

Область техники, к которой относится изобретение

Данное изобретение относится к способу образования комплекса, состоящего из двухцепочечной нуклеиновой кислоты и олигонуклеотида, способу создания сайта инициации репликации (ориджина) в составе нуклеиновой кислоты и способу репликации нуклеиновой кислоты, которые применимы в области генной инженерии.

Уровень техники

Прогресс в исследованиях в области молекулярной биологии привел к появлению различных методов исследования. Среди них способы на основе гибридизации нуклеиновых кислот являются несомненно ценными методами, которые позволяют детектировать и количественно определять нуклеиновые кислоты, и используются в различных областях, наряду с молекулярной биологией, в качестве способов, подходящих для соответствующих объектов.

По существу, гибридизация является реакцией спаривания оснований одноцепочечных нуклеиновых кислот, комплементарных друг другу. Таким образом, необходимо сначала разделить (денатурировать) двухцепочечную нуклеиновую кислоту на две отдельные цепи для гибридизации между двухцепочечной нуклеиновой кислотой и одноцепочечной нуклеиновой кислотой или двухцепочечными нуклеиновыми кислотами. Для денатурации используют нагревание или обработку щелочью. Однако такую обработку невозможно проводить в присутствии белка или т.п. без уничтожения активности этого белка.

Кроме того, в ходе гибридизации с использованием двухцепочечной нуклеиновой кислоты образование исходной двухцепочечной нуклеиновой кислоты с некоторой частотой является неизбежным.

Известно, что может образовываться тройная спираль между неденатурированной двухцепочечной нуклеиновой кислотой и одноцепочечной нуклеиновой кислотой (Nucleic Acids Research, 16:11431-11440 (1988)). Однако образование такой тройной спирали ограничивается районом двухцепочечной нуклеиновой кислоты, образованным особыми последовательностями, т.е. последовательностью с высоким содержанием пуринов и последовательностью с высоким содержанием пиримидинов.

Известно, что комплекс двухцепочечной нуклеиновой кислоты и одноцепочечной нуклеиновой кислоты образуется при неденатурирующих условиях в присутствии белка RecA, участвующего в гомологичной рекомбинации. Однако этот феномен основан на активности белка RecA, и способ неферментативного образования подобного комплекса не известен.

Способ поддержания или амплификации выделенной молекулы нуклеиновой кислоты является необходимым для исследований в об-

ласти генной инженерии. Поддержание или амплификацию нуклеиновой кислоты обычно выполняют встраиванием выделенной молекулы нуклеиновой кислоты в подходящий вектор для получения рекомбинантной молекулы ДНК. Такая рекомбинантная молекула ДНК может стабильно сохраняться, будучи выделенной или находясь в подходящем хозяине. Кроме того, если необходимо, возможно увеличить число молекул посредством культивирования хозяина, несущего рекомбинантную молекулу ДНК, с целью увеличения числа клеток.

Известны ряд векторов, полученных из плазмид, фагов, вирусов и т.п. Кроме того, были разработаны и являются коммерчески доступными вектора, искусственно модифицированные таким образом, что они имеют различные функции, пригодные для их применения.

Использование хозяина является обязательным для поддержания или амплификации гена с использованием вектора. Таким образом, трудно сконструировать рекомбинантную молекулу ДНК, в которой представляющая интерес молекула нуклеиновой кислоты включена в вектор, если последняя является вредной для этого хозяина (например, если вектор должен содержать ген, кодирующий продукт, летальный для хозяина).

Может быть рассмотрена амплификация представляющей интерес молекулы нуклеиновой кислоты без участия хозяина посредством репликации рекомбинантной молекулы ДНК вне клетки-хозяина (т.е. *in vitro*). Однако, поскольку любой известный вектор реплицируется от определенного сайта инициации репликации с использованием присущего ему механизма, не известны способы общего назначения искусственной репликации молекулы нуклеиновой кислоты.

Цели изобретения

Основной целью данного изобретения является обеспечение способа для образования комплекса, состоящего из двухцепочечной нуклеиновой кислоты и одноцепочечной нуклеиновой кислоты, без денатурации и удобного способа общего назначения для репликации молекулы нуклеиновой кислоты без применения организма-хозяина.

Сущность изобретения

В результате интенсивных исследований авторы данного изобретения обнаружили, что химерный олигонуклеотид, содержащий рибонуклеотид, отжигается (гибридуется) с неденатурированной двухцепочечной нуклеиновой кислотой с образованием комплекса *in vitro*, этот комплекс функционирует в качестве сайта инициации репликации на нуклеиновой кислоте, и эта нуклеиновая кислота может реплицироваться, начиная с этого сайта инициации репликации. Таким образом было выполнено данное изобретение.

Первый аспект данного изобретения относится к способу образования комплекса, состоящего из двухцепочечной нуклеиновой кислоты и олигонуклеотида, предусматривающему:

(а) смешивание двухцепочечной нуклеиновой кислоты и по меньшей мере одного олигонуклеотида для получения реакционной смеси, где данный олигонуклеотид является химерным олигонуклеотидом, содержащим по меньшей мере рибонуклеотид, а также член, выбранный из группы, состоящей из дезоксирибонуклеотида и аналога нуклеотида, и имеет последовательность, существенно комплементарную нуклеотидной последовательности одной из двух цепей двухцепочечной нуклеиновой кислоты; и

(b) инкубирование этой реакционной смеси с образованием комплекса в условиях, в которых двухцепочечная нуклеиновая кислота не является денатурированной.

Примеры двухцепочечных нуклеиновых кислот, используемых в первом аспекте, включают в себя линейную ДНК, кольцевую ДНК и геномную ДНК.

Олигонуклеотид может функционировать в качестве праймера для синтеза ДНК, комплементарной одной из двух цепей двухцепочечной нуклеиновой кислоты, и/или он может быть меченым.

Второй аспект данного изобретения относится к способу детектирования двухцепочечной нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность-мишень, предусматривающему:

(а) образование комплекса, состоящего из двухцепочечной нуклеиновой кислоты и олигонуклеотида в соответствии со способом первого аспекта, где указанный олигонуклеотид является химерным олигонуклеотидом, содержащим по меньшей мере рибонуклеотид, а также член, выбранный из группы, состоящей из дезоксирибонуклеотида и аналога нуклеотида, и имеет последовательность, существенно комплементарную нуклеотидной последовательности-мишени; и

(b) детектирование олигонуклеотида, образующего комплекс.

Третий аспект данного изобретения относится к способу создания сайта инициации репликации (ориджина) на двухцепочечной нуклеиновой кислоте, предусматривающему:

(а) смешивание двухцепочечной нуклеиновой кислоты и по меньшей мере одного олигонуклеотида для получения реакционной смеси, где данный олигонуклеотид является химерным олигонуклеотидом, содержащим по меньшей мере рибонуклеотид, а также член, выбранный из группы, состоящей из дезоксирибонуклеотида и аналога нуклеотида, позволяет دسترسی его 3'-конца ДНК-полимеразой и имеет последовательность, существенно компле-

ментарную нуклеотидной последовательности одной из двух цепей двухцепочечной нуклеиновой кислоты; и

(b) инкубирование этой реакционной смеси с образованием комплекса в условиях, в которых двухцепочечная нуклеиновая кислота не является денатурированной.

Примеры двухцепочечных нуклеиновых кислот, используемых в третьем аспекте, включают в себя линейную ДНК, кольцевую ДНК и геномную ДНК.

Четвертый аспект данного изобретения относится к способу репликации нуклеиновой кислоты, предусматривающему:

синтез ДНК, комплементарной одной из двух цепей двухцепочечной нуклеиновой кислоты, от сайта инициации репликации, созданного в соответствии со способом третьего аспекта, в присутствии ДНК-полимеразы.

Примером ДНК-полимеразы, используемой в четвертом аспекте, является фермент, который обладает активностью замещения цепи.

Краткое описание рисунков

Фиг. 1 иллюстрирует результаты электрофореза в агарозном геле ДНК-фрагментов, амплифицированных с сайтов инициации репликации, созданных в соответствии со способом данного изобретения.

Фиг. 2 иллюстрирует результаты электрофореза в агарозном геле ДНК-фрагментов, амплифицированных с сайтов инициации репликации, созданных в соответствии со способом данного изобретения.

Фиг. 3 иллюстрирует результаты электрофореза в агарозном геле ДНК-фрагментов, амплифицированных с сайтов инициации репликации, созданных в соответствии со способом данного изобретения.

Фиг. 4 иллюстрирует результаты электрофореза в агарозном геле ДНК-фрагментов, амплифицированных с сайтов инициации репликации, созданных в соответствии со способом данного изобретения.

Подробное описание изобретения

В контексте данного изобретения комплексом, состоящим из двухцепочечной нуклеиновой кислоты и олигонуклеотида, называют комплекс, в котором двухцепочечная нуклеиновая кислота и олигонуклеотид нековалентно связаны друг с другом. В отношении его формы нет никаких конкретных ограничений. Например, это может быть комплекс, образующий тройную спираль, или комплекс, в котором олигонуклеотид спаривается основаниями только с одной из двух цепей двухцепочечной нуклеиновой кислоты. В дальнейшем описании комплекс, состоящий из двухцепочечной нуклеиновой кислоты и олигонуклеотида, может называться просто «комплексом».

Согласно данному изобретению, нуклеотид является обычно дезоксирибонуклеотидом или рибонуклеотидом. Необязательно, может

быть включен аналог или производное (модификация) нуклеотида.

В контексте данного изобретения дезоксирибонуклеотидом называют нуклеотид, сахарная часть которого состоит из D-2-дезоксирибозы. Дезоксирибонуклеотиды включают в себя, например, дезоксирибонуклеотиды, имеющие аденин, цитозин, гуанин или тимин в качестве основания. Кроме того, дезоксирибонуклеотид включает в себя также аналог дезоксирибонуклеотида, имеющий модифицированное основание, такое как 7-деазагуанозин или инозин, в качестве основания.

В контексте данного изобретения рибонуклеотидом называют нуклеотид, сахарная часть которого состоит из D-рибозы. Рибонуклеотиды включают в себя, например, рибонуклеотиды, имеющие аденин, цитозин, гуанин или урацил в качестве основания. Рибонуклеотиды также включают в себя аналоги рибонуклеотидов и модифицированные рибонуклеотиды, такие как модифицированный рибонуклеотид, в котором атом кислорода фосфатной группы в α -положении заменен атомом серы ((α -S)-рибонуклеотид).

В контексте данного изобретения сайт инициации репликации (ориджин) обозначает сайт, который может функционировать в качестве точки инициации реакции репликации двухцепочечной нуклеиновой кислоты, т.е. синтеза ДНК, имеющей нуклеотидную последовательность данной нуклеиновой кислоты. Он не ограничивается сайтом, характеризующимся определенной нуклеотидной последовательностью. Далее данное изобретение будет описано подробно.

(1) Химерный олигонуклеотид, используемый в соответствии с данным изобретением.

Химерный олигонуклеотид, используемый в способе данного изобретения, является химерным олигонуклеотидом, который содержит по меньшей мере рибонуклеотид, а также член, выбранный из группы, состоящей из дезоксирибонуклеотида и аналога нуклеотида. Химерные олигонуклеотиды включают в себя олигонуклеотид, который содержит по меньшей мере, выбранный из группы, состоящей из модифицированного рибонуклеотида, модифицированного дезоксирибонуклеотида, аналога рибонуклеотида и аналога дезоксирибонуклеотида.

Например, аналог нуклеотида, содержащий в качестве основания такое основание, как инозин или 7-деазагуанин, или аналог нуклеотида, содержащий производное рибозы, такой как, "запертая" (locked) нуклеиновая кислота (LNA; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:5633-5638 (2000); WO 99/14226), может быть использован в качестве аналога нуклеотида, используемого в соответствии с данным изобретением. Примером модифицированного рибонуклеотида является (α -S)-нуклеотид, в котором атом кислоро-

да, присоединенный к фосфатной группе, заменен атомом серы, или нуклеотид, к которому присоединено метящее соединение. Кроме того, химерный олигонуклеотид данного изобретения может содержать пептидо-нуклеиновую кислоту (ПНК; Nature, 365:566-568, 1993).

Нет конкретного ограничения в отношении химерного олигонуклеотида, используемого в соответствии с данным изобретением, пока он способен образовывать комплекс с представляющей интерес двухцепочечной нуклеиновой кислотой. Нет также конкретного ограничения в отношении положения, в котором находится рибонуклеотид. Например, может быть использован олигонуклеотид, в котором рибонуклеотид находится на 3'-конце или на 3'-концевой стороне праймера. Кроме того, число рибонуклеотидов специально не ограничивается. В качестве примера может служить химерный олигонуклеотид, в котором половина или менее из составляющих его оснований являются рибонуклеотидами.

В контексте данного изобретения применении здесь, 3'-концевой стороной называют часть от центра до 3'-конца нуклеиновой кислоты, такой как олигонуклеотид. Подобным образом, 5'-концевой стороной называют часть от центра до 5'-конца нуклеиновой кислоты.

Химерный олигонуклеотид, используемый в способе данного изобретения, имеет нуклеотидную последовательность, существенно комплементарную части нуклеотидной последовательности двухцепочечной нуклеиновой кислоты, с которой химерный олигонуклеотид должен образовать комплекс. В контексте данного изобретения "существенно комплементарная нуклеотидная последовательность" означает нуклеотидную последовательность, которая может отжигаться с одной из двух цепей двухцепочечной нуклеиновой кислоты в условиях, в которых нуклеиновая кислота может принимать двухцепочечную форму, например, в условиях, в которых осуществляется данное изобретение.

Хотя длина химерного олигонуклеотида, используемого в способе по данному изобретению, специально не ограничивается, она составляет, например, от 12 нуклеотидов до 100 нуклеотидов, предпочтительно от 15 нуклеотидов до 40 нуклеотидов.

Включение аналога нуклеотида в химерный олигонуклеотид является эффективным для подавления образования структуры высокого порядка самим химерным олигонуклеотидом. Включение аналога нуклеотида, который может образовывать сильную связь при спаривании оснований, такого как LNA, применимо для высокоэффективного образования комплекса.

Такой химерный олигонуклеотид может быть синтезирован таким образом, что он имеет желаемую нуклеотидную последовательность, например, при помощи ДНК-синтезатора типа 394 производства фирмы Applied Biosystems Inc.

(ABI) с использованием фосфоамидитного метода. Альтернативно, любые методы, в том числе фосфаттриэфирный метод, Н-фосфонатный метод и тиофосфонатный способ, могут быть использованы для синтеза химерного олигонуклеотида.

(2) Способ образования комплекса данного изобретения.

Данное изобретение предусматривает способ образования комплекса, состоящего из химерного олигонуклеотида, описанного в (1) выше, и двухцепочечной нуклеиновой кислоты, имеющей нуклеотидную последовательность, существенно комплементарную этому химерному олигонуклеотиду.

Нет конкретного ограничения в отношении двухцепочечной нуклеиновой кислоты, используемой в способе данного изобретения. Способ может быть применен к линейной и кольцевой двухцепочечным нуклеиновым кислотам. Например, можно создать сайт инициации репликации (ориджин) на плазмидной ДНК, геномной ДНК, их фрагменте, ДНК-фрагменте, амплифицированном при помощи ПЦР или т.п. Способ данного изобретения может быть применен либо к природной нуклеиновой кислоте, либо к синтетически полученной нуклеиновой кислоте.

Согласно данному изобретению, можно образовать комплекс *in vitro* простым смешиванием химерного олигонуклеотида, описанного в (1) выше, и двухцепочечной нуклеиновой кислоты в подходящих условиях без денатурации двухцепочечной кислоты до отдельных цепей. Хотя и нет конкретного ограничения в отношении этих условий, обычно используют условия, в которых используемая двухцепочечная нуклеиновая кислота не денатурируется до отдельных цепей. Например, комплекс может быть образован при температуре 0-70°C при pH 6,0-9,5, предпочтительно, 7,0-9,2.

Реакционная смесь для образования комплекса может содержать буферный компонент для поддержания подходящего pH, нейтральную соль для поддержания ионной силы или другие компоненты. Кроме того, она может содержать фермент, которому дают действовать на образованный комплекс, и различные компоненты, необходимые для проявления активности этого фермента. Кроме того, ожидается, что добавление диметилсульфоксида (ДМСО), глицерина, полиэтиленгликоля и/или формамида будет уменьшать неспецифический отжиг химерного олигонуклеотида.

Хотя нет конкретного ограничения в отношении количества используемого химерного олигонуклеотида, это количество в реакционном объеме 50 мкл может быть в диапазоне от 1 до 1000 пмоль, предпочтительно, от 10 до 150 пмоль.

Можно синтезировать цепь ДНК, имеющую последовательность, комплементарную одной из двух цепей двухцепочечной нуклеино-

вой кислоты, с использованием комплекса, образованного в соответствии со способом данного изобретения, для синтеза ДНК с 3'-конца химерного олигонуклеотида. В этом случае можно образовать комплекс в реакционной смеси, содержащей ДНК-полимеразу, дезоксинуклеозидтрифосфаты в качестве субстратов, соль магния и т.п. для одновременного проведения синтеза ДНК.

Хотя это не предназначено для ограничения данного изобретения, способ образования комплекса данного изобретения может осуществляться в присутствии рибонуклеазы Н (РНКаза Н). Как мезофильная рибонуклеаза Н, так и термостабильная рибонуклеаза Н может быть предпочтительно использована в соответствии с данным изобретением. Например, кроме РНКаза из *E. coli* могут быть использованы коммерчески доступная термостабильная РНКаза Н Hybridase™ (Epicenter Technologies), а также РНКаза из термофильной бактерии рода *Bacillus*, бактерии рода *Thermus*, бактерии рода *Rugosoccus*, бактерии рода *Thermotoga* и т.п. Кроме того, предпочтительно могут быть использованы как природные рибонуклеазы, так и их варианты. Термостойчивая РНКаза Н из *Rugosoccus furiosus* может быть предпочтительно использована в соответствии с данным изобретением. Эта РНКаза Н может быть получена из *Rugosoccus furiosus* DSM3638. Альтернативно, она может быть получена с использованием гена, кодирующего этот фермент, как описано в ссыльном примере ниже.

Если данное изобретение осуществляют в присутствии рибонуклеазы Н, его предпочтительно осуществлять в реакционной смеси, в которой используемая рибонуклеаза может проявлять свою активность.

Хотя это зависит от типа используемой РНКаза Н, обычно используют реакционную смесь, содержащую подходящий буферный компонент и соль магния и/или соль марганца. Хотя это не предназначено для ограничения данного изобретения, хлорид магния, ацетат магния, сульфат магния, хлорид марганца, ацетат марганца или сульфат марганца, например, могут быть предпочтительно использованы в качестве соли магния/соли марганца в конечной концентрации 1 mM-20 mM, предпочтительно 2 mM-10 mM. Может быть использована реакционную смесь, содержащая, например, Бицин, Трицин, HEPES, Трис и фосфат (например, фосфат натрия и фосфат калия) в качестве буферного компонента. Используют, без ограничения, реакционную смесь, содержащую буферный компонент в конечной концентрации 5 mM-100 mM, предпочтительно 10 mM-50 mM при pH 6,0-9,5, предпочтительно 7,0-9,2.

Данное изобретение не ограничивается только образованием комплекса, но включает в себя различные операции, включающие стадию

образования вышеупомянутого комплекса без денатурации.

Способ образования комплекса данного изобретения может быть использован для детектирования нуклеиновой кислоты, как описано ниже. Кроме того, посредством образования комплекса в с участием нуклеиновой кислоты, который имеет специфическую функцию (например, с промоторным участком), можно подавлять или ингибировать эту функцию.

(3) Способ детектирования нуклеиновой кислоты данного изобретения.

На основании вышеупомянутого способа образования комплекса данное изобретение обеспечивает способ детектирования двухцепочечной кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность-мишень.

Химерный олигонуклеотид, описанный в (1) выше, образует комплекс с двухцепочечной нуклеиновой кислотой, имеющей нуклеотидную последовательность, существенно комплементарную химерному олигонуклеотиду. Таким образом, двухцепочечная нуклеиновая кислота, имеющая нуклеотидную последовательность, существенно комплементарную этому химерному олигонуклеотиду, может быть детектирована посредством обнаружения образования этого комплекса.

В этом воплощении предпочтительно использовать меченый химерный олигонуклеотид. Нет особого ограничения в отношении типа этой метки. Например, могут быть использованы радиоизотопы (^{32}P , и т.д.), красители, флуоресцентные вещества, люминесцентные вещества, различные лиганды (биотин, дигоксигенин и т.д.), ферменты и т.п. Присутствие меченого химерного олигонуклеотида может быть подтверждено при помощи способа детектирования, подходящего для данной метки. В случае лиганда, который не может быть детектирован непосредственно, он может быть использован в комбинации с веществом, которое способно связываться с этим лигандом и помечено детектируемой меткой. Например, нуклеиновая кислота-мишень может быть детектирована с высокой чувствительностью с использованием комбинации химерного олигонуклеотида, меченого лигандом, и антитела против лиганда, меченого ферментом, и усиления этого сигнала.

Кроме того, способ детектирования нуклеиновой кислоты-мишени данного изобретения может проводиться в присутствии рибонуклеазы Н, как описано в (2) выше.

(4) Способ создания сайта инициации репликации данного изобретения.

Способ создания сайта инициации репликации данного изобретения предусматривает:

(а) смешивание двухцепочечной нуклеиновой кислоты и по меньшей мере одного олигонуклеотида для получения реакционной смеси, где данный олигонуклеотид является химер-

ным олигонуклеотидом, содержащим по меньшей мере рибонуклеотид, а также член, выбранный из группы, состоящей из дезоксирибонуклеотида и аналога нуклеотида, позволяет удлинение от его 3'-конца ДНК-полимеразой и имеет последовательность, существенно комплементарную нуклеотидной последовательности одной из двух цепей двухцепочечной нуклеиновой кислоты; и

(б) инкубирование этой реакционной смеси для отжига олигонуклеотида с двухцепочечной нуклеиновой кислотой в условиях, в которых двухцепочечная нуклеиновая кислота не является денатурированной.

Нет специального ограничения в отношении двухцепочечной нуклеиновой кислоты, используемой в способе создания сайта инициации репликации данного изобретения. Любая из описанных выше в (2) двухцепочечных нуклеиновых кислот может быть использована. Также могут быть использованы условия реакции, используемые для способа образования комплекса данного изобретения, описанные в (2) выше. Химерный олигонуклеотид, который позволяет достраивание его 3'-конца ДНК-полимеразой, как описано в (1) выше, может служить в качестве праймера для синтеза ДНК ДНК-полимеразой, когда он образует комплекс с двухцепочечной нуклеиновой кислотой. ДНК-полимераза синтезирует ДНК, комплементарную одной из двух цепей двухцепочечной нуклеиновой кислоты, с 3'-конца химерного олигонуклеотида, осуществляя репликацию этой ДНК. Таким образом, комплекс функционирует в качестве сайта инициации репликации на двухцепочечной нуклеиновой кислоте.

В соответствии с данным изобретением можно создать сайт инициации репликации в любом положении на двухцепочечной нуклеиновой кислоте в зависимости от нуклеотидной последовательности химерного олигонуклеотида. Число создаваемых сайтов инициации репликации не ограничивается одним. Множество сайтов инициации репликации может быть создано одновременно с использованием множества химерных олигонуклеотидных праймеров.

Кроме того, способ создания сайта инициации репликации данного изобретения может осуществляться в присутствии рибонуклеазы Н, описанной в (2) выше.

(5) Способ репликации нуклеиновой кислоты данного изобретения.

Способ репликации нуклеиновой кислоты данного изобретения выполняют посредством синтеза ДНК-цепи, комплементарной одной из цепей двухцепочечной нуклеиновой кислоты, с 3'-конца химерного олигонуклеотида, содержащегося в сайте инициации репликации, созданном на двухцепочечной нуклеиновой кислоте в соответствии со способом, описанным в (4) выше, посредством действия ДНК-полимеразы.

Синтез ДНК инициируется с использованием химерного олигонуклеотида в качестве праймера и продолжается с использованием в качестве матрицы одной из двух цепей двухцепочечной нуклеиновой кислоты, имеющей нуклеотидную последовательность, существенно комплементарную этому химерному олигонуклеотиду.

ДНК-полимераза, используемая в способе для репликации нуклеиновой кислоты данного изобретения, не ограничивается специфической ДНК-полимеразой, если она имеет активность синтеза новой цепи ДНК с использованием ДНК-цепи в качестве матрицы. Например, ДНК-полимеразы Pol I-типа (ДНК-полимераза I *E. coli*, фрагмент Кленова, ДНК-полимераза Taq и т.д.), ДНК-полимеразы α -типа [ДНК-полимераза из *Pyrococcus furiosus* (Stratagene), ДНК-полимераза VENT (New England Biolabs), ДНК-полимераза KOD (Toyobo), ДНК-полимераза DEEP VENT (New England Biolabs)] и ДНК-полимеразы не- α , не-Pol I-типа (ДНК-полимераза, описанная в WO 97/24444) могут быть использованы в соответствии с данным изобретением. Кроме того, множество ДНК-полимераз могут быть смешаны и использованы. Предпочтительно использовать ДНК-полимеразу, не имеющую 5'→3' -экзонуклеазной активности, для репликации линейной двухцепочечной нуклеиновой кислоты.

В соответствии с данным изобретением может быть использована ДНК-полимераза, обладающая активностью замещения цепи ДНК. "Активностью замещения цепи" называют активность, которая может приводить к замещению цепи, т.е. которая может продолжать репликацию

ДНК на основе последовательности нуклеиновой кислоты в качестве матрицы, вытесняя ДНК-цепь с освобождением комплементарной цепи, которая была гибридизована с цепью-матрицей. Кроме того, ДНК-цепь, высвобождаемую в результате замещения цепи от последовательности нуклеиновой кислоты, используемой в качестве матрицы, называют здесь "заменяемой цепью".

В одном из предпочтительных воплощений способ репликации нуклеиновой кислоты данного изобретения реализуют в условиях высокой температуры (например, 45-70°C). В этом воплощении используют термостабильные ДНК-полимеразы, предпочтительно ДНК-полимеразы, происходящие из термофильных бактерий рода *Bacillus*, таких как *Bacillus caldopenax* или *Bacillus stearothermophilus*, а также мутантов ДНК-полимераз, не имеющих 5'→3' -экзонуклеазных активностей. Эти ДНК-полимеразы обладают вышеупомянутой активностью замещения цепи.

Реакция репликации может проводиться в реакционной смеси, содержащей четыре dNTP

(dATP, dCTP, dGTP, dTTP), в качестве субстратов для ДНК-полимеразы, и другие компоненты, требующиеся для проявления активности этого фермента, при реакционных условиях, подходящих для используемого фермента. Конечно, составы и концентрации соответствующих компонентов в реакционной смеси, pH реакционной смеси, температура реакции, время реакции и т.п. могут быть соответствующим образом подобраны в зависимости от используемого фермента или реплицируемой нуклеиновой кислоты.

Стадия реакции репликации может проводиться после стадии создания сайта инициации репликации. Альтернативно, эти стадии могут проводиться одновременно. В этом случае выбирают ДНК-полимеразу и другой фермент (ферменты), которые должны быть использованы, и определяют условия реакции таким образом, чтобы ферменты в достаточной степени проявляли свои активности.

Стадия реакции репликации может проводиться последовательно с использованием способа амплификации нуклеиновых кислот, в котором в комбинации используют ДНК-полимеразу, имеющую активность замещения цепи, и рибонуклеазу H. Такой способ описан в WO 00/56877 и может проводиться с использованием ДНК-полимеразы, имеющей активность замещения цепи, и рибонуклеазы H, как описано выше. В этом случае предпочтительно получать химерный олигонуклеотид в форме, подходящей для этого способа.

Кроме того, можно амплифицировать фрагмент нуклеиновой кислоты из района, находящегося между двумя сайтами инициации репликации, расположенными навстречу друг другу, посредством репликации нуклеиновой кислоты одновременно с этих сайтов инициации репликации. Такой вариант предусмотрен данным изобретением.

Примеры

Следующие примеры дополнительно подробно иллюстрируют данное изобретение, но не должны пониматься как ограничивающие объем изобретения.

Ссылочный пример

Клонирование гена РНКазы III *Pyrococcus furiosus* (1) Получение геномной ДНК из *Pyrococcus furiosus* 2 л среды, содержащей 1% Триптон (Difco Laboratories), 0,5% дрожжевой экстракт (Difco Laboratories), 1% растворимый крахмал (Nacalai Tesque), 3,5% Jamarine S Solid (Jamarine Laboratory), 0,5% Jamarine S Liquid (Jamarine Laboratory), 0,003% MgSO₄, 0,001% NaCl, 0,0001% FeSO₄·7H₂O, 0,0001% CoSO₄, 0,0001% CaCl₂·7H₂O, 0,0001% ZnSO₄, 0,1 м.д. CuSO₄·2H₂O, 0,1 м.д. KAl(SO₄)₂, 0,1 м.д. H₃BO₃, 0,1 м.д. Na₂MoO₄·2H₂O и 0,25 м.д. NiCl₂·6H₂O, помещали в матрас для среды на 2 л, стерилизовали при 120°C в течение 20 мин, барботиро-

вали газообразным азотом для удаления растворенного кислорода, затем инокулировали в эту среду *Rugosoccus furiosus* (приобретенный у Deutsche Sammlung von Microorganismen; DSM3638) и культивировали при 95°C в течение 16 ч без встряхивания. После культивирования клетки собирали центрифугированием.

Затем полученные клетки суспендировали в 4 мл 25% сахарозы, 50 мМ Трис-HCl буфера (pH 8,0). К суспензии добавляли 0,4 мл водного раствора хлорида лизоцима с концентрацией 10 мг/мл (Nacalai Tesque). Смесь оставляли при 20°C на 1 ч. После реакции к реакционной смеси добавляли 24 мл смеси, содержащей 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА и 20 мМ Трис-HCl буфера (pH 8,0), 0,2 мл раствора протеиназы К (Takara Shuzo) 20 мг/мл и 2 мл 10% водного раствора лаурилсульфата натрия. Смесь инкубировали при 37°C в течение 1 ч.

После реакции эту смесь подвергали экстракции смесью фенолхлороформ с последующим осаждением этанолом с получением приблизительно 1 мг геномной ДНК.

(2) Клонирование гена РНКазы НII.

Полная геномная последовательность *Rugosoccus horikoshii* была опубликована [DNA Research, 5:55-76 (1998)]. Существование одного гена, кодирующего гомолог РНКазы НII (PH1650), в этом геноме было известно (SEQ ID NO:1, исходная домашняя страница National Institute of Technology and Evaluation: <http://www.nite.go.jp/>).

Был проведен поиск гомологии между геном PH1650 (SEQ ID NO:1) и частично опубликованной геномной последовательностью *Rugosoccus furiosus* (домашняя страница University of Utah, Utah Genome Center: <http://www.genome.utah.edu/sequence.html>). В результате была найдена высокоомологичная последовательность.

На основе этой гомологичной последовательности синтезировали праймеры 1650Nde (SEQ ID NO:2) и 1650Bam (SEQ ID NO:3).

ПЦР проводили в объеме 100 мкл с использованием 200 нг геномной ДНК *Rugosoccus furiosus*, полученной в Ссылочном примере (1), в качестве матрицы, и 20 пмоль 1650Nde и 20 пмоль 1650Bam в качестве праймеров. TaKaRa Ex Taq (Takara Shuzo) использовали в качестве ДНК-полимеразы для ПЦР в соответствии с прилагаемым протоколом. ПЦР проводили следующим образом: 30 циклов при 94°C в течение 30 с, 55°C в течение 30 с и 72°C в течение 1 мин. Амплифицированный ДНК-фрагмент размером приблизительно 0,7 т.п.н. расщепляли с использованием NdeI и BamHI (оба от Takara Shuzo). Полученный ДНК-фрагмент вставляли между сайтами NdeI и BamHI в плазмидный вектор pET3a (Novagen) с получением плазмиды pPFU220.

(3) Определение нуклеотидной последовательности ДНК-фрагмента, содержащего ген РНКазы НII.

Нуклеотидную последовательность ДНК-фрагмента, встроенного в плазмиду pPFU220, полученную в Ссылочном примере (2), определяли дидезокси-методом.

Анализ определенной нуклеотидной последовательности выявил открытую рамку считывания (ORF), предположительно кодирующую РНКазу НII. Нуклеотидная последовательность этой открытой рамки считывания приведена в SEQ ID NO:4. Аминокислотная последовательность РНКазы НII, предсказанная на основании этой нуклеотидной последовательности, приведена в SEQ ID NO:5.

Escherichia coli JM109, трансформированная плазмидой pPFU220, обозначена и указывается как *Escherichia coli* JM109/pPFU220, и она была депонирована 5 сентября 2000 года (дата первоначального депонирования) в International Patent Organism Depositary, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8566, Japan под номером доступа FERM BP-7654.

(4) Получение очищенного препарата РНКазы НII.

Escherichia coli HMS174(DE3) (Novagen) трансформировали плазмидой pPFU220, полученной в Ссылочном примере (2). Полученную *Escherichia coli* HMS174(DE3), несущую плазмиду pPFU220, инокулировали в 2 л LB-среды (Luria-Bertani), содержащей 100 мкг/мл ампициллина, и культивировали при встряхивании при 37°C в течение 16 ч. После культивирования клетки, собранные центрифугированием, суспендировали в 66,0 мл буфера для обработки ультразвуком [50 мМ Трис-HCl (pH 8,0), 1 мМ ЭДТА, 2 мМ фенилметансульфонилфторид (ФМСФ)] и обрабатывали ультразвуком. Супернатант, полученный центрифугированием обработанной ультразвуком суспензии при 12 000 об/мин в течение 10 мин, нагревали при 60°C в течение 15 мин. Затем его опять центрифугировали при 12000 об/мин в течение 10 мин для сбора супернатанта. Таким образом получали 61,5 мл прогретого супернатанта.

Прогретый супернатант наносили на колонку RESOURCE Q (Amersham Pharmacia Biotech), уравновешенную Буфером А [50 мМ Трис-HCl буфер (pH 8,0), 1 мМ ЭДТА] и хроматографировали с использованием системы FPLC (жидкостной экспресс-хроматографии белков) (Amersham Pharmacia Biotech). В результате РНКазы НII проскакивала через колонку RESOURCE Q.

60,0 мл проскочивший через колонку фракции РНКазы НII наносили на колонку RESOURCE S (Amersham Pharmacia Biotech), уравновешенную буфером А, и элюировали линейным градиентом 0-500 мМ NaCl с использова-

нием системы FPLC. Получали фракцию, содержащую РНКазу НН, элюированную приблизительно 150 мМ NaCl.

2,0 мл этой фракции РНКазы НН концентрировали ультрафильтрацией с использованием Centricon-10 (Amicon). 250 мкл концентрата наносили на гель-фильтрационную колонку Superdex 200 (Amersham Pharmacia Biotech), уравновешенную 50 мМ Трис-НСl-буфером (pH 8,0), содержащим 100 мМ NaCl и 0,1 мМ ЭДТА, и элюировали тем же самым буфером. В результате РНКазы НН элюировались в положении, соответствующем молекулярной массе 17 кДа. Эта молекулярная масса соответствует молекулярной массе РНКазы НН в мономерной форме.

Элюированную таким образом РНКазу НН использовали в качестве препарата Pfu РНКазы НН.

Активность РНКазы НН полученного таким образом препарата Pfu РНКазы НН измеряли следующим образом.

Смешивали вместе 10 мМ Трис-НСl буфер (pH 8,0), 1 мМ дитиотреитол (ДТТ, Nacalai Tesque), 0,003% бычий сывороточный альбумин (фракция V, Sigma), 4% глицерин, 20 мкг/мл поли(dT) (Amersham Pharmacia Biotech) и 30 мкг/мл поли(rA) (Amersham Pharmacia Biotech). Эту смесь инкубировали при 37°C в течение 10 мин и использовали в качестве раствора субстрата для измерения активности РНКазы НН.

1 мкл 1 М MnCl₂ добавляли к 100 мкл раствора субстрата. Эту смесь инкубировали при 40°C. Подходящее разведение препарата Pfu РНКазы НН добавляли к этой смеси для инициации реакции. После реакции при 40°C в течение 30 мин к смеси добавляли 10 мкл 0,5М ЭДТА для остановки реакции. Затем измеряли поглощение при 260 нм.

В результате поглощение при 260 нм реакционной смеси, к которой добавляли препарат Pfu РНКазы НН, было более высоким, чем поглощение реакционной смеси, к которой добавляли 0,5 М ЭДТА перед добавлением препарата Pfu РНКазы НН. Таким образом, было показано, что этот препарат обладал активностью РНКазы Н.

Пример 1.

(1) Клетки RAW264.7 (ATCC TIB 71) суспендировали в модифицированной Дульбекко среде Игла (Bio Whittaker, 12-604F), содержащей 10% фетальную телячью сыворотку (Gibco), при концентрации $1,5 \times 10^5$ клеток/мл. По 5 мл этой суспензии добавляли в каждую лунку 6-луночного микротитровального планшета, и этот планшет инкубировали при 37°C в течение ночи в присутствии 5% CO₂. В лунки добавляли 50 мкл водного раствора 100 мкг/мл липополисахарида (LPS, Sigma, L-2012) и 50 мкл водного раствора 1000 Е/мл интерферона-γ (IFN-γ, Genzyme Technе, 3485). Планшет инкубировали в течение дополнительных 4 ч. Затем

из этих клеток выделяли РНК с использованием набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, 74104) в соответствии с прилагаемыми к набору инструкциями.

кДНК получали инкубированием 60 мкл смеси, содержащей 3 мкг полученной таким образом РНК, 10 мМ Трис-НСl буфер (pH 8,3), 50 мМ KCl, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ каждого из dNTP, 150 пмоль случайного 6-мерного праймера, 60 Е ингибитора рибонуклеазы (Takara Shuzo, 2310A) и 15 Е обратной транскриптазы XL (AmV)(Takara Shuzo, 2610A), при 30°C в течение 10 мин, 42°C в течение 1 ч и затем при 99°C в течение 5 мин для инактивации фермента с использованием термоциклера (GeneAmp PCR System 9600, Applied Biosystems).

(2) Праймеры NS-PCR1 и NS-PCR2, имеющие нуклеотидные последовательности, представленные SEQ ID NO:6 и SEQ ID NO:7, соответственно, синтезировали на основе нуклеотидной последовательности мРНК для мышинной индуцибельной NO-синтазы (iNOS) (номер доступа GeneBank NM-010927). ПЦР проводили с использованием этой пары праймеров и кДНК, полученной в примере 1-(1), в качестве матрицы для амплификации ДНК-фрагмента длиной 741 п.н. Этот фрагмент очищали с использованием Suprec02 (Takara Shuzo) и затем использовали для следующих экспериментов.

(3) Химерные олигонуклеотидные праймеры NS5 и NS6, представленные SEQ ID NO:8 и SEQ ID NO:9, соответственно, синтезировали на основе нуклеотидной последовательности мРНК мышинной индуцибельной NO-синтазы.

50 мкл реакционной смеси, содержащей 1 мкл раствора, содержащего ПЦР-амплифицированный ДНК-фрагмент, полученный в примере 1-(2), в концентрации 10 фг-100 пг/мкл, или воды (отрицательный контроль), 50 пмоль каждого из праймеров NS5 и NS6, 0,5 мМ каждого из dNTP, 32 мМ HEPES-гидроксид калия буфер (pH 7,8), 100 мМ ацетат калия, 4 мМ ацетат магния, 0,01% бычий сывороточный альбумин, 1% диметилсульфоксид, 0,0156 мкг Pfu РНКазы НН, описанной в Ссылочном примере, и 1 Е ДНК-полимеразы VcaBEST (Takara Shuzo), инкубировали при 60°C в течение 1 ч в термоциклере.

После реакции 5 мкл каждой из реакционных смесей анализировали электрофорезом в 3,0% агарозном геле. Фотография электрофореза показана на фиг. 1.

Фиг. 1 является фотографией электрофореза продуктов реакции. Дорожка 1: ДНК-маркер с шагом 100 п.н. (ladler); дорожка 2: отрицательный контроль (вода); дорожка 3: 10 фг матрицы; дорожка 4: 100 фг матрицы; дорожка 5: 1 пг матрицы; дорожка 6: 10 пг матрицы; дорожка 7: 100 пг матрицы.

Как показано на фиг. 1, было обнаружено, что ДНК-фрагмент, соответствующий району матрицы, находящемуся между химерными олигонуклеотидными праймерами, амплифициро-

вался при использовании в реакции 1 пг или более матрицы. Эти результаты показывают, что сайты инициации репликации образовались в результате отжига этих химерных олигонуклеотидных праймеров с матричной ДНК, хотя матричная ДНК не была денатурирована, и что ДНК-полимераза осуществляла синтез ДНК с сайтов инициации репликации с амплификацией ДНК-фрагмента, находящегося между этими сайтами инициации репликации.

Пример 2.

(1) Химерные олигонуклеотидные праймеры pDON-AI-1 и pDON-AI-2, каждый из которых имеет три РНК-остатка (рибонуклеотида) на 3'-конце, синтезировали на основе нуклеотидной последовательности упаковочного района ДНК плазмиды pDON-AI (Takara Shuzo). Нуклеотидные последовательности этих праймеров приведены в SEQ ID NO:10 и SEQ ID NO:11.

(2) 50 мкл реакционной смеси, содержащей 1 мкл раствора, содержащего ДНК pDON-AI (кольцевую) в концентрации от 10 фг до 1 нг на мкл, или воды (отрицательный контроль), 50 пмоль каждого из праймеров pDON-AI-1 и pDON-AI-2, 0,5 мМ каждого из dNTP, 32 мМ HEPES-гидроксид калия буфер (pH 7,8), 100 мМ ацетат калия, 4 мМ ацетат магния, 0,01% бычий сывороточный альбумин, 1% диметилсульфоксид, 0,0156 мкг Pfu РНКазы Н, описанной в Ссылочном примере, и 1 Е ДНК-полимеразы BcaBEST (Takara Shuzo), инкубировали при 60°C в течение 1 ч в термоциклере.

5 мкл каждой из реакционных смесей анализировали электрофорезом в 3,0 % агарозном геле. Результаты показаны на фиг. 2.

Фиг. 2 является фотографией электрофореза продуктов реакции. Дорожка 1: ДНК-маркер с шагом 100 п.н.; дорожка 2: отрицательный контроль (вода); дорожка 3: 10 фг матрицы; дорожка 4: 100 фг матрицы; дорожка 5: 1 пг матрицы; дорожка 6: 10 пг матрицы; дорожка 7: 100 пг матрицы и дорожка 8: 1 нг матрицы.

Как показано на фиг. 2, ДНК-фрагмент, соответствующий району матрицы, находящемуся между использованными химерными олигонуклеотидными праймерами, амплифицировался при использовании в реакции 10 фг или более матрицы. Таким образом, было показано, что сайт инициации репликации образуется на кольцевой молекуле ДНК при использовании РНКазы Н и химерного олигонуклеотидного праймера.

Пример 3.

(1) Химерные олигонуклеотидные праймеры SEA-1 и SEA-2, каждый из которых имеет три РНК-остатка (рибонуклеотида) на 3'-конце, синтезировали на основе нуклеотидной последовательности района гена энтеротоксина А *Staphylococcus aureus*. Праймер SEA-1 является смысловым праймером, тогда как праймер SEA-2 является антисмысловым праймером. Нуклео-

тидные последовательности праймеров SEA-1 и SEA-2 приведены в SEQ ID NO:12 и SEQ ID NO:13, соответственно.

(2) Готовили 50 мкл реакционной смеси, содержащей 1 мкл раствора, содержащего 0,115 нг или 1,15 нг геномной ДНК *Staphylococcus aureus* (ATCC 13565), или 1 мкл воды в качестве отрицательного контроля, 50 пмоль каждого из праймеров SEA-1 и SEA-2, 0,5 мМ каждого из dNTP, 32 мМ HEPES-гидроксид калия буфер (pH 7,8), 100 мМ ацетат калия, 4 мМ ацетат магния, 0,01% бычий сывороточный альбумин, 1% диметилсульфоксид, 0,0156 мкг Pfu РНКазы Н, описанной в ссылочном примере, и 1 Е ДНК-полимеразы BcaBEST (Takara Shuzo). Эту реакционную смесь инкубировали при 58°C в течение 1 ч в термоциклере.

5 мкл каждой из реакционных смесей анализировали электрофорезом в 3,0% агарозном геле. Результаты показаны на фиг. 3.

Фиг. 3 является фотографией электрофореза продуктов реакции. Дорожка 1: ДНК-маркер с шагом 100 п.н.; дорожка 2: отрицательный контроль (вода); дорожка 3: 0,115 нг матрицы и дорожка 4: 1,15 нг матрицы. Было подтверждено, что специфический продукт амплификации образовался при использовании 1,15 нг матричной ДНК в этой реакции. Таким образом, было показано, что можно создать сайт инициации репликации на геномной ДНК в соответствии со способом данного изобретения.

Пример 4.

(1) Экотропный ретровирус получали из супернатанта культуры упаковочных клеток GP+E-8 6 (ATCC CRL-9642), в которые плазмиды pDON-AI была введена кальций-фосфатным методом. Клетки NIH/3T3 (ATCC CRL-1658) инфицировали этим ретровирусом и культивировали в среде, содержащей G418, в течение 14 дней для получения трансформированных клеток. Было выделено 27 мкг геномной ДНК из 4×10^4 инфицированных ретровирусом клеток с использованием общепринятого способа.

(2) Получение праймеров.

Два химерных олигонуклеотидных праймера pDON-AI-68-1 (смысловый праймер) и pDON-AI-68-2 (антисмысловый праймер), каждый из которых имеет три РНК-основания (рибонуклеотида) на 3'-конце, синтезировали на основе нуклеотидной последовательности упаковочного района плазмиды pDON-AI. Нуклеотидные последовательности pDON-AI-68-1 и pDON-AI-68-2 приведены в SEQ ID NO:14 и SEQ ID NO:15, соответственно.

(3) Амплификация ДНК-фрагмента без денатурации матрицы.

Готовили 50 мкл реакционной смеси, содержащей 1 мкл раствора, содержащего 10 фг или 1 нг pDON-AI, 1 мкл раствора, содержащего 1 нг, 10 нг или 100 нг геномной ДНК клеток NIH/3T3, содержащих плазмиду pDON-AI, или

1 мкл воды в качестве отрицательного контроля, 50 пмоль каждого из праймеров, полученных в примере 4-(2) выше, 0,5 мМ каждого из dNTP, 32 мМ HEPES-гидроксид калия буфер (pH 7,8), 100 мМ ацетат калия, 4 мМ ацетат магния, 0,01% бычий сывороточный альбумин, 1% диметилсульфоксид, 18,5 Е Pfu РНКазы III, описанной в ссылочном примере, и 4 Е ДНК-полимеразы BcaBEST (Takara Shuzo). Эту реакционную смесь инкубировали при 64°C в течение 1 ч в термоциклере.

После реакции 5 мкл каждой из реакционных смесей подвергали электрофорезу в 3,0% агарозном геле для подтверждения продукта реакции. Результаты показаны на фиг. 4.

Фиг. 4 является фотографией электрофореза продуктов реакции. Дорожка М: ДНК-маркер с шагом 100 п.н.; дорожка 1: отрицательный контроль (вода); дорожка 2: 10 фг рDON-AI в качестве матрицы; дорожка 3: 1 пг рDON-AI в качестве матрицы; дорожка 4: 1 нг геномной ДНК из клеток NIH/3T3, содержащих рDON-AI, в качестве матрицы; дорожка 5: 10 нг геномной ДНК из клеток NIH/3T3, содержащих рDON-AI, в качестве матрицы и дорожка 6: 100 нг геномной ДНК из клеток NIH/3T3, содержащих рDON-AI, в качестве матрицы.

Как показано на фиг. 4, специфическую амплификацию ДНК-фрагмента наблюдали при использовании либо рDON-AI, либо геномной ДНК, содержащей интегрированную в нее плазмиду рDON-AI. Таким образом, было показано, что можно амплифицировать представляющий интерес ДНК-фрагмент без денатурации матричной ДНК перед реакцией, даже если в качестве матрицы используется геномная ДНК.

Пример 5.

(1) Синтез химерного олигонуклеотида и праймера Химерный олигонуклеотид k-ras-X, имеющий три РНК-остатка (рибонуклеотида) на 3'-конце и меченный по 5'-концу X-родаминизотиоцианатом (XRITC), конструировали и синтезировали на основе нуклеотидной последовательности гена c-Ki-ras человека. Нуклеотидная последовательность k-ras-X представлена в SEQ ID NO:16.

Праймеры gas-F (смысловой) и gas-R (анти-смысловой) синтезировали в виде пары праймеров для ПЦР для получения ПЦР-фрагмента, используемого в качестве матрицы. Нуклеотидные последовательности gas-F и gas-R представлены в SEQ ID NO:17 и SEQ ID NO:18, соответственно.

(2) Реакция химерного олигонуклеотида с матрицей.

ПЦР проводили с использованием 1 мкл геномной ДНК человека в качестве матрицы и праймеров gas-F и gas-R для синтеза ДНК-фрагмента для применения в качестве матрицы, который имел последовательность, комплементарную k-ras-X. Готовили 50 мкл реакционной смеси следующего состава, содержащей 270 нг

этого ДНК-фрагмента и 25 пмоль k-ras-X: 0,5 мМ каждого из dNTP, 32 мМ HEPES-гидроксид калия буфер (pH 7,8), 100 мМ ацетат калия, 4 мМ ацетат магния, 0,01% бычий сывороточный альбумин, 1% диметилсульфоксид. Реакционную смесь инкубировали при 52°C в течение 5 мин в термоциклере. Реакционную смесь, к которой добавляли ПЦР-амплифицированный фрагмент длиной 200 п.н., не имевший комплементарности с k-ras-X, готовили в качестве отрицательного контроля и инкубировали таким же образом.

20 мкл реакционной смеси подвергали электрофорезу в 5% неденатурирующем полиакриламидном геле. После электрофореза этот гель анализировали с использованием FMBIO-II Multi-View (Takara Shuzo) для подтверждения электрофоретического положения k-ras-X. В результате, в случае инкубирования с ДНК-фрагментом, имеющим комплементарную нуклеотидную последовательность, флуоресценцию k-ras-X наблюдали в электрофоретическом положении, соответствующем размеру этого ДНК-фрагмента, что было подтверждением того, что химерный олигонуклеотид образовал комплекс с этим ДНК-фрагментом. С другой стороны, такое связывание этого праймера с ДНК-фрагментом не наблюдали для отрицательного контроля. Таким образом, было показано, что химерный олигонуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, комплементарную ДНК-фрагменту, специфически связывается с нуклеотидной последовательностью этого ДНК-фрагмента без денатурации ДНК-фрагмента независимым от фермента образом.

Промышленная применимость

Данное изобретение обеспечивает способ искусственного создания сайта инициации репликации (ориджина) на молекуле нуклеиновой кислоты и репликации молекулы нуклеиновой кислоты с использованием этого сайта инициации репликации.

Согласно способу данного изобретения, молекула нуклеиновой кислоты может быть удобным образом реплицирована *in vitro* без встраивания ее в вектор. Кроме того, поскольку сайт инициации репликации (ориджин) может быть позиционирован по желанию, можно специфически реплицировать только нужную часть нуклеиновой кислоты или проводить реакции репликации с множеством сайтов инициации репликации одновременно.

Описание к перечню последовательностей

SEQ ID NO:2: ПЦР-праймер 1650Nde для клонирования гена, кодирующего полипептид, обладающий активностью РНКазы III из *Pyrococcus furiosus*

SEQ ID NO:3: ПЦР-праймер 1650Bam для клонирования гена, кодирующего полипептид, обладающий активностью РНКазы III из *Pyrococcus furiosus*

SEQ ID NO:6: Сконструированный олигонуклеотидный праймер для амплификации фрагмента iNOS-кодирующей последовательности из мыши

SEQ ID NO:7: Сконструированный олигонуклеотидный праймер для амплификации фрагмента iNOS-кодирующей последовательности из мыши

SEQ ID NO:8: Сконструированный химерный олигонуклеотидный праймер для амплификации фрагмента iNOS-кодирующей последовательности из мыши, «нуклеотиды 21-23 являются рибонуклеотидами, другие нуклеотиды являются дезоксирибонуклеотидами»

SEQ ID NO:9: Сконструированный химерный олигонуклеотидный праймер для амплификации фрагмента iNOS-кодирующей последовательности из мыши, «нуклеотиды 19-22 являются рибонуклеотидами, другие нуклеотиды являются дезоксирибонуклеотидами»

SEQ ID NO:10: Сконструированный химерный олигонуклеотидный праймер для амплификации фрагмента плазмиды pDON-AI. «нуклеотиды 17-19 являются рибонуклеотидами, другие нуклеотиды являются дезоксирибонуклеотидами»

SEQ ID NO:11: Сконструированный химерный олигонуклеотидный праймер для амплификации фрагмента плазмиды pDON-AI. «нуклеотиды 19-21 являются рибонуклеотидами, другие нуклеотиды являются дезоксирибонуклеотидами»

SEQ ID NO:12: Сконструированный химерный олигонуклеотидный праймер для амплификации фрагмента геномной ДНК *Staphylococcus aureus*. «нуклеотиды 19-21 являются рибонуклеотидами, другие нуклеотиды являются дезоксирибонуклеотидами»

SEQ ID NO:13: Сконструированный химерный олигонуклеотидный праймер для амплификации фрагмента геномной ДНК *Staphylococcus aureus*. «нуклеотиды 19-21 являются рибонуклеотидами, другие нуклеотиды являются дезоксирибонуклеотидами»

SEQ ID NO:14: Сконструированный химерный олигонуклеотидный праймер для амплификации фрагмента плазмиды pDON-AI. «нуклеотиды 20-22 являются рибонуклеотидами, другие нуклеотиды являются дезоксирибонуклеотидами»

SEQ ID NO:15: Сконструированный химерный олигонуклеотидный праймер для амплификации фрагмента плазмиды pDON-AI. «нуклеотиды 21-23 являются рибонуклеотидами, другие нуклеотиды являются дезоксирибонуклеотидами»

SEQ ID NO:16: Сконструированный химерный олигонуклеотид, комплементарный гену c-Ki-ras человека, «нуклеотиды 18-20 являются рибонуклеотидами, другие нуклеотиды являются дезоксирибонуклеотидами»

SEQ ID NO:17: Сконструированный олигонуклеотидный праймер для амплификации фрагмента гена c-Ki-ras человека

SEQ ID NO:18: Сконструированный олигонуклеотидный праймер для амплификации фрагмента гена c-Ki-ras человека

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ образования комплекса, состоящего из двухцепочечной нуклеиновой кислоты и олигонуклеотида, предусматривающий

(а) смешивание двухцепочечной нуклеиновой кислоты и по меньшей мере одного олигонуклеотида для получения реакционной смеси, где олигонуклеотид является химерным олигонуклеотидом, содержащим по меньшей мере рибонуклеотид, а также член, выбранный из группы, состоящей из дезоксирибонуклеотида и аналога нуклеотида, и имеет последовательность, существенно комплементарную нуклеотидной последовательности одной из двух цепей двухцепочечной нуклеиновой кислоты; и

(б) инкубирование этой реакционной смеси для образования комплекса в условиях, в которых двухцепочечная нуклеиновая кислота не является денатурированной.

2. Способ по п.1, где двухцепочечная нуклеиновая кислота является нуклеиновой кислотой, выбранной из группы, состоящей из линейной ДНК, кольцевой ДНК и геномной ДНК.

3. Способ по п.1, где олигонуклеотид может функционировать в качестве праймера для синтеза ДНК, комплементарной одной из двух цепей двухцепочечной нуклеиновой кислоты.

4. Способ по п.1, где олигонуклеотид является меченым.

5. Способ детектирования двухцепочечной нуклеиновой кислоты, имеющей нуклеотидную последовательность-мишень, предусматривающий

(а) образование комплекса, состоящего из двухцепочечной нуклеиновой кислоты и олигонуклеотида в соответствии со способом по п.1, где олигонуклеотид является химерным олигонуклеотидом, содержащим по меньшей мере рибонуклеотид, а также член, выбранный из группы, состоящей из дезоксирибонуклеотида и аналога нуклеотида, и имеет последовательность, существенно комплементарную нуклеотидной последовательности-мишени; и

(б) детектирование олигонуклеотида, образующего комплекс.

6. Способ создания сайта инициации репликации (ориджина) на двухцепочечной нуклеиновой кислоте, предусматривающий

(а) смешивание двухцепочечной нуклеиновой кислоты и по меньшей мере одного олигонуклеотида для получения реакционной смеси, где олигонуклеотид является химерным олигонуклеотидом, содержащим по меньшей мере рибонуклеотид, а также член, выбранный из

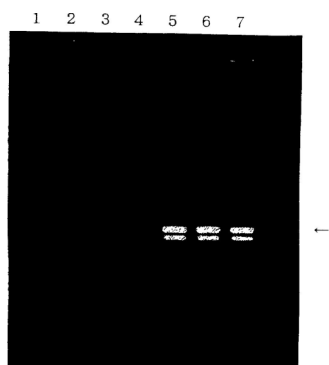
группы, состоящей из дезоксирибонуклеотида и аналога нуклеотида, позволяет достраивание его 3'-конца ДНК-полимеразой и имеет последовательность, существенно комплементарную нуклеотидной последовательности одной из двух цепей двухцепочечной нуклеиновой кислоты; и

(b) инкубирование этой реакционной смеси для образования комплекса в условиях, в которых двухцепочечная нуклеиновая кислота не является денатурированной.

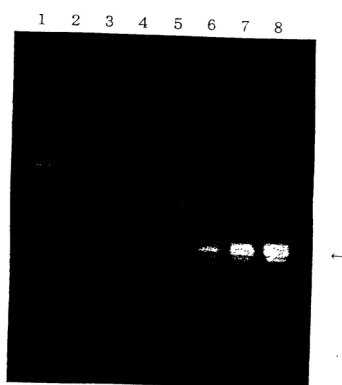
7. Способ по п.6, где двухцепочечная нуклеиновая кислота является нуклеиновой кислотой, выбранной из группы, состоящей из линейной ДНК, кольцевой ДНК и геномной ДНК.

8. Способ репликации нуклеиновой кислоты, предусматривающий синтез ДНК, комплементарной одной из двух цепей двухцепочечной кислоты, с сайта инициации репликации, созданного в соответствии со способом по п.6, в присутствии ДНК-полимеразы.

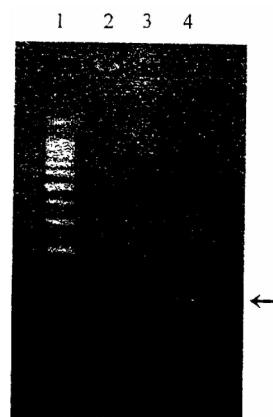
9. Способ по п.8, где ДНК-полимераза является ферментом, обладающим активностью замещения цепи.



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Takara Shuzo Co., Ltd.

<120> Способ образования комплекса

<130> 662808

<150> JP 2000-284420

<151> 2000-09-19

<150> JP 2001-139286

<151> 2001-05-09

<150> JP 2001-177537

<151> 2001-06-12

<160> 18

<210> 1

<211> 663

<212> ДНК

<213> *Pyrococcus horikoshii*

<400> 1

```
atgaaggttg ctggagtga tgaagcgggg agggggccgg taattggccc gttagtaatt 60
ggagtagccg ttatagatga gaaaaatatt gagaggttac gtgacattgg ggttaaagac 120
tccaaacaat taactcctgg gcaacgtgaa aaactaitta gcaaattaat agataccta 180
gacgattatt atgttcttct cgttaccccc aaggaaatag atgagaggca tcattctatg 240
```

aatgaactag aagctgagaa attcgttgta gccttgaatt ctttaaggat caagccgcag 300
 aagatatatg tggactctgc cgaatgatag cctaagaggt ttgtagtct aataaaggct 360
 gggttgaaat atgaagccac ggttatcgcc gagcataaag ccatgcaaa gtatgagata 420
 gtatcgccag catcaataat tgcaaaagtc actagggata gagagataga gaagctaaag 480
 caaaagtatg gggaatttgg ttctggctat ccgagtgatc cgagaactaa ggagtggtt 540
 gaagaatatt acaacaataa tggtagcttt cctccaatag ttaggagaac ttgggaacc 600
 gctaggaaga tagaggaaag gtttagaaaa aatcagctaa cgcttgataa attccttaag 660

tga

<210> 2

<211> 33

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ПЦР-праймер 1650Nde для клонирования гена, кодирующего полипептид, обладающий активностью РНКазы НП, из *Pyrococcus furiosus*

<400> 2

caggaggaga gacatatgaa aataggggga att 33

<210> 3

<211> 33

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ПЦР-праймер 1650Bam для клонирования гена, кодирующего полипептид, обладающий активностью РНКазы НП, из *Pyrococcus furiosus*

<400> 3

gaaggttggtg gatccacttt ctaagggttc tta 33

<210> 4

<211> 672

<212> ДНК

<213> *Pyrococcus furiosus*

<400> 4

atgaaaatag ggggaattga cgaagcagga agaggaccag cgaataggcc attagtagta 60
 gctactgtcg tctgtgatga gaaaaacatt gagaagctca gaaacattgg agtaaaagac 120
 tccaacaac taacacccca tgaaaggaag aatttatttt cccagataac ctcaatagcg 180
 gatgattaca aaatagtgtat agtatcccca gaagaaatcg acaatagatc aggaacaatg 240
 aacgagtttag aggtagagaa gtttgccttc gccttaaatc cgcttcagat aaaaccagct 300
 cttatatacg ctgatgcagc ggatgtagat gccaatagat ttgcaagctt gatagagaga 360
 agactcaatt ataaggcgaa gattattgcc gaacacaagg ccgatgcaaa gtatccagta 420
 gtttcagcag cttcaatact tgcaaaaggtt gttagggtat aggaattga aaaattaaaa 480
 aagcaatatg gagactttgg ctctgggtat ccaagtgtat caaaaacca gaaatggctt 540
 gaagagtact acaaaaaaca caactcttcc cctccaatag tcagacgaac ctgggaaact 600
 gtaagaaaaa tagaggaaag cattaaagcc aaaaaatccc agctaacgct tgataaatc 660
 ttttaagaac ct 672

<210> 5

<211> 224

<212> Белок

<213> *Pyrococcus furiosus*

<400> 5

Met Lys Ile Gly Gly Ile Asp Glu Ala Gly Arg Gly Pro Ala Ile
 1 5 10 15

Gly Pro Leu Val Val Ala Thr Val Val Val Asp Glu Lys Asn Ile
 20 25 30

Glu Lys Leu Arg Asn Ile Gly Val Lys Asp Ser Lys Gln Leu Thr
 35 40 45

Pro His Glu Arg Lys Asn Leu Phe Ser Gln Ile Thr Ser Ile Ala
 50 55 60

Asp Asp Tyr Lys Ile Val Ile Val Ser Pro Glu Glu Ile Asp Asn
 65 70 75

Arg Ser Gly Thr Met Asn Glu Leu Glu Val Glu Lys Phe Ala Leu
 80 85 90

Ala Leu Asn Ser Leu Gln Ile Lys Pro Ala Leu Ile Tyr Ala Asp
 95 100 105

Ala Ala Asp Val Asp Ala Asn Arg Phe Ala Ser Leu Ile Glu Arg
 110 115 120

Arg Leu Asn Tyr Lys Ala Lys Ile Ile Ala Glu His Lys Ala Asp
 125 130 135

Ala Lys Tyr Pro Val Val Ser Ala Ala Ser Ile Leu Ala Lys Val
 140 145 150

Val Arg Asp Glu Glu Ile Glu Lys Leu Lys Lys Gln Tyr Gly Asp
 155 160 165

Phe Gly Ser Gly Tyr Pro Ser Asp Pro Lys Thr Lys Lys Trp Leu
 170 175 180

Glu Glu Tyr Tyr Lys Lys His Asn Ser Phe Pro Pro Ile Val Arg
 185 190 195

Arg Thr Trp Glu Thr Val Arg Lys Ile Glu Glu Ser Ile Lys Ala
 200 205 210

Lys Lys Ser Gln Leu Thr Leu Asp Lys Phe Phe Lys Lys Pro
 215 220

<210> 6

<211> 21

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Сконцентрированный олигонуклеотидный праймер для амплификации фрагмента iNOS-кодирующей последовательности из мыши

<400> 6

caaaaggcca catcgattt c 21

<210> 7

<211> 21

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Сконцентрированный олигонуклеотидный праймер для амплификации фрагмента iNOS-кодирующей последовательности из мыши

<400> 7

tgcataccac tcaaccga g 21

<210> 8

<211> 23

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Сконструированный химерный олигонуклеотидный праймер для амплификации фрагмента iNOS-кодирующей последовательности из мыши, «нуклеотиды 21-23 являются рибонуклеотидами, другие нуклеотиды являются дезоксирибонуклеотидами»

<400> 8

ctcatgccat tgaagtcac aac 23

<210> 9

<211> 22

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Сконструированный химерный олигонуклеотидный праймер для амплификации фрагмента iNOS-кодирующей последовательности из мыши, «нуклеотиды 19-22 являются рибонуклеотидами, другие нуклеотиды являются дезоксирибонуклеотидами»

<400> 9

gctgtaggt tccgttgtt uc 22

<210> 10

<211> 19

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Сконструированный химерный олигонуклеотидный праймер для амплификации фрагмента плазмиды pDON-AI. «нуклеотиды 17-19 являются рибонуклеотидами, другие нуклеотиды являются дезоксирибонуклеотидами»

<400> 10

agctctgtat ctggcggac 19

<210> 11

<211> 21

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Сконструированный химерный олигонуклеотидный праймер для амплификации фрагмента плазмиды pDON-AI. «нуклеотиды 19-21 являются рибонуклеотидами, другие нуклеотиды являются дезоксирибонуклеотидами»

<400> 11

gatcgggatt ttggactca g 21

<210> 12

<211> 21

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Сконструированный химерный олигонуклеотидный праймер для амплификации фрагмента геномной ДНК Staphylococcus aureus. «нуклеотиды 19-21 являются рибонуклеотидами, другие нуклеотиды являются дезоксирибонуклеотидами»

<400> 12

tgatgtatg gtggtgtaac g 21

<210> 13

<211> 21

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Сконструированный химерный олигонуклеотидный праймер для амплификации фрагмента геномной ДНК Staphylococcus aureus. «нуклеотиды 19-21 являются рибонуклеотидами, другие нуклеотиды являются дезоксирибонуклеотидами»

<400> 13

taaccgtttc caaaggtacu g 21

<210> 14

<211> 22

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Сконструированный химерный олигонуклеотидный праймер для амплификации фрагмента плазмиды pDON-AI. «нуклеотиды 20-22 являются рибонуклеотидами, другие нуклеотиды являются дезоксирибонуклеотидами»

<400> 14

actagctctg taatcgagg ac 22

<210> 15

<211> 23

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Сконструированный химерный олигонуклеотидный праймер для амплификации фрагмента плазмиды pDON-AI. «нуклеотиды 21-23 являются рибонуклеотидами, другие нуклеотиды являются дезоксирибонуклеотидами»

<400> 15

acgatcgagg ttttgcaact cag 23

<210> 16

<211> 20

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Сконцентрированный химерный олигонуклеотид, комплементарный гену c-Ki-gas человека. «нуклеотиды 18-20 являются рибонуклеотидами, другие нуклеотиды являются дезоксирибонуклеотидами»

<400> 16

gactgaatat aaacttgugg 20

<210> 17

<211> 22

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Сконцентрированный олигонуклеотидный праймер для амплификации фрагмента гена c-Ki-gas человека.

<400> 17

tgacatgttc taatatagtc ac 22

<210> 18

<211> 20

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Сконцентрированный олигонуклеотидный праймер для амплификации фрагмента гена c-Ki-gas человека.

<400> 18

actcatgaag atgtgcagag 20

