



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102027112 B

(45) 授权公告日 2013. 11. 06

(21) 申请号 200980113771. 9

代理人 陈长会

(22) 申请日 2009. 02. 20

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

C12N 15/10(2006. 01)

0803109. 8 2008. 02. 20 GB

(56) 对比文件

(85) PCT申请进入国家阶段日

COURT D.L..High efficiency mutagenesis, repair, and engineering of chromosomal DNA using single-stranded oligonucleotides. 《PROC NATL ACAD SCI USA》.2001, 第 98 卷 (第 12 期), 6742-6746.

2010. 10. 19

(86) PCT申请的申请数据

PCT/IB2009/000488 2009. 02. 20

(87) PCT申请的公布数据

韩聪. Red 同源重组技术研究进展. 《中国生物工程杂志》. 2003, 第 23 卷 (第 12 期), 17-21.

W02009/104094 EN 2009. 08. 27

(73) 专利权人 基因桥有限责任公司

审查员 李振鹏

地址 德国海德堡

(72) 发明人 马尔切诺·马雷斯卡

阿克塞尔·斯特凡·埃勒尔 付军

菲利普·马丁·赛贝特

阿迪安·弗朗西斯·斯图尔特

张佑明

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司
11021

权利要求书4页 说明书33页
序列表1页 附图22页

(54) 发明名称

核酸重组方法

(57) 摘要

本发明提供用于将单链置换核酸插入到靶核酸的方法,所述方法包括下述步骤:a) 由双链核酸产生单链置换核酸,其中所述双链核酸在其一个或两个 5' 端改变,以便优先降解一条链和 / 或链分离而产生所述单链置换核酸,其中所述单链置换核酸包括与所述靶核酸上序列相同的 5' 区、与所述靶核酸上序列相同的 3' 区和任选地在所述 5' 和 3' 区之间与所述靶核酸上序列不同的置换区, b) 在适于重组的条件下将所述靶核酸暴露于所述单链置换核酸,以在所述单链置换核酸和所述靶核酸之间发生重组,和 c) 选择这样的靶核酸,其序列已经通过包括所述单链置换核酸而改变。本发明还提供了用于修饰靶核酸的其它方法。

1. 用于将单链置换核酸插入靶核酸的方法,所述方法包括下述步骤:

a) 由双链核酸产生单链置换核酸,其中所述双链核酸在其一个或两个 5' 端改变,以便优先降解一条链和 / 或链分离而产生所述单链置换核酸,其中所述单链置换核酸包括与所述靶核酸上序列相同的 5' 区、与所述靶核酸上序列相同的 3' 区和任选地在所述 5' 和 3' 区之间与所述靶核酸上序列不同的置换区,

b) 在适于重组的条件下将所述靶核酸暴露于所述单链置换核酸,以在所述单链置换核酸和所述靶核酸之间发生重组,和

c) 选择这样的靶核酸,其序列已经通过包括所述单链置换核酸而改变,

其中步骤 (a) 和 (b) 在存在 Red β 或其功能等价物的条件下进行,其中所述功能等价物保留介导 β 重组的能力。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中步骤 (a) 和 (b) 在存在 (i) Red β 或其功能等价物和 (ii) 其 5' -3' 核酸外切酶配偶体的条件下进行,其中所述功能等价物保留介导 β 重组的能力。

3. 根据权利要求 1 所述的方法,其中步骤 (a) 和 (b) 在存在 (i) Red β 或其功能等价物和 (ii) 解旋酶的条件下进行,其中所述功能等价物保留介导 β 重组的能力。

4. 根据权利要求 1 所述的方法,其中步骤 (a) 和 (b) 在存在 (i) Red β 或其功能等价物, (ii) 其 5' -3' 核酸外切酶配偶体和 (iii) 解旋酶的条件下进行,其中所述功能等价物保留介导 β 重组的能力。

5. 根据权利要求 1 所述的方法,其中改变所述双链核酸,以使其在其 5' 端不对称,其中所述不对称性使得一条链优先被降解。

6. 根据权利要求 5 所述的方法,其中所述不对称性通过影响 5' -3' 核酸外切酶在一条链上的行进而不影响所述 5' -3' 核酸外切酶在另一条链上的行进的修饰而赋予。

7. 根据权利要求 5 所述的方法,其中所述不对称性由防止 5' -3' 核酸外切酶与一条链结合而不影响所述 5' -3' 核酸外切酶与另一条链结合的修饰而赋予。

8. 根据权利要求 5-7 中任一项所述的方法,其中所述不对称性是一种共价修饰,所述共价修饰存在于一条链的 5' 端或紧邻 5' 端,而不存在于另一条链的 5' 端并且不紧邻另一条链的 5' 端。

9. 根据权利要求 8 所述的方法,其中所述共价修饰选自由下列各项组成的组:硫代磷酸酯键,磷酸乙酯键,锁定核苷酸,羟基和 5' 突出端。

10. 根据权利要求 8 所述的方法,其中所述共价修饰选自由下列各项组成的组:5' 磷酸基团,齐平的或凹进的 5' 端,携带不与靶 DNA 相同的 DNA 序列区段的 5' 端,或在 DNA 链中包括替换脱氧胸苷核苷酸的脱氧尿苷核苷酸的 5' 端。

11. 根据权利要求 1-8 中任一项所述的方法,其中一条链在其 5' 端改变,以包括如权利要求 9 列举的共价修饰,并且另一条链在其 5' 端改变,以包括如权利要求 10 列举的共价修饰。

12. 根据权利要求 6 或权利要求 7 所述的方法,其中一条链改变,以在一条链的 5' 端或 5' 端紧邻处而不在另一条链的 5' 端或 5' 端紧邻处包括 Red α 核酸外切酶中止序列或 cos 位点。

13. 根据权利要求 1-12 中任一项所述的方法,其中步骤 (a) 在存在 Red β 或其功能等

价物和存在 Red γ 或其功能等价物且不存在 Red α 或其功能等价物的条件下进行,其中所述功能等价物保留介导 β 重组的能力。

14. 根据权利要求 1-12 中任一项所述的方法,其中步骤 (a) 和 (b) 在存在 Red β 或其功能等价物、Red γ 或其功能等价物和 Red α 或其功能等价物的条件下进行,其中所述功能等价物保留介导 β 重组的能力。

15. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述双链核酸被改变,以在其两个 5' 端包括共价修饰。

16. 根据权利要求 15 所述的方法,其中所述共价修饰是存在生物素分子或硫代磷酸酯。

17. 根据权利要求 15 或权利要求 16 所述的方法,其中步骤 (a) 和 (b) 在存在 Red β 和解旋酶的条件下进行。

18. 根据权利要求 1-17 中任一项所述的方法,其中所述方法包括由两种或多种双链核酸或由一种或多种双链核酸以及一种或多种单链寡核苷酸制备双链核酸底物。

19. 根据权利要求 1-17 中任一项所述的方法,其中步骤 a)-c) 中的所述单链置换核酸是如步骤 a) 中限定的第一单链置换核酸,特别在 5' 和 3' 区之间包括置换区,并且所述方法包括另外的步骤 d)-f) :

d) 由第二双链核酸产生第二单链置换核酸,其中所述第二双链核酸在其一个或两个 5' 端被改变,以便优先降解一条链和 / 或链分离而产生所述第二单链置换核酸,其中所述第二单链置换核酸包括 :

i. 与第一单链置换核酸的置换区上的第一序列相同的 5' 区和与第一单链置换核酸的置换区上的第二序列相同的 3' 区,或与第一单链置换核酸的置换区上的第一序列互补的 5' 区和与第一单链置换核酸的置换区上的第二序列互补的 3' 区 ;和

ii. 任选地在所述 5' 和 3' 区之间与所述靶核酸上序列不同的置换区,

e) 在适于重组的条件下,将在步骤 c) 中所选择的靶核酸暴露于第二单链置换核酸,以在所述第二单链置换核酸和所选的靶核酸之间发生重组,和

f) 选择这样的靶核酸,其序列已经通过包括所述第二单链置换核酸而改变。

20. 根据权利要求 1-17 中任一项所述的方法,其中步骤 a)-c) 为 :

a) 生成下述

i) 由第一双链核酸生成第一单链置换核酸,其中所述第一双链核酸在其一个或两个 5' 端被改变,以便优先降解一条链和 / 或链分离而产生所述第一单链置换核酸,其中所述第一单链置换核酸包括与所述靶核酸上序列相同的 5' 区、与所述靶核酸上序列相同的 3' 区和在所述 5' 和 3' 区之间与所述靶核酸上序列不同的置换区,和

ii) 由第二双链核酸产生第二单链置换核酸,其中所述第二双链核酸在其一个或两个 5' 端被改变,以便优先降解一条链和 / 或链分离而产生所述第二单链置换核酸,其中所述第二单链置换核酸包括与第一单链核酸的置换序列上的第一序列互补的 5' 区,与第一单链核酸的置换序列上的第二序列互补的 3' 区,和任选地在所述 5' 和 3' 区之间与所述靶核酸上序列不同的置换区,

b) 在适于重组的条件下,将靶核酸暴露于所述第一和第二单链置换核酸,以在所述第一和第二单链置换核酸与所述靶核酸之间发生重组,和

c) 选择这样的靶核酸,其序列已经通过包括所述第一和第二单链置换核酸而改变。

21. 用于在靶核酸中产生突变的方法,所述方法包括下述步骤:

a) 在存在 Red β 、或其功能等价物的条件下,在适于重组的条件下,将靶核酸暴露于单链置换核酸,以在所述单链置换核酸和靶核酸之间发生重组,其中所述功能等价物保留介导 β 重组的能力;

其中所述单链置换核酸包括与所述靶核酸上序列相同的 5' 区、与所述靶核酸上序列相同的 3' 区和在所述 5' 和 3' 区之间与所述靶核酸上序列不同的置换区,其中所述置换区为至少 61 个碱基长,和

b) 选择这样的靶核酸,其序列已经通过包括所述单链置换核酸而改变,

其中所述方法包括由双链核酸底物生成单链核酸底物,所述双链核酸底物被改变从而使其在其 5' 端是不对称的,其中所述不对称性使得一条链优先被降解。

22. 根据权利要求 21 所述的方法,其中步骤 a) 在不存在 Red α 或其功能等价物的条件下进行。

23. 根据权利要求 22 所述的方法,其中步骤 a) 在存在 RecA 的条件下进行。

24. 根据权利要求 21-23 中任一项所述的方法,其中步骤 a) 在存在 Red γ 的条件下进行。

25. 根据权利要求 21-24 中任一项所述的方法,其中步骤 a) 和 b) 中的所述单链置换核酸是如步骤 a) 中定义的第一单链置换核酸,并且所述方法包括另外的步骤 c) 和 d):

c) 在存在 Red β 、或其功能等价物的条件下,在适于重组的条件下,将步骤 b) 中所选择的靶核酸暴露于第二单链置换核酸,从而在所述第二单链置换核酸和所选择的靶核酸之间发生重组,其中所述功能等价物保留介导 β 重组的能力,

其中所述第二单链置换核酸包括:

i) 与第一单链核酸的置换区上的第一序列相同的 5' 区和与第一单链核酸的置换区上的第二序列相同的 3' 区,或与第一单链置换核酸的置换区上的第一序列互补的 5' 区和与第一单链置换核酸的置换区上的第二序列互补的 3' 区;和

ii) 在所述 5' 和 3' 区之间与所述靶核酸上序列不同的置换区,其中所述置换区为至少 61 个碱基长,

d) 选择这样的靶核酸,其序列已经通过包括所述第二单链置换核酸而改变。

26. 根据权利要求 21-24 中任一项所述的方法,其中步骤 a) 和 b) 为:

a) 在存在 Red β 、或其功能等价物的条件下,在适于重组的条件下,将靶核酸暴露于第一和第二单链置换核酸,以在所述第一和第二单链置换核酸和靶核酸之间发生重组,其中所述功能等价物保留介导 β 重组的能力;

其中

i) 所述第一单链置换核酸包括与所述靶核酸上序列相同的 5' 区、与所述靶核酸上序列相同的 3' 区和在所述 5' 和 3' 区之间与所述靶核酸上序列不同的置换区,其中所述置换区为至少 61 个碱基长,和

ii) 所述第二单链置换核酸包括与所述第一单链置换核酸的置换区上的第一序列互补的 5' 区、与所述第一单链置换核酸的置换区上的第二序列互补的 3' 区和在所述 5' 和 3' 区之间与所述靶核酸上序列不同的置换区,其中所述置换区为至少 61 个碱基长,和

b) 选择这样的靶核酸,其序列已经通过包括所述第一和第二单链置换核酸而改变。

27. 根据权利要求 1-20 中任一项所述的方法,其中所述单链置换核酸包括长度为至少 61 个核苷酸的置换区。

28. 根据权利要求 1-27 中任一项所述的方法,其中所述单链置换核酸包括长度为至少 200 个核苷酸的置换区。

29. 根据权利要求 1-28 中任一项所述的方法,其中所述单链置换核酸包括长度为至少 1500 个核苷酸的置换区。

30. 根据权利要求 27-29 中任一项所述的方法,其中所述单链置换核酸包括包含完整基因的置换区。

31. 根据权利要求 30 所述的方法,其中所述基因作用为选择标记,并且选择步骤包括所述基因的选择。

32. 根据权利要求 1-31 中任一项所述的方法,其中在所述靶核酸中包括所述单链置换核酸形成选自由置换、插入和缺失组成的组一个或多个突变。

33. 根据权利要求 32 所述的方法,其中所述突变是插入突变。

34. 根据权利要求 1-33 中任一项所述的方法,其中在所述单链置换核酸上与所述靶核酸上序列相同的 3' 区长于在所述单链置换核酸上与所述靶核酸上序列相同的 5' 区。

35. 根据权利要求 1-34 中任一项所述的方法,其中所述方法在真核生物中实施。

36. 根据权利要求 1-35 中任一项所述的方法,其中所述选择步骤包括使用浓度为高于最低有效剂量 5-70% 的抗生素并且将其中所述单链置换核酸暴露于所述靶核酸的宿主细胞在 19°C -33°C 的温度下温育 1-7 天的时间进行的抗生素选择。

37. 根据权利要求 1-36 中任一项所述的方法,其包括在宿主细胞中进行重组,所述宿主细胞中相对于其野生型对应物,其内源性 sbcB 核酸外切酶、或其直向同源物的活性已被减少或失活。

38. 根据权利要求 37 所述的方法,其中所述宿主细胞是其中其内源性 sbcB 核酸外切酶的活性已被减少或失活的大肠杆菌 (*E. coli*) 细胞。

39. 根据权利要求 1-38 中任一项所述的的方法,其包括使用 Red β 进行所述同源重组,其中所述 Red β 是在 E176 具有突变的 Red β 、或其变体。

40. 根据权利要求 39 所述的方法,其中所述突变是置换为选自 Gly, Thr, Pro, Ala 和 Ser 的氨基酸。

核酸重组方法

[0001] 本发明涉及通过同源重组改变靶基因组的序列的新方法。

[0002] 在数种体系中,例如在培养物形式的某些原核生物、酵母、小鼠胚胎干细胞和脊椎动物细胞系中,充分建立了利用同源重组的基因组改造。同源重组是在选定的靶位点特异性修饰天然基因组的唯一方式。这是可用于基因组改造的最准确和精确的方法。然而,其仅可以用于一些有选择的真核细胞体系中,大部分真核生物基因组不能利用同源重组进行改造。甚至在易进行的体系中,同源重组的绝对频率很低,并且需要专门的方法来选择正确的事件 (Glaser, S., Anastassiadis, K. 和 Stewart A. F. (2005) Current issues in mouse genome engineering (目前在小鼠基因组改造中的问题), Nature Genetics (自然遗传学), 37, 1187-93)。因此,同源重组实践中的任何改进对目前易进行或难以进行同源重组改造的那些体系有着潜在的益处。

[0003] 同源重组的特异性应用涉及其用于 DNA 改造的应用。除了包括主要的体外 DNA 改造方法的限制酶消化、DNA 连接和 PCR 的方法之外,近年来,在活的大肠杆菌 (*E. coli*) 细胞中应用同源重组已经极大扩展了所有 DNA 改造策略 (综述参见 Muyrers 等, Trends in Bioch Sci (生物化学科学趋势), (2001) 5 月; 26(5): 325-331)。这些通过同源重组进行 DNA 改造的方法笼统称为“引起重组的改造 (recombinogenic engineering)”或“重组 (recombineering)”,并且已经在常见的实验室酵母菌酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 和常见的克隆宿主大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中实施 (Muyrers, J. P. P., Zhang, Y. 和 Stewart A. F. 2001 Recombinogenic Engineering: new options for manipulating DNA (引起重组的改造: 操作 DNA 的新选择) Trends in Biochemical Sciences (生物化学科学趋势), 26, 325-31)。

[0004] 基因组和 DNA 分子的改造对于生命科学研究有着基本的重要性。例如,在酵母中通过同源重组进行基因靶向对于真核细胞生物学中的许多基础研究是至关重要的;在小鼠 ES 细胞中的基因靶向是建立人类疾病小鼠模型的奠基石 (Glaser 等, 2005, 同前);并且,在例如功能基因组学 (综述参见 Vukmirovic 和 Tilghman, Nature (自然) 405 (2000), 820-822)、结构基因组学 (综述参见 Skolnick 等, Nature Biotech (自然生物技术) 18 (2000), 283-287) 和蛋白质组学 (综述参见 Banks 等, Lancet (柳叶刀) 356 (2000), 1749-1756; Pandey 和 Mann, Nature (自然) 405 (2000), 837-846) 研究领域的许多研究和应用中需要核酸分子的构建和精确操作。

[0005] 重组可以基于内源性大肠杆菌 RecA 途径或基于由噬菌体蛋白介导的途径;例如,来自 λ 噬菌体的 Red α /Red β 或来自 rac 原噬菌体的 RecE/RecT, 优选地与 Red gam 蛋白一起。Gam 抑制 RecBCD 核酸酶, 由此保护线性双链 DNA (“dsDNA”) 不被 RecBCD 核酸酶降解。5' 到 3' 核酸外切酶活性 (用于 RecA 途径的 RecBCD, 用于 Red 途径的 Red α 或用于 RecE/T 途径的 RecE) 攻击 dsDNA 末端以切除 5' 末端的链, 留下 3' 末端的单链区 (Carter, D. M. 和 Radding, C. M., 1971, J. Biol. Chem. (生物化学杂志) 246, 2502-2512; Little, J. W. 1967, J. Biol. Chem. (生物化学杂志), 242, 679-686), 其被退火蛋白 (用于 RecA 途径的 RecA, 用于 Red 途径的 Red β 或用于 RecE/T 途径的 RecT) 包被着 (参见 Karakousis, G. 等, 1998,

J. Mol. Biol. (分子生物学杂志) 276, 721-731; Li, Z. 等, 1998, J. Mol. Biol. (分子生物学杂志), 276, 733-744; Passy, S. I. 等 PNAS USA, 1999, 96: 4279-4284; Thresher, R. J. 等 J. Mol. Biol. (分子生物学杂志), 1995, 254: 364-371)。在所有情形中, 事实表明退火蛋白负载到正在生长的单链 DNA (“ssDNA”) 区是由配偶体核酸外切酶促进的。退火蛋白/ssDNA 复合物起始在该退火蛋白/ssDNA 复合物中的两个 DNA 区及其在第二核酸上的互补区之间的同源重组。

[0006] 最近, 发现某些噬菌体退火蛋白 (Red β 和 RecT) 在提供有单链寡核苷酸时表现出不依赖于其核酸外切酶配偶体促进小的重组事件的活性。此外, 另一种退火蛋白, 即来自 P22 噬菌体的 Erf, 也表现出能够介导这种活性, 此处称为“ssOR” (单链寡核苷酸修复)。ssOR 活性记述在许多文献中, 包括 Muyrers, J. P. P. 等 (2001) “Phage annealing proteins mediate efficient oligonucleotide directed mutagenesis (噬菌体退火蛋白介导有效的寡核苷酸定向的诱变)”; 国际专利公布号 W002/062988 (Gene Bridges GmbH); Swaminathan S. 等 (2001) “Rapid engineering of bacterial artificial chromosomes using oligonucleotides (使用寡核苷酸快速改造细菌人工染色体)”, Genesis, 29: 14-21; Ellis H. M. 等, (2001) “High efficiency mutagenesis, repair, and engineering of chromosomal DNA using single-stranded oligonucleotides (使用单链寡核苷酸高效诱变、修复和改造染色体 DNA)”, Proc Natl Acad Sci U S A (美国国家科学院学报), 98: 6742-6; Court D. L. 等, (2002) “Genetic engineering using homologous recombination (利用同源重组的基因改造)”, Annu Rev Genet. (遗传学年度综述) 36: 361-88; Zhang, Y. 等, (2003) “Phage annealing proteins promote oligonucleotide-directed mutagenesis in E. coli and mouse ES cells (噬菌体退火蛋白促进在大肠杆菌和小鼠 ES 细胞中的寡核苷酸定向诱变)”, BMC Mol Biol (BMC 分子生物学), 4(1): 1; Yu, D. 等, (2003) “Recombineering with overlapping single-stranded DNA oligonucleotides: testing a recombination intermediate (利用重叠单链 DNA 寡核苷酸重组: 检测重组中间体)”, Proc Natl Acad Sci USA (美国国家科学院学报), 100: 7207-12; Costantino N. 和 Court D. L. (2003) “Enhanced levels of lambda Red-mediated recombinants in mismatch repair mutants (在错配修复突变体中升高水平的 λ Red-介导的重组体)”, Proc Natl Acad Sci USA (美国国家科学院学报), 100: 15748-53; Li X. T. 等, (2003) “Identification of factors influencing strand bias in oligonucleotide-mediated recombination in Escherichia coli (鉴定大肠杆菌中影响寡核苷酸定向重组中的链偏好性的因素)”, Nucleic Acids Res. (核酸研究) 31: 6674-87; Oppenheim A. B. 等, “In vivo recombineering of bacteriophage lambda by PCR fragments and single-strand oligonucleotides (噬菌体 λ 通过 PCR 片段和单链寡核苷酸的体内重组)”, Virology (病毒学), 2004 年 2 月 20 日; 319(2): 185-9; Huen, M. S. 等, (2006) “The involvement of replication in stranded oligonucleotide-mediated gene repair (复制参与单链寡核苷酸介导的基因修复)”, Nucleic Acids Res. (核酸研究) 34: 6183-94; 美国专利号 7, 144, 734 (NIH)。

[0007] ssOR 活性的详细分析形成基于 Red β -或 RecT-结合的寡核苷酸复合物与复制叉周围单链区的退火的模型 (Zhang, Y. 等, BMC Mol. Biol. (BMC 分子生物学), 4(1), 1;

Court, D.L. 等, (2002), Annu Rev. Genet. (遗传学年度综述), 36 :361-388)。这一模型, 称为“BARF”(Bias Annealing at the Replication Fork(偏好在复制叉处退火); Zhang, Y. 等, BMC Mol. Biol. (BMC 分子生物学), 4(1), 1) 包括将在 DNA 复制叉处后随链的靶点片段替换为置换单链寡核苷酸的短的中心片段, 由于寡核苷酸可以与后随链模板上的互补序列退火, 其被导向后随链。

[0008] BARF 模型解释 ssOR 活性的两个方面。第一, 其解释在没有伴随的核酸外切酶的条件下重组可以怎样发生, 因为复制叉, 而不是核酸外切酶, 是暴露靶点上核苷酸与之退火的单链区的介质。此外, 公知的是更大的单链区在后随链合成过程中而不是前导链合成过程中暴露, 由此提供寡核苷酸可以与之退火的更大的靶点区域。因此, 其解释了 ssOR 为什么显示出靶点上对于与后随链模板退火的链优先性。

[0009] 因此, 当前所报道的重组运用使用 dsDNA 或单链寡核苷酸作为起始底物。目前开发的单链寡核苷酸技术的应用已经局限在部分基因构建或引入小的、位点定向的突变。在较大部分中, 这是由于容易获得单链 (ss) 寡核苷酸而不容易获得较长的 ssDNA 的事实, 和使用单链寡核苷酸进行改造仅有效地引入长度小于 30 个核苷酸的非常小的突变的事实。已经发现通过用长于 30 个核苷酸的 ssDNA 进行同源重组引入新 DNA 序列效率非常低 (图 4C 所示)。除利用单链寡核苷酸外, 利用 ssDNA 重组的基因组和 DNA 改造仍为未开发的技术。因此, 本发明的目的是提供更有效且更有策略灵活性地改造基因组和 DNA 的改进的方法。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明提供将单链置换核酸插入到靶核酸中的方法, 所述方法包括下述步骤:

[0012] a) 由双链核酸产生单链置换核酸, 其中所述双链核酸在其一个或两个 5' 端改变, 以便优先降解一条链和 / 或链分离而产生所述单链置换核酸, 其中所述单链置换核酸包括与所述靶核酸上序列相同的 5' 区、与所述靶核酸上序列相同的 3' 区和任选地在所述 5' 和 3' 区之间与所述靶核酸上序列不同的置换区,

[0013] b) 在适于重组的条件下将所述靶核酸暴露于所述单链置换核酸, 以在所述单链置换核酸和所述靶核酸之间发生重组, 和

[0014] c) 选择这样的靶核酸, 其序列已经通过包括所述单链置换核酸而改变。

[0015] 本发明还提供在靶核酸中产生突变的方法, 所述方法包括下述步骤:

[0016] a) 在适于重组的条件下, 在 Red β 或其功能等价物的存在下, 将靶核酸暴露于单链置换核酸, 以在所述单链置换核酸和所述靶核酸之间发生重组,

[0017] 其中所述单链置换核酸包括与所述靶核酸上序列相同的 5' 区、与所述靶核酸上序列相同的 3' 区和在所述 5' 和 3' 区之间与所述靶核酸上序列不同的置换区, 其中所述置换区长度为至少 61 个碱基, 和

[0018] b) 选择这样的靶核酸, 其序列已经通过包括所述单链置换核酸而改变。

[0019] 发明详述

[0020] 与所有预期相反, 已经发现了利用全长单链中间体而不是对称切除的、部分单链 / 部分 dsDNA 中间体的同源重组反应。在天然存在的内源性体系中, 这些全长单链中间体由 Red α 或其它内源性 5' -3' 核酸外切酶的核酸外切酶活性、或由内源性解旋酶产生。在本发明之前, 总是认为这些酶在 dsDNA 分子的两个末端同时工作, 以产生部分单链和部分双

链的重组中间体。

[0021] 在本发明之前,Red α / β 或 RecE/T 怎样介导 dsDNA 重组是未知的。虽然 BARF 解释了由合成的单链寡核苷酸介导的重组引入短的突变,但是 dsDNA-介导的基因组和 DNA 改造所包含的机制尚为未知的。例如, Court, D. L. 等 (Annu Rev. Genet. (遗传学年度综述) 2002, 36, 361-388) 提议了两种 dsDNA 重组的复合物模型,并且推测单链寡核苷酸所利用的机制不能对更长的 DNA 起作用。

[0022] 本发明所阐明的机制与现有使用 dsDNA 或单链寡核苷酸进行的基因组或 DNA 改造方法在机制上是不同的,并且在本发明中描述为 ' β 重组'。区别示意性显示在图 1 中。用于由 dsDNA 且特别是由 Rwd 蛋白起始同源重组的现有模型显示在图 1A 中。在第一步中,5'-3' 核酸外切酶,诸如 Red α , 对称地切除 dsDNA 的每个末端,从而产生具有末端单链区的部分双链的反应中间体。本发明所阐释的新机制显示在图 1B 中,其举例说明了全长 ssDNAs (本文还称为“单链置换核酸(s)”)通过核酸外切酶降解一条链而保留另一条链完好无损的不对称的作用、或者通过完全分离两条链的解旋酶由 dsDNA 底物产生。

[0023] 所提议的反应中间体示例在图 1D 中,其中由左向右显示复制叉。靶 DNA 的两条链显示为黑线和灰线,并且进入的单链重组底物 DNA 是浅灰线。在图 1D 中间是描述由在正中心处的其余的全酶和解旋酶(通过其后随链模板成为线性的)连接的两个 DNA 聚合酶的形状。前导链在上,聚合酶由左向右连续前进从而合成黑色子链,其作为亲本灰色链的互补物。下方黑色亲代链由解旋酶解链,从而伸出发生重组的单链区。在这一单链区中,Red β (链中的小点)使底物 DNA 与在序列互补处所暴露的单链 DNA 退火。尽管存在实质的非互补 DNA 的间隔,第二互补区保护该重组中间体。这一中间体的 3' 末端作为 DNA 聚合酶的引物,从而合成 Okazaki 样片段,其将与先前的 Okazaki 片段连接,此处为在左下角示例。

[0024] 文献中提议用来解释由噬菌体退火蛋白与单链寡核苷酸导致的重组现象的简单物理复制叉途径 (BARF) 的机制没有依据下述观察解释 β 重组:第一,RecT 和 Erf 蛋白可以介导有效的单链寡核苷酸定向的诱变 (ssOR),但是在使用长的单链置换核酸的 β 重组中效率非常低 (图 3)。第二,缺失错配修复途径增加了 ssOR 而不是 β 重组的效率 (图 4)。第三,已经发现消除 β 重组而不是 ssOR 的 Red β 的突变 (图 5 和 6)。第四,包括 Red γ 对 β 重组具有非常大的有益作用,但是对 ssOR 几乎没有作用 (图 7)。可能的是,除了由 BARF 机制起作用外,Red β 与 β 重组所需要的其它一种或多种特性相关。所述特性可以是,例如,沿着核酸单链区显著更大的聚合协作性,或与宿主因子相互作用的特有能力和能力。

[0025] 当改造基因组和重组 DNA 时,这种令人惊奇的观察对提高的同源重组效率具有重要的实践意义,因为其使得设计方法理想地获得更大的全长单链中间体产率,所述全长单链中间体将又促进更高的同源重组效率。实践中,实现这一改进的最简单的方法是修饰 dsDNA 底物,以致在同源重组反应过程中更有效地产生完整无损的 ssDNA 中间体。以前通过同源重组进行的基因组或 DNA 改造的应用未将这一观念结合在 dsDNA 底物中。因此,本发明与关于应用同源重组的现有技术是相反的,现有技术依赖于 5'-3' 核酸外切酶消化的第一步,而本文采取在一端或两端阻断这些活性的步骤。因此,本发明人阐明的令人吃惊的发现导致对改进的同源重组方法的开发。

[0026] 具体地,本发明提供将单链置换核酸插入到靶核酸中的方法,所述方法包括下述步骤:

[0027] a. 由双链核酸产生单链置换核酸,其中所述双链核酸在其一个或两个 5' 端改变,以便优先降解一条链和 / 或链分离而产生所述单链置换核酸,其中所述单链置换核酸包括与所述靶核酸上序列相同的 5' 区、与所述靶核酸上序列相同的 3' 区和任选地在所述 5' 和 3' 区之间与所述靶核酸上序列不同的置换区,

[0028] b. 在适于重组的条件下将所述靶核酸暴露于所述单链置换核酸,以在所述单链置换核酸和所述靶核酸之间发生重组,和

[0029] c. 选择这样的靶核酸,其序列已经通过包括所述单链置换核酸而改变。

[0030] 在通过 Red 系统介导的同源重组的研究过程中得到了这一令人吃惊的观察。因此,本发明直接适用于将 Red 系统应用于基因组或重组 DNA 改造,这称为“重组”。因此,由双链核酸底物产生单链置换核酸并且将靶核酸暴露于单链置换核酸的步骤优选地在存在噬菌体退火蛋白 Red β 或其功能等价物的条件下进行。然而,这一观察结果具有与同源重组改造基因组的一般应用的相关性,并且因此可以应用于真核系统以及原核系统。技术人员将能够依据发生重组的具体宿主确定应该使用哪些重组酶。例如,RecT 或 Erf 或其功能等价物可以备选地用于 ssOR。同样地,可以使用等价的真核系统。等价的真核酶的实例是疱疹病毒蛋白 HSV-1UL12 和 ICP8 以及相关的蛋白如来自埃巴病毒的那些 (Mumtsidu E. 等 (2008),“Structural features of the single-stranded DNA-binding protein of Epstein-Barr virus”(埃巴病毒单链 DNA 结合蛋白的结构特征),J StructBiol. (结构生物学杂志) 161:172-87), HSV-1UL12 为 5' -3' 核酸外切酶,ICP8 为 ssDNA 结合蛋白。

[0031] 在重组之前,由双链核酸底物生成单链置换核酸可以通过任何适当的方式介导。在优选的实施方案中,改变双链核酸底物,以致一条链优先完全降解,从而留下另一条链作为单链置换核酸。降解优选地由核酸外切酶介导。核酸外切酶可以是 3' 到 5' 核酸外切酶,但是优选是 5' 到 3' 核酸外切酶。优选地,所述 5' 到 3' 核酸外切酶是 Red α (Kovall, R. 和 Matthews, B. W. Science (科学), 1997, 277, 1824-1827; Carter, D. M. 和 Radding, C. M., 1971, J. Biol. Chem. (生物化学杂志) 246, 2502-2512; Little, J. W. 1967, J. Biol. Chem. (生物化学杂志), 242, 679-686) 或其功能等价物。在备选的实施方案中,所述核酸外切酶为 RecBCD。

[0032] 备选地和 / 或另外地,单链置换核酸通过解旋酶由双链核酸底物产生。解旋酶将 dsDNA 底物分离成两条单链核酸,其中的一条是单链置换核酸。解旋酶可以是 5' -3' 或 3' -5' 解旋酶。优选地,解旋酶是 RecBCD,同时其被 Red γ 抑制。在其它优选的实施方案中,解旋酶是 RecQ, RecG 或 DnaB 种类的任一种解旋酶。在一些实施方案中,由解旋酶产生的单链置换核酸相对于由解旋酶产生的另一条单链核酸优先被稳定。

[0033] 已经令人惊讶地发现,当在存在 Red β 的条件下,由双链核酸底物产生单链置换核酸时,例如,通过 Red α 降解产生,比当将单链核酸用作起点时,例如,当使用煮沸的 dsDNA 时,并且当不包括 Red α 且仅存在 Red β 时,产生更多的重组子。这可能是由于这样的事实,即,在双链核酸底物的核酸外切酶切除过程中,Red β 可以当新产生的单链区从酶显现时向前结合到新产生的单链区。类似地,当任何其它核酸外切酶或解旋酶一起作用时,Red β 对 ssDNAs 的结合更有效。因此,Red β 在刚出现的 ssDNA 自身分解之前与之结合。因此,与当 Red β 必须在没有将 dsDNA 进展性转化成 ssDNA 的酶的帮助下结合 ssDNA 时相比较,当 5' -3' 核酸外切酶或解旋酶一起作用时,Red β 对 ssDNAs 的结合更有效。效率差

异随着愈加变长的 DNA 底物而变得愈加更显著。

[0034] 因此,由双链核酸底物产生单链置换核酸并且将靶核酸暴露于单链置换核酸的步骤优选地在存在噬菌体退火蛋白(优选 Red β 或其功能等价物)、及其 5' -3' 核酸外切酶配偶体(优选 Red α 或其功能等价物)和 / 或解旋酶(优选 RecBCD 或其功能等价物)的条件下进行。

[0035] 由双链核酸底物产生单链置换核酸的步骤备选地可以在存在 Red β 或其功能等价物和 Red γ 或其功能等价物而不存在 Red α 或其功能等价物的条件下进行。Red γ 抑制大肠杆菌核酸外切酶 RecBCD 并且因此保护双链核酸底物免于被降解,这允许内源性解旋酶将两条链分离,从而产生单链置换核酸。包括 Red γ 对 β 重组具有巨大的有益作用(如图 7 所示)。该方法比当单独使用 Red β 与单链置换核酸时更有效。

[0036] 甚至更优选地,由双链核酸底物产生单链置换核酸并且将靶核酸暴露于单链置换核酸的步骤在存在 Red β 或其功能等价物, Red γ 或其功能等价物和 Red α 或其功能等价物的条件下进行。

[0037] 在优选实施方案中,由双链核酸底物产生单链置换核酸的步骤在发生重组的宿主细胞中进行。备选地,产生单链置换核酸的步骤可以在由发生重组的宿主细胞分离的宿主细胞中进行,并且然后可以通过任何适当的方式转移到发生重组的宿主细胞中,例如,通过转导、转染或电穿孔进行转移。备选地,由双链核酸底物产生单链置换核酸的步骤可以在体外进行。因此,可以通过对宿主细胞提供单链置换核酸,而避免发生重组的宿主细胞对 Red α 的需要或对优先降解双链核酸底物的一条链、或将两条链分离的备选酶的需要。

[0038] 有利地,改变双链核酸的一个或两个 5' 端增加单链置换核酸的产率。优选地,产率的这一增加是由于针对作用产生单链置换核酸的酶改变 5' 端的作用。

[0039] 优选地,改变双链核酸底物,以使其在其 5' 端不对称。不对称性优选地引起一条链优先降解。这优选地导致另一条链得到保持,并且因此,有利于产生单链置换核酸,由此提高单链置换核酸的产率。

[0040] 通过制备具有不对称 5' 端的双链核酸底物并且使其在存在 Red β 和适当的降解 / 分离酶(优选 Red α 或解旋酶)的条件下与靶核酸接触,可以将改造效率提高到比关于重组方法所述的任何其它构型更高的水平。因此,本发明的方法优选利用在其 5' 端具有不对称性的双链核酸底物,其中所述方法在存在 Red α 和 / 或解旋酶且存在 Red β 的条件下进行。优选地还存在 Red γ , 因为 Red γ 抑制降解双链 DNA 的 RecBCD。利用 Red 介导的同源重组改造 DNA 的另一种有效的方法是在存在 Red β 和 Red γ 、不存在 Red α 的条件下利用被改变具有不对称的 5' 端的双链核酸底物。一种效率较低但是仍然可操作的利用 Red 介导的同源重组改造 DNA 的方法在存在 Red β 、不存在 Red γ (或其功能等价物)和不存在 Red α (或其功能等价物)的条件下使用双链核酸底物,该双链核酸底物被改变具有不对称的 5' 端。所述方法也包括在本发明的范围内。

[0041] 本发明考虑任何适于制备不对称的双链核酸底物以使一条链优先降解而另一条链得以保留的方法。例如,不对称性可以由仅在双链核酸底物的一条链中存在的一个或多个特征赋予或由在双链核酸底物的两条链中存在的一个或多个特征赋予,其中在不同的链中存在不同的特征。

[0042] 优选地,不对称性存在于双链核酸底物两条链的 5' 端或存在于 5' 端的紧邻区,最

优选存在于 5' 端。例如,不对称性优选地存在于双链核酸底物的 5' 相同区 (5' identity regions) 的 5' 端,或可以存在于 5' 相同区的 5' 区。双链核酸底物的“相同区”对应于单链置换核酸与靶核酸上序列相同或与其互补的区域。例如,双链核酸底物可以在其一条链的 5' 端或 5' 端紧邻区具有一个或多个特征,而在另一条链的 5' 端或 5' 端紧邻区不具有,这使其成为不对称的。

[0043] 优选地,不对称性由对核酸序列的修饰赋予。优选地,修饰影响核酸外切酶、优选 5' -3' 核酸外切酶、优选 Red α 核酸外切酶在一条链上的行进,而不影响核酸外切酶在另一条链上的行进。例如,修饰可以抑制核酸外切酶在一条链上的行进,以使核酸外切酶优先降解另一条链。“抑制”核酸外切酶的行进意指,相对于另一条链,修饰抑制核酸外切酶在一条链上的行进,例如,抑制至少 10%,至少 20%,至少 30%,至少 40%,至少 50%,至少 60%,至少 70%,至少 80%,至少 90%,至少 95%,最优选 100%。例如,修饰可以是包括封闭 DNA 序列 (blocking DNA sequence),诸如 Red α 核酸外切酶中止序列 (exonuclease pause sequence),更优选地,Red α 五核苷酸中止序列 GGCGA,更优选地 GGCGATTCT,更优选地,左 λ 黏性末端,其也称为 cos 位点 (Perkins TT, Dalal RV, Mitsis PG, Block SM Sequence-dependent pausing of single lambda exonuclease molecules (单一 λ 核酸外切酶分子的 SM 序列依赖性中止). Science (科学) 301:1914-8)。例如,Red α 核酸外切酶中止位点可以位于一条链的 5' 端或 5' 端紧邻区,而不是位于另一条的 5' 端或 5' 端紧邻区。

[0044] 在进一步优选的实施方案中,修饰防止核酸外切酶与双链核酸底物的一条链结合,以致仅另一条链被降解。在进一步优选的实施方案中,修饰不防止核酸外切酶结合,而是阻止其降解双链核酸底物的一条链或两条链,以使将要与后随链退火的那条链在由解旋酶从 dsDNA 底物分离时得到稳定。在备选的实施方法中,修饰可以促进核酸外切酶、优选 5' -3' 核酸外切酶、更优选 Red α 核酸外切酶在一条链上的行进,以使核酸外切酶相对于另一条链优先降解所述链。“促进”核酸外切酶的行进意指,相对于另一条链,修饰促进核酸外切酶活性在一条链上的进展,例如,促进至少 10%,至少 20%,至少 30%,至少 40%,至少 50%,至少 60%,至少 70%,至少 80%,至少 90%,至少 95%,至少 100%,至少 200%,至少 300%,或至少 400%。在双链核酸底物的两条链通过解旋酶分离的实施方案中,修饰可以起作用优先稳定一条链,例如,通过防止核酸外切酶或核酸内切酶与所述链结合。在另一个实施方案中,修饰防止核酸外切酶降解两条链,以使通过解旋酶作用一条链得到保护,并且可以从另一条链释放。

[0045] 在优选的实施方案中,修饰是一个或多个共价修饰。优选地,共价修饰存在于一条链的 5' 端或 5' 端紧邻区,而不存在于另一条链的 5' 端或 5' 端紧邻区。更优选地,共价修饰存在于一条链的 5' 端,而不存在于另一条链的 5' 端。

[0046] 优选的共价修饰是存在置换核苷酸,诸如存在羟基或硫代磷酸酯 (phosphothioester) 键。这样的共价修饰不利于核酸外切酶作用。

[0047] 例如,在需要保护要被保留的链的 5' 端的实施方案中,共价修饰优选地选自下列中的一项或多项:

[0048] • 一个或多个硫代磷酸酯 (phosphothioates) 替换一个或多个磷酸二酯键。优选地,存在一个或多个硫代磷酸酯代替 5' 相同区中的最 5' - 端键,或存在一个或多个硫代磷

酸酯代替前两个键,或存在一个或多个硫代磷酸酯代替 5' 相同区中至多前六个(例如,3,4,5,6 个)以上键的每一个;

[0049] • 一个或多个磷酸乙酯(phosphoacetates) 替换一个或多个磷酸二酯键。优选地,存在一个或多个磷酸乙酯代替 5' 相同区中的最 5' - 端键,或存在一个或多个磷酸乙酯代替前两个键,或存在一个或多个磷酸乙酯代替 5' 相同区中至多前六个(例如,3,4,5,6 个)以上键的每一个;

[0050] • 一个或多个锁定核苷酸(优选 LNA ;2' -O 和 / 或 4' -C- 亚甲 - β -D- 呋喃核糖基(4' -C-Methylen- β -D-ribofuranosyl) 替换一个或多个核苷酸。优选地,存在一个或多个锁定核苷酸代替 5' 相同区中的第一个核苷酸,或存在一个或多个锁定核苷酸代替前两个核苷酸,或存在一个或多个锁定核苷酸代替至多前六个(例如,3,4,5,6 个)核苷酸;

[0051] • 羟基。优选地,底物的最 5' 核苷酸也是与靶核酸上的序列相同的区域的最 5' 核苷酸,并且羟基位于这一序列相同区的 5' 末端;

[0052] • 5' 突出端。例如,共价修饰可以是 2 个以上突出的核苷酸,4 个以上突出的核苷酸,6 个以上突出的核苷酸,优选 11 个以上突出的核苷酸,优选包含 Red α 中止序列的 5' 端,优选已知为 cos 的左 λ 黏着末端;

[0053] • 任何赋予针对 5' -3' 核酸外切酶的抗性的其它共价加合物。例如,可以修饰 5' 端,以包含附着的加合物如生物素 deoxygenin(biotin deoxygenin) 或荧光团如 FITC。

[0054] 在需要使得双链核酸底物的一条链对 5' -3' 核酸外切酶敏感从而使另一条链成为被保留的链的实施方案中,共价修饰优选地选自下列中的一项或多项:

[0055] • 5' 磷酸基团;

[0056] • 相对于相邻的 3' 端是齐平的(flush) 或凹进的 5' 端;

[0057] • 携带不与靶 DNA 相同的 DNA 序列区段的 5' 端。所述 DNA 序列区段可以是,例如,长度为 1-29bps,更优选地长度为 30-99bps,更优选地长度为 100-999bps,甚至更优选地长度大于 1kb;

[0058] • 在 DNA 链中包括脱氧尿苷核苷酸替换脱氧胸苷核苷酸的 5' 端;

[0059] • 赋予针对 5' -3' 核酸外切酶敏感性的任何其它共价加合物。

[0060] 本发明的范围还包括使用双链核酸底物的方法,所述双链核酸底物包含一个或多个保护链的 5' 端得以保留的共价修饰,并且还包含一个或多个使得双链核酸底物的另一条链对 5' -3' 核酸外切酶敏感的共价修饰。例如,双链核酸底物可以在一条链上缺少 5' 磷酸(即,存在羟基),而另一条链包括 5' 磷酸。

[0061] 优选地,改变双链核酸底物,以使其在其一个 5' 端包括 5' 硫代磷酸,而在另一个 5' 端不包括。

[0062] 本发明的范围还包括在 5' 端或 5' 端附近抑制或促进核酸外切酶行进或阻止核酸外切酶结合的任何其它的化学修饰。

[0063] 如上文所述,不对称性可以由具有不同单链性延伸的双链核酸底物引起;这是 5' 突出端、平端(或“齐平”)或 3' 突出端的不同组合。例如,双链核酸底物可以仅具有一个 5' 突出端,仅具有一个 3' 突出端和 / 或仅具有一个平端。不对称性可以通过限制性分裂在核酸底物上产生不同的末端而产生。限制酶保留 5' 突出端、平端或 3' 突出端。5' 突出端最不利于 Red α 消化。因此,在一个实施方案中,双链核酸底物优选地仅具有一个 5' 突

出端。在不对称性通过不同单链性延伸产生的实施方案中,优选地,双链核酸底物的每条链是连续的核酸链。

[0064] 不对称性可以备选地由具有不同双链性延伸的双链核酸底物引起。例如,一端可以在超出相同区末端之外不具有另外的核酸序列,并且另一端可以具有另外的不同序列。另外的不同序列可以是短至 4 个碱基对,然而,优选地长于 10 个碱基对,更优选地长于 100 个碱基对。

[0065] 如上文所述,还已经发现,还可以在不存在 Red α 核酸外切酶的条件下,当双链核酸底物在适于发生重组的条件下暴露于靶核酸时,发生同源重组。假设解旋酶起作用分离双链核酸底物的两条链,并且然后作为单链置换核酸的链可用于同源重组。令人惊讶地,已经发现,与不改变 5' 端的系统相比,改变双链核酸底物的两个 5' 端在所述系统中导致提高的同源重组效率。因此,在备选的实施方案中,双链核酸在其两个 5' 端对称地改变。在优选的实施方案中,双链核酸底物在其两个 5' 端进行共价修饰。特别优选的是使用这样的双链核酸底物,其中两个 5' 端用生物素分子共价修似乎,或者更优选地,用硫代磷酸酯修饰。优选地,在所述实施方案中,重组在不存在 Red α 的条件下进行。备选地,本发明还考虑使用解旋酶由具有不对称 5' 端的双链核酸底物产生单链置换核酸,如上所述。

[0066] 技术人员应该理解改变双链核酸底物使其不对称所需要的技术。例如,在通过限制酶分离后,可以用碱性磷酸酶将底物去磷酸化,然后用第二限制酶切割。由于限制酶通常保留 5' 端磷酸,这将产生不对称的磷酸化底物。

[0067] 可以设计两种寡核苷酸用作末端相同区,其对于重组操练是常见的。可以化学合成这些寡核苷酸,以使其 5' 端关于在 5' 端或在 5' 端紧邻区存在置换核苷酸而不同。例如,这些寡核苷酸可以在退火后用于寡核苷酸-定向的诱变,或模板上的 PCR 从而产生不对称末端双链核酸底物,或与标准的双链核酸盒混合,并且共同引入到宿主中进行“四倍体”重组(参见下文)。

[0068] 双链核酸底物可以通过任何适当的方法制备。例如,可以通过 PCR 技术产生,或可以由彼此退火的两个单链核酸制备。双链核酸底物可以特别由长序列 PCR(long range PCR) 产生。长序列 PCR 在本领域中已经用于产生双链片段,例如,至多 50kb 的双链片段(Cheng 等(1994)Proc Natl Acad Sci(国家科学院学报)91:5695-5699)。这一长序列 PCR 中所用的一个或两个引物的 5' 端可以改变,以使 PCR 产物适合用作本发明方法中的双链核酸底物。

[0069] 在一些实施方案中,双链核酸底物由两个或多个双链核酸制备,或由一个或多个双链核酸与一个或多个单链寡核苷酸制备。使用两个双链核酸制备双链核酸底物在本文中称为“三倍体”重组,因为存在用于制备双链核酸底物的两个双链核酸分子并且存在一个靶核酸。使用三个核酸制备双链核酸底物在本文中称为“四倍体”重组,因为存在用于制备双链核酸底物的三个核酸并且存在一个靶核酸。可以使用任何数量的单链和/或双链核酸制备双链核酸底物,条件是所得到的双链核酸底物在其一个或两个 5' 端改变,以便优先降解一条链和/或链分离而产生单链置换核酸。

[0070] 在使用多于一个核酸制备双链核酸底物的所有情形中,所述多于一个核酸的每一个的一部分必须能够与其相邻核酸的一部分退火。例如,对于三倍体重组,用于制备双链核酸底物的每个双链核酸的一个末端必须能够与靶标退火,而用于制备双链核酸底物的每个

双链核酸的另一些末端必须能够彼此退火。改变用于制备双链核酸底物的两个双链核酸,以便优先保留每个双链核酸的一条链。上文讨论了导致优先降解的改变的方法。在降解了两个双链核酸中每一个的一条链后,剩余的单链彼此退火形成本发明的双链核酸底物。三倍体重组在实施例 8 中进一步讨论,并且在图 8A 中示例。三倍体重组通常不是非常有效的,但是使用不对称分子产生双链核酸底物以及产生单链置换核酸有利地提高了效率。

[0071] 四倍体重组的优选实施方案包括使用两个单链的寡核苷酸和一个 dsDNA(“双链盒”)作为用于制备双链核酸底物的三个核酸。合成两个寡核苷酸,以使二者具有与靶核酸的序列同一性和与双链盒的序列同一性。对于四倍体重组,双链盒和靶核酸优选地没有 20 个以上连续的核苷酸的任何序列同一性。在这一优选的四倍体重组实施方案中所用的两个寡核苷酸还可以在其针对盒和靶标的 5' 和 3' 相同区之间具有额外的序列。优选地改变所述两个寡核苷酸,以使其二者均可以与盒上相同的链退火。一个寡核苷酸在其 5' 端包含与靶标相同的区域和在其 3' 端包含与盒相同的区域,而另一个寡核苷酸在其 3' 端包含与靶标相同的区域和在其 5' 端包含与盒相同的区域。由此,寡核苷酸提供针对同一单链分子的 5' 和 3' 相同区。有利地使得盒具有不对称的末端,以便优先降解的链具有与所合成的寡核苷酸相同的序列。在进一步的实施方案中,在由双链核酸底物产生的单链置换核酸中存在的 5' 寡核苷酸优选地具有 5' 硫代磷酸酯键。不对称性可以备选地或另外通过使用不对称性修饰的双链盒而赋予。通过限制性消化无需进行 PCR 由双链质粒获得双链盒是可能的,PCR 相对于常规方法极大地加快该步骤。四倍体重组在实施例 8 中进一步讨论,并且示例在图 8B 中。

[0072] 由双链核酸底物产生的单链置换核酸包括与靶核酸上序列相同的 5' 区(“5' 相同区”)、与靶核酸上序列相同的 3' 区(“3' 相同区”)和任选地在所述 5' 和 3' 相同区之间与靶核酸上序列不相同的置换区。技术人员应该理解怎样设计双链核酸底物以便产生所需要的单链置换核酸。优选地,单链置换核酸对应于双链核酸底物中一条链的全长。然而,单链置换核酸可以由存在于双链核酸底物中的链的 5' 和 / 或 3' 端失去一些序列,条件是其保留 5' 相同区、3' 相同区,以及在需要置换区的实施方案中,保留置换区。

[0073] 优选地,靶核酸是 DNA 复制叉的后随链模板,且单链置换核酸具有在靶 DNA 复制时可以与靶 DNA 的后随链模板退火的 5' 和 3' 相同区。术语“后随链”,用在本文中时,是指在 DNA 复制过程中在 dsDNA 分子的不连续合成过程中形成的链。单链置换核酸通过其 5' 和 3' 相同区与靶核酸的后随链模板退火,并且促进 Okazaki- 样合成,并且由此掺入后随链中。关于质粒、BACs 和染色体的复制方向是已知的,并且因此设计双链核酸底物以使保留的链是与后随链模板退火的链是可能的。

[0074] 上述三倍体重组的变化在本文中称为“双重”重组。本发明的这一实施方案包括两轮单链置换核酸插入到靶核酸中。在双重重组的一个实施方案中,步骤 a)-c) 中的单链置换核酸是如步骤 a) 中限定的第一单链置换核酸,特别在 5' 和 3' 区之间包括置换区,并且所述方法包括另外的步骤 d)-f) :

[0075] d) 由第二双链核酸产生第二单链置换核酸,其中所述第二双链核酸在其一个或两个 5' 端改变,以便优先降解一条链和 / 或链分离而产生所述第二单链置换核酸,其中所述第二单链置换核酸包括:

[0076] i) 与第一单链置换核酸的置换区上的第一序列相同的 5' 区,和与第一单链置换

核酸的置换区上的第二序列相同的 3' 区,或与第一单链置换核酸的置换区上的第一序列互补的 5' 区,和与第一单链置换核酸的置换区上的第二序列互补的 3' 区;和

[0077] ii) 任选地在所述 5' 和 3' 区之间与所述靶核酸上序列不同的置换区,

[0078] e) 在适于重组的条件下,将在步骤 c) 中所选择的靶核酸暴露于第二单链置换核酸,以在第二单链置换核酸和所选的靶核酸之间发生重组,和

[0079] f) 选择这样的靶核酸,其序列已经通过包括所述第二单链置换核酸而改变。

[0080] 如果第一单链置换核酸或第二单链置换核酸,优选的两者,在靶核酸复制时可以与靶核酸的后随链退火,则可以提高这种双重重组实施方案的效率。后随链可以由复制方向鉴定。这一方向可以由靶核酸中复制起点和重组位点的相对位置来确定。如果第二单链置换核酸包括与第一单链置换核酸置换区上的第一序列相同的 5' 区(5' 相同区)和与第一单链置换核酸置换区上的第二序列相同的 3' 区(3' 相同区),则第一和第二单链置换核酸与同一链退火。

[0081] 双重重组提供用于将第一和第二单链置换核酸插入到靶核酸中的方法。与三倍体重组不同,第一单链置换核酸的插入不依赖于第二单链置换核酸的插入。然而,第二单链置换核酸的插入依赖于第一单链置换核酸的插入。第二单链置换核酸的置换区插入在第一单链置换核酸置换区上的第一和第二序列之间。因此,第一单链置换核酸可以被视为通过步骤 a)-c) 插入的“衔接子”,其为第二单链置换核酸的插入提供适当的序列。换言之,利用第一单链置换核酸置换区中的第一和第二序列插入第二单链置换核酸是可能的。以这种方式,在步骤 c) 中选择靶核酸后,通过进行与不同的第二单链置换核酸平行的步骤 d)-f),可以产生包括不同插入的多种核酸。可以插入任何第二单链置换核酸,条件是其具有与第一单链置换核酸置换区上第一和第二序列相同或互补的适当的 5' 和 3' 区。例如,可以通过使用储备 PCR 引物(所述引物设计为在引物中包含 5' 和 3' 区)进行 PCR 产生第二双链核酸底物,或通过具有 5' 和 3' 区序列的小 dsDNA 片段连接到已经不包括这些区的 dsDNA 序列上,而将这些 5' 和 3' 区包括在第二置换核酸中。

[0082] 双重重组允许在第一单链置换核酸置换区上的第一和第二序列之间的序列置换或序列删除。例如,如果在第一和第二序列之间存在反式选择标记,则这是有用的。然后,可以在 f) 中选择该标记的丢失,由此产生在靶核酸中没有保留标记的序列。

[0083] 在优选的双重重组实施方案中,第一单链置换核酸的置换区和/或第二单链置换核酸的置换区包括选择标记。例如,该选择标记可以是抗生素抗性标记,诸如杀稻瘟菌素(blasticidin)、氨苄青霉素(ampicillin)、卡那霉素(kanamycin)或本领域已知的其它标记。

[0084] 优选地,在双重重组中,第一单链置换核酸的 5' 区长于 20 个核苷酸,更优选地在 40 和 60 个核苷酸之间。类似地,优选地,第一单链置换核酸的 3' 区长于 20 个核苷酸,更优选地在 40 和 60 个核苷酸之间。同样地,优选地,第二单链置换核酸的 5' 区长于 20 个核苷酸,更优选地在 40 和 60 个核苷酸之间;并且第二单链置换核酸的 3' 区长于 20 个核苷酸,更优选地在 40 和 60 个核苷酸之间。

[0085] 典型地,在双重重组中,靶核酸包括在基因组中或在附加体中,例如, BAC 或质粒中。

[0086] 在双重重组中使用的第一和第二双链核酸可以由任何来源获得。在优选实施方案

中,第一双链核酸是 PCR 片段、合成的寡聚体或通过基因合成获得的片段。类似地,第二双链核酸可以是 PCR 片段、合成的寡聚体或通过基因合成获得的片段。在另一些实施方案中,第二双链核酸是通过消化载体获得的片段。

[0087] 技术人员应该理解,以下在本发明方法的步骤 a)-c) 中整体所述的优选特征可以独立地应用于该实施方案步骤 d)-f) 中的相似整体。

[0088] 设计具有至少两个序列相同区的置换核酸的方法在本领域中是公知的。“相同”意指当比对置换和靶核酸分子的序列时,在所述序列之间的等价位置处存在多个相同的核苷酸残基。相同性的程度可以很容易地计算 (Computational Molecular Biology(计算分子生物学), Les, A. M., 等编, Oxford University Press(牛津大学出版社), 纽约, 1988; Biocomputing, Informatics and Genome Projects(生物计算、信息和基因组工程), Smith, D. W., 编, Academic Press(学院出版社), 纽约, 1993; Computer Analysis of Sequence Data(序列数据的计算机分析), Part1, Griffin, A. M., 和 Griffin, H. G., 编, Humana Press, 新泽西 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology(分子生物学中的序列分析), von Heinje, G., Academic Press(学院出版社), 1987; 和 Sequence Analysis Primer(序列分析引物), Gribskov, M. 和 Devereux, J. 编, M Stockton Press, 纽约, 1991)。这样的相同区域的长度优选至少 4 个核苷酸, 例如, 长度为 4-8 个核苷酸, 优选长度为至少 15 个核苷酸, 更优选长度为至少 20 个核苷酸, 更优选长度为至少 25 个核苷酸, 甚至更优选长度为至少 30 个核苷酸, 甚至更优选长度为至少 40 个核苷酸。特别地, 可以使用更长的相同区, 诸如 50 个核苷酸以上, 75 个核苷酸以上, 100 个核苷酸以上, 125 个核苷酸以上, 150 个核苷酸以上, 200 个核苷酸以上, 300 个核苷酸以上或 400 个核苷酸以上, 来实施有效的重组事件。5' 相同区可以与 3' 相同区同等长度。有利地, 3' 相同区可以长于 5' 相同区。已经令人惊讶地发现重组效率与增加的 3' 相同区长度相关。因此, 在优选的实施方案中, 3' 相同区长度为至少 30 个核苷酸, 而 5' 相同区长度为至少 20 个核苷酸, 其中 3' 相同区比 5' 相同区长 10 个以上的核苷酸。备选地, 5' 相同区可以长于 3' 相同区。

[0089] 优选地, 5' 和 3' 相同区的相同性程度为至少 95%, 98% 或 99% 以上的相同性, 优选 100% 的相同性, 这使用 BLAST 版本 2.1.3 利用 NCBI 指定的默认参数确定 (the National Center for Biotechnology Information(国立生物技术信息中心); <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) [Blosum 62 matrix; 缺口开发罚分 = 11, 缺口延伸罚分 = 1]。5' 和 3' 相同区可以被不同序列区中断, 条件是保留充分的序列相同性, 从而允许发生 β 重组反应。

[0090] 相似地, 用于设计具有至少两个互补序列区的置换核酸的方法在本领域中是公知的。在一些实施方案中, 第二单链置换核酸包括与第一单链置换核酸置换区上的第一序列互补的 5' 区 (“5' 互补区”) 和与第一单链置换核酸置换区上的第二序列互补的 3' 区 (“3' 互补区”)。在这种情形中, “互补”不是意指序列必须是 100% 互补, 尽管 100% 互补可以是优选的。“互补”意指当将与 5' 区 100% 互补的序列与第一序列比对时 (或相似地, 当将与 3' 区 100% 互补的序列与第二序列比对时), 在序列之间的等价位置处存在数个相同的核苷酸残基。如上文所讨论, 可以容易地计算相同性的程度。优选地, 相同性程度为至少 95%, 98% 或 99% 以上的相同性, 优选 100% 的相同性, 这使用上述 BLAST 方法确定。因此, 5' 和 3' 区可以被非互补序列区中断, 条件是保留充分的序列互补性, 以允许发生 β 重组反应。互补区长度优选为至少 4 个核苷酸, 例如, 长度为 4-8 个核苷酸, 优选地长度为至

少 15 个核苷酸,更优选地长度为至少 20 个核苷酸,更优选地长度为至少 25 个核苷酸,甚至更优选地长度为至少 30 个核苷酸,甚至更优选地长度为至少 40 个核苷酸。特别地,可以使用更长的互补区,诸如 50 个核苷酸以上,75 个核苷酸以上,100 个核苷酸以上,125 个核苷酸以上,150 个核苷酸以上,200 个核苷酸以上,300 个核苷酸以上或 400 个核苷酸以上,来实施有效的重组事件。

[0091] 5' 和 3' 相同区可以位于单链置换核酸分子上,以使 5' 相同区位于该分子的最 5' 端,且 3' 相同区位于该分子的最 3' 端。因此,5' 和 / 或 3' 相同区优选地分别延伸至单链置换核酸的 5' 和 / 或 3' 端。特别有利地是 5' 相同区延伸至单链置换核酸的末端,因为这与 5' 相同区不延伸至单链置换核酸的末端相比,导致提高的重组效率。然而,5' 和 3' 相同区之一或二者还可以位于内部。例如,可以存在 5' 相同区的另外的序列 5' 和 / 或 3' 相同区的 3'。当存在所述另外的序列时,长度优选为 1 个核苷酸 - 数千个碱基,例如,长度为 1 个核苷酸 - 3kb。5' 和 3' 相同区应该这样符合每个特定实验的要求。

[0092] 以相同的方式,在包括 5' 和 3' 互补区的实施方案中,5' 和 3' 互补区可以位于单链置换核酸分子上,以使 5' 互补区位于该分子的最 5' 端,3' 互补区位于最 3' 端。因此,5' 和 / 或 3' 互补区优选地分别延伸到单链置换核酸的 5' 和 / 或 3' 端。备选地,5' 和 3' 互补区中的一个或二者还可以位于内部。例如,可以存在 5' 互补区的另外的序列 5' 和 / 或 3' 互补区的 3'。当存在所述另外的序列时,长度优选为 1 个核苷酸 - 数千个碱基,例如,长度为 1 个核苷酸 - 3kb。5' 和 3' 互补区应该这样符合每个特定实验的要求。

[0093] 关于靶 DNA 分子上相对应的 5' 和 3' 相同区的位置,没有特别的限制,例外的是对于环形双链 DNA 分子,β 重组事件不应该消除复制的能力。

[0094] 通过在单链置换核酸中包括 5' 和 3' 相同区,所述 5' 和 3' 相同区跨越与靶核酸分子相比不同的序列区,可以获得沿着置换序列长度的一个或多个突变。类似地,在包括 5' 和 3' 互补区的实施方案中,单链置换核酸可以包括 5' 和 3' 互补区,所述 5' 和 3' 互补区跨越与靶核酸分子相比不同的序列区,以便可以获得沿着置换序列长度的一个或多个突变。突变可以是任何突变,例如,一种或多种置换(诸如点突变)、缺失或插入突变,但是优选是一种或多种插入突变。还可以制备这些突变的组合。因此,可以在单步骤中向靶核酸分子中引入多个突变。

[0095] 在实施方案中,其中不存在在 5' 和 3' 相同区之间的置换区,并且 5' 相同区紧邻 3' 相同区,单链置换核酸可以用来实施缺失突变。类似地,在实施方案中,其中包括 5' 和 3' 互补区,如果不存在 5' 和 3' 互补区之间的置换区,并且 5' 互补区紧邻 3' 互补区,则单链置换核酸可以用来实施缺失突变。在存在 5' 和 3' 区之间的置换区的实施方案中,优选地,置换区的序列与靶序列的同源性小于 50%,例如,小于 45%,小于 40%,小于 35%,小于 30%,小于 25%,小于 15%,小于 10%,或与靶序列的同源性小于 5%,或与靶序列没有同源性。以这种方式,可以在单步骤中对大的靶序列区域进行操作。例如,编码蛋白结构域的序列可以通过用其后接着非编码序列的“终止”密码子置换而删除,或者置换为编码备选的目的结构域的序列,或备选地通过删除整个区域而被“敲除”。备选地,目的基因可以通过用非编码序列置换靶核酸而被“敲除”。例如,置换可以导致点突变,并且可以进行插入和 / 或缺失,以产生改变的阅读框。优选地,单链置换核酸用于将序列插入到靶核酸中。

[0096] 置换区的长度可以短至一个核苷酸,优选地至少 20 个核苷酸长。然而,本方法对

于大于 30 个核苷酸的长度特别有效,所述长度是利用寡核苷酸-定向诱变难以得到的那些长度(还参见图 4C)。特别优选地是长度为 40 个以上核苷酸的序列,或长度为大于 60 个核苷酸、或长度为 150 个以上核苷酸或长度为 300 个以上核苷酸的序列(优选更长的区域,例如,至少 500 个,至少 1000 个,至少 2000 个,至少 3000 个或至少 5000 个核苷酸长)。这在下文中更详细地描述。

[0097] 所有当前使用 ssDNA 作为置换核酸的重组方法都是基于寡核苷酸。现有技术没有记述怎样使用比非常短的化学合成的 ssDNA 分子(称为“寡核苷酸”)更长的 ssDNA。先前使用噬菌体退火蛋白利用 ssDNA 实施重组的科学文献中的报道局限于使用短的寡核苷酸,其通常短于 100 个核苷酸(参见 Constantino, N. 和 Court, D. (2003) *Proc Natl Acad Sci USA* (美国国家科学院学报) 100 :15748-15753 ;Li, X, T. 等 (2003) *Nucleic Acids Res.* (核酸研究) 31 :6674-6687)。例如,单链寡核苷酸定向诱变(ssOR)已经用于指导引入从 1 个核苷酸到至多数十个核苷酸的小突变,但是这在 30 个核苷酸以上效率变得非常低,如图 4C 所示。已经使用了更长的合成寡核苷酸(至多 180 个核苷酸),但是寡核苷酸的质量随着增加的长度而减少使得这成为不理想的选择。这些寡核苷酸总是与它们重组的靶 DNA 几乎完全互补。在所有的情形中,寡核苷酸在 DNA 序列中仅包含小的、位于中心的与靶标的不同。这种不同,通过重组引入到靶 DNA 分子中,总是小于所述寡核苷酸的三分之一,并且总是小于 10%。因此,除了点突变和缺失之外,在大肠杆菌中仅报道了小的插入。操作性地,这意味着,现有的用于 Red β 介导的 ssDNA 重组的方法局限于向靶分子中引入小于 60nts 的变化。尽管在协同方法中可以使用多于一种寡核苷酸来避免这一问题,但是所述寡核苷酸必须具有至少 20 个核苷酸的完全互补性,并且同时一起转化的一些寡核苷酸的物理局限性有效地将这一选择限制为至多 4 个寡核苷酸(4x100 具有 20 个寡核苷酸重叠等于 340 个核苷酸)。然而,这是非常乐观的评价,并且使用多种寡核苷酸有效地导致小于 260 个核苷酸的长度。因此,在这些长度和互补性限制中,不可能引入新的基因,并且目前的应用局限在部分基因构建或引入小的、位点定向的突变。

[0098] 现有的 ssDNA 重组方法不允许引入遗传选择性基因,诸如抗生素抗性基因,因为它们太长。因此,用单链寡核苷酸改造依赖于鉴定重组子的物理方法,诸如 PCR,并且不能利用实验上简单的遗传选择方法来鉴定正确的重组子。这些当前局限性的结果为,使用 ssDNA 重组的 DNA 改造仍然是模糊的、专家感兴趣的。

[0099] 现在令人吃惊地发现,单独的 Red β , 无需其配偶体 Red α , 可以有效地重组比合成寡核苷酸更长的 ssDNA。第二发现紧接着上述讨论的第一发现而来:通过由 Red α 产生的全长单链中间体进行 Red 同源重组。本发明有利地允许使用 Red β 介导超过常规尺寸限制的 ssDNA 重组,其基于 ssDNA 提供了新的 DNA 改造尺寸。此外,已经发现,通过存在 Red γ , 甚至无需存在 Red α , 极大地促进了 Red β 的这种 ssDNA 活性。这种现象与先前公开的方法相比具有许多优点。具体地, β 重组可以用于向靶分子中插入大长度的核酸序列。

[0100] 关于这一令人吃惊的发现,本发明提供用于在靶核酸中产生突变的方法,所述方法包括下述步骤:

[0101] a) 在存在 Red β 和 Red γ 、或其功能等价物的条件下,在适于重组的条件下,将靶核酸暴露于单链置换核酸,以在所述单链置换核酸和靶核酸之间发生重组;

[0102] 其中所述单链置换核酸包括与所述靶核酸上序列相同的 5' 区、与所述靶核酸上序

列相同的 3' 区和在所述 5' 和 3' 区之间与所述靶核酸上序列不同的置换区,其中所述置换区为至少 61 个碱基长,和

[0103] b) 选择这样的靶核酸,其序列已经通过包括所述单链置换核酸而改变。

[0104] 此外,本发明提供用于在靶核酸中产生突变的方法,所述方法包括下述步骤:

[0105] a) 在存在 Red β 、或其功能等价物的条件下,在适于重组的条件下,将靶核酸暴露于单链置换核酸,以在所述单链置换核酸和靶核酸之间发生重组;

[0106] 其中所述单链置换核酸包括与所述靶核酸上序列相同的 5' 区、与所述靶核酸上序列相同的 3' 区和在所述 5' 和 3' 区之间与所述靶核酸上序列不同的置换区,其中所述置换区为至少 61 个碱基长,和

[0107] b) 选择这样的靶核酸,其序列已经通过包括所述单链置换核酸而改变。

[0108] 因此,在本发明所用的单链置换核酸中的置换区优选为至少 61 个核苷酸长,至少 110 个核苷酸,至少 150 个核苷酸长,至少 200 个核苷酸,至少 300 个核苷酸,至少 500 个核苷酸,至少 800 个核苷酸,至少 1100 个核苷酸,至少 1500 个核苷酸,至少 2,000 个核苷酸,至少 5,000 个核苷酸或更长。这将单链重组的应用延伸至插入完整的基因,例如,在质粒构建中,用于诸如 ES 细胞靶向的应用;或用于构建例如用在转基因、或内源性原核和真核染色体中的细菌人工染色体 (BACs)。优选地,置换区是基因的全部或一部分。更优选地,其是完整的基因。在置换区为基因的全部或一部分的情形中,置换区可以任选地包括基因表达所需要的一种或多种功能序列。基因可以作用为选择标记,诸如抗生素抗性基因。这使研究者由大部分目前的 ssDNA 改造应用中的当前需要解放到使用物理筛选方法,如菌落 PCR 杂交,并且允许实验上更简单的基因选择方法来鉴定正确的重组子。本发明方法的其它应用对于技术人员将是清楚的。

[0109] 因此,本发明人的发现导致更加多样性的同源重组步骤,因为其确保对本发明可以应用的突变类型没有限制,尽管大部分明显的应用包括使用目前可用的方法非常困难或费时的那些应用。实例包括在任何物种,如酵母染色体、小鼠胚胎干细胞染色体、秀丽隐杆线虫 (*C. elegans*) 染色体、拟南芥 (*Arabidopsis*) 和果蝇 (*Drosophila*) 染色体、人细胞系、病毒和寄生虫,或外源分子如质粒、YACs 和 HACs 中克隆、插入或删除完整的目的基因。

[0110] 任何制备单链置换核酸的方法将是适合的。单链置换核酸可以在体外或在体内产生。优选地,单链置换核酸由上述双链核酸底物产生。最优选地,其由这样的双链核酸底物产生,所述双链核酸底物在其一个或两个 5' 端改变,以使一条链优先降解和 / 或链分离,从而产生单链置换核酸,如上文所述。备选地,单链置换核酸可以使用单链噬菌体如 M13 产生。这些噬菌体仅扩增并且包装来自 dsDNA 模板的一条链。煮沸的 dsDNA (例如,在电穿孔前) 可以用来制备 ssDNA,但是当煮沸的 DNA 成为单链的时,其可以自我分解,并且变得难以被 Red β 结合。使用短的 ssDNAs 如寡核苷酸,这比使用较长的 ssDNAs 的问题要少得多。由于这一问题,使用标准重组方法,长于数百个核苷酸的 DNAs 似乎不工作,至少部分不工作。这便是 Court 等 (Annu Rev Genet (遗传学年度综述), 2002, 36:361-388) 为什么报道 Red β 不能介导使用较长 ssDNAs 的重组,并且因此提出关于使用比寡核苷酸更长的 DNAs 的重组中间体的复杂解释。

[0111] 双重重组,如上文所讨论,也可以使用本发明的这些方法进行。这一实施方案包括在靶核酸中产生两轮突变。在这种双重重组的一个实施方案中,步骤 a) 和 b) 中的单链置

换核酸是如步骤 a) 中定义的第一单链置换核酸, 并且所述方法包括另外的步骤 c) 和 d) :

[0112] c) 在存在 Red β 、或其功能等价物的条件下, 在适于重组的条件下, 将步骤 b) 中所选择的靶核酸暴露于第二单链置换核酸, 从而在所述第二单链置换核酸和所选择的靶核酸之间发生重组,

[0113] 其中所述第二单链置换核酸包括:

[0114] i) 与第一单链核酸的置换区上的第一序列相同的 5' 区, 和与第一单链核酸的置换区上的第二序列相同的 3' 区, 或与第一单链置换核酸的置换区上的第一序列互补的 5' 区, 和与第一单链置换核酸的置换区上的第二序列互补的 3' 区; 和

[0115] ii) 在所述 5' 和 3' 区之间与所述靶核酸上序列不同的置换区, 其中所述置换区为至少 61 个碱基长,

[0116] d) 选择这样的靶核酸, 其序列已经通过包括所述第二单链置换核酸而改变。

[0117] 如在上文讨论的另一个双重重组实施方案中, 如果第一单链置换核酸或第二单链置换核酸, 优选二者, 可以在靶核酸复制时与靶核酸的后随链退火, 则可以提高该方法的效率。后随链可以如上文所讨论那样由复制方向确定。如果第二单链置换核酸包括与第一单链置换核酸的置换区上的第一序列相同的 5' 区 (5' 相同区) 和与第一单链置换核酸的置换区上的第二序列相同的 3' 区 (3' 相同区), 则第一和第二单链置换核酸将与相同的链退火。

[0118] 该双重重组实施方案的优点和优选的次级实施方案与上文讨论的另一个双重重组实施方案的优点和优选的次级实施方案相同。技术人员还应该理解, 以下在本发明方法的步骤 a) 和 b) 中整体所述的优选特征可以独立地应用于该实施方案步骤 c) 和 d) 中的相似整体。

[0119] 两个双重重组实施方案可以改变, 以便同时发生对第一和第二单链置换核酸的暴露。根据这一改变, 因此本发明提供本发明方法的实施方案, 其中步骤 a)-c) 如下:

[0120] a) 生成下述

[0121] i) 由第一双链核酸生成第一单链置换核酸, 其中所述第一双链核酸在其一个或两个 5' 端改变, 以便优先降解一条链和 / 或链分离而产生所述第一单链置换核酸, 其中所述第一单链置换核酸包括与靶核酸上序列相同的 5' 区、与靶核酸上序列相同的 3' 区和任选地在所述 5' 和 3' 区之间与靶核酸上序列不同的置换区, 和

[0122] ii) 由第二双链核酸产生第二单链置换核酸, 其中所述第二双链核酸在其一个或两个 5' 端改变, 以便优先降解一条链和 / 或链分离而产生所述第二单链置换核酸, 其中所述第二单链置换核酸包括与第一单链核酸的置换序列上的第一序列互补的 5' 区, 与第一单链核酸的置换序列上的第二序列互补的 3' 区, 和任选地在所述 5' 和 3' 区之间与靶核酸上序列不同的置换区,

[0123] b) 在适于重组的条件下, 将靶核酸暴露于所述第一和第二单链置换核酸, 以在所述第一和第二单链置换核酸与所述靶核酸之间发生重组, 和

[0124] c) 选择这样的靶核酸, 其序列已经通过包括所述第一和第二单链置换核酸而改变。

[0125] 技术人员应该理解, 以下在本发明方法的步骤 a)-c) 中整体所述的优选特征可以独立地应用于本发明该实施方案步骤 a)-c) 中的相似整体。

[0126] 类似地,本发明提供本发明其他方法的实施方案,其中步骤 a) 和 b) 为:

[0127] a) 在存在 Red B、或其功能等价物的条件下,在适于重组的条件下,将靶核酸暴露于第一和第二单链置换核酸,以在所述第一和第二单链置换核酸和靶核酸之间发生重组;

[0128] 其中

[0129] i) 所述第一单链置换核酸包括与所述靶核酸上序列相同的 5' 区、与所述靶核酸上序列相同的 3' 区和在所述 5' 和 3' 区之间与所述靶核酸上序列不同的置换区,其中所述置换区为至少 61 个碱基长,和

[0130] ii) 所述第二单链置换核酸包括与所述第一单链置换核酸的置换区上的第一序列互补的 5' 区、与所述第一单链置换核酸的置换区上的第二序列互补的 3' 区和在所述 5' 和 3' 区之间与所述靶核酸上序列不同的置换区,其中所述置换区为至少 61 个碱基长,和

[0131] b) 选择这样的靶核酸,其序列已经通过包括所述第一和第二单链置换核酸而改变。

[0132] 技术人员应该理解,以下在本发明方法的步骤 a) 和 b) 中整体所述的优选特征可以独立地应用于本发明该实施方案步骤 a) 和 b) 中的相似整体。

[0133] 本发明人已经发现,如果第一单链置换核酸在靶核酸复制时可以与靶核酸的后随链退火,则可以提高这些双重重组变化实施方案的效率。后随链可以如上文所讨论那样通过复制方向鉴定。

[0134] 在这些双重重组变化中,第二单链置换核酸利用其 5' 区(5' 互补区)和第一单链置换核酸置换区上第一序列之间以及其 3' 区(3' 互补区)和所述置换区上第二序列之间的互补性能够与第一单链置换核酸退火。如果第二单链置换核酸的置换区不与第一单链置换核酸退火,则可以提高这些实施方案的效率。因此,在一些实施方案中,第二单链置换核酸的置换区不与第一单链置换核酸上的序列互补(特别不是 100% 互补)。

[0135] 这些双重重组的变化同样利用第一单链置换核酸“衔接子”,其提供适于插入第二单链置换核酸的合适的序列。任何第二单链置换核酸均可以插入,条件是其具有与第一单链置换核酸置换区上的第一和第二序列互补的合适的 5' 和 3' 区。同样地,通过使用设计引物中包含所述 5' 和 3' 区的储备 PCR 引物进行 PCR 产生第二双链核酸底物,或通过具有所述 5' 和 3' 区序列的小 dsDNA 片段连接到尚未包含这些区的 dsDNA 序列中,可以将这些 5' 和 3' 区包含在第二置换核酸中。

[0136] 在优选的实施方案中,第二单链置换核酸的置换区包括选择标记。例如,这种选择标记是抗生素抗性标记,诸如杀稻瘟菌素、氨苄青霉素、卡那霉素或本领域已知的其它标记。

[0137] 优选地,第一单链置换核酸的 5' 区长于 20 个核苷酸,更优选地在 40 和 60 个核苷酸之间。类似地,优选地,第一单链置换核酸的 3' 区长于 20 个核苷酸,更优选地在 40 和 60 个核苷酸之间。同样地,优选地,第二单链置换核酸的 5' 区长于 20 个核苷酸,更优选地在 40 和 60 个核苷酸之间;并且第二单链置换核酸的 3' 区长于 20 个核苷酸,更优选地在 40 和 60 个核苷酸之间。

[0138] 典型地,靶核酸包括在基因组中或在附加体中,例如, BAC 或质粒中。

[0139] 第一和第二双链核酸可以由任何来源获得。在优选实施方案中,第一双链核酸是 PCR 片段、合成的寡聚体或通过基因合成获得的片段。类似地,第二双链核酸可以是 PCR 片

段、合成的寡聚体或通过基因合成获得的片段。在另一些实施方案中,第二双链核酸是通过消化载体获得的片段。

[0140] 现在已经发现改变的方法,其与常规方法相比降低选择步骤的严格性,允许包含长单链置换核酸的重组子的说明。因此,本发明优选使用与 Court 等 (Annu Rev Genet (遗传学年度综述), 2002, 36 :361-388) 的方法相比较不严格的重组选择。常规选择方法使用的抗生素浓度是不存在细菌生长的最低有效剂量的五倍。然而,本发明优选地使用最低有效剂量的抗生素,更优选高于最低有效剂量 5-70%,更优选高于最低有效剂量 10-40%,更优选高于最低有效剂量 15-30%,最优选高于最低有效剂量 20%,用于选择。优选地,将宿主细胞温育 1-7 天,更优选 2-5 天,然后确定靶核酸的序列是否已经通过包含所述单链置换核酸而改变。因此,与常规选择技术相比,选择步骤优选在更长的时间期间内进行。

[0141] 当进一步询问时,已经出乎意料地发现,单独的 Red β 利用更长的 ssDNAs 作为重组底物的能力不仅仅是其利用单链寡核苷酸的能力的延伸。除了 ssOR, Red β 具有其他利用更长 ssDNAs 的活性。为方便起见,由 Red β 介导的利用更长 ssDNAs 的重组在本文中称为 β 重组。 β 重组所涉及的机制和 ssOR 所涉及的机制之间的差异在本领域中是已知的,由下述 4 条证据确定:

[0142] (i) 仅有 Red β 可以介导使用较长 ssDNAs 的重组。RecT 和 Erf 均不能介导使用较长 ssDNAs 的重组,尽管所有三种均可以重组单链寡核苷酸 (图 3)。因此, β 重组不是简单按比例增加的 ssOR。

[0143] (ii) Red β - 介导的使用寡核苷酸的重组受错配修复途径的抑制 (Constantino 和 Court, 2003, PNAS USA, 100 :15748-15753; Li 等, Nuc. Acids. Res. (核酸研究), 31 :6674-6687; Oppenheim 等, Virology (病毒学), 2004, 319 (2) :185-189; Huen 等, Nuc. Acids Res. (核酸研究) 34 :6183-6194)。然而, β 重组不受其抑制 (图 4)。这还表现为 β 重组与 ssOR 不同。因此, β 重组以及因此本发明的方法可以在其中有效运行错配修复途径的条件下进行。

[0144] (iii) 在 Red β C- 端的特异性突变消除其介导使用不对称磷酸化的 dsDNA 底物而不是使用单链寡核苷酸的重组的能力 (图 5)。

[0145] (iv) Red γ 的共同表达对 β 重组具有强刺激作用,而对 ssOR 没有影响 (图 7)。

[0146] 此外,在 ssOR 和 ssDNA (β) 重组机制的检验过程中,发现了改善版本的 Red β , 这形成本发明的一个方面。在氨基酸 176 由谷氨酸突变为丙氨酸的 Red β 在 ssOR 和 β 重组测定中均表现出提高的重组效率 (图 6)。相反,在氨基酸 191 由谷氨酸突变为丙氨酸的 Red β 完全保留与野生型蛋白相同的 ssOR 效率,然而却几乎完全失去其介导 β 重组的能力 (图 5 和 6)。因此,优选地,使用具有 E176 突变的 Red β 进行使用 ss 寡核苷酸或 ssDNAs 的诱变。优选地,残基编号按照图 10 所示的 Red β 序列进行。突变可以是缺失、插入或置换,但优选是置换。置换可以是保守置换或非保守置换。优选的置换选自 Gly, Thr, Pro, Ala 和 Ser, 其中优选是 Ala。因此,本发明还提供用于进行同源重组的方法,所述方法包括使用如上述在位置 E176 具有突变的 Red β 。优选地,同源重组按照本发明的方法进行。同源重组可以是单链寡核苷酸修复。所有这些突变形式的 Red β 形成本发明的各个方面。优选地,这样的突变形式表现出比野生型 Red β 蛋白更大的重组效率。

[0147] 使用 ssDNA 而不是 dsDNA 进行改造是有效的,因为其允许避免由不需要的双链

断裂引起的问题的实验构型。同源和不合理的重组以 DNA 中的双链断裂和双链断裂修复 (DSBR) 机制开始。双链断裂由于一些原因自然发生,特别是作为 DNA 复制叉处的失败结果而发生。当随机发生双链断裂时,断裂的末端需要通过 DSBR 机制处理,以重新起始复制,并且因此引起重组。在大肠杆菌中,这种重组几乎总是同源重组,其可以完全重设复制叉,因此不发生突变。备选地,同源重组可以在位于断裂两侧的序列重复之间发生。所述重复不必位于断裂附近,但是可以间隔数以千计的碱基对。与大肠杆菌基因组相反,克隆的 DNA 通常包含多得多的重复序列含量,并且因此在随机双链断裂处由于 DSBR 引起的重复指导的缺失可以是主要问题,并且是克隆序列不稳定性的主要原因。其还是克隆宿主为什么通常是 *recA* 缺陷型的原因,因为不存在 *RecA* 不能进行内源性 DSBR。当用 dsDNA 和 DSBR 改造时,重新激活在克隆的 DNA 序列中通过 DSBR 进行不需要的重排的可能性。对于高度重复性序列,诸如高级真核基因组的某些片段(其通常携带许多来源于易位事件的重复),以及原核二级代谢途径,诸如聚酮化合物 (polyketide) 和非核糖体肽合酶途径(其基于一些编码模块的重复),这可能是特别麻烦的。

[0148] 有利地,使用长的 ssDNAs 和 *Red β* 和 *Red γ*,或仅使用 *Red β*,可以在不启动 DSBR 途径的条件下进行改造(图 9)。在存在 *Red β* 的条件下,DSBR 需要 *Red α* 来为 *Red β* 准备双链断裂从而介导重组。因此,省略 *Red α* 减少来自随机发生的双链断裂的重组。因此,产生突变的方法优选在不存在 *Red α* 或其功能等价物的条件下进行。因为不存在天然来源的线性 ssDNA 分子,表达 *Red β* 不激活有问题的内源性机制。因此,克隆的 DNA 固有地更加稳定,并且想要的重组与不需要的重组的比例显著更好。因此,本发明提供可以在 *RecA* 背景中,使用长 ssDNAs 和 *Red β* 在不存在 *Red α* 的条件下进行重组的方法。使用 ssDNAs 改造的这些优点还应用于在不存在其各自的核酸外切酶的条件下使用由 *RecT* 或 *Erf* 介导的单链寡核苷酸的改造。然而,如上文所讨论,利用 *RecT* 或 *Erf* 使用单链寡核苷酸进行的改造应用局限于之后进行物理筛选的定向诱变,并且不容易允许引入新的基因或遗传选择的优势,而使用 *β* 重组这是可能的。因此,与现有技术相比,本发明的方法提供许多优点。

[0149] 现在已经令人吃惊地发现,使用由 *Red β* 介导的单链置换核酸进行的重组通过共同表达 *Red γ* 得到极大地提高(参见实施例 5 和图 6)。这是令人吃惊的,是因为认为 *Red γ* 抑制 *RecBCD*,其作为一种 dsDNA 核酸外切酶,并且因此预测对于 ssDNA 不具有任何作用。因此,尽管在使用单链置换核酸进行改造时,*Red γ* 表达不是主要的,但是 *Red γ* 优选地还存在于本发明的方法中,因为其导致增加的重组效率。因此,在优选的实施方案中,本发明的方法在存在 *Red β* 和 *Red γ* 的条件下进行,其中不存在 *Red α*。

[0150] 此外,在研究 ssOR 和 *β* 重组机制的同时,在大肠杆菌宿主中发现了提高 ssOR(对于后随链)和 *β* 重组的突变。对于核酸外切酶 *sbcB* 突变的大肠杆菌宿主表现出极大提高的 ss 寡核苷酸定向诱变,此时寡核苷酸与后随链模板退火,并且表现出极大提高的 ssDNAs 定向诱变。因此,本发明的优选实施方案是在关于核酸外切酶突变的宿主细胞中,特别是在关于 *sbcB* 突变的大肠杆菌宿主中,进行 ssOR 和 / 或 *β* 重组。因此,本发明还提供用于进行单链寡核苷酸修复和 / 或 *β* 重组的方法,所述方法包括在这样的宿主细胞中进行同源重组,在所述细胞中,其内源性 *sbcB* 核酸外切酶、或其直向同源物或功能等价物的活性已被失活或减低。本发明还提供这样的宿主细胞,其中相对于其野生型对应物,其内源性 *sbcB* 核酸外切酶、或其直向同源物的活性已被减低或失活;这样的宿主细胞形成本发明的一个

方面。优选地,宿主细胞是大肠杆菌。SbcB 或其直向同源物或功能等价物可以被失活,或其活性可以通过突变方式被降低。优选地,突变使 SbcB 或其直向同源物失活。考虑任何适当的突变,例如,缺失、插入或置换。例如,可以删除编码核酸外切酶的完整基因,或可以使用一个或多个点突变来使 SbcB 或其直向同源物失活。核酸外切酶可以以任何其他适当的方式失活,例如,通过基因沉默技术,利用核酸外切酶-特异性拮抗剂或通过核酸外切酶的降解进行。

[0151] 使用上述 SbcB/ 直向同源物 / 功能等价物的突变体的方法可以是本发明所述的方法。本发明还提供 SbcB 突变体 (和相对应的直向同源物 / 功能等价物) 在更宽泛的同源重组技术方面中的应用。因此,提供了改变靶核酸序列的方法,其包括 : (a) 在适于修复重组的条件下,在存在噬菌体退火蛋白、或其功能等价物或片段的条件下,使第一核酸分子与靶核酸分子接触,以在所述第一和第二核酸分子之间发生重组,其中所述第一核酸分子包括至少两个与所述靶核酸分子具有序列同源性的区域,其中所述功能等价物或片段保留介导重组的能力,其中宿主内源性 sbcB 核酸外切酶或其直向同源物或功能等价物的活性已被失活或降低;和 (b) 选择这样的靶核酸分子,其序列已被改变从而包括来自所述第一核酸分子的序列。优选地,所述噬菌体退火蛋白是 Red β 或其功能等价物。所述方法可以在不存在或存在 Red α 和 / 或 Red γ 或其功能等价物中的一种或两种的条件下进行。

[0152] 进一步的优点涉及反向选择的应用。反向选择是在没有任何残余的改造操作序列的条件下获得无漏洞 (seamlessly) 突变的产物的有用方式。通常,使用同源重组改造需要插入选择性基因。通常,这种基因的连续存在不是最佳的。其可以通过两种主要策略中的任一种去除。如果其侧连位点特异性重组靶位点 (RTs) 如 loxP 或 FRT,那么相对应的位点特异性重组酶的表达将删除该基因。然而,这种策略留下 34bp 的 ‘伤痕 (scar)’ ,其是残余的 RT。反向选择可以用来置换所选择的基因并且不留下伤痕。在这种情形中,所述置换 DNA 不包含可选择的方面,而是通过使用置换 DNA 的同源重组去除反向选择基因来提供选择压力。

[0153] 反向选择基因包括 rpsL,其使得天然抗链霉素的那些大肠杆菌宿主再对其敏感。其去除恢复抗性。另一种反向选择基因是 SacB,其赋予 (convey) 针对蔗糖的毒性。

[0154] 尽管反向选择是潜在有力的,但是主要的问题涉及通过经由侧接重复的分子内重组而不是通过需要的同源重组消除反向选择基因。大部分这样的分子内重组是由于 DSB。因此,使用 ssDNA 和 Red β 而不用 Red α 的重组可以提高反向选择的应用,因为其将不引发 DSB 以及随后的不需要的分子内重组。

[0155] 应用本发明的方法可以靶向许多不同类型的核酸分子。靶核酸分子可以是环形的或线性分子,并且因此在本发明的这一方面中,可以在宿主细胞中瞬时或永久性表达,例如,由染色体或由染色体外元件表达。因此,完好的环形双链核酸分子 (DNA 和 RNA),诸如质粒,和其他基于黏粒、P1、BAC 或 PAC 载体技术的染色体外 DNA 分子可以用作上述本发明所述的靶核酸分子。所述载体的实例,例如,由 Sambrook 和 Russell (Molecular Cloning (分子克隆),第 3 版 (2000), Cold Spring Harbor Laboratory Press (冷泉港实验室出版社)) 和 Ioannou 等 (Nature Genet. (自然遗传学) 6 (1994), 84-89) 以及其中引用的参考文献所记述。

[0156] 靶核酸分子还可以是宿主细胞染色体,诸如例如,大肠杆菌染色体。备选地,可以

使用真核宿主细胞染色体（例如，来自酵母、秀丽隐杆线虫、果蝇（*Drosophila*）、小鼠或人）或真核染色体外 DNA 分子诸如质粒、YAC 和 HAC。备选地，靶核酸分子不必是环形的，但是可以是线性的。优选地，靶核酸分子是双链核酸分子，更优选地是双链 NA 分子。

[0157] （所得到的）单链置换核酸分子或靶核酸分子应该包含复制起点。以这种方式，复制起点可以通过 β 重组结合到靶核酸分子中，从而使所述核酸分子可以在宿主细胞中增殖。在置换而不是靶核酸分子携带起点加选择性标记基因的情形中，本发明的方法可以使用 Zhang 等，*Nature Biotech*（自然生物技术）18(2000)，1314-1317 所述的核酸亚克隆方法；还参见国际专利申请 W001/04288。

[0158] 双链核酸底物和单链置换核酸优选是 DNA，但是可以备选地包括 RNA 或者一种或多种修饰的核苷酸。

[0159] 应该注意，双链核酸底物或单链置换核酸分子不必是单一物种的核酸分子。例如，可以使用异源双链或单链核酸分子群体，例如，以产生 DNA 文库，诸如基因组或 cDNA 文库。

[0160] 置换核酸分子可以来源于任何来源。例如，置换核酸分子可以通过核酸扩增反应如 PCR 反应合成的，例如，其中用来引发扩增的两种 DNA 寡核苷酸，除了包含在 3' - 端作为扩增引物的序列之外，还包含两个序列相同区中的一个或另一个。利用这种设计的寡核苷酸，扩增的核酸产物可以是任何适于扩增的核酸序列，并且将另外在每个末端具有序列相同区。

[0161] Red β 的序列在本领域中是公知的（例如，Iyer, L. M. 等，*BMC Genomics* (BMC 基因组)，2002, 3(1) :8)。优选地，用于本发明的 Red β 包括图 10 所示的序列或由图 10 所示的序列组成，或是如下文所讨论的其变体。

[0162] 本发明还包括 Red β 、Red α 和 Red γ 的功能等价物的应用，条件是所述功能等价物保留介导 β 重组的能力，如本文所述。功能等价物分子的实例包括包含由野生型序列的氨基酸置换、插入和 / 或删除的 Red β 、Red α 和 Red γ 蛋白，条件是这些变化没有不利地影响所述蛋白如本文所述那样介导 β 重组的功能。公认的是，编码 Red β 、Red α 和 Red γ 的基因可以在不本质上改变 Red β 、Red α 或 Red γ 的 β 重组功能的条件下被极大地突变。公知遗传密码是简并性的，并且因此不同的密码子可以编码相同的氨基酸。此外，引入氨基酸突变可以导致保守突变，其对 Red β 、Red α 或 Red γ 的基本功能没有实质性影响。用于实施保守置换的方法在本领域中是公知的。另外，可以在不削弱或消除 β 重组功能的条件下，删除 Red β 、Red α 或 Red γ 多肽链的一部分。技术人员将能够使用本领域已知的标准方法来检验任何变体的功能等价性。同样地，可以在 Red β 、Red α 或 Red γ 多肽链中进行插入或添加，例如，添加表位标记，而不削弱或消除其基本功能。所述功能等价物优选地具有与野生型 Red β 、Red α 或 Red γ 序列至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%、至少 98%、至少 99% 的核苷酸序列相同性。例如，使用标准工具来检索蛋白相似性，Iyer 等鉴定了多种新的 Red β 样蛋白 (Iyer LM, Koonin EV, Aravind L. (2002), " Classification and evolutionary history of the single-strand annealing proteins, RecT, Red beta, ERF and RAD52 (单链退火蛋白 RecT、Red β 、ERF 和 RAD52 的分类和进化史)", *BMC Genomics* (BMC 基因组). 3(1) :8)。当将基因组序列添加到数据库中时，添加了多种更相似的蛋白。

[0163] 例如，在本发明中可以使用相对于图 10 提供的序列具有一个或多个突变（例如，

2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14 或 15 个以上的突变) 的 Red β 蛋白。突变可以是插入、删除或置换。突变的实例是 A255T, A255S, 和 / 或 A246V。

[0164] 如上文提及, 使用 ss 寡核苷酸或 ssDNAs 的诱变使用在 E176 具有突变的 Red β 有利地进行。突变可以是删除、插入或置换, 但是优选是置换。置换可以是保守置换或非保守置换。优选的置换是选自 Gly, Thr, Pro, Ala 和 Ser 的氨基酸, 其中优选是 Ala。

[0165] 本发明还包括 Red β 、Red α 或 Red γ 蛋白的片段如截短的变体、和融合蛋白作为功能等价物, 其中 Red β 、Red α 或 Red γ 蛋白的序列形成保留介导 β 重组的能力的片段 (例如, 参见 Muyrers 等, *Genes Dev* (基因发育) 14(2000), 1971-1982)。认为所述功能等价物的鉴定是在熟练的读者 (skilled addressee) 的能力范围之内。

[0166] 还包括 Red β 、Red α 或 Red γ 的变体作为功能变体, 其已经通过例如 DNA 改组进行最优化和 / 或进化 (Stemmer, W. P. *Nature* (自然), 370, 389-391, (1994))。

[0167] 然而, 如上文提及, 只有 Red β 可以介导使用较长 ssDNAs 的重组。其他单链噬菌体退火蛋白 RecT 和 Erf 不能介导。因此, 在本发明使用长 ssDNAs 作为单链置换核酸的方法中使用的 Red β 的功能等价物优选地不包括 RecT 或 Erf。

[0168] 本发明的方法可以全部或部分在宿主中实施。适当的宿主包括多种物种的细胞, 包括病毒和寄生虫、原核生物和真核生物, 尽管优选细菌, 如革兰氏阴性细菌。更优选地, 宿主细胞是肠细菌细胞, 诸如沙门氏菌属 (*Salmonella*), 克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*), 杆状菌属 (*Bacillus*), *Photobacterium*, 奈瑟氏球菌属 (*Neisseria*) 或大肠杆菌细胞 (本发明的方法在所有已经检验的大肠杆菌菌株中有效运作)。其中已经证明存在本文所述的活性的原核宿主细胞的具体实例包括菌株 WS991 (Invitrogen), DK1 (New England Biolabs (纽英伦生物实验室)) 和 DH10B (Gibco BRL)。

[0169] 然而, 应该注意, 本发明的方法还适合用于真核细胞或生物体中, 如真菌、植物或动物细胞中, 以及病毒和寄生虫细胞和生物体中。适用于本发明方法的真核细胞包括已知在其中通过同源重组进行 DNA 改造是可行的那些, 包括, 例如, 大部分的酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 菌株、小鼠 ES 细胞 (诸如 E14 和 R1; 参见 Joyner, *Gene Targeting, a practical approach* (基因靶向, 实践方法), (2000) tatget edition, Oxford University Press Inc (牛津大学出版社), 纽约) 和某些体细胞系如 DT-40。此外, 包含 DNA 修复的功能性途径的任何细胞或物种 (其包括大部分细胞, 例如, 参见 Stucki 等 *Prog. Nucleic Acid Res Mole Biol* (核酸研究分子生物学进展) 65(2000) 261-298; Hansen 和 Kelley, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (药理学和实验治疗杂志) 295(2000) 1-9) 可能是适用的。

[0170] 优选地, 用于 β -重组的宿主细胞可以是其中表达 Red β 、或其功能等价物或片段的任何细胞。例如, 宿主细胞可以包括位于宿主细胞染色体上或位于非染色体核酸分子上如载体上的 Red β 基因, 优选地由启动子表达, 所述启动子诸如可调控的阿拉伯糖 (arabinose)-诱导型 BAD 或 lac 启动子或强组成型启动子 EM-7。备选地, Red β 可以由使用置换和潜在地使用靶核酸分子引入的 mRNA 表达。 β 重组反应如实结合来自单链置换核酸的序列。例如, 在大肠杆菌中, 所有重组的分子被内源性复制和修复系统校对。结果, 序列繁殖的保真度是极高的。

[0171] 在本文所述的系统中, Red β 的表达可以受到可调控启动子的控制。以这种方式, 系统的重组潜力仅在需要时引发, 并且在其他时间, 可能的不需要的重组反应得到限

制。由于多种不需要的重组反应通过经由双链断裂修复的同源重组发生 (Muyrers 等, Genes Dev(基因发育)14(2000), 1971-1982 ;Zhang 等 Nature Biotech(自然生物技术), 18(2000), 1314-1317), 并且因此需要噬菌体蛋白对的两种成分的表达 (Muyrers 等, Genes Dev(基因发育)14(2000), 1971-1982), 这样不需要的重组的危险在仅存在退火蛋白的条件下极大降低。此外, 假定本文所述的系统对 RecA 存在的依赖性, 该危险被在不表达 RecA 的宿主细胞中进行该方法而进一步降低。

[0172] 本发明的方法可以包括使单链置换核酸和靶核酸分子在体内接触。在一个实施方案中, 双链核酸底物或单链置换核酸可以被转化到已经携带所述靶核酸分子的宿主细胞中。在不同的实施方案中, 置换和靶核酸分子可以在它们共转化到宿主细胞中前在体外混合在一起。当然, 一种或两种核酸分子物种可以通过任何方式引入到宿主细胞中, 诸如通过转染、转导、转化、电穿孔等。对于细菌细胞, 优选的转化或共转化方法是电穿孔。

[0173] 本发明可以完全在体外起始, 不需要宿主细胞或细胞重组机制的参与。噬菌体退火蛋白如 Red β 能够在体外形成在蛋白本身、单链置换核酸和双链靶核酸分子之间的复合物 (Noirot 和 Kolodner, J. Biol. Chem. (生物化学杂志)273(1998), 12274-12280)。这样的复合物的一个实例是在 Red β 、单链置换核酸和完好的环形质粒之间形成的复合物。所述复合物导致在本文称为“连接分子”(在本实例中, 由质粒和单链置换核酸组成)的复合物的形成。已经发现所述连接分子在去除噬菌体退火蛋白后是稳定的。已经发现稳定的连接分子的形成依赖于在单链置换核酸和质粒之间存在共有的相同区。

[0174] 在体外, 单链置换核酸和同源靶序列之间的连接分子的形成仅依赖于退火蛋白的存在。对于所述反应不需要其他外源性成分, 并且对于加工的方法不需要特异性细胞操作。例如, RecBCD 不必被失活; 所述方法在 RecBCD+ 背景下仍然有效地运作 (参见国际专利申请 W002/062988)。这种系统是非常有力的, 并且可以用于在需要时向核酸分子中引入置换、删除和插入。

[0175] 还提议由 Red β 蛋白包被的单链置换核酸分子, 在本文中称为“包被的分子”, 与“裸露的”、未包被的核酸分子相比, 能够以更高的效率进行重组。因此, 本发明的一个实施方案提供 Red β 、或其功能等价物或片段和单链置换核酸的分离的复合物作为 β 重组加工的模板的应用, 这导致在宿主细胞中形成重组分子, 所述宿主细胞无论如何不需要表达任何噬菌体退火蛋白。包被的或连接分子向宿主细胞的递送 (在多种情形中, 其包含靶分子) 可以是多种类型的: 转化、转染、电穿孔等等 (以及真核生物递送技术), 或通过使用携带允许其穿过细胞壁的标记的 Red β , 所述标记如 TAT (Nagahura 等, Nature Med. (自然医学)4(1998), 1449-1452 ;Schwarze 等 Science(科学)285(1999), 1569-1572) 或 kFGF 标记 (Delli Bovi 等, Cell(细胞)50(1987), 729-737 ;Yoshida 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA(美国国家科学院学报)84(1987), 7305-5309 ;Peters 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA(美国国家科学院学报)86(1989) 5678-5682)。

[0176] 本发明方法的巨大优点是不需要复杂的选择步骤来选择重组分子。在有助于两种分子物种之间的 β 重组的条件下将置换和靶核酸分子接触之后, 必须选择一种或多种代表其中已经在置换和靶核酸分子之间发生了 β 重组的物种的核酸分子。该步骤可以通过数种不同的方法进行, 熟练的读者将是清楚的。优选地, 选择利用 PCR 进行, 尽管还可以使用利用印迹技术或利用测定的杂交反应 (参见, Sambrook 和 Russell ;在上述引文中)。尽

管本发明方法的高效性,可能存在方法中可能包括选择性基因步骤以提高方法效率的情形,包括抗生素选择方法,和使用位点特异性重组酶的选择。适当的选择方法的实例,例如,记述在国际专利申请号 W099/29837 中。

[0177] 现在,将参考下述具体实施例详细描述本发明。应该理解,在不背离本发明的范围的条件下可以进行细节的修改。

[0178] 附图简述

[0179] 图 1 :对同源重组的单链机制的新见解和双链核酸底物中功能区的说明 ;

[0180] 图 2 :不对称末端的双链核酸底物对于 Red 介导的重组作用更有效 ;

[0181] 图 3 :Red β 而不是 Erf 或 RecT 可以介导使用长 ssDNAs 的 β 重组 ;

[0182] 图 4 :宿主突变对 ssOR 和 β 重组的差别作用 ;

[0183] 图 5 :突变版本的 Red β 仍然可以介导 ssOR,但是对于 β 重组是缺陷型的 ;

[0184] 图 6 :数种 Red β 突变的分析揭示出表现出使用 ssOR 和 β 重组二者的提高的性能的突变,以及表现出选择性 β 重组丧失的突变 ;

[0185] 图 7 :不管 Red α 是否存在,Red β 介导的重组通过共表达 Red γ 而被极大地提高 ;并且 Red γ 提高 β 重组而不是 ssOR。不对称硫代磷酸化底物对于 Red 介导的重组作用更加有效。

[0186] 图 8 :不对称磷酸化底物用于三倍体和四倍体重组 ;

[0187] 图 9 :在用 Red β 和长 ssDNAs 不用 Red α 重组后减少的分子内重组 ;

[0188] 图 10 :优选的 Red β 序列 ;

[0189] 图 11 :双重重组 ;

[0190] 图 12 :同时插入两个单链置换核酸的双重重组 ;

[0191] 图 13 :同时插入两个单链置换核酸的双重重组的可能的机制 ;

[0192] 图 14 :顺序插入两个单链置换核酸的双重重组 ;

[0193] 图 15 :通过长范围 PCR 生成双链核酸底物 ;

[0194] 图 16 :具有不同配置的硫代磷酸酯的双链核酸底物 ;

[0195] 图 17 :使用硫代磷酸化底物的成功重组 ;

[0196] 图 18 :使用复制 (replicating) 底物的重组 ;

[0197] 图 19 :提议的基于线性 dsDNA 底物的重组模型 ;

[0198] 图 20 :重组和寡核苷酸介导的使用 ssDNA 的修复 ;

[0199] 图 21 :在 5' 端修饰对重组效率的影响 ;

[0200] 图 22 :在重组中针对对称切断的 dsDNA 中间体的证据 ;

[0201] 图 23 :对于重组中单链 DNA 中间体的提议的模型 ;

[0202] 图 24 :有利于异源双链体重组中间体的证据。

实施例

[0203] 实施例 1 :单链置换核酸

[0204] 图 1C 提供用于本发明的双链核酸底物的实例的示意图,其中双链核酸底物在上部图示,表示由 5' 到 3' 的三个特征,分别在上链中表示为 (a), (b) 和 (c),在下链中表示为 5' 到 3' 的 (a'), (b') 和 (c')。在本实施例中的上链表示将变为单链置换核酸的链。

片段 (a) 表示与靶核酸上序列相同的 5' 区。片段 (c) 表示与靶核酸上序列相同的 3' 区。片段 (a) 和 (c) 与其在靶核酸上的、优选在复制叉处的后随链模板上的互补序列退火。片段 (a) 和 (a') 优选地位于其各自链的 5' 端,但是对片段 (a) 和 (a') 可以存在另外的序列 5'。片段 (c) 和 (c') 优选地位于其各自链的 3' 端,但是对片段 (c) 和 (c') 可以存在另外的序列 3'。所述另外的 5' 和 3' 序列可以短至 1 个核苷酸或可以至多数千个碱基长。在双链核酸底物中存在另外的 5' 和 / 或 3' 序列的情形中,优选地这些还存在于所得到的单链置换核酸中,尽管也考虑在发生重组之前失去所述另外的 5' 和 / 或 3' 序列的实施方案。所述一个或两个 5' 改变优选地位于片段 (a) 和 (a') 的一个或两个的 5' 端,但是备选地可以位于片段 (a) 和 (a') 中的一个或两个的一个或多个另外的序列 5' 的 5' 端。优选地,双链核酸底物在其 5' 端不对称地改变。片段 (b),位于所述 5' 和 3' 区之间,代表置换区。该区可以从 0 个核苷酸到数百 kbp 的任何长度。

[0205] 实施例 2:对于 Red 介导的重组,不对称末端双链 DNA 底物作用更有效

[0206] 进行实施例 2,以表明 Red α /Red β 重组通过全长 ssDNA 中间体进行。进行两种测定(参见图 2),二者均使用相同的 DNA 片段作为 dsDNA 底物 (sunstrate),其以图 2 所示的四种版本使用。该 dsDNA 底物约 500bps 长,并且在 pBelo-BAC11 或大肠杆菌染色体上编码杀稻瘟菌素 (blasticidin) 抗性基因 (bsd),其在每个末端侧接 50bp 的相同区。四种版本仅依据 5' 磷酸 (P) 或羟基 (O) 的存在而不同。将这四种片段重组到 BAC(细菌人工染色体:上图)或重组到大肠杆菌染色体中(下图)。BAC 或染色体中的靶标采用一种构型或倒转的(分别为 bla 和 bla-inv)。这改变靶标的复制起点,使得前导链变为后随链。

[0207] 在所有的情形中,不对称的磷酸化底物是最有效的,所述不对称的磷酸化底物在通过 Red α 消化 5' 磷酸化链后,留下可以与后随链模板退火且引发 Okazaki 片段合成的链。其比其对应物或对称的磷酸化 (PP) 或非磷酸化 (OO) 底物更有效。因此,不对称末端双链 DNA 底物对于 Red 介导的重组作用更有效。

[0208] 实施例 3:Red β 而不是 Erf 或 RecT 可以介导 β 重组

[0209] 为了检验除了 Red β 外 β 重组是否还可以通过 Erf 或 RecT 进行,本发明人在存在由相同质粒表达的 Red β 、Erf 或 RecT 蛋白的条件下,在大肠杆菌 HS996 中进行了基于质粒靶标 pBAD-neo* 的重组的测定(参见图 3A,上图)。细胞用单链寡核苷酸和 ssDNA 底物共转化,所述单链寡核苷酸用于修复 neo* 基因从而产生卡那霉素抗性,其作用为测量 ssOR,所述 ssDNA 底物通过煮沸由氯霉素 (Cm) 抗性基因制备的 PCR 产物而制备。PCR 产物包括与质粒中 amp 基因相同的序列的末端区,以使单链 DNA 重组将用氯霉素抗性替代氨苄青霉素抗性。结果显示在图 3A 的表中。而 ssOR 对于所有三种均有用,但是使用长 ssDNA 底物的重组(β 重组)仅使用 Red β 有效。

[0210] 进行进一步的测定,其中 BACs 用作靶标(参见图 3B)。一个 BAC 是与图 2 所示的相同的靶标,另一个包含可以如上述由 ssOR 修复的 neo* 基因。通过在体外用 Red α 消化不对称的磷酸化 dsDNA 底物,在将它们电穿孔到包含 BAC 靶标的大肠杆菌中之前,制备更长的 ssDNA 底物。图 3C 的柱状图显示所有三种蛋白均可以介导 ssOR,具有对与后随链模板 (Lg) 退火的寡核苷酸的预测的喜好性。然而,仅 Red β 可以利用较长的 ssDNA 底物 (up, low)。与后随链模板退火的 ssDNAs (low) 与其与前导链模板退火的补体 (up) 相比,产生更多的重组体。

[0211] 实施例 4 : (a) 突变错配修复途径 ; (b) 突变 sbcB ; (c) 包括的非同源核苷酸序列的长度对 ssOR 和 β 重组的差别性影响

[0212] 图 4 是基于与实施例 3 所述和在图 3B 中示意性表示相同的测定。在图 4A 中, 比较在大肠杆菌菌株 HS996 和 HS996mutS 中的重组效率。由文献可知, 错配修复 (MMS) 途径中的突变提高 ssOR 效率, 尤其是关于前导链 (比较 Ld, Lg)。然而, 这种突变对使用更长 ssDNA 底物的重组没有影响 (比较 up, low)。因此, β 重组不受错配修复途径的影响。在图 4B 中, 显示了与 A 中相同的数据, 不同的是还显示了关于 sbcB 突变的大肠杆菌菌株的数据。可以看出, 失去 sbcB 导致强烈增加的 β 重组 (ss-Up ; ss-Low), 以及对于通过 ssOR 的 Lg, 而不对 Ld。在图 4C 中, 显示了在寡核苷酸定向的诱变和可以结合的非同源核苷酸序列尺寸之间的关系。获得在 5' 和 3' 相同区之间包含不同的非同源长度的不同的寡核苷酸, 如在 x- 轴所示。y- 轴显示在存在 Red β 、Plu β (其为在 *Photobabdu* *luminscens* 的基因组序列中发现的 Red β 样蛋白) 和 RecT 的条件下获得的正确的重组体的数目。可以看出, 插入 30 个核苷酸的非同源片段极大地降低了重组效率。低于这一尺寸的是 ssOR 区, 并且迄今为止试验了几乎所有寡核苷酸导向的 DNA 改造。以更大的非同源片段长度, 其为本发明的主题, Red β 产生显著更多数量的正确的重组体。

[0213] 实施例 5 : Red β 的突变版本仍然可以介导 ssOR, 但是对于 β 重组是缺陷性的

[0214] 图 5 是基于与实施例 3 所述和在图 3B 中示意性表示相同的测定。两种突变形式的 Red β 为具有融合到 C 端的 strep- 标记的 c-Strep 和氨基酸 191 由谷氨酸交换为丙氨酸的 E191A。图 5 中的结果表明这些突变版本的 Red β 仍然可以介导 ssOR (下图 ; 同样注意, 与后随链模板 (LG) 退火的寡核苷酸比其补体 (LD) 作用得更好)。然而, 当与野生型 Red β (上图) 比较时, 这些突变体版本对于 β 重组是缺陷性的。

[0215] 实施例 6 : 关于突变版本的 Red β , 包括改善重组的突变的进一步数据

[0216] 图 6 基于与图 5 相同的测定, 并且包括相同的数据。另外, 检验了 6 种以上的突变, 如图 A 所示。在图 B 中, 在 ssOR 测定中, 对于两条链 (LD- 所述寡核苷酸与前导链模板退火 ; LG- 所述寡核苷酸与后随链模板退火) ; 在 ssDNA 重组测定, 其使用两种相同的 dsDNA 底物, 除了相反的, 不对称硫代磷酸 (S) 或 5' 磷酸 (P), 如图所示, 来评估了野生型 (wt) 和突变版本的重组效率。可以看出, 在所有情形中, 一条链比另一条有利。在图 C 中, 将图 B 的结果 (优选链) 关于 ssOR (y- 轴) 和 ssDNA (x- 轴) 绘图, 以举例说明 : (i) 在两种测定中, E176A 突变一律比野生型更好, 而 Q252A, K258A 和 Q240A 在两种测定中均一律比野生型更差 (因为这些数据依赖于经由野生型的对角线) ; (ii) E191A 突变, 并且在较小程度上, E256A 突变保留 ssOR 活性, 但是对于 ssDNA 重组被选择性消弱。因此, β 重组在功能上不同于 ssOR。

[0217] 实施例 7 : 不管 Red α 是否存在, Red β 介导的重组通过共表达 Red γ 极大地提高 ; 并且 Red γ 提高 β 重组而不是 ssOR。不对称的硫代磷酸化底物对于 Red 介导的重组作用得更有效。

[0218] 图 7 的实验表明 Red β (b) 介导的 ssDNA 重组通过共表达 Red γ (g) 极大地提高, 而不管 Red α (a) 是否存在 (图 A 和 C)。它们还表明不对称的硫代磷酸化 dsDNA 底物对于 β 重组的效率产生进一步的提高 (图 A 和 B)。实验还表明 Red γ (g) 对于 Red β 介导的 ssOR (单链寡核苷酸定向的诱变 ; 图 D) 具有很少的影响。

[0219] 图 7 是基于与实施例 3 所述和在图 3B 中示意性表示相同的测定。Red 蛋白通过阿

拉伯糖-诱导的启动子 BAD 由 pSC101 表达。不对称末端底物使用如图所示的 5' 硫代磷酸酯键 (S)、5' 磷酸 (P) 或 5' 羟基 (O) 末端制备。将它们引入到下列细胞中：仅包含 Red β (b)，包含 Red γ 和 Red β (gb) 或包含 Red γ 、Red β 和 Red α (gba)。

[0220] 在图 A 的实验中，引入作为双链 DNA 的底物。可以看出，单独的 Red β 介导的重组与在存在 Red γ 或 Red γ 和 Red α 的条件下由 Red β 介导的重组相比，其效率低得多。然而，在所有三种情形中，观察到链特异性影响，其中相同链的硫代磷酸化保护产生最好的结果，其次是相同链的羟基保护。注意，图 B 显示与图 A 所示相同的仅关于 Red β 的相同数据，不同的是使用扩增的 abscissa。

[0221] 在图 C 的实验中，仅使用不对称的硫代磷酸化 / 磷酸化的底物，在体外用 Red α 预先消化后产生单链底物 (SP-ss 或 PS-ss)，或直接作为 dsDNA 底物 (SP-ds 或 PS-ds)，并且结果以这一顺序表示；在该图中由左至右，依据仅 Red β 表达，Red γ 和 Red β 表达，或 Red γ 、Red β 和 Red α 表达。同样，Red γ 的表达产生显著的益处。除了这种益处外，Red α 表达仅在使用的是 dsDNA 时产生另外的贡献。

[0222] 图 D 显示 ssOR 测定的结果，其表明 Red γ 表达对寡核苷酸定向的诱变具有很少的影响。因此，寡核苷酸诱变和 β 重组在机制上是不同的。

[0223] 实施例 8：对三倍体和四倍体重组应用不对称的磷酸化底物

[0224] 图 8A 所示的实施例涉及不对称的磷酸化底物对三倍体重组的应用。在顶部显示两种底物 DNAs，其是关于卡那霉素抗性基因的两个半份。这两个底物 DNAs 共有序列相同性区 (i)，其必须重组，从而产生卡那霉素抗性。它们必须也通过标记为“a”和“b”的两个序列相同区重组到靶标中，其将靶标上编码氨苄青霉素抗性的基因替换为卡那霉素抗性基因。靶标存在于高拷贝质粒 (pBAD24，上图) 上，BAC (BAC-amp，中图) 上或大肠杆菌染色体 (GB2005-amp，下图) 上。底物 DNAs 使用所示的磷酸化和非磷酸化末端的不同组合制备。测定在 HS996 或 GB2005-amp 中使用由质粒表达的 Red α 、 β 和 γ 进行。图 8A 中的结果表明，在所有情形中最有效的构型是相同的 PO/OP 组合。因此，如三倍体重组的复杂任务受益于不对称末端的底物。

[0225] 为了研究不对称磷酸化底物对四倍体重组的应用，进行如上述且图 8B 所示的 (pBAD24 质粒靶标) 相同测定，不同的是将卡那霉素基因分成三个片段。发现来源于不对称底物的退火组合比任何其他构型作用得更好。

[0226] 为了研究不对称性对使用盒与侧接寡核苷酸的四倍体重组的应用，实施相同的测定，不同的是所述盒不共有与所述靶标的序列相同性。订制另外两种寡核苷酸，其包含 (i) 与靶标中侧接氨苄青霉素基因的 (a) 和 (b) 序列相同的 50 个核苷酸，分别在两种寡核苷酸的 5' 或 3' 端显示为黑色盒白色区域；和 (ii) 与所述盒序列相同的 40 个核苷酸，在两种寡核苷酸的 3' 或 5' 端分别表示为灰色区域。所述寡核苷酸均与一条链或另一条链互补（分别为左图和右图）。所述盒是不对称磷酸化的 (OP 或 PO；其中 O 意指 5' 羟基化，P 意指 5' 磷酸化) 或不是不对称磷酸化的 (OO 或 PP)。可以看出，一种不对称构型比任意其他构型显著更有效。

[0227] 实施例 9：在用 Red β 和长 ssDNAs 而不用 Red α 重组后减少分子内重组

[0228] 为了研究使用 Red β 不用 Red α 对使用长 ssDNAs 进行的重组的优点，进行这样的测定，其中使用潮霉素 (hygromycin) 抗性基因 (Hyg) 作为底物。潮霉素基因是双链的或通

过煮沸制成单链的。潮霉素抗性,其由重组到靶标中而产生,从而替换 rpsL 反向选择基因,并且因此还保留链霉素抗性,提供对需要的重组的测量。靶 BAC DNA 包含两个半拷贝的氯霉素抗性基因,其共有短的序列相同区。这两个短区域之间的重组将产生氯霉素抗性,其提供对不需要的内部重组的测量。不同的 Red 蛋白组合由图 9 所示的 pBAD 质粒 ((a)pBAD24,无 Red 蛋白;(b)pBAD-b,仅有 Red β ;(c)pBAD-a,仅有 Red α ;(d)pBAD-ba Red β 和 α ;和(e)pBAD-gba, Red γ , β 和 α) 表达。

[0229] 图 9 的上表显示来自不需要的内部重组的结果。在所有情形中,发现一些不需要的重组。如预测的,共表达 Red α 和 β ,有或无 γ ,极大地刺激了不需要的重组。

[0230] 图 9 的中图显示需要的重组获得的菌落数目。不使用 Red β 没有获得重组,通过单独的 Red β 获得的数目通过变性提高。如预测的,当使用 dsDNA 底物共表达 Red α 、 β 和 γ 时获得最多的菌落。然而,这也与极大提高的不需要的重组水平相对应(参见图 9 的上表)。

[0231] 图 9 的下表是关于转化效率的对照。未诱导是基于除 pBAD 编码的蛋白的阿拉伯糖诱导外存在所有方面的对照。

[0232] 实施例 10:使用新鲜制备的细胞的重组和电穿孔。

[0233] 在本实施例中,大肠杆菌宿主包含赋予氯霉素 (cm) 抗性的 BAC 加用于 Red 蛋白 γ 、 β 和 α 的表达质粒——pSC101-BAD-gbaA-tet。其赋予四环素抗性。对于赋予氨苄青霉素 (amp) 抗性的高拷贝质粒的小流程变化显示在括号中。

[0234] 1. 在 Eppendorf 等温混合器中以 1000rpm 在 1.5ml Eppendorf 管中温育细胞。

[0235] 抗生素浓度以微克/ml 提供。

[0236] 2. 将单个菌落接种在 cm10(或 amp100) 加 tet5 的 LB 中,在 30°C 16 小时。

[0237] 3. 将 40 μ l 过夜 (O/N) 培养物接种到 1.4ml cm10(或 amp100) 加 tet3 的 YenB 中,并且在 30°C 温育 2 小时。

[0238] 4. 加入 20 μ l 10% L-阿拉伯糖,并且在 37°C 生长 40 分钟。

[0239] 5. 在 Eppendorf 冷却离心机中在 4°C 以 10,500rpm 离心 30 秒,然后去除上清。

[0240] 6. 加入 1ml 冰冷的 10% 甘油,通过涡旋重悬。

[0241] 7. 重组步骤 5 和 6 两次。

[0242] 8. 重悬在约 30 μ l 的残留液体中。

[0243] 9. 加入约 200ng 通过柱纯化且洗脱在双蒸水中的 PCR 产物,将黄色枪头 (tip) 留在管中。

[0244] 10. 使用同一枪头,将细胞加 PCR 产物转移到冰冷的 1mm 电穿孔杯中,以 1350 伏在 Eppendorf 电穿孔仪中电击。

[0245] 11. 向所述杯中加入 1ml SOC,吹吸两次,将其转移到 Eppendorf 管中。

[0246] 12. 在 37°C 温育 1 小时。

[0247] 13. 将 100 μ l (对于 HC 质粒) 或 1ml (对于 BAC,离心,重悬为 100 μ l) 划线在选择 LB 平板。放在 37°C 培养箱中过夜生长至 7 天。

[0248] 可以备选地使用 LB 替代 YenB 和 SOC,具有可使用的效率。

[0249] 实施例 11:使用各批次细胞重组和电穿孔

[0250] 重组实验以三个阶段进行:第一,制备各批次的电感受态细胞;第二,通过电穿孔

进行 DNA 转化,生长复苏和涂布在选择性琼脂平板上;和第三,菌落计数和数据分析。

[0251] 制备各电感受态细胞批次

[0252] 为了制备用于标准重组实验的电感受态细胞/各批次,由过夜培养物接种 60ml 培养液至起始 $OD_{600} = 0.05$ 。取决于表达质粒起点的需要,培养物在 30℃ (pSC101ori) 或在 37℃ (pBR322ori) 生长。蛋白表达在 $OD_{600} = 0.2$ 由 L-阿拉伯糖 (L-ara, 终浓度 (f. c.): 0.2%) 诱导 45 分钟,并且生长温度在诱导时转换至 37℃或保持在 37℃。收集细胞,在冰冷的 10%甘油中洗涤两次,并且将细胞密度调整至 $OD_{600} = 20$ (1.6×10^7 个细胞/ μ l)。感受态细胞立即进行转化或迅速在液氮中冷冻并且保存在 -80℃。

[0253] 通过电穿孔进行 DNA 转化

[0254] 通常通过电穿孔转化大肠杆菌细胞。对于单次电穿孔,制备 4.8×10^8 个电感受态细胞和 DNA 的混合物,并且随后转移到单个 0.1cm 缝宽的杯 (Molecular BioProducts (分子生物产品)) 中。将杯置于电穿孔仪 2510 (Eppendorf) 中,并且使用 12.5kV/cm 的场强 (脉冲长度 > 5msec) 电脉冲。细胞混悬液用 970 μ l LB-培养基从杯中冲洗出来。允许在 37℃ 生长复苏 60 分钟,然后在适当稀释之后涂布在选择性琼脂平板上。

[0255] 菌落计数和数据归一化

[0256] 使用 Molecular Imager Gel Doc XR System (分子成像凝胶 Doc XR 系统) (Bio-Rad) 结合 Quantity One® 1-D 分析软件版本 4.6.2 (Bio-Rad) 的菌落计数快速指导特征,半自动计数琼脂平板上生长的细菌菌落。对琼脂平板照相,记录,并且调整检测阈值以及反差以提高计数准确性。通过比较半自动计数与手动计数设置最佳计数参数。使用下述计数设置:使用下述设置:a) 计数灵敏度:1.0-4.0 和 b) 3-5 个菌落的平均值。由于单次实验之间的菌落尺寸屈居于各自的培养时间而不同,针对每次实验分别改变菌落尺寸截断值 (the colony size cut-off)。将计数的菌落数首先与每次转化的菌落数归一化,其次与电穿孔存活的细胞数目归一化,或与用对照质粒 (大小 < 5.0kb) 转化的细胞数目归一化。

[0257] 实施例 12A:共转化的双重重组

[0258] 图 11 举例说明可以在双重重组中使用的底物。在图 12 中,显示了不对称磷酸化的底物的应用。使用两种底物 DNAs (第一双链核酸“衔接子”和第二双链核酸“盒”) 来通过插入到靶标中而改变靶 DNA (BAC) 的序列。

[0259] 所述衔接子具有一对外臂,其与靶核酸上的序列相同,表示为深色长方形 L 和 R。衔接子还具有一对内臂,表示为长方形 S 和 D,其与侧接所述盒的序列相同。

[0260] 进行实验,其包括利用在底物 dsDNAs 的 5' 端的不对称修饰在体内生成 ssDNA 中间体。在图 12 的左手一侧,示意性表示双重重组底物和反应。衔接子为 200bps 长,并且由已经在 PCR 反应中接合在一起的合成的寡核苷酸制成。制得四种衔接子变体,对应于在每一端的 5' 磷酸化 (P) 或末端硫代磷酸酯键 (S)。相似地,制得四种盒变体,对应于在每一端的 5' 磷酸化 (P) 或末端硫代磷酸酯键 (S)。将四种版本的衔接子各自与四种版本的盒中的每一种组合,生成图 12 所示的 16 种组合,并且共转化在表达 Red 系统且包含 BAC 的细胞中。

[0261] 结果表示在图 12 的柱状图中。在 x-轴上,前两个字母 (P 或 S) 是指衔接子,后两个是指盒。纵坐标显示相对同源重组效率。这些结果表明:(i) 双重重组反应通过单链中间体进行;和 (ii) 在关于底物 dsDNAs (PSSP) 的最佳不对称构型和对称构型之间存在非常大

的差别,所述最佳不对称构型促进最好的 ssDNA 中间体。这对于 PPPP 构型是特别真实的,所述 PPPP 构型是正常的限制性消化的 dsDNA 状态。

[0262] 图 13 提议了一种关于这种双重重组反应的模型。重组底物被转化为 ssDNA 中间体,其如所示与复制叉退火。当衔接子 ssDNA 中间体在复制叉处与靶 DNA 的后随链退火时,获得最有效的结果。这种情形显示在图 13 左侧,并且认为对应于图 12 的 PSSP 实验。在右侧显示较不有效的情形,其中衔接子 ssDNA 中间体与靶 DNA 的前导链退火;认为这种情形对应于图 12 的 SPPS 实验。

[0263] 实施例 12B:通过顺序转化进行的双重重组

[0264] 双重重组还可以以两步连续的转化实现,由此最先引入的双链核酸是衔接子,第二双链核酸是盒。衔接子通过 PCR 制得,在一对内臂之间包含选择标记。所述选择标记是抗生素抗性标记。在第一重组步骤中,将衔接子转化到表达 Red 系统且包含靶核酸的细胞中,以使衔接子插入到靶 BAC 中。通过表达选择标记而选择插入。在第二重组步骤中,利用在第一重组步骤中插入的衔接子的内臂,将盒插入到靶核酸中。

[0265] 图 14 提议了一种关于这种两步双重重组反应的模型。在第一步中,插入衔接子。在第二步中,将盒通过衔接子的内臂插入到靶标中。在两个步骤中,最有效的重组中间体是可以与靶分子的后随链退火的 ssDNA 链。这里关于衔接子和盒的优选不对称性组合不同于图 12A 中讨论的共转化双重重组。PSPS(或 POPO, PSPO 或 POPS)是最有效的,因为其导致在两个步骤中与后随链退火的 ssDNA 链。

[0266] (合成) 实施例 13:制备衔接子和盒片段

[0267] 实施例 12A 和 12B 中所用的双链核酸衔接子通常使用具有相对不对称性的合成寡核苷酸(优选 P 和 S)制成。这些合成寡核苷酸在 PCR 反应中用作引物,并且 PCR 产物直接用于重组。

[0268] 双链核酸盒的制备更复杂,因为其对于 PCR 扩增通常是太长了,或者必须避免 PCR 扩增的诱变危险。因此,通常不可能利用合成寡核苷酸和 PCR 将 5' 不对称性附着在盒上。在这些情形中,盒用仅在一端分裂的酶切割。然后,将盒用磷酸酶进行处理,从而去除暴露的 5' 磷酸基团。在该步骤之后,盒的另一端用不同的限制酶分裂,以暴露 5' 磷酸基团。这产生不对称的 PO 或 OP 盒。

[0269] 实施例 14:小鼠 ES 细胞的重组

[0270] 通过长范围 PCR 生成双链核酸底物

[0271] 本发明所用的双链核酸底物可以通过长范围 PCR 生成,例如,质粒或附加体中的靶向构建体(TC)的长范围 PCR(图 15)。以这种方式使用长范围 PCR 试剂盒(Roche(罗氏))和携带修饰的 5' 端的合成寡核苷酸生成一系列底物。存在于质粒中的 Nanog 基因使用在其 5' 端携带或不携带两个硫代磷酸酯(PTO)键的不同寡核苷酸扩增,如图 16 所示。以这种方式,形成的底物在其 5' 端包含不同配制的硫代磷酸酯。所述寡核苷酸引发中央选择性“盒”两侧的 Nanog DNA 序列,以在所有情形中产生 4.5, 2.0 和 1.0kbs 的 5' 同源臂(如图 15 所示)和 4.5kb 的 3' 同源臂。

[0272] 重组

[0273] 使用双链核酸底物的成功重组显示在图 17 中。重组使用小鼠 ES 细胞按照标准步骤进行。通过长范围 PCR 筛选候选菌落,以区分同源重组体和随机整合。图 17 显示了在 5'

和 3' 两端由正确的重组事件形成的菌落 2,6,14 和 17。

[0274] 因此,通过长范围 PCR 生成的硫代磷酸化底物在哺乳动物细胞中是有功能的。硫代磷酸化底物比其未硫代磷酸化的对应物更有效。

[0275] 实施例 15:关于同源重组反应中的单链中间体的进一步的证据

[0276] 图 18 所述的所有重组实验使用线性底物,其在每个末端包含与靶标的 50nt/bp 连续的相同性(‘同源臂’),所述每个末端侧接编码抗生素抗性的基因(例外的是图 24C 的实验)。因此,重组容易地以获得针对对应的抗生素抗性的菌落计分。重组反应以我们的标准流程(同前所述)进行,所述标准流程已经最优化便利性和生产力。

[0277] 使用 dsDNA 底物的 Red 重组需要复制

[0278] 进行图 18 所示的实验,以评价 Red α 和 Red β 介导的 dsDNA 重组是否依赖于复制。在第一变化中,尝试将复制起点,R6K 质粒的 ori γ 或标准 pUC 质粒的 colE1,通过缺口修复亚克隆到相反的载体中。如预测的,没有一种单独的线性载体产生任何菌落(图 18A,仅 colE1,仅 R6K)。当完好的质粒复制时,发生唯一的生产性重组事件,从而生成抗性菌落。在本实验所用的细胞中,colE1 质粒复制,但是 R6K 质粒不复制(因为不提供 Pir 蛋白,其是 R6K 复制所必需的)。这一结果表明靶标质粒必须进行复制以允许生产性的重组。

[0279] 在第二检测中,使用下列各项:需要 Pir 蛋白进行复制的 R6K 质粒,以及包含 colE1 起点和杀稻瘟菌素抗性基因的线性 DNA 片段。在该检测中,选择同源臂,从而重组将用 colE1 起点替换 R6K 起点。因此,重组产物将具有可操作性的复制起点。将两种 DNAs 共同电穿孔到包含 Red α 、 β 和 γ 有或无 Pir 的大肠杆菌菌株中。重组仅在存在 Pir 的条件下发生,这表明在重组前需要 R6K 质粒的复制。

[0280] 重新考虑 Red 重组中的 dsDNA 中间体

[0281] 先前关于使用 dsDNA 底物的 Red 重组的观念已经假设反应通过核酸外切酶,即 Red α 起始切除 dsDNA 末端并且产生对称切割的 ssDNA/dsDNA 中间体(如图 19A 所示)的作用,所述 ssDNA/dsDNA 中间体然后杂交形成某种类型的连接分子。已经提议了四种类型的连接分子中间体(Muyrers 等,2000;Court 等,2002),如图 19 所示,其包括:(A)链侵入中间体;(B)退火中间体;(C)鸡爪式(chicken-foot)中间体和(D)双复制叉中间体。这些建议中的每个都有某些弱点,包括:(A)单链退火蛋白(SSAPs)如 Red β 似乎不具有链侵入活性(Kuzminov,1999);(B)需要接近重组位点的偶发性双链断裂;(C)鸡爪式中间体不能解释可以通过 Red 重组获得的非常大的缺失的效率;(D)提议的双复制叉是假设性的,并且从未有过记录。

[0282] 与 Red 重组由线性 dsDNA 底物的对称切除起始的假设相反,此处显示中间体是全长 ssDNA 的证据。

[0283] 为了检测这种观念,研究了 Red α 优先起始在 5' 磷酸化末端而不是羟基化(去磷酸化)末端的核酸外切酶活性的事实。因此,制备携带以图 3 所示的所有四种组合(OO,OP,PO,PP)的磷酸化(P)或羟基化(O)5'末端的 dsDNA 底物。这些底物在体外用 Red α 消化,并且通过 SSCP(单链构象聚丙烯酰胺凝胶电泳)分析产物。在图 20A 中可以看出,Red α 仅消化 OP 和 PO 底物中的磷酸化链,而 OO 底物在每条链都不被消化,PP 底物在两条链上消化,产生一些较小的 ssDNA 产物。

[0284] 因此,OP 和 PO ssDNA 产物用在重组反应中以将杀稻瘟菌素(bsd)抗性基因插入

到 BAC (图 20B) 中。因为对于 Red β 介导的使用单链寡核苷酸的重组不需要 Red α (Zhang 等, 2003), 携带 BAC 的细胞仅包含表达的 Red β 。平行地, 进行作为阳性对照的使用单链寡核苷酸的重组反应, 以修复新霉素 (neomycin) (neo) 抗性基因中的突变, 并且因此恢复卡那霉素抗性。如由先前的观察所预测的, 作为后随链合成 (Lg) 的引物的寡核苷酸产生比互补的寡聚物 (Ld) 更多的重组体 (图 20C)。使用 ssDNA 底物观察到相同的作用。即, 可与后随链模板杂交以引发后随链合成 (low) 的 ssDNA 产生比互补链多得多的重组体。显著地, 两种测定可以通过错配修复途径中的突变 (mutS) 进行区别, 这表明这两个反应是不同的。如先前所示 (Court, 香港), 错配修复途径中的突变增加寡核苷酸定向的诱变, 并且提高对于前导链寡聚物 (Ld) 更大。然而, 没有发现对 ssDNA 重组的 mutS 作用 (图 20C)。相反, sbcB 突变显著增加寡核苷酸和 ssDNA 定向的重组。

[0285] 在体内检测 ssDNA 中间体

[0286] 为了确定 dsDNA 重组在体内是否可以通过全长 ssDNA 中间体进行, 在存在 Red α (和 Red γ) 以及 Red β 的条件下的重组测定中使用四种线性 dsDNA 底物 (OO, OP, PO, PP)。本实验的目的是检测 Red α 是否可以不对称地降解底物以及这可能对重组效率具有怎样的影响。实验设计显示在图 21A 中。重组针对 BAC 或大肠杆菌染色体。在两种情形中, 靶标以两个方向 (bla 和 inv-bla) 建立, 其相对于复制起点改变重组反应。使用不对称的底物 (OP), SSCP 显示 Red α 在体内快速生成 ssDNA 中间体 (图 21B)。使用不对称磷酸化底物的重组最有效, 所述不对称磷酸化底物的羟基化 5' 链可以引发后随链合成, 以下称为 '后随链引物'。转换靶标转换了链优先性, 这表明 PO 和 OP 底物都是有效的 (proficient)。从 BAC 和染色体测定 (图 21C, D) 可以得出相同的结论。显著地, 所有构型中的次好底物是双羟基化的底物 (OO), 并且在这种情形中, 转换靶标没有影响。

[0287] 为了以另外的方式挑战这些发现, 制备了在 5' 端具有硫代磷酸酯键的底物。先前已经报道了硫代磷酸酯键对 Red 重组没有有益作用。然而, 本研究使用在 5' 端的五种保守硫代磷酸酯键。利用寡核苷酸测定检验这一问题, 并且发现两种保守的硫代磷酸酯键是最有益的 (未显示)。因此, 图 21E 的实验使用这种构型来产生组合硫代磷酸 (S) 与磷酸化 (P) 和羟基化 (O) 5' 端的底物变体。显著地, 不对称硫代磷酸化 / 磷酸化 (SP, PS) 底物比羟基化 / 磷酸化 (OP, PO) 底物更有效 (比较 D 和 E)。同样地, 最有效的 SP 方向在后随链引物的 5' 端具有硫代磷酸。此外, S 和 O 的排列, 如 OO 底物, 产生合理的重组效率。SO 底物表现出有限的链喜好性, 而 SS 底物没有表现出任何喜好性。所有这些结果与下述结论一致: (i) 一对硫代磷酸或羟基化在置于后随链引物的 5' 末端时提高重组; (ii) 当另一条链的 5' 末端被磷酸化时, 这种提高扩大, 这可能是因为磷酸化链被产生全长单链的后随链引物的 Red α 快速降解; (iii) 当两个 5' 末端针对核酸外切酶完全封闭时, 另一种活性诸如解旋酶必须分离链, 从而全长后随链引物可以起始重组。

[0288] 作为进一步的检测, 设计了评价对称切割的 dsDNA 中间体的重组效率的实验。这一实验依赖这样的观察, 即, 硫代磷酸阻断 Red α 核酸外切酶活性但是允许重组 (图 21)。一对硫代磷酸对称地放置在离底物 5' 末端增加的距离处, 如图 22 所示。即, 硫代磷酸离每个 5' 末端 10, 20, 30, 40, 50, 60 或 70 个核苷酸。两个 5' 末端被磷酸化, 以促进 Red α 核酸外切酶活性。推论 Red α 将切割两个末端直到到达硫代磷酸酯键, 由此生成对称切割的底物, 该底物先前被认为是最佳的重组中间体。由这种先前的逻辑, 选择了多至 70 的一系列

硫代磷酸化底物,以包括假定的最佳中间体,所述中间体具有以 ssDNA 暴露的两个同源臂和之间作为双链的区域。然而,发现这些底物效率非常低(图 22B),特别是当与 SS 底物比较时(图 21E)。为了控制底物的质量,将其煮沸以分离链,并且用在仅由 Red β 介导的重组测定中。尽管该仅有 Red β 的重组反应效率非常低,但是所有这些内部硫代磷酸化的底物在煮沸后对于重组是等价的。

[0289] 综上所述,这一证据支持关于经由在复制叉形成异源双链体的单链介导的同源重组的新模型,如图 23 所示。

[0290] 这种异源双链体模型预测重组中间体包括在重组位点的亲本区域以及新的突变链二者。如果异源双链体复制,产物应该是一种是亲本的子代和一种是突变体。为了寻找这种可能性,开发了基于菌落颜色的原位重组测定。携带完好的 malK 基因的亲本细胞产生红色,而关于 malK 的突变体是白色的。这种测定以两种方向进行,一种是突变 malK 基因,另一种是使其恢复。在温育以允许重组后,细胞以单细胞稀释液涂布,并且培养到菌落颜色变得明显。因为大肠杆菌细胞可以携带两个拷贝的任何基因(在其已经复制后,在细胞分裂前),进行这些实验作为重组的时间过程。如图 24B 所示,几乎在最早时间点的所有重组事件形成两种颜色的菌落,这表明其中发生重组的细胞如预测那样携带异源双链体。

[0291] 总之,在本实施例中描述了通过中间体进行的新型同源重组途径,所示中间体仅包括一条侵入复制叉的链,以形成似乎对错配修复途径不敏感的异源双链体。因此,这种新途径不同于先前的寡核苷酸-定向诱变的描述,其可以引入小的突变,而此处讨论的重组反应可以支持大的诱变。关于这种机制的新颖性和与寡核苷酸定向诱变的区别的概括、补充且扩充了图 3-7 中所示的证据。

[0292] 参考文献

[0293] Muyrers, J. P. P., Zhang, Y., Buchholz, F. 和 Stewart, A. F. (2000) RecE/RecT and Reda/Redb initiate double stranded break repair by specifically interacting with their respective partners (RecE/RecT 和 Reda/Redb 通过与其各自配偶体的特异性相互作用而起始双链断裂修复) Genes and Development (基因和发育), 14, 1971-1982.

[0294] Zhang, Y., Muyrers, J. P. P., Rientjes, J. 和 Stewart, A. F. (2003) Phage annealing proteins promote oligonucleotide-directed mutagenesis in E. coli and mouse ES cells (噬菌体退火蛋白在大肠杆菌和小鼠 ES 细胞中促进寡核苷酸-定向诱变) BMC Mol Biol (BMC 分子生物学), 4(1)1.

[0295] Kuzminov A (1999) Microbiol Mol Biol Rev. (微生物分子生物学综述) 63: 751-813

[0296] Court DL, Sawitzke JA, Thomason LC. (2002) Genetic engineering using homologous recombination (利用同源重组的遗传改造). Annu Rev Genet. (遗传学年度综述) 36: 361-88.

[0297] 应该清楚上述实施例仅是本发明的举例说明,并且可以进行在本发明的范围内的细节方面的修改。

[0001]

序列表

<110> 基因桥有限责任公司

<120> 核酸重组方法

<130> P049444W0

<150> GB 0803109.8

<151> 2008-02-20

<160> 1

<170> SeqWin99, version 1.02

<210> 1

<211> 166

<212> PRT

<213> λ 噬菌体

<400> 1

Met Ser Thr Ala Ala Thr Ala Gly Lys Ala Arg Val Gly Met Asp Ser
1 5 10 15Val Asp Thr Thr Arg Thr Ala Lys Gly Asp Ala Ser Asp Ala Ala Val
20 25 30Ala Asn Tyr Gly Asn Trp Thr Lys Tyr Ala Asp Lys Asn Gly Val Val
35 40 45Val Gly Val Asp Gly Trp Ser Arg Asn Asn Asp Gly Met Asp Asp Asn
50 55 60Ser Cys Thr Cys Arg Tyr Arg Lys Asp Arg Asn His Cys Val Thr Trp
65 70 75 80Met Asp Cys Arg Arg Lys Thr Arg Gly Arg Thr Gly Trp Ser His Lys
85 90 95Arg Met Arg His Lys Ala Met Cys Ala Arg Ala Gly Ala Gly Tyr Asp
100 105 110Lys Asp Ala Arg Val Asn Thr Ala Tyr Thr Ala Arg Arg Asp Thr Val
115 120 125Asn Asp Thr Met Asn Thr Ala Asp Lys Thr Trp Asp Asp Asp Cys Ser
130 135 140Arg Arg Asp Arg Ala Ser Ser Thr Ala Ala Val Lys Ala Gly Lys Lys
145 150 155 160Ala Ala Lys Val Ala Ala
165

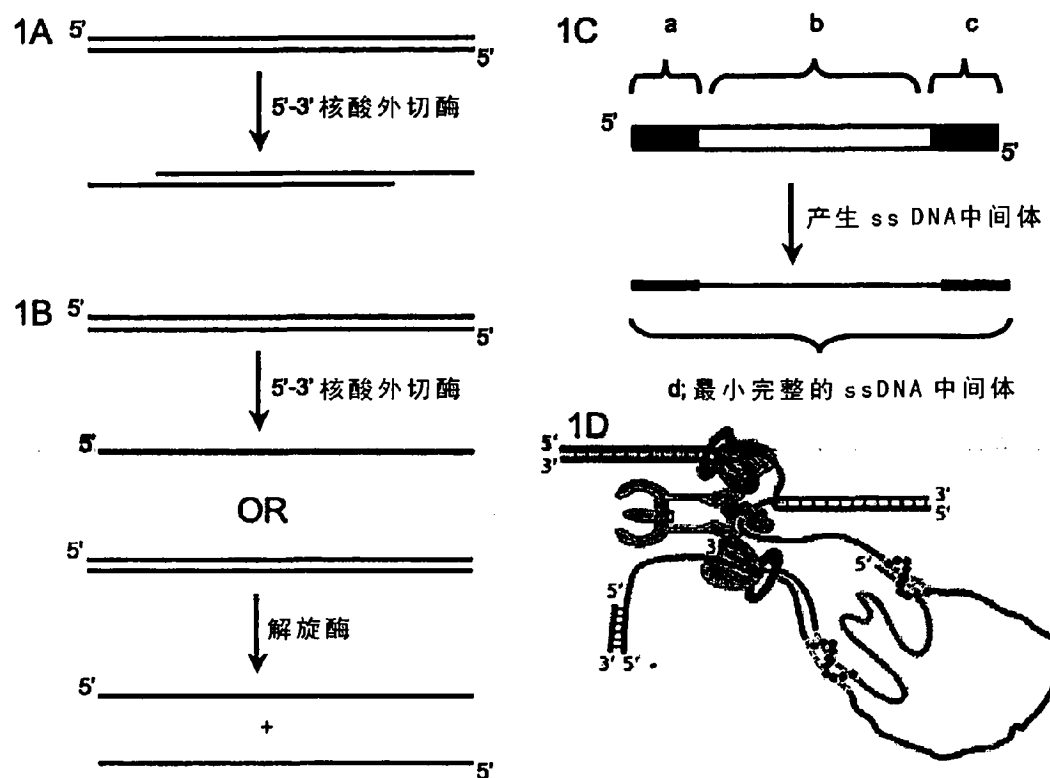


图 1

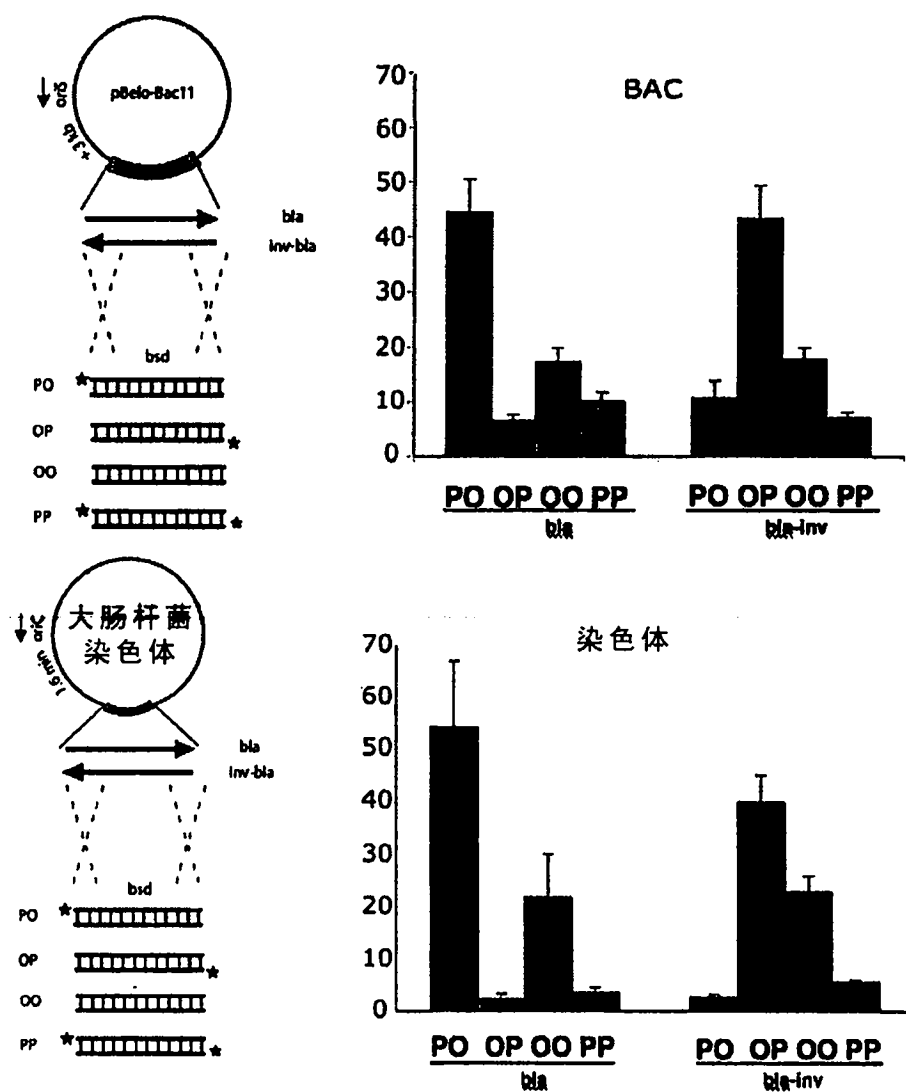
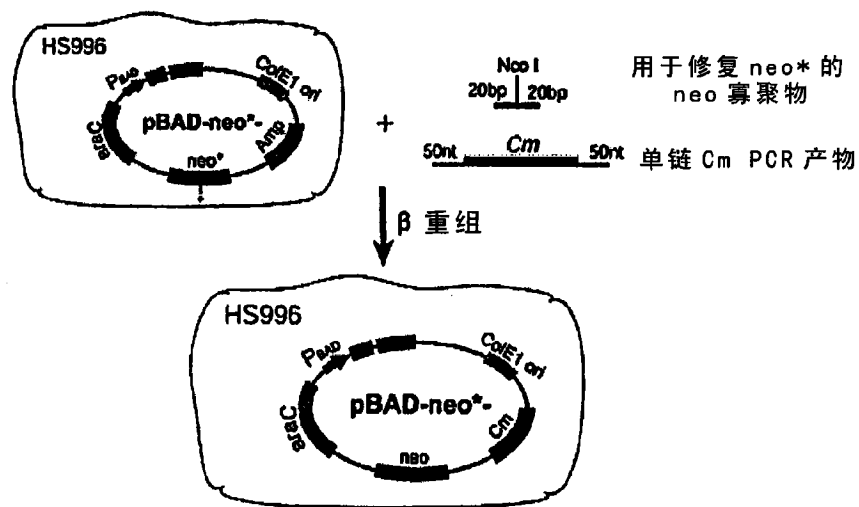


图 2



Cm 平板上的菌落 (50 μ l) 和 Km 平板上的菌落 (10 μ l) (3 次实验)

	pBAD-neo ⁺ -erf	pBAD-neo ⁺ -trcT	pBAD-neo ⁺ -trcB
变性的 Cm PCR 产物	5	21	560
用于修复 neo* 的 neo 寡聚物	520	570	540

图 3A

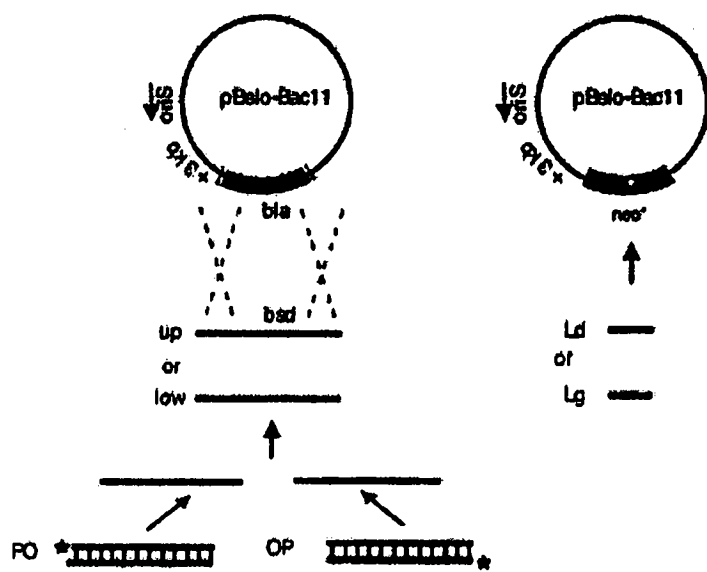


图 3B

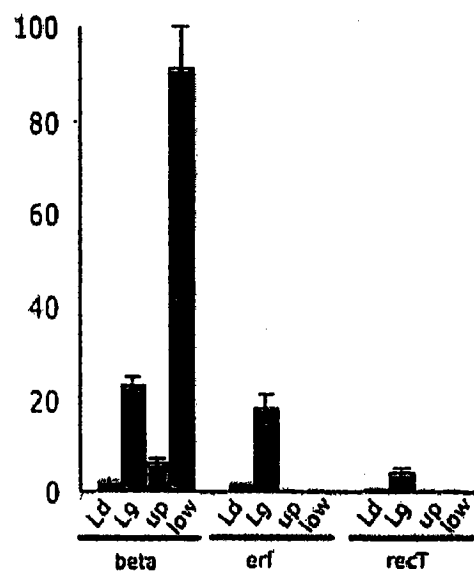


图 3C

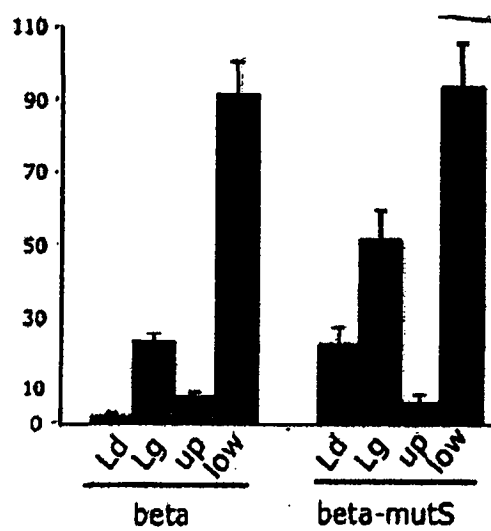


图 4A

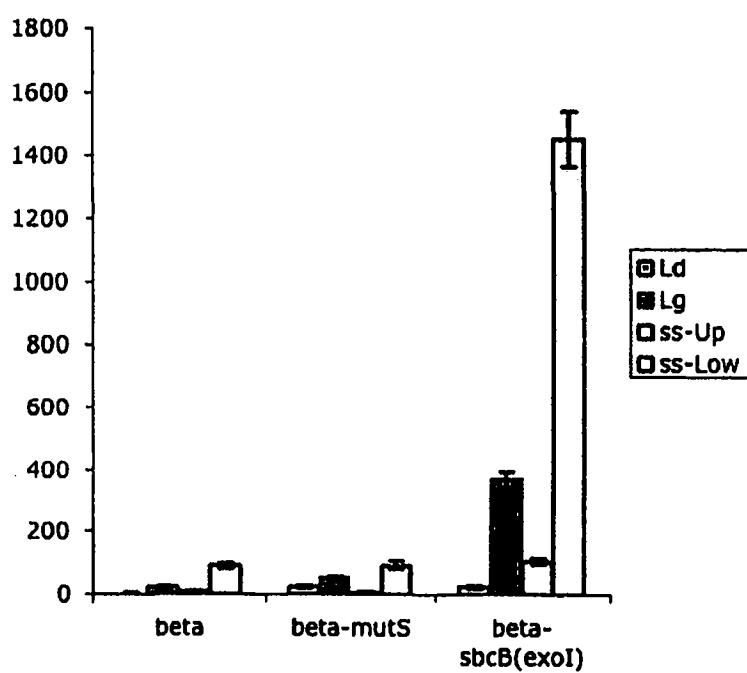


图 4B

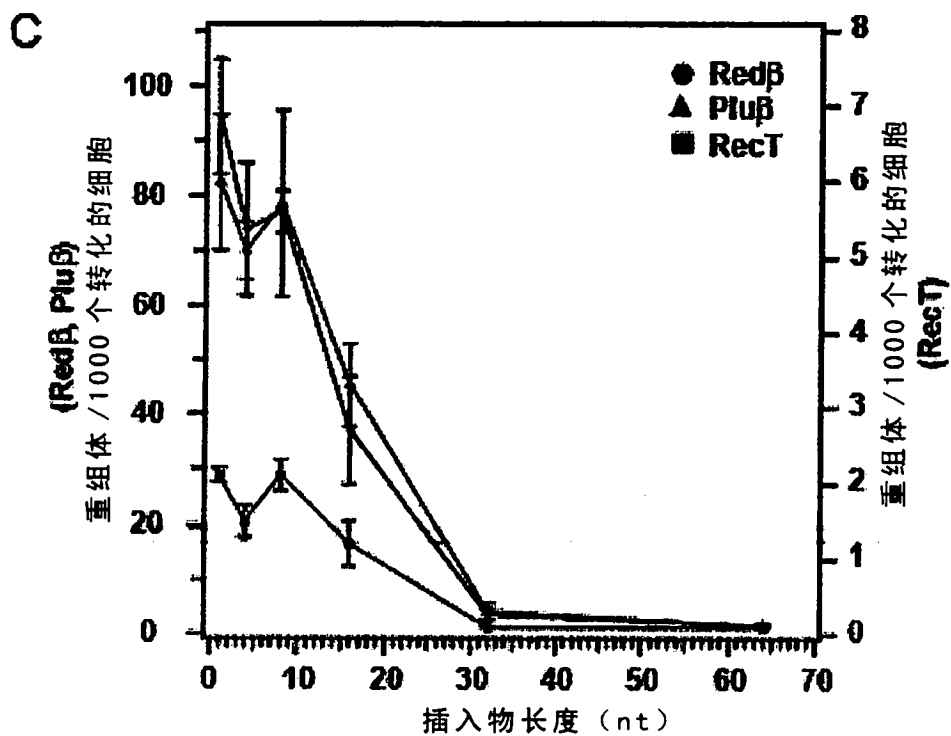


图 4C

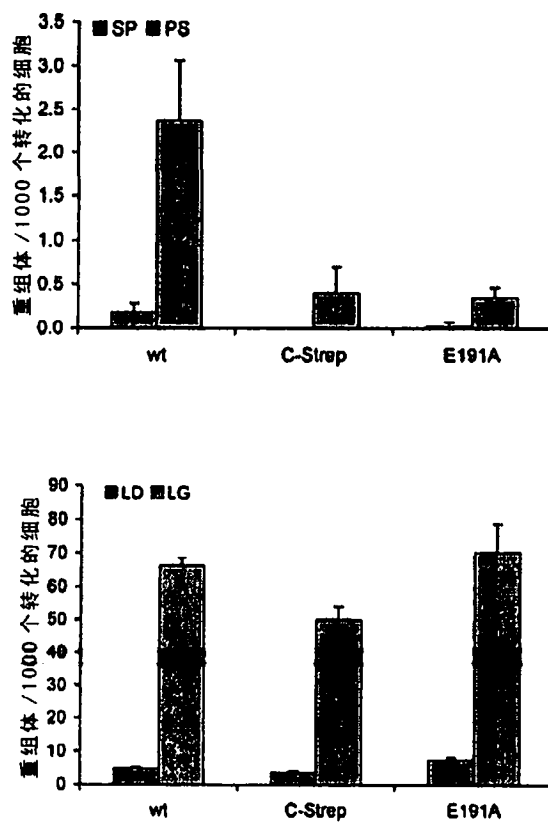


图 5

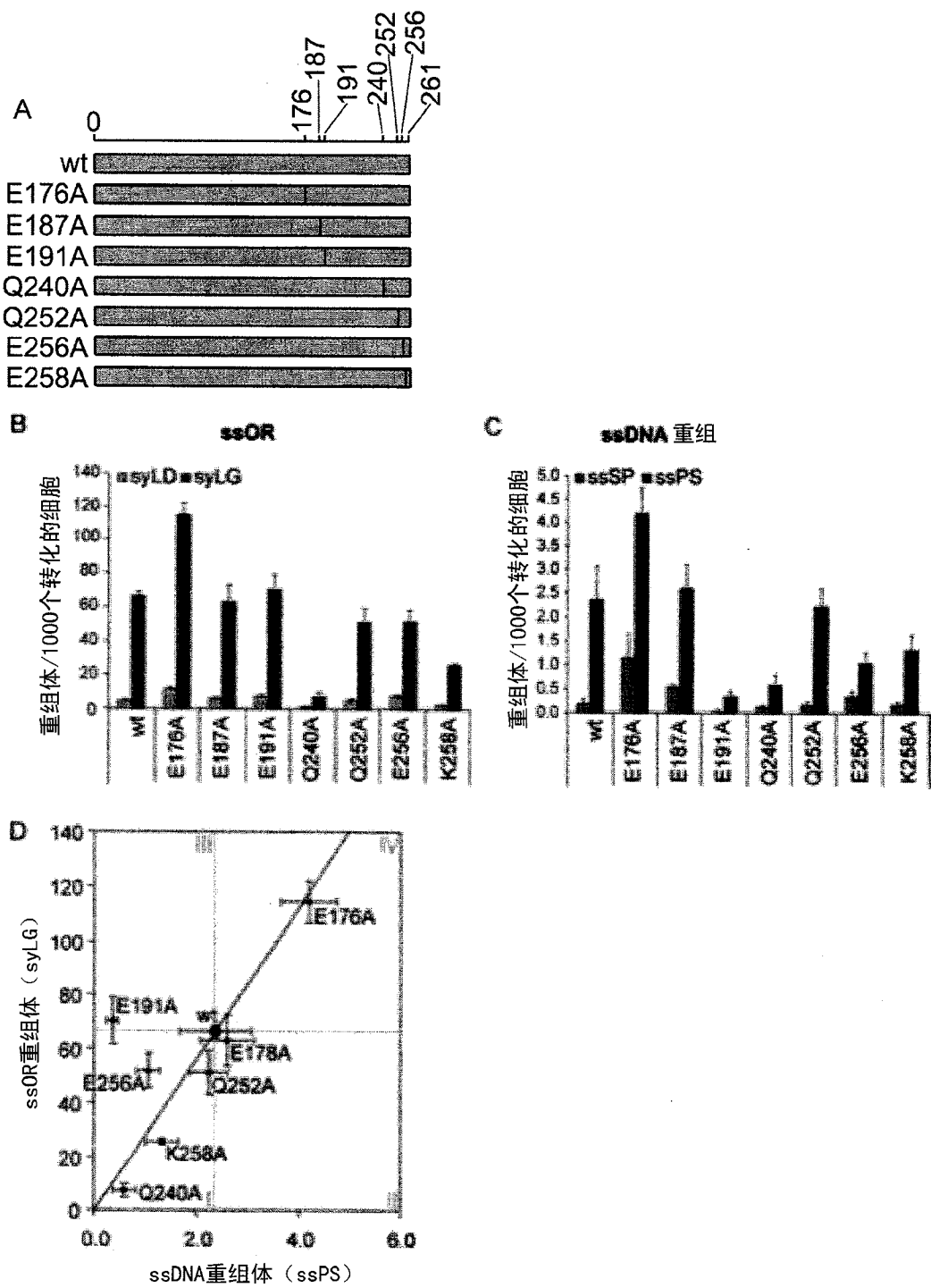


图 6

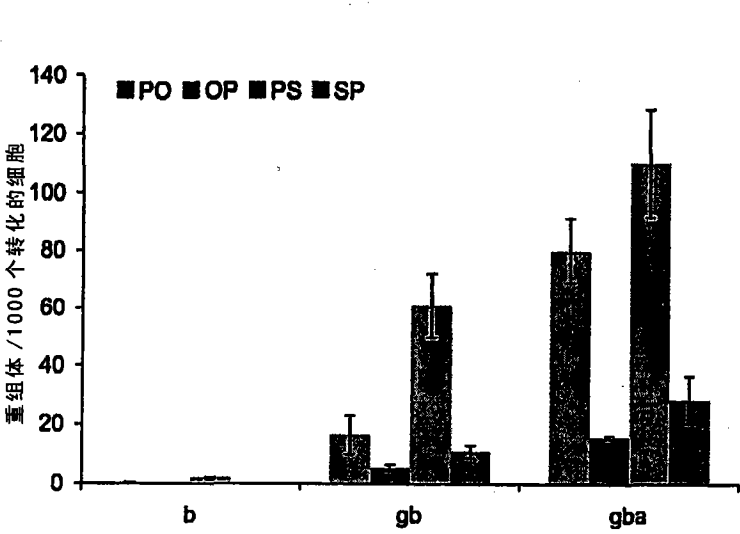


图 7A

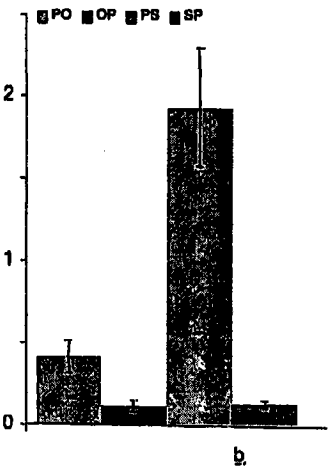


图 7B

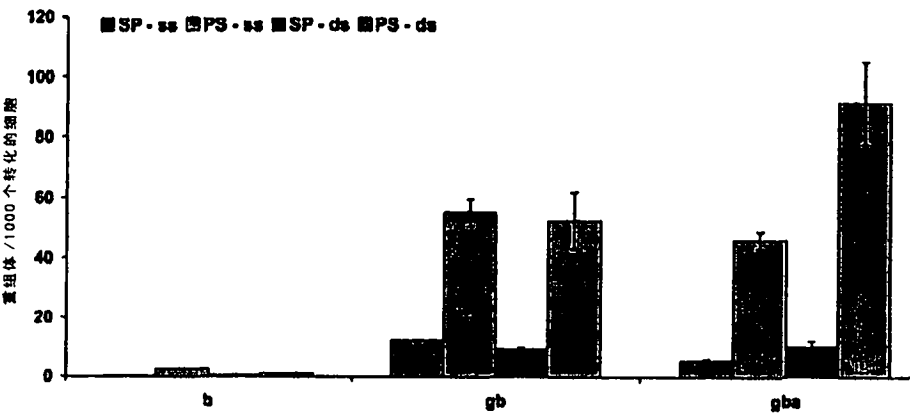


图 7C

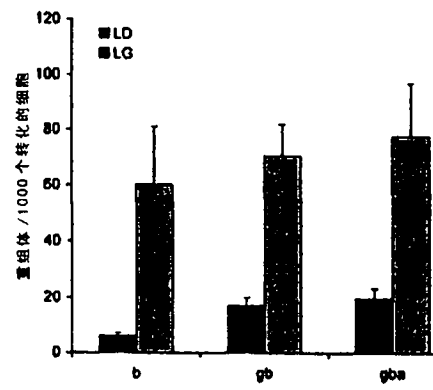


图 7D

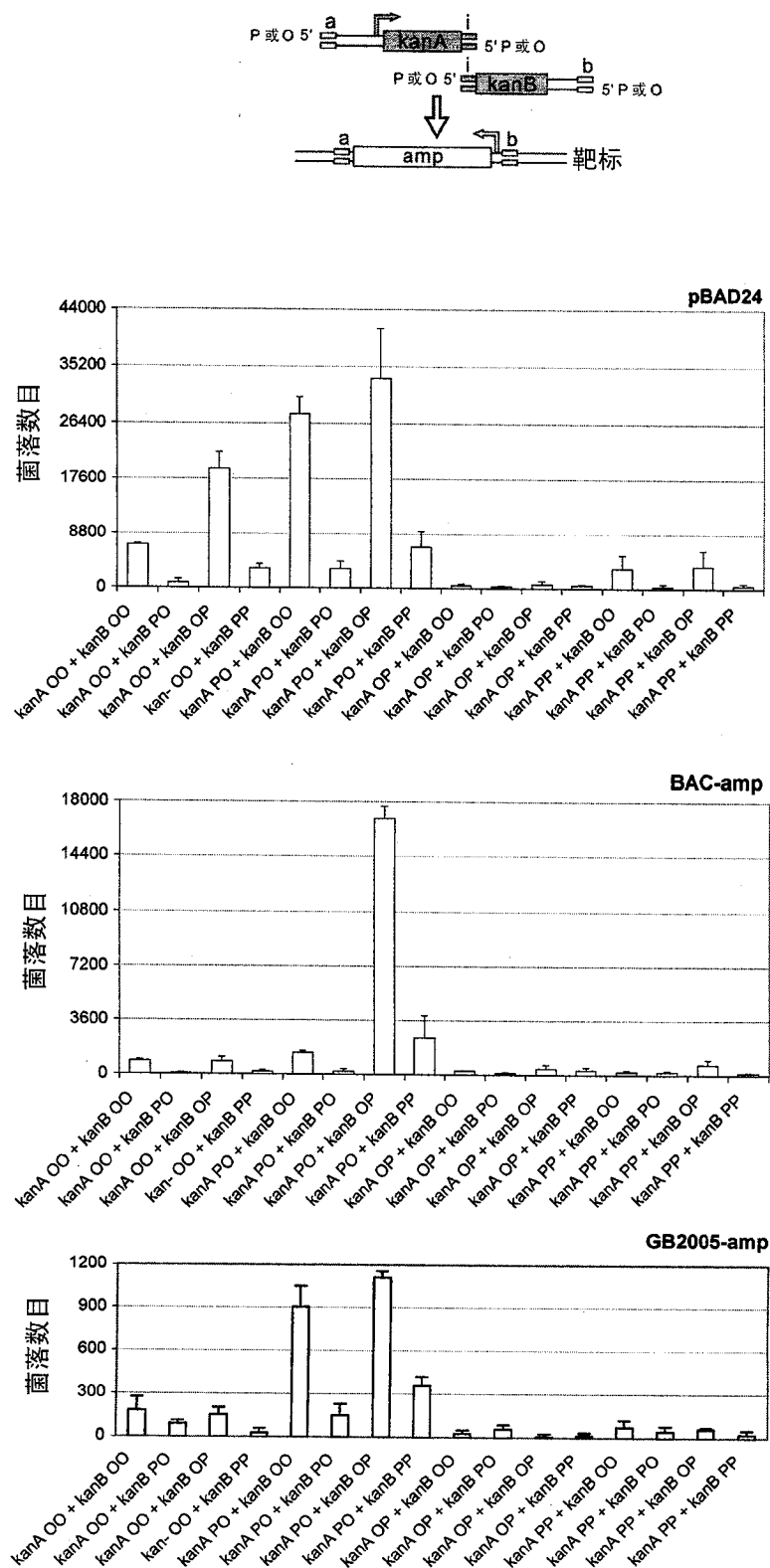


图 8A

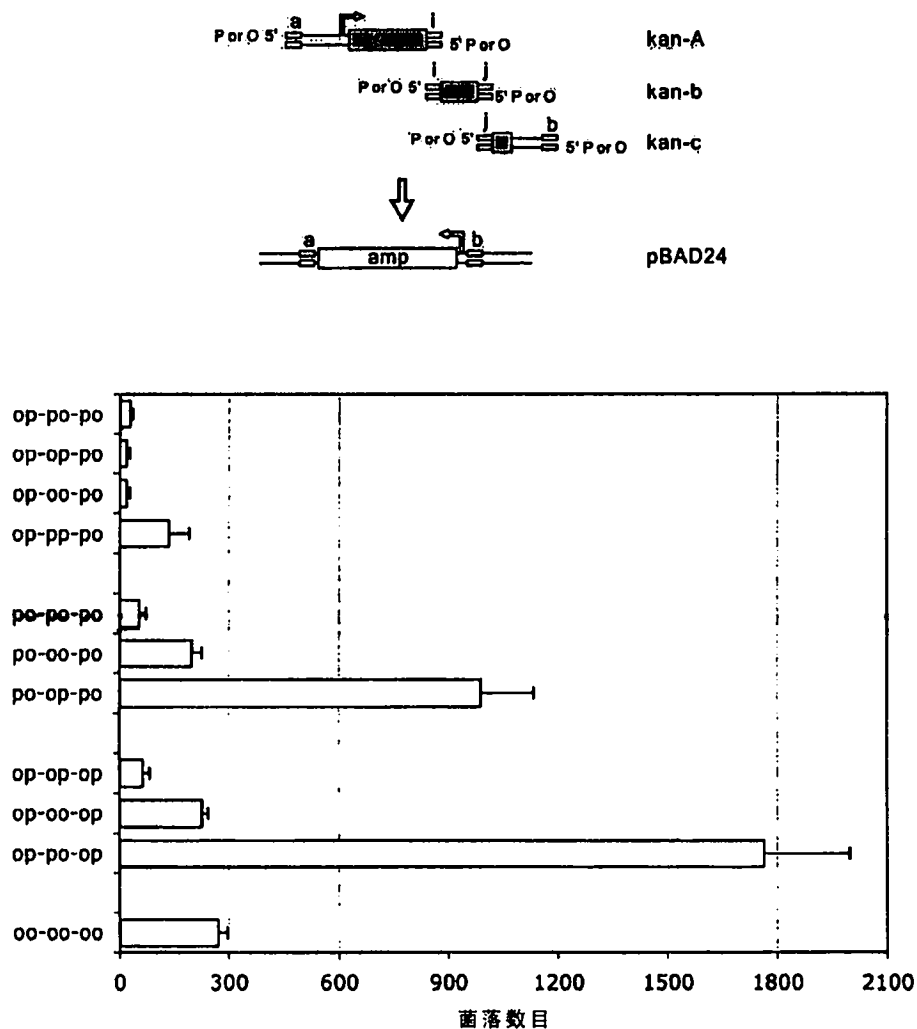


图 8B

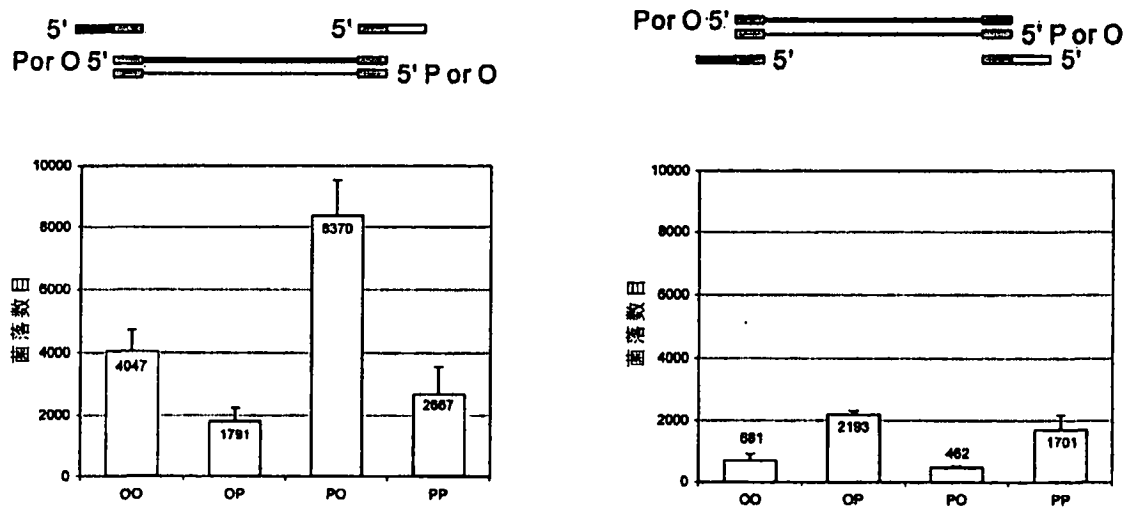
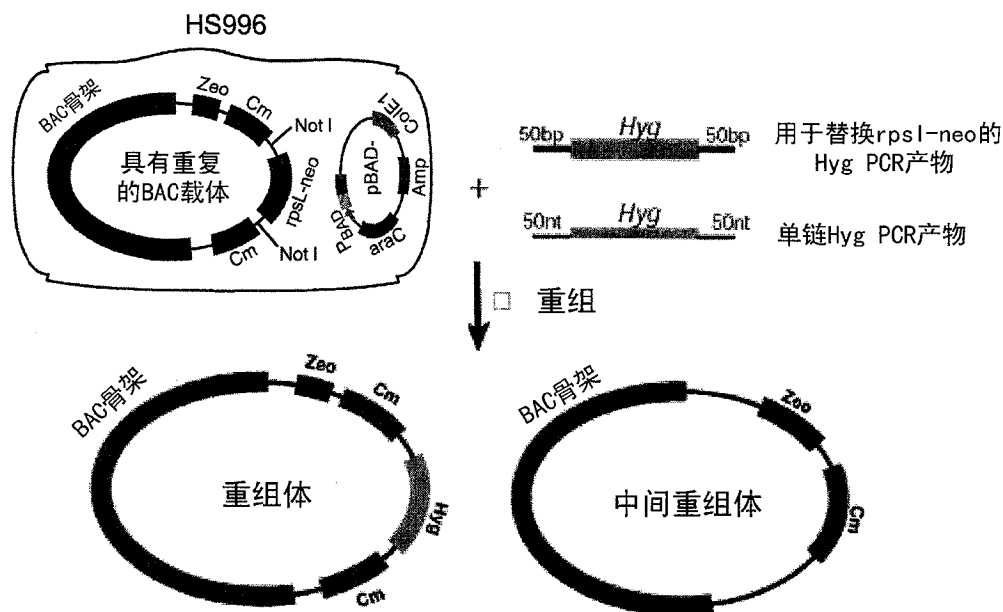


图 8C



在12.5 μ g/ml Zeo, 15 μ g/ml Cm和50 μ g/ml Str平板上的菌落 (2 $\times$ l培养物)

	pBAD24	pBAD-b	pBAD-a	pBAD-ba	pBAD-gba
PCR产物	119	161	107	>3000	>3000
变性的PCR产物	105	172	113	>3000	>3000
未诱导	115	146	106	237	225

在12.5 μ g/ml Zeo, 15 μ g/ml Hyg和50 μ g/ml Str平板上的菌落 (20 $\times$ l培养物)

	pBAD24	pBAD-b	pBAD-a	pBAD-ba	pBAD-gba
PCR产物	0	5	0	47	689
变性的PCR产物	0	140	0	112	485
未诱导	0	1	0	2	7

在来自20 $\times$ l培养物的10 μ g/ml四环素平板上的菌落 (10pg pACYC184)

	pBAD24	pBAD-b	pBAD-a	pBAD-ba	pBAD-gba
诱导	210	128	204	149	82
未诱导	246	246	250	237	210

图 9

Red beta

MSTALATLAGKLAERVGMDSVDPQELITTLRQTAFKGDASDAQFIALLIVANQYGLNPWT
 KEIYAFDPKQNGIVPVVGVDGWSRIINENQQFDGMDFEQDNESCTCRIYRKDRNHPICVT
 EWMDECRREPFKTREGREITGPWQSHPKRMLRHKAMIQCARLAFGFAGIYDKDEAERIVE
 NTAYTAERQPERDITPVNDETMQEINTLLIALDKTWDDDLLPLCSQIFRRDIRASSELTO
 AEAVKALGFLKQKAAEQKVAA

图 10

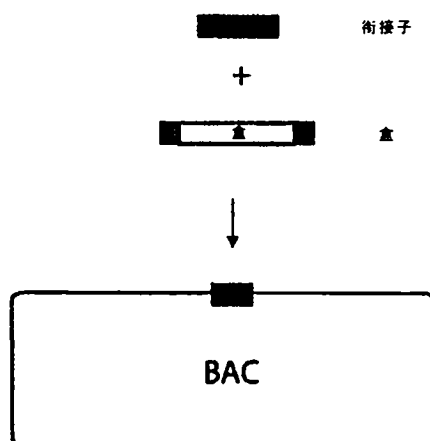


图 11

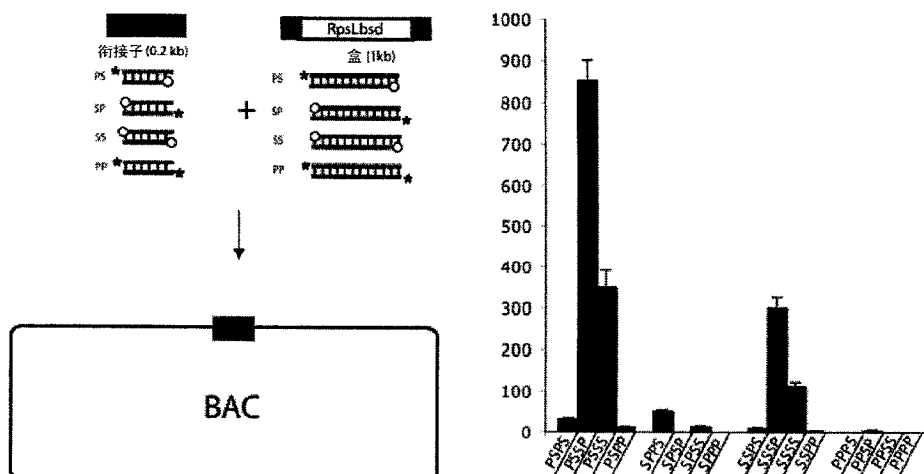


图 12

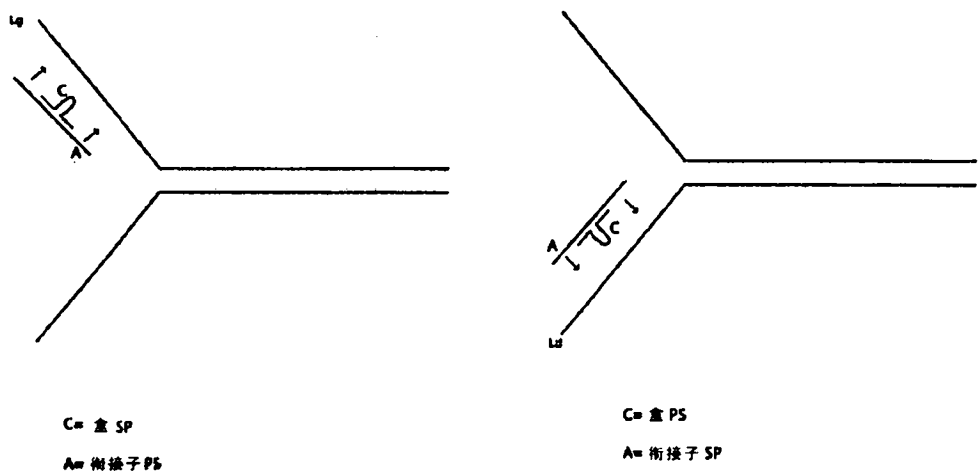


图 13

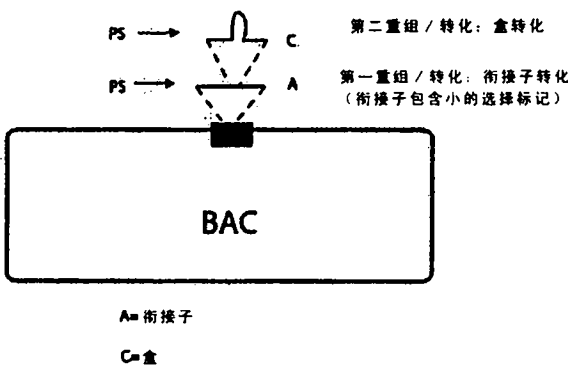


图 14

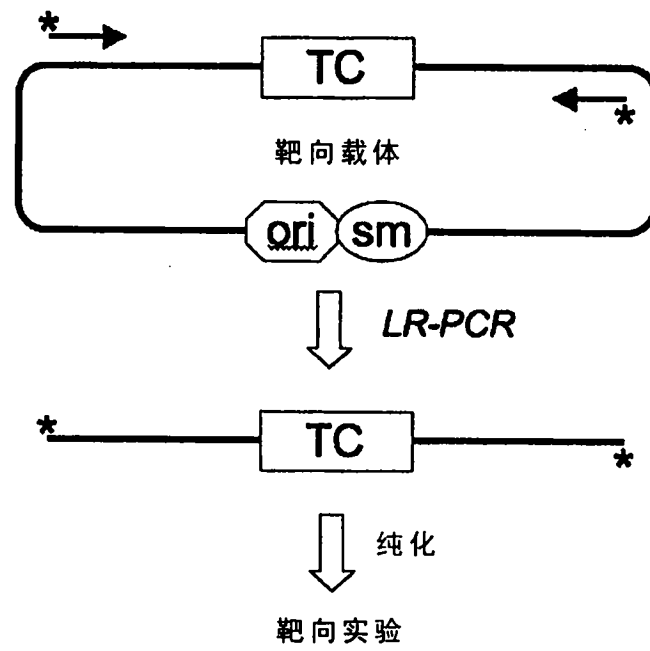


图 15

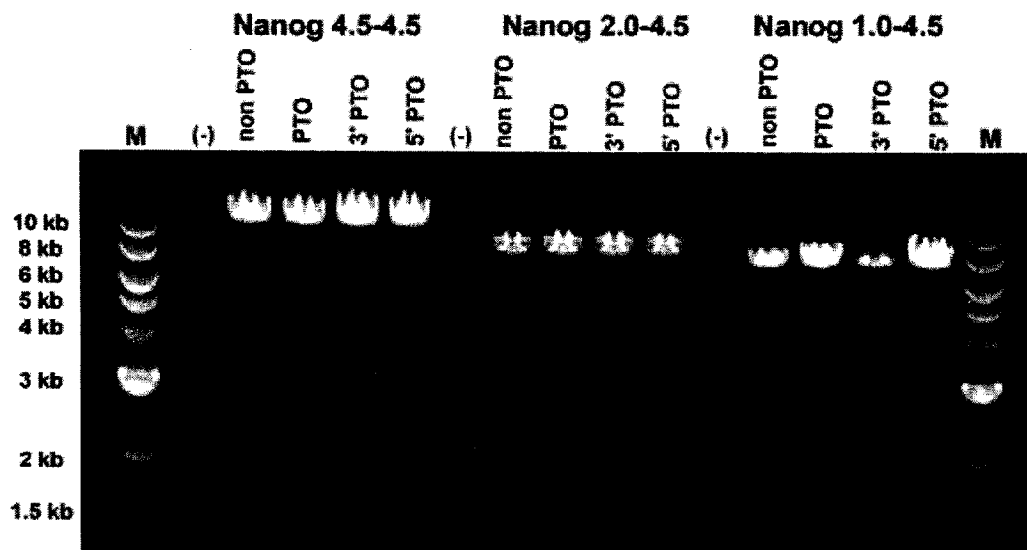


图 16

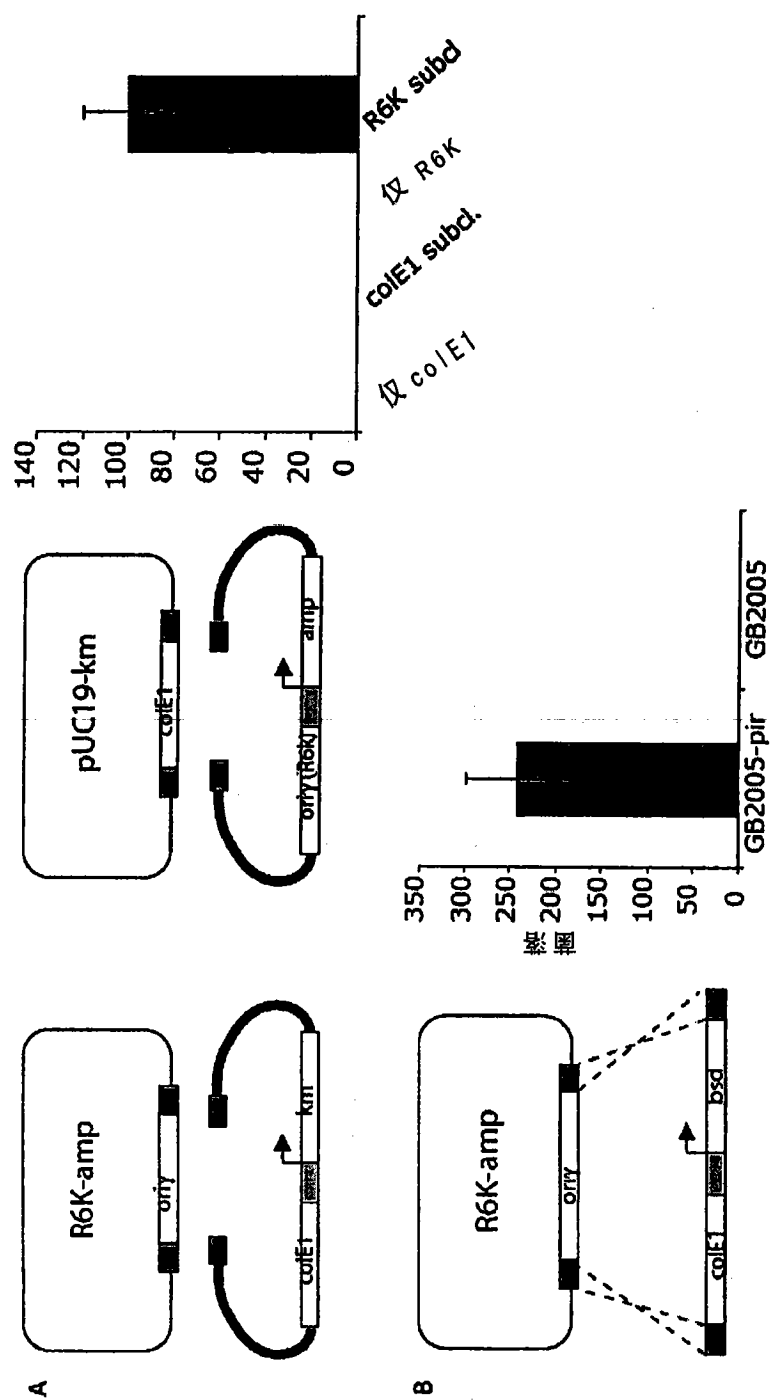


图 18

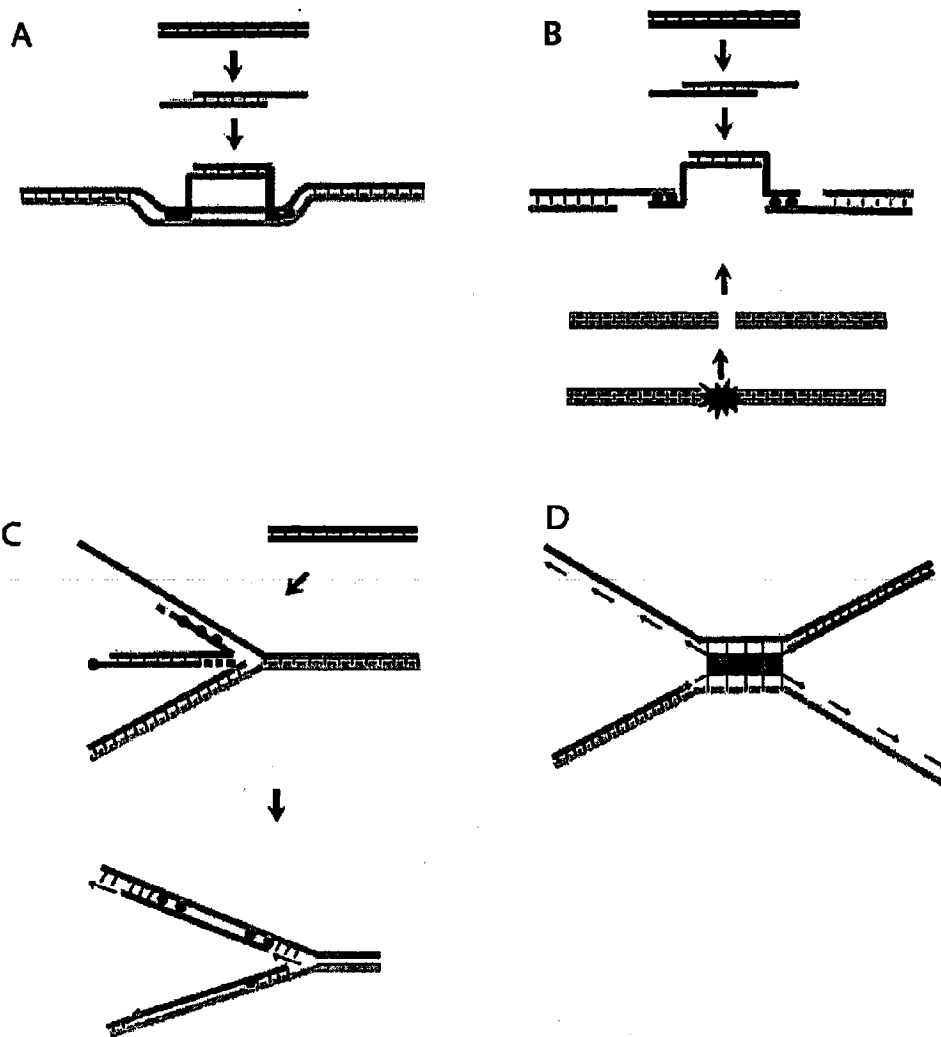


图 19

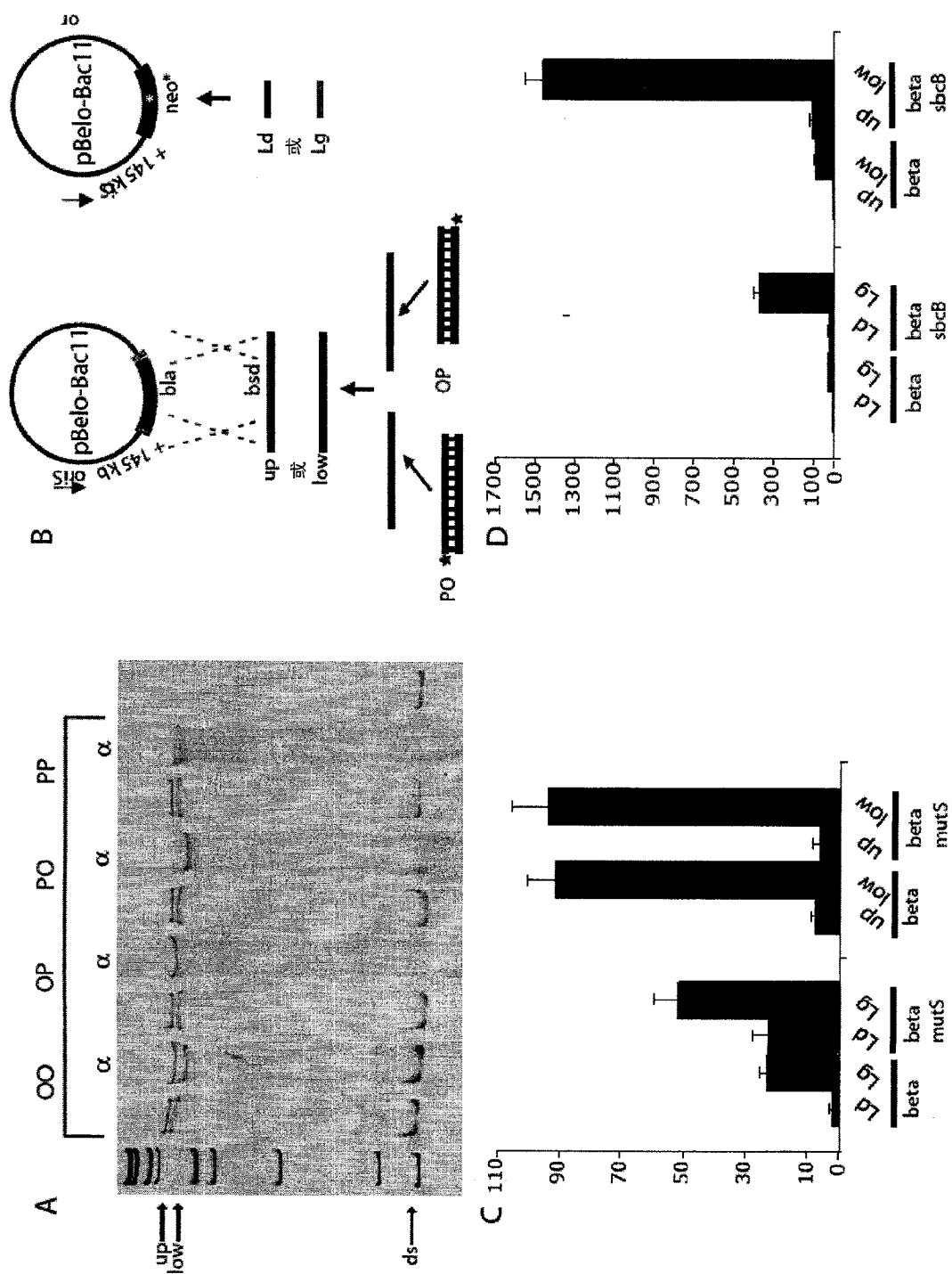


图 20

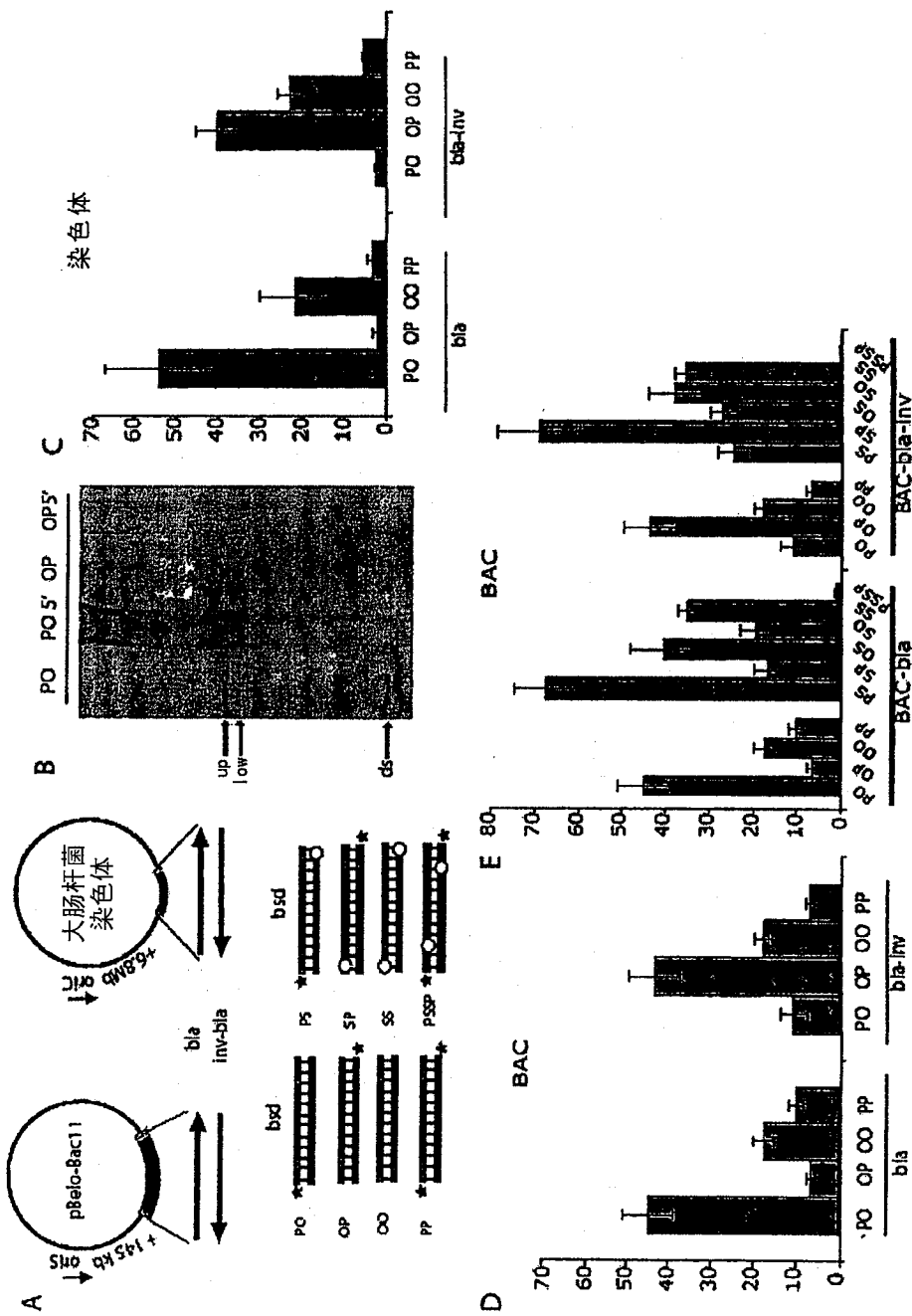


图 21

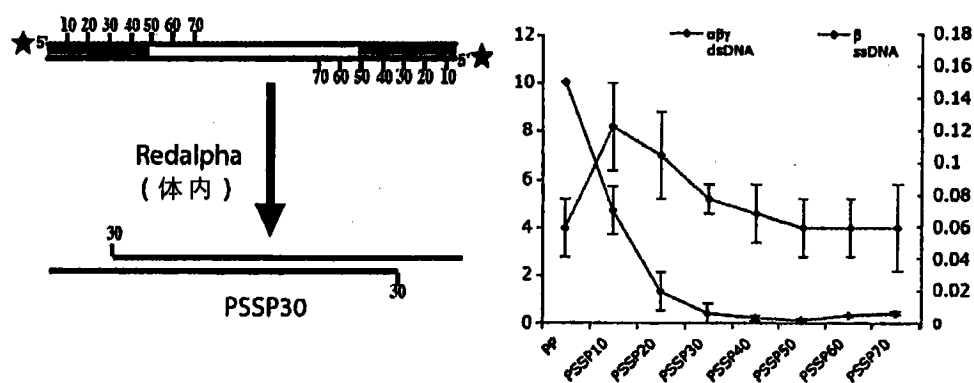


图 22

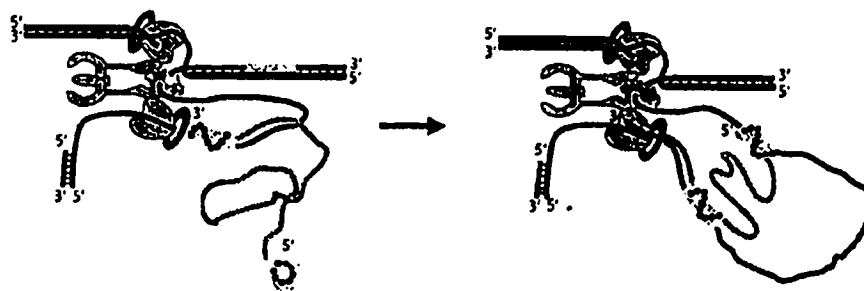


图 23

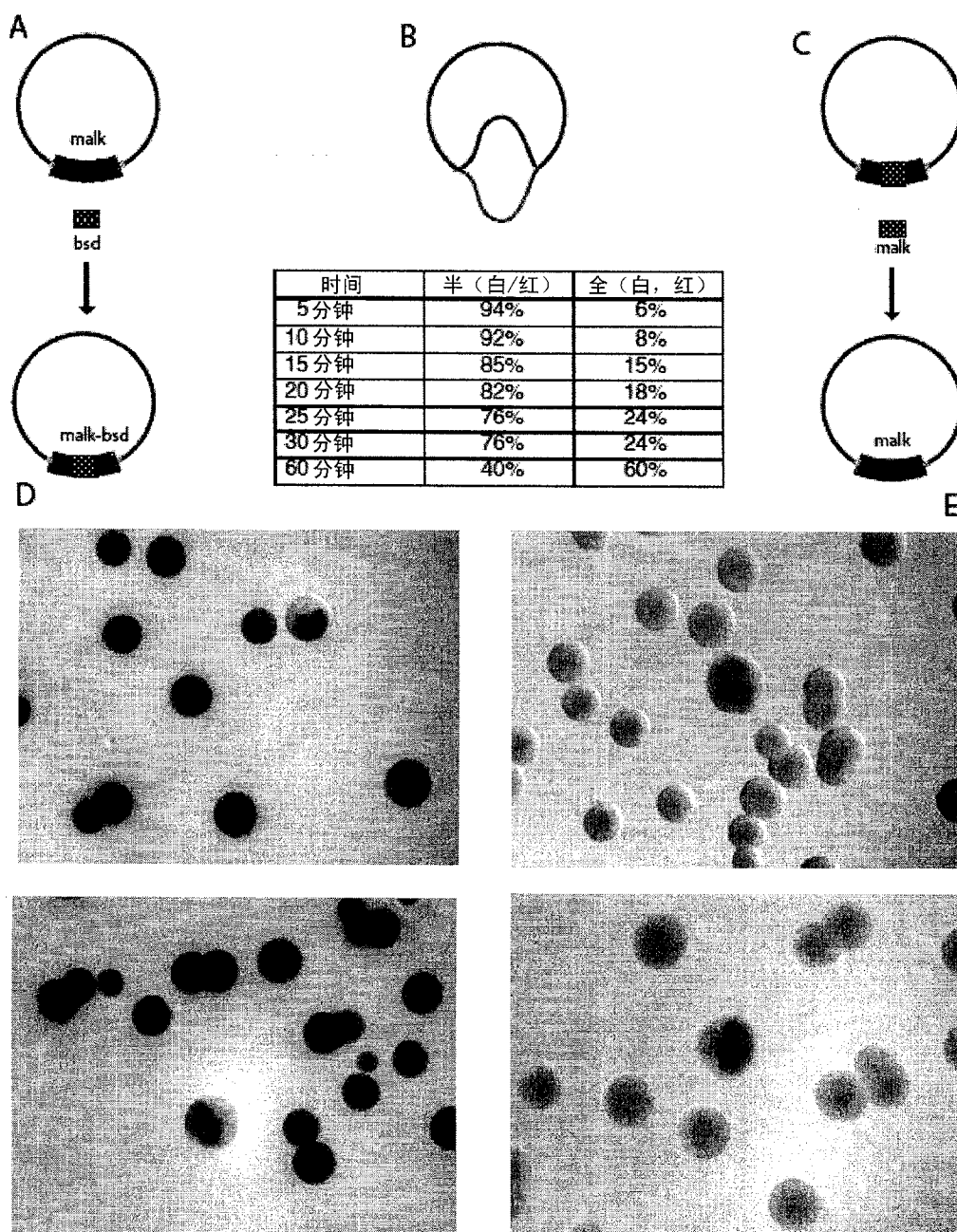


图 24