

(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1590543 B

(45) 授权公告日 2010.05.12

(21) 申请号 200410076657.2

(22) 申请日 2004.08.12

(30) 优先权数据

03017636.6 2003.08.12 EP

(73) 专利权人 霍夫曼—拉罗奇有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 W·安肯鲍尔 T·迈尔

A·多伊费尔 D·海恩德尔

G·贝茨尔 R·施穆克

B·施奈丁格 J·施特里

(56) 对比文件

WO , A, 9964438 , 1999.12.16, 全文 .

WO , A, 9206200 , 1992.04.16, 全文 .

DABROWSKI S ET AL. RECOMBINANT

HIS-TAGGED DNAPOLYMERASE.

I. CLONING, PURIFICATION AND

PARTIALCHARACTERIZATION OF THERMUS

THERMOPHILUSRECOMBINANT DNA POLYMERASE.

ACTA BIOCHIMICA POLONICA45 3. 1998, 45(3),
全文 .

审查员 王慧梅

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 李连涛 徐雁漪

(51) Int. Cl.

C12N 9/00(2006.01)

C12N 15/52(2006.01)

C12N 15/63(2006.01)

C11D 3/386(2006.01)

C12N 15/00(2006.01)

C12Q 1/68(2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 41 页 附图 1 页

(54) 发明名称

热稳定的 Taq 聚合酶片断

(57) 摘要

发现天然栖热水生菌 DNA 聚合酶 (TaqWT) 缺失 288 个 N 末端氨基酸的片断 (Taq Δ 288), 具有比 TaqWT、Taq Δ 279 和 Taq Δ 289 增强的热稳定性。因此本发明提供了 Taq Δ 288、编码其的重组表达载体或其衍生物, 以及 Taq Δ 288 的纯化方案。本发明也包含含有 Taq Δ 288 的试剂盒, 以及 Taq Δ 288 和含有 Taq Δ 288 试剂盒的用途。此外, 本发明包括测定核酸模板序列的方法和扩增目标核酸的方法。

1. 一种具有 DNA 聚合酶活性的多肽,其特征在于该多肽的氨基酸序列是 SEQ ID NO :2 所示的氨基酸序列。

2. 根据权利要求 1 的多肽,其特征在于该多肽的氨基酸序列是 SEQID NO :4 所示的氨基酸序列,其在权利要求 1 的多肽的 N 末端另外有一个甲硫氨酸残基。

3. 一种编码权利要求 1 和 2 中任意一项的多肽的核苷酸序列。

4. 根据权利要求 3 的核苷酸序列,其特征在于该核苷酸序列是 SEQID NO :1 或 SEQ ID NO :3 所示的核苷酸序列。

5. 一种重组 DNA 载体,其包含权利要求 3 和 4 中任意一项的 DNA 序列。

6. 根据权利要求 5 的重组 DNA 载体,其特征在于该 DNA 序列编码一种融合多肽,其由以下物质组成:

(i) 一个末端组氨酸标记,

(ii) 一个与组氨酸标记相邻的提供因子 X 蛋白酶剪切位点的氨基酸序列,和

(iii) 权利要求 1 的多肽。

7. 根据权利要求 6 的重组 DNA 载体,其特征在于该 DNA 序列编码一种 SEQ ID NO :5 所示的氨基酸序列的融合多肽。

8. 一种生产具有 DNA 聚合酶活性的多肽的方法,包含下列步骤:

(a) 用权利要求 5 的重组 DNA 载体转化宿主细胞,

(b) 培养该宿主细胞并在所述宿主细胞中表达具有 DNA 聚合酶活性的多肽,

(c) 纯化步骤 (b) 中表达的具有 DNA 聚合酶活性的多肽。

9. 一种生产具有 DNA 聚合酶活性的多肽的方法,包含下列步骤:

(a) 用权利要求 6 或 7 中任意一项的重组 DNA 载体转化宿主细胞,

(b) 培养该宿主细胞并在所述宿主细胞中表达一种由以下物质组成的融合多肽:

(i) 一个末端组氨酸标记,

(ii) 一个与组氨酸标记相邻的提供因子 X 蛋白酶剪切位点的氨基酸序列,和

(iii) 权利要求 1 的多肽,

(c) 纯化步骤 (b) 中表达的融合多肽,

(d) 在具有因子 X 蛋白水解活性的蛋白酶存在下,通过孵育所述融合多肽的方式剪切该融合多肽,从而从因子 X 蛋白酶剪切位点和组氨酸标记中分离具有 DNA 聚合酶活性的多肽,

(e) 纯化步骤 (d) 中具有 DNA 聚合酶活性的多肽。

10. 根据权利要求 9 的方法,其特征在于在步骤 (c) 中使用能结合组氨酸标记的颗粒状亲和基质纯化该融合多肽。

11. 根据权利要求 9 和 10 中任意一项的方法,其特征在于在步骤 (d) 中将融合多肽的组氨酸标记与颗粒状亲和基质结合。

12. 根据权利要求 10 的方法,其特征在于颗粒状亲和基质是一种涂有螯合金属的树脂的层析物质,并且金属离子被固定在所述的涂有树脂的层析物质上。

13. 根据权利要求 12 的方法,其特征在于该层析物质上涂有镍-次氨基三乙酸(Ni-NTA)。

14. 一种用权利要求 5 至 7 中任意一项所述的重组 DNA 载体转化的重组宿主细胞。

15. 一种在含有一种或多种非离子型聚合物去污剂的缓冲液中包含权利要求 1 或 2 中任意一项的多肽的稳定制剂。

16. 根据权利要求 15 的稳定制剂,其特征在于当共价结合于所述多肽时,该多肽共价地结合到能可逆地阻断该多肽的 DNA 聚合酶活性的化合物上。

17. 根据权利要求 16 的稳定制剂,其特征在于该化合物选自以下物质组成的组

(a) 柠檬酸酐,

(b) 顺式乌头酸酐,

(c) 2,3- 二甲基马来酸酐,

(d) 外 - 顺 -3,6- 桥氧基 - Δ 4- 四氢邻苯二甲酸酐,和

(e) 3,4,5,6- 四氢邻苯二甲酸酐。

18. 根据权利要求 15 的稳定制剂,其特征在于当结合所述多肽时,该多肽与能可逆地阻断该多肽的 DNA 聚合酶活性的抗体结合。

19. 根据权利要求 1 或 2 的任意一项的多肽、与一种化合物共价地偶联的根据权利要求 1 或 2 的任意一项的多肽、与一种抗体结合的根据权利要求 1 或 2 的任意一项的多肽、或者一种根据权利要求 15 至 18 中任意一项的稳定制剂在生产引物延伸产物中的用途,其中当该化合物共价地偶联于所述的多肽时,它能可逆地阻断该多肽的 DNA 聚合酶的活性,当该抗体与所述多肽结合时,它能可逆地阻断该多肽的 DNA 聚合酶的活性。

20. 根据权利要求 19 的用途,用于测定核酸模板的序列。

21. 根据权利要求 19 的用途,用于扩增目标核酸。

22. 一种用于生产引物延伸产物的试剂盒,其包含权利要求 15 至 18 中任意一项的稳定制剂。

23. 一种用于在样品中扩增目标核酸的方法,包括下列步骤

(a) 使所述的样品与含有与所述的目标核酸充分互补的引物的扩增反应混合物和选自以下物质组成的组的多肽接触:

(i) 权利要求 1 或 2 的任意一项的多肽,

(ii) 权利要求 1 或 2 的任意一项的多肽,它共价地结合到能可逆地阻断该多肽的 DNA 聚合酶活性的化合物上,和

(iii) 权利要求 1 或 2 的任意一项的多肽,它与能可逆地阻断该多肽的 DNA 聚合酶活性的抗体结合,

(b) 任选地通过热处理释放被阻断的 DNA 聚合酶活性,

(c) 将步骤 (a) 得到的所述的引物混合物退火到所述的目标核酸上,

(d) 在步骤 (b) 后通过孵育混合物来扩增目标核酸以允许形成引物延伸产物。

24. 一种测定核酸序列的方法,包含下列步骤:在至少一种链终止试剂和至少一种核苷酸三磷酸的存在下,用权利要求 1 或 2 的任意一项的多肽从要测序的核酸模板产生链终止的片断,以及从所述片断的大小确定所述核酸的序列。

热稳定的 Taq 聚合酶片段

技术领域

[0001] 本发明涉及分子生物学领域。特别地,本发明涉及一种具有 DNA 聚合酶活性的多肽。本发明提供了一种具有热稳定的 DNA 聚合酶活性,从而热稳定性增强的多肽。本发明也提供了一种生产所述多肽的方法。

背景技术

[0002] 源自嗜温性微生物如大肠杆菌的 DNA 聚合酶是本领域熟知的。参见,例如, Bessman et al., J. Biol. Chem. 223(1957)171-177 和 Buttin, G., and Kornberg, A, J. Biol. Chem. 241(1966)5419-5427。源自嗜热细菌如栖热水生菌种的 DNA 聚合酶也是本领域已知的。在 US 4,683,195、US 4,683,202 和 US 4,965,188 中描述了热稳定酶在与起始存在数量比较以巨大数量扩增现有的核酸序列的用途,其中描述了聚合酶链式反应 (PCR) 的过程。商业销售商如 Roche Diagnostics GmbH (曼海姆,德国) 销售 PCR 试剂并公布了 PCR 方案。引物、模板、核苷三磷酸、适当的缓冲液及反应条件和聚合酶用于 PCR 过程中,其中包括目标 DNA 的变性、引物的杂交和由聚合酶合成互补链。每一引物的延伸产物成为生产所需核酸序列的模板。这些专利公开了,如果使用的聚合酶是一种热稳定酶,则不需要在每个变性步骤之后加入聚合酶,因为热量不会破坏该聚合酶的活性。然而,在循环 PCR 过程中反复的加热会影响聚合酶的酶活性,这依赖于其热稳定性。特定的 PCR 循环次数后,具有较高热稳定性的聚合酶会比具有较低热稳定性的聚合酶保留更多的酶活性。因此,热稳定性对于聚合酶而言是一种期望得到的特征。

[0003] US 4,889,818 和 US 5,079,352 描述了,从栖热水生菌中分离和重组表达一种分子量约为 94kDa 的热稳定的 DNA 聚合酶 (Taq DNA 聚合酶,也称为 TaqWT) 和该聚合酶在 PCR 中的应用。

[0004] 例如由于其高合成速率(每秒能聚合大约 75 个核苷酸),栖热水生菌 DNA 聚合酶特别优选用于 PCR 和其它重组 DNA 技术中。不过,仍然需要可供选择的热稳定聚合酶。特别地,在 PCR 之前延长起始热孵的情况中,DNA 聚合酶的热稳定性增强是有利的。像这种情况的例子是 DNA 聚合酶的 DNA 聚合酶活性的激活,为了可逆性地阻断其酶促活性该 DNA 聚合酶已被化学修饰。

[0005] 特别地, Taq DNA 聚合酶的热稳定性胜过其它聚合酶。虽然 95℃ 时纯化的 TaqWT 的半衰期在稳定的制剂中约为 40 分钟,然而在用于 LightCycler PCR 中的典型反应混合物中约为 20 分钟,增加了其它 DNA 聚合酶如 Pwo DNA 聚合酶(源自沃氏热球菌; Roche 目录号 1664947)。Pwo DNA 聚合酶显示了增加的热稳定性,在 100℃ 时半衰期大于 2h,相对而言该温度时 Taq DNA 聚合酶的半衰期少于 5min。

[0006] WO 91/02090 描述了一种从栖热水生菌中纯化的热稳定 DNA 聚合酶。该聚合酶是完整的聚合酶(分子量为 94kDa) 的 80 或 85kDa 的降解产物,据说基本上没有 5' -3' 核酸外切酶活性。没有提供有关该聚合酶的序列数据。

[0007] Lawyer, F. C. 等人已在 J. Biol. Chem. 264(1989)6427-6437 中描述了在大肠杆菌

中分离、定性和表达源自栖热水生菌的 DNA 聚合酶基因。也公开了包含编码缺失了天然酶的 N-末端的 Taq DNA 聚合酶片断的 DNA 序列的表达载体的克隆。

[0008] Kaledin 等人已在 Chemical Abstract 93, No. 40169p (1989) 中报道了一种分子量约为 60-62kDa 的源自栖热水生菌的热稳定 DNA 聚合酶的纯化。该聚合酶的序列数据没有提供。

[0009] Chien 等人已在 Chemical Abstract 85, No. 155559t (1976) 中报道了一种源自栖热水生菌的热稳定 DNA 聚合酶的纯化。据报道该酶的分子量,由蔗糖梯度离心测得为 68kDa,而由凝胶过滤测得为 63kDa。该聚合酶的序列数据没有提供。

[0010] US 5,616,494 教导了一种有酶活性的截短的 Taq DNA 聚合酶的片断,其缺失了 N-末端的 235 个氨基酸残基。该纯化的酶描述为具有完全的活性,然而持续合成能力降低并缺乏了 5'-核酸外切酶活性。与天然 Taq DNA 聚合酶相比,由于缺失完成 PCR 扩增反应的片断,因此必需更多的 DNA 聚合酶单位。在大肠杆菌中表达了 N-末端添加了甲硫氨酸的截短形态。

[0011] US 5,885,813 公开了缺失 N-末端 271 和 272 个氨基酸的 Taq DNA 聚合酶的具有酶活性的截短形态,在其 dNMP 结合位点中,在相应于天然 Taq DNA 聚合酶的 667 位残基处都有一个酪氨酸。这两种截短形态都在大肠杆菌中表达,其每个阅读框中都融合了一个附加的编码甲硫氨酸的起始密码子。

[0012] US 5,079,352 教导了一种分子量约为 61kDa 的 Taq DNA 聚合酶的截短形态(实施例 IX)。在纯化过程中,该形态(也被称为是 Stoffel 片断)原先被认为是蛋白水解的人为产物。N-末端测序显示该截短形态是由于在 Glu289 和 Ser290 之间发生了蛋白水解剪切的结果。从天然 Taq DNA 聚合酶的 N-末端删除 289 个氨基酸产生了一个有完全活性的 DNA 聚合酶。该文献进一步描述了包含编码该截短形态即 Stoffel 片断的 DNA 和一个附加的编码甲硫氨酸的起始密码子的载体的构建。运用该载体,使分子量约为 61kDa 的天然 Taq DNA 聚合酶的该截短形态在大肠杆菌中进行了表达。在本文中,如 US 5,079,352 记载的天然 Taq DNA 聚合酶的 Stoffel 片断(可从 Applied Biosystem 通过商业性渠道获得,其名称为 AmpliTaq DNA 聚合酶)还被称为 Taq Δ 289。

[0013] US 5,436,149 教导了一种具有酶活性的截短的栖热水生菌 DNA 聚合酶,然而其缺失了 N-末端的 279 个氨基酸残基。该片断被在大肠杆菌中表达,其具有融合到编码相应于天然 Taq DNA 聚合酶 280 位残基的氨基酸的阅读框中的两个附加的编码甲硫氨酸(起始密码子)和甘氨酸残基的密码子。在本文中,如 US 5,436,149 记载的天然 Taq DNA 聚合酶的片断(也称为 Klentaql,可从 AB Peptides, Inc 以商业方式获得,而也称为 AdvanTaq DNA 聚合酶,可从 Clontech, Inc 以商业方式获得)进而被称为 Taq Δ 279。该截短形态显示出在反复暴露于 99℃ 的温度下仍具有酶活性。

[0014] 就现有技术状态而言,期望得到一种纯化的、热稳定的 DNA 聚合酶,当在其它重组技术如 DNA 测序,和其它利用 DNA 聚合酶活性、依赖于模板的延伸 DNA 引物的方法中,可以使用一种热稳定的 DNA 聚合酶来改善上述的 PCR 方法和改善获得的结果。

发明内容

[0015] 本发明人已惊奇地发现,天然栖热水生菌 DNA 聚合酶(TaqWT)的一个缺失了 N-末

端的 288 个氨基酸的片断 (Taq Δ 288) 具有比 TaqWT、Taq Δ 279 和 Taq Δ 289 增强的热稳定性。因此本发明通过提供 Taq Δ 288、编码它或其衍生物的重组表达载体以及纯化 Taq Δ 288 的方法,有助于满足上述需求。本发明也包括含有 Taq Δ 288 的试剂盒以及 Taq Δ 288 和含有 Taq Δ 288 的试剂盒的用途。此外,本发明包含核酸模板的测序方法和扩增目标核酸的方法。

[0016] 为了方便理解本发明,将一些术语定义如下。

[0017] 氨基酸的识别使用三字母缩写,也可以是单字母的氨基酸字母表,例如 AspD 天冬氨酸, Ile I 异亮氨酸, Thr T 苏氨酸, LeuL 亮氨酸, Ser S 丝氨酸, TyrY 酪氨酸, Glu E 谷氨酸, Phe F 苯丙氨酸, Pro P 脯氨酸, His H 组氨酸, GlyG 甘氨酸, Lys K 赖氨酸, Ala A 丙氨酸, Arg R 精氨酸, Cys C 半胱氨酸, Trp W 色氨酸, Val V 缬氨酸, Gln Q 谷氨酰胺, Met M 甲硫氨酸, Asn N 天冬酰胺。一个氨基酸在氨基酸序列中的特定位置由它的三字母缩写和一个数字给出。例如,参考 SEQ ID NO:2 所示的天然 Taq DNA 聚合酶的氨基酸序列,“Glu7”表示氨基酸位置 7 上的谷氨酸。

[0018] 术语“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可以互换使用,所有这类定义包括子代。因此,词语“转化体”或者“转化细胞”包括初级转化细胞和由该细胞衍生得到的培养物而不考虑传代数。由于有意或无意的突变,所有子代不可能在 DNA 含量上完全相同。与筛选到的原始转化细胞具有相同功能的突变体子代包括在转化体的定义中。

[0019] 术语“调控序列”是指对于在特定的宿主细胞中,可操作地连接的编码序列的表达所必需的 DNA 序列。适合于原核生物的调控序列例如包括启动子、任选的操纵基因序列、核糖体结合位点和可能的其它序列。已知真核细胞可利用启动子、聚腺苷酸化信号和增强子。

[0020] 术语“表达系统”是指包含所需的可操作地连接的编码序列和调控序列的 DNA 序列,致使用这些序列转化的宿主能生产编码蛋白。为实现转化,该表达系统可以被包含在载体上;然而,相关的 DNA 也可能被整合到宿主的染色体中。

[0021] 术语“基因”是指包含对于生产可复原的具生物活性的多肽或者前体所必需的调控和编码序列的 DNA 序列。该多肽可由全长编码序列编码,或者由该编码序列的任何部分编码,只要保留其酶活性就行。

[0022] 术语“可操作地连接定位”和“可操作地连接的”是指编码序列的定位使得调控序列发挥驱使由编码序列编码的蛋白质的表达的作用。因此,编码序列“可操作连接”到调控序列是指一种其中编码序列能在调控序列的指导下表达的结构。

[0023] 术语“非离子聚合型去污剂”是指没有离子性电荷且具有本发明目的特征的表面活性剂,其在 pH 从约 3.5 至约 9.5 优选从 4 至 8.5 的范围内具有稳定 Taq Δ 288 的能力。

[0024] 如这里使用的术语“寡核苷酸”被定义为包含两个或更多个脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸,优选多于三个,且通常多于十个的分子。确切的大小取决于许多因素,这些因素又取决于寡核苷酸的根本功能或用途。寡核苷酸可以通过合成或克隆获得。

[0025] 如这里使用的术语“引物”是指一种寡核苷酸,当置于引物延伸开始的条件下,其可担当合成的起始点。寡核苷酸“引物”可自然产生如同在纯化的限制性消化那样或者以合成方式产生。与核酸链互补的引物延伸产物的合成,是在合适的温度下,在存在四种不同的核苷三磷酸和热稳定聚合酶的情况下在合适的缓冲液中开始的。“缓冲液”包含辅因子(如二价金属离子)和盐(以提供合适的离子强度),并且被调节至所需的 pH。

[0026] 扩增中效率最大的是单链引物,但是也可以是双链的。如果是双链的,则在用于制备延伸产物前,首先要对该引物进行处理以分开它的两股链。引物通常为寡脱氧核糖核苷酸。引物必须足够长以在聚合酶存在下引导延伸产物的合成。引物的确切长度取决于许多因素,如引物的来源和所需的结果,且根据引物长度和核苷酸序列,必须将反应温度调整至以确保将引物正确地退火到模板上。根据目标序列的复杂性,典型的寡核苷酸引物包含 15 至 35 个核苷酸。短的引物分子一般要求较低的温度以与模板形成足够稳定的复合物。

[0027] 选择与模板的特定序列的链“充分”互补的引物。引物必须是充分互补的,是以与模板链杂交以发生引物的延伸。引物序列不一定反映模板的确切序列。例如,一个非互补的核苷酸片断可以附着于引物的 5' 末端,而该引物序列的其余部分充分互补于该链。如果引物序列与模板序列充分互补以至于杂交,从而为引物的延伸产物合成形成一个模板引物复合物,则非互补性碱基或较长序列可以分散于引物中。

[0028] 术语“限制性内切酶”和“限制性酶”是指在特定或接近特定的核苷酸序列处剪切双链 DNA 的细菌酶。

[0029] 术语具有 DNA 聚合酶活性的“热稳定的”多肽是指一种酶,其对热稳定且具有耐热性,能催化(促进)核苷酸以合适的方式结合,以形成与模板核酸链互补的引物延伸产物。一般而言,引物延伸产物的合成开始于引物的 3' 末端,并沿着模板链向 5' 方向前进,直到合成结束。一个热稳定的 DNA 聚合酶的例子是 Taq DNA 聚合酶 (TaqWT) 或者其缺失片断如 Taq Δ 279、Taq Δ 289 和本发明的酶即 Taq Δ 288。

[0030] DNA 聚合酶活性的测定使用一种 DNA 寡核苷酸进行,其末端序列富含 G+C,且能互相杂交。当末端序列杂交时,该寡核苷酸形成一个环。杂交导致带有 5' 单链突出端的双链 DNA 发生一个短的延伸。同时,在相对的链上,提供了末端 3' -OH 的功能,从而为 DNA 聚合酶提供了底物。在 dNTPs 和二价离子存在下在反应混合物中和在维持 DNA 聚合酶活性的条件下, DNA 聚合酶用与模板链互补的核苷酸,催化具有末端 3' -OH 功能的链即具有 5' 突起的链的延伸。反应进行到 5' 突起转变成一个平末端。

[0031] 该测定基于荧光共振能量传递 (FRET) 的原理,由 DNA 聚合酶活性引发。一般而言,第一和第二标记的荧光基团是优选的,其能彼此作用以产生 FRET。为了进行检测,使用如上所述的特定寡核苷酸,在双链部分内,一个连接第一荧光基团的核苷酸或核苷酸类似物,位于靠近最初提供 5' 单链突起的核苷酸的位置上。优选地,第一荧光基团是荧光素。在 5' 单链突起内和从荧光基团标记的第一位置起约 10 个核苷酸的位置上有一个腺嘌呤。反应混合物含有标记的 dUTP 或者标记的和未标记的 dUTP 混合物,以代替 dTTP;dUTP 能被掺入到相对链中以与所述的腺嘌呤配对。优选地,结合到 dUTP 的标记是作为第二荧光基团的 LightCycler-Red 640。一旦标记的 dUTP 过 DNA 聚合酶活性被掺入,则第一和第二标记被带入一个支持 FRET 的邻近位置。测量掺入了标记的 dUTP 的寡核苷酸分子可通过定量 FRET,使用特异于荧光素而非 LightCycler-Red 640 的确定的激发波长的光,用荧光计测量在 LightCycler-Red 640 的发射波长处的发射光。本领域的技术人员熟知该原理、方法和仪器以定量 FRET。

[0032] 使用 FRET 测定,本发明人比较了 TaqWT、Taq Δ 289、Taq Δ 279 和 Taq Δ 288,从而使每一聚合酶在大肠杆菌中重组表达。在各自表达培养的溶菌产物中,每一 DNA 聚合酶被测试了 DNA 聚合酶活性的热稳定性。在 97°C 下热孵 35 分钟之前和之后,测量溶菌产物样品中

的活性。令人惊奇地发现,由于热处理,TaqWT、Taq Δ 289 和 Taq Δ 279 的 DNA 聚合酶活性减少到小于 50%,Taq Δ 279 的保留活性在约 30%和小于约 50%之间,Taq Δ 289 的保留活性在约 15%和约 30%之间,而 TaqWT 的保留活性在 0%和约 5%之间。相反,具有末端甲硫氨酸的表达的 Taq Δ 288 的保留活性在大于约 50%和约 80%之间。

[0033] 使用相同的 FRET 活性测定方法,在 PCR 反应混合物中对作为纯化酶的 TaqWT 和 Taq Δ 288 进行了比较。在 98℃下热孵 30 分钟后,TaqWT 保留的活性在约 10%和约 15%之间。相反,Taq Δ 288 保留的活性在约 30%和 35%之间。

[0034] 使用相同的 FRET 活性测定方法,在稳定的制剂即含有 50%甘油的贮存缓冲液中对作为纯化酶的 TaqWT、Taq Δ 279 和 Taq Δ 288 进行了比较。TaqWT、Taq Δ 279 和 Taq Δ 288 保存在相同的贮存缓冲液中。在 98℃下热孵 30 分钟后,TaqWT 保留的活性在约 40%和约 50%之间。Taq Δ 279 保留活性约在 80%和约 100%之间。Taq Δ 288 保留的活性在约 90%和 100%之间。

[0035] 带有和不带 N-末端甲硫氨酸的 Taq Δ 288 的热稳定性是不能区分的。

[0036] 本发明的第一个实施方式是一种具有 DNA 聚合酶活性的多肽,其特征在于该多肽的氨基酸序列是栖热水生菌 (Taq) DNA 聚合酶的氨基酸序列,其缺失 Taq DNA 聚合酶的 N-末端的 288 个氨基酸。本文中所述的多肽也被称为 Taq Δ 288。优选地,该多肽的氨基酸序列是 SEQ ID NO :2 所示的氨基酸序列。

[0037] 根据本发明的多肽可以用不止一种方法生产。例如,可以从重组表达该多肽的转化宿主细胞中获得该多肽。然而该多肽的氨基酸序列是由编码该多肽的开放阅读框的密码子决定的。功能性开放阅读框要求一个编码 N-末端甲硫氨酸残基的起始密码子。因此,在本发明的另一个实施方式中,该多肽的氨基酸序列另外含有一个 N-末端甲硫氨酸残基。优选地,该多肽的氨基酸序列是 SEQ ID NO :4 所示的氨基酸序列。在本文中,SEQ ID NO :2 和 SEQ ID NO :4 所示的多肽都被称为 Taq Δ 288。

[0038] 优选地,相对于天然酶即具有 SEQ ID NO :7 所示的原始氨基酸序列的 TaqDNA 聚合酶 (TaqWT),该多肽的热稳定性增强了。也优选地,相对于缺失片段 Taq Δ 289 和 Taq Δ 279,其热稳定性增强了。本发明人已发现,当在大肠杆菌中在相同的条件下重组表达 Taq Δ 288 (带有 N-末端甲硫氨酸)、Taq Δ 289、Taq Δ 279 和 TaqWT 时,与其它的相比较,Taq Δ 288 具有最高的热稳定性。

[0039] 本发明的另一个实施方式是一种编码本发明的多肽的核苷酸序列。本领域的技术人员认识到,根据本发明的具有 DNA 聚合酶活性且热稳定性增强的多肽是最容易通过重组 DNA 技术构建的。在本发明的一个优选实施方式中,该核苷酸序列是 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :3 所示的核苷酸序列。

[0040] 本领域的技术人员也知道沉默的密码子改变 (即编码的氨基酸没有改变),它能被导入编码该多肽的最先 10 到 20 个氨基末端的氨基酸残基的核苷酸序列中,而不影响该多肽的序列。该变化可能导致一种最优化的核苷酸序列,可以存在于转化的宿主细胞如大肠杆菌细胞中,或者存在于无细胞表达系统中例如成为根据引起本发明的多肽产量增加的原因。其它优化的编码本发明多肽的核苷酸序列,可以通过在整个编码序列中导入沉默密码子改变来获得。如果该多肽在原核宿主细胞如杆菌菌种或者在真核宿主细胞如酵母细胞优选甲基营养型酵母细胞中表达,则这是特别有用的。

[0041] 为了构建表达载体,获得了一种 DNA,它能编码具有本发明 DNA 聚合酶活性的多肽,或者是该多肽与不破坏活性的附加序列或在调控条件下(如用肽酶处理)可剪切的以产生一种活性蛋白的附加序列的一种融合体。然后在表达载体中该编码序列与合适的调控序列可操作地连接。因此,本发明的另一个实施方式是包含本发明 DNA 序列的重组 DNA 载体。

[0042] 将载体用于转化合适的宿主细胞,并在适合表达具有 DNA 聚合酶活性的重组多肽的条件下培养转化的宿主细胞。该载体可设计成在宿主细胞中自主复制或者能整合到宿主细胞的染色体 DNA 中。

[0043] 前述的每一步骤可以用多种方法进行。例如,所需的编码序列可从基因组片断中获得,并且直接用于合适的宿主中。在各种宿主中可操作的表达载体的构建可使用合适的复制子和调控序列进行,正如下面一般所提到的。含有所需的编码和调控序列的合适载体的构建,使用本领域熟知的标准的连接和限制性酶切技术。将分离的质粒、DNA 序列或合成的寡核苷酸剪切、修饰和重新连接成所需的形式。如果不是正常可用的话,合适的限制性酶切位点可以被加在编码序列的末端,以便有助于表达载体的构建,如下面举例说明。

[0044] 对于要求序列修饰的载体或编码序列部分,可使用各种位点特异性的引物指导的突变方法。聚合酶链式反应(PCR)可用于进行位点特异性的突变。现在在本领域的另一个标准技术中,编码所需突变的合成的寡核苷酸用作引物指导单链载体的互补核酸序列的合成,如 pBS13+,其在突变引物的延伸产物的构建中用作模板。将突变的 DNA 转化到宿主细菌中,将转化的细菌培养物进行铺板和鉴别。鉴别修饰的载体可能包括:将筛选的转化体的 DNA 转移到硝酸纤维素滤膜或其它膜上,使“电梯”与激酶化的合成引物在某一温度下杂交,该温度允许与修饰序列进行准确配对的杂交,但阻止与原始链进行杂交。然后培养含有与探针杂交的 DNA 的转化体,并用作修饰 DNA 的储存库。

[0045] 本领域的技术人员也知道允许通过含有所谓的“组氨酸标记”的融合多肽的重组方法来构建表达载体。(聚)组氨酸标记是优选含有 6 个连续的组氨酸的氨基酸序列。该组氨酸标记通常融合到所需多肽的 N-末端或 C-末端。该融合多肽很容易通过固定化金属亲和层析而便于纯化,其中用聚组氨酸标记的融合多肽被固定在金属螯合树脂上的金属离子吸附。因此一个例子是来自 Qiagen 的 QIA 表达纯化系统。该公司提供了一种能用于生产聚组氨酸标记的融合多肽的表达载体(pQE)。

[0046] 然而,不必要求该组氨酸标记作为具有 DNA 活性的纯化的多肽的部分。这了实现这一点,可以将能提供蛋白酶剪切位点的附加序列插入到组氨酸标记和所需多肽之间。一个熟知的例子是为因子 X 蛋白酶提供剪切位点的序列。因此,本发明的另一个实施方式是包含本发明的 DNA 序列的重组 DNA 载体。优选地,该 DNA 序列编码由(i)末端组氨酸标记、(ii)与组氨酸标记相邻的能提供因子 X 蛋白酶剪切位点的氨基酸序列和(iii)本发明的多肽组成的融合多肽。应当理解融合多肽中的因子 X 蛋白酶剪切位点能被具有因子 X 蛋白酶活性的蛋白质识别和剪切。更优选地,该 DNA 序列编码具有 SEQ ID NO:5 所示氨基酸序列的融合多肽。

[0047] 当想要生产本发明具有 DNA 聚合酶活性的多肽或者其衍生物如融合多肽时,该多肽重组形式的生产典型地包括:表达载体即重组 DNA 载体的构建,用该载体转化宿主细胞,以及在发生表达的条件下培养转化的宿主细胞。因此,本发明的另一个实施方式是用本发

明的重组 DNA 载体转化的重组宿主细胞。

[0048] 调控序列、重组 DNA 载体和转化方法取决于用于表达基因的宿主细胞的类型。一般而言,原核生物、酵母、昆虫或者哺乳动物的细胞用作宿主。原核生物宿主对于生产重组蛋白一般是最有效的和最方便的,因此优选被用于本发明多肽或融合多肽的表达。

[0049] 最常用于表达重组蛋白的原核生物是大肠杆菌。本领域的技术人员知道许多能用于实施本发明的大肠杆菌菌株和表达系统。然而,除了大肠杆菌外的微生物菌株,像杆菌例如枯草芽孢杆菌、各种假单胞菌和其它细菌菌株,也可用于本发明的热稳定 DNA 聚合酶的重组表达。在这样的原核生物系统中,典型地使用含有衍生自宿主或者与宿主相容的种类的复制位点和调控序列的质粒载体。

[0050] 除了细菌外,真核微生物如酵母也能用作重组宿主细胞。因此优选使用甲基营养型酵母作为真核微生物宿主体也能生产本发明的多肽或融合多肽。甲基营养型酵母具有利用甲醇所必需的生物化学途径,基于细胞形态学和生长特征它被分为四个属:Hansenula、Pichia、Candida 和 Torulopsis。发育程度最高的甲基营养型宿主系统利用 Pichia pastoris(Komagataella pastoris) 和 Hansenulapolymorpha(Pichia angusta)。在 US 5,618,676、US 5,854,018、US 5,856,123 和 US5,919,651 中描述了异源蛋白在酵母中的表达。

[0051] 当终止子序列置于编码序列的 3'末端时,也可以用于增强表达。发现这样的终止子在 3'非翻译区,紧跟在源于酵母的基因中的编码序列之后。任何包含与酵母相容的启动子、复制起点和其它调控序列的载体,都适合用于构建本发明的热稳定 DNA 聚合酶的酵母表达载体。

[0052] 此外,也可在源自多细胞有机体的真核宿主细胞培养物中表达编码具有本发明 DNA 聚合酶活性的多肽或融合多肽的核苷酸序列。

[0053] 根据使用的宿主细胞的不同,用适合该细胞的标准技术进行转化。使用氯化钙的钙处理,如 Cohen, S. N., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69(1972)2110-2114 所述,用于原核生物或其它含有真实的细胞壁屏障的细胞。根癌农杆菌 (Agrobacterium tumefaciens) 感染 (Shaw, C. H., et al., Gene 23(1983)315-330) 用于某些植物细胞。对于哺乳动物细胞,优选 Graham 和 van der Eb, Virology 52(1978)546 的磷酸钙沉淀法。根据 van Solingen, P., and Plaats, J. B., J. Bact. 130(1977)946-947 和 Hsiao, C. L., and Carbon, J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76(1979)3829-3833 的方法进行酵母转化。

[0054] 本发明的另一个实施方式是一种生产具有 DNA 聚合酶活性的多肽的方法,包括下列步骤:(a) 用本发明的重组 DNA 载体转化宿主细胞;(b) 培养该宿主细胞并且在所述宿主细胞中表达具有 DNA 聚合酶活性的多肽;(c) 纯化在步骤 (b) 中表达的具有 DNA 聚合酶活性的多肽。重组表达多肽的纯化以与重组表达 TaqWT (US 5,079,352) 或其缺失片断 (US 5,616,494;US 5,436,149) 相似的方式达到,除了获得 Taq Δ 288 之外。更优选的是一种生产具有 DNA 聚合酶活性的多肽的方法,包括下列步骤:(a) 用本发明的重组 DNA 载体转化宿主细胞;(b) 培养该宿主细胞并且在所述宿主细胞中表达一种由 (i) 末端组氨酸标记、(ii) 与组氨酸标记相邻的能提供因子 X 蛋白酶剪切位点的氨基酸序列和 (iii) 本发明的多肽组成的融合多肽;(c) 纯化在步骤 (b) 中表达的融合多肽;(d) 在具有因子 X 蛋白水解酶活性的蛋白酶的存在下,通过培育所述融合多肽的方式剪切该融合多肽,从而将具有 DNA 聚合

酶活性的多肽与因子 X 的蛋白酶剪切位点和组氨酸标记分离；(e) 纯化步骤 (d) 中的具有 DNA 聚合酶活性的多肽。甚至更优选地，用可结合组氨酸标记的颗粒状亲和基质纯化步骤 (c) 中的融合多肽。甚至更优选地，步骤 (d) 中融合多肽的组氨酸标记与颗粒状亲和基质结合。甚至更优选地，颗粒状亲和基质是一种涂有螯合的金属树脂的层析物质，且金属离子被固定在涂有树脂的层析物质上。甚至更优选地，层析物质涂有镍-次氨基三乙酸 (Ni-NTA)。在这点上，本领域的技术人员已注意到 EP1 069131。因此，分离已经在转化的大肠杆菌细胞培养物中重组表达的本发明的组氨酸标记的融合多肽的优选的方法是制备细胞的溶菌产物。制备溶菌产物的一种方法是通过在溶菌产物缓冲液中悬浮细胞并且用超声波处理细胞。将存在于溶菌产物中的 DNA 用 DNA 酶优选 DNA 酶 I 消化。大肠杆菌蛋白质随后通过热变性方法（优选 72°C 30 分钟）降解，且能通过离心从溶菌产物中被分离出。在离心后，将澄清的上清液用 Ni-NTA 超流柱 (Qiagen 目录号 30410、30430 或 30450) 层析，借此将组氨酸标记的融合多肽与柱的固定化的金属亲和基质结合。用清洗缓冲液清洗两次后，运用清洗缓冲液和洗脱缓冲液的梯度，从而用洗脱缓冲液阶梯式地逐渐代替清洗缓冲液。从而组氨酸标记的融合多肽可从柱上被洗脱下来。进一步，在存在因子 X 蛋白酶的情况下，于支持因子 X 蛋白酶的特定蛋白水解活性的条件下，孵育洗脱的融合多肽。在热变性（优选 72°C 30 分钟）之后，通过使用 Ni-NTA 超流柱的再次层析，将剪切下来的组氨酸标记和未剪切的融合多肽与产物即 Taq Δ 288 中分离开来。收集包括产物的流通物质。进一步的处理步骤可以包括浓缩和透析，优选在一种能稳定 Taq Δ 288 的缓冲液中进行浓缩和透析，从而得到本发明的多肽的稳定制剂。

[0055] 可选择地，当与柱的固定化的金属亲和基质结合时，可用因子 X 蛋白酶剪切融合多肽。这样，在因子 X 蛋白酶的存在下，于支持因子 X 蛋白酶的特定蛋白水解活性的条件下，孵育与融合多肽结合的柱物质。随后用非洗脱缓冲液的缓冲液，即支持组氨酸标记与涂有 Ni-NTA 的层析物质结合的缓冲液清洗，在流体物质中获取 Taq Δ 288 多肽以及因子 X 蛋白酶。随后，灭活因子 X 并纯化 Taq Δ 288 多肽。

[0056] 为了长期稳定，可将本发明的热稳定 DNA 聚合酶贮存于含有一种或多种非离子聚合去污剂的缓冲液中。该去污剂的分子量一般约在 100 至 250,000 道尔顿的范围内，优选为约 4,000 至 200,000 道尔顿，将酶稳定在 pH 约为 3.5 至 9.5，优选约 4 至 8.5。该去污剂的例子包括由 McCutcheon Division of MC Publishing Co., 175 Rock Road, Glen Rock, NJ (USA) 公布的 McCutcheon's Emulsifiers & Detergents, North American edition (1983) 的第 295-298 页上列出的那些。

[0057] 优选地，去污剂选自包含乙氧基化的脂肪醇醚和十二烷基醚、乙氧基化的烷基酚、辛基苯氧基聚乙氧基乙醇化合物、经修饰的氧基乙基化的和 / 或氧基丙基化的直链醇、聚乙二醇单油酸酯化合物、聚山梨醇酯化合物和酚脂肪醇醚的组。更特别优选的是吐温 20，一种源自 ICI Americas Inc., Wilmington, DE 的聚氧基乙基化的 (20) 聚山梨糖醇单月桂酸酯，和 Iconol NP-40，一种源自 BASF Wyandotte Corp., Parsippany, NJ 的乙氧基烷基酚（壬基）。

[0058] 本发明的另一个实施方式是在含有一种或多种非离子型聚合物去污剂的缓冲液中的包含本发明的多肽的稳定制剂。优选地，稳定制剂的缓冲液含有选自由甘油、KCl、Tris/HCl (Tris(羟甲基)-氨基甲烷盐酸盐)、EDTA(乙二胺四乙酸二钠盐)、吐温 20 和二

硫苏糖醇 (DTT) 组成的组的成分。更优选的是一种由 63% (重量 / 体积) 甘油、100mMKCl、20mM Tris/HCl pH8.5、0.1mM EDTA、0.5% (体积 / 体积) 吐温 20、1mM DTT 组成的稳定制剂。

[0059] 在 PCR 扩增的每一循环中, 将双链目标序列变性, 将引物退火到每一变性目标链上, 通过 DNA 聚合酶的作用将引物延伸。扩增的特异性取决于引物杂交的特异性。选择与目标核酸序列的每一条链的 3' 末端的序列互补或者充分互补的引物。在典型的 PCR 中使用的提高的温度下, 引物只与想要的目标序列杂交。然而, 扩增反应混合物典型地在低于确保引物的杂交特异性所需的温度许多的室温下装配。在这样的较不严谨的条件下, 引物可能非特异性地与其它仅部分互补的核酸序列结合 (或甚至与其它引物结合), 并且开始合成非所需的延伸产物, 其可以沿着目标序列扩增。非特异性的引物延伸产物的扩增可与所需的目标序列的扩增相竞争, 并可显著地降低所需序列扩增的效率。在 Chou, Q., et al., Nucleic Acids Res. 20(1992)1717-1723 中进一步讨论了非特异性扩增所引起的问题。

[0060] 在反应开始之前, 通过减少由与非目标序列结合的引物形成延伸产物, 可以减少非特异性扩增。在一种被称为“热启动”方案的方法, 一种或多种关键试剂在反应混合物中被抑制, 直到提高温度到足够提供必要的杂交特异性。如此, 在反应条件不确保特异性的引物杂交期间, 反应混合物不能支持引物延伸。

[0061] 作为“热启动”方案中一个常见的特征, 通过可逆地灭活 DNA 聚合酶的方式, 也就是说, 可逆地阻断 DNA 聚合酶抑制 PCR 反应混合物中的 DNA 聚合酶活性。一种方法使用一种化学修饰的 DNA 聚合酶, 其只在提高的温度下孵育 DNA 聚合酶一段时间之后才变得有活性, 因此在构成 PCR 反应混合物期间阻止不想要的 DNA 合成产物的生产。US 6, 183, 998 描述了用醛如甲醛进行热稳定 DNA 的可逆灭活。本质上, 在高于 50°C 的温度下恢复酶活性, 在环境温度下可达到酶的完全失活。专利 EP 0 771 870 和 US 6, 479, 264 描述了用二羧酸酐可逆地灭活热稳定的 DNA 聚合酶。US 5, 773, 258 和 US 5, 677, 152 描述了一种热稳定酶的酶活性的可逆灭活。优选的共价修饰试剂包括马来酸酐; 取代的马来酸酐如柠檬酸酐、顺式乌头酸酐和 2,3-二甲基马来酸酐; 外-顺-3,6-桥氧基- Δ 4-四氢邻苯二甲酸酐; 和 3,4,5,6-四氢邻苯二甲酸酐。因此, 柠檬酸酐和顺-乌头酸酐被优选用于 PCR 扩增中制备可逆阻断的 DNA 聚合酶。可逆灭活的酶是对使酶失活的蛋白质进行化学修饰的结果。在扩增反应之前或作为其一部分, 在提高的温度下孵育反应混合物, 可恢复失活酶的活性。因此, 在本发明的另一个优选的实施方式中, 当共价地结合所述多肽时, 本发明的多肽则共价地结合到能可逆地阻断该多肽的 DNA 聚合酶活性的化合物上。更优选地, 该化合物选自由 (a) 柠檬酸酐, (b) 顺-乌头酸酐, (c) 2,3-二甲基马来酸酐, (d) 外-顺-3,6-桥氧基- Δ 4-四氢邻苯二甲酸酐, 和 (e) 3,4,5,6-四氢邻苯二甲酸酐组成的组。

[0062] 本发明的另一个优选的实施方式是包含具有 DNA 聚合酶活性的多肽的稳定制剂, 当共价地结合所述多肽时, 该多肽共价地结合到能可逆地阻断该多肽的 DNA 聚合酶活性的化合物上。更优选地, 该化合物选自由 (a) 柠檬酸酐, (b) 顺-乌头酸酐, (c) 2,3-二甲基马来酸酐, (d) 外-顺-3,6-桥氧基- Δ 4-四氢邻苯二甲酸酐, 和 (e) 3,4,5,6-四氢邻苯二甲酸酐组成的组。

[0063] 还有, 本发明另一个优选的实施方式是包含具有 DNA 聚合酶活性的多肽的稳定制剂, 当结合所述多肽时, 通过能可逆地阻断该多肽的 DNA 聚合酶活性的抗体结合该多肽。也

可通过 DNA 聚合酶的非共价修饰来可逆地阻断 DNA 聚合酶的活性。US 5, 338, 671 公开了使用特异于 DNA 聚合酶的抗体来抑制 DNA 聚合酶活性。DNA 聚合酶和 DNA 聚合酶的特异性抗体的预混合导致形成一个抗体聚合酶复合物。在这些条件下,基本上没有检测到寡核苷酸的延伸活性。在提升的温度下,抗体从复合物中分离,从而释放 DNA 聚合酶,然后其在 PCR 过程中在 DNA 合成中发挥作用。优选地,抗体是一种抗 Taq DNA 聚合酶的单克隆抗体。抗 Taq DNA 聚合酶的单克隆抗体是本领域所已知的,例如描述于 US5, 338, 671 中。优选地,抗 Taq DNA 聚合酶的单克隆抗体是 TP4-9.2 和 TP1-12.2, 得自保藏于美国典型培养物保藏中心(ATCC), 由 ATCC 指定保藏号分别为 HB11807 和 HB11127 的杂交瘤。优选的抗体具有与聚合酶的缔合常数至少约为 $1 \times 10^7 \text{M}^{-1}$ 。根据本发明, 定义为特异于 DNA 聚合酶的抗体, 是那些在温度约为 20-40°C 下能抑制 DNA 聚合酶活性的抗体。在 PCR 热循环过程中使用提升的温度, 或者在热循环开始之前在提升的温度下预孵 PCR 反应混合物来灭活本发明的抗体。通过本领域的普通技术人员已知的测定方法, 可检测抗体抑制聚合酶活性的能力, 例如像 Sharkey, D. J., et al., BioTechnology 12(1994) 506-509 所描述的。例如, DNA 聚合酶活性的标准测定可以基于聚合酶在 DNA 中形成的单链缺口中掺入 ^3H -dNTP 的能力。用聚合酶预孵抗体, 然后进行标准聚合酶测定, 可检测抗体抑制聚合酶活性的能力。在该测定中能显著降低聚合酶活性的抗体对本发明是有用的。类似的测定可以用于检测所需抗体的热灭活。简言之, 通过提高至所需温度后冷却并测定聚合酶活性, 可改进抗体抑制聚合酶能力的测定。所需抗体在 85-95°C 的温度下失活, 从而释放有活性的聚合酶。

[0064] 本发明的另一个实施方式是本发明多肽的、与一种化合物共价地偶联的本发明的多肽、与一种抗体结合的本发明的多肽或本发明的一种稳定制剂用于生产引物延伸产物用途, 其中当该化合物共价偶联于所述多肽时, 它能可逆地阻断该多肽 DNA 聚合酶的活性, 当该抗体结合所述多肽时, 它能可逆地阻断该多肽 DNA 聚合酶的活性。例如当进行 PCR 或者用 Sanger 方法进行测序反应时, 则生产出引物延伸产物。因此本发明的用途优选用于核酸模板的测序。本发明的用途也优选用于扩增目标核酸。引物延伸的另一个例子是切口平移。本领域的技术人员知道许多阐明术语“生产引物延伸产物”的其它例子。本发明包括用本发明的具有 DNA 聚合酶活性的多肽或者含有该多肽的制剂来生产引物延伸产物。

[0065] 本发明的另一个实施方式是一种用于生产包含本发明稳定制剂的引物延伸产物的试剂盒, 优选用于核酸模板测序的试剂盒。也优选用于扩增目标核酸的试剂盒。非常优选使用 LightCycler 扩增目标核酸的试剂盒。因此一个例子是 LightCycler DNA Master SYBR Green I 试剂盒 (Roche Diagnostics GmbH, 曼海姆; 目录号 2015099)。因此, 这样的试剂盒可包含三个小瓶, 其中一个小瓶 (1) 包含浓缩 10 倍的反应混合物, 含有 Taq Δ 288 或具有可逆阻断的 DNA 聚合酶活性时 Taq Δ 288 的稳定制剂, 以及附加的 dNTP 与任选的 dUTP 而不是 dTTP、SYBR 绿 I 染料和 10mM MgCl_2 的混合物。试剂盒的另一个小瓶 (2) 包含一定浓度的 MgCl_2 原液, 例如浓度为 25mM。试剂盒的另一个小瓶 (3) 包含用于调节最终的反应体积的无菌的 PCR 等级的纯水。

[0066] 本发明的另一个实施方式是一种扩增样品中的目标核酸的方法, 包括下列步骤: (a) 使所述样品与扩增反应混合物接触, 该混合物含有与所述目标核酸互补的引物和多肽, 其中多肽选自由下列组成的组 (i) 本发明的多肽, (ii) 与一种化合物共价地偶联的本发明的多肽, 当共价偶联于所述多肽时, 该化合物能可逆阻断该多肽 DNA 聚合酶的活性, 和

(iii) 与一种抗体结合的本发明的多肽,当结合所述多肽时,该抗体能与可逆地阻断该多肽 DNA 聚合酶的活性,(b) 任选地通过热处理释放阻断的 DNA 聚合酶活性,(c) 将步骤 (a) 得到的混合物中将所述引物退火到所述目标核酸上,(d) 通过孵育步骤 (b) 后的混合物来扩增目标核酸,从而形成引物延伸产物。

[0067] 为了易于讨论,下面的方案假设将要扩增的特定序列包含在双链核酸中。然而,该方法在扩增单链核酸如 mRNA 中同样有用,虽然在优选的实施方式中终产物仍旧是双链 DNA。在单链核酸的扩增中,第一步涉及互补链的合成(两个扩增引物中的一个可用于该目的),后续步骤的进行如同在以下所述的双链扩增过程。

[0068] 因此,一个示范性的扩增过程包括下列步骤:(a) 使每条核酸链与四种不同的核苷三磷酸和要扩增的每条特定序列的两条寡核苷酸引物接触,其中选择与特定序列的不同链充分互补的引物,以便由一个引物合成的衍生产物,当与其互补物分离时,可以作为合成其它引物的延伸产物的模板,所述接触是在允许每一引物与互补核酸链杂交的温度下进行的;(b) 在步骤 (a) 的同时或者之后,使每一核酸链与本发明的具有 DNA 聚合酶活性的、能与核苷三磷酸结合而形成与特定核酸序列的每条链互补的引物延伸产物的多肽接触;(c) 在有效温度下将步骤 (b) 中的混合物维持一段有效的时间,以提高具有 DNA 聚合酶活性多肽的活性,以及针对要扩增的每一不同序列合成每一引物的延伸产物,该引物与每一核酸链模板互补,而温度不会太高以至于使每一延伸产物与互补链模板分离;(d) 将步骤 (c) 中的混合物在有效温度下加热一段有效的时间,以从模板中分离引物延伸产物,在该模板上合成了这些产物延伸以生产单链分子,而温度不会太高以至于使酶不可逆地变性;(e) 将步骤 (d) 中的混合物冷却至有效温度维持一段有效的时间,以促进引物与步骤 (d) 中生产的每一单链分子的杂交;和 (f) 将步骤 (e) 中的混合物在有效温度下维持一段有效的时间,以提高具有 DNA 聚合酶活性的多肽的活性,及针对要扩增的每一不同序列合成每一引物的延伸产物,该引物与步骤 (d) 中生产的每一核酸模板互补,但是温度不会太高以至于使每一延伸产物与互补链模板分离。步骤 (e) 和 (f) 中的有效时间和温度可以一致,以使步骤 (e) 和 (f) 可同时进行。重复步骤 (d)-(f) 直到获得所需的扩增水平。

[0069] 扩增方法不仅可用于生产大量的已知序列的特定核酸序列,而且可用于生产已知存在的但是并不完全确定的核酸序列。只需充分详细知道序列的两个末端的足够多数量的碱基,使得能够制备两个寡核苷酸引物,其将与所需序列的不同链在沿着序列的相关位置上杂交,以使从一个引物出发合成的延伸产物,当与模板(补体)分离时,可作为用于将另一引物延伸成所定义的长度的核酸序列的模板。对序列两端的碱基了解得越多,针对目标核酸序列的引物的特异性和方法的效率以及反应的特异性就会越高。

[0070] 在任何情况下,虽然序列不必是纯的或者分离的分子,但是要扩增的序列的初始复制必须是可靠的。一般而言,扩增过程涉及链式反应,用于以相对于所涉及的反应步骤的数目呈指数值的方式,生产至少一种特定的核酸序列条件是:(a) 充分详细地了解所要求的序列的末端,以至于能合成与该末端杂交的寡核苷酸,和 (b) 可获得少量的序列用于启动链式反应。链式反应的产物将是一种分离的核酸双链体,具有与使用的特异引物的 5' 末端相对应的终端。

[0071] 如果它含有或被怀疑含有所要扩增的特异性核酸序列,任何纯化或非纯化形式的核酸序列都可被用作起始核酸。要扩增的核酸可以从任何来源获得,例如,源自质粒如

pBR322、源自克隆的 DNA 或 RNA 或者源自任何来源的 DNA 或 RNA, 包括细菌、酵母、病毒、细胞器和较高等生物体如植物和动物。DNA 或 RNA 可通过各种技术从血液、组织原料如绒毛膜或羊膜细胞中提取。例如参见 Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1982, pp. 280-281。因此, 该方法可使用例如 DNA 或 RNA, 包括信使 RNA, 其中 DNA 或 RNA 可以是单链或者双链的。另外, 可以使用含有每种中一条链的 DNA-RNA 杂合体。也可以使用这些核酸的任意混合物, 因为核酸可以从先前的扩增反应生产 (使用相同或不同的引物)。要扩增的特异性核酸序列可以仅仅是大分子的一个片断, 或者最初以分离的分子存在, 以使特异性序列构成了整个核酸。

[0072] 要扩增的序列最初不必以纯体形式存在; 该序列可以是复杂的混合物的一小部分, 如在整个人类 DNA 中含有的 β -球蛋白的一部分 (如 Saiki, R. K., et al., *Science* 230 (1985) 1350-1354 中例举的) 或者属于特定微生物的核酸序列的一部分, 该生物可能仅占特定生物样品的很小的部分。在低渗缓冲液悬浮和在约 90°C -100°C 下热处理后, 可直接将细胞用于扩增过程中, 直到细胞发生裂解, 细胞内成分分散开来 (一般 1 到 15 分钟)。在加热步骤后, 可直接将扩增试剂加入到裂解的细胞中。起始核酸序列可以包含比所需的特异性核酸序列更多的序列。扩增过程不仅可用于生产大量的一种特异性核酸序列, 而且可用于同时扩增位于相同或不同核酸分子上的不止一种不同的特异性核酸序列。

[0073] 引物在 PCR 方法中起着关键的作用。词语“引物”用于描述扩增过程时, 可以指不止一个引物, 特别是在要扩增片断的末端序列的信息有些不明确的情况下, 或者在使用 WO 91/05753 中所述的简并引物方法的情况下。例如, 在从蛋白质序列信息中推导出核酸序列的情况下, 含有基于遗传密码简并性的代表所有可能的密码子的序列的引物的集合, 可用于每一条链。该集合中的一个引物将与所要扩增的序列的一部分充分同源, 以便可用于扩增。

[0074] 另外, 不止一个特异性核酸序列可从第一个核酸或核酸混合物中扩增, 只要使用适当数量的不同寡核苷酸引物。例如, 如果要生产两种不同的特异性核酸序列, 则使用四个引物。两个引物特异于其中一种特异性核酸序列, 而另两个引物特异于第二种特异性核酸序列。如此, 通过本发明的方法能指数性地生产两种不同的特异性序列。

[0075] 在给定数量的扩增循环之后, 可扩增给定序列范围内的序列, 通过在至少一个扩增循环后, 加入一套与要扩增序列的内部序列 (即不是末端序列) 互补的引物, 可在反应中获得更高的特异性。这样的引物可在任何阶段加入且能提供一种较短的扩增片断。可选择地, 用具有非互补性末端但与先前扩增中使用的引物有些重叠的引物, 可制备较长的片断。

[0076] 当扩增过程用于体外突变时, 引物也起关键作用。在其中使用与原始模板非准确互补的引物进行扩增反应的产物中, 将包含引物的序列而不是模板的序列, 这样引入一种体外突变。在进一步的循环中, 该突变会以不可减少的效率被扩增, 因为没有要求进一步的错配引导。用不同引物引入进一步序列变化, 可在改变的 DNA 上重复如上所述的制备改变的 DNA 序列的过程。这样, 能逐步地产生一系列突变序列, 其中每添加一个新的突变到系列中都与上一个差异较小, 但是与原始的 DNA 来源序列差异较大。

[0077] 由于引物可包含非互补性序列作为其序列的一部分, 如果足够量的引物包含与要扩增的链互补的序列, 则可实现许多其它优点。例如, 与模板序列不互补的核苷酸序列 (例

如像启动子、连接区、编码序列等)可在一个或两个引物的 5' 末端被附着,且附加于扩增过程的产物上。在加入延伸引物后,进行足够的循环,以获得所需数量的含有非互补性核苷酸插入片断的新模板。用简单的技术,在相对短的时间内(例如两个小时或更少),允许生产大量的组合片断。

[0078] 用任何合适的方法例如像上述的磷酸三酯和磷酸二酯方法,或者其自动化的实施方式可制备寡核苷酸引物。在一个这样的自动化的实施方式中,二乙基亚磷酰胺被用作起始原料,并且可以如 Beaucage et al., *Tetrahedron Letters* 22(1981)1859-1862 所述方式被合成。在美国专利 4,458,066 中描述了一种在修饰的固相支持物上合成寡核苷酸的方法。也可以使用已从生物来源分离的(如限制性内切酶消化)引物。

[0079] 然而,无论用什么引物,反应混合物必须包含进行 PCR 的模板,因为特异性核酸序列是通过使用含有作为模板序列的核酸而生产的。第一步包括使每一核酸链与四种不同的核苷三磷酸和被扩增或检测的每一个特异性核酸序列的两个寡核苷酸引物接触。如果要扩增或检测的核酸是 DNA,则核苷三磷酸通常是 dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP,尽管各种核苷酸衍生物也可用于该过程中。例如,当使用 PCR 在未知序列的样品中检测已知的序列时,dTTP 经常被替换为 dUTP,以减少 WO 91/05210 中教导的样品之间的污染。

[0080] 核苷三磷酸的浓度可变化很大。典型地,用于扩增的缓冲液中每一 dNTP 的浓度是 50 至 500 μ M,存在于缓冲液中的 $MgCl_2$ 量为 1 至 3mM 以激活聚合酶和增强反应的特异性。然而,在一些应用中,如在高比活性下进行 DNA 测序或者生产放射性同位素标记探针中,可以优选 dNTP 的浓度为 1 至 20pM。

[0081] 目标核酸的核酸链用作附加的核酸链合成的模板,该附加的核酸链是引物的延伸产物。该合成可用任何合适的方法进行,但一般发生在缓冲的水溶液中,优选在 pH 为 7 至 9,最优选约为 8 下。为促进合成,将摩尔过量的两个寡核苷酸引物加入到含有模板链的缓冲液中。在实际情况下,当要扩增的序列被包含于复杂的长链核酸链的混合物中时,加入的引物量一般会摩尔过量于互补链(模板)的量。优选大的摩尔过量以改善扩增效率。因此,用于克隆的 DNA 模板一般使用的引物:模板比率至少为 1000 : 1 或者更高,用于从复杂的基因组样品中扩增时一般使用的引物:模板比率约为 100 : 1 或更高。

[0082] 然后根据被扩增或检测的核酸是否是双链或单链来处理模板、引物和核苷三磷酸的混合物。如果核酸是单链的,则在第一个延伸循环之前不需要变性步骤,并且将反应混合物维持在能促进引物与其互补目标(模板)序列杂交的温度。这样的温度一般约为 35°C 至 65°C 或更高,优选约为 37°C 至 60°C 维持一段有效的时间,一般为几秒到五分钟,优选为 30 秒到一分钟。杂交温度可以使用 35°C 至 70°C。使用长度为 15 个核苷酸或更长的引物以增加引物杂交的特异性。引物越短要求的杂交温度越低。

[0083] 在存在合适的缓冲液、dNTPs 和一个或多个寡核苷酸引物时,通过加入本发明具有 DNA 聚合酶活性的多肽,可以合成原始单链核酸的互补链。如果加入合适的单引物,则引物延伸产物会与单链核酸互补,且会以相等或不等长度的双链与核酸链杂交(取决于引物与模板杂交的位置),然后如上所述可分离成单链,以产生两个单一的、分离的互补链。然后加入第二引物,以便随后使用原始的单链核酸和第一引物的延伸产物作为模板,发生引物延伸的循环。可选择地,可将两个或多个合适的引物(其中一个引物能用其它引物的延伸产物作为模板而引导合成)加入到单链核酸中并进行反应。

[0084] 如果核酸含有两条链,如同在双链目标的扩增或单链目标的第二循环扩增的情况下,核酸链必须在引物杂交之前被分离。通过任何合适的变性方法,包括物理的、化学的或酶的方法可实现这种链分离。一个优选的分离核酸链的物理方法包括加热核酸直到发生完全的($> 99\%$)变性。典型的热变性涉及范围约为 80°C 到 105°C 的温度,维持范围一般约为几秒到几分钟的时间,这取决于核酸的组成和大小。优选地,有效的变性温度是 90°C - 100°C 维持几秒到 1 分钟。用选自被称为解螺旋酶的一类酶或者酶 RecA 也可诱导链分离,该酶 RECA 具有解螺旋酶活性且已知在存在 ATP 时能使 DNA 变性。适用于用解螺旋酶分离核酸链的反应条件由 Kuhn Hoffmann-Berling, CSH-Quantitative Biology 43(1978)63 描述,而使用 RecA 的技术见 Radding, C. M., Ann. Rev. Genetics 16(1982)405-437 的综述。变性产生两条相等或不等长度的分离的互补链。

[0085] 如果通过加热使双链核酸变性,则允许将反应混合物冷却至能促进每一引物与互补目标(模板)序列杂交的温度。该温度一般约为 35°C 至 65°C 或更高,取决于试剂,优选 37°C 至 60°C 。将杂交温度维持一段有效的时间,一般几秒至几分钟,优选地 10 秒到 1 分钟。在实际情况中,简单地将温度从约 95°C 降低至 37°C ,且在该温度范围内发生杂交。

[0086] 无论核酸是单链的还是双链的,在变性步骤之前或期间,或者当温度降低至或在促进杂交的范围内时,可以加入本发明的具有 DNA 聚合酶活性的多肽。虽然本发明聚合酶的热稳定性允许在任何时间将该酶加入该聚合酶到反应混合物中,但是通过在混合物还没有被冷却至严谨的杂交温度以下的在某个时间点时将聚合酶加入到反应混合物中,可以充分地抑制非特异性扩增。杂交后,则将反应混合物加热至或维持在能促进或优化具有 DNA 聚合酶活性的多肽的活性的温度,即该温度足以增加具有 DNA 聚合酶活性的多肽的活性,有助于从杂交的引物和模板合成引物延伸产物。实际上该温度必须足以合成与每一核酸模板互补的每一引物的延伸产物,但必须不能太高以将每一延伸产物从其互补性模板上变性下来(即温度一般约低于 80°C 至 90°C)。

[0087] 根据使用的核酸,对该合成反应有效的典型的温度一般在约为 40°C 至 80°C ,优选为 50°C 至 75°C 的范围内。对于本发明的具有 DNA 聚合酶活性的多肽,更优选的温度范围约为 65°C 至 75°C 。该合成所要求的时间范围可约为 10 秒到几分钟或更长,主要取决于温度、核酸的长度、酶和核酸混合物的复杂性。延伸时间通常约为 30 秒到几分钟。如果核酸较长,则一般合成互补链要求更长的时间。

[0088] 新合成的链和互补核酸链形成一个双链分子,其用于扩增过程的后续步骤中。在下一步中,在使分子变性的有效温度下和作用时间内,而不是在使具有 DNA 聚合酶活性的多肽完全不可逆变性或失活的温度下和作用时间长度内,进行热变性,将双链分子的链分离。在模板变性之后,如上所述,将温度降低至能促进引物与前一步骤产生的互补单链分子(模板)杂交的水平。

[0089] 在该杂交步骤之后,或者与该杂交步骤的同时,将温度调节至能有效地促进具有 DNA 聚合酶活性的多肽的活性的温度,用新合成链和原始链作为模板能够合成引物延伸产物。如上所述,温度也必须不能太高到将延伸产物从其模板中分离(变性)。在该步骤中可发生杂交,以至于不要求先前的变性后的冷却步骤。在这种使用同步的情况下,优选的温度范围是 50°C 到 70°C 。

[0090] 包括在一个链分离、杂交和延伸产物合成的循环中的加热和冷却步骤,根据生产

所需数量的特异性核酸序列的需要可被重复许多次。仅有的限制是引物、具有 DNA 聚合酶活性的多肽和提供的核苷三磷酸的量。通常,完成 15 至 30 个循环。对于扩增的 DNA 的诊断性检测来说,循环的数量将取决于样品的特性、样品中起始目标物的浓度和在扩增后所使用的检测方法的灵敏度。对于给定的检测灵敏度,如果被扩增的样品是纯的并且起始目标物浓度很高,则要求较少的循环。如果样品是复杂的核酸混合物并且起始目标物的浓度很低,则要求更多的循环来扩增到足以进行检测的信号。对于一般的扩增和检测,该过程约重复 15 次。当扩增用于产生要检测的带标记的序列特异性探针的序列时,并且当人的基因组 DNA 是扩增的目标时,该过程重复 15 至 30 次,以充分扩增序列以至于产生清楚的可检测的信号,也就是说使背景噪声不干涉检测。

[0091] 在起始添加后不必加入另外的核苷酸、引物或具有 DNA 聚合酶活性的多肽,如果关键的反应物没有被耗尽,并且具有 DNA 聚合酶活性的多肽没有变性或没有不可逆地失活,则在该情况下必须加入另外的聚合酶或其它反应物以继续反应。在完成合适数量的循环以产生所需数量的特异性核酸序列后,可以以常用方式,例如通过加入 EDTA、苯酚、SDS 或 CHCl_3 ,使具有 DNA 聚合酶活性的多肽失活或者分离反应的组分来停止反应。

[0092] 扩增过程可连续地操作。在一个自动化方法的实施方式中,可以让反应混合物进行温度循环,将温度程序控制在一定水平维持一定的时间。用于该目的的一个仪器是由 Perkin-Elmer Cetus Instruments 开发和销售的用于操作扩增反应的自动化的机器。使用该仪器进行 PCR 的详细说明可通过购买该仪器获得。这样仪器的另一个例子是 LightCycler,可获自 Roche Diagnostics GmbH,曼海姆,德国。

[0093] 本发明的具有 DNA 聚合酶活性的多肽在各种方法中是很有用的,在这些方法中通过 PCR 扩增核酸序列是有用的。如 US 4,800,159 中所述的,扩增方法可用于克隆要插入到合适的表达载体中的特定核酸序列。通过重组 DNA 技术的标准方法,可使用载体其转化合适的宿主细胞以生产该序列的基因产物。这样的克隆可包括用平末端连接直接连接到载体中,或者使用限制性酶在引物中含有的位点处进行剪切。其它适合于本发明的热稳定 DNA 聚合酶的方法包括描述于 US 4,683,195 和 US 4,683,202 和 EP 0 229 701; EP 0 237 362;和 EP 0 258 017 中的那些方法。此外,本发明的酶可用于非对称 PCR(见 Gyllenstein, U. B., and Erlich, H. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85(1988)7652-7656); 反向 PCR(Ochman, H., et al., Genetics 120(1988)621-623);和 DNA 测序(见 Innis, M. A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85(1988)9436-9440, and McConlogue, L., et al., Nucleic Acids Res. 16(1988)9869), cDNA 末端的随机扩增 (RACE), 用于扩增一系列 DNA 片断的随机引导 PCR,和如同由 Loh, E., in METHODS: A Companion to Methods in Enzymology(1991)2, pp. 11-19 所述的具有单侧特异性的 PCR 方法如锚定 PCR 和连接介导的锚定 PCR。

[0094] 特别地,本发明的具有 DNA 聚合酶活性的多肽对于用 LightCycler 扩增目标核酸是有用的。进行 PCR LightCycler 的仪器和方案描述于“LightCycler 操作者手册 3.5 版”手册中(2000 年 10 月),可获自 Roche Diagnostics GmbH,曼海姆,德国。因此,第 4.3.1 章节中给出的建议同样可用于 Taq Δ 288。

[0095] 本发明的另一个实施方式是一种用于测定核酸序列的方法,它包括下列步骤:在至少一种链终止试剂和一种或更多种核苷酸三磷酸的存在下,用本发明的多肽从要测序的

核酸模板产生链终止的片断,以及从所述片断的大小测定所述核酸的序列。

[0096] 最近几年,通过 Sanger 双脱氧核苷酸方法测定 DNA 序列 (Sanger, F., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74(1977)5463-5467) 已经历了重大的改进,包括新载体的开发 (Yanisch-Perron, C., et al., Gene 33(1985)103-119)、碱基类似物 (Mills, D. R., and Kramer, F. R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76(1979)2232-2235, and Barr et al., BioTechniques 4(1986)428-432)、酶 (Tabor, S., and Richardson, C. C., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84(1987)4767-4771, and Innis, M. A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85(1988)9436-9440) 和用于局部自动分析 DNA 序列的仪器 (Smith, L. M., et al., Nature 321(1986)674-679; Prober, J. M., et al., Science 238(1987)336-341; and Ansorge, W., et al., Nuc. Acids Res. 15(1987)4593-4602)。基本的双脱氧测序程序包括:(i) 将引物和合适的单链或变性的双链 DNA 模板退火;(ii) 在四个分离的反应中用 DNA 聚合酶延伸引物,每个反应包括一个 α -标记的 dNTP 或 ddNTP(可选择地,可以使用标记的引物)、未标记的 dNTPs 混合物和一个终止链的双脱氧核苷酸-5'-三磷酸(ddNTP);(iii) 在高分辨聚丙烯酰胺凝胶上分离四组反应产物;和(iv) 产生一个可被检测的凝胶放射自显影影像以推断 DNA 序列。可选择地,荧光标记的引物或核苷酸可用于识别反应产物。已知的双脱氧测序方法利用 DNA 聚合酶如大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片断、逆转录酶、Taq DNA 聚合酶或者修饰的 T7 DNA 聚合酶。

[0097] 对于基本的双脱氧测序的替代方法,循环双脱氧测序是一个在双脱氧链终止子存在下目标序列的线性、非对称扩增。一个单循环产生一族所有可能长度的延伸产物。在来自 DNA 模板的延伸反应产物变性后,在双脱氧终止子的存在下发生多个循环的引物退火和引物延伸。该方法不同于 PCR 因为只使用一个引物,在每一循环中测序反应产物的增长是线性的,并且扩增产物在长度上是不均一的,不会作为下一反应的模板。循环双脱氧测序是一种为使用自动化的 DNA 测序仪的实验室和其它高容量测序实验室提供优点的技术。由于该技术的特异性和产生的信号量增加了,有可能在无克隆的情况下直接进行基因组 DNA 的测序。循环测序方案适用于单链和双链模板,包括基因组的、克隆的和 PCR 扩增的模板。

[0098] 具有增强的热稳定性的 DNA 聚合酶,特别是 Taq Δ 288,在循环测序中具有几个优点:它们能经受引物与基因组目标物的特异性杂交所要求的严谨退火温度,也能经受多个发生在每一循环中的高温变性循环。在高温即 70-75°C 下进行延伸反应,由于二级结构的不稳定性,导致对含有二级结构的 DNA 的测序结果有重大改进。然而,这样的温度不会消除所有的二级结构。

[0099] 提供以下的实施例、参考文献、序列表、表格和附图,以帮助理解本发明,在附带的权利要求书中阐明的真正的保护范围。可以理解在不脱离本发明精神的情况下可以对所提出的程序进行修改。

[0100] 参考文献目录

[0101] Ansorge, W., et al., Nuc. Acids Res. 15(1987)4593-4602

[0102] Barr et al., BioTechniques 4(1986)428-432

[0103] Beaucage et al., Tetrahedron Letters 22(1981)1859-1862

[0104] Bessman et al., J. Biol. Chem. 233(1957)171-177

[0105] Buttin, G., and Kornberg, A., J. Biol. Chem. 241(1966)5419-5427

- [0106] Chien et al., Chemical Abstract 85, No. 155559t (1976)
- [0107] Chou, Q., et al., Nucleic Acids Res. 20 (1992) 1717-1723
- [0108] Cohen, S. N., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69 (1972) 2110-2114
- [0109] EP 0 229 701
- [0110] EP 0 237 362
- [0111] EP 0 258 017
- [0112] EP 0 771 870
- [0113] EP 1 069 131
- [0114] Graham and van der Eb, Virology 52 (1978) 546
- [0115] Gyllenstein, U. B., and Erlich, HA, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988) 7652-7656
- [0116] Hsiao, C. L., and Carbon, J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (1979) 3829-3833
- [0117] Innis, M. A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988) 9436-9440
- [0118] Kaledin et al., Chemical Abstract 93, No. 40169p (1989)
- [0119] Kuhn Hoffmann-Berling, CSH-Quantitative Biology 43 (1978) 63
- [0120] Lawyer, F. C., et al., J. Biol. Chem. 264 (1989) 6427-6437
- [0121] Loh, E., in METHODS: A Companion to Methods in Enzymology (1991) 2, pp. 11-19
- [0122] Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1982, pp. 280-281
- [0123] McConlogue, L., et al., Nucleic Acids Rec. 16 (1988) 9869
- [0124] McCutcheon's Emulsifiers & Detergents, North American edition (1983), McCutcheon Division of MC Publishing Co., 175 Rock Road, Glen Rock, NJ (USA), pp. 295-298
- [0125] Mills, D. R., and Kramer, F. R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (1979) 2232-2235
- [0126] Ochman, H., et al., Genetics 120 (1988) 621-623
- [0127] Prober, J. M., et al., Science 238 (1987) 336-341
- [0128] Qiagen manual "The QIAexpressionist™", 5th edition, June 2003
- [0129] Radding, C. M., Ann. Rev. Genetics 16 (1982) 405-437
- [0130] Saiki, R. K., et al., Science 230 (1985) 1350-1354
- [0131] Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd edition, CSHL Press, 2001
- [0132] Sanger, F., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977) 5463-5467
- [0133] Sharkey, D. J., et al., BioTechnology 12 (1994) 506-509
- [0134] Shaw, C. H., et al., Gene 23 (1983) 315-330
- [0135] Smith, L. M., et al., Nature 321 (1986) 674-679
- [0136] Tabor, S., and Richardson, C. C., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987) 4767-4771
- [0137] US 4, 458, 066
- [0138] US 4, 683, 195
- [0139] US 4, 683, 202
- [0140] US 4, 889, 818

- [0141] US 4,965,188
- [0142] US 5,079,352
- [0143] US 5,338,671
- [0144] US 5,436,149
- [0145] US 5,616,494
- [0146] US 5,618,676
- [0147] US 5,677,152
- [0148] US 5,773,258
- [0149] US 5,854,018
- [0150] US 5,856,123
- [0151] US 5,885,813
- [0152] US 5,919,651
- [0153] US 6,183,998
- [0154] US 6,479,264
- [0155] van Solingen, P., and Plaat, J. B., J. Bact. 130(1977)946-947
- [0156] WO 91/02090
- [0157] WO 91/05210
- [0158] WO 91/05753
- [0159] Yanisch-Perron, C., et al., Gene 33(1985)103-119

附图说明

[0160] 附图 1 用来检测 Taq Δ 288(1)、Taq Δ 279(2)、Taq Δ 289(3) 和 TaqWT(4) 的相对活性的四个实验的比较。用一般的填充图案显示对应于相同实验的竖条。竖条代表表 1 中给出的数值。

[0161] 本发明的具体实施方式

[0162] 实施例 1

[0163] 缺失突变体 Taq Δ 288 的构建和生产

[0164] 从 SEQ ID NO:6 所示的编码 TaqWT 的 DNA 序列、一种包含编码序列 MRGS-6xHis-IEGR 的 DNA 序列的寡核苷酸引物、一种与编码 TaqWT 的 C 末端的 DNA 序列杂交的寡核苷酸引物开始,用 PCR 组装编码 SEQ ID NO:5 所示氨基酸序列的 DNA。将构建体插入到 pQE80L 表达载体中。

[0165] 实施例 2

[0166] 在细菌溶菌产物中 WT Taq 聚合酶和 Taq 聚合酶的 N-末端缺失变体的活性

[0167] 用表达载体 pQE80L(Qiagen 目录号 32923),根据标准方法将 TaqWT、Taq Δ 279、Taq Δ 288 和 Taq Δ 289 的阅读框克隆到大肠杆菌菌株 XL-1 Blue 中 (Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd edition, CSHL Press, 2001; Qiagen manual "The QIAexpressionist™", 5th edition, June 2003)。将转化的菌落接种到 dYT 培养基(每升水中含 16g 细菌用胰蛋白胨、10g 细菌用酵母提取物、5g NaCl; 25 μ M 氨苄青霉素),并在 37°C 连续摇动(摇床孵育器,每分钟 150 转)的条件下,在微孔板(Falcon

No. 353227) 中过夜培养生长。将 100 μ l 过夜培养物与 100 μ l 新鲜培养基混合并孵育 1 小时。加入 IPTG 导致终浓度为 500 μ M 并将培养物再孵育 4 小时。随后,将培养物与 10% **B-PER**[®]溶液(例如 B-PER 蛋白提取试剂,Pierce)混合并在 60°C 下将混合物孵育 20 分钟,将细菌溶解。将微孔板在每分钟 3,300 转 (rpm) 下离心以分离溶菌产物。将每一溶菌产物的第一个 40 μ l 等分试样移液到微量 PCR 平板中(96 孔每孔体积为 0.2ml)。将平板在微量“主循环梯度”热循环仪中于 97°C 下孵育 35 分钟。将每一溶菌产物的第二个 40 μ l 等分试样保存在室温下作为阳性对照。

[0168] 随后,将 30-40 μ l 每一溶菌产物(加热后的溶菌产物以及对照)转移到另一个微孔板(Costar No. 3903, 96 孔)中并用 PCR 主混合物混合,以达到终体积为 100 μ l。PCR 主混合物含有 10 μ l 10 $\times$ Taq 缓冲液,各 0.15mM 的 dATP、dCTP 和 dGTP,0.2mM 的还含有 LightCycler Red 640-N- 羟基琥珀酰亚胺酯标记的 dUTP(等摩尔的)的 dNTP、0.5mM $MgCl_2$ (除了 10 $\times$ Taq 缓冲液中包含的 $MgCl_2$)和 50pM 荧光素标记的 SEQ ID NO:8 所示的模板(即 0.5 μ l 含有 1.6 μ g/ μ l 模板的溶液)。将微孔板在 72°C 下孵育 60 分钟以允许模板延伸。

[0169] 随后,将平板在 4°C 下冷却 10 分钟。用荧光计(Tecan)定量测定 FRET(荧光共振能量转移)。激发波长为 485nm。在 635nm 波长时进行光辐射的测量。除去背景信号后,发射值为残留的 DNA 聚合酶活性的函数。对于每个实验,通过用加热后样品的测量值除以未加热的对照样品的测量值并将结果乘以 100,可计算出相对活性值。表 1 总结了在四个实验中测定的相对活性值。

[0170] 表 1

[0171] 在 97°C 下在 35 分钟后具有 DNA 聚合酶活性的多肽的相对活性

[0172]

实验 #	Taq Δ 288	Taq Δ 279	Taq Δ 289	TaqWT
1	67	31	18	-3
2	90	36	32	-1
3	62	46	24	-3
4	78	38	28	1

[0173] 实施例 3

[0174] 具有 DNA 聚合酶活性的多肽的表达和纯化

[0175] 将总体积为 4L 的 dYT 培养基,分成 800ml 的等分试样装入 2L 烧瓶中,接种用 pQE80L 表达载体(Qiagen 目录号 32923)转化了的大肠杆菌菌株 XL-1 Blue,其中编码 Taq Δ 288、Taq Δ 279(Klentaq)、Stoffel 片段(Taq Δ 290)和 TaqWT 的阅读框已被插入到载体中。将细胞在 37°C 下摇动培养生长(摇床孵育器,每分钟 250 转)。在光密度约为 0.8(在 600nm 下测量)时,加入 IPTG(异丙基硫代半乳糖苷)至终浓度为 500 μ M。细胞进一步生长直到光密度达到 2 和 3 之间。然后离心沉淀细胞,将沉淀物在室温下重新悬浮在 B50 缓冲液(25mM TrisHCl pH8.5,0.1mMEDTA,5%甘油,1mM DTT(二硫苏糖醇),50mM NaCl)中。

[0176] 纯化方案 1

[0177] 用弗氏压碎器在 1,000 巴下溶解细胞两次。加入 NaCl 至 1.5M 以从 DNA 中溶解聚合酶。随后,在水浴中将混合物加热至 75℃维持 15 分钟。随后,不再进一步加热,将混合物留在水浴中维持 15 分钟。通过离心从上清液中分离沉淀物。将上清液在 B100 缓冲液(25mM TrisHCl pH8.5,0.1mM EDTA,5%甘油,1mM DTT,100mM NaCl)中透析。随后,进行层析步骤。第一步使用肝素琼脂糖凝胶柱和通过用 B100 和 B600(25mM TrisHCl pH8.5,0.1mM EDTA,5%甘油,1mM DTT,600mM NaCl)梯度洗脱方法进行 Taq Δ 288 多肽的洗脱。在 B50 中透析含有 Taq Δ 288 的级分之后,用 Q 琼脂糖凝胶柱进一步纯化该酶并用 B50 和 B250(25mM TrisHCl pH8.5,0.1mM EDTA,5%甘油,1mM DTT,250mM NaCl)进行梯度洗脱。最后将带有洗脱后的 Taq Δ 288 的级分在贮存缓冲液中透析(50% [v/v] 甘油,100mM KCl,20mM TrisHCl pH8.5,0.1mM EDTA,1mM DTT,0.25%聚醚醇)。

[0178] 纯化方案 2

[0179] 如果在纯化过程中使用组氨酸标记,则有助于纯化。将 5g 沉淀的细胞在 25ml 溶胞缓冲液(50mM NaH₂PO₄,300mM NaCl,10mM 咪唑,0.1mM PMSF(苯甲基磺酰氟),1mM DTT,pH8.0)中重新悬浮并用超声波溶解。加入 DNA 酶 I(Roche Diagnostics GmbH,曼海姆)以使终浓度为 20mg/ml 而且 MgCl₂ 终浓度为 4mM。在 25℃下将混合物孵育 30 分钟。在 72℃下热孵 30 分钟后,通过离心(22,000×g)将沉淀物沉淀。将澄清的上清液加载到 10ml Ni-NTA 超流柱(Qiagen)上。用两倍体积的缓冲液 A(50mM NaH₂PO₄,300mM NaCl,10mM 咪唑,pH8.0)清洗该柱。用体积为 100ml 的线性梯度洗脱该柱,开始用缓冲液 A,最后用缓冲液 B(50mM NaH₂PO₄,300mM NaCl,250mM 咪唑,pH8.0)。将组氨酸标记的 Taq Δ 288 多肽进一步通过带有 Q 琼脂糖凝胶的阴离子交换层析纯化。最后,将含有纯化的组氨酸标记的 Taq Δ 288 多肽的级分在贮存缓冲液中透析。

[0180] 为了除去组氨酸标记,将 Ni-NTA 纯化的组氨酸标记的 Taq Δ 288 多肽在 Xa 反应缓冲液中(20mM TrisHCl pH6.5,50mM NaCl,1mM CaCl₂)透析。将因子 Xa 蛋白酶(1U/毫克 Taq Δ 288 多肽)和总反应体积 1/10 的 10 倍浓缩反应缓冲液一起加入。将混合物在 4℃下孵育 3 到 6 天。随后,通过加入 1M pH8.5 的 TrisHCl(约 1/100 体积)将 pH 提高到 8.0。此外,加入经平衡的 Ni-NTA 超流物质并将混合物在室温下连续搅动(转动)孵育 30 分钟。将上清液从带有未切除组氨酸标记的 Taq Δ 288 多肽的 Ni-NTA 超流物质中分离并在 72℃下热失活 30 分钟。接下来的步骤是带有 Q 琼脂糖凝胶的阴离子交换层析,其后是在贮存缓冲液中透析。

[0181] 实施例 4**[0182] Taq Δ 288 的活性**

[0183] 用标准方法测定 DNA 聚合酶的活性,即先将 M13 引物在 65℃下杂交到 M13mp9ss DNA,然后掺入放射性标记的 α³²dCTP。通过液体闪烁计数法测量掺入量。将该活性与作为参照的主要批号的 TaqWT 制剂进行比较。表 2 概括了该结果。

[0184] 表 2**[0185] 具有 DNA 聚合酶活性的多肽的比活性****[0186]**

TaqWT	~ 100kU/mg
Taq Δ 288	~ 77kU/mg
Taq Δ 279	~ 370kU/mg
Taq Δ 290	~ 111kU/mg

[0187] 关于 Taq Δ 288 多肽中组氨酸标记的存在或不存在,没有检测到关于 DNA 聚合酶活性的差异。

[0188] 实施例 5

[0189] Taq Δ 288 的分子特性

[0190] 已制备了不带组氨酸标记的 Taq Δ 288 多肽。N- 末端测序已显示出氨基酸序列 ESPKALEEAPWPPPE。Taq Δ 288 多肽的分子量已通过 MALDI TOF 方法测定为 62.5kDa。

[0191] 实施例 6

[0192] Taq Δ 288 的柠康酰化

[0193] 将 3mg 纯化的组氨酸标记的 Taq Δ 288 多肽置于 3ml 反应缓冲液 (50mMHEPES, 300mM KCl, 1mM EDTA, pH8.5) 中与 2 μ l 柠康酸酐在室温下反应 1 小时。随后将混合物在贮存缓冲液 (63% [w/v] 甘油, 100mM KCl, 20mM TrisHClpH8.5, 0.1mM EDTA, 0.5% 吐温 20, 1mM DTT) 中透析。

[0194] 序列表

[0195] <110>Roche Diagnostics GmbH

[0196] F. Hoffmann-La Roche AG

[0197] <120> 热稳定的 Taq 聚合酶片段

[0198] <130>21822

[0199] <160>8

[0200] <170>PatentIn version 3.2

[0201] <210>1

[0202] <211>1638

[0203] <212>DNA

[0204] <213> 人工的

[0205] <220>

[0206] <223>Taq Δ 288_Δ -2, 切去了因子 Xa

[0207] <220>

[0208] <221>CDS

[0209] <222>(1)..(1638)

[0210] <220>

[0211] <221>misc_ 特征

[0212] <222>(1)..(1638)

[0213] <223> 不带 N- 末端甲硫氨酸的 Taq Δ 288

[0214]	<400>1	
[0215]	gaa agc ccc aag gcc ctg gag gag gcc ccc tgg ccc ccg ccg gaa ggg	48
[0216]	Glu Ser Pro Lys Ala Leu Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro Glu Gly	
[0217]	1 5 10 15	
[0218]	gcc ttc gtg ggc ttt gtg ctt tcc cgc aag gag ccc atg tgg gcc gat	96
[0219]	Ala Phe Val Gly Phe Val Leu Ser Arg Lys Glu Pro Met Trp Ala Asp	
[0220]	20 25 30	
[0221]	ctt ctg gcc ctg gcc gcc gcc agg ggg ggc cgg gtc cac cgg gcc ccc	144
[0222]	Leu Leu Ala Leu Ala Ala Ala Arg Gly Gly Arg Val His Arg Ala Pro	
[0223]	35 40 45	
[0224]	gag cct tat aaa gcc ctc agg gac ctg aag gag gcg cgg ggg ctt ctc	192
[0225]	Glu Pro Tyr Lys Ala Leu Arg Asp Leu Lys Glu Ala Arg Gly Leu Leu	
[0226]	50 55 60	
[0227]	gcc aaa gac ctg agc gtt ctg gcc ctg agg gaa ggc ctt ggc ctc ccg	240
[0228]	Ala Lys Asp Leu Ser Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Leu Gly Leu Pro	
[0229]	65 70 75 80	
[0230]	ccc ggc gac gac ccc atg ctc ctc gcc tac ctc ctg gac cct tcc aac	288
[0231]	Pro Gly Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro Ser Asn	
[0232]	85 90 95	
[0233]	acc acc ccc gag ggg gtg gcc cgg cgc tac ggc ggg gag tgg acg gag	336
[0234]	Thr Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp Thr Glu	
[0235]	100 105 110	
[0236]	gag gcg ggg gag cgg gcc gcc ctt tcc gag agg ctc ttc gcc aac ctg	384
[0237]	Glu Ala Gly Glu Arg Ala Ala Leu Ser Glu Arg Leu Phe Ala Asn Leu	
[0238]	115 120 125	
[0239]	tgg ggg agg ctt gag ggg gag gag agg ctc ctt tgg ctt tac cgg gag	432
[0240]	Trp Gly Arg Leu Glu Gly Glu Glu Arg Leu Leu Trp Leu Tyr Arg Glu	
[0241]	130 135 140	
[0242]	gtg gag agg ccc ctt tcc gct gtc ctg gcc cac atg gag gcc acg ggg	480
[0243]	Val Glu Arg Pro Leu Ser Ala Val Leu Ala His Met Glu Ala Thr Gly	
[0244]	145 150 155 160	
[0245]	gtg cgc ctg gac gtg gcc tat ctc agg gcc ttg tcc ctg gag gtg gcc	528
[0246]	Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Arg Ala Leu Ser Leu Glu Val Ala	
[0247]	165 170 175	
[0248]	gag gag atc gcc cgc ctc gag gcc gag gtc ttc cgc ctg gcc ggc cac	576
[0249]	Glu Glu Ile Ala Arg Leu Glu Ala Glu Val Phe Arg Leu Ala Gly His	
[0250]	180 185 190	
[0251]	ccc ttc aac ctc aac tcc cgg gac cag ctg gaa agg gtc ctc ttt gac	624
[0252]	Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu Phe Asp	

[0253]	195	200	205	
[0254]	gag cta ggg ctt ccc gcc atc ggc aag acg gag aag acc ggc aag cgc			672
[0255]	Glu Leu Gly Leu Pro Ala Ile Gly Lys Thr Glu Lys Thr Gly Lys Arg			
[0256]	210	215	220	
[0257]	tcc acc agc gcc gcc gtc ctg gag gcc ctc cgc gag gcc cac ccc atc			720
[0258]	Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His Pro Ile			
[0259]	225	230	235	240
[0260]	gtg gag aag atc ctg cag tac cgg gag ctc acc aag ctg aag agc acc			768
[0261]	Val Glu Lys Ile Leu Gln Tyr Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys Ser Thr			
[0262]		245	250	255
[0263]	tac att gac ccc ttg ccg gac ctc atc cac ccc agg acg ggc cgc ctc			816
[0264]	Tyr Ile Asp Pro Leu Pro Asp Leu Ile His Pro Arg Thr Gly Arg Leu			
[0265]	260	265	270	
[0266]	cac acc cgc ttc aac cag acg gcc acg gcc acg ggc agg cta agt agc			864
[0267]	His Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser			
[0268]	275	280	285	
[0269]	tcc gat ccc aac ctc cag aac atc ccc gtc cgc acc ccg ctt ggg cag			912
[0270]	Ser Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu Gly Gln			
[0271]	290	295	300	
[0272]	agg atc cgc cgg gcc ttc atc gcc gag gag ggg tgg cta ttg gtg gcc			960
[0273]	Arg Ile Arg Arg Ala Phe Ile Ala Glu Glu Gly Trp Leu Leu Val Ala			
[0274]	305	310	315	320
[0275]	ctg gac tat agc cag ata gag ctc agg gtg ctg gcc cac ctc tcc ggc			1008
[0276]	Leu Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser Gly			
[0277]		325	330	335
[0278]	gac gag aac ctg atc cgg gtc ttc cag gag ggg cgg gac atc cac acg			1056
[0279]	Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Arg Asp Ile His Thr			
[0280]	340	345	350	
[0281]	gag acc gcc agc tgg atg ttc ggc gtc ccc cgg gag gcc gtg gac ccc			1104
[0282]	Glu Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Pro Arg Glu Ala Val Asp Pro			
[0283]	355	360	365	
[0284]	ctg atg cgc cgg gcg gcc aag acc atc aac ttc ggg gtc ctc tac ggc			1152
[0285]	Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Ile Asn Phe Gly Val Leu Tyr Gly			
[0286]	370	375	380	
[0287]	atg tcg gcc cac cgc ctc tcc cag gag cta gcc atc cct tac gag gag			1200
[0288]	Met Ser Ala His Arg Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ile Pro Tyr Glu Glu			
[0289]	385	390	395	400
[0290]	gcc cag gcc ttc att gag cgc tac ttt cag agc ttc ccc aag gtg cgg			1248
[0291]	Ala Gln Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe Pro Lys Val Arg			

[0292]	405	410	415	
[0293]	gcc tgg att gag aag acc ctg gag gag ggc agg agg cgg ggg tac gtg			1296
[0294]	Ala Trp Ile Glu Lys Thr Leu Glu Glu Gly Arg Arg Arg Gly Tyr Val			
[0295]	420	425	430	
[0296]	gag acc ctc ttc ggc cgc cgc cgc tac gtg cca gac cta gag gcc cgg			1344
[0297]	Glu Thr Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Val Pro Asp Leu Glu Ala Arg			
[0298]	435	440	445	
[0299]	gtg aag agc gtg cgg gag gcg gcc gag cgc atg gcc ttc aac atg ccc			1392
[0300]	Val Lys Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn Met Pro			
[0301]	450	455	460	
[0302]	gtc cag ggc acc gcc gcc gac ctc atg aag ctg gct atg gtg aag ctc			1440
[0303]	Val Gln Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val Lys Leu			
[0304]	465	470	475	480
[0305]	ttc ccc agg ctg gag gaa atg ggg gcc agg atg ctc ctt cag gtc cac			1488
[0306]	Phe Pro Arg Leu Glu Glu Met Gly Ala Arg Met Leu Leu Gln Val His			
[0307]	485	490	495	
[0308]	gac gag ctg gtc ctc gag gcc cca aaa gag agg gcg gag gcc gtg gcc			1536
[0309]	Asp Glu Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ala Val Ala			
[0310]	500	505	510	
[0311]	cgg ctg gcc aag gag gtc atg gag ggg gtg tat ccc ctg gcc gtg ccc			1584
[0312]	Arg Leu Ala Lys Glu Val Met Glu Gly Val Tyr Pro Leu Ala Val Pro			
[0313]	515	520	525	
[0314]	ctg gag gtg gag gtg ggg ata ggg gag gac tgg ctc tcc gcc aag gag			1632
[0315]	Leu Glu Val Glu Val Gly Ile Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala Lys Glu			
[0316]	530	535	540	
[0317]	taa tga			1638
[0318]	<210>2			
[0319]	<211>544			
[0320]	<212>PRT			
[0321]	<213> 人工的			
[0322]	<220>			
[0323]	<223>Taq Δ 288_ Δ -2, 切去了因子 Xa			
[0324]	<400>2			
[0325]	Glu Ser Pro Lys Ala Leu Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro Glu Gly			
[0326]	1	5	10	15
[0327]	Ala Phe Val Gly Phe Val Leu Ser Arg Lys Glu Pro Met Trp Ala Asp			
[0328]	20	25	30	
[0329]	Leu Leu Ala Leu Ala Ala Ala Arg Gly Gly Arg Val His Arg Ala Pro			
[0330]	35	40	45	

[0331]	Glu Pro Tyr Lys Ala Leu Arg Asp Leu Lys Glu Ala Arg Gly Leu Leu
[0332]	50 55 60
[0333]	Ala Lys Asp Leu Ser Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Leu Gly Leu Pro
[0334]	65 70 75 80
[0335]	Pro Gly Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro Ser Asn
[0336]	85 90 95
[0337]	Thr Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp Thr Glu
[0338]	100 105 110
[0339]	Glu Ala Gly Glu Arg Ala Ala Leu Ser Glu Arg Leu Phe Ala Asn Leu
[0340]	115 120 125
[0341]	Trp Gly Arg Leu Glu Gly Glu Glu Arg Leu Leu Trp Leu Tyr Arg Glu
[0342]	130 135 140
[0343]	Val Glu Arg Pro Leu Ser Ala Val Leu Ala His Met Glu Ala Thr Gly
[0344]	145 150 155 160
[0345]	Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Arg Ala Leu Ser Leu Glu Val Ala
[0346]	165 170 175
[0347]	Glu Glu Ile Ala Arg Leu Glu Ala Glu Val Phe Arg Leu Ala Gly His
[0348]	180 185 190
[0349]	Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu Phe Asp
[0350]	195 200 205
[0351]	Glu Leu Gly Leu Pro Ala Ile Gly Lys Thr Glu Lys Thr Gly Lys Arg
[0352]	210 215 220
[0353]	Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His Pro Ile
[0354]	225 230 235 240
[0355]	Val Glu Lys Ile Leu Gln Tyr Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys Ser Thr
[0356]	245 250 255
[0357]	Tyr Ile Asp Pro Leu Pro Asp Leu Ile His Pro Arg Thr Gly Arg Leu
[0358]	260 265 270
[0359]	His Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser
[0360]	275 280 285
[0361]	Ser Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu Gly Gln
[0362]	290 295 300
[0363]	Arg Ile Arg Arg Ala Phe Ile Ala Glu Glu Gly Trp Leu Leu Val Ala
[0364]	305 310 315 320
[0365]	Leu Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser Gly
[0366]	325 330 335
[0367]	Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Arg Asp Ile His Thr
[0368]	340 345 350
[0369]	Glu Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Pro Arg Glu Ala Val Asp Pro

[0370]	355	360	365
[0371]	Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Ile Asn Phe Gly Val Leu Tyr Gly		
[0372]	370	375	380
[0373]	Met Ser Ala His Arg Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ile Pro Tyr Glu Glu		
[0374]	385	390	395
[0375]	Ala Gln Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe Pro Lys Val Arg		
[0376]	405	410	415
[0377]	Ala Trp Ile Glu Lys Thr Leu Glu Glu Gly Arg Arg Arg Gly Tyr Val		
[0378]	420	425	430
[0379]	Glu Thr Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Val Pro Asp Leu Glu Ala Arg		
[0380]	435	440	445
[0381]	Val Lys Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn Met Pro		
[0382]	450	455	460
[0383]	Val Gln Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val Lys Leu		
[0384]	465	470	475
[0385]	Phe Pro Arg Leu Glu Glu Met Gly Ala Arg Met Leu Leu Gln Val His		
[0386]	485	490	495
[0387]	Asp Glu Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ala Val Ala		
[0388]	500	505	510
[0389]	Arg Leu Ala Lys Glu Val Met Glu Gly Val Tyr Pro Leu Ala Val Pro		
[0390]	515	520	525
[0391]	Leu Glu Val Glu Val Gly Ile Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala Lys Glu		
[0392]	530	535	540
[0393]	<210>3		
[0394]	<211>1641		
[0395]	<212>DNA		
[0396]	<213> 人工的		
[0397]	<220>		
[0398]	<223> 无 N- 末端组氨酸		
[0399]	<220>		
[0400]	<221>CDS		
[0401]	<222>(1).. (1641)		
[0402]	<220>		
[0403]	<221>misc_ 特征		
[0404]	<222>(1).. (1641)		
[0405]	<223> 带 N- 末端甲硫氨酸的 Taq Δ 288		
[0406]	<400>3		
[0407]	atg gaa agc ccc aag gcc ctg gag gag gcc ccc tgg ccc ccg ccg gaa		48
[0408]	Met Glu Ser Pro Lys Ala Leu Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro Glu		

[0409]	1	5	10	15	
[0410]	ggg gcc ttc gtg ggc ttt gtg ctt tcc cgc aag gag ccc atg tgg gcc				96
[0411]	Gly Ala Phe Val Gly Phe Val Leu Ser Arg Lys Glu Pro Met Trp Ala				
[0412]		20	25	30	
[0413]	gat ctt ctg gcc ctg gcc gcc gcc agg ggg ggc cgg gtc cac cgg gcc				144
[0414]	Asp Leu Leu Ala Leu Ala Ala Ala Arg Gly Gly Arg Val His Arg Ala				
[0415]		35	40	45	
[0416]	ccc gag cct tat aaa gcc ctc agg gac ctg aag gag gcg cgg ggg ctt				192
[0417]	Pro Glu Pro Tyr Lys Ala Leu Arg Asp Leu Lys Glu Ala Arg Gly Leu				
[0418]		50	55	60	
[0419]	ctc gcc aaa gac ctg agc gtt ctg gcc ctg agg gaa ggc ctt ggc ctc				240
[0420]	Leu Ala Lys Asp Leu Ser Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Leu Gly Leu				
[0421]	65	70	75	80	
[0422]	ccg ccc ggc gac gac ccc atg ctc ctc gcc tac ctc ctg gac cct tcc				288
[0423]	Pro Pro Gly Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro Ser				
[0424]		85	90	95	
[0425]	aac acc acc ccc gag ggg gtg gcc cgg cgc tac ggc ggg gag tgg acg				336
[0426]	Asn Thr Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp Thr				
[0427]		100	105	110	
[0428]	gag gag gcg ggg gag cgg gcc gcc ctt tcc gag agg ctc ttc gcc aac				384
[0429]	Glu Glu Ala Gly Glu Arg Ala Ala Leu Ser Glu Arg Leu Phe Ala Asn				
[0430]		115	120	125	
[0431]	ctg tgg ggg agg ctt gag ggg gag gag agg ctc ctt tgg ctt tac cgg				432
[0432]	Leu Trp Gly Arg Leu Glu Gly Glu Glu Arg Leu Leu Trp Leu Tyr Arg				
[0433]		130	135	140	
[0434]	gag gtg gag agg ccc ctt tcc gct gtc ctg gcc cac atg gag gcc acg				480
[0435]	Glu Val Glu Arg Pro Leu Ser Ala Val Leu Ala His Met Glu Ala Thr				
[0436]	145	150	155	160	
[0437]	ggg gtg cgc ctg gac gtg gcc tat ctc agg gcc ttg tcc ctg gag gtg				528
[0438]	Gly Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Arg Ala Leu Ser Leu Glu Val				
[0439]		165	170	175	
[0440]	gcc gag gag atc gcc cgc ctc gag gcc gag gtc ttc cgc ctg gcc ggc				576
[0441]	Ala Glu Glu Ile Ala Arg Leu Glu Ala Glu Val Phe Arg Leu Ala Gly				
[0442]		180	185	190	
[0443]	cac ccc ttc aac ctc aac tcc cgg gac cag ctg gaa agg gtc ctc ttt				624
[0444]	His Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu Phe				
[0445]		195	200	205	
[0446]	gac gag cta ggg ctt ccc gcc atc ggc aag acg gag aag acc ggc aag				672
[0447]	Asp Glu Leu Gly Leu Pro Ala Ile Gly Lys Thr Glu Lys Thr Gly Lys				

[0448]	210	215	220	
[0449]	cgc tcc acc agc gcc gcc gtc ctg gag gcc ctc cgc gag gcc cac ccc			720
[0450]	Arg Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His Pro			
[0451]	225	230	235	240
[0452]	atc gtg gag aag atc ctg cag tac cgg gag ctc acc aag ctg aag agc			768
[0453]	Ile Val Glu Lys Ile Leu Gln Tyr Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys Ser			
[0454]	245	250	256	
[0455]	acc tac att gac ccc ttg ccg gac ctc atc cac ccc agg acg ggc cgc			816
[0456]	Thr Tyr Ile Asp Pro Leu Pro Asp Leu Ile His Pro Arg Thr Gly Arg			
[0457]	260	265	270	
[0458]	ctc cac acc cgc ttc aac cag acg gcc acg gcc acg ggc agg cta agt			864
[0459]	Leu His Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser			
[0460]	275	280	285	
[0461]	agc tcc gat ccc aac ctc cag aac atc ccc gtc cgc acc ccg ctt ggg			912
[0462]	Ser Ser Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu Gly			
[0463]	290	295	300	
[0464]	cag agg atc cgc cgg gcc ttc atc gcc gag gag ggg tgg cta ttg gtg			960
[0465]	Gln Arg Ile Arg Arg Ala Phe Ile Ala Glu Glu Gly Trp Leu Leu Val			
[0466]	305	310	315	320
[0467]	gcc ctg gac tat agc cag ata gag ctc agg gtg ctg gcc cac ctc tcc			1008
[0468]	Ala Leu Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser			
[0469]	325	330	335	
[0470]	ggc gac gag aac ctg atc cgg gtc ttc cag gag ggg cgg gac atc cac			1056
[0471]	Gly Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Arg Asp Ile His			
[0472]	340	345	350	
[0473]	acg gag acc gcc agc tgg atg ttc ggc gtc ccc cgg gag gcc gtg gac			1104
[0474]	Thr Glu Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Pro Arg Glu Ala Val Asp			
[0475]	355	360	365	
[0476]	ccc ctg atg cgc cgg gcg gcc aag acc atc aac ttc ggg gtc ctc tac			1152
[0477]	Pro Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Ile Asn Phe Gly Val Leu Tyr			
[0478]	370	375	380	
[0479]	ggc atg tcg gcc cac cgc ctc tcc cag gag cta gcc atc cct tac gag			1200
[0480]	Gly Met Ser Ala His Arg Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ile Pro Tyr Glu			
[0481]	385	390	395	400
[0482]	gag gcc cag gcc ttc att gag cgc tac ttt cag agc ttc ccc aag gtg			1248
[0483]	Glu Ala Gln Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe Pro Lys Val			
[0484]	405	410	415	
[0485]	cgg gcc tgg att gag aag acc ctg gag gag ggc agg agg cgg ggg tac			1296
[0486]	Arg Ala Trp Ile Glu Lys Thr Leu Glu Glu Gly Arg Arg Arg Gly Tyr			

[0487]	420	425	430	
[0488]	gtg gag acc ctc ttc ggc cgc cgc cgc tac gtg cca gac cta gag gcc	1344		
[0489]	Val Glu Thr Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Val Pro Asp Leu Glu Ala			
[0490]	435	440	445	
[0491]	cgg gtg aag agc gtg cgg gag gcg gcc gag cgc atg gcc ttc aac atg	1392		
[0492]	Arg Val Lys Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn Met			
[0493]	450	455	460	
[0494]	ccc gtc cag ggc acc gcc gcc gac ctc atg aag ctg gct atg gtg aag	1440		
[0495]	Pro Val Gln Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val Lys			
[0496]	465	470	475	480
[0497]	ctc ttc ccc agg ctg gag gaa atg ggg gcc agg atg ctc ctt cag gtc	1488		
[0498]	Leu Phe Pro Arg Leu Glu Glu Met Gly Ala Arg Met Leu Leu Gln Val			
[0499]	485	490	495	
[0500]	cac gac gag ctg gtc ctc gag gcc cca aaa gag agg gcg gag gcc gtg	1536		
[0501]	His Asp Glu Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ala Val			
[0502]	500	505	510	
[0503]	gcc cgg ctg gcc aag gag gtc atg gag ggg gtg tat ccc ctg gcc gtg	1584		
[0504]	Ala Arg Leu Ala Lys Glu Val Met Glu Gly Val Tyr Pro Leu Ala Val			
[0505]	515	520	525	
[0506]	ccc ctg gag gtg gag gtg ggg ata ggg gag gac tgg ctc tcc gcc aag	1632		
[0507]	Pro Leu Glu Val Glu Val Gly Ile Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala Lys			
[0508]	530	535	540	
[0509]	gag taa tga			1641
[0510]	Glu			
[0511]	545			
[0512]	<210>4			
[0513]	<211>545			
[0514]	<212>PRT			
[0515]	<213> 人工的			
[0516]	<220>			
[0517]	<223> 无 N- 末端组氨酸			
[0518]	<400>4			
[0519]	Met Glu Ser Pro Lys Ala Leu Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro Glu			
[0520]	1	5	10	15
[0521]	Gly Ala Phe Val Gly Phe Val Leu Ser Arg Lys Glu Pro Met Trp Ala			
[0522]	20	25	30	
[0523]	Asp Leu Leu Ala Leu Ala Ala Ala Arg Gly Gly Arg Val His Arg Ala			
[0524]	35	40	45	
[0525]	Pro Glu Pro Tyr Lys Ala Leu Arg Asp Leu Lys Glu Ala Arg Gly Leu			

[0526]	50	55	60
[0527]	Leu Ala Lys Asp Leu Ser Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Leu Gly Leu		
[0528]	65	70	75
[0529]	Pro Pro Gly Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro Ser		
[0530]	85	90	95
[0531]	Asn Thr Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp Thr		
[0532]	100	105	110
[0533]	Glu Glu Ala Gly Glu Arg Ala Ala Leu Ser Glu Arg Leu Phe Ala Asn		
[0534]	115	120	125
[0535]	Leu Trp Gly Arg Leu Glu Gly Glu Glu Arg Leu Leu Trp Leu Tyr Arg		
[0536]	130	135	140
[0537]	Glu Val Glu Arg Pro Leu Ser Ala Val Leu Ala His Met Glu Ala Thr		
[0538]	145	150	155
[0539]	Gly Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Arg Ala Leu Ser Leu Glu Val		
[0540]	165	170	175
[0541]	Ala Glu Glu Ile Ala Arg Leu Glu Ala Glu Val Phe Arg Leu Ala Gly		
[0542]	180	185	190
[0543]	His Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu Phe		
[0544]	195	200	205
[0545]	Asp Glu Leu Gly Leu Pro Ala Ile Gly Lys Thr Glu Lys Thr Gly Lys		
[0546]	210	215	220
[0547]	Arg Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His Pro		
[0548]	225	230	235
[0549]	Ile Val Glu Lys Ile Leu Gln Tyr Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys Ser		
[0550]	245	250	255
[0551]	Thr Tyr Ile Asp Pro Leu Pro Asp Leu Ile His Pro Arg Thr Gly Arg		
[0552]	260	265	270
[0553]	Leu His Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser		
[0554]	275	280	285
[0555]	Ser Ser Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu Gly		
[0556]	290	295	300
[0557]	Gln Arg Ile Arg Arg Ala Phe Ile Ala Glu Glu Gly Trp Leu Leu Val		
[0558]	305	310	315
[0559]	Ala Leu Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser		
[0560]	325	330	335
[0561]	Gly Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Arg Asp Ile His		
[0562]	340	345	350
[0563]	Thr Glu Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Pro Arg Glu Ala Val Asp		
[0564]	355	360	365

[0565] Pro Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Ile Asn Phe Gly Val Leu Tyr
 [0566] 370 375 380
 [0567] Gly Met Ser Ala His Arg Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ile Pro Tyr Glu
 [0568] 385 390 395 400
 [0569] Glu Ala Gln Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe Pro Lys Val
 [0570] 405 410 415
 [0571] Arg Ala Trp Ile Glu Lys Thr Leu Glu Glu Gly Arg Arg Arg Gly Tyr
 [0572] 420 425 430
 [0573] Val Glu Thr Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Val Pro Asp Leu Glu Ala
 [0574] 435 440 445
 [0575] Arg Val Lys Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn Met
 [0576] 450 455 460
 [0577] Pro Val Gln Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val Lys
 [0578] 465 470 475 480
 [0579] Leu Phe Pro Arg Leu Glu Glu Met Gly Ala Arg Met Leu Leu Gln Val
 [0580] 485 490 495
 [0581] His Asp Glu Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ala Val
 [0582] 500 505 510
 [0583] Ala Arg Leu Ala Lys Glu Val Met Glu Gly Val Tyr Pro Leu Ala Val
 [0584] 515 520 525
 [0585] Pro Leu Glu Val Glu Val Gly Ile Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala Lys
 [0586] 530 535 540
 [0587] Glu
 [0588] 545
 [0589] <210>5
 [0590] <211>558
 [0591] <212>PRT
 [0592] <213> 人工的
 [0593] <220>
 [0594] <223>Taq Δ 288_Δ -2
 [0595] <220>
 [0596] <221>misc_ 特征
 [0597] <223> 带 N- 末端组氨酸标记和因子 X 蛋白酶剪切位点的 Taq Δ 288
 [0598] <400>5
 [0599] Met Arg Gly Ser His His His His His His Ile Glu Gly Arg Glu Ser
 [0600] 1 5 10 15
 [0601] Pro Lys Ala Leu Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro Glu Gly Ala Phe
 [0602] 20 25 30
 [0603] Val Gly Phe Val Leu Ser Arg Lys Glu Pro Met Trp Ala Asp Leu Leu

[0604]	35	40	45
[0605]	Ala Leu Ala Ala Ala Arg Gly Gly Arg Val His Arg Ala Pro Glu Pro		
[0606]	50	55	60
[0607]	Tyr Lys Ala Leu Arg Asp Leu Lys Glu Ala Arg Gly Leu Leu Ala Lys		
[0608]	65	70	75
[0609]	Asp Leu Ser Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Leu Gly Leu Pro Pro Gly		
[0610]	85	90	95
[0611]	Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro Ser Asn Thr Thr		
[0612]	100	105	110
[0613]	Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp Thr Glu Glu Ala		
[0614]	115	120	125
[0615]	Gly Glu Arg Ala Ala Leu Ser Glu Arg Leu Phe Ala Asn Leu Trp Gly		
[0616]	130	135	140
[0617]	Arg Leu Glu Gly Glu Glu Arg Leu Leu Trp Leu Tyr Arg Glu Val Glu		
[0618]	145	150	155
[0619]	Arg Pro Leu Ser Ala Val Leu Ala His Met Glu Ala Thr Gly Val Arg		
[0620]	165	170	175
[0621]	Leu Asp Val Ala Tyr Leu Arg Ala Leu Ser Leu Glu Val Ala Glu Glu		
[0622]	180	185	190
[0623]	Ile Ala Arg Leu Glu Ala Glu Val Phe Arg Leu Ala Gly His Pro Phe		
[0624]	195	200	205
[0625]	Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu Phe Asp Glu Leu		
[0626]	210	215	220
[0627]	Gly Leu Pro Ala Ile Gly Lys Thr Glu Lys Thr Gly Lys Arg Ser Thr		
[0628]	225	230	235
[0629]	Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His Pro Ile Val Glu		
[0630]	245	250	255
[0631]	Lys Ile Leu Gln Tyr Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys Ser Thr Tyr Ile		
[0632]	260	265	270
[0633]	Asp Pro Leu Pro Asp Leu Ile His Pro Arg Thr Gly Arg Leu His Thr		
[0634]	275	280	285
[0635]	Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser Ser Asp		
[0636]	290	295	300
[0637]	Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu Gly Gln Arg Ile		
[0638]	305	310	315
[0639]	Arg Arg Ala Phe Ile Ala Glu Glu Gly Trp Leu Leu Val Ala Leu Asp		
[0640]	325	330	335
[0641]	Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser Gly Asp Glu		
[0642]	340	345	350

[0643]	Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Arg Asp Ile His Thr Glu Thr	
[0644]	355	360 365
[0645]	Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Pro Arg Glu Ala Val Asp Pro Leu Met	
[0646]	370	375 380
[0647]	Arg Arg Ala Ala Lys Thr Ile Asn Phe Gly Val Leu Tyr Gly Met Ser	
[0648]	385	390 395 400
[0649]	Ala His Arg Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ile Pro Tyr Glu Glu Ala Gln	
[0650]	405	410 415
[0651]	Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe Pro Lys Val Arg Ala Trp	
[0652]	420	425 430
[0653]	Ile Glu Lys Thr Leu Glu Glu Gly Arg Arg Arg Gly Tyr Val Glu Thr	
[0654]	435	440 445
[0655]	Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Val Pro Asp Leu Glu Ala Arg Val Lys	
[0656]	450	455 460
[0657]	Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn Met Pro Val Gln	
[0658]	465	470 475 480
[0659]	Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val Lys Leu Phe Pro	
[0660]	485	490 495
[0661]	Arg Leu Glu Glu Met Gly Ala Arg Met Leu Leu Gln Val His Asp Glu	
[0662]	500	505 510
[0663]	Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ala Val Ala Arg Leu	
[0664]	515	520 525
[0665]	Ala Lys Glu Val Met Glu Gly Val Tyr Pro Leu Ala Val Pro Leu Glu	
[0666]	530	535 540
[0667]	Val Glu Val Gly Ile Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala Lys Glu	
[0668]	545	550 555
[0669]	<210>6	
[0670]	<211>2499	
[0671]	<212>DNA	
[0672]	<213> 栖热水生菌	
[0673]	<220>	
[0674]	<221>misc_ 特征	
[0675]	<223> 编码天然栖热水生菌 (Taq)DNA 聚合酶的开放阅读框	
[0676]	<220>	
[0677]	<221>CDS	
[0678]	<222>(1).. (2499)	
[0679]	<400>6	
[0680]	atg agg ggg atg ctg ccc ctc ttt gag ccc aag ggc cgg gtc ctc ctg	48
[0681]	Met Arg Gly Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu	

[0682]	1	5	10	15	
[0683]	gtg gac ggc cac cac ctg gcc tac cgc acc ttc cac gcc ctg aag ggc				96
[0684]	Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe His Ala Leu Lys Gly				
[0685]		20	25	30	
[0686]	ctc acc acc agc cgg ggg gag ccg gtg cag gcg gtc tac ggc ttc gcc				144
[0687]	Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala				
[0688]		35	40	45	
[0689]	aag agc ctc ctc aag gcc ctc aag gag gac ggg gac gcg gtg atc gtg				192
[0690]	Lys Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Asp Ala Val Ile Val				
[0691]		50	55	60	
[0692]	gtc ttt gac gcc aag gcc ccc tcc ttc cgc cac gag gcc tac ggg ggg				240
[0693]	Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Gly Gly				
[0694]		65	70	75	80
[0695]	tac aag gcg ggc cgg gcc ccc acg ccg gag gac ttt ccc cgg caa ctc				288
[0696]	Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln Leu				
[0697]		85	90	95	
[0698]	gcc ctc atc aag gag ctg gtg gac ctc ctg ggg ctg gcg cgc ctc gag				336
[0699]	Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Leu Ala Arg Leu Glu				
[0700]		100	105	110	
[0701]	gtc ccg ggc tac gag gcg gac gac gtc ctg gcc agc ctg gcc aag aag				384
[0702]	Val Pro Gly Tyr Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Ser Leu Ala Lys Lys				
[0703]		115	120	125	
[0704]	gcg gaa aag gag ggc tac gag gtc cgc atc ctc acc gcc gac aaa gac				432
[0705]	Ala Glu Lys Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Lys Asp				
[0706]		130	135	140	
[0707]	ctt tac cag ctc ctt tcc gac cgc atc cac gtc ctc cac ccc gag ggg				480
[0708]	Leu Tyr Gln Leu Leu Ser Asp Arg Ile His Val Leu His Pro Glu Gly				
[0709]		145	150	155	160
[0710]	tac ctc atc acc ccg gcc tgg ctt tgg gaa aag tac ggc ctg agg ccc				528
[0711]	Tyr Leu Ile Thr Pro Ala Trp Leu Trp Glu Lys Tyr Gly Leu Arg Pro				
[0712]		165	170	175	
[0713]	gac cag tgg gcc gac tac cgg gcc ctg acc ggg gac gag tcc gac aac				576
[0714]	Asp Gln Trp Ala Asp Tyr Arg Ala Leu Thr Gly Asp Glu Ser Asp Asn				
[0715]		180	185	190	
[0716]	ctt ccc ggg gtc aag ggc atc ggg gag aag acg gcg agg aag ctt ctg				624
[0717]	Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Arg Lys Leu Leu				
[0718]		195	200	205	
[0719]	gag gag tgg ggg agc ctg gaa gcc ctc ctc aag aac ctg gac cgg ctg				672
[0720]	Glu Glu Trp Gly Ser Leu Glu Ala Leu Leu Lys Asn Leu Asp Arg Leu				

[0721]	210	215	220	
[0722]	aag ccc gcc atc cgg gag aag atc ctg gcc cac atg gac gat ctg aag			720
[0723]	Lys Pro Ala Ile Arg Glu Lys Ile Leu Ala His Met Asp Asp Leu Lys			
[0724]	225	230	235	240
[0725]	ctc tcc tgg gac ctg gcc aag gtg cgc acc gac ctg ccc ctg gag gtg			768
[0726]	Leu Ser Trp Asp Leu Ala Lys Val Arg Thr Asp Leu Pro Leu Glu Val			
[0727]		245	250	255
[0728]	gac ttc gcc aaa agg cgg gag ccc gac cgg gag agg ctt agg gcc ttt			816
[0729]	Asp Phe Ala Lys Arg Arg Glu Pro Asp Arg Glu Arg Leu Arg Ala Phe			
[0730]		260	265	270
[0731]	ctg gag agg ctt gag ttt ggc agc ctc ctc cac gag ttc ggc ctt ctg			864
[0732]	Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly Leu Leu			
[0733]		275	280	285
[0734]	gaa agc ccc aag gcc ctg gag gag gcc ccc tgg ccc ccg ccg gaa ggg			912
[0735]	Glu Ser Pro Lys Ala Leu Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro Glu Gly			
[0736]	290	295	300	
[0737]	gcc ttc gtg ggc ttt gtg ctt tcc cgc aag gag ccc atg tgg gcc gat			960
[0738]	Ala Phe Val Gly Phe Val Leu Ser Arg Lys Glu Pro Met Trp Ala Asp			
[0739]	305	310	315	320
[0740]	ctt ctg gcc ctg gcc gcc gcc agg ggg ggc cgg gtc cac cgg gcc ccc			1008
[0741]	Leu Leu Ala Leu Ala Ala Ala Arg Gly Gly Arg Val His Arg Ala Pro			
[0742]		325	330	335
[0743]	gag cct tat aaa gcc ctc agg gac ctg aag gag gcg cgg ggg ctt ctc			1056
[0744]	Glu Pro Tyr Lys Ala Leu Arg Asp Leu Lys Glu Ala Arg Gly Leu Leu			
[0745]		340	345	350
[0746]	gcc aaa gac ctg agc gtt ctg gcc ctg agg gaa ggc ctt ggc ctc ccg			1104
[0747]	Ala Lys Asp Leu Ser Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Leu Gly Leu Pro			
[0748]		355	360	365
[0749]	ccc ggc gac gac ccc atg ctc ctc gcc tac ctc ctg gac cct tcc aac			1152
[0750]	Pro Gly Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro Ser Asn			
[0751]	370	375	380	
[0752]	acc acc ccc gag ggg gtg gcc cgg cgc tac ggc ggg gag tgg acg gag			1200
[0753]	Thr Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp Thr Glu			
[0754]	385	390	395	400
[0755]	gag gcg ggg gag cgg gcc gcc ctt tcc gag agg ctc ttc gcc aac ctg			1248
[0756]	Glu Ala Gly Glu Arg Ala Ala Leu Ser Glu Arg Leu Phe Ala Asn Leu			
[0757]		405	410	415
[0758]	tgg ggg agg ctt gag ggg gag gag agg ctc ctt tgg ctt tac cgg gag			1296
[0759]	Trp Gly Arg Leu Glu Gly Glu Glu Arg Leu Leu Trp Leu Tyr Arg Glu			

[0760]	420	425	430	
[0761]	gtg gag agg ccc ctt tcc gct gtc ctg gcc cac atg gag gcc acg ggg	1344		
[0762]	Val Glu Arg Pro Leu Ser Ala Val Leu Ala His Met Glu Ala Thr Gly			
[0763]	435	440	445	
[0764]	gtg cgc ctg gac gtg gcc tat ctc agg gcc ttg tcc ctg gag gtg gcc	1392		
[0765]	Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Arg Ala Leu Ser Leu Glu Val Ala			
[0766]	450	455	460	
[0767]	gag gag atc gcc cgc ctc gag gcc gag gtc ttc cgc ctg gcc ggc cac	1440		
[0768]	Glu Glu Ile Ala Arg Leu Glu Ala Glu Val Phe Arg Leu Ala Gly His			
[0769]	465	470	475	480
[0770]	ccc ttc aac ctc aac tcc cgg gac cag ctg gaa agg gtc ctc ttt gac	1488		
[0771]	Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu Phe Asp			
[0772]	485	490	495	
[0773]	gag cta ggg ctt ccc gcc atc ggc aag acg gag aag acc ggc aag cgc	1536		
[0774]	Glu Leu Gly Leu Pro Ala Ile Gly Lys Thr Glu Lys Thr Gly Lys Arg			
[0775]	500	505	510	
[0776]	tcc acc agc gcc gcc gtc ctg gag gcc ctc cgc gag gcc cac ccc atc	1584		
[0777]	Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His Pro Ile			
[0778]	515	520	525	
[0779]	gtg gag aag atc ctg cag tac cgg gag ctc acc aag ctg aag agc acc	1632		
[0780]	Val Glu Lys Ile Leu Gln Tyr Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys Ser Thr			
[0781]	530	535	540	
[0782]	tac att gac ccc ttg ccg gac ctc atc cac ccc agg acg ggc cgc ctc	1680		
[0783]	Tyr Ile Asp Pro Leu Pro Asp Leu Ile His Pro Arg Thr Gly Arg Leu			
[0784]	545	550	555	560
[0785]	cac acc cgc ttc aac cag acg gcc acg gcc acg ggc agg cta agt agc	1728		
[0786]	His Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser			
[0787]	565	570	575	
[0788]	tcc gat ccc aac ctc cag aac atc ccc gtc cgc acc ccg ctt ggg cag	1776		
[0789]	Ser Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu Gly Gln			
[0790]	580	585	590	
[0791]	agg atc cgc cgg gcc ttc atc gcc gag gag ggg tgg cta ttg gtg gcc	1824		
[0792]	Arg Ile Arg Arg Ala Phe Ile Ala Glu Glu Gly Trp Leu Leu Val Ala			
[0793]	595	600	605	
[0794]	ctg gac tat agc cag ata gag ctc agg gtg ctg gcc cac ctc tcc ggc	1872		
[0795]	Leu Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser Gly			
[0796]	610	615	620	
[0797]	gac gag aac ctg atc cgg gtc ttc cag gag ggg cgg gac atc cac acg	1920		
[0798]	Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Arg Asp Ile His Thr			

[0799]	625	630	635	640	
[0800]	gag acc gcc agc tgg atg ttc ggc gtc ccc cgg gag gcc gtg gac ccc				1968
[0801]	Glu Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Pro Arg Glu Ala Val Asp Pro				
[0802]		645	650	655	
[0803]	ctg atg cgc cgg gcg gcc aag acc atc aac ttc ggg gtc ctc tac ggc				2016
[0804]	Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Ile Asn Phe Gly Val Leu Tyr Gly				
[0805]		660	665	670	
[0806]	atg tcg gcc cac cgc ctc tcc cag gag cta gcc atc cct tac gag gag				2064
[0807]	Met Ser Ala His Arg Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ile Pro Tyr Glu Glu				
[0808]		675	680	685	
[0809]	gcc cag gcc ttc att gag cgc tac ttt cag agc ttc ccc aag gtg cgg				2112
[0810]	Ala Gln Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe Pro Lys Val Arg				
[0811]		690	695	700	
[0812]	gcc tgg att gag aag acc ctg gag gag ggc agg agg cgg ggg tac gtg				2160
[0813]	Ala Trp Ile Glu Lys Thr Leu Glu Glu Gly Arg Arg Arg Gly Tyr Val				
[0814]	705	710	715	720	
[0815]	gag acc ctc ttc ggc cgc cgc cgc tac gtg cca gac cta gag gcc cgg				2208
[0816]	Glu Thr Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Val Pro Asp Leu Glu Ala Arg				
[0817]		725	730	735	
[0818]	gtg aag agc gtg cgg gag gcg gcc gag cgc atg gcc ttc aac atg ccc				2256
[0819]	Val Lys Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn Met Pro				
[0820]		740	745	750	
[0821]	gtc cag ggc acc gcc gcc gac ctc atg aag ctg gct atg gtg aag ctc				2304
[0822]	Val Gln Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val Lys Leu				
[0823]		755	760	765	
[0824]	ttc ccc agg ctg gag gaa atg ggg gcc agg atg ctc ctt cag gtc cac				2352
[0825]	Phe Pro Arg Leu Glu Glu Met Gly Ala Arg Met Leu Leu Gln Val His				
[0826]		770	775	780	
[0827]	gac gag ctg gtc ctc gag gcc cca aaa gag agg gcg gag gcc gtg gcc				2400
[0828]	Asp Glu Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ala Val Ala				
[0829]	785	790	795	800	
[0830]	cgg ctg gcc aag gag gtc atg gag ggg gtg tat ccc ctg gcc gtg ccc				2448
[0831]	Arg Leu Ala Lys Glu Val Met Glu Gly Val Tyr Pro Leu Ala Val Pro				
[0832]		805	810	815	
[0833]	ctg gag gtg gag gtg ggg ata ggg gag gac tgg ctc tcc gcc aag gag				2496
[0834]	Leu Glu Val Glu Val Gly Ile Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala Lys Glu				
[0835]		820	825	830	
[0836]	tga				2499
[0837]	<210>7				

[0838] <211>832
 [0839] <212>PRT
 [0840] <213> 栖热水生菌
 [0841] <400>7
 [0842] Met Arg Gly Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu
 [0843] 1 5 10 15
 [0844] Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe His Ala Leu Lys Gly
 [0845] 20 25 30
 [0846] Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala
 [0847] 35 40 45
 [0848] Lys Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Asp Ala Val Ile Val
 [0849] 50 55 60
 [0850] Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Gly Gly
 [0851] 65 70 75 80
 [0852] Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln Leu
 [0853] 85 90 95
 [0854] Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Leu Ala Arg Leu Glu
 [0855] 100 105 110
 [0856] Val Pro Gly Tyr Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Ser Leu Ala Lys Lys
 [0857] 115 120 125
 [0858] Ala Glu Lys Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Lys Asp
 [0859] 130 135 140
 [0860] Leu Tyr Gln Leu Leu Ser Asp Arg Ile His Val Leu His Pro Glu Gly
 [0861] 145 150 155 160
 [0862] Tyr Leu Ile Thr Pro Ala Trp Leu Trp Glu Lys Tyr Gly Leu Arg Pro
 [0863] 165 170 175
 [0864] Asp Gln Trp Ala Asp Tyr Arg Ala Leu Thr Gly Asp Glu Ser Asp Asn
 [0865] 180 185 190
 [0866] Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Arg Lys Leu Leu
 [0867] 195 200 205
 [0868] Glu Glu Trp Gly Ser Leu Glu Ala Leu Leu Lys Asn Leu Asp Arg Leu
 [0869] 210 215 220
 [0870] Lys Pro Ala Ile Arg Glu Lys Ile Leu Ala His Met Asp Asp Leu Lys
 [0871] 225 230 235 240
 [0872] Leu Ser Trp Asp Leu Ala Lys Val Arg Thr Asp Leu Pro Leu Glu Val
 [0873] 245 250 255
 [0874] Asp Phe Ala Lys Arg Arg Glu Pro Asp Arg Glu Arg Leu Arg Ala Phe
 [0875] 260 265 270
 [0876] Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly Leu Leu

[0877]	275	280	285
[0878]	Glu Ser Pro Lys Ala Leu Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro Glu Gly		
[0879]	290	295	300
[0880]	Ala Phe Val Gly Phe Val Leu Ser Arg Lys Glu Pro Met Trp Ala Asp		
[0881]	305	310	315
[0882]	Leu Leu Ala Leu Ala Ala Ala Arg Gly Gly Arg Val His Arg Ala Pro		
[0883]	325	330	335
[0884]	Glu Pro Tyr Lys Ala Leu Arg Asp Leu Lys Glu Ala Arg Gly Leu Leu		
[0885]	340	345	350
[0886]	Ala Lys Asp Leu Ser Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Leu Gly Leu Pro		
[0887]	355	360	365
[0888]	Pro Gly Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro Ser Asn		
[0889]	370	375	380
[0890]	Thr Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp Thr Glu		
[0891]	385	390	395
[0892]	Glu Ala Gly Glu Arg Ala Ala Leu Ser Glu Arg Leu Phe Ala Asn Leu		
[0893]	405	410	415
[0894]	Trp Gly Arg Leu Glu Gly Glu Glu Arg Leu Leu Trp Leu Tyr Arg Glu		
[0895]	420	425	430
[0896]	Val Glu Arg Pro Leu Ser Ala Val Leu Ala His Met Glu Ala Thr Gly		
[0897]	435	440	445
[0898]	Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Arg Ala Leu Ser Leu Glu Val Ala		
[0899]	450	455	460
[0900]	Glu Glu Ile Ala Arg Leu Glu Ala Glu Val Phe Arg Leu Ala Gly His		
[0901]	465	470	475
[0902]	Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu Phe Asp		
[0903]	485	490	495
[0904]	Glu Leu Gly Leu Pro Ala Ile Gly Lys Thr Glu Lys Thr Gly Lys Arg		
[0905]	500	505	510
[0906]	Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His Pro Ile		
[0907]	515	520	525
[0908]	Val Glu Lys Ile Leu Gln Tyr Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys Ser Thr		
[0909]	530	535	540
[0910]	Tyr Ile Asp Pro Leu Pro Asp Leu Ile His Pro Arg Thr Gly Arg Leu		
[0911]	545	550	555
[0912]	His Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser		
[0913]	565	570	575
[0914]	Ser Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu Gly Gln		
[0915]	580	585	590

[0916]	Arg Ile Arg Arg Ala Phe Ile Ala Glu Glu Gly Trp Leu Leu Val Ala		
[0917]	595	600	605
[0918]	Leu Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser Gly		
[0919]	610	615	620
[0920]	Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Arg Asp Ile His Thr		
[0921]	625	630	635 640
[0922]	Glu Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Pro Arg Glu Ala Val Asp Pro		
[0923]	645	650	655
[0924]	Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Ile Asn Phe Gly Val Leu Tyr Gly		
[0925]	660	665	670
[0926]	Met Ser Ala His Arg Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ile Pro Tyr Glu Glu		
[0927]	675	680	685
[0928]	Ala Gln Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe Pro Lys Val Arg		
[0929]	690	695	700
[0930]	Ala Trp Ile Glu Lys Thr Leu Glu Glu Gly Arg Arg Arg Gly Tyr Val		
[0931]	705	710	715 720
[0932]	Glu Thr Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Val Pro Asp Leu Glu Ala Arg		
[0933]	725	730	735
[0934]	Val Lys Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn Met Pro		
[0935]	740	745	750
[0936]	Val Gln Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val Lys Leu		
[0937]	755	760	765
[0938]	Phe Pro Arg Leu Glu Glu Met Gly Ala Arg Met Leu Leu Gln Val His		
[0939]	770	775	780
[0940]	Asp Glu Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ala Val Ala		
[0941]	785	790	795 800
[0942]	Arg Leu Ala Lys Glu Val Met Glu Gly Val Tyr Pro Leu Ala Val Pro		
[0943]	805	810	815
[0944]	Leu Glu Val Glu Val Gly Ile Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala Lys Glu		
[0945]	820	825	830
[0946]	<210>8		
[0947]	<211>53		
[0948]	<212>DNA		
[0949]	<213> 人工的		
[0950]	<220>		
[0951]	<223>Flu T-14 寡核苷酸 ;用于筛选热稳定的 DNA 聚合酶突变体的 DNA 模板 ;位置 14 上的 T 带有荧光素标记		
[0952]	<220>		
[0953]	<221>misc_ 特征		

-
- [0954] <222>(14)..(14)
- [0955] <223> 带有荧光素标记的
- [0956] <400>8
- [0957] tcgattcggt acgtccgcgc gatcggcgca tatagcgccg atcgcggaacg tac 53

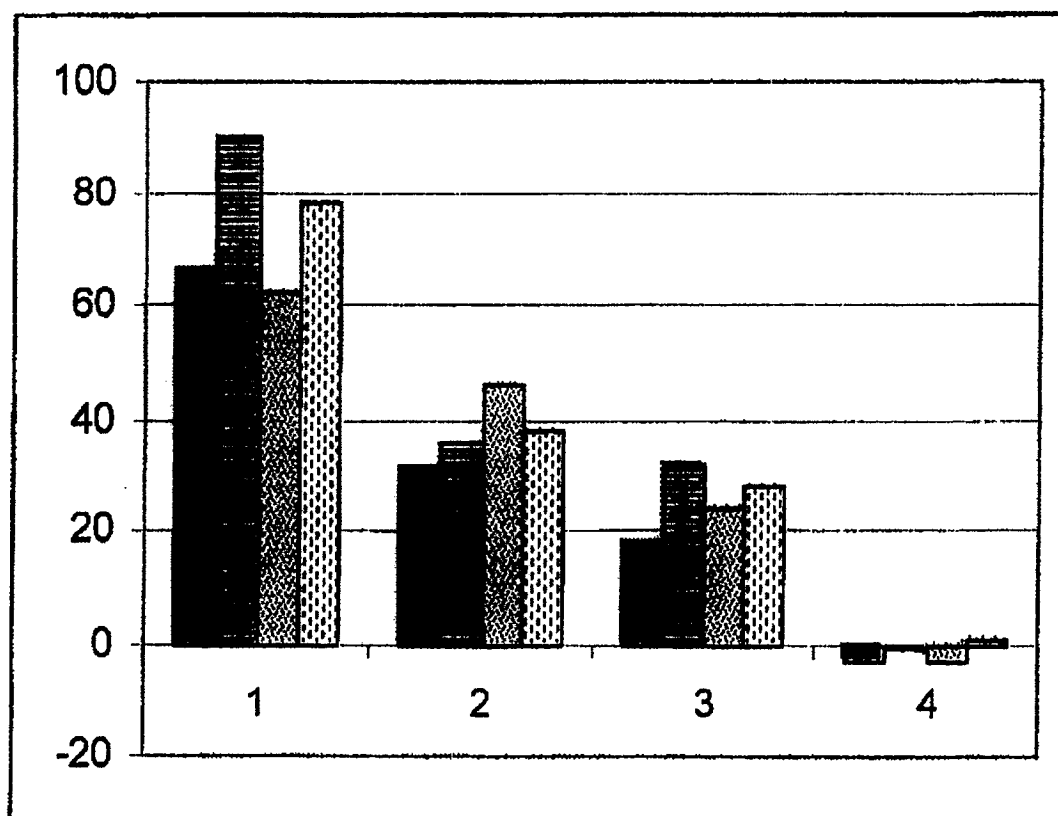


图 1