



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110747191 A

(43)申请公布日 2020.02.04

(21)申请号 201910989110.8

C12Q 1/6806(2018.01)

(22)申请日 2019.10.17

(71)申请人 深圳清华大学研究院

地址 518000 广东省深圳市南山区科技园
高新南七道19号清华研究院

申请人 安序源生物科技(深圳)有限公司

(72)发明人 高亚平 田晖 何筠

伊戈尔·伊万诺夫

(74)专利代理机构 广州嘉权专利商标事务所有
限公司 44205

代理人 谢岳鹏

(51)Int.Cl.

C12N 9/90(2006.01)

C12N 9/12(2006.01)

C12N 15/62(2006.01)

权利要求书1页 说明书8页

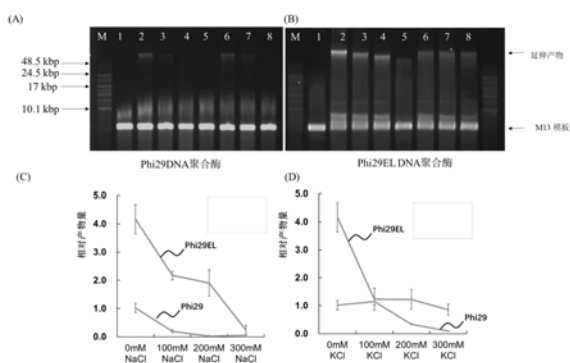
序列表11页 附图3页

(54)发明名称

多肽-嵌合聚合酶及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种多肽-嵌合聚合酶及其应用。该多肽具有如SEQ ID No.3所示的氨基酸序列。该嵌合聚合酶包括：噬菌体DNA聚合酶；上述多肽；连接噬菌体DNA聚合酶和上述多肽的连接肽。野生型的DNA聚合酶对高浓度盐的耐受性较差，在高氯化钠或氯化钾环境中，其活性急剧降低，无法得到预期的延生产物，而本发明所提供的多肽可以有效提高DNA聚合酶的耐盐性，在通过连接肽将其连接到DNA聚合酶上形成嵌合DNA聚合酶后，聚合酶的耐盐性有了很大的提升，可以适用于较高盐浓度下的扩增。



1. 一种多肽,其特征在于,具有如SEQ ID No.3所示的氨基酸序列。
2. 一种嵌合聚合酶,其特征在于,包括:
噬菌体DNA聚合酶;
权利要求1所述的多肽;
连接肽,用于连接所述噬菌体DNA聚合酶和权利要求1所述的多肽。
3. 根据权利要求2所述的嵌合聚合酶,其特征在于,所述噬菌体DNA聚合酶为Phi29 DNA聚合酶。
4. 根据权利要求3所述的嵌合聚合酶,其特征在于,所述Phi29 DNA聚合酶具有如SEQ ID No.1所示的氨基酸序列。
5. 根据权利要求2所述的嵌合聚合酶,其特征在于,所述连接肽具有如SEQ ID No.5或SEQ ID No.9所示的氨基酸序列。
6. 编码权利要求2至5任一项所述的嵌合聚合酶的核苷酸序列。
7. 一种重组载体,其特征在于,包括权利要求6所述的核苷酸序列。
8. 一种重组细胞,其特征在于,包括权利要求6所述的核苷酸序列。
9. 一种试剂盒,其特征在于,包括权利要求2至5任一项所述的嵌合聚合酶。
10. 一种对模板DNA进行复制、扩增或测序的方法,其特征在于,包括将所述模板DNA与混合物接触的步骤,所述混合物包括缓冲液、引物、核苷三磷酸和DNA聚合酶,所述DNA聚合酶为权利要求2至5任一项所述的嵌合聚合酶。

多肽、嵌合聚合酶及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及分子生物学领域,尤其是涉及一种多肽、嵌合聚合酶及其应用。

背景技术

[0002] 目前,在医学、生物学、农学以及相关的一些领域,核酸扩增正成为一种普遍的检验中间手段。而在核酸扩增的诸多方法中,聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)是用于体外DNA扩增的最常用方法。在PCR过程中,通常利用寡核苷酸引物、DNA聚合酶以及特定的模板链等通过退火延伸来生成DNA双链产物,并借由提高和降低反应混合物的温度(即,热循环)使得DNA双链产物的两条链重新分开,充当下一轮退火和延伸的模板并不断重复从而实现扩增。

[0003] 在过去的十几年间,已经开发出了不依赖于热循环的其它核酸扩增方法。这些方法因其循环过程无需依赖运行温度的变化而被称为是“等温扩增”。等温扩增作为PCR的有益补充,主要应用在微量的全基因组扩增和检测等方面。大多数的等温扩增过程中需要用到具有较强的链置换活性的DNA聚合酶,这些酶可以在复制的时候置换下游的DNA链从而不需要模板变性。Phi29 DNA聚合酶是等温扩增过程中的一种常用聚合酶,该聚合酶主要从枯草芽孢杆菌噬菌体Phi29中分离得到,具有良好的链置换能力和持续合成能力,目前已成为等温扩增的首选DNA聚合酶。但也应该看到,野生型Phi29 DNA聚合酶的两个缺陷:(1)耐盐性较差,在高氯化钠或氯化钾环境中,其活性急剧降低,难于适应在高盐体系中的应用;(2)底物DNA结合能力较差,需要提高反应体系中的酶量,来提高扩增产物。

发明内容

[0004] 本发明旨在至少解决现有技术中存在的技术问题之一。为此,本发明提出一种能够提高DNA聚合酶耐盐性的多肽、包含该多肽的嵌合聚合酶以及该嵌合聚合酶的应用。

[0005] 本发明所采取的技术方案是:

[0006] 本发明的第一方面,提供一种多肽,该多肽具有如SEQ ID No.3所示的氨基酸序列。

[0007] 本发明实施例的有益效果是:

[0008] 该多肽可以有效提高DNA聚合酶的耐盐性,在通过连接肽将其连接到DNA聚合酶上形成嵌合DNA聚合酶后,聚合酶的耐盐性有了很大的提升,可以适用于较高盐浓度下的扩增。

[0009] 本发明的第二方面,提供一种嵌合聚合酶,包括:噬菌体DNA聚合酶;上述多肽;连接噬菌体DNA聚合酶和上述多肽的连接肽。其中,上述多肽为超嗜热甲烷菌(Methanopyrus kandleri)拓扑异构酶V羧基端的E-L HhH模序,E-L HhH模序具有如SEQ ID No.3所示的氨基酸序列,或具有如SEQ ID No.4所示的核苷酸序列;

[0010] 该嵌合聚合酶相比于现有的野生型的DNA聚合酶而言,耐盐性能有了很大的提升,可以适用于较高盐浓度下的扩增。

[0011] 根据本发明的一些实施例,噬菌体DNA聚合酶为Phi29 DNA聚合酶。

[0012] 根据本发明的一些实施例,Phi29 DNA聚合酶具有如SEQ ID No.1所示的氨基酸序列或具有如SEQ ID No.2所示的核苷酸序列。

[0013] 根据本发明的一些实施例,噬菌体DNA聚合酶通过羧基端与所述连接肽相连。

[0014] 根据本发明的一些实施例,连接肽是至少2个氨基酸长的氨基酸序列,其使得嵌合聚合酶能够保持其两端功能性氨基酸序列的结构和功能。具体的连接肽序列的选择可以采用常用的柔性连接肽、刚性连接肽;或结合生物信息学技术,根据同源建模的方法计算机辅助相应的遗传算法设计相应的连接肽。

[0015] 根据本发明的一些实施例,连接肽具有如SEQ ID No.5或SEQ ID No.9所示的氨基酸序列或具有如SEQ ID No.6所示的核苷酸序列。

[0016] 本发明的第三方面,提供编码上述嵌合聚合酶的核苷酸序列。根据本发明的实施例,该核苷酸序列可以是如SEQ ID No.8所示的核苷酸序列。

[0017] 本发明的第四方面,提供一种重组载体,该重组载体包括上述的核苷酸序列。

[0018] 根据本发明的实施例,该重组载体可以是在质粒载体的多克隆位点插入上述核苷酸序列得到的重组质粒。

[0019] 根据本发明的实施例,质粒载体可以是诸如pET28a等本领域所知的质粒载体。

[0020] 根据本发明的实施例,重组载体可以是在诸如pET28a等质粒载体的Eco RI和NotI酶切识别位点插入上述核苷酸序列得到的重组质粒。

[0021] 本发明的第五方面,提供一种重组细胞,该重组细胞包括上述的核苷酸序列。

[0022] 根据本发明的实施例,该重组细胞可以是将上述重组载体导入大肠杆菌得到的重组细胞。

[0023] 根据本发明的实施例,该重组细胞可以是将上述重组载体导入大肠杆菌DH5α得到的重组细胞。

[0024] 本发明的第六方面,提供一种试剂盒,该试剂盒包括上述的嵌合聚合酶。

[0025] 根据本发明的实施例,该试剂盒可以是DNA扩增试剂盒或测序试剂盒。

[0026] 根据本发明的实施例,该试剂盒包括上述的嵌合聚合酶、缓冲液、核苷三磷酸、引物。

[0027] 本发明的第七方面,提供一种对模板DNA进行复制、扩增或测序的方法,包括将模板DNA与混合物接触的步骤,混合物包括缓冲液、引物、核苷三磷酸和上述任一种嵌合聚合酶。

[0028] 根据本发明的实施例,提供一种滚环扩增的方法,包括将模板DNA与上述嵌合聚合酶、缓冲液、引物、核苷三磷酸混合,在特定温度条件下作用一定时长。

[0029] 根据本发明的实施例,提供一种滚环扩增的方法,包括将模板DNA与上述嵌合聚合酶、缓冲液、引物、核苷三磷酸混合,在20-30℃的温度条件下反应30min-3h。

附图说明

[0030] 图1是本发明的一个实施例的突变型Phi29-e1嵌合聚合酶的构建策略图。

[0031] 图2是野生型Phi29和TopV-e1基因的质粒模板的PCR产物和回收产物结果,其中A是PCR结果,B是回收产物结果,A和B中marker右侧分别代表Phi29的质粒模板的条带和

TopV-e1的质粒模板的条带。

[0032] 图3是野生型Phi29和TopV-e1基因的质粒模板的酶切产物和酶切回收产物的结果。其中,A表示酶切产物的电泳结果,泳道2和泳道3为Phi29片段、泳道4和泳道5为TopV-e1片段;B表示酶切回收产物的电泳结果,泳道2为Phi29片段、泳道3为TopV-e1片段。

[0033] 图4是野生型Phi29 DNA聚合酶和突变型Phi29-e1嵌合聚合酶的12%SDS-PAGE电泳结果,A表示野生型Phi29 DNA聚合酶的电泳结果,B表示突变型Phi29-e1嵌合聚合酶的电泳结果。

[0034] 图5是野生型Phi29 DNA聚合酶及突变型Phi29-e1嵌合聚合酶的扩增能力检测结果。A是野生型Phi29 DNA聚合酶的电泳检测结果,B是突变型Phi29-e1嵌合聚合酶的电泳检测结果,A和B中的泳道2、泳道3、泳道4、泳道5分别代表酶和模板的浓度比例为20、10、5和2.5倍的情况。

[0035] 图6是野生型Phi29 DNA聚合酶及突变型Phi29-e1嵌合聚合酶的耐盐性能力检测结果,其中,A为野生型Phi29 DNA聚合酶的电泳结果,B为突变型Phi29-e1嵌合聚合酶的电泳结果,A和B中的泳道3-5分别为体系中添加100mM、200mM和300mM的NaCl,泳道6-8分别为体系中添加100mM、200mM和300mM的KCl;C和D分别表示A和B中的野生型Phi29 DNA聚合酶及突变型Phi29-e1嵌合聚合酶在NaCl和KCl的不同浓度条件下的相对产物量。

[0036] 图7是本发明的一个对比例的嵌合聚合酶的耐盐性能力检测结果,其中,A为电泳结果,泳道3-5分别为体系中添加100mM、200mM和300mM的NaCl,泳道6-8分别为体系中添加100mM、200mM和300mM的KCl;B为不同盐种类和不同盐浓度条件下的相对产物量。

具体实施方式

[0037] 以下将结合实施例对本发明的构思及产生的技术效果进行清楚、完整地描述,以充分地理解本发明的目的、特征和效果。显然,所描述的实施例只是本发明的一部分实施例,而不是全部实施例,基于本发明的实施例,本领域的技术人员在不付出创造性劳动的前提下所获得的其他实施例,均属于本发明保护的范围。

[0038] 实施例1

[0039] 1.实验步骤

[0040] 嵌合聚合酶的构建策略如图1所示,图1是本发明的一个实施例的突变型Phi29-e1嵌合聚合酶的构建策略图。

[0041] 1.1质粒模板扩增

[0042] 选取野生型Phi29 DNA聚合酶基因和TopV-e1基因的质粒模板,添加限制性内切酶酶切位点的引物。准备PCR反应体系,如表1:

[0043] 表1.质粒PCR反应体系

	试剂	Phi29 片段	TopV-el 片段
[0044]	2×PCR Buffer	25μL	25μL
	dNTPs (1mM)	4μL	4μL
	模板	1μL	1μL
	正向引物 (10μM)	1μL	1μL
	反向引物 (10μM)	1μL	1μL
	ExpTaq DNA 聚合酶 (10U)	0.5μL	0.5μL
	ddH ₂ O	加至总体积 50μL	加至总体积 50μL

[0045] PCR扩增的条件为95℃变性30s,循环周期为95℃,30s,54℃,30s,72℃,2min,30个循环。PCR结束后,用NEB Monarch™ PCR&DNA Cleanup Kit回收PCR。其中,DNA marker为全式金公司生产1kb plus DNA ladder (BM211-02)。Phi29片段扩增模板为质粒pGEX-6P-1-Phi29,来自于深圳清华大学研究院分子诊断及测序研发中心。TopV-el片段扩增模板为质粒pGEX-6P-1-TopVel,由上海捷瑞公司合成。ExpTaq DNA聚合酶购自湖南艾瑞克公司。

[0046] 1.2质粒模板酶切

[0047] 酶切Phi29片段和TopV-el片段。准备酶切反应体系,如表2:

[0048] 表2.酶切反应体系

	试剂	Phi29 片段	TopV-el 片段
[0049]	10×Cutsmart Buffer	5μL	5μL
	PCR 回收产物	5μL	5μL
	Kas I (10U)	0.5μL	0.5μL
	ddH ₂ O	加至总体积 50μL	加至总体积 50μL

[0050] 酶切反应条件为:37℃,16h。酶切产物用琼脂糖凝胶电泳检测,目标条带选取凝胶DNA回收试剂盒(天根,货号DP204-02)回收。Kas I购自NEB (R0544S)。

[0051] 1.3融合基因扩增

[0052] 连接Phi29片段和TopV-el片段。准备连接反应体系,如表3:

[0053] 表3.Phi29-EL连接反应体系

	试剂	用量
[0054]	Solution I	5μL
	Phi29 片段酶切回收产物	2.5μL
	TopV-el 片段酶切回收产物	2.5μL

[0055] 连接反应条件为:16℃,30min。

[0056] 选取连接产物(即Phi29和TopV-el的融合基因片段,Phi29-EL)扩增。准备PCR反应

体系,如表4:

[0057] 表4.Phi29-EL融合基因片段PCR反应体系

[0058]	试剂	用量
	2×PCR Buffer	25μL
	dNTPs (1mM)	4μL
	连接产物	1μL
	正向引物 (10μM)	1μL
	反向引物 (10μM)	1μL
	ExpTaq DNA 聚合酶 (10U)	0.5μL
	Dnase-free H ₂ O	加至总体积 50μL

[0059] PCR扩增的条件为95℃变性30s,循环周期为95℃,30s,55℃,30s,72℃,3min,30个循环。PCR结束后,用NEB Monarch™ PCR&DNA Cleanup Kit (T1030) 回收PCR产物。

[0060] 1.4重组质粒构建

[0061] 选取EcoR I和Not I对1.3中的PCR回收产物和pET28a载体进行双酶切,准备酶切反应体系,如表5:

[0062] 表5.酶切反应体系

[0063]	试剂	Phi29-EL 片段	pET28a 载体
	10×Cutsmart Buffer	5μL	5μL
	DNA	5μL	5μL
	EcoR I-HF (10U)	0.5μL	0.5μL
	Not I-HF (10U)	1μL	1μL
	Dnase-free H ₂ O	加至总体积 50μL	加至总体积 50μL

[0064] 酶切反应条件为:37℃,16h。酶切产物用琼脂糖凝胶电泳检测,目标条带选取凝胶DNA回收试剂盒回收。EcoR I (R3101) 和Not I (R3189) 购自NEB。

[0065] 连接Phi29-EL片段和pET28a片段。准备连接反应体系,如表6:

[0066] 表6.Phi29-EL与pET28a连接反应体系

[0067]	试剂	用量
	Solution I	5μL
	Phi29-EL 酶切回收产物	2.5μL
	pET28a 酶切回收产物	2.5μL

[0068] 连接反应条件为:16℃,30min。

[0069] 取连接产物转化大肠杆菌DH5 α 感受态细胞,挑取阳性克隆。选用Wolact®Plasmid DNA Purification Kit(质粒提取试剂盒)提取质粒,进行测序,获得序列正确的突变型Phi29 DNA聚合酶质粒pET28a-Phi29el。

[0070] 1.5蛋白表达纯化

[0071] 取质粒pGEX6P-1-Phi29和pET28a-Phi29el,转化大肠杆菌表达菌株Rosette (Transgene),表达野生型Phi29 DNA聚合酶和Phi29-EL DNA嵌合聚合酶。蛋白诱导表达选择Overnight Express Autoinduction system(Millipore)。诱导条件为30℃,16h。

[0072] 蛋白纯化步骤包括:

[0073] ①收集菌体,超声破碎细胞。功率50-100W,超声5-15s,间隔10-30s。共持续20-40min。

[0074] ②离心去除细胞碎片,取上清。分别采用采用Glutathione Sepharose 4B和Ni Sepharose亲和层析柱纯化步骤裂解粗产物。

[0075] ③用12%SDS-PAGE检测蛋白纯度和浓度。

[0076] 2.实验结果

[0077] 2.1质粒模板扩增

[0078] 图2是野生型Phi29和TopV-el基因的质粒模板的PCR产物和回收产物结果,其中A是PCR结果,B是回收产物结果,A和B中marker右侧分别代表Phi29的质粒模板的条带和TopV-el的质粒模板的条带。从图中可以看出,该次PCR已扩增出目的条带。

[0079] 2.2质粒模板酶切

[0080] 图3是野生型Phi29和TopV-el基因的质粒模板的酶切产物和酶切回收产物的结果。其中,A表示酶切产物的电泳结果,泳道2和泳道3为Phi29片段、泳道4和泳道5为TopV-el片段;B表示酶切回收产物的电泳结果,泳道2为Phi29片段、泳道3为TopV-el片段。A中泳道2和泳道3、B中泳道2表示的Phi29片段约为1.7kb;A中泳道4和泳道5、B中泳道3表示的TopV-el片段约为1.4kb。

[0081] 2.3蛋白质检测

[0082] 图4是野生型Phi29 DNA聚合酶和突变型Phi29-el嵌合聚合酶的12%SDS-PAGE电泳结果,A表示野生型Phi29 DNA聚合酶的电泳结果,B表示突变型Phi29-el嵌合聚合酶的电泳结果。其中,A中泳道1和泳道2为野生型Phi29 DNA聚合酶,分子量为67.0kD;B中泳道1、泳道2和泳道3为BSA,泳道4和泳道5为突变型Phi29-el嵌合聚合酶,分子量为116.6kD。

[0083] 上述结果表明,突变型Phi29-el嵌合聚合酶构建成功。

[0084] 本实施例中,野生型Phi29 DNA聚合酶的氨基酸序列如SEQ ID No.1所示;

[0085] 野生型Phi29 DNA聚合酶的核苷酸序列如SEQ ID No.2所示;

[0086] TopoV-EL(嗜热甲烷菌(Methanopyrus kandleri)拓扑异构酶V羧基端的E-L HhH模序)的氨基酸序列如SEQ ID No.3所示;

[0087] TopoV-EL(嗜热甲烷菌(Methanopyrus kandleri)拓扑异构酶V羧基端的E-L HhH模序)的核苷酸序列如SEQ ID No.4所示;

[0088] 连接肽的氨基酸序列如SEQ ID No.5(GTGSGA)所示;

[0089] 连接肽的核苷酸序列如SEQ ID No.6(GGTACCGGCTCTGGCGCC)所示;

[0090] 突变型Phi29-el嵌合聚合酶的氨基酸序列如SEQ ID No.7所示;

[0091] 突变型Phi29-e1嵌合聚合酶的核苷酸序列如SEQ ID No.8所示。

[0092] 实施例2

[0093] 扩增能力检测

[0094] 将单链M13mp18 (7249bp) 和引物 (5'-CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3') 退火生成模板引物复合物,以相同浓度的野生型Phi29 DNA聚合酶及突变型Phi29-e1嵌合聚合酶催化延伸反应。调整酶和模板的浓度比例为20、10、5和2.5倍。

[0095] 其中,引物退火反应体系包括:10pM单链M13mp18和100pM引物,1×退火缓冲液。10×退火缓冲液包括:100mM Tris-HCl (pH 7.5)、10mM EDTA、1M NaCl。退火反应条件为:95℃,5min;25℃,3h。

[0096] 延伸反应体系包括10nM M13mp18、不同浓度的野生型Phi29 DNA聚合酶及突变型Phi29-e1嵌合聚合酶、反应缓冲液 (50mM的Tris-HCl、10mM的MgCl₂、10mM的(NH₄)₂SO₄、4mM的DTT及200μM的dNTPs,25℃时pH为7.5)。反应条件是30℃,30min。0.5M EDTA终止反应后,采用碱性琼脂糖凝胶电泳检测延伸产物。电泳条件为100V/3h,电泳结束后采用SYBR Gold染料染色。10×碱性琼脂糖电泳缓冲液包括:500mmol/L NaOH、10mmol/L EDTA)。6×碱性凝胶载样缓冲液 (Leagene,NA0067)。

[0097] 图5是野生型Phi29 DNA聚合酶及突变型Phi29-e1嵌合聚合酶的扩增能力检测结果。A是野生型Phi29 DNA聚合酶的电泳检测结果,B是突变型Phi29-e1嵌合聚合酶的电泳检测结果,A和B中的泳道2、泳道3、泳道4、泳道5分别代表酶和模板的浓度比例为20、10、5和2.5倍的情况。从图5中可以看出,野生型Phi29 DNA聚合酶和突变型Phi29 DNA聚合酶均具有滚环复制能力,能够催化生成大于50kb的单链DNA。而在相同的酶浓度条件下,突变型Phi29-e1嵌合聚合酶能够更多的反应产物;而且,突变型Phi29-e1嵌合聚合酶在低模板浓度的扩增能力显著高于野生型Phi29 DNA聚合酶。

[0098] 实施例3

[0099] 耐盐性检测

[0100] 采用与实施例2类似的滚环复制实验,同样以单链M13作为模板,反应体系的区别仅在于在延伸反应体系中分别添加100mM、200mM和300mM的NaCl以及100mM、200mM和300mM的KCl。结果如图6所示。图6是野生型Phi29 DNA聚合酶及突变型Phi29-e1嵌合聚合酶的耐盐能力检测结果,其中,A为野生型Phi29 DNA聚合酶的电泳结果,B为突变型Phi29-e1嵌合聚合酶的电泳结果,A和B中的泳道3-5分别为体系中添加了100mM、200mM和300mM的NaCl,泳道6-8分别为体系中添加了100mM、200mM和300mM的KCl;C和D分别表示A和B中的野生型Phi29 DNA聚合酶及突变型Phi29-e1嵌合聚合酶在NaCl和KCl的不同浓度条件下的相对产物量。从图中可以看出,A中泳道3-8未发现有明显的延伸产物的条带,而B中泳道3、泳道4、泳道6-8则可以看到有较为明显的延伸产物的条带;比较C和D,在不同的高盐浓度条件下,突变型Phi29-e1嵌合聚合酶扩增产物量均明显高于野生型Phi29 DNA聚合酶。该结果表明,野生型的Phi29 DNA聚合酶对高浓度盐的耐受性较差,在高氯化钠或氯化钾环境中,其活性急剧降低,无法得到预期的延生产物,而突变型Phi29-e1嵌合聚合酶的耐盐性则得到了显著的提高,能够分别耐受200mM的NaCl和300mM的KCl,在上述高盐体系中可以正常使用。

[0101] 实施例4

[0102] 不同模序的比较

[0103] 对比例1

[0104] 一种嵌合聚合酶,采用实施例1中的方法将野生型Phi29 DNA聚合酶与超嗜热甲烷菌(Methanopyrus kandleri)拓扑异构酶V羧基端的H模序通过氨基酸序列如SEQ ID No.5所示的连接肽连接。

[0105] 将对比例1中的嵌合聚合酶采用实施例3中提供的方法测试其耐盐性结果如图7所示。图7是本发明的一个对比例的嵌合聚合酶的耐盐性能力检测结果,其中,A为电泳结果,泳道3-5分别为体系中添加100mM、200mM和300mM的NaCl,泳道6-8分别为体系中添加100mM、200mM和300mM的KCl;B为不同盐种类和不同盐浓度条件下的相对产物量。从图7中可以看到,泳道3-8未发现明显的延伸产物的条带,该嵌合聚合酶在高盐浓度条件下扩增产物的量下降异常明显,结合图6进行比较可以发现,其在100mM、200mM和300mM的NaCl或KCl溶液中扩增产物的相对量已经接近于野生型的Phi29 DNA聚合酶的水平,与突变型Phi29-el嵌合聚合酶的扩增水平相差较大。

[0106] 实施例5

[0107] 一种嵌合聚合酶Phi29-el,与实施例1的区别在于,所述采用的连接肽不同,本实施例中采用的连接肽的氨基酸序列如SEQ ID No.9 (AYVDGA)所示。采用实施例1中的方法构建嵌合聚合酶Phi29-el,连接Phi29片段和TopV-el片段,连接产物转化大肠杆菌DH5 α 感受态细胞,对阳性克隆中提取得到质粒进行测序,获得序列正确的突变型Phi29 DNA聚合酶质粒pET28a-Phi29el。转化大肠杆菌表达菌株Rosette (Transgene)表达Phi29-el DNA嵌合聚合酶。提纯后采用实施例3中的方法对野生型Phi29 DNA聚合酶和突变型Phi29-el DNA嵌合聚合酶的耐盐性检测,结果表明,野生型的Phi29 DNA聚合酶对高浓度盐的耐受性较差,在高氯化钠或氯化钾环境中,其活性急剧降低,无法得到预期的延生产物,而突变型Phi29-el嵌合聚合酶的耐盐性则得到了显著的提高,在高盐体系中仍然可以正常使用。

[0108] 上面结合附图对本发明实施例作了详细说明,但是本发明不限于上述实施例,在所述技术领域普通技术人员所具备的知识范围内,还可以在不脱离本发明宗旨的前提下作出各种变化。

SEQUENCE LISTING

<110> 深圳清华大学研究院

安序源生物科技(深圳)有限公司

<120> 多肽、嵌合聚合酶及其应用

<160> 9

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 575

<212> PRT

<213> 噬菌体Phi29

<400> 1

```

Met Lys His Met Pro Arg Lys Met Tyr Ser Cys Asp Phe Glu Thr Thr
1           5           10           15
Thr Lys Val Glu Asp Cys Arg Val Trp Ala Tyr Gly Tyr Met Asn Ile
          20           25           30
Glu Asp His Ser Glu Tyr Lys Ile Gly Asn Ser Leu Asp Glu Phe Met
          35           40           45
Ala Trp Val Leu Lys Val Gln Ala Asp Leu Tyr Phe His Asn Leu Lys
          50           55           60
Phe Asp Gly Ala Phe Ile Ile Asn Trp Leu Glu Arg Asn Gly Phe Lys
65           70           75           80
Trp Ser Ala Asp Gly Leu Pro Asn Thr Tyr Asn Thr Ile Ile Ser Arg
          85           90           95
Met Gly Gln Trp Tyr Met Ile Asp Ile Cys Leu Gly Tyr Lys Gly Lys
          100          105          110
Arg Lys Ile His Thr Val Ile Tyr Asp Ser Leu Lys Lys Leu Pro Phe
          115          120          125
Pro Val Lys Lys Ile Ala Lys Asp Phe Lys Leu Thr Val Leu Lys Gly
          130          135          140
Asp Ile Asp Tyr His Lys Glu Arg Pro Val Gly Tyr Lys Ile Thr Pro
145          150          155          160
Glu Glu Tyr Ala Tyr Ile Lys Asn Asp Ile Gln Ile Ile Ala Glu Ala
          165          170          175
Leu Leu Ile Gln Phe Lys Gln Gly Leu Asp Arg Met Thr Ala Gly Ser
          180          185          190
Asp Ser Leu Lys Gly Phe Lys Asp Ile Ile Thr Thr Lys Lys Phe Lys
          195          200          205
Lys Val Phe Pro Thr Leu Ser Leu Gly Leu Asp Lys Glu Val Arg Tyr

```

210	215	220
Ala Tyr Arg Gly Gly Phe Thr Trp Leu Asn Asp Arg Phe Lys Glu Lys		
225	230	235
Glu Ile Gly Glu Gly Met Val Phe Asp Val Asn Ser Leu Tyr Pro Ala		240
	245	250
Gln Met Tyr Ser Arg Leu Leu Pro Tyr Gly Glu Pro Ile Val Phe Glu		255
	260	265
Gly Lys Tyr Val Trp Asp Glu Asp Tyr Pro Leu His Ile Gln His Ile		270
	275	280
Arg Cys Glu Phe Glu Leu Lys Glu Gly Tyr Ile Pro Thr Ile Gln Ile		285
290	295	300
Lys Arg Ser Arg Phe Tyr Lys Gly Asn Glu Tyr Leu Lys Ser Ser Gly		
305	310	315
Gly Glu Ile Ala Asp Leu Trp Leu Ser Asn Val Asp Leu Glu Leu Met		320
	325	330
Lys Glu His Tyr Asp Leu Tyr Asn Val Glu Tyr Ile Ser Gly Leu Lys		335
	340	345
Phe Lys Ala Thr Thr Gly Leu Phe Lys Asp Phe Ile Asp Lys Trp Thr		350
	355	360
Tyr Ile Lys Thr Thr Ser Glu Gly Ala Ile Lys Gln Leu Ala Lys Leu		365
370	375	380
Met Leu Asn Ser Leu Tyr Gly Lys Phe Ala Ser Asn Pro Asp Val Thr		
385	390	395
Gly Lys Val Pro Tyr Leu Lys Glu Asn Gly Ala Leu Gly Phe Arg Leu		400
	405	410
Gly Glu Glu Glu Thr Lys Asp Pro Val Tyr Thr Pro Met Gly Val Phe		415
	420	425
Ile Thr Ala Trp Ala Arg Tyr Thr Thr Ile Thr Ala Ala Gln Ala Cys		430
	435	440
Tyr Asp Arg Ile Ile Tyr Cys Asp Thr Asp Ser Ile His Leu Thr Gly		445
450	455	460
Thr Glu Ile Pro Asp Val Ile Lys Asp Ile Val Asp Pro Lys Lys Leu		
465	470	475
Gly Tyr Trp Ala His Glu Ser Thr Phe Lys Arg Ala Lys Tyr Leu Arg		480
	485	490
Gln Lys Thr Tyr Ile Gln Asp Ile Tyr Met Lys Glu Val Asp Gly Lys		495
	500	505
Leu Val Glu Gly Ser Pro Asp Asp Tyr Thr Asp Ile Lys Phe Ser Val		510
515	520	525

Lys Cys Ala Gly Met Thr Asp Lys Ile Lys Lys Glu Val Thr Phe Glu
 530 535 540
 Asn Phe Lys Val Gly Phe Ser Arg Lys Met Lys Pro Lys Pro Val Gln
 545 550 555 560
 Val Pro Gly Gly Val Val Leu Val Asp Asp Thr Phe Thr Ile Lys
 565 570 575

<210> 2

<211> 1728

<212> DNA

<213> 噬菌体Phi29

<400> 2

atgaaacaca tgccgagaaa gatgtatagt tgtgactttg agacaactac taaagtggaa 60
 gactgtaggg tatgggcgta tggttatatg aatatagaag atcacagtga gtacaaaata 120
 ggtaatagcc tggatgagtt tatggcgtgg gtgttgaagg tacaagctga tctatatttc 180
 cataacctca aatttgacgg agctttttatc attaactggg tggaacgtaa tggttttaag 240
 tggtcggctg acggattgcc aaacacatat aatacgatca tatctcgcat gggacaatgg 300
 tacatgattg atatatgttt aggctacaaa gggaaacgta agatacatac agtgatatat 360
 gacagcttaa agaaactacc gtttcctgtt aagaagatag ctaaagactt taaactaact 420
 gttctttaaag gtgatattga ttaccacaaa gaaagaccag tcggctataa gataacaccc 480
 gaagaatacg cctatatataa aaacgatatt cagattattg cggaagctct gttaattcag 540
 tttaagcaag gtttagaccg gatgacagca ggcagtgaca gtctaaaagg tttcaaggat 600
 attataacca ctaagaaatt caaaaagggtg tttcctacat tgagtcttgg actcgataag 660
 gaagtgagat acgcctatag aggtgggtttt acatggttaa atgatagggt caaagaaaaa 720
 gaaatcggag aaggcatggt cttcgatgtt aatagtctat atcctgcaca gatgtatagc 780
 cgtctccttc catatgggtga acctatagta ttcgagggtg aatacgtttg ggacgaagat 840
 taccactac acatacagca tatcagatgt gagttcgaat tgaaagaggg ctatataccc 900
 actatacaga taaaaagaag taggttttat aaaggtaatg agtacctaaa aagtagcggc 960
 ggggagatag cgcacctctg gttgtcaa atgtacac tagacac tagacac tagacac 1020
 gatttatata acgttgaata tatcagcggc ttaaaattta aagcaactac aggtttgttt 1080
 aaagatttta tagataaatg gacgtacatc aagacgacat cagaaggagc gatcaagcaa 1140
 ctagcaaaac tgatgttaaa cagtctatac ggtaaattcg ctagtaacct tgatgttaca 1200
 gggaaagtcc cttatttaaa agagaatggg gcgctagggt tcgacttgg agaagaggaa 1260
 acaaaagacc ctgtttatac acctatgggc gttttcatca ctgcatgggc tagatacacg 1320
 acaattacag cggcacaggc ttgttatgat cggataatat actgtgatac tgacagcata 1380
 catttaacgg gtacagagat acctgatgta ataaaagata tagttgacct taagaaattg 1440
 ggatactggg cacatgaaag tacattcaaa agagctaaat atctgagaca gaagacctat 1500
 atacaagaca tctatatgaa agaagtagat ggtaagttag tagaaggtag tccagatgat 1560
 tacactgata taaaatttag tgttaaatgt gcgggaatga ctgacaagat taagaaagag 1620
 gttacgtttg agaatttcaa agtcggattc agtcggaaaa tgaagcctaa gcctgtgcaa 1680

gtgccgggcg ggggtggttct ggttgatgac acattcaciaa tcaaataa 1728

<210> 3

<211> 447

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 3

Leu	Lys	Thr	Leu	Glu	Ser	Ile	Val	Gly	Asp	Leu	Glu	Lys	Ala	Asp	Glu
1				5				10					15		
Leu	Lys	Arg	Lys	Tyr	Gly	Ser	Ala	Ser	Ala	Val	Arg	Arg	Leu	Pro	Val
			20					25					30		
Glu	Glu	Leu	Arg	Glu	Leu	Gly	Phe	Ser	Asp	Asp	Glu	Ile	Ala	Glu	Ile
			35				40						45		
Lys	Gly	Ile	Pro	Lys	Lys	Leu	Arg	Glu	Ala	Phe	Asp	Leu	Glu	Thr	Ala
	50					55					60				
Ala	Glu	Leu	Tyr	Glu	Arg	Tyr	Gly	Ser	Leu	Lys	Glu	Ile	Gly	Arg	Arg
65					70					75					80
Leu	Ser	Tyr	Asp	Asp	Leu	Leu	Glu	Leu	Gly	Ala	Thr	Pro	Lys	Ala	Ala
				85					90					95	
Ala	Glu	Ile	Lys	Gly	Pro	Glu	Phe	Lys	Phe	Leu	Leu	Asn	Ile	Glu	Gly
			100						105					110	
Val	Gly	Pro	Lys	Leu	Ala	Glu	Arg	Ile	Leu	Glu	Ala	Val	Asp	Tyr	Asp
			115					120						125	
Leu	Glu	Arg	Leu	Ala	Ser	Leu	Asn	Pro	Glu	Glu	Leu	Ala	Glu	Lys	Val
			130				135						140		
Glu	Gly	Leu	Gly	Glu	Glu	Leu	Ala	Glu	Arg	Val	Val	Tyr	Ala	Ala	Arg
145					150					155					160
Glu	Arg	Val	Glu	Ser	Arg	Arg	Lys	Ser	Gly	Arg	Gln	Glu	Arg	Ser	Glu
				165					170					175	
Glu	Glu	Trp	Lys	Glu	Trp	Leu	Glu	Arg	Lys	Val	Gly	Glu	Gly	Arg	Ala
			180					185						190	
Arg	Arg	Leu	Ile	Glu	Tyr	Phe	Gly	Ser	Ala	Gly	Glu	Val	Gly	Lys	Leu
			195					200						205	
Val	Glu	Asn	Ala	Glu	Val	Ser	Lys	Leu	Leu	Glu	Val	Pro	Gly	Ile	Gly
			210				215							220	
Asp	Glu	Ala	Val	Ala	Arg	Leu	Val	Pro	Gly	Tyr	Lys	Thr	Leu	Arg	Asp
225					230					235					240
Ala	Gly	Leu	Thr	Pro	Ala	Glu	Ala	Glu	Arg	Val	Leu	Lys	Arg	Tyr	Gly
				245					250					255	
Ser	Val	Ser	Lys	Val	Gln	Glu	Gly	Ala	Thr	Pro	Asp	Glu	Leu	Arg	Glu

260	265	270
Leu Gly Leu Gly Asp Ala Lys Ile	Ala Arg Ile Leu Gly Leu Arg Ser	
275	280	285
Leu Val Asn Lys Arg Leu Asp Val Asp Thr Ala Tyr Glu Leu Lys Arg		
290	295	300
Arg Tyr Gly Ser Val Ser Ala Val Arg Lys Ala Pro Val Lys Glu Leu		
305	310	315
Arg Glu Leu Gly Leu Ser Asp Arg Lys Ile Ala Arg Ile Lys Gly Ile		
325	330	335
Pro Glu Thr Met Leu Gln Val Arg Gly Met Ser Val Glu Lys Ala Glu		
340	345	350
Arg Leu Leu Glu Arg Phe Asp Thr Trp Thr Lys Val Lys Glu Ala Pro		
355	360	365
Val Ser Glu Leu Val Arg Val Pro Gly Val Gly Leu Ser Leu Val Lys		
370	375	380
Glu Ile Lys Ala Gln Val Asp Pro Ala Trp Lys Ala Leu Leu Asp Val		
385	390	395
Lys Gly Val Ser Pro Glu Leu Ala Asp Arg Leu Val Glu Glu Leu Gly		
405	410	415
Ser Pro Tyr Arg Val Leu Thr Ala Lys Lys Ser Asp Leu Met Arg Val		
420	425	430
Glu Arg Val Gly Pro Lys Leu Ala Glu Arg Ile Arg Ala Ala Gly		
435	440	445

<210> 4

<211> 1341

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 4

ctgaagaccc tggagagcat agtaggggat ctggagaagg ccgacgagct gaagcggaag 60
tacggatccg cgtccgcggt tcgacgtctg cccgtagagg agctacgca actcggttc 120
tccgacgatg agatcgccga gatcaagggg atacctaaga agctccggga ggccttcgac 180
cttgagaccg ccgcggaact ctacgagcgg tacggttcgc tgaaagagat cggtcgccga 240
ctctcttacg acgatctact cgagctcggg gcgactccga aggccgcggc cgagatcaag 300
gggcccggagt tcaagttcct cctgaacatc gaaggggtcg gaccgaaact cgctgagcgg 360
atactcgagg ccgtggatta tgacctcgag cgactggctt ccctgaatcc cgaggaactt 420
gcggagaagg tggaaggact gggcgaagag ctgcgcggagc gcgtcgtgta cgctgctagg 480
gagcgcgtag aaagtgcgag gaagtccggc cgccaggagc ggtcggagga agaatggaag 540
gagtggctcg agcgtaaggt cggcgagggg agggctcgcc gggttgattga gtatttcggc 600
tccgcgggtg aagtaggaaa gctggtcgag aacgccgagg tgtcgaagct actggaggtc 660

ccgggtatag gcgacgaggc cgtcgctagg ctcgtaccgg gctacaagac cctacgagac 720
 gccgggtctca cgccggccga agcggagcgc gtgctgaaac ggtacggctc ggtctccaaa 780
 gtgcaggaag gagccactcc ggacgagtta cgcgagctcg gcctcggcga cgccaagatc 840
 gcgaggatcc tgggcctgcg cagcctggtg aacaagaggc tggacgtgga caccgcgtac 900
 gagctcaagc gtagatacgg ttccgtctcc gccgtccgga aggccccggt gaaagaactg 960
 cgcgagctcg gcctctccga tcggaagatc gcacgtatca agggcatccc ggagacgatg 1020
 cttcaggtcc gagggatgag cgtggagaaa gcggagcggc tgctggagcg tttcgatacc 1080
 tggaccaagg tgaaggaagc tcccgtctcg gagctggtga ggtcccggg tgtcggattg 1140
 agtttggtga aggagatcaa ggctcaggtg gatccggcct ggaaggcact tctggatgtc 1200
 aaaggggtca gtccggagct ggccgaccgg ctcgtcgagg agctcggcag cccgtatcgg 1260
 gtgctgacgg ccaagaaatc cgacctgatg agagtcgaga gagtcggacc gaagctcgcc 1320
 gagcgaatcc gggccgcggg c 1341

<210> 5

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 5

Gly Thr Gly Ser Gly Ala

1 5

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 6

ggtaccggct ctggcgcc 18

<210> 7

<211> 1025

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 7

Met Pro Arg Lys Met Tyr Ser Cys Asp Phe Glu Thr Thr Thr Lys Val

1 5 10 15

Glu Asp Cys Arg Val Trp Ala Tyr Gly Tyr Met Asn Ile Glu Asp His

20 25 30

Ser Glu Tyr Lys Ile Gly Asn Ser Leu Asp Glu Phe Met Ala Trp Val

35 40 45

Leu Lys Val Gln Ala Asp Leu Tyr Phe His Asn Leu Lys Phe Asp Gly

50 55 60

Ala Phe Ile Ile Asn Trp Leu Glu Arg Asn Gly Phe Lys Trp Ser Ala

65	70	75	80
Asp Gly Leu Pro Asn Thr Tyr Asn Thr Ile Ile Ser Arg Met Gly Gln			
	85	90	95
Trp Tyr Met Ile Asp Ile Cys Leu Gly Tyr Lys Gly Lys Arg Lys Ile			
	100	105	110
His Thr Val Ile Tyr Asp Ser Leu Lys Lys Leu Pro Phe Pro Val Lys			
	115	120	125
Lys Ile Ala Lys Asp Phe Lys Leu Thr Val Leu Lys Gly Asp Ile Asp			
	130	135	140
Tyr His Lys Glu Arg Pro Val Gly Tyr Lys Ile Thr Pro Glu Glu Tyr			
145	150	155	160
Ala Tyr Ile Lys Asn Asp Ile Gln Ile Ile Ala Glu Ala Leu Leu Ile			
	165	170	175
Gln Phe Lys Gln Gly Leu Asp Arg Met Thr Ala Gly Ser Asp Ser Leu			
	180	185	190
Lys Gly Phe Lys Asp Ile Ile Thr Thr Lys Lys Phe Lys Lys Val Phe			
	195	200	205
Pro Thr Leu Ser Leu Gly Leu Asp Lys Glu Val Arg Tyr Ala Tyr Arg			
	210	215	220
Gly Gly Phe Thr Trp Leu Asn Asp Arg Phe Lys Glu Lys Glu Ile Gly			
225	230	235	240
Glu Gly Met Val Phe Asp Val Asn Ser Leu Tyr Pro Ala Gln Met Tyr			
	245	250	255
Ser Arg Leu Leu Pro Tyr Gly Glu Pro Ile Val Phe Glu Gly Lys Tyr			
	260	265	270
Val Trp Asp Glu Asp Tyr Pro Leu His Ile Gln His Ile Arg Cys Glu			
	275	280	285
Phe Glu Leu Lys Glu Gly Tyr Ile Pro Thr Ile Gln Ile Lys Arg Ser			
	290	295	300
Arg Phe Tyr Lys Gly Asn Glu Tyr Leu Lys Ser Ser Gly Gly Glu Ile			
305	310	315	320
Ala Asp Leu Trp Leu Ser Asn Val Asp Leu Glu Leu Met Lys Glu His			
	325	330	335
Tyr Asp Leu Tyr Asn Val Glu Tyr Ile Ser Gly Leu Lys Phe Lys Ala			
	340	345	350
Thr Thr Gly Leu Phe Lys Asp Phe Ile Asp Lys Trp Thr Tyr Ile Lys			
	355	360	365
Thr Thr Ser Glu Gly Ala Ile Lys Gln Leu Ala Lys Leu Met Leu Asn			
	370	375	380

Ser	Leu	Tyr	Gly	Lys	Phe	Ala	Ser	Asn	Pro	Asp	Val	Thr	Gly	Lys	Val
385						390				395					400
Pro	Tyr	Leu	Lys	Glu	Asn	Gly	Ala	Leu	Gly	Phe	Arg	Leu	Gly	Glu	Glu
				405					410					415	
Glu	Thr	Lys	Asp	Pro	Val	Tyr	Thr	Pro	Met	Gly	Val	Phe	Ile	Thr	Ala
			420					425					430		
Trp	Ala	Arg	Tyr	Thr	Thr	Ile	Thr	Ala	Ala	Gln	Ala	Cys	Tyr	Asp	Arg
	435					440						445			
Ile	Ile	Tyr	Cys	Asp	Thr	Asp	Ser	Ile	His	Leu	Thr	Gly	Thr	Glu	Ile
450						455					460				
Pro	Asp	Val	Ile	Lys	Asp	Ile	Val	Asp	Pro	Lys	Lys	Leu	Gly	Tyr	Trp
465				470						475					480
Ala	His	Glu	Ser	Thr	Phe	Lys	Arg	Ala	Lys	Tyr	Leu	Arg	Gln	Lys	Thr
				485				490						495	
Tyr	Ile	Gln	Asp	Ile	Tyr	Met	Lys	Glu	Val	Asp	Gly	Lys	Leu	Val	Glu
			500					505					510		
Gly	Ser	Pro	Asp	Asp	Tyr	Thr	Asp	Ile	Lys	Phe	Ser	Val	Lys	Cys	Ala
			515					520					525		
Gly	Met	Thr	Asp	Lys	Ile	Lys	Lys	Glu	Val	Thr	Phe	Glu	Asn	Phe	Lys
	530					535						540			
Val	Gly	Phe	Ser	Arg	Lys	Met	Lys	Pro	Lys	Pro	Val	Gln	Val	Pro	Gly
545					550					555					560
Gly	Val	Val	Leu	Val	Asp	Asp	Thr	Phe	Thr	Ile	Lys	Gly	Thr	Gly	Ser
				565				570						575	
Gly	Ala	Leu	Lys	Thr	Leu	Glu	Ser	Ile	Val	Gly	Asp	Leu	Glu	Lys	Ala
			580					585					590		
Asp	Glu	Leu	Lys	Arg	Lys	Tyr	Gly	Ser	Ala	Ser	Ala	Val	Arg	Arg	Leu
	595					600						605			
Pro	Val	Glu	Glu	Leu	Arg	Glu	Leu	Gly	Phe	Ser	Asp	Asp	Glu	Ile	Ala
	610					615						620			
Glu	Ile	Lys	Gly	Ile	Pro	Lys	Lys	Leu	Arg	Glu	Ala	Phe	Asp	Leu	Glu
625				630						635					640
Thr	Ala	Ala	Glu	Leu	Tyr	Glu	Arg	Tyr	Gly	Ser	Leu	Lys	Glu	Ile	Gly
				645				650					655		
Arg	Arg	Leu	Ser	Tyr	Asp	Asp	Leu	Leu	Glu	Leu	Gly	Ala	Thr	Pro	Lys
			660					665					670		
Ala	Ala	Ala	Glu	Ile	Lys	Gly	Pro	Glu	Phe	Lys	Phe	Leu	Leu	Asn	Ile
	675					680						685			
Glu	Gly	Val	Gly	Pro	Lys	Leu	Ala	Glu	Arg	Ile	Leu	Glu	Ala	Val	Asp

690	695	700
Tyr Asp Leu Glu Arg Leu Ala Ser Leu Asn Pro Glu Glu Leu Ala Glu		
705	710	715
Lys Val Glu Gly Leu Gly Glu Glu Leu Ala Glu Arg Val Val Tyr Ala		720
	725	730
Ala Arg Glu Arg Val Glu Ser Arg Arg Lys Ser Gly Arg Gln Glu Arg		735
	740	745
Ser Glu Glu Glu Trp Lys Glu Trp Leu Glu Arg Lys Val Gly Glu Gly		750
	755	760
Arg Ala Arg Arg Leu Ile Glu Tyr Phe Gly Ser Ala Gly Glu Val Gly		765
	770	780
Lys Leu Val Glu Asn Ala Glu Val Ser Lys Leu Leu Glu Val Pro Gly		
785	790	795
Ile Gly Asp Glu Ala Val Ala Arg Leu Val Pro Gly Tyr Lys Thr Leu		800
	805	810
Arg Asp Ala Gly Leu Thr Pro Ala Glu Ala Glu Arg Val Leu Lys Arg		815
	820	825
Tyr Gly Ser Val Ser Lys Val Gln Glu Gly Ala Thr Pro Asp Glu Leu		830
	835	840
Arg Glu Leu Gly Leu Gly Asp Ala Lys Ile Ala Arg Ile Leu Gly Leu		845
	850	855
Arg Ser Leu Val Asn Lys Arg Leu Asp Val Asp Thr Ala Tyr Glu Leu		860
865	870	875
Lys Arg Arg Tyr Gly Ser Val Ser Ala Val Arg Lys Ala Pro Val Lys		880
	885	890
Glu Leu Arg Glu Leu Gly Leu Ser Asp Arg Lys Ile Ala Arg Ile Lys		895
	900	905
Gly Ile Pro Glu Thr Met Leu Gln Val Arg Gly Met Ser Val Glu Lys		910
	915	920
Ala Glu Arg Leu Leu Glu Arg Phe Asp Thr Trp Thr Lys Val Lys Glu		925
	930	935
Ala Pro Val Ser Glu Leu Val Arg Val Pro Gly Val Gly Leu Ser Leu		940
945	950	955
Val Lys Glu Ile Lys Ala Gln Val Asp Pro Ala Trp Lys Ala Leu Leu		960
	965	970
Asp Val Lys Gly Val Ser Pro Glu Leu Ala Asp Arg Leu Val Glu Glu		975
	980	985
Leu Gly Ser Pro Tyr Arg Val Leu Thr Ala Lys Lys Ser Asp Leu Met		990
	995	1000
		1005

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

1010

1015

1020

Ala Gly

1025

<210> 8

<211> 3078

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 8

```

atgccgagaa agatgtatag ttgtgacttt gagacaacta ctaaagtgga agactgtagg 60
gtatgggcgt atggttatat gaatatagaa gatcacagtg agtacaaaat aggtaatagc 120
ctggatgagt ttatggcgtg ggtgttgaag gtacaagctg atctatattt ccataacctc 180
aaatttgacg gagcttttat cattaactgg ttggaacgta atggttttta gtggtcggct 240
gacggattgc caaacacata taatacgatc atatctcgca tgggacaatg gtacatgatt 300
gatatatgtt taggctacaa agggaaacgt aagatacata cagtgatata tgacagctta 360
aagaaactac cgtttcctgt taagaagata gctaaagact ttaaactaac tgttcttaaa 420
ggatgatattg attaccacaa agaaagacca gtcggctata agataacacc cgaagaatac 480
gcctatatta aaaacgatat tcagattatt gcggaagctc tgttaattca gtttaagcaa 540
ggtttagacc ggatgacagc aggcagtgac agtctaaaag gtttcaagga tattataacc 600
actaagaaat tcaaaaaggt gtttcctaca ttgagtcttg gactcgataa ggaagtgaga 660
tacgcctata gaggtggttt tacatggtta aatgataggt tcaaagaaaa agaaatcgga 720
gaaggcatgg tcttcgatgt taatagtcta ttcctgcac agatgtatag ccgtctcctt 780
ccatatgggtg aacctatagt attcgagggt aaatacgttt gggacgaaga ttaccacta 840
cacatacagc atatcagatg tgagttcgaa ttgaaagagg gctatatacc cactatacag 900
ataaaaagaa gtaggtttta taaaggtaat gactaccta aaagtagcgg cggggagata 960
gccgacctct ggttgtcaaa ttagaccta gaattaatga aagaacacta cgatttatat 1020
aacgttgaat atatcagcgg cttaaaattt aaagcaacta caggtttggt taaagatttt 1080
atagataaat ggacgtacat caagacgaca tcagaaggag cgatcaagca actagcaaaa 1140
ctgatgttaa acagtctata cggtaaattc gctagtaacc ctgatgttac agggaaagtc 1200
ccttatttta aagagaatgg ggcgctaggt ttcagacttg gagaagagga aacaaaagac 1260
cctgtttata cacctatggg cgttttcata actgcatggg ctagatacac gacaattaca 1320
gcggcacagg cttgttatga tcggataata tactgtgata ctgacagcat acatttaacg 1380
ggtagacaga tacctgatgt aataaaagat atagttgacc ctaagaaatt gggatactgg 1440
gcacatgaaa gtacattcaa aagagctaaa tatctgagac agaagaccta tatacaagac 1500
atctatatga aagaagtaga tggtaagtta gtagaaggta gtccagatga ttacactgat 1560
ataaaattta gtgttaaatg tgcgggaatg actgacaaga ttaagaaaga ggttacgttt 1620
gagaatttca aagtcggatt cagtcggaat atgaagccta agcctgtgca agtgccgggc 1680
ggggtggttc tggttgatga cacattcaca atcaaaggta ccggctctgg cgccctgaag 1740
accctggaga gcatagtagg ggatctggag aaggccgacg agctgaagcg gaagtacgga 1800

```

tccgcgtccg cggttcgacg tctgcccgtg gaggagctac gcgaactcgg gttctccgac 1860
gatgagatcg ccgagatcaa ggggatacct aagaagctcc gggaggcctt cgaccttgag 1920
accgccgcgg aactctacga gcggtacggt tcgctgaaag agatcggtcg ccgactctct 1980
tacgacgatc tactcgagct cgggtcgact ccgaaggccg cggccgagat caaggggccc 2040
gagttcaagt tcctcctgaa catcgaaggg gtcggaccga aactcgctga gcggatactc 2100
gaggccgtgg attatgacct cgagcgactg gcttccctga atcccaggga acttgccggag 2160
aaggtggaag gactgggcga agagctcgcg gagcgcgtcg tgtacgctgc tagggagcgc 2220
gtagaaaagtc gcaggaaagtc cggccgccag gagcggtcgg aggaagaatg gaaggagtgg 2280
ctcgagcgta aggtcggcga ggggagggtc cgccggttga ttgagtattt cggctccgcg 2340
ggtgaagtag gaaaagctggt cgagaacgcc gaggtgtcga agctactgga ggtcccgggt 2400
ataggcgacg aggccgtcgc taggtctgta ccgggctaca agaccctacg agacgccggt 2460
ctcacgccgg ccgaagcgga gcgcgtgctg aaacggtacg gctcggcttc caaagtgcag 2520
gaaggagcca ctccggacga gttacgcgag ctcgccctcg gcgacgcaa gatcgcgagg 2580
atcctgggcc tgcgcagcct ggtgaacaag aggctggacg tggacaccgc gtacgagctc 2640
aagcgtagat acggttccgt ctccgccgtc cggaaggccc cggtgaaaga actgcgcgag 2700
ctcgccctct ccgatcgga gatcgcacgt atcaaggga tcccggagac gatgcttcag 2760
gtccgagggg tgagcgtgga gaaagcgag cggctgctgg agcgtttcga tacctggacc 2820
aaggtgaagg aagctcccgt ctcgagctg gtgagagtcc cgggtgtcgg attgagtttg 2880
gtgaaggaga tcaaggctca ggtggatccg gcctggaagg cacttctgga tgtcaaaggg 2940
gtcagtccgg agctggccga ccggctcgtc gaggagctcg gcagcccgtg tcgggtgctg 3000
acggccaaga aatccgacct gatgagagtc gagagagtcg gaccgaagct cgccgagcga 3060
atccgggccc cgggctaa 3078

<210> 9

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 9

Ala Tyr Val Asp Gly Ala

1

5

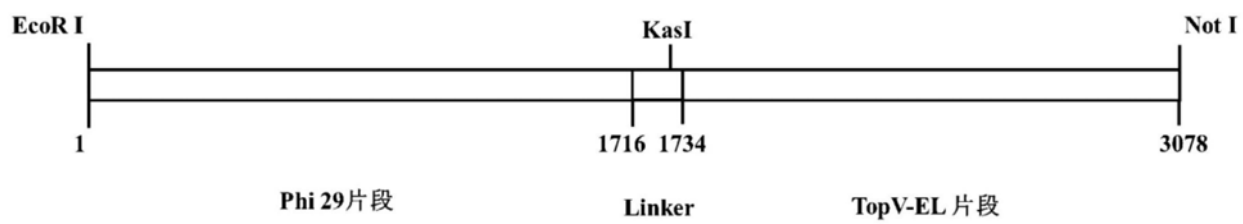


图1

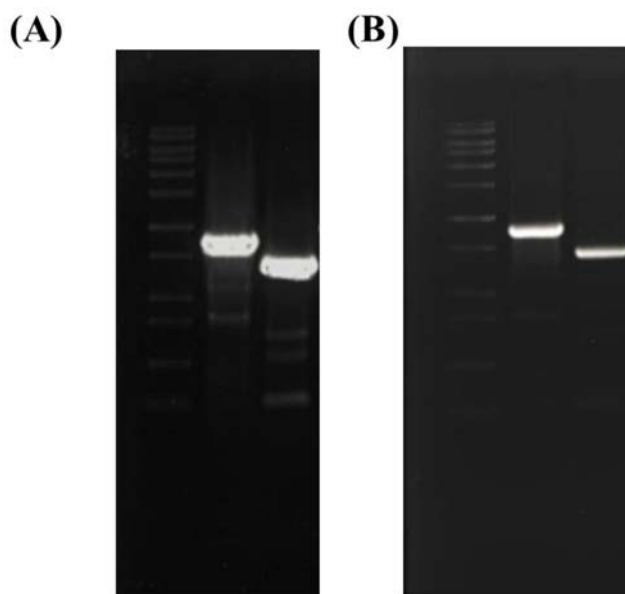


图2

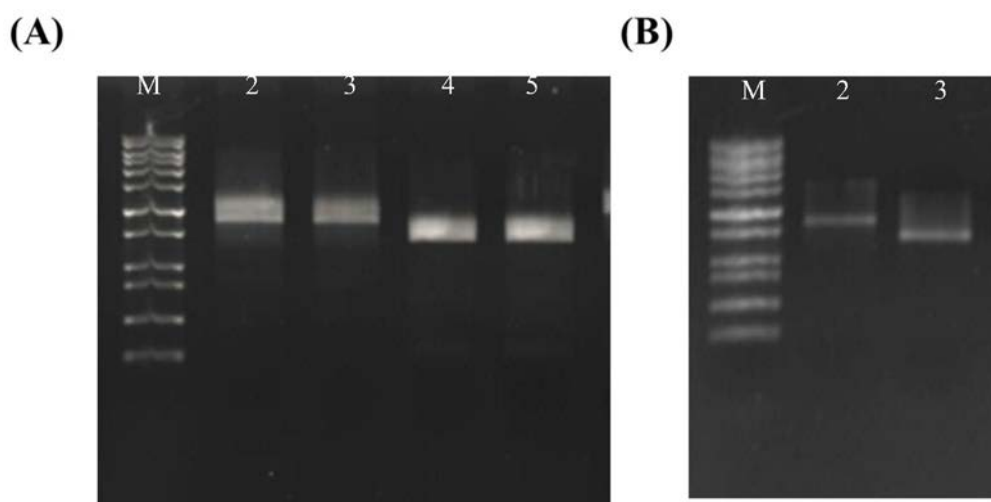


图3

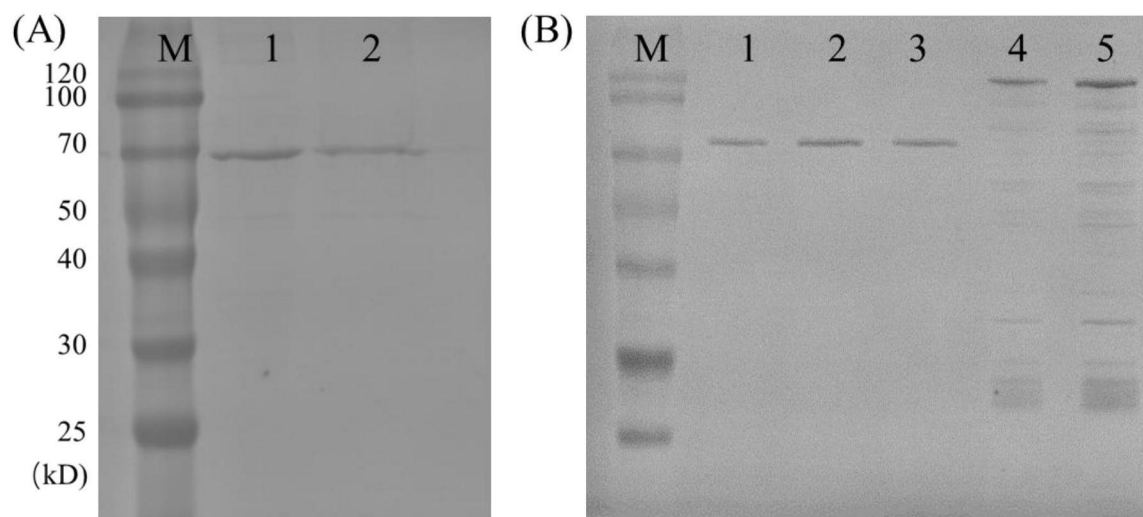


图4

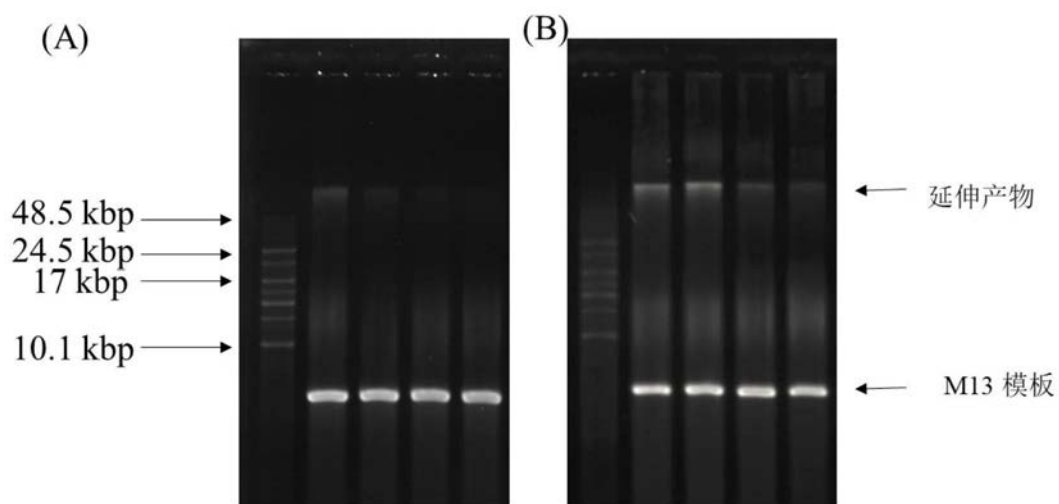


图5

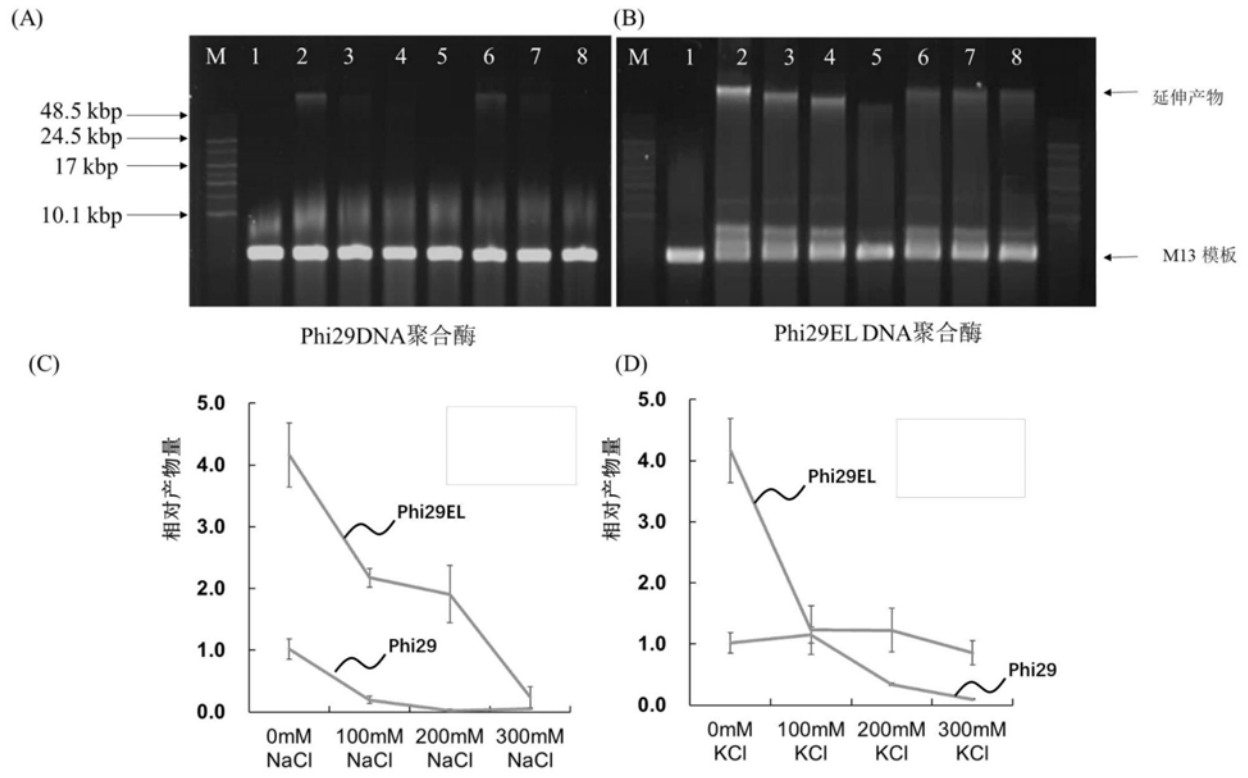


图6

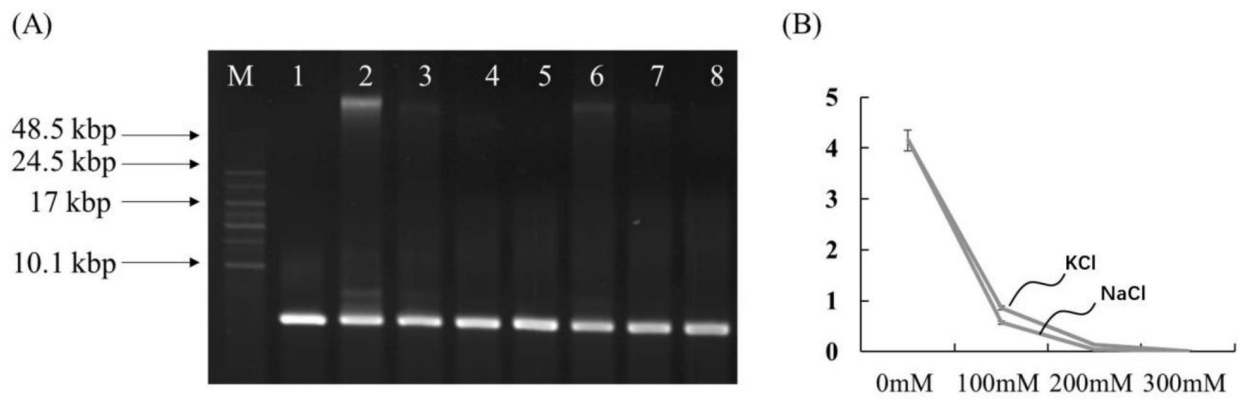


图7