



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102272319 B

(45) 授权公告日 2014. 08. 27

(21) 申请号 201080004057. 9

(22) 申请日 2010. 01. 07

(30) 优先权数据

61/143, 350 2009. 01. 08 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011. 07. 06

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2010/020371 2010. 01. 07

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/080910 EN 2010. 07. 15

(73) 专利权人 伯乐实验室公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 龚晓松 约翰·苏利文 付荣典

王岩 埃文·H·伯西 程曼

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

代理人 王旭

(51) Int. Cl.

C12P 19/34 (2006. 01)

C12N 9/10 (2006. 01)

(56) 对比文件

US 6025545 A, 2000. 02. 15, 说明书第 89 栏
第 5-15 行.

WO 2004/011605 A2, 2004. 02. 05, 全文.

EP 0821058 A2, 1998. 01. 28, 全文.

US 2004/0219558 A1, 2004. 11. 04, 说明书第
[0009]-[0010]、[0035]、[0047]-[0048]、[0077]、
[0117]、[0127]、[0176]、[0178] 段, 图 3.

审查员 朱宁

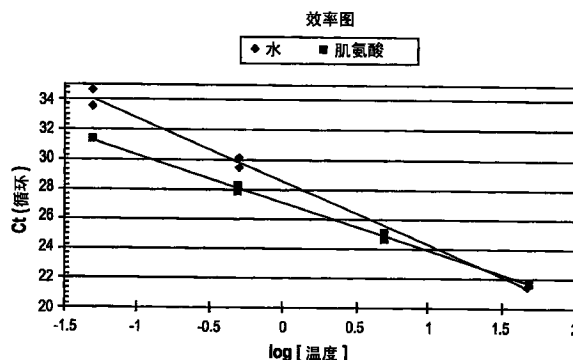
权利要求书2页 说明书38页 附图4页

(54) 发明名称

用于提高核酸扩增反应效率的方法和组合物

(57) 摘要

本发明提供用于提高核酸扩增反应效率的方法和组合物。本发明包括杂合聚合酶, 其显示出与野生型聚合酶相比增加的持续合成能力以及降低的外切核酸酶活性。本发明还包括用于进行核酸合成和扩增反应的方法、组合物和试剂盒, 其中减少引物的非特异性扩增。



1. 一种扩增样品中靶核酸的方法,所述方法包括:
在反应混合物中温育所述靶核酸,所述反应混合物包含:
至少一种引物,
杂合聚合酶,其包含聚合酶结构域和异源 DNA 结合结构域,其中所述异源 DNA 结合结构域是 Sso7d DNA 结合结构域,和
肌氨酸,所述肌氨酸处于这样的量,所述量足以将扩增反应的效率与缺少所述肌氨酸的反应混合物相比提高至少 10%,其中所述肌氨酸的浓度为至少 20mM 并且不大于 540mM,
其中所述温育处于允许所述靶核酸通过所述杂合聚合酶扩增的条件下。
2. 权利要求 1 的方法,其中所述杂合聚合酶包括缺乏 3' -5' 外切核酸酶活性的家族 B- 样聚合酶。
3. 权利要求 1 的方法,其中所述杂合聚合酶为 SEQ ID NO:2。
4. 权利要求 1 的方法,其中所述杂合聚合酶在所述温育步骤过程中加热步骤前,与一种或多种抗体复合。
5. 权利要求 4 的方法,其中所述抗体包括重链可变区和轻链可变区,其中所述可变区包括互补决定区 (CDRs), 其中:
 - (a) 所述重链可变区 CDRs 分别为 SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, 和 SEQ ID NO:24, 且所述轻链可变区 CDRs 分别为 SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, 和 SEQ ID NO:27; 或
 - (b) 所述重链可变区 CDRs 分别为 SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, 和 SEQ ID NO:30, 且所述轻链可变区 CDRs 分别为 SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, 和 SEQ ID NO:33; 或
 - (c) 所述重链可变区 CDRs 分别为 SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, 和 SEQ ID NO:36, 且所述轻链可变区 CDRs 分别为 SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, 和 SEQ ID NO:39。
6. 权利要求 1 的方法,其中所述异源 DNA 结合结构域与 SEQ ID NO:3 相同。
7. 权利要求 1 的方法,其中所述反应混合物还包含双链 DNA 结合染料。
8. 一种反应混合物,包含:
杂合聚合酶,其中所述聚合酶包含聚合酶结构域和异源 DNA 结合结构域,其中所述异源 DNA 结合结构域是 Sso7d DNA 结合结构域; 和
肌氨酸,所述肌氨酸处于这样的量,所述量足以将扩增反应的效率与缺少所述肌氨酸的反应混合物相比提高至少 10%,其中所述肌氨酸的浓度为至少 20mM 并且不大于 540mM。
9. 权利要求 8 的反应混合物,还包含至少一种寡核苷酸引物。
10. 权利要求 8 的反应混合物,其中所述杂合聚合酶包括缺乏 3' -5' 外切核酸酶活性的家族 B- 样聚合酶。
11. 权利要求 8 的反应混合物,其中所述杂合聚合酶为 SEQ ID NO:2。
12. 权利要求 8 的反应混合物,其中所述杂合聚合酶与抗体复合。
13. 权利要求 12 的反应混合物,其中所述抗体包括重链可变区和轻链可变区,其中所述可变区包括互补决定区 (CDRs), 其中:
 - (a) 所述重链可变区 CDRs 分别为 SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, 和 SEQ ID NO:24, 且所述轻链可变区 CDRs 分别为 SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, 和 SEQ ID NO:27; 或
 - (b) 所述重链可变区 CDRs 分别为 SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, 和 SEQ ID NO:30, 且所述轻链可变区 CDRs 分别为 SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, 和 SEQ ID NO:33; 或

(c) 所述重链可变区 CDRs 分别为 SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, 和 SEQ ID NO:36, 且所述轻链可变区 CDRs 分别为 SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, 和 SEQ ID NO:39。

14. 权利要求 8 的反应混合物, 其中所述异源 DNA 结合结构域与 SEQ ID NO:3 相同。

15. 权利要求 8 的反应混合物, 其中所述反应混合物还包含双链 DNA 结合染料。

16. 一种试剂盒, 包括:

杂合聚合酶, 其包含聚合酶结构域和异源 DNA 结合结构域, 其中所述异源 DNA 结合结构域是 Sso7d DNA 结合结构域; 和

肌氨酸, 所述肌氨酸处于这样的量, 所述量足以将扩增反应的效率与缺少所述肌氨酸的反应混合物相比提高至少 10%, 其中所述肌氨酸的浓度为至少 20mM 并且不大于 540mM。

17. 权利要求 16 的试剂盒, 其中所述杂合聚合酶包括缺乏 3'-5' 外切核酸酶活性的家族 B- 样聚合酶。

18. 权利要求 16 的试剂盒, 其中所述杂合聚合酶为 SEQ ID NO:2。

19. 权利要求 16 的试剂盒, 还包括特异于所述杂合聚合酶的抗体。

20. 权利要求 19 的试剂盒, 其中所述抗体包括重链可变区和轻链可变区, 其中所述可变区包括互补决定区 (CDRs), 其中:

(a) 所述重链可变区 CDRs 分别为 SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, 和 SEQ ID NO:24, 且所述轻链可变区 CDRs 分别为 SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, 和 SEQ ID NO:27; 或

(b) 所述重链可变区 CDRs 分别为 SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, 和 SEQ ID NO:30, 且所述轻链可变区 CDRs 分别为 SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, 和 SEQ ID NO:33; 或

(c) 所述重链可变区 CDRs 分别为 SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, 和 SEQ ID NO:36, 且所述轻链可变区 CDRs 分别为 SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, 和 SEQ ID NO:39。

21. 权利要求 16 的试剂盒, 其中所述异源 DNA 结合结构域与 SEQ ID NO:3 相同。

22. 权利要求 16 的试剂盒, 还包括以下各项中的一种或多种:

一种或多种不同三磷酸脱氧核糖核苷酸;

双链 DNA 结合染料; 和

至少一种寡核苷酸引物。

23. 权利要求 4 的方法, 权利要求 12 的反应混合物或权利要求 19 的试剂盒, 其中所述抗体的重链可变区和轻链可变区:

(a) 分别地为 SEQ ID NO:14 和 SEQ ID NO:18;

(b) 分别地为 SEQ ID NO:15 和 SEQ ID NO:19;

(c) 分别地为 SEQ ID NO:16 和 SEQ ID NO:20; 或 (d) 分别地为 SEQ ID NO:17 和 SEQ ID NO:21。

用于提高核酸扩增反应效率的方法和组合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本发明要求 2009 年 1 月 8 日提交的美国临时专利申请公开号 61/143,350 的优先权权益,为了所有目的将其通过参考引入本文。

[0003] 本发明涉及核酸扩增反应。本发明包括具有提高的持续合成能力的杂合聚合酶以及用于减少反应诸如 PCR 过程中非特异性扩增的方法和组合物。

[0004] 发明背景

[0005] 核酸扩增反应,诸如聚合酶链式反应 (PCR),一般是模板依赖性反应,其中所需的核酸序列通过使用过量的两种寡核苷酸引物处理靶核酸的分离的互补链来扩增。所述引物延伸形成互补引物延伸产物,所述产物起模板作用,以用于合成所需的核酸序列。在这样的过程中,选择性扩增各 DNA 链上的引物之间的核酸序列。

[0006] 发明概述

[0007] 因此,本发明提供用于提高核酸合成和扩增反应的效率和特异性的方法和组合物。

[0008] 在一方面,本发明提供扩增靶核酸的方法。该方法包括使用反应混合物温育靶核酸,所述反应混合物包括至少一种引物、杂合聚合酶、和渗透剂。在另一方面,所述温育步骤在这样的条件下进行,所述条件允许靶核酸通过杂合聚合酶来扩增。在再一方面,所述杂合聚合酶包括聚合酶结构域和 DNA 结合结构域。

[0009] 在另一方面,本发明提供用于定量 PCR 的试剂盒。在示范性方面,所述试剂盒包括:具有降低的外切核酸酶活性的杂合聚合酶、dNTPs、包含 肌氨酸的缓冲液、和在核酸扩增反应中使用杂合聚合酶的说明书。

[0010] 在一些实施方案中,本发明提供扩增样品中靶核酸的方法。在一些实施方案中,所述方法包括在反应化合物中温育所述靶核酸,所述反应混合物包括:

[0011] 至少一种引物,

[0012] 杂合聚合酶,其包含聚合酶结构域和异源 DNA 结合结构域,和

[0013] 添加剂,其选自由肌氨酸和肝素组成的组,所述添加剂处于这样的量,所述量足以将扩增反应的效率与缺少所述添加剂的反应混合物相比提高至少 10%,

[0014] 其中所述温育处于允许所述靶核酸通过所述杂合聚合酶扩增的条件下。

[0015] 在一些实施方案中,所述添加剂是肌氨酸,其处于小于 600mM 的浓度。

[0016] 在一些实施方案中,所述杂合聚合酶在外切核酸酶结构域中包括突变,以使得该聚合酶基本缺乏 3' -5' 外切核酸酶活性。在一些实施方案中,所述杂合聚合酶包括家族 B 样聚合酶,其基本缺乏(例如,具有突变,其导致基本缺乏)3' -5' 外切核酸酶活性。在一些实施方案中,所述杂合聚合酶包括与 SEQ ID NO:2 基本相同,即,跨越所述聚合酶结构域(即,除 SEQ ID NO:3 以外的全部)或 SEQ ID NO:2 完整序列的至少 65%,70%,75%,80%,85%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或 99%或更高的氨基酸序列同一性的多肽序列。在一些实施方案中,所述杂合聚合酶包括 SEQ ID NO:2。

[0017] 在一些实施方案中,所述样品包括扩增抑制剂且其中将所述样品的等分试样以这

样的量加入至反应混合物中,所述量使得抑制剂处于能够抑制野生型 Taq 聚合酶的浓度且其中杂合聚合酶扩增靶核酸。在一些实施方案中,所述样品选自血液或完整细胞或食物样品。

[0018] 在一些实施方案中,所述杂合聚合酶在温育步骤过程中在加热步骤前与一种或多种抗体复合。在一些实施方案中,所述抗体包括重链可变区和轻链可变区,其中所述可变区包括互补决定区 (CDRs),其中:

[0019] (a) 所述重链可变区 CDRs 包括 SEQ ID NO :22, SEQ ID NO :23, 和 SEQ ID NO :24, 且所述轻链可变区 CDRs 包括 SEQ ID NO :25, SEQ ID NO :26, 和 SEQ ID NO :27 ;或

[0020] (b) 所述重链可变区 CDRs 包括 SEQ ID NO :28, SEQ ID NO :29, 和 SEQ ID NO :30, 且所述轻链可变区 CDRs 包括 SEQ ID NO :31, SEQ ID NO :32, 和 SEQ ID NO :33 ;或

[0021] (c) 所述重链可变区 CDRs 包括 SEQ ID NO :34, SEQ ID NO :35, 和 SEQ ID NO :36, 且所述轻链可变区 CDRs 包括 SEQ ID NO :37, SEQ ID NO :38, 和 SEQ ID NO :39。

[0022] 在一些实施方案中,实时检测来自扩增的信号。

[0023] 在一些实施方案中,所述异源 DNA 结合结构域与 SEQ ID NO :3 基本相同(即,至少 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 或 99% 或更高)。

[0024] 在一些实施方案中,以小于 1, 2, 3, 或 4 秒的延伸时间进行扩增反应。

[0025] 在一些实施方案中,所述聚合酶和外切核酸酶结构域来自家族 B DNA 聚合酶。

[0026] 在一些实施方案中,所述反应混合物还包括双链 DNA 结合染料。

[0027] 本发明还提供反应混合物。在一些实施方案中,所述反应混合物包括:

[0028] 杂合聚合酶,其中所述聚合物包括聚合酶结构域和异源 DNA 结合结构域;和

[0029] 添加剂,其选自由肌氨酸和肝素组成的组,所述添加剂处于这样的量,所述量足以将扩增反应的效率与缺少所述添加剂的反应混合物相比提高至少 10%。

[0030] 在一些实施方案中,所述反应混合物还包括至少一种寡核苷酸引物。

[0031] 在一些实施方案中,所述添加剂是肌氨酸,其处于小于 600mM 的浓度。

[0032] 在一些实施方案中,所述杂合聚合酶在外切核酸酶结构域中包括突变,以使得该聚合酶基本缺乏 3' -5' 外切核酸酶活性。在一些实施方案中,所述杂合聚合酶包括家族 B 样聚合酶,其基本缺乏(例如,具有突变,其导致基本缺乏)3' -5' 外切核酸酶活性。在一些实施方案中,所述杂合聚合酶包括与 SEQ ID NO :2 基本相同,即,跨越所述聚合酶结构域(即,除 SEQ ID NO :3 以外的全部)或 SEQ ID NO :2 完整序列的至少 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 或 99% 或更高的氨基酸序列同一性的多肽序列。在一些实施方案中,所述杂合聚合酶包括 SEQ ID NO :2。

[0033] 在一些实施方案中,所述混合物包括样品等分试样,其中所述样品包括扩增抑制剂,其中所述抑制剂处于能够抑制野生型 Taq 聚合酶的浓度。在一些实施方案中,所述样品选自血液或完整细胞或食物样品。

[0034] 在一些实施方案中,所述杂合聚合酶与抗体复合。

[0035] 在一些实施方案中,所述抗体包括重链可变区和轻链可变区,其中所述可变区包括互补决定区 (CDRs),其中:

[0036] (a) 所述重链可变区 CDRs 包括 SEQ ID NO :22, SEQ ID NO :23, 和 SEQ ID NO :24,

且所述轻链可变区 CDRs 包括 SEQ ID NO :25, SEQ ID NO :26, 和 SEQ ID NO :27 ;或

[0037] (b) 所述重链可变区 CDRs 包括 SEQ ID NO :28, SEQ ID NO :29, 和 SEQ ID NO :30, 且所述轻链可变区 CDRs 包括 SEQ ID NO :31, SEQ ID NO :32, 和 SEQ ID NO :33 ;或

[0038] (c) 所述重链可变区 CDRs 包括 SEQ ID NO :34, SEQ ID NO :35, 和 SEQ ID NO :36, 且所述轻链可变区 CDRs 包括 SEQ ID NO :37, SEQ ID NO :38, 和 SEQ ID NO :39。

[0039] 在一些实施方案中,所述异源 DNA 结合结构域与 SEQ ID NO :3 基本相同(即,至少 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 或 99% 或更高)。

[0040] 在一些实施方案中,所述聚合酶和外切核酸酶结构域来自家族 B DNA 聚合酶。

[0041] 在一些实施方案中,所述反应混合物包括一种或多种不同的三磷酸脱氧核糖核苷酸。

[0042] 在一些实施方案中,所述反应混合物还包括双链 DNA 结合染料。

[0043] 本发明还提供试剂盒。在一些实施方案中,所述试剂盒包括:

[0044] 杂合聚合酶,其包含聚合酶结构域和异源 DNA 结合结构域;和

[0045] 添加剂,其选自肌氨酸和肝素组成的组,所述添加剂处于这样的量,所述量足以将扩增反应的效率与缺少所述添加剂的反应混合物相比提高至少 10%。

[0046] 在一些实施方案中,所述杂合聚合酶在外切核酸酶结构域中包括突变,以使得该聚合酶基本缺乏 3' -5' 外切核酸酶活性。在一些实施方案中,所述杂合聚合酶包括家族 B 样聚合酶,其基本缺乏(例如,具有突变,其导致基本缺乏)3' -5' 外切核酸酶活性。在一些实施方案中,所述杂合聚合酶包括与 SEQ ID NO :2 基本相同,即,跨越所述聚合酶结构域(即,除 SEQ ID NO :3 以外的全部)或 SEQ ID NO :2 完整序列的至少 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 或 99% 或更高的氨基酸序列同一性的多肽序列。在一些实施方案中,所述杂合聚合酶包括 SEQ ID NO :2。

[0047] 在一些实施方案中,所述试剂盒还包括特异于所述杂合聚合酶的抗体。

[0048] 在一些实施方案中,所述抗体包括重链可变区和轻链可变区,其中所述可变区包括互补决定区(CDRs),其中:

[0049] (a) 所述重链可变区 CDRs 包括 SEQ ID NO :22, SEQ ID NO :23, 和 SEQ ID NO :24, 且所述轻链可变区 CDRs 包括 SEQ ID NO :25, SEQ ID NO :26, 和 SEQ ID NO :27 ;或

[0050] (b) 所述重链可变区 CDRs 包括 SEQ ID NO :28, SEQ ID NO :29, 和 SEQ ID NO :30, 且所述轻链可变区 CDRs 包括 SEQ ID NO :31, SEQ ID NO :32, 和 SEQ ID NO :33 ;或

[0051] (c) 所述重链可变区 CDRs 包括 SEQ ID NO :34, SEQ ID NO :35, 和 SEQ ID NO :36, 且所述轻链可变区 CDRs 包括 SEQ ID NO :37, SEQ ID NO :38, 和 SEQ ID NO :39。

[0052] 在一些实施方案中,所述异源 DNA 结合结构域与 SEQ ID NO :3 基本相同(即,至少 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 或 99% 或更高)。

[0053] 在一些实施方案中,所述聚合酶和外切核酸酶结构域来自家族 B DNA 聚合酶。

[0054] 在一些实施方案中,所述试剂盒还包括以下一种或多种:一种或多种不同的三磷酸脱氧核糖核苷酸;双链 DNA 结合染料;和寡核苷酸引物。

[0055] 本发明还提供具有对于由 SEQ ID NO :2 组成的蛋白的结合特异性的分离抗体,

其中所述抗体包括重链可变区和轻链可变区,其中所述可变区包括互补决定区(CDRs),其中:

[0056] (a) 所述重链可变区 CDRs 包括 SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, 和 SEQ ID NO:24, 且所述轻链可变区 CDRs 包括 SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, 和 SEQ ID NO:27;或

[0057] (b) 所述重链可变区 CDRs 包括 SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, 和 SEQ ID NO:30, 且所述轻链可变区 CDRs 包括 SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, 和 SEQ ID NO:33;或

[0058] (c) 所述重链可变区 CDRs 包括 SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, 和 SEQ ID NO:36, 且所述轻链可变区 CDRs 包括 SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, 和 SEQ ID NO:39。

[0059] 在一些实施方案中,所述重链可变区和轻链可变区包括:

[0060] (a) 分别地, SEQ ID NO:14 和 SEQ ID NO:18;

[0061] (b) 分别地, SEQ ID NO:15 和 SEQ ID NO:19;

[0062] (c) 分别地, SEQ ID NO:16 和 SEQ ID NO:20;或

[0063] (d) 分别地, SEQ ID NO:17 和 SEQ ID NO:21;

[0064] 本发明还提供编码包括如上所述的重链可变区或轻链可变区的多肽的分离的多核苷酸。

[0065] 本发明还提供与聚合酶复合的抗体,其中所述抗体包括如上所述的重链可变区和/或轻链可变区。

[0066] 附图简述

[0067] 图 1 显示肌氨酸对 qPCR 反应的效率的影响。

[0068] 图 2 显示关于包含不同浓度的肝素反应与不添加肝素的反应的扩增曲线。

[0069] 图 3 显示关于不同杂合聚合酶随复性/延伸温度变化的扩增曲线。显示关于 25pg, 250pg, 和 2500pg 输入 DNA 的扩增曲线。

[0070] 图 4(A) 显示包括 DNA 结合结构域的示范性杂合聚合酶的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2)。图 4(B) 显示示范性 DNA 结合结构域的氨基酸序列 (SEQ ID NO:3)。

[0071] 优选实施方案详述

[0072] 除非另外指出,本文中使用的所有技术和科学术语具有本发明所属领域中一般技术人员通常理解的相同含义。本文中提及的所有公开物通常参考结合在本文中,以用于描述和公开所述公开物中描述的装置、制剂和方法,并且其可以与本发明联合使用。

[0073] 注意,当在本文中和在所述权利要求书中使用时,单数形式“一种”(“a”, “an”, “”)和“所述”(“the”)包括复数对象,除非上下文另外明确指示。因此,例如提到“一种聚合酶”意指一种试剂或这样的试剂的混合物,且提到“所述方法”包括提及本领域技术人员已知的等价步骤和方法,等等。

[0074] 当提供一定范围的数值时,理解该范围上限和下限之间的每一个介于其间的数值和该指定范围内的任何其他指定数值或介于其间的数值属于本发明。这些较小的范围的上限和下限可以独立地包括在所述较小的范围内,且也属于本发明,在指定的范围内进行任何明确的排除限值。当指定的范围包括一个或两个所述限值,则排除那些包括的限值中的任意 2 个的范围也包括在本发明中。

[0075] 在以下说明书中,阐述许多特定详细信息,以提供本发明的更全面的理解。然而,本领域技术人员应该清楚的是,本发明可以在不存在这些特定详细信息中的一种或多种的

条件下进行。在其他情况下,不需要描述公知的特征和本领域中技术人员公知的程序,以避免混淆本发明。本领域技术人员应该清楚的是,这些附件特征也属于本发明。

[0076] 定义

[0077] 除非另外定义,本文中使用的全部技术和科学术语具有本发明所属领域中一般技术人员通常理解的相同含义。一般地,本文中使用的术语和下述的细胞培养实验室程序、分子遗传学、有机化学、和核酸活性和杂交是本领域中公知并普遍使用的那些。使用标准技术来进行核酸和肽分析。所述技术和程序通常按照本领域中常规方法和多种一般参考文件(一般参见,Sambrook 等 MOLECULAR CLONING :A LABORATORY MANUAL(分子克隆:实验室手册),第二版(1989)Cold Spring Harbor Laboratory Press(冷泉港实验室出版社),Cold Spring Harbor(冷泉港),N.Y.,将其通过参考结合与此)来进行,其贯穿该文件提供。本文中使用的术语和下述分析化学、和有机合成的实验室程序是本领域中公知和普通使用的那些。使用标准技术或其改进方案进行化学合成和化学分析。

[0078] 术语“杂合聚合酶”在本文中用于描述包括来自多亲本序列的氨基酸残基的聚合酶。杂合聚合酶可以包括两种聚合酶结构域以及 DNA 结合结构域。

[0079] 术语“杂合位置”意指亲本序列,或子序列之间不同的位置。

[0080] “野生型聚合酶”意指天然存在的聚合酶。“野生型聚合酶氨基酸序列”意指天然存在的氨基酸序列。

[0081] “天然”聚合酶序列意指亲本聚合酶序列,典型地,“野生型”序列。

[0082] “亲本聚合酶序列”表示在操作本发明前的起始或参考氨基酸或核酸序列。该术语与“起始序列”交替使用。亲本序列可以是野生型蛋白、含有突变的蛋白、或其他工程蛋白。亲本序列也可以是全长蛋白、蛋白亚单元、蛋白结构域、氨基酸基序、蛋白活性位点、或任何聚合酶序列或聚合酶序列子集,无论是连续的还是被其他多肽序列中断的。

[0083] 术语“DNA 结合结构域”意指以序列非特异性方式结合 DNA 的蛋白结构域。在一些实施方案中,所述 DNA 结合结构域是以显著亲和性结合 DNA 的蛋白结构域,关于其不存在这样的已知核酸,所述核酸以与具有相同组成但不同核苷酸序列的另一种核酸相比超过 100 倍更高的亲和性结合蛋白结构域。

[0084] 术语“Sso7d”或“Sso7d DNA 结合结构域”或“Sso7d-样 DNA 结合结构域”或“Sso7d 结合蛋白”意指这样的核酸和多肽多形变体、等位基因、突变体、种间同源物:(1) 具有这样的氨基酸序列,其与 SEQ ID NO:3 的 Sso7d 序列具有高于约 60%氨基酸序列同一性,65%,70%,75%,80%,85%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或 99%或更高氨基酸序列同一性,优选在至少约 15,25,35,50,或 63 个氨基酸的区域内;(2) 结合针对包括氨基酸序列 SEQ ID NO:3 及其保守修饰变体的免疫原产生的抗体,例如,多克隆抗体;(3) 在严格杂交条件下与 SEQ ID NO:3 的 Sso7d 核酸序列及其保守修饰变体特异性杂交;(4) 具有这样的核酸序列,其与 SEQ ID NO:4 具有高于约 90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%,或更高核苷酸序列同一性,优选在至少约 50,100,150,或更多核苷酸的区域内。该术语包括全长 Sso7d 多肽和所述多肽具有序列非特异性双链结合活性的片段。Sso7d-样蛋白包括 Sac7d 和 Sac7e。

[0085] “结构域”意指蛋白或蛋白复合物的单元,其包括多肽序列、完整多肽序列、或许多多肽序列,其中所述单元具有确定的功能。理解所述功能是广泛定义的,且可以是配体结

合、催化活性或可以对蛋白的结构具有稳定化作用。

[0086] “效率”在本发明反应的上下文中意指反应组分在特定反应条件下执行其功能的能力。例如，效率可以意指聚合酶在特定反应条件下执行其催化功能的能力。用于计算扩增反应效率的方法是本领域中已知的，并在本文中进一步详细描述。

[0087] “增强”在酶的上下文中意指提高酶的活性，即增加产物量 / 单位酶 / 单位时间。

[0088] “异源的”，在关于蛋白的部分使用时，表示所述蛋白包括两个或多个在自然界彼此间不以相同关系存在的结构域。这样的蛋白，例如，融合蛋白，含有两个或多个来自被安排形成新的功能性蛋白的无关蛋白的结构域。

[0089] “连接”意指本领域中关于功能性连接蛋白结构域的任何已知方法，包括但不限于具有或不具有干扰结构域的重组融合、内含肽 - 介导的融合、非共价连接、和共价键结合、包括二硫键结合；氢键结合；静电结合；和构象结合，例如，抗体 - 抗原，和生物素 - 抗生物素蛋白连接。

[0090] “聚合酶”意指进行多核苷酸的模板 - 指导的合成的酶。该术语包括全长多肽和具有聚合酶活性的结构域二者。

[0091] “持续合成能力”意指聚合酶保持与模板或底物结合和进行多核苷酸合成的能力。持续合成能力通过每次结合事件中发生的催化事件（例如，结合的核苷酸）数量来测量。

[0092] “热稳定的聚合酶”用于本文中时，意指利用 DNA 或 RNA 作为模板，通过将核苷酸单元加入至核苷酸链来催化多核苷酸合成的任何酶，并在高于 45°C 的温度下具有最佳活性。

[0093] “栖热菌属 (*Thermus*) 聚合酶”指由任何栖热菌属物种分离的家族 ADNA 聚合酶，包括但不限于水生栖热菌 (*Thermus aquaticus*)、*Thermus brockianus*、和嗜热栖热菌 (*Thermus thermophilus*)；源自栖热菌属物种的任何重组聚合酶，及其任意功能性衍生物，无论是通过遗传修饰或化学修饰或本领域中已知的其他方法来衍生。

[0094] 术语“扩增反应”意指用于增加核酸靶序列拷贝的任意体外方法。这样的方法包括但不限于聚合酶链式反应 (PCR)、DNA 连接酶链式反应（参见美国专利号 4,683,195 和 4,683,202；PCR Protocols :A Guide to Methods and Applications (PCR 流程：方法和应用指导) (Innis 等编,1990))，(LCR)、QBeta RNA 复制酶、和基于 RNA 转录的（诸如 TAS 和 3SR）的扩展反应以及本领域中技术人员已知的其他。

[0095] “扩增”意指使溶液经历足以容许扩增多核苷酸的条件的步骤，条件是反应的全部组分是完整的。扩增反应的组分包括，例如，引物，多核苷酸模板、聚合酶、核苷酸等。术语“扩增”典型地意指靶核酸的“指数”增加。然而，“扩增”用于本文中时还可以意指核酸的选择靶序列数量的线性增加，诸如使用循环测序获得的。

[0096] 术语“扩增反应混合物”意指包含用于扩增靶核酸的多种试剂的水溶液。这些包括酶、水性缓冲液、盐、扩增引物、靶核酸、和三磷酸核苷。如本文中进一步讨论地，扩增反应混合物还可以进一步包括稳定剂和其他用于最优化效率和特异性的添加剂。根据上下文，所述混合物可以是完全的或不完全的扩增反应混合物。

[0097] “聚合酶链式反应”或“PCR”意指这样的方法，通过该方法以几何级数扩增靶双链 DNA 的特定区段或子序列。PCR 是本领域技术人员公知的技术；参见，例如，美国专利号 4,683,195 和 4,683,202；和 PCR Protocols :A Guide to Methods and Applications (PCR

流程：方法和应用指导），Innis 等编，1990。示范性 PCR 反应条件典型地包括两步骤或三步骤循环。两步骤循环具有变性步骤，随后是杂交 / 延伸步骤。三步骤循环包括变性步骤，随后是杂交步骤，随后是单独的延伸步骤。

[0098] “长 PCR”意指长度为 5kb 或以上的 DNA 片段的扩增。长 PCR 典型地使用特别适合的聚合酶或聚合酶混合物来进行（参见，例如，美国专利号 5, 436, 149 和 5, 512, 462），所述聚合酶或聚合酶混合物与常规用于扩增较短产物的聚合酶不同。

[0099] “引物”意指与靶核酸上的序列杂交的多核苷酸序列并担当核酸合成的起始点。引物可以具有不同的长度，且通常长度小于 50 个核苷酸，例如，长度为 12-30 个核苷酸。用于 PCR 中的引物的长度和序列可以基于本领域中技术人员已知的原则来设计，参见，例如，Innis 等，见上文。

[0100] “温度模式”意指 PCR 或循环测序反应的变性、复性和 / 或延伸步骤的温度和时间长度。PCR 或循环测序反应的温度模式典型地由相似或相同较短温度模式的 10-60 次循环；这些较短的模式中的每一个可以典型定义两步骤或三步骤循环。温度模式的选择基于本领域技术人员已知的多种考虑因素，参见，例如，Innis 等，见上文。在如本文中所述的长 PCR 反应中，获得长度为 5kb 或以上的扩增产物所需的延伸时间与常规聚合酶混合物相比缩短。

[0101] PCR “灵敏性”意指扩增以低拷贝数存在的靶核酸的能力。“低拷贝数”意指待扩增核酸样品中靶序列的拷贝数为 10^5 ，经常 10^4 ， 10^3 ， 10^2 ， 10^1 或更少。

[0102] 术语“聚合酶引物 / 模板结合特异性”用于本文中时，意指聚合酶辨别正确匹配的引物 / 模板和错配引物模板的能力。“聚合酶引物 / 模板结合特异性的增加”在该上下文中意指本发明聚合酶辨别匹配的引物 / 模板和错配的引物复合物的能力与野生型聚合酶相比的增加。

[0103] “模板”意指这样的多核苷酸序列，其包括待扩增的侧邻引物杂交位点的多核苷酸。因此，“靶模板”包括侧邻关于 5' 引物和 3' 引物的杂交位点的靶多核苷酸序列。

[0104] 用于本文中时，“核酸”意指 DNA，RNA，单链，双链，或更加高度聚集的杂交基序，及其任意化学修饰。修饰包括，但不仅限于，向核酸配体碱基或向作为整体的核酸配体提供结合另外的电荷、极化性、氢键结合、静电相互作用、连接点和功能性的化学基团的那些。这样的修饰包括，但不仅限于，肽核酸（PNAs），磷酸二酯基修饰，（例如，硫代磷酸酯，甲基膦酸酯），2' - 位糖修饰，5- 位嘧啶修饰，8- 位嘌呤修饰，环外胺的修饰，4- 硫尿苷的取代，5- 溴 - 尿嘧啶或 5- 碘 - 尿嘧啶的取代；主链修饰，甲基化，不寻常碱基 配对组合诸如异碱基（isobase），异胞苷（isocytidine）和异胍（isoguanidine）等。核酸还可以包括非天然碱基，诸如，例如，硝基嘌呤。修饰还可以包括 3' 和 5' 修饰诸如用荧光团（例如，量子点）或另一种结构部分加帽。

[0105] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白”在本文中交替使用，意指氨基酸残基的聚合物。该术语应用于其中一个或多个氨基酸残基是相应天然存在的氨基酸的人造化学模拟物的氨基酸聚合物，以及天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物。

[0106] 术语“氨基酸”意指天然存在和合成的氨基酸，以及以与天然存在的氨基酸相似的方式起作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的那些，以及稍后修饰的那些氨基酸，例如，羧基脯氨酸， γ - 羧基谷氨酸，和 O- 磷酸丝氨酸。

氨基酸类似物意指与天然存在的氨基酸具有相同基础化学结构,即,与氢原子、羧基、氨基、和 R 基结合的碳原子的化合物,例如,高丝氨酸,正亮氨酸,甲硫氨酸亚砷,甲硫氨酸甲基砷。这样的类似物具有修饰的 R 基(例如,正亮氨酸)或修饰肽主链,但是保持与天然存在的氨基酸相同的基础化学结构。氨基酸模拟物意指具有与氨基酸的一般化学结构不同的结构但以与天然存在的氨基酸类似的方式起作用的化学化合物。

[0107] 氨基酸在本文中可以通过其普遍已知的三字母符号或通过由 IUPAC-IUB 生物化学命名委员会推荐的一字母符号来提及。同样地,核苷酸可以通过其普遍接受的单字母密码来提及。

[0108] “保守修饰变体”应用于氨基酸和核酸序列二者。关于特殊的核酸序列,保守修饰变体意指编码相同或基本相同氨基酸序列,或其中核酸不编码氨基酸序列的那些核酸,基本相同序列。由于遗传密码的简并,大量功能相同的核酸编码任何给定蛋白。例如,密码子 GCA, GCC, GCG 和 GCU 都编码氨基酸丙氨酸。因此,在通过密码子指定丙氨酸的各个位置处,该密码子可以改变为所述相应密码子中任一个,而不改变编码的多肽。这样的核酸变化是“沉默变化”,其是保守修饰变化的一种。本文中编码多肽的各核酸序列也描述各种可能的核酸的沉默变化。本领域技术人员应该承认,核酸中的各密码子(除 AUG(其通常仅编码甲硫氨酸)和 TGG(其通常仅编码色氨酸外)可以修饰为产生功能相同的分子。因此,编码多肽的核酸的各沉默变化是各所述序列中固有的。

[0109] 作为氨基酸序列,本领域中技术人员应该承认,在编码的序列中改变、添加或缺失单氨基酸或小比例氨基酸的各取代、缺失或添加核酸、肽、多肽、或蛋白序列是“保守修饰的变体”,其中变化导致氨基酸被化学类似的氨基酸取代。提供功能相似氨基酸的保守取代表是本领域中公知的。这样的保守修饰变体是本发明多形变体、种间同源物、和等位基因以外的,但不排除这些。

[0110] 术语“编码”意指编码一个或多个氨基酸的多核苷酸序列。该术语不需要起始密码子或终止密码子。氨基酸序列可以以由多核苷酸序列提供的 6 种不同阅读框中任一种来编码。

[0111] 术语“启动子”意指位于转录起始上游和/或下游并参与识别和结合 RNA 聚合酶和其他蛋白以起始转录的区域或序列。

[0112] “载体”意指这样的多核苷酸,其在独立于宿主染色体时,能够在宿主生物体中复制。优选的载体包括质粒,且典型地具有复制起点。载体可以包括,例如,转录和翻译终止子,转录和翻译起始序列,和有效用于调节特殊核酸表达的启动子。

[0113] “重组”意指人操作的多核苷酸或人操作的多核苷酸的拷贝或补体。例如,包括与第二多核苷酸可操作连接的启动子的重组表达盒可以包括与所述第二多核苷酸异源的启动子,这是人操作(例如,通过 Sambrook 等, *Molecular Cloning-A Laboratory Manual* (分子克隆:实验室手册), Cold Spring Harbor Laboratory(冷泉港实验室), Cold Spring Harbor(冷泉港), N. Y., (1989) 或 *Current Protocols in Molecular Biology* (当前分子生物学方案) 第 1-3 卷, John Wiley & Sons, Inc. (1994-1998) 所述的方法) 包含表达盒的分离的核酸的结果。在另一个实例中,重组表达盒可以包括以这样的方式组合的多核苷酸,所述方式使得所述多核苷酸与自然界中存在的非常不像。例如,人操作的限制性位点或质粒载体序列可以使启动子侧邻所述第二多核苷酸或使启动子与所述第二多核苷酸分开。

本领域中技术人员应该承认,多核苷酸可以以许多方式来操作并不限于以上实例。

[0114] 本发明的“聚合酶多肽”是包含聚合酶结构域的蛋白。聚合酶多肽还可以包括另外的结构域包括异源 DNA 结合结构域,例如,Sso7D。DNA 聚合酶是本领域中技术人员公知的,包括但不限于,由嗜热古细菌 (*Pyrococcus furiosus*),*Thermococcus litoralis*,和海栖热袍菌 (*Thermotoga maritima*),或其修饰形式分离或来源的 DNA 聚合酶。它们包括 DNA- 依赖性聚合物和 RNA- 依赖性聚合酶二者,诸如逆转录酶。已知至少 5 个 DNA- 依赖性 DNA 聚合酶家族,尽管大部分属于家族 A、B 和 C。不同家族之间存在很少或不存在序列相似性。大多数家族 A 聚合酶是单链蛋白,其可以含有多酶功能包括聚合酶、3' 至 5' 外切核酸酶活性和 5' 至 3' 外切核酸酶活性。家族 B 聚合酶典型地具有聚合酶的单催化结构域和 3' 至 5' 外切核酸酶活性,以及辅助因子。家族 C 聚合酶典型地是多亚单元蛋白,其具有聚合和 3' 至 5' 外切核酸酶活性。在大肠杆菌 (*E. coli*) 中,已经发现三种类型的 DNA 聚合酶,即 DNA 聚合酶 I (家族 A), II (家族 B),和 III (家族 C)。在真核细胞中,三种不同的家族 B 聚合酶,即 DNA 聚合酶 α , δ , 和 ϵ , 参与核复制,且家族 A 聚合酶,即聚合酶 γ , 用于线粒体 DNA 复制。其他类型的 DNA 聚合酶包括噬菌体聚合酶。类似地, RNA 聚合酶典型地包括真核 RNA 聚合酶 I, II, 和 III, 和细菌 RNA 聚合酶以及噬菌体和病毒聚合酶。RNA 聚合酶可以是 DNA- 依赖性和 RNA- 依赖性的。

[0115] 本发明的多肽聚合酶具有聚合酶活性。使用本文中所述的测定法,可以测量本发明的多肽的活性。本发明的一些聚合酶多肽在本文中所述的测定法中,表现出与野生型聚合酶相比提高的聚合酶活性。

[0116] 两个核酸序列或多肽被称为“相同”,如果这两个序列中的核苷酸或氨基酸残基序列在如下所述比对以获得最大对应性时,分别相同。术语“相同”或百分比“同一性”在两个或多个核酸或多肽序列的背景下,意指当比较和比对以在比较窗中获得最大对应性时,相同或具有特定百分比的相同的氨基酸残基或核苷酸的两个或多个序列或子序列,其如使用一种以下序列比较运算法则或通过手工比对和视觉观察来测量。当序列同一性的百分比关于蛋白或多肽使用时,认为不相同的残基位置通常由于保守氨基酸取代而不同,其中氨基酸残基被取代为具有类似化学特性(例如,电荷或疏水性)的其他氨基酸残基并因此不改变该分子的功能特性。当序列在保守取代中不同时,百分比序列同一性可以上调,以校正取代的保守天性。用于进行该调整的手段是本领域中技术人员公知的。典型地,这涉及将保守取代作为部分而非完全错配来评分,由此增加百分比序列同一性。因此,例如,当相同的氨基酸给分为 1 且非保守取代给分为 0 时,保守取代给分在 0 和 1 之间。保守取代的评分根据例如, Meyers & Miller 的运算法则, *Computer Applic. Biol. Sci.* (计算机应用生物科学) 4:11-17 (1988) 来计算,例如,如以程序 PC/GENE (Intelligenetics, Mountain View, 加利福尼亚, USA) 进行。

[0117] 术语多核苷酸序列的“基本同一性”意指多核苷酸包含具有至少 50% 序列同一性的序列。示范性实施方案包括与参考序列相比至少: 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 或 99%, 其使用本文中所述的程序; 优选使用标准参数的 BLAST, 如下所述。本领域中技术人员应该承认, 这些数值可以适当地调节, 以通过考虑密码子简并, 氨基酸相似性, 阅读框定位等来确定由两个核苷酸序列编码的蛋白的相应同一性。氨基酸序列的基本同一性为了这些目的通常意指至少 65% 的序列同一性。示范性

实施方案包括至少 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 或 99%。“基本类似的”多肽共享如上所述的序列,例外之处在于不相同的残基位置可以通过保守氨基酸改变而不同。保守氨基酸取代意指具有相似侧链的残基的可交替性。例如,一组具有脂肪族侧链的氨基酸是甘氨酸,丙氨酸,缬氨酸,亮氨酸,和异亮氨酸;一组具有脂肪族-羟基侧链的氨基酸是丝氨酸和苏氨酸;一组具有含酰胺的侧链的氨基酸是天冬酰胺和谷氨酰胺;一组具有芳基侧链的氨基酸是苯丙氨酸,酪氨酸,和色氨酸;一组具有碱性侧链的氨基酸是赖氨酸,精氨酸,和组氨酸;且一组具有含硫的侧链的氨基酸是半胱氨酸和甲硫氨酸。示范性保守氨基酸取代组是:缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸,苯丙氨酸-酪氨酸,赖氨酸-精氨酸,丙氨酸-缬氨酸,天冬氨酸-谷氨酸,和天冬酰胺-谷氨酰胺。

[0118] 本领域中技术人员应该承认两个多肽也可以“基本相同”,条件是这两个多肽免疫学类似。因此,总蛋白结构可以类似,而两个多肽的氨基酸序列显示显著不同。因此,用于测量两个多肽是否基本相同的方法包括测量单克隆或多克隆抗体与每个多肽的结合。两个多肽基本相同,条件是特异于第一多肽的抗体以与第一多肽的亲合性的至少 1/3 的亲合性结合第二多肽。两个多肽也可以被认为是“基本相同的”,条件是它们在使用本领域中已知方法进行的 western 印迹分析中显示交叉反应性。

[0119] 为了序列比较,典型地,一个序列担当参考序列,测试序列与所述参考序列进行比较。当使用序列比较运算法则时,将测试序列和参考序列输入计算机,如果需要,指定子序列坐标,并指定序列运算法则程序参数。可以使用默认的程序参数,或可以指定备选的参数。序列比较运算法则然后基于程序参数,计算测试序列相对于参考序列的百分比序列同一性。

[0120] “比较窗”用于本文中时,包括选自由 20-600,通常约 50-约 200,更通常约 100-约 150 组成的组的任一连续位置数量的区段,其中当两序列最佳比对后,序列可以与相同数量的连续位置的参考序列进行比较。比对序列以进行比较的方法是本领域中公知的。用于比较的最佳序列比对可以,例如,通过 Smith&Waterman, Adv. Appl. Math. (现代应用数学) 2:482(1981) 的局部同源比对运算法则,通过 Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. (分子生物学杂志) 48:443(1970) 的同源比对运算法则,通过 Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA (美国国家科学院学报) 85:2444(1988) 的相似方法的搜索,通过计算机化执行这些运算法则 (GAP, BESTFIT, FASTA, 和 TFASTA, 在 Wisconsin Genetics Software Package (威斯康辛州遗传学软件包), Accelrys 中), 或提供人工比对和视觉观察来进行。

[0121] 适合用于确定百分比序列同一性和序列相似性的运算法则的实例是 BLAST 运算法则,其记述在 Altschul 等, J. Mol. Biol. (分子生物学杂志) 215:403-410(1990) 中。用于进行 BLAST 分析的软件可公共地获自国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。该运算法则包括首先通过识别查询序列中长度 W 的短词来识别高分序列对 (HSPs), 其在与数据库序列中相同长度的词比对时, 匹配或满足一些正值阈值评分。T 指邻近词评分阈值 (Altschul 等, 见上文)。这些起始邻近词击中担当开始搜索的种子, 以发现包含它们的较长的 HSPs。词击中以两个方向沿各序列延伸, 以直至可以增加累积比对评分。词击中在各方向的延伸中以下时刻停止: 累积比对评分通过量 X 由其最大获得值下降; 累积评分变为 0 或以下, 这归因于一个或多个负评分残基比对的累积; 或达到各序列的末端。BLAST 运算法则参数 W, T,

和 X 确定运算法则的灵敏性和速度。BLAST 程序在默认词长 (W)11 时, 使用 BLOSUM62 评分基质 (参见 Henikoff&Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (美国国家科学院学报) 89: 10915(1989)) 比对 (B) 为 50, 期望值 (E) 为 10, $M = 5$, $N = -4$, 和两条链比较。

[0122] BLAST 运算法则也进行两序列之间相似性的统计学分析 (参见, 例如, Karlin & Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (美国国家科学院学报) 90:5873-5787(1993))。由 BLAST 运算法则提供的相似性的一个测量值是最小综合可能性 (P(N)), 其提供两核苷酸或氨基酸序列之间的匹配偶然发生的可能性指示。例如, 核酸被认为与参考序列相似, 条件是测试核酸与参考核酸的比较中的最小总和可能性小于约 0.2, 更优选小于约 0.01, 且最优选小于约 0.001。

[0123] 术语“严格杂交条件”指这样的条件下, 在该条件下, 探针与其靶子序列, 典型地在核酸的复杂混合物中进行杂交, 而不与其他序列杂交。严格条件是序列依赖性的且在不同环境中应该不同。较长的序列特别在较高温度下杂交。核酸杂交的广泛指导参见 Tijssen, Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Probes (生物化学和分子生物学技术——使用核探针的杂交), “Overview of principles of hybridization and the strategy of 核酸 assays (杂交原理和核酸测定策略综述)” (1993)。一般地, 高严格条件被选为比特定序列在确定的离子强度 pH 下热熔点 (T_m) 低约 5-10°C。低严格条件通常被选为比 T_m 低约 15-30°C。 T_m 是这样的温度 (在确定的离子强度、pH、和核浓度下), 在该温度下, 50% 的与靶标互补的探针平衡地杂交靶序列 (当靶序列过量存在时, 在 T_m , 50% 的探针平衡地被占据)。杂交条件典型地是那样的, 其中盐浓度在 pH7.0-8.3 下, 低于约 1.0M 钠离子, 典型地约 0.01-1.0M 钠离子浓度 (或其他盐) 并且温度对于短探针 (例如, 10-50 核苷酸) 是至少约 30°C 且对于长探针 (例如, 大于 50 核苷酸) 是至少约 60°C。严格条件还可以使用添加去稳定剂诸如甲酰胺来实现。为了选择性或特异性杂交, 阳性信号是至少两倍背景, 优选 10 倍背景杂交。

[0124] 在严格条件下不相互杂交的核酸仍然是基本相同的, 条件是它们编码的多肽基本相同。这, 例如, 在使用遗传密码允许的最大密码子简并创建核酸拷贝时发生。在这样的情形中, 核酸典型地在中度严格杂交条件下杂交。示范性“中度严格杂交条件”包括在 40% 甲酰胺, 1M NaCl, 1% SDS 缓冲液中, 在 37°C 下杂交和在 1X SSC, 在 45°C 下洗涤。示范性“严格杂交条件”包括在 40% 甲酰胺, 1M NaCl, 1% SDS 缓冲液中, 在 37°C 下杂交和在 0.2X SSC, 在温度至少约 50°C, 通常约 55°C - 约 60°C 下至少一次 20 分钟的洗涤, 或等价条件。阳性杂交是至少两倍背景。本领域中技术人员应该欣然承认, 可以使用备选的杂交和洗涤条件来提供类似严格性的条件。

[0125] “抗体”指基本由一种或多种免疫球蛋白基因或其片段编码的多肽配体, 其特异性结合和识别表位 (例如, 抗原)。被识别的免疫球蛋白基因包括 κ 和 λ 轻链恒定区, α , γ , δ , ϵ 和 μ 重链恒定区基因, 和无数免疫球蛋白可变区基因。抗体, 例如, 作为完整免疫球蛋白或作为许多充分表征的使用不同肽酶消化产生的片段而存在。这包括, 例如, Fab' 和 F(ab)'₂ 片段。术语“抗体”用于本文中时, 还包括通过修饰完整抗体生成或利用重组 DNA 方法从头合成的抗体片段。其还包括多克隆抗体、单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体、或单链抗体。抗体的“Fc”部分指免疫球蛋白重链的包含一个或多个重链恒定区结构域、CH1、CH2 和 CH3, 但不包含重链可变区的部分。

[0126] 术语“渗透剂”用于本文中时,指影响渗透性和 / 或负责调节组织和细胞中渗透压的任何物质或化合物。

[0127] 综述

[0128] 本发明提供用于提高核酸扩增反应的效率和特异性的方法和组合物。

[0129] 在一方面,本发明提供包含聚合酶结构域和 DNA 结合结构域的杂合聚合酶。在一个实施方案中,本发明的杂合聚合酶包括导致聚合酶外切核酸酶缺陷的突变。“外切核酸酶缺陷”用于本文中时意指聚合酶具有充分减小(即,小于来自嗜热古细菌的 Pfu DNA 聚合酶的 3' -5' 外切核酸酶活性的 10%,5%或 1%)的或无外切核酸酶活性。例如,聚合酶结构域中取代位置 D141 和 E143 处的丙氨酸的双点突变可以去除或消除 3' -5' 外切核酸酶活性。Derbyshire 等, *Methods in Enzymology* (酶学方法), 卷 262 (1995), 第 363-385 页。包含这样的双点突变的杂合聚合酶应该通常在核酸扩增反应中显示增加的特异性,从而导致较少的扩增副产物(诸如引物二聚体的扩增)和扩增所需靶核酸的增加的效率。

[0130] 在进一步的实施方案中,本发明的杂合聚合酶的 DNA 结合结构域包括 Sso7d 蛋白。聚合酶结构域与 DNA 结合结构域诸如 Sso7d 的缀合增加聚合酶的持续合成能力,由此导致增加量的扩增产物。

[0131] 在进一步的方面,本发明提供用于执行核酸扩增反应的方法、组合物、反应混合物、和试剂盒,所述核酸扩增反应使用与热开始抗体复合的杂合聚合酶。所述热开始抗体以在较低(环境)温度下抑制聚合酶活性的方式结合杂合聚合酶。例如,在一些实施方案中,抗体在 50°C,60°C,和甚至 72°C 下基本抑制聚合酶活性,由此在室温反应设置过程中以及在由室温开始加热热循环块至例如,95°C 的过程中基本不发生 DNA 合成。这些抗体在较高温度下与聚合酶解离,由此释放聚合酶活性的抑制。这样的抗体增加核酸扩增反应的效率,因为聚合酶在扩增反应的开始设置过程中和在开始变性步骤之前保持失活。由于其在低温下失活,所以与抗体复合的聚合酶不能延伸可以在较低温度下形成的非特异性引物-模板杂交。

[0132] 在再一方面,本发明提供用于在存在添加剂的条件下进行核酸扩增反应的方法、组合物、反应混合物和试剂盒,所述添加剂起提高所述反应的效率和特异性的作用。在一个实施方案中,核酸扩增反应在存在渗透剂,诸如肌氨酸的条件下进行。已知肌氨酸稳定水溶液中的蛋白。使用肌氨酸的常规方法使用摩尔范围内的浓度,但是在本发明中,毫摩尔范围,一般 50 毫摩尔或更低的浓度导致扩增反应效率的提高。在另一个实施方案中,模拟双链 DNA 静电特性的分子包括在反应混合物中,以减少聚合酶与双链模板核酸的非特异性结合。在再一个实施方案中,为了减少非特异性结合而包括的分子是肝素分子。

[0133] 有效用于本发明的杂合聚合酶

[0134] 本发明提供包含聚合酶结构域和 DNA 结合结构域的杂合聚合酶。已知所述杂合聚合酶显示增加的持续合成能力。参见例如,美国专利申请公开号 2006/005174; 2004/0219558; 2004/0214194; 2004/0191825; 2004/0081963; 2004/0002076; 2003/0162173; 2003/0148330; 2003/0138830 和美国专利号 6,627,424 和 7,445,898,将其每一篇通过参考整体引入以获得全部目的,特别是获得关于聚合酶、杂合 / 嵌合聚合酶,以及所述用于制备和使用所述聚合酶的方法的所有教导。

[0135] 在一方面,本发明提供缺乏 3' -5' 外切核酸酶活性的杂合聚合酶。在一个实施方

案中,这样的杂合聚合酶在聚合酶结构域中包括双点突变,以提供该外切核酸酶缺陷。可以将多种突变引入至天然聚合酶结构域中,以减少或消除 3'-5' 外切核酸酶活性。例如,美国专利号 6,015,668 ;5,939,301 和 5,948,614 描述在 Tma 和 Tne DNA 聚合酶的 3'-5' 外切核酸酶结构域中金属结合的天冬氨酸突变为丙氨酸残基。这些突变将这些酶的 3'-5' 外切核酸酶活性减少至低于可检测水平。类似地,美国专利号 5,882,904 描述 *Thermococcus barossi* 中的类似的天冬氨酸-至-丙氨酸的突变,和美国专利号 5,489,523 教导沃氏热球菌 (*Pyrococcus wosei*) DNA 聚合酶的双突变 D141A E143A。这两种突变聚合酶实际上不具有可检测的 3'-5' 外切核酸酶活性。测定 3'-5' 外切核酸酶活性的方法是本领域中公知的。参见,例如, Freemont 等, *Proteins* (蛋白) 1:66 (1986) ; Derbyshire 等, *EMBO J.* (EMBO 杂志) 16:17 (1991) 和 Derbyshire 等, *Methods in Enzymology* (酶学方法) 262:36385 (1995)。应该理解,尽管上述突变最初在一个聚合酶中识别,但是人们通常可以将该突变引入至其他聚合酶中,以减少或消除外切核酸酶活性。在特定实施方案中,本发明的聚合酶在聚合酶结构域中包含双点突变 D141A/E143A。术语“对应于位置”涉及聚合酶氨基酸,意指与参考聚合酶氨基酸序列 (例如, SEQ ID NO:2) 中的相同氨基酸 (例如, D141 或 E143) 比对的氨基酸。序列比较可以利用任何 BLAST 包括具有默认参数的 BLAST 2.2 运算法则来进行,分别记述在 Altschul 等, *Nuc. Acids Res.* (核酸研究) 25:33893402 (1977) 和 Altschul 等, *J. Mol. Biol.* (分子生物学杂志) 215:403410 (1990)。

[0136] 在进一步的实施方案中,本发明的杂合聚合酶由根据 SEQ ID NO:1 的核苷酸序列来编码。在再一个实施方案中,本发明的杂合聚合酶由与 SEQ ID NO:1 具有约 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 和 99% 序列同一性的核苷酸序列来编码。

[0137] 在进一步的实施方案中,本发明的杂合聚合酶具有根据 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列。在再一个实施方案中,本发明的杂合聚合酶具有与 SEQ ID NO:2 具有约 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 和 99% 序列同一性的氨基酸序列。

[0138] 在一些实施方案中,本发明的杂合聚合酶的结合结构域来自热稳定性生物体并在较高温度,例如高于 45°C 的温度下提供提高的活性。例如, Sso7d 和 Sac7d 是小 (约 7kd MW), 碱性染色体蛋白,其分别来自超嗜热古细菌 (*hyperthermophilic archaeobacteria*) 硫磺矿硫化叶菌 (*Sulfolobus solfataricus*) 和嗜酸热硫化叶菌 (*S. acidocaldarius*) (参见,例如, Choli 等, *Biochimica et Biophysica Acta* 950:193-203, 1988 ; Baumann 等, *Structural Biol.* (结构生物学) 1:808-819, 1994 ; 和 Gao 等, *Nature Struc. Biol.* (自然结构生物学) 5:782-786, 1998)。这些蛋白以不依赖序列的方式结合 DNA, 且当在一些条件下结合时,增加 DNA 的 T_m 高至 40°C (McAfee 等, *Biochemistry* (生物化学) 34:10063-10077, 1995)。这些蛋白及其同源物通常在改进的聚合酶融合蛋白中用作序列非特异性 DNA 结合结构域。Sso7d, Sac7d, Sac7e 和相关序列 (本文中作为“Sso7 序列”或“Sso7 结构域”提及) 是本领域中已知的 (参见,例如,登记号 (P39476 (Sso7d) ; P13123 (Sac7d) ; 和 P13125 (Sac7e))。这些序列典型地具有至少 75% 或更高, 80%, 85%, 90%, 或 95% 或更高的氨基酸序列同一性。例如, Sso7 蛋白典型地与 Sso7d 序列具有至少 75% 的同一性。

[0139] 在进一步的实施方案中,在本发明中使用的杂合聚合酶记述在例如美国专利申

请公开号 2006/005174 ;2004/0219558 ;2004/0214194 ;2004/0191825 ;2004/0081963 ;2004/0002076 ;2003/0162173 ;2003/0148330 ;2003/0138830 和美国专利号 6,627,424 和 7,445,898 中,将其每一篇通过参考整体引入以获得全部目的,特别是获得关于聚合酶、杂合 / 嵌合聚合酶,以及所述用于制备和使用所述聚合酶的方法的所有教导。杂合聚合酶蛋白和生成杂合蛋白的方法的实例也在 W02004011605 中公开,将其通过参考整体引入以获得全部目的,特别是获得关于生成杂合蛋白的所有教导。

[0140] 本发明的一些聚合酶的一个优势是它们在存在不同浓度的典型地抑制使用野生型 Taq 聚合酶的 PCR 扩增的物质的条件下扩增靶核酸的能力。这样的抑制性物质的实例包括,但不限于,血液、完整细胞、和食物样品。因此,本发明的聚合酶可以用于扩增全血或血清中核酸,任选地,在加入至反应混合物中之前不纯化血液或血清的情形。在一些实施方案中,本发明聚合酶用于扩增完整细胞,包括但不限于,完整细菌、真菌、或酵母细胞,例如,在完整菌落 PCR 中。在一些实施方案中,本发明的聚合酶用于扩增食物样品中的核酸,任选地,在扩增之前不由食物样品进一步纯化核酸或由食物样品部分纯化核酸的条件下。这有效用于,例如,筛选食品的细菌、真菌、或病毒污染。示范性食物样品包括,但不限于,包含椰子、干酪、肉、蛋等的样品。

[0141] 在一些实施方案中,本发明的聚合酶能够特别迅速地扩增,这归因于其提高的持续合成能力。例如,在一些实施方案中,本发明的聚合酶用于具有小于 5,4,3,2,或 1 秒的延伸时间的扩增反应并仍,例如,以高效率(例如,大于 90%,95%或以上)扩增靶核酸。

[0142] 聚合酶结构域

[0143] 在一个示范性实施方案中,本发明的杂合聚合酶具有源自两个亲本聚合酶, Pfu 和 DeepVent 的聚合酶结构域。这样的聚合酶记述在例如美国申请公开号 20040219558 ;20040214194 ;20040191825 ;20030162173 中,将其每一篇通过参考整体引入以获得全部目的,特别是获得关于杂合聚合酶的所有教导。

[0144] 多种聚合酶可以用作本发明的杂合聚合酶的聚合酶结构域的至少一部分。已知至少 5 个家族的 DNA 依赖性 DNA 聚合酶,尽管大部分属于家族 A、B 和 C。不同家族之间存在很少或不存在结构或序列相似性。大多数家族 A 聚合酶是单链蛋白,其可以含有多酶功能包括聚合酶、3' 至 5' 外切核酸酶活性和 5' 至 3' 外切核酸酶活性。家族 B 聚合酶典型地具有单催化结构域、聚合酶和 3' 至 5' 外切核酸酶活性,以及辅助因子。家族 C 聚合酶典型地是多亚单元蛋白,其具有聚合和 3' 至 5' 外切核酸酶活性。在大肠杆菌 (E. coli) 中,已经发现三种类型的 DNA 聚合酶,即 DNA 聚合酶 I (家族 A), II (家族 B), 和 III (家族 C)。在真核细胞中,三种不同的家族 B 聚合酶,即 DNA 聚合酶 α , δ , 和 ϵ , 参与核复制,且家族 A 聚合酶,即 聚合酶 γ , 用于线粒体 DNA 复制。其他类型的 DNA 聚合酶包括噬菌体聚合酶。这些聚合酶中任一种,全部或部分这些聚合酶的组合,以及两个或更多所述聚合酶之间的嵌合物或杂合物或它们的等价物可以用于形成本发明的杂合聚合酶的一部分或全部聚合酶结构域。

[0145] 此外,在一些实施方案中,非热稳定的聚合酶也可以根据本发明使用。例如,具有突变 (D355A, E357A) 的大肠杆菌 DNA 聚合酶 I (Klenow) 的大片段 (Klenow 片段) 消除 3' $\Rightarrow$ 5' 外切核酸酶活性。该酶或等价酶可以用于这样的实施方案中,其中扩增反应不在高温下进行。

[0146] 在一些实施方案中,本发明的杂合聚合酶包括包含突变的聚合酶结构域,与不具有所述突变的聚合酶结构域的杂合聚合酶相比,所述突变较少或消除包含所述聚合酶结构域的任何杂合聚合酶外切核酸酶活性。在进一步的实施方案中,所述杂合聚合酶在外切核酸酶结构域中包括突变。在再一个实施方案中,所述杂合聚合酶包含根据 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列。

[0147] 核酸结合结构域

[0148] 在一些实施方案中,本发明的杂合聚合酶包含与 DNA 结合结构域缀合的聚合酶结构域。DNA 结合结构域是蛋白,或蛋白的确定区域,其以不依赖序列的方式结合核酸,例如,结合不展示对特定序列的显著偏好。DNA 结合结构域可以结合单链核酸或双链核酸。

[0149] 本发明中使用的 DNA 结合蛋白通常是热稳定的。这样的蛋白的实例包括,但不限于,古细菌小碱性 DNA 结合蛋白 Sso7d 和 Sso7d- 样蛋白(参见,例如,Choli 等, *Biochimica et Biophysica Acta* 950:193-203,1988;Baumann 等, *Structural Biol.* (结构生物学)1:808-819,1994;和 Gao 等, *Nature Struc. Biol.* (自然结构生物学)5:782-786,1998),古细菌 Hmf- 样蛋白(参见,例如,Starich 等, *J. Molec. Biol.* (分子生物学杂志)255:187-203,1996;Sandman 等, *Gene* (基因)150:207-208,1994),和 PCNA 同源物(参见,例如,Cann 等, *J. Bacteriology* (细菌学杂志)181:6591-6599,1999;Shamoo 和 Steitz, *Cell* (细胞):99,155-166,1999;De Felice 等, *J. Molec. Biol.* (分子生物学杂志)291,47-57,1999;和 Zhang 等, *Biochemistry* (生物化学)34:10703-10712,1995)。

[0150] Sso7d 和 Sso7d- 样蛋白, Sac7d 和 Sac7d- 样蛋白,例如, Sac7a, Sac7b, Sac7d, 和 Sac7e 是小(约 7,000kd MW),碱性染色体蛋白,其分别来自超嗜热古细菌(hyperthermophilic archaeobacteria)硫磺矿硫化叶菌(*Sulfolobus solfataricus*)和嗜酸热硫化叶菌(*S. acidocaldarius*)。这些蛋白富含赖氨酸并具有高热、酸和化学稳定性。它们以不依赖序列的方式结合 DNA,且当在一些条件下结合时,增加 DNA 的 T_m 高至 40°C (McAfee 等, *Biochemistry* (生物化学)34:10063-10077,1995;Gao 等, *Nat. Struct. Biol.* (自然结构生物学)5(9):782-786,1998)。这些蛋白及其同源物典型地被认为在高温下参与稳定化基因组 DNA。适合用于本发明的 Sso7d- 样 DNA 结合结构域可以基于它们与 Sso7d 的序列同源性来修饰。典型地,在约 25 个氨基酸,任选地约 50-100 个氨基酸,或整个蛋白长度的比较窗范围内,与已知 DNA 结合蛋白相同或基本相同的 DNA 结合结构域可以用于本发明中。序列可以在比较窗,或如使用一种所述比较运算法则或通过手工比对和视觉观察测量的指定区域范围内比较和比对以获得最大对应性。在一些实施方案中,DNA 聚合酶包含 SEQ ID NO:3 或其基本(例如,至少 60%,70%,80%,90%,95%)相同序列。Sso7 结合结构域中的多种突变已经记述在例如,美国专利申请号 2005/0048530 和 2007/0141591。

[0151] Hmf- 样蛋白是古细菌组蛋白,其在氨基酸序列和结构方面与真核 H4 组蛋白共享同源性,认为真核 H4 组蛋白与 DNA 直接相互作用。Hmf 蛋白家族在溶液中形成稳定的二聚体,并已经由热稳定物种(例如,炽热甲烷嗜热菌(*Methanothermus fervidus*)和热球菌(*Pyrococcus*)菌株 GB-3a)识别了若干 Hmf 同源物。Hmf 蛋白家族,一旦与 Taq DNA 聚合酶或任何具有低固有持续合成能力的 DNA 修饰酶连接时,可以提高该酶沿 DNA 底物滑动的能力并由此增加其持续合成能力。例如,二聚体 Hmf- 样蛋白可以与 Taq DNA 聚合酶共价,例如,通过化学修饰连接,并由此提高聚合酶的持续合成能力。

[0152] 某些螺旋-发夹-螺旋基序已经显示与 DNA 非特异性结合并提高与其融合的 DNA 聚合酶的持续合成能力 (Pavlov 等, Proc Natl Acad Sci USA. (美国国家科学院学报) 99: 13510-5, 2002)。

[0153] 适合用于本发明的另外的 DNA 结合结构域可以通过与已知 DNA 结合蛋白的同源性和/或通过交叉反应性来识别, 或可以通过生物化学测定手段来发现。DNA 结合结构域可以使用本文中所述的和本领域中已知的技术来合成或分离。

[0154] 用于本发明的序列非特异性双链核酸结合结构域也还使用与已知核酸结合结构域结合的抗体, 包括但不限于多克隆抗体, 通过交叉反应性来识别。多克隆抗体使用本领域中普通技术人员公知的方法来生成 (参见, 例如, Coligan, Current Protocols in Immunology (当前免疫学方案) (1991); Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual (抗体, 实验室手册) (1988))。作为免疫学交叉反应性结合蛋白的那些蛋白可以然后通过多种测定法来检测。为了描述可以使用的不同形式和条件, 参见, 例如, Methods in Cell Biology: Antibodies in Cell Biology (细胞生物学方法: 细胞生物学抗体), 卷 37 (Asai, 编 1993), Coligan, 见上文, 和 Harlow & Lane, 见上文。

[0155] 关于与双链核酸的结合的特异性可以多种本领域中普通技术人员已知的测定来测试。这些包括诸如例如滤器结合测定或凝胶移动测定。例如, 在滤器结合测定中, 待评估与双链 DNA 结合活性的多肽与放射性标记的 DNA, 双链或单链, 在适当的缓冲液中与预混合。混合物通过保留蛋白和蛋白-DNA 复合物的膜 (例如硝化纤维) 来过滤。保留在滤器上的 DNA 量表示与蛋白结合的量。结合可以通过竞争分析来量化, 其中标记的 DNA 的结合受到添加增加量的未标记的 DNA 的竞争。以比单链 DNA 10- 倍或更高亲和性结合双链 DNA 的多肽在本文中定义为双链 DNA 结合蛋白。备选地, 结合活性可以通过凝胶移动测定来测定, 其中放射性标记的 DNA 与测试多肽一起温育。蛋白-DNA 复合物将以比未结合的 DNA 更慢地移动通过凝胶, 由此导致移动的条带。结合量通过以下步骤来评估: 使用增加量的双链或单链未标记 DNA 温育样品和量化移动的条带中的放射性量。

[0156] 适合用于本发明的结合结构域以不依赖序列的方式结合双链核酸, 即, 本发明的结合结构域以显著的亲和性结合双链核酸, 但不存在以比具有相同核苷酸组成但不同核酸序列的另一核酸超过 100 倍更高的亲和性结合该结构域的已知核酸。非特异性结合可以利用与关于确定双链 vs. 单链核酸 结合所述的类似的方法来测定。滤器结合测定或凝胶迁移移动测定可以如上利用相同核酸组成但不同核酸序列的竞争 DNA 来进行, 以确定结合的特异性。

[0157] 用于本发明的序列非特异性双链核酸结合结构域也可以例如通过测定双链结合结构域增加修饰酶的持续合成能力或效率或增加核酸双链体稳定性至少 1°C 的能力来评估。

[0158] 本发明的结合结构域还通过通过直接评估所述结构域稳定化双链核酸构象的能力来识别。例如, 引物-模板构建体的解链曲线可以在存在或不存在蛋白条件下, 通过监测 260nm 处的 DNA 的 UV 吸光度来获得。双链底物的 T_m 可以由解链曲线的中点确定。序列非特异性双链核酸结合蛋白对 T_m 的影响可以然后通过比较在存在修饰的酶的条件下获得的 T_m 和在存在未修饰的酶的条件下获得的 T_m 来确定。(所述蛋白不显著贡献 UV 吸光度, 因为其在 260nm 处具有比 DNA 低得多的消光系数)。可以然后选择将 T_m 增加 1°C, 通常 5°C,

10℃或更多的结构域,以用于本发明。

[0159] 本发明的新型序列非特异性双链核酸结合蛋白也可以通过利用它们的 DNA 结合活性,例如通过在 DNA 纤维素柱上纯化来分离。分离的蛋白可以然后提供常规手段来进一步纯化,测序,并且基因通过常规手段经由 PCR 来克隆。由这些克隆过表达的蛋白可以然后提供任何上述方法来测试。

[0160] 生成本发明的聚合酶

[0161] 本发明的聚合酶通常通过使用化学和 / 或重组方法使聚合酶结构域与 DNA 结合结构域连接来生成。

[0162] 本发明的聚合酶可以使用本领域中已知的技术来生成。用于生成包含聚合酶结构域和核酸结合结构域的聚合酶的方法记述在,例如,美国专利申请公开号 2006/005174 ; 2004/0219558 ; 2004/0214194 ; 2004/0191825 ; 2004/0081963 ; 2004/0002076 ; 2003/0162173 ; 2003/0148330 ; 2003/0138830 和美国专利号 6,627,424 和 7,445,898 中,将其每一篇通过参考整体引入以获得全部目的,特别是获得关于聚合酶、杂合 / 嵌合聚合酶,以及用于制备和使用所述聚合酶的所有方法的所有教导。

[0163] 使 DNA 结合蛋白与聚合酶结构域连接的化学方法记述在,例如, Bioconjugate Techniques(生物缀合技术), Hermanson, 编, Academic Press(科学出版社)(1996) 中。这些包括,例如,以通过蛋白化学领域中公知的方法,直接或通过连接化合物,相互连接两种蛋白为目的的衍生化作用。例如,在一个化学缀合实施方案中,连接催化结构域和 DNA 结合结构域的手段包括异双功能 - 偶联试剂,其最终促进在两个结构部分之间形成分子间二硫键。在该能力方面有效用于本发明的其他类型的偶联试剂记述在,例如,美国专利号 4,545,985 中。备选地,分子间二硫键可以方便地在各结构部分中的半胱氨酸之间形成,其天然地发生或通过遗传改造插入。连接结构部分的手段还可以使用异双功能交联试剂之间的硫醚键或特异性低 pH 可裂解交联剂或特异性蛋白酶可裂解连接体或其他可裂解或不可裂解化学键。

[0164] 连接 DNA 结合结构域,例如, Sso7d, 和聚合酶结构域的方法还可以包括在通过标准肽合成化学或重组手段分别合成的结构部分之间形成的肽键。缀合蛋白本身也可以利用合成完整或部分氨基酸序列的化学方法来生成。例如,肽可以通过固相技术,诸如,例如, Merrifield 固相合成法来合成,其中将氨基酸顺序加入至正在增长的氨基酸链(参见, Merrifield(1963) J. Am. Chem. Soc(美国化学协会杂志), 85 :2149-2146)。自动化合成多肽的设备可商购自供应商诸如 PE Corp. (Foster City, Calif), 并可以根据制造商的说明书来操作。合成的肽可以然后与树脂分裂,并例如通过制备高效液相层析法来纯化(参见 Creighton, Proteins Structures and Molecular Principles(蛋白结构与分子原理), 50-60(1983))。合成的多肽或所述多肽的子片段的组成可以通过氨基酸分析或测序来验证(例如, Edman 降解程序; 参见 Creighton, Proteins, Structures and Molecular Principles(蛋白、结构与分子原理), 第 34-49 页(1983))。

[0165] 在另一个实施方案中, DNA 结合结构域和聚合酶结构域可以通过连接基团来连接。连接基团可以是化学交联剂, 包括, 例如, (N-马来酰亚胺基甲 - 基) - 环己烷 -1- 羧酸琥珀酰亚胺酯 (SMCC)。连接基团还可以是另外的氨基酸序列, 包括, 例如, 聚丙氨酸, 聚甘氨酸或类似地, 连接基团。

[0166] 在一些实施方案中,由此生成的融合蛋白(本文中也称为“杂合”和/或“嵌合的(chimeric)”或“嵌合(chimera)”蛋白)中各多肽的编码序列在其氨基或羧基端通过肽键以任意顺序直接连接。备选地,氨基酸连接体序列可以用于通过足以确保各多肽折叠为二级和三级结构的距离使第一和第二多肽组分分开。利用本领域中公知的标准技术将这样的氨基酸连接体序列引入至融合蛋白中。合适的肽连接体序列可以基于以下因素来选择:(1)它们采取柔性延伸构象的能力;(2)它们不能采取能够与第一和第二多肽上的功能性表位相互作用的二级结构;和(3)缺乏可以与多肽功能性表位相互作用的疏水性或带电残基。典型的肽连接体序列包含 Gly, Ser, Val 和 Thr 残基。其他接近中性的氨基酸,诸如 Ala 也可以用于连接体序列中。可以有效用作连接体的氨基酸序列包括 Maratea 等(1985) *Gene* (基因) 40:39-46;Murphy 等(1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (美国国家科学院学报) 83:8258-8262;美国专利号 4,935,233 和 4,751,180 中公开的那些,将其每一篇通过参考整体引入以获得全部目的,特别是关于连接体的全部教导。连接体序列通常可以是长度为 1-约 50 个氨基酸,例如,长度为 3,4,6,或 10 个氨基酸,但是长度可以为 100 或 200 个氨基酸。当第一和第二多肽具有非必需 N 端氨基酸区时,可以不需要连接体序列,所述非必需 N 端氨基酸区可以用于分离功能性结构域或防止位阻干扰。在一些实施方案中,用于本发明的连接体序列包括根据 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列。

[0167] 其他化学连接体包括糖类连接体、脂质连接体、脂肪酸连接体、聚醚连接体,例如,PEG 等。例如,聚乙二醇连接体可获自 Shearwater Polymers, Inc. Huntsville, Ala。这些连接体任选地具有酰胺键、巯基键、或异双功能键。

[0168] 其他连接 DNA 结合结构域和聚合酶结构域的方法包括通过表达阴性和阳性尾部的离子结合和通过抗体和链霉抗生物素-生物素相互作用的间接结合。(参见,例如, *Bioconjugate Techniques* (生物缀合技术),见上文)。所述结构域也可以通过中间相互作用序列连接在一起。例如, DNA 结合结构域-相互作用序列,即结合特定 DNA 结合结构域(诸如 Sso7d)的序列可以与聚合酶连接。由此生成的融合蛋白可以然后容许与 DNA 结合结构域非共价连接,以生成 DNA-结合-结构域-聚合酶缀合物。

[0169] 如前所述,编码聚合酶或 DNA 结合结构域的核酸可以利用重组遗传学领域中的常规技术来获得。公开本发明中使用的一般方法的基础课本包括 Sambrook 和 Russell, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (分子克隆,实验室手册)(第 3 版 2001);Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (基因转移和表达:实验室手册)(1990);和 *Current Protocols in Molecular Biology* (当前分子生物学方案)(Ausubel 等编., 1994-1999)。这样的核酸还可以通过体外扩增方法诸如本文中和 Berger, Sambrook, 和 Ausubel, 以及 Mullis 等, (1987) 美国专利号 4,683,202; *PCR Protocols A Guide to Methods and Applications* (PCR 流程,方法和应用指导)(Innis 等编) Academic Press Inc. (科学出版社) San Diego (圣地亚哥), 加利福尼亚 (1990) (Innis); Arnheim & Levinson (1990 年 10 月 1 日) *C&EN* 36-47; *The Journal of NIH Research* (NIH 研究杂志) (1991) 3:81-94; Kwok 等 (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (美国国家科学院学报) 86:1173; Guatelli 等 (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (美国国家科学院学报) 87, 1874; Lomell 等 (1989) *J. Clin. Chem.* (临床化学杂志), 35:1826; Landegren 等, (1988) *Science* (科学) 241:1077-1080; Van Brunt (1990) *Biotechnology* (生物技术) 8:291-294;

Wu 和 Wallace(1989)Gene(基因)4:560;和 Barringer 等(1990)Gene(基因)89:117 中记述的那些,将其每一篇通过参考整体引入以获得全部目的,特别是关于扩增方法的全部教导。

[0170] 技术人员应该认识到可以在不消除其生物学活性的条件下,对本发明的聚合酶另外进行修饰。可以进行一些修饰,以促进结构域克隆、表达或引入融合蛋白中。这样的修饰是本领域中技术人员公知的,且包括,例如,在编码结合结构域的多核苷酸任一端添加密码子以提供,例如,在氨基端添加的甲硫氨酸以提供起始位点,或置于任一端上的另外的氨基酸(例如,聚 His)以构建方便定位的限制性位点或终止密码子或纯化序列。

[0171] 本发明的聚合酶可以在多种宿主细胞,包括,大肠杆菌,其他细菌宿主,酵母,丝状真菌,和不同高等真核细胞诸如 COS, CHO 和 HeLa 细胞系和骨髓瘤细胞系中表达。在微生物体基因表达的技术记述在,例如,Smith, Gene Expression in Recombinant Microorganisms(在重组微生物中的基因表达)(Bioprocess Technology(生物处理技术),卷 22), Marcel Dekker, 1994 中。有效用于表达的细菌的实例包括,但不仅限于,埃希氏菌属(Escherichia)、肠杆菌属(Enterobacter)、固氮菌属(Azotobacter)、欧文氏菌属(Erwinia)、杆菌属(Bacillus)、假单胞菌属(Pseudomonas)、克雷伯菌属(Klebsiella)、变形杆菌属(Proteus)、沙门氏菌属(Salmonella)、沙雷氏菌属(Serratia)、志贺氏菌属(Shigella)、根瘤菌属(Rhizobia)、透明颤菌属(Vitreoscilla)、和副球菌属(Paracoccus)。有效用作表达宿主的丝状真菌包括,例如,以下属:曲霉属(Aspergillus),木霉属(Trichoderma),链孢霉属(Neurospora),青霉属(Penicillium),头孢菌属(Cephalosporium),绵霉属(Achlya),柄孢壳菌属(Podospora),毛霉菌属(Mucor),旋孢腔菌属(Cochliobolus),和 Pyricularia。参见,例如,美国专利号 5,679,543 和 Stahl 和 Tudzynski 编., Molecular Biology in Filamentous Fungi(丝状真菌分子生物学), John Wiley & Sons, 1992。酵母中异源蛋白的合成是公知的且记述在文献中。Methods in Yeast Genetics(酵母遗传学方法), Sherman, F., 等, Cold Spring Harbor Laboratory(冷泉港实验室), (1982) 是公认的描述可用于在酵母中生成酶的不同方法的作品。

[0172] 存在许多本领域中技术人员公知的用于生成本发明的聚合酶多肽的表达系统。(参见,例如, Gene Expression Systems(基因表达系统), Fernandex 和 Hoeffler 编. Academic Press(科学出版社), 1999; Sambrook 和 Russell, 见上文;和 Ausubel 等, 见上文.)。典型地,将编码不同多肽的多个核酸置于启动子的控制下,所述启动子在所需宿主细胞中起作用。许多不同的启动子是本领域中技术人员可获得的并已知的,且可以用于本发明的表达载体中,这取决于具体的应用。一般地,所选的启动子取决于其中所述启动子将具有活性的细胞。还任选地包括其他表达控制序列诸如核糖体结合位点、转录终止位点等。包括这些控制序列中的一个或多个的构建体称为“表达盒”。因此,引入编码连接的多肽的核酸,以在所需宿主细胞中获得高水平表达。

[0173] 适合用于特殊宿主细胞中的表达控制序列通常通过克隆在该细胞中表达的基因来获得。常用的原核控制序列,其在本文中定义为包括用于转录起始的启动子,任选地,与操纵子一起,连同核糖体结合位点序列,包括这样的常用启动子,如 β -内酰胺酶(青霉素酶)和乳糖(lac)启动子系统(Change 等, Nature(自然)(1977)198:1056),色氨酸(trp)启动子系统(Goeddel 等, Nucleic Acids Res.(核酸研究)(1980)8:4057), tac 启动子

(DeBoer, 等, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (美国国家科学院学报) (1983) 80 :21-25) ;和 λ - 来源的 PL 启动子和 N- 基因核糖体结合位点 (Shimatake 等, Nature (自然) (1981) 292 :128)。特殊的启动子系统对于本发明不是关键的, 可以使用任何可获得的在原核生物中起作用的启动子。标准细菌表达载体包括质粒诸如基于 pBR322 的质粒, 例如, pBLUESCRIPT™, pSKF, pET23D, λ - 噬菌体来源的载体, 和融合表达系统诸如 GST 和 LacZ。还可以将表位标签添加至重组蛋白, 以通过方便的分离方法, 例如, c-myc, HA-tag, 6-His (SEQ ID NO :46) 标签, 麦芽糖结合蛋白, VSV-G 标签, 抗 -DYKDDDDK (SEQ ID NO :47) 标签, 或任何这样的标签, 其中很多是本领域中技术人员公知的。

[0174] 为了在除大肠杆菌以外的原核细胞中表达, 需要在特殊原核物种中起作用的启动子。这样的启动子可以获自己已经有该物种克隆的基因, 或可以使用异源启动子。例如, 除大肠杆菌外, 杂合 trp-lac 启动子还在杆菌属物种 (*Bacillus* sp.) 中起作用。这些和其他合适的细菌启动子是本领域中公知的, 且记述在, 例如, Sambrook 等和 Ausubel 等中。用于表达本发明蛋白的细菌表达系统可以在例如, 大肠杆菌, 杆菌属物种, 和 *Salmonella* (Palva 等, Gene (基因) 22 :229-235 (1983) ;Mosbach 等, Nature (自然) 302 :543-545 (1983) 中获得。用于这样的表达系统的试剂盒可商购。

[0175] 用于哺乳动物细胞、酵母、和昆虫细胞的真核表达系统是本领域中公知的, 且也是可商购的。在酵母中, 载体包括酵母整合质粒 (例如, YIp5) 和酵母复制质粒 (Yrp 系列质粒) 和 pGPD-2。包含两种真核病毒的调节元件的表达载体典型地用于真核表达载体, 例如, SV40 载体, 乳头瘤病毒载体, 和源自 EB 病毒的载体中。其他示范性真核载体包括 pMSG, pAV009/A+, pMT010/A+, pMAMneo-5, 杆状病毒 pDSVE, 和容许在 CMV 启动子, SV40 早期启动子, SV40 晚期启动子, 金属硫蛋白启动子, 鼠类乳腺肿瘤病毒启动子, 劳氏肉瘤病毒启动子, 多角体蛋白启动子, 或显示出对在真核细胞中表达有效的其他启动子的指导下表达蛋白的任何其他载体。

[0176] 组成性或调节性启动子可以用于本发明中。调节性启动子可以是有利的, 因为在诱导融合多肽表达前宿主细胞可以生长至高密度。异源蛋白的高水平表达在一些情形中延缓细胞生长。诱导型启动子是在可通过环境或发育因素诸如, 例如, 温度、pH、无氧或有氧条件、光、转录因子和化学制品改变表达水平的情况下指导基因表达的启动子。

[0177] 关于大肠杆菌和其他细菌宿主细胞, 诱导型启动子是本领域中技术人员已知的。这些包括, 例如, lac 启动子, 噬菌体 λ P_L 启动子, 杂合 trp-lac 启动子 (Amann 等 (1983) Gene (基因) 25 :167 ;de Boer 等 (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA (美国国家科学院学报) 80 :21), 和噬菌体 T7 启动子 (Studier 等 (1986) J. Mol. Biol. (分子生物学杂志) ;Tabor 等 (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA (美国国家科学院学报) 82 :1074-8)。这些启动子及其应用也在 Sambrook 等, 见上文中讨论。

[0178] 翻译偶联可以用于增强表达。该策略使用源自对翻译系统天然的高度表达基因的短上游可读框, 其置于启动子的下游, 和核糖体结合位点, 及随后相隔几个氨基酸密码子的终止密码子。紧挨着终止密码子之前是第二核糖体结合位点, 且终止密码子之后是用于起始翻译的起始密码子。该系统溶解 RNA 中的二级结构, 容许翻译的有效起始。参见 Squires, 等 (1988), J. Biol. Chem. (生物化学杂志) 263 :16297-16302。

[0179] 多核苷酸构建体的构造一般需要使用能够在细菌中复制的载体。这样的载

体常用于本领域中。可商购许多试剂盒,以纯化来自细菌的质粒(例如,EasyPrep™, FlexiPrep™,来自 Pharmacia Biotech(药物生物技术);StrataClean™,来自 Stratagene;和, QIAexpress®表达系统, Qiagen)。分离的和纯化的质粒可以然后进一步操作,以生成其他质粒,并用于转化细胞。

[0180] 本发明的多肽可以在细胞内表达,或可以由细胞分泌。细胞内表达通常导致高产率。如果需要,可溶的活性融合多肽的量可以通过执行再折叠程序来增加(参见,例如, Sambrook 等,见上文.;Marston 等, Bio/Technology(生物/技术)(1984)2:800;Schoner 等, Bio/Technology(生物/技术)(1985)3:151)。本发明的多肽可以在多种宿主细胞,包括大肠杆菌,其他细菌宿主、酵母和不同高等真核细胞诸如 COS, CHO 和 HeLa 细胞系和骨髓瘤细胞系中表达。所述宿主细胞可以是哺乳动物细胞、昆虫细胞、或微生物,诸如,例如,酵母细胞、细菌细胞、或真菌细胞。

[0181] 一旦表达,所述多肽可以根据本领域的标准程序,包括硫酸铵沉淀、亲和柱、柱层析、凝胶电泳等来纯化(参见,一般地, R. Scopes, Protein Purification(蛋白质纯化), Springer-Verlag, N. Y. (1982), Deutscher, Methods in Enzymology(酶学方法)卷 182: Guide to Protein Purification.(蛋白质纯化指导), Academic Press, Inc.(科学出版社)N. Y. (1990))。至少约 90-95%的同质性的基本纯组成是优选的,且 98-99%以上的同质性是最优选的。一旦部分地纯化或如果需要,纯化至同质,则可以然后使用所述多肽(例如,作为用于抗体生成的免疫原)。

[0182] 为了促进本发明的多肽的纯化,编码所述多肽的核酸还可以包括关于表位或“标签”的编码序列,关于所述表位或“标签”可以获得亲和和结合试剂。合适的表位的实例包括 myc 和 V-5 报告基因;有效用于重组生成具有这些表位的融合多肽的表达载体是可商购的(例如, Invitrogen(Carlsbad 加利福尼亚)载体 pcDNA3.1/Myc-His 和 pcDNA3.1/V5-His 适合于在哺乳动物细胞中表达)。适合于使标签与本发明的融合蛋白连接的另外的表达载体和相应的检测系统是本领域中技术人员已知的,且许多是可商购的(例如, FLAG™(Kodak, Rochester N. Y.))。合适的标签的另一个实例是聚组氨酸序列,其能够结合金属螯合的亲合配体。典型的,使用 6 个相邻的组氨酸(SEQ ID NO:46),尽管人们可以使用多于或少于 6 个。可以担当聚组氨酸标签的结合结构部分的合适金属螯合亲和配体包括次氨基三乙酸(NTA)(Hochuli, E. (1990) "Purification of recombinant proteins with metal chelating adsorbents(使用金属螯合吸附剂纯化重组蛋白)", 在 Genetic Engineering: Principles and Methods(遗传工程:原理和方法), J. K. Setlow, 编, Plenum Press, N. Y.; 可商购自 Qiagen(Santa Clarita, 加利福尼亚))。

[0183] 本领域中技术人员应该认识到在生物表达或纯化后,聚合酶肽可以具有与组成性多肽的天然构象基本不同的构象。在该情形中,可能必须或需要变性和还原多肽并然后导致多肽再折叠为优选的构象。还原和变性蛋白和诱导再折叠的方法是本领域中技术人员公知的(参见, Debinski 等 (1993) J. Biol. Chem. (生物化学杂志) 268:14065-14070; Kreitman 和 Pastan(1993) Bioconjug. Chem. (生物缀合化学) 4:581-585; 和 Buchner 等 (1992) Anal. Biochem. (分析生物化学) 205:263-270)。Debinski 等,例如,描述在胍-DTE 中变性和还原内含体蛋白。蛋白然后在含有氧化的谷胱甘肽和 L-精氨酸的氧化还原缓冲液中再折叠。

[0184] 热起始方法

[0185] 在一些实施方案中,本发明的杂合聚合酶用于核酸扩增方法,特别地定量PCR(qPCR)方法中。在这样的扩增方法中,使用“热起始”方法可以有益于减少在环境温度下的引物二聚体和非特异性扩增产物的产生。已知许多热起始方法。这些包括物理分开聚合酶,使用核酸添加剂来抑制低温下的延伸反应,和对聚合酶活性位点进行修饰。通常,可能需要使用“热起始”聚合酶。在热起始聚合酶中,分子典型地在活性位点处与所述酶结合,以抑制低温下的聚合酶活性。在高温(例如,在95℃)下除去该分子,以容许聚合酶在该过程的需要点起作用。所述分子可以是一种或多种抗体、肽、或小有机分子。例如,热起始可以利用以抑制性方式在环境温度下以高亲和性结合聚合酶的一种或多种抗体来实现。该复合物在高温预热步骤中解离。

[0186] 聚合酶还可以化学修饰,以进行热起始。将易热分解的封闭基团引入至聚合酶中,这致使该酶在室温下失活。在循环前,在高温下去除这些封闭基团,以使得所述酶被激活。易热分解的修饰包括使柠康酐或顺式乌头酸酐(aconitric anhydride)与该酶的赖氨酸残基偶联,是本领域中已知的,参见例如,美国专利号5,677,152,将其通过参考整体引入本文以获得所有目的,特别是获得关于热起始方法的全部教导。

[0187] 美国专利申请公开号2003/0119150也公开了使用热稳定外切核酸酶和聚合酶的热起始PCR的概念。该方法基于通过在至少一种引物的3'末端引入化学修饰来防止低温下引物延伸。使用在环境温度或更低温度下失活的热稳定外切核酸酶。随着温度增加,该外切核酸酶变为具有活性的并能够去除引物的3'修饰,从而使其能够参与扩增反应。U.S. 20030119150,其通过参考整体引入本文以获得所有目的,特别是获得关于热起始方法的全部教导,进一步教导当杂交探针用于实时监测,例如TaqMan杂交探针,分子信标(Molecular Beacon)寡核苷酸,或两寡核苷酸杂交方法时,热稳定外切核酸酶III的存在需要关于检测探针的3'末端的合适封闭方法,以避免3'消化。

[0188] 热起始抗体

[0189] 在本发明的某些实施方案中,使用单克隆抗体来为本发明的杂合聚合酶提供热起始特性。

[0190] 在一方面,本发明提供用于生成和筛选针对本发明杂合聚合酶,特别是表现出5'至3'聚合酶活性和3'至5'外切核酸酶活性二者的那些聚合酶的合适抗体的方法。关于所述聚合酶,使用可以有效抑制杂合聚合酶的聚合酶和外切核酸酶活性之一或二者的一种或多种抗体可以是有益的。本发明这一方面使用的抗体的重要特性包括对于聚合酶的结合亲和性以及封闭聚合酶和/或外切核酸酶活性的能力。

[0191] 热起始抗体增加扩增反应的特异性,因为它们致使聚合酶在室温下失活,由此避免非特异性复性的引物或引物二聚体的延伸。聚合酶的功能活性通过使抗体与聚合酶解离来恢复,其一般通过高温下温育进行。在一些实施方案中,所述“高温”是约90℃-约99℃,约2-10分钟。应该理解,温育以解离抗体和激活聚合酶的温度和时间可以根据已知的参数而变化,从而在这些热起始方法中提供最有效的激活聚合酶的方法。

[0192] 用于筛选用于本发明中的抗体的方法包括本领域中已知的方法,诸如基于亲和性的ELISA测定,以及用于聚合酶和/或外切核酸酶抑制的功能性测定。关于所述功能性测定,可以将产生的或消化的DNA量/单位时间与所用聚合酶或外切核酸酶的活性相关联,由

此提供特定抗体可以对所述聚合酶的聚合酶和外切核酸酶活性之一或二者所施加的抑制量的评估。

[0193] 在一方面,本发明提供结合聚合酶包括但不限于包含 SEQ ID NO:2 的聚合酶的抗体。在一些实施方案中,所述抗体抑制 DNA 聚合酶活性,和 / 或,当存在时,抑制 3' -5' 外切核酸酶活性。在一些实施方案中,所述抗体在测量外切核酸酶活性的情形中,抑制包含 SEQ ID NO:2 但位置 141 是 D 且 143 是 E 的聚合酶的 DNA 聚合酶和 / 或 3' -5' 外切核酸酶活性,但是不显著抑制 Taq 聚合酶的相同聚合酶活性。在一些实施方案中,所述抗体抑制 DNA 聚合酶的 DNA 聚合酶和 / 或外切核酸酶活性至少 80% 或 90%,但是不抑制 Taq 聚合酶的 DNA 聚合酶活性超过 15%。四种示范性抗体以及与它们的重链和轻链可变区相关的序列信息,包括全部 CDR 序列在本文中提供。在一些实施方案中,本文中所述的抗体与聚合酶复合。

[0194] 在一些示范性实施方案中,用于本发明中的热起始抗体包括具有与 SEQ ID NOs:10-13 中任一项具有约 75%,80%,85%,90%,94%,95%,96%,97%,98%,99% 或 100% 序列同一性的核苷酸序列的轻链可变区。所述单克隆抗体在进一步的示范性实施方案中,可以包括具有与 SEQ ID NOs:6-9 中任一项具有约 75%,80%,85%,90%,94%,95%,96%,97%,98%,99% 或 100% 序列同一性的核苷酸序列的重链可变区。所述单克隆抗体在进一步的示范性实施方案中,包括具有与 SEQ ID NOs:14-17 中任一项具有约 75%,80%,85%,90%,94%,95%,96%,97%,98%,99% 或 100% 序列同一性的氨基酸序列的重链可变区和 / 或具有与 SEQ ID NOs:18-21 中任一项具有约 75%,80%,85%,90%,94%,95%,96%,97%,98%,99% 或 100% 序列同一性的氨基酸序列的轻链可变区。

[0195] 在一些实施方案中,提供抗体,其包含如下包含 CDR1, CDR2, 和 CDR3 的重链可变区:分别地 SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, 和 SEQ ID NO:24 和 / 或如下包含 CDR1, CDR2, 和 CDR3 的轻链可变区:分别地 SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, 和 SEQ ID NO:27。在一些实施方案中,抗体包括:包含 SEQ ID NO:14 的轻链可变区和 / 或包含 SEQ ID NO:18 的重链可变区。在一些实施方案中,包含本段中所述的 CDR 的抗体与本申请中描述的另一种抗体组合使用,由此抑制 DNA 聚合酶中的聚合酶活性。例如,在一些实施方案中,本段中如上所述的抗体与这样的抗体组合,所述这样的抗体包含如下包含 CDR1, CDR2, 和 CDR3 的重链可变区:分别地 SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, 和 SEQ ID NO:36 和 / 或如下包含 CDR1, CDR2, 和 CDR3 的轻链可变区:分别地 SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, 和 SEQ ID NO:39。

[0196] 在一些实施方案中,提供抗体,其包含如下包含 CDR1, CDR2, 和 CDR3 的重链可变区:分别地 SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, 和 SEQ ID NO:30 和 / 或如下包含 CDR1, CDR2, 和 CDR3 的轻链可变区:分别地 SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, 和 SEQ ID NO:33。在一些实施方案中,抗体包括:包含 SEQ ID NO:15 的轻链可变区和 / 或包含 SEQ ID NO:19 的重链可变区。本发明人已经发现包含上述 CDR 的抗体特别有效抑制包含 3' -5' 外切核酸酶活性的聚合酶中的所述活性。在一些实施方案中,包含本段中所述的 CDR 的抗体与本申请中描述的另一种抗体组合使用,由此抑制聚合酶和 / 或 3' -5' 外切核酸酶活性。例如,在一些实施方案中,本段中如上所述的抗体与这样的抗体组合,所述这样的抗体包含如下包含 CDR1, CDR2, 和 CDR3 的重链可变区:分别地 SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, 和 SEQ ID NO:24 和 / 或如下包含 CDR1, CDR2, 和 CDR3 的轻链可变区:分别地 SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26,

和 SEQ ID NO :27。

[0197] 在一些实施方案中,提供抗体,其包含如下包含 CDR1, CDR2, 和 CDR3 的重链可变区:分别地 SEQ ID NO :34, SEQ ID NO :35, 和 SEQ ID NO :36 和 / 或如下包含 CDR1, CDR2, 和 CDR3 的轻链可变区:分别地 SEQ ID NO :37, SEQ ID NO :38, 和 SEQ ID NO :39。在一些实施方案中,抗体包括:包含 SEQ ID NO :16 的重链可变区和 / 或包含 SEQ ID NO :20 的轻链可变区。在一些实施方案中,抗体包括:包含 SEQ ID NO :17 的重链可变区和 / 或包含 SEQ ID NO :21 的轻链可变区。

[0198] 本发明还提供编码蛋白(包括但不限于其抗原片段的抗体)的多核苷酸,其包含如上所述的任意重链或轻链的 1、2、或 3 个 CDR。在一些实施方案中,编码的蛋白包括重链或轻链可变区,例如如 SEQ ID NOs :14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 或 21 任一项所述。在一些实施方案中,所述蛋白包含另外的抗体成分,并且中一些情形中,是完整抗体重链或轻链。在一些实施方案中,本发明提供包含上述多核苷酸的表达盒或载体,以及包含所述表达盒或载体的宿主细胞(包括但不限于细菌、真菌、酵母、昆虫或哺乳动物细胞)。

[0199] 本文中所述的抗体有效用于,例如,“热起始”扩增或其他反应。因此,在一些实施方案中,它们以试剂盒提供,任选地还包括 DNA 或 RNA 聚合酶或用于核酸扩增的其他试剂。

[0200] 用于提高扩增反应效率的添加剂

[0201] 在某些方面,可能需要包括另外的化合物作为添加剂来提高扩增反应,包括但不限于 qPCR 中的效率。包括添加剂的扩增反应可以包括包含具有或缺乏 3' -5' 外切核酸酶活性和任选地包括异源 DNA 结合结构域的聚合酶的混合物。在一些实施方案中,与缺乏添加剂的对照混合物相比,包含添加剂足以增加聚合酶效率至少 5, 10, 15, 20, 25, 35, 40, 或 50% 或更多。

[0202] 在一些实施方案中,本发明的聚合酶在用于包括某些结合染料(诸如,在一个非限制性实例, EvaGreen DNA 结合染料)的制剂中时,表现出对于某些靶标的低效率。所述低效率中一些实施方案中,可以导致与低输入 DNA 浓度相关的 Ct 值延迟。用于测量特定反应的效率的方法是本领域中已知的并在下文中更详细地描述。

[0203] 在一些实施方案中,所述添加剂是包括在本发明的扩增反应中的渗透剂(osmolyte),以提高效率。渗透剂家族的成员已经显示出提高蛋白的热稳定性(Santoro, Biochemistry(生物化学), 1992) 以及降低 DNA 双螺旋稳定性(Chadalavada, FEBS Letters(FEBS 书信), 1997)。在一些实施方案中,渗透剂是小分子或化合物,其通过有生命的生物体应答环境压力诸如极端温度、脱水、或盐度而产生并且保护它们的细胞成分并帮助维持最佳胞质条件。用于本发明中的渗透剂可以包括但不限于肌氨酸,三甲胺 N-氧化物(TMAO), 二甲基磺基丙酯, 和三甲基甘氨酸。肌氨酸化学上类似甜菜碱,即一种已经显示出改善常规 PCR 的化学制品(Henke, Nucleic Acids Research(核酸研究), 1997)。

[0204] 在渗透剂的常规应用中,该化合物的稳定作用一般在相对高浓度(> 1M)下观察到。然而,在本发明的方法中,已经发现毫摩尔浓度的渗透剂有效提高扩增反应诸如 qPCR 的反应效率。在不受作用机制束缚的条件下,效率的提高可能是提高含有低浓度输入 DNA 样品的反应中的 DNA 聚合酶与 DNA 模板靶向区域的易接近性的结果。在一些实施方案中,浓度为约 100- 约 1000mM 的渗透剂用于本发明的方法和试剂盒中。在其他实施方案中,浓度为约 50- 约 700, 约 100- 约 600, 约 150- 约 500, 约 200- 约 400mM, 和约 300- 约 350mM 的

渗透剂用于本发明的方法和试剂盒中。在一些实施方案中,本发明的方法、反应混合物、和试剂盒中使用的渗透剂是肌氨酸(任选地,处于以上列出的浓度)。如图1中所示,与缺乏肌氨酸的对照相比,加入肌氨酸提高扩增反应的效率。

[0205] 在一些实施方案中,特别是在低拷贝靶核酸的扩增中,效率降低,这归因于聚合酶与非引物双链核酸靶标的结合。聚合酶与双链靶标的结合会阻止那些靶标变性,与引物杂交,和经历扩增反应。为了提高聚合酶与引物模板的特异性,在一些实施方案中,本发明的方法利用肝素。肝素分子,其带负电,可以包括在反应混合物中,以模拟双链核酸的静电特性。加入肝素可以,在不受作用机制的限制性下,阻止过量聚合酶与双链模板结合直至单链引物模板可以使用。在一些示范性实施方案中,肝素以约 50- 约 750pg/ μ l 的浓度用于本发明的方法和试剂盒中。在其他示范性实施方案中,肝素以约 75- 约 700, 约 100- 约 600, 约 125- 约 500, 约 150- 约 400, 约 175- 约 300, 和约 200- 约 250pg/ μ l 的浓度用于本发明的方法和试剂盒中。本领域中已知的其他分子可以类似的方式用于阻止聚合酶与非引物双链模板的非特异性结合。

[0206] 利用本发明的组合物的扩增反应

[0207] 如本文中所讨论地,本发明提供用于核酸扩增反应中的不同组合物,其包括聚合酶、热起始抗体和反应添加剂。所述扩增反应包括但不限于聚合酶链式反应(PCR), DNA 连接酶链式反应(LCR), QBeta RNA 复制酶,和基于转录的(诸如 TAS 和 3SR) 扩增反应以及本领域中技术人员已知的其他反应。可以利用本文中所述的组合物进行的聚合酶链式反应包括但不限于反转录 PCR(rt-PCR) 和定量 PCR(qPCR)。

[0208] 如应该理解地,本文中所述的不同成分的任意组合属于本发明,利用本发明的不同成分的任意组合的扩增反应也属于本发明。例如,本发明的扩增反应可以利用包含一个或多个去除或完全消除外切核酸酶活性,特别是 3'-5' 外切核酸酶活性的突变的杂合聚合酶。所述扩增反应可以进一步利用与热起始抗体组合的所述突变杂合聚合酶。本发明的一些扩增反应可以利用这样的突变杂合聚合酶,其包含与添加剂诸如肌氨酸或肝素组合的 D141A/E143A 双点突变。本发明的一些扩增反应还可以利用与热起始抗体和与添加剂诸如肌氨酸或肝素组合的缺乏 3'-5' 外切核酸酶活性的突变杂合聚合酶。其他组合容易地由本领域中技术人员利用本文中提供的公开内容来确定。

[0209] 扩增反应,诸如聚合酶链式反应(PCR) 方法,在当本发明的组合物是该反应的成分时,显示出提高的效率和特异性。典型地,如本文中讨论的“效率”通过中给定反应条件下生成的产物量来表示。例如,在有效的实时 PCR 反应中,PCR 产物应该在每个循环中加倍。如本领域中已知地,不同类型的扩增反应的效率可以利用不同的方法来计算。例如,PCR 的指数扩增通常利用以下等式来确定

$$[0210] \quad X_n = X_0 * (1 + E_x)^n, \quad (I)$$

[0211] 其中, X_n 是循环 n 中靶分子数, X_0 是起始靶分子数, 且 E_x 是靶标扩增的效率且 n 是循环数。

[0212] 用于本发明某些方面的效率和特异性的改善可以利用本领域中已知的和在下文中进一步详述的测定法来确定和量化。

[0213] 在一些实施方案中,可以使用基于染料的 qPCR 检测方法监测利用本发明成分的扩增反应。这样的检测方法一般依赖于监测由于 DNA 结合染料与扩增的 DNA 的结合而引

起的荧光信号增加。例如, SYBR Green I, 即一种常用的荧光 DNA 结合染料, 结合所有双链 DNA 并且通过测量整个循环中荧光增加来监测检测。SYBR Green I 分别具有 494nm 和 521nm 的激发和发射最大量。

[0214] 在其他实施方案中, 使用基于探针的 qPCR 检测方法监测利用本发明成分的扩增反应。这样的检测方法一般依赖于所需 PCR 产物的序列特异性检测。与检测全部双链 DNA 的基于染料的 qPCR 方法不同, 基于探针的 qPCR 利用荧光标记的靶标特异性探针, 其检测扩增 DNA 中的特定序列。

[0215] Ct 确定

[0216] 在利用双标记的荧光团探针 (诸如来自 Applied Bio Systems (应用生物系统) 的 TaqMan® 探针) 的 qPCR 应用中, 在反应过程中由 5' -3' 外切核酸酶活性生成的裂解产物的量基于循环阈值 (Ct) 来确定, 所述循环阈值 (Ct) 表示生成可检测量的 DNA 所需的循环数。在利用双标记的荧光团探针 (诸如来自 Applied Bio Systems (应用生物系统) 的 TaqMan® 探针) 的 qPCR 应用中, 生成的裂解产物的量通过染料的荧光性来监测, 所述染料通过聚合酶的 5' 外切核酸酶活性由荧光团探针释放。生成可检测量的 DNA 所需的循环数, 如通过染料荧光性监测地, 称为循环阈值 (Ct)。当形成的扩增子增加时, 信号强度增加至可测量的水平, 且当反应进入非对数期时, 在以后的循环中达到稳定水平。通过对反应对数期过程中的信号强度对比循环数作图, 可以推断获得可测量信号的特定循环, 并可以将其用于计算开始 PCR 前靶标的量。确定 Ct 的示范性方法记述在, 例如, Heid 等 Genome Methods (基因组方法) 6 :986-94, 1996 中。Ct 值代表生成可检测量的 DNA (“可检测” 量的 DNA 典型地是高于本底 2x, 5x, 10x, 100x 或更多倍) 所需的循环数。有效的聚合酶可能能够通过更紧密地接近 PCR 的理论最大扩增效率, 而以较小数量的循环产生可检测量的 DNA。因此, 对于给定量的输入 DNA 模板, 较低 Ct 值反映酶的较大扩增效率。

[0217] 评价持续合成能力和效率的测定法

[0218] 聚合酶持续合成能力可以通过本领域中技术人员已知的多种方法来测量。聚合酶持续合成能力一般定义为在修饰酶与引物模板的单个结合事件过程中引入的核苷酸数。例如, 5' FAM- 标记的引物复性为环状或线性化 DNA, 以形成引物模板。在测量持续合成能力中, 引物模板通常以比聚合酶显著摩尔过量的量存在, 以使得通过最小化聚合酶使任何引物模板延伸超过一次。因此, 引物模板以比率诸如约 4000 : 1 (引物 DNA : DNA 聚合酶) 与聚合酶中存在缓冲液和 dNTPs 的条件下混合。加入 MgCl₂, 以开始 DNA 合成。开始后样品在不同时刻猝灭, 并在测序凝胶上分析。在这样的聚合酶浓度下, 其中中间产物长度不随时间和聚合酶浓度而变化, 所述长度对应于该酶的持续合成能力。本发明的聚合酶的持续合成能力然后与野生型酶的持续合成能力进行比较。

[0219] 持续合成能力的提高可以反映在聚合酶盐灵敏性的降低。在一些实施方案中, 本发明的聚合酶在其持续合成能力提高时, 耐受较高盐浓度, 这归因于 dsDNA 结合结构域的存在。例如, 可以进行 PCR 分析来确定与野生型聚合酶相比, 在利用本发明的聚合酶在具有不同盐浓度的反应混合物中的反应中获得的产物量。尽管这两种酶在 50mM KCl 时, 可以生成相似量的产物, 但是预期本发明的聚合酶在较高 KCl 浓度, 例如 80mM, 100mM, 等时胜过野生型聚合酶。

[0220] 效率可以通过测量酶生成产物的能力来证明。增加的效率可以通过测量酶生成

产物能力的增加来证明。这样的分析测量通过确定反应中获得的产物量间接测量双链核酸双链体的稳定性。例如,可以使用 PCR 测定来测量使用短,例如长度为 12,或 18-20 个核苷酸的,在升高的温度,例如 50°C 下复性的引物获得的 PCR 产物量。在该分析中,提高效率通过修饰的或改善的聚合酶在使用在 50°C 复性的短引物的 PCR 反应中比中相同条件下野生型聚合物产生更多的产物来显示。

[0221] 长 PCR 可以用作证明提高的持续合成能力和效率的另一种方法。例如,具有提高的持续合成能力和效率的酶典型地容许与具有相对较低持续合成能力和效率的酶相比,以更短的延伸时间扩增长扩增子 (> 5kb)。

[0222] 评估本发明的聚合酶的效率的其他方法可以由本领域中技术人员利用给定修饰酶的酶活性的标准测定法来确定。

[0223] 引物/模板特异性是酶辨别匹配引物/模板双链体和错配引物/模板双链体的能力。特异性可以例如通过比较两个反应的相对产率来确定,一个反应使用匹配引物,且另一个反应使用错配引物。具有增加辨别力的酶应该与匹配引物具有比与错配引物更高的相对产率,即利用匹配引物的反应对比使用错配引物的反应的产率比为约 1 以上。该比率可以然后与使用野生型聚合酶的平行反应组中获得的产率进行比较。利用本发明的方法和组合物的反应中许多实施方案中,表现出相对于使用野生型聚合酶和/或标准反应条件的反应的至少 2 倍,通常 3 倍或更高的比率增加。

[0224] 本发明的反应混合物

[0225] 本发明还提供反应混合物,其包含本发明的聚合酶、本发明的抗体、本发明的添加剂、或其两种或三种的任意组合。任选地,所述抗体与聚合酶复合。反应混合物可以任选地包含一种或多种 dNTPs,一种或多种寡核苷酸,包含靶核酸的生物学样品,和/或双链 DNA 结合染料。反应混合物可以包括如本文中所述的抗体中的任一种、两种或多种。

[0226] 本发明的试剂盒

[0227] 在一方面,本发明提供用于进行核酸扩增反应的试剂盒。在一些实施方案中,所述试剂盒包括聚合酶,和任选地, dNTPs,和至少一种缓冲液。所述试剂盒还可以包括稳定剂和其他添加剂(例如,肝素和/或肌氨酸),以增加扩增反应的效率。所述试剂盒还可以包括一种或多种引物以及用于利用所述试剂盒的成分进行核酸扩增反应的说明书。

[0228] 在另一方面,本发明提供包括这样的成分的试剂盒,所述成分提高核酸扩增反应的效率和特异性超过使用常规反应条件和反应物进行的反应。这样的另外的成分在本文中描述,并包括但不仅限于杂合聚合酶,热起始抗体和/或添加剂诸如肌氨酸和肝素。

[0229] 在一个实施方案中,本发明的试剂盒包括杂合聚合酶,所述杂合聚合酶在其聚合酶结构域中包含突变,所述突变减小或消除聚合酶的 3' -5' 外切核酸酶活性。在另一个实施方案中,本发明的试剂盒包括具有与 SEQ ID NO :2 基本相同的氨基酸序列的杂合聚合酶。

[0230] 在一些实施方案中,所述聚合酶会与 DNA 结合结构域融合。在一些实施方案中,所述 DNA 结合结构域应该是 Sso 结合结构域。在一些实施方案中,所述 Sso 结合结构域与 SEQ ID NO :3 相同或基本相同。

[0231] 在再一个实施方案中,本发明的试剂盒包括杂合聚合酶,所述杂合聚合酶与一种或多种特定的单克隆抗体复合,以获得“热起始”能力。这样的单克隆抗体在一些示范性

实施方案中可以包括具有与 SEQ ID NOs :10-13 中任一项具有约 75%,80%,85%,90%,94%,95%,96%,97%,98%,99%或 100%序列同一性的核苷酸序列的轻链可变区。这样的单克隆抗体在另一些示范性实施方案中可以包括具有与 SEQ ID NOs :6-9 中任一项具有约 75%,80%,85%,90%,94%,95%,96%,97%,98%,99%或 100%序列同一性的核苷酸序列的重链可变区。这样的单克隆抗体在再一些示范性实施方案中可以包括具有与 SEQ ID NOs :14-17 中任一项具有约 75%,80%,85%,90%,94%,95%,96%,97%,98%,99%或 100%序列同一性的氨基酸序列的重链可变区和 / 或具有与 SEQ ID NOs :18-21 中任一项具有约 75%,80%,85%,90%,94%,95%,96%,97%,98%,99%或 100%序列同一性的氨基酸序列的轻链可变区。

[0232] 在一些实施方案中,所述抗体包括如下包含 CDR1,CDR2,和 CDR3 的重链可变区:分别地 SEQ ID NO :22,SEQ ID NO :23,和 SEQ ID NO :24 和 / 或如下包含 CDR1,CDR2,和 CDR3 的轻链可变区:分别地 SEQ ID NO :25,SEQ ID NO :26,和 SEQ ID NO :27。在一些实施方案中,所述抗体包括如下包含 CDR1,CDR2,和 CDR3 的重链可变区:分别地:SEQ ID NO :28,SEQ ID NO :29,和 SEQ ID NO :30,和 / 或如下包含 CDR1,CDR2,和 CDR3 的轻链可变区:分别地 SEQ ID NO :31,SEQ ID NO :32,和 SEQ ID NO :33。在一些实施方案中,所述抗体包括如下包含 CDR1,CDR2,和 CDR3 的重链可变区:分别地:SEQ ID NO :34,SEQ ID NO :35,和 SEQ ID NO :36,和 / 或如下包含 CDR1,CDR2,和 CDR3 的轻链可变区:分别地 SEQ ID NO :37,SEQ ID NO :38,和 SEQ ID NO :39。

[0233] 在再一个实施方案中,本发明的试剂盒包括最优化的缓冲液 (Tris-HCl,pH 9.0),KCl,(NH₄)₂SO₄,稳定剂,去污剂,dNTPs,MgCl₂,和 DMSO。

[0234] 在再一个实施方案中,本发明的试剂盒包括双链 DNA 结合染料。这样的双链 DNA 结合染料可以包括但不限于:EvaGreen 和 SYBR Green,以及本领域中已知的任何其他双链 DNA 结合染料。

[0235] 在再一个实施方案中,本发明的试剂盒包括用于增加核酸扩增反应的特异性和效率的添加剂。这样的添加剂包括但不限于肌氨酸和肝素。

[0236] 应该理解本发明的试剂盒还包括上述成分的任意组合。

[0237] 在一些方面,本发明的试剂盒包括的说明书应该包括典型扩增方案,其包括以下步骤:

[0238] 95-98°C,约 30 秒至约 2 分钟

[0239] 40 个循环 (95-98°C,约 1 至约 5 秒,60°C,约 1 至约 5 秒,检测步骤)

[0240] 解链循环,约 60°C至约 95°C

[0241] 应该理解,以上示范性方案可以利用本领域中公知的参数来改变,以最优核酸扩增反应,从而最优化不同靶核酸效率和特异性的条件。例如,较长的靶核酸的扩增可能需要较长的温育时间和 / 或较高的温度,以获得有效的特异性扩增。

[0242] 应该理解,本文中所述的实例和实施方案仅是为了举例说明的目的,并且根据它们的不同修饰或改变应该是本领域中技术人员所知的并包括在本申请的精神和范围和所附权利要求的范围内。本文中引用的全部公开文件、专利、和专利申请均通过参考整体引入本文以获得全部目的。

[0243] 实施例

[0244] 实施例 1 : 比较使用具有和不具有外切核酸酶活性的杂合聚合酶的反应中引物 - 二聚体的形成

[0245] 引物二聚体形成的趋势针对两种不同聚合酶进行比较。一种是杂合聚合酶 (A), 其具有 5' - 3' 聚合活性和用于保真的 3' - 5' 外切核酸酶活性二者, 且另一种是突变杂合体 (B), 其包含在不影响聚合酶活性的条件下消除 3' - 5' 外切核酸酶活性的 2 个点突变 (E141A, D143A-SEQ ID NO. 2)。设计四组引物 (a, b, c, d) 来显示引物二聚体形成的不同情形。这四组引物的特征如下:

[0246] (a) 两个引物可以在各引物的接近但非 3' 末端处形成 3 个 G-C 碱基对。

[0247] (b) 不存在基于引物序列的引物 - 引物复性趋势。

[0248] (c) 两个引物可以在 3' 末端处形成 3 个碱基对。

[0249] (d) 两个引物可以在各引物的接近但非 3' 末端处形成 3 个 A-T 碱基对。

[0250] 这些引物对的每一个在具有聚合酶 (A) 或 (B) 的反应缓冲液中, 在 45°C, 预温育 30 分钟, 以促进引物二聚体形成和延伸, 随后进行 qPCR 扩增流程, 以使得在预温育步骤过程中形成的引物二聚体进一步扩增。表 I 中表示的数字是来自 qPCR 扩增的 Ct (阈值循环) 值, 并且它们与在预温育步骤过程中形成的引物二聚体的量相关联, 即 Ct 值愈小, 则引物二聚体形成量越高 (较高的引物二聚体形成是不太有利的或不太有效的)。在生成表 1 中数据的实验中, 两种酶均与相应的热起始抗体预结合, 以中低温下完全抑制聚合酶活性。

[0251] 引物对 (a): 聚合酶 (A) 与聚合酶 (B) 相比, 导致 ~ 14 循环更早的 Ct。14 个循环的差别与形成的引物二聚体量的 > 10000 倍的差别相关联。可能地, 该差别的出现是因为聚合酶 (A) 的 3' - 5' 外切核酸酶活性裂解 3' 错配区, 并保持两引物之间完全互补的 3' 末端, 其可以然后用作聚合酶活性的底物。相反地, 缺乏 3' - 5' 外切核酸酶活性的聚合酶 (B) 不能裂解 3' 错配区, 并且 3' 错配结构然后不能有效被聚合酶活性用于延伸, 由此导致低得多水平的引物二聚体形成。在该情形中, 聚合酶 (B) 是优选的酶。

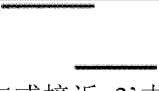
[0252] 引物对 (b): 当引物具有互相复性趋势时, 存在低的与两种聚合酶形成引物二聚体的趋势。

[0253] 引物对 (c): 当引物具有在 3' 末端形成互补序列的趋势时, 聚合酶 (A) 提供比聚合酶 (B) 显著更晚的 Ct。与聚合酶 (A) 相关的 Ct 延迟可能归因于引物 3' 端通过其 3' - 5' 外切核酸酶活性的消化, 这消除具有与另一种引物分子形成碱基对潜力的序列。尽管, 一般地, 关于引物二聚体的扩增需要具有延迟的 Ct 值, 但是在该特殊情形中, 引物的特性在长度和 3' 序列方面均改变, 这可以导致在存在模板的条件下的不理想扩增。

[0254] 引物对 (d): 这与引物对 (a) 类似, 区别在于 3' 碱基对不如引物对 (a) 中的稳定。使用两种聚合酶观察到相同的 Ct 值。

[0255] 表 1

[0256]

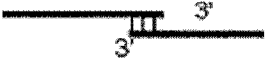
	(a) IL1B 引物	(b) BA 引物	(c) GAPD 引物	(d) 18s 引物
	 接近 3'末端的 GC bp	 在或接近 3'末端处无 bp	 在 3'末端处的 bp	 接近 3'末端的 AT bp
酶 (A)	21.6±0.3	36.5±1.5	44.5±0.9	33.1±0.4
突变酶 (B)	35.3±1.3	34.6±1.0	37.2±3.2	33.4±1.0
dCt (A-B)	-13.7	1.9	7.3	-0.3

[0257] 为了评价在两种聚合酶之间观察到的差别是否归因于抗体的存在或所用抗体的差别,利用杂合体和如上所述不与抗体复合的突变(外切核酸酶缺陷型)杂合体进行类似的测定。使用四组引物(见表2),A组和B组在3'末端处包含完全互补的碱基对,C组在接近3'末端处包含碱基对,随后在3'末端处包含一个碱基错配。使用A组和B组,与突变杂合体相比,杂合聚合酶提供Ct的5-8循环延迟。使用C组引物,与突变杂合聚合酶相比,使用杂合聚合酶获得显著更早的Ct值。利用单独的杂合聚合酶和突变杂合聚合酶获得总结果与使用热起始抗体和聚合物获得的类似。因此,两种聚合酶之间观察到的差别可能归因于外切核酸酶活性的差异而非抗体的存在。

[0258] 总之,缺乏外切核酸酶活性的聚合酶诸如如上所述的突变杂合体是qPCR应用的有效酶,以用于避免在这样的情况下的引物二聚体形成/扩增,在所述情况中,引物具有在接近3'末端处形成碱基对和保持3'末端处的错配碱基的趋势,并用于在这样的情况下消除引物长度/序列的改变,在所述情况中,引物在3'末端处形成碱基对。

[0259] 表2

[0260]

	A	B	C
	 在3'末端处的3bp匹配	 在3'末端处的5bp匹配	 接近3'末端处的4bp匹配及1个错配
杂合体	28.72	15.5	16.2
突变杂合体	20.90	10.17	28.85
dCt(杂合体-突变)	7.82	5.33	-12.65

[0261] 实施例2:比较具有和不具有外切核酸酶活性的杂合聚合酶的扩增效率

[0262] 进行另外的实验来直接比较与热起始抗体复合的杂合聚合酶与缺乏外切核酸酶活性的突变杂合聚合酶,所述缺乏外切核酸酶活性的突变杂合聚合酶也与相同的热起始抗体复合。相同制剂组合物与等浓度的杂合体或突变杂合体一起使用。在以下两个方面比较这两种酶的性能:(1)使用广泛范围的复性/延伸温度工作的能力,和(2)定量广泛范围的输入DNA模板的能力。使用的复性和延伸温度范围是56.6℃-66.6℃。扩增子来自人β-肌动蛋白基因,且输入DNA模板是25,250,和2500pg人基因组DNA/反应。如图3中所示,使用突变杂合体(右图)获得的扩增曲线和Ct值在复性/延伸温度由56.6℃变化为66.6℃时显示较小偏离。相反,使用杂合聚合酶(左图)观察到扩增曲线和由此的Ct值关于复性

/ 延伸温度变化的显著扩散。另外,热起始杂合体在测试的复性 / 延伸温度范围内提供低得多的并且更分散的扩增效率,而热起始突变杂合体提供持续的较高效率并且不受复性 / 延伸温度变化的显著影响,(见表 3)。

[0263] 表 3

[0264]

复性 / 延伸温度	杂交聚合酶的效率	突变杂交聚合酶的效率
66.6C	43.3%	94.8%
66.1C	46.6%	90.2%
64.9C	52.7%	98.8%
63.0C	56.1%	92.1%
60.6C	72.7%	92.3%
58.6C	62.3%	88.6%
57.3C	59.4%	93.0%
56.6C	67.2%	95.0%

[0265] 实施例 3 :用于评估热起始抗体的引物二聚体测定

[0266] 如前所述,热起始 DNA 聚合酶用于 PCR 中和特别是实时 PCR 中,以最小化或消除非特异性扩增,因为后者通常在存在低量输入 DNA 模板的条件下进行并且更倾向于非特异性扩增。开发引物二聚体测定,从而容许定量评估与适当抗体复合的上述杂交聚合酶或突变聚合酶是否适合于实时 PCR 应用。在该测定中,设计一对引物,彼此间在 3' 末端处形成 3 至 5 互补碱基对。该测定由以下两步组成:(1) 引物对在具有 DNA 复制所需的全部成分的 qPCR 混合物中,在 37-45℃ 温育 30 分钟;(2) 利用标准 qPCR 循环和检测方案继续第一步中的反应并容许扩增。如果 DNA 聚合酶在 37-45℃ 活化,则引物将在第一步过程中彼此延伸脱离,以生成在第二步过程中扩增的模板。如果 DNA 聚合酶在该温度范围内不活化或具有显著较低活性,则在第一步中仅发生低水平引物延伸,并且第二步过程中的扩增将导致延迟的 Ct。因此,通过比较单独使用 DNA 聚合酶对比使用与抗体复合的 DNA 聚合酶获得的 Ct 值,可能评估热起始抗体在防止 / 最小化引物二聚体形成中的益处。表 4 总结使用在 3' 末端处或在接近 3' 末端处形成碱基对倾向不同的三个引物组获得的结果。总之,与不加入抗体的反应相比,加入热起始抗体导致引物二聚体扩增中 5-11 循环的 Ct 延迟。使用热起始抗体的有益程度在两种聚合酶之间相类似。

[0267] 表 4

[0268]

	a	b	c
	在 3'末端处的 3bp 匹配	在 3'末端处的 5bp 匹配	接近 3'末端处的 4bp 匹配及在 3'末端处的 1 个错配
杂合聚合酶	28.72	15.5	16.2
与抗体复合的杂合聚合酶	35.05	26.43	22.46
dCt(杂合体-(杂合体+抗体))	-6.33	-10.93	-6.26
突变杂合聚合酶突变杂合体	20.90	10.17	28.85
与抗体复合的聚合酶	26.03	16.17	37.82
dCt(突变杂合体-突变(杂合体+抗体))	-5.13	-6.00	-8.97

[0269] 实施例 4 :确定肌氨酸的有效浓度

[0270] 为了确定肌氨酸的有效浓度范围,将不同浓度的肌氨酸 (20mM-540mM) 加入至包含缺乏 3'-5'外切核酸酶活性的杂合聚合酶的 qPCR 混合物中,如上所述。肌氨酸对 qPCR 反应效率的影响在使用浓度低至 20mM 的肌氨酸时明显。大于 40mM 的浓度提供最佳和类似的性能 (表 6)。这与公开的结果相反,公开的结果显示在浓度高于 1M 时的最佳渗压剂作用,并提示肌氨酸在本发明中的作用机制与公开的关于渗压剂作用的观察不同。使用 Sso7-Taq 融合聚合酶观察到类似的结果。

[0271]

表 6		
	CBP 扩增子 (50ng-50pg gDNA)	
	斜度/R2	扩增效率
0mM	-4.466 / 0.980	67.5%
20mM	-3.688 / 0.997	86.7%
40mM	-3.352 / 0.997	98.78%
60mM	-3.370 / 0.991	98.0%
80mM	-3.386 / 0.987	97.4%
100mM	-3.329 / 0.998	104%
100mM	-3.228 / 0.998	104%
200mM	-3.341 / 0.991	99.2%
300mM	-3.177 / 0.995	106%
400mM	-3.227 / 0.998	104%
540mM	-3.150 / 0.995	108%

[0272] 实施例 5 :肝素的作用

[0273] 肝素是带负电的聚合物,其模拟 dsDNA 的静电特性,并常用于纯化 DNA 结合蛋白或用作 DNA 结合蛋白的非特异性竞争者。加入肝素可以防止过量 DNA 聚合酶与双链模板结合,直至可以使用单链引物模板。

[0274] CBP 扩增子在 qPCR 反应中,由两种不同输入量 (5ng 和 0.5ng) 的人基因组 DNA 模板,使用包含杂合聚合酶的 qPCR 制剂来扩增,其中加入 0,10,20,100,200pg/ μ l 肝素 (图 2,表 7)。如果扩增效率为 100%,则与输入模板浓度的 10 倍差异所对应的预期 Ct 差异为 3.33。但不加入肝素时,5ng 和 0.5ng 反应之间的 Δ Ct 是 4.5,其对应于 67%扩增效率。当加入 100ng 肝素时,5ng 和 0.5ng 反应之间的 Δ Ct 是 3.4,其对应于 97%扩增效率,这与无肝素反应相比是显著提高。

[0275]

表 7					
	无肝素	10 pg/ μ l 肝素	20 pg/ μ l 肝素	100 pg/ μ l 肝素	200 pg/ μ l 肝素
5 ng gDNA	25.8	25.8	25.8	25.3	25.2
0.5 ng gDNA	30.3	30.3	29.4	28.7	28.8
Δ Ct (0.5ng-5ng)	4.50	4.50	3.60	3.40	3.60
效率	67%	67%	90%	97%	90%

[0276] 序列表

[0277] (A) SEQ ID NO :1

[0278] ATGATCCTGGATGCTGACTACATCACTGAAGAAGGCAAACCGTTATCCGTCTGTTCAAAAAAGAGAAC
 GGCGAATTTAAGATTGAGCATGATCGCACCTTTCGTCCATACATTTACGCTCTGCTGAAAGATGATTCTAAGATTGA
 GGAAGTTAAAAAATCACTGCTGAGCGCCATGGCAAGATTGTTTCGTATCGTTGATGCGGAAAAGGTAGAAAAGAAAT
 TTCTGGGCAGACCAATCACCGTGTGGAGACTGTATTTCGAACATCCACAAGATGTTCCGACTATTCGCGAGAAAATT
 CGCGAACATTCTGCAGTTGTTGACATCTTCGAATACGATATTCATTTGCAAAGCGTTACCTCATCGACAAAGGCCT
 GATACCAATGGAGGGCGATGAAGAACTCAAGCTCCTGGCGTTCGCTATAGCAACCTCTATCACGAAGGCGAAGAGT
 TTGGTAAAGGCCCAATTATAATGATCAGCTATGCAGATGAAGAAGAAGCAAAGGTGATTACTTGAAAAAATAGAT
 CTCCCATACGTTGAGGTTGTATCTTCCGAGCGCGAGATGATTAAGCGCTTCTCAAAATTATCCGCGAGAAGGATCC
 GGACATTATCATTACTTATAACGGCGACTCTTTTGACCTCCCATATCTGGCGAAACGCGCAGAAAAACTCGGTATTA
 AACTGACTATCGGCCGTGATGGTTCCGAGCCGAAGATGCAGCGTATCGGCGATATGACCGCTGTAGAAGTTAAGGGT
 CGTATCCATTTTCGACCTGTATCATGTAATTCGTCGTAATAAACCCTCCGACTTACACTCTCGAGGCTGTATATGA
 AGCAATTTTTGGTAAGCCGAAGGAGAAGGTATACGCCGATGAGATTGCAAAGGCGTGGGAAACCGGTGAGGGCCTCG
 AGCGTGTTGCAAAATACTCCATGGAAGATGCAAAGGCGACTTATGAACTCGGCAAAGAATTCTTCCCAATGGAAGCT
 CAGCTCTCTCGCCTGGTTGGCCAACCACTGTGGGATGTTTCTCGTTCTTCCACCGGTAACCTCGTAGAGTGGTTTCT
 CCTGCGCAAAGCGTACGAACGCAACGAACCTGGCTCCGAACAAGCCAGATGAACGTGAGTATGAACGCCGTCTCCGCG
 AGTCTTACGCTGGTGGCTTTGTTAAAGAGCCAGAAAAGGGCCTCTGGGAAAACATCGTGTCCCTCGATTTTCGCGCT
 CTGTATCCGTCTATTATCATTACCCACAACGTGTCTCCGGATACTCTCAACCGCGAGGGCTGCAGAACTATGATGT
 TGCTCCGGAAGTAGGCCACAAGTTCTGCAAGGACTTCCCGGGCTTTATTCCGTCTCTCCTGAAACGTCTGCTCGATG
 AACGCCAAAAGATTAAGACTAAAATGAAGGCGTCCAGGATCCGATTGAAAAAATAATGCTCGACTATCGCCAAAGA
 GCGATTAAAATCCTCGCAAACTCTTATTACGGCTATTATGGCTATGCAAAAGCACGCTGGTACTGTAAGGAGTGTGC
 TGAGTCCGTTACTGCTTGGGGTCGCGAATACATCGAGTTCGTGTGGAAGGAGCTCGAAGAAAAGTTTGGCTTTAAAG
 TTCTCTACATTGACACTGATGGTCTCTATGCGACTATTCGGGTGGTAAGTCTGAGGAAATTAAGAAAAAGGCTCTA
 GAATTTGTGGATTACATTAACGCGAAGCTCCCGGGTCTCCTGGAGCTCGAATATGAAGGCTTTTATAAACGCGGCTT
 CTTGTTACCAAGAAGAAATATGCGCTGATTGATGAAGAAGGCAAAATTATTACTCGTGGTCTCGAGATTGTGCGCC
 GTGATTGGAGCGAAATTGCGAAAGAACTCAAGCTAGAGTTCTCGAGGCTATTCTCAAACACGGCAACGTTGAAGAA
 GCTGTGAGAATTGTAAGAAGTAACCCAAAAGCTCTCTAAATATGAAATTCCGCCAGAGAAGCTCGCGATTTATGA
 GCAGATTACTCGCCCGCTGCATGAGTATAAGGCGATTGGTCCGCACGTGGCTGTTGCAAAGAGACTGGCTGCTAAAG

GCGTGAAAATTAAACCGGGTATGGTAATTGGCTACATTGTACTCCGCGCGATGGTCCGATTAGCAACCGTGCAATT
CTAGCTGAGGAATACGATCCGAGAAAAGCACAAGTATGACGCAGAAATATTACATTGAGAACCAGGTGCTCCCGGCGGT
ACTCCGTATTCTGGAGGGTTTTGGCTACCGTAAGGAAGACCTCCGCTGGCAAAAGACTAAACAGACTGGCCTCACTT
CTTGGCTCAACATTAAAAAATCCGGTACCGGCGGTGGCGGTGCAACCGTAAAGTTCAAGTACAAAGGCGAAGAAAAA
GAGGTAGACATCTCCAAGATCAAGAAAGTATGGCGTGTGGGCAAGATGATCTCCTTCACCTACGACGAGGGCGGTGG
CAAGACCGGCCGTGGTGCAGTAAGCGAAAAGGACGCGCCGAAGGAGCTGCTGCAGATGCTGGAGAAGCAGAAAAAGT
GA

[0279] (B) SEQ ID NO :2

[0280] MILDADYITEEGKPVIRLFKKENGFEKIEHDRTFRPYIYALLKDDSKIEEVKKITAERHGKIVRIVDAE
KVEKKFLGRPITVWRLYFEHPQDVPTIREKIREHSAVVDIFEYDIPFAKRYLIDKGLIPMEGDEELKLLAF^AIATLY
HEGEFEGKGPIMISYADEEEEAKVITWKKIDLPHYEVVSSEREMIKRFLKIIREKDPDIIITYNGDSFDLPYLAKRA
EKLGIKLTIGRDGSEPKMQRIGDMTAVEVKGRIFHFDLYHVIRRTINLPTYTLEAVYEAIFGPKPEKVYADEIAKAW
TGEGLERVAKYSMEDAKATYELGKEFFPMEAQLSRLVGQPLWDVSRSSSTGNLVEWFLLRKAYERNELAPNKPDEREY
ERRLRESYAGGFVKEPEKGLWENIVSLDFRALYPSIIITHNVSPDTLNREGCRNYDVAPEVGHKFCDFPGFIPSL
KRLDERQKIKTKMKASQDPIEKIMLDYRQRAIKILANSYYGYGYAKARWYCKECAESVTAWGREYIEFVWKELEE
KFGFKVLYIDTDGLYATIPGGKSEEEKKALEFVDYINAKLPGLLELEYEGFYKRGFFVTKKKYALIDEEGKIIITRG
LEIVRRDWSEIAKETQARVLEAILKHGNVEEAVRIVKEVTQKLSKYEIPPEKLAIYEQITRPLHEYKAIGPHVAVAK
RLAAKGVKIKPGMVIYIIVLRGDGPISNRAILAEYDPRKHKYDAEYYIENQVLPVLRILEGFGYRKEDLRWQKTK
QTGLTSWLNIIKSGTGGGGATVKFKYKGEEKEVDISKIKKVWRVGMISFTYDEGGGKTGRGAVSEKDAPKELLQML
EKQKK*

[0281] (C) SEQ ID NO :3

[0282] ATVKFKYKGEEKEVDISKIKKVWRVGMISFTYDEGGGKTGRGAVSEKDAPKELLQMLEKQKK

[0283] (D) SEQ ID NO :4

[0284] GCAACCGTAAAGTTCAAGTACAAAGGCGAAGAAAAAGAGGTAGACATCTCCAAGATCAAGAAAGTATGG
CGTGTGGGCAAGATGATCTCCTTCACCTACGACGAGGGCGGTGGCAAGACCGGCCGTGGTGCAGTAAGCGAAAAGGA
CGCGCCGAAGGAGCTGCTGCAGATGCTGGAGAAGCAGAAAAAG

[0285] (E) SEQ ID NO :5

[0286] GTGGGG

[0287] (A) 重链可变区 - 核苷酸序列

[0288] > M13-vh (SEQ ID NO :6)

[0289] GAAGTACAGCTGGAGCAGTCAGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGTCCTCAGTGAAGATTTCTGCAAG
GCTTCTGGCTATGTTTTAGTACCTACTGGATGAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGTCTTGAGTGGATTGG
ACAGATTTATCCTGGAGATGGTGGTGTAACTACAATGGAGAGTTCAAGGCTAGGGCCACACTGACTGCAGACAGAT
CCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGGAGCCTAACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGTTCTTCT
TACTACGGTGGTAGTTCCGTCTCCTGGCTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCTCTGTCTCTGCAGCCAAAAC
GACACCCCATCTGTCTATA

[0290] > M15-vh (SEQ ID NO :7)

[0291] GAAGTAAAGCTGGAGGAGTCAGGGGCTGAGTTGGCAAGACCTGGGGCTTCAGTGAAGTTGTCCTGCAA
GGCTTCTGGCTACACCTTTACTAGCTACTGGATGCAGTGGGTAAAACAGAGGCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATT

GGGGCTATTTATCCTGGAGATGGTGAGACTTGGCACACTCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGCAGAT
AAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCTTGGAACTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGA
GAAAGGGATAGGTTCG ACGGGTCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCAGCCAAAA
CGACACCCCCATCTGTCTATA

[0292] > M22-vh (SEQ ID NO :8)

[0293] GAGGTAAAGCTGCAGGAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTCCTGCAAG
GCTTCTGGCTACACGTTCAACACCTACTGGATGAACTGGGTAAAGCAGAGGCCTGAGCAAGGCCTTGAGTGGATTGG
AAGGATTGATCCTTACGATAGTGACACTCACTACAATCAAAAGTTCAAGTACAAGGCCATATTGACTGTAGACAAAT
CCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAACAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTTCAAGGGGGGAC
TATGTCCCCATCTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCC
ATCTGTCTATA

[0294] > M28-vh (SEQ ID NO :9)

[0295] GAGGTGAAGCTGGAGGAGTCAGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTCCTGCAAG
GCTTCTGGCTACACGTTCAACACCTACTGGATGAACTGGGTAAAGCAGAGGCCTGAGCAAGGCCTTGAGTGGATTGG
AAGGATTGATCCTTACGATAGTGACACTCACTACAATCAAAAGTTCAAGTACAAGGCCATATTGACTGTAGACAAAT
CCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAACAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTTCAAGGGGGGAC
TATGTCCCCATCTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCC
ATCTGTCTATA

[0296] (B) 轻链可变区 - 核苷酸序列

[0297] > M13-v1 (SEQ ID NO :10)

[0298] GACATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGC
AAGTCTAGTCAGAGCATTGTACATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCC
AAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGGACAG
ATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGACTTTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTCCG
TGGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCA

[0299] > M15-v1 (SEQ ID NO :11)

[0300] GACATTGTGATGACACAGACTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCACCATCTCTTGC
AAGGCCAGCCAAAGTGTTGATTATGATGGTGATAGTTATATGAACTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAA
ACTCCTCATCTATGCTGCATCCAATCTAGAATCTGGGATCCCAGCCAGGTTTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACT
TCATCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCTATCACTGTCAGCAAAGTAATGAGGATCCGTGG
ACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCC

[0301] > M22-v1 (SEQ ID NO :12)

[0302] GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGC
AGATCTAGTCAGAGCCTTGTACACAGTAATGGAAACACCTATTTACATTGGTACCTGCAGAGGCCAGGCCAGTCTCC
AAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCAATGGCAGTGGATCAGGGACAG
ATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAATTTATTTCTGCTCTCAAAGTACACATATTCCT
CGGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAGACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCC

[0303] > M28-v1 (SEQ ID NO :13)

[0304] GATATTGTGATCACACAGTCTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGC

AGATCTAGTCAGAGCCTTGTACACAGTAATGGAAACACCTATTTACATTGGTACCTGCAGAGGCCAGGCCAGTCTCC
AAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCAATGGCAGTGGATCAGGGACAG
ATTTCACTCAAGATCAGCAGAGT GGAGGCTGAGGATCTGGGAATTTATTTCTGCTCTCAAAGTACACATATTCC
TCGGACGTTTCG GTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAGACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCA

[0305] (C) 重链可变区 - 推定氨基酸序列

[0306] > M13-vh (SEQ ID NO :14)

[0307] EVQLEQSGAELVRPGSSVKISCKASGYVFSYWMNWVKRPGQGLEWIGQIYPGDGGVNYNGEFKARAT
LTADRSSTAYMQLRSLTSEDSAVYFCASSSYGGSSVSWLAYWGQGLTVSVSAAKTTPPSVY

[0308] > M15-vh (SEQ ID NO :15)

[0309] EVKLEESGAELARPGASVKLSCKASGYFTTSYWMQWVKRPGQGLEWIGAIYPGDGETWHTQKFKGKAT
LTADKSSSTAYMQLSSLESEDSAVYYCARERDRFDGSWFAYWGQGLTVTVSAAKTTPPSVY

[0310] > M22-vh (SEQ ID NO :16)

[0311] EVKLQESGAELVRPGASVKLSCKASGYFTTTYWMNWVKRPEQGLEWIGRIDPYDS DTHYNQKFSDKAI
LTVDKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCSRGDYVPIYAMDYWGQGLTSVTVSSAKTTPPSVY

[0312] > M28-vh (SEQ ID NO :17)

[0313] EVKLEESGAELVRPGASVKLSCKASGYFTTTYWMNWVKRPEQGLEWIGRIDPYDS DTHYNQKFSDKAI
LTVDKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCSRGDYVPIYAMDYWGQGLTSVTVSSAKTTPPSVY

[0314] (D) 轻链可变区 - 推定氨基酸序列

[0315] > M13-vl (SEQ ID NO :18)

[0316] DIVMTQTPLSLPVSLGDQASISCKSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVS NRFS GVPDRFSG
SGSGTDFTLKISRVEAEDLGLYYCFQGSHVPWTFGGGTKLEIKRADAAPT VS

[0317] > M15-vl (SEQ ID NO :19)

[0318] DIVMTQTPASLAVSLGQRATISCKASQSDYDGD SYMNWYQQKPGQPPKLLIYAASNLESGIPARFSGS
GSGTDFILNIHPVEEEDAATYHCQQSNEDPWTFGGGTKLEIKRADAAPT VS

[0319] > M22-vl (SEQ ID NO :20)

[0320] DIVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQRPQGSPKLLIYKVS NRFS GVPDRFNG
SGSGTDFTLKISRVEAEDLGIYFCSQSTHPRTFGGGTKLEIRRADAAPT VS

[0321] > M28-vl (SEQ ID NO :21)

[0322] DIVITQSPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQRPQGSPKLLIYKVS NRFS GVPDRFNG
SGSGTDFTLKISRVEAEDLGIYFCSQSTHPRTFGGGTKLEIRRADAAPT VS

[0323] SEQ ID NO :22Vh CDR1M13T Y W M N

[0324] SEQ ID NO :23Vh CDR2M13Q I Y P G D G G V N Y N

[0325] G E F K A

[0326] SEQ ID NO :24Vh CDR3 M13 S S Y Y G G S S V S W L

[0327] A Y

[0328] SEQ ID NO :25 V1 CDR1 M13 K S S Q S I V H S N G N T Y

[0329] L E

[0330] SEQ ID NO :26 V1 CDR2 M13 K V S N R F

[0331] SEQ ID NO :27 V1 CDR3 M13 F Q G S H V P W T

[0332] SEQ ID NO :28 Vh CDR1 M15 S Y W M Q
[0333] SEQ ID NO :29 Vh CDR2 M15 A I Y P G D G E T W H T Q K
[0334] F K G
[0335] SEQ ID NO :30 Vh CDR3 M15 E R D R F D G S W F A Y
[0336] SEQ ID NO :31 V1 CDR1 M15 K A S Q S V D Y D G D S Y M
[0337] N
[0338] SEQ ID NO :32 V1 CDR2 M15 A A S N L E S
[0339] SEQ ID NO :33 V1 CDR3 M15 Q Q S N E D P W T
[0340] SEQ ID NO :34 Vh CDR1 M22 T Y W M N
[0341] SEQ ID NO :35 Vh CDR2 M22 R I D P Y D S D T H Y N Q K
[0342] F S D
[0343] SEQ ID NO :36 Vh CDR3 M22 G D Y V P I Y A M D Y
[0344] SEQ ID NO :37 V1 CDR1 M22 R S S Q S L V H S N G N T Y
[0345] L H
[0346] SEQ ID NO :38 V1 CDR2 M22 K V S N R F S
[0347] SEQ ID NO :39 V1 CDR3 M22 S Q S T H I P R
[0348] SEQ ID NO :40 Vh CDR1 M28 T Y W M N
[0349] SEQ ID NO :41 Vh CDR2 M28 R I D P Y D S D T H Y N Q K
[0350] F S D
[0351] SEQ ID NO :42 Vh CDR3 M28 G D Y V P I Y A M D Y
[0352] SEQ ID NO :43 V1 CDR1 M28 R S S Q S L V H S N G N T Y
[0353] L H
[0354] SEQ ID NO :44 V1 CDR2 M28 K V S N R F S
[0355] SEQ ID NO :45 V1 CDR3 M28 S Q S T H I P R

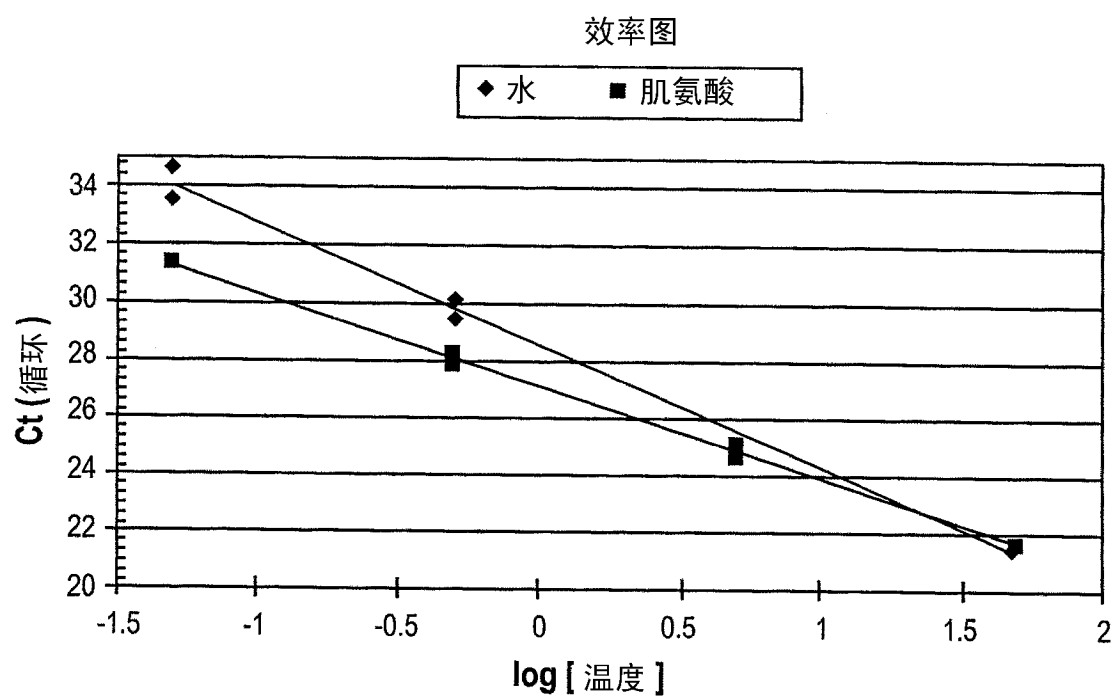


图 1

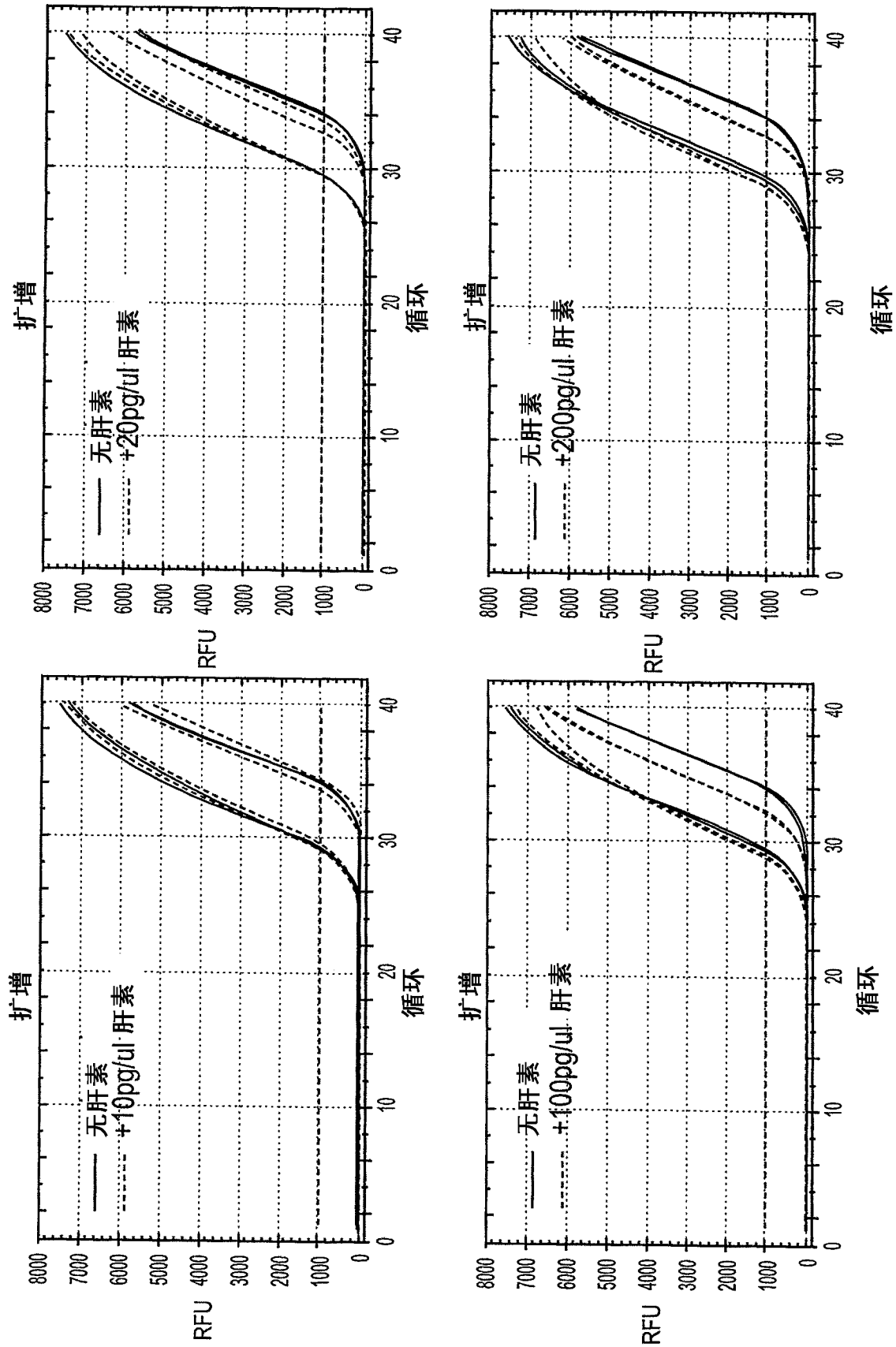


图 2

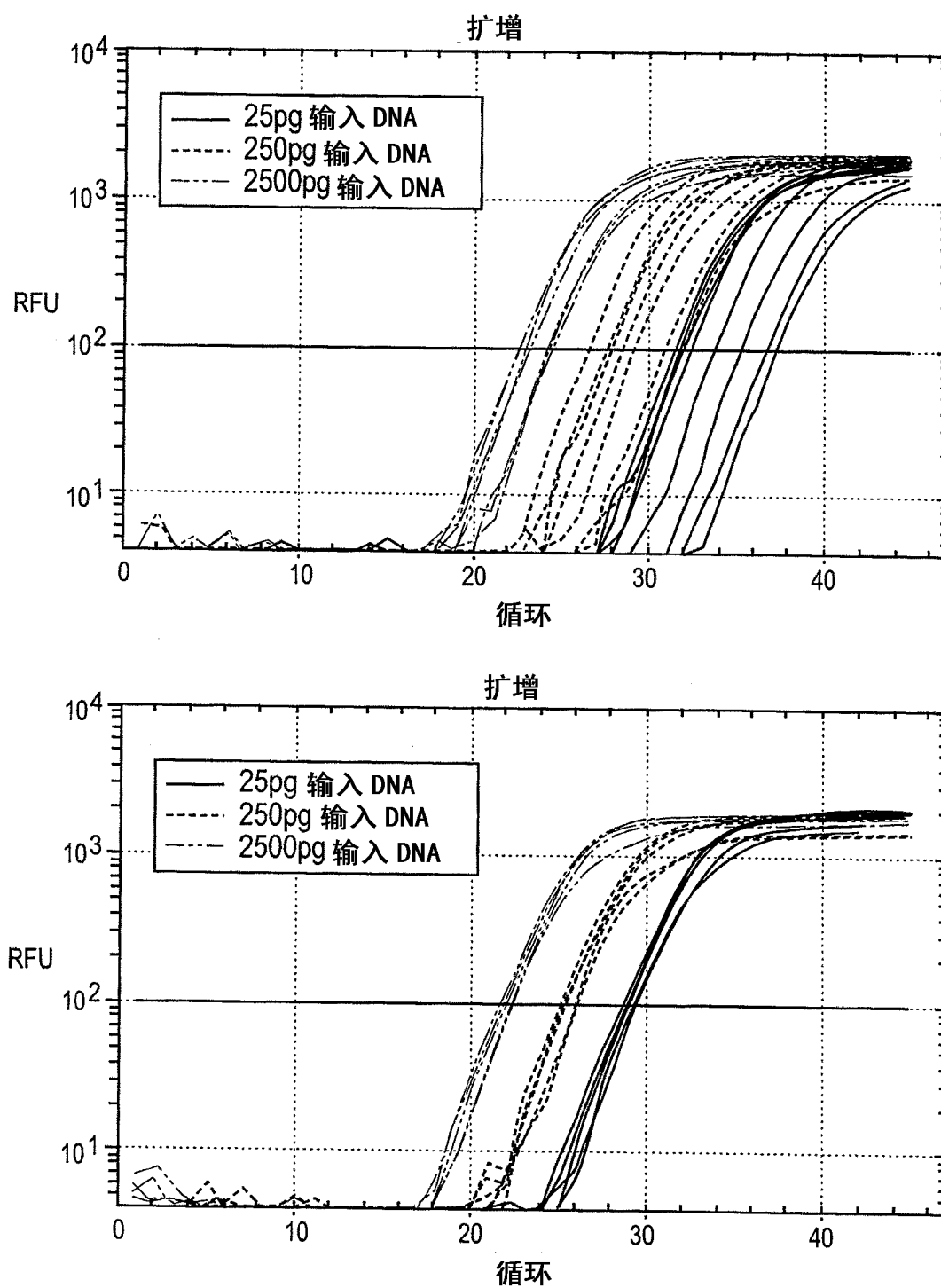


图 3

MILDADYITEEGKPVIRLFKKENGFEKIEHDRTFRPYIYALLKDDSKIEEVKKITAERH
GKIVRIVDAEKVEKKFLGRPITVWRLYFEHPQDVPTIREKIREHSAVVDIFEYDIPFAK
RYLIDKGLIPMEGDEELKLLAFAIATLYHEGEEFGKGPIIMISYADEEEEAKVITWKKID
LPYVEVVSSEREMIKRFLKIIREKDPDIIITYNGDSFDLPYLAKRAEKLGIKLTIGRDGS
EPKMQRIGDMTAVEVKGRIHFDLYHVIRRTINLPTYTLEAVYEAIFGKPKEKVYADEI
AKAWETGEGLERVAKYSMEDAKATYELGKEFFPMEAQLSRLVGQPLWDVSRSTG
NLVEWFLLRKAYERNELAPNKPDEREYERRLRESYAGGFVKEPEKGLWENIVSLDFR
ALYPSIIITHNVSPDTLNREGCRNYDVAPEVGHKFCCKDFPGFIPSLKRLDERQKIKT
KMKASQDPIEKIMLDYRQRAIKILANSYYGYGYAKARWYCKECAESVTAWGREYI
EFVWKELEEKFGFKVL YIDTDGLYATIPGGKSEEIKKKALEFVDYINAKLPGLLELEY
EGFYKRGFFVTKKKYALIDEEGKII TRGLEIVRRDWSEIAKETQARVLEAILKHG NVE
EAVRIVKEVTQKLSKYEIPPEKLAIYEQITRPLHEYKAIGPHVAVAKRLAAKGVKIKP
GMVIGYIVLRGDGPISNRAILAE EYDPRKHKYDAEYYIENQVLPVLRILEGFGYRKE
DLRWQKTKQTGLT SWLNKKSGTGGGGATVKFKYKGEEKEVDISKIKKVWRVGKM
ISFTYDEGGGKTGRGAVSEKDAPKELLQM LEKQKK*

图 4A

ATVKFKYKGEEKEVDISKIKKVWRVGKMISFTYDEGGGKTGRGAVSEKDAPKELLQ
MLEKQKK

图 4B