



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 106319032 A

(43) 申请公布日 2017. 01. 11

(21) 申请号 201510355193. 7

(22) 申请日 2015. 06. 24

(71) 申请人 深圳华大基因研究院

地址 518083 广东省深圳市盐田区北山工业  
区综合楼

(72) 发明人 席凤 郭苗苗 韩鸿雁

(74) 专利代理机构 深圳鼎合诚知识产权代理有  
限公司 44281

代理人 彭家恩 罗瑶

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006. 01)

C12Q 1/48(2006. 01)

权利要求书1页 说明书5页

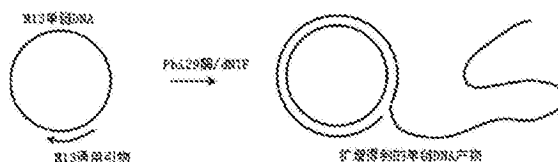
序列表1页 附图1页

(54) 发明名称

一种测定 Phi29 DNA 聚合酶活性的方法和滚环测序方法

(57) 摘要

本发明公开了一种测定 Phi29 DNA 聚合酶活性的方法和滚环测序方法,包括:以环状单链 DNA 为模板,在扩增引物的存在下,以 Phi29 DNA 聚合酶引发滚环复制,产生大量连续的单链 DNA 拷贝;然后将荧光分子掺入扩增产物,通过检测扩增产物的荧光信号来定量所产生的单链 DNA 拷贝数量,从而计算出 Phi29 DNA 聚合酶的活性。本发明的方法无放射性污染,具有简便、快速、高灵敏等优点,可用于高通量、自动化的聚合酶活筛选。



1. 一种测定 Phi29 DNA 聚合酶活性的方法,其特征在于,所述方法包括:以环状单链 DNA 为模板,在扩增引物的存在下,以所述 Phi29 DNA 聚合酶引发滚环复制,产生大量连续的单链 DNA 拷贝;然后将荧光分子掺入扩增产物,通过检测扩增产物的荧光信号来定量所产生的单链 DNA 拷贝数量,从而计算出所述 Phi29 DNA 聚合酶的活性。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述方法首先采用标准 Phi29 DNA 聚合酶引发滚环复制并绘制所产生的单链 DNA 拷贝数量与标准 Phi29 DNA 聚合酶活性的标准曲线,然后检测相同条件下待测 Phi29 DNA 聚合酶引发滚环复制所产生的单链 DNA 拷贝数量,并根据所述标准曲线计算出所述待测 Phi29 DNA 聚合酶的活性。

3. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述荧光分子为能够掺入单链 DNA 的荧光染料;优选为 Qubit ssDNA 分析试剂。

4. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述荧光分子为荧光修饰的 dNTP;所述将荧光分子掺入扩增产物具体为:在所述扩增产物上结合上测序引物,然后加入所述荧光修饰的 dNTP,在聚合酶的作用下,沿所述单链 DNA 拷贝模板延伸。

5. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述环状单链 DNA 为 M13 噬菌体单链 DNA。

6. 根据权利要求 5 所述的方法,其特征在于,所述扩增引物为 5'-aagccatccgcaaaaatg acctct-3'。

7. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述 Phi29 DNA 聚合酶的聚合活性以 U/ $\mu$ L 为单位表示。

8. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述 Phi29 DNA 聚合酶引发滚环复制的反应时间为 10min~1h;优选为 30min。

9. 一种滚环测序方法,其特征在于,利用权利要求 1 所述的扩增产物,将所述荧光分子掺入扩增产物,具体步骤为:在所述扩增产物上结合上机测序引物,然后加入所述荧光分子,在聚合酶的作用下,沿所述单链 DNA 拷贝模板延伸,通过不同的荧光信号来确定扩增产物序列。

10. 根据权利要求 9 所述的方法,其特征在于,所述荧光分子为荧光修饰的 dNTP。

## 一种测定 Phi29DNA 聚合酶活性的方法和滚环测序方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及酶活性测定技术领域,尤其涉及一种测定 Phi29DNA 聚合酶活性的方法和滚环测序方法。

### 背景技术

[0002] phi29DNA 聚合酶是从 *Bacillus subtilis* 噬菌体 phi29 中克隆出的嗜温 DNA 聚合酶,具有特殊的多重置换和连续合成特性,并且具有 3' 到 5' 外切酶校读能力。Phi29DNA 聚合酶不耐高温,在 30℃ 条件下即可进行扩增反应,其保真度与 pfu 聚合酶相当,是普通 Taq 酶的  $10^3$  倍。

[0003] Phi29DNA 聚合酶是一种重要的分子生物学工具酶,可用于全基因组扩增、等温扩增、滚环复制、DNA 测序、生化分析、病毒检测、核酸检测、内切酶活测定等,在基因工程、高通量测序、分子诊断、医学检测等领域有着重要的作用。

[0004] 由于上述多种重要的用途,准确测定 Phi29DNA 聚合酶的活性,保证批次活性的稳定性,具有至关重要的意义。传统的聚合酶测定方法主要依赖于放射性元素  $^3\text{H}$  标记的核苷酸的掺入。即在 Phi29DNA 聚合酶的反应体系和条件下,合成带有放射性标记的核苷酸链,通过测定酸不溶性产物中放射性同位素的量,计算出酶的活性。这种方法易产生放射性污染,且需要进行沉淀、过滤等多个步骤、周期长,难以实现高通量、自动化,给筛选带来了困难。

### 发明内容

[0005] 本发明提供一种以滚环复制为基础,结合分子荧光技术建立的测定 Phi29DNA 聚合酶活性的方法和滚环测序方法。

[0006] 本发明采用以下技术方案:

[0007] 一种测定 Phi29DNA 聚合酶活性的方法,包括:以环状单链 DNA 为模板,在扩增引物的存在下,以 Phi29DNA 聚合酶引发滚环复制,产生大量连续的单链 DNA 拷贝;然后将荧光分子掺入扩增产物,通过检测扩增产物的荧光信号来定量所产生的单链 DNA 拷贝数量,从而计算出上述 Phi29DNA 聚合酶的聚合活性。

[0008] 在一个优选实施方案中,上述方法首先采用标准 Phi29DNA 聚合酶引发滚环复制并绘制所产生的单链 DNA 拷贝数量与标准 Phi29DNA 聚合酶聚合活性的标准曲线,然后检测相同条件下待测 Phi29DNA 聚合酶引发滚环复制所产生的单链 DNA 拷贝数量,并根据上述标准曲线计算出上述待测 Phi29DNA 聚合酶的聚合活性。

[0009] 在一个优选实施方案中,上述荧光分子为能够掺入单链 DNA 的荧光染料。优选地,上述荧光染料为 Qubit ssDNA 分析试剂。

[0010] 在一个优选实施方案中,上述荧光分子为荧光修饰的 dNTP;上述将荧光分子掺入扩增产物具体为:在上述扩增产物上结合上测序引物,然后加入上述荧光修饰的 dNTP,在聚合酶的作用下,沿上述单链 DNA 拷贝模板延伸。

[0011] 在一个优选实施方案中,上述环状单链 DNA 为 M13 噬菌体单链 DNA。

[0012] 在一个优选实施方案中,上述扩增引物为 5'-aagccatccgcaaaaatgacctct-3' (SEQ ID NO :1)。

[0013] 在一个优选实施方案中,上述 Phi29DNA 聚合酶的聚合活性以 U/ $\mu$ L 为单位表示。

[0014] 在一个优选实施方案中,上述 Phi29DNA 聚合酶引发滚环复制的反应时间为 10min ~ 1h,优选为 30min。

[0015] 本发明的另一个方面,提供一种滚环测序的方法,利用上述扩增产物,将上述荧光分子掺入扩增产物,具体步骤为:在上述扩增产物上结合上机测序引物,然后加入上述荧光分子,在聚合酶的作用下,沿上述单链 DNA 拷贝模板延伸,通过不同的荧光信号来确定扩增产物序列。

[0016] 在一个优选实施方案中,上述荧光分子为荧光修饰的 dNTP。

[0017] 本发明利用 phi29DNA 聚合酶的高聚合性和链置换活性,通过检测扩增产物的荧光信号来定量所产生的滚环扩增产物的浓度来快速测定 phi29DNA 聚合酶的聚合活性,无放射性污染,具有简便、快速、高灵敏等优点,可用于高通量、自动化的聚合酶活筛选。

#### 附图说明

[0018] 图 1 为本发明一个实施方案中的滚环复制过程示意图;

[0019] 图 2 为本发明一个实施例中的单链 DNA 拷贝数量 (ssDNA 量) 与标准 Phi29DNA 聚合酶聚合活性 (酶用量) 的标准曲线图。

#### 具体实施方式

[0020] 下面通过具体实施方式结合附图对本发明作进一步详细说明。

[0021] 滚环扩增 (Rolling circle amplification, RCA) 技术是一种等温信号扩增方法, phi29DNA 聚合酶以环状单链 DNA 分子为模板,在扩增引物的作用下引发滚环复制。由于 phi29DNA 聚合酶具有的高进行性和链置换活性,可绕单链环连续扩增产生大量相互衔接的单链 DNA 拷贝。DNA 可在短时间内实现线性或指数扩增,可用于极微量的生物大分子和生物标志物的检测与研究,具有较高的灵敏度。

[0022] 本发明以滚环扩增技术为基础,提出一种快速测定 phi29DNA 聚合酶的聚合活性的方法,不需要使用放射性同位素,具有简便、快速、高灵敏度等优点,可实现高通量、自动化的聚合酶聚合活性筛选。RCA 技术相对于 PCR 来讲,具有如下几点优势:(1) 高灵敏度。RCA 具有极强扩增能力,线性 RCA 的扩增效率可达  $10^5$  倍;(2) 高特异性。(3) 高通量。(4) 操作方便。一方面,RCA 是一种恒温扩增,不需要特别的热循环仪器;另一方面,近年来兴起的高通量测序技术将 DNA 阵列与光学检测技术巧妙结合,实现了大规模并行信号检测。本发明中环状单链 DNA 分子经过滚环扩增后,其产物可直接结合在高密度的纳米阵列芯片,对环状单链 DNA 分子进行高通量测序,并可在短时间内获得大量测序数据。

[0023] 本发明主要以滚环扩增反应为基础(如图 1),结合分子荧光技术建立 phi29DNA 聚合酶聚合活性检测的新方法。

[0024] 在本发明的一个实施方案中,以 M13 噬菌体单链 DNA (M13ssDNA 单链环) 作为 RCA 反应的模板,设计扩增引物,在 phi29DNA 聚合酶作用下引发滚环复制,产生大量连续的 M13

单链拷贝。在荧光染料掺入情况下,可测得扩增产物的荧光信号,推测扩增效率,进而达到检测 phi 29DNA 聚合酶活性的目的。

[0025] 需要说明的是,本发明并不局限于以 M13 噬菌体单链 DNA 为 RCA 反应的模板。理论上,其它任何环状单链 DNA 均可以用于本发明。相应地,扩增引物是环状单链 DNA 上的特定序列的互补序列。

[0026] 在一个具体的实施方案中,针对标准 Phi29DNA 聚合酶(标准酶),设置不同酶用量体系梯度进行滚环扩增,用 Phi29DNA 聚合酶在室温条件下反应约半小时,加入反应终止液终止反应。将反应产物用 Qubit ssDNA 分析试剂(Qubit ssDNA assay kit,Invitrogen 公司)检测各体系单链 DNA 的浓度。以酶用量为横轴,单链 DNA 浓度为纵轴,绘制标准酶的标准曲线。

[0027] 将已知酶浓度的另一商品酶 Phi29DNA 聚合酶(待测酶)稀释至理论待测浓度,与制作标准曲线的 Phi29DNA 聚合酶同时进行 RCA 反应,反应产物使用 Qubit ssDNA assay kit 检测各体系单链 DNA 的浓度。根据标准酶的标准曲线计算待测酶的相对酶活。

[0028] 需要说明的是,本发明并不局限于使用 Qubit ssDNA assay kit 检测单链 DNA 的浓度。理论上,任何能够掺入单链 DNA 的荧光染料均可用于本发明中。而且,通过使用特定寡核苷酸序列与滚环复制所产生的单链 DNA 拷贝进行互补配对,能够形成部分双链的单链 DNA 产物,在这种情况下,某些双链 DNA 特异性荧光染料(如 picogreen 染料)也可用于本发明中。因此,基于本发明的精神,本发明的荧光染料可以是单链 DNA 特异性荧光染料或双链 DNA 特异性荧光染料。

[0029] 本发明利用了 phi29DNA 聚合酶的高聚合性和链置换活性,通过测定滚环扩增产物浓度来快速测定活性,无放射性污染,具有简便、快速、高灵敏等优点,可用于高通量、自动化的聚合酶活筛选。

[0030] 在本发明的另一个实施方案中,环状单链 DNA 经滚环复制可连续扩增产生大量相互衔接的单链 DNA 拷贝,并相互缠绕形成致密的球状结构。基于目前的高通量光学测序技术,将球状结构这一产物结合上测序引物(与 RCA 反应的扩增引物互补)后,加入荧光修饰的 dNTP,在聚合酶的作用下,可沿单链模板延伸并发出荧光。荧光信号的强度和球状结构中单链 DNA 拷贝数成正相关,通过测序仪上的光学检测装置即可检测每个球状结构光强,从而测序的同时也可以计算 phi29DNA 聚合酶的酶活。这种实施方案巧妙地结合了滚环扩增、分子荧光技术和高通量光学测序技术,能够简便、快速、高灵敏性地实现聚合酶活定量,并具有高通量、自动化的特点。

[0031] 以下通过具体实施例详细描述本发明。实施例中所描述的实验流程仅用于证明本发明的方法的可行性,本发明方法的应用并不仅限于此。实施例中所提及的实验操作,如无特殊说明,均为常规实验方法;所提及的试剂耗材,如无特殊说明,均为常规试剂耗材。

[0032] 实施例 1:荧光法测定 phi29DNA 聚合酶聚合活性方法的建立

[0033] 1、标准曲线建立

[0034] (1) 滚环扩增(RCA)反应

[0035] a) RCA 反应需要的材料如下:

[0036] 模板:M13 单链 DNA(ssDNA);

[0037] 扩增引物:5'-aagccatccgcaaaaatgacctct-3'(SEQ ID NO:1);

[0038] 聚合酶:Phi29DNA polymerase(Enzymatics 公司)。

[0039] b) RCA 反应操作步骤:

[0040] i. 配制引物模板杂交反应混合液,反应体系如表 1(可根据实际情况同理调整),将反应混合液置于 PCR 仪进行引物模板 95°C 杂交 3-5 分钟。

[0041] 表 1 引物模板杂交反应混合液参考体系

[0042]

组分	用量
M13 单链 DNA	1.5 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O 水	83.3 $\mu$ L
10 $\times$ phi29buffer	10 $\mu$ L
扩增引物 oligo(5 $\mu$ M)	0.2 $\mu$ L
dNTP(25mM)	4 $\mu$ L

[0043] ii. 将 Phi29DNA polymerase 加入上述反应混合液,稀释至不同的酶浓度梯度,参考酶梯度设置如表 2(可根据实际情况同理调整)。

[0044] 表 2 参考 Phi29DNA 聚合酶浓度梯度

[0045]

管号	1	2	3	4	5	6
酶浓度 (U/ $\mu$ L)	20	10	5	2.5	1.25	0.625

[0046] 将各浓度梯度的反应混合液置于 PCR 仪上进行 RCA 反应,室温反应 30 分钟后加入 EDTA 终止反应。反应时间可根据实际情况调整 10min-1h。

[0047] (2) Qubit 检测产物浓度

[0048] 将各产物根据需要做一定稀释后,用 Qubit ssDNA assay kit 定量,结果如表 3 所示。

[0049] 表 3 不同酶量 RCA 后 Qubit 定量结果

[0050]

管号	1	2	3	4	5	6
酶浓度 (U/ $\mu$ L)	20	10	5	2.5	1.25	0.625
单链 DNA 浓度 (ng/ $\mu$ L)	12.51	10.45	8.68	6.57	4.56	2.63

[0051] (3) 标准曲线绘制

[0052] 以酶用量 (U/ $\mu$ L) 为横轴,单链 DNA 浓度 (ng/ $\mu$ L) 为纵轴,绘制商品酶的标准曲

线（如图 2）。我们发现这些数据点能够很好地拟合出一条 S 型曲线 ( $R^2 > 0.999$ )，证明此方法做出的酶活标准曲线可信。得到的标准曲线方程  $y = 2.8519 \ln(x) + 3.966$ ，用于进一步验证已知商品酶活浓度。

[0053] 2、phi29DNA 聚合酶聚合活性测定

[0054] (1) RCA 反应

[0055] a) RCA 反应需要的材料如下：

[0056] 模板：M13 单链 DNA (ssDNA)

[0057] 扩增引物：5' -aagccatccgcaaaaatgacctct-3'

[0058] 聚合酶：Phi29DNA polymerase (NEB 公司)，不同于绘制标准曲线的聚合酶。

[0059] b) RCA 反应操作步骤：

[0060] 本实验实际与标准曲线实验同时进行，反应体系和操作流程相同。将待测商品酶 phi29DNA 聚合酶稀释至  $6U/\mu L$ ，再进行 RCA 反应。

[0061] (2) Qubit 检测产物浓度

[0062] 反应产物用 Qubit ssDNA assay kit 检测各体系单链 DNA 的浓度。根据商品酶标准曲线计算待测 phi29DNA 聚合酶的相对酶活。定量结果如表 4 所示。

[0063] 表 4 待测商品酶 Qubit 定量浓度

[0064]

管号	7
酶浓度 ( $U/\mu L$ )	NEB phi29 DNA 聚合酶按理论稀释至 $6U/\mu L$
ssDNA 浓度 ( $ng/\mu L$ )	9.11

[0065] 将此测定的浓度  $y = 9.11$ ，代入标准曲线方程  $y = 2.8519 \ln(x) + 3.966$  中，计算得到  $X = 6.072132$ ，此测定计算酶活浓度与 NEB 商品酶实际稀释的  $6U/\mu L$  一致性较高。

[0066] 实施例 2 RCA 产物基于纳米阵列光学测序平台的应用

[0067] 1、对于实施例 1 中所获得的 RCA 产物，取一定量的 RCA 产物进行 Qubit 检测浓度后，剩余的 RCA 产物，可以加入纳米阵列的芯片上面，使用高通量光学测序平台 BGI-1000 进行高通量测序。

[0068] 2、测序引物：与 RCA 反应的扩增引物互补。若实施例 1 中使用的为非 M13 单链 DNA，而是带有特定序列的环状单链 DNA，此处可用与已知特定序列相对应的序列作为测序引物。

[0069] 3、具体流程：待测样品预处理—待测样品上样—待测样品数据生成—待测样品数据处理—下游应用分析。

[0070] 4、应用：测序得到的数据，可以进行下游的数据分析和应用分析。

[0071] 以上内容是结合具体的实施方式对本发明所作的进一步详细说明，不能认定本发明的具体实施只局限于这些说明。对于本发明所属技术领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明构思的前提下，还可以做出若干简单推演或替换，都应当视为属于本发明的保护范围。

[0001]

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; 深圳华大基因研究院

&lt;120&gt; 一种测定 Phi29 DNA 聚合酶活性的方法和滚环测序方法

&lt;130&gt; 15I21438

&lt;160&gt; 1

&lt;170&gt; PatentIn version 3.3

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 扩增引物

&lt;400&gt; 1

aagccatccg caaaaatgac ctct

24



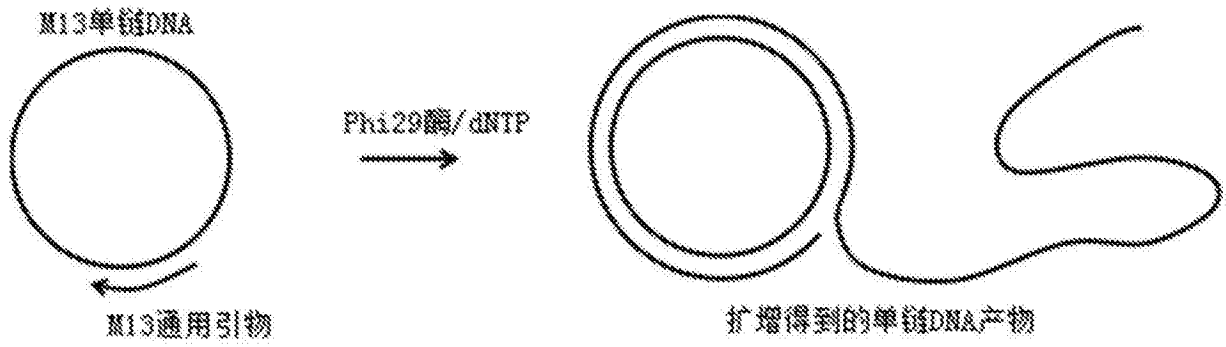


图 1

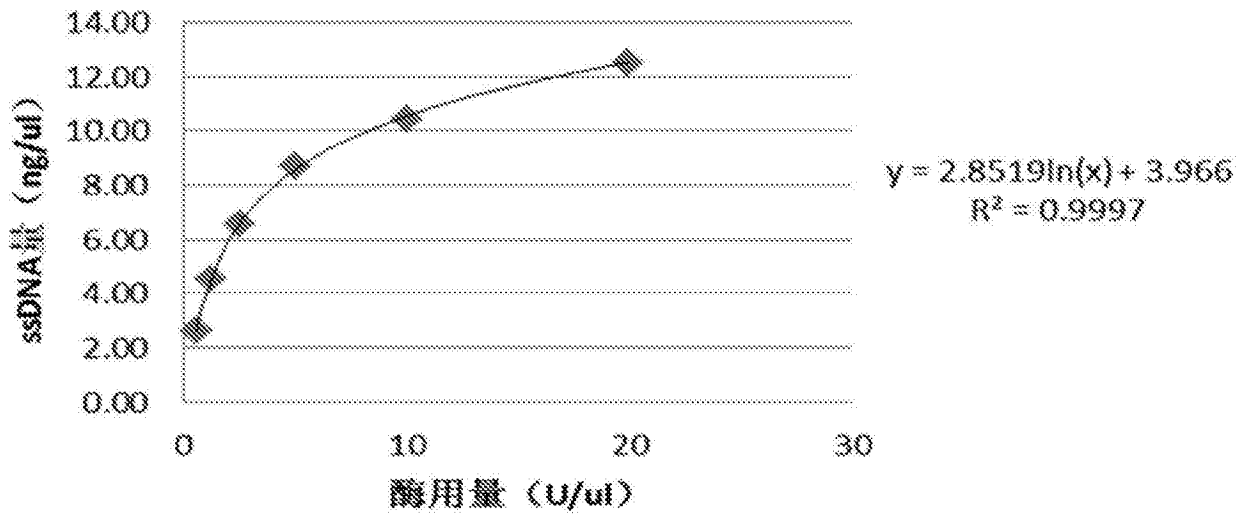


图 2