

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2024年7月11日 (11.07.2024)



(10) 国际公布号
WO 2024/145824 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 9/12 (2006.01) C12N 15/11 (2006.01)
C12N 15/54 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2023/070450

(22) 国际申请日: 2023年1月4日 (04.01.2023)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 中元汇吉生物技术股份有限公司
(ZYBIO INC.) [CN/CN]; 中国重庆市大渡口区
建桥工业园C区太康路6号30栋第1-4
层, Chongqing 400082 (CN)。

(72) 发明人: 兰山 (LAN, Shan); 中国重庆市大渡口区
建桥工业园C区太康路6号30栋第1-4层,
Chongqing 400082 (CN)。王佑富 (WANG, Youfu);
中国重庆市大渡口区建桥工业园C区太康路
6号30栋第1-4层, Chongqing 400082 (CN)。徐

玉群 (XU, Yuqun); 中国重庆市大渡口区建桥工
业园C区太康路6号30栋第1-4层, Chongqing
400082 (CN)。周娇娇 (ZHOU, Jiaojiao); 中国重
庆市大渡口区建桥工业园C区太康路6号30
栋第1-4层, Chongqing 400082 (CN)。

(74) 代理人: 北京知元同创知识产权代理事务所 (普
通合伙) (BEIJING ORIGINTELLIGENCE IP LAW
FIRM); 中国北京市海淀区上地东路35号院1号
楼4层3-509刘元霞, Beijing 100085 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家
保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU,
CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ,
IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ,
LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE,
PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE,

(54) Title: DNA POLYMERASE MUTANT, PREPARATION THEREFOR AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种DNA聚合酶突变体、制备及其应用

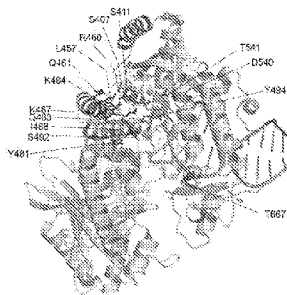
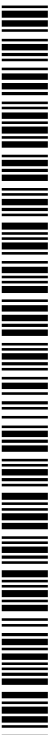


图1

(57) Abstract: The present invention relates to a DNA polymerase mutant, the preparation therefor and the use thereof. The amino acid sequence of the DNA polymerase is as shown in SEQ ID NO: 1; and at least one of 18 amino acid residues at position 406, position 407, position 411, position 412, position 457, position 460, position 461, position 464, position 481, position 483, position 484, position 487, position 488, position 492, position 494, position 540, position 541 and position 667 of an amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 is mutated to obtain a mutant protein having DNA polymerase activity. Compared with wild-type polymerase, the mutant 9°N DNA polymerase has higher polymerization activity. The mutant catalyzes the generation of more substrates within the same amount of time.

(57) 摘要: 本发明涉及一种DNA聚合酶突变体、制备以及其应用, DNA聚合酶氨基酸序列为SEQ ID NO:1所示, 且对SEQ ID NO:1氨基酸序列的第406位、第407位、第411位、第412位、第457位、第460位、第461位、第464位、第481位、第483位、第484位、第487位、第488位、第492位、第494位、第540位、第541位和第667位共18位中至少一位的氨基酸残基进行突变, 得到具有DNA聚合酶活性的突变蛋白。所述突变的9°N DNA聚合酶同野生型聚合酶相比较, 具有更高的聚合活性。所述突变体在相同时间内, 催化生成更多的底物。



WO 2024/145824 A1

SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

- (84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区
保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,
NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚
(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE,
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR,
HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO,
PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN,
TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

一种DNA聚合酶突变体、制备及其应用

技术领域

本发明涉及生物技术领域、核酸扩增领域、酶工程领域，具体涉及一种 DNA 聚合酶突变体、制备以及其应用。

背景技术

DNA 聚合酶（DNA polymerase）是细胞复制 DNA 的重要作用酶，以 DNA 为复制模板，从将 DNA 由 5'端点开始复制到 3'端的酶。DNA 聚合酶的主要活性是催化 DNA 的合成（在具备模板、引物、dNTP 等的情况下）及其相辅的活性。

DNA 聚合酶是保证核苷酸的掺入、SNPs 检测或者更广范的测序重要的工具，比如边合成边测序的应用。然而在边合成边测序的过程中，底物为非天然的核苷酸，大部分天然聚合酶对于持续合成或者非天然核苷酸的掺入能力低，无法应用到测序中。

耐热DNA聚合酶多应用在PCR技术中。各种耐热DNA聚合酶均具有5'-3'聚合酶活性，但不一定具有3'-5'和5'-3'的外切酶活性。3'-5'外切酶活性可以消除错配，切平末端；5'-3'外切酶活性可以消除合成障碍。由于上述这些不同，可以将耐热DNA聚合酶分为三类：

一、普通耐热DNA聚合酶

1. Taq DNA 聚合酶

由一种水生栖热菌yT1株分离提取出，是发现的耐热DNA聚合酶中活性最高的一种，达200,000单位/mg。具有5'-3'外切酶活性，但不具有3'-5'外切酶活性，因而在合成中对某些单核苷酸错配没有校正功能。

TaqDNA聚合酶还具有非模板依赖性活性，可将PCR双链产物的每一条链3'

加入单核苷酸尾，故可使PCR产物具有3'突出的单A核苷酸尾；另一方面，在仅有dTTP存在时，它可将平端的质粒的3'端加入单T核苷酸尾，产生3'端突出的单T核苷酸尾。应用这一特性，可实现PCR产物的T-A克隆法。

2. Tth DNA 聚合酶

从*Thermus thermophilus* HB8中提取而得，改酶在高温和MnCl₂条件下，能有效地逆转录RNA；当加入Mg²⁺后，该酶的聚合活性大大增加，从而使cDNA合成与扩增可用一种酶催化。

二、高保真DNA聚合酶

1. pfu DNA 聚合酶

是从*Pyrococcus furiosus*中精制而成的高保真耐高温DNA聚合酶，它不具有5'-3'外切酶活性，但具有3'-5'外切酶活性，可校正PCR扩增过程中产生的错误，使产物的碱基错配率极低。PCR产物为平端，无3'端突出的单A核苷酸。

2. Vent DNA 聚合酶

该酶是从*Litoralis*栖热球菌中分离出的，不具有5'-3'外切酶活性，但具有3'-5'外切酶活性，可以去除错配的碱基，具有校对功能。

三、DNA序列测定中应用的耐热DNA聚合酶

1. Promega公司测序级TaqDNA聚合酶

是在TaqDNA聚合酶的基础上对它进行修饰，去除5'-3'外切酶活性，保证测序记过的高度准确性，可产生强度均一的测序条带，背景清晰。

2. Bca Best DNA 聚合酶

从*Bacillus Caldotenax* YT-G菌株中提纯，并使其5'-3'外切酶活性缺失的DNA聚合酶。它的伸长性能优越；可抑制DNA二级结构形成，可以得到均一的DNA测序带。

3. Sac DNA 聚合酶

从酸热浴流化裂片菌中分离，无3'-5'外切酶活性，可用于DNA测序，但测序反应中ddNTP/dNTP的比率要高。

目前主流二代测序中的核心酶为DNA聚合酶，但是DNA聚合酶种类繁多，且天然的DNA聚合酶很难应用于现有的测序平台，需要花费大量的资源改造天然的DNA聚合酶来适应测序中对酶的要求，比如提高反应速度、稳定性，测序准确性等性能。

目前大量的研发是针对DNA聚合酶的聚合活性的位点进行半理性设计或者计算机模拟来改造，对DNA聚合酶进行定点突变以提高其热稳定性、及加快反应速率，从而提升测序的整体质量。本发明旨在通过半理性设计，对野生型9°N DNA聚合酶分子内部的位点进行定点突变提高其掺入非天然核苷酸的反应速度来缩短测序时间。

发明内容

为了改善上述技术问题，本发明提供一种重组耐热性的9°N DNA聚合酶突变体，提高非天然核苷酸的掺入能力从而提升了在测序中酶整体的催化效率。

第一方面，本发明提供一种具有DNA聚合酶活性的DNA聚合酶突变体，为如下A1)-A3)中的任一种：

A1)对9°N DNA聚合酶的氨基酸序列进行氨基酸残基的置换和/或缺失和/或添加得到的DNA聚合酶突变体；

A2)对9°N DNA聚合酶的氨基酸序列进行氨基酸残基的修饰得到的DNA聚合酶突变体；

A3)在A1)或A2)的中间或/和N端或/和C端连接标签得到的具有DNA聚合酶活性的融合蛋白质。

为了使A1)或A2)中的DNA聚合酶突变体便于纯化，可在A1)或A2)的DNA聚合酶突变体的中间或/和N端或/和C端连接上如表1所示的标签。

表1 标签的序列

标签	残基	序列
Poly-Arg	5-6	5×Arg、6×Arg

Poly-His	2-10	6×His、10×His
FLAG	8	DYKDDDDK
Strep-tag II	8	WSHPQFEK
c-myc	10	EQKLISEEDL

在一些实施方案中，上述 DNA 聚合酶突变体可人工合成，也可先合成其编码基因、再进行生物表达得到。

在一些实施方案中，9°N DNA 聚合酶的氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示。

在一些实施方案中，A1)中所述氨基酸残基的置换和/或缺失和/或添加为一个或几个氨基酸残基的置换和/或缺失和/或添加；

和/或，A2)中所述氨基酸残基的修饰为一个或几个氨基酸残基的修饰。

在一些实施方案中，A1)中 DNA 聚合酶突变体与 9°N DNA 聚合酶具有 75%或 75%以上同一性。上述 75%或 75%以上同一性，可为 80%、85%、90%或 95%以上的同一性，例如 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性。

在一些实施方案中，上述 DNA 聚合酶突变体为对 9°N DNA 聚合酶自 N 端起起的第 406 位、第 407 位、第 411 位、第 412 位、第 457 位、第 460 位、第 461 位、第 464 位、第 481 位、第 483 位、第 484 位、第 487 位、第 488 位、第 492 位、第 494 位、第 540 位、第 541 位和第 667 位中的至少一个位点进行置换和/或修饰得到的 DNA 聚合酶突变体。

在一些实施方案中，A3)中融合蛋白质具体可为在 A1)或 A2)的 DNA 聚合酶突变体的中间或其氨基末端或羧基末端连接 his 标签和/或 TEV 酶识别序列得到的蛋白质。

在一些实施方案中，上述 DNA 聚合酶突变体为如下 B1)-B20)中的任一种：

B1)将 9°N DNA 聚合酶自 N 端起起的第 411 位的丝氨酸残基置换为丙氨酸残

基得到的 DNA 聚合酶突变体 (ZYC5) ;

B2)将 9°N DNA 聚合酶自 N 端起的第 411 位的丝氨酸残基替换为亮氨酸残基得到的 DNA 聚合酶突变体 (ZYC6) ;

B3)将 9°N DNA 聚合酶自 N 端起的第 457 位的亮氨酸残基替换为苏氨酸残基得到的 DNA 聚合酶突变体 (ZYC8) ;

B4)将 9°N DNA 聚合酶自 N 端起的第 461 位的谷氨酰胺残基替换为丙氨酸残基得到的 DNA 聚合酶突变体 (ZYC11) ;

B5)将 9°N DNA 聚合酶自 N 端起的第 667 位的苏氨酸残基替换为谷氨酰胺残基得到的 DNA 聚合酶突变体 (ZYC24) ;

B6)将 9°N DNA 聚合酶自 N 端起的第 406 位的精氨酸残基替换为丙氨酸或亮氨酸残基得到的 DNA 聚合酶突变体 (ZYC1、ZYC2) ;

B7)将 9°N DNA 聚合酶自 N 端起的第 407 位的丝氨酸残基替换为异亮氨酸或赖氨酸残基得到的 DNA 聚合酶突变体 (ZYC3、ZYC4) ;

B8)将 9°N DNA 聚合酶自 N 端起的第 412 位的异亮氨酸残基替换为亮氨酸残基得到的 DNA 聚合酶突变体 (ZYC7) ;

B9)将 9°N DNA 聚合酶自 N 端起的第 457 位的亮氨酸残基替换为丙氨酸残基得到的 DNA 聚合酶突变体 (ZYC9) ;

B10)将 9°N DNA 聚合酶自 N 端起的第 460 位的精氨酸残基替换为甘氨酸残基得到的 DNA 聚合酶突变体 (ZYC10) ;

B11)将 9°N DNA 聚合酶自 N 端起的第 464 位的赖氨酸残基替换为苏氨酸残基得到的 DNA 聚合酶突变体 (ZYC12) ;

B12)将 9°N DNA 聚合酶自 N 端起的第 481 位的酪氨酸残基替换为丙氨酸残基得到的 DNA 聚合酶突变体 (ZYC13) ;

B13)将 9°N DNA 聚合酶自 N 端起的第 483 位的谷氨酰胺残基替换为亮氨酸或谷氨酸残基得到的 DNA 聚合酶突变体 (ZYC14、ZYC15) ;

B14)将 9°N DNA 聚合酶自 N 端起的第 484 位的精氨酸残基替换为丙氨酸或

亮氨酸残基得到的 DNA 聚合酶突变体 (ZYC16、ZYC17)；

B15)将 9°N DNA 聚合酶自 N 端起的第 487 位的赖氨酸残基替换为精氨酸残基得到的 DNA 聚合酶突变体 (ZYC18)；

B16)将 9°N DNA 聚合酶自 N 端起的第 488 位的异亮氨酸残基替换为丙氨酸残基得到的 DNA 聚合酶突变体 (ZYC19)；

B17)将 9°N DNA 聚合酶自 N 端起的第 492 位的丝氨酸残基替换为天冬氨酸残基得到的 DNA 聚合酶突变体 (ZYC20)；

B18)将 9°N DNA 聚合酶自 N 端起的第 494 位的酪氨酸残基替换为精氨酸或谷氨酸残基得到的 DNA 聚合酶突变体 (ZYC21)；

B19)将 9°N DNA 聚合酶自 N 端起的第 540 位的天冬氨酸残基替换为丝氨酸残基得到的 DNA 聚合酶突变体 (ZYC22)；

B20)将 9°N DNA 聚合酶自 N 端起的第 541 位的苏氨酸残基替换为丙氨酸残基得到的 DNA 聚合酶突变体 (ZYC23)。

在一些实施方案中，上述 DNA 聚合酶突变体为如下 B1)-B5)中的任一种：

B1)将 9°N DNA 聚合酶自 N 端起的第 411 位的丝氨酸残基替换为丙氨酸残基得到的 DNA 聚合酶突变体 (ZYC5)；

B2)将 9°N DNA 聚合酶自 N 端起的第 411 位的丝氨酸残基替换为亮氨酸残基得到的 DNA 聚合酶突变体 (ZYC6)；

B3)将 9°N DNA 聚合酶自 N 端起的第 457 位的亮氨酸残基替换为苏氨酸残基得到的 DNA 聚合酶突变体 (ZYC8)；

B4)将 9°N DNA 聚合酶自 N 端起的第 461 位的谷氨酰胺残基替换为丙氨酸残基得到的 DNA 聚合酶突变体 (ZYC11)；

B5)将 9°N DNA 聚合酶自 N 端起的第 667 位的苏氨酸残基替换为谷氨酰胺残基得到的 DNA 聚合酶突变体 (ZYC24)。

在一些实施方案中，上述蛋白可以以核苷酸或核苷酸类似物为底物。所述核苷酸类似物为对核苷酸进行修饰得到的物质。所述核苷酸类似物具体可为用

荧光基团修饰核苷酸得到的物质。

第二方面，本发明提供与上述 DNA 聚合酶突变体相关的生物材料，所述生物材料为下述 C1)至 C5)中的任一种：

C1)编码上述 DNA 聚合酶突变体的核酸分子；

C2)含有 C1)所述核酸分子的表达盒；

C3)含有 C1)所述核酸分子的重组载体、或含有 C2)所述表达盒的重组载体；

C4)含有 C1)所述核酸分子的重组微生物、或含有 C2)所述表达盒的重组微生物、或含有 C3)所述重组载体的重组微生物；

C5)含有 C1)所述核酸分子的转基因细胞系、或含有 C2)所述表达盒的转基因细胞系。

在一些实施方案中，C1)所述核酸分子为下述 1)、2)或 3)：

1)将 9°N DNA 聚合酶的编码基因的序列进行至少一个核苷酸的置换得到的编码上述 DNA 聚合酶突变体的 cDNA 分子或 DNA 分子；

2)与 1)限定的核苷酸序列具有 75%或 75%以上同一性，且编码上述 DNA 聚合酶突变体的 cDNA 分子或基因组 DNA 分子；

3)在严格条件下与 1)限定的核苷酸序列杂交，且编码上述 DNA 聚合酶突变体的 cDNA 分子或基因组 DNA 分子。

其中，所述核酸分子可以是 DNA，如 cDNA、基因组 DNA 或重组 DNA；所述核酸分子也可以是 RNA，如 mRNA 或 hnRNA 等。

本领域普通技术人员可以很容易地采用已知的方法，例如定向进化和点突变的方法，对本发明的编码上述 DNA 聚合酶突变体的核苷酸序列进行突变。那些经过人工修饰的，具有与本发明的 DNA 聚合酶突变体的核苷酸序列 75%或者更高同一性的核苷酸，只要编码上述 DNA 聚合酶突变体且具有上述 DNA 聚合酶突变体功能，均是衍生于本发明的核苷酸序列并且等同于本发明的序列。

这里使用的术语“同一性”指与天然核酸序列的序列相似性。“同一性”包括

与本发明的编码 DNA 聚合酶突变体的氨基酸序列的核苷酸序列具有 75% 或更高, 或 85% 或更高, 或 90% 或更高, 或 95% 或更高同一性的核苷酸序列。同一性可以用肉眼或计算机软件进行评价。使用计算机软件, 两个或多个序列之间的同一性可以用百分比(%)表示, 其可以用来评价相关序列之间的同一性。

上述生物材料中, 所述严格条件是在 $2\times$ SSC, 0.1% SDS 的溶液中, 在 68°C 下杂交并洗膜 2 次, 每次 5min, 又于 $0.5\times$ SSC, 0.1% SDS 的溶液中, 在 68°C 下杂交并洗膜 2 次, 每次 15min; 或, $0.1\times$ SSPE(或 $0.1\times$ SSC)、0.1% SDS 的溶液中, 65°C 条件下杂交并洗膜。

上述生物材料中, C2)所述的含有编码上述 DNA 聚合酶突变体的核酸分子的表达盒(上述 DNA 聚合酶突变体基因表达盒), 是指能够在宿主细胞中表达上述 DNA 聚合酶突变体的 DNA, 该 DNA 不但可包括启动上述 DNA 聚合酶突变体基因转录的启动子, 还可包括终止上述 DNA 聚合酶突变体基因转录的终止子。进一步, 所述表达盒还可包括增强子序列。

可用现有的表达载体构建含有所述上述 DNA 聚合酶突变体基因表达盒的重组载体。

上述生物材料中, 所述载体可为质粒、黏粒、噬菌体或病毒载体。所述质粒具体可为 pET-22(b)。

所述重组载体可为在所述载体的多克隆位点插入所述编码上述 DNA 聚合酶突变体的核酸分子得到的重组载体。

上述生物材料中, 所述微生物可为酵母、细菌、藻或真菌。其中, 细菌可为大肠杆菌, 如大肠杆菌 BL21(DE3)。

在本发明的实施例中, 所述重组微生物具体向大肠杆菌 BL21(DE3)中导入所述重组载体得到的载体。

上述生物材料中, 所述转基因细胞系可包括繁殖材料, 也可不包括繁殖材料。

第三方面，本发明提供上述 DNA 聚合酶突变体的制备方法，包括将上述 DNA 聚合酶突变体的编码基因导入生物细胞中使上述 DNA 聚合酶突变体的编码基因表达，得到上述 DNA 聚合酶突变体。

上述方法中，所述将上述 DNA 聚合酶突变体的编码基因导入生物细胞可为将含有所述上述 DNA 聚合酶突变体的编码基因的重组表达载体导入所述生物细胞中，得到重组细胞。

所述上述 DNA 聚合酶突变体的编码基因具体可为上文中 C1)所述核酸分子。

所述重组表达载体可为将所述上述 DNA 聚合酶突变体的编码基因导入表达载体中得到重组载体。所述表达载体可为质粒、黏粒、噬菌体或病毒载体。所述质粒具体可为 pET-22(b)。

上述方法中，所述生物细胞可为微生物、动物细胞或植物细胞。所述微生物具体可为大肠杆菌，如大肠杆菌 BL21(DE3)。

上述方法中，所述使上述 DNA 聚合酶突变体的编码基因表达具体可为培养所述重组细胞，得到培养物，使所述重组细胞中的所述上述 DNA 聚合酶突变体的编码基因得到表达。

上述方法还可包括从所述培养物中纯化上述 DNA 聚合酶突变体。从所述培养物中纯化上述 DNA 聚合酶突变体具体可利用亲和层析的方法和离子交换层析的方法进行纯化。

第四方面，本发明提供下述任一应用：

E1)上述 DNA 聚合酶突变体在作为 DNA 聚合酶中的应用；

E2)上述生物材料在制备 DNA 聚合酶中的应用；

E3)上述 DNA 聚合酶突变体在 DNA 聚合反应中的应用；

E4)上述 DNA 聚合酶突变体在制备聚合酶链式反应产品中的应用；

E5)上述生物材料在聚合酶链式反应中的应用；

E6)上述生物材料在制备聚合酶链式反应产品中的应用；

E7)上述方法在制备 DNA 聚合反应产品中的应用；

E8)上述 DNA 聚合酶突变体在测序中的应用；

E9)上述生物材料在测序中的应用；

E10)上述 DNA 聚合酶突变体在制备测序产品中的应用；

E11)上述生物材料在制备测序产品中的应用；

E12)上述方法在制备测序产品中的应用。

本发明中，所述 DNA 聚合酶可以以核苷酸或核苷酸类似物为底物。所述核苷酸类似物为对核苷酸进行修饰得到的物质。所述核苷酸类似物具体可为用荧光基团修饰核苷酸得到的物质。

上述 DNA 聚合酶突变体的编码基因可通过将编码 9^oN DNA 聚合酶的 DNA 序列中进行一个或几个核苷酸的突变，和/或在其序列中间和/或 5'端和/或 3'端连上表 1 所示的标签的编码序列得到。

通过对 SEQ NO.1 序列中聚合功能区域结构分析和预测，如图 1，筛选得到可能提高 9^oN DNA 聚合酶突变体聚合活性的突变体的位点信息。

本发明还提供一种用于实施非天然核苷酸掺入反应的试剂盒，在 3'糖羟基处修饰所述经修饰的核苷酸，使得取代基在大小上大于天然存在的 3'羟基基团，在模板的 5'磷酸基团处所述的修饰的核苷酸，使得取代基在大小上大于天然存在的 5'磷酸基团，通过在规定时间内 FRET 信号来检测所述分离的蛋白质掺入非天然的核苷酸速度来描述酶的性能。

本发明是基于所述SEQ NO:1序列的DNA聚合酶的三级结构，设计了一系列在分子外部、分子内部、底物附近、DNA结合位点附近的位点突变，得到的蛋白质突变体应用上述检测中，部分突变体蛋白的掺入非天然核苷酸的速度高于SEQ NO:1序列所示的DNA聚合酶，优选示例，第411位丝氨酸突变为丙氨酸，第411位丝氨酸突变为亮氨酸，第457位亮氨酸突变为苏氨酸，第461位谷氨酰胺

氨突变为丙氨酸，第676位苏氨酸突变为谷氨酰胺。

突变体：是指该基因相对于天然或野生型基因具有至少一个碱基(核苷酸)改变、缺失或插入。所述突变(一个或多个核苷酸的改变、缺失和/或插入)可以在基因的编码区或可以在内含子、3'UTR、5'UTR 或启动子区。作为非限制性实例，突变基因可以是在启动子区域内插入可以增加或减少基因表达的基因；可以是具有缺失的基因，导致产生非功能性蛋白质、截短蛋白质、显性失活蛋白质或无蛋白质；或者，可以是具有一个或多个点突变的基因，导致编码蛋白质的氨基酸发生变化或导致基因转录物的异常剪接。

野生型：指在自然界中发现的形式。例如，天然存在的或野生型多肽或多核苷酸序列是生物体中存在的序列，其未被人为操作故意修饰。

有益效果

所述突变的9°N DNA聚合酶同野生型聚合酶相比较，具有更高的聚合活性。所述突变体在相同时间内，催化生成更多的底物。

附图说明

图1：9°N DNA聚合酶结构示意图以及突变位点示意图，根据结构图来进行定点突变。

图2：9°N DNA聚合酶纯化后的SDS-PAGE电泳图，纯度均能达到90%以上。

图3：ZYC4的FRET检测结果，显示初始反应速度V0（单位时间内添加底物的模板上量）是野生型的1.37倍。

图4：ZYC5的FRET检测结果，显示初始反应速度V0（单位时间内添加底物到模板上的量）是野生型的1.33倍。

图5：ZYC11的FRET检测结果，显示初始反应速度V0（单位时间内添加底物的模板上量）是野生型的1.35倍。

具体实施方式

下文将结合具体实施例对本发明的技术方案做更进一步的详细说明。应当理解，下列实施例仅为示例性地说明和解释本发明，而不应被解释为对本发明保护范围的限制。凡基于本发明上述内容所实现的技术均涵盖在本发明旨在保护的范围内。

除非另有说明，以下实施例中使用的原料和试剂均为市售商品，或者可以通过已知方法制备。

根据本发明实施案例，分离的蛋白质为 SEQ NO:1 以及具有下列之一的突变体：R406A/L, S407I/K、S411A/L、I412L、L457T/A、R460G、Q461A、K464T、Y481A、Q483L/E、R484A/L、K487R、I488A、S492D、Y494R、D540S、T541A、T667Q。

实施例 1: 野生型 9^N DNA 聚合酶 SEQ NO:1(9N-WT)以及突变型 9^N DNA 聚合酶蛋白制备

(1) 聚合酶 SEQ NO:1(9N-WT)表达菌株的构建以及重组蛋白的诱导表达
将亚克隆至 pET-22(b)载体上包含 9N-WT 基因片段的质粒转化至 Transetta (DE3) (北京全式金生物技术股份有限公司) 大肠杆菌中，得到重组蛋白工程菌，接种到含氨苄青霉素的 LB 培养基中，37°C、200 rpm 振荡培养 3~4 小时进行活化。活化后的菌液按照 1:100 的比例加入到新的含氨苄青霉素的 LB 培养基中，37°C 振荡培养至 OD_{600nm} 到达 0.8-1.1 时，冰水浴降温后，加入终浓度为 0.5 mM IPTG，25°C 过夜振荡培养。经诱导的菌液，8000 rpm，10 min 离心收集菌体。

(2) 蛋白纯化

蛋白纯化用到的缓冲液如下：

Lysis buffer: 50 mM MOPS, 500 mM NaCl, 5% Glycerol, pH 7.6;

A buffer: 50 mM MOPS, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazole, 5% Glycerol, pH 7.6;

C buffer: 50 mM MOPS, 50 mM NaCl, 5% Glycerol, pH 7.0;

D Buffer: 50 mM MOPS, 50 mM NaCl, 500 mM Imidazole, 5% Glycerol, pH 7.0;

E Buffer: 50 mM MOPS, 5% Glycerol, pH 7.0;

F Buffer: 50 mM MOPS, 1M NaCl, 5% Glycerol, pH 7.0;

Dialysis buffer: 20 mM Tris-HCl, 200 mM KCl, 0.2 mM EDTA, pH 7.4。

按菌体重量 (g) /缓冲液体积 (ml) = 1:10 比例添加 Lysis buffer, 重悬菌体; 加入终浓度 1 mM PMSF。将样品加入高压均质机(ATS), 压力升至 700-800 MPa, 4°C裂解 2-3 次循环; 将裂解的菌液在 4°C、18000 rpm 超速离心 40 min; 将离心后所得的上清于 75°C水浴加热 30min, 期间定时搅拌使其受热混匀; 将上述所得粗酶液于 16000rpm, 4°C离心 30min, 用 0.45 μm 过滤膜 (Merck Millipore) 真空抽滤, 所得样品为后续实验的样品。

使用纯化仪 (Biorad NGC Quest 100) 进行亲和柱纯化。将上述滤液上样到预平衡的 Histrap HP 柱 (货号 17-5248-02, cytiva), 用上述 Lysis buffer 平衡层析柱 10 CV, 上样保留时间 2.5min; 待样品全部上柱后用 Lysis buffer 冲洗柱子至紫外吸收的基线平衡; B buffer 冲洗柱子 20 CV, 再用 C buffer 冲洗柱子 10CV, 最后用 D Buffer 洗脱目的蛋白, 直至收集峰值 A280nm 大于 400 mAU 的组分, 进行下一步的纯化。

亲和柱纯化洗脱的样品用 E Buffer 进行稀释 5 倍后上样到用 E Buffer+2% F Buffer 预平衡的 Hitrap Q HP 柱 (货号 17-1154-01, cytiva), 收集流穿;

用 E Buffer+2% F Buffer 预平衡的 Hitrap SP HP (17-1152-01) 柱, 上述流穿样品上柱, 上完样品后继续用 E Buffer+2% F Buffer 漂洗层析柱 5 CV 后, 用 2-50%的 QB Buffer 梯度洗脱, A280nm 大于 100 mAU 的时候开始收集, 低于 100 mAU 丢弃, 每管收集 5ml;

将 SP 柱洗脱的蛋白, 装入 10 kDa 透析袋 (货号 132576, Spectrum) 中, 过夜透析到 Dialysis buffer 中。透析后的样品先用酶标仪 (CLARIOstar Plus, BMG) 测定浓度后, 加入 Triton X-100 和甘油使其终浓度分别为 0.1%和 50%,

-80°C保存。

(3) 鉴定蛋白纯度

同时根据 SDS-PAGE 电泳胶图（图 2）确定蛋白纯度，经纯化后的野生型 9N-WT、ZYC1-ZYC24 蛋白纯度均能达到 90%以上，大小约为 92kd 的目的蛋白。

(4) 9°N DNA 聚合酶点突变体（ZYC1-ZYC24）的重组载体的制备

以 9N-WT 的基因片段 SEQ NO:2 的质粒为模板，设计单点突变引物进行 PCR 扩增，扩增后的片段连接转化至 Transetta（DE3）（北京全式金生物技术股份有限公司）大肠杆菌中，得到突变体重组蛋白工程菌。9°N DNA 聚合酶点突变体制备的方法也可以按照野生型制备方法。

表 1 为 9°N DNA 聚合酶单点突变体的突变位置及突变信息（同 SEQ NO: 1 相比较）。

表 1 9°N DNA 聚合酶单点突变体的突变位置及突变信息

9°N DNA 聚合酶突变体名称	突变位置	9°N DNA 聚合酶突变体中的氨基酸
ZYC1	406	A
ZYC2	406	L
ZYC3	407	I
ZYC4	407	K
ZYC5	411	A
ZYC6	411	L
ZYC7	412	L
ZYC8	457	T
ZYC9	457	A
ZYC10	460	G
ZYC11	461	A
ZYC12	464	T
ZYC13	481	A

ZYC14	483	L
ZYC15	483	E
ZYC16	484	A
ZYC17	484	L
ZYC18	487	R
ZYC19	488	A
ZYC20	492	D
ZYC21	494	R
ZYC22	540	S
ZYC23	541	A
ZYC24	667	Q

实施例 2: 重组型 9°N DNA 聚合酶及其突变体活性检测

(1) F/R-cy5 模板合成

引物合成

引物生工生物工程(上海)股份有限公司进行引物合成，序列如下：

引物 1 (5'-3') CCGAGTGTCGGGACGGTGACCCAAGCTGCACCAG

引物 2 (5'-3') AGCCCAGTCTGGTGCAGCTTGGGTCACCGTCCCG

其中引物 1 和引物 2 为反向互补序列，其中 cy5 连接在引物 1 和引物 2 的 5'端，通过退火后互补匹配，为模板和引物混合物，用于酶活测定。

(2) F/R-cy5 制备条件

反应在 PCR 仪中进行，反应体系以及反应程序如下，其中 5XAnneal buffer 购自索莱宝（北京）。

反应体系：引物 1 (100uM) 3uL
引物 2 (100uM) 3uL
5XAnneal buffer 20uL
ddH₂O 74uL

Total 100uL

反应程序: 95°C 5min

60°C 10min

反应结束后采用 Qubit 进行浓度测定双链的质量浓度, 通过分子量换算成其摩尔浓度。蛋白活性检测反应体系见表 2。

表 2 蛋白活性检测反应体系

F/R-Cy5	0.1 uM
dATP-Cy3-N3	0.4uM
10*Reaction buffer	5ul
dC/dG/dT 混合物	0.4uM
Enzyme	20ul
H2O	补水至 50ul

10* Reaction buffer 成分为: 200 mM Tris、100 mM (NH₄)₂SO₄、100 mM KCL、5 mM MgSO₄、pH=8.8, dC/dG/dT 购自生工生物工程(上海)股份有限公司, 为 dCTP (100 mM)、dGTP (100 mM)、dTTP (100 mM) 等体积混合后底物。

上述反应在酶标仪 (CLARIOstar Plus BMG) 中反应液于 42°反应 40min, 检测 FRET Cy5(excitation 530nm/emission 676nm)信号, 以单位时间内添加 150pmol 的非天然碱基 dATP-Cy3-N3 活性定义为 1U。

优选示例的 9°N DNA 聚合酶突变体的聚合活性相对野生型具有较高的聚合活性, 结果如表 3 所示。

表 3 9°N DNA 聚合酶突变体的聚合活性

9°N DNA 聚合酶名称	活性(U)	9°N DNA 聚合酶突变体中的氨基酸
9N-WT	1	
ZYC5	1.36	A
ZYC6	1.61	L

ZYC8	1.19	T
ZYC24	1.13	Q

ZYC5 突变体的氨基酸序列为将 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列的第 411 位的丝氨酸突变为丙氨酸；

ZYC6 突变体的氨基酸序列为将 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列的第 411 位的丝氨酸突变为亮氨酸；

ZYC8 突变体的氨基酸序列为将 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列的第 457 位的亮氨酸突变为苏氨酸；

ZYC24 突变体的氨基酸序列为将 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列的第 667 位的苏氨酸突变为谷氨酰胺；

优选示例的 9°N DNA 聚合酶突变体在反应初始时间段内聚合底物 (dATP-cy3-N3) 底物的速度用 V_0 表示，FRET Cy5(excitation 530nm/emission 676nm)信号越强初始反应速度越快，说明在初始相同时间内添加的 dATP-cy3-N3 越快。用反应前 4min 来计算初始速度，以野生型 9°N DNA 聚合酶添加 dATP-cy3-N3 速度为 1，则 9°N DNA 聚合酶突变体的反应速度用其倍数关系来表示见表 4、图 3-5。

表 4 9°N DNA 聚合酶突变体的反应速度

9°N DNA 聚合酶名称	V_0
9N-WT	1
ZYC5	1.37
ZYC6	1.33
ZYC11	1.35

ZYC5 突变体的氨基酸序列为将 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列的第 411 位的丝氨酸突变为丙氨酸；

ZYC6 突变体的氨基酸序列为将 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列的第 411 位的丝氨酸突变为亮氨酸；

ZYC11 突变体的氨基酸序列为将 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列的第 461 位的谷氨酰胺突变为丙氨酸；

结果表明，跟野生型 9°N DNA 聚合酶对比，优选示例如 ZYC5，ZYC6、ZYC8、ZYC11、ZYC24 突变体蛋白的酶活以及初始反应速度优于野生型，在测序反应中，能够缩短反应时间，提高催化效率。

以上，对本发明的实施方式进行了说明。但是，本发明不限于上述实施方式。凡在本发明的精神和原则之内，所做的任何修改、等同替换、改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

>SEQ ID No:1

Met Ile Leu Asp Thr Asp Tyr Ile Thr Glu Asn Gly Lys Pro Val Ile Arg Val Phe Lys Lys Glu Asn
 Gly Glu Phe Lys Ile Glu Tyr Asp Arg Thr Phe Glu Pro Tyr Phe Tyr Ala Leu Leu Lys Asp Asp Ser
 Ala Ile Glu Asp Val Lys Lys Val Thr Ala Lys Arg His Gly Thr Val Val Lys Val Lys Arg Ala Glu
 Lys Val Gln Lys Lys Phe Leu Gly Arg Pro Ile Glu Val Trp Lys Leu Tyr Phe Asn His Pro Gln Asp
 Val Pro Ala Ile Arg Asp Arg Ile Arg Ala His Pro Ala Val Val Asp Ile Tyr Glu Tyr Asp Ile Pro Phe
 Ala Lys Arg Tyr Leu Ile Asp Lys Gly Leu Ile Pro Met Glu Gly Asp Glu Glu Leu Thr Met Leu Ala
 Phe Ala Ile Ala Thr Leu Tyr His Glu Gly Glu Glu Phe Gly Thr Gly Pro Ile Leu Met Ile Ser Tyr Ala
 Asp Gly Ser Glu Ala Arg Val Ile Thr Trp Lys Lys Ile Asp Leu Pro Tyr Val Asp Val Val Ser Thr
 Glu Lys Glu Met Ile Lys Arg Phe Leu Arg Val Val Arg Glu Lys Asp Pro Asp Val Leu Ile Thr Tyr
 Asn Gly Asp Asn Phe Asp Phe Ala Tyr Leu Lys Lys Arg Cys Glu Glu Leu Gly Ile Lys Phe Thr Leu
 Gly Arg Asp Gly Ser Glu Pro Lys Ile Gln Arg Met Gly Asp Arg Phe Ala Val Glu Val Lys Gly Arg
 Ile His Phe Asp Leu Tyr Pro Val Ile Arg Arg Thr Ile Asn Leu Pro Thr Tyr Thr Leu Glu Ala Val Tyr
 Glu Ala Val Phe Gly Lys Pro Lys Glu Lys Val Tyr Ala Glu Glu Ile Ala Gln Ala Trp Glu Ser Gly
 Glu Gly Leu Glu Arg Val Ala Arg Tyr Ser Met Glu Asp Ala Lys Val Thr Tyr Glu Leu Gly Arg Glu
 Phe Phe Pro Met Glu Ala Gln Leu Ser Arg Leu Ile Gly Gln Ser Leu Trp Asp Val Ser Arg Ser Ser
 Thr Gly Asn Leu Val Glu Trp Phe Leu Leu Arg Lys Ala Tyr Lys Arg Asn Glu Leu Ala Pro Asn
 Lys Pro Asp Glu Arg Glu Leu Ala Arg Arg Arg Gly Gly Tyr Ala Gly Gly Tyr Val Lys Glu Pro Glu
 Arg Gly Leu Trp Asp Asn Ile Val Tyr Leu Asp Phe Arg Ser Ala Ala Ile Ser Ile Ile Ile Thr His Asn
 Val Ser Pro Asp Thr Leu Asn Arg Glu Gly Cys Lys Glu Tyr Asp Val Ala Pro Glu Val Gly His Lys
 Phe Cys Lys Asp Phe Pro Gly Phe Ile Pro Ser Leu Leu Gly Asp Leu Leu Glu Glu Arg Gln Lys Ile
 Lys Arg Lys Met Lys Ala Thr Val Asp Pro Leu Glu Lys Lys Leu Leu Asp Tyr Arg Gln Arg Leu Ile
 Lys Ile Leu Ala Asn Ser Phe Tyr Gly Tyr Tyr Gly Tyr Ala Lys Ala Arg Trp Tyr Cys Lys Glu Cys
 Ala Glu Ser Val Thr Ala Trp Gly Arg Glu Tyr Ile Glu Met Val Ile Arg Glu Leu Glu Glu Lys Phe
 Gly Phe Lys Val Leu Tyr Ala Asp Thr Asp Gly Leu His Ala Thr Ile Pro Gly Ala Asp Ala Glu Thr
 Val Lys Lys Lys Ala Lys Glu Phe Leu Lys Tyr Ile Asn Pro Lys Leu Pro Gly Leu Leu Glu Leu Glu
 Tyr Glu Gly Phe Tyr Val Arg Gly Phe Phe Val Thr Lys Lys Lys Tyr Ala Val Ile Asp Glu Glu Gly
 Lys Ile Thr Thr Arg Gly Leu Glu Ile Val Arg Arg Asp Trp Ser Glu Ile Ala Lys Glu Thr Gln Ala
 Arg Val Leu Glu Ala Ile Leu Lys His Gly Asp Val Glu Glu Ala Val Arg Ile Val Lys Glu Val Thr
 Glu Lys Leu Ser Lys Tyr Glu Val Pro Pro Glu Lys Leu Val Ile His Glu Gln Ile Thr Arg Asp Leu
 Arg Asp Tyr Lys Ala Thr Gly Pro His Val Ala Val Ala Lys Arg Leu Ala Ala Arg Gly Val Lys Ile
 Arg Pro Gly Thr Val Ile Ser Tyr Ile Val Leu Lys Gly Ser Gly Arg Ile Gly Asp Arg Ala Ile Pro Ala
 Asp Glu Phe Asp Pro Thr Lys His Arg Tyr Asp Ala Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln Val Leu Pro Ala
 Val Glu Arg Ile Leu Lys Ala Phe Gly Tyr Arg Lys Glu Asp Leu Arg Tyr Gln Lys Thr Lys Gln Val
 Gly Leu Gly Ala Trp Leu Lys Val Lys Gly Lys Lys

>SEQ ID No:2

ATGATCCTGGATACCGATTATATTACCGAAAATGGTAAACCGGTTATTCGCGTTTTTAA
 AAAAGAAAATGGCGAGTTTAAAATCGAGTATGATCGTACCTTTGAACCGTATTTTTATG
 CCCTGCTGAAAGATGATAGTGCCATTGAAGATGTGAAAAAAGTGACCGCCAAACGCCA
 CGGTACCGTTGTTAAAGTTAAACGTGCCGAAAAAGTTCAGAAAAAATTTCTGGGCCGC
 CCGATTGAAGTTTGAAACTGTATTTTAATCACCCGCAGGATGTGCCGGCCATTCGTGA
 TCGCATTTCGTGCCCATCCGGCCGTTGTTGATATCTATGAATATGATATTCGGTTCGCAA
 AACGTTATCTGATTGATAAAGGCCTGATTCCGATGGAAGGTGACGAAGAACTGACCAT
 GCTGGCCTTTGCAATTGCCACCCTGTATCATGAAGGTGAAGAATTTGGTACCGGCCCGA

TTCTGATGATTAGTTATGCAGATGGTAGTGAAGCCCGCGTTATTACCTGGAAAAAGATT
GATCTGCCGTATGTTGATGTTGTGAGCACCGAAAAAGAAATGATTAAGCGCTTTCTGC
GCGTTGTTCCGCGAAAAAGATCCGGATGTTCTGATTACCTATAATGGCGATAATTTTGAT
TTCGCCTATCTGAAAAAGCGCTGTGAAGAACTGGGTATTAAGTTTACCCTGGGCCGTG
ATGGTAGCGAACCGAAAATTCAGCGTATGGGCGATCGTTTTGCAGTTGAAGTTAAAGG
TCGTATTCATTTTGATCTGTATCCGGTTATTCGTTCGTACCATTAATCTGCCGACCTATAC
CCTGGAAGCAGTTTATGAAGCAGTGTGTTGGCAAACCGAAAAGAAAAAGTTTATGCCGAA
GAAATTGCACAGGCCTGGGAAAGTGGTGAAGGTCTGGAACGTGTGGCACGTTATAGTA
TGGAAGATGCCAAAGTTACCTATGAACTGGGTCGCGAATTTTCCCGATGGAAGCCCA
GCTGAGCCGTCTGATTGGTCAGAGCCTGTGGGATGTGAGTCGCAGCAGTACCGGCAAT
CTGGTTGAATGGTTTCTGCTGCGCAAAGCATATAAACGTAATGAACTGGCACCGAATA
AGCCGGATGAACGCGAACTGGCACGCCGCCGCGGTGGTTATGCCGGTGGTTATGTTAA
AGAACCGGAACGCGGTCTGTGGGATAATATTGTTTATCTGGATTTTCGTAGCGCAGCCA
TTAGCATTATTATTACCATAATGTTAGCCCGGATACCCTGAATCGCGAAGGTTGCAAA
GAATATGATGTTGCACCGGAAGTTGGTCATAAATTTTGTAAGATTTCCCGGGTTTTAT
CCCGAGTCTGCTGGGCGATCTGCTGGAAGAACGTCAGAAAATTAAGCGCAAAATGAAA
GCAACCGTTGATCCGCTGGAAAAGAACTGCTGGATTATCGCCAGCGCCTGATTAAGA
TTCTGGCCAATAGTTTTTATGGTTATTACGGTTATGCCAAAGCACGCTGGTATTGCAAA
GAATGCGCAGAAAGTGTTACCGCCTGGGGCCGTGAATATATTGAAATGGTTATTCGCG
AACTGGAAGAAAAATTTGGTTTTAAAGTGCTGTACGCAGATACCGATGGCCTGCATGC
CACCATTCCGGGTGCCGATGCAGAAACCGTTAAAAAGAAAAGCAAAAGAATTTCTGAAG
TACATCAACCCGAAACTGCCGGCCTGCTGGAAGTGAATATGAAGGCTTTTATGTTC
GCGTTTTCTTTGTTACCAAAAAGAAATATGCAGTGATCGATGAAGAAGGTA AAAATTAC
CACCCGTGGCCTGGA AATTGTGCGCCGTGATTGGAGTGAAATTGCCAAAGAAACCCAG
GCCCGCGTGCTGGAAGCAATTCTGAAACATGGCGATGTTGAAGAAGCCGTGCGTATTG
TTAAAGAAGTGACCGAAAAACTGAGCAAATATGAAGTGCCGCCGGAAAAACTGGTTA
TTCATGAACAGATTACCCGTGATCTGCGCGATTATAAAGCCACCGGCCCGCATGTTGCC
GTGGCCAAACGCCTGGCCGCACGTGGTGTGAAAATTCGTCCGGGTACCGTTATTAGTT
ATATTGTTCTGAAAGGTAGCGGTCGCATTGGCGATCGCGCAATTCCGGCAGATGAATTT
GATCCGACCAAACATCGTTATGATGCCGAATATTATATCGAAAATCAGGTGCTGCCGG
CAGTTGAACGCATTCTGAAAGCATTGGTTATCGCAAAGAAGATCTGCGTTATCAGAA
AACCAAACAGGTGGGTCTGGGTGCCTGGCTGAAAGTTAAAGGTA AAAAAA

权 利 要 求 书

1. 一种具有 DNA 聚合酶活性的 DNA 聚合酶突变体，为如下 A1)-A3)中的任一种：

A1)对 9°N DNA 聚合酶的氨基酸序列进行氨基酸残基的置换和/或缺失和/或添加得到的 DNA 聚合酶突变体；

A2)对 9°N DNA 聚合酶的氨基酸序列进行氨基酸残基的修饰得到的 DNA 聚合酶突变体；

A3)在 A1)或 A2)的中间或/和 N 端或/和 C 端去掉一段载体上带的序列或连接标签序列得到的具有 DNA 聚合酶活性的融合蛋白质；

9°N DNA 聚合酶的氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示。

2. 根据权利要求 1 所述的 DNA 聚合酶突变体，其特征在于，

A1)中所述氨基酸残基的置换和/或缺失和/或添加为一个或几个氨基酸残基的置换和/或缺失和/或添加；

和/或，A2)中所述氨基酸残基的修饰为一个或几个氨基酸残基的修饰；

和/或，A1)中 DNA 聚合酶突变体与 9°N DNA 聚合酶具有 75%或 75%以上同一性；上述 75%或 75%以上同一性，可为 80%、85%、90%或 95%以上的同一性，例如 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的 DNA 聚合酶突变体，其特征在于，所述 DNA 聚合酶突变体为对 9°N DNA 聚合酶自 N 端起的第 406 位、第 407 位、第 411 位、第 412 位、第 457 位、第 460 位、第 461 位、第 464 位、第 481 位、第 483 位、第 484 位、第 487 位、第 488 位、第 492 位、第 494 位、第 540 位、第 541 位和第 667 位中的至少一个位点进行置换和/或修饰得到的 DNA 聚合酶突变体。

4. 根据权利要求 1-3 任一项中所述的 DNA 聚合酶突变体，其特征在于，所

述 DNA 聚合酶突变体为如下 B1)-B20)中的任一种:

B1)将 9°N DNA 聚合酶自 N 端起的第 411 位的丝氨酸残基替换为丙氨酸残基得到的 DNA 聚合酶突变体 (ZYC5);

B2)将 9°N DNA 聚合酶自 N 端起的第 411 位的丝氨酸残基替换为亮氨酸残基得到的 DNA 聚合酶突变体 (ZYC6);

B3)将 9°N DNA 聚合酶自 N 端起的第 457 位的亮氨酸残基替换为苏氨酸残基得到的 DNA 聚合酶突变体 (ZYC8);

B4)将 9°N DNA 聚合酶自 N 端起的第 461 位的谷氨酰胺残基替换为丙氨酸残基得到的 DNA 聚合酶突变体 (ZYC11);

B5)将 9°N DNA 聚合酶自 N 端起的第 667 位的苏氨酸残基替换为谷氨酰胺残基得到的 DNA 聚合酶突变体 (ZYC24);

B6)将 9°N DNA 聚合酶自 N 端起的第 406 位的精氨酸残基替换为丙氨酸或亮氨酸残基得到的 DNA 聚合酶突变体 (ZYC1、ZYC2);

B7)将 9°N DNA 聚合酶自 N 端起的第 407 位的丝氨酸残基替换为异亮氨酸或赖氨酸残基得到的 DNA 聚合酶突变体 (ZYC3、ZYC4);

B8)将 9°N DNA 聚合酶自 N 端起的第 412 位的异亮氨酸残基替换为亮氨酸残基得到的 DNA 聚合酶突变体 (ZYC7);

B9)将 9°N DNA 聚合酶自 N 端起的第 457 位的亮氨酸残基替换为丙氨酸残基得到的 DNA 聚合酶突变体 (ZYC9);

B10)将 9°N DNA 聚合酶自 N 端起的第 460 位的精氨酸残基替换为甘氨酸残基得到的 DNA 聚合酶突变体 (ZYC10);

B11)将 9°N DNA 聚合酶自 N 端起的第 464 位的赖氨酸残基替换为苏氨酸残基得到的 DNA 聚合酶突变体 (ZYC12);

B12)将 9°N DNA 聚合酶自 N 端起的第 481 位的酪氨酸残基替换为丙氨酸残基得到的 DNA 聚合酶突变体 (ZYC13);

B13)将 9°N DNA 聚合酶自 N 端起的第 483 位的谷氨酰胺残基替换为亮氨酸

或谷氨酸残基得到的 DNA 聚合酶突变体 (ZYC14、ZYC15) ;

B14)将 9°N DNA 聚合酶自 N 端起的第 484 位的精氨酸残基置换为丙氨酸或亮氨酸残基得到的 DNA 聚合酶突变体 (ZYC16、ZYC17) ;

B15)将 9°N DNA 聚合酶自 N 端起的第 487 位的赖氨酸残基置换为精氨酸残基得到的 DNA 聚合酶突变体 (ZYC18) ;

B16)将 9°N DNA 聚合酶自 N 端起的第 488 位的异亮氨酸残基置换为丙氨酸残基得到的 DNA 聚合酶突变体 (ZYC19) ;

B17)将 9°N DNA 聚合酶自 N 端起的第 492 位的丝氨酸残基置换为天冬氨酸残基得到的 DNA 聚合酶突变体 (ZYC20) ;

B18)将 9°N DNA 聚合酶自 N 端起的第 494 位的酪氨酸残基置换为精氨酸或谷氨酸残基得到的 DNA 聚合酶突变体 (ZYC21) ;

B19)将 9°N DNA 聚合酶自 N 端起的第 540 位的天冬氨酸残基置换为丝氨酸残基得到的 DNA 聚合酶突变体 (ZYC22) ;

B20)将 9°N DNA 聚合酶自 N 端起的第 541 位的苏氨酸残基置换为丙氨酸残基得到的 DNA 聚合酶突变体 (ZYC23) ;

优选为 B1)-B5)中的任一种:

B1)将 9°N DNA 聚合酶自 N 端起的第 411 位的丝氨酸残基置换为丙氨酸残基得到的 DNA 聚合酶突变体 (ZYC5) ;

B2)将 9°N DNA 聚合酶自 N 端起的第 411 位的丝氨酸残基置换为亮氨酸残基得到的 DNA 聚合酶突变体 (ZYC6) ;

B3)将 9°N DNA 聚合酶自 N 端起的第 457 位的亮氨酸残基置换为苏氨酸残基得到的 DNA 聚合酶突变体 (ZYC8) ;

B4)将 9°N DNA 聚合酶自 N 端起的第 461 位的谷氨酰胺残基置换为丙氨酸残基得到的 DNA 聚合酶突变体 (ZYC11) ;

B5)将 9°N DNA 聚合酶自 N 端起的第 667 位的苏氨酸残基置换为谷氨酰胺残基得到的 DNA 聚合酶突变体 (ZYC24) 。

5. 与权利要求 1-4 任一项中所述的 DNA 聚合酶突变体相关的生物材料, 其特征在于, 所述生物材料为下述 C1)至 C5)中的任一种:

C1)编码权利要求 1-4 任一项中所述的 DNA 聚合酶突变体的核酸分子;

C2)含有 C1)所述核酸分子的表达盒;

C3)含有 C1)所述核酸分子的重组载体、或含有 C2)所述表达盒的重组载体;

C4)含有 C1)所述核酸分子的重组微生物、或含有 C2)所述表达盒的重组微生物、或含有 C3)所述重组载体的重组微生物;

C5)含有 C1)所述核酸分子的转基因细胞系、或含有 C2)所述表达盒的转基因细胞系。

6. 根据权利要求 5 所述的生物材料, 其特征在于, C1)所述核酸分子为下述 1)、2)或 3):

1)将 9°N DNA 聚合酶的编码基因的序列进行至少一个核苷酸的置换得到的编码权利要求 1-4 任一项中所述的 DNA 聚合酶突变体的 cDNA 分子或 DNA 分子;

2)与 1)限定的核苷酸序列具有 75%或 75%以上同一性, 且编码权利要求 1-4 任一项中所述的 DNA 聚合酶突变体的 cDNA 分子或基因组 DNA 分子;

3)在严格条件下与 1)限定的核苷酸序列杂交, 且编码权利要求 1-4 任一项中所述的 DNA 聚合酶突变体的 cDNA 分子或基因组 DNA 分子。

7. 权利要求 1-4 任一项中所述的 DNA 聚合酶突变体的制备方法, 包括将权利要求 1-4 任一项中所述的 DNA 聚合酶突变体的编码基因导入生物细胞中使权利要求 1-4 任一项中所述的 DNA 聚合酶突变体的编码基因表达, 得到权利要求 1-4 任一项中所述的 DNA 聚合酶突变体。

8. 下述任一应用:

E1) 权利要求 1-4 任一项中所述的 DNA 聚合酶突变体在作为 DNA 聚合酶中的应用;

E2) 权利要求 5 或 6 所述的生物材料在制备 DNA 聚合酶中的应用;

E3) 权利要求 1-4 任一项中所述的 DNA 聚合酶突变体在 DNA 聚合反应中的应用；

E4) 权利要求 1-4 任一项中所述的 DNA 聚合酶突变体在制备聚合酶链式反应产品中的应用；

E5) 权利要求 5 或 6 所述的生物材料在聚合酶链式反应中的应用；

E6) 权利要求 5 或 6 所述的生物材料在制备聚合酶链式反应产品中的应用；

E7) 权利要求 7 所述的方法在制备 DNA 聚合反应产品中的应用；

E8) 权利要求 1-4 任一项中所述的 DNA 聚合酶突变体在测序中的应用；

E9) 权利要求 5 或 6 所述的生物材料在测序中的应用；

E10) 权利要求 1-4 任一项中所述的 DNA 聚合酶突变体在制备测序产品中的应用；

E11) 权利要求 5 或 6 所述的生物材料在制备测序产品中的应用；

E12) 权利要求 7 所述的方法在制备测序产品中的应用。

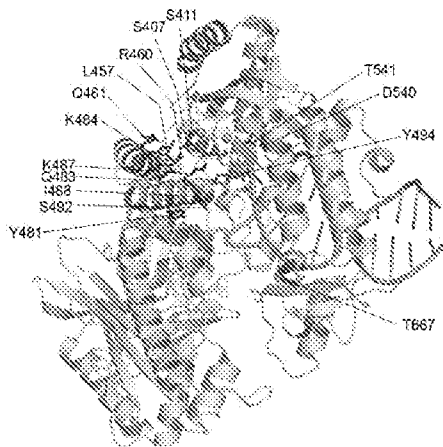


图 1

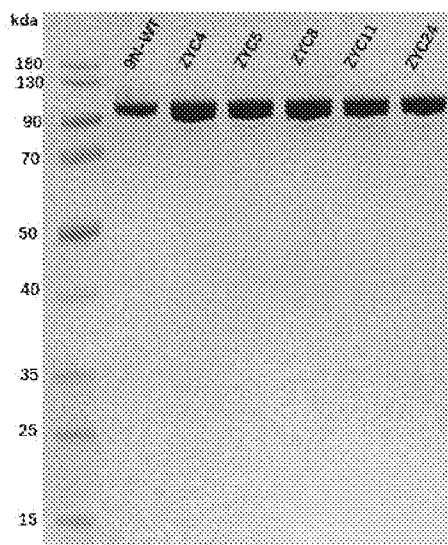


图 2

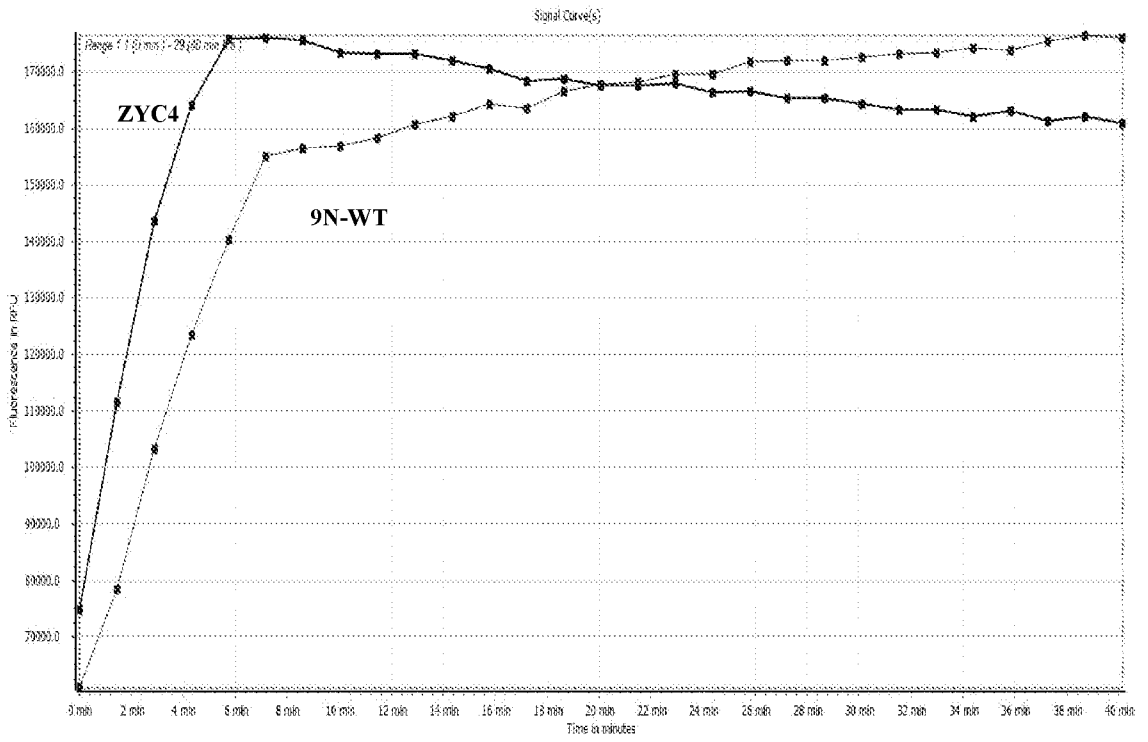


图 3

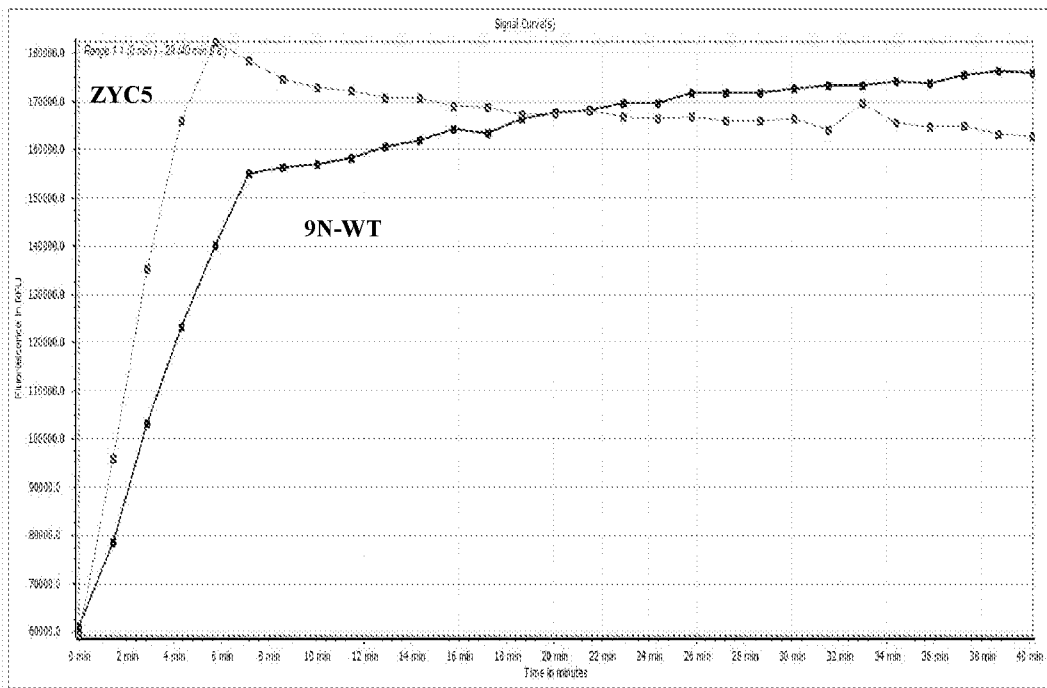


图 4

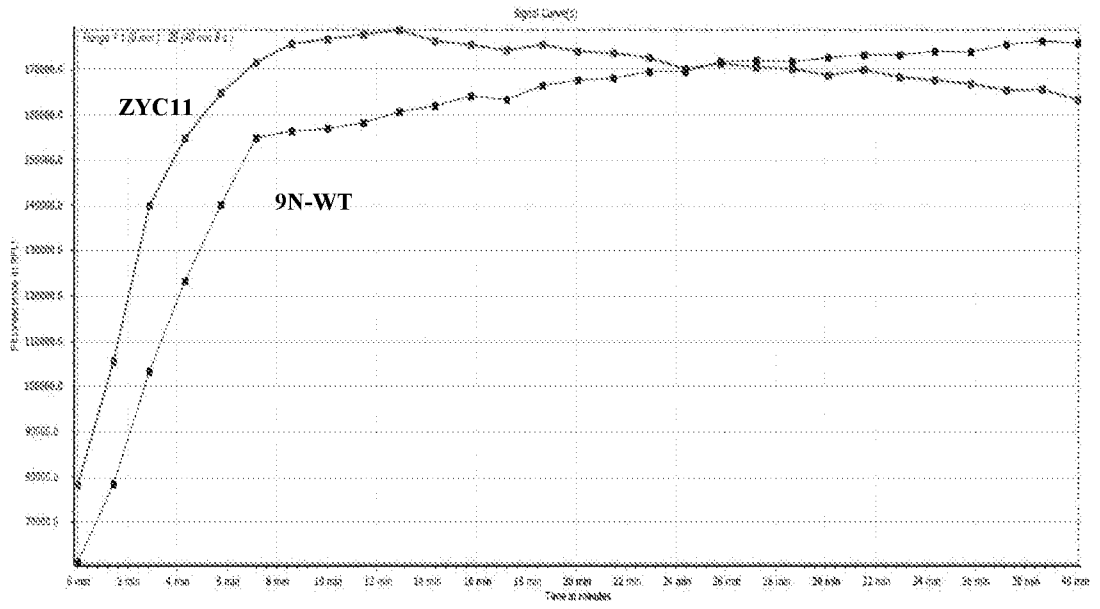


图 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/070450

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C12N9/12(2006.01)i; C12N15/54(2006.01)i; C12N15/11(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC: C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
CNTXT, ENTXT, ENTXTC, CNABS, DWPI, CNKI, PUBMED, 中国专利生物序列检索库, China Patents Biological Sequence Search Database, GENBANK, DDBJ, EMBL; SEQ ID NO: 1, 9°N, DNA聚合酶, polymerase, 407, 411, 457, 461, 667		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 111349623 A (SHENZHEN BGI LIFE SCIENCE RESEARCH INSTITUTE) 30 June 2020 (2020-06-30) see claims 1-10, and sequence table	5-8 (in part), 1-2
Y	CN 111349623 A (SHENZHEN BGI LIFE SCIENCE RESEARCH INSTITUTE) 30 June 2020 (2020-06-30) see claims 1-10, and sequence table	5-8 (in part), 3-4
Y	CN 108795900 A (MGI TECH CO., LTD.) 13 November 2018 (2018-11-13) see claims 1-4	5-8 (in part), 3-4
Y	US 2016032377 A1 (ILLUMINA, INC.) 04 February 2016 (2016-02-04) see claims 1-9, and description, paragraph 49	5-8 (in part), 3-4
Y	US 2007048748 A1 (LI-COR, INC.) 01 March 2007 (2007-03-01) see claims 1-6, and description, paragraph 54	5-8 (in part), 3-4
Y	CN 108018270 A (PERSONAL GENOMICS, INC.) 11 May 2018 (2018-05-11) see description, paragraph 146	5-8 (in part), 3-4
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
28 September 2023		03 October 2023
Name and mailing address of the ISA/CN		Authorized officer
China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/070450

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 112673098 A (ILLUMINA, INC.; ILLUMINA SINGAPORE PTE LTD.) 16 April 2021 (2021-04-16) see abstract	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/070450

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed.
 - b. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
 accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/070450

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN	111349623	A	30 June 2020	None	
CN	108795900	A	13 November 2018	None	
US	2016032377	A1	04 February 2016	US	2020056230 A1 20 February 2020
				US	10745751 B2 18 August 2020
				CA	2898459 A1 18 September 2014
				CA	2898459 C 02 February 2021
				HK	1213299 A1 30 June 2016
				EP	2971070 A1 20 January 2016
				EP	2971070 B1 25 April 2018
				EP	2971070 B2 03 March 2021
				ES	2674043 T3 27 June 2018
				ES	2674043 T5 03 November 2021
				US	2021147927 A1 20 May 2021
				US	10421996 B2 24 September 2019
				AU	2013382024 A1 06 August 2015
				AU	2013382024 B2 31 January 2019
				WO	2014142921 A1 18 September 2014
US	2007048748	A1	01 March 2007	WO	2006037064 A2 06 April 2006
				WO	2006037064 A3 09 April 2009
				CA	2581471 A1 06 April 2006
				EP	1805303 A2 11 July 2007
				EP	1805303 A4 02 December 2009
CN	108018270	A	11 May 2018	US	2018119115 A1 03 May 2018
				US	10662413 B2 26 May 2020
				TW	201817872 A 16 May 2018
				TWI	658139 B 01 May 2019
CN	112673098	A	16 April 2021	US	2022056424 A1 24 February 2022
				US	11560552 B2 24 January 2023
				JP	2022503427 A 12 January 2022
				ZA	202007838 B 26 April 2023
				CA	3103719 A1 07 May 2020
				WO	2020092830 A1 07 May 2020
				AU	2019374098 A1 07 January 2021
				MX	2020013347 A 28 April 2021
				US	2023212534 A1 06 July 2023
				IL	299237 A 01 February 2023
				KR	20210084349 A 07 July 2021
				BR	112020026658 A2 10 August 2021
				IL	279422 A 31 January 2021
				IL	279422 B1 01 January 2023
				IL	279422 B2 01 May 2023
				EP	3874036 A1 08 September 2021
				US	2020131484 A1 30 April 2020
				US	11104888 B2 31 August 2021
				SG	11202012493 WA 28 January 2021

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2023/070450

<p>A. 主题的分类</p> <p>C12N9/12(2006.01)i; C12N15/54(2006.01)i; C12N15/11(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																										
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>IPC: C12N</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>数据库: CNTXT, ENTXT, ENTXTC, CNABS, DWPI, CNKI, PUBMED, 中国专利生物序列检索库, GENBANK, DDBJ, EMBL 检索词: SEQ ID NO:1, 9° N, DNA聚合酶, polymerase, 407, 411, 457, 461, 667</p>																										
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>CN 111349623 A (深圳华大生命科学研究院) 2020年6月30日 (2020 - 06 - 30) 参见权利要求1-10及序列表</td> <td>5-8 (部分)、1-2</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 111349623 A (深圳华大生命科学研究院) 2020年6月30日 (2020 - 06 - 30) 参见权利要求1-10及序列表</td> <td>5-8 (部分)、3-4</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 108795900 A (深圳华大智造科技有限公司) 2018年11月13日 (2018 - 11 - 13) 参见权利要求1-4</td> <td>5-8 (部分)、3-4</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 2016032377 A1 (ILLUMINA INC) 2016年2月4日 (2016 - 02 - 04) 参见权利要求1-9及说明书第49段</td> <td>5-8 (部分)、3-4</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 2007048748 A1 (LI COR INC) 2007年3月1日 (2007 - 03 - 01) 参见权利要求1-6及说明书第54段</td> <td>5-8 (部分)、3-4</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 108018270 A (PGI股份有限公司) 2018年5月11日 (2018 - 05 - 11) 参见说明书146段</td> <td>5-8 (部分)、3-4</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 112673098 A (亿明达股份有限公司 亿明达新加坡私人有限公司) 2021年4月16日 (2021 - 04 - 16) 参见摘要</td> <td>1-8</td> </tr> </tbody> </table> <p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p> <p>* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “D” 申请人在国际申请中引证的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件</p>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	CN 111349623 A (深圳华大生命科学研究院) 2020年6月30日 (2020 - 06 - 30) 参见权利要求1-10及序列表	5-8 (部分)、1-2	Y	CN 111349623 A (深圳华大生命科学研究院) 2020年6月30日 (2020 - 06 - 30) 参见权利要求1-10及序列表	5-8 (部分)、3-4	Y	CN 108795900 A (深圳华大智造科技有限公司) 2018年11月13日 (2018 - 11 - 13) 参见权利要求1-4	5-8 (部分)、3-4	Y	US 2016032377 A1 (ILLUMINA INC) 2016年2月4日 (2016 - 02 - 04) 参见权利要求1-9及说明书第49段	5-8 (部分)、3-4	Y	US 2007048748 A1 (LI COR INC) 2007年3月1日 (2007 - 03 - 01) 参见权利要求1-6及说明书第54段	5-8 (部分)、3-4	Y	CN 108018270 A (PGI股份有限公司) 2018年5月11日 (2018 - 05 - 11) 参见说明书146段	5-8 (部分)、3-4	A	CN 112673098 A (亿明达股份有限公司 亿明达新加坡私人有限公司) 2021年4月16日 (2021 - 04 - 16) 参见摘要	1-8
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																								
X	CN 111349623 A (深圳华大生命科学研究院) 2020年6月30日 (2020 - 06 - 30) 参见权利要求1-10及序列表	5-8 (部分)、1-2																								
Y	CN 111349623 A (深圳华大生命科学研究院) 2020年6月30日 (2020 - 06 - 30) 参见权利要求1-10及序列表	5-8 (部分)、3-4																								
Y	CN 108795900 A (深圳华大智造科技有限公司) 2018年11月13日 (2018 - 11 - 13) 参见权利要求1-4	5-8 (部分)、3-4																								
Y	US 2016032377 A1 (ILLUMINA INC) 2016年2月4日 (2016 - 02 - 04) 参见权利要求1-9及说明书第49段	5-8 (部分)、3-4																								
Y	US 2007048748 A1 (LI COR INC) 2007年3月1日 (2007 - 03 - 01) 参见权利要求1-6及说明书第54段	5-8 (部分)、3-4																								
Y	CN 108018270 A (PGI股份有限公司) 2018年5月11日 (2018 - 05 - 11) 参见说明书146段	5-8 (部分)、3-4																								
A	CN 112673098 A (亿明达股份有限公司 亿明达新加坡私人有限公司) 2021年4月16日 (2021 - 04 - 16) 参见摘要	1-8																								
国际检索实际完成的日期	2023年9月28日	国际检索报告邮寄日期	2023年10月3日																							
ISA/CN的名称和邮寄地址	中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	授权官员	孙彦珂 电话号码 (+86) 010-62411091																							

第1栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列列表进行的:
 - a. 作为国际申请的一部分提交的;
 - b. 为国际检索的目的在国际申请日之后提交(细则13之三.1(a)),
 附有说明序列列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。
2. 本报告是在没有收到符合WIPO ST. 26标准的序列列表的情况下, 考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 在可进行有意义检索的范围内做出的。
3. 补充意见:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/070450

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	111349623	A	2020年6月30日	无			
CN	108795900	A	2018年11月13日	无			
US	2016032377	A1	2016年2月4日	US	2020056230	A1	2020年2月20日
				US	10745751	B2	2020年8月18日
				CA	2898459	A1	2014年9月18日
				CA	2898459	C	2021年2月2日
				HK	1213299	A1	2016年6月30日
				EP	2971070	A1	2016年1月20日
				EP	2971070	B1	2018年4月25日
				EP	2971070	B2	2021年3月3日
				ES	2674043	T3	2018年6月27日
				ES	2674043	T5	2021年11月3日
				US	2021147927	A1	2021年5月20日
				US	10421996	B2	2019年9月24日
				AU	2013382024	A1	2015年8月6日
				AU	2013382024	B2	2019年1月31日
				WO	2014142921	A1	2014年9月18日
US	2007048748	A1	2007年3月1日	WO	2006037064	A2	2006年4月6日
				WO	2006037064	A3	2009年4月9日
				CA	2581471	A1	2006年4月6日
				EP	1805303	A2	2007年7月11日
				EP	1805303	A4	2009年12月2日
CN	108018270	A	2018年5月11日	US	2018119115	A1	2018年5月3日
				US	10662413	B2	2020年5月26日
				TW	201817872	A	2018年5月16日
				TWI	658139	B	2019年5月1日
CN	112673098	A	2021年4月16日	US	2022056424	A1	2022年2月24日
				US	11560552	B2	2023年1月24日
				JP	2022503427	A	2022年1月12日
				ZA	202007838	B	2023年4月26日
				CA	3103719	A1	2020年5月7日
				WO	2020092830	A1	2020年5月7日
				AU	2019374098	A1	2021年1月7日
				MX	2020013347	A	2021年4月28日
				US	2023212534	A1	2023年7月6日
				IL	299237	A	2023年2月1日
				KR	20210084349	A	2021年7月7日
				BR	112020026658	A2	2021年8月10日
				IL	279422	A	2021年1月31日
				IL	279422	B1	2023年1月1日
				IL	279422	B2	2023年5月1日
				EP	3874036	A1	2021年9月8日
				US	2020131484	A1	2020年4月30日
				US	11104888	B2	2021年8月31日
				SG	11202012493	WA	2021年1月28日