

# (12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局

(43) 国际公布日  
2017年10月19日 (19.10.2017)



(10) 国际公布号  
WO 2017/177759 A1

- (51) 国际专利分类号:  
C12N 9/12 (2006.01) C12N 15/10 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2017/073573
- (22) 国际申请日: 2017年2月15日 (15.02.2017)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:  
PCT/CN2016/079006 2016年4月11日 (11.04.2016)  
CN
- (71) 申请人: 清华大学 (TSINGHUA UNIVERSITY)  
[CN/CN]; 中国北京市海淀区清华园1号, Beijing 100084 (CN)。
- (72) 发明人: 朱听 (ZHU, Ting); 中国北京市海淀区清华园1号, Beijing 100084 (CN)。 刘磊 (LIU, Lei); 中国北京市海淀区清华园1号, Beijing 100084 (CN)。 徐维亮 (XU, Weiliang); 中国北京市海淀区清华园1号, Beijing 100084 (CN)。 王子谋 (WANG, Zimou); 中国北京市海淀区清华园1号, Beijing 100084 (CN)。 姜文君 (JIANG, Wenjun); 中国北京市海淀区清华园1号, Beijing 100084 (CN)。 王佳星 (WANG, Jiaxing); 中国北京市海淀区清华园1号, Beijing 100084 (CN)。 俞林萍 (YU, Linping); 中国北京市海淀区清华园1号, Beijing 100084 (CN)。
- (74) 代理人: 北京华睿卓成知识产权代理事务所 (普通合伙) (CHENG & PENG INTELLECTUAL PROPERTY LAW OFFICE); 中国北京市东城区东直门外大街42号宇飞大厦821, Beijing 100027 (CN)。
- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。
- 本国际公布:  
— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。



WO 2017/177759 A1

(54) Title: MIRROR NUCLEIC ACID REPLICATION SYSTEM

(54) 发明名称: 镜像核酸复制体系

(57) Abstract: Provided is a method for replicating a mirror nucleic acid, comprising: reacting a mirror nucleic acid template, a mirror nucleic acid primer and mirror dNTPs/rNTPs in the presence of a mirror nucleic acid polymerase, so as to obtain the mirror nucleic acid.

(57) 摘要: 提供了对镜像核酸进行复制的方法, 包括: 在镜像核酸聚合酶、镜像核酸模板、镜像核酸引物以及镜像 dNTPs/rNTPs 的存在下进行反应, 以获得所述镜像核酸。

## 镜像核酸复制体系

### 技术领域

本发明涉及基因工程领域，更具体地说，涉及镜像核酸的复制和转录。

### 背景技术

手性是三维空间中一些分子的基本属性，也就是一个物体不能和它在镜中的影像重合。像人的左手和右手一样，二者是物体及镜像的关系，而无论在三维空间中如何翻转都不能重叠。这就是物体在空间中的手性，一个分子的镜像被称为它的对映体。它们有着相同的物理和化学性质，熔点、分子量、溶解度、密度、NMR 谱等均相同。对映体之间相互不同的性质是它们的光学性质——旋转平面偏振光方向。手性在自然界中广泛存在。生命体中的生物大分子，如蛋白质、多糖、DNA 和 RNA 等具有手性。地球上所有生物体，无论是大型的植物、哺乳动物或是肉眼不可见的微生物，组成蛋白质的 20 种氨基酸，除了甘氨酸没有手性以外，其他 19 种氨基酸全都是 L 型；而承载遗传信息的 DNA 和 RNA，它们的核糖全都是 D 型。

氨基酸在紧邻羧基的位置有一个手性碳原子，它作为手性中心使得甘氨酸以外的氨基酸均有 L 和 D 两种手性。L 指的是左旋 (levorotatory) 或者 left-handed)，D 指的是右旋 (dextrorotatory 或者 right-handed)。对于核酸来说，D 型是自然界中存在的手性，核酸分子的手性中心位于它的骨架上。

生命体中的两种不同手性的化合物，生物活性可能会完全不同。生物个体中的酶和细胞表面的受体大多数都是手性的，两个对映体在生物体中往往以不同的途径被吸收、活化和降解。对于常见的手性药物而言，两种对映体可能有着等同的药理活性，也可能一个有活性另一个没有活性，甚至其对映体有毒。目前认为，生命体中存在的蛋白质、核酸这些分子，有着手性单一性的特点。如果在天然的蛋白质序列中掺入镜像的氨基酸，会破坏它本身的二级结构(Krause et al., 2000)，并对其蛋白功能产生严重影响。

在地球早期环境中，出现最原始的细胞之前应该会有氨基酸、核酸这些生物分子的存在，尽管 RNA 作为生命物质起源的理论比较充分，但是目前没有证据表明氨基酸和核酸是哪一种先在地球上出现。人们对 1969 年坠落在澳大利亚的 Murchison 的陨石研究发现，其中含有多种氨基酸，包括甘氨酸、丙氨酸和谷氨酸等，而且两种手性的氨基酸并不是 1:1 的，L-氨基酸多于 D 氨基酸(Engel and Macko, 2001)。Breslow 和 Levine 的实验表明，即使是很小的手性差异，也可以在两次溶液蒸发与结晶后，在溶液中保留 90% 以上的一种手性的氨基酸(Breslow and Levine, 2006)，而这种过程在地球早期环境中是可以发生的。另外有其他假说认为，进化中的单一手性来源于方解石产生具有旋光性的晶

体，选择性地吸附一种旋光性的氨基酸，使得另一种在溶液中的比例增加。除了以上两种解释，目前的 RNA 生命起源假说认为，在地球早期环境中由有机分子形成了 RNA，RNA 进化成有自我复制、自我剪切等活性的有生物功能的 RNA——RNA 核酶；在进一步进化中，氨基酸组成的蛋白酶或多肽开始参与催化 RNA 的复制、解旋等，可能是在这一阶段会经历手性选择的过程，这就导致了最后进化成的复杂生命体中手性的单一性。

## 发明内容

本研究中，我们用化学合成的方法构建了基于 D-ASFV pol X 镜像聚合酶的遗传信息转录和复制体系，实现了镜像中心法则中 L-DNA 的复制以及转录为 L-RNA 这两个步骤。我们证实了镜像 DNA 的复制和转录遵循碱基互补配对原则，并且有着良好的手性特异性。我们发现把天然和镜像的 DNA 复制体系放在同一个溶液体系中，两者可以分别工作而没有严重的相互干扰。镜像聚合酶体系扩增 L-DNAzyme 脱氧核酶序列，可以实现和天然脱氧核酶相对应的自我剪切活性。镜像遗传信息复制和转录的实现，说明了镜像生命分子的存在并具有生物活性的潜在可能，也为未来在实验室环境中构建镜像细胞奠定了基础。经过对系统的进一步优化，镜像复制系统还将用于生物方法高效筛选镜像核酸药物。

本发明提供了对镜像核酸进行复制的方法，包括：在镜像核酸聚合酶、镜像核酸模板、镜像核酸引物以及镜像 dNTPs/rNTPs 的存在下进行反应，以获得所述镜像核酸。

本发明提供了进行镜像 PCR 的方法，包括：在镜像核酸聚合酶、镜像核酸模板、镜像核酸引物以及镜像 dNTPs/rNTPs 的存在下进行反应，以获得镜像核酸。

本发明提供了筛选镜像核酸分子的方法，包括：在允许二者结合的条件下，使随机镜像核酸序列库与靶标分子接触；获得与靶标分子结合的镜像核酸分子；以及通过镜像 PCR 扩增所述与靶标分子结合的镜像核酸分子。

本发明还提供了 D-型 ASFV pol X，其序列如 SEQ ID NO:17 所示，其中除没有手性的甘氨酸以外，其余氨基酸均为 D-型氨基酸。

## 附图说明

图 1 显示 D-ASFV Pol X 的化学合成路线。174 个氨基酸的 ASFV pol X 分成肽段 1：Met1-Lys85，肽段 2：Cys86-Leu105 和肽段 3：Ala106-Leu174 三段来合成和连接。先将 Cys86 用 Acm 保护起来，合成 Cys86-Leu105，再合成肽段 3：Cys106-Glu107-Leu174，经过活化、连接得到肽段 2 和肽段 3 的连接产物，然后将 Cys106 脱硫形成 Ala106。再合成肽段 1，催化脱去肽段 2 的 Acm 保护基，进行活化和连接，获得全长 ASFV pol X 聚合酶。

图 2 显示 D-ASFV pol X 合成全长产物的检测。a. 折叠后的 D-ASFV pol X HPLC 谱图。HPLC 分析使用了 214nm 吸收波长, Vydac C18 (4.6 × 250 mm)液相色谱柱。 b. ESI-MS 谱图 通过对于离子峰图的分析 and 计算, 观察到主要合成产物的大小为 20317.0 Da, ASFV pol X 理论值为 20316.0 Da。

图 3 显示 L 型和 D 型 ASFV pol X 检测。a. SDS-PAGE 检测 大肠杆菌表达的、化学合成 L 型和化学合成 D 型的 ASFV pol X 聚合酶在 15%的 SDS-PAGE 胶上分离, 并银染检测。M, 蛋白分子量 marker。 b. CD 检测 L 型和 D 型化学合成 ASFV pol X 在 Applied Photophysics Pistar-180 CD spectrometer 上进行检测, 吸收曲线是 3 次独立检测扣除背景后的平均值。

图 4 显示镜像 DNA 检测。a. HPLC 检测(Chemgenes 公司提供) 分别对 4 种 L-dNTP 进行了 HPLC 的纯化和分析, L-dATP 和 L-dGTP 的结果几乎没有杂峰, 而 L-dTTP 和 L-dCTP 有明显的杂峰。 b. primer12 CD 检测 从公司获得的 L 型经过 HPLC 纯化和 D 型经过 PAGE 纯化的 primer12, 吸收曲线有对称关系 (L-primer12 的实际上样浓度小于 D-primer) c. template18 CD 检测 从公司获得的 L 型 D 型的 template18, 在 CD 检测中吸收曲线有对称关系 (L-template18 的样品实际上样浓度小于 D-primer)。

图 5 显示镜像聚合酶催化 DNA 延伸。a. 天然和镜像 DNA 复制体系示意图 天然 DNA 复制系统包含 L-聚合酶, D-DNA 和 D-dNTPs; 镜像 DNA 复制系统包含 D-聚合酶, L-DNA 和 L-dNTPs b. 天然和镜像聚合酶催化 DNA 延伸(12nt 引物, 18nt 模板) 缓冲液条件为 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 50 mM KCl, 在 10ul 天然或镜像反应体系中加入对应手性的 0.7 μg ASFV pol X, 2.5 μM primer12, 2.5 μM template18 和 4 种 0.4 mM dNTPs。将反应体系置于 37°C 4 小时。“\*”表示 5' FAM 标记。 c. L-DNA 全长产物 ESI-MS 检测 通过分析计算得到预期的全长产物分子量为 5516.9 (理论值 5517.6) 以及模板的分子量 5481.9 (理论值 5481.6) d. 天然和镜像聚合酶催化 DNA 延伸(15nt 引物, 21nt 模板) 反应体系在 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 50 mM KCl 中进行, 加入了 2.5 μM 15-nt L-primer15 (没有 FAM 修饰), 2.5 μM 21-nt L-template21, 0.2 mM L-dNTPs (每种浓度), 以及 1.4 μg D-ASFV pol X. 在 37°C 反应 12 小时后进行 20% PAGE 胶的分离, 并且用 Sybr Gold 染色检测。

图 6 显示镜像 DNA 多循环扩增示意图。第一个循环不带 FAM 的 reverse 11 引物扩增得到双链的模板, 第二个循环 FAM 标记的 primer11 只能与第一循环扩增出的模板(橘红色) 进行互补, 得到全长产物。第三个循环 可以产生 3 倍于第二个循环的荧光全长产物。

图 7 显示镜像 DNA 复制体系多循环扩增。D-ASFV pol X 多循环扩增 L-DNA, Cycle0 为对照组, 在 cycle1 进行之前取样。Cycle1 扩增得到 reverse11 的全长产物, 可以被后

续循环作为模板。样品在 8M 尿素变性的 20%PAGE 胶上分离,用 Typhoon Trio+扫描荧光。检测到的所有产物均为带 FAM 标记的 DNA。

图 8 显示镜像 DNA 延伸的碱基互补配对特异性。在天然或者镜像的系统中分别添加对应手性的 0.2mM 的 dATP、dTTP、dCTP、dGTP 中的一种,模板的下一个位点碱基分别为 A、T、C、G (黑底白字方框标记),缓冲液条件为 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 50 mM KCl, 加入对应手性的 0.7 μg ASFV pol X, 2.5 μM primer, 2.5 μM template18。在 37°C 反应 30 分钟,在 20%的 PAGE 胶上电泳并用 Typhoon Trio+扫描仪扫描荧光信号。“\*”表示 5'FAM 标记。“-”表示未添加 D 或 L-dNTPs 的对照组。

图9显示镜像DNA延伸的手性特异性。在缓冲液条件为50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 50 mM KCl, 加入0.7 μg ASFV pol X, 2.5 μM primer, 2.5 μM template18, 蛋白、引物-模板、dNTPs的手性在图的下方列出,一共有8种组合。在37°C反应12小时,在20%的PAGE胶上电泳并用Typhoon Trio+扫描仪扫描荧光信号。“\*”表示5'FAM标记。

图10显示天然和镜像系统在同一溶液中反应。在缓冲液条件为50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 50 mM KCl, 加入两种手性的0.7 μg ASFV pol X, 2.5 μM天然5'末端Cy5标记的primer20, 2.5 μM天然 template26, 2.5 μM镜像5'末端 FAM标记的primer12, 2.5 μM镜像 template18, 两种手性的dNTPs各四种,每种终浓度0.2mM, 反应体系在37°C反应4小时,反应产物在8M尿素变性的20%PAGE胶上分离,用Typhoon Trio+的Cy5和FAM荧光模式扫描,并将图片整合到一起。

图11显示天然和镜像DNAzyme的酶合成与活性检测。a. Zn<sup>2+</sup>依赖的DNAzyme 二级结构 在44ntDNAzyme的5'末端添加了12nt的引物序列,全长为56nt。二级结构通过mfold服务器生成(Zuker, 2003)。 b. DNAzyme的酶合成 天然和镜像的 DNAzyme都在 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 50 mM KCl缓冲液条件下反应,加入了66nt的DNAzyme template和12nt的引物,在37°C经过36小时获得全长产物。M, marker为化学合成的56nt序列作为分子量标准。 c. 将延伸得到的全长DNAzyme从PAGE胶上切下,放在缓冲液里扩散过夜,用天恩泽PAGE胶回收试剂盒进行沉淀回收。将沉淀的DNA用buffer1: 50 mM HEPES, pH 7.0和100 mM NaCl溶解,并在90°C加热2min,再冰上降温5min。然后加入等体积的buffer 2: 50 mM HEPES, pH 7.0, 100 mM NaCl, 4 mM ZnCl<sub>2</sub>或 40 mM MgCl<sub>2</sub> 以开始反应(Zn<sup>2+</sup>与Mg<sup>2+</sup>终浓度为2mM与20mM)。在37°C反应36小时。最后用EDTA终止反应。样品在12%PAGE胶上分离并显影。

图12显示天然和镜像体系DNA模板依赖的RNA转录。a.天然和镜像ASFV pol X催化的RNA转录 缓冲液条件为50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT,

50 mM KCl, 在10ul反应体系中加入0.7  $\mu\text{g}$  ASFV pol X, 2.5  $\mu\text{M}$  primer, 2.5  $\mu\text{M}$  template和4种0.4 mM rNTPs, 天然体系中加入2unit RNase抑制剂。在37 $^{\circ}\text{C}$ 反应60小时后终止反应。b. 加入rNTP的天然体系经过37 $^{\circ}\text{C}$  36h的反应得到全长产物。加热到75 $^{\circ}\text{C}$  10min使ASFV pol X和RNase抑制剂失活。在三个实验中分别加入1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的RNase A, 然后在23 $^{\circ}\text{C}$ 孵育10min。加入20 unit RNase抑制剂终止降解反应, 并且加入上样缓冲液。反应产物在8M尿素变性的20%PAGE胶上分离, 并且用Typhoon Trio+系统成像。Sample 1:对照组, 延伸0h Sample 2:D-primer12经过36小时延伸的全长产物 Sample 3:全长产物在75 $^{\circ}\text{C}$ 加热10min, 失活RNase抑制剂以及ASFV pol X Sample 4-6:全长延伸产物, 经75 $^{\circ}\text{C}$ 加热10min, 加入0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的RNase A, 23 $^{\circ}\text{C}$ 放置10min, 加入20 unit RNase抑制剂终止反应。在20%的PAGE胶上电泳并用Typhoon Trio+扫描仪扫描荧光信号。“\*”表示5'FAM标记。

图13显示天然和镜像体系RNA转录的碱基互补配对特异性。天然或者镜像的系统中分别添加对应手性的0.2mM的rATP、rUTP、rCTP、rGTP中的一种, 模板的下一个位点碱基分别为A、T、C、G(黑底白字方框标记), 缓冲液条件为50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 20 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM DTT, 50 mM KCl, 加入对应手性的0.7  $\mu\text{g}$  ASFV pol X, 2.5  $\mu\text{M}$  primer, 2.5  $\mu\text{M}$  template18。在37 $^{\circ}\text{C}$ 反应12小时, 在20%的PAGE胶上电泳并用Typhoon Trio+扫描仪扫描荧光信号。“\*”表示5'FAM标记。“-”表示未添加D或L-dNTPs的对照组。

图14显示突变型Dpo4聚合酶的全化学合成设计。(a)野生型Dpo4聚合酶的氨基酸序列;(b)带His6标签的突变型Dpo4聚合酶(Dpo4-5m)的氨基酸序列, 高亮氨基酸位点分别是为了增加肽段连接位点而引入的四个突变(S86A, N123A, S207A和S313A), 以及防止在折叠过程中二硫键形成而导致的分子内二聚化而引入的一个突变位点(C31S)。此外, 为防止在固相多肽合成以及肽段连接过程中被氧化将肽链中所有的甲硫氨酸用正亮氨酸替代(Met1, Met76, Met89, Met157, Met216和Met251)。本图中这9个肽段的颜色与图2中的肽段(Dpo4-1至Dpo4-9)使用的颜色一一对应。

图15显示Dpo4-5m的合成路线。用酰肼来代替硫酯介导9个肽段从C至N末端方向上的组装最终实现Dpo4-5m的化学全合成。

图16显示Dpo4-5m聚合酶的生化特性。(a)使用12%的SDS-PAGE分析化学合成的Dpo4-5m聚合酶以及从大肠杆菌菌株BL21(DE3)中表达纯化的重组Dpo4-5m聚合酶的分子量及纯度, 使用考马斯亮蓝染色, 在合成的Dpo4-5m中可以观察到少量未连接的肽段。M为标准分子量蛋白标记。(b)应用重组的野生型Dpo4(图中标为“WT Dpo4”), 重组的突变型Dpo4-5m(“Recombinant”)以及合成的突变型Dpo4-5m

(“Synthetic”)聚合酶 PCR 扩增 200 bp 的 DNA 序列。PCR 反应体系中包含 50 mM HEPES (pH 7.5), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 5 mM DTT, 10% glycerol, 3% DMSO, 0.1 mg/ml BSA, 200 μM 的超纯 dNTPs, 0.5 μM 的双向引物, 2 nM 线性双链 DNA 模板和大约 300 nM 的 Dpo4-5m 酶。反应 35 个循环后, 用 2% 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物并用 GoldView (Solarbio) 染色。NC 是负对照实验, 反应体系中仅有模板和引物, 而无聚合酶。(c) 应用合成 Dpo4-5m 在不同的循环数下扩增得到的 200bp DNA 产物。用 2% 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物并用 GoldView (Solarbio) 染色, 泳道上方的数字代表了扩增的循环数。M 是标准分子量 DNA 标记。

图 17 显示应用化学合成的 Dpo4-5m 聚合酶 PCR 扩增不同长度的 DNA 序列。(a) 应用合成的 Dpo4-5m 聚合酶 PCR 扩增长度从 110bp 到 1kb 的序列, 每个反应进行 35 个循环, 对于扩增 110-300 bp 的序列每个循环的延伸时间设为 2 分钟, 400-600 bp 的序列延伸 5 分钟, 700-1000 bp 的序列延伸 10 分钟。预期得到的扩增子长度标示在泳道上方, 在主产物条带下方可以看到引物二聚体条带。W/o template 表示不添加模板的负对照, 反应中仅有引物和酶及其它 PCR 成分; NC (110 bp)/NC (1 kb) 表示不添加酶的负对照, 反应中仅有引物和模板 (110 bp/1 kb) 及其它 PCR 成分。(b) 应用合成的 Dpo4-5m 聚合酶 PCR 扩增 1.1kb 的 dpo4 基因, 反应进行 35 个循环, 每个循环中的延伸时间设为 10 分钟。(c) 应用合成的 Dpo4-5m 聚合酶 PCR 扩增 120bp 的大肠杆菌中编码 5S rRNA 的基因 rrfB, 反应进行 35 个循环, 每个循环中的延伸时间为 2 分钟。(d) 应用合成的 Dpo4-5m 聚合酶 PCR 扩增 1.5kb 的大肠杆菌中编码 16S rRNA 基因 rrfC, 反应进行 35 个循环, 每个循环中的延伸时间为 15 分钟, 在主产物条带下方可以观察到引物二聚体。所有的 PCR 产物都用 2% 的琼脂糖凝胶电泳进行分析, 并用 GoldView 染色。预期的扩增子长度标示在泳道上方, NC 表示不添加酶的负对照, 反应中仅有引物和模板及其它 PCR 成分, M 为标准分子量 DNA 标记。

图 18 显示应用合成的 Dpo4-5m 聚合酶进行组装 PCR。(a, b) 由 2 条具有 30bp 重叠区域的长引物 (tC19Z-F115 和 tC19Z-R113) 进行组装 PCR 反应, 扩增的目标产物为 198bp 的 tC19Z 基因, 反应进行 20 个循环, PCR 产物用 3% 高分辨率琼脂糖凝胶电泳分析并用 GoldView (Solarbio) 染色。Exo I 表示用核酸外切酶 I 处理, 此酶只消化单链 DNA 而不消化双链 DNA。(c, d) 由 6 条长度范围在 47 nt 到 59 nt 的短引物进行三步 PCR 反应, 组装 198bp 长的 tC19Z 基因, PCR 产物用 3% 高分辨率琼脂糖凝胶电泳分析并用 GoldView (Solarbio) 染色。第一、二、三步 PCR 反应的循环数分别为 5、10 和 20。这三步 PCR 反应预期扩增的序列长度分别为 88 bp, 162 bp 和 198 bp (标示在泳道上方)。在主产物条带下方可以观察到引物二聚体, M 为标准分子量 DNA 标记。

图 19 显示 Dpo4-10 的制备。(A) 将 54 mg Dpo4-1 溶解于 2 ml 酸化连接缓冲液 (6 M

Gn·HCl 和 0.1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  的水溶液, pH 3.0)。将混合物放置于冰盐浴中冷却, 然后加入 200  $\mu\text{l}$  含 0.5 M  $\text{NaNO}_2$  的酸化连接缓冲液, 在冰盐浴中搅拌 30 分钟后, 加入 2 ml 0.2 M MPAA (溶于 6 M Gn·HCl 和 0.1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 6.0)。再加入 49 mg 的 Dpo4-2, 并于室温下用氢氧化钠溶液将溶液 pH 调至 6.5。反应 15 个小时后, 用三(2-羧乙基)膦还原, 随后进行 HPLC 纯化, 最终得到 52 mg 的 Dpo4-10, 产率为 51%; (B) Dpo4-10 的分析型高效液相色谱图( $\lambda=214$  nm), 柱子: Welch C4; 梯度: 流动相配比  $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$  从 20% 到 70% (二者均含 0.1% TFA), 洗脱 30 分钟以上; (C) Dpo4-10 的电喷雾电离质谱图。

图 20 显示 Dpo4-11 的制备。(A) 将 43 mg Dpo4-10 溶解于 2 ml 酸化连接缓冲液 (6 M Gn·HCl 和 0.1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  的水溶液, pH 3.0)。将混合物放置于冰盐浴中冷却, 然后加入 160  $\mu\text{l}$  含 0.5 M  $\text{NaNO}_2$  的酸化连接缓冲液, 体系在冰盐浴中搅拌 25 分钟后加入 24 mg 巯乙磺酸钠 (MESNa)。在室温下用氢氧化钠溶液将溶液 pH 调至 5.1。反应 1 个小时后, 用 HPLC 纯化反应产物, 最终得到 25 mg 的 Dpo4-11, 产率为 60%; (B) Dpo4-11 的分析型高效液相色谱图( $\lambda=214$  nm), 柱子: Welch C4; 梯度: 流动相配比  $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$  从 20% 到 100% (二者均含 0.1% TFA), 洗脱 30 分钟以上; (C) Dpo4-11 的电喷雾电离质谱图。

图 21 显示 Dpo4-12 的制备。(A) 将 45 mg Dpo4-3 溶解于 4 ml 酸化连接缓冲液 (6 M Gn·HCl 和 0.1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  的水溶液, pH 3.0)。将混合物放置于冰盐浴中冷却, 然后加入 200  $\mu\text{l}$  含 0.5 M  $\text{NaNO}_2$  的酸化连接缓冲液, 在冰盐浴中搅拌 25 分钟后加入 1 ml 含 0.4 M 巯乙磺酸钠 (MESNa) 的酸化连接缓冲液。在室温下用氢氧化钠溶液将溶液 pH 调至 5.1。反应 1 个小时后, 用 HPLC 纯化产物, 最终得到 19 mg 的 Dpo4-12, 产率为 41%; (B) Dpo4-12 的分析型高效液相色谱图( $\lambda=214$  nm), 柱子: Welch C4; 梯度: 流动相配比  $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$  从 20% 到 70% (二者均含 0.1% TFA), 洗脱 30 分钟以上; (C) Dpo4-12 的电喷雾电离质谱图。

图 22 显示 Dpo4-13 的制备。(A) 将 70 mg Dpo4-5 溶解于 2.4 ml 酸化连接缓冲液 (6 M Gn·HCl 和 0.1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  的水溶液, pH 2.9)。将混合物放置于冰盐浴中冷却, 然后加入 240  $\mu\text{l}$  含 0.5 M  $\text{NaNO}_2$  的酸化连接缓冲液, 在冰盐浴中搅拌约 30 分钟后加入 2.4 ml 0.2 M MPAA (溶于 6 M Gn·HCl 和 0.1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 4.9)。在室温下用氢氧化钠溶液将溶液的 pH 调至 5.4, 添加 36 mg 的 Dpo4-6 后, 重新将溶液 pH 调至 6.6。反应 11 个小时后, 分析产物并将 pH 调节至 9.0 来完全去除 Tfa 基团。约 1 小时后再次分析产物, 然后加入 72 mg  $\text{MeONH}_2\cdot\text{HCl}$  来实现 Thz 向 Cys 的转化, 并加入 TCEP·HCl 将反应体系的 pH 调到 4.0。约 3 小时后, 用 HPLC 分析并纯化产物, 最终获得 56 mg Dpo4-13, 产率为 57%。(B) Dpo4-13 的分析型高效液相色谱图( $\lambda=214$  nm), 柱子: Welch C4; 梯度:

流动相配比  $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O}$  从 20% 到 70% (二者均含 0.1% TFA), 洗脱 30 分钟以上; (C) Dpo4-13 的电喷雾电离质谱图。

图 23 显示 Dpo4-14 的制备。(A) Dpo4-8 (53 mg) 和 Dpo4-9 (48 mg) 的连接反应与 Dpo4-5、Dpo4-6 的连接过程相似, 请参见图 22。最终获得 46 mg 的 Dpo4-13, 产率为 46%; (B) Dpo4-14 的分析型高效液相色谱图( $\lambda=214 \text{ nm}$ ), 柱子: Welch C4; 梯度: 流动相配比  $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O}$  从 20% 到 100% (二者均含 0.1% TFA), 洗脱 30 分钟以上; (C) Dpo4-14 的电喷雾电离质谱图。

图 24 显示 Dpo4-15 的制备。(A) 将 36 mg Dpo4-4 溶解于 2 ml 酸化连接缓冲液 (6 M  $\text{Gn} \cdot \text{HCl}$  和 0.1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  的水溶液, pH 3.0)。将混合物放置于冰盐浴中冷却, 然后加入 400  $\mu\text{l}$  含 0.5 M  $\text{NaNO}_2$  的酸化连接缓冲液, 在冰盐浴中搅拌 30 分钟后加入 2 ml 0.2 M MPAA (溶于 6 M  $\text{Gn} \cdot \text{HCl}$  和 0.1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 6.0)。再加入 81 mg 的 Dpo4-13 后, 室温下用氢氧化钠溶液将溶液 pH 调至 6.5。反应 15 个小时后, 用三(2-羧乙基)膦将产物还原后进行 HPLC 纯化, 最终得到 54 mg 的 Dpo4-15, 产率为 46%; (B) Dpo4-15 的电喷雾电离质谱图。

图 25 显示 Dpo4-16 的制备。(A) 将 82 mg Dpo4-15 溶解于 7 ml 酸化连接缓冲液 (6 M  $\text{Gn} \cdot \text{HCl}$  和 0.1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  的水溶液, pH 3.1)。将混合物放置于冰盐浴中冷却, 然后加入 140  $\mu\text{l}$  含 0.5 M  $\text{NaNO}_2$  的酸化连接缓冲液, 在冰盐浴中搅拌 30 分钟后加入 1.75 ml 含 0.8 M 硫乙磺酸钠 (MESNa) 的酸化连接缓冲液。在室温下用氢氧化钠溶液将溶液 pH 调至 5.5。反应 2 个小时后, 用三(2-羧乙基)膦将产物还原后再用 HPLC 纯化产物, 最终得到 69 mg 的 Dpo4-16, 产率为 83%; (B) Dpo4-16 的分析型高效液相色谱图( $\lambda=214 \text{ nm}$ ), 柱子: Welch C4; 梯度: 流动相配比  $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O}$  从 20% 到 70% (二者均含 0.1% TFA), 洗脱 30 分钟以上; (C) Dpo4-16 的电喷雾电离质谱图。

图 26 显示 Dpo4-17 的制备。(A) Dpo4-7 (25mg) 和 Dpo4-14 (47mg) 的连接反应与 Dpo4-5、Dpo4-6 的连接过程相似, 请参见图 22。最终获得 41 mg 的 Dpo4-17, 产率为 59%; (B) Dpo4-17 的分析型高效液相色谱图( $\lambda=214 \text{ nm}$ ), 柱子: Welch C4; 梯度: 流动相配比  $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O}$  从 20% 到 70% (二者均含 0.1% TFA), 洗脱 30 分钟以上; (C) Dpo4-17 的电喷雾电离质谱图。

图 27 显示 Dpo4-18 的制备。(A) 将 37 mg Dpo4-16 和 41 mg Dpo4-17 溶解于 1.1ml 的水溶液 (含 6 M  $\text{Gn} \cdot \text{HCl}$ , 0.1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 40 mM TCEP 和 125 mM MPAA, pH 6.8) 中, 反应混合物的 pH 调至 6.6。反应 12 个小时后, 用 HPLC 分析产物后再进行稀释和纯化, 最终得到 55mg 的 Dpo4-18, 产率为 75%; (B) Dpo4-18 的分析型高效液相色谱图( $\lambda=214 \text{ nm}$ ), 柱子: Welch C4; 梯度: 流动相配比  $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O}$  从 30% 到 80% (二者均含 0.1% TFA), 洗脱 30 分钟以上; (C) Dpo4-18 的电喷雾电离质谱图。

图 28 显示 Dpo4-19 的制备。(A) 通过 Pd 辅助的去保护法除去 Dpo4-18 中的 Acm 基团[1]，

将 55mg Dpo4-18 溶解于 2ml 的水溶液 ( 含 6 M Gn·HCl, 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 和 40 mM TCEP, pH 7.1 ) , 再将溶解了 10.4mg PdCl<sub>2</sub> 的 0.4ml 水溶液 ( 含 6 M Gn·HCl 和 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ) 加入到反应体系中。反应 13 个小时后, 再加入 4 ml 0.75 M DTT 的水溶液( 含 6 M Gn·HCl 和 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ) , 将反应混合物搅拌 1 小时, 用 HPLC 纯化产物。最终得到 47mg 的 Dpo4-19, 产率为 86%。(B) Dpo4-19 的分析型高效液相色谱图( $\lambda=214$  nm), 柱子: Welch C4 梯度: 流动相配比 CH<sub>3</sub>CN : H<sub>2</sub>O 从 30% 到 80% (二者均含 0.1% TFA), 洗脱 30 分钟以上; (C) Dpo4-19 的电喷雾电离质谱图。

图 29 显示 Dpo4-20 的制备。(A) 将 19mg Dpo4-12 和 47 mg Dpo4-19 溶解于 1.8ml 的水溶液 ( 含 6 M Gn·HCl, 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 40 mM TCEP 和 100 mM MPAA, pH 6.9 ) 中, 将反应混合物的 pH 调至 6.6。反应 15 个小时后, 用 HPLC 分析产物后再进行稀释和纯化, 最终得到 47mg 的 Dpo4-20, 产率为 85%; (B) Dpo4-20 的分析型高效液相色谱图 ( $\lambda=214$  nm), 柱子: Welch C4; 梯度: 流动相配比 CH<sub>3</sub>CN : H<sub>2</sub>O 从 30% 到 80% (二者均含 0.1% TFA), 洗脱 30 分钟以上; (C) Dpo4-20 的电喷雾电离质谱图。

图 30 显示 Dpo4-21 的制备。(A) 将 24mg Dpo4-20 溶解于 1.6 ml 的醋酸溶液, 然后在溶液中加入 10 mg 醋酸银, 过夜搅拌 14 个小时后, 加入 0.3 ml 2-巯基乙醇。用连接溶液 ( 6 M Gn·HCl, 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH=7 ) 将反应体系稀释到两倍, 离心后的上清液用半制备级的 HPLC 纯化, 沉淀物则进行彻底洗涤和纯化。冻干后得到 20mg 除去 Acm 基团的 Dpo4-21, 产率为 83%; (B) Dpo4-21 的分析型高效液相色谱图( $\lambda=214$  nm), 柱子: Welch C4; 梯度: 流动相配比 CH<sub>3</sub>CN : H<sub>2</sub>O 从 20% 到 100% (二者均含 0.1% TFA), 洗脱 30 分钟以上; (C) Dpo4-21 的电喷雾电离质谱图。

图 31 显示 Dpo4-22 的制备。(A) 将 13 mg ( 2 倍当量 ) Dpo4-11 和 20 mg Dpo4-21 溶解于 0.4 ml 的水溶液 ( 含 6 M Gn·HCl, 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 40 mM TCEP 和 100 mM MPAA, pH 6.9 ) 中, 将反应混合物的 pH 调至 6.6。反应 15 个小时后的产物用 HPLC 分析, 再进行稀释和纯化, 最终得到 21mg 的 Dpo4-22, 产率为 78%; (B) Dpo4-22 的分析型高效液相色谱图( $\lambda=214$  nm), 柱子: Welch C4; 梯度: 流动相配比 CH<sub>3</sub>CN : H<sub>2</sub>O 从 20% 到 100% (二者均含 0.1% TFA), 洗脱 30 分钟以上; (C) Dpo4-22 的电喷雾电离质谱图。

图 32 显示 Dpo4-23( Dpo4-5m )的制备。(A) 将 20 mg Dpo4-22 溶解于 6 ml 200 mM TCEP 溶液 ( 含 6 M Gn·HCl, 0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 6.9 ) 中, 再加入 0.1 mmol (32 mg) VA-044 和 0.2 mmol (62 mg) 还原型 L-谷胱甘肽。反应在 37°C 过夜搅拌。用 HPLC 和 ESI-MS 分析脱硫产物 Dpo4-23, 并用半制备型 HPLC 进行纯化。最终获得 16mg 冻干的 Dpo4-23,

产率为 80%。(B) Dpo4-23 的分析型高效液相色谱图( $\lambda=214\text{ nm}$ )，柱子：Welch C4；梯度：流动相配比  $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$  从 20%到 100% (二者均含 0.1% TFA)，洗脱 30 分钟以上；(C) Dpo4-23 的电喷雾电离质谱图。(D) Dpo4-23 经过进一步复性，加热，镍柱纯化后的电喷雾电离质谱图，产率为 15% (最终产物约 2 mg)。

图 33 显示人工合成的 Dpo4-5m PCR 扩增 200bp 的序列 从 0-10 个循环依次取样。

2%的琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物，并用 GoldView 染色。取样的循环数标记在泳道上方，M 是 DNA 标记。

图 34 显示 PCR 扩增序列 Sanger 测序结果与原始模板序列的比对。将 PCR 产物克隆到 T 载体上，并且挑取阳性菌落进行 sanger 测序，共存在 7 个单碱基缺失和 19 个单碱基突变，表明 35 个循环后的累积突变率约为 0.9%。

### 具体实施方式

本发明提供了一种对镜像核酸进行复制的方法，包括：在镜像核酸聚合酶、镜像核酸模板、镜像核酸引物以及镜像 dNTPs/rNTPs 的存在下进行反应，以获得所述镜像核酸。

本文所用的术语“镜像”是指在手性上与天然物质呈镜像关系的异构体。

本文所用的术语“镜像核酸”是指 L-型核酸，它与天然核酸（即 D-型核酸）呈镜像关系。镜像核酸包括 L-型 DNA 和 L-型 RNA。术语“镜像 DNA”与“L-型 DNA”或“L-DNA”可以互换使用。

本文所用的术语“镜像核酸聚合酶”或“镜像聚合酶”是指 D-型聚合酶，它与天然聚合酶（即 L-型聚合酶）呈镜像关系。术语“镜像聚合酶”与“D-型聚合酶”或“D-聚合酶”可以互换使用。例如，“D-Dpo4”是指 D-型 Dpo4 聚合酶，它与天然的 L-型 Dpo4 聚合酶呈镜像关系。

特别适合于本发明的聚合酶包括 D-ASFV pol X、D-Dpo4、D-Taq 聚合酶以及 D-Pfu 聚合酶。

Dpo4 (*Sulfolobus solfataricus* P2 DNA polymerase IV, 硫化叶菌 P2 DNA 聚合酶 IV) 是一种热稳定的聚合酶，也能在 37°C 合成 DNA。它的错配率在  $8\times 10^{-3}$ - $3\times 10^{-4}$  之间。它是一种可以替代 Taq 做多循环 PCR 反应的聚合酶。它的氨基酸序列长度在目前的化学合成技术可实现范围内。

Taq 聚合酶是 1976 年 Chien 及其同事在热泉微生物 *Thermus aquaticus* 中发现的热稳定聚合酶，它可以在 DNA 变性温度下保持活性，所以它替代 *E. coli* 聚合酶被用于 PCR 反应。Taq 的最适温度在 75°C-80°C，并且在 92.5°C 的半衰期约为 2h。

Pfu 聚合酶是在 *Pyrococcus furiosus* 中发现的，它在微生物中的功能是在细胞分裂期复制 DNA。它优于 Taq 的地方在于它具有 3'-5' 外切酶活性，可以在 DNA 合成过程中

剪切掉延伸的链上错误添加的核苷酸。商业化的 Pfu 错配率在 130 万分之一左右。

在一些实施方案中，所述镜像核酸、镜像核酸模板、镜像核酸引物以及镜像 dNTPs/rNTPs 为 L-型，所述镜像核酸聚合酶为 D 型。在某些情况下，反应体系中可以混有不同类型的模板、引物或 dNTPs/rNTPs（例如可以混有一部分 D 型模板引物或 dNTPs/rNTPs），但不会对反应产生严重干扰。

此处的核酸复制反应可以只进行一个循环，也可以进行多个循环。这可以由技术人员根据实际需要来确定。

此处所用的术语“多个”是指至少 2 个。例如，“多个循环”是指 2 个或多个循环，例如 3 个、4 个或 10 个循环。

此处所用的术语“复制”包括在 DNA 模板和 dNTPs 存在下获得目标 DNA 的一个或多个拷贝；也包括在 DNA 模板和 rNTPs 存在下获得目标 RNA 的一个或多个拷贝（此过程也可以称为 RNA 的“转录”）。

在核酸的复制过程中，模板和引物通常为 DNA，如果目标核酸为 DNA，则反应体系中应当添加 dNTPs；如果目标核酸为 RNA，则反应体系中应当添加 rNTPs。

在一些实施方案中，所述镜像核酸为 L 型 DNA，例如 L-DNAzyme。在另一些实施方案中，所述镜像核酸为 L 型 RNA。

在特别优选的实施方案中，所述反应为聚合酶链式反应。

本文所用的术语“PCR”具有本领域公知的含义，是指聚合酶链式反应（Polymerase Chain Reaction）。

在特别优选的实施方案中，所述反应在如下缓冲液中进行：50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 50 mM KCl。

本发明还提供了进行镜像 PCR 的方法，包括：在镜像核酸聚合酶、镜像核酸模板、镜像核酸引物以及镜像 dNTPs/rNTPs 的存在下进行反应，以获得镜像核酸。

本发明还提供了筛选镜像核酸分子的方法，包括：在允许二者结合的条件下，使随机镜像核酸序列库与靶标分子接触；获得与靶标分子结合的镜像核酸分子；以及通过镜像 PCR 扩增所述与靶标分子结合的镜像核酸分子。

优选地，所述靶标分子被固定在固相介质上，这样可能更有利于分离纯化。

例如，在随机镜像核酸序列库与靶标分子接触之后，可以通过洗涤去除不与靶标分子结合的镜像核酸序列，从而获得与靶标分子结合的镜像核酸分子。

所述镜像核酸分子可以为 L 型 DNA 或 L 型 RNA。

优选地，所述镜像 PCR 中使用的镜像核酸聚合酶可以是 D-ASFV pol X、D-Dpo4、D-Taq 聚合酶或 D-Pfu 聚合酶。

在本发明中，术语“核酸聚合酶”应当做广义的理解，可以指野生型酶，也可以指

该酶的功能性变体。

本文使用的术语“功能性变体”是指在野生型酶的氨基酸序列中含有一个或几个(例如 1-5 个、1-10 个或者 1-15 个,具体地,例如可以是 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、15 个甚至更多个)氨基酸的取代、缺失或添加的变体,并且所述变体基本保留了野生型酶的生物学活性,例如保留野生型酶生物学活性的 50%、60%、70%、80%或 90%或更高。所述“功能性变体”可以是自然产生的变体,也可以是人工变体,例如通过定点诱变获得的变体,或通过基因重组方法产生的变体。

在本发明的优选实施方案中,所述镜像核酸聚合酶可以包含亲和标签,以便于蛋白的纯化和重复利用,例如多聚组氨酸标签(His-Tag 或 His 标签)、多聚精氨酸标签、谷胱甘肽-S-转移酶标签等。

例如,本发明的优选实施方案中提供了 Dpo4 蛋白的功能性变体 Dpo4-5m,其中包含 6 个位点的氨基酸突变以及 His6 标签。

在特别优选的实施方案中,镜像 PCR 在如下缓冲液中进行: 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 50 mM KCl。

本发明还提供了 D-型 ASFV pol X,其序列如 SEQ ID NO:17 所示,其中除没有手性的甘氨酸以外,其余氨基酸均为 D-型氨基酸。

下面将参照附图和实施例对本发明进行进一步描述,附图和实施例只是出于解释本发明的目的,不应当被理解为是对本发明的限制。

## 实施例 1

### 哺乳动物中的 D-氨基酸

D-氨基酸存在于哺乳动物的体内。1965 年 Hoepflich 及同事在豚鼠和小鼠血液中检测到 D-Ala,这是研究者首次在哺乳动物体内发现 D-氨基酸(Corrigan, 1969)。到现在为止, D-Ala 被发现存在于多种哺乳动物的大脑、垂体,并且在尿液中发现 D-Ala 的排泄。D-Pro 和 D-Leu 在小鼠大脑的 7 个区域被发现,说明了 D-氨基酸在垂体和松果体有着相对较高的浓度(Hamase et al., 2001)。另外, D-Ser 和 D-Ala 也在人、小鼠等哺乳动物的脑和血液中被检测到(Hashimoto et al., 1993; Hashimoto et al., 1995)。D-氨基酸最早被认为是微生物、植物、无脊椎动物合成的,最近的研究表明 D-Ser 和 D-Asp 可以被哺乳动物组织合成。通过同位素标记实验发现带放射性的 L-Ser 在大鼠和小鼠的大脑可以被转化为 D-Ser, 1999 年丝氨酸异构酶(Ser racemase)被克隆和纯化出来,该异构酶在大鼠脑部可以催化 L-Ser 向 D-Ser 的催化(Wolosker et al., 1999)。哺乳动物中另一大 D-氨基酸的来

源是外源的食物和微生物。

### 镜像蛋白质的化学合成

尽管镜像氨基酸在自然状态的生命体中被证实有着较为广泛的存在，镜像氨基酸自然存在状态以单体为主，也有存在于短肽片段中，例如革兰氏阳性菌的四肽侧链氨基酸 d-丙-d-谷-r-1-赖-d-丙，目前尚未发现自然界中有功能性的镜像氨基酸组成的镜像蛋白，中心法则中的翻译是核糖体和 tRNA 参与的、按照 mRNA 遗传信息合成蛋白质的过程，镜像氨基酸没有在这一过程中当底物被使用。一般认为，生命体的遗传信息转录、翻译和主要生物功能的实现，依赖于天然手性的 L-氨基酸。

由于现有生物体的手性单一性特点，生物方法无法获得镜像蛋白质，目前对于镜像蛋白的研究均通过化学合成的方法来实现。多肽和小的蛋白可以通过固相多肽合成（SPSS, solid phase peptide synthesis）的方法来实现(Kent, 1988)。这一方法通常可以得到 60 个氨基酸左右的片段，进而通过自然化学连接（native chemical ligation）在溶液中把脱保护的肽段逐一连接起来(Dawson and Kent, 2000)。固相多肽合成以及自然化学连接的方法扩展了蛋白合成的范围，目前可以实现 300 个氨基酸以上蛋白的合成。通过这一技术也可以进行镜像蛋白质的合成研究。1992 年 Kent 课题组合成了首个镜像蛋白酶，HIV-1 蛋白酶（HIV-1 protease）(Milton et al., 1992)。基于理论 L 和 D 对映异构体有互为镜像的结构，科学家通常猜测镜像蛋白有着和天然蛋白相对应的功能，这一猜想在镜像 HIV-1 蛋白酶项目上首次得到证实。L 型和 D 型 HIV-1 蛋白酶有着相同的质谱分子量、相同的 HPLC 保留时间、相反的圆二色光谱曲线。在活性方面 L 型 HIV-1 蛋白酶可以切割 L 型肽底物，而 D 型蛋白酶可以切 D 型的底物。另一项研究中，两种手性的芽孢杆菌 RNA 酶（barnase）也显示出了类似的特性，天然 L 型 barnase 可以切割天然的 RNA，而对于镜像 RNA 它的活性要弱 4000 倍左右。而对于镜像 D 型 barnase，切割镜像 RNA 的活性则显著高于天然 RNA(Vinogradov et al., 2015)。1995 年 4-草酰巴豆酯互变异构酶的 L 型和 D 型被化学合成，它的两种对映体在催化无手性的底物 2-羟粘康酸的异构反应中显示了相同的反应效率。同位素标记催化位点碳原子上的氢，表明两种手性的异构酶作用在碳原子的不同侧面(Fitzgerald et al., 1995)。上述研究一致地表明了镜像蛋白酶和天然手性蛋白酶有着相同的活性，但是作用于不同的异构位置。

2014 年 M.S. Kay 课题组合成了最长的蛋白，312 氨基酸的 DapA。DapA 是依赖分子伴侣 GroEL/ES 的蛋白，在表达后依赖分子伴侣的协助才能折叠成功能构象。GroEL/ES 可以折叠 D 和 L 两种手性的 DapA，但是对于天然 L-DapA 的折叠效率要高于镜像 DapA(Weinstock et al., 2014)。

## 镜像核酸化学合成研究

关于生命起源早期假说的研究表明非酶催化的、模板指导的 RNA 扩增反应可以在单一手性的系统里进行。但是如果体系里有两种手性的 RNA 单体,那么延长反应会由于其镜像单体的加入而被阻止(Joyce et al., 1984)。这对于生命起源于自然产生的 RNA 的理论产生了严重的挑战。为了解释这个理论问题, Joyce 及其同事通过体外筛选的方法得到了 RNA 聚合核酶(RNA polymerase ribozyme),它由 83 个核糖核苷组成,可以催化对映手性的 RNA 聚合反应(Sczepanski and Joyce, 2014)。在这项研究中的镜像 RNA 是通过化学合成的方法得到的。它可以通过连接 11 个寡聚核苷酸片段来产生全长的与其自身手性相反的 RNA 聚合核酶,在同一反应体系中对于两种 RNA 的扩增可以互不干扰地进行。这为生命起源早期,两种手性的 RNA 分子共存,并且通过 RNA 聚合核酶进行扩增提供了一种理论上的可能。

2013 年 Barciszewski 课题组首次报道了有催化活性的镜像核苷酸酶,这种核苷酸酶是根据已有的天然核苷酸酶序列设计的,具有催化剪切镜像的 L-核苷酸分子的功能(Wyszko et al., 2013)。镜像核苷酸酶可以在体内实现剪切功能。在实验中证实了镜像核苷酸酶在血清中不易降解,还有无毒性、不引起免疫反应的特点,这使它成为较为理想的药物分子。

## 镜像核酸适体研究

DNA/RNA 最早被认为是遗传信息的携带工具,也被认为比蛋白质的结构要简单很多。但是实际上 DNA/RNA 也能够折叠成三级结构,也就有着一系列潜在的生理功能。最早在 1990 年,研究者就发现了 RNA 结构可以特异性地结合小分子底物。这些 RNA 结构像抗体一样,可以选择性地结合底物并且有很高的亲和性。这些能结合特定底物 RNA 结构就被称作核酸适体(aptamers)。后来, DNA 的核酸适体也被研究者发现。

体外筛选技术利用随机 DNA/RNA 序列库寻找与特定靶标分子结合的核酸适体。体外筛选首先要有一个随机序列库,既可以是 DNA 也可以是 RNA 的。库一般含有 30-80 个核苷酸的随机序列,以及在两边有两段引物区,以方便 PCR 扩增。然后进行多个循环的筛选过程,将目标小分子底物固定在一个基质上面,再把随机序列库加到底物上面,在清洗之后,不结合的 DNA 或 RNA 分子流过被固定的底物,而被筛选的有结合能力的序列就会留在上面。然后将这些特殊的序列洗脱下来,进行 PCR 扩增,再经过多个循环的富集、筛选过程,就可以得到一个或者几个能和底物特异性结合的核苷酸序列。

与天然的核酸适体一样,镜像核酸序列根据其序列具有特定的二级、三级结构,可以紧密、高特异性地结合目标分子。如果应用体外筛选策略对于镜像的靶标分子进行筛选,再合成镜像的核苷酸序列,就可以得到能结合天然靶标的镜像核苷酸分子。研究者

用体外筛选的方法得到了结合 D-腺苷和 L-精氨酸的镜像 L-RNA 适体(Klusmann et al., 1996; Nolte et al., 1996), D.P. Bartel 在 1997 年得到了结合抗利尿激素的 L-DNA 适体(Williams et al., 1997)。镜像核苷酸分子的优势在于在体内稳定不易降解、无毒性、不引起免疫反应, 而且生产成本较为低廉, 有着良好的作为药物分子的应用前景。

## 研究目的

镜像生物分子是否能够实现遗传信息的复制、转录, 镜像分子在进化上是否有组成生命的理论可能, 目前没有研究可以给出明确的论断。尽管已经有研究组合成并验证了镜像蛋白的活性以及比较了它们跟天然蛋白的特性, 但是这些研究通常仅从化学合成的角度阐释了镜像蛋白的特性。

我们的研究旨在设计并合成基于聚合酶的镜像复制与转录体系, 这一体系的意义有以下三个方面:

一、镜像复制与转录体系可以实现聚合酶对于镜像 DNA、RNA 的扩增, 说明镜像聚合酶可以像天然手性聚合酶一样催化 DNA、RNA 的合成, 证明镜像生物分子具有有效的生物活性;

二、镜像复制与转录体系实现了镜像中心法则中两个关键的步骤, 为镜像原始细胞的合成工作奠定开创性的基础;

三、现阶段体外筛选技术得到的天然核酸分子, 作为药物有着体内易水解的严重缺陷。为了避免这一问题, 需要用特殊方法进行镜像核酸的筛选。现有的体外筛选技术, 通过天然随机库对镜像靶标进行筛选, 得到有效的核酸序列, 再化学合成镜像核酸分子, 这样得到的镜像核酸分子可以结合天然靶标, 也就是潜在的镜像药物。但是这一方法的局限在于生物体内的常见药物靶点有很多是大于 300 个氨基酸的蛋白, 通过化学方法无法合成镜像靶标。镜像体外筛选如果能直接用天然的靶标分子和镜像的随机库进行, 将极大地提高这一技术的普遍性, 在更广泛的疾病领域筛选到药物分子。天然药物靶标、镜像随机库目前已经不存在技术难点, 镜像药物筛选的瓶颈在于镜像 PCR 无法实现。而我们的镜像复制与转录体系可以实现镜像的 PCR, 尽管 PCR 效率有待进一步优化和提高, 仍然为镜像药物筛选工作提供了理论和实践的基础。

## 实验材料与实验方法

### 实验药品与试剂

Q5 DNA polymerase	NEB
NdeI	NEB
BamHI	NEB

Trans 5 $\alpha$ 克隆感受态细胞	北京全式金
BL21(DE3)pLysS 表达感受态细胞	北京全式金
EasyTaq	北京全式金
Trans 2K DNA marker	北京全式金
T4 DNA 连接酶	北京全式金
质粒小提试剂盒	北京艾德莱
IPTG	北京艾德莱
Gel Extraction Kit	QIAGEN
Agarose	Biowest
预染蛋白 marker	Bio-Rad
40%Acrylamide	生工生物
Urea	生工生物
SYBRGold 染液	Invitrogen
考马斯亮蓝快速染液	北京天根生物
Ni-NTA beads	中科院过程研究所
咪唑	生工生物
D 型氨基酸	希施生物科技
L 型氨基酸	吉尔生化
2-(7-偶氮苯并三氮唑)- <i>N,N,N',N'</i> -四甲基脲六氟磷酸酯	吉尔生化
1-羟基-7-偶氮苯并三氮唑	吉尔生化
<i>N</i> -羟基-7-偶氮苯并三氮唑	吉尔生化
1-羟基-苯并-三氮唑	吉尔生化
<i>N,N'</i> -二环己基碳酰亚胺	阿尔法爱莎
1,2-乙二硫醇和 4-巯基苯乙酸	阿尔法爱莎
乙腈 (HPLC 级别)	杰帝贝柯
三(羟甲基)甲胺盐酸盐(Tris-HCl)	国药集团
氯化钾	国药集团
四水合醋酸镁	国药集团
乙二醇四乙酸	国药集团
磷酸二氢钠	国药集团
甘油	国药集团
盐酸胍	国药集团

无水乙醚	国药集团
85%水合肼	国药集团
还原型谷胱甘肽	百灵威
茴香硫醚	百灵威
三氟乙酸	百灵威
三异丙基硅烷	北京耦合
<i>N,N</i> -二异丙基乙基胺	北京耦合
氢氧化钠	北京化工
<i>N,N</i> -二甲基甲酰胺	北京化工
二氯甲烷	北京化工
亚硝酸钠	北京化工
2-氯三苯基氯树脂	天津南开合成
$\beta$ -巯基乙醇	北京中科拓展
L-DNA	Chemgenes
L-dNTPs	Chemgenes
L-NTPs	Chemgenes
D-DNA 引物	北京擎科生物
pEASY T3 试剂盒	全式金
RNase A	Fermentas
PAGE DNA 纯化试剂盒	天恩泽
酚氯仿	索莱宝
糖原	艾德来
RNase 抑制剂	TaKaRa

## 实验设备

核酸电泳槽	北京君意东方
PAGE 电泳槽	北京君意东方
台式恒温振荡器	华美生化仪器厂
SDS-PAGE 电泳槽	Bio-Rad
电泳仪	Bio-Rad
凝胶成像系统	Bio-Rad
Centrifuge5424	Eppendorf
分光光度计	Eppendorf

PCR 仪	AB
Milli-Q 纯水仪	MilliPore
AKTA 蛋白纯化系统	GE
QIAcube	QIAgen

### 核酸序列

名称	序列
<i>D-/L-primer12</i>	5'-ACTACGAACGCG (SEQ ID NO:1)
<i>D-/L-FAM-primer12</i>	5'-FAM-ACTACGAACGCG (SEQ ID NO:2)
<i>D-/L-template18</i>	5'-CTCAGTCGCGTTCGTAGT (SEQ ID NO:3)
<i>D-/L-DNAzymeTemplate</i>	5'-TGTACAGCCACTTCAACTAATTGCTCAACTATGGCTGTAGC ACCCGCGTTCGTAGTATGCAATGCA (SEQ ID NO:4)
<i>Cy5-primer20</i>	5'-Cy5-AGTGCGATACTACGAACGCG (SEQ ID NO:5)
<i>template26</i>	5'-CTCAGTCGCGTTCGTAGTATCGCACT (SEQ ID NO:6)
<i>template18A</i>	5'-CTCAGACGCGTTCGTAGT (SEQ ID NO:7)
<i>template18C</i>	5'-CTCAGCCGCGTTCGTAGT (SEQ ID NO:8)
<i>template18G</i>	5'-CTCATGCGCGTTCGTAGT (SEQ ID NO:9)
<i>L-primer15</i>	5'-GATCACAGTGAGTAC (SEQ ID NO:10)
<i>L-template21</i>	5'-CTATTGTACTCACTGTGATC (SEQ ID NO:11)
DNAzyme marker	5'-FAM-ACTACGAACGCGGGTGCTACAGCCATAGTTGAGCAA TTAGTTGAAGTGGCTGTACA (SEQ ID NO:12)
<i>L-template27</i>	5'-CGCGCTGTTATAGGGATACGGCAAAAA (SEQ ID NO:13)
<i>L-primer11</i>	5'-CGCGCTGTTAT (SEQ ID NO:14)
<i>L-FAM-primer11</i>	5'-FAM-CGCGCTGTTAT (SEQ ID NO:15)
<i>L-reverse11</i>	5'-GCCGTATCCCT (SEQ ID NO:16)

上述没有 D-/L- 标记的序列都指的是 D-DNA.

## ASFV pol X 的蛋白和 DNA 序列

## 蛋白序列

1 mltlqqkki vnhlrslaf eyngqlikil sknivavgsl rreekmlndv dliivpekk  
 61 llkhvlpnir ikglsvsvkv cgerkcvlfi ewekkyqld lftalaekp yaifhftgpv  
 121 syliriraal kkknyklnqy glfknqtlvp lkittekeli kelgftyrip kkrl (SEQ ID NO:17)

## DNA 序列

ATGTTAACGCTTATTCAAGGAAAAAAAAATTGTAAATCACTTACGTTCCCGACTTG  
 CGTTTGAATATAATGGACAACCTTATAAAAATTTTATCAAAAAACATCGTTGCTGT  
 TGGTAGTTTAAGACGCGAAGAGAAAATGCTTAATGACGTGGATCTTCTTATTATT  
 GTTCCAGAAAAAAACTTTTAAAACACGTCCTGCCCAACATTCGCATAAAGGGTC  
 TTTCTTTTTCTGTAAAAGTCTGCGGAGAACGAAAGTGTGTACTTTTTATTGAATGG  
 GAAAAAAGACGTATCAACTTGATCTTTTTACGGCTTTAGCCGAGGAAAAACCAT  
 ACGCAATATTTTCATTTTACGGGTCCCGTTTTCTTATCTAATAAGAATTCGAGCCGCG  
 TTAATAAAAAAGAATTATAAGCTAAATCAGTATGGATTATTTAAAAATCAAACCTT  
 TAGTACCTCTAAAAATCACTACTGAAAAAGAACTTATTAAAGAATTAGGATTTAC  
 GTATCGCATACCTAAGAAACGTTTATAA (SEQ ID NO:18)

## 实验方法

## ASFV pol X 的化学合成

我们将 D-ASFV pol X 的氨基酸序列分为三片段，采取从 C 端到 N 端顺序自然链接法。每一个多肽片段的合成采用的是基于 9-芴甲氧羰基 (Fmoc) 为保护基策略的固相多肽合成法 (Fmoc-SPPS)。合成片段 1 采用的是 2-Cl-trityl-Cl 树脂 (2CTC, 取代度为 0.5mmol/g)，而合成片段 2 以及片段 6 则使用胍取代的 2CTC 树脂。多肽片段的合成首先将树脂在二氯甲烷 (DCM) 以及 N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 的混合液中溶胀半小时，然后除去溶剂。随后，对于片段 1，将溶有 4 倍当量的氨基酸和 8 倍当量的 N,N-二异丙基乙基胺的 5ml DMF 溶液加入到反应管中，在 30℃ 的恒温摇床内反应 12 小时，之后加入 200μL 甲醇，封闭未反应的活性氯。对于片段 2 以及片段 6，将溶有 4 倍当量的氨基酸、3.8 倍当量的 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯 (HATU)、3.8 倍当量的苯并三氮唑 (HOAT) 和 8 倍当量的 N,N-二异丙基乙基胺的 5ml DMF 溶液加入到反应管中，在 30℃ 的恒温摇床内反应 1 小时。多肽片段合成过程中，脱去 Fmoc 保护基的方法是使用含有 20% 哌啶的 DMF 溶液，浸泡两次，一次 5 分钟，另一次 10 分钟。从第二个氨基酸开始直到最后，缩合体系都使用的是 HATU/HOAT/DIEA。多肽

片段合成完毕后,使用切割试剂 K(三氟乙酸/苯酚/水/茴香硫醚/乙二硫醇=82.5/5/5/5/2.5)浸泡 3 小时,然后用高纯氮气除去三氟乙酸将体系浓缩,随后加入乙醚,使多肽沉淀出来,最后离心,收集固体沉淀,使用半制备级别的反相高效液相色谱(RP-HPLC)分离纯化目标多肽片段。

按照以下方法进行多肽片段的自然化学连接。首先将含有酰肼基团的多肽片段溶于缓冲液中(6M 盐酸胍, 200mM 磷酸氢二钠, pH 3.0)。在冰盐浴中,往反应液中加入 15 倍当量的  $\text{NaNO}_2$  溶液,反应 20 分钟。随后加入混有 40 倍当量 4-巯基苯乙酸(MPAA),等当量的 N 端为半胱氨酸的多肽片段, pH 值为 7.0 的缓冲溶液。搅拌均匀后,将体系的 pH 值调至 7.0,反应 12 小时。反应结束后,加入 80mM 磷酸三氯乙酯(TCEP)缓冲液,将体系浓度稀释一倍。最后使用半制备级别的 RP-HPLC 分离目标产物。

按照以下方法进行多肽的脱硫反应。首先将  $1\mu\text{mol}$  多肽片段 3 溶于 2.5ml 200mM TCEP 缓冲溶液中(6M 盐酸胍, 0.2M 磷酸氢二钠, pH=6.9),然后加入  $50\mu\text{mol}$  VA-044 和  $100\mu\text{mol}$  还原型谷胱甘肽,溶液在  $37^\circ\text{C}$  下反应 12 小时。最后脱硫产物 4 用半制备级别的 RP-HPLC 分离纯化。

按照以下方法脱除 Cys86 侧链的乙酰胺甲基(Acm)保护基。 $0.5\mu\text{mol}$  多肽片段 4 溶于 1ml 50% 醋酸水溶液中。然后加入 5mg 醋酸银,在  $30^\circ\text{C}$  下搅拌过夜。随后加入  $2.5\text{mmol}$  巯基乙醇,并且用 6M 盐酸胍水溶液将体系稀释 2 倍。通过离心,除去沉淀,用 RP-HPLC 分离上清液,获得目标产物 5。

### ASFV pol X 的折叠复性

按照以下方法对 D-ASFV pol X 进行折叠复性。将 5mg D-ASFV pol X 溶于 10ml 6M 盐酸胍溶液中,将溶液置于 3K Da 的透析袋。然后把透析袋放在含有 4M 盐酸胍的缓冲液体系内(50 mM Tris-HCl, 40mM KCl, 6mM 醋酸镁, 0.01M EDTA 和 16% 甘油)浸泡 10 小时,随后将盐酸胍浓度逐渐降低为 2M, 1M 和 0M。透析袋在每种浓度盐酸胍溶液中浸泡时间均为 10 小时。使用圆二色谱和质谱可以证明, D-ASFV pol X 折叠正确并且 D-Cys81 和 D-Cys86 之间通过空气氧化形成二硫键。

### 天然和镜像 DNA、RNA 聚合酶反应方法

DNA 聚合反应方法:配置聚合酶反应缓冲液, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 20 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM DTT, 50 mM KCl。在 10ul 反应体系中加入  $0.7\mu\text{g}$  ASFV pol X,  $2.5\mu\text{M}$  primer,  $2.5\mu\text{M}$  template 和 4 种  $0.4\text{mM}$  dNTPs。将反应体系置于  $37^\circ\text{C}$  4 小时,加入  $0.5\text{M}$  EDTA  $1\mu\text{l}$  终止反应。反应得到与模板互补的 DNA 片段。

RNA 聚合反应方法:配置聚合酶反应缓冲液, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 20 mM  $\text{MgCl}_2$ ,

1 mM DTT, 50 mM KCl。在 10ul 反应体系中加入 0.7  $\mu$ g ASFV pol X, 2.5  $\mu$ M primer, 2.5  $\mu$ M template 和 4 种 0.4 mM rNTPs。将反应体系置于 37 $^{\circ}$ C 60 小时, 加入 0.5M EDTA 1 $\mu$ l 终止反应。反应得到 primer DNA 和 RNA 的复合体。

### PAGE 胶回收 DNA/RNA 片段方法

我们采用 PAGE 胶回收的方法分离纯化扩增产物, 首先在终止了反应的体系中加入含有二甲苯青、溴酚蓝的上样缓冲液, 在合适浓度的变性丙烯酰胺凝胶上进行电泳, 在电泳结束后将胶取下。用溴化乙锭进行 DNA/RNA 染色, 在 UV 光下把 DNA/RNA 的目的大小片段切下, 弃去杂带和空白的区域, 切割的胶块应该尽量小。然后将胶块放在 TE 缓冲液中, 颠倒混合过夜。小心吸取上清, 加入 1/10 体积的乙酸钠(3 mol/L, PH=5.2) 于 DNA 溶液中充分混匀, 使其最终浓度为 0.3 mol/L。加入 2 倍体积用冰预冷的乙醇混合后再次充分混匀置于 -20 $^{\circ}$ C 中 30 分钟。12,000 g 离心 10 分钟, 小心移出上清液, 吸去管壁上所有的液滴。于室温下将开盖的 EP 管的置于实验桌上以使残留的液体挥发至干。加适量的 ddH<sub>2</sub>O 溶解 DNA/RNA, 可以获得高纯度的酶扩增 L-DNA/RNA 片段。

### 镜像 DNAzyme 反应方法

我们用 100 $\mu$ l 的反应体系扩增了一段 DNAzyme 的序列, 这种 DNAzyme 是单链具有自我剪切活性的 DNA 短链。反应体系为: 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, and 50 mM KCl, 28.9  $\mu$ g D-ASFV pol X, 5  $\mu$ M primer12 引物, 5  $\mu$ M DNAzymeTemplate 模板和 1.6mM dNTPs。在 37 $^{\circ}$ C 反应 36 小时。下一步将反应产物加上上样缓冲液, 在 12%PAGE 胶上用 300V 3 个小时将条带分开。为了方便跑胶分离和切胶回收全长反应产物——单链的 DNAzyme, DNAzymeTemplate 模板在设计时比全长产物多 10 个核苷酸, 拆下胶板后显影并切下全长产物序列。将胶块用上面描述的方法处理, 扩散过夜并乙醇沉淀回收 DNA。沉淀下来的产物用 buffer 1: 50 mM HEPES, pH 7.0 和 100 mM NaCl 溶解, 并在 90 $^{\circ}$ C 加热 2min, 再冰上降温 5min。然后加入等体积的 buffer 2: 50 mM HEPES, pH 7.0, 100 mM NaCl, 4 mM ZnCl<sub>2</sub> or 40 mM MgCl<sub>2</sub> 以开始反应。在 37 $^{\circ}$ C 反应 36 小时。最后用 EDTA 终止反应。样品在 12%PAGE 胶上分离并显影。

### 镜像多循环聚合酶反应方法

配置聚合酶反应缓冲液, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 50 mM KCl。在反应体系中加入 2.672  $\mu$ g D-ASFV pol X, 2.5  $\mu$ M L-FAM-primer, 2.5  $\mu$ M L-template 和 4 种 0.4 mM L-dNTPs。将反应体系置于 37 $^{\circ}$ C 4 小时, 加入 0.5M EDTA 1 $\mu$ l 终止反应。由于 ASFV pol X 有着很强的结合 DNA 的能力, 即使在 95 $^{\circ}$ C 加热变性的条

件下也无法解离，我们用酚氯仿抽提的方法去除前一轮反应中的聚合酶。第二轮反应中，反应体系加热到 95℃ 30s，然后降至室温。在反应体系中再加入 0.334μg D-ASFV pol X，反应体系在 37℃ 放置 20h。第三个循环用同样的方法处理。反应产物在 8M 尿素变性的 20%PAGE 胶上分离，并且用 Typhoon Trio+ 系统成像。电泳条带定量使用 ImageQuant 软件进行。

## RNase A 消化天然 RNA 聚合产物

L-ASFV pol X RNA 反应体系（见 2.2.3），经过 37℃ 36h 的反应，加热到 75℃ 10min 使 ASFV pol X 和 RNase 抑制剂失活。在三个实验中分别加入 1μg/μl, 0.1μg/μl, 0.01μg/μl 的 RNase A，在 23℃ 孵育 10min。加入 20 unit RNase 抑制剂终止反应，并且加入上样缓冲液。反应产物在 8M 尿素变性的 20%PAGE 胶上分离，并且用 Typhoon Trio+ 系统成像。

## 镜像手性的遗传信息复制和转录体系的设计

### 概述

在地球上的生命体中，组成蛋白质的氨基酸除了没有手性的甘氨酸，几乎都为 L 型，核酸中的核糖都为 D 型。蛋白质和核酸有着手性单一性的特点，在天然的蛋白质中错误地加入一个或几个镜像的氨基酸，可能会使得蛋白质二级结构发生改变，甚至失去生物活性(Krause et al., 2000)。生物体具有严格的手性单一性特点。虽然在进化中研究者尚无法找到关于镜像手性为何丢失的明确证据，我们仍然可以通过化学合成的方法来研究镜像的蛋白质和核酸的特性，尝试构建镜像细胞生命体所需要的生物原件。作为镜像生命体的核心，尝试构建镜像中心法则中的关键步骤，DNA 的复制和转录 RNA 是重点研究的方向。

### 镜像DNA复制体系的设计

在天然生命体中，DNA 的复制需要作为模板的 DNA 长链、作为引物的 DNA 短链、DNA 聚合酶、dATP、dCTP、dTTP、dGTP 四种分子，以及适宜的溶液条件，例如合适的 pH 和 Mg<sup>2+</sup> 离子。我们参照天然生命体系，设计镜像 DNA 复制体系的成分，50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 50 mM KCl，再加入镜像的蛋白和核酸分子，D-聚合酶、L-DNA 模板、L-DNA 引物和四种 L-dNTPs。镜像蛋白和核酸分子在天然的生命体中不存在，而对于化学合成的过程来说，投入特定的原料，合成一种手性的分子与对映手性的分子所需要的化学过程并没有区别。所以我们确定用化学的方法获得镜像的 D-聚合酶和 L-DNA。

蛋白质的化学合成主要通过 60 氨基酸左右的多肽固相合成，以及自然化学连接在溶液中把脱保护的肽段逐一连接起来，目前能够合成的蛋白上限根据序列的不同大约是 350 个氨基酸。大肠杆菌聚合酶 I 的大小是 928 个氨基酸，我们常用的 taq 聚合酶是 832 个氨基酸，比通常认为聚合酶功能更简单的 T4 DNA 连接酶也有 487 个氨基酸。这些酶超出了我们的合成范围。通过文献检索我们选定了 174 个氨基酸的聚合酶 ASFV pol X，非洲猪瘟病毒聚合酶 X。

ASFV 编码两种 DNA 聚合酶，一种是真核类型的 family B 的 DNA 聚合酶，用于病毒基因组的复制；还有一种是 family X 的 DNA 聚合酶，被命名为 ASFV pol X (Oliveros et al., 1997)。ASFV Pol X 是现在发现的最小的 DNA 聚合酶 (Showalter and Tsai, 2001)，由 174 个氨基酸组成，大小为 20kDa。ASFV Pol X 是模板依赖的聚合酶，保真度很低，缺少 3'-5' 外切酶活性，对于双脱氧核苷酸的识别能力非常差 (Oliveros et al., 1997)。

将 ASFV Pol X 的基因序列和其他代表性的 family X 的聚合酶进行比对，可以看到 ASFV Pol X 和人、牛、鼠的 TdT、人、鼠 pol  $\beta$  等在结构和功能上有一定的联系。ASFV Pol X 的三维结构已经用 NMR 的方法解出。Pol X 和其它聚合酶不一样，它只具有一个 palm 结构和一个 C 端子域 (Maciejewski et al., 2001)。在真核的 Pol  $\beta$  中，一般还有一个 N 端结构域负责 DNA 结合。Pol X 没有这个关键的结构域，结合 DNA 的能力却强于 Pol  $\beta$ 。

另外，ASFV Pol X 可以结合单个核苷酸剪切修复 (BER) 的中间产物，并且可以高效地修复单个核苷酸缺口 (Showalter et al., 2001)。BER 的步骤中，Pol X 修复缺口并且很容易引入突变。在最后一步再由一种 ASFV 编码的一种容错连接酶把带有错配的新合成链连入基因组。Pol X 在修复基因组时将新的突变引入，有助于病毒变异的产生，以便在有生存压力的环境中存活下来。

## ASFV pol X 聚合酶的化学合成

D-ASFV PolX 的化学全合成方法采用的是由 Merrifield 于 1963 年提出的固相多肽合成技术 (SPPS)，该技术是目前最有效的多肽合成方法。根据保护策略的不同，主要有叔丁氧羰基 (Boc) 和苄氧羰基 (Fmoc) 两种方法。在本项目中，我们拟使用 Fmoc-固相合成技术将 D 型氨基酸连接成多肽。

尽管理论上 SPPS 的每一步缩合反应其产率能达到 99%，但是在实践中 Fmoc-固相合成技术通常只能合成少于 50 个氨基酸的肽链。由于这个原因，合成蛋白质往往需要把多肽片段连接起来，即将目标蛋白质分子分割成几个片段，使得每一片段的氨基酸都少于 50 个，然后通过高效的化学反应将各个片段连接起来获得目标蛋白质分子。

因此,在本项目中我们拟将目标 D-ASFV 蛋白质分子的多肽链分为 4 段,采用收敛法两两组合,通过改良后的一锅法自然化学连接(Native chemical ligation, NCL)---蛋白酰肼连接法,得到目标蛋白质的全长氨基酸序列。

由于酰肼链接的位点必须利用半胱氨酸,因此,我们拟将 36 位以及 129 位的丙氨酸突变为半胱氨酸,在连接反应完成后,进行脱硫反应,将半胱氨酸还原为丙氨酸(Qian and Danishefsky, 2007)。与此同时,在连接反应过程中,为了避免副反应的发生,需要对 81 位以及 86 位的半胱氨酸进行侧链巯基保护,在连接反应结束后,再进行脱除。我们拟使用乙酰胺甲基(Acm)作为反应过程中的巯基保护基团(Liu et al., 2012)。合成 D-ASFV pol X 的具体合成路线和步骤参照图 1。

为了验证合成途径的可行性,同时处于节约成本的考虑,我们先进行了 L-ASFV pol X 的合成。此后用相同的方法合成了 D-ASFV pol X。

### 化学 ASFV pol X 聚合酶的复性和分析检测

在得到全长的 L 和 D 型 ASFV pol X 之后,我们对它进行了反相色谱(RP-HPLC)纯化,使用了 Vydac C18 (4.6×250 mm)液相色谱柱,加入 TFA 并用 20%-70%的乙腈梯度进行分离(图 2)。得到强吸收的主峰和微弱的杂峰。电喷雾电离质谱(ESI-MS)得到的 D-ASFV pol X 合成全长产物分子量为 20317.0 Da,理论值为 20316.0 Da。

我们通过变性-透析的方法对合成的 D-ASFV pol X 进行复性,首先把冻干的聚合酶干粉加入含有 6M 盐酸胍的 10ml 透析液,透析液中含有 50mM Tris-HCl, pH7.4, 40mM KCl, 6mM (AcO)<sub>2</sub>Mg, 0.01M EDTA 和 16% 甘油。透析过程不断降低透析液中的盐酸胍浓度从 4M、2M 到 0,每次都在 4℃ 搅拌透析 10 小时。D-Cys81 和 D-Cys86 之间通过空气氧化形成二硫键。我们又通过 SDS-PAGE 比较了大肠杆菌表达、合成的 L 型和合成的 D 型 ASFV pol X,它们的条带位置保持一致(图 3)。我们同时观察到少量未完全连接的肽段。我们通过圆二色光谱(CD)的方法对比了 L 和 D 型 ASFV pol X。由于 D-ASFV pol X 不能被常用的蛋白酶降解(如胰蛋白酶和胃蛋白酶,实验结果未列出)无法进行测序,我们只用质谱测序分析了 L-ASFV pol X 的序列,在检测结果中覆盖到了 100%的 pol X 序列(表 3.1)。

表3.1 化学合成的L-ASFV pol X质谱测序肽段序列

Segment sequence	XCorr	Charge	MH+ [Da]	$\Delta M$ [ppm]	RT [min]
EEKmLNDVDLLIIVPEK	4.86360168	2	2014.09123	6.67686844	43.7154
HVLPNIRIKGLSFSVKVc	2.49292898	3	2409.36637	4.78211214	44.34
GER					
KcVLFIEWEK	3.71132851	2	1351.71477	5.0557844	38.6446
KKTYQLDLFTALAE	3.88172317	2	1640.89983	6.31761428	43.7574
KLLKHVLPNIR	3.55191755	2	1330.87224	3.02709865	31.6344
KTYQLDLFTALAEKPY	6.0060935	3	3631.95664	10.0763472	54.9092
AIFHFTGPVSYLIR					
LNQYGLFKNQTLVPLKI	2.74559188	5	4533.6656	7.29527526	54.3708
TTEKELIKELGFTYRIPK					
KRL					
mLTLIQGKKIVNHLRSRL	2.66363716	3	3299.90256	7.61680303	49.6173
AFEYNGQLIK					
NYKLNQYGLFK	3.87206316	2	1387.74187	3.58682542	33.5826
SRLAFEYNGQLIKILSKN	2.5462563	5	3431.98255	9.8659898	54.0116
IVAVGSLRREEK					

## 镜像DNA的检测

在 D-ASFV pol X 聚合酶成功合成之后, 镜像遗传信息复制体系中还缺少镜像核酸。我们在美国 Chemgenes 公司购买了 L-primer12、L-template18 等镜像 DNA 片段 (序列见 2.1.3) 和四种 L-dNTP。

## 小结

我们设计了镜像 DNA 复制的体系, 包括镜像聚合酶、镜像 DNA、四种镜像 dNTP 以及适宜的缓冲液条件。我们通过 Chemegenes 获得了镜像 DNA 和四种 dNTP。由于镜像蛋白质不能通过生物方法获得, 我们找到了 174 个氨基酸的 ASFV pol X 聚合酶, 并且设计了合成路线并合成了 L 型和 D 型的 ASFV pol X 聚合酶。通过盐酸胍变性-透析复性的方法将蛋白折叠至正确的构象。经过质谱、SDS-PAGE 检测, 验证化学合成蛋白的大小和天然蛋白一致。又通过 CD 检测, 看到天然和镜像聚合酶的吸收谱对称。通过对合成 L 型 ASFV pol X 的测序, 验证了化学合成蛋白序列的正确性。至此我们得到了镜像 DNA 复制系统的各个组成部分, 具备了进行后续对于镜像聚合酶反应研究的条件。

## 镜像手性遗传信息复制和转录体系的功能研究

### 概述

目前为止前人没有关于镜像 DNA 复制和转录的研究，我们合成的镜像聚合酶，首先要验证镜像蛋白质和 DNA 相互作用的可能性，镜像聚合酶的手性特异性，以及复制出的 DNA 是否具有生物活性。我们同时尝试实现镜像 DNA 的多循环扩增，未来可以在研究中用于获得更多镜像核酸分子。由于 ASFV pol X 所在的 X 聚合酶家族中有一些酶可以利用 NTP，模板互补扩增得到 RNA 分子，我们也尝试基于镜像 DNA 复制体系尝试依赖模板的转录。

### 镜像聚合酶催化的DNA延伸

我们已经设计了镜像 DNA 复制体系，并且通过化学合成的方法获得了体系中的主要组成部分(图 5a)。下面我们在非手性的 pH7.5 Tris-HCl 缓冲液中，加入 20 mM  $Mg^{2+}$ ，在天然的体系中加入 0.7  $\mu$ g L-ASFV pol X 聚合酶，2.5  $\mu$ M D-template18 模版，2.5  $\mu$ M D-primer12 引物以及 0.2 mM D-dNTPs；在镜像体系中加入相同浓度的 D-ASFV pol X 聚合酶以及 D-引物、模板和 dNTPs。将反应体系置于 37°C 静置 4h。我们在 L 和 D 型的引物 5' 末端都添加了荧光素氨基磷酸酯 (FAM) 标记，而模板未加修饰。这样在未经染色的条件下用 488nm 光激发，可以看到 primer 条带。在两个体系中，天然和镜像的 12nt 引物都延伸到 18nt(图 5b)。在 8M 尿素变性的 20%PAGE 胶上，可以清晰分辨从 12-18nt 每个碱基的位置。0h 作为对照组，引物长度为 12nt，而 4h 是完全延伸的终产物，长度为 18nt。根据模板序列推测延伸的 6 个碱基为 ACTGAG，说明在镜像体系中 4 种 dNTP 均可以被用作底物合成 DNA 链，这一结论仍然需要后续的互补配对验证。我们进一步希望验证镜像延伸产物是否添加了正确的镜像核苷。由于目前的一代测序方法仍然依赖聚合酶和天然的 dNTP 衍生物，这一体系无法用于 L-DNA 的测序。我们尝试通过质谱的方法来验证 18nt 延伸产物的质量是否正确。我们通过 ESI-MS 检测得到镜像全长延伸产物分子量为 5516.9 Da (理论值 5517.6 Da)，在误差范围内认为 18nt 的全长产物质量正确。另外，我们希望了解镜像扩增体系是否有局限性，是否可以应用到不同的引物、模板序列，在另一组实验中使用了 15nt 引物、21nt 模板(15nt 引物不带 FAM 标记，PAGE 胶经过 Sybr Gold 染色)，仍然可以观察到引物减少、中间条带出现以及全长 DNA 的量增大这些现象，说明镜像 DNA 延伸可以用于不同的 DNA 序列(图 5d)。

## 镜像DNA复制系统多循环扩增DNA

我们尝试镜像 DNA 复制系统尝试进行多循环的 PCR 扩增。尽管 ASFV pol X 不是一个热稳定的酶，我们仍然可以通过每个循环加酶的方式进行多个循环的扩增。ASFV pol X 结合 DNA 会阻碍下一个循环的扩增，所以我们在每个循环结束后进行酚氯仿抽提去除蛋白，再加入新的 ASFV pol X。每个循环的抽提会带来较大的 DNA 损失（回收效率约为 40%），我们只进行 3 个循环的扩增。由于循环较少难以检测到 DNA 产物的增加，我们使用了 FAM 标记的引物，而且它只能使用第一个循环产生的全长延伸产物才能进行第二轮的扩增（图 6）。在反应中使用了 FAM 标记的 primer11，不带标记的 reverse11，以及 template27，全长产物为 22nt（序列见 2.1.3）。我们通过 FAM 标记的全长产物定量，检测到第 2 到第 3 循环发生了 2.3 倍的扩增，理论扩增值为 3（图 7）。结果在理论上证实了镜像 DNA 复制体系多循环扩增 DNA 的可行性。

## 镜像DNA复制系统的碱基互补配对特异性

我们进一步需要检测镜像聚合酶催化的 DNA 扩增是否遵守碱基互补配对的规则。我们将 4 种 dNTP 分别加入反应体系，在模板的下一个碱基分别为 A、T、C、G 时检测延伸情况（图 8）。对于天然的系统，我们使用了 primer12 和四种不同的 template，在其 3' 端第 13 个碱基的位置分别为 A、T、C、G 序列。而对于镜像系统，我们为了减少购买镜像 DNA 的成本，分别用 primer12 进行了 1、2、3nt 的延伸，并进行 PAGE 胶回收得到 primer13、primer14、primer15，它们与 template18 互补，下一个模板上的碱基分别为 T、G、A、C。我们观察到只有 A:T、T:A、C:G、G:C4 种正确的配对条件下 dNTP 可以高效率地添加到引物序列的 3' 末端，没有明显的错配发生，在天然和镜像的系统中保持一致。所以镜像 DNA 复制系统也遵循互补配对原则，并且有着一定的保真度。

## 镜像DNA复制系统的手性特异性

关于聚合酶在添加 dNTP 时的手性特异性，在天然的聚合酶上已经有了一些研究。之前的研究表明哺乳动物聚合酶  $\gamma$ 、大肠杆菌聚合酶 I、HIV-1 逆转录酶催化的 DNA 延伸会受到 L-dTTP 的抑制，而对于哺乳动物聚合酶  $\alpha$ ，L-dTTP 不会抑制其催化的 DNA 聚合反应，对于哺乳动物  $\beta$ ，抑制的效果比较微弱(Yamaguchi et al., 1994)。L-dTTP 会抑制人的 DNA 聚合酶  $\gamma$ 、 $\delta$ 、牛胸腺末端转移酶，但是不会抑制人 DNA 聚合酶  $\beta$ ，但是 DNA 聚合酶  $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$  不能使用 L-dTTP 作为底物。在 3' 末端添加的 L-核苷会让 DNA 难以被 3'-5' 外切酶降解(Focher et al., 1995)。所以有的聚合酶在添加两种底物时会受到

镜像 dNTP 的抑制而有的不会。我们的研究希望阐释对于镜像 ASFV pol X 是否会有手性特异性, 以及它的聚合酶活性是否会受到天然手性 dNTP 的抑制。我们的研究中首先尝试单独添加不同手性的聚合酶、引物-模板、dNTP 的组合, 再尝试将天然和镜像两个体系放在同一溶液中进行反应。

我们在与之前相同的缓冲液条件下, 分别改变 ASFV pol X、引物-模板和 dNTP 的手性, 每个成分 L 型和 D 型两种手性, 体系共有 8 种组合(图 9)。将体系置于 37°C 孵育 12 小时, 在 20%PAGE 胶上观察结果。我们发现 L-ASFV pol X、D-引物-模板、D-dNTPs 的天然体系可以延伸 6 个碱基到全长, D-ASFV pol X、L-引物模板、L-dNTPs 的镜像体系可以延伸到全长, 而其他的组合均不可以延伸。例如 L-ASFV pol X、D-引物-模板、L-dNTPs, 天然的聚合酶不能将镜像的 dNTPs 添加到天然引物的 3' 末端; 对于 L-ASFV pol X、L-引物-模板、D-dNTPs, 天然的聚合酶不能将天然的 dNTPs 添加到镜像引物的 3' 末端; D-ASFV pol X、L-引物-模板、D-dNTPs, 镜像的聚合酶不能将天然的 dNTPs 添加到镜像引物的 3' 末端; 对于 D-ASFV pol X、D-引物-模板、L-dNTPs, 镜像的聚合酶不能将镜像的 dNTPs 添加到天然引物的 3' 末端。所以在镜像和天然的体系中, 错误手性的引物-模板、dNTP 均不能被作为底物参加延伸反应, 天然和镜像的 DNA 复制体系有着良好的手性特异性。

我们进而希望探究天然和镜像的系统在同一个溶液体系之中, 是否会发生相互干扰。前面所述的文献表明, 对于某些聚合酶镜像的 dNTP 会阻止 DNA 延伸反应的继续进行。我们的实验使用了与之前相同的缓冲液体系, 并同时加入了两种手性, 相同浓度的 ASFV pol X 和 dNTPs。为了分别观察引物的延伸, 我们设计了长度不同的引物和模板序列, 并且使用了不同的荧光修饰, 天然反应使用 Cy5 标记的 primer20 以及 template26, 镜像反应是 FAM 标记的 primer12 和 template18。我们将相同浓度的两种手性引物和模板都加入同一个溶液体系, 在 37°C 反应 4 小时以后在 20%PAGE 胶上分离检测反应产物(图 10)。红色的条带为天然反应, 在 21nt 和 26nt 之间, 而绿色的条带为镜像反应, 在 12nt 和 18nt 之间。左边的样品是只有天然体系的对照组, 中间的是镜像体系单独反应的对照组, 右侧是天然和镜像相同浓度在同一溶液体系中反应的实验组。我们可以看到在实验组中两个体系都可以分别延伸到 18nt 和 26nt 的全长, 混合体系反应速率与单独反应相差不多, 说明天然和镜像体系在同一个溶液之中不存在严重的相互干扰。

## 镜像 DNAzyme 的酶合成以及功能检测

我们已经验证了镜像 DNA 复制系统可以依赖模板合成 DNA, 而且具有一定的碱基互补配对特异性。进而我们希望验证镜像聚合酶合成的镜像 DNA 序列具有生物活性。

上世纪九十年代，体外筛选技术（in vitro selection）创立并得到应用。这项技术可以通过复杂度高的随机 DNA 或 RNA 序列库进行设计筛选，得到功能性的 DNA 或 RNA 分子，主要有可以结合特定靶标的核酸适体（aptamer）和有催化活性的核酶（ribozyme）和脱氧核酶（DNAzyme）。以核酸适体为例，体外筛首先要合成单链核酸序列库，其中含有 20-80 个随机序列，文库复杂度达到  $10^{14}$ 。文库中不同核酸的一级序列不同，它们在溶液中会形成不同的空间构型。在适宜的条件下将随机库与靶标分子相互作用，捕获能够与靶标结合的 DNA 或 RNA 分子，再将这些分子进行 PCR 扩增。得到扩增的这些分子相对于原始随机库对于靶标的亲和力得到了增强，将它作为次级库，再对于靶标分子进行第二轮的筛选。这样经过反复的扩增就能筛选到高亲和力的核酸适体序列。

我们选择用 D-ASFV pol X 合成一段 L-DNAzyme 序列，再验证它的脱氧核酶活性。R. Breaker 及其同事在 2013 年的研究中发现并验证了多个 DNAzyme 序列的活性(Gu et al., 2013)，我们选取了其中一个 44nt 的  $Zn^{2+}$  依赖的 DNAzyme 作为合成的目标。我们设计出的全长 DNAzyme 包括 5' 末端 12nt 的引物序列和完整的 44nt DNAzyme 序列(图 11a): 5'ACTACGAACGCGGGTGCTACAGCCATAGTTGAGCAATTAGTTGAAGTGGCTGTACA (SEQ ID NO:12)

我们将它的反向互补序列作为模板（为了方便胶回收分离单双链，我们在模板的 3' 末端额外添加了 10nt），加入 primer12 经过 36 小时的延伸获得了全长的 DNAzyme 序列(图 11b)。与 marker 的比对发现通过聚合酶合成的 DNAzyme 大小是正确的。天然的聚合酶催化合成 DNAzyme 全长序列的速率高于镜像系统，这可能由于镜像引物、模板和 dNTP 中含有杂质。此实验进一步说明镜像 DNA 复制系统的延伸长度在 44nt 以上，并且没有明显的序列选择性。我们进一步将反应到全长的 DNAzyme 胶染色并切下，与 66nt 的 template 小心分开，放在缓冲液中扩散过夜，并且用试剂盒沉淀 DNAzyme 序列。溶解 DNAzyme 之后先在 90℃ 加热再降至室温使 56nt 的 DNAzyme 序列折叠成正确的结构。然后再反应体系中加入 buffer2 以开始反应。对照组 buffer2 含有 20mM  $Mg^{2+}$ ，实验组含有 2mM  $Zn^{2+}$ ，在 37℃ 反应 36h。天然和镜像酶合成的 DNAzyme，均可以在 2mM  $Zn^{2+}$  离子存在的条件下实现高效率的自我剪切，在缺少  $Zn^{2+}$  或者加入  $Mg^{2+}$  的对照实验中都不能自我剪切（图 11c）。所以说明通过镜像 ASFV pol X 合成的 DNAzyme 序列具有自我剪切的活性。

## DNA模板依赖的镜像转录

我们已经验证了镜像的 DNA 聚合酶可以依照 DNA 模板进行引物的延伸，进而希望研究是否可以将镜像 DNA 转录为镜像 RNA。已知的 X 家族 DNA 聚合酶对于 dNTP

和 rNTP 的选择性很差, pol  $\mu$  可以依照模板添加 dNTP 或者 rNTP 到 DNA 链上, 定量来看, 它对于 rNTP 的选择特异性低于 pol  $\beta$  1000 倍(Sa and Ramsden, 2003)。ASFV pol X 没有被验证过是否可以利用 rNTP。我们首先用天然手性的 ASFV pol X 在 primer12 和 template18 的体系中加入 rNTP。我们发现尽管延伸的效率降低了很多, 仍然可以在 36 小时后得到全长的延伸产物(图 12a)。

RNase A 特异性地催化 RNA 的核糖在 C 和 U 残基的下一个核苷酸 5'磷酸二酯键断裂, 它可以识别 3', 5'磷酸二酯键而不能切断 2', 5'键, 形成具有 2', 3'-环磷酸衍生物 3'C 或 3'U 寡聚核苷酸。我们将 36 小时反应后的延伸产物加热到 75°C 10min 时间, 失活 RNase 抑制剂以及 ASFV pol X, 然后再加入不同浓度的 RNase A 进行消化(图 12b)。我们可以看到第一步的加热反应没有使 RNA 发生降解, 但是 RNase A 的加入使得全长的 18nt 产物降解为 13nt, 并且随着 RNase A 的浓度越高降解越明显。这一实验证明了 RNase A 消化 RNA 合成产物验证了添加的是 rNTP, 并且 rNTP 的添加方式为 3', 5'连接。

在镜像的 ASFV pol X 和 DNA 的体系中, 也可以将 L-rNTP 添加到引物链上, 尽管速率比天然的体系要慢(图 12a)。我们同样认为这可能是镜像模板、引物和 rNTP 的纯度不够高引起的(在 HPLC 中可以观察到杂峰, 在 CD 中发现模板、引物的量小于标称值)。

## 镜像转录 RNA 系统的碱基互补配对特异性

最后我们需要验证 RNA 转录体系是否依照模板遵循碱基互补配对规则。将 4 种 rNTP 分别加入反应体系, 使用了 5'末端 FAM 标记的 primer12 作为引物, 在模板的下一个碱基分别为 A、T、C、G 时, 观察是否可以延伸到 13nt。对于天然的系统, 我们使用了 primer12 和四种不同的 template, 在其 3'端第 13 个碱基的位置分别为 A、T、C、G 序列。而对于镜像系统, 分别用 primer12 添加 A、AC、ACT 进行了延伸反应, 并进行 PAGE 胶回收得到 primer13、primer14、primer15, 它们与 template18 互补时下一个模板上的碱基分别为 T、G、A、C。我们观察到 A:U、U:A、C:G、G:C 4 种正确的配对条件下 rNTP 可以高效率地添加到引物序列的 3'末端。镜像体系中出现了一些较为明显的错配, 比如 T:rG, A:rC 等等, 但是错误核苷添加的效率显著低于正确配对的(图 13)。所以镜像 RNA 转录系统遵循互补配对原则, 有着一定的保真度。

## 小结

我们设计构建的镜像手性遗传信息复制和转录体系, 包含核心成分为 D-ASFV pol X、L-引物、L-模板、L-dNTPs/rNTPs, 可以依照模板实现 DNA 的扩增和转录 RNA, 说明

镜像手性的聚合酶和 DNA 有相互作用。利用 ASFV pol X 聚合酶, 我们实现了理论上的多循环扩增 DNA, 在第二至第三循环实现了 2.3 倍的 DNA 扩增。另外, 我们验证了在利用天然和镜像体系添加 dNTP 或 rNTP 延伸引物链, 遵循碱基互补配对原则, 保真度良好。聚合酶、引物模板和 dNTP 在反应体系中存在手性特异性, 只有三者全是天然或者全是镜像分子时引物链可以延伸, 其他的各种组合均不能实现扩增。在同一溶液体系中加入相同浓度的两种手性的 DNA 复制体系, 两个体系可以分别进行延伸反应, 没有严重的相互阻碍。我们用镜像 ASFV pol X 延伸了 44nt 的  $Zn^{2+}$  依赖的 DNAzyme 序列, 在含有 2mM  $Zn^{2+}$  的缓冲液环境中, 经过纯化分离的单链 L-DNAzyme 有着自我剪切的生物活性。

## 总结与展望

### 总结

起源于对镜像生物分子的存在与生物活性的探究, 我们的工作构建了基于 D-ASFV pol X 的镜像遗传信息复制和转录体系。主要结论如下:

一. 我们设计了镜像 DNA 复制的体系, 包括镜像聚合酶、镜像 DNA、四种镜像 dNTP, 以及适宜的缓冲液条件(50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 20 mM  $MgCl_2$ , 1 mM DTT, 50 mM KCl)。通过全化学合成的方法得到了 D-ASFV pol X 的全长序列, 并且通过盐酸胍变性-透析的方法成功对其进行折叠复性。通过 HPLC、SDS-PAGE、ESI-MS、CD 等方法对其进行了分析检测。

二. 在镜像 DNA 复制体系中, 在上述缓冲液条件下加入 0.7  $\mu$ g D-ASFV pol X 聚合酶, 2.5  $\mu$ M L-模版, 2.5  $\mu$ M L-引物以及 0.2 mM L-dNTPs (每种浓度), 我们证实在多个模板引物组合中 (primer12-template18, primer15-template21, primer12-DNAzymeTemplate) 镜像 DNA 的复制延伸均可以进行。并且在 DNA 复制过程中新合成的 DNA 与模板链互补, 镜像复制过程遵循碱基互补配对法则, 有着较好的保真性。

三. 在反应体系中加入合适的模板和双链引物, 使用 95 $^{\circ}$ C 变性-室温退火-37 $^{\circ}$ C 延伸的 PCR 循环, 每次退火后重新加入 D-ASFV pol X, 可以实现对于 DNA 模板的多循环扩增。

四. 在实验中变换 ASFV pol X、引物-模板、dNTP 的手性组合, 一共有 8 种情况, 在适宜的反应体系中尝试进行延伸反应, 只有 L-ASFV pol X、D-引物-模板、D-dNTPs 的全天然组合, 以及 D-ASFV pol X、L-引物-模板、L-dNTPs 的全镜像组合可以反应, 其余六种条件在反应时间内均未检测到延伸。说明基于 ASFV pol X 的天然和镜像 DNA

复制系统可以识别错误手性的底物，在延伸反应中有着良好的手性特异性。

五.在混合两种手性的实验中，同一个反应体系中加入两种手性的 ASFV pol X、引物、模板和 dNTP，两个体系可以正确地识别本体系的蛋白或核酸分子，分别完成 DNA 链的延伸，没有严重的相互干扰。

六.用镜像 DNA 复制体系扩增一段 44nt 的  $Zn^{2+}$  依赖 DNAzyme 序列，在经过 36 小时的延伸后获得全长 DNA 链。通过 PAGE 胶回收分离得到单链 DNAzyme，在含有 2mM  $Zn^{2+}$  的缓冲液环境中，L-DNAzyme 有着自我剪切的生物活性，而对照组 20mM  $Mg^{2+}$  条件下不能剪切。镜像 DNA 复制系统可以扩增长链的、有活性的 L-DNA 序列。

七.镜像转录体系含有 D-ASFV pol X、L-模板、L-引物和 L-rNTP，在 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 20 mM  $MgCl_2$ , 1 mM DTT, 50 mM KCl 条件下可以将 L-rNTP 添加到模板的 3' 末端，合成一段 RNA 序列。D-ASFV pol X 模板依赖的转录 RNA 反应速率低于复制 DNA，转录同样遵循碱基互补配对原则，有一些错配产生。

我们的工作实现了构建镜像 DNA 复制和转录体系，并且证实了镜像聚合酶可以依照模板复制镜像 DNA 或者生成 RNA 链。虽然生命起源早期的进化证据已经无从查找，我们仍然不知道为何镜像的分子在高等细胞生命的进化过程中被舍弃了，但是我们在实验上证实了镜像生命分子可以实现相应的生物功能，提供了镜像分子存在的可能性依据。对于镜像中心法则中两个重要环节的实现，为未来在实验室环境中构建完整的镜像生命奠定了基础。

## 应用及展望

我们的工作延续了对于镜像手性生物分子的研究，不仅证实了镜像分子如研究者预期的那样具有和天然分子相对应的活性和手性特异性，而且作为理论和实践应用的开端，完成了镜像中心法则中的 DNA 复制和转录 RNA 两个环节。本发明有两个主要的应用领域：一是将镜像 DNA 复制体系用于体外筛选获得核酸药物，二是尝试构建完整的镜像原始细胞。

一. 镜像体外筛选获得核酸药物是未来很有应用前景的方向。天然和镜像的核酸序列都可以由于其多样的序列折叠成复杂多样的结构，有一些可以结合特定靶标分子 DNA 或 RNA 被称为核酸适体 (aptamer)。通常获得核酸适体的方式是体外筛选技术，体外筛选使用含有通常 30-80 个随机序列的 DNA 或 RNA，一般可以达到  $10^{14}$  以上的复杂度，两端加上固定的引物互补区方便 PCR 扩增。在筛选的过程中通常要用不同的方法固定靶标分子，将随机序列库与靶标分子放在一起结合，然后用洗涤液分离去除不与靶标分子结合的核酸序列，进而再获得亲和力较强的核酸分子，通过 PCR 扩增富集高亲和强

度的序列。经过多循环的筛选，即可得到与靶标分子较强结合的一个或几个核酸序列。

如果针对疾病相关的某种蛋白或小分子进行体外筛选，例如 CDK、GPCR、Bcl-2 等，可能可以获得与之高亲和力的核酸适体分子。然而将这些分子应用于临床的效果并不理想，在体内会快速被降解。进而有研究者希望以在体内更稳定的镜像核酸分子作为药物。目前已有的研究通过合成镜像的靶标分子，再用天然的随机序列库进行体外筛选，获得可以结合镜像靶标的天然核酸序列。由于手性镜像的关系，使用同样的序列合成镜像核酸适体，即可结合天然靶标(Williams et al., 1997)。这种筛选方法可以有效的获得能结合天然分子的镜像核酸适体，但是问题在于蛋白质化学合成的技术难度很高，很少有学术或商业机构可以合成较为复杂的蛋白质，而且生命体中的大多数的靶点都超出了目前蛋白合成的技术范围，例如 PD-L1 蛋白大小为 40kDa。

镜像体外筛选的难度在于目前没有办法在筛选的每一轮进行镜像 PCR 扩增。我们的镜像 PCR 技术将可以实现这一点。通过 DNA 合成仪合成镜像随机序列库，直接将其用于天然药物靶点的结合，再通过漂洗、洗脱、扩增高亲和序列，经多个循环直接得到镜像核酸适体序列，可以经优化和临床试验作为潜在药物分子。对于镜像 PCR 技术，本文用 ASFV pol X 每个循环加酶的方式实现了镜像 PCR。ASFV pol X 的反应速率很低（在病毒中主要用于基因组缺口的修复），以及它不是耐热聚合酶，在 3.5M 脯氨酸保护的条件下 50℃ 1 分钟即失去活性。未来可以选用已经发现的高效、耐热聚合酶，在合成技术范围内的比如 352 个氨基酸的 Dpo4 (*Sulfolobus solfataricus* P2 DNA polymerase IV)，文献报道 Dpo4 可以用于 PCR 扩增，未来可以使用镜像 Dpo4 蛋白进行 PCR 和镜像的体外筛选。

二. 构建镜像生命的重要步骤是将镜像中心法则中的另一个重要步骤——翻译过程在实验室实现。镜像核糖体和 tRNA 是实现翻译的主要生物原件，目前的技术水平仍然倾向于使用化学合成的方法来构建。细菌的核糖体包含 rRNA，通常还有 50-80 个核糖体蛋白组成(Wilson et al., 2009)，大多数的都短于 240 个氨基酸，目前的蛋白合成技术可以实现，还有一个 557 个氨基酸的 rpsA 蛋白需要未来改进的蛋白合成技术来实现。各组成部分别合成之后在体外进行复性和组装，成为有功能的镜像核糖体。通过化学合成 DNA 和 PCR 扩增更长的 L-DNA 模板，转录出长的 L-mRNA，再用镜像的核糖体和 tRNA 可以得到实现镜像细胞功能的蛋白分子，例如 DNA 连接酶、解旋酶、丙酮酸脱氢酶等等。如果能尽量多地合成出镜像细胞所需的蛋白和核酸组成成分，未来通过进一步的技术进展将会有可能构建简单的镜像细胞，也可以使用镜像细胞生产镜像的药物或镜像生物材料。

## 主要符号对照表

ASFV pol X	非洲猪瘟病毒聚合酶 X
DNAzyme	脱氧核酶
SDS-PAGE	十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
Tris	三羟甲基氨基甲烷
NMDA	N-甲基-D-天冬氨酸(N-methyl-D-aspartic acid)
HPLC	高效液相色谱(high performance liquid chromatography)
ESI-MS	电喷雾电离质谱(electrospray ionization mass spectrometry)
EDTA	乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid)
FAM	荧光素氨基磷酸酯(fluorescein amidite)

## 参考文献

- Breslow, R., and Levine, M. (2006). Amplification of enantiomeric concentrations under credible prebiotic conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 12979-12980.
- Corrigan, J. (1969). D-Amino Acids in Animals. *Science* *164*, 142-149.
- Dawson, P.E., and Kent, S.B.H. (2000). Synthesis of Native Proteins by Chemical Ligation. *Annual Review of Biochemistry* *69*, 923-960.
- Dawson, P.E., Muir, T.W., Clark-Lewis, I., and Kent, S.B. (1994). Synthesis of proteins by native chemical ligation. *Science* *266*, 776-779.
- Engel, M., and Macko, S. (2001). The stereochemistry of amino acids in the Murchison meteorite. *Precambrian Research* *106*, 35-45.
- Fields, G. (2002). Introduction to Peptide Synthesis, Vol Chapter 11.
- Fitzgerald, M.C., Chernushevich, I., Standing, K.G., Kent, S.B.H., and Whitman, C.P. (1995). Total Chemical Synthesis and Catalytic Properties of the Enzyme Enantiomers L- and D-4-Oxalocrotonate Tautomerase. *Journal of the American Chemical Society* *117*, 11075-11080.
- Focher, F., Maga, G., Bendiscioli, A., Capobianco, M., Colonna, F., Garbesi, A., and Spadari, S. (1995). Stereospecificity of human DNA polymerases alpha, beta, gamma, delta and epsilon, HIV-reverse transcriptase, HSV-1 DNA polymerase, calf thymus terminal transferase and Escherichia coli DNA polymerase I in recognizing D- and L-thymidine 5'-triphosphate as substrate. *Nucleic Acids Research* *23*, 2840-2847.

- Gu, H., Furukawa, K., Weinberg, Z., Berenson, D.F., and Breaker, R.R. (2013). Small, Highly Active DNAs That Hydrolyze DNA. *Journal of the American Chemical Society* *135*, 9121-9129.
- Hamase, K., Inoue, T., Morikawa, A., Konno, R., and Zaitu, K. (2001). Determination of Free [formula omitted]-Proline and [formula omitted]-Leucine in the Brains of Mutant Mice Lacking [formula omitted]-Amino Acid Oxidase Activity. *Analytical Biochemistry* *298*, 253-258.
- Hashimoto, A., Kumashiro, S., Nishikawa, T., Oka, T., Takahashi, K., Mito, T., Takashima, S., Doi, N., Mizutani, Y., Yamazaki, T., *et al.* (1993). Embryonic Development and Postnatal Changes in Free d - Aspartate and d - Serine in the Human Prefrontal Cortex. *Journal of Neurochemistry* *61*, 348-351.
- Hashimoto, A., Oka, T., and Nishikawa, T. (1995). Anatomical Distribution and Postnatal Changes in Endogenous Free D - Aspartate and D - Serine in Rat Brain and Periphery. *European Journal of Neuroscience* *7*, 1657-1663.
- Joyce, G., Visser, G., Van Boeckel, C., Van Boom, J., Orgel, L., and Van Westrenen, J. (1984). Chiral selection in poly(C)-directed synthesis of oligo(G). *Nature* *310*, 602.
- Kent, S.B. (1988). Chemical synthesis of peptides and proteins. *Annual Review of Biochemistry* *57*, 957-989.
- Klusmann, S., Nolte, A., Bald, R., Erdmann, V., and Furste, J. (1996). Mirror-image RNA that binds D-adenosine. *Nature Biotechnology* *14*, 1112.
- Krause, E., Bienert, M., Schmieder, P., and Wenschuh, H. (2000). The Helix-Destabilizing Propensity Scale of d -Amino Acids: The Influence of Side Chain Steric Effects.
- Liu, S., Pentelute, B.L., and Kent, P.S.B.H. (2012). Convergent Chemical Synthesis of [Lysine 24,&thinsp;38,&thinsp;83 ] Human Erythropoietin & dagger. *Angewandte Chemie International Edition* *51*, 993&ndash;999.
- Maciejewski, M., Shin, R., Pan, B., Marintchev, A., Denninger, A., Mullen, M., Chen, K., Gryk, M., and Mullen, G. (2001). Solution structure of a viral DNA repair polymerase. *Nature Structural & Molecular Biology* *8*, 936.
- Milton, R., Milton, S., and Kent, S. (1992). Total chemical synthesis of a D-enzyme: the enantiomers of HIV-1 protease show reciprocal chiral substrate specificity [corrected]. *Science* *256*, 1445-1448.
- Mothet, J., Parent, A., Wolosker, H., Brady, R., Linden, D., Ferris, C., Rogawski, M., and Snyder, S. (2000). d-Serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-d-aspartate receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *97*, 4926.
- Nagata, Y., Homma, H., Lee, J., and Imai, K. (1999). d-Aspartate stimulation of testosterone synthesis in rat Leydig cells. *FEBS Letters* *444*, 160-164.
- Nolte, A., Klusmann, S., Bald, R., Erdmann, V., and Furste, J. (1996). Mirror-design of L-oligonucleotide ligands binding to L-arginine. *Nature Biotechnology* *14*, 1116.
- Ohide, H., Miyoshi, Y., Maruyama, R., Hamase, K., and Konno, R. (2011). d-Amino acid

- metabolism in mammals: Biosynthesis, degradation and analytical aspects of the metabolic study. *Journal of Chromatography B* 879, 3162-3168.
- Oliveros, M., Yanez, R., Salas, M., Salas, J., Vinuela, E., and Blanco, L. (1997). Characterization of an African Swine Fever Virus 20-kDa DNA Polymerase Involved in DNA Repair. *Journal of Biological Chemistry* 272, 30899-30910.
- Qian, W., and Danishefsky, S.J. (2007). Free-radical-based, specific desulfurization of cysteine: a powerful advance in the synthesis of polypeptides and glycopolypeptides. *Angewandte Chemie International Edition* 46, 9248-9252.
- Sa, N., and Ramsden, D. (2003). Polymerase mu is a DNA-directed DNA/RNA polymerase. *Molecular and Cellular Biology* 23, 2309-2315.
- Schell, M., Molliver, M., and Snyder, S. (1995). D-serine, an endogenous synaptic modulator: localization to astrocytes and glutamate-stimulated release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 3948-3952.
- Sczepanski, J., and Joyce, G. (2014). A cross-chiral RNA polymerase ribozyme. *Nature* 515, 440.
- Showalter, A., Byeon, I., Su, M., and Tsai, M. (2001). Solution structure of a viral DNA polymerase X and evidence for a mutagenic function. *Nature Structural & Molecular Biology* 8, 942.
- Showalter, A., and Tsai, M. (2001). A DNA Polymerase with Specificity for Five Base Pairs. *Vinogradov, A., Evans, E., and Pentelute, B. (2015). Total synthesis and biochemical characterization of mirror image barnase. Chemical Science* 6, 2997-3002.
- Weinstock, M., Jacobsen, M., and Kay, M. (2014). Synthesis and folding of a mirror-image enzyme reveals ambidextrous chaperone activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 11679-11684.
- Williams, K., Liu, X., Schumacher, T., Lin, H., Ausiello, D., Kim, P., and Bartel, D. (1997). Bioactive and nuclease-resistant l-DNA ligand of vasopressin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 11285-11290.
- Wilson, D., Gupta, R., Mikolajka, A., and Nierhaus, K. (2009). *Ribosomal Proteins: Role in Ribosomal Functions*, Vol 2009.
- Wolosker, H., Blackshaw, S., and Snyder, S. (1999). Serine racemase: A glial enzyme synthesizing d-serine to regulate glutamate-N-methyl-d-aspartate neurotransmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 13409-13414.
- Wyszko, E., Szymanski, M., Zeichhardt, H., Muller, F., Barciszewski, J., and Erdmann, V. (2013). Spiegelzymes: Sequence Specific Hydrolysis of L-RNA with Mirror Image Hammerhead Ribozymes and DNAzymes. *PloS one* 8, e54741.
- Yamaguchi, T., Iwanami, N., Shudo, K., and Saneyoshi, M. (1994). Chiral Discrimination of Enantiomeric 2'-Deoxythymidine 5'-Triphosphate by HIV-1 Reverse Transcriptase and Eukaryotic DNA Polymerases. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 200, 1023-1027.

Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research* 31, 3406-3415.

## 实施例 2

### 热稳定 DNA 聚合酶的化学全合成

聚合酶链式反应 (PCR) 是应用于现代生物学研究中的重要工具。为了实现镜像生命体系的聚合酶链式反应, 我们设计并且化学合成了一个具有热稳定性的 DNA 聚合酶。该酶是由 352 个氨基酸残基组成的来自硫磺矿硫化叶菌 P2 菌株 (*Sulfolobus solfataricus* P2) 的 DNA 聚合酶 IV (DNA polymerase IV, Dpo4)。这一化学合成的 L 型 DNA 聚合酶是迄今为止报道过的分子量最大的人工合成蛋白质。经过 PCR 反应体系的优化, 我们最终使用这一人工合成的 L 型 Dpo4 酶扩增出长达 1.5Kb 的 DNA 序列。L 型 Dpo4 酶的化学合成路线的确立为日后合成适用于镜像体系 PCR 的 D 型 DNA 聚合酶奠定了坚实的基础, 从而为发现更多镜像分子工具开辟新道路。

在之前的研究中, 我们化学合成了含有 174 个 D 型-氨基酸残基的镜像非洲猪热病毒聚合酶 X (D-ASFV pol X), 并且成功通过该酶实现镜像 DNA 复制与转录[1]。然而由于 ASFV pol X 酶的持续合成能力较低, 通过引物延伸实验我们最终只能得到一条长为 44 nt 的依赖于锌离子进行自我剪切的 L 型-脱氧核酶 (DNAzyme) [1]。此外, 由于 ASFV pol X 不具有热稳定性, 我们只应用其进行了概念上的镜像基因复制链式反应实验, 即在每一个循环都添加新的酶[1], 这使得该酶不能有效地扩增 L 构型 DNA, 从而限制了其在镜像生命体系中的应用。

为了实现镜像 DNA 的有效扩增, 我们可以通过对目前的 L-ASFV pol 进行定向改造或者寻找和发展新的合成途径来获得更高效的和具有热稳定性的镜像聚合酶。PCR 反应中最常使用的 Taq DNA 聚合酶有 832 个氨基酸残基, 而目前通过化学方法合成的最大的蛋白质仅含有 312 个氨基酸残基, 因此很难通过全化学合成的方法合成 Taq DNA 聚合酶。然而来自硫化叶菌 P2 菌株的具有热稳定性的 DNA 聚合酶 IV (Dpo4) 不但能够 PCR 扩增长达 1.3kb 的 DNA 序列[3], 而且只含有 352 个氨基酸残基, 因此我们着手探索 Dpo4 酶的化学合成路线。

结果:

突变型 Dpo4 酶全化学合成的设计

由于通过固相多肽合成法 (SPPS) 直接合成的肽链一般不超过 50 个氨基酸残基,

因此我们采用自然化学连接法(NCL)通过天然肽键将短的多肽片段连接成长的多肽片段[4, 5]。这种方法要求在连接位点的N末端有半胱氨酸(Cys)残基,然而在野生型(WT)的Dpo4氨基酸序列(图14a)中仅存在一个半胱氨酸(Cys31)。在缺失半胱氨酸连接位点的情况下,我们在序列中寻找若干个丙氨酸(Ala)位点,在化学合成时将其替代为半胱氨酸,然后采用非金属自由基脱硫的方法在连接完成后将半胱氨酸再转变为丙氨酸。在原始序列中,A42,A155,A229和A268可作为这种方法的连接位点。然而,即使应用这四个丙氨酸残基作为连接位点,大多数多肽片段还是大于50个氨基酸残基,因此为了在此酶的氨基酸序列中引入更多可用的连接位点,我们在原始氨基酸序列引入了四个点突变(S86A,N123A,S207A和S313A)(图14b)。此外为避免在折叠过程中蛋白分子通过二硫键形成二聚体,还另外引入了C31S突变。我们在大肠杆菌中表达并纯化了含有这五个突变的重组聚合酶并且测试了活性,实验表明这五个点突变(C31S,S86A,N123A,S207A和S313A)不影响酶的PCR活性(图16b)。

我们利用这5个点突变采用基于酰肼基团的自然化学连接法(图15)从C至N末端方向组装9个多肽片段(Dpo4-1至Dpo4-9),从而实现了Dpo4-5m聚合酶的全化学合成[5, 7, 8]。为避免氨基酸侧链在SPPS和蛋白质连接过程中发生氧化,我们用正亮氨酸(Nle)取代蛋白中原有甲硫氨酸残基(Met1, Met76, Met89, Met157, Met216和Met251)。由于正亮氨酸和甲硫氨酸是等排的,所以正亮氨酸取代甲硫氨酸对蛋白质结构和功能几乎没有影响[9]。此外我们还在合成酶的N末端添加了组氨酸标签(His6),以便在后续实验中进一步纯化该蛋白。这样使得最终合成的多肽(Dpo4-5m)总长度为358个氨基酸(352个氨基酸的聚合酶加上6个氨基酸的His6标签;参见图14b)。

### Dpo4-5m的化学合成

长度范围在22至52个氨基酸的所有肽段都是通过基于Fmoc的固相多肽合成法来合成,并用反相高效液相层析(RP-HPLC)进行纯化。在用固相多肽合成法合成肽段过程中,我们发现未经修饰的肽段Dpo4-1和Dpo4-3具有高疏水性,它们在乙腈水溶液中的溶解性很低。文献报道将异酰基二肽掺入肽片段可以提高肽段的水溶性[10, 11],并且在自然化学连接条件下(pH~7)可以快速地进行O至N-酰基转移成为天然酰基键,从而实现无痕修饰[10, 11]。因此,我们在Val30-Ser31(在肽段Dpo4-1中)和Ala102-Ser103(在肽段Dpo4-3中)之间插入异酰基二肽。我们的实验结果表明掺入异酰基二肽不仅提高了肽段的溶解度,而且提高了多肽纯度。此外,我们还采用乙酰胺甲基(Acm)来保护肽段Dpo4-3和Dpo4-4的N-末端Cys,这样可以防止在连接和Cys脱硫过程中肽段的环化[12]。同时,我们在肽段Dpo4-5、Dpo4-7和Dpo4-8中引入三氟乙酰基噻唑烷-4-羧酸(Tfa-Thz)作为N-末端Cys的保护基团,Tfa-Thz与酰肼氧化相互兼

容而且可以在碱性条件下迅速地转化回 Thz。因此，可以通过自然化学连接和 Tfa-Thz 脱保护的一锅法策略，方便地获得 N-末端 Cys 未保护的肽段 Dpo4-13, Dpo4-14 和 Dpo4-17 (参见附录)。

通过使用自然化学连接法,在 C 末端到 N 末端方向上组装 9 个肽片段之后[5, 7, 8], 我们得到含 358 个氨基酸的合成肽段, 终产量为 16mg (图 19-32)。利用分析型反相高效液相色谱(HPLC)和电喷雾电离质谱(ESI-MS)分析所得全长肽的分子量为 40797.5Da, 理论值为 40799.9Da (图 32B, C)。将冻干的肽段粉末溶解于含 6M 盐酸胍的变性缓冲液中, 然后用分别含 4 M、2 M、1 M 和 0 M 盐酸胍的复性缓冲液连续透析来实现帮助肽段正确折叠。然后将折叠好的聚合酶加热到 78°C, 热不稳定的肽段以及未正确折叠的全长肽段在此温度下会聚集沉淀, 进而可以通过超速离心将其移除; 而折叠完全的合成的 Dpo4-5m 聚合酶由于具有热稳定性会存在于上清中, 经 Ni-NTA 柱纯化后用离心过滤器进行浓缩。浓缩后的 Dpo4-5m 聚合酶用 SDS-PAGE 分析其分子量大小及纯度(图 16a)。同时使用 LC-MS/MS 质谱对其氨基酸序列进行测定, 我们分别进行了由胰蛋白酶和胃蛋白酶处理的两个独立质谱测序实验, 两次检测结果覆盖了 100% 的序列 (见附表 S2)。

#### 应用化学合成的 Dpo4-5m 聚合酶进行 PCR 反应

我们首先应用 200bp 的模板检测通过上述方法制备的 Dpo4-5m 聚合酶的 PCR 活性。如图 33 所示, 通过比较不同循环数的 PCR 产物的相对量, 可以得出其 PCR 扩增效率约为 1.5, 与重组表达得到的野生型和突变型的聚合酶扩增效率基本相当。随后将扩增 35 个循环后的 PCR 产物克隆到 T 载体上进行 sanger 测序, 与原始序列比对结果显示在测得的 22 个克隆中, 共存在 7 个单碱基缺失和 19 个单碱基突变 (图 34), 该结果说明在 35 个循环后的其累积突变率约为 0.9%, 这与文献中报道的野生型 Dpo4 聚合酶的复制错误率基本一致[3, 14]。

随后, 我们应用 Dpo4-5m 聚合酶扩增不同长度的 DNA 序列。如图 17a 所示, 在 35 个循环后可以扩增得到从 110bp 到 1.0kb 的不同长度的 PCR 产物, 随着模板长度的增加, PCR 扩增效率会逐渐下降。在该实验中, 各个 PCR 反应条件基本一致, 延伸时间随模板长度的不同而有所变化, 对于 110-300bp 的片段, 每个循环的延伸时间为 2 分钟, 400-600bp 为 5 分钟, 700-1000bp 为 10 分钟。

在 Dpo4-5m 能够扩增 1.0kb 的 DNA 片段的基础上, 我们尝试并成功实现了长达 1.1kb 的 dpo4 基因片段的 PCR 扩增(图 17b), 该片段是 Dpo4 聚合酶自身的编码基因。此外, 我们还成功扩增了 120bp 的大肠杆菌 5s rRNA 基因 rrfB 和 1.5kb 的大肠杆菌 16S rRNA 基因 rrfC, 这些基因可用于转录相应的核糖体 RNA (ribosomal RNA, rRNA), 因此对于镜像核糖体(ribosome)的组装具有重要意义[15]。我们通过该方法得到的 1.5kb

的扩增片段超过此前文献中报道的应用野生型 Dpo4 聚合酶扩增的最长片段 (1.3 kb)。

### 应用化学合成的 Dpo4-5m 聚合酶进行组装 PCR 反应

组装 PCR 是一种可以得到化学合成 (通常小于 150nt) 不能有效合成的长 DNA 寡核苷酸链的方法。自然界中缺乏可用的 L 型 DNA 模板, 那么就可以用这一方法获得长的镜像基因序列。我们应用 Dpo4-5m 聚合酶成功组装了 198 bp 的 tC19Z 基因, 该基因编码一个通过体外进化方法得到的具有以 RNA 为模版的 RNA 聚合酶活性的核酶

(ribozyme) [17]。实验中我们使用两个具有 30 bp 重叠序列的长引物 (tC19Z-F115 和 tC19Z-R113) 进行 PCR 扩增反应。在 20 个循环后, 使用核酸外切酶 I (Exo I) 消化实验组与负对照组 (不加酶), 该酶只能消化单链 DNA 而不能消化双链 DNA, 因此最终反应体系中只剩下组装好的全长双链 DNA。图 18a 中的琼脂糖电泳结果表明该实验成功组装得到了全长 198b 的双链 DNA, 其产物序列也通过 sanger 测序进行了验证。

我们同时尝试使用 6 个长度在 47nt 到 59nt 之间的短引物, 进行三步组装 PCR 来扩增得到长为 198bp 的 tC19Z 基因序列 (图 18c)。这样的扩增策略未来可以应用于镜像 PCR 系统中, 由短的寡核苷酸引物链出发最终组装成为全长的 L 型基因序列。在该实验中第一步用 tC19Z-F1 和 tC19Z-R1 引物进行五个循环数的组装 PCR; 第二步是以第一步的组装 PCR 产物为模版用引物 tC19Z-F2 和 tC19Z-R2 扩增 10 个循环; 最后一步的以第二步的产物作为模版用引物 tC19Z-F3 和 tC19Z-R3 扩增 20 个循环后得到最终的全长产物。琼脂糖凝胶电泳分析表明三步 PCR 反应的分别得到长度为 88 bp, 162 bp 和 198 bp 的扩增产物 (图 18d), 最终全长产物也通过 sanger 测序法进行了验证。我们也尝试了同时使用 6 个引物进行一步 PCR 反应, 但该方法会出现较多的副产物条带。

### 讨论:

我们之前报道过的基于 ASFV pol X 的镜像遗传复制系统由于缺少持续性和热稳定性因而使其不能进行有效的 PCR 扩增实验来得到较长的 L 型 DNA 序列[1]。因此为了实现镜像系统的 PCR, 我们设计并且化学合成了一个能够进行 PCR 反应的突变型 Dpo4 聚合酶, 这也为日后适用于镜像体系 PCR 的 D 型 DNA 聚合酶的合成奠定了坚实的基础。由此建立的高效镜像 PCR 系统能产生更多的镜像分子工具, 例如利用这个反手性的 PCR 系统可以进行镜像核酸适配体的体外筛选 (mirror-image Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment, miSELEX), 从而筛选出能够特异性结合某一生物靶标的 L 型核酸适配体, 并有望成为用于研究和治疗的工具。

镜像 PCR 工具的开发中一个较大的难题是得到长的 DNA 模版序列。而合成的 Dpo4-5m 能够利用短的化学合成的寡核苷酸来进行组装 PCR, 因此解决了这一问题。但

由于合成的 Dpo4-5m 聚合酶对于较长的模版的扩增效率很低,所以要获得像 16S 和 23S rRNA 这样大于 1kb 的镜像基因还是比较困难。未来可能需要开发高效的镜像 DNA 或 RNA 连接酶来解决这个问题,例如可以通过全化学方法合成由 D 型氨基酸组成的核酸连接酶,或使用具有跨镜像连接酶活性的核酶[20]。

尽管基于我们开发的化学合成路线得到的 Dpo4-5m 聚合酶的终产量可达 16mg,但是对工业上大规模生产 D 型酶来说仍不是一个实用的方法,未来可以从合成路线以及采用其他的连接方法等方面进行优化[21-23],或者是设计并全化学合成截短的 Dpo4 聚合酶。

此外,实现高效镜像 PCR 的另一策略是寻找 Dpo4 聚合酶以外的其它聚合酶系统。Dpo4 聚合酶除了对于长的 DNA 序列的扩增效率较低外,另一个缺点是保真性不高,其复制错误率在  $4 \times 10^{-4}$  至  $8 \times 10^{-3}$  之间[3,14]。要实现更高效的镜像 PCR 系统,可以通过继续寻找其它的具有热稳定性的分子量较小的 DNA 聚合酶,或者通过定向改造分子量较小的 DNA 聚合酶使其获得热稳定性以及较高的扩增效率[24,25]。

#### 材料与方法:

##### 基于 9-芴甲氧羰基 (Fmoc) 的固相多肽合成法 (Fmoc-SPPS)

所有的肽段都是人工合成的。氨基酸的偶联反应在溶有 4 倍当量的 Fmoc-氨基酸、4 倍当量的乙基氧基乙醛酸-2-肟(Oxyma)和 4 倍当量的 N, N'-二异丙基碳二酰亚胺(DIC)的 N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 进行,或者是溶有 4 倍当量的 Fmoc-氨基酸、3.8 倍当量的 6-氯苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯 (HCTU) 和 8 倍当量的 N,N-二异丙基乙胺的 N,N-二甲基甲酰胺 (DMF)。必要时,用空气浴加热来加速反应进行[26]。肽段 Dpo4-9 在 Fmoc-Thr(tBu)-Wang 树脂 (GL Biochem) 上合成,其他肽段在 Fmoc-肼 2-氯三苯甲基氯树脂上合成以制备酰肼肽[27]。肽段 Dpo4-1 中的 Val30-Ser31 和肽段 Dpo4-3 中的 Ala102-Ser103 作为异酰基二肽进行偶联。在室温下用 Oxyma / DIC 来活化偶联 Tfa-Thz-OH。肽链组装完成后,使用切割试剂 (水/苯甲硫醚/三异丙基硅烷/1,2-乙二硫醇/三氟乙酸,比例为 0.5/0.5/0.5 /0.25/8.25) 将肽段从树脂上切割下来。在氮气鼓泡浓缩后,加入冰乙醚使多肽沉淀出来,最后离心,收集固体沉淀,得到多肽粗产品。

##### 自然化学连接 (NCL)

将 C-末端含有酰肼基团的多肽片段,溶解于酸化的连接缓冲液 (6M 盐酸胍和 0.1M 磷酸二氢钠, pH 3.0) 中。将混合物置于冰盐浴 (-15°C) 上,往其中加入 10-20 倍当量的  $\text{NaNO}_2$  溶液,搅拌反应 30 分钟。随后加入混有 40 倍当量 4-巯基苯乙酸 (MPAA) 和等当量的 N 端为半胱氨酸的多肽片段,在室温下将体系的 pH 值调至 6.5。过夜反应后,

加入 100mM 磷酸三氯乙酯 (TCEP) 缓冲液将体系浓度稀释两倍, 然后室温下搅拌反应 1 小时。最后使用半制备级的 RP-HPLC 分离目标产物。用 HPLC 和 ESI-MS 分析连接产物, 并用半制备级的 HPLC 进行纯化。

### 蛋白质复性与纯化

将冻干的 Dpo4-5m 聚合酶粉末溶解在含有 6M 盐酸胍的变性缓冲液中, 随后分别用含有 4 M, 2 M, 1 M 和 0 M 盐酸胍的复性缓冲液进行透析, 每一步透析都在 4°C 条件下轻柔旋转搅拌 10 小时。变性和复性缓冲液中还包含 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaAc, 1 mM DTT, 0.5 mM EDTA 和 16% 的甘油。复性后再用含有 10mM 磷酸钾 (pH 7.0), 50mM 氯化钠, 10mM 醋酸镁, 10% 甘油和 0.1% 2-巯基乙醇的缓冲液透析。将折叠好的聚合酶加热到 78°C, 使热不稳定的肽段沉淀, 随后在 4°C 下超速离心 (19,000 rpm) 40 分钟除去。上清液加入到 Ni-NTA 树脂 (Qiagen) 中并放于 4°C 孵育过夜, 随后按照之前所述的方法进行纯化, 但没有用 Mono S 柱进一步纯化[28]。纯化后使用分光光度计在测量蛋白在 280nm 波长下的吸光值, 消光系数设为  $24,058 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , 分子量设为 40.8 kDa。最终使用 12% 的 SDS-PAGE 分析合成的聚合酶 (约 100  $\mu\text{g}$ ) 和重组酶的纯度及产量。

### 应用化学合成的 Dpo4-5m 聚合酶进行 PCR 反应

文中所述 PCR 反应均在 20  $\mu\text{l}$  的体系中进行, 该体系中包含 50 mM HEPES (pH 7.5), 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 50 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 5 mM DTT, 10% glycerol, 3% DMSO, 0.1 mg/ml BSA, 200  $\mu\text{M}$  的超纯 dNTPs, 0.5  $\mu\text{M}$  的双向引物, 2 nM 线性双链 DNA 模板和大约 300 nM 的 Dpo4-5m 聚合酶。PCR 程序设定为 86°C 变性 3 分钟; 之后是 35 个循环的 86°C 变性 30 秒, 58-65 °C 退火 1 分钟 (退火温度取决于引物  $T_m$  值), 65°C 延伸 2 到 15 分钟 (延伸时间根据扩增子长度确定), 最后 65°C 延伸 5 分钟。在扩增不同长度的 DNA 序列的实验中, 使用相同的引物 (M13-long-F 和 M13-long-R, 见附表 S1) 进行 PCR, 110-300 bp 的模板延伸时间为 2 分钟, 400-600 bp 的模板延伸 5 分钟, 700-1000 bp 的模板延伸 10 分钟。PCR 结束后使用 2% 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物并用 GoldView (Solarbio) 染色。在测试 Dpo4-5m 的扩增效率和保真度的实验中, 以 Q5 DNA 聚合酶 (New England Biolabs) 制备的长为 200bp 的线性双链 DNA 作为模板, 使用 Image Lab 软件 (Bio-Rad) 分析前 10 个循环的产物条带来分析其扩增效率。使用 DNA Clean & Concentrator 试剂盒 (Zymo Research) 纯化 35 个循环后的 PCR 产物, 然后克隆到 T 载体进行 sanger 测序来分析其保真度。

### 应用合成的 Dpo4-5m 进行组装 PCR

使用具有 30bp 重叠区域的分别长为 115 nt 和 113 nt 的引物 (tC19Z-F115 和 tC19Z-R113) 来进行组装 PCR 反应 (附表 S1), 反应中不再加入其它模板, 目标产物为 198bp 的 tC19Z 基因, 负对照组中不加入酶。在经过 20 个循环的反应后, 实验组组和对照组的产物都用核酸外切酶 I 在 37°C 处理 10 分钟 (每 5  $\mu$ l 的 PCR 产物中加 10U)。采用三步法用 6 条短引物来组装 198bp 的 tC19Z 基因的实验, 第一步反应使用 tC19Z-F1 和 tC19Z-R1 引物, 第二步反应使用 tC19Z-F2 和 tC19Z-R2 引物, 第三步反应使用 tC19Z-F3 和 tC19Z-R3 引物。上一步 PCR 产物作为下一步反应的模板, 约占下一步反应体系的 5%。第一、二、三步 PCR 反应的循环数分别为 5、10 和 20。PCR 反应结束后产物使用 3% 高分辨率琼脂糖凝胶电泳进行分析并用 GoldView (Solarbio) 染色。最终得到的全长产物使用 DNA Clean & Concentrator 试剂盒 (Zymo Research) 进行纯化回收, 然后克隆到 T 载体上进行 sanger 测序。

附录:

### 热稳定 DNA 聚合酶的化学全合成

材料:

化学药品与试剂

9-苄甲氧羰基—氨基酸	吉尔生化和希施 (上海)
Boc-Cys(Acm)-OH、Boc-Cys(Trt)-OH	吉尔生化
6-氯苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯	吉尔生化
无水 1-羟基苯并三唑 (HOBt)	吉尔生化
N,N'-二异丙基碳二酰亚胺(DIC)	阿达玛斯
乙基氰基乙醛酸-2-脞 (Oxyma)	阿达玛斯
DL-1,4-二硫苏糖醇(DTT)	阿达玛斯
N,N-二甲基甲酰胺 (DMF)	百灵威
三氟乙酸 (TFA)	百灵威
三异丙基硅烷 (TIPS)	百灵威
1,2-乙二硫醇 (EDT)	百灵威
苯甲醚	百灵威
2-巯基乙磺酸钠 (MESNa)	百灵威
氯化钾	百灵威
2,2'-偶氮双[2-(2-咪唑啉-2-基)丙烷]二盐酸盐	百灵威

(VA-044)	
N, N-二异丙基乙胺 (DIEA)	北京耦合
二氯甲烷 (DCM)	北京化工
亚硝酸钠	国药集团
十二水合磷酸一氢钠	国药集团
哌啶	国药集团
乙醚	国药集团
醋酸	国药集团
乙酸银	国药集团
二水合磷酸二氢钠	国药集团
氢氧化钠	国药集团
盐酸胍	国药集团
盐酸	国药集团
氯化钠	国药集团
4-巯基苯乙酸 (MPAA)	Alfa Aesar (Heysham, England)
三(2-羧乙基)膦盐酸盐 (TCEP·HCl)	天津联宽精细化工
还原谷胱甘肽 (GSH)	Acros Organics (Belgium)
乙腈 (HPLC 级)	J. T. Baker (New Jersey, U.S.)

#### 实验方法:

反相高效液相色谱 (HPLC) 和电喷雾电离质谱 (ESI-MS)

使用 Shimadzu Prominence HPLC 系统 (溶剂递送单位: LC-20AT) 进行反相高效液相色谱分析及纯化产物, 配合使用月旭公司 (Welch) 生产的 C4 和 C18 的色谱柱, 流动相为水和乙腈 (二者均含 0.1% TFA)。电喷雾电离质谱使用 Shimadzu LCMS-2020 液相色谱质谱仪获得。

液相色谱-二级质谱连用 (LC-MS/MS) 进行肽段测序

用 12% SDS-PAGE 来纯化人工合成的 Dpo4-5m, 加入胰蛋白酶或胃蛋白酶进行凝胶内 37°C 过夜消化, 提取出的肽段用 LC-MS 进行分析。通过直接与 Thermo Scientific Q Exactive 质谱仪连接的 Thermo-Dionex Ultimate 3000 HPLC 系统分离样品, 以 0.3 μl/min 的流速进行梯度洗脱。分析柱是填充有 C-18 树脂 (300 Å, 5 μm, Varian, Lexington,

MA, U.S.) 的自制熔凝硅石毛细管柱 (75 $\mu$ m ID, 长 150mm; Upchurch, Oak Harbor)。Q Exactive 质谱仪在软件 Xcalibur 2.1.2 数据相关的采集模式下操作, 轨道阱 (300-1800 m/z, 70,000 分辨率) 中还有一个单独的全扫描质谱, 在 27% 归一化碰撞能量下进行 20 次数据依赖性的 MS / MS 扫描。

附表 S1 | 引物序列

Primer	Sequence
M13-long-F	5'-GTAAAACGACGGCCAGTGAATTAGAACTCGGT-3'
M13-long-R	5'-CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGTTT-3'
5s rRNA( <i>rrfB</i> )-F	5'-TGCCTGGCGGCAGTAGCGC-3'
5s rRNA( <i>rrfB</i> )-R	5'-ATGCCTGGCAGTTCCTACTCTCGC-3'
16s rRNA( <i>rrsC</i> )-F	5'-AAATTGAAGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGG-3'
16s rRNA( <i>rrsC</i> )-R	5'-TAAGGAGGTGATCCAACCGCAGGTTCC-3'
<i>dpo4</i> -F	5'-ATGATTGTTCTTTTCGTTGATTTTACTACTTT-3'
<i>dpo4</i> -R	5'-AGTATCGAAGAAGCTTGTCTAATCCTATTGCT-3'
<i>iC19Z</i> -F115	5'-GTCATTGAAAAAAAAAAGACAAATCTGCCCTCAGAGCTTGA GAACATCTTCGGATGCAGAGGAGGCAGCCTTCGGTGGCGCG ATAGCGCCAACGTTCTCAACAGACACCCAATACT-3'
<i>iC19Z</i> -R113	5'- GGAGCCGAAGCTCCGGGGATTATGACCTGGGCGTGTCTAAC ATCGCCTTTTCGTCAGGTGTTATCCCCACCCGCCGAAGCGGG AGTATTGGGTGTCTGTTGAGAACGTTGGCG-3'
<i>iC19Z</i> -F1	5'-AGAGGAGGCAGCCTTCGGTGGCGCGATAGCGCCAACGTT TCAACAGACACCCAATACT-3'
<i>iC19Z</i> -R1	5'-CAGGTGTTATCCCCACCCGCCGAAGCGGGAGTATTGGGTG TCTGTTGAGAACGTTGGCG-3'
<i>iC19Z</i> -F2	5'-CAAATCTGCCCTCAGAGCTTGAGAACATCTTCGGATGCAG AGGAGGCAGCCTTCGGTGG-3'
<i>iC19Z</i> -R2	5'-ATTATGACCTGGGCGTGTCTAACATCGCCTTTTCGTCAGGT GTTATCCCCACCCGCCGA-3'
<i>iC19Z</i> -F3	5'-GTCATTGAAAAAAAAAAGACAAATCTGCCCTCAGAGCTTGA GAACATCTTCG-3'
<i>iC19Z</i> -R3	5'-GGAGCCGAAGCTCCGGGGATTATGACCTGGGCGTGTCTAA CATCGCC-3'

## 参考文献:

1. Wang, Z., et al., *A synthetic molecular system capable of mirror-image genetic replication and transcription*. Nat Chem, 2016. **8**(7): p. 698-704.
2. Weinstock, M.T., M.T. Jacobsen, and M.S. Kay, *Synthesis and folding of a mirror-image enzyme reveals ambidextrous chaperone activity*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014. **111**(32): p. 11679-11684.
3. Boudsocq, F., et al., *Sulfolobus solfataricus P2 DNA polymerase IV (Dpo4): an archaeal DinB-like DNA polymerase with lesion-bypass properties akin to eukaryotic pol $\eta$* . Nucleic Acids Research, 2001. **29**(22): p. 4607-4616.
4. Kent, S.B.H., *Total chemical synthesis of proteins*. Chemical Society Reviews, 2009. **38**(2): p. 338-351.
5. Zheng, J.-S., et al., *Chemical synthesis of proteins using peptide hydrazides as thioester surrogates*. Nat Protocols, 2013. **8**(12): p. 2483-2495.
6. Wan, Q. and S.J. Danishefsky, *Free-radical-based, specific desulfurization of cysteine: a powerful advance in the synthesis of polypeptides and glycopolypeptides*. Angew Chem Int Ed Engl, 2007. **46**(48): p. 9248-52.
7. Fang, G.-M., et al., *Protein Chemical Synthesis by Ligation of Peptide Hydrazides*. Angewandte Chemie International Edition, 2011. **50**(33): p. 7645-7649.
8. Huang, Y.-C., G.-M. Fang, and L. Liu, *Chemical synthesis of proteins using hydrazide intermediates*. National Science Review, 2016. **3**(1): p. 107-116.
9. Dery, L., et al., *Accessing human selenoproteins through chemical protein synthesis*. Chemical Science, 2017.
10. Coin, I., *The depsipeptide method for solid-phase synthesis of difficult peptides*. J Pept Sci, 2010. **16**(5): p. 223-30.
11. Liu, F., et al., *A Synthetic Route to Human Insulin Using Isoacyl Peptides*. Angewandte Chemie, 2014. **126**(15): p. 4064-4068.
12. Raibaut, L., N. Ollivier, and O. Melnyk, *Sequential native peptide ligation strategies for total chemical protein synthesis*. Chem Soc Rev, 2012. **41**(21): p. 7001-15.
13. Huang, Y.C., et al., *Synthesis of l- and d-Ubiquitin by One-Pot Ligation and Metal-Free Desulfurization*. Chemistry, 2016. **22**(22): p. 7623-8.
14. Ling, H., et al., *Crystal structure of a Y-family DNA polymerase in action: a mechanism for error-prone and lesion-bypass replication*. Cell, 2001. **107**(1): p. 91-102.
15. Jewett, M.C., et al., *In vitro integration of ribosomal RNA synthesis, ribosome assembly, and translation*. Mol Syst Biol, 2013. **9**: p. 678.
16. Stemmer, W.P., et al., *Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides*. Gene, 1995. **164**(1): p. 49-53.
17. Wochner, A., et al., *Ribozyme-catalyzed transcription of an active ribozyme*. Science, 2011. **332**(6026): p. 209-12.

18. Williams, K.P., et al., *Bioactive and nuclease-resistant L-DNA ligand of vasopressin*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1997. **94**(21): p. 11285-11290.
19. Yatime, L., et al., *Structural basis for the targeting of complement anaphylatoxin C5a using a mixed L-RNA/L-DNA aptamer*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 6481.
20. Sczepanski, J.T. and G.F. Joyce, *A cross-chiral RNA polymerase ribozyme*. Nature, 2014. **515**(7527): p. 440-442.
21. Fiala, K.A. and Z. Suo, *Pre-steady-state kinetic studies of the fidelity of Sulfolobus solfataricus P2 DNA polymerase IV*. Biochemistry, 2004. **43**(7): p. 2106-15.
22. Bode, J.W., *Emerging methods in amide- and peptide-bond formation*. Curr Opin Drug Discov Devel, 2006. **9**(6): p. 765-75.
23. Englebretsen, D.R., B. Garnham, and P.F. Alewood, *A cassette ligation strategy with thioether replacement of three Gly-Gly peptide bonds: total chemical synthesis of the 101 residue protein early pregnancy factor [psi(CH<sub>2</sub>S)28-29,56-57,76-77]*. J Org Chem, 2002. **67**(17): p. 5883-90.
24. Zeng, W., et al., *Assembly of synthetic peptide vaccines by chemoselective ligation of epitopes: influence of different chemical linkages and epitope orientations on biological activity*. Vaccine, 2001. **19**(28-29): p. 3843-52.
25. Pinheiro, V.B., et al., *Synthetic genetic polymers capable of heredity and evolution*. Science, 2012. **336**(6079): p. 341-4.
26. Larsen, A.C., et al., *A general strategy for expanding polymerase function by droplet microfluidics*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 11235.
27. Huang, Y.-C., et al., *Accelerated Fmoc solid-phase synthesis of peptides with aggregation-disrupting backbones*. Organic & Biomolecular Chemistry, 2015. **13**(5): p. 1500-1506.
28. Huang, Y.-C., et al., *Facile synthesis of C-terminal peptide hydrazide and thioester of NY-ESO-1 (A39-A68) from an Fmoc-hydrazine 2-chlorotrityl chloride resin*. Tetrahedron, 2014. **70**: p. 2951-2955.

## 权利要求

1. 对镜像核酸进行复制的方法，包括：在镜像核酸聚合酶、镜像核酸模板、镜像核酸引物以及镜像 dNTPs/rNTPs 的存在下进行反应，以获得所述镜像核酸。
2. 权利要求 1 的方法，其中所述反应重复多个循环。
3. 权利要求 1 或 2 的方法，其中所述镜像核酸、镜像核酸模板、镜像核酸引物以及镜像 dNTPs/rNTPs 为 L-型，所述镜像核酸聚合酶为 D 型。
4. 权利要求 1-3 之任一项的方法，其中所述镜像核酸聚合酶选自由 D-ASFV pol X、D-Dpo4、D-Taq 聚合酶以及 D-Pfu 聚合酶构成的组。
5. 权利要求 1-4 之任一项的方法，其中所述镜像核酸聚合酶包含亲和标签。
6. 权利要求 1-5 之任一项的方法，其中所述镜像核酸为 L-DNAzyme。
7. 权利要求 1-6 之任一项的方法，其中所述镜像核酸为 L 型 DNA。
8. 权利要求 1-6 之任一项的方法，其中所述镜像核酸为 L 型 RNA。
9. 权利要求 1-8 之任一项的方法，其中所述反应为聚合酶链式反应。
10. 权利要求 1-9 之任一项的方法，其中所述反应在如下缓冲液中进行：50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 50 mM KCl。
11. 进行镜像 PCR 的方法，包括：在镜像核酸聚合酶、镜像核酸模板、镜像核酸引物以及镜像 dNTPs/rNTPs 的存在下进行反应，以获得镜像核酸。
12. 权利要求 11 的方法，其中所述反应重复多个循环。
13. 权利要求 11 或 12 的方法，其中所述镜像核酸、镜像核酸模板、镜像核酸引物以及镜像 dNTPs/rNTPs 为 L-型，所述镜像核酸聚合酶为 D 型。
14. 权利要求 11-13 之任一项的方法，其中所述镜像核酸聚合酶选自由 D-ASFV pol X、D-Dpo4、D-Taq 聚合酶以及 D-Pfu 聚合酶构成的组。
15. 权利要求 11-14 之任一项的方法，其中所述镜像核酸聚合酶包含亲和标签。
16. 权利要求 11-15 之任一项的方法，其中所述镜像核酸为 L 型 DNA。
17. 权利要求 11-15 之任一项的方法，其中所述镜像核酸为 L 型 RNA。
18. 权利要求 11-15 之任一项的方法，其中所述镜像核酸为 L-DNAzyme。
19. 权利要求 11-18 之任一项的方法，其中所述反应在如下缓冲液中进行：50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 50 mM KCl。
20. 筛选镜像核酸分子的方法，包括：  
在允许二者结合的条件下，使随机镜像核酸序列库与靶标分子接触；  
获得与靶标分子结合的镜像核酸分子；以及  
通过镜像 PCR 扩增所述与靶标分子结合的镜像核酸分子。

21. 权利要求 20 的方法，其中所述靶标分子被固定在固相介质上。
22. 权利要求 20-21 之任一项的方法，其中在随机镜像核酸序列库与靶标分子接触之后，通过洗涤去除不与靶标分子结合的镜像核酸序列，从而获得与靶标分子结合的镜像核酸分子。
23. 权利要求 20-22 之任一项的方法，其中所述镜像核酸分子为 L 型 DNA。
24. 权利要求 20-22 之任一项的方法，其中所述镜像核酸分子为 L 型 RNA。
25. 权利要求 20-22 之任一项的方法，其中所述镜像 PCR 中使用的镜像核酸聚合酶选自由 D-ASFV pol X、D-Dpo4、D-Taq 聚合酶以及 D-Pfu 聚合酶构成的组。
26. 权利要求 20-25 之任一项的方法，其中所述镜像核酸聚合酶包含亲和标签。
27. 权利要求 20-26 之任一项的方法，其中所述镜像 PCR 在如下缓冲液中进行：50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 50 mM KCl。
28. D-型 ASFV pol X，其序列如 SEQ ID NO:17 所示，其中除没有手性的甘氨酸以外，其余氨基酸均为 D-型氨基酸。

说明书附图

10 20 30 40 50  
 MLTIQGKKI VNHLSRLAF EYNGQLIKIL SKNIVAVGSL RREEKMLNDV  
 60 70 80 90 100  
 DLLIIVPEKK LLKHVLPNIR IKGLSFSVKV CGERKCVLFI EWEKKTYQLD  
 110 120 130 140 150  
 LFTALAEKPK YAFHFHTGPV SYLIRIRAAL KKKNYKLNQY GLFKNQTLVP  
 160 170  
 LKITTEKELI KELGFTYRIP KKRL

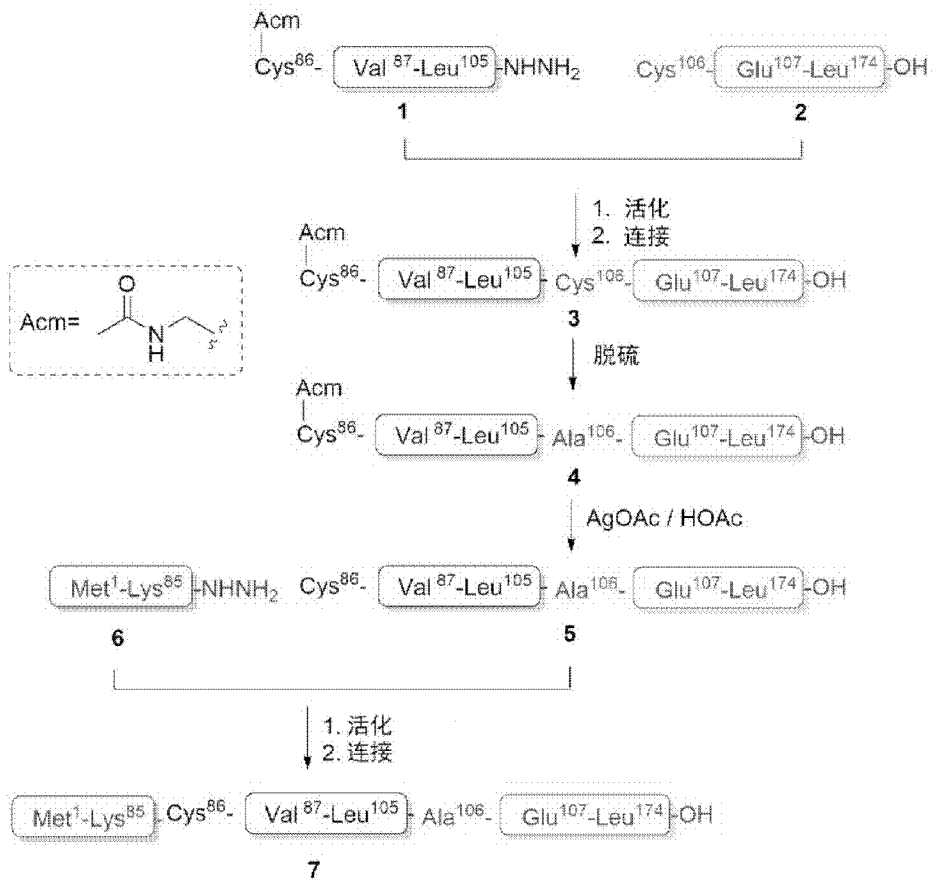


图 1

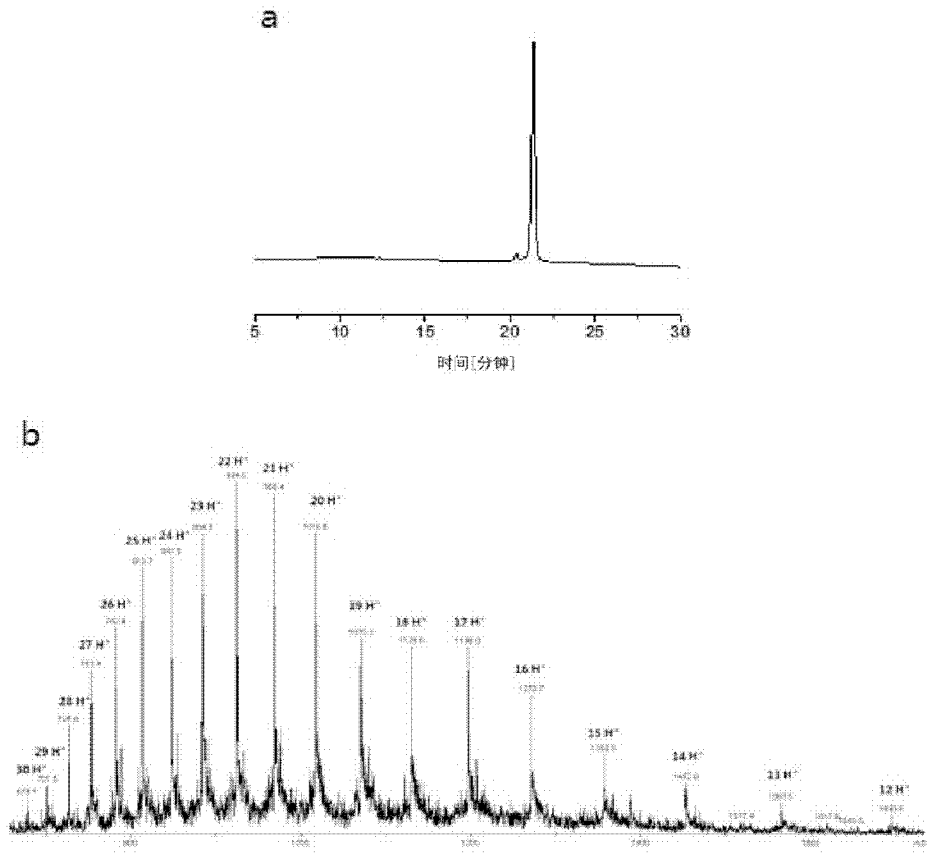


图 2

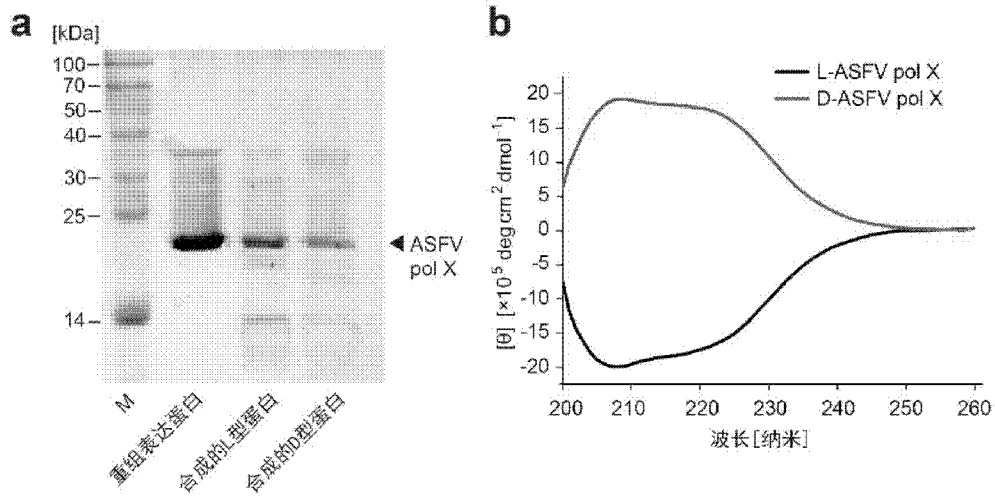


图 3

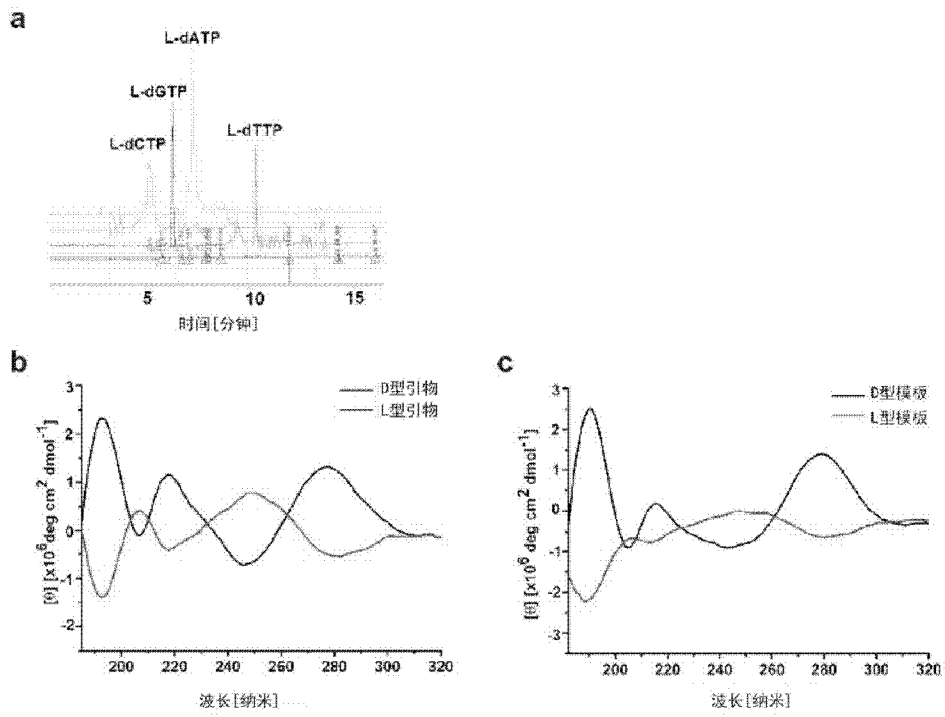


图 4

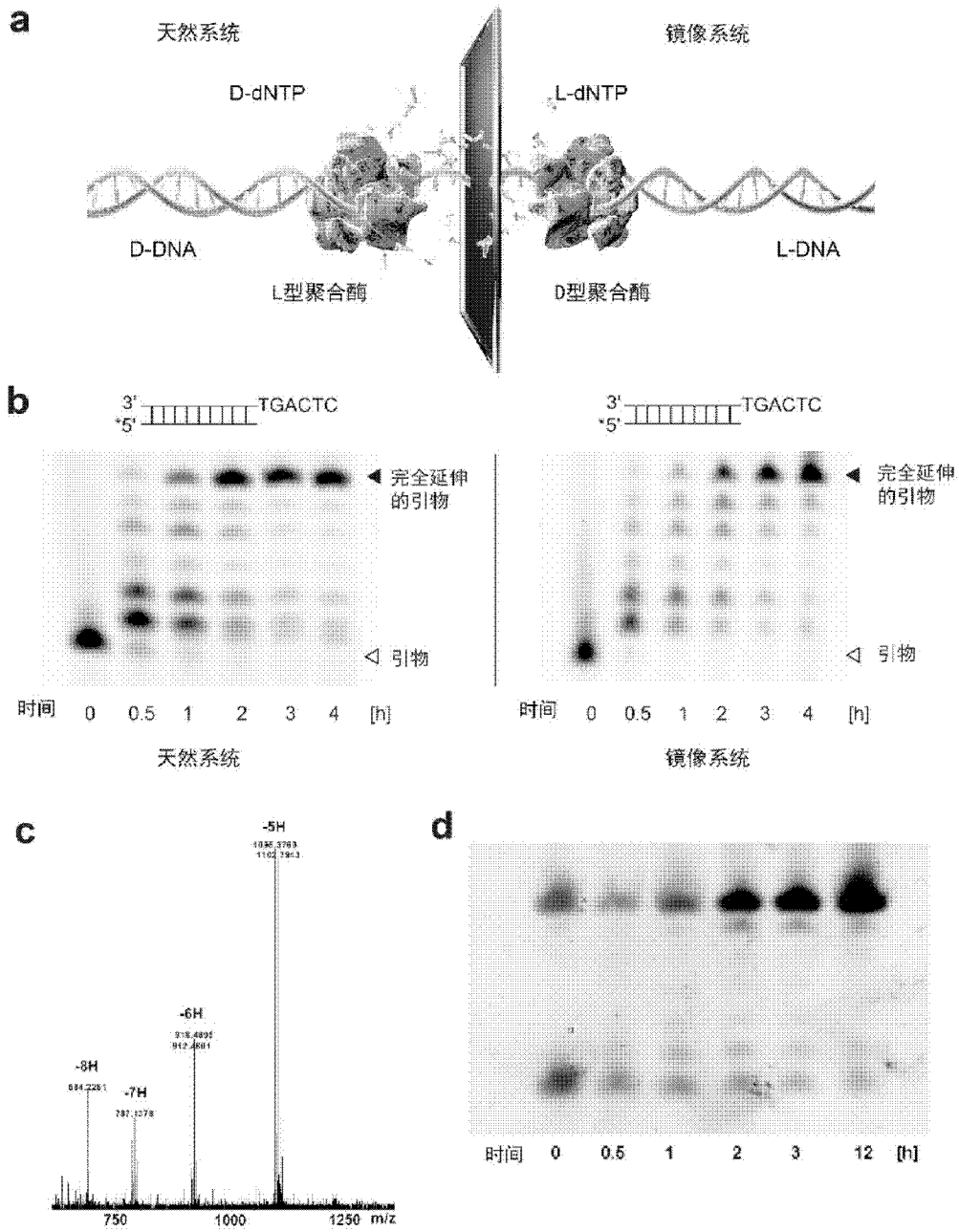


图 5

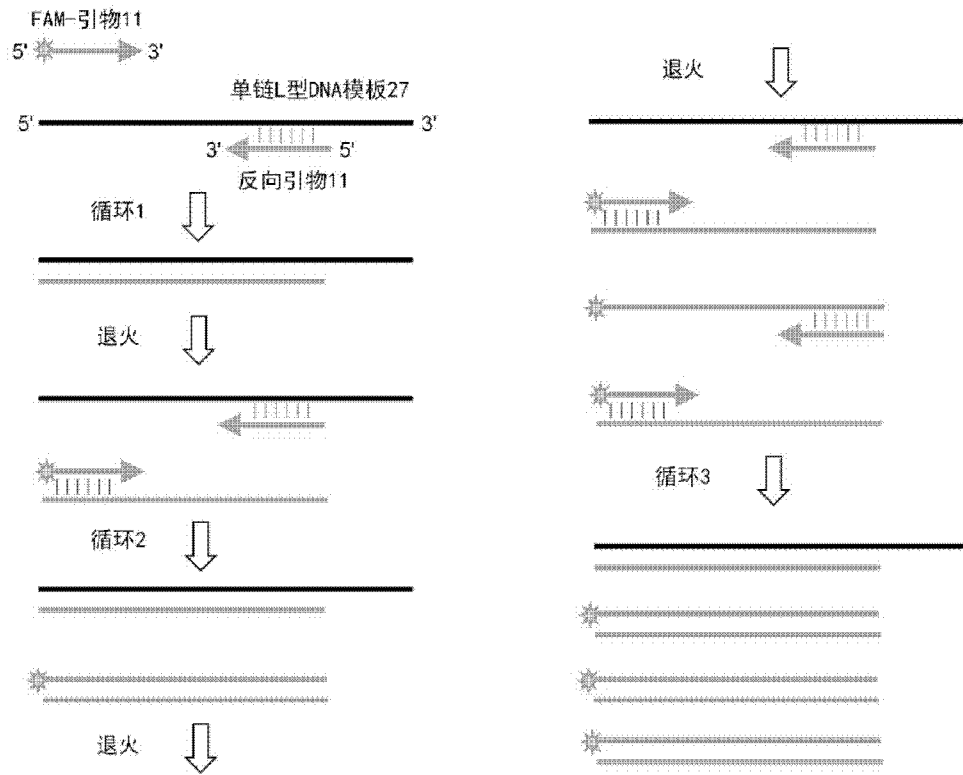


图 6

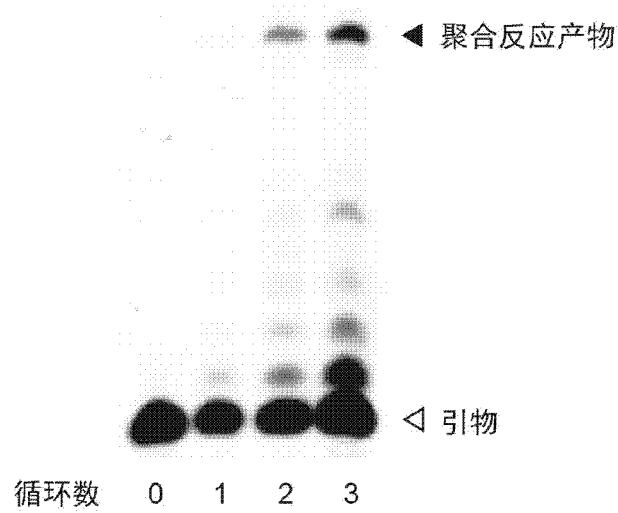


图 7

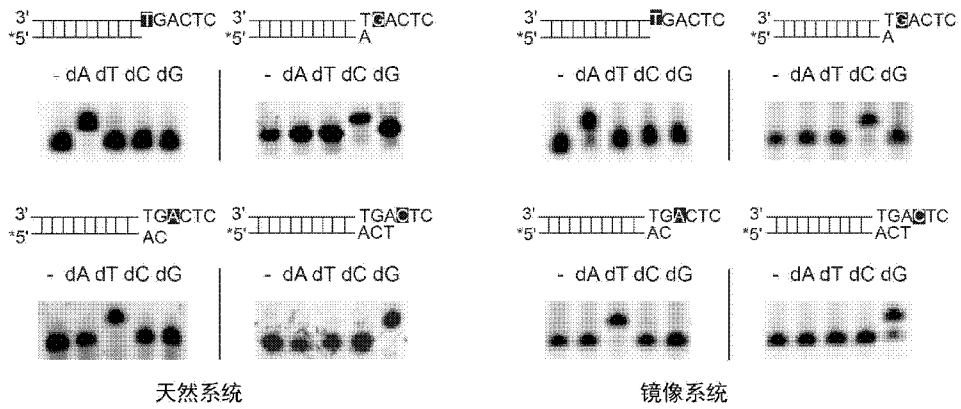


图 8

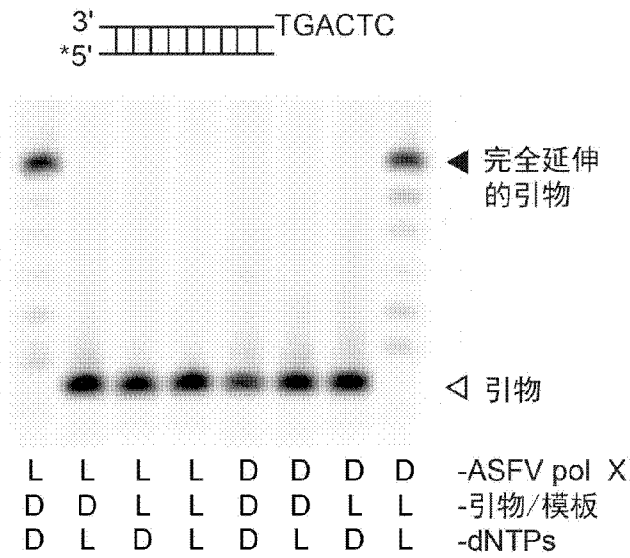


图 9

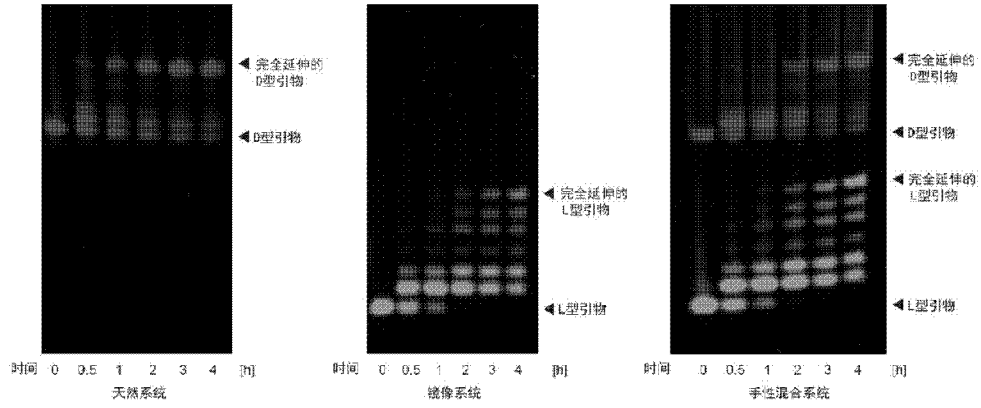


图 10

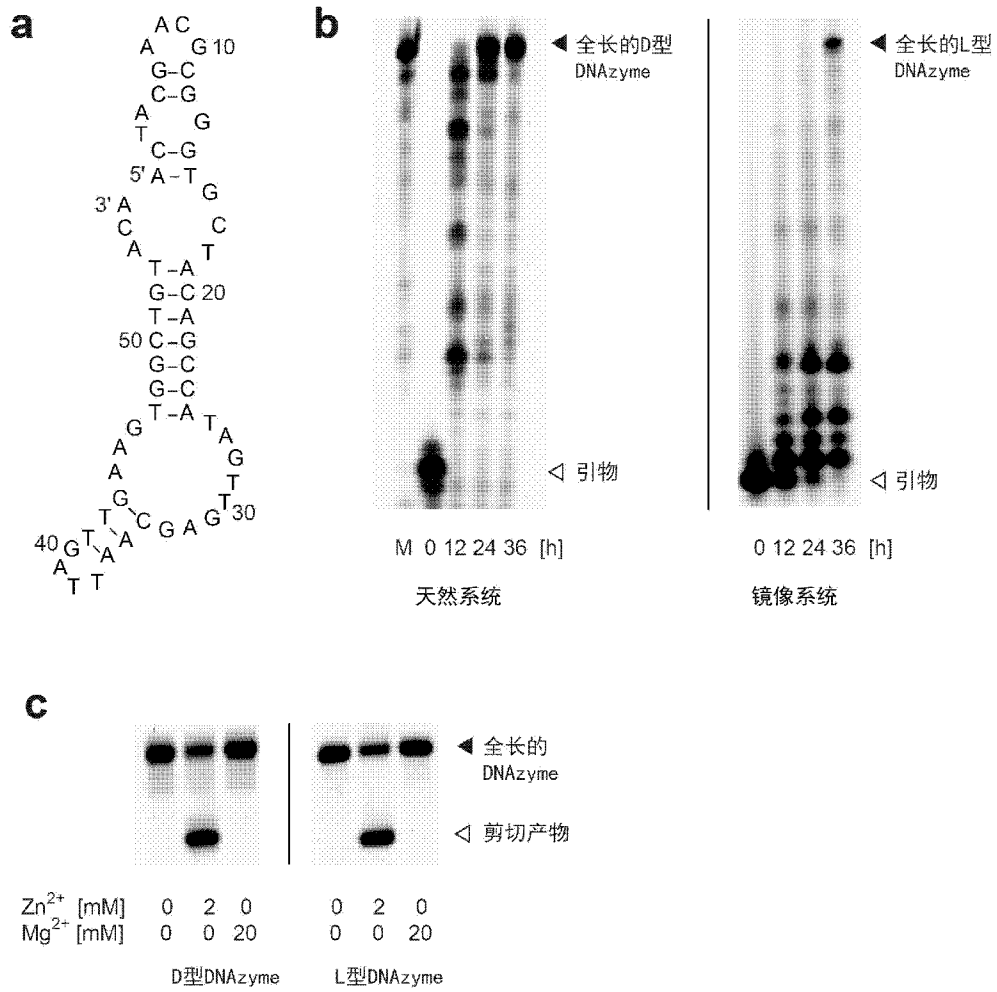


图 11

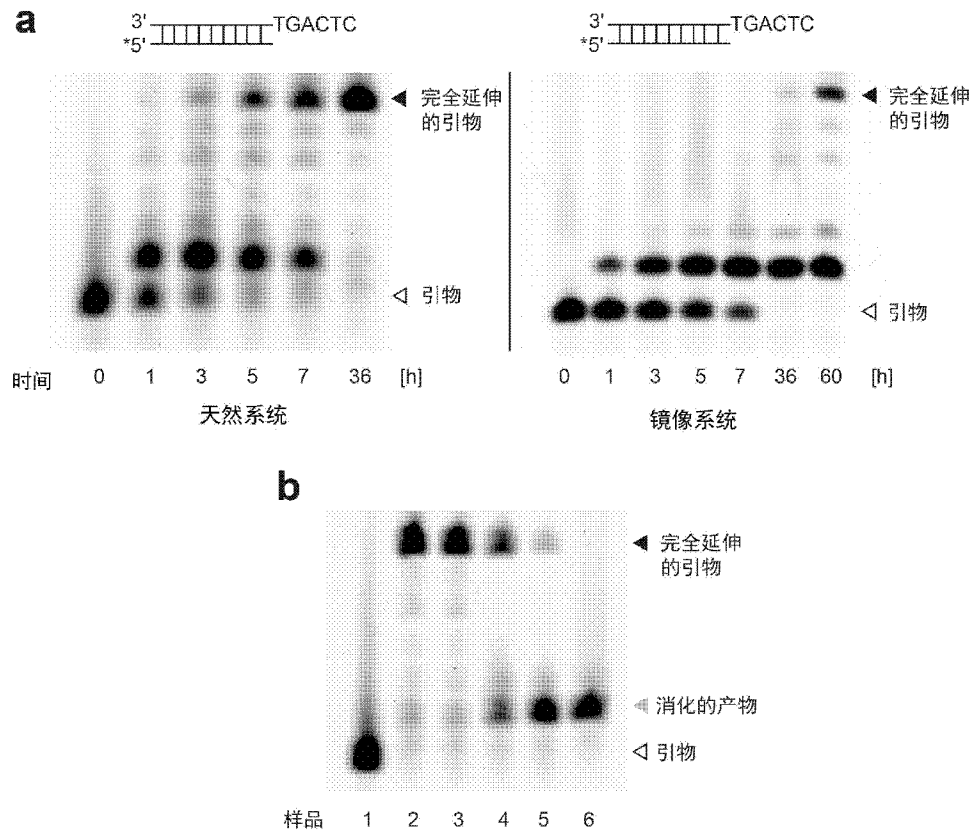


图 12

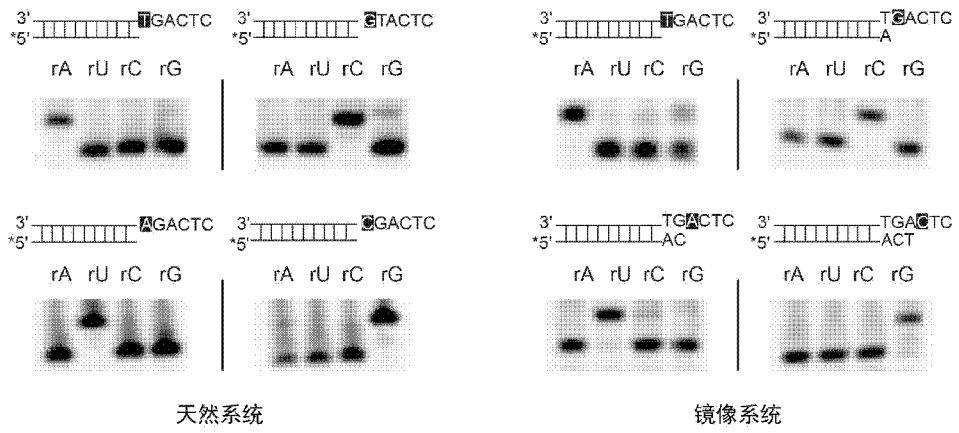


图 13

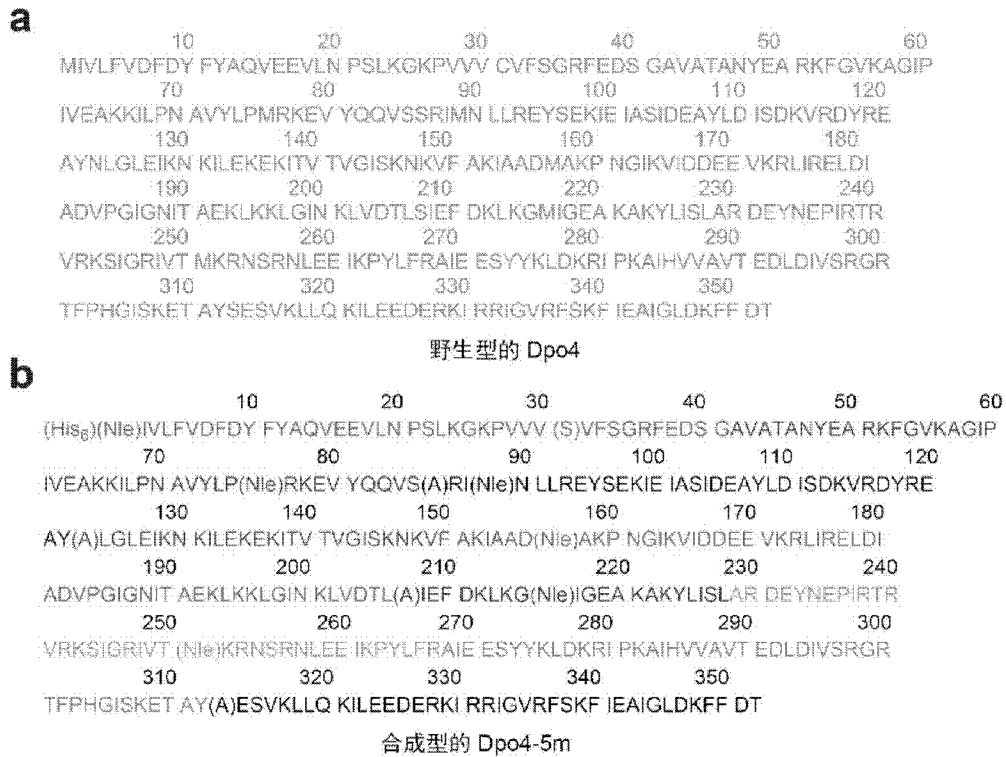


图 14

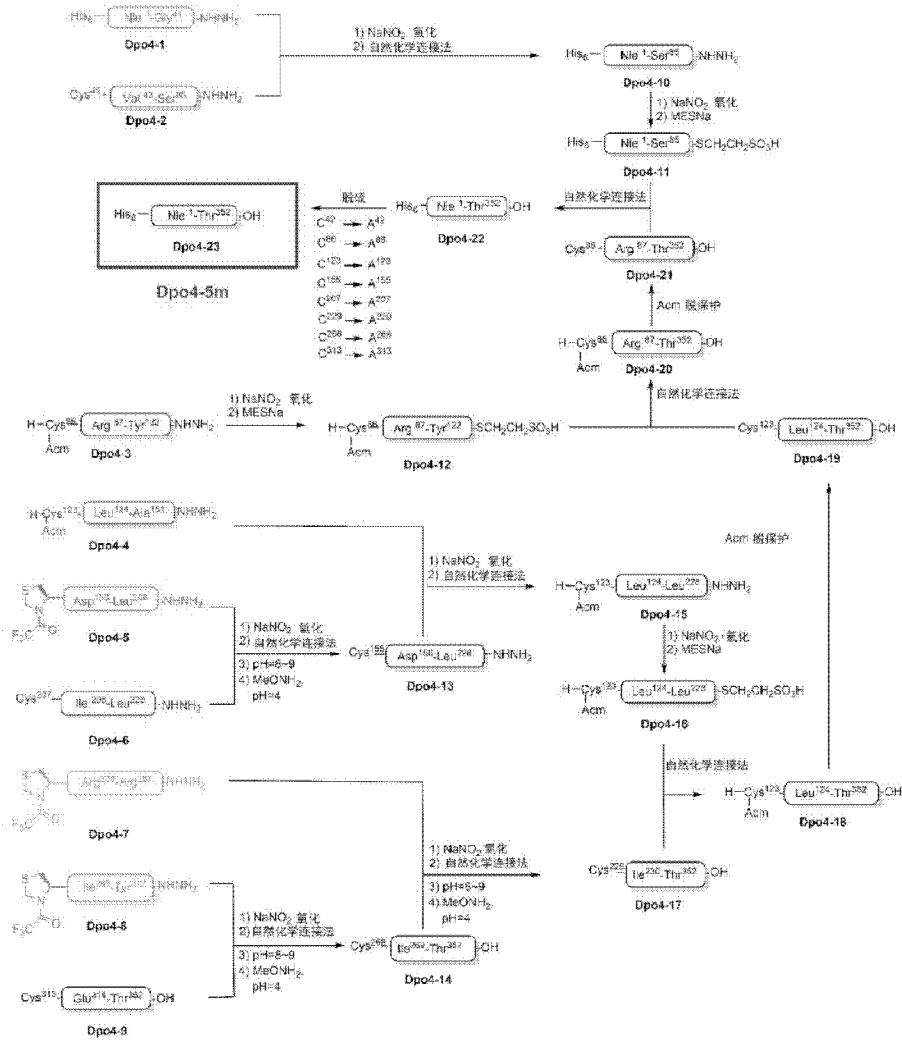


图 15

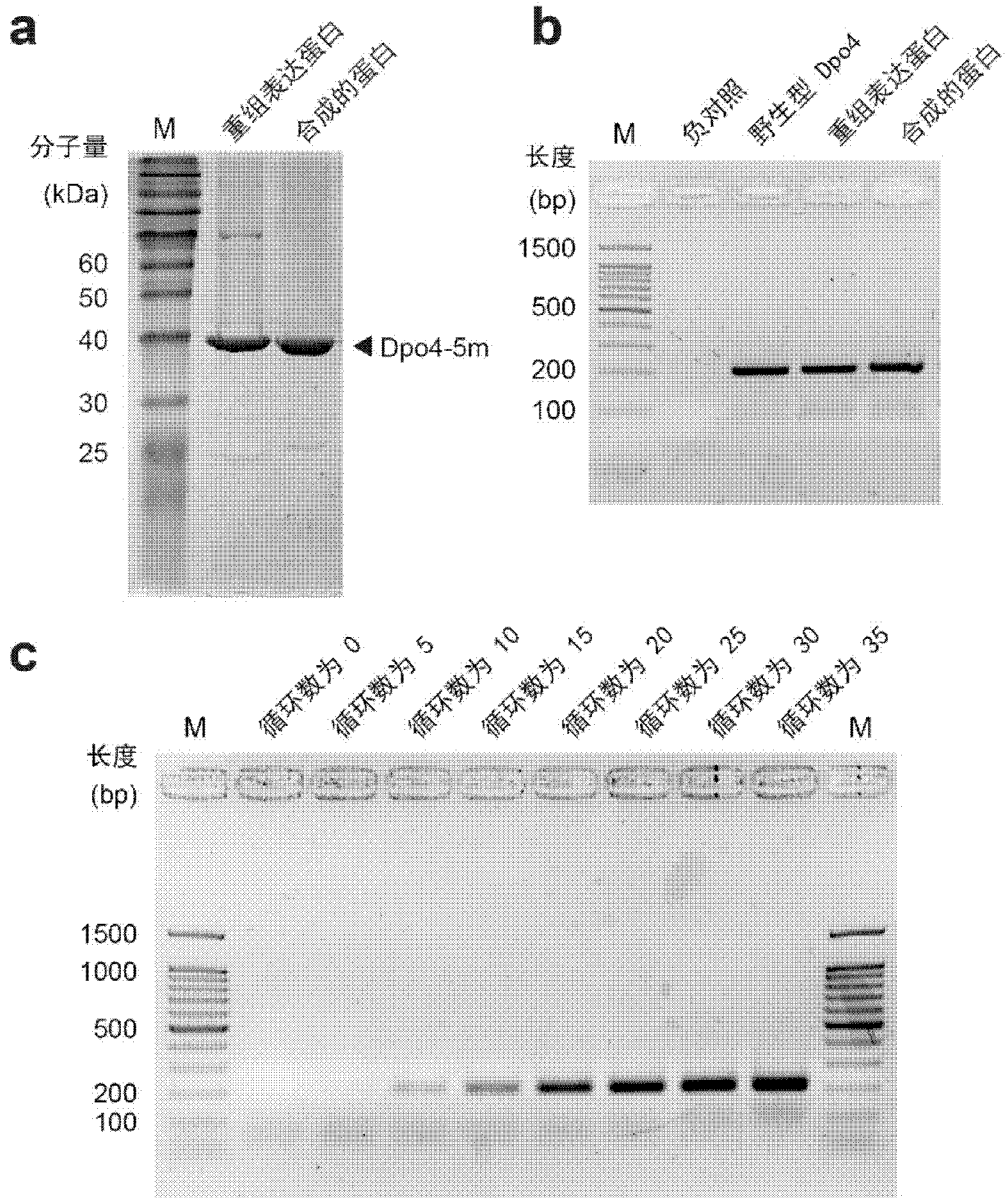


图 16

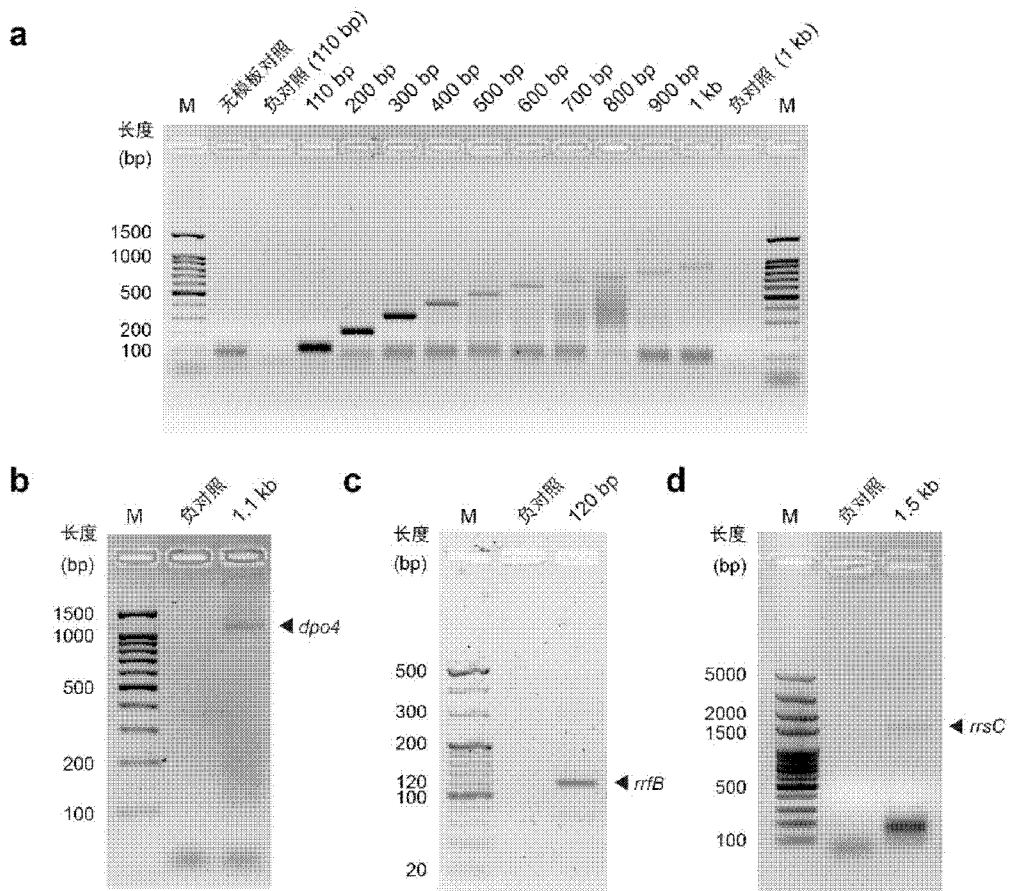


图 17

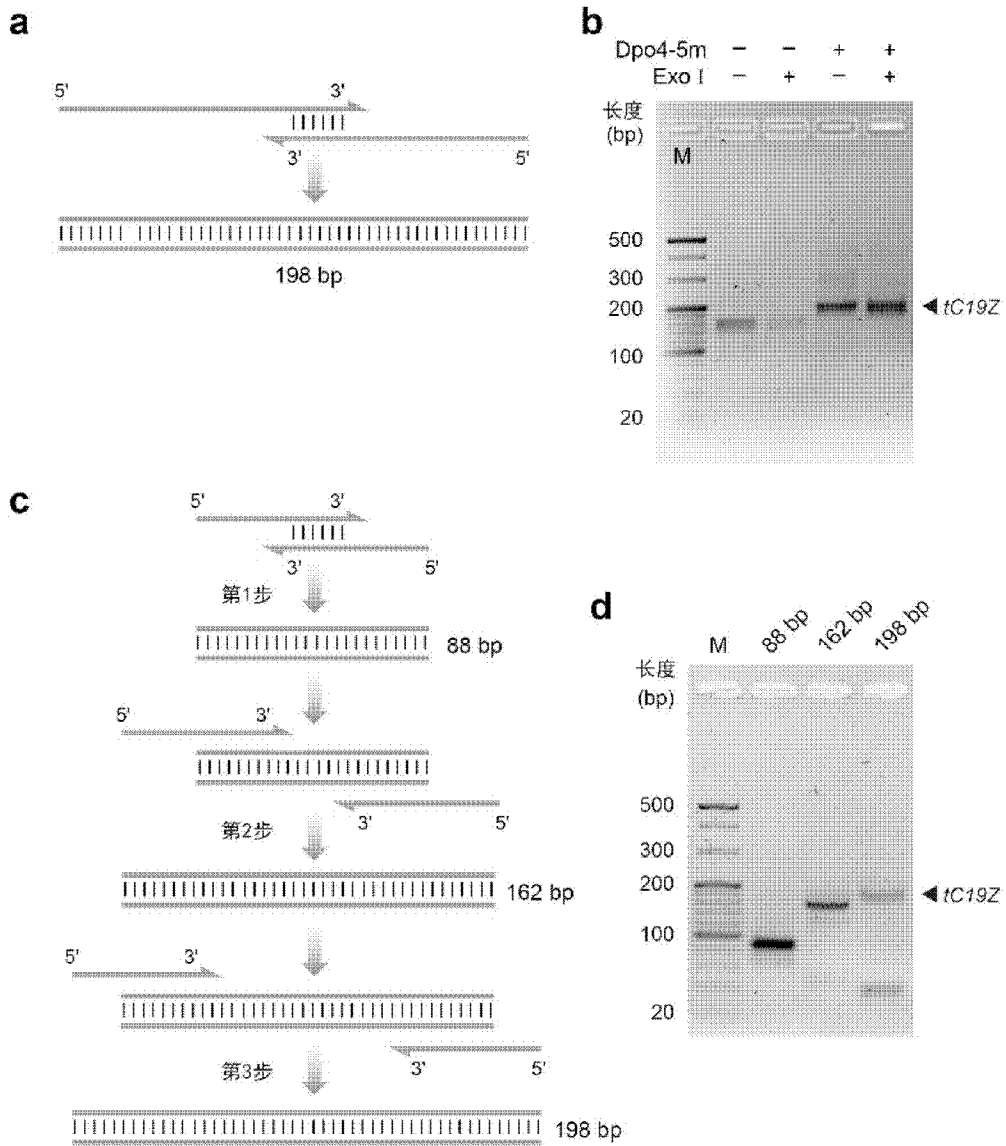


图 18

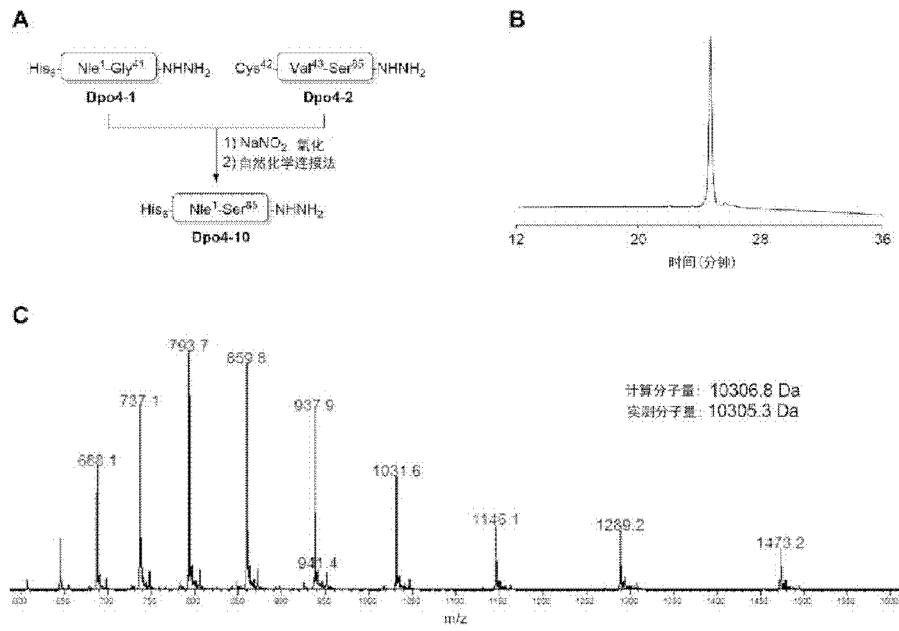


图 19

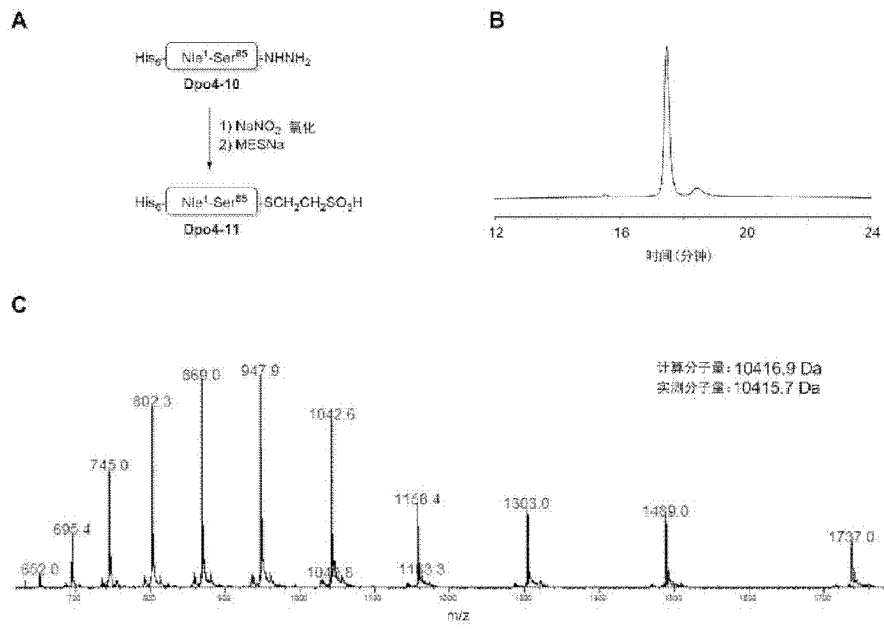


图 20

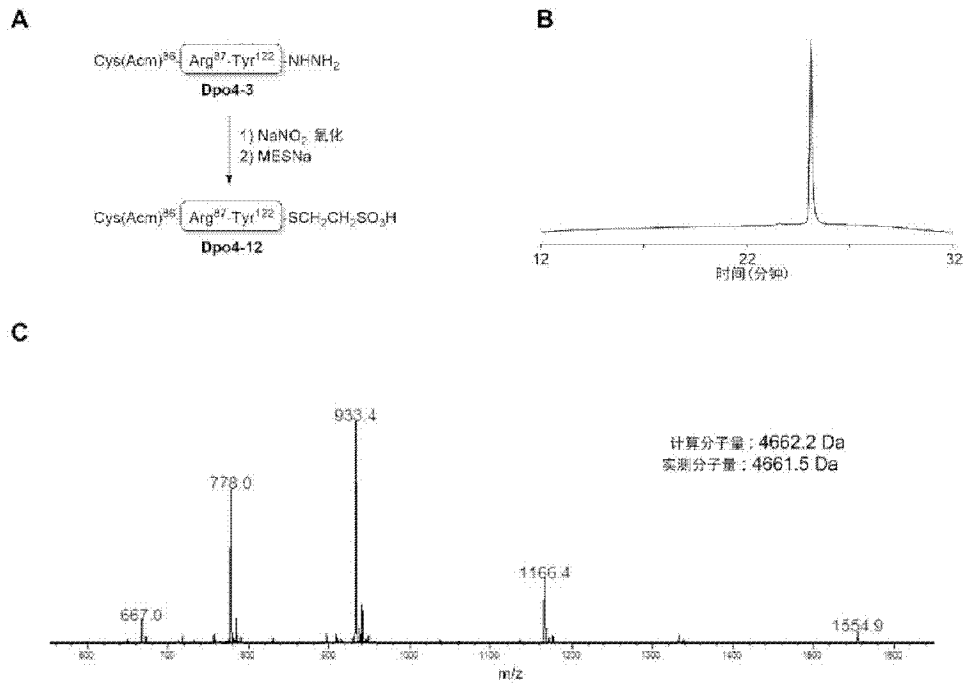


图 21

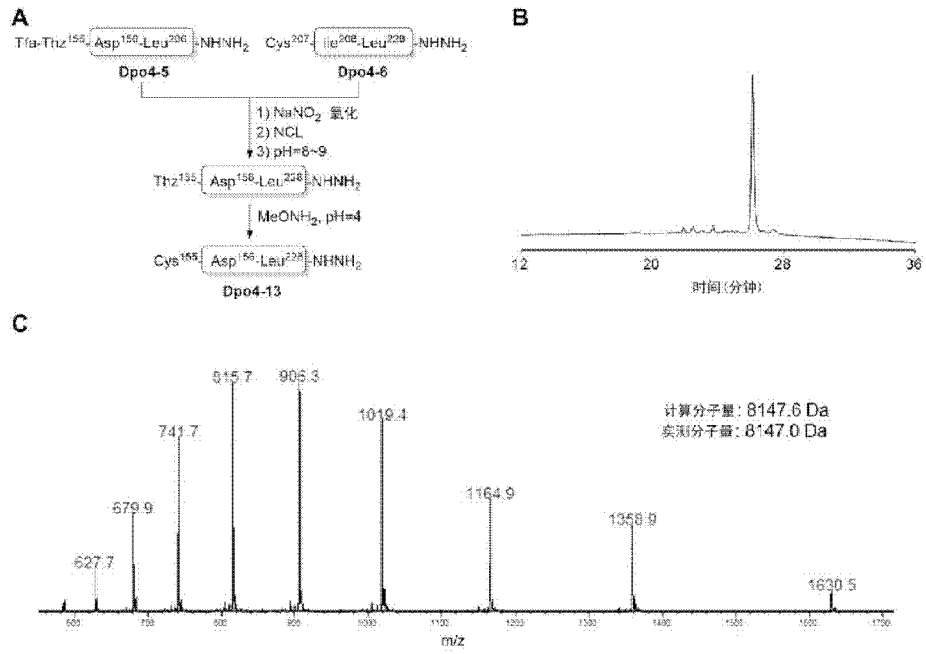


图 22

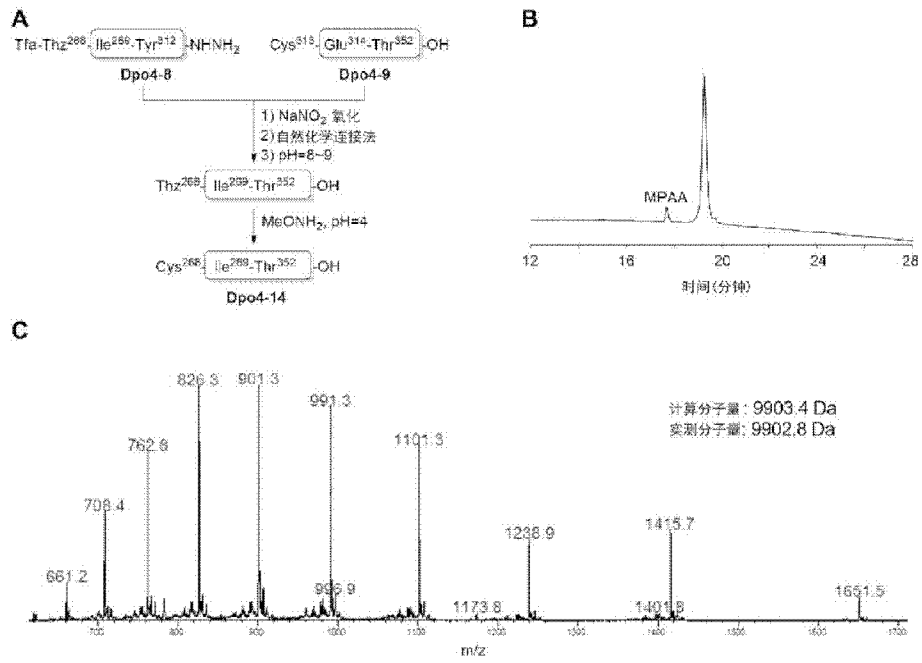
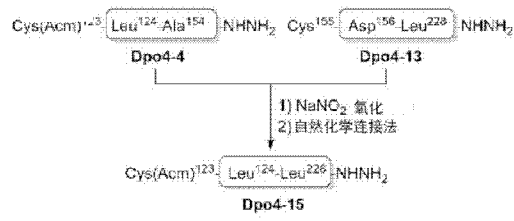


图 23

A



B

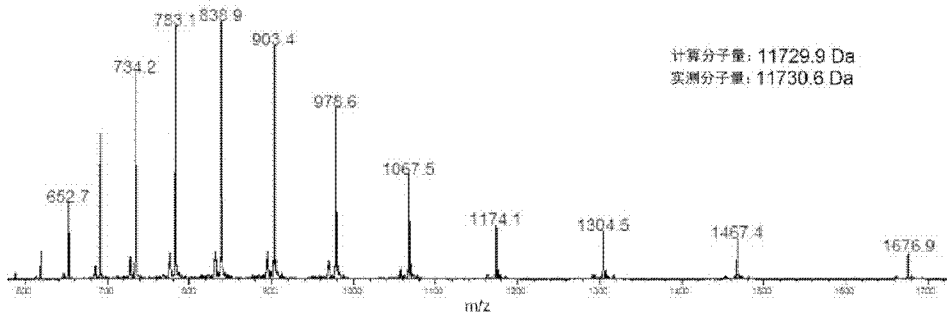


图 24

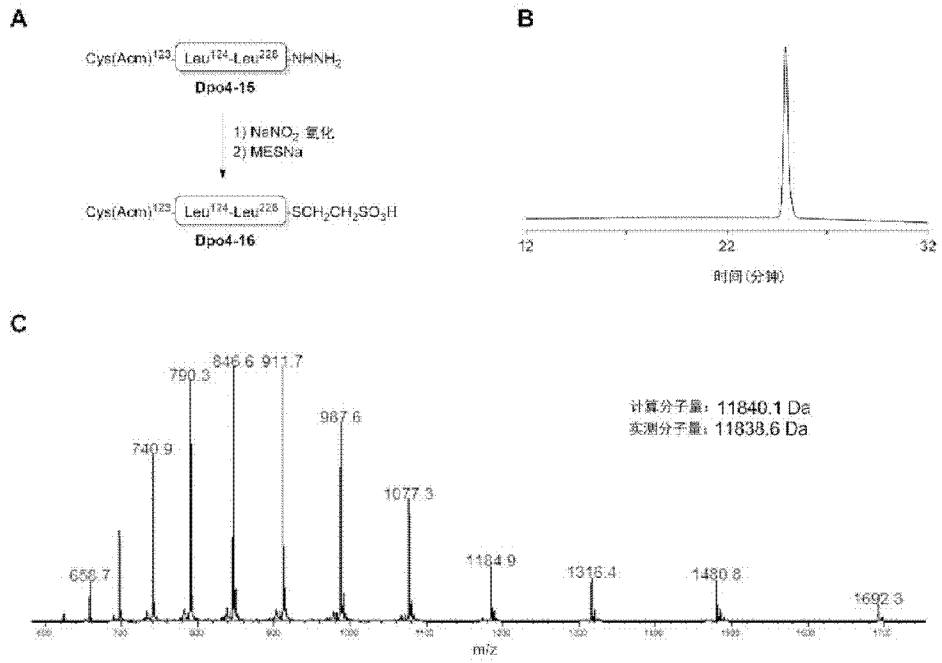


图 25

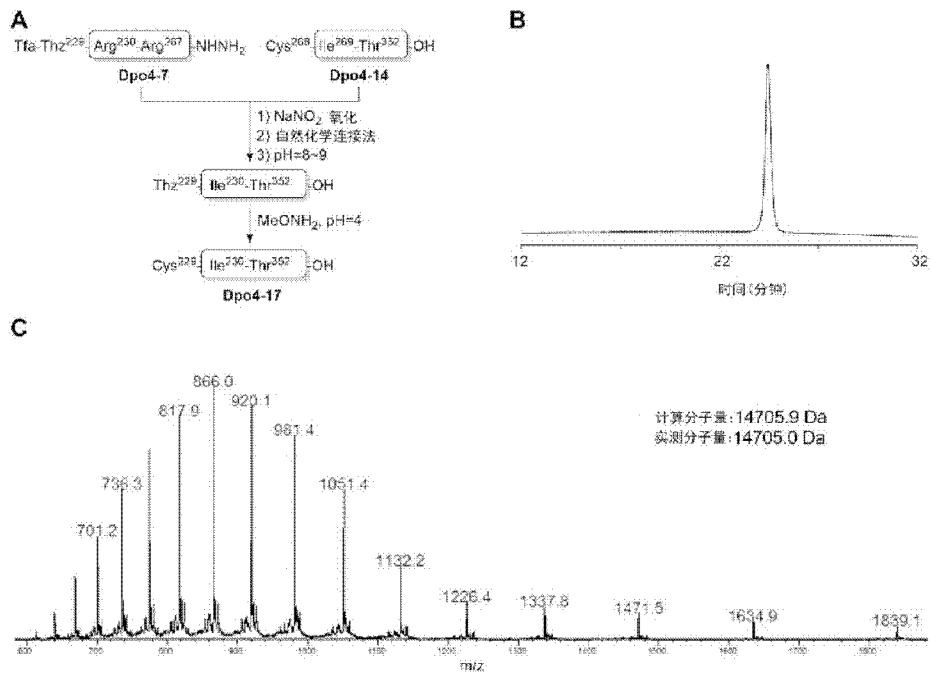


图 26



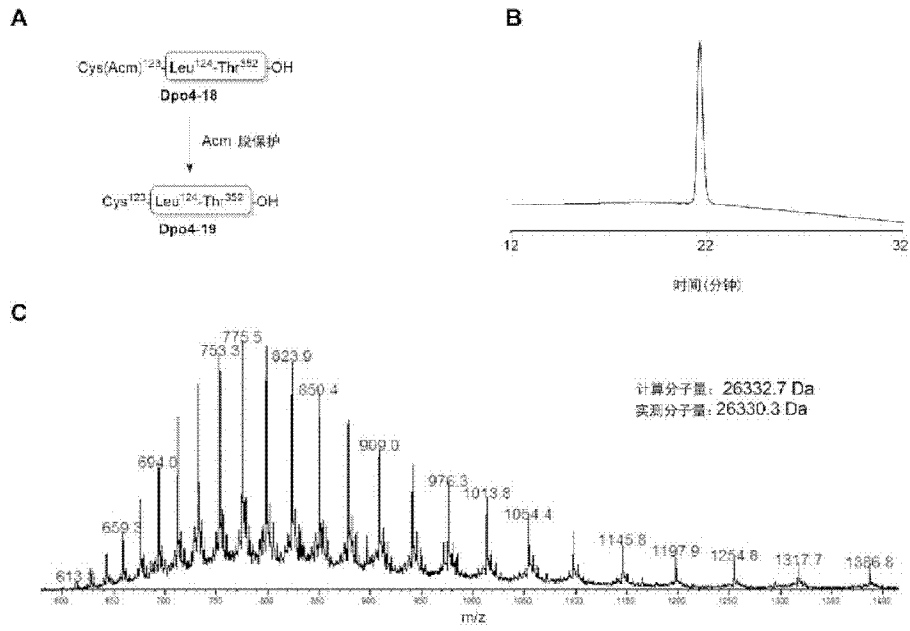


图 28

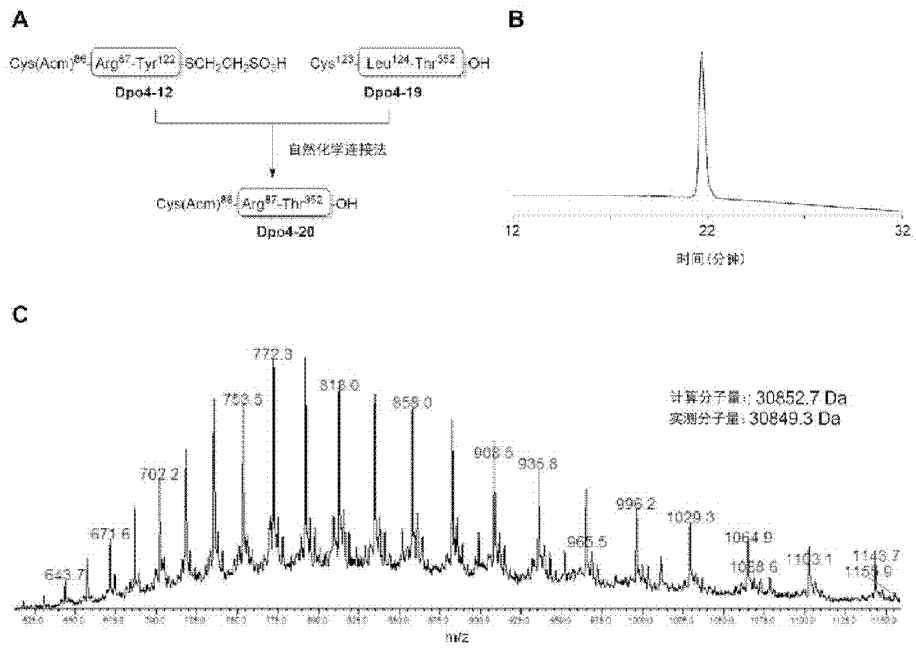


图 29

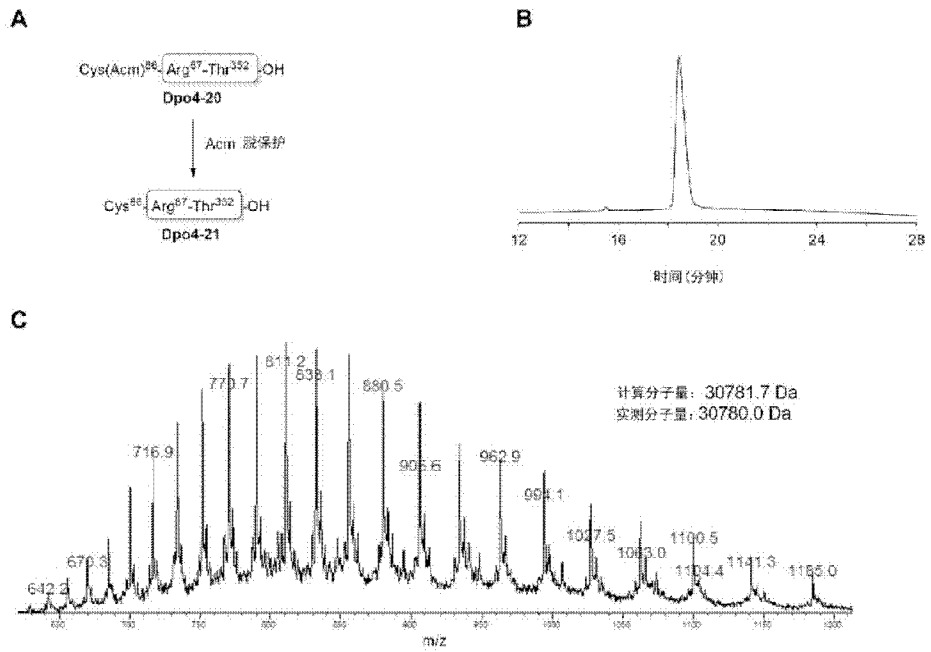


图 30



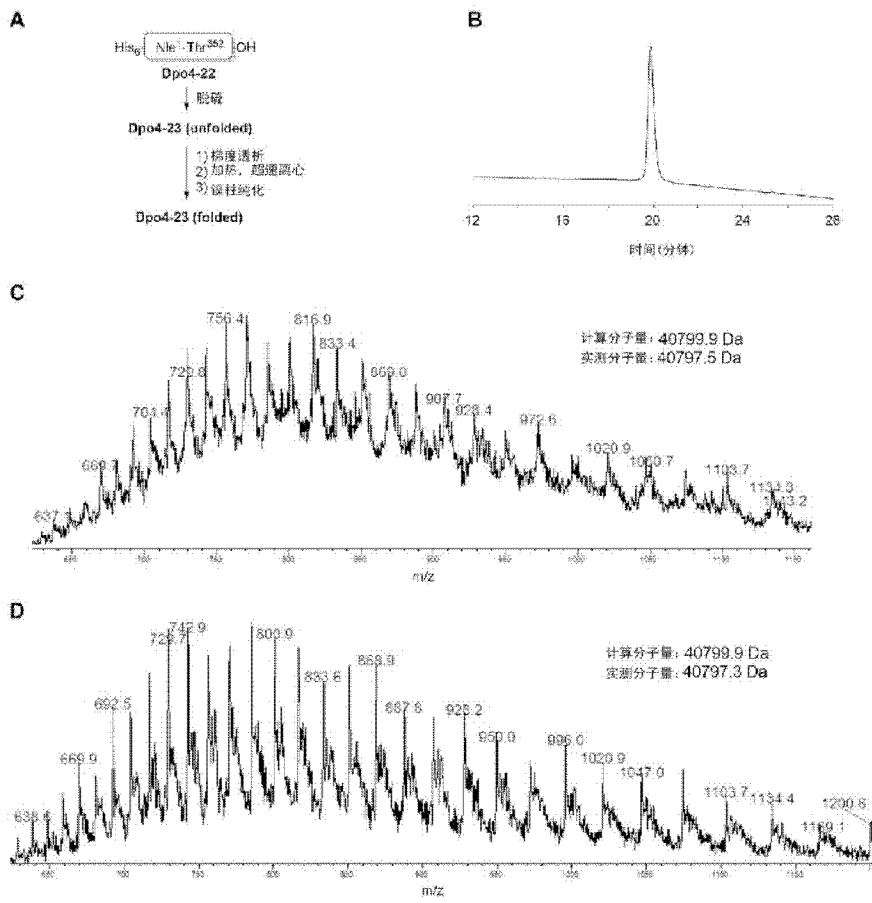


图 32

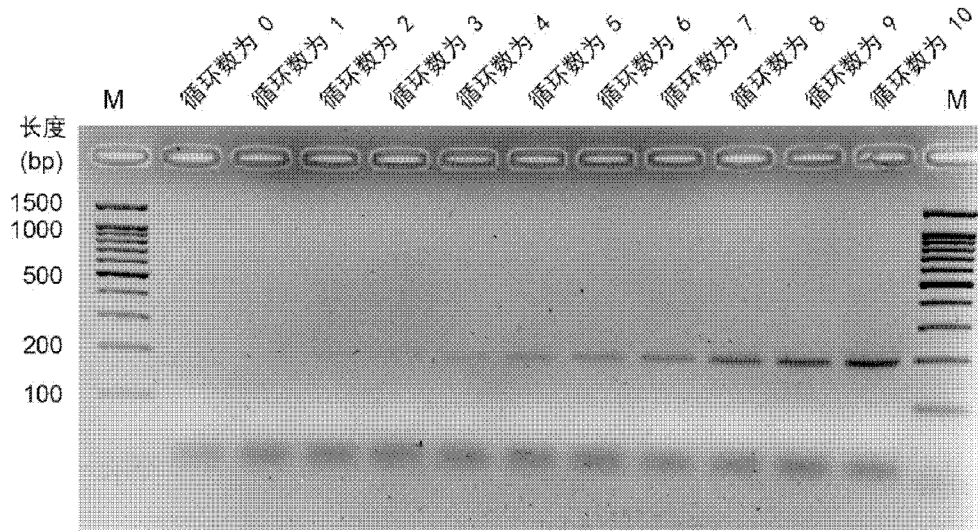


图 33

原始序列  
 1 AAGCCGCGATCTTCCAGGATTTGCTAATAACAGCTCACTATAGGAAATTGAGAAATTTGATCATGCTCAGATTAAGGCTTGGCCGAGGCTTAACAGATCCAACTGAAAGGCTGAAAGGCGAGGCTG  
 2 TCCGCGCGATCTTCCAGGATTTGCTAATAACAGCTCACTATAGGAAATTGAGAAATTTGATCATGCTCAGATTAAGGCTTGGCCGAGGCTTAACAGATCCAACTGAAAGGCTGAAAGGCGAGGCTG  
 3 AAGCCGCGATCTTCCAGGATTTGCTAATAACAGCTCACTATAGGAAATTGAGAAATTTGATCATGCTCAGATTAAGGCTTGGCCGAGGCTTAACAGATCCAACTGAAAGGCTGAAAGGCGAGGCTG  
 4 AAGCCGCGATCTTCCAGGATTTGCTAATAACAGCTCACTATAGGAAATTGAGAAATTTGATCATGCTCAGATTAAGGCTTGGCCGAGGCTTAACAGATCCAACTGAAAGGCTGAAAGGCGAGGCTG  
 5 AAGCCGCGATCTTCCAGGATTTGCTAATAACAGCTCACTATAGGAAATTGAGAAATTTGATCATGCTCAGATTAAGGCTTGGCCGAGGCTTAACAGATCCAACTGAAAGGCTGAAAGGCGAGGCTG  
 6 AAGCCGCGATCTTCCAGGATTTGCTAATAACAGCTCACTATAGGAAATTGAGAAATTTGATCATGCTCAGATTAAGGCTTGGCCGAGGCTTAACAGATCCAACTGAAAGGCTGAAAGGCGAGGCTG  
 7 AAGCCGCGATCTTCCAGGATTTGCTAATAACAGCTCACTATAGGAAATTGAGAAATTTGATCATGCTCAGATTAAGGCTTGGCCGAGGCTTAACAGATCCAACTGAAAGGCTGAAAGGCGAGGCTG  
 8 AAGCCGCGATCTTCCAGGATTTGCTAATAACAGCTCACTATAGGAAATTGAGAAATTTGATCATGCTCAGATTAAGGCTTGGCCGAGGCTTAACAGATCCAACTGAAAGGCTGAAAGGCGAGGCTG  
 9 AAGCCGCGATCTTCCAGGATTTGCTAATAACAGCTCACTATAGGAAATTGAGAAATTTGATCATGCTCAGATTAAGGCTTGGCCGAGGCTTAACAGATCCAACTGAAAGGCTGAAAGGCGAGGCTG  
 10 AAGCCGCGATCTTCCAGGATTTGCTAATAACAGCTCACTATAGGAAATTGAGAAATTTGATCATGCTCAGATTAAGGCTTGGCCGAGGCTTAACAGATCCAACTGAAAGGCTGAAAGGCGAGGCTG  
 11 AAGCCGCGATCTTCCAGGATTTGCTAATAACAGCTCACTATAGGAAATTGAGAAATTTGATCATGCTCAGATTAAGGCTTGGCCGAGGCTTAACAGATCCAACTGAAAGGCTGAAAGGCGAGGCTG  
 12 AAGCCGCGATCTTCCAGGATTTGCTAATAACAGCTCACTATAGGAAATTGAGAAATTTGATCATGCTCAGATTAAGGCTTGGCCGAGGCTTAACAGATCCAACTGAAAGGCTGAAAGGCGAGGCTG  
 13 AAGCCGCGATCTTCCAGGATTTGCTAATAACAGCTCACTATAGGAAATTGAGAAATTTGATCATGCTCAGATTAAGGCTTGGCCGAGGCTTAACAGATCCAACTGAAAGGCTGAAAGGCGAGGCTG  
 14 AAGCCGCGATCTTCCAGGATTTGCTAATAACAGCTCACTATAGGAAATTGAGAAATTTGATCATGCTCAGATTAAGGCTTGGCCGAGGCTTAACAGATCCAACTGAAAGGCTGAAAGGCGAGGCTG  
 15 AAGCCGCGATCTTCCAGGATTTGCTAATAACAGCTCACTATAGGAAATTGAGAAATTTGATCATGCTCAGATTAAGGCTTGGCCGAGGCTTAACAGATCCAACTGAAAGGCTGAAAGGCGAGGCTG  
 16 AAGCCGCGATCTTCCAGGATTTGCTAATAACAGCTCACTATAGGAAATTGAGAAATTTGATCATGCTCAGATTAAGGCTTGGCCGAGGCTTAACAGATCCAACTGAAAGGCTGAAAGGCGAGGCTG  
 17 AAGCCGCGATCTTCCAGGATTTGCTAATAACAGCTCACTATAGGAAATTGAGAAATTTGATCATGCTCAGATTAAGGCTTGGCCGAGGCTTAACAGATCCAACTGAAAGGCTGAAAGGCGAGGCTG  
 18 AAGCCGCGATCTTCCAGGATTTGCTAATAACAGCTCACTATAGGAAATTGAGAAATTTGATCATGCTCAGATTAAGGCTTGGCCGAGGCTTAACAGATCCAACTGAAAGGCTGAAAGGCGAGGCTG  
 19 AAGCCGCGATCTTCCAGGATTTGCTAATAACAGCTCACTATAGGAAATTGAGAAATTTGATCATGCTCAGATTAAGGCTTGGCCGAGGCTTAACAGATCCAACTGAAAGGCTGAAAGGCGAGGCTG  
 20 AAGCCGCGATCTTCCAGGATTTGCTAATAACAGCTCACTATAGGAAATTGAGAAATTTGATCATGCTCAGATTAAGGCTTGGCCGAGGCTTAACAGATCCAACTGAAAGGCTGAAAGGCGAGGCTG  
 21 AAGCCGCGATCTTCCAGGATTTGCTAATAACAGCTCACTATAGGAAATTGAGAAATTTGATCATGCTCAGATTAAGGCTTGGCCGAGGCTTAACAGATCCAACTGAAAGGCTGAAAGGCGAGGCTG  
 22 AAGCCGCGATCTTCCAGGATTTGCTAATAACAGCTCACTATAGGAAATTGAGAAATTTGATCATGCTCAGATTAAGGCTTGGCCGAGGCTTAACAGATCCAACTGAAAGGCTGAAAGGCGAGGCTG  
 23 AAGCCGCGATCTTCCAGGATTTGCTAATAACAGCTCACTATAGGAAATTGAGAAATTTGATCATGCTCAGATTAAGGCTTGGCCGAGGCTTAACAGATCCAACTGAAAGGCTGAAAGGCGAGGCTG  
 24 AAGCCGCGATCTTCCAGGATTTGCTAATAACAGCTCACTATAGGAAATTGAGAAATTTGATCATGCTCAGATTAAGGCTTGGCCGAGGCTTAACAGATCCAACTGAAAGGCTGAAAGGCGAGGCTG  
 25 AAGCCGCGATCTTCCAGGATTTGCTAATAACAGCTCACTATAGGAAATTGAGAAATTTGATCATGCTCAGATTAAGGCTTGGCCGAGGCTTAACAGATCCAACTGAAAGGCTGAAAGGCGAGGCTG  
 26 AAGCCGCGATCTTCCAGGATTTGCTAATAACAGCTCACTATAGGAAATTGAGAAATTTGATCATGCTCAGATTAAGGCTTGGCCGAGGCTTAACAGATCCAACTGAAAGGCTGAAAGGCGAGGCTG  
 27 AAGCCGCGATCTTCCAGGATTTGCTAATAACAGCTCACTATAGGAAATTGAGAAATTTGATCATGCTCAGATTAAGGCTTGGCCGAGGCTTAACAGATCCAACTGAAAGGCTGAAAGGCGAGGCTG  
 28 AAGCCGCGATCTTCCAGGATTTGCTAATAACAGCTCACTATAGGAAATTGAGAAATTTGATCATGCTCAGATTAAGGCTTGGCCGAGGCTTAACAGATCCAACTGAAAGGCTGAAAGGCGAGGCTG  
 29 AAGCCGCGATCTTCCAGGATTTGCTAATAACAGCTCACTATAGGAAATTGAGAAATTTGATCATGCTCAGATTAAGGCTTGGCCGAGGCTTAACAGATCCAACTGAAAGGCTGAAAGGCGAGGCTG  
 30 AAGCCGCGATCTTCCAGGATTTGCTAATAACAGCTCACTATAGGAAATTGAGAAATTTGATCATGCTCAGATTAAGGCTTGGCCGAGGCTTAACAGATCCAACTGAAAGGCTGAAAGGCGAGGCTG

图 34

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/CN2017/073573**

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 9/12 (2006.01) i; C12N 15/10 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CPEA, DWPI, JPABS, SIPOABS, VEN, CPRSABS, MOABS, CNABS, TWABS, CJFD, CSCD, SIPONPL USTXT, JPTXT, EPTXT, WOTXT, CNTXT, cnki, isi web of knowledge: mirror image, chirality, nucleic acid, replication, polymerase, pol x, L-DNA, L-RNA; GenBank+EMBL+DDBJ: search on SEQ ID NO: 17

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	WANG, Zimou et al., "A synthetic molecular system capable of mirror-image genetic replication and transcription", NATURE CHEMISTRY, vol. 8, no. 7, 16 May 2016 (16.05.2016), ISSN: 1755-4330, pages 698-704, see pages 699-700, page 702, right-hand column, the last paragraph to page 703, left-hand column, figures 1a, 2 and 5, and supplementary figure 1 in the supplementary data (i.e. page 5)	1-28
Y	YANEZ, R.J. et al., "DNA polymerase beta-like protein [African swine fever virus]", NCBI reference sequence: NP_042790.1, 19 November 2014 (19.11.2014), Genbank Database, see sequence information	28
Y	MATTHEW, T. et al., "Synthesis and folding of a mirror-image enzyme reveals ambidextrous chaperone activity" PNAS, vol. 111, no. 32, 12 August 2014 (12.08.2014), ISSN: 0027-8424, pages 11679-11684, see page 11680	28

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>
---	---

Date of the actual completion of the international search  
13 April 2017 (13.04.2017)

Date of mailing of the international search report  
**04 May 2017 (04.05.2017)**

Name and mailing address of the ISA/CN:  
State Intellectual Property Office of the P. R. China  
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao  
Haidian District, Beijing 100088, China  
Facsimile No.: (86-10) 62019451

Authorized officer  
**WANG, Qiyang**  
Telephone No.: (86-10) **62088409**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/CN2017/073573**

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MATTHEW, T. et al., "Synthesis and folding of a mirror-image enzyme reveals ambidextrous chaperone activity", PNAS, vol. 111, no. 32, 12 August 2014 (12.08.2014), ISSN: 0027-8424, pages 11679-11684, see the whole document	1-27

<p>A. 主题的分类</p> <p>C12N 9/12(2006.01)i; C12N 15/10(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>														
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C12N</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CPEA, DWPI, JPABS, SIPOABS, VEN, CPRSABS, MOABS, CNABS, TWABS, CJFD, CSCD, SIPONPL USTXT, JPTXT, EPTXT, WOTXT, CNTXT, cnki, isi web of knowledge: 镜像, 手性, 核酸, 复制, 聚合酶, mirror image, chirality, nucleic acid, replication, polymerase, pol x, L-DNA, L-RNA; GenBank+EMBL+DDBJ:关于SEQ ID NO:17的检索</p>														
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PX</td> <td>Zimou Wang 等人. "A synthetic molecular system capable of mirror-image genetic replication and transcription" Nature chemistry, 第8卷, 第7期, 2016年 5月 16日 (2016 - 05 - 16), ISSN: 1755-4330, 第698-704页, 参见第699-700页, 第702页右栏最后一段至第703页左栏, 图1a, 图2, 图5和补充数据中的补充附图1(即第5页)</td> <td>1-28</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>Yanez, R. J. 等人. "DNA polymerase beta-like protein[African swine fever virus]" NCBI reference sequence:NP_042790.1, 2014年 11月 19日 (2014 - 11 - 19), Genbank Database, 参见序列信息</td> <td>28</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>Matthew T 等人. "Synthesis and folding of a mirror-image enzyme reveals ambidextrous chaperone activity" PNAS, 第111卷, 第32期, 2014年 8月 12日 (2014 - 08 - 12), ISSN: 0027-8424, 第11679-11684页, 参见第11680页</td> <td>28</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	PX	Zimou Wang 等人. "A synthetic molecular system capable of mirror-image genetic replication and transcription" Nature chemistry, 第8卷, 第7期, 2016年 5月 16日 (2016 - 05 - 16), ISSN: 1755-4330, 第698-704页, 参见第699-700页, 第702页右栏最后一段至第703页左栏, 图1a, 图2, 图5和补充数据中的补充附图1(即第5页)	1-28	Y	Yanez, R. J. 等人. "DNA polymerase beta-like protein[African swine fever virus]" NCBI reference sequence:NP_042790.1, 2014年 11月 19日 (2014 - 11 - 19), Genbank Database, 参见序列信息	28	Y	Matthew T 等人. "Synthesis and folding of a mirror-image enzyme reveals ambidextrous chaperone activity" PNAS, 第111卷, 第32期, 2014年 8月 12日 (2014 - 08 - 12), ISSN: 0027-8424, 第11679-11684页, 参见第11680页	28
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求												
PX	Zimou Wang 等人. "A synthetic molecular system capable of mirror-image genetic replication and transcription" Nature chemistry, 第8卷, 第7期, 2016年 5月 16日 (2016 - 05 - 16), ISSN: 1755-4330, 第698-704页, 参见第699-700页, 第702页右栏最后一段至第703页左栏, 图1a, 图2, 图5和补充数据中的补充附图1(即第5页)	1-28												
Y	Yanez, R. J. 等人. "DNA polymerase beta-like protein[African swine fever virus]" NCBI reference sequence:NP_042790.1, 2014年 11月 19日 (2014 - 11 - 19), Genbank Database, 参见序列信息	28												
Y	Matthew T 等人. "Synthesis and folding of a mirror-image enzyme reveals ambidextrous chaperone activity" PNAS, 第111卷, 第32期, 2014年 8月 12日 (2014 - 08 - 12), ISSN: 0027-8424, 第11679-11684页, 参见第11680页	28												
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>														
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>"T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>"X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>"Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>"&amp;" 同族专利的文件</p>														
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2017年 4月 13日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2017年 5月 4日</p>												
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>王启扬</p> <p>电话号码 (86-10)62088409</p>												

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	Matthew T 等人. "Synthesis and folding of a mirror-image enzyme reveals ambidextrous chaperone activity" PNAS, 第111卷, 第32期, 2014年 8月 12日 (2014 - 08 - 12), ISSN: 0027-8424, 第11679-11684页, 参见全文	1-27