



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102648289 A

(43) 申请公布日 2012. 08. 22

(21) 申请号 201080039738. 9

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

(22) 申请日 2010. 07. 02

代理人 李进 郭文洁

(30) 优先权数据

P200930412 2009. 07. 02 ES

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 03. 02

(86) PCT申请的申请数据

PCT/ES2010/070456 2010. 07. 02

(87) PCT申请的公布数据

W02011/000998 ES 2011. 01. 06

(71) 申请人 康斯乔最高科学研究公司

地址 西班牙马德里

(72) 发明人 M·萨拉斯法尔盖拉斯

M·德贝加霍斯

J·M·拉扎罗博罗斯

L·布兰科达维拉

M·门西亚卡瓦列罗

权利要求书 2 页 说明书 8 页

序列表 4 页 附图 3 页

(54) 发明名称

用于对模板 DNA 进行复制、扩增和测序的方法

(57) 摘要

本发明涉及生物技术领域,具体涉及一种使用 Φ 29DNA 聚合酶对脱氧核糖核酸进行复制、扩增或测序的方法。依据所述方法,将所述聚合酶在尤其包含以下组分的反应混合物中孵育:浓度为 0.003-0.01% 的聚氧乙烯化单月桂酸山梨坦,以及可为 30-60mM 硫酸铵、60-120mM 氯化铵或乙酸铵的铵盐。本发明还涉及一种用于实施所述方法的试剂盒。

1. 用于对模板 DNA 进行复制、扩增或测序的方法,所述方法包括使所述 DNA 与包含至少以下的反应混合物接触:

- a) ϕ 29 型 DNA 聚合酶;
- b) 聚氧乙烯化单月桂酸山梨坦;
- c) 铵盐;
- d) 缓冲液;
- e) 氯化镁;
- f) 引物;和
- g) 核苷三磷酸。

2. 权利要求 1 的方法,其中所述反应混合物还包含钾盐。

3. 权利要求 2 的方法,其中所述钾盐为氯化钾或乙酸钾。

4. 权利要求 1-3 中任一项的方法,其中所述聚氧乙烯化单月桂酸山梨坦的比例为总反应体积的 0.003% -0.1%。

5. 权利要求 4 的方法,其中所述聚氧乙烯化单月桂酸山梨坦的比例为总反应体积的 0.006% -0.05%。

6. 权利要求 5 的方法,其中所述聚氧乙烯化单月桂酸山梨坦的比例为总反应体积的 0.01% -0.03%。

7. 权利要求 1-6 中任一项的方法,其中所述铵盐选自:硫酸铵、氯化铵或乙酸铵。

8. 权利要求 7 的方法,其中所述铵盐为硫酸铵。

9. 权利要求 8 的方法,其中所述硫酸铵的浓度为 30mM-60mM。

10. 权利要求 9 的方法,其中所述硫酸铵的浓度为 40mM-50mM。

11. 权利要求 7 的方法,其中所述铵盐为氯化铵或乙酸铵。

12. 权利要求 11 的方法,其中所述氯化铵或乙酸铵的浓度为 60mM-120mM。

13. 权利要求 12 的方法,其中所述氯化铵或乙酸铵的浓度为 80mM-100mM。

14. 权利要求 1-13 中任一项的方法,其中所述 ϕ 29 型 DNA 聚合酶选自分离自以下噬菌体的 DNA 聚合酶: ϕ 29、Cp-1、PRD-1、 ϕ 15、 ϕ 21、PZE、PZA、Nf、M2Y、B103、GA-1、SF5、Cp-5、Cp-7、PR4、PR5、PR722、L17 或 ABV。

15. 权利要求 14 的方法,其中所述 ϕ 29 型 DNA 聚合酶具有与 SEQ ID NO:1 具有至少 80% 同一性的氨基酸序列。

16. 权利要求 15 的方法,其中所述 ϕ 29 型 DNA 聚合酶具有与 SEQ ID NO:1 具有至少 90% 同一性的氨基酸序列。

17. 权利要求 16 的方法,其中所述 ϕ 29 型 DNA 聚合酶具有氨基酸序列 SEQ ID NO:1。

18. 权利要求 1-16 中任一项的方法,其中所述 ϕ 29 型 DNA 聚合酶在核酸外切酶结构域中具有修饰,其中所述经修饰的 DNA 聚合酶与相应的天然存在的 DNA 聚合酶相比具有小于 10% 的核酸外切酶活性。

19. 权利要求 18 的方法,其中所述经修饰的 ϕ 29 型 DNA 聚合酶与相应的天然存在的 DNA 聚合酶相比具有小于 1% 的核酸外切酶活性。

20. 权利要求 19 的方法,其中所述经修饰的 ϕ 29 型 DNA 聚合酶相对于相应的天然存在的 DNA 聚合酶缺乏可检测的核酸外切酶活性。

21. 权利要求 1-20 中任一项的方法,其中所述缓冲液为 tris- 盐酸、tris- 乙酸或 HEPES。
22. 权利要求 1-21 中任一项的方法,其中所述缓冲液的 pH 为 7-8.5。
23. 权利要求 1-22 中任一项的方法,其中所述氯化镁的浓度为 2mM-20mM。
24. 权利要求 23 的方法,其中所述氯化镁的浓度为 5mM-15mM。
25. 权利要求 2-24 中任一项的方法,其中所述氯化钾或乙酸钾的浓度为 30mM-70mM。
26. 权利要求 25 的方法,其中所述氯化钾或乙酸钾的浓度为 40mM-60mM。
27. 权利要求 1-26 中任一项的方法,其中所述核苷三磷酸为 dCTP、dGTP、dTTP 和 dATP。
28. 权利要求 27 的方法,其中所述 dCTP、dGTP、dTTP 和 dATP 核苷三磷酸为等摩尔量。
29. 权利要求 1-28 中任一项的方法,其中所述引物为随意的,并受到保护免受核酸外切酶的作用。
30. 权利要求 1-29 中任一项的方法,其中所述模板 DNA 为质粒 DNA。
31. 权利要求 1-29 中任一项的方法,其中所述模板 DNA 为基因组 DNA。
32. 权利要求 1-31 中任一项的方法,其中所述扩增在 25-40℃ 的基本上恒温下进行。
33. 权利要求 1-32 中任一项的用于扩增模板 DNA 的方法,其中所述扩增通过滚环式扩增 (RCA)、多重置换扩增 (MDA)、链置换扩增 (SDA) 或环介导扩增 (LAMP) 进行。
34. 权利要求 1-33 中任一项的方法,其中至少一种核苷三磷酸或一种引物被标记。
35. 用于实施权利要求 1-34 的方法的试剂盒,所述试剂盒包括:
 - a) ϕ 29 型 DNA 聚合酶;
 - b) 聚氧乙烯化单月桂酸山梨坦;
 - c) 铵盐;
 - d) 缓冲液;和
 - e) 氯化镁。
36. 权利要求 35 的试剂盒,所述试剂盒还包括钾盐。
37. 权利要求 35 或 36 的试剂盒,所述试剂盒还包括引物。
38. 权利要求 35-37 中任一项的试剂盒,所述试剂盒还包括权利要求 29 的引物。
39. 权利要求 35-38 中任一项的试剂盒,所述试剂盒还包括核苷三磷酸。
40. 权利要求 37-39 的试剂盒,其中至少一种核苷三磷酸或一种引物被标记。

用于对模板 DNA 进行复制、扩增和测序的方法

[0001] 本发明属于生物技术领域。具体而言,本发明涉及一种使用 ϕ 29 型 DNA 聚合酶对脱氧核糖核酸进行复制、扩增或测序的方法和一种用于实施所述方法的试剂盒。

[0002] 现有技术水平

[0003] 噬菌体 ϕ 29 复制其基因组所需要的唯一酶是其 DNA 聚合酶,这是既能催化复制起始又能催化合成链延伸的 66KDa 的单体蛋白。对于起始,该聚合酶与称为“末端”(TP) 的蛋白质结合,识别 ϕ 29DNA 的末端并催化 TP-dAMP 共价复合物形成。在聚合了 10 个核苷酸后, DNA 聚合酶 /TP 异二聚体解离,并延伸来自 DNA 的链。

[0004] 复制性 DNA 聚合酶需要与稳定酶和 DNA 间的结合的辅助蛋白相互作用 (Kuriyan 和 O' Donnell. J Mol Biol. 1993 ;234 :915-925)。另一方面,所述 DNA 聚合酶必须在当时未被复制的 DNA 链分离时偶联聚合,为此它们需要与解旋酶型蛋白的功能缔合。在这方面,噬菌体 ϕ 29 的 DNA 聚合酶具有以下使其独特的各种内在功能特性:

[0005] a) 高持续合成能力(定义为通过结合事件掺入的核苷酸数目);

[0006] b) 高链分离能力,这使得其可在不存在解旋酶型辅助蛋白时复制所述噬菌体的基因组。持续合成能力和链分离这两个特性使得 ϕ 29DNA 聚合酶能够合成超过 70kb 长的 DNA 链 (Blanco 等, J Biol Chem. 1989 ;264 :8935-8940);

[0007] c) 在新链中插入核苷酸的高准确性 (Esteban 等, J Biol Chem. 1993 ;268 : 2719-2726)。

[0008] 所有这些特性导致开发各种各样基于使用该聚合酶扩增双链 DNA (dsDNA) 的等温过程(恒温)方案。在简单构型中, ϕ 29DNA 聚合酶利用环状单链 DNA (ssDNA) 的能力使得可通过滚环式方法(或 RCA-滚环式扩增)扩增 DNA,产生很长的含有不止 10 个环状模板拷贝 ssDNA 分子 (Blanco 等, J Biol Chem. 1989 ;264 :8935-8940 ;US5001050, US5198543 和 US5576204)。在由 Amersham Biosciences/Molecular Staging (Dean 等, Genome Res. 2001 ; 11 :1095-1099 ;Dean 等, Proc Natl Acad Sci USA. 2002 ;99 :5261-5266) 开发的用于扩增 dsDNA 的方法中,将使用 ϕ 29DNA 聚合酶与使用六聚物(六-核苷酸)随机序列引物联合,使得能够从皮克级环状质粒 DNA [GE Healthcare 的 Templiphi™] 或从 10 纳克基因组 DNA [GE Healthcare 的 Genomiphi™ 和 Qiagen 的 Repli-G®] 开始获得 10^4 - 10^6 扩增因子。产生的产物具有高质量,并可直接被消化或测序而不需在前纯化,这证明了 ϕ 29DNA 聚合酶是用于该目的的最强的酶。用于实施使用 ϕ 29DNA 聚合酶的扩增反应的常见缓冲液含有 tris-HCl (pH 7.5) 加不同浓度(毫摩尔级)的 NaCl 或 KCl 和 $MgCl_2$ (US20030207267)。然而,尽管这些方案在多种情况下令人满意,但仍日益需要开发允许从更少 DNA 量开始的其它方案。

[0009] 发明简述

[0010] 本发明涉及一种使用 ϕ 29 型 DNA 聚合酶对脱氧核糖核酸进行复制、扩增或测序的方法和一种用于实施所述方法的试剂盒。

[0011] 噬菌体 ϕ 29DNA 聚合酶具有非常令人感兴趣的用于扩增 DNA 的几个特点,例如:无需任何辅助蛋白参与的高持续合成能力;和高链分离能力,这使得其可在与 DNA 单一结合

事件中复制所述噬菌体的基因组；以及在新链中插入核苷酸的高准确性。这些特性导致开发各种各样基于使用该聚合酶的用于等温扩增 DNA 的方案，该聚合酶使得能够获得不需在前纯化就可被直接消化或测序的高品质产物。然而，仍需要允许从其更小量扩增 DNA 的方案。本发明通过开发显著改进反应的特异性和产量的用于扩增 DNA 的方法来响应该需要。

[0012] 在本专利实施例中显示，将聚氧乙烯化单月桂酸山梨坦 (Tween® 20) 和铵盐同时加入通常用于用 ϕ 29 DNA 聚合酶来扩增的缓冲液中，一方面防止非特异性 DNA 扩增，另一方面使得能够从有限的 0.1 飞克 (fg) 的质粒 DNA 和作为模板的 10fg 基因组 DNA 实现可检测的特异性扩增。

[0013] 本发明第一方面涉及一种用于对模板 DNA 进行复制、扩增或测序的方法，所述方法包括使所述 DNA 与包含至少以下的反应混合物接触：

[0014] a) ϕ 29 型 DNA 聚合酶；

[0015] b) 聚氧乙烯化单月桂酸山梨坦；

[0016] c) 铵盐；

[0017] d) 缓冲液；

[0018] e) 氯化镁；

[0019] f) 引物；和

[0020] g) 核苷三磷酸。

[0021] 本发明该方面的一个优选实施方案涉及一种用于对模板 DNA 进行复制、扩增或测序的方法，所述方法包括使所述 DNA 与反应混合物接触，所述反应混合物包含前述 (a)-(g) 组分，并且还包含钾盐。优选所述钾盐为氯化钾或乙酸钾。

[0022] 本说明书所用术语“DNA 聚合酶”涉及能够催化脱氧核苷三磷酸聚合的酶。通常，所述酶在与模板 DNA 序列杂交的引物 3' 端起始合成，并向模板 DNA 链的 5' 端行进。

[0023] 本发明所用术语“ ϕ 29 型 DNA 聚合酶”涉及在其聚合结构域中含有 TPR1 和 TPR2 亚域的任何 DNA 聚合酶，所述聚合结构域为聚合酶提供将向前聚合与链分离偶联的能力。可用于本发明的 ϕ 29 型 DNA 聚合酶的实例选自分离自以下噬菌体的 DNA 聚合酶： ϕ 29、Cp-1、PRD-1、 ϕ 15、 ϕ 21、PZE、PZA、Nf、M2Y、B103、GA-1、SF5、Cp-5、Cp-7、PR4、PR5、PR722、L17 或酸菌属瓶形病毒 (Acidianus Bottle-shaped virus, ABV)。

[0024] 在本发明用于复制、扩增或测序的方法的一个优选实施方案中， ϕ 29 型 DNA 聚合酶选自分离自以下噬菌体的 DNA 聚合酶： ϕ 29、Cp-1、PRD-1、 ϕ 15、 ϕ 21、PZE、PZA、Nf、M2Y、B103、GA-1、SF5、Cp-5、Cp-7、PR4、PR5、PR722、L17 或酸菌属瓶形病毒 (ABV)。

[0025] 在本发明用于复制、扩增或测序的方法的一个优选实施方案中， ϕ 29 型 DNA 聚合酶具有与 SEQ ID NO:1 具有至少 80% 同一性的氨基酸序列。在一个更优选实施方案中， ϕ 29 型 DNA 聚合酶具有与 SEQ ID NO:1 具有至少 90% 同一性的氨基酸序列。在一个甚至更优选的实施方案中， ϕ 29 型 DNA 聚合酶具有氨基酸序列 SEQ ID NO:1。

[0026] ϕ 29 型 DNA 聚合酶的核酸外切酶结构域为已知的，并可能修饰以降低核酸外切酶活性，但保留高持续合成能力和链分离能力。这些经修饰的 DNA 聚合酶尤其可用于大分子测序。

[0027] 在本发明用于复制、扩增或测序的一个优选实施方案中， ϕ 29 型 DNA 聚合酶在核酸外切酶结构域中具有修饰，其中所述经修饰的 DNA 聚合酶与相应的天然存在的 DNA 聚合

酶或“野生型”相比具有小于 10% 的核酸外切酶活性。在一个更优选的实施方案中,经修饰的 ϕ 29 型 DNA 聚合酶与相应的天然存在的 DNA 聚合酶相比具有小于 1% 的核酸外切酶活性。在又一更优选实施方案中,经修饰的 ϕ 29 型 DNA 聚合酶相对于相应的天然存在的 DNA 聚合酶缺乏可检测的核酸外切酶活性。

[0028] 在本发明用于复制、扩增或测序的方法的一个优选实施方案中, ϕ 29 型 DNA 聚合酶(天然的或在核酸外切酶结构域中被修饰的)的浓度为 5nM-75nM。在一个更优选实施方案中, ϕ 29 型 DNA 聚合酶(天然的或在核酸外切酶结构域中被修饰的)的浓度为 25nM-60nM。在又一更优选实施方案中, ϕ 29 型 DNA 聚合酶(天然的或在核酸外切酶结构域中被修饰的)的浓度为大约 50nM。

[0029] 在本发明用于复制、扩增或测序的方法的一个优选实施方案中,聚氧乙烯化单月桂酸山梨坦(Tween® 20)的浓度为总反应体积的 0.003% -0.1%。在一个更优选实施方案中,聚氧乙烯化单月桂酸山梨坦的比例为总反应体积的 0.006% -0.05%。在又一更优选实施方案中,聚氧乙烯化单月桂酸山梨坦的比例为总反应体积的 0.01% -0.03%。在又一更优选实施方案中,聚氧乙烯化单月桂酸山梨坦的比例为总反应体积的大约 0.025%。“总反应体积”应理解为将模板 DNA 加入到反应混合物中以后得到的体积。

[0030] 在本发明用于复制、扩增或测序的方法的一个优选实施方案中,铵盐选自:硫酸铵、氯化铵或乙酸铵。

[0031] 在本发明用于复制、扩增或测序的方法的一个优选实施方案中,铵盐为硫酸铵。在一个更优选实施方案中,硫酸铵的浓度为 30mM-60mM。在又一更优选实施方案中,硫酸铵的浓度为 40mM-50mM。在又一更优选实施方案中,硫酸铵的浓度为大约 45mM。

[0032] 在本发明用于复制、扩增或测序的方法的一个优选实施方案中,铵盐为氯化铵。在一个更优选实施方案中,氯化铵的浓度为 60mM-120mM。在又一更优选实施方案中,氯化铵的浓度为 80mM-100mM。在又一更优选实施方案中,氯化铵的浓度为大约 90mM。

[0033] 在本发明用于复制、扩增或测序的方法的一个优选实施方案中,铵盐为乙酸铵。在一个更优选实施方案中,乙酸铵的浓度为 60mM-120mM。在又一更优选实施方案中,乙酸铵的浓度为 80mM-100mM。在又一更优选实施方案中,乙酸铵的浓度为大约 90mM。

[0034] 在本发明用于复制、扩增或测序的方法的一个优选实施方案中,缓冲液的 pH 为 7.0-8.5。在一个更优选实施方案中,缓冲液的 pH 为 7.2-8。在又一更优选实施方案中,缓冲液的 pH 为大约 7.5。

[0035] 在本发明用于复制、扩增或测序的方法的一个优选实施方案中,缓冲液为 tris- 盐酸、tris- 乙酸或 HEPES。在本发明用于复制、扩增或测序的方法的一个更优选实施方案中,缓冲液 tris- 盐酸、tris- 乙酸或 HEPES 的 pH 为 7.0-8.5。在又一更优选实施方案中,缓冲液 tris- 盐酸、tris- 乙酸或 HEPES 的 pH 为 7.2-8。在又一更优选实施方案中,缓冲液 tris- 盐酸、tris- 乙酸或 HEPES 的 pH 为大约 7.5。

[0036] 在本发明用于复制、扩增或测序的方法该方面的一个优选实施方案中,缓冲液 tris- 盐酸、tris- 乙酸或 HEPES 的浓度为 25mM-50mM。在一个更优选实施方案中,缓冲液 tris- 盐酸、tris- 乙酸或 HEPES 的浓度为 30mM-45mM。在又一更优选实施方案中,缓冲液 tris- 盐酸、tris- 乙酸或 HEPES 的浓度为大约 40mM。

[0037] 在本发明用于复制、扩增或测序的方法的一个优选实施方案中,氯化钾或乙酸钾

的浓度为 30mM-70mM。在一个更优选实施方案中,氯化钾或乙酸钾的浓度为 40mM-60mM。在又一更优选实施方案中,氯化钾或乙酸钾的浓度为大约 50mM。

[0038] 在本发明用于复制、扩增或测序的方法的一个优选实施方案中,氯化镁的浓度为 2mM-20mM。在一个更优选实施方案中,氯化镁的浓度为 5mM-15mM。在又一更优选实施方案中,氯化镁为大约 10mM。

[0039] 在本发明用于复制、扩增或测序的方法的一个优选实施方案中,聚氧乙烯化单月桂酸山梨坦的比例为总体积的 0.01% -0.03%,硫酸铵的浓度为 40mM-50mM,缓冲液 tris- 盐酸、tris- 乙酸或 HEPES 的浓度为 30mM-45mM 和 pH 为 7.2-8.0,氯化镁的浓度为 5mM-15mM,且氯化钾或乙酸钾的浓度为 40mM-60mM。

[0040] 在本发明用于复制、扩增或测序的方法的一个优选实施方案中,聚氧乙烯化单月桂酸山梨坦的浓度为总体积的 0.025%,硫酸铵的浓度为 45mM,缓冲液 tris- 盐酸、tris- 乙酸或 HEPES 的浓度为 40mM 和 pH 为 7.5,氯化镁的浓度为 10mM,且氯化钾或乙酸钾的浓度为 50mM。

[0041] 在本发明用于复制、扩增或测序的方法的一个优选实施方案中,聚氧乙烯化单月桂酸山梨坦的比例为总体积的 0.01% -0.03%,氯化铵的浓度为 80mM-100mM,缓冲液 tris- 盐酸、tris- 乙酸或 HEPES 的浓度为 30mM-45mM 和 pH 为 7.2-8.0,氯化镁的浓度为 5mM-15mM,且氯化钾或乙酸钾的浓度为 40mM-60mM。

[0042] 在本发明用于复制、扩增或测序的方法的一个更优选实施方案中,聚氧乙烯化单月桂酸山梨坦的浓度为总体积的 0.025%,氯化铵的浓度为 90mM,缓冲液 tris- 盐酸、tris- 乙酸或 HEPES 的浓度为 40mM 和 pH 为 7.5,氯化镁的浓度为 10mM,且氯化钾或乙酸钾的浓度为 50mM。

[0043] 在本发明用于复制、扩增或测序的方法的一个优选实施方案中,聚氧乙烯化单月桂酸山梨坦的比例为总体积的 0.01% -0.03%,乙酸铵的浓度为 80mM-100mM,缓冲液 tris- 盐酸、tris- 乙酸或 HEPES 的浓度为 30mM-45mM 和 pH 为 7.2-8.0,氯化镁的浓度为 5mM-15mM,且氯化钾或乙酸钾的浓度为 40mM-60mM。

[0044] 在本发明用于复制、扩增或测序的方法的一个更优选实施方案中,聚氧乙烯化单月桂酸山梨坦的浓度为总体积的 0.025%,乙酸铵的浓度为 90mM,缓冲液 tris- 盐酸、tris- 乙酸或 HEPES 的浓度为 40mM 和 pH 为 7.5,氯化镁的浓度为 10mM,且氯化钾或乙酸钾的浓度为 50mM。

[0045] 本说明书所用术语“复制”涉及从模板 DNA 合成互补 DNA。

[0046] 本说明书所用术语“扩增”涉及增加模板 DNA 的拷贝数。

[0047] 本说明书所用术语“测序”涉及测定模板 DNA 核苷酸的顺序。

[0048] “接触”应理解为这样的事实,即在引物延伸条件下孵育模板 DNA 与反应混合物。

[0049] 本文所用术语“引物”涉及当其在引物延伸条件下时能够作为 DNA 合成起点起作用的寡核苷酸。优选引物为脱氧核糖寡核苷酸。

[0050] 可通过任何合适的方法制备引物,所述方法包括例如但不限于直接化学合成。可将引物设计为与模板 DNA 的特定脱氧核苷酸序列杂交(特异性引物),或可随机合成(随意引物)。

[0051] 本说明书所用术语“特异性引物”涉及其序列与待扩增的模板 DNA 的特定脱氧核

核苷酸序列互补的引物。

[0052] “互补”应理解为这样的事实,即引物可与模板 DNA 的区域杂交,使得当其在引物延伸条件下时可作为 DNA 合成起点起作用。优选该区域与模板 DNA 的区域具有 100% 互补性。换言之,与引物互补的区域中的各核苷酸可与单链模板中存在的核苷酸形成氢键。然而,具有本领域一般知识的人员将会承认,含相对于模板 DNA 具有小于 100% 互补性的区域的引物可发挥作用以实施本发明用于复制、扩增或测序的方法。

[0053] 术语“随意引物”涉及其序列随机合成并用于在模板 DNA 的随机位置起始 DNA 合成的引物。通常,在本发明用于复制、扩增或测序的方法中,使用一组随意引物。术语“随意引物”涉及具有随机序列并用于在模板 DNA 的随机位置起始 DNA 合成的一系列引物。

[0054] 在本发明用于复制、扩增或测序的方法的一个优选实施方案中,引物为特异性的。

[0055] 在本发明用于复制、扩增或测序的方法的另一优选实施方案中,引物为随意的。优选随意引物受到保护免受 3' -5' 核酸外切酶的作用。且更优选随意引物为 6 个核苷酸的寡核苷酸、“六核苷酸”或“六聚物”,其受到保护免受 3' -5' 核酸外切酶的作用。

[0056] 本说明书所用表述“受到保护免受核酸外切酶的作用”涉及经修饰的引物,使得其抵抗 DNA 聚合酶中存在的任何 3' -5' 核酸外切酶活性的核酸降解。

[0057] 在本发明用于复制、扩增或测序的方法中,可使用不止一种引物,能使用特异性引物和 / 或随意引物。

[0058] 在本发明用于复制、扩增或测序的方法的一个优选实施方案中,引物的浓度为 2 μ M-100 μ M。在一个更优选实施方案中,引物为的浓度 20 μ M-80 μ M。在又一更优选实施方案中,引物的浓度为 40 μ M-60 μ M。在又一更优选实施方案中,引物的浓度为大约 50 μ M。

[0059] 本说明书所用术语“核苷三磷酸”涉及由戊糖、氮碱基和三个磷酸基团的共价键形成的有机分子。

[0060] 术语核苷三磷酸包括脱氧核苷三磷酸 (dNTP), 例如但不限于 dATP、dCTP、dTTP、dUTP、dGTP、dTTP 或其衍生物。优选脱氧核苷三磷酸为 dATP、dTTP、dGTP 和 dCTP。甚至更优选这四种 dNTP 处于等摩尔条件。在本发明该方面的一个优选实施方案中,脱氧核苷三磷酸的浓度为 100 μ M-800 μ M。在一个更优选实施方案中,脱氧核苷三磷酸的浓度为 200 μ M-600 μ M。在又一更优选实施方案中,脱氧核苷三磷酸的浓度为大约 500 μ M。

[0061] 术语核苷三磷酸亦包括双脱氧核苷三磷酸 (ddNTP), 例如但不限于 ddATP、ddCTP、ddITP、ddUTP、ddGTP、ddTTP 或其衍生物。

[0062] 在本发明用于复制、扩增或测序的方法的一些优选实施方案中,通过本领域现状中熟知的技术标记至少一种核苷三磷酸或一种引物。被标记的核苷酸可为例如脱氧核苷三磷酸或双脱氧核苷三磷酸。可检测的标记包括例如放射性同位素、荧光标记、化学发光标记、生物发光标记或酶标记。

[0063] 本说明书所用术语“模板 DNA”涉及可作为用于合成互补 DNA 链的底物的 DNA 分子; 即其涉及待复制、扩增或测序的 DNA 分子。在一个优选实施方案中,模板 DNA 为质粒 DNA。在另一优选实施方案中,模板 DNA 为基因组 DNA。

[0064] 在引物延伸条件下实施模板 DNA 的复制、扩增或测序。表述“引物延伸条件”指其中可发生在引物中起始的依赖模板 DNA 的合成条件。

[0065] 按照本发明用于复制、扩增或测序的方法,可通过热循环过程或在基本上恒温下

发生模板 DNA 合成。

[0066] “等温条件”应理解为基本上恒温。按照本发明用于复制、扩增或测序的方法，优选模板 DNA 合成在基本上恒温下发生。更优选基本上恒温为 25-40℃，甚至更优选为大约 30℃。

[0067] 允许 DNA 扩增的大量方法在本领域现状中众所周知。一些方法需要热循环过程，例如但不限于聚合酶链式反应 (PCR)。其它方法不需要热循环过程，而是在基本上恒温下进行，例如但不限于滚环式扩增 (RCA)、多重置换扩增 (multiple detachment amplification, MDA)、链置换扩增 (SDA) 或环介导扩增 (LAMP)。按照本发明方法可通过热循环过程或在基本上恒温下发生模板 DNA 扩增。

[0068] 按照本发明扩增方法，优选通过滚环式扩增 (RCA)、通过多重置换扩增 (MDA)、链置换扩增 (SDA) 或环介导扩增 (LAMP) 来进行模板 DNA 的扩增。

[0069] 本发明另一方面涉及一种包括适于实施本发明用于复制、扩增或测序的方法的组成部分的试剂盒或装置。

[0070] 本发明另一方面涉及一种用于实施本发明用于复制、扩增或测序的方法的试剂盒，所述试剂盒包括：

[0071] a) ϕ 29 型 DNA 聚合酶；

[0072] b) 聚氧乙烯化单月桂酸山梨坦；

[0073] c) 铵盐；

[0074] d) 缓冲液；和

[0075] e) 氯化镁。

[0076] 优选所述铵盐选自：硫酸铵、氯化铵或乙酸铵。

[0077] 在本发明该方面的一个优选实施方案中，试剂盒还包括钾盐。优选所述钾盐为氯化钾或乙酸钾。

[0078] 在本发明该方面一个优选实施方案中，试剂盒还包括引物。在一个更优选实施方案中，引物为受到保护免受 3' -5' 核酸外切酶作用的随意引物。

[0079] 在本发明该方面一个优选实施方案中，试剂盒还包括核苷三磷酸。例如，在本发明该方面一个更优选实施方案中，试剂盒还包括脱氧核苷三磷酸和 / 或双脱氧核苷三磷酸。

[0080] 在本发明该方面一个优选实施方案中，试剂盒包括至少一种核苷三磷酸或一种标记引物。标记的核苷可为例如脱氧核苷三磷酸或双脱氧核苷三磷酸。

[0081] 试剂盒还可包括但不限于任何形式的缓冲液、防止污染的试剂等。在另一方面，试剂盒可包括用于将其付诸实施及用于其优化所需的所有支持物和容器。优选试剂盒还包括用于实施本发明方法的说明书。

[0082] 贯穿本说明书和权利要求书的术语“包含”及其变体不排除其它技术特征、添加剂、组分或步骤。对于本领域技术人员而言，可部分地从本说明书和部分地从本发明的实施推知其它目的、优势及特征。通过举例说明提供以下附图及实施例，其不限制本发明。

附图说明

[0083] 图 1 显示 Tween® 20 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 在 ϕ 29 DNA 聚合酶扩增能力方面的作用。如主要的正文所述在所示量的质粒 DNA (4.2 kpb) 存在下实施测定。在 30℃ 孵育 5 小时后，如主

要的正文所述分析反应物。左边为用作 DNA 长度标记的在用 HindIII 消化 ϕ 29DNA 后获得的线性 DNA 片段。

[0084] 图 2 显示 ϕ 29DNA 聚合酶在 Tween® 20 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 存在下对不同量的质粒 DNA (飞克数量级) 的扩增。如主要的正文所述在 0.025% Tween® 20 和 45mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 存在下实施测定。DNA 长度标记与图 1 中所用相同。

[0085] 图 3 显示 NH_4^+ 离子在 ϕ 29DNA 聚合酶扩增能力方面的作用。如主要的正文所述在 0.025% Tween® 20 和所示铵盐以及所示量的质粒 DNA (4.2kpb) 存在下实施测定。在 30°C 孵育 6 小时后, 如主要的正文所述分析反应物。DNA 长度标记与图 1 中所用相同。

[0086] 图 4 显示 ϕ 29DNA 聚合酶在 Tween® 20 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 存在下对不同量枯草芽孢杆菌基因组 DNA 的扩增。如主要的正文所述在 0.025% Tween® 20 和 45mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 存在下实施测定。DNA 长度标记与图 1 中所用相同。

[0087] 图 5 显示通过将 0.025% Tween® 20 和 45mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 加入到用于基于 ϕ 29 DNA 聚合酶的 DNA 扩增的商业试剂盒 (General Electrics HealthCare 的 Illustra 试剂盒) 的目前反应缓冲液中所表示的显著改进。如主要的正文所述实施测定。DNA 长度标记与图 1 中所用相同。

[0088] 实施例 用于 ϕ 29DNA 聚合酶扩增多引物 DNA 的实验条件的优化

[0089] 本专利文件中提供的以下具体实施例起阐明本发明特性的作用。包括这些实施例仅为了阐明目的, 不必理解为对本文主张的本发明的限制。因此, 下述实施例阐明本发明而不限制其应用领域。

[0090] 业已显示 ϕ 29DNA 聚合酶从几皮克环状 DNA 开始扩增 10^4 – 10^6 倍。为此目的, 使用含有 40mM tris-HCl (pH 7.5)、50mM KCl 和 10mM MgCl_2 (下文称为缓冲液 A) 的反应缓冲液。在测试不同去污剂和盐条件对 ϕ 29DNA 聚合酶的 DNA 扩增能力的影响后, 发现将 0.025% Tween® 20 和 45mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 同时加入到缓冲液 A 中, 大大改善所提供的有限量的 DNA 的扩增。

[0091] 用于扩增质粒 DNA 的反应条件。- 孵育混合物含有 12.5 μ l 缓冲液 A、50 μ M 受保护免受 3'–5' 核酸外切酶作用的六聚物、500 μ M 的各脱氧核苷三磷酸 (dCTP、dGTP、dTTP 和 dATP)、所示量的质粒 DNA (大小为 4.2kbp), 并按所示加入 45mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 或 0.025% Tween® 20 或二者的组合。通过在 95°C 孵育 3 分钟和随后在冰中冷却 5 分钟, 使 DNA 变性。加入 50nM ϕ 29DNA 聚合酶后起始反应, 通过加热到 65°C 持续 10 分钟在 30°C 孵育后终止反应。为了分析结果, 从反应物中取出 1 μ l 样品, 用 EcoRI 限制性核酸内切酶消化扩增的 DNA, 并在 0.7% 琼脂糖凝胶中电泳。通过用溴化乙锭对凝胶染色来检测 DNA。

[0092] 用于扩增基因组 DNA 的反应条件。- 孵育混合物含有 12.5 μ l 缓冲液 A、45mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.025% Tween® 20、50 μ M 受保护免受 3'–5' 核酸外切酶作用的六聚物、500 μ M 各脱氧核苷三磷酸 (dCTP、dGTP、dTTP 和 dATP) 和所示量的枯草芽孢杆菌基因组 DNA (大小为 4Mpb)。通过在 95°C 孵育 3 分钟和随后在冰中冷却 5 分钟来使 DNA 变性。加入 50nM ϕ 29DNA 聚合酶后起始反应, 通过加热到 65°C 持续 10 分钟在 30°C 孵育后终止反应。为了分析结果, 从反应物中取出 1 μ l 样品, 并在 0.7% 琼脂糖凝胶中电泳。通过用溴化乙锭对凝胶染色来检测 DNA。

[0093] 图 1 显示加入 45mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 0.025% Tween® 20 在扩增所提供的少量质粒 DNA

中的作用。如所示,当使用 100fg 所提供的 DNA 时, ϕ 29DNA 聚合酶用标准缓冲液 A 未产生可检测的任何扩增产物。在这些反应条件中,在不存在 DNA 时加入 0.025% Tween® 20 导致出现痕量 DNA 产物,大部分可能是由于随机六聚物引物的杂交和延伸引起的非特异性 DNA 扩增。用 10fg 所提供的 DNA 观察到同样的痕量。然而,在 100fg 所提供的 DNA 存在下,加入 0.025% Tween® 20 使得 ϕ 29DNA 聚合酶能够产生可检测量的扩增的质粒。特异性或非特异性扩增的 DNA 的总产量表明,将 0.025% Tween® 20 加入到缓冲液 A 中促进了 ϕ 29DNA 聚合酶的扩增能力。用 NP40 去污剂观察到相似的作用。相反,所分析的其它去污剂例如 Triton X100 和 Triton X114 未促进 ϕ 29DNA 聚合酶的扩增能力(未显示)。将 0.025% Tween® 20 和 45mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 同时加入到缓冲液 A 中,在扩增产物的产量及特异性方面具有两种结果:1) 在不存在所提供的 DNA 时检测不到 DNA 扩增;2) 即使在所提供的 DNA 量低至 10fg 时,通过扩增也获得若干 μg 的单位长度的质粒 DNA。作为对照,将 45mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 加入到缓冲液 A 中对 ϕ 29DNA 聚合酶扩增能力不产生任何改进。

[0094] 因此,可得出的结论是,将 0.025% Tween® 20 和 45mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 同时加入到缓冲液 A 中(下文称为缓冲液 B)对于实施 ϕ 29DNA 聚合酶对环状 DNA 的多重引发扩增的实验条件产生明显优化,二者皆为扩增所提供的有限量(10fg)的 DNA 所绝对必需的试剂。事实上,如图 2 所见,使用缓冲液 B 使得 ϕ 29DNA 聚合酶能够用低至 0.1fg(约 24 个分子)的所提供的质粒量在 6 小时反应后合成微克 DNA。作为质量控制,用 EcoRI 消化扩增产物产生了 4.2kb 的线性 dsDNA 片段,这表明扩增产物确实是原始质粒的串联重复。此外,缓冲液 B 亦防止非特异性 DNA 扩增(参见图 2 中对应于未提供 DNA 所实施的反应的泳道)。

[0095] 图 3 显示铵离子和 0.025% Tween® 20 在改进扩增少量质粒 DNA 方面的作用。在 0.025% Tween® 20 和所示铵盐存在下在先前所述条件中实施测定。如图 3 可观察到的, NH_4Cl 和 $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ 二者都在扩增产物的产量和特异性方面具有与 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 相似的作用。该结果表明,前述 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 在扩增有限量质粒 DNA 中的作用是由于 NH_4^+ 离子。

[0096] 为了测定上述优化条件是否亦适用于扩增基因组 DNA,在有限浓度的枯草芽孢杆菌基因组 DNA(长 4Mpb)存在下,进行了所实施的同样类型的测定。如图 4 所示,在缓冲液 B 中存在 0.025% Tween® 20 和 45mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,一方面防止非特异性 DNA 扩增(无所提供的 DNA 的泳道),另一方面使得 ϕ 29DNA 聚合酶能够产生可检测的和特异性的基因组 DNA 扩增,即使在使用 10fg 所提供的 DNA 时,即相比目前商业基因组扩增试剂盒所推荐的量降低至 $1/10^6$ 。

[0097] 为了测定同时加入 0.025% Tween® 20 和 45mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 是否提高用于基于 ϕ 29 DNA 聚合酶的 DNA 扩增的目前商业试剂盒的扩增效率,进行了如图 1、2 和 3 所述相同类型的质粒 DNA 扩增测定。图 5 显示通过将 0.025% Tween® 20 和 45mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 加入到 Illustra 试剂盒(GE HealthCare)的目前反应缓冲液中所表示的显著改进。如可观察到的,根据供应商的推荐,用 Illustra 试剂盒只有在所提供的质粒量等于或大于 10pg 时,才可以以在琼脂糖凝胶中可检测的方式扩增。与此相反,将 0.025% Tween® 20 和 45mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 同时加入到 Illustra 试剂盒的反应缓冲液中,显著降低所需的可扩增的 DNA 的量,从所提供的 1fg 质粒 DNA 可观察到扩增产物,这涉及扩增的四个数量级的提高。

[0001]

CPCH1163910P

序 列 表

<110> 康斯乔最高科学研究公司

<120> 用于对模板 DNA 进行复制、扩增和测序的方法

<130> ES1641.386.2

<160> 1

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 572

<212> PRT

<213> 噬菌体 phi-29

<400> 1

Met Pro Arg Lys Met Tyr Ser Cys Asp Phe Glu Thr Thr Thr Lys Val
1 5 10 15

Glu Asp Cys Arg Val Trp Ala Tyr Gly Tyr Met Asn Ile Glu Asp His
20 25 30

Ser Glu Tyr Lys Ile Gly Asn Ser Leu Asp Glu Phe Met Ala Trp Val
35 40 45

Leu Lys Val Gln Ala Asp Leu Tyr Phe His Asn Leu Lys Phe Asp Gly
50 55 60

Ala Phe Ile Ile Asn Trp Leu Glu Arg Asn Gly Phe Lys Trp Ser Ala
65 70 75 80

Asp Gly Leu Pro Asn Thr Tyr Asn Thr Ile Ile Ser Arg Met Gly Gln
85 90 95

Trp Tyr Met Ile Asp Ile Cys Leu Gly Tyr Lys Gly Lys Arg Lys Ile
100 105 110

His Thr Val Ile Tyr Asp Ser Leu Lys Lys Leu Pro Phe Pro Val Lys

[0002]

115	120	125
Lys Ile Ala Lys Asp Phe	Lys Leu Thr Val Leu	Lys Gly Asp Ile Asp
130	135	140
Tyr His Lys Glu Arg Pro	Val Gly Tyr Lys Ile Thr	Pro Glu Glu Tyr
145	150	155 160
Ala Tyr Ile Lys Asn Asp	Ile Gln Ile Ile Ala Glu	Arg Leu Leu Ile
165	170	175
Gln Phe Lys Gln Gly Leu	Asp Arg Met Thr Ala Gly	Ser Asp Ser Leu
180	185	190
Lys Gly Phe Lys Asp Ile	Ile Thr Thr Lys Lys Phe	Lys Lys Val Phe
195	200	205
Pro Thr Leu Ser Leu Gly	Leu Asp Lys Glu Val Arg	Tyr Ala Tyr Arg
210	215	220
Gly Gly Phe Thr Trp Leu	Asn Asp Arg Phe Lys Glu	Lys Glu Ile Gly
225	230	235 240
Glu Gly Met Val Phe Asp	Val Asn Ser Leu Tyr Pro	Ala Gln Met Tyr
245	250	255
Ser Arg Leu Leu Pro Tyr	Gly Glu Pro Ile Val Phe	Glu Gly Lys Tyr
260	265	270
Val Trp Asp Glu Asp Tyr	Pro Leu His Ile Gln His	Ile Arg Cys Glu
275	280	285
Phe Glu Leu Lys Glu Gly	Tyr Ile Pro Thr Ile Gln	Ile Lys Arg Ser
290	295	300
Arg Phe Tyr Lys Gly Asn	Glu Tyr Leu Lys Ser Ser	Gly Gly Glu Ile
305	310	315 320

[0003]

Ala Asp Leu Trp Leu Ser Asn Val Asp Leu Glu Leu Met Lys Glu His
325 330 335

Tyr Asp Leu Tyr Asn Val Glu Tyr Ile Ser Gly Leu Lys Phe Lys Ala
340 345 350

Thr Thr Gly Leu Phe Lys Asp Phe Ile Asp Lys Trp Thr Tyr Ile Lys
355 360 365

Thr Thr Ser Glu Gly Ala Ile Lys Gln Leu Ala Lys Leu Met Leu Asn
370 375 380

Ser Leu Tyr Gly Lys Phe Ala Ser Asn Pro Asp Val Thr Gly Lys Val
385 390 395 400

Pro Tyr Leu Lys Glu Asn Gly Ala Leu Gly Phe Arg Leu Gly Glu Glu
405 410 415

Glu Thr Lys Asp Pro Val Tyr Thr Pro Met Gly Val Phe Ile Thr Ala
420 425 430

Trp Ala Arg Tyr Thr Thr Ile Thr Ala Ala Gln Ala Cys Tyr Asp Arg
435 440 445

Ile Ile Tyr Cys Asp Thr Asp Ser Ile His Leu Thr Gly Thr Glu Ile
450 455 460

Pro Asp Val Ile Lys Asp Ile Val Asp Pro Lys Lys Leu Gly Tyr Trp
465 470 475 480

Ala His Glu Ser Thr Phe Lys Arg Val Lys Tyr Leu Arg Gln Lys Thr
485 490 495

Tyr Ile Gln Asp Ile Tyr Met Lys Glu Val Asp Gly Lys Leu Val Glu
500 505 510

[0004]

Gly	Ser	Pro	Asp	Asp	Tyr	Thr	Asp	Ile	Lys	Phe	Ser	Val	Lys	Cys	Ala
		515					520					525			

Gly	Met	Thr	Asp	Lys	Ile	Lys	Lys	Glu	Val	Thr	Phe	Glu	Asn	Phe	Lys
		530					535				540				

Val	Gly	Phe	Ser	Arg	Lys	Met	Lys	Pro	Lys	Pro	Val	Gln	Val	Pro	Gly
545						550				555					560

Gly	Val	Val	Leu	Val	Asp	Asp	Thr	Phe	Thr	Ile	Lys
				565					570		

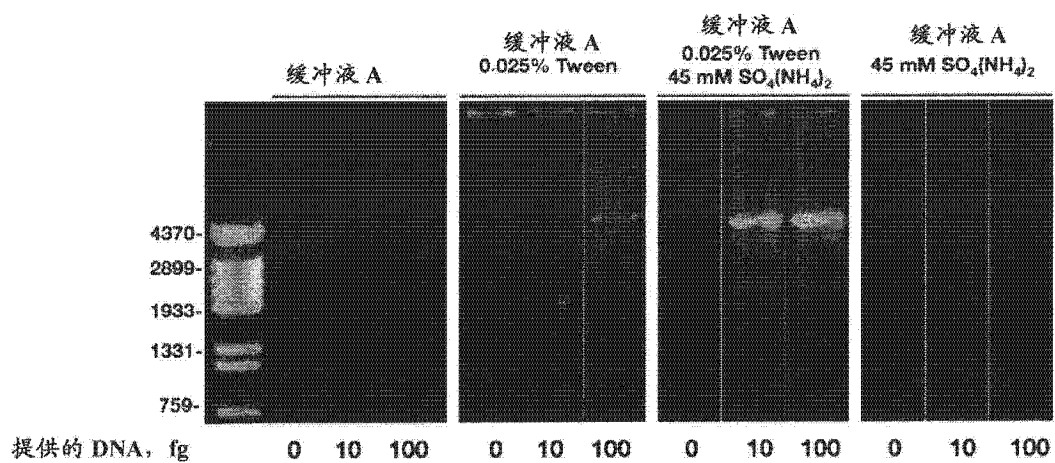


图 1

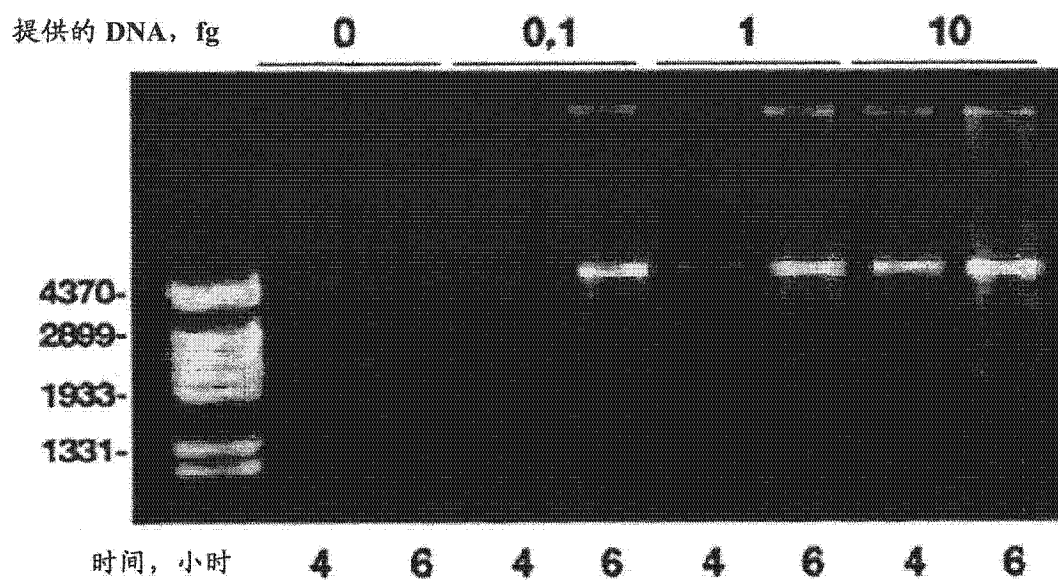


图 2

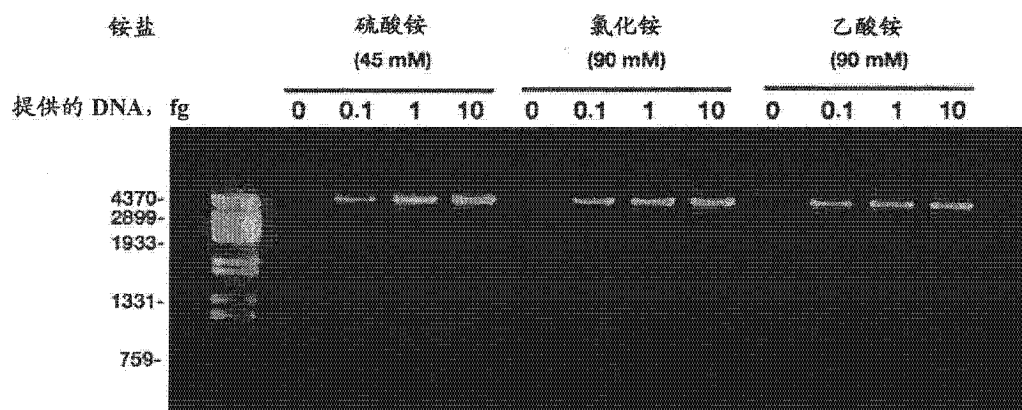


图 3

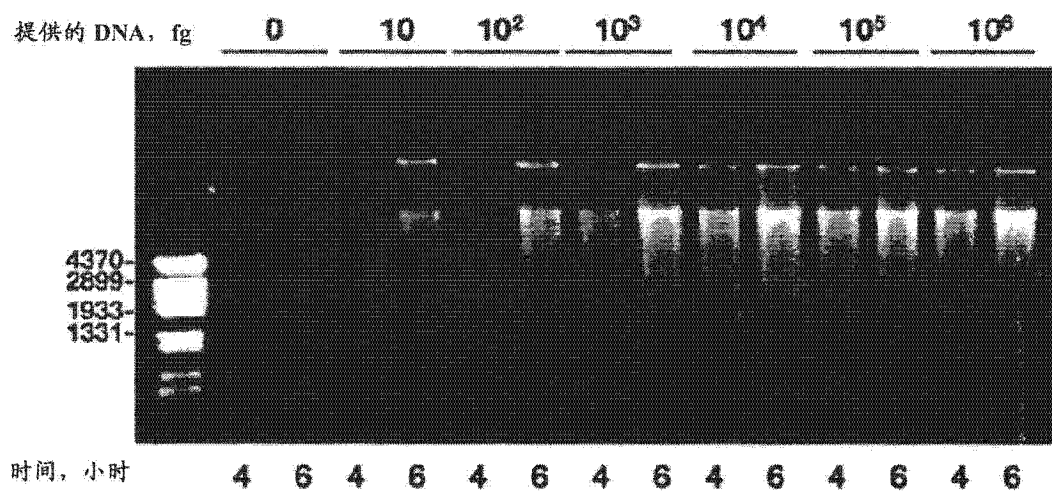


图 4

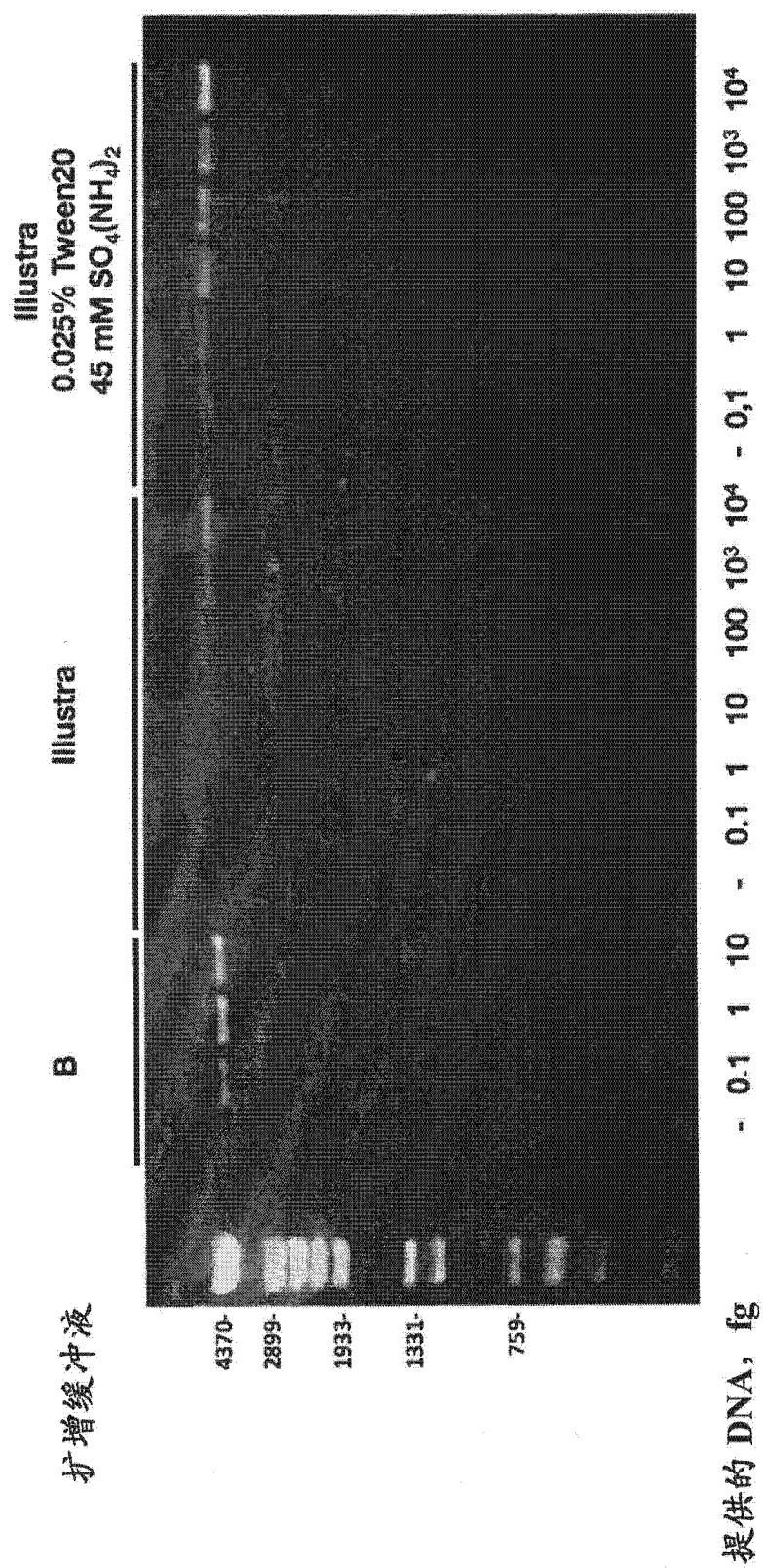


图 5