



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104379748 B

(45)授权公告日 2019.01.04

(21)申请号 201380024198.0	<i>C12N 15/10</i> (2006.01)
(22)申请日 2013.05.16	<i>C12N 9/12</i> (2006.01)
(65)同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 104379748 A	<i>C07K 1/02</i> (2006.01)
(43)申请公布日 2015.02.25	<i>C07K 1/04</i> (2006.01)
(30)优先权数据 12003887.2 2012.05.16 EP	<i>C12P 19/34</i> (2006.01)
(85)PCT国际申请进入国家阶段日 2014.11.07	<i>C12P 21/00</i> (2006.01)
(86)PCT国际申请的申请数据 PCT/EP2013/001458 2013.05.16	(56)对比文件
(87)PCT国际申请的公布数据 W02013/170963 EN 2013.11.21	WO 03/047743 A2,2003.12.06,
(73)专利权人 诺松制药股份公司 地址 德国柏林	US 2005196392 A1,2005.09.08,
(72)发明人 A·佩什 R·大卫 F·雅罗什 M·雅恩兹 S·克鲁斯曼	US 2010081710 A1,2010.04.01,
(74)专利代理机构 北京市铸成律师事务所 11313 代理人 郝文博	OLIVEROS M ET AL..Characterization of an African swine fever virus 20-kDa DNA polymerase involved in DNA repair.《THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY》.1997, 30899-30910.
(51)Int.Cl. <i>C12N 15/54</i> (2006.01)	BOUDSOCQ F ET AL..Sulffolobus solfataricus P2 DNA polymerase IV(Dpo4): an archeal DinB-like DNA polymerase with lesion-bypass properties akin to eukaryotic pol.《NUCLEIC ACIDS RESEARCH》 .2001,4607-4616.
	审查员 管冰
	权利要求书3页 说明书52页 附图22页

(54)发明名称

L-核酸的酶促合成

(57)摘要

本发明涉及一种用于添加一个或多个L-核苷酸到第一L-核酸的3'端的方法,其中所述方法包括在包含酶活性展现部分的蛋白质存在下使所述一个或多个L-核苷酸与所述第一L-核酸反应的步骤,其中所述酶活性能够添加一个或多个L-核苷酸到所述第一L-核酸的3'端。

1. 一种用于添加一个或多个L-核苷酸到第一L-核酸的3'端的方法,其中所述方法包括在具有聚合酶活性的聚合酶存在下使所述一个或多个L-核苷酸与所述第一L-核酸反应的步骤,其中所述聚合酶活性能够添加一个或多个L-核苷酸到所述第一L-核酸的3'端,

其中所述聚合酶由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列选自以下组成的组:根据SEQ ID NO:1的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:2的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:3的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:4的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:15的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:16的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:17的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:18的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:19的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:20的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:21的氨基酸序列和根据SEQ ID NO:22的氨基酸序列,其中所述氨基酸序列的氨基酸是D-氨基酸。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述聚合酶由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列选自以下组成的组:根据SEQ ID NO:15的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:16的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:17的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:18的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:19的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:20的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:21的氨基酸序列和根据SEQ ID NO:22的氨基酸序列,并且其中所述聚合酶活性是热稳定的聚合酶活性。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述反应步骤是在允许进行所述添加所述至少一个或多个L-核苷酸到所述第一L-核酸的条件下进行。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述添加所述至少一个或多个L-核苷酸到所述第一L-核酸是所述至少一个或多个L-核苷酸共价结合到所述第一L-核酸。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第一L-核酸是由DNA、RNA、经修饰的DNA、经修饰的RNA或其组合组成的引物。

6. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第一L-核酸由L-核苷酸和任选的修饰组成。

7. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第一L-核酸由L-核苷酸组成。

8. 根据权利要求1所述的方法,其中所述反应还包含第二L-核酸,其中使一分子的所述第一L-核酸与一分子的所述第二L-核酸杂交。

9. 根据权利要求8所述的方法,其中所述聚合酶合成与所述第二L-核酸互补的第三L-核酸,其中所述第三L-核酸包含所述第一L-核酸和添加到所述第一L-核酸的3'端的L-核苷酸。

10. 一种用于在L-核苷酸和聚合酶存在下扩增靶L-核酸的方法,其中聚合酶活性能够扩增所述靶L-核酸,其中所述聚合酶由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列选自根据以下氨基酸序列组成的组:选自SEQ ID NO:15的氨基酸序列、选自SEQ ID NO:16的氨基酸序列、选自SEQ ID NO:17的氨基酸序列、选自SEQ ID NO:18的氨基酸序列、选自SEQ ID NO:19的氨基酸序列、选自SEQ ID NO:20的氨基酸序列、选自SEQ ID NO:21的氨基酸序列和选自SEQ ID NO:22的氨基酸序列,其中所述氨基酸序列的氨基酸是D-氨基酸。

11. 根据权利要求10所述的方法,其中所述聚合酶活性是热稳定的聚合酶活性。

12. 根据权利要求10所述的方法,其中所述反应步骤是在允许扩增所述靶L-核酸的条件下进行。

13. 根据权利要求10所述的方法,其中所述方法使用至少一种引物,其中所述至少一种引物由L-核苷酸和任选的修饰组成。

14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述方法使用两种引物,其中所述引物由L-核苷

酸组成。

15. 根据权利要求10所述的方法,其中所述靶L-核酸由L-核苷酸组成。

16. 根据权利要求10所述的方法,其中所述方法是聚合酶链式反应。

17. 根据权利要求10所述的方法,其中所述靶L-核酸由L-DNA组成。

18. 根据权利要求10所述的方法,其中所述靶L-核酸由20至20,000个L-核苷酸组成。

19. 一种具有聚合酶活性的聚合酶,其中所述聚合酶由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列选自自由以下组成的组:根据SEQ ID NO:1的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:2的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:3的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:4的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:15的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:16的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:17的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:18的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:19的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:20的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:21的氨基酸序列和根据SEQ ID NO:22的氨基酸序列,其中所述氨基酸序列的氨基酸是D-氨基酸。

20. 根据权利要求19所述的聚合酶,其中所述聚合酶活性能够添加一个或多个L-核苷酸到所述第一L-核酸的3'端。

21. 根据权利要求19所述的聚合酶,其中所述聚合酶由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列选自自由以下组成的组:根据SEQ ID NO:15的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:16的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:17的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:18的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:19的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:20的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:21的氨基酸序列和根据SEQ ID NO:22的氨基酸序列,并且其中所述聚合酶活性是热稳定的聚合酶活性。

22. 包含聚合酶活性的聚合酶在用于添加一个或多个L-核苷酸到L-核酸的3'端的方法中的用途,其中所述聚合酶是由氨基酸序列组成的聚合酶,所述氨基酸序列选自自由以下组成的组:根据SEQ ID NO:1的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:2的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:3的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:4的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:15的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:16的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:17的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:18的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:19的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:20的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:21的氨基酸序列和根据SEQ ID NO:22的氨基酸序列,其中所述氨基酸序列的氨基酸是D-氨基酸。

23. 包含聚合酶活性的聚合酶在用于在L-核苷酸存在下扩增靶L-核酸的方法中的用途,其中所述聚合酶是由氨基酸序列组成的聚合酶,所述氨基酸序列选自自由以下组成的组:根据SEQ ID NO:15的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:16的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:17的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:18的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:19的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:20的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:21的氨基酸序列和根据SEQ ID NO:22的氨基酸序列,其中所述氨基酸序列的氨基酸是D-氨基酸。

24. 根据权利要求23所述的用途,其中所述用于扩增靶L-核酸的方法是聚合酶链式反应。

25. 一种用于鉴别结合靶分子的L-核酸分子的方法,所述方法包括以下步骤:

(a) 产生L-核酸分子的异源群体;

(b) 使步骤(a)的L-核酸分子的异源群体与所述靶分子接触;

(c) 分离未被所述靶分子结合的所述L-核酸分子;和

(d) 扩增被所述靶分子结合的所述L-核酸分子,其中所述扩增步骤使用根据权利要求19至21中任一项所述的聚合酶,

其中所述聚合酶由氨基酸序列组成,其中所述氨基酸序列的氨基酸是D-氨基酸。

26. 根据权利要求25所述的方法,还包括以下步骤:

(e) 对被所述靶分子结合的L-核酸分子进行测序;和

(f) 合成核苷酸序列与步骤(e)中所测序的所述L-核酸分子的核苷酸序列一致的核酸分子。

27. 根据权利要求25所述的方法,其中步骤(a)的L-核酸分子的异源群体的核酸分子在其5'端及其3'端上包含引物结合位点和分别与引物结合位点互补的序列,这允许通过聚合酶链式反应来扩增步骤(d)中所获得的所述L-核酸分子,其中所述聚合酶链式反应中所使用的所述聚合酶是根据权利要求19至21中任一项所述的聚合酶,所述聚合酶链式反应中所使用的所述引物由L-核苷酸组成,且所述聚合酶链式反应中所使用的所述核苷酸是L-核苷酸。

28. 根据权利要求26所述的方法,其中在步骤(d)之后引入以下步骤:

(da) 使所述扩增的核酸分子与所述靶分子接触,其中

步骤(b)和任选的步骤(c)和/或(d)是在步骤(e)之前进行,其中步骤(da)、(b)、(c)和任选的(d)是按照这个顺序进行一次或若干次。

29. 根据权利要求25所述的方法,其中结合所述靶分子的L-核酸是DNA。

30. 根据权利要求25所述的方法,其中结合所述靶分子的L-核酸分子由L-核苷酸组成。

31. 一种用于产生根据权利要求19至21中任一项所述的聚合酶的方法,其中

a) 化学合成根据权利要求19至21中任一项所述的聚合酶的两个或更多个片段,由此所述片段以其整体形式形成所述聚合酶的氨基酸序列,且

b) 通过链段缩合、天然化学连接、酶连接或其组合将步骤a)的所述片段彼此连接,其中所述聚合酶由氨基酸序列组成,其中所述氨基酸序列的氨基酸是D-氨基酸。

32. 根据权利要求31所述的用于产生聚合酶的方法,其中用于酶连接的所述酶是梭菌蛋白酶。

## L-核酸的酶促合成

[0001] 本发明涉及一种用于添加一个或多个L-核苷酸到第一L-核酸的3'端的方法；一种用于扩增靶L-核酸的方法；一种包含酶活性展现部分的蛋白质；包含氨基酸序列的聚合酶，其中所述氨基酸序列的氨基酸是D-氨基酸；一种野生型聚合酶的聚合酶变体，其中所述野生型聚合酶由根据SEQ ID NO:15的氨基酸序列组成；一种野生型聚合酶的聚合酶变体，其中所述野生型聚合酶由根据SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成；包含酶活性展现部分的蛋白质在用于添加一个或多个L-核苷酸的方法中的用途；包含酶活性展现部分的蛋白质在用于扩增靶L-核酸的方法中的用途；一种用于鉴别结合靶分子的L-核酸分子的方法；一种用于分别产生所述蛋白质和聚合酶的方法；以及一种用于将第一D-肽或第一D-蛋白质与第二D-肽或第二D-蛋白质彼此连接的方法。

[0002] 基因技术的可利用性在广义上对医学和诊断领域以及基础研究在过去数十年间所取得的进展贡献良多。基因技术所提供的合成力超过了化学合成的合成力。确切地说，基因技术和基因工程允许使用原核细胞和真核细胞的酶机制来产生事实上无限量的L-肽和L-蛋白质。确切地说，酶和聚合酶，或是野生型形式或是这些野生型形式的变体，允许通过连接D-核酸的构筑块（即，D-核苷酸）到化学合成可实现的长度（至少未获得合理的产率）来合成所述D-核酸。

[0003] 由于手性特异性，基因技术中所使用的酶仅能对应地使用手性与其自身的手性相符的构筑块和底物。对应地具有相反手性的构筑块和底物可能不受酶活性影响。由于手性互易原则，对应地具有相反手性的构筑块和底物的处理要求酶也具有相反的手性。

[0004] 举例来说，这种手性互易原则广泛用于产生靶结合L-核酸，这些靶结合L-核酸也是已知的并且称为镜像异构体。迄今为止，镜像异构体都是利用以下方法鉴别：在第一步骤中，使用D-核酸库针对诸如D-肽或D-蛋白质的靶分子或靶结构的对映异构形式进行体外选择。在第二步骤中，将如此鉴别的能结合靶分子或靶结构的对映异构形式的D-核酸制备为对应的L-核酸。由于手性互易原则，这些L-核酸（即镜像异构体）能够结合真实或实际的靶分子，诸如L-肽或L-蛋白质，而不结合用于选择过程的其对映异构形式，诸如D-肽或D-蛋白质。优选地，所述真实的或实际的靶分子或靶结构是诸如人体或动物体的生物学系统中存在的靶分子或靶结构。用于制备所述镜像异构体的方法描述于例如‘The Aptamer Handbook’（Klussmann编，2006）中。

[0005] 使鉴别镜像异构体的方法更容易的一种方式可能是重新设计所述方法，以便使用靶分子或靶结构直接从L-核酸库选择L-核酸，因为对映异构体形式由真实的或实际的靶分子或靶结构展现。由于所述方法的一部分是对最初对应地结合靶分子和靶结构的那些L-核酸进行扩增，故将会需要能添加至少一个核苷酸到L-引物的聚合酶。迄今为止，已知还没有聚合酶由能够这样做的L-氨基酸组成。因此，需要由D-氨基酸组成的聚合酶和类似的酶。由于基因技术不能提供这样的由D-氨基酸组成的功能活性聚合酶，故需要进行化学合成。然而，D-蛋白质或D-多肽的合成仅限于相对较小的分子。迄今合成的最大的D-蛋白质是由102个D-氨基酸组成的血管生成蛋白血管内皮生长因子（缩写VEGF-A）的D-蛋白质形式（Mandal等，2012），然而，聚合酶通常由超过300个氨基酸组成。

[0006] 因此,本发明潜在的问题是提供了一种允许添加至少一个核苷酸到诸如引物的L-核酸的方法。本发明的另一个潜在问题是提供了一种使用L-核苷酸扩增靶L-核酸的方法。本发明的另一个潜在问题是提供了允许实施这些方法的手段。

[0007] 所附的独立权利要求的主题解决了本发明的这些及其它潜在问题。可以根据所附的从属权利要求来进行优选实施方案。

[0008] 在第一方面,也是所述第一方面的第一实施方案中,通过一种用于添加一个或多个L-核苷酸到第一L-核酸的3'端的方法也解决了本申请潜在的问题,其中所述方法包括在包含酶活性展现部分的蛋白质存在下使所述一个或多个L-核苷酸与所述第一L-核酸反应的步骤,其中所述酶活性能够添加一个或多个L-核苷酸到所述第一L-核酸的3'端。

[0009] 在所述第一方面的第二实施方案,也是所述第一方面的第一实施方案的一个实施方案中,所述酶活性展现部分由氨基酸序列组成,其中所述氨基酸序列的氨基酸是D-氨基酸。

[0010] 在所述第一方面的第三实施方案,也是所述第一方面的第一和第二实施方案的一个实施方案中,所述酶活性展现部分是聚合酶活性展现部分。

[0011] 在所述第一方面的第四实施方案,也是所述第一方面的第一、第二和第三实施方案的一个实施方案中,所述酶活性是聚合酶活性。

[0012] 在所述第一方面的第五实施方案,也是所述第一方面的第四实施方案的一个实施方案中,所述聚合酶活性是热稳定的聚合酶活性。

[0013] 在所述第一方面的第六实施方案,也是所述第一方面的第三、第四和第五实施方案的一个实施方案中,所述聚合酶活性展现部分的氨基酸序列包含至少300个氨基酸。

[0014] 在所述第一方面的第七实施方案,也是所述第一方面的第六实施方案的一个实施方案中,所述聚合酶活性展现部分的氨基酸序列包含介于300和900个之间的氨基酸,优选介于300和600个之间的氨基酸,更优选介于300和360个之间的氨基酸,最优选340至360个氨基酸。

[0015] 在所述第一方面的第八实施方案,也是所述第一方面的第四、第五、第六和第七实施方案的一个实施方案中,所述聚合酶活性是DNA聚合酶活性。

[0016] 在所述第一方面的第九实施方案,也是所述第一方面的第八实施方案的一个实施方案中,所述DNA聚合酶活性是DNA依赖性DNA聚合酶活性。

[0017] 在所述第一方面的第十实施方案,也是所述第一方面的第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八和第九实施方案的一个实施方案中,所述酶活性展现部分是酶。

[0018] 在所述第一方面的第十一实施方案,也是所述第一方面的第三、第四、第五、第六、第七、第八和第九实施方案的一个实施方案中,所述聚合酶活性展现部分是聚合酶。

[0019] 在所述第一方面的第十二实施方案,也是所述第一方面的第一、第二、第三、第四、第八、第九、第十和第十一实施方案的一个实施方案中,所述聚合酶活性展现部分选自非洲猪瘟病毒聚合酶X、嗜热细菌聚合酶X核心域、大鼠聚合酶 $\beta$ 、真核生物聚合酶 $\beta$ 、克列诺片段(Klenow Fragment)、克列诺外切聚合酶、T4DNA聚合酶、Phi29DNA聚合酶、测序酶、T7DNA聚合酶、SP6聚合酶、DNA聚合酶I、聚合酶 $\lambda$ 及其中每一个和任一个的变体,

[0020] 其中所述聚合酶活性展现部分优选为非洲猪瘟病毒聚合酶X或其变体,其由选自以下的氨基酸序列的所选氨基酸序列组成:根据SEQ ID NO:1的氨基酸序列、根据SEQ ID

NO:2的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:3的氨基酸序列和根据SEQ ID NO:4的氨基酸序列。

[0021] 在所述第一方面的第十三实施方案,也是所述第一方面的第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十和第十一实施方案的一个实施方案中,所述聚合酶活性展现部分选自聚合酶DPO4、嗜热高温球菌DNA聚合酶、火球菌属某种DNA聚合酶、激烈火球菌DNA聚合酶、Pfurterbo聚合酶、硫磺矿硫化叶菌DNA聚合酶、嗜热古细菌(Thermococcus gorgonarius)DNA聚合酶、KOD聚合酶、Taq聚合酶、Tth聚合酶、Pyrobest聚合酶、Pwo聚合酶、Sac聚合酶、Bst聚合酶、Poc聚合酶、Pab聚合酶、Mth聚合酶、Pho聚合酶、ES4聚合酶、EX-Taq聚合酶、LA-Taq聚合酶、Expand聚合酶、Platinum Taq聚合酶、Hi-Fi聚合酶、Tbr聚合酶、Tfl聚合酶、Tru聚合酶、Tae聚合酶、Tne聚合酶、Tma聚合酶、Tih聚合酶、Tfi聚合酶、AmpliTaq、Stoffel片段、9°Nm DNA聚合酶、Therminator、Therminator II、Phusion High Fidelity聚合酶、Paq5000、Pfx-50、Proofstart、FideliTaq、Elongase及其变体,

[0022] 其中所述聚合酶活性展现部分优选为Dpo4聚合酶或其变体,其由选自以下的氨基酸序列的所选氨基酸序列组成:根据SEQ ID NO:15的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:16的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:17的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:18的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:19的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:20的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:21的氨基酸序列和根据SEQ ID NO:22的氨基酸序列。

[0023] 在所述第一方面的第十四实施方案,也是所述第一方面的第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二和第十三实施方案的一个实施方案中,所述反应步骤是在允许添加所述至少一个或多个L-核苷酸到所述第一L-核酸,优选允许添加5至20,000个L-核苷酸、优选10至2,000个L-核苷酸、更优选50至500个L-核苷酸、最优选50至100个L-核苷酸的条件下进行。

[0024] 在所述第一方面的第十五实施方案,也是所述第一方面的第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第十三和第十四实施方案的一个实施方案中,所述添加至少一个或多个L-核苷酸到所述第一L-核酸是所述至少一个或多个L-核苷酸共价结合到所述第一L-核酸,优选通过在所述第一L-核酸的3'OH与所述至少一个或多个L-核苷酸之一的5'磷酸之间形成3'-5'磷酸二酯键。

[0025] 在所述第一方面的第十六实施方案,也是所述第一方面的第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第十三、第十四和第十五实施方案的一个实施方案中,所述第一L-核酸是由DNA、RNA、经修饰的DNA、经修饰的RNA或其组合组成的引物。

[0026] 在所述第一方面的第十七实施方案,也是所述第一方面的第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第十三、第十四、第十五和第十六实施方案的一个实施方案中,所述第一L-核酸由L-核苷酸和任选的修饰组成。

[0027] 在所述第一方面的第十八实施方案,也是所述第一方面的第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第十三、第十四、第十五和第十六以及第十七实施方案的一个实施方案中,所述第一L-核酸由L-核苷酸组成。

[0028] 在所述第一方面的第十九实施方案,也是所述第一方面的第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第十三、第十四、第十五和第十六、第十七和第十八实施方案的一个实施方案中,所述反应还包括第二L-核酸,其中优选通过沃森-

克里克碱基配对使一分子的所述第一L-核酸与一分子的所述第二L-核酸杂交。

[0029] 在所述第一方面的第二十实施方案,也是所述第一方面的第十九实施方案的一个实施方案中,所述聚合酶活性展现部分合成与所述第二L-核酸互补的第三L-核酸,其中所述第三L-核酸包含所述第一L-核酸和添加到所述第一L-核酸的3'端的L-核苷酸。

[0030] 在第二方面,也是所述第二方面的第一实施方案中,通过一种用于在L-核苷酸和包含酶活性展现部分的蛋白质存在下扩增靶L-核酸的方法也解决了本申请潜在的问题,其中所述酶活性能够扩增所述靶L-核酸。

[0031] 在所述第二方面的第二实施方案,也是所述第二方面的第一实施方案的一个实施方案中,所述酶活性展现部分由氨基酸序列组成,其中所述氨基酸序列的氨基酸是D-氨基酸。

[0032] 在所述第二方面的第三实施方案,也是所述第二方面的第一和第二实施方案的一个实施方案中,所述酶活性展现部分是聚合酶活性展现部分。

[0033] 在所述第二方面的第四实施方案,也是所述第二方面的第一、第二和第三实施方案的一个实施方案中,所述酶活性是聚合酶活性。

[0034] 在所述第二方面的第五实施方案,也是所述第二方面的第四实施方案的一个实施方案中,所述聚合酶活性是热稳定的聚合酶活性。

[0035] 在所述第二方面的第六实施方案,也是所述第二方面的第三、第四和第五实施方案的一个实施方案中,所述聚合酶活性展现部分的氨基酸序列包含至少300个氨基酸。

[0036] 在所述第二方面的第七实施方案,也是所述第二方面的第六实施方案的一个实施方案中,所述聚合酶活性展现部分的氨基酸序列包含介于300和900个之间的氨基酸,优选介于300和600个之间的氨基酸,更优选介于300和360个之间的氨基酸,最优选介于340和360个之间的氨基酸。

[0037] 在所述第二方面的第八实施方案,也是所述第二方面的第四、第五和第六实施方案的一个实施方案中,所述聚合酶活性是DNA聚合酶活性。

[0038] 在所述第二方面的第九实施方案,也是所述第二方面的第八实施方案的一个实施方案中,所述DNA聚合酶活性是DNA依赖性DNA聚合酶活性。

[0039] 在所述第二方面的第十实施方案,也是所述第二方面的第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八和第九实施方案的一个实施方案中,所述酶活性展现部分是酶。

[0040] 在所述第二方面的第十一实施方案,也是所述第二方面的第三、第四、第五、第六、第七、第八和第九实施方案的一个实施方案中,所述聚合酶活性展现部分是聚合酶。

[0041] 在所述第二方面的第十二实施方案,也是所述第二方面的第一、第二、第三、第四、第八、第九、第十和第十一实施方案的一个实施方案中,所述聚合酶活性展现部分选自非洲猪瘟病毒聚合酶X、嗜热细菌聚合酶X核心域、大鼠聚合酶 $\beta$ 、真核生物聚合酶 $\beta$ 、克列诺片段、克列诺外切聚合酶、T4 DNA聚合酶、Phi29 DNA聚合酶、测序酶、T7 DNA聚合酶、SP6聚合酶、DNA聚合酶I、聚合酶 $\lambda$ 及其中每一个和任一个的变体,

[0042] 其中所述聚合酶活性展现部分优选为非洲猪瘟病毒聚合酶X或其变体,其由选自以下的氨基酸序列的所选氨基酸序列组成:根据SEQ ID NO:1的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:2的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:3的氨基酸序列和根据SEQ ID NO:4的氨基酸序列。

[0043] 在所述第二方面的第十三实施方案,也是所述第二方面的第一、第二、第三、第四、

第五、第六、第七、第八、第九、第十和第十一实施方案的一个实施方案中,所述聚合酶活性展现部分选自聚合酶DPO4、嗜热高温球菌DNA聚合酶、火球菌属某种DNA聚合酶、激烈火球菌DNA聚合酶、Pfururbo聚合酶、硫磺矿硫化叶菌DNA聚合酶、嗜热古细菌DNA聚合酶、KOD聚合酶、Taq聚合酶、Tth聚合酶、Pyrobest聚合酶、Pwo聚合酶、Sac聚合酶、Bst聚合酶、Poc聚合酶、Pab聚合酶、Mth聚合酶、Pho聚合酶、ES4聚合酶、EX-Taq聚合酶、LA-Taq聚合酶、Expand聚合酶、Platinum Taq聚合酶、Hi-Fi聚合酶、Tbr聚合酶、Tfl聚合酶、Tru聚合酶、Tac聚合酶、Tne聚合酶、Tma聚合酶、Tih聚合酶、Tfi聚合酶、AmpliTaq、Stoffel片段、9°Nm DNA聚合酶、Therminator、Therminator II、Phusion High Fidelity聚合酶、Paq5000、Pfx-50、Proofstart、FideliTaq、Elongase及其变体,

[0044] 其中所述聚合酶活性展现部分优选为Dpo4聚合酶或其变体,其由选自以下的氨基酸序列的所选氨基酸序列组成:根据SEQ ID NO:15的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:16的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:17的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:18的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:19的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:20的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:21的氨基酸序列和根据SEQ ID NO:22的氨基酸序列。

[0045] 在所述第二方面的第十四实施方案,也是所述第二方面的第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二和第十三实施方案的一个实施方案中,所述反应步骤是在允许扩增所述靶L-核酸的条件下进行。

[0046] 在所述第二方面的第十五实施方案,也是所述第二方面的第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第十三和第十四实施方案的一个实施方案中,所述方法使用至少一个引物,优选使用两个引物,其中所述至少一个引物由L-核苷酸和任选的修饰组成。

[0047] 在所述第二方面的第十六实施方案,也是所述第二方面的第十五实施方案的一个实施方案中,所述引物由L-核苷酸组成。

[0048] 在所述第二方面的第十七实施方案,也是所述第二方面的第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第十三、第十四、第十五和第十六实施方案的一个实施方案中,所述靶L-核酸由L-核苷酸组成。

[0049] 在所述第二方面的第十八实施方案,也是所述第二方面的第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第十三、第十四、第十五、第十六和第十七实施方案的一个实施方案中,所述方法是聚合酶链式反应。

[0050] 在所述第二方面的第十九实施方案,也是所述第二方面的第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第十三、第十四、第十五、第十六、第十七和第十八实施方案的一个实施方案中,所述靶L-核酸由L-DNA组成。

[0051] 在所述第二方面的第十实施方案,也是所述第二方面的第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第十三、第十四、第十五、第十六、第十七、第十八和第十九实施方案的一个实施方案中,所述靶L-核酸由20至20,000个L-核苷酸,优选30至2,000个L-核苷酸,更优选40至500个L-核苷酸,最优选50至100个L-核苷酸组成。

[0052] 在第三方面,也是所述第三方面的第一实施方案中,通过一种包含酶活性展现部分的蛋白质也解决了本申请潜在的问题,其中所述酶活性展现部分由氨基酸序列组成,其中所述氨基酸序列的氨基酸是D-氨基酸,其中所述酶活性能够添加一个或多个L-核苷酸到

所述第一L-核酸的3'端。

[0053] 在所述第三方面的第二实施方案,也是所述第三方面的第一实施方案的一个实施方案中,所述酶活性展现部分是聚合酶活性展现部分。

[0054] 在所述第三方面的第三实施方案,也是所述第三方面的第一实施方案的一个实施方案中,所述酶活性是聚合酶活性。

[0055] 在所述第三方面的第四实施方案,也是所述第三方面的第三实施方案的一个实施方案中,所述聚合酶活性是热稳定的聚合酶活性。

[0056] 在所述第三方面的第五实施方案,也是所述第三方面的第二、第三和第四实施方案的一个实施方案中,所述聚合酶活性展现部分的氨基酸序列包含至少300个氨基酸。

[0057] 在所述第三方面的第六实施方案,也是所述第三方面的第五实施方案的一个实施方案中,所述聚合酶活性展现部分的氨基酸序列包含介于300和900个之间的氨基酸,优选介于300和600个之间的氨基酸,更优选介于300和360个之间的氨基酸,最优选介于340和360个之间的氨基酸。

[0058] 在所述第三方面的第七实施方案,也是所述第三方面的第三、第四、第五和第六实施方案的一个实施方案中,所述聚合酶活性是DNA聚合酶活性。

[0059] 在所述第三方面的第八实施方案,也是所述第三方面的第七实施方案的一个实施方案中,所述DNA聚合酶活性是DNA依赖性DNA聚合酶活性。

[0060] 在所述第三方面的第九实施方案,也是所述第三方面的第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七和第八实施方案的一个实施方案中,所述酶活性展现部分是酶。

[0061] 在所述第三方面的第十实施方案,也是所述第三方面的第二、第三、第四、第五、第六、第七和第八实施方案的一个实施方案中,所述聚合酶活性展现部分是聚合酶。

[0062] 在所述第三方面的第十一实施方案,也是所述第三方面的第一、第二、第三、第七、第八、第九和第十实施方案的一个实施方案中,所述聚合酶活性展现部分选自非洲猪瘟病毒聚合酶X、嗜热细菌聚合酶X核心域、大鼠聚合酶β、真核生物聚合酶β、克列诺片段、克列诺外切聚合酶、T4 DNA聚合酶、Phi29 DNA聚合酶、测序酶、T7 DNA聚合酶、SP6聚合酶、DNA聚合酶I、聚合酶λ及其中每一个和任一个的变体,

[0063] 其中所述聚合酶活性展现部分优选为非洲猪瘟病毒聚合酶X或其变体,其由选自以下的氨基酸序列的所选氨基酸序列组成:根据SEQ ID NO:1的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:2的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:3的氨基酸序列和根据SEQ ID NO:4的氨基酸序列。

[0064] 在所述第三方面的第十二实施方案,也是所述第三方面的第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九和第十实施方案的一个实施方案中,所述聚合酶活性展现部分选自聚合酶DPO4、嗜热高温球菌DNA聚合酶、火球菌属某种DNA聚合酶、激烈火球菌DNA聚合酶、Pfururbo聚合酶、硫磺矿硫化叶菌DNA聚合酶、嗜热古细菌DNA聚合酶、KOD聚合酶、Taq聚合酶、Tth聚合酶、Pyrobest聚合酶、Pwo聚合酶、Sac聚合酶、Bst聚合酶、Poc聚合酶、Pab聚合酶、Mth聚合酶、Pho聚合酶、ES4聚合酶、EX-Taq聚合酶、LA-Taq聚合酶、Expand聚合酶、Platinum Taq聚合酶、Hi-Fi聚合酶、Tbr聚合酶、Tfl聚合酶、Tru聚合酶、Tac聚合酶、Tne聚合酶、Tma聚合酶、Tih聚合酶、Tfi聚合酶、AmpliTaq、Stoffel片段、9°Nm DNA聚合酶、Therminator、Therminator II、Phusion High Fidelity聚合酶、Paq5000、Pfx-50、Proofstart、FideliTaq、Elongase及其变体,

[0065] 其中所述聚合酶活性展现部分优选为Dpo4聚合酶或其变体,其由选自以下的氨基酸序列的所选氨基酸序列组成:根据SEQ ID NO:15的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:16的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:17的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:18的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:19的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:20的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:21的氨基酸序列和根据SEQ ID NO:22的氨基酸序列。

[0066] 在第四方面,也是所述第四方面的第一实施方案中,通过一种包含根据SEQ ID NO:15的氨基酸序列的聚合酶也解决了本申请潜在的问题,其中所述氨基酸序列的氨基酸是D-氨基酸。

[0067] 在第五方面,也是所述第五方面的第一实施方案中,通过一种包含根据SEQ ID NO:1的氨基酸序列的聚合酶也解决了本申请潜在的问题,其中所述氨基酸序列的氨基酸是D-氨基酸。

[0068] 在第六方面,也是所述第六方面的第一实施方案中,通过一种野生型聚合酶的聚合酶变体也解决了本申请潜在的问题,其中所述野生型聚合酶由根据SEQ ID NO:15的氨基酸序列组成,且其中所述聚合酶变体具有聚合酶活性,优选具有热稳定的聚合酶活性。

[0069] 在所述第六方面的第二实施方案,也是所述第六方面的第一实施方案的一个实施方案中,所述聚合酶变体包含氨基酸序列,其中所述聚合酶变体的氨基酸序列与所述野生型聚合酶的氨基酸序列在至少一个氨基酸位置上不同。

[0070] 在所述第六方面的第三实施方案,也是所述第六方面的第一和第二实施方案的一个实施方案中,所述聚合酶变体的氨基酸序列与所述野生型聚合酶的氨基酸序列在一个或两个氨基酸位置上不同。

[0071] 在所述第六方面的第四实施方案,也是所述第六方面的第一、第二和第三实施方案的一个实施方案中,所述聚合酶变体的氨基酸序列与所述野生型聚合酶的氨基酸序列在根据SEQ ID NO:15的氨基酸序列的氨基酸位置155和/或203上或在与其对应的氨基酸位置上不同,其中优选以半胱氨酸取代位置155和/或203上的氨基酸。

[0072] 在所述第六方面的第五实施方案,也是所述第六方面的第一、第二、第三和第四实施方案的一个实施方案中,所述聚合酶变体由选自以下的氨基酸序列组成:根据SEQ ID NO:16的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:17的氨基酸序列和根据SEQ ID NO:18的氨基酸序列。

[0073] 在所述第六方面的第六实施方案,也是所述第六方面的第一、第二和第三实施方案的一个实施方案中,所述聚合酶变体由选自以下的氨基酸序列组成:根据SEQ ID NO:19的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:20的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:21的氨基酸序列和根据SEQ ID NO:22的氨基酸序列。

[0074] 在所述第六方面的第七实施方案,也是所述第六方面的第一、第二、第三、第四、第五和第六实施方案的一个实施方案中,所述聚合酶变体的氨基酸序列的氨基酸是D-氨基酸。

[0075] 在所述第六方面的第八实施方案,也是所述第六方面的第一、第二、第三、第四、第五和第六实施方案的一个实施方案中,所述聚合酶变体的氨基酸序列的氨基酸是L-氨基酸。

[0076] 在第七方面,也是所述第七方面的第一实施方案中,通过一种野生型聚合酶的聚合酶变体也解决了本申请潜在的问题,其中所述野生型聚合酶由根据SEQ ID NO:1的氨基

酸序列组成,且其中所述聚合酶变体具有聚合酶活性。

[0077] 在所述第七方面的第二实施方案,也是所述第七方面的第一实施方案的一个实施方案中,所述聚合酶变体包含氨基酸序列,其中所述聚合酶变体的氨基酸序列与所述野生型聚合酶的氨基酸序列在至少一个氨基酸位置上不同。

[0078] 在所述第七方面的第三实施方案,也是所述第七方面的第一和第二实施方案的一个实施方案中,所述聚合酶变体的氨基酸序列与所述野生型聚合酶的氨基酸序列在一个氨基酸位置上不同。

[0079] 在所述第七方面的第四实施方案,也是所述第七方面的第一、第二和第三实施方案的一个实施方案中,所述聚合酶变体的氨基酸序列与所述野生型聚合酶的氨基酸序列在至少一个氨基酸位置上不同,其中所述至少一个氨基酸位置选自氨基酸位置80、氨基酸位置86和氨基酸位置124,各氨基酸序列根据SEQ ID NO:1或在与其对应的氨基酸位置上。

[0080] 在所述第七方面的第五实施方案,也是所述第七方面的第一、第二、第三和第四实施方案的一个实施方案中,所述聚合酶变体由选自以下的氨基酸序列组成:根据SEQ ID NO:2的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:3的氨基酸序列和根据SEQ ID NO:4的氨基酸序列。

[0081] 在所述第七方面的第六实施方案,也是所述第七方面的第一、第二、第三、第四和第五实施方案的一个实施方案中,所述聚合酶变体的氨基酸序列的氨基酸是D-氨基酸。

[0082] 在所述第七方面的第七实施方案,也是所述第七方面的第一、第二、第三、第四、第五和第六实施方案的一个实施方案中,所述聚合酶变体的氨基酸序列的氨基酸是L-氨基酸。

[0083] 在第八方面,也是所述第八方面的第一实施方案中,通过在用于添加一个或多个L-核苷酸到L-核酸的3'端的方法中使用包含酶活性展现部分的蛋白质也解决了本申请潜在的问题。

[0084] 在第九方面,也是所述第九方面的第一实施方案中,通过在用于在L-核苷酸存在下扩增靶L-核酸的方法中使用包含酶活性展现部分的蛋白质也解决了本申请潜在的问题。

[0085] 在所述第九方面的第二实施方案,也是所述第九方面的第一实施方案的一个实施方案中,所述用于扩增靶L-核酸的方法是聚合酶链式反应。

[0086] 在所述第八方面的第二实施方案,也是所述第八方面的第一实施方案的一个实施方案中和在所述第九方面的第三实施方案中,所述蛋白质是根据所述第三、第四、第五、第六和第七方面的任何实施方案的蛋白质,其中所述蛋白质由氨基酸序列组成,其中所述氨基酸序列的氨基酸是D-氨基酸。

[0087] 在第十方面,也是所述第十方面的第一实施方案中,通过一种用于鉴别结合靶分子的L-核酸分子的方法也解决了本申请潜在的问题,所述方法包括以下步骤:

[0088] (a) 产生L-核酸分子的异源群体;

[0089] (b) 使步骤(a)的L-核酸分子的异源群体与所述靶分子接触;

[0090] (c) 分离未被所述靶分子结合的L-核酸分子;和

[0091] (d) 扩增被所述靶分子结合的L-核酸分子,其中所述扩增步骤使用根据所述第三、第四、第五、第六和第七方面的任何实施方案的蛋白质,

[0092] 其中所述蛋白质由氨基酸序列组成,其中所述氨基酸序列的氨基酸是D-氨基酸。

[0093] 在所述第十方面的第二实施方案,也是所述第十方面的第一实施方案的一个实施

方案中,所述方法还包括以下步骤:

[0094] (e) 对被所述靶分子结合的L-核酸分子进行测序;和

[0095] (f) 合成核苷酸序列与步骤(e)中所测序的L-核酸分子的核苷酸序列一致的核酸分子。

[0096] 在所述第十方面的第三实施方案,也是所述第十方面的第一和第二实施方案的一个实施方案中,步骤(a)的L-核酸分子的异源群体的核酸分子在其5'端及其3'端上包含引物结合位点和分别与引物结合位点互补的序列,这允许通过聚合酶链式反应来扩增步骤(d)中所获得的L-核酸分子,其中所述聚合酶链式反应中所使用的聚合酶是根据所述第三、第四、第五、第六和第七方面的任何实施方案的蛋白质,所述聚合酶链式反应中所使用的引物由L-核苷酸组成,且所述聚合酶链式反应中所使用的核苷酸是L-核苷酸。

[0097] 在所述第十方面的第四实施方案,也是所述第十方面的第一、第二和第三实施方案的一个实施方案中,在步骤(d)之后引入以下步骤:

[0098] (da) 使扩增的核酸分子与所述靶分子接触,其中

[0099] 步骤(b)和任意的步骤(c)和/或(d)是在步骤(e)之前进行,其中步骤(da)、(b)、(c)和任意的(d)是按照这个顺序进行一次或若干次。

[0100] 在所述第十方面的第五实施方案,也是所述第十方面的第一、第二、第三和第四实施方案的一个实施方案中,所述结合靶分子的L-核酸是DNA。

[0101] 在所述第十方面的第六实施方案,也是所述第十方面的第一、第二、第三、第四和第五实施方案的一个实施方案中,所述结合靶分子的L-核酸分子由L-核苷酸组成。

[0102] 在第十一方面,也是所述第十一方面的第一实施方案中,通过一种用于产生根据所述第三、第四、第五、第六和第七方面的任何实施方案的蛋白质的方法也解决了本申请潜在的问题,其中

[0103] a) 化学合成根据所述第三、第四、第五、第六和第七方面的任何实施方案的蛋白质的两个或更多个片段,其中所述片段以其整体形式形成所述蛋白质的氨基酸序列,优选通过固相肽合成来合成所述片段,且

[0104] b) 通过链段缩合、天然化学连接、酶连接或其组合将步骤a)的片段彼此连接,

[0105] 其中所述蛋白质由氨基酸序列组成,其中所述氨基酸序列的氨基酸是D-氨基酸。

[0106] 在所述第十一方面的第二实施方案,也是所述第十一方面的第一实施方案的一个实施方案中,酶连接中所使用的所述酶是梭菌蛋白酶。

[0107] 在第十二方面,也是所述第十二方面的第一实施方案中,通过一种用于通过酶连接将第一D-肽或第一D-蛋白质与第二D-肽或第二D-蛋白质彼此连接的方法也解决了本申请潜在的问题,其中

[0108] 所述第一D-肽或所述第一D-蛋白质在其N末端由保护基保护,且在其C末端由4-胍基苯基酯基团保护,且

[0109] 所述第二D-肽或所述第二D-蛋白质包含游离N末端和处于其C末端的硫代烷基酯基团基团或硫代芳基酯基团。

[0110] 在所述第十二方面的第二实施方案,也是所述第十二方面的第一实施方案的一个实施方案中,所述酶连接中所使用的酶是梭菌蛋白酶。

[0111] 本申请的发明人惊讶地发现,有可能化学合成由D-氨基酸组成的具有功能活性的

蛋白质,由此所述蛋白质具有如聚合酶通常呈现的大小。更具体地说,本发明的发明人已经发觉了一种允许合成所述D-蛋白质和D-聚合酶(即,由D-氨基酸组成的聚合酶,其具有作为聚合酶活性)的方法。基于这个令人惊讶的发现,L-核酸和L-核酸分子的酶促合成所需的蛋白质和酶活性现在是可用的。L-核酸和L-核酸分子的所述酶促合成包括但不限于用于添加一个或多个L-核苷酸到第一L-核酸的3'端的方法和用于在L-核苷酸存在下扩增靶L-核酸作为L-核酸(即,扩增产物是L-核酸)的方法。

[0112] 由于这些方法和酶活性是用来鉴别镜像异构体的替代方法的一部分,故现在可以将所述鉴别镜像异构体的替代方法付诸实践。

[0113] 本发明的发明人已经开发出一种用于添加一个或多个L-核苷酸到第一L-核酸的3'端的方法,其中所述方法包括在包含酶活性展现部分的蛋白质存在下使所述一个或多个L-核苷酸与所述第一L-核酸反应的步骤,其中所述酶活性能够添加一个或多个L-核苷酸到所述第一L-核酸的3'端。

[0114] 在一个优选实施方案中,酶活性能够添加5至20,000个L-核苷酸到所述第一L-核酸的3'端,优选10至2,000个L-核苷酸,更优选50至500个L-核苷酸,最优选50至100个L-核苷酸。

[0115] 如本文中优选使用的术语添加是分子之间的共价键合,根据本发明为L-核酸的共价键合和所述至少一个或多个L-核苷酸与所述L-核酸的共价键合,优选通过在所述第一L-核酸的3'OH与所述至少一个或多个L-核苷酸之一的5'磷酸之间形成3'-5'磷酸二酯键。根据本发明,添加到L-核酸的L-核苷酸形成了被所述L-核苷酸延长的L-核酸的3'端。

[0116] 在一个优选实施方案中,所述用于添加一个或多个L-核苷酸到第一L-核酸的3'端的方法包括第二L-核酸,其中优选通过沃森-克里克碱基配对使一分子的第一L-核酸与一分子的第二L-核酸杂交。在一个更优选的实施方案中,所述方法允许合成与第二L-核酸互补的第三L-核酸,其中所述第三L-核酸包含所述第一L-核酸和添加到所述第一L-核酸的3'端的L-核苷酸,即,针对第一L-核酸,添加一个或多个L-核苷酸到第一L-核酸的3'端,从而产生所述第三L-核酸。

[0117] 根据本发明的包含酶活性展现部分的蛋白质包括仅具有酶活性展现部分的蛋白质和具有酶活性展现部分跟其它残基或部分的蛋白质,其中所述蛋白质的其它残基或部分不具有酶活性。根据本发明,所述酶活性展现部分的氨基酸序列包含介于300和900个之间的氨基酸,优选介于300和600个之间的氨基酸,更优选介于300和360个之间的氨基酸,最优选340至360个氨基酸。

[0118] 根据本发明的包含酶活性展现部分的蛋白质优选为聚合酶活性展现部分。根据本发明的包含聚合酶活性展现部分的蛋白质包括仅具有聚合酶活性展现部分的聚合酶和具有聚合酶活性展现部分跟其它残基或部分的聚合酶,其中所述聚合酶活性展现部分的其它残基或部分不具有聚合酶活性。根据本发明,所述聚合酶活性展现部分的氨基酸序列包含介于300和900个之间的氨基酸,优选介于300和600个之间的氨基酸,更优选介于300和360个之间的氨基酸,最优选340至360个氨基酸。

[0119] 根据本发明的聚合酶活性展现部分优选为热稳定的聚合酶活性展现部分,更优选为热稳定的DNA聚合酶活性展现部分,且最优选为热稳定的DNA依赖性DNA聚合酶活性展现部分。

[0120] 根据本发明的聚合酶活性展现部分优选为DNA聚合酶活性展现部分,更优选为DNA依赖性DNA聚合酶活性展现部分或热稳定的DNA聚合酶活性展现部分,最优选为热稳定的DNA依赖性DNA聚合酶活性展现部分。

[0121] 如本文中所使用的术语酶活性是催化特定反应,优选为添加一个或多个核苷酸到核酸的3'端、扩增核酸和/或聚合酶活性,更优选为添加一个或多个L-核苷酸到L-核酸的3'端和扩增L-核酸。

[0122] 根据本发明的术语聚合酶活性是酶使L-核苷酸聚合和/或L-核苷酸与L-核酸聚合的能力,其中L-核苷酸优选为L-核苷三磷酸。

[0123] 根据本发明的聚合酶活性优选为热稳定的聚合酶活性,更优选为热稳定的DNA聚合酶活性,且最优选为热稳定的DNA依赖性DNA聚合酶活性。

[0124] 根据本发明的聚合酶活性优选为DNA聚合酶活性,更优选为DNA依赖性DNA聚合酶活性或热稳定的DNA聚合酶活性,最优选为热稳定的DNA依赖性DNA聚合酶活性。

[0125] 已知的聚合酶来自于天然来源或者是来自于天然来源的聚合酶的经过优化或突变的变体。聚合酶由手性构筑块,即L-氨基酸组成。因此,聚合酶的结构也固有地是手性的,从而引起立体特异性底物识别。因此,这些酶仅接受呈胜任的,即对应的手性构型的底物分子。因此,已知的聚合酶使D-核苷酸或三磷酸D-核苷酸聚合,其中它们用作由D-核苷酸组成的模板链D-核酸以合成由D-核苷酸组成的互补D-核酸链。除模板链以外,聚合酶任选地使用与所述模板链杂交且由D-核苷酸组成的引物。因为天然存在的核酸是由D-核苷酸构成,且可以由确切地说由L-氨基酸组成的蛋白质和酶加以处理(例如扩增),故由L-氨基酸组成的所述蛋白质和酶对应地不识别L-核酸。因此,结合靶分子或靶结构(也称为镜像异构体)的L-核酸不能通过体外选择方法使用所述靶分子或靶结构的天然存在的形式直接获得。

[0126] 本发明的发明人惊讶地发现,有可能产生一种可以添加L-核酸核苷酸到能与L-核酸模板链杂交的由L-核苷酸组成的引物的聚合酶。此外,本发明的发明人惊讶地发现,有可能产生一种可用于扩增L-核酸,优选用于被称为聚合酶链式反应(缩写PCR)的方法中的聚合酶。

[0127] 聚合酶是一种能使核苷三磷酸聚合的酶。聚合酶使用模板核酸链来合成与所述模板核酸链互补的核酸链。除模板核酸链以外,聚合酶任选地使用基于碱基互补性与模板核酸链杂交的引物。模板核酸链、引物和由聚合酶合成的核酸链可以独立地为DNA或RNA。如本文中优选使用的聚合酶包括DNA聚合酶和RNA聚合酶,优选为DNA依赖性DNA聚合酶、RNA依赖性DNA聚合酶(诸如逆转录酶)、RNA依赖性RNA聚合酶和RNA依赖性DNA聚合酶。更优选地,聚合酶是热稳定的聚合酶。聚合酶不需要含有对应的天然或野生型酶中所发现的所有氨基酸,而是仅需要含有足以允许所述聚合酶实现所要的催化活性的氨基酸。在一个实施方案中,聚合酶活性是催化活性,所述催化活性选自包括例如5'-3'聚合活性、5'-3'核酸外切酶活性和3'-5'核酸外切酶活性的催化活性。

[0128] 根据本发明的聚合酶由D-氨基酸组成且能使L-核苷酸或L-核苷三磷酸聚合,其中根据本发明的聚合酶用作由L-核苷酸组成的模板链L-核酸以合成由L-核苷酸组成的互补L-核酸链。除模板链以外,根据本发明的聚合酶任选地使用能与所述模板链杂交且由L-核苷酸组成的引物。模板链、引物和所合成的核酸链可以独立地为L-DNA或L-RNA。根据本发明的聚合酶包括由D-氨基酸组成的DNA聚合酶和由D-氨基酸组成的RNA聚合酶,优选包括由D-

氨基酸组成的DNA依赖性DNA聚合酶、由D-氨基酸组成的RNA依赖性DNA聚合酶(诸如由D-氨基酸组成的逆转录酶)、由D-氨基酸组成的RNA依赖性RNA聚合酶和由D-氨基酸组成的RNA依赖性DNA聚合酶。更优选地,根据本发明的聚合酶是由D-氨基酸组成的热稳定的聚合酶。根据本发明的聚合酶不需要含有天然酶中所发现的所有氨基酸,而是仅需要含有足以允许根据本发明的聚合酶实现所要的催化活性的氨基酸。催化活性包括例如5'-3'聚合活性、5'-3'核酸外切酶活性和3'-5'核酸外切酶活性。

[0129] 仅由L-氨基酸组成的聚合酶在本文中优选地称为“全L聚合酶”。

[0130] 仅由D-氨基酸组成的聚合酶在本文中优选地称为“全D聚合酶”。

[0131] 在一个优选实施方案中,根据本发明的聚合酶选自非洲猪瘟病毒聚合酶X、嗜热细菌聚合酶X核心域、大鼠聚合酶 $\beta$ 、真核生物聚合酶 $\beta$ 、克列诺片段、克列诺外切聚合酶、T4 DNA聚合酶、Phi29 DNA聚合酶、测序酶、T7 DNA聚合酶、SP6聚合酶、DNA聚合酶I、聚合酶 $\lambda$ 、聚合酶DPO4、嗜热高温球菌DNA聚合酶、火球菌属某种DNA聚合酶、激烈火球菌DNA聚合酶、Pfururbo<sup>TM</sup>聚合酶、硫磺矿硫化叶菌DNA聚合酶、嗜热古细菌DNA聚合酶、KOD聚合酶、Taq聚合酶、Tth聚合酶、Pyrobest聚合酶、Pwo聚合酶、Sac聚合酶、Bst聚合酶、Poc聚合酶、Pab聚合酶、Mth聚合酶、Pho聚合酶、ES4聚合酶、EX-Taq<sup>TM</sup>聚合酶、LA-Taq<sup>TM</sup>聚合酶、Expand<sup>TM</sup>聚合酶、Platinum<sup>TM</sup> Taq聚合酶、Hi-Fi<sup>TM</sup>聚合酶、Tbr聚合酶、Tfl聚合酶、Tru聚合酶、Taq聚合酶、Tne聚合酶、Tma聚合酶、Tih聚合酶、Tfi聚合酶、AmpliTaq<sup>TM</sup>、Stoffel片段、9<sup>o</sup>Nm<sup>TM</sup> DNA聚合酶、Therminator<sup>TM</sup>、Therminator II<sup>TM</sup>、Phusion High Fidelity<sup>TM</sup>聚合酶、Paq5000<sup>TM</sup>、Pfx-50<sup>TM</sup>、Proofstart<sup>TM</sup>、FideliTaq<sup>TM</sup>、Elongase<sup>TM</sup>及其中每一个和任一个的变体。

[0132] 在一个更优选的实施方案中,根据本发明的聚合酶是由根据SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成的非洲猪瘟病毒聚合酶X。在另一个更优选的实施方案中,根据本发明的聚合酶是非洲猪瘟病毒聚合酶X的变体,最优选为具有选自以下的氨基酸序列的所选氨基酸序列的非洲猪瘟病毒聚合酶X的变体:根据SEQ ID NO:2的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:3的氨基酸序列和根据SEQ ID NO:4的氨基酸序列。

[0133] 在一个更优选的实施方案中,根据本发明的聚合酶是由根据SEQ ID NO:15的氨基酸序列组成的聚合酶Dpo4。在另一个更优选的实施方案中,根据本发明的聚合酶是聚合酶Dpo4的变体,最优选为由选自以下的氨基酸序列的所选氨基酸序列组成的聚合酶Dpo4的变体:根据SEQ ID NO:16的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:17的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:18的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:19的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:20的氨基酸序列、根据SEQ ID NO:21的氨基酸序列和根据SEQ ID NO:22的氨基酸序列。

[0134] 聚合酶的变体是在一个或多个氨基酸位置上与所述聚合酶的氨基酸序列不同的聚合酶。氨基酸序列中的氨基酸位置优选由其相对于聚合酶的N末端和C末端的位置和/或其相对于围绕所述氨基酸的氨基酸的位置确定,使得

[0135] a) 如果聚合酶在N末端被截短,则氨基酸的位置由其相对于聚合酶的C末端和相对于围绕所述氨基酸的氨基酸的位置确定,

[0136] b) 如果聚合酶在C末端被截短,则氨基酸的位置由其相对于聚合酶的N末端和相对于围绕所述氨基酸的氨基酸的位置确定,且

[0137] b) 如果聚合酶在N末端和C末端被截短,则氨基酸的位置由其相对于围绕所述氨基酸的氨基酸的位置确定。

[0138] 根据本发明的热稳定的聚合酶相对不受高温影响。在一个具体的非限制性实施例中,具有热稳定性的聚合酶不受至少50°C的温度,例如50°C、60°C、75°C、80°C、82°C、85°C、88°C、90°C、92°C、95°C或甚至更高的温度影响。

[0139] 在L-核苷三磷酸的聚合过程内,聚合酶添加一个核苷三磷酸到另一个核苷三磷酸,优选地产生寡核苷酸,也称为核酸。在一个优选的实施方案中,所述聚合酶仅添加一个核苷三磷酸到一个核苷三磷酸或到核酸的末端核苷酸,例如,如果核苷酸是诸如双脱氧核苷酸的链终止核苷酸的话。所述链终止核苷酸用于对核酸进行测序,并且是本领域技术人员已知的。

[0140] L-核苷三磷酸的聚合过程可用于扩增L-核酸,优选为靶L-核酸。

[0141] 扩增是增加核酸(优选为靶L-核酸)的拷贝数的任何过程。

[0142] 在一个优选实施方案中,所述靶L-核酸由20至20,000个L-核苷酸,优选30至2,000个L-核苷酸,更优选40至500个L-核苷酸,最优选50至100个L-核苷酸组成。

[0143] 扩增的一个例子是其中使核酸与一对引物在允许所述引物与核酸模板杂交的条件下接触。聚合酶通过在合适的条件下添加一个或多个核苷三磷酸到引物来延伸引物,引物与核酸模板分离,然后进行再退火、延伸和分离以扩增核酸分子的拷贝数。可以使用标准技术通过电泳、限制性内切酶裂解模式、寡核苷酸杂交或连接、和/或核酸测序来表征体外扩增的产物。

[0144] 替代的体外扩增技术是本领域技术人员已知的,包括无转录等温扩增、链置换扩增和NASBA™无RNA转录扩增。

[0145] 一些扩增方法依赖于热循环,其由用于使核酸(优选为双链核酸)解链和酶促复制核酸的反应的重复加热和冷却循环组成。这些热循环步骤首先对于在高温下在称为核酸解链的过程中物理分离双链核酸中的两条链是必需的。在较低温度下,各链则在核酸合成中被聚合酶用作模板以便选择性地扩增靶核酸。含有与靶区互补的序列的引物连同聚合酶(所述方法是据此命名)是使得能够进行选择性和重复扩增的关键组分。由于扩增方法基于热循环进展,故将所产生的核酸本身用作复制模板,从而开始链反应,其中指数扩增核酸模板。

[0146] 利用热扩增的最突出的扩增方法是聚合酶链式反应(缩写PCR)。

[0147] 引物是由DNA或RNA或其组合,优选长度为10个核苷酸或更多的DNA寡核苷酸组成的短核酸分子。更优选地,较长的引物的长度可以是约15、20或25个核苷酸或更多。引物可以通过核酸杂交与互补的靶核酸链退火,以便在引物与靶核酸链之间形成杂交物,然后由聚合酶沿靶核酸链延伸引物。引物对可以用于扩增核酸,例如通过PCR或本领域中已知的其它核酸扩增方法。

[0148] 使用由D-氨基酸组成的本发明的聚合酶使得引物和互补靶核酸链由L-核苷酸组成很有必要。优选至少一个引物由L-核苷酸和任选的修饰组成。

[0149] 用于制备和使用核酸引物和探针的方法描述于例如Sambrook等(Sambrook等,1989)中。PCR引物对可以来源于已知序列,例如通过使用意在用于该目的的计算程序,诸如Primer。本领域技术人员应了解,特定探针或引物的特异性随其长度而增加。

[0150] 根据本发明的聚合酶由D-氨基酸组成。因此由D-氨基酸组成的根据本发明的聚合酶无法从天然来源分离且无法使用细菌、酵母、真菌、病毒或动物细胞通过重组表达产生并

且不得不通过化学方法产生,所述化学方法优选诸如固相肽合成(缩写SPPS)与连接法的组合。

[0151] 固相肽合成是用于合成肽或蛋白质片段的现有技术:用可以在上面构筑肽链的功能单元(‘连接子’)处理不溶但多孔的小固体珠粒。肽将保持共价连接于珠粒,直到通过诸如无水氟化氢或三氟乙酸的试剂从它上面裂解。所述肽因而‘固定’在所述固相上且在过滤过程期间可以被保留,而液相试剂和合成副产物则被冲洗掉。SPPS的一般原理是重复偶合-洗涤-脱保护-洗涤循环的原理。固相连接肽的游离N末端胺偶合(见下文)于单个经N-保护的氨基酸单元。然后对这个单元进行脱保护,露出可能与另一氨基酸连接的新的N末端胺。这种技术的优越性部分在于能够在各反应之后进行洗涤循环,从而去除过量试剂,而所有正在生长的目的肽保持共价连接于不溶性树脂。有两种主要使用的SPPS形式,即Fmoc和Boc。氨基酸单体的N末端由这两个基团中的任一个加以保护且被添加到脱保护的氨基酸链上。SPPS受产率限制,且通常在70个氨基酸范围内的肽和蛋白质推进了合成可及性的极限。合成难度也具有序列依赖性。较大的合成寡肽和蛋白质可以通过使用诸如片段缩合、天然化学连接或酶促连接的连接法将两个肽偶合在一起来获取。然而,迄今合成的最大的D-蛋白质是由102个D-氨基酸组成的血管生成蛋白血管内皮生长因子(缩写VEGF-A)的D-蛋白质形式(Mandal等,2012),

[0152] 片段缩合使用肽,其中所述肽的氨基酸的侧链完全由化学基团保护且所述肽在溶液中偶合。

[0153] 天然化学连接是在水溶液中进行。挑战是必需的无保护肽-硫酯构筑块的制备。在天然化学连接中,无保护肽2的N末端半胱氨酸残基的炔硫基在水性缓冲液中在pH 7.0、20℃<T<37℃下攻击第二无保护肽1的C末端硫酯。这个可逆的转硫酯化步骤具有化学选择性和区域选择性,且导致形成硫酯中间物3。这种中间物通过分子内S,N-酰基位移进行重排,从而在连接位点上形成天然酰胺(‘肽’)键4。

[0154] 如实施例所示,发明人可能令人惊讶地示出了天然化学连接所必需的C末端硫酯在酶促连接的条件是稳定的,使得天然化学连接和酶促连接可以组合使用。

[0155] D-肽的酶促连接通过使用蛋白酶实现,包括以下步骤:(a)制备氨基组分,其中所述氨基组分是唯一的D-肽;(b)制备羧基组分,其中所述羧基组分包含离去基团并且是唯一的D-肽;和(c)在蛋白酶存在下使所述氨基组分与所述羧基组分反应,以便在所述氨基组分与所述羧基组分之间形成肽键,在离去基团裂解的情况下得到唯一的D-多肽(参见W02003047743)。优选所述蛋白酶为梭菌蛋白酶。

[0156] 本发明的聚合酶还应包括实质上与本发明的聚合酶且确切地说,与本文中所公开的特定序列同源的聚合酶。术语基本上同源的应理解为诸如同源性为至少75%,优选85%,更优选90%且最优选高于95%、96%、97%、98%或99%。

[0157] 本发明的聚合酶活性展现部分还应包括实质上与本发明的聚合酶活性展现部分且确切地说,与本文中所公开的特定序列同源的聚合酶活性展现部分。术语基本上同源的应理解为诸如同源性为至少75%,优选85%,更优选90%且最优选高于95%、96%、97%、98%或99%。

[0158] 本发明的聚合酶或本发明的聚合酶活性展现部分中所存在的同源氨基酸的实际百分比将取决于所述聚合酶或聚合酶活性展现部分中所存在的氨基酸的总数。修饰百分比

可以基于所述聚合酶或聚合酶活性展现部分中所存在的氨基酸的总数。

[0159] 两个聚合酶或两个聚合酶活性展现部分之间的同源性可以如本领域技术人员已知来确定。更具体地说,可以使用序列比较算法基于所指定的程序参数来计算测试序列相对于参考序列的序列同源性百分比。所述测试序列优选为聚合酶或聚合酶活性展现部分,据称其与不同的聚合酶或聚合酶活性展现部分同源或将测试其是否与不同的聚合酶或聚合酶活性展现部分同源和如果同源的话达到何种程度,由此所述不同的聚合酶或聚合酶活性展现部分也称为同源性参考序列。可以对用于比较的聚合酶的氨基酸序列进行最佳比对,例如通过Smith和Waterman的局部同源性算法(Smith & Waterman,1981)、通过Needleman和Wunsch的同源性比对算法(Needleman & Wunsch,1970)、通过Pearson和Lipman的相似性查找法(Pearson & Lipman,1988)、通过计算机实施这些算法(威斯康星遗传学软件包中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA,Genetics Computer Group,575 Science Dr.,Madison,Wis.)或通过目视检查。

[0160] 适合于测定序列同一性百分比的算法的一个例子是基本局部比对搜索工具(在下文中,“BLAST”)中所使用的算法,参见例如Altschul等(Altschul等,1990和Altschul等,1997)。用于执行BLAST分析的软件可以通过美国国家生物技术信息中心(在下文中,“NCBI”)公开获得。使用可获自NCBI的软件,例如BLASTN(用于核苷酸序列)和BLASTP(用于氨基酸序列)测定序列同一性时所使用的缺省参数描述于McGinnis等(McGinnis等,2004)中。

[0161] 本发明的聚合酶还应包括相对于本发明的聚合酶且确切地说,相对于本文中所公开的和由它们的氨基酸序列定义的本发明的特定聚合酶具有某种程度的同一性的聚合酶。更优选地,本发明还包括相对于本发明的聚合酶且确切地说,相对于本文中所公开的和由它们的氨基酸序列或其部分定义的本发明的特定聚合酶具有至少75%、优选85%、更优选90%且最优选超过95%、96%、97%、98%或99%的同一性的聚合酶。

[0162] 本发明的聚合酶活性展现部分还应包括相对于本发明的聚合酶活性展现部分且确切地说,相对于本文中所公开的和由它们的氨基酸序列定义的本发明的特定聚合酶活性展现部分具有某种程度的同一性的聚合酶活性展现部分。更优选地,本发明还包括相对于本发明的聚合酶活性展现部分且确切地说,相对于本文中所公开的和由它们的氨基酸序列或其部分定义的本发明的特定聚合酶活性展现部分具有至少75%、优选85%、更优选90%且最优选超过95%、96%、97%、98%或99%的同一性的那些聚合酶活性展现部分。

[0163] 结合本申请,如果不存在明确相反的指示,则术语核酸分子和核酸是以可互换的方式使用。

[0164] 如本文中优选使用,“核酸”是指多核苷酸或寡核苷酸,诸如脱氧核糖核酸(缩写DNA)和核糖核酸(缩写RNA)。此外,术语“核酸”包括多种核酸。术语“核酸(nucleic acid)和核酸(nucleic acids)”还应理解为包括由核苷酸类似物制备的RNA或DNA的变体和类似物、单链(有义或反义)和双链多核苷酸或寡核苷酸作为等效物。脱氧核糖核苷酸包括脱氧腺苷、脱氧胞苷、脱氧鸟苷和脱氧胸苷。核糖核苷酸包括腺苷、胞苷、鸟苷和尿苷。称为“多核苷酸”的核酸分子以其最广泛的义用于意指由共价键连接的两个或更多个核苷酸或核苷酸类似物,包括单链或双链分子。术语“寡核苷酸”在本文中还用于意指由共价键连接的两个或更多个核苷酸或核苷酸类似物,但是如本文中所定义,寡核苷酸包含少于一百个核苷酸。

[0165] 核酸的特征在于,形成核酸的所有连续核苷酸都是通过一个或多个于一个共价键彼此连接。更具体地说,所述核苷酸各自优选通过磷酸二酯键或其它键与两个其它核苷酸连接或连接至两个其它核苷酸,从而形成连续核苷酸的延伸段。然而,在所述排列中,两个末端核苷酸,即,优选在5'端和3'端的核苷酸,各自仅连接到单个核苷酸,条件是所述排列是线性的而不是环形的排列,且因而是线性的而不是环形的分子。

[0166] 在本申请的另一个实施方案中,所述核酸包含至少两组连续核苷酸,由此在连续核苷酸的各组内,各核苷酸优选通过磷酸二酯键或其它键与两个其它核苷酸连接或连接至两个其它核苷酸,从而形成连续核苷酸的延伸段。然而,在所述排列中,两个末端核苷酸,即,优选在5'端和3'端的核苷酸,各自仅连接到单个核苷酸。然而,在所述实施方案中,两组连续核苷酸不是通过共价键彼此连接或连接至彼此,所述共价键通过共价键,优选通过所述两个核苷酸之一的糖部分与所述两个核苷酸或核苷中另一者的磷部分之间形成的共价键来连接一组中的一个核苷酸与另一组或其它组中的一个核苷酸。然而,在替代实施方案中,两组连续核苷酸是通过共价键彼此连接或连接至彼此,所述共价键通过共价键,优选通过所述两个核苷酸之一的糖部分与所述两个核苷酸或核苷中另一者的磷部分之间形成的共价键来连接一组中的一个核苷酸与另一组或其它组中的一个核苷酸。优选地,所述至少两组连续核苷酸不通过任何共价键连接。在另一个优选实施方案中,所述至少两个组是通过不同于磷酸二酯键的共价键连接。

[0167] 术语核酸优选地还涵盖D-核酸或L-核酸。优选地,核酸是L-核酸。另外,可能的是核酸的一部分或若干部分作为D-核酸存在,且核酸的至少一部分或若干部分是L-核酸。术语核酸的“部分”应意指仅仅一个核苷酸。所述核酸在本文中一般对应地称为D-核酸和L-核酸。因此,在一个优选的实施方案中,根据本发明的核酸由L-核苷酸组成且包含至少一个D-核苷酸。优选地,所述D-核苷酸连接在任何延伸段和任何核酸的末端。

[0168] 如本文中所使用的L-核酸是由L-核苷酸组成,优选完全由L-核苷酸组成的核酸。

[0169] 如本文中所使用的D-核酸是由D-核苷酸组成,优选完全由D-核苷酸组成的核酸。

[0170] 此外,如果无相反指示,则本文中以5'→3'方向阐述任何核苷酸序列。

[0171] 不管核酸是由D-核苷酸、L-核苷酸或是两者的组合组成,其中所述组合是例如随机组合或限定顺序的由至少一个L-核苷酸和至少一个D-核苷酸组成的延伸段,所述核酸分子都可以由脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸或其组合组成。

[0172] 不考虑核酸是D-核酸、L-核酸、其混合物、DNA或RNA或其中每一者和任何组合,如本文中优选使用的术语核酸还将涵盖单链核酸和双链核酸,由此经历根据本发明的方法的核酸分子优选为单链核酸。

[0173] 如本文中优选使用的术语核酸还将涵盖经修饰的核酸。经修饰的核酸可以是核苷酸经修饰的RNA或核苷酸经修饰的DNA分子,由此所述RNA或DNA分子在个别核苷酸上经广泛修饰以便通过具有抗核酸酶基团的修饰增强稳定性,例如2'-氨基、2'-C-烯丙基、2'-氟基、2'-O-甲基、2'-H(关于综述,参见Usman & Cedergren,1992)。

[0174] 如本文中优选使用的术语核酸还将涵盖完全闭合的核酸。如果核苷酸序列根据本发明加以确定的核酸优选通过共价键闭合,则实现了核酸的完全闭合,即环形结构,由此更优选所述共价键在如本文中所公开的核酸分子序列的5'端与3'端之间制得。

[0175] 如优选使用的术语核酸还将涵盖包含非核酸分子部分的任何核酸分子。所述非核

酸分子部分可以选自如下文将更详细概述的包括肽、寡肽、多肽、蛋白质、碳水化合物、各种基团的基团。术语核酸因而还将涵盖包含至少一个核酸部分和至少一个可用于促进核酸分子递送到生物系统(诸如细胞)中的其它部分的缀合物和/或复合物。所提供的缀合物和复合物可以通过越过细胞膜转移治疗性化合物、改变药物动力学和/或调节本发明的核酸的定位来赋予治疗活性。这些种类的缀合物和复合物优选地适合于越过细胞膜递送的分子,包括但不限于小分子、脂质、磷脂、核苷、核苷酸、核酸、抗体、毒素、带负电的聚合物及其它聚合物,例如蛋白质、肽、激素、碳水化合物、聚乙二醇或聚胺。一般来说,所描述的转运蛋白被设计成能在存在或不存在可降解的连接子的情况下单独地或作为多组分系统的一部分加以使用。期望这些化合物能改善核酸分子在存在或不存在血清的情况下在来源于不同组织的许多细胞类型中的递送和/或定位(参见美国专利US 5,854,038)。本文中所描述的分子的缀合物可以经由可生物降解的连接子,诸如可生物降解的核酸连接子分子而连接到生物活性分子。

[0176] 如下文结合将测定序列的核酸所详述,非核酸部分可以是PEG部分,即聚(乙二醇)部分,或HES部分,即羟乙基淀粉部分。

[0177] 非核酸部分和优选地PEG和/或HES部分可以直接或通过连接子连接到核酸分子。核酸分子包含一个或多个修饰,优选地包含一个或多个PEG和/或HES部分也在本发明内。在一个实施方案中,个别连接子分子将多于一个PEG部分或HES部分连接到核酸分子。结合本发明使用的连接子本身可以是线性的或分支的。这些种类的连接子对于本领域技术人员是已知的且进一步描述于专利申请WO 2005/074993和WO 2003/035665中。

[0178] 在一个优选的实施方案中,所述连接子是可生物降解的连接子。由于修饰从核酸分子中释放,故可生物降解的连接子允许尤其在动物体(优选为人体)内停留时间方面对核酸分子的特征进行修饰。可生物降解的连接子的使用可以允许更好地控制核酸分子的停留时间。所述可生物降解的连接子的一个优选实施方案是可生物降解的连接子,诸如在但不局限于国际专利申请WO 2006/052790、WO 2008/034122、WO 2004/092191和WO 2005/099768中所描述的可生物降解的连接子,由此在国际专利申请WO 2004/092191和WO 2005/099768中,所述连接子是由一个或两个如本文中所描述的修饰、核酸分子和介于其之间的可生物降解的连接子组成的聚合寡核苷酸前药的一部分。

[0179] 如本文中优选使用,“核苷酸”包括但不限于天然存在的DNA核苷单磷酸盐、二磷酸盐和三磷酸盐:脱氧腺苷单磷酸盐、二磷酸盐和三磷酸盐;脱氧鸟苷单磷酸盐、二磷酸盐和三磷酸盐;脱氧胸苷单磷酸盐、二磷酸盐和三磷酸盐;和脱氧胞苷单磷酸盐、二磷酸盐和三磷酸盐。(在本文中对应地称为dA、dG、dT和dC或A、G、T和C)。术语核苷酸还包括天然存在的RNA核苷单磷酸盐、二磷酸盐和三磷酸盐:腺苷单磷酸盐、二磷酸盐和三磷酸盐;鸟嘌呤单磷酸盐、二磷酸盐和三磷酸盐;尿苷单磷酸盐、二磷酸盐和三磷酸盐;和胞苷单磷酸盐、二磷酸盐和三磷酸盐(在本文中对应地称为A、G、U和C)是指碱基-糖-磷酸盐组合,即,核酸分子(即,DNA分子和RNA分子)的单体单元。然而,换言之,术语“核苷酸”是指含有环状呋喃糖苷型糖(RNA中的 $\beta$ -D/L-核糖和DNA中的 $\beta$ -D/L-2'-脱氧核糖)的任何化合物,其在5'位置经磷酸化且具有经由-葡糖基C1'-N键连接在C-1'糖位置的嘌呤或嘧啶型碱基。核苷酸可以是天然的或合成的,包括经过修饰的核苷酸,尤其包括具有含经修饰碱基(例如5-甲基胞嘧啶)和经修饰糖基(例如2'-O-甲基核糖基、2'-O-甲氧基乙基核糖基、2'-氟基核糖基、2'-氨

基核糖基等等)的经修饰核苷的核苷酸。

[0180] 术语“核碱基”覆盖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,诸如黄嘌呤、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、N6,N6-桥亚乙基-2,6-二氨基嘌呤、5-甲基胞嘧啶、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、肌苷和美国专利US 5,432,272中、Freier和Altmann的出版物(Freier & Altmann,1997)中所描述的“非天然存在的”核碱基。术语“核碱基”因而不仅包括已知的嘌呤和嘧啶杂环,而且包括其杂环类似物和互变异构体。

[0181] 单链核酸可以形成独特而又稳定的三维结构且特异性地结合靶分子(如抗体)在本发明范围内。由D-核苷酸构成的所述核酸分子称为适体。可以针对若干个例如小分子、蛋白质、核酸的靶分子和甚至细胞、组织、和生物体鉴别适体,并且适体可以抑制特定靶分子的体外和/或体内功能。通常由称为体外选择的靶定向选择方法或指数富集的配体系统进化(缩写SELEX)来鉴别适体(Bock等,1992;Ellington & Szostak,1990;Tuerk & Gold,1990)。未经修饰的适体主要由于核酸酶降解而快速从血流中清除,半衰期为数分钟到数小时,且通过肾从体内清除,因为适体的分子量固有地较低。因此,为了在治疗上使用适体,它们必须在糖(例如核糖)骨架的2'位置上经修饰(Burmeister等,2006)。

[0182] 无所不在的核酸酶说明了适体的不稳定性,其由手性构筑块,即L-氨基酸组成。因此,核酸酶的结构也固有地是手性的,从而引起立体特异性底物识别。因此,这些酶仅接受呈胜任的手性构型的底物分子。因为适体和天然存在的核酸分子由D-核苷酸构成,故L-寡核苷酸将逃脱酶识别和随后的降解。不幸的是,由于相同的原理,在这种情况下,自然界未产生能扩增所述镜像核酸的酶活性。因此,L-核酸适体不能采用SELEX方法直接获得。但是,立体化学原理揭示了最终产生所要的功能L-核酸适体的迂回途径。

[0183] 如果体外选择的(D-)适体结合其天然靶,则这个适体的结构镜像以相同特征结合所述天然靶的镜像。这里,两种相互作用配偶体具有相同的(非天然的)手性。由于生命化学物和大部分生物化学化合物的同手性,所述对映RNA配体当然将具有受限制的实际用途。另一方面,如果针对(非天然的)镜像靶进行SELEX方法,则将获得识别这个(非天然的)靶的适体。所述适体,即所要的L-适体的相应镜像构型又识别天然靶。这种用于产生生物稳定的核酸分子的镜像选择方法在1996年首先公开(Klussmann等,1996;Nolte等,1996),且产生了不仅对给定的靶分子呈现出高亲和力和特异性,而且同时还呈现出生物学稳定性的功能镜像核酸分子配体。在本发明内,单链核酸分子是这样的配体结合L-核酸,其称为‘镜像异构体’(来自于德语词语‘Spiegel’,镜像)(参见‘The Aptamer Handbook’;Klussmann编,2006)

[0184] 其中,根据本发明的核酸可以包含修饰,所述修饰优选地允许检测根据本发明的核酸。所述修饰优选地选自放射性标记、酶标记和荧光标记。所述修饰还选自本身可能被选自放射性标记、酶标记和荧光标记的修饰修饰过的D-核苷酸。

[0185] 各种SEQ. ID.No.、本文中所使用的核酸、肽、寡肽和蛋白质的化学性质、其实际序列和内部参考物编号汇总于下表中。

[0186]

表1 (A) 本申请中提到的序列

SEQ ID NO:	类型	序列	内部参考物
1	蛋白质	MLTLIQGKKIVNHLRSRLAFEYNGQLIKILSKNIVAVGSLRREKMLNDVDLLIIVPEKK LLKHVLPNIRIKGLSFSVKVCGERKCVLFIEWEKTYQLDLFTALAEKPYAIFHFTGPV SYLIRIRAAALKKKNYKLNQYGLFKNQTLVPLKITTEKELIKELGFTYRIPKKRL	Pol-X, 聚合酶X
2	蛋白质	MLTLIQGKKIVNHLRSRLAFEYNGQLIKILSKNIVAVGSLRREKMLNDVDLLIIVPEKK LLKHVLPNIRIKGLSFSVKVCGERKCVLFIEWEKTYQLDLFTALAEKPYAIFHFTGPV SYLIRIRAAALKKKNYKLNQYGLFKNQTLVPLKITTEKELIKELGFTYRIPKKRL	Pol-X V80G, 聚合酶X 变体 V80G
3	蛋白质	MLTLIQGKKIVNHLRSRLAFEYNGQLIKILSKNIVAVGSLRREKMLNDVDLLIIVPEKK LLKHVLPNIRIKGLSFSVKVCGERKCVLFIEWEKTYQLDLFTALAEKPYAIFHFTGPV SYLIRIRAAALKKKNYKLNQYGLFKNQTLVPLKITTEKELIKELGFTYRIPKKRL	Pol-X V80A, 聚合酶X 变体 V80A
4	蛋白质	MLTLIQGKKIVNHLRSRLAFEYNGQLIKILSKNIVAVGSLRREKMLNDVDLLIIVPEKK LLKHVLPNIRIKGLSFSVKVCGERKCVLFIEWEKTYQLDLFTALAEKPYAIFHFTGPV SYLIRIRAAALKKKNYKLNQYGLFKNQTLVPLKITTEKELIKELGFTYRIPKKRL	Pol-X I124G, 聚合酶X 变体 I124G
5	蛋白质	MLTLIQGKKIVNHLRSRLAFEYNGQLIKILSKNIVAVGSLRREKMLNDVDLLIIVPEKK LLKHVLPNIRIKGLSFSVKVCGERKCVLFIEWEKTYQLDLFTALAEKPYAIFHFTGPV SYLIRIRAAALKKKNYKLNQYGLFKNQTLVPLKITTEKELIKELGFTYRIPKKRL	Pol-X C86S, 聚合酶X 变体 C86S
6	D/L-DNA	D(GG)-L(GATCACAGTGAGTAC)	MJ 1 58 MD
7	L-DNA	磷酸-GTAAAACGACGGCCAGT	MJ 1 143 LD
8	L-DNA	ACTGGCCGTCGTTTACAGTACTCACTGTGATC	MJ 1 145 LD
9	L-DNA	ACTGGCCGTCGTTTACCGTACTCACTGTGATC	MJ 1 146 LD
10	L-DNA	ACTGGCCGTCGTTTACGGTACTCACTGTGATC	MJ 1 147 LD
11	L-DNA	ACTGGCCGTCGTTTACGTACTCACTGTGATC	MJ 1 144 LD
12	D/L-DNA	D(GG)-L(GATCACAGTGAGTAC)	MJ 1 58 MD

[0187]

SEQ ID NO:	类型	序列	内部参考物
13	L-DNA	磷酸 -ACGACGGCCAGT	MJ 1 59 LD
14	L-DNA	ACTGGCCGTCGTTCTATTGTACTACTGTGATC	MJ 1 57 LD
15	蛋白质	MIVLFVDFDYFYAQVEEVLPNPSLKGKPVVVCVFSGRFEDSGAVATANYEARKFGVKA GIPIVEAKKILPNAVYLP <sup>MR</sup> KEVYQQVSSRIMNLLREYSEKIEIASIDEAYLDISDKVRD YREAYNLGLEIKNKILEKEKITVTVGISKNKVFAKIAADMAKPNGIKVIDDEEVKRLIRE LDIADVPGIGNITAEKLLKLGINKLVDTL <sup>SIE</sup> FDKLGKMGIEAKAKYLISLARDEYNEPI RTRVRKSGRIVTMKRNSRNLEEKPYLFR <sup>AI</sup> EESYYKLDK <sup>RIP</sup> KAIHVVA <sup>VTE</sup> DLDIVS RGRTPHGISKETA <sup>YSE</sup> SVKLLQKILEEDERKIR <sup>RIG</sup> VRFSK <sup>FIE</sup> AIGLDKFFDT	Dpo4, 聚合酶 Dpo4
16	蛋白质	MIVLFVDFDYFYAQVEEVLPNPSLKGKPVVVCVFSGRFEDSGAVATANYEARKFGVKA GIPIVEAKKILPNAVYLP <sup>MR</sup> KEVYQQVSSRIMNLLREYSEKIEIASIDEAYLDISDKVRD YREAYNLGLEIKNKILEKEKITVTVGISKNKVFAKIAADMAKPNGIKVIDDEEVKRLIRE LDIADVPGIGNITAEKLLKLGINKLVDTL <sup>SIE</sup> FDKLGKMGIEAKAKYLISLARDEYNEPI RTRVRKSGRIVTMKRNSRNLEEKPYLFR <sup>AI</sup> EESYYKLDK <sup>RIP</sup> KAIHVVA <sup>VTE</sup> DLDIVS RGRTPHGISKETA <sup>YSE</sup> SVKLLQKILEEDERKIR <sup>RIG</sup> VRFSK <sup>FIE</sup> AIGLDKFFDT	Dpo44 A155C, 聚合酶 Dpo4 变体 A155C
17	蛋白质	MIVLFVDFDYFYAQVEEVLPNPSLKGKPVVVCVFSGRFEDSGAVATANYEARKFGVKA GIPIVEAKKILPNAVYLP <sup>MR</sup> KEVYQQVSSRIMNLLREYSEKIEIASIDEAYLDISDKVRD YREAYNLGLEIKNKILEKEKITVTVGISKNKVFAKIAADMAKPNGIKVIDDEEVKRLIRE LDIADVPGIGNITAEKLLKLGINKL <sup>CD</sup> TL <sup>SIE</sup> FDKLGKMGIEAKAKYLISLARDEYNEPI RTRVRKSGRIVTMKRNSRNLEEKPYLFR <sup>AI</sup> EESYYKLDK <sup>RIP</sup> KAIHVVA <sup>VTE</sup> DLDIVS RGRTPHGISKETA <sup>YSE</sup> SVKLLQKILEEDERKIR <sup>RIG</sup> VRFSK <sup>FIE</sup> AIGLDKFFDT	Dpo4 V203C, 聚合酶 Dpo4 变体 V203C,
18	蛋白质	MIVLFVDFDYFYAQVEEVLPNPSLKGKPVVVCVFSGRFEDSGAVATANYEARKFGVKA GIPIVEAKKILPNAVYLP <sup>MR</sup> KEVYQQVSSRIMNLLREYSEKIEIASIDEAYLDISDKVRD YREAYNLGLEIKNKILEKEKITVTVGISKNKVFAKIAADMAKPNGIKVIDDEEVKRLIRE LDIADVPGIGNITAEKLLKLGINKL <sup>CD</sup> TL <sup>SIE</sup> FDKLGKMGIEAKAKYLISLARDEYNEPI	Dpo4 A155C/V203C, 聚合酶 Dpo4 变体 A155C/V203C,

[0188]

SEQ ID NO:	类型	序列	内部参考物
19	蛋白质	RTRVRKSGRIVTMKRNSRNLEEKPYLFR <sup>1</sup> AIEESYYKLDKRIPKAIHVVAVTE <sup>2</sup> DLDIVS RGRTPHGISKETA YSESVKLLQKILEEDERKIR <sup>3</sup> RIGVRF <sup>4</sup> SKFIEAIGLDKFFDT MIVLFVDFDYFYAQVEEVLPNPSLKGKPVV <sup>5</sup> V <sup>6</sup> SFSGRFEDSGAVATAN <sup>7</sup> YEARKFGVKA GIPIVEAKKILPNAVYLP <sup>8</sup> MRKEVYQQVSSRIMNLLREYSEKIEIASIDEAYL <sup>9</sup> DISDKVRD YREAYNLGLEIKNKILEKEKITVTVGISKNKVF <sup>10</sup> AKIAADMAKPN <sup>11</sup> GIKVIDDEEVKRLIRE LDIADVPGIGNITAEK <sup>12</sup> KLGIN <sup>13</sup> KLVD <sup>14</sup> TL <sup>15</sup> SIEFDK <sup>16</sup> LKGMIGEAKAKYL <sup>17</sup> ISLARDEYNEPI RTRVRKSGRIVTMKRNSRNLEEKPYLFR <sup>18</sup> AIEESYYKLDKRIPKAIHVVAVTE <sup>19</sup> DLDIVS RGRTPHGISKETA YSESVKLLQKILEEDERKIR <sup>20</sup> RIGVRF <sup>21</sup> SKFIEAIGLDKFFDT	Dpo4 C31S, 聚合酶Dpo4 变体 C31S,
20	蛋白质	MIVLFVDFDYFYAQVEEVLPNPSLKGKPVV <sup>1</sup> CVFSGRFEDSGAVATAN <sup>2</sup> YEARKFGVKA GIPIVEAKKILPNAVYLP <sup>3</sup> MRKEVYQQV <sup>4</sup> SRIMNLLREYSEKIEIASIDEAYL <sup>5</sup> DISDKVRD YREAYNLGLEIKNKILEKEKITVTVGISKNKVF <sup>6</sup> AKIAADMAKPN <sup>7</sup> GIKVIDDEEVKRLIRE LDIADVPGIGNITAEK <sup>8</sup> KLGIN <sup>9</sup> KLVD <sup>10</sup> TL <sup>11</sup> SIEFDK <sup>12</sup> LKGMIGEAKAKYL <sup>13</sup> ISLARDEYNEPI RTRVRKSGRIVTMKRNSRNLEEKPYLFR <sup>14</sup> AIEESYYKLDKRIPKAIHVVAVTE <sup>15</sup> DLDIVS RGRTPHGISKETA YSESVKLLQKILEEDERKIR <sup>16</sup> RIGVRF <sup>17</sup> SKFIEAIGLDKFFDT	Dpo4 S85C, 聚合酶Dpo4 变体 S85C
21	蛋白质	MIVLFVDFDYFYAQVEEVLPNPSLKGKPVV <sup>1</sup> V <sup>2</sup> CVFSGRFEDSGAVATAN <sup>3</sup> YEARKFGVKA GIPIVEAKKILPNAVYLP <sup>4</sup> MRKEVYQQV <sup>5</sup> CRIMNLLREYSEKIEIASIDEAYL <sup>6</sup> DISDKVRD YREAYNLGLEIKNKILEKEKITVTVGISKNKVF <sup>7</sup> AKIAADMAKPN <sup>8</sup> GIKVIDDEEVKRLIRE LDIADVPGIGNITAEK <sup>9</sup> KLGIN <sup>10</sup> KLVD <sup>11</sup> TL <sup>12</sup> SIEFDK <sup>13</sup> LKGMIGEAKAKYL <sup>14</sup> ISLARDEYNEPI RTRVRKSGRIVTMKRNSRNLEEKPYLFR <sup>15</sup> AIEESYYKLDKRIPKAIHVVAVTE <sup>16</sup> DLDIVS RGRTPHGISKETA YSESVKLLQKILEEDERKIR <sup>17</sup> RIGVRF <sup>18</sup> SKFIEAIGLDKFFDT	Dpo4 S86C, 聚合酶Dpo4 变体 S86C
22	蛋白质	MIVLFVDFDYFYAQVEEVLPNPSLKGKPVV <sup>1</sup> CVFSGRFEDSGAVATAN <sup>2</sup> YEARKFGVKA GIPIVEAKKILPNAVYLP <sup>3</sup> MRKEVYQQVSSRIMNLLREY <sup>4</sup> CEKIEIASIDEAYL <sup>5</sup> DISDKVRD YREAYNLGLEIKNKILEKEKITVTVGISKNKVF <sup>6</sup> AKIAADMAKPN <sup>7</sup> GIKVIDDEEVKRLIRE LDIADVPGIGNITAEK <sup>8</sup> KLGIN <sup>9</sup> KLVD <sup>10</sup> TL <sup>11</sup> SIEFDK <sup>12</sup> LKGMIGEAKAKYL <sup>13</sup> ISLARDEYNEPI	Dpo4 S96C, 聚合酶Dpo4 变体 S96C,

[0189]

SEQ ID NO:	类型	序列	内部参考物
23	L-DNA	RTRVRKSGRIVTMKRNSRNLEIEIKPYLFRAlEESYYKLDKRIPIKAIHVVAVTEDDLIVS RGRTPHGISKETAYSESVKLLQKILEEDERKIRIRIGVRFSEKFIIEAIGLDKFFDT GTGGAACCGACAACTTGTGCTGCTCCAGCATAAGAAAGGAGCTCCCTCAGAAGA AGCTGCGCAGCGTGCCAGTCTGAGCTCC	MJ_1_105_LD
24	L-DNA	TCTAATACGACTCACTATAGGAGCTCAGACTGGCACGC	MJ oligo 187 LD
25	L-DNA	GTGGAACCGACAACTTGTGC	MJ oligo 189 LD
26	D-DNA	ATGCTGACCCCTGATTCAGGGCAAAAATCGTGAACCATCTGCGTAGCCGCTCTGG CCTTTGAATATAACGGCCAGCTGATTAATAATCTGAGCAAAAACATTTGTGGCGGT GGCAGCCCTGCGTGTGAAGAAAATGCTGAACGATGGATCTGCTGATTATT GTGCCGGA AAAA AACTGCTGAAACATGTGTGCCGAAACATTCGTATTAAGGCC TGAGCTTTAGCGTGAAGTGTGCGGCAACGTAATGCGTGTGTTTATCGAATG GGAAAAAAAACCTACCAGCTGGACCTGTTTACCGCGCTGGCCGAAGAAAACC GTATGCCGATCTTTCAATTTACCGGTCCGGTGAGCTATCTGATTCGTATTCGTGCGG CGCTGAAAAAAA AACTACA AACTGAACTGAACTGTTTAA AACCAGAC CCTGGTGCCGCTGAAAAATTACCACCGAAAAAGAACTGATTAAGAACTGGGCTTT ACCTATCGCATTCCGAAAAAACGCCCTGTAATAA	经大肠杆菌 密码子优化的 ASFV Pol-X ORF
27	蛋白质	MGRSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDRWGSMLTLIQKKIVNHLRSL AFEYNGQLIKILSKNIVAVGSLRREKMLNDVDLLIVPEKLLKHVLPNIRIKGLSFSV KVCGERKCVLFIEWEKTYQLDLFTALAEKPYAIFHFTGPVSYLIRIRAALKKKNYKL NQYGLFKNQILVPLKITTEKELIKELGFTYRIPKKRL	如 pMJ14 中所编码的 经 His 标记的 Pol-X 蛋白质序列
28	D-DNA	TCCGGTGAGCTATCTGGGTCGTATTCGTGGCGG	QC10_上
29	D-DNA	CGCCGCACGAATACGACCCAGATAGCTCACCGGA	QC10_下
30	D-DNA	TGAGCTTTAGCGTGAAGGGTGCAGCGAACC	QC26_上
31	D-DNA	CGTTCCGCGCACCCCTTTCACGCTAAAGCTCA	QC26_下

[0190]

SEQ ID NO:	类型	序列	内部参考物
32	D-DNA	TGAGCTTTAGCGTGAAAGCGTGGCGGAACG	QC27_上
33	D-DNA	CGTTCGCCGCACGCTTTCACGCTAAAGCTCA	QC27_下
34	D-DNA	TGAAAGTGTGGCGGAACGTAAAGCGTGCTGTTTA	QC31_上
35	D-DNA	TAAACAGCACGCTTTTACGTTTCGCCGCACACTTTCA	QC31_下
36	D-DNA	GATCACAGTGAGTAC	SP-1
37	D-DNA	磷酸-GTAAACGACGGCCAGT	D(g1)P
38	D-DNA	ACTGGCCGTCGTTTTTACAGTACTCACTGTGATC	MJ 1 140 DD
39	D-DNA	ACTGGCCGTCGTTTTTACCGTACTCACTGTGATC	MJ 1 141 DD
40	D-DNA	ACTGGCCGTCGTTTTTACGGTACTCACTGTGATC	MJ 1 142 DD
41	D-DNA	ACTGGCCGTCGTTTTTACGTACTCACTGTGATC	SP1c+18(g1)
42	D-DNA	磷酸-ACGACGGCCAGT	D(g6)P
43	蛋白质	AcMLTLIQGKKIVNHLRSRLAFEYNGQLIKILSKNIVAVGSL-OGp	实施例3产物(1)
44	蛋白质	H-RREEKLNLDVDLLIIVPEKKL LKHVLPNIRIKGLSFSVKA-SMe	实施例3产物(2)
45	蛋白质	H-CGERKCVLFIWEKTTYQLDLFTALAEKPYAIFHFTGPVSYLIRIRAALKKKNYKL NQYGLFKNQTLVPLKITTEKELI KELGFTYRIPKKRL-OH	实施例3产物(3)
46	蛋白质	Ac-MLTLIQGKKIVNHLRSRLAFEYNGQLIKILSKNIVAVGSLRREEKMLNDVDLLIIVPE KLLKHLVLPNIRIKGLSFSVKA-SMe	实施例4产物(4)
47	D-DNA	Atto532-GGAGCTCAGACTGGCACGC	MJ 1 33 DD
48	D-DNA	GTGGAACCGACAACCTTGTGCTGCCAGCATAAGAAGGAGCTCCCTCAGAAGA AGCTGCCGACGCTGCCAGCTGAGCTCC	MJ 1_1 DD
49	D/L-DNA	D(GG)-L(GGAGCTCAGACTGGCACGC)	MJ 1 109 MD
50	D-DNA	ATGATTGTGCTGTTTTGTGGATTTTGAATATTTTTATGCCCAGGTGGAAGAAGTTCT GAATCCGAGCCTGAAAGGTAACCCGGTTGTTGTTGTTGTTTATAGCGGTCGCTTIG	经大肠杆菌密码子优化的Sso Dpo4 ORF

[0191]

SEQ ID NO:	类型	序列	内部参考物
51	蛋白质	AAGATAGCGGTGCAGTTGCAACCGCCAAATTATGAAGCCCGTAAATTTGGTGTAA AGCCGGTATTCGGATTGTTGAAGCCAAAATAATCTGCCGATGCAGTTTATCTGC CGATGCGCAAGAAGTTTATCAGCAGGTTAGCAGCCGTAATTATGAACTCTGCTGCG CGAATATAGCGAAAATAATTGAAATTTGCCAGCATTTGATGAAGCCCTATCTGGATATT AGCGATAAAGTGCAGATTATCGCGAAGCATATAAATCTGGGCCCTGGAAAATTA ATAAAATCTGGAAAAGAATAATACCGTGACCGTGGCATTAGCAAAAATA AAGTGTTCGCAAAAATTGCAGCAGATATGGCAAAACCGAATGGCATTAAAAGTGAT TGATGATGAAGAAGTGAACCGTCTGATTCGCGAACCTGGATATTGCAGATGTTCCG GGTATTGGCAATATACCGCAGAAAACCTGAAAACCTGGGCATTATAAACTGG TTGATACCCCTGAGCATTGAAATTTGATAAACTGAAAGGCATGATTGGTGAAGCGAA AGCCAAAATATCTGATTAGCCTGGCAGCTGATGAATATAATGAACCGATTTCGTACC CGTGTTCGTAAGAAGCATTGGTCGTATTGTGACCATGAACCGCAATAGCCGTAATCT GGAAAGAAATTAACCCGTACCTGTTTCGTGCAATTGAAGAAGCTATTATAAACTG GATAACGCATTCGAAAGCCATTATGTTGTCAGTACCAGAAAGATCTGGATAT TGTTAGCCGTGGTCGTACCTTTCGCGCATGTTAGCAAAAGAAACCCGCTATAGCG AAAGCGTTAAACTGCTGCAGAAAATCCTGGAAGAAGATGAACGTAATAAATTCGTCG TATTGGTGTGCGCTTTAGCAAAATTTATTGAAGCCATTGGCCTGGATAAAATTTTGG ATACC	如pMJ343中所编码的 经Strep标记的Dpo4 蛋白质序列
		MASAWSHPQFEKSGMIVLFDYFYAQVEEVNPSLKGKPVVVCVFSGRFEDSGAV ATANYEARKFVKGAPIVEAKKILPNAVYLPMRKEVYQQVSSRIMNLLREYSEKIEIA SIDEAYLDISDKVRDYREAYNLGLEIKNKILEKEKITVTVGISKNKVFAKIAADMAKPN GIKVIDDEEVKRLIRELDIADVPGIGNITAEKLLKLGINKLVDLTSIEFDKLLKGMIGEAKA KYLISLARDEYNEPIRTRVRKRSIGRIVTMKRNSRNLEEKPYLFRAlEESYYKLDKRIPKA IHVVAVTEDLDIVSRGRTFPHGISKETAYSESVKLLQKILEEDERKIRRGVRFKFIKIEAIG	

[0192]

SEQ ID NO:	类型	序列	内部参考物
		LDKFFDTGS	
52	D-DNA	CAAAAATAAAGTGTGGCCAAAATTGCATGCGATATGGCAAAACCG AATGGCATTAAAG	QC_28_上
53	D-DNA	CTTTAAATGCCATTTCGGTTTGGCCATATCGCATGCAATTTTGGCAAA CACTTTAATTTTG	QC_28_下
54	D-DNA	TGAAAAAACTGGGCATTAATAAACTGTGTGATACCCCTGAGCATTGAATTTG	QC_29_上
55	D-DNA	CAAAATTCAAATGCTCAGGGTATCACACAGTTTATTAATGCCCCAGTTTTTTCA	QC_29_下
56	D-DNA	TGAAAAGGTAAACCCGGTTGTGTTCTGTTTTAGCGGTC	QC_30_上
57	D-DNA	GACCGCTAAAAACAGAAACAACAACCGGTTACCTTTCA	QC_30_下
58	D-DNA	ATCGCAAAGAAGTTTATCAGCAGGTTGTAGCCGTATTATGAATC	QC_38_上
59	D-DNA	GATTCATAATACGGCTACAACCTGCTGATAAACTTCTTTGCGCAT	QC_38_下
60	D-DNA	AAGTTTATCAGCAGGTTAGCTGCTGTAATTATGAATCTGCTGCG	QC_39_上
61	D-DNA	CGCAGCAGATTTCATAATACGACAGCTAACCTGCTGATAAACTT	QC_39_下
62	D-DNA	ATTATGAATCTGCTGCGCAATATTGTGAAAAAATTGAAATTGCCAGCATT	QC_40_上
63	D-DNA	AATGCTGGCAATTTCAATTTTTCACAATATTCGCGCAGCAGATTCATAAT	QC_40_下
64	D-DNA	磷酸-AGCGGCTCTTCGATGATGTTGCTGTTTGGGATTTT	MJ_1_90_DD
65	D-DNA	磷酸-AGCGGCTCTTCGGCATGCAATTTTGGCAAAACACTT	MJ_1_91_DD
66	D-DNA	磷酸-AGCGGCTCTTCGTGCATCACGGGAGAT	MJ_1_72_DD
67	D-DNA	磷酸-AGCGGCTCTTCGCCCTTGAAGCTGCCACAAAGCAGGAACGTT	MJ_1_73_DD
68	蛋白质	MIVLFVDFDYFYAQVEEVLPNPSLKGKPVVVCVFSGRFEDSGAVATANYEARKFGVKA GIPIVEAKKILPNAVYLPMRKEYVQQVSSRIMNLLREYSEKIEIASIDEAYLDISDKVRD YREAYNLGLEIKNKILEKEKITVTVGISKNKVFAKIA-硫酯	Dpo4片段1-154
69	D-DNA	磷酸-AGCGGCTCTTCGATGGAGGGGAAAATCAACCGGGAA	MJ_1_99_DD

[0193]

SEQ ID NO:	类型	序列	内部参考物
70	D-DNA	磷酸-AGCGGCTCTTCGGCACAAAAGCTTTGAAGAGCTTGTGTC	MJ 1 100 DD
71	D-DNA	磷酸-AGCGGCTCTTCGTGCGATATGGCAAAACCGAATGGCAATAAA	MJ 1 96 DD
72	D-DNA	磷酸-AGCGGCTCTTCGCCCTTAGGTATCAAAAATTTATCCAGG	MJ 1 97 DD
73	蛋白质	CDMAKPNGIKVIDDEEVKRLIRELDIADVPGIGNITAEKCLKLGINKLVDTLSIEFDKLLKGMIGEAKAKYLISLARDEYNEPIRTRVRKKSIGRIVTMKRNSRNLEEKPYLFRRAIEESYYKLDKRIPKAIHVVAVTEDLDIVSRGRTPPHGISKETA YSESVKLLQKILEEDERKIRRGVRFSEKIEAIGLDKFFDT	Dpo4 A155C 片段155-352
74	D-DNA	磷酸-AGCGGCTCTTCGTGTGATACCCCTGAGCATTGAATTT	MJ 1 98 DD
75	蛋白质	CDTLSIEFDKLLKGMIGEAKAKYLISLARDEYNEPIRTRVRKKSIGRIVTMKRNSRNLEEKPYLFRRAIEESYYKLDKRIPKAIHVVAVTEDLDIVSRGRTPPHGISKETA YSESVKLLQKILEEDERKIRRGVRFSEKIEAIGLDKFFDT	Dpo4 V203C 片段203-352
76	D-DNA	磷酸-AGCGGCTCTTCGATGGCAGATATGGCAAAACCGAAT	MJ 1 101 DD
77	D-DNA	磷酸-AGCGGCTCTTCGGCACAGTTTATTAAATGCCCAAGTTT	MJ 1 102 DD
78	蛋白质	ADMAKPNGIKVIDDEEVKRLIRELDIADVPGIGNITAEKCLKLGINKL-硫酯	Dpo4 片段155-202
79	D-DNA	TCTAATACGACTCACTATAGGAGCTCAGACTGGCACCG	DE4.40T7
80	D-DNA	GTGGAACCGACAACCTTGTGC	DE4.40R
81	蛋白质	H-RTPPHGISKETA YSESVKLLQKILEEDERKIRRGVRFSEKIEAIGLDKFFDT-NH <sub>2</sub>	实施例10 产物(1)
82	蛋白质	Boc-VDTLSIEFDKLLKGMIGEAKAKYLISLARDEYNEPIRTRVRKKSIGRIVTMKRNSRNLEEKPYLFRRAIEESYYKLDKRIPKAIHVVAVTEDLDIVSRG-OH	实施例10 产物(2)
83	蛋白质	H-VDTLSIEFDKLLKGMIGEAKAKYLISLARDEYNEPIRTRVRKKSIGRIVTMKRNSRNLEEKPYLFRRAIEESYYKLDKRIPKAIHVVAVTEDLDIVSRGRTPPHGISKETA YSESVKLLQ	实施例10 产物(3)

[0194]

SEQ ID NO:	类型	序列	内部参考物
84	蛋白质	KILEEDERKIRIRIGVRFSKFIEAIGLDKFFDT-NH <sub>2</sub> Z-CDMAKPNNGIKVIDDEEVKRLIRELDIADVPGIGNITAEKLLKLGINKL-苄基-硫酸酯	实施例10 产物(4)
85	蛋白质	H-RKEVYQQVSSRIMNLLREYSEKIEIASIDEAYLDISDKVRDYREAYNLGLEIKNKILE KEKITVTVGISKNKVFAKIA-SMe	实施例10 产物(7)
86	蛋白质	Ac-MIVLFDVDFDYFYAQVEEVLNPSLKGKPVVVCVFSGRFEDSGAVATANYEARKFGV KAGIPIVEAKKILPNAVYLPVPM-OGp	实施例10 产物(6)
87	蛋白质	H-CDMAKPNNGIKVIDDEEVKRLIRELDIADVPGIGNITAEKLLKLGINKLCLDITLSIEFDKL KGMIGEAKAKYLISLARDEYNEPIRTRVRKSGIRIVTMKRNSRNLEEEKPYLFRALIEESY YKLDKRIPKAIHVAVATEDLDIVSRGRTPHIGISKETAYSESVKLLQKILEEDERKIRIRIG VRFKFIIEAIGLDKFFDT-OH	实施例10 产物(5)
88	蛋白质	Ac-MIVLFDVDFDYFYAQVEEVLNPSLKGKPVVVCVFSGRFEDSGAVATANYEARKFGV KAGIPIVEAKKILPNAVYLPVPMRKEVYQQVSSRIMNLLREYSEKIEIASIDEAYLDISDKV RDYREAYNLGLEIKNKILEKEKITVTVGISKNKVFAKIA-SMe	实施例10 产物(8)

[0195] 应理解,上文是分子结合本发明使用时的分子的代表。所附序列表仅反映仅氨基酸或其核苷酸序列,而不反映如上表所指示的所述分子的任何进一步特征。

[0196] 通过附图、实施例和序列表进一步说明本发明,由此可以获取其它特征、实施方案和优势,其中

[0197] 图1A示出了用于L-聚合酶X的活性测试的1-缺口D-DNA模板的组成;

[0198] 图1B示出了用于L-聚合酶X的活性测试的6-缺口D-DNA模板的组成;

[0199] 图2A-B示出了通过UPLC(A)和质谱法(B)对合成的D-多肽产物Ac-MLTLIQGKKIVNHLRSRLAFEYNGQLIKILSKNIVAVGSL-0Gp(1)的分析结果;

[0200] 图3A-B示出了通过UPLC(A)和质谱法(B)对合成的D-多肽产物H-RREEKLNVDLLIIVPEKKLLKHVLPNIRIKGLSFSVKA-SMe(2)的分析结果;

[0201] 图4A-B示出了通过UPLC(A)和质谱法(B)对合成的D-多肽产物H-CGERKCVLFIEWEKTYQLDLFTALAEKPYAIFHFTGPV SYLIRIRAALKKKNYKLNQYGLFKNQTLVPLKITTE KELI KELGFTYRIPKKRL-OH(3)的分析结果;

[0202] 图5A-B示出了通过UPLC(A)和质谱法(B)对合成的D-多肽产物Ac-MLTLIQGKKIVNHLRSRLAFEYNGQLIKILSKNIVAVGSLRREEKMLNDVDLLIIVPEKKLLKHVLPNIRIKGLSFSVKA-SMe(4)的分析结果;

[0203] 图6A-B示出了通过SDS-PAGE(A)和质谱法(B)对天然化学连接D-多肽产物Ac-MLTLIQGKKIVNHLRSRLAFEYNGQLIKILSKNIVAVGSLRREEKMLNDVDLLIIVPEKKLLKHVLPNIRIKGLSFSVKACGERKCVLFIEWEKTYQLDLFTALAEKPYAIFHFTGPVSYLIRIRAALKKKNYKLNQYGLFKNQTLVPLKITTEKELIKELGFTYRIPKKRL-OH(5)的分析结果;

[0204] 图7示出了用于D-聚合酶X的活性测试的1-缺口L-DNA模板的组成;

[0205] 图8示出了在1-缺口底物上进行的D-聚合酶X的L-DNA延伸活性测定的凝胶电泳;

[0206] 图9A示出了用于D-聚合酶X的活性测试的6-缺口L-DNA模板的组成;

[0207] 图9B示出了在6-缺口底物上进行的D-聚合酶X的L-DNA延伸活性测定的凝胶电泳;

[0208] 图10A示出了用于L-聚合酶X的活性测定的引物-模板复合物D-DNA底物;

[0209] 图10B示出了在恒温下进行的L-聚合酶X的D-DNA延伸活性测定的凝胶电泳;

[0210] 图10C示出了使用热循环进行的L-聚合酶X的D-DNA延伸活性测定的凝胶电泳;

[0211] 图11A-B示出了通过SDS-PAGE(A)和LC-ESI质谱法(B)对合成的全L聚合酶dpo4变体A155C的分析结果;

[0212] 图12A示出了L-聚合酶dpo4变体A155C、V203C、C31S和A155C/V203C的D-DNA PCR活性测定的凝胶电泳;

[0213] 图12B示出了重组和合成的L-聚合酶dpo4的D-DNA PCR活性测定的凝胶电泳;

[0214] 图13示出了通过质谱法对合成的D-多肽产物H-RTFPHGISKETAYSESVKLLQKILEEDERKIRRIGVRFKSFIEAIGLDKFFDT-NH<sub>2</sub>(1)的分析结果;

[0215] 图14示出了通过质谱法对合成的D-多肽产物Boc-VDTLSIEFDKLGKMGIEAKAKYLISLARDEYNEPIRTRVRKSIGRIVTMKRNSRNLEEIKPYLFRAIEESYYKLDKRIPKAIHVAVTEDLDIVSRG-OH(2)的分析结果;

[0216] 图15示出了通过质谱法对片段缩合D-多肽产物H-VDTLSIEFDKLGKMGIEAKAKYLISLARDEYNEPIRTRVRKSIGRIVTMKRNSRNLEEIKPYLFRAIEESYYKLDKRIPKAIHVAVTEDLDIVSRGRTFPHGISKETAYSESVKLLQKILEEDERKIRRIGVRFKSFIEAIGLDKFFDT-NH<sub>2</sub>(3)的分析结果;

[0217] 图16A-B示出了通过RP-HPLC(A)和质谱法(B)对合成的D-多肽产物Z-

CDMAKPNGIKVIDDEEVKRLIRELDIADVPGIGNITA EK LK KLGINKL-苜基-硫酯(4)的分析结果;

[0218] 图17A-B示出了通过UPLC(A)和质谱法(B)对合成的D-多肽产物H-RKEVYQQVSSRIMNLLREYSEKIEIASIDEAYLDISDKVRDYREAYNLGLEIKNKILEKEKITVTVGISKNKVFAKIA-SMe(7)的分析结果;

[0219] 图18A-B示出了通过UPLC(A)和质谱法(B)对合成的D-多肽产物Ac-MIVLFVDFDYFYAQVEEVLNPSLKGKPVVVCVFSGRFEDSGAVATANYEARFKGVKAGIPIVEAKKILPNAVYLP-OGp(6)的分析结果;

[0220] 图19A-B示出了通过SDS-PAGE(A)和质谱法(B)对梭菌蛋白酶介导的D-多肽连接产物Ac-MIVLFVDFDYFYAQVEEVLNPSLKGKPVVVCVFSGRFEDSGAVATANYEARFKGVKAGIPIVEAKKILPNAVYLP-PMRKEVYQQVSSRIMNLLREYSEKIEIASIDEAYLDISDKVRDYREAYNLGLEIKNKILEKEKITVTVGISKNKVFAKIA-SMe(8)的分析结果;

[0221] 图20A-B示出了通过SDS-PAGE(A)和LC-ESI质谱法(B)对全L聚合酶dpo4片段155-352(V203C)的天然化学连接产物的分析结果。

## 实施例

[0222] 如实施例中所使用的缩写。

[0223] ACN乙腈(Sigma-Aldrich Chemie GmbH,Schnelldorf,Deutschland)

[0224] DCM二氯甲烷(Sigma-Aldrich Chemie GmbH,Schnelldorf,Deutschland)

[0225] DIPEA N,N-二异丙胺(Sigma-Aldrich Chemie GmbH,Schnelldorf,Deutschland)

[0226] EDT(Sigma-Aldrich Chemie GmbH,Schnelldorf,Deutschland)

[0227] Fmoc 9-苜基-甲氧基羰基-

[0228] HATU(2-(7-氮杂-1H-苜并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲六氟磷酸酯)(CreoSalus,Louisville KY,USA)

[0229] HFIP 1,1,1,3,3,3-六氟磷酸盐(Sigma-Aldrich Chemie GmbH,Schnelldorf,Deutschland)

[0230] HPLC高效液相色谱(有时称为高压液相色谱)

[0231] MeIm甲基咪唑(Sigma-Aldrich Chemie GmbH,Schnelldorf,Deutschland)

[0232] MeOH甲醇(Sigma-Aldrich Chemie GmbH,Schnelldorf,Deutschland)

[0233] MSNT 1-(均三甲苯-2-磺酰基)-3-硝基-1,2,4-三唑(Merck KGaA,Darmstadt,Germany)

[0234] NMP N-甲基-吡咯烷酮(Iris Biotech GmbH,Marktredwitz,Deutschland)

[0235] PyBOP(苜并三唑-1-基氧基)三吡咯烷基磷六氟磷酸盐(MERCK KGAA,DARMSTADT,GERMANY)

[0236] SDS十二烷基硫酸钠(Sigma-Aldrich Chemie GmbH,Schnelldorf,Deutschland)

[0237] TBTU 0-(苜并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲四氟硼酸盐(Merck KGaA,Darmstadt,Germany)

[0238] tBu(叔丁基-)

[0239] TFA三氟乙酸(Sigma-Aldrich Chemie GmbH,Schnelldorf,Deutschland)

[0240] TFE 1,1,1-三氟乙醇 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland)  
 [0241] THF (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland)  
 [0242] TIS (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland)  
 [0243] TLC薄层色谱  
 [0244] Tris三(羟甲基)氨基甲烷 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland)

[0245] UPLC超高效液相色谱

[0246] 实施例1-聚合酶X的野生型和变体的重组表达和纯化

[0247] Oliveros等在1997年描述且表征了得自于非洲猪瘟病毒(缩写ASFV)的聚合酶X。聚合酶X的野生型基因具有仅有525个碱基对(包括起始密码子和终止密码子)的开放阅读框(缩写ORF)(Oliveros等,1997)。所编码的蛋白质的长度仅为174个氨基酸。本实施例描述了如何在大肠杆菌中表达和使用His<sub>6</sub>-Tag纯化聚合酶X以及其变体。

[0248] 1.1表达构建体

[0249] 由于ASFV的密码子用法不同于大肠杆菌,故从GeneArt AG (Regensburg, Germany)购买聚合酶X的经大肠杆菌密码子优化的合成基因。合成基因序列提供于pCR4-Blunt-TOPO载体(来源公司:Invitrogen, Karlsruhe, Germany)中。包括起始密码子和两个终止密码子的经密码子优化的开放阅读框具有以下序列:

[0250]

```
ATGCTGACCCTGATTCAGGGCAAAAAAATCGTGAACCATCTGCGTAGCCGTCTGGCCTTTGAATATAACGGCCAGCT
GATTAATAATTCTGAGCAAAAAACATTGTGGCGGTGGGCAGCCTGCGTCGTGAAGAAAAAATGCTCAACCATGTGGATC
TGCTGATTATTGTGCCGAAAAAAAACCTGCTCAAACATGTGCTGCCGAACATTCGTATTAAAGGCCTGAGCTTTAGC
CTGAAAGTGTGCGCCAACGTAAATGCGTGCTGTTTATCGAATGGGAAAAAAAACCTACCAGCTGGACCTGTTTAC
CGCGCTGGCCGAAGAAAAACCGTATGCGATCTTTCATTTTACCGGTCCGGTGAGCTATCTGATTCGTATTCGTGCGG
CGCTGAAAAAAAACCTACAACTGAACCAGTATGGCCTGTTTAAAAACAGACCCTGGTGCCGGTGAAAATTACC
ACCGAAAAACAACCTGATTAAGAAGCTGGGCTTTACCTATCGCATTCCGAAAAAACGCCTGTAATAA.
```

[0251] 为了获得聚合酶X(也称为全L聚合酶X)的表达构建体,从具有BamHI和PstI的pCR4-Blunt-TOPO中切出聚合酶X的基因且亚克隆在pRSET-A载体(Invitrogen, Karlsruhe, Germany)中。亚克隆添加His<sub>6</sub>-Tag到N末端,且使基因在T7启动子的控制之下。将所述构建体命名为pMJ14且用于在大肠杆菌中表达全L聚合酶X。由pMJ14表达的蛋白质聚合酶X具有以下序列,其具有210个氨基酸:

[0252]

```
MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDRWGSMLTLIQGKKIVNHLRSRLAFEYNGQLIKILSKNIVAVGSLR
REEKMLNDVLLLIIVPEKKLLKHVLPNIRIKGLSFSVKVCGERKCVLFIEWEKKTYQLDLFTALAEKPYAIFHFTG
PVSYLIRIRAALKKKNYKLNQYGLFKNQTLVPLKITTEKKLIKELGFTYRIPKKRL.
```

[0253] 初始36个氨基酸表示包括几个间隔氨基酸的His<sub>6</sub>-Tag和一些其它序列标签(T7基因10前导序列,抗表达表位)。最后的174个氨基酸的部分与如在ASFV中发现的聚合酶X蛋白质序列一致。

[0254] 使用市售QuikChange试剂盒(Stratagene GmbH, Waldbronn, Germany),根据制造商的方案制备全L聚合酶X的变体的表达构建体。质粒pMJ14充当模板。QuikChange所需要的

寡核苷酸是在NOXX0 N设备上合成(QC10\_上、QC10\_下)或从Purimex (Greibenstein, Germany) 购买(QC26\_上、QC26\_下、QC27\_上、QC27\_下、QC31\_上、QC31\_下)。制备以下变体表达构建体且用于在大肠杆菌中表达全L聚合酶的变体:

变体	表达构建体	用于 QuikChange 突变成程序的寡核苷酸
I124G	pMJ130	QC10_上 (5' - TCCGGTGAGCTATCTGGGTTCGTATTCGTGCGGCG-3') QC10_下 (5' - CGCCGCACGAATACGACCCAGATAGCTCACC GGA-3')
V80G	pMJ356	QC26_上 (5' - TGAGCTTTAGCGTGAAAGGGTGCGGCGAACG-3') QC26_下 (5' - CGTTCGCCGCACCCTTTCACGCTAAAGCTCA-3')
V80A	pMJ357	QC27_上 (5' - TGAGCTTTAGCGTGAAAGCGTGCGGCGAACG-3') QC27_下 (5' - CGTTCGCCGCACGCTTTCACGCTAAAGCTCA-3')
C86S	pMJ412	QC31_上 (5' - TGAAAGTGTGCGGCGAACGTAAAAGCGTGCTGTTTA-3') QC31_下 (5' - TAAACAGCACGCTTTTACGTTCCGCCACACTTTCA-3')

### [0256] 1.2大肠杆菌中的蛋白质表达

[0257] 使用表达构建体pMJ14在大肠杆菌中表达全L聚合酶X。由pMJ130、pMJ356、pMJ357或pMJ412表达全L聚合酶X的变体。对于表达来说,在感受态大肠杆菌菌株‘BL-21 (DE3) pLysS’ (Novagen/VWR, Dresden, Germany) 中转化适当的表达构建体且用抗生素氨苄青霉素来维持。使培养物在37℃下在2YT培养基中生长,直到在600nm下的光学密度达到约0.6。然后,通过加入异丙基β-D-1-硫代半乳糖苷(缩写IPTG)达到0.4mM的最终浓度来诱导蛋白质表达。在30℃下表达4小时。通过离心收集细胞且储存在-80℃下或立即处理。

### [0258] 1.3蛋白质纯化

[0259] 将新鲜的或冷冻的大肠杆菌细胞再悬浮在冰上的‘溶解和结合缓冲液’(50mM磷酸钠(pH 7.5)、500mM NaCl、40mM咪唑)中且使用‘French Press’(G.Heinemann, Schwäbisch Gmünd, Germany) 细胞破坏剂溶解。在4℃下使用‘Ni-NTA超流体’材料(Qiagen, Hilden, Germany) 进行纯化。利用洗脱缓冲液(50mM磷酸钠(pH 7.5)、500mM NaCl、200mM咪唑)进行洗脱步骤。使用SDS-PAGE (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) 分析级分,合并,且在需要时用阴离子交换色谱在‘ÄKTA 纯化器’系统上使用‘Q琼脂糖凝胶快速流’材料(GE healthcare, Freiburg, Germany) 进行进一步纯化。通过MALDI质谱法证实蛋白质同一性且合并准确的级分,浓缩并且再缓冲。将经过纯化的蛋白质储存在由25mM磷酸钠(pH 7.5)、250mM NaCl、50%甘油组成的-20℃缓冲液中。通过BCA-蛋白质测定(Pierce/Perbio Science, Bonn, Germany),使用牛血清白蛋白(缩写BSA)标准物估计蛋白质浓度。

### [0260] 实施例2-聚合酶X和聚合酶X的变体的活性证实

[0261] 利用由寡核苷酸形成的不同类型的底物复合物进行全L聚合酶X和全L聚合酶X的变体的活性测定(参见实施例1),其中所述底物和寡核苷酸由D-DNA-核苷酸组成。

### [0262] 2.1在具有1-核苷酸缺口的底物上进行活性测定

[0263] 1-缺口底物的寡核苷酸列表

[0264]

名称	长度, nt	序列 (5'→3')
SP-1	15	GATCACAGTGAGTAC
D(g1)P	17	磷酸-GTAAAACGACGGCCAGT
MJ_1_140_DD	33	ACTGGCCGTCGTTTTACAGTACTCACTGTGATC
MJ_1_141_DD	33	ACTGGCCGTCGTTTTACCGTACTCACTGTGATC
MJ_1_142_DD	33	ACTGGCCGTCGTTTTACGGTACTCACTGTGATC
SP1c+18(g1)	33	ACTGGCCGTCGTTTTACTGTACTCACTGTGATC

[0265] 通过将由33个核苷酸组成的DNA寡核苷酸的模板链(也称为下链)与分别由15个和17个核苷酸组成且分别在其5'端和3'端与上述模板链杂交的两个不同的DNA寡核苷酸退火,从而在上链中产生一个核苷酸的缺口来制备底物复合物。所述复合物在缺口内的模板位置上含有A、C、G或T。在退火之前,通过标准激酶反应,采用 $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -三磷酸腺苷(ATP)和T4多核苷酸激酶将由15个核苷酸组成的寡核苷酸SP-1在其5'端用 $^{32}\text{P}$ 进行放射性标记。在10mM Tris-HCl、5mM MgCl<sub>2</sub>(pH 8.0)中通过在65°C下加热10分钟且缓慢冷却进行退火。通过在NAP柱(GE healthcare)上纯化来去除未并入的 $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP。

[0266] 在活性测定中,将全L聚合酶X及其变体与D构型的1-缺口底物复合物(参见图1A)组合。作为阴性对照,也在无全L聚合酶X或其变体和D-脱氧核苷三磷酸(dNTP)的情况下孵育各底物。取决于1-缺口复合物内的模板碱基,在测定期间仅加入对应的D-dNTP。典型的6 $\mu$ l测定含有50nM底物复合物、1.7ng/ $\mu$ l L-全L聚合酶X或其变体、8 $\mu$ M一种D-dNTP和缓冲液(50mM Tris-HCl、10mM MgCl<sub>2</sub>、4%甘油、0.1mg/ml牛血清白蛋白(BSA)(pH 7.5))。D-dNTP购自Rovalab(Teltow, Germany)。在37°C下,孵育时间是30分钟。将整个测定体积与样品缓冲液/染料混合,加样在变性测序凝胶上且分离4小时。在-80°C下将凝胶暴露于Kodak K屏过夜,且使用BioRad Fx磷相仪系统读取。

[0267] 全L聚合酶X和变体I124G、V80A和V80G在这些条件下是活性的,且填充了两个上链DNA寡核苷酸之间的1核苷酸缺口。

[0268] 2.2在具有6-核苷酸缺口的底物上进行活性测定

[0269] 6-缺口底物的寡核苷酸列表:

名称	长度, nt	序列 (5'→3')
SP-1	15	GATCACAGTGAGTAC
D(g6)P	12	磷酸-ACGACGGCCAGT
SP1c+18(g6)	33	ACTGGCCGTCGTTCTATTGTACTCACTGTGATC

[0271] 通过将由33个核苷酸组成的DNA寡核苷酸的模板链(称为下链)与分别由15个和12个核苷酸组成且分别在其5'端和3'端与上述模板链杂交的两个不同的DNA寡核苷酸退火,从而在上链中产生六个核苷酸的缺口来制备底物复合物。在退火之前,通过标准激酶反应,采用 $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -三磷酸腺苷(ATP)和T4多核苷酸激酶将由15个核苷酸组成的寡核苷酸SP-1在其5'端用 $^{32}\text{P}$ 进行放射性标记。在10mM Tris-HCl、5mM MgCl<sub>2</sub>(pH 8.0)中通过在65°C下加热10分钟且缓慢冷却进行退火。通过在NAP柱(GE healthcare, Freiburg, Germany)上纯化来去

除未并入的  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP。

[0272] 在活性测定中,将全L聚合酶X及其变体与D构型的6-缺口底物复合物(图1B)组合。作为阴性对照,也在无全L聚合酶X或其变体和脱氧核苷三磷酸(D-dNTP)的情况下孵育底物。典型的6 $\mu\text{l}$ 测定含有50nM底物复合物、至多1.3ng/ $\mu\text{l}$ 全L聚合酶X或其变体、8 $\mu\text{M}$ 每种D-dNTP和缓冲液(50mM Tris-HCl、10mM MgCl<sub>2</sub>、4%甘油、0.1mg/ml牛血清白蛋白(BSA), pH 7.5)。D-dNTP是购自Roalab(Teltow, Germany)。在37°C下,典型的孵育时间是30分钟。将整个测定体积与样品缓冲液/染料混合,加样在变性测序凝胶上且分离4小时。在-80°C下将凝胶暴露于Kodak K屏过夜,且使用BioRad Fx磷相仪系统读取。

[0273] 全L聚合酶X和变体(除了C86S)在这些条件下是活性的,且填充了两个上链DNA寡核苷酸之间的6核苷酸缺口。

[0274] 实施例3-由D-氨基酸组成的聚合酶Po1 X变体的合成

[0275] 在本实施例内,描述了全D聚合酶X变体V80A的合成。全D聚合酶X变体V80A的氨基酸序列是Ac-MLTLIQGKKIVNHLRSRLAFEYNGQLIKILSKNIVAVGSLRREEKMLNDVLLIIVPEKKLLKHVLPNIRIKGLSFSVKACGERKCVLFIEWEKTYQLDLFTALAEKPYAIFHFTGPVSYLIRIRAALKKKNYKLNQYGLFKNQTLVPLKITTEKELIKELGFTYRIPKKRL-OH。

[0276] 所使用的所有氨基酸都根据固相肽合成Fmoc/tBu策略要求(Eric Atherton等, 1981)加以保护。所使用的所有氨基酸都是D-氨基酸(Bachem, Bubendorf, Switzerland)。

[0277] 3.1 HO-Gp(Boc)<sub>2</sub>的合成

[0278] 以类似于Sekizaki等(Sekizaki等, 1996)的方式合成经叔丁氧基羰基保护的4-胍基苯酚。据此,将40mmol N,N'-双-(叔丁氧基羰基)-S-甲基异硫脲(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland)和60mmol 4-氨基苯酚(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland)溶解于500ml圆底烧瓶中的250ml THF中。此后,对所述溶液用氩气冲洗10分钟且在用CaCl<sub>2</sub>管密封的同时保持搅拌120小时。

[0279] 在蒸发溶剂之后,用冰冷的甲醇使残余物沉淀。在真空下经P<sub>4</sub>O<sub>10</sub>干燥沉淀物。最后,使用快速色谱法用DCM纯化产物。合并含有产物的级分且在减压下蒸发溶剂。使用TLC、反相HPLC、质谱法和NMR进行分析。实验测定的质量与计算质量351Da相对应。

[0280] 3.2 H-D-Leu-OGp(Boc)<sub>2</sub>的合成

[0281] 将1mmol Z-D-Leu-OH(Bachem, Bubendorf, Switzerland)、0.9当量的TBTU和0.9当量的HO-Gp(Boc)<sub>2</sub>溶解于10ml DMF中。在加入2当量的DIPEA之后,将溶液搅拌2小时。在蒸发溶剂之后,利用快速色谱法使用DCM纯化粗产物。合并Z-D-Leu-OGp(Boc)<sub>2</sub>的纯级分且蒸发溶剂。

[0282] 将Z-D-Leu-OGp(Boc)<sub>2</sub>溶解于10ml MeOH中且用氩气冲洗。通过在2小时内加入Pd/C催化剂和H<sub>2</sub>来实现N末端Z-基团的水解裂解。过滤出H-D-Leu-OGp(Boc)<sub>2</sub>之后,在减压下蒸发MeOH。使用反相HPLC和质谱法进行分析。发现产物的正确质量是465Da且与计算质量一致。

[0283] 3.3全D肽AcMLTLIQGKKIVNHLRSRLAFEYNGQLIKILSKNIVAVGSL-OGp(1)的合成

[0284] 如Barlos等(Barlos等, 1989)所描述,使0.10mmol TentaGel-R-Triyl树脂(Rapp Polymere, Tübingen, Deutschland)装载有Fmoc-D-Ser(tBu)-OH(Bachem, Bubendorf, Switzerland)。因此,将0.10mmol树脂与0.6mmol亚硫酸氯一起孵育两次,历经30分钟,且

随后用DCM洗涤。此后,在6ml DCM中将树脂与0.6mmol Fmoc-D-Ser(tBu)-OH、2.4mmol DIPEA一起孵育90分钟。然后,使用含10%MeOH(v/v)、10%DIPEA(v/v)的DCM溶液将树脂阻断三次,历经10分钟,且用DCM洗涤。使用ABI 433(Applied Biosystems,Foster City, USA),利用FASTmoc方案进行自动化合成。使用含9当量的HATU和20当量的DIPEA的NMP使10当量的氨基酸活化。偶合时间为45分钟,且用含20%(v/v)哌啶(Sigma-Aldrich Chemie GmbH,Schnelldorf,Deutschland)的NMP进行三次Fmoc脱保护,历经7分钟。

[0285] 通过在10ml含30%(v/v)HFIP的DCM中将肽基树脂孵育两次,历经2小时来实现经完全保护的肽酸的裂解。在过滤出肽之后,蒸发溶剂且使用冰冷的乙醚使残余物沉淀。分离并干燥沉淀的肽。

[0286] 将0.01mmol经完全保护的肽、4当量的PyBOP和5当量的H-D-Leu-OGp(Boc)<sub>2</sub>溶解于6ml NMP中。在加入10当量的DIPEA之后,将混合物搅拌4小时。此后,蒸发减少溶剂且利用冰冷的乙醚使残余物沉淀。干燥沉淀的肽酯,且随后使用含2.5%EDT、2.5%水、2.5%TIS的TFA经2小时裂解掉保护基。蒸发TFA之后,用冰冷的乙醚使肽沉淀。在C18柱(Phenomenex,Aschaffenburg,Germany)上,使用ACN/水梯度进行肽酯的反相HPLC纯化。合并含有产物的级分并且冷冻干燥。

[0287] 通过HPLC/UPLC(图2A)和质谱法(图2B)表征最终产物。产物的测量质量4654.7Da与理论质量4652.7Da一致。

[0288] 3.4全D肽H-RREEKLNVDLLIIVPEKKL LKHVLPNIRIKGLSFSVKA-SMe(2)的合成

[0289] 在6ml NMP中使用5当量的氨基酸、4.9当量的HATU和10当量的DIPEA历经45分钟使0.10mmol TentaGel-R-NH<sub>2</sub>树脂(Rapp Polymere,Tübingen,Deutschland)装载有Fmoc-D-Ala-OH。随后用THF洗涤树脂。通过与4当量的劳森试剂一起在THF中在80℃下孵育2小时实现转化成Fmoc-d-Ala-Ψ[CS-NH]-R-TentaGel。此后用NMP洗涤树脂。随后,将如此制备的树脂用于如先前所描述的自动化肽合成(参见实施例1.3)。此后,根据Sharma等(Sharma等,2011),通过与甲基碘一起在DMF中孵育过夜来产生相应的硫酯。在过滤树脂之后,蒸发含有肽硫酯的溶剂且使用冰冷的乙醚使残余物沉淀。利用含2.5%EDT、2.5%水、2.5%TIS的TFA来裂解侧链保护基,历经2小时。蒸发TFA之后,用冰冷的乙醚使肽沉淀。在C18柱(Phenomenex,Aschaffenburg,Germany)上,使用ACN/水梯度进行肽硫酯的反相HPLC纯化。合并含有产物的级分并且冷冻干燥。

[0290] 通过HPLC/UPLC(图3A)和质谱法(图3B)表征最终产物。实验测定的产物质量(4683.8Da)与理论值4681.7Da一致。

[0291] 3.5全D肽H-CGERKCVLFIEWEKTYQLDLFTALAEKPYAIFHFTGPVSYLIRIRAALKKKNYKLNQ YGLFKNQTLVPLKITTEKELIKELGFTYRIPKKRL-OH(3)的合成

[0292] 使用含6当量的氨基酸、6当量的MSNT和4.5当量的MeIm的DCM使0.10mmol TentaGel-R-PHB树脂(Rapp Polymere,Tübingen,Deutschland)装载有Fmoc-D-Leu-OH。使用ABI 433,利用FASTmoc方案进行自动化合成。使用含9当量的HATU和20当量的DIPEA的NMP使10当量的氨基酸活化。偶合时间是45分钟,且利用含20%(v/v)哌啶的NMP进行三次Fmoc脱保护,历经7分钟。在42个氨基酸之后进行双偶合步骤。使用含2.5%EDT、2.5%水、2.5%TIS的TFA历经2小时实现N末端经Fmoc保护的肽的裂解。蒸发TFA之后,用冰冷的乙醚使肽沉淀。在C18柱上使用ACN/水梯度进行粗制N末端经保护的肽的反相HPLC纯化。合并含有产物

的级分并且冷冻干燥。随后在含20%胡椒碱的DMF中溶解经Fmoc保护的肽并且搅拌,以便裂解掉N末端Fmoc基团。在20分钟之后,蒸发溶剂且使用冰冷的乙醚使残余物沉淀。随后,使用反相HPLC,利用C18柱与ACN/水梯度纯化沉淀的粗制肽。合并含有产物的级分并且冷冻干燥。

[0293] 通过HPLC/UPLC(图4A)和质谱法(图4B)表征最终产物。产物的测定质量(11184.3Da)与理论质量11178.2Da相对应。

[0294] 3.6通过肽1与肽2的蛋白酶催化连接合成全D肽Ac-MLTLIQGKKIVNHLRSRLAFEYNGQLIKILSKNIVAVGSLRREEKMLNDVDLLIIVPEKKLLKHVLPNIRIKGLSFSVKA-SMe(4)

[0295] 将肽1以0.2mM且将肽2以0.6mM溶解于含有2% Triton X100(Sigma Aldrich Chemie GmbH,Schnelldorf,Germany)的磷酸钠缓冲液(100mM,pH 8.5,含100mM NaCl)。在加入20 $\mu$ M梭菌蛋白酶(内切蛋白酶Arg-C,Worthington Biochemical Corporation,Lakewood,N.J.,USA)之后,在37 $^{\circ}$ C下振荡反应混合物过夜。对沉淀的肽进行离心,溶解于H<sub>2</sub>O/ACN/甲酸60/40/0.5中且通过反相HPLC,使用RP-18柱(Phenomenex,Aschaffenburg,Germany)以30分钟内从30%到60%的ACN/水梯度进行纯化。合并含有产物的级分并且冷冻干燥。

[0296] 利用反相UPLC(图5A)和ESI-质谱法(图5B)分析最终肽。理论分子量( $M_{理论}=9199.3Da$ )与实测分子量( $M_{实测}=9199.4Da$ )相对应。

[0297] 3.7通过肽4与肽3的天然化学连接合成全D聚合酶X变体V80A

[0298] 将肽3和4都以0.2M溶解于含有6M盐酸胍(Sigma Aldrich Chemie GmbH,Schnelldorf,Germany)、200mM巯苯基乙酸(Sigma Aldrich Chemie GmbH,Schnelldorf,Germany)和5mm Tris(2-羧乙基)膦盐酸盐(Sigma Aldrich Chemie GmbH,Schnelldorf,Germany)的TRIS缓冲液(pH 8.6)中。在室温下将反应混合物振荡72小时。然后,通过反相HPLC,使用RP-8柱(Phenomenex,Aschaffenburg,Germany)以30分钟内从30%到60%的ACN/水梯度纯化混合物。合并含有连接产物的级分并且干燥。将干粉末溶解于水中,且通过尺寸排除色谱法,使用SEC3000柱(Phenomenex,Aschaffenburg,Germany),以磷酸钠缓冲液(Sigma Aldrich Chemie GmbH,Schnelldorf,Germany)(50mM,pH 6.8,0.5% SDS)作为洗脱液进行纯化。合并含有产物的级分并且冷冻干燥。

[0299] 利用SDS-PAGE(图6A)和ESI-质谱法(图6B)分析最终产物。在介于14.4kDa与21.5kDa之间的泳道7中发现了清楚的条带,表明纯的全长聚合酶。如ESI-MS所示,理论分子量( $M_{理论}=20342Da$ )与实测分子量( $M_{实测}=20361Da$ )相对应。

[0300] 实施例4-由D-氨基酸组成的合成聚合酶X变体的活性证实

[0301] 将根据实施例3的干燥全D聚合酶X变体V80A溶解于6M盐酸胍中,且在4 $^{\circ}$ C下通过在市售透析装置(Pierce/PerBio,Bonn,Germany)中以3,500的分子量截断值逐步透析来进行再折叠。最终缓冲液是50mM磷酸钠、500mM氯化钠(pH 7.5)。通过在预制的凝胶(Invitrogen,Karlsruhe,Germany)上使用标准系列的已知蛋白质浓度进行十二烷基硫酸钠(SDS)聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE),随后进行SYPRO-RED染色(Invitrogen,Karlsruhe,Germany)和在BioRad Fx扫描仪上进行密度条带分析来估计蛋白质浓度。

[0302] 利用两种不同的底物类型进行全D聚合酶X变体V80A的活性测定:

[0303] 4.1在具有1-核苷酸缺口的底物上进行活性测定

[0304] 通过将33-聚体下链DNA寡核苷酸与两个17-聚体上链DNA寡核苷酸退火从而在上链中产生1个核苷酸的缺口来制备底物。合成了呈L-构型的寡核苷酸。在退火之前,通过标准激酶反应,采用 $\gamma$ -<sup>32</sup>P-三磷酸腺苷( $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP)和T4多核苷酸激酶将17-聚体上链寡核苷酸MJ\_1\_58\_MD在其5'端用<sup>32</sup>P进行放射性标记。为了促进L-寡核苷酸MJ\_1\_58\_MD的激酶反应,在寡核苷酸合成期间,在5'端添加两个D构型的鸟苷碱基。在10mM Tris-HCl、5mM MgCl<sub>2</sub>(pH 8.0)中通过在65°C下加热10分钟且缓慢冷却进行退火。通过在NAP柱(GE healthcare, Freiburg, Germany)上纯化来去除未并入的 $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP。所述复合物在缺口内的模板位置上含有A、C、G或T。关于底物复合物的设定,参见图7。

[0305] 在活性测定中,将合成的全D聚合酶X变体V80A与L构型的1-缺口底物复合物组合。作为阴性对照,也在无全D聚合酶X变体V80A和L-脱氧核苷三磷酸(dNTP)的情况下孵育各底物。取决于1-缺口复合物内的模板碱基,在测定期间仅加入相应的L-dNTP。典型的6 $\mu$ l测定含有50nM底物复合物、1.7ng/ $\mu$ l全D聚合酶X变体V80A、8 $\mu$ M一种L-dNTP和缓冲液(50mM Tris-HCl、10mM MgCl<sub>2</sub>、4%甘油、0.1mg/ml牛血清白蛋白(BSA)(pH 7.5))。L-dNTP是以委托合成的方式购自Rasayan, Inc. (Encinitas, CA, USA)。在37°C下,孵育时间是30分钟。将整个测定体积与样品缓冲液/染料混合,上样在变性测序凝胶上且分离4小时。在-80°C下将凝胶暴露于Kodak K屏过夜,且使用BioRad Fx磷相仪系统读取。

[0306] 如从图8可见,全D聚合酶X变体V80A在L-DNA 1-缺口底物上得到了延伸产物,因而证实了所述合成蛋白质的活性。值得注意的是,仅与L-底物和L-dNTP组合的全D聚合酶X变体V80A得到了任何延伸产物。还有,仅含有对应于其模板碱基的L-dNTP的样品产生了延伸产物。这意味着A复合物上必须存在dTTP核苷酸、C-复合物上必须存在dGTP核苷酸、G-复合物上必须存在dCTP核苷酸且T-复合物上必须存在dATP核苷酸才能产生任何延伸产物。

#### [0307] 4.2在具有6-核苷酸缺口的底物上进行活性测定

[0308] 通过将33-聚体下链DNA寡核苷酸与两个17-聚体和12-聚体上链DNA寡核苷酸退火从而在上链中产生6个核苷酸的缺口来制备底物。合成了呈L-构型的寡核苷酸。在退火之前,通过标准激酶反应,采用 $\gamma$ -<sup>32</sup>P-三磷酸腺苷(ATP)和T4多核苷酸激酶将17-聚体上链寡核苷酸MJ\_1\_58\_MD(L-构型)在其5'端用<sup>32</sup>P进行放射性标记。为了促进L-寡核苷酸MJ\_1\_58\_MD的激酶反应,在寡核苷酸合成期间,在5'端添加两个D构型的鸟苷碱基。在10mM Tris-HCl、5mM MgCl<sub>2</sub>(pH8.0)中通过在65°C下加热10分钟且缓慢冷却进行退火。通过在NAP柱(GE healthcare, Freiburg, Germany)上纯化来去除未并入的 $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP。关于底物复合物的设定,参见图9A。

[0309] 在活性测定中,将合成的全D聚合酶X变体V80A与L构型的6-缺口底物复合物组合。作为阴性对照,也在无全D聚合酶X变体V80A和脱氧核苷三磷酸(L-dNTP)的情况下孵育所述底物。典型的6 $\mu$ l测定含有50nM底物复合物、至多1.3ng/ $\mu$ l全D聚合酶X变体V80A、8 $\mu$ M每种L-dNTP和缓冲液(50mM Tris-HCl、10mM MgCl<sub>2</sub>、4%甘油、0.1mg/ml牛血清白蛋白(BSA)(pH 7.5))。L-dNTP是以委托合成的方式购自Rasayan, Inc. (Encinitas, CA, USA)。在37°C下,典型的孵育时间是30分钟,但取决于批料的活性,可使用更久的孵育。将整个测定体积与样品缓冲液/染料混合,上样在变性测序凝胶上且分离4小时。在-80°C下将凝胶暴露于Kodak K屏过夜,且使用BioRad Fx磷相仪系统读取。

[0310] 如从图9B可见,合成的全D聚合酶X变体V80A在L-DNA 6-缺口底物上得到了N+6延

伸产物,因而证实了所述合成蛋白质的活性。然而,在相同的6-缺口复合物上,N+6延伸产物的合成与N+1延伸产物相比不那么明显。还有必要增加孵育时间来填充6-缺口。值得注意的是,仅与L-底物加L-dNTP组合的全D聚合酶X变体V80A得到了任何延伸产物。

[0311] 实施例5-由聚合酶X和聚合酶X的变体进行DNA合成

[0312] 文献(Oliveros,1997)中将得自于非洲猪瘟病毒(缩写ASFV)的聚合酶X描述为一种具有缺口修复功能的高度分散的酶。如实施例2中所示,全L聚合酶X及其变体已示出在缺口化底物上进行各引发之后仅催化极少的核苷酸并入。这里,我们公开了一种允许使用全L聚合酶X和变体来合成更长DNA的方法,且示出83-聚体链的完全聚合。

[0313] 5.1引物-模板底物

[0314] 已使用引物-模板复合物来测试全L聚合酶X及其变体的活性。还使用同一复合物来测试全L聚合酶X的变体V80G和V80A。

[0315] 无缺口引物-模板复合物的D-寡核苷酸列表:

名称	长度, nt	构型	序列(5'→3')
[0316] MJ_1_33_DD	19	D	Atto532-GGAGCTCAGACTGGCACGC
MJ_1_1_DD	83	D	GTGGAACCGACAACCTTGTGCTGCGTCCAGCATAAGAAAGGAG CTCCCTCAGAAGAAGCTGCGCAGCGTGCCAGTCTGAGCTCC

[0317] 通过将由83个核苷酸组成的模板链DNA寡核苷酸(MJ\_1\_1\_DD)与由19个核苷酸组成的DNA寡核苷酸退火来制备底物。在NOXXON上合成寡核苷酸。寡核苷酸MJ\_1\_33\_DD携带荧光染料Atto-532(AttoTec,Siegen,Germany)。在10mM Tris-HCl、5mM MgCl<sub>2</sub>(pH8.0)中通过在65°C下加热10分钟且缓慢冷却进行退火。图10A中描绘了引物-模板复合物。

[0318] 5.2在恒温下反应

[0319] 在活性测定中,将全L聚合酶X或全L聚合酶X的变体V80G或V80A与D构型的引物-模板复合物组合。典型的6μl测定含有50nM底物复合物、至多1.3ng/μl全L聚合酶X或全L聚合酶X的变体V80G或V80A、8μM每种D-dNTP和缓冲液(50mM Tris-HCl、10mM MgCl<sub>2</sub>、4%甘油、0.1mg/ml牛血清白蛋白(BSA)(pH 7.5))。D-dNTP是购自Rovalab(Teltow,Germany)。对于Pol-X样品,在37°C下的孵育时间是30分钟。作为阴性对照,还在无任何全L聚合酶X或全L聚合酶X变体V80G或V80A和无脱氧核苷三磷酸(D-dNTP)的情况下孵育底物。利用以0.083U/μl最终浓度使用的Taq聚合酶(Invitrogen,Karlsruhe,Germany)在由制造商供应的Taq缓冲液中进行阳性对照。在60°C下将Taq样品孵育30分钟。将整个测定体积与样品缓冲液/染料混合,且在变性凝胶上分离。使用BioRad Fx磷相仪系统读取凝胶。

[0320] 全L聚合酶X或全L聚合酶X变体V80G或V80A是活性的,但不能完成完整83-聚体模板的聚合。Taq聚合酶阳性对照示出83-聚体模板完全聚合,参见图10B。

[0321] 5.3在热循环条件下的反应

[0322] 假定在引发之后全L聚合酶X催化仅一个核苷酸并入且然后暂停,同时停留在DNA底物上,那么我们进行重复热脉冲(50°C,2分钟)以便允许全L聚合酶X与模板解离和再缔合。通过使用这个重复热循环程序,我们能够进行83-聚体与全L聚合酶X的完全聚合。如上文针对恒温所描述来设定反应和对照,但全L聚合酶X样品的温度分布示出如下运行:

[0323] 5至25个(在20°C下30分钟//在50°C下2分钟)的循环

[0324] 然后是在20°C下30分钟的最后步骤。

[0325] 据观察,类似于阳性对照,从15个循环向前,全L聚合酶X能够使完整83-聚体模板

链聚合,参见图10C。

[0326] 实施例6-用由D-氨基酸组成的合成聚合酶X变体进行引物延伸

[0327] 本实施例中所公开的方法使用L-构型的底物来测试全D构型的聚合酶。

[0328] 6.1引物-模板底物

[0329] 无缺口的引物-模板复合物的L-寡核苷酸列表:

名称	长度, nt	构型	序列(5'→3')
[0330] MJ_1_109_MD	21	前两个 = D,其它 = L	D(GG)-L(GGAGCTCAGACTGGCACGC)
MJ_1_105_LD	83	L	GTGGAACCGACAACCTTGTGCTGCGTCCAGCATAAGAAAGGAG CTCCCTCAGAAGAAGCTGCGCAGCGTGCCAGTCTGAGCTCC

[0331] 通过将83-聚体下链DNA寡核苷酸与19-聚体上链DNA寡核苷酸退火来制备底物。在NOXXON的自有设备上合成呈L-构型的寡核苷酸。在退火之前,通过标准激酶反应,采用 $\gamma$ - $^{32}$ P-三磷酸腺苷(ATP)和T4多核苷酸激酶将21-聚体上链寡核苷酸MJ\_1\_109\_MD在其5'端用 $^{32}$ P进行放射性标记。为了促进L-寡核苷酸MJ\_1\_109\_MD的激酶反应,在寡核苷酸合成期间,在5'端添加两个D构型的鸟苷碱基。在10mM Tris-HCl、5mM MgCl<sub>2</sub>(pH 8.0)中通过在65℃下加热10分钟且缓慢冷却进行退火。通过在NAP柱(GE healthcare, Freiburg, Germany)上纯化来去除未并入的 $\gamma$ - $^{32}$ P-ATP。

[0332] 6.2在恒温下的反应

[0333] 在活性测定中,将合成的全D聚合酶X变体V80A与L构型的引物-模板复合物组合。典型的6 $\mu$ l测定含有50nM底物复合物、至多1.3ng/ $\mu$ l全D聚合酶X变体、8 $\mu$ M每种L-dNTP和缓冲液(50mM Tris-HCl、10mM MgCl<sub>2</sub>、4%甘油、0.1mg/ml牛血清白蛋白(BSA)(pH7.5))。L-dNTP是购自Rasayan, Inc. (Encinitas, CA, USA)。在37℃下的孵育时间至少是30分钟。作为阴性对照,还在无任何聚合酶和无脱氧核苷三磷酸(L-dNTP)的情况下孵育所述底物。将整个测定体积与样品缓冲液/染料混合,且在变性凝胶上分离。使用BioRad Fx磷相仪系统读取凝胶。

[0334] 合成的全D聚合酶X变体V80A在这个条件下具有活性,但类似于全L聚合酶X对应物,不能够使完整的83核苷酸模板链聚合。

[0335] 6.3在热循环条件下的反应

[0336] 类似于实施例5,使用重复热循环程序以允许83-聚体L-底物与全D聚合酶X变体V80A完全聚合。如上文针对恒温所描述来设定反应和对照,但温度分布示出如下运行:

[0337] 5至25个(在20℃下30分钟//在50℃下2分钟)的循环

[0338] 然后是在20℃下30分钟的最后步骤。

[0339] 可以观察到,当使用热循环延伸时,类似于全L聚合酶X对应物,全D聚合酶X变体V80A能够使完整的83-聚体模板链聚合。

[0340] 实施例7-全部由L-氨基酸组成的聚合酶Dpo4和聚合酶Dpo4的变体的重组表达和纯化

[0341] 最初是在硫磺矿硫化叶菌(缩写Sso)中发现了聚合酶Dpo4(Boudsocq, 2001)。野生型基因具有1,059个碱基对(包括起始密码子和终止密码子)的开放阅读框(缩写ORF)。所编码的蛋白质的长度为352个氨基酸。本实施例描述了如何在大肠杆菌中表达和使用Strep-Tag纯化聚合酶Dpo4和聚合酶Dpo4的变体。

## [0342] 7.1表达构建体

[0343] 由于Sso的密码子用法不同于大肠杆菌,故从GeneArt AG (Regensburg, Germany) 购买野生型Sso聚合酶Dpo4的经大肠杆菌密码子优化的合成基因。合成基因序列提供于pENTRY-IBA10载体(来源公司:IBA GmbH, **Göttingen**, Germany)中。包括起始密码子但不包括终止密码子的经密码子优化的开放阅读框具有以下序列:

[0344]

```
ATGATTGTGCTGTTTGTGGATTTTATTATTTTTATGCCAGGTGGAAGAAGTTCTGAATCCGAGCCTGAAAGGTAA
ACCGGTTGTTGTTTGTGTTTTAGCGGTGCGTTTGAAGATAGCGGTGCAGTTGCAACCGCCAATTATGAAGCCCCTA
AATTTGGTGTAAAGCCGCTATTCCGATTGTTGAAGCCAAAAAATTCTGCCGAATGCAGTTTATCTGCCGATGCGC
AAAGAAGTTTATCAGCAGGTTAGCAGCCGTATTATGAATCTGCTGCGCAATATAGCGAAAAAATTGAAATTGCCAG
CATTGATGAAGCCTATCTGGATATTAGCGATAAAGTGCAGGATTATCGCGAAGCATATAATCTGGGCCTGGAAATTA
AAAATAAAATCCTGGAAAAAGAAAAAATTACCGTGACCGTGGGCATTAGCAAAAATAAAGTGTGGCCAAAATTGCA
GCAGATATGGCAAAACCGAATGGCATTAAAGTGATTGATGATGAAGAAGTAAACGTCTGATTTCGCGAACTGCATAT
TGCAGATGTTCCGGGTATTGGCAATATTACCGCAGAAAACTGAAAAACTGGGCATTAATAAACTGGTTGATACCC
TGAGCATTGAATTTGATAAACTGAAAGGCATGATTGGTGAAGCGAAAGCCAAATATCTGATTAGCCTGGCACGTGAT
GAATATAATGAACCGATTTCGTACCCGTGTTTCGTAAAAGCATTGGTTCGTATTGTGACCATGAAACGCAATAGCCGTAA
TCTGGAAGAAATTAACCGTACCTGTTTCGTGCAATTGAAGAAAGCTATTATAAACTGCATAAACGCATTCCGAAAG
CCATTCATGTTGTTGCAGTTACCGAAGATCTGGATATTGTTAGCCGTGGTTCGTACCTTCCGCATGGTATTAGCAAA
GAAACCGCCTATAGCGAAAGCGTTAAACTGCTGCAGAAAATCCTGGAAGAAGATGAACGTAAAATTCGTTCGTATTGG
TGTGCGCTTTAGCAAATTTATTGAAGCCATTGGGCTGGATAAAATTTTTTGATACC.
```

[0345] 为了获得聚合酶Dpo4(也称为全L聚合酶Dpo4)的表达构建体,使用市售StarGate克隆试剂盒(IBA GmbH)将所述基因从pENTRY-IBA10亚克隆到pASG-IBA5载体(IBA GmbH, **Göttingen**, Germany)中。亚克隆添加Strep-Tag II到N末端且添加终止密码子到C末端,并且使所述基因在tet启动子控制之下。将所述构建体命名为pMJ343且用于在大肠杆菌中表达全L聚合酶Dpo4。由pMJ343表达的全L聚合酶Dpo4具有以下368个氨基酸的序列:

[0346]

```
MASAWSHPQFEKSGMIVLFDYFYAQVEEVLNPSLKGKPVVVCVFSGRFEDSGAVATANYEARFKFGVKAGIPIVE
AKKILPNAVYLPMPKEVYQQVSSRIMNLLREYSEKIEIASIDEAYLDISDKVRDYREAYNLGLEIKNKILEKEKITV
TVGISKNKVFAKIAADMAKPNGIKVTDDEEVKRLIRELDIADVPGIGNITAEKLLKLGINKLVDTLSEFDKLGMI
GEAKAKYLISLARDEYNEPIRTRVRKSIGRIVTMKRNSRNLEEIKPYLFRAIEESYYKLDKRIPKAIHVAVTEDLD
IVSRGRTFPHGISKETAYSESVKLLQKILEEDERKIRRIGVRFKFI EAIGLDKFFDTGS.
```

[0347] 初始的14个氨基酸代表包括几个间隔氨基酸的Strep-Tag II,最后的2个氨基酸代表间隔氨基酸,且中间的352个氨基酸部分与如在Sso中发现的聚合酶Dpo4序列一致。

[0348] 使用市售QuikChange试剂盒(Stratagene GmbH, Waldbronn, Germany),根据制造商的方案制备全L聚合酶Dpo4的变体的表达构建体。质粒pMJ343充当模板。QuikChange所需的寡核苷酸是在NOXXON上合成(QC\_38\_上、QC\_38\_下、QC\_39\_上、QC\_39\_下、QC\_40\_上、QC\_40\_下)或从Purimex (Gebenstein, Germany) 购买(QC\_28\_上、QC\_28\_下、QC\_29\_上、QC\_29\_下、QC\_30\_上、QC\_30\_下)。

[0349] 制备以下变体表达构建体且用于在大肠杆菌中表达全L聚合酶Dpo4的变体

变体	构建体	用于QuikChange突变形程序的寡核苷酸
A155C	pMJ361	QC_28_上. (5' CAAAAATAAAGTGTGGCCAAAATTGCATGCGATATGGCAAAACCG AATGGCATTAAAG 3') QC_28_下 (5' CTTTAATGCCATTTCGGTTTTGCCATATCGCATGCAATTTTGGCAA CACTTTATTTTGG 3')
V203C	pMJ362	QC_29_上 (5' TGAAAAAAGTGGGCATTAATAAACTGTGTGATACCCCTGAGCATTGA ATTG 3') QC_29_下 (5' CAAATTC AATGCTCAGGGTATCACAGCTTATTAATGCCAGTTT TTCA 3')
C31S	pMJ363	QC_30_上 (5' TGAAAGGTAAACCGGTTGTTTCTGTTTTAGCGGTC 3') QC_30_下 (5' GACCGCTAAAAACAGAAACAACACCGGTTTACCTTTCA 3')
A155C + V203C	pMJ365	QC_28_上 QC_28_下 QC_29_上 QC_29_下
S85C	pMJ502	QC_38_上 (5' ATGCGCAAAGAAGTTTATCAGCAGGTTTGTAGCCGTATTATGAATC 3') QC_38_下 (5' GATTCATAATACGGCTACAAACCTGCTGATAAACTTCTTTGGGCAT -3')
S86C	pMJ503	QC_39_上 (5' AAGTTTATCAGCAGGTTAGCTGCTGATTATGAATCTGCTGCG 3') QC_39_下 (5' CGCAGCAGATTCATAATACGACAGCTAACCTGCTGATAAACTT 3')
S96C	pMJ504	QC_40_上 (5' ATTATGAATCTGCTGCGCAATATTGTGAAAAAATTGAAATTGCCA GCATT 3') QC_40_下 (5' AATGCTGGCAATTTCAATTTTTTCAATATTTCGCGCAGCAGATTC ATAAT 3')

[0351] 7.2大肠杆菌中的蛋白质表达

[0352] 使用表达构建体pMJ343在大肠杆菌中表达全L聚合酶Dpo4。由pMJ361、pMJ362、pMJ363、pMJ365、pMJ502、pMJ503或pMJ504表达全L聚合酶Dpo4的突变变体。对于表达来说，使用‘转化和储存溶液’(Epicentre/Biozym, Hessisch Oldendorf, Germany)在大肠杆菌菌株‘NEB express’(New England Biolabs, Frankfurt am Main, Germany)中转化适当的表达构建体且用抗生素氨基青霉素来维持。在30℃下，使用200ng/ml脱水四环素(IBA GmbH, Göttingen, Germany)作为诱导剂在培养基‘EnBase Flo’或‘EnPresso’(BioSilta, Oulu, Finland)中表达48小时。通过离心收集细胞且储存在-80℃下或立即处理。

[0353] 7.3蛋白质纯化

[0354] 将新鲜的或冷冻的大肠杆菌细胞再悬浮在冰上的‘缓冲液W’(100mM Tris-HCl (pH 8.0)、150mM NaCl、1mM EDTA)中且使用‘French Press’(G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd, Germany)细胞破坏剂溶解。在4℃下，在装备有5ml StrepTrap HP柱的‘ÄKTA Express’系统(GE healthcare, Freiburg, Germany)上进行纯化。利用包括2.5mM脱巯生物素(IBA GmbH, Göttingen, Germany)的缓冲液W进行洗脱步骤。使用SDS-PAGE(Invitrogen, Karlsruhe, Germany)分析级分，合并，且在需要时用阴离子交换色谱在装备有‘Q HP’柱(GE healthcare, Freiburg, Germany)的‘ÄKTA纯化器’系统上进行进一步纯化。利用LC-MS质

谱法证实蛋白质同一性且合并准确的级分,浓缩并且使用10,000的分子量截断值(MWCO)的VivaSpin 15R浓缩装置(VivaSciences/Sartorius Stedim Biotech, **Göttingen**, Germany)进行再缓冲。将经过纯化的蛋白质储存在由100mM KCl、10mM Tris-HCl (pH7.4)、0.1mM EDTA、1mM DTT、50%甘油组成的-20℃缓冲液中。通过凝胶密度测量术,在SDS-PAGE上使用牛血清白蛋白(缩写BSA)标准物且用SYPRO Red (Invitrogen, Karlsruhe, Germany)染色来估计蛋白质浓度。

[0355] 实施例8-由两个片段组成的合成聚合酶Dpo4的产生

[0356] 全L聚合酶Dpo4的长度是352个氨基酸。为了以化学方式产生全L聚合酶Dpo4,必须由可通过固相肽合成来合成的较短片段组装所述合成的全L聚合酶Dpo4,其中所述较短片段必须通过诸如天然化学连接等肽连接法来连接。本实施例描述了如何在大肠杆菌中表达Dpo4的连接片段1-154、155-352、155-202和203-352、纯化和通过天然化学连接而彼此连接以产生合成的全L聚合酶Dpo4。

[0357] 8.1表达构建体

[0358] 如实施例7中所公开,已经获得了呈来自于商业来源的合成基因构建体(GeneArt, Regensburg, Germany)形式的全L聚合酶Dpo4的基因。本实施例的所有片段都是基于那个经密码子优化的序列进行克隆。针对全L聚合酶Dpo4变体A155C的片段1-154、155-352、155-202和203-352制备了以下表达构建体:

Dpo4的片段(氨基酸范围)	表达构建体
1-154- 硫酯	pMJ370
155-352 含有A155C突变	pMJ384
203-352 含有A155C突变	pMJ385
155-202 硫酯	pMJ388

[0359] [0360] 8.1.1全L聚合酶Dpo4变体A155C的片段1-154-硫酯-表达构建体pMJ370

[0361] 这个构建体依序含有全L聚合酶Dpo4变体A155C的片段1-154和用于产生硫酯的Mxe GyrA内含肽,和壳多糖结合域(CBD)。所述构建体是由两种PCR产物组装。使用pMJ343作为模板且使用引物MJ\_1\_90\_DD(5'-磷酸-AGCGGCTCTTCGATGATTGTGCTGTTTGTGGATTTT-3')和MJ\_1\_91\_DD(5'-磷酸-AGCGGCTCTTCGGCATGCAATTTTGGCAAACACTTT-3')制备PCR产物1以扩增全L聚合酶Dpo4变体A155C的片段1-154。使用pTWIN1(New England Biolabs, Frankfurt am Main, Germany)作为模板且使用引物MJ\_1\_72\_DD(5'-磷酸-AGCGGCTCTTCGTGCATCACGGGAGAT-3')和MJ\_1\_73\_DD(5'-磷酸-AGCGGCTCTTCGCCCTTGAAGCTGCCACAAGGCAGGAACGTT-3')制备PCR产物2以扩增Mxe Gyr A内含肽和CBD。引物MJ\_1\_90\_DD和MJ\_1\_91\_DD是购自Purimex(Grebenstein, Germany),而引物MJ\_1\_72\_DD和MJ\_1\_73\_DD是得自于IBA GmbH(**Göttingen**, Germany)。在快速凝胶系统(LONZA, Basel, Switzerland)上对两种PCR产物进行凝胶纯化,且使用StarGate Mutagenesis ENTR Y克隆试剂盒(IBA GmbH, **Göttingen**, Germany)一起克隆在pENTR Y-

IBA20中以产生pMJ366。使用StarGate Transfer克隆试剂盒 (IBA GmbH, **Göttingen**, Germany) 从pMJ366亚克隆在pASG-IBAw1 (IBA GmbH, **Göttingen**, Germany) 中产生了pMJ370。构建体pMJ370编码全L聚合酶Dpo4变体A155C的片段1-154-硫酯,其具有长度为154个氨基酸的以下蛋白质序列(在内含肽裂解/硫酯产生之后):

[0362]

MIVLFDYDFYFAQVEEVLNPSLKGKPVVVCVFSGRFEDSGAVATANYEARFKFGVKAGIPIVEAKKILPNAVYLP  
MRKEVYQQVSSRIMNLLREYSEKIEIASIDEAYLDISDKVRDYREAYNLGLEIKNKILEKEKITVTVGISKNKVFAKIA  
-硫酯。

[0363] 8.1.2全L聚合酶Dpo4变体A155C的片段155-352-表达构建体pMJ384

[0364] 这个构建体依序含有‘Profinity eXact’标签和全L聚合酶Dpo4变体A155C的片段155-352。‘Profinity eXact’标签是用于纯化和蛋白水解裂解。所述构建体是由两种PCR产物组装。使用pPAL7 (Bio-Rad, München, Germany) 作为模板且使用引物MJ\_1\_99\_DD (5’-磷酸-AGCGGCTCTTCGATGGGAGGGAAATCAAACGGGGAA-3’) 和MJ\_1\_100\_DD (5’-磷酸-AGCGGCTCTTCGGCACAAAGCTTTGAAGAGCTTGTC-3’) 制备PCR产物1以扩增‘Profinity eXact’标签。使用pMJ361作为模板且使用引物MJ\_1\_96\_DD (5’-磷酸-AGCGGCTCTTCGTGCGATATGGCAAA  
CCGAATGGCATTAAA-3’) 和MJ\_1\_97\_DD (5’-磷酸-AGCGGCTCTTCGCCCTTAGGTATCAAAAAATTTATCC  
AGG-3’) 制备PCR产物2以扩增含有A155C突变的dpo4片段155-352。引物MJ\_1\_96\_DD、MJ\_1\_97\_DD、MJ\_1\_99\_DD和MJ\_1\_100\_DD都来自于Purimex (Gebenstein, Germany)。在快速凝胶系统 (LONZA, Basel, Switzerland) 上对2种PCR产物进行凝胶纯化,且使用StarGate Mutagenesis ENTRY克隆试剂盒 (IBA GmbH, **Göttingen**, Germany) 一起克隆在pENTRY-IBA20中以产生pMJ382。使用StarGate Transfer克隆试剂盒 (IBA GmbH, **Göttingen**, Germany) 从pMJ382亚克隆在pASG-IBA5 (IBA GmbH, **Göttingen**, Germany) 中产生了pMJ384。构建体pMJ384编码含有突变A155C的全L聚合酶Dpo4的片段155-352,其具有长度为198个氨基酸的以下蛋白质序列(在蛋白水解裂解之后):

[0365]

CDMAKPNGIKVIDDEEVKRLIRELDIADVPGIGNITAELKKGINKLVDTLSEFDKLGKMGIEAKAKYLISLARD  
EYNEPIRTRVRKSIGRIVTMKRNSRNLEEIKPYLFRAIEESYKLDKRIPKAIHVAVTEDLDIVSRGRTFPHGISK  
ETAYSESVKLLQKILEEDERKIRRIGVRFKSFIEAIGLDKFFDT.

[0366] 8.1.3全L聚合酶Dpo4变体A155C的片段203-352-表达构建体pMJ385

[0367] 这个构建体依序含有‘Profinity eXact’标签和含有突变V203C的dpo4片段203-352。‘Profinity eXact’标签是用于纯化和蛋白水解裂解。所述构建体是由两种PCR产物组装。使用pPAL7 (Bio-Rad, München, Germany) 作为模板且使用引物MJ\_1\_99\_DD (5’-磷酸-AGCGGCTCTTCGATGGGAGGGAAATCAAACGGGGAA-3’) 和MJ\_1\_100\_DD (5’-磷酸-AGCGGCTCTTCGGCACAAAGCTTTGAAGAGCTTGTC-3’) 制备PCR产物1以扩增‘Profinity eXact’标签。使用pMJ362作为模板且使用引物MJ\_1\_98\_DD (5’-磷酸-AGCGGCTCTTCGTGTGATACCCTGAGC  
ATTGAATTT-3’) 和MJ\_1\_97\_DD (5’-磷酸-AGCGGCTCTTCGCCCTTAGGTATCAAAAAATTTATCCAGG-  
3’) 制备PCR产物2以扩增含有V203C突变的dpo4片段203-352。引物MJ\_1\_97\_DD、MJ\_1\_98\_

DD、MJ\_1\_99\_DD和MJ\_1\_100\_DD都来自于Purimex (Grebenstein, Germany)。在快速凝胶系统 (LONZA, Basel, Switzerland) 上对2种PCR产物进行凝胶纯化, 且使用StarGate Mutagenesis ENTRY克隆试剂盒 (IBA GmbH, **Göttingen**, Germany) 一起克隆在pENTRY-IBA20中以产生pMJ383。使用StarGate Transfer克隆试剂盒 (IBA GmbH, **Göttingen**, Germany) 从pMJ383亚克隆在pASG-IBA5 (IBA GmbH, **Göttingen**, Germany) 中产生了pMJ385。构建体pMJ385编码dpo4片段203-352 V203C, 其具有长度为150个氨基酸的以下蛋白质序列 (在蛋白水解裂解之后):

[0368] CDTLSIEFDKLGKMGIEAKAKYLLISLARDEYNEPIRTRVRKLSIGRIVTMKRNRSNLEEIKPYLFRAIEE  
SYKLDKRIKAIHVAVTEDLDIVSRGRTFPHGISKETAYSESVKLLQKILEEDERKIRRIGVRFSEKFIKGLDK  
FFDT

[0369] 8.1.4全L聚合酶Dpo4的片段155-202-表达构建体pMJ388

[0370] 这个构建体依序含有dpo4片段155-202和用于产生硫酯的Mxe GyrA内含肽, 和壳多糖结合域 (CBD)。所述构建体是由两种PCR产物组装。使用pMJ343作为模板且使用引物MJ\_1\_101\_DD (5'-磷酸-AGCGGCTCTTCGATGGCAGATATGGCAAACCGAAT-3') 和MJ\_1\_102\_DD (5'-磷酸-AGCGGCTCTTCGGCACAGTTTATTAATGCCAGTTT-3') 制备PCR产物1以扩增dpo4155-202片段。使用pTWIN1 (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Germany) 作为模板且使用引物MJ\_1\_72\_DD (5'-磷酸-AGCGGCTCTTCGTGCATCACGGGAGAT-3') 和MJ\_1\_73\_DD (5'-磷酸-AGCGGCTCTTCGCCCTTGAAGCTGCCACAAGGCAGGAACGTT-3') 制备PCR产物2以扩增Mxe Gyr A内含肽和CBD。引物MJ\_1\_101\_DD和MJ\_1\_102\_DD是购自Purimex (Grebenstein, Germany), 而引物MJ\_1\_72\_DD和MJ\_1\_73\_DD是来自于IBA GmbH (**Göttingen**, Germany)。在快速凝胶系统 (LONZA, Basel, Switzerland) 上对2种PCR产物进行凝胶纯化, 且使用StarGate Mutagenesis ENTRY克隆试剂盒 (IBA GmbH, **Göttingen**, Germany) 一起克隆在pENTRY-IBA20中以产生pMJ386。使用StarGate Transfer克隆试剂盒 (IBA GmbH, **Göttingen**, Germany) 从pMJ386亚克隆在pASG-IBAw1 (IBA GmbH, **Göttingen**, Germany) 中产生了pMJ388。构建体pMJ388编码dpo4片段155-202, 其具有长度为48个氨基酸的以下蛋白质序列 (在大肠杆菌介导的初始甲硫氨酸裂解之后和在内含肽裂解/硫酯产生之后):

[0371] ADMAKPNGIKVIDDEEVKRLIRELDIADVPGIGNITAEKLLKLGINKL-硫酯

[0372] 8.2大肠杆菌中的蛋白质表达

[0373] 对于表达来说, 使用‘转化和储存溶液’ (Epicentre/Biozym, Hessisch Oldendorf, Germany) 在大肠杆菌菌株‘NEB express’ (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Germany) 中转化适当的表达构建体且用抗生素氨苄青霉素来维持。在环境温度下, 使用200ng/ml脱水四环素 (IBA GmbH, **Göttingen**, Germany) 作为诱导剂在培养基‘EnBase Flo’ 或‘EnPresso’ (BioSilta, Oulu, Finland) 中表达过夜。通过离心收集细胞且储存在-80℃下或立即处理。

[0374] 8.3由具有Mxe Gyr A内含肽的构建体pMJ370和pMJ388纯化和产生硫酯

[0375] 将新鲜的或冷冻的大肠杆菌细胞再悬浮在冰上的‘柱缓冲液’ (20mM HEPES (pH

8.5)、500mM NaCl) 中且使用 ‘French Press’ (G.Heinemann, **Schwäbisch** Gmünd, Germany) 细胞破坏剂溶解。在4℃下,在装备有含有结合壳多糖的珠粒 (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Germany) 的柱的 ‘**ÄKTA Express**’ 系统 (GE healthcare, Freiburg, Germany) 上进行纯化。在应用细胞溶解物 and 用柱缓冲液洗涤直到基线之后,在4℃下将柱与 50mM 2-巯基乙烷磺酸酯 (缩写MESNA) 一起在柱缓冲液中孵育20小时以诱导内含肽介导的蛋白质裂解和硫酯形成。用柱缓冲液从柱中洗出携带硫酯的裂解蛋白质,浓缩且使用 BioGel P60培养基材料 (BioRad, München, Germany) 在由5mM Bis-Tris (pH 6.5)、250mM NaCl组成的缓冲液中进行凝胶过滤。通过凝胶密度测量术,在SDS-PAGE上使用牛血清白蛋白 (BSA) 标准物且用SYPRO Red (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) 染色来估计蛋白质浓度。利用LC-MS质谱法证实蛋白质同一性和硫酯的存在。

#### [0376] 8.4由具有 ‘Profinity eXact’ 标签的构建体pMJ384纯化和蛋白水解裂解

[0377] 如下进行由pMJ384纯化全L聚合酶Dpo4变体A155C的片段155-352:将新鲜的或冷冻的大肠杆菌细胞再悬浮在冰上的 ‘缓冲液W’ (100mM Tris-HCl (pH 8.0)、150mM NaCl、1mM EDTA) 中且使用 ‘French Press’ (G.Heinemann, **Schwäbisch** Gmünd, Germany) 细胞破坏剂溶解。在4℃下,在装备有5ml StrepTrap HP柱的 ‘**ÄKTA Express**’ 系统 (GE healthcare, Freiburg, Germany) 上进行纯化。利用包括2.5mM脱巯生物素 (IBA GmbH, **Göttingen**, Germany) 的缓冲液W进行洗脱步骤。使用HiPrep 26/10脱盐柱 (GE healthcare, Freiburg, Germany) 在 ‘Profinity eXact洗脱缓冲液’ (0.1M磷酸钠 (pH 7.2)、0.1M NaF) 中对洗脱的蛋白质进行缓冲液交换,然后缓慢泵送通过Profinity eXact柱。浓缩样品,补充Tris (2-羧乙基) 膦 (TCEP) 到1mM最终浓度且使用HiLoad 16/60 Superdex 75制备级柱 (GE healthcare, Freiburg, Germany) 应用于凝胶过滤,在由5mM Bis-Tris (pH 6.5)、250mM NaCl组成的缓冲液中显色。浓缩蛋白质且储存在-80℃下。通过凝胶密度测量术,在SDS-PAGE上使用牛血清白蛋白 (BSA) 标准物且用SYPRO Red (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) 染色来估计蛋白质浓度。利用LC-MS质谱法证实蛋白质同一性。

#### [0378] 8.5由具有 ‘Profinity eXact’ 标签的构建体pMJ385纯化和蛋白水解裂解

[0379] 如下进行由pMJ385纯化dpo4片段203-352V203C:如 ‘i-FOLD Protein再折叠系统’ 手册 (Novagen/Merck-Millipore, Darmstadt, Germany) 中所描述制备包涵体和使其变性。使用Sephadex G-25精细材料 (GE healthcare, Freiburg, Germany) 在 ‘缓冲液W’ (100mM Tris-HCl (pH 8.0)、150mM NaCl、1mM EDTA) 中对溶液化的蛋白质进行缓冲液交换,且在4℃下在装备有StrepTrap HP柱的 ‘**ÄKTA Express**’ 系统 (GE healthcare, Freiburg, Germany) 上纯化。利用包括2.5mM脱巯生物素 (IBA GmbH, **Göttingen**, Germany) 的缓冲液W进行洗脱步骤。向洗脱的蛋白质溶液补充NaF达到最终浓度0.1M和三 (2-羧乙基) 膦 (TCEP) 达到最终浓度1mM,然后缓慢泵送通过Profinity eXact柱。用去离子水对通过的流体进行1:3稀释且使用HCl将pH值调节到7.2。通过阳离子交换色谱法,使用在 ‘Buffer A’ (50mM磷酸钠 (pH 7.2)、1mM 2-巯基乙醇) 中平衡的HiTrap SP HP柱 (GE healthcare, Freiburg, Germany) 进一步纯化样品。使用17%、25%和100% ‘缓冲液B’ (50mM磷酸钠 (pH 7.2)、1M NaCl、1mM 2-巯基乙醇) 进行洗脱步骤。合并级分,浓缩且使用HiLoad 16/60 Superdex 75

制备级柱(GE healthcare, Freiburg, Germany)应用于凝胶过滤,在去离子水中显色。在液氮中快速冷冻蛋白质且冻干。通过凝胶密度测量术,在SDS-PAGE上使用牛血清白蛋白(BSA)标准物且用SYPRO Red (Invitrogen, Karlsruhe, Germany)染色来估计蛋白质浓度。利用LC-MS质谱法证实蛋白质同一性。

[0380] 8.6通过片段1-154-硫酯和155-352的天然化学连接来合成合成的全L聚合酶Dpo4变体A155C

[0381] 将全L聚合酶Dpo4变体A155C的片段1-154-硫酯和155-352溶解于含有2% Triton X100、1%苯硫酚和5mM三(2-羧乙基)膦盐酸盐的50 $\mu$ M TRIS缓冲液(pH 8.6)中。在室温下将反应混合物振荡72小时。之后,利用SDS-PAGE(图11A)和LC-ESI质谱法(RP18柱,梯度ACN+0.1%TFA的水溶液+0.1%TFA,20分钟内5%到95%,图11B)分析连接成功率。在41kDa左右的泳道中发现了清楚的条带,表明全长聚合酶。如ESI-MS所示,理论分子量( $M_{理论}=40223\text{Da}$ )与实测分子量( $M_{实测}=40265\text{Da}$ )相对应。

[0382] 8.7通过片段155-202-硫酯和203-352的天然化学连接来合成片段155-352

[0383] 将全L聚合酶Dpo4的片段155-202-硫酯和203-352 V203C溶解于含有2% SDS、1%苯硫酚和5mM三(2-羧乙基)膦盐酸盐的0.2M TRIS缓冲液(pH 8.6)中。在室温下将反应混合物振荡72小时。利用SDS-PAGE(图20A)和LC-ESI质谱法(RP18柱,梯度ACN+0.1%TFA的水溶液+0.1%TFA,20分钟内5%至95%,图20B)分析连接成功率。在21.5kDa左右的泳道7中发现了表明连接产物的清楚的条带。如ESI-MS所示,理论分子量( $M_{理论}=22749\text{Da}$ )与实测分子量( $M_{实测}=22769\text{Da}$ )相对应。

[0384] 实施例9-由L-氨基酸组成的聚合酶Dpo4和聚合酶Dpo4的变体的活性证实

[0385] 本实施例描述了根据实施例7的全L聚合酶Dpo4和全L聚合酶Dpo4的变体和根据实施例8的合成全L聚合酶Dpo4的PCR活性测试。

[0386] 9.1用于PCR活性测定的模板

[0387] 用于PCR反应的模板是83聚体单链D-DNA寡核苷酸(MJ\_1\_1\_DD),在第一个热循环中,由此制备相对链。此后,两条链都充当指数扩增的模板。在NOXXON上合成呈D-构型的模板DNA寡核苷酸和DNA引物。

[0388] 用于PCR活性测定的寡核苷酸列表:

名称	长度, nt	序列(5'→3')
MJ_1_1_DD	83	GTGGAACCGACAACCTTGTGCTGCGTCCAGCATAA GAAAGGAGCTCCCTCAGAAGAAGCTGCGCAGCGT GCCAGTCTGAGCTCC
DE4.40T7	38	TCTAATACGACTCACTATAGGAGCTCAGACTGGCA CGC
DE4.40R	20	GTGGAACCGACAACCTTGTGC

[0390] 9.2 PCR反应

[0391] 15 $\mu$ l PCR反应含有0.2mM四种D-dNTP中的每一种、10nM 83聚体ssDNA(MJ\_1\_1\_DD)模板、1 $\mu$ M正向引物和反向引物、1 $\times$ ThermoPol缓冲液(Invitrogen,20mM Tris-HCl、10mM KCl、10mM(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、2mM MgSO<sub>4</sub>、0.1%Triton X-100(pH 8.8)在25 $^{\circ}$ C下)和至少0.67ng/ $\mu$ l全L聚合酶Dpo4或全L聚合酶Dpo4变体或合成的全L聚合酶Dpo4。正向引物是DE4.40T7,反向引物是DE4.40R,产生长度为102个碱基对的PCR产物。D-dNTP是购自Rovalab(Teltow,

Germany)。通过省略全L聚合酶Dpo4或全L聚合酶Dpo4变体或合成的全L聚合酶Dpo4来进行阴性对照。使用市售的全L-dpo4(New England Biolabs, Frankfurt am Main, Germany)进行阳性对照。

[0392] 热循环程序由1个循环(85°C, 3分钟), 然后至少7个循环(85°C、30秒/56°C、1分钟/60°C、4分钟), 然后保持在4°C组成。将PCR反应的4μl等分试样与样品上样缓冲液混合且在TBE-PAGE上或琼脂糖凝胶(LONZA, Cologne, Germany)上进行分析。除了别的以外, 将含有100bp条带的DNA标准梯应用于凝胶。

### [0393] 9.3活性证实

[0394] 测试了全L聚合酶Dpo4、全L聚合酶Dpo4变体A155C、V203C、C31S、A155C/V203C、S85C、S86C、S96C和合成的全L聚合酶Dpo4。所有测试的聚合酶都能够在PCR反应中扩增模板链。图12A示出了对利用全L聚合酶Dpo4变体A155C、V203C、C31S、A155C/V203C进行的PCR反应的分析, 所有变体都示出与DNA标准梯相比在约100bp范围内的条带。预期的PCR产物大小是102个碱基对。所述条带未在省略了聚合酶的阴性对照中出现。此外, 所述102bp条带的迁移程度高于83聚体模板。图12B示出了对利用重组全L聚合酶dpo4和利用由片段连接制备的合成的全L聚合酶dpo4进行的PCR反应的分析。凝胶示出与DNA标准梯相比在约100bp范围内的条带。预期的PCR产物大小是102个碱基对。所述条带在省略了聚合酶的阴性对照中极弱。如当比较图12B的泳道2和3时可见, 重组全L聚合酶dpo4和合成的全L聚合酶dpo4示出相同的活性。

### [0395] 实施例10-由D-氨基酸组成的聚合酶Dpo4变体的合成

[0396] 在本实施例内, 描述了全D聚合酶Dpo变体A155C/V203C的合成。全D聚合酶Dpo变体A155C/V203C的氨基酸序列是Ac-MIVLFVDFDYFYAQVEEVLNPSLKGKPVVVCVFSGRFEDSGAVATANYEARKFGVKAGIPIVEAKKILPNAVYLPMPRKEVYQQVSSRIMNLLREYSEKIEIASIDEAYLDISDKVRDYREAYNLGLEIKNKILEKEKITVTVGISKKNVFAKIACDMAKPNGIKVIDDEEVKRLIRELDIADVPGIGNITAEKLLKLGINKLCDTLSEIFDKLKGMI GEAKAKYLISLARDEYN EPIRTRVRK SIGRIVTMKRNSRNLEEIKPYLFRAIEESYYKLDKRI PKAIHVAVTEDLDIVSRGRTFPHGISKETAYSESVKLLQKILEEDERKIRRIGVRF SKFIEAIGLDKFFDT-OH。

[0397] 所使用的所有氨基酸都根据固相肽合成Fmoc/tBu对策要求(Eric Atherton等, 1981)加以保护。所使用的所有氨基酸都是D-氨基酸(Bachem, Bubendorf, Switzerland)。

### [0398] 10.1 H-D-Met-OGp (Boc)<sub>2</sub>的合成

[0399] 将1mmol Z-D-Met-OH、0.9当量的TBTU和0.9mmol HO-Gp (Boc)<sub>2</sub>溶解于10ml DMF中。在加入2当量的DIPEA之后, 将溶液搅拌2小时。在蒸发溶剂之后, 利用快速色谱法使用DCM纯化粗产物。合并Z-D-Met-OGp (Boc)<sub>2</sub>的纯级分且蒸发溶剂。

[0400] 将Z-D-Met-OGp (Boc)<sub>2</sub>溶解于10ml MeOH中且用氩气冲洗。通过在2小时内加入Pd/C催化剂和H<sub>2</sub>来实现N末端Z-基团的水解裂解。过滤出H-D-Met-OGp (Boc)<sub>2</sub>之后, 在减压下蒸发MeOH。使用反相HPLC和质谱法进行分析。计算质量482Da与测定质量483Da一致。

### [0401] 10.2经完全保护的全D肽H-RTFPHGISKETAYSESVKLLQKILEEDERKIRRIGVRF SKFIEAIGLDKFFDT-NH<sub>2</sub> (1)的合成

[0402] 在Fmoc脱保护之后, 使用5当量的氨基酸、4.9当量的HATU和10当量的DIPEA在6ml NMP中保持45分钟使0.1mmol Fmoc-Sieber rink amide NovaSynTG树脂装载有Fmoc-D-Thr (tBu)-OH。

[0403] 使用ABI 433,利用FASTmoc方案进行自动化合成。使用含9当量的HATU和20当量的DIPEA的NMP使10当量的氨基酸活化。偶合时间是45分钟,且利用含20% (v/v) 哌啶的NMP进行三次Fmoc脱保护,历经7分钟。在偶合42个氨基酸之后进行双偶合。

[0404] 通过在10ml含1% (v/v) TFA的DCM中将肽基树脂孵育两次,历经2小时来实现经完全保护的肽酸的裂解。在过滤出肽之后,蒸发溶剂且使用冰冷的乙醚使残余物沉淀。分离并干燥沉淀的肽。

[0405] 利用HPLC和质谱法表征最终产物(图13)。产物的计算质量(6244Da)与测量质量(6249Da)相对应。

[0406] 10.3经完全保护的全D肽Boc-VDTLSIEFDKLGKMGIEAKAKYLI SLARDEYNEPIRTRVRK SIG RIVTMKRNSRNLEEIKPYLFRAIEESYYKLDKRIPKAIHVAVTEDLDIVSRG-OH (2) 的合成

[0407] 如Barlos等(Barlos等,1989)所描述使0.10mmol TentaGel-R-Trityl树脂装载有Fmoc-D-Gly-OH。因此,将0.10mmol树脂与0.6mmol亚硫酸氯一起孵育两次,历经30分钟,且随后用DCM洗涤。此后,在将树脂与6ml DCM中的0.6mmol Fmoc-Gly-OH、2.4mmol DIPEA一起孵育90分钟。然后,使用含10%MeOH (v/v)、10%DIPEA (v/v)的DCM溶液将树脂阻断三次,历经10分钟,且用DCM洗涤。使用ABI 433,利用FASTmoc方案进行自动化合成。使用含9当量的HATU和20当量的DIPEA的NMP使10当量的氨基酸活化。偶合时间是45分钟,且利用含20% (v/v) 哌啶的NMP进行三次Fmoc脱保护,历经7分钟。在偶合39个氨基酸之后进行双偶合。

[0408] 通过在10ml含30% (v/v) HFIP的DCM中将肽基树脂孵育两次,历经2小时来实现经完全保护的肽酸的裂解。在过滤出肽之后,蒸发溶剂且使用冰冷的乙醚使残余物沉淀。分离并干燥沉淀的肽。利用HPLC和质谱法表征最终产物(图14)。实验测定的产物质量(11289Da)与理论值(11286Da)一致。

[0409] 10.4通过肽1与肽2的片段缩合合成全D肽H-VDTLSIEFDKLGKMGIEAKAKYLI SLARDEYN EPIRTRVRK SIG RIVTMKRNSRNLEEIKPYLFRAIEESYYKLDKRIPKAIHVAVTEDLDIVSRGRTPHGISKETA YSESVKLLQKILEEDERKIRRIGVRF SKFIEAIGLDKFFDT-NH<sub>2</sub> (3)。

[0410] 将5 $\mu$ mol (2)和1当量的(1)溶解于含25% (v/v) TFE的DCM中。在加入5当量的PyBOP和10当量的DIPEA之后,将混合物搅拌过夜。在蒸发溶剂之后,使用冰冷的乙醚使肽沉淀并且过滤出来。

[0411] 利用含2.5%EDT、2.5%水、2.5%TIS的TFA来裂解肽的侧链保护基,历经2小时。在蒸发TFA之后,用冰冷的乙醚使肽沉淀。在C18柱上使用ACN/水梯度进行N末端经Fmoc保护的肽的反相HPLC纯化。合并含有产物的级分并且冷冻干燥。

[0412] 利用HPLC和质谱法表征最终产物(图15)。实验测定质量(17531Da)与理论分子量(17512Da)相对应。

[0413] 10.5全D肽Z-CDMAKPNGIKVIDDEEVKRLIRELDIADVPGIGNITAEKLLKLGINKL-苄基-硫酸酯 (4) 的合成

[0414] 如Barlos等(Barlos等,1989)所描述使0.10mmol TentaGel-R-Trityl树脂装载有Fmoc-D-Leu-OH。因此,将0.10mmol树脂与0.6mmol亚硫酸氯一起孵育两次,历经30分钟,且随后用DCM洗涤。此后,在6ml DCM中将树脂与0.6mmol Fmoc-D-Leu-OH、2.4mmol DIPEA一起孵育90分钟。然后,使用含10%MeOH (v/v)、10%DIPEA (v/v)的DCM溶液将树脂阻断三次,历经10分钟,且用DCM洗涤。使用ABI 433,利用FASTmoc方案进行自动化合成。使用含9当量的

HATU和20当量的DIPEA的NMP使10当量的氨基酸活化。偶合时间是45分钟,且利用含20% (v/v) 哌啶的NMP进行三次Fmoc脱保护,历经7分钟。

[0415] 通过在10ml含30% (v/v) HFIP的DCM中将肽基树脂孵育两次,历经2小时来实现经完全保护的肽酸的裂解。在过滤出肽之后,蒸发溶剂且使用冰冷的乙醚使残余物沉淀。分离并干燥沉淀的肽。

[0416] 将N末端Z-和完全经侧链保护的肽4以1mM溶解于DMF中。在加入5当量的PyBOP、10当量的DIPEA和30当量的苄基硫醇之后,将混合物搅拌4小时。然后蒸发DMF,使肽沉淀并且用冰冷的乙醚洗涤。通过用含2.5% EDT、2.5% 水、2.5% TIS的TFA处理2小时来去除侧链保护基。在蒸发TFA之后,使肽沉淀且用冰冷的乙醚洗涤。然后通过反相HPLC纯化肽-苄基-硫酯,且利用反相HPLC (图16A) 和ESI-MS (图16B) 进行分析。如ESI-MS所示,理论分子量 ( $M_{理论}=5527\text{Da}$ ) 与实测分子量 ( $M_{实测}=5533\text{Da}$ ) 相对应。

[0417] 10.6全D肽H-RKEVYQQVSSRIMNLLREYSEKIEIASIDEAYLDISDKVRDYREAYNLGLEIKNKILE KEKITVTVGISKNKVFAKIA-SMe (7) 的合成

[0418] 在6ml NMP中使用5当量的氨基酸、4.9当量的HATU和10当量的DIPEA历经45分钟使0.10mmol TentaGel-R-NH<sub>2</sub>树脂装载有Fmoc-D-Ala-OH。随后用THF洗涤树脂。通过与4当量的劳森试剂一起在THF中在80℃下孵育2小时来实现转化成Fmoc-D-Ala-Ψ [C S-NH]-R-TentaGel。此后用NMP洗涤树脂。随后如先前所描述将如此制备的树脂用于自动化肽合成 (ABI 433, FASTmoc方案,使用9当量的HATU和20当量的DIPEA在NMP中使10当量的氨基酸活化;偶合时间是45分钟,且用含20% (v/v) 哌啶的NMP进行三次Fmoc脱保护,历经7分钟)。在44个偶合氨基酸之后进行双偶合步骤。

[0419] 此后,根据Sharma等 (Sharma等,2011),通过与甲基碘一起在DMF中孵育过夜来产生相应的硫酯。在过滤树脂之后,蒸发含有肽硫酯的溶剂且使用冰冷的乙醚使残余物沉淀。利用含2.5% EDT、2.5% 水、2.5% TIS的TFA历经2小时来裂解侧链保护基。在蒸发TFA之后,用冰冷的乙醚使肽沉淀。在C18柱上使用ACN/水梯度进行肽硫酯的反相HPLC纯化。合并含有产物的级分并且冷冻干燥。

[0420] 通过HPLC (图17A) 和质谱法 (图17B) 表征最终产物。通过质谱法测定的产物分子量 (9155Da) 与计算质量 (9150Da) 一致。

[0421] 10.7 Ac-MIVLFVDFDYFYAQVEEVLNPSLKGKPVVVCVFSGRFEDSGAVATANYEARKFGVKAGIPI VEAkkILPNAVYLPM-OGp (6) 的合成

[0422] 如Barlos等 (Barlos等,1989) 所描述使0.10mmol TentaGel-R-Trityl树脂装载有Fmoc-D-Pro-OH。因此,将0.10mmol树脂与0.6mmol亚硫酰氯一起孵育两次,历经30分钟,且随后用DCM洗涤。此后,在6ml DCM中将树脂与0.6mmol Fmoc-D-Pro-OH、2.4mmol DIPEA一起孵育90分钟。然后,使用含10% MeOH (v/v)、10% DIPEA (v/v) 的DCM溶液将树脂阻断三次,历经10分钟,且用DCM洗涤。使用ABI 433,利用FASTmoc方案进行自动化合成。使用含9当量的HATU和20当量的DIPEA的NMP使10当量的氨基酸活化。偶合时间是45分钟,且利用含20% (v/v) 哌啶的NMP进行三次Fmoc脱保护,历经7分钟。在偶合46个氨基酸之后进行双偶合。利用含10% (v/v) 乙酸酐和10% (v/v) DIPEA的DMF将N末端乙酰化三次,历经10分钟。

[0423] 通过在10ml含30% (v/v) HFIP的DCM中将肽基树脂孵育两次,历经2小时来实现经完全保护的肽酸的裂解。在过滤出肽之后,蒸发溶剂且使用冰冷的乙醚使残余物沉淀。分离

并干燥沉淀的肽。

[0424] 将0.01mmol经完全保护的肽、4当量的PyBOP和5当量的H-D-Met-OGp (Boc)<sub>2</sub>溶解于6ml NMP中。在加入10当量的DIPEA之后,将混合物搅拌4小时。此后,蒸发减少溶剂且利用冰冷的乙醚使残余物沉淀。干燥沉淀的肽酯,且随后使用含2.5%EDT、2.5%水、2.5%TIS的TFA经2小时裂解掉保护基。在蒸发TFA之后,用冰冷的乙醚使肽沉淀。在C18柱上使用ACN/水梯度进行肽酯的反相HPLC纯化。合并含有产物的级分并且冷冻干燥。

[0425] 通过HPLC(图18A)和质谱法(图18B)表征最终产物。实验测定质量(8547Da)与理论分子质量(8541Da)相对应。

[0426] 10.8通过肽4与肽3的天然化学连接合成全D肽

[0427] H-CDMAKPNGIKVIDDEEVKRLIRELDIADVPGIGNITAEKLLKLGINKLCDTLSIEFDKLGKMGIEAK  
AKYLISLARDEYNEPIRTRVRKSIGRIVTMKRSRNLEEIKPYLFRAIEESYYKLDKRIPKAIHVAVTEDLDIVSR  
GRTFPHGISKETAYSESVKLLQKILEEDERKIRRIGVRFSEKIEAIGLDKFFDT-OH (5)

[0428] 将肽3和4两者以0.2M溶解于含有2%SDS、1%苯硫酚和5mM三(2-羧乙基)膦酸盐的TRIS-缓冲液(pH 8.6)中。在室温下将反应混合物振荡72小时。然后,利用反相HPLC纯化混合物。为了去除N末端Z-保护基,将肽溶解于270当量的TFA和50当量的大茴香硫醚(thioanisol)中,且在室温下振荡6小时(Yoshiaki Kiso等,1980)。在蒸发TFA之后,使肽沉淀且利用冰冷的乙醚进行洗涤,并且利用反相HPLC(Phenomenex,Aschaffenburg,Germany)再次纯化。利用SDS-PAGE、反相UPLC和ESI-质谱法分析游离的肽5。发现了产物的准确质量。

[0429] 10.9通过肽6与肽7的蛋白酶催化连接合成全D肽Ac-MIVLFVDFDYFYAQVEEVLNPSLKG  
KPVVVCVFSGRFEDSGAVATANYEARFGVKAGIPIVEAKKILPNAVYLPMPRKEVYQQVSSRIMNLLREYSEKIEIA  
SIDEAYLDISDKVRDYREAYNLGLEIKNKILEKEKITVTVGISKKNVFAKIA-SMe (8)

[0430] 将肽6以0.2mM且将肽7以0.6mM溶解于含有4M尿素的磷酸钠缓冲液(100mM(pH 8.5),含100mM NaCl)中。在加入20μM梭菌蛋白酶(内切蛋白酶Arg-C,Worthington Biochemical Corporation,Lakewood,N.J.,USA)之后,在37℃下将反应混合物振荡过夜。对沉淀的肽进行离心,溶解于H<sub>2</sub>O/甲酸80/20中且将利用反相HPLC,使用RP-18柱(Phenomenex,Aschaffenburg,Germany)以在30分钟内从5%至95%的ACN/水梯度进行纯化。利用SDS-PAGE(图19A)和ESI-质谱法(图19B)分析最终肽。在介于14.4kDa与21.5kDa之间的泳道1中发现了表明连接产物的条带。如ESI-MS所示,连接产物的理论分子量(M<sub>理论</sub>=17476Da)与实测分子量(M<sub>实测</sub>=17486Da)相对应。

[0431] 10.10通过肽8与肽5的天然化学连接合成全D聚合酶Dpo变体A115C/V203C

[0432] 将肽5和8两者以0.2M溶解于含有2%Triton X100、1%苯硫酚和5mM三(2-羧乙基)膦酸盐的TRIS-缓冲液(pH 8.6)中。在室温下将反应混合物振荡72小时。然后,利用反相HPLC纯化混合物,且利用SDS-PAGE、反相UPLC和ESI-质谱法加以分析。发现了连接产物的准确质量。

[0433] 实施例11-由D-氨基酸组成的合成聚合酶dpo4的活性证实

[0434] 本实施例描述了根据实施例10的全D聚合酶Dpo4变体A155C/V203C的PCR活性测试。

[0435] 令人惊讶的是,合成的全D聚合酶Dpo4变体A155C/V203C在不试图额外再折叠的情况下具有活性,且因而不进行进一步再折叠程序即使用。通过在预制的凝胶(Invitrogen,

Karlsruhe, Germany) 上使用标准系列的已知蛋白质浓度进行十二烷基硫酸钠 (缩写 SDS) 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (缩写 PAGE), 随后进行 SYPRO-RED 染色 (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) 和在 BioRad Fx 扫描仪上进行密度条带分析来估计蛋白质浓度。

[0436] 11.1 用于 PCR 活性测定的模板

[0437] 用于 PCR 反应的模板是 83 聚体单链 L-DNA 寡核苷酸 (MJ\_1\_105\_LD), 在第一个热循环中, 由此制备相对的链。此后, 两条链都充当指数扩增的模板。在 NOXXON 上合成呈 L-构型的模板 DNA 寡核苷酸和 DNA 引物。

[0438] 用于 PCR 活性测定的寡核苷酸列表:

名称	长度, nt	构型	序列 (5'→3')
[0439] MJ_1_105_LD	83	L	GTGGAACCGACAACCTGTGCTGCGTCCAGCATAAGA AAGGAGCTCCCTCAGAAGAAGCTGCGCAGCGTGCCA GTCTGAGCTCC
MJ_oligo_187_LD	38	L	TCTAATACGACTCACTATAGGAGCTCAGACTGGCAC GC
MJ_oligo_189_LD	20	L	GTGGAACCGACAACCTGTGC

[0440] 11.2 PCR 反应

[0441] 15 $\mu$ l PCR 反应含有 0.2mM 四种 L-dNTP 中的每一种、10nM 83-聚体 ssDNA (MJ\_1\_105\_LD) 模板、1 $\mu$ M 正向引物和反向引物、1 $\times$  ThermoPol 缓冲液 (Invitrogen, 20mM Tris-HCl、10mM KCl、10mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、2mM MgSO<sub>4</sub>、0.1% Triton X-100 (pH 8.8) 在 25 $^{\circ}$ C 下) 和至少 0.67ng/ $\mu$ l 全 D 聚合酶 Dpo4 变体 A155C/V203C。正向引物是 MJ\_oligo\_187\_LD, 产生了 102bp 的 PCR 产物, 这与 83-聚体模板不同。反向引物是 MJ\_oligo\_189\_LD。L-dNTP 是以委托合成的方式购自 Rasayan, Inc. (Encinitas, CA, USA)。

[0442] 通过省略全 D 聚合酶 Dpo4 变体 A155C/V203C 来进行阴性对照。

[0443] 热循环程序由 1 个循环 (85 $^{\circ}$ C、3 分钟), 然后至少 7 个循环 (85 $^{\circ}$ C、30 秒/56 $^{\circ}$ C、1 分钟/60 $^{\circ}$ C、4 分钟), 然后保持在 4 $^{\circ}$ C 组成。将 PCR 反应的 4 $\mu$ l 等分试样与样品上样缓冲液混合且在 TBE 凝胶上进行分析。除了别的以外, 将含有 100bp 条带的 DNA 标准梯应用于凝胶。

[0444] 11.3 活性证实

[0445] 具有全 D 聚合酶 Dpo4 变体 A155C/V203C 和 L-DNA 底物和 L-核苷酸的 PCR 反应产生了与 DNA 标准梯相比在约 100bp 范围内的条带。所述条带在省略了聚合酶的阴性对照中未出现。此外, 所述 102bp 条带的迁移程度高于 83-聚体模板。L-DNA 扩增产物的全 D 聚合酶 Dpo4 变体 A155C/V203C 依赖性出现因而证实了合成全 D 聚合酶 Dpo4 变体 A155C/V203C 在热扩增过程中的活性。

[0446] 实施例 12-D-或 L-核酸的合成

[0447] 通过固相合成, 利用 ABI 394 合成器 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 使用具有标准环外胺保护基的 2' TBDMS DNA 亚磷酰胺化学产生 L-DNA 核酸或 D-DNA 核酸 (Damha 和 Ogilvie, 1993)。对于 DNA 合成, 应用呈 D-构型和 L-构型的 dA (N-Bz)-、dC (N-Ac)-、dG (N-ibu)- 和 dT。所有亚磷酰胺都是购自 ChemGenes, Wilmington, MA。在合成和脱保护之后, 通过凝胶电泳纯化 L-DNA 核酸或 D-DNA 核酸。

[0448] 参考文献

[0449] 如果不存在相反指示, 则本文中所述的文献的完整书目数据如下, 由此所述参考文献的公开内容以引用的方式并入本文中。

- [0450] Altschul S.F., Gish W., et al. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215 (3) :403-10.
- [0451] Altschul S.F., Madden T.L., et al. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25 (17) : 3389-402.
- [0452] Atherton E., Logan C.J. and Sheppard R.C. (1981) Peptide synthesis. Part 2. Procedures for solid-phase synthesis using N $\alpha$ -fluorenylmethoxycarbonylamino-acids on polyamide supports. Synthesis of substance P and of acyl carrier protein 65-74 decapeptide. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 538-546
- [0453] Barlos, K., Gatos, D., Kallitsis, J., Papaphotiu, G., Sotiriu, P., Yao, W. Q. and Schäfer, W. (1989) Darstellung geschützter Peptid-Fragmente unter Einsatz substituierter Triphenylmethyl-Harze. *Tetrahedron Letters.* 30 (30) :3943-3946
- [0454] Bock L.C., Griffin L.C., Latham J.A., Vermaas E.H. and Toole J.J. (1992) Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. *Nature.* 355 (6360) :564-6.
- [0455] Boudsocq, F., S. Iwai, et al. (2001). "Sulfolobus solfataricus P2 DNA polymerase IV (Dpo4): an archaeal DinB-like DNA polymerase with lesion-bypass properties akin to eukaryotic poleta." *Nucleic Acids Res* 29 (22) :4607-16. Burmeister P.E. et al (2006) 2'-Deoxy purine, 2'-O-methyl pyrimidine (dRmY) aptamers as candidate therapeutics. *Oligonucleotides.* 16 (4) :337-51.
- [0456] Damha MJ, Ogilvie KK. (1993) Oligoribonucleotide synthesis. The silyl-phosphoramidite method. *Methods Mol Biol.* 20:81-114
- [0457] Ellington A.D. and Szostak J.W. (1990) In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature.* 346 (6287) :818-22.
- [0458] Freier S.M. and Altmann K.H. (1997) The ups and downs of nucleic acid duplex stability: structure-stability studies on chemically-modified DNA:RNA duplexes. *Nucleic Acids Res.* 25 (22) :4429-43.
- [0459] Klussmann S. (2006). *The Aptamer Handbook-Functional Oligonucleotides and their Applications.* S. Klussmann ed. WILEY-VCH, Weinheim, Germany, ISBN 3-527-31059-2
- [0460] Klussmann S., Nolte A., Bald R., Erdmann V.A. and Fürste J.P. (1996) Mirror-image RNA that binds D-adenosine. *Nat Biotechnol.* 14 (9) :1112-5.
- [0461] Kusser W. (2000) Chemically modified nucleic acid aptamers for in vitro selections: evolving evolution. *J Biotechnol* 74 (1) :27-38.
- [0462] Mairal T., Ozalp V.C., Lozano Sánchez P., et al. (2008) Aptamers: molecular tools for analytical applications. *Anal Bioanal Chem.* 390 (4) :989-1007
- [0463] Mandal K., Uppalapati M., Ault-Riché D., Kenney J., Lowitz J., Sidhu S.S. and Kent S.B.H. (2012) Chemical synthesis and X-ray structure of a

heterochiral {D-protein antagonist plus vascular endothelial growth factor} protein complex by racemic crystallography. PNAS. 109 (37)

[0464] McGinnis S., Madden T.L. et al. (2004) BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. Nucleic Acids Res. 32 (Web Server issue): W20-5.

[0465] Needleman and Wunsch (1970) A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. J Mol Biol. 48 (3): 443-53.

[0466] Nolte A., Klussmann S., Bald R., Erdmann V.A. and Fürste J.P. (1996) Mirror-design of L-oligonucleotide ligands binding to L-arginine. Nat Biotechnol. 14 (9): 1116-9.

[0467] Oliveros, M., R.J. Yanez, et al. (1997). "Characterization of an African swine fever virus 20-kDa DNA polymerase involved in DNA repair." J Biol Chem 272 (49): 30899-910.

[0468] Pearson and Lipman (1988) Improved tools for biological sequence comparison. Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85: 2444

[0469] Sambrook et al. (ed.), (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY

[0470] Sekizaki, H., Itoh, K., Toyota, E. and Tanizawa, K. (1996) Synthesis and tryptic hydrolysis of p-guanidinophenyl esters derived from amino acids and peptides. Chemical & Pharmaceutical Bulletin. 44 (8): 1577-9

[0471] Sekizaki, H., Itoh, K., Toyota, E. and Tanizawa, K. (1996) Trypsin-catalyzed peptide synthesis and various p-guanidinophenyl esters as acyl donors. Chemical & Pharmaceutical Bulletin. 44 (8): 1585-7

[0472] Sharma, I. and Crich, D. (2011) Direct Fmoc-Chemistry-Based Solid-Phase Synthesis of Peptidyl Thioesters. Journal of Organic Chemistry. 76 (16): 6518-24

[0473] Smith and Waterman (1981), Adv. Appl. Math. 2: 482

[0474] Tuerk C. and Gold L. (1990) Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. Science. 249 (4968): 505-10.

[0475] Usman N. and Cedergren R. (1992) Exploiting the chemical synthesis of RNA. Trends Biochem Sci. 17 (9): 334-9

[0476] Venkatesan N., Kim S.J., et al. (2003) Novel phosphoramidite building blocks in synthesis and applications toward modified oligonucleotides. Curr Med Chem 10 (19): 1973-91

[0477] Wincott F., DiRenzo A., et al. (1995). Synthesis, deprotection, analysis and purification of RNA and ribozymes. Nucleic Acids Res.; 23 (14): 2677-84.

[0478] 本说明书、权利要求书和/或附图中所公开的本发明特征可以单独地和以其任何组合形式作为用于以各种形式实现本发明的材料。

## (A)

SP-1 (15-聚体) D(g1)P (17-聚体)  
 复合物1-缺口-A (D) 5'-GATCACAGTGAGTAC GTAAAACGACGGCCAGT-3'  
 3'-CTAGTGTCACCTCATGACATTTTGCTGCCGGTCA-5'  
 MJ\_1\_140\_DD (33-聚体)

SP-1 (15-聚体) D(g1)P (17-聚体)  
 复合物1-缺口-C (D) 5'-GATCACAGTGAGTAC GTAAAACGACGGCCAGT-3'  
 3'-CTAGTGTCACCTCATGCCATTTTGCTGCCGGTCA-5'  
 MJ\_1\_141\_DD (33-聚体)

SP-1 (15-聚体) D(g1)P (17-聚体)  
 复合物1-缺口-G (D) 5'-GATCACAGTGAGTAC GTAAAACGACGGCCAGT-3'  
 3'-CTAGTGTCACCTCATGGCATTTTGCTGCCGGTCA-5'  
 MJ\_1\_142\_DD (33-聚体)

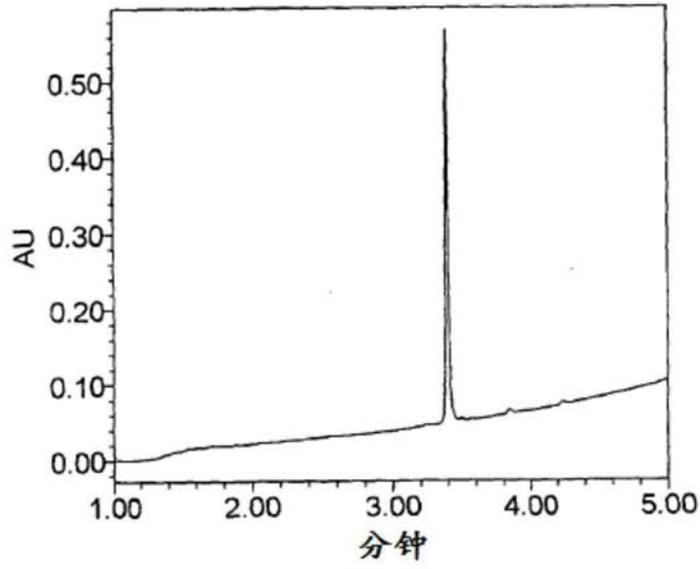
SP-1 (15-聚体) D(g1)P (17-聚体)  
 复合物1-缺口-T (D) 5'-GATCACAGTGAGTAC GTAAAACGACGGCCAGT-3'  
 3'-CTAGTGTCACCTCATGTCATTTTGCTGCCGGTCA-5'  
 SP1c+18(g1) (33-聚体)

## (B)

SP-1 (15-聚体) D(g6)P (12-聚体)  
 复合物6-缺口 (D): 5'-GATCACAGTGAGTAC ACGACGGCCAGT-3'  
 3'-CTAGTGTCACCTCATGTTATCTTGCTGCCGGTCA-5'  
 SP1c+18(g6) (33-聚体)

图1

(A)



(B)

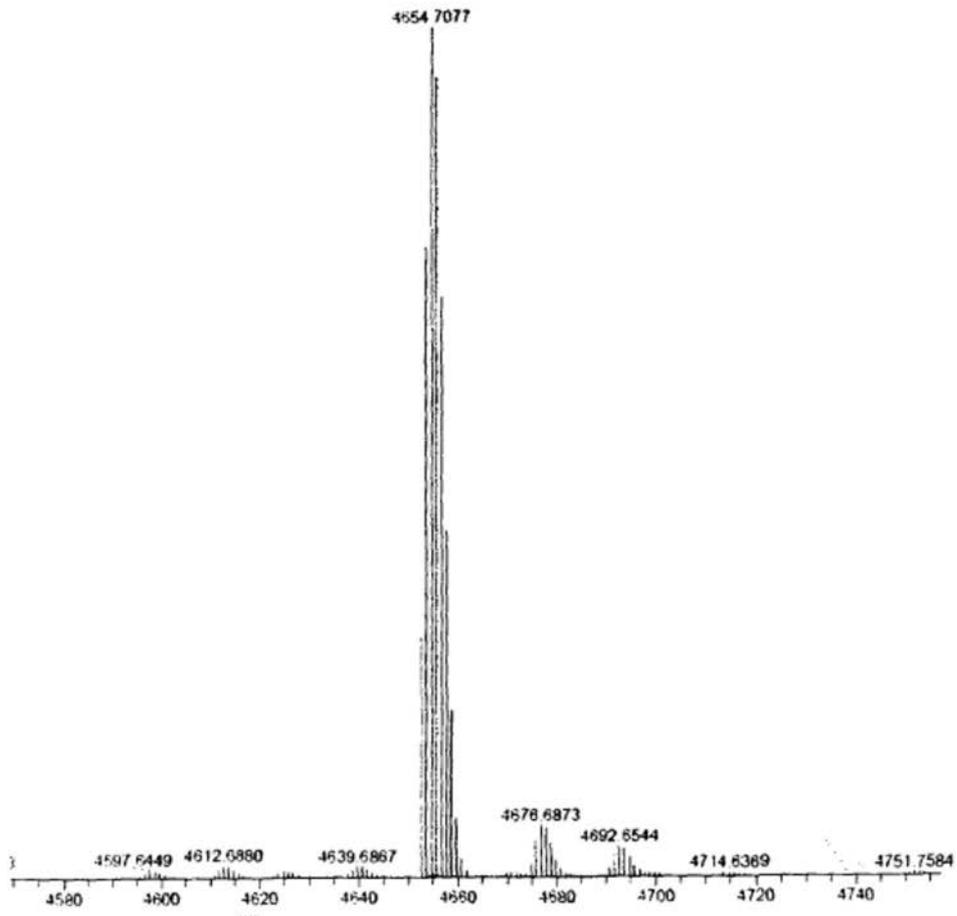


图2

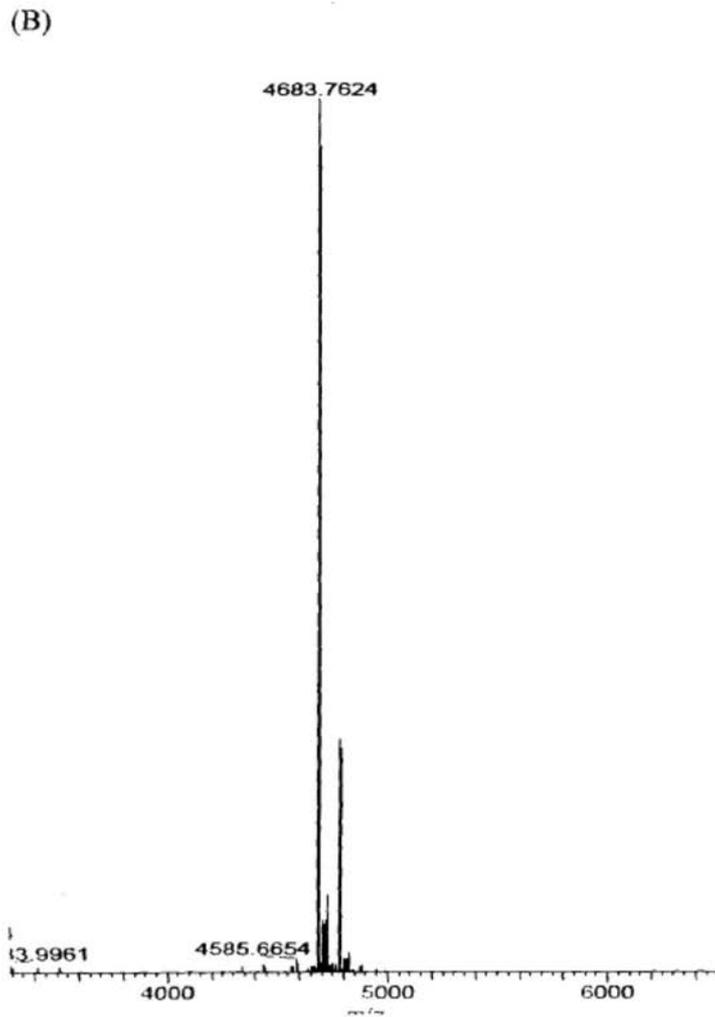
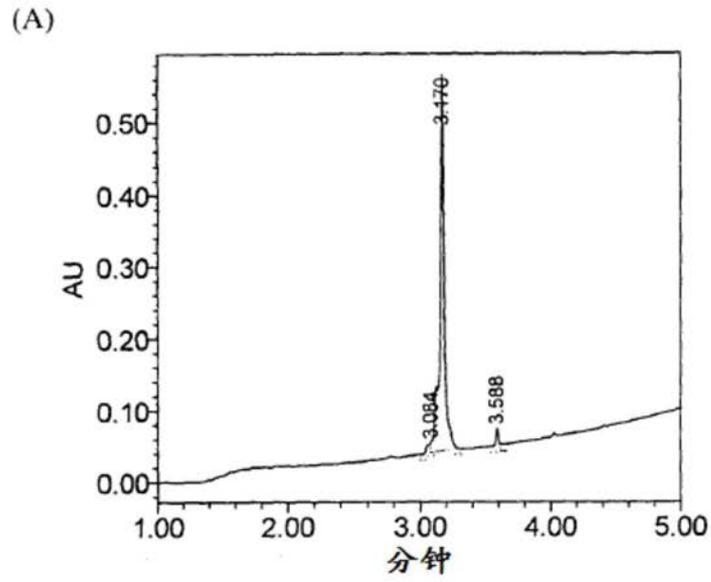


图3

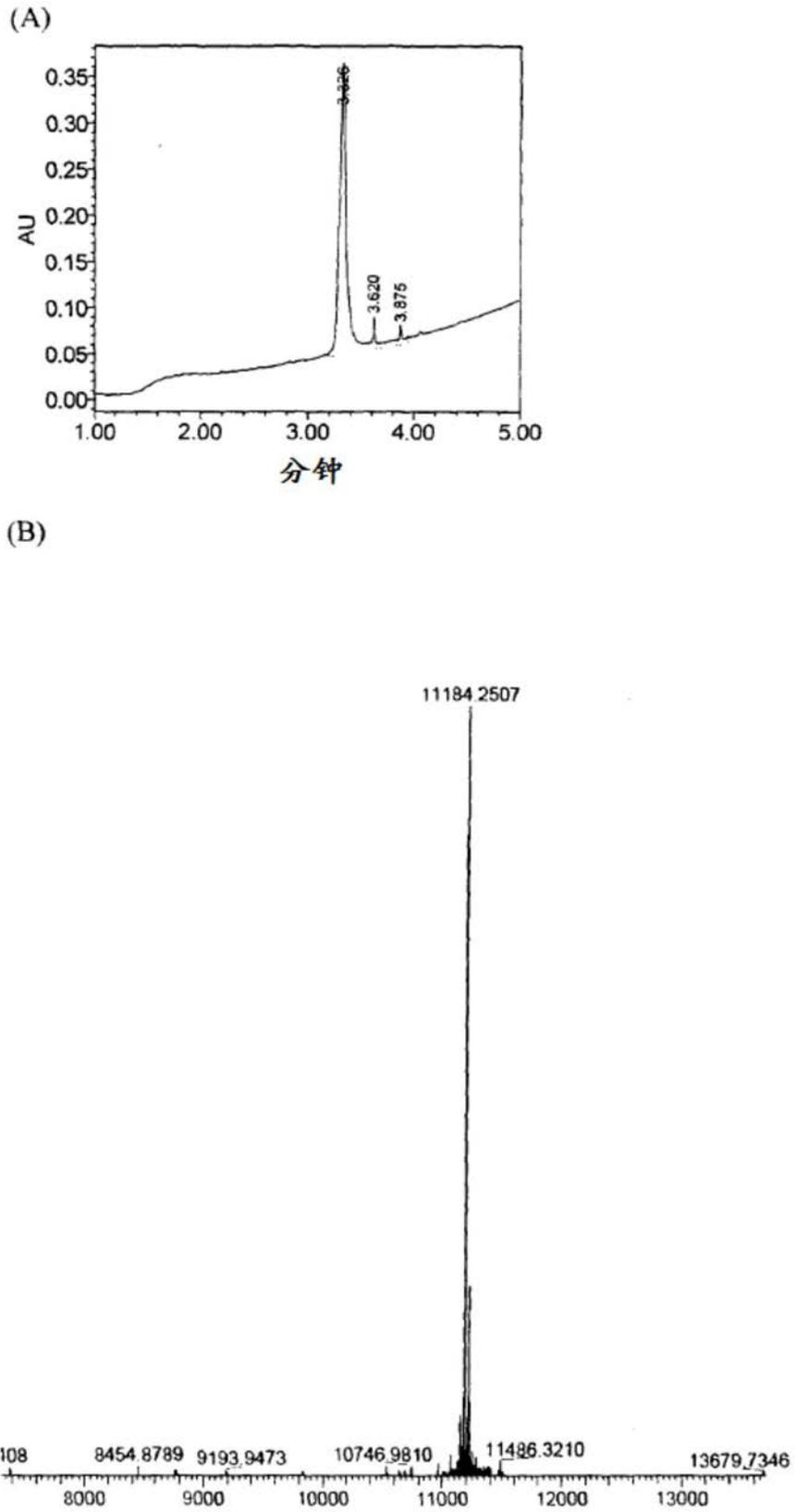


图4

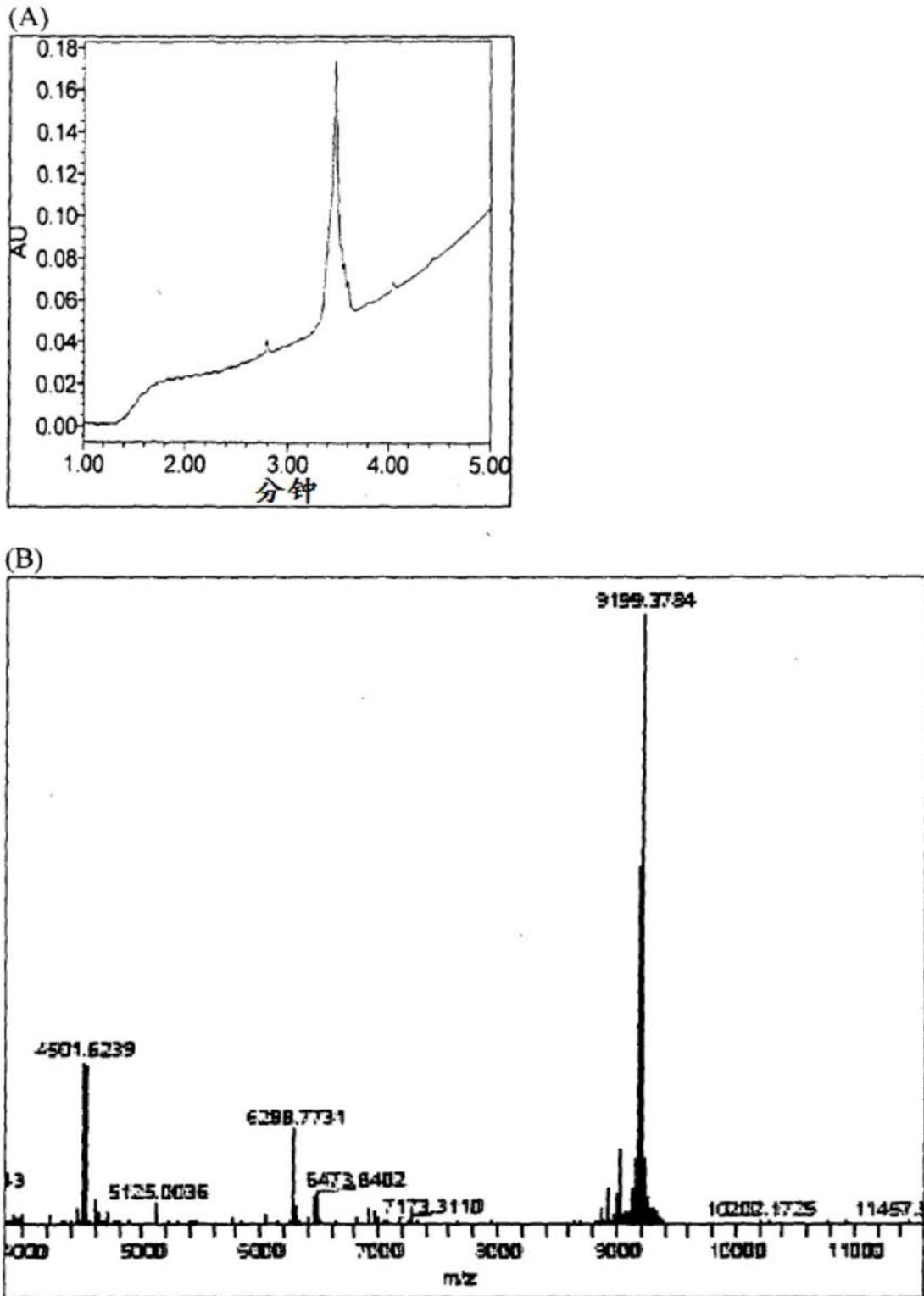


图5

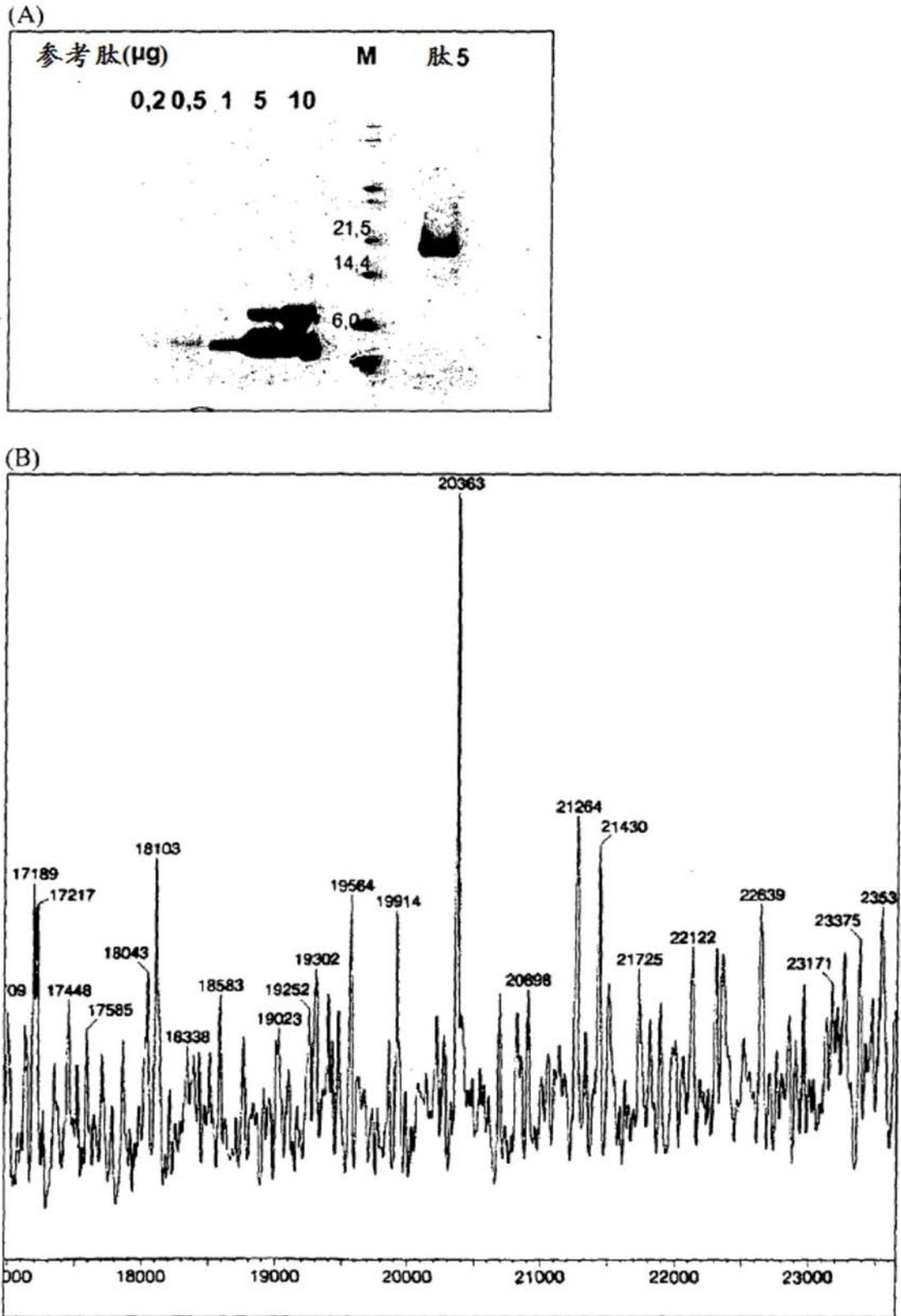
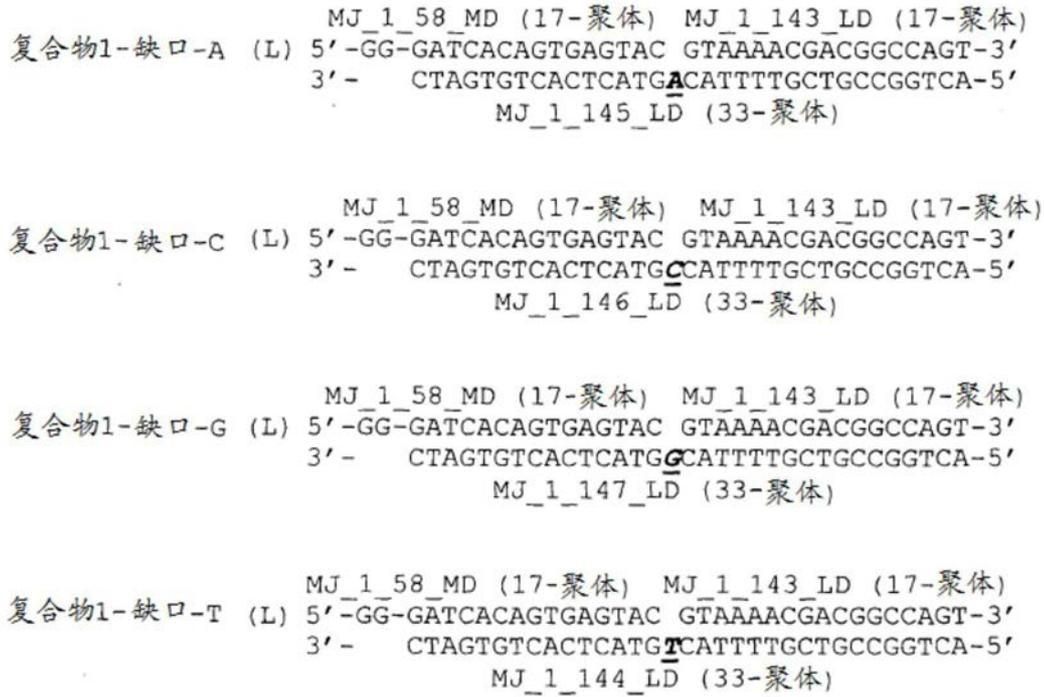


图6



1-缺口底物的寡核苷酸列表:

名称	nt	构型	序列 (5'→3')
MJ_1_58_MD	17	前两个G's=D, 其余=L	GG-GATCACAGTGAGTAC
MJ_1_143_LD	17	L	磷酸- GTAAAACGACGGCCAGT
MJ_1_145_LD	33	L	ACTGGCCGTCGTTTTAC <u>A</u> GTACTC ACTGTGATC
MJ_1_146_LD	33	L	ACTGGCCGTCGTTTTAC <u>C</u> GTACTC ACTGTGATC
MJ_1_147_LD	33	L	ACTGGCCGTCGTTTTAC <u>G</u> GTACTC ACTGTGATC
MJ_1_144_LD	33	L	ACTGGCCGTCGTTTTAC <u>T</u> GTACTC ACTGTGATC

图7

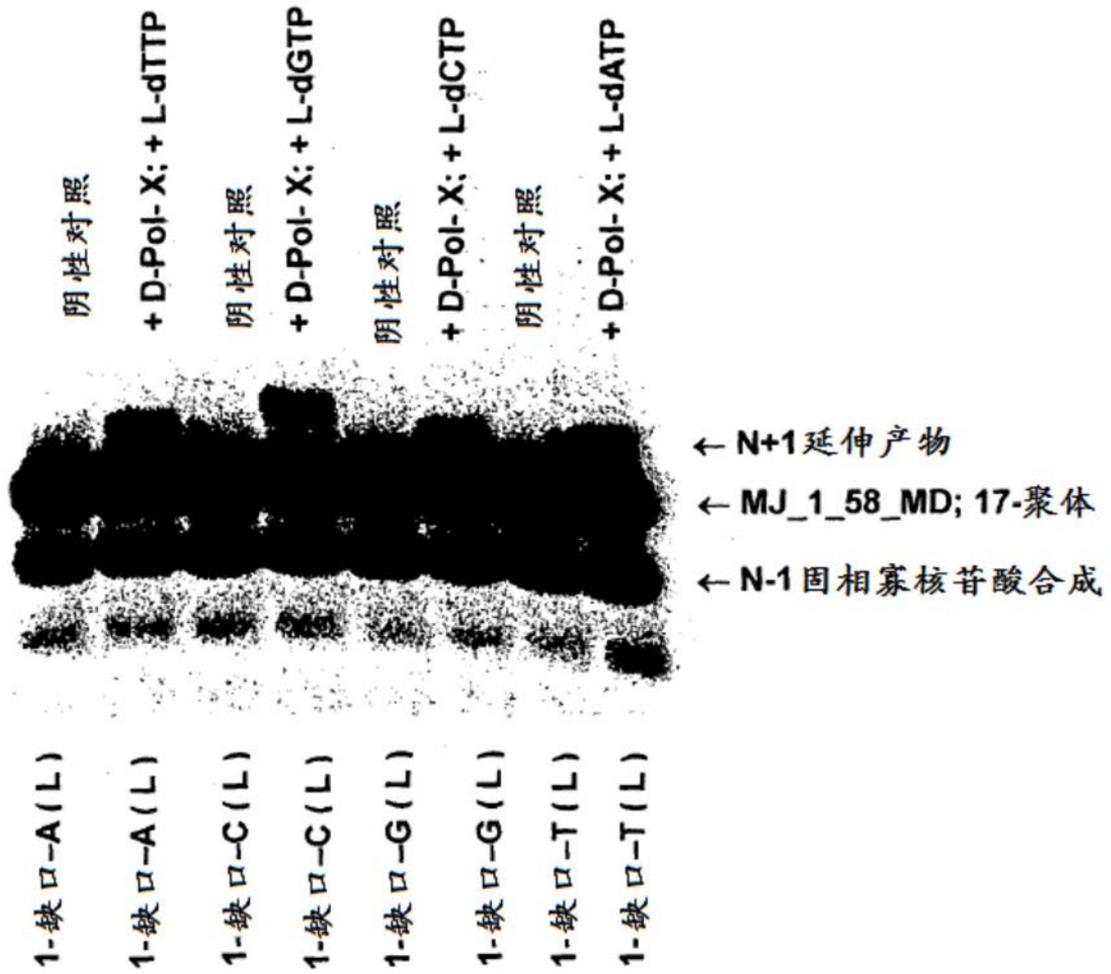
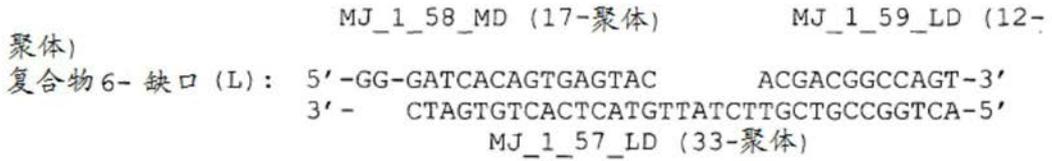


图8

(A)



6-缺口底物的寡核苷酸列表:

名称	nt	构型	序列 (5'→3')
MJ_1_58_MD	17	前两个G's = D, 其余 = L	GG-GATCACAGTGAGTAC
MJ_1_59_LD	12	L	磷酸-ACGACGGCCAGT
MJ_1_57_LD	33	L	ACTGGCCGTCGTTCTATTGTACTCACTGTGATC

(B)

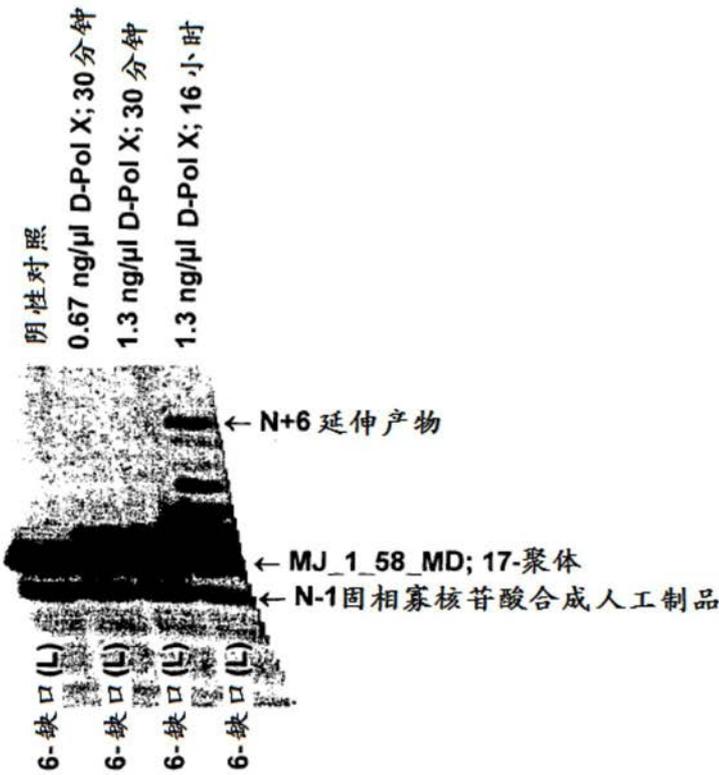
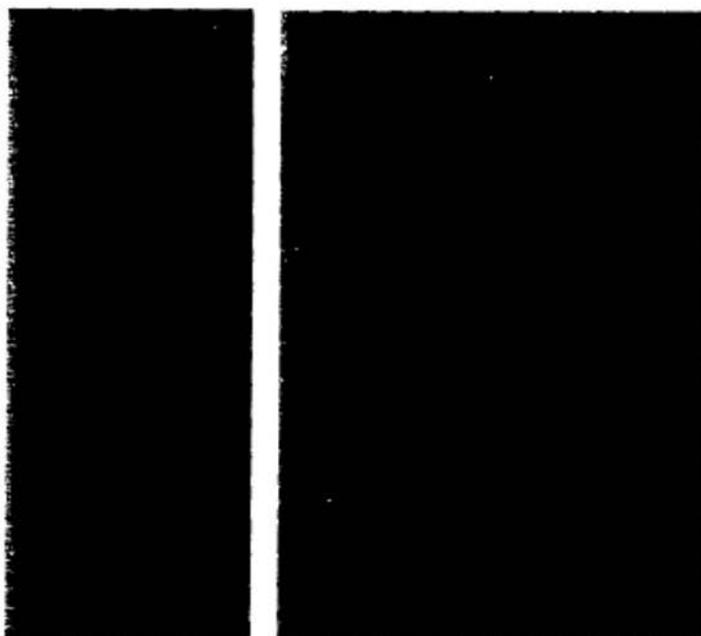


图9

(A)

Atto532---MJ\_1\_33\_DD\_19ntMJ\_1\_1\_DD\_83nt

(B)

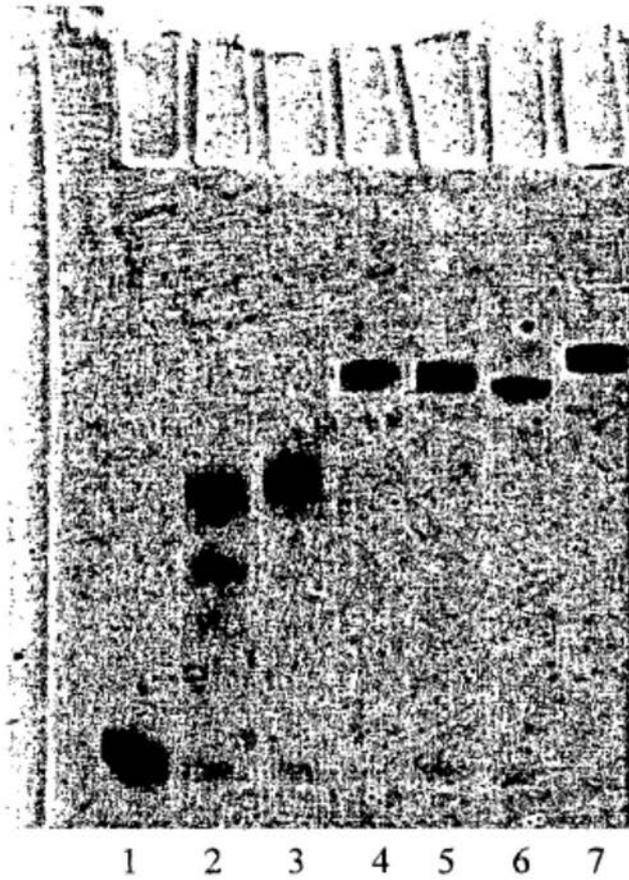


1 2 3 4 5 6 7 8 9

- 1: 阴性对照(无聚合酶)
- 2: 阳性对照 (Taq)
- 3: 野生型L-聚合酶 X, 1.7 ng/μl
- 4: L-Pol-X V80G, 1.7 ng/μl
- 5: L-Pol-X V80G, 4 ng/μl
- 6: L-Pol-X V80G, 4 ng/μl (未纯化)
- 7: L-Pol-X V80A, 1.7 ng/μl
- 8: L-Pol-X V80A, 4 ng/μl
- 9: L-Pol-X V80A, 4 ng/μl (未纯化)

图10

(C)



- 1: 阴性对照(无聚合酶)
- 2: 野生型L-聚合酶X, 5个热循环
- 3: 野生型L-聚合酶X, 10个热循环
- 4: 野生型L-聚合酶X, 15个热循环
- 5: 野生型L-聚合酶X, 20个热循环
- 6: 野生型L-聚合酶X, 25个热循环
- 7: 阳性对照(Taq)

图10(续)

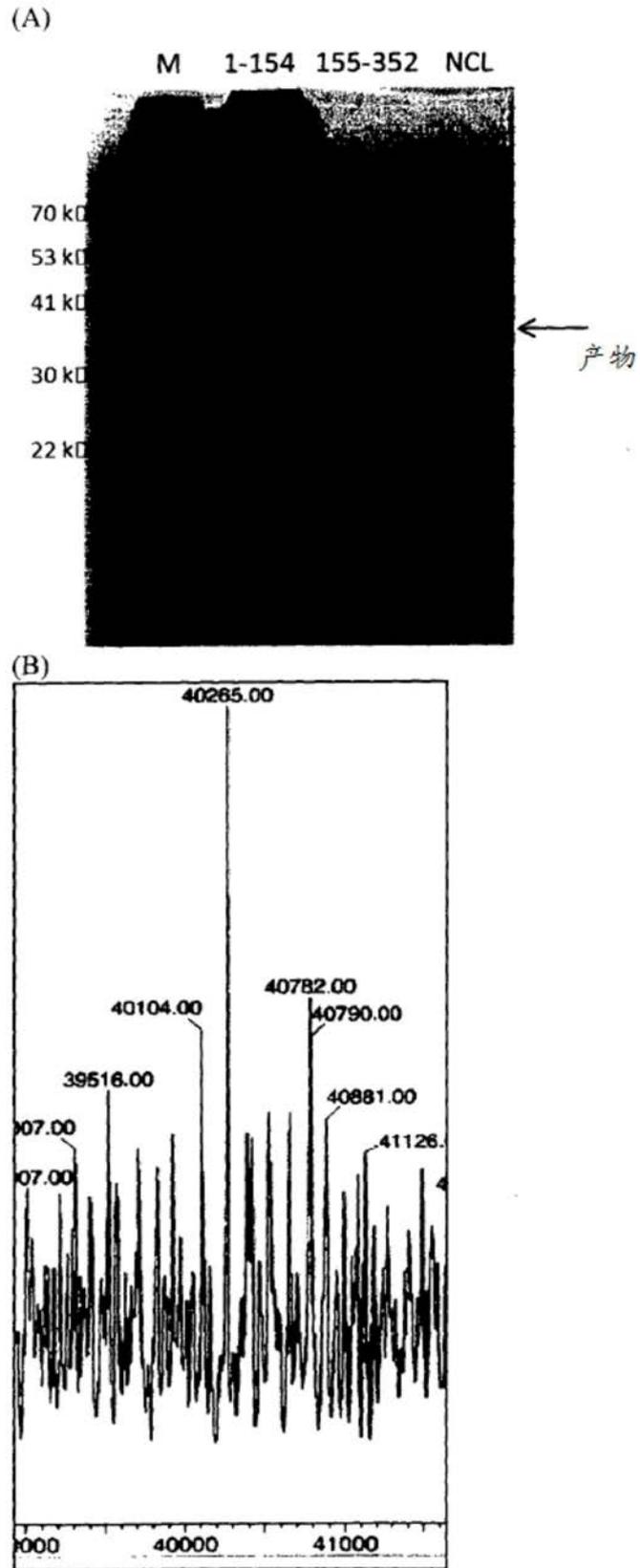
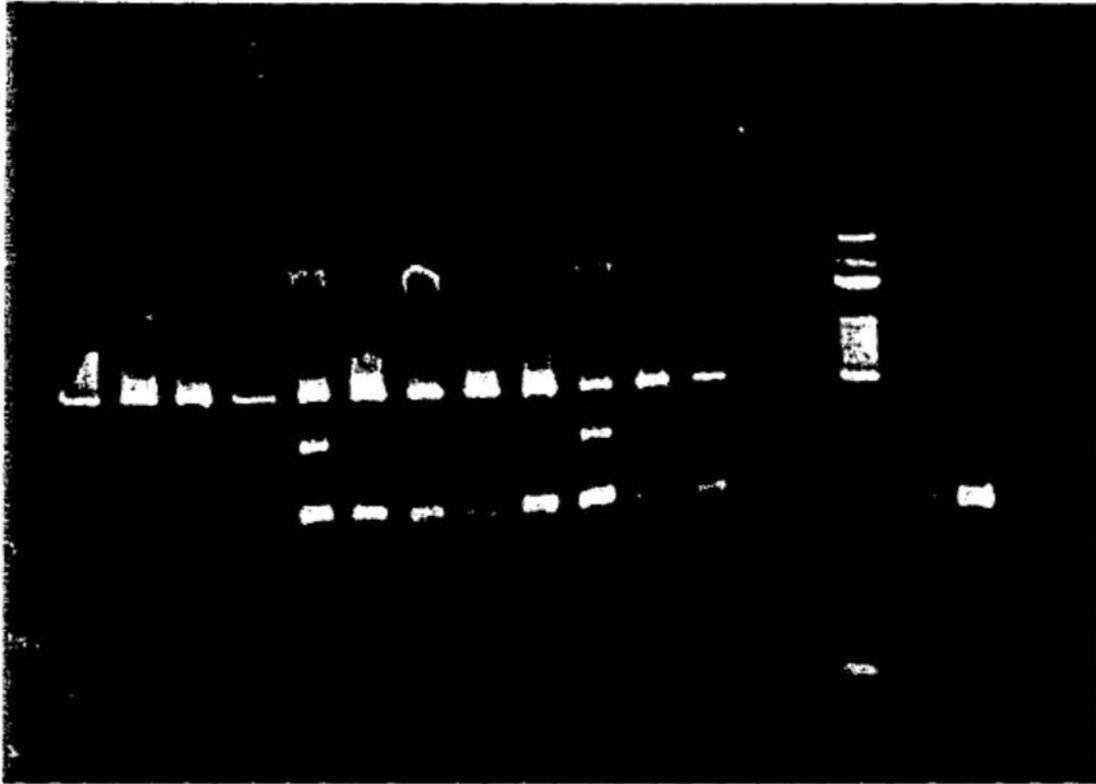


图11

(A)



M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 M 12 13 14 15

M: 10 bp DNA 梯(最低的可见条带:20 bp; 100 bp 条带更密集)

1:阳性对照, 得自于 New England Biolabs 的全 L-dpo4 (100 ng)

2:阳性对照, 得自于 New England Biolabs 的全 L-dpo4 (50 ng)

3:未上样

4:全 L 聚合酶 dpo4 变体 A155C (100 ng)

5:全 L 聚合酶 dpo4 变体 A155C (50 ng)

6:全 L 聚合酶 dpo4 变体 V203C (100 ng)

7:全 L 聚合酶 dpo4 变体 V203C (50 ng)

8:全 L 聚合酶 dpo4 变体 C31S (100 ng)

9:全 L 聚合酶 dpo4 变体 C31S (50 ng)

10:全 L 聚合酶 dpo4 变体 A155C/V203C (100 ng)

11:全 L 聚合酶 dpo4 变体 A155C/V203C (50 ng)

12:阴性对照(模板, 正向引物和反向引物)

13:仅正向引物

14:仅反向引物

15:阴性对照(无模板, 无引物)

图12

(B)



M: 50 bp DNA 梯(最下面的条带: 50 bp, 然后是 100 bp)

1: 阴性对照(无聚合酶)

2: 阳性对照; 全 L 聚合酶 dpo4 (重组体), 10 ng

3: 全 L 聚合酶 dpo4 (合成), 10 ng

4: 全 L 聚合酶 dpo4 (合成), 20 ng

图12(续)

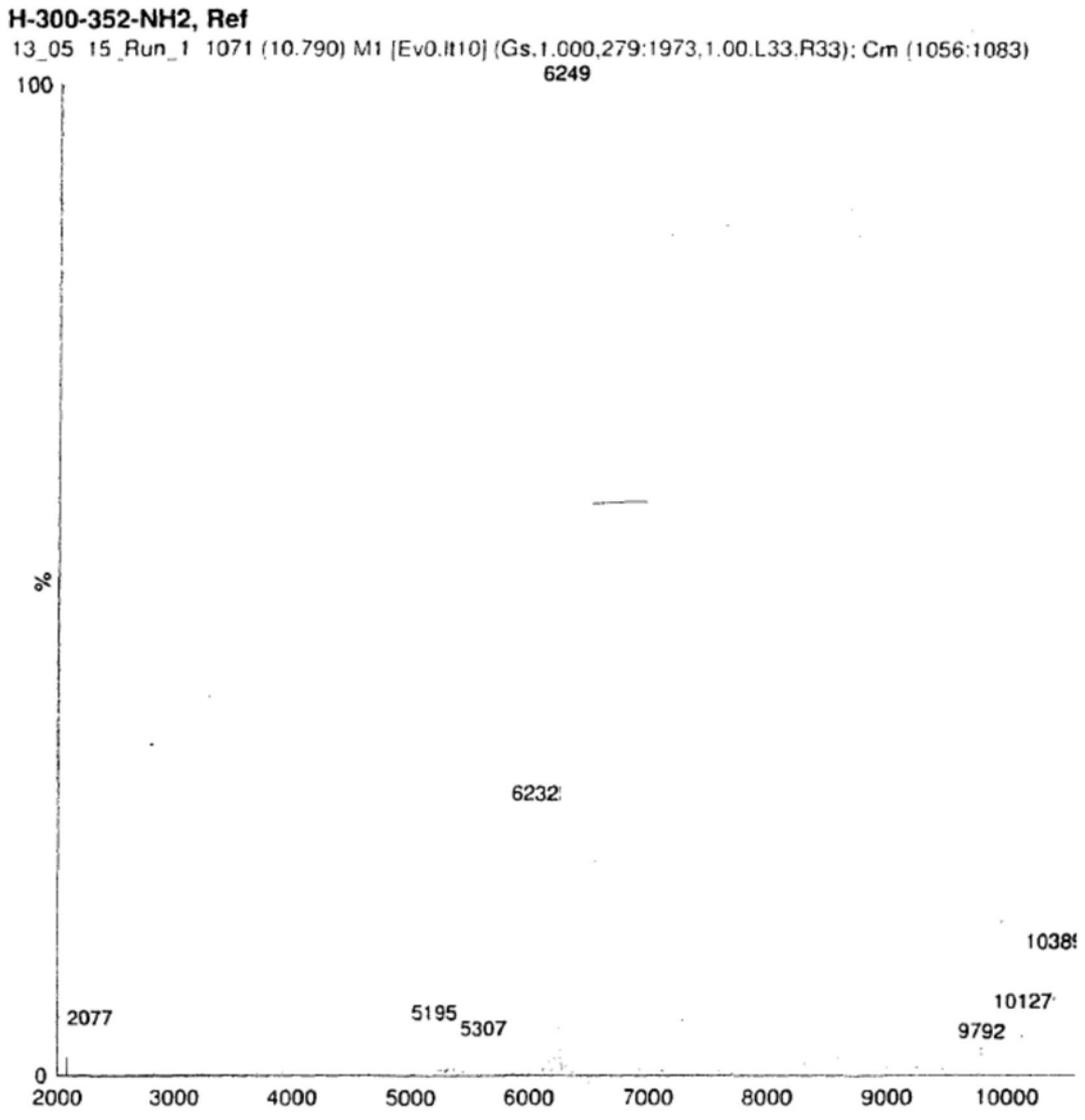


图13

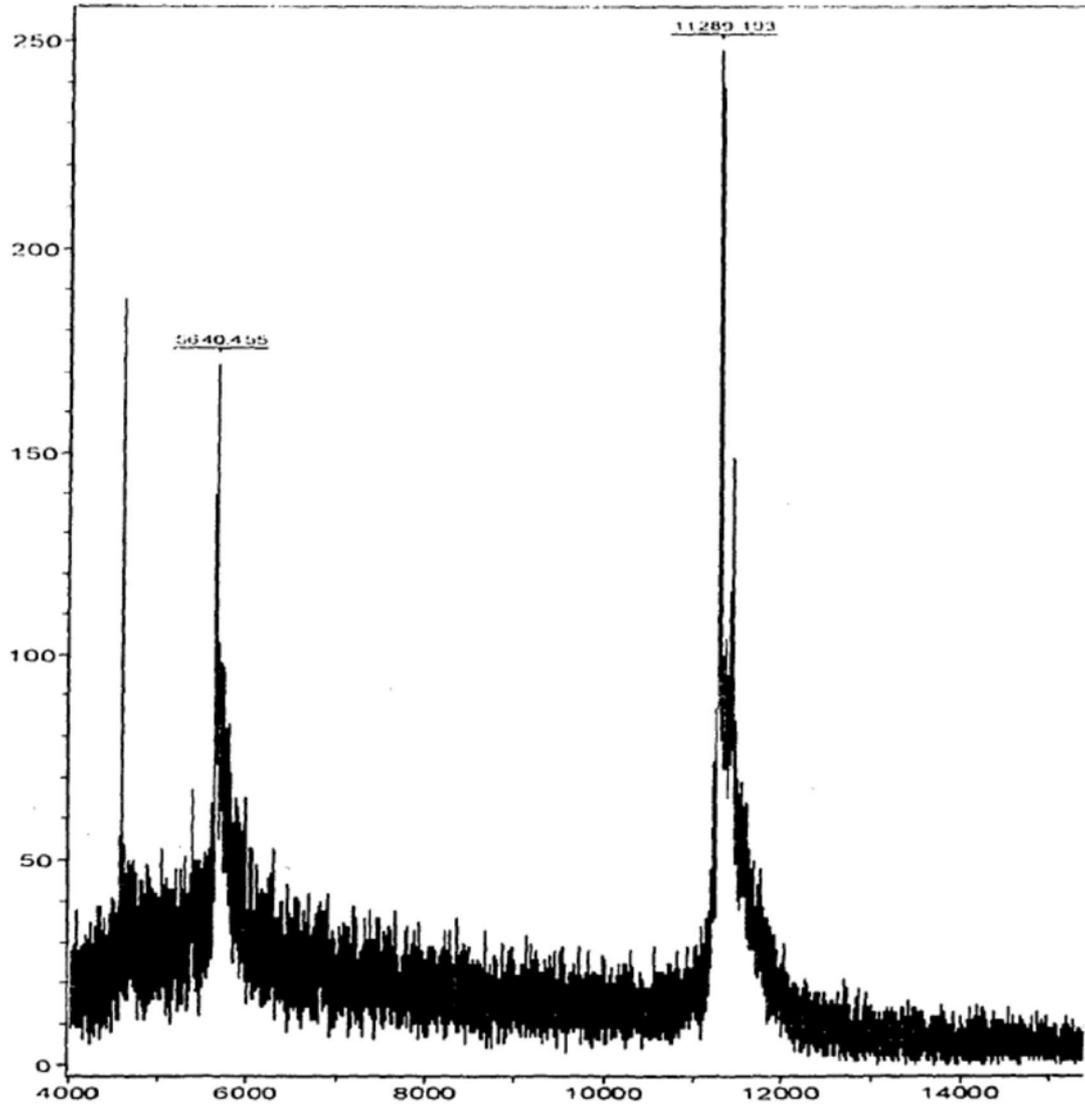


图14

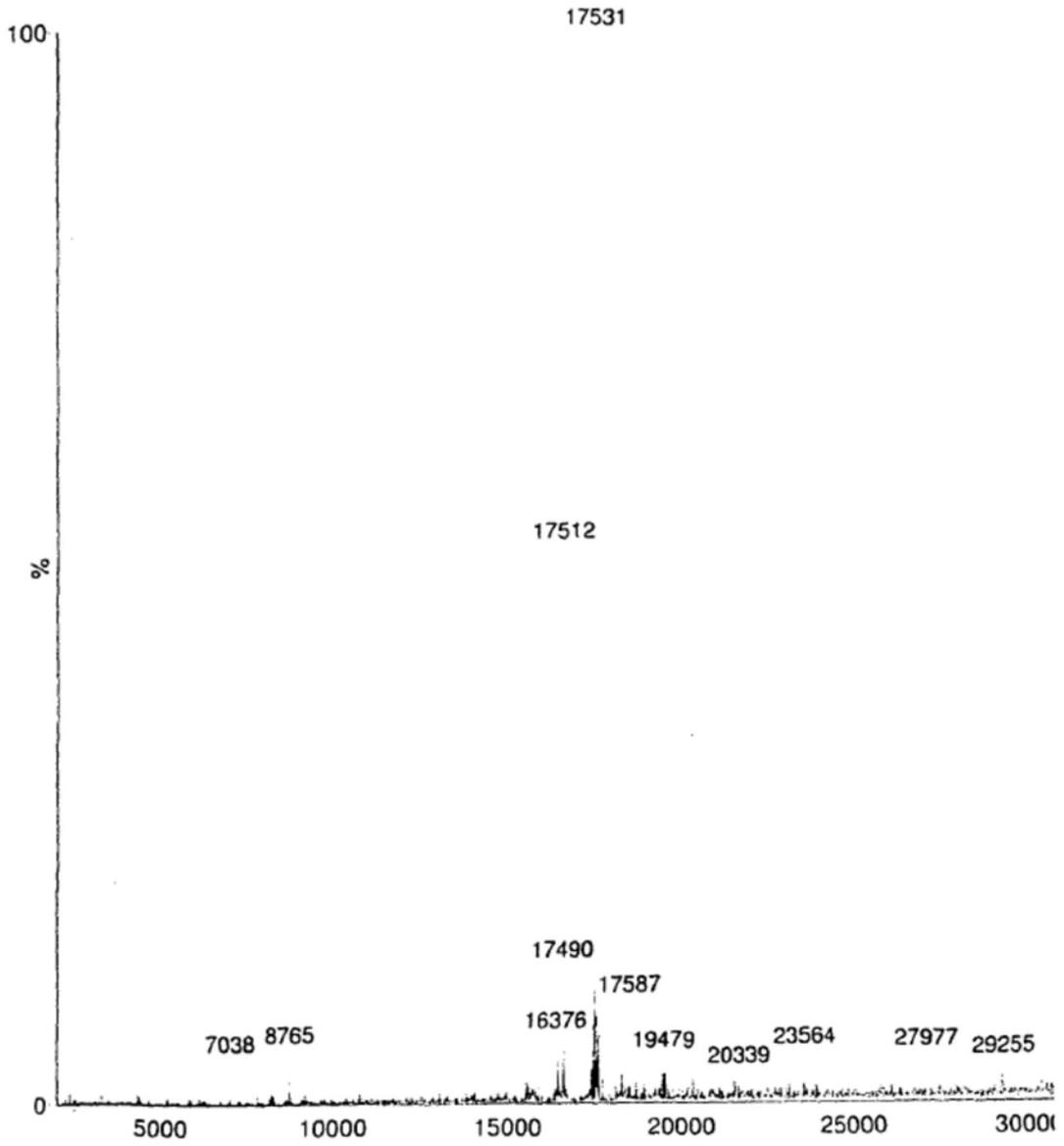


图15

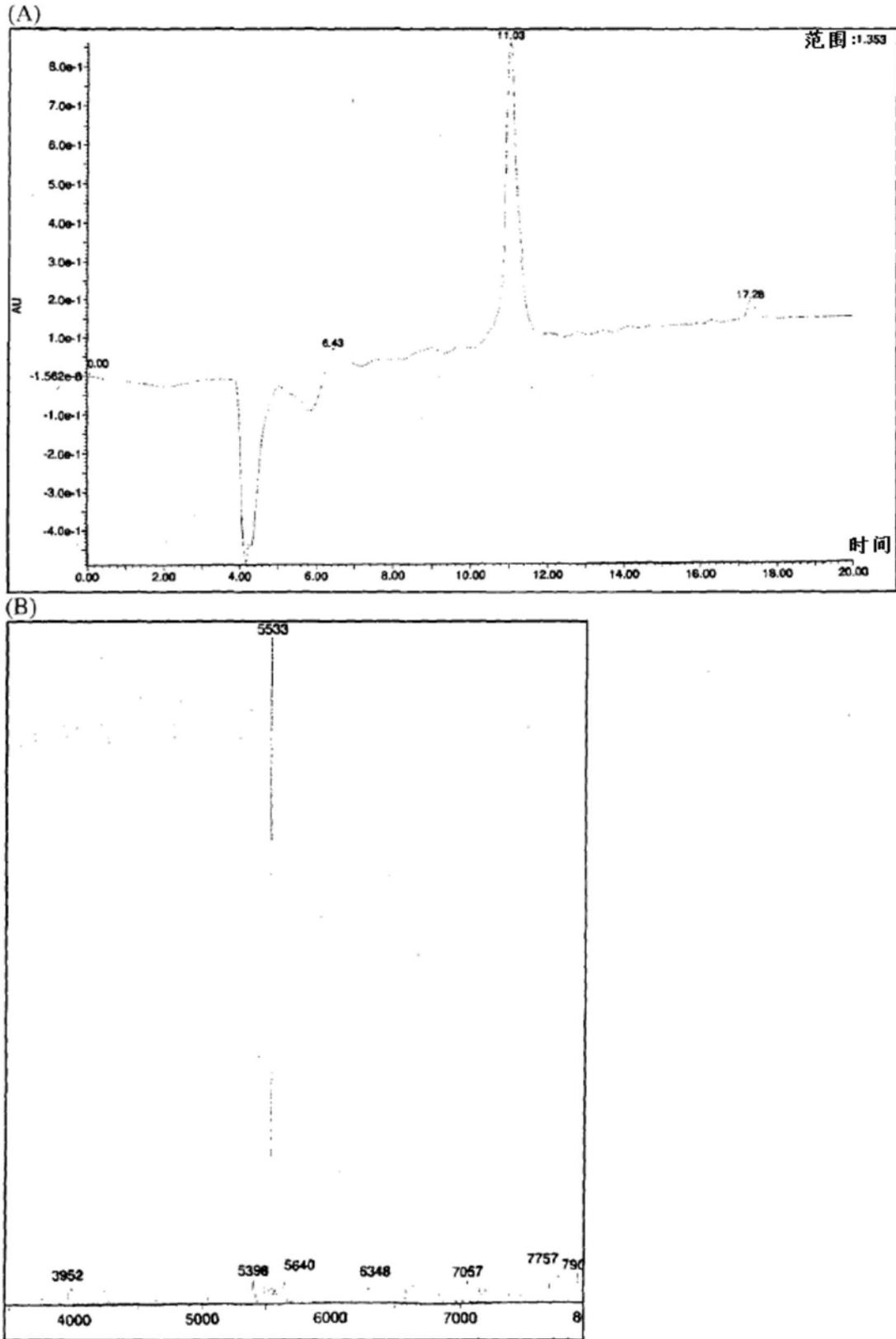


图16

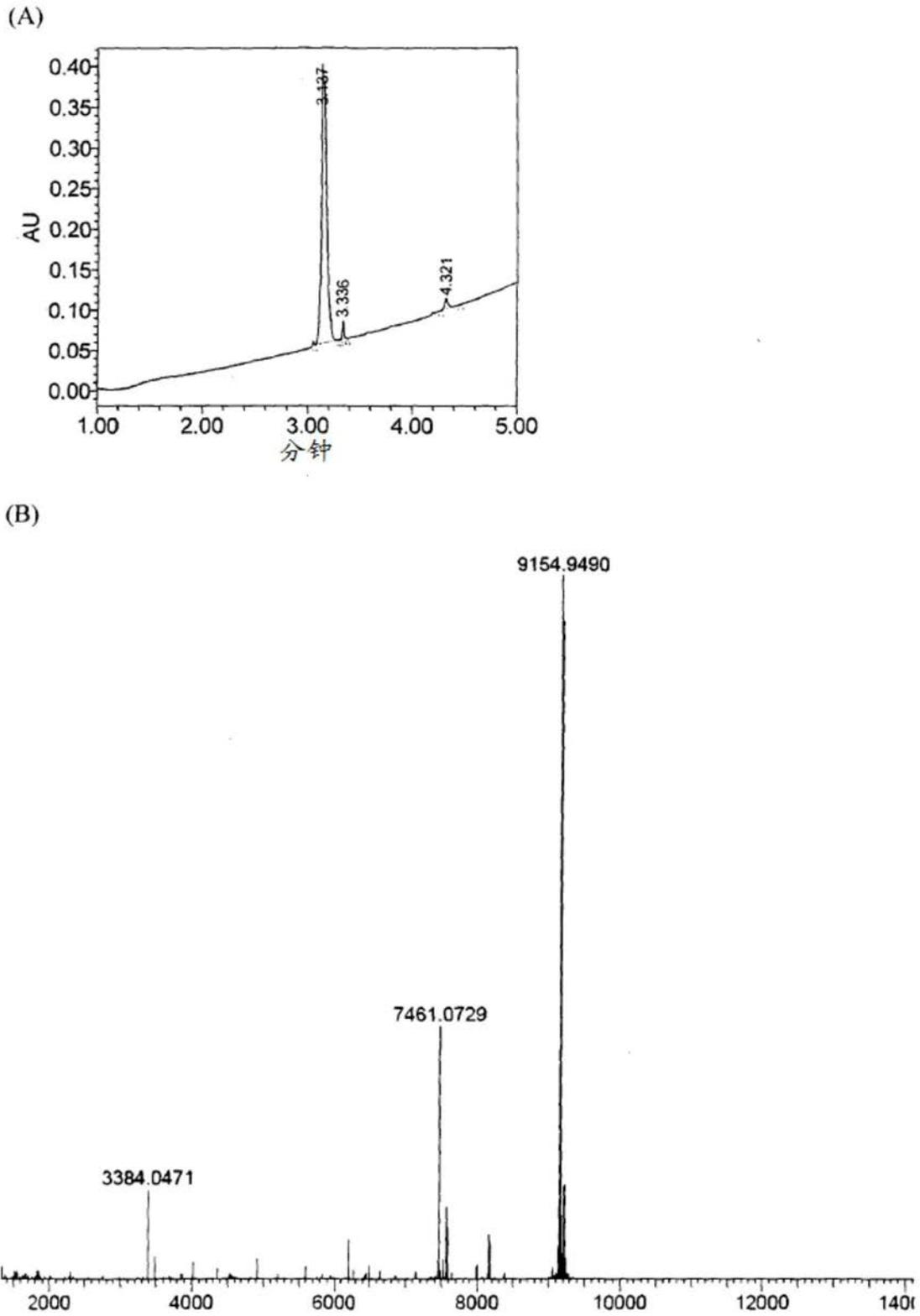


图17

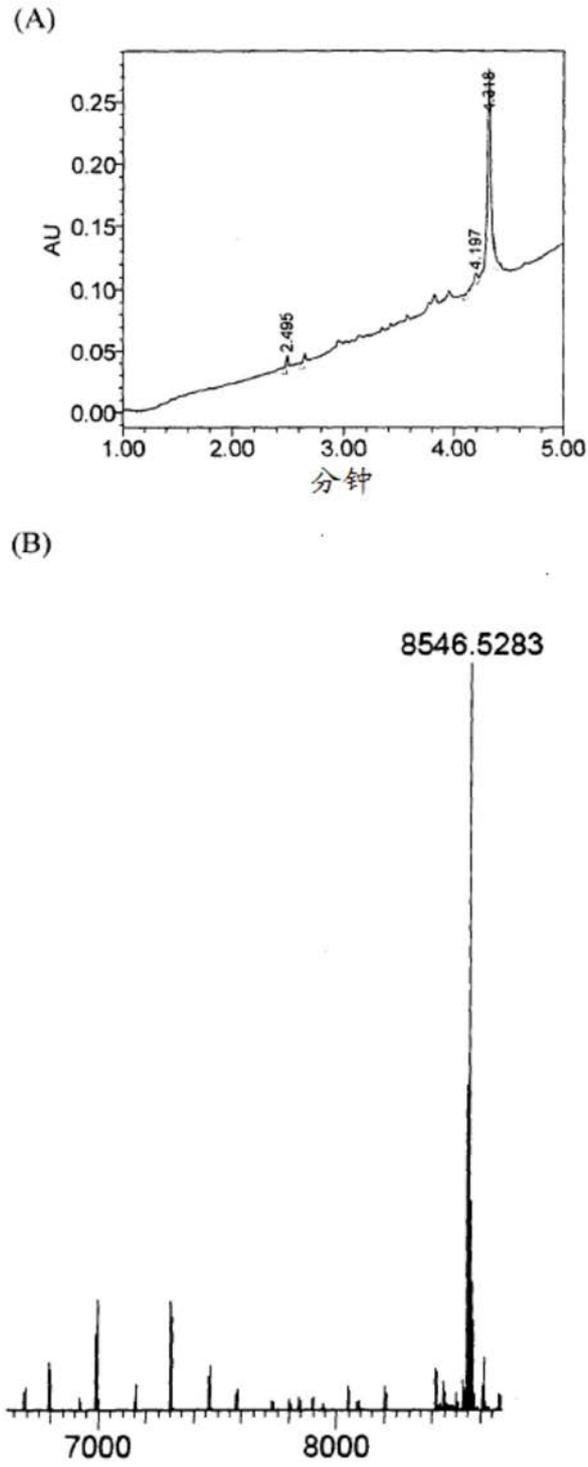


图18

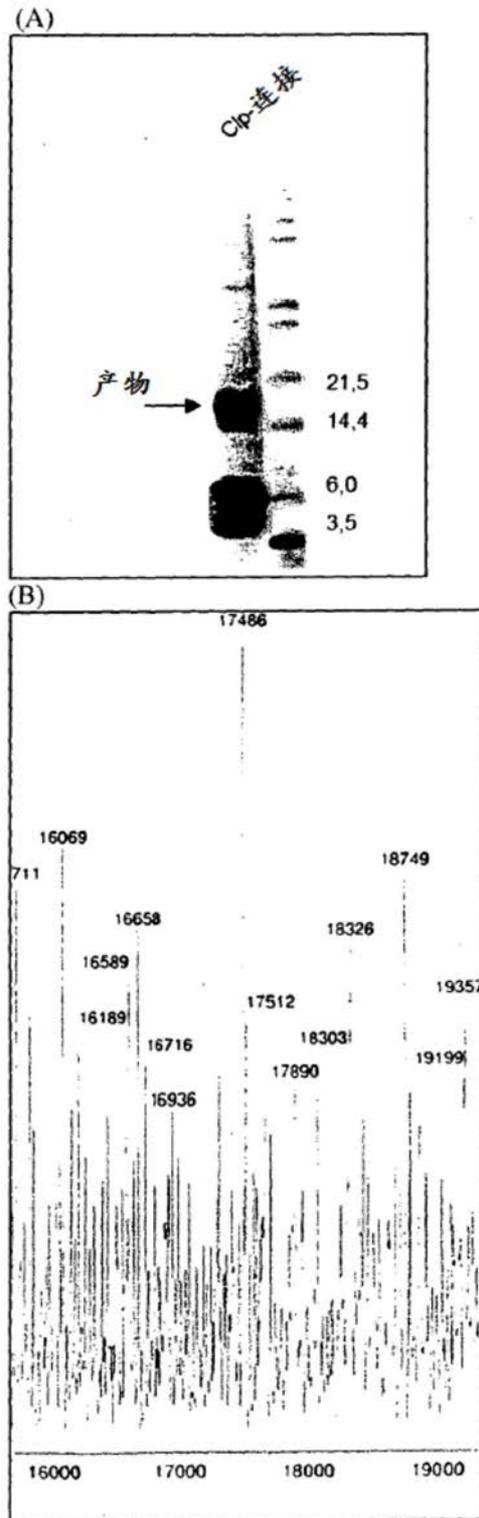


图19

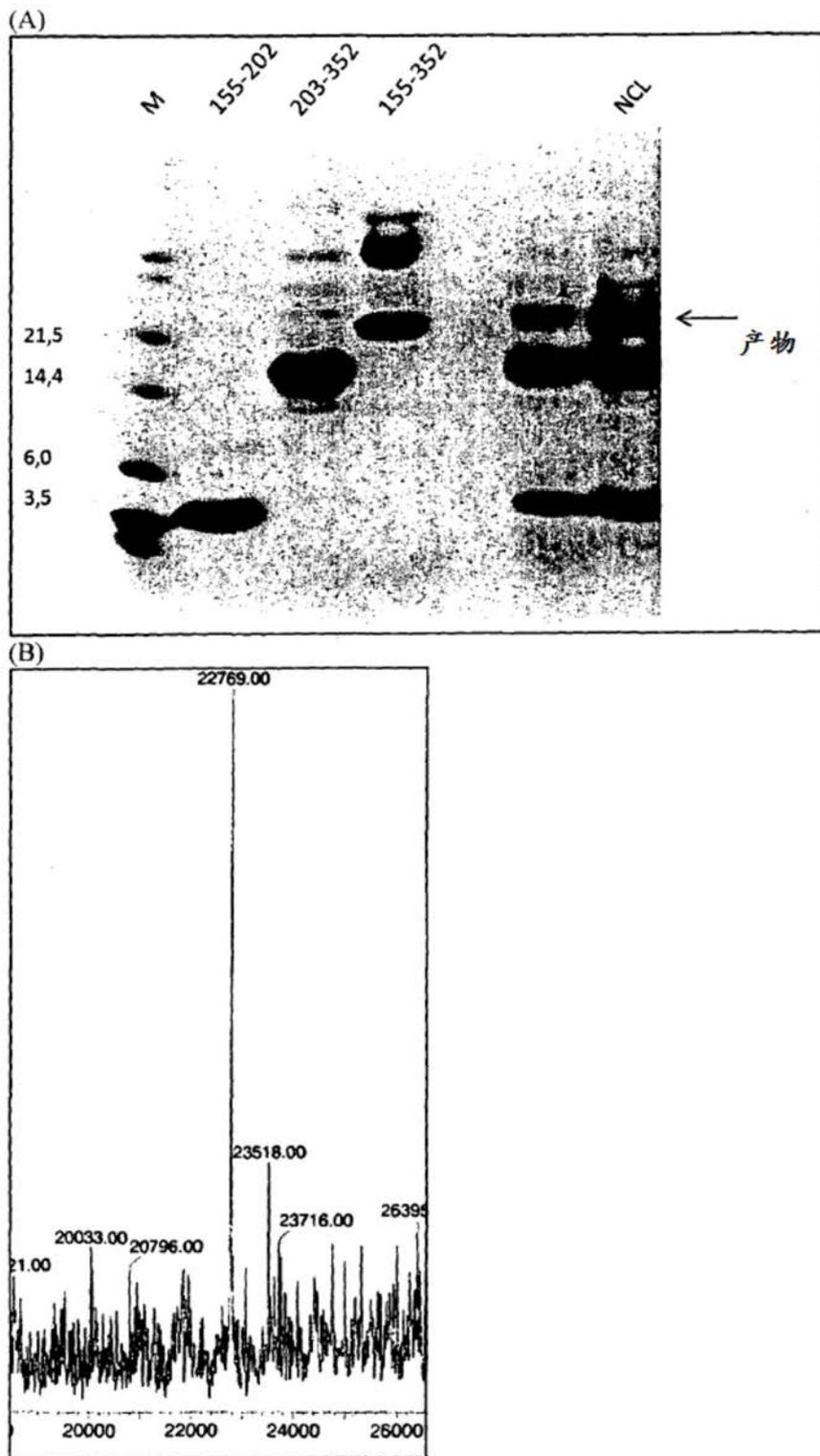


图20