

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01117024.7

[43] 公开日 2002 年 4 月 17 日

[11] 公开号 CN 1344802A

[22] 申请日 2001.4.18 [21] 申请号 01117024.7
[30] 优先权
[32] 2000.4.18 [33] US [31] 60/198,336
[71] 申请人 霍夫曼 - 拉罗奇有限公司
地址 瑞士巴塞尔
[72] 发明人 E·S·史密斯 C·M·埃尔夫斯特伦
D·H·格尔范德 R·G·希古赤
T·W·麦尔斯 N·J·索恩布伦纳
A·M·王

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 张广育 谭明胜

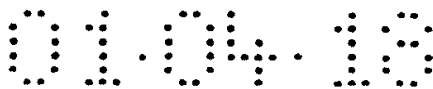
权利要求书 2 页 说明书 29 页 附图页数 0 页

[54] 发明名称 使用突变 DNA 聚合酶的高温逆转录

[57] 摘要

本发明涉及使用热稳定 DNA 聚合酶的改进逆转录方法,特别是在 镁离子缓冲液中。这些方法在合并逆转录/扩增反应中特别有用。

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



权 利 要 求 书

1. 逆转录 RNA 的方法，包括：

(a) 提供含有所述 RNA、引物、二价阳离子和突变热活性 DNA 聚合酶的逆转录反应混合物，其中所述突变 DNA 聚合酶的特征在于

5 i) 该 DNA 聚合酶的天然形式中包含有 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列；

ii) 与天然序列相比，所述氨基酸序列中 4 位氨基酸突变成除 E、A、G 或 P 之外的氨基酸；和

10 (b) 在足以使所述突变 DNA 聚合酶起始所述引物的延伸产物合成的温度下处理所述反应混合物，以提供与所述 RNA 互补的 cDNA 分子。

2. 权利要求 1 的方法，其中所述 DNA 聚合酶的天然形式包含有选自 SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6 和 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列。

3. 权利要求 1 的方法，其中所述 DNA 聚合酶的天然形式包含有 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列。

15 4. 权利要求 3 的方法，其中所述 DNA 聚合酶的天然形式包含有选自 SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列。

5. 权利要求 1 到 4 任一项的方法，其中所述二价阳离子是 Mg^{+2} 。

6. 权利要求 1 到 4 任一项的方法，其中所述突变 DNA 聚合酶是热稳定性的。

20 7. 权利要求 1、3 和 4 任一项的方法，其中所述 DNA 聚合酶是一种栖热菌 DNA 聚合酶的突变形式。

8. 权利要求 7 的方法，其中所述 DNA 聚合酶是嗜热栖热菌 DNA 聚合酶或水生栖热菌 DNA 聚合酶的突变形式。

25 9. 权利要求 1 到 8 任一项的方法，其中步骤 (b) 所述反应混合物的温度为 40°C 到 80°C。

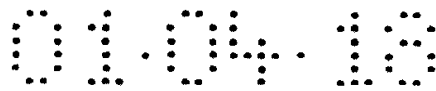
10. 权利要求 1 到 9 任一项的方法，其中与天然序列相比，所述氨基酸序列的 4 位氨基酸突变成除 E、A、G、P、Q 或 D 以外的氨基酸。

11. 扩增 RNA 的方法，包括：

(a) 根据权利要求 1 的方法逆转录所述 RNA 以提供 cDNA；

30 (b) 扩增所述 cDNA。

12. 权利要求 11 的方法，其中 DNA 聚合酶的天然形式包含有选自 SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6 和 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列。



13. 权利要求 11 的方法，其中所述 DNA 聚合酶的天然形式包含有 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列。

14. 权利要求 13 的方法，其中所述 DNA 聚合酶的天然形式包含有选自 SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列。

5 15. 权利要求 11 到 14 任一项的方法，其中步骤(b)中所述扩增是使用聚合酶链反应实现的。

16. 权利要求 11 到 15 任一项的方法，其中使用单酶逆转录/扩增反应扩增 RNA。

10 17. 权利要求 11 到 16 任一项的方法，其中所述二价阳离子是 Mg^{+2} 。

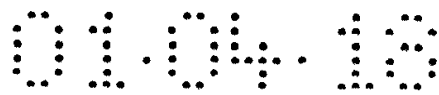
18. 权利要求 11 到 17 任一项的方法，其中所述突变 DNA 聚合酶是热稳定性的。

19. 权利要求 11、13 和 14 任一项的方法，其中所述 DNA 聚合酶是一种栖热菌 DNA 聚合酶的突变形式。

15 20. 权利要求 19 的方法，其中所述 DNA 聚合酶是嗜热栖热菌 DNA 聚合酶或水生栖热菌 DNA 聚合酶的突变形式。

21. 权利要求 11 到 20 任一项的方法，其中步骤(b)所述反应混合物的温度为 40°C 到 80°C。

20 22. 权利要求 11 到 21 任一项的方法，其中与天然序列相比，所述氨基酸序列的 4 位氨基酸突变成除 E、A、G、P、Q 或 D 以外的氨基酸。



说明书

使用突变 DNA 聚合酶的高温逆转录

发明背景

5 发明领域

本发明涉及分子生物学领域，特别是逆转录和核糖核酸（RNA）序列扩增的方法。

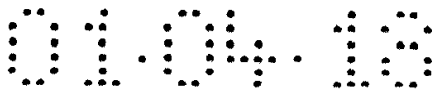
现有技术状况

10 术语“逆转录酶”是指一类鉴定为 RNA 依赖性 DNA 聚合酶的聚合酶。所有已知的逆转录酶由 RNA 模板合成 DNA 均需引物。长期以来，逆转录酶主要用于将 mRNA 转录成 cDNA，后者再被克隆到载体中供进一步操作。

15 术语“DNA 聚合酶”是指一类鉴定为 DNA 依赖性 DNA 聚合酶的聚合酶。DNA 聚合酶强烈地排斥识别 RNA 模板，这与其体内功能是一致的。但是，有几个实验室已经发现，某些 DNA 聚合酶能够在体外转录 RNA（Karkas, 1973, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70:3834-3838; Gulati et al., 1974, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71:1035-1039; 和 Wittig 和 Wittig, 1978, Nuc. Acid Res. 5:1165-1178）。Gulati 等发现大肠杆菌 Pol I 可用于使用寡聚(dT)₁₀引物转录 QB 病毒 RNA。
20 Wittig 和 Wittig 已经证实大肠杆菌 Pol I 能被用于已使用寡聚(dA)酶促延长的 tRNA 的逆转录。但是，Gulati 等证实，需要的酶量和 cDNA 产物分子较小的事实表明大肠杆菌 Pol I 的逆转录酶活性几乎不具实用价值。

25 水生栖热菌（*T. aquaticus*, Taq）DNA 聚合酶是热稳定性 DNA 聚合酶，已有报导称使用镁离子作为二价金属离子时其合成 cDNA 效率很低（Jones and Foulkes, 1989, Nuc. Acids. Res. 176:8387-8388）。Tse 和 Forget (1990, Gene 88:293-296) 以及 Shaffer 等 (1990, Anal. Biochem. 190:292-296) 已经介绍了使用 Taq DNA 聚合酶和镁离子扩增 RNA 的方法。但是，该方法效果差且不
30 敏感。

RNA 和 DNA 核酸序列扩增的描述可参见美国专利 4,683,195; 4,683,202 和 4,965,188, 所述专利本文引为参考。优选的方法是聚



合酶链反应 (PCR)，该方法一般使用 Taq DNA 聚合酶等热稳定 DNA 聚合酶进行，这些酶能够经受每个循环中变性扩增产物的温度。在本领域中，PCR 现已广为人知，在科学文献中有大量的描述。可参见诸如《PCR 应用》1999 (Innis et al., Academic Press, San Diego)，
5 《PCR 策略》1995 (Innis et al., Eds., Academic Press, San Diego)；《PCR 方法》1990 (Innis et al., Eds., Academic Press, San Diego)；和《PCR 技术》1989 (Erlich, ed., Stochton Press, New York)；所述文献均引为参考。PE Biosystems (Foster City, CA) 等销售商供应 PCR 试剂并出版 PCR 方法。扩增方法的综述见 Abramson
10 和 Myers, 1993, “现代生物技术评析” 4: 41 - 47, 该文献在此引为参考。

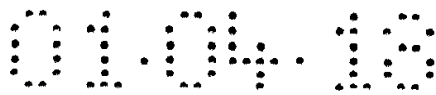
由于使用镁离子缓冲液中的 Taq DNA 聚合酶的逆转录效率低至不具实用价值，进行由 RNA 模板起始的 PCR 扩增时，先使用美拉尼鼠白血病病毒逆转录酶 (MoMuLV RT) 或 AMV-RT 等非热稳定病毒逆转录酶等首先逆转录靶 RNA，然后使用热稳定 DNA 聚合酶扩增所得的
15 cDNA。

一项重要进展是，发现不在镁 (Mg^{2+}) 缓冲液而在锰 (Mn^{2+}) 缓冲液中进行反应时，热稳定 DNA 聚合酶可以用来有效地逆转录 RNA 模板，使用 DNA 模板进行引物延伸更为优选。使用热稳定 DNA 聚合酶的有效锰离子激活逆转录公开于美国专利 5,310,652；5,322,770；
20 5,407,800；5,641,058 和 5,693,517, 所述专利均引为参考。由于由 DNA 模板的 cDNA 合成和由 DNA 模板的 DNA 合成均可在锰离子缓冲液中进行，使用锰离子缓冲液可以实现单一酶偶联逆转录/扩增反应 (也可参见 Myers and Sigua, 1995, 《PCR 策略》，同前文，第 5
25 章)。

发明概述

本发明提供使用热稳定 DNA 聚合酶逆转录 RNA 序列的方法。本发明还提供逆转录和扩增 RNA 序列的方法，优选在一个偶联的单管反应中使用单一热稳定 DNA 聚合酶。相对于以前所述的高温逆转录方法，
30 本发明的方法提供了较高的逆转录 (“RT”) 效率。

在一个优选实施方案中，本发明提供了在镁离子 (Mg^{+2}) 缓冲液中逆转录 RNA 的方法，以及使用单一热稳定 DNA 聚合酶在镁离子缓冲液



中逆转录和扩增 RNA 序列的方法，优选是一个偶联的单管反应。相对于以前所述的依赖锰离子 (Mn^{+2}) 激活热稳定 DNA 聚合酶的方法，使用镁离子缓冲液的该方法的保真性较高。

5 本发明的方法使用一种突变热活性 DNA 聚合酶，优选热稳定 DNA 聚合酶，其在关键氨基酸位置含有点突变，以前已经报导所述关键氨基酸位置影响 DNA 聚合酶对荧光素或花菁族染料标记的双脱氧核苷酸 (ddNTP) 的结合能力。本发明源于以下惊人发现，即这些突变 DNA 聚合酶也具有显著提高的进行逆转录反应的能力，特别是在镁离子缓冲液中的反应。

10 用于本发明方法的突变 DNA 聚合酶公开于欧洲专利申请 0 902,035、共同未决的美国专利申请 09/146,631 和 PCT 国际专利公开 WO 98/40496，所述专利申请均引为参考。根据其中的记载，这些突变的 DNA 聚合酶具有更强的结合核苷酸的能力，所述核苷酸包括荧光素和花菁族染料标记的脱氧核苷酸 (dNTP) 和双脱氧核苷酸 (ddNTP) 等碱基类似物。为方便起见，这些突变 DNA 聚合酶在本文中称为“荧光素家族染料结合”DNA 聚合酶或“FDI”DNA 聚合酶。FDI DNA 聚合酶的主要用途是用于使用荧光素或花菁族染料标记的染料终止物 (染料标记的 ddNTP) 的 DNA 测序反应中。由于野生型 DNA 聚合酶排斥识别核苷酸类似物，甚至排斥标记的核苷酸类似物，染料终止物测序反应一般使用过量染料终止物。通过降低对标记染料终止物的排斥识别，FDI DNA 聚合酶使得用显著较低的染料终止物浓度进行测序反应成为可能。

25 在本发明方法中使用的 DNA 聚合酶中发生突变的关键氨基酸位置，与影响 DNA 聚合酶对荧光素和花菁族染料标记的双脱氧核苷酸的结合能力的关键氨基酸相同，该位置在欧洲专利申请 0 902 035 和共同未决的美国专利申请 09/146,631 中通过定位于天然酶中存在的一个保守基序中而得以鉴定。在多种 DNA 聚合酶中存在的序列基序的实例见本文表 1。序列基序和关键氨基酸下文以基本相同的方式鉴定。

30 最一般地说，使用标准的氨基酸单字母缩写时，该天然形式 DNA 聚合酶的关键基序包括以下氨基酸序列

LXXXXXXXXXE (SEQ ID NO:1)

其中，2 位的 X 是 S 或 A，3、4、6、7、8、9 和 10 位的 X 是任何

氨基酸，5位的X是L或I。

在一个更具体的实施方案中，天然形式DNA聚合酶的关键基序包括以下氨基酸序列

LSXELXIPYEE (SEQ ID NO:2)

5 其中，3位的X是Q或G，6位的X是S或A。含有该基序的DNA聚合酶的实例是栖热菌属DNA聚合酶。

在一个优选实施方案中，天然形式DNA聚合酶的关键基序包括以下氨基酸序列

LSQELAIPIYEE (SEQ ID NO:3)

10 含有该基序的DNA聚合酶的实例是栖热菌属水生栖热菌、嗜热栖热菌、Z05和T. caldophilus的DNA聚合酶。

在另一个优选实施方案中，天然形式DNA聚合酶的关键基序包括以下氨基酸序列

LSXELSIPYEE (SEQ ID NO:4)

15 其中，3位的X是Q或G。含有该基序的DNA聚合酶的实例是栖热菌属黄栖热菌、sps17和丝状栖热菌的DNA聚合酶。

在另一个更具体的实施方案中，天然形式DNA聚合酶中的关键基序包括以下氨基酸序列

LSVRLGXPVKE (SEQ ID NO:5)

20 其中，7位的X是V或I。含有该基序的DNA聚合酶的实例是栖热袍菌属海栖热袍菌和那不勒斯栖热袍菌的DNA聚合酶。

在另一个更具体的实施方案中，天然形式DNA聚合酶的关键基序包括以下氨基酸序列

LKSRIGLSVSE (SEQ ID NO:6)

25 含有该基序的DNA聚合酶实例是非洲栖热腔菌的DNA聚合酶。

在另一个更具体的实施方案中，天然形式DNA聚合酶的关键基序包括以下氨基酸序列

LAQNLNIXRKE (SEQ ID NO:7)

30 其中，8位的X是S或T。含有该基序的DNA聚合酶实例是芽孢杆菌属热坚芽孢杆菌和嗜热脂肪芽孢杆菌的DNA聚合酶。

在所有上述鉴定的关键基序中，关键氨基酸是4位氨基酸。

如实施例证实，对除E(实施例中使用的天然DNA聚合酶中存

在)、A、G或P以外的任何关键氨基酸的突变提供了较高的RT效率。因此,本发明的方法使用热活性突变DNA聚合酶,优选热稳定DNA聚合酶,其特征在于天然形式DNA聚合酶包括选自SEQ ID NO: 1-7的序列基序,该基序中4位氨基酸突变成除E、A、G或P外的任何氨基酸。5 优选,关键氨基酸突变成除E、A、G、P或Q外的任何氨基酸,更优选突变成除E、A、G、P、Q或D外的任何氨基酸。

本发明一方面涉及逆转录RNA的方法,该方法包括使用本文所述的突变热活性或热稳定DNA聚合酶进行逆转录。优选,该方法包括:

(a) 提供含有与RNA足够互补的引物和本文所述突变热活性或热10 稳定DNA聚合酶的反应混合物,该引物与RNA杂交并起始与靶RNA互补的cDNA分子的合成;和

(b) 在合适的条件下处理反应混合物以提供单链cDNA。

在一个优选实施方案中,反应步骤(a)在合适的缓冲液中进行,其中缓冲液含有 Mg^{+2} 。

15 本发明另一方面涉及扩增RNA的方法,该方法包括使用本文所述的突变热活性或热稳定DNA聚合酶进行单一酶合并逆转录/扩增反应。优选,该方法包括:

(a) 提供在合适的缓冲液中含有第一和第二引物以及本文所述突20 变热活性或热稳定DNA聚合酶的反应混合物,其中第一引物与靶RNA足够互补,从而与其杂交并起始与靶RNA互补的cDNA分子的合成,第二引物与靶RNA足够同源,从而与cDNA杂交并起始延伸产物的合成,缓冲液中含有 Mg^{+2} ;

(b) 在合适的条件下处理反应混合物以提供单链cDNA;

(c) 在合适的条件下处理步骤(b)的反应混合物以扩增步骤(b)的25 cDNA。

在优选实施方案中,逆转录和扩增是使用本文所述的突变热活性或热稳定DNA聚合酶在含有 Mg^{+2} 的缓冲液中进行的单一酶单管偶联逆转录/PCR扩增反应。

发明详述

30 为了方便理解本发明,以下定义一些术语。

术语“热活性DNA聚合酶”在本文中是指具有较高的最适反应温度的DNA聚合酶。在本发明中,热活性DNA聚合酶催化最适合在60

到 90°C 之间的温度进行的引物延伸。

术语“热稳定 DNA 聚合酶”是指对热稳定的 DNA 聚合酶，即它在实现双链核酸变性所必需的时间内处于较高温度不会不可逆地变性（失活）。核酸变性所需的加热条件在本领域中是众所周知的。在本文中，热稳定聚合酶适合在如 4, 965, 188（本文引为参考）所述的聚合酶链反应（PCR）扩增方法的循环反应温度下使用。

“高温逆转录反应”在本文中是指在至少 40°C 下进行的逆转录反应，优选反应温度为 40°C 到 80°C，更优选 50°C 到 70°C。

术语“基因”是指含有生成可回收的生物活性多肽或前体所必需的控制和编码序列的 DNA 序列。

术语“天然的”是指由天然来源分离的基因或基因产物。该术语也指通过分子生物学技术制备的重组形式天然蛋白，其氨基酸序列与天然形式相同。

术语“突变体”是指其核酸序列已经发生改变的基因或其氨基酸序列已经发生改变的基因产物，产生的基因产物具有与天然或野生型基因或基因产物不同的功能特性。

在本文中，氨基酸序列中的“点突变”是指单个氨基酸取代或单个氨基酸缺失。点突变优选通过编码 DNA 中合适的密码子改变引入氨基酸序列。

序列中各个氨基酸在本文中表示为 AN，其中 A 是序列中的氨基酸，N 是在序列中的位置。氨基酸序列中取代型点突变在本文中表示为 A_1NA_2 ，其中 A_1 是未突变蛋白序列中的氨基酸， A_2 是突变蛋白序列中的氨基酸，N 是氨基酸序列中的位置。使用单字母或三字母代码代表氨基酸（参见 Lehninger, BioChemistry 2nd ed., 1975, Worth Publishers, Inc. New York, NY: p73-75, 本文引为参考）。例如 G46D 突变代表 46 位甘氨酸到天冬氨酸的改变。氨基酸位置根据蛋白的全长序列编号，含有突变的区域来自该全长序列。DNA 序列中核苷酸和点突变的表示与此类似。

术语“核酸”和“寡核苷酸”是指待检测的引物、探针和寡聚体，是聚脱氧核糖核苷酸（含 2-脱氧-D-核糖）、聚核糖核苷酸（含 D-核糖）和作为嘌呤或嘧啶碱基或修饰嘌呤或嘧啶碱基的 N 糖苷的任何其它类型多核苷酸的总称。术语“核酸”和“寡核苷酸”的长度没

有确定的区别，这些术语可以互换使用。这些术语仅指分子的一级结构。因此，这些术语包括双链和单链 DNA 以及双链和单链 RNA。

寡核苷酸可通过任何合适的方法制备，包括例如合适序列的克隆和限制和直接化学合成，化学合成方法包括磷酸三酯法 (Narang et al., 1979, Meth. Enzymol. 68:90-99)、磷酸二酯法 (Brown et al., 1979, Meth. Enzymol. 68:109-151)、二乙基磷酰胺 (diethylphosphoramidite) 法 (Beaucage et al., 1981, Tetrahedron Lett. 22:1859-1862) 和固相载体法 (美国专利 4,458,066)，上述文献均引为参考。使用氰乙基磷酰胺化学法的自动合成是优选的。试剂和仪器可向例如 PE Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, CA) 和 Pharmacia (Piscataway, NJ) 洽购。

术语“引物”在本文中是指天然或合成的寡核苷酸，当置于起始引物延伸的条件下时，它能作为合成的起始点。引物优选是单链寡脱氧核糖核苷酸。引物的合适长度取决于引物的预定用途，但一般是 15 到 35 个核苷酸。短引物分子与模板形成足够稳定的杂合体通常需要较低的温度。引物无需反应模板的确切序列，但必需足够互补，从而与引物延伸模板杂交。

“一对引物”在本文中是指为扩增所需靶序列选定的在聚合酶链反应等扩增反应中有功能的第一和第二引物。例如，为用于扩增靶 RNA 的偶联逆转录/扩增反应，一对引物包括第一和第二引物，其中第一引物与靶 RNA 足够互补，从而与其杂交并起始与该靶 RNA 互补的 cDNA 分子合成，所述第二引物与所述靶 RNA 足够同源，从而与 cDNA 杂交并起始延伸产物的合成。扩增核酸序列的引物对的设计在本领域是众所周知的。

必要时，引物可以通过掺入分光光度法、光化学法、免疫化学法或化学法可以检测的标记进行标记。例如，有用的标记包括 ^{32}P 、荧光染料、电子致密试剂、酶 (ELISA 试验中常用)、生物素或可用其获得抗血清或单克隆抗体的半抗原和蛋白。

在本文中，术语“cDNA”是指使用核糖核酸链 (RNA) 作为模板合成的 DNA 分子拷贝。RNA 可以是 mRNA、tRNA、rRNA 或病毒 RNA 等其它形式 RNA。cDNA 可以是单链、双链或可以是与互补 RNA 分子氢键

结合成 RNA/cDNA 杂合体。

术语“逆转录反应混合物”是指含有用来逆转录靶 RNA 的各种试剂的含水溶液。这些试剂包括酶、含水缓冲液、盐、寡核苷酸引物、靶核酸和核苷三磷酸。在不同情况下，混合物可以是完整或不完整的
5 逆转录反应混合物。

术语“扩增反应混合物”是指含有用来扩增靶核酸的各种试剂的含水溶液。这些试剂包括酶、含水缓冲液、盐、扩增引物、靶核酸和核苷三磷酸。在不同情况下，该混合物可以是完整或不完整的反应混合物。在本发明优选实施方案中，扩增反应是聚合酶链反应（PCR），
10 扩增反应混合物是 PCR 混合物。在本文中，扩增反应混合物包括在偶联逆转录/扩增反应中用于扩增 RNA 的反应混合物。

术语“缓冲液”在本文中是指含有缓冲剂或缓冲剂混合物的溶液，可选地含有二价阳离子和单价阳离子。

分子生物学和核酸化学的常规技术均属现有技术，在文献中有详细的介绍。参见例如 Sambrook et al., 1989《分子克隆 - 实验指南》，
15 Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York; 《寡核苷酸合成》(M. J. Gait, ed., 1984); 《核酸杂交》(B. D. Hames 和 S. J. Higgins. Eds., 1984); 《分子生物学基本方法》(Elsevier, NY); 《现代分子生物学方法》(John Wiley 和 Sons, NY) 及《酶学方法》系列 (Academic Press, Inc.)，上引文献全部引为参考。本文上文和下文提及的所有专利、专利申请和出版物均引为参考。
20

本发明方法中使用的突变 DNA 聚合酶在欧洲专利申请 0 902,035、共同未决的美国申请 09/146,631 和 PCT 国际专利公开
25 W098/40496 (均引为参考) 鉴定的关键氨基酸位置含有点突变。欧洲专利申请 0 902,035 和共同未决的美国申请 09/146,631 鉴定了天然 DNA 聚合酶序列中发现的保守关键序列内的关键氨基酸位置。PCT 国际公开 WO 98/40496 通过与 Taq DNA 聚合酶的氨基酸序列同源性鉴定了 Taq DNA 聚合酶和其它 DNA 聚合酶中关键氨基酸的位置 (E681)。
30 两种方法均鉴定了相同的关键氨基酸位置。为了叙述的准确性，本文中关键氨基酸采用其在保守关键序列基序中的位置表述。

表 1 基本上是按照欧洲专利申请 0 902,035、共同未决的美国申

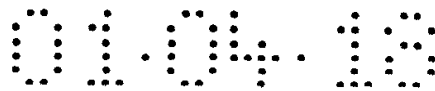
请 09/146,631 的表 1 复制而来, 它提供了多种代表性 DNA 聚合酶中发现的关键基序(关键氨基酸以黑体表示)和全长酶序列中关键氨基酸的位置。提供了多个位置数, 其中相同物种的 DNA 聚合酶在文献中报导的氨基酸序列略有不同。

5 表 1

生物体	<u>SEQ ID NO:</u>	关键基序	位置
栖热菌			
水生栖热菌	8	LSQELAI P YEE	681
黄栖热菌	9	LSGELSI P YEE	679
嗜热栖热菌	10	LSQELAI P YEE	683
Z05	11	LSQELAI P YEE	683
sps17	12	LSQELSI P YEE	679
<i>caldophilus</i>	13	LSQELAI P YEE	683
丝状栖热菌	14	LSQELSI P YEE	679
栖热袍菌			
海栖热袍菌	15	LSVRLGVPV K E	744
那不勒斯栖热袍菌	16	LSVRLGIPV K E	744
栖热腔菌			
非洲栖热腔菌	17	LSKRIGLSV S E	743
芽孢杆菌			
热竖芽孢杆菌	18	LAQNLNISR K E	725, 724
嗜热脂肪芽孢杆菌	19	LAQNLNITR K E	724, 727, 802

具有热活性 DNA 聚合酶的多种物种可参见欧洲专利申请 0 902, 035、共同未决的美国申请 09/146, 631 和 PCT 国际专利公开 W098/40496, 该酶含有关键基序。用于本发明的优选 DNA 聚合酶来自一种栖热菌。

10 用于本发明方法的突变 DNA 聚合酶是热活性突变 DNA 聚合酶, 优选热稳定 DNA 聚合酶, 其特征在于天然形式 DNA 聚合酶包括选自 SEQ ID NO: 1-7 的序列基序, 该基序中 4 位氨基酸突变成除 E、A、G 或



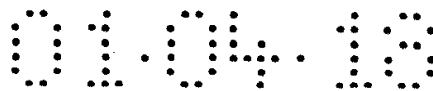
P 外的任何氨基酸。优选，关键氨基酸突变成除 E、A、G、P 或 Q 外的任何氨基酸，更优选突变成除 E、A、G、P、Q 或 D 外的任何氨基酸。

突变 DNA 聚合酶可以来自于任何具有热活性 DNA 聚合酶的物种，该酶含有聚合酶结构域中的关键基序。关键基序确定该酶的聚合酶结构域内的具体功能区域，确定该基序内对其功能至关重要的氨基酸。5 这些实例介绍了广泛使用的热稳定 DNA 聚合酶嗜热栖热菌 DNA 聚合酶中该位点的每一种可能的突变对镁离子激活的逆转录效率的影响。在基本上所有具有保守的关键基序的 DNA 聚合酶中，该位点的氨基酸改变影响荧光素或花菁族染料标记的双脱氧核苷酸 (ddNTP) 的掺入效率，10 预期该位点的氨基酸改变将会影响几乎所有具有保守关键基序的 DNA 聚合酶的镁离子激活的逆转录效率。

DNA 聚合酶的结构相关性和保守功能域的存在是众所周知的 (参见例如 Ito 和 Braithwaite, 1991, Nucl. Acids Res. 19(15):4045-4047; Blanco et al., 1991, Gene 100:27-38; Gutman 15 和 Minton, 1993, Nucl. Acids. Res. 21(18):4406-4407; 和 Delarue et al., 1990, Protein Engineering 3(6):461-467; 均引为参考)。一般，预期保守功能域中关键氨基酸的突变引入其它 DNA 聚合酶具有类似效果 (参见例如, Xu et al., 1997, J. Mol. Biol. 268:284-302; 美国专利 5,466,591; 5,795,762; 5,939,292 和 20 5,614,365, 均引为参考)。

其它含有关键基序的热活性或热稳定 DNA 聚合酶及其中关键氨基酸的位置可以通过直接考察氨基酸序列方便地确定。此外，关键基序和氨基酸可以利用与其它已知含有关键基序的 DNA 聚合酶如表 1 所列的嗜热菌的 DNA 聚合酶的序列同源性确定。氨基酸和核酸序列比较程序可以方便地获得。例如，包括 “GAP”、“BESTFIT” 和 “PILEUP” 25 的广泛使用的序列比较程序可获自 Genetics Computer Group (Madison, Wisconsin)。一般，使用缺省参数进行序列比较促进与表 1 中所列的 DNA 聚合酶之一的关键氨基酸同源的 DNA 聚合酶序列中关键氨基酸的确定。

30 获得了新的 DNA 聚合酶序列后，可以发现含有在 SEQ ID NO:1 中未明确描述的关键基序变体，但通过与已知酶的序列同源性可鉴别的序列。作为假定的例子，以下酶由于其与几种嗜热菌酶的关键基序的



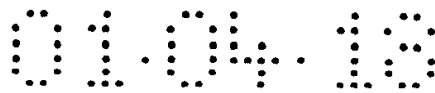
高同源性（本例中是 11 个氨基酸中的 10 个）将被认为具有该关键基序，该酶在 DNA 聚合酶结构域具有作为 SEQ ID NO: 3 变体的基序，其区别仅在于 5 位氨基酸不是 L 或 I。这种酶就本发明目的而言被视为等同物。

5 关键氨基酸参照天然酶确定。但是，这并不意味着突变酶其它各处的氨基酸序列与天然酶相同。本发明方法中使用的突变 DNA 聚合酶可以含有其它突变，这些突变对于具体的应用可能更有利。例如，消除了 5' 到 3' 外切核酸酶活性或 3' 到 5' 外切核酸酶活性的突变及其应用是众所周知的。在 SEQ ID NO: 1-7 中确定的关键基序 3 位上的另一个突变（例如 Tth DNA 聚合酶的 Q682K、E683K 突变）可以提供额外的
10 好处，特别是在 Mn^{+2} 激活的反应中，如允许 Mn^{+2} 浓度进一步降低，或进一步扩展可以使用的盐浓度范围。

 本发明方法中使用的 DNA 聚合酶优选以重组表达载体表达，在该载体中编码序列已经过修饰，表达特定的目标突变蛋白序列。在表达
15 质粒的编码序列中引入点突变的方法在本领域是众所周知的，在本文引用的专利和科学文献中也有介绍。详细的方法介绍参见例如 Sambrook et al., 《分子克隆：实验指南》Cold Spring Harbor, 1989, 第二版, 15.51 章“寡核苷酸介导的诱变”和 Ausebel et al., 《现代分子生物学方法》（最新版），二者均引为参考。欧洲专利申请 0
20 902,035、共同未决的美国申请 09/146,631 和 PCT 国际专利公开 W098/40496 教导了合适表达载体的构建和所得突变 DNA 聚合酶的表达和纯化。按照引用文献的指导，使用众所周知的技术，本领域技术人员将能够制备任何数量的表达载体，其中含有适于在多种宿主系统中表达本发明方法中使用的突变 DNA 聚合酶的突变基因。

25 用于本发明的高温逆转录方法时，只需要 DNA 聚合酶是热活性即可。由于由 RNA 模板制备 cDNA 不涉及高温重复变性循环，该方法中使用的酶没有必要是热稳定的和热活性的。在实施例中的单一酶合并逆转录/聚合酶链反应扩增（RT/PCR）方法中，使用热稳定 DNA 聚合酶是优选的，因为 DNA 聚合酶要经受 RT 和 PCR 两种条件，其中包括
30 重复变性循环。

 根据本发明逆转录时，在含有 RNA 模板、引物和热活性或热稳定突变 DNA 聚合酶的混合物中进行反应。反应混合物通常含有所有四种



脱氧核苷三磷酸 (dNTP) 和含有二价阳离子和一价阳离子的缓冲液。DNA 聚合酶的催化活性需要二价阳离子。使用 DNA 模板进行延伸反应时, 优选的二价阳离子是镁离子, 但锰离子或钴离子等其它阳离子也可激活 DNA 聚合酶。

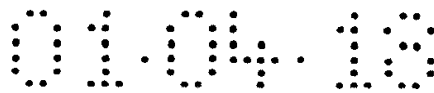
5 与使用热活性或热稳定 DNA 聚合酶和 DNA 模板的延伸反应不同, 使用 RNA 模板的延伸反应即逆转录基本上必需使用锰离子来获得实用的效率。例如使用氯化锰或醋酸锰与 Tth DNA 聚合酶进行 RNA 扩增比使用氯化镁和标准 PCR 条件相比, 敏感性至少增加 10^6 倍。

10 尽管使用 Mn^{+2} 增加逆转录效率, 但也降低保真性, 产生较多的错误合成核苷酸。使用 Mn^{+2} 也降低 DNA 扩增的保真性。因此, 使用 Mn^{+2} 的单酶单管 RNA 扩增反应的结果是降低 RNA 和 DNA 反应阶段的保真性。因此, 如需要高保真 RNA 扩增, 优选分两步进行反应, 首先使用 EDTA 等螯合剂从逆转录混合物中有效去除锰离子, 然后加入合适的含镁离子的 DNA 扩增混合物完成反应, 优选的螯合剂是 EGTA。

15 无论使用何种二价阳离子, 在本发明方法中使用突变 DNA 聚合酶对逆转录反应都是有利的。在锰离子反应中, 与使用天然酶相比, 使用突变 DNA 聚合酶可以进行高温逆转录, 以更高的效率扩增 RNA。此外, 使用突变 DNA 聚合酶可以在较低的锰离子浓度下进行反应, 因此, 减少了锰离子对保真性的负面影响。

20 尤其出乎意料的是, 突变 DNA 聚合酶能使用镁离子以显著增加的效率进行逆转录。使用该酶的优选二价阳离子镁离子, 提供了显著较高的保真性。因此, 在镁离子反应中, 使用突变 DNA 聚合酶可以以实用的效率进行高温、高保真 RNA 逆转录和扩增。

25 二价阳离子以盐形式提供, 如氯化镁、醋酸镁、硫酸镁、氯化锰、醋酸锰或硫酸锰。通常, 使用二价锰离子的反应中, 在 Tris-HCl 缓冲液中可以使用的阳离子浓度是 0.5 到 7 mM $MnCl_2$, 优选 0.5 到 2 mM, 在 N-二甘氨酸/醋酸钾缓冲液或三甘氨酸(tricine)/醋酸钾缓冲液中可以使用的阳离子浓度是 0.5 到 20 mM 醋酸锰, 优选 0.5 到 5 mM。一般, 使用二价镁离子的反应中, 在 Tris-HCl 缓冲液中可以使用的阳离子浓度是 0.5 到 10 mM $MgCl_2$, 在 N-二甘氨酸/醋酸钾缓冲液或三甘氨酸(tricine)/醋酸钾缓冲液中可以使用的阳离子浓度是 0.5 到 20 mM 醋酸锰, 优选 0.5 到 5 mM。这些浓度提供进行常规反应优



化的有用起始条件。在特定反应中，最佳二价离子浓度不仅取决于所用的酶，也取决于其它反应成分，如 dNTP 浓度和引物序列和浓度。本领域技术人员可以理解，对于任何特定反应，一般反应条件，特别是二价阳离子浓度，可以使用常规实验方法实现优化。

5 以前，尽管混合二价阳离子缓冲液（如二价镁离子和二价锰离子）能够激活 RNA 模板指导的 DNA 合成，但由于较低的敏感性和效率，它并不是优选的。预期混合二价阳离子缓冲液可以用于本发明的方法中，在某些应用中还可能是优选的。使用混合阳离子可能在高效率但低保真性的 Mn^{+2} 激活反应和高保真 Mg^{+2} 激活反应中实现平衡。

10 在 Mn^{+2} 缓冲液中使用热稳定 DNA 聚合酶的高温逆转录方法和合并逆转录/扩增方法在本领域是众所周知的。参见，例如美国专利 5,310,652；5,322,770；5,407,800；5,561,058；5,641,864 和 5,693,517，均引为参考。本发明的方法是前述方法的改进，其中改进包括使用突变 DNA 聚合酶，已如上述。在优选实施方案中，反应在
15 含有 Mg^{+2} 作为激活 DNA 聚合酶的二价阳离子的缓冲液中进行。

本发明方法的一个优点是使用突变 DNA 聚合酶似乎提供了较快的 RT 延伸速度，因此 RT 反应所需的时间较少。优选，为了使逆转录反应中产生的 cDNA 量最大，反应进行约 30 分钟。取决于具体应用，特别是在锰反应中，RT 时间短至 1 分钟或更短可以提供可接受的结果。

20 本发明方法的其它优点是使用突变 DNA 聚合酶可以在较低的酶浓度提供较高的 RT 效率，并且提供较宽的可使用盐浓度范围。预期，最适反应条件取决于诸如使用的具体酶，可以以常规方式凭经验确定。

25 实施本发明方法所需考虑的其它方面，如靶 RNA 的选择，样品制备，引物设计和除 DNA 聚合酶和二价阳离子以外用来激活 DNA 聚合酶
的其它反应条件，在本领域是众所周知的，可参见例如上引专利。同样，如果逆转录偶联扩增反应，除 DNA 聚合酶和二价阳离子以外用来
30 激活 DNA 聚合酶的所有扩增方面在本领域也是众所周知的，可参见例如上引专利。最后，RNA 的逆转录和扩增的应用在本领域是众所周知的，可参见例如上引专利。本领域技术人员可以将本发明方法应用于需要 RNA 逆转录或还需要扩增的任何应用中。

提供以下实施例仅为说明，并非以任何方式限制本发明。

实施例 1

突变 DNA 聚合酶实例

由“天然”嗜热栖热菌 (Tth) DNA 聚合酶构建一系列共 19 个突变 DNA 聚合酶, 代表关键氨基酸中的所有可能突变。如欧洲专利申请 5 0 902 035 和共同未决的美国申请 09/146, 631 中所述, Tth DNA 聚合酶氨基酸序列含有 SEQ ID NO: 3 代表的关键序列基序 (它是 SEQ ID NO: 2 的具体实施方案, 而后者是普通基序 SEQ ID NO: 1 的较窄的实施方案)。关键氨基酸位于 683 位 (E683)。

Tth DNA 聚合酶序列和含有 Tth DNA 聚合酶基因的质粒在本领域 10 是已知的 (例见美国专利 5, 618, 711 和 5, 789, 224, 均引为参考)。在本实施例中使用的具体质粒编码也含有 G46E 点突变的 Tth DNA 聚合酶, 该突变消除了酶的 5' 到 3' 外切核酸酶活性, 如美国专利 5, 466, 591 所述, 该专利引为参考。此外, 专利含有静默核苷酸取代, 引入了含有密码子 678、679 和 680 的第一个核苷酸的 ClaI 识别和切 15 割位点, 没有改变编码氨基酸序列。据信在 5' 到 3' 外切核酸酶结构域存在其它突变对 DNA 聚合酶在 Mg^{+2} 缓冲液中逆转录 RNA 的能力没有可见的影响; 具有 G46E 突变的 DNA 聚合酶在本文中被认为是天然 DNA 聚合酶。

在表达蛋白中的点突变通过使用标准技术突变编码 DNA 序列引 20 入。基本上, 含有密码子 683 的编码序列短片段用含有所需序列的合成片段置换。长度为 65 个核苷酸的短片段通过限制酶 *CalI* 和 *HindIII* 消化质粒切割。合成编码氨基酸序列同切割片段相同但在密码子 683 中含有所需突变的合成双链 DNA 插入物。合成的片段连接至消化的质粒中, 产生含有编码具有所需点突变的全长 Tth DNA 聚合酶的突变密 25 码子的质粒。

实施例 2

逆转录/扩增效率

比较实施例 1 的 20 种 DNA 聚合酶 (1 种天然酶和 19 种突变酶) 催化逆转录/扩增反应的能力。一般, 用各种 DNA 聚合酶进行偶联单 30 酶逆转录/扩增反应。每个反应中使用相同的起始靶拷贝数, 在反应中监测扩增产物的合成。确定每种 DNA 聚合酶产生任意但确定量的扩增产物所需的循环数, 它反映了反应效率。由于在逆转录/扩增反应

中，起始逆转录步骤一般是关键的限速步骤，总体反应效率的提高也表明了起始逆转录步骤反应效率的提高。

在反应中扩增核酸的增加使用文献中所述的方法 (Higuchi et al., Bio/Technology 10:413-417, 1992; Higuchi et al., 1993, Bio/Technology 11:1026-1030; Higuchi 和 Watson 《PCR 应用》，上文，16 章；美国专利 5,994,056；和欧洲专利公开 487,218 和 512,334，均引为参考) 监测。这些方法在本文中称为动态 PCR，它们取决于溴化乙锭 (EtBr) 和其它 DNA 结合染料结合于双链 DNA 时增加的荧光，以便测定反应中双链 DNA 的量的变化。由靶序列合成导致的双链 DNA 的增加引起结合于双链 DNA 的染料量的增加和相应的荧光的可见增加。

在反应中用溴化乙锭进行扩增。或者，在反应中使用 SYBR[®] Green I (Molecular Probes, Eugene, OR) 进行扩增。两种染料在插入或结合于双链 DNA 后荧光增加。反应在合并的热循环仪和荧光测定系统中进行，荧光测定系统可以监测扩增反应过程中反应混合物的荧光。很清楚，除了下文所述仪器外，还可以使用任何合适的仪器。

RNA 靶和扩增引物

靶 RNA 使用编码人甘油醛 - 3 - 磷酸脱氢酶 (GAPDH) 基因的表达质粒合成。GAPDH RNA 的一个区用以下引物扩增，引物以 5' 到 3' 方向显示：

P1 (SEQ ID NO:20) 5'-CGAGATCCCTCCAAAATCAA

P2 (SEQ ID NO:21) 5'-CATGAGTCCTTCCACGATACCAA

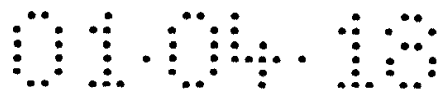
起始靶浓度以标准方式测定。比较本文所述反应时，相对拷贝数较绝对拷贝数更重要。为了确保每一反应中的拷贝数相同，使用同一起始 RNA 储存液稀释物等分试样。

本领域技术人员会意识到选择靶很方便。其它 RNA 靶和相应扩增引物可以以基本相同的方法使用。反应条件的常规优化是可以预期的。

扩增

每一 RT-PCR 扩增在 100 μ l 的总反应体积中进行。最终试剂浓度如下：

10 单位 DNA 聚合酶



10⁶ 拷贝 GAPDH RNA

50 mM 三甘氨酸, pH8.15

50 mM 醋酸钾

2 mM 醋酸镁

5 200 μM dATP, dGTP, dCTP

400 μM dUTP

200 nm 各种引物

8% 甘油

1% DMSO

10 1 μg/ml 溴化乙锭

2 单位 UNG*

*由 Roche Molecular Systems 生产, Applied Biosystems, Foster City, CA 销售。

或者, 可以用 SYBR[®] Green I 代替溴化乙锭用来监测扩增产物。

15 使用 SYBR[®] Green I 的扩增在 DMSO 稀释的 0.2×SYBR[®] Green I (商品形式为 10,000×) 中进行。

使用溴化乙锭的反应优选使用 ABI PRISM[®]7700 序列测定系统 (Applied Biosystems, Foster City, CA) 进行, 该系统可以选择适当的检测波长。使用 SYBR[®] Green I 的反应优选使用 GeneAmp[®]5700 序列测定系统 (Applied Biosystems, Foster City, CA) 在相同的热循环条件下进行。GeneAmp[®]5700 序列测定系统是为使用 SYBR[®] Green I 而设计, 其激发和测定波长预先针对这种染料设定。

25 下文所述实验使用常规仪器进行, 该仪器基本上由 GeneAmp[®]PCR 系统 9600 热循环仪 (PE Biosystem, Foster City, CA) 组成, 但增加了类似于 GeneAmp[®]5700 序列测定系统中使用的、但设计使用溴化乙锭的荧光检测系统。使用该常规仪器获得的结果预期与使用优选的仪器之一获得的结果相当。

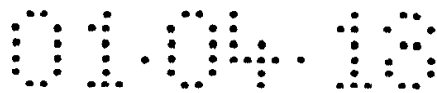
使用如下所示的具体温度循环进行扩增反应。

热循环时间和温度

反应前温育: 50°C 2 分钟

逆转录: 60°C 30 分钟

95°C 1 分钟



55 个循环	变性	95°C 15 秒
	退火	55°C 30 秒
	延伸	72°C 15 秒
最后延伸和保持:		72°C

检测

反应过程中每一循环的扩增产物积累通过测定反应荧光的增加确定。在每一扩增循环中，每一反应以接近染料最大激发极限的波长的光激发，染料发射在接近其最大发射极限处测定。

5 荧光测定通过除以在反应中循环间荧光测定值相对恒定的循环早期获得的起始荧光测定值来标准化。选定进行起始荧光测定的循环数对比较的所有反应是相同的，所以所有测定值代表了相对相同反应循环的增加值。

10 进行到荧光超过任意荧光水平 (AFL) 的扩增循环数由观察的荧光值计算。选择接近基线荧光水平但高于测定荧光的随机波动范围的 AFL，以便确定在扩增早期产物呈几何级数增加时的反应动力学。在扩增的几何增长期间，达到特定阈值所需的循环数仅取决于起始拷贝数和反应效率。如每一反应使用相同的起始靶拷贝数，达到阈值的循环数就是反应效率的度量。在较后的循环中，扩增产物的积累和试剂
15 的消耗最终会导致反应平台。

所有反应的 AFL 选定为 1.12。由于 PCR 扩增由单独的循环组成并且每一循环进行荧光测定，在每一循环中测定的荧光一般由低于 AFL 增加到高于 AFL。为了提高测定的准确度，达到 AFL 阈值的“精确”循环数 (本文称为 C_T 值) 通过循环间荧光测定值的内插计算。

20 结果

使用天然 Tth DNA 聚合酶 (E683) 和每种突变 DNA 聚合酶 (以 683 位的氨基酸表示) 获得的 C_T 值示于下表。每一 C_T 值代表两个反应中获得的平均值。为了方便比较，也提供了 C_T 值差，即 (天然 C_T 值) - (突变 C_T 值)。使用突变 DNA 聚合酶增加了效率，导致达到预期所
25 需的循环数较少，即 C_T 值较低。因此， C_T 值的正差代表效率的增加。

反应效率

aa @ 683 单字 母代码	aa @ 683 三字 母代码	平均C _T	(天然C _T 值) - (突变C _T 值)
E	Glu	37.7	0.0
A	Ala	38.7	-1.1
C	Cys	33.2	4.5
D	Asp	36.6	1.1
F	Phe	28.2	9.5
G	Gly	42.3	-4.7
H	His	32.0	5.7
I	Ile	33.4	4.3
K	Lys	27.6	10.1
L	Leu	27.8	9.9
M	Met	30.3	7.4
N	Asn	31.5	6.2
P	Pro	38.8	-1.1

Q	Gln	37.4	0.3
R	Arg	27.2	10.5
S	Ser	32.0	5.7
T	Thr	31.5	6.2
V	Val	31.4	6.3
W	Trp	29.2	8.5
Y	Tyr	26.1	11.6

结果表明 683 位氨基酸突变成除 Ala, Gly 或 Pro 以外的任何氨基酸导致 DNA 聚合酶的效率增加。其中, 除 Asp 和 Gln 突变体外, 其

余突变体导致 C_T 值改善至少 4 个循环。

实施例 3

逆转录效率

比较实施例 1 所述的选定 DNA 聚合酶催化逆转录反应的能力。使用 Mg^{+2} 或 Mn^{+2} 对每一种 DNA 聚合酶进行逆转录反应。由每一反应得到的 cDNA 然后使用天然酶和 Mg^{+2} 在所示条件下进行扩增。该方法可以测定酶对逆转录/扩增反应中逆转录的特异性影响。

除了天然酶外，使用 683 位氨基酸为 F、K、L、R 和 Y 的突变 DNA 聚合酶进行反应。实施例 2 中证实这些突变均显著增加合并逆转录/扩增反应的效率。

逆转录

在 $100\mu l$ 的总反应体积中进行每一种逆转录反应。最终试剂浓度如下：

- 5 单位 DNA 聚合酶
- 15 10^6 拷贝 GAPDH RNA
- 50 mM 三甘氨酸, pH8.15
- 50 mM 醋酸钾
- 2 mM 醋酸镁或醋酸锰
- 200 μM dATP, dGTP, dCTP, dUTP
- 20 200 nm 各种引物
- 8% 甘油
- 1% DMSO
- 0.2 \times SYBR[®]Green I
- 1 单位 UNG*
- 25 *由 Roche Molecular Systems 生产, Applied Biosystems, Foster City, CA 销售。

使用如下所示的具体温度循环进行扩增反应。

逆转录时间和温度

反应前温育:	50°C 2 分钟
逆转录:	60°C 30 分钟
保持:	4°C

扩增

逆转录后，向 10 μ l 反应产物加入 10 μ l 2 mM EGTA 螯合金属离子，从而从下列扩增反应中有效去除金属离子。将混合物加入含有天然酶和 Mg²⁺ 的 PCR 扩增混合物。因此，残余突变 DNA 聚合酶被稀释，预期任何效应均可忽略不计。用以下最终试剂浓度在 100 μ l 反应中进行 PCR 扩增：

- 5 单位天然 DNA 聚合酶
- 50 mM 三甘氨酸，pH8.15
- 50 mM 醋酸钾
- 10 2 mM 醋酸镁或醋酸锰
- 200 μ M dATP, dGTP, dCTP, dUTP
- 200 nm 各种引物
- 8% 甘油
- 1% DMSO
- 15 0.2 \times SYBR[®]Green I

使用如下所示的具体温度循环进行扩增反应。

扩增热循环时间和温度

		95°C 1 分钟
55 个循环	变性	95°C 15 秒
	退火	55°C 30 秒
	延伸	72°C 15 秒
最终延伸和保持		72°C

结果

使用天然 Tth DNA 聚合酶 (E683) 和每种突变 DNA 聚合酶 (以 683 位的氨基酸表示) 进行逆转录和天然 Tth DNA 聚合酶进行所有扩增获得的 C_T 值示于下表。每一 C_T 值代表两个反应中获得的平均值。为了方便比较，也提供了 C_T 值差，即 (天然 C_T 值) - (突变 C_T 值)。使用突变 DNA 聚合酶增加了效率，导致达到预期所需的循环数较少，即 C_T 值较低。因此，C_T 值的正差代表效率的增加。

反应效率

 Mg^{+2} 激活的 RT

aa @ 683	平均 C_T	(天然 C_T) - (突变 C_T)
E	33.8	0.0
F	26.9	6.9
K	29.0	4.8
L	26.0	7.8
R	25.9	7.9
Y	24.5	9.3

反应效率

 Mn^{+2} 激活的 RT

aa @ 683	平均 C_T	(天然 C_T) - (突变 C_T)
E	24.6	0.0
F	21.1	3.5
K	20.2	4.4
L	20.6	4.0
R	20.7	3.9
Y	20.3	4.3

5

这些突变 DNA 聚合酶的每一种均显著增加了逆转录/扩增反应的效率。因为每一反应的 DNA 扩增部分均使用天然酶进行，这些结果表明这些突变 DNA 聚合酶的每一种增加了反应中逆转录部分的效率。使用任一种阳离子这些突变 DNA 聚合酶均显著提高了效率。

10

使用 Mg^{+2} 的改善特别明显，表明使用天然 DNA 聚合酶使得 Mg^{+2} 激活的反应成为现实。与以前报导的一致，使用天然酶的 RNA 扩增必需使用 Mn^{+2} 获得实用的反应效率，这由使用 Mg^{+2} 时 C_T 几乎延迟 10 个循环 (33.8-24.6) 可知。相形之下，使用 E683Y 突变体时， Mg^{+2} 激活的反应的效率与使用天然酶和 Mn^{+2} 时相同。

实施例 4

保真性

选定突变 DNA 聚合酶和突变酶的保真性以几种方式进行了比较。在 Mg^{+2} 中进行的偶联逆转录/扩增反应的保真性与在 Mn^{+2} 缓冲液中进行的反应的保真性进行了比较。此外，比较了用于 DNA 扩增的酶的保真性。

DNA 聚合酶的保真性可以通过测定使用酶产生的扩增产物的融解温度 (T_m) 谱来比较。DNA 聚合酶的保真性反映的是链合成过程中发生错配的数量。使用低保真性酶的扩增将会导致产生的扩增序列群体的较大异质性。为了测定异质性，将扩增产物变性，退火，测定所得双链体的 T_m 。因为双链体中的链由异源序列群体随机联合形成，双链体一般含有一定双链的错配。扩增产物群体的异质性越大，双链体中的平均错配数越大。这些错配使双链体不稳定，因而测定的 T_m 值较低。

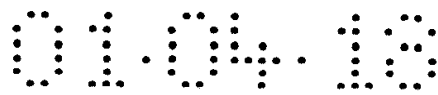
使用扩增时使用的热循环仪/荧光测定仪可以方便地获得动态 PCR 反应扩增产物的融解曲线。扩增后，荧光和稳定之间的关系在包含产物退火温度的温度范围内确定。双链和单链分子间的转换通过染料荧光的变化反映。因此，融解温度可以方便地确定。或者，可以使用标准方法进行测定，通常包括监测随温度变化的光密度变化，它是反应中双链 DNA 量的度量。

天然 DNA 聚合酶的保真性与含有 E683K 和 E683N 突变的两种突变 DNA 聚合酶的保真性分别进行比较。偶联逆转录/扩增反应基本上如实施例 2 所述在 Mg^{+2} 和 Mn^{+2} 缓冲液中按双份进行，改变如下。对 Mn^{+2} 反应，在反应中使用 2 mM 醋酸锰。使用 25 单位 DNA 聚合酶进行所有反应。

为了测定扩增双链靶序列的杂交稳定性谱（融解曲线），扩增后反应混合物的荧光在至少 60 到 80°C 的温度范围内监测。不出所料，荧光测定产生了 S 形融解曲线。 T_m 为 S 形融解曲线中温度的拐点，这相当于一半靶序列成为单链形式的温度。

结果

Mg^{+2} 激活反应和 Mn^{+2} 激活反应扩增产物的 T_m 值示于下表。给出的每一测定值均为两次反应的平均值。所有温度为摄氏度。



扩增产物 T_m 值

<u>DNA 聚合酶</u>	<u>T_m, Mg⁺²</u>	<u>T_m, Mn⁺²</u>
天然	80	78
E683K	80	76
E683N	80	76

5 使用 Mg⁺² 缓冲液，未观察到天然酶和突变 DNA 聚合酶的保真性有差别。使用所有 20 种 DNA 聚合酶进行的类似反应（数据未示出）证实，在 Mg⁺² 激活反应中所有突变 DNA 聚合酶的保真性与天然 DNA 聚合酶的保真性相同。

使用 Mn⁺² 缓冲液获得的结果与使用 Mg⁺² 缓冲液获得的结果相比，所有 DNA 聚合酶的保真性均下降，这可由所得的 T_m 值较低看出。有意思的是，使用 Mn⁺² 缓冲液时，两种突变 DNA 聚合酶甚至具有更低的保真性，至少在这些反应条件下。

10 保真性受 Mn⁺² 浓度影响。为了比较 Mn⁺² 浓度对突变和天然酶保真性的影响，使用 E683K 突变在 Mn⁺² 浓度为 0.5 到 5 mM 的范围内进行进一步试验。这些结果（数据未示出）表明，不出所料，使用两种酶中任一种，最低的 Mn⁺² 浓度均获得最高的保真性。突变酶的保真性较天然酶的保真性受增加的 Mn⁺² 浓度影响更甚。但是，出乎意料的是，至少在这些试验中，突变酶也是在最低的 Mn⁺² 浓度下最有效。因此，
15 使用突变酶可以在较低的 Mn⁺² 浓度下进行反应，从而使 Mn⁺² 浓度对保真性的不利影响最小。

此外，Mg⁺² 激活反应和 Mn⁺² 激活反应均基本如上所述进行，但使用 DNA 模板，这使仅在反应的 DNA 部分观察保真性的影响更为便利。
20 在所有情况下，DNA 扩增产物的 T_m 值与 RNA 扩增产物的 T_m 值无法区分。

该结果和前面实施例的结果证实了本发明方法的优势。以前报导了使用 Mn⁺² 进行高温逆转录和扩增的方法，其缺点是保真性降低。本发明提供了几种选择。使用 Mn⁺² 时，使用突变酶进行 RNA 的高温逆转录和扩增的效率较使用天然酶时要高，可以在较低的 Mn⁺² 浓度下进行
25 反应，从而使 Mn⁺² 浓度对保真性的不利影响最小。使用 Mg⁺² 时，使用突变酶提供了具有实用效率的 RNA 高温高保真逆转录和扩增。

序列表

<110> F. Hoffmann-La Roche AG
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel
瑞士

<120> 使用突变DNA聚合酶的高温逆转录

<130> 5395

<150> US 60/198,336

<151> 2000-04-18

<160> 21

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 序列基序

<220>

<221> 变体

<222> (2)..(2)

<223> X是S或A

<220>

<221> 变体

<222> (3)..(3)

<223> X是任何氨基酸

<220>

<221> 变体

<222> (4)..(4)

<223> X是任何氨基酸

<220>

<221> 变体

<222> (5)..(5)

<223> X是L或I

<220>

<221> 变体

<222> (6)..(6)

<223> X是任何氨基酸

<220>

<221> 变体

<222> (7)..(7)

<223> X是任何氨基酸

<220>
 <221> 变体
 <222> (8)..(8)
 <223> X是任何氨基酸

<220>
 <221> 变体
 <222> (9)..(9)
 <223> X是任何氨基酸

<220>
 <221> 变体
 <222> (10)..(10)
 <223> X是任何氨基酸

<400> 1

Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Glu
 1 5 10

<210> 2
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 序列基序

<220>
 <221> 变体
 <222> (3)..(3)
 <223> X是Q或G

<220>
 <221> 变体
 <222> (6)..(6)
 <223> X是S或A

<400> 2

Leu Ser Xaa Glu Leu Xaa Ile Pro Tyr Glu Glu
 1 5 10

<210> 3
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 序列基序

<400> 3

Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ile Pro Tyr Glu Glu
 1 5 10

<210> 4
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 序列基序

<220>
 <221> 变体
 <222> (3)..(3)
 <223> X是Q或G

<400> 4

Leu Ser Xaa Glu Leu Ser Ile Pro Tyr Glu Glu
 1 5 10

<210> 5
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 序列基序

<220>
 <221> 变体
 <222> (7)..(7)
 <223> X是V或I

<400> 5

Leu Ser Val Arg Leu Gly Xaa Pro Val Lys Glu
 1 5 10

<210> 6
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 序列基序

<400> 6

Leu Ser Lys Arg Ile Gly Leu Ser Val Ser Glu
 1 5 10

<210> 7
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 序列基序

<220>
 <221> 变体
 <222> (8)..(8)
 <223> X是S或T

<400> 7

Leu Ala Gln Asn Leu Asn Ile Xaa Arg Lys Glu
1 5 10

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> 水生栖热菌

<400> 8

Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ile Pro Tyr Glu Glu
1 5 10

<210> 9

<211> 11

<212> PRT

<213> 黄栖热菌

<400> 9

Leu Ser Gly Glu Leu Ser Ile Pro Tyr Glu Glu
1 5 10

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> 嗜热栖热菌

<400> 10

Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ile Pro Tyr Glu Glu
1 5 10

<210> 11

<211> 11

<212> PRT

<213> 栖热菌.Z05

<400> 11

Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ile Pro Tyr Glu Glu
1 5 10

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

<213> 栖热菌.sps17

<400> 12

Leu Ser Gln Glu Leu Ser Ile Pro Tyr Glu Glu
1 5 10

<210> 13

<211> 11

<212> PRT

<213> Thermus caldophilus

<400> 13

Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ile Pro Tyr Glu Glu
1 5 10

<210> 14
<211> 11
<212> PRT
<213> 丝状栖热菌

<400> 14

Leu Ser Gln Glu Leu Ser Ile Pro Tyr Glu Glu
1 5 10

<210> 15
<211> 11
<212> PRT
<213> 海栖热袍菌

<400> 15

Leu Ser Val Arg Leu Gly Val Pro Val Lys Glu
1 5 10

<210> 16
<211> 11
<212> PRT
<213> 那不勒斯栖热袍菌

<400> 16

Leu Ser Val Arg Leu Gly Ile Pro Val Lys Glu
1 5 10

<210> 17
<211> 11
<212> PRT
<213> 非洲栖热腔菌

<400> 17

Leu Ser Lys Arg Ile Gly Leu Ser Val Ser Glu
1 5 10

<210> 18
<211> 11
<212> PRT
<213> 热坚芽孢杆菌

<400> 18

Leu Ala Gln Asn Leu Asn Ile Ser Arg Lys Glu
1 5 10

<210> 19
<211> 11
<212> PRT
<213> 嗜热脂肪芽孢杆菌

<400> 19

Leu Ala Gln Asn Leu Asn Ile Thr Arg Lys Glu
1 5 10

<210> 20
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物

<400> 20
cgagatccct ccaaaatcaa 20

<210> 21
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物

<400> 21
catgagtcct tccacgatac caa 23