



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115820595 A

(43) 申请公布日 2023. 03. 21

(21) 申请号 202211228769.X

C07H 21/04 (2006.01)

(22) 申请日 2020.05.11

C12Q 1/686 (2018.01)

(62) 分案原申请数据

202010393420.6 2020.05.11

(71) 申请人 南京君华基因科技有限公司

地址 211135 江苏省南京市麒麟科技创新园
园窠村街5号麒麟智慧园7号楼2042

申请人 上海羿鸣生物科技有限公司

(72) 发明人 杨国华 郭志伟 林国旻 车彬

余佳佳 李杰

(74) 专利代理机构 上海德禾翰通律师事务所

31319

专利代理师 侯莉

(51) Int. Cl.

C12N 9/12 (2006.01)

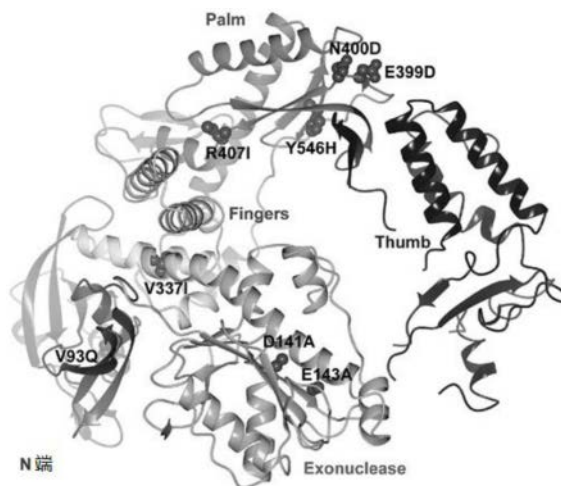
权利要求书4页 说明书21页
序列表(电子公布) 附图2页

(54) 发明名称

一种优化的扩增目标核酸的聚合酶、复合体系及应用

(57) 摘要

本发明涉及生物技术领域,公开了一种优化的扩增目标核酸的方法,包括:使结合了引物的模板和至少部分经标记分子修饰的dNTP,以及具有3'-5'外切酶活性的高保真聚合酶DNA聚合酶接触得到扩增产物,得到得率和标记分子掺入率均理想的纯化产物。本发明还公开了用于所述方法的具有高掺入率的dNTP-DNA聚合酶复合体系、经改造的DNA聚合酶、经标记分子修饰的dNTP。本发明提供的方法及复合体系、经改造的DNA聚合酶、经标记分子修饰的dNTP,对不定长度的单链扩增实现了显著的技术进步,具有广泛的应用前景和显著的经济价值。



1. 具有高掺入率的dNTP-DNA聚合酶复合体系,其特征在于,所述高掺入率的dNTP-DNA聚合酶复合体系包括dNTP和DNA聚合酶;

所述dNTP是至少部分经标记分子修饰的dNTP,当DNA聚合酶含N端结构域的定点突变时,所述经标记分子修饰的dNTP中的修饰基团与dNTP碱基基团连接的前3个C原子内含有或不含有阻止修饰基团分子旋转的二键或三键结构;当DNA聚合酶不含N端结构域的定点突变时,所述经标记分子修饰的dNTP中的修饰基团与dNTP碱基基团连接的前3个C原子内不含有阻止修饰基团分子旋转的二键或三键结构;

所述DNA聚合酶是具有3' -5' 外切酶活性的高保真聚合酶。

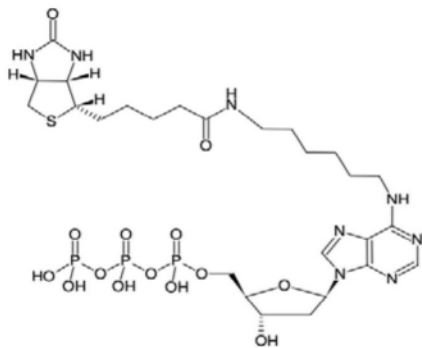
2. 如权利要求1所述的复合体系,其特征在于,

所述DNA聚合酶是Pfu,Deep Vent,KOD中的一种或多种;和/或,所述DNA聚合酶由Pfu,Deep Vent,KOD中的一种或多种经过改造得到;所述经标记分子修饰的dNTP是dATP,dCTP,dGTP中的一种或多种;当DNA聚合酶含V93Q突变时,所述经标记分子修饰的dNTP中的修饰基团与dNTP碱基基团连接的前3个C原子内含有或不含有阻止修饰基团分子旋转的二键或三键结构;当DNA聚合酶不含V93Q突变时,所述经标记分子修饰的dNTP中的修饰基团与dNTP碱基基团连接的前3个C原子内不含有阻止修饰基团分子旋转的二键或三键结构;

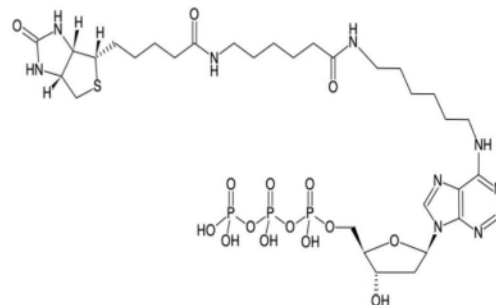
所述标记分子是生物素。

3. 如权利要求2所述的复合体系,其特征在于,

所述含有生物素的修饰基团与所述dATP结合的位点是碱基的N6或7-Deaza;优选的,当所述含有生物素的修饰基团与所述dATP结合的位点是碱基的N6时,所述经生物素修饰的dATP是biotin-7-dATP,或biotin-14-dATP,其结构式如下所示;

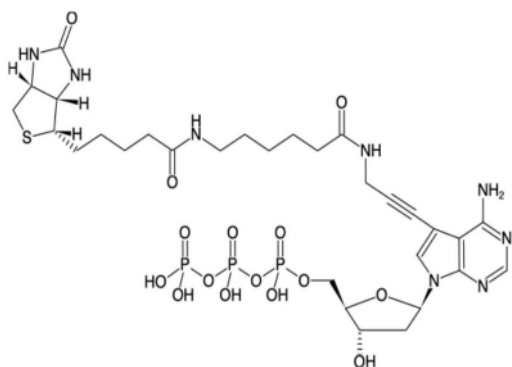


biotin-7-dATP



biotin-14-dATP

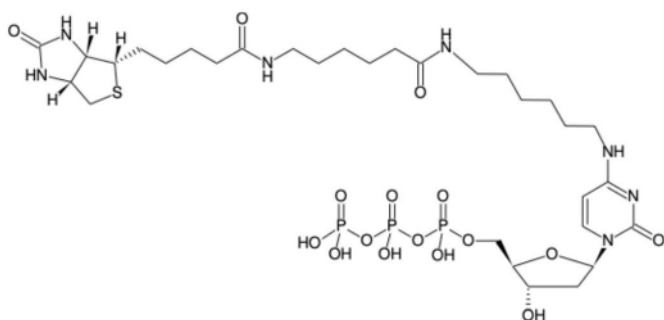
当所述含有生物素的修饰基团与所述dATP结合的位点是碱基的7-Deaza时,所述经生物素修饰的dATP是biotin-11-dATP,其结构式如下所示;



biotin-11-dATP

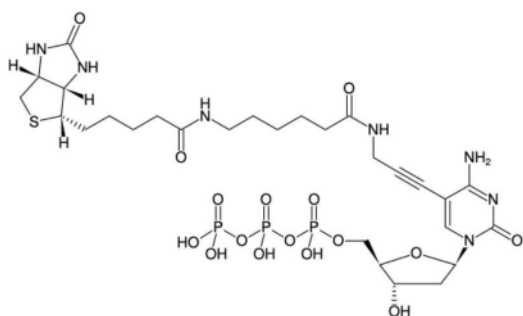
和/或,所述含有生物素的修饰基团与所述dCTP结合的位点是碱基的N4或C5;

优选的,当所述含有生物素的修饰基团与所述dCTP结合的位点是碱基的N4时,所述经生物素修饰的dCTP是biotin-14-dCTP,其结构式如下所示;

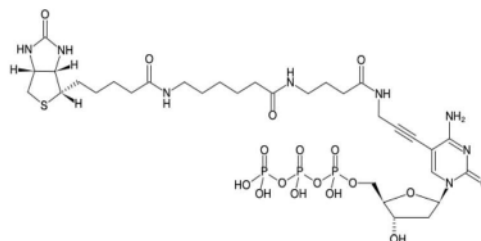


biotin-14-dCTP

当所述含有生物素的修饰基团与所述dCTP结合的位点是碱基的C5时,所述经生物素修饰的dCTP是biotin-11-dCTP或biotin-16-dCTP,其结构式如下所示;



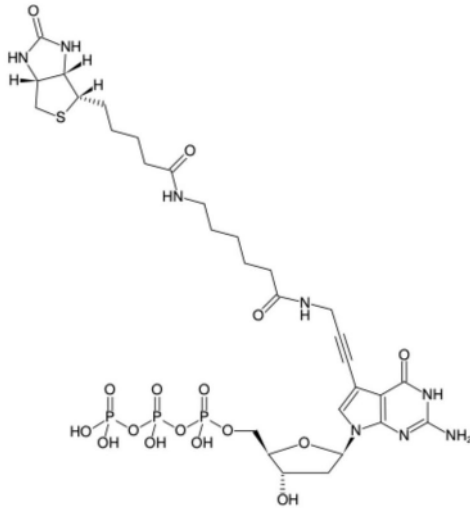
biotin-11-dCTP



biotin-16-dCTP

和/或,所述含有生物素的修饰基团与所述dGTP结合的位点是碱基的7-Deaza;

优选的,所述经生物素修饰的dGTP是biotin-11-dGTP,其结构式如下所示;



biotin-11-dGTP。

4. 如权利要求2所述的复合体系,其特征在于,
 所述改造是在DNA聚合酶上加一段双链DNA结合结构域;
 优选的,所述改造是在DNA聚合酶的C端加一段Sso7d结构域;
 更优选的,所述改造是在Pfu聚合酶的C端加一段Sso7d结构域形成加尾体1;或,所述改造是在KOD聚合酶的C端加一段Sso7d结构域形成加尾体2;或,所述改造是将Pfu和Deep Vent聚合酶进行嵌合后在C端加一段Sso7d结构域形成嵌合体1。
5. 如权利要求4所述的复合体系,其特征在于,
 所述改造还包括将所述加尾体2和所述嵌合体1进行链置换形成置换体1和2;
 其中所述置换体1由嵌合体1的C端和加尾体2的N端融合而成,
 所述置换体2由嵌合体1的N端和加尾体2的C端融合而成;
 优选的,所述链置换的位点在3' -5' 外切酶活性区与聚合酶活性区之间;
 更优选的,所述链置换的位点在N端第300-360个氨基酸之间;
 更优选的,所述链置换的位点在N端第326-327个氨基酸之间;
 更优选的,所述改造还包括在置换体2的N端附近设置点突变形成突变体1;
 更优选的,所述点突变的位点在N端第1-100个氨基酸之间;
 更优选的,所述点突变的位置是V93Q。
6. 如权利要求2所述的复合体系,其特征在于,所述DNA聚合酶的氨基酸序列为SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:9中的一种或几种;或,
 所述DNA聚合酶的氨基酸序列与SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:9中任意其一的N端起360个氨基酸的同源性大于等于90%。
7. 一种DNA聚合酶,其特征在于,所述DNA聚合酶如权利要求1~6之任一项所述的复合体系中所述。
8. 一种经标记分子修饰的dNTP,其特征在于,所述DNA聚合酶如权利要求1~6之任一项所述的复合体系中所述。
9. 一种优化的扩增目标核酸的体系或试剂盒,其包括权利要求1~6之任一项所述的具有高掺入率的dNTP-DNA聚合酶复合体系或如权利要求7所述的DNA聚合酶或如权利要求8所

述的经标记分子修饰的dNTP。

10. 如权利要求1~6之任一项所述的复合体系、或如权利要求7所述的DNA聚合酶、或如权利要求8所述的经标记分子修饰的dNTP、或如权利要求9所述的优化的扩增目标核酸的体系或试剂盒在扩增目标核酸、或扩增并纯化目标核酸、或在制备用于扩增目标核酸的产品、或在制备用于扩增并纯化目标核酸的产品中的应用。

一种优化的扩增目标核酸的聚合酶、复合体系及应用

[0001] 本申请是如下申请的分案申请：

[0002] 发明名称：一种优化的扩增目标核酸的聚合酶、复合体系及应用

[0003] 申请号：202010393420.6

[0004] 申请日：2020年5月11日

[0005] 申请人：南京君华基因科技有限公司；上海羿鸣生物科技有限公司

技术领域

[0006] 本发明涉及生物技术领域，更具体地说，涉及一种优化的扩增并纯化目标核酸的方法和体系。

背景技术

[0007] 对于靶向扩增技术而言，扩增纯化后得到产量和纯度都足够的目标产物非常关键。现有技术对于核酸扩增后目标产物的纯化方式主要包括固相载体吸附法，比如吸附柱法或固相可逆磁珠法，利用的是载体对核酸本身较强的亲和力和吸附力；分子筛法，通过分子量大小的不同来筛选目标分子；电泳法，通过电泳分析，将目标分子量的核酸纯化回收；亲和纯化，用标记物标记探针或引物，利用固相载体通过标记物的亲和性来纯化目标DNA分子。

[0008] 鉴于通量和成本，目前在二代测序建库中常用的是基于标记物与固相载体亲和性状的亲和纯化，比如用链霉亲和素包被的磁珠纯化用生物素标记的探针或引物扩增得到的扩增产物。该法相较其它三种纯化法而言，对于短片段或单链DNA回收率高，原始DNA模板转化率高，纯化产物中非核酸产物少，且适合不定长度的原始模板，但缺点是纯化产物中未结合模板的带有标记分子的游离探针或引物大量残留。

[0009] 为了解决被标记的游离探针或引物在纯化产物中大量残留的问题，现有技术采用的另一种纯化方法是将标记分子标记在作为扩增反应底物的dNTP而不是探针或引物上，通过DNA聚合酶的酶促反应将被标记的dNTP掺入到扩增产物中，再利用亲和纯化获得目标纯化产物。通常，对于各种测试的dNTP类似物，扩增产物得率与经修饰的dNTP类似物掺入率之间存在反比关系，找到合适修饰的dNTP类似物作为反应底物不可或缺。然而，可以用生物素修饰的天然dNTP至少有四种，对这四种dNTP的不同位点进行不同碳链长度的生物素修饰更多达几十种，不同修饰的dNTP类似物其底物性能大相径庭，有的产物掺入率尚可但扩增得率很低。再考虑DNA聚合酶的问题，经过分子生物学至今的发展，天然与定向改造后的DNA聚合酶细分种类已多至不可数，其结构和性能千差万别，不同种类的DNA聚合酶与不同种类修饰物、修饰位点、混合比例的dNTP类似物配合使用，排列组合几乎无限，产物得率与纯化性能天差地别。现有技术只提到失去3'-5'外切酶活性的DNA聚合酶可以在DNA扩增中掺入经生物素修饰的dNTP (Incorporation of reporter molecule-labeled nucleotides by DNA polymerases. II. High-density labeling of natural DNA, T Tasara, B Angerer, etc, Nucleic Acids Res. 2003 May 15; 31(10):2636-2646.)，但3'-5'外切酶活性失活的

DNA聚合酶不具有高保真性,不能满足靶向扩增技术准确富集目标核酸序列的需求。B类DNA聚合酶能够确保扩增序列的准确性,其3'-5'外切酶活性使其较其他类别的DNA聚合酶有更高的碱基保真性。关于如何在保留DNA聚合酶3'-5'外切酶活性的前提下找到合适的底物通过引物延伸法扩增不定长度的DNA,尤其是对于采用单链线性扩增技术的应用场景,现有技术未给出技术启示。其中所述的单链线性扩增是一种有别于传统PCR的目标核酸扩增技术,采用单端引物反复的对模板核酸进行结合和延伸扩增,因此扩增产物是以线性扩增而非指数扩增生成,这一特点可避免PCR引入碱基错误的累积,进一步确保扩增产物的准确性。

发明内容

[0010] 鉴于以上所述现有技术的缺点,本发明提供了一种优化的扩增目标核酸的方法,包括下述步骤:

[0011] 在反应体系中,以目标核酸分子为模板,加入引物,具有高掺入率的dNTP-DNA聚合酶复合体系,经扩增反应得到所述目标核酸的扩增产物;

[0012] 其中,所述高掺入率的dNTP-DNA聚合酶复合体系包括dNTP和DNA聚合酶;

[0013] 所述dNTP是至少部分经标记分子修饰的dNTP,经标记分子修饰的dNTP中不可有阻止修饰基团分子旋转的结构;

[0014] 所述DNA聚合酶是具有3'-5'外切酶活性的高保真聚合酶。

[0015] 本发明另一方面提供一种优化的扩增目标核酸的体系,其包括适用于本发明第一方面提供的优化的扩增的方法的经标记分子修饰的dNTP类似物和DNA高保真聚合酶。

[0016] 本申请人花费大量精力和经费,经过大量试错研究,尝试了无数种酶与dNTP类似物的排列组合,提供了一种优化的扩增目标核酸的方法,所述方法操作简单、性能卓越,尤其对于模板长度不定的由单端引物扩增的单链DNA产物有极其优越的产物得率和掺入率,在此基础上完成了本发明。

[0017] 本发明一方面提供一种优化的扩增目标核酸的方法,包括下述步骤:

[0018] 在反应体系中,以目标核酸分子为模板,加入引物,具有高掺入率的dNTP-DNA聚合酶复合体系,经扩增反应得到所述目标核酸的扩增产物。

[0019] 其中所述高掺入率的dNTP-DNA聚合酶复合体系包括dNTP和DNA聚合酶;其中,所述dNTP是至少部分经标记分子修饰的dNTP,所述DNA聚合酶是具有3'-5'外切酶活性的高保真聚合酶,所述复合体系用于进行的扩增是单链线性扩增。所述高掺入率的dNTP-DNA聚合酶复合体系能够高效掺入经修饰dNTP以获得高纯度的目标核酸扩增产物,解决3'-5'外切酶活性高保真DNA聚合酶无法掺入经修饰dNTP的缺憾,有效生成高纯度、高保真的目标核酸扩增产物。随着所述高保真DNA聚合酶的修改优化,掺入效果好的经修饰dNTP种类也随之提高。

[0020] 其中,所述DNA聚合酶——C端含有双链DNA结合结构域,即Sso7d;C端可以为Pfu/Deep Vent嵌合体;可以含V93Q突变。

[0021] 其中,当DNA聚合酶含N端结构域的定点突变时,所述经标记分子修饰的dNTP中的修饰基团与dNTP碱基基团连接的前3个C原子内含有或不含有阻止修饰基团分子旋转的二键或三键结构;当DNA聚合酶不含N端结构域的定点突变时,所述经标记分子修饰的dNTP中的修饰基团与dNTP碱基基团连接的前3个C原子内不可有二键或三键等阻止分子旋转的结

构。

[0022] 进一步地,当DNA聚合酶含V93Q突变时,所述经标记分子修饰的dNTP中的修饰基团与dNTP碱基基团连接的前3个C原子内含有或不含有阻止修饰基团分子旋转的二键或三键结构;当DNA聚合酶不含V93Q突变时,所述经标记分子修饰的dNTP中的修饰基团与dNTP碱基基团连接的前3个C原子内不可有二键或三键等阻止分子旋转的结构;修饰在与dNTP的连接位点不应靠近核糖基团,即连接位点不应为dATP/dGTP的7-Deaza和dCTP的C5。

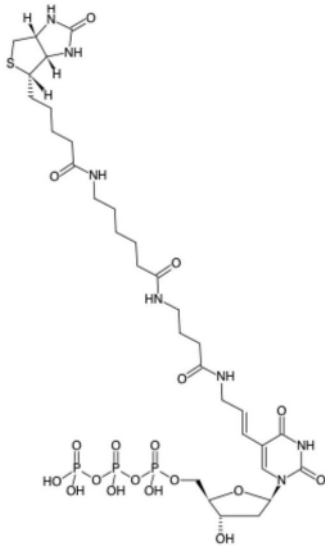
[0023] 本发明中,所述高掺入率定义为:在扩增产物中经标记分子修饰的dNTP占总dNTP的比例超过20%,可有效达到纯化扩增产物的目的。

[0024] 现有技术中将带有标记分子的dNTP掺入DNA的方法主要包含PCR,切口平移法(Nick Translation),引物延伸法和逆转录法。本发明提供的优化的扩增目标核酸的方法是基于单链线性扩增的扩增方法。扩增体系包括单端引物、DNA模板、作为底物的dNTP和促使延伸反应进行的DNA聚合酶、金属离子等,其中体现本发明核心进步的是带有标记分子的dNTP和DNA聚合酶的选用。

[0025] 本发明选用的dNTP中至少部分是经标记分子修饰的dNTP类似物,所述标记分子比如可以是荧光基团、染色基团或生物素。本发明选用的DNA聚合酶是保留了3'-5'外切酶活性,没有牺牲proofreading功能的B类高保真DNA聚合酶,这一点对现有技术使用去除了3'-5'外切酶结构域的DNA聚合酶掺入修饰的dNTP类似物在聚合酶的性能探索方面具有显著的突破。对于靶向扩增技术,尤其是引物可能经过改造的扩增系统而言,扩增后序列的准确性要求很高,聚合酶的高保真性是无可妥协的。虽然3'-5'外切酶活性会使酶从3'端切割游离引物的磷脂键,对引物有一定损耗,但在引物浓度足够的情况下,高保真性是本发明用引物延伸法扩增目标核酸的方法所用聚合酶必须具有的性能。引物与模板退火后,dNTP和经标记分子修饰的dNTP类似物在DNA聚合酶介导下使引物沿模板延伸得到掺入了标记分子的线性扩增产物,再用具有能够和该标记分子结合的配体分子的载体对扩增产物进行亲和纯化,得到产量和掺入率都满足需求的纯化产物。

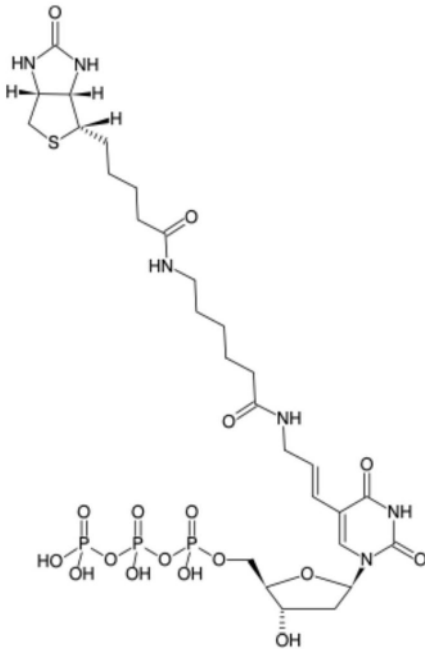
[0026] 本发明提供的优化的扩增目标核酸的方法中,所述DNA聚合酶比如可以是Pfu,Deep Vent (Pst),KOD(KOD plus)中的一种,或经由其中的一种或几种改造得到。这三种酶及它们的改造酶种均已成熟市场化,市场上常见的对应商品有KOD Hot Start,Phusion Hot Start,Vent,Deep Vent等。上述Pfu,Deep Vent,KOD和它们的变体都属于B类热稳定性DNA聚合酶,原始品种皆由深海耐高温古菌分离得到,彼此间同源性约85%。其它种类的DNA聚合酶比如PCR反应中最常用的taq酶对本发明的扩增方法就不适用。

[0027] 本发明方法中所述经标记分子修饰的dNTP可以是dATP,dCTP,dGTP中的一种或多种;而现有技术的标记分子掺入系统中应用最广的,应用方向为PCR、切口平移、引物延伸和逆转录的3'端标记的dUTP(如下式Biotin-16-dUTP、Biotin-11-dUTP),其所有的生物素修饰类似物经实验证实不适用本发明提供的扩增方法。



Biotin-16-dUTP

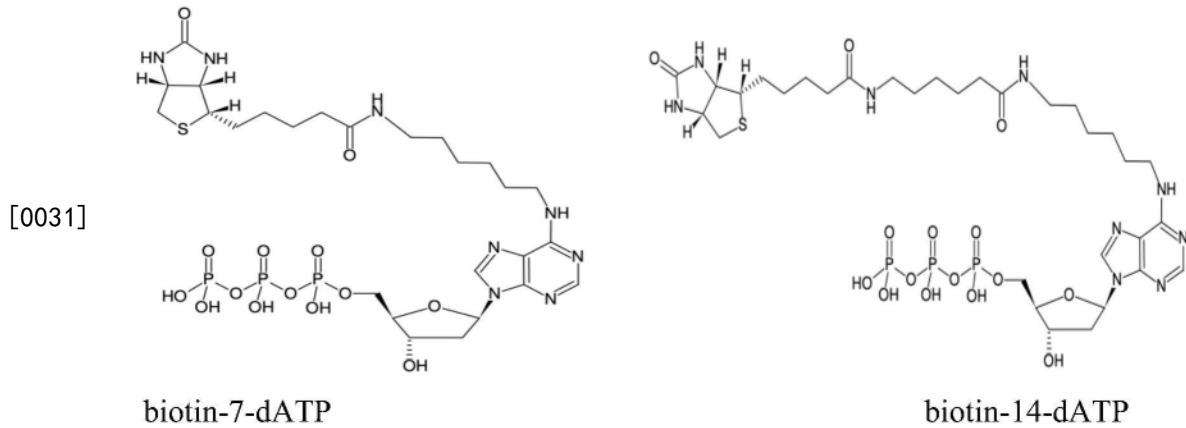
[0028]



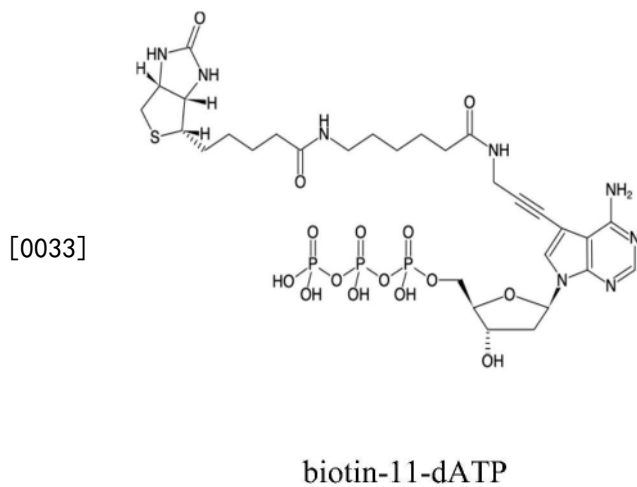
Biotin-11-dUTP

[0029] 本发明提供的优化的扩增目标核酸的方法中,所述含有生物素的修饰基团与所述不同的dNTP有不同的可结合位点。对于dATP而言,结合的位点可以是碱基的N6或7-Deaza;对于dCTP而言,结合的位点可以是碱基的N4或C5;对于dGTP而言,结合的位点只能是碱基的7-Deaza。其它可能结合生物素修饰生成的dNTP类似物,比如dUTP所有位点结合生物素生成的类似物,经实验证实不适用本发明提供的扩增方法。

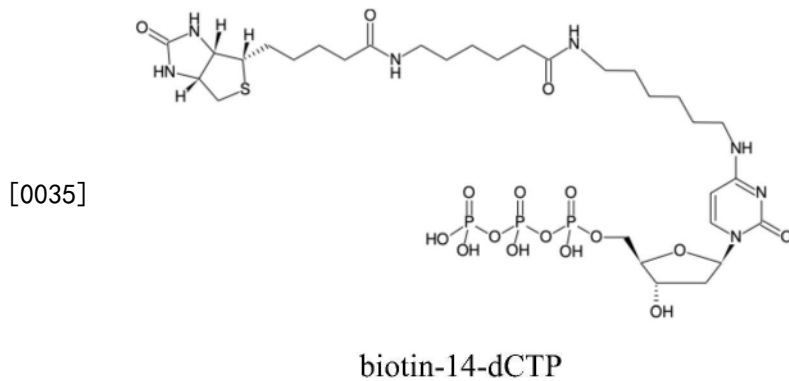
[0030] 在本发明一些实施方式中,当含有生物素的修饰基团与所述dATP结合的位点是碱基的N6时,所述经生物素修饰的dATP类似物可以是biotin-7-dATP,或biotin-14-dATP,其结构式分别如下所示:



[0032] 在本发明一些实施方式中,当含有生物素的修饰基团与所述dATP结合的位点是碱基的7-Deaza时,所述经生物素修饰的dATP类似物可以是biotin-11-dATP,其结构式如下所示:

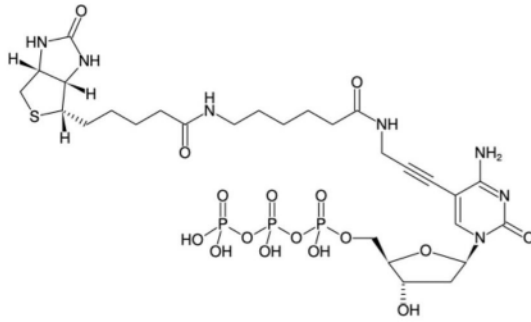


[0034] 在本发明一些实施方式中,当含有生物素的修饰基团与所述dCTP结合的位点是碱基的N4时,所述经生物素修饰的dCTP类似物可以是biotin-14-dCTP,其结构式如下所示:

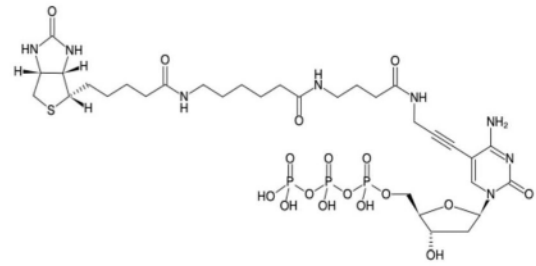


[0036] 在本发明一些实施方式中,当含有生物素的修饰基团与所述dCTP结合的位点是碱基的C5时,所述经生物素修饰的dCTP类似物可以是biotin-11-dCTP或biotin-16-dCTP,其结构式分别如下所示:

[0037]



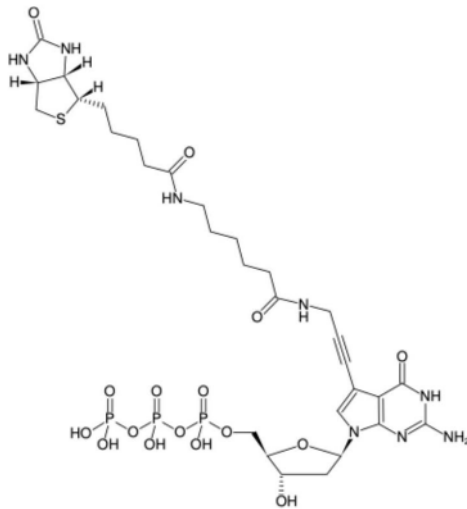
biotin-11-dCTP



biotin-16-dCTP

[0038] 在本发明一些实施方式中,当含有生物素的修饰基团与所述dGTP结合的位点是碱基的7-Deaza时,所述经生物素修饰的dGTP可以是biotin-11-dGTP,其结构式如下所示:

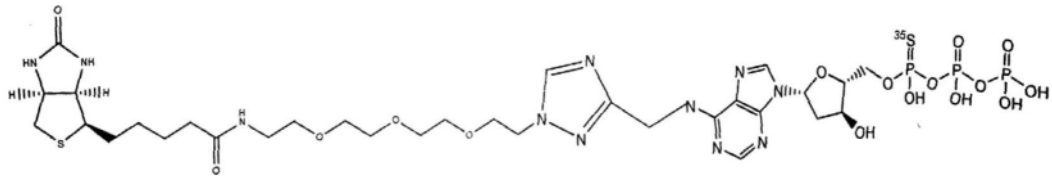
[0039]



biotin-11-dGTP

[0040] 在本发明一些实施方式中,当含有生物素的修饰基团与所述dATP结合的位点是碱基的N6时,所述经生物素修饰的dATP可以是R1006,其结构式如下所示:

[0041]



R1006

[0042] 本发明提供的优化的扩增目标核酸的方法中,所述对DNA聚合酶的改造主要包括对其工作的持续性方面的改造,避免热稳定性聚合酶常见的易脱落性,即沿着模板延伸几个碱基后就从模板上脱落下来。为了改善聚合酶与模板的结合性能,本发明所述改造是在DNA聚合酶上加一段双链DNA结合结构域。在本发明一些实施方式中,所述改造可以是在DNA聚合酶的C端加一段Sso7d结构域,比如Pfu,KOD,它们的进化体Phusion等,都可以在其C端融合Sso7d这个结构域以使其更好地结合模板,并具有改善酶工作的持续性的作用。在本发明一些实施方式中,所述改造是在Pfu聚合酶的C端加一段Sso7d结构域形成加尾体1。在本发明另一些实施方式中,所述改造是在KOD聚合酶的C端加一段Sso7d结构域形成加尾体2。

在本发明其他一些实施例中,为了在提高酶工作的持续性的基础上进一步改善酶的工作效率,尤其是提高修饰后的dNTP类似物的掺入率,所述对DNA聚合酶的改造包括将酶相互嵌合后再加Sso7d结构域,比如可以是将Pfu聚合酶和Deep Vent聚合酶嵌合后再加Sso7d结构域形成嵌合体1,结果证实嵌合体1比商品酶单纯叠加DNA结合结构域表现出更好的生物素掺入率。

[0043] 本发明提供的优化的扩增目标核酸的方法中,为了追求更优的扩增和掺入率,在先前C端叠加DNA结合结构域获得加尾体1、2、相互嵌合形成嵌合体1的基础上,对DNA聚合酶做了进一步改造。在本发明一些实施方式中,所述改造是将加尾体2和所述嵌合体1进行链置换形成置换体1和2,其中所述置换体1由嵌合体1的C端和加尾体2的N端融合而成,所述置换体2由嵌合体1的N端和加尾体2的C端融合而成。在本发明一些实施方式中,所述链置换的位点在DNA聚合酶的3' -5' 外切酶活性区与聚合酶活性区之间,以确保酶的3' -5' 外切酶功能和聚合酶功能都能正常进行。在本发明一些实施方式中,所述链置换的位点在聚合酶N端第300-360个氨基酸之间。在本发明一些实施方式中,所述链置换的位点在聚合酶N端第326-327个氨基酸之间。

[0044] 本发明提供的优化的扩增目标核酸的方法中,除了加尾、嵌合、置换,在一些实施方式中,对DNA聚合酶的改造还包括在酶的N端附近进行点突变,以进一步改进酶的性能。在本发明一些实施方式中,所述改造可以是在所述置换体1的N端附近设置点突变;在本发明另一些实施方式中,所述点突变的位点在所述置换体1的N端第1-100个氨基酸之间;在本发明其他一些实施方式中,所述点突变的位置是V93Q,实验证实获得了更优的掺入率和扩增效果的DNA聚合酶。

[0045] 至此,从具有聚合酶活性和3' -5' 外切酶活性的数种市售的B家族热稳定性DNA聚合酶出发,到C端融合双链DNA结合结构域形成工作持续性更优的加尾体,到相互嵌合和置换形成标记物掺入率更高的嵌合体和置换体,再出于精益求精尝试了N端附近点突变获得了性能上锦上添花的突变体,本发明经过不断试错,对DNA聚合酶在单链线性扩增方向的研究上开展了既广泛又深入的探索,使其性能的提升兼具显著性和准确性。

[0046] 本发明提供的优化的扩增目标核酸的方法中,修饰的dNTP类似物在所有dNTP中所占摩尔比例并不是越高越好,合适的混合比例既能保证产物中生物素掺入率,也不会过于影响扩增产物的得率。本发明中,所述dNTP是dATP, dCTP, dGTP和dUTP的两种或多种的等摩尔混合物。在本发明一些实施方式中,所述结合生物素的dNTP类似物在同类总dNTP中的混合比例采取相对极端的10%~100% (其中,所述总dNTP是指修饰的dNTP和未经修饰的dNTP之和;所述混合比例是指经修饰dNTP占同类总dNTP的摩尔比例;在扩增反应中4种dNTP (dATP, dCTP, dGTP和dUTP/dTTP是) 等摩尔混合;在本发明另一些实施方式中,所述结合生物素的dNTP类似物在同类总dNTP中的混合摩尔比例采取较为适中的20%~50%,取得了比相对极端的混合比例更好的扩增和纯化效果。同时,本发明提供的优化的扩增并纯化目标核酸的方法中,也对结合了标记物的不同种dNTP类似物的混用做出了进一步探索。在本发明一些实施方式中,经生物素修饰的不同种类的dNTP可以组合混用,取得了比只使用修饰的单种类dNTP更好的掺入率。在本发明一些实施方式中,所述经生物素修饰的dNTP可以是dATP, dCTP, dGTP中两种的组合,比如因生物素修饰的dGTP类似物成本过高而选择的dATP和dCTP类似物的组合,实验结果表明其扩增纯化效果优于单用dATP类似物或单用dCTP类似物

的掺入率。在本发明另一些实施方式中,所述结合生物素的dNTP可以是dATP,dCTP,dGTP全部三种的组合。

[0047] 本发明提供的优化的扩增目标核酸的方法中,模板长度可以不均等。最能发挥本发明技术优势的重要应用场景正是针对模板链长度长短不一的真实临床DNA样本,尤其是不利于PCR发挥长处长度不均等的短片段模板的扩增。在本发明一些实施方式中,扩增所用引物是单端引物,且为了减少引物二聚体的产生,其3'端经过修饰,此条件下需要切除结合上模板的引物上的3'端修饰才能使延伸得以进行,则聚合酶的3'-5'外切酶活性不可或缺。在本发明一些实施方式中,所述单链线性扩增为多轮扩增,用于确保扩增产物的得率和标记分子的掺入率,同时由于线性扩增不会累积PCR指数扩增中的错配,配合保留了3'-5'外切酶活性的DNA聚合酶的保真性,使用多轮扩增进一步确保了原始模板的转化率。

[0048] 本发明一些实施方式中,所述DNA聚合酶的氨基酸序列为SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:3中任意其一,它们分别是Pfu (Promega),Deep Vent (NEB)和KOD1 (TOYOBO)这三种酶的氨基酸序列。

[0049] 本发明一些实施方式中,所述DNA聚合酶的氨基酸序列为SEQ ID NO:4-SEQ ID NO:9中任意其一,它们是本申请人从序列为SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:3的这三种酶定向改造得到。经一致性分析,氨基酸序列为SEQ ID NO:4-SEQ ID NO:9的六种酶两两之间的同源性皆在80%以上。本申请人无法穷尽所有氨基酸位点的差异性是否影响聚合酶功能的考察,本发明的技术进步在于揭示具有3'-5'外切酶活性的DNA聚合酶对于掺入携带标记分子的dNTP在引物延伸方向上的意义,故具有3'-5'外切酶活性的,与SEQ ID NO:4-SEQ ID NO:9中任意其一的N端起360个氨基酸的同源性大于等于90%的DNA聚合酶都应在本发明方法的保护范围之内。

[0050] 本发明一些实施方式中,所述方法还包括对所述扩增产物进行纯化的步骤,所述方法包括:

[0051] 1)使结合了引物的模板和dNTP、DNA聚合酶接触得到扩增产物;

[0052] 2)纯化所述扩增产物得到纯化产物。

[0053] 其中,所述纯化是基于所述标记分子的亲和纯化,即链霉亲和素磁珠纯化。

[0054] 其中,所述DNA聚合酶是具有3'-5'外切酶活性的高保真聚合酶;所述扩增是单链线性扩增;所述dNTP至少部分经标记分子修饰,所述标记分子比如可以是生物素,所述纯化比如可以是现有技术常用的链霉亲和素亲和纯化,载体是磁性微珠。

[0055] 本发明另一方面提供一种优化的扩增并纯化目标核酸的体系,其包括适用于本发明第一方面提供的优化的扩增并纯化目标核酸的方法的经标记分子修饰的dNTP类似物和DNA高保真聚合酶。

[0056] 本发明提供的优化的扩增目标核酸的方法中,所述反应体系包括:

[0057] DNA聚合酶的终浓度为0.002-0.05unit/ μ L;优选地,为0.01unit/ μ L。

[0058] dNTP的终浓度为20-1000 μ M;优选地,为200 μ M。

[0059] 引物的终浓度为100-2500nM;优选地,为500nM。

[0060] 本发明提供的优化的扩增目标核酸的方法中,

[0061] 所述反应的变性、退火、延伸温度为93-103 $^{\circ}$ C、62-72 $^{\circ}$ C、67-77 $^{\circ}$ C;优选地,为98 $^{\circ}$ C、67 $^{\circ}$ C、72 $^{\circ}$ C。

[0062] 所述反应的变性、退火、延伸时间为5-15秒、15-25秒、35-45秒；优选地，为10秒、20秒、40秒。

[0063] 本发明进一步提供了上述具有高掺入率的dNTP-DNA聚合酶复合体系、经改造的聚合酶、经修饰的dNTP。

[0064] 具体地，本发明另一方面提供一种具有高掺入率的dNTP-DNA聚合酶复合体系，所述高掺入率的dNTP-DNA聚合酶复合体系包括dNTP和DNA聚合酶，其中，所述dNTP是至少部分经标记分子修饰的dNTP，当DNA聚合酶含V93Q突变时，所述经标记分子修饰的dNTP中的修饰基团与dNTP碱基基团连接的前3个C原子内含有或不含有阻止修饰基团分子旋转的二键或三键结构；当DNA聚合酶不含V93Q突变时，所述经标记分子修饰的dNTP中的修饰基团与dNTP碱基基团连接的前3个C原子内不含有阻止修饰基团分子旋转的二键或三键结构；所述DNA聚合酶是具有3' -5' 外切酶活性的高保真聚合酶。

[0065] 所述经标记分子修饰的dNTP是dATP, dCTP, dGTP中的一种或多种；

[0066] 所述标记分子是生物素；

[0067] 所述DNA聚合酶是Pfu, Deep Vent, KOD中的一种；和/或，

[0068] 所述DNA聚合酶由Pfu, Deep Vent, KOD中的一种或几种经过改造得到；

[0069] 所述改造是在DNA聚合酶上加一段双链DNA结合结构域；

[0070] 优选的，所述改造是在DNA聚合酶的C端加一段Sso7d结构域；

[0071] 更优选的，所述改造是在Pfu聚合酶的C端加一段Sso7d结构域形成加尾体1；或，所述改造是在KOD聚合酶的C端加一段Sso7d结构域形成加尾体2；

[0072] 或，所述改造是将Pfu和Deep Vent聚合酶进行嵌合后在C端加一段Sso7d结构域形成嵌合体1。

[0073] 本发明另一方面提供一种DNA聚合酶，所述对DNA聚合酶的改造主要包括对其工作的持续性方面的改造，避免热稳定性聚合酶常见的易脱落性，即沿着模板延伸几个碱基后就从模板上脱落下来。为了改善聚合酶与模板的结合性能，本发明所述改造是在DNA聚合酶上加一段双链DNA结合结构域。在本发明一些实施方式中，所述改造可以是在DNA聚合酶的C端加一段Sso7d结构域，比如Pfu, KOD, 它们的进化体Phusion等，都可以在其C端融合Sso7d这个结构域以使其更好地结合模板，并具有改善的酶工作的持续性。在本发明一些实施方式中，所述改造是在Pfu聚合酶的C端加一段Sso7d结构域形成加尾体1。在本发明另一些实施方式中，所述改造是在KOD聚合酶的C端加一段Sso7d结构域形成加尾体2。在本发明其他一些实施例中，为了在提高酶工作的持续性的基础上进一步改善酶的工作效率，尤其是提高修饰后的dNTP类似物的掺入率，所述对DNA聚合酶的改造包括将酶相互嵌合后再加Sso7d结构域，比如可以是将Pfu聚合酶和Deep Vent聚合酶嵌合后再加Sso7d结构域形成嵌合体1，结果证实嵌合体1比商品酶单纯叠加DNA结合结构域表现出更好的生物素掺入率。

[0074] 本发明提供的具有高掺入率的dNTP-DNA聚合酶复合体系、DNA聚合酶中，为了追求更优的扩增和掺入率，在先前C端叠加DNA结合结构域获得加尾体1、2、相互嵌合形成嵌合体1的基础上，对DNA聚合酶做进一步改造。在本发明一些实施方式中，所述改造是将加尾体2和所述嵌合体1进行链置换形成置换体1和2，其中所述置换体1由嵌合体1的C端和加尾体2的N端融合而成，所述置换体2由嵌合体1的N端和加尾体2的C端融合而成。在本发明一些实施方式中，所述链置换的位点在DNA聚合酶的3' -5' 外切酶活性区与聚合酶活性区之间，以

确保酶的3'-5'外切酶功能和聚合酶功能都能正常进行。在本发明一些实施方式中,所述链置换的位点在聚合酶N端第300-360个氨基酸之间。在本发明一些实施方式中,所述链置换的位点在聚合酶N端第326-327个氨基酸之间。

[0075] 本发明提供的具有高掺入率的dNTP-DNA聚合酶复合体系、DNA聚合酶中,除了加尾、嵌合、置换,在一些实施方式中,对DNA聚合酶的改造还包括在酶的N端附近进行点突变,以进一步改进酶的性能。在本发明一些实施方式中,所述改造可以是在所述置换体1的N端附近设置点突变;在本发明另一些实施方式中,所述点突变的位点在所述置换体1的N端第1-100个氨基酸之间;在本发明其他一些实施方式中,所述点突变的位置是V93Q,实验证实获得了更优的掺入率和扩增效果的DNA聚合酶。

[0076] 本发明一些实施方式中,所述DNA聚合酶的氨基酸序列为SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:3中任意其一,它们分别是Pfu (Promega), Deep Vent (NEB) 和KOD1 (TOYOBO) 这三种酶的氨基酸序列。

[0077] 本发明一些实施方式中,所述DNA聚合酶的氨基酸序列为SEQ ID NO:4-SEQ ID NO:9中任意其一,它们是本申请人从序列为SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:3的这三种酶定向改造得到。经一致性分析,氨基酸序列为SEQ ID NO:4-SEQ ID NO:9的六种酶两两之间的同源性皆在80%以上。本发明的技术进步在于揭示具有3'-5'外切酶活性的DNA聚合酶对于掺入携带标记分子的dNTP在引物延伸方向上的意义,故具有3'-5'外切酶活性的,与SEQ ID NO:4-SEQ ID NO:9中任意其一的N端起360个氨基酸的同源性大于等于90%的DNA聚合酶都应在本发明方法的保护范围之内。

[0078] 本发明另一方面提供一种如上文所述的经标记分子修饰的dNTP,详细见上文所述。

[0079] 本发明还提供了所述的具有高掺入率的dNTP-DNA聚合酶复合体系或DNA聚合酶或经标记分子修饰的dNTP在扩增目标核酸、或扩增并纯化目标核酸、或在制备用于扩增目标核酸的产品、或在制备用于扩增并纯化目标核酸的产品中的应用。

[0080] 本发明另一方面提供一种优化的扩增并纯化目标核酸的体系或试剂盒,其包括适用于本发明提供的优化的扩增目标核酸的方法的经标记分子修饰的dNTP类似物和DNA高保真聚合酶,或所述体系或试剂盒包含具有高掺入率的dNTP-DNA聚合酶复合体系。具体的dNTP类似物和DNA高保真聚合酶的种类和特征,在本发明第一方面已有详述,此处不再赘述。

[0081] 本发明提供的扩增目标核酸的体系中,

[0082] DNA聚合酶的终浓度为0.002-0.05unit/ μ L;优选地,为0.01unit/ μ L。

[0083] dNTP的终浓度为20-1000 μ M;优选地,为200 μ M。

[0084] 引物的终浓度为100-2500nM;优选地,为500nM。

[0085] 本发明还提供了优化的扩增目标核酸的体系或试剂盒在扩增目标核酸、或扩增并纯化目标核酸、或在制备用于扩增目标核酸的产品、或在制备用于扩增并纯化目标核酸的产品中的应用。

[0086] 本发明中,涉及或包括DNA聚合酶核酸序列或DNA聚合酶多肽的每一实施方式中,DNA聚合酶序列可包含前述完整的DNA聚合酶序列、或具有所述DNA聚合酶序列的一个或多个功能特性的衍生物、变体、突变体、片段或模拟肽。任何上述序列均能用于本发明。本发明

一个实施方式中,所使用的DNA聚合酶序列具有Pfu、Deep Vent、KOD、ApoA-1~ApoA-6之任一序列大于85%同源性的序列。在另一实施方式中,DNA聚合酶序列的变体或突变体为与Pfu、Deep Vent、KOD、ApoA-1~ApoA-6之任一序列具有约85%同源性的序列,或与Pfu、Deep Vent、KOD、ApoA-1~ApoA-6之任一序列具有约88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同源性的序列,且其保持对所述目标核酸较高的扩增得率和经标记dNTP类似物的较理想的掺入率。在另一实施方式中,DNA聚合酶的片段在长度上相对于Pfu、Deep Vent、KOD、ApoA-1~ApoA-6之任一序列存在±30个核苷酸差异,或相对于Pfu、Deep Vent、KOD、ApoA-1~ApoA-6之任一序列存在约±28个核苷酸、约±26个核苷酸、约±24个核苷酸、约±22个核苷酸、约±20个核苷酸、约±18个核苷酸、约±16个核苷酸、约±14个核苷酸、约±12个核苷酸、约±10个核苷酸、约±9个核苷酸、约±8个核苷酸、约±7个核苷酸、约±6个核苷酸、约±5个核苷酸、约±4个核苷酸、约±3个核苷酸、约±2个核苷酸或约±1个核苷酸差异,上述所有序列可保持所述DNA聚合酶的特性,包括但不限于对所述目标核酸较高的扩增得率和经标记的dNTP类似物的较理想的掺入率。

[0087] 本发明的有益效果在于,其一,本发明所用DNA聚合酶保留了B类DNA聚合酶的3'-5'外切酶活性,使其不仅能发挥聚合酶功能还保留了其高保真性,且适用各种延伸引物比如经过修饰的引物;其二,卯定了具体的酶与具体修饰结构的dNTP类似物间的具体组合,突破了现有技术中扩增产物得率和标记分子掺入率不能兼得的瓶颈,在浩瀚的排列组合可能性中探明了极其有限的通往本发明技术目的的真实路径;其三,对已经确定可能性的酶和dNTP类似物选择上精益求精,提出了性能更优的酶和性价比更高的dNTP类似物及其配比,实现了满足可行性要求上的进一步优化。

[0088] 综上所述,本发明使结合了引物的模板和至少部分经标记分子修饰的dNTP,以及具有3'-5'外切酶活性的高保真聚合酶DNA聚合酶接触得到扩增产物,再纯化所述扩增产物得到得率和标记分子掺入率均理想的纯化产物。在保留DNA聚合酶3'-5'外切酶功能以达到高保真核酸扩增的前提下,通过结合经改造的DNA聚合酶结构和经标记分子修饰的dNTP结构,以及两者之间一一对应的构效关系达到对目标核酸的高效扩增和纯化。本发明提供的优化的扩增并纯化目标核酸的方法和体系,研究深入,步骤简单,性能卓越,适用于模板链长度长短不一的临床DNA样本,尤其是不利于PCR发挥优势的长度不均等的短片段模板的扩增,对不定长度的单链扩增和纯化实现了前所未有的技术进步,具有广泛的应用前景和显著的经济价值。

[0089] 本发明所涉及的相关术语与效果定义:

[0090] 扩增倍率=纯化后产物的输出拷贝数÷输入拷贝数×100%;

[0091] 扩增产物得率(扩增得率)=扩增后、纯化前目标核酸的所得率,可由扩增倍率间接反映;

[0092] 标记分子掺入率=经修饰dNTP掺入到扩增产物的效率,可由扩增倍率间接反映;

[0093] 核酸回收率或模板转化率=等同于扩增倍率;

[0094] 纯化效果=纯化后产物中未结合模板的带标记分子的占比;占比愈小,即纯化效果愈好。

附图说明

[0095] 图1为Pfu酶结构图,本发明中的主要功能结构为B类DNA聚合酶中共有的 exonuclease区域(具有3' -5' 外切酶功能)以及N端中的V93Q点突变。

[0096] 图2为各种DNA聚合酶的结构组成示意图;其中,

[0097] SEQ ID NO:1 (Seq1) 即本发明实施例1中所述的Pfu;

[0098] SEQ ID NO:2 (Seq2) 即本发明实施例1中所述的Deep Vent;

[0099] SEQ ID NO:3 (Seq3) 即本发明实施例1中所述的KOD;

[0100] SEQ ID NO:4 (Seq4) 即本发明所述的Pfu+Sso7d(加尾体1,即实施例1中的APO-1);

[0101] SEQ ID NO:5 (Seq5) 即本发明所述的KOD+Sso7d(加尾体2,即实施例1中的APO-2);

[0102] SEQ ID NO:6 (Seq6) 即本发明所述的Pfu/Deep Vent嵌合体+Sso7d(嵌合体1,即实施例1中的APO-3);

[0103] SEQ ID NO:7 (Seq7) 即本发明所述的置换体1(即实施例1中的APO-4);

[0104] SEQ ID NO:8 (Seq8) 即本发明所述的置换体2(即实施例1中的APO-5);

[0105] SEQ ID NO:9 (Seq9) 即本发明所述的置换体1+V93Q点突变(即实施例1中的APO-6);

[0106] 图3为各种DNA聚合酶的序列对比展示图;其中包含,本发明中最重要的具有3' -5' 外切酶活性、结构为Pfu/Deep Vent嵌合体C端约300aa序列(即SEQ ID NO:7和9的首300aa)。

具体实施方式

[0107] 以下通过特定的具体实例说明本发明的实施方式,本领域技术人员可由本说明书所揭露的内容轻易地了解本发明的其他优点与功效。本发明还可以通过另外不同的具体实施方式加以实施或应用,本说明书中的各项细节也可以基于不同观点与应用,在没有背离本发明的精神下进行各种修饰或改变。

[0108] 实施例1.不同DNA聚合酶和不同biotin-dNTP类似物的矩阵实验

[0109] 实验目的

[0110] 通过相同混合比例条件下不同修饰的biotin-dNTP与不同DNA聚合酶交叉使用的矩阵实验,评价不同DNA聚合酶和不同dNTP类似物组合下的扩增表现,筛选满足扩增和纯化需求的酶与dNTP类似物。

[0111] 本实施例采用的DNA聚合酶蛋白质序列如表1所示。

[0112] 表1.DNA聚合酶蛋白质序列

[0113]

SEQ ID NO	序列名称	序列
1	Pfu	MILDVDYITEEGKPVIRLFFKKENGKFKIEHDRTRFRPIYIALLRDDS KIEEVKKITGERHGKIVRIVDVEKVEKKFLGKPVVWKLYLEHPQD VPTIREKVVREHPAVVDIFEYDIPFAKRYLIDKGLIPMEGEEELKILAF DIETLYHEGEEFGKGPIMISYADENEAKVITWKNIDLPHYVEVSS EREMIKRFRLRIREKDPDIIVTYNGDSFDFPYLAKRAEKLGIKLTIGR DGSEPKMQRIGDMTAVEVKGRIHFDLYHVITRTINLPTYTLEAVY EAIFGKPKKVKYADEIAKAWESGENLERVAKYSMEDAKATYELG KEFLPMEIQLSRLVGQPLWDVSRSTGNLVEWFLLRKAYERNEV APNKPSEEEYQRRRESYTGGFVKEPEKGLWENIVYLDLFRALYPS IIITHNVSPDTLNLEGCKNYDIAPQVGHKFKCDIPGFIPSLGHL EERQKIKTKMKETQDPIEKILLDYRQKAIKLLANSFYGGYGYAKA RWYCKECAESVTAWGRKYIELVWKELEEKFGFKVLYIDTDGLYA TIPGGESEIKKKALEFVKYINSKLPGLLELEYEGFYKRGFFVTKKRY AVIDEEGKVITRGLVRRDWSEIAKETQARVLETILKHGDVEAV RIVKEVIQKLANYEIPPEKLAIEQITRPLHEYKAIGPHVAVAKLA AKGVKIKPGMVIYIVLRGDGPISNRILAEEYDPKHKHYDAEY IENQVLPVLRILEGFGYRKEDLRYQKTRQVGLTSLWLNKKS
2	Deep Vent	MILDADYITEDGKPIIRIFKKENGFEKVEYDRNFRPIYIALLKDDS QIDEVRKITAERHGKIVRIIDAERKVRKKFLGRPIEVWRLYFEHPQD VPAIRDKIREHSAVIDIFEYDIPFAKRYLIDKGLIPMEGDEELKLLAF DIETLYHEGEEFAKGPIMISYADEEEAKVITWKKIDLPHYVEVSS REMIKRFLKVIKREKDPDVIITVYNGDSFDLPYLVKRAEKLGIKPLGR DGSEPKMQRIGDMTAVEIKGRIHFDLYHVIRRTINLPTYTLEAVY EAIFGKPKKVKYAEHIAEAWETGKGLERVAKYSMEDAKVTYELG REFFPMEAQLSRLVGQPLWDVSRSTGNLVEWYLLRKAYERNE LAPNKPDEREYERRRESYAGGYVKEPEKGLWEGLVSLDFRSLY SIIITHNVSPDTLNREGCREYDVAPEVGHKFKCDIPGFIPSLKRL LDERQEIKRKMASKDPIEKMLDYRQRAIKILANSYYGGYGYA KARWYCKECAESVTAWGREYIEFVRKELEEKFGFKVLYIDTDGLY ATIPGAKPEEIKKALEFVDYINAKLPGLLELEYEGFYVRFVTKK KYALIDEEGKIITRGLVRRDWSEIAKETQAKVLEAILKHGNVEE AVKIVKEVTEKLSKYEIPPEKLVIEQITRPLHEYKAIGPHVAVAKR LAARGVKVRPGMVIYIVLRGDGPISKRAILAEEFDLRKHKYDAE YYIENQVLPVLRILEAFGYRKEDLRWQTKQTGLTAWLNKKS
3	KOD	MILDTDYITEDGKPVIRIFKKENGFKIEYDRTFEPYFYALLKDDSA IEEVKKITAERHGTVVTVKRVEKVQKFLGRPVVWKLTYFTHPQ DVPDIRDKIREHPAVIDIYEDIPFAKRYLIDKGLVPMEGDEELKML LAFDIETLYHEGEEFAEGPILMISYADEEGARVITWKNVDLPHYVD VVSTEREMIKRFLRVVKEKDPDVLITYNGDNFDFAYLKKRCEKLG INFALGRDSEPKIQRMGDRFAVEVKGRIHFDLYPVIRRTINLPT YTLEAVYEAVFGQPKKVKYAEIITAWETGENLERVARYSMEDA KVTYELGKEFLPMEAQLSRLIGQSLWDVSRSTGNLVEWFLLRK AYERNELAPNKPDEKELARRRQSYEGGYVKEPERGLWENIVYLD FRSLYPSIIITHNVSPDTLNREGCKEYDVAQVGHKFKCDIPGFIP SLLGDLEERQIKKMKATIDPIERKLLDYRQRAIKILANSYYGY YGYARARWYCKECAESVTAWGREYITMTIKEIEEKYGFKVIYSDT DGFFATIPGADAETVKKKAMEFLKYINAKLPGALELEYEGFYKRG FFVTKKRYAVIDEEGKITRGLVRRDWSEIAKETQARVLEALLK DGDVEKAVRIVKEVTEKLSKYEVPPEKLVIEQITRDLKDYKATG PHVAVAKRLAARGVKIRPGTVISYIVLKGSGRIGDRAIPDFEDPT KHKYDAEYIENQVLPVLRILEAFGYRKEDLRYQKTRQVGLSA

[0114]

		WLKPKGT
4	APO-1	MILDVDYITEEGKPVIRLFKKENGEFKIEHDRTFRPIYIALLRDDS KIEEVKKITGERHGKIVRIVDVEKVEKKFLGKIPITVWKLYLEHPQD VPTIREKVRHPAVVDIFEYDIPFAKRYLIDKGLIPMEGEEELKILAF DIETLYHEGEEFGKGPIMISYADENEAKVITWKNIDLPHYVEVSS EREMIKRFLRIREKDPDIIVTYNGDSFDFPYLAKRAEKLGIKLTIGR DGSEPKMQRIGDMTAVEVKGRIHFDLYHVITRTINLPTYTLEAVY EAIFGKPKKVEYADEIAKAWESGENLERVAKYSMEDAKATY ELGKEFLPMEIQLSRLVGQPLWDVSRSTGNLVEWFLLRKAYER NEVAPNKPSEEEYQRRRESYTGGFVKEPEKGLWENIVYLDLFRAL LYPSIIITHNVSPDTLNLEGCKNYDIAPQVGHKFKCDIPGFIPSL GHLLERQKIKTKMKETQDPIEKILLDYRQKAIKLLANSFYGYGY AKARWYCKECAESVTAWGRKYIELVWKELEKFGFKVLYIDTDG LYATIPGGSEEEIKKALEFVKYINSKLPGLLELEYEGFYKRGFFVTK KRYAVIDEEGKVITRGLIVRRDWSEIAKETQARVLETILKHGDVE EAVRIVKEVIQKLANEYIPEPEKLAIYEQITRPLHEYKAIGPHVAVAK KLAAGVKIKPGMVIYIVLRGDGPISNRILAEEYDPKHKHYDA EYIENQVLPVAVLRILEGFGYRKEDLRYQKTRQVGLTSLWLNKKS GTGGGGATVKFKYKGEKEVDISKIKKVVWRVGMISFTYDEGGG KTGRGAVSEKDAPKELLQMLEKQKK
5	APO-2	MILDTDYITEDGKPVIRIFKKENGEFKIEYDRTFEPYFYALLKDDSA IEEVKKITAERHGTVVTVKRVEKVQKKFLGRPVVWKLTYFTHPQ DVPDIRDKIREHPAVIDIYEDIPFAKRYLIDKGLVPMEGDEELKM LAFDIETLYHEGEEFAEGPILMISYADEEGARVITWKNVLDLPIYVD VVSTEREMIKRFLRVVKEKDPDVLITYNGDNDFAYLKKRCEKLG INFALGRDGGSEPKIQRMGDRFAVEVKGRIHFDLYPVIRRTINLPT YTLAVYEAVFGQPKEKVEYAEIITAWETGENLSEVARYSMEDA KVTYELGKEFLPMEAQLSRLIGQSLWDVSRSTGNLVEWFLLRK AYERNELAPNKPDEKELARRRQSYEGGYVKEPERGLWENIVYLD FRSLYPSIIITHNVSPDTLNREGCKEYDVAPQVGHFRFCKDFPFGIF SLGDLLEERQIKKKMKATIDPIERKLLDYRQRAIKILANSYGY YGYARARWYCKECAESVTAWGREYITMTIKEIEEKYGFKVIYSDT DGFATIPGADAETVKKKAMEFLKYINAKLPGALELEYEGFYKRG FFVTKKKYAVIDEEGKITRGLIVRRDWSEIAKETQARVLEALLK DGDVEKAVRIVKEVTEKLSKYVPEPEKLVIEHQITRDLDYKATG PHVAVAKRLAARGVKIRPGTVISYIVLKGSGRIGDRAIPFDEFDPT KHKYDAEYIENQVLPVAVRILRAFGRKEDLRYQKTRQVGLSA WLKPKGTGTGGGGATVKFKYKGEKEVDISKIKKVVWRVGMISF TYDEGGGKTGRGAVSEKDAPKELLQMLEKQKK
6	APO-3	MILDVDYITEEGKPVIRLFKKENGEFKIEHDRTFRPIYIALLKDDSK IEEVKKITGERHGKIVRIVDVEKVEKKFLGKIPITVWRLYFEHPQDV PTIREKVRHPAVVDIFEYDIPFAKRYLIDKGLIPMEGDEELKLLAF DIETLYHEGEEFGKGPIMISYADEEEAKVITWKNIDLPHYVEVSS REMIKRFLLIIEKDPDIIVTYNGDSFDLPYLAKRAEKLGIKLTIGR DGSEPKMQRIGDMTAVEVKGRIHFDLYHVIRRTINLPTYTLEAV YEAIFGKPKKVEYADEIAKAWESGENLERVAKYSMEDAKATYEL GKEFLPMEAQLSRLVGQPLWDVSRSTGNLVEWFLLRKAYERNE EVAPNKPSEEEYQRRRESYAGGFVKEPEKGLWENIVYLDLFRALY PSIIITHNVSPDTLNREGCKNYDIAPEVGHKFKCDPFGFIPSLGHL LLEERQKIKTKMKASQDPIEKIMLDYRQRAIKILANSYGYGYGYA KARWYCKECAESVTAWGREYIEFVWKELEKFGFKVLYIDTDGL YATIPGGKSEEEIKKALEFVKYINAKLPGLELEYEGFYKRGFFVTK KRYAVIDEEGKVITRGLIVRRDWSEIAKETQARVLEAILKHGDVE EAVRIVKEVTQKLSKYIPEPEKLAIYEQITRPLHEYKAIGPHVAVAK KLAAGVKIKPGMVIYIVLRGDGPISNRILAEEYDPRKHKHYDA EYIENQVLPVAVLRILEGFGYRKEDLRYQKTRQVGLTSLWLNKKS GTGGGGATVKFKYKGEKEVDISKIKKVVWRVGMISFTYDEGGG KTGRGAVSEKDAPKELLQMLEKQKK
7	APO-4	MILDVDYITEEGKPVIRLFKKENGEFKIEHDRTFRPIYIALLKDDSK IEEVKKITGERHGKIVRIVDVEKVEKKFLGKIPITVWRLYFEHPQDV PTIREKVRHPAVVDIFEYDIPFAKRYLIDKGLIPMEGDEELKLLAF DIETLYHEGEEFGKGPIMISYADEEEAKVITWKNIDLPHYVEVSS REMIKRFLLIIEKDPDIIVTYNGDSFDLPYLAKRAEKLGIKLTIGR DGSEPKMQRIGDMTAVEVKGRIHFDLYHVIRRTINLPTYTLEAV YEAIFGKPKKVEYADEIAKAWESGENLERVAKYSMEDAKATYEL GKEFLPMEAQLSRLIGQSLWDVSRSTGNLVEWFLLRKAYERNE LAPNKPDEKELARRRQSYEGGYVKEPERGLWENIVYLDLFRSLY SIIITHNVSPDTLNREGCKEYDVAPQVGHFRFCKDFPFGFIPSLGDL LLEERQIKKKMKATIDPIERKLLDYRQRRIKILANSYGYGYGYAR

		ARWYCKECAESVTAWGREYITMTIKEIEEKYGFVKVIYSDTDGFFA TIPGADAETVKKKAMEFLKYINAKLPGALELEYEGFYKRGFFVTK KKYAVIDEEGKITTRGLEIVRRDWSEIAKETQARVLEALLKDGDV EKAVRIVKEVTEKLSKYEVPEKLVIIHQITRDLDKDYKATGPHVAV AKRLAARGVKIRPGTVISYIVLKGSGRIGDRAIPFDEFDPTKHKYD AEYYIENQVLP AVERILRAFGRYKEDLRYQKTRQVGLSAWLKPK GTGTGGGGATVKFKYKGEKEVDISKIKKVVWRVGMISFTYDEG GGKTGRGAVSEKDAPKELLQMLEKQKK
[0115]	8 APO-5	MILDTDYITEDGKPVIRIFKKENGEFKIEYDRTFEPYFYALLKDDSA IEEVKKITAERHGTVVTVKRVEKVQKFLGRPVVWVLYFTHPQ DVPAIRDKIREHPAVIDIYEDIPFAKRYLIDKGLVPMEGDEELKM LAFAIATLYHEGEEFAEGPILMISYADEEGARVITWKNVDLPYVD VVSTEREMIKRFLRVVKEKDPDVLITYNGDNDFAYLKKRCEKLG INFALGRDGGSEPKIORMGDRFAVEVKGRIHFDLYPVIRRTINLPT YTLEAVYEAVFGQPKEKVYAEIITAWETGENLERVARYSMEDA KVTYELGKEFLPMEAQLSRLVGOPLWDVSRSTGNLVEWFLLRK AYERNEVAPNKPSEEEYQRRRESYAGGFVKEPEKGLWENIVYL DFRALYPSIIITHNVSPDTLNREGCKNYDIAPEVGHKFKCDFPGFI PSLLGHLLEERQKIKTKMKASQDPIEKIMLDYRQRAIKILANSYY GYYGYAKARWYCKECAESVTAWGREYIEFVWKELEEKFGFKVLY IDTDGLYATIPGGKSEEIKKALEFVKYINAKLPGLELEYEGFYK GFFVTKKRYAVIDEEGKVITRGLEIVRRDWSEIAKETQARVLEAIL KHGDVEEAVRIVKEVTQKLSKYEIPPEKLAIEYEQITRPLHEYKAIGP HVAVAKKLAAGVKIKPGMVIGYIVLRGDGPISNRILAEEYDPR KHKYDAEYYIENQVLP AVALRILEGFGYRKEKEDLRYQKTRQVGLTS WLNKKSQTGGGGATVKFKYKGEKEVDISKIKKVVWRVGMISF TYDEGGGKTGRGAVSEKDAPKELLQMLEKQKK
	9 APO-6	MILDVDYITEEGKPVIRLFFKKENGEFKIEHDRTFRPIYIYALLKDDSK IEEVKKITGERHGKIVRIVDVEKVEKKFLGKPIVWRLYFEHPQDQ PTIREKVREHPAVVDIFEDIPFAKRYLIDKGLIPMEGDEELKLLAF DIETLYHEGEEFGKGIIMISYADEEEAKVITWKNIDLPHYVEVSSSE REMIKRFLKIIREKDPDIIVTYNGDSFDLPYLAKRAEKLGIKLTIGR DGSEPKMQRIGDMTAVEVKGRIHFDLYHVIRRTINLPTYTLEAV YEAFGKPKKEKVYADEIAKAWESGENLERVAKYSMEDAKATYEL GKEFLPMEAQLSRLIGQSLWDVSRSTGNLVEWFLLRKAYERNE LAPNKPDEKELARRRQSYEGGYVKEPERGLWENIVYLDFRSLYP SIIITHNVSPDTLNREGCKEYDVAPQVGHFRFCKDFPGFIPSLDGD LLEERQKIKKMKATIDPIERKLLDYRQRRIKILANSYYGYYGYAR ARWYCKECAESVTAWGREYITMTIKEIEEKYGFVKVIYSDTDGFFA TIPGADAETVKKKAMEFLKYINAKLPGALELEYEGFYKRGFFVTK KKYAVIDEEGKITTRGLEIVRRDWSEIAKETQARVLEALLKDGDV EKAVRIVKEVTEKLSKYEVPEKLVIIHQITRDLDKDYKATGPHVAV AKRLAARGVKIRPGTVISYIVLKGSGRIGDRAIPFDEFDPTKHKYD AEYYIENQVLP AVERILRAFGRYKEDLRYQKTRQVGLSAWLKPK GTGTGGGGATVKFKYKGEKEVDISKIKKVVWRVGMISFTYDEG GGKTGRGAVSEKDAPKELLQMLEKQKK

[0116] 本实施例采用的寡核苷酸序列如表2所示。

[0117] 表2. 寡核苷酸序列

SEQ ID NO.	序列名称	序列 5'-3'
[0118] 10	Primer 1	tcgtcggcagcgtcagatgtgataagagacagcctggcagccaggaacgtactg gtgaaaac
11	Primer 2	tcgtcggcagcgtcagatgtgataagagacagcctggcagccaggaacgtactg gtgaaaac
12	F1	tactggtgaaaacaccgca
13	R1	ttccgcaaccagcagttt
14	MGB	tgcaagatcacagatttgggc

[0119] 其中Primer 2 (SEQ ID NO:11) 的3' -OH以C3 Spacer替换。

[0120] 主要试剂与材料

[0121] 本实施例所用外周血游离DNA提取试剂盒购自上海臻迪基因科技有限公司;所用

pfu高保真DNA聚合酶 (SEQ ID NO:1) 购自Promega, DeepVent高保真DNA聚合酶 (SEQ ID NO:2) 购自NEB, KOD高保真DNA聚合酶 (SEQ ID NO:3) 购自TOYOBO。APO系列DNA聚合酶 (SEQ ID NO:4-9) 由申请人自行制备。定量检测核酸所使用的qPCRmastermix购自TOYOBO。

[0122] DynabeadsMyOneStreptavidin C1磁珠购自Invitrogen。小牛胸腺DNA溶液购自上海翊圣生物科技有限公司。 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP购自PerkinElmer。所有种类Biotin-dNTP类似物购自JenaBioscience。XbaI购自NEB。其他分子生物学试剂与化学试剂购自Sigma。本实施例所用全部寡核苷酸由上海百力格生物科技有限公司合成。

[0123] 实验方法

[0124] 1. DNA聚合酶蛋白表达纯化

[0125] APO系列DNA聚合酶 (SEQ ID NO:4-9) 的蛋白表达质粒由申请人自行构建。提供DNA序列由上海百力格全基因合成后, 克隆至pGEX-4T-1表达载体, 再将表达克隆转化至感受态菌中, 使用IPTG诱导表达, GST纯化后, 酶切去除N端GST蛋白得到本发明SEQ ID NO.4-9的DNA聚合酶。对纯化后的DNA聚合酶测定酶活后, 保存于下述配方的存储缓冲液中: 20mM Tris-HCl (pH 7.4, 25°C), 0.1mM EDTA, 1mM DTT, 100mM KCl, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BSA和50%甘油。

[0126] 2. qPCR检测用校准品制备

[0127] 提供DNA序列由上海百力格全基因合成后, 克隆至克隆载体PUC57, 并用Sanger法测序以验证克隆序列。验证后, 使用XbaI酶切质粒, 使用保存缓冲液 (10mM Tris-HCl (pH 7.4, 25°C), 1mM EDTA, 30%甘油) 稀释质粒, 按照100,000拷贝/ μL , 10,000拷贝/ μL , 1000拷贝/ μL , 100拷贝/ μL , 10拷贝/ μL 五个浓度梯度制备校准品。

[0128] 3. cfDNA提取和定量

[0129] 使用外周血游离DNA提取试剂盒提取健康人血浆样本中的循环游离核酸 (circulating free DNA, cfDNA), 使用表3中的qPCR检测体系对cfDNA样本定量。健康人血浆样本中的cfDNA是一种核酸长度不均一的临床样本。

[0130] 表3. qPCR检测体系

[0131]	组分	用量 (μL)	终浓度
	2 \times Taqman Mix	25	1 \times
	F1 (10 μM)	1.5	300 nM
	R1 (10 μM)	1.5	300 nM
[0132]	MGB (10 μM)	0.5	100 nM
	H ₂ O	17.5	/
	待测产物/校准品	4	/
	总体积	50	/

[0133] qPCR程序如表4所示。

[0134] 表4. qPCR程序

[0135]	循环数	温度	时间
	1	95°C	3 min
	45	95°C	10s
60°C		30s	

[0136] 4. 使用不同DNA聚合酶与不同dNTP类似物条件下的cfDNA引物延伸扩增

[0137] 将2000拷贝cfDNA作为反应模板按照表5和表6中的体系进行基于引物延伸法的线性扩增。其中dNTP混合物为四种dNTP的1mM等摩尔混合的单掺dNTP混合物,所谓单掺是指该dNTP混合物有且仅有一种经biotin标记的单一类型dNTP类似物,该经biotin标记的单一类型dNTP类似物占该单一类型dNTP的50%。其中DNA聚合酶Pfu/Deep Vent/KOD使用酶产品自带的10X反应缓冲液;本申请人自行制备的APO系列聚合酶,使用如下配方的5X反应缓冲液:150mM Tris-HCl,200mM K₂SO₄,5mM (NH₄)₂SO₄,7.5mM MgSO₄,0.5% Triton X-100与0.5% BSA,pH为10.0。

[0138] 表5. 引物单链线性扩增体系1

[0139]	组分	体积 (μL)	终浓度
	DNA聚合酶Pfu/Deep Vent/KOD	1	0.01unit/μL
	Primer 1或Primer 2 (10μM)	1	500nM
	cfDNA样本	2	2000拷贝
	dNTP混合物	4	200μM
	10XPCR反应缓冲液	2	1X
	去离子水	10	/
	总计	20	/

[0140] 表6. 引物单链线性扩增体系2

[0141]	组分	体积 (μL)	终浓度
	APO系列聚合酶	1	0.01unit/μL
	Primer1或Primer 2 (10μM)	1	500nM
	cfDNA样本	2	2000拷贝
	dNTP混合物	4	200μM
	5XPCR反应缓冲液	4	1X
	去离子水	8	/
	总计	20	/

[0142] 扩增PCR程序如表7所示。

[0143] 表7. 引物单链线性扩增程序

循环数	温度	时间
1	98°C	60 sec
60	98°C	10 sec
	67°C	20 sec
	72°C	40 sec
1	72°C	5 min

[0144] 5. 亲和纯化

[0146] 将扩增完成后的反应体系与50 μ L链霉亲和素磁珠 (Dynabeads MyOne Streptavidin C1) 混合,按照使用说明书,纯化单链扩增产物。最终使用40 μ L去离子水,90 $^{\circ}$ C,10min洗脱纯化产物。按照表2、表3中的反应体系与程序检测扩增产物。将扩增后的拷贝数除以输入的拷贝数2000,计算扩增倍率。

[0147] 实验结果

[0148] 未修饰引物Primer 1和经修饰引物Primer2在不同反应条件下的扩增结果分别如表8和表9所示。该结果综合对应表5和表6中的引物延伸扩增体系1和2。表8. 未修饰引物Primer 1的扩增倍率表 (扩增倍率=纯化后cfDNA输出拷贝数/2000 \times 100%,nd=non-detectable未检出)

dNTP 类似物 DNA 聚合酶	biotin- 7- dATP	biotin- 14- dATP	biotin- 11- dATP	biotin- 14- dCTP	biotin- 11- dCTP	biotin- 16- dCTP	biotin- 11- dGTP	biotin- 11- dUTP	biotin- 16- dUTP	R1006
	Pfu	2.1	2.8	0.1	1.5	nd	nd	nd	nd	nd
Deep Vent	3.6	3.5	0.2	2.1	nd	nd	nd	nd	nd	nd
KOD	3.4	3.2	0.2	3.2	nd	nd	nd	nd	nd	nd
APO-1	4.8	5.6	0.4	5.3	0.2	0.1	nd	nd	nd	nd
APO-2	6.4	5.8	0.3	5.4	0.3	0.2	nd	nd	nd	nd
APO-3	6.8	8.5	0.2	8.3	0.5	0.2	nd	nd	nd	nd
APO-4	9.6	11.5	0.3	10.5	0.6	0.5	0.5	nd	nd	nd
APO-5	9.9	9.2	0.4	6.8	0.6	0.4	nd	nd	nd	nd
APO-6	10.8	14.6	0.2	12.5	0.5	0.4	12.8	nd	nd	nd

[0149] 表9. 经修饰引物Primer 2的扩增倍率表 (扩增倍率=纯化后cfDNA输出拷贝数/2000 \times 100%,nd=non-detectable未检出,NA=未经检测)

dNTP 类似物	biotin-7-	biotin-14-	biotin-11-	biotin-14-	biotin-11-	biotin-16-	biotin-11-	biotin-11-	biotin-16-	R1006
	dATP	dATP	dATP	dCTP	dCTP	dCTP	dGTP	dUTP	dUTP	
Pfu	1.5	1.2	nd	0.5	nd	nd	NA	nd	nd	nd
Deep Vent	0.2	0.3	nd	0.3	nd	nd	NA	nd	nd	nd
KOD	0.4	0.2	nd	0.2	nd	nd	NA	nd	nd	nd
APO-1	2.8	2.4	nd	3.2	nd	nd	NA	nd	nd	nd
APO-2	0.2	0.3	nd	0.5	nd	nd	NA	nd	nd	nd
APO-3	5.8	5.8	nd	5.4	nd	nd	NA	nd	nd	nd
APO-4	6.4	6.8	nd	8.9	nd	nd	0.3	nd	nd	nd
APO-5	0.7	0.9	nd	0.8	nd	nd	NA	nd	nd	nd
APO-6	10.3	12.5	nd	11.9	nd	nd	8.6	nd	nd	nd

[0151] 结论:

[0152] 由表8和表9可见,对于评价不同DNA聚合酶的性能方面,总体而言本申请人改造制备的APO系列聚合酶扩增倍率优于市售DNA聚合酶。由于修饰后的引物Primer 2需要DNA聚合酶发挥3'-5'外切酶活性切除修饰后才能延伸,总体上不如未修饰引物Primer 1扩增倍率高,但设计了一处点突变V93Q的聚合酶APO-6用于修饰后引物Primer 2的扩增体系,在各种不同的biotin-dNTP类似物掺入条件下都有不错的扩增表现,APO-3和APO-4掺入各种biotin-dNTP类似物的表现也算满足需求。对于评价不同dNTP类似物的掺入率方面,对于一般延伸引物Primer 1而言,biotin-7-dATP,biotin-14-dATP和biotin-14-dCTP配合APO系列聚合酶3~6(SEQ ID NO:6-9)使用都有不错的扩增表现;对于修饰后的引物Primer 2而言,仍然是这几种dNTP类似物堪用,但聚合酶的搭配上选择APO-3、APO-4和APO-6(SEQ ID NO:6,7,9),扩增效果才令人满意。

[0153] 由表8和9的结果可知,

[0154] • 经修饰/未修饰引物的效果基本一致。

[0155] • 加上Sso7d后biotin-7-dATP、biotin-14-dATP及biotin-14-dCTP的效果有较大改善,其中Pfu/Deep Vent嵌合体在经修饰引物扩增中的效果最佳。

[0156] • 置换体中C端为Pfu/Deep Vent嵌合体的APO-4和APO-6效果最佳,其中含V93Q的APO-6对最多的经修饰dNTP有最优的效果。

[0157] • Biotin-11-dATP、biotin-11-dUTP、biotin-16-dUTP、biotin-11-dCTP、biotin-16-dCTP、biotin-11-dGTP以及R1006的修饰基团在与dNTP连接的3个C原子内均有二键或三键可以阻止分子旋转的结构,结果可见此类经修饰dNTP的效果差,推测可能与上述修饰基团与核苷酸分子的偶联处如有存在二键或三键结构,会影响修饰后的核苷酸分子与B类DNA聚合酶的结合,导致其聚合/扩增活性丧失。至于修饰基团在碱基上的位置,可能不是决定性的作用。

[0159] • 此外,含V93Q的AP0-6,由于单个氨基酸的变异,改变了聚合酶的分子构象,使之能够适配于biotin-11-dGTP的分子。之前有文献报道,V93Q变异的pfu酶可以识别未经修饰的dUTP,而野生型的pfu,是不能识别未经修饰的dUTP的(Structural basis for uracil recognition by archaeal family B DNApolymerases,Nature structural biology, volume 9,number 12,December 2002)。这也体现了V93Q变异对DNA聚合酶识别dNTP的功能具有重要意义。本发明经V93Q变异修饰的酶在结构组成和功能上与该文献显著不同。

[0160] • 同样地,Biotin-11-dATP (7-Deaza)、biotin-11-dUTP (C5)、biotin-16-dUTP (C5)、biotin-11-dCTP (C5)、biotin-16-dCTP (C5) 及biotin-11-dGTP (7-Deaza) 的修饰在与dNTP的连接位点更靠近核糖基团,结果可见此类经修饰dNTP的效果差,推测可能与修饰的结构影响酶结合有关。

[0161] 实施例2.Biotin-dNTP类似物混合比例的优化及多种biotin-dNTP类似物混合掺入实验

[0162] 实验目的

[0163] 将实施例1筛选出的几种掺入效果较佳的biotin-dNTP类似物进行混合比例优化和混合掺入优化。通过选定的biotin-dNTP类似物在不同掺入梯度下和混合掺入条件下在选定的DNA聚合酶催化下的表现,优化biotin-dNTP类似物混合比例与混合掺入条件。

[0164] 实验材料和方法

[0165] 本实施例采用的实验材料和设备与实施例1完全相同,差别仅在于dNTP混合物的混合配比。

[0166] 使用初始浓度为1mM的biotin-14-dATP,biotin-11-dGTP,biotin-14-dCTP,分别配制成各自在dATP、dGTP、dCTP中占比为10%,20%,50%,80%,100%的单掺dNTP混合物;再配置biotin-14-dATP和biotin-11-dGTP两种dNTP类似物混合,分别在dATP和dGTP(即dATP在dATP中的含量、dGTP在dGTP中的含量)中占比20%的混合掺入dNTP混合物;和biotin-14-dATP和biotin-14-dCTP两种dNTP类似物混合,分别在dATP和dCTP中占比20%的混掺dNTP混合物;以及biotin-14-dATP,biotin-11-dGTP,biotin-14-dCTP三种类似物混合,分别在dATP、dGTP、dCTP中占比10%的混掺dNTP混合物。其中,在扩增反应中,不同配置的dNTP混合物是四种dNTP的1mM等摩尔混合物。

[0167] 按照实施例1提供的实验方法和条件,将2000拷贝cfDNA作为反应模板进行线性扩增。使用AP0-6聚合酶和上述每种配置的dNTP混合物对未修饰引物Primer 1进行引物延伸扩增。将扩增后的输出拷贝数除以输入的拷贝数2000,计算扩增倍率以评价不同掺入梯度以及单掺混掺的表现。

[0168] 实验结果

[0169] 使用Primer 1和DNA聚合酶AP0-6在不同biotin-dNTP掺入梯度及混合条件下的cfDNA扩增结果如表10所示。该结果对应表6中的引物延伸扩增体系2。表10.不同biotin-dNTP掺入梯度及混掺条件下的cfDNA扩增倍率(扩增倍率=纯化后cfDNA输出拷贝数/2000×100%)

[0170]

biotin-14-dATP	biotin-11-dGTP	biotin-14-dCTP	扩增倍率
10%	0	0	5.3
20%	0	0	8.4

50%	0	0	14.6
80%	0	0	6.3
100%	0	0	1.4
0	10%	0	3.8
0	20%	0	8.8
0	50%	0	12.8
0	80%	0	5.6
	100%	0	2.5
0	0	10%	3.3
0	0	20%	6.5
0	0	50%	12.5
0	0	80%	7.6
0	0	100%	1.3
20%	20%	0%	15.2
20%	0	20%	14.8
10%	10%	10%	16.8

[0171] 结论:

[0172] 由表10的扩增结果可见,对于在扩增体系中混合单一种类的dNTP类似物而言,混合比例太高(80%以上)或太低(10%),效果不如混合比例适中(20%-50%)的扩增效果好。对于在扩增体系中混合单一种类的dNTP类似物和混合复数种类的dNTP类似物的比较而言,混合复数种类的dNTP类似物,无论是biotin-14-dATP配biotin-11-dGTP,还是biotin-14-dATP配biotin-14-dCTP,抑或三者皆混合,只要混合比例适中,都有比混合单一种类的dNTP类似物更优的扩增效果。考虑到biotin-11-dGTP的成本明显高过biotin-14-dATP和biotin-14-dCTP,biotin-14-dATP配biotin-14-dCTP各掺20%是性价比理想的选择。

[0173] 综上所述,本发明有效克服了现有技术中的种种缺点而具高度产业利用价值。

[0174] 上述实施例仅例示性说明本发明的原理及其功效,而非用于限制本发明。任何熟悉此技术的人士皆可在不违背本发明的精神及范畴下,对上述实施例进行修饰或改变。因此,举凡所属技术领域中具有通常知识者在未脱离本发明所揭示的精神与技术思想下所完成的一切等效修饰或改变,仍应由本发明的权利要求所涵盖。

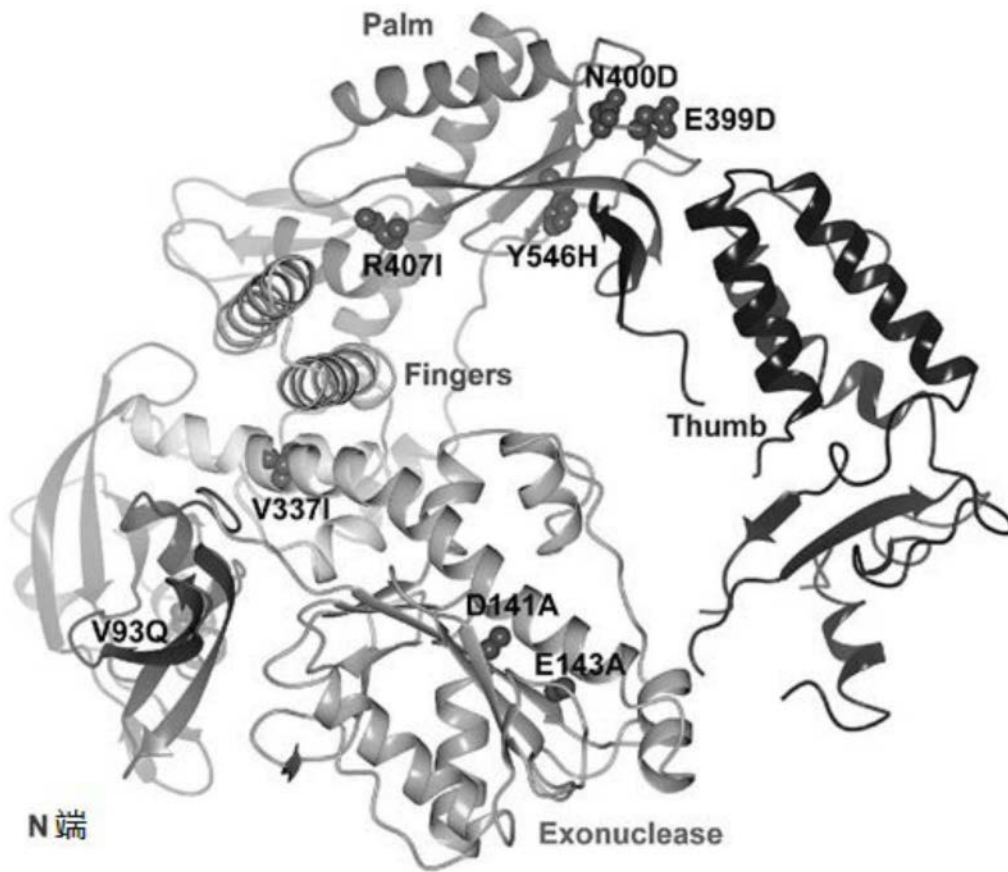


图1



图2

Majarti ty	MILDDVYITEEGKPVIRL FKHENGFKTEHRTFRPYIYALLKDDSKITEEKKITGERHGKIVRIVDVEKVEKFLGKPTTWKLYFHEPODPTTRKREHPAWDIFEYDIPFAKRYLIDKGLPMEGDDEELKLAFOITELIYHGE	150
SEQ4 APO-1.pro	MILDDVYITEEGKPVIRL FKHENGFKTEHRTFRPYIYALLKDDSKITEEKKITGERHGKIVRIVDVEKVEKFLGKPTTWKLYFHEPODPTTRKREHPAWDIFEYDIPFAKRYLIDKGLPMEGDDEELKLAFOITELIYHGE	150
SEQ5 APO-2.pro	MILDDVYITEEGKPVIRL FKHENGFKTEHRTFRPYIYALLKDDSKITEEKKITGERHGKIVRIVDVEKVEKFLGKPTTWKLYFHEPODPTTRKREHPAWDIFEYDIPFAKRYLIDKGLPMEGDDEELKLAFOITELIYHGE	150
SEQ6 APO-3.pro	MILDDVYITEEGKPVIRL FKHENGFKTEHRTFRPYIYALLKDDSKITEEKKITGERHGKIVRIVDVEKVEKFLGKPTTWKLYFHEPODPTTRKREHPAWDIFEYDIPFAKRYLIDKGLPMEGDDEELKLAFOITELIYHGE	150
SEQ7 APO-4.pro	MILDDVYITEEGKPVIRL FKHENGFKTEHRTFRPYIYALLKDDSKITEEKKITGERHGKIVRIVDVEKVEKFLGKPTTWKLYFHEPODPTTRKREHPAWDIFEYDIPFAKRYLIDKGLPMEGDDEELKLAFOITELIYHGE	150
SEQ8 APO-5.pro	MILDDVYITEEGKPVIRL FKHENGFKTEHRTFRPYIYALLKDDSKITEEKKITGERHGKIVRIVDVEKVEKFLGKPTTWKLYFHEPODPTTRKREHPAWDIFEYDIPFAKRYLIDKGLPMEGDDEELKLAFOITELIYHGE	150
SEQ9 APO-6.pro	MILDDVYITEEGKPVIRL FKHENGFKTEHRTFRPYIYALLKDDSKITEEKKITGERHGKIVRIVDVEKVEKFLGKPTTWKLYFHEPODPTTRKREHPAWDIFEYDIPFAKRYLIDKGLPMEGDDEELKLAFOITELIYHGE	150
Majarti ty	EFGKGPITMISYADEEAAKVTIKNIDLPVVEVSSEREMDKRFLXII REKDPDIIVT YGDS FDXPL YAK RAEKLGKLTIGRDS EPVQM RIGDMTAVEKGRIDHFDL VHVIRRTINLPTTYTLEAVYEATFGKPK EKVYADEIAK AWE	300
SEQ4 APO-1.pro	EFGKGPITMISYADEEAAKVTIKNIDLPVVEVSSEREMDKRFLXII REKDPDIIVT YGDS FDXPL YAK RAEKLGKLTIGRDS EPVQM RIGDMTAVEKGRIDHFDL VHVIRRTINLPTTYTLEAVYEATFGKPK EKVYADEIAK AWE	300
SEQ5 APO-2.pro	EFGKGPITMISYADEEAAKVTIKNIDLPVVEVSSEREMDKRFLXII REKDPDIIVT YGDS FDXPL YAK RAEKLGKLTIGRDS EPVQM RIGDMTAVEKGRIDHFDL VHVIRRTINLPTTYTLEAVYEATFGKPK EKVYADEIAK AWE	300
SEQ6 APO-3.pro	EFGKGPITMISYADEEAAKVTIKNIDLPVVEVSSEREMDKRFLXII REKDPDIIVT YGDS FDXPL YAK RAEKLGKLTIGRDS EPVQM RIGDMTAVEKGRIDHFDL VHVIRRTINLPTTYTLEAVYEATFGKPK EKVYADEIAK AWE	300
SEQ7 APO-4.pro	EFGKGPITMISYADEEAAKVTIKNIDLPVVEVSSEREMDKRFLXII REKDPDIIVT YGDS FDXPL YAK RAEKLGKLTIGRDS EPVQM RIGDMTAVEKGRIDHFDL VHVIRRTINLPTTYTLEAVYEATFGKPK EKVYADEIAK AWE	300
SEQ8 APO-5.pro	EFGKGPITMISYADEEAAKVTIKNIDLPVVEVSSEREMDKRFLXII REKDPDIIVT YGDS FDXPL YAK RAEKLGKLTIGRDS EPVQM RIGDMTAVEKGRIDHFDL VHVIRRTINLPTTYTLEAVYEATFGKPK EKVYADEIAK AWE	300
SEQ9 APO-6.pro	EFGKGPITMISYADEEAAKVTIKNIDLPVVEVSSEREMDKRFLXII REKDPDIIVT YGDS FDXPL YAK RAEKLGKLTIGRDS EPVQM RIGDMTAVEKGRIDHFDL VHVIRRTINLPTTYTLEAVYEATFGKPK EKVYADEIAK AWE	300
Majarti ty	SGENLERVAKYSMEDAKATYELGKFLPMEQL SRLTGQNLVSRSSSTGNLVEWFLRKAYERNIEAPNKPDKELARPRSGYEGGKWEPEGLWENIVLDFRSLYPSIIITHNVPDNLNREGCKEYDAPQVGHKDFKDFGFI	450
SEQ4 APO-1.pro	SGENLERVAKYSMEDAKATYELGKFLPMEQL SRLTGQNLVSRSSSTGNLVEWFLRKAYERNIEAPNKPDKELARPRSGYEGGKWEPEGLWENIVLDFRSLYPSIIITHNVPDNLNREGCKEYDAPQVGHKDFKDFGFI	450
SEQ5 APO-2.pro	SGENLERVAKYSMEDAKATYELGKFLPMEQL SRLTGQNLVSRSSSTGNLVEWFLRKAYERNIEAPNKPDKELARPRSGYEGGKWEPEGLWENIVLDFRSLYPSIIITHNVPDNLNREGCKEYDAPQVGHKDFKDFGFI	449
SEQ6 APO-3.pro	SGENLERVAKYSMEDAKATYELGKFLPMEQL SRLTGQNLVSRSSSTGNLVEWFLRKAYERNIEAPNKPDKELARPRSGYEGGKWEPEGLWENIVLDFRSLYPSIIITHNVPDNLNREGCKEYDAPQVGHKDFKDFGFI	450
SEQ7 APO-4.pro	SGENLERVAKYSMEDAKATYELGKFLPMEQL SRLTGQNLVSRSSSTGNLVEWFLRKAYERNIEAPNKPDKELARPRSGYEGGKWEPEGLWENIVLDFRSLYPSIIITHNVPDNLNREGCKEYDAPQVGHKDFKDFGFI	449
SEQ8 APO-5.pro	SGENLERVAKYSMEDAKATYELGKFLPMEQL SRLTGQNLVSRSSSTGNLVEWFLRKAYERNIEAPNKPDKELARPRSGYEGGKWEPEGLWENIVLDFRSLYPSIIITHNVPDNLNREGCKEYDAPQVGHKDFKDFGFI	450
SEQ9 APO-6.pro	SGENLERVAKYSMEDAKATYELGKFLPMEQL SRLTGQNLVSRSSSTGNLVEWFLRKAYERNIEAPNKPDKELARPRSGYEGGKWEPEGLWENIVLDFRSLYPSIIITHNVPDNLNREGCKEYDAPQVGHKDFKDFGFI	449
Majarti ty	PSLLGLLEERQIKDKXMKATDPTERKLLDYRQRKILANSYGYGAYARWYKCEASVTANGREYIEMKXKEEKGGKXVYDGDGXAATIPGXDXEKXKXKAXEFKXYINAKLPGALELEYEGFKRGFFVTKKXAVYIDE	600
SEQ4 APO-1.pro	PSLLGLLEERQIKDKXMKATDPTERKLLDYRQRKILANSYGYGAYARWYKCEASVTANGREYIEMKXKEEKGGKXVYDGDGXAATIPGXDXEKXKXKAXEFKXYINAKLPGALELEYEGFKRGFFVTKKXAVYIDE	600
SEQ5 APO-2.pro	PSLLGLLEERQIKDKXMKATDPTERKLLDYRQRKILANSYGYGAYARWYKCEASVTANGREYIEMKXKEEKGGKXVYDGDGXAATIPGXDXEKXKXKAXEFKXYINAKLPGALELEYEGFKRGFFVTKKXAVYIDE	599
SEQ6 APO-3.pro	PSLLGLLEERQIKDKXMKATDPTERKLLDYRQRKILANSYGYGAYARWYKCEASVTANGREYIEMKXKEEKGGKXVYDGDGXAATIPGXDXEKXKXKAXEFKXYINAKLPGALELEYEGFKRGFFVTKKXAVYIDE	600
SEQ7 APO-4.pro	PSLLGLLEERQIKDKXMKATDPTERKLLDYRQRKILANSYGYGAYARWYKCEASVTANGREYIEMKXKEEKGGKXVYDGDGXAATIPGXDXEKXKXKAXEFKXYINAKLPGALELEYEGFKRGFFVTKKXAVYIDE	599
SEQ8 APO-5.pro	PSLLGLLEERQIKDKXMKATDPTERKLLDYRQRKILANSYGYGAYARWYKCEASVTANGREYIEMKXKEEKGGKXVYDGDGXAATIPGXDXEKXKXKAXEFKXYINAKLPGALELEYEGFKRGFFVTKKXAVYIDE	600
SEQ9 APO-6.pro	PSLLGLLEERQIKDKXMKATDPTERKLLDYRQRKILANSYGYGAYARWYKCEASVTANGREYIEMKXKEEKGGKXVYDGDGXAATIPGXDXEKXKXKAXEFKXYINAKLPGALELEYEGFKRGFFVTKKXAVYIDE	599
Majarti ty	EGKXXTRGLEIVRDIWEIAKETQARVLEALLKDDVEKAVRIWKEVTEKLSKYEYPPKLVTHIOTITRDLKATGPHAVAKRLAARGVIRPOTVLSYVLKSGRIGDRAIPDFDEPDKHKYDAEYIENQVLPVAVRILRAF	750
SEQ4 APO-1.pro	EGKXXTRGLEIVRDIWEIAKETQARVLEALLKDDVEKAVRIWKEVTEKLSKYEYPPKLVTHIOTITRDLKATGPHAVAKRLAARGVIRPOTVLSYVLKSGRIGDRAIPDFDEPDKHKYDAEYIENQVLPVAVRILRAF	750
SEQ5 APO-2.pro	EGKXXTRGLEIVRDIWEIAKETQARVLEALLKDDVEKAVRIWKEVTEKLSKYEYPPKLVTHIOTITRDLKATGPHAVAKRLAARGVIRPOTVLSYVLKSGRIGDRAIPDFDEPDKHKYDAEYIENQVLPVAVRILRAF	749
SEQ6 APO-3.pro	EGKXXTRGLEIVRDIWEIAKETQARVLEALLKDDVEKAVRIWKEVTEKLSKYEYPPKLVTHIOTITRDLKATGPHAVAKRLAARGVIRPOTVLSYVLKSGRIGDRAIPDFDEPDKHKYDAEYIENQVLPVAVRILRAF	750
SEQ7 APO-4.pro	EGKXXTRGLEIVRDIWEIAKETQARVLEALLKDDVEKAVRIWKEVTEKLSKYEYPPKLVTHIOTITRDLKATGPHAVAKRLAARGVIRPOTVLSYVLKSGRIGDRAIPDFDEPDKHKYDAEYIENQVLPVAVRILRAF	749
SEQ8 APO-5.pro	EGKXXTRGLEIVRDIWEIAKETQARVLEALLKDDVEKAVRIWKEVTEKLSKYEYPPKLVTHIOTITRDLKATGPHAVAKRLAARGVIRPOTVLSYVLKSGRIGDRAIPDFDEPDKHKYDAEYIENQVLPVAVRILRAF	749
SEQ9 APO-6.pro	EGKXXTRGLEIVRDIWEIAKETQARVLEALLKDDVEKAVRIWKEVTEKLSKYEYPPKLVTHIOTITRDLKATGPHAVAKRLAARGVIRPOTVLSYVLKSGRIGDRAIPDFDEPDKHKYDAEYIENQVLPVAVRILRAF	749
Majarti ty	YRKEDLRYKTRQVGLSAILNPKGTGTGGGGATWFKYKGEKEVDLSKDKVVRVGMISFTYDEGGKTRGVAISEKDPKELLQMLEKQK	844
SEQ4 APO-1.pro	YRKEDLRYKTRQVGLSAILNPKGTGTGGGGATWFKYKGEKEVDLSKDKVVRVGMISFTYDEGGKTRGVAISEKDPKELLQMLEKQK	844
SEQ5 APO-2.pro	YRKEDLRYKTRQVGLSAILNPKGTGTGGGGATWFKYKGEKEVDLSKDKVVRVGMISFTYDEGGKTRGVAISEKDPKELLQMLEKQK	844
SEQ6 APO-3.pro	YRKEDLRYKTRQVGLSAILNPKGTGTGGGGATWFKYKGEKEVDLSKDKVVRVGMISFTYDEGGKTRGVAISEKDPKELLQMLEKQK	844
SEQ7 APO-4.pro	YRKEDLRYKTRQVGLSAILNPKGTGTGGGGATWFKYKGEKEVDLSKDKVVRVGMISFTYDEGGKTRGVAISEKDPKELLQMLEKQK	844
SEQ8 APO-5.pro	YRKEDLRYKTRQVGLSAILNPKGTGTGGGGATWFKYKGEKEVDLSKDKVVRVGMISFTYDEGGKTRGVAISEKDPKELLQMLEKQK	844
SEQ9 APO-6.pro	YRKEDLRYKTRQVGLSAILNPKGTGTGGGGATWFKYKGEKEVDLSKDKVVRVGMISFTYDEGGKTRGVAISEKDPKELLQMLEKQK	844

Decoration *Decoration #1*: Shade (with solid black) residues that match SEQ7 APO-4.pro exactly.

图3