



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112703248 B

(45) 授权公告日 2025. 03. 25

(21) 申请号 201980059768.7

(22) 申请日 2019.09.12

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 112703248 A

(43) 申请公布日 2021.04.23

(30) 优先权数据  
62/730908 2018.09.13 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2021.03.12

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/EP2019/074320 2019.09.12

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02020/053327 EN 2020.03.19

(73) 专利权人 豪夫迈·罗氏有限公司  
地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 F·库尔巴诺夫

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司  
72001  
专利代理师 甘霖 李唐

(51) Int.Cl.  
C12N 9/12 (2006.01)  
C12Q 1/6869 (2006.01)  
C12N 15/09 (2006.01)

(56) 对比文件  
CN 102099464 A, 2011.06.15

审查员 王灿

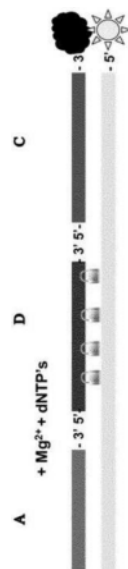
权利要求书1页 说明书33页  
序列表64页 附图11页

(54) 发明名称

具有改良链置换能力的突变型DNA聚合酶

(57) 摘要

本发明公开了相对于对应的未修饰聚合酶具有增加的5'-3'链置换活性与显著降低的5'-3'核酸外切酶和核酸内切酶活性的DNA聚合酶。所述聚合酶可用于多种公开的引物延伸方法。还公开了相关的组合物,所述组合物包括重组核酸、载体和宿主细胞,其可用于例如DNA聚合酶的生产。



1. 一种DNA聚合酶,其与由SEQ ID NO:40的氨基酸序列组成的对照DNA聚合酶相比具有增加的5'-3'链置换活性和显著降低的5'-3'核酸外切酶和核酸内切酶活性,其中所述DNA聚合酶的氨基酸序列与SEQ ID NO:40的氨基酸序列相同,只是在与SEQ ID NO:40的位置686和693相对应的位置存在突变的组合;

其中所述突变是I686V、A693V。

2. 根据权利要求1所述的DNA聚合酶,其中所述增加的5'-3'链置换活性和显著降低的5'-3'核酸外切酶和核酸内切酶活性在高温下发生。

3. 一种重组核酸,其编码根据权利要求1至2中任一项所述的DNA聚合酶。

4. 一种用于进行引物延伸的方法,其包括:

在适合引物延伸的条件下将根据权利要求1至2中任一项所述的DNA聚合酶与所述引物、多核苷酸模板和核苷三磷酸接触,从而产生延伸的引物。

5. 根据权利要求4所述的方法,其中,所述引物延伸方法包括链置换反应、聚合酶链式反应、等温扩增、或选自环介导扩增、交叉引物扩增和聚合酶链置换反应的扩增反应。

6. 根据权利要求4和5中任一项所述的方法,其中所述条件包括高温。

7. 一种用于生产延伸的引物的试剂盒,其包括:

至少一个容器,所述容器包括根据权利要求1至2中任一项所述的DNA聚合酶。

8. 根据权利要求7所述的试剂盒,其进一步包括一个或多个其他容器,所述其他容器选自自由以下项组成的组:

(a) 提供在引物延伸条件下可与预定多核苷酸模板杂交的引物的容器;

(b) 提供核苷三磷酸的容器;以及

(c) 提供适用于引物延伸的缓冲剂的容器。

9. 一种反应混合物,其包含根据权利要求1至2中任一项所述的DNA聚合酶、至少一种引物、多核苷酸模板和核苷三磷酸。

## 具有改良链置换能力的突变型DNA聚合酶

[0001] 优先权信息

[0002] 本专利申请要求于2018年9月13日提交的美国临时专利申请号62/730,908的优先权,其内容全文以引用方式并入本文以用于所有目的。2018年8月29日创建的150,900字节的机器格式IBM-PC、MS-Windows操作系统的文件SequenceListing\_31934-US.txt中写入的序列表全文以引用方式并入本文以用于所有目的。

### 技术领域

[0003] 本发明提供了具有改良活性的DNA聚合酶,其包括增加的5'-3'链置换活性和显著降低的5'-3'核酸外切酶/核酸内切酶活性,以及此类聚合酶在各种应用中的用途,其包括核酸多核苷酸延伸和扩增。

### 背景技术

[0004] DNA聚合酶负责基因组的复制和维持,该作用对于准确地一代一代地传递遗传信息至关重要。DNA聚合酶在细胞中起负责DNA合成的酶的作用。它们在金属活化剂存在(诸如 $Mg^{2+}$ )的情况下,按照复制的DNA模板或多核苷酸模板指示的顺序聚合脱氧核糖核苷三磷酸。在体内,DNA聚合酶参与一系列DNA合成过程,其包括DNA复制、DNA修复、重组和基因扩增。在每个DNA合成过程期间,DNA模板复制一次或至多几次,以产生相同的复制品。相反,在体外,DNA复制可以诸如在聚合酶链式反应期间(参见例如美国专利号4,683,202)重复很多次。

[0005] 在用聚合酶链式反应(PCR)的初步研究中,在每轮DNA复制的开始添加DNA聚合酶(参见美国专利号4,683,202)。随后,确定可以从在高温下生长的细菌获得热稳定DNA聚合酶,并且确定这些酶仅需要添加一次(参见美国专利号4,889,818和美国专利号4,965,188)。在PCR期间使用的高温下,这些酶不会不可逆地失活。结果,人们可以进行重复的聚合酶链式反应循环,而无需在每个合成加成过程的开始时添加新鲜的酶。DNA聚合酶、特别是热稳定的聚合酶是重组DNA研究和疾病的医学诊断中众多技术的关键。特别是对于诊断应用,靶核酸序列可能只是所讨论的DNA或RNA的一小部分,因此可能难以在不进行扩增的情况下检测出靶核酸序列的存在。

[0006] DNA聚合酶的整体折叠模式类似于人类的右手,并包含手掌、手指和拇指三个独特的亚结构域。(参见Beese等人,Science 260:352-355,1993);Patel等人,Biochemistry 34:5351-5363,1995)。尽管手指和拇指亚结构域的结构在大小和细胞功能不同的聚合酶之间差异很大,但催化性的手掌亚结构域均可重叠。例如,与引入的dNTP相互作用并在化学催化作用期间稳定过渡态的基序A可重叠,其中在哺乳动物pol $\alpha$ 和原核pol I家族DNA聚合酶之间的平均偏差约为一Å(Wang等人,Cell 89:1087-1099,1997)。在结构上基序A以主要包含疏水性残基的反平行 $\beta$ -链起始并且延续至 $\alpha$ -螺旋。DNA聚合酶活性位点的一级氨基酸序列极为保守。在基序A的情况下,例如,序列DYSQIELR(SEQ ID NO:22)保留在来自数百万年进化分离的生物体包括例如水生栖热菌、沙眼衣原体和大肠杆菌的聚合酶中。

[0007] 除了高度保守之外,DNA聚合酶的活性位点也已证明是相对易突变的,其能够适应

某些氨基酸取代而不显著降低DNA聚合酶活性。(参见例如Patel等人的美国专利号6,602,695)。此类突变型DNA聚合酶可以在例如包括核酸合成反应的诊断和研究应用中提供各种选择性优势。

[0008] 链置换是指在DNA合成期间,聚合酶置换而不是降解所遇到的下游DNA的能力。在链置换复制期间,一次仅复制一条DNA链。链置换合成释放单链DNA,然后将其复制为双链DNA。许多热稳定DNA聚合酶表现出快速和持续的引物延伸DNA合成,但是链置换DNA合成效率低下。本公开提供了在高温下具有改良链置换活性的热稳定DNA聚合酶,其导致改良的5'-3'链置换活性和显著降低的5'-3'核酸外切酶/核酸内切酶活性。

## 发明内容

[0009] 本文提供了当其他具有显著链置换活性的DNA聚合酶,例如Phi 29DNA聚合酶或Bst DNA聚合酶不能起作用时,在高温下具有改良的链置换活性的热稳定DNA聚合酶。本公开描述了DNA聚合酶的聚合酶结构域中的突变,其导致改良的5'-3'链置换活性和显著降低的核酸外切酶和/或核酸内切酶活性。在一些实施例中,DNA聚合酶具有降低的5'-3'核酸外切酶和/或核酸内切酶活性。本文所述的突变提供了基于紧密相关的DNA聚合酶的现有三维结构无法预料到的出乎意料的优势,并且本文所述的突变型聚合酶也将表现出增强的链置换活性,这即使回顾也是不可预测的。

[0010] 一方面,本文提供了相对于对应的未修饰的对照聚合酶具有改良的活性、包括增加的5'-3'链置换活性和显著降低的5'-3'核酸外切酶/核酸内切酶活性的DNA聚合酶,以及制备并使用此类DNA聚合酶的方法。在一些实施例中,与对照DNA聚合酶相比,改良的DNA聚合酶具有增加的5'-3'链置换活性。在一些实施例中,与对照DNA聚合酶相比,改良的DNA聚合酶具有显著降低的5'-3'核酸外切酶/核酸内切酶活性。在一些实施例中,对照DNA聚合酶包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。在一些实施例中,对照DNA聚合酶包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列,除了对照DNA聚合酶在与SEQ ID NO:1的位置46相对应的氨基酸处具有突变。在一些实施例中,对照DNA聚合酶在与SEQ ID NO:1的位置46相对应的氨基酸处包含甘氨酸(Gly/G)至谷氨酸(Glu/E)突变。G46E突变削弱了5'-3'核酸外切酶和核酸内切酶的活性,这对于链置换酶是非期望的。在一些实施例中,对照DNA聚合酶包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列。在一些实施例中,对照DNA聚合酶由SEQ ID NO:41的核酸序列编码。在一些实施例中,本文所述的改良的或突变型DNA聚合酶由与SEQ ID NO:41具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的核酸序列编码。在一些实施例中,对照DNA聚合酶包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列。

[0011] 在一些实施例中,改良的DNA聚合酶在与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:40的以下位置相对应的位置包含一个或多个突变、或突变的组合:

[0012] 686、693、516、633、415、420、636、752、768、525、694、491、516、515、666、402、555、582、737、759、521、546、668、456、507、571、652、832、498、524、598、616、444、498、660、673、493、511、648、749和635。

[0013] 在一些实施例中,改良的DNA聚合酶在与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:40的以下位置相对应的位置包含一个或多个突变、或突变的组合:

[0014] I686V、A693V、T516I、V633I、Q415H、E420D、E636G、N752S、V768M、R525G、F694S、

Q491H、T516S、S515F、T666M、E402V、V555A、N582D、A737T、A759T、L521Q、T546A、N668S、A456T、K507M、T571A、S652F、A832V、D498E、L524V、R598G、M616I、A444T、M660K、Y673N、E493D、T511S、M648I、M749L和/或Q635K。

[0015] 在一些实施例中,改良的DNA聚合酶包含与SEQ ID NO:1基本上相同(例如,具有至少约60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%同一性)的氨基酸序列,其中DNA聚合酶的氨基酸序列在与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:40的以下位置相对应的位置包含一个或多个突变、或突变的组合:

[0016] 686、693、516、633、415、420、636、752、768、525、694、491、516、515、666、402、555、582、737、759、521、546、668、456、507、571、652、832、498、524、598、616、444、498、660、673、493、511、648、749和635。

[0017] 在一些实施例中,改良的DNA聚合酶包含与SEQ ID NO:1基本上相同(例如,具有至少约60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%同一性)的氨基酸序列,其中DNA聚合酶的氨基酸序列在与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:40的以下位置相对应的位置包含一个或多个突变、或突变的组合:

[0018] I686、A693、T516、V633、Q415、E420、E636、N752、V768、R525、F694、Q491、T516、S515、T666、E402、V555、N582、A737、A759、L521、T546、N668、A456、K507、T571、S652、A832、D498、L524、R598、M616、A444、D498、M660、Y673、E493、T511、M648、M749和/或Q635。

[0019] 在一些实施例中,改良的DNA聚合酶包含与SEQ ID NO:1基本上相同(例如,具有至少约60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%同一性)的氨基酸序列,其中:

[0020] i.与SEQ ID NO:1的位置686相对应的DNA聚合酶的氨基酸是除I以外的任何氨基酸;

[0021] ii.与SEQ ID NO:1的位置693相对应的DNA聚合酶的氨基酸是除A以外的任何氨基酸;

[0022] iii.与SEQ ID NO:1的位置516相对应的DNA聚合酶的氨基酸是除T以外的任何氨基酸;

[0023] iv.与SEQ ID NO:1的位置633相对应的DNA聚合酶的氨基酸是除V以外的任何氨基酸;

[0024] v.与SEQ ID NO:1的位置415相对应的DNA聚合酶的氨基酸是除Q以外的任何氨基酸;

[0025] vi.与SEQ ID NO:1的位置420相对应的DNA聚合酶的氨基酸是除E以外的任何氨基酸;

[0026] vii.与SEQ ID NO:1的位置636相对应的DNA聚合酶的氨基酸是除E以外的任何氨基酸;

[0027] viii.与SEQ ID NO:1的位置752相对应的DNA聚合酶的氨基酸是除N以外的任何氨基酸;

[0028] ix.与SEQ ID NO:1的位置768相对应的DNA聚合酶的氨基酸是除V以外的任何氨基酸;

[0029] x.与SEQ ID NO:1的位置525相对应的DNA聚合酶的氨基酸是除R以外的任何氨基酸;

- [0030] xi.与SEQ ID NO:1的位置694相对应的DNA聚合酶的氨基酸是除F以外的任何氨基酸;
- [0031] xii.与SEQ ID NO:1的位置491相对应的DNA聚合酶的氨基酸是除Q以外的任何氨基酸;
- [0032] xiii.与SEQ ID NO:1的位置516相对应的DNA聚合酶的氨基酸是除T以外的任何氨基酸;
- [0033] xiv.与SEQ ID NO:1的位置515相对应的DNA聚合酶的氨基酸是除S以外的任何氨基酸;
- [0034] xv.与SEQ ID NO:1的位置666相对应的DNA聚合酶的氨基酸是除T以外的任何氨基酸;
- [0035] xvi.与SEQ ID NO:1的位置402相对应的DNA聚合酶的氨基酸是除E以外的任何氨基酸;
- [0036] xvii.与SEQ ID NO:1的位置555相对应的DNA聚合酶的氨基酸是除V以外的任何氨基酸;
- [0037] xviii.与SEQ ID NO:1的位置582相对应的DNA聚合酶的氨基酸是除N以外的任何氨基酸;
- [0038] xix.与SEQ ID NO:1的位置737相对应的DNA聚合酶的氨基酸是除A以外的任何氨基酸;
- [0039] xx.与SEQ ID NO:1的位置759相对应的DNA聚合酶的氨基酸是除A以外的任何氨基酸;
- [0040] xxi.与SEQ ID NO:1的位置521相对应的DNA聚合酶的氨基酸是除L以外的任何氨基酸;
- [0041] xxii.与SEQ ID NO:1的位置546相对应的DNA聚合酶的氨基酸是除T以外的任何氨基酸;
- [0042] xxiii.与SEQ ID NO:1的位置668相对应的DNA聚合酶的氨基酸是除N以外的任何氨基酸;
- [0043] xxiv.与SEQ ID NO:1的位置456相对应的DNA聚合酶的氨基酸是除A以外的任何氨基酸;
- [0044] xxv.与SEQ ID NO:1的位置507相对应的DNA聚合酶的氨基酸是除K以外的任何氨基酸;
- [0045] xxvi.与SEQ ID NO:1的位置571相对应的DNA聚合酶的氨基酸是除T以外的任何氨基酸;
- [0046] xxvii.与SEQ ID NO:1的位置652相对应的DNA聚合酶的氨基酸是除S以外的任何氨基酸;
- [0047] xxviii.与SEQ ID NO:1的位置832相对应的DNA聚合酶的氨基酸是除A以外的任何氨基酸;
- [0048] xxix.与SEQ ID NO:1的位置498相对应的DNA聚合酶的氨基酸是除D以外的任何氨基酸;
- [0049] xxx.与SEQ ID NO:1的位置524相对应的DNA聚合酶的氨基酸是除L以外的任何氨基酸;

基酸；

[0050] xxxi.与SEQ ID NO:1的位置598相对应的DNA聚合酶的氨基酸是除R以外的任何氨基酸；

[0051] xxxii.与SEQ ID NO:1的位置616相对应的DNA聚合酶的氨基酸是除M以外的任何氨基酸；

[0052] xxxiii.与SEQ ID NO:1的位置444相对应的DNA聚合酶的氨基酸是除A以外的任何氨基酸；

[0053] xxxiv.与SEQ ID NO:1的位置660相对应的DNA聚合酶的氨基酸是除M以外的任何氨基酸；

[0054] xxxv.与SEQ ID NO:1的位置673相对应的DNA聚合酶的氨基酸是除Y以外的任何氨基酸；

[0055] xxxvi.与SEQ ID NO:1的位置493相对应的DNA聚合酶的氨基酸是除E以外的任何氨基酸；

[0056] xxxvii.与SEQ ID NO:1的位置511相对应的DNA聚合酶的氨基酸是除T以外的任何氨基酸；

[0057] xxxviii.与SEQ ID NO:1的位置648相对应的DNA聚合酶的氨基酸是除M以外的任何氨基酸；

[0058] xxxix.与SEQ ID NO:1的位置749相对应的DNA聚合酶的氨基酸是除M以外的任何氨基酸；和/或

[0059] xl.与SEQ ID NO:1的位置635相对应的DNA聚合酶的氨基酸是除Q以外的任何氨基酸。

[0060] 在一些实施例中,改良的DNA聚合酶包含与SEQ ID NO:1基本上相同(例如,具有至少约60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%同一性)的氨基酸序列,其中:

[0061] i.与SEQ ID NO:1的位置686相对应的DNA聚合酶的氨基酸是V;

[0062] ii.与SEQ ID NO:1的位置693相对应的DNA聚合酶的氨基酸是V;

[0063] iii.与SEQ ID NO:1的位置516相对应的DNA聚合酶的氨基酸是I;

[0064] iv.与SEQ ID NO:1的位置633相对应的DNA聚合酶的氨基酸是I;

[0065] v.与SEQ ID NO:1的位置415相对应的DNA聚合酶的氨基酸是H;

[0066] vi.与SEQ ID NO:1的位置420相对应的DNA聚合酶的氨基酸是D;

[0067] vii.与SEQ ID NO:1的位置636相对应的DNA聚合酶的氨基酸是G;

[0068] viii.与SEQ ID NO:1的位置752相对应的DNA聚合酶的氨基酸是S;

[0069] ix.与SEQ ID NO:1的位置768相对应的DNA聚合酶的氨基酸是M;

[0070] x.与SEQ ID NO:1的位置525相对应的DNA聚合酶的氨基酸是G;

[0071] xi.与SEQ ID NO:1的位置694相对应的DNA聚合酶的氨基酸是S;

[0072] xii.与SEQ ID NO:1的位置491相对应的DNA聚合酶的氨基酸是H;

[0073] xiii.与SEQ ID NO:1的位置516相对应的DNA聚合酶的氨基酸是S;

[0074] xiv.与SEQ ID NO:1的位置515相对应的DNA聚合酶的氨基酸是F;

[0075] xv.与SEQ ID NO:1的位置666相对应的DNA聚合酶的氨基酸是M;

[0076] xvi.与SEQ ID NO:1的位置402相对应的DNA聚合酶的氨基酸是V;

- [0077] xvii.与SEQ ID NO:1的位置555相对应的DNA聚合酶的氨基酸是A;
- [0078] xviii.与SEQ ID NO:1的位置582相对应的DNA聚合酶的氨基酸是D;
- [0079] xix.与SEQ ID NO:1的位置737相对应的DNA聚合酶的氨基酸是T;
- [0080] xx.与SEQ ID NO:1的位置759相对应的DNA聚合酶的氨基酸是T;
- [0081] xxi.与SEQ ID NO:1的位置521相对应的DNA聚合酶的氨基酸是Q;
- [0082] xxii.与SEQ ID NO:1的位置546相对应的DNA聚合酶的氨基酸是A;
- [0083] xxiii.与SEQ ID NO:1的位置668相对应的DNA聚合酶的氨基酸是S;
- [0084] xxiv.与SEQ ID NO:1的位置456相对应的DNA聚合酶的氨基酸是T;
- [0085] xxv.与SEQ ID NO:1的位置507相对应的DNA聚合酶的氨基酸是M;
- [0086] xxvi.与SEQ ID NO:1的位置571相对应的DNA聚合酶的氨基酸是A;
- [0087] xxvii.与SEQ ID NO:1的位置652相对应的DNA聚合酶的氨基酸是F
- [0088] xxviii.与SEQ ID NO:1的位置832相对应的DNA聚合酶的氨基酸是V;
- [0089] xxix.与SEQ ID NO:1的位置498相对应的DNA聚合酶的氨基酸是E;
- [0090] xxx.与SEQ ID NO:1的位置524相对应的DNA聚合酶的氨基酸是V;
- [0091] xxxi.与SEQ ID NO:1的位置598相对应的DNA聚合酶的氨基酸是G;
- [0092] xxxii.与SEQ ID NO:1的位置616相对应的DNA聚合酶的氨基酸是I;
- [0093] xxxiii.与SEQ ID NO:1的位置444相对应的DNA聚合酶的氨基酸是T;
- [0094] xxxiv.与SEQ ID NO:1的位置660相对应的DNA聚合酶的氨基酸是K;
- [0095] xxxv.与SEQ ID NO:1的位置673相对应的DNA聚合酶的氨基酸是除Y以外的任何氨基酸;
- [0096] xxxvi.与SEQ ID NO:1的位置493相对应的DNA聚合酶的氨基酸是D;
- [0097] xxxvii.与SEQ ID NO:1的位置511相对应的DNA聚合酶的氨基酸是S;
- [0098] xxxviii.与SEQ ID NO:1的位置648相对应的DNA聚合酶的氨基酸是I;
- [0099] xxxix.与SEQ ID NO:1的位置749相对应的DNA聚合酶的氨基酸是L;和/或
- [0100] xl.与SEQ ID NO:1的位置635相对应的DNA聚合酶的氨基酸是K。
- [0101] 在一些实施例中,改良的DNA聚合酶包含与SEQ ID NO:1基本上相同(例如,具有至少约60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%同一性)的氨基酸序列,其中DNA聚合酶的氨基酸序列在与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:40的以下位置相对应的位置包含一个或多个突变、或突变的组合:
- [0102] I686V、A693V、T516I、V633I、Q415H、E420D、E636G、N752S、V768M、R525G、F694S、Q491H、T516S、S515F、T666M、E402V、V555A、N582D A737T、A759T、L521Q、T546A、N668S、A456T、K507M、T571A、S652F、S515F、A832V、D498E、L524V、R598G、M616I、A444T、D498E、M660K、Y673N、E493D、T511S、M648I、M749L和/或Q635K。
- [0103] 在一些实施例中,改良的DNA聚合酶在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:40的以下位置包含一个或多个突变、或突变的组合:
- [0104] 686、693、516、633、415、420、636、752、768、525、694、491、516、515、666、402、555、582、737、759、521、546、668、456、507、571、652、515、832、498、524、598、616、444、498、660、673、493、511、648、749和635。
- [0105] 在一些实施例中,改良的DNA聚合酶在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:40的以下位置包

含一个或多个突变、或突变的组合：

[0106] I686V、A693V、T516I、V633I、Q415H、E420D、E636G、N752S、V768M、R525G、F694S、Q491H、T516S、S515F、T666M、E402V、V555A、N582D、A737T、A759T、L521Q、T546A、N668S、A456T、K507M、T571A、S652F、S515F、A832V、D498E、L524V、R598G、M616I、A444T、M660K、Y673N、E493D、T511S、M648I、M749L和/或Q635K。

[0107] 在一些实施例中，DNA聚合酶的氨基酸序列包括在与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:40的以下项的位置相对应的位置的单一突变和/或突变的组合：

- [0108] i. I686V和A693V；
- [0109] ii. T516I和V633I；
- [0110] iii. Q415H、E420D、E636G、N752S和V768M；
- [0111] iv. R525G和F694S；
- [0112] v. Q491H和T516S；
- [0113] vi. S515F和T666M；
- [0114] vii. E402V、V555A和N582D；
- [0115] viii. A737T和A759T；
- [0116] ix. L521Q和T546A；
- [0117] x. N668S；
- [0118] xi. A456T；
- [0119] xii. K507M、T571A和S652F；
- [0120] xiii. S515F和A832V；
- [0121] xiv. D498E、L524V、R598G和M616I；
- [0122] xv. A444T、D498E、M660K和Y673N；
- [0123] xvi. E493D、T511S、M648I和M749L；和/或
- [0124] xvii. Q635K。

[0125] 在一些实施例中，突变位于与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:40的氨基酸515-516、521-525、633-636、666-668、和693-694相对应的一级氨基酸序列中的以下“热点”或片段中。

[0126] 在一些实施例中，改良的DNA聚合酶进一步包含与SEQ ID NO:40基本上相同（例如，具有至少约60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%同一性）的氨基酸序列，其中与SEQ ID NO:40的位置46相对应的DNA聚合酶的氨基酸是Glu(E)。

[0127] 在一些实施例中，改良的DNA聚合酶进一步包含与SEQ ID NO:1基本相同（例如，具有至少约60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%同一性）的氨基酸序列，其中与SEQ ID NO:1的位置580相对应的DNA聚合酶的氨基酸是除D或E以外的任何氨基酸。在一些实施例中，与SEQ ID NO:1的位置580相对应的DNA聚合酶的氨基酸是除D以外的任何氨基酸。在一些实施例中，与SEQ ID NO:1的位置580相对应的DNA聚合酶的氨基酸选自L、G、T、Q、A、S、N、R和K组成的组。在一些实施例中，与SEQ ID NO:1的位置580相对应的DNA聚合酶的氨基酸是G。

[0128] 在一些实施例中，改良的DNA聚合酶进一步包含与SEQ ID NO:1基本上相同（例如，具有至少约60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%同一性）的氨基酸序列，其中与

SEQ ID NO:1的位置709相对应的DNA聚合酶的氨基酸是除I以外的任何氨基酸。在一些实施例中,与SEQ ID NO:1的位置709相对应的DNA聚合酶的氨基酸选自由K、R、S、G和A组成的组。在一些实施例中,与SEQ ID NO:1的位置709相对应的DNA聚合酶的氨基酸是K。

[0129] 多种DNA聚合酶适合于根据本发明的突变。特别适宜的是热稳定聚合酶,其包括来自各种嗜热菌的物种中的野生型或天然存在的热稳定聚合酶,以及通过氨基酸取代、插入或缺失或其他修饰来源于此类野生型或天然存在的酶的合成热稳定聚合酶。示例性的未修饰形式的聚合酶包括例如CS5、CS6或Z05 DNA聚合酶,或与其具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的氨基酸序列同一性的功能性DNA聚合酶。其他未修饰聚合酶包括例如来自以下嗜热菌的物种中的任一个的DNA聚合酶(或与此类聚合酶具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的氨基酸序列同一性的功能性DNA聚合酶):海栖热袍菌;水生栖热菌;嗜热栖热菌;黄栖热菌;丝状栖热菌;栖热菌种sps17;栖热菌种Z05;那不勒斯栖热袍菌;非洲栖热腔菌;Thermus caldophilus、耐辐射奇异球菌、嗜热脂肪芽孢杆菌或热坚芽孢杆菌。适合的聚合酶还包括那些具有逆转录酶(RT)活性和/或能够掺入非常规核苷酸(诸如核糖核苷酸或其他2'-修饰的核苷酸)的聚合酶。

[0130] 尽管具有有效逆转录活性的热稳定DNA聚合酶特别适合于执行RT-PCR,尤其是单酶RT-PCR,但是具有有效逆转录活性的热活性而并非热稳定的DNA聚合酶也适合于根据本发明的突变。例如,增加的逆转录酶效率、错配耐受性、延伸速率和/或RT抑制剂耐受性的属性可用于RT-PCR中的RT步骤,并且此步骤无需在会使热活性而并非热稳定的DNA聚合酶失活的温度下执行。在RT步骤之后,可以添加热稳定DNA聚合酶,或者它可能已经包含在反应混合物中,以执行PCR扩增步骤。例如,如示例中所述,在RT步骤之前,本文所述的改良的DNA聚合酶可以在适用于RNA和DNA模板的延伸和扩增的缓冲剂中与第二热稳定DNA聚合酶组合。合适的热稳定DNA聚合酶的示例在授予Gelfand等人的美国专利号4,889,818和美国专利号5,773,258和5,677,152中进行了描述,其全文以引用方式明确并入本文。在一些实施例中,第二热稳定DNA聚合酶是AmpliTaq® DNA聚合酶(脱氧核苷三磷酸:DNA脱氧核苷酸转移酶,E.C.2.7.7.7)。在一些实施例中,第二热稳定DNA聚合酶是可逆失活的热稳定聚合酶,如下所述。在一个实施例中,可逆失活的热稳定聚合酶是AmpliTaqGold® DNA聚合酶(Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA)。通过使用化学修饰的热稳定DNA聚合酶(或其他使热稳定DNA聚合酶失活的HotStart技术),此第二方法将特别受益,从而使其在RT步骤期间不会完全活化。具有有效的逆转录活性的热活性而并非热稳定的DNA聚合酶的示例是来自生氢氧化碳嗜热菌(Carboxydotherrmus hydrogeniformans)的DNA聚合酶(Chy; SEQ ID NO:39)。参见例如美国专利号6,468,775和6,399,320。

[0131] 在一些实施例中,DNA聚合酶与选自由以下项组成的组中的聚合酶具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%的氨基酸序列同一性:

[0132] (a) 栖热菌种Z05 DNA聚合酶(Z05)(SEQ ID NO:1);

[0133] (b) 水生栖热菌DNA聚合酶(Taq)(SEQ ID NO:2);

[0134] (c) 丝状栖热菌DNA聚合酶(Tfi)(SEQ ID NO:3);

[0135] (d) 黄栖热菌DNA聚合酶(Tf1) (SEQ ID NO:4) ;

[0136] (e) 栖热菌种sps17DNA聚合酶(Sps17) (SEQ ID NO:5) ;

[0137] (f) 嗜热栖热菌DNA聚合酶(Tth) (SEQ ID NO:6) ;以及

[0138] (g) Thermus caldophilus DNA聚合酶(Tca) (SEQ ID NO:7)

[0139] (h) 生氢氧化碳嗜热菌DNA聚合酶(Chy) (SEQ ID NO:39)

[0140] 在一些实施例中,DNA聚合酶是栖热袍菌属DNA聚合酶。例如,在一些实施例中,DNA聚合酶与选自由以下项组成的组中的聚合酶具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%的氨基酸序列同一性:

[0141] (a) 海栖热袍菌DNA聚合酶(Tma) (SEQ ID NO:34) ;

[0142] (b) 那不勒斯栖热袍菌DNA聚合酶(Tne) (SEQ ID NO:35) 。

[0143] 在一些实施例中,DNA聚合酶与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:40、或SEQ ID NO:42具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%的氨基酸序列同一性。在一些实施例中,DNA聚合酶是Z05DNA聚合酶,其进一步包括位置580处的取代,并且位置580处的氨基酸为除D或E以外的任何氨基酸。在一些实施例中,DNA聚合酶是Z05DNA聚合酶,并且位置580处的氨基酸可为除D以外的任何氨基酸。在一些实施例中,DNA聚合酶是Z05 DNA聚合酶,并且位置580处的氨基酸选自由L、G、T、Q、A、S、N、R、和K组成的组。在一些实施例中,DNA聚合酶是Z05 DNA聚合酶,并且位置580处的氨基酸为G。在一些实施例中,DNA聚合酶是Z05 DNA聚合酶,其进一步包括位置709的取代,并且位置709处的氨基酸为除I以外的任何氨基酸。在一些实施例中,DNA聚合酶是Z05 DNA聚合酶,并且位置709处的氨基酸选自由K、R、S、G和A组成的组。在一些实施例中,DNA聚合酶是Z05 DNA聚合酶,并且位置709处的氨基酸为K。

[0144] 在一些实施例中,对照DNA聚合酶是Z05、Z05 D580G、或Z05D580G I709K聚合酶。在一些实施例中,对照DNA聚合酶是C21或C21G46E聚合酶(SEQ ID NO:40)。在一些实施例中,对照DNA聚合酶包括SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:40、或SEQ ID NO:42的氨基酸序列。

[0145] 突变型或改良聚合酶可包括其他非取代性修饰。一种此类修饰是使酶失活的热可逆共价修饰,但在高温(诸如通常用于多核苷酸延伸的温度)下孵育时,其逆转以活化酶。用于此类热可逆修饰的示例性试剂描述于美国专利号5,773,258和5,677,152中,其全文以引用方式明确并入本文。

[0146] 在各个其他方面,本公开提供了编码本文所述的突变型或改良DNA聚合酶的重组核酸、包括重组核酸的载体、以及使用载体转化的宿主细胞。在某些实施例中,载体是表达载体。包括此类表达载体的宿主细胞在本发明的方法中可用于通过在适用于表达重组核酸的条件下培养宿主细胞来产生突变型或改良聚合酶。本发明的聚合酶可包含在反应混合物和/或试剂盒中。重组核酸、宿主细胞、载体、表达载体、反应混合物和试剂盒的实施例如上所述并且如本文所述。

[0147] 在又一方面,提供了一种进行多核苷酸延伸的方法。该方法通常包括在适用于引物延伸的条件下,将本文所述的具有增加的链置换活性和显著降低的5'-3'核酸外切酶/核酸内切酶活性的DNA聚合酶与引物、多核苷酸模板和核苷三磷酸接触,从而产生延伸的引物。多核苷酸模板可以是例如RNA或DNA模板。核苷三磷酸可以包括非常规的核苷酸,诸如核

糖核苷酸和/或标记核苷酸。进一步地,引物或模板可以包括一种或多种核苷酸类似物。在一些变体中,多核苷酸延伸法是用于多核苷酸扩增的方法,其包括在适用于多核苷酸扩增的条件下,将突变型或改良DNA聚合酶与引物对、多核苷酸模板和核苷三磷酸接触。多核苷酸延伸反应可以是例如PCR、等温延伸或测序(例如,454测序反应)。多核苷酸模板可以来自任何类型的生物样品。

[0148] 在一些实施例中,引物延伸方法包括链置换反应、聚合酶链式反应(PCR)、等温扩增、或选自环介导扩增(LAMP)、交叉引物扩增(CSA)和聚合酶链置换反应(PCDR)的扩增反应。在一些实施例中,适用于引物延伸的条件包括高温。

[0149] 任选地,引物延伸反应可包括参考或未修饰聚合酶的实际或潜在抑制剂。抑制剂可以抑制参考或未修饰(对照)聚合酶的核酸延伸速率和/或链置换活性。在一些实施例中,抑制剂为血红蛋白或其降解产物。例如,在一些实施例中,血红蛋白降解产物是一种血红素分解产物,诸如血红素、血卟啉或胆红素。在一些实施例中,抑制剂是铁螯合剂或紫色染料。在一些实施例中,抑制剂是肝素或黑色素。在某些实施例中,抑制剂是嵌入染料。在一些实施例中,嵌入染料是[2-[N-双-(3-二甲氨基丙基)-氨基]-4-[2,3-二氢-3-甲基-(苯并-1,3-噻唑-2-基)-亚甲基]-1-苯基-喹啉鎓]<sup>+</sup>。在一些实施例中,嵌入染料是[2-[N-(3-二甲氨基丙基)-N-丙胺基]-4-[2,3-二氢-3-甲基-(苯并-1,3-噻唑-2-基)-亚甲基]-1-苯基-喹啉鎓]<sup>+</sup>。在一些实施例中,嵌入染料不是[2-[N-(3-二甲氨基丙基)-N-丙胺基]-4-[2,3-二氢-3-甲基-(苯并-1,3-噻唑-2-基)-亚甲基]-1-苯基-喹啉鎓]<sup>+</sup>。在一些实施例中,适用于延伸的条件包括Mg<sup>++</sup>。在一些实施例中,适用于延伸的条件包括Mn<sup>++</sup>。

[0150] 本公开还提供了一种可用于此类多核苷酸延伸方法的试剂盒。通常,试剂盒包括至少一个容器,该容器提供本文所述的突变型或改良DNA聚合酶。在某些实施例中,试剂盒进一步包括提供一种或多种其他试剂的一个或多个其他容器。例如,在特定的变体中,一个或多个其他容器提供核苷三磷酸;适用于多核苷酸延伸的缓冲剂;和/或在多核苷酸延伸条件下能够与预定多核苷酸模板杂交的一个或多个引物或探针多核苷酸。多核苷酸模板可以来自任何类型的生物样品。

[0151] 进一步提供了包含本文描述的聚合酶的反应混合物。反应混合物还可以包含模板核酸(DNA和/或RNA)、一种或多种引物或探针多核苷酸、核苷三磷酸(包括例如脱氧核糖核苷三磷酸、核糖核苷三磷酸、标记的核苷三磷酸、非常规的核苷三磷酸)、缓冲剂、盐、标记(例如,荧光团)。在一些实施例中,反应混合物包含铁螯合剂或紫色染料。在某些实施例中,反应混合物包含血红蛋白或血红蛋白的降解产物。例如,在某些实施例中,血红蛋白的降解产物包括血红素分解产物,诸如血红素、血色素、血卟啉和胆红素。在其他实施例中,反应混合物包含肝素或其盐。任选地,反应混合物包含嵌入染料(包括但不限于上文或本文其他地方所述的那些)。在某些实施例中,反应混合物包含与血液分离的模板核酸。在其他实施例中,模板核酸是RNA,并且反应混合物包含肝素或其盐。

[0152] 在一些实施例中,反应混合物包含两种或更多种聚合酶。例如,在一些实施例中,反应混合物包含如本文所述具有增加的链置换活性的改良的DNA聚合酶,和具有增加的逆转录效率(例如延伸RNA模板的增加的活性)的另一种聚合酶。在一个实施例中,反应混合物包含如本文所述的具有增加的链置换活性的改良的DNA聚合酶和第二热稳定DNA依赖性聚合酶的共混物。第二热稳定DNA依赖性聚合酶可以是如上所述的可逆修饰的聚合酶,使得酶

在适用于逆转录步骤的温度下失活,在合适的条件下例如在约90°C至100°C的高温下持续长达约12分钟的时间段进行活化。例如在热启动PCR反应中提供了用于活化可逆失活的热稳定聚合酶的合适条件。合适的第二热稳定DNA依赖性聚合酶的示例描述于美国专利号5,773,258和5,677,152中。

[0153] 本文描述进一步的实施例。

[0154] 定义

[0155] 除非另外指明,本文所用的所有科学技术术语具有如本发明所属领域的普通技术人员通常理解相同意义。尽管基本上任何与本文描述的方法和材料相似的方法和材料都可以用于本发明的实践或测试中,但是仅描述了示例性方法和材料。出于本发明的目的,以下术语定义如下。

[0156] 除非上下文另外清楚指出,术语“一个”、“一种”、“所述”包含复数指代。

[0157] “氨基酸”是指代可以合并为肽、多肽或蛋白质的任何单体单元。如本文所用,术语“氨基酸”包括以下二十种天然或遗传编码的 $\alpha$ -氨基酸:丙氨酸(Ala或A)、精氨酸(Arg或R)、天冬酰胺(Asn或N)、天冬氨酸(Asp或D)、半胱氨酸(Cys或C)、谷氨酰胺(Gln或Q)、谷氨酸(Glu或E)、甘氨酸(Gly或G)、组氨酸(His或H)、异亮氨酸(Ile或I)、亮氨酸(Leu或L)、赖氨酸(Lys或K)、甲硫氨酸(Met或M)、苯丙氨酸(Phe或F)、脯氨酸(Pro或P)、丝氨酸(Ser或S)、苏氨酸(Thr或T)、色氨酸(Trp或W)、酪氨酸(Tyr或Y)和缬氨酸(Val或V)。在“X”个残基未定义的情况下,应将其定义为“任何氨基酸”。这二十种天然氨基酸的结构例如在Stryer等人, *Biochemistry*, 第5版, Freeman and Company (2002) 中示出,其以引用方式并入。其他氨基酸诸如硒代半胱氨酸和吡咯赖氨酸也可遗传编码(Stadtman (1996) “Selenocysteine,” *Annu Rev Biochem.* 65:83-100和Ibba等人(2002) “Genetic code:introducing pyrrolysine,” *Curr Biol.* 12(13):R464-R466,其均以引用方式并入)。术语“氨基酸”还包括非天然氨基酸、经修饰的氨基酸(例如具有经修饰的侧链和/或主链)和氨基酸类似物。参见例如Zhang等人(2004) “Selective incorporation of 5-hydroxytryptophan into proteins in mammalian cells,” *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 101(24):8882-8887, Anderson等人(2004) “An expanded genetic code with a functional quadruplet codon” *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 101(20):7566-7571, Ikeda等人(2003) “Synthesis of a novel histidine analogue and its efficient incorporation into a protein in vivo,” *Protein Eng.Des.Sel.* 16(9):699-706, Chin等人(2003) “An Expanded Eukaryotic Genetic Code,” *Science* 301(5635):964-967, James等人(2001) “Kinetic characterization of ribonuclease S mutants containing photoisomerizable phenylazophenylalanine residues,” *Protein Eng.Des.Sel.* 14(12):983-991, Kohrer等人(2001) “Import of amber and ochre suppressor tRNAs into mammalian cells:A general approach to site-specific insertion of amino acid analogues into proteins,” *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 98(25):14310-14315, Bacher等人(2001) “Selection and Characterization of Escherichia coli Variants Capable of Growth on an Otherwise Toxic Tryptophan Analogue,” *J.Bacteriol.* 183(18):5414-5425, Hamano-Takaku等人(2000) “A Mutant Escherichia coli Tyrosyl-tRNA Synthetase Utilizes the Unnatural Amino Acid Azatyrosine More Efficiently

than Tyrosine,” *J. Biol. Chem.* 275 (51) :40324-40328, 和 Budisa 等人 (2001) “Proteins with {beta} - (thienopyrrolyl) alanines as alternative chromophores and pharmaceutically active amino acids,” *Protein Sci.* 10(7) :1281-1292, 其各自以引用方式并入。

[0158] 为了进一步说明, 氨基酸通常为包括取代的或未被取代的氨基、取代的或未被取代的羧基、和一种或多种侧链或基团、或这些基团的任一个的类似物的有机酸。示例性的侧链包括例如巯基、硒基、磺酰基、烷基、芳基、酰基、酮基、叠氮基、羟基、胍、氰基、卤代、酰肼、烯基、炔基、醚、硼酸酯、硼酸盐、二氧磷基、膦酰基、膦、杂环、烯酮、亚胺、醛、酯、硫代酸、羧胺或这些基团的任意组合。其他代表性的氨基酸包括但不限于, 包含光活化交联剂的氨基酸、金属结合氨基酸、自旋标记的氨基酸、荧光氨基酸、包含金属的氨基酸、具有新官能团的氨基酸、与其他分子共价或非共价相互作用的氨基酸、光敏笼形 (photocaged) 和/或可光异构化的氨基酸、放射性氨基酸、包含生物素或生物素类似物的氨基酸、糖基化氨基酸、其他碳水化合物修饰的氨基酸、包含聚乙二醇或聚醚的氨基酸、重原子取代的氨基酸、可化学裂解的和/或可光裂解的氨基酸、包含碳连接糖的氨基酸、氧化还原活性氨基酸、包含氨基硫代酸的氨基酸和包含一个或多个毒性部分的氨基酸。

[0159] 术语“生物样品”涵盖从生物体获得的多种样品类型, 并且可以用于诊断或监测测定中。该术语涵盖尿液、尿沉渣、血液、唾液和其他生物学来源的液体样品、固体组织样品, 诸如活检样本或组织培养物或由其衍生的细胞及其后代。该术语涵盖在采购后以任何方式处理过的样品, 诸如通过使用试剂、增溶、沉淀或某些成分富集来处理的样品。该术语涵盖临床样品, 还包括细胞培养物中的细胞、细胞上清液、细胞裂解物、血清、血浆、生物液和组织样品。

[0160] 在本发明的DNA聚合酶上下文中的术语“突变体”意指相对于对应的功能性DNA聚合酶, 包含一个或多个氨基酸取代的多肽, 其通常为重组多肽。

[0161] 在突变型聚合酶上下文中的术语“未修饰形式”是本文中用来定义本发明的突变型DNA聚合酶的术语: 术语“未修饰形式”是指具有除指定为表征突变型聚合酶的一个或多个氨基酸位置外的突变型聚合酶氨基酸序列的功能性DNA聚合酶。因此, 参考在 (a) 其未修饰形式和 (b) 一个或多个特定氨基酸取代方面的突变型DNA聚合酶意指除特定的氨基酸取代之外, 突变型聚合酶以其他方式在特定的基序中具有与未修饰形式相同的氨基酸序列。“未修饰的聚合酶” (以及因此具有增加的逆转录酶效率、错配耐受性、延伸速率和/或RT和聚合酶抑制剂耐受性的经修饰的形式) 可以包含其他突变以提供需要的功能性, 例如改良的双脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、核糖核苷酸类似物、染料标记的核苷酸的掺入, 调节5'-核酸酶活性, 调节3'-核酸酶 (或校正) 活性等。因此, 在进行本文所述的本发明时, 预定未修饰形式的DNA聚合酶。未修饰形式的DNA聚合酶可以是, 例如野生型和/或天然存在的DNA聚合酶, 或已经有意修饰过的DNA聚合酶。未修饰形式的聚合酶优选为热稳定DNA聚合酶, 诸如来自各种嗜热菌的DNA聚合酶及其功能性变体, 该功能性变体与野生型或天然存在的热稳定聚合酶具有基本的序列同一性。此类变体可以包括, 例如嵌合DNA聚合酶, 诸如描述于美国专利号6,228,628和7,148,049中的嵌合DNA聚合酶, 其全文以引用方式并入本文。在某些实施例中, 未修饰形式的聚合酶具有逆转录酶 (RT) 活性。

[0162] 术语“热稳定聚合酶”是指对热稳定的酶, 它是耐热的, 当在高温下经过实现双链

核酸变性所需要的时间后,其保留足够的活性以实现随后的多核苷酸延伸反应,并且不会不可逆变性(失活)。核酸变性所需的加热条件是本领域众所周知的并在例如美国专利号4,683,202、4,683,195和4,965,188中举例说明,这些专利以引用方式并入本文。如本文所用,热稳定聚合酶适用于温度循环反应,诸如聚合酶链式反应(“PCR”)。用于本文目的的不可逆变性是指永久的和完全的酶活性丧失。对于热稳定聚合酶,酶活性是指以适当的方式组合核苷酸以形成与模板核酸链互补的多核苷酸延伸产品的催化作用。来自嗜热菌的热稳定DNA聚合酶包括,例如来自海栖热袍菌、水生栖热菌、嗜热栖热菌、黄栖热菌、丝状栖热菌、栖热菌种sps17、栖热菌种Z05、*Thermus caldophilus*、热坚芽孢杆菌、那不勒斯栖热袍菌和非洲栖热腔菌的DNA聚合酶。

[0163] 术语“热活性”是指在通常用于RT-PCR和/或PCR反应中的逆转录或退火/延伸步骤的温度(即45-80°C)下保持催化特性的酶。热稳定酶是在经受核酸变性所需的高温时不会不可逆地失活或变性的热稳定酶。热活性酶可能是热稳定的,也可能不是。热活性DNA聚合酶可以是依赖于嗜热菌种或嗜温菌种的DNA或RNA,其包括但不限于大肠杆菌、莫洛尼小鼠白血病病毒和禽成髓细胞瘤病毒。

[0164] 如本文所用,“嵌合”蛋白质是指其氨基酸序列代表来自至少两个不同的蛋白质的氨基酸序列的子序列的融合产物的蛋白质。嵌合蛋白通常并不通过氨基酸序列的直接操作产生,而是从编码嵌合氨基酸序列的“嵌合”基因表达出来。在某些实施例中,例如,本发明的未修饰形式的突变型DNA聚合酶是由来源于栖热菌种DNA聚合酶的氨基端(N-末端)区域和来源于Tma DNA聚合酶的羧基端(C-末端)区域组成的嵌合蛋白。N-末端区域是指从N-末端(氨基酸位置1)延伸至内部氨基酸的区域。类似地,C-末端区域是指从内部氨基酸延伸至C-末端的区域。

[0165] 术语“适配体”是指识别并结合至DNA聚合酶并有效抑制聚合酶活性的单链DNA,如美国专利号5,693,502中所述,其在此全文以引用方式明确并入本文。适配体和dUTP/UNG在RT-PCR中的用途例如在Smith,E.S.等人,(*Amplification of RNA:High-temperature Reverse Transcription and DNA Amplification with a Magnesium-activated Thermostable DNA Polymerase,in PCR Primer:A Laboratory Manual*,第2版,Dieffenbach,C.W.和Dveksler,G.S.,编辑,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,New York,211-219,(2003))的著作中亦被提及讨论。

[0166] 在突变型DNA聚合酶的上下文中,与另一条序列(例如区域、片段、核苷酸或氨基酸位置等)的“对应”基于根据核苷酸或氨基酸的位置数的编号惯例,然后以最大化序列同一性百分比的方式比对序列。“对应于[特定序列]的位置[X]”的氨基酸是指目标多肽中与指定序列的等同氨基酸比对的氨基酸。通常,如本文所述,可以使用比对算法,诸如如下所述的BLAST,来确定对应于聚合酶位置的氨基酸。因为不是给定的“对应区域”内的所有位置都需要相同,对应区域内的非匹配位置可能被认为是“对应位置”。因此,如本文所用,特定DNA聚合酶的“与氨基酸位置[X]对应的氨基酸位置”是指其他DNA聚合酶和结构同系物和家族中基于比对的等同位置。在本发明的一些实施例中,氨基酸位置的“对应”相对于包含一个或多个SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、或SEQ ID NO:39的基序的聚合酶区域来进行确定。当聚合酶多肽序

列不同于SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、或SEQ ID NO:39时(例如,通过氨基酸变化或氨基酸的添加或缺失),可能与本文讨论的改良活性相关联的特定突变将不在如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、或SEQ ID NO:39中一样的位置编号中。例如,在表1中对此进行了说明。

[0167] 如本文所用,“重组”是指已经通过重组方法有意修饰过的氨基酸序列或核苷酸序列。本文中的术语“重组核酸”意指通常通过限制性核酸内切酶对核酸的操作以自然界中通常不存在的形式而最初体外形成的核酸。因此,出于本发明的目的,分离的线性形式的突变型DNA聚合酶核酸或通过连接通常不接合的DNA分子而在体外形成的表达载体均被认为是重组。应当理解,一旦制备了重组核酸并将其重新引入宿主细胞,它将使用宿主细胞的体内细胞机制而不是体外操作非重组地复制;然而,这种核酸一旦被重组产生,尽管随后非重组地复制,但是出于本发明的目的仍被认为是重组。“重组蛋白质”是使用重组技术,即通过上述的重组核酸的表达制造的蛋白质。

[0168] 当核酸与另一个核酸序列置于功能性关系中时,该核酸是“可操作连接的”。例如,如果启动子或增强子影响编码序列的转录,则所述启动子或增强子可操作地连接至所述编码序列,或如果核糖体结合位点被定位以便于翻译,则所述核糖体结合位点可操作地连接至编码序列。

[0169] 术语“宿主细胞”是指单细胞的原核生物和真核生物有机体(例如细菌、酵母和放线菌)以及细胞培养物中生长的来自高等植物或者动物的单个的细胞。

[0170] 术语“载体”是指一段DNA,通常是双链的,其可以已经插入一段外源DNA。载体可以是例如质粒来源的。载体包含“复制子”多核苷酸序列,其促进载体在宿主细胞中的自主复制。外源DNA被定义为异源DNA,其是宿主细胞中天然不存在的DNA,所述异源DNA例如复制载体分子、编码可选择标志物或可筛选标志物或编码转基因。载体用于将外源或异源DNA转运到合适的宿主细胞中。一旦进入宿主细胞,载体可以独立于宿主染色体DNA复制或与宿主染色体DNA整合,并且可以生成所述载体及其插入的DNA的多个拷贝。另外,载体还可以包含允许插入的DNA转录成mRNA分子或以其他方式引起插入的DNA复制成RNA的多个拷贝的必需元件。一些表达载体还另外包含与插入的DNA相邻的序列元件,其增加了表达的mRNA的半衰期和/或允许mRNA翻译成蛋白分子。因此,可以快速合成由插入的DNA编码的许多mRNA和多肽分子。

[0171] 术语“核苷酸”除了指天然存在的核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸单体之外,本文中还应理解为涉及其相关的结构变体,其包括衍生物和类似物,其相对于使用核苷酸的特定上下文(例如,与互补碱基杂交)在功能上是等同的,除非上下文另外明确指出。

[0172] 术语“核酸”或“多核苷酸”是指聚合物,其可以对应于核糖核酸(RNA)或脱氧核糖核酸(DNA)聚合物或其类似物。这包括核苷酸的聚合物,诸如RNA和DNA,以及其合成形式、修饰(例如化学或生物化学修饰)形式,和混合聚合物(例如包括RNA和DNA亚基两者)。示例性的修饰包括甲基化,用类似物取代天然存在的核苷酸中的一个或多个,核苷酸间的修饰诸如不带电荷的键(例如甲基磷酸酯、磷酸三酯、磷酸酰胺化物、氨基甲酸盐等),悬垂部分(例

如多肽),嵌入剂(例如吡啶、补骨脂素等),螯合剂,烷化剂,和修饰的键(例如 $\alpha$ 异头核酸等)。还包括在其能力中模拟多核苷酸以经由氢键及其他化学相互作用与指定序列结合的合成分子。通常核苷酸单体经由磷酸二酯键连接,尽管合成形式的核酸可以包括其他键(例如,如Nielsen等人(Science 254:1497-1500,1991)所述的肽核酸。核酸可以是或包括例如染色体或染色体片段、载体(例如表达载体)、表达盒、裸DNA或RNA聚合物、聚合酶链式反应(PCR)的产物、寡核苷酸、探针和引物。核酸可以是例如单链、双链、或三链,并且不限于任何特定的长度。除非另外指出,除了任何明确指出的序列之外,特定的核酸序列任选地包含或编码互补序列。

[0173] 术语“寡核苷酸”是指包括至少两个核酸单体单元(例如核苷酸)的核酸。寡核苷酸通常包括约六至约175个核酸单体单元,更通常为约八至约100个核酸单体单元,并且更通常为约10至约50个核酸单体单元(例如约15、约20、约25、约30、约35或更多的核酸单体单元)。寡核苷酸的确切大小取决于许多因素,其包括寡核苷酸的最终功能或用途。寡核苷酸任选地通过任何合适的方法制备,其包括但不限于现有或天然序列的分离、DNA复制或扩增、逆转录、适当序列的克隆和限制性酶切,或通过诸如Narang等人的磷酸三酯法(Meth.Enzymol.68:90-99,1979);Brown等人的磷酸二酯法(Meth.Enzymol.68:109-151,1979);Beaucage等人的二乙基亚磷酰胺法(Tetrahedron Lett.22:1859-1862,1981);Matteucci等人的三酯法(J.Am.Chem.Soc.103:3185-3191,1981);自动合成法;或美国专利号4,458,066的固体支持法,或本领域技术人员所知的其他方法直接化学合成。这些参考文献中的全部以引用方式并入。

[0174] 本文中使用的术语“引物”是指在引发多核苷酸延伸的条件下(例如,在包括在适当的缓冲剂中和合适的温度或温度周期(例如在聚合酶链式反应中)下存在所需的核苷三磷酸(由所复制的模板决定)和聚合酶的条件下)能够作为模板定向核酸合成的起始点的多核苷酸。为了进一步说明,引物还可以用于其他多种寡核苷酸介导的合成过程,其包括作为RNA从头合成和体外转录相关的过程(例如基于核酸序列的扩增(NASBA)、转录介导的扩增(TMA)等)的引发剂。引物通常是单链寡核苷酸(例如寡脱氧核糖核苷酸)。引物的适当长度取决于引物预定的用途,但是其范围通常为从6至40个核苷酸,更通常为从15至35个核苷酸。短的引物分子通常需要较低的温度以与模板形成足够稳定的杂交复合物。引物不需要反映模板的精确序列,但是必须是足够互补以与模板杂交以用于发生引物延伸。在某些实施例中,术语“引物对”意指一组引物,其包括与待扩增的核酸序列的5'末端的互补序列杂交的5'有义引物(有时称为“正向”)以及与待扩增的序列的3'末端杂交的3'反义引物(有时称为“反向”) (例如,如果靶序列作为RNA表达或者是RNA)。如果需要,引物可以通过与用光谱学、光化学、生物化学、免疫化学或化学方法可检测的标记相结合来进行标记。例如,有用的标记包括<sup>32</sup>P、荧光染料、电子致密试剂、酶(通常用于ELISA测定)、生物素、或者对其可利用抗血清或单克隆抗体的半抗原和蛋白质。

[0175] 当涉及核酸碱基、核苷三磷酸或核苷酸时,术语“常规的”或“天然的”是指所述多核苷酸中天然存在的那些(即,对于DNA这些是dATP、dGTP、dCTP和dTTP)。另外,在体外DNA合成反应诸如测序中,dITP和7-脱氮-dGTP经常用于代替dGTP,而7-脱氮-dATP可以用于代替dATP。这些可统称为dNTP。

[0176] 当涉及核酸碱基、核苷或核苷酸时,术语“非常规的”或“修饰的”包括在特定的多

核苷酸中天然存在的常规的碱基、核苷或核苷酸的修饰物、衍生物或类似物。与常规的dNTP相比,某些非常规核苷酸在核糖的2'位置修饰。因此,尽管对于RNA天然存在的核苷酸是核糖核苷酸(即ATP、GTP、CTP、UTP,统称为rNTP),因为这些核苷酸具有在糖2'位的羟基,与之相比dNTP中没有,如本文所用,作为用于DNA聚合酶的底物的核糖核苷酸是非常规的核苷酸。如本文所用,非常规的核苷酸包括但不限于用于核酸测序的用作终止剂的化合物。示例性的终止剂化合物包括但不限于具有2',3'双脱氧结构的称为双脱氧核苷三磷酸的那些化合物。双脱氧核苷三磷酸ddATP、ddTTP、ddCTP和ddGTP统称为ddNTP。终止剂化合物的其他示例包括核糖核苷酸的2'-PO<sub>4</sub>类似物(参见例如美国公开号2005/0037991和2005/0037398,其均以引用方式并入)。其他非常规的核苷酸包括硫代磷酸酯dNTP([ $\alpha$ -S]dNTP)、5'-[ $\alpha$ -硼烷]-dNTP、[ $\alpha$ ]-甲基-磷酸酯dNTP和核糖核苷三磷酸(rNTP)。非常规的碱基可以用放射性同位素来标记,诸如<sup>32</sup>P、<sup>33</sup>P或<sup>35</sup>S;荧光标记;化学发光标记;生物发光标记;半抗原标记,诸如生物素;或者酶标记,诸如链霉亲和素或亲和素。荧光标记可以包括带负电荷的染料,诸如荧光素家族的染料,或者电中性的染料,诸如罗丹明家族的染料,或者带正电荷的染料,诸如花菁家族的染料。荧光素家族的染料包括例如FAM、HEX、TET、JOE、NAN和ZOE。罗丹明家族的染料包括德克萨斯红、ROX、R110、R6G和TAMRA。由Perkin-Elmer (Boston, MA)、Applied Biosystems (Foster City, CA)或Invitrogen/Molecular Probes (Eugene, OR)出售各种染料或用FAM、HEX、TET、JOE、NAN、ZOE、ROX、R110、R6G、德克萨斯红和TAMRA标记的核苷酸。花菁家族的染料包括Cy2、Cy3、Cy5和Cy7,并且由GE Healthcare UK Limited (Amersham Place, Little Chalfont, Buckinghamshire, England)出售。

[0177] 如本文所用,“序列同一性百分比”通过在比较窗口比较两条最佳比对的序列来确定,其中对于两条序列的最佳比对,在比较窗口中的序列部分与参考序列(其不包括添加或缺失)相比可以包括添加或缺失(即缺口)。百分比通过确定存在于两条序列中相同的核酸碱基或氨基酸残基的位置的数目以得到匹配位置的数目,将匹配位置的数目除以比较窗口中的位置总数并将该结果乘以100以得到序列同一性百分比来计算。

[0178] 在两个或更多核酸或多肽序列的上下文中,术语“相同的”或“同一性”百分比是指相同的两条或更多条序列或子序列。当在比较窗口或者指定区域中使用以下序列比较算法中的一种或用手工比对及目检测量为针对最大对应而比较和比对时,如果序列具有特定百分比的相同核苷酸或氨基酸残基(例如在特定区域中具有至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、或至少95%同一性),则它们彼此“基本上相同”。如果序列具有至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、或者至少55%同一性,那么它们“基本上相同”。这些定义也指测试序列的互补序列。任选地,同一性存在于至少约50核苷酸长度的区域中,或更通常在100至500或1000或更多核苷酸长度的区域中。

[0179] 在两个或更多多肽序列的上下文中,术语“相似性”或“相似性百分比”是指当在比较窗口或者指定区域中,使用以下序列比较算法中的一种或用手工比对及目检测量为针对最大对应而比较和比对时,具有特定百分比的由保守氨基酸取代定义为相同或相似的(例如在特定区域中具有60%相似性,任选地65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%相似性)氨基酸残基的两条或更多条序列或子序列。如果序列彼此具有至少20%、至少25%、至少

30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、或者至少55%相似性,则它们彼此“基本上相似”。任选地,此相似性存在于至少约50氨基酸长度的区域中,或更通常存在于至少约100至500或1000或更多氨基酸长度的区域中。

[0180] 对于序列比较,通常以一条序列作为参考序列,用测试序列与其比较。当使用序列比较算法时,将测试和参考序列输入电脑,指定子序列坐标,如有必要,指定序列算法程序参数。通常使用默认程序参数,或者可以指定替代参数。然后基于程序参数,序列比较算法计算相对于参考序列的测试序列的序列同一性或相似性百分比。

[0181] 如本文所用,“比较窗口”包括参考选自以下项组成的组的任一数目连续位置的片段:20至600,通常约50至约200,更通常约100至约150,其中在两条序列最佳比对后序列可以与相同数目连续位置的参考序列进行比较。用来比较的序列比对方法是本领域众所周知的。用于比较的最佳序列比对可以例如通过Smith和Waterman的局部同源性算法(Adv. Appl. Math. 2:482, 1970),通过Needleman和Wunsch的同源性比对算法(J. Mol. Biol. 48:443, 1970),通过Pearson和Lipman的搜索相似性法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444, 1988),通过这些算法的计算机化执行(例如,威斯康星遗传学软件包中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.),或者通过手工比对及目检(参见例如Ausubel等人, Current Protocols in Molecular Biology(1995 supplement))来进行。

[0182] 适用于确定序列同一性和序列相似性百分比的算法的示例是BLAST和BLAST 2.0算法,其描述于Altschul等人(Nuc. Acids Res. 25:3389-402, 1977)和Altschul等人(J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990)中。用于执行BLAST分析的软件可通过国立生物技术信息中心(参见互联网www.ncbi.nlm.nih.gov/)公开地获得。该算法涉及:首先通过在查询序列中识别长度W的短字段来识别高分序列对(HSP),其在与数据库序列的相同长度字段比对时匹配或满足一定阳性阈值评分T。T称为邻近字段评分阈值(Altschul等人,同上)。这些最初的邻近字段命中作为用于引发搜索的种子以发现包含它们的更长HSP。字段命中沿着各序列双向延伸,只要累计的比对分数可增加。对于核苷酸序列,使用参数M(用于匹配残基对的奖分;始终>0)和N(用于错配残基的罚分;始终<0)来计算累计分数。对于氨基酸序列,使用评分矩阵以计算累计分数。当累计比对分数从其最大实现值降低数量X;由于一个或多个负分残基比对的累积,累计分数达到或低于零时;或者到达任一序列的末端时,字段命中在各方向上的延伸停止。BLAST算法参数W、T和X确定比对的灵敏度和速度。BLASTN程序(用于核苷酸序列)使用默认字长(W) 11,期望值(E) 10, M=5, N=-4, 并比较两条链。对于氨基酸序列, BLASTP程序使用默认字长3,期望值(E) 10, 和BLOSUM62评分矩阵(参见Henikoff和Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915, 1989) 比对(B) 50, 以及期望值(E) 10, M=5, N=-4。

[0183] BLAST算法也执行两条序列之间相似性的统计分析(参见例如Karlin和Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-87, 1993)。由BLAST算法提供的一种相似性度量是最小总和概率(P(N)),其提供两条核苷酸或氨基酸序列之间匹配偶然发生的概率的指示。例如,如果在测试核酸与参考核酸的比较中最小总和概率低于约0.2,通常低于约0.01,以及更通常低于约0.001,则核酸被认为与参考序列相似。

[0184] 术语“逆转录效率”是指在给定的逆转录反应中逆转录为cDNA的RNA分子的比例。

在某些实施例中,相对于这些未修饰形式的DNA聚合酶,本发明的突变型DNA聚合酶具有改良的逆转录效率。即,在特定的一组反应条件下,这些突变型DNA聚合酶比其未修饰形式逆转录更高比例的RNA模板。不受理论的限制,本文所述的突变型DNA聚合酶逆转录更高比例的RNA模板的能力可以归因于增加的逆转录活性,例如,增加的核苷酸掺入率和/或增加的酶持续合成能力。逆转录效率可例如通过使用RNA模板测量PCR反应的交叉点(Cp)、并将Cp值与对照反应的Cp值进行比较来测得,其中相同序列的DNA模板(除了U以T进行代替)扩增,其中RNA和DNA扩增使用共同的引物集和相同的聚合酶,例如,如示例中所述。测试聚合酶具有改良的RT效率:当在RNA用作模板时,测试聚合酶与对照聚合酶相比具有降低的Cp值,而在DNA用作模板时,其相对于对照聚合酶具有基本上不变的Cp值。在一些实施例中,本发明的聚合酶具有改良的RT效率,使得Cp比RNA模板上的对应对照聚合酶少至少一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个单元。

[0185] 术语“错配耐受性”是指当以模板依赖性方式通过将一个或多个核苷酸(例如共价地)附接至核酸来延伸核酸(例如,引物或其他寡核苷酸)时,聚合酶耐受包含错配序列的能力。术语“3'错配耐受性”是指聚合酶耐受包含错配(几乎互补)序列的能力,其中待延伸的核酸(例如引物或其他寡核苷酸)与其模板在引物的3'末端核苷酸处具有错配。与模板的错配也可能位于引物的3'倒数第二个核苷酸处,或位于引物序列内的另一个位置。

[0186] 术语“错配判别”是指当以模板依赖性方式通过将一个或多个核苷酸(例如共价地)附接至核酸来延伸核酸(例如,引物或其他寡核苷酸)时,聚合酶区分完全互补序列与包含错配序列的能力。术语“3'-错配判别”是指聚合酶区分完全互补序列与包含错配(几乎互补)序列的能力,其中与核酸杂交的模板相比,待延伸核酸(例如引物或其他寡核苷酸)在核酸3'末端处具有错配。术语“错配”是指在一段互补的双链体形成(或潜在的双链体形成)序列内存在一个或多个碱基错配(或“非互补碱基对立”)。

[0187] 术语“Cp值”或“交叉点”值是指允许对输入的目标核酸进行定量的值。可以根据二阶导数最大法(the second-derivative maximum method)确定Cp值(Van Luu-The,等人,“Improved real-time RT-PCR method for high-throughput measurements using second derivative calculation and double correction,”*BioTechniques*,第38卷,第2期,2005年2月,第287-293页)。在二阶导数法中,Cp对应二阶导数曲线的第一峰。此峰对应于对数线性相的开始。二阶导数法计算实时荧光强度曲线的二阶导数值,且仅获得一个值。初始Cp方法基于强度值的局部定义的可微分的近似值,例如,通过多项式函数。然后计算三阶导数。Cp值是三阶导数的最小的根。也可以使用拟合点法确定Cp,其中通过对数线性区域中平行线与阈值线的交叉确定Cp(Van Luu-The,等人,*BioTechniques*,第38卷,第2期,2005年2月,第287-293页)。Roche提供的LightCycler仪器通过根据二阶导数最大法计算而提供Cp值。

[0188] 术语“PCR效率”是指循环至循环扩增效率的指标。使用以下方程式计算每种条件的PCR效率: $\% \text{PCR效率} = (10^{(\text{斜率})} - 1) \times 100$ 计算每种条件的PCR效率,其中通过y轴上绘制的对数拷贝数和x轴上绘制的Cp的线性回归而计算斜率。可以使用完全匹配或错配的引物模板测量PCR效率。

[0189] 术语“核酸延伸速率”是指生物催化剂(例如酶,诸如聚合酶、连接酶等)以模板依赖性或非模板依赖性方式通过将一个或多个核苷酸(例如共价地)附接至核酸来延伸核酸

(例如,引物或其他寡核苷酸)的速率。为了说明,本文描述的某些突变型DNA聚合酶相对于这些未修饰形式的DNA聚合酶具有改良的核酸延伸速率,使得在一组给定的反应条件下它们可以高于这些未修饰形式的速率延伸引物。

[0190] 术语“RT和聚合酶抑制剂的耐受性”是指在存在一定量的抑制剂的情况下,聚合酶维持活性(聚合酶或逆转录活性)的能力,该抑制剂会抑制对照聚合酶的聚合酶活性或逆转录活性。在一些实施例中,在存在一定量的抑制剂的情况下,改良的聚合酶能够具有聚合酶或逆转录活性,该抑制剂将基本上消除对照聚合酶活性。

[0191] 术语“5'-核酸酶探针”是指包含至少一个发光标记部分并且用于5'-核酸酶反应以实现靶核酸检测的寡核苷酸。在一些实施例中,例如,5'-核酸酶探针仅包括单个发光部分(例如,荧光染料等)。在某些实施例中,5'-核酸酶探针包括自身互补的区域,使得探针能够在选定条件下形成发夹结构。为了进一步说明,在一些实施例中,5'-核酸酶探针包含至少两个标记部分,并且在从寡核苷酸切割或以其他方式分离两个标记中的一个后,发射强度增加的辐射。在某些实施例中,5'-核酸酶探针用两种不同的荧光染料标记,例如5'末端报告染料和3'末端淬灭染料或部分。在一些实施例中,在与末端位置不同或除了末端位置之外的一个或多个位置标记5'-核酸酶探针。当探针完好无损时,通常在两个荧光团之间发生能量转移,使得来自报告染料的荧光发射至少部分淬灭。在聚合酶链式反应的延伸步骤期间,例如,结合至模板核酸的5'-核酸酶探针由例如Taq聚合酶或具有此活性的另一种聚合酶的5'至3'核酸酶活性切割,使得报告染料的荧光发射不再淬灭。示例性的5'-核酸酶探针也描述于例如美国专利号5,210,015、美国专利号5,994,056和美国专利号6,171,785,其各自以引用方式并入本文。在其他实施例中,可以用两种或更多种不同的报告染料和3'末端淬灭染料或部分来标记5'核酸酶探针。

[0192] 术语“FRET”或“荧光共振能量转移”或“Foerster共振能量转移”是指至少两个发色团、供体发色团和受体发色团(被称为淬灭剂)之间的能量转移。当供体被具有合适波长的光辐射激发时,供体通常将能量转移至受体。受体通常以具有不同的波长的光辐射的形式重新发射转移的能量。当受体是“黑暗”淬灭剂时,它以除光以外的形式耗散转移的能量。特定的荧光团充当供体还是受体起作用取决于FRET对其他成员的特性。常用的供体-受体对包括FAM-TAMRA对。常用的淬灭剂是DABCYL和TAMRA。常用的黑暗淬灭剂包括BlackHole Quenchers<sup>TM</sup> (BHQ) (Biosearch Technologies, Inc., Novato, Cal.)、Iowa Black<sup>TM</sup> (Integrated DNA Tech., Inc., Coralville, Iowa)和BlackBerry<sup>TM</sup> Quencher 650 (BBQ-650) (Berry&Assoc., Dexter, Mich.)。

[0193] 术语“链置换活性”是指聚合酶置换在合成期间遇到的下游DNA的能力。英国皇家化学学会将术语“链置换”定义为“将与完整双链DNA中其互补链形成异源双链DNA的断裂3'单链DNA分子排斥出去。恢复了原始双链体中的Watson-Crick碱基对。受排斥的3'单链DNA分子以其原始互补序列重新退火,以重新形成两个完整的双链分子。”在一些实施例中,该术语包括称为链置换扩增(SDA)的等温扩增方法。

[0194] 术语“高温”是指高于双链DNA分子的解链温度的温度。解链温度( $T_m$ )定义为一半DNA链处于无规卷曲或单链(ssDNA)状态的温度。如本领域中众所周知的, $T_m$ 取决于DNA分子的长度及其特定核苷酸序列。在PCR变性、退火和延伸反应中遇到高温的典型示例,诸如60°C或更高,例如,从约60°C至约95°C。

## 附图说明

[0195] 图1提供了以下DNA聚合酶I酶之间的序列同一性:栖热菌种Z05DNA聚合酶(Z05);水生栖热菌DNA聚合酶(Taq);丝状栖热菌DNA聚合酶(Tfi);黄栖热菌DNA聚合酶(Tf1);栖热菌种sps17 DNA聚合酶(Sps17);嗜热栖热菌DNA聚合酶(Tth);*Thermus caldophilus* DNA聚合酶(Tca);耐辐射奇异球菌DNA聚合酶(Dra);海栖热袍菌DNA聚合酶(Tma);那不勒斯栖热袍菌DNA聚合酶(Tne);非洲栖热腔菌DNA聚合酶(Taf);嗜热脂肪芽孢杆菌DNA聚合酶(Bst);以及热坚芽孢杆菌DNA聚合酶(Bca)。(A)整个聚合酶I酶上的序列同一性(对应于Z05的氨基酸1-834);以及(B)与Z05的氨基酸420-834相对应的聚合酶亚结构域上的序列同一性。

[0196] 图2提供了各种栖热菌种DNA聚合酶I酶之间的序列同一性:栖热菌种Z05 DNA聚合酶(Z05);水生栖热菌DNA聚合酶(Taq);丝状栖热菌DNA聚合酶(Tfi);黄栖热菌DNA聚合酶(Tf1);栖热菌种sps17 DNA聚合酶(Sps17);嗜热栖热菌DNA聚合酶(Tth);以及*Thermus caldophilus* DNA聚合酶(Tca)。(A)整个聚合酶I酶上的序列同一性(对应于Z05的氨基酸1-834);以及(B)与Z05的氨基酸420-834相对应的聚合酶亚结构域上的序列同一性。

[0197] 图3示出了示例中描述的测定设计。四个互补的寡核苷酸Oligo A(绿色)、Oligo B(浅蓝色)、Oligo C(深蓝色)和锁定核酸(LNA)Oligo D(红色)彼此退火。Oligo A与Oligo B互补,并引发聚合反应。Oligo B是模板,并且在5'-末端具有FAM-荧光报告剂。Oligo C与Oligo B互补,并且在3'-末端处具有BHQ淬灭剂。锁定核酸Oligo D与模板Oligo B互补,并且用作高能栅栏。当将聚合酶、 $Mg^{2+}$ 和核苷酸添加至退火的混合物时,聚合反应使Oligo A延伸,并且新合成的链置换LNA Oligo D和Oligo C,从而从荧光探针释放淬灭剂。循环完成后生成荧光信号。

[0198] 图4A示出了具有细菌菌落(克隆)的孔的结果,所述菌落表达了与对照G46E C21克隆相比具有增加的链置换活性的突变型聚合酶。板6示出了G46E C21克隆的结果(板6的所有孔包含原始G46E C21克隆)。板1示出了随后经测序的以下克隆的增加的链置换活性:F24(包含I686V和A693V突变)、L3(包含T516I和V633I突变)和P19(包含Q415H、E420D、E636G、N752S和V768M突变)。

[0199] 图4B示出了针对板2-5的结果。板6(上方)用作所有这些实验的对照。板2示出了以下克隆的增加的链置换活性,其具有针对克隆的后续测序结果:M22(包含R525G和F694S突变)、G9(包含Q491H和T516S突变)、N19(包含S515F和T666M突变)和N7(包含E402V、V555A和N582D突变)。板3示出了以下克隆的增加的链置换活性,其具有针对克隆的后续测序结果:A24(包含A737T和A759T突变)、F21(包含L521Q和T546A突变)、G10(包含N668S突变)和I14(包含A456T突变)。板4示出了以下克隆的增加的链置换活性,其具有针对克隆的后续测序结果:G23(包含K507M、T571A和S652F突变)和K12(包含S515F和A832V突变)。板5示出了以下克隆的增加的链置换活性,其具有针对克隆的后续测序结果:C6(包含D498E、L524V、R598G和M616I突变)、G20(包含A444T、D498E、M660K和Y673N突变)、G23(包含E493D、T511S、M648I和M749L突变)和H21(包含Q635K突变)。

[0200] 图5A和图5B提供示出了本文所述的突变型聚合酶具有显著降低的核酸内切酶和核酸外切酶活性的数据。

## 具体实施方式

[0201] 本公开提供了改良DNA聚合酶,其中相对于功能性DNA聚合酶,聚合酶结构域中的一个或多个氨基酸已经突变。本文所述的DNA聚合酶是相对于未修饰形式的聚合酶具有增加的链置换活性和/或增加的错配耐受性、延伸速率以及RT和聚合酶抑制剂的耐受性。在某些实施例中,突变型DNA聚合酶可在更低的浓度下用于与亲本酶相比优越或等同的性能。在一些实施例中,突变型DNA聚合酶相对于未修饰或对照聚合酶具有增加的链置换活性,同时保留基本上相同的DNA依赖性聚合酶活性。在一些实施例中,突变型DNA聚合酶具有显著降低的核酸外切酶或核酸内切酶活性。在一些实施例中,突变型DNA聚合酶具有降低的5'至3'核酸外切酶活性。

[0202] 具有增加的链置换活性的DNA聚合酶可用于例如高温下的聚合酶链式反应(PCR)和等温扩增(诸如链置换扩增(SDA)),并且用于诸如环介导扩增(LAMP)、交叉引物扩增(CSA)和聚合酶链置换反应(PCDR)的DNA扩增技术。因此,DNA聚合酶可用于涉及多核苷酸延伸的多种应用,其包括例如在重组DNA研究和疾病的医学诊断中的应用。

[0203] 在一些实施例中,DNA聚合酶进一步包含SEQ ID NO:29和/或SEQ ID NO:38的基序。

[0204] 此基序存在于许多家族A型DNA依赖性DNA聚合酶的“手指”结构域(L $\alpha$ 螺旋)中,特别是来自嗜热菌的热稳定DNA聚合酶(Li等人,EMBOJ.17:7514-7525,1998)。例如,图1示出了来自若干种细菌的DNA聚合酶“手指”结构域的区域氨基酸序列比对:热坚芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、耐辐射奇异球菌、非洲栖热腔菌、海栖热袍菌、那不勒斯栖热袍菌、水生栖热菌、*Thermus caldophilus*、丝状栖热菌、黄栖热菌、栖热菌种sps17、栖热菌种Z05和嗜热栖热菌。如图所示,与上述基序相对应的天然序列存在于这些聚合酶中的每一个中,这表明用于聚合酶的此区域的保守功能。图2提供了这些DNA聚合酶之间的序列同一性。

[0205] 在一些实施例中,本文所述的具有改良的活性和/或特性的聚合酶是野生型或天然存在的DNA聚合酶,诸如,来自以上所列嗜热菌的物种中的任一个的聚合酶,或与此类野生型或天然存在的DNA聚合酶基本相同。例如,在一些实施例中,聚合酶与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40或SEQ ID NO:42具有至少80%、85%、90%或95%同一性。在一个变体中,未修饰形式的聚合酶来自栖热菌种属的一个物种。在本发明的其他实施例中,未修饰的聚合酶来自除栖热菌种以外的嗜热菌种,例如,栖热袍菌属。可获得用于许多热稳定DNA聚合酶的完整核酸和氨基酸序列。水生栖热菌(Taq)(SEQ ID NO:2)、嗜热栖热菌(Tth)(SEQ ID NO:6)、栖热菌种Z05(SEQ ID NO:1)、栖热菌种sps17(SEQ ID NO:5)、海栖热袍菌(Tma)(SEQ ID NO:34)和非洲栖热腔菌(Taf)(SEQ ID NO:33)聚合酶中的每个的序列已在PCT国际专利公开号WO 92/06200中公开,其以引用方式并入本文。来自黄栖热菌的DNA聚合酶的序列(SEQ ID NO:4)已经在Akhmetzjanov和Vakhitov(Nucleic Acids Research 20:5839,1992)中公开,其以引用方式并入本文。来自*Thermus caldophilus*的热稳定DNA聚合酶的序列(SEQ ID NO:7)参见EMBL/GenBank登录号U62584。来自丝状栖热菌的热稳定DNA聚合酶的序列可以使用例如美国专利号4,889,818中提供的方法以及表1中提供的序列信息从ATCC保藏号42380恢复。那不勒斯栖热袍菌DNA聚合酶的序列(SEQ ID NO:35)来自GeneSeq专利

数据库登录号R98144和PCT WO 97/09451,其各自以引用方式并入本文。来自热稳定芽孢杆菌的热稳定DNA聚合酶的序列(SEQ ID NO:37描述于例如Uemori等人(J Biochem(Tokyo)113(3):401-410,1993;另参见Swiss-Prot数据库登录号Q04957以及GenBank登录号D12982和BAA02361),其各自以引用方式并入。可以如本文所述进行修饰的未修饰形式的DNA聚合酶的示例还描述于例如美国专利号6,228,628;6,346,379;7,030,220;6,881,559;6,794,177;6,468,775;和美国专利号7,148,049;7,179,590;7,410,782;7,378,262,其各自以引用方式并入。序列中还提供了代表性的全长聚合酶序列。

[0206] 还适合于本文描述的突变的是先前已修饰(例如,通过氨基酸取代、添加或缺失)的功能性DNA聚合酶。在一些实施例中,此类功能性修饰的聚合酶包含SEQ ID NO:40或SEQ ID NO:42的氨基序列,或与SEQ ID NO:40或SEQ ID NO:42具有基本上序列同一性或相似性,例如与SEQ ID NO:40或SEQ ID NO:42具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性。在一些实施例中,合适的未修饰的DNA聚合酶还包括野生型或天然存在的聚合酶的功能性变体。此类变体通常将与野生型或天然存在的聚合酶具有基本的序列同一性或相似性,通常具有至少80%序列同一性,并且更通常具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性。

[0207] 在一些实施例中,本文所述的聚合酶还包含核酸酶结构域(例如,对应于Z05(SEQ ID NO:1)的位置1至291)。

[0208] 在一些实施例中,本文所述的聚合酶是嵌合聚合酶,即,其包含来自两种或更多种酶的多肽区域。此类嵌合DNA聚合酶的示例描述于例如美国专利号6,228,628,其全文以引用方式并入本文。嵌合CS家族DNA聚合酶是特别合适的,其包括CS5(SEQ ID NO:27)和CS6(SEQ ID NO:28)聚合酶及其变体,其具有与SEQ ID NO:27或SEQ ID NO:28基本上氨基酸序列同一性或相似性(通常具有至少80%的氨基酸序列同一性,并且更通常具有90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%氨基酸序列同一性)。CS5和CS6 DNA聚合酶为来源于栖热菌种Z05和海栖热袍菌(Tma) DNA聚合酶的嵌合酶。它们包含栖热菌种酶的N-末端5'-核酸酶结构域和Tma酶的C-末端3'-5'核酸外切酶和聚合酶结构域。这些酶具有有效的逆转录酶活性,可以延伸含核苷酸类似物的引物,并且可以掺入 $\alpha$ -硫代磷酸酯dNTP、dUTP、dITP以及荧光素和花菁染料家族标记的dNTP。CS5和CS6聚合酶也是有效的 $Mg^{2+}$ 活化PCR酶。CS5和CS6嵌合聚合酶进一步描述于例如美国专利号7,148,049中,其全文以引用方式并入本文。

[0209] 在一些实施例中,氨基酸取代是单个氨基酸取代。相对于未修饰的聚合酶,本文提供的DNA聚合酶可以在活性位点中包含一个或多个氨基酸取代。

[0210] 在一些实施例中,本文所述的聚合酶进一步如下包含SEQ ID NO:38的氨基酸基序(对应于Z05(SEQ ID NO:1)的D580X突变):

[0211] Thr-Gly-Arg-Leu-Ser-Ser- $X_7$ - $X_8$ -Pro-Asn-Leu-Gln-Asn

[0212] (在本文中也用单字母代码称为

[0213] T-G-R-L-S-S- $X_7$ - $X_8$ -P-N-L-Q-N)(SEQ ID NO:38);其中

[0214]  $X_7$ 是Ser(S)或Thr(T);并且

[0215]  $X_8$ 是除Asp(D)或Glu(E)以外的任何氨基酸

[0216] 在例如美国专利公开号2009/0148891中更详细地讨论了由SEQ ID NO:38表征的

突变。此类功能性变体聚合酶通常将与野生型或天然存在的聚合酶(例如,SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40和SEQ ID NO:42)具有基本上序列同一性或相似性,通常具有至少80%的氨基酸序列同一性,更通常具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的氨基酸序列同一性。

[0217] 在一些实施例中,本文所述的聚合酶进一步如下包含SEQ ID NO:29的氨基酸基序(对应于Z05(SEQ ID NO:1)的I709X突变):

[0218]  $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}-\text{Gly-Tyr-Val-}$

[0219]  $X_{14}-\text{Thr-Leu}$ (在本文中也用单字母代码称为 $X_1-X_2-X_3-$

[0220]  $X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}-\text{G-Y-V-}X_{14}-\text{T-L}$ )

[0221] (SEQ ID NO:29);其中

[0222]  $X_1$ 是Ala(A)、Asp(D)、Ser(S)、Glu(E)、Arg(R)或

[0223] Gln(Q);

[0224]  $X_2$ 是Trp(W)或Tyr(Y);

[0225]  $X_3$ 是除Ile(I)、Leu(L)或Met(M)以外的任何氨基酸;

[0226]  $X_4$ 是Glu(E)、Ala(A)、Gln(Q)、Lys(K)、Asn(N)或

[0227] Asp(D);

[0228]  $X_5$ 是Lys(K)、Gly(G)、Arg(R)、Gln(Q)、His(H)或

[0229] Asn(N);

[0230]  $X_6$ 是Thr(T)、Val(V)、Met(M)或Ile(I);

[0231]  $X_7$ 是Leu(L)、Val(V)或Lys(K);

[0232]  $X_8$ 是Glu(E)、Ser(S)、Ala(A)、Asp(D)或Gln(Q);

[0233]  $X_9$ 是Glu(E)或Phe(F);

[0234]  $X_{10}$ 是Gly(G)或Ala(A);

[0235]  $X_{11}$ 是Arg(R)或Lys(K);

[0236]  $X_{12}$ 是Lys(K)、Arg(R)、Glu(E)、Thr(T)或Gln(Q);

[0237]  $X_{13}$ 是Arg(R)、Lys(K)或His(H);以及

[0238]  $X_{14}$ 是Glu(E)、Arg(R)或Thr(T)。

[0239] 在一些实施例中,此类功能性变体聚合酶通常将与野生型或天然存在的聚合酶(例如,SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40或SEQ ID NO:42)具有基本上序列同一性或相似性,通常具有至少80%的氨基酸序列同一性,更通常具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的氨基酸序列同一性。

[0240] 在一些实施例中,DNA聚合酶包含与SEQ ID NO:38和SEQ ID NO:29相对应的氨基酸取代。在一些实施例中,氨基酸取代包括在SEQ ID NO:38的位置 $X_8$ 的亮氨酸(L)、甘氨酸(G)、苏氨酸(T)、谷氨酰胺(Q)、丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、天冬酰胺(N)、精氨酸(R)和赖氨酸(K)。在某些实施例中,氨基酸取代包括SEQ ID NO:38的位置 $X_8$ 处的甘氨酸(G)。在一些实施

例中,氨基酸取代包括在SEQ ID NO:29的位置 $X_3$ 处的赖氨酸(K)、精氨酸(R)、丝氨酸(S)、甘氨酸(G)或丙氨酸(A)。在某些实施例中,氨基酸取代包括SEQ ID NO:29的位置 $X_3$ 处的赖氨酸(K)。

[0241] 可以使用例如定点诱变的已知方法和在本文进一步描述的或本领域技术人员已知的测定中多核苷酸延伸性能的确定,来确定在已识别位点中的一个或多个处的其他合适的氨基酸取代,例如描述于美国专利申请公开号2009/0148891和2009/0280539中的氨基酸取代,其全文以引用方式并入本文。

[0242] 因为DNA聚合酶的精确长度变化,所以对应于 $X_8$  (SEQ ID NO:38)和 $X_3$  (SEQ ID NO:29)的精确氨基酸位置可以根据所使用的特定突变型聚合酶而变化。氨基酸和核酸序列比对程序是容易获得的(参见例如上文提及的那些),并且鉴于本文中识别的特定基序,用于辅助识别根据本发明的用于修饰的确切氨基酸(和对应的密码子)。表1中示出了来自示例性嗜热菌种的代表性嵌合热稳定DNA聚合酶和热稳定DNA聚合酶的对应于 $X_8$ 和 $X_3$ 的位置。

[0243] 表1. 在示例性聚合酶中对应于基序位置 (SEQ ID NO:38的)  $X_8$ 和 (SEQ ID NO:29的)  $X_3$ 的氨基酸位置。

	生物体或嵌合序列	氨基酸位置	
		(SEQ ID NO:38的) $X_8$	(SEQ ID NO:29的) $X_3$
[0244]	嗜热栖热菌 (6)	580	709
	<i>T. caldophilus</i> (7)	580	709
	栖热菌种 Z05 (1)	580	709
	水生栖热菌 (2)	578	707

生物体或嵌合序列	氨基酸位置	
	(SEQ ID NO:38 的) X <sub>8</sub>	(SEQ ID NO:29 的) X <sub>3</sub>
共有 (SEQ ID NO:)		
黄栖热菌 (4)	577	706
丝状栖热菌 (3)	576	705
栖热菌种 sps17 (5)	576	705
[0245] 海栖热袍菌 (34)	640	770
那不勒斯栖热袍菌 (35)	640	770
非洲栖热腔菌 (33)	639	769
热坚芽孢杆菌 (37)	621	751
嗜热脂肪芽孢杆菌 (36)	620	750
CS5 (27)	640	770
CS6 (28)	640	770

[0246] 在一些实施例中,本发明的DNA聚合酶来源于栖热菌种Z05 DNA聚合酶 (SEQ ID NO:1) 或其变体 (例如,带有D580G突变等)。如上所提及,在栖热菌种Z05 DNA聚合酶中,位置X<sub>8</sub>对应于位置580处的天冬氨酸(D),位置X<sub>3</sub>对应于位置709处的异亮氨酸(I)。因此,在本发明的某些变体中,相对于栖热菌种Z05 DNA聚合酶 (或与SEQ ID NO:1基本相同、例如具有至少约60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%同一性的DNA聚合酶),突变型聚合酶进一步包含在D580和/或I709处的至少一个氨基酸取代。在某些实施例中,SEQ ID NO:1的位置580处的氨基酸残基可以选自亮氨酸(L)、甘氨酸(G)、苏氨酸(T)、谷氨酰胺(Q)、丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、天冬酰胺(N)、精氨酸(R)和赖氨酸(K)。因此,在一些实施例中,在SEQ ID NO:1的位置580处的氨基酸残基是甘氨酸(G)。进一步地,在某些实施例中,SEQ ID NO:1的位置709处的氨基酸不是I。在一些实施例中,SEQ ID NO:1的位置709处的氨基酸选自G、A、V、R、F、W、P、S、T、C、Y、N、Q、D、E、K、L、M或H。在一些实施例中,SEQ ID NO:1的位置709处的氨基酸是K、R、S、G或A。在一些实施例中,SEQ ID NO:1的位置709处的氨基酸是K。

[0247] 示例性的栖热菌种Z05 DNA聚合酶突变体包括那些包含氨基酸取代I709K (或I709R、I709S、I709G、I709A) 和/或D580G的突变体。

[0248] 本发明人已经示出,在与上述SEQ ID NO:1的位置709相对应的氨基酸处的取代可以导致DNA聚合酶具有改良的 (即,增加的) 逆转录效率、增加的RT-PCR活性 (例如,更有效的RNA模板扩增而不影响DNA模板上的PCR效率)、在存在Mg<sup>2+</sup>的情况下增加的RT-PCR效率、在存在抑制剂 (例如,血红蛋白的分解产物,诸如血红素和/或肝素) 的情况下增加的逆转录酶活性、与对照聚合酶相比增加的延伸速率和改良的3'-错配耐受性。参见美国专利公开号US 2012-0258501,其内容全文以引用方式并入本文。因此,预期本文所述的在与SEQ ID NO:1的位置709相对应的氨基酸处包含取代的改良的聚合酶也将具有上述改良的特性。

[0249] 除了本文描述的突变和取代之外,本发明的DNA聚合酶还可以包括其他非取代性修饰。此类修饰可以包括例如本领域已知的共价修饰以给予包括多核苷酸延伸的应用中的

其他优点。例如,一种此类修饰是使酶失活的热可逆共价修饰,但在高温(诸如通常用于多核苷酸延伸的温度)下孵育时,其逆转以活化酶。在美国专利号5,773,258和5,677,152中描述了用于此类热可逆修饰的示例性试剂,其全文以引用方式明确并入本文。

[0250] 本发明的DNA聚合酶可以通过对编码对应的未修饰聚合酶(例如,野生型聚合酶或者本发明的聚合酶所来源于的对应变体)的DNA序列进行突变来构建,诸如通过使用通常称为定点诱变的技术。编码未修饰形式的聚合酶的核酸分子可以通过本领域普通技术人员熟知的各种聚合酶链式反应(PCR)技术来突变。(参见例如PCR Strategies (M.A. Innis, D.H. Gelfand, and J.J. Sninsky编辑,1995,Academic Press, San Diego, CA) 第14章; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky和T.J. White编辑,Academic Press, NY, 1990) 中描述。

[0251] 作为非限制性示例,用于来自Clontech的转化定点诱变试剂盒中的双引物系统可以用于将定点突变引入编码未修饰形式的聚合酶的多核苷酸。在此系统中的靶质粒变性之后,两条引物同时退火至质粒;这些引物中的一条包含需要的定点突变,另一条包含引起限制性位点消除的在质粒中的另一个点的突变。然后进行第二条链的合成,紧密连接这两个突变,并且将产生的质粒转化至大肠杆菌mutS菌株中。质粒DNA从转化的细菌中分离,用相关的限制酶进行限制性酶切(从而线性化未突变的质粒),然后重新转换至大肠杆菌中。此系统允许直接在表达质粒中生成突变,而无需亚克隆或者生成单链的噬粒。两个突变的紧密连接和随后的未突变质粒的线性化导致高突变效率并允许最少的筛选。在初始限制性位点引物的合成之后,此方法对每个突变位点只需要使用一种新的引物类型。可以合成一组“已设计的简并”寡核苷酸引物,以便同时在给定的位点引入所有需要的突变体,而非分别准备各位置的突变体。可以对通过诱变处理区域的质粒DNA进行测序来筛选转化体,以识别并分选突变体克隆。然后每个突变型DNA可诸如在突变检测增强凝胶(Mallinckrodt Baker, Inc., Phillipsburg, NJ) 上经限制性酶切并由电泳分析,以证实在该序列上不存在其他改变(通过与未诱变处理的对照进行带移比较)。可替代地,可以对整个DNA区域测序以证实在靶区域之外没有其他突变事件发生。

[0252] 具有多于一个氨基酸取代的DNA聚合酶可以用各种方式生成。在氨基酸密集地位于多肽链中的情况下,它们可以使用编码所有需要的氨基酸取代的一条寡核苷酸来同时突变。然而如果氨基酸彼此定位隔开一定距离(例如由十个以上氨基酸分隔),则生成编码所有需要的变化的单一寡核苷酸更困难。作为替代,可以采用两种替代方法中的一种。在第一种方法中,针对每个待取代的氨基酸产生分离的寡核苷酸。然后将寡核苷酸同时退火至单链模板DNA,并且从模板合成的DNA第二条链将编码所有需要的氨基酸取代。一个替代方法涉及两轮或更多轮诱变以产生需要的突变体。第一轮如针对单突变体所述:编码未修饰聚合酶的DNA用于模板,将编码需要的第一氨基酸取代的寡核苷酸退火至此模板,然后生成异源双链DNA分子。第二轮的诱变利用第一轮的诱变中产生的突变DNA作为模板。因此,此模板已经包含一个或多个突变。然后将编码其他需要的氨基酸取代的寡核苷酸退火至此模板,并且产生的DNA链现在编码来自第一轮诱变和第二轮诱变两者的突变。由此产生的DNA能够在第三轮的诱变中用作模板等等。可替代地,可以利用Seyfang和Jin的多位点诱变法(Anal. Biochem. 324:285-291. 2004)。

[0253] 因此,还提供了编码本发明的DNA聚合酶中的任一个的重组核酸。使用本发明的编

码DNA聚合酶的核酸可以制成各种载体。包含来源于与宿主细胞相容的物种的复制子和控制序列的任何载体可用于本发明的实践中。通常,表达载体包括与编码DNA聚合酶的核酸可操作连接的转录和翻译调控核酸区域。术语“控制序列”是指在特定的宿主生物体中为可操作连接的编码序列的表达所需的DNA序列。适用于原核生物的控制序列例如包括启动子,任选地操纵子序列,和核糖体结合位点。另外,载体可以包含正反向调控元件(PRE)以增强转录的mRNA的半衰期(参见Gelfand等人的美国专利号4,666,848)。转录和翻译调控核酸区域通常适合于用于表达聚合酶的宿主细胞。本领域已知用于各种宿主细胞的多种适当的表达载体和合适的调控序列。通常,转录和翻译调控序列可以包括例如启动子序列、核糖体结合位点、转录起始和终止序列、翻译起始和终止序列和增强子或激活子序列。在典型的实施例中,调控序列包括启动子和转录起始和终止序列。载体通常也包括包含若干用于外源DNA插入的限制性位点的多接头区域。在某些实施例中,“融合标记”用于促进纯化和随后的标签/标记序列的去除(如果需要的话),例如“组氨酸标签(His-Tag)”。然而,当从嗜温宿主(例如大肠杆菌)中纯化热活性和/或热稳定蛋白质时这些通常是不必要的,其中可采用“热步骤”。包含编码复制序列、调控序列、表型选择基因和目标聚合酶的DNA的合适的载体的构建使用标准重组DNA程序来制备。分离的质粒、病毒载体和DNA片段以特定顺序切割、裁剪和连接到一起以便生成需要的载体,其是本领域所熟知的(参见例如Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(Cold Spring Harbor Laboratory Press,New York,NY,第2版1989))。

[0254] 在某些实施例中,表达载体包括可选择标记基因以允许转化的宿主细胞的选择。选择基因是本领域众所周知的,并且将随所使用的宿主细胞而变化。合适的选择基因可以包括例如编码氨苄青霉素和/或四环素抗性的基因,其使以这些载体转化的细胞能够在这些抗生素存在的情况下生长。

[0255] 在本发明的一方面,编码DNA聚合酶的核酸以单独或与载体结合的形式被引入细胞。本文中的“引入”或语法等同形式意指核酸以一种适用于随后的核酸整合、扩增和/或表达的方式进入细胞。引入的方法主要由靶细胞类型决定。示例性的方法包括CaPO<sub>4</sub>沉淀、脂质体融合、LIPOFECTIN®、电穿孔、病毒感染等。

[0256] 在一些实施例中,原核生物通常用作本发明最初的克隆步骤的宿主细胞。它们对于大量DNA的迅速生产、用于定点诱变的单链DNA模板的生产、同时筛选许多突变体和生成的突变体的DNA测序特别有用。合适的原核宿主细胞包括大肠杆菌K12菌株94(ATCC No.31,446)、大肠杆菌菌株W3110(ATCC No.27,325)、大肠杆菌K12菌株DG116(ATCC No.53,606)、大肠杆菌X1776(ATCC No.31,537)和大肠杆菌B;然而大肠杆菌的诸如HB101、JM101、NM522、NM538、NM539的许多其他菌株、以及许多其他种和属的原核生物包括诸如枯草芽孢杆菌的杆菌、诸如鼠伤寒沙门氏杆菌或粘质沙雷氏菌的其他肠杆菌科和各种假单胞菌属的菌种全部都能用作为宿主。原核宿主细胞或其他具有刚性细胞壁的宿主细胞通常使用如上文的Sambrook等人的1.82节中描述的氯化钙方法来转化。可替代地,可使用电穿孔法以用于转化这些细胞。原核生物转化技术阐述于例如Dower,in Genetic Engineering,Principles and Methods 12:275-296(Plenum Publishing Corp.,1990);Hanahan等人,Meth.Enzymol.,204:63,1991。通常用于大肠杆菌转化的质粒包括pBR322、pUCI8、pUCI9、pUCI18、pUCI19和Bluescript M13,它们中的全部均描述于上文的Sambrook等人的1.12-

1.20节。然而,许多其他合适的载体也可用。

[0257] 本发明DNA聚合酶通常在诱导或引起DNA聚合酶表达的适当条件下,通过培养宿主细胞而产生,该宿主细胞用包含编码DNA聚合酶的核酸的表达载体进行转化。在适用于蛋白质表达的条件下培养转化的宿主细胞的方法是本领域所熟知的(参见例如Sambrook等人,同上)。用于从包含 $\lambda$ pL启动子的质粒载体生产聚合酶的合适的宿主细胞包括大肠杆菌菌株DG116(ATCC No.53606)(参见美国专利号5,079,352和Lawyer,F.C.等人,PCR Methods and Applications 2:275-87,1993,其均以引用方式并入本文)。表达之后,可以收获和分离聚合酶。用于纯化热稳定DNA聚合酶的方法描述于例如上文的Lawyer等人。一旦纯化,就可以测试DNA聚合酶具有增加的链置换活性、改良的RT效率、增加的错配耐受性、延伸速率和/或RT和聚合酶抑制剂的耐受性的能力(例如,如示例中所述)。

[0258] 本发明的改良的DNA聚合酶可以用于其中此类酶活性是必要或需要的任何目的。因此,在本发明的另一个方面,提供了使用聚合酶的多核苷酸延伸方法(例如PCR)。适用于多核苷酸延伸的条件是本领域已知的。(参见例如Sambrook等人,同上另参见Ausubel等人,Short Protocols in Molecular Biology(第4版,John Wiley&Sons 1999)。通常,将引物退火、即杂交至靶核酸以形成引物-模板复合物。在合适的环境中将引物-模板复合物与DNA聚合酶及核苷三磷酸接触,以允许一个或多个核苷酸添加至引物的3'-末端,从而产生与靶核酸互补的延伸的引物。引物可以包括例如一个或多个核苷酸类似物。另外,核苷三磷酸可以是常规核苷酸、非常规核苷酸(例如核糖核苷酸或标记的核苷酸)或其混合物。在一些变体中,多核苷酸延伸反应包括靶核酸的扩增。适用于使用DNA聚合酶和引物对进行核酸扩增的条件也是本领域已知的(例如PCR扩增方法)。(参见例如Sambrook等人,同上;Ausubel等人,同上;PCR Applications:Protocols for Functional Genomics(Innis等人编辑,Academic Press1999)。在其他非互斥的实施例中,多核苷酸延伸反应包括RNA模板的逆转录(例如RT-PCR)。在一些实施例中,发现改良的聚合酶用于454测序(Margulies,M等人2005,Nature,437,376-380)。

[0259] 任选地,引物延伸反应可包括参考或未修饰聚合酶的实际或潜在抑制剂。抑制剂可以抑制例如参考或未修饰的(对照)聚合酶的核酸延伸速率和/或逆转录效率。在一些实施例中,抑制剂为血红蛋白或其降解产物。例如,在一些实施例中,血红蛋白降解产物是一种血红素分解产物,诸如血红素、血卟啉或胆红素。在一些实施例中,抑制剂是铁螯合剂或紫色染料。在一些实施例中,抑制剂是肝素。在某些实施例中,抑制剂是嵌入染料。在某些实施例中,抑制剂是黑色素,其已描述为聚合酶抑制剂。参见例如Ekhardt,等人,BiochemBiophysRes Commun.271(3):726-30(2000)。

[0260] 本发明的DNA聚合酶可在存在从包含聚合酶抑制剂的样品(诸如血液)中分离的多核苷酸模板的情况下用于延伸模板。例如,本发明的DNA聚合酶可用于在存在血液的主要成分血红蛋白或存在血红蛋白降解产物的情况下延伸模板。血红蛋白可以降解为各种血红素分解产物,诸如血红素、血色素、血卟啉和胆红素。因此,在某些实施例中,本发明的DNA聚合酶可用于在存在血红蛋白降解产物(包括但不限于血红素、血色素、血卟啉和胆红素)的情况下延伸模板。在某些实施例中,血红蛋白降解产物是血红素。在一些实施例中,本发明的DNA聚合酶可以用于在存在约0.5至20.0 $\mu$ M、约0.5至10.0 $\mu$ M、约0.5至5.0 $\mu$ M、约1.0至10.0 $\mu$ M、约1.0至5.0 $\mu$ M、约2.0至5.0 $\mu$ M、或约2.0至3.0 $\mu$ M血红素的情况下延伸模板。在其他实施例

中,本发明的DNA聚合酶可用于在存在至少约0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、4.0、5.0、10.0、20.0或大于20 $\mu$ M血红素的情况下延伸模板。血红蛋白的分解产物包括铁螯合剂和紫色颜料。因此,在一些实施例中,本发明的DNA聚合酶可用于在存在铁螯合剂和/或紫色颜料的情况下延伸模板。在其他实施例中,本发明的DNA聚合酶可以用于在存在一定量的血红蛋白降解产物的情况下延伸模板,该血红蛋白降解产物会抑制由参考或对照DNA聚合酶延伸同一模板。

[0261] 本发明的DNA聚合酶可用于在存在肝素的情况下延伸模板。肝素通常作为抗凝剂存在于从血液中分离的样品中。在一些实施例中,本发明的DNA聚合酶可以用于在存在约1.0至400ng/ $\mu$ l、1.0至300ng/ $\mu$ l、1.0至200ng/ $\mu$ l、5.0至400ng/ $\mu$ l、5.0至300ng/ $\mu$ l、5.0至200ng/ $\mu$ l、10.0至400ng/ $\mu$ l、10.0至300ng/ $\mu$ l或10.0至200ng/ $\mu$ l肝素的情况下延伸模板。在一些实施例中,本发明的DNA聚合酶可以用于在存在至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、30、40、50、100、150、200、250、300、350、400ng/ $\mu$ l或大于400ng/ $\mu$ l肝素的情况下延伸模板。在其他实施例中,本发明的DNA聚合酶可用于在存在一定量的肝素的情况下延伸模板,该肝素会抑制由参考或对照DNA聚合酶延伸同一模板。

[0262] 在一些实施例中,本文所述的改良的聚合酶用于链置换反应中。在一些实施例中,链置换反应在包含DNA模板、一种或多种引物和本文所述的热稳定DNA聚合酶的混合物中进行。反应混合物通常包含所有四种标准的脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP)和含有二价阳离子和一价阳离子的缓冲剂。示例性的阳离子包括例如Mg<sup>2+</sup>,尽管其他阳离子诸如Mn<sup>2+</sup>或Co<sup>2+</sup>可以活化DNA聚合酶。在其他实施例中,链置换反应用本发明的热活性DNA聚合酶进行。在特定实施例中,本文所述的改良的聚合酶允许在高温下进行更有效的链置换反应,同时具有降低的核酸外切酶和/或核酸内切酶活性。

[0263] 在一些实施例中,与对照聚合酶相比,改良的聚合酶具有增加的链置换活性。先前未理解到,在本文所述的SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:40的对应位置处的氨基酸取代可导致链置换活性增加。

[0264] 在一些实施例中,使用RNA模板,改良的聚合酶具有增加的逆转录效率,而使用DNA模板,聚合酶活性没有显著降低。因此,在一些实施例中,当与对照聚合酶相比时,改良的DNA聚合酶具有增加的RT效率,而DNA依赖性聚合酶活性没有显著降低。在一些实施例中,本文所述的改良的DNA聚合酶具有与对照多聚酶基本相同的DNA依赖性聚合酶活性。因此,在一些实施例中,本文所述的改良的DNA聚合酶具有的DNA依赖性聚合酶活性为对照聚合酶活性的至少约90%,例如为对照聚合酶活性的至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%或更高。DNA依赖性聚合酶活性可以例如通过如本文所述扩增DNA模板并确定Cp值来测得。因此,在一些实施例中,DNA聚合酶具有改良的RT效率,其测量为在将RNA用作模板时与对照聚合酶相比具有降低的Cp值,而在将DNA用作模板时相对于对照聚合酶具有基本上不变的Cp值。例如,当扩增DNA模板时,与对照聚合酶相比,改良的DNA聚合酶可以具有相差小于1.0、小于0.5、小于0.4、小于0.3、小于0.2或小于0.1的Cp值。在一些实施例中,如示例中所述确定DNA依赖性聚合酶活性。

[0265] 在一些实施例中,本发明的改良的聚合酶通过减少延伸RNA模板所需的反应时间来增加逆转录效率。例如,与对照聚合酶相比,本文描述的改良的聚合酶可以显著缩短将RNA转录成cDNA所需的反应时间,从而提高逆转录酶效率。不受理论的限制,改良的聚合酶

可以通过例如增加在RNA模板上的酶的活性,诸如增加核苷酸掺入的速率和/或增加聚合酶的持续合成能力,来增加RT效率,从而有效地缩短RNA模板或RNA模板群体的延伸时间。当使用未修饰的或对照的聚合酶时,用于初始RT步骤的反应时间通常在65摄氏度下为约30分钟或更长时间。因此,在一些实施例中,改进的聚合酶可以在65摄氏度下在小于约30分钟、小于约20分钟、小于约10分钟、小于约8分钟、小于约5分钟、小于约4分钟、小于约3分钟或小于约2分钟的时间内将RNA模板转录成cDNA。在一些实施例中,改良的聚合酶可以比对照聚合酶在更短时间内或更快地将来源于丙型肝炎病毒(HCV)转录本JP2-5的RNA模板(包含HCV基因型1b5'NTR的前800个碱基)转录成cDNA。例如,改良的聚合酶可以在相同的反应条件下在比对照聚合酶约少15秒、少30秒、少一分钟、少两分钟、少3分钟、少4分钟、少5分钟、或约少10分钟的时间内将HCV JP2-5 RNA模板的240个碱基转录成全长cDNA。在一些实施例中,改良的聚合酶可以比对照聚合酶更快地将来源于HCV JP2-5 RNA模板的240个碱基转录成全长cDNA,例如在相同的反应条件下比对照聚合酶快约5秒、10秒、15秒、30秒、45秒或60秒或更快。在一些实施例中,反应条件是示例中描述的那些。在一些实施例中,本文所述的改良的聚合酶在上述反应混合物中在65摄氏度下与RNA模板接触约2分钟。如示例中所述,延伸步骤之后可以是延伸模板的PCR扩增。

[0266] 使用 $Mn^{2+}$ 作为二价金属离子活化剂,已经实现了热稳定DNA聚合酶中最有效的RT活性。然而,众所周知,当反应中存在 $Mn^{2+}$ 时,DNA聚合酶的保真度较低。除非人们尝试生成突变,否则通常倾向于保持较高的保真度。幸运的是,大多数常规测序、PCR和RT-PCR应用不需要高保真度条件,因为检测系统通常关注产物群体。随着下一代测序、数字PCR等的出现,产物的保真度变得越来越重要,而允许更高保真度的DNA合成的方法变得至关重要。使用 $Mg^{2+}$ 作为二价金属离子活化剂来实现有效的RT活性是一种显著提高DNA聚合酶保真度并允许更可靠地复制核酸靶的极好方法。因此,在一些实施例中,如示例中所述,本发明的改良的聚合酶允许使用 $Mg^{2+}$ 作为二价金属离子活化剂来有效延伸和/或扩增RNA模板。

[0267] 因为本文所述的聚合酶也可具有增加的错配耐受性,所以聚合酶用于可能发生靶模板变化而无论在高温下如何变化仍期望扩增模板的方法中。此类模板的示例可以包括例如病毒、细菌或其他病原体序列。在许多实施例中,期望简单地确定个体(人类或非人类动物)是否具有病毒感染或其他感染,而不管已经感染个体的确切病毒变体如何。作为示例,即使感染个体的特定病毒具有在引物杂交位点处导致错配的突变,也可以使用引物对以使用本发明的聚合酶扩增HCV并检测HCV的存在。

[0268] 靶核酸可以来自生物或合成来源。靶可以是例如DNA或RNA。通常,在生成扩增子的地方,扩增子将由DNA组成,尽管核糖核苷酸或合成核苷酸也可以掺入扩增子中。在希望检测RNA的情况下,扩增过程通常将涉及逆转录的使用,其包括例如逆转录PCR(RT-PCR)。

[0269] 特定靶序列可以包括例如病毒核酸(例如人免疫缺陷病毒(HIV)、乙型肝炎病毒(HBV)、(巨细胞病毒(CMV)、细小B19病毒、爱泼斯坦-巴尔病毒、丙型肝炎病毒(HCV)、人乳头瘤病毒(HPV)、日本脑炎病毒(JEV)、西尼罗河病毒(WNV)、圣路易斯脑炎病毒(SLEV)、墨累谷脑炎病毒和昆金病毒)、细菌核酸(例如金黄色葡萄球菌、脑膜炎奈瑟氏球菌、恶性疟原虫、鼠型沙眼衣原体、沙眼衣原体)、分枝杆菌、真菌核酸、或动植物核酸。在一些实施例中,靶核酸是动物(例如人)核酸或来源于动物(例如人)样品(即病毒或其他病原生物体核酸可以存在于来自动物活检的样品、血液样品、尿液样品、粪便样品、唾液等)。在一些实施例中,靶核

酸是例如人类遗传区域,其可以包括与疾病(例如,癌症、糖尿病等)相关联的变体。因为在一些实施例中,本发明的聚合酶具有错配耐受性,所以例如在靶序列中可以存在多种相关序列的情况下,此类酶特别有用。作为示例,本发明可用于检测病毒病原体,其中病毒病原体在其基因组中具有足够的变异,以使其难以或不可能设计单个或小集合的引物,所述引物将扩增大部分或全部可能的病毒基因组;或在已知或可能发生序列变异的癌症或其他疾病遗传标记具有足够的变异。

[0270] 用于使用本文所述的改良的聚合酶来检测延伸产物或扩增产物的其他方法包括使用荧光双链核苷酸结合染料或荧光双链核苷酸嵌入染料。荧光双链DNA结合染料的示例包括SYBR-green(分子探针)。结合染料的双链DNA可以与解链曲线分析结合使用,以测量引物延伸产物和/或扩增产物。解链曲线分析可以在实时PCR仪器上执行,诸如具有有机载软件(SDS2.1)的ABI 5700/7000(96孔格式)或ABI 7900(384孔格式)仪器。可替代地,可以将解链曲线分析作为终点分析加以执行。熔点分析的示例性方法描述于美国专利公开号2006/0172324中,其内容全文以引用方式明确并入本文。

[0271] 在本发明的另一个方面,提供了用于本文描述的引物延伸方法的试剂盒。在一些实施例中,将试剂盒划区以便于使用并包含至少一个容器,该容器提供根据本发明的改良DNA聚合酶。还可以包括一个或多个提供其他试剂的其他容器。在一些实施例中,试剂盒还可包括包含肝素或其盐或将肝素释放至溶液中的血液收集管、容器或单元。血液收集单元可以是肝素化管。此类其他容器可以包括用于根据上述方法的引物延伸程序的为熟练技术人员所知的任何试剂或其他元件,其包括用于例如核酸扩增程序(例如PCR、RT-PCR)、DNA测序程序或DNA标记程序的试剂。例如,在某些实施例中,试剂盒进一步包括容器,该容器提供在引物延伸条件下可与预定的多核苷酸模板杂交的5'有义引物,或提供包括5'有义引物和对应的3'反义引物的引物对。在其他非互斥的变体中,试剂盒包括一个或多个提供核苷三磷酸的(常规的和/或非常规的)容器。在特定的实施例中,试剂盒包括 $\alpha$ -硫代磷酸酯dNTP、dUTP、dITP,和/或标记的dNTP,诸如荧光素或花菁染料家族dNTP。在其他非互斥的实施例中,试剂盒包括一个或多个提供适用于引物延伸反应的缓冲剂的容器。

[0272] 在本发明的另一方面,提供了反应混合物,其包含本文所述的具有增加的逆转录酶效率、错配耐受性、延伸速率和/或RT和聚合酶抑制剂耐受性的聚合酶。反应混合物可进一步包含用于例如核酸扩增程序(例如PCR、RT-PCR)、DNA测序程序或DNA标记程序的试剂。例如,在某些实施例中,反应混合物包含适用于引物延伸反应的缓冲剂。反应混合物还可以包含模板核酸(DNA和/或RNA)、一种或多种引物或探针多核苷酸、核苷三磷酸(包括例如脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、标记的核苷酸、非常规的核苷酸)、盐(例如 $Mn^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ )、标记(例如,荧光团)。在一些实施例中,反应混合物包含在引物延伸条件下可与预定多核苷酸模板杂交的5'-有义引物,或包含5'-有义引物和对应的3'反义引物的引物对。在一些实施例中,反应混合物包含 $\alpha$ -硫代磷酸酯dNTP、dUTP、dITP和/或标记的dNTP,诸如荧光素或花菁染料家族dNTP。在一些实施例中,反应混合物包含铁螯合剂或紫色染料。在某些实施例中,反应混合物包含血红蛋白或血红蛋白的降解产物。例如,在某些实施例中,血红蛋白的降解产物包括血红素分解产物,诸如血红素、血色素、血卟啉和胆红素。在其他实施例中,反应混合物包含肝素或其盐。在某些实施例中,反应混合物包含与血液分离的模板核酸。在其他实施例中,模板核酸是RNA,并且反应混合物包含肝素或其盐。

[0273] 在一些实施例中,反应混合物包含两种或更多种聚合酶。例如,在一些实施例中,反应混合物包含与对照聚合酶相比具有增加的逆转录酶效率的第一DNA聚合酶,和具有DNA依赖性聚合酶活性的第二DNA聚合酶。第二DNA聚合酶可以是野生型或未修饰的聚合酶,或者可以是具有增加的DNA依赖性聚合酶活性的改良的聚合酶。通过提供具有增加的逆转录酶活性的聚合酶和具有DNA依赖性聚合酶活性的聚合酶,此类反应混合物可用于扩增RNA模板(例如,RT-PCR)。

[0274] 实例

[0275] 提供以下实例以说明但不限制要求保护的发明。

[0276] 实例1:文库生成

[0277] 简而言之,此筛选过程中的步骤包括文库生成、突变型酶的表达和部分纯化、用于所需特性的酶的筛选、DNA测序、克隆纯化,和所选候选突变体的进一步表征。这些步骤中的每一个都进一步描述于下文。

[0278] 克隆文库生成:编码C21 DNA聚合酶G46E突变的核酸使用用于易错PCR的GeneMorph II™随机诱变试剂盒(Agilent Technologies)来经受易错(诱变)PCR。使用In-Fusion™克隆系统(Takara Bio USA, Inc)来克隆PCR片段,以创建诱变文库。克隆的插入物转化至化学感受态LK4细胞中。然后针对表达的突变型聚合酶的升高的链置换活性筛选文库。

[0279] 测定设计:测定设计在图3中示出。四个互补的寡核苷酸Oligo A(绿色)、Oligo B(浅蓝色)、Oligo C(深蓝色)和锁定核酸(LNA)Oligo D(红色)彼此退火。Oligo A与Oligo B互补,并引发聚合反应。Oligo B是模板,并且在5'-末端具有FAM-荧光报告剂。Oligo C与Oligo B互补,并且在3'-末端处具有BHQ淬灭剂。锁定核酸Oligo D与模板Oligo B互补,并且用作高能栅栏。当将聚合酶、Mg<sup>2+</sup>和核苷酸添加至退火的混合物时,聚合反应使Oligo A延伸,并且新合成的链置换LNA Oligo D和Oligo C,从而从荧光探针释放淬灭剂。循环完成后生成荧光信号。热循环条件为:

[0280] 变性 95°C 3"

[0281] 退火 60°C 5"

[0282] 延伸 65°C 30"

[0283] 30周期

[0284] 对克隆的PCR片段进行测序以确定在任何单个克隆中存在的突变。

[0285] 核酸酶活性为了确定核酸酶活性,在不添加dNTP的情况下进行延伸反应。当反应中不存在dNTP时,荧光信号的任何增加均归因于酶的核酸酶活性。如果未观察到荧光信号增加,则酶几乎没有或具有显著降低的核酸内切酶和核酸外切酶活性。

[0286] 结果:识别出许多与亲本G46E C21聚合酶相比具有增加的链置换活性的克隆。包含单个细菌菌落(克隆)的代表性板在图4A和4B中示出。总之,对以下具有增加的链置换活性的克隆进行测序,并且指示突变(其中第一个数字对应于图4A和4B中示出的板号,而字母-数字(例如,F24)对应于板上的孔):

[0287] 板1\_克隆F24:突变:I686V和A693V

[0288] 板1\_克隆L3:突变:T516I和V633I

[0289] 板1\_克隆P19:突变:Q415H、E420D、E636G、N752S、V768M

- [0290] 板2\_克隆M22:突变:R525G和F694S
- [0291] 板2\_克隆G9:突变:Q491H和T516S
- [0292] 板2\_克隆N19:突变:S515F和T666M
- [0293] 板2\_克隆N7:突变:E402V、V555A和N582D
- [0294] 板3\_克隆A24:突变:A737T和A759T
- [0295] 板3\_克隆F21:突变:L521Q和T546A
- [0296] 板3\_克隆G10:突变:N668S
- [0297] 板3\_克隆I14:突变:A456T
- [0298] 板4\_克隆G23:突变:K507M、T571A和S652F
- [0299] 板4\_克隆K12:突变:S515F和A832V
- [0300] 板5\_克隆C6:突变:D498E、L524V、R598G和M616I
- [0301] 板5\_克隆G20:突变:A444T、D498E、M660K和Y673N
- [0302] 板5\_克隆G23:突变:E493D、T511S、M648I和M749L
- [0303] 板5\_克隆H21:突变:Q635K
- [0304] 突变扩散至整个聚合酶结构域。这些突变包括一级氨基酸序列中的以下“热点”或片段:515-516、521-525、633-636、666-668、693-694。
- [0305] 核酸酶活性:图5A和5B示出了来自没有将dNTP添加至延伸反应中的两个板的结果。大多数克隆不示出任何荧光信号。应当注意,一些孔示出荧光信号,但其处于背景水平且不高于0.5的相对荧光单元(RFU)。
- [0306] 此示例证实,与G46E亲本酶相比,上述突变型聚合酶具有增加或增强的链置换活性。突变型聚合酶还可以在高温下发挥作用(即,它们承受95°C的变性温度、60°C的退火温度和65°C的延伸温度。另外,突变型聚合酶表现出非常少的核酸外切酶或核酸内切酶活性。
- [0307] 应当理解,本文描述的示例和实施例仅用于说明目的,并且鉴于其的各种修改或改变将被建议给本领域技术人员,并且将被包括在本申请的精神和界限内以及本发明所附权利要求的范围内。本文引用的所有出版物、序列登录号、专利和专利申请全文以引用方式并入本文以用于所有目的。

## 序列表

<110> F. Hoffmann-La Roche AG  
 Roche Diagnostics GmbH  
 Roche Molecular Systems, Inc.

<120> 具有改良链置换能力的突变型 DNA 聚合酶

<130> P34971-WO-HS

<150> 62/730,908  
 <151> 2018-09-13

<160> 42

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1  
 <211> 834  
 <212> PRT  
 <213> 栖热菌种

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(834)  
 <223> 栖热菌种 Z05 DNA 聚合酶 (Z05)

<400> 1

Met Lys Ala Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu  
 1                   5                   10                   15

Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe Phe Ala Leu Lys Gly  
                   20                   25                   30

[0001] Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala  
                   35                   40                   45

Lys Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Tyr Lys Ala Val Phe  
           50                   55                   60

Val Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Glu  
 65                   70                   75                   80

Ala Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln  
                   85                   90                   95

Leu Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Phe Thr Arg Leu  
                   100                   105                   110

Glu Val Pro Gly Phe Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Thr Leu Ala Lys  
           115                   120                   125

Lys Ala Glu Arg Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Arg  
           130                   135                   140

Asp Leu Tyr Gln Leu Val Ser Asp Arg Val Ala Val Leu His Pro Glu  
 145                   150                   155                   160

Gly His Leu Ile Thr Pro Glu Trp Leu Trp Glu Lys Tyr Gly Leu Lys  
                   165                   170                   175

Pro Glu Gln Trp Val Asp Phe Arg Ala Leu Val Gly Asp Pro Ser Asp  
                   180                   185                   190

Asn Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Leu Lys Leu  
 195 200 205

Leu Lys Glu Trp Gly Ser Leu Glu Asn Ile Leu Lys Asn Leu Asp Arg  
 210 215 220

Val Lys Pro Glu Ser Val Arg Glu Arg Ile Lys Ala His Leu Glu Asp  
 225 230 235 240

Leu Lys Leu Ser Leu Glu Leu Ser Arg Val Arg Ser Asp Leu Pro Leu  
 245 250 255

Glu Val Asp Phe Ala Arg Arg Arg Glu Pro Asp Arg Glu Gly Leu Arg  
 260 265 270

Ala Phe Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly  
 275 280 285

Leu Leu Glu Ala Pro Ala Pro Leu Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro  
 290 295 300

Glu Gly Ala Phe Val Gly Phe Val Leu Ser Arg Pro Glu Pro Met Trp  
 305 310 315 320

Ala Glu Leu Lys Ala Leu Ala Ala Cys Lys Glu Gly Arg Val His Arg  
 325 330 335

[0002] Ala Lys Asp Pro Leu Ala Gly Leu Lys Asp Leu Lys Glu Val Arg Gly  
 340 345 350

Leu Leu Ala Lys Asp Leu Ala Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Leu Asp  
 355 360 365

Leu Ala Pro Ser Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro  
 370 375 380

Ser Asn Thr Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp  
 385 390 395 400

Thr Glu Asp Ala Ala His Arg Ala Leu Leu Ala Glu Arg Leu Gln Gln  
 405 410 415

Asn Leu Leu Glu Arg Leu Lys Gly Glu Glu Lys Leu Leu Trp Leu Tyr  
 420 425 430

Gln Glu Val Glu Lys Pro Leu Ser Arg Val Leu Ala His Met Glu Ala  
 435 440 445

Thr Gly Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Lys Ala Leu Ser Leu Glu  
 450 455 460

Leu Ala Glu Glu Ile Arg Arg Leu Glu Glu Glu Val Phe Arg Leu Ala  
 465 470 475 480

Gly His Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu  
 485 490 495

Phe Asp Glu Leu Arg Leu Pro Ala Leu Gly Lys Thr Gln Lys Thr Gly  
 500 505 510

Lys Arg Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His  
 515 520 525

Pro Ile Val Glu Lys Ile Leu Gln His Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys  
 530 535 540

Asn Thr Tyr Val Asp Pro Leu Pro Gly Leu Val His Pro Arg Thr Gly  
 545 550 555 560

Arg Leu His Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu  
 565 570 575

Ser Ser Ser Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Ile Arg Thr Pro Leu  
 580 585 590

Gly Gln Arg Ile Arg Arg Ala Phe Val Ala Glu Ala Gly Trp Ala Leu  
 595 600 605

Val Ala Leu Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu  
 610 615 620

Ser Gly Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Lys Asp Ile  
 625 630 635 640

[0003] His Thr Gln Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Ser Pro Glu Ala Val  
 645 650 655

Asp Pro Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Val Asn Phe Gly Val Leu  
 660 665 670

Tyr Gly Met Ser Ala His Arg Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ile Pro Tyr  
 675 680 685

Glu Glu Ala Val Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe Pro Lys  
 690 695 700

Val Arg Ala Trp Ile Glu Lys Thr Leu Glu Glu Gly Arg Lys Arg Gly  
 705 710 715 720

Tyr Val Glu Thr Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Val Pro Asp Leu Asn  
 725 730 735

Ala Arg Val Lys Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn  
 740 745 750

Met Pro Val Gln Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val  
 755 760 765

Lys Leu Phe Pro His Leu Arg Glu Met Gly Ala Arg Met Leu Leu Gln  
 770 775 780

Val His Asp Glu Leu Leu Leu Glu Ala Pro Gln Ala Arg Ala Glu Glu  
 785 790 795 800

Val Ala Ala Leu Ala Lys Glu Ala Met Glu Lys Ala Tyr Pro Leu Ala  
 805 810 815

Val Pro Leu Glu Val Glu Val Gly Ile Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala  
 820 825 830

Lys Gly

<210> 2  
 <211> 832  
 <212> PRT  
 <213> 水生栖热菌

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(832)  
 <223> 水生栖热菌 DNA 聚合酶 (Taq)

<400> 2

Met Arg Gly Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu  
 1 5 10 15

Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe His Ala Leu Lys Gly  
 20 25 30

Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala  
 35 40 45

[0004] Lys Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Asp Ala Val Ile Val  
 50 55 60

Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Gly Gly  
 65 70 75 80

Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln Leu  
 85 90 95

Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Leu Ala Arg Leu Glu  
 100 105 110

Val Pro Gly Tyr Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Ser Leu Ala Lys Lys  
 115 120 125

Ala Glu Lys Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Lys Asp  
 130 135 140

Leu Tyr Gln Leu Leu Ser Asp Arg Ile His Val Leu His Pro Glu Gly  
 145 150 155 160

Tyr Leu Ile Thr Pro Ala Trp Leu Trp Glu Lys Tyr Gly Leu Arg Pro  
 165 170 175

Asp Gln Trp Ala Asp Tyr Arg Ala Leu Thr Gly Asp Glu Ser Asp Asn  
 180 185 190

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

195	200	205
Glu Glu Trp Gly Ser Leu 210	Glu Ala Leu Leu Lys 215	Asn Leu Asp Arg Leu 220
Lys Pro Ala Ile Arg 225	Glu Lys Ile Leu Ala 230	His Met Asp Asp Leu Lys 235 240
Leu Ser Trp Asp 245	Leu Ala Lys Val Arg Thr 250	Asp Leu Pro Leu Glu Val 255
Asp Phe Ala Lys Arg Arg 260	Glu Pro Asp Arg Glu Arg 265	Leu Arg Ala Phe 270
Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly 275	Ser Leu Leu His Glu Phe 280 285	Gly Leu Leu
Glu Ser Pro Lys Ala Leu 290	Glu Glu Ala Pro Trp 295	Pro Pro Pro Glu Gly 300
Ala Phe Val Gly Phe Val 305	Leu Ser Arg Lys Glu Pro 310 315	Met Trp Ala Asp 320
Leu Leu Ala Leu Ala Ala 325	Ala Arg Gly Gly Arg Val 330	His Arg Ala Pro 335
Glu Pro Tyr Lys Ala Leu Arg 340	Asp Leu Lys Glu Ala Arg 345	Gly Leu Leu 350
Ala Lys Asp Leu Ser Val 355	Leu Ala Leu Arg Glu Gly 360 365	Leu Gly Leu Pro
Pro Gly Asp Asp Pro Met 370	Leu Leu Ala Tyr Leu 375 380	Leu Asp Pro Ser Asn
Thr Thr Pro Glu Gly Val 385	Ala Arg Arg Tyr Gly Gly 390 395	Glu Trp Thr Glu 400
Glu Ala Gly Glu Arg Ala Ala 405	Leu Ser Glu Arg Leu Phe 410	Ala Asn Leu 415
Trp Gly Arg Leu Glu Gly Glu 420	Glu Arg Leu Leu Trp Leu 425	Tyr Arg Glu 430
Val Glu Arg Pro Leu Ser Ala 435	Val Leu Ala His Met Glu 440 445	Ala Thr Gly
Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr 450	Leu Arg Ala Leu Ser Leu 455 460	Glu Val Ala
Glu Glu Ile Ala Arg Leu Glu 465	Ala Glu Val Phe Arg Leu 470 475	Ala Gly His 480
Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg 485	Asp Gln Leu Glu Arg Val 490	Leu Phe Asp 495
Glu Leu Gly Leu Pro Ala Ile 495	Gly Lys Thr Glu Lys Thr 500	Gly Lys Arg

[0005]

	500		505		510	
	Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu	Glu Ala Leu Arg Glu Ala His Pro Ile				
	515	520		525		
	Val Glu Lys Ile Leu Gln Tyr Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys Ser Thr					
	530	535		540		
	Tyr Ile Asp Pro Leu Pro Asp Leu Ile His Pro Arg Thr Gly Arg Leu					
	545	550		555	560	
	His Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser					
		565		570	575	
	Ser Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu Gly Gln					
		580		585	590	
	Arg Ile Arg Arg Ala Phe Ile Ala Glu Glu Gly Trp Leu Leu Val Ala					
		595		600	605	
	Leu Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser Gly					
		610		615	620	
	Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Arg Asp Ile His Thr					
		625		630	635	640
	Glu Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Pro Arg Glu Ala Val Asp Pro					
		645		650	655	
[0006]	Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Ile Asn Phe Gly Val Leu Tyr Gly					
		660		665	670	
	Met Ser Ala His Arg Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ile Pro Tyr Glu Glu					
		675		680	685	
	Ala Gln Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe Pro Lys Val Arg					
		690		695	700	
	Ala Trp Ile Glu Lys Thr Leu Glu Glu Gly Arg Arg Arg Gly Tyr Val					
		705		710	715	720
	Glu Thr Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Val Pro Asp Leu Glu Ala Arg					
		725		730	735	
	Val Lys Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn Met Pro					
		740		745	750	
	Val Gln Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val Lys Leu					
		755		760	765	
	Phe Pro Arg Leu Glu Glu Met Gly Ala Arg Met Leu Leu Gln Val His					
		770		775	780	
	Asp Glu Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ala Val Ala					
		785		790	795	800
	Arg Leu Ala Lys Glu Val Met Glu Gly Val Tyr Pro Leu Ala Val Pro					

	805	810	815
	Leu Glu Val	Glu Val Gly Ile Gly	Glu Asp Trp Leu Ser Ala Lys Glu
	820	825	830
	<210> 3		
	<211> 830		
	<212> PRT		
	<213> 丝状栖热菌		
	<220>		
	<221> MISC_FEATURE		
	<222> (1)..(830)		
	<223> 丝状栖热菌 DNA 聚合酶 (Tfi)		
	<400> 3		
	Met Leu Pro Leu	Leu Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu Val Asp Gly	
	1	5	10 15
	His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe Phe Ala Leu Lys Gly Leu Thr Thr		
	20	25	30
	Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala Lys Ser Leu		
	35	40	45
	Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Glu Val Ala Ile Val Val Phe Asp		
	50	55	60
[0007]	Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Glu Ala Tyr Lys Ala		
	65	70	75 80
	Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln Leu Ala Leu Ile		
	85	90	95
	Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Leu Val Arg Leu Glu Val Pro Gly		
	100	105	110
	Phe Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Thr Leu Ala Arg Lys Ala Glu Arg		
	115	120	125
	Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Ser Ala Asp Arg Asp Leu Tyr Gln		
	130	135	140
	Leu Leu Ser Asp Arg Ile His Leu Leu His Pro Glu Gly Glu Val Leu		
	145	150	155 160
	Thr Pro Gly Trp Leu Gln Glu Arg Tyr Gly Leu Ser Pro Glu Arg Trp		
	165	170	175
	Val Glu Tyr Arg Ala Leu Val Gly Asp Pro Ser Asp Asn Leu Pro Gly		
	180	185	190
	Val Pro Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Leu Lys Leu Leu Lys Glu Trp		
	195	200	205
	Gly Ser Leu Glu Ala Ile Leu Lys Asn Leu Asp Gln Val Lys Pro Glu		
	210	215	220

Arg Val Trp Glu Ala Ile Arg Asn Asn Leu Asp Lys Leu Gln Met Ser  
 225 230 235 240

Leu Glu Leu Ser Arg Leu Arg Thr Asp Leu Pro Leu Glu Val Asp Phe  
 245 250 255

Ala Lys Arg Arg Glu Pro Thr Gly Lys Gly Leu Lys Ala Phe Leu Glu  
 260 265 270

Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly Leu Leu Glu Ala  
 275 280 285

Pro Lys Glu Ala Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro Gly Gly Ala Phe  
 290 295 300

Leu Gly Phe Leu Leu Ser Arg Pro Glu Pro Met Trp Ala Glu Leu Leu  
 305 310 315

Ala Leu Ala Gly Ala Lys Glu Gly Arg Val His Arg Ala Glu Asp Pro  
 325 330 335

Val Gly Ala Leu Lys Asp Leu Lys Glu Ile Arg Gly Leu Leu Ala Lys  
 340 345 350

Asp Leu Ser Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Arg Glu Ile Pro Pro Gly  
 355 360 365

[0008] Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro Gly Asn Thr Asn  
 370 375 380

Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp Lys Glu Asp Ala  
 385 390 395 400

Ala Ala Arg Ala Leu Leu Ser Glu Arg Leu Trp Gln Ala Leu Tyr Pro  
 405 410 415

Arg Val Ala Glu Glu Glu Arg Leu Leu Trp Leu Tyr Arg Glu Val Glu  
 420 425 430

Arg Pro Leu Ala Gln Val Leu Ala His Met Glu Ala Thr Gly Val Arg  
 435 440 445

Leu Asp Val Pro Tyr Leu Glu Ala Leu Ser Gln Glu Val Ala Phe Glu  
 450 455 460

Leu Glu Arg Leu Glu Ala Glu Val His Arg Leu Ala Gly His Pro Phe  
 465 470 475 480

Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu Phe Asp Glu Leu  
 485 490 495

Gly Leu Pro Pro Ile Gly Lys Thr Glu Lys Thr Gly Lys Arg Ser Thr  
 500 505 510

Ser Ala Ala Val Leu Glu Leu Leu Arg Glu Ala His Pro Ile Val Gly  
 515 520 525

Arg Ile Leu Glu Tyr Arg Glu Leu Met Lys Leu Lys Ser Thr Tyr Ile  
 530 535 540

Asp Pro Leu Pro Arg Leu Val His Pro Lys Thr Gly Arg Leu His Thr  
 545 550 555 560

Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser Ser Asp  
 565 570 575

Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu Gly Gln Arg Ile  
 580 585 590

Arg Lys Ala Phe Ile Ala Glu Glu Gly His Leu Leu Val Ala Leu Asp  
 595 600 605

Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser Gly Asp Glu  
 610 615 620

Asn Leu Ile Arg Val Phe Arg Glu Gly Lys Asp Ile His Thr Glu Thr  
 625 630 635 640

Ala Ala Trp Met Phe Gly Val Pro Pro Glu Gly Val Asp Gly Ala Met  
 645 650 655

Arg Arg Ala Ala Lys Thr Val Asn Phe Gly Val Leu Tyr Gly Met Ser  
 660 665 670

[0009] Ala His Arg Leu Ser Gln Glu Leu Ser Ile Pro Tyr Glu Glu Ala Ala  
 675 680 685

Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe Pro Lys Val Arg Ala Trp  
 690 695 700

Ile Ala Lys Thr Leu Glu Glu Gly Arg Lys Lys Gly Tyr Val Glu Thr  
 705 710 715 720

Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Val Pro Asp Leu Asn Ala Arg Val Lys  
 725 730 735

Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn Met Pro Val Gln  
 740 745 750

Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val Lys Leu Phe Pro  
 755 760 765

Arg Leu Arg Pro Leu Gly Val Arg Ile Leu Leu Gln Val His Asp Glu  
 770 775 780

Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Ala Arg Ala Glu Glu Ala Ala Gln Leu  
 785 790 795 800

Ala Lys Glu Thr Met Glu Gly Val Tyr Pro Leu Ser Val Pro Leu Glu  
 805 810 815

Val Glu Val Gly Met Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala Lys Glu  
 820 825 830

<210> 4  
 <211> 831  
 <212> PRT  
 <213> 黄栖热菌

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)-(831)  
 <223> 黄栖热菌 DNA 聚合酶 (Tf1)

<400> 4

Met Ala Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu Val  
 1 5 10 15

Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe Phe Ala Leu Lys Gly Leu  
 20 25 30

Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala Lys  
 35 40 45

Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Asp Val Val Val Val Val  
 50 55 60

Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Glu Ala Tyr  
 65 70 75 80

Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln Leu Ala  
 85 90 95

[0010] Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Leu Val Arg Leu Glu Val  
 100 105 110

Pro Gly Phe Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Thr Leu Ala Lys Arg Ala  
 115 120 125

Glu Lys Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Arg Asp Leu  
 130 135 140

Tyr Gln Leu Leu Ser Glu Arg Ile Ala Ile Leu His Pro Glu Gly Tyr  
 145 150 155 160

Leu Ile Thr Pro Ala Trp Leu Tyr Glu Lys Tyr Gly Leu Arg Pro Glu  
 165 170 175

Gln Trp Val Asp Tyr Arg Ala Leu Ala Gly Asp Pro Ser Asp Asn Ile  
 180 185 190

Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Gln Arg Leu Ile Arg  
 195 200 205

Glu Trp Gly Ser Leu Glu Asn Leu Phe Gln His Leu Asp Gln Val Lys  
 210 215 220

Pro Ser Leu Arg Glu Lys Leu Gln Ala Gly Met Glu Ala Leu Ala Leu  
 225 230 235 240

Ser Arg Lys Leu Ser Gln Val His Thr Asp Leu Pro Leu Glu Val Asp  
 245 250 255

Phe Gly Arg Arg Arg Thr Pro Asn Leu Glu Gly Leu Arg Ala Phe Leu  
 260 265 270

Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly Leu Leu Glu  
 275 280 285

Gly Pro Lys Ala Ala Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro Glu Gly Ala  
 290 295 300

Phe Leu Gly Phe Ser Phe Ser Arg Pro Glu Pro Met Trp Ala Glu Leu  
 305 310 315 320

Leu Ala Leu Ala Gly Ala Trp Glu Gly Arg Leu His Arg Ala Gln Asp  
 325 330 335

Pro Leu Arg Gly Leu Arg Asp Leu Lys Gly Val Arg Gly Ile Leu Ala  
 340 345 350

Lys Asp Leu Ala Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Leu Asp Leu Phe Pro  
 355 360 365

Glu Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro Ser Asn Thr  
 370 375 380

Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp Thr Glu Asp  
 385 390 395 400

[0011] Ala Gly Glu Arg Ala Leu Leu Ala Glu Arg Leu Phe Gln Thr Leu Lys  
 405 410 415

Glu Arg Leu Lys Gly Glu Glu Arg Leu Leu Trp Leu Tyr Glu Glu Val  
 420 425 430

Glu Lys Pro Leu Ser Arg Val Leu Ala Arg Met Glu Ala Thr Gly Val  
 435 440 445

Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Gln Ala Leu Ser Leu Glu Val Glu Ala  
 450 455 460

Glu Val Arg Gln Leu Glu Glu Glu Val Phe Arg Leu Ala Gly His Pro  
 465 470 475 480

Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu Phe Asp Glu  
 485 490 495

Leu Gly Leu Pro Ala Ile Gly Lys Thr Glu Lys Thr Gly Lys Arg Ser  
 500 505 510

Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His Pro Ile Val  
 515 520 525

Asp Arg Ile Leu Gln Tyr Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys Asn Thr Tyr  
 530 535 540

Ile Asp Pro Leu Pro Ala Leu Val His Pro Lys Thr Gly Arg Leu His  
 545 550 555 560

Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser Ser  
 565 570 575  
 Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu Gly Gln Arg  
 580 585 590  
 Ile Arg Arg Ala Phe Val Ala Glu Glu Gly Trp Val Leu Val Val Leu  
 595 600 605  
 Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser Gly Asp  
 610 615 620  
 Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Arg Asp Ile His Thr Gln  
 625 630 635 640  
 Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Ser Pro Glu Gly Val Asp Pro Leu  
 645 650 655  
 Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Ile Asn Phe Gly Val Leu Tyr Gly Met  
 660 665 670  
 Ser Ala His Arg Leu Ser Gly Glu Leu Ser Ile Pro Tyr Glu Glu Ala  
 675 680 685  
 Val Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Tyr Pro Lys Val Arg Ala  
 690 695 700  
 [0012] Trp Ile Glu Gly Thr Leu Glu Glu Gly Arg Arg Arg Gly Tyr Val Glu  
 705 710 715 720  
 Thr Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Val Pro Asp Leu Asn Ala Arg Val  
 725 730 735  
 Lys Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn Met Pro Val  
 740 745 750  
 Gln Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val Arg Leu Phe  
 755 760 765  
 Pro Arg Leu Gln Glu Leu Gly Ala Arg Met Leu Leu Gln Val His Asp  
 770 775 780  
 Glu Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Asp Arg Ala Glu Arg Val Ala Ala  
 785 790 795 800  
 Leu Ala Lys Glu Val Met Glu Gly Val Trp Pro Leu Gln Val Pro Leu  
 805 810 815  
 Glu Val Glu Val Gly Leu Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala Lys Glu  
 820 825 830  
 <210> 5  
 <211> 830  
 <212> PRT  
 <213> 栖热菌种  
 <220>

<221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(830)  
 <223> 栖热菌种 sps17 DNA 聚合酶 (Sps17)  
 <400> 5  
 Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu Val Asp Gly  
 1 5 10 15  
 His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe Phe Ala Leu Lys Gly Leu Thr Thr  
 20 25 30  
 Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala Lys Ser Leu  
 35 40 45  
 Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Glu Val Ala Ile Val Val Phe Asp  
 50 55 60  
 Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Glu Ala Tyr Lys Ala  
 65 70 75 80  
 Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln Leu Ala Leu Ile  
 85 90 95  
 Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Leu Val Arg Leu Glu Val Pro Gly  
 100 105 110  
 Phe Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Thr Leu Ala Lys Lys Ala Glu Arg  
 115 120 125  
 [0013] Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Ser Ala Asp Arg Asp Leu Tyr Gln  
 130 135 140  
 Leu Leu Ser Asp Arg Ile His Leu Leu His Pro Glu Gly Glu Val Leu  
 145 150 155 160  
 Thr Pro Gly Trp Leu Gln Glu Arg Tyr Gly Leu Ser Pro Glu Arg Trp  
 165 170 175  
 Val Glu Tyr Arg Ala Leu Val Gly Asp Pro Ser Asp Asn Leu Pro Gly  
 180 185 190  
 Val Pro Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Leu Lys Leu Leu Lys Glu Trp  
 195 200 205  
 Gly Ser Leu Glu Ala Ile Leu Lys Asn Leu Asp Gln Val Lys Pro Glu  
 210 215 220  
 Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Asn Asn Leu Asp Lys Leu Gln Met Ser  
 225 230 235 240  
 Leu Glu Leu Ser Arg Leu Arg Thr Asp Leu Pro Leu Glu Val Asp Phe  
 245 250 255  
 Ala Lys Arg Arg Glu Pro Asp Trp Glu Gly Leu Lys Ala Phe Leu Glu  
 260 265 270  
 Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly Leu Leu Glu Ala  
 275 280 285

Pro Lys Glu Ala Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro Gly Gly Ala Phe  
 290 295 300

Leu Gly Phe Leu Leu Ser Arg Pro Glu Pro Met Trp Ala Glu Leu Leu  
 305 310 315 320

Ala Leu Ala Gly Ala Lys Glu Gly Arg Val His Arg Ala Glu Asp Pro  
 325 330 335

Val Gly Ala Leu Lys Asp Leu Lys Glu Ile Arg Gly Leu Leu Ala Lys  
 340 345 350

Asp Leu Ser Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Arg Glu Ile Pro Pro Gly  
 355 360 365

Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro Gly Asn Thr Asn  
 370 375 380

Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp Lys Glu Asp Ala  
 385 390 395 400

Ala Ala Arg Ala Leu Leu Ser Glu Arg Leu Trp Gln Ala Leu Tyr Pro  
 405 410 415

Arg Val Ala Glu Glu Glu Arg Leu Leu Trp Leu Tyr Arg Glu Val Glu  
 420 425 430

[0014] Arg Pro Leu Ala Gln Val Leu Ala His Met Glu Ala Thr Gly Val Arg  
 435 440 445

Leu Asp Val Pro Tyr Leu Glu Ala Leu Ser Gln Glu Val Ala Phe Glu  
 450 455 460

Leu Glu Arg Leu Glu Ala Glu Val His Arg Leu Ala Gly His Pro Phe  
 465 470 475 480

Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu Phe Asp Glu Leu  
 485 490 495

Gly Leu Pro Pro Ile Gly Lys Thr Glu Lys Thr Gly Lys Arg Ser Thr  
 500 505 510

Ser Ala Ala Val Leu Glu Leu Leu Arg Glu Ala His Pro Ile Val Gly  
 515 520 525

Arg Ile Leu Glu Tyr Arg Glu Leu Met Lys Leu Lys Ser Thr Tyr Ile  
 530 535 540

Asp Pro Leu Pro Arg Leu Val His Pro Lys Thr Gly Arg Leu His Thr  
 545 550 555 560

Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser Ser Asp  
 565 570 575

Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu Gly Gln Arg Ile  
 580 585 590

Arg Lys Ala Phe Ile Ala Glu Glu Gly His Leu Leu Val Ala Leu Asp  
 595 600 605  
 Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser Gly Asp Glu  
 610 615 620  
 Asn Leu Ile Arg Val Phe Arg Glu Gly Lys Asp Ile His Thr Glu Thr  
 625 630 635 640  
 Ala Ala Trp Met Phe Gly Val Pro Pro Glu Gly Val Asp Gly Ala Met  
 645 650 655  
 Arg Arg Ala Ala Lys Thr Val Asn Phe Gly Val Leu Tyr Gly Met Ser  
 660 665 670  
 Ala His Arg Leu Ser Gln Glu Leu Ser Ile Pro Tyr Glu Glu Ala Ala  
 675 680 685  
 Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe Pro Lys Val Arg Ala Trp  
 690 695 700  
 Ile Ala Lys Thr Leu Glu Glu Gly Arg Lys Lys Gly Tyr Val Glu Thr  
 705 710 715 720  
 Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Val Pro Asp Leu Asn Ala Arg Val Lys  
 725 730 735  
 [0015] Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn Met Pro Val Gln  
 740 745 750  
 Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val Lys Leu Phe Pro  
 755 760 765  
 Arg Leu Arg Pro Leu Gly Val Arg Ile Leu Leu Gln Val His Asp Glu  
 770 775 780  
 Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Ala Arg Ala Glu Glu Ala Ala Gln Leu  
 785 790 795 800  
 Ala Lys Glu Thr Met Glu Gly Val Tyr Pro Leu Ser Val Pro Leu Glu  
 805 810 815  
 Val Glu Val Gly Met Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala Lys Ala  
 820 825 830  
 <210> 6  
 <211> 834  
 <212> PRT  
 <213> 嗜热栖热菌  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(834)  
 <223> 嗜热栖热菌 DNA 聚合酶 (Tth)  
 <400> 6  
 Met Glu Ala Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu

1	5	10	15
Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe Phe Ala Leu Lys Gly	20	25	30
Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala	35	40	45
Lys Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Tyr Lys Ala Val Phe	50	55	60
Val Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Glu	65	70	80
Ala Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln	85	90	95
Leu Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Phe Thr Arg Leu	100	105	110
Glu Val Pro Gly Tyr Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Thr Leu Ala Lys	115	120	125
Lys Ala Glu Lys Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Arg	130	135	140
Asp Leu Tyr Gln Leu Val Ser Asp Arg Val Ala Val Leu His Pro Glu	145	150	160
Gly His Leu Ile Thr Pro Glu Trp Leu Trp Glu Lys Tyr Gly Leu Arg	165	170	175
Pro Glu Gln Trp Val Asp Phe Arg Ala Leu Val Gly Asp Pro Ser Asp	180	185	190
Asn Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Leu Lys Leu	195	200	205
Leu Lys Glu Trp Gly Ser Leu Glu Asn Leu Leu Lys Asn Leu Asp Arg	210	215	220
Val Lys Pro Glu Asn Val Arg Glu Lys Ile Lys Ala His Leu Glu Asp	225	230	240
Leu Arg Leu Ser Leu Glu Leu Ser Arg Val Arg Thr Asp Leu Pro Leu	245	250	255
Glu Val Asp Leu Ala Gln Gly Arg Glu Pro Asp Arg Glu Gly Leu Arg	260	265	270
Ala Phe Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly	275	280	285
Leu Leu Glu Ala Pro Ala Pro Leu Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro	290	295	300
Glu Gly Ala Phe Val Gly Phe Val Leu Ser Arg Pro Glu Pro Met Trp			

[0016]

305	310	315	320
Ala Glu Leu Lys	Ala Leu Ala Ala Cys	Arg Asp Gly Arg Val	His Arg
	325	330	335
Ala Ala Asp Pro	Leu Ala Gly Leu Lys	Asp Leu Lys Glu	Val Arg Gly
	340	345	350
Leu Leu Ala Lys	Asp Leu Ala Val	Leu Ala Ser Arg	Glu Gly Leu Asp
	355	360	365
Leu Val Pro Gly	Asp Asp Pro Met	Leu Leu Ala Tyr	Leu Leu Asp Pro
	370	375	380
Ser Asn Thr Thr	Pro Glu Gly Val	Ala Arg Arg Tyr	Gly Gly Glu Trp
	385	390	400
Thr Glu Asp Ala	Ala His Arg Ala	Leu Leu Ser Glu	Arg Leu His Arg
	405	410	415
Asn Leu Leu Lys	Arg Leu Glu Gly	Glu Glu Lys Leu	Leu Trp Leu Tyr
	420	425	430
His Glu Val Glu	Lys Pro Leu Ser	Arg Val Leu Ala	His Met Glu Ala
	435	440	445
Thr Gly Val Arg	Arg Asp Val Ala	Tyr Leu Gln Ala	Leu Ser Leu Glu
	450	455	460
Leu Ala Glu Glu	Ile Arg Arg Leu	Glu Glu Glu Val	Phe Arg Leu Ala
	465	470	475
Gly His Pro Phe	Asn Leu Asn Ser	Arg Asp Gln Leu	Glu Arg Val Leu
	485	490	495
Phe Asp Glu Leu	Arg Leu Pro Ala	Leu Gly Lys Thr	Gln Lys Thr Gly
	500	505	510
Lys Arg Ser Thr	Ser Ala Ala Val	Leu Glu Ala Leu	Arg Glu Ala His
	515	520	525
Pro Ile Val Glu	Lys Ile Leu Gln	His Arg Glu Leu	Thr Lys Leu Lys
	530	535	540
Asn Thr Tyr Val	Asp Pro Leu Pro	Ser Leu Val His	Pro Arg Thr Gly
	545	550	555
Arg Leu His Thr	Arg Phe Asn Gln	Thr Ala Thr Ala	Thr Gly Arg Leu
	565	570	575
Ser Ser Ser Asp	Pro Asn Leu Gln	Asn Ile Pro Val	Arg Thr Pro Leu
	580	585	590
Gly Gln Arg Ile	Arg Arg Ala Phe	Val Ala Glu Ala	Gly Trp Ala Leu
	595	600	605
Val Ala Leu Asp	Tyr Ser Gln Ile	Glu Leu Arg Val	Leu Ala His Leu

[0017]



Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe Phe Ala Leu Lys Gly  
 20 25 30

Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala  
 35 40 45

Lys Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Tyr Lys Ala Val Phe  
 50 55 60

Val Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Glu  
 65 70 75 80

Ala Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln  
 85 90 95

Leu Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Phe Thr Arg Leu  
 100 105 110

Glu Val Pro Gly Tyr Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Thr Leu Ala Lys  
 115 120 125

Asn Pro Glu Lys Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Arg  
 130 135 140

Asp Leu Asp Gln Leu Val Ser Asp Arg Val Ala Val Leu His Pro Glu  
 145 150 155 160

[0019] Gly His Leu Ile Thr Pro Glu Trp Leu Trp Gln Lys Tyr Gly Leu Lys  
 165 170 175

Pro Glu Gln Trp Val Asp Phe Arg Ala Leu Val Gly Asp Pro Ser Asp  
 180 185 190

Asn Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Leu Lys Leu  
 195 200 205

Leu Lys Glu Trp Gly Ser Leu Glu Asn Leu Leu Lys Asn Leu Asp Arg  
 210 215 220

Val Lys Pro Glu Asn Val Arg Glu Lys Ile Lys Ala His Leu Glu Asp  
 225 230 235 240

Leu Arg Leu Ser Leu Glu Leu Ser Arg Val Arg Thr Asp Leu Pro Leu  
 245 250 255

Glu Val Asp Leu Ala Gln Gly Arg Glu Pro Asp Arg Glu Gly Leu Arg  
 260 265 270

Ala Phe Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly  
 275 280 285

Leu Leu Glu Ala Pro Ala Pro Leu Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro  
 290 295 300

Glu Gly Ala Phe Val Gly Phe Val Leu Ser Arg Pro Glu Pro Met Trp  
 305 310 315 320

Ala Glu Leu Lys Ala Leu Ala Ala Cys Arg Asp Gly Arg Val His Arg  
325 330 335

Ala Ala Asp Pro Leu Ala Gly Leu Lys Asp Leu Lys Glu Val Arg Gly  
340 345 350

Leu Leu Ala Lys Asp Leu Ala Val Leu Ala Ser Arg Glu Gly Leu Asp  
355 360 365

Leu Val Pro Gly Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro  
370 375 380

Ser Asn Thr Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp  
385 390 395 400

Thr Glu Asp Ala Ala His Arg Ala Leu Leu Ser Glu Arg Leu His Arg  
405 410 415

Asn Leu Leu Lys Arg Leu Gln Gly Glu Glu Lys Leu Leu Trp Leu Tyr  
420 425 430

His Glu Val Glu Lys Pro Leu Ser Arg Val Leu Ala His Met Glu Ala  
435 440 445

Thr Gly Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Gln Ala Leu Ser Leu Glu  
450 455 460

[0020] Leu Ala Glu Glu Ile Arg Arg Leu Glu Glu Glu Val Phe Arg Leu Ala  
465 470 475 480

Gly His Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu  
485 490 495

Phe Asp Glu Leu Arg Leu Pro Ala Leu Gly Lys Thr Gln Lys Thr Gly  
500 505 510

Lys Arg Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His  
515 520 525

Pro Ile Val Glu Lys Ile Leu Gln His Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys  
530 535 540

Asn Thr Tyr Val Asp Pro Leu Pro Ser Leu Val His Pro Asn Thr Gly  
545 550 555 560

Arg Leu His Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu  
565 570 575

Ser Ser Ser Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu  
580 585 590

Gly Gln Arg Ile Arg Arg Ala Phe Val Ala Glu Ala Gly Trp Ala Leu  
595 600 605

Val Ala Leu Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu  
610 615 620

Ser Gly Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Lys Asp Ile  
 625 630 635 640  
 His Thr Gln Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Pro Pro Glu Ala Val  
 645 650 655  
 Asp Pro Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Val Asn Phe Gly Val Leu  
 660 665 670  
 Tyr Gly Met Ser Ala His Arg Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ile Pro Tyr  
 675 680 685  
 Glu Glu Ala Val Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe Pro Lys  
 690 695 700  
 Val Arg Ala Trp Ile Glu Lys Thr Leu Glu Glu Gly Arg Lys Arg Gly  
 705 710 715 720  
 Tyr Val Glu Thr Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Val Pro Asp Leu Asn  
 725 730 735  
 Ala Arg Val Lys Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn  
 740 745 750  
 Met Pro Val Gln Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val  
 755 760 765  
 Lys Leu Phe Pro Arg Leu Arg Glu Met Gly Ala Arg Met Leu Leu Gln  
 770 775 780  
 Val His Asp Glu Leu Leu Leu Glu Ala Pro Gln Ala Gly Ala Glu Glu  
 785 790 795 800  
 Val Ala Ala Leu Ala Lys Glu Ala Met Glu Lys Ala Tyr Pro Leu Ala  
 805 810 815  
 Val Pro Leu Glu Val Glu Val Gly Met Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala  
 820 825 830

[0021]

Lys Gly

<210> 8  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成 DNA 聚合酶基序

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa = Leu 或 Ile

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa = Val、Leu、Ile 或 Phe

<220>

<221> 变体  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Xaa = Ala、Val、Ser 或 Gly

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Xaa = Leu 或 Ala

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Xaa = 除 Ile、Lys、Asn、Gln 或 Thr 以外的任何氨基酸

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (13)..(13)  
 <223> Xaa = Val、Ile 或 Leu

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (17)..(17)  
 <223> Xaa = Leu、Val 或 Ile

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa = Ser 或 Ala

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (19)..(19)  
 <223> Xaa = Gly、Lys、Asp 或 Glu

<400> 8  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Tyr Ser Gln Xaa Glu Leu Arg Xaa Leu Ala His  
 1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Asp  
 20

<210> 9  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成 DNA 聚合酶基序

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Xaa = Ala 或 Val

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Xaa = 除 Ile、Lys、Asn、Gln 或 Thr 以外的任何氨基酸

<400> 9  
 Leu Val Xaa Leu Asp Tyr Ser Gln Xaa Glu Leu Arg Val Leu Ala His  
 1 5 10 15

Leu Ser Gly Asp  
 20

<210> 10  
 <211> 20  
 <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成 DNA 聚合酶基序

<220>

<221> 变体

<222> (9)..(9)

<223> Xaa = 除 Ile、Lys、Asn、Gln 或 Thr 以外的任何氨基酸

<400> 10

Leu Val Ala Leu Asp Tyr Ser Gln Xaa Glu Leu Arg Val Leu Ala His  
1 5 10 15

Leu Ser Gly Asp  
20

<210> 11

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成 DNA 聚合酶基序

<400> 11

Leu Val Ala Leu Asp Tyr Ser Gln Met Glu Leu Arg Val Leu Ala His  
1 5 10 15

Leu Ser Gly Asp  
20

[0023]

<210> 12

<211> 38

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 栖热菌种 Z05 DNA 聚合酶 (Z05) 的合成聚合酶结构域区域

<400> 12

Arg Arg Ala Phe Val Ala Glu Ala Gly Trp Ala Leu Val Ala Leu Asp  
1 5 10 15

Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser Gly Asp Glu  
20 25 30

Asn Leu Ile Arg Val Phe  
35

<210> 13

<211> 38

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 水生栖热菌 DNA 聚合酶 (Taq) 的合成聚合酶结构域区域

<400> 13

Arg Arg Ala Phe Ile Ala Glu Glu Gly Trp Leu Leu Val Ala Leu Asp  
1 5 10 15

Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser Gly Asp Glu

	20	25	30
	Asn Leu Ile Arg Val Phe		
	35		
	<210> 14		
	<211> 38		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 丝状栖热菌 DNA 聚合酶 (Tfi) 的合成聚合酶结构域区域		
	<400> 14		
	Arg Lys Ala Phe Ile Ala Glu Glu Gly His Leu Leu Val Ala Leu Asp		
	1	5	10 15
	Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser Gly Asp Glu		
	20	25	30
	Asn Leu Ile Arg Val Phe		
	35		
	<210> 15		
	<211> 38		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 黄栖热菌 DNA 聚合酶 (Tf1) 的合成聚合酶结构域区域		
[0024]	<400> 15		
	Arg Arg Ala Phe Val Ala Glu Glu Gly Trp Val Leu Val Val Leu Asp		
	1	5	10 15
	Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser Gly Asp Glu		
	20	25	30
	Asn Leu Ile Arg Val Phe		
	35		
	<210> 16		
	<211> 38		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 栖热菌种 sps17 DNA 聚合酶 (Sps17) 的合成聚合酶结构域区域		
	<400> 16		
	Arg Lys Ala Phe Ile Ala Glu Glu Gly His Leu Leu Val Ala Leu Asp		
	1	5	10 15
	Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser Gly Asp Glu		
	20	25	30
	Asn Leu Ile Arg Val Phe		
	35		
	<210> 17		
	<211> 38		
	<212> PRT		

<213> 人工序列

<220>

<223> 嗜热栖热菌 DNA 聚合酶 (Tth) 的合成聚合酶结构域区域

<400> 17

Arg Arg Ala Phe Val Ala Glu Ala Gly Trp Ala Leu Val Ala Leu Asp  
1 5 10 15

Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser Gly Asp Glu  
20 25 30

Asn Leu Ile Arg Val Phe  
35

<210> 18

<211> 38

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Thermus caldophilus DNA 聚合酶 (Tca) 的合成聚合酶结构域区域

<400> 18

Arg Arg Ala Phe Val Ala Glu Ala Gly Trp Ala Leu Val Ala Leu Asp  
1 5 10 15

Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser Gly Asp Glu  
20 25 30

[0025]

Asn Leu Ile Arg Val Phe  
35

<210> 19

<211> 39

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 海栖热袍菌 DNA 聚合酶 (Tma) 的合成聚合酶结构域区域

<400> 19

Arg Lys Ala Ile Val Pro Gln Asp Pro Asn Trp Trp Ile Val Ser Ala  
1 5 10 15

Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Ile Leu Ala His Leu Ser Gly Asp  
20 25 30

Glu Asn Leu Leu Arg Ala Phe  
35

<210> 20

<211> 39

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 那不勒斯栖热袍菌 DNA 聚合酶 (Tne) 的合成聚合酶结构域区域

<400> 20

Arg Lys Ala Ile Val Pro Gln Asp Pro Asp Trp Trp Ile Val Ser Ala  
1 5 10 15

Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Ile Leu Ala His Leu Ser Gly Asp  
 20 25 30

Glu Asn Leu Val Lys Ala Phe  
 35

<210> 21  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 非洲栖热腔菌 DNA 聚合酶 (Taf) 的合成聚合酶结构域区域

<400> 21

Arg Lys Ala Val Arg Pro Gln Arg Gln Asp Trp Trp Ile Leu Gly Ala  
 1 5 10 15

Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Val Ser Lys Asp  
 20 25 30

Glu Asn Leu Leu Lys Ala Phe  
 35

<210> 22  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成保守的 DNA 聚合酶活性位点基序 A

[0026]

<400> 22

Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg  
 1 5

<210> 23  
 <211> 38  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 嗜热栖热菌 DNA 聚合酶 (Dra) 的合成聚合酶结构域区域

<400> 23

Arg Lys Gly Phe Ile Ala Glu Asp Gly Phe Thr Leu Ile Ala Ala Asp  
 1 5 10 15

Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Leu Leu Ala His Ile Ala Asp Asp Pro  
 20 25 30

Leu Met Gln Gln Ala Phe  
 35

<210> 24  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 嗜热脂肪芽孢杆菌 DNA 聚合酶 (Bst) 的合成聚合酶结构域区域

<400> 24

Arg Gln Ala Phe Val Pro Ser Glu Pro Asp Trp Leu Ile Phe Ala Ala  
1 5 10 15

Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Ile Ala Glu Asp  
20 25 30

Asp Asn Leu Ile Glu Ala Phe  
35

<210> 25

<211> 39

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 嗜热脂肪芽孢杆菌 DNA 聚合酶 (Bca) 的合成聚合酶结构域区域

<400> 25

Arg Gln Ala Phe Val Pro Ser Glu Ser Asp Trp Leu Ile Phe Ala Ala  
1 5 10 15

Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Ile Ala Glu Asp  
20 25 30

Asp Asn Leu Met Glu Ala Phe  
35

<210> 26

<211> 20

<212> PRT

[0027]

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成聚合酶结构域区域天然共有基序

<220>

<221> 变体

<222> (1)..(1)

<223> Xaa = Leu 或 Ile

<220>

<221> 变体

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Val、Leu、Ile 或 Phe

<220>

<221> 变体

<222> (3)..(3)

<223> Xaa = Ala、Val、Ser 或 Gly

<220>

<221> 变体

<222> (4)..(4)

<223> Xaa = Leu 或 Ala

<220>

<221> 变体

<222> (13)..(13)

<223> Xaa = Val、Ile 变体 Leu

<220>

<221> 变体

<222> (17)..(17)

<223> Xaa = Leu、Val 或 Ile

<220>

<221> 变体

<222> (18)..(18)  
 <223> Xaa = Ser 或 Ala  
  
 <220>  
 <221> 变体  
 <222> (19)..(19)  
 <223> Xaa = Gly、Lys、Asp 或 Glu  
  
 <400> 26  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Xaa Leu Ala His  
 1 5 10 15  
  
 Xaa Xaa Xaa Asp  
 20  
  
 <210> 27  
 <211> 893  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 合成的嵌合 CS5 DNA 聚合酶, 其来源于栖热菌种 Z05 的 N-末端  
 5'-核酸酶结构域和海栖热袍菌 DNA 聚合酶的 C-末端 3'-5'  
 核酸外切酶和聚合酶结构域  
  
 <400> 27  
 Met Lys Ala Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu  
 1 5 10 15  
  
 Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe Phe Ala Leu Lys Gly  
 20 25 30  
  
 [0028] Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala  
 35 40 45  
  
 Lys Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Tyr Lys Ala Val Phe  
 50 55 60  
  
 Val Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Glu  
 65 70 75 80  
  
 Ala Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln  
 85 90 95  
  
 Leu Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Phe Thr Arg Leu  
 100 105 110  
  
 Glu Val Pro Gly Phe Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Thr Leu Ala Lys  
 115 120 125  
  
 Lys Ala Glu Arg Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Arg  
 130 135 140  
  
 Asp Leu Tyr Gln Leu Val Ser Asp Arg Val Ala Val Leu His Pro Glu  
 145 150 155 160  
  
 Gly His Leu Ile Thr Pro Glu Trp Leu Trp Glu Lys Tyr Gly Leu Lys  
 165 170 175  
  
 Pro Glu Gln Trp Val Asp Phe Arg Ala Leu Val Gly Asp Pro Ser Asp  
 180 185 190

Asn Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Leu Lys Leu  
 195 200 205

Leu Lys Glu Trp Gly Ser Leu Glu Asn Ile Leu Lys Asn Leu Asp Arg  
 210 215 220

Val Lys Pro Glu Ser Val Arg Glu Arg Ile Lys Ala His Leu Glu Asp  
 225 230 235 240

Leu Lys Leu Ser Leu Glu Leu Ser Arg Val Arg Ser Asp Leu Pro Leu  
 245 250 255

Glu Val Asp Phe Ala Arg Arg Arg Glu Pro Asp Arg Glu Gly Leu Arg  
 260 265 270

Ala Phe Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly  
 275 280 285

Leu Leu Glu Glu Ser Glu Pro Val Gly Tyr Arg Ile Val Lys Asp Leu  
 290 295 300

Val Glu Phe Glu Lys Leu Ile Glu Lys Leu Arg Glu Ser Pro Ser Phe  
 305 310 315 320

Ala Ile Asp Leu Glu Thr Ser Ser Leu Asp Pro Phe Asp Cys Asp Ile  
 325 330 335

[0029] Val Gly Ile Ser Val Ser Phe Lys Pro Lys Glu Ala Tyr Tyr Ile Pro  
 340 345 350

Leu His His Arg Asn Ala Gln Asn Leu Asp Glu Lys Glu Val Leu Lys  
 355 360 365

Lys Leu Lys Glu Ile Leu Glu Asp Pro Gly Ala Lys Ile Val Gly Gln  
 370 375 380

Asn Leu Lys Phe Asp Tyr Lys Val Leu Met Val Lys Gly Val Glu Pro  
 385 390 395 400

Val Pro Pro Tyr Phe Asp Thr Met Ile Ala Ala Tyr Leu Leu Glu Pro  
 405 410 415

Asn Glu Lys Lys Phe Asn Leu Asp Asp Leu Ala Leu Lys Phe Leu Gly  
 420 425 430

Tyr Lys Met Thr Ser Tyr Gln Glu Leu Met Ser Phe Ser Phe Pro Leu  
 435 440 445

Phe Gly Phe Ser Phe Ala Asp Val Pro Val Glu Lys Ala Ala Asn Tyr  
 450 455 460

Ser Cys Glu Asp Ala Asp Ile Thr Tyr Arg Leu Tyr Lys Thr Leu Ser  
 465 470 475 480

Leu Lys Leu His Glu Ala Asp Leu Glu Asn Val Phe Tyr Lys Ile Glu  
 485 490 495

Met Pro Leu Val Asn Val Leu Ala Arg Met Glu Leu Asn Gly Val Tyr  
500 505 510

Val Asp Thr Glu Phe Leu Lys Lys Leu Ser Glu Glu Tyr Gly Lys Lys  
515 520 525

Leu Glu Glu Leu Ala Glu Glu Ile Tyr Arg Ile Ala Gly Glu Pro Phe  
530 535 540

Asn Ile Asn Ser Pro Lys Gln Val Ser Arg Ile Leu Phe Glu Lys Leu  
545 550 555 560

Gly Ile Lys Pro Arg Gly Lys Thr Thr Lys Thr Gly Asp Tyr Ser Thr  
565 570 575

Arg Ile Glu Val Leu Glu Glu Leu Ala Gly Glu His Glu Ile Ile Pro  
580 585 590

Leu Ile Leu Glu Tyr Arg Lys Ile Gln Lys Leu Lys Ser Thr Tyr Ile  
595 600 605

Asp Ala Leu Pro Lys Met Val Asn Pro Lys Thr Gly Arg Ile His Ala  
610 615 620

Ser Phe Asn Gln Thr Gly Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser Ser Asp  
625 630 635 640

[0030] Pro Asn Leu Gln Asn Leu Pro Thr Lys Ser Glu Glu Gly Lys Glu Ile  
645 650 655

Arg Lys Ala Ile Val Pro Gln Asp Pro Asn Trp Trp Ile Val Ser Ala  
660 665 670

Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Ile Leu Ala His Leu Ser Gly Asp  
675 680 685

Glu Asn Leu Leu Arg Ala Phe Glu Glu Gly Ile Asp Val His Thr Leu  
690 695 700

Thr Ala Ser Arg Ile Phe Asn Val Lys Pro Glu Glu Val Thr Glu Glu  
705 710 715 720

Met Arg Arg Ala Gly Lys Met Val Asn Phe Ser Ile Ile Tyr Gly Val  
725 730 735

Thr Pro Tyr Gly Leu Ser Val Arg Leu Gly Val Pro Val Lys Glu Ala  
740 745 750

Glu Lys Met Ile Val Asn Tyr Phe Val Leu Tyr Pro Lys Val Arg Asp  
755 760 765

Tyr Ile Gln Arg Val Val Ser Glu Ala Lys Glu Lys Gly Tyr Val Arg  
770 775 780

Thr Leu Phe Gly Arg Lys Arg Asp Ile Pro Gln Leu Met Ala Arg Asp  
785 790 795 800

Arg Asn Thr Gln Ala Glu Gly Glu Arg Ile Ala Ile Asn Thr Pro Ile  
805 810 815

Gln Gly Thr Ala Ala Asp Ile Ile Lys Leu Ala Met Ile Glu Ile Asp  
820 825 830

Arg Glu Leu Lys Glu Arg Lys Met Arg Ser Lys Met Ile Ile Gln Val  
835 840 845

His Asp Glu Leu Val Phe Glu Val Pro Asn Glu Glu Lys Asp Ala Leu  
850 855 860

Val Glu Leu Val Lys Asp Arg Met Thr Asn Val Val Lys Leu Ser Val  
865 870 875 880

Pro Leu Glu Val Asp Val Thr Ile Gly Lys Thr Trp Ser  
885 890

<210> 28

<211> 893

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的嵌合 CS6 DNA 聚合酶, 其来源于栖热菌种 Z05 的 N-末端 5'-核酸酶结构域和海栖热袍菌 DNA 聚合酶的 C-末端 3'-5' 核酸外切酶和聚合酶结构域

<400> 28

[0031]

Met Lys Ala Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu  
1 5 10 15

Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe Phe Ala Leu Lys Gly  
20 25 30

Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala  
35 40 45

Lys Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Tyr Lys Ala Val Phe  
50 55 60

Val Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Glu  
65 70 75 80

Ala Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln  
85 90 95

Leu Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Phe Thr Arg Leu  
100 105 110

Glu Val Pro Gly Phe Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Thr Leu Ala Lys  
115 120 125

Lys Ala Glu Arg Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Arg  
130 135 140

Asp Leu Tyr Gln Leu Val Ser Asp Arg Val Ala Val Leu His Pro Glu  
145 150 155 160

Gly His Leu Ile Thr Pro Glu Trp Leu Trp Glu Lys Tyr Gly Leu Lys  
 165 170 175

Pro Glu Gln Trp Val Asp Phe Arg Ala Leu Val Gly Asp Pro Ser Asp  
 180 185 190

Asn Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Leu Lys Leu  
 195 200 205

Leu Lys Glu Trp Gly Ser Leu Glu Asn Ile Leu Lys Asn Leu Asp Arg  
 210 215 220

Val Lys Pro Glu Ser Val Arg Glu Arg Ile Lys Ala His Leu Glu Asp  
 225 230 235 240

Leu Lys Leu Ser Leu Glu Leu Ser Arg Val Arg Ser Asp Leu Pro Leu  
 245 250 255

Glu Val Asp Phe Ala Arg Arg Arg Glu Pro Asp Arg Glu Gly Leu Arg  
 260 265 270

Ala Phe Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly  
 275 280 285

Leu Leu Glu Glu Ser Glu Pro Val Gly Tyr Arg Ile Val Lys Asp Leu  
 290 295 300

[0032] Val Glu Phe Glu Lys Leu Ile Glu Lys Leu Arg Glu Ser Pro Ser Phe  
 305 310 315 320

Ala Ile Ala Leu Ala Thr Ser Ser Leu Asp Pro Phe Asp Cys Asp Ile  
 325 330 335

Val Gly Ile Ser Val Ser Phe Lys Pro Lys Glu Ala Tyr Tyr Ile Pro  
 340 345 350

Leu His His Arg Asn Ala Gln Asn Leu Asp Glu Lys Glu Val Leu Lys  
 355 360 365

Lys Leu Lys Glu Ile Leu Glu Asp Pro Gly Ala Lys Ile Val Gly Gln  
 370 375 380

Asn Leu Lys Phe Asp Tyr Lys Val Leu Met Val Lys Gly Val Glu Pro  
 385 390 395 400

Val Pro Pro Tyr Phe Asp Thr Met Ile Ala Ala Tyr Leu Leu Glu Pro  
 405 410 415

Asn Glu Lys Lys Phe Asn Leu Asp Asp Leu Ala Leu Lys Phe Leu Gly  
 420 425 430

Tyr Lys Met Thr Ser Tyr Gln Glu Leu Met Ser Phe Ser Phe Pro Leu  
 435 440 445

Phe Gly Phe Ser Phe Ala Asp Val Pro Val Glu Lys Ala Ala Asn Tyr  
 450 455 460

Ser Cys Glu Asp Ala Asp Ile Thr Tyr Arg Leu Tyr Lys Thr Leu Ser  
 465 470 475 480

Leu Lys Leu His Glu Ala Asp Leu Glu Asn Val Phe Tyr Lys Ile Glu  
 485 490 495

Met Pro Leu Val Asn Val Leu Ala Arg Met Glu Leu Asn Gly Val Tyr  
 500 505 510

Val Asp Thr Glu Phe Leu Lys Lys Leu Ser Glu Glu Tyr Gly Lys Lys  
 515 520 525

Leu Glu Glu Leu Ala Glu Glu Ile Tyr Arg Ile Ala Gly Glu Pro Phe  
 530 535 540

Asn Ile Asn Ser Pro Lys Gln Val Ser Arg Ile Leu Phe Glu Lys Leu  
 545 550 555 560

Gly Ile Lys Pro Arg Gly Lys Thr Thr Lys Thr Gly Asp Tyr Ser Thr  
 565 570 575

Arg Ile Glu Val Leu Glu Glu Leu Ala Gly Glu His Glu Ile Ile Pro  
 580 585 590

Leu Ile Leu Glu Tyr Arg Lys Ile Gln Lys Leu Lys Ser Thr Tyr Ile  
 595 600 605

[0033] Asp Ala Leu Pro Lys Met Val Asn Pro Lys Thr Gly Arg Ile His Ala  
 610 615 620

Ser Phe Asn Gln Thr Gly Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser Ser Asp  
 625 630 635 640

Pro Asn Leu Gln Asn Leu Pro Thr Lys Ser Glu Glu Gly Lys Glu Ile  
 645 650 655

Arg Lys Ala Ile Val Pro Gln Asp Pro Asn Trp Trp Ile Val Ser Ala  
 660 665 670

Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Ile Leu Ala His Leu Ser Gly Asp  
 675 680 685

Glu Asn Leu Leu Arg Ala Phe Glu Glu Gly Ile Asp Val His Thr Leu  
 690 695 700

Thr Ala Ser Arg Ile Phe Asn Val Lys Pro Glu Glu Val Thr Glu Glu  
 705 710 715 720

Met Arg Arg Ala Gly Lys Met Val Asn Phe Ser Ile Ile Tyr Gly Val  
 725 730 735

Thr Pro Tyr Gly Leu Ser Val Arg Leu Gly Val Pro Val Lys Glu Ala  
 740 745 750

Glu Lys Met Ile Val Asn Tyr Phe Val Leu Tyr Pro Lys Val Arg Asp  
 755 760 765

Tyr Ile Gln Arg Val Val Ser Glu Ala Lys Glu Lys Gly Tyr Val Arg  
 770 775 780  
 Thr Leu Phe Gly Arg Lys Arg Asp Ile Pro Gln Leu Met Ala Arg Asp  
 785 790 795 800  
 Arg Asn Thr Gln Ala Glu Gly Glu Arg Ile Ala Ile Asn Thr Pro Ile  
 805 810 815  
 Gln Gly Thr Ala Ala Asp Ile Ile Lys Leu Ala Met Ile Glu Ile Asp  
 820 825 830  
 Arg Glu Leu Lys Glu Arg Lys Met Arg Ser Lys Met Ile Ile Gln Val  
 835 840 845  
 His Asp Glu Leu Val Phe Glu Val Pro Asn Glu Glu Lys Asp Ala Leu  
 850 855 860  
 Val Glu Leu Val Lys Asp Arg Met Thr Asn Val Val Lys Leu Ser Val  
 865 870 875 880  
 Pro Leu Glu Val Asp Val Thr Ile Gly Lys Thr Trp Ser  
 885 890

<210> 29  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

[0034]

<220>  
 <223> 合成 DNA 聚合酶基序

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa = Ala、Asp、Ser、Glu、Arg 或 Gln

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa = Trp 或 Tyr

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Xaa = 除 Ile、Leu 或 Met 以外的任何氨基酸

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Xaa = Glu、Ala、Gln、Lys、Asn 或 Asp

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Xaa = Lys、Gly、Arg、Gln、His 或 Asn

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Xaa = Thr、Val、Met 或 Ile

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (7)..(7)

<223> Xaa = Leu、Val 或 Lys  
 <220>  
 <221> 变体  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Xaa = Glu、Ser、Ala、Asp 或 Gln

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Xaa = Glu 或 Phe

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Xaa = Gly 或 Ala

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (11)..(11)  
 <223> Xaa = Arg 或 Lys

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (12)..(12)  
 <223> Xaa = Lys、Arg、Glu、Thr 或 Gln

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (13)..(13)  
 <223> Xaa = Arg、Lys 或 His

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (17)..(17)  
 <223> Xaa = Glu、Arg 或 Thr

[0035]

<400> 29  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Tyr Val  
 1 5 10 15

Xaa Thr Leu

<210> 30  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 易错合成 (诱变) PCR 扩增正向引物

<400> 30  
 ctacctctg gaccctcca a 21

<210> 31  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 易错合成 (诱变) PCR 扩增反向引物

<400> 31  
 ataaccaact ggtagtggcg tgtaa 25

<210> 32  
 <211> 921  
 <212> PRT  
 <213> 耐辐射奇异球菌

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(921)  
 <223> 耐辐射奇异球菌 DNA 聚合酶 (Dra)  
 <400> 32  
 Met Ala Asp Ala Ser Pro Asp Pro Ser Lys Pro Asp Ala Leu Val Leu  
 1 5 10 15  
 Ile Asp Gly His Ala Leu Ala Phe Arg Ser Tyr Phe Ala Leu Pro Pro  
 20 25 30  
 Leu Asn Asn Ser Lys Gly Glu Met Thr Asp Ala Ile Val Gly Phe Met  
 35 40 45  
 Lys Leu Leu Leu Arg Leu Ala Arg Gln Lys Ser Asn Gln Val Ile Val  
 50 55 60  
 Val Phe Asp Pro Pro Val Lys Thr Leu Arg His Glu Gln Tyr Glu Gly  
 65 70 75 80  
 Tyr Lys Ser Gly Arg Ala Gln Thr Pro Glu Asp Leu Arg Gly Gln Ile  
 85 90 95  
 Asn Arg Ile Arg Ala Leu Val Asp Ala Leu Gly Phe Pro Arg Leu Glu  
 100 105 110  
 Glu Pro Gly Tyr Glu Ala Asp Asp Val Ile Ala Ser Leu Thr Arg Met  
 115 120 125  
 Ala Glu Gly Lys Gly Tyr Glu Val Arg Ile Val Thr Ser Asp Arg Asp  
 130 135 140  
 Ala Tyr Gln Leu Leu Asp Glu His Val Lys Val Ile Ala Asn Asp Phe  
 145 150 155 160  
 Ser Leu Ile Gly Pro Ala Gln Val Glu Glu Lys Tyr Gly Val Thr Val  
 165 170 175  
 Arg Gln Trp Val Asp Tyr Arg Ala Leu Thr Gly Asp Ala Ser Asp Asn  
 180 185 190  
 Ile Pro Gly Ala Lys Gly Ile Gly Pro Lys Thr Ala Ala Lys Leu Leu  
 195 200 205  
 Gln Glu Tyr Gly Thr Leu Glu Lys Val Tyr Glu Ala Ala His Ala Gly  
 210 215 220  
 Thr Leu Lys Pro Asp Gly Thr Arg Lys Lys Leu Leu Asp Ser Glu Glu  
 225 230 235 240  
 Asn Val Lys Phe Ser His Asp Leu Ser Cys Met Val Thr Asp Leu Pro  
 245 250 255  
 Leu Asp Ile Glu Phe Gly Val Arg Arg Leu Pro Asp Asn Pro Leu Val  
 260 265 270

[0036]

Thr Glu Asp Leu Leu Thr Glu Leu Glu Leu His Ser Leu Arg Pro Met  
 275 280 285

Ile Leu Gly Leu Asn Gly Pro Glu Gln Asp Gly His Ala Pro Asp Asp  
 290 295 300

Leu Leu Glu Arg Glu His Ala Gln Thr Pro Glu Glu Asp Glu Ala Ala  
 305 310 315 320

Ala Leu Pro Ala Phe Ser Ala Pro Glu Leu Ala Glu Trp Gln Thr Pro  
 325 330 335

Ala Glu Gly Ala Val Trp Gly Tyr Val Leu Ser Arg Glu Asp Asp Leu  
 340 345 350

Thr Ala Ala Leu Leu Ala Ala Ala Thr Phe Glu Asp Gly Val Ala Arg  
 355 360 365

Pro Ala Arg Val Ser Glu Pro Asp Glu Trp Ala Gln Ala Glu Ala Pro  
 370 375 380

Glu Asn Leu Phe Gly Glu Leu Leu Pro Ser Asp Lys Pro Leu Thr Lys  
 385 390 395 400

Lys Glu Gln Lys Ala Leu Glu Lys Ala Gln Lys Asp Ala Glu Lys Ala  
 405 410 415

[0037] Arg Ala Lys Leu Arg Glu Gln Phe Pro Ala Thr Val Asp Glu Ala Glu  
 420 425 430

Phe Val Gly Gln Arg Thr Val Thr Ala Ala Ala Ala Lys Ala Leu Ala  
 435 440 445

Ala His Leu Ser Val Arg Gly Thr Val Val Glu Pro Gly Asp Asp Pro  
 450 455 460

Leu Leu Tyr Ala Tyr Leu Leu Asp Pro Ala Asn Thr Asn Met Pro Val  
 465 470 475 480

Val Ala Lys Arg Tyr Leu Asp Arg Glu Trp Pro Ala Asp Ala Pro Thr  
 485 490 495

Arg Ala Ala Ile Thr Gly His Leu Val Arg Glu Leu Pro Pro Leu Leu  
 500 505 510

Asp Asp Ala Arg Arg Lys Met Tyr Asp Glu Met Glu Lys Pro Leu Ser  
 515 520 525

Gly Val Leu Gly Arg Met Glu Val Arg Gly Val Gln Val Asp Ser Asp  
 530 535 540

Phe Leu Gln Thr Leu Ser Ile Gln Ala Gly Val Arg Leu Ala Asp Leu  
 545 550 555 560

Glu Ser Gln Ile His Glu Tyr Ala Gly Glu Glu Phe His Ile Arg Ser  
 565 570 575

Pro Lys Gln Leu Glu Thr Val Leu Tyr Asp Lys Leu Glu Leu Ala Ser  
 580 585 590

Ser Lys Lys Thr Lys Leu Thr Gly Gln Arg Ser Thr Ala Val Ser Ala  
 595 600 605

Leu Glu Pro Leu Arg Asp Ala His Pro Ile Ile Pro Leu Val Leu Glu  
 610 615 620

Phe Arg Glu Leu Asp Lys Leu Arg Gly Thr Tyr Leu Asp Pro Ile Pro  
 625 630 635 640

Asn Leu Val Asn Pro His Thr Gly Arg Leu His Thr Thr Phe Ala Gln  
 645 650 655

Thr Ala Val Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser Leu Asn Pro Asn Leu Gln  
 660 665 670

Asn Ile Pro Ile Arg Ser Glu Leu Gly Arg Glu Ile Arg Lys Gly Phe  
 675 680 685

Ile Ala Glu Asp Gly Phe Thr Leu Ile Ala Ala Asp Tyr Ser Gln Ile  
 690 695 700

Glu Leu Arg Leu Leu Ala His Ile Ala Asp Asp Pro Leu Met Gln Gln  
 705 710 715 720

[0038] Ala Phe Val Glu Gly Ala Asp Ile His Arg Arg Thr Ala Ala Gln Val  
 725 730 735

Leu Gly Leu Asp Glu Ala Thr Val Asp Ala Asn Gln Arg Arg Ala Ala  
 740 745 750

Lys Thr Val Asn Phe Gly Val Leu Tyr Gly Met Ser Ala His Arg Leu  
 755 760 765

Ser Asn Asp Leu Gly Ile Pro Tyr Ala Glu Ala Ala Thr Phe Ile Glu  
 770 775 780

Ile Tyr Phe Ala Thr Tyr Pro Gly Ile Arg Arg Tyr Ile Asn His Thr  
 785 790 795 800

Leu Asp Phe Gly Arg Thr His Gly Tyr Val Glu Thr Leu Tyr Gly Arg  
 805 810 815

Arg Arg Tyr Val Pro Gly Leu Ser Ser Arg Asn Arg Val Gln Arg Glu  
 820 825 830

Ala Glu Glu Arg Leu Ala Tyr Asn Met Pro Ile Gln Gly Thr Ala Ala  
 835 840 845

Asp Ile Met Lys Leu Ala Met Val Gln Leu Asp Pro Gln Leu Asp Ala  
 850 855 860

Ile Gly Ala Arg Met Leu Leu Gln Val His Asp Glu Leu Leu Ile Glu  
 865 870 875 880

Ala Pro Leu Asp Lys Ala Glu Gln Val Ala Ala Leu Thr Lys Lys Val  
885 890 895

Met Glu Asn Val Val Gln Leu Lys Val Pro Leu Ala Val Glu Val Gly  
900 905 910

Thr Gly Pro Asn Trp Phe Asp Thr Lys  
915 920

<210> 33  
<211> 892  
<212> PRT  
<213> 非洲栖热腔菌

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(892)  
<223> 非洲栖热腔菌 DNA 聚合酶 (Taf)

<400> 33

Met Gly Lys Met Phe Leu Phe Asp Gly Thr Gly Leu Val Tyr Arg Ala  
1 5 10 15

Phe Tyr Ala Ile Asp Gln Ser Leu Gln Thr Ser Ser Gly Leu His Thr  
20 25 30

Asn Ala Val Tyr Gly Leu Thr Lys Met Leu Ile Lys Phe Leu Lys Glu  
35 40 45

[0039] His Ile Ser Ile Gly Lys Asp Ala Cys Val Phe Val Leu Asp Ser Lys  
50 55 60

Gly Gly Ser Lys Lys Arg Lys Asp Ile Leu Glu Thr Tyr Lys Ala Asn  
65 70 75 80

Arg Pro Ser Thr Pro Asp Leu Leu Leu Glu Gln Ile Pro Tyr Val Glu  
85 90 95

Glu Leu Val Asp Ala Leu Gly Ile Lys Val Leu Lys Ile Glu Gly Phe  
100 105 110

Glu Ala Asp Asp Ile Ile Ala Thr Leu Ser Lys Lys Phe Glu Ser Asp  
115 120 125

Phe Glu Lys Val Asn Ile Ile Thr Gly Asp Lys Asp Leu Leu Gln Leu  
130 135 140

Val Ser Asp Lys Val Phe Val Trp Arg Val Glu Arg Gly Ile Thr Asp  
145 150 155 160

Leu Val Leu Tyr Asp Arg Asn Lys Val Ile Glu Lys Tyr Gly Ile Tyr  
165 170 175

Pro Glu Gln Phe Lys Asp Tyr Leu Ser Leu Val Gly Asp Gln Ile Asp  
180 185 190

Asn Ile Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Lys Lys Thr Ala Val Ser Leu  
195 200 205

Leu Lys Lys Tyr Asn Ser Leu Glu Asn Val Leu Lys Asn Ile Asn Leu  
 210 215 220

Leu Thr Glu Lys Leu Arg Arg Leu Leu Glu Asp Ser Lys Glu Asp Leu  
 225 230 235 240

Gln Lys Ser Ile Glu Leu Val Glu Leu Ile Tyr Asp Val Pro Met Asp  
 245 250 255

Val Glu Lys Asp Glu Ile Ile Tyr Arg Gly Tyr Asn Pro Asp Lys Leu  
 260 265 270

Leu Lys Val Leu Lys Lys Tyr Glu Phe Ser Ser Ile Ile Lys Glu Leu  
 275 280 285

Asn Leu Gln Glu Lys Leu Glu Lys Glu Tyr Ile Leu Val Asp Asn Glu  
 290 295 300

Asp Lys Leu Lys Lys Leu Ala Glu Glu Ile Glu Lys Tyr Lys Thr Phe  
 305 310 315 320

Ser Ile Asp Thr Glu Thr Thr Ser Leu Asp Pro Phe Glu Ala Lys Leu  
 325 330 335

Val Gly Ile Ser Ile Ser Thr Met Glu Gly Lys Ala Tyr Tyr Ile Pro  
 340 345 350

[0040] Val Ser His Phe Gly Ala Lys Asn Ile Ser Lys Ser Leu Ile Asp Lys  
 355 360 365

Phe Leu Lys Gln Ile Leu Gln Glu Lys Asp Tyr Asn Ile Val Gly Gln  
 370 375 380

Asn Leu Lys Phe Asp Tyr Glu Ile Phe Lys Ser Met Gly Phe Ser Pro  
 385 390 395 400

Asn Val Pro His Phe Asp Thr Met Ile Ala Ala Tyr Leu Leu Asn Pro  
 405 410 415

Asp Glu Lys Arg Phe Asn Leu Glu Glu Leu Ser Leu Lys Tyr Leu Gly  
 420 425 430

Tyr Lys Met Ile Ser Phe Asp Glu Leu Val Asn Glu Asn Val Pro Leu  
 435 440 445

Phe Gly Asn Asp Phe Ser Tyr Val Pro Leu Glu Arg Ala Val Glu Tyr  
 450 455 460

Ser Cys Glu Asp Ala Asp Val Thr Tyr Arg Ile Phe Arg Lys Leu Gly  
 465 470 475 480

Arg Lys Ile Tyr Glu Asn Glu Met Glu Lys Leu Phe Tyr Glu Ile Glu  
 485 490 495

Met Pro Leu Ile Asp Val Leu Ser Glu Met Glu Leu Asn Gly Val Tyr  
 500 505 510

Phe Asp Glu Glu Tyr Leu Lys Glu Leu Ser Lys Lys Tyr Gln Glu Lys  
 515 520 525

Met Asp Gly Ile Lys Glu Lys Val Phe Glu Ile Ala Gly Glu Thr Phe  
 530 535 540

Asn Leu Asn Ser Ser Thr Gln Val Ala Tyr Ile Leu Phe Glu Lys Leu  
 545 550 555 560

Asn Ile Ala Pro Tyr Lys Lys Thr Ala Thr Gly Lys Phe Ser Thr Asn  
 565 570 575

Ala Glu Val Leu Glu Glu Leu Ser Lys Glu His Glu Ile Ala Lys Leu  
 580 585 590

Leu Leu Glu Tyr Arg Lys Tyr Gln Lys Leu Lys Ser Thr Tyr Ile Asp  
 595 600 605

Ser Ile Pro Leu Ser Ile Asn Arg Lys Thr Asn Arg Val His Thr Thr  
 610 615 620

Phe His Gln Thr Gly Thr Ser Thr Gly Arg Leu Ser Ser Ser Asn Pro  
 625 630 635 640

Asn Leu Gln Asn Leu Pro Thr Arg Ser Glu Glu Gly Lys Glu Ile Arg  
 645 650 655

[0041] Lys Ala Val Arg Pro Gln Arg Gln Asp Trp Trp Ile Leu Gly Ala Asp  
 660 665 670

Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Val Ser Lys Asp Glu  
 675 680 685

Asn Leu Leu Lys Ala Phe Lys Glu Asp Leu Asp Ile His Thr Ile Thr  
 690 695 700

Ala Ala Lys Ile Phe Gly Val Ser Glu Met Phe Val Ser Glu Gln Met  
 705 710 715 720

Arg Arg Val Gly Lys Met Val Asn Phe Ala Ile Ile Tyr Gly Val Ser  
 725 730 735

Pro Tyr Gly Leu Ser Lys Arg Ile Gly Leu Ser Val Ser Glu Thr Lys  
 740 745 750

Lys Ile Ile Asp Asn Tyr Phe Arg Tyr Tyr Lys Gly Val Phe Glu Tyr  
 755 760 765

Leu Lys Arg Met Lys Asp Glu Ala Arg Lys Lys Gly Tyr Val Thr Thr  
 770 775 780

Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Ile Pro Gln Leu Arg Ser Lys Asn Gly  
 785 790 795 800

Asn Arg Val Gln Glu Gly Glu Arg Ile Ala Val Asn Thr Pro Ile Gln  
 805 810 815

Gly Thr Ala Ala Asp Ile Ile Lys Ile Ala Met Ile Asn Ile His Asn  
 820 825 830

Arg Leu Lys Lys Glu Asn Leu Arg Ser Lys Met Ile Leu Gln Val His  
 835 840 845

Asp Glu Leu Val Phe Glu Val Pro Asp Asn Glu Leu Glu Ile Val Lys  
 850 855 860

Asp Leu Val Arg Asp Glu Met Glu Asn Ala Val Lys Leu Asp Val Pro  
 865 870 875 880

Leu Lys Val Asp Val Tyr Tyr Gly Lys Glu Trp Glu  
 885 890

<210> 34  
 <211> 893  
 <212> PRT  
 <213> 海栖热袍菌

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(893)  
 <223> 海栖热袍菌 DNA 聚合酶 (Tma)

<400> 34

Met Ala Arg Leu Phe Leu Phe Asp Gly Thr Ala Leu Ala Tyr Arg Ala  
 1 5 10 15

[0042]

Tyr Tyr Ala Leu Asp Arg Ser Leu Ser Thr Ser Thr Gly Ile Pro Thr  
 20 25 30

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

His Ile Ile Val Gly Lys Asp Tyr Val Ala Val Ala Phe Asp Lys Lys  
 50 55 60

Ala Ala Thr Phe Arg His Lys Leu Leu Glu Thr Tyr Lys Ala Gln Arg  
 65 70 75 80

Pro Lys Thr Pro Asp Leu Leu Ile Gln Gln Leu Pro Tyr Ile Lys Lys  
 85 90 95

Leu Val Glu Ala Leu Gly Met Lys Val Leu Glu Val Glu Gly Tyr Glu  
 100 105 110

Ala Asp Asp Ile Ile Ala Thr Leu Ala Val Lys Gly Leu Pro Leu Phe  
 115 120 125

Asp Glu Ile Phe Ile Val Thr Gly Asp Lys Asp Met Leu Gln Leu Val  
 130 135 140

Asn Glu Lys Ile Lys Val Trp Arg Ile Val Lys Gly Ile Ser Asp Leu  
 145 150 155 160

Glu Leu Tyr Asp Ala Gln Lys Val Lys Glu Lys Tyr Gly Val Glu Pro  
 165 170 175

Gln Gln Ile Pro Asp Leu Leu Ala Leu Thr Gly Asp Glu Ile Asp Asn  
 180 185 190

Ile Pro Gly Val Thr Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Val Gln Leu Leu  
 195 200 205

Glu Lys Tyr Lys Asp Leu Glu Asp Ile Leu Asn His Val Arg Glu Leu  
 210 215 220

Pro Gln Lys Val Arg Lys Ala Leu Leu Arg Asp Arg Glu Asn Ala Ile  
 225 230 235 240

Leu Ser Lys Lys Leu Ala Ile Leu Glu Thr Asn Val Pro Ile Glu Ile  
 245 250 255

Asn Trp Glu Glu Leu Arg Tyr Gln Gly Tyr Asp Arg Glu Lys Leu Leu  
 260 265 270

Pro Leu Leu Lys Glu Leu Glu Phe Ala Ser Ile Met Lys Glu Leu Gln  
 275 280 285

Leu Tyr Glu Glu Ser Glu Pro Val Gly Tyr Arg Ile Val Lys Asp Leu  
 290 295 300

Val Glu Phe Glu Lys Leu Ile Glu Lys Leu Arg Glu Ser Pro Ser Phe  
 305 310 315 320

[0043] Ala Ile Asp Leu Glu Thr Ser Ser Leu Asp Pro Phe Asp Cys Asp Ile  
 325 330 335

Val Gly Ile Ser Val Ser Phe Lys Pro Lys Glu Ala Tyr Tyr Ile Pro  
 340 345 350

Leu His His Arg Asn Ala Gln Asn Leu Asp Glu Lys Glu Val Leu Lys  
 355 360 365

Lys Leu Lys Glu Ile Leu Glu Asp Pro Gly Ala Lys Ile Val Gly Gln  
 370 375 380

Asn Leu Lys Phe Asp Tyr Lys Val Leu Met Val Lys Gly Val Glu Pro  
 385 390 395 400

Val Pro Pro Tyr Phe Asp Thr Met Ile Ala Ala Tyr Leu Leu Glu Pro  
 405 410 415

Asn Glu Lys Lys Phe Asn Leu Asp Asp Leu Ala Leu Lys Phe Leu Gly  
 420 425 430

Tyr Lys Met Thr Ser Tyr Gln Glu Leu Met Ser Phe Ser Phe Pro Leu  
 435 440 445

Phe Gly Phe Ser Phe Ala Asp Val Pro Val Glu Lys Ala Ala Asn Tyr  
 450 455 460

Ser Cys Glu Asp Ala Asp Ile Thr Tyr Arg Leu Tyr Lys Thr Leu Ser  
 465 470 475 480

Leu Lys Leu His Glu Ala Asp Leu Glu Asn Val Phe Tyr Lys Ile Glu  
 485 490 495

Met Pro Leu Val Asn Val Leu Ala Arg Met Glu Leu Asn Gly Val Tyr  
 500 505 510

Val Asp Thr Glu Phe Leu Lys Lys Leu Ser Glu Glu Tyr Gly Lys Lys  
 515 520 525

Leu Glu Glu Leu Ala Glu Glu Ile Tyr Arg Ile Ala Gly Glu Pro Phe  
 530 535 540

Asn Ile Asn Ser Pro Lys Gln Val Ser Arg Ile Leu Phe Glu Lys Leu  
 545 550 555 560

Gly Ile Lys Pro Arg Gly Lys Thr Thr Lys Thr Gly Asp Tyr Ser Thr  
 565 570 575

Arg Ile Glu Val Leu Glu Glu Leu Ala Gly Glu His Glu Ile Ile Pro  
 580 585 590

Leu Ile Leu Glu Tyr Arg Lys Ile Gln Lys Leu Lys Ser Thr Tyr Ile  
 595 600 605

Asp Ala Leu Pro Lys Met Val Asn Pro Lys Thr Gly Arg Ile His Ala  
 610 615 620

[0044] Ser Phe Asn Gln Thr Gly Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser Ser Asp  
 625 630 635 640

Pro Asn Leu Gln Asn Leu Pro Thr Lys Ser Glu Glu Gly Lys Glu Ile  
 645 650 655

Arg Lys Ala Ile Val Pro Gln Asp Pro Asn Trp Trp Ile Val Ser Ala  
 660 665 670

Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Ile Leu Ala His Leu Ser Gly Asp  
 675 680 685

Glu Asn Leu Leu Arg Ala Phe Glu Glu Gly Ile Asp Val His Thr Leu  
 690 695 700

Thr Ala Ser Arg Ile Phe Asn Val Lys Pro Glu Glu Val Thr Glu Glu  
 705 710 715 720

Met Arg Arg Ala Gly Lys Met Val Asn Phe Ser Ile Ile Tyr Gly Val  
 725 730 735

Thr Pro Tyr Gly Leu Ser Val Arg Leu Gly Val Pro Val Lys Glu Ala  
 740 745 750

Glu Lys Met Ile Val Asn Tyr Phe Val Leu Tyr Pro Lys Val Arg Asp  
 755 760 765

Tyr Ile Gln Arg Val Val Ser Glu Ala Lys Glu Lys Gly Tyr Val Arg  
 770 775 780

Thr Leu Phe Gly Arg Lys Arg Asp Ile Pro Gln Leu Met Ala Arg Asp  
 785 790 795 800  
 Arg Asn Thr Gln Ala Glu Gly Glu Arg Ile Ala Ile Asn Thr Pro Ile  
 805 810 815  
 Gln Gly Thr Ala Ala Asp Ile Ile Lys Leu Ala Met Ile Glu Ile Asp  
 820 825 830  
 Arg Glu Leu Lys Glu Arg Lys Met Arg Ser Lys Met Ile Ile Gln Val  
 835 840 845  
 His Asp Glu Leu Val Phe Glu Val Pro Asn Glu Glu Lys Asp Ala Leu  
 850 855 860  
 Val Glu Leu Val Lys Asp Arg Met Thr Asn Val Val Lys Leu Ser Val  
 865 870 875 880  
 Pro Leu Glu Val Asp Val Thr Ile Gly Lys Thr Trp Ser  
 885 890  
 <210> 35  
 <211> 893  
 <212> PRT  
 <213> 那不勒斯栖热袍菌  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(893)  
 <223> 那不勒斯栖热袍菌 DNA 聚合酶 (Tne)  
 <400> 35  
 Met Ala Arg Leu Phe Leu Phe Asp Gly Thr Ala Leu Ala Tyr Arg Ala  
 1 5 10 15  
 Tyr Tyr Ala Leu Asp Arg Ser Leu Ser Thr Ser Thr Gly Ile Pro Thr  
 20 25 30  
 Asn Ala Val Tyr Gly Val Ala Arg Met Leu Val Lys Phe Ile Lys Glu  
 35 40 45  
 His Ile Ile Pro Glu Lys Asp Tyr Ala Ala Val Ala Phe Asp Lys Lys  
 50 55 60  
 Ala Ala Thr Phe Arg His Lys Leu Leu Val Ser Asp Lys Ala Gln Arg  
 65 70 75 80  
 Pro Lys Thr Pro Ala Leu Leu Val Gln Gln Leu Pro Tyr Ile Lys Arg  
 85 90 95  
 Leu Ile Glu Ala Leu Gly Phe Lys Val Leu Glu Leu Glu Gly Tyr Glu  
 100 105 110  
 Ala Asp Asp Ile Ile Ala Thr Leu Ala Val Arg Ala Ala Arg Phe Leu  
 115 120 125  
 Met Arg Phe Ser Leu Ile Thr Gly Asp Lys Asp Met Leu Gln Leu Val

[0045]

130	135	140
Asn Glu Lys Ile Lys Val Trp Arg Ile Val Lys Gly Ile Ser Asp Leu 145 150 155 160		
Glu Leu Tyr Asp Ser Lys Lys Val Lys Glu Arg Tyr Gly Val Glu Pro 165 170 175		
His Gln Ile Pro Asp Leu Leu Ala Leu Thr Gly Asp Asp Ile Asp Asn 180 185 190		
Ile Pro Gly Val Thr Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Val Gln Leu Leu 195 200 205		
Gly Lys Tyr Arg Asn Leu Glu Tyr Ile Leu Glu His Ala Arg Glu Leu 210 215 220		
Pro Gln Arg Val Arg Lys Ala Leu Leu Arg Asp Arg Glu Val Ala Ile 225 230 235 240		
Leu Ser Lys Lys Leu Ala Thr Leu Val Thr Asn Ala Pro Val Glu Val 245 250 255		
Asp Trp Glu Glu Met Lys Tyr Arg Gly Tyr Asp Lys Arg Lys Leu Leu 260 265 270		
Pro Ile Leu Lys Glu Leu Glu Phe Ala Ser Ile Met Lys Glu Leu Gln 275 280 285		
[0046] Leu Tyr Glu Glu Ala Glu Pro Thr Gly Tyr Glu Ile Val Lys Asp His 290 295 300		
Lys Thr Phe Glu Asp Leu Ile Glu Lys Leu Lys Glu Val Pro Ser Phe 305 310 315 320		
Ala Leu Asp Leu Glu Thr Ser Ser Leu Asp Pro Phe Asn Cys Glu Ile 325 330 335		
Val Gly Ile Ser Val Ser Phe Lys Pro Lys Thr Ala Tyr Tyr Ile Pro 340 345 350		
Leu His His Arg Asn Ala His Asn Leu Asp Glu Thr Leu Val Leu Ser 355 360 365		
Lys Leu Lys Glu Ile Leu Glu Asp Pro Ser Ser Lys Ile Val Gly Gln 370 375 380		
Asn Leu Lys Tyr Asp Tyr Lys Val Leu Met Val Lys Gly Ile Ser Pro 385 390 395 400		
Val Tyr Pro His Phe Asp Thr Met Ile Ala Ala Tyr Leu Leu Glu Pro 405 410 415		
Asn Glu Lys Lys Phe Asn Leu Glu Asp Leu Ser Leu Lys Phe Leu Gly 420 425 430		
Tyr Lys Met Thr Ser Tyr Gln Glu Leu Met Ser Phe Ser Ser Pro Leu		

435	440	445
Phe Gly Phe Ser Phe Ala Asp Val Pro Val Asp Lys Ala Ala Glu Tyr 450	455	460
Ser Cys Glu Asp Ala Asp Ile Thr Tyr Arg Leu Tyr Lys Ile Leu Ser 465	470	475
Met Lys Leu His Glu Ala Glu Leu Glu Asn Val Phe Tyr Arg Ile Glu 485	490	495
Met Pro Leu Val Asn Val Leu Ala Arg Met Glu Phe Asn Trp Val Tyr 500	505	510
Val Asp Thr Glu Phe Leu Lys Lys Leu Ser Glu Glu Tyr Gly Lys Lys 515	520	525
Leu Glu Glu Leu Ala Glu Lys Ile Tyr Gln Ile Ala Gly Glu Pro Phe 530	535	540
Asn Ile Asn Ser Pro Lys Gln Val Ser Asn Ile Leu Phe Glu Lys Leu 545	550	555
Gly Ile Lys Pro Arg Gly Lys Thr Thr Lys Thr Gly Asp Tyr Ser Thr 565	570	575
Arg Ile Glu Val Leu Glu Glu Ile Ala Asn Glu His Glu Ile Val Pro 580	585	590
Leu Ile Leu Glu Phe Arg Lys Ile Leu Lys Leu Lys Ser Thr Tyr Ile 595	600	605
Asp Thr Leu Pro Lys Leu Val Asn Pro Lys Thr Gly Arg Phe His Ala 610	615	620
Ser Phe His Gln Thr Gly Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser Ser Asp 625	630	635
Pro Asn Leu Gln Asn Leu Pro Thr Lys Ser Glu Glu Gly Lys Glu Ile 645	650	655
Arg Lys Ala Ile Val Pro Gln Asp Pro Asp Trp Trp Ile Val Ser Ala 660	665	670
Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Ile Leu Ala His Leu Ser Gly Asp 675	680	685
Glu Asn Leu Val Lys Ala Phe Glu Glu Gly Ile Asp Val His Thr Leu 690	695	700
Thr Ala Ser Arg Ile Tyr Asn Val Lys Pro Glu Glu Val Asn Glu Glu 705	710	715
Met Arg Arg Val Gly Lys Met Val Asn Phe Ser Ile Ile Tyr Gly Val 725	730	735
Thr Pro Tyr Gly Leu Ser Val Arg Leu Gly Ile Pro Val Lys Glu Ala		

[0047]

```

                740                745                750
Glu Lys Met Ile Ile Ser Tyr Phe Thr Leu Tyr Pro Lys Val Arg Ser
      755                760                765

Tyr Ile Gln Gln Val Val Ala Glu Ala Lys Glu Lys Gly Tyr Val Arg
      770                775                780

Thr Leu Phe Gly Arg Lys Arg Asp Ile Pro Gln Leu Met Ala Arg Asp
785                790                795                800

Lys Asn Thr Gln Ser Glu Gly Glu Arg Ile Ala Ile Asn Thr Pro Ile
      805                810                815

Gln Gly Thr Ala Ala Asp Ile Ile Lys Leu Ala Met Ile Asp Ile Asp
      820                825                830

Glu Glu Leu Arg Lys Arg Asn Met Lys Ser Arg Met Ile Ile Gln Val
      835                840                845

His Asp Glu Leu Val Phe Glu Val Pro Asp Glu Glu Lys Glu Glu Leu
      850                855                860

Val Asp Leu Val Lys Asn Lys Met Thr Asn Val Val Lys Leu Ser Val
865                870                875                880

Pro Leu Glu Val Asp Ile Ser Ile Gly Lys Ser Trp Ser
      885                890

[0048]

<210> 36
<211> 876
<212> PRT
<213> 嗜热脂肪芽孢杆菌

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(876)
<223> 嗜热脂肪芽孢杆菌 DNA 聚合酶 (Bst)

<400> 36

Met Lys Asn Lys Leu Val Leu Ile Asp Gly Asn Ser Val Ala Tyr Arg
1                5                10                15

Ala Phe Phe Ala Leu Pro Leu Leu His Asn Asp Lys Gly Ile His Thr
20                25                30

Asn Ala Val Tyr Gly Phe Thr Met Met Leu Asn Lys Ile Leu Ala Glu
35                40                45

Glu Gln Pro Thr His Ile Leu Val Ala Phe Asp Ala Gly Lys Thr Thr
50                55                60

Phe Arg His Glu Thr Phe Gln Asp Tyr Lys Gly Gly Arg Gln Gln Thr
65                70                75                80

Pro Pro Glu Leu Ser Glu Gln Phe Pro Leu Leu Arg Glu Leu Leu Lys
85                90                95

```

Ala Tyr Arg Ile Pro Ala Tyr Glu Leu Asp His Tyr Glu Ala Asp Asp  
100 105 110

Ile Ile Gly Thr Met Ala Ala Arg Ala Glu Arg Glu Gly Phe Ala Val  
115 120 125

Lys Val Ile Ser Gly Asp Arg Asp Leu Thr Gln Leu Ala Ser Pro Gln  
130 135 140

Val Thr Val Glu Ile Thr Lys Lys Gly Ile Thr Asp Ile Glu Ser Tyr  
145 150 155 160

Thr Pro Glu Thr Val Val Glu Lys Tyr Gly Leu Thr Pro Glu Gln Ile  
165 170 175

Val Asp Leu Lys Gly Leu Met Gly Asp Lys Ser Asp Asn Ile Pro Gly  
180 185 190

Val Pro Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Val Lys Leu Leu Lys Gln Phe  
195 200 205

Gly Thr Val Glu Asn Val Leu Ala Ser Ile Asp Glu Ile Lys Gly Glu  
210 215 220

Lys Leu Lys Glu Asn Leu Arg Gln Tyr Arg Asp Leu Ala Leu Leu Ser  
225 230 235 240

[0049] Lys Gln Leu Ala Ala Ile Cys Arg Asp Ala Pro Val Glu Leu Thr Leu  
245 250 255

Asp Asp Ile Val Tyr Lys Gly Glu Asp Arg Glu Lys Val Val Ala Leu  
260 265 270

Phe Gln Glu Leu Gly Phe Gln Ser Phe Leu Asp Lys Met Ala Val Gln  
275 280 285

Thr Asp Glu Gly Glu Lys Pro Leu Ala Gly Met Asp Phe Ala Ile Ala  
290 295 300

Asp Ser Val Thr Asp Glu Met Leu Ala Asp Lys Ala Ala Leu Val Val  
305 310 315 320

Glu Val Val Gly Asp Asn Tyr His His Ala Pro Ile Val Gly Ile Ala  
325 330 335

Leu Ala Asn Glu Arg Gly Arg Phe Phe Leu Arg Pro Glu Thr Ala Leu  
340 345 350

Ala Asp Pro Lys Phe Leu Ala Trp Leu Gly Asp Glu Thr Lys Lys Lys  
355 360 365

Thr Met Phe Asp Ser Lys Arg Ala Ala Val Ala Leu Lys Trp Lys Gly  
370 375 380

Ile Glu Leu Arg Gly Val Val Phe Asp Leu Leu Leu Ala Ala Tyr Leu  
385 390 395 400

Leu Asp Pro Ala Gln Ala Ala Gly Asp Val Ala Ala Val Ala Lys Met  
 405 410 415  
 His Gln Tyr Glu Ala Val Arg Ser Asp Glu Ala Val Tyr Gly Lys Gly  
 420 425 430  
 Ala Lys Arg Thr Val Pro Asp Glu Pro Thr Leu Ala Glu His Leu Ala  
 435 440 445  
 Arg Lys Ala Ala Ala Ile Trp Ala Leu Glu Glu Pro Leu Met Asp Glu  
 450 455 460  
 Leu Arg Arg Asn Glu Gln Asp Arg Leu Leu Thr Glu Leu Glu Gln Pro  
 465 470 475 480  
 Leu Ala Gly Ile Leu Ala Asn Met Glu Phe Thr Gly Val Lys Val Asp  
 485 490 495  
 Thr Lys Arg Leu Glu Gln Met Gly Ala Glu Leu Thr Glu Gln Leu Gln  
 500 505 510  
 Ala Val Glu Arg Arg Ile Tyr Glu Leu Ala Gly Gln Glu Phe Asn Ile  
 515 520 525  
 Asn Ser Pro Lys Gln Leu Gly Thr Val Leu Phe Asp Lys Leu Gln Leu  
 530 535 540  
 [0050] Pro Val Leu Lys Lys Thr Lys Thr Gly Tyr Ser Thr Ser Ala Asp Val  
 545 550 555 560  
 Leu Glu Lys Leu Ala Pro His His Glu Ile Val Glu His Ile Leu His  
 565 570 575  
 Tyr Arg Gln Leu Gly Lys Leu Gln Ser Thr Tyr Ile Glu Gly Leu Leu  
 580 585 590  
 Lys Val Val His Pro Val Thr Gly Lys Val His Thr Met Phe Asn Gln  
 595 600 605  
 Ala Leu Thr Gln Thr Gly Arg Leu Ser Ser Val Glu Pro Asn Leu Gln  
 610 615 620  
 Asn Ile Pro Ile Arg Leu Glu Glu Gly Arg Lys Ile Arg Gln Ala Phe  
 625 630 635 640  
 Val Pro Ser Glu Pro Asp Trp Leu Ile Phe Ala Ala Asp Tyr Ser Gln  
 645 650 655  
 Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Ile Ala Glu Asp Asp Asn Leu Ile  
 660 665 670  
 Glu Ala Phe Arg Arg Gly Leu Asp Ile His Thr Lys Thr Ala Met Asp  
 675 680 685  
 Ile Phe His Val Ser Glu Glu Asp Val Thr Ala Asn Met Arg Arg Gln  
 690 695 700

Ala Lys Ala Val Asn Phe Gly Ile Val Tyr Gly Ile Ser Asp Tyr Gly  
705 710 715 720

Leu Ala Gln Asn Leu Asn Ile Thr Arg Lys Glu Ala Ala Glu Phe Ile  
725 730 735

Glu Arg Tyr Phe Ala Ser Phe Pro Gly Val Lys Gln Tyr Met Asp Asn  
740 745 750

Ile Val Gln Glu Ala Lys Gln Lys Gly Tyr Val Thr Thr Leu Leu His  
755 760 765

Arg Arg Arg Tyr Leu Pro Asp Ile Thr Ser Arg Asn Phe Asn Val Arg  
770 775 780

Ser Phe Ala Glu Arg Thr Ala Met Asn Thr Pro Ile Gln Gly Ser Ala  
785 790 795 800

Ala Asp Ile Ile Lys Lys Ala Met Ile Asp Leu Ser Val Arg Leu Arg  
805 810 815

Glu Glu Arg Leu Gln Ala Arg Leu Leu Leu Gln Val His Asp Glu Leu  
820 825 830

Ile Leu Glu Ala Pro Lys Glu Glu Ile Glu Arg Leu Cys Arg Leu Val  
835 840 845

[0051] Pro Glu Val Met Glu Gln Ala Val Ala Leu Arg Val Pro Leu Lys Val  
850 855 860

Asp Tyr His Tyr Gly Pro Thr Trp Tyr Asp Ala Lys  
865 870 875

<210> 37  
 <211> 877  
 <212> PRT  
 <213> 热坚芽孢杆菌

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(877)  
 <223> 热坚芽孢杆菌 DNA 聚合酶 (Bca)

<400> 37

Met Lys Lys Lys Leu Val Leu Ile Asp Gly Ser Ser Val Ala Tyr Arg  
1 5 10 15

Ala Phe Phe Ala Leu Pro Leu Leu His Asn Asp Lys Gly Ile His Thr  
20 25 30

Asn Ala Val Tyr Gly Phe Thr Met Met Leu Asn Lys Ile Leu Ala Glu  
35 40 45

Glu Glu Pro Thr His Met Leu Val Ala Phe Asp Ala Gly Lys Thr Thr  
50 55 60

Phe Arg His Glu Ala Phe Gln Glu Tyr Lys Gly Gly Arg Gln Gln Thr  
65 70 75 80

Pro Pro Glu Leu Ser Glu Gln Phe Pro Leu Leu Arg Glu Leu Leu Arg  
 85 90 95

Ala Tyr Arg Ile Pro Ala Tyr Glu Leu Glu Asn Tyr Glu Ala Asp Asp  
 100 105 110

Ile Ile Gly Thr Leu Ala Ala Arg Ala Glu Gln Glu Gly Phe Glu Val  
 115 120 125

Lys Val Ile Ser Gly Asp Arg Asp Leu Thr Gln Leu Ala Ser Pro His  
 130 135 140

Val Thr Val Asp Ile Thr Lys Lys Gly Ile Thr Asp Ile Glu Pro Tyr  
 145 150 155 160

Thr Pro Glu Ala Val Arg Glu Lys Tyr Gly Leu Thr Pro Glu Gln Ile  
 165 170 175

Val Asp Leu Lys Gly Leu Met Gly Asp Lys Ser Asp Asn Ile Pro Gly  
 180 185 190

Val Pro Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Val Lys Leu Leu Arg Gln Phe  
 195 200 205

Gly Thr Val Glu Asn Val Leu Ala Ser Ile Asp Glu Ile Lys Gly Glu  
 210 215 220

[0052] Lys Leu Lys Glu Thr Leu Arg Gln His Arg Glu Met Ala Leu Leu Ser  
 225 230 235 240

Lys Lys Leu Ala Ala Ile Arg Arg Asp Ala Pro Val Glu Leu Ser Leu  
 245 250 255

Asp Asp Ile Ala Tyr Gln Gly Glu Asp Arg Glu Lys Val Val Ala Leu  
 260 265 270

Phe Lys Glu Leu Gly Phe Gln Ser Phe Leu Glu Lys Met Glu Ser Pro  
 275 280 285

Ser Ser Glu Glu Glu Lys Pro Leu Ala Lys Met Ala Phe Thr Leu Ala  
 290 295 300

Asp Arg Val Thr Glu Glu Met Leu Ala Asp Lys Ala Ala Leu Val Val  
 305 310 315 320

Glu Val Val Glu Glu Asn Tyr His Asp Ala Pro Ile Val Gly Ile Ala  
 325 330 335

Val Val Asn Glu His Gly Arg Phe Phe Leu Arg Pro Glu Thr Ala Leu  
 340 345 350

Ala Asp Pro Gln Phe Val Ala Trp Leu Gly Asp Glu Thr Lys Lys Lys  
 355 360 365

Ser Met Phe Asp Ser Lys Arg Ala Ala Val Ala Leu Lys Trp Lys Gly  
 370 375 380

Ile Glu Leu Cys Gly Val Ser Phe Asp Leu Leu Leu Ala Ala Tyr Leu  
 385 390 395 400

Leu Asp Pro Ala Gln Gly Val Asp Asp Val Ala Ala Ala Ala Lys Met  
 405 410 415

Lys Gln Tyr Glu Ala Val Arg Pro Asp Glu Ala Val Tyr Gly Lys Gly  
 420 425 430

Ala Lys Arg Ala Val Pro Asp Glu Pro Val Leu Ala Glu His Leu Val  
 435 440 445

Arg Lys Ala Ala Ala Ile Trp Ala Leu Glu Arg Pro Phe Leu Asp Glu  
 450 455 460

Leu Arg Arg Asn Glu Gln Asp Arg Leu Leu Val Glu Leu Glu Gln Pro  
 465 470 475 480

Leu Ser Ser Ile Leu Ala Glu Met Glu Phe Ala Gly Val Lys Val Asp  
 485 490 495

Thr Lys Arg Leu Glu Gln Met Gly Glu Glu Leu Ala Glu Gln Leu Arg  
 500 505 510

Thr Val Glu Gln Arg Ile Tyr Glu Leu Ala Gly Gln Glu Phe Asn Ile  
 515 520 525

[0053] Asn Ser Pro Lys Gln Leu Gly Val Ile Leu Phe Glu Lys Leu Gln Leu  
 530 535 540

Pro Val Leu Lys Lys Ser Lys Thr Gly Tyr Ser Thr Ser Ala Asp Val  
 545 550 555 560

Leu Glu Lys Leu Ala Pro Tyr His Glu Ile Val Glu Asn Ile Leu Gln  
 565 570 575

His Tyr Arg Gln Leu Gly Lys Leu Gln Ser Thr Tyr Ile Glu Gly Leu  
 580 585 590

Leu Lys Val Val Arg Pro Asp Thr Lys Lys Val His Thr Ile Phe Asn  
 595 600 605

Gln Ala Leu Thr Gln Thr Gly Arg Leu Ser Ser Thr Glu Pro Asn Leu  
 610 615 620

Gln Asn Ile Pro Ile Arg Leu Glu Glu Gly Arg Lys Ile Arg Gln Ala  
 625 630 635 640

Phe Val Pro Ser Glu Ser Asp Trp Leu Ile Phe Ala Ala Asp Tyr Ser  
 645 650 655

Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Ile Ala Glu Asp Asp Asn Leu  
 660 665 670

Met Glu Ala Phe Arg Arg Asp Leu Asp Ile His Thr Lys Thr Ala Met  
 675 680 685

Asp Ile Phe Gln Val Ser Glu Asp Glu Val Thr Pro Asn Met Arg Arg  
 690 695 700

Gln Ala Lys Ala Val Asn Phe Gly Ile Val Tyr Gly Ile Ser Asp Tyr  
 705 710 715 720

Gly Leu Ala Gln Asn Leu Asn Ile Ser Arg Lys Glu Ala Ala Glu Phe  
 725 730 735

Ile Glu Arg Tyr Phe Glu Ser Phe Pro Gly Val Lys Arg Tyr Met Glu  
 740 745 750

Asn Ile Val Gln Glu Ala Lys Gln Lys Gly Tyr Val Thr Thr Leu Leu  
 755 760 765

His Arg Arg Arg Tyr Leu Pro Asp Ile Thr Ser Arg Asn Phe Asn Val  
 770 775 780

Arg Ser Phe Ala Glu Arg Met Ala Met Asn Thr Pro Ile Gln Gly Ser  
 785 790 795 800

Ala Ala Asp Ile Ile Lys Lys Ala Met Ile Asp Leu Asn Ala Arg Leu  
 805 810 815

Lys Glu Glu Arg Leu Gln Ala Arg Leu Leu Leu Gln Val His Asp Glu  
 820 825 830

[0054] Leu Ile Leu Glu Ala Pro Lys Glu Glu Met Glu Arg Leu Cys Arg Leu  
 835 840 845

Val Pro Glu Val Met Glu Gln Ala Val Thr Leu Arg Val Pro Leu Lys  
 850 855 860

Val Asp Tyr His Tyr Gly Ser Thr Trp Tyr Asp Ala Lys  
 865 870 875

<210> 38  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 对应于 Z05 的 D580X 突变的合成聚合酶基序

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Xaa = Ser 或 Thr

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Xaa = 除 Asp 或 Glu 以外的任何氨基酸

<400> 38

Thr Gly Arg Leu Ser Ser Xaa Xaa Pro Asn Leu Gln Asn  
 1 5 10

<210> 39  
 <211> 831

<212> PRT  
 <213> 生氢氧化碳嗜热菌  
  
 <220>  
 <221> MISC FEATURE  
 <222> (1)-(831)  
 <223> 生氢氧化碳嗜热菌 DNA 聚合酶 (Chy)  
  
 <400> 39  
 Met Gly Lys Val Val Leu Val Asp Gly Asn Ser Leu Leu His Arg Ala  
 1 5 10 15  
  
 Phe Phe Ala Leu Pro Pro Leu Lys Thr Thr Lys Gly Glu Pro Thr Gly  
 20 25 30  
  
 Ala Val Tyr Glu Phe Leu Thr Met Leu Phe Arg Val Ile Lys Asp Glu  
 35 40 45  
  
 Lys Pro Glu Tyr Leu Ala Val Ala Phe Asp Ile Ser Arg Lys Thr Phe  
 50 55 60  
  
 Arg Thr Glu Gln Phe Thr Ala Tyr Lys Gly His Arg Lys Glu Ala Pro  
 65 70 75 80  
  
 Asp Glu Leu Val Pro Gln Phe Ala Leu Val Arg Glu Val Leu Lys Val  
 85 90 95  
  
 Leu Asn Val Pro Tyr Ile Glu Leu Asp Gly Tyr Glu Ala Asp Asp Ile  
 100 105 110  
  
 Ile Gly His Leu Ser Arg Ala Phe Ala Gly Gln Gly His Glu Val Val  
 115 120 125  
  
 Ile Tyr Thr Ala Asp Arg Asp Met Leu Gln Leu Val Asp Glu Lys Thr  
 130 135 140  
  
 Val Val Tyr Leu Thr Lys Lys Gly Ile Thr Glu Leu Val Lys Met Asp  
 145 150 155 160  
  
 Leu Ala Ala Ile Leu Glu Asn Tyr Gly Leu Lys Pro Lys Gln Leu Val  
 165 170 175  
  
 Asp Val Lys Gly Leu Met Gly Asp Pro Ser Asp Asn Ile Pro Gly Val  
 180 185 190  
  
 Pro Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Leu Asp Leu Ile Lys Thr Tyr Gly  
 195 200 205  
  
 Ser Val Glu Glu Val Leu Ala Arg Lys Asp Glu Leu Lys Pro Lys Leu  
 210 215 220  
  
 Arg Glu Lys Leu Ala Glu His Glu Asn Leu Ala Lys Ile Ser Lys Gln  
 225 230 235 240  
  
 Leu Ala Thr Ile Leu Arg Glu Ile Pro Leu Glu Ile Ser Leu Glu Asp  
 245 250 255  
  
 Leu Lys Val Lys Glu Pro Asn Tyr Glu Glu Val Ala Lys Leu Phe Leu

[0055]

	260	265	270
	His Leu Glu Phe Lys Ser Phe 275	Leu Lys Glu Ile Glu 280	Pro Lys Ile Lys 285
	Lys Glu Tyr Gln Glu Gly Lys 290	Asp Leu Val Gln Val 295	Glu Thr Val Glu 300
	Thr Glu Gly Gln Ile Ala Val 305	Val Phe Ser Asp Gly Phe 310	Tyr Val Asp 315
	Asp Gly Glu Lys Thr Lys Phe 325	Tyr Ser Leu Asp Arg 330	Leu Asn Glu Ile 335
	Glu Glu Ile Phe Arg Asn Lys 340	Lys Lys Ile Ile Thr Asp 345	Asp Ala Lys Gly 350
	Ile Tyr His Val Cys Leu Glu 355	Lys Gly Leu Thr Phe 360	Pro Glu Val Cys 365
	Phe Asp Ala Arg Ile Ala Ala 370	Tyr Val Leu Asn Pro Ala 375	Asp Gln Asn 380
	Pro Gly Leu Lys Gly Leu Tyr 385	Leu Lys Tyr Asp Leu Pro 390	Val Tyr Glu 395
	Asp Val Ser Leu Asn Ile Arg 405	Gly Leu Phe Tyr Leu Lys 410	Lys Lys Glu Met 415
[0056]	Met Arg Lys Ile Phe Glu Gln 420	Glu Gln Glu Arg Leu Phe 425	Tyr Glu Ile 430
	Glu Leu Pro Leu Thr Pro Val 435	Leu Ala Gln Met Glu His 440	Thr Gly Ile 445
	Gln Val Asp Arg Glu Ala Leu 450	Lys Glu Met Ser Leu Glu 455	Leu Gly Glu 460
	Gln Ile Glu Glu Leu Ile Arg 465	Glu Ile Tyr Val Leu Ala 470	Gly Glu Glu 475
	Phe Asn Leu Asn Ser Pro Arg 485	Gln Leu Gly Val Ile Leu 490	Phe Glu Lys 495
	Leu Gly Leu Pro Val Ile Lys 500	Lys Lys Thr Lys Thr Gly 505	Tyr Ser Thr Asp 510
	Ala Glu Val Leu Glu Glu Leu 515	Leu Pro Phe His Glu Ile 520	Ile Gly Lys 525
	Ile Leu Asn Tyr Arg Gln Leu 530	Met Lys Leu Lys Ser Thr 535	Tyr Thr Asp 540
	Gly Leu Met Pro Leu Ile Asn 545	Glu Arg Thr Gly Lys Leu 550	His Thr Thr 555
	Phe Asn Gln Thr Gly Thr Leu 560	Thr Gly Arg Leu Ala Ser 565	Ser Glu Pro 570

	565	570	575
	Asn Leu Gln Asn Ile Pro Ile Arg Leu Glu Leu Gly Arg Lys Leu Arg 580	585	590
	Lys Met Phe Ile Pro Ser Pro Gly Tyr Asp Tyr Ile Val Ser Ala Asp 595	600	605
	Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Leu Leu Ala His Phe Ser Glu Glu Pro 610	615	620
	Lys Leu Ile Glu Ala Tyr Gln Lys Gly Glu Asp Ile His Arg Lys Thr 625	630	635
	Ala Ser Glu Val Phe Gly Val Ser Leu Glu Glu Val Thr Pro Glu Met 645	650	655
	Arg Ala His Ala Lys Ser Val Asn Phe Gly Ile Val Tyr Gly Ile Ser 660	665	670
	Asp Phe Gly Leu Gly Arg Asp Leu Lys Ile Pro Arg Glu Val Ala Gly 675	680	685
	Lys Tyr Ile Lys Asn Tyr Phe Ala Asn Tyr Pro Lys Val Arg Glu Tyr 690	695	700
	Leu Asp Glu Leu Val Arg Thr Ala Arg Glu Lys Gly Tyr Val Thr Thr 705	710	715
[0057]	Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Ile Pro Glu Leu Ser Ser Lys Asn Arg 725	730	735
	Thr Val Gln Gly Phe Gly Glu Arg Thr Ala Met Asn Thr Pro Leu Gln 740	745	750
	Gly Ser Ala Ala Asp Ile Ile Lys Leu Ala Met Ile Asn Val Glu Lys 755	760	765
	Glu Leu Lys Ala Arg Lys Leu Lys Ser Arg Leu Leu Leu Ser Val His 770	775	780
	Asp Glu Leu Val Leu Glu Val Pro Ala Glu Glu Leu Glu Glu Val Lys 785	790	795
	Ala Leu Val Lys Gly Val Met Glu Ser Val Val Glu Leu Lys Val Pro 805	810	815
	Leu Ile Ala Glu Val Gly Ala Gly Lys Asn Trp Tyr Glu Ala Lys 820	825	830
<210>	40		
<211>	834		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成 G42E C21 DNA 聚合酶		
<400>	40		

Met Lys Ala Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu  
 1 5 10 15  
 Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe Phe Ala Leu Lys Gly  
 20 25 30  
 Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Glu Phe Ala  
 35 40 45  
 Lys Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Tyr Lys Ala Val Phe  
 50 55 60  
 Val Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Glu  
 65 70 75 80  
 Ala Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln  
 85 90 95  
 Leu Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Phe Thr Arg Leu  
 100 105 110  
 Glu Val Pro Gly Phe Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Thr Leu Ala Lys  
 115 120 125  
 Lys Ala Glu Arg Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Arg  
 130 135 140  
 [0058] Asp Leu Tyr Gln Leu Val Ser Asp Arg Val Ala Val Leu His Pro Glu  
 145 150 155 160  
 Gly His Leu Ile Thr Pro Glu Trp Leu Trp Glu Lys Tyr Gly Leu Lys  
 165 170 175  
 Pro Glu Gln Trp Val Asp Phe Arg Ala Leu Val Gly Asp Pro Ser Asp  
 180 185 190  
 Asn Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Leu Lys Leu  
 195 200 205  
 Leu Lys Glu Trp Gly Ser Leu Glu Asn Ile Leu Lys Asn Leu Asp Arg  
 210 215 220  
 Val Lys Pro Glu Ser Val Arg Glu Arg Ile Lys Ala His Leu Glu Asp  
 225 230 235 240  
 Leu Lys Leu Ser Leu Glu Leu Ser Arg Val Arg Ser Asp Leu Pro Leu  
 245 250 255  
 Glu Val Asp Phe Ala Arg Arg Arg Glu Pro Asp Arg Glu Gly Leu Arg  
 260 265 270  
 Ala Phe Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly  
 275 280 285  
 Leu Leu Glu Ala Pro Ala Pro Leu Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro  
 290 295 300

Glu Gly Ala Phe Val Gly Phe Val Leu Ser Arg Pro Glu Pro Met Trp  
 305 310 315 320  
 Ala Glu Leu Lys Ala Leu Ala Ala Cys Lys Glu Gly Arg Val His Arg  
 325 330 335  
 Ala Lys Asp Pro Leu Ala Gly Leu Lys Asp Leu Lys Glu Val Arg Gly  
 340 345 350  
 Leu Leu Ala Lys Asp Leu Ala Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Leu Asp  
 355 360 365  
 Leu Ala Pro Ser Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro  
 370 375 380  
 Ser Asn Thr Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp  
 385 390 395 400  
 Thr Glu Asp Ala Ala His Arg Ala Leu Leu Ala Glu Arg Leu Gln Gln  
 405 410 415  
 Asn Leu Leu Glu Arg Leu Lys Gly Glu Glu Lys Leu Leu Trp Leu Tyr  
 420 425 430  
 Gln Glu Val Glu Lys Pro Leu Ser Arg Val Leu Ala His Met Glu Ala  
 435 440 445  
 [0059] Thr Gly Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Lys Ala Leu Ser Leu Glu  
 450 455 460  
 Leu Ala Glu Glu Ile Arg Arg Leu Glu Glu Glu Val Phe Arg Leu Ala  
 465 470 475 480  
 Gly His Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu  
 485 490 495  
 Phe Asp Glu Leu Arg Leu Pro Ala Leu Gly Lys Thr Gln Lys Thr Gly  
 500 505 510  
 Lys Arg Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His  
 515 520 525  
 Pro Ile Val Glu Lys Ile Leu Gln His Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys  
 530 535 540  
 Asn Thr Tyr Val Asp Pro Leu Pro Gly Leu Val His Pro Arg Thr Gly  
 545 550 555 560  
 Arg Leu His Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu  
 565 570 575  
 Ser Ser Ser Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Ile Arg Thr Pro Leu  
 580 585 590  
 Gly Gln Arg Ile Arg Arg Ala Phe Val Ala Glu Ala Gly Trp Ala Leu  
 595 600 605

Val Ala Leu Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu  
610 615 620

Ser Gly Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Lys Asp Ile  
625 630 635 640

His Thr Gln Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Ser Pro Glu Ala Val  
645 650 655

Asp Pro Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Val Asn Phe Gly Val Leu  
660 665 670

Tyr Gly Met Ser Ala His Arg Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ile Pro Tyr  
675 680 685

Glu Glu Ala Val Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe Pro Lys  
690 695 700

Val Arg Ala Trp Ile Glu Lys Thr Leu Glu Glu Gly Arg Lys Arg Gly  
705 710 715 720

Tyr Val Glu Thr Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Val Pro Asp Leu Asn  
725 730 735

Ala Arg Val Lys Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn  
740 745 750

[0060] Met Pro Val Gln Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val  
755 760 765

Lys Leu Phe Pro His Leu Arg Glu Met Gly Ala Arg Met Leu Leu Gln  
770 775 780

Val His Asp Glu Leu Leu Leu Glu Ala Pro Gln Ala Arg Ala Glu Glu  
785 790 795 800

Val Ala Ala Leu Ala Lys Glu Ala Met Glu Lys Ala Tyr Pro Leu Ala  
805 810 815

Val Pro Leu Glu Val Glu Val Gly Ile Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala  
820 825 830

Lys Gly

<210> 41

<211> 2505

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码 C21 聚合酶的合成核酸序列

<400> 41

atgaaagcta tgttaccatt attcgaacce aaaggccggg tctctctggt ggacggccac 60

cacctggcct accgcacctt cttcgccctg aagggectca ccacgagccg gggcgaaccg 120

gtgcaggcgg tttacggctt cgccaagagc ctctcaagg ccctgaagga ggacgggtac 180

aaggccgtct tcgtggtctt tgacgccaag gcccttccct tccgccacga ggcctacgag	240
gcctacaagg caggccgcgc cccgaccccc gaggaattcc cccggcagct cgcctcatc	300
aaggagctgg tggacctctt ggggtttact cgcctcgagg ttccgggctt tgaggcggac	360
gacgtectcg ccacctggc caagaaggcg gaaaggagg ggtacgaggt gcgcatectc	420
accgccgacc gggaccttta ccagctcgtc tccgaccgcg tcgccgtctt ccaccccag	480
ggccacctca tcaccccga gtggctttgg gagaaglac gccttaagcc ggagcagtg	540
gtggacttcc gcgcctctgt gggggacccc tccgacaacc tccccgggt caaggcatc	600
ggggagaaga cgcctcaa gctcctcaag gagggggaa gcctggaaaa tctcctcaag	660
aacctggacc gggigaagcc gaaaagcgtc cgggaaagga tcaaggcca cctggaagac	720
cttaagctct ccttggagct ttccccggtg cgtcggacc tccccctgga ggtggacttc	780
gcccggaggc gggagcctga ccgggaaggg cttcggcct ttttggagcg cttggagttc	840
ggcagctccc tccagagtt cggcctctc gaggeccccg cccccctgga ggaggcccc	900
tggccccgc cggaaggggc ctctgtgggc ttctctctt cccgccccga gcccatgtg	960
gcggagctta aagccctggc gcctgcaag gagggccggg tgcaccgggc aaaggacccc	1020
ttggcggggc taaaggacct caaggagtc cgaggcctc tcgccaagga cctcgcctt	1080
ttggcccttc gcgaggggct ggacctcgc ccttcggac acccatgct cctgcctac	1140
ctctggacc cctccaacac ccccccgag ggggtggccc ggcgctacgg gggggagtgg	1200
acggaggacg cgcgccacc ggccctctc gctgagcggc tcagcaaaa cctcttgaa	1260
cgctcaagg gagaggaaa gctcctttg cctaccaag aggtgaaaa gccctctcc	1320
cggtctctgg cccacatgga ggccaccggg gtaaggctgg acgtggccta tctaaagcc	1380
cttctctgg agcttgcgga ggagattgc cgcctcgagg aggagcttt ccgctggcg	1440
ggccacccct tcaacctgaa ctcccgtgac cagctagagc ggtgtcttt tgacgagctt	1500
aggcttcccc ccttgggcaa gacgcaaaag acggggaage gctccaccag cgcgcggtg	1560
ctggaggccc tcaggaggc ccacccatc gtggagaaga tctccagca ccgggagctc	1620
accaagctca agaacacct cgtagacccc ctccccggc tcgtccacc gaggacgggc	1680
cgctccaca cccgcttcaa ccagacagc acggccacgg gaaggtctc tagctccggg	1740
cccaacctgc agaacatccc catccgacc ccttgggccc agaggatccg ccggccttc	1800
gtggccgagg cgggatggc gttgtggcc ctggactata gccagatgga gctccgggtc	1860
ctgcccacc tctccgggga cgagaacctg atcagggtct tcaggaggg gaaggacatc	1920
cacaccaga ccgcaagctg gatgttcggc gctccccgg aggccgtgga ccccctgatg	1980
cgccgggccc ccaagacggt gaacttcggc gtctctacg geatgtccg ccataggtc	2040
tcccaggagc ttgcatccc ctacaggag gcggtggcct ttatagagcg ctacttcaa	2100
agcttcccc aggtgcgcgc ctgaaagaa aagaccctgg aggaggggag gaagcggggc	2160
tacttgaaa ccctcttcgg aagaaggcgc tactgtccc acctcaacgc ccgggtgaag	2220
agcgtcaggg aggccgcgga gcgcatggc ttcaacatgc ccgtccagg caccgcccc	2280
gacctcatga agctcgcct ggtgaagctc tccccacc tccgggagat gggggcccgc	2340
atgctctcc aggtccacga cgagctctc ctggaggccc cccaagcgc gcccgaggag	2400
gtggcggctt tgccaagga ggccatggag aagcctacc cctcgcctg gccctggag	2460

[0061]

gtggagggtgg ggatcgggga ggactggcctt tccgccaagg gctga 2505

<210> 42  
 <211> 834  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 具有 I709K 突变的合成 C21 聚合酶

<400> 42

Met Lys Ala Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu  
 1 5 10 15

Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe Phe Ala Leu Lys Gly  
 20 25 30

Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala  
 35 40 45

Lys Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Tyr Lys Ala Val Phe  
 50 55 60

Val Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Glu  
 65 70 75 80

Ala Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln  
 85 90 95

[0062] Leu Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Phe Thr Arg Leu  
 100 105 110

Glu Val Pro Gly Phe Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Thr Leu Ala Lys  
 115 120 125

Lys Ala Glu Arg Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Arg  
 130 135 140

Asp Leu Tyr Gln Leu Val Ser Asp Arg Val Ala Val Leu His Pro Glu  
 145 150 155 160

Gly His Leu Ile Thr Pro Glu Trp Leu Trp Glu Lys Tyr Gly Leu Lys  
 165 170 175

Pro Glu Gln Trp Val Asp Phe Arg Ala Leu Val Gly Asp Pro Ser Asp  
 180 185 190

Asn Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Leu Lys Leu  
 195 200 205

Leu Lys Glu Trp Gly Ser Leu Glu Asn Ile Leu Lys Asn Leu Asp Arg  
 210 215 220

Val Lys Pro Glu Ser Val Arg Glu Arg Ile Lys Ala His Leu Glu Asp  
 225 230 235 240

Leu Lys Leu Ser Leu Glu Leu Ser Arg Val Arg Ser Asp Leu Pro Leu  
 245 250 255

Glu Val Asp Phe Ala Arg Arg Arg Glu Pro Asp Arg Glu Gly Leu Arg  
 260 265 270

Ala Phe Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly  
 275 280 285

Leu Leu Glu Ala Pro Ala Pro Leu Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro  
 290 295 300

Glu Gly Ala Phe Val Gly Phe Val Leu Ser Arg Pro Glu Pro Met Trp  
 305 310 315 320

Ala Glu Leu Lys Ala Leu Ala Ala Cys Lys Glu Gly Arg Val His Arg  
 325 330 335

Ala Lys Asp Pro Leu Ala Gly Leu Lys Asp Leu Lys Glu Val Arg Gly  
 340 345 350

Leu Leu Ala Lys Asp Leu Ala Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Leu Asp  
 355 360 365

Leu Ala Pro Ser Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro  
 370 375 380

Ser Asn Thr Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp  
 385 390 395 400

[0063] Thr Glu Asp Ala Ala His Arg Ala Leu Leu Ala Glu Arg Leu Gln Gln  
 405 410 415

Asn Leu Leu Glu Arg Leu Lys Gly Glu Glu Lys Leu Leu Trp Leu Tyr  
 420 425 430

Gln Glu Val Glu Lys Pro Leu Ser Arg Val Leu Ala His Met Glu Ala  
 435 440 445

Thr Gly Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Lys Ala Leu Ser Leu Glu  
 450 455 460

Leu Ala Glu Glu Ile Arg Arg Leu Glu Glu Glu Val Phe Arg Leu Ala  
 465 470 475 480

Gly His Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu  
 485 490 495

Phe Asp Glu Leu Arg Leu Pro Ala Leu Gly Lys Thr Gln Lys Thr Gly  
 500 505 510

Lys Arg Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His  
 515 520 525

Pro Ile Val Glu Lys Ile Leu Gln His Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys  
 530 535 540

Asn Thr Tyr Val Asp Pro Leu Pro Gly Leu Val His Pro Arg Thr Gly  
 545 550 555 560

Arg Leu His Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu  
 565 570 575  
 Ser Ser Ser Gly Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Ile Arg Thr Pro Leu  
 580 585 590  
 Gly Gln Arg Ile Arg Arg Ala Phe Val Ala Glu Ala Gly Trp Ala Leu  
 595 600 605  
 Val Ala Leu Asp Tyr Ser Gln Met Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu  
 610 615 620  
 Ser Gly Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Lys Asp Ile  
 625 630 635 640  
 His Thr Gln Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Ser Pro Glu Ala Val  
 645 650 655  
 Asp Pro Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Val Asn Phe Gly Val Leu  
 660 665 670  
 Tyr Gly Met Ser Ala His Arg Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ile Pro Tyr  
 675 680 685  
 Glu Glu Ala Val Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe Pro Lys  
 690 695 700  
 [0064]  
 Val Arg Ala Trp Lys Glu Lys Thr Leu Glu Glu Gly Arg Lys Arg Gly  
 705 710 715 720  
 Tyr Val Glu Thr Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Val Pro Asp Leu Asn  
 725 730 735  
 Ala Arg Val Lys Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn  
 740 745 750  
 Met Pro Val Gln Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val  
 755 760 765  
 Lys Leu Phe Pro His Leu Arg Glu Met Gly Ala Arg Met Leu Leu Gln  
 770 775 780  
 Val His Asp Glu Leu Leu Leu Glu Ala Pro Gln Ala Arg Ala Glu Glu  
 785 790 795 800  
 Val Ala Ala Leu Ala Lys Glu Ala Met Glu Lys Ala Tyr Pro Leu Ala  
 805 810 815  
 Val Pro Leu Glu Val Glu Val Gly Ile Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala  
 820 825 830  
 Lys Gly

A. 整个聚合酶 I 酶上的序列同一性 (对应于 Z05 的氨基酸 1-834)													
名称	Z05	Taq	Tfi	Tfi	Sps17	Tth	Tca	Dra	Tma	Tnc	Taf	Bst	Bca
Z05		0.864	0.833	0.859	0.839	0.962	0.958	0.459	0.374	0.368	0.359	0.407	0.408
Taq	0.864		0.831	0.854	0.836	0.872	0.864	0.468	0.382	0.368	0.351	0.397	0.397
Tfi	0.833	0.831		0.82	0.991	0.829	0.824	0.45	0.371	0.375	0.353	0.405	0.397
Tth	0.859	0.854	0.82		0.824	0.853	0.848	0.462	0.381	0.374	0.356	0.397	0.398
Sps17	0.839	0.836	0.991	0.824		0.835	0.83	0.452	0.375	0.377	0.355	0.407	0.399
Tth	0.962	0.872	0.829	0.853	0.835		0.989	0.463	0.373	0.367	0.358	0.406	0.406
Tca	0.958	0.864	0.824	0.848	0.83	0.989		0.46	0.371	0.365	0.356	0.404	0.404
Dra	0.459	0.468	0.45	0.462	0.452	0.463	0.46		0.334	0.325	0.314	0.338	0.339
Tma	0.374	0.382	0.371	0.381	0.375	0.373	0.371	0.334		0.854	0.567	0.37	0.377
Tnc	0.368	0.368	0.375	0.374	0.377	0.367	0.365	0.325	0.854		0.558	0.377	0.376
Taf	0.359	0.351	0.353	0.356	0.355	0.358	0.356	0.314	0.567	0.558		0.356	0.364
Bst	0.407	0.397	0.405	0.397	0.407	0.406	0.404	0.338	0.37	0.377	0.356		0.881
Bca	0.408	0.397	0.397	0.398	0.399	0.406	0.404	0.339	0.377	0.376	0.364	0.881	
B. 仅在聚合酶亚结构域上的序列同一性 (对应于 Z05 的氨基酸 420-834)													
名称	Z05	Taq	Tfi	Tfi	Sps17	Tth	Tca	Dra	Tma	Tnc	Taf	Bst	Bca
Z05		0.901	0.845	0.891	0.845	0.975	0.973	0.563	0.483	0.478	0.44	0.498	0.49
Taq	0.901		0.879	0.901	0.877	0.906	0.901	0.561	0.488	0.473	0.44	0.503	0.495
Tfi	0.845	0.879		0.857	0.997	0.853	0.853	0.566	0.495	0.49	0.449	0.512	0.49
Tth	0.891	0.901	0.857		0.855	0.889	0.889	0.571	0.492	0.48	0.444	0.494	0.485
Sps17	0.845	0.877	0.997	0.855		0.853	0.853	0.566	0.495	0.49	0.449	0.512	0.49
Tth	0.975	0.906	0.853	0.889	0.853		0.99	0.563	0.478	0.473	0.437	0.496	0.488
Tca	0.973	0.901	0.853	0.889	0.853	0.99		0.563	0.478	0.473	0.437	0.496	0.488
Dra	0.563	0.561	0.566	0.571	0.566	0.563	0.563		0.45	0.448	0.426	0.474	0.454
Tma	0.483	0.488	0.495	0.492	0.495	0.478	0.478	0.45		0.883	0.622	0.474	0.475
Tnc	0.478	0.473	0.49	0.48	0.49	0.473	0.473	0.448	0.883		0.615	0.476	0.473
Taf	0.44	0.44	0.449	0.444	0.449	0.437	0.437	0.426	0.622	0.615		0.46	0.473
Bst	0.498	0.503	0.512	0.494	0.512	0.496	0.496	0.474	0.474	0.476	0.46		0.898
Bca	0.49	0.495	0.49	0.485	0.49	0.488	0.488	0.454	0.475	0.473	0.473	0.898	

图1

A. 整个聚合酶 I 酶上的序列同一性 (对应于 Z05 的氨基酸 1-834)									
名称	Z05	Tth	Tfi	Tfi	Tca	Taq	Sps17		
Z05		0.962	0.833	0.859	0.958	0.864	0.839		
Tth	0.962		0.829	0.853	0.989	0.872	0.835		
Tfi	0.833	0.829		0.82	0.824	0.831	0.991		
Tfi	0.859	0.853	0.82		0.848	0.854	0.824		
Tca	0.958	0.989	0.824	0.848		0.864	0.83		
Taq	0.864	0.872	0.831	0.854	0.864		0.836		
Sps17	0.839	0.835	0.991	0.824	0.83	0.836			
B. 仅在聚合酶亚结构域上的序列同一性 (对应于 Z05 的氨基酸 420-834)									
名称	Z05	Tth	Tfi	Tfi	Tca	Taq	Sps17		
Z05		0.975	0.845	0.891	0.973	0.901	0.845		
Tth	0.975		0.853	0.889	0.99	0.906	0.853		
Tfi	0.845	0.853		0.857	0.853	0.879	0.997		
Tfi	0.891	0.889	0.857		0.889	0.901	0.855		
Tca	0.973	0.99	0.853	0.889		0.901	0.853		
Taq	0.901	0.906	0.879	0.901	0.901		0.877		
Sps17	0.845	0.853	0.997	0.855	0.853	0.877			

图2

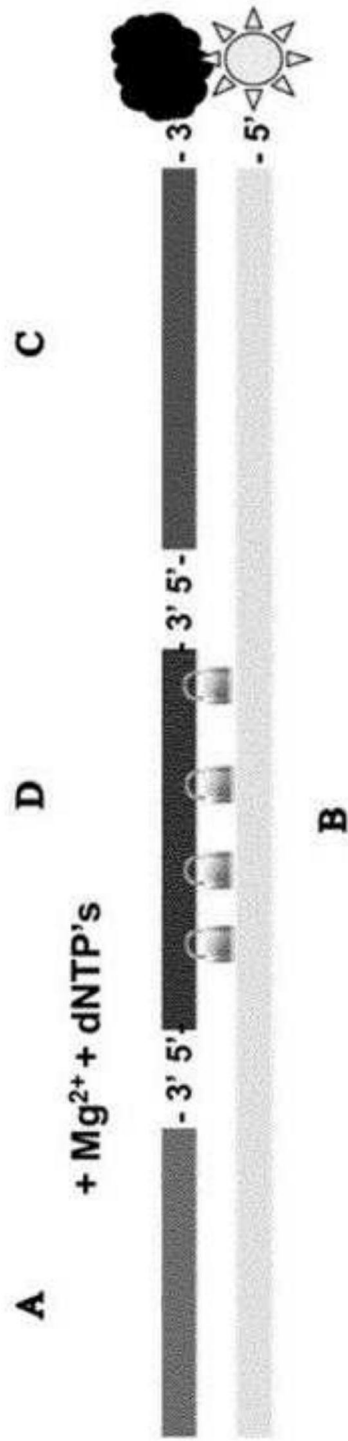


图3

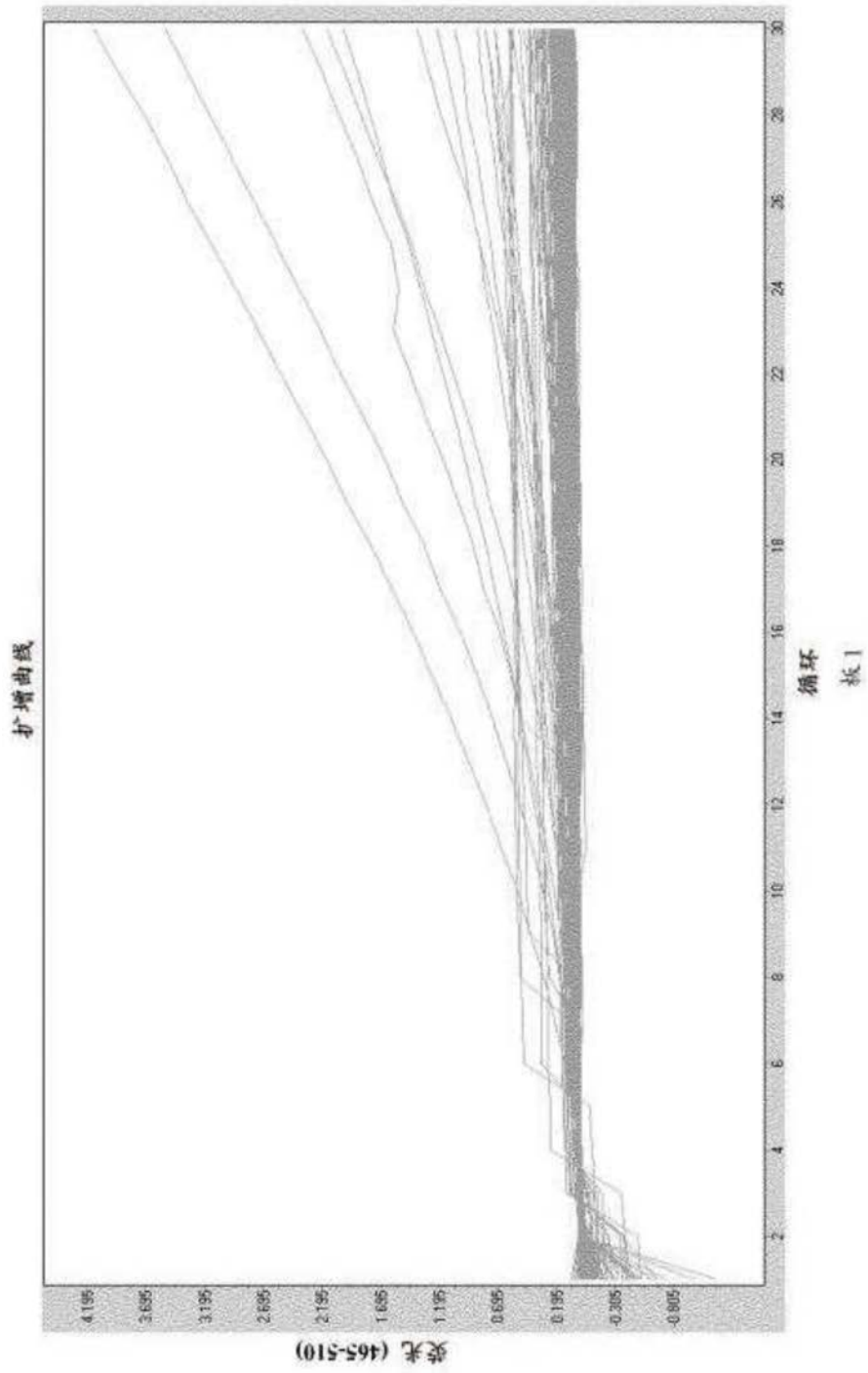


图4A

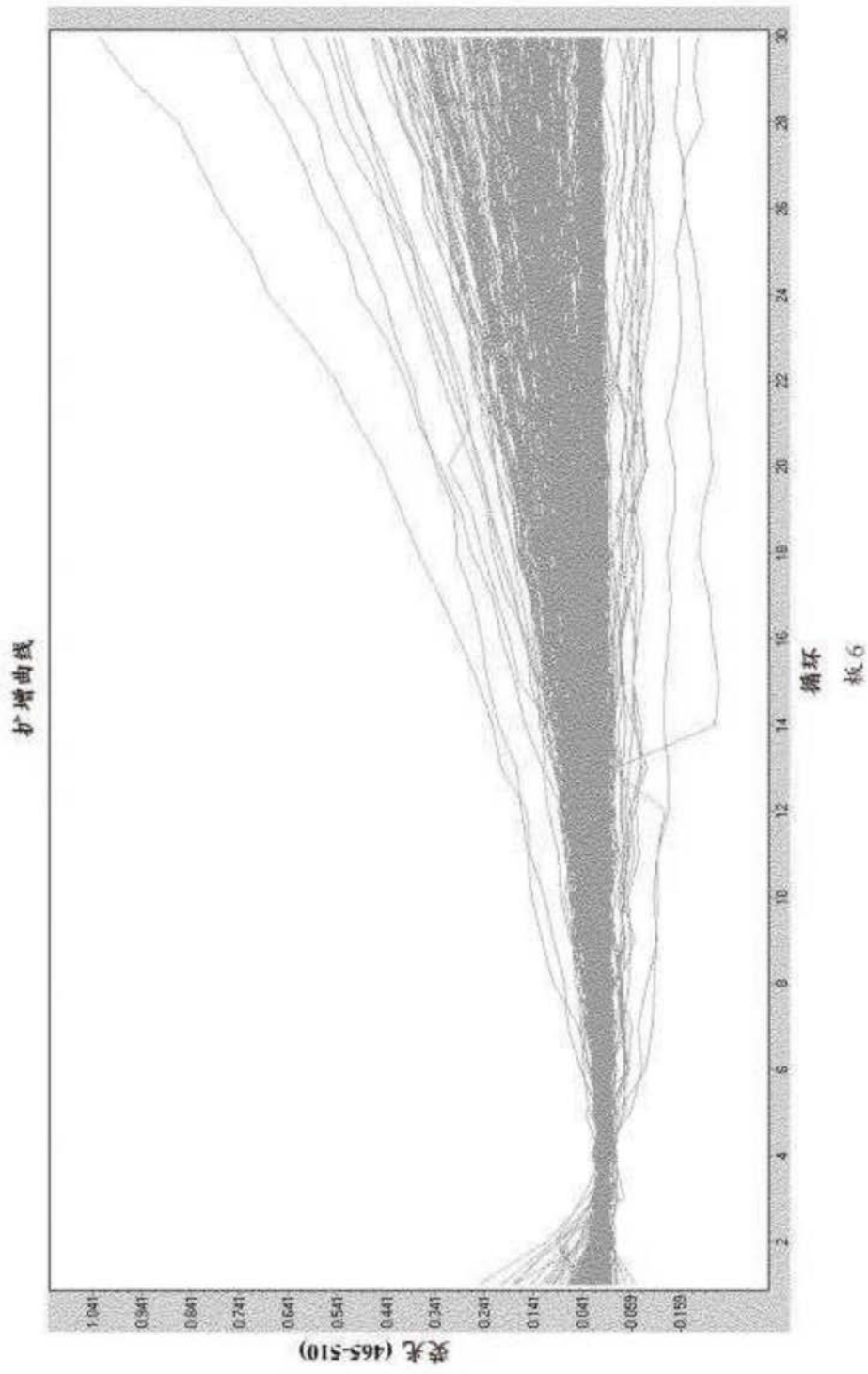


图4A ff.

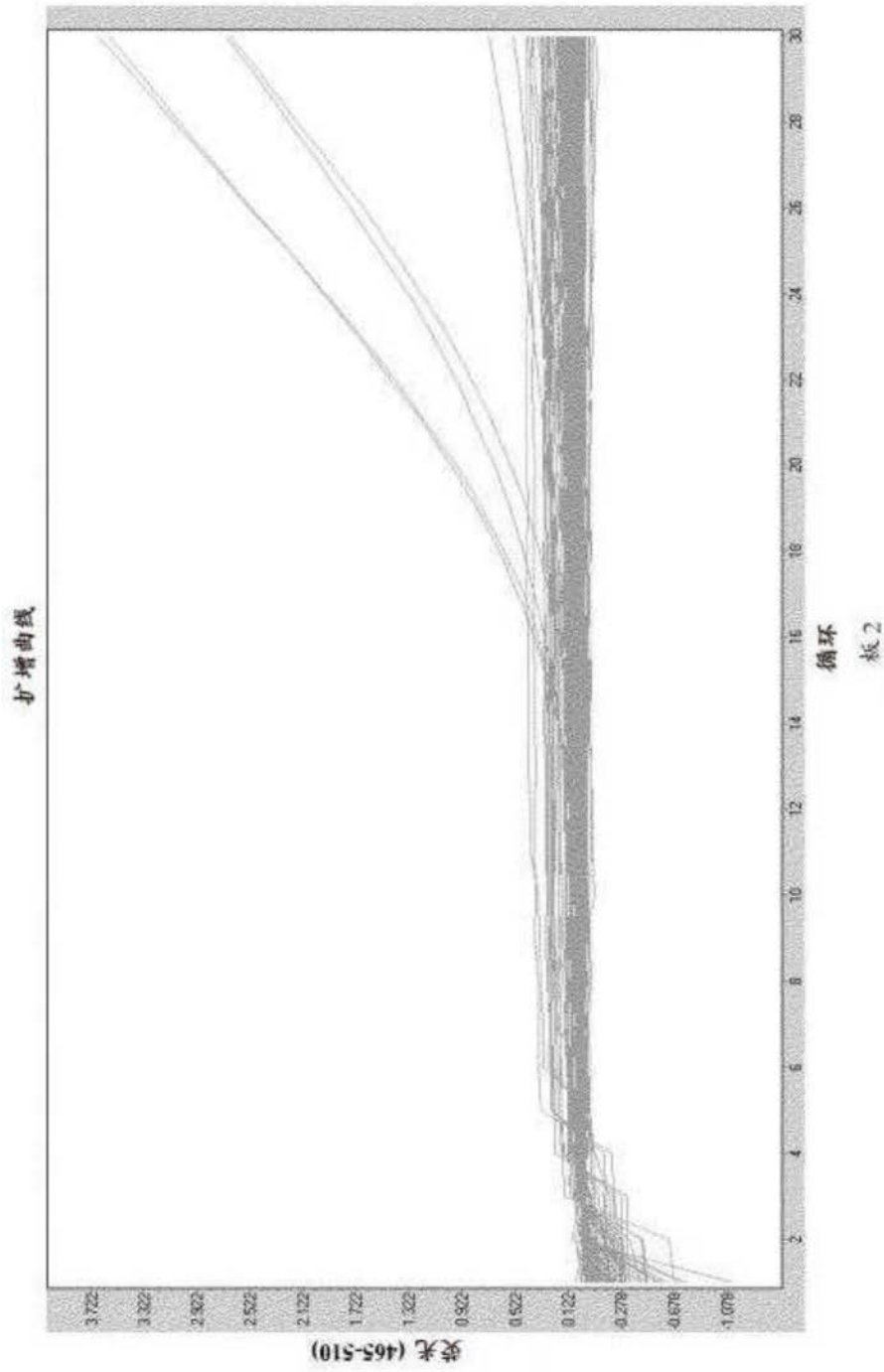


图4B

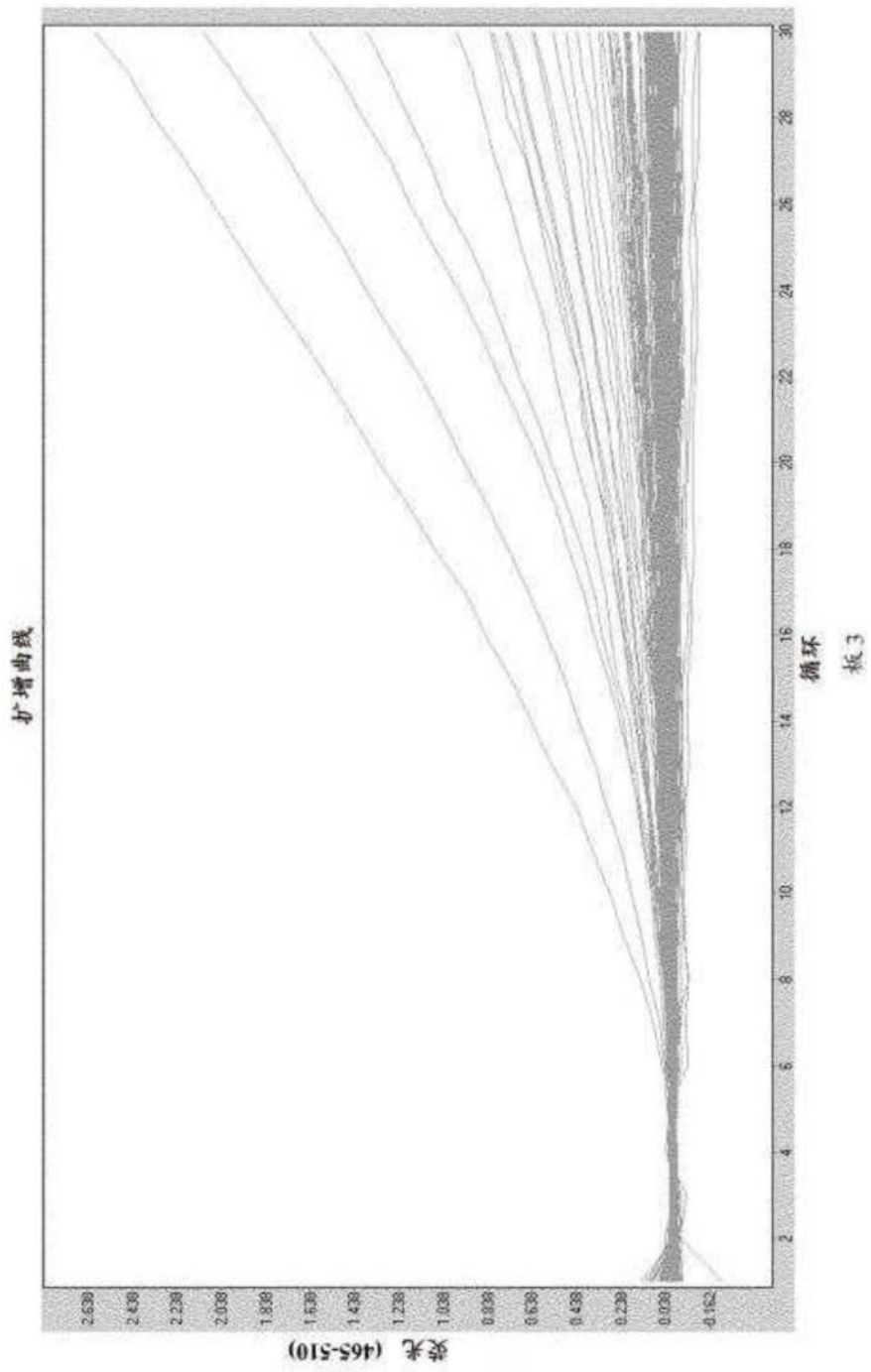


图4B ff.

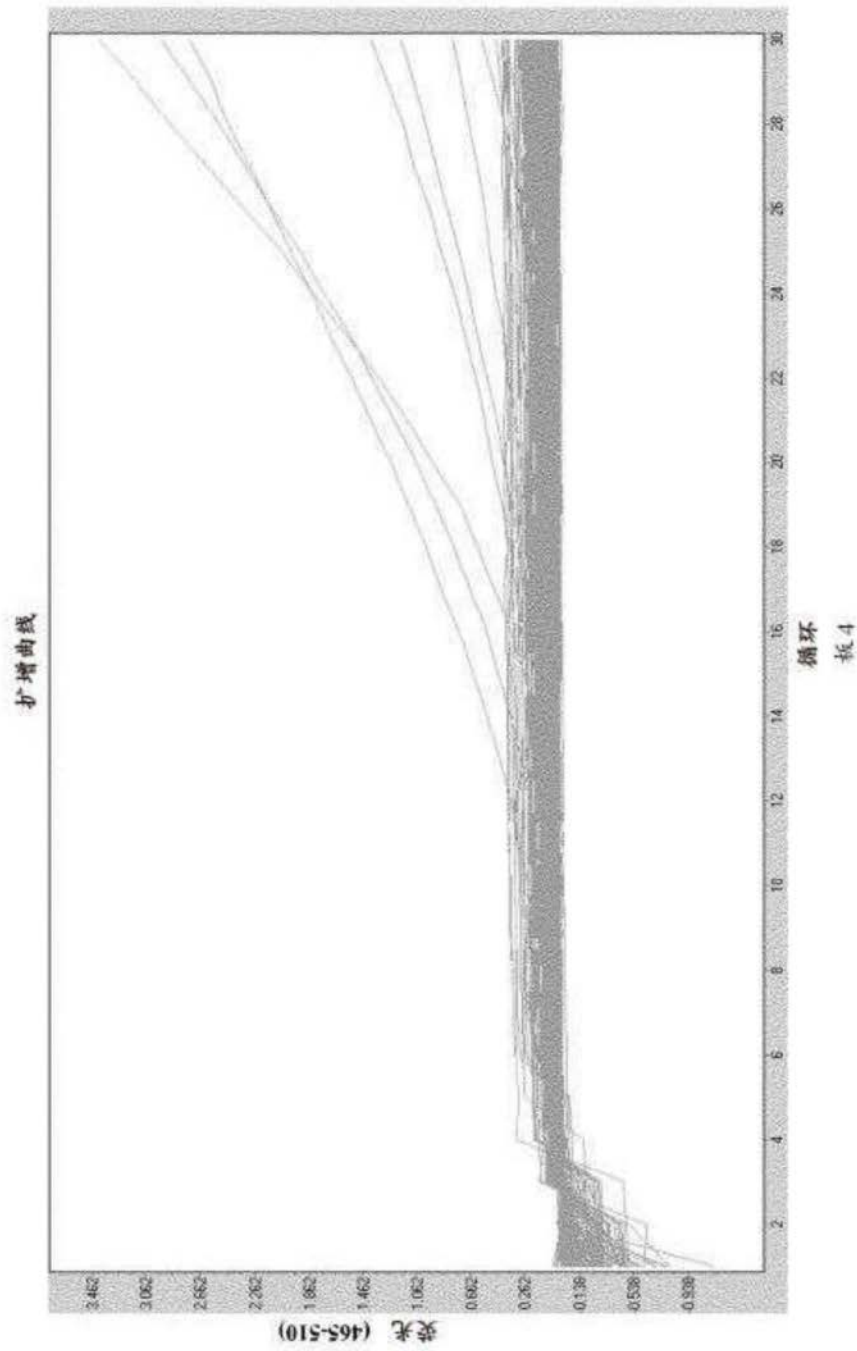


图4B ff.

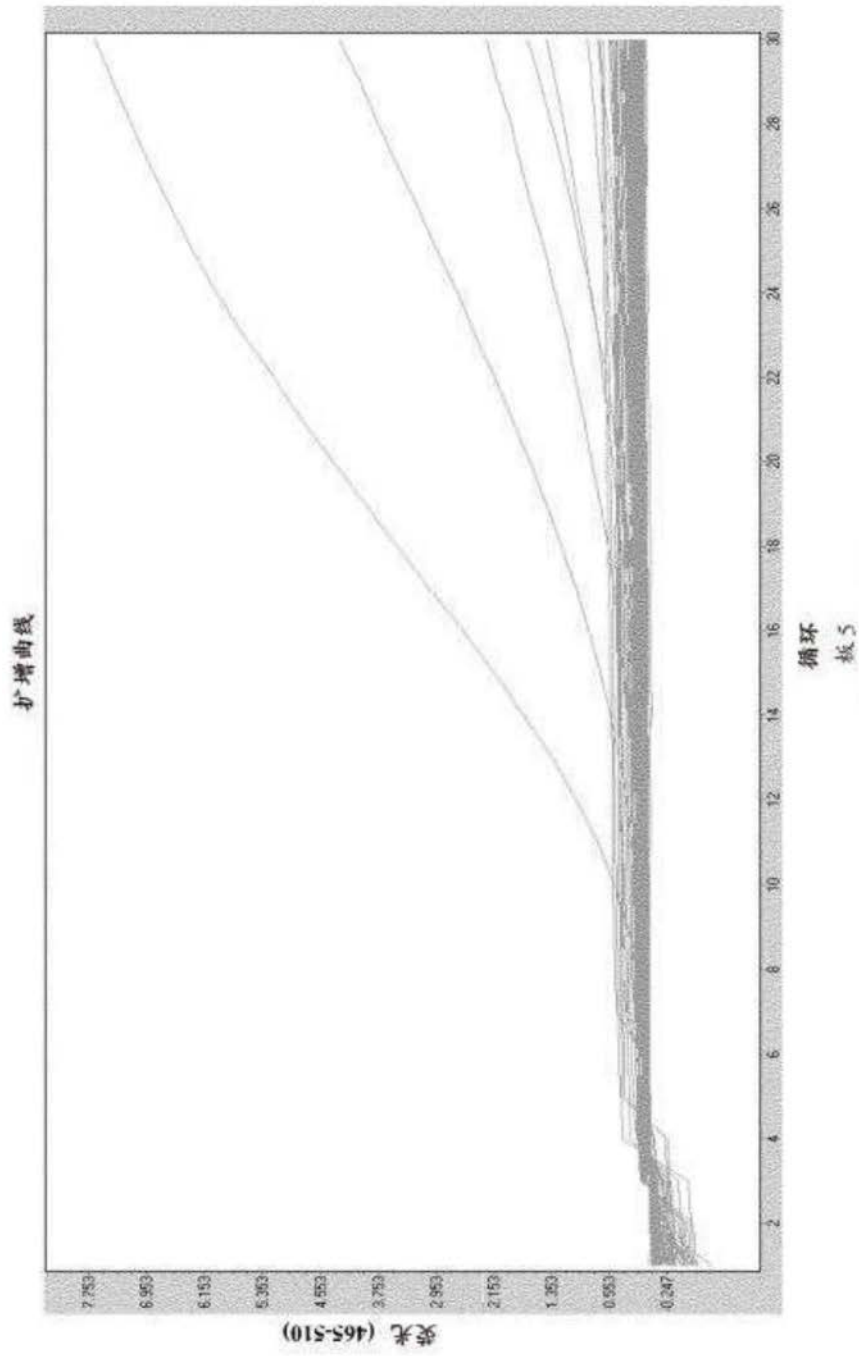


图4B ff.

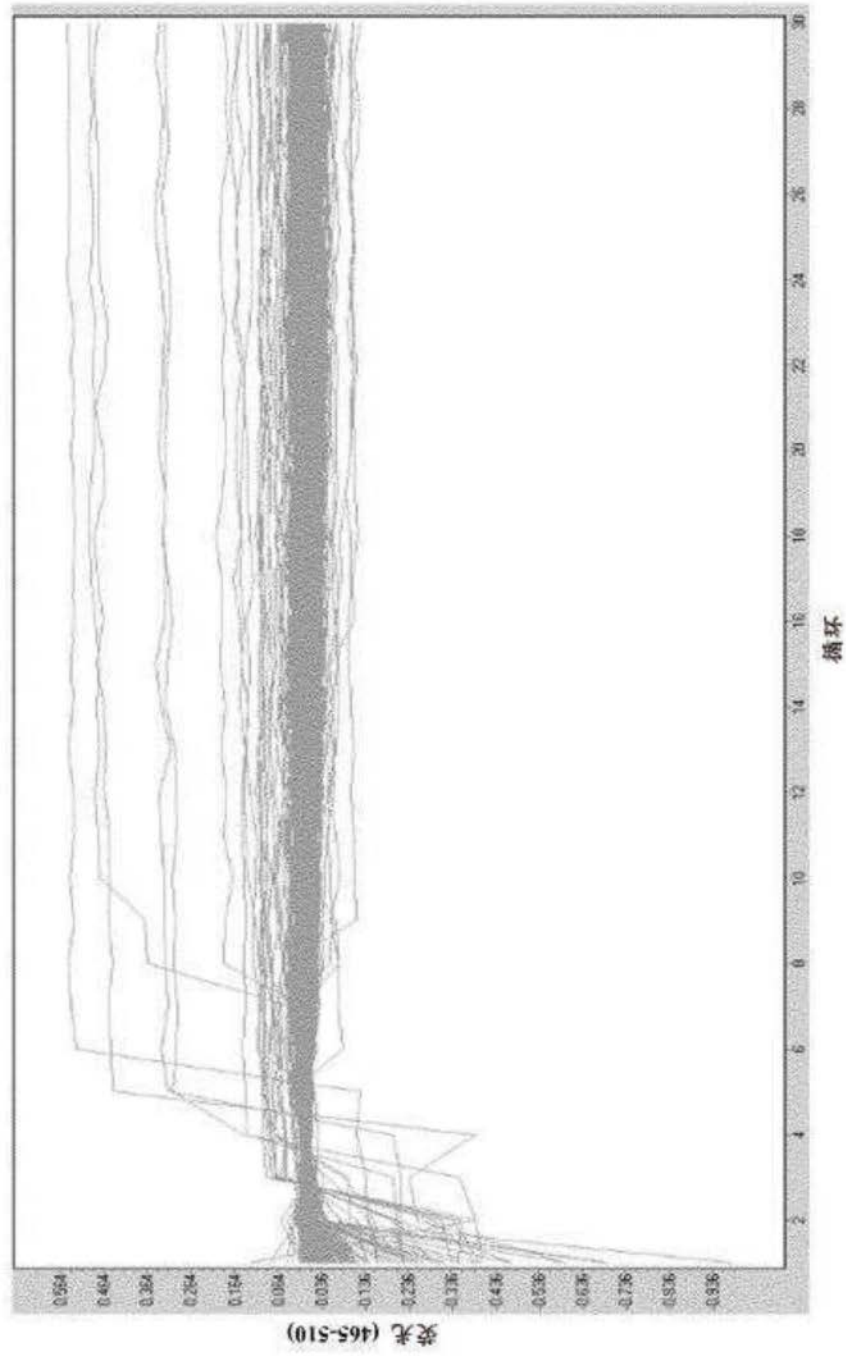


图5A

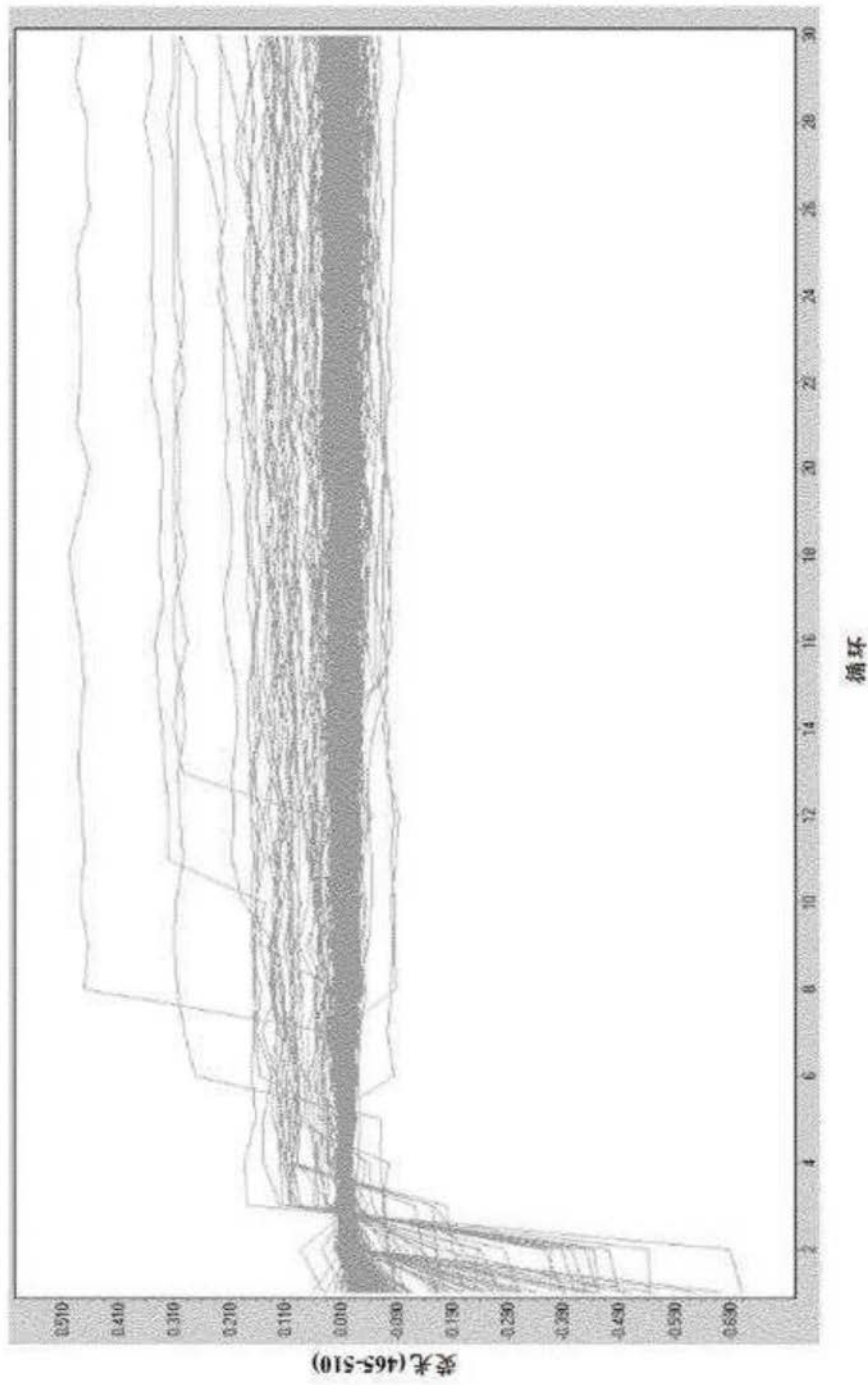


图5B