增，从而应用于高通量测序等领域。

在本申请第二种典型的实施方式中，提供了一种 DNA 分子，该 DNA 分子编码上述 DNA 聚合酶。

需要说明的是，由于密码子简并性原则，翻译氨基酸序列的核苷酸序列并不是唯一恒定的序列，任何可以编码上述 DNA 聚合酶的氨基酸序列的核苷酸序列都是本专利范围内的核酸序列。

在一种优选的实施例中，DNA 分子具有 SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 4 所示的核苷酸序列。

SEQ ID NO: 2:

```
atgcgcggcgtgattgtggtatgtgatcatgatctgggcaaccgcaacagaccattattcgctgtatgtgcgcggcgaagatggcagc
gttcatgtgattcgaaagaatatacccccgtattttatgtgctgagcgaaaacccggaagataccgtgcagaaaattcggaactgagcggcgtg
aaaagcgcggaaattgtggaacgctttgtgcgtgggagaaaaagcgcgtgattctggtgcgcgtggcgcacagaaatataaccgcattcg
cgaaaagatcaaggagatggcgggcgaatgccgcgaacatgataaactgtggaacgcaaatttctgtatgagcacggcctggaaccgctggg
cggtattgataccgaaacccgtgagcccgggtggaacccgcgttgaaccgggtattgctggcgtttgatctggaagtgtatcgaaagatcgcatgc
cggaaccggatcgcccggaaaatgaaattattatggcgagctgggtggatagcaccggccgcgtgtgttattaccaccaaagatattgaacgc
gattatgtggtgaaagtggaaaccgaagcgcagattattagcgaactgaaccgcctgatgcgcgaagtggatccggatattgtctgacctataa
cggcgataactttgatctgcgtatctgcgcgaacgcgcacgcttttagcatgcgcattccgtggggctcgtgatggtagcgaaccgcgcattcg
ccgtggccctaccgtaataaccacggtgatattgcccggcgtgcgcattgttgcagttgtgagttatggcgggcatlggcgcgattg
acagcattcatctggatctggaaagcgtgtatgaagcgggtgctgggcaaaaagaaagtgaataaaacacatggacatcgccgatcagtgccg
cagcggcgatttagcttattagcggattataacctgcagatagcattgcgtgtatgaactgggcattggaatttctgccgctgtatgtggaactg
agccgcattaccgtgagcccgtgcgaataaccacccgcgatgagcgcgagccaattagtgaatggaccctgattcgccgcgcgtttaaaatgg
gcaaagtgtgcccgcgaacccgcgcgaagaagaagttcgcgcacgtatgatgaaacctatcaggcgcggtttgtgaaagaaccggtgccg
ggcttacatgaacgcattgtggtgctggattttcgcagcctgtatccgaccattattattagccataacgtggatccggataccggaacgcgccgt
attgcagccgtgaaaatgcgtatgtgagcccgggtggccatttttgcagaacccgaaaggcctgattccgggcattgctggaagaagtgcgtg
gaactgcgctttgcgtgaaagataaactgaaaaagatggacaaggacacccggattataagccgctgtatgcgaacagaaagcgcgtgaaa
attgtggcgaacgcgacctatggctatctgggctttgccgcgcacgttgggtattgcaaagtgtgcgcggaagccgtgaccgcgtgggcgcgtc
attatattaaaaaggtgatgaaatggcgaggagcatggctttaccgtgatttatggcgataccgatagcgtgtttattaaactggcggaagatca
gacctggaagatgcgctggcgtttatgggctgggtgaacgaacccctgccgaaaccgatggcgtggtgattttgatggctattatgtgcgcggca
ttttctgagcaaacgccgcagcggcaaagcggcgaagaaaaagtatgcgctgattgatgaaaaggccgctgaaaattaccggcctggaata
tgtgcgccgcgattggcggaattgcgaagaagtgaggcgaaagtgtggaatatgtgctgaaagaaggcgatgtgaaaaaggcgggtgg
attatgtgaaacgcgtgattgcggatgttcgcgcgggcaaaatccgaaagaaaaactgattttacaccagatccagaaggagctggaccgc
tatgcggcgcgtggacctcatgttcgcggcggtttaaagcgatgaaacgcggcgttcattatgaaccgggcattattggctatattattacca
aacgcggcagcagcattagcgataaagcggaactggcgcagttgtgcgcgaaggcgattatgatccggaatattatgtggaacatcagattatt
ccggcgggtgctgccgattctggaagaactgggctatgatgaacgtgcgctgaacaggatgcgggccagcgtagcatttttgattttacctaa。
```

SEQ ID NO: 4:

```
atgcgcggcgtgattgtggtatgtgatcatgatctgggcaaccgcaacagaccattattcgctgtatgtgcgcggcgaagatggcagc
gttcatgtgattcgaaagaatatacccccgtattttatgtgctgagcgaaaacccggaagataccgtgcagaaaattcggaactgagcggcgtg
aaaagcgcggaaattgtggaacgctttgtgcgtgggagaaaaagcgcgtgattctggtgcgcgtggcgcacagaaatataaccgcattcg
cgaaaagatcaaggagatggcgggcgaatgccgcgaacatgataaactgtggaacgcaaatttctgtatgagcacggcctggaaccgctggg
cggtattgataccgaaacccgtgagcccgggtggaacccgcgttgaaccgggtattgctggcgtttgcactggcagtgatgcgaagatcgcatgc
```

cggaaccggatcgcccgaaaatgaaattattatggcgagctgggtggatagcaccggcccgctgtgttattaccaccaagatattgaacgcgattatgtgggtgaaagtggaaaccgaagcgcagattattagcgaactgaaccgcctgatgcggaagtggatccggatattgtgctgacctataacggcgataactttgatctgccgtatctgcgcgaacgcgcacgcttttaggcattgcgcattccgtggggctgctgatggtagcgaaccgcgcattcccggtggccctaccggtaataaccaccgttgatattgcccccgctgcgcattgtgatgtgttcagattgtgcagtttatggcgggcatlggcgcgattaacagcattcatctggatctggaaagcgtgtatgaagcgggtgctggggcaaaaagaaagtgaaaattaaacacatggacatcgcgatcagtggcgcagcggcgatttaggcttattagcggattataacctgcaggatagcattgcgtgctatgaactgggcatggaatttctccgctgtatgtggaactgagccgattaccgtgagcccgtgccgaataaccaccgcgatgagcgcgagccaattagtggaatggaccctgattcgccgcgcttataaatggcaaaagtggtgccgcgcaaacgcgcgaagaagaagttcgcgcacgtatgatggaaacctatcaggggcgctgtgtgaaagaaccggtgccggctttacatgaacgcattgtgggtgctggatttctgcagcgcagcaataaccattattatgacataacgtggatccggataaccgcgaacgcgcgtattgcagccgtgaaaatgcgtatgtgagcccgggtgggccatttttgcgaagaaccgaaaggcctgattccgggcatgctggaagaagtgtggaactgcgctttgcgctgaaagataaactgaaaaagatggacaaggacaccgggattataagccgctgtatgcgaacagaaactactgaaaattgtggcgaacgcgacctatggctatctgggctttgcccgcgacgttggtattgcaaaagtgtgcgcggaagccgtgaccgcgtgggcgcgtcattatattaaaaaggtgatgaaatggcgaggagcatggctttaccgtgatttatggcgataccgatagcgtgtttataaactgggcgaagatcagacctggaagatgcgctggcgtttatgggctgggtgaacgaacgcctgccgaaaccgatggcgctggattttgatggctattatgtgcgcggcatatttctgagcaaacgccgcagcggcaaaagcggcgaagaaaagtatgcgctgattgatgaaaagggccgctgaaaattaccggcctggaatagtgtgcgccgcatgggggaaattgcgaagaagtgcaggcgaaagtgtggaatatgtgctgaaagaaggcgatgtaaaaaggcggtggattatgtaaacgcgtgattgcggatgttcgcgcgggcaaaattccgaaagaaaactgattttacaccagatccagaaggagctggaccgtatgcggcgctggacctcatgttcggcgcgctttaaagcgatgaaacgcggcggtcatattgaaccggcatgattattggctatattattacaacgcggcagcagcattagcgataaagcggaaactggcgagtttgcgcgaaggcgattatgatccggaatattatgtggaacatcagattattccggcggtgctgccgattctggaagaactgggctatgatgaacgtgcgctgaacaggatgcggggcagcgtagcatttttgattttaccta.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

在一种优选的实施例中，缓冲液包括 9.5~10.5 mM Tris-HCl (pH 8.2~9.4)，20~80 mM KCl，1.0~3.0 mM MgCl₂，35~45 mM TMAC (四甲基氯化铵)，0.05~0.15% Triton X-100 (曲拉通 X-100)；优选地，缓冲液包括如下任意一种或多种：9.5~10.5 mM Tris-HCl (pH 8.2~8.6)，20~30 mM KCl，1.0~2.0 mM MgCl₂，35~45 mM TMAC，0.05~0.15% Triton X-100；9.5~10.5 mM Tris-HCl (pH 8.2~8.6)，70~80 mM KCl，1.0~2.0 mM MgCl₂，35~45 mM TMAC，0.05~0.15% Triton X-100；9.5~10.5 mM Tris-HCl (pH 8.2~8.6)，70~80 mM KCl，2.01~3.0 mM MgCl₂，35~45 mM TMAC，0.05~0.15% Triton X-100；9.5~10.5 mM Tris-HCl (pH 8.61~9.0)，20~30 mM KCl，1.0~2.0 mM MgCl₂，35~45 mM TMAC，0.05~0.15% Triton X-100；9.5~10.5 mM Tris-HCl (pH 9.0~9.4)，20~30 mM KCl，1.0~2.0 mM MgCl₂，35~45 mM TMAC，0.05~0.15% Triton X-100。

更优选地，缓冲液包括如下任意一种或多种：

10 mM Tris-HCl (pH 8.4)，25 mM KCl，1.5 mM MgCl₂，40 mM TMAC，0.1% Triton X-100；

10 mM Tris-HCl (pH 8.4)，75 mM KCl，1.5 mM MgCl₂，40 mM TMAC，0.1% Triton X-100；

10 mM Tris-HCl (pH 8.4)，75 mM KCl，2.5 mM MgCl₂，40 mM TMAC，0.1% Triton X-100；

10 mM Tris-HCl (pH 8.8)，25 mM KCl，1.5 mM MgCl₂，40 mM TMAC，0.1% Triton X-100；

或

10 mM Tris-HCl (pH 9.2)，25 mM KCl，1.5 mM MgCl₂，40 mM TMAC，0.1% Triton X-100。

在上述缓冲液中，pH 指为 Tris-HCl 溶液的 pH 值，在获得特定 pH 的 Tris-HCl 溶液后，加入 KCl、MgCl₂、TMAC、Triton X-100 等成分，即能够获得上述缓冲液。

在本申请第六种典型的实施方式中，提供了一种上述 DNA 聚合酶或 PCR 试剂盒在 PCR 扩增、文库构建或测序中的应用。

在本申请第七种典型的实施方式中，提供了一种 PCR 扩增方法，上述 PCR 方法中利用上述 DNA 聚合酶或上述 PCR 试剂盒进行 PCR 扩增。

在一种优选的实施例中，PCR 方法包括：在扩增过程中利用上述 DNA 聚合酶掺入含有修饰的脱氧核糖核苷酸；优选地，修饰包括 3' -O-阻断修饰；优选地，3' -O-阻断修饰包括 3' -O-叠氮甲基修饰。

在本申请第八种典型的实施方式中，提供了一种文库构建试剂盒，上述文库构建试剂盒中包括上述 DNA 聚合酶。

在一种优选的实施例中，文库构建试剂盒中还包括如下任意一种或多种成分：1) 用于文库构建的接头序列；2) 用于提供文库构建环境的缓冲液；3) 用于构建文库的酶，包括 DNA 打断酶、末端修复酶或连接酶中的一种或多种；4) 含有修饰的脱氧核糖核苷酸。

优选地，上述修饰包括但不限于 3' -O-阻断修饰；优选地，3' -O-阻断修饰包括但不限于 3' -O-叠氮甲基修饰。

在本申请第九种典型的实施方式中，提供了一种文库构建方法，包括：利用上述 DNA 聚合酶或上述文库构建试剂盒进行文库构建。

在一种优选的实施例中，文库构建方法包括：利用上述 DNA 聚合酶对连接有测序接头的待测序片段进行 PCR 扩增，获得 DNA 文库；优选地，文库构建方法包括：在进行 DNA 扩增过程中利用 DNA 聚合酶掺入含有修饰的脱氧核糖核苷酸；优选地，文库构建方法还包括：对基因组 DNA 进行片段化处理，获得片段化 DNA；对片段化 DNA 进行末端修复，获得修复片段化 DNA；将接头序列连接至修复片段化 DNA，获得连接有测序接头的待测序片段；优选地，上述修饰包括但不限于 3' -O-阻断修饰；优选地，3' -O-阻断修饰包括但不限于 3' -O-叠氮甲基修饰。

利用上述文库构建试剂盒和/或文库构建方法，利用上述 DNA 聚合酶能够将连接有测序接头（包括但不限于全长型接头或截短型接头）的待测序片段进行 PCR 扩增、富集，为后续的测序提供充足的样本。

在本申请第十种典型的实施方式中，提供了一种测序试剂盒，上述测序试剂盒包括上述 DNA 聚合酶。

在一种优选的实施例中，测序试剂盒中还包括如下任意一种或多种成分：1) 用于与接头序列互补配对的引物；2) 双脱氧核苷酸；3) dNTPs；4) 核酸探针；5) 用于测序的酶，包括 DNA 连接酶和/或内切酶；6) 用于洗脱核酸探针和/或 dNTPs 的缓冲液；7) 含有修饰的脱氧核糖核苷酸。

优选地，上述修饰包括但不限于 3'-O-阻断修饰；优选地，3'-O-阻断修饰包括但不限于 3'-O-叠氮甲基修饰。

在本申请第十一种典型的实施方式中，提供了一种测序方法，包括：利用上述 DNA 聚合酶或上述测序试剂盒进行测序。

在一种优选的实施例中，测序方法包括：利用上述 DNA 聚合酶对待测序样本进行 PCR 扩增，获得 DNA 文库，利用测序技术对 DNA 文库进行测序，获得测序结果；优选地，上述测序方法还包括：在进行 PCR 扩增过程中利用所述 DNA 聚合酶掺入含有修饰的脱氧核糖核苷酸。

优选地，上述修饰包括但不限于 3'-O-阻断修饰；优选地，3'-O-阻断修饰包括但不限于 3'-O-叠氮甲基修饰。

利用上述测序试剂盒和/或测序方法，能够通过现有技术中 Sanger 测序、二代测序或三代测序等方法实现对于待测序样本的测序。在测序中，利用本申请上述 DNA 聚合酶，能够实现乳液 PCR、桥式 PCR、滚环扩增技术等现有测序技术中常见的 PCR 反应。上述乳液 PCR 可以参考 ABI 公司的 Soild 测序方法中的乳液 PCR 操作、或参考 Roche 454 测序方法中的乳液 PCR 操作。上述桥式 PCR 可以参考 illumina 公司的 Solexa 测序方法中的桥式 PCR 操作。上述滚环扩增技术可以参考华大基因的 MGI 测序方法中的滚环扩增技术 (RCA) 扩增制备 DNA 纳米球 (DNB) 的方法。

利用上述 DNA 聚合酶，能够实现对于目标样本或序列的 PCR 扩展、文库构建或高通量测序。尤其是利用上述对修饰单碱基 (包括但不限于对 3'-O-阻断修饰的脱氧核糖核苷酸) 具有聚合活性的 DNA 聚合酶 (DNA 聚合酶突变体)，能够在 PCR 扩增或建库阶段利用含有阻断修饰的核苷酸进行 DNA 聚合，实现对于目标序列的标记。或在测序阶段，利用上述 DNA 聚合酶突变体，能够实现对于含有阻断修饰的核苷酸的 DNA 的扩增，从而完成对于含有阻断修饰的核苷酸的 DNA 的测序。

下面将结合具体的实施例来进一步详细解释本申请的有益效果。在本申请实施例中进行如下探究：

- (1). 将 22°S DNA 聚合酶序列基因合成后，构建入 pET-28a(+) 载体内 (插入位点为 *Nde I/Xho I*)，并在大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态中进行异源表达。
- (2). 采用镍柱和离子柱进行纯化。
- (3). 通过功能活性测定，确定该酶具有较好的热稳定性、5'-3' 聚合活性及 3'-5' 外切活性。
- (4). 通过功能 PCR 测试，该酶可直接应用于 PCR 反应。
- (5). 对 22°S DNA 聚合酶进行定点突变和突变体蛋白诱导表达、纯化，获得 22°S-Mut DNA 聚合酶。
- (6). 对 22°S-Mut DNA 聚合酶在酶标仪上进行 3'-O-阻断修饰的脱氧核糖核苷酸的聚合活性

测试。

实施例1 序列比对

采用Clustal Omega在线序列比对网站，将本发明所披露的22°S DNA聚合酶和KOD DNA聚合酶以及Pfu DNA聚合酶进行多重序列比对，比对结果显示22°S DNA聚合酶和KOD及Pfu DNA聚合酶的序列一致性分别为40.28%和42.52%，具体比对结果如图1所示。

Pfu DNA聚合酶的氨基酸序列如SEQ ID NO: 5所示，KOD DNA聚合酶的氨基酸序列如SEQ ID NO: 6所示。

SEQ ID NO: 5:

MILDVDYITEEGKPVIRLFKKENGKFKIEHDRTFRPYIYALLRDDSKIEEVKKITGERHG
KIVRIVDVEKVEKKFLGKPITVWKLYLEHPQDVPTIREKVRHHPAVVDIFEYDIPFAKRYLID
KGLIPMEGEEELKILAFDIETLYHEGEEFGKGPIIMISYADENEAKVITWKNIDLPYVEVVSSE
REMIKRFLRIREKDPDIIVTYNGDSFDFPYLAKRAEKLGIKLTIGRDGSEPKMQRIGDMTAV
EVKGRIHFDLYHVITRTINLPTYTLEAVYEAIFGKPKEKVYADEIAKAWESGENLERVAKYS
MEDAKATYELGKEFLPMEIQLSRLVGQPLWDVSRSSSTGNLVEWFLLRKAYERNEVAPNKP
SEEEYQRRRLRESYTGGFVKEPEKGLWENIVYLDLFRALYPSIIITHNVSPDTLNLEGCKNYDIA
PQVGHKFCKDIPGFIPSLGHLLEERQKIKTKMKETQDPIEKILLDYRQKAIKLLANSFYGY
GYAKARWYCKECAESVTAWGRKYIELVWKELEEKFGFKVLYIDTDGLYATIPGGESSEEIKK
KALEFVKYINSKLPGLLELEYEGFYKRGFFVTKKRYAVIDEEGKVITRGLEIVRRDWSEIAKE
TQARVLETILKHGDVEEAVRIVKEVIQKLANYEIPPEKLAIYEQITRPLHEYKAIGHVAVAK
KLAAGVKIKPGMVIGYIVLRGDGPISNRAILAEYDPKKHKYDAEYYIENQVLPVLRILE
GFGYRKEDLRYQKTRQVGLTSWLNKKS。

SEQ ID NO: 6:

MILDTDYITEDGKPVIRIFKKENGFEKIEYDRTFEPYFYALLKDDSAIEEVKKITAERHGT
VVTVKRVEKVQKKFLGRPVEVWKL YFTHPQDVPAIRDKIREHHPAVIDIYEYDIPFAKRYLID
KGLVPMEGDEELKMLAFDIETLYHEGEEFAEGPILMISYADEEGARVITWKNVDLPYVDVV
STEREMIKRFLRVVKEKDPDVLITYNGDNDFAYLKKRCEKLGINFALGRDGSEPKIQRMG
DRFAVEVKGRIHFDLYPVIRRTINLPTYTLEAVYEA VFGQPKEKVYAE EITTAWETGENLER
VARYSMEDAKVTYELGKEFLPMEAQLSRLIGQSLWDVSRSSSTGNLVEWFLLRKAYERNEL
APNKPDEKELARRRQSYEGGYVKEPERGLWENIVYLDLFRSLYPSIIITHNVSPDTLNREGCKE
YDVAPQVGHRFCKDFPGFIPSLGDLLEERQKIKKKMKATIDPIERKLLDYRQRAIKILANSY
YGYGYARARWYCKECAESVTAWGREYITMTIKEIEEKYGFKVIYSDDTGFFATIPGADAE
TVKKKAMEFLKYINAKLPGALELEYEGFYKRGFFVTKKKYAVIDEEGKITTRGLEIVRRDW
SEIAKETQARVLEALLKGDVEKAVRIVKEVTEKLSKYEVPEKLV IHEQITRDLKDYKATG
PHVAVAKRLAARGVKIRPGTVISYIVLKGSGRIGDRAIPFDEFDPTKHKYDAEYYIENQVLP
AVERILRAFGYRKEDLRYQKTRQVGLSAWLKPKGT。

实施例2 结构模型

对该序列进行基于AlphaFold的蛋白结构模型预测，通过结构分析，可见22°S DNA聚合酶

具有B家族DNA聚合酶典型的结构域特征，包括N-端域、核酸外切域、掌域、指域及拇指域。22°S DNA聚合酶结构域特征分析图如图2所示。

实施例3 22°S DNA聚合酶重组质粒构建及蛋白表达纯化

1. 22°S DNA聚合酶质粒构建与转化

含有22°S DNA聚合酶基因序列的表达质粒pET-28a(+)/22°S委托常州新一产生命科技有限公司进行合成构建，克隆位点为*Nde* I和*Xho* I。pET-28a(+)/22°S重组质粒转化入购买自天根生化科技（北京）有限公司的大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞（货号：CB105）中，进行后续表达纯化。转化步骤为：取0.5 μ L 50 ng/ μ L的pET-28a(+)/22°S质粒加入100 μ L BL21(DE3)感受态细胞中，轻弹混匀并于冰上放置5分钟；42℃热激1分钟后再次于冰上放置5分钟；加入400 μ L无抗性LB，37℃摇床220 rpm震荡1小时；取100 μ L培养物涂于卡那霉素抗性LB平板，37℃孵育12-16小时。

2. 22°S DNA聚合酶蛋白表达与纯化

(1). 挑取平板上长势良好的单菌落3-6个，接种至50/250 mL的LB液体锥形瓶中，37℃培养5-7h，OD₆₀₀达到0.6-4.0。随后以1%的接种量将上述菌液接种至2L/5L的LB培养基中，37℃培养2-4小时，待OD₆₀₀达到0.6-0.8。将原摇床预冷至16℃。向培养基中加入IPTG，使其终浓度为0.5 mM。16℃的摇床内，220 rpm、诱导表达12-16小时。

(2). 诱导表达后，所有菌液采用8000g转速，离心10 min收集菌体。随后按1:10比例加入Ni柱亲和A液进行菌体重悬，并采用超声的方法，在冰浴环境中进行菌体破碎。

(3). 加热处理：水浴锅预热至 75-80℃，将已破碎菌体放入水浴锅中，摇动混匀，用干净的温度计检测菌液内部温度到达 75℃时，计时 30 min，期间每 10 min 摇动混匀 1 次，使受热均匀。

(4). 将热处理后的超声破碎液在12000 rpm转速下4℃离心60 min，将上清用0.22 μ M滤膜进行过滤，作为AKTA（ÄKTA pure™ 25 T纯化系统，Cytiva）纯化柱上样样品。

将上述样品以2.5 mL/min的流速上样进预处理后的镍层析柱（HisTrap FF，5 mL柱）。上样完成后，继续用Ni柱亲和A液冲洗20个柱体积（20 CV）。随后进行Ni柱亲和B液占比0-70%、10.5 CV的线性洗脱。紫外吸收峰达到50 mAu时收集洗脱蛋白，紫外吸收峰下降到200 mAu时停止收集。将收集的样品进行SDS-PAGE电泳分析确定蛋白纯度。22°S DNA聚合酶纯化样品SDS-PAGE电泳分析结果图如图3所示。

(5). 将收集的蛋白洗脱峰样品在4℃透析过夜。透析完成后测定蛋白浓度，并储存在储存液中保存于-20℃冰箱，用于后续功能活性分析，酶储浓度0.18 mg/mL。

纯化过程中所用缓冲液具体组分如下所示：

Ni柱亲和A液：20 mM Tris-HCl (2.43 g/L)，500 mM NaCl (29.22 g/L)，20 mM Imidazole (咪唑，1.36 g/L)，5% Glycerol (甘油，62.5 g/L)，pH 7.5。

Ni柱亲和B液：20 mM Tris-HCl (2.43 g/L)，500 mM NaCl (29.22 g/L)，500 mM Imidazole (34.04 g/L)，5% Glycerol (62.5 g/L)，pH 7.5 @ 25°C。

2×透析液：40 mM Tris-HCl (4.86 g/L)，200 mM KCl (14.91 g/L)，2 mM DTT (二硫苏糖醇，0.3085 g/L)，0.2 mM EDTA-2Na (0.0744 g/L)，5% Glycerol (62.5 g/L)，pH 8.0 @ 25°C。

储存液：10 mM Tris-HCl (1.21 g/L)，100 mM KCl (7.455 g/L)，1 mM DTT (0.15425 g/L)，0.1 mM EDTA-2Na (0.0372 g/L)，50% Glycerol (625 g/L)，pH 7.5 @ 25°C。

实施例4 22°S DNA聚合酶热稳定性测定

采用购买自赛默飞公司的Protein Thermal Shift™ 染料试剂盒（货号：4461146）对22°S DNA聚合酶进行蛋白稳定性测定。对照采用KOD DNA聚合酶（SEQ ID NO：6）和Pfu DNA聚合酶（SEQ ID NO：5），测试反应体系为：5 μL Protein Thermal Shift Buffer、2 μL待测蛋白、2.5 μL 8×Protein Thermal Shift Dye、10.5 μL无核酸酶水。将上述反应体系混匀后置于StepOne™ 实时荧光定量PCR系统（Applied Biosystems™）上进行25-99°C升温实验，监测ROX荧光信号变化，结果如表1所示。

表1

名称	Tm (°C)
22°S DNA聚合酶	96.25
KOD DNA聚合酶	95.90
Pfu DNA聚合酶	92.80

实施例5 22°S DNA聚合酶聚合活性测定

采用Primed M13mp18 Single-stranded DNA（NEB，货号：N4040S）底物进行聚合活性测定，具体原理如图4所示。在聚合活性存在的情况下Primed M13 ssDNA上的引物会按照5'→3'的方向沿着ssDNA进行延伸生成dsDNA。生成的dsDNA可通过Qubit™ dsDNA HS定量试剂盒（赛默飞，货号：Q32854）进行定量检测。基于Primed M13 ssDNA的聚合活性检测原理示意图如图4所示。具体反应体系及组分如表2所示。

表2

组分	体积（μL）
10×ThermoPol® Reaction Buffer	2.5
50 nM Primed-M13 ssDNA	4
10 mM dNTP Mix	1
22°S DNA聚合酶	1

无核酸酶水	16.5
-------	------

将上述反应液在72℃反应5 min后，加入2 μL 0.5 M的EDTA终止反应，并用Qubit™ dsDNA HS定量试剂盒进行dsDNA浓度测定。阴性对照以同体积的酶储存液替代22°S DNA聚合酶。以实验组的Qubit值减去阴性对照组的Quibt值作为ΔQubit值表征聚合活性。结果如表3所示，22°S DNA聚合酶在72℃具有聚合活性。

表3

DNA聚合酶	反应条件	ΔQubit值（ng/μL）
22°S DNA聚合酶	72℃/5min	12.62

实施例6 22°S DNA聚合酶外切活性测定

采用末端错配荧光探针的方法，对22°S DNA聚合酶进行外切活性定性测试，探针序列为ATCAGCAGGCCACACGTTAACTGT-BHQ2（SEQ ID NO: 7）和FAM-5'-TGTCTTTAAC GTGTGGCCTGCTGAT（SEQ ID NO: 8），两者按照等摩尔量混合（终浓度10 μM）并进行退火处理，作为外切活性测试的荧光探针底物。外切活性测试所采用的反应体系（总体积25 μL）如下：2.5 μL 10×ThermoPol® Reaction Buffer、0.25 μL 10 μM荧光探针底物、2 μL的22°S DNA聚合酶（酶浓度为0.18 mg/mL）、20.25 μL的无核酸酶水。阳性对照组KOD DNA聚合酶。阴性对照组将其中的酶液组分用同体积的酶储存液进行替换。反应体系在冰上配置，配制完成后转移到384孔板并置于酶标仪（BioTek Synergy H1, Agilent）中进行荧光信号的检测。激发光和发射光分别设置为492 nm和518 nm，反应温度37℃，每间隔30 s收集一次荧光信号，整个反应时长为1小时。22°S DNA聚合酶外切活性测试结果如图5所示（荧光数值均已减去对应空白对照值），22°S DNA聚合酶外切活性与KOD DNA聚合酶相当。

实施例7 22°S DNA聚合酶PCR潜力评估

采用5种具有代表性的PCR反应Buffer测试22°S DNA聚合酶应用于PCR的潜力。所用5种反应Buffer（缓冲液）组分如表4所示。

表4

Buffer #	组分
Buffer 1	10 mM Tris-HCl (pH 8.4), 25 mM KCl, 1.5 mM MgCl ₂ , 40 mM TMAC, 0.1% Triton X-100
Buffer 2	10 mM Tris-HCl (pH 8.4), 75 mM KCl, 1.5 mM MgCl ₂ , 40 mM TMAC, 0.1% Triton X-100
Buffer 3	10 mM Tris-HCl (pH 8.4), 75 mM KCl, 2.5 mM MgCl ₂ , 40 mM TMAC, 0.1% Triton X-100
Buffer 4	10 mM Tris-HCl (pH 8.8), 25 mM KCl, 1.5 mM MgCl ₂ , 40 mM TMAC, 0.1% Triton X-100
Buffer 5	10 mM Tris-HCl (pH 9.2), 25 mM KCl, 1.5 mM MgCl ₂ , 40 mM TMAC, 0.1% Triton X-100

采用大肠杆菌基因组为模板进行16s基因的扩增，所用上下游引物为E16S-27F（5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'，SEQ ID NO：9）和E16S-1492R（5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'，SEQ ID NO：10），PCR反应体系如表5所示。

表5

组分	体积
10×反应 buffer	2.5
10 mM dNTPs	1.25
10 ng/μL <i>E. coli</i> gDNA（基因组 DNA）	1
10 μM E16S-27F	1
10 μM E16S-1492R	1
0.6 mg/mL 22°S DNA 聚合酶	1
无核酸酶水	17.25

PCR循环为：95℃预变性3 min；95℃ 20 s，58℃ 15 s，72℃ 1.5 min，30个循环；最后72℃延伸7 min，4℃保存。PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳，所用分子marker为天根100bp DNA ladder（货号：MD109-01），22°S DNA聚合酶PCR扩增产物琼脂糖凝胶电泳结果如图6所示。22°S DNA聚合酶在这5个Buffer条件下均能进行PCR扩增，其中在Buffer 4条件下扩增最好、产量最高。

实施例8-22°S DNA聚合酶突变体载体构建

以22°S DNA聚合酶野生型表达质粒pET-28a/22°S为模板，构建了包含6个突变位点的突变体22°S-Mut。以下表6所列3对引物对，通过三轮快速PCR扩增，在相应位点引入突变。

快速PCR反应体系为：5 μL *Pfu* DNA聚合酶 10X Buffer with MgSO₄，1 μL dNTP Mix（10 mM each），1.5 μL正向引物（10 μM），1.5 μL反向引物（10 μM），50 ng模板DNA，0.5 μL的*Pfu* DNA聚合酶（3 U/μL，Promega，货号：M7741），加入去核酸酶水至总体积50 μL。快速PCR反应程序设定为：95℃预变性2 min；95℃ 30 s，58℃ 30 s，72℃ 8 min，16个循环；最后72℃延伸5 min，4℃保存。

在PCR产物中加入1 μL DpnI（20 U/μL，NEB，货号：R0176V），37℃金属浴2 h，消化模板。之后反应产物转化到购买自天根的大肠杆菌DH5α感受态细胞（货号：CB101）中。转化步骤为：取10 μL反应产物加入100 μL DH5α感受态细胞中，轻弹混匀并于冰上放置30分钟；42℃热激1分钟后再次于冰上放置10分钟；加入400 μL无抗性LB，37℃摇床220 rpm/min震荡1小时。培养物于3000g离心3 min后，弃去部分上清，约留100 μL，重悬混匀后涂于卡那霉素抗性LB平板，37℃孵育12-16小时。

分别挑取若干个单菌落于37℃摇床过夜培养后进行质粒DNA小量提取。质粒寄送到北京六合华大基因科技有限公司进行Sanger测序以验证突变位点是否正确引入。将同时带有D147A+E149A+L424A+Y425A+P426I+A503L共6个突变位点的测序正确的质粒pET-28a/22°S-Mut转化到表达宿主大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞中,转化过程参照实施例3,获得表达突变体22°S-Mut的重组大肠杆菌菌株。

表6

引物名称	突变	引物序列 5'→3'
P147/149-F	D147A+E149A	ggttattgcggcggttgctctggcagtgatgcgaaagatc (SEQ ID NO: 11)
P147/149-R	D147A+E149A	gatctttgcatacactgccagagcaaacgccgcaataacc (SEQ ID NO: 12)
P424/425/426-F	L424A+Y425A +P426I	gctggattttgcagcgcagcaataaccattattattagc (SEQ ID NO: 13)
P424/425/426-R	L424A+Y425A +P426I	gctaataataatggttattgctgcgtgcgaaaatccagc (SEQ ID NO: 14)
P503-F	A503L	gtatgcgaaacagaaactactgaaaattgtggcgaac (SEQ ID NO: 15)
P503-R	A503L	gttcgccacaattttcagtagtttctgtttcgcatcac (SEQ ID NO: 16)

实施例9 22°S DNA聚合酶突变体蛋白表达纯化

22°S DNA聚合酶突变体22°S-Mut (D147A+E149A+L424A+Y425A+P426I+A503L)的表达纯化参照实施例3,对收集的蛋白洗脱峰样品进行SDS-PAGE电泳分析确定蛋白纯度,22°S-Mut DNA聚合酶纯化样品SDS-PAGE电泳分析结果如图7所示。22°S-Mut储存在储存液中,酶储浓度0.25 mg/mL。

实施例10 22°S DNA聚合酶突变体对修饰单碱基参入的聚合活性检测

利用带Cy5荧光染料标记和3'-O-叠氮甲基阻断基团修饰的dATP作为底物,以带Cy3荧光染料标记的DNA双链作为模板引物,模拟高通量测序过程中参入阻断修饰核苷酸。通过在酶标仪上检测底物聚合到模板链上时因Cy3与Cy5处于相互作用距离内而产生的FRET-Cy5荧光信号,进行22°S-Mut DNA聚合酶对修饰单碱基参入的聚合活性检测。

检测方法如下:10X反应Buffer为200 mM Tris-HCl、100 mM (NH₄)₂SO₄、100 mM KCl、20 mM MgSO₄、pH 8.5 @ 25°C。50 μL反应体系按如下进行配制,5 μL 10X反应Buffer、40 μM dT/G/GTP、0.1 mg/mL BSA(牛血清蛋白)、1 μM Cy3-DNA双链模板(结构如图8所示)、4 μM Cy5修饰的3'-O-AzidoMethyl-dATP(3'-O-叠氮甲基-dATP)、0.5 μg 22°S DNA聚合酶或22°S-Mut DNA聚合酶,无核酸酶水补齐反应体系至50 μL。

其中,Cy3-DNA双链模板的正义链为5'-CGTGTATGCGTAATAGGATCCCGACTCACTA TGGACG-3' (SEQ ID NO: 17);反义链为5'-CGTGTATCGTCCATAGTGAGTCGGGATC

CTATTACGC-3' (SEQ ID NO: 18), 正义链和反义链的5'端均有Cy3修饰。

反应体系在冰上配置, 配制完成后转移到384孔板并置于酶标仪 (BioTek Synergy H1, Agilent) 中进行荧光信号的检测。反应温度40℃, 每间隔30 s收集一次530/568 nm和630/676 nm (FRET Cy5) 荧光信号, 整个反应时长为2小时。阴性对照以等体积的酶储存液替换22°S-Mut DNA聚合酶。反应结束后, 导出原始数据并计算最大斜率, 即单位时间内的 Δ FRET-Cy5荧光值 (Δ RFU), 用以表征聚合酶对修饰单碱基参与的聚合活性。

实验结果如下表7所示, 22°S DNA聚合酶实验组的荧光信号曲线与阴性对照组一样, 并没有检测到FRET Cy5荧光信号的检测。22°S-Mut DNA聚合酶实验组能检测到荧光信号上升, 其聚合速率为1.4 Δ RFU/min。通过突变改造获得的22°S-Mut DNA聚合酶对修饰单碱基具有聚合活性。通过对22°S DNA聚合酶进行有效突变, 可为高通量测序提供具有很大应用潜力的突变体。

表7

ID	聚合活性
22°S DNA聚合酶	无信号
22°S-Mut DNA聚合酶	1.4 Δ RFU/min

从以上的描述中, 可以看出, 本发明上述的实施例实现了如下技术效果: 相较于现有的 B 家族 DNA 聚合酶或其他 DNA 聚合酶, 上述 DNA 聚合酶为新型 DNA 聚合酶, 且该聚合酶野生型已具备较好的热稳定性和 PCR 扩增能力, 原始酶学性能较好, 可以较好地进行 PCR 扩增; 序列新颖性好, 可为 DNA 聚合酶不同应用场景的改造需求提供全新的酶骨架, 可根据不同的应用场景进行进一步体系优化和改造, 具有较大提升空间和应用潜力。进一步地, 通过上述野生型的 DNA 聚合酶进行简单的突变改造, 能够获得对 3' -O-叠氮甲基等阻断修饰的脱氧核糖核苷酸具有聚合活性的 DNA 聚合酶突变体, 在基于 3' -O-叠氮甲基等阻断修饰的脱氧核糖核苷酸的高通量测序技术中具有应用价值。

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

权利要求书

1. 一种 DNA 聚合酶，其特征在于，包括如下任一种蛋白：
 - (a) 具有 SEQ ID NO: 1 所示的序列的蛋白；
 - (b) 在 SEQ ID NO: 1 所示的序列中，如下至少一个位点发生取代、缺失和/或添加一个或几个氨基酸的蛋白：D147、E149、L424、Y425、P426 和 A503；或
 - (c) 与 (a) 或 (b) 中的序列具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、或至少 99% 以上同源性、且具有 DNA 聚合酶活性的蛋白。
2. 根据权利要求 1 所述的 DNA 聚合酶，其特征在于，所述 DNA 聚合酶具有热稳定性；

优选地，所述 DNA 聚合酶的热稳定性优于 KOD DNA 聚合酶或 Pfu DNA 聚合酶；

优选地，所述 DNA 聚合酶具有 3'-5' 核酸外切活性。
3. 根据权利要求 1 所述的 DNA 聚合酶，其特征在于，所述 (b) 中，各位点取代的氨基酸类型包括以下至少一种：

D147A、

E149A、

L424A/G/H/I/K/L/M/N/Q/S/T/V、

Y425A/G/S/T/V、

P426I/A/D/G/L/P/S/T/V 或

A503L/C/D/H/I/M/N/P/Q/R/S/T/V/Y。
4. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的 DNA 聚合酶，其特征在于，所述 DNA 聚合酶包括：

具有 SEQ ID NO: 3 所示的序列的蛋白，或

与 SEQ ID NO: 3 所示的序列具有 70% 以上同源性、具有 DNA 聚合活性、且对修饰的脱氧核糖核苷酸具有聚合活性的蛋白；

优选地，所述修饰包括 3' -O- 阻断修饰；

优选地，所述 3' -O- 阻断修饰包括 3' -O- 叠氮甲基修饰。
5. 一种 DNA 分子，其特征在于，所述 DNA 分子包含编码权利要求 1 至 4 中任一项所述的 DNA 聚合酶的多核苷酸。
6. 根据权利要求 5 所述的 DNA 分子，其特征在于，所述 DNA 分子具有 SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 4 所示的核苷酸序列。
7. 一种重组载体，其特征在于，所述重组载体包含有权利要求 5 或 6 所述的 DNA 分子。

8. 一种宿主细胞，其特征在于，所述宿主细胞内含有权利要求 5 或 6 所述的 DNA 分子、或权利要求 7 所述的重组载体。
9. 根据权利要求 8 所述的宿主细胞，其特征在于，所述宿主细胞包括原核细胞或真核细胞；
优选地，所述原核细胞包括大肠杆菌。
10. 一种 PCR 试剂盒，其特征在于，所述 PCR 试剂盒包括权利要求 1 至 4 中任一项所述的 DNA 聚合酶。
11. 根据权利要求 10 所述的 PCR 试剂盒，其特征在于，所述 PCR 试剂盒中还包括如下任意一种或多种成分：
 - 1) 用于提供 PCR 扩增环境的缓冲液；
 - 2) PCR 引物；
 - 3) 用于提取目标 DNA 的试剂。
12. 根据权利要求 11 所述的 PCR 试剂盒，其特征在于，所述缓冲液包括 9.5~10.5 mM Tris-HCl, pH 8.2~9.4, 20~80 mM KCl, 1.0~3.0 mM MgCl₂, 35~45 mM TMAC, 0.05~0.15% Triton X-100；
优选地，所述缓冲液包括如下任意一种或多种：
9.5~10.5 mM Tris-HCl, pH 8.2~8.6, 20~30 mM KCl, 1.0~2.0 mM MgCl₂, 35~45 mM TMAC, 0.05~0.15% Triton X-100；
9.5~10.5 mM Tris-HCl, pH 8.2~8.6, 70~80 mM KCl, 1.0~2.0 mM MgCl₂, 35~45 mM TMAC, 0.05~0.15% Triton X-100；
9.5~10.5 mM Tris-HCl, pH 8.2~8.6, 70~80 mM KCl, 2.01~3.0 mM MgCl₂, 35~45 mM TMAC, 0.05~0.15% Triton X-100；
9.5~10.5 mM Tris-HCl, pH 8.61~9.0, 20~30 mM KCl, 1.0~2.0 mM MgCl₂, 35~45 mM TMAC, 0.05~0.15% Triton X-100；或
9.5~10.5 mM Tris-HCl, pH 9.01~9.4, 20~30 mM KCl, 1.0~2.0 mM MgCl₂, 35~45 mM TMAC, 0.05~0.15% Triton X-100；
更优选地，所述缓冲液包括如下任意一种或多种：
10 mM Tris-HCl, pH 8.4, 25 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 40 mM TMAC, 0.1% Triton X-100；
10 mM Tris-HCl, pH 8.4, 75 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 40 mM TMAC, 0.1% Triton X-100；

10 mM Tris-HCl, pH 8.4, 75 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 40 mM TMAC, 0.1% Triton X-100;

10mM Tris-HCl, pH 8.8, 25 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 40 mM TMAC, 0.1% Triton X-100; 或

10 mM Tris-HCl, pH 9.2, 25 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 40 mM TMAC, 0.1% Triton X-100。

13. 权利要求 1 至 4 中任一项所述的 DNA 聚合酶或权利要求 10 至 12 中任一项所述的 PCR 试剂盒在 PCR 扩增、文库构建或测序中的应用。
14. 一种 PCR 扩增方法, 其特征在于, 所述 PCR 方法包括: 利用权利要求 1 至 4 中任一项所述的 DNA 聚合酶或权利要求 10 至 12 中任一项所述的 PCR 试剂盒进行 PCR 扩增。
15. 根据权利要求 14 所述的 PCR 扩增方法, 其特征在于, 所述 PCR 扩增方法包括: 在扩增过程中利用所述 DNA 聚合酶掺入含有修饰的脱氧核糖核苷酸;

优选地, 所述修饰包括 3' -O-阻断修饰;

优选地, 所述 3' -O-阻断修饰包括 3' -O-叠氮甲基修饰。

16. 一种文库构建试剂盒, 其特征在于, 所述文库构建试剂盒中包括权利要求 1 至 4 中任一项所述的 DNA 聚合酶。
17. 根据权利要求 16 所述的文库构建试剂盒, 其特征在于, 所述文库构建试剂盒中还包括如下任意一种或多种成分:
 - 1) 用于文库构建的接头序列;
 - 2) 用于提供文库构建环境的缓冲液;
 - 3) 用于构建文库的酶, 包括 DNA 打断酶、末端修复酶或连接酶中的一种或多种;
 - 4) 含有修饰的脱氧核糖核苷酸。

18. 一种文库构建方法, 其特征在于, 所述文库构建方法包括: 利用权利要求 1 至 4 中任一项所述的 DNA 聚合酶或权利要求 16 或 17 所述的文库构建试剂盒进行文库构建。
19. 根据权利要求 18 所述的文库构建方法, 其特征在于, 所述文库构建方法包括:

利用所述 DNA 聚合酶对连接有测序接头的待测序片段进行 PCR 扩增, 获得 DNA 文库;

优选地, 所述文库构建方法还包括: 在进行 DNA 扩增过程中利用所述 DNA 聚合酶掺入含有修饰的脱氧核糖核苷酸。

20. 一种测序试剂盒,其特征在于,所述测序试剂盒包括权利要求 1 至 4 中任一项所述的 DNA 聚合酶。
21. 根据权利要求 20 所述的测序试剂盒,其特征在于,所述测序试剂盒中还包括如下任意一种或多种成分:
- 1) 用于与接头序列互补配对的引物;
 - 2) 双脱氧核苷酸;
 - 3) dNTPs;
 - 4) 核酸探针;
 - 5) 用于测序的酶,包括 DNA 连接酶和/或内切酶;
 - 6) 用于洗脱所述核酸探针和/或 dNTPs 的缓冲液;
 - 7) 含有修饰的脱氧核糖核苷酸。
22. 一种测序方法,其特征在于,所述测序方法包括:利用权利要求 1 至 4 中任一项所述的 DNA 聚合酶或权利要求 20 或 21 所述的测序试剂盒进行测序。
23. 根据权利要求 22 所述的测序方法,其特征在于,所述测序方法包括利用所述 DNA 聚合酶对待测序样本进行 PCR 扩增,获得 DNA 文库;
- 利用测序技术对所述 DNA 文库进行测序,获得测序结果;
- 优选地,所述测序方法还包括:
- 在进行 PCR 扩增过程中利用所述 DNA 聚合酶掺入含有修饰的脱氧核糖核苷酸。

图 1

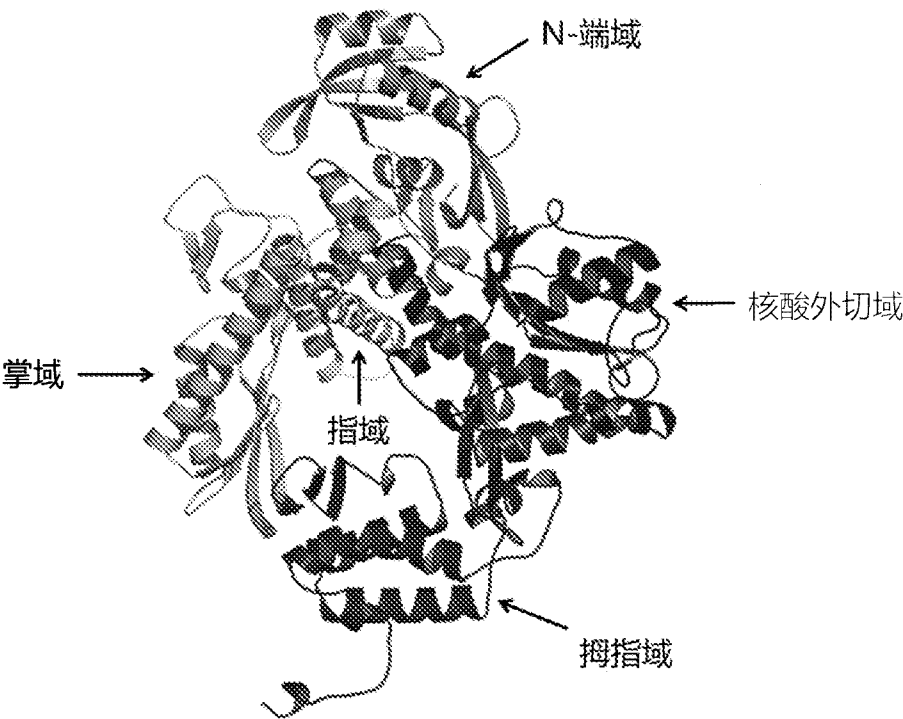


图 2

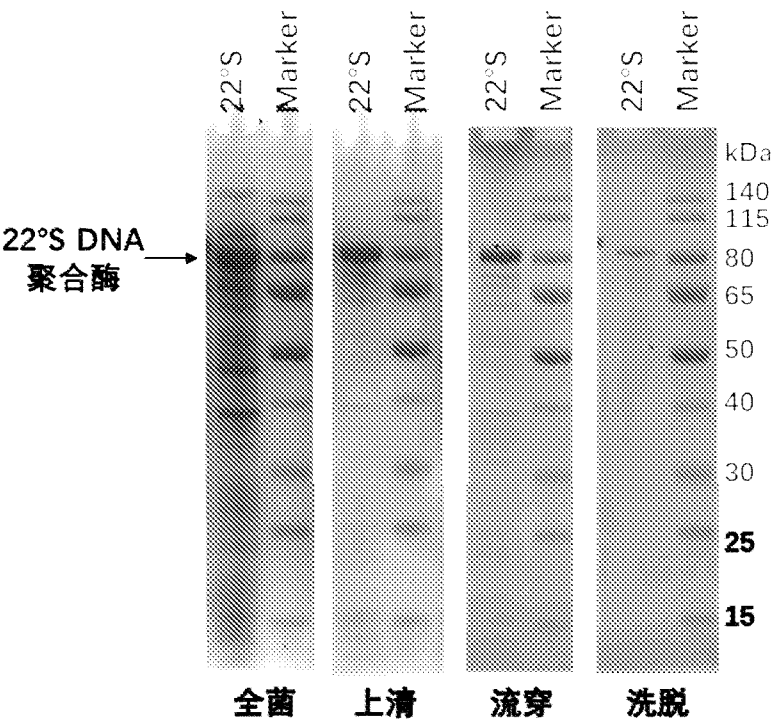


图 3

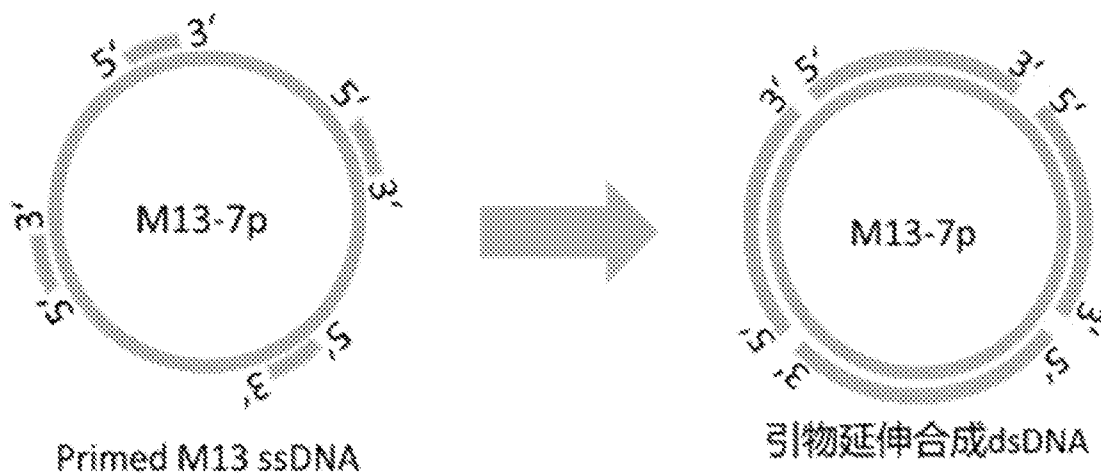


图 4

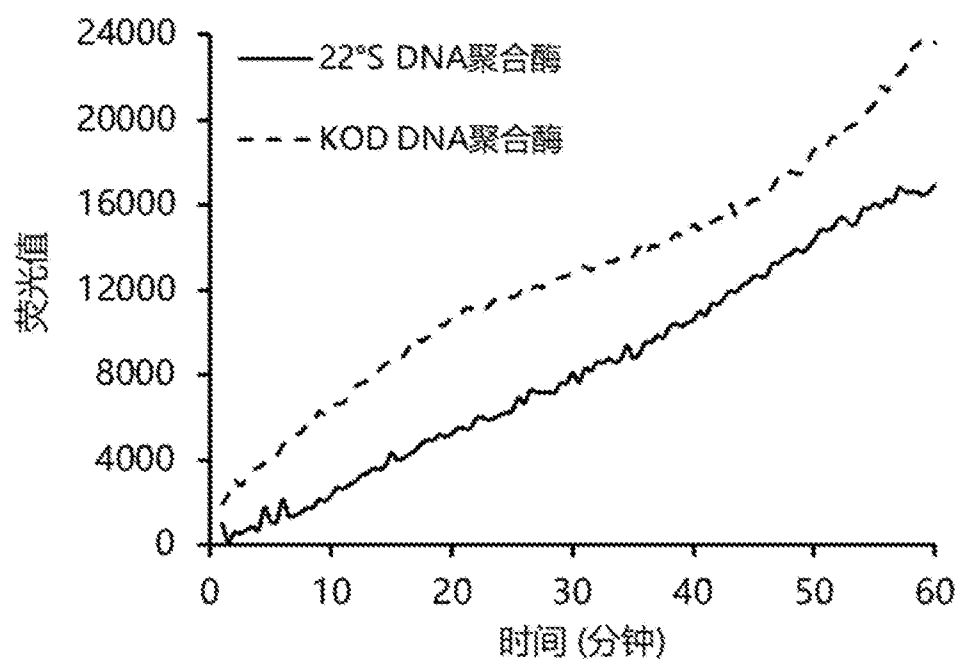


图 5

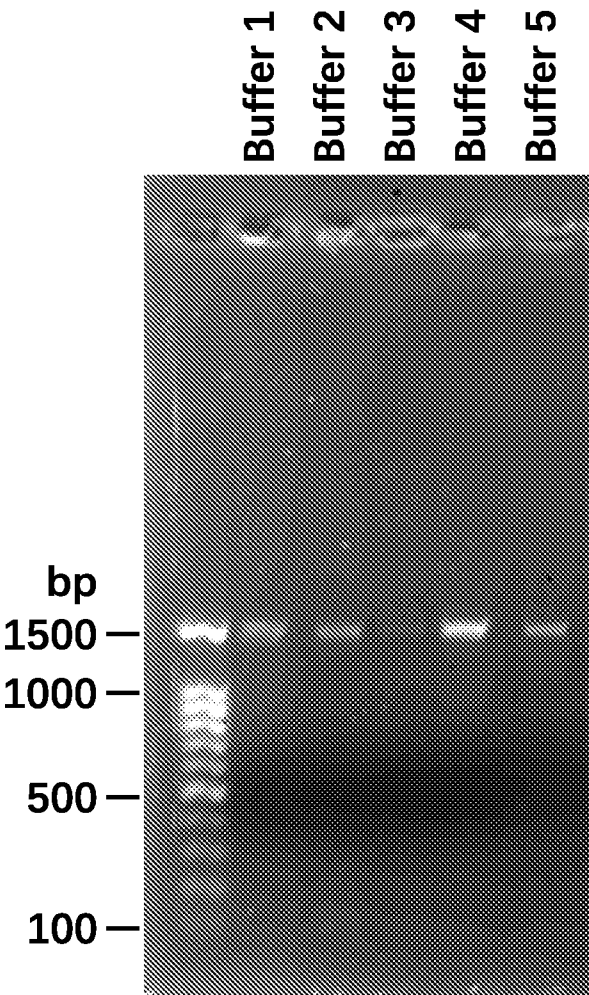


图 6

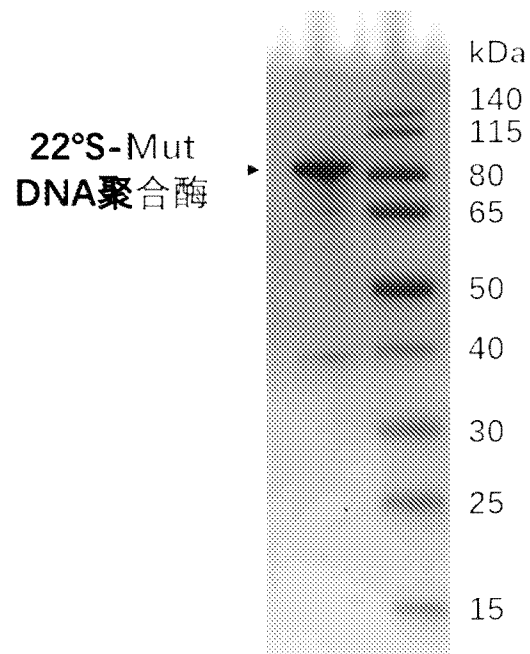


图 7

5' – Cy3 – CGTGTATGCGTAATAGGATCCCGACTCACTATGGACG – 3'
 3' – CGCATTATCCTAGGGCTGAGTGATACCTGCTATGTGC – Cy3 – 5'

图 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/141295

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N 9/12(2006.01)i; C12N 15/54(2006.01)i; C12P 19/34(2006.01)i; C12Q 1/6806(2018.01)i; C12Q 1/6844(2018.01)i; C12Q 1/6869(2018.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC: C12N, C12P, C12Q Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNTXT, DWPI, USTXT, EPTXT, WOTXT, ENTXT, CNKI, 万方数据库, WANFANG DATABASE, WEB OF SCIENCE, PUBMED: DNA聚合酶, D147, E149, L424, Y425, P426, A503; GenBank+EMBL+中国专利生物序列检索系统, China Patents Biological Sequence Search System: 对SEQ ID NO: 1和3的序列检索, sequence search for SEQ ID NOs: 1 and 3.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 104250641 A (SNOVA BIOTECHNOLOGIES CO., LTD.) 31 December 2014 (2014-12-31) see abstract	1-23
A	CN 111996179 A (CHENGDU HYRUX BIO-TECH SCIENCE CO., LTD.) 27 November 2020 (2020-11-27) see abstract	1-23
A	US 2010167292 A1 (LIFE TECHNOLOGIES CORP.) 01 July 2010 (2010-07-01) see abstract	1-23
A	王尧等 (WANG, Yao et al.). "一种嵌合式DNA聚合酶的表达及功能验证 (Expression and Functional Validation of a Chimeric DNA Polymerase)" 安阳工学院学报 (Journal of Anyang Institute of Technology), 31 July 2023 (2023-07-31), pages 120-124, see abstract	1-23
A	HIKIDA, Y. et al. "Crystal Structure of Deep Vent DNA Polymerase" Biochemical and Biophysical Research Communications, 04 January 2017 (2017-01-04), pages 52-57, see abstract	1-23
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 12 September 2024		Date of mailing of the international search report 20 September 2024
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/141295

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

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/141295

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	104250641	A	31 December 2014	WO	2014205882	A1	31 December 2014
CN	111996179	A	27 November 2020	None			
US	2010167292	A1	01 July 2010	ATE	502043	T1	15 April 2011
				JP	2001513983	A	11 September 2001
				EP	2390258	A1	30 November 2011
				EP	2390258	A8	11 January 2012
				WO	9910366	A1	04 March 1999
				WO	9910366	A9	24 June 1999
				AU	9123598	A	16 March 1999
				CA	2302393	A1	04 March 1999
				EP	1012161	A1	28 June 2000
				EP	1012161	A4	10 November 2004
				EP	1012161	B1	16 March 2011
				DE	69842183	D1	28 April 2011

A. 主题的分类

C12N 9/12(2006.01)i; C12N 15/54(2006.01)i; C12P 19/34(2006.01)i; C12Q 1/6806(2018.01)i; C12Q 1/6844(2018.01)i; C12Q 1/6869(2018.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: C12N, C12P, C12Q

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNTEXT, DWPI, USTXT, EPTXT, WOTXT, ENTXT, CNKI, 万方数据库, WEB OF SCIENCE, PUBMED; DNA 聚合酶, D147, E149, L424, Y425, P426, #A503; GenBank+EMBL+中国专利生物序列检索系统: 对SEQ ID NO:1 和3的序列检索。

C. 相关文件

类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 104250641 A (思洛生物技术股份有限公司) 2014年12月31日 (2014 - 12 - 31) 参见摘要	1-23
A	CN 111996179 A (成都汇瑞新元生物科技有限责任公司) 2020年11月27日 (2020 - 11 - 27) 参见摘要	1-23
A	US 2010167292 A1 (LIFE TECHNOLOGIES CORP) 2010年7月1日 (2010 - 07 - 01) 参见摘要	1-23
A	王尧 等. "一种嵌合式 DNA 聚合酶的表达及功能验证" 安阳工学院学报, 2023年7月31日 (2023 - 07 - 31), 第120-124页, 参见摘要	1-23
A	Yasushi Hikida 等. "Crystal structure of Deep Vent DNA polymerase" Biochemical and Biophysical Research Communications, 2017年1月4日 (2017 - 01 - 04), 第52-57页, 参见摘要	1-23

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

★ 引用文件的具体类型:

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"D" 申请人在国际申请中引证的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

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

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

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

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

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

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2024年9月12日

国际检索报告邮寄日期

2024年9月20日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

授权官员

吴汀晨

电话号码 (+86) 010-62089319

PCT/ISA/210 表(第2页) (2022年7月)

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

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

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

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

3. 补充意见:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2023/141295

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	104250641	A	2014年12月31日	WO	2014205882	A1	2014年12月31日
CN	111996179	A	2020年11月27日	无			
US	2010167292	A1	2010年7月1日	ATE	502043	T1	2011年4月15日
				JP	2001513983	A	2001年9月11日
				EP	2390258	A1	2011年11月30日
				EP	2390258	A8	2012年1月11日
				WO	9910366	A1	1999年3月4日
				WO	9910366	A9	1999年6月24日
				AU	9123598	A	1999年3月16日
				CA	2302393	A1	1999年3月4日
				EP	1012161	A1	2000年6月28日
				EP	1012161	A4	2004年11月10日
				EP	1012161	B1	2011年3月16日
				DE	69842183	D1	2011年4月28日