

[12] 发明专利申请公开说明书

[21]申请号 94113990.5

[51]Int.Cl⁶

C12Q 1/25

[43]公开日 1996年5月29日

[22]申请日 94.11.17

[71]申请人 中国科学院上海生物化学研究所

地址 200031上海市岳阳路320号

[72]发明人 洪国藩 翟峰

[74]专利代理机构 中国科学院上海专利事务所

代理人 袁诚宜 汪克臻

C12Q 1/68 C12N 9/00

C12N 1/20

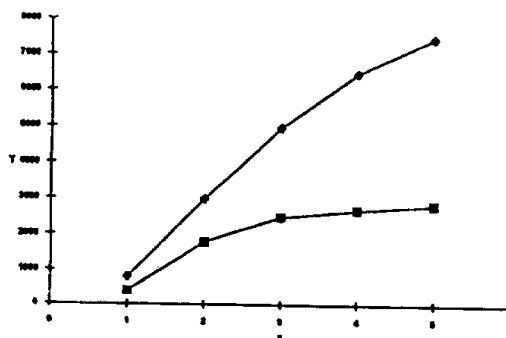
//(C12Q 1/25,C12R 1:07)

权利要求书 2 页 说明书 5 页 附图页数 1 页

[54]发明名称 高温、高传真脱氧核糖核酸(DNA)聚合酶(HiFi Bst)

[57]摘要

本发明表明,一种将嗜热脂肪芽孢杆菌(Bacillus stearothermophilus),经紫外线等处理制备所获得的高温、高传真DNA聚合酶(HiFi Bst)。具有高效地切除不配对的核苷酸的活力,使DNA顺序反应具有独特的专一性,从而保证了DNA顺序测定图谱的高质量。



权 利 要 求 书

1. 一种用于DNA顺序测定的高温、高传真DNA聚合酶(HiFi Bst)和它的分析系统, 其特征在于:

- (1) 它切除配对的核苷酸, 也切除不配对的核苷酸;
- (2) 切除不配对的核苷酸的速度大于切除配对核苷酸的速度;
- (3) 引物的设计为:

5' C A T T T T G C T G C C G G T C A 3'

(4) DNA模板设计

(a) 3' — G T A A A A C G A C G G C C A G T C T T — 5'

(b) 3' — G T A A A A C G A C G G C C A G T C G G — 5'

(5) 引物的同位素标记:

5' C A T T T T G C T G C C G G T C A 3'

— G T A A A A C G A C G G C C A G T C T T —

↓ $\alpha^{32}\text{P}$ dATP, dGTP, Taq酶

C A T T T T G C T G C C G G T C A G A* A* (*表示 ^{32}P 标记)

(6) 将标记引物与DNA模板配对:

引物

+

+

DNA模板 (a)

DNA模板 (b)



5' C A T T T T G C T G C C G G T C A G A* A* 3'

3' — G T A A A A C G A C G G C C A G T C G G — 5'

5' C A T T T T G C T G C C G G T C A G A* A* 3'

3' — G T A A A A C G A C G G C C A G T C T T — 5'

2. 根据权利要求1中所述的高温、高传真DNA聚合酶(HiFi Bst)

其特征在于是用紫外线处理嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Bacillus stearothermophilus*), 获得高产菌, 从中制备的DNA聚合酶, 再经枯草杆菌蛋白酶 (*Subtilisin*) 将此酶水解成二个片段, 其中大片段即是HiFi Bst。

说 明 书

高温、高传真脱氧核糖核酸 (DNA) 聚合酶 (HiFi Bst)

本发明涉及用于DNA顺序测定的聚合酶和它的分析系统。

我们从嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Bacillus stearothermophilus*) 中制备得到DNA聚合酶, 进而又用Subtilisin将此DNA聚合酶水解成二个片段。其中一个大片段定名为Bst。经过反复研究, 证明Bst具有如下九个重要的技术指标:

- (1) Bst可在65 — 70℃测定DNA顺序, 从而消除堆积现象;
- (2) 在此高温条件下, 无非专一的引物与模块的结合, 从而消除了杂带;
- (3) 包括胞嘧啶在内的所有四种核苷酸都能均匀地渗入, 消除了“C”不清的现象;
- (4) 此高温DNA顺序测定系统既可用于标准的Sanger一步法, 也可用于将同位素标记和聚合 — 终止反应分开的二步法;
- (5) 此高温体系同样适用于双链DNA顺序测定;
- (6) 此高温体系同样适用于³⁵S标记和³²P标记的核苷酸;
- (7) 二种去压缩剂 — 7-deaza-dGTP和dITP均可在此高温体系中使用;
- (8) 此高温体系在室温可放置二个星期而不失活力, 充分满足了DNA顺序测定自动化的高稳定性要求;
- (9) 此高温体系既适用于荧光法自动化DNA顺序测定, 也适用于放射性同位素法自动化DNA顺序测定。

经与其他DNA聚合酶比较, Bst的特点总结如下:

特性	T7	Klenow	Taq	Bst	Vent	AMVRT
3' → 5' 外切酶	无	低	无		无	无
5' → 3' 外切酶	无	无	有	无	无	无
延伸率	高	中	中	高	中	低
对核苷酸衍生物利用 dITP	能	能	不	能	能	?
7-deaza-dGT	能	能	能	能	能	
条带的均一性	极好	差	好	较好	好	一般
顺序测定温度 (°C)	<55	<50	<70	<65	<75	<42

从上表可看出, Bst的特性使它成为测定DNA顺序的理想的酶。从上表也可看出, 关于Bst的3' → 5' 外切酶的特性不知。而其余的酶均没有3' → 5' 活力(Klenow具有较低的3' → 5' 活力。由于Klenow的延伸率不高, 条带均一性差, 及顺序测定温度低, 在DNA 顺序测定中已不应用)。

我们用紫外线处理Bacillus Stearothermophilus获得高产菌Mo

-1. 从Mo-1中获得HiFi Bst。用双链DNA作模板, 证明HiFi Bst有3'→5' 外切酶活力, 并具有如下两个特性: (1) 它切除配对的核苷酸, 也切除不配对的核苷酸。(2) 切除不配对的核苷酸的速度大于切除配对核苷酸的速度。这两个特性是目前国际上所有用于DNA顺序测定的DNA聚合酶所没有的。从而使HiFi Bst具有特殊的高度校正活力。

本发明提供了DNA顺序测定中校正活力最好的DNA聚合酶 HiFi Bst, 因为HiFi Bst可以有效切除不配对的核苷酸, 使DNA 顺序反应具有独特的专一性, 从而保证了DNA顺序测定图谱的高质量。

本文中简写说明:

TE: 100mmol/L Tris (pH8.0) 1mmol/L EDTA (pH8.0)

HiFi Bst 反应缓冲液: 15mM Tris-Cl, pH8.5, 15mM MgCl₂

DE-81: whatman 产品

图1是活力测定结果

■ : HiFi Bst切除非配对核苷酸的活力反应

■ : HiFi Bst切除配对核苷酸的活力反应

X轴: 单位: 小时

Y轴: 计数/30秒(由FH-408自动定标器测定)

在下述的实施例中对本发明进行具体的描述:

实施例1: 高温、高传真DNA聚合酶(HiFi Bst)的制备

嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*), 经紫外线处理获得高产菌Mo-1, 经制备得到DNA聚合酶, 进而用枯草杆菌蛋白酶(*Subtilisin*)将此DNA聚合酶水解成二个片段[*Ye, S. and Hong, G., Scientia Sinica, 30, 503-506 (1987)*], 其中大片段即是高温、高传真DNA聚合酶(HiFi Bst)。

实施例2: 引物的设计

5' C A T T T G C T G C C G G T C A 3'

实施例3: DNA模板设计

(a) 3' — G T A A A A C G A C G G C C A G T C T T — 5'

(b) 3' — G T A A A A C G A C G G C C A G T C G G — 5'

实施例4: 引物的同位素标记

5' C A T T T T G C T G C C G G T C A 3'
— G T A A A A C G A C G G C C A G T C T T —

↓ $\alpha^{32}\text{p}$ dATP, dGTP, Taq酶

C A T T T T G C T G C C G G T C A G A* A* (*表示 ^{32}P 标记)

实施例5: 将标记引物与DNA模板配对

引物

+

+

DNA模板 (a)

DNA模板 (b)



5' C A T T T T G C T G C C G G T C A G A* A* 3'

3' — G T A A A A C G A C G G C C A G T C G G — 5'

5' C A T T T T G C T G C C G G T C A G A* A* 3'

3' — G T A A A A C G A C G G C C A G T C T T — 5'

实施例6: HiFi Bst切除配对核苷酸的活力的测定:

将退火的模板DNA (a) 和标记的引物混合物溶于 $10\mu\text{l}$ TE中, 加入 $4\mu\text{l}$ HiFi Bst反应缓冲液, 2单位HiFi Bst酶, 加水至 $20\mu\text{l}$, 充分混合后, 以 $3\mu\text{l}$ /管分装入多个 0.5ml 微型离心管中, 再加 $3\mu\text{l}$ 石蜡油封管, 置 65°C 水浴中保温。每间隔一定时间取出一管, 将管内反应混合物滴到DE-81纸上, 在定标仪上进行初级计数。然后用 0.3M 磷酸钠缓冲液 (pH6.8) 洗涤三次, 每次10分钟, 然后进行第二次计数, 二次计数之差即为被HiFi Bst切除的游离的同位素的量。外切酶活力以单位时间内产生游离同位素的量表示。

实施例7: HiFi Bst 切除非配对核苷酸的活力的测定

将退火的模板DNA (b) 和标记的引物混合物溶于 $10\mu\text{l}$ TE中, 加入 $4\mu\text{l}$ Bst反应缓冲液, 2单位HiFi Bst 酶加水至 $20\mu\text{l}$, 充分混匀后, 以 $3\mu\text{l}$ /管分装入多个0.5ml微型离心管中, 再加入 $3\mu\text{l}$ 石蜡油封管, 置 65°C 水浴中保温。每间隔一定时间取出一管, 将管内反应混合物滴到DE-81纸上, 在定标仪上进行初级计数。然后用0.3M磷酸钠缓冲液(pH6.8)洗涤三次, 每次10分钟, 然后进行第二次计数, 二次计数之差即为被HiFi Bst切除的游离的同位素的量。外切酶活力以单位时间内产生游离同位素的量表示。

说明书附图

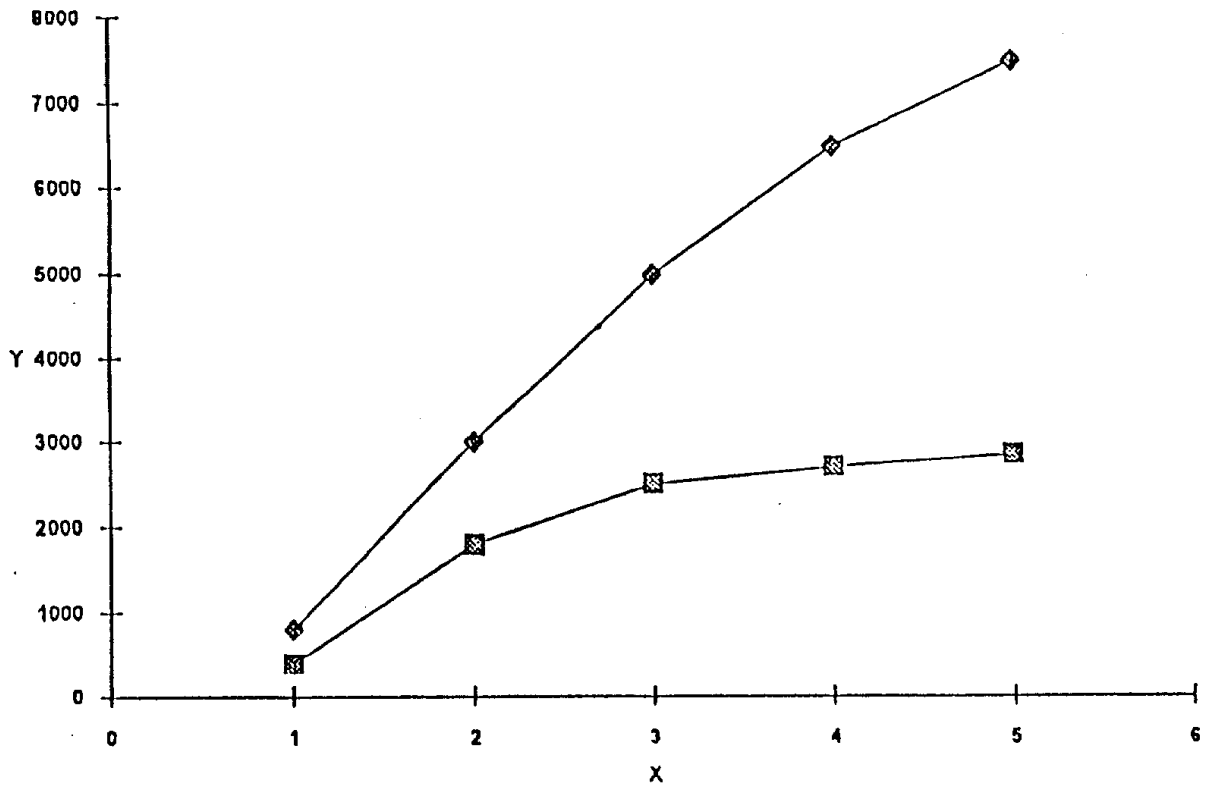


图 1