



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1703509 B

(45) 授权公告日 2010.09.01

(21) 申请号 03823305.3

C12N 15/66(2006.01)

(22) 申请日 2003.09.03

C12N 15/70(2006.01)

(30) 优先权数据

60/408,482 2002.09.03 US

(56) 对比文件

WO 02066657 A1, 2002.08.29, 说明书第5页第6行至第12页第18行.

(85) PCT申请进入国家阶段日

2005.03.29

EP 1111061 A1, 2001.06.27, 说明书全文.

US 5910438 A, 1999.06.08, 说明书全文.

(86) PCT申请的申请数据

PCT/BE2003/000147 2003.09.03

审查员 刘红霞

(87) PCT申请的公布数据

WO2004/022745 EN 2004.03.18

(73) 专利权人 布鲁塞尔自由大学

地址 比利时布鲁塞尔

(72) 发明人 C·兹皮尔 M·C·米林科维奇

P·加班特

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 程泳

(51) Int. Cl.

C12N 15/10(2006.01)

C12N 15/65(2006.01)

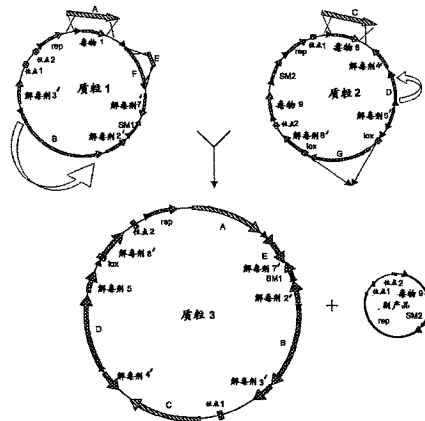
权利要求书 2 页 说明书 6 页 附图 5 页

(54) 发明名称

可逆的、平行的和多任务的克隆方法和试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及一种可逆的、平行的和/或多任务的克隆方法和试剂盒,它们改进了核酸构建体诸如载体或细胞染色体中的遗传元件(优选多个)的克隆,也改进了在体内或者体外快速、高效地选择正确整合了所述遗传元件的所述构建体。



1. 适用于至少一个靶核苷酸序列的插入和 / 或缺失和 / 或倒位的遗传构建体, 包含:
- 位于编码第一毒性分子的第一核苷酸序列的上游的第一启动子和激活子序列, 和位于相反方向的第二启动子和激活子序列, 其中所述第二启动子和激活子序列位于不同于编码第一毒性分子的第一核苷酸序列的第二毒性分子的解毒剂的第二核苷酸序列的上游。

2. 权利要求 1 的遗传构建体, 其还包含编码第一毒性分子的解毒剂的第三核苷酸序列, 所述第三核苷酸序列处于第二启动子和激活子序列的控制之下。

3. 依照权利要求 1 或 2 的遗传构建体, 其中编码毒性分子或者毒性分子的解毒剂的每个核苷酸序列是编码作为具有毒性分子或者所述毒性分子的解毒剂活性的融合蛋白的核酸序列, 所述融合蛋白由下述编码核苷酸序列所编码, 所述编码核苷酸序列包括几个独特的克隆位点以及编码针对细胞的毒性分子或毒性分子的解毒剂的核苷酸序列。

4. 依照权利要求 1 或 2 的遗传构建体, 进一步包括位于编码毒性分子的核苷酸序列和 / 或编码毒性分子的解毒剂的核苷酸序列的上游和下游的重组位点。

5. 依照权利要求 1 或 2 的遗传构建体, 其中编码毒性分子以及所述毒性分子的解毒剂的序列是毒物和解毒剂序列。

6. 权利要求 5 的遗传构建体, 其中所述毒物和解毒剂序列选自下列毒物 / 解毒剂系统: CcdB/Ccdh、Kid/Kis、Hok/Sok、Doc/Phd、ReIE/ReIB、PasA/PasB/PasC、MazE/MazF、ParE/ParD。

7. 克隆载体, 包含至少一个前面权利要求 1 至 6 中任何一项的遗传构建体。

8. 权利要求 7 的克隆载体, 进一步包含复制起点和选择标记。

9. 权利要求 8 的克隆载体, 其中所述选择标记为抗生素抗性选择标记。

10. 被前面权利要求 1 至 6 中任何一项的遗传构建体或者前面权利要求 7 至 9 中任何一项的克隆载体转化或者含有整合于其染色体基因组上的至少一个依照前面权利要求 1 至 6 中任何一项的遗传构建体的细胞。

11. 权利要求 10 的细胞, 选自原核细胞、植物细胞、动物细胞和真菌细胞。

12. 权利要求 11 的细胞, 其中所述动物细胞为人细胞, 所述真菌细胞为酵母细胞。

13. 克隆和选择试剂盒, 包括一个或者多个依照前面权利要求 1 至 6 中任何一项的遗传构建体, 一个或多个权利要求 7-9 中任一项的克隆载体以及将被所述构建体或者克隆载体转化的细胞, 所述细胞对一种或者多种所述毒性分子具有抗性或者敏感, 表达一种或者多种所述毒性分子或者所述毒性分子的解毒剂。

14. 一种把靶核苷酸序列插入遗传构建体中的方法, 包括下列步骤:

- 通过鉴定外显子 - 内含子结构以及与表达基因数据库进行比较而分析基因组序列, 从而从所述基因组数据库中选择所述靶核苷酸序列,

- 给出适合所述靶基因序列的基因扩增和克隆的引物序列,

- 选出数据库中存在的所述遗传构建体元件以及待被所述遗传构建体转化的细胞,

- 给出适用于所述靶核苷酸序列整合的遗传构建体的设计, 把已经获得的虚拟遗传构建体的设计存入目标存储数据库,

- 根据所述设计, 提供权利要求 1-6 中任一项的遗传构建体, 编码毒性分子的核苷酸序列缺失, 通过失活编码毒性分子的核苷酸序列而将所述靶核苷酸序列插入所述核酸构建体, 和

- 在对所述毒性分子敏感的细胞中选择已经整合了所述靶核苷酸序列的遗传构建体。

15. 权利要求 14 的方法, 其用自动机操作。

16. 权利要求 14 的方法, 其中权利要求 1-6 中任一项的遗传构建体整合于权利要求 7-9 中任一项的克隆载体或权利要求 10-12 中任一项的细胞。

17. 权利要求 14 的方法, 进一步包括用靶序列插入后被删去的元件替换所述靶序列, 或通过整合具有倒位的表达方向的靶序列而替换所述靶序列。

18. 权利要求 14-17 中任一项的方法, 其中靶序列的整合、替换或者倒位用经典的限制性酶切 / 连接、位点特异性重组、TOPO 克隆和同源重组来完成。

19. 权利要求 14-17 中任何一项的方法, 包括几个靶核苷酸序列插入和 / 或缺失和 / 或倒位到多个遗传构建体, 以及同时选择已经正确整合、缺失或倒位了所述靶序列的构建体。

20. 权利要求 19 的方法, 其中同时选择已经正确整合、缺失或倒位了所述靶序列的构建体的步骤在单个细胞或单个反应管中进行。

21. 用于执行权利要求 14-20 中任一项的方法并且连于计算机数据库的自动机, 所述自动机包含依照权利要求 1 至 6 任一项的遗传构建体或者依照权利要求 7-9 中任一项的克隆载体或者依照权利要求 10-12 中任一项的细胞或者依照权利要求 13 的试剂盒的组分。

可逆的、平行的和多任务的克隆方法和试剂盒

[0001] 发明领域

[0002] 本发明涉及一种可逆的、平行的和 / 或多任务的克隆方法和试剂盒,它们改进了核酸构建体诸如载体或细胞染色体中的遗传元件(优选多个)的克隆,也改进了在体内或者体外快速、高效地选择正确整合了所述遗传元件的构建体。

[0003] 发明背景

[0004] 为了获得含多个遗传元件的复合分子构建体,选择那些促成目的构建体含有的所述遗传元件在正确位置、以正确方向组装的遗传事件(DNA片断的插入和 / 或缺失和 / 或倒位)通常是一个耗时的过程。

[0005] 尤其是,一个人必需面对可能在同一个反应管中选择多个不同的遗传事件(遗传序列在核酸构建体中的插入、缺失、倒位)这一重要问题。

[0006] 所以,分子生物学家通常应该在同一反应管中彼此分离地而不是同步地获得遗传事件(遗传序列在核酸构建体中的插入、缺失、倒位)并且应该避免在所述的遗传操作中犯任何错误(遗传序列以错误的方向进行错误整合,等等,)。

[0007] 发明目的

[0008] 本发明首要的目的涉及方法和工具,它们为上述问题提供了一种解决办法,尤其是能够让分子生物学家插入和 / 或除去遗传元件,或者谋求改变核苷酸序列中所述遗传元件的表达方向(lectureorientation)(倒位),无论在体内还是体外。

[0009] 本发明另一个目的是提供允许在体内或者体外创建遗传构建体(例如载体或者细胞的染色体),通过多个遗传元件的插入、缺失、和 / 或倒位进行组装并进而选出正确整合(删除或倒位)这些遗传元件的所述遗传构建体的方法和工具。

[0010] 本发明更深远的目的是为生物学家提供允许其平行操作本方法步骤以及在同一或不同反应管中同时进行多项作业(选择多重遗传事件)的工具。

[0011] 本发明最后一个目的是提供使遗传事件(插入和缺失和倒位)可逆的工具,这样任何核酸构建体都可看作是一套可被重复利用的元件,即,可重复用于其它不同的核酸构建体的组装的元件。

[0012] 发明概述

[0013] 此后描述的方法和试剂盒中,本领域技术人员使用特定遗传构建体,它是依照本发明进行克隆和选择方法的工具。所述的工具为可整合入载体(质粒或病毒,包括噬菌体)或者细胞染色体基因组的遗传构建体,其中所述载体或染色体基因组适于克隆并选择各种遗传元件的正确组装。所有这些方法和系统允许一个或者多个外源遗传元件(目的靶序列)整合到所述核酸构建体载体或者细胞染色体特定位点。外源遗传(优选自体的)元件整合到本发明的核酸构建体可用本领域技术人员所熟知的技术来完成,诸如,但不限于经典的限制性酶切 / 连接、位点特异性重组、TOPO 克隆和同源重组。遗传元件的组装可能涉及到核苷酸序列的插入、缺失和 / 或倒位。依据本发明的方法,选出正确插入的序列需使用特殊标记,这是一些核苷酸序列,所编码的分子对细胞有毒性或者是此类毒性分子的抑制因子和 / 或能够阻断细胞表达的此类分子的毒性活性。所述分子优选为毒物和 / 或毒物抑

制剂,优选选自(但不限于)下列毒物/解毒剂系统:Ccdb/Ccda、Kid/Kis、Hok/Sok、Doc/Phd、RelE/RelB、PasA/PasB/PasC、MazE/MazF、ParE/ParD。

[0014] 依据本发明的方法中,所述外源核苷酸元件有利地连(在其3'或者5'或者两端)于一个或多个启动子/操纵基因核苷酸序列,诸如,但不限于组成型启动子,所述组成型启动子使依照本发明整合于核苷酸构建体的靶核苷酸序列得以表达,只要他们依照合适的和所要求的表达方向放置。

[0015] 依照本发明的方法,本领域技术人员使用恰当的、对一种或多种所述毒性分子具有抗性或者敏感的细胞株(原核的和/或真核的)以获得和选择重组体。细胞株的这些特性举例说可能归因于编码毒物和/或解毒剂的基因的存在且整合进细胞的染色体或者存在于游离序列(诸如质粒)中。

[0016] 可逆的克隆和选择方法以及试剂盒

[0017] 本发明一个首要的方面涉及一种可逆的克隆方法和试剂盒,针对它们的几个优选的特定例子详述如下,参照图2-5。

[0018] 本发明的方法中所用的元件为特殊的细胞以及整合于载体或者细胞的染色体中的遗传元件,所述遗传元件包含:

[0019] - 启动子/激活子序列11,位于编码两个不同毒性分子(例如毒物1和毒物2)的第一和第二核苷酸序列(1,2)的上游(图2,左),或者

[0020] - 第一启动子/激活子序列11,位于编码毒性分子(例如毒物1)的第一核苷酸序列1的上游,以及位于与第一启动子/激活子序列11表达方向相反的第二启动子/激活子序列12,位于编码第二毒性分子的解毒剂2'的第二核苷酸序列的上游(图3,左),或者

[0021] - 启动子/激活子序列11,位于分别编码第一毒性分子(例如毒物1)以及不同于所述第一毒性分子的第二毒性分子(例如毒物2)的解毒剂的第一和第二核苷酸序列(1,2')的上游(图4,左)。

[0022] - 这里的术语“编码毒性分子或者毒性分子的解毒剂的核苷酸序列”也囊括了含有编码几个相同毒性分子的多个编码部分的序列。

[0023] 外源靶核苷酸序列(A)“插入”编码毒性分子成分的核苷酸序列(1)或者“取代其”可使得:

[0024] - 编码第一毒性分子的核苷酸序列1失活,且编码第二毒性分子的序列2激活或者保持活化(图2);或者:

[0025] - 编码第一毒性分子的第一核苷酸序列1失活,且编码第二毒性分子的解毒剂的核苷酸序列2失活(图3);或者:

[0026] - 编码第一毒性分子的第一核苷酸序列1失活(图4)。

[0027] 插入的外源遗传元件(靶序列)可能是调控序列或目的基因(可能连接一个或多个启动子/操纵基因序列)。

[0028] 遗传事件(插入)的选出可以在对第一毒性分子(图.2&3&4)敏感且可能抗第二毒性分子(图.2)的细胞株中进行。

[0029] 但是,所述遗传事件(插入或者置换)是可逆的,即可以用第一步中重组和插入后缺失掉的元件置换已插入的元件(靶序列)。这一靶序列的可逆缺失反应可以在对毒性分子1具有抗性并对毒性分子2(图2,3,4)敏感以及可能产生毒性分子2(图3&4)的株系中

选择。

[0030] 此可逆克隆和选择方法同样适用于获得插入的遗传元件的倒位。下面详述一具体例子,参照图 5。的确,通过本发明的方法(优选按照图 4 的插入步骤)或者直接将靶序列插入到两个不同的解毒剂序列之间(1',2')可以将目的序列的方向逆转。连接启动子/操纵基因(在 3' 或者 5' 末端)的所述遗传元件(靶序列)最初整合于分别编码两个不同毒性分子 1 和 2 的两种不同解毒剂的两个核苷酸序列(1',2')中间。所述编码两种不同解毒剂的两个核苷酸序列(1',2')位于相反的表达方向(以相反背离(opposite divergent)的表达方向位于靶核苷酸序列的上游和下游)。此构建体允许选择重组事件,所述重组事件使得目的靶核苷酸序列及其关联的启动子要么与编码第一毒性分子的解毒剂的核苷酸序列 1' 的方向相同(在既对毒物 1 敏感又产生毒物 1 的株系中进行选择),要么与编码第二毒性分子的解毒剂的核苷酸序列 2' 的方向相同(在既对毒物 2 敏感又产生毒物 2 的株系中进行选择)。(参见 WO 02/066657,此处引用作为参考)平行的和/或多任务的克隆和选择

[0031] 上述可逆克隆和选择方法和元件(核酸构建体或者载体与特定细胞株)也可用于下述平行和/或多任务的克隆和选择方法。(详述于随后参照图 1 的实施例中)。

[0032] 多个外源遗传元件(不同的靶序列)在载体或者细胞染色体上的组装(体外或者体内)以及正确组装的选择是用含有一个或者多个(相同或者不同)毒性分子和/或其解毒剂的编码序列的多个核酸构建体来获得的。根据核酸构建体的类型以及选择标记(编码毒性分子和/或毒性分子的解毒剂)的类型,本领域技术人员能够选出所述多个遗传元件恰当的插入、缺失和/或倒位事件。

[0033] 所述克隆和选择方法或许需要有可能在同一反应管或单一细胞里进行(顺次地)的多个步骤。

[0034] 所述方法可与蛋白质体外合成(使用体外转录和翻译试剂盒)的步骤和手段相结合。

[0035] 本发明的另一方面涉及算法、计算机程序以及数据库(包括可能存储于计算机可读介质上的编码及手段),它们可帮助进行本发明的方法中的一步或多步操作。所述的算法、数据库以及程序编码手段用来定义(但不限于)下列的正确组合:

[0036] - 恰当的标记(编码毒性分子和/或所述毒性分子的解毒剂);

[0037] - 用于选择恰当的遗传事件的合适的细胞株;

[0038] - 恰当的起始前(pre-starting)核酸构建体;

[0039] - 将被插入、缺失和/或倒位的恰当的遗传元件(靶核苷酸序列和/或他们的操纵基因/启动子序列);

[0040] - 分子构建体组装/生产所必须的反应混合物(包括但不限于重组混合物、缓冲剂、培养基、酶...)

[0041] 该算法、计算机程序和数据库也能够控制本发明方法中的一个或者多个步骤,可能进行自动化操作。

[0042] 本发明的另一个方面涉及试剂盒(克隆和/或选择试剂盒),包括用于施行本发明的方法的恰当的成分,尤其是上述计算机程序、核酸构建体、细胞株和/或克隆和选择技术中用到的常见产品和培养基。

[0043] 本发明的另一方面涉及把靶核苷酸序列插入遗传构建体中的方法,包括下列步骤:

[0044] - 通过鉴定外显子-内含子结构以及与表达基因数据库进行比较而分析所述基因组序列,从而有可能从基因组数据库中选择所述靶核苷酸序列,

[0045] - 可能给出适合所述靶基因序列基因扩增和克隆的引物序列,

[0046] - 可能选出数据库中存在的所述核酸构建体元件以及待被所述核酸构建体转化的细胞,

[0047] - 可能给出适用于所述靶核苷酸序列整合的核酸构建体的设计也有可能把已经获得的实际核酸构建体的设计存入目标存储数据库,

[0048] - 提供(可能来自所述设计)本发明的核酸构建体,该核酸构建体可能整合于载体上或细胞中,并且通过失活编码毒性分子的核苷酸序列而使所述靶核苷酸序列插入所述核酸构建体,以及

[0049] - 在对所述毒性分子敏感的细胞中选择已经整合了所述靶核苷酸序列的核酸构建体。

[0050] 本发明的另一个方面涉及自动机,其可执行本发明方法以及使用上述试剂盒。所述试剂盒(克隆和选择试剂盒,结合足够的培养基、细胞和体外转录和翻译试剂盒中的培养基)和自动机也可能包含其他要素,诸如缓冲溶液、移液元件(pipeting element)、基因扩增用引物、细胞培养基以及记录结果和保存数据的手段。

[0051] 随后的实施例中参照附图对本发明进行详细的描述,作为本发明多方面的非限制性示例。

[0052] 附图简述

[0053] 图 1 为实施本发明方法通过平行多遗传事件而获得的复合遗传构建体的例图。

[0054] 图 2 到 5 是本发明中可逆克隆和选择方法和试剂盒的例图。

[0055] 发明详述

[0056] 此项发明利用 (i) 同时和 (ii) 平行事件(各种重组和选择事件以几乎同样的频率出现)可制造复合遗传构建体。本发明的“多任务”性质定义如下:比如,本发明允许进行遗传元件 A 和 C 的插入、遗传元件 E 和 F 的缺失以及遗传元件 B 和 D 的倒位,一些或者所有事件(图. 1)在体外(即,在同一试管中)或者体内(即,同一生物体中)同时进行。上述事件的最终产物是包含遗传元件 A、B、C 和 D 且方向一致的复合构建体。利用针对每一事件的不同选择标记(例如此处的毒物和解毒剂基因)达成对几个遗传事件(例如,此处为插入、缺失、倒位、重组)的同时选择。实心黑色箭头代表启动子。

[0057] 质粒 1 在对毒物 1 具有抗性的株系中扩增。质粒 2 在对毒物 6 和 9 具有抗性的株系中扩增。质粒 3 在下面某一株系中进行选择:

[0058] - 对毒物 1 和 6 敏感(用于选择遗传元件 A 和 C 的插入),

[0059] - 对毒物 3 和 5 敏感(用于选择遗传元件 B 和 D 的倒位),

[0060] - 对毒物 7 和 8 敏感(用于选择遗传元件 E 和 F 的缺失),

[0061] - 对毒物 9 敏感(用于选择发生在源于质粒 1 的构建体和源于质粒 2 的构建体之间的重组事件),

[0062] - 以及产生毒物 3、毒物 5、毒物 7 和毒物 8。

[0063] 每一个“重组”事件的实现可以通过诸如,但不限于,经典的限制性酶切/连接、位点特异性重组或者同源重组这些技术来完成。每一个遗传事件(插入、缺失、倒位等)的特异性由重组事件的特异性保证。例如,使用不同的邻接于插入位点和插入片段的DNA序列(这些DNA序列可由本领域操作所述重组事件的技术人员选出)可以实现插入的特异性(插入(靶核苷酸序列)的位置和方向)。这些侧翼序列构成不同的位点特异性重组元件(位点特异性重组的情况下)或构成不同的同源元件(同源重组的情况下)。利用针对每一事件的不同选择标记达成对几个遗传事件(例如,插入、缺失和倒位)的同时选择。由于每一个遗传事件很少自然发生,选出所有事件同时存在的状况需要使用非常高效的选择标记(例如,但不限于,解毒剂/毒物基因)。

[0064] 本发明中平行克隆的性质定义如下:可以用上述多任务方法产生于同一反应混合物(即,在同一试管)的N个不同的遗传构建体可以进行预先设计,使它们的组装(此处指源于质粒1的构建体和源于质粒2的构建体二者的组装)也能通过重组事件得以发生。换句话说,N-1遗传构建体可看作供体,而1构建体可看作受体。例如,通过使用针对n-1个重组事件的n-1个选择标记,N个构建体可以得以组合(图1)。

[0065] 而且,本发明允许将多任务/平行克隆方法得到的产物用作新反应的原材料(building block)。确实,本发明产出的构建体是原材料的独特组合,这些原材料可被重新用于新的(不同)构建体;即本方法是可逆的并且是可扩展的,示于图2至4。

[0066] 图2中,要插入的DNA片断编码目的靶序列和位于其3'末端的启动子序列。在对毒物1敏感但对毒物2具有抗性的株系中缺失掉编码毒物1的核苷酸序列1从而选出含有适当插入物的核酸构建体。插入最初除去的DNA片断(即,5'端带启动子的编码毒物1的核苷酸序列1)可以完成靶序列(DNA片断A)缺失以重复利用原材料。这一逆转事件在对毒物2敏感但对毒物1具有抗性的株系中选择。质粒1具有在对毒物1抗性的株系中扩增。质粒2在对毒物2具有抗性的株系中扩增。

[0067] 图3中,靶序列(DNA片断A)的插入可通过在对毒物1敏感的株系中缺失编码毒物1的核苷酸序列1而选出。插入最初除去的DNA片断(即,5'端带两个反方向启动子的毒物1)可以完成DNA片断A缺失,以重复利用原材料。这一逆转事件在允许毒物2进行条件性表达、对毒物2敏感并对毒物1具有抗性的株系中选出。质粒1在对毒物1具有抗性的株系中扩增。质粒2在其活性不受质粒2存在与否的影响的任一株系中扩增。

[0068] 图4中,质粒1编码了构成操纵子的毒物1和解毒剂2。靶序列(DNA片断A)的插入可以通过在对毒物1敏感的株系中缺失编码毒物1的核苷酸序列而选出。插入最初除去的DNA片断(即,5'端带启动子的编码毒物1的核苷酸序列)可以完成靶序列(DNA片断A)缺失,以重复利用原材料。这一逆转事件可以通过在允许毒物2进行条件性表达、对毒物2敏感并对毒物1具有抗性的株系中激活编码解毒剂2的核苷酸序列而选出。质粒1在对毒物1具有抗性的株系中扩增。质粒2在其活性不受质粒2存在与否的影响的任一株系中扩增。

[0069] 图5中,靶序列(DNA片断A)含有允许产生解毒剂的启动子。DNA片断A的倒位可用允许毒物2进行条件性表达但又对其敏感的株系选出。逆转事件在允许毒物1进行条件性表达但又对其敏感的株系中选出。

[0070] 换句话说,通过本发明制得的构建体不是终端产品(dead-end product)(即,只用

于生产它们所要达到的目的) ;它们可被再循环。这就强调了本发明软件成分的重要性,因为它不仅创建一个原料数据库,而且使创建业已完成、储存(虚拟的存于计算机,真实物质存于冷冻或其他装置)备用的产品的数据库均成为可能。由于软件能够追踪每一原料和产品的特征,所以它也能鉴定出哪些元件对未来新的多任务/平行/可逆的方法是(i)必需的以及(ii)彼此兼容的。

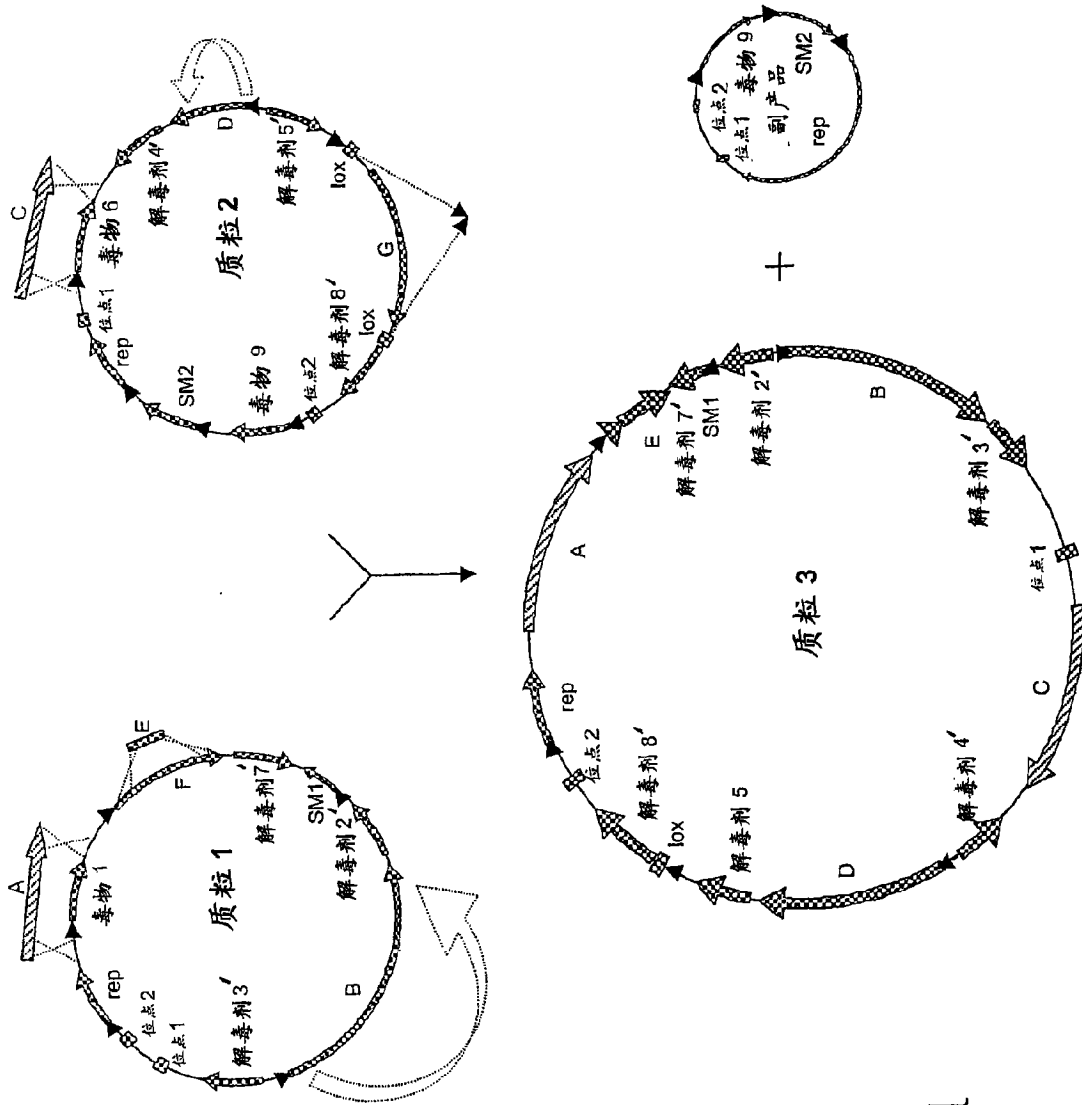


图1

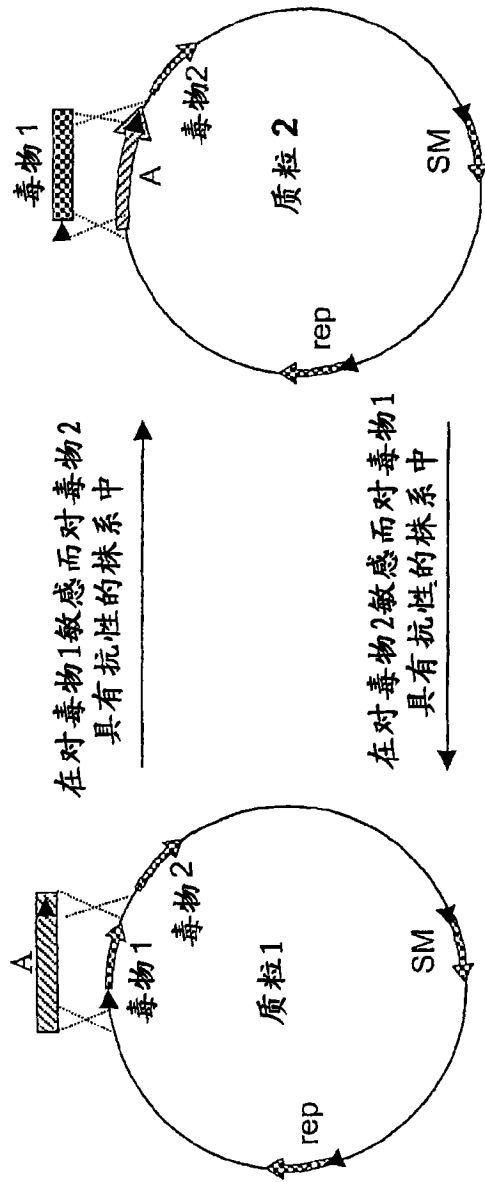


图2

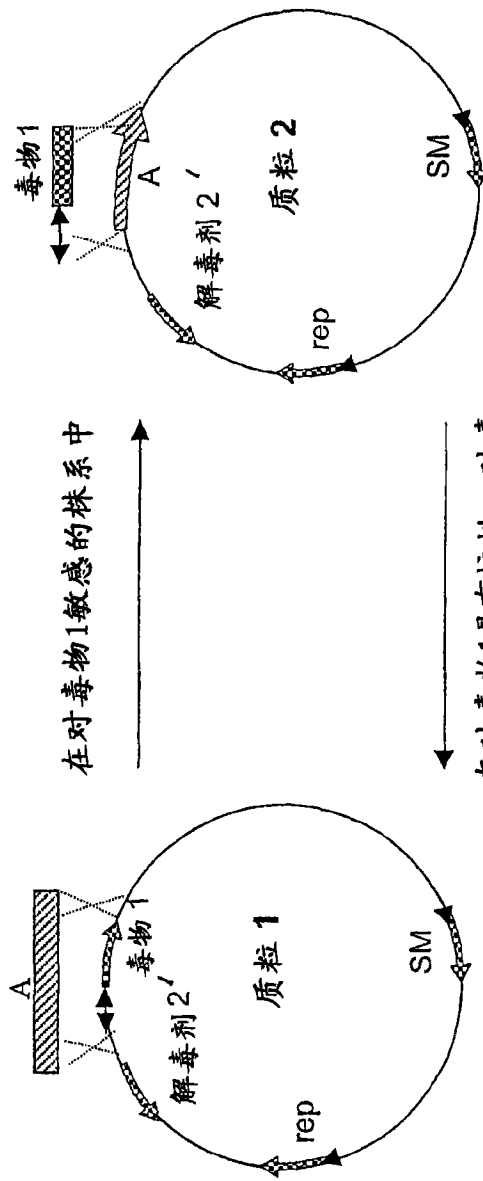


图 3

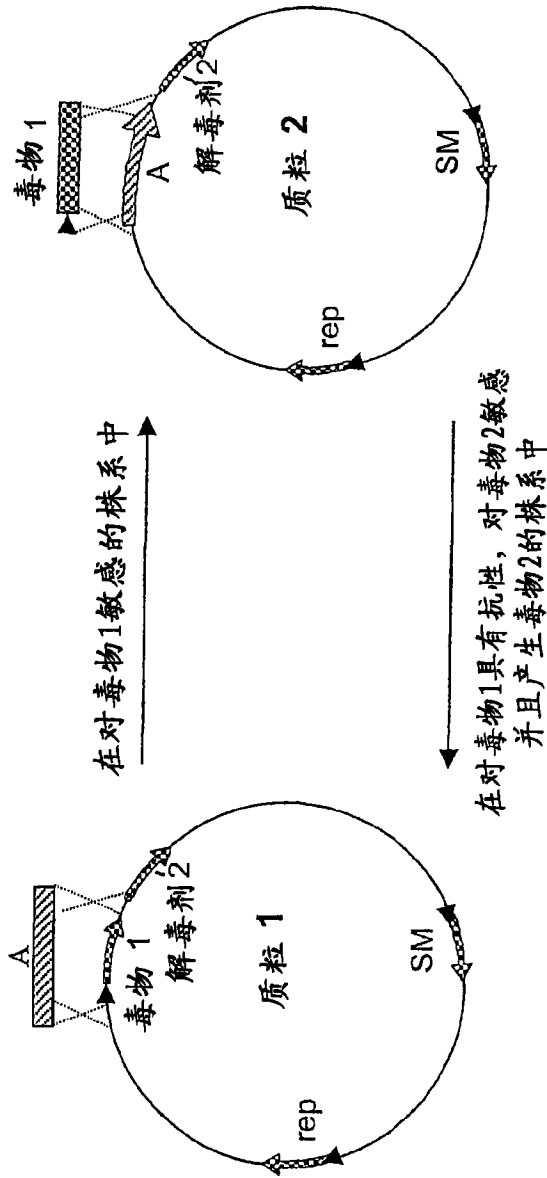


图4

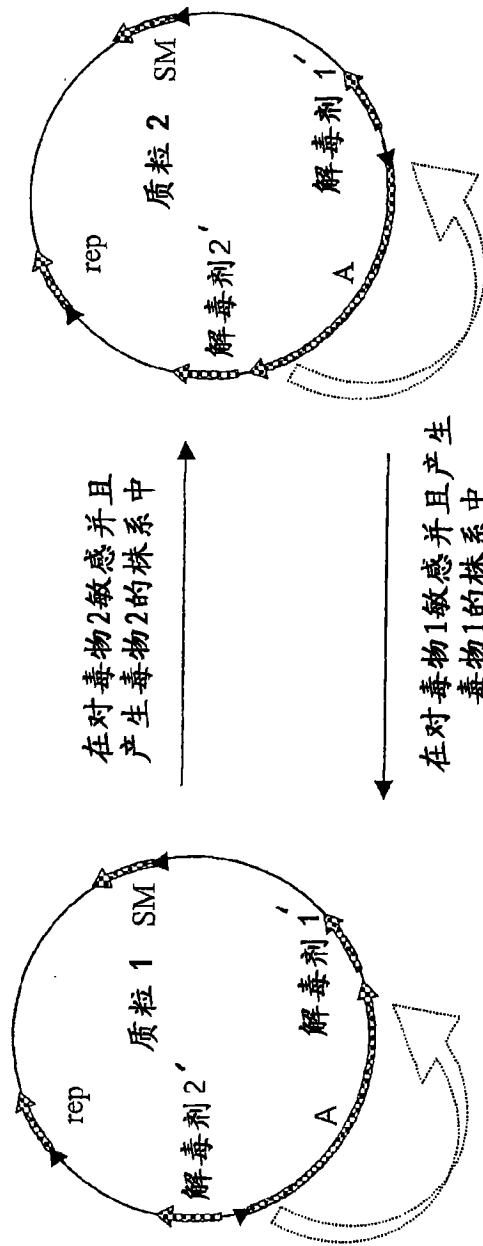


图5