



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103080337 B

(45)授权公告日 2016.08.17

(21)申请号 201180038378.5

(22)申请日 2011.08.04

(30)优先权数据

1013153.0 2010.08.04 GB

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2013.02.04

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2011/001175 2011.08.04

(87)PCT国际申请的公布数据

W02012/017210 EN 2012.02.09

(73)专利权人 触光基因学有限公司

地址 英国伦敦

(72)发明人 尼尔·波特 莉萨·卡普罗尼

卡伦·奥利弗

金高·卡尔博夫尼采克

安格斯·奈特

(74)专利代理机构 北京康信知识产权代理有限

责任公司 11240

代理人 李丙林 张英

(51)Int.Cl.

C12Q 1/68(2006.01)

(56)对比文件

WO 0177384 A2, 2001.10.18, 说明书核苷酸和氨基酸序列SEQ-ID: 335741.

CN 101103122 A, 2008.01.09, 权利要求1, 6, 说明书第5页第3-8段, 第6页第1段.

CN 101103122 A, 2008.01.09, 权利要求1, 6, 说明书第5页第3-8段, 第6页第1段.

US 2003054392 A1, 2003.03.20, 全文.

Jochen Heinrich et al..Linear closed mini DNA generated by the prokaryotic cleaving-joining enzyme TelN is functional in mammalian cells.《Journal of Molecular Medicine》.2008,第80卷(第10期),第648-654页.

审查员 蔡放

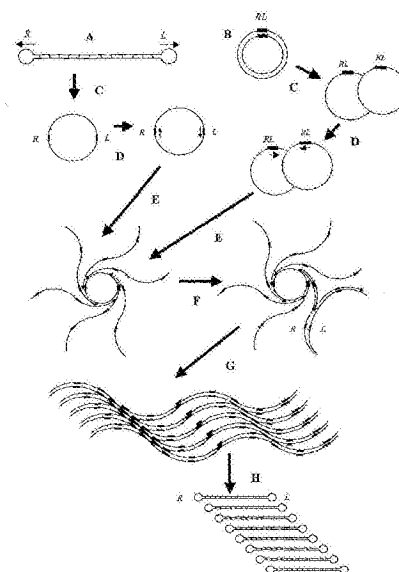
权利要求书3页 说明书32页 附图8页

(54)发明名称

利用回文序列生产闭合线性DNA

(57)摘要

一种引物,用于扩增包含原核端粒酶靶序列的DNA模板,特别用于生产闭合线性DNA,上述引物能够特异性地结合于原核端粒酶靶序列内的回文序列并引发在两个方向上的扩增。



1. 一种用于生产闭合线性脱氧核糖核酸(DNA)的体外无细胞方法,包括:

(a)在有至少一种引物存在的条件下、在促进模板的扩增的条件下,使包含至少一种原核端粒酶靶序列的DNA模板接触至少一种DNA聚合酶,其中所述至少一种引物能够特异性地结合于在所述至少一种原核端粒酶靶序列内的回文序列并且能够通过特异性地结合于所述模板的互补链的每一个而引发所述模板在两个方向上的扩增;以及

(b)在促进闭合线性DNA的生产的条件下使在(a)中产生的扩增DNA接触至少一种原核端粒酶。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中,在促进所述模板的扩增的条件下,温育所述DNA模板,所述模板的扩增是借助于复制链的替换并通过另一条链的链替换复制。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,所述DNA聚合酶是SEQ ID NO:2的phi29,和/或所述至少一种原核端粒酶是SEQ ID NO:15的噬菌体N15TelN。

4. 一种用于扩增脱氧核糖核酸(DNA)的体外无细胞方法,包括:

在有至少一种引物存在的条件下、在促进DNA模板的扩增的条件下,使包含至少一种原核端粒酶靶序列的所述DNA模板接触至少一种DNA聚合酶,所述模板的扩增是借助于复制链的替换并通过另一条链的链替换复制,其中所述至少一种引物能够特异性地结合于在所述至少一种原核端粒酶靶序列内的回文序列并且能够通过特异性地结合于所述模板的互补链的每一个而引发所述模板在两个方向上的扩增。

5. 根据权利要求1或4所述的方法,其中,通过滚环扩增(RCA)来进行所述模板的扩增。

6. 根据权利要求1或4所述的方法,其中,在有单种引物存在的条件下进行所述模板的扩增。

7. 根据权利要求1或4所述的方法,其中,所述引物由选自以下的序列组成:

SEQ ID NO:30 CACACAATWGYCCATTATACGC,

SEQ ID NO:31 GCGTATAATGGRCWATTGTGTG,

SEQ ID NO:32 GCGTATAATGG,

SEQ ID NO:33 CCATTATACGC,

SEQ ID NO:34 CACACAATWGYCCAT,

SEQ ID NO:35 ATGGRCWATTGTGTG,

SEQ ID NO:37 GCGTAGTATGCTGAAATAGGT,

SEQ ID NO:39 GTATAGTATGCCGATGTTACATATGG,或

SEQ ID NO:41 ATATAATWTTTWWTTAGTA;

其中,Y是T或C,W是A或T,以及R是A或G。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中,所述引物包含硫代磷酸酯键。

9. 根据权利要求1或4所述的方法,其中,所述扩增DNA包含多联体,所述多联体包含扩增自所述DNA模板的DNA序列的串联单元。

10. 根据权利要求9所述的方法,其中,通过所述原核端粒酶,所述多联体被分解为扩增DNA序列的单一单元。

11. 根据权利要求9所述的方法,其中,通过限制性内切核酸酶,所述多联体被分解为扩增DNA序列的单一单元。

12. 根据权利要求1或4所述的方法,其中所述DNA模板是闭合线性DNA。

13.一种引物,能够特异性地结合于在原核端粒酶靶序列内的回文序列并通过特异性地结合于模板的互补链的每一个而引发所述原核端粒酶靶序列在两个方向上的扩增,所述引物由选自以下的序列组成:

SEQ ID NO:30 CACACAATWGYCCATTATACGC,

SEQ ID NO:31 GCGTATAATGGRCWATTGTGTG,

SEQ ID NO:32 GCGTATAATGG,

SEQ ID NO:33 CCATTATACGC,

SEQ ID NO:34 CACACAATWGYCCAT,

SEQ ID NO:35 ATGGRCWATTGTGTG,

SEQ ID NO:37 GCGTAGTATGCTGAAATAGGT,

SEQ ID NO:39 GTATAGTATGCCGATGTTACATATGG,或

SEQ ID NO:41 ATATAATWTTTWWTTAGTA;

其中,Y是T或C,W是A或T,以及R是A或G,且其中,所述引物结合至闭合线性DNA模板的原核端粒酶靶序列内的回文序列。

14.根据权利要求13所述的引物,其包含硫代磷酸酯键。

15.一种引物,能够特异性地结合于在原核端粒酶靶序列内的回文序列并通过特异性地结合于模板的互补链的每一个而引发所述原核端粒酶靶序列在两个方向上的扩增,所述引物由选自以下的序列组成:

SEQ ID NO:30 CACACAATWGYCCATTATACGC,

SEQ ID NO:31 GCGTATAATGGRCWATTGTGTG,

SEQ ID NO:32 GCGTATAATGG,

SEQ ID NO:33 CCATTATACGC,

SEQ ID NO:34 CACACAATWGYCCAT,

SEQ ID NO:35 ATGGRCWATTGTGTG,

SEQ ID NO:37 GCGTAGTATGCTGAAATAGGT,

SEQ ID NO:39 GTATAGTATGCCGATGTTACATATGG,或

SEQ ID NO:41 ATATAATWTTTWWTTAGTA;

其中,Y是T或C,W是A或T,以及R是A或G。

16.根据权利要求15所述的引物,其包含硫代磷酸酯键。

17.一种试剂盒,包含至少一种根据权利要求15所述的引物,以及至少一种DNA聚合酶。

18.根据权利要求17所述的试剂盒,其中:

(a)所述DNA聚合酶是链替换型DNA聚合酶;和/或

(b)所述试剂盒进一步包括至少一种原核端粒酶。

19.根据权利要求17所述的试剂盒,其中,所述试剂盒进一步包括至少一种原核端粒酶,以及用于根据权利要求1至3或从属于权利要求1的权利要求5至10中任一项所述的方法的说明书。

20.一种试剂盒,包含至少一种权利要求15所述的引物和至少一种原核端粒酶。

21.一种用于制备包含闭合线性DNA分子的药物组合物的方法,所述方法包括实施根据权利要求1至3或从属于权利要求1的权利要求5至10中任一项所述的方法,以及配制产生的

所述闭合线性DNA和药用载体或赋形剂。

利用回文序列生产闭合线性DNA

技术领域

[0001] 本发明涉及一种回文引物,其用于扩增包含原核端粒酶(protelomerase)靶序列的脱氧核糖核酸(DNA)模板。

背景技术

[0002] 用于大批量扩增DNA的传统的基于细胞的过程是昂贵的。例如,细菌的使用需要它们大量地生长在昂贵的发酵罐中,其中上述发酵罐需要保持在无菌状态下以防止培养物的污染。还需要溶解细菌以释放扩增DNA并且DNA需要被清洗和纯化自其它细菌成分。尤其是,在产生DNA疫苗或其它治疗性DNA剂的情况下,需要高纯度以消除对哺乳动物具有毒性的内毒素的存在。

[0003] 除成本问题以外,在许多情况下,细菌的使用可以面临扩增过程的保真度的困难。在细菌细胞的复杂的生化环境中,难以控制所期望的DNA产物的质量和产量。细菌可以偶尔改变在扩增DNA内所需要的克隆的基因并且使它对于所需的目的是无用的。在感兴趣的DNA的忠实的生产中重组事件还可以产生问题。用于扩增DNA的无细胞酶促过程可以避免要求使用宿主细胞,因此是有利的。

[0004] 例如,药用DNA盒(cassette)的制造几乎完全依赖于它们插入细菌质粒以及它们在细菌发酵过程中的扩增。

[0005] 本领域方法的目前状态以多种方式限制了用于改善上述DNA药物的制造的机会。另外,质粒产物基本上是粗制DNA分子,因为它包含其药用功能不需要的核苷酸序列。因此,在DNA产物(如DNA药物)的生产领域中,需要提供用于大批量扩增DNA的改善的方法。尤其是,需要提供用于扩增DNA的特定形式(如闭合线性DNA)的改善的方法。闭合线性DNA分子可以特别用于治疗性应用,因为相比于DNA的其它形式它们具有改善的稳定性和安全性。

发明内容

[0006] 本发明涉及使用至少单种引物来扩增DNA模板。上述引物可以用于生产线性共价闭合DNA(闭合线性DNA)。模板DNA包含至少一种原核端粒酶靶序列。本发明的引物特异性地结合于在至少一个原核端粒酶靶序列内的回文序列并且能够引发在两个方向上的扩增。因此仅需要单种引物来引发每个模板。另外,和其它形式的引物相比,就扩增DNA产物的均匀性而言,可以获得好处。

[0007] 因此,本发明提供了:

[0008] 一种引物,其能够特异性地结合于在原核端粒酶靶序列内的回文序列并引发在两个方向上的扩增。

[0009] 用于生产闭合线性脱氧核糖核酸(DNA)的体外无细胞方法包括:

[0010] (a)在有至少一种引物存在的条件下并在促进所述模板的扩增的条件下,使包含至少一种原核端粒酶靶序列的DNA模板接触至少一种DNA聚合酶,其中至少一种引物能够特异性地结合于在至少一种原核端粒酶靶序列内的回文序列并且能够引发在两个方向上的

扩增;以及

[0011] (b)在促进闭合线性DNA的生产的条件下,使在(a)中产生的扩增DNA接触至少一种原核端粒酶。

[0012] 用于扩增脱氧核糖核酸(DNA)的体外无细胞方法包括:

[0013] 在有至少一种引物存在的条件下并在促进所述模板的扩增的条件下,使包含至少一种原核端粒酶靶序列的DNA模板接触至少一种DNA聚合酶,其中所述模板的扩增是借助于复制链的替换(displacement)并通过另一条链的链替换复制(strand displacement replication),其中至少一种引物能够特异性地结合于在至少一种原核端粒酶靶序列内的回文序列并且能够引发在两个方向上的扩增。

[0014] 本发明进一步涉及试剂盒,其提供了在本发明的方法中必要的成分。因此,本发明提供了一种试剂盒,其包括至少一种按照本发明的引物和至少一种DNA聚合酶。试剂盒可以进一步包括至少一种原核端粒酶以及可选地用于扩增本发明的闭合线性DNA的方法的说明书。

附图说明

[0015] 图1:在噬菌体中线性共价闭合DNA的复制和原核端粒酶的作用。A.染色体外噬菌体线性共价闭合DNA的描述。*=端粒的回文序列的中心。R序列是L序列的反转回文重复。B.在宿主中噬菌体DNA的复制:气泡(bubble)表示DNA链复制。相对于R和L的互补链的合成导致相同的双链RL序列。C.通过原核端粒酶的作用所形成的产物。原核端粒酶结合于RL序列并切割和连接在回文序列的中心点处的相反链以改造端粒并完成原始线性共价闭合DNA的复制。

[0016] 图2:大肠杆菌噬菌体N15原核端粒酶(TelN)对环状双链DNA(包含其靶位点, telRL)的作用。TelRL是反转回文,其具有箭头所示的28bp右(telR)和左(telL)臂。下划线序列表示在telRL回文中的不完美(缺陷, imperfection)。中心22bp完美反转回文TelO是酶TelN的结合所需要的。TelN在其中点切割此22bp序列并连接互补链的末端以形成共价闭合末端。

[0017] 图3:在各种生物体中发现的原核端粒酶靶序列的比较。盒(框出)序列示出完美或不完美回文序列的程度。下划线示出在回文中的不完美。突出显示的碱基对序列对于所有原核端粒酶靶序列是共有的,这表明它们对原核端粒酶结合和作用的重要性。A. 大肠杆菌(*Escherichia coli*)噬菌体N15。B. 克雷伯氏菌(*Klebsiella*)噬菌体Phi K02。C. 耶尔森氏菌(*Yersinia*)噬菌体Py54。D. 盐单胞菌(*Halomonas*)噬菌体Phi HAP。E. 弧菌(*Vibrio*)噬菌体VP882。F. 伯氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*)质粒lpB31.16。盒序列示出每种噬菌体的完美或不完美回文序列的程度。G. 示出用于噬菌体原核端粒酶结合和作用的共有反向回文序列。这是22个碱基对完美的反向重复序列(在切割位点的每一侧11个碱基对)。共有序列源自保守的突出显示残基,其显示为A-E。示出保守碱基对以及它们在回文中的位置。虚线表示在序列组成中的柔性(灵活性),即,其中碱基可以是N(A、T、C或G)。

[0018] 图4:闭合线性DNA模板的扩增,上述模板包含端粒末端,其形成自原核端粒酶TelN的回文结合序列。单个特异性回文引物的实例,其可以结合于端粒末端以通过DNA聚合酶来起始DNA扩增。

[0019] 图5:环状双链DNA模板的扩增,上述模板包含原核端粒酶TelN(telRL)的反转回文结合序列。单一回文引物的实例,其可以在telRL位点处特异性地结合于两个互补DNA链以起始DNA扩增。

[0020] 图6:闭合线性DNA的体外制造的具体过程,其中利用单一特异性回文引物、和RCA链替换DNA聚合酶连同TelN原核端粒酶。

[0021] A. 闭合线性DNA模板。B. 环状双链DNA模板。R和L表示TelN原核端粒酶结合序列的右和左臂的DNA序列。C. 起始模板的变性以形成环形单链DNA。D. 单一特异性引物的结合。E-F. 通过RCA链替换DNA聚合酶,自单链DNA模板的滚环扩增(rolling circle amplification)。G. 长多联体(串联体,concatameric)双链DNA的形成,其包含通过原核端粒酶结合序列(RL)分离的扩增模板的单一单元。H. 接触对于RL序列特异的TelN原核端粒酶。原核端粒酶切割多联体DNA(在RL位点)并连接互补链以产生线性共价闭合DNA模板的扩增拷贝。

[0022] 图7.A. 在30℃下多联体DNA生产的速率,其中通过phi29 DNA聚合酶,来自4.3kb双链环形模板并利用随机六聚体和单一特异性引物序列SEQ ID 32、33、34和35。利用PicoGreen测定(Invitrogen)来量化扩增多联体DNA。x轴:时间(小时);y轴:DNA浓度,μg/ml。

[0023] DNA合成的初始速率:

[0024] ●随机六聚体引物(88μg/ml/hr)

[0025] ■SEQ ID NO 32(25μg/ml/hr)

[0026] ▲SEQ ID NO 33(10μg/ml/hr)

[0027] ▼SEQ ID NO 34(17.5μg/ml/hr)

[0028] ◆SEQ ID NO 35(11μg/ml/hr)

[0029] B. 在34℃下多联体DNA生产的速率,其中通过phi29 DNA聚合酶,来自4.3kb双链环形模板并利用随机六聚体和单一特异性引物序列SEQ ID 32和33。利用PicoGreen测定(Invitrogen)来量化扩增多联体DNA。x轴:时间(小时);y轴:DNA浓度,μg/ml。

[0030] DNA合成的初始速率:

[0031] ●随机六聚体引物(32.5μg/ml/hr)

[0032] ■SEQ ID NO 32(15μg/ml/hr)

[0033] ▲SEQ ID NO 33(5.2μg/ml/hr)

[0034] 图8.A:在30℃下在DNA的滚环扩增中在单一寡核苷酸引物和随机六聚体之间的比较。HindIII消化多联体DNA产物的电泳凝胶。泳道1-5示出在模板DNA扩增1小时以后的HindIII消化产物,泳道6-10示出在扩增2小时以后的HindIII消化产物,泳道11-15示出在扩增4小时以后的HindIII消化产物,以及泳道16-20示出在扩增6小时以后的HindIII消化产物。引发DNA扩增反应如下:泳道1、6、11、16(随机六聚体),泳道2、7、12、17(SEQ ID 32(11聚体)引物),泳道3、8、13、18(SEQ ID 33(11聚体)引物),泳道4、9、14、19(SEQ ID 34(15聚体)引物),以及泳道5、10、15、20(SEQ ID 35(15聚体)引物)。

[0035] 分离样品源自250ng多联体DNA的消化,除泳道2(125ng)、泳道3(48ng)、泳道4(90ng)、泳道5(70ng)、泳道8(100ng)、泳道9(200ng)和泳道10(131ng)以外。在箭头所示的每个泳道中清楚地看到4.3kb特定产物带。

[0036] B. 在34℃下在DNA的滚环扩增中在单一寡核苷酸引物和随机六聚体之间的比较。HindIII消化多联体DNA产物的电泳凝胶。泳道1至3示出在模板DNA扩增1小时以后的Hind III消化产物,泳道4至6示出在模板DNA扩增2小时以后的Hind III消化产物,泳道7至9示出在模板DNA扩增4小时以后的Hind III消化产物,泳道10至12示出在模板DNA扩增6小时以后的Hind III消化产物,以及泳道13至15示出在模板DNA扩增9小时以后的Hind III消化产物。引发DNA扩增反应如下:泳道1、4、7、10、13(随机六聚体),泳道2、5、8、11、14(SEQ ID 32(11聚体)引物),泳道3、6、9、12、15(SEQ ID 33(11聚体)引物)。分离样品源自250ng多联体DNA的消化,除泳道1(5ng)、泳道3(63ng)和泳道6(106ng)以外。在箭头所示的每个泳道中清楚地看到4.3kb特定产物带。

[0037] C. 在34℃下在DNA的滚环扩增中在单一寡核苷酸引物和随机六聚体之间的比较。原核端粒酶TelN消化多联体DNA产物的电泳凝胶。泳道1至3示出在以模板DNA扩增1小时后的TelN消化产物,泳道4至6示出在以模板DNA扩增2小时后的TelN消化产物,泳道7至9示出在以模板DNA扩增4小时后的TelN消化产物,泳道10至12示出在以模板DNA扩增6小时后的TelN消化产物,以及泳道13至15示出在以模板DNA扩增9小时后的TelN消化产物。引发DNA扩增反应如下:泳道1、4、7、10、13(随机六聚体),泳道2、5、8、11、14(SEQ ID 32(11聚体)引物),泳道3、6、9、12、15(SEQ ID 33(11聚体)引物)。分离样品源自250ng多联体DNA的消化,除泳道1(5ng)、泳道3(63ng)和泳道6(106ng)以外。在箭头所示的每个泳道中清楚地看到4.3kb特定产物带(在这种情况下为闭合线性DNA)。

[0038] 图9. 内切核酸酶消化扩增产物的密度测定迹线(densitometry trace)。箭头表示4.3kb特定产物。A. 泳道11至15的密度测定迹线,在图8A中的顶部至底部图片。B. 泳道10至12的密度测定迹线,在图8B中的顶部至底部图片。

[0039] 序列的描述

[0040] SEQ ID NO:1是芽孢杆菌噬菌体phi29 DNA聚合酶的核酸序列。

[0041] SEQ ID NO:2是由SEQ ID NO:1编码的芽孢杆菌噬菌体phi29 DNA聚合酶的氨基酸序列。

[0042] SEQ ID NO:3是Pyrococcus sp Deep Vent DNA聚合酶的氨基酸序列。

[0043] SEQ ID NO:4是嗜热脂肪芽孢杆菌(Bacillus stearothermophilus)DNA聚合酶I的核酸序列。

[0044] SEQ ID NO:5是由SEQ ID NO:4编码的嗜热脂肪芽孢杆菌DNA聚合酶I的氨基酸序列。

[0045] SEQ ID NO:6是盐单胞菌(Halomonas)噬菌体phiHAP-1原核端粒酶核酸序列的核酸序列。

[0046] SEQ ID NO:7是由SEQ ID NO:6编码的盐单胞菌噬菌体phiHAP-1原核端粒酶的氨基酸序列。

[0047] SEQ ID NO:8是耶尔森氏菌噬菌体PY54原核端粒酶的核酸序列。

[0048] SEQ ID NO:9是由SEQ ID NO:8编码的耶尔森氏菌噬菌体PY54原核端粒酶的氨基酸序列。

[0049] SEQ ID NO:10是克雷伯氏菌噬菌体phiK02原核端粒酶的核酸序列。

[0050] SEQ ID NO:11是由SEQ ID NO:10编码的克雷伯氏菌噬菌体phiK02原核端粒酶的

氨基酸序列。

[0051] SEQ ID NO:12是弧菌噬菌体VP882原核端粒酶的核酸序列。

[0052] SEQ ID NO:13是由SEQ ID NO:12编码的弧菌噬菌体VP882原核端粒酶的氨基酸序列。

[0053] SEQ ID NO:14是大肠杆菌噬菌体N15原核端粒酶(telN)和二次免疫阻抑蛋白(secondary immunity repressor)(cA)核酸序列的核酸序列。

[0054] SEQ ID NO:15是由SEQ ID NO:14编码的大肠杆菌噬菌体N15原核端粒酶(telN)的氨基酸序列。

[0055] SEQ ID NO:16是在噬菌体原核端粒酶靶序列中存在的完美的反向重复的共有核酸序列。

[0056] SEQ ID NO:17是来自大肠杆菌噬菌体N15和克雷伯氏菌噬菌体phiK02的22个碱基完美的反向重复核酸序列。

[0057] SEQ ID NO:18是来自耶尔森氏菌噬菌体PY54的22个碱基完美的反向重复核酸序列。

[0058] SEQ ID NO:19是来自盐单胞菌噬菌体phiHAP-1的22个碱基完美的反向重复核酸序列。

[0059] SEQ ID NO:20是来自弧菌噬菌体VP882的22个碱基完美的反向重复核酸序列。

[0060] SEQ ID NO:21是来自伯氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*)质粒lpB31.16的14个碱基完美的反向重复核酸序列。

[0061] SEQ ID NO:22是来自弧菌噬菌体VP882的24个碱基完美的反向重复核酸序列。

[0062] SEQ ID NO:23是来自耶尔森氏菌噬菌体PY54的42个碱基完美的反向重复核酸序列。

[0063] SEQ ID NO:24是来自盐单胞菌噬菌体phiHAP-1的90个碱基完美的反向重复核酸序列。

[0064] SEQ ID NO:25是来自大肠杆菌噬菌体N15的包含原核端粒酶靶序列的核酸序列。

[0065] SEQ ID NO:26是来自克雷伯氏菌噬菌体phiK02的包含原核端粒酶靶序列的核酸序列。

[0066] SEQ ID NO:27是来自耶尔森氏菌噬菌体PY54的包含原核端粒酶靶序列的核酸序列。

[0067] SEQ ID NO:28是来自弧菌噬菌体VP882的包含原核端粒酶靶序列的核酸序列。

[0068] SEQ ID NO:29是来自伯氏疏螺旋体质粒lpB31.16的包含原核端粒酶靶序列的核酸序列。

[0069] SEQ ID NO:30是按照本发明的引物的实例,其适合结合于SEQ ID NO:25的原核端粒酶靶序列。

[0070] SEQ ID NO:31是按照本发明的引物的实例,其适合结合于SEQ ID NO:25的原核端粒酶靶序列。

[0071] SEQ ID NO:32是按照本发明的引物的实例,其适合结合于SEQ ID NO:25或SEQ ID NO:26的原核端粒酶靶序列。

[0072] SEQ ID NO:33是按照本发明的引物的实例,其适合结合于SEQ ID NO:25或SEQ ID

NO:26的原核端粒酶靶序列。

[0073] SEQ ID NO:34是按照本发明的引物的实例,其适合结合于SEQ ID NO:25的原核端粒酶靶序列。

[0074] SEQ ID NO:35是按照本发明的引物的实例,其适合结合于SEQ ID NO:25的原核端粒酶靶序列。

[0075] SEQ ID NO:36是按照本发明的引物的实例,其适合结合于SEQ ID NO:27的原核端粒酶靶序列。

[0076] SEQ ID NO:37是按照本发明的引物的实例,其适合结合于SEQ ID NO:27的原核端粒酶靶序列。

[0077] SEQ ID NO:38是按照本发明的引物的实例,其适合结合于SEQ ID NO:28的原核端粒酶靶序列。

[0078] SEQ ID NO:39是按照本发明的引物的实例,其适合结合于SEQ ID NO:28的原核端粒酶靶序列。

[0079] SEQ ID NO:40是按照本发明的引物的实例,其适合结合于SEQ ID NO:29的原核端粒酶靶序列。

[0080] SEQ ID NO:41是按照本发明的引物的实例,其适合结合于SEQ ID NO:29的原核端粒酶靶序列。

具体实施方式

[0081] 本发明涉及用于扩增包含原核端粒酶靶序列的DNA模板的引物,通常用于闭合线性DNA分子的生产,利用所述引物的方法,以及包含所述引物的试剂盒。

[0082] 闭合线性DNA分子通常包含共价闭合末端,其还描述为发夹环,其中在互补DNA链之间不存在碱基配对。发夹环连接互补DNA链的末端。这种类型的结构通常形成在染色体的端粒末端以防止染色体DNA的损失或损害,其中通过在闭合结构中螯合(捕获,sequester)末端核苷酸。在本文描述的闭合线性DNA分子的实例中,发夹环侧接互补碱基配对的DNA链,从而形成“狗骨(doggy-bone)”形结构(如图1所示)。

[0083] 本发明的引物能够特异性地结合于回文序列,该回文序列是在包含在DNA模板内的原核端粒酶靶序列内。引物能够引发在两个方向上的扩增,所以对于每个模板仅需要一种引物分子。先前用于产生闭合线性DNA的方法已依赖于多个随机引物。虽然这可以提供多个独立的引发事件,因而高水平的扩增,但引物可以在编码序列内结合,因而不能完全扩增上述序列。本发明的引物与原核端粒酶靶序列的特异性结合可以确保模板的更多数量的完整拷贝。

[0084] 因此,利用本发明的引物有利地允许提供产物DNA的扩增拷贝的更均匀的群体,如与由本发明者获得的随机引物的比较数据所示。

[0085] 通常,本发明的引物结合或特异性地结合于仅一半的给定回文序列,以最大限度地减少引物内和引物间结合的发生。引物长度可能有所不同,例如长度为12、15、18、20、30或50个核苷酸。引物的长度可以为6至50、12至50、18至50、25至50或35至50个核苷酸,其覆盖一半的回文序列的全部或部分。可以延长引物的长度以补充在给定模板中在现有回文序列之外引入的另外的回文序列,从而改善原核端粒酶的结合和功能。引物可以是未标记的,

或可以包含一个或多个标记,例如放射性核素或荧光染料。引物还可以包含化学修饰核苷酸,通常使得引物具有相对于水解的改善的抗性。例如,引物可以优选包含一个或多个硫代磷酸酯键。

[0086] 可以将引物设计和制造的常规方法应用于能够特异性地结合于任何确定的原核端粒酶靶序列的引物的生产。通常可以基于温度考虑如在用于扩增步骤的温度下能够结合于模板,来选择引物长度/序列。

[0087] 最佳地,在其变性以后,本发明的引物有效结合于DNA模板以分离互补序列。在标准扩增方法中变性通常涉及高温“解链”步骤。因此,可以通过它的解链温度,或 T_m ,其是在其下双链核苷酸分离成单链的温度,来定义引物。

[0088] 本发明的方法采用上述引物来扩增包含原核端粒酶靶序列的模板的序列。上述方法可以包括在促进所述模板的扩增的条件下扩增模板DNA的单一步骤,其中借助于复制链的替换并通过另一条链的链替换复制。这有利地解决这样的问题,其涉及在用随机引物进行的链替换扩增反应中扩增产物DNA的不同的异质性。

[0089] 本发明的一种优选方法提供了闭合线性DNA分子的高通量生产,其中通过在一种过程中采用本发明的引物,上述过程结合DNA扩增的步骤和将扩增DNA转化成闭合线性DNA的另一步骤。

[0090] 在体外无细胞(cell-free)环境中进行本发明的方法,因此本发明的方法并不限于使用具有为细菌繁殖所必要的外源序列的DNA模板。如下文概述的,因此本发明的方法可以用来产生缺少有问题的载体序列的闭合线性DNA分子并且特别适用于治疗用途。

[0091] 闭合DNA分子具有作为治疗剂的特殊用途,即DNA药物,其可以用来体内表达基因产物。这是因为,它们的共价闭合结构可以防止酶如外切核酸酶的攻击,从而导致和具有暴露的DNA末端的“开放”DNA分子相比基因表达的增强的稳定性和寿命。当被引入宿主组织时,已证明线性双链开放式盒在基因表达方面是低效的。这已被归因于盒不稳定性,其起因于在细胞外间隙中外切核酸酶的作用。

[0092] 整合在共价闭合结构内的DNA末端还具有其它优点。DNA末端被阻止整合于基因组DNA,所以闭合线性DNA分子具有改善的安全性。另外,闭合线性结构可以防止在宿主细胞内DNA分子的多联体化(concatamerisation),因而可以以更加敏感的方式来调节基因产物的表达水平。本发明提供了用于生产闭合线性DNA分子的体外无细胞方法,其包括模板导向的DNA扩增、以及通过原核端粒酶对扩增DNA的特异性处理。

[0093] 通常,本发明的方法可以用于生产在宿主细胞中,尤其是在DNA疫苗中,用于体外表达的DNA。DNA疫苗通常编码感染性生物的DNA的修饰形式。将DNA疫苗给予主体,其中它们表达感染性生物的选定蛋白质,引发相对于上述蛋白质(其通常是保护性的)的免疫反应。在癌症免疫疗法中DNA疫苗还可以编码肿瘤抗原。

[0094] DNA疫苗可以包含编码抗原的核酸序列,用于治疗或预防若干病症,其包括但不限于癌症、变态反应、毒性和病原体感染,上述病原体例如但不限于真菌,病毒,包括人乳头瘤病毒(HPV)、HIV、HSV2/HSV1、流感病毒(A、B和C型)、脊髓灰质炎病毒、RSV病毒、鼻病毒(Rhinoviruse)、轮状病毒、甲型肝炎病毒、诺沃克病毒组、肠病毒、星状病毒、麻疹病毒、副流感病毒、腮腺炎病毒、水痘-带状疱疹病毒、巨细胞病毒、埃巴病毒、腺病毒、风疹病毒、人T细胞淋巴瘤I型病毒(HTLV-I)、乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)、丁型肝炎病毒、痘

苗病毒、马堡病毒和埃博拉病毒；细菌，包括结核分枝杆菌、衣原体属、淋病奈瑟氏菌、志贺氏菌属、沙门氏菌属、霍乱弧菌、苍白密螺旋体、假单胞菌属、百日咳博德特氏菌、布氏杆菌属、土拉热弗朗西丝菌、幽门螺杆菌、肾脏钩端螺旋体、嗜肺军团菌、鼠疫耶尔森菌、链球菌属(A和B型)、肺炎球菌属、脑膜炎球菌、流感嗜血杆菌(b型)、鼠弓形体、弯曲杆菌、粘膜炎莫拉菌、杜凡诺小体(Donovanosis)、和放线菌(Actinomycosis)；真菌病原体，包括念珠菌属(Candidiasis)和曲霉菌属(Aspergillosis)；寄生性病原体，包括绦虫属、吸虫、蛔虫、变形虫(Amoebiasis)、贾第鞭毛虫(Giardiasis)、隐孢子虫属、血吸虫属、卡氏肺囊虫、毛滴虫(Trichomoniasis)和旋毛虫(Trichinosis)。

[0095] DNA疫苗可以包含编码抗原的核酸序列，其是来自以下病毒科的成员：腺病毒科(包括例如人腺病毒)、疱疹病毒科(包括例如HSV-1、HSV-2、EBV、CMV和VZV)、乳多空病毒科(包括例如HPV)、痘病毒科(包括例如天花和牛痘)、细小病毒科(包括例如细小病毒B19)、呼肠孤病毒科(包括例如轮状病毒)、冠状病毒科(包括例如SARS)、黄病毒科(包括例如黄热病毒、西尼罗病毒、登革热病毒、丙型肝炎病毒和蜱传脑炎病毒)、小RNA病毒科(包括脊髓灰质炎病毒、鼻病毒、和甲型肝炎病毒)、披膜病毒科(包括例如风疹病毒)、丝状病毒科(包括例如马堡病毒和埃博拉病毒)、副粘病毒科(包括例如副流感病毒、呼吸道融合病毒、腮腺炎病毒和麻疹病毒)、弹状病毒科(包括例如狂犬病病毒)、布尼亚病毒科(包括例如汉坦病毒)、正粘病毒科(包括例如甲型、乙型和丙型流感病毒)、逆转录病毒科(包括例如HIV和HTLV)和肝DNA病毒科(hepadnaviridae)(包括例如乙型肝炎病毒)。

[0096] 抗原可以来自造成兽医疾病的原因的病原体并且尤其可以来自病毒病原体，包括，例如，呼肠孤病毒(如非洲马疫或蓝舌病病毒)和疱疹病毒(包括马疱疹病毒)。抗原可以是来自口蹄疫病毒、蜱传脑炎病毒、登革热病毒、SARS、西尼罗病毒和汉坦病毒的一种。抗原可以来自免疫缺陷病毒，并且可以，例如，来自SIV或猫免疫缺陷病毒。

[0097] 通过本发明的方法产生的DNA疫苗还可以包含编码肿瘤抗原的核酸序列。肿瘤相关抗原的实例包括但不限于癌症-睾丸抗原如MAGE家族的成员(MAGE 1、2、3等)，NY-ESO-1和SSX-2，分化抗原如酪氨酸酶、gp100、PSA、Her-2和CEA，突变的自体抗原和病毒肿瘤抗原如E6和/或E7(来自致癌HPV类型)。特定肿瘤抗原的另外的实例包括MART-1、Melan-A、p97、 β -HCG、GaINAc、MAGE-1、MAGE-2、MAGE-4、MAGE-12、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC18、CEA、DDC、P1A、EpCam、黑色素瘤抗原gp75、Hker 8、高分子量黑色素瘤抗原、K19、Tyr1、Tyr2、pMel 17基因家族的成员、c-Met、PSM(前列腺粘蛋白抗原)、PSMA(前列腺特异性膜抗原)、前列腺分泌蛋白、 α -胎儿蛋白、CA125、CA19.9、TAG-72、BRCA-1和BRCA-2抗原。

[0098] 另外，本发明的方法可以产生其它类型的治疗性DNA分子，例如，那些用于基因治疗的DNA分子。例如，上述DNA分子可以用来表达功能基因，其中主体患有由基因的功能失调性变体所引起的遗传病。上述疾病的实例包括迪谢内肌营养不良、囊性纤维化、戈谢病、和腺苷脱氨酶(ADA)缺乏症。其中基因治疗可以是有用的其它疾病包括炎症性疾病、自身免疫性疾病、慢性病和传染病，包括这样的疾病如AIDS、癌症、神经系统疾病、心血管疾病、高胆固醇血症(hypercholesterolemia)，各种血液疾病，其包括各种贫血、珠蛋白生成障碍性贫血、血友病、和气肿。为了治疗实体瘤，可能表达编码毒性肽的基因(即，化疗剂如蓖麻蛋白、白喉毒素和眼镜蛇毒素因子)、肿瘤抑制基因如p53，编码mRNA序列(其相对于转化癌基因是反义的)的基因、抗肿瘤肽如肿瘤坏死因子(TNF)和其它细胞因子、或转化癌基因的反式显性负

突变体(transdominant negative mutant)。

[0099] 还设想通过本发明的方法来生产其它类型的治疗性DNA分子。例如,按照本发明的方法,可以产生被转录成活性RNA形式的DNA分子,例如小干扰RNA(siRNA)。

[0100] 在涉及生产具有治疗效用的DNA分子的实施方式中,DNA模板将通常包含表达盒,其包含一种或多种启动子或增强子元件以及基因或其它编码序列(其编码感兴趣的mRNA或蛋白质)。在涉及产生用于基因治疗的DNA疫苗分子或DNA分子的特定实施方式中,DNA模板包含表达盒(表达框),其由可操作地连接于编码感兴趣的蛋白质的序列的真核启动子,和可选地增强子和/或真核转录终止序列组成。通常,DNA模板可以具有载体的形式,上述载体通常用来安放基因例如染色体外基因元件如质粒。

[0101] “启动子”是核苷酸序列,其起始和调节多核苷酸的转录。启动子可以包括诱导型启动子(其中通过分析物、辅因子、调节蛋白等来诱导可操作地连接于启动子的多核苷酸序列的表达)、阻抑型启动子(其中通过分析物、辅因子、调节蛋白等来抑制可操作地连接于启动子的多核苷酸序列的表达)、和组成型启动子。术语“启动子”或“控制元件”用来包括全长启动子区和这些区的功能(例如,控制转录或翻译)区段。

[0102] “可操作地连接的”是指元件的安排,其中如此描述的成分成一定构造以进行它们的常用功能。因此,当存在适当酶时,可操作地连接于核酸序列的给定启动子能够实施上述序列的表达。启动子不必相邻于上述序列,只要它引导其表达。因此,例如,在启动子序列和核酸序列之间,可以存在干预非翻译但转录序列,并且启动子序列仍可视为“可操作地连接”于编码序列。因此,术语“可操作地连接的”旨在涵盖启动子元件和感兴趣的DNA序列的任何间隔或定向,其允许在识别启动子元件以后通过转录复合体来引发感兴趣的DNA序列的转录。

[0103] 按照本发明,通过原核端粒酶作用于DNA来产生闭合线性DNA分子,其中上述DNA扩增自包含至少一种原核端粒酶靶序列的闭合线性DNA模板。

[0104] 原核端粒酶靶序列是任何DNA序列,其在DNA模板中的存在允许通过原核端粒酶的酶活性将它转化成闭合线性DNA。换句话说,原核端粒酶靶序列是双链DNA的切割和再连接(通过原核端粒酶)以形成共价闭合线性DNA所需要的。

[0105] 通常,原核端粒酶靶序列包含任何完美回文序列,即具有双重旋转对称的任何双链DNA序列,在本文中描述为完美的反向重复。如图3所示,来自各种中温噬菌体(mesophilic bacteriophage)的原核端粒酶靶序列、和细菌质粒都共享包含完美的反向重复的共同特点。完美的反向重复的长度是不同的,其取决于具体的生物体。在博氏疏螺旋体中,完美的反向重复的长度为14个碱基对。在各种中温噬菌体中,完美的反向重复的长度为22个或更多碱基对。另外,在一些情况下,例如,大肠杆菌N15,中心完美反转回文侧接反向重复序列,即形成较大不完美反转回文的一部分(参见图2和3;下划线碱基表示此处反向重复的对称性被打断)。

[0106] 如在本发明中使用的原核端粒酶靶序列优选包含长度为至少14个碱基对的双链回文(完美的反向重复)序列。优选的完美的反向重复序列包括SEQ ID NO:16至21的序列以及其变体。SEQ ID NO:16(NCATNNTANNCGNTANNATGN)是中温噬菌体完美的反向重复的22个碱基的共有序列。如图3所示,完美的反向重复的碱基对在不同噬菌体之间的某些位置处是保守的,同时在其它位置处序列的柔性(灵活性、可变性,flexibility)则是可能的。因此,

在本发明的方法中,SEQ ID NO:16是和噬菌体原核端粒酶一起使用的完美的反向重复序列的最小共有序列。

[0107] 在由SEQ ID NO:16定义的共有序列内,SEQ ID NO:17(CCATTATACGCGCGTATAATGG)是和大肠杆菌噬菌体N15(SEQ ID NO:15)、和克雷伯氏菌噬菌体Phi K02(SEQ ID NO:11)原核端粒酶一起使用的特别优选的完美的反向重复序列。此外在由SEQ ID NO:16定义的共有序列内,SEQ ID NO:18至20:

[0108] SEQ ID NO:18(GCATACTACGCGCGTAGTATGC),

[0109] SEQ ID NO:19(CCATACTATACGTATAGTATGG),

[0110] SEQ ID NO:20(GCATACTATACGTATAGTATGC),

[0111] 是分别和耶尔森氏菌噬菌体PY54原核端粒酶(SEQ ID NO:9)、盐单胞菌噬菌体phiHAP-1原核端粒酶(SEQ ID NO:7)、和弧菌噬菌体VP882原核端粒酶(SEQ ID NO:13)一起使用的特别优选的完美的反向重复序列。SEQ ID NO:21(ATTATATATATAAT)是和博氏疏螺旋体原核端粒酶一起使用的特别优选的完美的反向重复序列。这种完美的反向重复序列是来自包含在博氏疏螺旋体中的线性共价闭合质粒,1pB31.16。这种14个碱基序列短于噬菌体的22bp共有完美的反向重复(SEQ ID NO:16),这表明,在特定的靶序列要求方面,细菌原核端粒酶可以不同于噬菌体原核端粒酶。然而,所有原核端粒酶靶序列均共享完美的反向重复的共同结构基序。

[0112] 完美的反向重复序列的长度可以大于22bp,其取决于在本发明的方法中所使用的特定原核端粒酶的要求。因此,在一些实施方式中,完美的反向重复的长度可以是至少30、至少40、至少60、至少80或至少100个碱基对。上述完美的反向重复序列的实例包括SEQ ID NO:22至24以及它们的变体。

[0113] SEQ ID NO:22(GGCATAC TATACGTAT AGTATGCC)

[0114] SEQ ID NO:23(ACCTATTTTCAGCATACTACGCGCGTAGTATGCTGAAATAGGT)

[0115] SEQ ID NO:24(CCTATATTGGGCCACCTATGTATGCACAGTTCGCCCATACGTATAGTATGG GCGAACTGTGCATACATAGGTGGCCCAATATAGG)

[0116] SEQ ID NO:22至24以及它们的变体特别优选分别和弧菌噬菌体VP882原核端粒酶(SEQ ID NO:13)、耶尔森氏菌噬菌体PY54原核端粒酶(SEQ ID NO:9)和盐单胞菌噬菌体phi HAP-1原核端粒酶(SEQ ID NO:7)一起使用。

[0117] 完美的反向重复可以侧接另外的反向重复序列。侧接反向重复可以是完美或不完美的重复,即可以是完全对称的或部分对称的。侧接反向重复可以相邻或者非相邻于中心回文。原核端粒酶靶序列可以包含不完美的反向重复序列,其包含长度为至少14个碱基对的完美的反向重复序列。一个实例是SEQ ID NO:29。上述不完美的反向重复序列可以包含长度为至少22个碱基对的完美的反向重复序列。一个实例是SEQ ID NO:25。

[0118] 特别优选的原核端粒酶靶序列包含SEQ ID NO:25至29的序列或其变体。

[0119] SEQ ID NO:25:(TATCAGCACACAATTGCCATTATACGCGCGTATAATGGACTATTGTGTGCTGAT A)

[0120] SEQ ID NO:26(ATGCGCGCATCCATTATACGCGCGTATAATGGCGATAATACA)

[0121] SEQ ID NO:27(TAGTCACCTATTTTCAGCATACTACGCGCGTAGTATGCTGAAATAGGTTACTG)

[0122] SEQ ID NO:28:(GGGATCCCGTTCCATACATACATGTATCCATGTGGCATACTATACGTATAGTATG

CCGATGTTACATATGGTATCATTCGGGATCCCGTT)

[0123] SEQ ID NO:29(TACTAAATAAATATTATATATATAATTTTTTATTAGTA)

[0124] 本发明的优选引物能够特异性地结合于SEQ ID No:25至29的任何一种序列。例如,本发明的优选引物可以包含或包括选自以下的序列:

[0125] SEQ ID NO:30CGCATATTACCT/CGA/TTAACACAC

[0126] SEQ ID NO:31GCGTATAATGGA/GCT/AATTGTGTG

[0127] SEQ ID NO:32GCGTATAATGG

[0128] SEQ ID NO:33CATTATACGC

[0129] SEQ ID NO:34CACACAATA/TGC/TCCAT

[0130] SEQ ID NO:35ATGGA/GCA/TATTGTGTG

[0131] SEQ ID NO:36CGCATCATACGACTTTATCCA

[0132] SEQ ID NO:37GCGTAGTATGCTGAAATAGGT

[0133] SEQ ID NO:38CATATCATACGGCTACAATGTATACC

[0134] SEQ ID NO:39GTATAGTATGCCGATGTTACATATGG

[0135] SEQ ID NO:40TATATTAA/TAAAA/TT/AAATCAT

[0136] SEQ ID NO:41ATATAATT/ATTTT/AA/TTTAGTA

[0137] SEQ ID NO.30至35的序列适用于特异性地结合于SEQ ID NO:25。在这些引物中,连同大肠杆菌噬菌体N15原核端粒酶识别序列一起,SEQ ID NO:32特别优选用于本发明的方法,这是因为研究表明,它在多于一个的退火温度下可以提供最好的DNA扩增速率。

[0138] SEQ ID NO.32和33的序列还适合于特异性地结合于SEQ ID NO:26。SEQ ID NO.36和37的序列适合于特异性地结合于SEQ ID NO:27。SEQ ID NO.38和39的序列适合于特异性地结合于SEQ ID NO:28。SEQ ID NO.40和41的序列适合于特异性地结合于SEQ ID NO:29。

[0139] SEQ ID NO:25至29的序列包含如上所述的完美的反向重复序列,并且另外包含来自有关生物体的侧接序列。包含SEQ ID NO:25的序列或其变体的原核端粒酶靶序列优选连同SEQ ID NO:15和其变体的大肠杆菌N15 Te1N原核端粒酶一起使用。包含SEQ ID NO:26的序列或其变体的原核端粒酶靶序列优选连同SEQ ID NO:11和其变体的克雷伯氏菌噬菌体Phi K02原核端粒酶一起使用。包含SEQ ID NO:27的序列或其变体的原核端粒酶靶序列优选连同SEQ ID NO:9和其变体的耶尔森氏菌噬菌体PY54原核端粒酶一起使用。包含SEQ ID NO:28的序列或其变体的原核端粒酶靶序列优选连同SEQ ID NO:13和其变体的弧菌噬菌体VP882原核端粒酶一起使用。包含SEQ ID NO:29的序列或其变体的原核端粒酶靶序列优选连同博氏疏螺旋体原核端粒酶一起使用。

[0140] 任何上述回文或原核端粒酶靶序列的变体包括其同源物或突变体。突变体包括相对于天然序列的截短、替代或缺失。变体序列是任何序列,其在DNA模板中的存在允许它转化成闭合线性DNA(通过原核端粒酶的酶活性)。这可以容易地通过使用用于闭合线性DNA的形成的适当测定来确定。可以使用在本领域中描述的任何适宜的测定。适宜测定的实例描述于Deneke et al,PNAS(2000)97,7721-7726。优选地,变体允许原核端粒酶结合和活性,其相当于对天然序列所观测到的原核端粒酶结合和活性。本文描述的回文序列的优选变体的实例包括截短的回文序列,其保存完美的重复结构,并且仍然能够允许闭合线性DNA的形成。然而,可以修饰变体原核端粒酶靶序列,以致它们不再保存完美的回文,条件是,它们能

够作为原核端粒酶活性的底物。

[0141] 应当理解的是,基于上面概述的原则,技术人员将能够容易地确定适宜的原核端粒酶靶序列并设计用于本发明的适当引物。利用上述测定,可以筛查候选原核端粒酶靶序列的促进闭合线性DNA的形成的能力。

[0142] DNA模板可以包含多于一种的原核端粒酶靶序列,例如,两种、三种、四种、五种、十种或更多种原核端粒酶靶序列。多个原核端粒酶靶序列的使用可以允许从较大DNA分子切除包含感兴趣的序列的短闭合线性DNA。尤其是,在DNA模板中,感兴趣的一个或多个序列可以在任一侧(即,5'和3')侧接原核端粒酶靶序列。然后两个侧接原核端粒酶序列可以介导从扩增DNA(作为闭合线性DNA)切除感兴趣的每个短序列(经受原核端粒酶的作用)。DNA模板可以包含一个或多个感兴趣的序列(优选表达盒),其在任一侧侧接原核端粒酶靶序列。DNA模板可以包含两种、三种、四种、五种或更多种感兴趣的序列,其侧接原核端粒酶靶序列(如上所述)。

[0143] 在一种优选实施方式中,本发明的方法使用包含表达盒的DNA模板,其中上述表达盒在任一侧侧接原核端粒酶靶序列。表达盒优选包含可操作地连接于感兴趣的编码序列的真核启动子,以及可选地真核转录终止序列。在此实施方式中,在扩增模板DNA、和接触按照本发明的原核端粒酶以后,从扩增模板释放表达盒作为闭合线性DNA。同时在模板DNA中除去不必要的序列作为产物的结果。

[0144] 上述不必要的或外源序列(还被描述为细菌或载体序列)可以包括细菌复制起点、细菌选择标记(例如抗生素抗性基因)、和未甲基化CpG二核苷酸。上述序列的缺失会产生“最小”表达盒,其并不包含外来遗传物质。另外,在一些治疗方法中,上述类型的细菌序列可能是有问题的。例如,在哺乳动物细胞内,细菌/质粒DNA可以引起克隆的基因发生关闭(switch off),以致不能实现感兴趣的蛋白质的持续表达。此外,在细菌繁殖中使用的抗生素抗性基因可以对人类健康造成风险。另外,细菌质粒/载体DNA可以触发不需要的非特异性免疫反应。细菌DNA序列的特异性特性,未甲基化胞嘧啶-鸟嘌呤二核苷酸的存在,通常被称为CpG基序,也可以导致不需要的免疫反应。

[0145] 在一些实施方式中,尤其是在闭合线性DNA产物是DNA疫苗的情况下,CpG基序可以被保留在产物的序列中。这是因为,它们可以对相对于编码蛋白的免疫反应具有有益的辅助效应。

[0146] 如上文所概述的,按照本发明的方法,可以扩增包含至少一种原核端粒酶靶序列的DNA模板。因此,虽然DNA疫苗和其它治疗性DNA分子的生产是优选的,但本发明的方法可以用来产生任何类型的闭合线性DNA。DNA模板可以是双链(ds)或单链(ss)DNA。双链DNA模板可以是开环双链DNA、闭环双链DNA、开放线性双链DNA或闭合线性双链DNA。优选地,模板是闭环双链DNA。和RCA DNA聚合酶一起使用,闭环dsDNA模板是特别优选的。环状dsDNA模板可以具有质粒或其它载体的形式,上述质粒或其它载体通常用来安放用于细菌繁殖的基因。因此,本发明的方法可以用来扩增任何市售质粒或其它载体,如市售DNA药物,然后将扩增的载体DNA转化成闭合线性DNA。

[0147] 开环dsDNA可以用作模板,其中DNA聚合酶是链替换聚合酶,其可以起始自带切口DNA链的扩增。在此实施方式中,可以用一种或多种酶预先温育模板,上述酶在一个或多个位点处切割(nick)在模板中的DNA链。

[0148] 闭合线性dsDNA也可以用作模板。在闭合线性DNA用作模板的情况下,它可以在变性条件下加以温育以在促进模板DNA的扩增的条件以前或期间形成单链环状DNA。闭合线性dsDNA模板(起始材料)可以相同于闭合线性DNA产物。因此,模板可以是闭合线性DNA,其本身是用于生产闭合线性DNA的体外无细胞方法的产物,例如依照本发明的方法。用于生产闭合线性DNA的方法通常可以包括:

[0149] (a)在有至少一种引物存在的条件下并在促进所述模板的扩增的条件下,使包含至少一种原核端粒酶靶序列的DNA模板接触至少一种DNA聚合酶;以及

[0150] (b)在促进闭合线性DNA的生产的条件下,使在(a)中产生的扩增DNA接触至少一种原核端粒酶。

[0151] 优选地,在步骤(a)中的至少一种引物是依照本发明的引物。即,上述至少一种引物能够特异性地结合于在至少一种原核端粒酶靶序列内的回文序列并且能够引发在两个方向上的扩增。

[0152] 换句话说,按照本发明的方法可以包括:

[0153] (a)在有一种或多种引物存在的条件下并在促进所述模板的扩增的条件下,使包含至少一种原核端粒酶靶序列的DNA模板接触至少一种DNA聚合酶;以及

[0154] (b)在促进闭合线性DNA的生产的条件下,使在(a)中产生的扩增DNA接触至少一种原核端粒酶;

[0155] (c)重复步骤(a),其中DNA模板是步骤(b)的闭合线性DNA产物;以及

[0156] (d)对在(c)中产生的扩增DNA重复步骤(b);以及可选地

[0157] (e)进行另一轮的步骤(c)和(d),其中用于步骤(c)的每个重复的模板包含步骤(d)的先前重复的产物。

[0158] 如将明了的,步骤(c)至(e)的加入可以提供循环反应,其中产物和模板是相同的,从而可以容易从少量的起始模板进行过程的扩大。

[0159] 优选地,在步骤(a)和(c)中的至少一种引物是依照本发明的引物。即,上述至少一种引物能够特异性地结合于在至少一种原核端粒酶靶序列内的回文序列并且能够引发在两个方向上的扩增。

[0160] 和相应的线性模板相比,闭合线性DNA模板通常在较窄的温度范围内解链(melt)和重退火(re-anneal),这是因为互补链彼此在每个末端相连,从而更容易重退火。因此,在上述较窄的温度范围内,本发明的优选引物以高亲和力结合于回文序列。温度范围通常为50℃至95℃。因此本发明的引物的T_m优选为45℃至60℃、55℃至70℃、65℃至80℃或75℃至95℃。

[0161] 如上文所概述的,DNA模板通常包含如上所述的表达盒,即,包含可操作地连接于编码感兴趣的蛋白质的序列的真核启动子,以及可选地真核转录终止序列,或由或基本上由它们组成。可选地,表达盒可以是如上文所定义的最小表达盒,即,缺少一种或多种细菌或载体序列,并且通常选自由(i)细菌复制起点、(ii)细菌选择标记(通常为抗生素抗性基因)和(iii)未甲基化CpG基序组成的组。

[0162] 可以通过本领域已知的任何方法并以足以用于上述方法的量来提供DNA模板。例如,可以通过聚合酶链反应(PCR)来产生DNA模板。在DNA模板是dsDNA的情况下,通过在至少94℃的温度下的预先温育,它可以提供用于扩增步骤作为变性单链。因此,本发明的方法优

选包括变性dsDNA模板以提供单链DNA的步骤。可替换地,可以以双链形式来提供dsDNA模板。在反应中可以扩增DNA模板的全部或选定部分。

[0163] 在促进所述模板的扩增的条件下使DNA模板接触至少一种DNA聚合酶。任何DNA聚合酶可以用于用来扩增本发明的闭合线性DNA的方法。任何市售DNA聚合酶适用于本发明的这种方法。可以使用两种、三种、四种、五种或更多种不同DNA聚合酶,例如,一种提供校对功能(proof reading function)的DNA聚合酶以及一种或多种并不提供校对功能的其它DNA聚合酶。可以使用具有不同机制的DNA聚合酶,例如链替换型聚合酶和通过其它方法来复制DNA的DNA聚合酶。并不具有链替换活性的DNA聚合酶的适宜实例是T4DNA聚合酶。

[0164] 优选的是,DNA聚合酶是高度稳定的,以致在过程条件下的长时间温育并不显著降低它的活性。因此,在一系列的处理条件(包括但不限于温度和pH)下酶优选具有长半衰期。还优选的是,DNA聚合酶具有适合于制造过程的一种或多种特性。DNA聚合酶优选具有高保真度,例如通过具有校对活性。另外,优选的是,DNA聚合酶显示高持续扩增能力(processivity)、高链替换活性以及对于dNTP和DNA的低 K_m 。优选的是,DNA聚合酶并不显示非特异性外切核酸酶活性。

[0165] 通过比较于由市售DNA聚合酶,例如phi 29、DeepVent®和嗜热脂肪芽胞杆菌(Bst)DNA聚合酶I,分别为SEQ ID NO:2、3和5,所显示的性能,技术人员可以确定给定DNA聚合酶是否显示如上文所定义的特性。Bst DNA聚合酶I市售自New England Biolabs, Inc.。在提及高持续扩增能力的情况下,这通常表示DNA聚合酶每次与模板结合/解离添加的核苷酸的平均数,即,获自单次结合事件的引物延伸的长度。

[0166] 链替换型聚合酶优选用于扩增本发明的闭合线性DNA的方法。链替换型聚合酶还用于本发明的DNA扩增的方法,其并不需要使用原核端粒酶。优选的链替换型聚合酶是Phi 29(SEQ ID NO:2)、Deep Vent®(SEQ ID NO:3)和Bst DNA聚合酶I(SEQ ID NO:5)或任何它们的变体。SEQ ID NO:2、3和5的变体可以如下文相对于原核端粒酶所定义。在本文中术语“链替换”用来描述在DNA合成期间在遇到双链DNA区以后DNA聚合酶替换互补链的能力。

[0167] 应当理解的是,链替换扩增方法不同于基于PCR的方法:对于有效的DNA扩增,变性循环并不是必需的,因为双链DNA不是新DNA链的持续合成的障碍。相比之下,PCR方法在扩增过程的每个循环中需要变性步骤(即,升高温度至94℃以上)以解链双链DNA并提供新的单链模板。

[0168] 在本发明的方法中使用的链替换DNA聚合酶优选具有至少20kb的持续扩增能力(引物延伸长度),更优选至少30kb,至少50kb,或至少70kb或更大。在特别优选的实施方案中,链替换DNA聚合酶具有相当于、或大于phi29 DNA聚合酶的持续扩增能力。

[0169] 优选的链替换复制方法是滚环扩增(RCA)。术语RCA描述RCA型DNA聚合酶(还在本文中称为RCA聚合酶)围绕环状DNA模板链不断行进同时延伸杂交引物的能力。这导致具有多个重复的扩增DNA的线性单链产物的形成。这些线性单链产物用作复合杂交(多重杂交, multiple hybridisation)、引物延伸和链替换事件的基础,从而导致多联体双链DNA产物的形成,其再次包含多个重复的扩增DNA。因此在多联体双链DNA产物中存在每种扩增“单一单元”DNA的多个拷贝。

[0170] RCA聚合酶特别优选用于本发明的方法。RCA型链替换复制方法的产物通常需要复杂的处理以释放单一单元DNA。有利地,按照本发明,原核端粒酶催化功能的使用便于以单

一步骤来进行上述处理。原核端粒酶的使用还直接产生所期望的闭合线性DNA结构而无需另外的处理步骤来形成具有这种结构的分子。

[0171] 在促进引物退火至DNA模板的条件下,使DNA模板接触DNA聚合酶和本发明的至少一种引物。上述条件包括存在单链DNA,其允许引物的杂交。上述条件还包括温度和缓冲液,其允许引物退火至模板。可以选择适当的退火/杂交条件,其取决于引物的特性。在本发明中使用的优选退火条件的一个实例包括缓冲液30mM Tris-HCl pH 7.5、20mM KCl、8mM MgCl₂。可以在变性以后通过高度受控逐渐冷却至所期望的反应温度来进行退火。典型的冷却速率(°C/分钟)是1.0至5.0,但优选为0.1至1.0、0.3至1.0、0.5至1.0或0.7至1.0。在冷却期间,可以将温度保持在冷却范围内的特定温度下1至10分钟以产生用于引物至模板退火过程的最佳温度分布。这有利于在模板本身复性以前允许引物与模板的最大结合。

[0172] 在用DNA聚合酶和一种或多种引物接触DNA模板以后,然后是在促进所述模板的扩增的条件下的温育步骤。优选地,上述条件促进所述模板的扩增,其中借助于复制链的替换并通过另一条链的链替换复制。上述条件包括使用允许DNA的扩增的任何温度,通常在20至90°C的范围内。优选的温度范围可以是约20至约40或约25至约35°C。

[0173] 通常,基于在其下特异性DNA聚合酶具有最佳活性的温度来选择适当的温度。这种信息是通常可获得的并且形成技术人员的一般知识的一部分。例如,在使用phi29 DNA聚合酶的情况下,合适的温度范围应是约25至约35°C,优选约30°C。技术人员将常规地能够确定用于按照本发明的方法的有效扩增的合适温度。例如,可以在温度范围内进行上述方法,并监测扩增DNA的产量以确定用于给定DNA聚合酶的最佳温度范围。

[0174] 促进DNA模板的扩增的其它条件包括DNA聚合酶和一种或多种引物的存在。上述条件还包括存在所有四种dNTP、ATP、TTP、CTP和GTP、合适的缓冲剂/pH以及酶的性能和稳定性所需要的其它因素。合适的条件包括用来为本领域已知的DNA聚合酶提供活性的任何条件。

[0175] 例如,pH可以为3至10,优选5至8或约7,如约7.5。可以通过使用一种或多种缓冲剂将pH保持在上述范围内。这样的缓冲剂包括但不限于MES、Bis-Tris、ADA、ACES、PIPES、MOBS、MOPS、MOPSO、Bis-Tris丙烷、BES、TES、HEPES、DIPSO、TAPSO、Trizma、HEPPSO、POPSO、TEA、EPPS、三羟甲基甘氨酸(Tricine)、Gly-Gly、N-二(羟乙基)甘氨酸(Bicine)、HEPBS、TAPS、AMPD、TABS、AMPSO、CHES、CAPSO、AMP、CAPS、CABS、磷酸盐、柠檬酸-磷酸氢二钠、柠檬酸-柠檬酸钠、乙酸钠-乙酸、咪唑和碳酸钠-碳酸氢钠。反应还可以包含二价金属的盐如但不限于镁(Mg²⁺)和锰(Mn²⁺)的盐,包括氯化物、乙酸盐和硫酸盐。还可以包括单价金属的盐,如钠盐和钾盐,例如氯化钾。可以包括的其它盐是铵盐,尤其是硫酸铵。

[0176] 还可以包括洗涤剂。合适的洗涤剂的实例包括Triton X-100、吐温20(Tween 20)以及它们的衍生物。在反应中还可以包括稳定剂。可以使用任何适宜的稳定剂,尤其是牛血清白蛋白(BSA)和其它稳定蛋白。还可以通过添加弛豫(relax)DNA和使得模板变性更容易的制剂来改善反应条件。上述制剂包括,例如,二甲亚砜(DMSO)、甲酰胺、甘油和甜菜碱。

[0177] 应当理解的是,基于他们的一般知识,技术人员能够改进和优化用于本发明的方法的扩增和温育条件。同样,可以基于本领域中的先前的实例来选择特定制剂的具体浓度并基于一般知识加以进一步优化。作为示例在本领域中在基于RCA的方法中使用的适宜的反应缓冲液是50mM Tris HCl, pH 7.5、10mM MgCl₂、20mM (NH₄)₂SO₄、5%甘油、0.2mM BSA、1mM dNTP。在本发明的RCA扩增中使用的优选的反应缓冲液是35mM Tris-HCl、50mM KCl、

14mM MgCl₂、10mM(NH₄)₂SO₄、4mM DTT、1mM dNTP。这种缓冲液特别适用于和phi29 RCA聚合酶一起使用。

[0178] 反应条件还可以包括使用一种或多种另外的蛋白质。可以在有至少一种焦磷酸酶如酵母无机焦磷酸酶存在的条件下扩增DNA模板。可以使用两种、三种、四种、五种或更多种不同焦磷酸酶。这些酶能够降解在链复制期间通过DNA聚合酶产生自dNTP的焦磷酸(pyrophosphate)。在反应中焦磷酸的积聚可以引起DNA聚合酶的抑制并降低DNA扩增的速度和效率。焦磷酸酶能够将焦磷酸分解为非抑制性磷酸(phosphate)。用于本发明的方法的适宜焦磷酸酶的一个实例是酿酒酵母焦磷酸酶,其可商业上获自New England Biolabs, Inc。

[0179] 在本发明的方法中可以使用任何单链结合蛋白(SSBP),以稳定单链DNA。SSBP是活细胞的必要组分并参与涉及ssDNA的所有过程,如DNA复制、修复和重组。在这些过程中,SSBP结合于瞬时形成的ssDNA并且可以帮助稳定ssDNA结构。用于本发明的方法的适宜SSBP的一个实例是T4基因32蛋白,其可商业上获自New England Biolabs, Inc.。

[0180] 除扩增步骤以外,本发明的用于扩增闭合线性DNA的方法还包括用于生产闭合线性DNA的处理步骤。在促进闭合线性DNA的生产的条件下使扩增DNA接触至少一种原核端粒酶。相对于用来生产闭合线性DNA分子的其它方法,这种基于原核端粒酶的简单的处理步骤是有利的。可以同时或一起进行扩增和处理步骤。然而,优选地,相继地进行扩增和处理步骤,并在扩增步骤(即对于扩增DNA)之后进行处理步骤。

[0181] 在本发明中使用的原核端粒酶是任何多肽,其能够剪切和再连接包含原核端粒酶靶位点的模板,以产生共价闭合线性DNA分子。因此,原核端粒酶具有DNA切割和连接功能。具有原核端粒酶型活性的酶也已被描述为端粒解离酶(telomere resolvase)(例如在博氏疏螺旋体中)。用于原核端粒酶的典型底物是环状双链DNA。如果此DNA包含原核端粒酶靶位点,则酶可以在此位点切割DNA并连接末端以产生线性双链共价闭合DNA分子。上文讨论了对原核端粒酶靶位点的要求。同样如上文概述的,可以利用在本领域中描述的任何适宜测定来确定给定多肽催化从包含原核端粒酶靶位点的模板来生产闭合线性DNA的能力。

[0182] 在噬菌体中已描述了原核端粒酶。在一些溶原性细菌中,噬菌体存在为染色体外DNA,其包含具有共价闭合末端的线性双链。这种DNA的复制和共价闭合末端(或端粒末端)的维持取决于酶,原核端粒酶,的活性。在病毒DNA的复制中原核端粒酶的作用示于图1。这种催化活性的一个实例由酶,Te1N,提供,上述酶来自噬菌体,N15,其感染大肠杆菌。Te1N识别在环状双链DNA中的特定核苷酸序列。这种序列是稍微不完美的反转回文结构,称作telRL,其包含两半,telR和telL,侧接22个碱基对反转完美的重复(tel0)(参见图2)。通过作用于线性噬菌体DNA的特定DNA聚合酶的初始活性,在环状双链DNA中形成了两个telRL位点。Te1N将这种环状DNA转化成两个相同的线性噬菌体DNA分子,从而完成复制周期。telR和telL包含线性噬菌体DNA的闭合末端,从而使DNA能够以相同方式进一步被复制。

[0183] 本发明的用于扩增闭合线性DNA的方法需要使用至少一种原核端粒酶。本发明的这种方法可以包括使用多于一种的原核端粒酶,如两种、三种、四种、五种或更多种不同的原核端粒酶。适宜原核端粒酶的实例包括那些来自噬菌体的原核端粒酶,如来自盐单胞菌碧绿(*Halomonas aquamarina*)的phiHAP-1(SEQ ID NO:7)、来自小肠结肠炎耶尔森氏菌(*Yersinia enterocolytica*)的PY54(SEQ ID NO:9)、来自产酸克雷伯氏菌(*Klebsiella*

oxytoca)的phiK02(SEQ ID NO:11)、来自弧菌属(*Vibrio* sp.)的VP882(SEQ ID NO:13)、和来自大肠杆菌的N15(SEQ ID NO:15)、或它们的变体。噬菌体N15原核端粒酶(SEQ ID NO:15)或其变体的使用是特别优选的。

[0184] SEQ ID NO:7、9、11、13和15的变体包括其同源物或突变体。突变体包括相对于天然序列的截短、替代或缺失。变体必须从如上所述的包含原核端粒酶靶位点的模板产生闭合线性DNA。

[0185] 本文提及的任何同源物通常是功能性同源物并且通常至少40%同源于天然蛋白的相关区。利用已知方法可以测量同源性。例如, UWGCG软件包提供BESTFIT程序,其可以用来计算同源性(例如使用其默认设置)(Devereux et al(1984)Nucleic Acids Research 12,387-395)。PILEUP和BLAST算法可以用来计算同源性或比对(line up)序列(通常基于它们的默认设置),例如如在Altschul S.F.(1993)J Mol Evol 36:290-300、Altschul, S, F et al(1990)J Mol Biol 215:403-10中所描述的。用于进行BLAST分析的软件可通过国家生物技术信息中心(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)公开获得。

[0186] BLAST算法对在两个序列之间的相似性进行统计分析;参见例如, Karlin and Altschul(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:5873-5787。由BLAST算法提供的相似性的一种度量是最小总和概率(smallest sum probability)(P(N)),其指示在两个核苷酸或氨基酸序列之间将偶然发生配对的概率。例如,在比较第一序列与第二序列时如果最小总和概率小于约1,优选小于约0.1,更优选小于约0.01,以及最优选小于约0.001,则认为序列类似于另一序列。

[0187] 变体多肽包含序列(或由其组成),其相对于天然蛋白具有至少40%同一性。在优选的实施方式中,相对于至少20,优选至少30,例如至少40、60、100、200、300、400或更多相邻氨基酸,或甚至相对于变体的整个序列,变体序列可以至少55%、65%、70%、75%、80%、85%、90%并且更优选至少95%、97%或99%同源于天然蛋白的特定区。可替换地,变体序列可以至少55%、65%、70%、75%、80%、85%、90%并且更优选至少95%、97%或99%同源于全长天然蛋白。通常,变体序列不同于天然蛋白的相关区至少、或少于2、5、10、20、40、50或60个突变(各自可以是替代、插入或缺失)。相对于全长天然蛋白的特定区,并越过上述序列的任何长度,本发明的变体序列可以具有百分比同一性,其相同于任何的特定百分比同源性值(即,它可以具有至少40%、55%、80%或90%并且更优选至少95%、97%或99%同一性)。

[0188] 天然蛋白的变体还包括截短体。可以使用任何截短体,只要变体仍然能够产生如上所述的闭合线性DNA。将通常进行截短以除去这样的序列,其对于催化活性是非必要的和/或并不影响折叠蛋白的构象,尤其是活性位点的折叠。还可以选择截短体以改善原核端粒酶多肽的可溶性。可以通过从N端或C端系统截短不同长度的序列来常规地确定适当的截短。

[0189] 天然蛋白的变体进一步包括突变体,相对于天然蛋白的特定区,其具有一个或多个,例如,2、3、4、5至10、10至20、20至40或更多氨基酸插入、替代或缺失。优选在催化区的外侧进行缺失和插入。通常在源自天然蛋白的序列的N端或C端进行插入,例如用于重组表达。还通常在对催化活性是非必要的和/或并不影响折叠蛋白的构象的区中进行替代。可以进行上述替代以改善酶的可溶性或其它特性。虽然一般不是优选的,但还可以在活性位点或

在第二范围(second sphere)(即,残基,其影响或接触在活性位点处的一个或多个氨基酸的位置或定向)进行替代。可以进行这些替代以改善催化性能。

[0190] 替代优选引入一种或多种保守变化,其用具有类似化学结构、类似化学性能或类似侧链体积的其它氨基酸替代氨基酸。引入的氨基酸可以具有与它们替代的氨基酸类似的极性、亲水性、疏水性、碱性、酸性、中性或电荷。可替换地,保守变化可以引入另一种芳族或脂族氨基酸来代替先前存在的芳族或脂族氨基酸。保守氨基酸变化是本领域中众所周知的并且可以按照如在表A中所定义的20种主要氨基酸的性能来选择。

[0191] 表A-氨基酸的化学性能

[0192]	Ala	脂族的, 疏水的, 中性的	Met	疏水的, 中性的
	Cys	极性的, 疏水的, 中性的	Asn	极性的, 亲水的, 中性的
	Asp	极性的, 亲水的, 带电荷的(-)	Pro	疏水的, 中性的
	Glu	极性的, 亲水的, 带电荷的(-)	Gln	极性的, 亲水的, 中性的
	Phe	芳族的, 疏水的, 中性的	Arg	极性的, 亲水的, 带电荷的(+)
	Gly	脂族的, 中性的	Ser	极性的, 亲水的, 中性的
	His	芳族的, 极性的, 亲水的, 带电荷的(+)	Thr	极性的, 亲水的, 中性的
	Ile	脂族的, 疏水的, 中性的	Val	脂族的, 疏水的, 中性的
	Lys	极性的, 亲水的, 带电荷的(+)	Trp	芳族的, 疏水的, 中性的
	Leu	脂族的, 疏水的, 中性的	Tyr	芳族的, 极性的, 疏水的

[0193] 特别优选的是,变体能够产生如上所述的闭合线性DNA,其具有相当于、或相同于天然蛋白的效率。

[0194] 如上文所概述的,优选的是,通过链替换DNA聚合酶,更优选RCA DNA聚合酶,来实施按照本发明的方法的DNA的扩增。在体外无细胞过程中RCA DNA聚合酶和原核端粒酶的结合允许在闭合线性DNA的生产中获得令人惊讶的效率和简单性。

[0195] 如上文所讨论的,在链替换反应中最初形成长线性单链DNA分子,其然后作为新模板,以致形成双链分子(图4)。双链分子包含一系列连续的串联单元的扩增DNA,其是通过链替换聚合酶(多联体)的持续作用所形成。这些多联体DNA产物包含扩增模板DNA的多个重复。因此,用本发明的方法产生的多联体包含扩增自DNA模板的序列的多个单元。多联体可以包含扩增序列的10、20、50、100、200、500或1000或更多单元,其取决于待扩增的单一单元的长度。多联体的大小可以是至少5kb、至少10kb、至少20kb,更优选至少30kb、至少50kb、或至少70kb或更大。

[0196] 在许多实施方式中,例如在DNA药物的生产中,扩增DNA将需要用作单一单元。因此,上述多联体需要处理以释放扩增DNA的单一单元。为了将这种多联体DNA转化成扩增DNA的单一单元,则需要精确切割并需要再连接配对链的末端。

[0197] 按照本发明,这可以通过将限制性内切核酸酶位点加入DNA模板来完成。因此,可以用多联体温育限制性内切核酸酶以在它们的识别位点进行切割并释放单一单元。然后可

以用DNA连接酶温育通过限制性内切核酸酶的作用形成的开放线性双链DNA,以共价关闭单一单元DNA。可以使用技术人员已知的任何适宜的限制性内切核酸酶。例如,适宜的限制性内切核酸酶包括HindIII、EcoRI、NdeI、XmnI、PvuI、BsaI、BciVI和AlwNI或任何其它模板相容的单位点特异性酶。和限制性内切核酸酶和DNA连接酶一起使用的合适条件是本领域技术人员已知的。

[0198] 按照本发明,然而优选通过使用单一酶,原核端粒酶,来将多联体DNA处理成闭合线性单一单元DNA。这表示用于产生闭合线性DNA分子的方法的有利的简单性和经济性。首先,通过借助于单一酶的温育来实现单一单元的切割和再连接。其次,还释放具有所期望的闭合线性结构的单一单元,所以不需要另外的处理步骤来产生这种结构(即,自共价闭环单一单元DNA)。

[0199] 因此,在促进闭合线性DNA的生产的条件下,优选借助于至少一种原核端粒酶来温育扩增自DNA模板的DNA。换句话说,上述条件促进包含原核端粒酶靶序列的双链DNA的切割和再连接以形成具有发夹末端的共价闭合线性DNA。促进闭合线性DNA的生产的条件包括使用允许生产闭合线性DNA的任何温度,通常为20至90℃。上述温度可以优选为25至40℃,如约25至约35℃,或约30℃。可以按照上文相对于针对DNA聚合酶的温度条件概述的原则来选择用于特定原核端粒酶的适当温度。和SEQ ID NO:15的大肠杆菌噬菌体Te1N原核端粒酶一起使用的合适温度是约25至约35℃,如约30℃。

[0200] 促进闭合线性DNA的生产的条件还包括存在原核端粒酶和合适的缓冲剂/pH以及为获得酶的性能和稳定性所需要的其它因素。合适的条件包括任何条件,其用来提供本领域已知的原核端粒酶的活性。例如,在使用大肠杆菌噬菌体Te1N原核端粒酶的情况下,适宜的缓冲液可以是20mM TrisHCl,pH 7.6;5mM CaCl₂;50mM谷氨酸钾;0.1mM EDTA;1mM二硫苏糖醇(DTT)。用来保持最佳活性和稳定性的制剂和条件还可以选自针对DNA聚合酶所列的那些制剂和条件。

[0201] 在一些实施方式中,用于原核端粒酶的活性的条件可以使用如用于DNA扩增的相同条件。尤其是,在同时或一起进行DNA扩增和处理(通过原核端粒酶)的情况下,描述了相同条件的使用。在其它实施方式中,可能需要改变反应条件,其中用来提供最佳的DNA聚合酶活性的条件导致次优的原核端粒酶活性。可以通过过滤、透析和本领域中已知的其它方法来除去在反应条件中的特定的制剂和变化。技术人员将容易地能够确定允许最佳的DNA聚合酶活性和/或原核端粒酶活性的条件。

[0202] 在一种特别优选的实施方式中,为了用于通过RCA DNA聚合酶,优选phi29,来扩增DNA,在25至35℃的温度下,如约30℃,并在缓冲条件下进行DNA扩增,其中上述缓冲条件基本上相同于或基本上由35mM Tris-HCl、50mM KCl、14mM MgCl₂、10mM(NH₄)₂SO₄、4mM DTT、1mM dNTP组成。然后在25至35℃的温度下,如约30℃,可以优选连同Te1N一起进行借助于原核端粒酶的处理步骤,和/或优选在缓冲条件下进行,其中上述缓冲条件基本上相同于或基本上由20mM TrisHCl、pH 7.6;5mM CaCl₂;50mM谷氨酸钾;0.1mM EDTA;1mM二硫苏糖醇(DTT)组成。

[0203] 可以重组产生(例如在细菌中)用于本发明的方法的所有酶和蛋白质。可以使用技术人员已知的允许重组表达的任何方式。可以将包含编码感兴趣的蛋白质的核酸序列的质粒或其它形式的表达载体引入细菌,以致它们表达编码蛋白。例如,为了SEQ ID NO:2、5、7、

9、11、13或15的表达,载体可以分别包含SEQ ID NO:1、4、6、8、10、12或14的序列。然后通常将纯化表达蛋白,例如通过使用亲和标记物,其具有足够量并具有适用于本发明的方法的形式。对于技术人员,基于他们的一般知识,用于重组蛋白生产的上述方法通常是可获得的。上述讨论适用于提供本文所讨论的任何蛋白质。

[0204] 在接触原核端粒酶或其它酶以前,可以纯化通过接触DNA模板和DNA聚合酶所获得的扩增DNA。因此,本发明的方法可以进一步包括纯化扩增自DNA模板的DNA的步骤。然而,在一种优选实施方式中,在接触原核端粒酶或其它酶以前,进行上述方法而没有纯化扩增的DNA。这意味着,通常在相同容器或溶液中,可以连续地进行扩增和处理步骤。在一些这样的实施方式中,上述方法涉及添加提供原核端粒酶活性的缓冲液,即以提供促进闭合线性DNA的形成的条件。类似地,在适用情况下,可以添加提供限制性内切核酸酶活性的缓冲液。

[0205] 在通过原核端粒酶的作用来生产闭合线性DNA以后,本发明的用于扩增闭合线性DNA的方法可以进一步包括纯化线性共价闭合DNA产物的步骤。类似地,也可以纯化按照本发明的其它方法扩增的DNA。将通常进行上文提到的纯化以除去任何不想要的产物。可以通过本领域已知的任何适宜方式来进行纯化。例如,扩增DNA或线性共价闭合DNA的处理可以包括苯酚/氯仿核酸纯化或使用选择性地结合核酸的柱,如那些市售自Qiagen的柱。技术人员可以常规地确定用于扩增DNA的分离的适宜的纯化技术。

[0206] 在以足够量产生和纯化按照本发明产生的线性共价闭合DNA或另一种形式的DNA以后,本发明的方法可以进一步包括它的制剂作为DNA组合物,例如治疗性DNA组合物。治疗性DNA组合物将包含上文提到的类型的治疗性DNA分子。这样的组合物将包含治疗有效量的DNA,其具有适合于通过所期望的途径来给予的形式,例如,气雾剂、可注射组合物或适合于口服、粘膜或局部给予的剂型。

[0207] 可以利用本领域技术人员可获得的标准的药物配制化学和方法来将DNA配制为常规药物制剂。可以使用任何药用载体或赋形剂。在赋形剂或载体中可以存在辅助物质,如润湿剂或乳化剂、pH缓冲物质等。这些赋形剂、载体和辅助物质通常是这样的药剂,其可以被给予而没有过度毒性并且在疫苗组合物的情况下其将不会在接受组合物的个体中诱导免疫反应。一种适宜载体可以是脂质体。

[0208] 药用赋形剂包括但不限于液体如水、盐水、聚乙二醇、透明质酸、甘油和乙醇。其中还可以包括药用盐,例如,无机酸盐如盐酸盐、氢溴酸盐、磷酸盐、硫酸盐等;以及有机酸的盐如乙酸盐、丙酸盐、丙二酸盐、苯甲酸盐等。还优选的是,虽然不是必需的,制剂将包含药用赋形剂,其作为稳定剂,尤其用于肽、蛋白质或其它类似分子(如果它们包括在组合物中)。还作为肽的稳定剂的适宜载体的实例包括但不限于医药级葡萄糖、蔗糖、乳糖、海藻糖、甘露醇、山梨醇、肌醇、右旋糖酐(葡聚糖)等。其它适宜载体包括但不限于淀粉、纤维素、磷酸钠或磷酸钙、柠檬酸、酒石酸、甘氨酸、高分子量聚乙二醇(PEG)、以及它们的组合。药用赋形剂、载体和辅助物质的充分讨论可参见REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES(Mack Pub.Co., N.J. 1991),其以引用方式结合于本文。

[0209] 在体外无细胞环境中进行本发明的方法。因此,上述方法是在不存在宿主细胞的情况下进行并且通常包括使用纯化的酶成分。因此,模板DNA的扩增,包括通过原核端粒酶或其它酶的处理(在适用情况下),通常是在适宜容器中的溶液中通过接触反应成分来进行。可选地,可以以固定形式(如附着于固体载体)来提供特定成分。

[0210] 应当理解的是,可以在任何规模下进行本发明的方法。然而,优选的是,进行上述方法以在商业或工业规模上扩增DNA,即产生毫克或更大量的扩增DNA。优选的是,上述方法产生至少1毫克、至少10毫克、至少20毫克、至少50毫克或至少100毫克的扩增DNA。在用于扩增本发明的闭合线性DNA的方法中,还可以优选以毫克或更大量来产生源自扩增DNA的最终闭合线性DNA产物。优选的是,上述方法产生至少1毫克、至少2毫克、至少5毫克、至少10毫克、至少20毫克、至少50毫克、或至少100毫克的闭合线性DNA。

[0211] 本发明进一步提供了试剂盒,其包括为进行本发明的方法所需要的成分。这种试剂盒包括至少一种按照本发明的引物和至少一种DNA聚合酶。优选地,DNA聚合酶是链替换型DNA聚合酶。试剂盒可以进一步包括至少一种原核端粒酶和可选地用于扩增如本文描述的闭合线性DNA的方法的说明书。

[0212] 试剂盒可以包含两种、三种、四种、五种或更多种不同DNA聚合酶。优选地,试剂盒包括至少1种链替换型DNA聚合酶,还更优选RCA DNA聚合酶。特别优选的是,试剂盒包括phi29 DNA聚合酶(SEQ ID NO:2)、Deep Vent® DNA聚合酶(SEQ ID NO:3)或Bst 1DNA聚合酶(SEQ ID NO:5)或它们的变体。在一些实施方式中,还可以包括通过其它方法来复制DNA的DNA聚合酶。

[0213] 试剂盒优选包括至少一种原核端粒酶。试剂盒可以包括两种、三种、四种或更多种不同原核端粒酶。原核端粒酶可以选自SEQ ID NO:5、7、9、11、13或15的任何一种或它们的变体。特别优选的是,试剂盒包含大肠杆菌N15 TelN(SEQ ID NO:15)或其变体。

[0214] 试剂盒可以包含限制性内切核酸酶,如上述的那些限制性内切核酸酶,并优选连同链替换型DNA聚合酶一起。

[0215] 试剂盒可以优选包含至少一种引物,其包含或由选自以下的序列组成:

[0216] SEQ ID NO:30 CGCATATTACCT/CGA/TTAACACAC

[0217] SEQ ID NO:31 GCGTATAATGGA/GCT/AATTGTGTG

[0218] SEQ ID NO:32 GCGTATAATGG

[0219] SEQ ID NO:33 CCATTATACGC

[0220] SEQ ID NO:34 CACACAATA/TGC/TCCAT

[0221] SEQ ID NO:35 ATGGA/GCA/TATTGTGTG

[0222] SEQ ID NO:36 CGCATCATACGACTTTATCCA

[0223] SEQ ID NO:37 GCGTAGTATGCTGAAATAGGT

[0224] SEQ ID NO:38 CATATCATACGGCTACAATGTATACC

[0225] SEQ ID NO:39 GTATAGTATGCCGATGTTACATATGG

[0226] SEQ ID NO:40 TATATTAA/TAAAA/TT/AAATCAT

[0227] SEQ ID NO:41 ATATAATT/ATTTT/AA/TTTAGTA

[0228] 试剂盒还可以包含至少一种单链结合蛋白(SSBP)。优选的SSBP是T4基因32蛋白,其可商业上获自New England Biolabs,Inc.。在试剂盒中可以包括两种、三种、四种或更多种不同SSBP。试剂盒可以进一步包括焦磷酸酶。优选的焦磷酸酶是酿酒酵母焦磷酸酶,其可商业上获自New England Biolabs,Inc.。在一些实施方式中,可以包括两种、三种、四种、五种或更多种不同焦磷酸酶。试剂盒可以包含本文描述的任何DNA聚合酶、原核端粒酶、限制性内切核酸酶、SSBP或焦磷酸酶。试剂盒还可以包括dNTP、合适的缓冲液和为获得如上所述

的DNA聚合酶和/或原核端粒酶酶的性能或稳定性所需要的其它因素。

[0229] 实施例

[0230] 实施例1

[0231] 闭合线性DNA自双链环状DNA模板的生产

[0232] 包含原核端粒酶TelN结合序列的双链环状DNA用作DNA模板。互补于回文序列(其包含原核端粒酶TelN结合位点)的一半的一部分的单回文寡核苷酸用来特异性地引发两种链。适宜引物的实例包括SEQ ID NO.30至35。在包含,例如,30mM Tris-HCl pH 7.5、20mM KCl、2.5mM MgCl₂的退火/变性缓冲液中进行双链环形模板的变性和单引物的退火。通过加热至95℃并保持在此温度下1至10分钟来进行变性,接着小心控制冷却分布(cooling profile),以优化特异性引物与模板的最大结合。然后降低温度至通过适宜DNA聚合酶进行DNA扩增的最佳温度。适宜的酶是分离自枯草杆菌噬菌体phi29的phi29,其在30℃下最佳地进行工作。

[0233] 然后将适当容积的包含酶phi29和PPi(酵母无机焦磷酸酶)的反应缓冲液加入退火DNA/引物反应。在约30℃下温育反应混合物5至20小时或更长时间。适宜的反应缓冲液通常包含35mM Tris-HCl、50mM KCl、2.5mM MgCl₂、10mM(NH₄)₂SO₄、4mM DTT、1mM dNTP。

[0234] 然后在30℃下用原核端粒酶TelN在适宜缓冲液中如10mM Tris HCl pH 7.6、5mM CaCl₂、50mM谷氨酸钾、0.1mM EDTA、1mM DTT,温育通过RCA扩增的多联体DNA,直至反应完成。可以,例如,通过凝胶电泳或适宜的层析法(取决于待纯化的量)来纯化产生的闭合线性DNA产物。

[0235] 实施例2

[0236] 闭合线性DNA自闭合线性DNA模板的生产

[0237] 包含端粒末端的闭合线性DNA(包含原核端粒酶TelN的结合序列)用作DNA模板。互补于回文序列(其包含模板的端粒末端)的一半的一部分的单回文寡核苷酸用作特异性引物。该引物结合于在DNA模板上的两个相同的位点。适宜引物的实例包括SEQ ID NO.30至35。

[0238] 在包含,例如,30mM Tris-HCl pH 7.5、20mM KCl、2.5mM MgCl₂的退火/变性缓冲液中进行闭合线性DNA模板的变性和单引物的退火。通过加热95℃1分钟并保持在此温度下1至10分钟来进行变性,接着小心控制冷却分布,以优化特异性引物与模板的最大结合。然后降低温度至通过适宜DNA聚合酶进行DNA扩增的最佳温度。适宜的酶是分离自枯草杆菌噬菌体phi29的phi29,其在30℃下最佳地进行工作。

[0239] 然后将适当容积的包含酶phi29和PPi(酵母无机焦磷酸酶)的反应缓冲液加入退火DNA/引物反应。在约30℃下温育反应混合物5至20小时或更长时间。适宜的反应缓冲液通常包含35mM Tris-HCl、50mM KCl、2.5mM MgCl₂、10mM(NH₄)₂SO₄、4mM DTT、1mM dNTP。

[0240] 然后在30℃下用在适宜缓冲液如10mM Tris HCl pH 7.6、5mM CaCl₂、50mM谷氨酸钾、0.1mM EDTA、1mM DTT中的原核端粒酶TelN温育通过RCA扩增的多联体DNA,直至反应完成。可以,例如,通过凝胶电泳或适宜的层析法(取决于待纯化的量),来纯化产生的闭合线性DNA产物。

[0241] 实施例2的方法提供了循环反应,其中产物相同于模板,因此提供了用于从非常少量的模板来容易扩大反应的方法,其中通过进行方法步骤的另外的循环。

[0242] 实施例3和4(材料和方法)

[0243] 用于DNA扩增的条件

[0244] 包含原核端粒酶TelN结合序列和HindIII限制性内切核酸酶位点的4.3kb环状双链DNA用作DNA模板。TelN结合序列构成反转回文。互补于在回文TelN结合位点的一半的序列上的不同长度的寡核苷酸用作单一特异性引物。这样的引物结合于在DNA模板的TelN序列内的相反链上的相同位点,并起始在相反方向上的DNA合成。因此,仅需要单寡核苷酸来引发每个链。所测试的引物的实例选自SEQ ID NO.30至42。

[0245] 在容积为50 μ l的包含1ng DNA模板、30mM Tris-HCl pH 7.5、30mM KCl和15mM MgCl₂的缓冲液中进行环状双链DNA模板的变性和单引物的初始退火。单引物的浓度为10mM而包括的用于比较目的随机六聚体的浓度则为50mM。通过加热至95 $^{\circ}$ C 1分钟,接着经2分钟快速冷却至25 $^{\circ}$ C,来进行变性。然后将温度改变到所选温度,用于利用枯草杆菌噬菌体phi29 DNA聚合酶进行DNA扩增。Phi29 DNA聚合酶在25-35 $^{\circ}$ C的温度范围内发挥作用并在30 $^{\circ}$ C下最佳地发挥作用。

[0246] 通过将50 μ l的包含酶phi29(0.04 μ M)和酵母无机焦磷酸酶(0.5U/ml)的反应缓冲液(30mM Tris-HCl、30mM KCl、15mM MgCl₂、5mM(NH₄)₂SO₄、2mM DTT、0.5mM dNTP)加入退火DNA/引物反应混合物来进行DNA扩增。在30 $^{\circ}$ C和34 $^{\circ}$ C下进行反应长达20小时。

[0247] 然后用原核端粒酶TelN或HindIII限制性内切核酸酶处理在滚环扩增反应(RCA)中通过phi29酶产生的多联体DNA。两种酶均切割多联体DNA以产生和模板相同大小的产物但包含具有共价闭合末端的TelN产物。反应条件如下:

[0248] HindIII反应条件

[0249] 对于HindIII消化,利用PicoGreen测定(Invitrogen)来量化多联体DNA的反应样品并在可能的情况下调节至250ng/20 μ l缓冲液/酶,其包含40 U Hind III限制酶、20mM Tris-OAc、pH 7.9、50mM KOAc、10mM Mg(OAc)₂和1mM二硫苏糖醇。在37 $^{\circ}$ C下温育反应30分钟。

[0250] TelN反应条件

[0251] 对于TelN切割/连接,利用PicoGreen测定(Invitrogen)来量化多联体DNA的样品并在可能的情况下调节至250ng/20 μ l缓冲液/酶,其包含8pmol TelN原核端粒酶、10mM Tris HCl pH 7.6、5mM CaCl₂、50mM谷氨酸钾、0.1mM EDTA、1mM二硫苏糖醇。在30 $^{\circ}$ C下温育反应1.5小时。

[0252] 凝胶电泳

[0253] 将20 μ l消化DNA产物与4 μ l凝胶加样缓冲液混合并加载到0.8%琼脂糖凝胶上。通过电泳来分离混合物并用溴化乙锭染色以可视化DNA。加载5 μ l DNA梯状条带(ladder)作为参比,以允许鉴定4.3kb DNA产物。

[0254] 凝胶成像

[0255] 在UV条件下并利用SynGene GeneSnap软件来进行图像分析。利用ImageJ分析软件(<http://imagej.nih.gov/ij/>)来进行凝胶图像的密度测定迹线。密度测定图像便于,和随机六聚体相比,更加清晰地比较源自单一特异性引物的4.3kb产物的纯度。

[0256] 实施例3:在30 $^{\circ}$ C下在DNA的滚环扩增中在单一寡核苷酸引物和随机六聚体之间的比较。

[0257] 在30℃下,利用随机六聚体、11聚体引物SEQ ID 32和33(每种引物的解链温度大约为32℃)和15聚体引物SEQ ID 34和35(解链温度为36℃至39℃)来进行通过RCA的模板DNA扩增反应。

[0258] 在1小时、2小时、4小时、6小时和9小时以后,分析反应。对来自反应的多联体DNA样品进行HindIII处理并通过凝胶电泳来分离产物(如先前所描述的)。利用如描述的SynGene GeneSnap分析软件来分析凝胶。结果示于图7A、8A和9A。对于每种引物,通过phi 29的RCA反应速率计算自在每个时间点的多联体DNA量化结果,其中通过利用PicoGreen方法。

[0259] 结果

[0260] 如图7A所示,在30℃下,每种单一特异性引物(11聚体SEQ ID 32和33以及15聚体SEQ ID 34和35)能够引发通过phi 29 DNA聚合酶的4.3kb环状双链DNA模板的扩增。示出每种引物的反应速率。在所使用的单引物浓度(10mM)下,引物SEQ ID 32(11聚体)和34(15聚体)的表现好于引物SEQ ID 33(11聚体)和35(15聚体)。和随机六聚体相比,虽然在使用引物SEQ ID 32和34的情况下,DNA扩增的速率较低,但它们达到同样的最终DNA产量。

[0261] 随机六聚体引物产生比最好的单引物(SEQ ID 32)更好的反应速率,但应该指出的是,所使用的浓度(50mM)是用于单引发反应的5倍(10mM)。优化单引物的浓度以避免引物二聚体的形成可以产生更高的反应速率。

[0262] 还通过比较开放末端线性双链4.3kb产物的纯度来监测反应,其中上述产物是通过用HindIII限制性内切核酸酶处理phi 29反应的多联体DNA产物所形成(图8A)。比较的样品各自源自250ng DNA消化作用。残留在借助于随机六聚体和单11聚体引物(SEQ ID 32)进行的扩增的孔中的DNA最有可能是网获的(meshed)单链DNA,其不能用HindIII加以切割。在借助于phi 29聚合酶进行的RCA反应中通常观测到这种情况(泳道1、6、11、16和17)。

[0263] 图8A中的数据(泳道11至20)清楚地表明,在30℃下,各种单一特异性引物产生比随机六聚体引物更加整齐的4.3kb产物,其呈现更少的外来带和较低水平的围绕4.3kb产物带的拖尾。比较例如泳道11与泳道12至15以及泳道16与泳道17至20。从图9A中的密度测定数据也可以看到这种情况。

[0264] 可以解释这种令人惊讶的观测结果,这是因为六聚体引物可以在DNA模板上随机起始DNA合成,从而引起phi 29聚合酶产生更多种不同的多联体长度。因此,在用HindIII处理以后形成更多DNA废弃片段,并且这体现为在电泳凝胶中的额外带和拖尾。

[0265] 这在DNA生产过程中是特别重要的。单一特异性引物以及链置换滚环DNA聚合酶(如phi 29)的使用将导致底物到产物的更有效的转化。另外,可以更容易和经济有效地纯化产物。如此,相比于引物如随机六聚体的混合物,单个特异性回文引物具有重要优势。

[0266] 实施例4:在34℃下在DNA的滚环扩增中在单一寡核苷酸引物和随机六聚体之间的比较。

[0267] 在34℃下,利用随机六聚体、和11聚体引物SEQ ID 32和33(解链温度大约为32℃),进行通过RCA的模板DNA扩增反应。在1小时、2小时、4小时、6小时和9小时以后分析反应。对来自反应的分开多联体DNA样品进行HindIII和原核端粒酶TelN处理并通过凝胶电泳来分离产物(如先前所描述的)。利用如所描述的图像分析软件来分析凝胶。结果示于图8B(HindIII消化液)和图8C(TelN消化多联体DNA)。

[0268] 结果

[0269] 相比于随机六聚体退火,对于11聚体退火至模板,34℃将预期是更理想的温度,但高于用于phi29 DNA聚合酶活性的最佳温度30℃。

[0270] 随机六聚体引物和各种单一特异性引物(11聚体SEQ ID 32和33)能够引发4.3kb环状双链DNA模板的扩增(通过phi29 DNA聚合酶)。各种引物的反应速率示于图7B。在所使用的单引物浓度(10mM)下,引物SEQ ID 32(11聚体)的表现好于引物SEQ ID 33(11聚体),但并没有达到通过随机六聚体所达到的速率。再一次,如前面所述,可能的是,相比于用于随机六聚体的浓度(50mM),单引物的10mM的浓度对于反应是次优的。这可以解释所观测到的较低的反应速率。

[0271] 对于所有三种引物类型,和在30℃下相比,在34℃下的DNA合成速率显著较低,其可能是由于在此温度下酶次优地进行工作。

[0272] 还通过比较开放末端线性双链4.3kb产物的纯度来监测反应,其中上述产物是通过用HindIII限制性内切核酸酶处理phi29反应的多联体DNA产物所形成(图8B)。比较的样品各自源自250ng DNA消化作用。残留在借助于随机六聚体和单11聚体引物(SEQ ID 32)进行的扩增的孔中的DNA最有可能是网获的单链DNA,其不能借助于HindIII加以切割(泳道7和10)。

[0273] 图8B中的数据(泳道7至15)清楚地表明,在34℃下,相比于随机六聚体引物,各种单一特异性引物再次产生更加整齐的4.3kb产物,并具有更少外来带和较低水平的围绕4.3kb产物带的拖尾。从图9B的密度测定数据也可以看到这种情况。这类似于在30℃下借助于上述三种类型的引物所获得的观测结果。

[0274] 另外,当用原核端粒酶TelN消化phi29酶的DNA多联体产物以产生闭合线性4.3kb产物时,结果表明,通过随机六聚体引物和两种11聚体引物SEQ ID 32和33获得相同性能(图8C)。比较的样品再次源自250ng DNA消化作用。

[0275] 获得的结果表明,就最终产物的质量而言,单一特异性寡核苷酸引物可以优于随机六聚体引物的混合物。

[0276] 本发明的序列

[0277] 表A

[0278]

芽孢杆菌噬菌体 phi29 DNA 聚合酶核酸序列(SEQ ID NO: 1)

atgaagcata	tgccgagaaa	gatgtatagt	tgtgactttg	agacaaactac	taaagtggaa	60
gactgtaggg	tatgggogta	tggttatatg	aatatagaag	atcacagtga	gtacaaaata	120
ggtaatagcc	tggatgagtt	tatggcgtgg	gtgttgaagg	tacaagctga	tctatatttc	180
cataacctca	aatttgacgg	agctttttatc	attaactgg	tggaaactga	tggttttaag	240
tggtcggtcg	acggattgco	aaacacatat	aatacgatca	tatctcgcat	gggacaatgg	300
tacatgattg	atatatgttt	aggtacaaaa	gggaaacgta	agatacatat	agtgatatat	360
gacagcttaa	agaaactacc	gtttcctggt	aagaagatag	ctaaagactt	taaactaact	420
gttcottaaag	gtgatattga	ttaccacaaa	gaaagaccag	tcggctataa	gataacaccc	480
gaagaatac	cctatattaa	aaacgatatt	cagattattg	cggaaactct	gttaattcag	540
tttaagcaag	gttttagaccg	gatgacagca	ggcagtgaca	gtctaaaagg	tttcaaggat	600
attataacca	ctaagaaatt	caaaaagggtg	tttctacat	tgagtcttgg	actcgataag	660
gaagtgaag	acgcctatag	aggtgggttt	acatgggtta	atgatagggt	caaagaaaaa	720
gaaatcggag	aaggcatggt	cttcgatggt	aatagctctat	atcctgcaca	gatgtatagc	780
ogtctccttc	catatggtga	acctatagta	ttcgagggtg	aatacgtttg	ggacgaagat	840
taccactac	acatacagca	tatcagatgt	gagttcgaat	tgaagagggg	ctatataccc	900
actatacaga	taaaaagaag	taggttttat	aaaggtaatg	agtacctaaa	aagtagcggc	960
ggggagatag	cgcacctctg	gttgctcaaat	gtagacctag	aattaatgaa	agaacactac	1020
gatttatata	acgttgtaata	tatcagcggc	ttaaaattta	aagcaactac	aggtttgttt	1080
aaagatttta	tagataaatg	gacgtacatc	aagacgacat	cagaaggagg	gatcaagcaa	1140
ctagcaaaac	tgatgttaaa	cagttctatac	ggtaaatctg	ctagtaaccc	tgatgttaca	1200
gggaaagtcc	cttattttaa	agagaatggg	ggcctagggt	tcagacttgg	agaagaggaa	1260
acaaaagacc	ctgtttatac	acctatgggc	gttttcatca	ctgcattggc	tagatacacg	1320
acaattacag	cggcacaggc	ttgttatgat	cggaataat	actgtgatac	tgacagcata	1380
catttaacgg	gtacagagat	acctgatgta	ataaaagata	tagttgaccc	taagaaattg	1440
ggatactggg	caacatgaa	tacattcaaa	agagttaaat	atctgagaca	gaagacctat	1500
atacaagaca	tctatatgaa	agaagtagat	ggtaagttag	tagaaggtag	tccagatgat	1560
tacactgata	taaaatttag	tgttaaatgt	gcggaatga	ctgacaagat	taagaaagag	1620
gttacggttg	agaatttcaa	agtcggattc	agtcggaaaa	tgaagcctaa	gcctgtgcaa	1680
gtgcgcggcg	gggtgggtct	ggttgatgac	acattcacaa	tcaaataa		1728

芽孢杆菌噬菌体 phi29 DNA 聚合酶氨基酸序列(SEQ ID NO: 2)

MKHMPRKMY	CDFTTTKVE	DCRVWAYGY	NIEDHSEYKI	GNSLDEFMAW	VLKVQADLYF	60
HNLKFDGAFI	INWLERNGFK	WSADGLPNTY	NTIISRMGQW	YMIDICLGK	GKRKIHTVIY	120
DSLKKLPFPV	KKIAKDFKLT	VLKGDIDYHK	ERPVGKYP	EEYAYIKNDI	QIIAERLLIQ	180
FKQGLDRMTA	GSDSLKGFKD	IITTKKFKKV	FPTLSLGLDK	EVRYAYRGGF	TWLNDRFKEK	240
EIGEGMVFDV	NSLYPAQMY	RLLPYGEPIV	FEGKYVWDED	YPLHIQHRC	EFELKEGYIP	300
TIQIKRSRFF	KGNEYLKSSG	GEIADLWLSN	VDLELMKEHY	DLYNVEYISG	LKFKATTGLF	360
KDFIDKWYTI	KTTSEGAIKQ	LAKLMLNSLY	GKFASNPVDT	GKVPYLKENG	ALGFRLLGEE	420
TKDPVYTPMG	VFITAWARYT	TITAAQACYD	RIIYCDTDSI	HLTGTEIPDV	IKDIVDPKKL	480
GYWAHESTFK	RVKYLKQKTY	IQDIYMKEVD	GKLVEGSPDD	YTDIKFSVKC	AGMTDKIKKE	540
VTFENFKVGF	SRKMKPKPVQ	VPGGVVLVD	TFTIK			575

[0279] 表B

[0280]

Pyrococcus sp Deep Vent DNA 聚合酶氨基酸序列(SEQ ID NO: 3)

MILDADYITE	DGKPIIRIFK	KENGFEKVEY	DRNFRPYIYA	LLKDDSQIDE	VRKITAERHG	60
KIVRIIDAOK	VRKKFLGRPI	EVWRLYFEHP	QDVPAIRDKI	REHSAVIDIF	EYDIPFAKRY	120
LIDKGLIPME	GDEELKLLAF	DIETLYHEGE	EFAKGPIIMI	SYADEEEAKV	ITWKKIDLPY	180
VEVVSSEREM	IKRFLKVIRE	KDPDVIITYN	GDSFDLPYLV	KRAEKLGIKL	PLGRDSEPK	240
MQRLGDMTAV	EIKGRIHFDL	YHVIRRTINL	PTYTLEAVYE	AIFGKPKKEV	YAHEIAEAW	300
TGKGLERVAK	YSMEDAKVTY	ELGREFFPME	AQLSRLVGQP	LWDVSRSSSTG	NLVEWYLLRK	360

[0281]

AYERNELAPN	KPDEREYERR	LRYSYAGGYV	KEPEKGLWEG	LVSLDFRSLY	PSIIITHNVS	420
PDTLNREGCR	EYDVAPEVGH	KCKDFPGFI	PSLLKRLLE	RQEIKRKMKA	SKDPTEKKML	480
DYRQRAIKIL	ANSYYGYGY	AKARWYCKEC	AESVTAWGRE	YIEFVRKELE	EKFGFKVLYI	540
DTDGLYATIP	GAKPEEIKKK	ALEFVDYINA	KLPGLLELEY	EGFYVRGFFV	TKKKYALIDE	600
EGKIITRGLE	IVRRDWSEIA	KETQAKVLEA	ILKHGNVEEA	VKEVKEVTEK	LSKYEIPPEK	660
LVIYEQITRP	LHEYKAIGPH	VAVAKRLAAR	GVKVRPGMVI	GYIVLRGDGP	ISKRAILAE	720
EDLRKHKYDA	EYYIENQVLP	AVLRILEAFG	YRKEDLRWQK	TKQTGLTAWL	NIKKK	775

[0282] 表C

[0283]

嗜热脂肪芽胞杆菌 DNA 聚合酶 I(polA)核酸序列(SEQ ID NO: 4)

atgaagaaga	agctagtact	aattgatggc	aacagtgtgg	cataccgcgc	ctttttttgcc	60
ttgccacttt	tgcataacga	caaaggcatt	catacgaatg	cggtttacgg	gtttacgatg	120
atgttgaaca	aaatttttggc	ggaagaacaa	cgcacccatt	tacttgtagc	gtttgacgcc	180
ggaaaaacga	cgttcgggca	tgaaacgttt	caagagtata	aaggcggacg	gcaacaaact	240
cccccggaac	tgcccgagca	gtttccgctg	ttgcgcgagc	tattaaaagc	gtaccgcatt	300
cccgcttatg	aacttgatca	ttacgaagcg	gacgatatta	tcgggacgct	cgctgcccg	360
gctgagcaag	aagggtttga	agtgaatac	atttcggcg	accgcgattt	aaccagctc	420
gcctcccgta	atgtgacggt	cgatattacg	aaaaaaggga	ttaccgacat	tgagccgtat	480
acgccagaga	cggttcgaga	aaaatacggc	ctgactccgg	agcaaatagt	ggatttaaaa	540
ggattgtatg	cgataaaatc	cgacaacatc	cggggcgctg	cggcatcg	ggaaaaaacg	600
ggggtcaagc	tgctgaagca	atttggtacg	gtggaaaatg	tgctcgcatc	gattgatgag	660
gtgaaagggg	aaaaactgaa	agaaaaactg	cgcacaacac	gggatttagc	tctcttgagc	720
aaacagctgg	cgtccatttg	cgcgacgcgc	cgggttgagc	tgctgttaga	tgacattgtc	780
tacgaaggac	aagaccggca	aaaagtcac	gcgttattta	aagaactcgg	gtttcagtcg	840
ttcttggaag	aaatggccgc	gccggcagcc	gaaggggaga	aaccgcttga	ggagatggag	900
tttgccatcg	ttgacgtcat	taccgaagag	atgcttgccg	acaaggcagc	gcttgctgtt	960
gaggtgatgg	aagaaaacta	ccacgatgcc	cggattgtcg	gaatcgcaat	agtgaacgag	1020
catgggcgat	tttttatgcg	cccggagacc	gcgctggctg	attcgcaatt	tttagcatgg	1080
cttgccgatg	aaacgaagaa	aaaaagcatg	tttgacgcga	agcgggcagt	cggttacctt	1140
aagtggaaag	gaattgagct	tcgcggcgct	gcctttgatt	tattgctcgc	tgctcatttg	1200
ctcaatccgg	ctcaagatgc	cggcgatata	gctgcgggtg	cgaaaatgaa	acaatatgaa	1260
ggggtgcggt	cggatgaagc	ggtctatggc	aaaggcgctc	agcggctcgc	gcggagcgaa	1320
cagacgcttg	ctgagcatct	cgttcgcaca	gggcagccca	tttggcgctc	tgagcagccg	1380
tttatggagc	atttgccgaa	caacgaacaa	gatcaattat	taacgaagct	tgagcagccg	1440
ctggcgccga	ttttgctgta	aatggaattc	actggggtga	acgtggatac	aaagcggctt	1500
gaacagatgg	gttcggagct	cgcgaacaaa	ctgcgtgcca	tcgagcagcg	catttacgag	1560
ctagccggcc	aagagttcaa	cattaaactc	ccaaaacagc	tcggagtcac	tttatttgaa	1620
aagctgcagc	taccggtgct	gaagaagacg	aaaacaggct	attcgacttc	ggctgatgtg	1680
cttgagaagc	ttgcgcgcga	tcatagaata	gtcgaaaaca	ttttgcatta	cgcgcagctt	1740
ggcaaacctg	aatcaacgta	tattgaagga	ttgttgaaag	ttgtgcgcgc	tgataccggc	1800
aaagtgcata	cgatgttcaa	ccaagcgcgt	acgcaaacct	ggcggtcag	ctcgcccgag	1860
cggaaacttg	aaaacattcc	gattcggtgc	gaagaggggc	ggaaaatccg	ccaagcgttc	1920
gtcccgctcag	agccggactg	gtcatttttc	gcgcgcgatt	actcacaat	tgaattgcgc	1980
gtcctcgccc	atatcgccga	tgacgacaat	ctaattgaag	cgttccaaac	cgatttggtat	2040
attcacacaa	aaacggcgat	ggacattttc	catgtgagcg	aagagggaag	cacggccaac	2100
atgcgcgcgc	aggcaaaagg	cgttaacttc	ggtatcgctt	acggaattag	cgattacgga	2160
ttggcgcaaa	acttgaacat	tacgcgcaca	gaagctgcgc	aatttatcga	acgttacttc	2220
gccagctttc	cggcggtaaa	gcagtatatg	gaaaacattg	tgcaagaagc	gaaacagaaa	2280
ggatatgtga	caacgctgtt	gcacgcgcgc	cgtattttgc	ctgatattac	aagccgcaat	2340
ttcaacgtcc	gcagttttgc	agagcggacg	gccatgaaca	cgccaattca	aggaagcgcc	2400
gctgacatta	ttaaaaaagc	gatgattgat	ttagcggcac	ggctgaaaag	agagcagctt	2460
caggctcgtc	ttttgctgca	agtgcacgac	gagctcattt	tggaagcgcc	aaaagaggaa	2520
attgagcgat	tatgtgagct	tgttccggaa	gtgatggagc	aggccgttac	gctccgcgtg	2580
cggctgaaag	tcgaactacca	ttacggccca	acatgggtatg	atgccaataa	a	2631

[0284]

嗜热脂肪芽胞杆菌 DNA 聚合酶 I(polA)氨基酸序列(SEQ ID NO: 5)

MKKKLVLIDG	NSVAYRAFFA	LPLLIHNDKGI	ITNAVYGFMT	MLNKILAEEO	PTILLVAFDA	60
GKTTFRNETF	QEYKGGRRQT	PFELSEQFPL	LRELLKAYRI	PAYELDHIEA	DDIIGTLAAR	120
AEQEGFEVKI	ISGDRDLTQL	ASRIIVTVDIT	KKGITDIEPY	TPETVREKYG	LTPEQIVDLK	180
GLMGDKSDNI	PGVPGIGECT	AVKLLKQFGT	VENVLASIDE	VKGEKLKENL	RQIRDLALLS	240
KQLASICRDA	PVELSLDDIV	YEQDREKVI	ALFKELGFQS	FLEKMAAPAA	EGEKPLEEME	300
FAIVDVITEE	MLADKAALVV	EVMEENYHDA	PIVGIALVNE	HGRFFMRPET	ALADSQFLAW	360
LADETKKKS	MDAKRAVVAL	KWKGIELRGV	AFDLLLLAAYL	LNPAQDAGDI	AAVAKMKQYE	420
AVRSDEAVYG	KGVKRSPLDE	QTLAEHLVRK	AAAIWALEQP	FMDDLRRNEQ	DQLLTKELEP	480
LAAILAEMEF	TGVNVDTKRL	EQMGSELAEO	LRAIEQRIYE	LAGQEFNINS	FKQLGVILFE	540
KLQPLVLKKT	KTGYSTADV	LEKLAPHHEI	VENILHYRQL	GKLQSTYIEG	LLKVVRPDTG	600
KVHTMFNQAL	TQGRLLSSAE	PNLQNIPIRL	EEGRKIRQAF	VPSEPDWLIF	AADYSQIELR	660
VLAHIADDDN	LIEAFQRDL	IHTKTAMDIF	HVSEEEVTAN	MRRQAKAVNF	GIVYGISDYG	720
LAQNINITRK	EAAEFIERYF	ASEPGVKQYM	ENIVQEAQKQ	GYVTLLHRR	RYLPDITSRN	780
FNVRSAERT	AMNTPIQGSA	ADIKKAMID	LAARLKEEQL	QARLLLQVHD	ELILEAPKEE	840
IERLCELVE	VMEQAVTLRV	PLKVDYHYGP	TWYDAK			876

[0285] 表D

[0286]

盐单胞菌噬菌体 phiHAP-1 原核端粒酶核酸序列(SEQ ID NO:6)

atgagcgggtg	agtcacgtag	aaaggtegat	ttagcgggaat	tgatagagt	gttgctcagc	60
gagatcaaag	agatcgacgc	cgatgatgag	atgccacgta	aagagaaaac	caagcgcag	120
gcgcggctgg	caagtagctt	caaaacgcgc	ctgcagtag	acaagcgccg	caaggattct	180
gagcggatcg	cggtcacgac	ctttcgccgc	tacatgacag	aagcgcgcaa	ggcggtagct	240
gcgcagaact	ggcgccatca	cagcttcgac	cagcagatcg	agcggctggc	cagccgctac	300
ccggcttatg	ccagcaagct	ggaagcgctc	ggcaagctga	ccgatatcag	cgccattcgt	360
atggcccacc	gcgagctgct	cgaccagatc	cgcaacgatg	acgacgctta	tgaggacatc	420
cgggcgatga	agctggacca	tgaaatcatg	cgccacctga	cgttgagctc	tgccacagaa	480
agcacgctgg	ctgaagaggc	cagcgagacg	ctggaagagc	gcgcggtgaa	cacggctcag	540
atcaactacc	actggttgat	ggagacgggt	tacgagctgc	tgagtaaccg	ggagagaatg	600
gtcgatgggg	agtagcgcg	ctttttcagt	tacctagcgc	ttggcctggc	gctggccacc	660
ggcgctcgct	cgatcgaggt	gctgaagacc	ggacggatca	cgaaggtggg	cgagtatgag	720
ctggagttca	gcggccaggc	gaaaaagcgc	ggcgcgctcg	actatagcga	ggcttaccac	780
atttataccc	tggtgaaagc	tgacctgggt	atcgaaagct	gggatgagct	tcgctcgtcg	840
ccggaagctg	ctgagctgca	gggcattggc	aacagcgatg	tgaaccgccc	cacggcgagg	900
acgctcaaca	cgctcaactaa	gcggatcttt	aacaacgatg	agcgcgtttt	caaggacagc	960
cgggcgatct	ggcgcgcgct	ggtgttttag	ctgcacttct	cgcgcgacaa	gcgctggaag	1020
aaagtcaccg	aggacgtggt	ctggcgtag	atgctggggc	atgaggacat	ggatacacag	1080
cgcagctacc	gcgcctttaa	aatcgactac	gacgagccgg	atcaagccga	ccagggaagat	1140
tacgaacacg	ctagcgcctc	cgccgcgctg	caggcgctgg	acggccatga	gcagcttgag	1200
agcagcgacg	cccagcgcg	tgtgcatgce	tgggtgaaag	cgcagatcga	gcaggagcct	1260
gacgcgaaaa	ttacgcagtc	tctgatcagc	cgggagctgg	gcgtttatcg	ccctgccata	1320
aaagcgtacc	tgagctggc	gcgagaggcg	ctcgacgcgc	cgaacgtcga	tctggacaag	1380
gtcgcgggcg	cagtgcggaa	ggaagtagcc	gaggcggaag	cccgctgaa	cgccaccaca	1440
caaggggatg	gcaggtgggt	cggggtggct	tcaatcaacg	gggtggaagt	tgacggggtg	1500
ggcaaccagg	caggcggat	cgaagcgatg	aaagcgccct	ataaagcggc	gggtgggcgc	1560
tga						1563

盐单胞菌噬菌体 phiHAP-1 原核端粒酶氨基酸序列(SEQ ID NO:7)

MSGESRRKVD	LAELIEWLLS	EIKEIDADDE	MPRKEKTKRM	ARLARSFKTR	LHDDKRRKDS	60
ERIAVTTFR	YMTEARKAVT	AQNWRHHSFD	QQIERLASRY	PAYASKLEAL	GKLTDISAIR	120
MAHRELLDQI	RNDDDAYEDI	RAMKLDHEIM	RHLTLSSAQK	STLAEAESET	LEERAVNTVE	180
INYHWMETV	YELLSNRERM	VDGEYRGFFS	YLALGLALAT	GRRSIEVLKT	GRITKVGGEY	240
LEPSGQAKKR	GGVDYSEAYH	IYTLVKADLV	IEAWDELRS	PEAAELQGM	NSDVNRRTAK	300
TLNLTTRKIF	NNDERVFKDS	RAIWARLVFE	LHFSRDKRWK	KVTEDVFWRE	MLGHEDMDTQ	360
RSYRAFKIDY	DEPDQADQED	YEHASRLAAL	QALDGHEQLE	SSDAQARVHA	WVKAQIEQEP	420
DAKITQSLIS	RELGVYRPAI	KAYLELAREA	LDAPNVDLDK	VAAAVPKEVA	EAKPRLNAHP	480
QGDGRWVGVA	SINGVEVARV	GNQAGRIEAM	KAAYKAAGGR			520

[0287] 表E

[0288]

耶尔森氏菌噬菌体 PY54 原核端粒酶核酸序列(SEQ ID NO:8)						
atgaaaaatcc	atttttcgcga	tttagttagt	ggtttagtta	aagagatcga	tgaaatagaa	60
aaatcagacc	gggcgcaggg	tgacaaaact	cggcggtatc	agggcgcggc	cagaaagtcc	120
aaaaatgcgc	tgttttatgga	taaacggaaa	tatcgcggtg	acggtatgaa	gaatagaata	180
tcgtttaacaa	cattttaataa	atattttaagt	cgagcacggt	ctcggtttga	agaaaggcct	240
caccatagtt	ttcctcaatc	tatagcaact	atctcaaata	aatatcctgc	attcagcgaa	300
ataataaaaag	atctggataa	tagacccgct	catgaagtta	gaataaaaact	taaagaatta	360
ataactcctc	ttgaatccgg	tgtaatttta	ttagaaaaaa	taggtagcct	agggaaaata	420
aaaccatcta	cagctaaaaa	aatagtttag	ttaaaaaaaa	tgtaccctac	atgggctaata	480
gatctagata	ctttaattag	tactgaagat	gctacagaat	tacaacaaaa	gtagagcaa	540
gggacgcacc	tacttaacgc	attacattct	ctaaaagtaa	accatgaagt	tatgtatgca	600
ttaacgatgc	agccttctga	cagagctgca	ttaaaagcta	ggcatgacgc	tgccttctac	660
tttaaaaagc	gtaacatcgt	acctatcgat	tatcccggtc	atatgcaacg	aatgacggac	720
atactacatc	ttccagataa	agcttttgaa	gattcgctgg	catcaacttg	cccttttagca	780
tttgcctctag	cagctgctag	cggctgcaga	caaattgaaa	tactaattac	tggtaggttt	840
gaagccaaaa	ataaaaagcat	cattaaattt	tctggacaag	caaaaaaaag	aatggcggtt	900
tcaggtggac	attatgaaat	atacagttct	attgactcag	agctattcat	tcaacggtta	960
gagttttttac	gttctcatag	ctcaataact	cgattacaaa	atttggaat	agcacatgat	1020
gaacatcgta	ctgaactatc	tgttattaac	ggttttgtag	ccaaaccttt	aatgatgca	1080
gcaaaacagt	tctttgtcga	tgacagaaga	gtatttaaag	ataccctgct	aatttacgct	1140
cgcatagcac	atgaaaaatg	gtttagaaca	gacccctgct	gggcgaagtg	cgaagagat	1200
gttttcttct	ctgaattatt	aggccatgac	gaaccagata	ctcagctggc	atataaaca	1260
ttcaagctgg	taaaattcaa	tcaaaaatgg	acacctata	tatcagatga	aaacctctgg	1320
ttagctgcac	ttcaagagct	tgacaatgat	atgcccggcc	tagcacgtgg	cgatgcggca	1380
gttcgcatac	atgagtggtt	taaagagcaa	ctggcgagca	accctgcggc	aaaaataact	1440
gcataccaaa	tcaagaaaaa	tttaaatgtt	cgaaatgact	tggccagccg	atacatggca	1500
tgggtgtctg	acgcgctagg	ggttgttatt	ggtgatgatg	gacaggcaag	gccagaagaa	1560
ctcccaccat	cgctcgtgct	tgatattaac	gctgatgaca	ctgacgctga	agaagatgaa	1620
atagagggaag	actttactga	tgaggaaata	gacgacaccg	aattcgacgt	atcagataac	1680
gccagtgatg	aagataagcc	cgaagataaa	cctcgctttg	cagcaccat	tcgtagaagt	1740
gaggactctt	ggctgattaa	atttgaattt	gctggcaagc	aatatagctg	ggagggtaat	1800
gccgaaagtg	ttatcgatgc	gatgaaacaa	gcattggactg	aaaatatgga	gtaa	1854

耶尔森氏菌噬菌体 PY54 原核端粒酶氨基酸序列(SEQ ID NO:9)						
MKIHFRDLVS	GLVKEIDEIE	KSDRAQGDKT	RRYQGAARKT	KNAVFMDKRR	YRGNGMKNRI	60
SLTTFNKYLS	RARSFEERL	HHSFPQSIAT	ISNKYPATSE	IIKDLDNRPA	HEVRIKLKEL	120
ITHLESGVNL	LEKIGSLGKI	KPSTAKKIVS	LKKMYPSPAN	DLDTLISTED	ATELQOKLEQ	180
GTDLNLALHS	LKVNHEVMYA	LTMQPSDRAA	LKARHDAALH	FKKRNIVPID	YPGYMQRMTD	240
ILHLPDIAFE	DSMASLAPLA	FALAAASGRR	QIEILITGEF	DAKNKSIKIF	SGQAKKRMAY	300
SGGHYEIYSL	IDSELFQRL	EFLRSHSSIL	RLQNLIEAHD	EHRTELSVIN	GFVAKPLNDA	360
AKQFFVDDRR	VFKDTRAIYA	RIAYEKWFRT	DPRWAKCDED	VFFSELLGHD	DPDTQLAYKQ	420
FKLVNFPNPKW	TPNISDENPR	LAALQELDND	MPGLARGDAA	VRIHEWVKEQ	LAQNPAAKIT	480
AYQIKKNLNC	RNDLASRYMA	WCADALGVVI	GDDGQARPEE	LPPSLVLDIN	ADDTDAEED	540
IEEDFTDEEI	DDTEFDVSDN	ASDEDKPEDK	PRFAAPIRRS	EDSWLIKFEF	AGKQYSWEGN	600
AESVIDAMKQ	AWTENME					617

[0289] 表F

[0290]

克雷伯氏菌噬菌体 phiKO2 原核端粒酶核酸序列(SEQ ID NO:10)						
atgcgtaagg	tgaaaattgg	tgagctaata	aattcgcttg	tgagcgaggt	cgaggcaata	60
gatgcctctg	atcgctccga	aggcgataaa	acgaagaaaa	ttaaagcgcg	agcattaaaa	120
tataagaatg	cattatttta	tgacaaaaga	aagtttcgcg	gtaaagggtt	agaaaaaaga	180
attttctgca	acacgttcaa	ctcgatatatg	agtcgggcaa	ggaaaagatt	tgatgataga	240
ttgcatacata	actttgaaaa	gaatgtaatt	aaactatcag	aaaaatatcc	tttatatagt	300
gaagaattat	cttcgtggct	ttctatgcct	gcgccatcaa	ttagacagca	tatgtcaaga	360
ttgcaagcca	agctaaaaga	gataatgcca	ttggcagaag	acttatccaa	tataaagatt	420
ggtacaaaaa	atagcgaagc	aaaaataaat	aaactcgcta	ataaatatcc	tgaatggcaa	480

[0291]

ttogetatta	gtgattttaa	tagcgaagat	tggaaggata	aaagagatta	tctttataaa	540
ctattccaac	aaggttcttc	gtccttgga	gacttgaata	acctgaaagt	aaaccatgag	600
gttctctatc	atctgcagct	tagttctgoc	gagcgaacct	ctatccagca	gcgctgggccc	660
aacgtectca	gcgagaaaa	gcgcaacgtt	gtcgtgattg	actatccgcg	ctatatgcag	720
gccatctacg	atataatcaa	caagcctata	gtttcgttcg	atttgactac	tcgtcgtggt	780
atggcccccgc	tggcgttcgc	ccttgccgcg	ctatctggtc	gcggaatgat	tgaaatcatg	840
ctccagggtg	aattttccgt	cgcaggtaaa	tatacagtaa	cattcctggg	gcaagctaaa	900
aaacgctcgg	aagataaagg	tatatcaagg	aaaatatata	ccttatgcga	cgetacttta	960
tttggttagtt	tggtaaatga	acttcgctca	tgccccgctg	ctgcggattt	tgatgaagta	1020
ataaaaggat	atggcgaaaa	tgacactcgc	tcagaaaatg	ggcgtattaa	tgcaattctc	1080
gctacagctt	ttaatccgtg	ggtaaaaact	ttcttaggcg	atgaccgcgc	cgttttataaa	1140
gatagccgcg	ctattttacgc	ccgtattgcc	tatgaaatgt	tcttcgcgcg	tgaccctcgc	1200
tggaagaatg	ttgatgagga	tgtattcttc	atggagattc	tcggccatga	cgatgaaaac	1260
acccaactgc	actataagca	gtttaaattg	gctaaacttc	ccagaacatg	gcgaccaaact	1320
gtcggcgagg	agaatgcccg	cctagcggcg	ctgcaaaaagc	tgatagcat	gatgccagat	1380
tttgccaggg	gcgacgcccg	ggttcgtatt	catgagaccg	tgaagcagct	ggtggagcag	1440
gaccatcga	taaaaaatcac	aaacagcacc	ctgcgaccgt	ttaacttcag	taccaggctg	1500
attcctcgt	acctggagtt	tgccgccgat	gcattgggccc	agttcgtcgg	tgaaaatggg	1560
caatggcaac	tgaaggatga	ggcgccctgca	atagtcctgc	ctgatgagga	aattcttgag	1620
cctatggacg	acgtcgatct	cgatgacgaa	aacctgatg	atgaaacgct	ggatgacgat	1680
gagatcgaag	tggaacgaa	cgaaggagag	gaactggagg	aagcggcgca	cgtcgaagag	1740
gcgaggttg	ctgaacagga	agagaagcad	cctggcaagc	caaactttta	agcgccgagg	1800
gataatggcg	atggtaccta	catggtggaa	tttgaattcg	gtggccgtca	ttacgcctgg	1860
tcgggtgccg	ccggtaatcg	ggtagaggca	atgcaatctg	cctggagtgc	ctaactcaag	1920
tga						1923

克雷伯氏菌噬菌体 phiKO2 原核端粒酶氨基酸序列(SEQ ID NO:11)

MRKVKIGELI	NSLVSEVEAI	DASDRPQGD	TKKIKAAALK	YKNALFNDKR	KFRGKGLEKR	60
ISANTFNSYM	SRARKRFDDR	LHHNFEKNI	KLSEKYPLYS	EELSSWLSMP	AASIRQHMSR	120
LQAKLKEIMP	LAEDLSNIKI	GTKNSEAKIN	KLANKYPEWQ	FAISDLNSED	WKDKRDYLYK	180
LFOQGSSSLE	DLNNLKVNHE	VLHLQLSSA	ERTSIQQRWA	NVLSEKKRNV	VVIDYPRYMQ	240
AIYDIINKPI	VSFDLTTRRG	MAPLAPALAA	LSGRMIEIM	LQGEFVSAGK	YTVTFLGQAK	300
KRSEDKGISR	KIYTLCDATL	FVSLVNELRS	CPAAADFDEV	IKGYGENDTR	SENGRINAIL	360
ATAFNPWVKT	FLGDDRRVYK	DSRAIYARIA	YEMFFRVDPR	WKNVDEDVFF	MEILGHDDEN	420
TQLHYKQFKL	ANFSRTWRPN	VGEENARLAA	LQKLDMMMPD	FARGDAGVRI	HETVKQLVEQ	480
DPSIKITNST	LRFNFSTR	IPRYLEFAAD	ALGQFVGENG	QWQLKDEAPA	IVLPDEEILE	540
PMDDVDLDDE	NHDETLDD	EIEVDESEGE	ELEEAGDAEE	AEVAEQEEKH	PGKPNFKAPR	600
DNGDGYTME	FEFGGRHYAW	SGAAGNRVEA	MQSAWSAYFK			640

[0292] 表G

[0293]

弧菌噬菌体 VP882 原核端粒酶核酸序列(SEQ ID NO:12)

atgagcggcg	aaagtagaca	aaaggtaaac	ctcagggagt	taataaatga	gctcgtcgag	60
gaggtgaaaa	ccatcgatga	caatgaggcg	attactcgg	ctgaaaaaac	caagttgatc	120
accagggcgc	cgactaaatt	caagaccaag	ctgcacgacg	ataagcgccg	gaaggatgcg	180
accagaatcg	ctctgagcac	ctatcgtaag	tacatgacaa	tggccagggc	agcagttact	240
gagcagaact	ggaaacacca	cagtctcgag	cagcagatag	agcggtctgc	caaaaagcac	300
ccgcaatacg	ctgagcagct	ggtggccatc	ggggccatgg	ataacatcac	cgagttgcgc	360
ctggcgcac	gcgacctcct	gaagagcact	aaggacaacg	atgaagcctt	cgaggatata	420
cgacgcatga	agtttagacca	cgaggtaatg	cgccatctga	cgctacccag	tgcgcaaaag	480
gcgagactgg	cagaggaagc	cgccgaggcg	ttgaccgaga	agaaaaccgc	cacggtcgac	540
atcaactatc	acgagctgat	ggccggcggtg	gtggagctgt	tgaccaagaa	gaccaagacg	600
gtcggcagcg	acagcaccta	cagcttcagc	cggttgggcg	ttggtattgg	cctggctacc	660
ggtcgtcgtt	ctatcgagat	actgaagcag	ggcgagttca	aaaagggtga	tgagcagcgg	720
ctcaggtttc	ctggccaagc	gaaaaagcgc	ggcggtgcgc	actattcaga	gacctatacc	780
atttacaccc	tggtcgactc	cgacctggta	ctgatggcgc	tgaagaacct	gcgagagttg	840
ccagaagtte	gcgcactgga	tgagtacgac	caactggcg	agattaagcg	gaaagacgcc	900

[0294]

atcaataaac	gctgtgcaaa	aacgctcaac	caaaccgcca	agcagttctt	tggcagcgac	960
gagcgcggtg	tcaaagatag	tcggtgccatc	tgggcgcgtc	tggcttatga	gttgtttttt	1020
caacgtgatc	cgcgctggaa	aaagaaagac	gaggacgttt	tctggcagga	gatgctgggc	1080
cacgaggaca	tcgagactca	gaaagcctat	aagcaattca	aggtcgacta	cagcgaacct	1140
gagcagccgg	tgcacaagcc	tggcaaat	aagagcagag	ctgaagccct	cgcggcgctc	1200
gactcaaatg	aggacattac	caccgcgtca	tccatggcca	agatccacga	ctgggtgaaa	1260
gagcgtattg	cggaagaccc	cgaggcgaac	atcacacagt	cactcatcac	cggggaactg	1320
ggctcaggcc	gtaaggtgat	caaggactac	ctcgacctgg	ctgaogatgc	ccttgctgtg	1380
gtgaatactc	ctgtcgatga	cgcagtcgtc	gaggttccag	ctgatgtgcc	ggcagcagaa	1440
aaacagccga	agaaagcgca	gaagcccaga	ctcgtggctc	accaggttga	tgatgagcac	1500
tgggaagcct	gggcgctggt	ggaaggcgag	gaggtggcca	gggtgaaaat	caagggcacc	1560
cgcgttgagg	caatgacagc	cgcattggag	gccagccaaa	aggcactcga	tgactaa	1617

弧菌噬菌体 VP82 原核端粒酶氨基酸序列(SEQ ID NO:13)

MSGESRQKVN	LEELINELVE	EVKTIDDNEA	ITRSEKTKLI	TRAATKFKTK	LHDDKRRKDA	60
TRIALSTYRK	YMTMARAAVT	EQNWKHHSLE	QQIERLAKKH	QYAEQLVAI	GAMDNITELR	120
LAHRDLLKSI	KDNDEAFEDI	RSMKLDHEVM	RHLTLPSAQK	ARLAEAEAEA	LTEKKTATVD	180
INYHELMAGV	VELLTKKTKT	VGSDSTYSFS	RLALGIGLAT	GRRSIBILKQ	GEFKKVDEQR	240
LEFSGQAKKR	GGADYSETYT	IYTLVDSDLV	LMALKNLREL	PEVRALDEYD	QLGEIKRNDA	300
INKRCAKTLN	QTAKQFFGSD	ERVFKDSRAI	WARLAYELFF	QREPRWKKKD	EDVFWQEMLG	360
HEDIETQKAY	KQFKVDYSEP	EQPVHKPGKF	KSRAEALAAL	DSNEDITTRS	SMAKIHDWVK	420
ERIAEDPEAN	ITQSLITREL	GSGRKVIKDY	LDLADDALAV	VNTPVDDAVV	EVPADVPAAE	480
KQPKKAQKPR	LVAHQVDDDEH	WEAWALVEGE	EVARVKIKGT	RVEAMTAAWE	ASQKALDD	538

[0295] 表H

[0296]

大肠杆菌噬菌体 N15 端粒酶(telN)和二次免疫抑制蛋白(cA)核酸序列(SEQ ID NO:14)

catatgcact	atatcatatc	tcaattaacg	aacatatacag	cacacaattg	cccattatac	60
gcgcggtataa	tggactattg	tgtgctgata	aggagaacat	aagcgcagaa	caatatgtat	120
ctattccggt	gttgtgttcc	tttgttatto	tgotattatg	ttctottata	gtgtgaogaa	180
agcagcataa	ttaatcgtea	ottgtttctt	gattgtgtta	cgatatccag	agaattagaa	240
acggggggaac	cgggatgagc	aaggtaaaaa	tgggtgagtt	gatcaaacag	cttgtgaaatg	300
aggtagagcc	aattgtatgc	tcagacgcgc	cacaaggcga	caaaaacgaag	agaattaaag	360
cgcagccgcg	acggtataag	aacgcgttat	ttaatgataa	aagaaagtto	cgtgggaaag	420
gattgcagaa	aagaataacc	gcgaataact	ttaacgccta	tatgagcagg	gcaagaaagc	480
ggtttgatga	taaattacat	catagctttg	ataaaaaatat	taataaaatta	tgggaaaagt	540
atctctttta	cagogaagaa	ttatcttcat	ggctttctat	gactacggct	aatattcgcc	600
agcacatgtc	atcggtacaa	tctaaattga	aagaaataat	gccgtttgcc	gaagagttat	660
caaatgtatg	aataggctct	aaaggcagtg	atgcaaaaat	agcaagacta	ataaaaaaat	720
atccagattg	gagttttgct	cttagtgatt	ttaaacagtga	tgattggaag	gagcgcgctg	780
actatcttta	taagttatcc	caacaaggct	ctgcgttggt	agaagaacta	caccagctca	840
aggtaacca	tgaggtctcg	taccatctgc	agctaagccc	tgcggagcgt	acatctatac	900
agcaacgatg	ggcggatggt	ctgcgcgaga	agaagcgtaa	tgttggtggt	attgactacc	960
caacatacat	gcagtcctatc	tatgatattt	tgaataatcc	tgcaacttta	tttagtttaa	1020
acactcgttc	tggaaatggca	cctttggcct	ttgctctggc	tgcggtatca	gggcgaagaa	1080
tgattgagat	aatgtttcag	ggtgaatttg	cgttttcagg	aaagtatacg	gttaattttct	1140
cagggcaagc	taaaaaaacgc	tctgaagata	aaagcgtaac	cagaaacgatt	tatactttat	1200
gogaagcaaaa	attattcggt	gaattattaa	cagaattgcg	ttcttgctct	gctgcactctg	1260
atttcgatga	ggttggttaa	ggatatggaa	aggatgatac	aaggtctgag	aaoggcagga	1320
taaatgctat	tttagcaaaa	gcattttaacc	cctgggttaa	atcatttttc	ggcgatgacc	1380
gtcgtgttta	taaagatagc	cgcgctat	acgcctgcac	cgcttatgag	atgtttcttcc	1440
gcgtcgatcc	acggtggaaa	aacgtcgacg	aggatgtggt	cttcattggag	attctcggac	1500
acgacgatga	gaacaccgag	ctgcactata	agcagttcaa	gctggccaac	ttctccagaa	1560
cctggcgacc	tgaagtggg	gatgaaaaca	ccaggctggt	ggctctgcag	aaactggacg	1620
atgaaatgcc	aggctttgct	agaggtgacg	ctggcgtccg	tctccatgaa	accgttaagc	1680
agctggtgga	gcaggaccca	tcagcaaaaa	taaccaacag	cactctccgg	gcctttaaat	1740
ttagcccgac	gatgattagc	cggtaacctg	agttttgccg	tgatgcattg	gggcagttcg	1800

[0297]

ttggcgagaa	cgggcagtg	cagctgaaga	tagagacacc	tgcaatcgto	ctgcctgatg	1860
aagaatccgt	tgagaccatc	gacgaaccgg	atgatgagtc	ccaagacgac	gagctggatg	1920
aagatgaaat	tgagctcgac	gaggggtggcg	gogatgaacc	aaccgaagag	gaagggccag	1980
aagaacatca	gccaaactgt	ctaaaaccgg	tcttcaagcc	tgcaaaaaat	aacgggggacg	2040
gaacgtacaa	gatagagttt	gaatacagatg	gaaagcatta	tgcttggtcc	ggccccgcgcg	2100
atagccctat	ggccgcaatg	cgatccgcat	gggaaacgta	ctacagctaa	aagaaaagcc	2160
acgggtgtta	atcggtggct	tttttattga	ggcctgtccc	taccatccc	ctgcaaggga	2220
cggaaggatt	aggcggaaac	tgcagetgca	actacggaca	tcgcctgccc	gaetgcaggg	2280
aottccccgc	gtaaagcggg	gcttaaattc	gggctggcca	accctatttt	tctgcaatcg	2340
ctggcgatgt	tagtttctgt	gatagcgttt	ccagcttttc	aatggccagc	tcaaatgtg	2400
ctggcgagcac	cttctccagt	tccgtatcaa	tatcggtgat	cggcagctct	ccacaagaca	2460
tactccggcg	accgccacga	actacatcgc	gcagcagctc	ccgttcgtag	acaegcatgt	2520
tgcccagagc	cgtttctgca	gccgttaata	tcggcgccac	gtcggcgatg	attgcceggga	2580
gatcatccac	ggttattggg	ttcgggtgatg	ggttccctgca	ggcgcggcgg	agagccatcc	2640
agacgcgcgt	aaccatgcg	ttaecgtact	gaaaactttg	tgctatgtcg	tttatcaggc	2700
ccgaagtctt	tctttctgcc	gccagtccag	tggttcacgg	gcgttcttag	gctcaggctc	2760
gacaaaagca	tactcgccgt	ttttccggat	agctggcaga	acctcgttcg	tcaccacttt	2820
goggaaaccgc	caggctgtcg	tccctgtttt	caccgcgtcg	cggcagcgga	ggattatggt	2880
gtagagacca	gattccgata	ccacatttac	ttccctggcc	atccgatcaa	gtttttgtgc	2940
ctcgggttaa	ccgaggttca	atttttccatc	atgatccagc	ttacgcaatg	catcagaagg	3000
gtttgctata	ttcaatgcag	cacagatata	cagcgcacga	aaccacgggt	caccacccgac	3060
aagaaccacc	cgtatagggt	ggctttcctg	aaatgaaaag	acggagagag	ccttcattgc	3120
gcctccccgg	atttcagctg	ctcagaaaagg	gacagggagc	agccgcgagc	ttcctgcgtg	3180
agtttcgcgcg	cgacctgcag	aagtcccgca	gcttccctgca	aatacagcgt	ggcctcataa	3240
ctggagatag	tgccgtgagc	agagcccaca	agcgttccaa	cctgcagcag	gcgttccctca	3300
atcgtctcca	gcaggccctg	ggcgtttaac	tgaattctgt	tcatgcgata	acctcgctga	3360
ccgggatacg	ggctgacaga	acgaggacaa	aacggctggc	gaactggcga	cgagcttctc	3420
gctcggatga	tgcaatggtg	gaaaggcggg	ggatatggga	ttttttgtcc	gtgcggacga	3480
cagctgcaaa	tttgaatttg	aacatggtat	gcattccctat	cttgtatagg	gtgtataccac	3540
cagagttgag	aatctctata	gggggtggtag	cccagacagg	gttctcaaca	ccggtacaag	3600
aagaaaccgg	cccaaccgaa	gttgggcccca	tctgagccac	cataattoag	gtatgcgcag	3660
atttaacaca	caaaaaaaca	cgtcggcgcg	tggtgtgcgc	ttcttgteat	tcgggggttga	3720
gaggcccggc	tgcaattttt	gctgcagcgg	ggtaactcta	ccgccaaaag	agaacgcacg	3780
tcaataattt	aggtggatat	tttaccocgt	gaccagtcac	gtgcacaggt	gttttttatag	3840
tttgctttac	tgaetgatca	gaacctgata	agttatttga	gtccggtaat	cttattgatg	3900
accgcagcca	ccttagatgt	tgtctcaaac	ccatacggc	cacgaatgag	ccactggaac	3960
ggaatagtca	gcaggtagag	cggaaacgaac	cacaaacggt	tcagacgctg	ccagaacgctc	4020
gcataccgac	gttccatcca	ttcgggtattg	tcgac			4055

大肠杆菌噬菌体 N15 端粒酶氨基酸序列(SEQ ID NO:15)

MSKVKIGELI	NTLVNEVEAI	DASDRPQGD	TKRIKAAAAR	YKNALFNDKR	KERFGKLQKR	60
ITANTFNAYM	SRARKRFDDK	LHHSFDKNIN	KLSEKYPLYS	EELSSWLSMP	TANIRQHMS	120
LQSKLKEIMP	LAEELSNVRI	GSKGSDAKIA	RLIKKYPDWS	FALSDLNSDD	WKERRDYLYK	180
LFQOGSALLE	ELHQLKVNHE	VLYHLQLSPA	ERTSIQQRWA	DVLREKKRNV	VVIDYPTVMQ	240
SIYDILNNPA	TLFSLNTRSG	MAPLAFALAA	VSGRRMIEIM	FQGEFAVSGK	YTVNFGQAK	300
KRSEDKSVTR	TIYTLCEAKL	FVELLTELRS	CSAASDFDEV	VKGYGKDDTR	SENGRINAIL	360
AKAFNPWVKS	FFGDDRRVYK	DSRAIYARIA	YEMFFRVDP	WKNVDEDVFE	MEILGHDDEN	420
TQLHYKQFKL	ANFSRTWRPE	VGENTRLIVA	LQKLDDEMPG	FARGDAGVRL	HETVKQLVEQ	480
DPSAKITNST	LRAFKFSPTM	ISRYLEFAAD	ALGQFVGENG	QWQLKIETPA	IVLPDEESVE	540
TIDEPDDESQ	DDELDEDEIE	LDEGGGDEPT	EEEGPEEHQP	TALKPVFKPA	KNNGDGTYKI	600
EFYDYGKHYA	WSPADSPMA	AMRSAWETYY	S			631

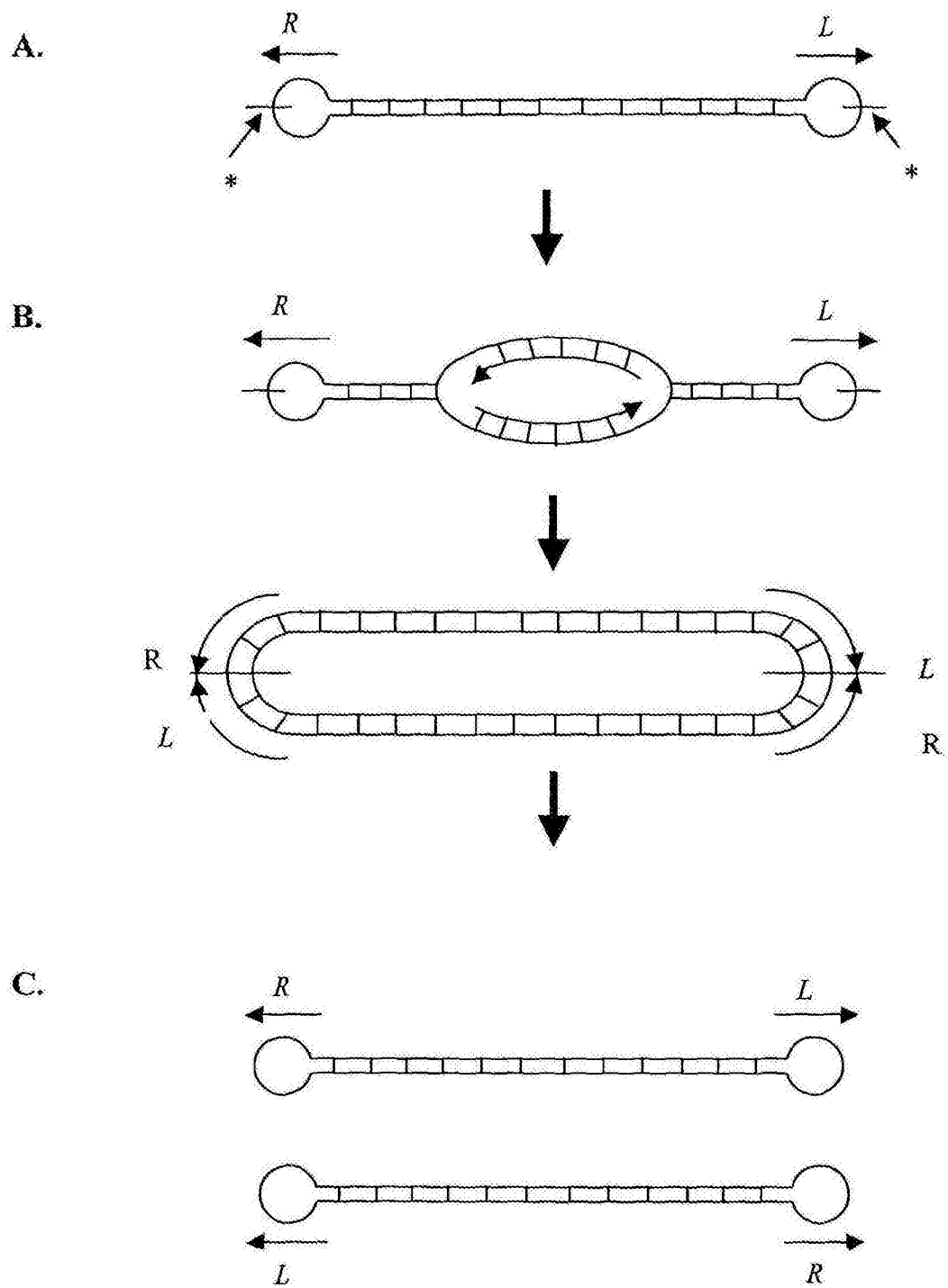


图1

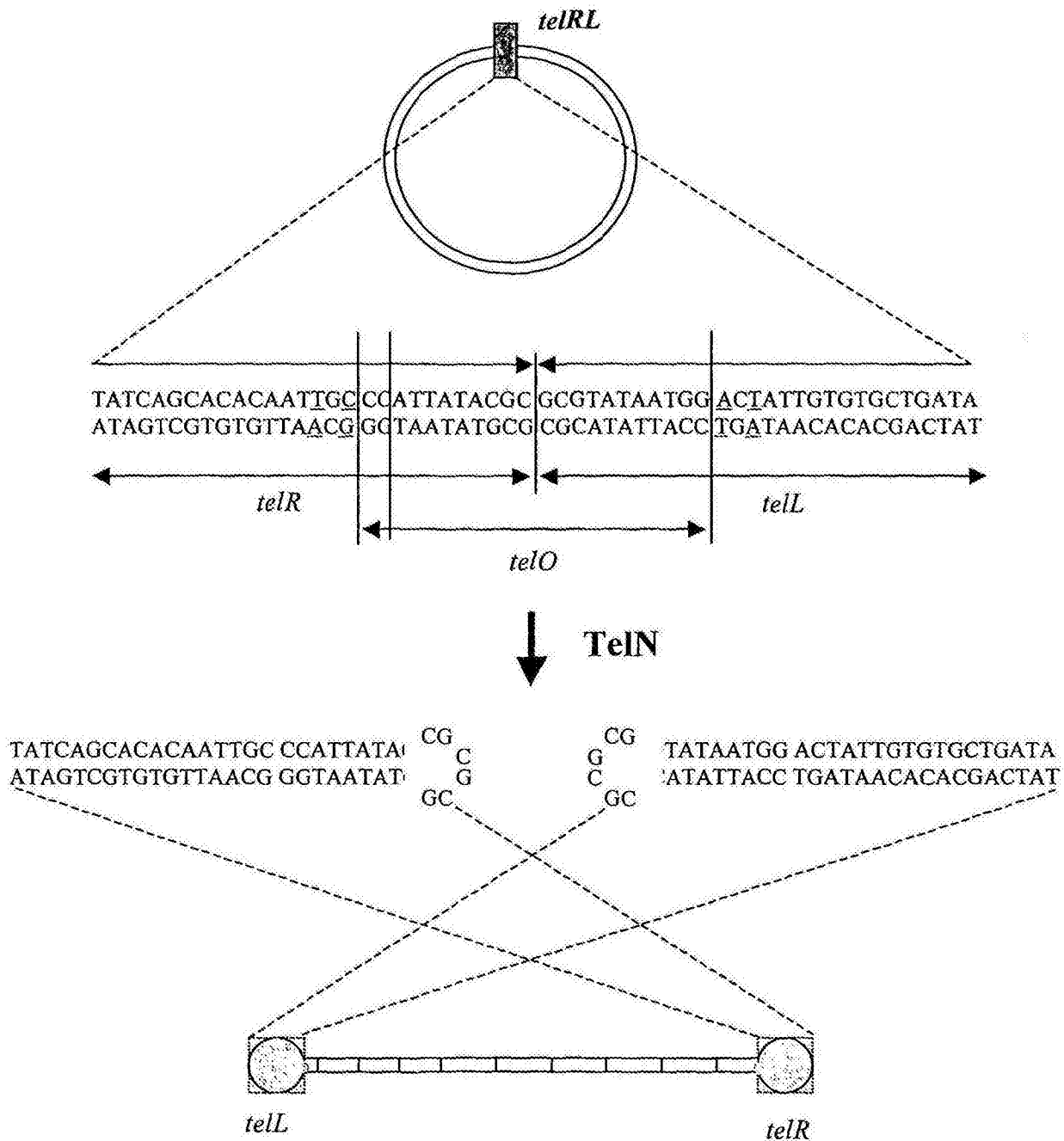


图2

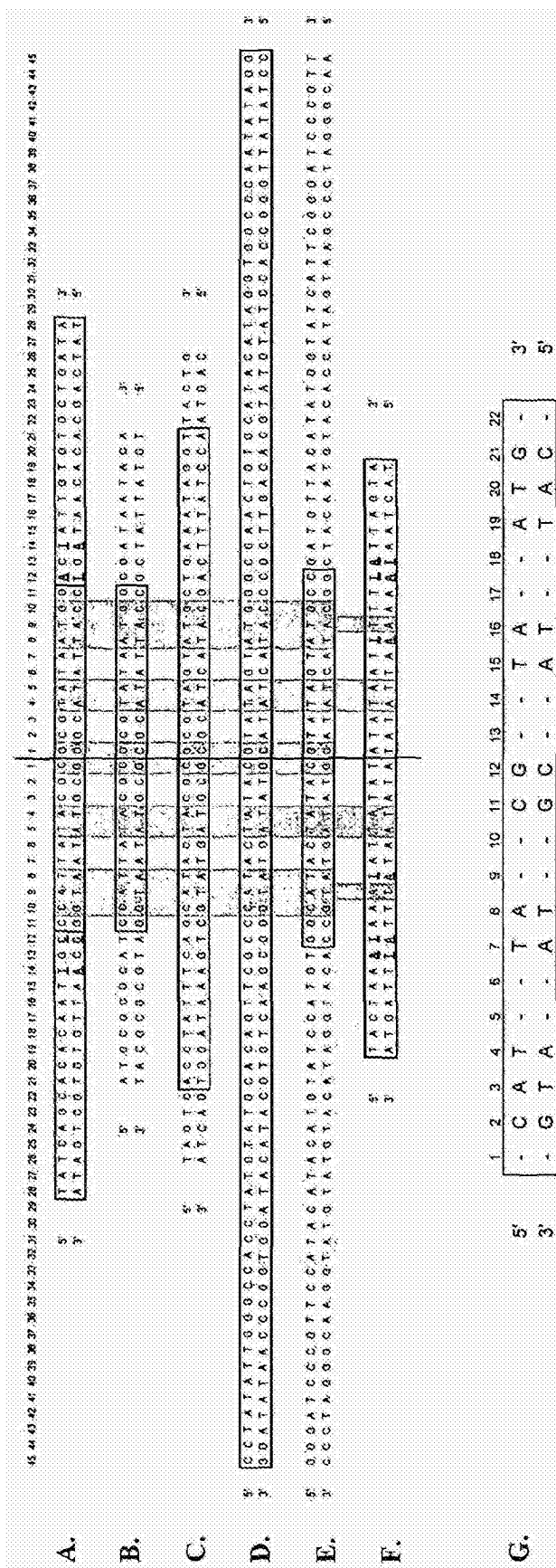


图3

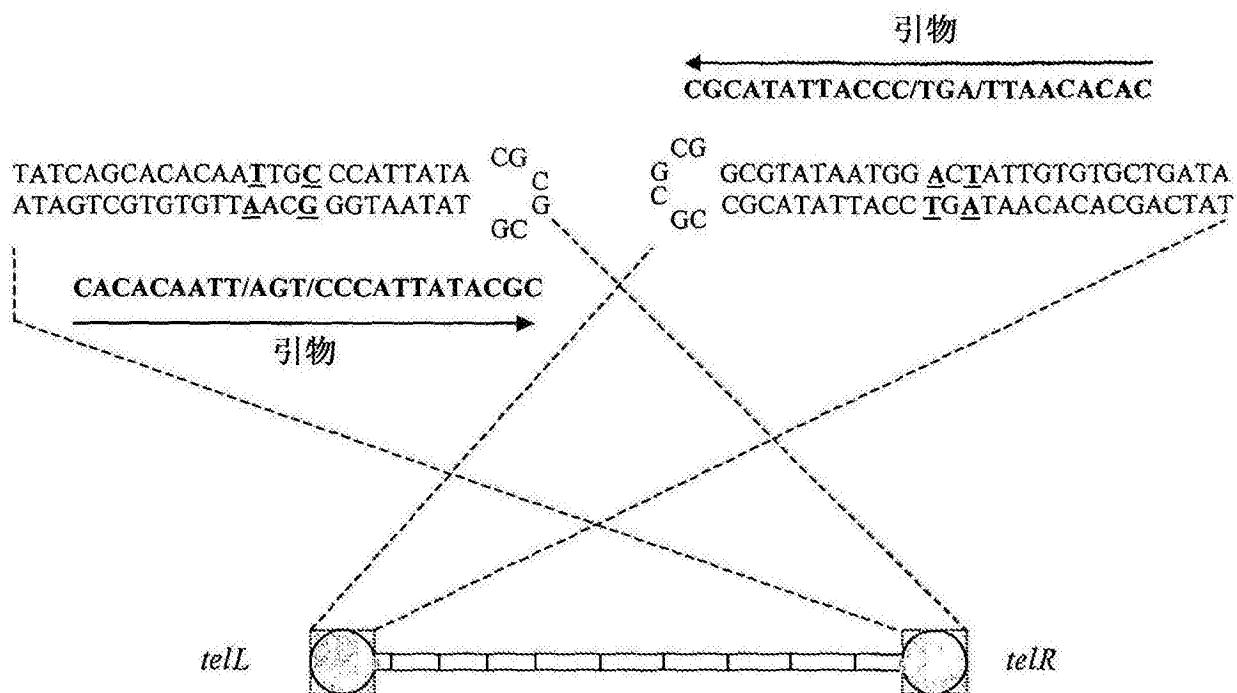


图4

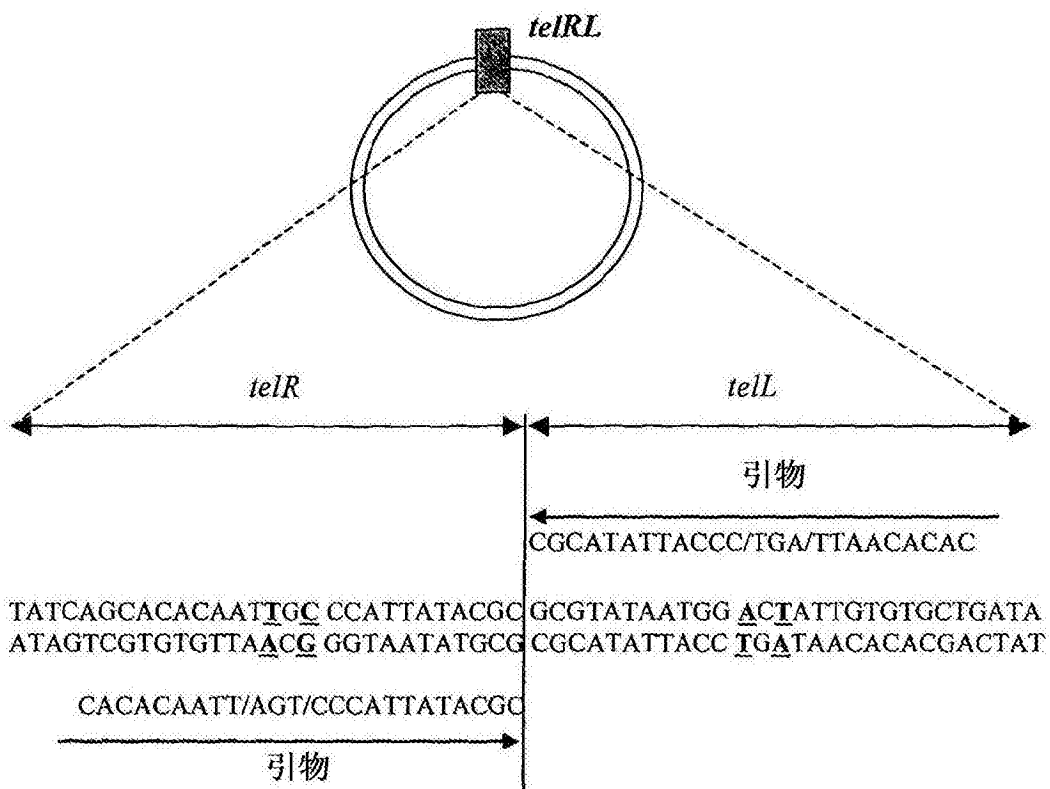


图5

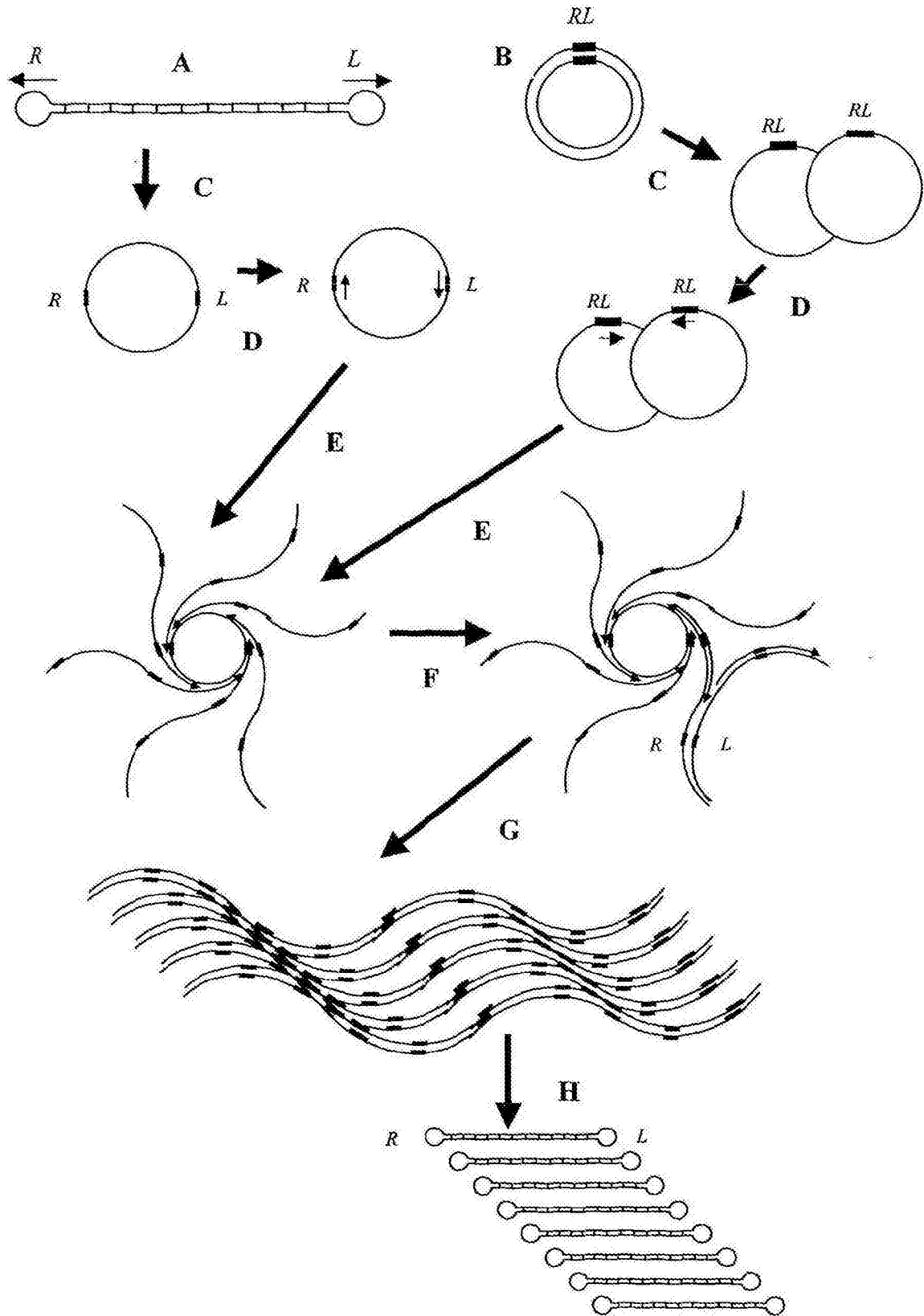


图6

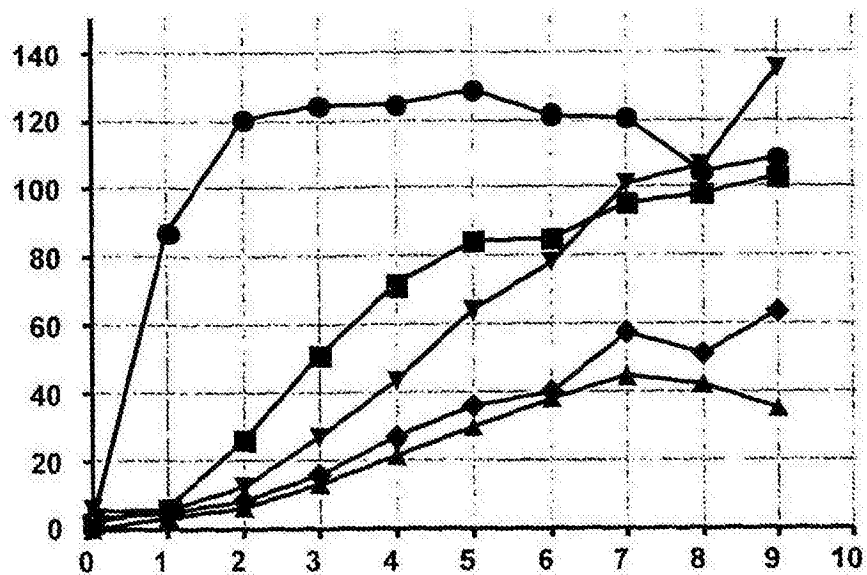


图7A

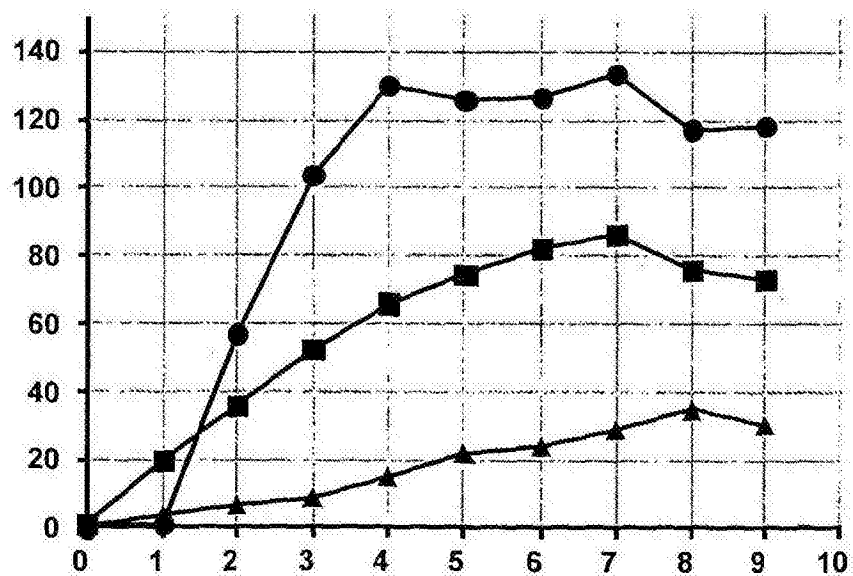


图7B

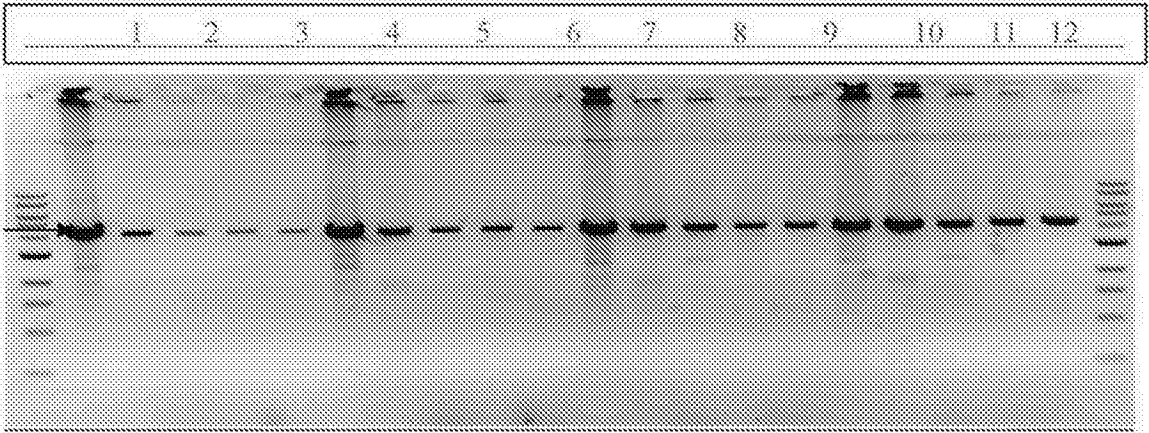


图8A

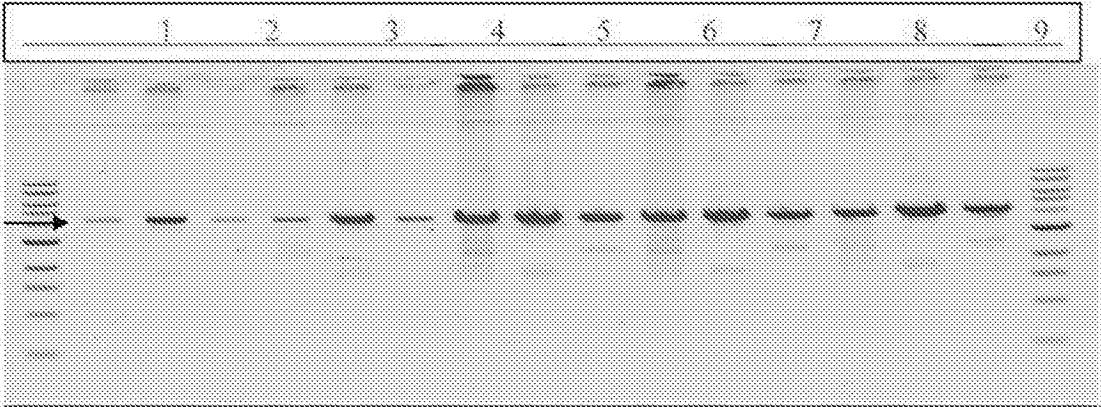


图8B

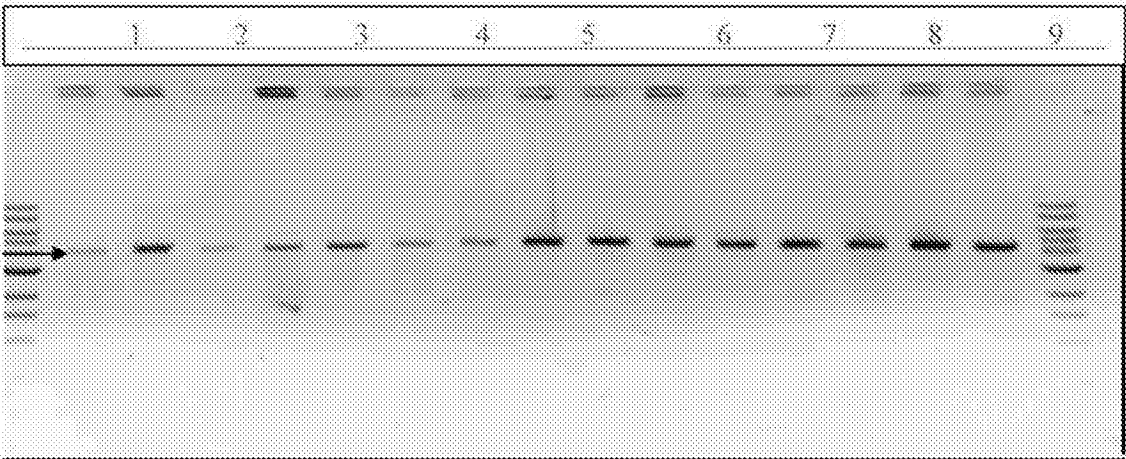


图8C

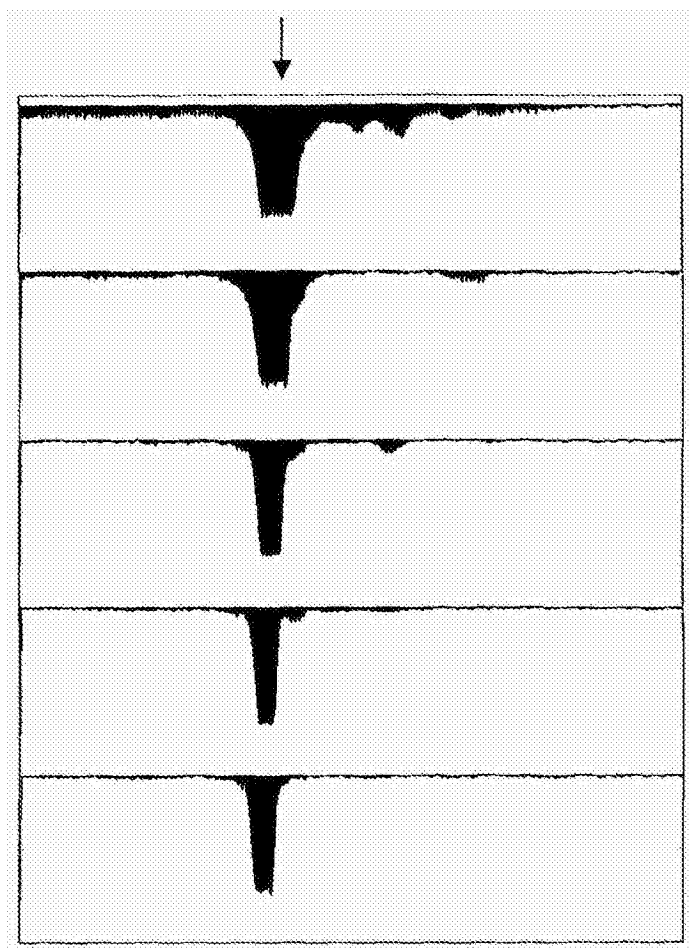


图9A

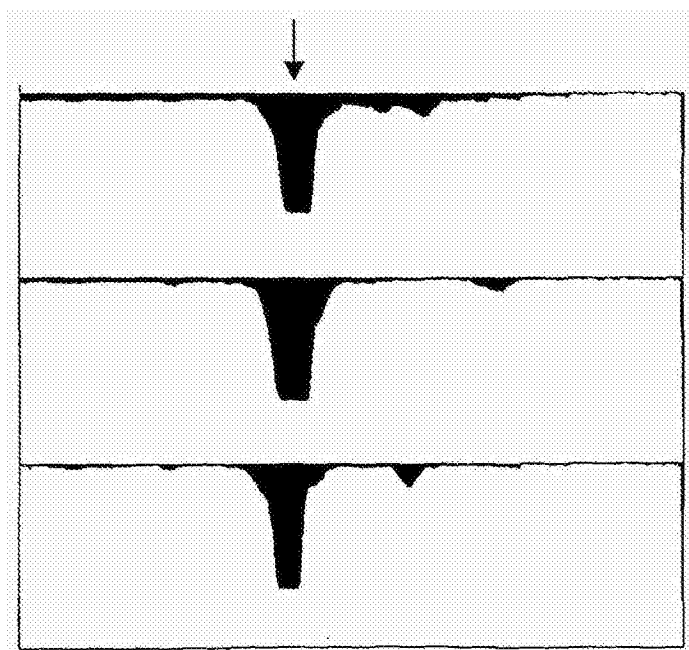


图9B