



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公告本

(11) 證書號數：TW I869710 B

(45) 公告日：中華民國 114 (2025) 年 01 月 11 日

(21) 申請案號：111136857 (22) 申請日：中華民國 111 (2022) 年 09 月 28 日

(51) Int. Cl. : *C12N9/12 (2006.01)* *C12N15/54 (2006.01)*  
*C12N15/34 (2006.01)* *C12P19/34 (2006.01)*

(30) 優先權：2021/09/29 美國 63/249,819

(71) 申請人：陳 呈堯 (美國) CHEN, CHENG-YAO (US)  
 新竹市東區光復路二段 101 號

(72) 發明人：陳 呈堯 CHEN, CHENG-YAO (US) ; 鄭伊雯 CHENG, YI-WEN (TW) ; 洪于婷  
 HUNG, YU TING (TW) ; 陳玟婷 CHEN, WEN-TING (TW)

(74) 代理人：陳豫宛

(56) 參考文獻：  
 US 2013/0130320A1 US 2017/0355970A1  
 US 2020/0087637A1

審查人員：吳佩諄

申請專利範圍項數：27 項 圖式數：6 共 103 頁

## (54) 名稱

用於無模板 RNA 合成的核酸聚合酶變體、試劑套組及方法

## (57) 摘要

本發明所提供內容係關於核酸聚合酶變體及包含該核酸聚合酶變體的套組，其中該核酸聚合酶變體可利用核糖核苷酸 (rNTP) 以耐熱方式執行無模板核酸合成，故具有更理想的功能及活性。

Provided herein relates to nucleic acid polymerase variants and kits including the same, where the nucleic acid polymerase variant has an improved function and activity of performing template-independent nucleic acids synthesis using ribonucleotides (rNTPs) in a thermotolerant manner.

指定代表圖：

	20	40	60	80																		
Tgo	M				1																	
Kod1	M				1																	
9 <sup>n</sup>	M				1																	
Pfu	M				1																	
Vent	M				1																	
Mma	M				1																	
Mec	M				1																	
hPOLD	MDGKRRP	PGVPPK	ARG GLWDDDD	APR PSQF	-----EEDLA LMEEMEA	EH-----RL	50															
SoePOLD	MSEKRS	PMVDVK	----DDED	TPQ LEKKIK	ROS1 DHG	VGSEPV	S TIEI	IPSDSF	RK	YNSQGF	KA	KD	TD	LM	GT	QL	71					
Pis	MELK	VWP																7				
Soe	MTKQL	TLFDI	PSSKPA	SEQ NT														22				
Pae	MELL																	4				
Eco	MAQA																	4				
RB69	MKE																	3				
T4	MKE																	3				
Phi29	MK																	2				
Consensus	M																					
	100	120	140	160																		
Tgo			ILD	TDY	I					TED	GKPVIRIF	K	20									
Kod1			ILD	TDY	I					TED	GKPVIRIF	K	20									
9 <sup>n</sup>			ILD	TDY	I					TEN	GKPVIRIF	K	20									
Pfu			ILD	VDY	I					TEE	GKPVIRIF	K	20									
Vent			ILD	TDY	I					TKD	GKPIIRIF	K	20									
Mma			ESLID	LDY	N					SDD	LCIYLYLI	N	22									
Mec			PMDFGILD	ADYEV						VND	SGPVIRL	FGR	27									
hPOLD	QE	EEEE	ELGS	VLEGVAD	GOV	PPSAID	PRWL	RPTPPAL	DPQ	TEPLIF	QQL	IDHYV	GPAQP	VPGGPP	PSRG	SVPVLR	AFGV	130				
SoePOLD	ESTFE	OE	LSG	MEHDMAD	QEE	HDLS	SFERKK	LPTD	--FDP	S	LYDIS	FQ	QID	AE	-----QS	VLNGI	KDENT	ST	VVRF	FGV	142	
Pis																						26
Soe			QQS	QASAP	VEEKK	VVRREW	LEE	A	GENK	I	YFL	LQ	VDY									72
Pae																						16
Eco																						14
RB69																						20
T4																						20
Phi29																						2
Consensus																						

圖1



I869710

**【發明摘要】****【中文發明名稱】** 用於無模板RNA合成的核酸聚合酶變體、試劑套組及方法**【英文發明名稱】** NUCLEIC ACID POLYMERASE VARIANTS, KITS AND

METHODS FOR TEMPLATE-INDEPENDENT RNA SYNTHESIS

**【中文】**

本發明所提供內容係關於核酸聚合酶變體及包含該核酸聚合酶變體的套組，其中該核酸聚合酶變體可利用核糖核苷酸 (rNTP) 以耐熱方式執行無模板核酸合成，故具有更理想的功能及活性。

**【英文】**

Provided herein relates to nucleic acid polymerase variants and kits including the same, where the nucleic acid polymerase variant has an improved function and activity of performing template-independent nucleic acids synthesis using ribonucleotides (rNTPs) in a thermotolerant manner.

**【指定代表圖】** 圖1**【代表圖之符號簡單說明】**

無。

**【特徵化學式】**

無。

## 【發明說明書】

【中文發明名稱】 用於無模板RNA合成的核酸聚合酶變體、試劑套組及方法

【英文發明名稱】 NUCLEIC ACID POLYMERASE VARIANTS, KITS AND

METHODS FOR TEMPLATE-INDEPENDENT RNA SYNTHESIS

### 【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種聚合酶變體以及包含其的試劑套組，具體而言係關於用於酶催化核酸新生合成 (*de novo enzymatic nucleic acid synthesis*) 的聚合酶變體及包含該變體的試劑套組；然而本發明並不以此為限。

### 【先前技術】

【0002】 不論在學術或工業領域，寡核苷酸的合成對於生物技術研究的各種面向而言都至關重要。然而，過去數十年所發展的傳統化學合成方法存在著許多侷限；尤其是核糖核酸 (以下簡稱 RNA) 新生合成 (*de novo RNA synthesis*) 更是如此，因此對於那些大舉投資以推進基因體工程技術及利用RNA的診斷、治療、定序技術、核酸資訊儲存甚至生物計算的人而言，此技術顯然仍遙不可及。RNA的化學合成深受冗長的反應步驟所困，且該些反應步驟皆需要較為苛刻的化學試劑及生物不相容的有機溶劑；此等反應條件往往會導致核苷酸鹼基去嘌呤 (*depurination*)、整體序列發生意外插入 (*insertion*) 或者自序列中缺失，以及過早發生不可逆的寡核苷酸加帽 (*irreversible capping*)，導致無用的截短產物。這些問題皆大幅增加了RNA合成的整體錯誤率，並限制了RNA寡核苷酸的合成長度 (小於120個核苷酸)，且需要更長的生產時間才能獲得差強人意的預期產物產

率。除此之外，RNA寡核苷酸的化學合成具有毒性且勞力密集。據此，克服當前RNA寡核苷酸合成的種種侷限實為重要的課題。

【0003】 由酶催化的核酸新生合成為一種新興且無毒的方法，用以替代已有數十年歷史，運用亞磷醯胺且有毒性的化學核酸合成方法。所有生命體都依賴核酸聚合酶有效地複製其核酸。依據複製核酸的機制，絕大多數的核酸聚合酶都需要模板來引導核苷酸合成以及將核苷酸併入增長中的核酸鏈內。在依賴模板的核酸合成方式中，聚合酶必須與引子-模板核酸結合，隨後聚合酶才能將核苷酸添加至引子的3'端。

【0004】 然而，與大多數複製性的核酸聚合酶不同，X族末端去氧核苷酸轉移酶 (Terminal deoxynucleotidyl Transferase ; Tdt) 係一類獨特的嗜中溫酶 (mesophilic enzyme)，其在合成核酸期間並不依賴模板添加核苷酸。Tdt僅需要一段短的起始DNA或引子來引導核苷酸的合成，以及將核苷酸併入增長中的起始DNA或引子中。先前的研究表明，Tdt可結合去氧核糖核苷酸 (dNTP) 及核糖核苷酸 (rNTP) 且對兩者的區別不大(Boulé, J B等人，*The Journal of biological chemistry* (2001))。然而，Tdt僅能延長形成最多約4到5個核糖核苷酸的新合成RNA鏈，可見實務上Tdt在使用核糖核酸或核糖核酸/去氧核糖核酸混合受質進一步合成的併入功效並不理想；故，Tdt並不適用於RNA新生合成之反應。

#### 【發明內容】

【0005】 由於上述多樣化的結構-功能關係，自然中用以複製的核酸聚合酶恐無法輕易地將核糖核苷酸 (rNTP) 用作核糖核酸新生合成之受質。因此，特製化、經修飾的核酸聚合酶實為往後各種核酸合成應用得以發揮的必要先決條件。

【0006】本發明人在B族DNA聚合酶變體的胺基酸序列中發現了一些新位置/區域，該些位置/區域在賦予所述聚合酶的模板非依賴性 (template independence) 以及增強該聚合酶對於核糖核苷酸的受質結合親和力上有關鍵的作用，進而為無模板RNA合成方法提供了新的可能性。

【0007】具體而言，本發明一方面提供一種所謂的RNA聚合酶變體，其包含：A模體及B模體，分別對應於共通序列(SEQ ID NO：1)之位置706至730以及位置843至855；以及至少一個胺基酸取代，此取代係位於A模體、B模體或其組合中的位置；其中該RNA聚合酶變體具有減弱或缺失的3'至5'核酸外切酶活性。

【0008】根據本發明之一實施例，代表性RNA聚合酶變體係由野生型B族DNA聚合酶修飾而成，且該野生型B族DNA聚合酶的胺基酸序列包含選自於SEQ ID NO：2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16或17之胺基酸序列。

【0009】根據本發明之一實施例，該野生型B族DNA聚合酶係柳珊瑚嗜熱球菌 (*Thermococcus gorgonarius*) DNA聚合酶 (Tgo)、鹿兒島嗜熱球菌 (*Thermococcus kodakarensis*) DNA聚合酶 (Kod1)、嗜熱球菌屬 (菌株9°N-7) DNA聚合酶(9°N)、激烈火球菌 (*Pyrococcus furiosus*) DNA聚合酶 (Pfu)、海濱嗜熱球菌 (*Thermococcus litoralis*) DNA聚合酶 (Vent)、嗜乙酸甲烷八疊球菌 (*Methanosarcina acetivorans*) DNA聚合酶 (Mac)、冰島熱棒菌 (*Pyrobaculum islandicum*) DNA聚合酶 (Pis)、硫磺礦硫化葉菌 (*Sulfolobus solfataricus*) DNA聚合酶 (Sso)、海沼甲烷球菌 (*Methanococcus maripaludis*) DNA聚合酶 (Mma)、人類DNA聚合酶 $\delta$ 催化p125次單元 (hPOLD)、釀酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) DNA聚合酶 $\delta$ 催化次單元 (ScePOLD)、綠膿桿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) DNA

聚合酶II (Pae)、大腸桿菌 (*Escherichia. coli*) DNA聚合酶II (Eco)、大腸桿菌噬菌體RB69 DNA聚合酶 (RB69)、大腸桿菌噬菌體T4 DNA聚合酶 (T4) 或芽孢桿菌噬菌體 Phi29 DNA聚合酶 (Phi29)。

【0010】 根據本發明之一實施例，代表性RNA聚合酶變體包含對應於共通序列(SEQ ID NO：1)之位置349至位置364的Exo I模體，且該RNA聚合酶變體在該Exo I模體中的位置具有至少一胺基酸取代。較佳地，根據本發明之一實施例，該RNA聚合酶變體之中，對應於SEQ ID NO：1位置715之胺基酸L或M係由A、C、D、F、G、H、K、N、Q、S、W或Y所取代；對應於SEQ ID NO：1位置716之胺基酸Y保持不變或係由A、C、D、G、N、S、T或V所取代；以及對應於SEQ ID NO：1位置717之胺基酸P保持不變或係由A、C、G、I、L、M、N、S、T或V所取代。

【0011】 根據本發明之一實施例，所選之RNA聚合酶變體係源自具有野生型胺基酸序列SEQ ID NO：2之柳珊瑚嗜熱球菌 (*Thermococcus gorgonarius*) DNA聚合酶 (Tgo)，且其中：在SEQ ID NO：2位置408之胺基酸L係由A、C、D、F、G、H、K、M、N、Q、S、W或Y所取代；在SEQ ID NO：2位置409之胺基酸Y保持不變或係由A、C、D、G、N、S、T或V所取代；以及在SEQ ID NO：2位置410之胺基酸P保持不變或係由A、C、G、I、L、M、N、S、T或V所取代。

【0012】 根據本發明之一實施例，代表性RNA聚合酶變體係源自具有野生型胺基酸序列SEQ ID NO：2之柳珊瑚嗜熱球菌 (*Thermococcus gorgonarius*) DNA聚合酶 (Tgo)，且其中：在SEQ ID NO：2位置408之胺基酸L係由A、C、D、F、G、H、K、M、N、Q、S、W或Y所取代；在SEQ ID NO：2位置409之胺基酸Y保持不變或係由A、C、D、G、N、S、T或V所取代；在SEQ ID NO：2位置410

之胺基酸P保持不變或係由A、C、G、I、L、M、N、S、T或V所取代；以及在SEQ ID NO：2位置485之胺基酸A係由C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、T、V、W或Y所取代。

【0013】根據本發明之一實施例，代表性RNA聚合酶變體係源自具有野生型胺基酸序列SEQ ID NO：3之鹿兒島嗜熱球菌 (*Thermococcus kodakarensis*) DNA聚合酶 (Kod1)，且其中：在SEQ ID NO：3位置408之胺基酸L係由A、C、D、F、G、H、K、M、N、Q、S、W或Y所取代；在SEQ ID NO：3位置409之胺基酸Y保持不變或係由A、C、D、G、N、S、T或V所取代；以及在SEQ ID NO：3位置410之胺基酸P保持不變或係由A、C、G、I、L、M、N、S、T或V所取代。

【0014】根據本發明之一實施例，代表性RNA聚合酶變體係源自具有野生型胺基酸序列SEQ ID NO：3之鹿兒島嗜熱球菌 (*Thermococcus kodakarensis*) DNA聚合酶 (Kod1)，且其中：在SEQ ID NO：3位置408之胺基酸L係由A、C、D、F、G、H、K、M、N、Q、S、W或Y所取代；在SEQ ID NO：3位置409之胺基酸Y保持不變或由A、C、D、G、N、S、T或V所取代；在SEQ ID NO：3位置410之胺基酸P保持不變或係由A、C、G、I、L、M、N、S、T或V所取代；以及在SEQ ID NO：3位置485之胺基酸A係由C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、T、V、W或Y所取代。

【0015】根據本發明之一實施例，代表性RNA聚合酶變體係源自具有含野生型胺基酸序列SEQ ID NO：4之嗜熱球菌屬 (菌株9°N-7) DNA聚合酶 (9°N)，且其中：在SEQ ID NO：4位置408之胺基酸L係由A、C、D、F、G、H、K、M、N、Q、S、W或Y所取代；在SEQ ID NO：4位置409之胺基酸Y保持不變或係由

A、C、D、G、N、S、T或V所取代；以及在SEQ ID NO：4位置410之胺基酸P保持不變或係由A、C、G、I、L、M、N、S、T或V所取代。

【0016】 根據本發明之一實施例，代表性RNA聚合酶變體係源自具有野生型胺基酸序列SEQ ID NO：4之嗜熱球菌屬 (菌株9°N-7) DNA聚合酶(9°N)，且其中：在SEQ ID NO：4位置408之胺基酸L係由A、C、D、F、G、H、K、M、N、Q、S、W或Y所取代；在SEQ ID NO：4位置409之胺基酸Y保持不變或係由A、C、D、G、N、S、T或V所取代；在SEQ ID NO：4位置410之胺基酸P保持不變或係由A、C、G、I、L、M、N、S、T或V所取代；以及在SEQ ID NO：4位置485之胺基酸A係由C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、T、V、W或Y所取代。

【0017】 根據本發明之一實施例，代表性RNA聚合酶變體係源自具有野生型胺基酸序列SEQ ID NO：5之激烈火球菌 (*Pyrococcus furiosus*) DNA聚合酶(Pfu)，且其中：在SEQ ID NO：5位置409之胺基酸L係由A、C、D、F、G、H、K、M、N、Q、S、W或Y所取代；在SEQ ID NO：5位置410之胺基酸Y保持不變或係由A、C、D、G、N、S、T或V所取代；以及在SEQ ID NO：5位置411之胺基酸P保持不變或係由A、C、G、I、L、M、N、S、T或V所取代。

【0018】 根據本發明之一實施例，代表性RNA聚合酶變體係源自具有野生型胺基酸序列SEQ ID NO：5之激烈火球菌 (*Pyrococcus furiosus*) DNA聚合酶(Pfu)，且其中：在SEQ ID NO：5位置409之胺基酸L係由A、C、D、F、G、H、K、M、N、Q、S、W或Y所取代；在SEQ ID NO：5位置410之胺基酸Y保持不變或係由A、C、D、G、N、S、T或V所取代；在SEQ ID NO：5位置411之胺基酸P保持不變或係由A、C、G、I、L、M、N、S、T或V所取代；以及在SEQ ID NO：

5位置486之胺基酸A係由C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、T、V、W或Y所取代。

【0019】 根據本發明之一實施例，代表性RNA聚合酶變體係源自具有野生型胺基酸序列SEQ ID NO：6之海濱嗜熱球菌 (*Thermococcus litoralis*) DNA聚合酶 (Vent)，且其中：在SEQ ID NO：6位置411之胺基酸L係由A、C、D、F、G、H、K、M、N、Q、S、W或Y所取代；在SEQ ID NO：6位置412之胺基酸Y保持不變或係由A、C、D、G、N、S、T或V所取代；以及在SEQ ID NO：6位置413之胺基酸P保持不變或係由A、C、G、I、L、M、N、S、T或V所取代。

【0020】 根據本發明之一實施例，代表性RNA聚合酶變體係源自具有野生型胺基酸序列SEQ ID NO：6之海濱嗜熱球菌 (*Thermococcus litoralis*) DNA聚合酶 (Vent)，且其中：在SEQ ID NO：6位置411之胺基酸L係由A、C、D、F、G、H、K、M、N、Q、S、W或Y所取代；在SEQ ID NO：6位置412之胺基酸Y保持不變或係由A、C、D、G、N、S、T或V所取代；在SEQ ID NO：6位置413之胺基酸P保持不變或係由A、C、G、I、L、M、N、S、T或V所取代；以及在SEQ ID NO：6位置488之胺基酸A係由C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、T、V、W或Y所取代。

【0021】 根據本發明之一實施例，代表性RNA聚合酶變體係源自具有野生型胺基酸序列SEQ ID NO：7之嗜乙酸甲烷八疊球菌 (*Methanosarcina acetivorans*) DNA聚合酶 (Mac)，且其中：在SEQ ID NO：7位置485之胺基酸L係由A、C、D、F、G、H、K、M、N、Q、S、W或Y所取代；在SEQ ID NO：7位置486之胺基酸Y保持不變或係由A、C、D、G、N、S、T或V所取代；以及在SEQ ID NO：7位置487之胺基酸P保持不變或係由A、C、G、I、L、M、N、S、T或V所取代。

【0022】 根據本發明之一實施例，代表性RNA聚合酶變體係源自具有野生型胺基酸序列SEQ ID NO：7之嗜乙酸甲烷八疊球菌 (*Methanosarcina acetivorans*) DNA聚合酶 (Mac)，且其中：在SEQ ID NO：7位置485之胺基酸L係由A、C、D、F、G、H、K、M、N、Q、S、W或Y所取代；在SEQ ID NO：7位置486之胺基酸Y保持不變或係由A、C、D、G、N、S、T或V所取代；在SEQ ID NO：7位置487之胺基酸P保持不變或係由A、C、G、I、L、M、N、S、T或V所取代；以及在SEQ ID NO：7位置565之胺基酸A係由C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、T、V、W或Y所取代。

【0023】 根據本發明之一實施例，代表性RNA聚合酶變體係源自具有野生型胺基酸序列SEQ ID NO：8之冰島熱棒菌 (*Pyrobaculum islandicum*) DNA聚合酶 (Pis)，且其中：在SEQ ID NO：8位置426之胺基酸M係由A、C、D、F、G、H、K、N、Q、S、W或Y所取代；在SEQ ID NO：8位置427之胺基酸Y保持不變或係由A、C、D、G、N、S、T或V所取代；以及在SEQ ID NO：8位置428之胺基酸P保持不變或係由A、C、G、I、L、M、N、S、T或V所取代。

【0024】 根據本發明之一實施例，代表性RNA聚合酶變體係源自具有野生型胺基酸序列SEQ ID NO：8之冰島熱棒菌 (*Pyrobaculum islandicum*) DNA聚合酶 (Pis)，且其中：在SEQ ID NO：8位置426之胺基酸M係由A、C、D、F、G、H、K、N、Q、S、W或Y所取代；在SEQ ID NO：8位置427之胺基酸Y保持不變或係由A、C、D、G、N、S、T或V所取代；在SEQ ID NO：8位置428之胺基酸P保持不變或係由A、C、G、I、L、M、N、S、T或V所取代；以及在SEQ ID NO：8位置508之胺基酸A係由C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、T、V、W或Y所取代。

【0025】 根據本發明之一實施例，代表性RNA聚合酶變體係源自具有野生型胺基酸序列SEQ ID NO：9之硫磺礦硫化葉菌 (*Sulfolobus solfataricus*) DNA聚合酶 (Sso)，且其中：在SEQ ID NO：9位置518之胺基酸L係由A、C、D、F、G、H、K、M、N、Q、S、W或Y所取代；在SEQ ID NO：9位置519之胺基酸Y保持不變或係由A、C、D、G、N、S、T或V所取代；以及在SEQ ID NO：9位置520之胺基酸P保持不變或係由A、C、G、I、L、M、N、S、T或V所取代。所取代

【0026】 根據本發明之一實施例，代表性RNA聚合酶變體係源自具有野生型胺基酸序列SEQ ID NO：9之硫磺礦硫化葉菌 (*Sulfolobus solfataricus*) DNA聚合酶 (Sso)，且其中：在SEQ ID NO：9位置518之胺基酸L係由A、C、D、F、G、H、K、M、N、Q、S、W或Y所取代；在SEQ ID NO：9位置519之胺基酸Y保持不變或係由A、C、D、G、N、S、T或V所取代；在SEQ ID NO：9位置520之胺基酸P保持不變或係由A、C、G、I、L、M、N、S、T或V所取代；以及在SEQ ID NO：9位置601之胺基酸A係由C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、T、V、W或Y所取代。

【0027】 根據本發明之一實施例，代表性RNA聚合酶變體表現出一無模板核酸合成活性，係藉由將至少一核苷酸添加至一可延長的起始子，以無模板方式合成核酸，其中該至少一核苷酸選自由天然存在的核苷酸、核苷酸類似物及其混合物。

【0028】 根據本發明之一實施例，該可延長的起始子包括一單股寡核苷酸起始子、平末端 (blunt-end) 雙股寡核苷酸起始子或其混合物。

【0029】 根據本發明之一實施例，該可延長的起始子係在液相中反應之游離態核酸。

【0030】 根據本發明之一實施例，該可延長的起始子係固定在固相載體上，其中該固相載體包括粒子、珠粒、載玻片、陣列表面、膜、流通池、孔、微孔、奈米孔、腔室、微流體腔室、通道或微流體通道。

【0031】 根據本發明之一實施例，前述之至少一種核苷酸與一可偵測標記連接。

【0032】 根據本發明之一實施例，前述之至少一種核苷酸包括一核糖。

【0033】 根據本發明之一實施例，代表性RNA聚合酶變體介於在10°C至100°C之間的反應溫度下表現該無模板核酸合成活性。

【0034】 本發明另一方面提供一種用於執行酶催化核酸新生合成的試劑套組，其包含源自野生型B族DNA聚合酶修飾之RNA聚合酶變體，該野生型B族DNA聚合酶之胺基酸序列包含選自於由SEQ ID NO：2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16和17之一胺基酸序列；其中該RNA聚合酶變體表現出一無模板核酸合成活性，係藉由將至少一種核苷酸添加至可延長的起始子以合成所需的核酸序列，其中該至少一種核苷酸選自由天然存在的核苷酸、核苷酸類似物及其混合物的群組。

【0035】 本發明另一方面進一步提供一種無模板合成RNA寡核苷酸的方法，其包括：(a)提供起始寡核苷酸；(b)提供RNA聚合酶變體；(c)在足以將至少一種核苷酸添加至該起始寡核苷酸的3'端的條件下，聯合起始寡核苷酸、RNA聚合酶變體及至少一種核苷酸合成前述之RNA寡核苷酸。其中，特定RNA聚合酶變體包含：分別對應於共通序列(SEQ ID NO：1)之位置706至730以及位置843至855的A模體及B模體；以及至少一胺基酸取代，位於A模體、B模體或其組合

中的位置；其中RNA聚合酶變體具有減弱或缺失的內生性3'至5'核酸外切酶活性。

【0036】 據此，本發明係關於一種特定的RNA聚合酶變體，其在不具核酸模板的情況下，可於各種反應溫度下改善核酸合成過程中併入多種核苷酸的效能。具體而言，藉由前述RNA聚合酶變體可廣泛運用多樣的核苷酸及核苷酸類似物之特性，得以有效率地執行RNA新生合成方法。

### 【圖式簡單說明】

【0037】 為使本發明上述及其他目的、特徵、優點及實施例更加明顯易懂，因此針對圖式說明如下：

【0038】 圖 1 係本發明相關的野生型 B 族 DNA 聚合酶 (PolB) 胺基酸序列比對結果及其共通序列。

【0039】 圖 2A 及圖 2B 係本發明實例 3.1 之 RNA 合成反應結果圖。

【0040】 圖 3A 及圖 3B 係本發明實例 3.2 之 RNA 合成反應結果圖。

【0041】 圖 4A 及圖 4B 係本發明實例 3.3 之 RNA 合成反應結果圖。

【0042】 圖 5A 及圖 5B 係本發明實例 3.4 之 RNA 合成反應結果圖。

【0043】 圖 6A 及圖 6B 係本發明實例 3.5 之 RNA 合成反應結果圖。

### 【實施方式】

#### 相關申請案之交叉參考

【0044】 本申請案主張2021年9月29日申請之美國臨時專利申請案第US63/249,819號的優先權，該申請案之內容以全文引用之方式併入本文中。

## 序列表

【0045】本申請案係與電子格式之序列表一併申請。該序列表名稱為P222338TW-序列表.XML，其基於2022年9月28日提交之外文本P222338US\_sequence\_listing.XML所建立，且大小為34kb。該序列表中的相關資訊係以全文引用之方式併入本文中。

## 定義

【0046】本說明書中所使用的術語廣泛涵蓋於本發明的範圍內，且每個術語的具體背景與其在相關領域的一般含義相同。在本說明書中，說明本發明時所使用的具體術語，將於下文或本說明書的其他處說明，以幫助業界人士理解本發明的相關說明。在相同上下文中，同一術語具有相同的範圍和含義。此外，由於表達同一事物的方式不止一種；因此，本說明書中所討論的術語可以用替代術語和同義詞替換，而且在本說明書中無論是否指定或討論某一術語，皆不表示任何特殊含義。本說明書雖然提供一些術語的同義詞，但是使用一或多個同義詞並不表示排除其他同義詞的使用。

【0047】於本說明書中，除上下文另有明確說明外，術語「一」和「該」也可解釋為複數。又，於本說明書中，除上下文另有明確說明外，術語「或」可與術語「及/或」互換使用。

【0048】再者，於本說明書中，當物或方法分別「包括」或「包含」成分或步驟時，除非有與之相反的特定描述，否則該物或方法可以進一步包括而非排除其他成分或其他步驟。除此之外，說明書為便於閱讀可能附有標題和副標題，但這些標題並不影響本發明的範圍。

【0049】如本說明書中所使用的「胺基酸」係指可併入肽、多肽或蛋白質中的任何單體單元。如本說明書中所使用的術語「胺基酸」包括以下二十種天然或基因編碼的 $\alpha$ -胺基酸：丙胺酸 (Ala或A)、精胺酸 (Arg或R)、天門冬醯胺酸 (Asn或N)、天門冬胺酸 (Asp或D)、半胱胺酸 (Cys或C)、麩醯胺酸 (Gln或Q)、麩胺酸 (Glu或E)、甘胺酸 (Gly或G)、組胺酸 (His或H)、異白胺酸 (Ile或I)、白胺酸 (Leu或L)、離胺酸 (Lys或K)、甲硫胺酸 (Met或M)、苯丙胺酸 (Phe或F)、脯胺酸 (Pro或P)、絲胺酸 (Ser或S)、蘇胺酸 (Thr或T)、色胺酸 (Trp或W)、酪胺酸 (Tyr或Y) 和纈胺酸 (Val或V)。當未清楚定義「X」殘基情況下，這些胺基酸應定義為「任一種胺基酸」。

【0050】術語「功能等效」或「等效」用於描述特異性 B 族 DNA 聚合酶 (PolB) 變體及本文所提供任何衍生 RNA 聚合酶變體。根據序列比對或參考序列研判，此衍生 RNA 聚合酶變體帶有之特定胺基酸位置的取代或突變，視同發生在其他 PolB 或 PolB 變體中對等胺基酸位置的取代或突變，且這些等效位置在酶中具有相同的功能或結構作用。等效位置可以根據同源物、保守模體 (conserved motif)、使用者定義或衍生取得的共通序列加以定義。

【0051】一般而言，同源PolB具有相似或相同的胺基酸序列及功能結構，因此不同PolB之間的等效胺基酸取代突變通常發生在同源胺基酸位置處。基於蛋白質序列或結構比對而言，無論發生突變的胺基酸的實際功能為何，本文所用的術語「功能等效」或「等效」亦涵蓋與特定突變「同源」或「位置上等效」的突變。實務上而言，可以根據蛋白質序列或結構比對識別不同聚合酶的「功能等效」、「同源」及/或「位置上等效的」胺基酸殘基。據此，圖1呈現針對多

種野生型PolB進行跨物種比對的結果，並將共通序列 (SEQ ID NO： 1) 用作位置參考序列。

【0052】 舉例而言，在野生型鹿兒島嗜熱球菌 (*Thermococcus kodakarensis*) DNA聚合酶 (Kod1) 之胺基酸序列的位置141用丙胺酸 (A) 取代天門冬胺酸 (D)(簡述為D141A)，將視為功能上等效於在野生型大腸桿菌噬菌體 RB69 DNA聚合酶 (RB69) 之胺基酸序列的保守殘基位置114用A取代D (簡述為D114A)。當使用位置參考序列來描述該等等效胺基酸取代時，Kod1之位置141的胺基酸殘基及RB69之位置114的胺基酸殘基為功能等效位置，且兩者的功能等效位置皆對應於共通序列 (SEQ ID NO： 1) 之位置354。

【0053】 術語「保守」則係指在不同來源之不同PolB的同源或等效位置上，其聚合酶片段具有相同的胺基酸殘基。術語「半保守」係指在不同來源之不同PolB的同源或等效位置上，其聚合酶片段具有特性相似的胺基酸殘基或相同的胺基酸殘基。

【0054】 術語「核酸」、「核酸序列」、「寡核苷酸」、「多核苷酸」及「核酸片段」係指單股或雙股形式的核糖核酸 (RNA) 或去氧核糖核酸 (DNA) 序列，該序列的來源及長度在本文中不做限制；且通常包括天然存在的核苷酸或人工化學模擬物。如本文所用的術語「核酸」可與包括天然或非天然「寡核苷酸」、「多核苷酸」、「DNA」、「RNA」、「基因」、「互補DNA」(cDNA) 及「信使RNA」(mRNA)在內的術語互換。

【0055】 本文所用的「核酸」、「寡核苷酸」或「多核苷酸」係指可對應於核糖核酸 (RNA) 或去氧核糖核酸 (DNA) 聚合物的聚合物或其類似物。此包括核苷酸 (諸如RNA及DNA) 的聚合物，以及其合成形式、修飾 (如化學或生物化

學修飾體)形式，以及混合聚合物(如包括RNA和DNA次單元)。例示修飾包括甲基化、以類似物取代一或多個天然存在的核苷酸、核苷酸間修飾，例如產生不帶電荷鍵聯(如甲基磷酸酯、磷酸三酯、胺基磷酸酯、胺甲酸酯等)、懸垂部分(如多肽)、嵌入劑(如，吡啶、補骨脂素等)、螯合劑、烷基化劑和已修飾鍵聯(如 $\alpha$ 變旋異構核酸等)。除此之外亦包括有能力模擬多核苷酸經由氫鍵和其他化學交互作用鍵結指定序列的合成分子。雖然核酸的合成形式可包含其他鍵聯(如Nielsen等人所述的肽核酸(Science 254:1497-1500,1991))，不過通常情況下的核苷酸單體均經由磷酸二酯鍵鍵聯。核酸可以是或包括如染色體或染色體片段、載體(如表現載體)、表現匣、裸露的DNA或RNA聚合物、聚合酶鏈鎖反應(PCR)的產物、寡核苷酸、探針和引子。核酸可以是單股、雙股或三股，不限於任何特定長度。除另有說明外，特定的核酸序列除了明確指定的序列外，還可任意包含或編碼互補序列。

**【0056】** 如上所述，本說明書所用的「核酸」亦包括「核酸類似物」，其描述在功能或結構上等效於與天然存在的RNA及DNA的化合物或人工核酸。核酸類似物可以具有經修飾核苷酸的一或多個組成部分(磷酸骨架、戊糖及核鹼基)。核苷酸上的該等修飾改變了核酸的結構及幾何形狀以及其與核酸聚合酶的交互作用。核酸類似物亦涵蓋新興的人工核酸，如XNA，其經設計具有新穎的糖骨架。

**【0057】** 核酸類似物的實例包括但不限於：通用鹼基，諸如肌苷、3-硝基吡咯及5-硝基吡咯，其可以與所有四種典型鹼基(canonical base)形成鹼基對；磷酸-糖骨架類似物，諸如肽-核酸(PNA)，其影響核酸的骨架特性；化學連接子或螢光團(fluorophore) 附接的類似物，諸如胺反應性胺基烯丙基(amine-reactive

aminoallyl) 核苷酸、含硫醇的核苷酸、生物素連接的核苷酸、羅丹明 (rhodamine) 連接的核苷酸及花青色素 (cyanine) 連接的核苷酸；螢光鹼基類似物，諸如2-氨基嘌呤 (2-aminopurine, 2-AP)、3-甲基異黃蝶呤 (3-methylisoxanthopterin, 3-MI)、6-甲基異黃蝶呤 (6-MI)、4-氨基-6-甲基異黃蝶呤 (4-amino-6-methylisoxanthopterin, 6-MAP) 及4-二甲氨基吡啶 (4-dimethylaminopyridine, DMAP)；用於各種遺傳應用的核酸探針，諸如與螢光報導染料綴合的寡核苷酸 (ALEXA、FAM、TET、TAMRA、CY3、CY5、VIC、JOE、HEX、NED、PET、ROX、Texas Red等) 及/或螢光淬滅劑 (BHQ)；分子信標 (MB)，其係單股核酸探針，含有莖環結構以及雙螢光團及淬滅劑 (fluorophore-and-quencher) 標記；及核酸適體。

**【0058】** 通常，本說明書中所使用的術語「模板」是指包含所需或未知的目標核苷酸序列的多核苷酸或多核苷酸模擬物。在一些情況下，術語「目標序列」、「模板多核苷酸」、「目標核酸」、「目標多核苷酸」、「核酸模板」、「序列模板」及其變體用語可互換使用。具體而言，術語「模板」是指一股核酸 (或核酸鏈)，係用以供模板依賴性或模板導引性的核酸聚合酶進行複製，從核苷酸或核苷酸類似物合成一互補的複製品。在習知定義中，位在核酸雙股螺旋中的模板股係描繪形容成「底」股。同樣地，非模板股係經常描繪形容成「頂」股。「模板」股也可稱為「有義」或「正」股，非模板股則稱為「反義」或「負」股。

**【0059】** 本說明書中所使用的術語「起始子 (initiator)」係指單核苷、單核苷酸及寡核苷酸、多核苷酸或其經修飾的類似物，核酸聚合酶以其為起始物開始進行核酸新生 (*de novo*) 合成。術語「起始子」亦可指異種核酸 (XNA) 或具有3'-羥基基團的肽核酸 (PNA)。

【0060】本說明書中所使用的術語「核苷酸併入」、「類似物併入」、「併入核苷酸」和「併入類似物」係熟悉該項技術領域人士已知，且係用於說明核酸合成的流程或反應。因此，本說明書中所使用的術語「併入」可知係靈活地指在核酸起始子或引子的3'-羥基末端添加一或多個核苷酸或任何特定的核酸前驅物。

【0061】進一步地，本說明書中所使用的術語「核苷酸類似物」為熟悉該項技術領域人士所知，用來說明屬於典型核苷酸結構模擬物的化學修飾核苷酸或人工核苷酸。這些核苷酸類似物可以作為核酸聚合酶合成核酸的受質。核苷酸類似物可具有核苷酸的一或多個改變的組成部分(如磷酸骨架、戊糖和核鹼基)，這些改變的組成部份不僅會改變核苷酸的結構和配置，並影響它們與其他核鹼基和核酸聚合酶的交互作用。舉例來說，核苷酸類似物如具有一改變的核鹼基時，可以賦予DNA或RNA其他鹼基配對和鹼基堆疊的特性以供選擇。再舉例來說，在鹼基處進行修飾的話，可產生各種核苷，例如肌苷、甲基-5-去氧胞苷、去氧尿苷、二甲胺基-5-去氧尿苷、二胺基-2,6-嘌呤或溴-5-去氧尿苷及其他任何允許雜交的類似物等。在其他例示實施態樣中，這些修飾可發生於核糖的部位(例如以類似物替代去氧核糖)和/或磷酸官能基層級(例如硼酸鹽、烷基膦酸鹽(alkylphosphonate)或硫代磷酸鹽衍生物)。核苷酸類似物單體的磷酸官能基係可選自於單磷酸、二磷酸、三磷酸、四磷酸、五磷酸和六磷酸。

【0062】其他核苷酸類似物案例還包括具有可移除保護基部分(blocking moiety)的核苷酸。可移除保護基部分的案例包括但不限於3'-O-保護基部分、鹼基保護基部分及其組合。3'-O-保護基部分的案例包括但不限於O-疊氮基(O-N<sub>3</sub>)、O-疊氮甲基、O-胺基、O-烯丙基、O-苯氧基乙醯基、O-甲氧基乙醯基、

O-乙醯基、O-(p-甲苯)磺酸鹽、O-磷酸鹽、O-硝酸鹽、O-[4-甲氧基]-四氫噻喃基、O-四氫噻喃基、O-[5-甲基]-四氫呋喃基、O-[2-甲基, 4-甲氧基]-四氫吡喃基、O-[5-甲基]-四氫吡喃基、O-四氫噻吩基、O-2-硝基苄基、O-甲基和O-醯基。鹼基保護基部分的案例可以是可逆染料終止子。可逆染料終止子的案例包括但不限於：Illumina MiSeq的可逆染料終止子、Illumina HiSeq的可逆染料終止子、Illumina Genome Analyzer IIX的可逆染料終止子、Helicos Biosciences Heliscope的可逆染料終止子以及LaserGen Lightning Terminator的可逆染料終止子。

【0063】本說明書中所使用的「B族DNA聚合酶 (PolB)」是指所有生命域和眾多DNA病毒中最常見的模板依賴性核酸聚合酶或複製酶。天然PolB與大多數核酸聚合酶一樣，催化核苷酸轉移酶反應將核苷酸添加到引子末端的3'-羥基(3'-OH)時，必須有雙股引子模板DNA且引子末端處帶有游離3'-羥基官能基、所有四種核苷三磷酸 (dATP、dTTP、dCTP和dGTP) 以及催化用二價陽離子 ( $Mg^{2+}$  或  $Mn^{2+}$  等)。PolB酶，如細菌Pol II和古菌B族DNA聚合酶，是複製型和修復型聚合酶，它們本質上包含著聚合酶催化域 (catalytic polymerase domain) 及3'→5'核酸外切域 (exonucleolytic domain，或稱為校對域)，用於在核酸複製過程中，從不斷增長的引子股中移除錯誤併入的核苷酸。術語「3'→5'核酸外切域」(簡稱 Exo域) 係指一種聚合酶的胺基酸序列區域，該區域的功能在於發揮核酸降解活性，從引子或多核苷酸鏈的3'末端開始降解核酸。同等的術語「聚合酶催化域」亦指一種聚合酶的胺基酸序列區域，該區域的功能在於發揮DNA/RNA聚合酶催化活性，將核苷酸添加到引子或多核苷酸鏈的3'末端。

【0064】目前已知的PolB聚合酶催化域皆類似於人類右手的形狀，其中關鍵功能區域分別界定為手指、手掌和拇指子域。其中最保守的手掌子域包含催化用的必需殘基。在源自不同界 (kingdom) 之生命體和DNA病毒的各種B族DNA

聚合酶之間進行蛋白質序列比對，結果顯示PolB聚合酶一般帶有六個半保守或保守的模體 (I-VI)，用於發揮基本的核酸外切酶和聚合酶功能。前三個序列模體 (Exo I、Exo II、Exo III)位於3'→5'核酸外切域，而另三個模體 (分別稱為A、B及C模體) 則位於聚合酶域 (1999年Hopfner等人發表於Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 3600–3605)。在本發明的一些實施例中，不受任何理論所限制，該等B族DNA聚合酶模體中有一些新穎的位置/區域修飾，而聚合酶可以藉此作為無模板 (即非模板依賴性) RNA聚合酶，有效地催化RNA新生合成。基於後天獲得之RNA新生合成活性，該等經修飾的B族DNA聚合酶稱為無模板RNA聚合酶變體。換言之，這些RNA聚合酶變體能夠在受阻的反應條件下於起始寡核苷酸的3'末端處併入核糖核苷酸，諸如rATP、rUTP、rCTP及rGTP。

【0065】 本發明當中上下文中所使用的術語「突變體」(mutant) 係指一種通常為重組的多肽，其中包含一或多個相對於對應功能性DNA聚合酶的胺基酸取代。

【0066】 本發明當中上下文中所使用的「對應於另一序列」(如區域、片段、核苷酸或胺基酸位置等) 之描述係基於核苷酸或胺基酸位置編號的編號慣例，然後按照序列一致性 (identity) 百分比最大化之原則進行序列比對所獲得之對應結果。胺基酸「對應於特定序列的位置X」之類的描述，是指針對所關注的多肽與特定序列比對後，得知該多肽中某一胺基酸對應於特定序列中位置X的等效胺基酸。通常如本說明書所述，可使用比對演算法 (如BLAST等) 及其他執行胺基酸序列比對的工具方法確定某一胺基酸對應於聚合酶的位置。因為既定「對應區域」內的所有位置不盡然必須與關注的序列位置完全相配，故對應區域內與關注的序列不相配的位置也可視為或定義為「對應位置」。故，如本說明書中所

提及「與特定DNA聚合酶的胺基酸位置X對應的胺基酸位置」，其係指根據比對而知某一胺基酸位置本身與其他DNA聚合酶、結構同源物和同族物中胺基酸位置X相互對應之等效位置。

【0067】如本說明書中所使用的術語「SEQ ID NO：1共通序列」係指包含跨物種B族DNA聚合酶之保守或半保守胺基酸的參考序列。SEQ ID NO：1共通序列係一虛擬序列，其係經由比對以下16種野生型B族DNA聚合酶而產生，以獲得其中的保守胺基酸：柳珊瑚嗜熱球菌 (*Thermococcus gorgonarius*) DNA聚合酶 (Tgo)、鹿兒島嗜熱球菌 (*Thermococcus kodakarensis*) DNA聚合酶 (Kod1)、嗜熱球菌屬 (*Thermococcus sp.*)(菌株9°N-7) DNA聚合酶 (9°N)、激烈火球菌 (*Pyrococcus furiosus*) DNA聚合酶(Pfu)、海濱嗜熱球菌 (*Thermococcus litoralis*) DNA聚合酶 (Vent)、海沼甲烷球菌 (*Methanococcus maripaludis*) DNA聚合酶 (Mma)、嗜乙酸甲烷八疊球菌 (*Methanosarcina acetivorans*) DNA聚合酶 (Mac)、人類DNA聚合酶 $\delta$ 催化p125次單元 (hPOLD)、釀酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) DNA聚合酶 $\delta$ 催化次單元 (ScePOLD)、冰島熱棒菌 (*Pyrobaculum islandicum*) DNA聚合酶 (Pis)、硫磺礦硫化葉菌 (*Sulfolobus solfataricus*) DNA聚合酶 (Sso)、綠膿桿菌DNA聚合酶II (Pae)、大腸桿菌DNA聚合酶II (Eco)、大腸桿菌噬菌體 (*Escherichia coli* phage) RB69 DNA聚合酶 (RB69)、大腸桿菌噬菌體 T4 DNA聚合酶 (T4) 和芽孢桿菌噬菌體 (*Bacillus* phage) Phi29 DNA聚合酶 (Phi29)。將該等PolB之序列進行比對，以獲得比對序列作為功能等效位置的參考。

【0068】本發明所指 Exo I模體、Exo II模體、Exo III模體、A模體、B模體及C模體的位置係由發明人使用本發明SEQ ID NO：1共通序列所定義；因此，

應注意本發明中所定義的模體位置並不完全等同於文獻或先前技術中所述之位置。

## 目的

【0069】本發明人經過實驗後發現一種PolB變體，其在運用典型的核苷酸、核苷酸類似物及起始子進行無模板的多核苷酸合成上，具有更佳的功能及活性。該等PolB變體可以在不存在模板的情況下有效地將典型核苷酸或核苷酸類似物添加至起始子，以合成具有隨機或限定序列的多核苷酸。

【0070】更具體而言，本發明人發現PolB變體可以在不存在模板的情況下，有效地催化使天然核糖核苷酸 (rNTP)，如rATP、rUTP、rCTP及rGTP添加至單股核酸起始子或平末端 (blunt end) 雙股核酸起始子的3'-OH末端，以生成具有所需核酸序列的多核苷酸。此外，本發明之PolB變體通常具有更廣泛的受質特異性，此意謂PolB變體不僅可以利用天然存在的核苷酸，更能利用多種經修飾的核苷酸及核酸類似物來進行核酸新生合成。據此，經修飾的核苷酸可以進一步設計用於併入起始子以生成特定的功能性多核苷酸。是以，對於用在合成具有所需序列及特徵的多核苷酸之無模板酶催化核酸合成反應，本發明之PolB變體提供了更廣的應用範圍及更高的實用性。

## B族DNA聚合酶的蛋白質序列比對

【0071】圖1呈現了本發明人所採用的16種不同野生型B族DNA聚合酶 (PolB) 之胺基酸序列比對結果，且經比對取得共通序列 (SEQ ID NO：1) 的結果列於底部。用於比對的16種野生型PolB分別為柳珊瑚嗜熱球菌 (*Thermococcus gorgonarius*) DNA聚合酶 (Tgo, SEQ ID NO：2)、鹿兒島嗜熱球菌 (*Thermococcus kodakarensis*) DNA聚合酶 (Kod1, SEQ ID NO：3)、嗜熱球菌屬 (*Thermococcus sp.*) (菌株9°N-7) DNA聚合酶 (9°N, SEQ ID NO：4)、激烈火球菌 (*Pyrococcus*

*furiosus*) DNA聚合酶 (Pfu, SEQ ID NO: 5)、海濱嗜熱球菌 (*Thermococcus litoralis*) DNA聚合酶 (Vent, SEQ ID NO: 6)、嗜乙酸甲烷八疊球菌 (*Methanosarcina acetivorans*) DNA聚合酶 (Mac, SEQ ID NO: 7)、冰島熱棒菌 (*Pyrobaculum islandicum*) DNA聚合酶 (Pis, SEQ ID NO: 8)、硫磺礦硫化葉菌 (*Sulfolobus solfataricus*) DNA聚合酶 (Sso, SEQ ID NO: 9)、海沼甲烷球菌 (*Methanococcus maripaludis*) DNA聚合酶 (Mma, SEQ ID NO: 10)、人類DNA聚合酶 $\delta$ 催化p125次單元 (hPOLD, SEQ ID NO: 11)、釀酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) DNA聚合酶 $\delta$ 催化次單元 (ScePOLD, SEQ ID NO: 12)、綠膿桿菌DNA聚合酶II (Pae, SEQ ID NO: 13)、大腸桿菌DNA聚合酶II (Eco, SEQ ID NO: 14)、大腸桿菌噬菌體 (*Escherichia phage*) RB69 DNA聚合酶 (RB69, SEQ ID NO: 15)、大腸桿菌噬菌體T4 DNA聚合酶 (T4, SEQ ID NO: 16) 及芽孢桿菌噬菌體 Phi29 DNA聚合酶 (Phi29, SEQ ID NO: 17)。

【0072】如圖1所示，該些例示野生型PolB中具有呈現高度保守的各種序列區域，亦有其他可變的區塊。本領域技藝人士當能理解，除了本文特別指出及描述的突變之外，在不改變或不實質上改變聚合酶活性的情形下，亦可以在該些可變區域中進行其他突變。類似地，可以在不改變或不實質上改變經突變的酶的聚合酶活性的情況下，在任何PolB的保守殘基/位置處進行保守突變。基於其他功能上相關的酶或同系物 (homolog) 的結構比較分析的酵素工程乃分子生物學領域中的實用技術，令本發明人得以合理地預測特定突變對酶催化活性的影響。基於本文所使用的胺基酸序列、結構資料集和物理特性，本領域技藝人士可以在不改變或不實質上改變酶的關鍵、固有特徵的情況下使酶 (諸如本發明所涵蓋的DNA聚合酶) 突變。

【0073】除此之外，本發明聚焦於模體Exo I、Exo II、Exo III、A、B及C，其分別對應於共通序列SEQ ID NO: 1之位置349至364、位置450至476、位置590

至608、位置706至730、位置843至855及位置940至956。更具體地，本發明中的聚合酶變體係基於對應該等模體中的一或多個殘基處的取代突變所建立。

### RNA 聚合酶變體

【0074】 基於上述內容，本發明所提供之聚合酶變體係以共通序列的胺基酸序列 (SEQ ID NO：1) 為基礎描述該聚合酶變體。比較 SEQ ID NO：1 共通序列可知，該聚合酶變體在一或多個殘基處出現取代突變現象，且取代突變可發生在與該序列相同的位置或功能等效的位置。本案所屬技術領域具有通常知識者當能理解本說明書所述之聚合酶變體並非天然存在。因此，本文所述的聚合酶變體係以 SEQ ID NO：1 共通序列為基礎，進而依據個別的野生型聚合酶再包括一或多個殘基處的取代突變。在一實施例中，取代突變是發生在與 SEQ ID NO：1 共通序列的胺基酸功能等效的位置。「功能等效」係指該聚合酶變體在 SEQ ID NO：1 共通序列中的胺基酸位置發生胺基酸取代，而前述胺基酸取代在共通序列和聚合酶變體兩者上均具有相同功能或結構作用。

【0075】 通常而言，兩個或更多不同聚合酶中的功能等效取代突變係發生在該些聚合酶胺基酸序列中的同源胺基酸位置。因此，不論突變胺基酸的特定功能是否已知，只要該突變屬於「位置等效」或「同源」時，即可歸類為「功能等效」。在序列比對和/或分子建模的基礎上，可識別兩個或更多不同聚合酶的胺基酸序列中功能等效和位置等效的胺基酸殘基位置。例如，可將來自不同生命領域的例示性 16 種野生型 B 族 DNA 聚合酶的胺基酸序列比對用於鑒定位置上等效及/或功能上等效的殘基，該等 PolB 之間的蛋白質序列比對結果示於圖 1。因此，Tgo、Kod1、9°N、Pfu 和 Vent 聚合酶的例示殘基 141、Pis 聚合酶的

殘基 171、Sso 聚合酶的殘基 231 和 Mac DNA 聚合酶的殘基 198 即屬於功能上和位置上等效。同理，Tgo、Kod1、9°N、Pfu 和 Vent DNA 聚合酶的例示殘基 143、Pis 聚合酶的殘基 173、Sso 聚合酶的殘基 233 和 Mac 聚合酶的殘基 200 即屬於功能上和位置上等效。本案所屬技術領域具有通常知識者亦能容易地識別其他聚合酶中功能等效的殘基。

【0076】根據本發明的一些實施例，本發明之 RNA 聚合酶變體包含：分別對應於一共通序列 (SEQ ID NO：1) 之位置 706 至 730 以及位置 843 至 855 的 A 模體及 B 模體；以及至少一胺基酸取代(一個或多個胺基酸取代、或胺基酸取代的組合)，位於 A 模體、B 模體或其組合中的一位置；其中 RNA 聚合酶變體具有減弱或缺失的 3'至 5'核酸外切酶活性。所述 3'至 5'核酸外切酶活性缺失可藉由任意適當的方式達成；例如，可藉由修飾聚合酶的 3'至 5'核酸外切域以生成具有減弱、缺失或失活之 3'至 5'核酸外切酶活性的聚合酶。較佳地，修飾 3'至 5'核酸外切域的方法可以採用胺基酸取代的方式。換言之，本發明所提供的 RNA 聚合酶變體亦可包含在 Exo I、Exo II、Exo III 或其組合中的至少一個胺基酸取代。例如，PolB 變體可在 SEQ ID NO：1 的 Exo I 模體中功能等效或位置等效的位置 354 以 A 取代原生 D (D354A) 及位置 356 以 A 取代 E(E356A)，進而導致 3'-5'核酸外切酶缺失。

【0077】根據本發明的一些實施例，RNA 聚合酶變體係由野生型 B 族 DNA 聚合酶修飾而成，且該野生型 B 族 DNA 聚合酶之胺基酸序列係選自於由 SEQ ID NO：2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16 和 17 所組成的群組，分別源自下列野生型 B 族 DNA 聚合酶：柳珊瑚嗜熱球菌 (*Thermococcus gorgonarius*) DNA 聚合酶 (*Thermococcus sp.*)(Tgo)、鹿兒島嗜熱球菌

(*Thermococcus kodakarensis*) DNA 聚合酶 (Kod1)、嗜熱球菌屬 (菌株 9°N-7) DNA 聚合酶 (9°N)、激烈火球菌 (*Pyrococcus furiosus*) DNA 聚合酶 (Pfu)、海濱嗜熱球菌 (*Thermococcus litoralis*) DNA 聚合酶 (Vent)、嗜乙酸甲烷八疊球菌 (*Methanosarcina acetivorans*) DNA 聚合酶 (Mac)、冰島熱桿菌 (*Pyrobaculum islandicum*) DNA 聚合酶 (Pis)、硫磺礦硫化葉菌 (*Sulfolobus solfataricus*) DNA 聚合酶 (Sso)、海沼甲烷球菌 (*Methanococcus maripaludis*) DNA 聚合酶 (Mma)、人類 DNA 聚合酶  $\delta$  催化 p125 次單元 (hPOLD)、釀酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) DNA 聚合酶  $\delta$  催化次單元 (ScePOLD)、綠膿桿菌 DNA 聚合酶 II (Pae)、大腸桿菌 DNA 聚合酶 II (Eco)、大腸桿菌噬菌體 RB69 DNA 聚合酶 (RB69)、大腸桿菌噬菌體 T4 DNA 聚合酶 (T4) 或芽孢桿菌噬菌體 Phi29 DNA 聚合酶 (Phi29)。

【0078】根據本發明之一些實施例，RNA 聚合酶變體包含對應於該共通序列 (SEQ ID NO：1) 之位置 349 至位置 364 之一 Exo I 模體，且該 RNA 聚合酶變體在該 Exo I 模體中的一位置具有至少一胺基酸取代。較佳地，對應於 SEQ ID NO：1 位置 715 之胺基酸 L 或 M 係由 A、C、D、F、G、H、K、N、Q、S、W 或 Y 所取代；對應於 SEQ ID NO：1 位置 716 之胺基酸 Y 保持不變或係由 A、C、D、G、N、S、T 或 V 所取代；以及對應於 SEQ ID NO：1 位置 717 之胺基酸 P 保持不變或係由 A、C、G、I、L、M、N、S、T 或 V 所取代。

【0079】根據本發明之一些實施例，RNA 聚合酶變體係源自具有野生型胺基酸序列 SEQ ID NO：2 之柳珊瑚嗜熱球菌 (*Thermococcus gorgonarius*) DNA 聚合酶 (Tgo)，且其中：在 SEQ ID NO：2 位置 408 之胺基酸 L 係由 A、C、D、F、G、H、K、M、N、Q、S、W 或 Y 所取代，較佳地係由 Y 所取代；在 SEQ ID NO：2 位置 409 之胺基酸 Y 保持不變或係由 A、C、D、G、N、S、T 或 V 所取代，

較佳地係由 A 所取代；以及在 SEQ ID NO：2 位置 410 之胺基酸 P 保持不變或係由 A、C、G、I、L、M、N、S、T 或 V 所取代，較佳地係由 G 所取代。

【0080】 根據本發明之一些實施例，RNA 聚合酶變體係源自具有野生型胺基酸序列 SEQ ID NO：2 之柳珊瑚嗜熱球菌 (*Thermococcus gorgonarius*) DNA 聚合酶 (Tgo)，且其中：在 SEQ ID NO：2 位置 408 之胺基酸 L 係由 A、C、D、F、G、H、K、M、N、Q、S、W 或 Y 所取代，較佳地係由 Y 所取代；在 SEQ ID NO：2 位置 409 之胺基酸 Y 保持不變或係由 A、C、D、G、N、S、T 或 V 所取代，較佳地係由 A 所取代；在 SEQ ID NO：2 位置 410 之胺基酸 P 保持不變或係由 A、C、G、I、L、M、N、S、T 或 V 所取代，較佳地係由 G 所取代；以及在 SEQ ID NO：2 位置 485 之胺基酸 A 係由 C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、T、V、W 或 Y 所取代，較佳地係由 E 或 L 所取代。

【0081】 根據本發明之一些實施例，RNA 聚合酶變體係源自具有野生型胺基酸序列 SEQ ID NO：3 之鹿兒島嗜熱球菌 (*Thermococcus kodakarensis*) DNA 聚合酶 (Kod1)，且其中：在 SEQ ID NO：3 位置 408 之胺基酸 L 係由 A、C、D、F、G、H、K、M、N、Q、S、W 或 Y 所取代，較佳地係由 Y 所取代；在 SEQ ID NO：3 位置 409 之胺基酸 Y 保持不變或係由 A、C、D、G、N、S、T 或 V 所取代，較佳地係由 A 所取代；以及在 SEQ ID NO：3 位置 410 之胺基酸 P 保持不變或係由 A、C、G、I、L、M、N、S、T 或 V 所取代，較佳地係由 G 所取代。

【0082】 根據本發明之一些實施例，RNA 聚合酶變體係源自具有野生型胺基酸序列 SEQ ID NO：3 之鹿兒島嗜熱球菌 (*Thermococcus kodakarensis*) DNA 聚合酶 (Kod1)，且其中：在 SEQ ID NO：3 位置 408 之胺基酸 L 係由 A、C、D、F、G、H、K、M、N、Q、S、W 或 Y 所取代，較佳地係由 Y 所取代；在 SEQ ID NO：

3 位置 409 之胺基酸 Y 保持不變或係由 A、C、D、G、N、S、T 或 V 所取代，較佳地係由 A 所取代；在 SEQ ID NO:3 位置 410 之胺基酸 P 保持不變或係由 A、C、G、I、L、M、N、S、T 或 V 所取代，較佳地係由 G 所取代；以及在 SEQ ID NO:3 位置 485 之胺基酸 A 係由 C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、T、V、W 或 Y 所取代，較佳地係由 E 或 L 所取代。

【0083】 根據本發明之一些實施例，RNA 聚合酶變體係源自具有野生型胺基酸序列 SEQ ID NO:4 之嗜熱球菌屬 (菌株 9°N-7) DNA 聚合酶 (9°N)，且其中：在 SEQ ID NO:4 位置 408 之胺基酸 L 係由 A、C、D、F、G、H、K、M、N、Q、S、W 或 Y 所取代，較佳地係由 Y 所取代；在 SEQ ID NO:4 位置 409 之胺基酸 Y 保持不變或係由 A、C、D、G、N、S、T 或 V 所取代，較佳地係由 A 所取代；以及在 SEQ ID NO:4 位置 410 之胺基酸 P 保持不變或係由 A、C、G、I、L、M、N、S、T 或 V 所取代，較佳地係由 G 所取代。

【0084】 根據本發明之一些實施例，RNA 聚合酶變體係源自具有野生型胺基酸序列 SEQ ID NO:4 之嗜熱球菌屬 (菌株 9°N-7) DNA 聚合酶 (9°N)，且其中：在 SEQ ID NO:4 位置 408 之胺基酸 L 係由 A、C、D、F、G、H、K、M、N、Q、S、W 或 Y 所取代，較佳地係由 Y 所取代；在 SEQ ID NO:4 位置 409 之胺基酸 Y 保持不變或係由 A、C、D、G、N、S、T 或 V 所取代，較佳地係由 A 所取代；在 SEQ ID NO:4 位置 410 之胺基酸 P 保持不變或係由 A、C、G、I、L、M、N、S、T 或 V 所取代，較佳地係由 G 所取代；以及在 SEQ ID NO:4 位置 485 之胺基酸 A 係由 C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、T、V、W 或 Y 所取代，較佳地係由 E 或 L 所取代。

【0085】 根據本發明之一些實施例，RNA 聚合酶變體係源自具有野生型胺基酸序列 SEQ ID NO：5 之激烈火球菌(*Pyrococcus furiosus*) DNA 聚合酶(Pfu)，且其中：在 SEQ ID NO：5 位置 409 之胺基酸 L 係由 A、C、D、F、G、H、K、M、N、Q、S、W 或 Y 所取代，較佳地係由 Y 所取代；在 SEQ ID NO：5 位置 410 之胺基酸 Y 保持不變或係由 A、C、D、G、N、S、T 或 V 所取代，較佳地係由 A 所取代；以及在 SEQ ID NO：5 位置 411 之胺基酸 P 保持不變或係由 A、C、G、I、L、M、N、S、T 或 V 所取代，較佳地係由 G 所取代。

【0086】 根據本發明之一些實施例，RNA 聚合酶變體係源自具有野生型胺基酸序列 SEQ ID NO：5 之激烈火球菌 (*Pyrococcus furiosus*) DNA 聚合酶 (Pfu)，且其中：在 SEQ ID NO：5 位置 409 之胺基酸 L 係由 A、C、D、F、G、H、K、M、N、Q、S、W 或 Y 所取代，較佳地係由 Y 所取代；在 SEQ ID NO：5 位置 410 之胺基酸 Y 保持不變或係由 A、C、D、G、N、S、T 或 V 所取代，較佳地係由 A 所取代；在 SEQ ID NO：5 位置 411 之胺基酸 P 保持不變或係由 A、C、G、I、L、M、N、S、T 或 V 所取代，較佳地係由 G 所取代；以及在 SEQ ID NO：5 位置 486 之胺基酸 A 係由 C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、T、V、W 或 Y 所取代，較佳地係由 E 或 L 所取代。

【0087】 根據本發明之一些實施例，RNA 聚合酶變體係源自具有野生型胺基酸序列 SEQ ID NO：6 之海濱嗜熱球菌 (*Thermococcus litoralis*) DNA 聚合酶 (Vent)，且其中：在 SEQ ID NO：6 位置 411 之胺基酸 L 係由 A、C、D、F、G、H、K、M、N、Q、S、W 或 Y 所取代，較佳地係由 Y 所取代；在 SEQ ID NO：6 位置 412 之胺基酸 Y 保持不變或係由 A、C、D、G、N、S、T 或 V 所取代，

較佳地係由 A 所取代；以及在 SEQ ID NO：6 位置 413 之胺基酸 P 保持不變或係由 A、C、G、I、L、M、N、S、T 或 V 所取代，較佳地係由 G 所取代。

【0088】 根據本發明之一些實施例，RNA 聚合酶變體係源自具有野生型胺基酸序列 SEQ ID NO：6 之海濱嗜熱球菌 (*Thermococcus litoralis*) DNA 聚合酶 (Vent)，且其中：在 SEQ ID NO：6 位置 411 之胺基酸 L 係由 A、C、D、F、G、H、K、M、N、Q、S、W 或 Y 所取代，較佳地係由 Y 所取代；在 SEQ ID NO：6 位置 412 之胺基酸 Y 保持不變或係由 A、C、D、G、N、S、T 或 V 所取代，較佳地係由 A 所取代；在 SEQ ID NO：6 位置 413 之胺基酸 P 保持不變或係由 A、C、G、I、L、M、N、S、T 或 V 所取代，較佳地係由 G 所取代；以及在 SEQ ID NO：6 位置 488 之胺基酸 A 係由 C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、T、V、W 或 Y 所取代，較佳地係由 E 或 L 所取代。

【0089】 根據本發明之一些實施例，RNA 聚合酶變體係源自具有野生型胺基酸序列 SEQ ID NO：7 之嗜乙酸甲烷八疊球菌 (*Methanosarcina acetivorans*) DNA 聚合酶 (Mac)，且其中：在 SEQ ID NO：7 位置 485 之胺基酸 L 係由 A、C、D、F、G、H、K、M、N、Q、S、W 或 Y 所取代，較佳地係由 Y 所取代；在 SEQ ID NO：7 位置 486 之胺基酸 Y 保持不變或係由 A、C、D、G、N、S、T 或 V 所取代，較佳地係由 A 所取代；以及在 SEQ ID NO：7 位置 487 之胺基酸 P 保持不變或係由 A、C、G、I、L、M、N、S、T 或 V 所取代，較佳地係由 G 所取代。

【0090】 根據本發明之一些實施例，RNA 聚合酶變體係源自具有野生型胺基酸序列 SEQ ID NO：7 之嗜乙酸甲烷八疊球菌 (*Methanosarcina acetivorans*) DNA 聚合酶 (Mac)，且其中：在 SEQ ID NO：7 位置 485 之胺基酸 L 係由 A、C、

D、F、G、H、K、M、N、Q、S、W 或 Y 所取代，較佳地係由 Y 所取代；在 SEQ ID NO：7 位置 486 之胺基酸 Y 保持不變或係由 A、C、D、G、N、S、T 或 V 所取代，較佳地係由 A 所取代；在 SEQ ID NO：7 位置 487 之胺基酸 P 保持不變或係由 A、C、G、I、L、M、N、S、T 或 V 所取代，較佳地係由 G 所取代；以及在 SEQ ID NO：7 位置 565 之胺基酸 A 係由 C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、T、V、W 或 Y 所取代，較佳地係由 E 或 L 所取代。

【0091】 根據本發明之一些實施例，RNA 聚合酶變體係源自具有野生型胺基酸序列 SEQ ID NO:8 之冰島熱棒菌 (*Pyrobaculum islandicum*) DNA 聚合酶 (Pis)，且其中：在 SEQ ID NO：8 位置 426 之胺基酸 M 係由 A、C、D、F、G、H、K、M、N、Q、S、W 或 Y 所取代，較佳地係由 Y 所取代；在 SEQ ID NO：8 位置 427 之胺基酸 Y 保持不變或係由 A、C、D、G、N、S、T 或 V 所取代，較佳地係由 A 所取代；以及在 SEQ ID NO：8 位置 428 之胺基酸 P 保持不變或係由 A、C、G、I、L、M、N、S、T 或 V 所取代，較佳地係由 G 所取代。

【0092】 根據本發明之一些實施例，RNA 聚合酶變體係源自具有野生型胺基酸序列 SEQ ID NO:8 之冰島熱棒菌 (*Pyrobaculum islandicum*) DNA 聚合酶(Pis)，且其中：在 SEQ ID NO：8 位置 426 之胺基酸 M 係由 A、C、D、F、G、H、K、M、N、Q、S、W 或 Y 所取代，較佳地係由 Y 所取代；在 SEQ ID NO：8 位置 427 之胺基酸 Y 保持不變或係由 A、C、D、G、N、S、T 或 V 所取代，較佳地係由 A 所取代；在 SEQ ID NO：8 位置 428 之胺基酸 P 保持不變或係由 A、C、G、I、L、M、N、S、T 或 V 所取代，較佳地係由 G 所取代；以及在 SEQ ID NO：8 位置 508 之胺基酸 A 係由 C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、T、V、W 或 Y 所取代，較佳地係由 E 或 L 所取代。

【0093】 根據本發明之一些實施例，RNA 聚合酶變體係源自具有野生型胺基酸序列 SEQ ID NO：9 之硫磺礦硫化葉菌 (*Sulfolobus solfataricus*) DNA 聚合酶 (Sso)，且其中：在 SEQ ID NO：9 位置 518 之胺基酸 L 係由 A、C、D、F、G、H、K、M、N、Q、S、W 或 Y 所取代，較佳地係由 Y 所取代；在 SEQ ID NO：9 位置 519 之胺基酸 Y 保持不變或係由 A、C、D、G、N、S、T 或 V 所取代，較佳地係由 A 所取代；以及在 SEQ ID NO：9 位置 520 之胺基酸 P 保持不變或係由 A、C、G、I、L、M、N、S、T 或 V 所取代，較佳地係由 G 所取代。

【0094】 根據本發明之一些實施例，RNA 聚合酶變體係源自具有野生型胺基酸序列 SEQ ID NO：9 之硫磺礦硫化葉菌 (*Sulfolobus solfataricus*) DNA 聚合酶 (Sso)，且其中：在 SEQ ID NO：9 位置 518 之胺基酸 L 係由 A、C、D、F、G、H、K、M、N、Q、S、W 或 Y 所取代，較佳地係由 Y 所取代；在 SEQ ID NO：9 位置 519 之胺基酸 Y 保持不變或係由 A、C、D、G、N、S、T 或 V 所取代，較佳地係由 A 所取代；在 SEQ ID NO：9 位置 520 之胺基酸 P 保持不變或係由 A、C、G、I、L、M、N、S、T 或 V 所取代，較佳地係由 G 所取代；以及在 SEQ ID NO：9 位置 601 之胺基酸 A 係由 C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、T、V、W 或 Y 所取代，較佳地係由 E 或 L 所取代。

【0095】 根據一些實施例，RNA 聚合酶變體表現出無模板核酸合成活性，可藉由將至少一種核苷酸添加至可延長的起始子，並且以無模板方式合成核酸，其中使用的至少一種核苷酸選自由天然存在的核苷酸、核苷酸類似物及其混合物的群組。

【0096】 根據一些實施例，前述可延長的起始子包括一段單股寡核苷酸起始子、一段平末端(blunt-ended)雙股寡核苷酸起始子或其混合物。根據一些實施例，可延長的起始子係在液相中反應之游離態核酸。

【0097】 根據一些實施例，前述可延長的起始子係固定在固相載體上，其中該固相載體包括粒子、珠粒、載玻片、陣列表面、膜、流通池、孔、微孔、奈米孔、腔室、微流體腔室、通道或微流體通道。

【0098】 根據一些實施例，前述至少一種核苷酸包括核糖。除此之外，前述核苷酸與可偵測標記連接；而可偵測標記為諸如螢光團 (fluorophore)、酶、放射性磷酸鹽、洋地黃毒苷 (digoxigenin) 或生物素。

【0099】 根據本發明之一些實施例，RNA 聚合酶變體在 10°C 至 100°C 之間的反應溫度下表現上述無模板核酸合成活性。例如，反應溫度介於 10°C 與 20°C 之間、介於 20°C 與 30°C 之間、介於 30°C 與 40°C 之間、介於 40°C 與 50°C 之間、介於 50°C 與 60°C 之間、介於 60°C 與 70°C 之間、介於 70°C 與 80°C 之間、介於 80°C 與 90°C 之間、介於 90°C 與 95°C 之間、介於 95°C 與 100°C 之間，或者係由上限 15°C、20°C、25°C、30°C、35°C、37°C、40°C、45°C、50°C、55°C、60°C、65°C、70°C、75°C、80°C、85°C、90°C、95°C、或 100°C 及下限 10°C、15°C、20°C、25°C、30°C、35°C、37°C、40°C、45°C、50°C、55°C、60°C、65°C、70°C、75°C、80°C、85°C、90°C 或 95°C 限定的範圍內的任何反應溫度。

### 生成聚合酶變體

【0100】 在本文說明之內容中，可任意使用各種類型的誘發突變之技術，例如利用修改聚合酶來產生本發明的變體，或使用隨機或半隨機突變法。一般可取得的誘發突變 (mutagenesis; 以下簡稱誘變) 程序均可用於製備聚合酶變體，

其包括可任意就一種或多種關注活性來選擇修改過的核酸和多肽。可使用的程序包括但不限於：位點導引位點誘變、隨機位點誘變、體外或體內同源重組(活體外 DNA 分子演化技術 (DNA shuffling) 和組合重疊 PCR (combinatorial overlap PCR))、使用含有尿嘧啶的模板進行誘變、寡核苷酸導引誘變、硫代磷酸酯 (phosphorothioate) 修飾的 DNA 誘變、使用有缺口的雙股 DNA 誘變、位點錯配修復 (point mismatch repair)、使用修復功能缺陷的宿主菌株誘變、限制性選擇 (restriction-selection) 和限制性純化 (restriction-purification)、缺失誘變、利用全基因合成誘變、簡併式 (degenerate) PCR、雙股斷裂修復，以及本發明所屬技術領域具有通常知識者所知的眾多其他方法。

### 執行無模板核酸合成的試劑套組

**【0101】** 本發明一方面亦提供了一種試劑套組，其用於執行無模板酶催化核酸新生合成反應，其內容包括：本發明上述之 RNA 聚合酶變體，此 RNA 聚合酶變體表現出無模板核酸合成活性，係藉由將至少一種核苷酸添加至可延長的起始子，進而產生所需的核酸序列；其中核苷酸選自由天然存在的核苷酸、核苷酸類似物及其混合物的群組。

**【0102】** 可選地，上述試劑套組亦包括其他試劑，諸如 RNA 聚合酶變體及核苷酸溶液所需的緩衝液及溶液；經裝配或包裝成分的使用說明通常但不必然地亦包括在內。

### RNA 聚合酶變體之使用方法及用途

**【0103】** 根據一些實施例，本發明之 RNA 聚合酶變體可使用無模板合成方式將天然核糖核苷酸 (rNTP)(諸如 rATP、rUTP、rCTP 及 rGTP) 添加至單股或

平末端雙股核酸起始子的 3'-羥基 (3'-OH) 末端，以產生具有所需序列的多核苷酸。

**【0104】** 在一些實施例中，本發明之 RNA 聚合酶變體可用於將天然核糖核苷酸 (rNTP)(諸如 rATP、rUTP、rCTP 及 rGTP) 添加至成簇的單股或平末端雙股核酸起始子的陣列之 3'-OH 端；如前所述，該等陣列受固定或物理性限制於固相載體上，亦可從固相載體分離；且較佳地，該固相載體由玻璃製成並以矽晶圓的形式實施。因此，可以執行多重、並行的核酸新生合成以合成大量具有不同序列的各種多核苷酸或核酸。

**【0105】** 在一些實施例中，本文所述的 RNA 聚合酶變體可使用無模板合成方式，將核苷酸綴合物 (nucleotide conjugates，先前所定義的核苷酸類似物其中一類) 併入至核酸起始子的 3'端，其核苷酸綴合物係與酶、抗體、化學基團 (如生物素、脫硫生物素) 或位在核苷酸的鹼基、磷酸基團或戊糖上的螢光團共價連接。

**【0106】** 在核酸合成期間藉由 RNA 聚合酶變體將前述核苷酸類似物併入核酸中，並據此同時以鹼基特異性、位點特異性或序列特異性的形式連帶將所需成分 (諸如連接的酶、抗體或化學基團) 添加至新合成的核酸。本領域中用於標記或生成核酸探針及綴合物的常用成分包括但不限於經放射性標記的核苷酸及核苷酸類似物、經修飾的连接子 (諸如生物素、硫醇、疊氮基或胺基基團)、螢光團、酶及抗體。

**【0107】** 或者，在其他實施例中，為了標記或生成核酸探針，可以藉由在所合成的核苷酸的鹼基、磷酸基團或戊糖上，藉由共價或非共價連接經修飾的连接子與酶、抗體、化學基團或螢光團耦合 (coupling) 來達成核酸的合成後修飾。

因此，所需成分可以與特定鹼基共價或非共價結合，或者連接至新合成之核酸的 5'端或 3'端。

**【0108】** 在一些實施例中，藉由 RNA 聚合酶變體併入經連接子修飾的核苷酸類似物可促進新合成的多核苷酸或核酸附著、固定或物理性限制在各種固體表面上。在其他實施例中，具有獨特標籤、標記或螢光團的新合成之序列特异性核酸可用於各種基於核酸的分子偵測，其包括但不限於螢光原位雜交 (FISH)、TaqMan 即時 PCR (RT-PCR)、即時螢光連接酶鏈式反應 (RT-LCR)、即時螢光重組酶-聚合酶擴增 (RPA) 測定及即時螢光恆溫環狀擴增測定。

**【0109】** 本案進一步提供了一種用於 RNA 寡核苷酸的無模板合成方法，其包括：(a) 提供起始寡核苷酸；(b) 提供 RNA 聚合酶變體；以及(c) 在足以將至少一種核苷酸添加/併入至起始寡核苷酸的 3'端的條件下，聯合起始寡核苷酸、RNA 聚合酶變體及核苷酸進行反應，以合成該 RNA 寡核苷酸。

**【0110】** 一旦前述核苷酸併入至起始寡核苷酸，就可以接著添加一或多種額外的核苷酸以合成所需的 RNA 寡核苷酸。據此，在某些實施例中，該方法進一步包括將一或多種天然或經修飾的核苷酸添加至反應獲得的 RNA 寡核苷酸 (亦即在步驟 (c) 中形成的 RNA 寡核苷酸) 之 3'端，直至獲得所需的 RNA 序列。在某些實施例中，此方法進一步包括：(d) 重複步驟 (a) 至 (c)，直至獲得所需的 RNA 序列。

**【0111】** 在一些實施例中，在一或多種額外的酶的存在下進行步驟 (c)。在某些實施例中，在兩種或更多種不同酶的混合物的存在下進行步驟 (c)。前述酶的混合物可包含多於一種不同的 RNA 聚合酶變體 (例如，2 種或 3 種 RNA 聚合酶變體)。

【0112】 在一些實施例中，步驟 (c) 除了使用 RNA 聚合酶變體之外，亦使用一或多種額外的酶 (亦即輔助酶)(諸如特異性磷酸酶)。在一些實施例中，步驟 (c) 除了使用 RNA 聚合酶變體之外，亦使用酵母無機焦磷酸酶 (PPi 酶)。

【0113】 在一些實施例中，步驟 (c) 中的反應係在一或多種額外添加劑的存在下進行。在一些實施例中，步驟 (c) 使用擁擠劑 (crowding agent)。在某些實施例中，擁擠劑係聚乙二醇 (PEG) 或 Ficoll。在某些特定實施例中，擁擠劑係聚乙二醇 (PEG)。在一些實施例中，步驟 (c) 使用 RNA 酶抑制劑。在某些實施例中，步驟 (c) 在不可水解的核苷酸的存在下進行。

### 實施例

【0114】 在本節中，將透過以下實施例來詳細說明本發明的內容。這些案例僅作為說明之用，而本案所屬技術領域具有通常知識者得以容易知悉各種修改例和變化例。因此，下面將詳細說明本發明的各種實施例，然而本發明並不限於本說明書中列出的各種實施例。

#### 實施例 1：製備 RNA 聚合酶變體

【0115】 根據本說明書所揭露之可選的 PolB 保守和半保守區域中保守/共通氨基酸的特性，採用基因合成法和誘變技術創造例示的 RNA 聚合酶變體。例如，採用本領域所熟知的位點導引誘變法，分別改變例示性野生型 PolB 的保守 Exo I 模體、Exo II 模體、Exo III 模體、A 模體、B 模體及模體 C 區域中的胺基酸殘基。

【0116】 在一些實施例中，獲得所述 RNA 聚合酶變體的程序通常分為三個步驟，包括步驟 1：野生型 PolB 及其 3'至 5'核酸外切酶缺陷型(Exo<sup>-</sup>)突變體的基因合成；步驟 2：在期望區域內構建 RNA 聚合酶變體；以及步驟 3：野生型

PolB、Exo<sup>-</sup>突變體及 RNA 聚合酶變體的表現及純化。更詳細描述如下文，在其程序中使用的技術為本領域技藝人士所熟知。

**【0117】** 在步驟 1 中，用以表現野生型無內含子的 PolB 之密碼子改良的基因片段係由臺灣新北市的基龍米克斯生物科技股份有限公司所合成；3'至 5'核酸外切酶缺陷型 (稱為 Exo<sup>-</sup>) PolB 亦由同一供應商提供。本文所使用的位在任何一種 PolB 縮寫名稱後方的上標「Exo<sup>-</sup>」係指指定的野生型 PolB 已藉由修飾消除內生性的 3'至 5'核酸外切酶活性，此標示表明該 PolB 係 3'至 5'核酸外切酶缺陷型 PolB。根據一些較佳實施例，Exo<sup>-</sup>意謂分別在對應於 SEQ ID NO：1 的 D354 位置 (由丙胺酸殘基取代 (D354A))及 SEQ ID NO：1 的 E356 位置 (由丙胺酸殘基取代 (E356A)) 帶有組合突變的 PolB 變體。

**【0118】** 在步驟 2 中，透過側接的 NdeI 及 NotI 限制酶位點將合成的野生型 PolB 基因及 Exo<sup>-</sup> PolB 基因經由次選殖分別置入 pET28b 載體中，並以藉由 DNA 定序確認重組質體的序列。執行位點導引誘變，針對 PolB Exo<sup>-</sup>蛋白質架構上的所需模體區域產生 RNA 聚合酶變體。簡而言之，使用來自麻塞諸塞州伊普斯威奇 (Ipswich, MA) 的新英格蘭生物實驗室公司 (New England Biolabs) 的 Q5 位點導引誘變試劑套組，搭配重組質體執行位點導引誘變 PCR，以導入胺基酸取代。首先藉由 1%瓊脂糖凝膠分析產物以確認擴增子大小，隨後在 37°C 下用 DpnI 處理剩餘的 PCR 反應混合物達一小時。將混合物於 70°C 進一步培養 10 分鐘，以使 DpnI 功能失活。然後藉由凱杰公司 (Qiagen) 的 QIAquick PCR 純化試劑套組 (麻塞諸塞州沃特曼 (Whatman, MA)) 純化經 DpnI 處理的 PCR 反應混合物。用 T4 PNK 酶與 T4 DNA 連接酶的混合物處理經純化的 DNA 片段。將重新環化的經 PCR 擴增的 DNA 轉形回大腸桿菌細胞中。接續，使用凱杰公司的質體微

型套組 (Qiagen Plasmid Mini Kit) 從大腸桿菌細胞中抽取質體 DNA。藉由 DNA 定序確認聚合酶變體中所需模體區域或特定區域的突變序列。

**【0119】** 在步驟 3 中，將帶有特定聚合酶變體基因的質體 DNA 的大腸桿菌 Acella 細胞，在 37°C 下以內含 0.5% 葡萄糖和 50 µg/ml 羧苄青黴素 (carbenicillin) 的 2 公升 LB 培養基進行培養。當細胞密度在 OD<sub>600nm</sub> 波長檢測出吸光值達到約 0.6-0.8 時，添加 1 mM 的異丙基-β-D-1-硫代半乳糖哌喃糖苷 (IPTG) 以誘導蛋白表現。在 37°C 下讓細胞再生長 4 小時，隨後於 4°C 以 7,000×g 離心 10 分鐘收集細胞。使用含有 1 mM 鹽酸苯甲脒 (benzamidine hydrochloride) 的緩衝液 A [50 mM 三羥甲基胺基甲烷 (Tris-HCl)(pH7.5)、300 mM 氯化鈉 (NaCl)、0.5 mM 乙二胺四乙酸(EDTA)、1 mM 二硫蘇糖醇 (DTT)、5% (體積百分比，v/v) 甘油] 重新懸浮細胞沉澱物。將細胞與 50 mg 溶菌酶一起在冰上培養 1 小時，接著再進行超音波處理，即可完成細胞裂解。於 4°C 以 18,000 ×g 離心 25 分鐘來澄清細胞裂解物；再將澄清的細胞粗萃取物於 70°C 下培養 30 分鐘，之後冷卻至 4°C。在 4°C 下以 18,000 xg 離心 25 分鐘來進一步澄清經熱處理的細胞萃取物。在離心後，取上清液用不含 NaCl 的緩衝液 A 稀釋，並上樣到 ÄKTA 液相層析系統 [美國麻塞諸塞州馬爾伯勒思拓凡公司 (Cytiva Life Sciences)]，以緩衝液 A 預平衡的 HiTrap (思拓凡公司) 管柱進行分析。使用緩衝液 B [50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 M NaCl、0.5 mM EDTA、1 mM DTT、5% (v/v) 甘油]，以 100 mM 至 1 M NaCl 線性梯度沖提蛋白質。接著使用 10% SDS-PAGE 分析管柱餾分。將含有所需蛋白質的餾分匯合後，於 4°C 下以儲存緩衝液 [50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、250 mM NaCl、0.5 mM EDTA、1 mM DTT、5% (v/v) 甘油] 進行隔夜透析。使用 Amicon 過濾器 (分子量截止值 50,000) 濃縮含有目標蛋白質的透析蛋白質餾分匯合液。將濃縮的蛋白質

匯合液分裝並儲存於-20°C。用與上述相同的程序純化每種突變的聚合酶變體。以牛血清白蛋白作為標準品，使用 Bio-Rad 蛋白質定量試劑套組 (美國加州 Hercules) 進行 Bradford 反應 (Bradford, 1976) 以確定最終蛋白質濃度。

【0120】於此實施例，選擇若干例示性 Exo<sup>-</sup> RNA 聚合酶變體為實例，用於下文所述之各項檢測，針對 A 模體及/或 B 模體中的功能取代或位置取代說明其結果，並總結列於表 1。

表 1：例示性 RNA 聚合酶變體中的胺基酸取代表列表

PolB 酶類 型	SEQ ID NO	對應於共通序列 (SEQ ID NO : 1) 的 A 模體及/或 B 模體中的等效取 代			
		位置 715 (A 模體)	位置 716 (A 模體)	位置 717 (A 模體)	位置 854 (B 模體)
Tgo	2	L408A, L408C, L408D, L408F, L408G, L408H, L408K, L408M, L408N, L408Q, L408S, L408W, L408Y	Y409A, Y409C, Y409D, Y409G, Y409N, Y409S, Y409T, Y409V	P410A, P410C, P410G, P410I, P410L, P410M, P410N, P410S, P410T, P410V	A485C, A485D, A485E, A485F, A485G, A485H, A485I, A485K, A485L, A485M, A485N, A485P, A485Q, A485R, A485T, A485V, A485W, A485Y
Kod1	3	L408A, L408C, L408D, L408F, L408G, L408H, L408K, L408M, L408N, L408Q, L408S, L408W,	Y409A, Y409C, Y409D, Y409G, Y409N, Y409S, Y409T, Y409V	P410A, P410C, P410G, P410I, P410L, P410M, P410N, P410S, P410T, P410V	A485C, A485D, A485E, A485F, A485G, A485H, A485I, A485K, A485L, A485M, A485N, A485P,

		L408Y				A485Q, A485R, A485T, A485V, A485W, A485Y
9°N	4	L408A, L408C, L408D, L408F, L408G, L408H, L408K, L408M, L408N, L408Q, L408S, L408W, L408Y	Y409A, Y409C, Y409D, Y409G, Y409N, Y409S, Y409T, Y409V	P410A, P410C, P410G, P410I, P410L, P410M, P410N, P410S, P410T, P410V		A485C, A485D, A485E, A485F, A485G, A485H, A485I, A485K, A485L, A485M, A485N, A485P, A485Q, A485R, A485T, A485V, A485W, A485Y
Pfu	5	L409A, L409C, L409D, L409F, L409G, L409H, L409K, L409M, L409N, L409Q, L409S, L409W, L409Y	Y410A, Y410C, Y410D, Y410G, Y410N, Y410S, Y410T, Y410V	P411A, P411C, P411G, P411I, P411L, P411M, P411N, P411S, P411T, P411V		A486C, A486D, A486E, A486F, A486G, A486H, A486I, A486K, A486L, A486M, A486N, A486P, A486Q, A486R, A486T, A486V, A486W, A486Y
Vent	6	L411A, L411C, L411D, L411F, L411G, L411H, L411K, L411M, L411N, L411Q, L411S, L411W, L411Y	Y412A, Y412C, Y412D, Y412G, Y412N, Y412S, Y412T, Y412V	P413A, P413C, P413G, P413I, P413L, P413M, P413N, P413S, P413T, P413V		A488C, A488D, A488E, A488F, A488G, A488H, A488I, A488K, A488L, A488M, A488N, A488P, A488Q, A488R, A488T, A488V,

						A488W, A488Y
Mac	7	L485A, L485C, L485D, L485F, L485G, L485H, L485K, L485M, L485N, L485Q, L485S, L485W, L485Y	Y486A, Y486C, Y486D, Y486G, Y486N, Y486S, Y486T, Y486V	P487A, P487C, P487G, P487I, P487L, P487M, P487N, P487S, P487T, P487V	A565C, A565D, A565E, A565F, A565G, A565H, A565I, A565K, A565L, A565M, A565N, A565P, A565Q, A565R, A565T, A565V, A565W, A565Y	
Pis	8	M426A, M426C, M426D, M426F, M426G, M426H, M426K, M426M, M426N, M426Q, M426S, M426W, M426Y	Y427A, Y427C, Y427D, Y427G, Y427N, Y427S, Y427T, Y427V	P428A, P428C, P428G, P428I, P428L, P428M, P428N, P428S, P428T, P428V	A508C, A508D, A508E, A508F, A508G, A508H, A508I, A508K, A508L, A508M, A508N, A508P, A508Q, A508R, A508T, A508V, A508W, A508Y	
Sso	9	L518A, L518C, L518D, L518F, L518G, L518H, L518K, L518M, L518N, L518Q, L518S, L518W,	Y519A, Y519C, Y519D, Y519G, Y519N, Y519S, Y519T, Y519V	P520A, P520C, P520G, P520I, P520L, P520M, P520N, P520S, P520T, P520V	A601C, A601D, A601E, A601F, A601G, A601H, A601I, A601K, A601L, A601M, A601N, A601P,	

L518Y

A601Q, A601R,  
A601T, A601V,  
A601W, A601Y

## 實施例 2：無模板 RNA 合成測定

**【0121】** 以無模板 (或稱非模板依賴性) 之 RNA 合成方法評估本發明之 RNA 聚合酶變體。為了進一步確定 RNA 聚合酶變體的相關活性 (併入天然核糖核苷酸的效能)，本文使用了正常 rNTP 及單股 DNA 起始子或平末端雙股 DNA 起始子進行測定。除此之外，將該方法的反應溫度設定為 55°C，以評估實施例 RNA 聚合酶變體的耐熱性。

**【0122】** 在此實例中，以下列合成寡核苷酸係作為起始子，用以測定 RNA 聚合酶變體的無模板 RNA 合成活性。

**【0123】** 測定模式 I 的 FAM-45 單元 (mer) 單股 DNA (ssDNA) 起始子：具有 5'-CTCGGCCTGGCACAGGTCCGTTTCAGTGCTGCGGCGACCACCGAGG-3' (SEQ ID NO：18) 序列的單股 DNA。此單股寡核苷酸在 5'端帶有發螢光的螢光素亞磷醯胺 (FAM) 染料標記 (以下稱 FAM-45 單元 ssDNA)。

**【0124】** 測定模式 II 的平末端雙股 DNA 起始子：由上述 FAM-45 單元 ssDNA 以及與其互補的單股 45 單元 DNA 所黏合 (Annealing) 構成的雙股 DNA。

**【0125】** 該平末端雙股 DNA 起始子係利用將 FAM-45 單元 ssDNA 起始子引子與互補的 45 單元 DNA 以 1:1.5 的莫耳比率在含有 100 mM NaCl 的 1x TE 緩衝液 [10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 及 1 mM EDTA] 中所黏合形成。DNA 黏合反應係在 Bio-Rad 熱循環儀 (Hercules, CA) 中藉由先將樣品混合物加熱至 98°C 達 3 分鐘，

再逐漸將其冷卻(5°C/30 秒)至 4°C所執行。黏合反應後的產物中不具懸垂端 (overhang) 者係用作平末端雙股 DNA 起始子。

【0126】 無模板 RNA 合成反應係在含有 100 nM FAM-45 單元 ssDNA 起始子 (測定模式 I) 或平末端雙股 DNA 起始子 (測定模式 II)、0.25 mM 氯化錳 (MnCl<sub>2</sub>)、及 200 nM 的實施例 RNA 聚合酶變體的反應混合物 (10 µl) 中執行。藉由添加 100 µM 的 rNTP 啟動酶催化 RNA 新生合成反應，並使反應進行特定的時間 (例如，對於測定模式 I 為 2 分鐘，而對於測定模式 II 為 10 分鐘)，隨後在特定的反應溫度下 (例如，測定模式 I 測定或測定模式 II 皆為 55°C) 添加 10 µl 的 2x 猝滅溶液 (95%去離子的甲醯胺及 25 mM EDTA) 終止反應。在測定模式 I 或測定模式 II 的反應後，首先將樣品混合物於 95°C 變性 10 min 並藉由含有 8M 尿素的 20% 聚丙烯醯胺凝膠電泳 (尿素-PAGE) 進行分析。隨後藉由在 Amersham Typhoon 雷射掃描儀 (Cytiva Life Sciences) 上對凝膠進行成像以將酶催化 RNA 新生合成反應之產物視覺化。

【0127】 基於上述測定，對每種變體的相對無模板 RNA 合成活性進行評分並用符號「+」的數字予以表示。每種變體的總活性得分分成 4 個不同的級別：

- 1) 「+++」表示與受質對照的條帶強度及位置相比，起始子完全延長至各種長度的新合成 RNA；故，該變體可視為具有 100% 的 RNA 合成活性；
- 2) 「++」表示與受質對照的條帶強度及位置相比，約 50% 至 100% 起始子延長至各種長度的新合成 RNA；故，該變體視為具有 50% 至 100% 的 RNA 合成活性；
- 3) 「+」表示與受質對照的條帶強度及位置相比，約 10% 至 50% 起始子延長至各種長度的新合成 RNA；故，該變體視為具有 10% 至 50% 的 RNA 合成活性；
- 4) 「+/-」表示與受質對照的條帶強度及位置相比，小於 10% 起始子延長至各種長度的新合成

RNA；故，該變體視為具有<10%的 RNA 合成活性。本案通篇之活性相關評分運用此原則，並將所得資料列出在對應的表格中。

### 實施例 3：RNA 聚合酶變體將 rNTP 併入 FAM-45 單元 ssDNA 起始子及平末端

#### 雙股 DNA 起始子的催化活性

【0128】於此，特定的核酸外切酶缺陷型 RNA 聚合酶變體（例如，Tgo<sup>exo-</sup>、Kod1<sup>exo-</sup>、9°N<sup>exo-</sup>、Pfu<sup>exo-</sup>、Vent<sup>exo-</sup>、Mac<sup>exo-</sup>及 Sso<sup>exo-</sup>）經修飾以包含在每種蛋白質中不同保守區域或模體中的一或多個胺基酸取代。

【0129】此外，在初步篩選中，本發明人發現該等核酸外切酶缺陷型 RNA 聚合酶變體的保守模體在功能及位置上等效於本文所定義的共通序列（SEQ ID NO：1）的模體 A 中 L715、Y716 及 P717，該保守模體主要可能與 RNA 新生合成功能相關。更具體而言，該保守模體可能係無模板 RNA 合成活性的必要位點。此外，模體 B 中功能及位置上等效於共通序列（SEQ ID NO：1）的保守殘基 A854，其作用在於增強無模板 RNA 合成活性的可增強位點（資料未示出）。

#### 【0130】實施例 3.1：Vent 變體的無模板 RNA 合成活性

【0131】在此實施例中，例示性地使用源自 Vent（SEQ ID NO：6）的 RNA 聚合酶變體，以評估帶有位在 Exo I 模體、A 模體及 B 模體中的取代組合對於無模板 RNA 合成活性的影響。另外，美國發明專利第 US11136564B2 號揭示了一種 AAI 模體，其用於取代一些古細菌 DNA 聚合酶中對應的保守模體，以改善進行模板依賴性 DNA 合成反應（亦即 DNA 定序）時核苷酸類似物的併入。保守模體 AAI 在功能及位置上等效於共通序列（SEQ ID NO：1）的 L715、Y716 及 P717；因此，該保守模體亦在功能及位置上等效於野生型 Vent（SEQ ID NO：6）A 模體中的 L411、Y412 及 P413。據此，有鑒於 AAI 模體對於需模板引導之核苷酸併

入的影響，AAI 模體取代亦在此一併進行比較。除此之外，在此實施例中，亦評估了同時取代共通序列 B 模體中的 A854 (其在功能及位置上等效於於野生型 Vent 之 B 模體中的 A488) 的組合效應。

【0132】 在此實施例中，使用上述測定模式 I 及測定模式 II 評估從 Vent<sup>Exo-</sup> 骨架修飾而成的變體；其中測定模式 I 之結果呈現於表 2.1 及圖 2A，而測定模式 II 之結果呈現於表 2.2 及圖 2B，其中圖式表示的「S」代表受質 (FAM-45 單元 ssDNA 起始子或平末端雙股 DNA 起始子) 並作為空白 DNA 對照。此外，為簡潔起見，在圖 2A 及圖 2B 中僅呈現了代表性 Vent 變體的例示性結果。

表 2.1：藉由測定模式 I 來確定例示性 Vent 變體的胺基酸取代及 RNA 合成活性得分列表

變體名稱	取代	活性得分
V01	D141A + E143A	-
V02	D141A + E143A + A488L	-
V03	D141A + E143A + P413E	+/-
V04	D141A + E143A + L411Y	+/-
V05	D141A + E143A + L411A + A488L	+/-
V06	D141A + E143A + L411C + A488L	+/-
V07	D141A + E143A + L411D + A488L	+/-
V08	D141A + E143A + L411F + A488L	++
V09	D141A + E143A + L411G + A488L	+/-
V10	D141A + E143A + L411H + A488L	++
V11	D141A + E143A + L411K + A488L	+/-
V12	D141A + E143A + L411M + A488L	+/-
V13	D141A + E143A + L411Q + A488L	+/-

V14	D141A + E143A + L411Y + A488L	++
V15	D141A + E143A + Y412A + A488L	+
V16	D141A + E143A + Y412C + A488L	+/-
V17	D141A + E143A + Y412G + A488L	+
V18	D141A + E143A + Y412N + A488L	+/-
V19	D141A + E143A + Y412S + A488L	+
V20	D141A + E143A + P413S + A488L	++
V21	D141A + E143A + L411A + Y412A + P413G + A488L	++
V22	D141A + E143A + L411C + Y412A + P413G + A488L	+++
V23	D141A + E143A + L411D + Y412A + P413G + A488L	+
V24	D141A + E143A + L411E + Y412A + P413G + A488L	+
V25	D141A + E143A + L411F + Y412A + P413G + A488L	+++
V26	D141A + E143A + L411G + Y412A + P413G + A488L	+
V27	D141A + E143A + L411H + Y412A + P413G + A488L	+++
V28	D141A + E143A + L411I + Y412A + P413G + A488L	+
V29	D141A + E143A + L411K + Y412A + P413G + A488L	+++
V30	D141A + E143A + Y412A + P413G + A488L	+
V31	D141A + E143A + L411M + Y412A + P413G + A488L	+++
V32	D141A + E143A + L411N + Y412A + P413G + A488L	++
V33	D141A + E143A + L411Q + Y412A + P413G + A488L	+++
V34	D141A + E143A + L411S + Y412A + P413G + A488L	++
V35	D141A + E143A + L411T + Y412A + P413G + A488L	+
V36	D141A + E143A + L411V + Y412A + P413G + A488L	+
V37	D141A + E143A + L411W + Y412A + P413G + A488L	++
V38	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413G + A488L	++
V39	D141A + E143A + L411Y + Y412C + P413G + A488L	+
V40	D141A + E143A + L411Y + Y412D + P413G + A488L	++
V41	D141A + E143A + L411Y + Y412F + P413G + A488L	+
V42	D141A + E143A + L411Y + Y412G + P413G + A488L	++

V43	D141A + E143A + L411Y + Y412H + P413G + A488L	+
V44	D141A + E143A + L411Y + Y412I + P413G + A488L	+
V45	D141A + E143A + L411Y + Y412L + P413G + A488L	+
V46	D141A + E143A + L411Y + Y412M + P413G + A488L	+
V47	D141A + E143A + L411Y + Y412N + P413G + A488L	++
V48	D141A + E143A + L411Y + Y412Q + P413G + A488L	+
V49	D141A + E143A + L411Y + Y412S + P413G + A488L	++
V50	D141A + E143A + L411Y + Y412T + P413G + A488L	++
V51	D141A + E143A + L411Y + Y412V + P413G + A488L	++
V52	D141A + E143A + L411Y + P413G + A488L	++
V53	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413A + A488L	++
V54	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413C + A488L	++
V55	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413D + A488L	+
V56	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413E + A488L	+
V57	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413F + A488L	+
V58	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413H + A488L	+
V59	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413I + A488L	++
V60	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413K + A488L	+
V61	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413L + A488L	++
V62	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413M + A488L	++
V63	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413N + A488L	++
V64	D141A + E143A + L411Y + Y412A + A488L	++
V65	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413Q + A488L	+
V66	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413S + A488L	++
V67	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413T + A488L	++
V68	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413V + A488L	++
V69	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413W + A488L	+
V70	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413Y + A488L	+
V71	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413G + A488A	+

V72	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413G + A488C	++
V73	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413G + A488D	++
V74	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413G + A488E	++
V75	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413G + A488F	++
V76	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413G + A488G	++
V77	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413G + A488H	++
V78	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413G + A488I	++
V79	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413G + A488K	++
V80	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413G + A488M	++
V81	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413G + A488N	++
V82	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413G + A488P	+
V83	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413G + A488Q	++
V84	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413G + A488R	++
V85	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413G + A488T	++
V86	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413G + A488V	++
V87	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413G + A488W	++
V88	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413G + A488Y	++

表 2.2：藉由測定模式 II 來確定例示性 Vent 變體的胺基酸取代及 RNA 合成活性  
得分列表

變體名稱	取代	活性得分
V02	D141A + E143A + A488L	-
V05	D141A + E143A + L411A + A488L	+++
V06	D141A + E143A + L411C + A488L	+++
V07	D141A + E143A + L411D + A488L	+++
V08	D141A + E143A + L411F + A488L	+++
V09	D141A + E143A + L411G + A488L	-/+

V10	D141A + E143A + L411H + A488L	++
V11	D141A + E143A + L411K + A488L	-/+
V12	D141A + E143A + L411M + A488L	++
V13	D141A + E143A + L411Q + A488L	++
V14	D141A + E143A + L411Y + A488L	+++
V16	D141A + E143A + Y412C + A488L	+++
V17	D141A + E143A + Y412G + A488L	+++
V18	D141A + E143A + Y412N + A488L	+++
V19	D141A + E143A + Y412S + A488L	+++
V20	D141A + E143A + P413S + A488L	+++
V38	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413G + A488L	+++
V21	D141A + E143A + L411A + Y412A + P413G + A488L	+++
V22	D141A + E143A + L411C + Y412A + P413G + A488L	+++
V23	D141A + E143A + L411D + Y412A + P413G + A488L	+++
V24	D141A + E143A + L411E + Y412A + P413G + A488L	+++
V25	D141A + E143A + L411F + Y412A + P413G + A488L	+++
V26	D141A + E143A + L411G + Y412A + P413G + A488L	+++
V27	D141A + E143A + L411H + Y412A + P413G + A488L	+++
V28	D141A + E143A + L411I + Y412A + P413G + A488L	+++
V29	D141A + E143A + L411K + Y412A + P413G + A488L	+++
V30	D141A + E143A + Y412A + P413G + A488L	+++
V31	D141A + E143A + L411M + Y412A + P413G + A488L	+++
V32	D141A + E143A + L411N + Y412A + P413G + A488L	+++
V33	D141A + E143A + L411Q + Y412A + P413G + A488L	+++
V34	D141A + E143A + L411S + Y412A + P413G + A488L	+++
V35	D141A + E143A + L411T + Y412A + P413G + A488L	+++
V36	D141A + E143A + L411V + Y412A + P413G + A488L	+++
V37	D141A + E143A + L411W + Y412A + P413G + A488L	+++
V52	D141A + E143A + L411Y + P413G + A488L	+++

V39	D141A + E143A + L411Y + Y412C + P413G + A488L	+++
V40	D141A + E143A + L411Y + Y412D + P413G + A488L	+++
V41	D141A + E143A + L411Y + Y412F + P413G + A488L	+++
V43	D141A + E143A + L411Y + Y412H + P413G + A488L	+++
V44	D141A + E143A + L411Y + Y412I + P413G + A488L	+++
V45	D141A + E143A + L411Y + Y412L + P413G + A488L	+++
V46	D141A + E143A + L411Y + Y412M + P413G + A488L	+++
V47	D141A + E143A + L411Y + Y412N + P413G + A488L	+++
V48	D141A + E143A + L411Y + Y412Q + P413G + A488L	+++
V49	D141A + E143A + L411Y + Y412S + P413G + A488L	+++
V50	D141A + E143A + L411Y + Y412T + P413G + A488L	+++
V51	D141A + E143A + L411Y + Y412V + P413G + A488L	+++
V64	D141A + E143A + L411Y + Y412A + A488L	+++
V53	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413A + A488L	+++
V54	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413C + A488L	+++
V55	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413D + A488L	+++
V56	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413E + A488L	+++
V57	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413F + A488L	+++
V58	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413H + A488L	+++
V59	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413I + A488L	+++
V60	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413K + A488L	+++
V61	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413L + A488L	+++
V62	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413M + A488L	+++
V63	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413N + A488L	+++
V65	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413Q + A488L	+++
V66	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413S + A488L	+++
V67	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413T + A488L	+++
V68	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413V + A488L	+++
V69	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413W + A488L	+++

V70	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413Y + A488L	+++
V72	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413G + A488C	+++
V73	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413G + A488D	+++
V74	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413G + A488E	+++
V75	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413G + A488F	+++
V77	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413G + A488H	+++
V78	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413G + A488I	+++
V79	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413G + A488K	+++
V80	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413G + A488M	+++
V81	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413G + A488N	+++
V82	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413G + A488P	+++
V83	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413G + A488Q	+++
V84	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413G + A488R	+++
V85	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413G + A488T	+++
V86	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413G + A488V	+++
V87	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413G + A488W	+++
V88	D141A + E143A + L411Y + Y412A + P413G + A488Y	+++

【0133】如表 2.1、表 2.2、圖 2A 及圖 2B 所示，帶有位於 Exo I 模體、A 模體及/或 B 模體 (A488L) 的胺基酸取代之變體在測定模式 I 及測定模式 II 中均表現出顯著的無模板酶催化 RNA 合成活性。更具體而言，對於無模板酶催化 RNA 合成的催化活性，較佳的取代組合出現在 A 模體中，例如：L411A + Y412A + P413G (AAG)、L411C + Y412A + P413G (CAG)、L411F + Y412A + P413G (FAG)、L411H + Y412A + P413G (HAG)、L411K + Y412A + P413G (KAG)、L411M + Y412A + P413G (MAG)、L411Q + Y412A + P413G (QAG) 及 L411Y + Y412A + P413G (YAG)。

【0134】 實施例 3.2：Pfu 變體的無模板 RNA 合成活性

【0135】 在此實施例中，例示性地使用源自 Pfu (SEQ ID NO：5) 的 RNA 聚合酶變體，以評估帶有位在 Exo I 模體、A 模體及 B 模體中的取代組合對於無模板 RNA 合成活性的影響。

【0136】 具體而言，使用如上所述的測定模式 I 及 II 評估從 Pfu<sup>Exo-</sup>骨架修飾而成的變體；其中測定模式 I 之結果呈現於表 3.1 及圖 3A 中，而測定模式 II 之結果呈現於表 3.2 及圖 3B 中，其中圖中表示的「S」代表受質 (FAM-45 單元 ssDNA 起始子或平末端雙股 DNA 起始子) 並作為空白 DNA 對照。此外，為簡潔起見，在此實例僅呈現了代表性 Pfu 變體的例示性結果。

表 3.1：藉由測定模式 I 來確定例示性 Pfu 變體的胺基酸取代及 RNA 合成活性得分列表

變體名稱	取代	活性得分
P01	D141A + E143A	-
P02	D141A + E143A + A486L	+/-
P03	D141A + E143A + L409Y + Y410A + P411G	+
P04	D141A + E143A + L409Y + Y410A + P411G + A486L	+++
P05	D141A + E143A + L409A + Y410A + P411I + A486L	+++

表 3.2：藉由測定模式 II 來確定例示性 Pfu 變體的胺基酸取代及 RNA 合成活性得分列表

變體名稱	取代	活性得分
P01	D141A + E143A	-
P02	D141A + E143A + A486L	+/-
P03	D141A + E143A + L409Y + Y410A + P411G	+++

P04	D141A + E143A + L409Y + Y410A + P411G + A486L	+++
P05	D141A + E143A + L409A + Y410A + P411I + A486L	+++

【0137】如圖 3A、圖 3B、表 3.1 及表 3.2 所示，帶有位於 Exo I 模體及 A 模體的胺基酸取代之變體，諸如變體 P03、P04 及 P05，在測定模式 I 及測定模式 II 均表現出顯著的無模板酶催化 RNA 合成催化活性。此外，帶有位於 Exo I 模體、A 模體及 B 模體中的胺基酸取代組合之變體，諸如變體 P04 及 P05，進一步增強了該催化活性。

【0138】實施例 3.3：Kod1 變體的無模板 RNA 合成活性

【0139】在此實例中，例示性地使用源自 Kod1 (SEQ ID NO：3) 的 RNA 聚合酶變體，以評估帶有位在 Exo I 模體、A 模體及 B 模體中的取代組合對於無模板 RNA 合成活性的影響。

【0140】具體而言，使用如上所述的測定模式 I 及 II 評估從 Kod1<sup>Exo-</sup>骨架修飾而成的變體；其中測定模式 I 之結果呈現於表 4.1 及圖 4A 中，而測定模式 II 之結果呈現於表 4.2 及圖 4B 中，其中圖中表示的「S」代表受質 (FAM-45 單元 ssDNA 起始子或平末端雙股 DNA 起始子) 並作為空白 DNA 對照。此外，為簡潔起見，在此實例僅呈現了代表性 Kod1 變體的例示性結果。

表 4.1：藉由測定模式 I 來確定例示性 Kod1 變體的胺基酸取代及 RNA 合成活性得分列表

變體名稱	取代	活性得分
K01	D141A + E143A	-
K02	D141A + E143A + A485L	+
K03	D141A + E143A + L408Y + Y409A + P410G	++

K04	D141A + E143A + L408Y + Y409A + P410G + A485L	+++
K05	D141A + E143A + L408A + Y409A + P410I + A485L	++

表 4.2: 藉由測定模式 II 來確定例示性 Kod1 變體的胺基酸取代及 RNA 合成活性得分列表

變體名稱	取代	活性得分
K01	D141A + E143A	-
K02	D141A + E143A + A485L	+
K03	D141A + E143A + L408Y + Y409A + P410G	+++
K04	D141A + E143A + L408Y + Y409A + P410G + A485L	+++
K05	D141A + E143A + L408A + Y409A + P410I + A485L	+++

【0141】如圖 4A、圖 4B、表 4.1 及表 4.2 所示，帶有位於 Exo I 模體、A 模體及/或 B 模體的胺基酸取代之變體，諸如變體 K02、K03、K04 及 K05，在測定模式 I 及測定模式 II 均表現出顯著的無模板酶催化 RNA 合成催化活性。此外，帶有位於 Exo I 模體、A 模體及 B 模體中的胺基酸取代組合之變體，諸如變體 K04 及 K05，進一步增強了該催化活性。

【0142】實施例 3.4：Mac 變體的無模板 RNA 合成活性

【0143】在此實施例中，例示性地使用源自 Mac (SEQ ID NO: 7) 的 RNA 聚合酶變體，以評估帶有位在 Exo I 模體、A 模體及 B 模體中的取代組合對於無模板 RNA 合成活性的影響。

【0144】具體而言，使用如上所述的測定模式 I 及 II 評估從 Mac<sup>Exo-</sup>骨架修飾而成的變體；其中測定模式 I 之結果呈現於表 5.1 及圖 5A 中，而測定模式 II 之結果呈現於表 5.2 及圖 5B 中，其中圖中表示的「S」代表受質 (FAM-45 單元

ssDNA 起始子或平末端雙股 DNA 起始子) 並作為空白 DNA 對照。此外，為簡潔起見，在此實例僅呈現了代表性 Mac 變體的例示性結果。

表 5.1：藉由測定模式 I 來確定例示性 Mac 變體的胺基酸取代及 RNA 合成活性得分列表

變體名稱	取代	活性得分
M01	D198A + E200A	-
M02	D198A + E200A + L485Y + Y486A + P487G	+/-
M03	D198A + E200A + L485Y + Y486A + P487G + A565L	+

表 5.2：藉由測定模式 II 來確定例示性 Mac 變體的胺基酸取代及 RNA 合成活性得分列表

變體名稱	取代	活性得分
M01	D198A + E200A	-
M02	D198A + E200A + L485Y + Y486A + P487G	+++
M03	D198A + E200A + L485Y + Y486A + P487G + A565L	+++

【0145】如圖 5A、圖 5B、表 5.1 及表 5.2 所示，帶有位於 Exo I 模體及 A 模體的胺基酸取代之變體，例如變體 M02，在測定模式 I 及測定模式 II 均表現出顯著的無模板酶催化 RNA 合成催化活性。此外，帶有位於 Exo I 模體、A 模體及 B 模體中的胺基酸取代組合之變體，如變體 M03，進一步增強了該催化活性。

【0146】實施例 3.5：Tgo 變體的無模板 RNA 合成活性

【0147】 在此實例中，例示性地使用源自 Tgo (SEQ ID NO：2) 的 RNA 聚合酶變體，以評估帶有位在 Exo I 模體、A 模體及 B 模體中的取代組合對於無模板 RNA 合成活性的影響。

【0148】 具體而言，使用如上所述的測定模式 I 及 II 評估從 Tgo<sup>Exo-</sup>骨架修飾而成的變體；其中測定模式 I 之結果呈現於表 6.1 及圖 6A 中，而測定模式 II 之結果呈現於表 6.2 及圖 6B 中，其中圖中表示的「S」代表受質 (FAM-45 單元 ssDNA 起始子或平末端雙股 DNA 起始子) 並作為空白 DNA 對照。此外，為簡潔起見，在此實例僅呈現了代表性 Tgo 變體的例示性結果。

表 6.1：藉由測定模式 I 來確定例示性 Tgo 變體的胺基酸取代及 RNA 合成活性得分列表

變體名稱	取代	活性得分
T01	D141A + E143A + L408A + Y409A + P410A + A485L	+++
T02	D141A + E143A + L408Y + Y409A + P410G + A485L	+++

表 6.2：藉由測定模式 II 來確定例示性 Tgo 變體的胺基酸取代及 RNA 合成活性得分列表

變體名稱	取代	活性得分
T01	D141A + E143A + L408A + Y409A + P410A + A485L	+++
T02	D141A + E143A + L408Y + Y409A + P410G + A485L	+++

【0149】 如圖 6A、圖 6B、表 6.1 及表 6.2 所示，帶有位於 Exo I 模體、A 模體及 B 模體的胺基酸取代之變體，諸如變體 T01 及 T02，在測定模式 I 及測定模式 II 均表現出顯著的無模板酶催化 RNA 合成催化活性。

【0150】 實施例 3.6：Sso 變體的無模板 RNA 合成活性

**【0151】** 在此實例中，例示性地使用源自 Sso (SEQ ID NO：9) 的 RNA 聚合酶變體，以評估帶有位在 Exo I 模體、A 模體及 B 模體中的取代組合對於無模板 RNA 合成的活性。

**【0152】** 具體而言，使用如上所述的測定模式 I 及 II 評估從 Sso<sup>Exo-</sup>骨架修飾而成的變體；其中測定模式 I 之結果呈現於表 7.1 中，而測定模式 II 之結果呈現於表 7.2 中。為簡潔起見，省略了此實例中的尿素-PAGE 圖像結果。

表 7.1：藉由測定模式 I 來確定例示性 Sso 變體的胺基酸取代及 RNA 合成活性得分列表

變體名稱	取代	活性得分
S01	D231A + E233A	-
S03	D231A + E233A + L518Y + Y519A + P520G	+++
S06	D231A + E233A + L518Y + Y519A + P520G + A601L	+++

表 7.2：藉由測定模式 II 來確定例示性 Sso 變體的胺基酸取代及 RNA 合成活性得分列表

變體名稱	取代	活性得分
S01	D231A + E233A	-
S03	D231A + E233A + L518Y + Y519A + P520G	+++
S06	D231A + E233A + L518Y + Y519A + P520G + A601L	+++

**【0153】** 如表 7.1 及表 7.2 所示，帶有位於 Exo I 模體、A 模體及/或 B 模體的胺基酸取代之變體，諸如變體 S03 及 S06，在測定模式 I 及測定模式 II 均表現出顯著的無模板酶催化 RNA 合成催化活性。

【0154】 實施例 3.7：9°N 變體的無模板 RNA 合成活性

【0155】 在此實例中，例示性地使用源自 9°N (SEQ ID NO：4)的 RNA 聚合酶變體，以評估帶有位在 Exo I 模體、A 模體及 B 模體中的取代組合對於無模板 RNA 合成的活性。

【0156】 具體而言，使用如上所述的測定模式 I 及 II 評估從 9°N<sup>Exo-</sup>骨架修飾而成的變體；其中測定模式 I 之結果呈現於表 8.1 中，而測定模式 II 之結果呈現於表 8.2 中。為簡潔起見，省略了此實例中的尿素-PAGE 圖像結果。

表 8.1: 藉由測定模式 I 來確定例示性 9°N 變體的胺基酸取代及 RNA 合成活性得分列表

變體名稱	取代	活性得分
N02	D141A + E143A + L408Y + Y409A + P410E + A485V	++
N03	D141A + E143A + L408Y + Y409A + P410F + A485V	++
N04	D141A + E143A + L408Y + Y409A + P410G + A485V	+++
N05	D141A + E143A + L408Y + Y409A + P410H + A485V	+++
N06	D141A + E143A + L408Y + Y409A + P410T + A485V	+++
N07	D141A + E143A + L408Y + Y409A + P410V + A485V	+++
N08	D141A + E143A + L408Y + Y409C + P410G + A485V	++
N09	D141A + E143A + L408Y + Y409G + P410G + A485V	++
N10	D141A + E143A + L408Y + Y409I + P410G + A485V	++
N11	D141A + E143A + L408Y + Y409K + P410G + A485V	+/-
N12	D141A + E143A + L408Y + Y409L + P410G + A485V	+/-
N13	D141A + E143A + L408Y + Y409Q + P410G + A485V	+/-
N14	D141A + E143A + L408Y + Y409Y + P410G + A485V	+++
N15	D141A + E143A + L408A + Y409A + P410G + A485V	++
N16	D141A + E143A + L408S + Y409A + P410G + A485V	++

N17	D141A + E143A + L408V + Y409A + P410G + A485V	+++
-----	-----------------------------------------------	-----

表 8.2：藉由測定模式 II 來確定例示性 9<sup>N</sup> 變體的胺基酸取代及 RNA 合成活性得分列表

變體名稱	取代	活性得分
N02	D141A + E143A + L408Y + Y409A + P410E + A485V	+++
N03	D141A + E143A + L408Y + Y409A + P410F + A485V	+++
N04	D141A + E143A + L408Y + Y409A + P410G + A485V	+++
N05	D141A + E143A + L408Y + Y409A + P410H + A485V	+++
N06	D141A + E143A + L408Y + Y409A + P410T + A485V	+++
N07	D141A + E143A + L408Y + Y409A + P410V + A485V	+++
N08	D141A + E143A + L408Y + Y409C + P410G + A485V	+++
N09	D141A + E143A + L408Y + Y409G + P410G + A485V	+++
N10	D141A + E143A + L408Y + Y409I + P410G + A485V	+++
N11	D141A + E143A + L408Y + Y409K + P410G + A485V	+++
N12	D141A + E143A + L408Y + Y409L + P410G + A485V	+++
N13	D141A + E143A + L408Y + Y409Q + P410G + A485V	+++
N14	D141A + E143A + L408Y + Y409Y + P410G + A485V	+++
N15	D141A + E143A + L408A + Y409A + P410G + A485V	+++
N16	D141A + E143A + L408S + Y409A + P410G + A485V	+++
N17	D141A + E143A + L408V + Y409A + P410G + A485V	++

【0157】如表 8.1 及表 8.2 所示，帶有位於 Exo I 模體、A 模體及/或 B 模體的胺基酸取代之變體在測定模式 I 及測定模式 II 均表現出顯著的無模板酶催化 RNA 合成催化活性。

【0158】綜上所得結果，本發明提供的 RNA 聚合酶變體及試劑套組已在各種情況下證明得以有效且高效地使用 rNTP 進行酶催化 RNA 新生合成。除此

之外，該等 RNA 聚合酶變體亦證明可在涵蓋從大氣溫度至高溫條件的較廣泛反應溫度下成功發揮無模板 RNA 合成功能，展現出更高的耐熱性。因此，本文範疇內的 RNA 聚合酶變體及試劑套組可拓展無模板酶催化核酸合成在不同反應條件下的各種應用範圍。

**【0159】** 本發明具體實施例已經揭露，但並非旨在限制本發明。本案所屬技術領域具有通常知識者均能夠理解，在未偏離本發明原理和精神的情況下，可以做出各種變更例和修飾例，因此本發明的保護範圍應當以隨附的專利申請範圍中所限定的範圍為基礎。

**【符號說明】**

**【0160】**

無。

**【生物材料寄存】**

**【0161】**

無。

```
<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>
<!DOCTYPE ST26SequenceListing PUBLIC "-//WIPO//DTD Sequence Listing 1.3//EN"
"ST26SequenceListing_V1_3.dtd">
<ST26SequenceListing nonEnglishFreeTextLanguageCode="zh" dtdVersion="V1_3"
fileName="P222338TW-序列表_final.xml" softwareName="WIPO Sequence"
softwareVersion="2.2.0" productionDate="2023-03-22">
  <ApplicationIdentification>
    <IPOfficeCode>TW</IPOfficeCode>
    <ApplicationNumberText>111136857</ApplicationNumberText>
    <FilingDate>2022-09-28</FilingDate>
  </ApplicationIdentification>
  <ApplicantFileReference>P222338TW</ApplicantFileReference>
  <EarliestPriorityApplicationIdentification>
    <IPOfficeCode>US</IPOfficeCode>
    <ApplicationNumberText>63/249,819</ApplicationNumberText>
    <FilingDate>2021-09-29</FilingDate>
  </EarliestPriorityApplicationIdentification>
  <ApplicantName languageCode="zh">陳呈堯</ApplicantName>
  <ApplicantNameLatin>Cheng-Yao CHEN</ApplicantNameLatin>
  <InventionTitle languageCode="zh">用於無模板RNA合成的核酸聚合酶變體、試劑套組及
方法</InventionTitle>
  <SequenceTotalQuantity>18</SequenceTotalQuantity>
  <SequenceData sequenceIDNumber="1">
    <INSDSeq>
      <INSDSeq_length>1360</INSDSeq_length>
      <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
      <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
      <INSDSeq_feature-table>
        <INSDFeature>
          <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
          <INSDFeature_location>1..1360</INSDFeature_location>
          <INSDFeature_qual>
            <INSDQualifier id="q1">
              <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
              <INSDQualifier_value>consensus sequence</INSDQualifier_value>
              <NonEnglishQualifier_value>共通序列</NonEnglishQualifier_value>
            </INSDQualifier>
          </INSDFeature_qual>
        </INSDFeature>
      </INSDSeq_feature-table>
    </INSDSeq>
  </SequenceData>
</ST26SequenceListing>
```

```

<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>SITE</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>715</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier id="q76">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>misc_feature - leucine (Leu) or methionine
(Met)</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>亮胺酸或甲硫胺酸</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..1360</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q158">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>人工序列</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MKEKRXXXXXPVXPKXXXXXWDDXDXPXXXXXIKRQSIDHGVGXEXXXXXEXXXXXFRK
YNSQGFKAKD TDLMGTXLXXXEXELXXXXXADQXXXSAXXERKKXPTXXXLDPXXEPXIFXILD TDYXIXPAQXVX
XGXXD TEDGKPVIRXFGKKENGFEKIEYDRTFEPYFYALLXXGXXKDDLSAIEEVKKITAERHXR XGXETXVRVDAEEV
VKKFEPLGLEXXRPIEVWKLYFXHPQDVPAIRDKIREHPAVVXXXGXXDIXXYEYDIPFAKRYLIDKGLIPPMSVWXMEG
DKXXXGRLLNXXSXCQLEXXXXSDXXVHPXXXRLEELPDYIPPLKVLAFDIETLYHXELGSFPEPGKXRP IIAITHY
DSIDDRFYVFDMISSAYADEEEARPFLXXVITWKNIDXLPEIXDXVDVVSFDTEREMLRFLXXXXEKDPDVIIGYNGD
NFDXPYLKRAEKLKVVXXGIPLXLGRLSXRSSXDGSVFEPKIQRMYGDRFAVEICLGYKKGRIHFDLYPVIRRTIFT
NYAFEWNLPSYTLA VA EALLGXXKEKDXVYAEEIAXAWNEXGENLERLARYSXEDAELTXELGAKKEFLPXEXLIQL
SRVXGQPLDWDVSRSSSTGNLVEWLLLRKAYERNEVAPNKPSEXEXARRXXXRESALIKXXXYPGGYVWLNDRFKEPEXGL
YEXNIVXLDFRSLYPSIXTHNLSPDTLLNREGCXPYHXYIXDVAPEEXVXXXSGHXFCXTKDFPGFIPSILIKRGDLL
EERKKIKKSGGKMXAXXXNXEXIKXXXXXXLSXXEXXXVXXXXXFSDXFKKIDPNTXXIEKKLLDYRQRAIXXXXTXQ
XNRKILANSFYGYLGYAKARWYCXECAESVTAXGFRQYIEXTIREIEEKFGKVCGTNXXEAFXXXXAXXCXXNGYXXGFKV

```

```

LYGDTDSXFVTIPGXIXKVGXXXFADAEEKXKXILXFKXXEFLKYINAWWREXXXMKNLPGLELEYEGFYKRGLFXXG
RGXFVGTGKKRYAGLIDEMXXDRFAEGKITTKGLETVRRDWSSELAKETQARVLEXILKXEPEGDVEEAEESVVXYVKEVIE
KLXXYEVPXAGXIEKLVIHKQLTRDLDDYKATGFPGXKCPXHVAVAKRLDRANAARGRGVKKRPGTVISYVILKGGGXIG
DXDRAIPPDEXDPXKHKYDAEYYIENQVLXXPAVERILEAFIGDAFAXXXXXRGDHXXXXXXXXTGYRKEDLXXFXKXXX
XCXXCXXLXXGXGXXCXXCXXRYQKTKQVGLXAWXXLKPKGKRLWTQCQRCXGNLHXXVXCXXXXCXIFYMRXKVXXKL
DXXXXLXXFGPPGPFXF</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="2">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>773</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..773</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q159">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Thermococcus gorgonarius</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>柳珊瑚嗜熱球菌</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>MILDTDYITEDGKPVIRIFKKENGEFKIDYDRNFEPYIYALLKDDSAIEDVKKITAERHGTT
VRVRAEKVKKKFLGRPIEVWKLTYFTHPQDVPAIRDKIKEHPAVVDIYEYDIPFAKRYLIDKGLIPMEGDEELKMLAFDI
ETLYHEGEEFAEGPILMISYADEEGARVITWKNIDLPHYVDVSTEKEMIKRFLKVVKEKDPDVLITYNGDNFDFAYLKKR
SEKLGVKFILGREGSEPKIQRMGDRFAVEVKGRIFHFDLYPVIIRRTINLPTYTLEAVYEAIFGQPKVKVYAEIEAQAWETG
EGLERVARYSMEDAKVTYELGKEFFPMEAQLSRLVGQSLWDVSRSSSTGNLVEWFLLRKAYERNELAPNKPDERELARRRE
SYAGGYVKEPERGLWENIVYLDFRSLYPSIIITHNVSPDTLNREGCEEYDVAPQVGHKFKCDFPGFIPSLGLDLEERQK
VKKMKATIDPIEKLLDYRQRAIKILANSFYGYGYAKARWYCKEAE SVTAWGRQYIETTIREIEEKFGFKVLYADTD
GFFATIPGADAETVKKKAKEFLDYINAKLPGLELEYEGFYKRGLFVTKKKYAVIDEEDKITTRGLEIVRRDWSIEIAKET
QARVLEAILKHGDVEEAVRIVKEVTEKLSKYEVPEKLVIEYQITRDLKDYKATGPHVAVAKRLAARGIKIRPGTVISYI
VLKSGRIGDRAIPFDEFDPKHKYDAEYYIENQVLPAVERILRAFGYRKEDLRYQKTRQVGLGAWLKPKT</INSDSeq

```

```

_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 3" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>774</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..774</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="ql60">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Thermococcus kodakarensis</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>鹿兒島嗜熱球菌</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>MILDTDYITEDGKPVIRIFKKENGEFKIEYDRTFEPYFYALLKDDSAIEEVKKITAERHGTV
    VTKRVEKVQKKFLGRPVEVWKL YFTHPQDVPAIRDKIREHPAVIDIYEYDIPFAKRYLIDKGLVPMEGDEELKMLAFDI
    ETL YEEGEEFAEGPILMISYADEEGARVITWKNVDLPYVDVSTEREMIKRFLRVVKEKDPDVLITYNGDNFDFAYLKKR
    CEKLGINFALGRDGSEPKIQRMGDRFAVEVKGRIFHFDLYPVIRRTINLPTYTLEAVYEAVFGQPKEKVYAEIITAWETG
    ENLERVARYSMEDAKVTYELGKEFLPMEAQLSRLIGQSLWDVSRSSSTGNLVEWFLLRKAYERNELAPNKPDEKELARRRQ
    SYEGGYVKEPERGLWENIVYLDFRSLYPSIIITHNVSPDTLNREGCKEYDVAPQVGHFRFCKDFPGFIPSLGDLLEERQK
    IKKKMKATIDPIERKLLDYRQRAIKILANSYGYGYARARWYCKECAESVTAWGREYITMTIKEIEEKYGFKVIYSDTD
    GFFATIPGADAETVKKKAMEFLKYINAKLPGALELEYEGFYERGFVTKKKYAVIDEEGKITTRGLEIVRRDWEIAKET
    QARVLEALLKGDVEKAVRIVKEVTEKLSKYEVPPEKLVIEHQITRDLKDYKATGPHVAVAKRLAARGVKIRPGTVISYI
    VLKSGRIGDRAIPFDEFDPTKHKYDAEYYIENQVLPAYERILRAFGYRKEDLRYQKTRQVGLSAWLKPKGT</INSDSe
q_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 4" >

```

```

<INSDSeq>
  <INSDSeq_length>775</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..775</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_qual>
        <INSDQualifier>
          <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
        <INSDQualifier id="ql77">
          <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>Thermococcus sp.</INSDQualifier_value>
          <NonEnglishQualifier_value>嗜熱球菌</NonEnglishQualifier_value>
        </INSDQualifier>
      </INSDFeature_qual>
    </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>MILDTDYITENKGPVIRVFKKENGEFKIEYDRTFEPYFYALLKDDSAIEDVKKVTAKRHGTV
  VKVKRAEKVQKKFLGRPIEVWKLNFHPQDVPAIRDRIRAHPAVVDIYEYDIPFAKRYLIDKGLIPMEGDEELTMLAFDI
  ETLYHEGEEFGTGPILMISYADGSEARVITWKKIDLPHYVDVSTEKEMIKRFLRVVREKDPDVLITYNGDNFDFAYLKKR
  CEELGIKFTLGRDSEPKIQRMGDRFAVEVKGRIFHFDLYPVI RRTINLPTYTLEAVYEAVFGPKPEKVYAEIEAQAWESG
  EGLERVARYSMEDAKVTYELGREFFPMEAQLSRLIGQSLWDVSRSSSTGNLVEWFLLRKAYKRNELAPNKPDERELARRRG
  GYAGGYVKEPERGLWDNIVYLDFRSLYPSIIITHNVSPDTLNREGCKEYDVAPEVGHKFKCKDFPGFIPSLGDLLEERQK
  IKRKMKATVDPLEKKLLDYRQRAIKILANSFYGGYGYAKARWYCKECAESVTAWGREYIEMVIRELEEKFGFKVLYADTD
  GLHATIPGADAETVKKKAKEFLKYINPKLPGLLELEYEGFYVRGFFVTKKKYAVIDEEGKITTRGLEIVRRDWSEIAKET
  QARVLEAILKHGDVEEAVRIVKEVTEKLSKYEVPPEKLVIEHQITRDLRDYKATGPHVAVAKRLAARGVKIRPGTVISYI
  VLKSGRIGDRAIPAEFDPTKHRYDAEYIENQVLPAYERILKAFGYRKEDLRYQKTKQVGLGAWLKVKGKK</INSDS
  eq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="5">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>775</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>

```

```

<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..775</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="ql62">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Pyrococcus furiosus</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>激烈火球菌</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MILDVDYITEEGKPVIRLFKKENGKFKIEHDRTFRPYIYALLRDDSKIEEVKKITGERHGKI
VRIVDVEKVEKKFLGKPI TVWKLYLEHPQDVPTIREK VREHPAVVDIFEYDIPFAKRYLIDKGLIPMEGEEELKILAFDI
ETLYHEGEEFGKGPIMISYADENEAKVITWKNIDL PYVEVSSEREMIKRFLRIIREKDPDIIVTYNGDSFDFPYLAKR
AEKLGIKLTIGRDGSEPKMQRIGDMTAVEVKGRIFHFDLYHVITRTINLPTYTLEAVYEAIFGKPKVKVYADEIAKAWESG
ENLERVAKYSMEDAKATYELGKEFLPMEIQLSRLV GQPLWDVSRSSSTGNLVEWFLLRKAYERNEVAPNKPSEEEYQRRLR
ESYTGGFVKEPEKGLWENIVYLDFRALYPSIIITHNVSPDTLNLEGCKNYDIAPQVGHKFKCKDIPGFI PSLLGHLLEERQ
KIKTKMKETQDPIEKILLDYRQKAIKLLANSFYGYGYAKARWYCKECAESVTAWGRKYIELVWKELEEKFGFKVLYIDT
DGLYATIPGGESEEIKKKALEFVKYINSKLPGLLELEYEGFYKRGFFVTKKRYAVIDEEGKVI TRGLEIVRRDWSEIAKE
TQARVLETILKHGDVEEAVRIVKEVIQKLANYEIPPEKLAIEYEQITRPLHEYKAI GPHVAVAKKLAAGVKIKPGMVI GY
IVLRGDGPI SNRAILAE EYDPKHKHYDAEYYIENQVLPVLRILEGFGYRKEDLRYQKTRQVGLT SWLNIKKS</INSDS
eq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="6">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>774</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..774</INSDFeature_location>

```

```

<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q163">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>Thermococcus litoralis</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>海濱嗜熱球菌</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MILDTDYITKDGKPIIRIFKKENGEFKIELDPHFQPYIYALLKDDSAIEEIKAIKGERHGKT
VRVLDAVKVRKKFLGREVEVWKLIFEHPQDVPAMRGKIREHPAVVDIYEYDIPFAKRYLIDKGLIPMEGDEELKLLAFDI
ETFYHEGDEFKGEIIMISYADEEEARVITWKNIDLPHYVVDVVSNEREMIKRFVQVVKEKDPDVIITYNGDNFDLPYLKR
AEKLGVRLVLGRDKEHPEPKIQRMGDSFAVEIKGRIHFDFPVRRTINLPTYTLEAVYEAVLGKTKSKLGAEIEAAIWE
TEESMKKLAQYSMEDARATYELGKEFFPMEAELAKLIGQSVWDVSRSSSTGNLVEWYLLRVAYARNELAPNKPDEEEYKRR
LRTTYLGGYVKEPEKGLWENIYLDFRSLYPSIVTHNVSPDTLEKEGCKNYDVAPIVGYRFCKDFPGFIPSI LGDLIAM
RQDIKKMKSTIDPIIEKKMLDYRQRAIKLLANSYYGYMGYPKARWYSKECAESVTAWGRHYIEMTIREIEEKFGFKVLYA
DTDGFYATIPGEKPELIKKAKEFLNYINSKLPGLLELEYEGFYLRGFFVTKKRYAVIDEEGRITTRGLEVVRRDWSEIA
KETQAKVLEAILKEGSVEKAVEVVRDVVEKIAKYRVPLEKLVIEHQITRDLDYKAI GPHVAIAKRLAARGIKVKPGTII
SYIVLKGSGKISDRVILLTEYDPRKHKYDPDYIENQVLPVLRILEAFGYRKEDLRYQSSKQTGLDAWLKR</INSDSe
q_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="7">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>937</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..937</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>

```

```

</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q164">
  <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>Methanosarcina acetivorans</INSDQualifier_value>
  <NonEnglishQualifier_value>嗜乙酸甲烷八疊球菌</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MPMDFQILDADYEVVNDSGPVIRLFGRGADGKSVCCFVPDFEPYFYLKASGDLHAVARLIKD
TFEQVKKVEIVEKFEPVGYQKTKKEMLRVTTRLPKDVPEIRDEILKIRDVLAEGDWQVYESDILFRNRFLIDRALGGMV
WVSAEGKPVDPVRYLGAGSAWRSCENFACDSAVLASGLKRVENLAIAPLKYLAFDIECLPLDGGMPSPDVSPIMISFS
FEPEYKGHKTLILLAKPAAGMDGDLSCMDETEMLNKFFEICEYDPDIVAGYNHQDFDIPYITERVKALVAKGETINSV
VGRDGPPIGYRKFLITRTEMKGRVVVDALPLVRRASFSLKQYTLRAVSKELLSREKLDVPPLEMEEHWNDSGDKFRKFVD
YARRDSELALVLELRLLDKYIALAQVSGSLLQEIVDGGQTSMVETLLLREFGLKDRVILPKPGDELSAERYDMSSDLK
GGEVLEPKKGLLENVILDYKSLYPTIMMAHNLCTTVVTRDRPDGKTIKPPSGGEFVPEVFRGIVPSILEDLLNKRGD
TKKRMKRTSDENEHRVLDATQLAIKILLNSFYGYSGYARARLYSLTLANAVTSFGRSNILNTRDLINGRIGKIVLRNSAA
LLLEEAGKLSQPDRIVELSVAYGDTDSVFVHCKAKGDLSEEVSLVGNRLSEIVSASLPDPMELEFESVAKRALLIAKKR
YALWLFEPNSGWENKIKVKGMEVTRRDWCELTSITLNRVLEFVLEIEGDVDAVEHVRKVVSDVRNLDPGKDAGIEKLV
LTRLTRKADSYKNKQPHLTV AENLKKRTGIMP SIGTRIPFVITAGKGLFVDRAEDPDYVRENNVPIDVDYVYVKKQILPP
VERILEVFGVKMSSLDFAKQKGLDFEVKKPEAKKQEKSSSQKGTNGKILEKAPEEKARYSENGRVEQRSLFDF</INS
DSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="8">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>785</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..785</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q165">

```

```

    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>Pyrobaculum islandicum</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>冰島熱棒菌</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MELKVVPLDITYAVVGSVPEIRIFGILSSGERVVLIDRSFKPYFYVDCAVCEPAALKTALSR
VAPIDDVQIVERRFLGRSKKFLKVI AKIPEDVRKLR EAAMSI PRVSGVYEADIRFYMRYMIDMGVVPCSWNVAEVEEGGR
LGGIPTVYVVSQWYGI DEGFP PSLKVMAFDIEVYNERGSPDPI RDPVVM LAIKTNDGHEEVFEASGKDDRGVVRAFVDFIR
SYDPDVI VGYNSNGFDWPYLVERAKAVGVPLKVDRLSNPPQOSVYGHWSIVGRANVDLYNIVEEFPEIKLKTLD RVAEYF
GVMKREERVLIPGHK IYEYWKDPNKRPLLKRYVLDDVRSTLGLADKLLPFLIQLSSVSGLPLDQVAAAASVGNRVEWMLLR
YAYRLGEVAPNREEREYEPYKGAIVLEPKPGMYEDVLVLD FSSMYPNIMMKYNLSPDTYLEPGEPDPPEGVNV APEVGH R
FRRSPPGFVPQVLKSLVELRKAVREEAKKYP PDSPEFKILDERQRALKVMANA IGYLGWVGARWYKREVAESVTAFARA
ILKDVIEQARRLGI VVYGD TDSL FVKKHGDVDKLIK YVEEKYGI DIKVDKDYAKVLFTEAKKRYAGLLRDGRIDIVGFE
VVRGDWSELAKDVQLRVIEI ILKSRDIVEARHGVIKYIREIERLKNYKFNIDDLI IWKTLDKELDEYKAYPPHVHAAQI
LKRHGYRVGKGT TIGYVI VKGGEKV SERALPYILLDDIKKIDIDYIERQI IPAALRIA EIVGVKESDLKTGRMERSLLD
FLS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="9">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>882</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..882</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q166">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Sulfolobus solfataricus</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>硫磺礦硫化葉菌</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>

```

```
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MTKQLTLFDIPSSKPAKSEQNTQQSQQSAPVEEKKVVRREWLEEAQENKIYFLLQVDYDGKK
GKAVCKLFDKETQKIYALYDNTGHKPYFLVDLEPKVGIKPKIVRDPSFDHIETVSKIDPYTWNKFKLTKIVVRDPLAVR
RLRNDVPKAYEAHIKYFNMYDIGLIPGMPYVVKNGKLESVYLSLDEKDVVEIKKAFADSDEMTRQMAVDWLPWFETEI
PKIKRVAIDIEVYTPVKGRIPDSQKAEPFISIALAGSDGLKKVVLNRNDVNEGSVKLDGISVERFNTEYELLGRFFDI
LLEYPVILTFNGDDFDLPYIYFRALKLGYFPEEIPIDVAGKDEAKYLAGLHIDLKFFFNKAVRNYAFEGKYNEYNLDAV
AKALLGTSKVKVDTLISFLDVEKLEIYNFRDAEITLQLTTFNNDLTMKLI VLF SRI SRLGIEELTRTEISTWVKNLYYWE
HRKRNLIPLKEEILAKSSNIRTSALIKGKGYGAVVIDPPAGIFFNITVLDFA SLYPSI IRTWNLSYETVDIQCKKPY
EVKDETGEVLHIVCMRPGITAVITGLLRDFRVKIYKKKAKNPNNSEEQKLLYD VVQ RAMKVF INATYGVFGAETFPLYA
PAVAESVTALGRYVITSTVKKAREEGLTVLYGDTDSLFLNPPKNSLENIKWKVTTFNLDLEVDKTYKFVAFSGLKKNY
FGVYQDGKVDIKGMLVKKRNTPEFVKVFNVEKELMISINSPNDVKEIKRKIVDVVKG SYEKLKNKGYNLDELAFKVMLS
KPLDAYKKNT PQHVKAALQLRPFVGNVLPRIIYVVKVRSKDGVKPVQLAKVTEIDA EKYLEALRSTFEQILRAFVGSWD
EIAATMSIDSFFSYPSKGNS</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="10">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>784</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..784</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q167">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>Methanococcus maripaludis</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>海沼甲烷球菌</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
```

```

<INSDSeq_sequence>MESLIDL DYN SDDL CIYLYLINSI I KEKDFKPYFYVNSTDKEQ ILEFLKDYEKHKHKL DSE I S
KMIEN IETVKK I VFDENYQEKELSKVTVKYPNNVKT VRE ILM EFERLYEYD I PFVRRYLIDNSV IPTSTWDFEN NKK IDN
K I PDFKTVSFD IEVYCNKEPNPKKDP I MASFSSKDFNTV VSTK KFDHEKLEYVKDEKEL I KRI I E I LKEYD I I YTYNGD
NFDFPYLKKRAESFGLLEKLGK NDEK I K I TKGGMNSKSY I PGRVH I DLYP I ARRLNLT KYRLENVTEALFDVKKVDVGH
EN I PKMWDNLDETLVEYSHQDAYYTQR I GEQFLPLE I MFSRVVNQSLYD I NRMSSSQMVEYLLLKNSYKMGV I APNRPSG
KEYQKR I RSSYEGGYVKEPLKGI HED I VSMDFLSLYPS I IMSHNLSPET I DCTCCSDEENGENEE I LGHKFCCKS I G I P
KTLMDL I NRRKKVKKVLREKA EKGFEDEEYQ I LDYEQRS I KVLANSHYGYLAFPMARWYSRDCAE I TTHLGRQY I QKT I E
EAENFGFKV I YADTDGFYSKWADDKEKLSKYELLEKTREFLKN I NNTLPGEMELEFEGYFKRG I FVTKKKYAL I DENEK I
TVKGLEVRRDWSNVSKNTQKNVLNALLKEGSVENAKKVI QDT I KELKDGKVNNE DLL I HTQLTKRI EDYKTTAPHVEVA
KK I LKSGNRVNTGDV I SY I I TSGNKS I SERAE I LENAKNYDTNYY I ENQ I LPPV I RLMEALG I TKDELKDSKKQYTLHHF
LK</INSDSeq_sequence>

```

```
</INSDSeq>
```

```
</SequenceData>
```

```
<SequenceData sequenceIDNumber="11">
```

```
<INSDSeq>
```

```
<INSDSeq_length>1107</INSDSeq_length>
```

```
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
```

```
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
```

```
<INSDSeq_feature-table>
```

```
<INSDFeature>
```

```
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
```

```
<INSDFeature_location>1..1107</INSDFeature_location>
```

```
<INSDFeature_qual>
```

```
<INSDQualifier>
```

```
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
```

```
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
```

```
</INSDQualifier>
```

```
<INSDQualifier id="q168">
```

```
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

```
<INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
```

```
<NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
```

```
</INSDQualifier>
```

```
</INSDFeature_qual>
```

```
</INSDFeature>
```

```
</INSDSeq_feature-table>
```

```

<INSDSeq_sequence>MDGKRRPGPGVPPKRARGGLWDDDDAPRPSQFEEDLALMEEMEAHRLQE QEEEEELQSVL
EGVADGQVPPSAIDPRWLRPTPALDPQTEPLIFQQLEIDHYVGPAQPVPGGPPPSRGSVPVLRAGVVTDEGFSVCCHIH
GFAPYFYTPAPPFGPEHMGDLQRELNAISRDSRGRELTPAVLAVELCSRESMFGYHGHGSPFLRITVALPRLVAP
ARRLLEQGIRVAGLGTSPFAPYEANVDFEIRFMVDTDIVGCNWLELPAGKYALRLKEKATQCQLEADVLSVSDVVSHPPEG
PWQRIAPLRVLSFDIECAGRKGI FPEPERDPVIQICSLGLRWGEPEPFLRLALTLRPCAPILGAKVQS YEKEEDLLQAWS

```

TFIRIMDPDVI TGYNIQNFDPYLISRAQTLKVQTFPFLGRVAGLCSNIRDSSFQSKQTGRRDTKVVSVMVGRVQMDMLQV  
 LLREYKLRSYTLNAVSFHFLGEQKEDVQHSIITDLQNGNDQTRRRLAVYCLKDAYLPLRLLERLMVLVNAVEMARVTGVP  
 LSYLLSRGQQVKVVSQLLRQAMHEGLLMPVVKSEGGEDYTGATVIEPLKGYDVP IATLDFSSLYPSIMMAHNLCYTTLL  
 RPGTAQKLGLTEDQFIRTPTGDEFVKTSVRKGLLPQILENLLSARKRAKELAKETDPLRRQVLDGRQLALKVSANSVYG  
 FTGAQVQKLPCLISQSVTGFGRQMIKTKQLVESKYTVENGYSTSAKVYVGD TDSVMCRFGVSSVAEAMALGREAADWV  
 SGHFPSPIRLEFEKVYFPYLLISKKRYAGLLFSSRPDAHDRMDCKGLEAVRRDNCPLVANLVTASLRLLIDRDPEGAVA  
 HAQDVISDLLCNRIDISQLVITKELTRAASDYAGQAHVELAERMKRDPGSAPSLGDRVPYVIISAAGVAAYMKSEDP  
 LRVLEHSLPIDTQYYLEQQAKPLLRIFEPILGEGRAEAVLLRGDHTRCKTVLTGKVGGLLAFKRRNCCIGCRTVLSHQ  
 GAVCEFCQPRESELYQKEVSHLNALEERFSRLWTQCQRCQGLHEDVICTSRDCPIFYMRKKVRKDLEDQEQLLRRFGPP  
 GPEAW</INSDSeq\_sequence>

</INSDSeq>

</SequenceData>

<SequenceData sequenceIDNumber="12" >

<INSDSeq>

<INSDSeq\_length>1097</INSDSeq\_length>

<INSDSeq\_moltype>AA</INSDSeq\_moltype>

<INSDSeq\_division>PAT</INSDSeq\_division>

<INSDSeq\_feature-table>

<INSDFeature>

<INSDFeature\_key>source</INSDFeature\_key>

<INSDFeature\_location>1..1097</INSDFeature\_location>

<INSDFeature\_qual>

<INSDQualifier>

<INSDQualifier\_name>mol\_type</INSDQualifier\_name>

<INSDQualifier\_value>protein</INSDQualifier\_value>

</INSDQualifier>

<INSDQualifier id="q169" >

<INSDQualifier\_name>organism</INSDQualifier\_name>

<INSDQualifier\_value>Saccharomyces cerevisiae</INSDQualifier\_value>

<NonEnglishQualifier\_value>釀酒酵母</NonEnglishQualifier\_value>

</INSDQualifier>

</INSDFeature\_qual>

</INSDFeature>

</INSDSeq\_feature-table>

<INSDSeq\_sequence>MSEKRSLPMVDVKIDDEDTPQLEKKIKRQSIDHGVGSEPVSTIEIIPSDSFRKYNSQGFKAK  
 DTDLMGTQLESTFEQELSQMEHDMADQEEHDLSSFERKKLPTDFDPSLYDISFQQIDAEQSVLNGIKDENTSTVVRFFGV  
 TSEGHSVLCNVTGFKNLYVPAPNSSDANDQEQINKFVHYLNETFDHAIDSIEVVSKQSIWGYSGDTKLPFWKIYVTPH  
 MVNKLRTAFERGHLSFNSWFNGTTTYDNIAYTLRLMVDGCVIGMSWITLPGKYSMIEPNNRVSSCQLEVSINYNLIA  
 HPAEGDWSHTAPLRIMSFDIECAGRIGVFPEPEYDPVIQIANVVSIIAGAKKPIRNVFTLNTCSPITGSMIFSHATEEEM  
 LSNWRNFIKVDPDVIGYNTTTFDIPYLLNRAKALKVNDFFPYFGRLKTVKQEIKEVSFSSKAYGTRETKNVNI DGRLQL

DLLQFIQREYKLRSYTLNAVSAHFLGEQKEDVHYSIISDLQNGDSETRRRRLAVYCLKDAYLPLRLMEKLMALVNYTEMAR  
 VTGVPFSYLLARGQQIKVVSQFRKCLEIDTVIPNMQSQASDDQYEGATVIEPIRGYYDVPIATLDFNSLYPSIMMAHNL  
 CYTTLCKATVERLNLKIDEDYVITPNGDYFVTTKRRRGILPIILDELSARKRAKKDLRDEKDPFKRDVNLNGRQLALKI  
 SANSVYGFTGATVGKLPCLAISSSVTAYGRMILKTKTAVQEKYCIKNGYKHDVAVVYGDTSVMVKFGTTDLKEAMD LG  
 TEAAKYVSTLTKHPINLEFEKAYFPYLLINKKRYAGLFWTNPDKFDKLDQKGLASVRRDSCSLVSI VMNKVLK KIL IERN  
 VDGALAFVRETINDILHNRVDISKLIISKTLAPNYTNPQPHAVLAERMKRREGVGPVNGDRVDYVIGGNDKLYNRAEDP  
 LFVLENNIQVDSRYYL TNQLQNPIISIVAPIIGDKQANGMFVVKSIKINTGSQKGLMSFIKKVEACKSCKGPLRKGE GP  
 LCSNCLARSGELYIKALYDVRDLEEKYSRLWTQCQRACAGNLHSEVLC SNKNCDFYMRVKVKKELQEKVEQLSKW</INS  
 DSeq\_sequence>

</INSDSeq>

</SequenceData>

<SequenceData sequenceIDNumber="13">

<INSDSeq>

<INSDSeq\_length>787</INSDSeq\_length>

<INSDSeq\_moltype>AA</INSDSeq\_moltype>

<INSDSeq\_division>PAT</INSDSeq\_division>

<INSDSeq\_feature-table>

<INSDFeature>

<INSDFeature\_key>source</INSDFeature\_key>

<INSDFeature\_location>1..787</INSDFeature\_location>

<INSDFeature\_qual>

<INSDQualifier>

<INSDQualifier\_name>mol\_type</INSDQualifier\_name>

<INSDQualifier\_value>protein</INSDQualifier\_value>

</INSDQualifier>

<INSDQualifier id="q170">

<INSDQualifier\_name>organism</INSDQualifier\_name>

<INSDQualifier\_value>Pseudomonas aeruginosa</INSDQualifier\_value>

<NonEnglishQualifier\_value>綠膿桿菌</NonEnglishQualifier\_value>

</INSDQualifier>

</INSDFeature\_qual>

</INSDFeature>

</INSDSeq\_feature-table>

<INSDSeq\_sequence>MELLQGFVLRHWRDTPAGTEVAFWLATEQGPRQVRLPPQPSVAFVLAEQRGRVESLLAGET  
 GAELRPLALRDFQQRPVGLGYCQHRQLMNLEKRLRQAGVEVFEADIRPPERYLMERFITAPVSLEASVEADGSLARRL  
 KPAPDYRPRRLVSLDIETNARGDLYSIALEGCDQRQVYMLGPANGDAAAVDFRLDYCDSRAGLLERLNQWLAEHDPDAI  
 IGWNLVQFDLRLVHEHAQRLKVPLRLGRGGDEMGWREHGSRNNHFFAAAAGRLIDGIEALRSATWSFSPSLENVARTL  
 LGEGKAIDNPYQRMDEIDRMFAEDKPALAHYNLKDCELVTRIFARTELLDFLLERATVTGLPADRSVAAFTHLYMPL  
 MHRAGFVAPNLGEKRPEASPGGFVMSRPGLYESVLVLDYKSLYPSIIRTFLIDPVGLVEGLRQPDDEHSVEGFRRGARFS  
 RTRHCLPAIVARVWEGREAAKRERNQPLSQALKIMNAFYGVLGSSGCRFFDPRLASSITLRGHRIMRRTRELIEAEGYT

VIYGDTDSTFVWLGSPRAEEEEAAI GRALVARVNDWWREHLKEEFGLD SALELQFETHYRRFLMPTVVRGAEEGSKKRYAG  
 LVRRADGGEEMVFKGLETVRTDWSPLAQRFFQELYLRIFNRQPYQDYVRDYVRRTLAGELDDLLVYRKRLRRRLDDYQRN  
 VPPHVRAARIADDYNLERGRPRQYQSGGWISYVIVSAGPEOPLEARRSAIDYEHYVGKQLQPVADAILPFVGDDEFATLVDR  
 QMALF</INSDSeq\_sequence>

</INSDSeq>

</SequenceData>

<SequenceData sequenceIDNumber="14">

<INSDSeq>

<INSDSeq\_length>783</INSDSeq\_length>

<INSDSeq\_moltype>AA</INSDSeq\_moltype>

<INSDSeq\_division>PAT</INSDSeq\_division>

<INSDSeq\_feature-table>

<INSDFeature>

<INSDFeature\_key>source</INSDFeature\_key>

<INSDFeature\_location>1..783</INSDFeature\_location>

<INSDFeature\_qual>

<INSDQualifier>

<INSDQualifier\_name>mol\_type</INSDQualifier\_name>

<INSDQualifier\_value>protein</INSDQualifier\_value>

</INSDQualifier>

<INSDQualifier id="q171">

<INSDQualifier\_name>organism</INSDQualifier\_name>

<INSDQualifier\_value>Escherichia coli</INSDQualifier\_value>

<NonEnglishQualifier\_value>大腸桿菌</NonEnglishQualifier\_value>

</INSDQualifier>

</INSDFeature\_qual>

</INSDFeature>

</INSDSeq\_feature-table>

<INSDSeq\_sequence>MAQAGFILTRHWRDTPQGTEVSFWLATDNGPLQVTLAPQESVAFIPADQVPRAQHILQGEQG  
 FRLTPLALKDFHRQPVYGLYCRAHRQLMNYEKRLREGGVTVEADVRPPERLYMERFITSPVWVEGDMHNGTIVNARLKP  
 HPDYRPPLKWVSIDIETTRHGELCYIGLEGCGQRIVYMLGPENGDASSLDFELEYVASRPQLEKLNAWFANYDPDVIIG  
 WNVVQFDLRLMLQKHAERYRLPLRLGRDNSELEWREHGFKNGVFFAQAKGRLIDGIEALKSAFWNFSSFSLETVAQELG  
 EGKSIDNPWDRMDEIDRRFAEDKPALATYNLKDCELVTQIFHKTEIMPFLERATVNGLPVDRHGGSVAAFGHLYFPRMH  
 RAGYVAPNLGEVPPHASPGGYVMSRPGLYDSVLVLDYKSLYPSIIRTFLIDPVGLVEGMAQPDPEHSTEGFLDAWFSRE  
 KHCLPEIVTNIWHRDEAKRQGNKPLSQALKIMNAFYGLVGTACRFFDPRLASSITMRGHQIMRQTKALIEAQGYDVI  
 YGD TDSTFVWLKGAHSEEEAAI GRALVQHVNAWAAETLQKQRLTSALELEYETHFCRFLMPTIRGADTGSKKRYAGLIQ  
 EGDKQRMVFKGLETVRTDWTPLAQQFQELYLRIFRNEPYQEYVRETIKLMAGELDARLVYRKRLRRPLSEYQRNVPPH  
 VRAARLADEENQKRGRPLQYQNRGTIKYVWTTNGPEPLDYQRSPLDYEHYLTRQLQPVAEGLPFIEDNFATLMTGQLGL  
 F</INSDSeq\_sequence>

```

</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="15">
<INSDSeq>
  <INSDSeq_length>903</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..903</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_qual>
        <INSDQualifier>
          <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
        <INSDQualifier id="q181">
          <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>Escherichia coli phage</INSDQualifier_value>
          <NonEnglishQualifier_value>大腸桿菌噬菌體</NonEnglishQualifier_value>
        </INSDQualifier>
      </INSDFeature_qual>
    </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MKEFYLTVEQIGDSIFERYIDSNGRERTREVEYKPSLFAHCPESQATKYFDIYGKPCTRKLF
ANMRDASQWIKRMEDIGLEALGMDDFKLAYLSDTYNYEIKYDHTKIRVANFDIEVTSPDGFPEPSQAKHPIDAITHYDSI
DDRFYVFDLLNSPYGNVEEWSIEIAAKLQEQQGDEVPSIEIDKI IYMPFDNEKELLMEYLNFWQKTPVILTGWNVESFD
IPYVYNRINKNIFGESTAKRLSPHRKTRVKVIENMYGSREIITLFGISVLDYIDLYKKFSFTNQPSYSLDYISEFELNVGK
LKYDGPISKLRNSHQRYISYNI DVYRVLQIDAKRQFINLSLDMGYAKIQIQSVFSPIKTWDAIFNSLKEQNKVIPQ
GRSHPVQPYPGAFVKEPIPNRYKYVMSFDLTSLYPSIRQVNI SPETIAGTFKVAPLHDYINAVAERP SDVYSCSPNGMM
YYKDRDGVPTEITKVFNRKEHKGYMLAAQRNGEIKEALHNPNSVDEPLDVDYRFD SDEIKEKIKKLSAKSLNEML
FRAQRTEVAGMTAQINRKL LINSLYGALGNVWFRYYDLRNATAITTFGQMALQWIERKVNEYLNEVCGTEGEAFVLYGDT
DSIYVSADKI IDKVGESKFRD TNHWVDFLDK FARERMEPAIDRGFREMCEYMNNKQHLMFMDREA IAGPPLGSKGIGGFW
TGKKRYALNVWDMEGTRYAEPKLIKMGLETQKSSTPKAVQKALKECIRRMLQEGEESLQEYFKEFEKEFRQLNYISIASV
SSANNIAKYDVGFPKCPFHIRGILTYNRAIKGNIDAPQVVEGEKVYVPLPLREGNPFQKCI AWPSGTEITDLIKDDV
LHWMDYTVLLEKTFIKPLEGFTSAAKLDYEKKASLDFMDFD</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="16">

```

```

<INSDSeq>
  <INSDSeq_length>898</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..898</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_qual>
        <INSDQualifier>
          <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
        <INSDQualifier id="q182">
          <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>Escherichia coli phage</INSDQualifier_value>
          <NonEnglishQualifier_value>大腸桿菌噬菌體</NonEnglishQualifier_value>
        </INSDQualifier>
      </INSDFeature_qual>
    </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>MKEFYIS IETVGNNI VERYIDENKERTREVEYLPTMFRHCKEESKYKDIYGKNCAPQKFPS
MKDARDWMKRMEDIGLEALGMNDFKLAYISDTYGSEIVYDRKFVRVANCDIEVTGDKFPDPMKAEYEIDAITHYDSIDDR
FYVFDLLNSMYGSVSKWDAKLAALDCEGGDEVPQEILDRVIYMPFDNERDMLMEYINLWEQKRPAIFGTGWNIEGFDVPY
IMNRVKMILGERSMKRFSPIGRVKSKLIQNMYGSKEIYSIDGVSILDYLDLYKKFAFTNLPSFSLESVAQHETKKGKLPY
DGPINKLRETNHQRYISYNIIDVESVQAIDKIRGFIDLVLMSYYAKMPFSGVMSPIKTWDAIIFNSLKGEHKVIPQQGS
HVKQSFPGAFVFEKPIARRYIMSFDLTSLYPSIIRQVNI SPETIRGQFKVHPIHEYIAGTAPKPSDEYSCSPNGWMDK
HQEGIIPKEIAKVFQKDWKKMFAEEMNAEAIKKIMKGAGSCSTKPEVERYVKFSDDLNELSNYTESVLNSLIEEC
EKAATLANTNQLNRKILINSLYGALGNIHFRYDLRNATAITIFGQVGIQWIARKINEYLNKVCGTNDEDFIAAGDTDSV
YVCVDKVI EKVGLDRFKEQNDLVEFMNQFGKKMEPMIDVAYRELCDYMNNREHLMHMDREAI SCPLGSKGVGGFWKAK
KRYALNVYDMEDKRF AEPHLKIMGMETQQSSTPKAVQEALEESIRRI LQEGEESVQEYYKNFEKEYRQLDYKVI AEVKTA
NDIAKYDDKGWPGFKCPFHIRGVLTYRRAVSLGLVAPILDGNKVMVPLREGNPFQDKCIAWPSGTELPKEIRSDVLSWI
DHSTLFQKSFVKPLAGMCESAGMDYEEKASLDFLFG</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="17">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>575</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>

```

```

<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..575</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q180">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Bacillus phage</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>芽孢桿菌噬菌體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MKHMPRKMYSDFETTTKVEDCRVWAYGYMNI EDHSEYKIGNSLDEFMAWVLKVQADLYFHN
LKFDFGAFIINWLERNGFKWSADGLPNTYNTIISRMGQWYIMIDICLGYGKGRKIHTVIYDSLKKLPFPVKKI AKDFKLTVL
KGDIDYHKERPVGKITYPEEYAIKNDIQIIAEALLIQFKQGLDRMTAGSDSLKGFKDIITTKKFKKVFP TSLGLDKEV
RYAYRGGFTWLNDRFKEKEIGEGMVFDVNSLYPAQMYRLLPYGEPVFEKGKVVWDEDYPLHIQHIRCEFELKEGYIPTI
QIKRSRFYKNEYLKSSGGEIADLWLSNVDLELMKEHYDLYNVEYISGLKFKATTGLFKDFIDKWTYIKTTSEGAIKQLA
KLMLNSLYGKFASNPDVTGKVPYLKENGALGFRLGEEETKDPVYTPMGVFI TAWARYTTITAAQACYDRIIYCDTDSIHL
TGTEIPDVIKDIVDPKKGWYWAHESTFKRAKYLRQKTYIQDIYMKEVDGKLVGSPDDYTDIKFSVKCAGMTDKIKKEVT
FENFKVGF SRKMKPKPVQVPGGVVLVDDTFTIK</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="18">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>45</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..45</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q175">

```

```
<INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>FAM-45-mer DNA initiator</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>FAM-45單元DNA起始子
</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..45</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q176">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>人工序列</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ctcggcctggcacaggtccgttcagtgtgcggcgaccaccgagg</INSDSeq_sequenc
e>
</INSDSeq>
</SequenceData>
</ST26SequenceListing>
```

## 【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種RNA聚合酶變體，其係由一野生型B族DNA聚合酶修飾而成，該野生型B族DNA聚合酶係選自於由SEQ ID NO：2、3、4、5、6、7、8和9所組成群組之一胺基酸序列，其中

SEQ ID NO：2的位置408的該胺基酸L係由C、D、G、H、K、M、N、Q、S、W或Y所取代；

SEQ ID NO：3的位置408的該胺基酸L係由C、D、G、H、K、M、N、Q、S、W或Y所取代；

SEQ ID NO：4的位置408的該胺基酸L係由C、D、G、H、K、M、N、Q、S、W或Y所取代；

SEQ ID NO：5的位置409的該胺基酸L係由C、D、F、G、H、K、M、N、Q、S、W或Y所取代；

SEQ ID NO：6的位置411的該胺基酸L係由A、C、D、F、G、H、K、M、N、Q、S、W或Y所取代；

SEQ ID NO：7的位置485的該胺基酸L係由A、C、D、F、G、H、K、M、N、Q、S、W或Y所取代；

SEQ ID NO：8的位置426的該胺基酸M係由A、C、D、F、G、H、K、N、Q、S、W或Y所取代；

SEQ ID NO：9的位置518的該胺基酸L係由A、C、D、F、G、H、K、M、N、Q、S、W或Y所取代；

其中該RNA聚合酶變體具有一減弱或缺失的3'至5'核酸外切酶活性。

【請求項2】 如請求項1所述之RNA聚合酶變體，其中該野生型B族DNA聚合酶係柳珊瑚嗜熱球菌 (*Thermococcus gorgonarius*) DNA聚合酶 (Tgo)、鹿兒島嗜熱

球菌 (*Thermococcus kodakarensis*) DNA聚合酶 (Kod1)、嗜熱球菌屬 (菌株9°N-7) DNA聚合酶 (9°N)、激烈火球菌 (*Pyrococcus furiosus*) DNA聚合酶 (Pfu)、海濱嗜熱球菌 (*Thermococcus litoralis*) DNA聚合酶 (Vent)、嗜乙酸甲烷八疊球菌 (*Methanosarcina acetivorans*) DNA聚合酶 (Mac)、冰島熱棒菌 (*Pyrobaculum islandicum*) DNA聚合酶 (Pis)或硫磺礦硫化葉菌 (*Sulfolobus solfataricus*) DNA聚合酶 (Sso)。

【請求項3】 如請求項1所述之RNA聚合酶變體，其中該RNA聚合酶變體係源自具有野生型胺基酸序列SEQ ID NO：2之柳珊瑚嗜熱球菌 (*Thermococcus gorgonarius*) DNA聚合酶 (Tgo)，且其中：

- i. 在SEQ ID NO：2位置409之胺基酸Y保持不變或係由A、C、D、G、N、S、T或V所取代；以及
- ii. 在SEQ ID NO：2位置410之胺基酸P保持不變或係由A、C、G、I、L、M、N、S、T或V所取代。

【請求項4】 如請求項1所述之RNA聚合酶變體，其中該RNA聚合酶變體係源自具有野生型胺基酸序列SEQ ID NO：2之柳珊瑚嗜熱球菌 (*Thermococcus gorgonarius*) DNA聚合酶 (Tgo)，且其中：

- i. 在SEQ ID NO：2位置409之胺基酸Y保持不變或係由A、C、D、G、N、S、T或V所取代；
- ii. 在SEQ ID NO：2位置410之胺基酸P保持不變或係由A、C、G、I、L、M、N、S、T或V所取代；以及
- iii. 在SEQ ID NO：2位置485之胺基酸A係由C、E、F、G、I、L、M、P、Q、R、V或Y所取代。

【請求項5】 如請求項1所述之RNA聚合酶變體，其中該RNA聚合酶變體係源自具有野生型胺基酸序列SEQ ID NO：3之鹿兒島嗜熱球菌 (*Thermococcus kodakarensis*) DNA聚合酶 (Kod1)，且其中：

- i. 在SEQ ID NO：3位置409之胺基酸Y保持不變或係由A、C、D、G、N、S、T或V所取代；以及
- ii. 在SEQ ID NO：3位置410之胺基酸P保持不變或係由A、C、G、I、L、M、N、S、T或V所取代。

【請求項6】 如請求項1所述之RNA聚合酶變體，其中該RNA聚合酶變體係源自具有野生型胺基酸序列SEQ ID NO：3之鹿兒島嗜熱球菌 (*Thermococcus kodakarensis*) DNA聚合酶 (Kod1)，且其中：

- i. 在SEQ ID NO：3位置409之胺基酸Y保持不變或係由A、C、D、G、N、S、T或V所取代；
- ii. 在SEQ ID NO：3位置410之胺基酸P保持不變或係由A、C、G、I、L、M、N、S、T或V所取代；以及
- iii. 在SEQ ID NO：3位置485之胺基酸A係由C、E、F、G、I、L、M、P、Q、R、V或Y所取代。

【請求項7】 如請求項1所述之RNA聚合酶變體，其中該RNA聚合酶變體係源自具有野生型胺基酸序列SEQ ID NO：4之嗜熱球菌屬 (菌株9°N-7) DNA聚合酶 (9°N)，且其中：

- i. 在SEQ ID NO：4位置409之胺基酸Y保持不變或係由A、C、D、G、N、S、T或V所取代；以及

- ii. 在SEQ ID NO：4位置410之胺基酸P保持不變或係由A、C、G、I、L、M、N、S、T或V所取代。

【請求項8】 如請求項1所述之RNA聚合酶變體，其中該RNA聚合酶變體係源自具有野生型胺基酸序列SEQ ID NO：4之嗜熱球菌屬 (菌株9°N-7) DNA聚合酶 (9°N)，且其中：

- i. 在SEQ ID NO：4位置409之胺基酸Y保持不變或係由A、C、D、G、N、S、T或V所取代；
- ii. 在SEQ ID NO：4位置410之胺基酸P保持不變或係由A、C、G、I、L、M、N、S、T或V所取代；以及
- iii. 在SEQ ID NO：4位置485之胺基酸A係由C、E、F、G、I、L、M、P、Q、R、V或Y所取代。

【請求項9】 如請求項1所述之RNA聚合酶變體，其中該RNA聚合酶變體係源自具有野生型胺基酸序列SEQ ID NO：5之激烈火球菌 (*Pyrococcus furiosus*) DNA聚合酶 (Pfu)，且其中：

- i. 在SEQ ID NO：5位置410之胺基酸Y保持不變或係由A、C、D、G、N、S、T或V所取代；以及
- ii. 在SEQ ID NO：5位置411之胺基酸P保持不變或係由A、C、G、I、L、M、N、S、T或V所取代。

【請求項10】 如請求項1所述之RNA聚合酶變體，其中該RNA聚合酶變體係源自具有野生型胺基酸序列SEQ ID NO：5之激烈火球菌 (*Pyrococcus furiosus*) DNA聚合酶 (Pfu)，且其中：

- i. 在SEQ ID NO：5位置410之胺基酸Y保持不變或係由A、C、D、G、N、S、T或V所取代；
- ii. 在SEQ ID NO：5位置411之胺基酸P保持不變或係由A、C、G、I、L、M、N、S、T或V所取代；以及
- iii. 在SEQ ID NO：5位置486之胺基酸A係由C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、T、V、W或Y所取代。

【請求項11】 如請求項1所述之RNA聚合酶變體，其中該RNA聚合酶變體係源自具有野生型胺基酸序列SEQ ID NO：6之海濱嗜熱球菌 (*Thermococcus litoralis*) DNA聚合酶 (Vent)，且其中：

- i. 在SEQ ID NO：6位置412之胺基酸Y保持不變或係由A、C、D、G、N、S、T或V所取代；以及
- ii. 在SEQ ID NO：6位置413之胺基酸P保持不變或係由A、C、G、I、L、M、N、S、T或V所取代。

【請求項12】 如請求項1所述之RNA聚合酶變體，其中該RNA聚合酶變體係源自具有野生型胺基酸序列SEQ ID NO：6之海濱嗜熱球菌 (*Thermococcus litoralis*) DNA聚合酶 (Vent)，且其中：

- i. 在SEQ ID NO：6位置412之胺基酸Y保持不變或係由A、C、D、G、N、S、T或V所取代；
- ii. 在SEQ ID NO：6位置413之胺基酸P保持不變或係由A、C、G、I、L、M、N、S、T或V所取代；以及
- iii. 在SEQ ID NO：6位置488之胺基酸A係由C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、T、V、W或Y所取代。

【請求項13】 如請求項1所述之RNA聚合酶變體，其中該RNA聚合酶變體係源自具有野生型胺基酸序列 SEQ ID NO：7 之嗜乙酸甲烷八疊球菌 (*Methanosarcina acetivorans*) DNA聚合酶 (Mac)，且其中：

- i. 在SEQ ID NO：7位置486之胺基酸Y保持不變或係由A、C、D、G、N、S、T或V所取代；以及
- ii. 在SEQ ID NO：7位置487之胺基酸P保持不變或係由A、C、G、I、L、M、N、S、T或V所取代。

【請求項14】 如請求項1所述之RNA聚合酶變體，其中該RNA聚合酶變體係源自具有野生型胺基酸序列 SEQ ID NO：7 之嗜乙酸甲烷八疊球菌 (*Methanosarcina acetivorans*) DNA聚合酶 (Mac)，且其中：

- i. 在SEQ ID NO：7位置486之胺基酸Y保持不變或係由A、C、D、G、N、S、T或V所取代；
- ii. 在SEQ ID NO：7位置487之胺基酸P保持不變或係由A、C、G、I、L、M、N、S、T或V所取代；以及
- iii. 在SEQ ID NO：7位置565之胺基酸係由C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、T、V、W或Y所取代。

【請求項15】 如請求項1所述之RNA聚合酶變體，其中該RNA聚合酶變體係源自具有野生型胺基酸序列 SEQ ID NO：8 之冰島熱棒菌 (*Pyrobaculum islandicum*) DNA聚合酶 (Pis)，且其中：

- i. 在SEQ ID NO：8位置427之胺基酸Y保持不變或係由A、C、D、G、N、S、T或V所取代；以及

- ii. 在SEQ ID NO：8位置428之胺基酸P保持不變或係由A、C、G、I、L、M、N、S、T或V所取代。

【請求項16】 如請求項1所述之RNA聚合酶變體，其中該RNA聚合酶變體係源自具有野生型胺基酸序列SEQ ID NO：8之冰島熱棒菌 (*Pyrobaculum islandicum*) DNA聚合酶 (Pis)，且其中：

- i. 在SEQ ID NO：8位置427之胺基酸Y保持不變或係由A、C、D、G、N、S、T或V所取代；
- ii. 在SEQ ID NO：8位置428之胺基酸P保持不變或係由A、C、G、I、L、M、N、S、T或V所取代；以及
- iii. 在SEQ ID NO：8位置508之胺基酸A係由C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、T、V、W或Y所取代。

【請求項17】 如請求項1所述之RNA聚合酶變體，其中該RNA聚合酶變體係源自具有野生型胺基酸序列SEQ ID NO：9之硫磺礦硫化葉菌 (*Sulfolobus solfataricus*) DNA聚合酶 (Sso)，且其中：

- i. 在SEQ ID NO：9位置519之胺基酸Y保持不變或係由A、C、D、G、N、S、T或V所取代；以及
- ii. 在SEQ ID NO：9位置520之胺基酸P保持不變或係由A、C、G、I、L、M、N、S、T或V所取代。

【請求項18】 如請求項1所述之RNA聚合酶變體，其中該RNA聚合酶變體係源自具有野生型胺基酸序列SEQ ID NO：9之硫磺礦硫化葉菌 (*Sulfolobus solfataricus*) DNA聚合酶 (Sso)，且其中：

- i. 在SEQ ID NO：9位置519之胺基酸Y保持不變或係由A、C、D、G、N、S、T或V所取代；
- ii. 在SEQ ID NO：9位置520之胺基酸P保持不變或係由A、C、G、I、L、M、N、S、T或V所取代；以及
- iii. 在SEQ ID NO：9位置601之胺基酸A係由C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、T、V、W或Y所取代。

**【請求項19】** 如請求項1所述之RNA聚合酶變體，其中該RNA聚合酶變體表現出一無模板核酸合成活性，係藉由將至少一核苷酸添加至一可延長的起始子，以無模板方式合成核酸，其中該至少一核苷酸選自由天然存在的核苷酸、核苷酸類似物及其混合物的群組。

**【請求項20】** 如請求項19所述之RNA聚合酶變體，其中該可延長的起始子包括一單股寡核苷酸起始子、平末端 (blunt-end) 雙股寡核苷酸起始子或其混合物。

**【請求項21】** 如請求項19所述之RNA聚合酶變體，其中該可延長的起始子係在液相中反應之一游離態核酸。

**【請求項22】** 如請求項19所述之RNA聚合酶變體，其中該可延長的起始子係固定在一固相載體上，其中該固相載體包括一粒子、珠粒、載玻片、陣列表面、膜、流通池、孔、微孔、奈米孔、腔室、微流體腔室、通道或微流體通道。

**【請求項23】** 如請求項19所述之RNA聚合酶變體，其中該至少一核苷酸與一可偵測標記連接。

**【請求項24】** 如請求項19所述之RNA聚合酶變體，其中該至少一核苷酸包括一核糖。

【請求項25】如請求項19所述之RNA聚合酶變體，其中該RNA聚合酶變體在介於10°C至100°C之間的反應溫度下表現該無模板核酸合成活性。

【請求項26】一種用於執行酶催化核酸新生合成的試劑套組，其包含源自一野生型B族DNA聚合酶修飾之一如請求項1所述之RNA聚合酶變體，該野生型B族DNA聚合酶包含選自於由SEQ ID NO：2、3、4、5、6、7、8和9所組成群組之一胺基酸序列；其中該RNA聚合酶變體表現出一無模板核酸合成活性，係藉由將至少一核苷酸添加至一可延長的起始子以合成一所需的核酸序列，其中該至少一核苷酸選自由天然存在的核苷酸、核苷酸類似物及其混合物的群組。

【請求項27】一種無模板合成RNA寡核苷酸的方法，其包括：

(a)提供一起始寡核苷酸；

(b)提供一RNA聚合酶變體；

(c)在足以將至少一核苷酸添加至該起始寡核苷酸的3'端的條件下，聯合該起始寡核苷酸、該RNA聚合酶變體及該至少一核苷酸合成該RNA寡核苷酸；

其中該RNA聚合酶變體，係由一野生型B族DNA聚合酶修飾而成，該野生型B族DNA聚合酶係選自於由SEQ ID NO：2、3、4、5、6、7、8和9所組成群組之一胺基酸序列，其中

SEQ ID NO：2的位置408的該胺基酸L係由C、D、G、H、K、M、N、Q、S、W或Y所取代；

SEQ ID NO：3的位置408的該胺基酸L係由C、D、G、H、K、M、N、Q、S、W或Y所取代；

SEQ ID NO：4的位置408的該胺基酸L係由C、D、G、H、K、M、N、Q、S、W或Y所取代；

SEQ ID NO : 5的位置409的該胺基酸L係由C、D、F、G、H、K、M、N、Q、S、W或Y所取代；

SEQ ID NO : 6的位置411的該胺基酸L係由A、C、D、F、G、H、K、M、N、Q、S、W或Y所取代；

SEQ ID NO : 7的位置485的該胺基酸L係由A、C、D、F、G、H、K、M、N、Q、S、W或Y所取代；

SEQ ID NO : 8的位置426的該胺基酸M係由A、C、D、F、G、H、K、N、Q、S、W或Y所取代；

SEQ ID NO : 9的位置518的該胺基酸L係由A、C、D、F、G、H、K、M、N、Q、S、W或Y所取代；

其中該RNA聚合酶變體具有一減弱或缺失的3'至5'核酸外切酶活性。



	180	200	220	240
<b>Tgo</b>	KENGEFKIDY DRNFEPYIYA LL-----KDD	-SAIEDVKKI TAERH---G-	-TTVRVRAE KVKKKF--LG	-----RPIEVW 83
<b>Kod1</b>	KENGEFKIEY DRTFEPYFYA LL-----KDD	-SAIEEVKKI TAERH---G-	-TVVTVKRVE KVKKKF--LG	-----RPVEVW 83
<b>g<sup>n</sup></b>	KENGEFKIEY DRTFEPYFYA LL-----KDD	-SAIEDVKKV TAKRH---G-	-TVVKVKRAE KVKKKF--LG	-----RPIEVW 83
<b>Pfu</b>	KENGEFKIEH DRTFRPYIYA LL-----RDD	-SKIEEVKKI TGERH---G-	-KIVRIVDVE KVEKKF--LG	-----KPITVW 83
<b>Vent</b>	KENGEFKIEL DPHFQPYIYA LL-----KDD	-SAIEEIKAI KGERH---G-	-KTVRVLDVAV KVRKKF--LG	-----REVEVW 83
<b>Mma</b>	S-----I IK EKDFKPYFYV NS-----TDK	-EQILEFLKD YEKHKLDS-	-EISKMIENI ETVKI--VF	DENYQEKELS 86
<b>Mec</b>	GADGKSVCCF VPDFEPYFYL KA-----SGD	LHAVARLIKD TFEQ-----	-----VKKV EIVEKPEVVG	YQKTKK-EML 89
<b>hPOLD</b>	TDEGFSVCCN IHGFAPYFYT PAPPFGFPEH	MGDLQRELN AISRDSRGR	ELTGP AVLAV ELSRESFMFG	YHGHSPPFL 210
<b>ScePOLD</b>	TSEGHSVLNC VTGFKNYLYV PAP-----NSSD	AND-QEQINK FVHYLN---	ETFDHAIDSI EVVSKQSIWG	YSGD TKLPFW 214
<b>Pis</b>	LSSGERVVL I DRSFKPYFYV -----D	CAVCEPAALK TA-----L	SRVAP IDDVQ IVERRF--LG	-----RSKKFL 84
<b>Sso</b>	ETOKIYALYD NTGHKPYFLV DLE-----PDK	VGKIPKIVRD PSFDH-----	-----I ETVSKIDPYT W-	-----NKFKLT 131
<b>Pae</b>	TPAGT-----EVAFWL ATEQGPRQVR	LPPQPSVAFV LAEQRGR---	-----VESLLAG ETGAELRPLA	LRDFQQRPLV 80
<b>Eco</b>	TPQGT-----EVSFWL ATDNGPLQVT	LAPQESVAF I PADQVPR---	-----AQHILQG EQGFRLTPLA	LKDFHRQPVY 79
<b>RB89</b>	DSNGR-----ERTREVEYKP SFAHCPEPQ	ATKYFDIYGK PCTRK-----	-LFANMRDAS QWIKRMEDIG	LEALGMDDFK 89
<b>T4</b>	DENGG-----ERTREVEYLP TMFRHCKEE-	-SKYKDIYGK NCAAPQ-----	-KFPSMKDAR DWMKRMEDIG	LEALGMDDFK 87
<b>Phi29</b>	-----DRTFEPYFYA LL-----KDD	-SAIEEVKKI TAERH-----	-----VRVVDAAE EVVKKF--LG	-----HMPRKMY 9
<b>Consensus</b>	<b>KENGE--I--DRTFEPYFYA LL-----KDD</b>	<b>-SAIEEVKKI TAERH-----</b>	<b>-----VRVVDAAE EVVKKF--LG</b>	<b>-----RPIEVW</b>
	260	280	300	320
<b>Tgo</b>	KL YFTHPQDV PAIRDKIKEH PAVV-----	DI--YEYDIP FAKRYLIDKG LIP-----M	EGD-----	-----132
<b>Kod1</b>	KL YFTHPQDV PAIRDKIREH PAVI-----	DI--YEYDIP FAKRYLIDKG LVP-----M	EGD-----	-----132
<b>g<sup>n</sup></b>	KL YFNHPQDV PAIRDRI RAH PAVV-----	DI--YEYDIP FAKRYLIDKG LIP-----M	EGD-----	-----132
<b>Pfu</b>	KL YLEHPQDV PTIREKVVREH PAVV-----	DI--FEYDIP FAKRYLIDKG LIP-----M	EGE-----	-----132
<b>Vent</b>	KL I FEHPQDV PAMRGKIREH PAVV-----	DI--YEYDIP FAKRYLIDKG LIP-----M	EGD-----	-----132
<b>Mma</b>	KVTVKYPNNV KTVREILMEF ER-----	-L--YEYDIP FVRRYLIDNS VIP-TS TWDF	ENN-----	-----137
<b>Mec</b>	RVTTRLPKDV PEIRDEILKI RDVLR AEGDW	QV--YESDIL FRNRFIDRA LGG-MWVSA	EGKPVDPVRY LGAGSAMRSR	166
<b>hPOLD</b>	RITVALPRLV APARRLLEQG -IRVAGLGTG	SFAPYEANVD FEIRFMVDTD IVG-CNWLEL	PAGKYAL-RL KEKATQCQLE	287
<b>ScePOLD</b>	KIYVYTPHMV NKLR TAFERG HLSFNSWFSN	GTTTTD-NIA YTLRLMVDCCG IVG-MSWITL	PKGKYSMIEP NNRVSSCQLE	292
<b>Pis</b>	KVI AKIPEDV RKLREAAMS I PRV-----	-SGVYEADIR FYMR YMIDMG VVP-CSWNVA	EVEEGR LG-----	-----144
<b>Sso</b>	KIVVRDPLAV RRLRNDVPK-----	---AYEAHIK YFNNYMYD I G LIPGMPYVVK	NGKLESVYLS LDEKDVEEIK	197
<b>Pae</b>	GLY CQHRQL MNLEKRLRQA -----	GVEVFEADIR PPERYLMERF ITAP---VSL	EASVEADGSL LAR-----	-----140
<b>Eco</b>	GLYCR AHRQL MNYEKRLREG -----	GVTVYEADVR PPERYLMERF ITSP---VWV	EGDMH-NGT I VNA-----	-----138
<b>RB89</b>	LAYLS-----	-DTYNYEIK YDHTKI-----	-----	-----108
<b>T4</b>	LAYIS-----	-DTYGSEIV YDRKFFV-----	-----	-----106
<b>Phi29</b>	SCDFETT TKV EDCR-----	-VWAYGY-----	-----	-----29
<b>Consensus</b>	<b>KLYFXHPQDV PAIRDKIREH --V-----I--YEYDIP FAKRYLIDKG LIP-----M EGD-----</b>			

圖1(接續)



Tgo	-GVKFI LGR-	500	-EGS	540	-EPKI QRM-	550	GDRFAVEV-	560	DL YPVI RRTI	560	PT YTL EAVYE	280	
Kod1	-GINFALGR-		-DGS		-EPKI QRM-		GDRFAVEV-		DL YPVI RRTI		PT YTL EAVYE	280	
9°N	-GIKFTLGR-		-DGS		-EPKI QRM-		GDRFAVEV-		DL YPVI RRTI		PT YTL EAVYE	280	
Pfu	-GIKLTI GR-		-DGS		-EPKQRI-		GDMTAVEV-		DL YHVI TRTI		PT YTL EAVYE	280	
Vent	-GIVRLVGR-		-DKE		HPEPKI QRM-		GDSFAVEI-		DLFPVVRTI		PT YTL EAVYE	282	
Mma	-GLELKL GK-		-NDE		-KIKITKG-		GMSKSYI-		DL YPIARRLL		TKYRLENVTE	290	
Mac	ETINSVVGR-		-DGS		PIG--YRKF-		GLI TRTEM-		DALPLVRRAF		KQYTLRAVSK	351	
hPOLD	FPF--LGRV		AGLCSNIRDS		SFQSKQTGR-		RDTKVVSM-		DMLQVLLREY		RSYTLNVSF	479	
ScopOLD	FPY--FGRL		KTVKOEIKES		VFSSKAYGT-		RETKNVI-		DLLQFI QREY		RSYTLNVA	484	
Pis	-GVPLKVDRL		SN		-PPQQSVY-		GHW--SI-		DL YNIVEEFP		KLKTLDRVAE	300	
Sso	EEIPIDVA-		-		-		GKDEAKYL-		DL YKFFFNKA		VRNYAFEGKY	384	
Pae	-VPLRLGR-		-GGDE		MGWREHGSR-		NNHFFAAA-		DGIEALRSAT		PFSELENVAR	300	
Eco	-LPLRLGR-		-DNSE		LEWREHGFK-		NGVFFAQA-		DGIEALKSAF		SFSLETTVAQ	298	
RB69	-FGES		TAKRLSPHRK		TRVKVIENMY		GSREIITL-		DYIDL YKKFS		FT--N	295	
T4	-LGER		SMKRFSPIGR		VKSKLIQNMV		GSKEIYSI-		DYLDLYKKFA		FT--N	292	
Phi29	-RN		GFKWSADGLP		NTYNTIISRM		GQWYMIDICL		GYKGRKIHT		VIYDSLKKL-	-PPVKKIAK	135
Consensus	-GI-L-LGR-		-DGS		-EPKI QRM-		GDRFAVEI-		-KGR I HF		DL YPVI RRTI	-N	PSYTL EAVAE
Tgo	AIFGQPKK-	580	-VYAEI A	620	QAW-ETGEG	640	ERVARYSMED	660	AKVTYELG--	680	QLSRLVGQSL	-WDVSRSSSTG	350
Kod1	AVFGQPKK-		-VYAEI T		TAW-ETGENL		ERVARYSMED		AKVTYELG--		QLSRLVGQSL	-WDVSRSSSTG	350
9°N	AVFGQPKK-		-VYAEI A		QAW-ESGEG		ERVARYSMED		AKVTYELG--		QLSRLVGQSL	-WDVSRSSSTG	350
Pfu	AIFGQPKK-		-VYADEI A		KAW-ESGENL		ERVAKYSMED		AKATYELG--		QLSRLVGQPL	-WDVSRSSSTG	350
Vent	AVLGKTKSK-		-LGAEI A		AIW-ETEESM		KKLAQYSMED		ARATYELG--		ELAKLIGQSV	-WDVSRSSSTG	352
Mma	ALFDVKKVD-		-VGHENIP		KMW-DNLD-		ETLVEYSHQD		AYYTRIG--		EQFLPLE--I	MFSRVVNQSL	358
Mac	ELLSREKLD-		-VPPLEME		EHWNDSGDKF		RKFVDYARRD		SELALELV--		LELRLLDKYI	ALAQVSGSLL	424
hPOLD	HFLGQKED-		-VQHSIIT		DLQNGNDQTR		RRLAVYCLKD		AYLPLRLM--		EKLMLVNAV	EMARVTGVPL	553
ScopOLD	HFLGQKED-		-VHYSIIS		DLQNGDSETR		RRLAVYCLKD		AYLPLRLM--		EKLMLVNAV	EMARVTGVPF	558
Pis	-YFGVMKREE		RVLIPGHKIY		EYWKDPNK-R		PLLRKYVLDD		VRSTLGLA--		DKLLPF--LI	QLSSVSGLPL	373
Sso	ALLGTSKVKV		DTLISFLDV		-		EKLIEYNFRD		AEITLQLTTF		NNDLTMKLI V	LFSRISRLGI	452
Pae	TLLGEGKAID		NPYORMDEID		RMF--AEDK		PALAHYNLKD		CELVTRIFAR		TELLDF--LL	ERATVTGLPA	372
Eco	ELLGEGKSID		NPWDRMDEID		RRF--AEDK		PALATYNLKD		CELVTRIFHK		TEIMPF--LL	ERATVNGLPV	370
RB69	FELNVGKLY		DGPI SKLR--		-ESNH		QRYISYNIID		VYRVLQIDAK		RQFINL--SL	DMGYAKIQI	365
T4	HETKKGKLPY		DGPI NKLR--		-ETNH		QRYISYNIID		VESVQAIDKI		RGFIDL--VL	SMSYYAKMPF	362
Phi29	DF--KLT		-KLT		VLKGDIDYHK		ERPVGKITP		EEYAY-IKND		IQI IAEALLI	QFK--QGL	195
Consensus	ALLGXXKKEK-		-VYAEI A		-AW-E-GENL		ERLARYSXED		AELTXELG--		KEFLPXE--I	QLSRVXGQPL	-WDVSRSSSTG

圖1(接續)



	820	840	860	880
Tgo	---	---KATIDP---	---IEKKLLDY RQRAL---	---KILAN SFYGYGYAK 501
Kod1	---	---KATIDP---	---IERKLLDY RQRAL---	---KILAN SYGYGYAR 501
9°N	---	---KATVDP---	---LEKKLLDY RQRAL---	---KILAN SFYGYGYAK 501
Pfu	---	---KETQDP---	---IEKILLDY RQKAL---	---KLLAN SFYGYGYAK 502
Vent	---	---KSTIDP---	---IEKKMLDY RQRAL---	---KLLAN SYGYMGYPK 504
Mma	---	---REKAEKGE FDEEYQILDY EQRSI---	---KVLAN SHYGYLAFPM 517	
Mac	---	---KRTSDEN---	---EHRVLDA TQLAL---	---KILLN SFYGYSGYAR 581
hPOLD	---	---AKETDP---	---LRRQVLDG RQLAL---	---KVSAN SVYGFPGAQV 708
SeePOLD	---	---RDEKDP---	---FKRDVLNG RQLAL---	---KISAN SVYGFGTATV 715
Pis	---	---KKYPPDSP---	---EFKILDE RQRAL---	---KVMAN AIYGYLGVWG 524
Sso	---	---KKAKNPNN SEEQKLLYDV VQRAM---	---QAL AFYGVVFGAET 617	
Pae	---	---NQPLS---	---QAL AFYGVLGSSG 509	
Eco	---	---NKPLS---	---QAL AFYGVLGTTA 507	
RB69	NGEIIKEALH NPNLSVDEPL DVDYRFDSD EIKEKIKKLS AKSLNEMLFR AQRTEVAGMT AQINRKLIN SLYGALGNVW 574			
T4	NAEAIKKIIM KGAGSCSTKP EVERYVKFSD DFLNELSNYT ESVLNSLIEE CEKAATLANT NQLNRKILIN SLYGALGNIH 571			
Phi29	SNVDLELMKE HYDLYNVEYI SGLKFKATTG LFKDFIDKWT YIKTTSEGAI KQLA-----			---KMLN SLYGKFASNP 397
Consensus	-----	---KKTIDP---	---IEKKLLDY RQRAL-----	---KILAN SFYGYLGYAK
	900	920	940	960
Tgo	ARWYCKECAE SVTAWG-RQY IETTIREIEE KFG-----			KVLYADTDGF FATIPG---- 550
Kod1	ARWYCKECAE SVTAWG-REY ITMTIKEIEE KYG-----			KVIYSDTDGF FATIPG---- 550
9°N	ARWYCKECAE SVTAWG-REY IEMVIRELEE KFG-----			KVLYADTDGL HATIPG---- 550
Pfu	ARWYCKECAE SVTAWG-RKY IELVWKELEE KFG-----			KVLYIDTDGL YATIPG---- 551
Vent	ARWYSKECAE SVTAWG-RHY IEMTIREIEE KFG-----			KVLYADTDGF YATIPG---- 553
Mma	ARWYSRDCAE ITTHLG-RQY IQKTIEEAEN -FG-----			KVIYADTDGF YSKW-A---- 564
Mac	ARLYSLTLAN AVTSFG-RSN LNTRDLING RIGKIVLRNS AALLLEEAGK LSPQDRIVEL SVAYGDTDSV FVHCKA---- 656			KVVYGD TDSV MCRFGV---- 765
hPOLD	GKLPCLAISS SVTGFG-RQM IEKTKQLVES KY-----			KVYGD TDSV MVKFGT---- 772
SeePOLD	GKLPCLAISS SVTAYG-RTM ILKTKTAVQE KY-----			VVVYGD TDSL FVKKHG---- 572
Pis	ARWYKREVAE SVTAFARA-RAI LKDVIEQARR -----			TVLYGD TDSL FLLNPP---- 665
Sso	FPLYAPAVAE SVTALG-RYV ITSTVKKARE E-----			TVIYGD TDSL FVWLGS---- 557
Pae	CRFFDPRLAS SITLRG-HRI MRRTRALIEA E-----			DVIYGD TDSL FVWLKG---- 555
Eco	CRFFDPRLAS SITMRG-HQI MRQTKALIEA Q-----			-VLYGD TDSL YVSADKIDK 635
RB69	FRYYDLRNAT AITTFG-QMA LQWIERKVN E YLNEVCGTEG EAF-----			-IAAGD TDSV YVCVDKVIK 632
T4	FRYYDLRNAT AITIFG-QVG IQWIARKINE YLNKVCGTND EDF-----			RIIYCD TDSI HLT----- 463
Phi29	DVTGKVPYLK ENGALGFRLG EEETKDPVYT PMGVFITAWA RYTTITAAQA CYD-----			KVLYGD TDSX FVTIPG----
Consensus	ARWYCKECAE SVTAXG-RQY IEXTIREIEE KFG-----			

圖1(接續)



	1140	1160	1180	1200
Tgo	IYEI TRDLK	RL---AAR-	ISYI VLKGS	RIG--DRAIP
Kod1	IHEI TRDLK	RL---AAR-	ISYI VLKGS	RIG--DRAIP
9 <sup>n</sup>	IHEI TRDLR	RL---AAR-	ISYI VLKGS	RIG--DRAIP
Pfu	IYEI TRPLH	EYKAIG----	IGYI VLRGDG	PIS--NRAIL
Vent	IHEI TRDLK	DYKAIG----	ISYI VLKGS	KIS--DRVIL
Mma	IHTQLTKRIE	DYKTTA----	ISYI TSGNK	SIS--ERA--
Mac	ILRTL TRKAD	SYNKKQ----	IPFYI TAGKG	LFV--DRAED
hPOLD	ITKEL TRAA	DYAGKQ----	VPYVI I SAAK	GVAAYMKS
ScePOLD	ISKTL ---AP	NYTNPQ----	VQYVI I GND	KL--YNRAED
Pis	IWKTLDKELD	EYKAYP----	IGYI VKGGE	KVS--ERALP
Sso	FKVMSKPLD	AYKNT-----	IYYVK VRSKD	GVKP VQLA--
Pae	YRKRRLRRRLD	EYQRNV----	ISYI SVAG-	-----
Eco	YRKRRLRPLS	EYQRNV----	IKYVWTTNG-	-----
RB69	ASVSSANNIA	KYDVGFFPGP	VYVLP LREGN	PFQDKCI AWP
T4	AEVKTANDIA	KYDDKGMWPGF	VMVLP LREGN	PFQDKCI AWP
Phi29	IKKEVT--FE	NFK-VGFSRK	MKPKPVQV-	-----
Consensus	HKQLTRDL	DYKATG-	SYVILKGGG	XIG--DRAIP
	1220	1240	1260	1280
Tgo	YDAEYYIENQ	VL--PAVERI	LRAF-----	-GYR
Kod1	YDAEYYIENQ	VL--PAVERI	LRAF-----	-GYR
9 <sup>n</sup>	YDAEYYIENQ	VL--PAVERI	LKAF-----	-GYR
Pfu	YDAEYYIENQ	VL--PAVLR	LEGF-----	-GYR
Vent	YDPDYIENQ	VL--PAVLR	LEAF-----	-GYR
Mma	YDTNYYIENQ	IL--PPVIRL	MEAL-----	-GIT
Mac	IDVDYYVKKQ	IL--PPVERI	LEVF-----	-GVK
hPOLD	IDTOYLEQQ	LA--KPLLR	FEPILGEGRA	EAVLLRGDHT
ScePOLD	VDSRYLNTQ	LQ--NPIISI	VAPIIGDKQA	NGMFV---V
Pis	IDIDYYIERQ	II--PAALRI	AEVI-----	-GVK
Sso	IDAEEKYLE-A	LR--STFEQI	LRAF-----	-GVS
Pae	IDYEHYVGKQ	LQ--PVADAI	L-PFVGDDFA	TLV-----
Eco	LDYEHYLTRQ	LQ--PVAEGI	L-PFIEDNFA	TLM-----
RB69	DDVLHWMDDY	VLLEKTFIKP	LEGFTSAAKL	DY-----
T4	SDVLSWIDHS	TLFQKSFVKP	LAGMCESAGM	DY-----
Phi29	VDDTFTIK--	-----	-----	-----
Consensus	YDAEYYIENQ	VL--PAVERI	LEAF-----	-G-R
				KEDL-----

第 8 頁，共 14 頁(發明圖式)

圖 1(接續)

	1300	1320	1340	1360
Tgo	---R YQK TR QVGLGAW--L KPK-T	---	---	---
Kod1	---R YQK TR QVGLS AW--L KPKGT	---	---	---
9 <sup>n</sup>	---R YQK TK QVGLGAW--L KVKGKK	---	---	---
Pfu	---R YQK TR QVGLTSW--L NIK-KS	---	---	---
Vent	---R YQSSK QTGLD AW--L K--R	---	---	---
Mma	---K DSK-K QYTLHHF--L K--	---	---	---
Mac	---DFD-AK QKGLDFDFE VK KPEAKKQEK S	SSQKGTNGKI LEK APEEKAR YSENGRVEQR	SLFD	---
hPOLD	FCQPRESELY QKEVSHLNAL EERFSRLWTQ	CQRCQGS LHE DVICTSRDCP IF YMRKKVRK	DLEDQEQLLR RFGPPGPEAW	1107
ScePOLD	NCLARSGELY I KALYDVRDL EEKYSRLWTQ	CQRCAGNLHS EVLCSNKNCD IF YMRVKVKK	ELQEKVEQLS K	1097
Pis	---K TG RMERSLLDFL S--	---	---	---
Sso	---AA TMSIDSFYSY PSKGN S	---	---	---
Pae	---DR QMAL--	---	---	---
Eco	---TG QLGL--	---	---	---
RB69	---EK KASLFDM--	---	---	---
T4	---EE KASLDFL--	---	---	---
Phi29	---	---	---	---
Consensus	---R---TK QVGLXAW--L K	---	---	---

第 9 頁，共 14 頁(發明圖式)

圖 1(接續)



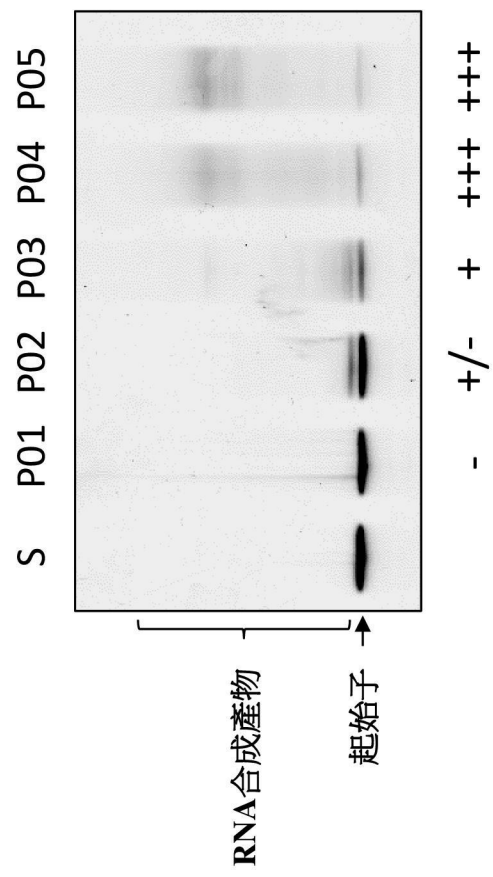


圖3A

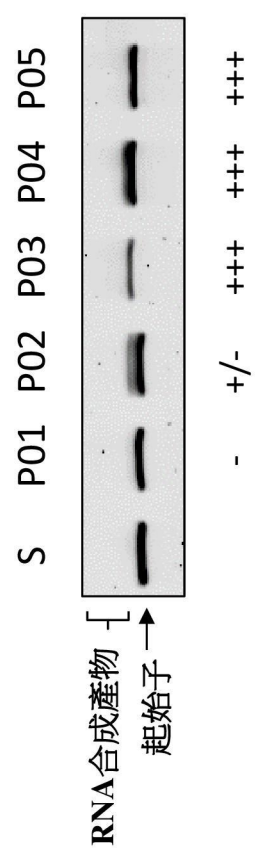


圖3B

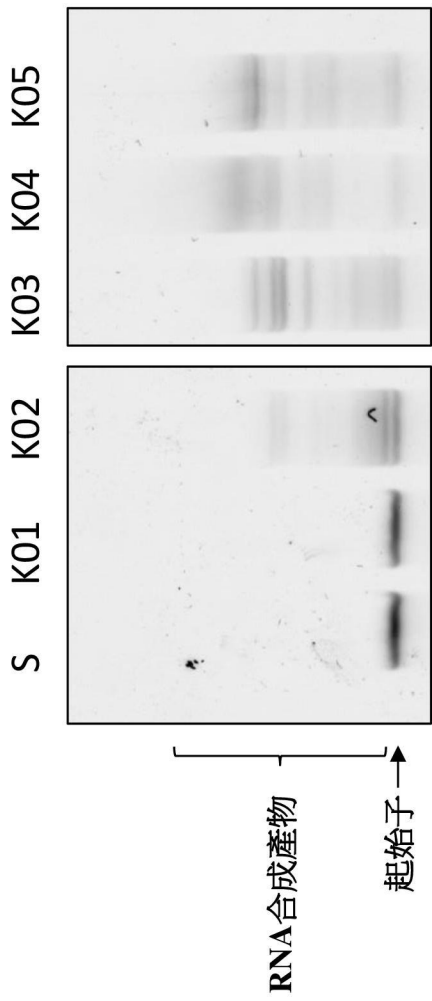


圖4A

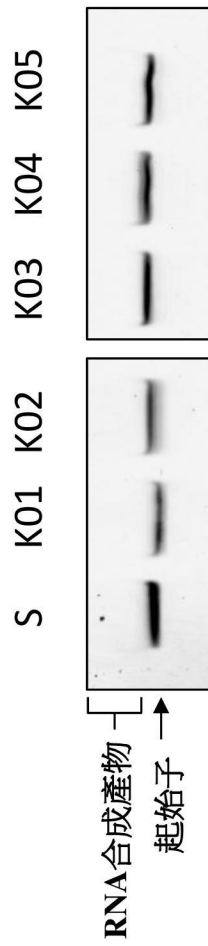


圖4B

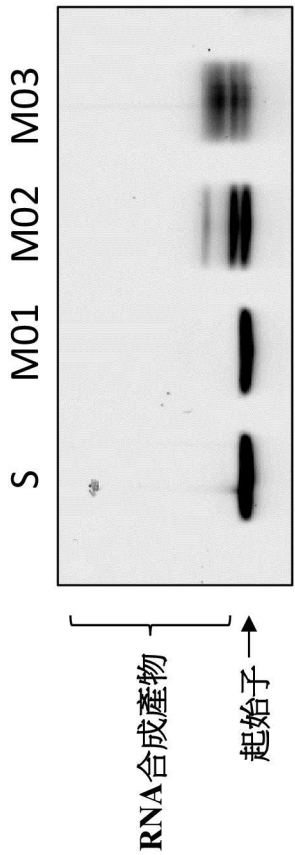


圖5A

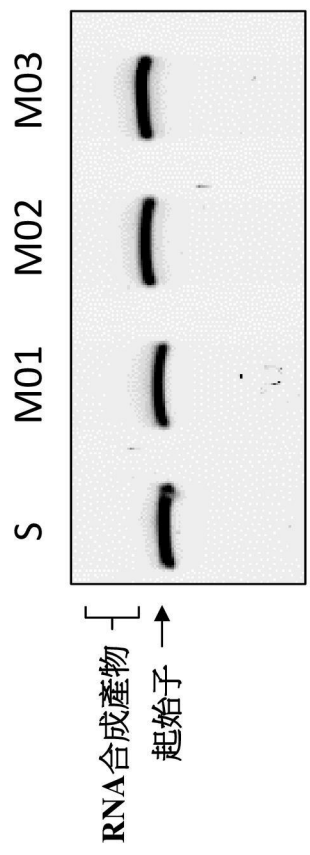


圖5B

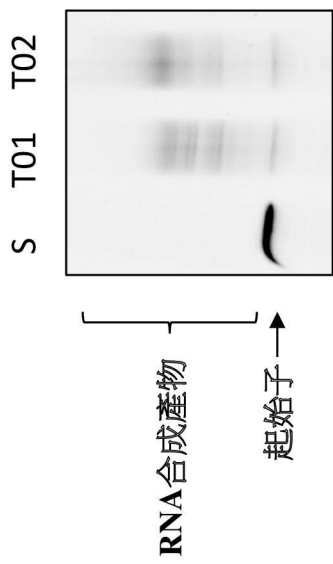


圖6A

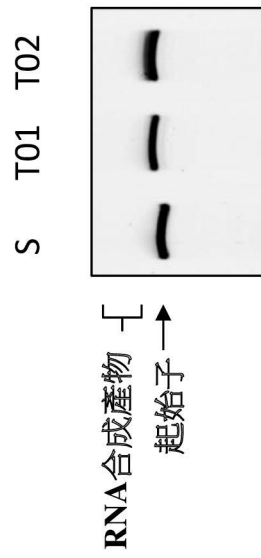


圖6B