



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114480338 B

(45) 授权公告日 2024.04.05

(21) 申请号 202011271788.1

C12N 15/70 (2006.01)

(22) 申请日 2020.11.13

C12N 1/21 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

C12Q 1/70 (2006.01)

申请公布号 CN 114480338 A

C12Q 1/6851 (2018.01)

(43) 申请公布日 2022.05.13

C12R 1/19 (2006.01)

C12R 1/93 (2006.01)

(73) 专利权人 广州达安基因股份有限公司

(56) 对比文件

地址 510665 广东省广州市高新技术开发

CN 106164261 A, 2016.11.23

区香山路19号

CN 1430670 A, 2003.07.16

(72) 发明人 刘霭珊 蒋析文 郑桑桑 连献兰

Gary F. Gerard等.The role of

(74) 专利代理机构 上海助之鑫知识产权代理有

template-primer in protection of reverse
transcriptase from thermal
inactivation.Nucleic Acids Research,2002,
第30卷(第14期),3118-3129.

限公司 31328

专利代理师 陈详

审查员 陈中伟

(51) Int. Cl.

C12N 9/12 (2006.01)

C12N 15/54 (2006.01)

权利要求书1页 说明书18页

序列表5页

(54) 发明名称

用于核酸检测的逆转录酶突变体

(57) 摘要

本发明提供了用于核酸检测的逆转录酶突变体,具体地,本发明构建了逆转录酶(M-MLV)突变库,通过逐步筛选,最终筛选出了热稳定性提高且扩增效率较高的突变体,可以使用本发明的逆转录酶突变体对病毒核酸进行高效检测。

1. 一种M-MLV酶突变体,其特征在于,所述M-MLV酶突变体在如SEQ ID NO.1所示的野生型鼠白血病逆转录酶(M-MLV)的第583位氨基酸残基和第446位氨基酸残基发生突变,并且,第583位的氨基酸残基位点突变为Asn,第446位的氨基酸残基位点突变为Cys。

2. 一种多核苷酸分子,其特征在于,所述多核苷酸分子编码权利要求1所述的M-MLV酶突变体。

3. 一种载体,其特征在于,所述载体含有权利要求2所述的多核苷酸分子。

4. 一种宿主细胞,其特征在于,所述宿主细胞含有权利要求3所述的载体或染色体整合有权利要求2所述的多核苷酸分子。

5. 如权利要求4所述的宿主细胞,其特征在于,所述宿主细胞为原核细胞或真核细胞。

6. 一种试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包含权利要求1所述的M-MLV酶突变体。

7. 一种制备权利要求1所述的M-MLV酶突变体的方法,包括步骤:

(i) 在适合的条件下,培养权利要求4所述的宿主细胞,从而表达出所述的M-MLV酶突变体;和

(ii) 分离所述的M-MLV酶突变体。

8. 权利要求1所述的M-MLV酶突变体在制备逆转录检测试剂或逆转录试剂盒中的用途。

9. 一种RNA逆转录方法,其特征在于,所述方法包括步骤:

(1) 提供含有RNA的样品;

(2) 逆转录反应:

使用权利要求1所述的M-MLV酶突变体对步骤(1)提供的含有RNA的样品进行逆转录反应。

用于核酸检测的逆转录酶突变体

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体地说,本发明涉及一种用于核酸检测的逆转录酶突变体。

背景技术

[0002] 鼠白血病逆转录酶(M-MLV)是一种以RNA为模板的DNA聚合酶,具有RNase H活性,不具有3'-5'外切酶活性,可用于逆转录合成cDNA。由于RNA具有较复杂的二级结构,对M-MLV酶的逆转录效率影响较大。打开RNA二级结构最简单的方法是通过高温使二级结构的氢键打开,RNA变为线性单链。但野生型的M-MLV酶最适反应温度为37℃,高温下稳定性下降并且活性降低。因此通过突变使M-MLV酶的热稳定性提高,使其适应高温下的反应是M-MLV酶的主要改造方向。

[0003] M-MLV酶的突变改造有以下的途径:

[0004] 1、随机突变。对M-MLV全长序列或者某一结构域进行随机突变,然后进行筛选。此方法可筛选出高活性和高热稳定性的MMLV突变体,但技术过程繁复,随机突变产生的突变库容量可达到 10^7 ,伴随大量的无活性突变,筛选难度极大。(参考文献:Arezi B,Hogrefe H.Novel mutations in Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase increase thermostability through tighter binding to template-primer[J].Nucleic Acids Research,2008,37(2):473-481.)

[0005] 2、对特定活性位点进行定点突变。此方法针对性较强,通过增加核酸结合位点、金属离子结合位点等关键活性位点氨基酸与底物的亲和力,提高酶活。但此方法缺乏对酶整体结构的分析,不能从整体上提高酶的稳定性。(参考文献:Yasukawa K,Mizuno M,Konishi A,et al.Increase in thermal stability of Moloney murine leukaemia virus reverse transcriptase by site-directed mutagenesis[J].Journal of Biotechnology,2010,150(3):299-306.)

[0006] 总体而言,由于蛋白质结构的复杂性,不仅是位于活性位点的氨基酸甚至一些远离活性位点的氨基酸都可能对酶的整体结构及性能产生影响,因此酶的改造存在极大的不确定性。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供一种耐高温且具有高逆转录效率的逆转录酶突变体。

[0008] 在本发明的第一方面,提供了一种M-MLV酶突变体,所述M-MLV酶突变体在选自下组的至少两个(可以为两个、三个、四个、或五个)位点发生突变:第446位氨基酸残基、第313位氨基酸残基、第583位氨基酸残基、第607位氨基酸残基、第221位氨基酸残基,其中氨基酸残基编号采用SEQ ID NO.1所示的编号。

[0009] 对应的野生型鼠白血病逆转录酶(M-MLV)的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0010] 在另一优选例中,所述M-MLV酶突变体中,第446位的氨基酸残基位点突变为Cys。

- [0011] 在另一优选例中,所述M-MLV酶突变体中,第313位的氨基酸残基位点突变为His或Gln。
- [0012] 在另一优选例中,所述M-MLV酶突变体中,第583位的氨基酸残基位点突变为Asn。
- [0013] 在另一优选例中,所述M-MLV酶突变体中,第607位的氨基酸残基位点突变为Lys。
- [0014] 在另一优选例中,所述M-MLV酶突变体中,第221位的氨基酸残基位点突变为Arg。
- [0015] 在另一优选例中,所述M-MLV酶突变体的氨基酸序列与SEQ ID NO.1相比具有至少约80%的同源性;更优选地,具有至少约90%的同源性;最优选地,具有至少约95%的同源性;如具有至少约96%、97%、98%、99%的同源性。
- [0016] 在另一优选例中,所述M-MLV酶突变体在第583位氨基酸残基、和第313位氨基酸残基发生突变。
- [0017] 在另一优选例中,所述M-MLV酶突变体在第313位氨基酸残基、和第221位氨基酸残基发生突变。
- [0018] 在另一优选例中,所述M-MLV酶突变体在第583位氨基酸残基、和第446位氨基酸残基发生突变。
- [0019] 在另一优选例中,所述M-MLV酶突变体在第583位氨基酸残基、和第221位氨基酸残基发生突变。
- [0020] 在另一优选例中,所述M-MLV酶突变体在第313位氨基酸残基、和第446位氨基酸残基发生突变。
- [0021] 在另一优选例中,所述M-MLV酶突变体在第313位氨基酸残基、和第607位氨基酸残基发生突变。
- [0022] 在另一优选例中,所述M-MLV酶突变体在第313位氨基酸残基、第583位氨基酸残基、和第221位氨基酸残基发生突变。
- [0023] 在另一优选例中,所述M-MLV酶突变体在第313位氨基酸残基、第583位氨基酸残基、和第607位氨基酸残基发生突变。
- [0024] 在另一优选例中,所述M-MLV酶突变体在第313位氨基酸残基、第583位氨基酸残基、和第446位氨基酸残基发生突变。
- [0025] 在另一优选例中,与野生型相比,所述M-MLV酶突变体在高温情况下(58℃)的逆转录效率提高10倍以上,优选地提高20倍以上,更优选地提高30倍以上。
- [0026] 本发明的第二方面,提供了一种多核苷酸分子,所述多核苷酸分子编码本发明第一方面所述的M-MLV酶突变体。
- [0027] 本发明的第三方面,提供了一种载体,所述载体含有本发明第二方面所述的核酸分子。
- [0028] 本发明的第四方面,提供了一种宿主细胞,所述宿主细胞含有本发明第一方面所述的载体或染色体整合有本发明第二方面所述的核酸分子。
- [0029] 在另一优选例中,所述宿主细胞为原核细胞、或真核细胞。
- [0030] 在另一优选例中,所述原核细胞为大肠杆菌。
- [0031] 在另一优选例中,所述真核细胞为酵母细胞。
- [0032] 本发明的第五方面,提供了一种制备本发明第一方面所述的M-MLV酶突变体的方法,包括步骤:

[0033] (i) 在适合条件下,培养本发明第四方面所述的宿主细胞,从而表达出所述的M-MLV酶突变体;和

[0034] (ii) 分离所述的M-MLV酶突变体。

[0035] 在另一优选例中,所述步骤(i)中培养所述宿主细胞的温度为20°C-40°C;优选为25°C-37°C,如35°C。

[0036] 本发明的第六方面,提供了一种试剂盒,所述试剂盒包含本发明第一方面所述的M-MLV酶突变体。

[0037] 在另一优选例中,所述试剂盒还包含选自下组的一种或多种组分:

[0038] dNTP、缓冲液、引物、探针、和纯水。

[0039] 本发明的第七方面,提供了本发明第一方面所述的M-MLV酶突变体在制备逆转录检测试剂或逆转录试剂盒中的用途。

[0040] 本发明的第八方面,提供了一种RNA逆转录方法,所述方法包括步骤:

[0041] (1) 提供含有RNA的样品;

[0042] (2) 逆转录反应

[0043] 使用本发明第一方面所述的逆转录酶突变体对步骤(1)提供的含有RNA的样品进行逆转录反应。

[0044] 在另一优选例中,所述步骤(2)中,逆转录反应温度为55°C以上,优选地为58°C以上。

[0045] 应理解,在本发明范围内中,本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合,从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅,在此不再一一累述。

具体实施方式

[0046] 本发明人通过广泛而深入的研究,构建了逆转录酶(M-MLV)突变库,通过逐步筛选,最终筛选出了热稳定性提高且扩增效率较高的突变体。在此基础上,完成了本发明。

[0047] 在描述本发明之前,应当理解本发明不限于所述的具体方法和实验条件,因为这类方法和条件可以变动。还应当理解本文所用的术语其目的仅在于描述具体实施方案,并且不意图是限制性的,本发明的范围将仅由所附的权利要求书限制。

[0048] 除非另外定义,否则本文中所用的全部技术与科学术语均具有如本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义。如本文所用,在提到具体列举的数值中使用术语“约”意指该值可以从列举的值变动不多于1%。例如,如本文所用,表述“约100”包括99和101和之间的全部值(例如,99.1、99.2、99.3、99.4等)。

[0049] 虽然在本发明的实施或测试中可以使用与本发明中所述相似或等价的任何方法和材料,本文在此处例举优选的方法和材料。

[0050] 逆转录酶

[0051] 逆转录酶(reverse transcriptase)又称为依赖RNA的DNA聚合酶。该酶以RNA为模板,以dNTP为底物,tRNA(主要是色氨酸tRNA)为引物,在tRNA 3'-OH末端上,根据碱基配对的原则,按5'-3'方向合成一条与RNA模板互补的DNA单链,这条DNA单链叫做互补DNA(complementary DNA,cDNA)。

[0052] 逆转录酶可用于合成第一链cDNA、制作cDNA探针、RNA转录、测序和RNA的逆转录反应。本领域常用的逆转录酶包括鼠白血病病毒 (M-MLV) 逆转录酶和禽成髓细胞瘤病毒 (AMV) 逆转录酶。

[0053] 在本发明的一个优选地实施方式中,本发明野生型M-MLV蛋白质序列如下:

[0054] TLNIEDEHRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLI IPLKATSTPVS IKQYPMSQ EARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPSSHQ WYTVL DLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGI SGLTWTRLPQGFKNSPTLFDEALHRDLADFRIQHPDLILL QYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLG YLLKEGQRWLTEARKETVMGQPTPKT PRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKTGTLFNWGPDQQKAYQEI KQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDE KQGYAKGVLTKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPP DRWLSNARMTHYQALLLDTRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPADHTWYTD GSSLLQEGQRKAGAAVTTEVEI WAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKNVYTD SRYAFATAHIHGEIYRR RGLLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSI IHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTSTLL (SEQ ID NO. :1)

[0055] 在本发明的一个优选地实施方式中,经密码子优化的野生型M-MLV DNA序列 (WT) 如下:

[0056] ACGCTGAATATCGAGGACGAACACCGTCTGCACGAAACCAGCAAGGAGCCGACGTTAGTCTGGGTAG CACGTGGCTGAGCGATTTCCACAAGCGTGGGCGGAAACCGGTGGTATGGGTCTCGCCGTTCCGAAGCCCCACTC ATTATCCCCTGAAAGCCACGAGCAGCCGGTGGTATCAAGCAGTACCCGATGAGCCAAGAAGCCCGCCTCGGCA TTAACCGCATATTCAGCGTCTGCTGGACCAAGGCATTCTGGTGCCGTGCCAGAGTCCGTGGAATACGCCACTGCT CCCGGTTAAGAAGCCGGGCACCAACGATTATCGCCCGGTTCAAGACCTCCGCGAAGTGAACAAGCGCGTGAAGAT ATCCATCCGACCGTGCCAAATCCGTACAATCTGCTGAGTGGCCTCCCGCCGAGTCATCAATGGTACACCGTGGTGG ATCTCAAGGATGCGTTTTTCTGCCTCCGTCTGCATCCAACCAGCCAGCCACTCTTTGCGTTTGAGTGGCGGACCC AGAAATGGGTATCAGCGGTCAACTGACGTGGACGCGTCTGCCGCAAGGCTTCAAAAACAGCCCAGCGTGTTCGAT GAGGCCCTCCATCGCGATCTGGCGGATTTCCGTATCCAGCATCCAGATCTGATTCTGCTGCAGTACGTTGACGATC TGCTCCTCGCGCCACCAGTGAAGTGGATTGCCAGCAAGGTACCCGTGCGCTGCTGCAGACGCTGGGCAATCTGGG CTACCGTGCCAGCGCGAAAAAGGCGCAAATCTGCCAGAAGCAAGTAAAGTACCTCGGTTATCTGCTGAAAGAGGGT CAACGCTGGCTGACCGAGGCGCGTAAAGAGACCGTTATGGGTGAGCCAAAGCCAAAGACGCCACGCCAGCTCCGCG AATTTCTGGGTACCGCCGGCTTCTGTCGCTGTGGATTCCGGGCTTCGCGGAAATGGCGGCGCCACTCTACCCGCT GACCAAAACCGGTACCTCTTCAATTGGGGCCAGATCAGCAGAAGGCTACCAAGAAATTAACAAGCGCTGCTC ACCGCGCCGCGCCCTCGGTCTCCAGATCTGACCAAACCGTTTGAGCTGTTGTTGACGAGAGAAGCAAGGCTACGCCA AAGGCGTGCTGACCCAGAACTCGGTCCATGGCGTCCGTTGGCCTACCTCAGTAAGAACTGGATCCAGTTGC GCGGGTTGGCCGCATGTCTCCGTATGGTGGCGCGATTGCCGTTCTGACCAAAGACGCCGGCAAACCTACCATG GGTGAGCCGCTGGTTATTCTCGCCCACATGCGGTGGAAGCGCTGGTTAAACAACCGCCAGACCGCTGGCTGAGCA ATGCCCGCATGACCCATTATCAAGCGTCTGCTGGACACCGACCGGTTTCAGTTCGGTCCGGTGGTTGCGCTGAA TCCAGCGACGCTGCTGCCGCTGCCAGAAGAAGTCTGCAGCACAACCTGTCTGGACATTCTGGCCGAGGCCCATGGC ACCCGTCCAGATCTACCGATCAGCCACTGCCAGACCGGATCATACTGGTACACCGATGGTAGTAGTCTGCTGC AAGAAGGTCAACGTAAAGCGGGTCCGCGGTGACGACGAAACCGAGGTGATCTGGGCCAAAGCGCTGCCAGCGGG TACCAGCGCGCAACGTGCGGAACTGATCGCGCTGACCAAGCGCTCAAAATGGCCGAGGGCAAGAACTCAACGTG

TACACCGACAGTCGCTACGCGTTTGCACCCGCGCACATCCACGGTGAGATTTATCGCCGCCGTGGTCTGCTCACGA
GCGAAGGTAAGGAGATCAAGAATAAGGACGAGATCCTCGCGCTGCTGAAAGCCCTCTTTCTGCCGAAACGTCTGAG
CATCATCCATTGCCCGGGTCACCAGAAGGGCCACAGTGCAGGAAGCGCGGTAATCGCATGGCCGATCAAGCCGCG
CGCAAAGCGGCGATTACGGAAACCCCGGATACGAGCACGCTGCTG (SEQ ID NO.:2)

[0057] 突变体的筛选和制备

[0058] 本发明计算单点突变后酶分子的吉布斯自由能变的变化值 (DDG), 以此衡量突变后分子稳定性的变化。DDG值 (Delta Delta G) 是分子的吉布斯自由能变的变化值, 蛋白质分子从正常的折叠状态向无规则卷曲状态转变的过程需要消耗能量, 此能量的值为 ΔG 值, ΔG 值的高低可用于衡量蛋白质的稳定性, ΔG 值越高, 蛋白质变性所需要消耗的能量越多, 使蛋白发生变性的温度越高, 蛋白越稳定。

[0059] 蛋白质经过定点突变, 各氨基酸相互作用发生变化, 使 ΔG 值发生改变, 野生型蛋白的 ΔG 值与突变体的 ΔG 值的差值即为 DDG 值。DDG 值 >0 , 说明突变后蛋白的 ΔG 值比野生型降低, 蛋白更不稳定; DDG 值 <0 , 说明突变后蛋白 ΔG 值比野生型升高, 蛋白更稳定。因此 DDG 值可用于预测蛋白质发生定点突变后结构的稳定性变化。从一系列的突变体中选出 DDG 值较高的突变, 构建 MMLV 蛋白突变库, 经过表达纯化, 测定突变后 MMLV 的活性及热稳定性, 筛选出具有高活性高热稳定性的单点突变体。但是由于蛋白结构地复杂性, 不可能仅通过预测来获得符合实际应用需求的突变体, 而且在大多数情况下模拟预测出的突变体均会导致酶活性的显著降低。

[0060] 经过大量筛选, 本发明筛选出了 6 个可使 M-MLV 酶获得耐高温和高活性的突变位点如下:

编号	野生型氨基酸	氨基酸残基位置	突变型氨基酸
Mu_15	Gln	446	Cys
Mu_16	Trp	313	His
Mu_26	Trp	313	Gln
Mu_36	Asp	583	Asn
Mu_38	Gln	607	Lys
Mu_40	Gln	221	Arg

[0062] 对以上 6 个突变位点进行组合, 构建了 10 个 MMLV 突变体, 得到了比以上 6 个单点突变性能更优的 MMLV 突变体。

[0063] 因此, 在本发明的一个优选地实施方式中, 本发明提供了一种 M-MLV 酶突变体, 所述 M-MLV 酶突变体在选自下组的至少两个 (可以为两个、三个、四个、或五个) 位点发生突变: 第 446 位氨基酸残基、第 313 位氨基酸残基、第 583 位氨基酸残基、第 607 位氨基酸残基、第 221 位氨基酸残基, 其中氨基酸残基编号采用 SEQ ID NO.1 所示的编号。

[0064] 在一个优选地实施方式中, 本发明的 M-MLV 酶突变体如下:

编号	野生型氨基酸	氨基酸残基位置	突变型氨基酸
Mu_41	Asp	583	Asn
	Trp	313	Gln
Mu_42	Asp	583	Asn
	Trp	313	His
Mu_43	Trp	313	Gln
	Gln	221	Arg
Mu_44	Asp	583	Asn
	Gln	446	Cys
Mu_45	Asp	583	Asn
	Gln	221	Arg
Mu_46	Trp	313	Gln
	Gln	446	Cys
Mu_47	Trp	313	Gln
	Gln	607	Lys
Mu_48	Trp	313	Gln
	Asp	583	Asn
	Gln	221	Arg
Mu_49	Trp	313	Gln
	Asp	583	Asn
	Gln	607	Lys
Mu_50	Trp	313	Gln
	Asp	583	Asn
	Gln	446	Cys

[0066] 与野生型相比,所述M-MLV酶突变体在高温情况下(58℃)的逆转录效率提高10倍以上,优选地提高20倍以上,更优选地提高30倍以上。

[0067] 在一个优选地实施方式中,逆转录效率测试方法如下:

[0068] 从Hela细胞中提取总RNA为模板,按以下体系进行逆转录反应

	总 RNA	500ng
	5XRT buffer	4ul
[0069]	dNTP (2.5mM)	2ul
	Random 6 随机引物 (20pmol/ul)	1ul
	MMLV 蛋白样品	1ul
[0070]	DdH ₂ O	补至 20ul

[0071] 将野生型和突变体MMLV蛋白按以上体系进行反应,58℃15分钟,75℃5分钟灭活;然后取逆转录后产物,按以下体系进行荧光定量PCR检测

	逆转录产物	1ul
	GAPDH-PF 引物 (2pmol/ul)	2ul
[0072]	GAPDH-PR 引物 (2pmol/ul)	2ul
	2XQ-PCR Mix	10ul
	DdH ₂ O	5ul

[0073] Q-PCR程序:95℃3分钟,(95℃15秒,60℃15秒,72℃15秒读取荧光信号)X40个循环。

[0074] 以野生型逆转录酶效率为100%,与野生型逆转录酶的反应效率对比,突变型的逆转录效率计算公式如下:

$$[0075] \text{ 逆转录反应效率} = 100\% \times 2^{(Ct_{\text{野生型}} - Ct_{\text{突变型}})}$$

[0076] 其中,Random 6随机引物序列如下:

[0077] NNNNNN (N=A或T或G或C)

[0078] GAPDH-PF引物序列如下:

[0079] GCCTGCTTACCACCTTCTT (SEQ ID NO.:3)

[0080] GAPDH-PR引物序列如下:

[0081] TGAACGGGAAGCTCACTGGC (SEQ ID NO.:4)

[0082] 本领域的普通技术人员可以使用的常规方法获得本发明的M-MLV酶基因序列,例如全人工合成或PCR法合成。一种优选的合成法为不对称PCR法。不对称PCR法是用不等量的一对引物,PCR扩增后产生大量的单链DNA(ssDNA)。这对引物分别称为非限制引物与限制性引物,其比例一般为50-100:1。在PCR反应的最初10-15个循环中,其扩增产物主要是双链DNA,但当限制性引物(低浓度引物)消耗完后,非限制性引物(高浓度引物)引导的PCR就会产生大量的单链DNA。用于PCR的引物可根据本文所公开的本发明的序列信息适当地选择,并可用常规方法合成。可用常规方法如通过凝胶电泳分离和纯化扩增的DNA/RNA片段。

[0083] 本发明的M-MLV酶突变体可以通过常规的重组DNA技术进行表达或生产,包括步骤:

[0084] (1) 用编码本发明蛋白的多核苷酸,或用含有该多核苷酸的重组表达载体转化或转导合适的宿主细胞;

[0085] (2) 在合适的培养基中培养宿主细胞;

[0086] (3) 从培养基或细胞中分离、纯化目的蛋白质,从而获得M-MLV酶突变体。

[0087] 本领域的技术人员熟知的方法能用于构建含本发明M-MLV酶的编码DNA序列和合适的转录/翻译控制信号的表达载体,优选市售的载体:pET28。这些方法包括体外重组DNA技术、DNA合成技术、体内重组技术等。所述的DNA序列可有效连接到表达载体中的适当启动子上,以指导mRNA合成。表达载体还包括翻译起始用的核糖体结合位点和转录终止子。此外,表达载体优选包含一个或多个选择性标记基因,以提供用于选择转化的宿主细胞的表型性状。

[0088] 所述重组载体在5'到3'方向上包括:启动子,目的基因和终止子。如果需要,所述重组载体还可以包括以下元件:蛋白纯化标签;3'多聚核苷酸化信号;非翻译核酸序列;转运和靶向核酸序列;选择标记(抗生素抗性基因、荧光蛋白等);增强子;或操作子。

[0089] 用于制备重组载体的方法是本领域普通技术人员所熟知的。表达载体可以是细菌

质粒、噬菌体、酵母质粒、植物细胞病毒、哺乳动物细胞病毒或其他载体。总之,只要其能够在宿主体内复制和稳定,任何质粒和载体都可以被采用。

[0090] 本领域普通技术人员可以采用熟知的方法构建含有本发明启动子和/或目的基因序列的载体。这些方法包括体外重组DNA技术、DNA合成技术、体内重组技术等。

[0091] 本发明的表达载体,可以用于转化适当的宿主细胞,以使宿主转录目的RNA或表达目的蛋白质。宿主细胞可以是原核细胞,如大肠杆菌、谷氨酸棒杆菌、黄色短杆菌、链霉菌属、农杆菌;或是低等真核细胞,如酵母细胞;或是高等真核细胞,如植物细胞。本领域一般技术人员都清楚如何选择适当的载体和宿主细胞。用重组DNA转化宿主细胞可用本领域技术人员熟知的常规技术进行。当宿主为原核生物(如大肠杆菌)时,可以用CaCl₂法处理,也可用电穿孔法进行。当宿主是真核生物,可选用如下的DNA转染方法:磷酸钙共沉淀法,常规机械方法(如显微注射、电穿孔、脂质体包装等)。转化植物也可使用农杆菌转化或基因枪转化等方法,例如叶盘法、幼胚转化法、花芽浸泡法等。对于转化的植物细胞、组织或器官可以用常规方法再生成植株,从而获得转基因的植物。

[0092] 术语“可操作连接”是指将准备转录表达的目的基因以一种本领域的常规方式连接到它的控制序列以被表达。

[0093] 工程菌的培养和目的蛋白发酵生产

[0094] 在获得工程细胞后,便可在适合条件下培养工程细胞,表达本发明的基因序列所编码的蛋白。根据宿主细胞的不同,培养中所用的培养基可选自各种常规培养基,在适于宿主细胞生长的条件下进行培养。当宿主细胞生长到适当的细胞密度后,用合适的方法(如温度转换或化学诱导)诱导选择的启动子,将细胞再培养一段时间。

[0095] 在本发明中,可采用常规的发酵条件。代表性的条件包括(但并不限于):

[0096] (a) 就温度而言,M-MLV酶的发酵及诱导温度保持在25-37℃;

[0097] (b) 就诱导期的pH值而言,诱导期pH控制在3-9;

[0098] (c) 就溶氧(DO)而言,DO控制在10-90%,溶氧的维持可以用氧气/空气混合气体的通入来解决;

[0099] (d) 就补料而言,补料种类宜包括甘油、甲醇、葡萄糖等碳源,可单独补料或混合补料;

[0100] (e) 就诱导期IPTG浓度而言,常规诱导浓度都可用于本发明,通常IPTG浓度控制在0.1-1.5mM;

[0101] (f) 就诱导时间而言,没有特别限制,通常为2-20小时,较佳地为5-15小时。

[0102] 本发明的目的蛋白M-MLV酶存在大肠杆菌细胞胞内,通过离心机收集宿主细胞,然后通过高压、机器力、酶解细胞被或其他细胞破碎方法破碎宿主细胞,释放重组蛋白,优选的是高压法。宿主细胞裂解液可通过絮凝、盐析、超滤等方法进行初步纯化后再进行层析、超滤等纯化,也可直接进行层析纯化。

[0103] 层析技术包括阳离子交换层析、阴离子交换层析、凝胶过滤层析、疏水层析、亲和层析等技术。常用的层析方法包括:

[0104] 1. 阴离子交换层析:

[0105] 阴离子交换层析介质包括(但不限于):Q-Sepharose、DEAE-Sepharose。如果发酵样品的盐浓度较高,影响与离子交换介质的结合,则在进行离子交换层析前需降低盐浓度。

样品可以用稀释、超滤、透析、凝胶过滤层析等手段进行平衡缓冲液的更换,直至与对应的离子交换柱平衡液系统相似,然后上样,进行盐浓度或pH的梯度洗脱。

[0106] 2. 疏水层析:

[0107] 疏水层析介质包括(但不限于):Phenyl-Sepharose、Butyl-Sepharose、Octyl-Sepharose。样品通过添加NaCl、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 等方式提高盐浓度,然后上样,通过降低盐浓度方法洗脱。通过疏水层析除去疏水性有较大差异的杂蛋白。

[0108] 3. 凝胶过滤层析

[0109] 疏水层析介质包括(但不限于):Sephacryl、Superdex、Sephadex类。通过凝胶过滤层析更换缓冲体系,或进一步精纯。

[0110] 4. 亲和层析

[0111] 亲和层析介质包括(但不限于):HiTrap™HeparinHPColumns。

[0112] 5. 膜过滤

[0113] 超滤介质包括:有机膜如聚砜膜、无机膜如陶瓷膜、金属膜类。通过膜过滤可以达到纯化和浓缩的目的。

[0114] 本发明的主要优点在于:

[0115] (1) 本发明提供了耐高温且具有高逆转录效率的逆转录酶突变体。

[0116] (2) 本发明的具有高逆转录效率的逆转录酶突变体在同等条件下扩增效率比野生型M-MLV酶有显著的提高,因此能够显著提高检测效率。

[0117] (3) 本发明从数十个突变体中进行多轮筛选,筛选出了6株单突变耐高温的逆转录酶突变体,在58℃的逆转录温度下仍然能够保持较高的逆转录效率。而且,其中3株耐高温的逆转录酶突变体在1分钟反应时间内即可达到反应平衡。因此,本发明筛选获得的各逆转录酶突变体具有出乎意料的优异技术效果。

[0118] (4) 对单突变位点进行组合获得含多突变位点的耐高温的逆转录酶突变体,与单突变逆转录酶突变体相比,本发明的含多突变位点的耐高温的逆转录酶突变体的逆转录效率进一步提高,优势突变位点的组合有助于提高M-MLV酶的综合性能。

[0119] 下面结合具体实施例,进一步详陈本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不用来限制本发明的范围。下列实施例中未注明详细条件的实验方法,通常按照常规条件如美国Sambrook.J等著《分子克隆实验室指南》(黄培堂等译,北京:科学出版社,2002年)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明,否则百分比和份数按重量计算。以下实施例中所用的实验材料和试剂如无特别说明均可从市售渠道获得。

[0120] 实施例1各位点DDG值的计算及筛选

[0121] 将MMLV蛋白质序列输入Rosetta算法软件Cyrus Bench(Cyrus Biotechnology),对0~100,101~200,201~300,301~400,401~500,501~600,601~671位氨基酸分段进行全位点全突变的DDG值计算,得到DDG值显著降低(DDG值<-2)的突变位点信息如下:

[0122] 表1

[0123]

NO.	野生型氨基酸	氨基酸残基位置	突变型氨基酸	DDG 值
Mu_1	Lys	62	Asp	-2.45
Mu_2	Gln	63	Asp	-3.54
Mu_3	Tyr	64	Asp	-5.24
Mu_4	Met	66	Asp	-3.49
Mu_5	Ser	67	Asp	-5.24
Mu_6	Ala	70	Asp	-5.98
Mu_7	Arg	71	Asp	-8.52
Mu_8	Leu	99	Asp	-7.32
Mu_9	Lys	102	Asp	-4.25
Mu_10	Lys	103	Asp	-8.56
Mu_11	Thr	106	Asp	-9.21
Mu_12	Tyr	109	Asp	-7.34
Mu_13	Arg	110	Asp	-6.54
Mu_14	Arg	116	Asp	-2.34
Mu_15	Gln	446	Cys	-7.26
Mu_16	Trp	313	His	-9.45
Mu_17	Trp	313	Lys	-5.23
Mu_18	Asn	107	Cys	-8.54
Mu_19	Val	223	Lys	-6.79
Mu_20	Trp	313	Thr	-9.46
Mu_21	Trp	313	Asn	-11.35
Mu_22	Pro	132	Trp	-10.48
Mu_23	Leu	183	Cys	-6.45
Mu_24	Ile	49	Cys	-5.32
Mu_25	Trp	313	Arg	-4.26
Mu_26	Trp	313	Gln	-3.21
Mu_27	Leu	188	His	-7.64
Mu_28	Pro	132	Ala	-6.54
Mu_29	Ser	195	Leu	-11.56
Mu_30	Trp	313	Ser	-4.36
Mu_31	Leu	478	Trp	-5.67
Mu_32	Ile	314	His	-9.26
Mu_33	Trp	145	His	-10.64
Mu_34	Lys	397	Arg	-8.65

[0124]	Mu_35	Asp	524	Gly	-7.92
	Mu_36	Asp	583	Asn	-8.54
	Mu_37	Leu	435	Arg	-7.56
	Mu_38	Gln	607	Lys	-5.24
	Mu_39	Val	223	Ala	-9.63
	Mu_40	Gln	221	Arg	-10.79

[0125] 实施例2构建MMLV突变库

[0126] 根据以上蛋白质序列,由苏州金唯智生物科技有限公司进行密码子优化,编译出DNA序列(SEQ ID NO.:2)。

[0127] 由苏州金唯智生物科技有限公司根据以上DNA序列进行基因合成,添加5' (NheI)及3' (XhoI)限制性酶切位点,将基因通过5'NheI and 3'XhoI克隆至载体pET28a,构建质粒WT-pET28a,制备重组质粒DNA和含有该重组质粒的甘油菌,并根据实施例1所涉及的突变位点对质粒WT-pET28a进行定点突变,构建出突变库Mu1-pET28a~Mu40-pET28a。

[0128] 实施例3 MMLV突变体的表达及纯化

[0129] 将WT-pET28a,Mu1~40-pET28a质粒转化至BL21(DE3)感受态细胞,得到37个表达宿主菌,然后转接3ml LB培养基,37℃震荡培养5小时,然后加入0.1M IPTG 18℃诱导培养过夜。收集诱导后菌体,加入裂解液(50Mm Tris,50Mm NaCl,pH7.5),超声裂解,离心分离上清液。取上清液,经Ni NTA金属离子螯合填料纯化,得到野生型和40种突变MMLV蛋白

[0130] 实施例4突变体的筛选

[0131] A:第一轮筛选(筛选保持活性的突变)

[0132] 从HeLa细胞中提取总RNA为模板,按以下体系进行逆转录反应

	总 RNA	500ng
	5XRT buffer	4ul
	dNTP (2.5mM)	2ul
[0133]	Random 6 随机引物 (20pmol/ul)	1ul
	MMLV 蛋白样品	1ul
	DdH ₂ O	补至 20ul

[0134] 将野生型和36个突变体MMLV蛋白按以上体系进行反应,42℃15分钟,75℃5分钟灭活。然后取逆转录后产物,按以下体系进行荧光定量PCR检测

	逆转录产物	1ul
	GAPDH-PF 引物 (2pmol/ul)	2ul
[0135]	GAPDH-PR 引物 (2pmol/ul)	2ul
	2XQ-PCR Mix	10ul
	DdH ₂ O	5ul

[0136] Q-PCR程序:95℃3分钟,(95℃15秒,60℃15秒,72℃15秒读取荧光信号)X40个循环。

[0137] 各突变体逆转录产物荧光定量PCR结果见下表:

[0138] 表2

编号	ct mean	编号	Ct Mean
WT	24.57	Mu_8	27.39
<u>Mu_36</u>	<u>20.40</u>	Mu_20	28.15
<u>Mu_38</u>	<u>20.67</u>	Mu_9	28.23
<u>Mu_16</u>	<u>20.69</u>	Mu_32	28.32
<u>Mu_40</u>	<u>20.82</u>	Mu_6	28.83
<u>Mu_28</u>	<u>22.39</u>	Mu_37	28.84
<u>Mu_11</u>	<u>22.93</u>	Mu_3	28.94
<u>Mu_1</u>	<u>23.25</u>	Mu_5	29.36
<u>Mu_31</u>	<u>23.30</u>	Mu_17	30.54
<u>Mu_33</u>	<u>23.49</u>	Mu_29	30.82
[0139] <u>Mu_15</u>	<u>23.57</u>	Mu_4	30.88
<u>Mu_24</u>	<u>23.67</u>	Mu_19	30.94
<u>Mu_7</u>	<u>23.99</u>	Mu_10	31.26
<u>Mu_23</u>	<u>24.33</u>	Mu_14	31.52
<u>Mu_26</u>	<u>24.41</u>	Mu_25	31.60
<u>Mu_30</u>	<u>24.71</u>	Mu_13	31.62
<u>Mu_2</u>	<u>25.24</u>	Mu_12	31.88
<u>Mu_21</u>	<u>25.53</u>	Mu_27	32.39
<u>Mu_22</u>	<u>25.54</u>		
<u>Mu_34</u>	<u>25.67</u>		
<u>Mu_18</u>	<u>25.90</u>		

[0140] 下划线标记的14个突变体ct值低于野生型,即逆转录效率高于野生型。选择这些突变体进行第二轮筛选

[0141] B: 第二轮筛选(筛选耐高温突变)

[0142] 选第一轮筛选选出的突变体,按第一轮筛选的逆转录反应体系,提高逆转录反应温度至50、55、58℃,然后按第一轮筛选的荧光定量PCR体系进行逆转录效率检测,结果如下:

[0143] 表3

组别	50℃/ ct mean	55℃/ct mean	58℃/ ct mean	逆转录效率 (%, 58℃)
WT	21.11	22.35	24.01	100%
[0144] Mu_1	19.64	20.92	22.93	211.40%
Mu_7	16.4	19.7	19.93	1691.23%
Mu_11	16.97	17.54	18.48	4620.57%
Mu_15	19.17	19.2	18.7	3967.06%
Mu_16	19.97	18.55	18.91	3429.68%

[0145]	Mu_23	19.59	19.42	20.69	998.66%
	Mu_24	20.91	21.93	20.6	1062.95%
	Mu_26	17.57	17.19	15.22	44264.31%
	Mu_28	19.06	19.75	22.06	386.37%
	Mu_31	19.73	21.46	23.54	138.51%
	Mu_33	19.96	21	22.34	318.21%
	Mu_36	17.16	16.48	14.43	76536.28%
	Mu_38	20.61	20.71	19.52	2247.11%
	Mu_40	18.82	18.84	18.47	4652.71%

[0146] 备注:以野生型逆转录酶效率为100%,与野生型逆转录酶的反应效率对比,突变型的逆转录效率计算公式如下:

$$[0147] \quad \text{逆转录反应效率} = 100\% \times 2^{(Ct_{\text{野生型}} - Ct_{\text{突变型}})}$$

[0148] 从第二轮筛选结果看,Mu_15、16、26、36、38、40,6个突变体58℃下逆转录效率不低于50℃逆转录。选这6个突变体进行第三轮筛选。

[0149] C:第三轮筛选(筛选高合成速率突变)

[0150] 选第二轮筛选选出的突变体,按第一轮筛选的逆转录反应体系,逆转录反应温度55℃,反应时间1分钟、2分钟、5分钟,然后按第一轮筛选的荧光定量PCR体系进行逆转录效率检测,结果如下:

[0151] 表4

[0152]	组别	1min/ct mean	2min/ct mean	5min/ct mean
	WT	24.88	22.99	21.85
	15	22.24	20.28	19.17
	16	20.01	19.25	19.47
	26	21.17	20.79	17.72
	36	17.64	17.92	17.93
	38	21.15	20.73	20.14
	40	18.95	19.00	18.34

[0153] 从第三轮筛选的结果看,Mu_16、36、40逆转录反应1分钟与5分钟差异不大,证明反应1分钟后反应即达到平衡。

[0154] 实施例5

[0155] 上述实施例中筛选出了6个可使M-MLV酶获得耐高温和高活性的突变位点如下:

[0156]	编号	野生型氨基酸	氨基酸残基位置	突变型氨基酸
	Mu_15	Gln	446	Cys
	Mu_16	Trp	313	His
	Mu_26	Trp	313	Gln
	Mu_36	Asp	583	Asn
	Mu_38	Gln	607	Lys

[0157]	Mu_40	Gln	221	Arg
--------	-------	-----	-----	-----

[0158] 本实施例对以上6个突变位点进行组合,构建了10个MMLV突变体,期望得到比以上6个单点突变性能更优的MMLV突变体。

[0159] 按照下表的突变位点设计,在野生型MMLV蛋白质序列上进行突变。

[0160] 野生型MMLV蛋白质序列如SEQ ID NO.:1所示。

编号	野生型氨基酸	氨基酸残基位置	突变型氨基酸
Mu_41	Asp	583	Asn
	Trp	313	Gln
Mu_42	Asp	583	Asn
	Trp	313	His
Mu_43	Trp	313	Gln
	Gln	221	Arg
Mu_44	Asp	583	Asn
	Gln	446	Cys
Mu_45	Asp	583	Asn
	Gln	221	Arg
Mu_46	Trp	313	Gln
	Gln	446	Cys
Mu_47	Trp	313	Gln
	Gln	607	Lys
Mu_48	Trp	313	Gln
	Asp	583	Asn
	Gln	221	Arg
Mu_49	Trp	313	Gln
	Asp	583	Asn
	Gln	607	Lys
Mu_50	Trp	313	Gln
	Asp	583	Asn
	Gln	446	Cys

[0162] 根据以上蛋白质序列,由苏州金唯智生物科技有限公司进行密码子优化,编译出DNA序列,野生型MMLV DNA序列(WT)如SEQ ID NO.:2所示。

[0163] 由苏州金唯智生物科技有限公司根据以上DNA序列进行基因合成,添加5' (NheI)及3' (XhoI)限制性酶切位点,将基因通过5'NheI and 3'XhoI克隆至载体pET28a,构建质粒WT-pET28a,制备重组质粒DNA和含有该重组质粒的甘油菌,并根据所涉及的突变位点对质粒WT-pET28a进行定点突变,构建出突变库Mu41-pET28a至Mu50-pET28a

[0164] 实施例6 MMLV突变体的表达及纯化

[0165] 将Mu41至Mu50-pET28a质粒转化至BL21 (DE3) 感受态细胞,得到37个表达宿主菌,

然后转接3ml LB培养基,37℃震荡培养5小时,然后加入0.1Mm IPTG18℃诱导培养过夜。收集诱导后菌体,加入裂解液(50Mm Tris、50Mm NaCl、pH7.5),超声裂解,离心分离上清液。取上清液,经Ni NTA金属离子螯合填料纯化,得到10种突变MMLV蛋白

[0166] 实施例7 10种突变酶与单点突变MMLV的耐热性能对比

[0167] 取浓度为200U/ul的Mu41至Mu50 10种突变酶蛋白,及Mu_15、16、26、36、38、和40共6种MMLV突变酶蛋白,放置于50℃恒温金属浴下处理60分钟,同时进行50℃、55℃、60℃、65℃及70℃的恒温金属浴上加热15分钟,然后与未经加热处理的酶样品一起进行逆转录反应。从HeLa细胞中提取总RNA为模板,逆转录反应体系如下:

[0168]

总 RNA	500ng
5XRT buffer	4ul
dNTP (2.5mM)	2ul
Random 6 随机引物 (20pmol/ul)	1ul
MMLV 蛋白样品	1ul
DdH ₂ O	补足 20ul

[0169] 42℃15分钟,95℃5分钟灭活。然后取逆转录后产物,按以下体系进行荧光定量PCR检测

[0170]

逆转录产物	1ul
GAPDH-PF 引物 (2pmol/ul)	2ul
GAPDH-PR 引物 (2pmol/ul)	2ul
2XQ-PCR Mix	10ul
DdH ₂ O	5ul

[0171] Q-PCR程序:95℃3分钟,(95℃15秒,60℃15秒,72℃15秒读取荧光信号)X40个循环。

[0172] 荧光定量PCR结果(Ct值)见下表:

[0173]

	未经热处理	热处理 60 分钟	热处理 15min				
		50℃	50℃	55℃	60℃	65℃	70℃
Mu_15	21.45	22.18	21.56	22.45	25.64	30.68	32.14
Mu_16	21.54	22.25	21.49	22.98	24.36	30.54	32.14
Mu_26	20.13	20.59	20.26	21.34	23.39	30.96	32.11
Mu_36	20.41	20.98	20.56	21.65	25.14	28.67	32.09
Mu_38	21.14	21.66	21.23	22.68	26.73	29.33	32.48
Mu_40	21.45	21.37	21.29	22.97	23.54	26.52	30.49
Mu_41	20.15	20.49	20.32	20.56	22.67	25.99	30.25
Mu_42	20.35	20.57	20.33	20.98	21.97	23.76	26.33
Mu_43	20.33	20.42	20.31	20.55	22.59	25.48	28.44
Mu_44	21.14	21.37	21.22	21.53	23.49	26.87	29.55

[0174]	Mu_45	21.06	21.22	21.15	21.59	23.64	25.79	28.63
	Mu_46	21.23	21.68	21.57	22.01	24.68	26.77	28.41
	Mu_47	20.86	20.88	20.98	21.34	22.54	24.68	26.11
	Mu_48	19.68	19.97	20.02	20.16	21.96	23.49	26.96
	Mu_49	19.47	19.96	19.88	20.04	21.36	24.01	27.17
	Mu_50	20.16	20.33	20.24	20.31	21.57	23.24	26.97

[0175] 从以上结果可见,组合突变的Mu_40至Mu_50在55℃以上温度下比单点突变体稳定性高。在50℃下处理1小时,酶的逆转录性能基本没有改变。

[0176] 实施例8 10种突变酶与单点突变MMLV的反应速率对比

[0177] 按上述实施例7的逆转录反应体系进行逆转录反应,反应温度55℃,逆转录时间分别为30秒、1分钟、2分钟、3分钟,对逆转录产物进行荧光定量PCR检测,反应体系同实施例3。Ct值结果如下:

	逆转录反应时间			
	30 秒	1 分钟	2 分钟	3 分钟
Mu_15	24.35	23.49	22.28	22.34
Mu_16	25.63	24.26	22.67	22.54
Mu_26	23.55	22.13	21.49	21.31
Mu_36	22.98	22.04	21.78	21.98
Mu_38	24.98	23.49	22.34	22.77
Mu_40	24.68	23.46	22.87	22.58
Mu_41	21.97	21.68	21.32	20.97
Mu_42	20.97	20.67	20.13	19.98
Mu_43	22.34	22.06	21.37	21.49
Mu_44	22.37	21.98	21.59	21.67
Mu_45	21.97	21.44	21.54	21.36
Mu_46	24.23	23.98	23.67	23.97
Mu_47	21.87	21.3	21.24	21.39
Mu_48	21.35	21.22	21.49	21.2
Mu_49	21.09	20.34	20.19	20.08
Mu_50	22.38	22.09	21.67	21.87

[0179] 从上述结果可见,Mu_42、Mu_45、Mu_47、Mu_48、Mu_49在反应1分钟后ct值即与反应2、3分钟基本没有差异,因此判断其反应1分钟后即达到平衡。10个组合突变体在相同反应时间下的ct值均小于单点突变体,证明优势突变位点的组合有助于提高M-MLV酶的综合性能。

[0180] 实施例9在新冠病毒核酸检测中的应用

[0181] 本实施例提供了筛选出的组合突变体M-MLV酶在新型冠状病毒(2019-nCoV)检测试剂上的应用。

[0182] 采用荧光定量PCR法检测2019-nCoV病毒的ORF1ab基因及N基因的序列,使用的引

物及探针序列信息如下:

[0183] Target 1(ORF1ab):

[0184] 正向引物(F):CCCTGTGGGTTTTACTTAA(SEQ ID NO.:5)

[0185] 反向引物(R):ACGATTGTGCATCAGCTGA(SEQ ID NO.:6)

[0186] 荧光探针(P):5'-FAM-CCGTCTGCGGTATGTGGAAAGGTTATGG-BHQ1-3'(SEQ ID NO.:7)

[0187] Target 2(N):

[0188] 正向引物(F):GGGGAAGTTCTCCTGCTAGAAT(SEQ ID NO.:8)

[0189] 反向引物(R):CAGACATTTTGCTCTCAAGCTG(SEQ ID NO.:9)

[0190] 荧光探针(P):5'-FAM-TTGCTGCTGCTTGACAGATT-TAMRA-3'(SEQ ID NO.:10)

[0191] 配制反应体系如下:

2019-nCoV 参考品样品 5ul

5XRT buffer 5ul

dNTP (2.5mM) 2ul

引物 (2pmol/ul) 2ul

[0192] 探针 (10pmol/ul) 0.5ul

MMLV 蛋白样品 1ul

热启动 Taq 酶 (5U/ul) 1ul

DdH₂O 补至 25ul

[0193] 配制好反应体系后,进行RT-PCR反应如下:55℃5分钟,95℃2分钟,(95℃30秒;68℃1分钟读取荧光)×40循环。结果如下:

	Ct 值	
	ORF1ab 基因	N 基因
Mu_42	32.6	31.9
Mu_45	33.4	32.4
[0194] Mu_47	34.2	33.8
Mu_48	31.7	32.6
Mu_49	33.2	32.8
野生型 M-MLV 酶	38.5	37.2

[0195] 对比5种组合突变酶与野生型M-MLV酶的ct差值(ΔCt),计算与野生型M-MLV酶在ORF1ab及N基因扩增效率的差异倍数如下:

	ORF1ab 基因		N 基因	
	ΔCt	扩增效率 差异倍数	ΔCt	扩增效率 差异倍数
[0196] Mu_42	5.9	59.71	5.3	39.40
Mu_45	5.1	34.30	4.8	27.86
Mu_47	4.3	19.70	3.4	10.56
Mu_48	6.8	111.43	4.6	24.25
Mu_49	5.3	39.40	4.4	21.11

[0197] 从不同的组合突变体MMLV和野生型M-MLV酶对新冠参考品样品的扩增Ct值看,突变体的扩增效率比野生型有明显提高。

[0198] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

[0001] 序列表

[0002] <110> 中山大学达安基因股份有限公司

[0003] <120> 用于核酸检测的逆转录酶突变体

[0004] <130> 0000754

[0005] <160> 10

[0006] <170> SIPOSequenceListing 1.0

[0007] <210> 1

[0008] <211> 671

[0009] <212> PRT

[0010] <213> 小鼠白血病病毒 (Murine leukemia virus)

[0011] <400> 1

[0012] Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu

[0013] 1 5 10 15

[0014] Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala

[0015] 20 25 30

[0016] Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu

[0017] 35 40 45

[0018] Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr

[0019] 50 55 60

[0020] Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg

[0021] 65 70 75 80

[0022] Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr

[0023] 85 90 95

[0024] Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val

[0025] 100 105 110

[0026] Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr

[0027] 115 120 125

[0028] Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln

[0029] 130 135 140

[0030] Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu

[0031] 145 150 155 160

[0032] His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu

[0033] 165 170 175

[0034] Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe

[0035] 180 185 190

[0036] Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala

[0037] 195 200 205

[0038] Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp

[0039] 210 215 220

[0040] Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr

[0041] 225 230 235 240

[0042]	Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala		
[0043]		245	250 255
[0044]	Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu		
[0045]		260	265 270
[0046]	Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val		
[0047]		275	280 285
[0048]	Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu		
[0049]		290	295 300
[0050]	Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met		
[0051]		305	310 315 320
[0052]	Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp		
[0053]		325	330 335
[0054]	Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu		
[0055]		340	345 350
[0056]	Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu		
[0057]		355	360 365
[0058]	Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys		
[0059]		370	375 380
[0060]	Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp		
[0061]		385	390 395 400
[0062]	Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile		
[0063]		405	410 415
[0064]	Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu		
[0065]		420	425 430
[0066]	Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro		
[0067]		435	440 445
[0068]	Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu		
[0069]		450	455 460
[0070]	Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro		
[0071]		465	470 475 480
[0072]	Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu		
[0073]		485	490 495
[0074]	Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln		
[0075]		500	505 510
[0076]	Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu		
[0077]		515	520 525
[0078]	Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr		
[0079]		530	535 540
[0080]	Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg		
[0081]		545	550 555 560
[0082]	Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys		
[0083]		565	570 575

[0084]	Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His
[0085]	580 585 590
[0086]	Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly
[0087]	595 600 605
[0088]	Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu
[0089]	610 615 620
[0090]	Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys
[0091]	625 630 635 640
[0092]	Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala
[0093]	645 650 655
[0094]	Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu
[0095]	660 665 670
[0096]	<210> 2
[0097]	<211> 2013
[0098]	<212> DNA
[0099]	<213> 人工序列(Artificial sequence)
[0100]	<400> 2
[0101]	acgctgaata tcgaggacga acaccgtctg cacgaaacca gcaaggagcc ggacgttagt 60
[0102]	ctgggtagca cgtggctgag cgattttcca caagcgtggg cggaaaccgg tggtaggggt 120
[0103]	ctcgcgcttc gccaaagcccc actcattatc cactgaaag ccacgagcac gccggtgagc 180
[0104]	atcaagcagt acccgatgag ccaagaagcc cgcctcgca ttaaaccgca tattcagcgt 240
[0105]	ctgctggacc aaggcattct ggtgccgtgc cagagtccgt ggaatacgc actgctcccg 300
[0106]	gttaagaagc cgggcaccaa cgattatcgc ccggttcaag acctccgca agtgaacaag 360
[0107]	cgcgtggaag atatccatcc gaccgtgcca aatccgtaca atctgctgag tggcctcccg 420
[0108]	ccgagtcac aatggtacac cgtgctggat ctcaaggatg cgtttttctg cctccgtctg 480
[0109]	catccaacca gccagccact ctttgcgttt gagtggcgcg acccagaaat gggatcagc 540
[0110]	ggtcaactga cgtggacgcg tctgccgcaa ggcttcaaaa acagcccagc gctgttcgat 600
[0111]	gaggccctcc atcgcgatct ggcggtttc cgtatccagc atccagatct gattctgctg 660
[0112]	cagtacgttg acgatctgct cctcgcggcc accagtgaac tggattgcca gcaaggtacc 720
[0113]	cgtgcgctgc tgcagacgct gggcaatctg ggctaccgtg ccagcgcgaa aaaggcgcgaa 780
[0114]	atctgccaga agcaagttaa gtacctcggc tatctgctga aagagggtca acgctggctg 840
[0115]	accgagcgc gtaaagagac cgttatgggt cagccaacgc caaagacgc acgccagctc 900
[0116]	cgcgaatttc tgggtaccgc cggcttctgt cgtctgtgga ttccgggctt cgcggaaatg 960
[0117]	gcggcgccac tctaccgct gaccaaaacc ggtaccctct tcaattgggg cccagatcag 1020
[0118]	cagaagcct accaagaaat taaacaagcg ctgctcaccg cgccggccct cggctctcca 1080
[0119]	gatctgacca aaccgttga gctgttcgtg gacgagaagc aaggctacgc caaaggcgtg 1140
[0120]	ctgaccaga aactcggctc atggcgtcgt ccggtggcct acctcagtaa gaaactggat 1200
[0121]	ccagttgagg cgggttgccc gccatgtctc cgtatggtgg cggcgattgc cgttctgacc 1260
[0122]	aaagacccg gcaaaactac catgggtcag ccgctggtta ttctcgcgcc acatgcgggtg 1320
[0123]	gaagcgtgg ttaacaacc gccagaccgc tggctgagca atgcccgcac gaccattat 1380
[0124]	caagcgtgc tgctggacac cgaccgcgtt cagttcggtc cgggtggttc gctgaatcca 1440
[0125]	gcgacgctgc tgccgtgcc agaagaaggt ctgcagcaca actgtctgga cattctggcc 1500

- [0126] gaggcccatg gcaccctcc agatctcacc gatcagccac tgccagacgc cgatcatacg 1560
- [0127] tggtagaccg atggtagtag tctgctgcaa gaaggtcaac gtaaagcggg tgccgcgggtg 1620
- [0128] acgacggaaa ccgagtgat ctgggcaaaa gcgctgccag cgggtaccag cgcgcaacgt 1680
- [0129] gcggaactga tcgcgtgac ccaagcgtc aaaatggccg agggcaagaa actcaacgtg 1740
- [0130] tacaccgaca gtcgctacgc gtttgcgacc gcgcacatcc acggtgagat ttatcgccgc 1800
- [0131] cgtggctctgc tcacgagcga aggtaaggag atcaagaata aggacgagat cctcgcgctg 1860
- [0132] ctgaaagccc tctttctgcc gaaacgtctg agcatcatcc attgcccggg tcaccagaag 1920
- [0133] ggccacagtg cggaagcgcg cggtaatcgc atggccgatc aagccgcgcg caaagcggcg 1980
- [0134] attacggaaa ccccgatac gagcacgctg ctg 2013
- [0135] <210> 3
- [0136] <211> 20
- [0137] <212> DNA
- [0138] <213> 人工序列(Artificial sequence)
- [0139] <400> 3
- [0140] gcctgcttca ccaccttctt 20
- [0141] <210> 4
- [0142] <211> 20
- [0143] <212> DNA
- [0144] <213> 人工序列(Artificial sequence)
- [0145] <400> 4
- [0146] tgaacgggaa gctcactggc 20
- [0147] <210> 5
- [0148] <211> 21
- [0149] <212> DNA
- [0150] <213> 人工序列(Artificial sequence)
- [0151] <400> 5
- [0152] ccctgtgggt ttactactta a 21
- [0153] <210> 6
- [0154] <211> 19
- [0155] <212> DNA
- [0156] <213> 人工序列(Artificial sequence)
- [0157] <400> 6
- [0158] acgattgtgc atcagctga 19
- [0159] <210> 7
- [0160] <211> 28
- [0161] <212> DNA
- [0162] <213> 人工序列(Artificial sequence)
- [0163] <400> 7
- [0164] ccgtctgcgg tatgtggaaa gtttatgg 28
- [0165] <210> 8
- [0166] <211> 22
- [0167] <212> DNA

-
- [0168] <213> 人工序列(Artificial sequence)
[0169] <400> 8
[0170] ggggaacttc tctgctaga at 22
[0171] <210> 9
[0172] <211> 22
[0173] <212> DNA
[0174] <213> 人工序列(Artificial sequence)
[0175] <400> 9
[0176] cagacatddd gctctcaagc tg 22
[0177] <210> 10
[0178] <211> 20
[0179] <212> DNA
[0180] <213> 人工序列(Artificial sequence)
[0181] <400> 10
[0182] ttgctgctgc ttgacagatt 20