

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C12Q 1/68 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02813272.6

[45] 授权公告日 2007 年 5 月 30 日

[11] 授权公告号 CN 1318604C

[22] 申请日 2002.4.22 [21] 申请号 02813272.6

[30] 优先权

[32] 2001.4.30 [33] GB [31] 0110501.4

[86] 国际申请 PCT/GB2002/001861 2002.4.22

[87] 国际公布 WO2002/088387 英 2002.11.7

[85] 进入国家阶段日期 2003.12.30

[73] 专利权人 英国国防部

地址 英国威尔特郡

[72] 发明人 D·R·克拉克 S·P·文森特

[56] 参考文献

EP0763599A 1997.3.19

WO9405797A1 1994.3.17

WO9822615A 1998.5.28

审查员 郭晓勇

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 温宏艳 孟凡宏

权利要求书 2 页 说明书 40 页 附图 12 页

[54] 发明名称

扩增方法

[57] 摘要

一种进行核酸扩增反应的方法。该方法包括：
在足量的焦磷酸盐存在下，形成扩增反应混合物，
以避免引物延伸的发生；采用焦磷酸酶(PPase)消化
该焦磷酸盐；并使该反应混合物处于可进行扩增反
应的条件下。该方法可作为“热启动”扩增应用。
也描述并要求保护用于该方法中特定的新的焦磷酸
酶。

1. 一种进行核酸扩增反应的方法，该方法包括：将进行扩增反应所必须的试剂与足量焦磷酸盐混合，以阻止引物延伸的发生；采用在50℃下没有显著活性的耐热焦磷酸酶消化该焦磷酸盐；并且使该反应混合物处于扩增反应得以进行的条件下。

2. 权利要求1的方法，其中扩增反应是聚合酶链式反应，并且反应混合物含有用于进行该反应的试剂。

3. 一种进行核酸扩增反应的方法，该方法包括：通过混合经聚合酶链式反应进行扩增反应所必须的试剂和足量焦磷酸盐而形成PCR反应混合物以阻止引物延伸，向所述混合物中加入每50μL PCR反应混合物至少0.04单位的耐热焦磷酸酶，并且使所述反应混合物处于当进行扩增反应时所述焦磷酸盐被耐热焦磷酸酶消化的条件下。

4. 权利要求1或3的方法，其中反应混合物含有选自下组的DNA聚合酶：水生栖热菌聚合酶、嗜热栖热菌聚合酶、栖热菌NH聚合酶、*Thermus brockianus*聚合酶、激烈火球菌聚合酶、9°N7外DNA聚合酶、*Thermococcus litoralis* DNA聚合酶。

5. 权利要求1或3的方法，其中焦磷酸盐是碱金属焦磷酸盐。

6. 权利要求5的方法，其中焦磷酸盐是焦磷酸四钠，分子式为 $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 。

7. 权利要求1或3的方法，其中存在于反应混合物中的焦磷酸盐的浓度为0.5mM-10mM。

8. 权利要求7的方法，其中焦磷酸盐以1-10mM的浓度存在。

9. 权利要求1或3的方法，其中耐热焦磷酸酶是嗜酸热硫化叶菌无机焦磷酸酶，*Thermococcus litoralis*无机焦磷酸酶或*Aeropyrum pernix*无机焦磷酸酶。

10. 权利要求1或3的方法，其中耐热焦磷酸酶包含SEQ ID NO. 25的氨基酸序列。

11. 权利要求1或3的方法，其中耐热焦磷酸酶是在反应混合物形成时添加到其中。

12. 权利要求10的方法，包括扩增反应前在50℃-100℃的温度下的温育步骤，以使焦磷酸酶消化存在的无机焦磷酸盐。

13. 权利要求1的方法，其中添加到反应混合物中的焦磷酸酶的

浓度为至少 0.04u/50 μ l PCR 反应混合物。

14. 权利要求 1 或 3 的方法，其中添加到反应混合物中的焦磷酸酶的浓度为 0.08u/50 μ l PCR 反应混合物。

15. 权利要求 3 或 13 的方法，其中添加到反应混合物中的焦磷酸酶的浓度为 0.2-10u/50 μ l PCR 反应混合物。

16. 一种进行扩增反应的试剂盒，该试剂盒包含焦磷酸盐、在 50℃下没有显著活性的耐热焦磷酸酶、以及扩增反应所需的任选一种或多种试剂。

17. 权利要求 16 的试剂盒，进一步包含进行特定目标核酸扩增所必需的一种或多种引物。

18. 权利要求 16 或 17 的试剂盒，进一步包含一种或多种荧光标记的试剂。

19. 权利要求 18 的试剂盒，其中荧光标记的试剂选自下组的一或多个：嵌入染料、荧光标记的探针、荧光标记的引物或荧光标记的核苷酸。

20. 权利要求 16 的试剂盒，其中耐热焦磷酸酶的量足以提供每 50 μ l PCR 反应混合物至少 0.04 单位。

21. 权利要求 16 的试剂盒，其中耐热焦磷酸酶是从 *Aeropyrum pernix* 分离的。

22. 在 50℃下没有显著活性的耐热焦磷酸酶在权利要求 1-15 中的任何一项的进行扩增反应的方法中的用途。

23. 权利要求 22 的用途，其中焦磷酸酶是分离自 *Aeropyrum pernix* 的酶。

24. 权利要求 23 的用途，其中焦磷酸酶是由 SEQ ID NO.26 所示的多核苷酸序列编码的。

25. 权利要求 22 的用途，其中焦磷酸酶包含如 SEQ ID NO.25 所示的氨基酸序列。

扩增方法

本发明涉及进行核酸扩增反应的方法，控制这些反应的方法以及试剂盒和试剂，特别是用以进行反应的酶。

扩增反应，如聚合酶链反应（PCR）已是众所周知，并被广泛地应用在生物技术研究、诊断和检测领域中。

PCR 是根据 DNA 的碱基配对特性和互补 DNA 链的准确复制，产生大量特定核酸序列，特别是 DNA 序列的步骤。典型 PCR 包括三个基本步骤的循环过程。

变性：将含有 PCR 试剂的混合物（包括待复制核酸，可以是 DNA 或 RNA（模板）；各个核苷酸碱基（A、T、G、C）；合适的引物和聚合酶）加热至预定温度，以使靶 DNA 的双链分离。

退火：然后将混合物冷却至另一个预定温度，引物定位于它们在 DNA 链上的互补序列，并与其结合。

延伸：再次将混合物加热至另一个预定温度。聚合酶（作为催化剂）将各个核苷酸碱基加入到引物的末端，以形成与靶 DNA 的序列互补的 DNA 新链，双链彼此结合。

这些反应依赖于以非常精确的次序发生的步骤的顺序，以及操作这些步骤所需的精确温度。当在不同温度下将试剂混合即使很短时间，例如在反应开始前，也会产生一个问题。引物可能与核酸模板相互作用，引起模板引物延伸。这样会导致预期产物的总产量下降及非特异性产物的产生。

克服该难题的多种不同方法以前已经被提出过。例如，最初尝试采用蜡屏障使试管中多种不同的 PCR 试剂彼此分离，以克服该难题（见例如 USP5,565,339）。当反应混合物加热至初始变性温度时，蜡融化，使得试剂尽可能晚地混合，而使副反应的可能性减到最小。这种反应被认为是“热启动”反应。

其它实现抑制副反应的化学方法已经被尝试过。例如，美国专利 No. 5,677,152 描述的方法中，DNA 聚合酶被化学修饰，以确保其仅在高温时具有活性。然而，为实现这一方法，需要在高温温育反应混合物一段时间，以产生活性酶。这种迟滞，在一些情况中有时不显著，

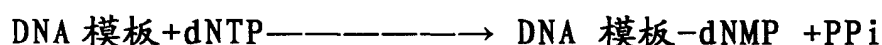
但在快速要求 PCR 结果的情况下可能是不利的。对 PCR 技术的许多应用而言，在尽可能短的时间内完成循环顺序是理想的。例如，特别是当人类消耗的空气、液体或食物和动物贮存物被怀疑污染的时候，快速诊断方法即使不能挽救健康也可以节省可观的金钱，甚至可以挽救生命。

其它方法中，水生嗜热杆菌（Taq）DNA 聚合酶的单克隆抗体，如 Sigma 提供的抗 Taq DNA 聚合酶抗体，被引入反应混合物中。抗体结合到酶上，以使其在室温失活。然而，在扩增循环期间采用的高温使抗体变性，并从酶上解离，酶从而具有活性。不过在一些情况中，该方法似乎不能除去非特异副产物。

在 PCR 反应期间，模板的引物延伸可以被表示为：



DNA 聚合酶



dNTP 是脱氧核糖核酸三磷酸，dNMP 是相应的脱氧核糖核酸单磷酸，PPi 是无机焦磷酸盐。该反应也可表示为：



已知 PPi 水平的增加可使上述反应逆向进行，例如在 DNA 测序反应中。这被认为是焦磷酸解作用，并且在 70℃ 采用耐热 DNA 聚合酶进行的 DNA 测序中，该作用是公认的难题。通过将耐热 PPase 添加到用于 DNA 测序中的 DNA 聚合酶配方中，可克服这一难题。

申请人发现该反应可形成优势扩增反应的基础，在该优势扩增反应中，非特异产物的产量可被减到最小。

本发明提供了一种进行核酸扩增反应的方法，该方法包括：在足量焦磷酸盐存在下，形成扩增反应混合物，以避免引物延伸的发生；酶消化该焦磷酸盐；并使该反应混合物处于可进行扩增反应的条件。

采用本发明的方法，可进行精确扩增反应，该反应可快速进行，并且具有良好的特异。因此这是现有“热启动”扩增技术的一个好的可选方案。

用于发明方法中的初始扩增反应混合物总的来说是常规混合物，如用于 PCR 反应中，添加了焦磷酸盐的混合物。因此该混合物通常包括：

i) 含有或怀疑含有靶核酸序列的样品; ii) 至少一个杂交于该靶序列末端区域的引物; iii) 镁离子源; iv) 构成靶序列的核苷酸或核苷碱基(即 DNA 扩增情况中的 A, T, C, G 和/或 U, 或 RNA 扩增情况中的 A, U, C 和 G), 及 v) 在实现扩增反应的温度下耐热的 DNA 聚合酶。根据实现反应的需要, 如本领域所知, 该混合物也可包括缓冲液。

特别的, 对 DNA 扩增而言, (iv) 可包括核苷酸 A, T, G 和 C; 对 RNA 扩增而言, 可包括核苷 A, U, C 和 G。

然而, 在进行其它基于引物的扩增反应, 如逆转录酶 PCR(RT-PCR) 时, 可以利用其它组合。

另外, 试剂可以包括标记的探针或引物, 和/或其它标记方式, 诸如 Sybr Green、Sybr Gold、溴化乙锭等嵌入染料, 或这些染料的组合, 使得应用可被监测, 无须随后检测凝胶上的产物。这些标记方式的性质取决于进行的鉴定类型。一般的嵌入剂方法采用嵌入染料监测扩增过程中双链 DNA 中的增加情况。这些仅是准链特异性, 所以在要求检测链特异性时需要其它标记。

链特异性方法利用另外的核酸反应组分监测扩增反应的进展。这些方法经常以荧光能转移(FET)作为检测的基础。一个或多个核酸探针由荧光分子标记, 其中一个荧光分子可作为能量供体, 另一个荧光分子则是能量受体分子。有时这些分子被认为分别是报道分子和淬灭分子。供体分子由位于其激发光谱内的特定波长的光激发, 并随后在其荧光发射波长内发光。通过多种距离依赖性能量转移机制, 受体分子接受来自供体分子的能量, 从而也在该波长被激发。可发生的荧光能量转移的特定实例是荧光共振能量转移或“FRET”。通常, 当受体分子与供体分子极为接近(如, 位于同一分子, 或邻近分子)时, 受体分子接受供体分子的发射能。荧光能量转移检测的基础是监测供体和受体发射波长的改变。

有两种常用的 FET 或 FRET 探针类型, 一类利用核酸探针的水解作用使供体与受体分离, 另一类利用杂交作用改变供体与受体分子的空间关系。

水解探针是商业上可获得的, 如 TaqMan™ 探针。这类探针由供体和受体分子标记的 DNA 寡聚核苷酸组成。探针被设计为结合到 PCR 产物的一条链上的特定区域。

在 PCR 引物退火到该链上后, Taq 酶通过 5'到 3'的聚合酶活性延伸 DNA。Taq 酶也抑制 5'到 3'的核酸外切酶活性。在 3'末端, 磷酸化作用保护 TaqMan™ 探针, 使其不能引发 Taq 延伸。如果 TaqMan™ 探针被杂交到产物链, 延伸的 Taq 分子也可水解探针, 从受体释放出供体作为检测的基础。该情况中的信号是累积的, 游离供体和受体分子的浓度随着扩增反应的每一个循环而增加。

美国专利 No. 5, 491, 063 描述了一种荧光标记探针的溶液内猝灭的方法, 该方法依赖于通过 DNA 结合剂对来自标记的单链寡核苷酸的信号进行的修饰。聚合酶链反应期间, 探针裂解(水解作用)后, 由于探针的链长度减少引起的该信号的差异被认为提供了一种检测靶核酸是否存在的方法。

杂交探针有许多形式可利用。分子信标是具有互补的 5'和 3'序列, 并因此形成发夹环的寡聚核苷酸。当发夹环结构形成时, 末端荧光标记是处于极为接近便于发生 FRET 的位置。分子信标杂交到互补序列后, 荧光标记便被分离了, 所以 FRET 不会发生, 并且这形成了检测基础。

也可采用成对的标记寡聚核苷酸。它们在 PCR 产物链上极为接近的位置上杂交, 使供体和受体分子结合, 以使 FRET 可以发生。增强的 FRET 是检测的基础。这种类型的变体包括采用具有单一邻近探针的标记扩增引物。

美国专利 No. 4, 868, 103 概括地描述了检测分析物是否存在的 FRET 体系, 该体系利用嵌入染料作为供体分子。该方法不包括扩增期。

利用 FET 或 FRET 检测的分析的其它实例有, WO 99/28500 描述了利用嵌入染料和单一标记探针的组合作为信号传递体系, WO 99/28501 描述了利用标记引物和酶的组合以产生可检测的荧光信号, WO 99/42611 描述了利用嵌入染料与荧光标记的核苷酸的组合作为信号基础。然而作为补充, 例如在 WO 99/66071 中描述的进一步分析是利用包括标记和化学阻滞剂的复合引物。

用于本发明方法中的反应混合物可以包括任何进行上述分析进行所必需的标记试剂。这种反应混合物尤其可以有利地被应用在基因型分析中, 并且更为特别的是应用在 SNP 评估中。这些情况中, 本发明的方法与双 TaqMan™ 探针联合使用, 一个探针特异于基础序列, 另一

个探针则特异于突变体。每一个探针优选地含有不同的荧光团，因此依赖于存在基因的不同形式的数量便产生了不同的信号。单一信号产生自纯合体，混合的信号产生自杂合体。

本发明范围内可用的合适 DNA 聚合酶的实例是耐热聚合酶，如水生栖热菌聚合酶 (Taq)、嗜热栖热菌聚合酶 (Tth)、栖热菌 NH 聚合酶 (TspNH)、*Thermus brockianus* 聚合酶 (Tbr) (以上均可获得自例如 GeneSys Limited, Farnborough, U.K.)、激烈火球菌聚合酶 (Pfu) (可获得自 Stratagene)、9°N7 外 DNA 聚合酶、*Thermococcus litoralis* DNA 聚合酶 (可获得自 New England Biolabs, 为 VENT™ DNA 聚合酶)。

用于本发明方法中的焦磷酸盐可以是任何可溶性焦磷酸盐，包括可溶性金属和非金属 (如铵盐)。这种化合物通常被认为是“无机焦磷酸盐”或 PPI，本申请采用该术语。特别地，焦磷酸盐可为碱金属焦磷酸盐，如焦磷酸钠或焦磷酸钾，包括焦磷酸二钠 ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$)、无水焦磷酸四钠 ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$)、十水合焦磷酸四钠 ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) 和焦磷酸四钾 (无水)。其它可应用的可溶性焦磷酸盐包括焦磷酸铁，如焦磷酸铁 ($\text{Fe}_4(\text{P}_2\text{O}_7)_3$)，可溶性铵盐如无水焦磷酸三丁铵。其它可溶性焦磷酸盐可通过商业渠道获得。

优选的无机焦磷酸盐是焦磷酸四钠，分子式为 $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 。

反应混合物应用的焦磷酸盐的浓度应该足以阻止引物延伸的发生。这在很大程度上取决于扩增序列的特性和浓度，采用的引物和聚合酶及其浓度，并其任何特定情况下都可通过常规方法测定。

最初形成的反应混合物合适地含有至少 0.5mM 浓度的焦磷酸盐，合适的是至少 1mM，例如 1-10mM，优选的是 1-5mM。

无机焦磷酸盐的酶消化作用是在扩增反应的第一个阶段期间或之前立即合适地进行。该作用可通过在扩增反应开始之前立即添加焦磷酸酶 (Ppase) (可被认为是无机焦磷酸酶-PPIase) 实现。

然而，酶消化作用优选的是采用在高温下，如超过 50℃ 仍具有活性的耐热焦磷酸酶实现的。优选的酶仅在这些高温下具有有效活性。这意味着在形成反应混合物时，焦磷酸酶可以被包括其中，但是它在常温则不能或不能有效地消化抑制性焦磷酸盐。仅当反应混合物在必要时被加热时，如在 PCR 反应的起始变性阶段，焦磷酸酶才具有适当

的活性。不过可以在高温下进行短暂的初步温育，如 50-100℃，及优选的是 80-95℃。

耐热焦磷酸酶的实例包括可获得自 GeneSys Limited, Farnborough UK. 的嗜酸热硫化叶菌焦磷酸酶 (Sac PPase-Meyer et al., *Achieves of Biochem. and Biophys.* (1995) 319,1,149-156), 或可获得自 New England Biolabs (目录号 #M0296S 和 #M0296L) 的 *Thermococcus litoralis* 焦磷酸酶。优选的耐热焦磷酸酶是可获得自 Genesys Limited, Farnborough UK 的 *Aeropyrum pernix* 无机焦磷酸酶。

第一种严格需氧的高度嗜热的古生菌, *Aeropyrum pernix* K1, 是 1993 年在 Kodakara-Jima Island, Japan, 从海岸硫化热喷泉中分离而来 (Sako et al., *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46 (1996): 1070-1077)。保藏于日本微生物保藏中心, JCM 9820。

申请人首次从 *Aeropyrum pernix* 中分离出耐热焦磷酸酶, 并且这构成本发明的另一方面。包括该焦磷酸酶的基因组序列, 如 SEQ ID NO. 1 所示, 相应的氨基酸序列, 如 SEQ ID NO. 2 所示 (下文图 11)。发明的酶特别具有如 SEQ ID NO 25 所示的氨基酸序列, 该序列被图 11 中黑体显示的 SEQ ID NO 1 区域编码, 也如 SEQ ID NO 26 所示。

因此, 本发明包括含有 SEQ ID NO 26 的多核苷酸和其变体或片段。例如, 发明提供了 SEQ ID NO 1 的多核苷酸。

本发明进一步包括含有 SEQ ID NO 25 的氨基酸序列和其变体或片段。例如, 该氨基酸序列可包含 SEQ ID NO 2。

此处所用与多核苷酸序列相关的术语“其片段”指具有与完整多核苷酸序列相同活性的已知多核苷酸序列的任何部分。片段合适地包含至少 300 个, 优选地包含至少 450 个来自基础序列的连续碱基。

与多核苷酸序列相关的术语“其变体”指任何在多核苷酸上发生的一个或多个核酸的取代、变异、修饰、置换、缺失、或添加, 提供了多核苷酸编码的相应蛋白质序列, 该序列显示了与基础序列编码的蛋白质相同的特性。因此该术语包括等位变体, 也包括与本发明多核苷酸序列基本杂交的多核苷酸。优选的这种杂交作用发生在低和高严格性条件下或之间。概括地, 低严格性条件可定义为 3×SSC 在约室温到约 55℃, 高严格性条件为 0.1×SSC 在约 65℃。SSC 是 0.15M NaCl,

0.015M 柠檬酸三钠缓冲液的名称。3×SSC 是 SSC 的三倍强度等等。

典型的变体具有 62%或更多的核苷酸与本发明的多核苷酸序列相同，更典型的是 65%，优选的是 70%，甚至更为优选的是 80%或 85%，特别优选的是 90%，95%，98%或 99%或更高的同一性。

为测定同一性程度，比较核酸序列时，可采用诸如 BESTFIT 和 GAP 程序（均来自 Wisconsin Genetics Computer Group (GCG) 软件包）。例如 BESTFIT 比较两种序列，并生成最相似区段的最佳比对。GAP 可使序列沿其全长比对，并通过在任一适当序列中插入间隔，从而找到最佳比对。合适地，在本发明范围内，当讨论核酸序列同一性时，是通过沿其全长排列序列进行比较的。

此处所用与氨基酸序列相关的术语“其片段”指具有与完整氨基酸序列相同活性的已知氨基酸序列的任意部分。片段合适地包含至少 100 个，优选地包含至少 150 个来自基础序列的连续氨基酸。

此处所用与氨基酸序列相关的术语“其变体”指与其来源的基础序列不同，即基础序列中有一个或多个氨基酸被其它氨基酸所取代而得到的氨基酸序列。氨基酸取代作用可被认为是“保守的”，即氨基酸被具有广泛相似特性的不同氨基酸所置换。非保守取代作用是指氨基酸被不同类型氨基酸所置换。一般地说，不改变多肽的生物学活性的更少非保守取代是可能的。合适的变体与基础序列有至少 60%，优选至少 75%，更为优选至少 90%的同一性。

在该情况中的同源性是可以被判定的，例如运用 Lipman-Pearson 算法，设置 Ktuple: 2, 空位罚分: 4, 空位长度罚分: 12, 标准 PAM 评分矩阵 (Lipman, D. J. and Pearson, W. R., Rapid and Sensitive Protein Similarity Searches, Science, 1985, vol. 227, 1435-1441)。

优选的本发明的多核苷酸包含 SEQ ID NO 26 和与其相比具有超过 62%同一性的序列。

这些酶可从天然来源获得，或可采用常规方法于重组宿主细胞，如大肠杆菌细胞中表达。

除去焦磷酸盐，如于 $>50^{\circ}\text{C}$ ，通过耐热焦磷酸酶 (PPase) 作用，然后如常规进行引物延伸（并因此扩增）。该过程中，1 摩尔的焦磷酸盐转变为 2 摩尔不干扰扩增反应的无机磷酸盐 (Pi)。

所包含焦磷酸酶的量应当足以消化反应混合物中存在的过量焦磷

酸盐。一般而言，这个量应大于常规用于相同循环反应中那些酶的量，以阻止焦磷酸解作用的发生，例如大约 5 倍多。准确的量取决于多种不同因素，包括采用的特定酶，焦磷酸盐的浓度等。扩增反应混合物中包括的 PPase 和特定耐热 PPase 的典型浓度为至少 0.04 个单位/50 μ L PCR 反应混合物，优选至少含有 0.08 个单位/50 μ L PCR 反应混合物，更为优选的是含有 0.2-10 个单位/50 μ L PCR 反应混合物。该情况中，一个单位被定义为 1 分钟内，75 $^{\circ}$ C 和下列反应条件下：1mM $K_4P_2O_7$ ，2mM $MgCl_2$ ，50mM Tris-HCl，pH9.0 (25 $^{\circ}$ C)，催化 1 μ mol 焦磷酸盐转化为 2 μ mol 正磷酸盐所需要的酶的量。

本发明方法中的酶可迅速除去无机焦磷酸盐，这取决于采用的温度。通常可在少于 5 分钟的时间内实现完全除去，更为通常的是在少于 2 分钟的时间内，如果需要可少至 15 秒。

一旦从反应混合物中酶促除去了无机焦磷酸盐，便可进行扩增反应，例如采用常规热循环程序。

本发明方法借以达到预期结果的机制尚不清楚。可能是过量焦磷酸盐的存在抑制了引物延伸反应。不过，似乎没有显著降低 PCR 灵敏度或产量。

本发明方法可在任何常规设备中进行以进行应用反应。这些设备包括 Perkin-Elmer Corporation 提供的常规封闭加热设备如 EP-A-0810030，或 Idaho Technologies Inc. 提供的快速热空气热循环仪如 RapidCyclerTM 和 LightCyclerTM，或如 W098/24548 中描述的其它类型的热循环仪。

根据另一方面，本发明提供了一种进行扩增反应的试剂盒。该试剂盒包含无机焦磷酸盐、无机焦磷酸酶，及扩增反应所需任选的一种或多种试剂。如上所述，无机焦磷酸盐合适地足量存在，以抑制扩增反应。试剂盒中存在的无机焦磷酸酶优选的量足以消化所有该无机焦磷酸盐。

一种或多种试剂包括上文所列 (ii) - (v) 试剂中的任意一种，并且也可包括缓冲液。无机焦磷酸酶的特定实例是上述的耐热无机焦磷酸酶。

特别的，试剂盒可以合适地包含一种任选的附加试剂，一种或多种进行扩增特定靶 DNA 序列所需的引物，例如一种诊断特定疾病条件或

样品中特定病原体是否存在的序列。该方法也可被用于检测遗传分析中的多态性或等位变异。

此外,试剂盒可以包含一个或多个标记试剂,如嵌入染料,或荧光标记的探针、引物或核苷酸,这些试剂将有助于原位检测或监测扩增反应。

另一方面中,本发明提供了上述无机焦磷酸盐在进行上述扩增反应的方法中的用途。优选的无机焦磷酸酶是来自 *Aeropyrum pernix*。

最后,在另一方面中,本发明提供了上述无机焦磷酸酶在进行上述扩增反应的方法中的用途。

现在,将通过附有简图的实施例特别详细地描述本发明。

图 1 显示的是在不同量的 PPi 存在下进行 PCR 的结果,其中 PPi 为焦磷酸三钠;

图 2 显示的是在 3mM PPi 缺乏或存在情况下增加 MgCl₂ 的效果;

图 3 显示的是采用本发明方法和常规 PCR 反应获得的结果;

图 4 显示的是在分析中采用本发明方法,并与常规 PCR 比较所获得的结果;

图 5 显示的是测试本发明方法所用 PCR 反应混合物的储存稳定性的实验结果,并与常规混合物的结果进行比较;

图 6 显示的是在本发明方法中采用不同 PPase 所获得的结果;

图 7a 和 7b 及图 8a 和 8b 显示的是采用本发明方法和多种不同 DNA 聚合酶进行 PCR 实验所获得的结果;

图 9 显示的是比较本发明方法与常规“热启动”PCR 的实验结果;

图 10 显示的是进行类似试验,但采用可选的常规 PCR 所获得的结果;

图 11 显示的是如 SEQ ID NO.1 所示的 *Aeropyrum pernix* 的基因组序列(参考 GenBank BA000002 中的 NC 000854)、相应的氨基酸序列 SEQ ID NO.2 和酶的序列(SEQ ID NO 25);

图 12 显示的是不同 PPase 序列(SEQ ID NOS 2-9)的比对,包括如 SEQ ID NO.2 所示的 *Aeropyrum pernix* 的蛋白质序列;

图 13 显示的是从 *Aeropyrum pernix* 分离焦磷酸酶期间产生的 686 个碱基对的 PCR 产物(SEQ ID NO 10);

图 14 显示的是从 *Aeropyrum pernix* 分离焦磷酸酶所用的多接头

序列 (SEQ ID NO 11) ;

图 15 显示的是从 *Aeropyrum pernix* 分离焦磷酸酶所用的 pTTQ18NHK 载体的序列 (SEQ ID NO 12) ;

图 16 显示的是 pTTQ18NHK 载体的序列 (Z=终止), 包括从 *Aeropyrum pernix* 分离焦磷酸酶所用的 PPase 序列 (SEQ ID NO 13) ; 及

图 17 显示的是本发明方法采用来自 *Aeropyrum pernix* 的无机焦磷酸酶所获得的结果。

实施例 1

PPi 对 PCR 的影响

在不同量的无机焦磷酸盐, 十水合焦磷酸四钠 (PPi) 存在下采用 Taq DNA 聚合酶及下列试剂, 进行标准 500bp λ 模板 PCR。

试剂	体积	终浓度
10 $\times$ 反应缓冲液	5 μ l	1x
25mM MgCl ₂	3 μ l	1.5mM
5mM dNTPs	2 μ l	200 μ M
5'引物 (10pm/ μ l)	5 μ l	1 μ M
3'引物 (10pm/ μ l)	5 μ l	1 μ M
模板	1ng	λ DNA
DNA 聚合酶 (5u/ μ l)	0.25	1.25u
加水至总体积	50.0 μ l	

λ 500bp 引物序列

5'引物 GAT GAG TTC GTG TCC GTA CAA CTG G (SEQ ID NO 14)

3'引物 GGT TAT CGA AAT CAG CCA CAG CGC C (SEQ ID NO 15)

1 $\times$ 反应缓冲液: 10mM Tris. pH8.0, 50mM KCl.

用于试验的 PCR 条件如下:

i) 94 $^{\circ}$ C 3.00 分钟

ii) 20 个循环的: 94 $^{\circ}$ C 10 秒

50 $^{\circ}$ C 10 秒

72 $^{\circ}$ C 30 秒

iii) 72 $^{\circ}$ C 7 分钟

iv) 25℃ 保持

添加 PPi 使其在反应混合物中的最终浓度为 0、1、2、3、4 和 5mM。结果如图 1 所示。该图中，泳道与 PPi 的下列浓度对应。

泳道

1 + 2	0 PPi
3 + 4	1mM PPi
5 + 6	2mM PPi
7 + 8	3mM PPi
9 + 10	4mM PPi
11	5mM PPi

在所有测试的 PPi 水平上，均没有产生 PCR 产物。

实施例 2

增加镁离子浓度的影响

Mg 结合 PPi，因此实施例 1 的观测结果有可能是由于 Mg 被过量的 PPi 螯合而产生。这导致存在的 Mg 不足以使引物延伸得以进行。为消除这种可能性，在不同浓度镁离子存在下重复进行采用 3mM PPi 的实施例 1 的步骤。

结果如图 2 所示。该图中，泳道代表下列反应：

泳道

1 + 2	1.5mM MgCl ₂
3 + 4	5mM MgCl ₂
5 + 6	7.5mM MgCl ₂
7 + 8	10mM MgCl ₂
9 + 10	1.5mM MgCl ₂ + 3mM PPi
11 + 12	5mM MgCl ₂ + 3mM PPi
13 + 14	7.5mM MgCl ₂ + 3mM PPi
15	10mM MgCl ₂ + 3mM PPi

结果显示添加 Mg⁺⁺ 高达 10mM 最终浓度 (1.5mM 是 PCR 中的标准)，也不能使 PCR 发生，这表明是 PPi 阻滞了引物延伸。

实施例 3

在 PPi 和 PPase 存在下的 PCR 反应

重复实施例 1 的 500bp λ PCR, 不过这次在含焦磷酸盐 (PPi) 的反应中包括了 0.2u 的嗜酸热硫化叶菌 PPase (Sac PPase)。在 0.2u 的 Sac PPase 存在下, 于 95℃温育反应 5 分钟, 足以破坏焦磷酸盐, 使 PCR 反应得以进行。

结果如图 3 所示, 其中泳道代表下列反应:

泳道

上排	
1 + 2	1mM PPi + 0.2u PPase
3 + 4	2mM PPi + 0.2u PPase
5 + 6	3mM PPi + 0.2u PPase
7 + 8	4mM PPi + 0.2u PPase
9 + 10	5mM PPi + 0.2u PPase

下排	
1 + 2	1mM PPi
3 + 4	2mM PPi
5 + 6	3mM PPi
7 + 8	4mM PPi
9 + 10	5mM PPi
11 + 12	0mM PPi

当与没有 PPi 和 PPase 二者参与的反应相比时, 产生了 PCR 产物的可比较水平。

采用小于 1mM 的 PPi 浓度重复该实施例。结果(未示出)表明 0.4mM 的 PPi 不能完全抑制 PCR, 但在 PPi 浓度为 0.6mM 时, PCR 不能发生。

实施例 4

PCR 试验

将本发明方法应用到需要“热启动”反应的试验体系, 以产生正确大小的 PCR 产物。

试验基于人类血管紧张素基因的 321bp 片段的扩增。该试验被认为仅在甜菜碱存在情况下可产生正确扩增产物(EP-A-0962526-具体见实施例 8)。

无甜菜碱存在时, 热启动 DNA 聚合酶产生很少或根本不产生非特异性扩增产物, 反之, 非热启动 DNA 聚合酶 PCR 可产生大量非特异性

扩增产物。

血管紧张素试验所用的 PCR 条件可概括如下：

试剂	体积	最终浓度
10×反应缓冲液	5 μ l	1×
25mM MgCl_2	3 μ l	1.5Mm
5mM dNTPs	2 μ l	200 μ M
5'引物 (100 μ m)	0.25	0.5/ μ M
3'引物 (100 μ m)	0.25	0.5/ μ M
模板 100ng/ μ l	50ng	人类 xsoma1 DNA
5M 甜菜碱	10.0	1M
DNA 聚合酶 (5u/ μ l)	0.25	1.25u
加水至总体积	50.0 μ l	

血管紧张素引物序列

5'引物 GCA ACG CCC CTC ACT ATA AA (SEQ ID NO 16)

3'引物 GCA CCC CGC CCT TGA AGT CC (SEQ ID NO 17)

1×反应缓冲液：10mM Tris. pH8.0, 50mM KCl。

用于试验的 PCR 条件如下：

i) 95℃ 2 分钟或少于 2 分钟

ii) 35 个循环的 95℃ 15 秒

50℃ 30 秒

72℃ 30 秒

iii) 72℃ 7 分钟

iv) 25℃ 保持

采用 PE9700 仪器，在实施例 3 所述 3mM PPI 和 0.2u PPase 的存在情况下进行反应。

结果如图 4 所示，其中泳道代表下列反应。

泳道

1 标准 Taq 聚合酶 PCR—无甜菜碱—许多错误引发

2 标准 Taq 聚合酶 PCR—有甜菜碱—亮条带是正确产物—有一些错误引发

3 标准 Taq 聚合酶 PCR—无甜菜碱, 但有 3mM PPi 和 0.2u Sac PPase—无错误引发--95℃下 5 分钟变性

4 标准 Taq 聚合酶 PCR—有甜菜碱, 还有 3mM PPi 和 0.2u Sac PPase—仅有正确产物--95℃下 5 分钟变性

5+6 按照 3 的反应, 但在 95℃下仅 2 分钟变性

7+8 按照 4 的反应, 但在 95℃下仅 2 分钟变性

很明显, 采用本发明方法可实现有效的“热启动”反应。在甜菜碱存在情况下, 采用 PPi 和 Sac PPase 可获得纯的单一产物。另外, 未发现错误引发, 甚至在甜菜碱不存在的情况下, 也未发现错误引发。

实施例 5

室温储存的影响

研究在进行血管紧张素试验前, 将含 0.2u Sac PPase 和 3mM PPi 的 PCR 混合物置于室温 20℃, 持续不同时间段的影响。尽管 Sac PPase 是耐热酶, 但仍然可能在室温下具有低水平的酶活性。这可能导致反应中抑制/终止 DNA 聚合酶的 PPi 的量不足, 从而引起引物延伸, 并缺乏“热启动”功能性。

重复实施例 4 的方法, 但是在进行试验前将反应混合物储存于室温, 持续不同时间段最长达 2 小时。

结果如图 5 所示, 其中:

上排—显示的是室温下温育试剂所示的时间后, 进行血管紧张素的常规 Taq 聚合酶 PCR 的结果 (有或无甜菜碱存在); 及

下排—显示的是根据本发明方法的相似的一组试验, 在所有情况下, 每 50μl PCR 试验混合物中含有 3mM PPi 和 0.2 u PPase。

泳道	甜菜碱的存在	22℃持续时间段 (室温)
1 + 2	-	0
3 + 4	+	0
5 + 6	-	30 mins
7 + 8	+	30 mins
9 + 10	-	60 mins
11 + 12	+	60 mins
13 + 14	-	120 mins
15 + 16	+	120 mins

甚至在 2 小时以后, 根据本发明的试验仍然如预想进行, 表明室温下, Sac PPase 对 PPi 的消化是不充分的。

图 5 显示的结果表明如果采用 PPi 和 Sac PPase, 在 PCR 前将 PCR 混合物室温温育 2 小时对特异性没有影响。

实施例 6

其它耐热 PPase 在本发明方法中的用途

重复实施例 4 的试验, 同时进行相似反应, 采用不同的商业可获得耐热 PPase (具有不同单位定义的活性) 取代 Sac PPase。结果如图 6 所示, 其中泳道代表下列反应:

泳道

1+2 标准 Taq 聚合酶 PCR-无甜菜碱

3+4 标准 Taq 聚合酶 PCR-有甜菜碱

5+6 标准 Taq 聚合酶 PCR-无甜菜碱, 但有 3mM PPi 和 0.2u Sac PPase

7+8 标准 Taq 聚合酶 PCR-有甜菜碱, 及 3mM PPi 和 0.2u Sac PPase

9+10 标准 Taq 聚合酶 PCR-无甜菜碱, 但有 3mM PPi 和 10u**Thermococcus litoralis* PPase

11+12 标准 Taq 聚合酶 PCR-有甜菜碱, 及 3mM PPi 和 10u**Thermococcus litoralis* PPase

*该情况采用的单位由生产商提供, 定义为: 于标准反应条件下 (50mM Tricine[pH8.5]、1mM MgCl₂、0.32mM PPi、0.5ml 反应体积中, 75℃反应 10 分钟), 每分钟可产生 40 nmol 磷酸盐的酶的量。

该试验中 *Thermococcus litoralis* PPase (获得自 New England Biolabs) 似乎具有与 Sac PPase 相同的效果。

实施例 7

不同耐热 DNA 聚合酶在发明方法中的用途

在本发明方法和一些比较试验中, 应用了多种耐热 DNA 聚合酶。这些酶包括一些未校正的栖热菌 DNA 聚合酶、校正的超耐高度嗜热的古生菌 DNA 聚合酶, 及未校正和校正的 DNA 聚合酶的混合物。

采用如实施例 1 所述的 500bp λ PCR 测试所有酶 (图 7a 和 7b), 个别采用实施例 4 所述血管紧张素试验进行测试 (图 8a 和 8b)。

具体试验条件概括如下:

图 7a—栖热 DNA 聚合酶

泳道

上排

1+2 Taq 聚合酶 0mM PPI, 无 PPase
 3+4 Taq 聚合酶 3mM PPI, 无 PPase
 5+6 Taq 聚合酶 3mM PPI, 0.2u Sac PPase
 7+8 Tbr 聚合酶 0mM PPI, 无 PPase
 9+10 Tbr 聚合酶 3mM PPI, 无 PPase
 11+12 Tbr 聚合酶 3mM PPI, 0.2u Sac PPase

下排

1+2 Tth 聚合酶 0mM PPI, 无 PPase
 3+4 Tth 聚合酶 3mM PPI, 无 PPase
 5+6 Tth 聚合酶 3mM PPI, 0.2u Sac PPase
 7+8 TspNH 聚合酶 0mM PPI, 无 PPase
 9+10 TspNH 聚合酶 3mM PPI, 无 PPase
 11+12 TspNH 聚合酶 3mM PPI, 0.2u Sac PPase

图 7b—古生菌校正 DNA 聚合酶

泳道

上排

1+2 Pfu 聚合酶 0mM PPI, 无 PPase
 3+4 Pfu 聚合酶 3mM PPI, 无 PPase
 5+6 Pfu 聚合酶 3mM PPI, 0.2u Sac PPase
 7+8 9°N 外聚合酶 0mM PPI, 无 PPase
 9+10 9 °N 外聚合酶 3mM PPI, 无 PPase
 11+12 9 °N 外聚合酶 3mM PPI, 0.2u Sac PPase

下排

1+2 VENT 聚合酶 0mM PPI, 无 PPase
 3+4 VENT 聚合酶 3mM PPI, 无 PPase
 5+6 VENT 聚合酶 3mM PPI, 0.2u Sac PPase

图 8a 血管紧张素试验, 无 PPI, 无 Sac PPase (有和无甜菜碱)

泳道

1+2 Taq 聚合酶 无甜菜碱
3+4 Taq 聚合酶 有甜菜碱
5+6 Accurase 聚合酶 无甜菜碱
7+8 Accurase 聚合酶 有甜菜碱
9+10 Tbr 聚合酶 无甜菜碱
11+12 Tbr 聚合酶 有甜菜碱
13+14 Tth 聚合酶 无甜菜碱
15+16 Tth 聚合酶 有甜菜碱

图 8b 血管紧张素试验, 有 PPI, 有 Sac PPase (有和无甜菜碱)

对照泳道为 1-4 (上排) 和 12-16 (下排)

泳道**上排**

1+2 Taq 聚合酶, 无甜菜碱, 有 3mM PPI, 无 Sac PPase
3+4 Taq 聚合酶, 有甜菜碱, 有 3mM PPI, 无 Sac PPase

以下全部有 3mM PPI 和 0.2u Sac PPase

5+6 Taq 聚合酶, 无甜菜碱
7+8 Taq 聚合酶, 有甜菜碱
9+10 Accurase 聚合酶, 无甜菜碱
11+12 Accurase 聚合酶, 有甜菜碱
13+14 Tbr 聚合酶, 无甜菜碱
15+16 Tbr 聚合酶, 有甜菜碱

下排

以下全部有 3mM PPI 和 0.2u Sac PPase

1+2 Tth 聚合酶 无甜菜碱
3+4 Tth 聚合酶 有甜菜碱
5+6 TspNH 聚合酶 无甜菜碱
7+8 TspNH 聚合酶 有甜菜碱
9+10 Pfu 聚合酶 无甜菜碱
11+12 Pfu 聚合酶 有甜菜碱
13+14 Taq 聚合酶对照 无甜菜碱, 无 PPI 或 PPase

15+16Taq 聚合酶对照 有甜菜碱, 无 PPI 或 PPase

测试的所有 DNA 聚合酶均受 PPI 抑制, 采用 Sac PPase 可克服该抑制作用。

比较实施例 8

本发明方法与常规“热启动”方法学的比较

我们有一些原始结果(图 9 和 10)显示: 化学修饰的 Taq 聚合酶(如美国专利 No5,677,152 所述方法进行修饰)在缺乏甜菜碱时会产生一些错误 PCR 产物, 但在甜菜碱存在情况下可得到正确产物。

图 9 血管紧张素试验

泳道

1+2 Taq 聚合酶, 无甜菜碱

3+4 Taq 聚合酶, 有甜菜碱

5+6 化学修饰的 Taq, 无甜菜碱

7+8 化学修饰的 Taq, 有甜菜碱

9+10 本发明的方法(3mM PPI 和 2u Sac PPase), 无甜菜碱

11+12 本发明的方法(3mM PPI 和 2u Sac PPase), 有甜菜碱

看来在这些环境下, 化学修饰的酶是无活性的, 直到在 95℃下激活 10 分钟才具有活性。没有经过初步温育时, 产生的 PCR 产物少到可以忽略。因为化学修饰的 Taq 在室温是无活性的, 所以难以解释在缺乏甜菜碱时产生错误 PCR 产物和明显错误引发的原因。

图 10 血管紧张素试验, 有 Taq 和抗 Taq 抗体

泳道

1+2 抗-Taq 抗体加 Taq 聚合酶, 无甜菜碱

3+4 抗-Taq 抗体加 Taq 聚合酶, 有甜菜碱

在抗 Taq DNA 聚合酶抗体介导的热启动中, 在缺乏甜菜碱的情况下产生大量的错误产物(与无甜菜碱的标准 Taq 聚合酶 PCR 类似), 并且在甜菜碱存在的情况下, 伴随正确产物也产生了极少的错误产物。

发明方法似乎给出比这些商业 HotStart 方法学更为特异的快速

PCR 反应。

实施例 9

从 Aeropyrum pernix 分离无机焦磷酸酶

从 J. C. M. 保藏中心获得 Aeropyrum pernix。克隆、表达并纯化无机焦磷酸酶。

从 A. pernix 克隆并表达无机焦磷酸酶

包含 Aeropyrum pernix 的焦磷酸酶基因的基因组序列如图 11 所示。所用的引物是从 Aeropyrum pernix 的基因组序列设计而来。这些引物以 5’-3’的顺序如下所示，并具有黑体显示的限制酶切位点。

上引物，导入 Nde I 位点：（SEQ ID NO 18）
TGCATGCATATGACAGGCTGTCTGAAAATTG
下引物，导入 Hind III 位点：（SEQ ID NO 19）
TAAGTGT AAGCTT GACTGTGGGGGCGGTGAAAG

来自具有其它焦磷酸盐基因的基因组的推断序列的比对表明：后一个 ATG 应该是起始蛋氨酸，并非数据库所显示的那样（图 11SEQ ID NO.1 中的斜体显示），并且酶的氨基酸序列实际上如 SEQ ID NO 25 所示。因此根据后一个蛋氨酸设计引物（图 11SEQ ID NO.1 中的黑体显示）。

采用 100ng 的 Aeropyrum pernix DNA 和 50pM 的上述引物，在 100μl 反应体积中进行 PCR。进行 20 个循环，55℃退火，45 秒延伸时间。

最初在 94℃保持 3 分钟。
20 个循环的 94℃，10 秒，55℃，10 秒，68℃，45 秒。
最终在 72℃保持 7 分钟。

PCR 条件

50pM 上引物（5’ TGCATGCATATGACAGGCTGTCTGAAAATTG..3’-SEQ ID NO 18）

50pM 下引物（5’ TAAGTGT**AAGCTT**GACTGTGGGGGCGGTGAAAG..3’ - SEQ ID NO 19）

1.5mM MgCl₂
1.25u Accurase DNA 聚合酶（Cat. No. AC001, GeneSys Ltd.）

75mM Tris, pH 8.8
20mM 硫酸铵
0.1% (w/v) Tween20
100ng *Aeropyrum pernix* 基因组 DNA

PCR 产物长度为 686 个碱基对, 如图 13 所示。按照生产商推荐条件采用 Prepanol™ (Cat. No.P001, GeneSys Ltd.) 沉淀 PCR 产物, 并最终重悬浮于 10mM Tris, 0.1mM EDTA 中。

采用限制酶 Nde I 和 Hind III 消化 PCR 产物, 苯酚提取, 乙醇沉淀, 并重悬浮于 10mM Tris, 0.1mM EDTA 中。

pTTQ18NHK 载体 (如图 15 所示) 也由 Nde I 和 Hind III 消化, 苯酚提取, 乙醇沉淀, 并重悬浮于 10mM Tris, 0.1mM EDTA 中。

在 1×NEB 连接缓冲液中, 采用 200u 的 New England Biolabs T4 DNA 连接酶使 100ng 切割的 PCR 序列与 1μg 切割的 pTTQ18NHK 载体连接, 总体积为 10μl, 16℃ 下过夜 (见图 16)。质粒载体是 pTTQ18NHK, 即载体 pTTQ18 的修饰形式 (Stark MJ, Gene, 1987; 51(2-3): 255-67), 该修饰载体含有插入在独特的 Eco0109 I 限制酶位点的卡那霉素抗生素基因, 和插入在原始载体的 EcoR I 位点和 Hind III 位点之间的替代多接头 (见图 14)。

添加 20μl 水, 并把反应加热到 70℃ 持续 20 分钟。添加 1/10 体积 pH5.2 的 3M 乙酸钠和 2 体积乙醇。混匀后在 -20℃ 存放 1 小时。在 10,000g 微离心 10 分钟后, 从沉淀的 DNA 中移去上清液, 并在 5μl 水中重悬浮 DNA。

通过电穿孔将 0.5μl 导入大肠杆菌 TOP10F' 细胞中, 并在 37℃ 恢复 1 小时后, 将细胞的等分试样平铺在卡那霉素 Luria Broth 琼脂平板上。在 37℃ 温育过夜。

将菌落在新鲜卡那霉素 Luria 培养液琼脂平板上, 和添加有 1μl 20mg/ml XGAL 及 1μl 0.5M IPTG/毫升琼脂凝胶的卡那霉素 Luria 培养液琼脂平板 (KIX 平板) 上以双份铺格。

在 37℃ 温育过夜后, 通过 PCR 以 M13 正向和反向引物筛选在 KIX 平板上的白色菌落, 以检测相应于 *Aeropyrum pernix* PCR 产物的插入是否存在。

当含有 701bp 产物的 9 个菌落在加有 100 μ g/ml 卡那霉素的 20ml LB 中生长至 OD600=1.0 时, 通过添加 IPTG 至 0.5mM 的最终浓度, 以诱导表达。细胞进一步生长 4 小时, 然后收获细胞, 并于-20 $^{\circ}$ C 冷冻存放。

通过添加 0.5ml 含 50mM pH 7.9 的 Tris-HCl、50mM 葡萄糖、1mM EDTA 的溶液和 0.5ml 含 10mM pH 7.9 的 Tris-HCl、50mM KCl、1mM EDTA、0.5%(v/v) Tween 20、0.5%(v/v) Nonidet-P40 的溶液, 并于 80 $^{\circ}$ C 温育 15 分钟以裂解细胞。

室温下 10,000g 离心 10 分钟后, 通过凝胶浓度为 12% 的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析取自每一裂解细胞的等分试样。电泳完成后, 采用考马斯亮蓝 R250 进行染色。所有样品均显示大约 23kDa 的条带与推定的 PPase 大小符合。

然后采用 Jukka K. Heinonen, Reijo J. Lahti. (1981) Analytical Biochemistry, Vol.113, pp313-317 描述的比色分析法检验同一样品在 75 $^{\circ}$ C 的 PPase 活性。

所有样品均显示阳性, 证实表达的蛋白质具有嗜热无机焦磷酸酶活性。

随后利用第一个克隆大规模制备蛋白质。

焦磷酸酶的纯化

将该克隆培养在 24 升的 LB 中。一旦 OD600 达到大约 1.5 的时候, 采用 0.5mM IPTG 诱导培养物, 并继续生长 4 小时。然后收获细胞, 并裂解细胞沉淀。通过在苯基-琼脂糖凝胶 CL4B (Amersham Pharmacia Biotech)、羟磷灰石 (Bio-rad Laboratories) 及 Hi-Performance Q 琼脂糖凝胶 (Amersham Pharmacia Biotech) 上进行标准柱层析以纯化表达的酶, 最后将纯化的酶-20 $^{\circ}$ C 存放在含有下列物质的溶液中: 20mM Tris-HCl, pH8.0、100mM NaCl、0.5%(v/v) Tween 20、0.5%(v/v) Nonidet P40、0.1mM EDTA、1mM 二硫苏糖醇、50%甘油。

实施例 10

采用 A. pernix 无机焦磷酸酶的 PCR 试验

采用 A. pernix 无机焦磷酸酶进行本发明的方法。试验基于人类 B-肌动蛋白基因的扩增。

该试验中, 采用获得自 Eurogentec S.A., Parc Scientifique du

Sart-Tilman, rue Bois Saint-Jean 14, 4102 SERAING, Belgium (Cat. No. RT-QP73-05) 的试剂盒。标准 Taq 聚合酶被试剂盒提供的 HotStart Taq 聚合酶替代。

PCR 反应混合物

1×反应缓冲液

200μM, dATP, dCTP, dGTP 和 400μM dUTP

0.025u/μl 未修饰 Taq 聚合酶

0.025u/μl *Aeropyrum pernix* 无机焦磷酸酶

0.3μM 5' 引物 (5' GAC TCG TCA TAC TCC TGC TTG CT 3' - SEQ ID NO 22)

0.3μM 3' 引物 (5' CAT TGC CGA CAG GAT GCA GAA 3' - SEQ ID NO 23)

0.15μM Taqman 探针 (FAM-ATCCACATCTGCTGGAAGGTGGACAGT-TAMRA - SEQ ID NO 24)

5mM MgCl₂

2mM NaPPi

被动参考

从 7.5ng (2500 拷贝) 起始对人类基因组 DNA 进行 1:4 稀释。

循环条件

94℃ 最初变性 3 分钟

40 个循环的 94℃, 15 秒和 60℃, 60 秒

结果如图 19 所示。

总之, 我们相信采用本发明方法, 利用焦磷酸盐抑制 PCR, 并随后消除抑制作用, 例如 80℃-95℃ 通过利用耐热 PPase, 表现方式与 HotStart PCR 相同, 但快速并兼具增加特异性的益处。

在以上说明书中提到的文献在此引入, 作为参考。本发明的其它修改没有背离发明范围和精神, 并且对本领域内的技术人员来说是显而易见的。尽管本发明是连同特定优选实施方案一起被描述的, 仍然应当理解权利要求的发明不应当过度局限于这些特定实施方案。实际上, 如本领域技术人员所熟知的, 对描述的发明的方式所进行的多种修改应该被包括在下文权利要求的范围内。

序列表

<110> 英国国防部
英国威尔特郡

<120> 扩增方法

<130> CG/P/133/WOD

<140>

<141>

<150> GB 0110501.4

<151> 2001-04-30

<160> 26

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 960

<212> DNA

<213> *Aeropyrum pernix*

<400> 1

```

taatcctaata togetttatg tggacgatcc ttcccagcaa aaccgggttt gttaacagcc 60
ttagctttat aactcgacta gccaaactat cggtagacg ggtgcatgca atgacaggct 120
gtctgaaaat tggctctgga gatgaggctc cagatgttgt gaatgtcgtt atagagatac 180
ctatgaacag ttctgttaag tacgagttcg acaaggaggc gtgtattgtt aaggttgata 240
ggttccttta caccagcatg gtctaccctt tcaactacgg gttcatacca ggcactctag 300
aggaggacgg agatcctggt gacgttctag ttattagccg ggagcccggt gctcccggt 360
cgcttataga ggctgtgccc gtggccgtgt tagacatgga ggacgaggag ggtccggaca 420
gcaaggttgt tgccgtaccc aaggccaagc tggacccctt attgccagc tataaggacg 480
ttggcgacat acctgatgcc ctgaaatcca agataaagca cttcttcgag cactataagg 540
agctggagcc tggaaagtgg gttagagtga ctggatggag gcctgctgcc gatgcgaagg 600
agattataag gagggctata gagaggtata agggggcgtg atgagggtt aacggctcac 660
gttttctggg agagtgtcgc acctttgagg gcgatcacc cgcagcgt gcgtgtgctt 720
ttgtctatga ttatggctac agttcttcta gccgctttca cgcgccccac agtcaataca 780
cttacacctg gaggttctgc gctgtatgct gtggatgtag ttgtagtaga cgccagcaca 840
ggatctgccc tggggttctc ccggtttgtc gtatccgcct acagaggggg ggtcggggat 900
gtgggtgtta tctactcttc ggggggtctc gtatcagggt ctagtctgga aaggctgctg 960

```

<210> 2

<211> 207

<212> PRT

<213> *Aeropyrum pernix*

<400> 2

Met Trp Thr Ile Leu Pro Ser Lys Thr Gly Phe Val Asn Ser Leu Ser
 1 5 10 15

Phe Ile Thr Arg Leu Ala Lys Leu Ser Val Arg Arg Val His Ala Met
 20 25 30

Thr Gly Cys Leu Lys Ile Gly Pro Gly Asp Glu Ala Pro Asp Val Val
 35 40 45

Asn Val Val Ile Glu Ile Pro Met Asn Ser Ser Val Lys Tyr Glu Phe
 50 55 60

Asp Lys Glu Ala Cys Ile Val Lys Val Asp Arg Phe Leu Tyr Thr Ser
 65 70 75 80

Met Val Tyr Pro Phe Asn Tyr Gly Phe Ile Pro Gly Thr Leu Glu Glu
 85 90 95

Asp Gly Asp Pro Val Asp Val Leu Val Ile Ser Arg Glu Pro Val Ala
 100 105 110

Pro Gly Ser Leu Ile Glu Ala Val Pro Val Ala Val Leu Asp Met Glu
 115 120 125

Asp Glu Glu Gly Pro Asp Ser Lys Val Val Ala Val Pro Lys Ala Lys
 130 135 140

Leu Asp Pro Leu Phe Ala Ser Tyr Lys Asp Val Gly Asp Ile Pro Asp
 145 150 155 160

Ala Leu Lys Ser Lys Ile Lys His Phe Phe Glu His Tyr Lys Glu Leu
 165 170 175

Glu Pro Gly Lys Trp Val Arg Val Thr Gly Trp Arg Pro Ala Ala Asp
 180 185 190

Ala Lys Glu Ile Ile Arg Arg Ala Ile Glu Arg Tyr Lys Gly Ala
 195 200 205

<210> 3

<211> 173

<212> PRT

<213> 硫磺矿硫化叶菌 (*Sulfolobus solfataricus*)

<400> 3

Met Lys Leu Ser Pro Gly Lys Asn Ala Pro Asp Val Val Asn Val Leu

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

<210> 4

<211> 176

<212> PRT

<213> 大肠杆菌 (Escherichia coli)

<400> 4

Met Ser Leu Leu Asn Gly Pro Ala Gly Lys Asp Leu Pro Glu Asp Ile			
1	5	10	15
Tyr Val Val Ile Glu Ile Pro Ala Asn Ala Asp Pro Ile Lys Tyr Glu			
20	25	30	
Ile Asp Lys Glu Ser Gly Ala Leu Phe Val Asp Arg Phe Met Ser Thr			
35	40	45	

Ala Met Phe Tyr Pro Cys Asn Tyr Gly Tyr Ile Asn His Ile Leu Ser
50 55 60

Leu Asp Gly Asp Pro Val Asp Val Leu Val Pro Thr Pro Tyr Pro Leu
65 70 75 80

Gln Pro Gly Ser Val Ile Arg Cys Arg Pro Val Gly Val Leu Lys Met
85 90 95

Thr Asp Glu Ala Gly Glu Asp Ala Lys Leu Val Ala Val Pro His Ser
100 105 110

Lys Leu Ser Lys Glu Tyr Asp His Ile Lys Asp Val Asn Asp Leu Pro
115 120 125

Glu Leu Leu Lys Ala Gln Ile Ala His Phe Phe Glu His Tyr Lys Asp
130 135 140

Leu Glu Lys Gly Lys Trp Val Lys Val Glu Gly Trp Glu Asn Ala Glu
145 150 155 160

Ala Ala Lys Ala Glu Ile Val Ala Ser Phe Glu Arg Ala Lys Asn Lys
165 170 175

<210> 5

<211> 178

<212> PRT

<213> Aquifex aeolicus

<400> 5

Met Gly Tyr Asp Gln Leu Pro Pro Gly Lys Asn Pro Pro Glu Asp Ile
1 5 10 15

Tyr Val Val Ile Glu Ile Pro Gln Gly Ser Ala Val Lys Tyr Glu Leu
20 25 30

Asp Lys Asp Thr Gly Val Ile Phe Val Asp Arg Phe Leu Phe Thr Ala
35 40 45

Met Tyr Tyr Pro Phe Asn Tyr Gly Phe Val Pro Gln Thr Leu Ala Asp
50 55 60

Asp Gly Asp Pro Val Asp Val Leu Val Ile Ser Arg Glu Pro Val Val
65 70 75 80

Pro Gly Ala Val Met Arg Cys Arg Pro Ile Gly Met Leu Glu Met Arg
85 90 95

Asp Glu Ala Gly Ile Asp Thr Lys Val Ile Ala Val Pro His Glu Lys
100 105 110

Leu Asp Pro Ser Tyr Ser Asn Ile Lys Thr Val Asp Asn Leu Pro Glu
115 120 125

Ile Val Arg Glu Lys Ile Lys His Phe Phe Glu His Tyr Lys Glu Leu
130 135 140

Glu Pro Gly Lys Trp Val Lys Val Glu Asn Trp Lys Gly Leu Gln Asp
145 150 155 160

Ala Ile Glu Glu Ile Lys Lys Gly Ile Glu Asn Tyr Lys Lys Asn Lys
165 170 175

Glu Gly

<210> 6

<211> 178

<212> PRT

<213> *Pyrococcus horikoshii*

<400> 6

Met Asn Pro Phe His Asp Leu Glu Pro Gly Pro Asn Val Pro Glu Val
1 5 10 15

Val Tyr Ala Leu Ile Glu Ile Pro Lys Gly Ser Arg Asn Lys Tyr Glu
20 25 30

Leu Asp Lys Glu Thr Gly Leu Leu Lys Leu Asp Arg Val Leu Tyr Thr
35 40 45

Pro Phe His Tyr Pro Val Asp Tyr Gly Ile Ile Pro Arg Thr Trp Tyr
50 55 60

Glu Asp Gly Asp Pro Phe Asp Ile Met Val Ile Met Arg Glu Pro Thr
65 70 75 80

Tyr Pro Leu Thr Ile Ile Glu Ala Arg Pro Ile Gly Leu Phe Lys Met
85 90 95

Ile Asp Ser Gly Asp Lys Asp Tyr Lys Val Leu Ala Val Pro Val Glu

100	105	110
Asp Pro Tyr Phe Lys Asp Trp Lys Asp Ile Ser Asp Val Pro Lys Ala		
115	120	125
Phe Leu Asp Glu Ile Ala His Phe Phe Lys Arg Tyr Lys Glu Leu Glu		
130	135	140
Gly Lys Glu Ile Ile Val Glu Gly Trp Glu Gly Ala Glu Ala Ala Lys		
145	150	155
Arg Glu Ile Leu Arg Ala Ile Glu Met Tyr Lys Glu Lys Phe Gly Lys		
165	170	175
Lys Glu		

<210> 7

<211> 178

<212> PRT

<213> *Pyrococcus abyssi*

<400> 7

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

Phe Leu Asp Glu Ile Ala His Phe Phe Lys Arg Tyr Lys Glu Leu Gln
130 135 140

Gly Lys Glu Ile Ile Val Glu Gly Trp Glu Gly Ala Glu Ala Ala Lys
145 150 155 160

Arg Glu Ile Leu Arg Ala Ile Glu Leu Tyr Lys Glu Lys Phe Gly Ser
165 170 175

Lys Glu

<210> 8

<211> 176

<212> PRT

<213> *Thermococcus litoralis*

<400> 8

Met Asn Pro Phe His Asp Leu Glu Pro Gly Pro Glu Val Pro Glu Val
1 5 10 15

Val Tyr Ala Leu Ile Glu Ile Pro Lys Gly Ser Arg Asn Lys Tyr Glu
20 25 30

Leu Asp Lys Lys Thr Gly Leu Ile Lys Leu Asp Arg Val Leu Tyr Ser
35 40 45

Pro Phe His Tyr Pro Val Asp Tyr Gly Ile Ile Pro Gln Thr Trp Tyr
50 55 60

Asp Asp Asp Asp Pro Phe Asp Ile Met Val Ile Met Arg Glu Pro Thr
65 70 75 80

Tyr Pro Gly Val Leu Ile Glu Ala Arg Pro Ile Gly Leu Phe Lys Met
85 90 95

Ile Asp Ser Gly Asp Lys Asp Tyr Lys Val Leu Ala Val Pro Val Glu
100 105 110

Asp Pro Tyr Phe Asn Asp Trp Lys Asp Ile Ser Asp Val Pro Lys Ala
115 120 125

Phe Leu Asp Glu Ile Ala His Phe Phe Gln Arg Tyr Lys Glu Leu Gln
130 135 140

Gly Lys Glu Ile Ile Val Glu Gly Trp Glu Asn Ala Glu Lys Ala Lys
145 150 155 160

Gln Glu Ile Leu Arg Ala Ile Glu Leu Tyr Lys Glu Lys Phe Lys Lys
 165 170 175

<210> 9

<211> 179

<212> PRT

<213> 嗜酸热原体 (*Thermoplasma acidophilum*)

<400> 9

Met Glu Ser Phe Tyr His Ser Val Pro Val Gly Pro Lys Pro Pro Glu
 1 5 10 15

Glu Val Tyr Val Ile Val Glu Ile Pro Arg Gly Ser Arg Val Lys Tyr
 20 25 30

Glu Ile Ala Lys Asp Phe Pro Gly Met Leu Val Asp Arg Val Leu Tyr
 35 40 45

Ser Ser Val Val Tyr Pro Val Asp Tyr Gly Leu Ile Pro Arg Thr Leu
 50 55 60

Tyr Tyr Asp Gly Asp Pro Met Asp Val Met Val Leu Ile Ser Gln Pro
 65 70 75 80

Thr Phe Pro Gly Ala Ile Met Lys Val Arg Pro Ile Gly Met Met Lys
 85 90 95

Met Val Asp Gln Gly Glu Thr Asp Asn Lys Ile Leu Ala Val Phe Asp
 100 105 110

Lys Asp Pro Asn Val Ser Tyr Ile Lys Asp Leu Lys Asp Val Asn Ala
 115 120 125

His Leu Leu Asp Glu Ile Ala Asn Phe Phe Ser Thr Tyr Lys Ile Leu
 130 135 140

Glu Lys Lys Glu Thr Lys Val Leu Gly Trp Glu Gly Lys Glu Ala Ala
 145 150 155 160

Leu Lys Glu Ile Glu Val Ser Ile Lys Met Tyr Glu Glu Lys Tyr Gly
 165 170 175

Lys Lys Asn

<210> 10
 <211> 686
 <212> DNA
 <213> *Aeropyrum pernix*

<400> 10
 tgc atgcata tgacaggctg tctgaaaatt ggtcctggag atgaggctcc agatgttgtg 60
 aatgtcgtta tagagatacc tatgaacagt tctgttaagt acgagttcga caaggaggcg 120
 tgtattgtta aggttgatag gticcctttac accagcatgg tctacccctt caactacggg 180
 ttcataccag gcactctaga ggaggacgga gatcctgttg acgttctagt tattagccgg 240
 gagcccgttg ctcccggctc gcttatagag gctgtgcccg tggccgtgtt agacatggag 300
 gacgaggagg gtccggacag caaggttggt gccgtaccca aggccaagct ggacccccta 360
 ttgccagct ataaggacgt tggcgacata cctgatgcc tgaaatcaa gataaagcac 420
 ttcttcgagc actataagga gctggagcct ggaaagtggg ttagagtac tggatggagg 480
 cctgctgccg atgcgaagga gattataagg agggctatag agaggtataa gggggcgtga 540
 tgagggctta acggctcacg tttcttgga gagtgtcgca cctttgagg cgatcacct 600
 cgccagcgtg cgtgtgcttt tgtctatgat tatggctaca gttcttctag ccgctttcac 660
 cgccccaca gtcaagctta cactta 686

<210> 11
 <211> 89
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列说明: pTTQ18N HK 的修饰的多接头序列

<400> 11
 atgcaccacc accaccacca tatgggcatg ctgaattcga gctcggtacc cggggatcct 60
 ctagagtoga cctgcaggca tgcaagctt 89

<210> 12
 <211> 5503
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列说明: pTTQ18N HK 载体

<220>
 <221> misc_特征
 <222> (3279, 3525)
 <223> n 是 a 或 g 或 c 或 t

<400> 12

```

gaactggatc tcaacagcgg taagatcctt gagagttttc gccccgaaga acgttttcca 60
atgatgagca cttttaaaagt tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgat tgacgccggg 120
caagagcaac tcggtcgccg catacactat tctcagaatg acttggttga gtactcacca 180
gtcacagaaa agcatccttac ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata 240
accatgagtg ataacactgc ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag 300
ctaaccgctt ttttgacaaa catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg 360
gagctgaatg aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca 420
acaacgttgc gcaactatt aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta 480
atagactgga tggaggcgga taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc cttccggct 540
ggctggttta ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcgcg tatcattgca 600
gcaactgggc cagatggtaa gccctcccgt atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag 660
gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat 720
tggttaactgt cagaccaagt ttactcatat atactttaga ttgatttaaa acttcatttt 780
taatttataa ggatctaggt gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa 840
cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga 900
gatccttttt ttctgcgctt aatctgctgc ttgcaaaaaa aaaaaccacc gctaccagcg 960
gtggtttgtt tgccggatca agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc 1020
agagcgcaga taccaaatac tgccttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag 1080
aactctgtag caccgcctac atacctcgt ctgctaatac tgttaccagt ggctgctgcc 1140
agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg 1200
cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttgagcg aacgacctac 1260
accgaactga gatacctaca gcgtgagcat tgagaaagcg ccacgcttc cgaagggaga 1320
aagcgggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgac gagggagctt 1380
ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttccccacct ctgacttgag 1440
cgtcgatttt tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg 1500
gcctttttac ggttccctgc cttttgctgg ccttttctc acatgttctt tctgcgtta 1560
tccccgtatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgtcgcgcg 1620
agccgaacga ccgagcgag cgagtcagt agcaggaag cggaagagcg cccaatacgc 1680
aaaccgcctc tcccgcgcg ttggccgatt cattaatgca gaattaatc tcatgtttga 1740
cagcttatca tcgactgcac ggtgcaccaa tgcctctggc gtcaggcagc catcggaagc 1800
tgtggtatgg ctgtgcaggt cgtaaatcac tgcataatc gtgtcgtca aggcgcactc 1860
ccgttctgga taatgttttt tgcgcgcgac tcataacggt tctggcaaat attctgaaat 1920
gagctgttga caattaatca tcggctcgta taatgtgtgg aattgtgagc ggataacaat 1980
ttcacacagg aaacacatat atgcaccacc accaccacca tatgggcag ctgaattcga 2040
gctcgggtacc cggggatcct ctagagtga cctgcaggca tgcaagcttg gcaactggcg 2100
tcgttttaca acgtcgtgac tgggaaaacc ctggcgttac ccaacttaat cgccttgacg 2160
cacatcccc tttcgccagc tggcgtaata gcgaagagc ccgcacgat cgccttccc 2220
aacagttgag cagcctgaat ggcgatggc gcctgatgag gtattttct cttacgcac 2280
tgtgcggtat ttcacaccgc ataatccc tgttttgag gatgagagaa gattttcagc 2340
ctgatacaga ttaaatcaga acgcagaagc ggtctgataa aacagaattt gcctggcgcg 2400
agtagcgcgg tgggtcccac tgaccccatg ccgaactcag aagtgaacgc ccgtagcgcc 2460
gatggtagtg tgggtctc ccatgcgaga gtagggaact gccaggcacc aaataaacg 2520
aaaggctcag tcgaaagact gggcctttcg ttttatctgt tgtttgtcg tgaacgctct 2580
cctgagtagg acaaatccgc cgggagcgga tttgaacgtt gcgaagcaac ggcccggagg 2640
gtggcgggca ggacgcccgc cataaactgc caggcatcaa attaagcaga aggccatcct 2700
gacggatggc ctttttgcgt ttctacaaac tcttctgtc gtcatatcta caagccatcc 2760

```

```

ccccacagat acggtaaact agcctcgttt ttgcatcagg aaagcaggga atttatggtg 2820
cactctcagt acaatctgct ctgatgccgc atagttaagc cagccccgac acccgccaac 2880
acccgctgac ggcacctgac gggettgctt gctcccgga tccgettaca gacaagctgt 2940
gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag gttttcaccc tcatcaccca aacgcgcgag 3000
acgaaagggc ctgattagaa aaactcatcg agcatcaaata gaaactgcaa tttattcata 3060
tcaggattat caataccata tttttgaaaa agccgtttct gtaatgaagg agaaaactca 3120
ccgaggcagt tccataggat ggcaagatcc tggatatcgt ctgcgattcc gactcgtcca 3180
acatcaatac aacctattaa tttccctcgc tcaaaaataa ggttatcaag tgagaaatca 3240
ccatgagtga cgactgaatc cgggtgagaat ggcaaaagnt tatgcatttc tttccagact 3300
tgttcaacag gccagccatt acgctcgtca tcaaaatcac tcgcatcaac caaacccgtta 3360
ttcattcgtg attgcgctg agcgagacga aatacgcat cgctgttaaa aggacaatta 3420
caaacaggaa tcgaatgcaa ccggcgagg aacactgcca ggcacatcaac aatattttca 3480
cctgaatcag gatattcttc taatacctgg aatgctgttt tccnnggat cgcagtgggtg 3540
agtaacctag catcatcagg agtacggata aaatgcttga tggtcggaag aggcataaat 3600
tccgtcagcc agtttagtct gaccatctca tctgtaacat cattggcaac gctacctttg 3660
ccatgtttca gaaacaactc tggcgcatcg ggcttccat acaatcgata gattgtcgca 3720
cctgattgcc cgacattatc gcgagcccat ttatacccat ataaatcagc atccatgttg 3780
gaatttaatc gcggcctcga gcaagacgtt tcccggtgaa tatggctcat aacacccctt 3840
gtattactgt ttatgtaagc agacagtttt attgttcatt atgatatatt tttatcttgt 3900
gcaatgtaac atcagggcct cgtgatacgc ctatttttat aggttaatgt catgataata 3960
atggtttctt agacgtgagg ttctgtaccc gacaccatcg aatggtgcaa aacctttcgc 4020
ggtatggcat gatagcggcc ggaagagagt caattcaggg tggtagaatgt gaaaccagta 4080
acgttatacg atgtcgcaga gtatgcgggt gtctcttata agaccgtttc ccgcgtgggtg 4140
aaccaggcca gccacgttcc tgcgaaaacg cgggaaaaag tggaaagcgc gatggcggag 4200
ctgaattaca ttcccaaccg cgtggcaca caactggcgg gcaaacagtc gttgctgatt 4260
ggcgttgcca cctccagtct ggccctgcac gcgcctgcgc aaattgtcgc ggcgattaaa 4320
tctcgcgcgc atcaactggg tgccagcgtg gtggtgtcga tggtagaacg aagcggcgtc 4380
gaagcctgta aagcggcggg gcacaatctt ctgcgcgaac gcgtcagtgg gctgatcatt 4440
aactatccgc tggatgacca ggatgccatt gctgtggaag ctgcctgcac taatgttccg 4500
gcgttatttc ttgatgtctc tgaccagaca cccatcaaca gtattatttt ctcccatgaa 4560
gacggtacgc gactgggcgt ggagcatctg gtgcatttg gtcaccagca aatcgcgctg 4620
ttagcgggcc cattaagttc tgtctcggcg cgtctgcgtc tggctggctg gcataaatat 4680
ctcactcgca atcaaattca gccgatagcg gaacgggaag gcgactggag tgccatgtcc 4740
ggttttcaac aaacctatga aatgctgaat gagggcatcg ttccactgc gatgetggtt 4800
gccaacgata agatggcgtt gggcgcaatg cgcgccatta ccgagtcagg gctgcgcgtt 4860
ggtgcggata tctcggtagt gggatacgc gatacgaag acagctcatg ttatatcccg 4920
ccgttaacca ccatcaaaca ggattttcgc ctgctggggc aaaccagcgt ggaccgcttg 4980
ctgcaactct ctcagggccca ggcggtgaag ggcaatcagc tgttgcctgt ctcactggtg 5040
aaaagaaaaa ccacctggc gcccaatacg caaacgcct ctccccgcgc gttggccgat 5100
tcattaatgc agctggcacg acaggtttcc cgactggaaa gcgggcagtg agcgcaacgc 5160
aattaatgta agttagctca ctcattaggc accccaggct ttacacttta tgettccgac 5220
ctgcaagaac ctcacgtcag gtggcacttt tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg 5280
tttatttttc taaatacatt caaatatgta tccgctcatg agacaataac cctgataaat 5340
gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat gagtattcaa catttccgtg tcgcccttat 5400
tccctttttt gcggcatttt gccttctgt ttttctcac ccagaaacgc tggtgaaagt 5460
aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac atc 5503

```

<210> 13
 <211> 6105
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列说明: 包含 PPase 序列的 pTTQ18NHK 载体

<220>
 <221> misc_特征
 <222> (3881, 4127)
 <223> n 是 a 或 g 或 c 或 t

<400> 13
 gaactggatc tcaacagcgg taagatecctt gagagttttc gccccgaaga acgttttcca 60
 atgatgagca cttttaaaagt tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgat tgacgccggg 120
 caagagcaac tcggtcgcgc catacactat tctcagaatg acttggttga gtactcacca 180
 gtcacagaaa agcatcttac ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata 240
 accatgagtg ataactatgc ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag 300
 ctaaccgctt ttttgacaaa catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg 360
 gagctgaatg aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca 420
 acaacgttgc gcaaaactatt aactggcgaa ctacttactc tagcttccc gcaacaatta 480
 atagactgga tggaggcgga taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc ccttcggct 540
 ggctggttta ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcgcgg tatcattgca 600
 gcaactgggc cagatggtaa gccctcccgat atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag 660
 gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat 720
 tggttaactgt cagaccaagt ttactcatat atactttaga ttgatttaa acttcatttt 780
 taatttaaaa ggatctaggt gaagatcctt ttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa 840
 cgtgagtttt cgttcactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga 900
 gatccttttt ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaacaaa aaaaaccacc gctaccagcg 960
 gtggtttgtt tgccggatca agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggttcagc 1020
 agagcgcaga taccaaatc tgctcttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag 1080
 aactctgtag caccgcctac atacctcgt ctgctaacc ttgtaccagt ggctgctgcc 1140
 agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg 1200
 cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttgagcg aacgacctac 1260
 accgaactga gatacctaca gcgtgagcat tgagaaagcg ccacgcttc cgaagggaga 1320
 aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtccgaacag gagagcgac gagggagctt 1380
 ccaggggga acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttgccacct ctgacttgag 1440
 cgtcgatttt tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg 1500
 gcctttttac ggttcctggc cttttgctgg cttttgctc acatgttctt tcctgcgtta 1560
 tccccgatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc 1620
 agccgaacga ccgagcgag cgagtcagt agcaggaag cgaagagcg cccaatacgc 1680
 aaaccgcctc tccccgcgcg ttggccgatt cattaatgca gaattaattc tcatgtttga 1740
 cagcttatca tcgactgcac ggtgcaccaa tgcctctggc gtcaggcagc catcggaagc 1800
 tgtggtatgg ctgtgcaggt cgtaaatcac tgataattc gtgtcgtca aggcgcactc 1860
 ccgttctgga taatgttttt tgcgcgcaca tcataacggt tctggcaaat attctgaaat 1920
 gagctgttga caattaatca tcggtcgtga taatgtgtgg aattgtgagc ggataacaat 1980
 ttcacacagg aaacacatat atgcaccacc accaccacca tatgacagcg tgtctgaaaa 2040

ttggtcctgg agatgaggct ccagatgttg tgaatgtcgt tatagagata cctatgaaca 2100
 gttctgttaa gtacgagttc gacaaggagg cgtgtattgt taaggttgat aggttccttt 2160
 acaccagcat ggtctacccc ttcaactacg ggttcatacc aggcaactcta gaggaggacg 2220
 gagatcctgt tgacgttcta gttattagcc gggagcccggt tgcctccggc tcgcttatag 2280
 aggcgtgtgcc cgtggccgtg ttagacatgg aggaacgagga gggtcggac agcaaggttg 2340
 ttgccgtacc caaggccaag ctggaccccc tattcgccag ctataaggac gttggcgaca 2400
 tacctgatgc cctgaaatcc aagataaagc acttcttcga gcactataag gagctggagc 2460
 ctggaaaagtg ggtagagtg actggatgga ggcctgctgc cgatgcgaag gagattataa 2520
 ggagggtat agagaggtat aagggggcgt gatgagggt taacggctca cgttttctgg 2580
 gagagtgtcg cacccttgag ggcgatcacc ctgccagcg tgcgtgtgct tttgtctatg 2640
 attatggcta cagttctct agccgcttt accgccccca cagtcaagct tggcactggc 2700
 cgtcgtttta caacgtcgt actgggaaaa ccctggcgtt acccaactta atcgcttgc 2760
 agcacatccc ccttcgccca gctggcgtaa tagogaagag gcccgcccg atcgccctc 2820
 ccaacagttg cgcagcctga atggcgaatg gcgcctgat cggtattttc tccttacgca 2880
 tctgtcgggt atttcacacc gcataaattc cctgttttg cggtatgagag aagattttca 2940
 gcctgataca gattaaatca gaacgcagaa ggcgtctgat aaaacagaat ttgcctggcg 3000
 gcagtagcgc ggtggtccca cctgacccca tgccgaactc agaagtgaac gccgtagcg 3060
 ccgatggtag tgtgggtct ccccatgcga gaggtaggaa ctgccaggca tcaataaaaa 3120
 cgaaaggctc agtcgaaaga ctgggccttt cgttttatct gttgtttgtc ggtgaacgt 3180
 ctctgagta ggacaaatcc gccgggagcg gatttgaacg ttgcgaagca acggcccga 3240
 ggggtggcggg caggacgccc gccataaact gccaggcatc aaattaagca gaaggccatc 3300
 ctgacggatg gcctttttgc gtttctacaa actcttcctg tcgtcatatc tacaagccat 3360
 cccccacag atacggtaaa ctagcctcgt tttgcatca ggaaagcagg gaatttatgg 3420
 tgcaacttca gtacaatctg ctctgatgcc gcatagttaa gccagccccg acaccgccca 3480
 acaccgctg acgcgcctg acgggcttgt ctgctcccg catccgctta cagacaagct 3540
 gtgaccgtct ccgggagctg catgtgtcag aggttttcac cgtcatcacc gaaacgcgcg 3600
 agacgaaagg gcctgattag aaaaactcat cgagcatcaa atgaaactgc aatttattca 3660
 tatcaggatt atcaatacca tatTTTTGAA aaagccgttt ctgtaatgaa ggagaaaact 3720
 caccgaggca gttccatagg atggcaagat cctggtatcg gtctgcgatt ccgactcgtc 3780
 caacatcaat acaacctatt aatttccct cgtcaaaaat aaggttatca agtgagaaat 3840
 caccatgagt gacgactgaa tccggtgaga atggcaaaag nttatgcatt tcttccaga 3900
 ctgtttcaac aggccagcca ttacgtcgt catcaaaatc actcgcatca accaaaccgt 3960
 tattcattcg tgattgcgc tgagcgagac gaaatacgcg atcgctgtta aaaggacaat 4020
 tacaacagg aatcgaatgc aaccggcgca ggaacactgc cagcgcatca acaatatttt 4080
 cacctgaatc aggatattct tctaatacct ggaatgctgt tttccnggg atcgagtg 4140
 tgagtaacca tgcatcatca ggagtacgga taaatgctt gatggtcgga agaggcataa 4200
 attccgtcag ccagtttagt ctgacatct catctgtaac atcattggca acgctacctt 4260
 tgccatgttt cagaacaac tctggcgcat cgggttccc atacaatcga tagattgtcg 4320
 caoctgattg cccgacatta tcgcgagccc atttataccc atataaatca gcacccatgt 4380
 tggaaatttaa tcgggcctc gagcaagacg tttccggtg aatatggctc ataacacccc 4440
 ttgtattact gtttatgtaa gcagacagtt ttattgttca tgatgatata tttttatctt 4500
 gtgcaatgta acatcagggc ctcgtgatac gcctattttt ataggttaat gtcagtataa 4560
 taatggtttc ttagacgtga ggttctgtac ccgacacat cgaatggtgc aaaaccttc 4620
 gcggtatggc atgatagcgc ccggaagaga gtcaattcag ggtggtgaat gtgaaaccag 4680
 taacgttata cgatgtcgca gagtatgccg gtgtctctta tcagaccgtt tcccgcgtgg 4740
 tgaaccaggc cagccacgtt tctgcgaaaa cgcgggaaaa agtgggaagcg gcgatggcg 4800
 agctgaatta cattcccaac cgcgtggcac aacaactggc gggaacacag tcgttctga 4860
 ttggcgttgc cactccagt ctggccctgc acgcgccgtc gcaaattgtc gcggcgatta 4920

```

aatctcgcgc cgatcaactg ggtgccagcg tgggtggtgc gatggtagaa cgaagcggcg 4980
togaagcctg taaagcggcg gtgcacaatc ttctcgcgca acgcgtcagt gggctgatca 5040
ttaactatcc gctggatgac caggatgcca ttgctgtgga agctgcctgc actaatgttc 5100
cggcgttatt tcttgatgtc tctgaccaga caccatcaa cagtattatt ttctcccatg 5160
aagacggtac gcgactgggc gtggagcatc tggtcgcatt gggtcaccag caaatcgcgc 5220
tgtagcggg cccattaagt tctgtctcgg cgcgtctcgc tctggctggc tggcataaat 5280
atctcactcg caatcaaatt cagccgatag cggaacggga aggcgactgg agtgccatgt 5340
ccggttttca acaaaccatg caaatgctga atgagggcac cggtcccaact gcgatgctgg 5400
ttgccaacga tcagatggcg ctgggcgcaa tgcgcgccat taccgagtcc gggctgcgcg 5460
ttgggtgcga tatctcggtg gtgggatacg acgataccga agacagctca tgttatatcc 5520
cgccgttaac caccatcaaa caggattttc gcctgctggg gcaaaccagc gtggaccgct 5580
tgctgcaact ctctcagggc caggcggtga agggcaatca gctgttgccc gtctcactgg 5640
tgaaaagaaa aaccaccctg gcgccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttgcccg 5700
attcattaat gcagctggca cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac 5760
gcaattaatg taagttagct cactcattag gcaccccagg ctttacactt tatgcttccg 5820
acctgcaaga acctcacgtc aggtggcact ttctggggaa atgtgcgcgg aaccttatt 5880
tgtttatttt tctaaataca ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata acctgataa 5940
atgcttcaat aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc aacatttccg tgtcgccctt 6000
attccctttt ttgcggcatt ttgccttctt gtttttgcct acccagaaac gctggtgaaa 6060
gtaaaagatg ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt acatc 6105

```

<210> 14

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 引物

<400> 14

gatgagttcg tgtccgtaca actgg

25

<210> 15

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 引物

<400> 15

ggttatcgaa atcagccaca gcgcc

25

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明：引物

<400> 16

gcaacgcccc tcactataaa

20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明：引物

<400> 17

gcaccccgcc cttgaagtcc

20

<210> 18

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明：引物

<400> 18

tgcattgcata tgacaggctg tctgaaaatt g

31

<210> 19

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明：引物

<400> 19

taagtgtgaag cttgactgtg ggggcgggtga aag

33

<210> 20

<400> 20

000

<210> 21

<400> 21

000

<210> 22

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明：引物

<400> 22

gactcgtcat actcctgctt gct

23

<210> 23

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明：引物

<400> 23

cattgccgac aggatgcaga a

21

<210> 24

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明：探针

<400> 24

atccacatct gctggaaggt ggacagt

27

<210> 25

<211> 176

<212> PRT

<213> *Aeropyrum pernix*

<400> 25

Met Thr Gly Cys Leu Lys Ile Gly Pro Gly Asp Glu Ala Pro Asp Val

1 5 10 15

Val Asn Val Val Ile Glu Ile Pro Met Asn Ser Ser Val Lys Tyr Glu

20 25 30

Phe Asp Lys Glu Ala Cys Ile Val Lys Val Asp Arg Phe Leu Tyr Thr

35 40 45

Ser Met Val Tyr Pro Phe Asn Tyr Gly Phe Ile Pro Gly Thr Leu Glu

50 55 60

Glu Asp Gly Asp Pro Val Asp Val Leu Val Ile Ser Arg Glu Pro Val

65 70 75 80

Ala Pro Gly Ser Leu Ile Glu Ala Val Pro Val Ala Val Leu Asp Met

85 90 95

Glu Asp Glu Glu Gly Pro Asp Ser Lys Val Val Ala Val Pro Lys Ala

100 105 110

Lys Leu Asp Pro Leu Phe Ala Ser Tyr Lys Asp Val Gly Asp Ile Pro

115 120 125

Asp Ala Leu Lys Ser Lys Ile Lys His Phe Phe Glu His Tyr Lys Glu

130 135 140

Leu Glu Pro Gly Lys Trp Val Arg Val Thr Gly Trp Arg Pro Ala Ala

145 150 155 160

Asp Ala Lys Glu Ile Ile Arg Arg Ala Ile Glu Arg Tyr Lys Gly Ala

165 170 175

<210> 26

<211> 531

<212> DNA

<213> *Aeropyrum pernix*

<400> 26

atgacaggct gtctgaaaat tggctcctgga gatgaggctc cagatgttgt gaatgtcgtt 60

atagagatac ctatgaacag ttctgttaag tacgagttcg acaaggaggc gtgtattgtt 120

```
aaggttgata gggttccttta caccagcatg gtctaccctt tcaactacgg gttcatacca 180
ggcactctag aggaggacgg agatcctgtt gacgttctag ttattagccg ggagcccgtt 240
gctcccggct cgcttataga ggctgtgccc gtggccgtgt tagacatgga ggacgaggag 300
ggtcgggaca gcaaggttgt tgccgtaccc aaggccaagc tggacccctt attcgccagc 360
tataaggacg ttggcgacat acctgatgcc ctgaaatcca agataaagca cttcttcgag 420
cactataagg agctggagcc tggaaagtgg gttagagtga ctggatggag gcctgctgcc 480
gatgcgaagg agattataag gagggctata gagaggtata agggggcgtg a          531
```



图 1



图 2

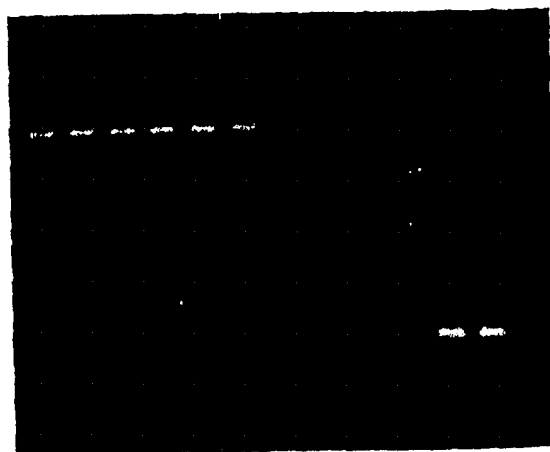


图 3

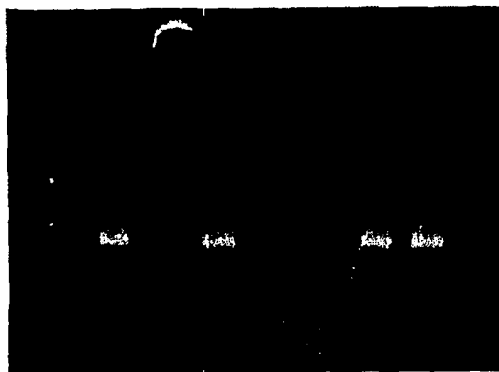


图 4

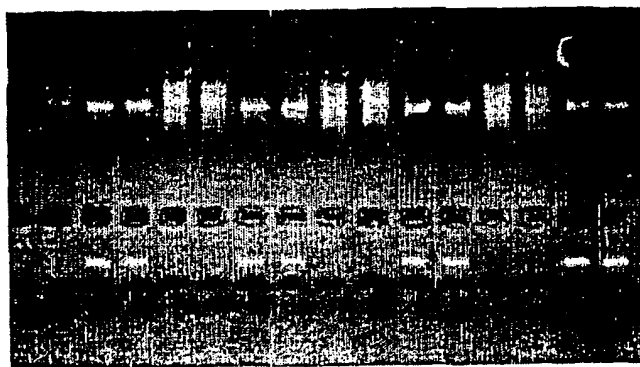


图 5



图 6

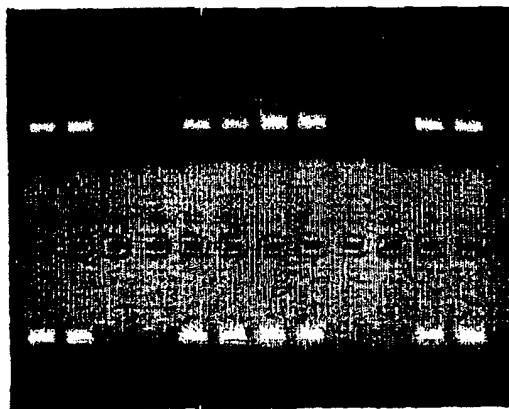


图 7a

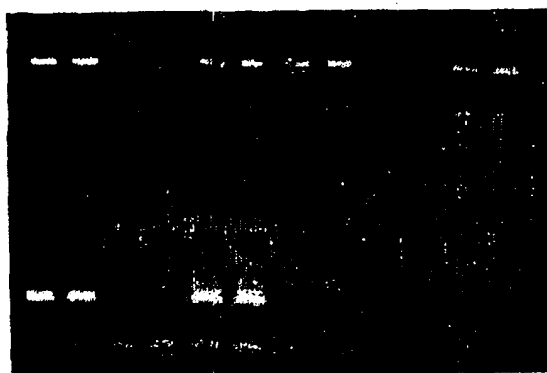


图 7b

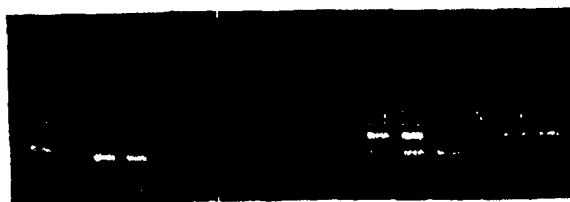


图 8a



图 8b

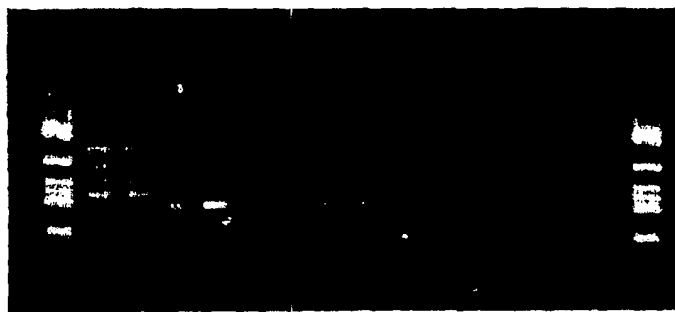


图 9



图 10

图 11

Aeropyrum pernix 序列

MWTILPSKTGFVNSLSFITRLAKLSVRRVHAMTGCLKIGPGDEAPDVVNVVIEIPMN
 SSVKYEFDKEACIVKVDRFLYTSMVYPFNYGFIPGTLEEDGDPVDVLVISREPVAPG
 SLIEAVPVAVLDMEDEEGPDSKVVAVPKAKLDPLFASYKDVGDIPDALKSKIKHFFE
 HYKELEPGKWVRVTGWRPAADAKEIIRRAIERKGA
 (SEQ ID NO 2)

SEQ ID NO 1

1066801 taatcctaata tgcctttatg tggacgatcc ttcccagcaa aaccgggttt gttaacagcc
 1066851 ttagccttat aactcgacta gccaaactat cgggttagacg ggtgcatgca atgacaggct
 1066921 gtctgaaaat tggctcctgga gatgaggctc cagatgttgt gaatgtcgtt atagagatac
 1066981 ctatgaacag ttctgttaag tacgagttcg acaaggaggc gtgtattgtt aagggtgata
 1067041 ggttccttta caccagcatg gtctacccct tcaactacgg gtctatacca ggcactctag
 1067101 aggaggacgg agatcctgtt gacgttctag ttattagccg ggagcccgtt gctcccggct
 1067161 cgcttataga ggctgtgccc gtggccgtgt tagacatgga ggacgaggag ggtccggaca
 1067221 gcaagggtgt tgcctgaccc aaggccaagc tggaccccct attcgccagc tataaggacg
 1067281 ttggcgacat acctgatgcc ctgaaatcca agataaagca cttcttcgag cactataagg
 1067341 agctggagcc tggaaagtgg gttagagtga ctggatggag gcctgctgcc gatgcgaagg
 1067401 agattataag gagggtctata gagaggtata agggggcgtg atgagggtt aacggctcac
 1067461 gttttctggg agagtgtcgc acctttgagg gcgatcacc tcgccagcgt gcgtgtgctt
 1067521 ttgtctatga ttatggctac agttcttcta gccgcttca ccgccccac agtcaatata
 1067581 cttacaccta gaggttctgc gctgtatgct gtggatgtag ttgtagtaga cgccagcaca
 1067641 ggatctgccc tggggttctc ccggtttgtc gtatccgcct acagagggg ggtcggggat
 1067701 gtgggtgtta tctactcttc gggggtctca gtatcagggt ctagtctgga aaggctgctg

MTGCLKIGPGDEAPDVVNVVIEIPMNSSSVKYEFDKEACIVKVDRFLYTSMVYPFNYG
 FIPGTLEEDGDPVDVLVISREPVAPGSLIEAVPVAVLDMEDEEGPDSKVVAVPKAKL
 DPLFASYKDVGDIPDALKSKIKHFFEHYKELEPGKWVRVTGWRPAADAKEIIRRAIE
 RYKGA (SEQ ID NO 25)

SEQ ID NO 26

atgacaggct gtctgaaaat tggctcctgga gatgaggctc cagatgttgt
 gaatgtcgtt atagagatac ctatgaacag ttctgttaag tacgagttcg
 acaaggaggc gtgtattgtt aagggtgata ggttccttta caccagcatg
 gtctacccct tcaactacgg gtctatacca ggcactctag aggaggacgg
 agatcctgtt gacgttctag ttattagccg ggagcccgtt gctcccggct
 cgcttataga ggctgtgccc gtggccgtgt tagacatgga ggacgaggag
 ggtccggaca gcaagggtgt tgcctgaccc aaggccaagc tggaccccct
 attcgccagc tataaggacg ttggcgacat acctgatgcc ctgaaatcca
 agataaagca cttcttcgag cactataagg agctggagcc tggaaagtgg
 gttagagtga ctggatggag gcctgctgcc gatgcgaagg agattataag
 gagggtctata gagaggtata agggggcgtg a

图 12

用 ClustalW 进行的 PPase 序列比对

Aeropyrum = <i>Aeropyrum pernix</i>	SEQ ID NO 2
Sulfolobus = 硫磺矿硫化叶菌	SEQ ID NO 3
E.coli = 大肠杆菌	SEQ ID NO 4
Aquifex = <i>Aquifex aeolicus</i>	SEQ ID NO 5
Pho = <i>Pyrococcus horikoshii</i>	SEQ ID NO 6
Pab = <i>Pyrococcus abyssi</i>	SEQ ID NO 7
Tli = <i>Thermococcus litoralis</i>	SEQ ID NO 8
Thermoplasma = 嗜酸热原体	SEQ ID NO 9

CLUSTAL W (1.8) 多序列比对

```

aeropyrum      MWTILPSKTGFVNSLSFITRLAKLSVRRVHAMTGCLKIGP-GDEAPDVNVVIEIPM-NS
sulfolobus     -----MKLSP-GKNAPDVNVVIEIPQ-GS
E.coli         -----MSLLNGPA-GKDLPEDIYVVIEIPANAD
aquifex        -----MGYDQLPP-GKNPPEDIYVVIEIPQ-GS
Pho            -----MNPFDLEP-GPNVPEVVYALIEIPK-GS
Pab            -----MNPFDLEP-GPNVPEVVYALIEIPK-GS
Tli            -----MNPFDLEP-GPEVPEVVYALIEIPK-GS
thermoplasma   -----MESFYHSVPVGPKEPEEVYVIVEIPR-GS
               . . . * . * : : : : : * * .

aeropyrum      SVKYEFDKEACIVKVDRLYTSMVYFPFNYGFIPGTLEEDGDPVDVLVISREPVPAGSLIE
sulfolobus     NIKYEYDDEEGVIKVDRLYTSMNYPFNYGFIPGTLEEDGDPLDVLVITNYQLYPGSVIE
E.coli         PIKYEIDKESGALFVDRFMSTAMFYPCNYGYINHILSLDGDVPDVLVPTPYPLQPGSVIR
aquifex        AVKYELDKDTGVIFVDRFLFTAMYYFPFNYGFVPQTLADDGDPVDVLVISREPVPVPGAVMR
Pho            RNKYELDKETGLLKLDRVLYTFPHYPVDYGLIPRTWYEDGDPFDIMVIMREPTYPLTIE
Pab            RNKYELDKKTGLLKLDRVLYSPFFYPVDYGLIPRTWYDDDDPFDIMVIMREPTYPLTIE
Tli            RNKYELDKKTGLIKLDRVLYSPFHYVPDYGLIPQWYDDDDPFDIMVIMREPTYPGVIE
thermoplasma   RVKYEIAKDFPGMLVDRVLYSSVVYPVDYGLIPRTLYYDGDPMVMVLISQPTFFGAIMK
               *** . . : : ** : : . * * : * : * . * : * : * : * : * :

aeropyrum      AVPVAVLDMEEGPD SKVAVPKAKLDPLFASYKDVGDIPDALKSKIKHFFEHYKELEP
sulfolobus     VRPIGILYMKDEEGEDAKIVAVPKDKTDPSFSNIKDINDLPQATKNKIVHFFEHYKELEP
E.coli         CRPVGVLMKMTDEAGEDAKLVAVPHSKLSKEYDHIKDVNDLPPELLKAQIAHFFEHYKDLEK
aquifex        CRPIGMLEMRDEAGIDTKVIAVPREKLDPSYSNIKTVDNLPEIVREKIKHFFEHYKELEP
Pho            ARPIGLFFKMIDSGDKDYKVLAVPVE--DPYFKDWKDISDVPKAFLDEIAHFFKRYKELEP
Pab            ARPIGLFFKMIDSGDKDYKVLAVPVE--DPYFKDWKIDDDVPKAFLDEIAHFFKRYKELEP
Tli            ARPIGLFFKMIDSGDKDYKVLAVPVE--DPYFNDWKDISDVPKAFLDEIAHFFQRYKELEP
thermoplasma   VRPIGMMKMVDQGETDNKILAVFDK--DPNVSYIKDLKDVNAHLLDEIANFFSTYKILE-
               * : : : * * . * * : : * . * : : : * : * : * : * :

aeropyrum      GKWVRVTGWRPAADAKEIIRRAIERYKGA-----
sulfolobus     GKYVKISGWGSATEAKNRIQLAKRVSGGQZ----
E.coli         GKWKVVEGWENAEAAKAEIVASFER-AKNKZ----
aquifex        GKWKVVENWKLQDAIEEIKKGIENYKKNKEG---
Pho            GKEIIVEGWEGAEAAKREILRAIEMYKEKFGKKEZ
Pab            GKEIIVEGWEGAEAAKREILRAIELYKEKFGSKKEZ
Tli            GKEIIVEGWENAEAAKQELRAIELYKEKFKKZ--
thermoplasma   KKETKVLGWEGEALKEIEVSIKMYEEKYKKNZ
               * : : * * . * * : :

```

图 13

686bp PCR 产物 (SEQ ID NO 10)

RE位点用黑体表示, PPase基因用斜体表示, 引物位点用下划线标出

TGCATGCATATGACAGGCTGTCTGAAAATTGGTCCTGGAGATGAGGCTCCAGATGTTGTGAATGTCGTT
ATAGAGATACCTATGAACAGTTCTGTTAAGTACGAGTTCGACAAGGAGGCGTGATTGTTAAGGTTGAT
AGGTTCCCTTACACCAGCATGGTCTACCCCTCAACTACGGGTTTCATACCAGGCACTCTAGAGGAGGAC
GGAGATCCTGTTGACGTTCTAGTTATTAGCNGGGAGCCCGTTGCTCCCGGCTCGCTTATAGAGGCTGTG
CCCGTGGCCGTGTTAGACATGGAGGACGAGGAGGGTCCGGACAGCAAGGTTGTTGCCGTACCCAAGGCC
AAGCTGGACCCCCCTATTGCGCCAGCTATAAGGACGTTGGCGACATACCTGATGCCCTGAAATCCAAGATA
AAGCACTTCTTCGAGCACTATAAGGAGCTGGAGCCTGGAAAGTGGGTTAGAGTGAAGTGGATGGAGGCCT
GCTGCCGATGCGAAGGAGATTATAAGGAGGGCTATAGAGAGGTATAAGGGGGCGTGATGAGGGCTTAAC
GGCTCACGTTTTCTGGGAGAGTGTGCGACCTTTGAGGGCGATCACCCCTCGCCAGCGTGCGTGTGCTTTT
GTCTATGATTATGGCTACAGTTCTTCTAGCCGCTTTCACCGCCCCCACAGTCAAGCTTACACTTA

图 14

从起始ATG到NdeI位点, 然后是HindIII位点的修饰的PTTQ18N HK的多接头序列 (SEQ ID NO 11)

Met **Nde I**
 ATGCACCACCACCACCACCATATGGGCATGCTGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCG
 ACCTGCAGGCATGCAAGCTT
Hind III

图 15

pTTQ18NHK 序列 (SEQ ID NO 12)

```

>pTTQ18NHK Sequence
GAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTGCCCCGAAGAAGCTTTTCCA 60
ATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGG 120
CAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAAAGACTTGGTTGAGTACTCACC 180
GTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATA 240
ACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAG 300
CTAACCCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCTTGATCGTTGGGAACCG 360
GAGCTGAATGAAGCCATACCAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCA 420
ACAACGTTGCGCAAACTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGCAACAATTA 480
ATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCCTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCT 540
GGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGCTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCA 600
GCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACAGACGGGGAGTCAG 660
AGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCG 720
TGGTAACGTGCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTAAAACTTCATTTT 780
TAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTGTATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAA 840
CGTGAGTTTTCTGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAGGATCTTCTTGA 900
GATCCTTTTTTTCTGCGGTAATCTGCTGCTTGCAAAACAAAAAACCCGCTACCGCG 960
GTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGC 1020
AGAGCGCAGATACCAAACTACTGCTCTTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAG 1080
AACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCTCTTACCAGTGGCTGCTGCC 1140
AGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCG 1200
CAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGTTCTGTCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTAC 1260
ACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCATTGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGA 1320
AAGCGGCACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTT 1380
CCAGGGGGAAACGCTTGGTATCTTTATAGTCTGCGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAG 1440
CGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCG 1500
GCCTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGTGCTGGCCTTTTGTCTCACATGTTCTTTCTGCGTTA 1560
TCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGC 1620
AGCCGAACGAGCGAGCGAGCTAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGGCCAATAGCG 1680
AAACCGCCTCTCCCCGCGCTTGGCCGATTCATTAATGCAGAATTAATTTCTCATGTTGA 1740
CAGCTTATCATCGACTGCACGGTGCACCAATGCTTCTGGCGTCAGGCGAGCCATCGGAAGC 1800
TGTGGTATGGCTGTGCAGGTCTGTAATCACTGCATAATTCGTGTGCTCAAGGCGCACTC 1860
CCGTTCTGGATAATGTTTTTTCGCCGACATCATAACGTTTCTGGCAAAATATTCTGAAAT 1920
GAGCTGTTGACAAATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGAATGTGAGCGGATAACAAT 1980
TTCACACAGGAAACACATATATGACCACCACCACCACCATATGGGCGATGCTGAATTGCA 2040
GCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCGATGCAAGCTTGGCACTGGCCG 2100
TCGTTTTACACAGTCGTGACTGGGAAAACCCCTGGCGTTACCCAATTAATCGCCTTGCA 2160
CACATCCCCCTTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCC 2220
AACAGTTGCGCGAGCTGAATGGCGAATGGCGCTGATGCGGTATTTCTCCTTACGCATC 2280
TGTGCGGTATTTACACCCGCATAAATCCCTGTTTTGGCGGATGAGAGAAGATTTTCAGC 2340
CTGATACAGATTAAATCAGAACGCAAGCGGCTGATAAAACAGAATTTGCTTGGCGGC 2400
AGTAGCGCGGTGGTCCCACCTGACCCCATGCCGAACCTCAGAAGTGAACGCCGTAGCGCC 2460
GATGGTAGTGTGGGTCTCCCATGCGAGAGTAGGGAATGCCAGGCATCAAAATAAACG 2520
AAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTCTGTTTTATCTGTTGTTGTGCGGTGAACGCTCT 2580
CCTGATGAGGACAAATCCGCGGAGCGGATTTGAACGTTGCGAAGCAACGCCCGGAGG 2640
GTGGCGGCGAGGACGCCGCCATAAACTGCCAGGCATCAAAATTAAGCAGAAGGCCATCCT 2700
GACGGATGGCCTTTTTGCGTTTCTACAACTCTTCTGCTGCTCATATCTACAGCCATCC 2760
CCCCACAGATACGGTAACTAGCCTCGTTTTTGCATCAGGAAAGCAGGGAATTTATGGTG 2820
CACTTTTCACTCAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACCCCGCCAAC 2880
ACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGT 2940
GACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGAGAGGTTTTACCGCTCATCACCAGAACGCGCGAG 3000
ACGAAAGGGCCTGATTAGAAAACCTCATCGAGCATCAATGAACTGCAATTTATTCTATA 3060
TCAGGATTATCAATACCATATTTTTGAAAAGCCGTTTTCTGTAATGAAGGAGAAAACCTCA 3120
CCGAGGCGAGTTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTCGTCCA 3180
ACATCAATACAACCTATTAATTTCCCTCGTCAAAAATAAGGTTATCAAGTGAGAAATCA 3240
CCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAATGGCAAAAGNTTATGCATTTCTTTCCAGACT 3300
TGTTCAACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCATCAAAATCACTCGCATCAACCAACCGTTA 3360
TTCATTCTGATTTGCGCCTGAGCGAGACGAAATACGCGATCGCTGTTAAAGGACAATTA 3420
CAAACAGGAAATCGAATGCAACCGCGCAGGAACACTGCCAGCGCATCAACAAATTTTCA 3480
CCTGAATCAGGATATTCTTCTAATACCTGGAATGCTGTTTTCCNGGGATCGCAGTGGTG 3540
AGTAACCATGCGATCATCAGGAGTACGGATAAAATGCTTGATGGTGGAAAGAGGCATAAT 3600
TCCGTGAGCCAGTTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAAACATCATTGGCAACGCTACCTTG 3660
CCATGTTTTCAGAAACAACTCTGGCGCATCGGGCTTCCCATACAATCGATAGATTGTGCGA 3720
CCTGATTGCCGACATTATCGCGAGCCCATTTATACCCATATAAATCAGCATCCATGTTG 3780
GAATTTAATCGCGGCTCGAGCAAGACGTTTTCCCGTTGAATATGGCTCATAACACCCCTT 3840
GTATTACTGTTTATGTAAGCAGACAGTTTTATGTTTCATGATGATATATTTTATCTTGT 3900
GCAATGTAACATCAGGGCCTCGTGATACGCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATA 3960

```

图 15续

```

ATGGTTTCTTAGACGTGAGGTTCTGTACCCGACACCATCGAATGGTGCAAAACCTTTCGC 4020
GGTATGGCATGATAGCGCCCGGAAGAGAGTCAATTCAGGGTGGTGAATGTGAAACCAGTA 4080
ACGTTATACGATGTCGCGAGAGTATGCCGGTGTCTCTTATCAGACCGTTTCCCGCGTGGTG 4140
AACCAGGCCAGCCACGTTTCTGCGAAAACGCGGGAAAAATGGAAGCGGCGATGGCGGAG 4200
CTGAATTACATTCCCAACCGCGTGGCACAACAACCTGGCGGGCAACAGTCGTTGCTGATT 4260
GGCGTTGCCACCTCCAGTCTGGCCCTGCACGCGCCGTCGCAAAATGTGCGGGCGATTAAA 4320
TCTCGCGCCGATCAACTGGGTGCCAGCGTGGTGGTGTGCGATGGTAGAACGAAGCGCGTC 4380
GAAGCCTGTAAAGCGGCGGTGCACAATCTTCTCGCGCAACGCGTCAGTGGGCTGATCATT 4440
AACTATCCGCTGGATGACCAGGATGCCATTGCTGTGGAAGCTGCCTGCACTAATGTTCG 4500
GCGTTATTTCTTGATGTCTCTGACCAGACACCCATCAACAGTATTATTTTCTCCCATGAA 4560
GACCGGTACGCGACTGGGCGTGGAGCATCTGGTCGCAATTGGGTCACCAGCAAATCGCGCTG 4620
TTAGCGGGCCCATTAAGTTCTGTCTCGGCGCGTCTGCGTCTGGCTGGCTGGCATAAATAT 4680
CTCACTCGCAATCAAATTCAGCCGATAGCGGAACGGGAAGCGACTGGAGTGCCATGTCC 4740
GGTTTTCAACAAACCATGCAAAATGCTGAATGAGGGCATCGTCCCACTGCGATGCTGGTT 4800
GCCAAGATCAGATGGCGCTGGGCGCAATGCGCGCCATTACCGAGTCCGGGCTGCGCGTT 4860
GGTGCGGATATCTCGGTAGTGGGATACGACGATACCGAAGACAGCTCATGTTATATCCCG 4920
CCGTTAACCAACCATCAAACAGGATTTTCGCCTGCTGGGGCAAAACAGCGTGGACCGCTTG 4980
CTGCAACTCTCTCAGGGCCAGGCGGTGAAGGGCAATCAGCTGTTGCCCGTCTCACTGGTG 5040
AAAAGAAAAACCCCTGGCGCCCAATACGCAAAACCGCCCTCTCCCGCGCGTTGGCCGAT 5100
TCATTAATGCAGCTGGCAGCAGAGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGC 5160
AATTAATGTAAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGAC 5220
CTGCAAGAACCTCAGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTG 5280
TTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCGTATAAAT 5340
GCTTCAATAATATTGAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTAT 5400
TCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCCTTCCTGTTTTGCTCACCAGAAACGCTGGTGAAAGT 5460
AAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATC 5503

```

图 16

含有PPase (粗体) 及被克隆的PCR产物的剩余部分的
pTTQ18NHK序列 (SEQ ID NO 13)

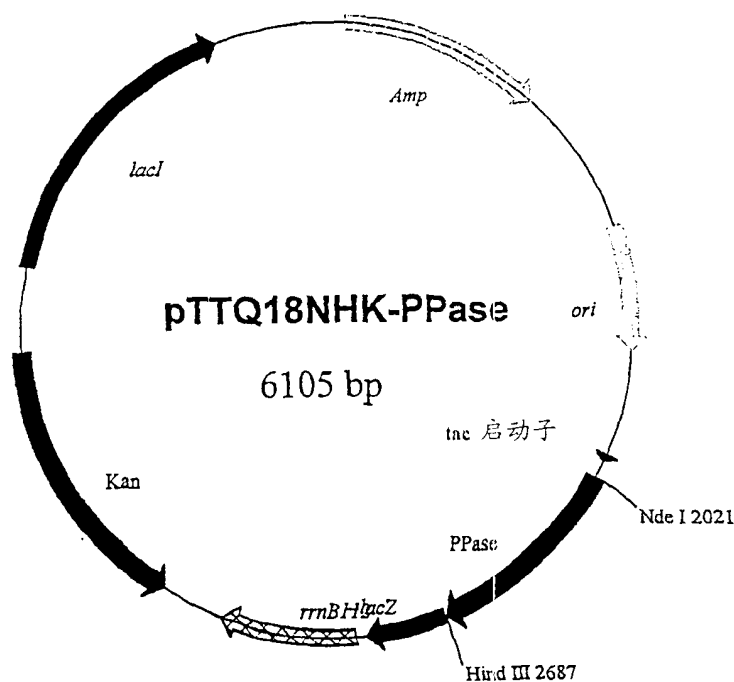


图 16续

```

>PTTQ18NHK-PPASE SEQUENCE
GAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTGCCCCGAAGAACGTTTTTCCA 60
ATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGG 120
CAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTACCA 180
GTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATA 240
ACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAG 300
CTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCG 360
GAGCTGAATGAAGCCATACCAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCA 420
ACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTA 480
ATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCT 540
GGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCA 600
GCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAG 660
GCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCAT 720
TGCTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTT 780
TAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAATCCCTTAA 840
CGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGA 900
GATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTGCAACAAAAAACCCGCTACCAGCG 960
GTGGTTGTTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGC 1020
AGAGCGCAGATACCAAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAG 1080
AACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCC 1140
AGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCG 1200
CAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTAC 1260
ACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCATTGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGA 1320
AAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTT 1380
CCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAG 1440
CGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGA AAAACGCCAGCAACGCG 1500
GCCTTTTTTACGGTTCTTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTCTGCGTTA 1560
TCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGC 1620
AGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGC 1680
AAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCTAATGCAAGATTAATTCTCATGTTTGA 1740
CAGCTTATCATCGACTGCACGGTGACCAATGCTTCTGGCGTCAGGCAGCCATCGGAAGC 1800
TGTGGTATGCTGTGTCAGGTCTGTAATCACTGCATAATTGCTGTGCTCAAGGCGCACTC 1860
CCCTTCTGGATAATGTTTTTGGCCCGACATCATAACGGTTCTGGCAAAATATTCTGAAAT 1920
GAGCTGTTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGAATTGTGAGCGGATAACAAT 1980
TTCACACAGGAACACATATATGACCACCACCACCATATGACAGGCTGCTCTGAAAA 2040
TTGGTCTGGAGATGAGGCTCCAGATGTTGTGAATGTGCTTATAGAGATACCTATGAACA 2100
GTTCTGTTAAGTACGAGTTCGACAAGGAGCGGTGATTGTTAAGGTTGATAGGTTCTTTT 2160
ACACCAGCATGGTCTACCCCTTCAACTACGGGTTTATACCAGGCACCTCTAGAGGAGACG 2220
GAGATCCTGTTGACGTTCTAGTTTATAGCCGGAGCCCGTTGCTCCCGGCTCGCTTATAG 2280
AGGCTGTGCCCGTGGCCGTGTTAGACATGGAGGACGAGGAGGGTCCGGACAGCAAGGTTG 2340
TTGCCGTACCCAAAGCCAAAGCTGGACCCCTATTTCGCCAGCTATAAGGACGTTGGCGACA 2400
TACCTGATGCCCTGAAATCCAAGATAAAGCACTTCTTCGAGCACTATAAGGAGCTGGAGC 2460
CTGGAAAGTGGGTAGAGTGACTGGATGGAGGCGCTGCTGCCGATGCGAAGGAGATTATAA 2520
GGAGGGCTATAGAGAGGTATAAGGGGGCGTGATGAGGGCTTAACGGCTCACGTTTTCTGG 2580
GAGAGTGTGCGACCTTTGAGGGCGATCACCTCGCCAGCGTGCGTGTGCTTTTGTCTATG 2640
ATTATGGCTACAGTTCTTCTAGCCGCTTTCACCGCCCCCACAGTCAAGCTTGGCACTGGC 2700
CGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAATTAATCGCCTTGC 2760
AGCACATCCCCCTTTGCGCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTC 2820
CCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCA 2880
TCTGTGCGGTATTTACACCGCATAAATCCCTGTTTTGGCGGATGAGAGAAGATTTTCA 2940
GCCTGATACAGATTAAATCAGAACGCAAGCGGTCTGATAAAACAGAATTTGCTGGCG 3000
GCAGTAGCGCGGTGGTCCCACCTGACCCCATGCCGAAGTGAAGCGGCGTAGCG 3060
CCGATGGTAGTGTGGGGTCTCCCCATGCGAGAGTAGGGAAGTCCAGGCATCAAATAAAA 3120
CGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCTTTCTGTTTTATCTGTTGTTGTCGGTGAACGCT 3180
CTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCGGGAGCGGATTTGAACGTTGCGAAGCAACGGCCCGGA 3240
GGGTGSCGGGACGAGACGCCCGCCATAAACTGCCAGGCATCAAATTAAGCAGAAGGCCATC 3300
CTGACCGGATGGCCTTTTTGCGTTTTCTACAAACTCTTCTGTGCTCATATCTACAGCCAT 3360
CCCCCAGAGATACGGTAAACTAGCCTCGTTTTTGTCATCAGGAAAGCAGGGAATTTATGG 3420
TGCACCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCA 3480
ACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCT 3540
GTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGAGAGGTTTTACCGTCATCACCGAAACGCGCG 3600
AGACGAAAGGGCCTGATTAGAAAACTCATCGAGCATCAAATGAACTGCAATTTATTCA 3660

```

图 16续

```

TATCAGGATTATCAATACCATATTTTGA AAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAAC T 3720
CACCGAGGCAGTTCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTCGTC 3780
CAACATCAATACAACCTATTAATTTCCCTCGTCAAAAATAAGGTATCAAGTGAGAAAT 3840
CACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAATGGCAAAAGNTTATGCATTTCTTCCAGA 3900
CTTGTTCAACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCATCAAAATCACTCGCATCAACCAAACCGT 3960
TATTCATTGCTGATTGCGCCTGAGCGAGACGAAATACGCGATCGCTGTTAAAAGGACAAT 4020
TACAAACAGGAATCGAATGCAACCGGCGCAGGAACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTT 4080
CACCTGAATCAGGATATTCTTCTAATACCTGGAATGCTGTTTTCCCNNGGGATCGCAGTGG 4140
TGAGTAACCATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAATGCTTGATGGTCGGAAGAGGCATAA 4200
ATCCGTCAGCCAGTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAACATCATTGGCAACGCTACCTT 4260
TGCCATGTTTTAGAAACAACTCTGGCGCATCGGGCTTCCCATACAATCGATAGATTGTCG 4320
CACCTGATTGCCGACATTATCGCGAGCCCATTTATACCCATATAAATCAGCATCCATGT 4380
TGGAATTTAATCGCGGCCTCGAGCAAGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCATAACACCCC 4440
TTGTATTACTGTTTTATGTAAGCAGACAGTTTTATTGTTTCATGATGATATATTTTATCTT 4500
GTGCAATGTAACATCAGGGCCTCGTGATACGCCATTTTTTATAGGTTAATGTCATGATAA 4560
TAATGGTTTTCTTAGACGTGAGGTTCTGTACCCGACACCATCGAATGGTGCAAAACCTTTC 4620
GCGGTATGGCATGATAGCGCCCGGAAGAGAGTCAATTCAGGGTGGTGAATGTGAAACCAG 4680
TAACGTTATACGATGTCGCAGAGTATGCCGGTGTCTCTTATCAGACCGTTTCCGCGTGG 4740
TGAACAGGCCAGCCACGTTTCTGCGAAAACGCGGGA AAAAGTGGAAGCGGCGATGGCGG 4800
AGCTGAATTACATTTCCCAACCGCGTGGCACAACAACACTGGCGGGCAAACAGTCGTTGCTGA 4860
TTGGCGTTGCCACCTCCAGTCTGGCCCTGCACGCGCCGTCGCAAATTGTCGCGCGCATTA 4920
AATCTCGCGCCGATCAACTGGGTGCCAGCGTGGTGGTGTGATGGTAGAACGAAGCGGCG 4980
TCGAAGCCTGTAAAGCGGCGGTGCACAATCTTCTCGCGCAACGCGTCAGTGGGCTGATCA 5040
TTAACTATCCGCTGGATGACCAGGATGCCATTGCTGTGGAAGCTGCCTGCACTAATGTTTC 5100
CGGCGTTATTTCTTGATGTCTCTGACCAGACACCCATCAACAGTATTATTTTCTCCCATG 5160
AAGACGGTACGCGACTGGGCGTGGAGCATCTGGTTCGATTGGGTACCAGCAAATCGCGC 5220
TGTTAGCGGGCCCATTAAGTTCTGTCTCGGCGCTCTGCGTCTGGCTGGCTGGCATAAAT 5280
ATCTCACTCGCAATCAAATTCAAGCCGATAGCGGAACGGGAAGCGGACTGGAGTGCCATGT 5340
CCGGTTTTCAACAAACCATGCAAATGCTGAATGAGGGCATCGTTCCCACTGCGATGCTGG 5400
TTGCCAACGATCAGATGGCGCTGGGCGCAATGCGCGCCATTACCGAGTCCGGGCTGCGCG 5460
TTGGTGCGGATATCTCGGTAGTGGGATACGACGATACCGAAGACAGCTCATGTTATATCC 5520
CGCGGTTAACCACCATCAAACAGGATTTTCGCCTGCTGGGGCAAACAGCGTGGACCGCT 5580
TGCTGCAACTCTCTCAGGGCCAGGCGGTGAAGGGCAATCAGCTGTTGCCCGTCTCACTGG 5640
TGAAAAGAAAAACCACCTGGCGCCCAATACGCAACCGCCTCTCCCGCGCGTTGGCCG 5700
ATTCTATTAATGCAGCTGGCAGACAGGTTTCCCGACTGGAAGCGGGCAGTGAGCGCAAC 5760
GCAATTAATGTAAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCG 5820
ACCTGCAAGAACCTCACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAATGTGCGCGGAACCCCTATT 5880
TGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCTGATAA 5940
ATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCGCCTT 6000
ATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAA 6060
GTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATC 6105

```

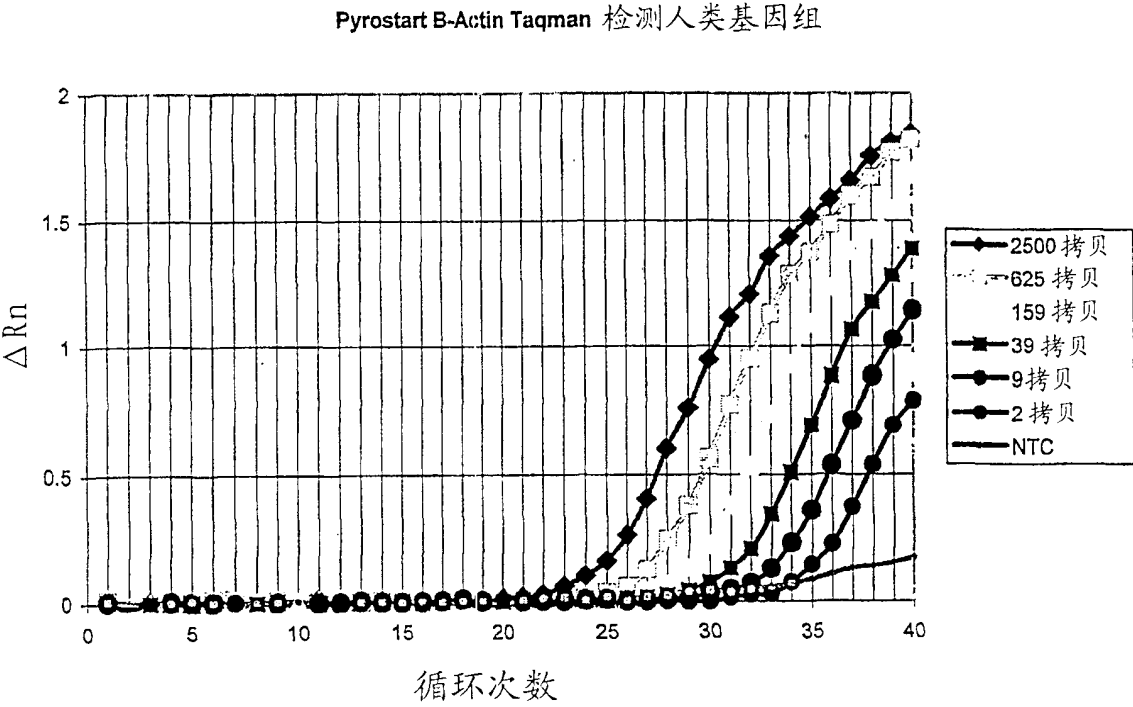


图 17