



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))。
- 包括说明书序列列表部分(细则5.2(a))。

## 酶活性提高的逆转录酶及其应用

### 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逆转录酶及其应用，尤其涉及一种聚合活性提高、热稳定性提高和 RNaseH 活性降低的逆转录酶。

### 10 背景技术

逆转录酶(Reverse transcriptase, RT)是一种存在于病毒中的 DNA 聚合酶，负责病毒基因组的复制，具有 RNA 和 DNA 依赖的 DNA 聚合酶活性和 RNase H 活性。利用逆转录酶将 mRNA 转化为 cDNA 是研究表达基因的重要步骤。该酶主要有三类：禽髓母细胞病毒(avian myeloblastosis virus, AMV) 来源的逆转录酶、莫洛尼小鼠白血病病毒(Moloney murine leukaemia virus, M-MLV)来源的逆转录酶，以及人体免疫缺陷病毒(Human Immunodeficiency Virus, HIV)来源的逆转录酶，其中前两种逆转录酶因具有较高的催化活性和相对高的保真度而被广泛应用于 cDNA 的合成。AMV RT 与 MMLV RT 比较，前者的反应温度较后者高 3°C -5°C，然而前者具有较强的 RNase H 活性，该活性会导致合成中的 cDNA 链 3'-OH 末端的 RNA 模板的断裂，从而影响全长 cDNA 的合成。

20 获得高质量的逆转录酶，需要进一步研究和改进。

### 发明内容

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、稳定性提高以及 RNase H 活性降低的逆转录酶，使得所提供的逆转录酶具有高聚合活性、高热稳定性及低 RNase H 活性。

在逆转录酶所参与的逆转录反应中，提高反应温度可以解开 RNA 模板的二级结构，并降低引物与模板的非特异性结合。然而逆转录酶为常温酶，高温易变性失活，因此提高逆转录酶的耐热性不仅可以有效地合成 cDNA，而且有利于酶的储存、包装和运输。同时，逆转录酶有两个活性：DNA 聚合酶活性和 RNase H 活性。RNase H 活性会缩短合成的 cDNA 长度，降低逆转录的效率，而且去除 RNase H 活性可以显著地增强逆转录活性的热稳定性。因此，通过对缺少 RNase H 活性的 M-MLV 来源的逆转录酶进行研究，获得高稳定性和高聚合活性的逆转录酶，应用于逆转录反应中，具有重要的意义。

为此，根据本发明的第一方面，本发明提供了一种逆转录酶，与 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列相比，所述逆转录酶具有下列突变中的至少一种：R450H，  
35 E286K-E302K-W313F-D524A-D583G， T306K-D583G， E562K-D583N，  
W313F-D524G-D583N， T306K-D524A， E302K-D524A， E302K-L435R-D524A，

L435G-D524A, E302K-L435R-D524A-E562Q, E302K-L435G-D524A, D524G-R450H, W313F-D524A, W313F-E562K-D583N, D583N-E562Q, E286K-E302K-W313F-T330P-D524A-D583G, D524G-D583N-R450H, E302R-W313F-L435G, W313F-L435G.

5 本发明所提供的逆转录酶相较于野生型的逆转录酶, 具有提高的聚合活性、提高的热稳定性和降低的 RNase H 活性, 可以用于低模板起始量的逆转录反应以及单细胞测序中的 cDNA 文库的构建。

在本发明的一些实施例中, 以上所述逆转录酶可以进一步附加如下技术特征:

10 在本发明的一些实施例中, 所述逆转录酶具有提高的聚合酶活性和降低的 RNaseH 活性。

在本发明的一些实施例中, 所述逆转录酶的聚合酶活性相较于未突变的 M-MLV 逆转录酶活性至少提高了 1-4 倍。

在本发明的一些实施例中, 所述突变体的 RNaseH 酶活性相较于未突变的 M-MLV 逆转录酶活性降低了 30%-80%。

15 在本发明的一些实施例中, 所述逆转录酶在加热至 50 摄氏度达 30 分钟后可保持逆转录酶活性不变。

在本发明的一些实施例中, 所述逆转录酶在加热至 42 摄氏度达 30 分钟后可保持逆转录酶活性不变。

20 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, 所述核酸分子编码本发明第一方面所述的逆转录酶。

根据本发明的第三方面, 本申请提供了一种构建体, 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。

25 在本发明的一些实施例中, 所述启动子选自下列中的一种:  $\lambda$ -PL 启动子、tac 启动子、trp 启动子、araBAD 启动子、T7 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, 所述宿主细胞包含有本发明第三方面所述的构建体。用来表达目的基因或者核酸分子的宿主细胞可以是原核细胞。在至少一些实施例中, 利用原核细胞表达本发明的逆转录酶, 例如大肠杆菌 (*Escherichia coli*)。

30 根据本发明的第五方面, 本发明提供了一种逆转录酶的生成方法, 所述逆转录酶为本发明第一方面所述的逆转录酶, 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; 对所述宿主细胞进行诱导处理, 使得所述宿主细胞表达所述逆转录酶; 分离获得所述逆转录酶。

在本发明的一些实施例中, 所述宿主细胞为大肠杆菌。

35 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逆转录酶。应用含有逆转录酶的试剂盒可以提高逆转录反应的效率。

在本发明的一些实施例中，以上所述的试剂盒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 DNA 聚合酶，一种或多种缓冲液、一种或多种引物、一种或多种终止剂。

在本发明的一些实施例中，所述终止剂为双脱氧核苷酸。

5 根据本发明的第七方面，本发明提供了一种用于逆转录核酸分子的方法，所述方法包括：将至少一种核酸模板与至少一种逆转录酶混合，得到混合物，所述逆转录酶为本发明第一方面所述的逆转录酶；将所述混合物进行逆转录反应，以便获得与所述至少一种核酸模板全部或者部分互补的第一核酸分子。

10 根据本发明的实施例，以上所述的用于逆转录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，所述第一核酸分子为 cDNA 分子。

在本发明的一些实施例中，所述核酸模板为 mRNA。

在本发明的一些实施例中，所述核酸模板的最低含量为 10pg。

15 在本发明的一些实施例中，所述方法进一步包括：将所述第一核酸分子进行 PCR 反应，以便获得与所述第一核酸分子全部或者部分互补的第二核酸分子。

20 根据本发明的第八方面，本发明提供了一种用于扩增核酸分子的方法，包括：将至少一种核酸模板与至少一种逆转录酶进行第一混合反应，获得反应产物，所述至少一种逆转录酶为本发明第一方面所述的逆转录酶；将所述反应产物与至少一种 DNA 聚合酶进行第二混合反应，以便获得与所述至少一种核酸模板全部或者部分互补的扩增后的核酸分子。“混合反应”是指将原料混合后，原料之间发生反应。

在本发明的一些实施例中，以上用于扩增核酸分子的方法进一步包括：对所述扩增后的核酸分子进行测序，确定所述扩增后的核酸分子的核苷酸序列。

25 根据本发明的第九方面，本发明提供了一种构建 cDNA 文库的方法，包括：提取待测生物样本中的 RNA，获得所述待测生物样本的 mRNA；基于所述生物样本的 mRNA，利用本发明第七方面所述方法进行处理，获得 cDNA 分子；基于所述 cDNA 分子，扩增，建库，以便获得 cDNA 文库。

在本发明的一些实施例中，以上构建 cDNA 文库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，所述待测生物样本为动物组织、植物组织或者细菌。例如，可以对这些生物样本中的多细胞或者单细胞进行处理，获得 RNA。

30 在本发明的一些实施例中，所述待测生物样本中的总 RNA 含量最低为 10pg。

在本发明的一些实施例中，所述待测生物样本选自土壤、粪便、血液、血清中的至少一种。不同生物来源的样本中含有多种抑制 MMLV RT 活性的抑制剂，如土壤和粪便中的腐植酸，血液中的血色素，血清中的各种血液抗凝剂如肝素和柠檬酸盐以及胍、硫氰酸酯、乙醇、甲酰胺、EDTA 及植物酸性多糖等。因此提高该酶的抗抑制剂能力能够更加有效地扩  
35 展其应用范围。

在本发明的一些实施例中，所获得的 cDNA 的长度至少为 2000bp。利用本发明所提供

的逆转录酶，可以用于大片段 mRNA 的逆转录反应，从而获得长片段的 cDNA。根据本发明的实施例，所获得的 cDNA 的长度可以为 500bp 以上、1000bp 以上、2000bp 以上、3000bp 以上、4000bp 以上、5000bp 以上、6000bp 以上、7000bp 以上、8000bp 以上、9000bp。

5 本申请所取得的有益效果为：本申请所提供的逆转录酶，热稳定性好、RNaseH 活性低、聚合活性高，应用于逆转录反应过程中，可以实现复杂模板的扩增，以及全长 cDNA 的扩增，并且反应耐受温度提高，提高了扩增效率。

## 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 M-MLV RT 表达载体示意图。

图 2 是根据本发明的一个实施例提供的野生型 M-MLV RT 及突变体粗酶液的热稳定性筛选结果图。

15 图 3 是根据本发明的一个实施例提供的野生型 M-MLV RT 及突变体纯酶液的热稳定性筛选结果图。

图 4 是根据本发明的一个实施例提供的野生型 M-MLV RT 及突变体粗酶液的聚合酶活性测定结果图。

图 5 是根据本发明的一个实施例提供的野生型 M-MLV RT 及突变体纯酶液的聚合酶活性测定结果图。

20 图 6 是根据本发明的一个实施例提供的野生型 M-MLV RT 及突变体实时荧光曲线图。

图 7 是根据本发明的一个实施例提供的野生型 M-MLV RT 及突变体粗酶液的 RNase H 活性筛选测定结果图。

图 8 是根据本发明的一个实施例提供的野生型 M-MLV RT 及突变体纯酶液的 RNase H 活性筛选测定结果图。

25 图 9 是根据本发明的一个实施例提供的野生型 M-MLV RT 及突变体合成的 cDNA 的长度和产量结果图。

图 10 是根据本发明的一个实施例提供的不同逆转录酶的灵敏度结果图。

图 11 是根据本发明的一个实施例提供的 M-MLV RT 突变体在常规 RNA-seq 中 cDNA 产量和片段分布图。

30 图 12 是根据本发明的一个实施例提供的 M-MLV RT 单细胞加 C 尾功能结果图。

图 13 是根据本发明的一个实施例提供的 M-MLV RT 突变体 cDNA 产量和片段分布图。

## 具体实施方式

35 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。

为了方便理解,下面对本文中的术语进行解释和说明,本领域技术人员应该理解的是,这些解释和说明并不应该理解为对本发明保护范围的限制。

在本文中,术语“逆转录酶”是指表现出逆转录酶活性的蛋白质、多肽或者多肽片段。

术语“逆转录酶活性”、“逆转录活性”或者“逆转录”,指 RNA 为模板,借助于酶合成 DNA 链的能力。

术语“突变”或者“突变体”、“突变型”等,指相较于野生型 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在氨基酸水平上。

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“R450H”,其中“R”代表突变前的氨基酸,“450”为相应的突变位点,“H”代表突变后的氨基酸。其中“R”和“H”均是采用本领域通用的单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“T306K-D583G”代表相较于野生型,在第 306 个氨基酸和第 583 个氨基酸同时发生了突变。

本发明提供了逆转录酶、包含这些逆转录酶的组合物。本发明提供了包含一种或多种(例如两种、三种、四种、八种、十种、十五种等)具有本发明逆转录酶活性的多肽、用于逆转录核酸分子的组合物。这些组合物除了包含这些逆转录酶之外,还可以包含一种多种核苷酸、一种或多种缓冲液、一种或多种 DNA 聚合酶。本发明的组合物还可以包含一种或多种寡核核酸引物。

本发明所提供的逆转录酶与 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列相比,具有下列突变中的至少一种: R450H, E286K-E302K-W313F-D524A-D583G, T306K-D583G, E562K-D583N, W313F-D524G-D583N, T306K-D524A, E302K-D524A, E302K-L435R-D524A, L435G-D524A, E302K-L435R-D524A-E562Q, E302K-L435G-D524A, D524G-R450H, W313F-D524A, W313F-E562K-D583N, D583N-E562Q, E286K-E302K-W313F-T330P-D524A-D583G, D524G-D583N-R450H, E302R-W313F-L435G, W313F-L435G。

在本发明的一些实施方式中,与 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列相比,所述逆转录酶具有 R450H 突变。

在本发明的一些实施方式中,与 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列相比,所述逆转录酶具有 E286K-E302K-W313F-D524A-D583G 突变。

在本发明的一些实施方式中,与 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列相比,所述逆转录酶具有 T306K-D583G 突变。

在本发明的一些实施方式中,与 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列相比,所述逆转录酶具有 E562K-D583N 突变。

在本发明的一些实施方式中,与 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列相比,所述逆转录酶具

有 W313F-D524G-D583N 突变。

在本发明的一些实施方式中，与 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列相比，所述逆转录酶具有 T306K-D524A 突变。

5 在本申请的一些实施方式中，与 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列相比，所述逆转录酶具有 E302K-D524A 突变。

在本申请的一些实施方式中，与 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列，所述逆转录酶具有 E302K-L435R-D524A 突变。

在本申请的一些实施方式中，与 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列，所述逆转录酶具有 L435G-D524A 突变。

10 在本申请的一些实施方式中，与 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列，所述逆转录酶具有 E302K-L435R-D524A-E562Q 突变。

在本申请的一些实施方式中，与 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列，所述逆转录酶具有 E302K-L435G-D524A 突变。

15 在本申请的一些实施方式中，与 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列，所述逆转录酶具有 D524G-R450H 突变。

在本申请的一些实施方式中，与 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列，所述逆转录酶具有 W313F-D524A 突变。

在本发明的一些实施方式中，与 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列，所述逆转录酶具有 W313F-E562K-D583N 突变。

20 在本发明的一些实施方式中，与 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列，所述逆转录酶具有 D583N-E562Q 突变。

在本发明的一些实施方式中，与 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列相比，所述逆转录酶具有 E286K-E302K-W313F-T330P-D524A-D583G 突变。

25 在本发明的一些实施方式中，与 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列相比，所述逆转录酶具有 D524G-D583N-R450H 突变。

在本发明的一些实施方式中，与 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列相比，所述逆转录酶具有 E302R-W313F-L435G 突变。

在本发明的一些实施方式中，与 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列相比，所述逆转录酶具有 W313F-L435G 突变。

30 本发明所提供的逆转录酶对于生物样品中存在的酶抑制剂具有抗性。这些生物样品例如可以是血液、粪便、动物组织、植物组织、细菌、汗液、泪液、尘土、唾液、尿液和胆汁等。这些抑制剂可以是腐殖酸、肝素、乙醇、胆盐、富里酸、金属离子、十二烷基硫酸钠、EDTA、胍盐、甲酰胺、焦磷酸钠和亚精胺。在对这些生物样品或者含有这些抑制剂的样品进行逆转录处理时，本发明所提供的逆转录酶至少可以展现出 10% 的逆  
35 转录酶活性。更具体地说，相较于不含有抑制剂的样品，在抑制剂存在的情况下，本发明所提供的逆转录酶能够展现出 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80% 甚至

是 90%的逆转录酶活性。

本发明还提供了一种试剂盒。本发明提供的试剂盒可以用于生成、扩增核酸分子（单链或者双链）或者用于测序。本申请所提供的试剂盒包括可装载载体，例如盒子或者硬质盒等等。这些可装载载体中装有一种或多种容器，例如小瓶、管子等。在这些容器中可以装  
5 有本申请所提供的一种或多种逆转录酶。另外，除了逆转录酶之外，还可以在相同或者不同的容器中装置一种或者多种 DNA 聚合酶，一种或者多种适用于核酸合成的缓冲液、和一种或多种核苷酸。

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，  
10 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 M-MLV RT 野生型及其突变体表达载体构建

#### 1、M-MLV RT 野生型表达载体构建

根据 NCBI 数据库中获得莫洛尼小鼠白血病病毒(Moloney murine leukaemia virus,  
15 M-MLV)来源的逆转录酶的核酸序列。而由于该核酸序列中存在大肠杆菌难以识别的密码子，所以该核酸序列中大肠杆菌难以识别的密码子改为大肠杆菌中常用的密码子，使得基因更利于在大肠杆菌中表达，获得优化处理后的序列。然后将优化处理后的核酸序列导入到表达质粒中，获得表达载体。

其中，野生型 M-MLV RT 的核酸序列(经过优化处理后的) (SEQ ID NO:1) 如下：

20 ATGCTGAACATCGAGGACGAACACCGTCTGCACGAGACCAGCAAGGAACCGGAC  
GTGAGCCTGGGTAGCACCTGGCTGAGCGATTTCCCGCAGGCGTGGGCGGAGACCGGT  
GGCATGGGTCTGGCGGTGCGTCAAGCGCCGCTGATCATTCCGCTGAAGGCGACCAGC  
ACCCCGTTAGCATCAAACAGTACCCGATGAGCCAAGAAGCGCGTCTGGGTATCAAAC  
CGCACATTCAGCGTCTGCTGGACCAAGGCATTCTGGTTCCGTGCCAAAGCCCGTGGAA  
25 CACCCCGCTGCTGCCGGTGAAGAAACCGGGCACCAACGACTATCGTCCGGTTCAGGA  
TCTGCGTGAGGTGAACAAGCGTGTTGAAGATATCCACCCGACCGTGCCGAACCCGTAC  
AACCTGCTGAGCGGTCTGCCGCCGAGCCATCAGTGGTATACCGTTCTGGACCTGAAAG  
ATGCGTTCTTTTGCCTGCGTCTGCATCCGACCAGCCAGCCGCTGTTTGCCTTTGAGTGG  
CGTGACCCGAAATGGGTATTAGCGGTCAGCTGACCTGGACCCGTCTGCCGCAAGGCT  
30 TCAAGAACAGCCCGACCCTGTTTGACGAGGCGCTGCACCGTGACCTGGCGGATTTTCG  
TATCCAGCACCCGGATCTGATTCTGCTGCAATACGTGGACGATCTGCTGCTGGCGGCGA  
CCAGCGAACTGGATTGCCAGCAAGGTACCCGTGCGCTGCTGCAGACCCTGGGTAACC  
TGGGCTATCGTGCGAGCGCGAAGAAAGCGCAAATCTGCCAGAAGCAAGTGAAATACC  
TGGGTTATCTGCTGAAAGAGGGTCAGCGTTGGCTGACCGAGGCGCGTAAGGAAACCG  
35 TTATGGGTCAGCCGACCCCGAAAACCCCGCGTCAACTGCGTGAGTTCCTGGGTACCGC  
GGGCTTTTGCCTGCTGTGGATTCCGGGTTTTGCGGAAATGGCGGCGCCGCTGTACCCG

CTGACCAAAACCGGTACCCTGTTTAACTGGGGCCCGGACCAGCAAAAGGCGTATCAG  
 GAAATTAACAAGCGCTGCTGACCGCGCCGGCGCTGGGTCTGCCGGACCTGACCAAG  
 CCGTTCGAGCTGTTTGTGGATGAAAAGCAGGGTTACGCGAAAGGCGTTCTGACCCAA  
 AACTGGGTCCGTGGCGTCGTCCGGTGGCGTATCTGAGCAAGAACTGGACCCGGTT  
 5 GCGGCGGGTTGGCCGCCATGCCTGCGTATGGTGGCGGCGATCGCGGTTCTGACCAAGG  
 ATGCGGGTAAACTGACCATGGGTCAGCCGCTGGTGATTCTGGCGCCGCACGCGGTGGA  
 GGCGCTGGTTAAACAACCGCCGGATCGTTGGCTGAGCAACGCGCGTATGACCCACTAC  
 CAGGCGCTGCTGCTGGACACCGATCGTGTTCATTTGGTCCGGTGGTTGCGCTGAACC  
 CGGCGACCCTGCTGCCGCTGCCGGAGGAAGGTCTGCAGCACAACCTGCCTGGACATTC  
 10 TGGCGGAGGCGCATGGTACCCGTCCGGACCTGACCGATCAACCGCTGCCGGACGCGG  
 ATCACACCTGGTATACCGATGGTAGCAGCCTGCTGCAGGAAGGTCAGCGTAAAGCGGG  
 TGCGGCGGTGACCACCGAGACCGAAGTTATCTGGGCGAAGGCGCTGCCGGCGGGTAC  
 CAGCGCGCAGCGTGCGGAGCTGATTGCGCTGACCCAAGCGCTGAAGATGGCGGAAGG  
 CAAGAACTGAACGTTTACACCGACAGCCGTTATGCGTTCGCGACCGCGCACATCCAC  
 15 GGCGAGATTTACCGTCGTCTGGTCTGCTGACCAGCGAGGGCAAGGAAATCAAGAAC  
 AAGGATGAAATCCTGGCGCTGCTGAAGGCGCTGTTTCTGCCGAAACGTCTGAGCATCA  
 TTCACTGCCCCGGGTCACCAGAAAGGTCACAGCGCGGAGGCGCGTGGTAACCGTATGG  
 CGGACCAAGCGGCGCGTAAAGCGGCGATCACCGAAACCCCGGATAACCAGCACCCCTGC  
 TGATT

20 野生型 M-MLV RT 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2) 如下所示:

MLNIEDEHRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIPLKATSTP  
 VSIKQYPMSQEARLGKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLL PVKKPGTNDYRPVQDLREV  
 NKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKD AFFCLR LHPTSQPLFAFEWRDPEMG  
 ISGQLTWTRLPQGFKN SPTLFDEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQG  
 25 TRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLYLLKEGQRWLTEARKETVMGQPTPKTP  
 RQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKTGLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPAL  
 GLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLG PWRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIA  
 VLT KDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVV  
 ALNPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKA  
 30 GAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKNVYTDSRYAFATAHIIHGEI  
 YRRRGLLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHC PGHQKGHSAEARGNRMADQAAR  
 KAAITETPDTSTLLI

35 将野生型 *m-mlv rt* 基因序列 (SEQ ID NO:1) 插入表达质粒 pET22b(+)的 *NdeI* 和 *EcoRI*  
 酶切位点之间, 该载体在 *m-mlv rt* 序列的 C 端带有 6 个 His 以利于蛋白的纯化。将该表达  
 载体命名为 pET-MRT, 如图 1 所示。

2、M-MLV RT 突变体表达载体的构建

对可能有利于提高逆转录酶热稳定性及降低其 RNase H 活性突变位点等设计正反向突变引物对，以 pET-MRT 为模板，使用 Pfu DNA 聚合酶(EP0501, ThermoFisher)进行定点突变 PCR，分别获得相应的 M-MLV RT 突变体表达载体。其中针对不同突变位点可以设计不同的正反向引物，进行定点突变。方法如下：

(1) 按照下述反应体系和反应条件进行定点突变：

表 1 构建 M-MLV RT 突变表达载体的 PCR 反应体系

| 反应组分                               | 体积 (μl) |
|------------------------------------|---------|
| 10×Pfu 缓冲液 (含有 MgSO <sub>4</sub> ) | 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(pET-MRT)                | 1       |
| H <sub>2</sub> O                   | 17.6    |

表 2 构建 M-MLV RT 突变表达载体的 PCR 反应条件

| 反应条件        |          |
|-------------|----------|
| 95°C, 5min  |          |
| 95°C, 30s   | } 19 个循环 |
| 53°C, 30s   |          |
| 68°C, 8min  |          |
| 68°C, 10min |          |
| 4°C, ∞      |          |

(2) 反应结束后，加入 1 μl DpnI 于 37°C 消化 2h；

(3) 取 5 μl 消化后的产物进行 E.coli DH5 α 感受态细胞转化；

(4) 从平板上挑取单克隆于含有氨苄抗生素 LB 培养基中 37°C，200rpm 振荡培养。

(5) 提取质粒，测序比对分析获得正确突变的克隆。

所构建的突变体如下：

表 3 M-MLV RT 逆转录酶突变信息

| 编号   | 突变位点  | 编号    | 突变位点                                |
|------|-------|-------|-------------------------------------|
| RT-1 | E302K | RT-23 | W313F-D583N                         |
| RT-2 | L435G | RT-24 | D524G-D583N-R450H                   |
| RT-3 | D524A | RT-25 | E286K-E302K-W313F-T330P-D524A-D583G |
| RT-4 | E562Q | RT-26 | W313F-D524G                         |

10

|       |                               |       |                   |
|-------|-------------------------------|-------|-------------------|
| RT-5  | D583G                         | RT-27 | W313F-D524G-D583N |
| RT-6  | D524N                         | RT-28 | W313F-E562K-D583N |
| RT-7  | N454R                         | RT-29 | T306K-D524A       |
| RT-8  | E286K                         | RT-30 | T306K-D583G       |
| RT-9  | W313F                         | RT-31 | W313F-D524A       |
| RT-10 | D583N                         | RT-32 | D583N-D524G       |
| RT-11 | D524G                         | RT-33 | D583N-E562Q       |
| RT-12 | R450H                         | RT-34 | D524G-E562Q       |
| RT-13 | T330P                         | RT-35 | E562K-D583N       |
| RT-14 | E562K                         | RT-36 | E302R-W313F-L435G |
| RT-15 | T306K                         | RT-37 | W313F-L435G       |
| RT-16 | E302R                         | RT-38 | E302R-W313F       |
| RT-17 | E302K-L435R-D524A-E562Q       | RT-39 | D524G-R450H       |
| RT-18 | E302K-L435R-D524A-D583G       | RT-40 | L435G-D524A       |
| RT-19 | L435R-D524A-D583G             | RT-41 | E302K-L435G-D524A |
| RT-20 | D524N-D583G                   | RT-42 | E286K-E302K-D524A |
| RT-21 | D524N-N454R                   | RT-43 | E302K-D524A       |
| RT-22 | E286K-E302K-W313F-D524A-D583G | RT-44 | E302K-L435R-D524A |

## 实施例 2. M-MLV RT 逆转录酶及其突变体表达及纯化

### 1、野生型 M-MLV RT 逆转录酶及其突变体小量诱导表达及纯化获得粗酶

野生型 M-MLV RT 逆转录酶及其突变体均通过 pET22b 的启动子启动表达，并且均在 C-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，分别获得相应的粗酶液。方法如下：

(1) 野生型及突变体质粒进行 BL21 感受态细胞（购自全式金生物科技有限公司）转化；

(2) 然后挑取单菌落于 10ml 含氨苄抗性(100 $\mu$ g/ml) 的 LB 培养基中，37 $^{\circ}$ C，200rpm/min，振荡培养至 OD600 $\approx$ 0.6；

(3) 再加入诱导剂 IPTG（终浓度为 0.5mM），18 $^{\circ}$ C，200rpm/min 诱导过夜；

(4) 在 12000rpm/min 下离心 5min，收集诱导后的菌液沉淀；

(5) 使用 M-MLV RT 重悬液（含有 20 mM Tris-HCl，500 mM NaCl，20 mM Imidazole，5% Glycerol，pH 7.5，于 25 $^{\circ}$ C 孵育）重悬，并加入 1%的 10mg/ml 溶菌酶及 1%PMSF 和 0.5%

的 TritonX-100; 在冰水浴条件下进行超声破菌, 超声条件为: 变幅杆直径  $\phi 10$ , 功率 35%, 超声 2s, 间歇 3s, 超声 5min;

(6) 将破碎后的菌液在 12000rpm、4°C 下离心 10min, 收集上清;

5 将上步准备好的 MMLV RT 粗酶上清液进行 Ni 亲和纯化, 主要步骤为: 填料与粗酶液孵育结合; 重悬液清洗未结合 Ni 的杂蛋白; 利用洗脱液 (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 260 mM Imidazole, 5% Glycerol, pH 7.5) 在 25°C 下洗脱目的蛋白, 获得粗酶液。

纯化后得到的目的蛋白 A280 测定浓度, 并调整至相同浓度, 用于后续筛选实验。

## 2、野生型 M-MLV RT 逆转录酶及其突变体大量诱导表达及纯化获得纯酶

10 野生型 M-MLV RT 逆转录酶及其突变体均通过 pET22b 的启动子启动表达, 并且均在 C-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, 分别获得相应的纯酶。

(1) 野生型及突变体质粒进行 BL21 感受态细胞 (购自全式金生物科技有限公司) 转化;

15 (2) 然后挑取单菌落于 5ml 含氨苄抗性(100 $\mu$ g/ml) LB 培养基中, 37°C, 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 含氨苄抗性(100 $\mu$ g/ml) 的 LB 培养基中, 37°C, 200rpm/min, 振荡培养至 OD600 $\approx$ 0.6;

(3) 再加入诱导剂 IPTG (终浓度为 0.5mM), 18°C, 200rpm/min 诱导过夜;

(4) 8000rpm/min 离心 10min, 收集诱导后的菌液沉淀;

20 (5) 使用 M-MLV RT 重悬液 (含有 20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazole, 5% Glycerol, pH 7.5, 于 25°C 孵育) 重悬, 并加入 1% 的 10mg/ml 溶菌酶及 1% PMSF 和 0.5% 的 TritonX-100; 在冰水浴条件下进行超声破菌, 超声条件为: 变幅杆直径  $\phi 10$ , 功率 35%, 超声 2s, 间歇 3s, 超声 30min;

(6) 将破碎后的菌液 12000rpm、4°C 下离心 30min, 收集上清;

25 将上步准备好的样品利用 AKTA 蛋白纯化系统进行亲和纯化, 将经亲和纯化得到的样品用 M-MLV RT 稀释液 (20mM Tris-HCl, 5% Glycerol, pH7.5) 进行 3.33 倍稀释。然后进行阴离子交换层析, 获得纯化后的目的蛋白, 即为纯酶液。

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 野生型 M-MLV RT 逆转录酶及其突变体的热稳定性筛选及分析

30 M-MLV RT 为常温酶, 野生型 M-MLV RT 的 T50 (10 分钟活性降低为初始活性的 50% 的温度), 在底物不存在时为 44°C, 底物存在时为 47°C。本发明通过试剂盒对野生型 M-MLV RT 以及突变体进行热稳定测定。同时, 通过比较突变体酶在不同温度下聚合产物量, 对比突变体和野生型 M-MLV RT 的活性保存率, 进而筛选热稳定性较野生型稳定的突变体。

35 分别对野生型 M-MLV RT 逆转录酶及其突变体的粗酶液和纯酶液进行热稳定性测定。热稳定性测试过程中使用检测试剂盒: Protein Thermal Shift™ Dye Kit (购自 Thermal)。具体检测原理为: 随着温度上升, 蛋白质结构发生变化, 疏水结构域暴露, 与荧光染料结合

产生荧光，通过 qPCR 仪实时检测温度（Melt Curve）与荧光值之间的变体，比较野生型的 M-MLV RT 逆转录酶及其突变体的 Tm 值，从而判断其稳定性。

使用 96 孔板按照上述试剂盒操作配制反应体系，具体反应体系如下：

表 4 M-MLV RT 逆转录酶热稳定性筛选反应体系

| 反应组分                                    | 体积 (μl) |
|---|---------|
| Protein Thermal Shift™ Buffer           | 5       |
| M-MLV RT 逆转录酶酶液 (0.3mg/ml)              | 12.5    |
| Diluted Protein Thermal Shift™ Dye (8x) | 2.5     |

- 5 备注：上表中 M-MLV RT 逆转录酶酶液(0.3mg/ml)是指在实施例 2 中纯化得到的酶液进行一定倍数稀释后得到的浓度在 0.3mg/ml 的待测试酶液，Dye 是使用无菌水将试剂盒中的染料 (1000 x) 稀释到 8 x，检测使用 96 孔板。

加样完成后，置于 StepOne™ qPCR 仪中进行 Melt Curve，具体 Melt curve 反应条件完全参照试剂盒说明设置。

- 10 再使用 Protein Thermal Shift™ software v1.0 软件分析野生型 M-MLV RT 逆转录酶及突变体具体 Tm 值，其结果见表 5 以及图 2 和图 3。

表 5 野生型 M-MLV RT 逆转录酶及突变体粗酶液热稳定性筛选结果

| 编号    | Tm 值 (°C) | 编号    | Tm 值 (°C) | 编号    | Tm 值 (°C) |
|-------|-----------|-------|-----------|-------|-----------|
| RT-7  | 47.2      | RT-5  | 50.6      | RT-29 | 52.5      |
| RT-16 | 47.9      | RT-22 | 50.7      | RT-26 | 52.7      |
| RT-12 | 48.3      | RT-30 | 51.1      | RT-43 | 53.0      |
| RT-38 | 48.3      | RT-6  | 51.1      | RT-3  | 53.1      |
| RT-4  | 48.5      | RT-35 | 51.2      | RT-28 | 53.5      |
| RT-1  | 48.7      | RT-10 | 51.4      | RT-33 | 53.8      |
| RT-2  | 49.9      | RT-39 | 51.4      | RT-18 | 54.2      |
| RT-36 | 48.9      | RT-31 | 51.6      | RT-44 | 54.4      |
| RT-15 | 48.9      | RT-34 | 51.6      | RT-40 | 54.4      |
| RT-8  | 48.9      | RT-23 | 51.8      | RT-25 | 54.5      |
| RT-13 | 49.0      | RT-21 | 52.0      | RT-17 | 54.6      |
| RT-14 | 49.3      | RT-11 | 52.0      | RT-9  | 55.9      |
| RT-37 | 49.7      | RT-27 | 52.0      | RT-41 | 56.2      |
| RT-20 | 49.8      | RT-32 | 52.2      | RT-24 | 56.4      |
| WT    | 50.0      | RT-19 | 52.3      | RT-42 | 64.7      |

- 15 其中，图 2 所示为野生型 M-MLV RT 逆转录酶及突变体粗酶液的热稳定性测定结果图，图 3 所示为野生型 M-MLV RT 逆转录酶及突变体纯酶液的热稳定性测定结果图。表 5 所示出的结果对应图 2 所示结果。图 2 中黑色箭头区域代表各检测样本的热稳定性提高。综合

粗酶液和纯酶液的热稳定性测定结果，粗酶液中个别突变体的热稳定测定结果与纯酶液有出入，不受理论限制，可能是由于酶液的纯度不同所造成的差异。粗酶液由于纯度不高，其热稳定性测定结果可以帮助去掉部分效果不佳的位点。

5 **实施例 4 野生型 M-MLV RT 逆转录酶及其突变体的聚合活性测定及分析**

M-MLV RT 逆转录酶为常温酶，随着温度的升高，其聚合活性会随之降低。因此，相同反应温度下，通过对突变体与野生型 M-MLV RT 聚合产物量进行比较，可以筛选出活性较好的突变体。

10 以 poly(rA)为模板，oligo(dT)为引物，利用逆转录酶聚合生成 poly(rA):(dT)的杂合链。分别在不同的反应温度条件下进行聚合反应，通过 Qubit dsDNA HS kit (Invitrogen) 检测产物浓度。通过对比突变体和野生型 M-MLV RT 逆转录酶及其突变体，组合突变体和单点突变体产物量，筛选活性较好的突变体。

表 6 聚合反应体系

| 试剂                              | 体积/ul   |
|---------------------------------|---------|
| DEPC H <sub>2</sub> O           | —       |
| 5× RT reaction Buffer(with DTT) | 4.0     |
| 10mM dTTP                       | 1.0     |
| 10uM oligo(dT)                  | 3.0     |
| 40U/ul RI                       | 1.0     |
| Poly(rA)                        | 终 500ng |
| RT-mutants/ H <sub>2</sub> O    | 终 0.6ug |
| V <sub>total</sub>              | 20ul    |

15 分别在 37℃、42℃和 50℃反应 30 分钟；然后利用 1ul 0.5M EDTA 终止反应。获得的产物浓度如图 4 和图 5 所示，以及与 WT 活性比之如表 7。

表 7 M-MLV RT 突变体粗酶液聚合酶活性

| 编号   | 42℃ 30min | 50℃ 30min | 编号    | 42℃ 30min | 50℃ 30min |
|------|-----------|-----------|-------|-----------|-----------|
| RT-1 | 0.88      | 1.14      | RT-24 | 1.14      | 1.21      |
| RT-2 | 0.87      | 0.97      | RT-25 | 1.26      | 1.52      |
| RT-3 | 0.96      | 1.03      | RT-26 | 0.95      | 0.97      |
| RT-4 | 0.84      | 1.19      | RT-27 | 0.95      | 1.09      |
| RT-5 | 1.01      | 0.78      | RT-28 | 0.95      | 1.04      |
| RT-6 | 0.87      | 1.13      | RT-29 | 0.96      | 1.21      |
| RT-7 | 0.80      | 0.91      | RT-30 | 1.05      | 1.16      |
| RT-8 | 0.72      | 0.93      | RT-31 | 0.95      | 0.98      |
| RT-9 | 0.94      | 1.02      | RT-32 | 0.84      | 1.09      |

|       |      |      |       |      |      |
|-------|------|------|-------|------|------|
| RT-10 | 1.04 | 1.15 | RT-33 | 0.96 | 1.18 |
| RT-11 | 1.06 | 1.38 | RT-34 | 0.81 | 1.05 |
| RT-12 | 0.94 | 1.26 | RT-35 | 1.00 | 1.14 |
| RT-13 | 0.88 | 1.02 | RT-36 | 0.96 | 1.18 |
| RT-14 | 1.15 | 1.23 | RT-37 | 1.01 | 1.22 |
| RT-15 | 0.94 | 1.06 | RT-38 | 1.06 | 1.07 |
| RT-16 | 0.91 | 1.37 | RT-39 | 1.26 | 1.33 |
| RT-17 | 1.05 | 1.65 | RT-40 | 1.02 | 1.44 |
| RT-18 | 1.03 | 1.32 | RT-41 | 1.29 | 1.85 |
| RT-19 | 1.01 | 1.34 | RT-42 | 1.08 | 2.02 |
| RT-20 | 1.02 | 1.09 | RT-43 | 1.11 | 1.53 |
| RT-21 | 1.06 | 0.97 | RT-44 | 1.15 | 1.65 |
| RT-22 | 0.97 | 1.22 | WT    | 1    | 1    |
| RT-23 | 1.08 | 1.40 | SSII  | 1.16 | 1.24 |

其中图 4 为 M-MLV RT 逆转录酶及其突变体粗酶液在不同温度下的聚合酶活性，同时在表 7 中示出了 M-MLV RT 逆转录酶及其突变体粗酶液在 42℃和 50℃条件下的产物浓度。图 5 为部分 M-MLV RT 逆转录酶及其突变体纯酶液的聚合酶活性结果图，同时表 8 为部分 M-MLV RT 逆转录酶及其突变体纯酶液产物浓度。表 7 中所示出的粗酶液在不同温度下的产物浓度，可能存在一些偏差。不受理论限制，这些偏差可能是由于粗酶液纯度不高，粗酶液中杂质存在所带来的。粗酶液的结果可以作为纯酶液结果表征的重要参考。

表 8 M-MLV RT 突变体纯酶液聚合酶活性

| 编号    | $\Delta$ cDNA, ng/ul | 编号    | $\Delta$ cDNA, ng/ul |
|-------|----------------------|-------|----------------------|
| RT-1  | 12.01                | RT-33 | 29.04                |
| RT-3  | 25.74                | RT-35 | 21.24                |
| RT-5  | 23.94                | RT-40 | 20.74                |
| RT-6  | 17.34                | RT-41 | 21.14                |
| RT-17 | 18.2                 | RT-43 | 19.24                |
| RT-25 | 22.74                | SSII  | 22.54                |
| RT-28 | 17.11                | WT    | 6.19                 |

### 实施例 5 M-MLV RT 逆转录酶及其突变体的 RNase H 活性筛选及分析

10 M-MLV RT 逆转录酶具有 RNase H 活性，能够降解 DNA/RNA 杂合链中的 RNA。根据荧光能量共振转移原理，荧光-淬灭基团对在淬灭基团被转移到与荧光基团能量共振距离之外时，通常能提供较低的背景信号和灵敏的荧光强度的改变；当 M-MLV RT 逆转录酶具备

RNase H 活性时，会降解杂合链中的 RNA 链（其 3' 端存在淬灭基团 BHQ2），会引起杂合链中 DNA 单链中 5' 端荧光基团 cy3 荧光值的明显升高。因此可以筛选出荧光值低于野生型 M-MLV RT 的突变即为 RNaseH 活性降低的突变体。

5 M-MLV RT 逆转录酶及其突变体经过纯化后得到质检合格的纯酶液，进行 RNase H 活性测定。

活性测定体系中所用荧光标记底物分别为 DNA 单链：

Poly (dT) 30

5' -cy3TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT -3'，

RNA 单链：Poly (rA) 30

10 5' -AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA -3' -BHQ2，

长度为 30-mer，DNA 单链 5' 端带有 cy3 荧光基团，RNA 单链 3' 端带有 BHQ2 淬灭基团，先将 RNA 与 DNA 单链进行退火形成杂合链，经酶标仪测试，其合适的激发波长和发射波长分别确定为 540nm 和 570nm。

15 实验过程：退火合成 DNA/RNA 杂合链，底物 Poly (dT) <sub>30</sub>、Poly (rA) <sub>30</sub> 浓度分别为 10 μ M，按照 1:1 比例 80℃退火 5min 中，自然降至室温。

M-MLV RT 逆转录酶及其突变体 RNase H 活性测定的反应体系如下表 8：

表 8 M-MLV RT 逆转录酶酶液 RNase H 活性测定体系

| 反应组分                      | 体积         |
|---------------------------|------------|
| DNA/RNA 杂合链               | 3 μ l      |
| 10×RNase H 反应缓冲液          | 2.5 μ l    |
| M-MLV RT 逆转录酶酶液(0.3mg/ml) | 2 μ l      |
| 无菌水                       | 补足至 20 μ l |

20 备注：上表中 M-MLV RT 逆转录酶酶液(0.3mg/ml)是指在实施例 2 中纯化得到的酶液进行一定倍数稀释后得到的浓度在 0.3mg/ml 的待测试酶液，Dye 是使用无菌水将试剂盒中的染料(1000 x)稀释到 8 x，检测时使用的为 384 孔板(Corning black ,clear bottom 384 plates)，加样操作必须保证在冰上快速进行。

25 加样完成后，置于 BioTek 酶标仪上进行检测，检测在 37℃进行。检测程序应保证在加样操作进行前便设置完成(包括需要选好 384 孔板中的对应加样孔位)，程序具体设置为：开始动力学(检测前振板 30 秒；每 min 记录一次数据)，检测总时间 30 min，激发波长 540nm，发射波长 570nm。

检测结束后，进行 M-MLV RT 及其突变体 RNase H 活性的分析比较及筛选。在检测完成时，将会导出横坐标为时间轴、纵坐标为荧光值的信号变化曲线趋势图和相应的具体数据表格（见附图 6、图 7 和图 8）。

30 其中图 6 显示的是实时荧光曲线图。中间曲线代表的是野生型逆转录酶，位于中间曲线下方的突变体的 RNase H 活性低于野生型。图 7 是粗酶液 RNase H 活性筛选结果图。其中

黑色箭头区域代表相较于野生型逆转录酶, 突变体的RNase H活性降低。图8是纯酶液RNase H活性验证结果图。

从实施例3~实施例5, 通过不同的实验对突变体的酶活性进行了验证, 综合不同实验验证的结果, 在针对单点突变所形成的突变体, 仅保留了R450H突变体; 在多点突变所形成的突变体中, 保留了酶活性效果明显高于野生型M-MLV逆转录酶的突变体。综合起来, 最终选择了R450H, E286K-E302K-W313F-D524A-D583G, T306K-D583G, E562K-D583N, W313F-D524G-D583N, T306K-D524A, E302K-D524A, E302K-L435R-D524A, L435G-D524A, E302K-L435R-D524A-E562Q, E302K-L435G-D524A, D524G-R450H, W313F-D524A, W313F-E562K-D583N, D583N-E562Q, E286K-E302K-W313F-T330P-D524A-D583G, D524G-D583N-R450H, E302R-W313F-L435G, W313F-L435G。

#### 实施例6 M-MLV RT 逆转录酶及其突变体的cDNA长度检测及分析

将通过活性、RNase H活性、热稳定性筛选的M-MLV RT逆转录酶突变体(RT3、RT5、RT6、RT33、RT40、RT41、RT43, 其中RT3、RT5和RT6作为已有位点报道的效果较佳位点, 可作为对照)与商品ssII同时转录1 $\mu$ g RNA Marker(0.5k-9k), 转录体系和反应条件如下表9, 将cDNA产物进行1%碱性琼脂糖凝胶电泳检测(见附图9)。

表9 逆转录酶转录反应体系及条件

| 组分   | 体积(ul)     |
|--|------------|
| 1 $\mu$ g RNA Marker                           | 1          |
| 50 $\mu$ M Oligo dT23VN                        | 1          |
| RNase Free H <sub>2</sub> O                    | Up to 11ul |
| 65 $^{\circ}$ C, 5min                          |            |
| 25mM dNTP                                      | 1          |
| 5X RT buffer                                   | 4          |
| RNase inhibitor                                | 1          |
| 0.1M DTT                                       | 2          |
| 逆转录酶   | 1          |
| 42 $^{\circ}$ C, 50min, 70 $^{\circ}$ C, 10min |            |

图9显示的是利用不同的逆转录酶所获得的cDNA产物的凝胶电泳图, 从图9可以看出, 所获得的cDNA的长度在0.5~9kbp之间。结果显示RT33、RT40、RT41、RT43均能够合成9k的片段。

#### 实施例7 M-MLV RT 逆转录酶及其突变体的灵敏度检测及分析

将通过活性、RNase H 活性、热稳定性筛选的 M-MLV RT 逆转录酶突变体(RT3、RT6、RT33、RT40、RT41、RT43)与商品 ssII 同时分别转录 10pg、100pg、1ng、10ng Hela total RNA, 反应体系和条件参照表 9, 将反应产物 cDNA 使用 SYBR Green Ex Taq premix qPCR B2M 基因, 以 RNA 投入量的对数为横坐标, Ct 值为纵坐标绘制曲线, 计算各逆转录酶的效率, 比较逆转录酶的灵敏度(见附图 10)。

图 10 中每张曲线图中的曲线对应总 RNA 的浓度从左到右分别为 10ng、1ng、100pg、10pg, 每个总 RNA 测定两次平行实验(以 RT3 为例, 在附图上已经标出)。从图 10 可以看出, RT33、RT43、RT3 以及商品 ssII 的灵敏度为 10pg total RNA。

#### 10 实施例 8 M-MLV RT 逆转录酶及其突变体在常规 RNA-seq 中的应用测试及分析

将通过活性、RNase H 活性、热稳定性筛选的 M-MLV RT 逆转录酶突变体(RT3、RT5、RT6、RT33、RT40、RT41、RT43)与商品 ssII 同时进行 RNA-seq 建库测试, 其中逆转录酶用于 RNA 的反转录过程, 将合成的 cDNA 按照 MGI Easy mRNA 文库制备试剂盒 V2.0 使用说明书的记载, 经过末端修复加接头、PCR 富集、环化等过程构建文库, 上机测序。通过 Aglient 2100 仪器检测并比较 cDNA PCR 产物的产量和片段分布来分析逆转录酶合成 cDNA 的产量和片段分布(见附图 11 和表 10), 并通过文库的上机测序结果进行逆转录酶突变体的转录性能(见附图 9)。

表 10 M-MLV RT 突变体上机测序结果

| RNA-seq | 过滤比例                      | 基因组比对情况             | 基因集比对情况             | 基因或者 transcript 检出数 | qPCR 相关性 |         |
|---------|---------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------|---------|
| RNA-seq | Project Clean Reads Ratio | Total Mapping Ratio | Total Mapping Ratio | Total GeneNumber    | Spearman | Pearson |
| RT6     | 92.99%                    | 93.19%              | 67.45%              | 19635               | 0.862    | 0.851   |
| RT5     | 93.24%                    | 93.19%              | 67.45%              | 19635               | 0.862    | 0.851   |
| RT41    | 93.91%                    | 94.43%              | 70.02%              | 19694               | 0.868    | 0.859   |
| RT3     | 94.69%                    | 95.02%              | 69.46%              | 19674               | 0.863    | 0.853   |
| RT40    | 94.80%                    | 94.66%              | 68.63%              | 19685               | 0.861    | 0.855   |
| RT33    | 94.45%                    | 94.82%              | 68.65%              | 19666               | 0.862    | 0.855   |
| RT43    | 94.59%                    | 93.78%              | 68.82%              | 19696               | 0.866    | 0.857   |
| ssII    | 94.25%                    | 94.34%              | 68.50%              | 19650               | 0.865    | 0.86    |

20 表 10 中, Project clean reads ratio 代表: 过滤掉含 adapter 的 reads、低质量的 reads、N 含量太高的 reads 后的可用 reads。第一个 Total Mapping ratio 代表: 基因组比对情况。第二个 Total Mapping Ratio 代表: 基因集比对情况。Total Gene number 代表: 基因或者 transcript 检出数。Superman 和 Pearson 代表: qPCR 相关性。

其中图 11 显示了不同突变体在常规 RNA-seq 中 cDNA 产量和片段分布图。结果显示,

RT3、RT5、RT6、RT33、RT40、R43 与商品酶在常规 RNA-seq 中 cDNA 的产量相当，片段分布在 240bp 左右。

结果显示 RT40、RT43 突变体文库上机效果略好于商品酶 ssII，RT33 突变体文库的上机效果与商品酶 ssII 相当。

5

### 实施例 9 M-MLV RT 逆转录酶及其突变体在单细胞 RNA-seq 中的应用测试及分析

MMLV RT 已广泛用于单细胞测序的 cDNA 建库。该过程利用此酶的末端转移(TdT)活性，即在新生成的 cDNA 互补链平端的 3'端额外加上几个碱基，以便与加入的模板转换寡核苷酸 (template-switching oligonucleotide, TSO) 的 3'端互补。然而，该特性与保真性为负相关，如何协调两者关系达到最佳需进一步研究。

10

#### 1、单细胞 RNA-seq 应用中测试逆转录酶加 C 尾功能

参照文献 Full-length RNA-seq from single cells using Smart-seq2, Simone Picelli et al., Nature Protocols 9, 171-181(2014)中所记载的方法进行单细胞 RNA 测序，采用如下表 11 的体系和反应条件，检测逆转录酶单细胞中加 C 尾功能

15

表11 加C尾反应体系和反应条件

| 组分                       | 体积     |
|--------------------------|--------|
| RNA                      | 1ul    |
| OligodT30VN(100uM)       | 1ul    |
| 10mM dNTP mix            | 1ul    |
| 72℃ 反应 3min              |        |
| Reverse transcriptase    | 0.5ul  |
| RNase inhibitor (40U/μl) | 1ul    |
| first-strand buffer (5×) | 2ul    |
| DTT(100mM)               | 1ul    |
| Betaine (5 M)            | 2ul    |
| MgCl <sub>2</sub> (50mM) | 1.2ul  |
| TSO(100uM)               | 0.1    |
| 42℃, 90min;              |        |
| KAPA HiFi HotStart       | 12.5ul |
| IS primer                | 0.25   |

|   |
|---|
| 98°C, 3 min; 98°C, 20s, 67° C, 15s, 72°<br>C,6min(18cycle);72° C,5min |
|---|

## 2、单细胞 RNA-seq 建库测试

采用上述体系和原理进行 RNA 文库的构建，其中突变体 cDNA 产量和片段分布结果见图 12。

结果显示，RT43、RT41、RT3、RT5、RT6、RT33 均具有加 C 尾的功能，其中 RT6 加 C 尾的功能弱于商品酶 ssII，其他突变体加 C 尾功能与 ssII 相当。图 13 的结果显示在单细胞 RNA-seq 中，逆转录酶 RT33、RT5、RT43 转录的 cDNA 长度普遍在 2k，且产量比商品酶 ssII 略高。

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、一种逆转录酶，其特征在于，与 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列相比，所述逆转录酶具有下列突变中的至少一种：

5 R450H， E286K-E302K-W313F-D524A-D583G， T306K-D583G， E562K-D583N，  
W313F-D524G-D583N， T306K-D524A， E302K-D524A， E302K-L435R-D524A，  
L435G-D524A， E302K-L435R-D524A-E562Q， E302K-L435G-D524A， D524G-R450H，  
W313F-D524A， W313F-E562K-D583N， D583N-E562Q，  
E286K-E302K-W313F-T330P-D524A-D583G， D524G-D583N-R450H， E302R-W313F-L435G，  
10 W313F-L435G。

2、根据权利要求 1 所述的逆转录酶，其特征在于，所述逆转录酶具有提高的聚合酶活性、提高的热稳定性和降低的 RNase H 活性。

3、根据权利要求 1 所述的逆转录酶，其特征在于，所述逆转录酶为 M-MLV 逆转录酶的突变体。

15 4、根据权利要求 1 所述的逆转录酶，其特征在于，所述逆转录酶的聚合酶活性相较于未突变的 M-MLV 逆转录酶活性至少提高了 1~4 倍。

5、根据权利要求 1 所述的逆转录酶，其特征在于，所述突变体的 RNaseH 酶活性相较于未突变的 M-MLV 逆转录酶活性降低了 30%—80%。

20 6、根据权利要求 1 所述的逆转录酶，其特征在于，所述逆转录酶在加热至 50 摄氏度达 30 分钟后可保持逆转录酶活性不变。

7、根据权利要求 1 所述的逆转录酶，其特征在于，所述逆转录酶在加热至 42 摄氏度达 30 分钟后可保持逆转录酶活性不变。

8、一种分离的核酸分子，所述核酸分子编码权利要求 1~7 中任一项所述的逆转录酶。

9、一种构建体，其特征在于，包含权利要求 8 所述的分离的核酸分子。

25 10、根据权利要求 9 所述的构建体，其特征在于，所述构建体为质粒。

11、根据权利要求 9 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。

12、根据权利要求 11 所述的构建体，其特征在于，所述启动子选自下列中的一种： $\lambda$ -PL 启动子、tac 启动子、trp 启动子、araBAD 启动子、T7 启动子和 trc 启动子。

30 13、一种宿主细胞，其特征在于，所述宿主细胞包含有权利要求 9~12 中任一项所述的构建体。

14、权利要求 1~7 中任一项所述逆转录酶的生产方法，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；

对所述宿主细胞进行诱导处理，使得所述宿主细胞表达所述逆转录酶；

35 分离获得所述逆转录酶。

15、根据权利要求 14 所述的生产方法，其特征在于，所述宿主细胞为大肠杆菌。

16、一种试剂盒，其特征在于，包括权利要求 1~7 中任一项所述的逆转录酶。

17、根据权利要求 16 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 DNA 聚合酶，一种或多种缓冲液、一种或多种引物、一种或多种终止剂。

5 18、根据权利要求 17 所述的试剂盒，其特征在于，所述终止剂为双脱氧核苷酸。

19、一种用于逆转录核酸分子的方法，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逆转录酶混合，得到混合物，所述逆转录酶为权利要求 1 所述的逆转录酶；

10 将所述混合物进行逆转录反应，以便获得与所述至少一种核酸模板全部或者部分互补的第一核酸分子。

20、根据权利要求 19 所述的方法，其特征在于，所述第一核酸分子为 cDNA 分子。

21、根据权利要求 19 所述的方法，其特征在于，所述核酸模板为 mRNA。

22、根据权利要求 19 所述的方法，其特征在于，所述核酸模板的最低含量为 10pg。

23、根据权利要求 19 所述的方法，其特征在于，所述方法进一步包括：

15 将所述第一核酸分子进行 PCR 反应，以便获得与所述第一核酸分子全部或者部分互补的第二核酸分子。

24、一种用于扩增核酸分子的方法，其特征在于，包括：

将至少一种核酸模板与至少一种逆转录酶进行第一混合反应，获得反应产物，所述至少一种逆转录酶为权利要求 1 所述的逆转录酶；

20 将所述反应产物与至少一种 DNA 聚合酶进行第二混合反应，以便获得与所述至少一种核酸模板全部或者部分互补的扩增后的核酸分子。

25、根据权利要求 24 所述的方法，其特征在于，进一步包括：对所述扩增后的核酸分子进行测序，确定所述扩增后的核酸分子的核苷酸序列。

26、一种构建 cDNA 文库的方法，其特征在于，包括：

25 提取待测生物样本中的 RNA，获得所述待测生物样本的 mRNA；

基于所述待测生物样本的 mRNA，利用权利要求 19 所述的方法进行处理，获得 cDNA 分子；

基于所述 cDNA 分子，扩增，建库，以便获得 cDNA 文库。

30 27、根据权利要求 26 所述的方法，其特征在于，所述待测生物样本为动物组织、植物组织或者细菌。

28、根据权利要求 26 所述的方法，其特征在于，所述待测生物样中的总 RNA 含量最低为 10pg。

29、根据权利要求 26 所述的方法，其特征在于，所述待测生物样本选自土壤、粪便、血液、血清中的至少一种。

35 30、根据权利要求 26 所述的方法，其特征在于，所获得的 cDNA 的长度至少为 2000bp。

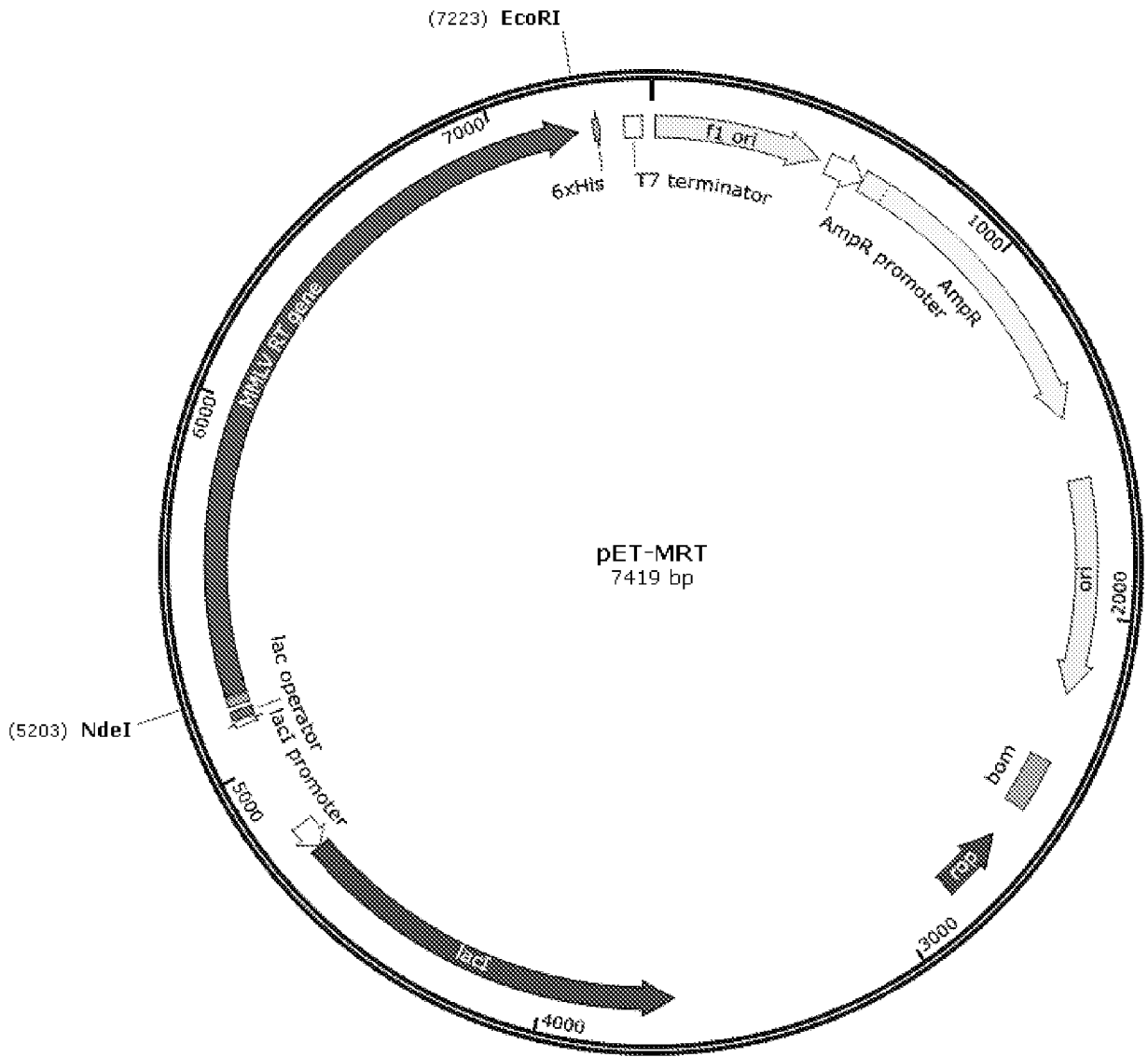


图 1

热稳定性筛选结果

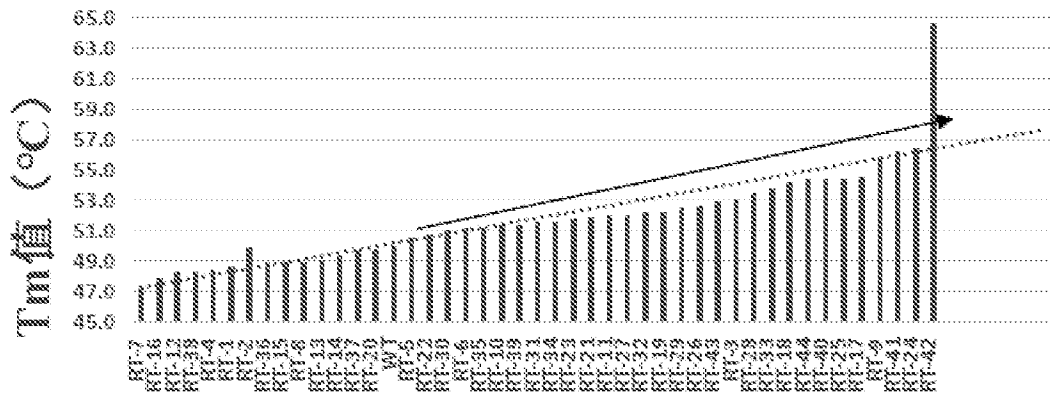


图 2

热稳定性测定

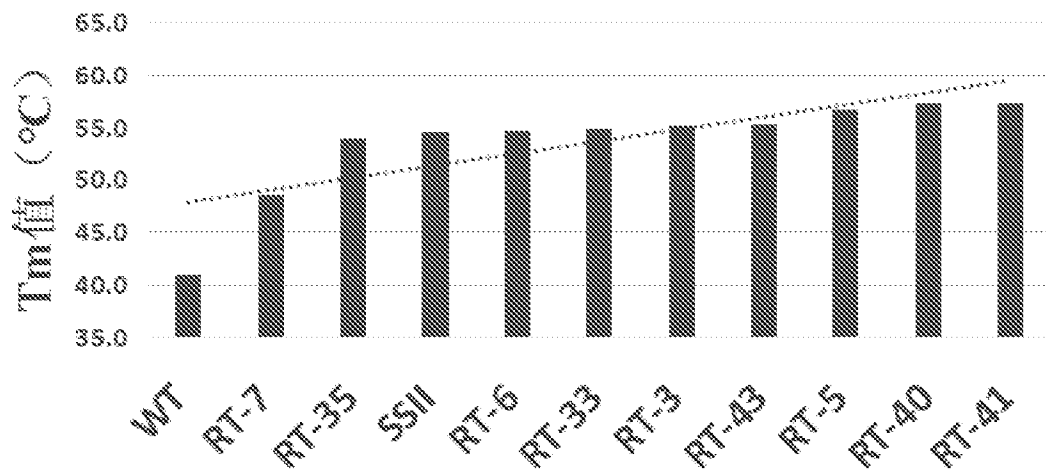


图 3

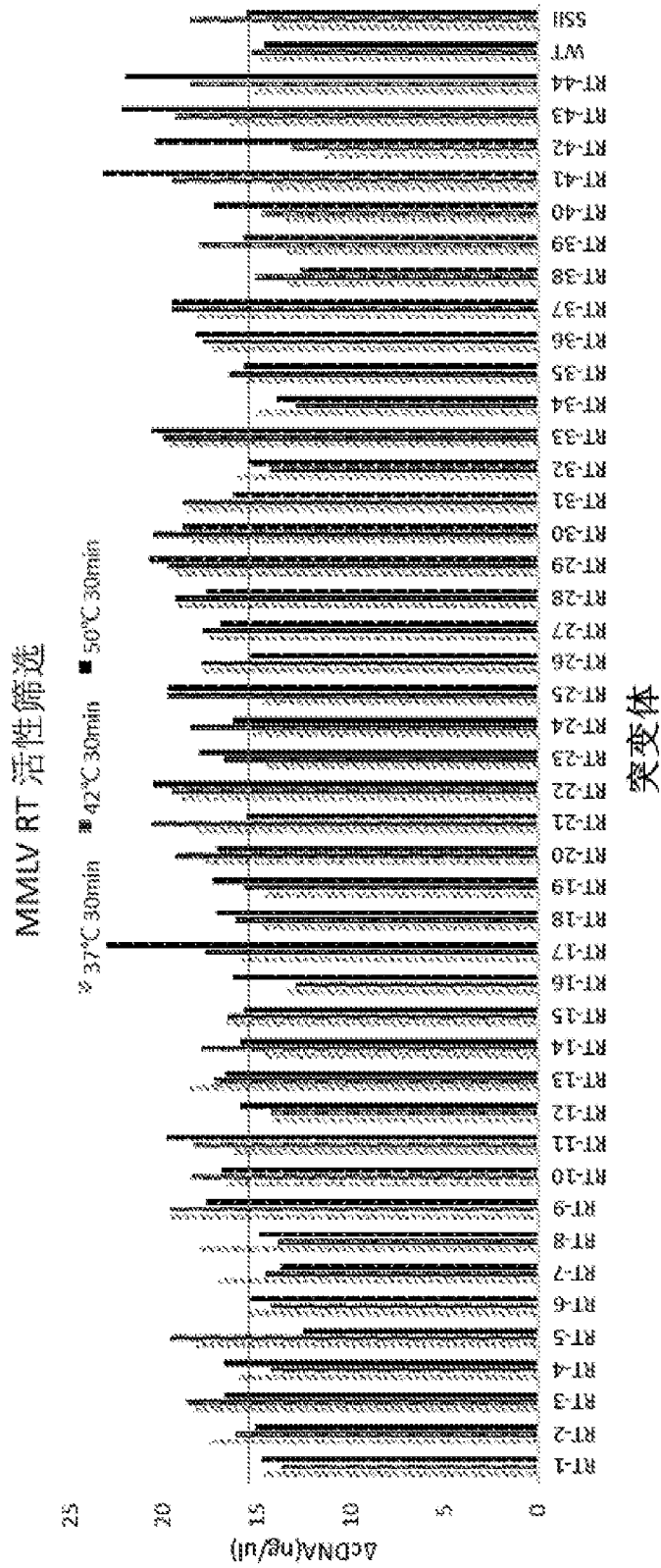


图 4

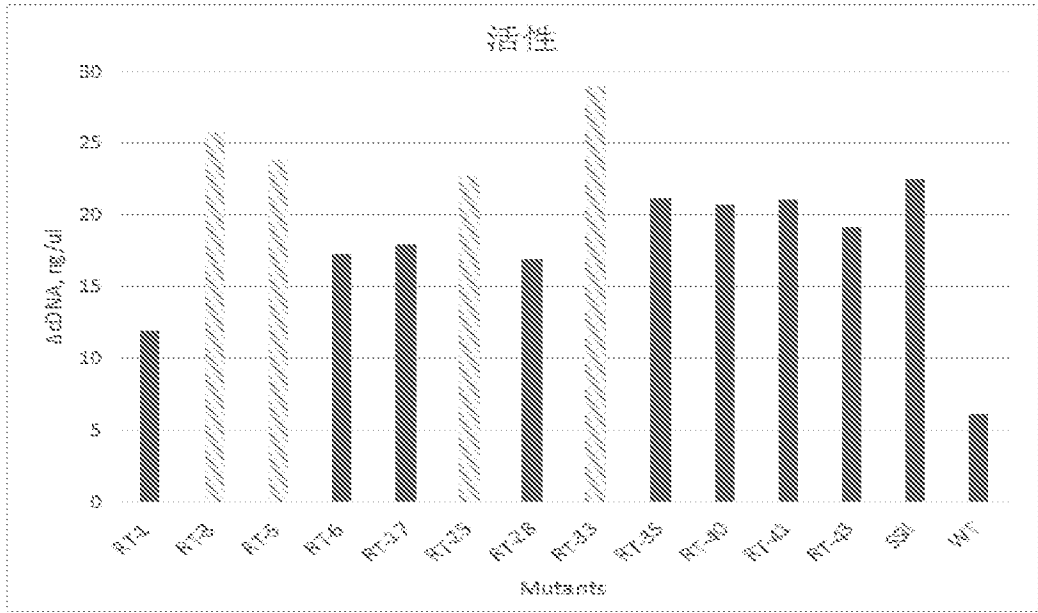


图 5

### MMLV-RT突变体实时荧光强度测定

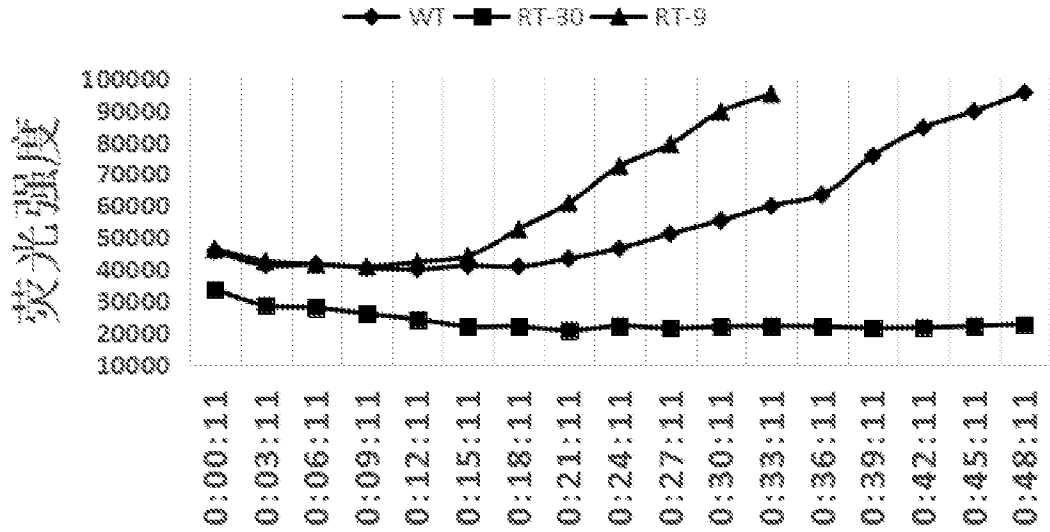


图 6

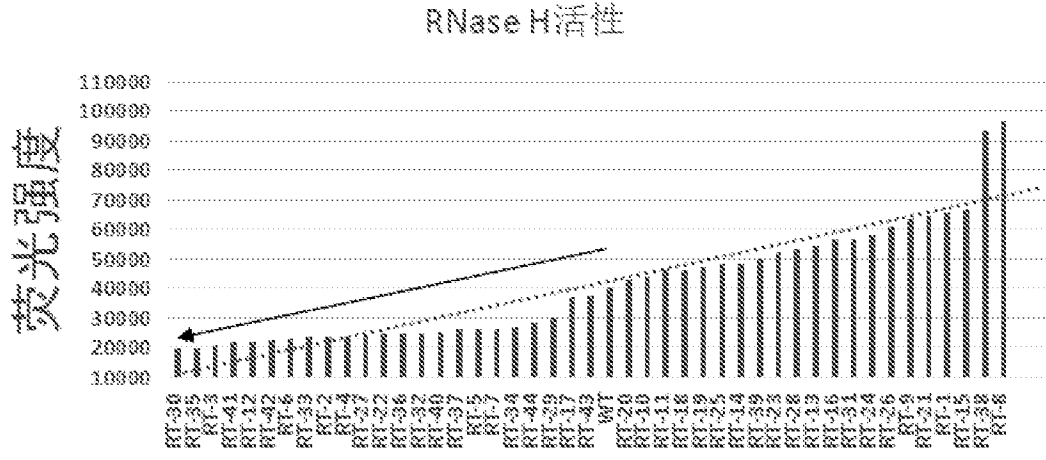


图 7

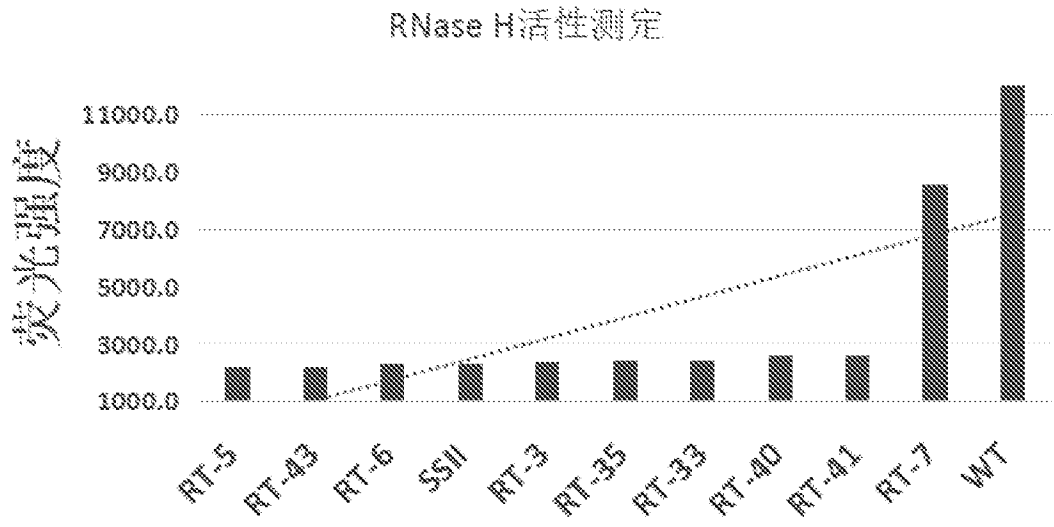


图 8

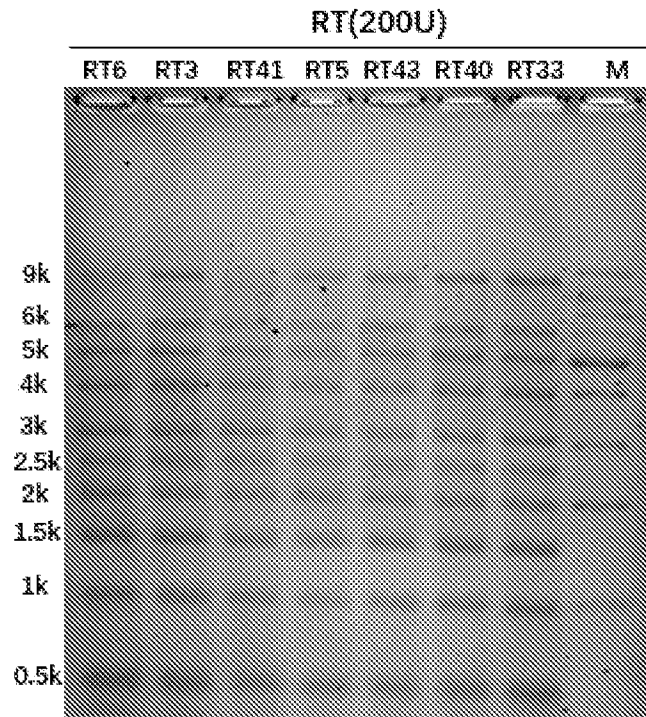


图 9

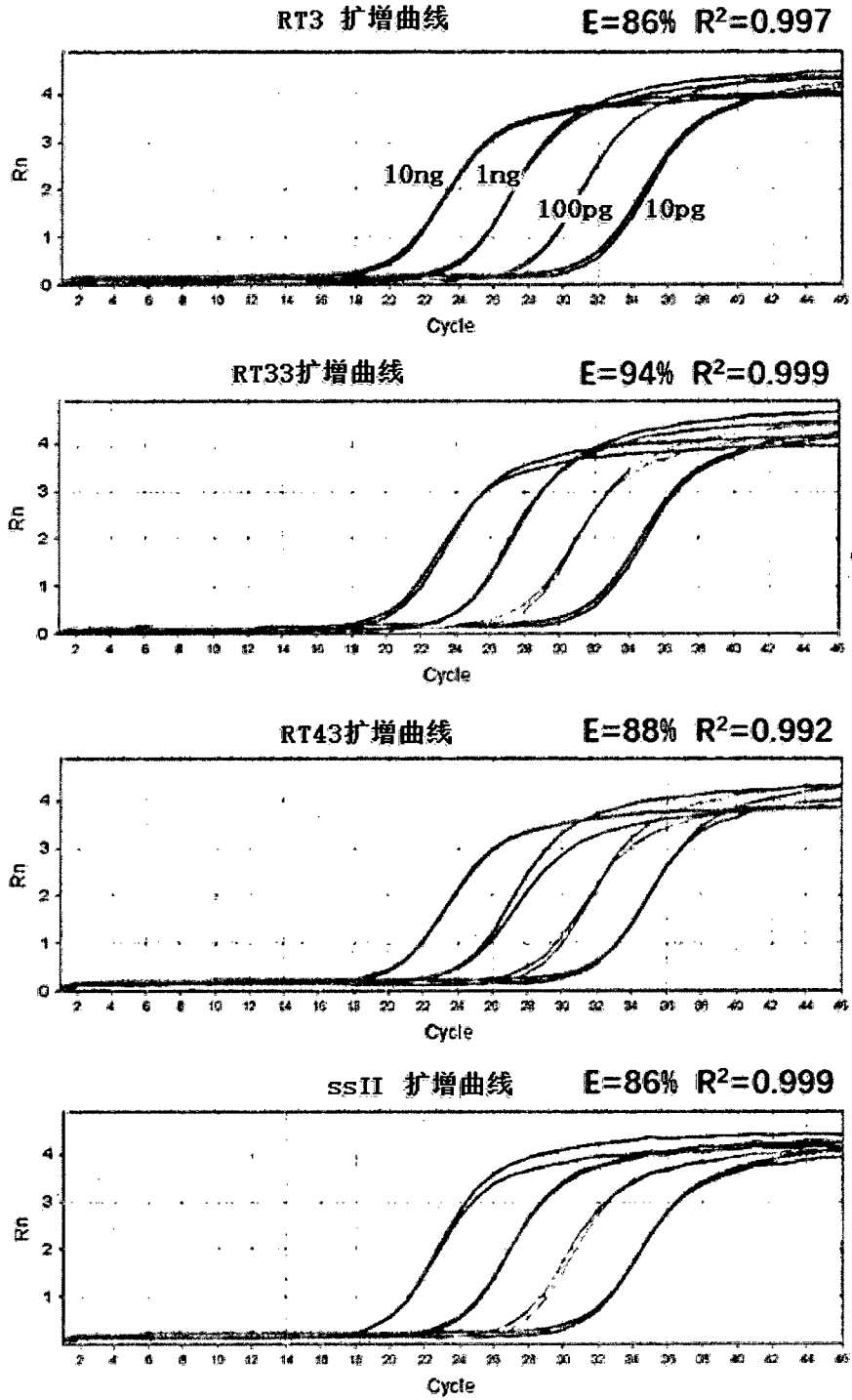


图 10

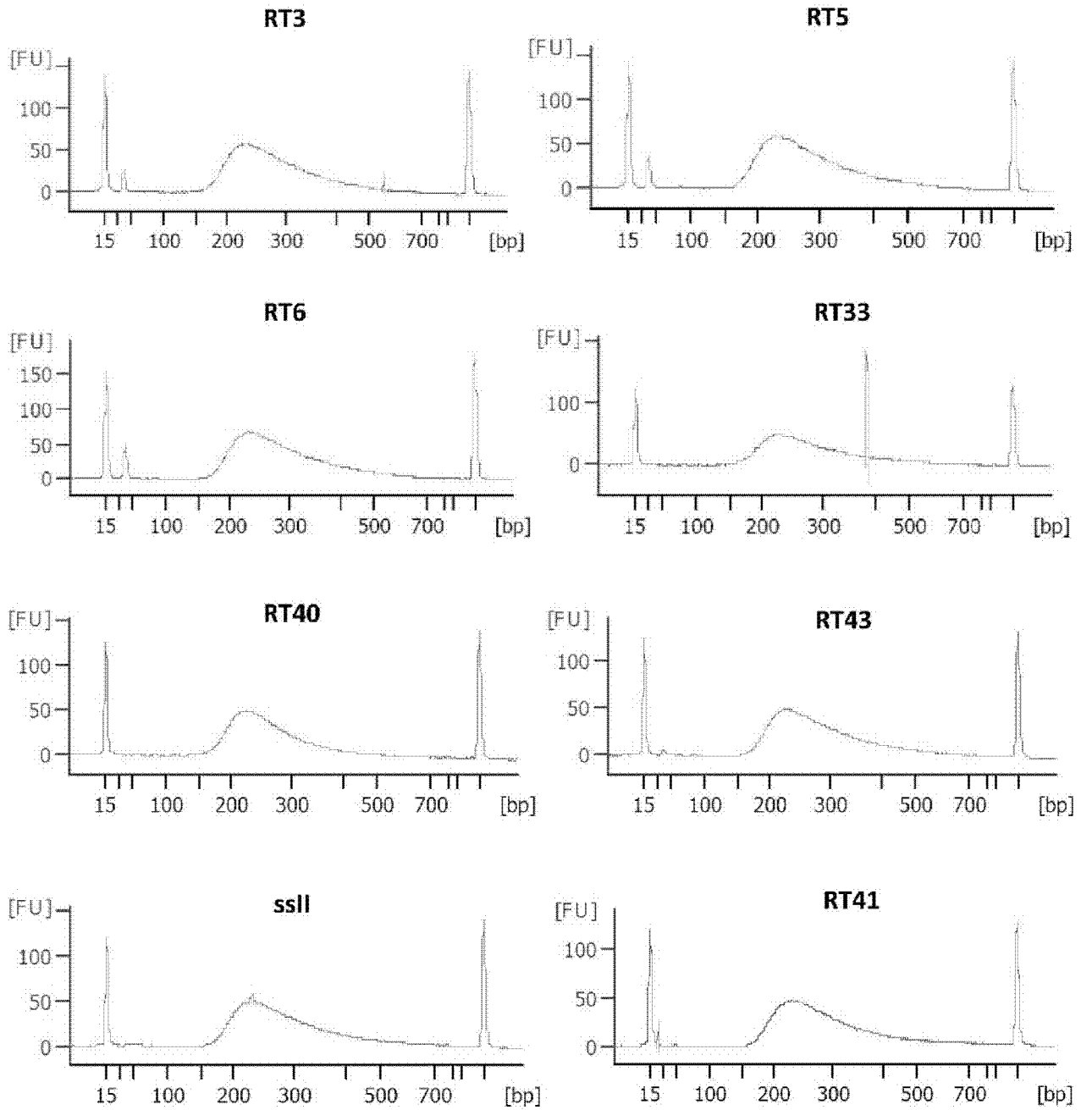


图 11

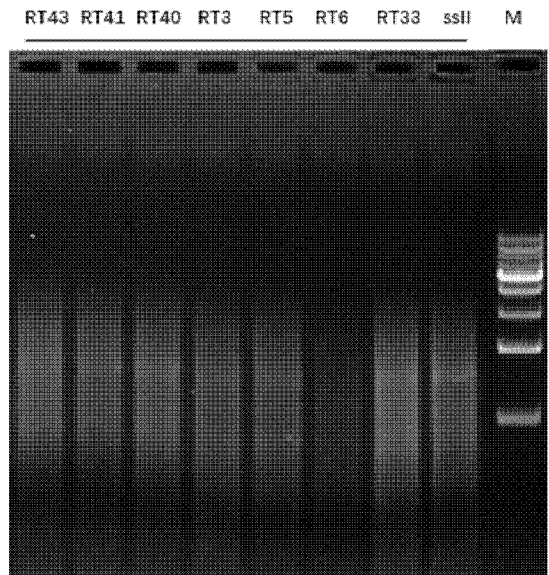


图 12

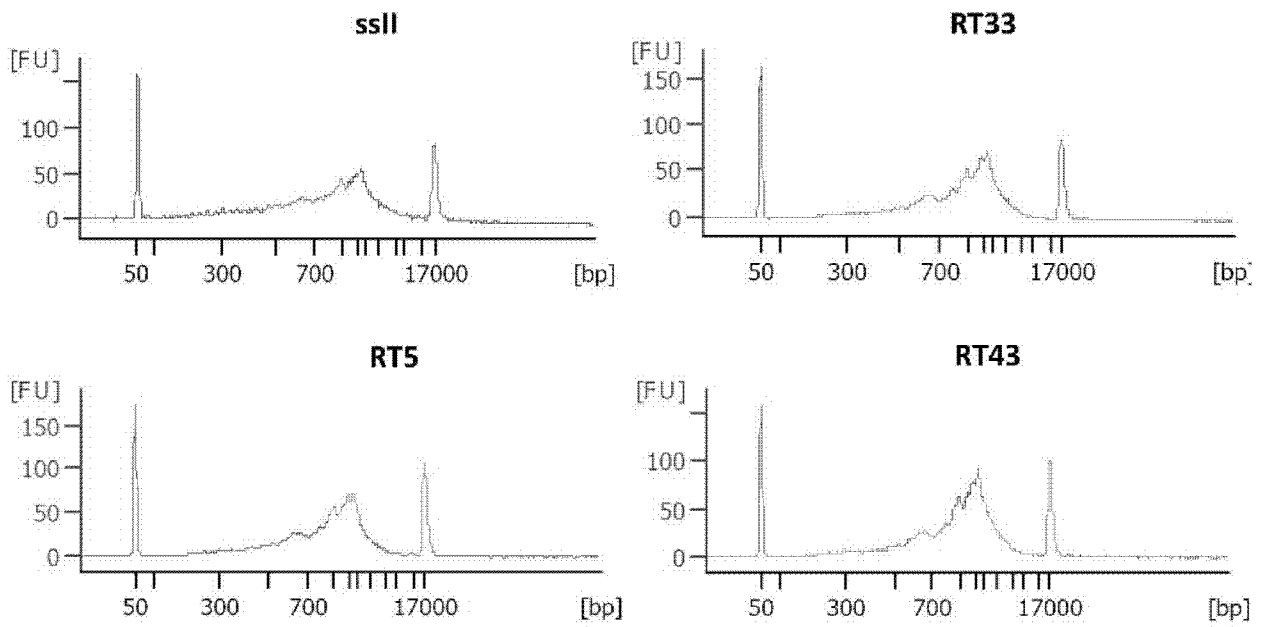


图 13

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/123994

| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>   |   |  |
|--|---|--|
| C12N 9/12(2006.01)i; C12N 15/54(2006.01)i; C12P 19/34(2006.01)i; C12N 15/10(2006.01)i  |   |  |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC  |   |  |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b>  |   |  |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>C12N; C12P  |   |  |
| 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)<br>CNABS; CNTXT; CNKI; USTXT; EPTXT; WOTXT; NCBI; EBI; VEN; ISI web of knowledge; STN; 中国专利生物序列检索系统, CHINA PATENT BIOLOGICAL SEQUENCE SEARCH SYSTEM: 深圳华大, 逆转录酶, 突变, 热稳定性, 核酸, reverse transcriptase, mutation, thermal stability, M-MLV, nucleic acid, 基于序列2检索, search based on SEQ ID NO: 2   |   |  |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>  |   |  |
| Category*  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                    | Relevant to claim No.  |
| A  | CN 106164261 A (LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION) 23 November 2016 (2016-11-23)<br>description, paragraphs [0009]-[0013] | 1-30   |
| A  | CN 1259957 A (LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION) 12 July 2000 (2000-07-12)<br>entire document                             | 1-30   |
| A  | CN 102057039 A (FERMENTAS UAB) 11 May 2011 (2011-05-11)<br>entire document  | 1-30   |
| A  | EP 1931772 B1 (STRATAGENE CALIFORNIA) 30 November 2011 (2011-11-30)<br>entire document                                | 1-30   |
| A  | US 2018010105 A1 (LIFE TECHNOLOGIES CORP.) 11 January 2018 (2018-01-11)<br>entire document                            | 1-30   |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.   |   |  |
| * Special categories of cited documents:<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date<br>"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)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>"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<br>"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<br>"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<br>"&" document member of the same patent family |   |  |
| Date of the actual completion of the international search<br><b>20 August 2019</b>   |   | Date of mailing of the international search report<br><b>18 September 2019</b> |
| Name and mailing address of the ISA/CN<br><b>State Intellectual Property Office of the P. R. China<br/>No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing<br/>100088<br/>China</b><br>Facsimile No. (86-10)62019451  |   | Authorized officer<br><br>Telephone No.  |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2018/123994**

| Patent document cited in search report |            |    | Publication date (day/month/year) | Patent family member(s) |               |    | Publication date (day/month/year) |
|--|------------|----|-----------------------------------|-------------------------|---------------|----|-----------------------------------|
| CN                                     | 106164261  | A  | 23 November 2016                  | US                      | 2018010105    | A1 | 11 January 2018                   |
|  |            |    |                                   | US                      | 2015210989    | A1 | 30 July 2015                      |
|  |            |    |                                   | WO                      | 2015112767    | A3 | 22 October 2015                   |
|  |            |    |                                   | WO                      | 2015112767    | A2 | 30 July 2015                      |
|  |            |    |                                   | JP                      | 2017503521    | A  | 02 February 2017                  |
|  |            |    |                                   | KR                      | 20160113177   | A  | 28 September 2016                 |
|  |            |    |                                   | US                      | 9663770       | B2 | 30 May 2017                       |
|  |            |    |                                   | EP                      | 3097190       | A2 | 30 November 2016                  |
| CN                                     | 1259957    | A  | 12 July 2000                      | US                      | 6989259       | B2 | 24 January 2006                   |
|  |            |    |                                   | US                      | 6518019       | B2 | 11 February 2003                  |
|  |            |    |                                   | US                      | 2003198944    | A1 | 23 October 2003                   |
|  |            |    |                                   | CN                      | 1259957       | B  | 22 August 2012                    |
|  |            |    |                                   | US                      | 7115406       | B2 | 03 October 2006                   |
|  |            |    |                                   | EP                      | 1005481       | A1 | 07 June 2000                      |
|  |            |    |                                   | WO                      | 9847912       | A1 | 29 October 1998                   |
|  |            |    |                                   | US                      | 2003186270    | A1 | 02 October 2003                   |
|  |            |    |                                   | EP                      | 2184289       | A1 | 12 May 2010                       |
|  |            |    |                                   | AT                      | 445630        | T  | 15 October 2009                   |
|  |            |    |                                   | EP                      | 1005481       | B1 | 14 October 2009                   |
|  |            |    |                                   | US                      | 2007269878    | A1 | 22 November 2007                  |
|  |            |    |                                   | EP                      | 2251347       | A2 | 17 November 2010                  |
|  |            |    |                                   | US                      | 2011008770    | A1 | 13 January 2011                   |
|  |            |    |                                   | EP                      | 2251347       | A3 | 23 February 2011                  |
|  |            |    |                                   | DE                      | 69841241      | D1 | 26 November 2009                  |
|  |            |    |                                   | US                      | 2002081581    | A1 | 27 June 2002                      |
|  |            |    |                                   | CA                      | 2287542       | A1 | 29 October 1998                   |
|  |            |    |                                   | US                      | 2003032086    | A1 | 13 February 2003                  |
|  |            |    |                                   | EP                      | 1005481       | A4 | 16 March 2005                     |
| US                                     | 6835561    | B1 | 28 December 2004                  |                         |               |    |                                   |
| AU                                     | 7360198    | A  | 13 November 1998                  |                         |               |    |                                   |
| JP                                     | 2001523098 | A  | 20 November 2001                  |                         |               |    |                                   |
| CN                                     | 102057039  | A  | 11 May 2011                       | EP                      | 3375870       | A1 | 19 September 2018                 |
|  |            |    |                                   | AU                      | 2009235368    | B2 | 16 January 2014                   |
|  |            |    |                                   | SG                      | 10201503327 Q | A  | 29 June 2015                      |
|  |            |    |                                   | US                      | 2013288925    | A1 | 31 October 2013                   |
|  |            |    |                                   | EP                      | 3098308       | B1 | 14 November 2018                  |
|  |            |    |                                   | JP                      | 2016073298    | A  | 12 May 2016                       |
|  |            |    |                                   | KR                      | 20160062213   | A  | 01 June 2016                      |
|  |            |    |                                   | JP                      | 5642662       | B2 | 17 December 2014                  |
|  |            |    |                                   | US                      | 10358670      | B2 | 23 July 2019                      |
|  |            |    |                                   | KR                      | 20180016635   | A  | 14 February 2018                  |
|  |            |    |                                   | CN                      | 107058258     | A  | 18 August 2017                    |
|  |            |    |                                   | IL                      | 246396        | A  | 30 April 2018                     |
|  |            |    |                                   | IL                      | 208578        | A  | 31 July 2016                      |
|  |            |    |                                   | WO                      | 2009125006    | A2 | 15 October 2009                   |
|  |            |    |                                   | KR                      | 20190016132   | A  | 15 February 2019                  |
|  |            |    |                                   | US                      | 10287614      | B2 | 14 May 2019                       |
|  |            |    |                                   | KR                      | 101828902     | B1 | 13 February 2018                  |
|  |            |    |                                   | ES                      | 2647272       | T3 | 20 December 2017                  |
| WO                                     | 2009125006 | A3 | 11 March 2010                     |                         |               |    |                                   |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2018/123994**

| Patent document cited in search report |            |    | Publication date (day/month/year) | Patent family member(s) | Publication date (day/month/year) |
|--|------------|----|-----------------------------------|-------------------------|-----------------------------------|
|  |            |    |                                   | CA 2721117 A1           | 15 October 2009                   |
|  |            |    |                                   | EP 2639300 A2           | 18 September 2013                 |
|  |            |    |                                   | KR 101947101 B1         | 12 February 2019                  |
|  |            |    |                                   | US 2017298403 A1        | 19 October 2017                   |
|  |            |    |                                   | JP 2017169575 A         | 28 September 2017                 |
|  |            |    |                                   | US 9683251 B2           | 20 June 2017                      |
|  |            |    |                                   | EP 2639300 A3           | 26 March 2014                     |
|  |            |    |                                   | JP 2011516072 A         | 26 May 2011                       |
|  |            |    |                                   | US 2018298414 A1        | 18 October 2018                   |
|  |            |    |                                   | US 2012156752 A1        | 21 June 2012                      |
|  |            |    |                                   | EP 2281035 A2           | 09 February 2011                  |
|  |            |    |                                   | JP 2014158473 A         | 04 September 2014                 |
|  |            |    |                                   | US 8580548 B2           | 12 November 2013                  |
|  |            |    |                                   | JP 6236563 B2           | 22 November 2017                  |
|  |            |    |                                   | KR 101653775 B1         | 05 September 2016                 |
|  |            |    |                                   | EP 3098308 A1           | 30 November 2016                  |
|  |            |    |                                   | GB 0806562 D0           | 14 May 2008                       |
|  |            |    |                                   | AU 2009235368 A1        | 15 October 2009                   |
|  |            |    |                                   | NZ 588468 A             | 26 October 2012                   |
|  |            |    |                                   | JP 2018046841 A         | 29 March 2018                     |
|  |            |    |                                   | JP 6140792 B2           | 31 May 2017                       |
|  |            |    |                                   | EP 2639300 B1           | 09 August 2017                    |
|  |            |    |                                   | KR 20110065420 A        | 15 June 2011                      |
|  |            |    |                                   | JP 6473795 B2           | 20 February 2019                  |
|  |            |    |                                   | EP 2281035 B1           | 21 January 2015                   |
|  |            |    |                                   | IL 208578 D0            | 30 December 2010                  |
|  |            |    |                                   | US 2011065606 A1        | 17 March 2011                     |
|  |            |    |                                   | US 8835148 B2           | 16 September 2014                 |
|  |            |    |                                   | SG 165584 A1            | 29 November 2010                  |
|  |            |    |                                   | IN 201006473 P4         | 10 June 2011                      |
|  |            |    |                                   | IL 291256 B             | 05 January 2018                   |
|  |            |    |                                   | IN 201748043949 A       | 28 September 2017                 |
| EP                                     | 1931772    | B1 | 30 November 2011                  | EP 1931772 A4           | 30 December 2009                  |
|  |            |    |                                   | JP 2009504162 A         | 05 February 2009                  |
|  |            |    |                                   | JP 5203200 B2           | 05 June 2013                      |
|  |            |    |                                   | EP 1931772 A2           | 18 June 2008                      |
|  |            |    |                                   | CA 2617790 A1           | 22 February 2007                  |
|  |            |    |                                   | AT 535603 T             | 15 December 2011                  |
|  |            |    |                                   | WO 2007022045 A3        | 22 May 2009                       |
|  |            |    |                                   | WO 2007022045 A2        | 22 February 2007                  |
|  |            |    |                                   | US 2016340657 A1        | 24 November 2016                  |
| US                                     | 2018010105 | A1 | 11 January 2018                   | US 2015210989 A1        | 30 July 2015                      |
|  |            |    |                                   | WO 2015112767 A3        | 22 October 2015                   |
|  |            |    |                                   | WO 2015112767 A2        | 30 July 2015                      |
|  |            |    |                                   | JP 2017503521 A         | 02 February 2017                  |
|  |            |    |                                   | KR 20160113177 A        | 28 September 2016                 |
|  |            |    |                                   | US 9663770 B2           | 30 May 2017                       |
|  |            |    |                                   | EP 3097190 A2           | 30 November 2016                  |
|  |            |    |                                   | CN 106164261 A          | 23 November 2016                  |

| <p><b>A. 主题的分类</b></p> <p>C12N 9/12(2006.01)i; C12N 15/54(2006.01)i; C12P 19/34(2006.01)i; C12N 15/10(2006.01)i</p> <p>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</p>   |   |  |     |                   |         |   |  |      |   |   |      |   |  |      |   |  |      |   |   |      |
|--|---|--|-----|-------------------|---------|---|--|------|---|---|------|---|--|------|---|--|------|---|---|------|
| <p><b>B. 检索领域</b></p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C12N; C12P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>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))</p> <p>CNABS;CNTXT;CNKI;USTXT;EPTXT;WOTXT;NCBI;EBI;VEN;ISI web of knowledge;STN;中国专利生物序列检索系统: 深圳华大, 逆转录酶, 突变, 热稳定性, 核酸, reverse transcriptase, mutation, thermal stability, M-MLV, nucleic acid, 基于序列2检索</p>   |   |  |     |                   |         |   |  |      |   |   |      |   |  |      |   |  |      |   |   |      |
| <p><b>C. 相关文件</b></p> <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>A</td> <td>CN 106164261 A (生命技术公司) 2016年 11月 23日 (2016 - 11 - 23)<br/>说明书第[0009]-[0013]段</td> <td>1-30</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 1259957 A (生命技术公司) 2000年 7月 12日 (2000 - 07 - 12)<br/>全文</td> <td>1-30</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 102057039 A (菲门特斯UAB公司) 2011年 5月 11日 (2011 - 05 - 11)<br/>全文</td> <td>1-30</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>EP 1931772 B1 (STRATAGENE CALIFORNIA) 2011年 11月 30日 (2011 - 11 - 30)<br/>全文</td> <td>1-30</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2018010105 A1 (LIFE TECHNOLOGIES CORP) 2018年 1月 11日 (2018 - 01 - 11)<br/>全文</td> <td>1-30</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 | A | CN 106164261 A (生命技术公司) 2016年 11月 23日 (2016 - 11 - 23)<br>说明书第[0009]-[0013]段 | 1-30 | A | CN 1259957 A (生命技术公司) 2000年 7月 12日 (2000 - 07 - 12)<br>全文 | 1-30 | A | CN 102057039 A (菲门特斯UAB公司) 2011年 5月 11日 (2011 - 05 - 11)<br>全文 | 1-30 | A | EP 1931772 B1 (STRATAGENE CALIFORNIA) 2011年 11月 30日 (2011 - 11 - 30)<br>全文 | 1-30 | A | US 2018010105 A1 (LIFE TECHNOLOGIES CORP) 2018年 1月 11日 (2018 - 01 - 11)<br>全文 | 1-30 |
| 类型*  | 引用文件, 必要时, 指明相关段落   | 相关的权利要求  |     |                   |         |   |  |      |   |   |      |   |  |      |   |  |      |   |   |      |
| A  | CN 106164261 A (生命技术公司) 2016年 11月 23日 (2016 - 11 - 23)<br>说明书第[0009]-[0013]段  | 1-30   |     |                   |         |   |  |      |   |   |      |   |  |      |   |  |      |   |   |      |
| A  | CN 1259957 A (生命技术公司) 2000年 7月 12日 (2000 - 07 - 12)<br>全文                     | 1-30   |     |                   |         |   |  |      |   |   |      |   |  |      |   |  |      |   |   |      |
| A  | CN 102057039 A (菲门特斯UAB公司) 2011年 5月 11日 (2011 - 05 - 11)<br>全文                | 1-30   |     |                   |         |   |  |      |   |   |      |   |  |      |   |  |      |   |   |      |
| A  | EP 1931772 B1 (STRATAGENE CALIFORNIA) 2011年 11月 30日 (2011 - 11 - 30)<br>全文    | 1-30   |     |                   |         |   |  |      |   |   |      |   |  |      |   |  |      |   |   |      |
| A  | US 2018010105 A1 (LIFE TECHNOLOGIES CORP) 2018年 1月 11日 (2018 - 01 - 11)<br>全文 | 1-30   |     |                   |         |   |  |      |   |   |      |   |  |      |   |  |      |   |   |      |
| <p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>   |   |  |     |                   |         |   |  |      |   |   |      |   |  |      |   |  |      |   |   |      |
| <p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“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)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&amp;” 同族专利的文件</p>  |   |  |     |                   |         |   |  |      |   |   |      |   |  |      |   |  |      |   |   |      |
| <p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2019年 8月 20日</p>   |   | <p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2019年 9月 18日</p>                |     |                   |         |   |  |      |   |   |      |   |  |      |   |  |      |   |   |      |
| <p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局(ISA/CN)<br/>中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>   |   | <p>授权官员</p> <p>王光新</p> <p>电话号码 (86-512) 88996448</p> |     |                   |         |   |  |      |   |   |      |   |  |      |   |  |      |   |   |      |

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/123994

| 检索报告引用的专利文件 |            |    | 公布日<br>(年/月/日) | 同族专利 |              |    | 公布日<br>(年/月/日) |
|-------------|------------|----|----------------|------|--------------|----|----------------|
| CN          | 106164261  | A  | 2016年 11月 23日  | US   | 2018010105   | A1 | 2018年 1月 11日   |
|             |            |    |                | US   | 2015210989   | A1 | 2015年 7月 30日   |
|             |            |    |                | WO   | 2015112767   | A3 | 2015年 10月 22日  |
|             |            |    |                | WO   | 2015112767   | A2 | 2015年 7月 30日   |
|             |            |    |                | JP   | 2017503521   | A  | 2017年 2月 2日    |
|             |            |    |                | KR   | 20160113177  | A  | 2016年 9月 28日   |
|             |            |    |                | US   | 9663770      | B2 | 2017年 5月 30日   |
|             |            |    |                | EP   | 3097190      | A2 | 2016年 11月 30日  |
|             |            |    |                | CN   | 1259957      | A  | 2000年 7月 12日   |
| US          | 6518019    | B2 | 2003年 2月 11日   |      |              |    |                |
| US          | 2003198944 | A1 | 2003年 10月 23日  |      |              |    |                |
| CN          | 1259957    | B  | 2012年 8月 22日   |      |              |    |                |
| US          | 7115406    | B2 | 2006年 10月 3日   |      |              |    |                |
| EP          | 1005481    | A1 | 2000年 6月 7日    |      |              |    |                |
| WO          | 9847912    | A1 | 1998年 10月 29日  |      |              |    |                |
| US          | 2003186270 | A1 | 2003年 10月 2日   |      |              |    |                |
| EP          | 2184289    | A1 | 2010年 5月 12日   |      |              |    |                |
| AT          | 445630     | T  | 2009年 10月 15日  |      |              |    |                |
| EP          | 1005481    | B1 | 2009年 10月 14日  |      |              |    |                |
| US          | 2007269878 | A1 | 2007年 11月 22日  |      |              |    |                |
| EP          | 2251347    | A2 | 2010年 11月 17日  |      |              |    |                |
| US          | 2011008770 | A1 | 2011年 1月 13日   |      |              |    |                |
| EP          | 2251347    | A3 | 2011年 2月 23日   |      |              |    |                |
| DE          | 69841241   | D1 | 2009年 11月 26日  |      |              |    |                |
| US          | 2002081581 | A1 | 2002年 6月 27日   |      |              |    |                |
| CA          | 2287542    | A1 | 1998年 10月 29日  |      |              |    |                |
| US          | 2003032086 | A1 | 2003年 2月 13日   |      |              |    |                |
| EP          | 1005481    | A4 | 2005年 3月 16日   |      |              |    |                |
| US          | 6835561    | B1 | 2004年 12月 28日  |      |              |    |                |
| AU          | 7360198    | A  | 1998年 11月 13日  |      |              |    |                |
| JP          | 2001523098 | A  | 2001年 11月 20日  |      |              |    |                |
| CN          | 102057039  | A  | 2011年 5月 11日   | EP   | 3375870      | A1 | 2018年 9月 19日   |
|             |            |    |                | AU   | 2009235368   | B2 | 2014年 1月 16日   |
|             |            |    |                | SG   | 10201503327Q | A  | 2015年 6月 29日   |
|             |            |    |                | US   | 2013288925   | A1 | 2013年 10月 31日  |
|             |            |    |                | EP   | 3098308      | B1 | 2018年 11月 14日  |
|             |            |    |                | JP   | 2016073298   | A  | 2016年 5月 12日   |
|             |            |    |                | KR   | 20160062213  | A  | 2016年 6月 1日    |
|             |            |    |                | JP   | 5642662      | B2 | 2014年 12月 17日  |
|             |            |    |                | US   | 10358670     | B2 | 2019年 7月 23日   |
|             |            |    |                | KR   | 20180016635  | A  | 2018年 2月 14日   |
|             |            |    |                | CN   | 107058258    | A  | 2017年 8月 18日   |
|             |            |    |                | IL   | 246396       | A  | 2018年 4月 30日   |
|             |            |    |                | IL   | 208578       | A  | 2016年 7月 31日   |
|             |            |    |                | WO   | 2009125006   | A2 | 2009年 10月 15日  |
|             |            |    |                | KR   | 20190016132  | A  | 2019年 2月 15日   |
|             |            |    |                | US   | 10287614     | B2 | 2019年 5月 14日   |
|             |            |    |                | KR   | 101828902    | B1 | 2018年 2月 13日   |
|             |            |    |                | ES   | 2647272      | T3 | 2017年 12月 20日  |
|             |            |    |                | WO   | 2009125006   | A3 | 2010年 3月 11日   |

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/123994

| 检索报告引用的专利文件 | 公布日<br>(年/月/日) | 同族专利              | 公布日<br>(年/月/日)   |               |
|-------------|----------------|-------------------|------------------|---------------|
|             |                | CA 2721117 A1     | 2009年 10月 15日    |               |
|             |                | EP 2639300 A2     | 2013年 9月 18日     |               |
|             |                | KR 101947101 B1   | 2019年 2月 12日     |               |
|             |                | US 2017298403 A1  | 2017年 10月 19日    |               |
|             |                | JP 2017169575 A   | 2017年 9月 28日     |               |
|             |                | US 9683251 B2     | 2017年 6月 20日     |               |
|             |                | EP 2639300 A3     | 2014年 3月 26日     |               |
|             |                | JP 2011516072 A   | 2011年 5月 26日     |               |
|             |                | US 2018298414 A1  | 2018年 10月 18日    |               |
|             |                | US 2012156752 A1  | 2012年 6月 21日     |               |
|             |                | EP 2281035 A2     | 2011年 2月 9日      |               |
|             |                | JP 2014158473 A   | 2014年 9月 4日      |               |
|             |                | US 8580548 B2     | 2013年 11月 12日    |               |
|             |                | JP 6236563 B2     | 2017年 11月 22日    |               |
|             |                | KR 101653775 B1   | 2016年 9月 5日      |               |
|             |                | EP 3098308 A1     | 2016年 11月 30日    |               |
|             |                | GB 0806562 D0     | 2008年 5月 14日     |               |
|             |                | AU 2009235368 A1  | 2009年 10月 15日    |               |
|             |                | NZ 588468 A       | 2012年 10月 26日    |               |
|             |                | JP 2018046841 A   | 2018年 3月 29日     |               |
|             |                | JP 6140792 B2     | 2017年 5月 31日     |               |
|             |                | EP 2639300 B1     | 2017年 8月 9日      |               |
|             |                | KR 20110065420 A  | 2011年 6月 15日     |               |
|             |                | JP 6473795 B2     | 2019年 2月 20日     |               |
|             |                | EP 2281035 B1     | 2015年 1月 21日     |               |
|             |                | IL 208578 D0      | 2010年 12月 30日    |               |
|             |                | US 2011065606 A1  | 2011年 3月 17日     |               |
|             |                | US 8835148 B2     | 2014年 9月 16日     |               |
|             |                | SG 165584 A1      | 2010年 11月 29日    |               |
|             |                | IN 201006473 P4   | 2011年 6月 10日     |               |
|             |                | IL 291256 B       | 2018年 1月 5日      |               |
|             |                | IN 201748043949 A | 2017年 9月 28日     |               |
| EP          | 1931772 B1     | 2011年 11月 30日     | EP 1931772 A4    | 2009年 12月 30日 |
|             |                |                   | JP 2009504162 A  | 2009年 2月 5日   |
|             |                |                   | JP 5203200 B2    | 2013年 6月 5日   |
|             |                |                   | EP 1931772 A2    | 2008年 6月 18日  |
|             |                |                   | CA 2617790 A1    | 2007年 2月 22日  |
|             |                |                   | AT 535603 T      | 2011年 12月 15日 |
|             |                |                   | WO 2007022045 A3 | 2009年 5月 22日  |
|             |                |                   | WO 2007022045 A2 | 2007年 2月 22日  |
|             |                |                   | US 2016340657 A1 | 2016年 11月 24日 |
| US          | 2018010105 A1  | 2018年 1月 11日      | US 2015210989 A1 | 2015年 7月 30日  |
|             |                |                   | WO 2015112767 A3 | 2015年 10月 22日 |
|             |                |                   | WO 2015112767 A2 | 2015年 7月 30日  |
|             |                |                   | JP 2017503521 A  | 2017年 2月 2日   |
|             |                |                   | KR 20160113177 A | 2016年 9月 28日  |
|             |                |                   | US 9663770 B2    | 2017年 5月 30日  |
|             |                |                   | EP 3097190 A2    | 2016年 11月 30日 |
|             |                |                   | CN 106164261 A   | 2016年 11月 23日 |

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)