



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110564744 A

(43)申请公布日 2019.12.13

(21)申请号 201910778360.7

C12Q 1/6869(2018.01)

(22)申请日 2019.08.22

C12R 1/19(2006.01)

(71)申请人 安序源生物科技(深圳)有限公司

地址 518051 广东省深圳市南山区粤海街
道高新南七道19号B209室

(72)发明人 高亚平 田晖 何筠

(74)专利代理机构 广州华进联合专利商标代理
有限公司 44224

代理人 方宇

(51)Int.Cl.

C12N 15/54(2006.01)

C12N 9/12(2006.01)

C12N 15/70(2006.01)

C12N 1/21(2006.01)

C12Q 1/686(2018.01)

权利要求书1页 说明书10页

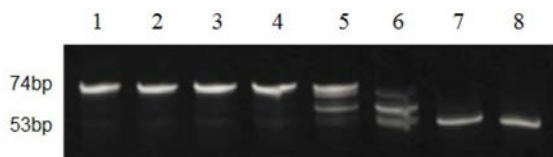
序列表7页 附图5页

(54)发明名称

DNA聚合酶及其制备方法、表达基因、表达载
体、宿主细胞及试剂盒

(57)摘要

本发明涉及一种DNA聚合酶及其制备方法、
表达基因、表达载体、宿主细胞及试剂盒。该DNA
聚合酶包括氨基酸序列如SEQ ID No.1所示的蛋
白片段,该DNA聚合酶具有较高的耐盐性。



1. 一种DNA聚合酶的表达基因,其特征在于,包括编码氨基酸序列如SEQ ID No.1所示的蛋白片段的核苷酸片段。

2. 根据权利要求1所述的DNA聚合酶的表达基因,其特征在于,包括序列如SEQ ID No.2所示的核苷酸片段。

3. 一种DNA聚合酶的表达载体,其特征在于,包括权利要求1或2所述的DNA聚合酶的表达基因。

4. 一种宿主细胞,其特征在于,包括权利要求3所述的DNA聚合酶的表达载体。

5. 一种DNA聚合酶,其特征在于,包括氨基酸序列如SEQ ID No.1所示的蛋白片段。

6. 一种DNA聚合酶的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

用DNA聚合酶的表达基因和空载体构建用于表达DNA聚合酶的表达载体,其中,所述DNA聚合酶的表达基因包括编码氨基酸序列如SEQ ID No.1所示的蛋白片段的核苷酸片段;及将所述表达载体转入宿主细胞,诱导培养,得到所述DNA聚合酶。

7. 根据权利要求6所述的DNA聚合酶的制备方法,其特征在于,所述空载体为pGEX-6P-1;及/或

所述宿主细胞为原核细胞。

8. 一种DNA扩增试剂盒,其特征在于,包括权利要求5所述的DNA聚合酶或权利要求6~7任一项所述的DNA聚合酶的制备方法制得的DNA聚合酶。

9. 根据权利要求8所述的DNA扩增试剂盒,其特征在于,还包括核酸提取试剂及PCR缓冲液中的至少一种。

10. 一种纳米孔测序试剂盒,其特征在于,包括具有纳米孔的测序组件和检测试剂,所述检测试剂包括权利要求5所述的DNA聚合酶或权利要求6~7任一项所述的DNA聚合酶的制备方法制得的DNA聚合酶。

DNA聚合酶及其制备方法、表达基因、表达载体、宿主细胞及试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及分子生物技术领域,特别是涉及一种DNA聚合酶及其制备方法、表达基因、表达载体、宿主细胞及试剂盒。

背景技术

[0002] DNA聚合酶的发现是近代生物技术的重要里程碑。DNA聚合酶能以DNA为模板、dNTPs为底物完成核酸链的复制。近年来,DNA聚合酶广泛应用于生物技术和科学研究领域的各个方面,包括cDNA合成,DNA末端修饰和DNA测序等,越来越多的耐热型DNA聚合酶和恒温型DNA聚合酶被开发应用。

[0003] 但是,目前的DNA聚合酶耐盐性比较差。一般的DNA聚合酶能耐受200mM以下的钠离子,当钠离子浓度超过200mM后,DNA聚合酶的活性会急剧下降,甚至完全丧失。

发明内容

[0004] 基于此,针对传统的DNA聚合酶耐盐性能差的问题,有必要提供一种耐盐性较好的DNA聚合酶及其制备方法。此外,还有必要提供一种用于表达该DNA聚合酶的表达基因、表达载体、宿主细胞及试剂盒。

[0005] 一种DNA聚合酶的表达基因,包括编码氨基酸序列如SEQ ID No.1所示的蛋白片段的核苷酸片段。

[0006] 上述DNA聚合酶的表达基因包括编码氨基酸序列包括如SEQ ID No.1所示的蛋白片段的核苷酸片段,上述DNA聚合酶的表达基因表达的DNA聚合酶具有良好的耐盐性。

[0007] 在其中一个实施例中,包括序列如SEQ ID No.2所示的核苷酸片段。

[0008] 一种DNA聚合酶的表达载体,包括上述DNA聚合酶的表达基因。

[0009] 一种宿主细胞,包括上述DNA聚合酶的表达载体。

[0010] 一种DNA聚合酶,包括氨基酸序列如SEQ ID No.1所示的蛋白片段。

[0011] 一种DNA聚合酶的制备方法,包括以下步骤:

[0012] 用DNA聚合酶的表达基因和空载体构建用于表达DNA聚合酶的表达载体,其中,所述DNA聚合酶的表达基因包括编码氨基酸序列如SEQ ID No.1所示的蛋白片段的核苷酸片段;及

[0013] 将所述表达载体转入宿主细胞,诱导培养,得到所述DNA聚合酶。

[0014] 在其中一个实施例中,所述空载体为pGEX-6P-1;及/或

[0015] 所述宿主细胞为原核细胞。

[0016] 一种DNA扩增试剂盒,包括上述DNA聚合酶或上述DNA聚合酶的制备方法制得的DNA聚合酶。

[0017] 在其中一个实施例中,还包括核酸提取试剂及PCR缓冲液中的至少一种。

[0018] 一种纳米孔测序试剂盒,包括具有纳米孔的测序组件和检测试剂,所述检测试剂

包括上述DNA聚合酶或上述DNA聚合酶的制备方法制得的DNA聚合酶。

附图说明

- [0019] 图1为实施例1的DNA聚合酶的SDS-PAGE电泳图；
[0020] 图2为实施例2的Phi29 DNA聚合酶的SDS-PAGE电泳图；
[0021] 图3为温度对实施例1制备的DNA聚合酶的活性影响图；
[0022] 图4为金属离子对实施例1制备的DNA聚合酶的活性影响图；
[0023] 图5为buffer1、添加300mM NaCl的buffer1及空白对照的结果图；
[0024] 图6为buffer2、添加300mM NaCl的buffer2及空白对照的结果图；
[0025] 图7为buffer3、添加300mM NaCl的buffer3及空白对照的结果图；
[0026] 图8为buffer4、添加300mM NaCl的buffer4及空白对照的结果图；
[0027] 图9为实施例1制备的DNA聚合酶的耐盐性的结果图；
[0028] 图10为实施例2制备的Phi29 DNA聚合酶的耐盐性的结果图；
[0029] 图11为NEB Taq DNA聚合酶的耐盐性的结果图；
[0030] 图12为实施例1制备的DNA聚合酶、实施例2制备的Phi29 DNA聚合酶及NEB Taq DNA聚合酶的酶活定量图；
[0031] 图13为Phi29 DNA聚合酶与实施例1制备的DNA聚合酶的持续性比较图。

具体实施方式

[0032] 为了便于理解本发明，下面将参照相关附图对本发明进行更全面的描述。附图中给出了本发明的部分实施例。但是，本发明可以以许多不同的形式来实现，并不限于本文所描述的实施例。相反地，提供这些实施例的目的是使本发明公开内容更加透彻全面。

[0033] 除非另有定义，本文所使用的所有的技术和科学术语与属于本发明的技术领域的技术人员通常理解的含义相同。本文中在本发明的说明书中所使用的术语只是为了描述具体的实施例的目的，不是旨在限制本发明。

[0034] 本发明一实施方式提供了一种DNA聚合酶的表达基因，该DNA聚合酶的表达基因包括编码氨基酸序列如SEQ ID No.1所示的蛋白片段的核苷酸片段，该DNA聚合酶的表达基因表达的DNA聚合酶具有良好的耐盐性。

[0035] 具体地，上述DNA聚合酶的表达基因包括编码氨基酸序列如SEQ ID No.1所示的蛋白片段的核苷酸片段。如SEQ ID No.1所示的氨基酸序列为：

[0036] MSELKDYSEYLPKFLLDLDP E IYLSMNFLVLDLETDTGDERSPDATWEQN DIVSASWVFGTGGRGTE
KFVYGGIHDMD ELIQDMYEADFVVAHNAKFDIKW LIRAGLDPSRILVADTMLAEYVLTGNLKAGKKGALT LGALAK
QYLGVT KDPLVDKLMRGGVSPR VIPKSL LERRNKSDIFQTRNLWLKLRDEMMERDVIHLFYNRCLLSPVLADIELN
GVHLDKERVCEEHDIASRRMAEVEADLMD MIDGRNPRSVPMQEF IYDVLKFKPLKRGV EWRPTGEEVLQFEART
KKQQAFLDLKKEFAQLNADLSKNLDYFYGVVTEREDCLFYAQFNQAQTVTHRLSSSGIKTKFEMYPKAKSIQLQNS
PRKYKRLYSARNPDWYV IEMDGAQIEFRVAGYIGQDTRICQDIVDGV DVHRFTASVLNHCDEEEVTKDQRTDAKPD
TFKPLYGGQYGTDDQMAYYEAFRNKYQDITQAQQDWLMKVL RNKEITHPTGITFYYPNASMSSSGYCQDFP SVCNY
PVQNLATAEIIPIALVAIWHVMKAMKLSFLVNTVHDSVISESPRDELELMYEISKWAFLWWVYEF LDICYDLQFN
VPLGVGYQAHTHWGGGKEIFFEPSQYDGEVVKIDKGEITVTAIPPTKMDGVDYSELYKGDK。

[0037] 在其中一个实施例中,上述DNA聚合酶的表达基因为编码氨基酸序列如SEQ ID No.1所示的蛋白片段的核苷酸片段。

[0038] 进一步地,上述DNA聚合酶的表达基因包括序列如SEQ ID No.2所示的核苷酸片段。具体地,如SEQ ID No.2所示的核苷酸序列为:

[0039] 5'-ATGAGTGAGCTGAAAGACTACAGCGAGTACCTACCTAAGTTCCTATTGGACTTAGACCCTGAGATATACCTGTCCATGAACTTCCTTGTCCTTGACTTGGAGACAGACACGGATGGGGATGAGCGTTCGCCTGATGCTACATGGGAACAGAACGATATTGTTTCTGCCTCATGGGTGTTTCGGTACAGGTGGACGTGGTACTGAGAAGTTTGTCTATGTGGTATCCATGACATGGACGAACTGATACAGGACATGTACGAAGCAGACTTTGTCGTGGCACAACAATGCTAAGTTCGACATCAAGTGGCTCATCCGTGCAGGGCTAGACCCTTCACGTATCCTAGTAGCTGACACGATGCTGGCTGAGTATGTGCTTACGGGCAATCTCAAAGCAGGTAAGAAGGGTGCCTTACGCTAGGTGCTCTGGCTAAGCAATACCTCGGTGTTACTAAAGACCCCTCGTTGATAAGTTGATGCGAGGTGGGGTGTCAACACGTGTGATACCTAAGTCTTTACTTGAACGCCGTAACAAATCAGACATCTTCCAGACAAGAAACCTGTGGCTCAAGCTACGTGATGAGATGATGGAACGTGATGTGATACATCTGTTCTATAACCGTTGCTTGCTGTCCCCGTGTTAGCCGACATTGAGTTGAACGGGTGCATCTGGATAAGGAACGAGTATGTGAGGAACATGACATAGCCTCTCGCCGTATGGCTGAGGTGGAAGCTGACTTGATGGACATGATAGACGGACGTAACCCCGCTCTGTACCGCAGATGCAGGAGTTCATCTACGATGTGCTCAAGTTCAAGCCATTAAGAAACGTGGTGTTGAGTGGCGACCAACAGGGGAGGAGGTACTGCAATTCGAGGCACGTACCAAGAAGCAGCAGGCTTTTCCTTGACCTCAAGAAAGAGTTCGCTCAGCTCAATGCTGACCTAAGTAAGAACCTCGACTACTTCTACGGGGTAGTCACGGAACGTGAGGACTGTTTATTCTATGCACAATTCAACCAAGCTCAGACCGTTACGCACAGGTTGTCTTCTTCGGGTATTAAGACCAAGTTCGAAATGTACCCGAAAGCCAAGAGCATTACGTTACAGAACTCACCTCGAAAATATAAGCGTCTTTACTCAGCCCGAAATCCCGACTGGTACGTCATTGAAATGGACGGTGCTCAGATTGAATTTAGGGTTGCTGGATATATAGGACAAGACACGCGCATCTGTCAGGATATTGTTGACGGTGTAGACGTGCACCGATTACCGCCTCATGTGTTGAACCACTGTGACGAGGAGGAGGTAAGTAAGGACCAGCGTACTGACGCTAAGCCTGATACATTCAAGCCACGTGTATGGAGGACAGTATGGTACGGATGACCAGATGGCTTACTACGAAGCGTTCGGTAACAAGTATCAAGACATCACACAGGCACAACAAGACTGGCTGATGAAGGTGCTACGTAACAAAGAGATTACCCATCCAACGGGTATCACTTTCTATACCCTAACGCCAGCATGAGTAGCAGTGGTTACTGTGACGACTTCCCGTCCGTGTGTAAGTACCCAGTGCAGAACCAGCGACAGCGAAATCATCCCTATCGCATTGGTTGCTATCTGGCATGTGATGAAAGCAATGAAGCTACAGTCGTTCTTAGTTAACTGTGCATGACTCAGTAATATCTGAATCACCACGTGATGAGTTGGAGCTGATGTACGAGATTAGTAAGTGGGCTTTCTCTGGTGGGTCTACGAATTTCTGGACATCTGCTATGATTTACAATTCATGTCCCGCTCGGTGTTGTTATCAGGCTCACACCCATTGGGGTGGTGGTAAGGAAATCTTCTTCGAGCCTTCGCAGTATGACGGCGAGGTGTGTAAGATAGACAAAGGTGAGATAACTGTTACAGCTATCCCGCCTACTAAGATGGATGGAGTTGATTACTCCGAACTGTATAAGGGAGACAAGTAA-3'。

[0040] 当然,在其他一些实施例中,根据密码子的简并性,编码氨基酸序列如SEQ ID No.1所示的蛋白片段的核苷酸片段不限于序列如SEQ ID No.2所示的核苷酸片段,还可以是其他能够编码氨基酸序列如SEQ ID No.1所示的蛋白片段的核苷酸片段。

[0041] 本发明一实施方式还提供一种DNA聚合酶的表达载体,该DNA聚合酶的表达载体用于表达上述DNA聚合酶的表达基因。采用上述DNA聚合酶的表达载体表达获得的DNA聚合酶具有良好的耐盐性。

[0042] 在其中一个实施例中,上述DNA聚合酶的表达载体包括空载体及插入在空载体中的上述DNA聚合酶的表达基因。空载体上具有表达元件及便于上述DNA聚合酶的表达基因插

入的多克隆位点。表达元件用于表达上述DNA聚合酶的表达基因。进一步地,空载体上还包括纯化标签,例如组氨酸标签,GST标签等。纯化标签用于纯化上述DNA聚合酶的表达基因所表达的DNA聚合酶。更进一步地,空载体为pGEX-6P-1。pGEX-6P-1具有GST标签,便于后续纯化DNA聚合酶。

[0043] 本发明一实施方式还提供一种宿主细胞,该宿主细胞包括上述DNA聚合酶的表达载体。该宿主细胞能够产生DNA聚合酶,该DNA聚合酶具有良好的耐盐性,适用于高盐离子浓度的扩增反应。

[0044] 在其中一个实施例中,宿主细胞为原核细胞。更进一步地,宿主细胞为大肠杆菌。

[0045] 本发明一实施方式还提供了一种DNA聚合酶,该DNA聚合酶包括氨基酸序列如SEQ ID No.1所示的蛋白片段。该DNA聚合酶具有良好的耐盐性,适用于高盐离子浓度的扩增反应。此外,该DNA聚合酶能够在较低温度条件下进行扩增反应。当然,也适用于制备纳米孔测序试剂盒。

[0046] 本发明一实施方式还提供了一种DNA聚合酶的制备方法,包括步骤S110~步骤S130。

[0047] 步骤S110、用DNA聚合酶的表达基因和空载体构建用于表达DNA聚合酶的表达载体,其中,DNA聚合酶的表达基因包括编码氨基酸序列如SEQ ID No.1所示的蛋白片段的核苷酸片段。

[0048] 具体地,步骤S110包括步骤S111~步骤S113。

[0049] 步骤S111、提供DNA聚合酶的表达基因。该DNA聚合酶的表达基因包括编码氨基酸序列如SEQ ID No.1所示的蛋白片段的核苷酸片段及酶切位点。

[0050] 步骤S113、构建含有上述DNA聚合酶的表达基因的表达载体。

[0051] 具体地,将上述DNA聚合酶的表达基因导入到空载体中,得到含有上述DNA聚合酶的表达基因的表达载体。

[0052] 进一步地,将上述DNA聚合酶的表达基因酶切后接到用相应的酶切处理之后的空载体中,得到含有上述DNA聚合酶的表达基因的表达载体。酶切处理可采用NotI/EcoRI双酶切。空载体可根据DNA聚合酶的表达基因的表达序列特点及常规的分子克隆实验指南,选用各种常规标准表达载体。

[0053] 在其中一个实施例中,空载体为pGEX-6P-1。

[0054] 步骤S130、将表达载体转入宿主细胞,诱导培养,得到DNA聚合酶。

[0055] 具体地,步骤S130包括步骤S131~步骤S137。

[0056] 步骤S131、将表达载体转化到宿主细胞中,得到重组细胞。

[0057] 具体地,表达载体转化可以通过试剂盒生产厂家推荐的方法实现。

[0058] 宿主细胞为感受态细胞,例如,大肠杆菌感受态细胞。在本实施方式中,宿主细胞为大肠杆菌感受态细胞Rossete。

[0059] 在其中一个实施例中,将构建好的基因表达载体加入感受态细胞,热激处理,使感受态细胞的细胞膜结构扰动,细胞膜上出现空隙以便基因表达载体进入细胞,之后恒温培养,使宿主细胞复苏。

[0060] 进一步地,在表达载体转化到宿主细胞后,还包括对转化后的宿主细胞进行抗性筛选的步骤。具体地,培养基中加入的抗生素的种类可根据表达载体上的抗性基因对应进

行。

[0061] 步骤S133、对步骤S131得到的重组细胞进行诱导表达,收集菌体。

[0062] 具体地,培养重组细胞,然后加入诱导剂对重组细胞进行诱导表达,然后离心收集菌体。

[0063] 进一步地,诱导剂为异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)。诱导表达的温度为 $16^{\circ}\text{C}\sim 28^{\circ}\text{C}$ 、诱导剂的终浓度为 $100\mu\text{M}\sim 1000\mu\text{M}$,诱导表达的时间为 $4\text{h}\sim 20\text{h}$ 。进一步地,诱导表达的温度为 $16^{\circ}\text{C}\sim 25^{\circ}\text{C}$ 、诱导剂的终浓度为 $100\mu\text{M}\sim 500\mu\text{M}$,诱导表达的时间为 $16\text{h}\sim 20\text{h}$ 。

[0064] 在本实施方式中,诱导条件为终浓度为 $300\mu\text{M}$ 的IPTG, 16°C 培养过夜。

[0065] 步骤S135、将步骤S133得到的菌体裂解,收集裂解粗产物。

[0066] 具体地,裂解是为了让菌体释放的DNA聚合酶。可以向菌体中加入溶菌酶和去污剂,振荡混匀后离心收集裂解粗产物。

[0067] 在本实施方式中,将菌体用PBS溶液涡旋混匀后,用超声波细胞粉碎机进行细菌破碎。其中超声波的功率 $50\text{W}\sim 100\text{W}$,超声 $5\text{s}\sim 20\text{s}$,间隔 $5\text{s}\sim 20\text{s}$,共持续 $10\text{min}\sim 40\text{min}$ 。

[0068] 步骤S137、纯化步骤S135得到的裂解粗产物,得到DNA聚合酶。

[0069] 具体地,利用亲和层析纯化步骤S135得到的裂解粗产物。

[0070] 在本实施方式中,采用Glutathione Sepharose 4B亲和层析柱纯化步骤S135得到的裂解粗产物。

[0071] 本发明一实施方式还提供了一种DNA扩增试剂盒,该DNA扩增试剂盒包括上述DNA聚合酶。上述DNA扩增试剂盒包括上述DNA聚合酶,具有较高的耐盐性能,适用于盐离子浓度较高时DNA扩增反应。

[0072] 在其中一个实施例中,上述DNA扩增试剂盒还包括核酸提取试剂及PCR缓冲液中的至少一种。核酸提取试剂用于样本中DNA的提取;PCR缓冲液用于DNA扩增反应。

[0073] 进一步地,核酸提取试剂包括裂解液及纯化剂。裂解液用于裂解细胞或细胞核,释放核酸。纯化剂用于纯化核酸。PCR缓冲液($10\times$)的包括 $200\text{mM}\sim 500\text{mM}$ 的Tris-HCl、 $20\text{mM}\sim 200\text{mM}$ 的 Mg^{2+} 、 $100\text{mM}\sim 400\text{mM}$ 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $40\text{mM}\sim 200\text{mM}$ 的DTT。

[0074] 本发明一实施方式还提供了一种纳米孔测序试剂盒,包括具有纳米孔的测序组件和检测试剂,检测试剂包括上述DNA聚合酶。

[0075] 纳米孔测序是世界公认的第四代测序技术。纳米孔测序技术通过在纳米孔两端施加电场,核酸分子在电场驱动下穿过纳米孔,产生差异电流信号,同时DNA聚合酶根据模板链序列信息整合核苷酸分子,并完成复制,从而实现边合成边测序。有研究表明,纳米孔测序时增加电解槽中盐溶液的浓度,有利于提高测试过程中的信噪比以及检测结果的准确性,提升测序质量。然而传统的DNA聚合酶的耐盐性较差,所以如果增加电解槽的盐溶液的浓度,则DNA聚合酶的活性降低,DNA的合成速度降低,使得整个测序的速度降低。

[0076] 上述纳米孔测序试剂盒包括具有较好耐盐性的上述DNA聚合酶,能够提高纳米孔测序的准确性及测序速度。

[0077] 具体地,检测试剂包括上述DNA聚合酶。进一步地,检测试剂还包括缓冲液。缓冲液包括 $20\text{mM}\sim 200\text{mM}$ 的Tris-HCl、 $2\text{mM}\sim 20\text{mM}$ 的 Mg^{2+} 、 $10\text{mM}\sim 40\text{mM}$ 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $4\text{mM}\sim 20\text{mM}$ 的DTT及 $0.2\text{mM}\sim 0.5\text{mM}$ 的dNTPs。

[0078] 具体地,在纳米孔两端施加外源电压,电解池中离子通过纳米孔,产生pA级电流。

DNA聚合酶以DNA为模板,并利用穿过纳米孔的携带标签的dNTPs延伸合成新链,携带标签的dNTPs穿过纳米孔时产生不同程度的电流变化,从而完成序列测定。

[0079] 进一步地,纳米孔测序的反应体系包括50nM~500nM的核酸模板、100nM~500nM的上述DNA聚合酶、20mM~50mM的Tris-HCl、2mM~20mM的 Mg^{2+} 、10mM~40mM的 $(NH_4)_2SO_4$ 、4mM~20mM的DTT及0.2mM~0.5mM的dNTPs。上述反应体系既能提高反应效率,又能节省试剂用量,减少成本。更进一步地,扩增反应体系包括50nM~500nM的核酸模板、100nM~500nM的上述DNA聚合酶、20mM~100mM的Tris-HCl、2mM~10mM的 Mg^{2+} 、10mM~20mM的 $(NH_4)_2SO_4$ 、4mM~10mM的DTT、0.2mM~0.5mM的dNTPs以及0mM~500mM的NaCl或者0mM~500mM的KCl。

[0080] 进一步地,扩增反应的条件:30℃~37℃,5min~120min。在30℃~37℃条件下,扩增体系中的DNA聚合酶的效率,保真度高。

[0081] 具体实施例

[0082] 以下结合具体实施例进行详细说明。以下实施例如未特殊说明,则不包括除不可避免的杂质外的其他组分。实施例中采用药物和仪器如非特别说明,均为本领域常规选择。实施例中未注明具体条件的实验方法,按照常规条件,例如文献、书本中所述的条件或者生产厂家推荐的方法实现。

[0083] 实施例1

[0084] (1) 委托上海捷瑞生物工程有限公司合成序列SEQ ID No.2所示的DNA聚合酶的表达基因。并委托上海捷瑞生物工程有限公司将该表达基因连接到pGEX-6P-1载体中,得到DNA聚合酶的表达载体。

[0085] (2) 将DNA聚合酶的表达载体转化到大肠杆菌感受态细胞Rossete(北京全式金生物技术有限公司)中,抗氨苄青霉素培养基进行培养及测序验证。

[0086] (3) 待确认转化成功之后,挑取单克隆菌落接种至5mL LB液体培养基中过夜培养;然后转接于500mL LB液体培养基中,摇培4h后到OD值为0.6,加入IPTG至IPTG终浓度为300μM后继续摇培过夜。将培养液离心,收集菌体,并用超声波细胞粉碎机裂解细胞,其中超声波的功率70W,超声10s,间隔10s,共持续30min。然后用Glutathione Sepharose 4B柱亲和层析,并通过PP酶(Prescission Protease)切除GST标签,纯化得到实施例1的DNA聚合酶。

[0087] (4) 将步骤(3)得到的DNA聚合酶进行SDS-PAGE蛋白电泳,以验证DNA聚合酶蛋白的大小。实施例1的DNA聚合酶的氨基酸序列如SEQ ID No.1所示,实施例1的DNA聚合酶分子量为76kD。

[0088] SDS-PAGE蛋白电泳结果如图1所示。图1中1泳道为蛋白Marker,2泳道和3泳道分别为100ng和200ng的步骤(3)得到的DNA聚合酶。由于步骤(3)得到的DNA聚合酶携带较多的酸性氨基酸,所以在蛋白胶中迁移稍慢。从图中条带位置结合测序结果初步判断,实施例1制备的DNA聚合酶大小正确。

[0089] 实施例2

[0090] (1) 委托上海捷瑞生物工程有限公司合成序列SEQ ID No.3所示的Phi29 DNA聚合酶的表达基因。委托海捷瑞生物工程有限公司将该表达基因连接到pGEX-6P-1载体中,得到Phi29 DNA聚合酶的表达载体。

[0091] (2) 将Phi29 DNA聚合酶的表达载体转化到大肠杆菌感受态细胞Rossete(北京全

式金生物技术有限公司)中,抗氨苄青霉素培养基进行培养及测序验证。

[0092] (3)待确认转化成功之后,挑取单克隆菌落接种至5mL LB液体培养基中过夜培养;然后转接于500mL LB液体培养基中,摇培4h后到OD值为0.6,加入IPTG至IPTG终浓度为300 μ M后继续摇培过夜。将培养液离心,收集菌体,并用超声波细胞粉碎机裂解细胞,其中超声波的功率70W,超声10s,间隔10s,共持续30min。用Glutathione Sepharose 4B柱亲和层析,并通过PP酶(Prescission Protease)切除GST标签,纯化得到Phi29 DNA聚合酶。

[0093] (4)步骤(3)得到的Phi29 DNA聚合酶进行SDS-PAGE蛋白电泳检测,以验证VpV262DNA聚合酶蛋白的大小。Phi29 DNA聚合酶的氨基酸序列如SEQ ID No.4所示,Phi29 DNA聚合酶分子量大小为67kD。

[0094] SDS-PAGE蛋白电泳结果如图2所示,图中2泳道为蛋白Marker,2泳道和3泳道分别为100ng和200ng的Phi29 DNA聚合酶。从图中条带位置结合测序结果初步判断,Phi29 DNA聚合酶大小正确。

[0095] 实施例3

[0096] 引物延伸实验确定实施例1制备的DNA聚合酶的酶活

[0097] (1)将200nM实施例1制备的DNA聚合酶、500nM的发夹模板及反应缓冲液混合,得到反应体系。其中:反应缓冲液由50mM的Tris-HCl、10mM的MgCl₂、10mM的(NH₄)₂SO₄、4mM的DTT及200 μ M的dNTPs组成,反应缓冲液在25℃条件下的pH为7.5;发夹模板的核苷酸序列SEQ ID No.5所示,SEQ ID No.5所示的核苷酸序列具体如下:

[0098] 5'-ACCGTGGATCCTGAGACCCAATGTTCTCGTTAGACTTTTGTCTAACGAGAACA-3'。

[0099] (2)将反应体系在温度为30℃的条件下反应10min,得到反应产物。

[0100] (3)将反应产物加入6xDNA loading后,上样到20%TBU聚丙烯酰胺凝胶中;电泳条件为180v,4h。电泳结束后,将PAGE胶浸泡在SYBR Gold染液中,缓慢水平震荡约20min。然后利用Azure Biosystems成像检测模板链和产物链的亮度。通过模板链和产物链的亮度确定实施例1制备的DNA聚合酶的活性。

[0101] 由检测结果可知,实施例1制备的DNA聚合酶的具有DNA酶的活性,能够以模板链为模板延伸形成产物链。

[0102] 实施例4

[0103] 通过调整引物延伸实验的反应温度及金属离子类型,确定实施例1制备的DNA聚合酶最适反应温度和金属离子类型。具体地:

[0104] (1)在相同的发夹模板、相同酶量及相同缓冲液的条件下,分别选择温度为30℃、37℃、45℃、55℃、65℃、75℃及85℃的延伸条件下进行延伸反应,以检测温度对实施例1制备的DNA聚合酶的活性影响。在相同的发夹模板、相同酶量及除金属离子的类型外的均相同的缓冲液条件下,分别选择金属离子为Mg²⁺、Mn²⁺、Ca²⁺、Zn²⁺及Li⁺的缓冲液进行延伸反应,以检测Mg²⁺、Mn²⁺、Ca²⁺、Zn²⁺及Li⁺对实施例1制备的DNA聚合酶的活性影响。结果如图3~4所示。

[0105] 图3为温度对实施例1制备的DNA聚合酶的活性影响图。图3中,1泳道~7泳道依次对应反应条件为30℃、37℃、45℃、55℃、65℃、75℃及85℃的结果,8泳道对应于空白对照组的结果(空白对照组指未加任何DNA聚合酶的实验组,空白对照组的反应温度为30℃)。由图3可知,实施例1制备的DNA聚合酶的最适温度为DNA聚合酶为30℃~37℃;高于45℃时,实施例1制备的聚合酶活性较差。

[0106] 图4为金属离子对实施例1制备的DNA聚合酶的活性影响图。图4中,1泳道~5泳道依次对应反应缓冲液中的金属离子为 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 及 Li^{+} 的结果。由图4可知,实施例1制备的DNA聚合酶的活性依赖于镁离子和锰离子,而在钙离子、锌离子和锂离子存在下,活性较差。因此,最适金属离子类型为镁离子。

[0107] (2) 在使用等量的酶和底物的情况下,向反应体系中添加四种不同的缓冲液,进行引物延伸实验。反应所生成的产物DNA的量越多,缓冲液最为适宜。

[0108] 其中:buffer1由50mM的Tris-HCl、10mM的 $MgCl_2$ 、10mM的 $(NH_4)_2SO_4$ 、4mM的DTT及200 μ M的dNTPs组成;25℃时,buffer1的pH为7.5。buffer2由10mM的Tris-HCl、50mM的KCl、1.5mM的 $MgCl_2$ 及200 μ M的dNTPs组成;25℃时,buffer2的pH为8.3。buffer3由20mM的Tris-HCl、10mM的 $(NH_4)_2SO_4$ 、0.1% Triton X-100、50mM的KCl、2mM的 $MgSO_4$ 及200 μ M的dNTPs组成;25℃时,buffer3的pH为8.8。buffer4由20mM的磷酸钠、10mM的 $MgCl_2$ 、10mM的 $(NH_4)_2SO_4$ 、4mM的DTT及200 μ M的dNTPs组成,25℃时,buffer4的pH为5.8。结果如图5~图8所示。

[0109] 图5为buffer1、添加300mM NaCl的buffer1及空白对照的结果图,图5中1泳道对应于buffer1的结果,2泳道对应于添加300mM NaCl的buffer1的结果,3泳道对应于不含任何DNA聚合酶、反应缓冲液不含有NaCl的空白对照的结果。

[0110] 图6为buffer2、添加300mM NaCl的buffer2及空白对照的结果图,图6中1泳道对应于buffer2的结果,2泳道对应于添加300mM NaCl的buffer2的结果,3泳道为不含任何DNA聚合酶、反应缓冲液不含有NaCl的空白对照的结果。

[0111] 图7为buffer3、添加300mM NaCl的buffer3及空白对照的结果图,图7中1泳道对应于buffer3的结果,2泳道对应于添加300mM NaCl的buffer3的结果,3泳道对应于不含任何DNA聚合酶、反应缓冲液不含有NaCl的空白对照的结果。

[0112] 图8为buffer4、添加300mM NaCl的buffer4及空白对照的结果图,图8中1泳道对应于buffer4的结果,2泳道对应于添加300mM NaCl的buffer4的结果,3泳道对应于不含任何DNA聚合酶、反应缓冲液不含有NaCl的空白对照的结果。

[0113] 由图5~图8可知,实施例1制备的DNA聚合酶活性在pH 7.5的buffer1中活性最高且稳定;其次,在不添加NaCl的偏碱性pH 7.5的buffer2中,活性较高,而在300mM NaCl存在下,活性偏弱;在添加NaCl的buffer3中,实施例1制备得到的DNA聚合酶活性受到一定程度的抑制。

[0114] 实施例5

[0115] 比较Phi29 DNA聚合酶、NEB Taq DNA聚合酶及实施例1制备的DNA聚合酶的活性和耐盐性

[0116] 利用引物延伸反应,以相同浓度的实施例2制备的Phi29 DNA聚合酶、NEB Taq DNA聚合酶及实施例1制备的DNA聚合酶,以及不同浓度的NaCl,比较Phi29 DNA聚合酶、NEB Taq DNA聚合酶及实施例1制备的DNA聚合酶耐盐性和酶活性。其中,测定上述三种DNA聚合酶的耐盐性的引物延伸反应中,实施例1制备的DNA聚合酶DNA的反应条件为30℃、缓冲液与实施例4的buffer1的组成相同。Phi29 DNA聚合酶的反应条件为30℃、缓冲液与实施例4的buffer1的组成相同。NEB Taq DNA聚合酶反应条件为72℃、缓冲液与实施例2的buffer 2的组成相同,各延伸反应中的模板均与实施例3中的发夹模板相同,且个延伸反应的模板的浓度相同。结果如图9~图12所示。

[0117] 图9为实施例1制备的DNA聚合酶的耐盐性的结果图。图9中1泳道~8泳道分别对应于0mM NaCl、100mM NaCl、200mM NaCl、300mM NaCl、400mM NaCl、500mM NaCl、100mM NaCl及空白对照(空白对照中不含任何DNA聚合酶,且不含NaCl)的结果。

[0118] 图10为实施例2制备的Phi29 DNA聚合酶的耐盐性的结果图。图10中1泳道~8泳道分别对应于0mM NaCl、100mM NaCl、200mM NaCl、300mM NaCl、400mM NaCl、500mM NaCl、100mM NaCl及空白对照(空白对照中不含任何DNA聚合酶,且不含NaCl)的结果。

[0119] 图11为NEB Taq DNA聚合酶的耐盐性的结果图。图10中1泳道~8泳道分别对应于0mM NaCl、100mM NaCl、200mM NaCl、300mM NaCl、400mM NaCl、500mM NaCl、100mM NaCl及空白对照(空白对照中不含任何DNA聚合酶,且不含NaCl)的结果。

[0120] 图12为实施例1制备的DNA聚合酶、实施例2制备的Phi29 DNA聚合酶及NEB Taq DNA聚合酶的酶活定量图。

[0121] 由图9~图11可知,实施例1制备的DNA聚合酶的耐盐性高于Phi29 DNA和NEB Taq DNA聚合酶。在NaCl浓度不超过300mM的反应条件下,实施例1制备的DNA聚合酶能够完成所有模板的延伸;在NaCl浓度超过400mM时,实施例1制备的DNA聚合酶的活性逐渐下降。而Phi29 DNA聚合酶在NaCl浓度超过100mM的反应条件下,超过50%的模板不能延伸,且随着NaCl浓度的升高,活性急剧下降。Taq DNA聚合酶在NaCl浓度超过300mM的反应条件下,活性急剧下降。所以,与Phi29 DNA聚合酶和Taq DNA聚合酶相比,实施例1制备的DNA聚合酶是一个具有较高耐盐性的DNA聚合酶。

[0122] 由图12可以看出,与实施例2制备的Phi29 DNA聚合酶及NEB Taq DNA聚合酶相比,实施例1制备的DNA聚合酶的在较高浓度NaCl的溶液中还具有较高的活性。

[0123] 实施例6

[0124] 比较Phi29 DNA聚合酶及实施例1制备的DNA聚合酶的持续性

[0125] (1) 将单链M13mp18 (7249bp, NEB, 货号N4040S) 和核苷酸序列如SEQ ID No.6所示(5'-CGCCAGGGTTTCCAGTCACGAC-3')的引物退火生成模板引物复合物。其中,引物退火反应体系包括:10pM单链M13mp18和100pM引物,1x退火缓冲液。10x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。

[0126] (2) 然后利用滚环复制,分别以相同浓度(均为100nM)的实施例2制备的Phi29 DNA聚合酶及实施例1制备的DNA聚合酶催化延伸反应。其中,延伸反应体系的反应缓冲液与实施例4的buffer1组成相同,延伸反应条件是30℃, 30min。0.5M EDTA终止反应。反应结束后,采用碱性琼脂糖凝胶电泳检测延伸产物,结果如图13所示。其中,碱性琼脂糖凝胶电泳条件为3V/CM, 3hours。碱性琼脂糖凝胶电泳的10×碱性琼脂糖电泳缓冲液包括:500mmol/L NaOH及10mmol/L EDTA;碱性琼脂糖凝胶电泳的6×碱性凝胶载样缓冲液包括:300mmol/L NaOH, 6mmol/L EDTA, 18% (m/V) Ficoll-400 (Pharmacia公司), 0.15% (m/V) 溴甲酚绿及0.25% (m/V) 二甲苯氰。

[0127] 在图13中,第一泳道为DNAmaker,第二泳道不添加Phi29 DNA聚合酶的空白对照组,第三泳道和第四泳道均为Phi29 DNA聚合酶实验组,第五泳道为不添加实施例1制备的DNA聚合酶的空白对照组,第六泳道为添加了失活的实施例1制备的DNA聚合酶的阴性对照组,第七泳道为实施例1制备的DNA聚合酶实验组。阴性对照组是为了说明实施例1制备的DNA聚合酶的延伸产物并非蛋白提取过程中的大肠杆菌DNA。

[0128] 由图13可知,Phi29 DNA聚合酶具有链置换能力,能够催化生成>50kb的单链DNA。由图13的第七泳道可以看出,实施例1制备的DNA聚合酶能够生成小于模板长度的不同大小的单链DNA片段,其中,以1k~3kb范围内的片段最多。因此实施例1制备的DNA聚合酶具有持续合成能力,但不具备链置换能力。

[0129] 以上所述实施例的各技术特征可以进行任意的组合,为使描述简洁,未对上述实施例中的各个技术特征所有可能的组合都进行描述,然而,只要这些技术特征的组合不存在矛盾,都应当认为是本说明书记载的范围。

[0130] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但并不能因此而理解为对发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。因此,发明专利的保护范围应以所附权利要求为准。

序列表

<110> 安序源生物科技(深圳)有限公司
 <120> DNA聚合酶及其制备方法、表达基因、表达载体、宿主细胞及试剂盒
 <160> 6
 <170> SIPOSequenceListing 1.0
 <210> 1
 <211> 661
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 1
 Met Ser Glu Leu Lys Asp Tyr Ser Glu Tyr Leu Pro Lys Phe Leu Leu
 1 5 10 15
 Asp Leu Asp Pro Glu Ile Tyr Leu Ser Met Asn Phe Leu Val Leu Asp
 20 25 30
 Leu Glu Thr Asp Thr Asp Gly Asp Glu Arg Ser Pro Asp Ala Thr Trp
 35 40 45
 Glu Gln Asn Asp Ile Val Ser Ala Ser Trp Val Phe Gly Thr Gly Gly
 50 55 60
 Arg Gly Thr Glu Lys Phe Val Tyr Gly Gly Ile His Asp Met Asp Glu
 65 70 75 80
 Leu Ile Gln Asp Met Tyr Glu Ala Asp Phe Val Val Ala His Asn Ala
 85 90 95
 Lys Phe Asp Ile Lys Trp Leu Ile Arg Ala Gly Leu Asp Pro Ser Arg
 100 105 110
 Ile Leu Val Ala Asp Thr Met Leu Ala Glu Tyr Val Leu Thr Gly Asn
 115 120 125
 Leu Lys Ala Gly Lys Lys Gly Ala Leu Thr Leu Gly Ala Leu Ala Lys
 130 135 140
 Gln Tyr Leu Gly Val Thr Lys Asp Pro Leu Val Asp Lys Leu Met Arg
 145 150 155 160
 Gly Gly Val Ser Pro Arg Val Ile Pro Lys Ser Leu Leu Glu Arg Arg
 165 170 175
 Asn Lys Ser Asp Ile Phe Gln Thr Arg Asn Leu Trp Leu Lys Leu Arg
 180 185 190
 Asp Glu Met Met Glu Arg Asp Val Ile His Leu Phe Tyr Asn Arg Cys
 195 200 205
 Leu Leu Ser Pro Val Leu Ala Asp Ile Glu Leu Asn Gly Val His Leu
 210 215 220

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

530	535	540
Val Met Lys Ala Met Lys Leu Gln Ser Phe Leu Val Asn Thr Val His		
545	550	555
Asp Ser Val Ile Ser Glu Ser Pro Arg Asp Glu Leu Glu Leu Met Tyr		
	565	570
Glu Ile Ser Lys Trp Ala Phe Leu Trp Trp Val Tyr Glu Phe Leu Asp		
	580	585
Ile Cys Tyr Asp Leu Gln Phe Asn Val Pro Leu Gly Val Gly Tyr Gln		
	595	600
Ala His Thr His Trp Gly Gly Gly Lys Glu Ile Phe Phe Glu Pro Ser		
610	615	620
Gln Tyr Asp Gly Glu Val Val Lys Ile Asp Lys Gly Glu Ile Thr Val		
625	630	635
Thr Ala Ile Pro Pro Thr Lys Met Asp Gly Val Asp Tyr Ser Glu Leu		
	645	650
Tyr Lys Gly Asp Lys		
660		

<210> 2

<211> 1986

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

atgagtgagc tgaaagacta cagcgagtac ctacctaagt tcctattgga ctagaccct	60
gagatatacc tgtccatgaa cttccttgct cttgacttgg agacagacac ggatggggat	120
gagcgttcgc ctgatgctac atgggaacag aacgatattg tttctgcctc atgggtgttc	180
ggtacaggtg gacgtggtac tgagaagttt gtctatggtg gtatccatga catggacgaa	240
ctgatacagg acatgtacga agcagacttt gtcgtggcac acaatgctaa gttcgacatc	300
aagtggctca tccgtgcagg gctagaccct tcacgtatcc tagtagctga cacgatgctg	360
gctgagtatg tgcttacggg caatctcaaa gcaggtaaga aggggtgcgct tacgctaggt	420
gctctggcta agcaatacct cgggtgttact aaagaccccc tcgttgataa gttgatgcga	480
ggtgggggtg caccacgtgt gatacctaag tctttacttg aacgccgtaa caaatcagac	540
atcttccaga caagaaacct gtggctcaag ctacgtgatg agatgatgga acgtgatgtg	600
atacatctgt tctataaccg ttgcttctgt tccccctgt tagccgacat tgagttgaac	660
ggggtgcatc tggataagga acgagtatgt gaggaacatg acatagcctc tcgccgtatg	720
gctgaggtgg aagctgactt gatggacatg atagacggac gtaacccccg ctctgtaccg	780
cagatgcagg agttcatcta cgatgtgctc aagttcaagc cattaaagaa acgtggtgtt	840
gagtggcgac caacagggga ggaggtactg caattcgagg cacgtaccaa gaagcagcag	900
gctttccttg acctcaagaa agagttcgct cagctcaatg ctgacctaa taagaacctc	960
gactacttct acggggtagt cacggaacgt gaggactgtt tattctatgc acaattcaac	1020

caagctcaga	ccgttacgca	caggttgtct	tcttcgggta	ttaagaccaa	gttcgaaatg	1080
tacccgaaag	ccaagagcat	tcagttacag	aactcacctc	gaaaatataa	gcgtctttac	1140
tcagccccgaa	atccccgactg	gtacgtcatt	gaaatggacg	gtgctcagat	tgaatttagg	1200
gttgctggat	atataggaca	agacacgcgc	atctgtcagg	atattgttga	cggtgtagac	1260
gtgcaccgat	tcaccgcctc	agtgttgaac	cactgtgacg	aggaggaggt	aactaaggac	1320
cagcgtagctg	acgctaagcc	tgatacattc	aagccactgt	atggaggaca	gtatggtacg	1380
gatgaccaga	tggcttacta	cgaagcggtc	cgtaacaagt	atcaagacat	cacacaggca	1440
caacaagact	ggctgatgaa	ggtgctacgt	aacaaagaga	ttacccatcc	aacgggtatc	1500
actttctact	accctaacgc	cagcatgagt	agcagtgggt	actgtcagga	cttcccgtcc	1560
gtgtgtaact	accagtgca	gaacctagcg	acagcggaaa	tcatccctat	cgcattgggt	1620
gctatctggc	atgtgatgaa	agcaatgaag	ctacagtcgt	tcttagttaa	cactgtgcat	1680
gactcagtaa	tatctgaatc	accacgtgat	gagttggagc	tgatgtacga	gattagtaag	1740
tgggctttcc	tctgggtgggt	ctacgaatth	ctggacatct	gctatgattt	acaattcaat	1800
gtcccgtctg	gtgttggtta	tcaggctcac	accattggg	gtggtggtta	ggaaatcttc	1860
ttcgagcctt	cgcagtatga	cggcgaggtt	gtgaagatag	acaaaggtga	gataactgtt	1920
acagctatcc	cgcctactaa	gatggatgga	gttgattact	ccgaactgta	taaggagac	1980
aagtaa						1986
<210>	3					
<211>	1719					
<212>	DNA					
<213>	人工序列(Artificial Sequence)					
<400>	3					
atgccgagaa	agatgtatag	ttgtgacttt	gagacaacta	ctaaagtgga	agactgtagg	60
gtatgggcgt	atggttatat	gaatatagaa	gatcacagt	agtacaaaat	aggtaatagc	120
ctggatgagt	ttatggcgtg	ggtgttgaag	gtacaagctg	atctatatth	ccataacctc	180
aaatttgacg	gagctttttat	cattaactgg	ttggaacgta	atggttttta	gtggctcggt	240
gacggattgc	caaacacata	taatacgatc	atatctcgca	tgggacaatg	gtacatgatt	300
gatatatgtt	taggctacaa	agggaaacgt	aagatacata	cagtgatata	tgacagctta	360
aagaaaactac	cgtttcctgt	taagaagata	gctaaagact	ttaaactaac	tgttcttaaa	420
ggtgatattg	attaccacaa	agaaagacca	gtcggctata	agataacacc	cgaagaatac	480
gcctatattha	aaaacgatat	tcagattatt	gcggaagctc	tgtaatttca	gtttaagcaa	540
ggttttagacc	ggatgacagc	aggcagtgac	agtctaaaag	gtttcaagga	tattataacc	600
actaagaaaat	tcaaaaaggt	gtttcctaca	ttgagtcttg	gactcgataa	ggaagtgaga	660
tacgcctata	gaggtgggtt	tacatgggtta	aatgataggt	tcaaagaaaa	agaaatcgga	720
gaaggcatgg	tcttcgatgt	taatagtcta	tatcctgcac	agatgtatag	ccgtctcctt	780
ccatatgggtg	aacctatagt	attcgagggt	aaatacgttt	gggacgaaga	ttacccacta	840
cacatacagc	atatcagatg	tgagttcgaa	ttgaaagagg	gctatatacc	cactatacag	900
ataaaaagaa	gtaggtttta	taaaggtaat	gagtacctaa	aaagtagcgg	cggggagata	960
gccgacctct	ggttgtcaaa	tgtagaccta	gaattaatga	aagaacacta	cgattttatat	1020


```

aacgttgaat atatcagcgg cttaaaattt aaagcaacta caggtttgtt taaagatttt 1080
atagataaat ggacgtacat caagacgaca tcagaaggag cgatcaagca actagcaaaa 1140
ctgatgttaa acagtctata cggtaaattc gctagtaacc ctgatgttac agggaaagtc 1200
ccttatttaa aagagaatgg ggcgctaggt ttcagacttg gagaagagga aacaaaagac 1260
cctgtttata cacctatggg cgttttcatc actgcatggg ctagatacac gacaattaca 1320
gcggcacagg cttgttatga tcggataata tactgtgata ctgacagcat acatttaacg 1380
ggtacagaga tacctgatgt aataaaagat atagttgacc ctaagaaatt gggatactgg 1440
gcacatgaaa gtacattcaa aagagctaaa tatctgagac agaagaccta tatacaagac 1500
atctatatga aagaagtaga tggtaaagta gtagaaggta gtccagatga ttacactgat 1560
ataaaattta gtgttaaatg tgcgggaatg actgacaaga ttaagaaaga ggttacgttt 1620
gagaatttca aagtcggatt cagtcggaaa atgaagccta agcctgtgca agtgccgggc 1680
ggggtggttc tggttgatga cacattcaca atcaaataa 1719

```

<210> 4

<211> 572

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 4

```

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
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
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
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
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
Gly Val Val Leu Val Asp Asp Thr Phe Thr Ile Lys		
565	570	

<210> 5

<211> 53

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 5

accgtggatc ctgagaccca atgttctcgt tagacttttg tctaacgaga aca

53

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 6

cgccagggtt ttcccagtca cgac

24

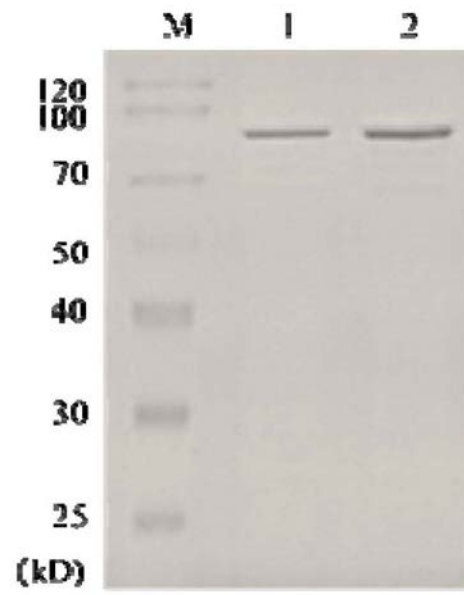


图1

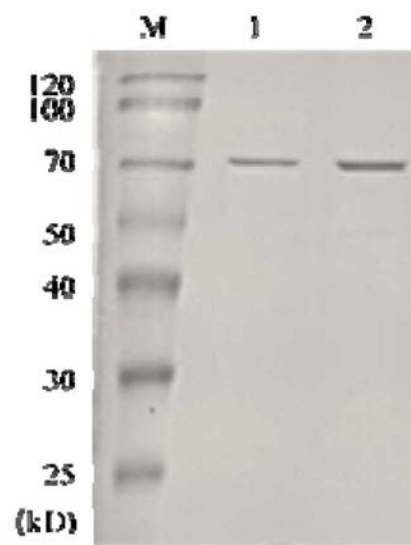


图2

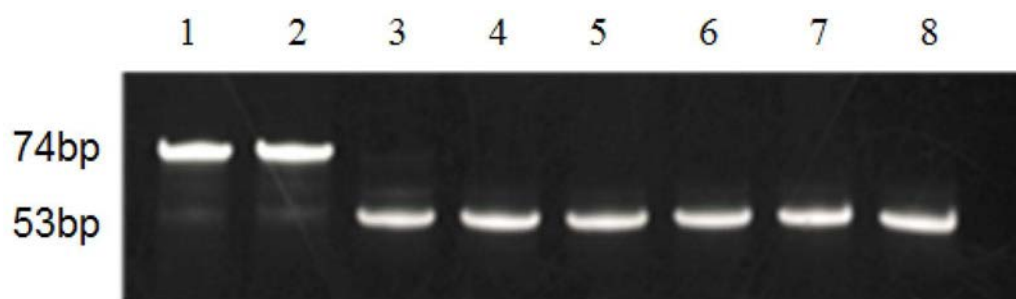


图3

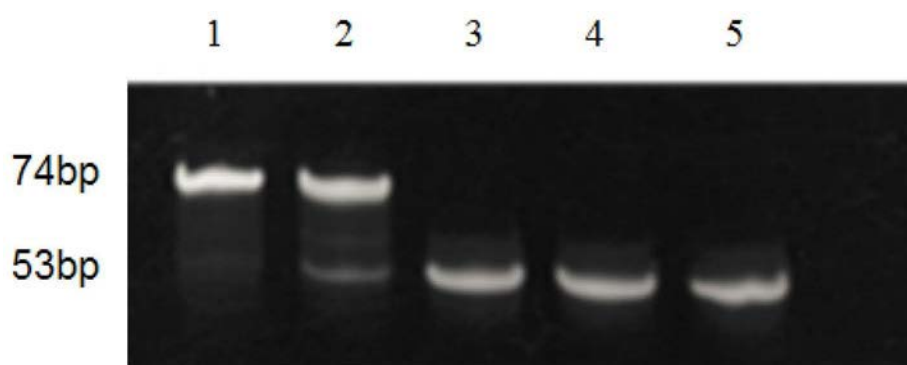


图4

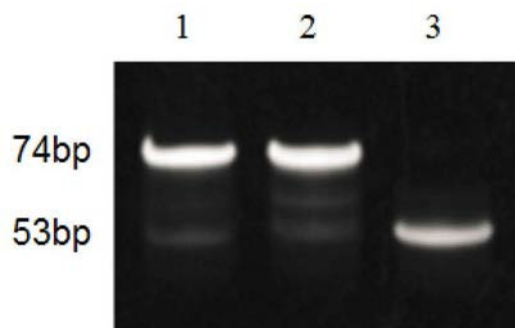


图5

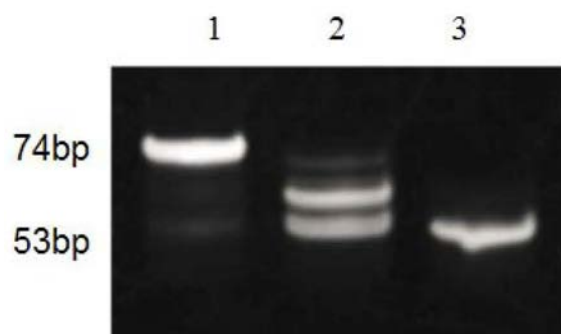


图6

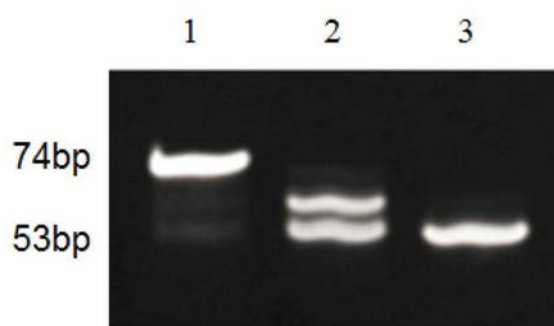


图7

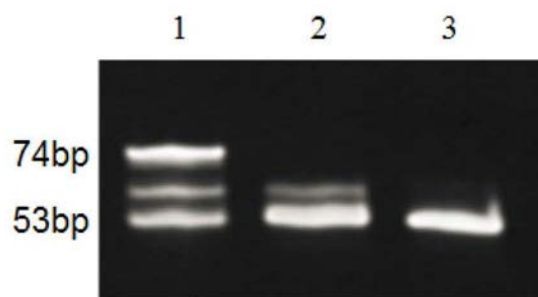


图8

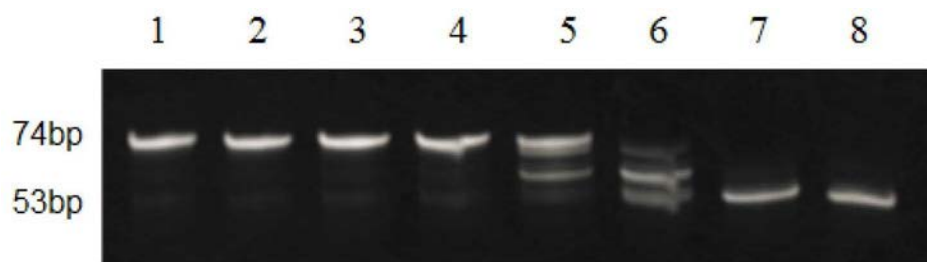


图9

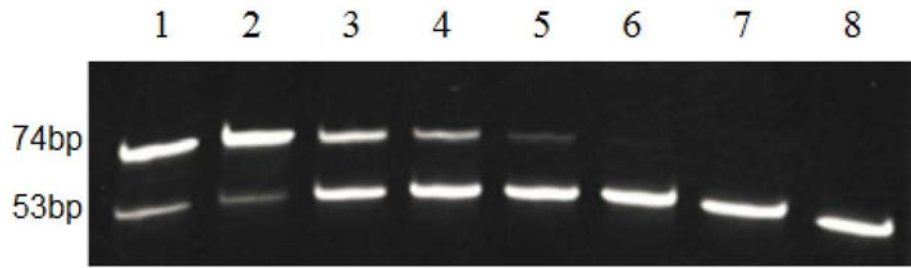


图10

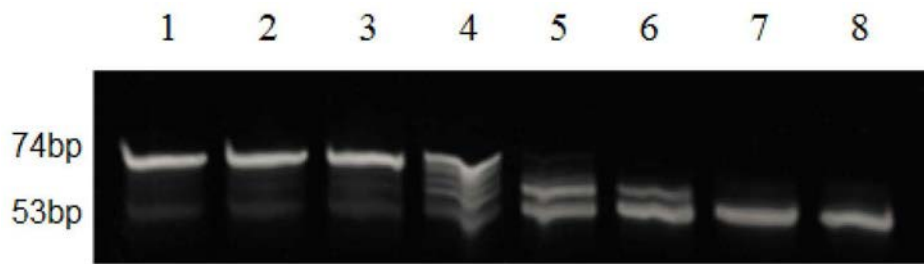


图11

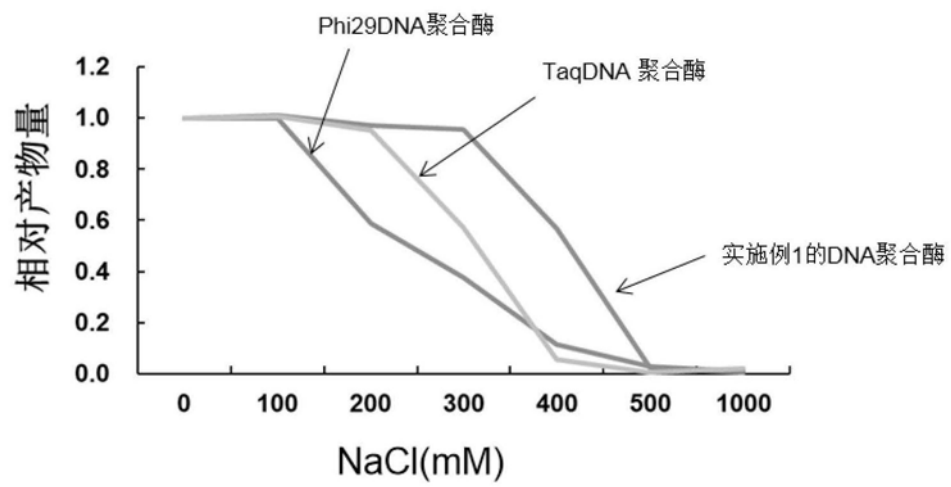


图12

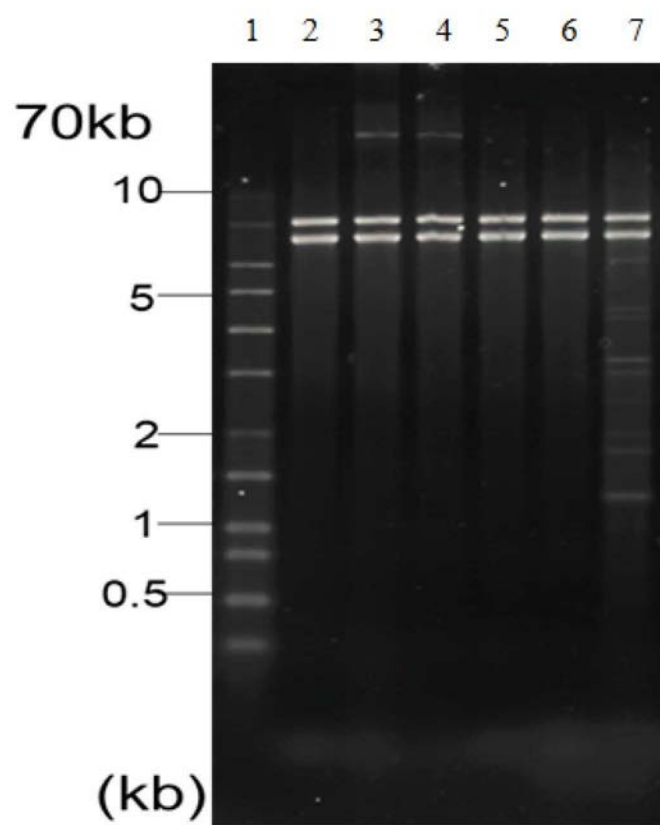


图13