

1. 一种试剂盒,其包含:

模板非依赖性核酸聚合酶;

衰减子多核苷酸,其包含衰减子序列和定位在所述衰减子序列附近的序列W,其中所述衰减子序列的长度为10至100个核苷酸,其中所述衰减子多核苷酸包含选自至少一个核糖核苷酸、至少一个脱氧核苷酸、C3间隔区、磷酸、双脱氧核苷酸、氨基以及反向脱氧胸苷的3'封闭基团;

衔接子多核苷酸,其中所述衔接子多核苷酸包含与所述衰减子多核苷酸的序列W互补的序列X;

与衰减子序列互补的核苷酸;以及

连接酶,

其中所述衰减子多核苷酸控制通过模板非依赖性核酸聚合酶添加至衬底多核苷酸的核苷酸尾部,以及其中所述衔接子多核苷酸与序列W杂交并被连接至衬底多核苷酸的所述核苷酸尾部,并且

所述衰减子多核苷酸和所述衔接子多核苷酸被退火到一起。

2. 一种试剂盒,其包含:

模板非依赖性核酸聚合酶;

衰减子多核苷酸,其包含衰减子序列和定位在所述衰减子序列附近的序列W,其中所述衰减子序列的长度为10至100个核苷酸,其中所述衰减子多核苷酸包含选自至少一个核糖核苷酸、至少一个脱氧核苷酸、C3间隔区、磷酸、双脱氧核苷酸、氨基以及反向脱氧胸苷的3'封闭基团;

衔接子多核苷酸,其中所述衔接子多核苷酸包含与所述衰减子多核苷酸的序列W互补的序列X;

与衰减子序列互补的核苷酸;以及

连接酶,

其中所述衰减子多核苷酸控制通过模板非依赖性核酸聚合酶添加至衬底多核苷酸的核苷酸尾部,以及其中所述衔接子多核苷酸与序列W杂交并被连接至衬底多核苷酸的所述核苷酸尾部,并且

其中所述衰减子多核苷酸和所述衔接子多核苷酸是同一多核苷酸的部分。

3. 如权利要求2所述的试剂盒,其中所述衰减子多核苷酸和所述衔接子多核苷酸形成发夹结构。

4. 如权利要求1所述的试剂盒,其中序列W被定位成与所述衰减子序列5'相邻。

5. 如权利要求2所述的试剂盒,其中序列W被定位成与所述衰减子序列5'相邻。

6. 如权利要求3所述的试剂盒,其中序列W被定位成与所述衰减子序列5'相邻。

7. 一种试剂盒,其包含:

模板非依赖性核酸聚合酶;

衰减子多核苷酸,其包含衰减子序列和定位在所述衰减子序列附近的序列W,其中所述衰减子序列的长度为10至100个核苷酸,其中所述衰减子多核苷酸包含选自至少一个核糖核苷酸、至少一个脱氧核苷酸、C3间隔区、磷酸、双脱氧核苷酸、氨基以及反向脱氧胸苷的3'封闭基团;

衔接子多核苷酸,其中所述衔接子多核苷酸包含与所述衰减子多核苷酸的序列W互补的序列X;

与衰减子序列互补的核苷酸;以及
连接酶,

其中所述衰减子多核苷酸和所述衔接子多核苷酸被退火到一起或者是同一多核苷酸的部分,

其中所述衰减子多核苷酸控制通过模板非依赖性核酸聚合酶添加至衬底多核苷酸的核苷酸尾部,以及其中所述衔接子多核苷酸与序列W杂交并被连接至衬底多核苷酸的所述核苷酸尾部,

其中序列W被定位成与所述衰减子序列5'相邻。

8.如权利要求1-7中任一项所述的试剂盒,其中所述衰减子序列包含选自以下的核苷酸:2'-脱氧胸苷5'-一磷酸(dTMP)、2'-脱氧鸟苷5'-一磷酸(dGMP)、2'-脱氧腺苷5'-一磷酸(dAMP)、2'-脱氧胞苷5'-一磷酸(dCMP)、2'-脱氧尿苷5'-一磷酸(dUMP)、胸苷一磷酸(TMP)、鸟苷一磷酸(GMP)、腺苷一磷酸(AMP)、胞苷一磷酸(CMP)、尿苷一磷酸(UMP)、碱基类似物以及其组合。

9.如权利要求1-7中任一项所述的试剂盒,其中

(i)所述衰减子多核苷酸包含dU碱基并且用dU糖基化酶孵育使所述衰减子多核苷酸不稳定,或用dU糖基化酶孵育并且后续在高于80℃的温度下孵育使所述衰减子多核苷酸降解,或用dU糖基化酶与脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶的混合物来孵育所述衰减子多核苷酸;

(ii)所述衰减子多核苷酸包含核糖核苷酸并且在对于核糖核酸酶活性充足的条件下能被核糖核酸酶降解,其中所述核糖核酸酶选自:RNase H、RNase HII、RNase A以及RNase T1;和/或

(iii)所述衰减子多核苷酸包含脱氧核糖核苷酸并且能被DNA特异性核酸酶降解,任选地其中所述DNA特异性核酸酶为DNaseI。

10.如权利要求1-7中任一项所述的试剂盒,其中序列X包含与SEQ ID NO:44-45中任一者互补的序列。

11.如权利要求8所述的试剂盒,其中

(i)所述衰减子多核苷酸包含dU碱基并且用dU糖基化酶孵育使所述衰减子多核苷酸不稳定,或用dU糖基化酶孵育并且后续在高于80℃的温度下孵育使所述衰减子多核苷酸降解,或用dU糖基化酶与脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶的混合物来孵育所述衰减子多核苷酸;

(ii)所述衰减子多核苷酸包含核糖核苷酸并且在对于核糖核酸酶活性充足的条件下能被核糖核酸酶降解,其中所述核糖核酸酶选自:RNase H、RNase HII、RNase A以及RNase T1;和/或

(iii)所述衰减子多核苷酸包含脱氧核糖核苷酸并且能被DNA特异性核酸酶降解,任选地其中所述DNA特异性核酸酶为DNaseI。

12.如权利要求8所述的试剂盒,其中序列X包含与SEQ ID NO:44-45中任一者互补的序列。

13.如权利要求9所述的试剂盒,其中序列X包含与SEQ ID NO:44-45中任一者互补的序列。

14. 如权利要求11所述的试剂盒,其中序列X包含与SEQ ID NO:44-45中任一者互补的序列。

用于通过核酸聚合酶对衬底多核苷酸进行大小受控的同聚物 加尾的方法和组合物

[0001] 本申请为国际申请日2013年3月13日、国际申请号 PCT/US2013/031104于2014年9月12日进入中国国家阶段、申请号 201380014044.3、发明名称“用于通过核酸聚合酶对衬底多核苷酸进行大小受控的同聚物加尾的方法和组合物”的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 根据美国法典第35篇第119条(e)款,本申请要求2012年3月13日提交的美国临时申请号61/610,296和2012年3月21日提交的美国临时申请号61/613,784的优先权权益,所述申请各自以引用的方式整体并入本文。

技术领域

[0004] 本发明涉及用于将具有特定长度的尾部添加至衬底多核苷酸的方法和组合物。本发明还涵盖用于将加尾衬底固定至固体支持物的方法和组合物。

背景技术

[0005] 许多当前下一代测序(NGS)平台在测序之前都要求特殊的DNA和RNA制备。最常用的制备涉及通过连接反应将衔接子序列添加至双链DNA片段的末端。所述反应通常涉及平末端DNA或在3'末端处具有单个脱氧腺苷(dA)核苷酸的DNA以及高浓度的DNA连接酶,并且所述反应导致形成大量的嵌合模板。模板依赖性聚合酶如DNA特异性末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)以及RNA特异性聚(A)和聚(U)聚合酶可能代表用于制备NGS分析所用的DNA和RNA的一种有吸引力的替代方法,其中富有挑战性的问题是由这些酶产生的聚合物尾部的长度在广泛范围(20个至500个核苷酸)内变化,这取决于许多因素并且不易控制,因而降低了它们对NGS的效用。

发明内容

[0006] 因此,本发明提供一种包含核酸聚合酶和衰减子分子的组合物。本发明预期所述衰减子分子是与添加至衬底多核苷酸的尾部序列缔合,并且控制尾部序列至所述衬底多核苷酸的3'末端的添加的任何生物分子。添加至所述衬底多核苷酸的所述序列本文称为尾部序列,或简称尾部,并且将核苷酸添加至衬底多核苷酸的过程本文称为加尾。如本文所使用的衰减子分子是多核苷酸、多肽、多糖以及其组合。在所述衰减子分子为多核苷酸的方面,进一步预期的是所述多核苷酸为环状分子,或所述多核苷酸包含肽核酸、裂褶多糖(Schizophyllan polysaccharide)、锁核酸以及其组合。

[0007] 如上所述,所述衰减子分子与添加至所述衬底多核苷酸的尾部序列缔合并控制核苷酸至所述衬底多核苷酸的添加。在一些实施方案中,所述衰减子分子是与添加至衬底多核苷酸的序列杂交的多核苷酸,其中添加至所述衬底多核苷酸的核苷酸的数量基本上等于与所述尾部序列缔合的所述衰减子分子的部分中的核苷酸的数量。在一些方面,添加至所述衬底多核苷酸的核苷酸的数量基本上等于与所述尾部序列缔合的所述衰减子分子中

的核苷酸数量的倍数。如本文所使用,术语“基本上”和“基本上等于”应理解成指的是近似或近似相等。

[0008] 在一些实施方案中,所述核酸聚合酶为模板依赖性聚合酶。在一方面,所述核酸聚合酶为DNA聚合酶,并且在另一方面,所述DNA聚合酶为末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)。在相关实施方案中,所述核酸聚合酶为RNA聚合酶,所述RNA聚合酶在各个方面选自自由聚(A)聚合酶、RNA特异性核苷酸转移酶以及聚(U)聚合酶组成的组。

[0009] 本发明预期的是,在一些实施方案中,所述衰减子分子包含选自以下组成的组的核苷酸:2'-脱氧胸苷5'-一磷酸(dTMP)、2'-脱氧鸟苷5'-一磷酸(dGMP)、2'-脱氧腺苷5'-一磷酸(dAMP)、2'-脱氧胞苷5'-一磷酸(dCMP)、2'-脱氧尿苷5'-一磷酸(dUMP)、胸苷一磷酸(TMP)、鸟苷一磷酸(GMP)、腺苷一磷酸(AMP)、胞苷一磷酸(CMP)、尿苷一磷酸(UMP)、碱基类似物以及其组合。因此,在某些实施方案中,所述衰减子分子包含为杂聚序列或同聚序列的衰减子序列,其中所述序列为二核苷酸序列或同聚物序列。

[0010] 在各个方面,所述衰减子分子包含1个核苷酸、2个核苷酸、3个核苷酸、4个核苷酸、5个核苷酸、10个核苷酸、20个核苷酸、30个核苷酸、50个核苷酸、100个核苷酸或更多。

[0011] 在一些实施方案中,所述衰减子分子包含封闭基团,并且在一方面,所述封闭基团位于所述分子的3'末端。所述封闭基团阻止所述衰减子分子通过所述核酸聚合酶的延伸。因此,在各个方面,所述封闭基团选自自由以下组成的组:至少一个核糖核苷酸、至少一个脱氧核苷酸、C3间隔区、磷酸、双脱氧核苷酸、氨基以及反向脱氧胸苷。

[0012] 在本发明的一些实施方案中,所述衰减子分子进一步包含位于所述衰减子序列(同聚物序列或二核苷酸序列)5'的衔接子序列、鉴定标签序列,或两者。在一个实施方案中,所述衰减子分子是固定的。在另外的实施方案中,所述组合物中存在连接酶。在另一个实施方案中,所述组合物进一步包含连接酶。

[0013] 在另一个实施方案中,所述衰减子分子是衰减子-衔接子分子,所述衰减子-衔接子分子包含衰减子序列并且进一步包含定位在所述衰减子序列附近并且与单独的多核苷酸上的序列X互补的序列W;所述组合物进一步包含衔接子分子,所述衔接子分子包含与序列V互补的序列Y,其中序列V具有与Y相同的长度或小于与序列Y相同的长度,所述衔接子分子是与所述衰减子-衔接子分子分开的分子。

[0014] 在本发明的一些实施方案中,所述衰减子分子进一步包含下一代测序(NGS)衔接子序列。NGS衔接子序列与衔接子序列的不同之处在于 NGS衔接子序列可用于测序平台。在本发明的一些实施方案中,所述衰减子分子进一步包含含有序列X和序列Y的下一代测序(NGS)衔接子序列(对于本文论述的各个序列(例如,序列X、序列Y等)的进一步描述,参见以下附图和论述)、鉴定标签序列或其组合,它们位于同聚物序列或二核苷酸序列的5'。在其中所述衰减子分子进一步包含衔接子序列的实施方案中,所述衰减子分子本文称为衰减子-衔接子分子。在一个实施方案中,所述衰减子分子和/或衰减子-衔接子分子是固定的。在相关实施方案中,序列X和序列Y是与Illumina、Ion Torrent、Roche 454或SOLiD测序平台相容的NGS衔接子序列。

[0015] 在另外的实施方案中,序列X和序列Y处于单独的衰减子-衔接子分子上,而在其它实施方案中,序列X和序列Y在同一衰减子-衔接子分子上彼此相邻。

[0016] 在一些实施方案中,本发明还提供其中衔接子序列进一步包含位于序列X与序列Y

之间的可裂解序列(Z)的组合物。在一些方面,序列 Z中的裂解位点是至少一个dU碱基或RNA碱基,或限制性核酸内切酶位点。

[0017] 本发明还提供其中所述衰减子分子是单链或至少部分是双链的组合物。“部分双链”指的是所述衰减子分子包含单链部分和双链部分。在其中所述衰减子分子至少部分是双链的一些方面,部分双链的衰减子分子通过使衰减子分子的部分退火到衔接子分子(其包含衔接子序列,在一些实施方案中,所述衔接子序列是NGS衔接子序列)来产生,所述衰减子分子的部分与所述衔接子分子是互补的。在一些方面,退火是(a)在衰减子分子与单独的衔接子分子之间,或(b)退火发生在形成发夹结构的单个衰减子分子内,因此所述衰减子分子既包含同聚序列或二核苷酸序列,又包含衔接子序列。

[0018] 在另一个实施方案中,所述衰减子分子包含与衔接子序列X完全互补的序列W。在一些方面,序列W还与衔接子序列Y完全或部分互补。

[0019] 在各个方面,所述衰减子分子包含选自由以下组成的组的同聚序列:聚(dA)、聚(dT)、聚(dC)、聚(dG)、聚(dU)、聚(rA)、聚(U)、聚(rC)、聚(rG);以及包含以下组合的杂聚序列或二核苷酸序列:(i)dA与rA碱基、(ii)dT、dU与U碱基、(iii)dC与rC碱基,或(iv)dG与rG碱基。

[0020] 在另外的方面,所述衰减子分子包含脱氧核糖核苷酸并且可用DNA特异性核酸酶降解。在这些方面的一些方面中,DNA特异性核酸酶为DNase I。在另外的实施方案中,本发明提供一种组合物包含单链环化连接酶,其包括但不限于CircLigase和/或CircLigase II。

[0021] 在一些方面,本发明还提供一种组合物,所述组合物包含缺乏校正活性的DNA聚合酶以及具有校正活性的Kapa HiFi聚合酶。在另外的实施方案中,本发明的一种组合物包含连接酶。

[0022] 本发明的另外的实施方案提供一种组合物,所述组合物包含能够裂解序列Z的限制性核酸内切酶,所述序列Z位于序列X与序列Y之间并且当与互补的X'Z'Y'多核苷酸杂交时,包含限制性核酸内切酶位点。

[0023] 在一些实施方案中,提供一种组合物,其中部分双链的衔接子序列包含序列V和序列Y,其中V是Y的截短补体并且包含封闭的3'末端,这样使得部分双链的衔接子能够平端连接至双链衬底分子。在另一个实施方案中,序列V与序列Y完全互补。

[0024] 本发明进一步涵盖其中所述衰减子分子可降解的组合物。在一些方面,所述衰减子分子包含dU碱基并且可通过用dU糖基化酶孵育(这产生无碱基位点),之后在80°C以上的温度下孵育(在无碱基位点内引起断裂),或用dU糖基化酶和脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶的混合物孵育来降解。因此,在各个方面,本发明提供组合物,其中所述衰减子分子包含dU碱基并且用dU糖基化酶孵育来使所述衰减子分子不稳定,或用dU糖基化酶孵育并且在80°C以上的温度下后续孵育使所述衰减子分子降解,或用dU糖基化酶与脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶的混合物来孵育所述衰减子分子。在另外的方面,所述衰减子分子包含核糖核苷酸并且在对于核糖核酸酶活性充足的条件下可用核糖核酸酶降解。在相关方面,核糖核酸酶选自由以下组成的组:RNase H、RNase HII、RNase A以及RNase T1。

[0025] 在另外的方面,所述衰减子分子包含脱氧核糖核苷酸并且可用DNA特异性核酸酶降解。在这些方面的一些方面中,所述DNA特异性核酸酶为DNase I。

[0026] 本发明还提供一种使衬底多核苷酸延伸的方法,所述方法包括在足以允许将尾部序列添加至所述衬底多核苷酸的3'末端的条件下,用本文所描述的组合物来孵育所述衬底多核苷酸,并且其中所述尾部序列的所述添加允许所述尾部序列与所述衰减子分子之间缔合以形成复合物。在另一方面,所述方法进一步包括在所述衬底多核苷酸的延伸之后使所述衰减子分子降解。在另外的方面,所述方法进一步包括分离所延伸的衬底多核苷酸。所述方法的其它方面进一步包括将本文所描述的组合物与所述衬底多核苷酸以及与所述衰减子分子的同聚部分互补的核苷酸混合。

[0027] 根据本发明的各个方面,所述衬底多核苷酸是单链多核苷酸或双链多核苷酸。在一些方面,所述双链多核苷酸具有平末端、3'突出末端、3'凹陷末端或游离的3'羟基。本发明提供方法,其中所述衬底多核苷酸是双链的,并且在某些方面,所述双链衬底多核苷酸通过在足以允许第一衬底多核苷酸与第二衬底多核苷酸缔合的条件下,使所述第一衬底多核苷酸退火到所述第二衬底多核苷酸而产生。根据本发明的另外的方面,所述衬底多核苷酸包含游离的3'羟基。在各个实施方案中,所述单链多核苷酸通过片段化的双链DNA的变性或由RNA的逆转录来制备。在一些方面,所述双链多核苷酸具有平末端或带有游离的3'羟基的3'突出末端。

[0028] 在本发明的所述方法的各个方面,将多个核苷酸添加至所述衬底多核苷酸。在各个方面,添加至所述衬底多核苷酸的核苷酸的数量包括:至少约1个核苷酸到至多约10、20、50或100个核苷酸,至少约3个核苷酸到至多约10、20、50或100个核苷酸,至少约10个核苷酸到至多约20、30、50或100个核苷酸,至少约5个核苷酸到至多约10、20、50或100个核苷酸,至少约10个核苷酸到至多约20、30、50或100个核苷酸,至少约1个核苷酸到至多约5、10或20个核苷酸,至少约3个核苷酸到至多约5、10或20个核苷酸,至少约5个核苷酸到至多约20、40或50个核苷酸,至少1个核苷酸,至少2个核苷酸,至少3个核苷酸,至少4个核苷酸,至少5个核苷酸,至少6个,至少7个,至少8个,至少9个,至少10个,至少11个,至少12个,至少13个,至少14个,至少15个,至少16个,至少17个,至少18个,至少19个,至少20个,至少21个,至少22个,至少23个,至少24个,至少25个,至少26个,至少27个,至少28个,至少29个,至少30个,至少31个,至少32个,至少33个,至少34个,至少35个,至少36个,至少37个,至少38个,至少39个,至少40个,至少41个,至少42个,至少43个,至少44个,至少45个,至少46个,至少47个,至少48个,至少49个,至少50个,至少51个,至少52个,至少53个,至少54个,至少55个,至少56个,至少57个,至少58个,至少59个,至少60个,至少61个,至少62个,至少63个,至少64个,至少65个,至少66个,至少67个,至少68个,至少69个,至少70个,至少71个,至少72个,至少73个,至少74个,至少75个,至少76个,至少77个,至少78个,至少79个,至少80个,至少81个,至少82个,至少83个,至少84个,至少85个,至少86个,至少87个,至少88个,至少89个,至少90个,至少91个,至少92个,至少93个,至少94个,至少95个,至少96个,至少97个,至少98个,至少99个,至少100个核苷酸或更多。

[0029] 本发明提供的另外的实施方案包括其中所述衰减子分子在全部或部分的衰减子分子长度上与所述尾部序列缔合的那些。在一些实施方案中,所述衰减子分子在添加所述尾部序列的过程期间与所述尾部序列缔合。在另外的方面,所述衰减子分子与所述尾部序列的缔合调节核苷酸至所述衬底多核苷酸的添加。在一些方面,所述衰减子分子另外包含衔接子序列,并且在将所述尾部序列添加至所述衬底多核苷酸期间,通过连接酶将所述衔

接子序列连接至所述衬底多核苷酸,并且在各种实施方案中,所述连接酶为DNA连接酶或RNA连接酶。

[0030] 本发明还预期的是,在一些方面,所述方法的条件调节所述尾部序列至所述衬底多核苷酸的添加。就预期调节所述尾部序列至所述衬底多核苷酸的添加的条件来说,预期的是,在一些方面,所述尾部序列至所述衬底多核苷酸的所述添加对温度敏感。预期了其中温度介于约4℃与约50℃之间的条件。在其中使用热稳定聚合酶的方面,温度可以高于50℃。因此,在另外的方面,所述温度介于约50℃与约90℃之间。

[0031] 在另外的实施方案中,所述尾部序列至所述衬底多核苷酸的所述添加对时间敏感,并且在各个方面,允许孵育步骤进行在约0.5分钟至约120分钟的范围内的时间长度。在另外的实施方案中,所述尾部序列至所述衬底多核苷酸的所述添加对pH敏感。在这些实施方案的一些实施方案中,所述尾部序列至所述衬底多核苷酸的所述添加在其中pH 处于约pH 5.0至约pH 9.0的范围内的条件下进行。

[0032] 在各种实施方案中,所述衬底多核苷酸为DNA或RNA。

[0033] 本文提供的方法还包括其中所述衰减子-衔接子分子是固定的那些方法。在一些方面,在将尾部序列添加至衬底多核苷酸期间,通过 DNA或RNA连接酶将所固定的衰减子-衔接子分子连接至所述衬底多核苷酸,从而使所述衬底多核苷酸固定。在另外的方面,添加至反应物的连接酶的量约为0.1个单位至约1000个单位(U)。

[0034] 在某些方面,本文所描述的方法进一步包括量为约1mM至约100 mM的镁。在另外的方面,所述方法进一步包括量为约1mM至约1M 的钾或钠。

[0035] 在本发明的特定方面,提供一种使DNA衬底多核苷酸延伸的方法,所述方法包括将所述DNA衬底多核苷酸与TdT酶、包含3'磷酸的可降解的衰减子多核苷酸以及与所述衰减子多核苷酸的同聚部分互补的核苷酸混合;将混合物在37℃下孵育约30分钟,之后在70℃下另外孵育约10分钟;通过添加DNA糖基化酶来使所述衰减子分子降解并且将所述混合物在37℃下孵育约5分钟;以及任选地分离所延伸的 DNA衬底多核苷酸。

[0036] 在另一方面,本发明提供一种使DNA衬底多核苷酸延伸的方法,所述方法包括将衬底多核苷酸与TdT酶、包含3'末端处的两个核糖核苷酸的衰减子多核苷酸以及与所述衰减子多核苷酸的同聚部分互补的核苷酸混合;将混合物在30℃下孵育30分钟,之后在70℃下另外孵育约10分钟来使所述TdT酶失活;以及任选地分离所延伸的DNA衬底多核苷酸。

[0037] 在一方面,本发明进一步提供一种使衬底RNA多核苷酸延伸的方法,所述方法包括将所述衬底RNA多核苷酸与RNA聚合酶、可降解的衰减子多核苷酸以及与所述衰减子多核苷酸的同聚部分互补的核糖核苷酸混合;将混合物在30℃下孵育约30分钟,之后在95℃下另外孵育约10分钟;通过添加DNA糖基化酶来使所述衰减子分子降解并且将所述混合物在37℃下孵育约10分钟;以及任选地分离所延伸的衬底多核苷酸。

[0038] 在另一方面,本发明提供一种使DNA衬底多核苷酸延伸的方法,所述方法包括通过将衰减子分子和衔接子分子的混合物在合适的缓冲液中加热至约100℃并且然后冷却至约25℃来使彼此部分互补的所述衰减子分子和所述衔接子分子退火,其中所述退火产生了部分双链的衰减子-衔接子分子;将所述DNA衬底多核苷酸与TdT酶、连接酶、所述部分双链的衰减子-衔接子分子以及与所述衰减子-衔接子分子的同聚部分互补的核苷酸混合;在约37℃下孵育约15至约30分钟;以及任选地分离连接至所述衰减子-衔接子分子的所延伸的DNA

衬底多核苷酸。

[0039] 在一方面,本发明进一步提供一种使DNA衬底多核苷酸延伸的方法,所述方法包括通过将一个衰减子-衔接子分子和第二生物素化的衔接子分子的混合物在合适的缓冲液中加热至约100℃并且然后冷却至约25℃来使彼此至少部分互补的所述衰减子-衔接子分子退火到所述第二生物素化的衔接子分子,其中所述退火产生了双链的生物素化的衰减子-衔接子分子;通过在约25℃下,将所述双链的生物素化的衰减子-衔接子分子与包含链霉亲和素涂布的磁珠的溶液混合约30至约60分钟,来使所述双链的生物素化的衰减子-衔接子分子固定,从而使所述双链的生物素化的衰减子-衔接子分子固定至所述链霉亲和素涂布的磁珠;用所述DNA衬底多核苷酸、TdT酶、连接酶以及与所述双链衰减子分子的同聚部分互补的核苷酸来将连接至所述链霉亲和素涂布的磁珠的所固定的双链生物素化的衰减子-衔接子分子在约37℃下孵育15至约30分钟;用NaOH洗涤所述溶液来将非生物素化的单链DNA从珠粒中去除;以及任选地分离连接至所述双链生物素化的衰减子-衔接子分子的所延伸的DNA衬底多核苷酸。

[0040] 在另一方面,提供一种使RNA衬底多核苷酸延伸的方法,所述方法包括通过将衰减子分子和衔接子分子的混合物在合适的缓冲液中加热至约100℃并且然后冷却至约25℃来使彼此至少部分互补的所述衰减子分子和所述衔接子分子退火,其中所述退火产生了部分双链的衰减子-衔接子分子;将RNA衬底多核苷酸与聚(A)或聚(U)酶、连接酶、所述部分双链的衰减子-衔接子分子以及与所述部分双链的衰减子分子的单链同聚部分互补的核糖核苷酸混合;在约30℃至约37℃下孵育约15至30分钟;以及任选地分离连接至所述衰减子-衔接子分子的所延伸的RNA衬底多核苷酸。

[0041] 在另一方面,本发明提供一种使RNA衬底多核苷酸延伸和固定的方法,所述方法包括通过将衰减子-衔接子分子和生物素化的衔接子分子的混合物在合适的缓冲液中加热至约100℃并且然后冷却至约25℃来使彼此至少部分互补的所述衰减子-衔接子分子退火到所述生物素化的衔接子分子,其中所述退火产生了部分双链的生物素化的衰减子-衔接子分子;通过在约25℃下将所述部分双链的生物素化的衰减子-衔接子分子与包含链霉亲和素涂布的磁珠的溶液混合约两小时,来使所述部分双链的生物素化的衰减子-衔接子分子固定,从而使所述部分双链的生物素化的衰减子-衔接子分子固定至所述链霉亲和素涂布的磁珠;用所述RNA衬底多核苷酸、聚(A)或聚(U)聚合酶、连接酶以及与所述部分双链的衰减子-衔接子分子的单链同聚部分互补的核糖核苷酸来将连接至所述链霉亲和素涂布的磁珠的所固定的部分双链的生物素化的衰减子-衔接子分子在约30℃至约37℃下孵育约15至30分钟;用NaOH洗涤所述溶液来将非生物素化的单链多核苷酸从珠粒中去除;以及任选地分离连接至所述双链生物素化的衰减子-衔接子分子的所延伸并固定的RNA衬底多核苷酸。

[0042] 在各种实施方案中,本发明还提供其中将DNA聚合酶与dNTP混合来进行衬底多核苷酸的聚合酶延伸的方法,所述聚合酶延伸在受控的同聚物加尾之后发生并且使得一个或多个NGS衔接子序列(序列X、序列Y或序列X和Y)3'引入至与位于所述衰减子分子的同聚物5'的另外的序列X'和序列Y'互补的衬底同聚物。

[0043] 在另外的实施方案中,在将核苷酸添加至所述衬底多核苷酸期间,通过连接酶将NGS衔接子序列X、序列Y或序列X和Y任选地连接至所述衬底多核苷酸。在其它实施方案中,在将核苷酸添加至所述衬底多核苷酸之后,通过连接酶将NGS衔接子序列X、序列Y或序列X

和Y任选地连接至所述衬底多核苷酸。在相关实施方案中,连接酶为 DNA连接酶或RNA连接酶。

[0044] 在另外的实施方案中,衰减子分子序列W任选地相对于序列X' 和Y' 为截短的,以允许全长X'Y' 多核苷酸引物替代截短的衰减子并且使得聚合酶延伸,以产生双链衔接的衬底分子。如本文所使用,“衔接分子”是已经经历了加尾和连接反应的衬底分子。

[0045] 本发明进一步提供其中在同聚物添加和聚合酶延伸之后,任选地用导致衔接的单链DNA分子的环化的单链DNA环化连接酶来孵育所述衬底分子的实施方案。在一个实施方案中,通过降解阻止包含序列X 和序列Y的所述衰减子分子的环化。

[0046] 在另一个实施方案中,在同聚物添加和连接之后,任选地用导致衔接的单链DNA分子的环化的单链DNA环化连接酶来孵育所述衬底分子。

[0047] 在本发明的另一个实施方案中,通过形成双链或部分双链的衰减子-衔接子分子来阻止XYZ衔接子分子的环化。

[0048] 本发明的实施方案涵盖环状DNA分子在序列Z处的裂解,所述裂解由用例如但不限于dU糖基化酶和脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶孵育造成(在其中Z包含dU碱基的实施方案中)。

[0049] 本发明的另外的实施方案包括环状DNA分子在序列Z处的裂解,所述裂解由在与XYZ连接区互补的寡核苷酸的杂交之后用RNase H、RNase H II(在其中Z包含RNA碱基的实施方案中)或通过限制性酶孵育造成。

[0050] 在另外的方面,本发明提供一种使DNA衬底多核苷酸延伸的方法,所述方法包括:将所述DNA衬底多核苷酸与聚合酶和连接酶、包含NGS衔接子序列X和Y以及可裂解序列Z的衔接子多核苷酸以及与所述衰减子多核苷酸的同聚部分互补的脱氧核苷酸混合,其中所述衔接子任选地包含3'核糖核苷酸和5'磷酸,并且退火到具有截短的NGS 衔接子序列W和3'封闭部分的衰减子;进行加尾和连接同步反应,使所述聚合酶和连接酶热失活,之后用单链特异性环化连接酶来孵育;任选地包括Z序列处的裂解反应或用反向X和Y引物进行的扩增反应,进行所述反应中的任一个来将环状分子分解成完整的线性NGS文库分子。

[0051] 在另一方面,本发明提供一种使DNA衬底多核苷酸延伸的方法,所述方法包括将DNA衬底多核苷酸与聚合酶、具有NGS衔接子序列 X' 和Y' 并且包含如本文所描述的3'延伸封闭部分和裂解位点的衰减子,以及与所述衰减子多核苷酸的同聚部分互补的脱氧核苷酸混合;进行加尾反应,使所述聚合酶热失活,之后添加DNA聚合酶和dNTP混合物来对所加尾的衬底多核苷酸进行聚合酶延伸,以将同聚物添加3'的 NGS衔接子序列X和Y引入到所述衬底上;然后将衰减子模板多核苷酸用RNase或dU糖基化酶降解,之后用单链特异性环化连接酶孵育;任选地包括Z序列处的裂解反应或用反向X和Y引物进行的扩增反应,进行所述反应中的任一个,以将环状分子分解成完整的线性NGS文库分子。

[0052] 在另一方面,本发明提供一种使DNA衬底多核苷酸延伸的方法,所述方法包括将所述DNA衬底多核苷酸与聚合酶和连接酶、包含NGS 衔接子序列X的衔接子多核苷酸,以及与所述衰减子多核苷酸的同聚部分互补的脱氧核苷酸混合,其中所述衔接子任选地包含3'延伸封闭部分和5'磷酸,并且退火到具有截短的NGS衔接子序列W和3'封闭部分的衰减子;进行加尾和连接同步反应,使所述聚合酶和连接酶热失活,之后用与能够替代所述衰减子分子的全长NGS衔接子序列X' 互补的引物、DNA聚合酶以及任选地包括dUTP的dNTP来孵育,以进行延伸反应,生成第二链和具有平末端的双链衬底分子;用T4DNA连接酶以及通过使包含

NGS衔接子序列Y和截短的补体(序列V)以及3'磷酸的两个多核苷酸退火而形成的平末端衔接子进行连接,其中Y多核苷酸连接至所述衬底分子的5'磷酸来实现线性NGS文库分子;任选地使用dU糖基化酶并且加热至95℃来降解所合成的链。

[0053] 本发明的另一方面提供一种使DNA衬底多核苷酸延伸的方法,所述方法包括:将所述DNA衬底多核苷酸与聚合酶、具有NGS衔接子序列X'并且包含3'延伸封闭部分和裂解位点的衰减子,以及与所述衰减子多核苷酸的同聚部分互补的脱氧核苷酸混合;进行加尾反应,使所述聚合酶热失活,之后添加校正DNA聚合酶和dNTP混合物来进行聚合酶延伸,以将同聚物添加3'的NGS衔接子序列X引入到所述衬底上并且将非互补碱基从衰减子3'末端去除来允许聚合酶延伸,以生成平末端的双链衬底;用T4DNA连接酶和通过使包含NGS衔接子序列Y和截短的补体(序列V)以及3'磷酸的两个多核苷酸退火而形成的平末端衔接子分子进行连接,其中Y多核苷酸连接至所述衬底分子的5'磷酸,以实现线性NGS文库分子;任选地使用dU糖基化酶并且加热至介于约90℃与100℃之间来降解所合成的链。在各种实施方案中,将所述混合物加热至介于约90℃与95℃之间,或介于约95℃与100℃之间,或约90℃,或约91℃,或约92℃,或约93℃,或约94℃,或约95℃,或约96℃,或约97℃,或约98℃,或约99℃,或约100℃。

[0054] 在另一方面,提供一种使RNA衬底多核苷酸延伸的方法,所述方法包括:将所述RNA衬底多核苷酸与聚(A)或聚(U)酶和T4DNA连接酶、包含NGS衔接子序列X的DNA衔接子多核苷酸,以及与所述衰减子多核苷酸的同聚部分互补的核糖核苷酸混合,其中所述衔接子任选地包含3'延伸封闭部分和5'磷酸,并且退火到具有截短的NGS衔接子序列W和3'封闭部分的RNA衰减子;进行加尾和连接同步反应,使所述聚(A)或聚(U)酶热失活,之后用与能够替代针对序列X'截短的衰减子分子的全长NGS衔接子序列X'互补的引物、逆转录酶以及dNTP孵育,以进行延伸反应,生成第二链和双链衬底分子;进行磁珠DNA纯化步骤,之后在95℃下进行链变性;然后使用聚合酶和连接酶以及DNA衰减子-衔接子分子来进行第二同步加尾和连接,所述第二同步加尾和连接会将同聚物和Y NGS衔接子序列添加至所述衬底分子的游离的3'末端,从而实现线性NGS文库分子,其中需要任选的DNA纯化步骤。

[0055] 本发明还提供一种使用受控的同聚物加尾和连接,之后使衬底多核苷酸环化(图25)来进行NGS文库合成的方法,其中片段化的单链DNA通过使片段化的双链DNA变性或通过RNA的逆转录来制备,其中受控的加尾和连接在聚合酶、连接酶、核苷酸D(其中D=dATP、dTTP或dGTP)以及衰减子-衔接子分子的存在下进行,其中所述衰减子-衔接子分子通过使以下两个多核苷酸退火而形成:多核苷酸XZY和多核苷酸W(H)_n。

[0056] 多核苷酸XZY包含5'磷酸,以及位于3'末端处的阻止同聚物尾部的添加的核糖核苷酸碱基或其它封闭基团。序列X和Y表示NGS文库的衔接子序列和任选的ID标签。任选的序列Z用于裂解并且包含dU碱基、RNA碱基或限制性核酸内切酶位点。多核苷酸W(H)_n包含两个序列:与多核苷酸XZY的5'部分互补的5'序列W以及同聚衰减子序列(H)_n,其中H为A、T或C碱基,并且n=10-30。多核苷酸W(H)_n包含3'封闭基团,其包括但不限于3'磷酸、双脱氧核苷酸、C3间隔区、反向胸苷或通过聚合酶特异性地抑制碱基的添加的一个或多个核糖核苷酸。在反应中,所述聚合酶会将有限数量的碱基添加至DNA衬底的3'末端,之后通过连接酶来连接XZY衔接子分子。在某些实施方案中,通过所述聚合酶添加至DNA衬底的3'末端的碱基的数量介于约1与50个dA或dT碱基之间或介于约1与50个dG碱基之间。在另外的实施方

案中,通过所述聚合酶添加至DNA衬底的3'末端的碱基的数量为约 1个核苷酸到至多约5、10、20、30、40或50个dA、dT或dG核苷酸,或约5个到至多约10、15、20、30、40或50个dA、dT或dG核苷酸,或约10个到至多约15、20、30、40或50个dA、dT或dG核苷酸,或约9个至约12个dA、dT或dG核苷酸,或约6个至约8个dA、dT 或dG核苷酸。在另外的实施方案中,通过所述聚合酶添加至DNA衬底的3'末端的碱基的数量为至少约1个、至少约2个、至少约3个、至少约4个、至少约5个、至少约6个、至少约7个、至少约8个、至少约9个、至少约10个、至少约11个、至少约12个、至少约13个、至少约14个、至少约15个、至少约16个、至少约17个、至少约18 个、至少约19个、至少约20个、至少约21个、至少约22个、至少约23个、至少约24个、至少约25个、至少约26个、至少约27个、至少约28个、至少约29个、至少约30个、至少约31个、至少约32 个、至少约33个、至少约34个、至少约35个、至少约36个、至少约37个、至少约38个、至少约39个、至少约40个、至少约41个、至少约42个、至少约43个、至少约44个、至少约45个、至少约46 个、至少约47个、至少约48个、至少约49个或至少约50个dA、dT 或dG核苷酸。在另外的实施方案中,通过所述聚合酶添加至DNA衬底的3'末端的碱基的数量为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50个或更多个dA、dT或dG核苷酸。

[0057] 在使所述聚合酶和所述连接酶任选热失活之后,用单链环化连接酶(Epicentre/Illumina)孵育导致所衔接的单链DNA分子的环化。通过在XZY多核苷酸与W(H)_n多核苷酸之间形成双链衰减子-衔接子复合物来阻止XZY多核苷酸的环化。环化的NGS文库可以直接用于簇形成(Ion Torrent、454以及Solid平台情况下的乳化PCR,以及Illumina平台情况下的过桥式扩增(bridge amplification))或直接用于测序(PacBio)。任选地,所述环状DNA分子的裂解通过dU糖基化酶和脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶(在Z序列包含dU碱基的情况下),通过RNase H或RNase H II (在Z序列包含RNA碱基的情况下)或通过限制性核酸内切酶来实现。在后两种情况下,与所述XZY连接区互补的多核苷酸的杂交是提供用于RNase H或限制性核酸内切酶的模板所必需的。可替代地,进行扩增反应来将环状形式分解成线性形式。

[0058] 本发明还提供一种用于使用受控的同聚物加尾,之后是聚合酶延伸和环化(图26)进行NGS文库合成的替代方法,其中单链衬底多核苷酸的加尾在聚合酶、核苷酸D(其中D=dATP、dTTP或dGTP)以及衰减子-模板多核苷酸的存在下进行,其中所述衰减子-模板多核苷酸包含三个序列:与衔接子序列Y互补的5'序列Y',与衔接子序列X互补的序列X'以及同聚衰减子序列(H)_n,其中H为A、T或C碱基,并且n= 10-30。所述衰减子-模板多核苷酸另外包含位于3'末端处的磷酸基团、核糖核苷酸或其它封闭基团。序列X和Y表示用于NGS文库的衔接子序列和任选的ID标签。所述衰减子序列和X',Y'序列两者均具有可降解碱基,如核糖核苷酸或dU。在所述衰减子分子的存在下,聚合酶将有限数量的碱基添加至DNA的3'末端。在某些实施方案中,通过所述聚合酶添加至DNA衬底的3'末端的碱基的数量介于约1与50个dA或 dT碱基之间或介于约1与50个dG碱基之间。在另外的实施方案中,通过所述聚合酶添加至DNA衬底的3'末端的碱基的数量为约1个核苷酸到至多约5、10、20、30、40或50个dA、dT或dG核苷酸,或约5 个到至多约10、15、20、30、40或50个dA、dT或dG核苷酸,或约 10个到至多约12、15、20、30、40或50个dA、dT或dG核苷酸,或约10个至约13个dA、dT或dG核苷酸。在另外的实施方案中,通过所述聚合酶添加至DNA衬底的3'末端的碱基的数量为至少约1个、至少约2个、至少约3个、至少约4个、至少约5个、至少约6个、至少约7个、至少约8个、至少约9个、

至少约10个、至少约11个、至少约12个、至少约13个、至少约14个、至少约15个、至少约16个、至少约17个、至少约18个、至少约19个、至少约20个、至少约21个、至少约22个、至少约23个、至少约24个、至少约25个、至少约26个、至少约27个、至少约28个、至少约29个、至少约30个、至少约31个、至少约32个、至少约33个、至少约34个、至少约35个、至少约36个、至少约37个、至少约38个、至少约39个、至少约40个、至少约41个、至少约42个、至少约43个、至少约44个、至少约45个、至少约46个、至少约47个、至少约48个、至少约49个或至少约50个dA、dT或dG核苷酸。在另外的实施方案中,通过所述聚合酶添加至DNA衬底的3'末端的碱基的数量为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50个或更多个dA、dT或dG核苷酸。

[0059] 在使所述聚合酶和所述连接酶任选热失活之后,添加DNA聚合酶和dNTP混合物来进行聚合酶延伸,这使得将X序列和Y序列添加至同聚序列(D)_n的3'末端。在通过添加dU糖基化酶或RNase进行衰减子-模板的降解之后,用单链环化连接酶(Epicentre/Illumina)孵育导致所衔接的单链DNA分子的环化。如果有需要,进行任选的扩增来将环状形式分解成线性形式。可替代地,X与Y之间的任选序列Z用于在与XZY 结构域互补的多核苷酸的杂交和裂解反应之后产生线性形式(如上文所述)。在某些实施方案中,进行来将环状形式分解成线性形式的任选的扩增是一项技术,包括但不限于反向PCR。

[0060] 还涵盖一种NGS文库合成的方法,所述方法包括受控的同聚物加尾和连接,之后是反向链合成和平端衔接子连接(图27),其中加尾和连接在TdT酶、大肠杆菌DNA连接酶、核苷酸D(其中D=dATP、dTTP 或dGTP)以及衰减子-衔接子分子的存在下进行,所述衰减子-衔接子分子通过使以下两个多核苷酸退火而形成:多核苷酸X和多核苷酸 W(H)_n。多核苷酸X包含5'磷酸和3'封闭基团,其中序列X包含NGS 文库衔接子序列以及任选的ID标签。多核苷酸W(H)_n由两个序列组成:与多核苷酸X的5'部分互补的5'序列W以及同聚衰减子序列(H)_n,其中H为A、T或C碱基,并且n=10-30,并且另外包含3'封闭基团。在反应中,所述聚合酶会将有限数量的碱基添加至DNA衬底的3'末端,之后通过连接酶来连接所述衰减子-衔接子分子。在某些实施方案中,通过所述聚合酶添加至DNA衬底的3'末端的碱基的数量介于约1与50个dA或dT碱基之间或介于约1与50个dG碱基之间。在另外的实施方案中,通过所述聚合酶添加至DNA衬底的3'末端的碱基的数量为约 1个核苷酸到至多约5、10、20、30、40或50个dA、dT或dG核苷酸,或约5个到至多约10、15、20、30、40或50个dA、dT或dG核苷酸,或约10个到至多约15、20、30、40或50个dA、dT或dG核苷酸,或约9个至约12个dA、dT或dG核苷酸,或约6个至约8个dA、dT 或dG核苷酸。在另外的实施方案中,通过所述聚合酶添加至DNA衬底的3'末端的碱基的数量为至少约1个、至少约2个、至少约3个、至少约4个、至少约5个、至少约6个、至少约7个、至少约8个、至少约9个、至少约10个、至少约11个、至少约12个、至少约13个、至少约14个、至少约15个、至少约16个、至少约17个、至少约18 个、至少约19个、至少约20个、至少约21个、至少约22个、至少约23个、至少约24个、至少约25个、至少约26个、至少约27个、至少约28个、至少约29个、至少约30个、至少约31个、至少约32 个、至少约33个、至少约34个、至少约35个、至少约36个、至少约37个、至少约38个、至少约39个、至少约40个、至少约41个、至少约42个、至少约43个、至少约44个、至少约45个、至少约46 个、至少约47个、至少约48个、至少约49个或至少约50个dA、dT 或dG核苷酸。在另外的实施方案中,通过所述聚合酶添加

至DNA衬底的3'末端的碱基的数量为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50个或更多个dA、dT或dG核苷酸。

[0061] 在使所述聚合酶和所述连接酶任选热失活之后,添加DNA聚合酶以及含有5'序列X'、位于3'末端处的1至10个H碱基(或者,在另外的实施方案中,约1个至约5、7或10个H碱基,或约5个至约6、8或10个H碱基,或约6个至约8个H碱基)以及任选的dU碱基的引物引起反向链复制,从而形成双链平末端(在校正DNA聚合酶的存在下)或具有3'dA碱基的双链末端(在DNA聚合酶缺乏校正活性的情况下),并且其中聚合混合物任选地包括dUTP。平末端或dT衔接子的连接通过连接酶来实现,其中有待连接的衔接子通过以下两个多核苷酸形成:多核苷酸Y,其中Y为第二NGS衔接子;以及与多核苷酸Y的3'部分互补的多核苷酸V。多核苷酸V的3'末端具有磷酸封闭基团。连接导致多核苷酸Y的3'末端共价连接至原始DNA片段的5'磷酸,而多核苷酸V的5'末端与引物延伸产物的3'末端之间未形成连接。任选地,所复制的DNA链和引物X'通过用dU糖基化酶孵育以及95℃孵育来降解。在一些实施方案中,所述孵育在约90℃与100℃之间发生。在另外的实施方案中,将所述混合物加热至介于约90℃与95℃之间,或介于约95℃与100℃之间,或约90℃,或约91℃,或约92℃,或约93℃,或约94℃,或约95℃,或约96℃,或约97℃,或约98℃,或约99℃,或约100℃。

[0062] 本发明还提供一种用于NGS文库构建的替代方法,所述方法包括受控的加尾和聚合,之后是反向链合成和平端连接(图28),其中加尾在聚合酶、核苷酸D(其中D=dATP、dTTP或dGTP)以及衰减子-模板多核苷酸的存在下进行,所述衰减子-模板多核苷酸包含两个序列:与NGS衔接子X互补的5'序列X',以及同聚衰减子序列(H)_n,其中H为A、T或C碱基,并且n=10-30,并且另外包含3'核糖核苷酸和内部可降解碱基(如核糖核苷酸或dU)。在所述衰减子分子的存在下,所述聚合酶将有限数量的碱基添加至DNA衬底的3'末端并且在任选的热失活之后,包括了具有校正活性的DNA聚合酶和dNTP混合物将使所述DNA衬底延伸以包括序列X,并且还将过量的非互补碱基从衰减子多核苷酸3'末端去除,并且然后引起产生双链平末端的反向链复制。聚合混合物可以任选地包含dUTP。平末端衔接子的连接通过T4DNA连接酶来实现,其中所述平末端衔接子通过以下两个多核苷酸形成:多核苷酸Y,其中Y为第二NGS衔接子的序列;以及与多核苷酸Y的3'部分互补的多核苷酸V,并且其中多核苷酸V的3'末端包含磷酸或其它封闭基团。平端连接导致多核苷酸Y的3'末端共价连接至原始DNA片段的5'磷酸,而多核苷酸V的5'末端与引物延伸产物的3'末端之间不存在连接。任选地,通过用dU糖基化酶孵育以及95℃孵育来降解所复制的DNA链和引物X'。在一些实施方案中,所述孵育在约90℃与100℃之间发生。在另外的实施方案中,将所述混合物加热至介于约90℃与95℃之间,或介于约95℃与100℃之间,或约90℃,或约91℃,或约92℃,或约93℃,或约94℃,或约95℃,或约96℃,或约97℃,或约98℃,或约99℃,或约100℃。

[0063] 本发明用于NGS文库制备的另一种方法包括两个顺序的加尾和连接反应(图29),其中第一加尾和连接反应在聚合酶、连接酶、核苷酸D(其中D=dATP、dTTP或dGTP)以及衰减子-衔接子分子的存在下进行,所述衰减子-衔接子分子通过使以下两个多核苷酸退火而形成:多核苷酸X和多核苷酸W(H)_n,其中多核苷酸X包含5'磷酸、3'封闭基团和NGS衔接子序列以及任选的ID标签;并且多核苷酸W(H)_n包含两个序列:与多核苷酸X的5'部分互补的5'序列W以及同聚衰减子序列(H)_n,其中H为A、T或C碱基,并且n=10-30,并且另外包含3'封

闭基团。

[0064] 在反应中,聚合酶会将有限数量的碱基(1至50个dA或dT碱基以及1至50个dG碱基)添加至DNA衬底的3'末端,之后通过连接酶来连接第一衰减子-衔接子分子。在使所述聚合酶和所述连接酶任选热失活之后,添加含有与序列X互补的5'序列X'和位于3'末端处的1至10个H碱基的引物导致引物退火到衔接子序列X并且替代衰减子多核苷酸。此外,引物X'可以包含位于3'末端处的rH封闭碱基以防止利用第二加尾和连接反应进行聚合酶介导的引物加尾。添加DNA聚合酶将使所述引物延伸并且复制衬底的反向链,其中任选地通过EDTA停止反应并且通过基于磁珠的DNA纯化来纯化,之后在退火到第二NGS衔接子Y的第二衰减子的存在下,第二次添加聚合酶来将有限数量的碱基(1至50个dA或dT碱基以及1至50个dG碱基)添加至DNA延伸产物的3'末端,然后通过连接酶来连接包含所述第二NGS衔接子Y的第二衰减子-衔接子分子。任选地,使所述聚合酶和所述连接酶热失活,之后进行基于磁珠的DNA纯化。如上所述并且在另外的实施方案中,通过所述聚合酶添加至DNA衬底的3'末端的碱基的数量为约1个核苷酸到至多约5、10、20、30、40或50个dA、dT或dG核苷酸,或约5个到至多约10、15、20、30、40或50个dA、dT或dG核苷酸,或约10个到至多约15、20、30、40或50个dA、dT或dG核苷酸,或约9个至约12个dA、dT或dG核苷酸,或约6个至约8个dA、dT或dG核苷酸。在另外的实施方案中,通过所述聚合酶添加至DNA衬底的3'末端的碱基的数量为至少约1个、至少约2个、至少约3个、至少约4个、至少约5个、至少约6个、至少约7个、至少约8个、至少约9个、至少约10个、至少约11个、至少约12个、至少约13个、至少约14个、至少约15个、至少约16个、至少约17个、至少约18个、至少约19个、至少约20个、至少约21个、至少约22个、至少约23个、至少约24个、至少约25个、至少约26个、至少约27个、至少约28个、至少约29个、至少约30个、至少约31个、至少约32个、至少约33个、至少约34个、至少约35个、至少约36个、至少约37个、至少约38个、至少约39个、至少约40个、至少约41个、至少约42个、至少约43个、至少约44个、至少约45个、至少约46个、至少约47个、至少约48个、至少约49个或至少约50个dA、dT或dG核苷酸。在另外的实施方案中,通过所述聚合酶添加至DNA衬底的3'末端的碱基的数量为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50个或更多个dA、dT或dG核苷酸。

[0065] 本发明还提供用于在衬底多核苷酸上使用5'加尾随机引物延伸的组合,之后是受控的加尾和连接(图30)进行NGS文库合成的方法,其中在允许与包含以下两个结构域的随机引物杂交的条件下接触完整的或片段化的单链核酸:5'结构域X,其中序列X在各种实施方案中包含NGS衔接子序列和任选的鉴别标签;以及3'结构域,其包含随机序列n,从而允许引物与核酸样品内的任何区域杂交,并且在适当的反应条件下,在聚合酶和核苷酸的存在下,实现引物延伸以及衔接子X在延伸产物的5'末端的引入。引物在各个方面包含5'标记,包括但不限于生物素。在任选的纯化或核苷酸降解步骤之后,在聚合酶、连接酶、核苷酸D(其中D=A、T或G)以及衰减子-衔接子分子的存在下在所述延伸产物上进行加尾和连接反应,所述衰减子-衔接子分子通过使以下两个多核苷酸退火而形成:多核苷酸Y和多核苷酸V(H)_n。多核苷酸Y包含5'磷酸和3'封闭基团,其中序列Y包含第二NGS文库衔接子序列以及任选的鉴别标签。多核苷酸V(H)_n由两个序列组成:与多核苷酸Y的5'部分互补的5'序列V以及同聚衰减子序列(H)_n,其中H为A、T或C碱基,并且n=10-30,并且另外包含3'封闭基团。

在反应中,所述聚合酶将有限数量的碱基(即,约1个至约50个核苷酸)添加至引物延伸产物的3'末端,之后通过连接酶来连接Y/V(H)_n衰减子-衔接子分子,从而完成第一NGS衔接子和第二NGS衔接子的添加。

[0066] 本发明还涵盖一种靶向NGS文库合成的方法:在衬底多核苷酸上使用5'加尾靶特异性引物延伸的组合,之后是受控的加尾和连接(图31),其中完整的或片段化的单链核酸通过包含以下两个结构域的多个靶特异性引物来进行杂交:多个引物中的所有引物共有的5'结构域X,其中序列X包含NGS衔接子序列和任选的鉴别标签;以及对多个引物中的每一个来说独特的3'结构域,各自包含靶特异性序列,从而允许引物与核酸样品内的所需的任意多个靶标杂交,并且在适当的反应条件下,在聚合酶和核苷酸的存在下,实现引物延伸以及衔接子X在延伸产物的5'末端的引入。所述多个引物可以另外包含5'标记,包括但不限于生物素。在任选的纯化或核苷酸降解步骤之后,在聚合酶、连接酶、核苷酸D(其中D=A、T或G)以及衰减子-衔接子分子的存在下进行加尾和连接反应,所述衰减子-衔接子分子通过使以下两个多核苷酸退火而形成:多核苷酸Y和多核苷酸V(H)_n。多核苷酸Y包含5'磷酸和3'封闭基团,其中序列Y包含第二NGS文库衔接子序列以及任选的鉴别标签。多核苷酸V(H)_n由两个序列组成:与多核苷酸Y的5'部分互补的5'序列V以及同聚衰减子序列(H)_n,其中H为A、T或C碱基,并且n=10-30,并且另外包含3'封闭基团。在反应中,所述聚合酶将有限数量的碱基(即,约1个至约50个核苷酸)添加至引物延伸产物的3'末端,之后通过连接酶来连接Y/V(H)_n衰减子-衔接子分子,从而完成两个NGS衔接子在多个靶标中的每个靶标上的添加。

[0067] 还涵盖一种靶向NGS文库合成的方法,所述方法包括受控的同聚物加尾和连接,之后是靶特异性引物延伸和靶特异性平端衔接子连接(图32),其中在聚合酶、连接酶、核苷酸D(其中D=A、T或G)以及衰减子-衔接子分子的存在下进行加尾和连接,所述衰减子-衔接子分子通过使以下两个多核苷酸退火而形成:多核苷酸X和多核苷酸W(H)_n。多核苷酸X包含5'磷酸和3'封闭基团,其中序列X包含NGS文库衔接子序列以及任选的鉴别标签。多核苷酸W(H)_n包含两个序列:与多核苷酸X的5'部分互补的5'序列W,以及同聚衰减子序列(H)_n,其中H为A、T或C碱基,并且n=10-30,并且另外包含3'封闭基团。在反应中,所述聚合酶将有限数量的碱基(即,约1个至约50个核苷酸)添加至核酸衬底的3'末端,之后通过连接酶来连接所述衰减子-衔接子分子。在使聚合酶和连接酶任选热失活之后,在适当的反应条件下添加聚合酶、核苷酸以及多个靶特异性引物导致形成包含多个靶特异性引物的互补序列的片段的双链平末端(在校正DNA聚合酶的存在下)或具有3'dA碱基的双链末端(在DNA聚合酶缺乏校正活性的情况下)。所述多个引物可以另外包含5'标记,包括但不限于生物素。平末端或dT衔接子与所述多个靶特异性产物的连接通过连接酶来实现,其中有待连接的衔接子通过以下两个多核苷酸形成:多核苷酸Y,其中Y为第二NGS衔接子;以及与多核苷酸Y的3'部分互补的多核苷酸V。多核苷酸V的3'末端具有磷酸封闭基团。连接导致多核苷酸Y的3'末端共价连接至多个靶特异性片段的5'磷酸,而多核苷酸V的5'末端与靶特异性引物-延伸产物的3'末端之间未形成连接。任选地,使用NGS衔接子特异性引物通过PCR扩增所实现的多个靶特异性文库产物。

[0068] 在图33中,描绘了涉及受控的加尾和连接步骤的靶特异性NGS文库制备方法的简要内容。方法1总结了图32中描述的方法,并且方法2中具有任选的靶向文库珠粒捕获。方法3总结了一种方法,其中构建了全基因组NGS文库并且之后接着是靶特异性引物延伸和靶向

文库珠粒捕获以及扩增。方法4和方法5描绘了图31中所呈现的方法的替代工作流程。在方法4中,多个生物素化的靶特异性引物延伸来自片段化的核酸样品的选择性区域,之后是第一NGS衔接子的平端连接或TA连接,珠粒捕获,然后是用以添加第二NGS衔接子的受控的加尾和连接。方法5与方法4相似,只是在第一步骤中,靶特异性引物包含具有NGS衔接子序列的5'尾部。在方法6中,在进行受控的加尾和连接,以引入第一NGS衔接子和衔接子特异性引物延伸之后,进行变性,之后进行第二NGS衔接子5'加尾的靶特异性引物延伸来实现 NGS文库,其可以进一步进行扩增。在用于靶特异性NGS文库制备的任何方法中,预期的是允许一次至多次使用本文所描述的衰减子分子。在另外的实施方案中,允许使用一次本文所描述的衰减子分子来将文库产物固定至表面。

[0069] 对于使用受控的加尾和连接来引入NGS衔接子序列的所公开方法进行全基因组或靶向文库构建的各种实施方案中的任何一个来说,第二衔接子序列通过第二受控的加尾和连接来引入或通过在引物延伸反应之后平端连接或TA连接至双链衬底来引入。如图37中所示,设想了用于选择性地连接一个链或连接两个链的平端和TA衔接子连接的各种方法。因此,在各种实施方案中,衔接子序列包括平末端或T- 突出末端(因此允许发生TA连接)。在另外的实施方案中,所述衔接子序列可以是平末端的,具有T碱基的3'突出、5'磷酸或3'基团封闭连接(例如但不限于双脱氧核苷酸)或其组合。

[0070] 本发明进一步提供一种使衬底多核苷酸延伸的方法,所述方法包括:(1)在允许所述衬底多核苷酸延伸来为所述衬底加尾的条件下,用以下各项孵育包含所述衬底多核苷酸的混合物:(i)聚合酶;(ii)组合物,其包含衰减子分子,所述衰减子分子包含衰减子序列并且进一步包含定位在所述衰减子序列附近并且与单独的多核苷酸上的衔接子序列X 互补的序列W;所述组合物进一步包含衔接子分子,所述衔接子分子包含与序列V互补的序列Y,其中序列V具有与Y相同的长度或小于与序列Y相同的长度,所述衔接子分子是与所述衰减子-衔接子分子分开的分子;以及(iii)脱氧核苷酸,其与所述衰减子分子的所述衰减子序列互补;(2)将所述衔接子序列X连接至所述衬底多核苷酸并且使所述衰减子分子与所述单独多核苷酸解离;(3)在其中引物与所述衬底多核苷酸杂交的条件下,添加与所述衬底多核苷酸中的序列互补的引物;(4)添加聚合酶和脱氧核苷酸,以由所述引物进行聚合酶延伸,以产生与所述衬底多核苷酸互补的第二链多核苷酸并且产生双链衬底分子;(5)将所述衔接子分子连接至所述双链衬底分子;(6)任选地使所述第二链多核苷酸降解。在一些实施方案中,所述引物与所述衬底多核苷酸中的序列充分互补,以在适当的条件下与序列X杂交。在另外的实施方案中,所述引物是靶特异性引物,其与所述衬底分子中序列X之外的序列充分互补以在适当的条件下与所述序列杂交。在另外的实施方案中,所述衬底多核苷酸为单链DNA多核苷酸,并且在另外的实施方案中,所述衬底多核苷酸为核糖核酸(RNA)。

[0071] 还提供了一种包括本文所公开的任何组合物的试剂盒。

附图说明

[0072] 图1描绘了在长的(>20b)互补的聚(dT)多核苷酸的存在下进行的衰减的聚合酶介导的聚(dA)DNA加尾。所述图例示了(不限于)使用TdT 酶进行加尾反应。

[0073] 图2描绘了使用短的(12-14b)互补的聚(dT)多核苷酸进行的衰减的聚合酶介导的聚(dA)加尾。所述图例示了(不限于)使用TdT酶进行加尾反应。

- [0074] 图3描绘了在短的聚(dT)衰减子分子的存在下进行的聚(dA)加尾的期望动力学。
- [0075] 图4描绘了一种方法,其中衰减的聚合酶介导的聚(dA)加尾是用含有dU碱基的可降解的衰减子多核苷酸来进行的。所述图例示了(不限于)使用TdT酶进行加尾反应。
- [0076] 图5描绘了使用长的(>20b)互补的衰减子多核苷酸进行的衰减的聚合酶介导的聚(dT)、聚(dG)以及聚(dC)加尾。所述图例示了(不限于)使用TdT酶进行加尾反应。
- [0077] 图6描绘了使用可降解的衰减子核糖多核苷酸进行的衰减的聚合酶介导的聚(dA)、聚(dT)、聚(dG)以及聚(dC)加尾。所述图例示了(不限于)使用TdT酶进行加尾反应。
- [0078] 图7描绘了使用互补的DNA聚(dT)₃₀多核苷酸对RNA衬底进行的衰减的聚(A)-聚合酶介导的聚(rA)加尾。
- [0079] 图8描绘了使用互补的DNA聚(dA)₃₀多核苷酸对RNA衬底进行的衰减的聚(U)-聚合酶介导的聚(rU)加尾。
- [0080] 图9描绘了使用有限加尾反应将3'末端衔接子连接至单链DNA或RNA分子。
- [0081] 图10描绘了使用偶联的有限的加尾-连接反应或有限的加尾-聚合酶延伸反应将单链DNA和RNA共价固定至固体支持物。
- [0082] 图11描绘了通过平末端或dA/dT连接进行的第二衔接子连接。
- [0083] 图12描绘了通过偶联的有限的加尾-连接反应进行的第二衔接子连接。gDNA表示基因组DNA。
- [0084] 图13描绘了通过有限的加尾-聚合酶-延伸反应进行的第二衔接子连接。
- [0085] 图14描绘了在长的聚(dT)衰减子分子的存在下通过聚合酶引入的聚(dA)序列的预测长度随着反应温度的变化而变化。所述图例示了(不限于)使用TdT酶进行加尾反应。
- [0086] 图15示出了在缺乏和存在长的可降解的DNA衰减子分子(TTTTTT)₆TTT(SEQ ID NO:43)的情况下通过TdT酶对单链DNA模板进行聚(dA)加尾的实验测定的时间过程。
- [0087] 图16示出了在短的衰减子分子的存在下通过TdT对单链DNA模板进行的受控的聚(dA)加尾:a.衰减子长度和反应温度的影响;b.使用短的衰减子的长的孵育时间的影响。
- [0088] 图17示出了双链DNA模板的受控和不受控的聚(dA)TdT加尾。
- [0089] 图18示出了具有随机化末端的单链DNA模板的受控的聚(dA)TdT加尾。
- [0090] 图19示出了使用聚(dT)、聚(dC)以及聚(dG)尾部的单链DNA模板的受控的TdT加尾。
- [0091] 图20示出了通过大肠杆菌聚(A)聚合酶对单链RNA模板进行的受控的聚(rA)加尾。
- [0092] 图21示出了通过酵母(栗酒裂殖酵母(S.pombe))聚(U)聚合酶对单链RNA模板进行的受控的聚(rU)加尾;a.在短的DNA衰减子存在下的时间过程;b.长的DNA和RNA衰减子的影响;c.长的RNA寡核苷酸衰减子的影响。
- [0093] 图22示出了同步的受控的DNA TdT加尾以及与衰减子-衔接子复合物在溶液和固相中的连接。
- [0094] 图23示出实验数据,所述实验数据示出了同步的受控的聚(A)聚合酶加尾以及单链RNA模板与衰减子-衔接子复合物在溶液中的连接。
- [0095] 图24描绘了示出单链DNA和RNA的同步的受控的加尾、连接以及固定的过程的图:a.使用在溶液中的衰减子-衔接子复合物(DNA);b.使用固定至磁珠的衰减子-衔接子复合物(DNA);c.使用在溶液中的衰减子-衔接子复合物(RNA)。所述图例示了(不限于)使用TdT

酶进行加尾反应。

[0096] 图25描绘了一种NGS文库合成的方法:使用受控的同聚物加尾和连接,之后是衬底多核苷酸的环化。

[0097] 图26示出了一种用于NGS文库合成的替代方法:使用受控的同聚物加尾,之后是聚合酶延伸和环化。

[0098] 图27描绘了一种NGS文库合成方法:使用受控的同聚物加尾和连接,之后是反向链合成和平端衔接子连接。

[0099] 图28示出了一种用于NGS文库构建的替代方法,所述替代方法包括受控的加尾和聚合,之后是反向链合成和平端连接。

[0100] 图29描绘了另一种NGS文库制备方法,所述方法包括两个顺序的加尾和连接反应。

[0101] 图30是通过随机引物延伸以及延伸产物的受控的加尾和连接来制备片段NGS文库的示意图。

[0102] 图31是通过靶特异性引物延伸以及延伸产物的受控的加尾和连接来制备靶向NGS文库的示意图。

[0103] 图32为使用受控的加尾和连接反应,之后是复制和衔接子连接来制备靶向NGS文库的示意图。

[0104] 图33为用于使用如本发明所设想的受控的加尾-衔接子连接反应来制备靶向NGS文库的各种方法的示意图。

[0105] 图34示出了与实施例12凝胶1有关的实验数据,所述实施例是使用包含另外的具有随机碱基组成的3'结构域的衰减子-衔接子分子进行的受控的加尾和连接反应。

[0106] 图35示出了与实施例12凝胶2有关的实验数据,所述实施例是使用包含另外的具有随机碱基组成的3'结构域的衰减子-衔接子分子进行的受控的加尾和连接反应。

[0107] 图36示出了与使用二核苷酸衰减子-衔接子的受控的加尾和连接反应有关的实验数据。

[0108] 图37描绘了作为全基因组或靶向文库制备的部分的平端或TA衔接子连接的各种方法。

[0109] 图38示出了方案1。

具体实施方式

[0110] 本文提供一种包含核酸聚合酶和衰减子分子的组合物。所述组合物用于一种方法,所述方法用于以受控方式将一个或多个核苷酸添加至衬底多核苷酸,从而将所需数量的核苷酸添加至衬底多核苷酸。通过举例并且非限制性地,通过添加衰减子分子的延长反应混合物来调节使用核酸聚合酶进行的多核苷酸链的延长,所述衰减子分子结合至由聚合酶产生的新添加的尾部序列,从而形成双链体结构并且因此降低聚合过程的速率。因此,控制了反应速率并且将具有所需有限大小的尾部序列添加至反应混合物中的衬底多核苷酸,并且添加至反应混合物中的衬底多核苷酸的尾部具有非常窄的大小分布。

[0111] 本发明提供允许对通过核酸聚合酶将尾部序列添加至衬底多核苷酸的末端进行衰减和控制的方法和试剂。本发明还提供用于用作方法的基础的反应的组合物,以及设计来执行方法的试剂盒,以用于使用核酸聚合酶来将如本文所描述的尾部序列添加至衬底多

核苷酸的大小受控的加尾。组合物和方法以及用于执行方法的试剂盒提供尾部序列至衬底多核苷酸的有效并且受控的连接。

[0112] 如本文所使用的术语“加尾”可与术语“受控加尾”和“有限加尾”互换。

[0113] 本文中应注意,除非上下文另有明确指示,否则在本说明书和附加权利要求中使用的单数形式“一个”、“一种”以及“所述”包括复数个指示物。

[0114] 还应当注意,本文所使用的术语“约”应理解为指的是近似。在提及本发明的分子(例如但不限于衰减子分子)时的“使……不稳定”指的是使得容易断裂。通过例如但不限于在高温(约80℃或更高)下孵育分子,用脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶孵育分子或其组合而发生断裂。

[0115] 核酸聚合酶

[0116] 本发明涵盖一种包含衰减子分子和核酸聚合酶的组合物。本发明的方法还包括利用另外的核酸聚合酶的那些方法。可以将特异性同聚序列添加至核酸的3'末端的任何聚合酶均预期用于本文所描述的方法。

[0117] 在一些方面,核酸聚合酶为DNA聚合酶,并且在一个具体的方面,DNA聚合酶为末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)。还预期的是,核酸聚合酶为RNA聚合酶,并且在这些方面,RNA聚合酶选自由聚(A)聚合酶和聚(U)聚合酶组成的组。在一个具体方面,RNA聚合酶为RNA特异性核糖核苷酸转移酶。这些聚合酶全部表示模板依赖性聚合酶的家族。

[0118] 就酶可以将特异性同聚序列添加至核酸的3'末端来说,可用于实践本发明的酶的非限制性实例包括但不限于:末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)、大肠杆菌聚(A)聚合酶、粟酒裂殖酵母聚(U)聚合酶以及酵母聚(A)聚合酶。将重复序列添加至衬底的3'末端可以通过DNA端粒酶来进行。

[0119] 可用于实践本文所公开的方法的其它聚合酶包括但不限于:Deep VentR™ DNA聚合酶、LongAmp™ Taq DNA聚合酶、Phusion™高保真DNA聚合酶、Phusion™热启动高保真DNA聚合酶、VentR® DNA聚合酶、DyNAzyme™ II热启动DNA聚合酶、Phire™热启动DNA聚合酶、Crimson LongAmp™ Taq DNA聚合酶、DyNAzyme™ EXT DNA聚合酶、LongAmp™ Taq DNA聚合酶、具有标准Taq(不含Mg)缓冲液的Taq DNA聚合酶、具有标准Taq缓冲液的Taq DNA聚合酶、具有ThermoPol II(不含Mg)缓冲液的Taq DNA聚合酶、具有ThermoPol缓冲液的Taq DNA聚合酶、Crimson Taq™ DNA聚合酶、具有(不含Mg)缓冲液的Crimson Taq™ DNA聚合酶、VentR®(外切)DNA聚合酶、Hemo KlenTaq™、Deep VentR™(外切)DNA聚合酶、ProtoScript® AMV 第一链cDNA合成试剂盒、ProtoScript® M-MuLV第一链cDNA合成试剂盒、Bst DNA聚合酶、全长Bst DNA聚合酶、具有ThermoPol缓冲液的大片段Taq DNA聚合酶、9°Nm DNA聚合酶、Crimson Taq™ DNA聚合酶、具有(不含Mg)缓冲液的Crimson Taq™ DNA聚合酶、Deep VentR™(外切)DNA聚合酶、Deep VentR™ DNA聚合酶、DyNAzyme™ EXT DNA聚合酶、DyNAzyme™ II热启动DNA聚合酶、Hemo KlenTaq™、Phusion™高保真DNA聚合酶、Phusion™热启动高保真DNA聚合酶、Sulfolobus DNA聚合酶IV、Therminator™ γ DNA聚合酶、Therminator™ DNA聚合酶、Therminator™ II DNA聚合酶、Therminator™ III DNA聚合酶、VentR® DNA聚合酶、VentR®(外切)DNA聚合酶、Bst DNA聚合酶、大片段DNA聚合酶I(大肠杆菌)、DNA聚合酶I、大(Klenow)片段、Klenow片段(3'→5'外切)、phi29DNA聚合酶、

T4DNA聚合酶、T7DNA聚合酶(未修饰)、逆转录酶和RNA聚合酶、AMV逆转录酶、M-MuLV逆转录酶、phi6RNA聚合酶(RdRP)、SP6RNA聚合酶以及T7RNA聚合酶。

[0120] 可用于实践本发明的方法的连接酶包括但不限于:T4DNA连接酶、T4RNA连接酶、大肠杆菌DNA连接酶以及大肠杆菌RNA连接酶。

[0121] 衰减子分子

[0122] 本发明提供包含衰减子分子(本文可与“衰减子多核苷酸”互换使用)的组合物和方法。在各个方面,衰减子为多核苷酸、固定的分子、多肽、多糖、线性分子、环状分子、单链分子、部分双链分子、肽核酸、裂褶多糖、锁核酸和/或其组合。

[0123] 添加至衬底多核苷酸的核苷酸的数量取决于反应进行时所处的条件。在一些方面,衰减子分子是与利用组合物中的聚合酶活性来添加至衬底多核苷酸的序列杂交的多核苷酸,其中添加至衬底多核苷酸的核苷酸的数量基本上等于尾部序列可以与之缔合的衰减子分子中的核苷酸的数量。在一些方面,添加至衬底多核苷酸的核苷酸的数量基本上等于尾部序列可以与之缔合的衰减子分子中的核苷酸的数量的倍数。通过举例并且非限制性地,如果衰减子分子的长度为13个核苷酸,那么添加至衬底多核苷酸的核苷酸的数量基本上为13个核苷酸。然而,取决于反应进行时所处的条件,添加至衬底多核苷酸的核苷酸的数量为13的倍数,或基本上为26(衰减子分子长度的两倍),或基本上为39(衰减子分子长度的三倍),或基本上为52(衰减子分子长度的四倍)或衰减子分子长度的更多倍。因此,在一些方面,衬底多核苷酸的尾部序列与一个以上衰减子分子相互作用。在一些方面,添加至衬底多核苷酸尾部的核苷酸的数量小于衰减子分子的长度。

[0124] 在一些方面,添加至衬底多核苷酸的核苷酸的数量不由衰减子的长度决定,而是由反应进行时所处的温度和/或盐浓度决定。在一些方面,较高的温度和较低的盐浓度将使更多的核苷酸添加至衬底多核苷酸的尾部。设想的是,添加至衬底多核苷酸尾部的核苷酸的数量将一直增加直到达到某一数量,所述数量由衬底多核苷酸与衰减子分子之间形成稳定双链体时所处的条件(即,温度和/或盐浓度)决定。用衰减子分子形成稳定的双链体抑制了核苷酸进一步添加至衬底多核苷酸的尾部,并且因此稳定双链体的 T_m 规定了添加至衬底多核苷酸尾部的核苷酸的数量。

[0125] 在另外的实施方案中,衰减子分子进一步包含如下文描述的衔接子序列。在其中衰减子分子为多核苷酸的方面,预期的是多核苷酸的同聚部分是“衰减子”部分。在其中多核苷酸包含除了同聚序列之外的核苷酸的方面,多核苷酸本文称为“衰减子-衔接子”分子。另外的核苷酸可以是同一多核苷酸的部分,或可以存在于彼此杂交的两个单独的多核苷酸中。因此,在另外的实施方案中,衰减子分子和衔接子分子(其包含衔接子序列)是至少部分杂交在一起的两个单独的多核苷酸。在各种实施方案中,单个多核苷酸包含衰减子部分和衔接子序列。在各个方面,多核苷酸形成发夹结构以产生部分双链的多核苷酸。在这个发夹构型中,衰减子部分是单链的,并且衔接子序列是双链的。

[0126] 在另外的实施方案中,衰减子或衰减子-衔接子分子包含二核苷酸聚合物序列而非同聚物序列。因此,在各种实施方案中,本发明预期衰减子的二核苷酸部分包含多个随机序列,所述随机序列包含以下二核苷酸组合:(i) dG或dC;(ii) dA或dT;(iii) dG或dT;(iv) dG或dA;(v) dA或dC;或(vi) dC或dT。在各种实施方案中,二核苷酸序列包含核糖核苷酸与脱氧核糖核苷酸的混合物。在这些实施方案中,进一步预期用于加尾反应的核苷酸混合物包

括与衰减子的同聚部分中所使用的那些互补的核苷酸。在加尾过程期间,生成了包含与二核苷酸衰减子互补的二核苷酸的多个随机尾部序列。在本发明中,参考同聚物序列或同聚物或二核苷酸序列描述了各种实施方案。然而,本领域工作人员或技术人员将认识到,在仅描述了一种同聚物的情况下,可以使用如本文所描述的具有修饰的二核苷酸序列来容易地执行所述方法。

[0127] 在另外的实施方案中,衰减子或衰减子-衔接子分子进一步包含位于其3'末端的另外的序列,其中另外的序列不是同聚物或二核苷酸序列,但包含随机核苷酸序列,所述随机核苷酸序列在各个方面包含核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸或其组合。另外的随机序列的长度为约1个核苷酸至约50个核苷酸或更多,或约1个核苷酸至约5个核苷酸,或约1个核苷酸至约10、20、30、40或50个核苷酸,或约5个核苷酸至约10个核苷酸,或约4个核苷酸至约7个核苷酸,或约5个核苷酸至约15个核苷酸,或约10个核苷酸至约15个核苷酸,或长度为约10个核苷酸至约20、30、40或50个核苷酸,或约5个核苷酸至约10、20、30、40或50个核苷酸,或长度为约10个核苷酸至约20、30、40或50个核苷酸,或长度为约20个核苷酸至约30、40或50个核苷酸。在另外的实施方案中,另外序列的长度为约1个、约2个、约3个、约4个、约5个、约6个、约7个、约8个、约9个、约10个、约11个、约12个、约13个、约14个、约15个、约16个、约17个、约18个、约19个、约20个、约21个、约22个、约23个、约24个、约25个、约26个、约27个、约28个、约29个、约30个、约31个、约32个、约33个、约34个、约35个、约36个、约37个、约38个、约39个、约40个、约41个、约42个、约43个、约44个、约45个、约46个、约47个、约48个、约49个、约50个或更多个核苷酸。在另外的实施方案中,另外序列的长度为至少约1个、至少约2个、至少约3个、至少约4个、至少约5个、至少约6个、至少约7个、至少约8个、至少约9个、至少约10个、至少约11个、至少约12个、至少约13个、至少约14个、至少约15个、至少约16个、至少约17个、至少约18个、至少约19个、至少约20个、至少约21个、至少约22个、至少约23个、至少约24个、至少约25个、至少约26个、至少约27个、至少约28个、至少约29个、至少约30个、至少约31个、至少约32个、至少约33个、至少约34个、至少约35个、至少约36个、至少约37个、至少约38个、至少约39个、至少约40个、至少约41个、至少约42个、至少约43个、至少约44个、至少约45个、至少约46个、至少约47个、至少约48个、至少约49个、至少约50个或更多个核苷酸。在另外的实施方案中,另外序列的长度为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50或更多个核苷酸。

[0128] 将理解,并非给定反应中所使用的所有衰减子或衰减子-衔接子分子的大小都是统一的。因此,在各种实施方案中,衰减子分子的同聚物部分和另外序列部分的长度各自为约1个核苷酸至约500个核苷酸。在另外的实施方案中,本发明预期,为多核苷酸的衰减子分子包含同聚物部分和另外序列部分,它们各自为至少1个核苷酸到至多约5、10、20、30、50、100、200、300或500个核苷酸,至少2个核苷酸到至多约5、10、20、30、50、100、200、300或500个核苷酸,至少5个核苷酸到至多约10、20、30、50、100、200、300或500个核苷酸,至少5个核苷酸到至多约10、15、20、25、30、35、40、45或50个核苷酸,至少10个到至多约15、20、25、30、35、40、45或50个核苷酸,至少10个到至多约20、30、40、50、100、200、300或500个核苷酸,至少20个到至多约30、40、50、100、200、300或500个核苷酸,至少50个到至多约70、100、200、300或500个核苷酸或至少50个到至多约100、300、400或500个核苷酸。

[0129] 预期的是,如本文所使用的“杂交”涵盖衰减子分子与衬底多核苷酸的尾部序列之间的任何缔合。通过举例并且非限制性地,缔合可能起因于Watson-Crick碱基配对,或衰减子分子与衬底多核苷酸如DNA、RNA以及肽核酸(PNA)之间的其它类型的碱基配对。

[0130] 在一些实施方案中,衰减子分子为多核苷酸并且所述多核苷酸在严格的条件下与衬底多核苷酸的尾部部分杂交。如本文所使用的“严格的条件”可以由本领域普通技术人员实验测定,并且将基于(例如但不限于)衰减子分子和衬底多核苷酸尾部序列的长度、衰减子分子和衬底多核苷酸的浓度、杂交缓冲液中的盐浓度(即,离子强度)、执行杂交时所处的温度、执行杂交的时间长度,以及影响衰减子分子和衬底多核苷酸尾部序列的表面电荷的因素的存在而发生变化。一般来说,严格条件是其中衬底多核苷酸的尾部序列相对于衰减子分子的任何其它区域来说能够优先并以较高亲和力结合至其互补序列的那些条件。用于与具有20个碱基的衬底多核苷酸序列的尾部序列的其补体杂交的示例性严格的条件包括但不限于约50mM盐(Na^+)以及约60°C的退火温度。对于更长的序列来说,在更高的温度下实现特异性杂交。一般来说,严格的条件为使得退火在低于衬底多核苷酸的解链温度约5°C下执行的条件。“解链温度”是与衬底多核苷酸互补的衰减子分子的50%在平衡时在限定的离子强度、pH以及浓度下与衬底多核苷酸解离时所处的温度。如下文进一步描述,在各个方面,进行杂交和延伸时所处的温度与核苷酸至衬底多核苷酸的添加相关。

[0131] 在某些实施方案中,在衰减子分子为多核苷酸的情况下,衰减子多核苷酸是单链的或至少部分双链的,因为双链多核苷酸能够与添加至衬底多核苷酸的尾部序列缔合。在另外的实施方案中,衰减子分子为环状分子,所述环状分子包含能够与添加至衬底多核苷酸的尾部序列缔合的同聚核苷酸序列。

[0132] 在另外的实施方案中,为多核苷酸的衰减子分子包含选自由以下组成的组的核苷酸:2'-脱氧胸苷5'-一磷酸(dTMP)、2'-脱氧鸟苷5'-一磷酸(dGMP)、2'-脱氧腺苷5'-一磷酸(dAMP)、2'-脱氧胞苷5'-一磷酸(dCMP)、2'-脱氧尿苷5'-一磷酸(dUMP)、胸苷一磷酸(TMP)、鸟苷一磷酸(GMP)、腺苷一磷酸(AMP)、胞苷一磷酸(CMP)、尿苷一磷酸(UMP)、碱基类似物以及其组合。还预期的是,衰减子分子多核苷酸包含如本文所定义的修饰的核苷酸。

[0133] 在相关方面,衰减子分子包含同聚分子,如聚2'-脱氧腺苷5'-一磷酸(dAMP)(聚dA)、聚2'-脱氧胸苷5'-一磷酸(dTMP)(聚dT)、聚2'-脱氧胞苷5'-一磷酸(聚dC)、聚2'-脱氧鸟苷5'-一磷酸(聚dG)、聚2'-脱氧尿苷5'-一磷酸(聚dU)、聚腺苷一磷酸(聚rA)、聚尿苷一磷酸(聚U)、聚胞苷一磷酸(聚rC)、聚鸟苷一磷酸(聚rG)或包含dA与rA碱基,或dT、dU与U碱基,或dC与rC碱基,或dG与rG碱基的组合的杂聚分子。

[0134] 在各个方面,衰减子分子包含1、5、10、20、30、50、100或更多个核苷酸。事实上,本发明预期为多核苷酸的衰减子分子包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、

800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000或更多个核苷酸。在另外的实施方案中,本发明预期为多核苷酸的衰减子分子包含至少1个核苷酸到至多约5、10、20、50、100、200、500或1000个核苷酸,至少2个核苷酸到至多约5、10、20、50、100、200、500或1000个核苷酸,至少5个核苷酸到至多约10、20、50、100、200、500或1000个核苷酸,至少5个核苷酸到至多约10、15、20、25、30、35、40、45或50个核苷酸,至少10个到至多约15、20、25、30、35、40、45或50个核苷酸,至少10个到至多约20、30、40、50、100、200、500或1000个核苷酸,至少20个到至多约30、40、50、100、200、500或1000个核苷酸,至少50个到至多约70、100、200、500、700或1000个核苷酸或至少50个到至多约100、500、750、800或1000个核苷酸。

[0135] 在各个方面,衰减子分子包含封闭基团。如本文所使用的封闭基团是阻止通过酶进行的延伸的部分,所述酶能够通过添加核苷酸合成多核苷酸。封闭基团包括但不限于:磷酸基团、双脱氧核苷酸、核糖核苷酸(在使用TdT酶的方面)、脱氧核苷酸(在使用聚(A)和/或聚(U)聚合酶的方面)、氨基、三碳或六碳乙二醇间隔区(并且在一方面,六碳乙二醇间隔区为己二醇)以及反向脱氧胸苷(dT)。

[0136] 在本发明的另一方面,衰减子分子是可降解的。在各个方面,可降解的衰减子分子包含dU碱基并且降解是通过与dU糖基化酶接触,之后在高于80℃的温度下孵育,或通过与dU糖基化酶与脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶的混合物接触而引起的。

[0137] 还预期的是,在一些实施方案中,衰减子分子包含核糖核苷酸并且具有可用核糖核酸酶降解的序列。在各个方面,在对于核糖核酸酶活性充足的条件下,核糖核酸酶选自自由以下组成的组:RNase H、RNase HII、RNase A以及RNase T1。在相关方面,衰减子分子包含脱氧核糖核苷酸并且具有可用DNA特异性核酸酶降解的序列。在一些方面,DNA特异性核酸酶为DNase I。

[0138] 在另外的实施方案中,衰减子分子进一步包含衔接子序列、鉴定标签序列或两者。“衔接子序列”提供用于核酸片段的扩增和测序的引发序列并且在一些方面用于下一代测序应用。在另外的方面,“衔接子序列”用作RNA分子的生成的启动子序列,其中启动子序列例如但不限于T7启动子序列或SP6启动子序列。本领域中已知的任何RNA启动子设想为衔接子序列。

[0139] 在一些实施方案中,“鉴定标签序列(identifier tag sequence)”是独特地鉴定特定衬底或衰减子分子的序列。在一方面,鉴定标签序列为条形码。

[0140] 在一些方面,衰减子分子为多肽。如本文所使用的,术语“多肽”是指肽、蛋白质、氨基酸的聚合物以及天然衍生、合成产生或重组产生的抗体。多肽还包括脂蛋白和翻译后修饰的蛋白质,例如像糖基化蛋白以及具有D-氨基酸、修饰的、衍生的或非天然存在的呈D-或L-构型的氨基酸和/或肽模拟单元作为其结构的部分的蛋白质或蛋白物质。

[0141] 对于蛋白质来说,所预期的衰减子分子包括全长蛋白质以及其片段,所述片段保留了全长蛋白质的所需特性。还设想了融合蛋白,其包括其中一个融合补体为片段或模拟物的融合蛋白。

[0142] 抗体衰减子分子包括全长抗体的片段和衍生物。具体涵盖的片段和衍生物包括但不限于:Fab'片段、F(ab)₂片段、Fv片段、Fc片段、一个或多个互补决定区(CDR)片段、单独重链、单独轻链、二聚重链和轻链(与完整抗体中发现的异四聚重链和轻链相反)、单链抗体

(scAb)、人源化抗体(以及以人源化抗体的方式修饰但所得的抗体与非人物种中的抗体更为相似的抗体)、螯合重组抗体(CRAB)、双特异性抗体和多特异性抗体,以及本领域中已知的其它抗体衍生物或片段。

[0143] DNA和RNA结合蛋白预期用于本发明的方法和组合物中。DNA结合蛋白是包含DNA结合结构域并且因此对单链DNA具有特定或一般亲和力的蛋白质[Travers,DNA-protein Interactions.Springer,1993; Pabo等,Protein-DNA recognition.Annu Rev Biochem..53:293-321 (1984)]。结合至同聚序列的多肽是本领域中已知的[Lobanekov等,Eur J Biochem.159(1):181-8(1986);Travers,Annu Rev Biochem,58: 427-452 (1989);Ostrowski等,Proc.Natl.Acad.Sci. (USA) 98(16): 9044-9049(2001)],并且预期用于本文。

[0144] RNA结合蛋白通常是通过RNA识别基序(RRM)与双链或单链RNA缔合的胞质蛋白和核蛋白。RNA结合蛋白可以调节RNA的翻译以及翻译后事件,例如但不限于RNA剪接和编辑。RNA结合蛋白的一些实例包括但不限于结合RNA的翻译起始因子、聚A-结合蛋白、snRNP以及双链的RNA特异性腺苷脱氨酶(ADAR)。

[0145] 本发明预期的另一种类型的衰减子分子是裂褶多糖,其可以与聚(C)、聚(A)、聚(dA)以及聚(dT)同聚物形成非Watson-Crick型大分子复合物。裂褶多糖(SPG)是分别在水中作为三螺旋存在并且在二甲基亚砜(DMSO)中作为单链存在的天然 β -(1,3)-D-葡聚糖[Matsumoto等,Biochim Biophys Acta.1670(2):91-104(2004)]。裂褶多糖通过 β -1,6-糖苷键而具有葡萄糖侧链。已显示,裂褶多糖可以与单链多核苷酸形成复合物。在多核苷酸的存在下,单链SPG在水溶液中形成由两个SPG链和一个多核苷酸链组成的三链复合物。裂褶多糖可以通过氢键合和疏水性相互作用来与单链多核苷酸形成三链复合物。已显示,多核苷酸在与裂褶多糖形成复合物的过程中受到保护而免受核酸酶攻击,并且裂褶多糖提高了反义效率[Sakurai等,Nucleic Acids Research Supplement No.1:223-224(2001)]。

[0146] 不管衰减子分子的类型如何,预期的是,在一些方面,如下文所描述将衰减子分子固定在支持物上。

[0147] 衬底多核苷酸

[0148] 衬底多核苷酸是如下文所描述的多核苷酸、修饰的多核苷酸或其组合。在各种实施方案中,衬底多核苷酸为DNA、RNA或其组合。尾部添加至其上的衬底多核苷酸是单链或双链的。在另外的方面,衬底多核苷酸可以是三螺旋、G-四联体或其它多链结构。在另一个实施方案中,衬底多核苷酸是经过化学处理的核酸,包括但不限于其中衬底多核苷酸是通过NGS检测甲基化状态的经过亚硫酸氢盐处理的DNA的实施方案。

[0149] 预期的是,衬底多核苷酸是从天然存在的来源获得的或它们可以是合成的。天然存在的来源是来自原核生物或真核生物的RNA和/或基因组DNA。通过举例并且非限制性地,来源可以是人、小鼠、病毒、植物或细菌。在各个方面,衬底多核苷酸被加尾,以用于涉及微阵列的测定并且产生用于下一代核酸测序的文库。加尾的衬底多核苷酸还可以用于DNA和RNA的有效克隆。

[0150] 如果衬底多核苷酸的来源是基因组DNA,预期的是,在一些实施方案中,在进行加尾之前将基因组DNA片段化。基因组DNA的片段化是本领域技术人员已知的一般程序,并且例如但不限于通过以下各项在体外进行:剪切DNA(使DNA雾化),用核酸内切酶裂解DNA,超

声处理DNA,加热DNA,使用 α 、 β 、 γ 或其它放射源来辐射DNA,光照,在金属离子的存在下化学裂解DNA,放射裂解以及其组合。基因组DNA的片段化还可以例如但不限于由于凋亡、放射和/或暴露于石棉而在体内发生。根据本文所提供的方法,不要求衬底多核苷酸群体具有统一大小。因此,本发明的方法有效用于不同大小的衬底多核苷酸片段的群体。

[0151] 如本文所公开,衬底多核苷酸是单链的或双链的并且包含3'突出。在一些方面,衬底多核苷酸是双链的并且包含平末端。在其它方面,双链衬底多核苷酸包含3'凹陷末端。在所有方面,衬底多核苷酸包含游离的3'羟基。衬底多核苷酸的突出末端或凹陷末端的长度可以变化。在各个方面,衬底多核苷酸的突出末端或凹陷末端的长度为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个核苷酸。在具体方面,长度为3个核苷酸的3'突出比长度为2个核苷酸或长度为1个核苷酸的3'突出对衬底多核苷酸更有效。在各个方面,衬底多核苷酸群体包括其中单个反应中存在一个以上上文提及的衬底多核苷酸类型的那些。

[0152] 在一些实施方案中,预期的是,衬底多核苷酸如下文所述固定在固体表面上。在一方面,衬底多核苷酸的固定由如下文所描述的其与衰减子-衔接子分子的连接造成。

[0153] 衬底多核苷酸的长度预期介于约3个与约 1×10^6 个核苷酸之间。在一些方面,衬底多核苷酸的长度介于约10个与约3000个核苷酸之间,或介于约40个与约2000个核苷酸之间,或介于约50个与约1000个核苷酸之间,或介于约100个与约500个核苷酸之间,或介于约1000个与约5000个核苷酸之间,或介于约10,000个与50,000个核苷酸之间,或介于约100,000个与 1×10^6 个核苷酸之间。在另外的方面,衬底多核苷酸的长度为至少3个到至多约50、100或1000个核苷酸;或至少10个到至多约50、100或1000个核苷酸;或至少100个到至多约1000、5000或10000个核苷酸;或至少1000个到至多约10000、20000以及50000个核苷酸;或至少10000个到至多约20000、50000以及100,000个核苷酸;或至少20000个到至多约100,000、200,000或500,000个核苷酸;或至少200,000个到至多约500,000、700,000或1,000,000个核苷酸。在各个方面,衬底多核苷酸的长度为约6、约7、约8、约9、约10、约11、约12、约13、约14、约15、约16、约17、约18、约19、约20、约21、约22、约23、约24、约25、约26、约27、约28、约29、约30、约31、约32、约33、约34、约35、约36、约37、约38、约39、约40、约41、约42、约43、约44、约45、约46、约47、约48、约49、约50、约51、约52、约53、约54、约55、约56、约57、约58、约59、约60、约61、约62、约63、约64、约65、约66、约67、约68、约69、约70、约71、约72、约73、约74、约75、约76、约77、约78、约79、约80、约81、约82、约83、约84、约85、约86、约87、约88、约89、约90、约91、约92、约93、约94、约95、约96、约97、约98、约99、约100、约110、约120、约130、约140、约150、约160、约170、约180、约190、约200、约210、约220、约230、约240、约250、约260、约270、约280、约290、约300、约310、约320、约330、约340、约350、约360、约370、约380、约390、约400、约410、约420、约430、约440、约450、约460、约470、约480、约490、约500、约510、约520、约530、约540、约550、约560、约570、约580、约590、约600、约610、约620、约630、约640、约650、约660、约670、约680、约690、约700、约710、约720、约730、约740、约750、约760、约770、约780、约790、约800、约810、约820、约830、约840、约850、约860、约870、约880、约890、约900、约910、约920、约930、约940、约950、约960、约970、约980、约990、约1000、约1100、约1200、约1300、约1400、约1500、约1600、约1700、约1800、约1900、约2000、约2100、约2200、约2300、约2400、约2500、约2600、约2700、约2800、约2900、约3000、约3100、约3200、约3300、约3400、约3500、约3600、约3700、约3800、约3900、约4000、约4100、

约4200、约4300、约4400、约4500、约4600、约4700、约4800、约 4900、约5000、10,000、15,000、20,000、50,000、100,000、150,000、200,000、250,000、300,000、350,000、400,000、450,000、500,000、550,000、600,000、650,000、700,000、750,000、800,000、850,000、900,000、950,000、1,000,000或更多个核苷酸。

[0154] 多核苷酸

[0155] 如本文所使用的术语“多核苷酸”和“核苷酸”或复数形式可与如本文所论述和本领域中另外已知的修饰形式互换。如本文所描述的多核苷酸是指衰减子多核苷酸或衬底多核苷酸,并且在各种实施方案中,包含脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸或其组合。在另外的实施方案中,包含核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸或其组合的衰减子多核苷酸与为 DNA或RNA的衬底多核苷酸结合使用。

[0156] 在某些情况下,本领域使用术语“核碱基”,其包括天然存在的核苷酸以及可以聚合的核苷酸的修饰物。因此,核苷酸或核碱基指的是天然存在的核碱基腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)、胞嘧啶(C)、胸腺嘧啶(T)和尿嘧啶(U),以及非天然存在的核碱基,如黄嘌呤、二氨基嘌呤、8-氧代-N6-甲基腺嘌呤、7-脱氮黄嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤、N4,N4-桥亚乙基胞嘧啶、N',N'-桥亚乙基-2,6-二氨基嘌呤、5-甲基胞嘧啶(mC)、5-(C₃-C₆)-炔基-胞嘧啶、5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、假异胞嘧啶、2-羟基-5-甲基-4-三唑并吡啶、异胞嘧啶、异鸟嘌呤、肌苷,以及Benner等,美国专利号 5,432,272以及Susan M.Freier和Karl-Heinz Altmann,1997, Nucleic Acids Research,第25卷:第4429-4443页中所描述的“非天然存在的”核碱基。术语“核碱基”还不仅包括已知的嘌呤和嘧啶杂环类,而且包括其杂环类似物和互变异构体。另外的天然和非天然存在的核碱基包括美国专利号3,687,808(Merigan等);Sanghvi的第15章,Antisense Research and Application,S.T.Crooke和B.Lebbleu编著,CRC Press,1993;Englisch等,1991,Angewandte Chemie,国际版本,30:613-722(特别参见第622页和第623页,并且参见Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering,J.I.Kroschwitz编著,John Wiley&Sons,1990,第858-859页,Cook,Anti-Cancer Drug Design 1991,6,585-607,所述文献各自以引用的方式整体并入本文)中公开的那些。在各个方面,多核苷酸还包括一种或多种“核苷碱基”或“碱基单元”,其包括可以充当核碱基的化合物如杂环化合物,所述核碱基包括虽然在最传统意义上不是核苷碱基但是却充当核苷碱基的某些“通用碱基”。通用碱基包括3-硝基吡咯、任选取代的吡咯(例如5-硝基吡咯)以及任选取代的次黄嘌呤。其它理想的通用碱基包括吡咯、二唑或三唑衍生物,包括本领域中已知的那些通用碱基。

[0157] 多核苷酸还可包括修饰的核碱基。“修饰的碱基”在本领域中应理解成可以与天然碱基(例如,腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶和/或胸腺嘧啶)配对和/或可以与非天然存在的碱基配对的碱基。示例性的修饰的碱基在EP 1 072 679和WO 97/12896中有所描述,所述专利的公开内容以引用的方式并入本文。修饰的核碱基包括但不限于:5-甲基胞嘧啶(5-me-C),5-羟甲基胞嘧啶,黄嘌呤,次黄嘌呤,2-氨基腺嘌呤,腺嘌呤和鸟嘌呤的6-甲基以及其它烷基衍生物,腺嘌呤和鸟嘌呤的2-丙基以及其它烷基衍生物,2-硫代尿嘧啶、2-硫代胸腺嘧啶和2-硫代胞嘧啶,5-卤代尿嘧啶和5-卤代胞嘧啶,5-丙炔基尿嘧啶和5-丙炔基胞嘧啶以及嘧啶碱基的其它炔基衍生物,6-偶氮尿嘧啶、6-偶氮胞嘧啶和6-偶氮胸腺嘧啶,5-尿嘧啶(假尿嘧啶),4-硫代尿嘧啶,8-卤代基、8-氨基、8-硫醇基、8-硫代烷基、8-羟基和其

它8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤, 5-卤代基尤其是5-溴基、5-三氟甲基和其它5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶, 7-甲基鸟嘌呤和7-甲基腺嘌呤, 2-F-腺嘌呤, 2-氨基腺嘌呤, 8-氮鸟嘌呤和8-氮腺嘌呤, 7-脱氮鸟嘌呤和7-脱氮腺嘌呤以及3-脱氮鸟嘌呤和 3-脱氮腺嘌呤。另外的修饰的碱基包括三环嘧啶类, 如吩噻嗪胞苷 (1H- 嘧啶并[5,4-b][1,4] 苯并噻嗪-2(3H)-酮)、吩噻嗪胞苷 (1H-嘧啶并 [5,4-b][1,4] 苯并噻嗪-2(3H)-酮)、G-形钳如取代的吩噻嗪胞苷 (例如9-(2-氨基乙氧基)-H-嘧啶并[5,4-b][1,4] 苯并噻嗪-2(3H)-酮)、呋唑胞苷 (2H- 嘧啶并[4,5-b] 呋唑-2-酮)、吡啶并呋唑胞苷 (H-吡啶并[3',2':4,5] 吡咯并 [2,3-d] 嘧啶-2-酮)。修饰的碱基还可包括其中嘌呤或嘧啶碱基被其它杂环类替代的那些碱基, 例如7-脱氮腺嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤、2-氨基吡啶以及2-吡啶酮。另外的核碱基包括美国专利号3,687,808中公开的那些, The Concise Encyclopedia Of polymer Science And Engineering, 第 858-859页, Kroschwitz, J.I., 编著, John Wiley&Sons, 1990中公开的那些, Englisch等, 1991, Angewandte Chemie, 国际版本, 30:613中公开的那些, 以及Sanghvi, Y.S., 第15章, Antisense Research and Applications, 第289-302页, Crooke, S.T.和Lebleu, B., 编著, CRC Press, 1993中公开的那些。这些碱基中的某些碱基适用于提高结合亲和力并且包括5-取代的嘧啶、6-氮杂嘧啶以及N-2、N-6和O-6取代的嘌呤, 包括2-氨基腺嘌呤、5-丙炔基尿嘧啶以及5-丙炔基胞嘧啶。5-甲基胞嘧啶取代物已显示出将核酸双链体的稳定性提高0.6℃至1.2℃并且在某些方面与 2'-O-甲氧基乙基糖修饰物结合。参见美国专利号3,687,808、美国专利号4,845,205、5,130,302、5,134,066、5,175,273、5,367,066、5,432,272、5,457,187、5,459,255、5,484,908、5,502,177、5,525,711、5,552,540、5,587,469、5,594,121、5,596,091、5,614,617、5,645,985、5,830,653、5,763,588、6,005,096、5,750,692以及5,681,941,所述专利的公开内容以引用的方式并入本文。

[0158] 制备具有预定序列的多核苷酸的方法是众所周知的。参见例如 Sambrook等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第2版, 1989) 以及F.Eckstein (编著) Oligonucleotides and Analogues, 第1版, (Oxford University Press, New York, 1991)。固相合成方法对于多聚核糖核苷酸和多聚脱氧核糖核苷酸来说均为优选的 (合成DNA的众所周知的方法也适用于合成RNA)。多聚核糖核苷酸还可通过酶法进行制备。也可以将非天然存在的核碱基引入多核苷酸中。参见例如美国专利号 7,223,833; Katz, J.Am.Chem.Soc., 74:2238 (1951); Yamane等, J.Am. Chem.Soc., 83:2599 (1961); Kosturko等, Biochemistry, 13:3949 (1974); Thomas, J.Am.Chem.Soc., 76:6032 (1954); Zhang等, J.Am.Chem. Soc., 127:74-75 (2005); 以及Zimmermann等, J.Am.Chem.Soc., 124: 13684-13685 (2002)。

[0159] 修饰的多核苷酸

[0160] 修饰的多核苷酸预期用于衰减子分子或用于衬底多核苷酸, 其中多核苷酸中的核苷酸单元的一个或多个糖和/或一个或多个核苷酸间键被“非天然存在的”基团替代。在一方面, 本实施方案涵盖了肽核酸 (PNA)。在PNA化合物中, 用含酰胺的骨架替代多核苷酸的糖骨架。参见, 例如美国专利号5,539,082、5,714,331和5,719,262, 以及Nielsen 等, Science, 1991, 254, 1497-1500, 所述文献的公开内容以引用的方式并入本文。

[0161] 预期用于所公开的多核苷酸的核苷酸与非天然核苷酸之间的其它键包括美国专利号4,981,957、5,118,800、5,319,080、5,359,044、5,393,878、5,446,137、5,466,786、5,

514,785、5,519,134、5,567,811、5,576,427、5,591,722、5,597,909、5,610,300、5,627,053、5,639,873、5,646,265、5,658,873、5,670,633、5,792,747以及5,700,920;美国专利公布号20040219565;国际专利公布号W0 98/39352和W0 99/14226; Mesmaeker等, *Current Opinion in Structural Biology* 5:343-355(1995)以及Susan M.Freier和Karl-Heinz Altmann, *Nucleic Acids Research*, 25:4429-4443(1997)中描述的那些,所述文献的公开内容以引用的方式并入本文。

[0162] 多核苷酸的特定实例包括含有修饰的骨架或非天然核苷酸间键的那些多核苷酸。具有修饰骨架的多核苷酸包括在骨架中保留了磷原子的那些多核苷酸以及在骨架中不具有磷原子的那些多核苷酸。在其核苷酸间骨架中不具有磷原子的修饰多核苷酸视为处于“多核苷酸”的含义之内。

[0163] 含有磷原子的修饰的多核苷酸骨架包括,例如,具有通常的3'-5'键的硫代磷酸酯、手性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨烷基磷酸三酯、甲基和其它烷基磷酸酯(包括3'-烯基磷酸酯、5'-烯基磷酸酯和手性磷酸酯、次磷酸酯)、磷酰胺酯(包括3'-氨基磷酰胺酯和氨烷基磷酰胺酯、硫羰磷酰胺酯(thionophosphoramidates))、硫羰烷基磷酸酯(thionoalkylphosphonates)、硫羰烷基磷酸三酯(thionoalkylphosphotriesters)、硒代磷酸酯和硼代磷酸酯(boranophosphates)、这些修饰的多核苷酸骨架的2'-5'连接的类似物,以及具有反向极性的那些修饰的多核苷酸骨架,其中一个或多个核苷酸间键为3'至5'、5'至5'或2'至2'的键。还设想的是具有反向极性的多核苷酸,其在3'-最末端的核苷酸间键处包含一个3'至3'的键,即,单个反向核苷酸残基,其可为无碱基的(核苷酸丢失或被羟基代替)。所设想的还有盐类、混合盐类以及游离酸形式。

[0164] 可教导制备上述含磷的键的代表性美国专利包括:美国专利号 3,687,808、4,469,863、4,476,301、5,023,243、5,177,196、5,188,897、5,264,423、5,276,019、5,278,302、5,286,717、5,321,131、5,399,676、5,405,939、5,453,496、5,455,233、5,466,677、5,476,925、5,519,126、5,536,821、5,541,306、5,550,111、5,563,253、5,571,799、5,587,361、5,194,599、5,565,555、5,527,899、5,721,218、5,672,697和5,625,050,所述专利的公开内容以引用的方式并入本文。

[0165] 不包括磷原子的经过修饰的多核苷酸骨架具有由短链烷基或环烷基核苷间键、混合的杂原子和烷基或环烷基核苷间键,或一个或多个短链杂原子或杂环核苷间键形成的骨架。这些骨架包括:具有吗啉键的骨架;硅氧烷骨架;硫化物、亚砷和砷骨架;甲酰乙酰基和硫代甲酰乙酰基骨架;亚甲基甲酰乙酰基和硫代甲酰乙酰基骨架;核糖乙酰基骨架;含烯烃的骨架;氨基磺酸酯骨架;亚甲基亚胺基和亚甲基胍基骨架;磺酸酯和磺酰胺骨架;酰胺骨架;以及其它具有混合的N、O、S和CH₂组成部分的骨架。在其它实施方案中,多核苷酸具有硫代磷酸酯骨架,并且寡核苷具有杂原子骨架,并且包括在美国专利号5,489,677和5,602,240中所描述的-CH₂-NH-O-CH₂-、-CH₂-N(CH₃)-O-CH₂-、-CH₂-O-N(CH₃)-CH₂-、-CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)-CH₂-以及-O-N(CH₃)-CH₂-CH₂-。参见例如美国专利号5,034,506、5,166,315、5,185,444、5,214,134、5,216,141、5,235,033、5,264,562、5,264,564、5,405,938、5,434,257、5,466,677、5,470,967、5,489,677、5,541,307、5,561,225、5,596,086、5,602,240、5,610,289、5,602,240、5,608,046、5,610,289、5,618,704、5,623,070、5,663,312、5,633,360、5,677,437、5,792,608、5,646,269以及5,677,439,所述专利的公开内容以引用的方式

整体并入本文。

[0166] 在各种形式中,多核苷酸中两个相连的单体之间的键由2至4个(理想情况下是3个)基团/原子组成,所述基团/原子选自 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{NRH}-$ 、 $>\text{C}=\text{O}$ 、 $>\text{C}=\text{NRH}$ 、 $>\text{C}=\text{S}$ 、 $-\text{Si}(\text{R}'')_2-$ 、 $-\text{SO}-$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2-$ 、 $-\text{P}(\text{O})_2-$ 、 $-\text{PO}(\text{BH}_3)-$ 、 $-\text{P}(\text{O},\text{S})-$ 、 $-\text{P}(\text{S})_2-$ 、 $-\text{PO}(\text{R}'')-$ 、 $-\text{PO}(\text{OCH}_3)-$ 以及 $-\text{PO}(\text{NHRH})-$,其中RH选自氢和C1-4烷基,并且R''选自C1-6烷基和苯基。所述键的说明性实例为 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}=($ (当用作至相连单体的键时包括R5)、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ 、 $-\text{NRH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NRH}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{NRH}-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NRH}-$ 、 $-\text{NRH}-\text{CO}-\text{O}-$ 、 $-\text{NRH}-\text{CO}-\text{NRH}-$ 、 $-\text{NRH}-\text{CS}-\text{NRH}-$ 、 $-\text{NRH}-\text{C}(=\text{NRH})-\text{NRH}-$ 、 $-\text{NRH}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{NRH}-\text{O}-\text{CO}-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NRH}-$ 、 $-\text{O}-\text{CO}-\text{NRH}-$ 、 $-\text{NRH}-\text{CO}-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NRH}-$ 、 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NRH}-$ 、 $-\text{CH}=\text{N}-\text{O}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{NRH}-\text{O}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{N}=($ (当用作至相连单体的键时包括R5)、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{NRH}-$ 、 $-\text{CO}-\text{NRH}-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{NRH}-\text{O}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{NRH}-\text{CO}-$ 、 $-\text{O}-\text{NRH}-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{O}-\text{NRH}-$ 、 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{S}-$ 、 $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{O}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-$ 、 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-$ 、 $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}=($ (当用作至相连单体的键时包括R5)、 $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{SO}-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{SO}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{O}-\text{SO}-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{S}(\text{O})_2-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{O}-\text{S}(\text{O})_2-\text{NRH}-$ 、 $-\text{NRH}-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{O}-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{O}-\text{P}(\text{O})_2-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{P}(\text{O},\text{S})-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{P}(\text{S})_2-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-\text{P}(\text{O})_2-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-\text{P}(\text{O},\text{S})-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-\text{P}(\text{S})_2-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{P}(\text{O})_2-\text{S}-$ 、 $-\text{O}-\text{P}(\text{O},\text{S})-\text{S}-$ 、 $-\text{O}-\text{P}(\text{S})_2-\text{S}-$ 、 $-\text{S}-\text{P}(\text{O})_2-\text{S}-$ 、 $-\text{S}-\text{P}(\text{O},\text{S})-\text{S}-$ 、 $-\text{S}-\text{P}(\text{S})_2-\text{S}-$ 、 $-\text{O}-\text{PO}(\text{R}'')-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{PO}(\text{OCH}_3)-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{PO}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{PO}(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{S}-\text{R})-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{PO}(\text{BH}_3)-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{PO}(\text{NHRN})-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{P}(\text{O})_2-\text{NRHH}-$ 、 $-\text{NRH}-\text{P}(\text{O})_2-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{P}(\text{O},\text{NRH})-\text{O}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{P}(\text{O})_2-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{P}(\text{O})_2-\text{CH}_2-$ 以及 $-\text{O}-\text{Si}(\text{R}'')_2-\text{O}-$;其中预期了 $-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NRH}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{NRH}-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{P}(\text{O})_2-\text{O}-\text{O}-\text{P}(-\text{O},\text{S})-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{P}(\text{S})_2-\text{O}-$ 、 $-\text{NRHP}(\text{O})_2-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{P}(\text{O},\text{NRH})-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{PO}(\text{R}'')-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{PO}(\text{CH}_3)-\text{O}-$ 以及 $-\text{O}-\text{PO}(\text{NHRN})-\text{O}-$,其中RH选自氢和C1-4烷基,并且R''选自C1-6烷基和苯基。Mesmaeker等,1995, Current Opinion in Structural Biology, 5: 343-355以及Susan M.Freier和Karl-Heinz Altmann,1997, Nucleic Acids Research, 第25卷:第4429-4443页中给出了另外的说明性实例。

[0167] 多核苷酸的另外其它修饰形式在美国专利申请号20040219565中有详细描述,所述专利申请的公开内容以引用的方式整体并入本文。

[0168] 修饰的多核苷酸还可含有一个或多个取代的糖部分。在某些方面,多核苷酸在2'位置上包含以下中的一个:OH;F;O-、S-或N-烷基;O-、S-或N-烯基;O-、S-或N-炔基;或O-烷基-O-烷基,其中烷基、烯基以及炔基可以是取代或未取代的C₁至C₁₀烷基或C₂至C₁₀烯基和炔基。其它实施方案包括 $\text{O}[(\text{CH}_2)_n\text{O}]_m\text{CH}_3$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{OCH}_3$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ONH}_2$ 以及 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ON}[(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3]_2$,其中n和m为1至约10。其它多核苷酸在2'位置上包含以下中的一个:C1至C10 低级烷基、取代的低级烷基、烯基、炔基、烷芳基、芳烷基、O-烷芳基或O-芳烷基、SH、SCH₃、OCN、Cl、Br、CN、CF₃、OCF₃、SOCH₃、SO₂CH₃、ONO₂、NO₂、N₃、NH₂、杂环烷基、杂环烷芳基、氨基烷基氨基、多烷基氨基、取代的甲硅烷基、RNA裂解基团、报告基因基团、嵌入剂、用于改善多核苷酸的药代动力学特性的基团或用于改善多核苷酸的药效学特性的基团,以及具有类似特性的其它取代基。在一方面,修饰包括2'-甲氧基乙氧基(2'-O-CH₂CH₂OCH₃,也称为2'-O-(2-甲氧乙基)或2'-MOE)(Martin等,1995, Helv. Chim. Acta, 78:486-504),即烷氧基烷氧基。其它修饰包括2'-二甲氨基氧基乙氧基,即 $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{ON}(\text{CH}_3)_2$ 基团,也称为2'-

DMAOE, 以及2'-二甲氨基乙氧基乙氧基(在本领域中也称为2'-0-二甲基-氨基-乙氧基-乙基或2'-DMAEOE), 即2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₃)₂。

[0169] 另外的其它修饰包括2'-甲氧基(2'-O-CH₃)、2'-氨丙氧基(2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂)、2'-烯丙基(2'-CH₂-CH=CH₂)、2'-O-烯丙基(2'-O-CH₂-CH=CH₂)以及2'-氟基(2'-F)。2'-修饰可处于阿拉伯糖(上)位或核糖(下)位。在一方面, 2'-阿拉伯糖修饰为2'-F。还可在多核苷酸的其它位置上进行类似的修饰, 例如, 在位于3'末端核苷酸上或2'-5'连接的多核苷酸中的糖的3'位置上以及5'末端核苷酸的5'位置上。多核苷酸还可具有糖模拟物(如环丁基部分)代替戊呋喃糖基糖。参见例如美国专利号4,981,957、5,118,800、5,319,080、5,359,044、5,393,878、5,446,137、5,466,786、5,514,785、5,519,134、5,567,811、5,576,427、5,591,722、5,597,909、5,610,300、5,627,053、5,639,873、5,646,265、5,658,873、5,670,633、5,792,747以及5,700,920,所述专利的公开内容以引用的方式整体并入本文。

[0170] 另外的修饰包括使遗传密码例如但不限于Iso-dC和Iso-dG延伸的那些修饰。Iso-dC和Iso-dG分别为胞嘧啶和鸟嘌呤的化学变体。Iso-dC将与Iso-dG而不是与dG氢键键合。类似地, Iso-dG将与Iso-dC而不是与dC进行碱基配对[Switzer等, Biochemistry 32: 10489-96 (1993)]。在这些方面, 通过使用聚(iso-dG)衰减子分子来实现通过添加Iso-dC碱基进行的受控加尾, 并且反之亦然。

[0171] 在一方面, 糖的修饰包括锁核酸(LNA), 其中2'-羟基连接至糖环的3'或4'碳原子, 从而形成双环糖部分。在某些方面, 所述键为桥联2'氧原子和4'碳原子的亚甲基(-CH₂-)_n基团, 其中n为1或2。LNA及其制备在W0 98/39352和W0 99/14226中有所描述, 所述专利的公开内容以引用的方式并入本文。

[0172] 标记

[0173] 在本发明的一些方面, 所述方法中使用的任何多核苷酸或本文所描述的组合物包含标记。在这些方面的一些方面, 标记是荧光的。用荧光分子标记多核苷酸和测量荧光的方法在本领域是已知的。适用于本发明的实践的荧光标记包括但不限于: 1,8-ANS(1-苯胺基萘-8-磺酸)、1-苯胺基萘-8-磺酸(1,8-ANS)、pH为9.0的5-羧基-2',7'-二氯荧光素(和6-羧基-2',7'-二氯荧光素)、pH为9.0的5-FAM、5-ROX(5-羧基-X-罗丹明三乙胺盐)、pH为7.0的5-ROX、5-TAMRA、pH为7.0的5-TAMRA、5-TAMRA-MeOH、6JOE、pH为9.0的6,8-二氟-7-羟基-4-甲基香豆素、pH为7.0的6-羧基罗丹明6G、6-羧基罗丹明6G盐酸盐、pH为9.0的6-HEX, SE、pH为9.0的6-TET, SE、pH为7.0的7-氨基-4-甲基香豆素、7-羟基-4-甲基香豆素、pH为9.0的7-羟基-4-甲基香豆素、Alexa 350、Alexa 405、Alexa 430、Alexa 488、Alexa 532、Alexa 546、Alexa 555、Alexa 568、Alexa 594、Alexa 647、Alexa 660、Alexa 680、Alexa 700、pH为7.2的Alexa Fluor 430抗体缀合物、pH为8.0的Alexa Fluor 488抗体缀合物、Alexa Fluor 488酰肼-水、pH为7.2的Alexa Fluor 532抗体缀合物、pH为7.2的Alexa Fluor 555抗体缀合物、pH为7.2的Alexa Fluor 568抗体缀合物、pH为7.2的Alexa Fluor 610R-藻红蛋白链霉亲和素、pH为7.2的Alexa Fluor 647抗体缀合物、pH为7.2的Alexa Fluor 647R-藻红蛋白链霉亲和素、pH为7.2的Alexa Fluor 660抗体缀合物、pH为7.2的Alexa Fluor 680抗体缀合物、pH为7.2的Alexa Fluor 700抗体缀合物、pH为7.5的别藻蓝蛋白、AMCA缀合物、氨基香豆素、APC(别藻蓝蛋白)、Atto 647、pH为5.5的BCECF、pH为9.0的BCECF、BFP(蓝色荧光蛋白)、BO-PRO-1-DNA、BO-PRO-3-DNA、BOBO-1-DNA、BOBO-3-DNA、

BODIPY 650/665-X, MeOH、BODIPY FL缀合物、BODIPY FL, MeOH、Bodipy R6G SE、BODIPY R6G, MeOH、pH为7.2的BODIPY TMR-X抗体缀合物、Bodipy TMR-X缀合物、BODIPY TMR-X, MeOH、BODIPY TMR-X, SE、pH 为7.0的BODIPY TR-X类鬼笔(毒)环肽、BODIPY TR-X, MeOH、BODIPY TR-X, SE、BOPRO-1、BOPRO-3、钙黄绿素(Calcein)、pH 为9.0的钙黄绿素、钙深红色(Calcium Crimson)、钙深红色Ca²⁺、钙绿色(Calcium Green)、钙绿色-1Ca²⁺、钙橙色(Calcium Orange)、钙橙色Ca²⁺、pH为10.0的羧基萘并荧光素、级联蓝(Cascade Blue)、pH为7.0的级联蓝BSA、Cascade Yellow、pH为8.0的级联黄抗体缀合物、CFDA、CFP(蓝绿色荧光蛋白)、pH为2.5的CI-NERF、pH为 6.0的CI-NERF、柠檬黄(Citrine)、香豆素、Cy 2、Cy 3、Cy 3.5、Cy 5、Cy 5.5、CyQUANT GR-DNA、丹磺酰尸胺、丹磺酰尸胺, MeOH、DAPI、DAPI-DNA、Dapoxyl (2-氨基乙基)磺酰胺、pH为9.0的DDAO、Di-8ANEPPS、Di-8-ANEPPS-脂质、DiI、DiO、pH为4.0的DM-NERF、pH为7.0的DM-NERF、DsRed、DTAF、dTomato、eCFP(增强蓝绿色荧光蛋白)、eGFP(增强绿色荧光蛋白)、曙红(Eosin)、pH为8.0的曙红抗体缀合物、pH为9.0的赤藓红-5-异硫氰酸盐、溴化乙啶、乙啶同型二聚体、乙啶同型二聚体-1-DNA、eYFP(增强黄色荧光蛋白)、FDA、FITC、pH为8.0的FITC抗体缀合物、FlAsH、Fluo-3、Fluo-3Ca²⁺、Fluo-4、Fluor-Ruby、荧光素、0.1M NaOH荧光素、pH为8.0的荧光素抗体缀合物、pH为8.0的荧光素右旋糖酐、pH为9.0的荧光素、Fluoro- 翠绿色(Emerald)、FM 1-43、FM 1-43脂质、FM 4-64、FM 4-64, 2% CHAPS、Fura Red Ca²⁺、高Ca的Fura Red、低Ca的Fura Red、Fura-2 Ca²⁺、高Ca的Fura-2、无Ca的Fura-2、GFP(S65T)、HcRed、Hoechst 33258、Hoechst 33258-DNA、Hoechst 33342、Indo-1Ca²⁺、不含Ca的 Indo-1、Ca饱和的Indo-1、JC-1、pH为8.2的JC-1、丽丝胺罗丹明、LOLO-1-DNA、荧光黄、CH、LysoSensor Blue、pH为5.0的LysoSensor Blue、LysoSensor Green、pH为5.0的LysoSensor Green、pH为3.0的 LysoSensor Yellow、pH为9.0的LysoSensor Yellow、LysoTracker Blue、LysoTracker Green、LysoTracker Red、Magnesium Green、Magnesium Green Mg²⁺、Magnesium Orange、Marina Blue、mBanana、mCherry、mHoneydew、MitoTracker Green、MitoTracker Green FM, MeOH、MitoTracker Orange、MitoTracker Orange, MeOH、MitoTracker Red、MitoTracker Red, MeOH、mOrange、mPlum、mRFP、mStrawberry、mTangerine、NBD-X、NBD-X, MeOH、NeuroTrace 500/525、绿色荧光 Nissl染色-RNA、Nile Blue、EtOH、Nile Red、Nile Red-脂质、Nissl、Oregon Green 488、pH为8.0的Oregon Green 488抗体缀合物、Oregon Green 514、pH为8.0的Oregon Green 514抗体缀合物、Pacific Blue、pH为8.0的Pacific Blue抗体缀合物、藻红蛋白、PO-PRO-1、PO-PRO-1-DNA、PO-PRO-3、PO-PRO-3-DNA、POPO-1、POPO-1-DNA、POPO-3、碘化丙啶、碘化丙啶-DNA、pH为7.5的R-藻红蛋白、ReAsH、试卤灵、pH为9.0的试卤灵、Rhod-2、Rhod-2Ca²⁺、罗丹明、罗丹明 110、pH为7.0的罗丹明110、罗丹明123, MeOH、罗丹明绿、pH为 7.0的罗丹明鬼笔环肽、pH为8.0的罗丹明Red-X抗体缀合物、pH为 7.0的罗丹明绿、pH为8.0的Rhodol Green抗体缀合物、Sapphire、SBFI-Na⁺、Sodium Green Na⁺、磺基罗丹明101、SYBR Green I、SYPRO Ruby、SYTO 13-DNA、SYTO 45-DNA、SYTOX Blue-DNA、pH为8.0 的四甲基罗丹明抗体缀合物、pH为7.0的四甲基罗丹明右旋糖苷、pH 为7.2的Texas Red-X抗体缀合物、TO-PRO-1-DNA、TO-PRO-3-DNA、TOTO-1-DNA、TOTO-3-DNA、TRITC、X-Rhod-1Ca²⁺、YO-PRO-1-DNA、YO-PRO-3-DNA、YOYO-1-DNA以及YOYO-3-DNA。

[0174] 可以使用荧光分子之外的其它标记,如杂交时将给出可检测信号或可检测信号变

化的化学发光分子和放射性分子。此外,可以使用亲和标记,包括但不限于生物素、双标生物素以及地高辛。

[0175] 方法

[0176] 本发明提供用于使用包含核酸聚合酶和衰减子分子的组合物的方法。在一个实施方案中,提供一种使衬底多核苷酸延伸的方法,所述方法包括在足以允许将尾部序列添加至衬底多核苷酸的3'末端的条件下,用本文所描述的组合物来孵育衬底多核苷酸,其中尾部序列的添加允许尾部序列与衰减子分子之间缔合以形成复合物。在一些方面,所述方法进一步包括在衬底多核苷酸的延伸之后使衰减子分子降解。在另一方面,本发明的方法的实践进一步包括分离所延伸的衬底多核苷酸。在一些方面,本文所描述的方法进一步包括将如本文所描述的组合物与衬底多核苷酸以及与衰减子分子的同聚部分互补的核苷酸混合。本发明的各个方面涵盖部分双链的衬底多核苷酸和/或衰减子分子。此外,所述方法的一些方面进一步包括退火步骤,其中通过在足以允许第一多核苷酸与第二多核苷酸缔合的条件下,使第一多核苷酸退火到第二多核苷酸来产生部分双链的多核苷酸。在本发明的一些方面,衬底多核苷酸为单链RNA或DNA。在其中衬底多核苷酸是双链的各个方面,两个游离的3'末端各自被延伸。在其它方面,双链衬底多核苷酸的游离的3'末端中仅一个被延伸。在其中双链多核苷酸的游离的3'末端中仅一个被延伸的方面,预期的是另一个游离的3'末端的延伸被阻止。本发明的另一方面涵盖一种包括固定步骤的方法,其中将衰减子/衰减子-衔接子分子或衬底多核苷酸或两者固定至表面。本发明的另外方面涵盖连接步骤,并且另外的方面涵盖包括酶的失活的步骤。在本文公开的任何方法中,预期的是不止一个反应发生在同一反应容器中。通过举例,本发明涵盖其中加尾反应和连接发生在同一反应容器中的方法。

[0177] 因此,在各个方面,本发明提供的方法包括孵育步骤、降解步骤、混合步骤、分离步骤、退火步骤、失活步骤、连接步骤以及固定步骤。在一些方面,所述方法包括孵育步骤和混合步骤。在另一方面,所述方法包括孵育步骤和分离步骤。在一些方面,所述方法包括孵育步骤和失活步骤。本发明的另一方面提供一种包括孵育步骤、混合步骤以及连接步骤的方法。本发明的另一方面提供一种包括孵育步骤、失活步骤以及降解步骤的方法。在另一方面,所述方法包括孵育步骤、混合步骤以及退火步骤。本发明的另一方面提供一种包括孵育步骤、混合步骤、退火步骤、连接步骤以及固定步骤的方法。在另一方面,所述方法包括孵育步骤、混合步骤、退火步骤以及分离步骤。本发明的另一方面涵盖一种包括孵育步骤、混合步骤、退火步骤、降解步骤以及分离步骤的方法。本发明的另一方面提供一种包括孵育步骤、混合步骤、退火步骤、降解步骤、固定步骤以及分离步骤的方法。本发明的另一方面提供一种包括孵育步骤、混合步骤、退火步骤、失活步骤、降解步骤、固定步骤以及分离步骤的方法。本领域技术人员将理解的是,各种步骤能够以任何组合和顺序使用,其中仅混合步骤和孵育步骤是所有方法的共同特征。

[0178] 还涵盖一种方法,借此将如本文所描述使用受控的加尾和连接的 NGS文库制备与用于靶向NGS测序的富集步骤结合。在一个实施方案中,用于受控的加尾和连接介导的NGS文库制备的输入衬底多核苷酸是通过包括但不限于杂交捕获和靶特异性PCR的任何方法获得的基因组的富集部分。在另一个实施方案中,如本发明中所描述的受控的加尾和连接介导的NGS文库的产物随后通过包括但不限于杂交捕获的任何方法进行靶向富集。在一个替

代实施方案中,输入衬底多核苷酸首先进行受控的加尾和连接反应,以引入第一NGS衔接子,其中进行包括通过杂交捕获来靶向富集的第二步骤;并且在第三步骤中,通过第二受控的加尾和连接反应或平端连接或TA连接来将第二NGS衔接子引入到富集的DNA部分上。

[0179] 本发明涉及受控的加尾和连接的方法在各种实施方案中应用于引物延伸产物或扩增产物,包括但不限于来源于聚合酶链式反应、等温扩增以及RNA转录的那些扩增产物。本发明的方法还可以应用于合成核酸。具体地说,所述方法适用于合成寡核苷酸、合成基因、基因组片段以及基因组的序列分析。

[0180] 本发明中还涵盖一种将同步末端修复与受控的加尾和连接反应组合的方法。末端修复包括但不限于以下酶:多核苷酸激酶、T4DNA聚合酶、尿嘧啶DNA糖基化酶、APE1核酸内切酶、核酸内切酶III (Nth)、核酸内切酶IV、核酸内切酶V、核酸内切酶VIII、Fpg、hAAG、hOGG1 以及hsMUG1。末端修复是并入现有NGS文库制备方法中来修复由在本发明中作为DNA片段化的手段的DNA的物理剪切所诱导的损伤的单独反应。在这方面,受控的加尾和连接反应条件与末端修复反应条件是相容的并且可以作为单个步骤同步进行。

[0181] 不受理论的束缚,本发明预期的是,在一些方面,在溶液中发生的反应比涉及固定步骤的那些更有效。“更有效”指的是溶液中的反应的完成时间比遵循固定步骤的相同反应更短。

[0182] 下文将更详细地论述上文所描述的每个方法步骤。

[0183] 孵育步骤

[0184] 本发明的方法涉及在足以允许将尾部序列添加至衬底多核苷酸的 3'末端的条件下,用如本文所描述的组合物来孵育衬底多核苷酸。在一些方面,使用选自由聚乙二醇(PEG)、聚胺、六氨合钴以及CoCl₂组成的组的试剂来促进衰减子/衰减子-衔接子分子和衬底多核苷酸的缔合,或控制核苷酸至衬底多核苷酸的添加。

[0185] 本发明提供的方法还包括其中将多个核苷酸添加至衬底多核苷酸来形成尾部序列的那些。在一些方面,衰减子分子在全部或部分衰减子分子长度上与尾部序列缔合。在另外的实施方案中,衰减子分子在添加尾部序列的过程期间与尾部序列缔合。

[0186] 一般来说,本文所描述的方法还包括其中衰减子分子与尾部序列的缔合调节核苷酸至多核苷酸的添加的那些。

[0187] 对于核苷酸至衬底多核苷酸的添加来说,本发明提供其中条件调节尾部序列至衬底多核苷酸的添加的方法。通过举例并且非限制性地,在一方面,尾部序列至衬底多核苷酸的添加对温度敏感。在一个实施方案中,将尾部序列添加至衬底多核苷酸时所处的温度为至少约4℃。在另外的实施方案中,添加尾部序列时所处的温度条件为至少约4℃至约50℃、约4℃至约40℃、约4℃至约37℃、约4℃至约30℃、约4℃至约25℃、约4℃至约20℃、约10℃至约50℃、约10℃至约40℃、约10℃至约37℃、约10℃至约30℃、约10℃至约25℃、约10℃至约20℃、约20℃至约50℃、约20℃至约40℃、约20℃至约37℃、约25℃至约37℃、约25℃至约40℃、约30℃至约40℃、至少约5℃、至少约6℃、至少约7℃、至少约8℃、至少约9℃、至少约10℃、至少约11℃、至少约12℃、至少约13℃、至少约14℃、至少约15℃、至少约16℃、至少约17℃、至少约18℃、至少约19℃、至少约20℃、至少约21℃、至少约22℃、至少约23℃、至少约24℃、至少约25℃、至少约26℃、至少约27℃、至少约28℃、至少约29℃、至少约30℃、至少约31℃、至少约32℃、至少约33℃、至少约34℃、至少约35℃、至少约36℃、至少约37℃、至少

约38℃、至少约39℃、至少约40℃、至少约41℃、至少约42℃、至少约43℃、至少约44℃、至少约45℃、至少约46℃、至少约47℃、至少约48℃、至少约49℃、至少约50℃或更高。

[0188] 因此,在某些方面,进行孵育步骤时所处的温度决定了添加至衬底多核苷酸的核苷酸的数量。举例来说,提供了其中添加至衬底多核苷酸的尾部的长度在25℃下为约10个核苷酸、在30℃下为约11个核苷酸、在37℃下为约13个核苷酸并且在45℃下为约16个核苷酸的方法。

[0189] 除了进行孵育步骤时所处的温度之外,调节尾部序列至衬底多核苷酸的添加的另一个条件是允许孵育步骤进行的时间长度。一般来说,允许孵育步骤进行的时间长度为约0.5分钟至约120分钟。在一些方面,允许孵育步骤进行的时间长度为至少约0.5分钟到至多约1、2或3分钟;或至少约1分钟到至多约2、5或10分钟;或至少约2分钟到至多约5、8或10分钟;或至少约5分钟到至多约10、15或20分钟;或至少约10分钟到至多约15、20或30分钟;或至少约20分钟到至多约30、40或60分钟;或至少约30分钟到至多约40、60或80分钟;或至少约60分钟到至多约80、90或100分钟;或至少约90分钟到至多约100、110或120分钟。在各种实施方案中,允许孵育步骤进行的时间长度为约1、约2、约3、约4、约5、约6、约7、约8、约9、约10、约11、约12、约13、约14、约15、约16、约17、约18、约19、约20、约21、约22、约23、约24、约25、约26、约27、约28、约29、约30、约31、约32、约33、约34、约35、约36、约37、约38、约39、约40、约41、约42、约43、约44、约45、约46、约47、约48、约49、约50、约51、约52、约53、约54、约55、约56、约57、约58、约59、约60、约61、约62、约63、约64、约65、约66、约67、约68、约69、约70、约71、约72、约73、约74、约75、约76、约77、约78、约79、约80、约81、约82、约83、约84、约85、约86、约87、约88、约89、约90、约91、约92、约93、约94、约95、约96、约97、约98、约99、约100、约101、约102、约103、约104、约105、约106、约107、约108、约109、约110、约111、约112、约113、约114、约115、约116、约117、约118、约119、约120分钟或更多。

[0190] 进行孵育所处的pH为约5.0至约9.0。在一方面,pH为约7.9。在一些方面,进行孵育时所处的pH为至少约pH 5.0到至多约pH 5.1、5.5或5.8;或至少约pH 5.5到至多约pH 5.8、6.0或6.2;或至少约pH 6.0到至多约pH 6.2、6.5或6.8;或至少约pH 6.5到至多约pH 7.0、7.2或7.5;或至少约pH 7.5到并且至多约pH 7.8、8.0或8.2;或至少约pH 8.0到至多约pH 8.2、8.5或9.0。在各个方面,进行孵育时所处的pH为约pH 5.1、约pH 5.2、约pH 5.3、约pH 5.4、约pH 5.5、约pH 5.6、约pH 5.7、约pH 5.8、约pH 5.9、约pH 6.0、约pH 6.1、约pH 6.2、约pH 6.3、约pH 6.4、约pH 6.5、约pH 6.6、约pH 6.7、约pH 6.8、约pH 6.9、约pH 7.0、约pH 7.1、约pH 7.2、约pH 7.3、约pH 7.4、约pH 7.5、约pH 7.6、约pH 7.7、约pH 7.8、约pH 7.9、约pH 8.0、约pH 8.1、约pH 8.2、约pH 8.3、约pH 8.4、约pH 8.5、约pH 8.6、约pH 8.7、约pH 8.8、约pH 8.9、pH 9.0或更高。

[0191] 降解步骤

[0192] 在其中衰减子分子是可降解的方法的方面,降解步骤任选地处于孵育步骤之后。在一方面,将具有溶核活性的一定量的酶添加至反应容器中并且将混合物在酶的最优温度下孵育另一个时间段。在其中衰减子分子为多核苷酸的各个方面,具有溶核活性的酶选自自由DNA糖基化酶、脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶以及核糖核酸酶组成的组。在另外的方面,核糖核酸酶选自自由以下组成的组:RNase H、RNase HII、RNase A以及RNase T1。因此,举例来说,在各个方面,可降解的衰减子分子包含尿嘧啶核苷酸并且因尿嘧啶DNA糖基化酶的活性而

发生降解。在另一方面,可降解的衰减子分子包含核糖核苷酸并且因核糖核酸酶的活性而发生降解。将理解,对溶核酶进行选择以使得衬底多核苷酸不被衰减子分子降解。因此,在一方面,包含核糖核苷酸的衰减子分子将用于一种方法,其中衬底分子包含脱氧核糖核苷酸,并且所使用的溶核酶是不会使衬底多核苷酸降解的核糖核酸酶。

[0193] 在所需温度下孵育反应容器来使衰减子分子降解的另一个时间段为至少约5分钟,但涵盖约0.5分钟至约60分钟或更多。

[0194] 混合步骤

[0195] 本文提供的方法通常包括将核酸聚合酶、衬底多核苷酸以及衰减子分子在合适的反应容器中混合。混合物的另外组分包含合适的缓冲液(在所述缓冲液中,核酸聚合酶活性最佳)、用于添加至衬底多核苷酸的核苷酸以及连接酶。任选地,根据下文描述的各种方法,另外的组分包括钾、 CoCl_2 、钠、锂、钙、锰、tris及其衍生物以及镁。

[0196] 合适的反应容器是本领域技术人员已知的并且包括但不限于微量离心管或微量滴定板。

[0197] 在一些方面,将一种以上类型的衬底多核苷酸添加至单个反应容器。因此,在各个方面,可将能够与一种以上类型的衬底多核苷酸缔合的一种以上类型的衰减子分子添加至单个反应容器。在另外的方面,将至少2种、至少3种、至少4种、至少5种、至少6种、至少7种、至少8种、至少9种、至少10或更多种类型的衬底多核苷酸和能够与一种以上类型的衬底多核苷酸缔合的衰减子分子添加至单个反应容器。进一步预期的是,反应液包括一个以上衰减子多核苷酸和/或一个以上衰减子-衔接子分子和/或衰减子多核苷酸与衰减子-衔接子分子的混合物。一个以上衰减子多核苷酸和/或一个以上衰减子-衔接子分子的使用允许多次的并且允许通过模板依赖性聚合酶如脱氧核苷酸转移酶(TdT)、聚(A)聚合酶或聚(U)聚合酶来进行受控的DNA和RNA加尾-连接反应。

[0198] 对于核酸聚合酶来说,每次反应有待添加的量为约1个单位(“U”)至约1000U。在一些方面,有待添加的核酸聚合酶的量为至少约1U 到至多约2、3或4U;或至少约2U到至多约3、4或5U;或至少约 5U到至多约20、50或100U;或至少约5U到至多约6、7或8U;或至少约6U到至多约7、8或9U;或至少约7U到至多约8、9或10 U;或至少约10U到至多约50、100或500U;或至少约10U到至多约12、15或18U;或至少约15U到至多约18、20或25U;或至少约 20U到至多约50、100或1000U;或至少约20U到至多约25、30或 35U;或至少约30U到至多约35、40或50U;或至少约40U到至多约50、60或70U;或至少约50U到至多约100、500或1000U;或至少约60U到至多约80、90或100U;或至少约100U到至多约120、150或200U;或至少约200U到至多约250、275或300U;或至少约 300U到至多约325、350或400U;或至少约400U到至多约450、500 或550U;或至少约600U到至多约700、800或900U;或至少约700 U到至多约800、900或1000U。在各个方面,每次反应有待添加的核酸聚合酶的量为约2、约3、约4、约5、约6、约7、约8、约9、约 10、约11、约12、约13、约14、约15、约16、约17、约18、约19、约20、约21、约22、约23、约24、约25、约26、约27、约28、约 29、约30、约40、约50、约60、约70、约80、约90、约100、约110、约120、约130、约140、约150、约160、约170、约180、约190、约200、约210、约220、约230、约240、约250、约260、约270、约280、约290、约300、约310、约320、约330、约340、约350、约360、约370、约380、约390、约400、约410、约420、约430、约440、约450、约460、约470、约480、约490、约500、约510、约520、约530、约540、约550、约560、约570、约580、约590、约600、约

610、约620、约630、约640、约650、约660、约670、约680、约690、约700、约710、约720、约730、约740、约750、约760、约770、约780、约790、约800、约810、约820、约830、约840、约850、约860、约870、约880、约890、约900、约910、约920、约930、约940、约950、约960、约970、约980、约990个或约1000个单位或更多。

[0199] 添加至反应容器的核苷酸将取决于给定的应用。举例来说,如果衰减子分子是同聚多核苷酸,那么添加至反应容器的核苷酸是与构成衰减子分子的同聚部分的核苷酸互补的核苷酸。还预期的是,在各种实施方案中,将核苷酸的混合物添加至反应容器。因此,在一些实施方案中,将脱氧核糖核苷酸与核糖核苷酸的混合物添加至反应容器(例如,dA/rA、dT/dU/rU、dC/rC或dG/rG)。在一些实施方案中,在反应容器中包括核糖核苷酸减少了在如TdT的聚合酶存在下的另外的加尾,而在反应容器中包括脱氧核糖核苷酸减少了在如聚(A)聚合酶或聚(U)聚合酶的聚合酶存在下的另外的加尾。反应容器内的核苷酸浓度通常为约0.1mM,但是在各个方面,其介于约0.01mM与约5mM之间。

[0200] 如上所述,所述方法的一些实施方案包括连接酶。对于连接酶来说,每次反应有待添加的量介于约0.1U与约1000U之间。

[0201] 对于镁来说,预期的是,每次反应有待添加的量为约1mM至约100mM。在各个方面,有待添加的钾的量为约1mM至约10mM,或约2mM至约20mM,或约10mM至约100mM。

[0202] 分离步骤

[0203] 在一些实施方案中,将衬底多核苷酸分离。衬底多核苷酸的分离通过本领域技术人员已知和理解的任何方法来进行。在一方面,衬底多核苷酸的分离通过如本文所描述的衬底多核苷酸的固定来进行。在另一方面,使用配体偶联的珠粒或微球来与衬底多核苷酸特异性地缔合并促进其分离。举例来说,可以使用聚-dT偶联的珠粒来分离用同聚腺嘌呤序列加尾的衬底多核苷酸。在其它方面,通过衬底多核苷酸的沉淀、凝胶过滤或自旋柱微量离心来进行衬底多核苷酸的分离。

[0204] 固定步骤

[0205] 在一些方面,衰减子分子和/或衬底多核苷酸共价地或非共价地偶联至支持物。设想了本领域中熟知的偶联化学和支持材料的选择。例如,支持物包括全部或部分由玻璃、二氧化硅、金属、塑料、纤维、树脂以及聚合物制成的那些。示例性聚合物包括例如但不限于纤维素、硝酸纤维素、聚乙酸酯、聚碳酸酯、聚苯乙烯、聚酯、聚乙烯二氟苯、尼龙、碳纤维或任何其它合适的聚合物材料。在某些相关实施方案中,本文所描述的一个或多个衰减子分子和/或衬底多核苷酸可以提供为固定在固体支持物上的阵列,所述阵列包括用于以可识别(例如但不限于,可寻址)的方式空间布置所述分子的许多熟知构型中的任何构型。在各个方面,固定涉及生物素化的衰减子-衔接子分子以及链霉亲和素(抗生物素蛋白)涂布的表面(例如但不限于,管、珠粒或磁珠)。技术人员将熟悉用于制作和使用所述固相固定的衰减子分子和/或衬底多核苷酸阵列的各种组合物和方法。

[0206] 失活步骤

[0207] 在一些方面,在包含反应液组分的反应容器的孵育之后,将反应容器在更高温度下进一步孵育,以使核酸聚合酶失活。在一些方面,进一步孵育进行至少约1分钟到至多约2、5或10分钟;或至少约5分钟到至多约10、20或30分钟;或至少约10分钟到至多约15、20或30分钟;或至少约15分钟到至多约20、25或30分钟。在一些实施方案中,进一步孵育进行

约1分钟至约30分钟。在各个方面,进一步孵育进行约2、约3、约4、约5、约6、约7、约8、约9、约10、约11、约12、约13、约14、约15、约16、约17、约18、约19、约20、约21、约22、约23、约24、约25、约26、约27、约28、约29、约30分钟或更多。

[0208] 进行进一步孵育时所处的更高温度为约60℃至约100℃。在一些方面,进行进一步孵育时所处的温度为至少约60℃到至多约62℃、65℃或68℃;或至少约60℃到至多约65℃、70℃或75℃;或至少约60℃到至多约70℃、75℃或80℃;或至少约70℃到至多约75℃、80℃或85℃;或至少约70℃到至多80℃、90℃或100℃。在各个方面,进行进一步孵育时所处的温度为约61℃、约62℃、约63℃、约64℃、约65℃、约66℃、约67℃、约68℃、约69℃、约70℃、约71℃、约72℃、约73℃、约74℃、约75℃、约76℃、约77℃、约78℃、约79℃、约80℃、约81℃、约82℃、约83℃、约84℃、约85℃、约86℃、约87℃、约88℃、约89℃、约90℃、约91℃、约92℃、约93℃、约94℃、约95℃、约96℃、约97℃、约98℃、约99℃、约100℃或更高。

[0209] 连接步骤

[0210] 在所提供的方法的一些方面,反应是这样的:使得衬底多核苷酸的加尾与衬底多核苷酸与衔接子分子的连接同步发生。在这些方面,包括核酸聚合酶、衬底多核苷酸、衰减子-衔接子分子、缓冲液以及连接酶的混合物全存在于单个反应容器中(参见,例如但不限于实施例9)。为实现衬底多核苷酸的加尾以及其与衰减子-衔接子分子的连接而对混合物进行的孵育与上文针对单独加尾所描述的方法相同。在各个方面,连接酶为DNA连接酶或RNA连接酶。本文已描述了所固定的衰减子分子。在所述方法的一些方面,在将尾部序列添加至多核苷酸分子期间,通过DNA或RNA连接酶将固定的衰减子分子连接至多核苷酸。

[0211] 对于连接酶来说,每次反应有待添加的量为约0.1个单位(“U”)至约1000U。在一些方面,有待添加的连接酶的量至少约0.1U到至多约0.5、1、2、3或4U;或至少约1U到至多约3、4或5U;或至少约5U到至多约20、50或100U;或至少约5U到至多约6、7或8U;或至少约6U到至多约7、8或9U;或至少约7U到至多约8、9或10U;或至少约10U到至多约50、100或500U;或至少约10U到至多约12、15或18U;或至少约15U到至多约18、20或25U;或至少约20U到至多约50、100或1000U;或至少约20U到至多约25、30或35U;或至少约30U到至多约35、40或50U;或至少约40U到至多约50、60或70U;或至少约50U到至多约100、500或1000U;或至少约60U到至多约80、90或100U;或至少约100U到至多约120、150或200U;或至少约200U到至多约250、275或300U;或至少约300U到至多约325、350或400U;或至少约400U到至多约450、500或550U;或至少约600U到至多约700、800或900U;或至少约700U到至多约800、900或1000U。在各个方面,每次反应有待添加的连接酶的量至少约0.2、约0.3、约0.4、约0.5、约0.6、约0.7、约0.8、约0.9、约1、约2、约3、约4、约5、约6、约7、约8、约9、约10、约11、约12、约13、约14、约15、约16、约17、约18、约19、约20、约21、约22、约23、约24、约25、约26、约27、约28、约29、约30、约40、约50、约60、约70、约80、约90、约100、约110、约120、约130、约140、约150、约160、约170、约180、约190、约200、约210、约220、约230、约240、约250、约260、约270、约280、约290、约300、约310、约320、约330、约340、约350、约360、约370、约380、约390、约400、约410、约420、约430、约440、约450、约460、约470、约480、约490、约500、约510、约520、约530、约540、约550、约560、约570、约580、约590、约600、约610、约620、约630、约640、约650、约660、约670、约680、约690、约700、约710、约720、约730、约740、约750、约760、约770、约780、约790、约800、约810、约820、约830、约840、约850、约860、约870、约880、约890、约900、约910、约

920、约930、约940、约950、约960、约970、约980、约990或约1000个单位或更多。

[0212] 治疗应用

[0213] 此外,本发明还涵盖衰减的衬底多核苷酸用于控制细胞和病毒增殖的治疗应用。治疗应用包括但不限于基因表达的反义调节。真核生物的聚(A)聚合酶在信使RNA加工期间负责聚(A)尾部的添加。所得 mRNA的聚(A)尾部起到多个作用。所述聚(A)尾部是从细胞核到细胞质的转运所必需的,它们促进蛋白质合成的效率并且它们使mRNA稳定。细菌中RNA的聚腺苷酸化对RNA衰变起到非常重要的作用。对真核细胞中聚(U)尾部的添加了解甚少,但可能控制某些RNA的降解。合成的衰减子分子可以潜在地用作反义分子,以抑制或限制细胞内的聚(A)和聚(U)加尾,并且因此建立对细胞和病毒增殖的控制。

[0214] 试剂盒

[0215] 本发明提供用于通过核酸聚合酶进行的受控和有限核酸加尾的试剂盒。

[0216] 本发明所提供的试剂盒包括如本文所描述的衰减子/任选的衰减子-衔接子分子(包括任选的固相固定的衰减子-衔接子分子),核酸聚合酶、任选地连接酶、糖基化酶以及辅助性试剂如适当的缓冲液、洗涤溶液、指示剂以及检测介质,它们取决于有待实践的具体测定配置。在一些方面,衰减子分子与核酸聚合酶预混合或提供在单独的管内。

[0217] 所述试剂盒的实例包括但不限于以下。

[0218] TdT-介导的DNA加尾

[0219] 这种试剂盒包含以下组分。对于聚(dA)加尾试剂盒:补充有3'-封闭的线性或环状聚(dT)、聚(dU)或聚(U)衰减子分子的TdT酶。对于聚(dT)加尾试剂盒:补充有3'-封闭的线性或环状聚(dA)或聚(A)衰减子分子的TdT酶。对于聚(dG)加尾试剂盒:补充有3'-封闭的线性或环状聚(dC)或聚(C)衰减子分子的TdT酶。对于聚(dC)加尾试剂盒:补充有3'-封闭的线性或环状聚(dG)或聚(G)衰减子分子的TdT酶。

[0220] 聚(A)和聚(U)聚合酶介导的RNA加尾

[0221] 聚(A)加尾试剂盒包括:补充有聚(dT)、聚(dU)或聚(U)衰减子分子的聚(A)聚合酶。聚(U)加尾试剂盒包括:补充有聚(dA)或聚(A)衰减子分子的聚(U)聚合酶。

[0222] 另外的试剂盒包括用于针对DNA衬底和RNA衬底两者的单个反应的加尾和衔接子连接的试剂以及用于针对DNA衬底和RNA衬底两者的单个反应的加尾-连接-固定的试剂。其它试剂盒可以将条形码引入到DNA和RNA分子上。另外其它的试剂盒可以将DNA和RNA衬底转化成用于下一代测序的文库。在一个实施方案中,提供了一种NGS文库制备试剂盒,其包括用于进行以下各项的材料:(i)受控的加尾反应;(ii)末端修复;(iii)引物延伸;以及(iv)平末端或TA连接或第二受控的加尾和连接。

[0223] 以下在实施例部分中提供了使用本发明所描述的组合物和方法的具体应用。将理解的是,这些应用仅通过举例的方式提供,并且不以任何方式进行限制。

[0224] 实施例

[0225] 实施例1

[0226] 在长的(>20b)互补的聚(dT)多核苷酸的存在下进行的衰减的TdT介导的聚(dA)DNA加尾

[0227] 第1阶段:在37℃下发生DNA引物的非衰减并且快速的TdT介导的聚(dA)加尾,直到尾部的大小达到能够与含有长的(dT)₃₀序列的互补衰减子分子形成稳定复合物的临界大

小。通过将封闭基团放置在衰减子分子的3'末端(例如但不限于,磷酸酯、双脱氧核苷酸、氨基、反向dT或几个核糖核苷酸),或通过使用环状衰减子分子来防止衰减子分子的加尾。

[0228] 第2阶段:在衰减子多核苷酸(dT)₃₀与聚(dA)尾部之间形成复合物导致聚(dA)合成的显著减少。通过TdT酶添加的每个后续dA碱基增加了双链体的长度和稳定性,从而导致几乎完全抑制了通过TdT酶进行的聚(dA)合成(图1)。

[0229] 在长的聚(dT)衰减子分子的存在下进行的聚(dA)加尾的动力学

[0230] 在所述方法的一些实施方案中,在37℃下,在长的衰减子分子的存在下进行的TdT介导的dA加尾产生了具有非常窄的大小分布的相对较短的尾部(约13b)(参见实施例1和图38中的方案1)。

[0231] 使用短的(12-14b)互补的聚(dT)多核苷酸进行的衰减的TdT介导的聚(dA)加尾

[0232] 在另外的实施方案中,提供了一种方法,其中衬底DNA引物的非衰减并且快速的TdT介导的聚(dA)加尾发生在第1阶段(图2)。衰减子多核苷酸与聚(A)尾部之间的复合物的形成以及聚(dA)合成速率的降低发生在第2a阶段。在这个阶段,每个另外添加的dA碱基都会使复合物更稳定,直到尾部长度达到衰减子分子的全长并且形成平的双链体末端。当在所述方法的替代实施方案(参见上文)中时,反应绝不会进入到第2b阶段,因为衰减子分子的大小有限。

[0233] 在第3阶段(图3),然后发生平末端衬底的缓慢的聚(dA)加尾,直到产生含有3至4个dA碱基的3'单链聚(dA)突出。然后重复第1阶段至第3阶段。

[0234] 在短的聚(dT)衰减子分子的存在下进行的聚(dA)加尾的动力学

[0235] 在一些方面,在短的衰减子分子的存在下进行的TdT介导的DNA dA加尾导致DNA分子的合成,其中聚(dA)尾部具有离散的梯状大小分布,其中尾部的长度具有的碱基是例如但不限于13的倍数(13、26、39等)(图3)。在另一个实施方案中,涵盖一种方法,其中衰减的TdT介导的聚(dA)加尾是用含有dU碱基的可降解的衰减子多核苷酸进行的(图4)。

[0236] 本发明所提供的方法还包括使用长的(约20至30个碱基)互补的衰减子多核苷酸进行的衰减的TdT介导的聚(dT)、聚(dG)以及聚(dC)加尾(参见图5)。还提供了一种使用可降解的衰减子核糖多核苷酸进行衰减的TdT介导的聚(dA)、聚(dT)、聚(dG)以及聚(dC)加尾的方法(图6)。

[0237] 通过聚(A)和聚(U)聚合酶进行的受控的RNA加尾

[0238] 本文所描述涉及TdT介导的同聚DNA加尾的衰减和控制的方法还预期应用于通过聚(A)或聚(U)聚合酶催化的酶促反应,所述反应将聚(A)和聚(U)序列添加至RNA模板。与涉及DNA的方法类似,3'-封闭的线性聚(U)与聚(A)、非封闭的聚(dU)与聚(dA)分子,以及聚(U)、聚(A)、聚(dU)、聚(dA)、聚(dU)与聚(dA)分子,以及聚(U)、聚(A)、聚(dU)、聚(dA)环可以用作聚(A)和聚(U)聚合酶的衰减子。

[0239] 通过聚(A)和聚(U)聚合酶用C和G核糖核苷酸对RNA进行的受控加尾在各个方面要求相应的DNA或RNA衰减子分子。

[0240] 图7描绘了使用互补的DNA聚(dT)₃₀多核苷酸对RNA衬底进行的衰减的聚(A)-聚合酶介导的聚(rA)加尾。在第1阶段(图7的顶部部分),示出了RNA引物的非衰减并且快速的聚(A)-聚合酶介导的聚(A)加尾。在第2阶段(在添加聚(rA)尾部之后),在衰减子多核苷酸聚(dT)₃₀与聚(A)尾部之间形成稳定的复合物导致聚(A)合成的显著减少或甚至完全抑制。

[0241] 所述方法的另一方面提供使用互补的DNA聚(dA)₃₀多核苷酸对RNA衬底进行的衰减的聚(U)-聚合酶介导的聚(rU)加尾(图8)。图8的顶部部分描绘了所述方法的第1阶段,其中发生了RNA引物的非衰减的聚(U)聚合酶介导的聚(U)加尾。在第2阶段(在添加聚(rU)尾部之后),在衰减子多核苷酸聚(dA)₃₀与聚(U)尾部之间形成稳定复合物导致聚(U)合成的显著减少或甚至完全抑制。

[0242] 受控的大小有限的加尾对衔接子(条形码)连接至DNA或RNA片段的一个末端以及固定至固体支持物的用途

[0243] 前文描述的衰减子分子是与通过例如但不限于TdT、聚(A)或聚(U)聚合酶产生的尾部互补的可降解的或不可降解的同聚分子。以下介绍了除了其同聚3'-结构域之外在5'部分处还具有单链或双链结构域的一类衰减子分子。这些结构域用于通过聚合或连接反应将衔接子序列引入尾部区域的下游。连接反应的优点在于它在单管单步骤反应中与非模板同聚加尾反应结合。所述加尾-连接反应的使用提供了用一个或两个衔接子产生DNA、RNA或cDNA文库的简单而有效的方式,所述文库应用于基因组DNA和RNA下一代测序(NGS)应用的样品制备。图9提供了使用有限的加尾反应将3'末端衔接子连接至单链DNA或RNA分子的示意图。图9的A部分描绘了有限的加尾-连接反应。在所述反应中,在部分双链的衰减子-衔接子分子的存在下用模板依赖性聚合酶和连接酶来孵育单链(ss)DNA或RNA,其中衰减子-衔接子的3'-封闭的单链聚(T)或聚(dT)部分用作衰减子,并且衰减子-衔接子的5'-磷酸化的双链部分用作衔接子。然后经由模板依赖性聚合酶将有限的聚(dA)或聚(A)链段添加至多核苷酸,并且所述聚(dA)或聚(A)链段与衰减子-衔接子的单链部分形成双链体。然后经由衔接子分子上存在的5'磷酸将衰减子-衔接子的衔接子部分连接至衰减的多核苷酸。受控的加尾和连接反应以封闭的管形式发生。衔接子分子任选地进一步包含标签(例如但不限于,生物素)。然后任选地将所连接的分子固定至链霉亲和素涂布的磁珠以促进分离。

[0244] 图9的B部分描绘了有限的加尾-聚合酶-延伸反应。在所述反应中,在单链衰减子-衔接子分子的存在下,用模板依赖性聚合酶孵育DNA或RNA。然后经由模板依赖性聚合酶将聚(dA)或聚(A)链段添加至多核苷酸,并且DNA聚合酶的存在将允许在整个DNA或RNA分子上延伸,从而产生双链产物。受控的加尾和延伸反应能够以封闭的管形式进行。在这种情况下,脱氧核苷酸三磷酸(dNTP)混合物必须包括可热活化的dTTP、dCTP和dGTP(CleanAmp核苷酸, TriLink Bio Technologies, San Diego)以及标准的dATP,并且单链衰减子-衔接子的3'末端还必须含有热活化的碱基。因此,受控的衰减的加尾将在37°C下,在仅可获得dATP而其它核苷酸和衰减子-衔接子的3'末端保持封闭的情况下发生。在95°C下加热混合物之后,其余核苷酸变得活化并且衰减子-衔接子的3'末端变得可延伸。衔接子分子任选地进一步包含标签(例如但不限于,生物素)。然后任选地将产物分子固定至链霉亲和素涂布的磁珠以促进分离。

[0245] 在另一方面,本发明提供一种用于使用有限的加尾反应将单链DNA和RNA共价固定至固体支持物的方法(图10)。图10的A部分描绘了使用有限的加尾-连接反应通过3'末端进行的固定。在所述反应中,在部分双链的3'末端共价固定的衰减子-衔接子分子的存在下,用模板依赖性聚合酶和连接酶孵育DNA或RNA分子,其中3'末端封闭的单链聚(T)或聚(dT)部分用作衰减子并且5'磷酸化的双链部分用作衔接子。然后通过模板依赖性聚合酶将有限的聚(dA)或聚(A)链段添加至衬底,并且衬底与衰减子-衔接子的单链部分形成双链

体。然后经由衔接子分子上存在的5'磷酸将固定的衰减子-衔接子的衔接子部分连接至衰减的衬底多核苷酸,从而产生固定的DNA或RNA分子。受控的加尾、连接以及固定反应以封闭的管形式发生。

[0246] 图10的B部分描绘了使用有限的加尾-聚合酶-延伸反应通过5'末端进行的固定,这是本发明的另一方面。在所述反应中,在5'末端共价固定的衰减子-衔接子分子的存在下,用模板依赖性聚合酶孵育DNA或RNA分子。然后通过模板依赖性聚合酶来添加聚(dA)或聚(A)链段,并且DNA聚合酶的存在允许在整个DNA或RNA分子上延伸,从而产生固定的双链产物。受控的加尾、延伸以及固定反应能够以封闭的管形式进行。在这种情况下,dNTP混合物必须包括可热活化的dTTP、dCTP和dGTP(CleanAmp核苷酸, TriLink Bio Technologies, San Diego)以及标准的dATP,并且固定的单链衰减子-衔接子的3'末端还必须含有热活化的碱基。因此,受控的衰减的加尾将在37℃下,在仅可获得dATP而其它核苷酸和固定的衰减子-衔接子的3'末端保持封闭的情况下发生。在95℃下加热混合物之后,其余核苷酸变得活化并且固定的衰减子-衔接子的3'末端变得可延伸。

[0247] 在一些方面,在DNA衬底的情况下,同步加尾-连接反应(图9,A部分以及图10,A部分)将涉及TdT酶和大肠杆菌DNA连接酶(不受理论的束缚,预期的是,在一些实施方案中,T4DNA连接酶所需要的ATP将封闭TdT加尾过程)。在RNA衬底的情况下,同步加尾-连接反应(图9,A部分以及图10,A部分)涉及聚(A)和T4DNA连接酶或聚(U)聚合酶。然而,在一些方面,ATP的存在导致混合的聚(U/A)加尾。

[0248] 在DNA衬底的情况下,加尾-延伸反应(图9,B部分以及图10,B部分)通过TdT酶和嗜温或嗜热DNA聚合酶来执行。在RNA衬底的情况下,加尾-延伸反应(图9,B部分以及图10,B部分)通过聚(A)或聚(U)聚合酶以及具有逆转录酶活性的DNA聚合酶来执行。上文已描述了预期用于本发明的方法和组合物的聚合酶。

[0249] 在固定至和不固定至固体支持物的情况下,受控的大小有限的加尾对衔接子连接至DNA文库两个末端的用途

[0250] 在将衔接子连接至双链衬底的情况下(图11),所述方法涉及高浓度的DNA连接酶(例如但不限于,T4DNA连接酶)以及平末端衔接子。可替代地,如果衬底核酸的第二DNA链通过不具有3'校正活性的聚合酶合成,那么衔接子具有单个dT-碱基3'-突出。在一些方面,所述聚合酶将另外的dA碱基添加至DNA的3'末端。

[0251] 在单链DNA衬底(所述衬底可以通过其5'末端或通过生物素-链霉亲和素相互作用共价地固定,如图12和图13所示,或在溶液中可为游离的)的情况下,第二衔接子的连接可以涉及图9中所示的过程,所述过程利用与连接过程(图12)或与聚合过程(图13)结合的有限的加尾。

[0252] 实施例2

[0253] 在长的聚(dT)衰减子分子的存在下通过TdT酶引入的聚(dA)序列的长度

[0254] 图14示出聚(dA)/聚(dT)双链体的长度与其解链温度之间的计算得到的依赖性(空心圆),并且由此得出衰减的聚(dA)尾部的期望大小随着反应温度的变化而变化,但限制范围为10至16个碱基。

[0255] 在长的(可降解的)衰减子分子的存在下通过TdT酶对单链DNA多核苷酸模板进行的受控的聚(dA)加尾

[0256] 材料:

[0257]	衬底多核苷酸10-001 (表1)
	长的可降解的衰减子多核苷酸10-103 (表2)
	DNA多核苷酸大小标记物: 5种多核苷酸10-001、10-099、10-100、10-101以及10-102 (表4)的等摩尔混合物
	TdT酶(New England BioLabs, 目录号M0315S, 20 U/ μ l)
	1 x TdT缓冲液: 20 mM Tris-醋酸盐、50 mM乙酸钾、10 mM乙酸镁、0.25 mM CoCl ₂ , 在25℃下pH为7.9
	USER酶(New England BioLabs, 目录号M5505S, 1 U/ μ l)

[0258] 方法: 在37℃下, 在含有1x TdT缓冲液、0.1mM dATP、4pmol 衬底多核苷酸10-001、10U TdT酶以及0pmol或20pmol衰减子多核苷酸10-103的5 μ l反应体积中进行聚(dA)加尾反应, 持续1、5、15、30以及60分钟, 之后在70℃下孵育10分钟以使TdT酶失活。添加0.25 U的USER酶并且在37℃下孵育5分钟。将样品在甲酰胺加样缓冲液中煮沸, 并且在预制的15% TBE-尿素聚丙烯酰胺凝胶 (Invitrogen, 目录号EC68852Box) 上跑胶, 用SYBR Gold染色剂 (Invitrogen, 目录号S11494) 染色, 在Dark Reader光盒 (Clare Chemical Research) 上显现, 并且使用数码相机照相。

[0259] 结果: 图15示出了通过TdT酶进行的标准和衰减的聚(dA)加尾反应的产物的电泳分析。泳道1、2、3、4和5示出了在衰减子10-103的存在下用TdT酶孵育1、5、10、15以及30分钟后的加尾反应的产物; 泳道7、8、9、10和11示出了在不存在衰减子的情况下用TdT酶孵育1、5、10、15以及30分钟后的加尾反应的产物; 泳道6为DNA多核苷酸大小标记物。在两种情况下, 加尾反应在30分钟内完成。在不存在衰减子分子的情况下, 通过TdT酶添加至衬底多核苷酸的聚(dA)尾部非常长并且大小是不均匀的。在衰减子分子的存在下, 所添加的聚(dA)尾部的大小非常离散, 其分布非常窄, 并且最大值为约12至13个碱基(被USER酶降解的长的衰减子分子在凝胶上是不可见的, 因为降解产物不超过5个碱基)。值得注意的是, 由衰减子分子10-103与含有13个dA碱基的聚(dA)尾部形成的复合物的解链温度(稳定性)为约37.6℃, 所述温度非常接近反应温度37℃。不存在尾部超过13个碱基的任何产物表明, 衰减子分子强烈抑制了超过这个限制的dA碱基的添加。

[0260] 结论: 使用长的(40b)聚(dT)分子来实现聚(dA)加尾的完全衰减。在长的衰减子分子的存在下, 通过TdT酶添加的聚(dA)尾部的长度为约12至13个dA碱基, 其中极窄的大小分布与在不存在衰减子分子的情况下添加的数百个dA碱基形成对比。在完成加尾反应之后, 使用USER酶将含有dU碱基的衰减子分子降解, 以简化dA加尾的DNA衬底的下利用。

[0261] 实施例3

[0262] 在短的衰减子分子的存在下通过TdT酶对单链DNA多核苷酸模板进行的受控的聚(dA)加尾

[0263] 材料:

[0264]	衬底多核苷酸10-001 (表1)
	短的衰减子多核苷酸: 10-130、10-131、10-132、10-133、10-134以及10-135 (表2)
	在短的衰减子分子的末端添加两个核糖U核苷酸, 以阻止通过TdT酶进行的衰减子分子的加尾
	长的可降解的衰减子多核苷酸10-103 (表2)
[0265]	DNA多核苷酸大小标记物: 多核苷酸10-001、10-099、10-100、10-101以及10-102 (表4)的等摩尔混合物
	25 bp梯度DNA大小标记物(Invitrogen, 目录号10488-022)
	TdT酶(New England BioLabs, 目录号M031S, 20 U/ μ l)
	1 x TdT缓冲液: 20 mM Tris-醋酸盐、50 mM乙酸钾、10 mM乙酸镁、0.25 mM CoCl_2 , 在25℃下pH为7.9
	USER酶(New England BioLabs, 目录号M5505S, 1 U/ μ l)

[0266] 方法: 在30℃下, 在含有1x TdT缓冲液、0.1mM dATP、4pmol 衬底多核苷酸10-001、10U TdT酶以及60pmol短的衰减子多核苷酸 10-130至10-135或20pmol长的衰减子多核苷酸10-103的5 μ l反应体积中进行聚(dA)加尾反应, 持续30分钟, 之后在70℃下孵育10分钟以使TdT酶失活。还在衰减子分子10-133的存在下实施衬底10-001 的受控反应, 持续0、30、60、90以及120分钟。将0.25U的USER 酶添加至含有长的衰减子分子10-103的管中并且在37℃下孵育5分钟。将样品在甲酰胺加样缓冲液中煮沸, 并且在预制的15%TBE-尿素聚丙烯酰胺凝胶 (Invitrogen, 目录号EC68852Box) 上跑胶, 用SYBR Gold染色剂 (Invitrogen, 目录号S11494) 染色, 在Dark Reader光盒 (Clare Chemical Research) 上显现, 并且使用数码相机照相。

[0267] 结果: 图16a示出了使用具有不同长度和稳定性的衰减子分子通过TdT酶进行的衰减的聚(dA)加尾反应的产物的电泳分析。泳道2示出了未加尾的模板多核苷酸-衬底10-001, 泳道3至泳道10为TdT加尾之后的多核苷酸-衬底10-1001。泳道3示出了不受控加尾产物, 泳道 4为在长的衰减子分子10-103的存在下的受控加尾产物, 并且泳道5、6、7、8、9和10分别为在短的衰减子分子10-130、10-131、10-132、10-133、10-134以及10-135的存在下的受控加尾产物。泳道1和泳道 11分别示出了DNA多核苷酸和25bp梯度大小标记物。图16b示出了在衰减子分子10-133的存在下进行的加尾反应的动力学, 泳道1为衬底10-001, 泳道2、3、4和5分别为在用TdT酶孵育30、60、90以及120分钟后的加尾产物。如在实施例2中, 在长的衰减子分子10-103 的存在下, 所添加的聚(dA)尾部的大小非常离散, 其分布非常窄, 其中平均值为约12至13个碱基。短的衰减子分子的影响更为复杂并且取决于其大小。具有T7rUrU和T8rUrU链段的衰减子分子10-130和 10-131 (分别在解链温度 $T_m = 14.5^\circ\text{C}$ 和 10°C 的情况下能够与聚(dA)尾部形成复合物) 仅略微减小聚(dA)尾部的平均大小, 而它们的大

小分布仍然保持非常宽(图16a,泳道5和泳道6)。具有T9rUrU链段的衰减子分子10-132(在解链温度 $T_m=24.7^{\circ}\text{C}$ 的情况下能够与聚(dA)尾部形成复合物)产生预测梯度的条带,其中增量近似为15个碱基(图16a,泳道7)。当孵育时间增加到90至120分钟时,梯度变得更为明显,如从图16b的泳道4和泳道5可以看出。利用短的衰减子分子的衰减的加尾的所述动力学在理论上预测并且在本文中进行论述。衰减子分子10-133、10-134以及10-135(分别在解链温度 $T_m=28.6^{\circ}\text{C}$ 、 32°C 以及 35°C 的情况下能够与聚(dA)尾部形成复合物)产生单个离散的条带,其中大小在衰减子大小增加时逐渐从15个碱基减少至12个碱基(图16a,泳道8至泳道10)。总数为14个碱基的衰减子分子10-135在 $T_m=35^{\circ}\text{C}$ 的情况下能够与聚(dA)尾部形成复合物,并且具有与长的40碱基的衰减子分子10-103相同的效果。在反应温度 30°C 下观察到的聚(dA)尾部的12碱基的长度比在反应温度 37°C 下观察到的13碱基的大小少一个碱基,这与在较低反应温度下具有较短长度的复合物的期望增加的稳定性相一致。在凝胶的底部观察到衰减子分子10-130至10-135(图16a中泳道5至泳道10所示)。

[0268] 结论:使用通过1至2个核糖核苷酸、磷酸基团或阻止衰减子分子的TdT加尾的其它修饰在3'末端封闭的短的(12至14个碱基)聚(dT)分子来实现聚(dA)加尾的完全衰减。在衰减子分子的存在下,通过TdT酶添加的聚(dA)尾部的长度通过反应温度和衰减子分子的大小来控制。衰减的聚(dA)尾部具有非常窄的大小分布(± 1 个碱基),其中平均值从11个碱基至15个碱基变化。在含有近似12个dT碱基的衰减子的存在下使用TdT的延长孵育导致增量为12至15个dA碱基的重复序列。

[0269] 实施例4

[0270] 通过TdT酶对双链DNA多核苷酸模板进行的受控的和不受控的聚(dA)加尾效率低下并且显示出强烈的序列偏好。

[0271] 材料:

[0272]	具有由多核苷酸10-105和10-106 (表1和表5)形成的富含GC的平末端的双链DNA衬底;
	具有由多核苷酸10-107和10-108 (表1和表5)形成的富含AT的平末端的双链DNA衬底;
	具有由多核苷酸10-105和10-109 (表1和表5)形成的3'突出末端(3个碱基)的双链DNA衬底;
	具有由多核苷酸10-105和10-110 (表1和表5)形成的3'凹陷末端(3个碱基)的双链DNA衬底;
	长的可降解的衰减子多核苷酸10-103 (表2);
	25 bp梯度DNA大小标记物(Invitrogen,目录号10488-022);
	TdT酶(New England Biolabs,目录号M0315S, 20 U/ μ L);
	1 x TDT缓冲液: 20 mM Tris-醋酸盐、50 mM乙酸钾、10 mM 乙酸镁、0.25 mM CoCl_2 , pH为7.9

[0273] 方法:通过使多核苷酸对10-105/10-106、10-107/10-108、10-105/10-109以及10-105/10-110退火来制备双链DNA模板。确切地说,在煮沸之后,允许混合的多核苷酸在含有0.1mM EDTA和50mM NaCl的10mM Tris-HCl中缓慢冷却至室温。在37℃下,在含有1x TdT缓冲液、0.1mM dATP、1pmol衬底多核苷酸对10-105/106、105/109、105/110或107/108、10U TdT酶、0.5 μ L的2.5mM CoCl_2 以及0pmol 或20pmol衰减子多核苷酸10-103的5 μ L反应体积中进行聚(dA)加尾反应,持续60分钟,之后在70℃下孵育10分钟来使TdT酶失活。添加0.25U的USER酶并且在37℃下孵育5分钟。将样品在甲酰胺加样缓冲液中煮沸,并且在预制的15% TBE-尿素凝胶(Invitrogen,目录号EC68852BOX)上跑胶,用SYBR Gold(Invitrogen,目录号S11494)染色,在Dark Reader光盒(Clare Chemical Research)上显现,并且使用数码相机照相。

[0274] 结果:图17中示出了通过TdT酶进行的标准和衰减的聚(dA)加尾反应的产物的电泳分析。泳道1至泳道4示出了在衰减子分子存在下的加尾产物;泳道6至泳道10为在不存在衰减子分子的情况下;泳道5为25碱基对梯度大小标记物;泳道6为单链多核苷酸衬底10-001 的不受控加尾。所有双链模板均展现出比单链模板效率低的TdT加尾。对于加尾反应,具有3'突出的双链构建体(图17,泳道2和泳道8)是比具有凹陷末端(图17,泳道3和泳道9)或平末端(图17,泳道1、4、7 和10)的双链构建体更好的模板。富含AT的平末端构建体(图17,泳道 4和泳道10)的加尾比相应的富含GC的构建体(图17,泳道1和泳道 7)更有效。具有3'突出的构建体(图17,泳道2)的受控的加尾更为显著,但是它并未进行完全。

[0275] 结论:平末端双链DNA(dsDNA)的加尾比具有3'突出的dsDNA 的加尾发生得更缓慢。富含AT的平末端的加尾比富含GC的末端更有效。不受理论的束缚,这可能归因于富含AT的序列的3'末端的增加的“呼吸”,从而允许其表现得有点像单链DNA(ssDNA)。具有凹陷末

端的双链DNA (dsDNA) 几乎没有效率,如果有任何加尾的话。可以观察到受控的加尾并且具有3'单链突出的双链DNA分子的受控的加尾更有效。

[0276] 实施例5

[0277] 在衰减子分子的存在下通过TdT酶对单链DNA多核苷酸模板进行的受控的聚(dA)加尾不显示出序列偏好。

[0278] 材料:

[0279]

衬底多核苷酸10-001 (表1)

具有随机序列的衬底多核苷酸10-127、128、129以及139 (表1)

长的可降解的衰减子多核苷酸10-103 (表2)

[0280]

TdT酶(New England Biolabs,目录号M0315S, 20 U/ μ L)

1 x TDT缓冲液: 20 mM Tris-醋酸盐、50 mM乙酸钾、10 mM乙酸镁、0.25 mM CoCl_2 , pH为7.9

USER酶(New England BioLabs,目录号M5505S, 1 U/ μ L)

[0281] 方法:在含有1x TdT缓冲液、0.1mM dATP、4pmol衬底多核苷酸10-01或10-127或10-128或10-129或10-139(或四种多核苷酸 10-127、10-128、10-129以及10-139的混合物)以及0pmol或20pmol 衰减子多核苷酸10-103的5 μ L反应体积中进行聚(dA)加尾反应,并且然后在95℃下煮沸3分钟以确保所有衬底均为单链的。添加10个单位的TdT酶并且将反应混合物在37℃下孵育30分钟,之后在70℃下孵育10分钟以使TdT酶失活。添加0.25U的USER酶并且在37℃下孵育5分钟。将样品在甲酰胺加样缓冲液中煮沸,并且在预制的15%TBE-尿素凝胶(Invitrogen,目录号EC68852BOX)上跑胶,用SYBR Gold (Invitrogen,目录号S11494)染色,在Dark Reader光盒(Clare Chemical Research)上显现,并且使用数码相机照相。

[0282] 结果:图18中示出了通过TdT酶进行的标准和衰减的聚(dA)加尾反应的产物的电泳分析。泳道1、3、5、7、9和11分别示出了未加尾的模板10-1001、混合模板(参见方法)以及模板10-139、10-127、10-128 以及10-129;泳道2、4、6、8、10和12分别示出了受控加尾模板10-1001,受控加尾的混合模板以及受控加尾模板10-139、10-127、10-128以及 10-129。所有随机化的多核苷酸衬底的加尾与非随机衬底10-001的加尾相似。

[0283] 结论:在衰减子分子的存在下,在单链DNA衬底的受控的聚(dA)加尾期间,TdT酶不展现出序列偏好。

[0284] 实施例6

[0285] 在衰减子分子的存在下通过TdT酶对单链DNA多核苷酸模板进行的受控的聚(dT)、聚(dC)、聚(dG)加尾。

[0286] 材料:

[0287]

衬底多核苷酸10-085 (表1)
衰减子多核苷酸: 10-103、10-136、10-137以及10-138 (表2)
25 bp梯度DNA大小标记物(Invitrogen, 目录号10488-022)
TdT酶(New England Biolabs, 目录号M0315S, 20 U/ μ L)
1 x TdT缓冲液: 20 mM Tris-醋酸盐、50 mM乙酸钾、10 mM乙酸镁、0.25 mM CoCl_2 , pH为7.9
USER酶(New England BioLabs, 目录号M5505S, 1 U/ μ L)

[0288] 方法:在含有1x TdT缓冲液,0.1mM的dATP、dTTP、dGTP或 dCTP,4pmol衬底多核苷酸10-185以及0pmol或20pmol衰减子多核苷酸10-103、10-136、10-137或10-138的5 μ L反应体积中分别进行聚 (dA)、聚 (dT)、聚 (dG) 以及聚 (dC) 加尾反应。添加10U的TdT酶并且在37℃下孵育30分钟,之后在70℃下孵育10分钟以使TdT酶失活。将0.25U的USER酶添加至含有10-103的反应液中并且在37℃下孵育 5分钟。将样品在甲酰胺加样缓冲液中煮沸,并且在预制的15% TBE- 尿素凝胶 (Invitrogen, 目录号EC68852BOX) 上跑胶,用SYBR Gold (Invitrogen, 目录号S11494) 染色,在Dark Reader光盒 (Clare Chemical Research) 上显现,并且使用数码相机照相。

[0289] 结果:图19中示出了通过TdT酶进行的标准和衰减的聚 (dA)、聚 (dT)、聚 (dG) 以及聚 (dC) 加尾反应的产物的电泳分析。泳道1示出了未加尾的衬底多核苷酸10-085;泳道2、4、6和8示出了通过dA、dT、dG以及dC核苷酸对衬底10-1085进行的受控加尾的产物;泳道3、5、7和9示出了通过dA、dT、dG以及dC核苷酸对衬底10-085进行的不受控加尾的产物;泳道11为25bp梯度DNA大小标记物。在衰减子分子10-136的存在下用dT核苷酸进行的受控的衰减的加尾与在衰减子分子10-103的存在下用dA核苷酸进行的受控的衰减的加尾不可区分。两个反应均产生了具有聚 (dA) 和聚 (dT) 尾部大小 (大约为12至13个碱基) 的狭长条带 (图19,泳道2和泳道4)。用dG核苷酸进行的受控的衰减的加尾也产生具有聚 (dG) 尾部的平均大小 (大约为10至12个碱基) 的狭长条带,这与聚 (dG) /聚 (dC) 双链体的较高稳定性相一致。控制聚 (dC) 加尾的尝试不太成功并且产生了难以解释的结果。

[0290] 结论:衰减子控制的聚 (dA)、聚 (dT) 以及聚 (dG) TdT加尾反应表现得非常相似,从而产生模板的100%的有效加尾并且将非常短并且准确的同聚尾部添加至衬底DNA分子。用dA和dT核苷酸加尾产生约 12至13个碱基的尾部,而用dG核苷酸加尾产生约10至12个碱基的尾部。使用dC核苷酸的受控加尾存在问题,这是因为难以制备和处理含有dG碱基的长链段 (大于6) 的衰减子多核苷酸 (为此原因,将dT碱基包括在衰减子10-138中)。

[0291] 实施例7

[0292] 在衰减子分子的存在下通过大肠杆菌聚 (A) 聚合酶对单链RNA多核苷酸模板进行的受控的聚 (rA) 加尾

[0293] 材料:

[0294]

衬底RNA多核苷酸10-191 (表1)
衰减子多核苷酸10-103 (表2)
大肠杆菌聚(A)聚合酶(New England Biolabs, 目录号M0276S, 5 U/ μ L)
1 x 聚(A)聚合酶缓冲液: 50 mM Tris-HCl、250 mM NaCl、10 mM MgCl ₂ 、1 mM ATP、pH为7.9
USER酶(New England Biolabs, 目录号M5505S, 1 U/ μ L)
低范围ssRNA标记物(New England BioLabs, 目录号N0364S)

[0295]

微小RNA标记物: (New England BioLabs, 目录号N2102S)

[0296] 方法: 在含有4pmol衬底多核苷酸10-191和0pmol或20pmol 衰减子多核苷酸10-103以及2.5U聚(A)聚合酶的5 μ L体积的1x聚(A)聚合酶缓冲液中执行反应。将反应在30℃下进行5、10、15或30分钟(图20)并且然后加热至95℃以使聚(A)聚合酶失活。然后将0.5U的USER酶添加至含有衰减子分子的管内并且在37℃下孵育10分钟。然后将样品在甲酰胺加样缓冲液中煮沸, 并且在预制的15%TBE-尿素凝胶(Invitrogen, 目录号EC68852BOX)上跑胶, 用SYBR Gold(Invitrogen, 目录号S11494)染色, 在Dark Reader光盒(Clare Chemical Research)上显现, 并且使用数码相机照相。

[0297] 结果: 图20中示出了通过聚(A)聚合酶对RNA衬底多核苷酸10-191进行的标准的和衰减的聚(rA)加尾的产物的电泳分析。泳道4、5、6和7以及泳道9、10、11和12分别示出了在不存在和存在衰减子分子10-103的情况下用聚(A)聚合酶孵育5、10、15以及30分钟的加尾动力学。泳道1、2和3分别示出了在用USER酶孵育之后的RNA衬底10-191、衰减子多核苷酸10-103以及衰减子多核苷酸。泳道8示出了低范围ssRNA标记物与微小RNA标记物的组合。在两种情况下, 加尾反应均在15分钟内完成。在不存在衰减子分子的情况下, 通过聚(A)聚合酶添加至衬底多核苷酸的聚(rA)尾部非常长并且大小是不均匀的。在衰减子分子的存在下, 所添加的聚(rA)尾部的大小大致较短, 具有与尾部具有大约20个碱基的衬底相对应的非常窄的条带(图20, 泳道9)。长的衰减子分子通过USER酶降解并且在凝胶上是不可见的, 因为降解产物不超过5个碱基(图20, 泳道2和泳道3)。在较长的孵育时间下, 观察到与具有40个碱基的尾部大小相对应的二聚体条带(图20, 泳道10、11和12)。与通过TdT酶添加的尾部(12至13个碱基)相比较, 通过大肠杆菌聚合酶(A)引入的受控的衰减尾部(20b)的更大的大小以及在相同的衰减子分子10-103存在下的二聚体条带的外观通过聚(rA)/聚(dT)双链体相对于聚(dA)/聚(dT)双链体的较低的热稳定性来解释。

[0298] 结论: 使用长的DNA聚(dT)分子来实现RNA模板的聚(rA)加尾的完全衰减。在长的衰减子分子的存在下通过聚(A)聚合酶添加的聚(rA)尾部的长度为约20个rA碱基, 其中窄的大小分布与在不存在衰减子分子的情况下添加的数百个rA碱基形成对比。在完成加尾反应之后, 使用USER酶来使含有dU碱基的衰减子分子降解, 以简化rA-加尾的RNA衬底的下利用。通过聚(A)聚合酶进行的衰减的加尾产生具有大约20个碱基的尾部, 所述尾部可以有

效用于RNA和微小RNA分析。

[0299] 实施例8

[0300] 在DNA和RNA衰减子分子的存在下通过酵母(粟酒裂殖酵母)聚 (U) 聚合酶对单链RNA多核苷酸模板进行的受控的聚 (rU) 加尾

[0301] 材料:

[0302]	衬底RNA多核苷酸10-191 (表1)
	衰减子多核苷酸10-136、10-192以及11-049 (表2), 或高分子量聚 (rA) (Midland Certified Reagent Company, Texas, 目录号P3001)
	RNA大小梯度: 0.5 μl低范围ssRNA梯度(NEB N0364S)和10 μl微小RNA标记物(NEB N2102S)与10 μl甲酰胺缓冲液组合
	DNA大小梯度: 25 bp梯度DNA大小标记物(Invitrogen, 目录号10488-022)
	酵母(粟酒裂殖酵母)聚(U)聚合酶(New England Biolabs , 目录号M0337S, 2 U/μL)
	1 x 聚(U)聚合酶缓冲液: 10 mM Tris-HCl、50 mM NaCl、10 mM MgCl ₂ 、1 mM UTP、1 mM DTT、pH为7.9 甲酰胺缓冲液: 97%甲酰胺、10 mM EDTA、0.01%溴酚蓝、0.01%二甲苯蓝

[0303] 方法:在含有4皮摩尔 (pmol) 衬底多核苷酸10-191和0pmol或20 pmol DNA衰减子多核苷酸10-136和10-192或高分子量 (HMW) RNA 衰减子聚 (rA) (平均大小约为200b) 的5ul 体积的1x聚 (U) 聚合酶缓冲液中执行反应。将反应在37℃ (图21a) 或30℃ (图21b) 下进行10、15 或30分钟。通过将8pmol衬底核糖多核苷酸10-191以及40pmol核糖多核苷酸11-049或2μl超纯水添加至含有1X NEB 2缓冲液和1mM rUTP的反应管中来准备具有RNA衰减子的反应液。向每个管中添加2 U的NEB聚 (U) 聚合酶并且将反应液在30℃下孵育15分钟 (图21c)。为了停止反应,将10ml的2X甲酰胺加样缓冲液添加至每个管中,煮沸并且使其在预制的15%TBE-尿素凝胶 (Invitrogen, 目录号 EC68852BOX) 上跑胶,用SYBR Gold (Invitrogen, 目录号S11494) 染色,在Dark Reader光盒 (Clare Chemical Research) 上显现,并且使用数码相机照相。

[0304] 结果:图21a和图21b中示出了通过聚 (U) 聚合酶进行的标准和衰减的聚 (rU) 加尾反应的产物的电泳分析。图21a分别示出了在相对较短的DNA衰减子多核苷酸10-136 (20b) 的存在下,10、15以及30分钟的孵育时间的RNA衬底10-191的受控 (泳道6、7和8) 和不受控 (泳道3、4和5) 的聚 (U) 加尾的时间过程;泳道2为初始RNA衬底10-191;泳道 1为25bp梯度

DNA大小标记物。图21b示出了在长的40碱基的DNA 衰减子(图21b,泳道3)和高分子量聚(rA)RNA衰减子(图21b,泳道4) 的存在下对RNA衬底10-191(图21b,泳道2) 进行的受控加尾。泳道1 示出低范围ssRNA标记物和微小RNA标记物的组合,泳道5为RNA 衬底10-191与高分子量聚(rA)RNA衰减子的混合物。图21c示出了在长的30b RNA衰减子多核苷酸11-049的存在下对RNA衬底10-191(泳道3) 进行的受控加尾。如从图21a可见,在短的DNA聚(dA)₂₀(SEQ ID NO:21) 衰减子的存在下进行的衰减的加尾导致了重复的加尾模式(梯度),其表明衰减过程正在进行,但却无法实现通过20-碱基DNA衰减子进行完全抑制以及窄的尾部大小分布。将DNA衰减子的长度增加到 40个碱基确实能够改进衰减过程并且产生宽的单一一条带(图21b,泳道3)。已知聚(rU)和聚(dA)聚合物形成非常不稳定的双链体,而聚(rU)和聚(rA)形成更为稳定的复合物。这通过使用高分子量聚(rA)和较短的核糖多核苷酸(rA)₃₀(11-049)作为聚(U)RNA加尾的衰减子来证实。如从图21b的泳道4可以看出,在长的RNA衰减子的存在下进行的加尾产生的加尾产物具有非常窄的大小分布并且尾部大小约为20个碱基(衬底的19个碱基加上聚(U)尾部的大约20个碱基产生与大小为40个碱基的衰减子10-192相似的大小为约40个碱基的分子)。使用衰减子核糖多核苷酸11-049获得类似的结果(图21c,泳道3),其中聚(U)加尾的衬底核糖多核苷酸10-191可以看做是具有约40个碱基的产物,从而表明聚(U)尾部的大小为约20个碱基。

[0305] 结论:受控的衰减的聚(U)加尾在DNA聚(dA)衰减子的存在下实现,但在RNA聚(rA)衰减子的存在下更为有效。通过聚(U)聚合酶进行的衰减的加尾产生具有大约20个碱基的尾部,所述尾部可以有效用于 RNA和微小RNA分析。

[0306] 实施例9

[0307] 通过TdT和大肠杆菌DNA连接酶的组合作用对单链DNA进行的同步的受控聚(dA)加尾和衰减子-衔接子分子连接

[0308] 材料:

[0309]	衬底多核苷酸10-105 (表1)
	通过多核苷酸10-211和10-212 (表3和表6)形成的双链衰减子-衔接子
	TdT酶(New England BioLabs,目录号M0315S, 20 U/ μ L)
	1 x TDT缓冲液: 20 mM Tris-醋酸盐、50 mM乙酸钾、10 mM乙酸镁、0.25 mM CoCl ₂ , pH为7.9
	大肠杆菌DNA连接酶(New England Biolabs,目录号M0205S, 10 U/ μ L)

[0310] 方法:通过煮沸使多核苷酸10-211和10-212共同退火并且然后允许所述多核苷酸在含有0.1mM EDTA和50mM NaCl的10mM Tris-HCl中缓慢冷却至室温。在含有1x TdT缓冲液、0.1mM dATP、26 μ M NAD⁺、4pmol衬底多核苷酸以及20pmol衰减子-衔接子分子的 10 μ L反应体积中进行同步聚(dA)加尾和衰减子-衔接子连接反应。添加 10U TdT酶以及0U或10U DNA连接酶并且在37℃下孵育15分钟。然后将样品在甲酰胺加样缓冲液中煮沸,并且在预制

的15%TBE-尿素凝胶 (Invitrogen, 目录号EC68852BOX) 上跑胶, 用SYBR Gold (Invitrogen, 目录号S11494) 染色, 在Dark Reader光盒 (Clare Chemical Research) 上显现, 并且使用数码相机照相。

[0311] 结果: 图22中示出了同步的衰减的TdT介导的聚(dA)加尾和衔接子连接反应的产物的电泳分析。泳道1表示25bp梯度DNA标记物; 泳道2为反应中使用的衬底和衰减子-衔接子分子。泳道3示出了同步加尾-连接反应的产物; 泳道4为使用衰减子-衔接子构建体(无连接酶)的加尾反应的产物。在TdT酶和大肠杆菌连接酶的存在下, 反应产生位于25碱基DNA梯度的75碱基条带与100碱基条带之间的狭长条带。加尾和连接产物的期望大小为95个碱基, 其非常接近所观察到的产物的大小(图22, 泳道3, 最大条带)。与未反应的衬底相对应的50碱基条带在泳道4中几乎是不可见的, 从而表明衰减的加尾-连接反应的效率接近100%。泳道4(仅TdT)和泳道5(TdT和连接酶)中呈现的数据表明, 所使用的反应时间(15分钟)足以用于添加12个碱基的尾部并连接衔接子, 但不足以将衬底转化成添加了12至13个dA碱基的产物。图24a示意性地示出了单管单步骤DNA加尾-连接过程。

[0312] 结论: 聚(dA)加尾和随后与衰减子-衔接子分子的连接当在单个样品管内同时进行时发生得非常快速和有效。所述反应用于以单管单反应形式对随机的单链DNA分子进行有效的衔接和加标签。

[0313] 实施例10

[0314] 通过TdT和DNA连接酶的组合作用以及固定至磁珠的衰减子-衔接子的使用对单链DNA进行同步的受控的聚(dA)加尾和固定。

[0315] 材料:

[0316]

衬底多核苷酸10-105 (表1);
通过多核苷酸10-211和10-212 (表3和表6)形成的衰减子-衔接子
TdT酶(New England BioLabs, 目录号M0315S, 20 U/ μ L)
1 x TDT缓冲液: 20 mM Tris-醋酸盐、50 mM乙酸钾、10 mM 乙酸镁、0.25 mM CoCl_2 , pH为7.9
大肠杆菌DNA连接酶(New England Biolabs, 目录号M0205S, 10 U/ μ L)
Dynabeads MyOne Streptavidin T1 (Invitrogen 目录号656.01)
珠粒洗涤缓冲液: pH为7.5的5 mM Tris-HCl、0.5 mM EDTA、1M NaCl、0.05% Tween-20

[0317] 方法: 如实施例9中所述制备衰减子-衔接子复合物。用珠粒洗涤缓冲液将100uL Dynabead洗涤两次并且然后重新悬浮在20uL珠粒洗涤缓冲液中。将80pmol退火的10-211/212对添加至珠粒溶液中。在室温下, 在轨道摇床(Nutator)上将珠粒孵育大约2小时, 然后

在4℃下储存直到需要。在反应进行之前不久,将5μL珠粒溶液转移到新管,并且用TdT缓冲液洗涤两次。在含有1x TdT缓冲液、0.1mM dATP、26 uM NAD⁺、4pmol衬底多核苷酸以及20pmol固定在珠粒上的衰减子-衔接子复合物的10uL反应体积中进行同步聚(dA)加尾和衰减子连接反应。添加10U TdT酶以及0U或10U DNA连接酶并且在37℃下孵育15分钟。用去离子水将珠粒洗涤两次并且然后用10μL的125mM NaOH将非生物素化的ssDNA从珠粒上剥离。将通过NaOH释放的DNA中和并且然后将其余样品在甲酰胺加样缓冲液中煮沸,并且在预制的15%TBE-尿素凝胶(Invitrogen,目录号EC68852B0X)上跑胶,用SYBR Gold(Invitrogen,目录号S11494)染色,在Dark Reader光盒(Clare Chemical Research)上显现,并且使用数码相机照相。

[0318] 结果:图22的泳道5中示出了同步衰减的TdT介导的聚(dA)加尾和固定的衰减子-衔接子的连接的产物的电泳分析。加尾和连接产物的期望大小为95个碱基,其非常接近所观察到的产物的大小(图22,泳道5,最大条带)和实施例9中所描述的加尾-连接反应的产物(泳道3)。泳道3和泳道5中95碱基对条带的强度表明衰减的加尾-连接-固定反应的效率接近100%。与泳道5中多核苷酸10-212相对应的强条带归因于存在过量未反应的衔接子。图24b中示出了固定过程。

[0319] 结论:聚(dA)加尾和随后与固定的衰减子-衔接子分子的连接当在单个样品管内同时进行时发生得非常快速和有效。所述反应用于以单管单反应形式对随机的单链DNA分子进行有效的衔接、加标签和固定。

[0320] 实施例11

[0321] 通过酵母聚(A)聚合酶和T4DNA连接酶的组合作用对单链RNA进行的同步的受控的聚(rA)加尾和衰减子-衔接子分子连接

[0322] 材料:

[0323]	衬底多核苷酸10-191(表1);
	通过多核苷酸11-010和11-011(表3和表6)形成的衰减子-衔接子
	酵母聚(A)聚合酶(Affymetrix, 74225Y; 600 U/μl)
	1 x TDT缓冲液: 20 mM Tris-醋酸盐、50 mM乙酸钾、10 mM乙酸镁、0.25 mM CoCl ₂ , pH为7.9
	T4 DNA连接酶(New England BioLabs, 目录号M0202T, 2,000,0000末端单位/ml)
	Dynabeads MyOne Streptavidin T1 (Invitrogen 目录号656.01)
	珠粒洗涤缓冲液: pH为7.5的5 mM Tris-HCl、0.5 mM EDTA

[0324]

、1M NaCl、0.05% Tween-20
5X 聚(A)聚合酶反应缓冲液(Affymetrix; 74226): pH为7.0 的100 mM Tris-HCl、3mM MnCl ₂ 、0.1 mM EDTA、1mM 二硫苏糖醇、500 ug/mL乙酰化BSA、50%甘油
TrackIt 25 bp梯度: Invitrogen; 10488-022
甲酰胺缓冲液: 97%甲酰胺、10 mM EDTA、0.01%溴酚蓝 、0.01%二甲苯蓝(内部制备)

[0325] 方法:通过将8pmol衬底核糖寡核苷酸(10-191)和40pmol衰减子 / 衔接子寡核苷酸对(11-010/11-011)添加至含有1x聚(A)聚合酶反应缓冲液和1mM rATP的反应管中来准备反应液。向每个管中添加300单位的酵母聚(A)聚合酶和2,000粘性末端单位的T4DNA连接酶,并且将反应液在37℃下孵育30分钟。为了停止反应,将10μL的2x甲酰胺加样缓冲液添加至每个管中并且将反应液在95℃下煮沸2分钟。将 25bp梯度和10uL每种反应液加样到15% TBE-尿素凝胶上。向凝胶施加200伏特的电流,持续30分钟,以使分子分开并且然后用SYBR Gold 对凝胶染色,持续10分钟,并且然后在Dark Reader光盒(Clare Chemical Research)上显现,并且使用数码相机照相。

[0326] 结果:图23中示出了通过聚(A)聚合酶和T4DNA连接酶进行的同步加尾和连接的衬底的产物的电泳分析。图24c示意性地示出了单管单步骤RNA加尾-连接过程。

[0327] 结论:合成RNA衬底可以通过由聚(A)聚合酶和T4DNA连接酶催化的组合的衰减的聚(rA)-加尾和连接来使DNA衔接子序列连接至 RNA衬底的3'末端。所述反应可以用于以单管单反应形式对随机的单链RNA分子进行有效的衔接和加标签。

[0328] 表1. 合成的多核苷酸衬底

[0329]

ID	SEQ ID NO	序列
----	-----------	----

[0330]

10-001:	1	5'-GGT CGT AGC AGT CGT TGA TG-3'
10-105:	2	5'-TAG TTG CTG CAA CCT AGT CTA GAT CTA TAA ACG CAC CTT TGG ACA CGG GG-3'
10-106:	3	5'-CCC CGT GTC CAA AGG TGC GTT TAT AGA TCT AGA TCT AGA CTA GGT TGC AGC AAC TA- 3'磷酸
10-107:	4	5'-TAG TTG CTG CAA CCT AGT CTA GAT CTA TAA ACG CAC CTT TGG ACA CTT TT-3'
10-108:	5	5'-AAA AGT GTC CAA AGG TGC GTT TAT AGA TCT AGA CTA GGT TGC AGC AAC TA-3'磷酸
10-109:	6	5'-CGT GTC CAA AGG TGC GTT TAT AGA TCT AGA TCT AGA TCT AGA CTA GGT TGC AGC AAC TA-3'磷酸
10-110:	7	5'-GGT CCC CGT GTC CAA AGG TGC GTT TAT AGA TCT AGA TCT AGA TCT AGA CTA GGT TGC AGC AAC TA-3'磷酸
10-085:	8	5'-GTA TCG CTA CGT TGT CAC ACA CTA CAC TGC TCG ACA GTA AAT ATG CCA AG-3'
10-127:	9	5'-GAT CGT AGC TAG (N) ₁₁ G-3'
10-128:	10	5'-GAT CGT AGC TAG (N) ₁₁ C-3'
10-129:	11	5'-GAT CGT AGC TAG (N) ₁₁ T-3'
10-139:	12	5'-GAT CGT AGC TAG (N) ₁₁ A-3'
10-191:	13	5'-rGrGrCrCrUrUrGrUrUrCrCrUrGrUrCrCrCrCrA-3'

[0331] 表2. 合成的多核苷酸-衰减子

[0332]

ID	SEQ ID NO	序列
10-103:	14	5' - (TTTTTU) ₆ TTTT-3' 磷酸
10-130:	15	5' -GAT CGT AU T ₇ rUrU-3'
10-131:	16	5' -GAT CGT AU T ₈ rUrU-3'
10-132:	17	5' -GAT CGT AU T ₉ rUrU-3'
10-133:	18	5' -GAT CGT AU T ₁₀ rUrU-3'
10-134:	19	5' -GAT CGT AU T ₁₁ rUrU-3'
10-135:	20	5' -GAT CGT AU T ₁₂ rUrU-3'
10-136:	21	5' - (AAA) ₆ AA-3' 磷酸
10-137:	22	5' - (CCC) ₆ CC-3' 磷酸
10-138:	23	5' - (GGG GGT) ₆ GGG G-3' 磷酸
10-192:	24	5' - (AAA) ₁₃ A-3' 磷酸
11-049	25	5' - (rArArA) ₁₀ -3' 磷酸

[0333] 表3. 包含衰减子-衔接子复合物的合成多核苷酸

[0334]

ID	SEQ ID NO	序列
10-211	26	5'生物素-TAC ACT CTT TCC CTA CAC GAC GCT CTT CCG ATC TTT TTT TTT TrUrU-3'
10-212	27	5'磷酸-GAT CGG AAG AGC GTC GTG TAG GGA AAG AGT GTA-3'磷酸
11-010	28	5'磷酸-CTT ATT GCT GTG GTT GGT TCC TGT GCT GTT TT-3'磷酸
11-011	29	5'-CCAACCACAGCAAUAAGUTTTTUTTTTUTTTTUTTT T-3'磷酸

[0335] 表4. 包含DNA加尾大小标记物的合成多核苷酸

[0336]

ID	SEQ ID NO	序列
10-001	30	5'-GGT CGT AGC AGT CGT TGA TG-3'
10-099	31	5'-GGT CGT AGC AGT CGT TGA TGA AAA A-3'
10-100	32	5'-GGT CGT AGC AGT CGT TGA TGA AAA AAA AAA-3'
10-101	33	5'-GGT CGT AGC AGT CGT TGA TGA AAA AAA AAA AAA AA-3'
10-102	34	5'-GGT CGT AGC AGT CGT TGA TGA AAA AAA AAA AAA AAA AAA A-3'

[0337] 表5. 双链DNA衬底

[0338]

ID	SEQ ID NO	序列
平末端, 富含GC		
10-105	35	5'-TAG TTG CTG CAA CCT AGT CTA GAT CTA TAA ACG CAC CTT TGG ACA CGGGG-3'
10-106	36	3P'-ATC AAC GAC GTT GGA TCA GAT CTA GAT ATT TGC GTG GAA ACC TGT GCC CC-5'
平末端, 富含AT		
10-107	37	5'-TAG TTG CTG CAA CCT AGT CTA GAT CTA TAA ACG CAC CTT TGG ACA CTT TT-3'

[0339]

10-108	38	3P'-ATC AAC GAC GTT GGA TCA GAT CTA GAT ATT TGC GTG GAA ACC TGT GAAAA-5'
3'突出末端(3个碱基)		
10-105	35	5'-TAG TTG CTG CAA CCT AGT CTA GAT CTA TAA ACG CAC CTT TGG ACA CGGGG-3'
10-109	39	3P'-ATC AAC GAC GTT GGA TCA GAT CTA GAT ATT TGC GTG GAA ACC TGT GC-5'
3'凹陷末端(3个碱基)		
10-105	35	5'-TAG TTG CTG CAA CCT AGT CTA GAT CTA TAA ACG CAC CTT TGG ACA CGGGG-3'
10-110	40	3P'-ATC AAC GAC GTT GGA TCA GAT CTA GAT ATT TGC GTG GAA ACC TGT GCC CCTGG-5'
衰减子-衔接子		
10-212	41	5'-GATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT A-3'P
10-211	42	3'-rUrUTTTTTTTTTTCTAGCC TTCT CGCAGCACATC C CTTT CTCACAT-生物素-5'

[0340] 表6. 衰减子-衔接子复合物的结构

[0341]

ID	SEQ ID NO	结构
10-212 10-211	41 42	<p>5'-P-GATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGA-3'-P</p> <p>3'-rUrUTTTTTTTTCTAGCC TTCT CGCAGCACATC C CTTT CTCACAT - 生物素 -5'</p> <p>12b-衰减子结构域 33b-衔接子结构域</p>
11-010 11-011	28 29	<p>5'-P-CTTATTGCTGTGGTTGGTTCCTGTGCTGTTTT-3'-P</p> <p>3'-P-TTTTUTTTTTTUTTTTUTTTUGAAUAACGACACCAACC-5'</p> <p>19b-衰减子结构域 32b-衔接子结构域</p>

[0342] 下表7提供了与NGS序列X和序列Y相对应的NGS衔接子序列（参见图25至图29）。

[0343]

衔接子	序列(5'-3')	SEQ ID NO
Ion Torrent衔接子A	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	44
Ion Torrent P1	CCACTACGCCTCCGCTTTCCTCTCTATGGG CAGTCGGTGAT	45
Illumina衔接子1	P-GATCGGAAGAGCTCGTATGCCGTCTTCTG CTTG	46
Illumina衔接子2	ACACTCTTTCCTACACGACGCTCTTCCGA TCT	47
Roche 454衔接子A	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	48
Roche 454衔接子B	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAG	49
SOLiD衔接子P1	CCACTACGCCTCCGCTTTCCTCTCTATGGG CAGTCGGTGAT	50
SOLiD衔接子P2	AGAGAATGAGGAACCCGGGGCAGTT	51

[0344] 实施例12:用包含具有随机碱基组成的另外的3' 结构域的衰减子- 衔接子分子进行的受控的加尾和连接反应

[0345] 材料:

[0346]

10 μ M衔接子寡核苷酸13-128 (表X)
10 μ M衰减子-衔接子寡核苷酸7N 13-281
10 μ M衰减子-衔接子寡核苷酸6N 13-280
10 μ M衰减子-衔接子寡核苷酸5N 13-279
10 μ M衰减子-衔接子寡核苷酸3N 13-278
衬底寡核苷酸12-492
T4 DNA 连接 酶 (Rapid) 600,000 U/ml (Enzymatics, 目录号 L6030-HC-L)
末端脱氧核苷酸转移酶20,000 U/ml (Enzymatics, 目录号P7070L)
10X绿色缓冲液(Enzymatics, 目录号B0120)
腺苷 5'-三磷酸 (ATP) 10mM (New England BioLabs, 目录号 P0756S)
100 mM dATP Set (Life technologies, Invitrogen, 目录号 10216-018)
25 bp梯度DNA大小标记物(Life technologies, Invitrogen, 目录号 10488-022)

[0347] 方法:

[0348] 在终浓度为0.25 μ M的衬底寡核苷酸12-492, 0.75 μ M衔接子寡核苷酸13-128, 1.5 μ M衰减子-衔接子寡核苷酸13-281或1.5 μ M衰减子-衔接子寡核苷酸13-280或1.5 μ M衰减子-衔接子寡核苷酸13-279或 1.5 μ M衰减子-衔接子寡核苷酸13-278或每种0.375 μ M、或每种0.750 μ M、或每种1.125 μ M的这四种物质的组合, 1X绿色缓冲液, 1mM ATP, 1mM dATP, 15U/ μ l T4DNA连接酶以及0.5U/ μ l末端脱氧核苷酸转移酶的40 μ l的总体积中按顺序组织受控的加尾和连接反应。

[0349] 将反应液在25 $^{\circ}$ C下孵育10分钟, 在95 $^{\circ}$ C下孵育2分钟。接着, 将10 μ l样品与2x甲酰胺加样缓冲液一起煮沸, 并且随后在预制的15% TBE-尿素聚丙烯酰胺凝胶 (Invitrogen, 目录号S11494) 上跑胶, 用SYBR® Gold核酸凝胶染色剂 (Invitrogen, 目录号S11494) 染色, 在Dark reader光盒 (Clare Chemical Research) 上显现, 并且使用数码相机照相。

[0350] 结果:

[0351] 进行了受控的加尾和连接反应并且在变性条件下通过电泳在15%聚丙烯酰胺凝胶上显现。凝胶1的泳道1仅含有寡核苷酸。凝胶1的泳道2、3和4示出了表示同聚物 (大约2至6个碱基对) 添加至衬底 (43 个碱基对) 并且衔接子 (23个碱基对) 连接至所述衬底的产物的条带 (图 34)。凝胶2的泳道1、2、3和4示出了表示同聚物 (大约2至6个碱基对) 添加至衬底 (43个碱基对) 并且衔接子 (23个碱基对) 连接至所述衬底的产物的条带 (图35)。在随机碱基

衰减子-衔接子13-278、13-279、13-280、13-281以及所有四种随机碱基衰减子-衔接子的等摩尔组合的存在下观察到了与添加同聚物尾部和连接靶衬底的产物相对应的条带。

[0352] 结论:

[0353] 同聚物尾部的添加和与靶衬底的连接使用呈现不同效率的随机碱基衰减子-衔接子13-278、13-279、13-280以及13-281来实现。

[0354] 实施例13.用二核苷酸衰减子-衔接子进行的受控的加尾和连接反应

[0355] 材料:

[0356]	衬底寡核苷酸(12-492)
	衔接子寡核苷酸(13-128)
	衰减子-衔接子寡核苷酸12T (13-114)
	衰减子-衔接子寡核苷酸6C (13-263)
	衰减子-衔接子寡核苷酸6K (13-274), 其中K与G/T二核苷酸相对应
	衰减子-衔接子寡核苷酸6R (13-275), 其中R与G/A二核苷酸相对应
	T4 DNA 连接 酶 (Rapid) 600,000 U/ml (Enzymatics, 目录号 L6030-HC-L)
	末端脱氧核苷酸转移酶20,000 U/ml (Enzymatics, 目录号P7070L)
	10X绿色缓冲液(Enzymatics, 目录号B0120)
	腺苷5'-三磷酸(ATP) 10mM (New England BioLabs, 目录号P0756S)
	100 mM脱氧核糖核苷酸三磷酸(dNTP) Set (Life technologies, Invitrogen, 目录号10297-117)
	25 bp梯度DNA大小标记物(Life technologies, Invitrogen, 目录号10488-022)

[0357] 方法:

[0358] 在终浓度为0.25 μ M的衬底寡核苷酸13-325, 0.75 μ M衔接子寡核苷酸13-128, 具有与12T或6C同聚物或多个6R (G/A) 或6K (G/T) 随机合成的二核苷酸相对应的衰减子部分的1.5 μ M衰减子-衔接子寡核苷酸, 1X绿色缓冲液, 0.5mM, 1mM ATP, 与所使用的单核苷酸或二核苷酸衰减子-衔接子互补的1mM的适当的dNTP单核苷酸或二核苷酸混合物(参见凝胶标记), 15U/ μ l T4DNA连接酶以及0.5U/ μ l末端脱氧核苷酸转移酶的40 μ l的总体积中按顺序组织受控的加尾和连接反应。

[0359] 将反应液在25 $^{\circ}$ C下孵育30分钟, 之后在95 $^{\circ}$ C下孵育2分钟。接着, 将10 μ l样品与2x甲酰胺加样缓冲液一起煮沸, 并且随后在预制的15% TBE-尿素聚丙烯酰胺凝胶(Invitrogen, 目录号S11494)上跑胶, 用SYBR® Gold核酸凝胶染色剂(Invitrogen, 目录号S11494)染色, 在Dark reader光盒(Clar e Chemical Research)上显现, 并且使用数码相

机照相。

[0360] 结果：

[0361] 进行了受控的加尾和连接反应并且在变性条件下通过电泳在15%聚丙烯酰胺凝胶上显现。泳道2、3、4和5示出了与将23个碱基的衔接子(13-128)连接至通过TdT酶(大约6个碱基)加尾的43个碱基的衬底(12-492)相对应的恰好在75碱基标记物下方的产物大小约为72个碱基的所加尾和连接的产物。还观察到了过量的衔接子(13-128)和衰减子-衔接子。在泳道2、4和5中的43个碱基处还观察到了一些剩余产物。泳道1与掺有衬底寡核苷酸(12-492)、衔接子寡核苷酸(13-128)以及衰减子-衔接子寡核苷酸6K(13-274)的DNA多核苷酸标记物相对应(图 36)。

[0362] 结论：

[0363] 使用通过多个对应互补的随机碱基的二核苷酸衰减子-衔接子进行的二核苷酸加尾进行的受控的加尾和连接反应是有效的。

[0364] 表8. 用于实施例12和实施例13的合成多核苷酸衬底

ID	SEQ ID NO	序列
12-492	52	/5PHOS/NNNNNNNNNNNTGCCTCCTGGACTATGTCCGGG TANNNNNNNNNNN

[0366] 表9. 用于实施例12和实施例13的合成多核苷酸衰减子-衔接子

ID	SEQ ID NO	序列
13-281	53	CAGTCGGUGATTNNNNNNN/3SpC3/
13-280	54	CAGTCGGUGATTTNNNNNNN/3SpC3/
13-279	55	CAGTCGGUGATTTTNNNNNN/3SpC3/
13-278	56	CAGTCGGUGATTTTTNNNN/3SpC3/
13-114	57	CAGTCGGTGAUTTTTTTUTTTTTT/3SpC3/
13-263	58	CAGTCGGUGATCCCCC/3SpC3/
13-274	59	CAGTCGGUGATKKKKKK/3SpC3/
13-275	60	CAGTCGGUGATRRRRRR/3SpC3/

[0368] 表10. 包含用于实施例12和实施例13的衔接子的合成多核苷酸。

ID	SEQ ID NO	序列
13-128	61	/5Phos/ATCACCGACTGCCCATAGAGAGG/3Phos/

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 斯威夫特生物科学公司 (SWIFT BIOSCIENCES, INC.)
- [0003] <120> 用于通过核酸聚合酶对衬底多核苷酸进行大小受控的同聚物加尾的方法和组合物 (METHODS AND COMPOSITIONS FOR SIZE-CONTROLLED HOMOPOLYMER TAILING OF SUBSTRATE POLYNUCLEOTIDES BY A NUCLEIC ACID POLYMERASE)
- [0004] <130> SPI180002-81
- [0005] <150> 美国61/610,296
- [0006] <151> 2012-03-13
- [0007] <150> 美国61/613,784
- [0008] <151> 2012-03-21
- [0009] <160> 61
- [0010] <170> PatentIn 3.5版
- [0011] <210> 1
- [0012] <211> 20
- [0013] <212> DNA
- [0014] <213> 人工序列
- [0015] <220>
- [0016] <223> 合成多核苷酸
- [0017] <400> 1
- [0018] ggtcgtagca gtcgttgatg 20
- [0019] <210> 2
- [0020] <211> 50
- [0021] <212> DNA
- [0022] <213> 人工序列
- [0023] <220>
- [0024] <223> 合成多核苷酸
- [0025] <400> 2
- [0026] tagttgctgc aacctagtct agatctataa acgcaccttt ggacacgggg 50
- [0027] <210> 3
- [0028] <211> 56
- [0029] <212> DNA
- [0030] <213> 人工序列
- [0031] <220>
- [0032] <223> 合成多核苷酸
- [0033] <220>
- [0034] <221> misc_feature
- [0035] <222> (56) .. (56)
- [0036] <223> 3'磷酸

[0037]	<400> 3
[0038]	ccccgtgtcc aaaggtgcgt ttatagatct agatctagac taggttgcag caacta 56
[0039]	<210> 4
[0040]	<211> 50
[0041]	<212> DNA
[0042]	<213> 人工序列
[0043]	<220>
[0044]	<223> 合成多核苷酸
[0045]	<400> 4
[0046]	tagttgctgc aacctagtct agatctataa acgcaccttt ggacactttt 50
[0047]	<210> 5
[0048]	<211> 50
[0049]	<212> DNA
[0050]	<213> 人工序列
[0051]	<220>
[0052]	<223> 合成多核苷酸
[0053]	<220>
[0054]	<221> misc_feature
[0055]	<222> (50) .. (50)
[0056]	<223> 3'磷酸
[0057]	<400> 5
[0058]	aaaagtgtcc aaaggtgcgt ttatagatct agactaggtt gcagcaacta 50
[0059]	<210> 6
[0060]	<211> 59
[0061]	<212> DNA
[0062]	<213> 人工序列
[0063]	<220>
[0064]	<223> 合成多核苷酸
[0065]	<220>
[0066]	<221> misc_feature
[0067]	<222> (59) .. (59)
[0068]	<223> 3'磷酸
[0069]	<400> 6
[0070]	cgtgtccaaa ggtgcgttta tagatctaga tctagatcta gactaggttg cagcaacta 59
[0071]	<210> 7
[0072]	<211> 65
[0073]	<212> DNA
[0074]	<213> 人工序列
[0075]	<220>

[0076] <223> 合成多核苷酸
[0077] <220>
[0078] <221> misc_feature
[0079] <222> (65) .. (65)
[0080] <223> 3'磷酸
[0081] <400> 7
[0082] ggtccccgtg tccaaaggtg cgtttataga tctagatcta gatctagact aggttgcagc 60
[0083] aacta 65
[0084] <210> 8
[0085] <211> 50
[0086] <212> DNA
[0087] <213> 人工序列
[0088] <220>
[0089] <223> 合成多核苷酸
[0090] <400> 8
[0091] gtatcgctac gttgtcacac actacactgc tcgacagtaa atatgccaag 50
[0092] <210> 9
[0093] <211> 24
[0094] <212> DNA
[0095] <213> 人工序列
[0096] <220>
[0097] <223> 合成多核苷酸
[0098] <220>
[0099] <221> misc_feature
[0100] <222> (13) .. (23)
[0101] <223> n为a、c、g或t
[0102] <400> 9
[0103] gatcgtagct agnnnnnnnn nnng 24
[0104] <210> 10
[0105] <211> 24
[0106] <212> DNA
[0107] <213> 人工序列
[0108] <220>
[0109] <223> 合成多核苷酸
[0110] <220>
[0111] <221> misc_feature
[0112] <222> (13) .. (23)
[0113] <223> n为a、c、g或t
[0114] <400> 10

[0115] gatcgtagct agnnnnnnnn nnnc 24
[0116] <210> 11
[0117] <211> 24
[0118] <212> DNA
[0119] <213> 人工序列
[0120] <220>
[0121] <223> 合成多核苷酸
[0122] <220>
[0123] <221> misc_feature
[0124] <222> (13) .. (23)
[0125] <223> n为a、c、g或t
[0126] <400> 11
[0127] gatcgtagct agnnnnnnnn nnnt 24
[0128] <210> 12
[0129] <211> 24
[0130] <212> DNA
[0131] <213> 人工序列
[0132] <220>
[0133] <223> 合成多核苷酸
[0134] <220>
[0135] <221> misc_feature
[0136] <222> (13) .. (23)
[0137] <223> n为a、c、g或t
[0138] <400> 12
[0139] gatcgtagct agnnnnnnnn nnna 24
[0140] <210> 13
[0141] <211> 19
[0142] <212> RNA
[0143] <213> 人工序列
[0144] <220>
[0145] <223> 合成多核苷酸
[0146] <220>
[0147] <221> misc_feature
[0148] <222> (1) .. (19)
[0149] <223> 核糖核苷酸
[0150] <400> 13
[0151] ggccuuguuc cugucccca 19
[0152] <210> 14
[0153] <211> 40

[0154] <212> DNA
[0155] <213> 人工序列
[0156] <220>
[0157] <223> 合成多核苷酸
[0158] <220>
[0159] <221> misc_feature
[0160] <222> (40) .. (40)
[0161] <223> 3'磷酸
[0162] <400> 14
[0163] tttttutttt tutttttutt ttuttttttu tttttutttt 40
[0164] <210> 15
[0165] <211> 17
[0166] <212> DNA
[0167] <213> 人工序列
[0168] <220>
[0169] <223> 合成多核苷酸
[0170] <220>
[0171] <221> misc_feature
[0172] <222> (16) .. (17)
[0173] <223> 核糖核苷酸
[0174] <400> 15
[0175] gatcgtautt tttttuu 17
[0176] <210> 16
[0177] <211> 18
[0178] <212> DNA
[0179] <213> 人工序列
[0180] <220>
[0181] <223> 合成多核苷酸
[0182] <220>
[0183] <221> misc_feature
[0184] <222> (17) .. (18)
[0185] <223> 核糖核苷酸
[0186] <400> 16
[0187] gatcgtautt tttttuu 18
[0188] <210> 17
[0189] <211> 19
[0190] <212> DNA
[0191] <213> 人工序列
[0192] <220>

[0193]	<223> 合成多核苷酸
[0194]	<220>
[0195]	<221> misc_feature
[0196]	<222> (18) .. (19)
[0197]	<223> 核糖核苷酸
[0198]	<400> 17
[0199]	gatcgtautt tttttttuu 19
[0200]	<210> 18
[0201]	<211> 20
[0202]	<212> DNA
[0203]	<213> 人工序列
[0204]	<220>
[0205]	<223> 合成多核苷酸
[0206]	<220>
[0207]	<221> misc_feature
[0208]	<222> (19) .. (20)
[0209]	<223> 核糖核苷酸
[0210]	<400> 18
[0211]	gatcgtautt tttttttuu 20
[0212]	<210> 19
[0213]	<211> 21
[0214]	<212> DNA
[0215]	<213> 人工序列
[0216]	<220>
[0217]	<223> 合成多核苷酸
[0218]	<220>
[0219]	<221> misc_feature
[0220]	<222> (20) .. (21)
[0221]	<223> 核糖核苷酸
[0222]	<400> 19
[0223]	gatcgtautt tttttttttu u 21
[0224]	<210> 20
[0225]	<211> 22
[0226]	<212> DNA
[0227]	<213> 人工序列
[0228]	<220>
[0229]	<223> 合成多核苷酸
[0230]	<220>
[0231]	<221> misc_feature

[0232]	<222>	(21) .. (22)
[0233]	<223>	核糖核苷酸
[0234]	<400>	20
[0235]		gatcgtautt tttttttttt uu 22
[0236]	<210>	21
[0237]	<211>	20
[0238]	<212>	DNA
[0239]	<213>	人工序列
[0240]	<220>	
[0241]	<223>	合成多核苷酸
[0242]	<220>	
[0243]	<221>	misc_feature
[0244]	<222>	(20) .. (20)
[0245]	<223>	3'磷酸
[0246]	<400>	21
[0247]		aaaaaaaaa aaaaaaaaaa 20
[0248]	<210>	22
[0249]	<211>	20
[0250]	<212>	DNA
[0251]	<213>	人工序列
[0252]	<220>	
[0253]	<223>	合成多核苷酸
[0254]	<220>	
[0255]	<221>	misc_feature
[0256]	<222>	(20) .. (20)
[0257]	<223>	3'磷酸
[0258]	<400>	22
[0259]		cccccccccc ccccccccc 20
[0260]	<210>	23
[0261]	<211>	40
[0262]	<212>	DNA
[0263]	<213>	人工序列
[0264]	<220>	
[0265]	<223>	合成多核苷酸
[0266]	<220>	
[0267]	<221>	misc_feature
[0268]	<222>	(40) .. (40)
[0269]	<223>	3'磷酸
[0270]	<400>	23

[0271] gggggtgggg gtgggggtgg ggggtgggggt gggggtgggg 40
[0272] <210> 24
[0273] <211> 40
[0274] <212> DNA
[0275] <213> 人工序列
[0276] <220>
[0277] <223> 合成多核苷酸
[0278] <220>
[0279] <221> misc_feature
[0280] <222> (40) .. (40)
[0281] <223> 3'磷酸
[0282] <400> 24
[0283] aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 40
[0284] <210> 25
[0285] <211> 30
[0286] <212> RNA
[0287] <213> 人工序列
[0288] <220>
[0289] <223> 合成多核苷酸
[0290] <220>
[0291] <221> misc_feature
[0292] <222> (30) .. (30)
[0293] <223> 3'磷酸
[0294] <400> 25
[0295] aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 30
[0296] <210> 26
[0297] <211> 45
[0298] <212> DNA
[0299] <213> 人工序列
[0300] <220>
[0301] <223> 合成多核苷酸
[0302] <220>
[0303] <221> misc_feature
[0304] <222> (1) .. (1)
[0305] <223> 5'生物素
[0306] <220>
[0307] <221> misc_feature
[0308] <222> (44) .. (45)
[0309] <223> 核糖核苷酸

[0310]	<400> 26
[0311]	tacactcttt ccctacacga cgctcttccg atcttttttt ttuu 45
[0312]	<210> 27
[0313]	<211> 33
[0314]	<212> DNA
[0315]	<213> 人工序列
[0316]	<220>
[0317]	<223> 合成多核苷酸
[0318]	<220>
[0319]	<221> misc_feature
[0320]	<222> (1) .. (1)
[0321]	<223> 5'磷酸
[0322]	<220>
[0323]	<221> misc_feature
[0324]	<222> (33) .. (33)
[0325]	<223> 3'磷酸
[0326]	<400> 27
[0327]	gatcggaaga gcgtcgtgta gggaaagagt gta 33
[0328]	<210> 28
[0329]	<211> 32
[0330]	<212> DNA
[0331]	<213> 人工序列
[0332]	<220>
[0333]	<223> 合成多核苷酸
[0334]	<220>
[0335]	<221> misc_feature
[0336]	<222> (1) .. (1)
[0337]	<223> 5'磷酸
[0338]	<220>
[0339]	<221> misc_feature
[0340]	<222> (32) .. (32)
[0341]	<223> 3'磷酸
[0342]	<400> 28
[0343]	cttattgctg tggttggttc ctgtgctgtt tt 32
[0344]	<210> 29
[0345]	<211> 36
[0346]	<212> DNA
[0347]	<213> 人工序列
[0348]	<220>

[0349] <223> 合成多核苷酸
[0350] <220>
[0351] <221> misc_feature
[0352] <222> (36) .. (36)
[0353] <223> 3'磷酸
[0354] <400> 29
[0355] ccaaccacag caauaagutt tutttttuttt tutttt 36
[0356] <210> 30
[0357] <211> 20
[0358] <212> DNA
[0359] <213> 人工序列
[0360] <220>
[0361] <223> 合成多核苷酸
[0362] <400> 30
[0363] ggtcgttagca gtcgttgatg 20
[0364] <210> 31
[0365] <211> 25
[0366] <212> DNA
[0367] <213> 人工序列
[0368] <220>
[0369] <223> 合成多核苷酸
[0370] <400> 31
[0371] ggtcgttagca gtcgttgatg aaaaa 25
[0372] <210> 32
[0373] <211> 30
[0374] <212> DNA
[0375] <213> 人工序列
[0376] <220>
[0377] <223> 合成多核苷酸
[0378] <400> 32
[0379] ggtcgttagca gtcgttgatg aaaaaaaaaa 30
[0380] <210> 33
[0381] <211> 35
[0382] <212> DNA
[0383] <213> 人工序列
[0384] <220>
[0385] <223> 合成多核苷酸
[0386] <400> 33
[0387] ggtcgttagca gtcgttgatg aaaaaaaaaa aaaaa 35

[0388] <210> 34
[0389] <211> 40
[0390] <212> DNA
[0391] <213> 人工序列
[0392] <220>
[0393] <223> 合成多核苷酸
[0394] <400> 34
[0395] ggtcgtagca gtcgttgatg aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 40
[0396] <210> 35
[0397] <211> 50
[0398] <212> DNA
[0399] <213> 人工序列
[0400] <220>
[0401] <223> 合成多核苷酸
[0402] <400> 35
[0403] tagttgctgc aacctagtct agatctataa acgcaccttt ggacacgggg 50
[0404] <210> 36
[0405] <211> 50
[0406] <212> DNA
[0407] <213> 人工序列
[0408] <220>
[0409] <223> 合成多核苷酸
[0410] <220>
[0411] <221> misc_feature
[0412] <222> (50) .. (50)
[0413] <223> 3'磷酸
[0414] <400> 36
[0415] ccccggtgcc aaaggtgcgt ttatagatct agactagggt gcagcaacta 50
[0416] <210> 37
[0417] <211> 50
[0418] <212> DNA
[0419] <213> 人工序列
[0420] <220>
[0421] <223> 合成多核苷酸
[0422] <400> 37
[0423] tagttgctgc aacctagtct agatctataa acgcaccttt ggacactttt 50
[0424] <210> 38
[0425] <211> 50
[0426] <212> DNA

[0427] <213> 人工序列
[0428] <220>
[0429] <223> 合成多核苷酸
[0430] <220>
[0431] <221> misc_feature
[0432] <222> (50) .. (50)
[0433] <223> 3'磷酸
[0434] <400> 38
[0435] aaaagtgtcc accggtgcgt ttatagatct agactagggt gcagcaacta 50
[0436] <210> 39
[0437] <211> 47
[0438] <212> DNA
[0439] <213> 人工序列
[0440] <220>
[0441] <223> 合成多核苷酸
[0442] <220>
[0443] <221> misc_feature
[0444] <222> (47) .. (47)
[0445] <223> 3'磷酸
[0446] <400> 39
[0447] cgtgtccaaa ggtgcgttta tagatctaga ctaggttgca gcaacta 47
[0448] <210> 40
[0449] <211> 53
[0450] <212> DNA
[0451] <213> 人工序列
[0452] <220>
[0453] <223> 合成多核苷酸
[0454] <220>
[0455] <221> misc_feature
[0456] <222> (53) .. (35)
[0457] <223> 3'磷酸
[0458] <400> 40
[0459] ggtccccgtg tccaccggtg cgtttataga tctagactag gttgcagcaa cta 53
[0460] <210> 41
[0461] <211> 33
[0462] <212> DNA
[0463] <213> 人工序列
[0464] <220>
[0465] <223> 合成多核苷酸

[0466] <220>
[0467] <221> misc_feature
[0468] <222> (1) .. (1)
[0469] <223> 5'磷酸
[0470] <220>
[0471] <221> misc_feature
[0472] <222> (33) .. (33)
[0473] <223> 3'磷酸
[0474] <400> 41
[0475] gatcggaaga gcgtcgtgta gggaaagagt gta 33
[0476] <210> 42
[0477] <211> 45
[0478] <212> DNA
[0479] <213> 人工序列
[0480] <220>
[0481] <223> 合成多核苷酸
[0482] <220>
[0483] <221> misc_feature
[0484] <222> (1) .. (1)
[0485] <223> 5'生物素
[0486] <220>
[0487] <221> misc_feature
[0488] <222> (45) .. (45)
[0489] <223> 3'磷酸
[0490] <400> 42
[0491] tacactcttt ccctacacga cgctcttccg atcttttttt ttuu 45
[0492] <210> 43
[0493] <211> 39
[0494] <212> DNA
[0495] <213> 人工序列
[0496] <220>
[0497] <223> 合成多核苷酸
[0498] <400> 43
[0499] tttttutttt tutttttutt ttuttttttu tttttuttt 39
[0500] <210> 44
[0501] <211> 30
[0502] <212> DNA
[0503] <213> 人工序列
[0504] <220>

[0505] <223> 合成寡核苷酸
[0506] <400> 44
[0507] ccatctcatc cctgcgtgtc tccgactcag 30
[0508] <210> 45
[0509] <211> 41
[0510] <212> DNA
[0511] <213> 人工序列
[0512] <220>
[0513] <223> 合成寡核苷酸
[0514] <400> 45
[0515] ccactacgcc tccgctttcc tctctatggg cagtcggtga t 41
[0516] <210> 46
[0517] <211> 33
[0518] <212> DNA
[0519] <213> 人工序列
[0520] <220>
[0521] <223> 合成寡核苷酸
[0522] <220>
[0523] <221> misc_feature
[0524] <222> (1) .. (1)
[0525] <223> 磷酸
[0526] <400> 46
[0527] gatcggaaga gctcgtatgc cgtcttctgc ttg 33
[0528] <210> 47
[0529] <211> 33
[0530] <212> DNA
[0531] <213> 人工序列
[0532] <220>
[0533] <223> 合成寡核苷酸
[0534] <400> 47
[0535] acactctttc cctacacgac gctcttccga tct 33
[0536] <210> 48
[0537] <211> 30
[0538] <212> DNA
[0539] <213> 人工序列
[0540] <220>
[0541] <223> 合成寡核苷酸
[0542] <400> 48
[0543] ccatctcatc cctgcgtgtc tccgactcag 30

[0544]	<210> 49
[0545]	<211> 30
[0546]	<212> DNA
[0547]	<213> 人工序列
[0548]	<220>
[0549]	<223> 合成寡核苷酸
[0550]	<400> 49
[0551]	cctatcccct gtgtgccttg gcagtctcag 30
[0552]	<210> 50
[0553]	<211> 41
[0554]	<212> DNA
[0555]	<213> 人工序列
[0556]	<220>
[0557]	<223> 合成寡核苷酸
[0558]	<400> 50
[0559]	ccactacgcc tccgctttcc tctctatggg cagtcggtga t 41
[0560]	<210> 51
[0561]	<211> 25
[0562]	<212> DNA
[0563]	<213> 人工序列
[0564]	<220>
[0565]	<223> 合成寡核苷酸
[0566]	<400> 51
[0567]	agagaatgag gaacccgggg cagtt 25
[0568]	<210> 52
[0569]	<211> 44
[0570]	<212> DNA
[0571]	<213> 人工序列
[0572]	<220>
[0573]	<223> 合成寡核苷酸
[0574]	<220>
[0575]	<221> misc_feature
[0576]	<222> (1) .. (1)
[0577]	<223> 5'磷酸
[0578]	<220>
[0579]	<221> misc_feature
[0580]	<222> (2) .. (10)
[0581]	<223> n为a、c、g或t
[0582]	<220>

[0583] <221> misc_feature
[0584] <222> (35) .. (44)
[0585] <223> n为a、c、g或t
[0586] <400> 52
[0587] nnnnnnnnnn tgcctcctgg actatgtccg ggtannnnnn nnnn 44
[0588] <210> 53
[0589] <211> 19
[0590] <212> DNA
[0591] <213> 人工序列
[0592] <220>
[0593] <223> 合成寡核苷酸
[0594] <220>
[0595] <221> misc_feature
[0596] <222> (13) .. (18)
[0597] <223> n为a、c、g、t或u
[0598] <220>
[0599] <221> misc_feature
[0600] <222> (19) .. (19)
[0601] <223> 3' 3SpC3间隔区
[0602] <400> 53
[0603] cagtcgguga tttnnnnnnn 19
[0604] <210> 54
[0605] <211> 19
[0606] <212> DNA
[0607] <213> 人工序列
[0608] <220>
[0609] <223> 合成寡核苷酸
[0610] <220>
[0611] <221> misc_feature
[0612] <222> (14) .. (18)
[0613] <223> n为a、c、g、t或u
[0614] <220>
[0615] <221> misc_feature
[0616] <222> (19) .. (19)
[0617] <223> 3' 3SpC3间隔区
[0618] <400> 54
[0619] cagtcgguga tttnnnnnnn 19
[0620] <210> 55
[0621] <211> 19

[0622]	<212> DNA
[0623]	<213> 人工序列
[0624]	<220>
[0625]	<223> 合成寡核苷酸
[0626]	<220>
[0627]	<221> misc_feature
[0628]	<222> (15) .. (18)
[0629]	<223> n为a、c、g、t或u
[0630]	<220>
[0631]	<221> misc_feature
[0632]	<222> (19) .. (19)
[0633]	<223> 3' 3SpC3间隔区
[0634]	<400> 55
[0635]	cagtcgguga ttttnnnnn 19
[0636]	<210> 56
[0637]	<211> 19
[0638]	<212> DNA
[0639]	<213> 人工序列
[0640]	<220>
[0641]	<223> 合成寡核苷酸
[0642]	<220>
[0643]	<221> misc_feature
[0644]	<222> (17) .. (18)
[0645]	<223> n为a、c、g、t或u
[0646]	<220>
[0647]	<221> misc_feature
[0648]	<222> (19) .. (19)
[0649]	<223> 3' 3SpC3间隔区
[0650]	<400> 56
[0651]	cagtcgguga ttttttnnn 19
[0652]	<210> 57
[0653]	<211> 23
[0654]	<212> DNA
[0655]	<213> 人工序列
[0656]	<220>
[0657]	<223> 合成寡核苷酸
[0658]	<220>
[0659]	<221> misc_feature
[0660]	<222> (23) .. (23)

[0661] <223> 3' 3SpC3间隔区
[0662] <400> 57
[0663] cagtcggtga utttttuttt ttt 23
[0664] <210> 58
[0665] <211> 17
[0666] <212> DNA
[0667] <213> 人工序列
[0668] <220>
[0669] <223> 合成寡核苷酸
[0670] <220>
[0671] <221> misc_feature
[0672] <222> (17) .. (17)
[0673] <223> 3' 3SpC3间隔区
[0674] <400> 58
[0675] cagtcgguga tcccccc 17
[0676] <210> 59
[0677] <211> 17
[0678] <212> DNA
[0679] <213> 人工序列
[0680] <220>
[0681] <223> 合成寡核苷酸
[0682] <220>
[0683] <221> misc_feature
[0684] <222> (17) .. (17)
[0685] <223> 3' 3SpC3间隔区
[0686] <400> 59
[0687] cagtcgguga tkkkkkk 17
[0688] <210> 60
[0689] <211> 17
[0690] <212> DNA
[0691] <213> 人工序列
[0692] <220>
[0693] <223> 合成寡核苷酸
[0694] <220>
[0695] <221> misc_feature
[0696] <222> (17) .. (17)
[0697] <223> 3' 3SpC3间隔区
[0698] <400> 60
[0699] cagtcgguga trrrrrr 17

[0700]	<210>	61
[0701]	<211>	23
[0702]	<212>	DNA
[0703]	<213>	人工序列
[0704]	<220>	
[0705]	<223>	合成寡核苷酸
[0706]	<220>	
[0707]	<221>	misc_feature
[0708]	<222>	(1) .. (1)
[0709]	<223>	5'磷酸
[0710]	<220>	
[0711]	<221>	misc_feature
[0712]	<222>	(23) .. (23)
[0713]	<223>	3'磷酸
[0714]	<400>	61
[0715]	atcaccgact gcccatagag agg	23

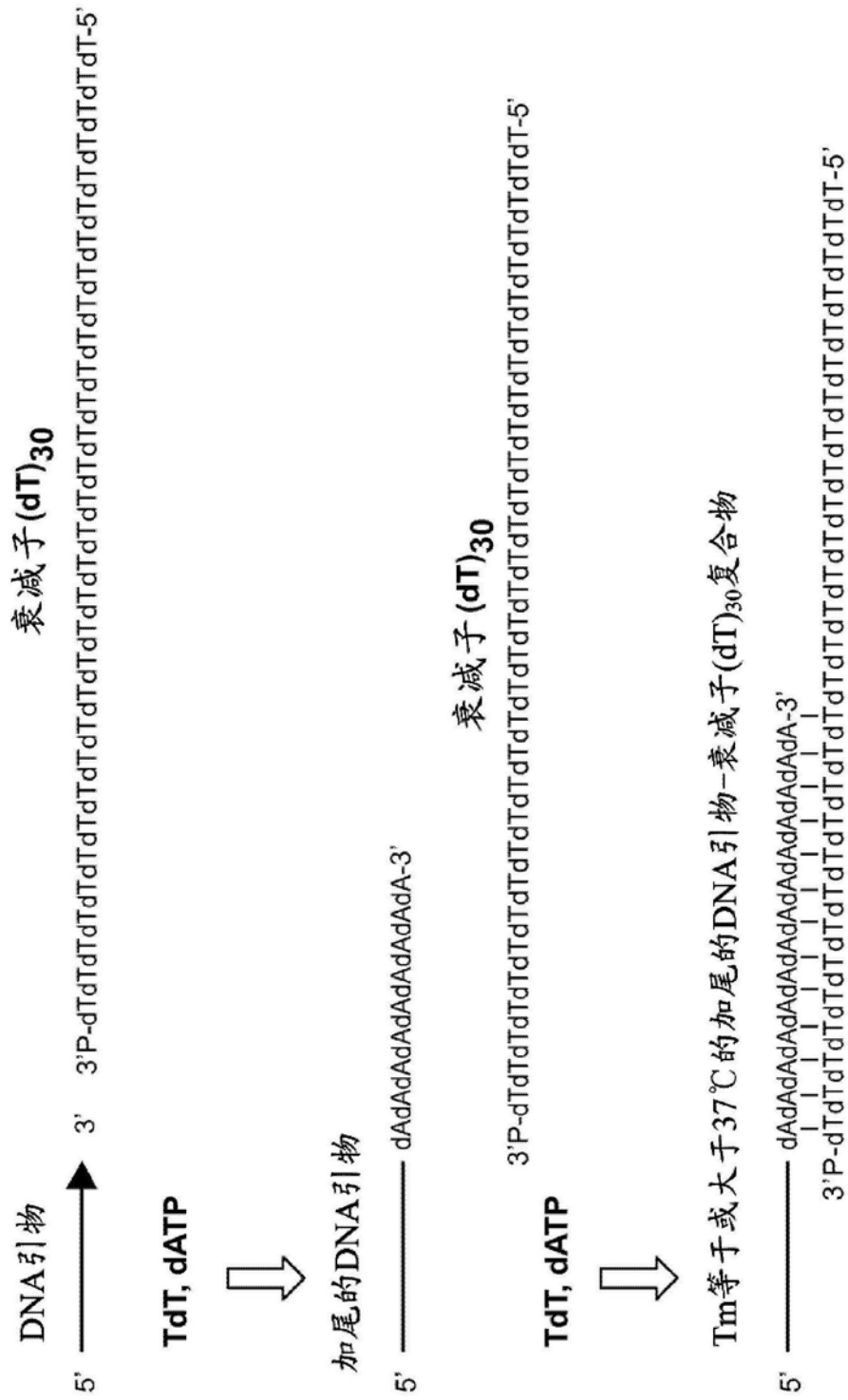


图1

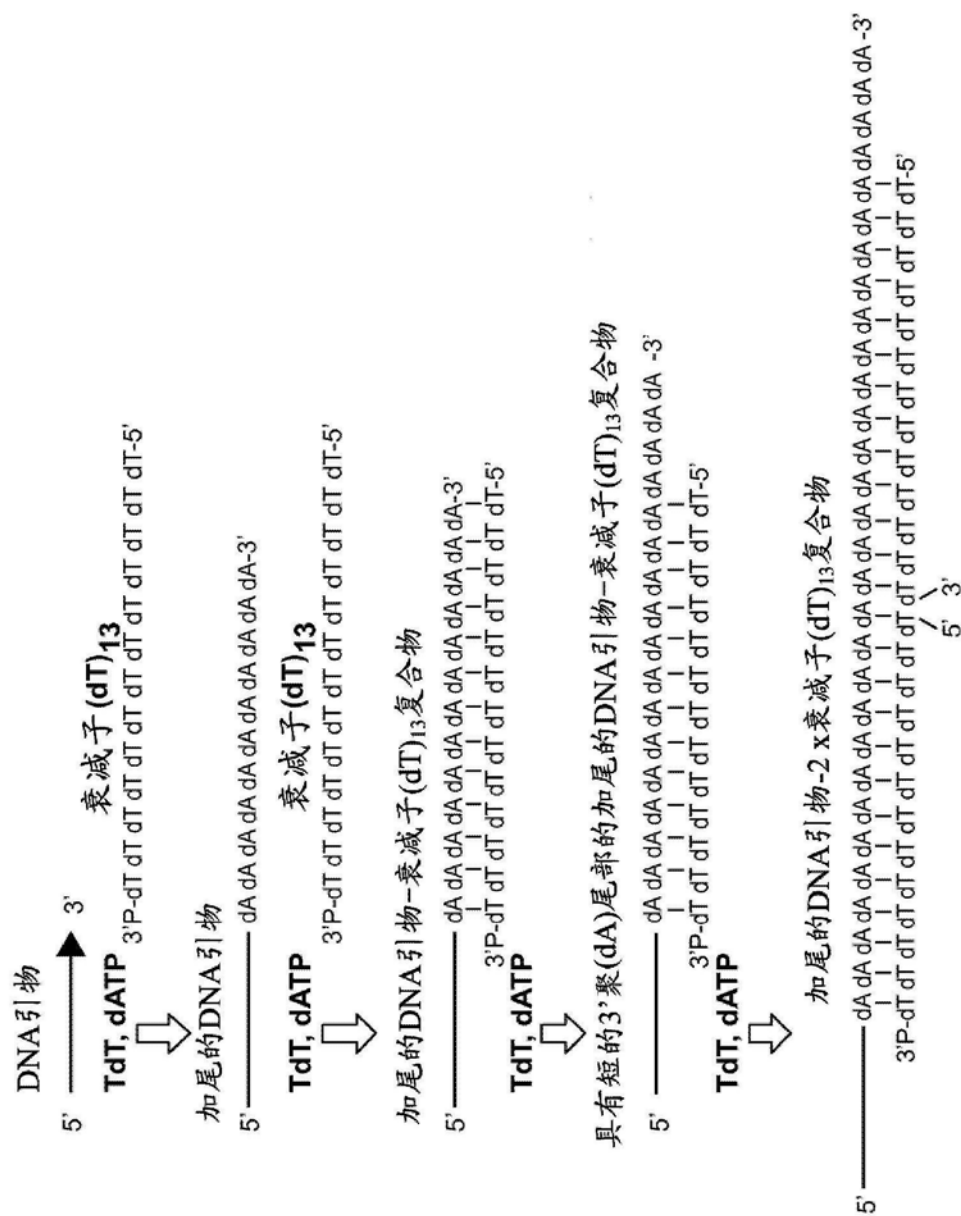


图2

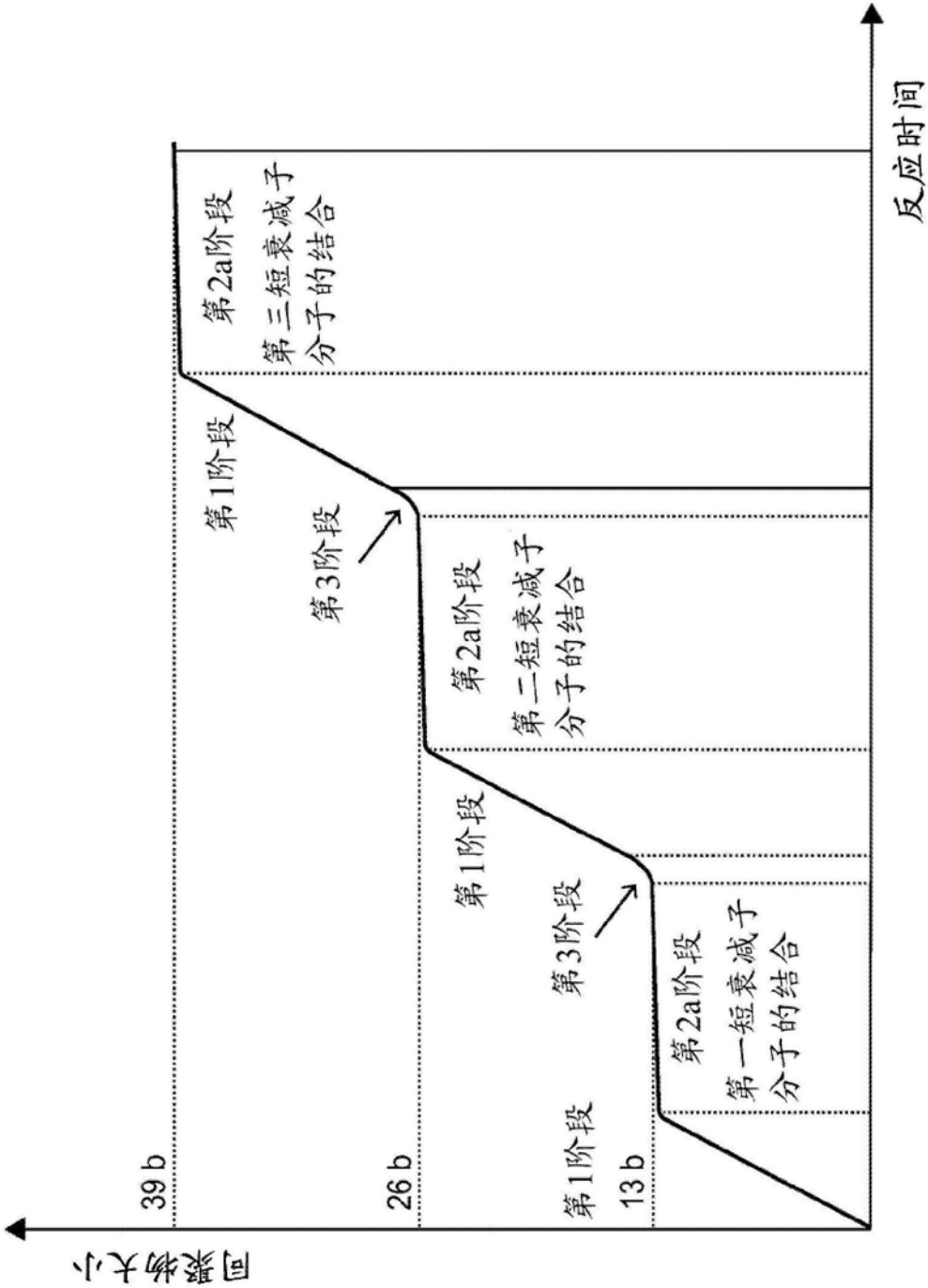


图3

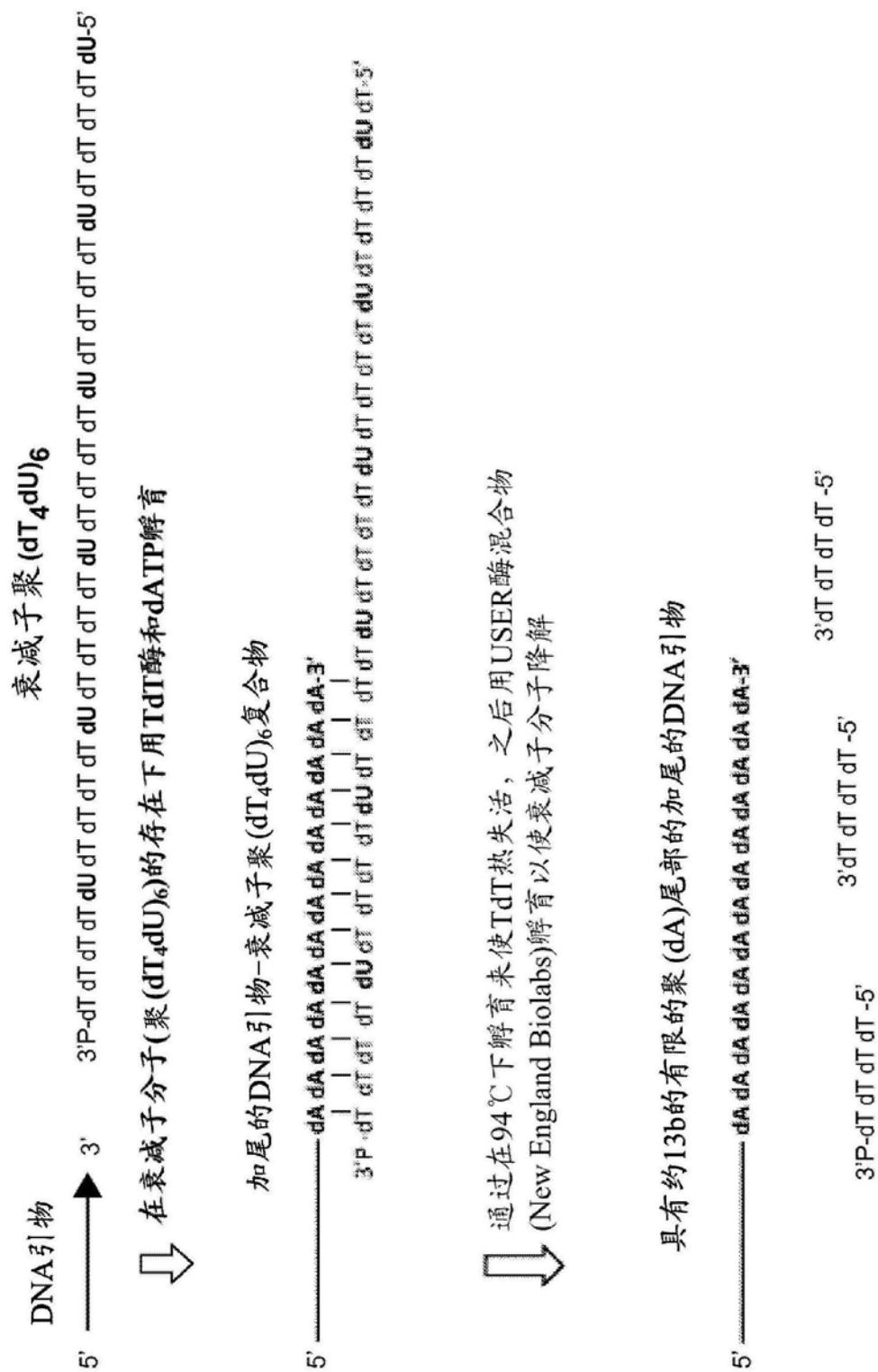


图4

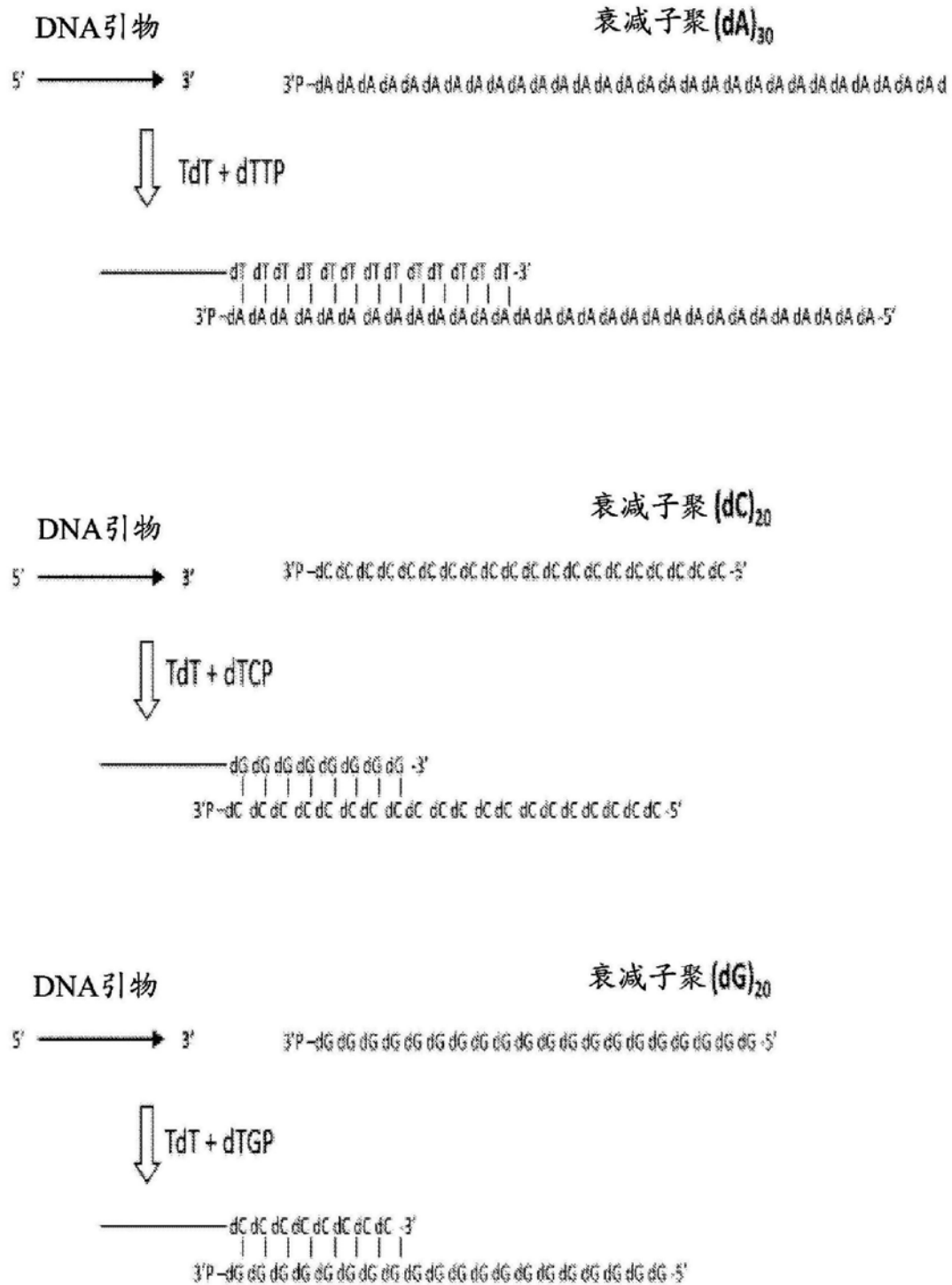


图5

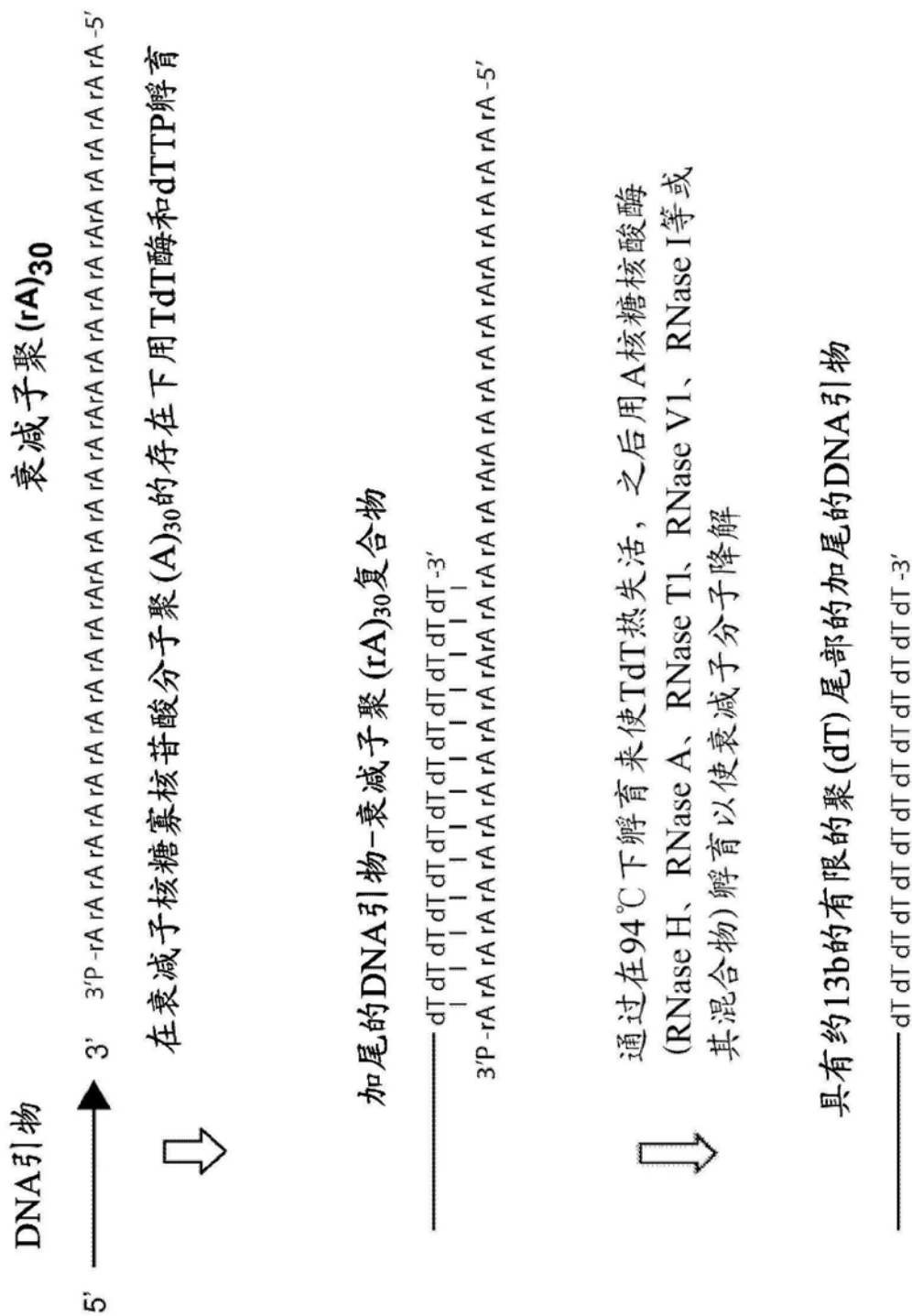


图6

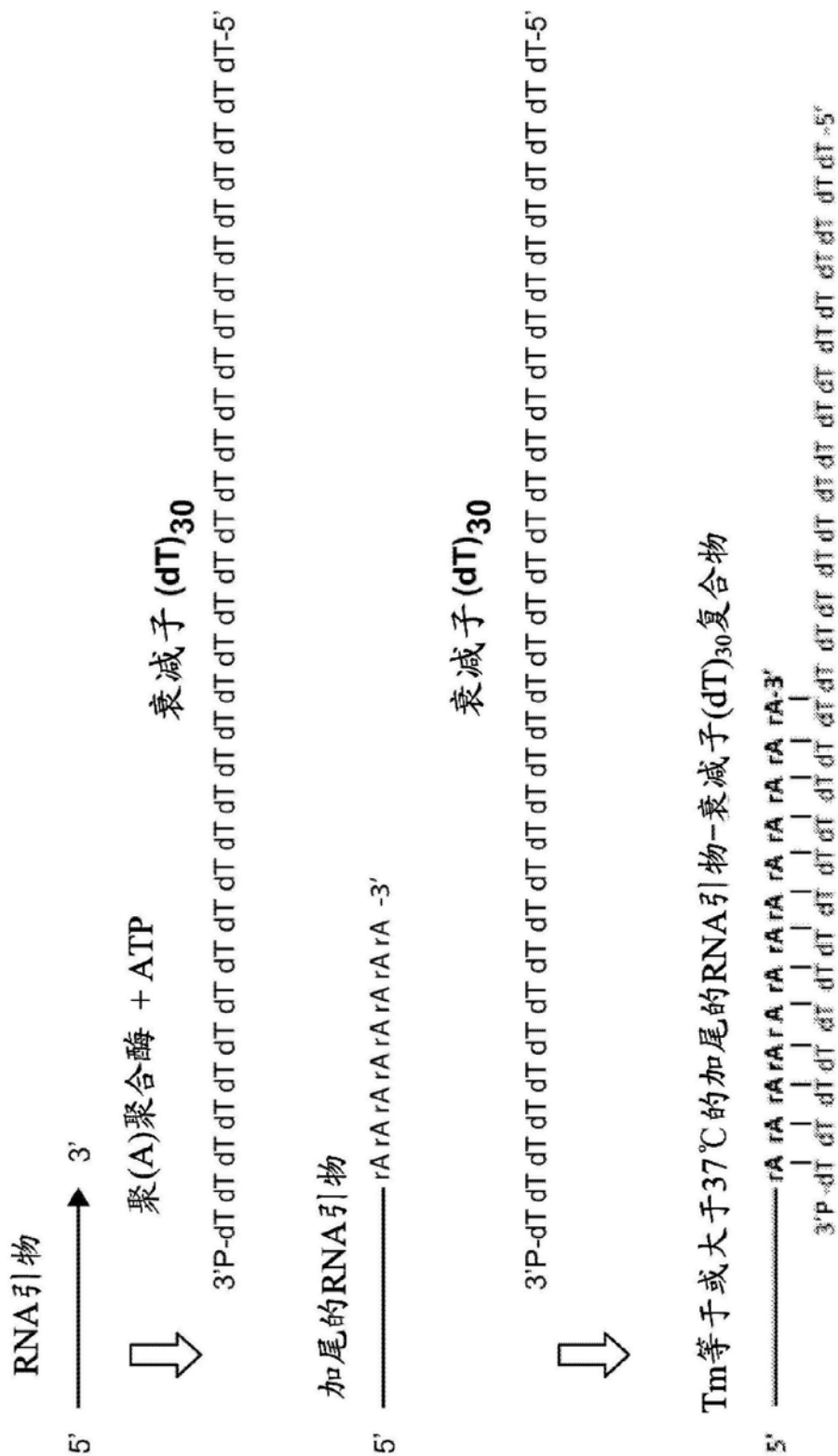


图7

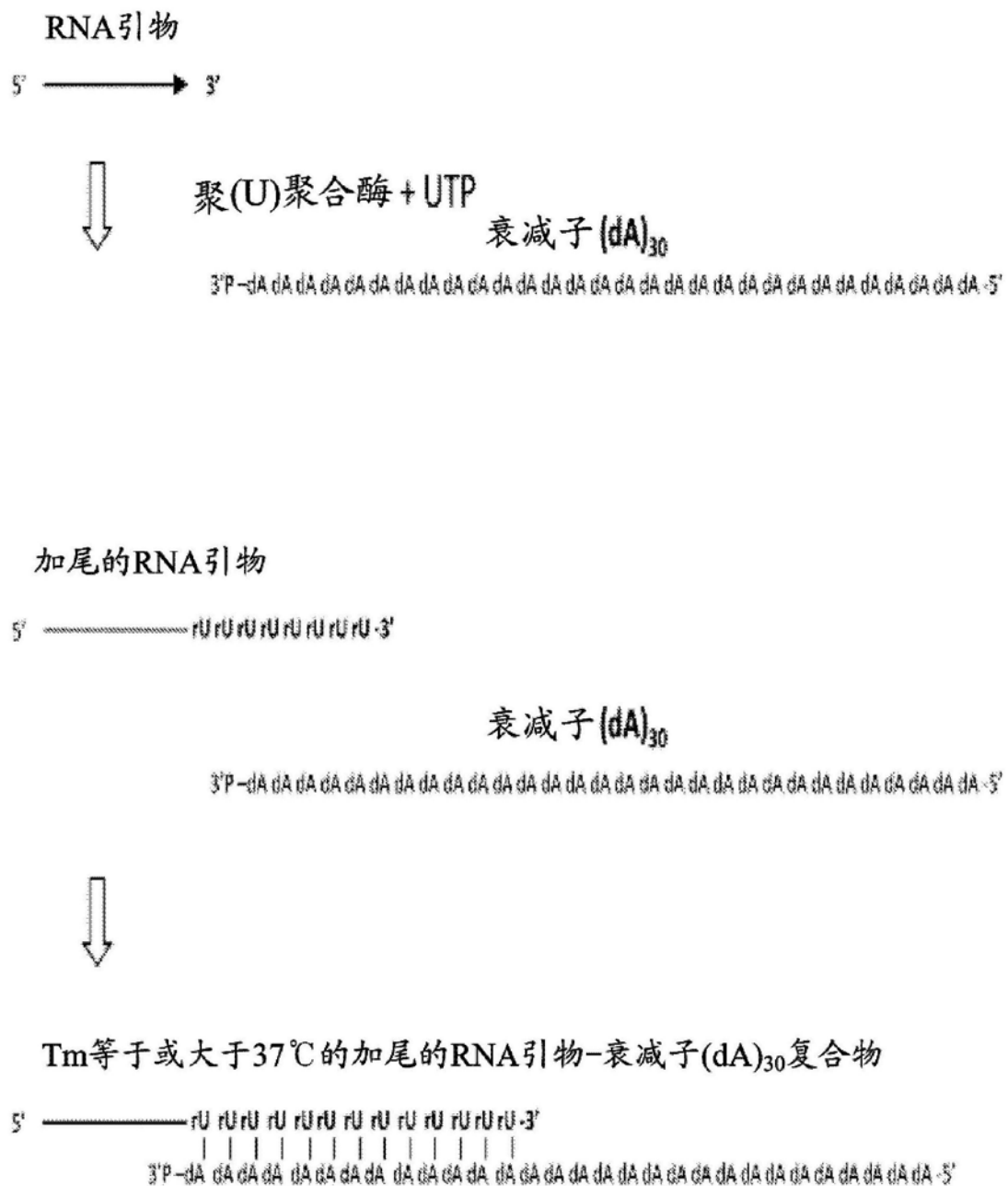
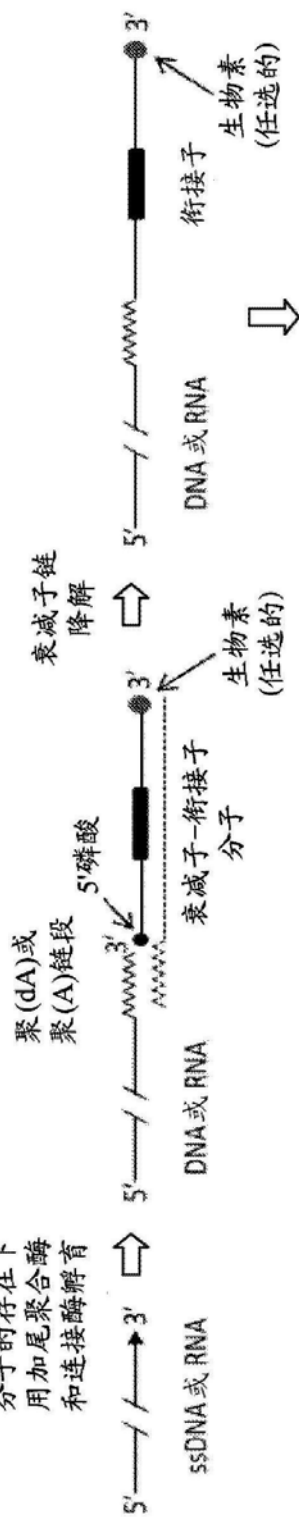


图8

A. 有限的加尾-连接反应

在衰减子-衔接子
分子的存在下
用加尾聚合酶
和连接酶孵育



B. 有限的加尾-聚合酶-延伸反应

在衰减子-衔接子
分子的存在下
用加尾聚合酶
和连接酶孵育

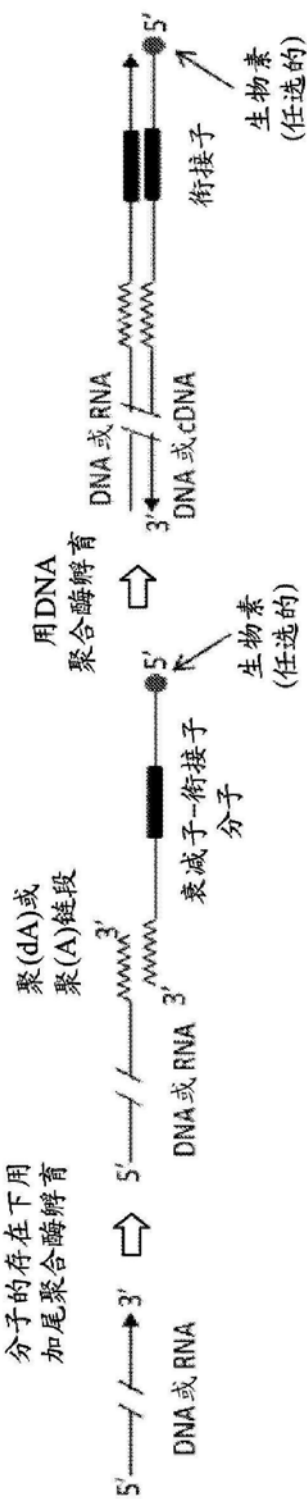
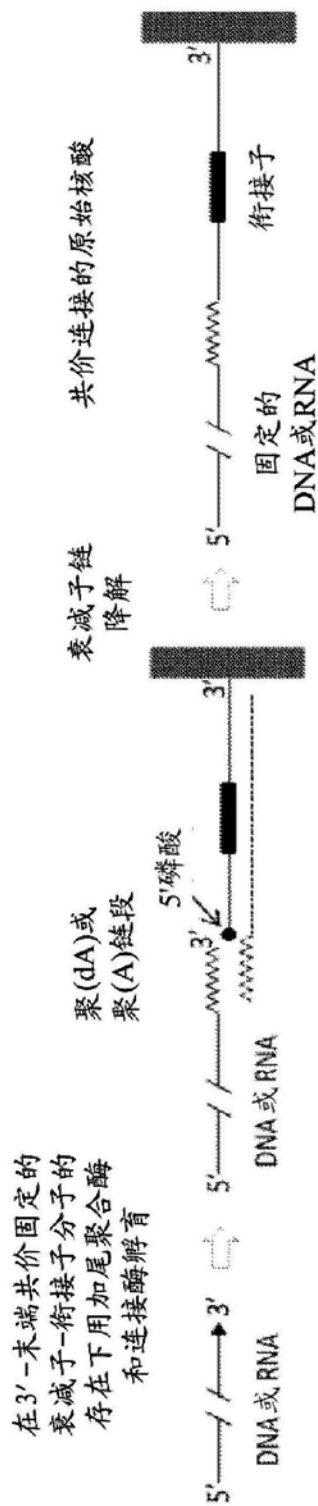


图9

A. 使用有限的加尾-连接反应通过3'-末端进行的固定



B. 使用有限的加尾-聚合酶-延伸反应通过5'-末端进行的固定

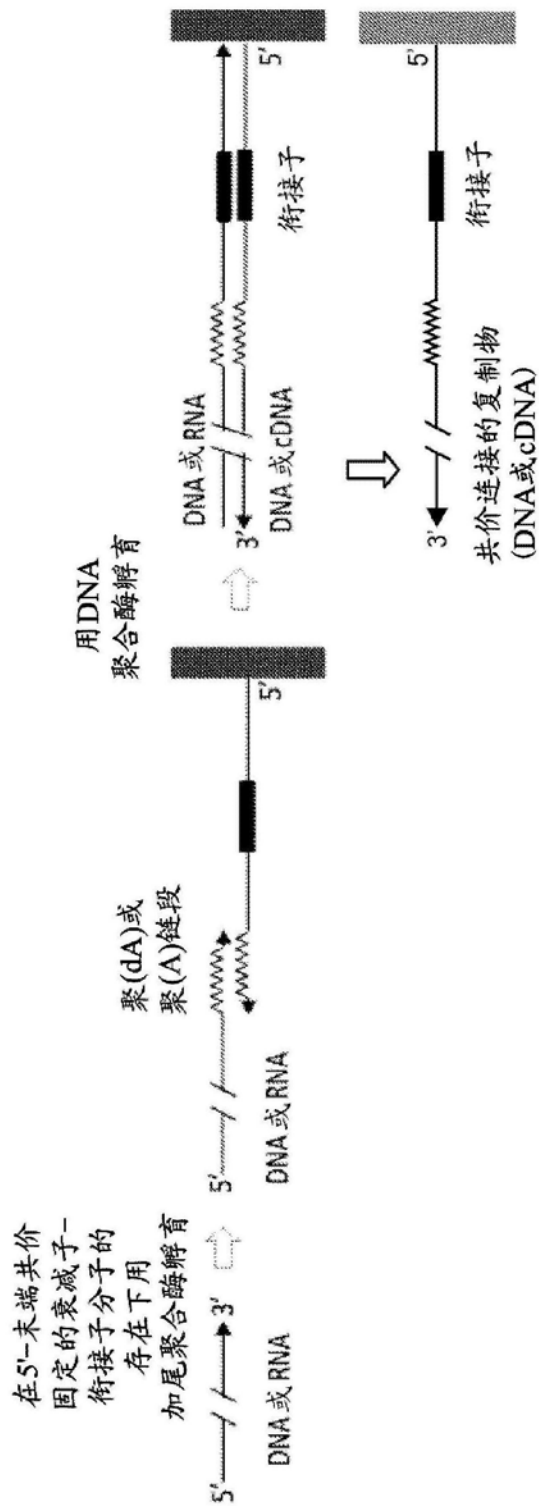


图10

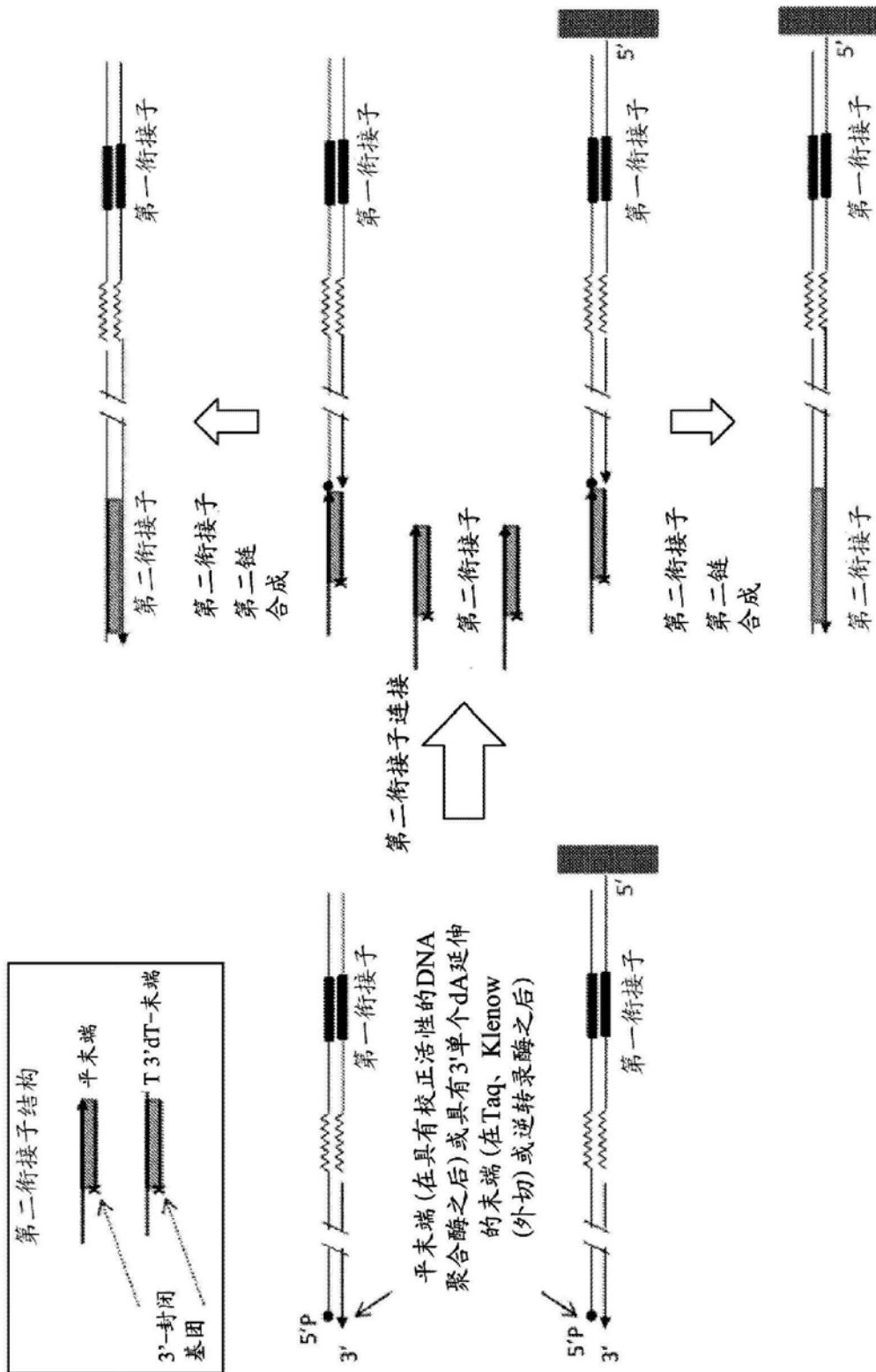


图11

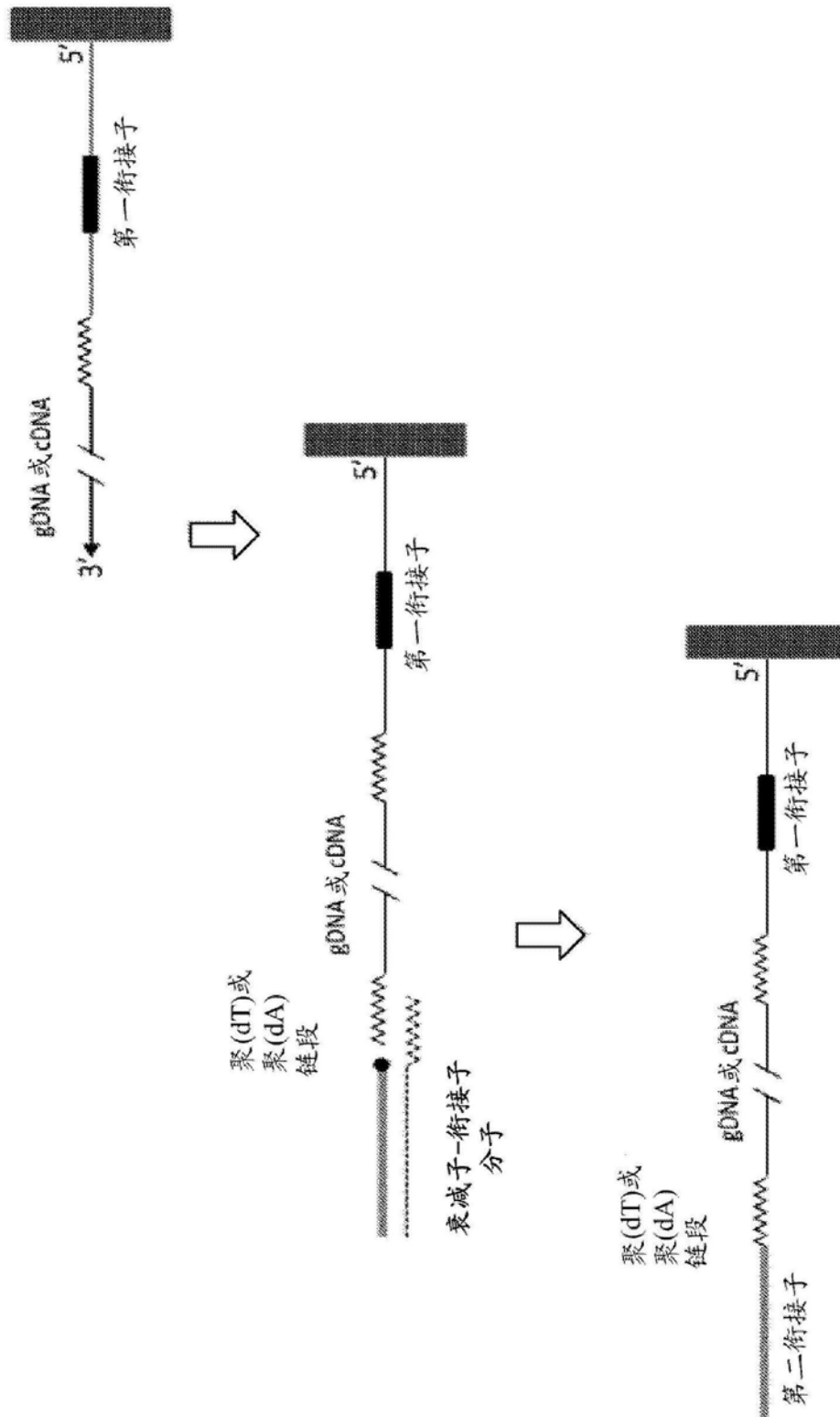


图12

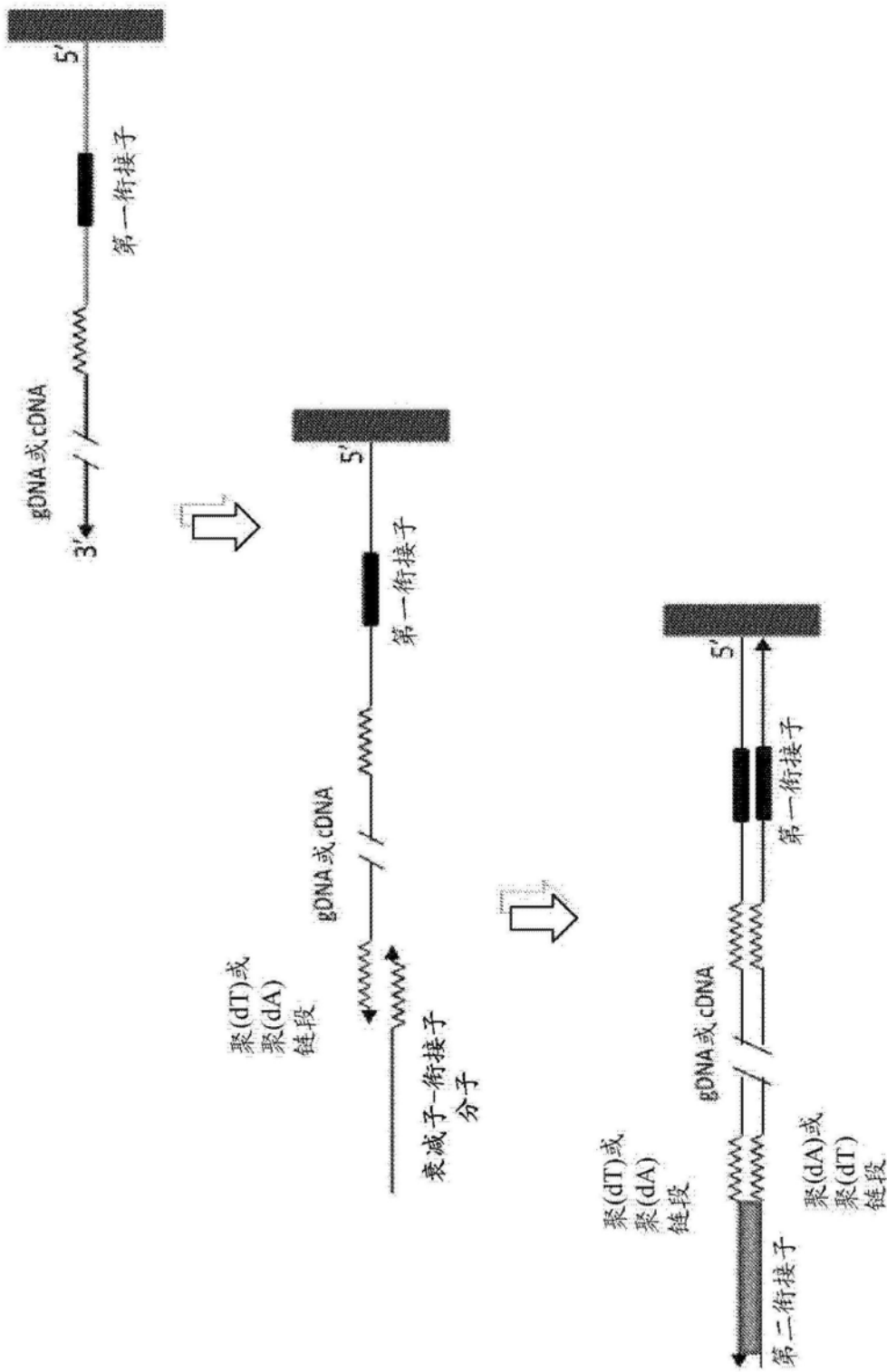


图13

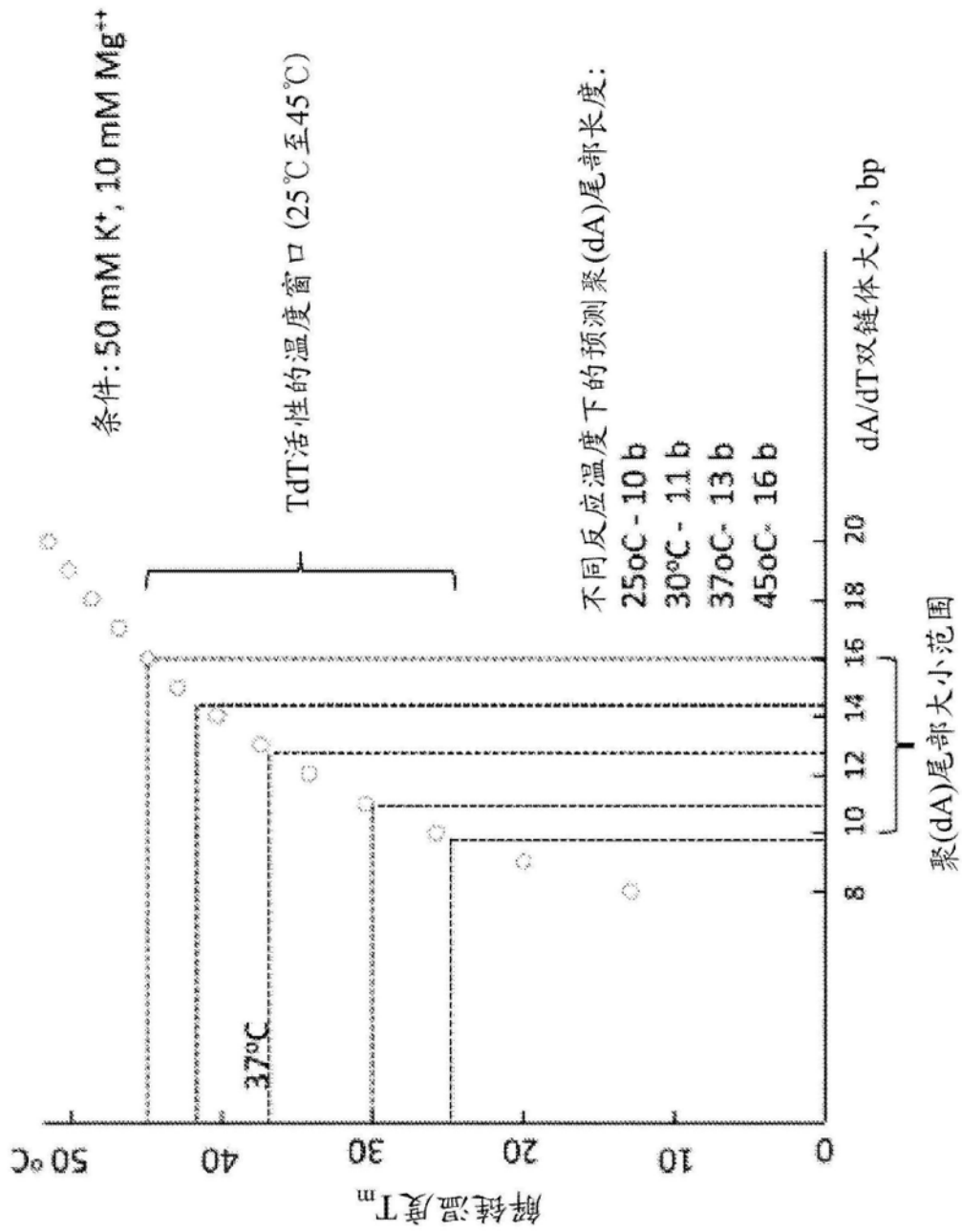


图14

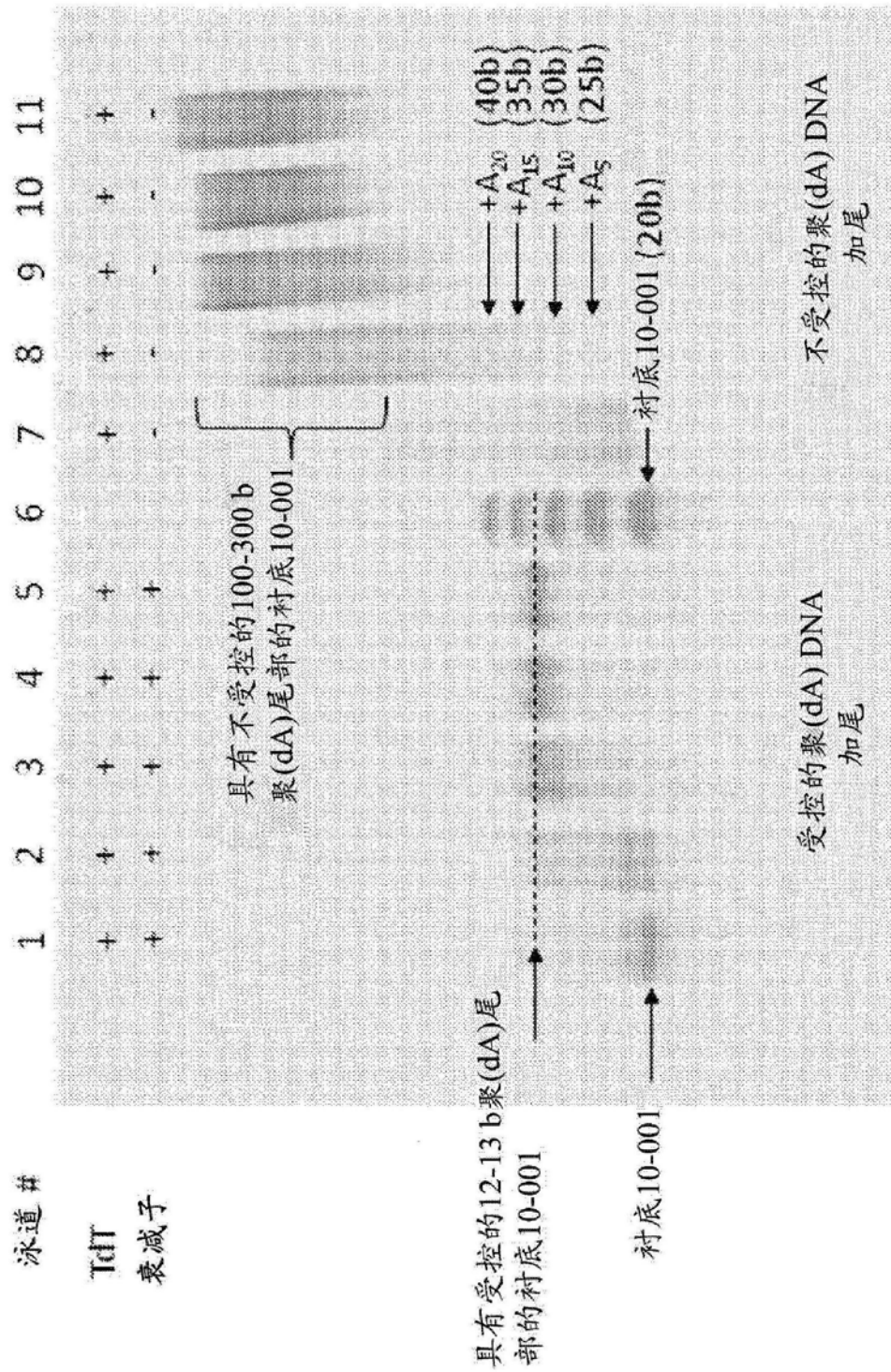


图15

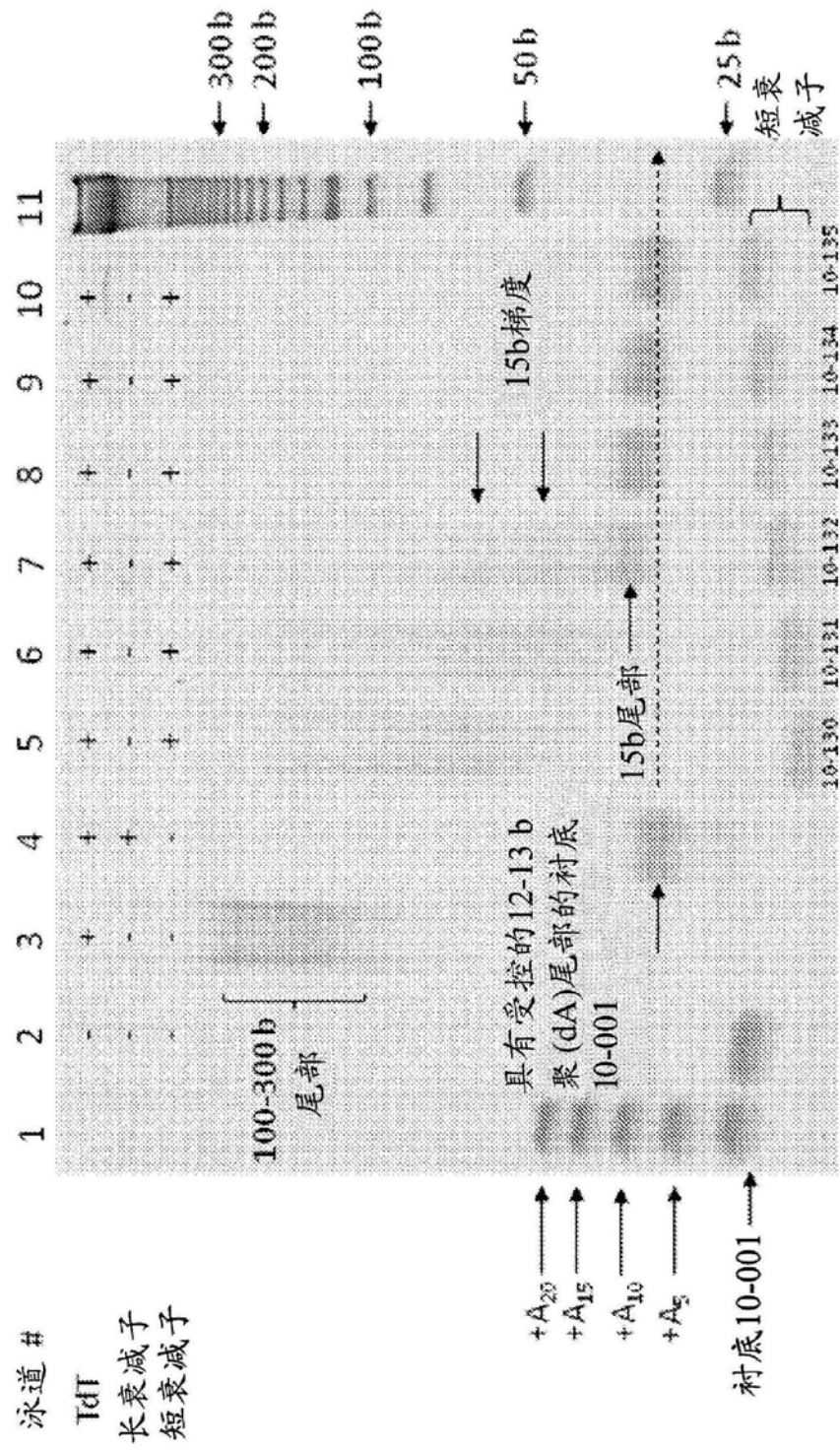


图16a

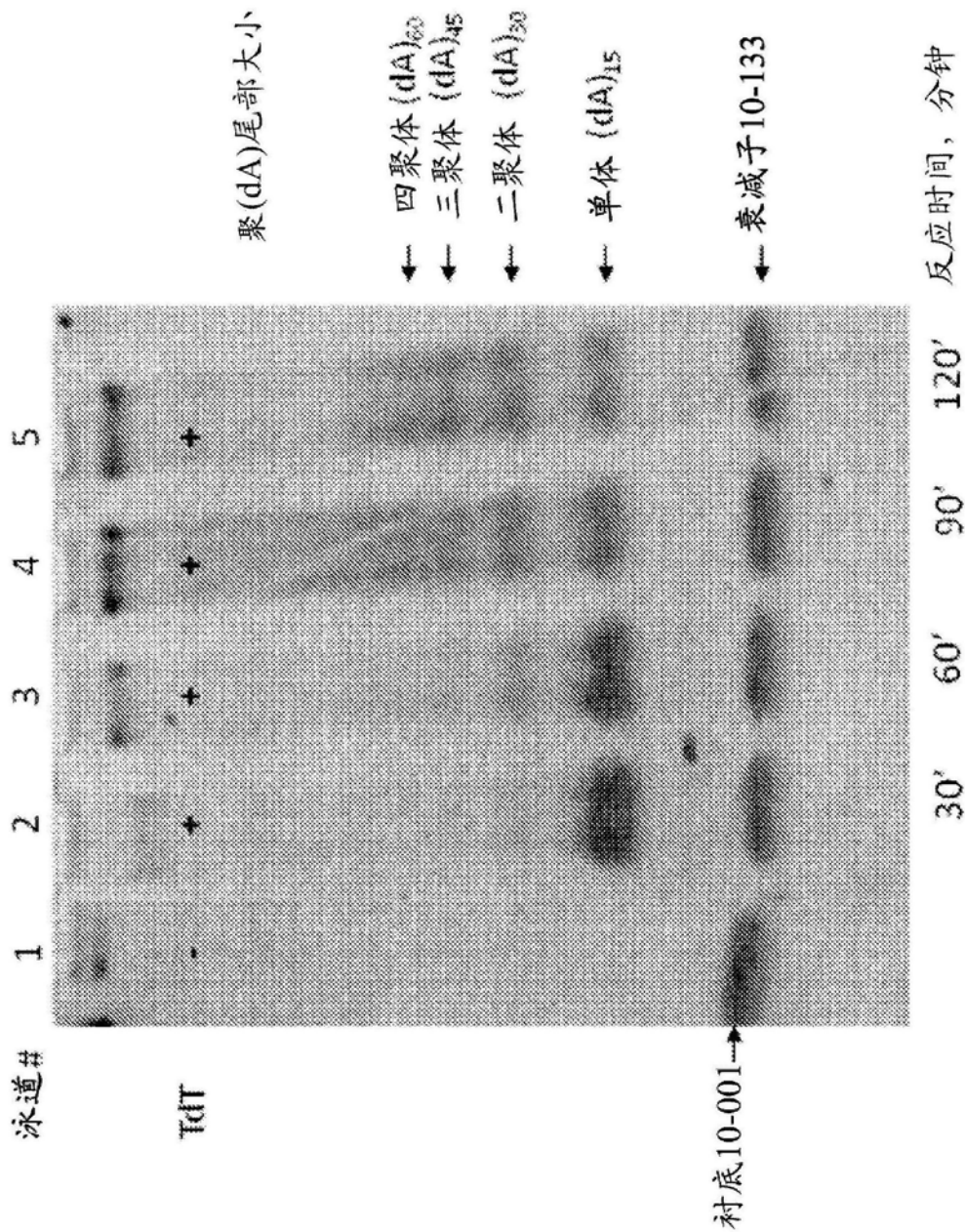


图16b

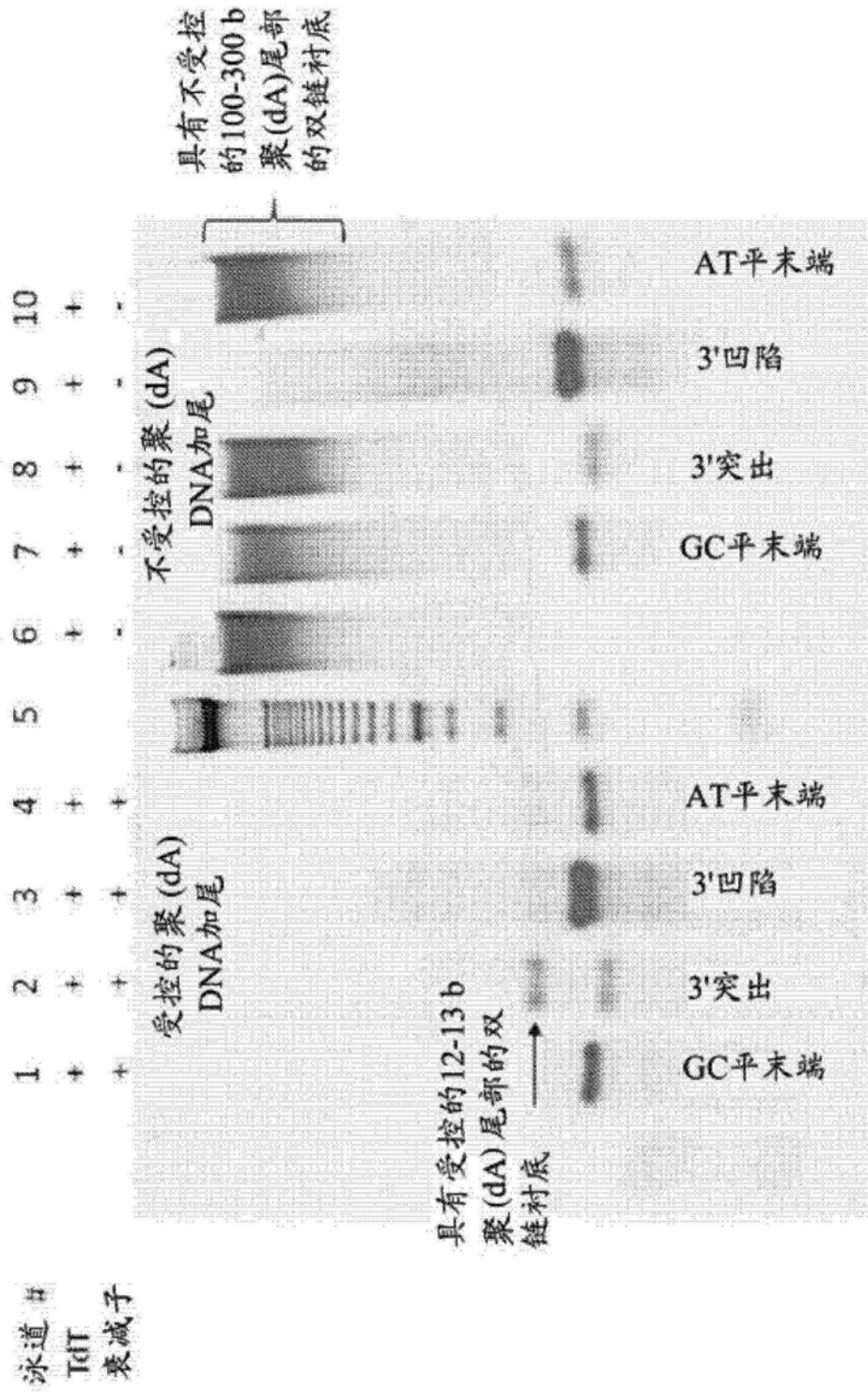


图17

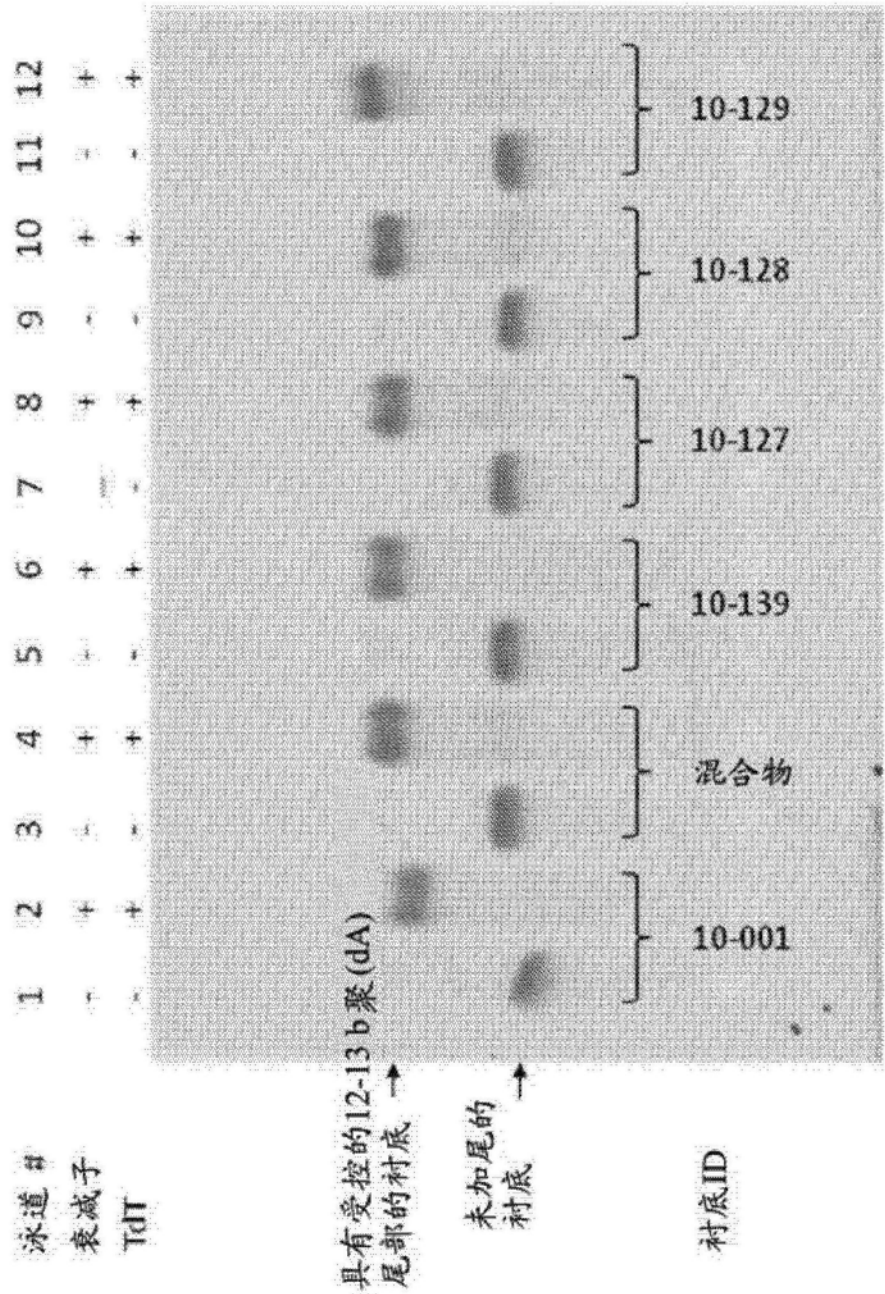


图18

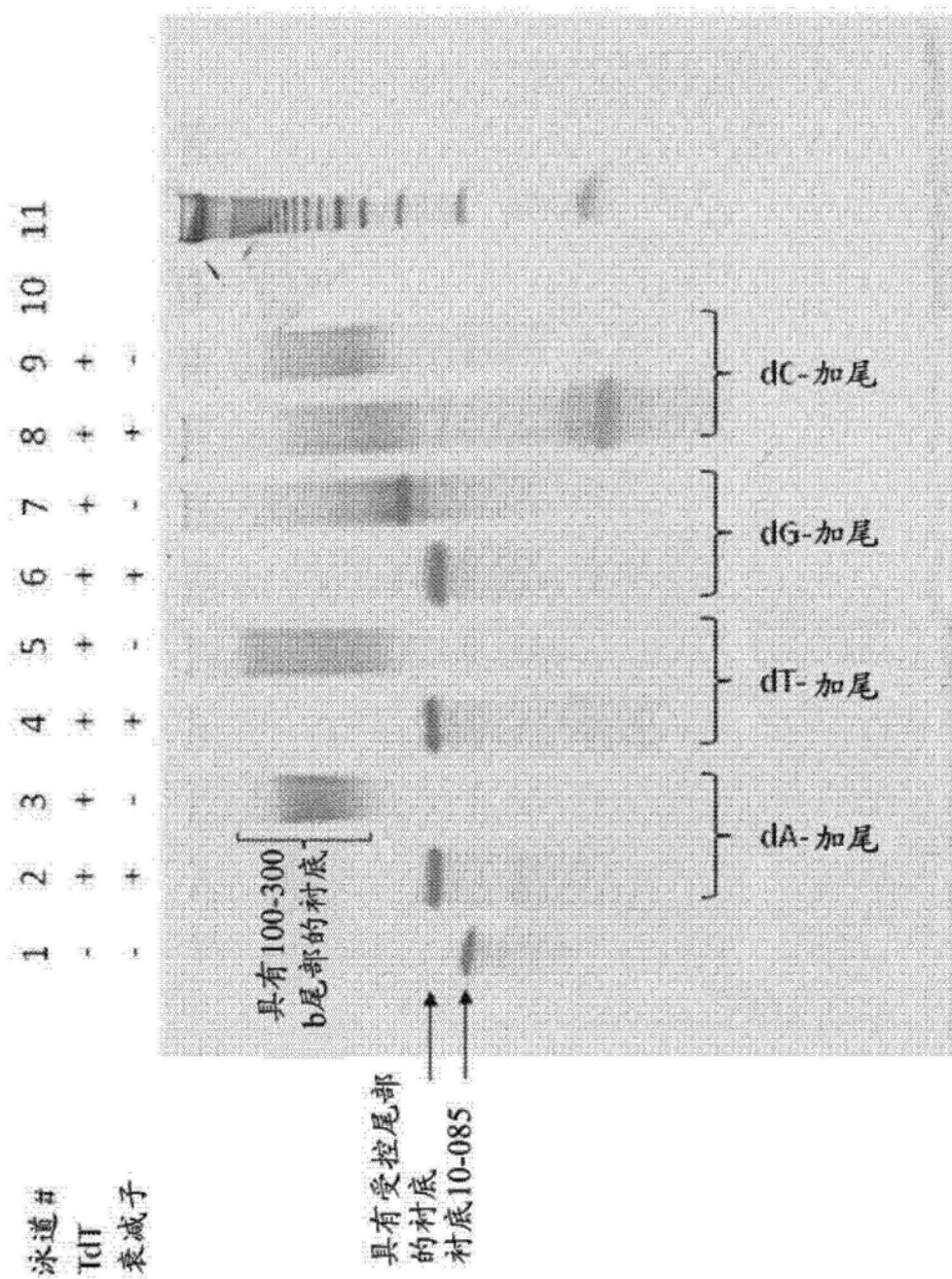


图19

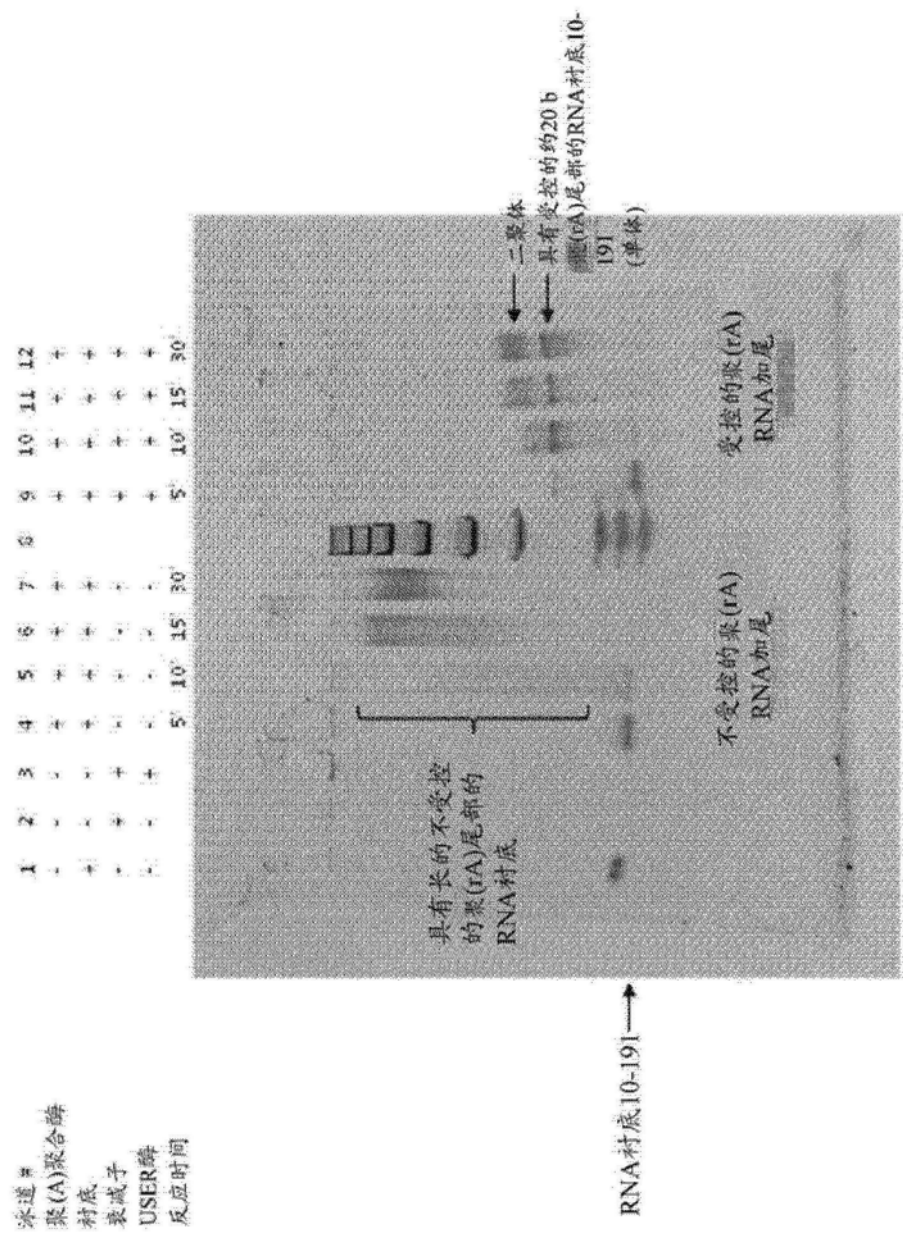


图20

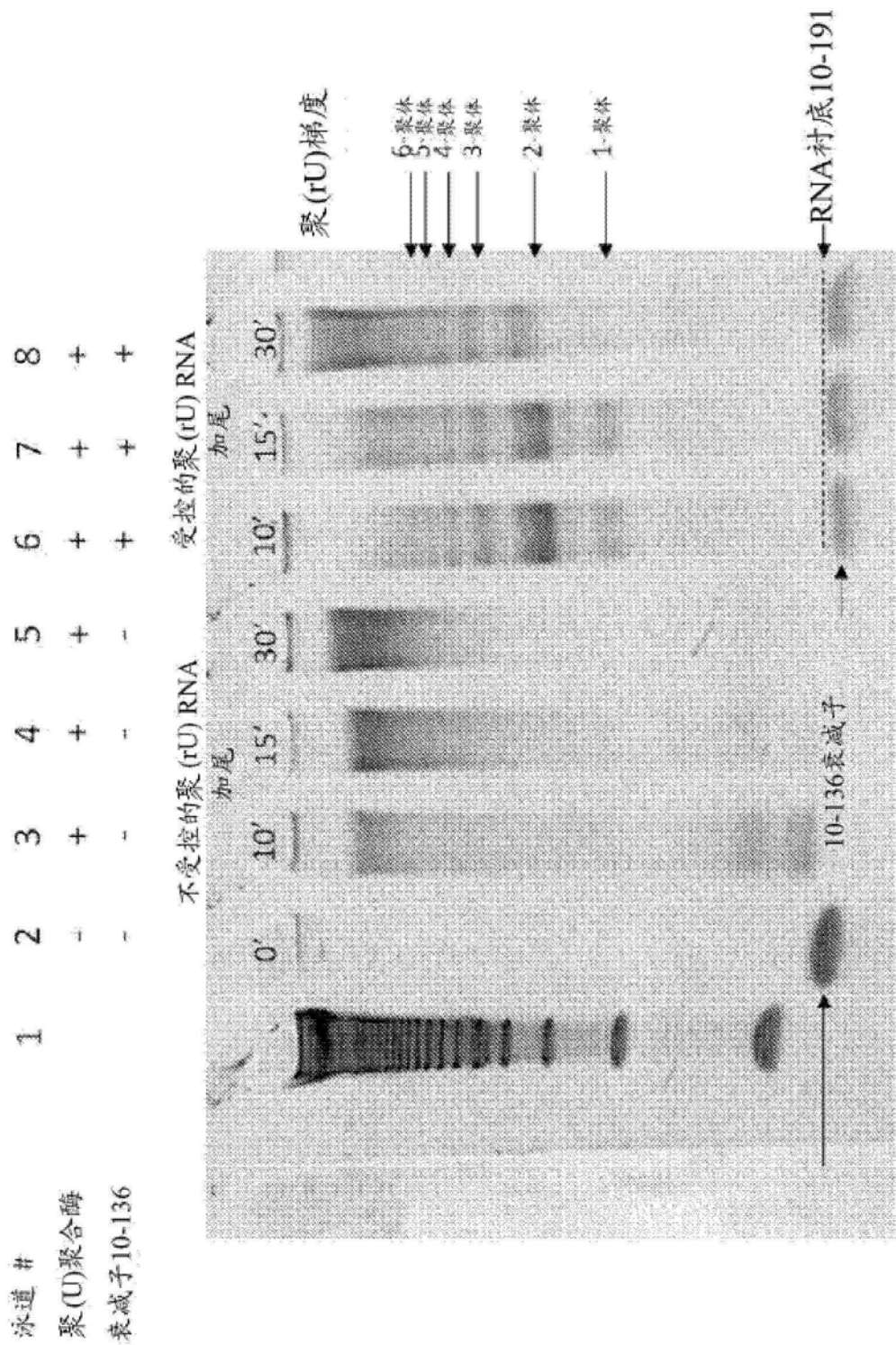


图21a

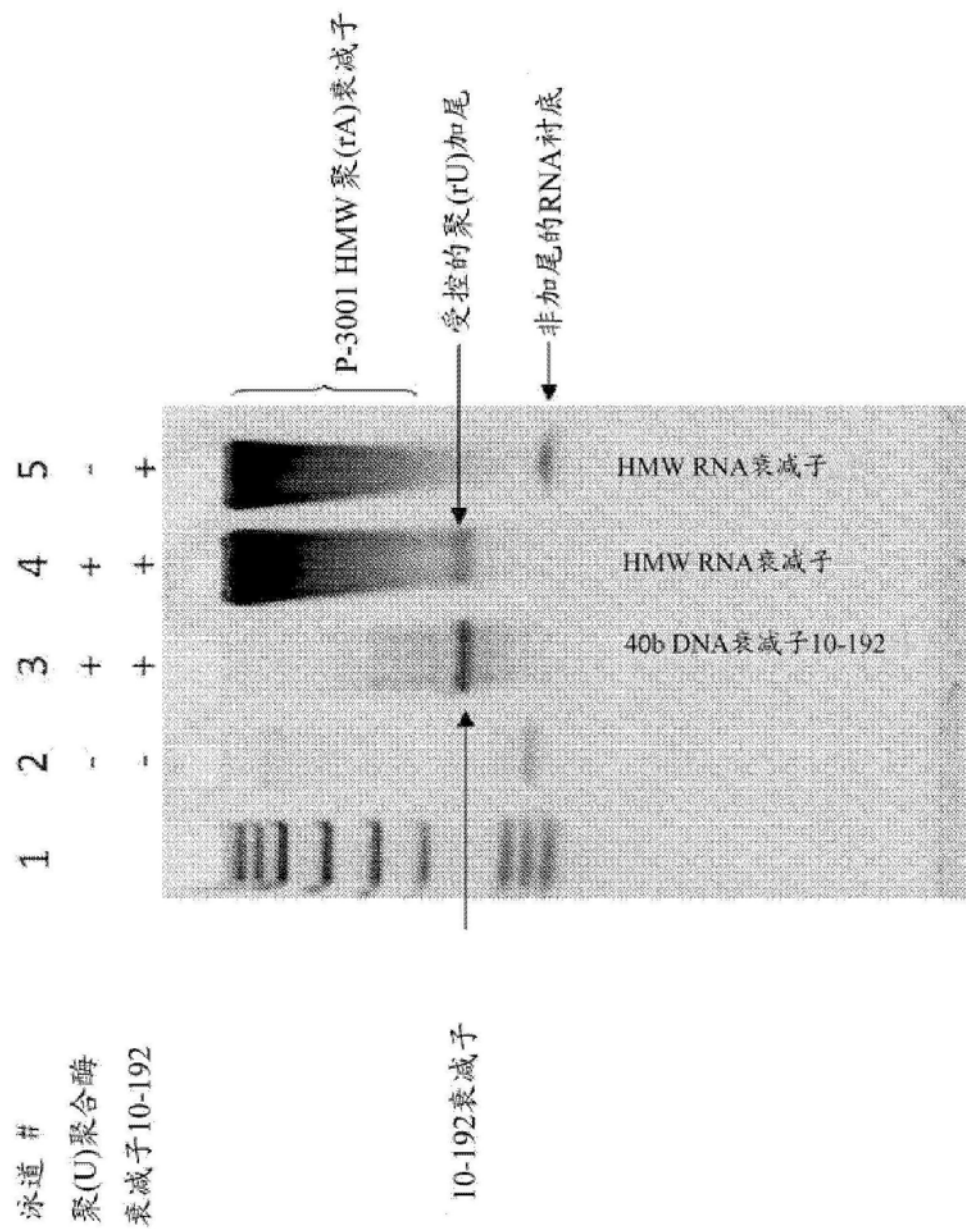


图21b

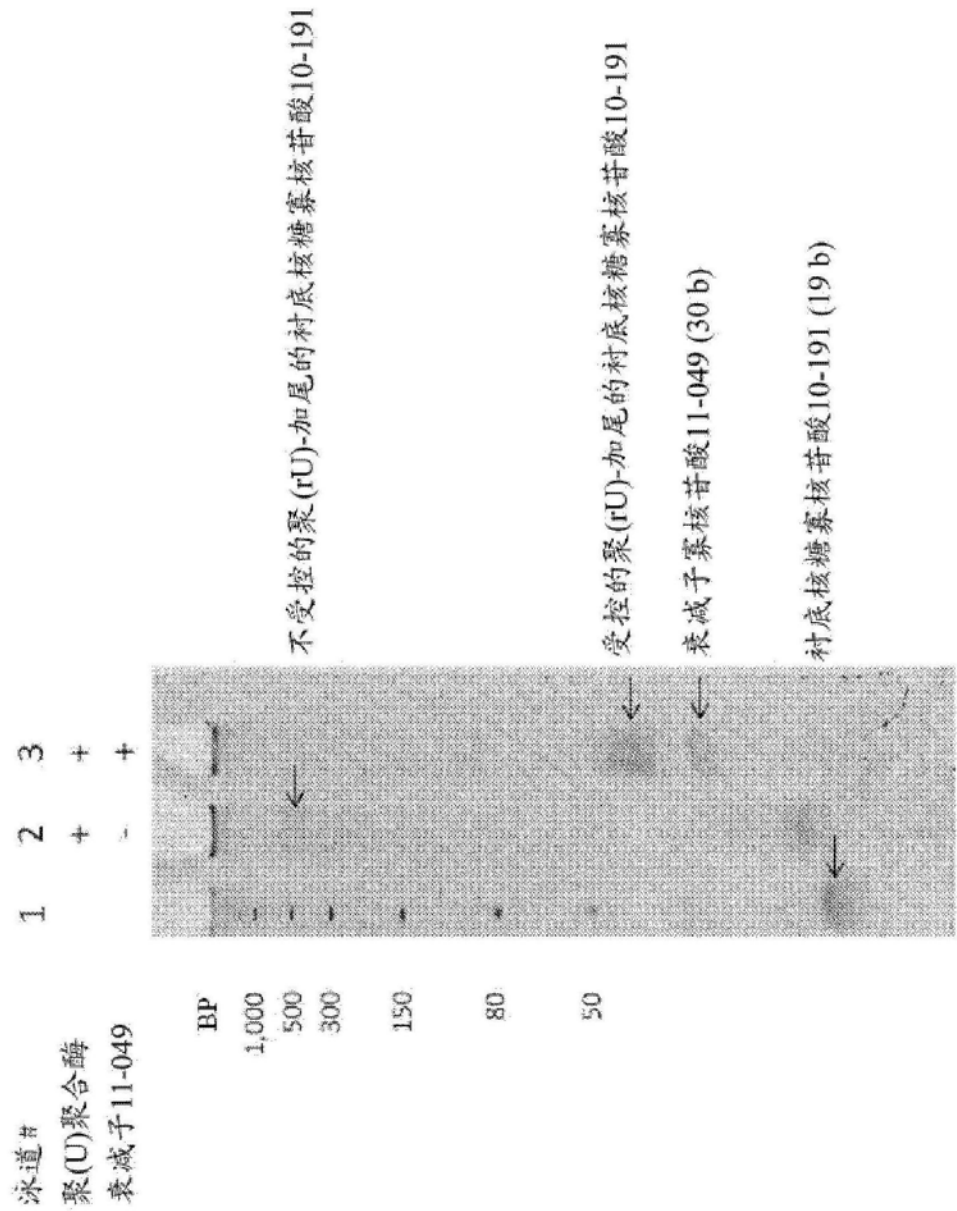


图21c

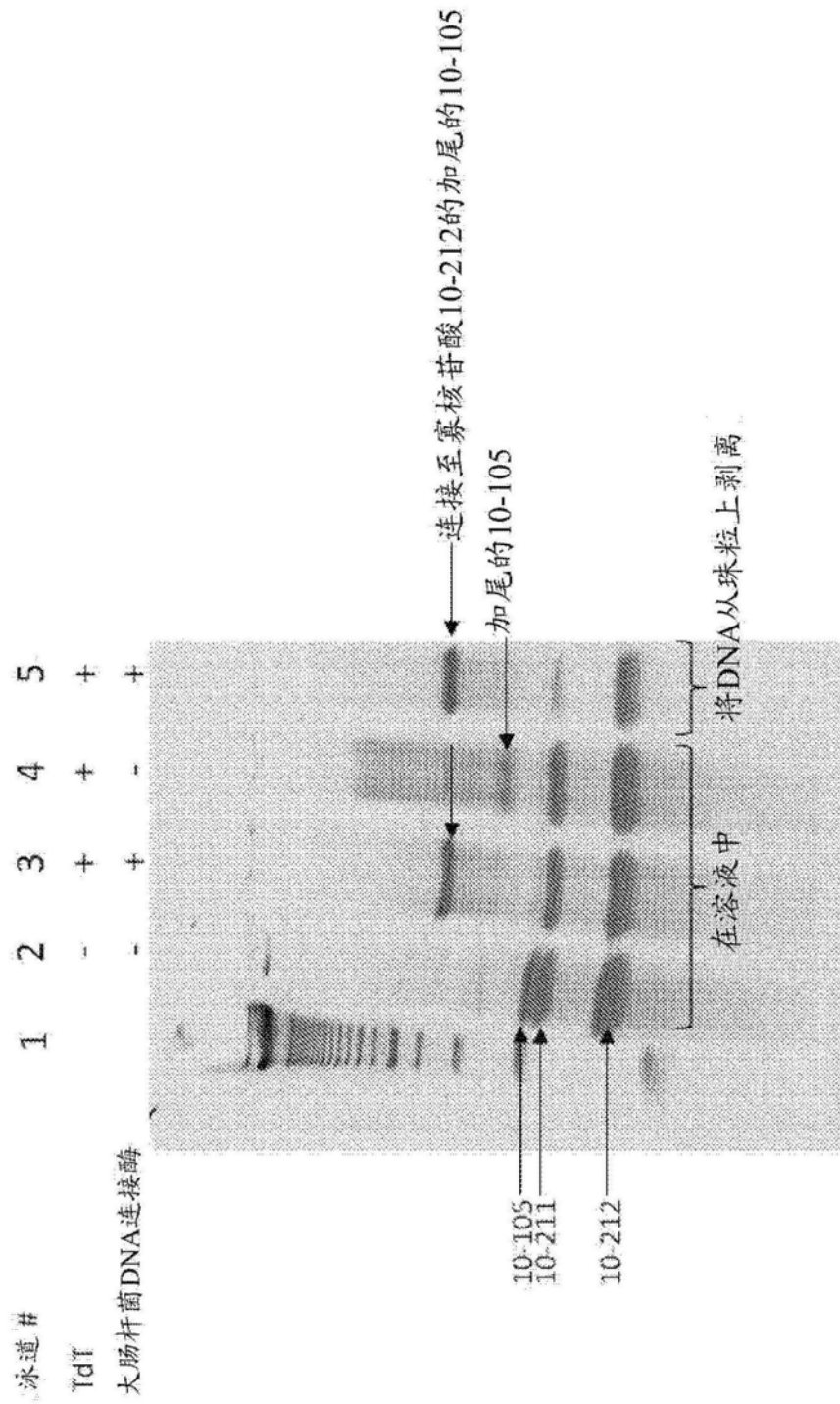


图22

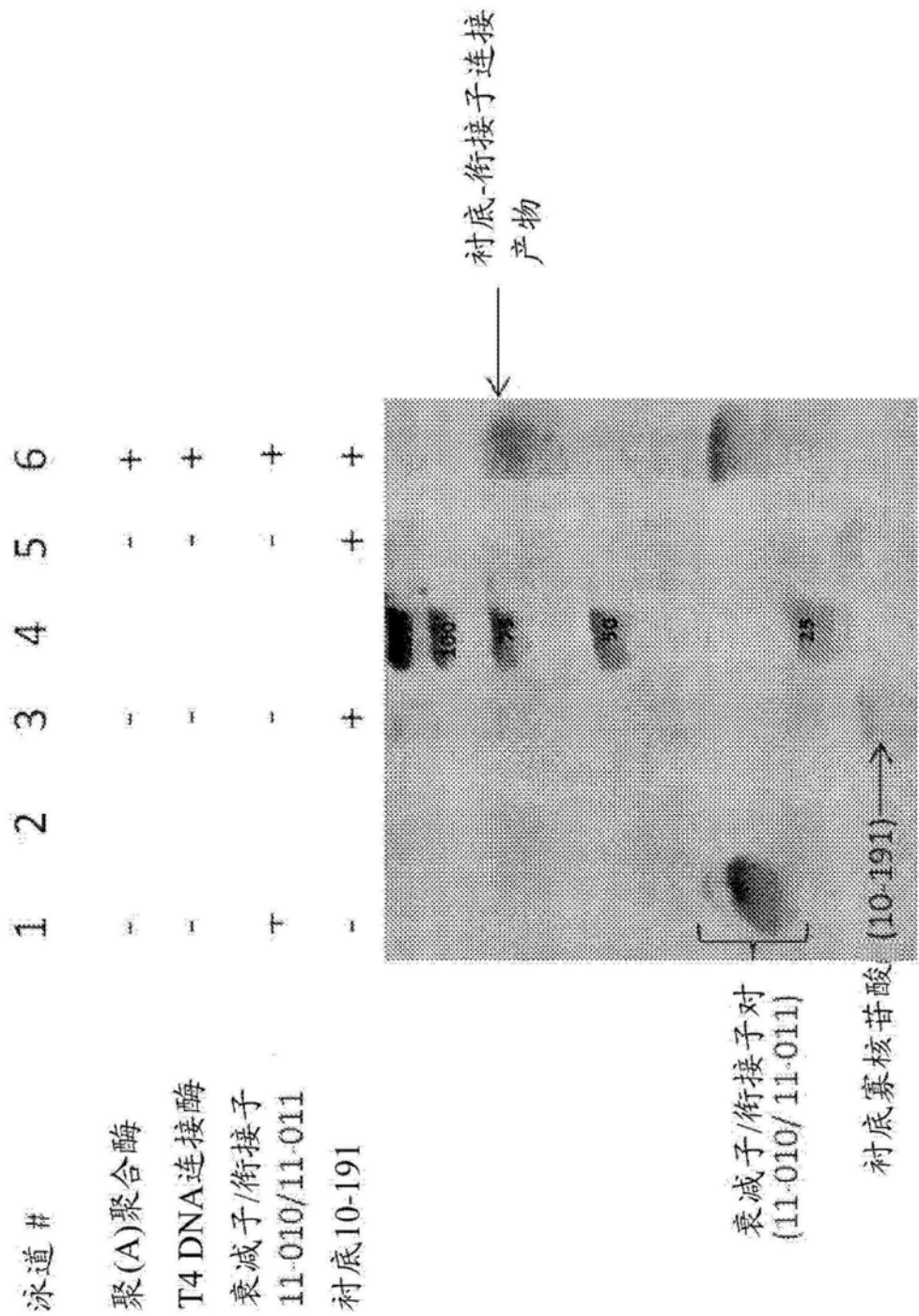


图23

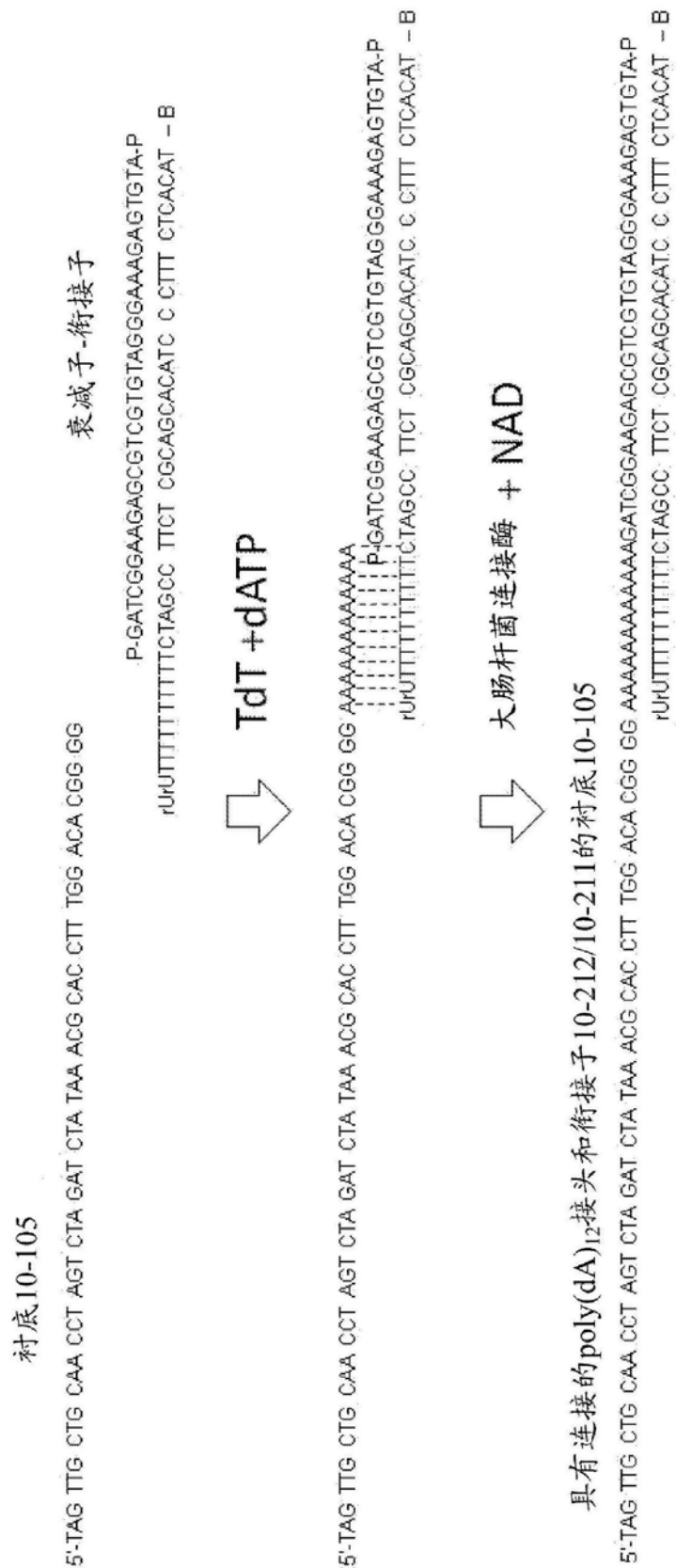


图24a

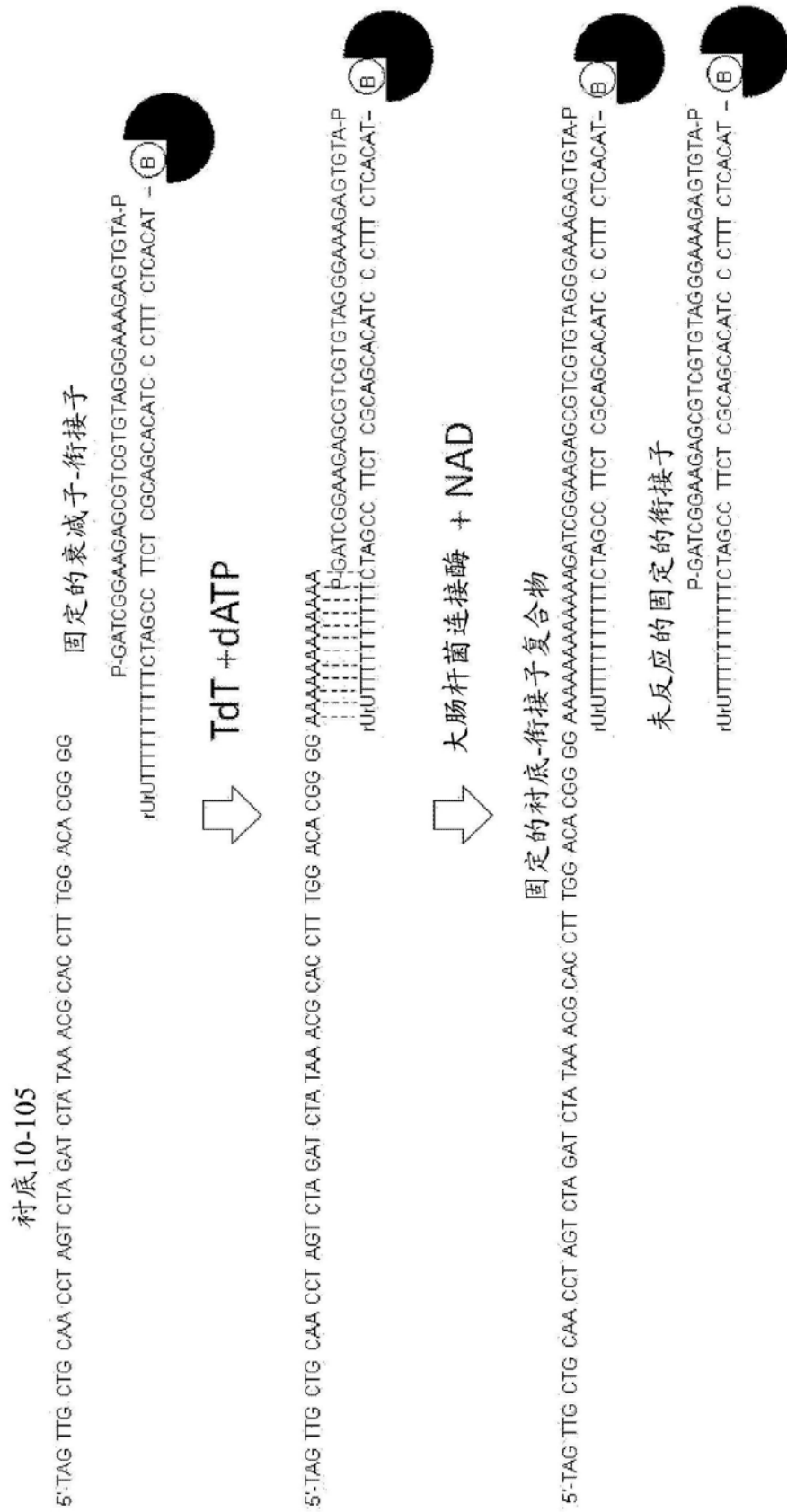


图24b

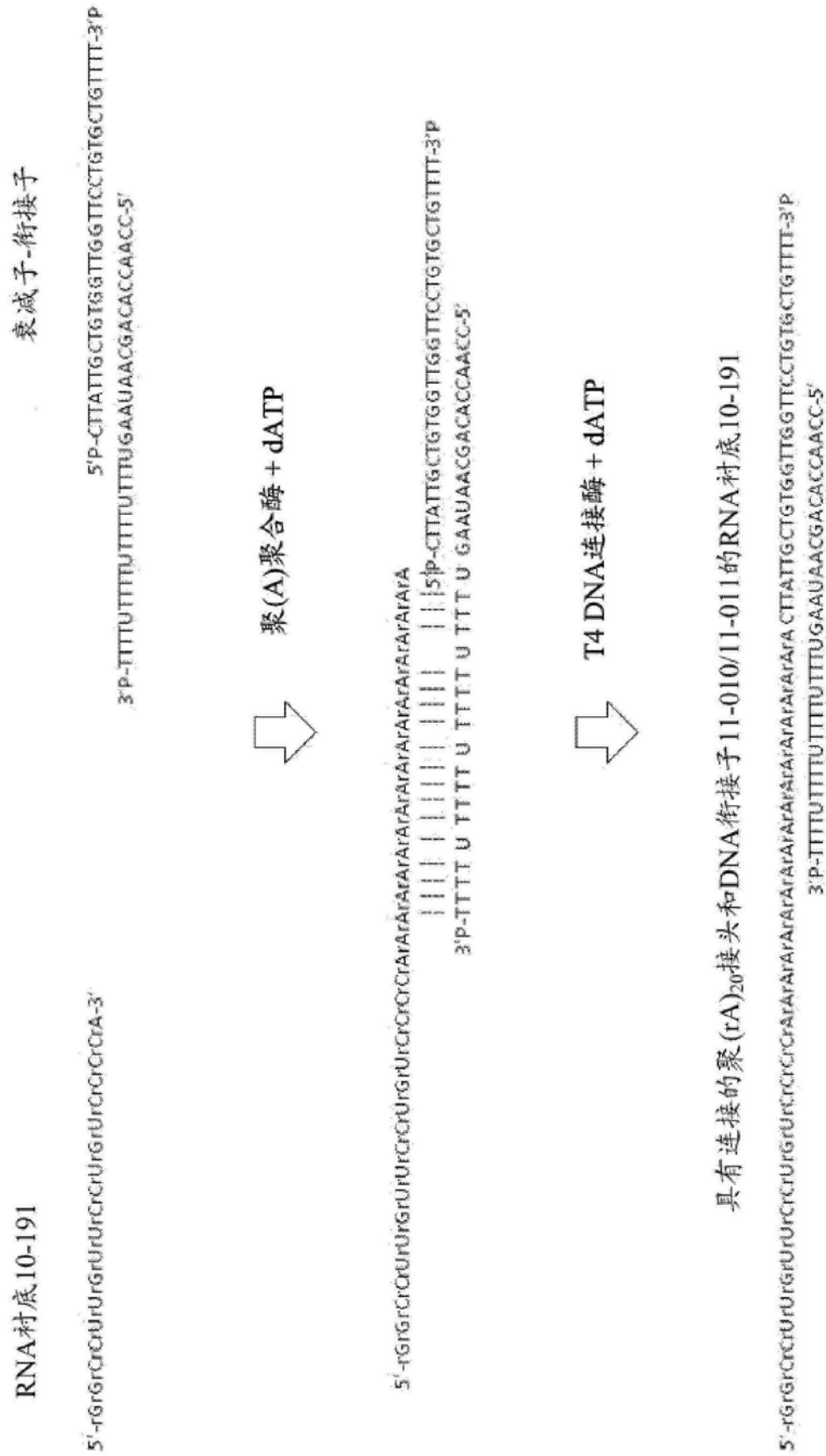


图24c

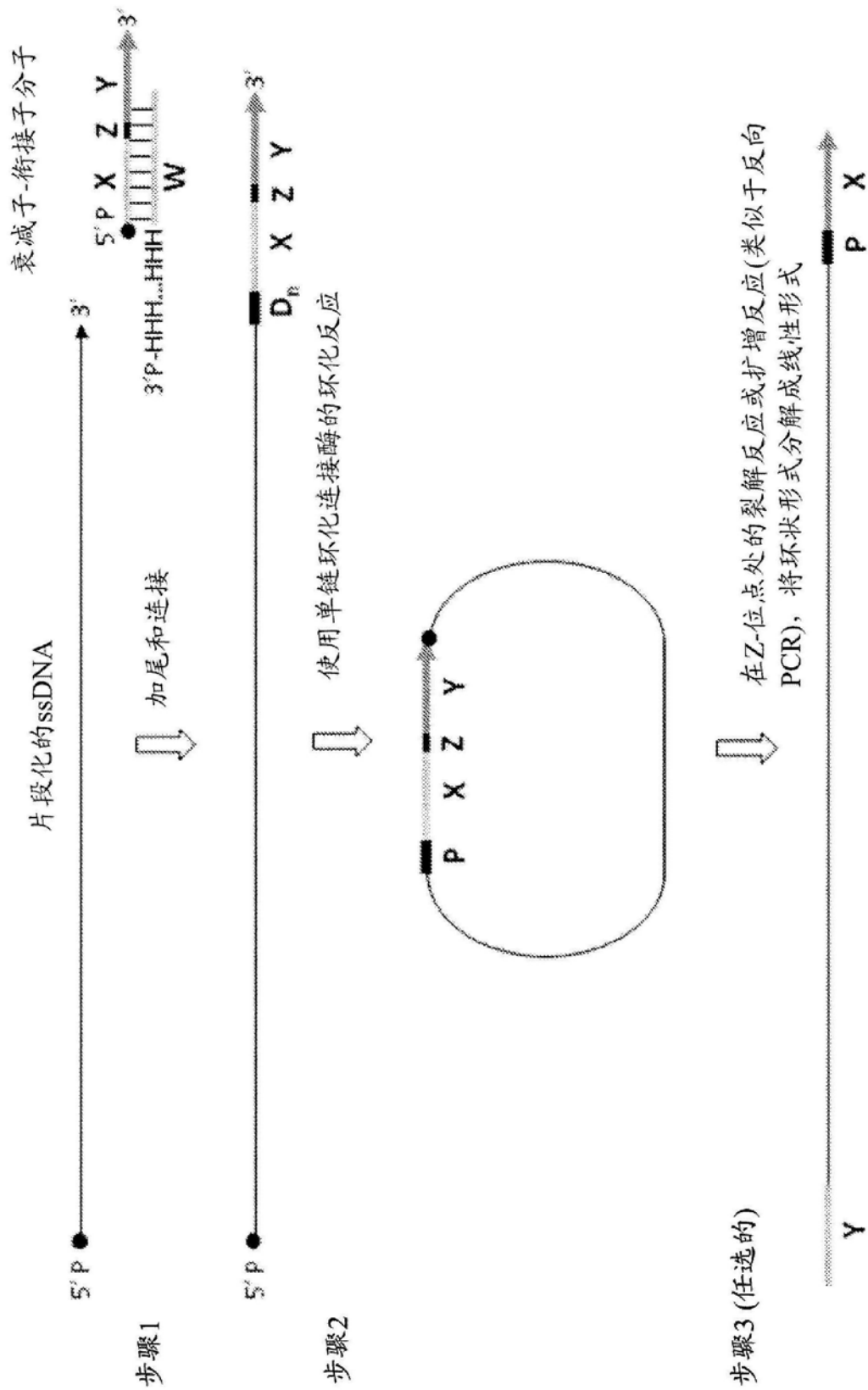


图25

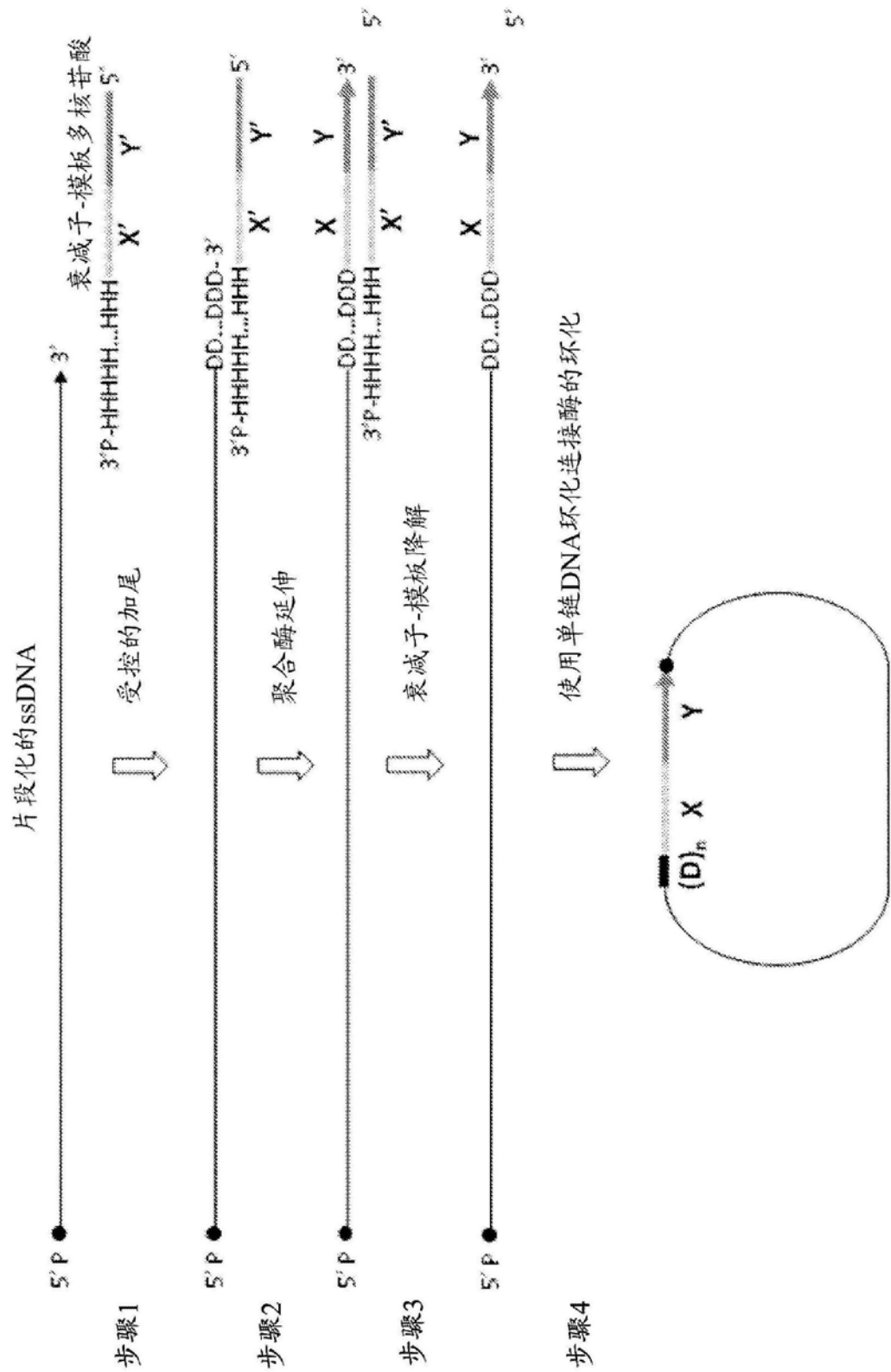


图26

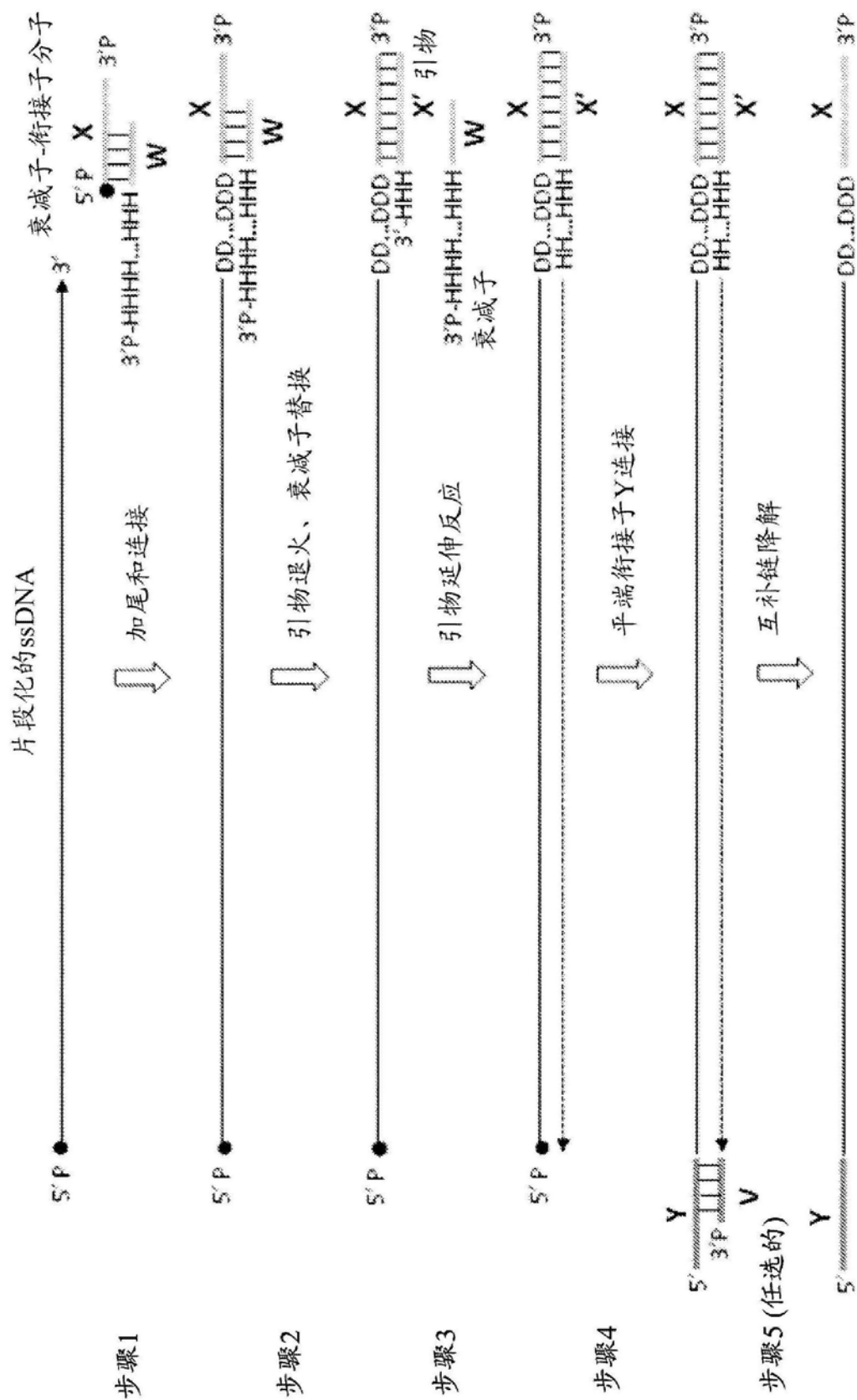


图27

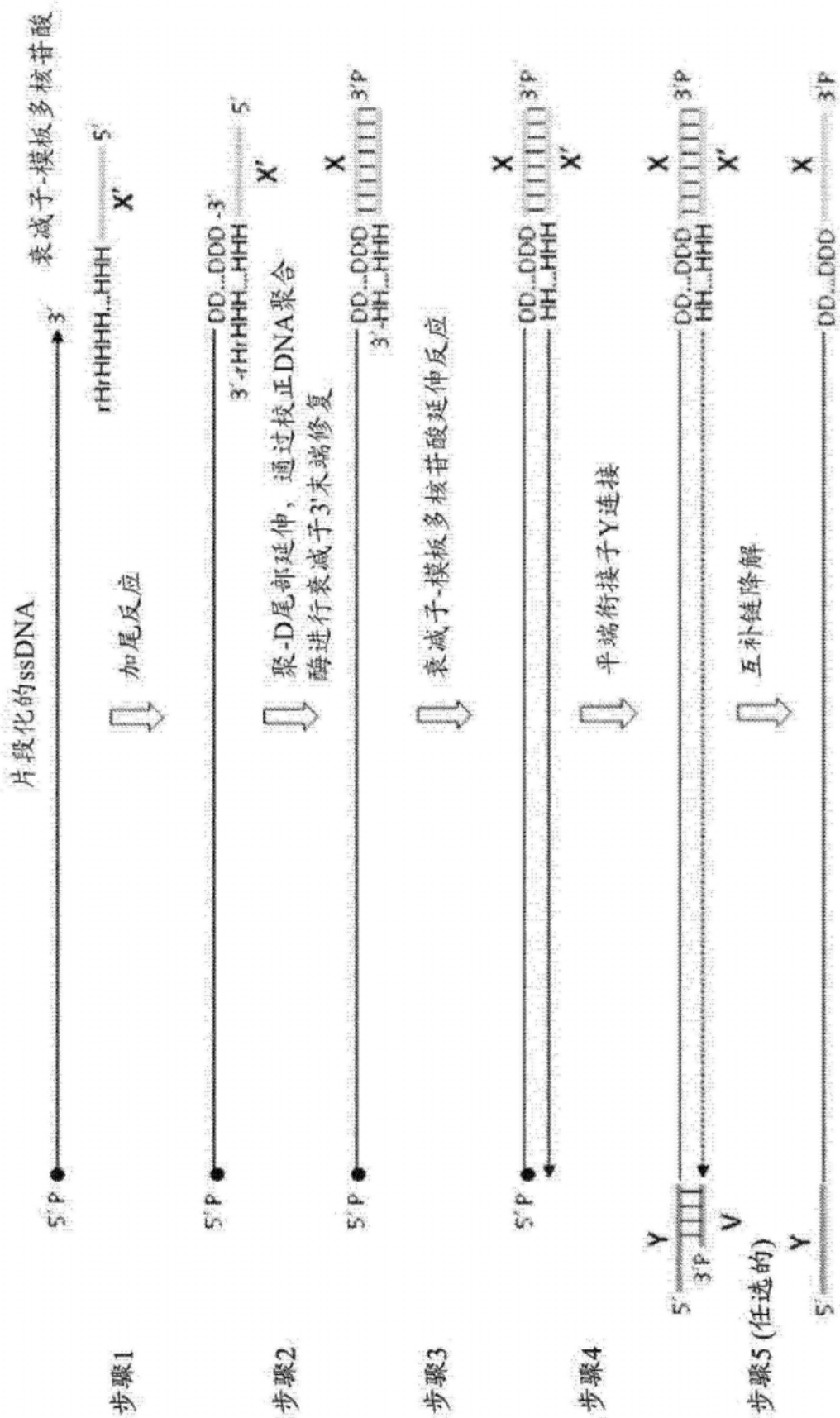


图28

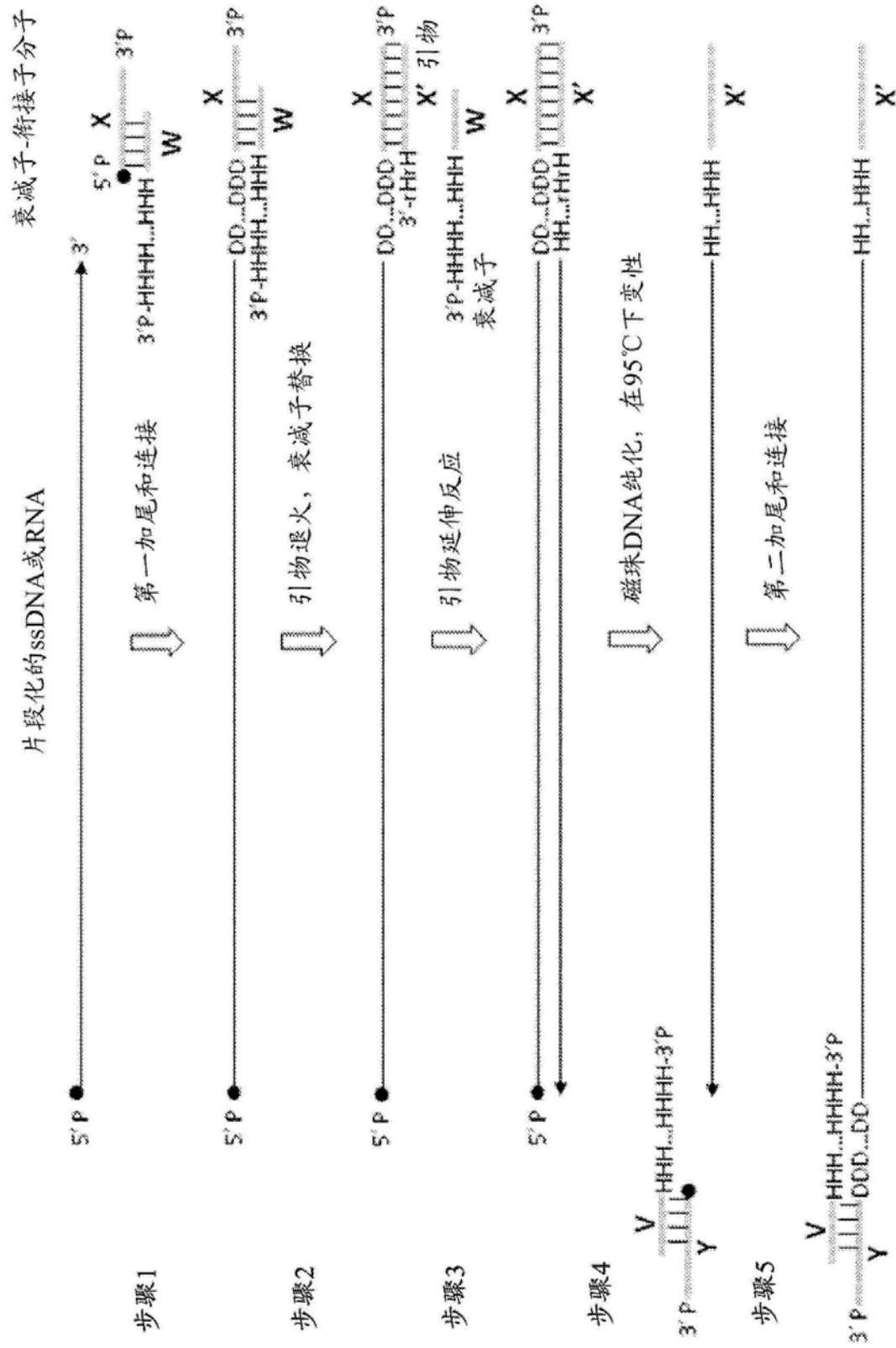


图29

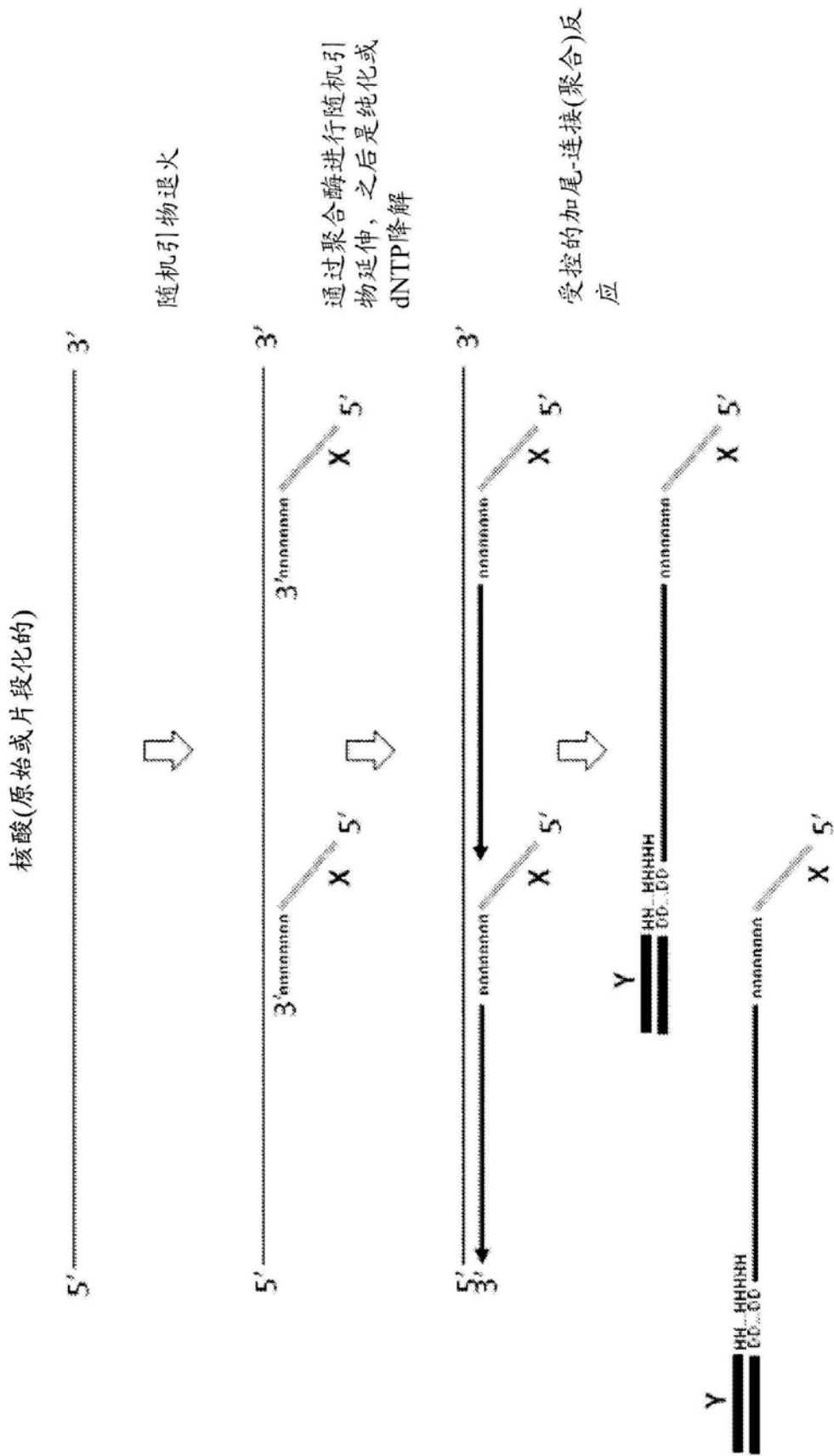


图30

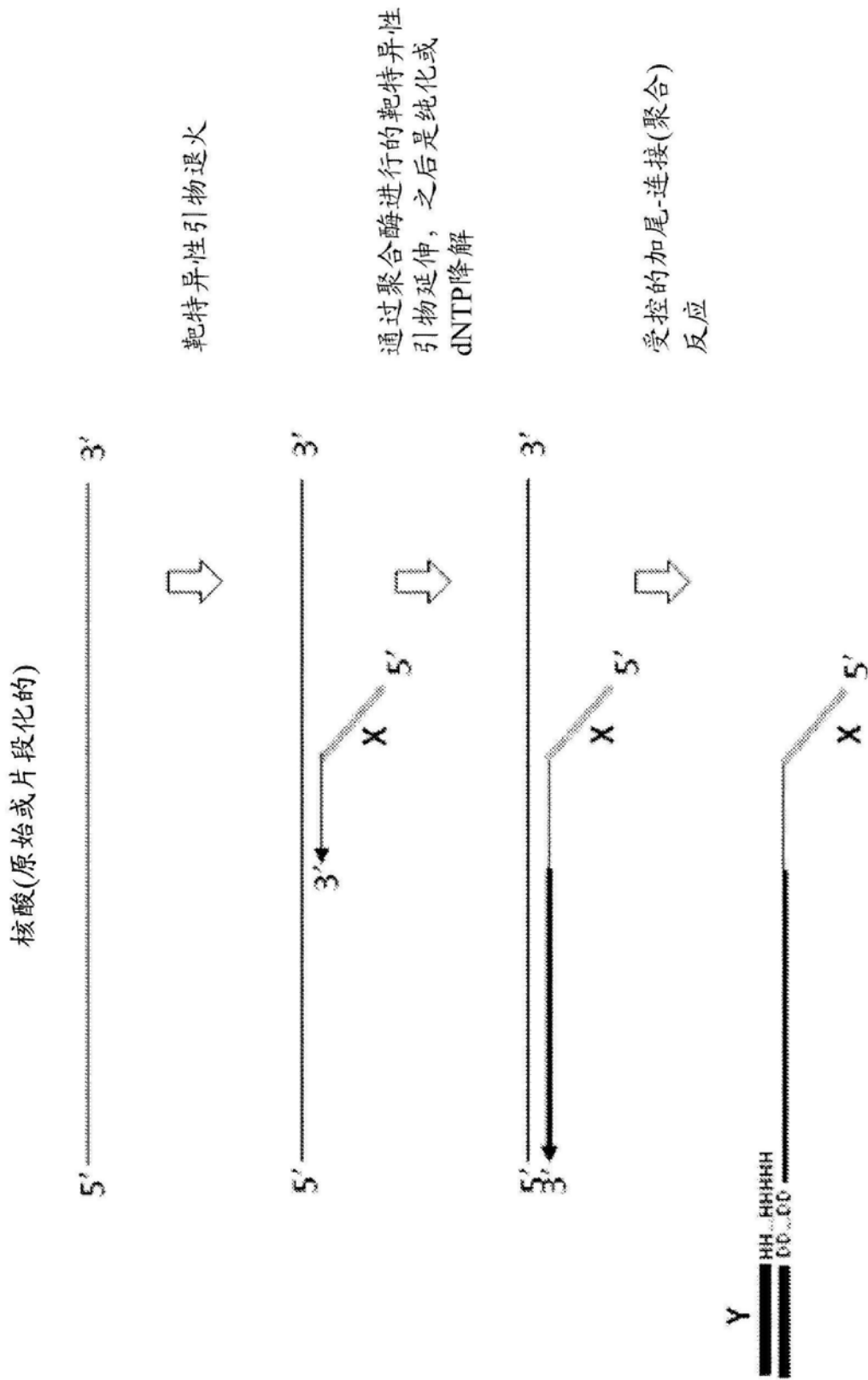


图31

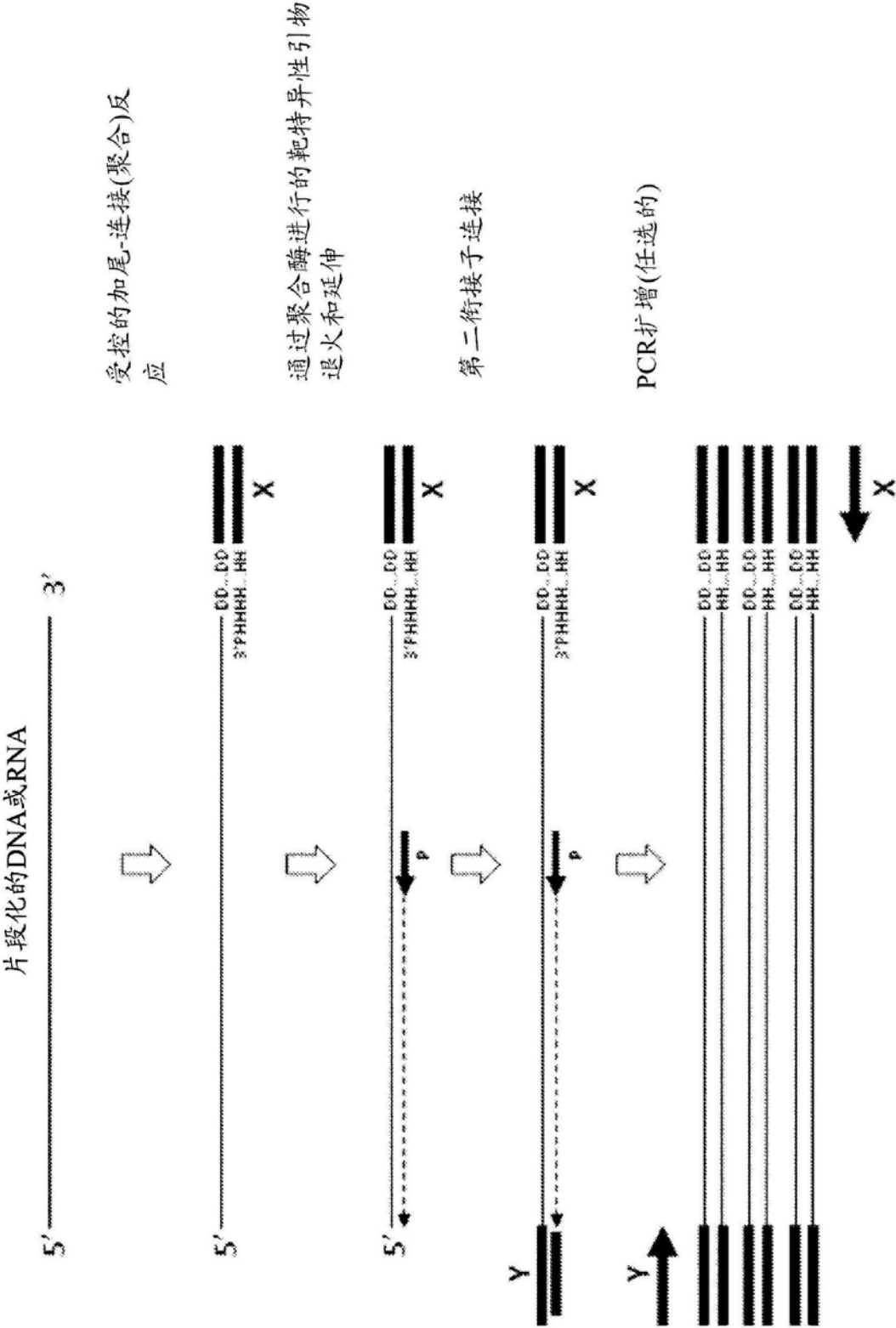


图32

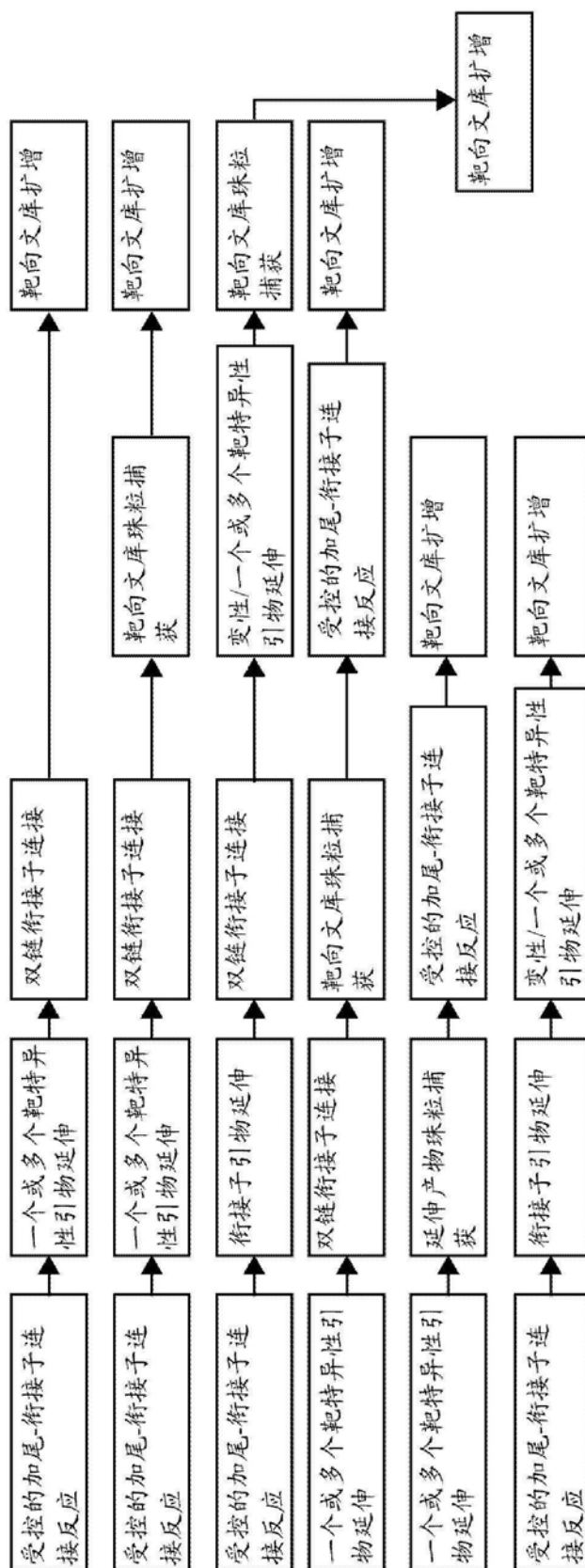


图33

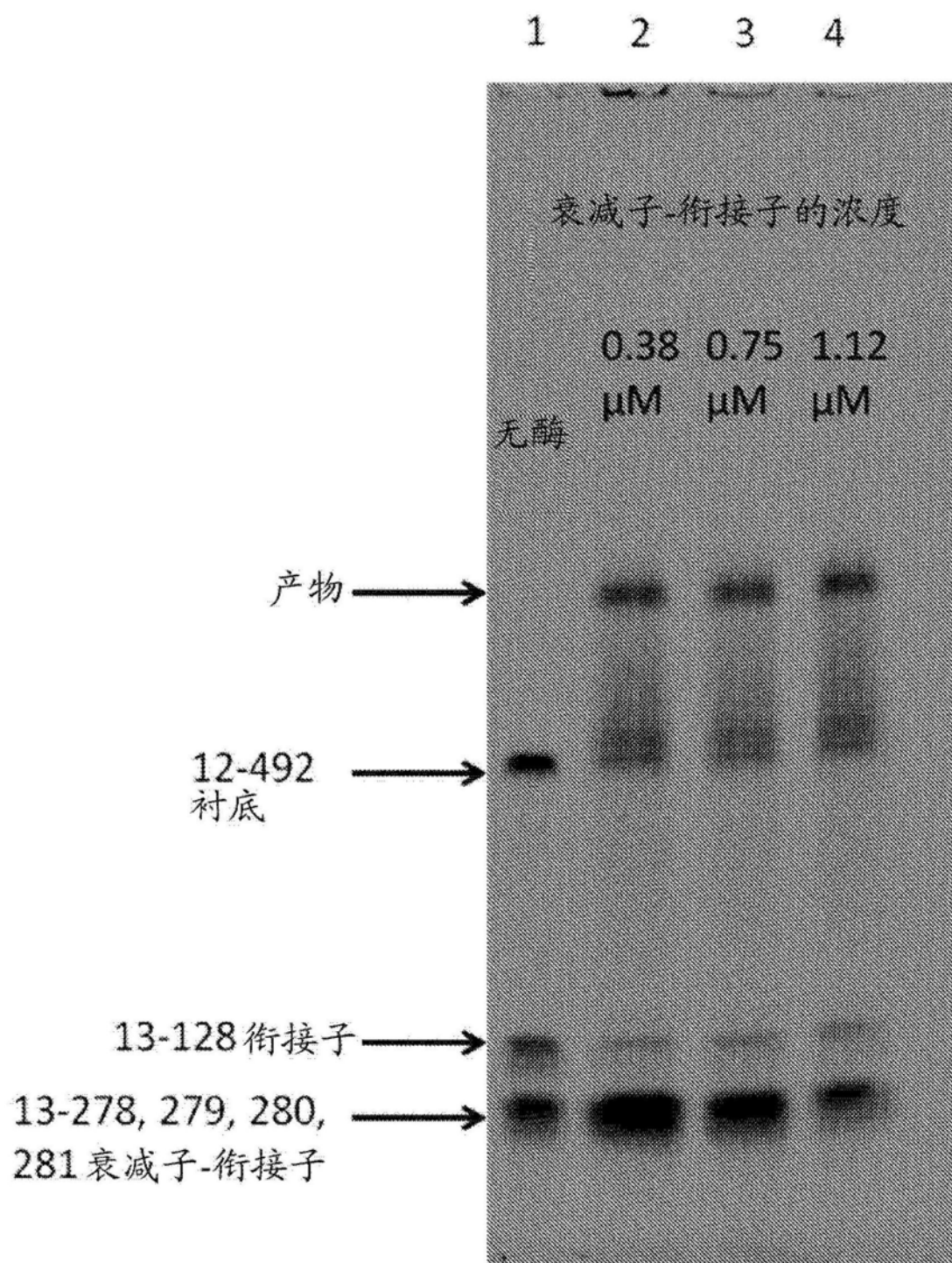


图34

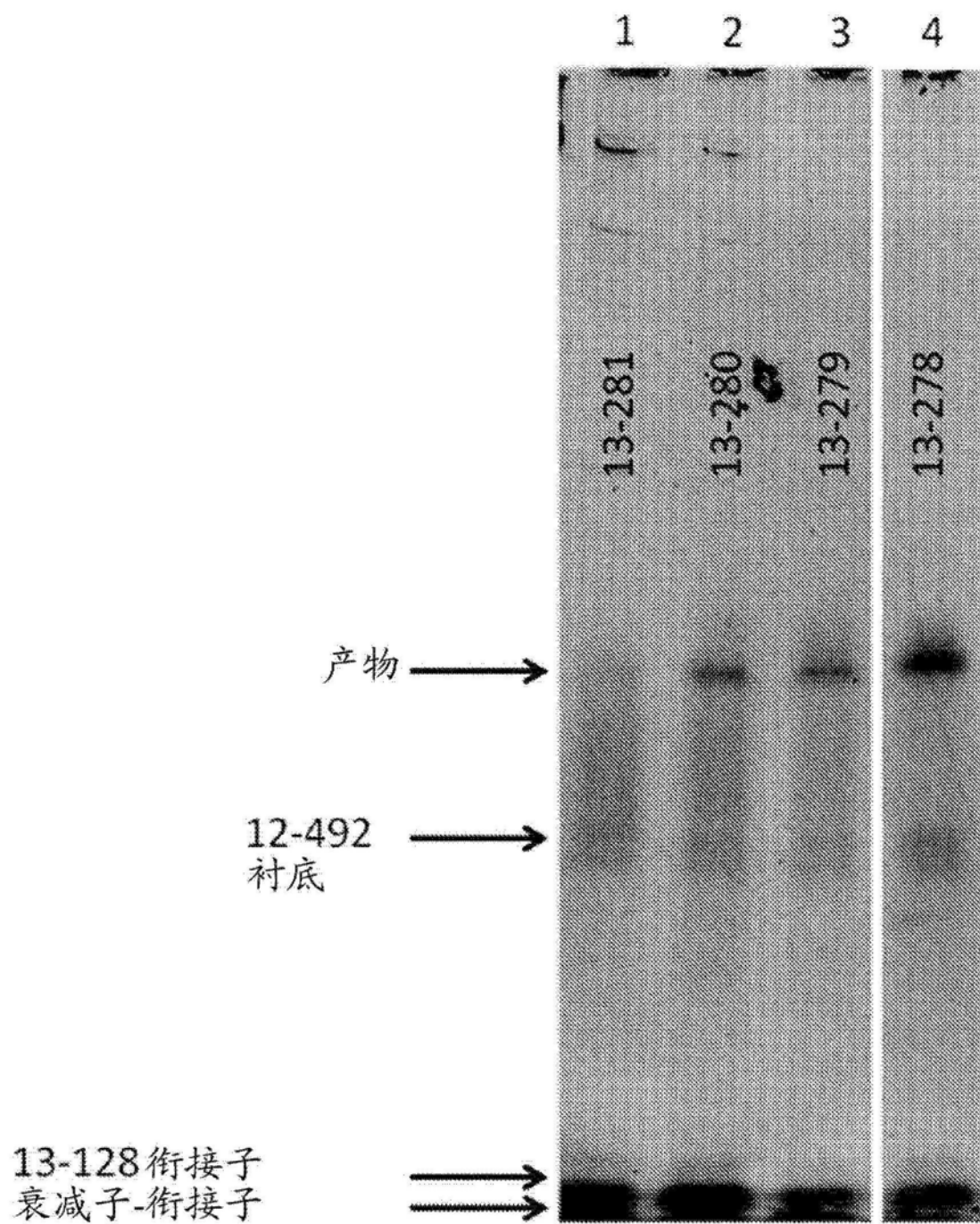


图35

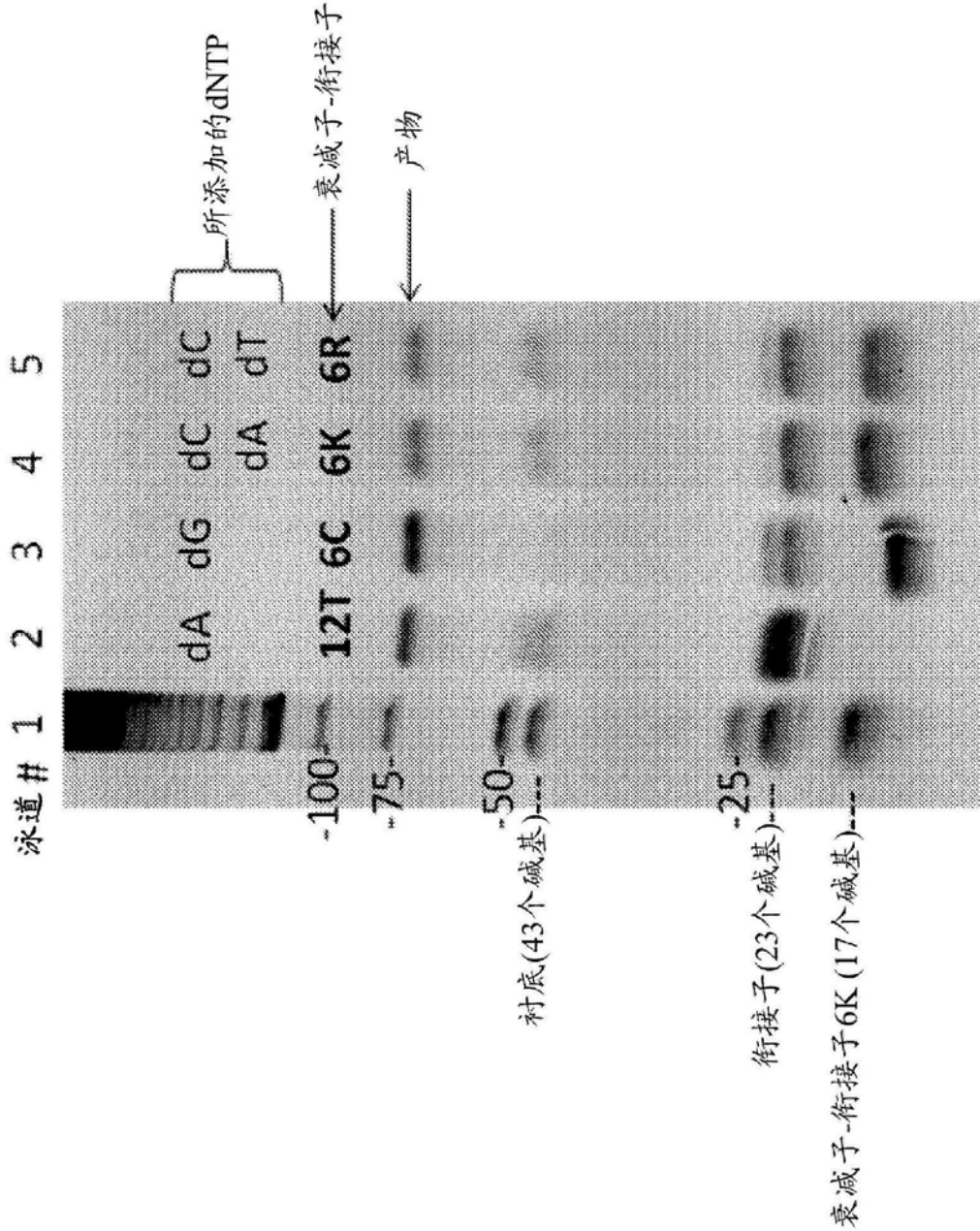


图36

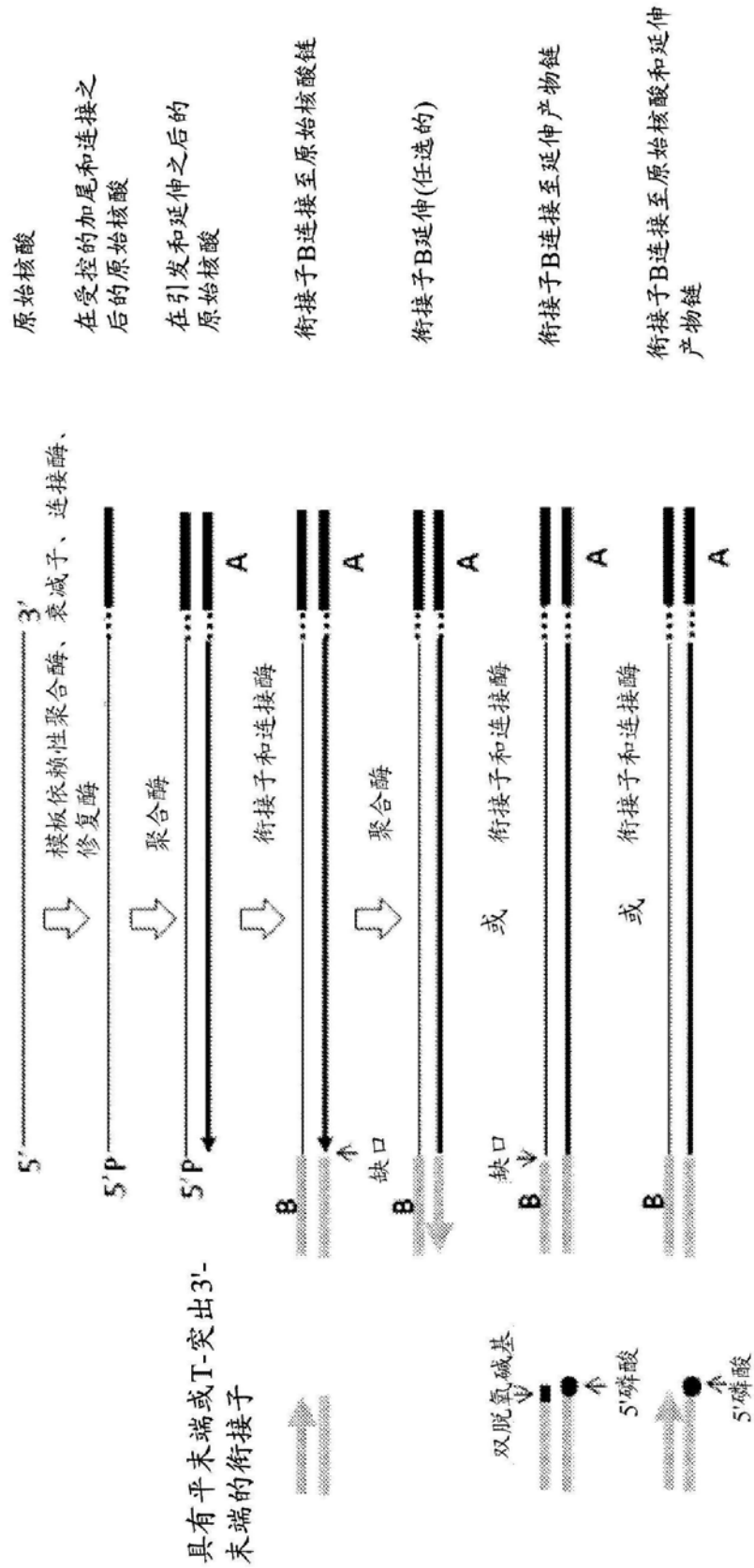


图37

方案 1

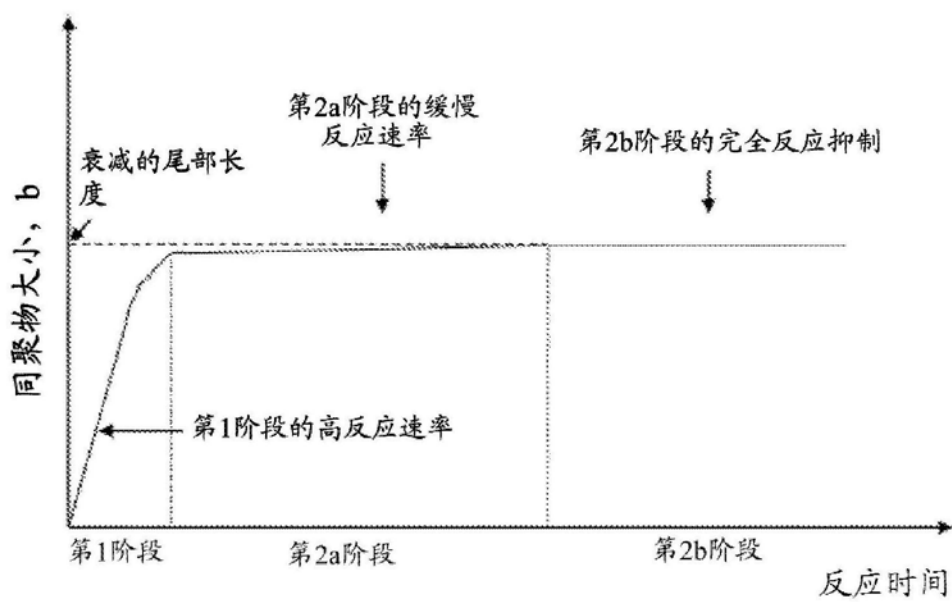


图38