

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 9/12

C12Q 1/68 C12N 15/54

C12N 15/70 C12N 15/63



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 99809812.4

[45] 授权公告日 2004 年 1 月 14 日

[11] 授权公告号 CN 1134538C

[22] 申请日 1999.6.17 [21] 申请号 99809812.4

[30] 优先权

[32] 1998.6.17 [33] US [31] 60/089,556

[86] 国际申请 PCT/US99/13741 1999.6.17

[87] 国际公布 WO99/65938 英 1999.12.23

[85] 进入国家阶段日期 2001.2.19

[71] 专利权人 阿默森生物科学有限公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 M·达维斯 C·W·福勒

J·A·马莫尼 L·黄

审查员 王朋飞

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 罗宏 谭明胜

权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图 29 页

[54] 发明名称 FY7 聚合酶

[57] 摘要

本发明公开了一种纯化的重组热稳定性 DNA 聚合酶，它在 50mM 和 50mM 以上的盐浓度下表现出至少约 80% 的活性、在 25mM 和 25mM 以上的盐浓度下表现出至少约 70% 的活性、且每次结合具有约 30 个核苷酸的加工能力。本发明还公开了一种编码所述热稳定性 DNA 聚合酶的分离的核酸以及一种包括所述核酸的重组 DNA 载体和用该载体转化的重组宿主细胞。本发明还公开了一种使用所述 DNA 聚合酶测序 DNA 的方法以及一种用于测序 DNA 的试剂盒。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种纯化的重组热稳定性 DNA 聚合酶，它包括附图 1 中所示的氨基酸序列。
2. 一种编码热稳定性 DNA 聚合酶的分离的核酸，其中所述的核酸
5 由附图 1 所示的核苷酸序列组成。
3. 一种重组 DNA 载体，它包括权利要求 1 所述的核酸。
4. 测序 DNA 的方法，该方法包括下列步骤：在有至少一种链终止剂
和一种或多种核苷酸三磷酸存在的情况下，用权利要求 1 的 DNA 聚合酶
从待测序的 DNA 模板生成链终止的片段，并根据所述片段的大小
10 来确定所述 DNA 的序列。
5. 一种用于测序 DNA 的试剂盒，它包括权利要求 1 所述的 DNA 聚合酶。

FY7 聚合酶

相关申请的交叉参考

- 5 本申请要求 1998 年 6 月 17 日提交的美国临时申请顺序号 60/089,556 的优先权，将该文献的全部公开内容引入本文。

发明背景

发明领域

- 10 本说明书涉及表现出改善的稳定性和功效的热稳定性 DNA 聚合酶。

背景

- 15 DNA 聚合酶是用于许多重组 DNA 技术的酶类，所述的重组 DNA 技术诸如通过聚合酶链反应（“PCR”）的核酸扩增、自动维持序列扩增（“3SR”）和高温 DNA 测序。热稳定性聚合酶类是特别有用的。因为加热不会破坏聚合酶的活性，所以不需要在每次变性步骤后添加另外的聚合酶。

- 20 然而，已经发现许多热稳定性聚合酶显示出 5'-3'外切核酸酶或结构依赖性单链内切核酸酶（“SDSSE”）活性，这种活性可以限制生成的产物的量或产生通常产物呈指数累积中的平台现象。这类 5'-3'核酸酶活性可以使有效生成大于或等于 10kb 的长 PCR 产物的能力减弱，特别是就富含 G+C 的靶物而言。在 DNA 测序的应用和循环测序的应用中，5'-3'核酸酶活性的存在可使所需的带强度降低和/或生成假或背景带。

- 25 另外，目前可得到的许多酶类对高盐环境敏感，通常的条件是：目前可得到的酶类勉强具有加工能力（更具有分布性 - 通常减退得更为明显 - 更具体地解释）

添加 dITP 以解决迫切的问题 - 通常杀灭酶的活性。

- 30 因此，需要持续存在一种对高盐条件、dITP 的有效应用、高生产能力和对富含 GC 模板的改善特性具有增加的耐受性的改进的 DNA 聚合酶。

本发明的简要概括

本说明书教导了一种纯化的重组热稳定性 DNA 聚合酶，它包括附

图 1 中所示的氨基酸序列；本说明书还教导了一种纯化的重组热稳定性 DNA 聚合酶，它在 50mM 和 50mM 以上的盐浓度下表现出至少约 80% 的活性。本说明书进一步教导了一种纯化的重组热稳定性 DNA 聚合酶，它在 25mM 和 25mM 以上的盐浓度下表现出至少约 70% 的活性；且本说明书还教导了一种纯化的重组热稳定性 DNA 聚合酶，它在每次结合时具有约 30 个核苷酸的加工 (processivity) 能力。

本说明书还教导了一种编码热稳定性 DNA 聚合酶的分离的核酸，其中所述的核酸由附图 1 中所示的核苷酸序列组成；本说明书还教导了一种包括所述核酸的重组 DNA 载体和用该载体转化的重组宿主细胞。

本说明书还教导了一种测序 DNA 的方法，该方法包括下列步骤：在有至少一种链终止剂和一种或多种核苷酸三磷酸存在的情况下从用所述的 DNA 聚合酶测序的 DNA 模板生成链终止的片段并根据所述片段的大小来确定所述 DNA 的序列。本说明书还教导了一种用于测序 DNA 的试剂盒，它包括所述的 DNA 聚合酶。

几个附图的简要说明

附图 1 描绘了 FT7 聚合酶的氨基酸序列(和编码它们的 DNA 序列)。

附图 2 描绘了使用在 Mn 条件下配制的 FY7 聚合酶测序的 M13mp18 DNA 的 DNA 序列，正如从 ABI 377 型自动荧光 DNA 测序仪中打印出的结果所示。

附图 3 描绘了使用在 Mg 条件下配制的 FY7 聚合酶测序的 M13mp18 DNA 的 DNA 序列，正如从 ABI 377 型自动荧光 DNA 测序仪中打印出的结果所示。

附图 4 描绘了在不同 KCl 浓度下 Thermo Sequenase™ 酶 DNA 聚合酶/FY7 DNA 聚合酶的最大聚合酶活性的百分比。

附图 5 描绘了高盐浓度对在使用 Thermo Sequenase™ 酶 DNA 聚合酶/FY7 DNA 聚合酶的放射性标记的 DNA 测序反应中的 DNA 测序能力的影响。

附图 6-10 描绘了增加的盐浓度对 Thermo Sequenase 特性的影响。在低至 25mM 的浓度下，数据的质量受到影响读取长度从至少 600 个碱基减少至约 450 个碱基。在 50mM 盐浓度下，读取的长度进一步减少至约 350 个碱基；在 75mM 盐浓度下，读取的长度进一步减少至约 250

个碱基, 而浓度在 100mM 时读取长度可以忽略不计。

附图 11-15 描绘了增加的盐浓度对 FY7 DNA 聚合酶特性的影响。至少 75mM KCl 时, 不存在对特性的不利影响, 且仅在 100mM KCl 下数据的质量轻微降低。

- 5 附图 16 描绘了对 Thermo Sequenase DNA 聚合酶、Ampli Taq FS DNA 聚合酶测定的加工能力/对 FY7 DNA 聚合酶测定的加工能力相比较的结果。

附图 17 描绘了在 72℃ 下引入 dGTP(鸟苷三磷酸)类似物 dITP(肌苷三磷酸)的放射性标记测序反应中使用 FY7 聚合酶/热测序酶(Thermo Sequenase) DNA 聚合酶时获得的改进的读取长度。

- 10 附图 18-22 表示增加的延伸步骤时间对由荧光标记的终止子 DNA 测序反应中 Thermo Sequenase DNA 聚合酶产生的读取长度和数据质量的影响。

附图 23-27 表示增加的延伸步骤时间对由荧光标记的终止子 DNA 测序反应中 FY7 DNA 聚合酶产生的读取长度和数据质量的影响。

- 15 发明详述

为了获得一种用于 DNA 测序的改进的聚合酶、通过降低在全长嗜热栖热菌和水生栖热菌 DNA 聚合酶 I 型酶类中发现的外切核酸酶活性来构建一系列聚合酶突变体。在 pol I 型聚合酶的氨基末端结构域中鉴定了 6 种保守基元, 已证实在其中保留了 5'至 3'的外切核酸酯活性

- 20 (Gutman 和 Minton (1993) 《核酸研究》(Nucleic Acids Research) 21, 4406-4407)。此外, 晶体结构表明在这些保守基元中的 6 个羧酸残基位于水生栖热菌 DNA pol I 的外切核酸酶结构域的活性位点上 (Kim 等 (1995) 《自然》(Nature) 376, 612-616)。通过对 Tth 和 Taq 聚合酶内 6 个保守基元中的 3 个中的羧酸和其它残基进行定点
25 诱变来进行点突变, 如下:

Taq D18A、Taq T140V、Taq D142N/D144N。所有这些均在外切核酸酶结构域的外部具有突变 F667Y;

Tth D18A、Tth T141V、Tth D143N/D145N。所有这些均在外切核酸酶结构域的外部具有突变 F669Y。

- 30 对所有的聚合酶评估外切核酸酶活性、加工能力、链置换、盐耐受性、热稳定性和测序质量。下面进一步具体地描述一种 FY7 聚合酶 (Tth D18A、F669Y)。

实施例

方法

体外诱变

使用 PCR 在克隆的全长 F669Y Tth 的密码子 18 (D18A) 上引入
5 天冬氨酸 - 丙氨酸的改变 (质粒 pMR10) 。 诱变引物 1
(CTGTTCTGAACCCAAAGGCCGTGTCCTCCTGGTGGCCGGCCACCAC) 包括 pMR10
的 19 - 60 位核苷酸包括密码子 18 和 BstBI 限制位点。寡核苷酸引物
2 (GAGGCTGCCGAATTCCAGCCTCTC) 包括 pMR10 的 EcoRI 位点, 将 pMR10
用作模板 DNA。将 PCR 产物用 BstBI 和 EcoRI 消化并与 pMR10 的两个
10 片段即 5000bp KpnI/BstBI 和 2057bp EcoRI/KpnI 连接, 从而生成质
粒 pMR12。将大肠杆菌菌株 DH1 λ^+ 的细胞用于初级转化并将菌株 M5248
(λ cI857) 用于蛋白质表达, 不过, 可以使用携带 cI $^+$ 和 cI857 等位
基因的类似一对大肠杆菌菌株。另一方面, 用化学剂诸如萘啶酮酸可
以将任意的 rec $^+$ cI $^+$ 菌株诱变以产生聚合酶。

15 聚合酶的纯化

在 30 $^{\circ}$ C 下, 使含有质粒 pMR12 的 M5248 在 1 升的 LB 培养基 (1%
胰化蛋白胨、0.5% 酵母提取物、1% NaCl) 、优选在含有 100mg/ml 氨
苄西林的 2X LB 培养基中生长。当 OD₆₀₀ 达到 1.0 时, 在 42 $^{\circ}$ C 下将培
养物诱导 1.5 小时。然后使该培养物冷却至 <20 $^{\circ}$ C 并在 4 $^{\circ}$ C 下的 Sorvall
20 RC-3B 离心机中通过以 500 rpm 离心 15 - 30 分钟来收集细胞。将所收
集的细胞保存在 -80 $^{\circ}$ C 下。

将细胞沉淀重新悬浮于 25ml 预热的裂解缓冲液 (50mM Tris-HCl pH
8.0; 10mM MgCl₂; 16mM (NH₄)₂SO₄; 1mM EDTA; 0.1%、优选 0.2% Tween
20; 0.1%、优选 0.2% NP40) 中。优选所述的裂解缓冲液含有 300mM
25 NaCl。将重新悬浮的细胞在 75 - 85 $^{\circ}$ C 下培养 10 - 20 分钟、超声处理 1
分钟并通过离心澄清。使澄清的裂解液通过用含有 100mM、优选含有
300mM NaCl 的缓冲液 A (50mM Tris-HCl pH 8.0; 1mM EDTA; 0.2% Tween
20; 0.1% NP40) 平衡的 300ml 的二乙氨基乙基纤维素 (Whatman DE 52)
柱。分析级分的聚合酶活性并收集那些被证明具有聚合酶活性的峰、
30 用 50mM 含有缓冲液 A 的 NaCl 稀释并上用 50mM NaCl 的缓冲液 A 的溶
液平衡的肝素琼脂糖柱 (20ml) 。使用 50mM - 700mM NaCl 的缓冲液 A
的溶液的线性盐梯度从该柱上洗脱聚合酶。分析级分的聚合酶活性并

收集那些可证明具有活性峰的级分且对最终缓冲液 (20mM Tris-HCl pH 8.5、50% (v/v) 甘油、0.1mM EDTA、0.5% Tween 20、0.5% NP40、1mM DTT、100mM KCl) 透析。将纯化的蛋白质命名为 FY7。氨基酸序列 (和编码氨基酸序列的 DNA 序列) 如附图 1 中所示。

5 细菌菌株

大肠杆菌菌株:DH1 λ^+ [gyrA96、recA1、relA1、endA1、thi-1、hsdR17、supE44、 λ^+];M5248[λ (bio275、cI857、cIII⁺、N⁺、 λ (H1))].
PCR

通过 SDS 碱性裂解方法 (Sambrook 等《分子克隆》(Molecular Cloning) 第 2 版, Cold Spring Harbor Press, 1989) 来制备来自大肠杆菌 DH1 λ^+ 的质粒 DNA (pMR10)。反应条件如下: 每 100 μ l 反应物中用 10mM Tris-HCl pH 8.3、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、0.001% 明胶、1 μ M 各种引物、2.5 U Taq 聚合酶。循环条件为 94 $^{\circ}$ C 下 2 分钟; 然后是 94 $^{\circ}$ C 30 秒、55 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 3 分钟、随后是 72 $^{\circ}$ C 7 分钟组成的 35 个循环。

实施例 1 在 Mn 条件下的酶制剂

在下列“预混合”方案中, 在两种溶液中均包括所有试剂; 试剂混合物 A 和试剂混合物 B。

试剂混合物 A

20 合并下列试剂来制成 10ml 试剂混合物 A:
2.5ml 1M HEPPS N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-(3-丙磺酸), pH 8.0;
500 μ l 1M 酒石酸, pH 8.0;
50,000 单位的 FY7 DNA 聚合酶;
1 单位的嗜酸热原体无机焦磷酸酶;
25 100 μ l 100mM dATP;
100 μ l 100mM dTTP;
100 μ l 100mM dCTP;
500 μ l 100mM dITP;
9.375 μ l 100 μ M C-7-炔丙基氨基-4-罗丹明-6-G-ddATP;
30 90 μ l 100 μ M C-5-炔丙基氨基-4-罗丹明-X-ddCTP;
6.75 μ l 100 μ M C-7-炔丙基氨基-4-罗丹明-I10-ddGTP;
165 μ l 100 μ M C-5-炔丙基氨基-4-四甲基罗丹明-ddUTP;

10 μ l 50mM EDTA;

1ml 甘油;

用去离子 H₂O 将体积加至 10,000 μ l.

试剂混合物 B

5 合并下列试剂以制成 10ml 的试剂混合物 B:

10 μ l 1M MES 2-(N-吗啉代)乙磺酸, pH 6.0;

200 μ l 1M MgCl₂

75 μ l 1M MnSO₄;

用去离子 H₂O 将体积加至 10,000 μ l.

10 实施例 2: 来自实施例 1 的制剂的应用

将两(2) μ l 试剂混合物 A、2 μ l 试剂混合物 B、200ng M13mp18 DNA、5 pmole 引物 (M13-40 正向 5'-GTTTCCCAGTCACGTTGTA) 和去离子水补充 20 μ l 总体积彼此混合并在热循环仪中进行 25 个循环 (95℃ 30 秒、60℃ 1 分钟)。循环后, 加入含有 1.5M 乙酸钠、250mM EDTA 的 4 μ l 溶液。将该溶液混合并加入 4 个体积 (100 μ l) 的乙醇。通过在冰上培养 15-20 分钟、随后离心来沉淀 DNA。除去上清液并用 70% 乙醇洗涤沉淀、将其干燥并重新悬浮于 4 μ l 的含有加样染料的甲酰胺中。然后使重新悬浮的 DNA 在自动荧光 DNA 测序仪 (ABI 377 型仪器) 上运动。从该机器中打印出的 DNA 序列如附图 2 中所示。

20 实施例 3 在 Mg 条件下的酶制剂

在下列“预混合物”方案中, 在一种溶液中包含所有试剂。

测序预混合物

合并下列试剂以制成 800 μ l 的测序预混合物:

200 μ l 的 500mM Tris-HCl pH 9.5、20mM MgCl₂;

25 100 μ l 40 单位/ μ l FY7 DNA 聚合酶、0.0008 单位/ μ l 的嗜酸热原体无机焦磷酸酶;

100 μ l 10mM dITP、2mM dATP、2mM dTTP、2mM dCTP;

100 μ l 0.125 μ M C-7-炔丙基氨基-4-罗丹明-6-G-ddATP;

100 μ l 1.2 μ M C-5-炔丙基氨基-4-罗丹明-X-ddCTP;

30 100 μ l 0.09 μ M C-7-炔丙基氨基-4-罗丹明-110-ddGTP;

100 μ l 2.2 μ M C-5-炔丙基氨基-4-四甲基罗丹明-ddUTP.

实施例 4 来自实施例 3 的制剂的应用

将四 (4) μl 测序预混合物、200ng M13mp18 DNA、5 pmole 引物 (M13-40 正向 5'-GTTTCCCAGTCACGTTGTA) 和去离子水, 至 20 μl 总体积的彼此混合并在热循环仪中进行 25 个循环 (95 $^{\circ}\text{C}$ 30 秒、60 $^{\circ}\text{C}$ 2 分钟)。循环后, 加入 7 μl 的 7.5M 乙酸铵。将该溶液混合并加入 4 个体积 (100 μl) 的乙醇。通过在冰上培养 15-20 分钟、随后离心来沉淀 DNA。除去上清液并用 70% 乙醇洗涤沉淀、将其干燥并重新悬浮于 4 μl 的含有加样染料的甲酰胺中。然后将重新悬浮的 DNA 在自动荧光 DNA 测序仪 (ABI 377 型仪器) 测序。从该机器中打印出的 DNA 序列如附图 3 中所示。

10 实施例 5 Thermo SequenaseTM 酶与 FY7 酶的聚合酶活性/盐浓度 (KCl)

在不同 KCl 浓度下测定 Thermo SequenaseTM 酶 DNA 聚合酶与 FY7 DNA 聚合酶的最大聚合酶活性的百分比。结果如附图 4 中所示。数据表明 FY7 在反应混合物中具有远高于 Thermo SequenaseTM 的最适盐浓度和广范围的盐的耐受性。对于 FY7 来说, 产生 50% 活性的盐浓度比 Thermo Sequenase 高 5 倍。

还实验了高盐浓度对放射性标记的 DNA 测序反应中 DNA 测序能力的影响。结果如附图 5 中所示。在 50mM 或 50mM 以上的 KCl 浓度下, Thermo SequenaseTM 聚合酶特性降解至不能够获得有用数据的水平。然而, FY7 DNA 聚合酶能够在 100mM 的 KCl 浓度下得到极好的测序数据。

20 实施例 6 荧光测序的盐耐受性

这些实验检验了上述证明的聚合酶活性在高盐浓度下对荧光标记的终止子 DNA 测序反应中 DNA 测序能力的影响。结果如附图 6-15 中所示。

附图 6-10 表示增加的盐浓度对 Thermo Sequenase 特性的影响。在低至 25mM 的浓度下, 数据的质量受到从至少 600 个碱基减少至约 450 个碱基的读取长度的影响。在 50mM 盐浓度下, 读取的长度进一步减少至约 350 个碱基; 在 75mM 盐浓度下, 读取的长度进一步减少至约 250 个碱基, 而浓度在 100mM 时读取长度可以忽略不计。

附图 11-15 表示增加的盐浓度对 FY7 DNA 聚合酶特性的影响。至少 75mM KCl 时, 对其特性无不利影响, 且仅在 100mM KCl 下数据的质量轻度降低。

当认识到某些类型的 DNA 制剂可以受到盐污染时 (对 DNA 测序数

据的质量不利)，FY7 DNA 聚合酶的应用可使得在广范围模板条件下的测序反应更为稳定。

实施例 7 聚合酶的加工能力

已经测定了不同 DNA 测序聚合酶的加工能力（每次 DNA 聚合酶结合时参入的核苷酸数量）。结果如附图 16 中所示。Thermo Sequenase DNA 聚合酶每次结合时仅具有 ~4 个核苷酸的加工能力。Ampli Taq FS DNA 聚合酶在每次结合时具有 ~15 个核苷酸的加工能力。FY7 DNA 聚合酶具有比 Thermo Sequenase DNA 聚合酶高 7 倍的加工能力且在每次结合 ~30 个核苷酸时具有比 Ampli Taq FS DNA 聚合酶高 ~2 倍的加工能力。

10 实施例 8 在 72℃ 下使用 dITP 的聚合酶延伸反应

本系列实验检验了当在 72℃ 下引入 dGTP(鸟苷三磷酸)类似物 dITP(肌苷三磷酸)的放射性标记测序反应中使用 FY7 聚合酶 Thermo Sequenase DNA 聚合酶时获得的改进的读取长度。结果如附图 17 中所示。FY7 能够在标准 $^{33}\text{P}[\alpha\text{-aATP}]$ 测序条件下结合比 Thermo Sequenase >50-100 个以上的核苷酸。

实施例 9 延伸步骤时间对读取长度的影响

这些系列实验检验了在放射性标记的终止子 DNA 测序反应中增加的延伸步骤时间对 Thermo Sequenase 和 FY7 DNA 聚合酶获得的读取长度和数据质量的影响。结果如附图 18-27 中所示。

20 附图 18-22 表示增加的延伸步骤时间对由 Thermo Sequenase DNA 聚合酶产生的读取长度和数据质量的影响。该数据表明热测序酶(Thermo Sequenase)要求最短 2 分钟的延伸步骤以便获得至少优质读取 600 个碱基。信号强度一般在 4 分钟的延伸时(该时间在应用这种酶和方法的商品中是特定的)增加到最大值。

25 附图 23-27 表示增加的延伸步骤时间对由 FY7 DNA 聚合酶产生的读取长度和数据质量的影响。该数据表明 FY7 要求最短 30 秒的延伸步骤以便获得至少优质读取 600 个碱基。信号强度在约 1 分钟的延伸时间时产生平台。FY7 DNA 聚合酶可以在四分之一或二分之一的延伸反应时间中产生与 Thermo Sequenase 相同质量的数据。

30 尽管上述实施例具体地描述了本发明的各种实施方案，但是对于本领域技术人员来说显然可以对它们进行改变。因此，上述实施例用于解释目的且不应以任何方式用于限制所附权利要求的范围。

```

/1
ATG GAA GCG ATG CTG CCG CTG TTC GAA CCC
M E A M L P L F E P
61/21
CAC CTG GCC TAC CGC ACC TTC TTC GCC CTG
H L A Y R T F F A L
121/41
GTG CAG GCG GTC TAC GGC TTC GCC AAG AGC
V Q A V Y G F A K S
181/61
AAG GCC GTC TTC GTG GTC TTT GAC GCC AAG
K A V F V V F D A K
241/81
GCC TAC AAG GCG GGG AGG GCC CCG ACC CCC
A Y K A G R A P T P
301/101
AAG GAG CTG GTG GAC CTC CTG GGG TTT ACC
K E L V D L L G F T
361/121
GAC GTT CTC GCC ACC CTG GCC AAG AAG GCG
D V L A T L A K K A
421/141
ACC GCC GAC CGC GAC CTC TAC CAA CTC GTC
T A D R D L Y Q L V
481/161
GGC CAC CTC ATC ACC CCG GAG TGG CTT TGG
G H L I T P E W L W
541/181
GTG GAC TTC CGC GCC CTC GTG GGG GAC CCC
V D F R A L V G D P
601/201
GGG GAG AAG ACC GCC CTC AAG CTC CTC AAG
G E K T A L K L L K
661/221
AAC CTG GAC CGG GTA AAG CCA GAA AAC GTC
N L D R V K P E N V
721/241
CTC AGG CTC TCC TTG GAG CTC TCC CGG GTG
L R L S L E L S R V
781/261
GCC CAG GGG CGG GAG CCC GAC CGG GAG GGG
A Q G R E P D R E G
841/281
GGC AGC CTC CTC CAC GAG TTC GGC CTC CTG
G S L L H E F G L L
901/301
TGG CCC CCG CCG GAA GGG GCC TTC GTG GGC
W P P P E G A F V G
961/321
GCG GAG CTT AAA GCC CTG GCG GCC TGC AGG
A E L K A L A A C R
1021/341
TTG GCG GGG CTA AAG GAC CTC AAG GAG GTC
L A G L K D L K E V
1081/361
TTG GCC TCG AGG GAG GGG CTA GAC CTC GTG
L A S R E G L D L V
1141/381
CTC CTG GAC CCC TCC AAC ACC ACC CCC GAG
L L D P S N T T P E
1201/401

31/11
AAA GGC CGT GTC CTC CTG GTG GCC GGC CAC
K G R V L L V A G H
91/31
AAG GGC CTC ACC ACG AGC CGG GGC GAA CCG
K G L T T S R G E P
151/51
CTC CTC AAG GCC CTG AAG GAG GAC GGG TAC
L L K A L K E D G Y
211/71
GCC CCC TCC TTC CGC CAC GAG GCC TAC GAG
A P S F R H E A Y E
271/91
GAG GAC TTC CCC CGG CAG CTC GCC CTC ATC
E D F P R Q L A L I
331/111
CGC CTC GAG GTC CCC GGC TAC GAG GCG GAC
R L E V P G Y E A D
391/131
GAA AAG GAG GGG TAC GAG GTG CGC ATC CTC
E K E G Y E V R I L
451/151
TCC GAC CGC GTC GCC GTC CTC CAC CCC GAG
S D R V A V L H P E
511/171
GAG AAG TAC GGC CTC AGG CCG GAG CAG TGG
E K Y G L R P E Q W
571/191
TCC GAC AAC CTC CCC GGG GTC AAG GGC ATC
S D N L P G V K G I
631/211
GAG TGG GGA AGC CTG GAA AAC CTC CTC AAG
E W G S L E N L L K
691/231
CGG GAG AAG ATC AAG GCC CAC CTG GAA GAC
R E K I K A H L E D
751/251
CGC ACC GAC CTC CCC CTG GAG GTG GAC CTC
R T D L P L E V D L
811/271
CTT AGG GCC TTC CTG GAG AGG CTG GAA TTC
L R A F L E R L E F
871/291
GAG GCC CCC GCC CCC CTG GAG GAG GCC CCC
E A P A P L E E A P
931/311
TTC CTC CTC TCC CGC CCC GAG CCC ATG TGG
F V L S R P E P M W
991/331
GAG GGC CGG GTG CAC CGG GCA GCA GAC CCC
D G R V H R A A D P
1051/351
CGG GGC CTC CTC GCC AAG GAC CTC GCC GTC
R G L L A K D L A V
1111/371
CCC GGG GAC GAC CCC ATG CTC CTC GCC TAC
P G D D P M L L A Y
1171/391
GGG GTG GCG CGG CGC TAC GGG GGG GAG TGG
G V A R R Y G G E W
1231/411

```

图 1

ACG GAG GAC GCC GCC CAC CGG GCC CTC CTC TCG GAG AGG CTC CAT CGG AAC CTC CTT AAG
 T E D A A H R A L L S E R L H R N L L K
 1261/421 1291/431
 CGC CTC GAG GGG GAG GAG AAG CTC CTT TGG CTC TAC CAC GAG GTG GAA AAG CCC CTC TCC
 R L E G E E K L L W L Y H E V E K P L S
 1321/441 1351/451
 CGG GTC CTG GCC CAC ATG GAG GCC ACC GGG GTA CGG CTG GAC GTG GCC TAC CTT CAG GCC
 R V L A H M E A T G V R L D V A Y L Q A
 1381/461 1411/471
 CTT TCC CTG GAG CTT GCG GAG GAG ATC CGC CGC CTC GAG GAG GAG GTC TTC CGC TTG GCG
 L S L E L A E E I R R L E E E V F R L A
 1441/481 1471/491
 GGC CAC CCC TTC AAC CTC AAC TCC CGG GAC CAG CTG GAA AGG GTG CTC TTT GAC GAG CTT
 G H P F N L N S R D Q L E R V L F D E L
 1501/501 1531/511
 AGG CTT CCC GCC TTG GGG AAG ACG CAA AAG ACA GGC AAG CGC TCC ACC AGC GCC GCG GTG
 R L P A L G K T Q K T G K R S T S A A V
 1561/521 1591/531
 CTG GAG GCC CTA CGG GAG GCC CAC CCC ATC GTG GAG AAG ATC CTC CAG CAC CGG GAG CTC
 L E A L R E A H P I V E K I L Q H R E L
 1621/541 1651/551
 ACC AAG CTC AAG AAC ACC TAC GTG GAC CCC CTC CCA AGC CTC GTC CAC CCG AGG ACG GGC
 T K L K N T Y V D P L P S L V H P R T G
 1681/561 1711/571
 CGC CTC CAC ACC CGC TTC AAC CAG ACG GCC ACG GCC ACG GGG AGG CTT AGT AGC TCC GAC
 R L H T R F N Q T A T A T G R L S S S D
 1741/581 1771/591
 CCC AAC CTG CAG AAC ATC CCC GTC CGC ACC CCC TTG GGC CAG AGG ATC CGC CGG GCC TTC
 P N L Q N I P V R T P L G Q R I R R A F
 1801/601 1831/611
 GTG GCC GAG GCG GGT TGG GCG TTG GTG GCC CTG GAC TAT AGC CAG ATA GAG CTC CGC GTC
 V A E A G W A L V A L D Y S Q I E L R V
 1861/621 1891/631
 CTC GCC CAC CTC TCC GGG GAC GAA AAC CTG ATC AGG GTC TTC CAG GAG GGG AAG GAC ATC
 L A H L S G D E N L I R V F Q E G K D I
 1921/641 1951/651
 CAC ACC CAG ACC GCA AGC TGG ATG TTC GGC GTC CCC CCG GAG GCC GTG GAC CCC CTG ATG
 H T Q T A S W M F G V P P E A V D P L M
 1981/661 2011/671
 CGC CGG GCG GCC AAG ACG GTG AAC TAC GGC GTC CTC TAC GGC ATG TCC GCC CAT AGG CTC
 R R A A K T V N Y G V L Y G M S A H R L
 2041/681 2071/691
 TCC CAG GAG CTA GCC ATC CCC TAC GAA GAA GCG GTG GCC TTT ATA GAG CGC TAC TTC CAA
 S Q E L A I P Y E E A V A F I E R Y F Q
 2101/701 2131/711
 AGC TTC CCC AAG GTG CGG GCC TGG ATA GAA AAG ACC CTG GAG GAG GGG AGG AAG CGG GGC
 S F P K V R A W I E K T L E E G R K R G
 2161/721 2191/731
 TAC GTG GAA ACC CTC TTC GGA AGA AGG CGC TAC GTG CCC GAC CTC AAC GCC CGG GTG AAG
 Y V E T L F G R R R Y V P D L N A R V K
 2221/741 2251/751
 AGC GTC AGG GAG GCC GCG GAG CGC ATG GCC TTC AAC ATG CCC GTC CAG GGC ACC GCC GCC
 S V R E A A E R M A F N M P V Q G T A A
 2281/761 2311/771
 GAC CTC ATG AAG CTC GCC ATG GTG AAG CTC TTC CCC CGC CTC CGG GAG ATG GGG GCC CGC
 D L M K L A M V K L F P R L R E M G A R
 2341/781 2371/791
 ATG CTC CTC CAG GTC CAC GAC GAG CTC CTC CTG GAG GCC CCC CAA GCG CGG GCC GAG GAG
 M L L Q V H D E L L L E A P Q A R A E E
 2401/801 2431/811
 GTG GCG GCT TTG GCC AAG GAG GCC ATG GAG AAG GCC TAT CCC CTC GCC GTG CCC CTG GAG
 V A A L A K E A M E K A Y P L A V P L E

图 1(接续)

2461/821

GTG GAG GTG GGG ATG GGG GAG GAC TGG CTT

V E V G M G E D W L

2491/831

TCC GCC AAG GGT TAG

S A K G *

图 1(接续)

热测序酶(Thermo Sequenase)和FY7的聚合酶
活性与盐浓度(KCl)

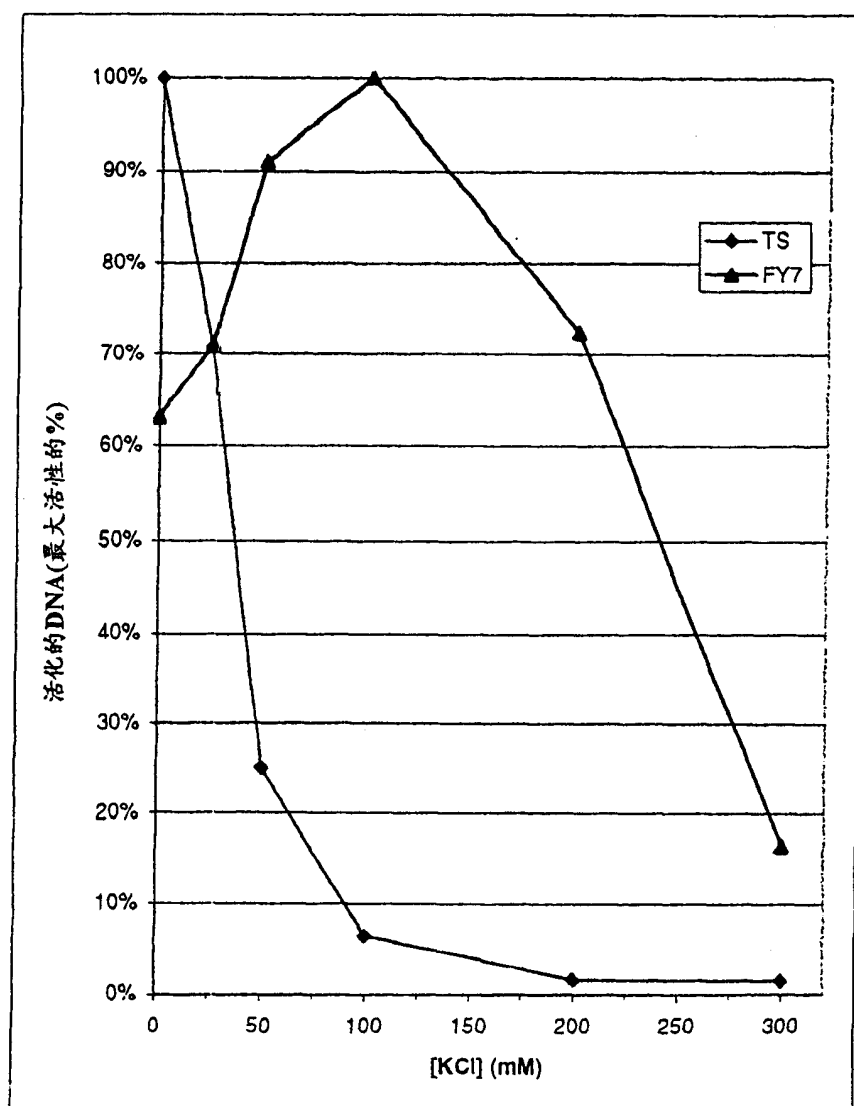


图 4

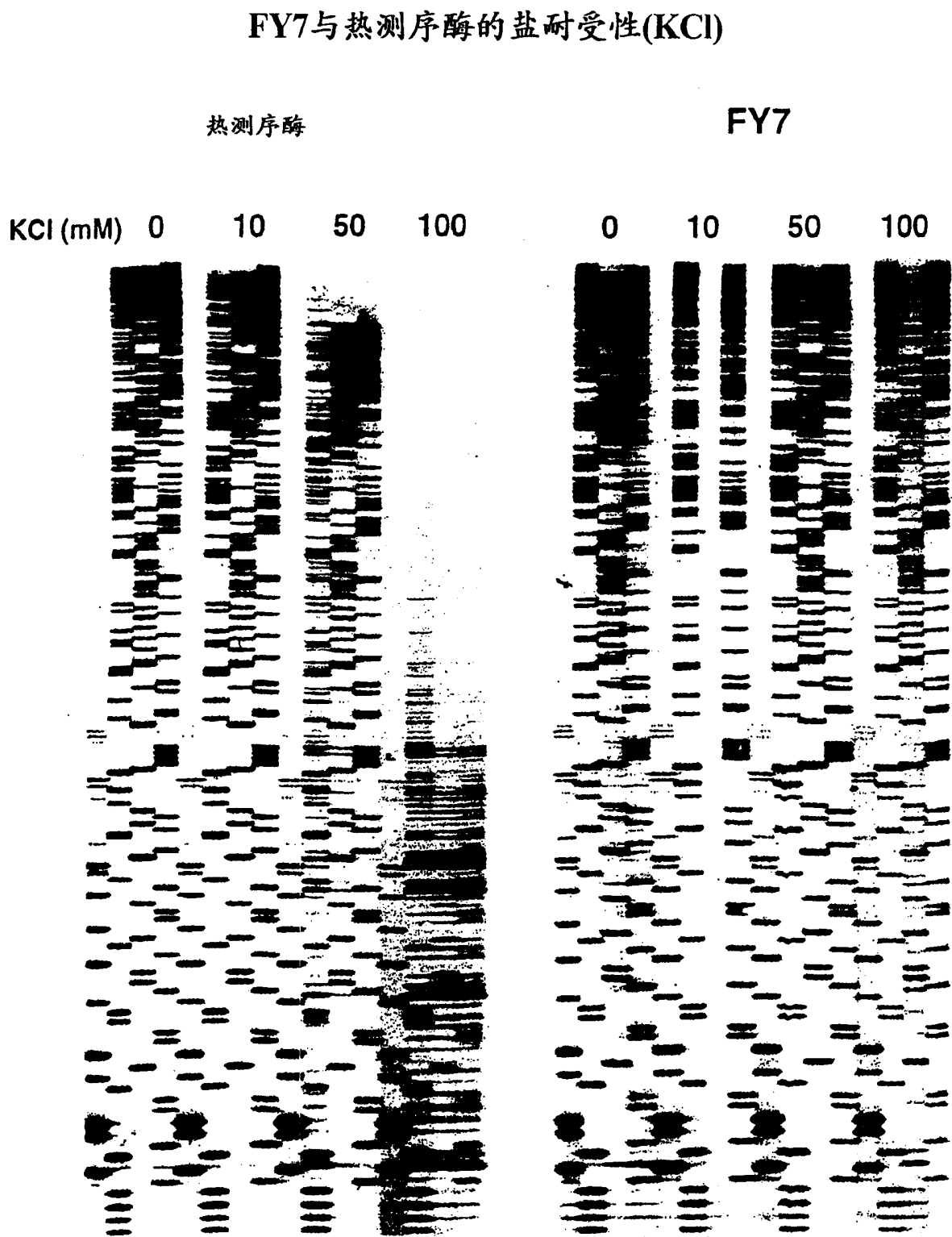
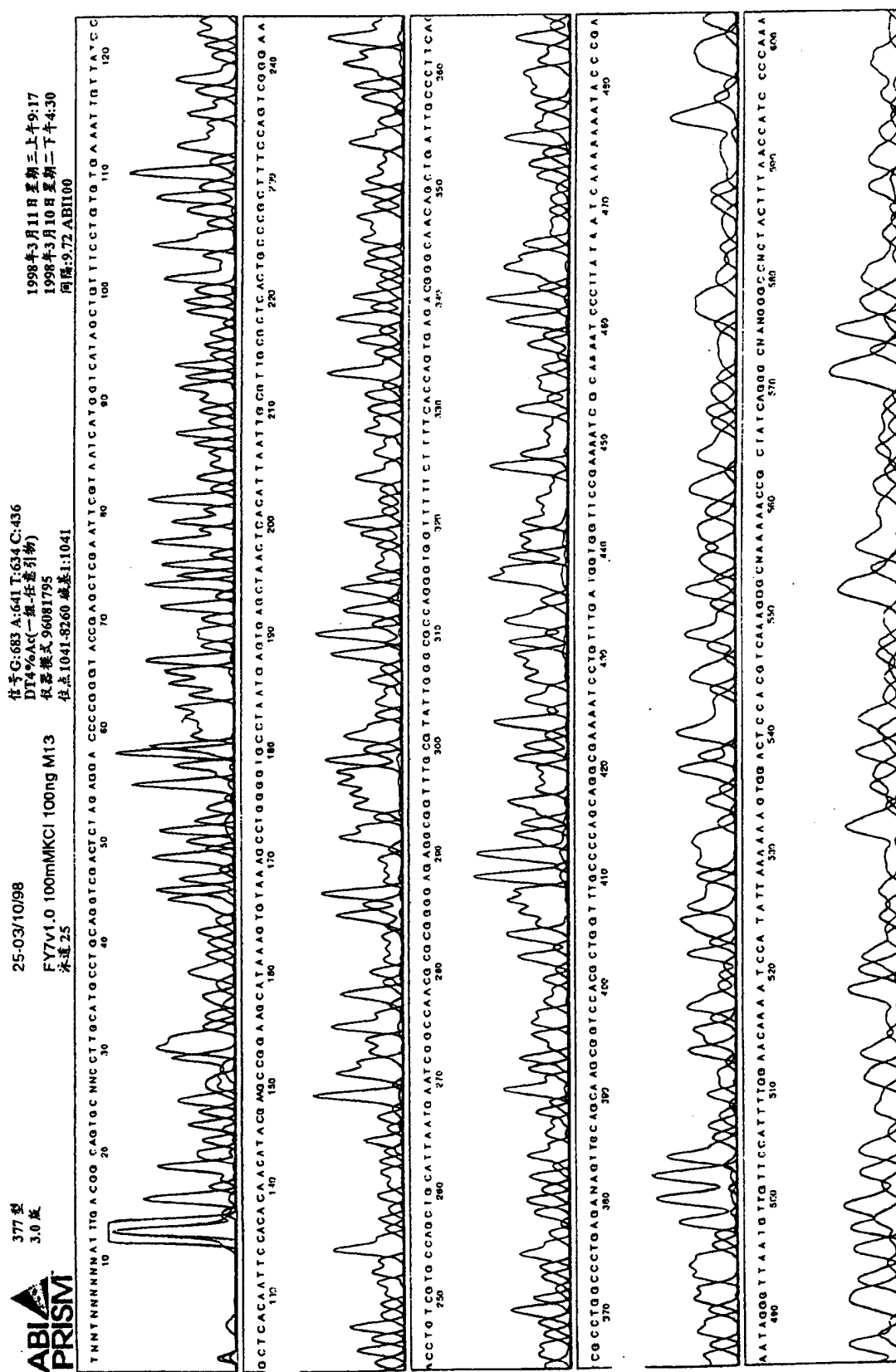


图 5



聚合酶	加工能力 核苷酸数量
热测序酶	4
Amplitag FS	15
FY7	30

图 16

在72℃下使用dITP的聚合酶延伸

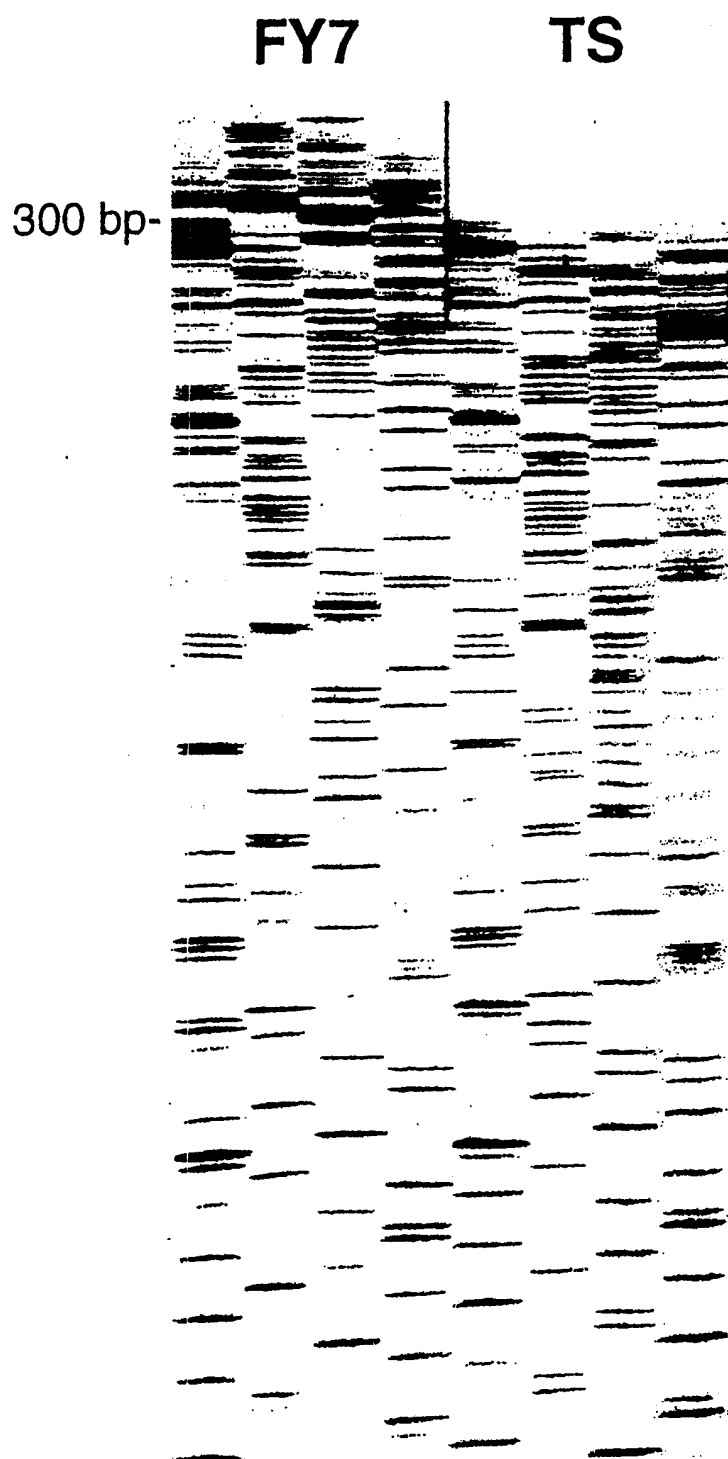


图 17

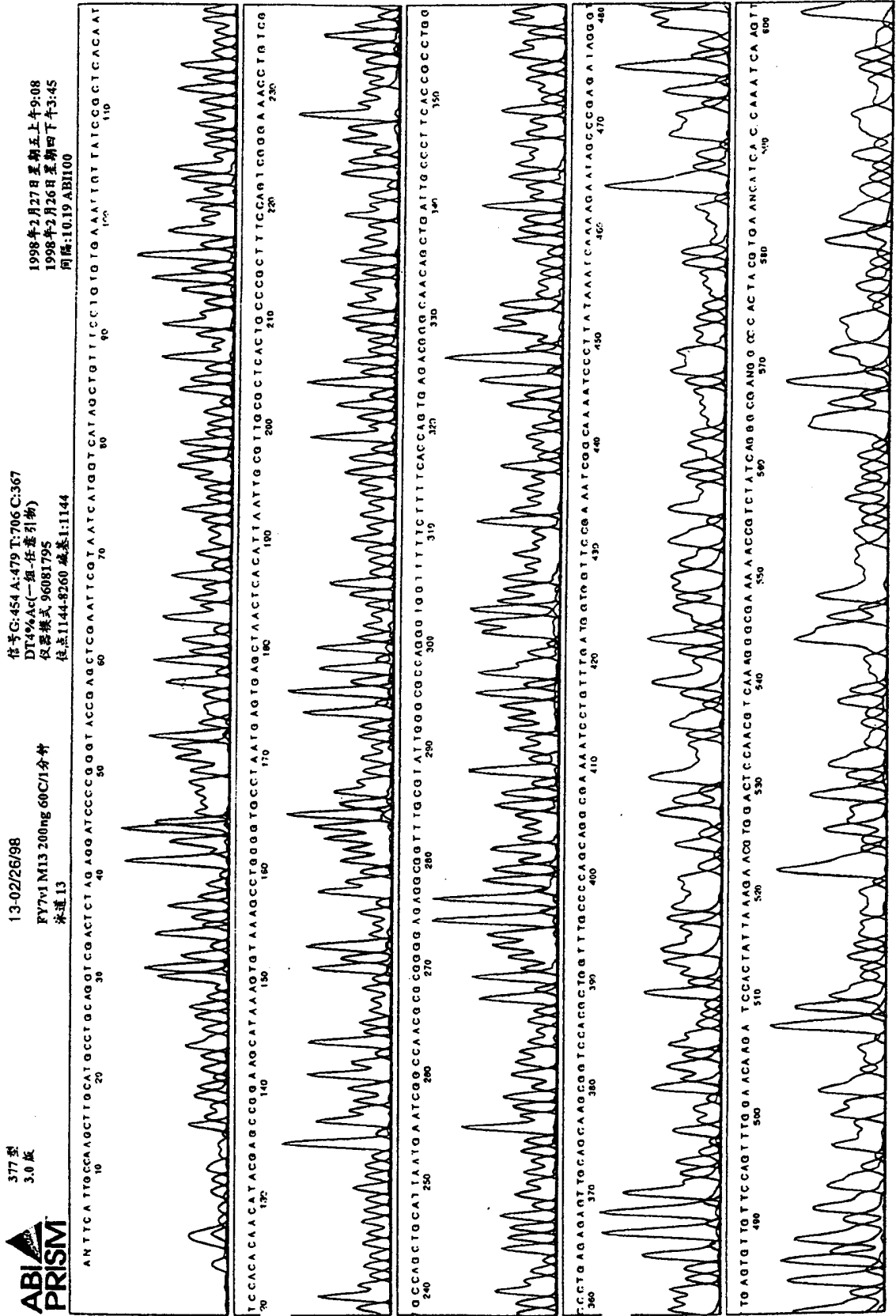


图 25

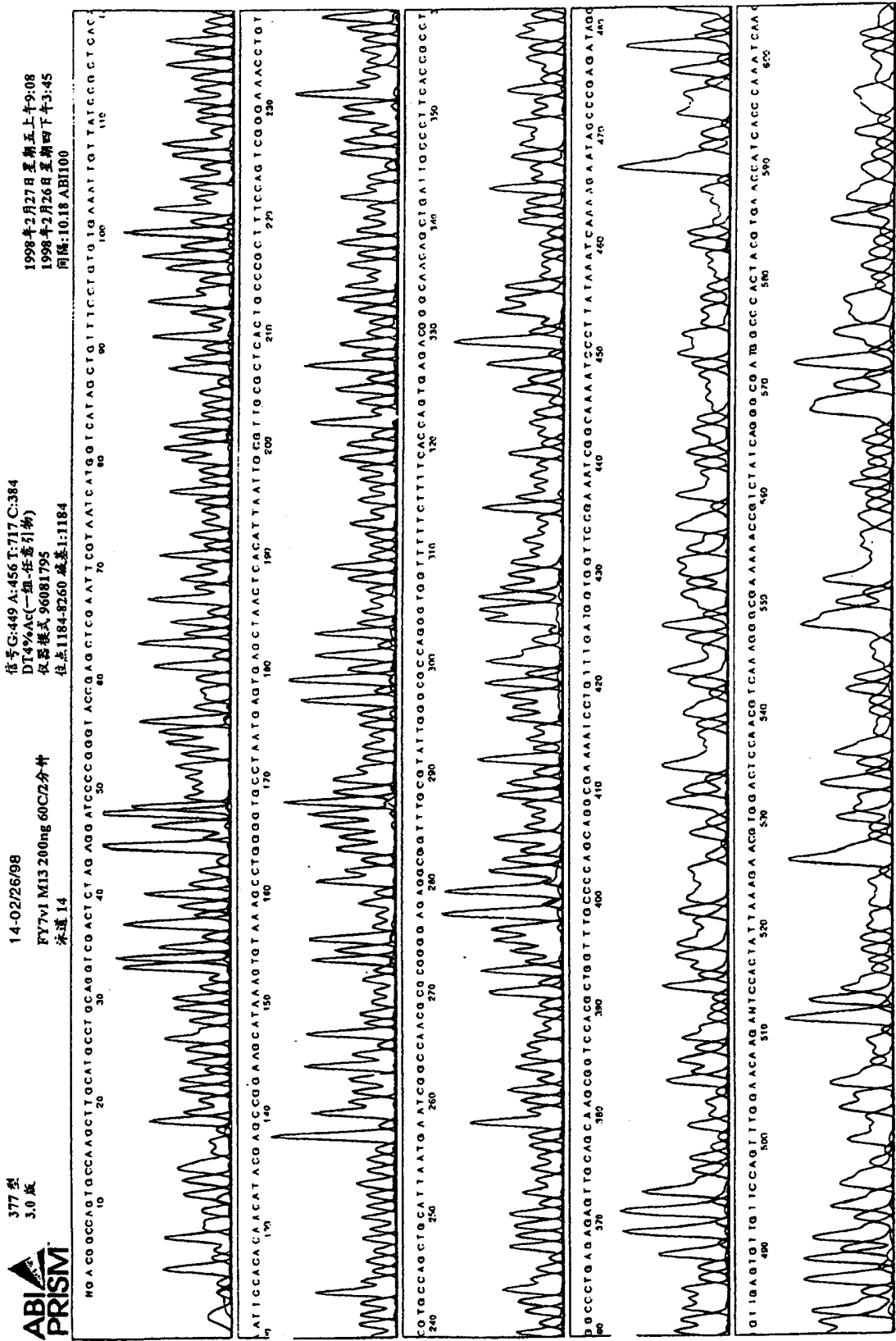


图 26

