



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 112746094 A

(43)申请公布日 2021.05.04

(21)申请号 201911038986.0

(22)申请日 2019.10.29

(71)申请人 深圳清华大学研究院

地址 518051 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 杨照亮
伊戈尔·伊万诺夫

(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 谭露盈

(51)Int.Cl.

C12Q 1/6818(2018.01)

C12Q 1/48(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

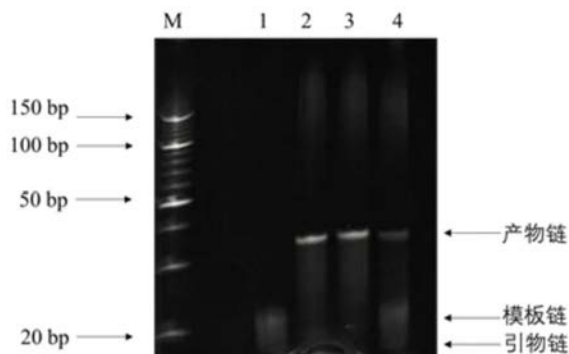
权利要求书2页 说明书8页
序列表1页 附图2页

(54)发明名称

DNA聚合酶的前稳态酶促反应动力学参数的
测定方法

(57)摘要

本发明涉及一种DNA聚合酶的前稳态酶促反应动力学参数的测定方法,该方法包括以下步骤:提供待补平模板和底物,待补平模板包括模板链和与部分模板链配对结合的引物链;将包括不同浓度的第二标记的核苷酸的底物分别与待补平模板和足量的DNA聚合酶混合,以进行延伸反应,并采用停流光谱法检测各延伸反应的荧光强度变化,得到多个荧光强度变化速度;及根据荧光强度变化速度及对应的第二标记的核苷酸的浓度,得到DNA聚合酶的动力学参数。上述方法测定DNA聚合酶的前稳态酶促反应动力学参数准确性更高。



1. 一种DNA聚合酶的前稳态酶促反应动力学参数的测定方法,其特征在于,包括以下步骤:

提供待补平模板和底物,所述待补平模板包括模板链和与部分所述模板链配对结合的引物链,所述待补平模板具有第一标记,所述底物包括具有第二标记的核苷酸,所述第二标记与所述第一标记能够发生荧光共振能量转移,所述模板链未与所述引物链配对结合的核苷酸中只有一个能与所述具有第二标记的核苷酸互补配对;

将包括不同浓度的所述第二标记的核苷酸的底物分别与所述待补平模板和足量的DNA聚合酶混合,以进行不同浓度的所述第二标记的核苷酸的所述引物链的延伸反应,并采用停流光谱法检测各所述延伸反应的荧光强度变化,得到多个荧光强度变化速度;及

根据多个所述荧光强度变化速度及对应的具有所述第二标记的核苷酸的浓度,得到所述DNA聚合酶的前稳态酶促反应动力学参数。

2. 根据权利要求1所述的DNA聚合酶的前稳态酶促反应动力学参数的测定方法,其特征在于,所述DNA聚合酶的前稳态酶促反应动力学参数包括具有所述第二标记的核苷酸的解离常数和结合常数。

3. 根据权利要求1或2所述的DNA聚合酶的前稳态酶促反应动力学参数的测定方法,其特征在于,所述根据多个所述荧光强度变化速度及对应的所述第二标记的核苷酸的浓度,得到所述DNA聚合酶的动力学参数的步骤包括:

对多个所述荧光强度变化速度及对应的具有所述第二标记的核苷酸的浓度进行线性拟合,得到线性公式,将所述线性公式与 $k_{\text{obs}} = k_{\text{on}}[L] + k_{\text{off}}$ 比对,得到具有所述第二标记的核苷酸的解离常数和结合常数,其中,所述 $k_{\text{obs}} = k_{\text{on}}[L] + k_{\text{off}}$ 中, k_{obs} 为荧光强度变化速度, $[L]$ 为具有所述第二标记的核苷酸的浓度, k_{on} 为具有所述第二标记的核苷酸的结合常数, k_{off} 为具有所述第二标记的核苷酸的解离常数。

4. 根据权利要求1所述的DNA聚合酶的前稳态酶促反应动力学参数的测定方法,其特征在于,所述第一标记为荧光供体基团和荧光受体基团中的一种,所述第二标记为荧光供体基团和荧光受体基团中的另一种。

5. 根据权利要求4所述的DNA聚合酶的前稳态酶促反应动力学参数的测定方法,其特征在于,所述荧光供体基团选自Alexa Fluro 350、Alexa Fluro 448、Alexa Fluro 546、Alexa Fluro 555、Alexa Fluro 568、Alexa Fluro 594及Alexa Fluro 647中的一种;

及/或,所述荧光受体基团选自Cy5、Alexa Fluro 488、Alexa Fluro 546、Alexa Fluro 555、Alexa Fluro 568、Alexa Fluro 594及Alexa Fluro 647中的一种。

6. 根据权利要求1所述的DNA聚合酶的前稳态酶促反应动力学参数的测定方法,其特征在于,所述待补平模板上连接有所述第一标记的核苷酸,与所述待补平模板上和具有所述第二标记的核苷酸互补配对的核苷酸的距离为0nm~560nm。

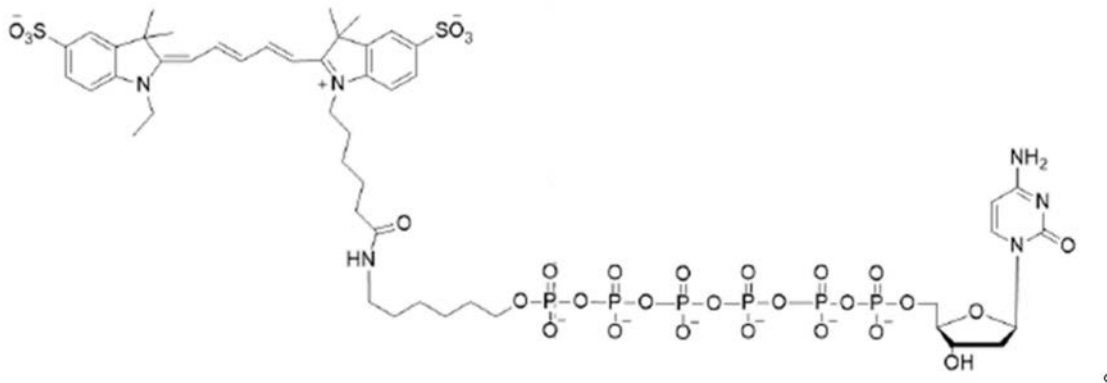
7. 根据权利要求1所述的DNA聚合酶的前稳态酶促反应动力学参数的测定方法,其特征在于,所述引物链具有第一标记;及/或,当所述DNA聚合酶具有3'-5'外切酶活性时,所述引物链的3'端的碱基经硫代修饰。

8. 根据权利要求1所述的DNA聚合酶的前稳态酶促反应动力学参数的测定方法,其特征在于,所述底物还包括未标记的核苷酸,所述未标记的核苷酸的碱基与所述具有第二标记的核苷酸的碱基不同。

9. 根据权利要求1所述的DNA聚合酶的前稳态酶促反应动力学参数的测定方法,其特征
在于,所述模板链的碱基序列如SEQ ID No.1所示;及/或

所述引物链的碱基序列如SEQ ID No.2所示。

10. 根据权利要求1所述的DNA聚合酶的前稳态酶促反应动力学参数的测定方法,其特
征在于,所述具有第二标记的核苷酸的结构式如下:



DNA聚合酶的前稳态酶促反应动力学参数的测定方法

技术领域

[0001] 本发明涉及DNA聚合酶,特别是涉及一种DNA聚合酶的前稳态酶促反应动力学参数的测定方法。

背景技术

[0002] DNA聚合酶(DNA polymerase)是细胞复制DNA中的重要作用酶,广泛存在与几乎所有的生物中。DNA聚合酶能利用DNA或者RNA为模板,dNTP为底物,完成一条核酸链的复制。自然条件下,DNA聚合酶以及其他的蛋白分子共同协作,参与了细胞分裂和基因组复制的过程,在维持遗传物质完整性方面发挥着重要作用。

[0003] DNA聚合酶因其种类、来源、结构和功能的多样性,使得从1959年第一个DNA聚合酶的发现至今,DNA聚合酶的研究从未中止过。研究表明,DNA聚合酶家族拥有众多成员,根据蛋白序列保守性和二级结构特征分析,可以将DNA聚合酶分为A、B、C、D、X、Y和逆转录酶(RT)七个亚家族。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。

[0004] 传统的检测DNA聚合酶活性的方法有放射性同位素法、PCR法及荧光染料掺入法。放射性同位素法是通过DNA聚合酶催化的³²P标记的dNTP掺入到小牛胸腺DNA中,经过TCA沉淀、whatman滤纸过滤,通过测定酸不溶性物质中放射性的含量,从而计算聚合酶活性。放射性同位素法方法易产生放射性污染、操作繁琐,难以实现高通量的检测。

[0005] PCR法是使用5'端有cy5荧光标记的引物进行PCR,在不同的时间内加入等体积的终止液终止反应,终止液中含有竞争性寡聚核苷酸,可阻止荧光产物与模板的重结合。随后使用含8M尿素的聚丙烯酰胺进行电泳验证结果。

[0006] 荧光染料掺入法是通过在PCR反应体系中掺入荧光染料,反应体系的荧光的强度会随着反应的进行逐渐提高,通过实时荧光定量PCR仪给出的图像可得到反应的初始速率,加入酶的浓度不同,初始速率也会不同,根据这一特点可以用已知酶活的聚合酶绘制标准曲线,将未知聚合酶反应的初始速率带入标准曲线,即可得到该未知聚合酶的酶活。

[0007] 虽然PCR法和荧光染料掺入法的检测DNA聚合酶活性能够避免放射性污染,但是PCR法和荧光染料掺入法都是检测的DNA聚合酶在稳态条件下的动力学参数,评价的都是DNA聚合酶在稳态条件下的酶活性。对于DNA聚合酶在前稳态条件下催化反应的动力学参数还无法检测,还无法评价是DNA聚合酶在前稳态条件下的酶活性。

发明内容

[0008] 基于此,有必要提供一种检测DNA聚合酶的前稳态酶促反应动力学参数的测定方法。

[0009] 一种DNA聚合酶的前稳态酶促反应动力学参数的测定方法,包括以下步骤:

[0010] 提供待补平模板和底物,所述待补平模板包括模板链和与部分所述模板链配对结合的引物链,所述待补平模板具有第一标记,所述底物包括具有第二标记的核苷酸,所述第

二标记与所述第一标记能够发生荧光共振能量转移,所述模板链未与所述引物链配对结合的核苷酸中只有一个能与所述具有第二标记的核苷酸互补配对;

[0011] 将包括不同浓度的所述第二标记的核苷酸的底物分别与所述待补平模板和足量的DNA聚合酶混合,以进行不同浓度的所述第二标记的核苷酸的所述引物链的延伸反应,并采用停流光谱法检测各所述延伸反应的荧光强度变化,得到多个荧光强度变化速度;及

[0012] 根据多个所述荧光强度变化速度及对应的所述第二标记的核苷酸的浓度,得到所述DNA聚合酶的前稳态酶促反应动力学参数。

[0013] 上述DNA聚合酶的前稳态酶促反应动力学参数的测定方法,采用待补平模板的延伸反应中第一标记和第二标记发生荧光共振能量转移,并结合快速停留技术检测延伸反应中荧光强度的变化而得到DNA聚合酶的前稳态酶促反应动力学参数。快速反应停留技术能使样品迅速混匀,并能检测除去死时间外,能够检测到毫秒到秒级时间内的荧光强度变化,也能使得荧光的检测更加准确,从而能测得的DNA聚合酶的前稳态的动力学参数且结果准确性更高。

[0014] 在其中一个实施例中,所述DNA聚合酶的前稳态酶促反应动力学参数包括具有所述第二标记的核苷酸的解离常数和结合常数。

[0015] 在其中一个实施例中,所述根据多个所述荧光强度变化速度及对应的所述第二标记的核苷酸的浓度,得到所述DNA聚合酶的动力学参数的步骤包括:

[0016] 对多个所述荧光强度变化速度及对应的具有所述第二标记的核苷酸的浓度进行线性拟合,得到线性公式,将所述线性公式与 $k_{\text{obs}} = k_{\text{on}}[L] + k_{\text{off}}$ 比对,得到具有所述第二标记的核苷酸的解离常数和结合常数,其中,所述 $k_{\text{obs}} = k_{\text{on}}[L] + k_{\text{off}}$ 中, k_{obs} 为荧光强度变化速度, $[L]$ 为具有所述第二标记的核苷酸的浓度, k_{on} 为具有所述第二标记的核苷酸的结合常数, k_{off} 为具有所述第二标记的核苷酸的解离常数。

[0017] 在其中一个实施例中,所述第一标记为荧光供体基团和荧光受体基团中的一种,所述第二标记为荧光供体基团和荧光受体基团中的另一种。

[0018] 在其中一个实施例中,所述荧光供体基团选自Alexa Fluro 350、Alexa Fluro448、Alexa Fluro 546、Alexa Fluro 555、Alexa Fluro 568、Alexa Fluro 594及Alexa Fluro 647中的一种;

[0019] 及/或,所述荧光受体基团选自Cy5、Alexa Fluro 488、Alexa Fluro 546、Alexa Fluro 555、Alexa Fluro 568、Alexa Fluro 594及Alexa Fluro 647中的一种。

[0020] 在其中一个实施例中,所述待补平模板上连接有所述第一标记的核苷酸,与所述待补平模板上和具有所述第二标记的核苷酸互补配对的核苷酸的距离为0nm~560nm。

[0021] 在其中一个实施例中,所述引物链具有第一标记;及/或,当所述DNA聚合酶具有3'-5'外切酶活性时,所述引物链的3'端的碱基经硫代修饰。

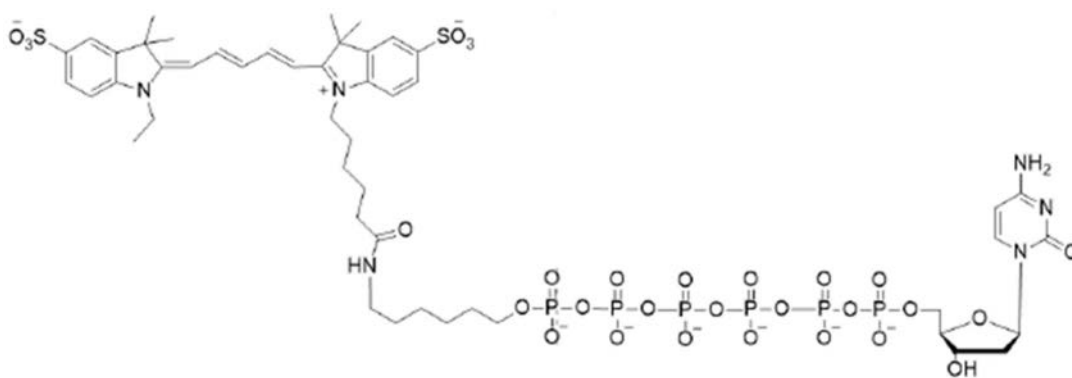
[0022] 在其中一个实施例中,所述底物还包括未标记的核苷酸,所述未标记的核苷酸的碱基与所述具有第二标记的核苷酸的碱基不同。

[0023] 在其中一个实施例中,所述模板链的碱基序列如SEQ ID No.1所示;及/或

[0024] 所述引物链的碱基序列如SEQ ID No.2所示。

[0025] 在其中一个实施例中,所述具有第二标记的核苷酸的结构式如下:

[0026]



附图说明

[0027] 图1为Alexa Fluro 488的激发光谱和发射光谱；

[0028] 图2为Alexa Fluro-647的激发光谱和发射光谱；

[0029] 图3为Cy5的激发光谱和发射光谱；

[0030] 图4为实施例1的PAGE电泳图。

具体实施方式

[0031] 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。

[0032] 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，不是旨在于限制本发明。

[0033] 一实施方式的DNA聚合酶的前稳态酶促反应动力学参数的测定方法，包括步骤S110～步骤S140。

[0034] 步骤S110、提供待补平模板和底物。

[0035] 具体地，待补平模板包括模板链和与部分模板链配对结合的引物链，待补平模板具有第一标记。底物包括具有第二标记的核苷酸，第二标记和第一标记能够发生荧光共振能量转移。模板链未与引物链配对结合的核苷酸中只有一个能与具有第二标记的核苷酸互补配对。

[0036] 一般地，模板链的长度为15bp～50bp，引物链的长度为50bp～45bp。

[0037] 引物链具有第一标记，第一标记为荧光基团。第一标记位于引物链的3'端，与引物链的3'端的碱基相连。可以理解的是，第一标记的位置不限于引物链的3'端，可以是待补平模板的其他位置。例如，第一标记也可以位于模板链的5'端，与模板链的5'端的碱基连接。

[0038] 进一步地，引物链的3'端的碱基被硫代修饰。被硫代修饰之后，原有的碱基之间的磷酸二酯键中的O被替代为S。硫代修饰是为防止具有3'-5'外切酶活性的DNA聚合酶将引物链的3'端连接有第一标记的核苷酸切割。当然，在其他一些实施方式中，还可以采用其他修饰方式对引物链的3'端进行修饰，以避免具有3'-5'外切酶活性的DNA聚合酶将引物链的3'端切割。

[0039] 在本实施方式中，模板链的碱基序列如SEQ ID No.1所示，引物链的碱基序列如

SEQ ID No.2所示。引物链的3'端到5'端方向上的第一个的胸腺嘧啶上连接有第一标记。具体地,如SEQ ID No.1所示的碱基序列为:5'-TTTTTGAAGGCTGGTCGGTCAGTC-3'。如SEQ ID No.2所示的碱基序列为:5'-GACTGACCGACCAGCCT*T*G-3'。需要说明的是,本文中的“T*T*”表示T和T之间、T和G之间的磷酸二酯键中的O被替代为S,将T、T和G之间的磷酸二酯键中的O被替代为S之后,3'端的抗剪切的能力提高。当然,在其他一些实施例中,也可以是3'端的第一个G和第一个T之间磷酸二酯键中的O被替代为S;或第一个T和第二个T之间磷酸二酯键中的O被替代为S。

[0040] 当然,在其他实施方式中,模板链的碱基序列不限于SEQ ID No.1所示,可以是其他任意符合作为模板的碱基序列。相应地,引物链的碱基序列也不限于SEQ ID No.2所示,引物链的碱基序列可以根据模板链进行设计调整。

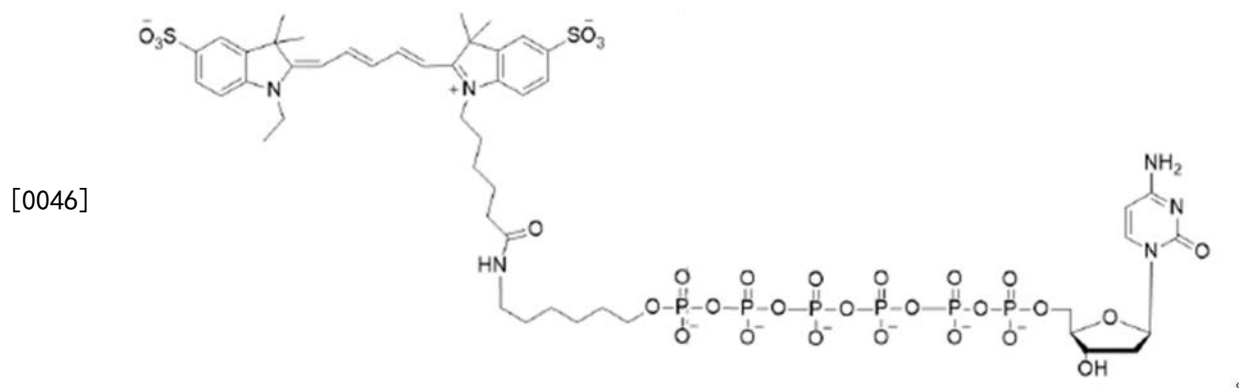
[0041] 进一步地,第一标记为荧光供体基团和荧光受体基团中的一种,第二标记为荧光供体基团和荧光受体基团中的另一种。具体的,荧光供体基团选自Alexa Fluro 488、Alexa Fluro 546、Alexa Fluro 555、Alexa Fluro 568、Alexa Fluro 594及Alexa Fluro 647中的一种。荧光受体基团选自Cy5、Alexa Fluro 488、Alexa Fluro 546、Alexa Fluro 555、Alexa Fluro 568、Alexa Fluro 594及Alexa Fluro 647中的一种。

[0042] 在其中一个实施例中,待补平模板上连接有第一标记的核苷酸,与待补平模板上和具有第二标记的核苷酸互补配对的核苷酸的距离为0nm~560nm。

[0043] 具体地,具有第二标记的核苷酸包括第二标记、碱基(嘌呤碱或嘧啶碱)、脱氧核糖以及磷酸;第二标记、磷酸、脱氧核糖以及碱基依次通过化学键连接。其中,磷酸不限于具有三个磷酸基团的三磷酸,还可以具有其他数量的磷酸基团的磷酸,例如单磷酸、六磷酸等。具有第二标记的核苷酸在DNA聚合酶的作用下整合到待补平模板上,当然,第二标记的核苷酸整合到待补平模板的具体位置需要能够使得第一标记和第二标记发生荧光共振能量转移。

[0044] 在其中一个实施例中,具有第二标记的核苷酸为具有第二标记的脱氧胞嘧啶核糖六磷酸。进一步地,具有第二标记的核苷酸还包括连接臂,第二标记与磷酸通过连接臂连接。连接臂一般为烷基,用于增加第二标记与磷酸之间的距离,减少第二标记对具有第二标记的核苷酸与模板链的结合。

[0045] 在本实施方式中,具有第二标记的核苷酸的结构如下:



[0047] 在其中一个实施例中,底物还包括未标记的核苷酸。具体地,未标记的核苷酸可根据模板链的碱基序列进行提供。进一步地,未标记的核苷酸的碱基与具有第二标记的核苷酸的碱基不同。例如,具有第二标记的核苷酸的碱基为胞嘧啶,则未标记的核苷酸的碱基为

除胞嘧啶以外的其他碱基。

[0048] 在其中一个实施例中,第一标记为Alexa Fluro 488,第二标记为Cy5。荧光染料Cy5与Alexa Fluor 647具有相似的激发和发射光谱范围,但价格相差数十倍。Alexa Fluro-488、Alexa Fluro-647和Cy5的激发光谱和发射光谱依次如图1~图3所示。

[0049] 步骤S120、将待补平模板、底物和DNA聚合酶混合以进行引物链的延伸反应,并采用停流光谱法得到延伸反应的荧光强度变化速度。

[0050] 在本实施方式中,延伸反应的条件为:25℃~37℃,5min~20min。优选地,延伸反应的条件为:30℃~37℃,5min~10min。当然,在其他实施方式中,延伸条件可以根据具体的模板链、引物链及底物进行设计。

[0051] 延伸反应的体系包括:0.5μM~1μM的待补平模板、100μM~1000μM的具有第二标记的核苷酸和0.1μM~0.5μM的DNA聚合酶。

[0052] 本实施方式中,DNA聚合酶为Phi29 DNA聚合酶。当然,DNA聚合酶不限于Phi29 DNA聚合酶,还可以本领域的其他DNA聚合酶。

[0053] 具体地,将待补平模板、包括具有第二标记的核苷酸的底物和足量的DNA聚合酶加入停流光谱仪中进行延伸反应;停流光谱仪检测第一标记或第二标记的荧光强度变化,并收集第一标记或第二标记的荧光强度变化数据,然后停流光谱仪通过指数方程对收集的第一标记或第二标记的荧光强度数据作非线性回归,拟合动力学曲线;然后根据动力学曲线输出延伸反应的荧光强度变化速度。

[0054] 在底物量不足时,相同的DNA聚合酶催化延伸反应的速度不同,则得到的荧光强度变化速度也不同。进一步地,在相同浓度的待补平模板和相同浓度的DNA聚合酶的条件下,分别使用停流光谱仪检测多个不同浓度(未过量的)的具有第二标记的核苷酸的荧光强度变化,得到多个荧光强度变化速度。

[0055] 步骤S130、根据多个荧光强度变化速度,得到DNA聚合酶的动力学参数。

[0056] 在DNA聚合酶促进的DNA扩增反应中,DNA聚合酶首先结合到引物-模板复合物(即上文提到的待补平模板)上,然后再整合游离的脱氧核糖核苷酸。在大部分的DNA聚合酶中,待结合的脱氧核糖核苷酸先进入模板链对向的插入前位点(pre-insertion site),然后进入插入位点(insertion site);随后DNA聚合酶催化脱氧核糖核苷酸整合,引物链延伸一个碱基以及一分子的焦磷酸结合在活性位点附近。伴随新形成的引物链,DNA聚合酶末端移出脱氧核糖核苷酸插入位点,α-磷酸键断裂,焦磷酸释放。因此DNA聚合酶结合和解离dNTP(或者dNTP类似物)的速度,以及产物释放的速度共同决定了DNA聚合酶的聚合速度。

[0057] 在本实施方式中,DNA聚合酶的前稳态酶促反应动力学参数包括具有所述第二标记的核苷酸的解离常数和结合常数。

[0058] 具体地,将多个荧光强度变化速度及其对应的具有第二标记的核苷酸的浓度进行线性拟合,得到线性公式;然后将曲线公式与 $k_{\text{obs}} = k_{\text{on}}[L] + k_{\text{off}}$ 进行比对,得到具有第二标记的核苷酸的解离常数和结合常数。其中, $k_{\text{obs}} = k_{\text{on}}[L] + k_{\text{off}}$ 中,[L]指具有第二标记的核苷酸的浓度, k_{obs} 指停流光谱仪得到的荧光强度变化速度, k_{on} 指具有第二标记的核苷酸的结合常数, k_{off} 指具有第二标记的核苷酸的解离常数。需要说明的是,对于同一种DNA聚合酶和特定的核苷酸底物,其 k_{on} 和 k_{off} 是不变的。

[0059] 上述DNA聚合酶的前稳态酶促反应动力学参数的测定方法,通过待补平模板的延

伸反应中第一标记和第二标记发生荧光共振能量转移,并结合快速停留技术检测底物量不足时的延伸反应中荧光强度的变化,得到不同底物浓度条件下的荧光强度变化速度,从而得到DNA聚合酶的前稳态酶促反应动力学参数。通过快速反应停留技术能使样品迅速混匀,并检测除去死时间外的毫秒到秒级时间内的荧光强度变化,能够用于DNA聚合酶的前稳态酶促反应动力学参数的测定,并且荧光的检测更加准确,测得的DNA聚合酶的前稳态酶促反应动力学参数的准确性更高。

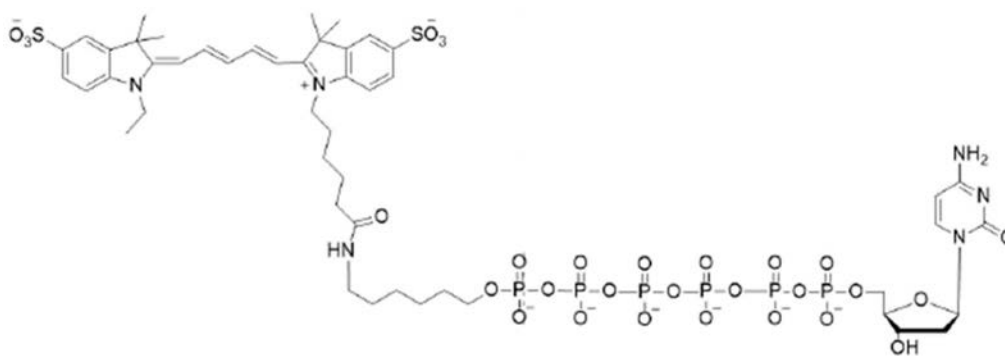
[0060] 具体实施例

[0061] 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。

[0062] 实施例1

[0063] (1) 分别配制如表1所示的对照组、实验组1及实验组2对应的延伸反应体系。表1中:待补平模板的模板由Invitrogen公司合成;待补平模板的模板链的碱基序列如SEQ ID No.1所示,待补平模板的引物链的碱基序列如SEQ ID No.2所示,引物链的3'端的第一个胸腺嘧啶上连接有Alexa Fluro 488,引物链的3'端的第一个、第二个胸腺嘧啶及第一个G之间的磷酸二酯键中的O被S替代(点硫代修饰)。Cy5-dC6P为具有第二标记的核苷酸,Cy5-dC6P的结构式为:

[0064]



[0065] 表1

[0066]

试剂名称	对照组	实验组 1	实验组 2
10x Phi29 Buffer	1μL	1μL	5μL
BSA (20mg/mL)	0.1μL	0.1μL	0.1μL
待补平模板 (10μM)	1μL	1μL	5μL
Phi29 聚合酶 (1μM)	0 μL	1 μL	0.5μL
Cy5-dC6P (1mM)	0μL	0μL	1μL
dATP (10mM)	0μL	0μL	1μL
dNTP (10mM)	1μL	1μL	0μL
ddH ₂ O	加至总体积 10μL	加至总体积 10μL	加至总体积 10μL

[0067] (2) 分别将对照组、实验组1及实验组2对应的延伸反应体系在温度为30℃的条件下反应10min,得到各组的反应产物。

[0068] (3) 分别在各组的反应产物中加入6xDNA loading后,上样到15%TBU聚丙烯酰胺

凝胶 (PAGE胶) 中电泳, 其中电泳条件为180v、1.5h。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。检测结果如图4所示。图4中, M泳道为DNA Maker, 泳道1为对照组, 泳道2和3均为实验组1, 泳道4为实验组2。

[0069] 由图1可知, Cy5-dC6P能够作为DNA延伸反应的底物。

[0070] 实施例2

[0071] (1) 配制如表2所示的体系, 其中体系1为7份, 体系2~体系8均为1份。

[0072] 表2

试剂名称	体系 1	体系 2	体系 3	体系 4	体系 5	体系 6	体系 7	体系 8
10x Phi29 Buffer	100μL	100μL	100μL	100μL	100μL	100μL	100μL	100μL
BSA(20 mg/ml)	10μL	10μL	10μL	10μL	10μL	10μL	10μL	10μL
[0073] 模板: 引物(10uM)	10μL	0μL	0μL	0μL	0μL	0μL	0μL	0μL
Cy5-dC6P (1mM)	0μL	0μL	5μL	10μL	20μL	30μL	40μL	80μL
dATP (100mM)	0μL	20μL	20μL	20μL	20μL	20μL	20μL	20μL
Phi29 聚合酶(1uM)	500μL	0μL	0μL	0μL	0μL	0μL	0μL	0μL
[0074] ddH ₂ O	加至总体积 1000μL	加至总体积 1000μL	加至总体积 1000μL	加至总体积 1000μL	加至总体积 1000μL	加至总体积 1000μL	加至总体积 1000μL	加至总体积 1000μL

[0075] (2) 将1份体系1和1份体系2组合作为第一组进行反应和检测: 按照标准操作模式将1份体系1注入停流光谱仪 (英国光应用物理公司 (Applied Photophysics) 的SX20停流光谱仪) 的注射器1、1份体系2注入停流光谱仪的注射器2, 采用注入停流光谱仪, 采用单次混合 (反应物按照1:1混合) 后进行反应, 检测Alexa Fluro-488荧光强度的变化, 得出第一组Cy5-dC6P的荧光强度变化速度。其中, 反应的条件为循环水浴30℃、5min。停留光谱仪的设置为: Bandwidth, 8nm; Pathlength, 2mm; 激发狭缝为2nm; Alexa Fluro 488的激发波长选择493nm, Alexa Fluro 488的发射波长选择带通滤光XF3084 (510nm~570nm, 美国Omega Optical公司)。

[0076] 将1份体系1和1份体系3组合作为第二组、将1份体系1和1份体系4组合作为第三组、将1份体系1和1份体系5组合作为第四组、将1份体系1和1份体系6组合作为第五组、将1份体系1和1份体系7组合作为第六组、将1份体系1和1份体系8组合作为第七组, 分别注入停流光谱仪, 并采用与第一组相同的反应条件和检测条件进行反应和检测, 得到各组的Cy5-dC6P的荧光强度变化速度。

[0077] (3) 根据步骤(2)得到的多个荧光Cy5-dC6P的荧光强度变化速度及对应的Cy5-dC6P浓度进行拟合曲线, 得到线性公式。将该公式与公式: $k_{obs} = k_{on}[L] + k_{off}$ 进行比对, 得到Phi29聚合酶的 k_{on} 和 k_{off} 。

[0078] 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。

[0079] 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,本发明专利的保护范围应以所附权利要求为准。

序列表

<110> 深圳清华大学研究院

安序源生物科技(深圳)有限公司

<120> DNA聚合酶的前稳态酶促反应动力学参数的测定方法

<160> 2

<170> SIP0SequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

ttttttgcaa ggctggtcgg tcagtc 26

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

gactgaccga ccagccttg 19

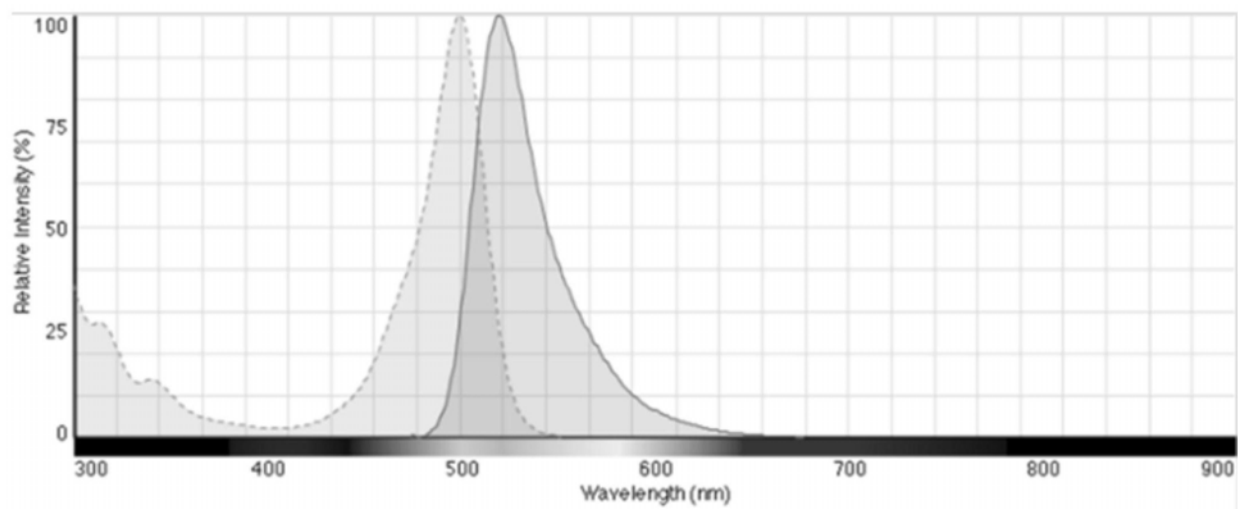


图1

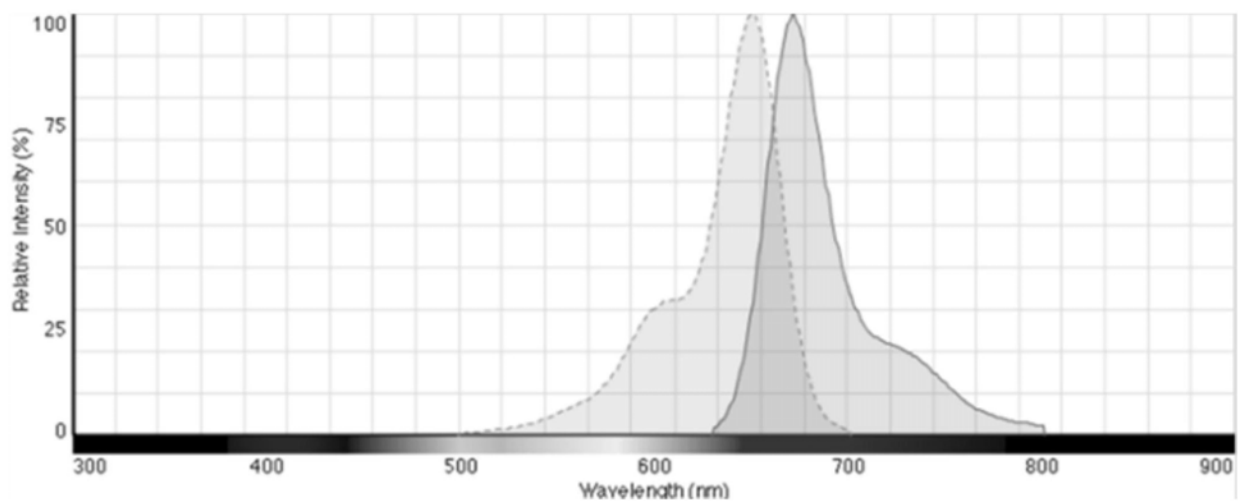


图2

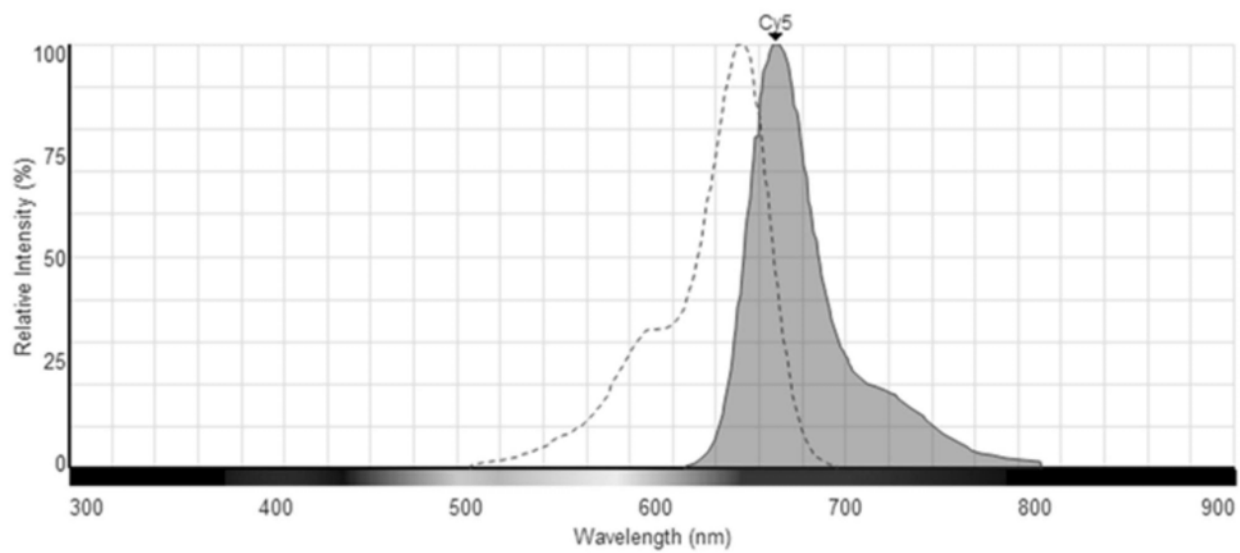


图3

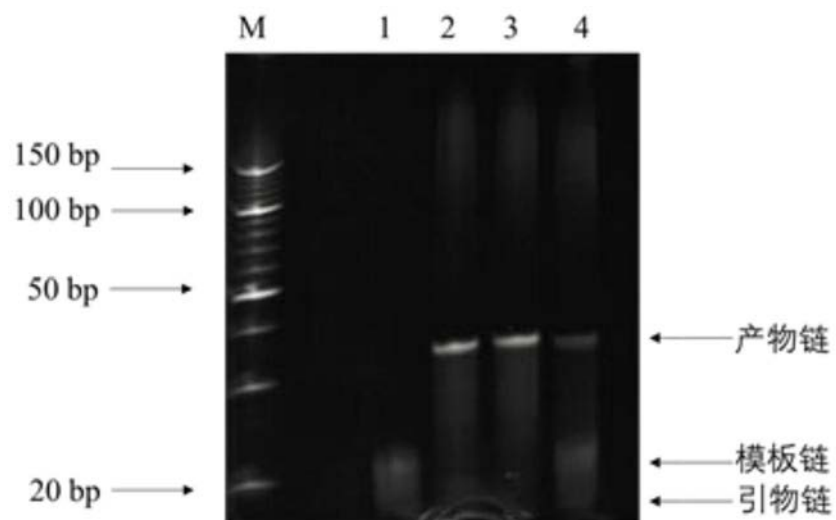


图4