



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 112292456 B

(45) 授权公告日 2025. 06. 13

(21) 申请号 201980038640.2	(72) 发明人 约翰·米尔顿 索比亚·纳亚 简·里德尔 大柿亮祐
(22) 申请日 2019.05.23	
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 112292456 A	(74) 专利代理机构 北京同立钧成知识产权代理有限公司 11205 专利代理师 严罗一 臧建明
(43) 申请公布日 2021.01.29	
(30) 优先权数据 1808474.9 2018.05.23 GB	(51) Int.Cl. C12Q 1/6806 (2006.01) C12P 19/34 (2006.01) C12Q 1/6855 (2006.01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2020.12.09	
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/GB2019/051423 2019.05.23	(56) 对比文件 W0 2011150168 A1,2011.12.01 W0 2016128731 A1,2016.08.18
(87) PCT国际申请的公布数据 W02019/224544 EN 2019.11.28	审查员 王炜晨
(73) 专利权人 牛津纳米孔科技公开有限公司 地址 英国剑桥郡	权利要求书12页 说明书115页 序列表22页 附图61页

(54) 发明名称
多核苷酸合成方法、系统和试剂盒

(57) 摘要
本发明涉及用于根据预定义核苷酸序列合成多核苷酸分子的新方法。本发明还涉及用于在合成之后组装合成多核苷酸的方法,以及用于进行合成和/或组装方法的系统和试剂盒。

1. 一种合成具有预定义序列的双股多核苷酸的体外方法,所述方法包括进行合成循环,其中每个循环包括裂解双股多核苷酸并且通过掺入核苷酸对来延伸裂解的双股多核苷酸,其中所述裂解的双股多核苷酸的第一股的末端通过添加预定义序列的核苷酸而延伸,并且与所述第一股杂交的所述裂解的双股多核苷酸的第二股的末端通过添加配偶体核苷酸而延伸,从而与所述第一股的掺入核苷酸形成核苷酸对;

其中每个循环包括通过添加所述预定义序列的所述核苷酸连同连接的可逆封闭基团来延伸所述第一股,然后延伸所述第二股,其中在所述第二股被延伸之前或之后去除所述可逆封闭基团,进一步

其中在每个循环中,所述核苷酸被掺入裂解的支架多核苷酸中;并且

其中每个循环包括:

(1) 提供支架多核苷酸;

(2) 在裂解位点裂解所述支架多核苷酸;

(3) 通过核苷酸转移酶或聚合酶的作用将所述预定义序列的核苷酸添加到所述裂解的支架多核苷酸中,所述核苷酸包括阻止通过酶进一步延伸的可逆终止子基团;

(4) 从所述预定义序列的所述核苷酸去除所述可逆终止子基团;并且

(5) 将连接多核苷酸连接到所述裂解的支架多核苷酸,所述连接多核苷酸包括所述预定义序列的所述核苷酸的配偶体核苷酸,其中在连接之后,所述预定义序列的所述核苷酸与所述配偶体核苷酸配对。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中步骤(1)包括提供包括合成股和与其杂交的支持股的支架多核苷酸,其中所述合成股包括引物股部分,并且所述支持股包括通用核苷酸;其中步骤(2)包括在裂解位点裂解所述支架多核苷酸,所述位点由包括所述支持股中的所述通用核苷酸的序列定义,其中裂解包括裂解所述支持股并且从所述支架多核苷酸去除所述通用核苷酸;并且其中在步骤(5)中,所述连接多核苷酸包括支持股,所述支持股包括所述配偶体核苷酸和定义用于下一循环的裂解位点的通用核苷酸,并且其中所述连接多核苷酸连接到所述裂解的支架多核苷酸的所述支持股,从而形成所述核苷酸对。

3. 根据权利要求1所述的方法,所述方法包括:

(1) 提供包括合成股和与其杂交的支持股的支架多核苷酸,其中所述合成股包括通过单股断裂分离的引物股部分和辅助股部分,并且所述支持股包括通用核苷酸;

(2) 在裂解位点裂解所述支架多核苷酸,所述位点由包括所述支持股中的所述通用核苷酸的序列定义,其中裂解包括裂解所述支持股并且从所述支架多核苷酸去除所述通用核苷酸,以提供裂解的双股支架多核苷酸,所述裂解的双股支架多核苷酸包括支持股和包括所述引物股部分的合成股;

(3) 通过核苷酸转移酶或聚合酶的作用使所述裂解的双股支架多核苷酸的所述合成股的所述引物股部分的所述末端与所述预定义序列的第一核苷酸一起延伸,所述第一核苷酸包括阻止通过所述酶进一步延伸的可逆终止子基团;

(4) 从所述第一核苷酸去除所述可逆终止子基团;

(5) 将双股连接多核苷酸连接到所述裂解的支架多核苷酸,所述连接多核苷酸包括支持股和与其杂交的辅助股并且进一步包括互补连接端,所述连接端包括:

(i) 在所述支持股中的通用核苷酸和所述第一核苷酸的配偶体核苷酸,其中所述第一

核苷酸的所述配偶体核苷酸突出于所述辅助股;以及

(ii) 在所述辅助股中的缺少磷酸基团的末端核苷酸;

其中在连接所述支持股之后,所述第一核苷酸与所述配偶体核苷酸配对;

(6) 在裂解位点裂解所述支架多核苷酸,所述位点由包括所述支持股中的所述通用核苷酸的序列定义,其中裂解包括裂解所述支持股并且从所述支架多核苷酸去除所述通用核苷酸,以提供裂解的双股支架多核苷酸,所述裂解的双股支架多核苷酸包括支持股和包括引物股部分的合成股;

(7) 通过核苷酸转移酶或聚合酶的作用使所述裂解的双股支架多核苷酸的所述合成股的所述引物股部分的所述末端与所述预定义核苷酸序列的下一核苷酸一起延伸,所述下一核苷酸包括阻止通过所述酶进一步延伸的可逆终止子基团;

(8) 从所述下一核苷酸去除所述可逆终止子基团;并且

(9) 将双股连接多核苷酸连接到所述裂解的支架多核苷酸,所述连接多核苷酸包括支持股和与其杂交的辅助股并且进一步包括互补连接端,所述连接端包括:

(i) 在所述支持股中的通用核苷酸和所述下一核苷酸的配偶体核苷酸,其中所述下一核苷酸的所述配偶体核苷酸突出于所述辅助股;以及

(ii) 在所述辅助股中的缺少磷酸基团的末端核苷酸;

其中在连接所述支持股之后,所述下一核苷酸与所述配偶体核苷酸配对;

(10) 重复步骤6到9多次以提供具有预定义核苷酸序列的所述双股多核苷酸。

4. 根据权利要求3所述的方法,其中:

a) 在第一循环的裂解步骤(步骤2)之前和在所述裂解步骤时,所述通用核苷酸占据所述支架多核苷酸的所述支持股中的位置n,其中位置n为所述支持股中与所述合成股中的位置相对的核苷酸位置,在所述循环中,在将所述预定义序列的所述第一核苷酸添加到所述引物股部分的末端之后,所述合成股中的位置将由所述第一核苷酸占据,其中在所述支持股中的位置n处的所述核苷酸与所述辅助股的所述末端核苷酸相对并且与其配对;

b) 在所述第一循环的所述裂解步骤(步骤2)中,所述支架多核苷酸的所述支持股在位置n与n-1之间裂解,其中相对于在所述辅助股的远侧/所述引物股部分的近侧的方向上的位置n,位置n-1是所述支持股中的下一核苷酸位置;

c) 在所述第一循环的所述连接步骤(步骤5)中,所述连接多核苷酸的互补连接端经结构化以使得用于所述预定义序列的所述第一核苷酸的所述配偶体核苷酸为所述支持股的所述末端核苷酸并且占据位置n,其中所述通用核苷酸占据所述支持股中的位置n+1,并且与所述辅助股的所述末端核苷酸配对,其中位置n为在步骤5中将所述连接多核苷酸连接到所述裂解的支架多核苷酸之后,将与所述预定义序列的所述第一核苷酸相对的核苷酸位置;

d) 在第二循环的所述裂解步骤(步骤6)和所有后续循环的裂解步骤中:

i. 所述通用核苷酸占据所述支架多核苷酸的所述支持股中的位置n,其中位置n为所述支持股中与所述合成股中的位置相对的所述核苷酸位置,在所述循环中,在将所述预定义序列的所述下一核苷酸占据添加到所述引物股部分的末端之后,所述合成股中的位置将由所述下一核苷酸占据;并且

ii. 所述支架多核苷酸的所述支持股在位置n与n-1之间裂解,其中相对于在所述辅助

股的远侧/所述引物股部分的近侧方向上的位置 $n, n-1$ 是所述支持股中的所述下一核苷酸位置;并且

e) 在所述第二循环的所述连接步骤(步骤9)和所有后续循环的连接步骤中,所述连接多核苷酸的所述互补接合端经结构化以使得所述循环中的所述预定义序列的所述下一核苷酸的所述配偶体核苷酸为所述支持股中的所述末端核苷酸并且占据位置 n ,并且所述通用核苷酸占据所述支持股中的位置 $n+1$,并且与所述辅助股的所述末端核苷酸配对;其中位置 n 是核苷酸位置,其在将所述连接多核苷酸连接到所述裂解的支架多核苷酸后将与所述循环中掺入的所述预定义序列的所述下一核苷酸相对(步骤7)。

5. 根据权利要求3所述的方法,其中:

a) 在第一循环的裂解步骤(步骤2)之前和在所述裂解步骤时,所述通用核苷酸占据所述支架多核苷酸的所述支持股中的位置 $n+1$,其中位置 n 是在所述支持股中与所述合成股中的位置相对的核苷酸位置,在所述循环中,在将所述预定义序列的所述第一核苷酸添加到所述引物股部分的末端之后,所述合成股中的位置将由所述第一核苷酸占据,其中在所述支持股中的位置 n 处的核苷酸与所述辅助股的末端核苷酸相对并且与其配对,并且其中相对于在所述辅助股的近侧/所述引物股部分的远侧的方向上的位置 n ,位置 $n+1$ 是所述支持股中的下一核苷酸位置;

b) 在所述第一循环的所述裂解步骤(步骤2)中,所述支架多核苷酸的所述支持股在位置 n 与 $n-1$ 之间裂解,其中相对于在所述辅助股的远侧/所述引物股部分的近侧的方向上的位置 n ,位置 $n-1$ 是所述支持股中的下一核苷酸位置;

c) 在所述第一循环的所述连接步骤(步骤5)中,所述连接多核苷酸的互补连接端经结构化以使得所述预定义序列的第一核苷酸的所述配偶体核苷酸为所述支持股中的所述末端核苷酸并且占据位置 n ,其中所述通用核苷酸占据所述支持股中的位置 $n+2$,并且与所述辅助股的倒数第二个核苷酸配对;其中位置 n 为在步骤5中将所述连接多核苷酸连接到所述裂解的支架多核苷酸中之后,将与所述预定义序列的第一核苷酸相对的核苷酸位置,并且相对于在所述辅助股的近侧/所述引物股部分的远侧的方向上的位置 n ,位置 $n+2$ 是所述支持股中的第二位置;

d) 在第二循环的所述裂解步骤(步骤6)和所有后续循环的裂解步骤中:

i. 所述通用核苷酸占据所述支架多核苷酸的所述支持股中的位置 $n+1$,其中位置 n 为所述支持股中与所述合成股中的位置相对的核苷酸位置,在所述循环中,在将所述预定义序列的下一核苷酸添加到所述引物股部分的末端之后,所述合成股中的位置将由所述下一核苷酸占据;并且其中相对于在所述辅助股的近侧/所述引物股部分的远侧的方向上的位置 n ,位置 $n+1$ 是所述支持股中的下一核苷酸位置;并且

ii. 所述支架多核苷酸的所述支持股在位置 n 与 $n-1$ 之间裂解,其中相对于在所述辅助股的远侧/所述引物股部分的近侧方向上的位置 $n, n-1$ 是所述支持股中的下一核苷酸位置;并且

e) 在所述第二循环的所述连接步骤(步骤9)和所有后续循环的连接步骤中,所述连接多核苷酸的互补连接端经结构化以使得所述循环中的所述预定义序列的所述下一核苷酸的所述配偶体核苷酸为所述支持股中的所述末端核苷酸并且占据位置 n ,并且所述通用核苷酸占据所述支持股中的位置 $n+2$,并且与所述辅助股的倒数第二个核苷酸配对;其中位置

n是核苷酸位置,其在将所述连接多核苷酸连接到所述裂解的支架多核苷酸后将与所述循环中掺入的所述预定义序列的所述下一核苷酸相对(步骤7),并且相对于在所述辅助股的近侧/所述引物股部分的远侧的方向上的位置n,位置n+2是所述支持股中的第二位置。

6. 根据权利要求3所述的方法,其中:

a) 在第一循环的裂解步骤(步骤2)之前和在所述裂解步骤时,所述通用核苷酸占据所述支架多核苷酸的所述支持股中的位置n,其中位置n为所述支持股中与所述合成股中的位置相对的核苷酸位置,在所述循环中,在将所述预定义序列的所述第一核苷酸添加到所述引物股部分的末端之后,所述合成股中的位置将由所述第一核苷酸占据,其中在所述支持股中的位置n处的所述核苷酸与所述辅助股的所述末端核苷酸相对并且与其配对;

b) 在所述第一循环的所述裂解步骤(步骤2)中,所述支架多核苷酸的所述支持股在位置n-1与n-2之间裂解,其中相对于在所述辅助股的远侧/所述引物股部分的近侧的方向上的位置n,位置n-1和n-2分别是所述支持股中的下一核苷酸位置和后续核苷酸位置;

c) 在所述第一循环的所述连接步骤(步骤5)中,所述连接多核苷酸的互补连接端经结构化以使得所述预定义序列的所述第一核苷酸的所述配偶体核苷酸为所述支持股的倒数第二个核苷酸并且占据位置n,其中所述通用核苷酸占据所述支持股中的位置n+1,并且与所述辅助股的末端核苷酸配对;其中位置n为在步骤5中将所述连接多核苷酸连接到所述裂解的支架多核苷酸之后,将与所述预定义序列的第一核苷酸相对的核苷酸位置,并且其中相对于在所述辅助股的近侧/所述引物股部分的远侧的方向上的位置n,位置n+1是所述支持股中的下一核苷酸位置;

d) 在第二循环的裂解步骤(步骤6)和所有后续循环的裂解步骤中:

i. 所述通用核苷酸占据所述支架多核苷酸的所述支持股中的位置n,其中位置n为所述支持股中与所述合成股中的位置相对的核苷酸位置,在所述循环中,在将所述预定义序列的下一核苷酸添加到所述引物股部分的末端之后,所述合成股中的位置将由所述下一核苷酸占据;并且

ii. 所述支架多核苷酸的所述支持股在位置n-1与n-2之间裂解,其中相对于在所述辅助股的远侧/所述引物股部分的近侧的方向上的位置n,位置n-1和n-2分别是所述支持股中的下一个核苷酸位置和后续核苷酸位置;并且

e) 在所述第二循环的所述连接步骤(步骤9)和所有后续循环的连接步骤中,所述连接多核苷酸的互补连接端经结构化以使得所述循环中的所述预定义序列的所述下一核苷酸的所述配偶体核苷酸为所述支持股中的倒数第二个核苷酸并且占据位置n,并且所述通用核苷酸占据所述支持股中的位置n+1,并且与所述辅助股的末端核苷酸配对;其中位置n是核苷酸位置,其在将所述连接多核苷酸连接到所述裂解的支架多核苷酸后将与所述循环中掺入的所述预定义序列的下一核苷酸相对(步骤7),并且相对于在所述辅助股的近侧/所述引物股部分的远侧的方向上的位置n,位置n+1是所述支持股中的下一核苷酸位置。

7. 根据权利要求3所述的方法,其中:

a) 在第一循环的裂解步骤(步骤2)之前和在所述裂解步骤时,所述通用核苷酸占据所述支架多核苷酸的所述支持股中的位置n+2,其中位置n是在所述支持股中与所述合成股中的位置相对的核苷酸位置,在所述循环中,在将所述预定义序列的所述第一核苷酸添加到所述引物股部分的末端之后,所述合成股中的位置将由所述第一核苷酸占据,其中在所述

支持股中的位置 n 处的核苷酸与所述辅助股的末端核苷酸相对并且与其配对,并且其中相对于在所述辅助股的近侧/所述引物股部分的远侧的方向上的位置 n ,位置 $n+2$ 是所述支持股中的第二核苷酸位置;

b) 在所述第一循环的所述裂解步骤(步骤2)中,所述支架多核苷酸的所述支持股在位置 n 与 $n-1$ 之间裂解,其中相对于在所述辅助股的远侧/所述引物股部分的近侧的方向上的位置 n ,位置 $n-1$ 是所述支持股中的下一核苷酸位置;

c) 在所述第一循环的所述连接步骤(步骤5)中,所述连接多核苷酸的互补连接端经结构化以使得所述预定义序列的第一核苷酸的配偶体核苷酸为所述支持股中的末端核苷酸并且占据位置 n ,其中所述通用核苷酸占据所述支持股中的位置 $n+3$,并且与在所述引物股部分的远侧的方向上从所述辅助股的末端核苷酸去除两个位置的核苷酸配对;其中位置 n 为在步骤5中将所述连接多核苷酸连接到所述裂解的支架多核苷酸之后,将与所述预定义序列的第一核苷酸相对的核苷酸位置,并且相对于在所述辅助股的近侧/所述引物股部分的远侧的方向上的位置 n ,位置 $n+3$ 是所述支持股中的第三位置;

d) 在第二循环的所述裂解步骤(步骤6)和所有后续循环的裂解步骤中:

i. 所述通用核苷酸占据所述支架多核苷酸的所述支持股中的位置 $n+2$,其中位置 n 是所述支持股中与所述合成股中的位置相对的核苷酸位置,在所述循环中,在将所述预定义序列的所述下一核苷酸添加到所述引物股部分的末端之后,所述合成股中的位置将由所述下一核苷酸占据;并且其中相对于在所述辅助股的近侧/所述引物股部分的远侧的方向上的位置 n ,位置 $n+2$ 是所述支持股中的第二核苷酸位置;并且

ii. 所述支架多核苷酸的所述支持股在位置 n 与 $n-1$ 之间裂解,其中相对于在所述辅助股的远侧/所述引物股部分的近侧的方向上的位置 n ,位置 $n-1$ 是所述支持股中的下一核苷酸位置;并且

e) 在所述第二循环的所述连接步骤(步骤9)和所有后续循环的连接步骤中,所述连接多核苷酸的互补连接端经结构化以使得所述循环中的预定义序列的下一核苷酸的配偶体核苷酸为所述支持股中的末端核苷酸并且占据位置 n ,并且所述通用核苷酸占据所述支持股中的位置 $n+3$,并且与在所述引物股部分的远侧的方向上从所述辅助股的末端核苷酸去除两个位置的核苷酸配对;其中位置 n 是核苷酸位置,其在将所述连接多核苷酸连接到所述裂解的支架多核苷酸后,将与所述循环中掺入的预定义序列的下一个核苷酸相对(步骤7),并且相对于在所述辅助股的近侧/所述引物股部分的远侧的方向上的位置 n ,位置 $n+3$ 是所述支持股中的第三位置。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中:

(i) 在所述第一循环的所述裂解步骤(步骤2)中,所述通用核苷酸改为占据所述支架多核苷酸的所述支持股中的位置 $n+3$,其中相对于在所述辅助股的近侧/所述引物股部分的远侧的方向上的位置 n ,位置 $n+3$ 是所述支持股中的第三核苷酸位置;并且所述支架多核苷酸的所述支持股在位置 n 与 $n-1$ 之间裂解;

(ii) 在所述第一循环的所述连接步骤(步骤5)中,所述连接多核苷酸的所述互补连接端经结构化以使得所述通用核苷酸改为占据所述支持股中的位置 $n+4$,并且与在所述互补连接端处从所述辅助股的末端核苷酸去除3个位置的核苷酸配对;其中相对于在所述辅助股的近侧/所述引物股部分的远侧的方向上的位置 n ,位置 $n+4$ 是所述支持股中的位置4;

(iii) 在所述第二循环的所述裂解步骤(步骤6)和所有后续循环的裂解步骤中,所述通用核苷酸占据所述支架多核苷酸的所述支持股中的位置 $n+3$,并且所述支架多核苷酸的所述支持股在位置 n 与 $n-1$ 之间裂解;并且

(iv) 在所述第二循环的所述连接步骤(步骤9)和所有后续循环的连接步骤中,所述连接多核苷酸的所述互补连接端经结构化以使得所述通用核苷酸占据所述支持股中的位置 $n+4$,并且与在所述互补连接端处从所述辅助股的末端核苷酸去除2个位置的核苷酸配对。

9. 根据权利要求3所述的方法,其中:

(i) 在第一循环的所述裂解步骤(步骤2)中,所述通用核苷酸改为占据所述支架多核苷酸的所述支持股中的位置 $n+3+x$,其中相对于在所述辅助股的近侧/所述引物股部分的远侧的方向上的位置 n , $n+3$ 是所述支持股中的第三核苷酸位置;并且所述支架多核苷酸的所述支持股在位置 n 与 $n-1$ 之间裂解;

(ii) 在所述第一循环的所述连接步骤(步骤5)中,所述连接多核苷酸的所述互补连接端经结构化以使得所述通用核苷酸改为占据所述支持股中的位置 $n+4+x$,并且与在所述互补连接端处从所述辅助股的末端核苷酸去除 $3+x$ 个位置的核苷酸配对;其中相对于在所述辅助股的近侧/所述引物股部分的远侧的方向上的位置 n ,位置 $n+4$ 是所述支持股中的位置4;

(iii) 在第二循环的所述裂解步骤(步骤6)和所有后续循环的裂解步骤中,所述通用核苷酸占据所述支架多核苷酸的所述支持股中的位置 $n+3+x$,并且所述支架多核苷酸的所述支持股在位置 n 与 $n-1$ 之间裂解;

(iv) 在所述第二循环的所述连接步骤(步骤9)和所有后续循环的连接步骤中,所述连接多核苷酸的所述互补连接端经结构化以使得所述通用核苷酸占据所述支持股中的位置 $n+4+x$,并且与在所述互补连接端处从所述辅助股的末端核苷酸去除 $2+x$ 个位置的核苷酸配对;并且

(v) 其中 x 为1到10之间或更大的整数,并且其中 x 为步骤(2)、(5)、(6)和(9)中的相同整数。

10. 根据权利要求3所述的方法,其中:

a) 在第一循环的所述裂解步骤(步骤2)之前和在所述裂解步骤时,所述通用核苷酸占据所述支架多核苷酸的所述支持股中的位置 $n+1$,其中位置 n 是所述支持股中与所述合成股中的位置相对的核苷酸位置,在所述循环中,在将所述预定义序列的所述第一核苷酸添加到所述引物股部分的末端之后,所述合成股中的位置将由所述第一核苷酸占据,其中在所述支持股中的位置 n 处的核苷酸与所述辅助股的末端核苷酸相对并且与其配对,并且其中相对于在所述辅助股的近侧/所述引物股部分的远侧的方向上的位置 n ,位置 $n+1$ 是所述支持股中的下一核苷酸位置;

b) 在所述第一循环的所述裂解步骤(步骤2)中,所述支架多核苷酸的所述支持股在位置 $n-1$ 与 $n-2$ 之间裂解,其中相对于在所述辅助股的远侧/所述引物股部分的近侧的方向上的位置 n ,位置 $n-1$ 和 $n-2$ 分别是所述支持股中的下一核苷酸位置和后续核苷酸位置;

c) 在所述第一循环的所述连接步骤(步骤5)中,所述连接多核苷酸的所述互补连接端经结构化以使得所述预定义序列的所述第一核苷酸的配偶体核苷酸为所述支持股中的倒数第二个核苷酸并且占据位置 n ,其中所述通用核苷酸占据所述支持股中的位置 $n+2$,并且

与所述辅助股的倒数第二个核苷酸配对;其中位置 n 为在将所述连接多核苷酸连接到所述裂解的支架多核苷酸之后,将与所述预定义序列的所述第一核苷酸相对的核苷酸位置,并且其中相对于在所述辅助股的近侧/所述引物股部分的远侧的方向上的位置 n ,位置 $n+2$ 是所述支持股中的第二核苷酸位置;

d) 在第二循环的所述裂解步骤(步骤6)和所有后续循环的裂解步骤中:

i. 所述通用核苷酸占据所述支架多核苷酸的所述支持股中的位置 $n+1$,其中位置 n 是所述支持股中与所述合成股中的位置相对的核苷酸位置,在所述循环中,在将所述预定义序列的下一核苷酸添加到所述引物股部分的末端之后,所述合成股中的位置将由所述下一核苷酸占据;并且其中相对于在所述辅助股的近侧/所述引物股部分的远侧的方向上的位置 n , $n+1$ 是所述支持股中的下一核苷酸位置;并且

ii. 所述支架多核苷酸的所述支持股在位置 $n-1$ 与 $n-2$ 之间裂解,其中相对于在所述辅助股的远侧/所述引物股部分的近侧的方向上的位置 n ,位置 $n-1$ 和 $n-2$ 分别是所述支持股中的下一个核苷酸位置和后续核苷酸位置;

e) 在所述第二循环的所述连接步骤(步骤9)和所有后续循环的连接步骤中,所述连接多核苷酸的所述互补连接端经结构化以使得所述循环中的预定义序列的下一核苷酸的配偶体核苷酸为所述支持股中的倒数第二个核苷酸并且占据位置 n ,并且所述通用核苷酸占据所述支持股中的位置 $n+2$,并且与所述辅助股的倒数第二个核苷酸配对;其中位置 n 是核苷酸位置,其在将所述连接多核苷酸连接到所述裂解的支架多核苷酸后将与所述循环中掺入的预定义序列的下一核苷酸相对(步骤7),并且其中相对于在所述辅助股的近侧/所述引物股部分的远侧的方向上的位置 n ,位置 $n+2$ 是所述支持股中的第二核苷酸位置。

11. 根据权利要求10所述的方法,其中:

(i) 在所述第一循环的所述裂解步骤(步骤2)中,所述通用核苷酸改为占据所述支架多核苷酸的所述支持股中的位置 $n+2$,其中相对于在所述辅助股的近侧/所述引物股部分的远侧的方向上的位置 n , $n+2$ 是所述支持股中的第二核苷酸位置;并且所述支架多核苷酸的所述支持股在位置 n 与 $n-1$ 之间裂解;

(ii) 在所述第一循环的所述连接步骤(步骤5)中,所述连接多核苷酸的所述互补连接端经结构化以使得所述通用核苷酸改为占据所述支持股中的位置 $n+3$,并且与在所述互补连接端处从所述辅助股的末端核苷酸去除2个位置的核苷酸配对;其中相对于在所述辅助股的近侧/所述引物股部分的远侧的方向上的位置 n ,位置 $n+3$ 是所述支持股中的位置3;

(iii) 在所述第二循环的所述裂解步骤(步骤6)和所有后续循环的裂解步骤中,所述通用核苷酸占据所述支架多核苷酸的所述支持股中的位置 $n+2$,并且所述支架多核苷酸的所述支持股在位置 n 与 $n-1$ 之间裂解;并且

(iv) 在所述第二循环的所述连接步骤(步骤9)和在所有后续循环的连接步骤中,所述连接多核苷酸的所述互补连接端经结构化以使得所述通用核苷酸占据所述支持股中的位置 $n+3$,并且与在所述互补连接端处从所述辅助股的末端核苷酸去除2个位置的核苷酸配对。

12. 根据权利要求10所述的方法,其中:

(i) 在所述第一循环的所述裂解步骤(步骤2)中,所述通用核苷酸改为占据所述支架多核苷酸的所述支持股中的位置 $n+2+x$,其中相对于在所述辅助股的近侧/所述引物股部分的

远侧的方向上的位置 $n, n+2$ 是所述支持股中的第二核苷酸位置;并且所述支架多核苷酸的所述支持股在位置 n 与 $n-1$ 之间裂解;

(ii) 在所述第一循环的所述连接步骤(步骤5)中,所述连接多核苷酸的所述互补连接端经结构化以使得所述通用核苷酸改为占据所述支持股中的位置 $n+3+x$,并且与在所述互补连接端处从所述辅助股的末端核苷酸去除 $2+x$ 个位置的核苷酸配对;其中相对于在所述辅助股的近侧/所述引物股部分的远侧的方向上的位置 n ,位置 $n+3$ 是所述支持股中的位置3;

(iii) 在所述第二循环的所述裂解步骤(步骤6)和所有后续循环的裂解步骤中,所述通用核苷酸占据所述支架多核苷酸的所述支持股中的位置 $n+2+x$,并且所述支架多核苷酸的所述支持股在位置 n 与 $n-1$ 之间裂解;

(iv) 在所述第二循环的所述连接步骤(步骤9)和所有后续循环的连接步骤中,所述连接多核苷酸的所述互补连接端经结构化以使得所述通用核苷酸占据所述支持股中的位置 $n+3+x$,并且与在所述互补连接端处从所述辅助股的所述末端核苷酸去除 $2+x$ 个位置的核苷酸配对;并且

(v) 其中 x 为1到10之间或更大的整数,并且其中 x 为步骤(2)、(5)、(6)和(9)中的相同整数。

13. 根据权利要求1所述的方法,其中与所述预定义序列的第一核苷酸配对的配偶体核苷酸为与所述第一核苷酸互补的核苷酸。

14. 根据权利要求3所述的方法,其中在任何一个或多个合成循环中,或在所有合成循环中,在步骤(2)和/或(6)之前,提供所述支架多核苷酸,其包括合成股和与其杂交的支持股,并且其中在无辅助股的情况下提供所述合成股。

15. 根据权利要求3所述的方法,其中在任何一个或多个合成循环中,或在所有合成循环中,在步骤(2)和/或(6)之前,从所述支架多核苷酸去除所述合成股。

16. 根据权利要求15所述的方法,其中所述合成股的辅助股部分通过以下方式从所述支架多核苷酸中去除:(i) 将所述支架多核苷酸加热到 80°C 到 95°C 的温度,并且将所述辅助股部分与所述支架多核苷酸分离;(ii) 用尿素溶液处理所述支架多核苷酸,并且将所述辅助股部分与所述支架多核苷酸分离;(iii) 用甲酰胺或甲酰胺溶液处理所述支架多核苷酸,并且将所述辅助股部分与所述支架多核苷酸分离;或(iv) 使所述支架多核苷酸与单股多核苷酸分子接触,所述单股多核苷酸分子包括与所述辅助股部分的序列互补的核苷酸序列区域,从而竞争性地抑制所述辅助股部分与所述支架多核苷酸的杂交。

17. 根据权利要求2所述的方法,其中每个裂解步骤包括两步裂解过程,其中每个裂解步骤包括第一步骤,所述第一步骤包括去除所述通用核苷酸,因此形成无碱基位点;和第二步骤,所述第二步骤包括在所述无碱基位点处裂解所述支持股。

18. 根据权利要求17所述的方法,其中所述第一步骤用核苷酸切除酶进行。

19. 根据权利要求18所述的方法,其中所述核苷酸切除酶为3-甲基腺嘌呤DNA糖基化酶。

20. 根据权利要求19所述的方法,其中所述核苷酸切除酶为:

- i. 人烷基腺嘌呤DNA糖基化酶(hAAG);或
- ii. 尿嘧啶DNA糖基化酶(UDG)。

21. 根据权利要求17至20中任一项所述的方法,其中所述第二步骤用作为碱的化学物质进行。

22. 根据权利要求21所述的方法,其中所述碱为NaOH。

23. 根据权利要求17所述的方法,其中所述第二步骤用具有无碱基位点裂解活性的有机化学物质进行。

24. 根据权利要求23所述的方法,其中所述有机化学物质为N,N'-二甲基乙二胺。

25. 根据权利要求17所述的方法,其中所述第二步骤用具有无碱基位点裂解酶活性的酶进行,其中所述具有无碱基位点裂解酶活性的酶为

(i) AP核酸内切酶I;

(ii) 核酸内切酶III (Nth);或

(iii) 核酸内切酶VIII。

26. 根据权利要求1所述的方法,其中每个裂解步骤包括单步裂解过程,所述单步裂解过程包括用裂解酶去除通用核苷酸,其中所述酶为

(i) 核酸内切酶III;

(ii) 核酸内切酶VIII;

(iii) 甲酰胺基嘧啶DNA糖基化酶(Fpg);或

(iv) 8-氧代鸟嘌呤DNA糖基化酶(hOGG1)。

27. 根据权利要求2所述的方法,其中所述裂解步骤包括用酶裂解所述支持股。

28. 根据权利要求27所述的方法,其中所述酶在所述核苷酸之后裂解所述支持股,所述核苷酸紧邻所述通用核苷酸,从而在所述合成股中产生突出端。

29. 根据权利要求27所述的方法,其中所述酶为核酸内切酶V。

30. 根据权利要求2所述的方法,其中所述裂解步骤包括用酶裂解所述支持股。

31. 根据权利要求30所述的方法,其中所述酶在所述核苷酸之后裂解所述支持股,所述核苷酸紧邻所述通用核苷酸,从而在所述合成股中产生突出端。

32. 根据权利要求30所述的方法,其中所述酶为核酸内切酶V。

33. 根据权利要求1所述的方法,其中所述合成双股多核苷酸的两条股皆为DNA股。

34. 根据权利要求2所述的方法,其中所述合成股和所述支持股为DNA股。

35. 根据权利要求33所述的方法,其中所掺入核苷酸为dNTP。

36. 根据权利要求35所述的方法,其中所掺入核苷酸为包括可逆终止子基团的dNTP。

37. 根据权利要求36所述的方法,其中包括可逆终止子基团的所述所掺入核苷酸中的一个或多个为3'-O-烯丙基-dNTP。

38. 根据权利要求36所述的方法,其中包括可逆终止子基团的所述所掺入核苷酸中的一个或多个为3'-O-叠氮基甲基-dNTP。

39. 根据权利要求1所述的方法,其中所述合成双股多核苷酸的第一股为DNA股并且所述合成双股多核苷酸的第二股为RNA股。

40. 根据权利要求2所述的方法,其中所述合成股为RNA股并且所述支持股为DNA股。

41. 根据权利要求40所述的方法,其中所掺入核苷酸为NTP。

42. 根据权利要求41所述的方法,其中所掺入核苷酸为包括可逆终止子基团的NTP。

43. 根据权利要求42所述的方法,其中包括可逆终止子基团的所掺入核苷酸为3'-O-烯

丙基-NTP。

44. 根据权利要求42所述的方法,其中包括可逆终止子基团的所掺入核苷酸为3'-O-叠氮基甲基-NTP。

45. 根据权利要求1所述的方法,其中所述酶为聚合酶,所述聚合酶为DNA聚合酶。

46. 根据权利要求45所述的方法,其中所述聚合酶为来自热球菌属物种9°N的天然DNA聚合酶的变异体。

47. 根据权利要求1所述的方法,其中所述酶为聚合酶,所述聚合酶为RNA聚合酶。

48. 根据权利要求1所述的方法,其中所述酶具有末端转移酶活性。

49. 根据权利要求1所述的方法,其中从第一核苷酸去除所述可逆终止子基团的步骤是用三(羧乙基)膦(TCEP)进行。

50. 根据权利要求1所述的方法,其中将双股连接多核苷酸连接到所述裂解的支架多核苷酸的步骤是用连接酶进行。

51. 根据权利要求50所述的方法,其中所述连接酶为T3 DNA连接酶或T4 DNA连接酶。

52. 根据权利要求3所述的方法,其中在步骤(1)、(5)和/或(9)中,所述辅助股和与其杂交的所述支持股的所述部分通过发夹环连接。

53. 根据权利要求2所述的方法,其中在步骤(1)中,包括所述引物股部分的所述合成股和与其杂交的所述支持股的所述部分通过发夹环连接。

54. 根据权利要求3所述的方法,其中在步骤(1)、(5)和/或(9)中:

a) 所述辅助股和与其杂交的所述支持股的所述部分通过发夹环连接;并且

b) 包括所述引物股部分的所述合成股和与其杂交的所述支持股的所述部分通过发夹环连接。

55. 根据权利要求3所述的方法,其中至少一个所述连接多核苷酸作为单一分子提供,所述单一分子包括在与互补连接端相对的末端处连接所述支持股和所述辅助股的发夹环。

56. 根据权利要求3所述的方法,其中每个合成循环的所述连接多核苷酸提供为单一分子,所述单一分子各自包括在与所述互补连接端相对的末端处连接所述支持股和所述辅助股的发夹环。

57. 根据权利要求3所述的方法,其中在步骤(1)中,将包括所述引物股部分的所述合成股和与其杂交的所述支持股的所述部分系栓到共同表面。

58. 根据权利要求57所述的方法,其中所述引物股部分和与其杂交的所述支持股的所述部分各自包括可裂解的接头,其中所述接头可裂解以在合成之后从所述表面分离所述双股多核苷酸。

59. 根据权利要求3所述的方法,其中在步骤(1)中,所述合成股的所述引物股部分和与其杂交的所述支持股的所述部分通过发夹环连接,并且其中所述发夹环系栓到表面。

60. 根据权利要求59所述的方法,其中所述发夹环通过可裂解的接头系栓到表面,其中所述接头可裂解以在合成之后从所述表面分离所述双股多核苷酸。

61. 根据权利要求58所述的方法,其中所述可裂解的接头为UV可裂解的接头。

62. 根据权利要求57所述的方法,其中所述表面为微粒。

63. 根据权利要求57所述的方法,其中所述表面为平面表面。

64. 根据权利要求63所述的方法,其中所述表面包括凝胶。

65. 根据权利要求64所述的方法,其中所述表面包括聚丙烯酰胺表面。
66. 根据权利要求57所述的方法,其中包括所述引物股部分的所述合成股和与其杂交的所述支持股的所述部分通过一个或多个共价键系栓到所述共同表面。
67. 根据权利要求66所述的方法,其中所述一个或多个共价键形成于所述共同表面上的官能团与所述支架分子上的官能团之间,其中所述支架分子上的所述官能团为胺基、硫醇基、硫代磷酸基或硫代酰胺基。
68. 根据权利要求67所述的方法,其中所述共同表面上的所述官能团为溴乙酰基。
69. 根据权利要求1所述的方法,其中从所述预定义序列的核苷酸去除所述可逆终止子基团的步骤在所述连接步骤之前或之后进行。
70. 根据权利要求1所述的方法,其中合成循环在微流体系统内的液滴中进行。
71. 根据权利要求70所述的方法,其中所述微流体系统为电润湿系统。
72. 根据权利要求71所述的方法,其中所述微流体系统为电介质上电润湿系统(EWOD)。
73. 根据权利要求1所述的方法,其中在合成之后,分离所述双股多核苷酸的股以提供具有预定义序列的单股多核苷酸。
74. 根据权利要求1所述的方法,其中在合成之后,通过PCR来扩增所述双股多核苷酸或其区域。
75. 一种组装具有预定义序列的多核苷酸的方法,所述方法包括进行根据权利要求1所述的方法以合成具有预定义序列的第一多核苷酸和具有预定义序列的一种或多种额外多核苷酸,并且将所述第一多核苷酸和所述一种或多种额外多核苷酸接合在一起。
76. 根据权利要求75所述的方法,其中所述第一多核苷酸和所述一种或多种额外多核苷酸为双股的。
77. 根据权利要求75所述的方法,其中所述第一多核苷酸和所述一种或多种额外多核苷酸为单股的。
78. 根据权利要求75所述的方法,其中所述第一多核苷酸和所述一种或多种额外多核苷酸经裂解以产生相容末端并且通过连接而接合在一起。
79. 根据权利要求78所述的方法,其中所述第一多核苷酸和所述一种或多种额外多核苷酸在裂解位点处通过限制酶裂解。
80. 根据权利要求71所述的方法,其中所述合成和/或组装步骤在微流体系统内的液滴中进行。
81. 根据权利要求80所述的方法,其中所述组装步骤包括提供包括具有预定义序列的第一合成多核苷酸的第一液滴和包括额外一种或多种具有预定义序列的合成多核苷酸的第二液滴,其中使所述液滴彼此接触并且其中所述合成多核苷酸接合在一起,从而组装包括第一和额外一种或多种多核苷酸的多核苷酸。
82. 根据权利要求81所述的方法,其中如下地进行所述合成步骤:通过提供多个液滴,每个液滴包括对应于合成循环步骤的反应试剂,并且根据所述合成循环步骤将所述液滴依次递送到支架多核苷酸。
83. 根据权利要求82所述的方法,其中在递送液滴之后并且在递送下一个液滴之前,进行洗涤步骤以去除过量反应试剂。
84. 根据权利要求82所述的方法,其中所述微流体系统为电润湿系统。

85. 根据权利要求84所述的方法, 其中所述微流体系统为电介质上电润湿系统(EWOD)。

86. 根据权利要求82所述的方法, 其中在相同系统内进行合成和组装步骤。

87. 一种用于进行根据权利要求1至86中任一项所述的方法的多核苷酸合成系统, 其包括: (a) 大量反应区域, 其中每一反应区域包括至少一个支架多核苷酸; 以及 (b) 用于将所述反应试剂递送到所述反应区域的构件; 以及 (c) 从所述支架多核苷酸裂解所述合成双股多核苷酸的构件。

88. 根据权利要求87所述的系统, 其进一步包括用于以液滴形式提供所述反应试剂的构件和用于根据所述合成循环将所述液滴递送到所述支架多核苷酸的构件。

89. 一种试剂盒, 其与根据权利要求87所述的系统一起使用并且用于进行根据权利要求1至86中任一项所述的方法, 所述试剂盒包括对应于合成循环的步骤的一定体积的反应试剂。

90. 一种制备多核苷酸微阵列的方法, 其中所述微阵列包括多个反应区域, 每一区域包括一种或多种具有预定义序列的多核苷酸, 所述方法包括:

a) 提供包括多个反应区域的表面, 每一区域包括一种或多种双股锚或支架多核苷酸, 以及

b) 根据权利要求1所述的方法在每个反应区域进行合成循环, 从而在每个区域处合成一种或多种具有预定义序列的双股多核苷酸。

91. 根据权利要求90所述的方法, 其中在合成之后, 分离所述双股多核苷酸的股以提供微阵列, 其中每一区域包括一种或多种具有预定义序列的单股多核苷酸。

多核苷酸合成方法、系统和试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及根据预限定的核苷酸序列合成多核苷酸分子的新方法。本发明还涉及合成后组装合成多核苷酸的方法,以及用于进行合成和/或组装方法的系统和试剂盒。

背景技术

[0002] 存在用于合成和组装多核苷酸分子,特别是DNA的两种主要方法。

[0003] 亚磷酰胺化学是通过逐步过程将化学活化的T、C、A或G的单体组装成长度为大约100/150个碱基的寡核苷酸的合成方法。化学反应步骤是高度敏感的,并且条件在完全无水(完全不存在水)、水性氧化和酸性条件之间交替(Roy和Caruthers,《分子(Molecules)》,2013,18,14268-14284)。如果来自先前反应步骤的试剂尚未完全去除,则这将不利于未来的合成步骤。因此,这个合成方法限于产生长度约为100个核苷酸的多核苷酸。

[0004] 聚合酶合成方法使用聚合酶使用T、C、A和G三磷酸合成DNA模板的互补股。反应条件是水性的和温和的,并且此方法可以用于合成长度为数千个碱基的DNA多核苷酸。此方法的主要缺点是单股和双股DNA不能通过此方法从头合成,其需要从中制备拷贝的DNA模板。(Kosuri和Church,《自然方法(Nature Methods)》,2014,11,499-507)。

[0005] 因此,先前的方法不能用于在没有拷贝的预先存在的模板分子的帮助下从头合成双股DNA。

[0006] 本发明人开发了新的方法,通过所述方法可以以逐步的方式从头合成单股和双股多核苷酸分子,而无需复制预先存在的模板分子。这些方法还避免了与亚磷酰胺化学技术相关的极端条件,相反,在中性pH附近的温和水性条件下进行。这样的方法也能使单股或双股多核苷酸分子的从头合成与当前合成方法具有>100聚体的核苷酸长度至完整基因组相比具有潜在的 10^8 改进,提供了广泛的在合成生物学可能的应用。

发明内容

[0007] 本发明提供合成具有预定义序列的双股多核苷酸的体外方法,所述方法包括进行合成循环,其中每个循环包括裂解双股多核苷酸并且通过结合核苷酸对来延伸裂解的双股多核苷酸,其中裂解的双股多核苷酸的第一股的末端通过添加预定义序列的核苷酸而延伸,并且与第一股杂交的裂解的双股多核苷酸的第二股的末端通过添加配偶体核苷酸而延伸,从而与第一股的结合核苷酸形成核苷酸对。优选地,所述方法用于合成DNA。

[0008] 在本文所述的本发明的任何方法中,所述方法可以提供单股多核苷酸分子的合成,其中在合成具有预定义序列的双股多核苷酸分子后,去除或复制和/或扩增双股多核苷酸分子的一条股,以提供单股多核苷酸分子。

[0009] 在本文所述的本发明的任何方法中,所述方法可提供双股或单股寡核苷酸的合成。因此,本文中提及使用本发明任何方法合成双股或单股多核苷酸的所有参考经必要修改后适用于双股或单股寡核苷酸的合成。

[0010] 在上文所描述的本发明的方法中,每个循环可包括通过添加预定义序列的核苷酸

连同连接的可逆封闭基团来延伸第一股,然后延伸第二股,其中在第二股延伸之前或之后去除可逆封闭基团。在任何这样的方法中,在每个循环中,核苷酸可掺入裂解支架多核苷酸中。

[0011] 本发明提供如上所述和本文的方法,其中每个循环包括:

[0012] (1) 提供支架多核苷酸;

[0013] (2) 在裂解位点裂解所述支架多核苷酸;

[0014] (3) 通过核苷酸转移酶或聚合酶的作用将所述预定义序列的核苷酸添加到所述裂解支架多核苷酸中,所述核苷酸包括阻止所述酶进一步延伸的可逆终止子基团;

[0015] (4) 从所述预定义序列的所述核苷酸去除所述可逆终止子基团;并且

[0016] (5) 将连接多核苷酸连接到所述裂解支架多核苷酸,所述连接多核苷酸包括所述预定义序列的核苷酸的配偶体核苷酸,其中在连接之后,将所述预定义序列的核苷酸与所述配偶体核苷酸配对。

[0017] 在涉及支架多核苷酸的方法中,可以提供支架多核苷酸,其包括合成股和与其杂交的支持股,其中合成股包括引物股部分和辅助股部分。在任何此类方法中,辅助股部分可以在任何一个、多个或所有裂解步骤之前从支架多核苷酸中去除。

[0018] 在涉及支架多核苷酸的任何此类方法中,合成股可以是第一股,并且支持股可以是第二股。

[0019] 在任何这样的方法中,支持股可以通过连接多核苷酸连接到支持股而延伸,其中在每个合成循环中,所述连接多核苷酸包含与在所述循环中掺入第一股中的预定的核苷酸形成核苷酸对的核苷酸。

[0020] 连接多核苷酸可以是单股或双股的。优选地,连接多核苷酸是双股的。

[0021] 在连接多核苷酸是双股的方法中,连接多核苷酸可以优选包括支持股和辅助股。在下一合成循环中在裂解步骤之前,可从支架多核苷酸中去除辅助股,在这些方法中,在连接步骤后去除辅助股。

[0022] 本发明提供如上所述的方法,其中步骤(1)包括提供包含合成股和与其杂交的支持股的支架多核苷酸,其中所述合成股包括引物股部分,并且所述支持股包括通用核苷酸;其中步骤(2)包括在裂解位点裂解支架多核苷酸,所述位点由包括支持股中的通用核苷酸的序列限定,其中裂解包括裂解支持股并且从支架多核苷酸去除通用核苷酸;并且其中在步骤(5)中,所述连接多核苷酸包括支持股,所述支持股包括配偶体核苷酸和限定用于下一循环的裂解位点的通用核苷酸,并且其中所述连接多核苷酸连接到所述裂解支架多核苷酸的支持股上,从而形成核苷酸对。

[0023] 本发明提供一种如上所述的方法,其包括:

[0024] (1) 提供包括合成股和与其杂交的支持股的支架多核苷酸,其中所述合成股包括通过单股断裂分开的引物股部分和辅助股部分,并且所述支持股包括通用核苷酸;

[0025] (2) 在裂解位点使支架多核苷酸裂解,所述位点由在所述支持股中包括所述通用核苷酸的序列定义,其中裂解包括使所述支持股裂解并且从所述支架多核苷酸去除所述通用核苷酸,以提供裂解双股支架多核苷酸,所述裂解双股支架多核苷酸包括支持股和包括引物股部分的合成股;

[0026] (3) 通过核苷酸转移酶或聚合酶的作用使所述裂解双股支架多核苷酸的所述合成

股的引物股部分的末端与所述预定义序列的第一核苷酸一起延伸,所述第一核苷酸包括阻止所述酶进一步延伸的可逆终止子基团;

[0027] (4) 从第一核苷酸中去除终止子基团;

[0028] (5) 将双股连接多核苷酸连接到所述裂解支架多核苷酸,所述连接多核苷酸包括支持股和与其杂交的辅助股并且进一步包括互补连接末端,所述连接末端包括:

[0029] (i) 在所述支持股中,通用核苷酸和所述第一核苷酸的配偶体核苷酸,其中所述第一核苷酸的所述配偶体核苷酸悬垂于所述辅助股中;以及

[0030] (ii) 在辅助股中缺少磷酸基团的末端核苷酸;

[0031] 其中在连接所述支持股之后,所述第一核苷酸与所述配偶体核苷酸配对;

[0032] (6) 在裂解位点使支架多核苷酸裂解,所述位点由在所述支持股中包括所述通用核苷酸的序列定义,其中裂解包括使所述支持股裂解并且从所述支架多核苷酸去除所述通用核苷酸,以提供裂解双股支架多核苷酸,所述裂解双股支架多核苷酸包括支持股和包括引物股部分的合成股;

[0033] (7) 通过核苷酸转移酶或聚合酶的作用使所述裂解双股支架多核苷酸的所述合成股的引物股部分的末端与所述预定义核苷酸序列的所述下一核苷酸一起延伸,所述下一核苷酸包括阻止所述酶进一步延伸的可逆终止子基团;

[0034] (8) 从所述下一核苷酸去除所述终止子基团;并且

[0035] (9) 将双股连接多核苷酸连接到所述裂解支架多核苷酸,所述连接多核苷酸包括支持股和与其杂交的辅助股并且进一步包括互补连接末端,所述连接末端包括:

[0036] (i) 在所述支持股中,通用核苷酸和下一核苷酸的配偶体核苷酸,其中所述下一核苷酸的所述配偶体核苷酸悬垂于所述辅助股中;以及

[0037] (ii) 在辅助股中缺少磷酸基团的末端核苷酸;

[0038] 其中在连接所述支持股之后,所述下一核苷酸与所述配偶体核苷酸配对;

[0039] (10) 重复步骤6到9多次以提供具有预定义核苷酸序列的双股多核苷酸。

[0040] 可以根据本发明指定合成方法版本1的方法执行如上文所描述的任何此类方法,其中:

[0041] a) 在第一循环的裂解步骤之前和在裂解步骤时(步骤2),通用核苷酸占据所述支架多核苷酸的支持股中的位置n,其中位置n为支持股中与所述合成股中的位置相对的核苷酸位置,在所述循环中,在将其添加到引物股部分的末端之后,所述合成股中的位置将由所述预定义序列的所述第一核苷酸占据,其中在支持股中的位置n处的核苷酸与辅助股的末端核苷酸相对并且与其配对;

[0042] b) 在第一循环的裂解步骤(步骤2)中,支架多核苷酸的支持股在位置n与n-1之间裂解,其中相对于在辅助股的远侧/引物股部分的近侧的方向上的位置n,位置n-1是支持股中的下一核苷酸位置;

[0043] c) 在第一循环的连接步骤(步骤5)中,连接多核苷酸的互补连接末端经结构化以使得用于预定义序列的第一核苷酸的配偶体核苷酸为支持股的末端核苷酸且占据位置n,其中通用核苷酸占据支持股中的位置n+1,并且与辅助股的末端核苷酸配对,其中在步骤5中,在将连接多核苷酸连接到裂解支架多核苷酸中之后,位置n为与预定义序列的第一核苷酸相对的核苷酸位置。

[0044] d) 在第二循环的裂解步骤(步骤6)和所有后续循环的裂解步骤中:

[0045] i. 通用核苷酸占据支架多核苷酸的支持股中的位置 n , 其中位置 n 为支持股中与合成股中的位置相反的核苷酸位置, 在所述循环中, 在将其添加到引物股部分的末端之后, 所述合成股中的位置将由预定义序列的下一核苷酸占据; 并且

[0046] ii. 支架多核苷酸的支持股在位置 n 与 $n-1$ 之间裂解, 其中相对于在辅助股的远侧/引物股部分的近侧方向上的位置 $n, n-1$ 是支持股中的下一核苷酸位置; 并且

[0047] e) 在第二循环的连接步骤(步骤9)和所有后续循环的连接步骤中, 对连接多核苷酸的互补连接末端进行结构化, 使得所述循环中预定义序列的下一核苷酸的配偶体核苷酸为支持股中的末端核苷酸并且占据位置 n , 并且通用核苷酸在支持股中占据位置 $n+1$, 并且与辅助股的末端核苷酸配对; 其中位置 n 是将连接多核苷酸连接到裂解支架多核苷酸时的核苷酸位置, 所述位置 n 将与结合在所述循环中的预定义序列的下一核苷酸相对(步骤7)。

[0048] 或者, 可根据本发明指定合成方法版本2的方法执行如上文所描述的任何此类方法, 其中:

[0049] a) 在第一循环的断裂步骤之前和断裂步骤时(步骤2), 通用核苷酸占据支架多核苷酸的支持股中的位置 $n+1$, 其中位置 n 是在支持股中与合成股中的位置相对的核苷酸位置, 在所述循环中, 在将其添加到引物股部分的末端之后, 所述合成股中的位置将由所述预定义序列的所述第一核苷酸占据, 其中在支持股中的位置 n 处的核苷酸与辅助股的末端核苷酸相对并且与其配对, 并且其中相对于在辅助股的近侧/引物股部分的远侧的方向上的位置 n , 位置 $n+1$ 是支持股中的下一核苷酸位置;

[0050] b) 在第一循环的裂解步骤(步骤2)中, 支架多核苷酸的支持股在位置 n 与 $n-1$ 之间裂解, 其中相对于在辅助股的远侧/引物股部分的近侧的方向上的位置 n , 位置 $n-1$ 是支持股中的下一核苷酸位置;

[0051] c) 在第一循环的连接步骤(步骤5)中, 对连接多核苷酸的互补连接末端进行结构化, 使得预定义序列的下一核苷酸的配偶体核苷酸为支持股中的末端核苷酸并且占据位置 n , 其中通用核苷酸在支持股中占据位置 $n+2$, 并且与辅助股的倒数第二个核苷酸配对; 其中在步骤5中, 在将连接多核苷酸连接到裂解支架多核苷酸中之后, 位置 n 为与预定义序列的第一核苷酸相对的核苷酸位置, 并且相对于在辅助股的近侧/引物股部分的远侧的方向上的位置 n , 位置 $n+2$ 是支持股中的第二位置;

[0052] d) 在第二循环的裂解步骤(步骤6)和所有后续循环的裂解步骤中:

[0053] i. 通用核苷酸占据支架多核苷酸的支持股中的位置 $n+1$, 其中位置 n 为支持股中与合成股中的位置相反的核苷酸位置, 在所述循环中, 在将其添加到引物股部分的末端之后, 所述合成股中的位置将由预定义序列的下一核苷酸占据; 并且其中相对于在辅助股的近侧/引物股部分的远侧的方向上的位置 $n, n+1$ 是支持股中的下一核苷酸位置; 并且

[0054] ii. 支架多核苷酸的支持股在位置 n 与 $n-1$ 之间裂解, 其中相对于在辅助股的远侧/引物股部分的近侧方向上的位置 $n, n-1$ 是支持股中的下一核苷酸位置; 并且

[0055] e) 在第二循环的连接步骤(步骤9)和所有后续循环的连接步骤中, 对连接多核苷酸的互补连接末端进行结构化, 使得所述循环中的预定义序列的下一核苷酸的配偶体核苷酸为支持股中的末端核苷酸并且占据位置 n , 并且通用核苷酸在支持股中占据位置 $n+2$, 并且与辅助股的倒数第二个核苷酸配对; 其中位置 n 是将连接多核苷酸连接到裂解支架多核

核苷酸时的核苷酸位置,所述位置 n 将与结合在所述循环中的预定义序列的下一核苷酸相对(步骤7),并且相对于在辅助股的近侧/引物股部分的远侧的方向上的位置 n ,位置 $n+2$ 是支持股中的第二位置;

[0056] 又或者,可以根据本发明指定合成方法版本3的方法执行如上文所描述的任何此类方法,其中:

[0057] a) 在第一循环的裂解步骤之前和在裂解步骤时(步骤2),通用核苷酸占据所述支架多核苷酸的支持股中的位置 n ,其中位置 n 为支持股中与所述合成股中的位置相对的核苷酸位置,在所述循环中,在将其添加到引物股部分的末端之后,所述合成股中的位置将由所述预定义序列的所述第一核苷酸占据,其中在支持股中的位置 n 处的核苷酸与辅助股的末端核苷酸相对并且与其配对;

[0058] b) 在第一循环的裂解步骤(步骤2)中,支架多核苷酸的支持股在位置 $n-1$ 与 $n-2$ 之间裂解,其中相对于在辅助股的远侧/引物股部分的近侧的方向上的位置 n ,位置 $n-1$ 和 $n-2$ 分别是支持股中的下一核苷酸位置和连续核苷酸位置;

[0059] c) 在第一循环的连接步骤(步骤5)中,对连接多核苷酸的互补连接末端进行结构化,使得预定义序列的第一核苷酸的配偶体核苷酸为支持股中的倒数第二个核苷酸并且占据位置 n ,其中通用核苷酸在支持股中占据位置 $n+1$,并且与辅助股的末端核苷酸配对;其中在步骤5中,在将连接多核苷酸连接到裂解支架多核苷酸中之后,位置 n 为与预定义序列的第一核苷酸相对的核苷酸位置,并且其中相对于在辅助股的近侧/引物股部分的远侧的方向上的位置 n ,位置 $n+1$ 是支持股中的下一核苷酸位置;

[0060] d) 在第二循环的裂解步骤(步骤6)和所有后续循环的裂解步骤中:

[0061] i. 通用核苷酸占据支架多核苷酸的支持股中的位置 n ,其中位置 n 为支持股中与合成股中的位置相反的核苷酸位置,在所述循环中,在将其添加到引物股部分的末端之后,所述合成股中的位置将由预定义序列的下一核苷酸占据;并且

[0062] ii. 支架多核苷酸的支持股在位置 $n-1$ 与 $n-2$ 之间裂解,其中相对于在辅助股的远侧/引物股部分的近侧的方向上的位置 n ,位置 $n-1$ 和 $n-2$ 分别是支持股中的下一核苷酸位置和连续核苷酸位置;并且

[0063] e) 在第二循环的连接步骤(步骤9)和所有后续循环的连接步骤中,对连接多核苷酸的互补连接末端进行结构化,使得所述循环中的预定义序列的下一核苷酸的配偶体核苷酸为支持股中的倒数第二个核苷酸并且占据位置 n ,并且通用核苷酸在支持股中占据位置 $n+1$,并且与辅助股的末端核苷酸配对;其中位置 n 是将连接多核苷酸连接到裂解支架多核苷酸时的核苷酸位置,所述位置 n 将与结合在所述循环中的预定义序列的下一核苷酸相对(步骤7),并且其中相对于在辅助股的近侧/引物股部分的远侧的方向上的位置 n ,位置 $n+1$ 是支持股中的下一核苷酸位置;

[0064] 又或者,可以根据本发明指定合成方法版本4的方法执行如上文所描述的任何此类方法,其中:

[0065] a) 在第一循环的断裂步骤之前和断裂步骤时(步骤2),通用核苷酸占据支架多核苷酸的支持股中的位置 $n+2$,其中位置 n 是在支持股中与合成股中的位置相对的核苷酸位置,在所述循环中,在将其添加到引物股部分的末端之后,所述合成股中的位置将由所述预定义序列的所述第一核苷酸占据,其中在支持股中的位置 n 处的核苷酸与辅助股的末端核

核苷酸相对并且与其配对,并且其中相对于在辅助股的近侧/引物股部分的远侧的方向上的位置 n ,位置 $n+2$ 是支持股中的第二核苷酸位置;

[0066] b) 在第一循环的裂解步骤(步骤2)中,支架多核苷酸的支持股在位置 n 与 $n-1$ 之间裂解,其中相对于在辅助股的远侧/引物股部分的近侧的方向上的位置 n ,位置 $n-1$ 是支持股中的下一核苷酸位置;

[0067] c) 在第一循环的连接步骤(步骤5)中,对连接多核苷酸的互补连接末端进行结构化,使得预定义序列的第一核苷酸的配偶体核苷酸为支持股中的末端核苷酸并且占据位置 n ,其中通用核苷酸在支持股中占据位置 $n+3$,并且与在引物股部分的远端方向上从辅助股的末端核苷酸去除两个位置的核苷酸配对;其中在步骤5中,在将连接多核苷酸连接到裂解支架多核苷酸中之后,位置 n 为与预定义序列的第一核苷酸相对的核苷酸位置,并且相对于在辅助股的近侧/引物股部分的远侧的方向上的位置 n ,位置 $n+3$ 是支持股中的第三位置;

[0068] d) 在第二循环的裂解步骤(步骤6)和所有后续循环的裂解步骤中:

[0069] i. 通用核苷酸占据支架多核苷酸的支持股中的位置 $n+2$,其中位置 n 为支持股中与合成股中的位置相反的核苷酸位置,在所述循环中,在将其添加到引物股部分的末端之后,所述合成股中的位置将由预定义序列的下一核苷酸占据;并且其中相对于在辅助股的近侧/引物股部分的远侧的方向上的位置 n , $n+2$ 是支持股中的第二核苷酸位置;并且

[0070] ii. 支架多核苷酸的支持股在位置 n 与 $n-1$ 之间裂解,其中相对于在辅助股的远侧/引物股部分的近侧方向上的位置 n , $n-1$ 是支持股中的下一核苷酸位置;并且

[0071] e) 在第二循环的连接步骤(步骤9)和所有后续循环的连接步骤中,对连接多核苷酸的互补连接末端进行结构化,使得所述循环中的预定义序列的下一核苷酸的配偶体核苷酸为支持股中的末端核苷酸并且占据位置 n ,并且通用核苷酸在支持股中占据位置 $n+3$,并且与在引物股部分的远端方向上从辅助股的末端核苷酸去除两个位置的核苷酸配对;其中位置 n 是将连接多核苷酸连接到裂解支架多核苷酸时的核苷酸位置,所述位置 n 将与结合在所述循环中的预定义序列的下一核苷酸相对(步骤7),并且相对于在辅助股的近侧/引物股部分的远侧的方向上的位置 n ,位置 $n+3$ 是支持股中的第三位置;

[0072] 可根据本发明的方法执行任何此类方法,所述方法是合成方法版本4的变化形式,其中:

[0073] (i) 在第一循环的裂解步骤(步骤2)中,通用核苷酸改为占据支架多核苷酸的支持股中的位置 $n+3$,其中相对于在辅助股的近侧/引物股部分的远侧的方向上的位置 n ,位置 $n+3$ 是支持股中的第三核苷酸位置;并且支架多核苷酸的支持股在位置 n 与 $n-1$ 之间裂解;

[0074] (ii) 在第一循环的连接步骤(步骤5)中,对连接多核苷酸的互补连接末端进行结构化,使得通用核苷酸在支持股中改为占据位置 $n+4$,并且与在互补连接末端从辅助股的末端核苷酸去除3个位置的核苷酸配对;其中相对于在辅助股的近侧/引物股部分的远侧的方向上的位置 n ,位置 $n+4$ 是支持股中的位置4;

[0075] (iii) 在第二循环的裂解步骤(步骤6)和所有后续循环的断裂步骤中,通用核苷酸占据支架多核苷酸的支持股的位置 $n+3$,并且支架多核苷酸的支持股在位置 n 和 $n-1$ 处裂解;并且

[0076] (iv) 在第二循环的连接步骤(步骤9)和在所有后续循环的连接步骤中,连接多核苷酸的互补连接末端经结构化,以使得通用核苷酸占据支持股中的位置 $n+4$,并且与在互补

连接末端从辅助股的末端核苷酸去除2个位置的核苷酸配对。

[0077] 可根据本发明的方法执行任何此类方法,所述方法是合成方法版本4的另一变化形式,其中:

[0078] (i) 在第一循环的裂解步骤(步骤2)中,通用核苷酸改为占据支架多核苷酸的支持股中的位置 $n+3+x$,其中相对于在辅助股的近侧/引物股部分的远侧的方向上的位置 n ,位置 $n+3$ 是支持股中的第三核苷酸位置;并且支架多核苷酸的支持股在位置 n 与 $n-1$ 之间裂解;

[0079] (ii) 在第一循环的连接步骤(步骤5)中,对连接多核苷酸的互补连接末端进行结构化,使得通用核苷酸在支持股中改为占据位置 $n+4+x$,并且与在互补连接末端从辅助股的末端核苷酸去除 $3+x$ 位置的核苷酸配对;其中相对于在辅助股的近侧/引物股部分的远侧的方向上的位置 n ,位置 $n+4$ 是支持股中的位置4;

[0080] (iii) 在第二循环的裂解步骤(步骤6)和所有后续循环的断裂步骤中,通用核苷酸占据支架多核苷酸的支持股的位置 $n+3+x$,并且支架多核苷酸的支持股在位置 n 和 $n-1$ 处裂解;

[0081] (iv) 在第二循环的连接步骤(步骤9)和在所有后续循环的连接步骤中,连接多核苷酸的互补连接末端经结构化,以使得通用核苷酸占据支持股中的位置 $n+4+x$,并且与在互补连接末端从辅助股的末端核苷酸去除 $2+x$ 位置的核苷酸配对;并且

[0082] (v) 其中 x 为1到10之间的整数或更大,并且其中 x 为步骤(2)、(5)、(6)和(9)中的相同整数。

[0083] 又或者,可根据本发明指定合成方法版本5的方法执行如上文所描述的任何此类方法,其中:

[0084] a) 在第一循环的断裂步骤之前和断裂步骤时(步骤2),通用核苷酸占据支架多核苷酸的支持股中的位置 $n+1$,其中位置 n 是在支持股中与合成股中的位置相对的核苷酸位置,在所述循环中,在将其添加到引物股部分的末端之后,所述合成股中的位置将由所述预定义序列的所述第一核苷酸占据,其中在支持股中的位置 n 处的核苷酸与辅助股的末端核苷酸相对并且与其配对,并且其中相对于在辅助股的近侧/引物股部分的远侧的方向上的位置 n ,位置 $n+1$ 是支持股中的下一核苷酸位置;

[0085] b) 在第一循环的裂解步骤(步骤2)中,支架多核苷酸的支持股在位置 $n-1$ 与 $n-2$ 之间裂解,其中相对于在辅助股的远侧/引物股部分的近侧的方向上的位置 n ,位置 $n-1$ 和 $n-2$ 分别是支持股中的下一核苷酸位置和连续核苷酸位置;

[0086] c) 在第一循环的连接步骤(步骤5)中,对连接多核苷酸的互补连接末端进行结构化,使得预定义序列的第一核苷酸的配偶体核苷酸为支持股中的倒数第二个核苷酸并且占据位置 n ,其中通用核苷酸在支持股中占据位置 $n+2$,并且与辅助股的倒数第二个核苷酸配对;其中在将连接多核苷酸连接到裂解支架多核苷酸中之后,位置 n 为与预定义序列的第一核苷酸相对的核苷酸位置,并且相对于在辅助股的近侧/引物股部分的远侧的方向上的位置 n ,位置 $n+2$ 是支持股中的第二核苷酸位置;

[0087] d) 在第二循环的裂解步骤(步骤6)和所有后续循环的裂解步骤中:

[0088] i. 通用核苷酸占据支架多核苷酸的支持股中的位置 $n+1$,其中位置 n 为支持股中与合成股中的位置相反的核苷酸位置,在所述循环中,在将其添加到引物股部分的末端之后,所述合成股中的位置将由预定义序列的下一核苷酸占据;并且其中相对于在辅助股的近

侧/引物股部分的远侧的方向上的位置 $n, n+1$ 是支持股中的下一核苷酸位置;并且

[0089] ii. 支架多核苷酸的支持股在位置 $n-1$ 与 $n-2$ 之间裂解,其中相对于在辅助股的远侧/引物股部分的近侧的方向上的位置 n ,位置 $n-1$ 和 $n-2$ 分别是支持股中的下一核苷酸位置和连续核苷酸位置;

[0090] e) 在第二循环的连接步骤(步骤9)和所有后续循环的连接步骤中,对连接多核苷酸的互补连接末端进行结构化,使得所述循环中的预定义序列的下一核苷酸的配偶体核苷酸为支持股中的倒数第二个核苷酸并且占据位置 n ,并且通用核苷酸在支持股中占据位置 $n+2$,并且与辅助股的末端核苷酸配对;其中位置 n 是将连接多核苷酸连接到裂解支架多核苷酸时的核苷酸位置,所述位置 n 将与结合在所述循环中的预定义序列的下一核苷酸相对(步骤7),并且其中相对于在辅助股的近侧/引物股部分的远侧的方向上的位置 n ,位置 $n+2$ 是支持股中的第二核苷酸位置;

[0091] 可根据本发明的方法执行任何此类方法,所述方法是合成方法版本5的变化形式,其中:

[0092] (i) 在第一循环的裂解步骤(步骤2)中,通用核苷酸改为占据支架多核苷酸的支持股中的位置 $n+2$,其中相对于在辅助股的近侧/引物股部分的远侧的方向上的位置 $n, n+2$ 是支持股中的第二核苷酸位置;并且支架多核苷酸的支持股在位置 n 与 $n-1$ 之间裂解;

[0093] (ii) 在第一循环的连接步骤(步骤5)中,对连接多核苷酸的互补连接末端进行结构化,使得通用核苷酸在支持股中改为占据位置 $n+3$,并且与在互补连接末端从辅助股的末端核苷酸去除2个位置的核苷酸配对;其中相对于在辅助股的近侧/引物股部分的远侧的方向上的位置 n ,位置 $n+3$ 是支持股中的位置3;

[0094] (iii) 在第二循环的裂解步骤(步骤6)和所有后续循环的裂解步骤中,通用核苷酸占据支架多核苷酸的支持股的位置 $n+2$,并且支架多核苷酸的支持股在位置 n 和 $n-1$ 处裂解;并且

[0095] (iv) 在第二循环的连接步骤(步骤9)和在所有后续循环的连接步骤中,连接多核苷酸的互补连接末端经结构化,以使得通用核苷酸占据支持股中的位置 $n+3$,并且与在互补连接末端从辅助股的末端核苷酸去除2个位置的核苷酸配对。

[0096] 可根据本发明的方法执行任何此类方法,所述方法是合成方法版本5的另一变化形式,其中:

[0097] (i) 在第一循环的裂解步骤(步骤2)中,通用核苷酸改为占据支架多核苷酸的支持股中的位置 $n+2+x$,其中相对于在辅助股的近侧/引物股部分的远侧的方向上的位置 $n, n+2$ 是支持股中的第二核苷酸位置;并且支架多核苷酸的支持股在位置 n 与 $n-1$ 之间裂解;

[0098] (ii) 在第一循环的连接步骤(步骤5)中,对连接多核苷酸的互补连接末端进行结构化,使得通用核苷酸在支持股中改为占据位置 $n+3+x$,并且与在互补连接末端从辅助股的末端核苷酸去除 $2+x$ 个位置的核苷酸配对;其中相对于在辅助股的近侧/引物股部分的远侧的方向上的位置 n ,位置 $n+3$ 是支持股中的位置3;

[0099] (iii) 在第二循环的裂解步骤(步骤6)和所有后续循环的断裂步骤中,通用核苷酸占据支架多核苷酸的支持股的位置 $n+2+x$,并且支架多核苷酸的支持股在位置 n 和 $n-1$ 处裂解;

[0100] (iv) 在第二循环的连接步骤(步骤9)和在所有后续循环的连接步骤中,连接多核

苷酸的互补连接末端经结构化,以使得通用核苷酸占据支持股中的位置 $n+3+x$,并且与在互补连接末端从辅助股的末端核苷酸去除 $2+x$ 个位置的核苷酸配对;并且

[0101] (v) 其中 x 为1到10之间的整数或更大,并且其中 x 为步骤(2)、(5)、(6)和(9)中的相同整数。

[0102] 在上文和本文所述的任何方法中,与预定义序列的第一个/下一核苷酸配对的核苷酸可为与第一个/下一核苷酸互补的核苷酸,优选天然互补的核苷酸。

[0103] 在上文和本文所述的任何方法中,在任何一个或多个合成循环中,或在所有合成循环中,在步骤(2)和/或(6)之前,可提供支架多核苷酸,其包含合成股和与其杂交的支持股,并且其中在无辅助股的情况下提供合成股。在任何一个或多个合成循环中,或在所有合成循环中,在步骤(2)和/或(6)之前,可从支架多核苷酸中去除合成股。

[0104] 在上文和本文所述的任何方法中,在任何一个或多个合成循环中,或在所有合成循环中,在将双股连接多核苷酸连接至裂解的支架多核苷酸的步骤之后和在将预定核苷酸序列的下一核苷酸掺入支架多核苷酸的合成股的步骤之前,可从支架多核苷酸中去除合成股的辅助股部分。在任何这样的方法中,合成股的辅助股部分可以通过以下方式从支架多核苷酸中去除:(i) 将支架多核苷酸加热至约 80°C 至约 95°C 的温度,并且将辅助股部分与支架多核苷酸分离;(ii) 用尿素溶液,例如8M尿素处理支架多核苷酸,并且将辅助股部分与支架多核苷酸分离;(iii) 用甲酰胺或甲酰胺溶液,例如100%甲酰胺处理支架多核苷酸,并且将辅助股部分与支架多核苷酸分离;或(iv) 使支架多核苷酸与单股多核苷酸分子接触,所述单股多核苷酸分子包括与辅助股部分的序列互补的核苷酸序列区域,从而竞争性地抑制辅助股部分与支架多核苷酸的杂交。

[0105] 在上文和本文所述的任何此类方法中,其中通用核苷酸占据位置 n ,并且其中支架多核苷酸的支持股在位置 n 和 $n-1$ 之间裂解,每个裂解步骤可包括两步裂解工艺,其中每个裂解步骤可包括第一步骤,所述第一步骤包括去除通用核苷酸,从而形成无碱基位点;和第二步骤,所述第二步骤包括在无碱基位点处裂解支持股。在任何这样的方法中,第一步骤可用核苷酸切除酶进行。核苷酸切除酶可为3-甲基腺嘌呤DNA糖基化酶。核苷酸切除酶可为人类烷基腺嘌呤DNA糖基化酶(hAAG)或尿嘧啶DNA糖基化酶(UDG)。在任何这样的方法中,第二步骤可用作为碱的化学品进行。碱可为NaOH。在任何这样的方法中,第二步骤可以用具有无碱基位点裂解活性的有机化学品进行。所述有机化学品可为 $\text{N,N}'$ -二甲基乙二胺。在任何此类方法中,第二步骤可用具有无碱基位点裂解酶活性的酶,如AP核酸内切酶、核酸内切酶III(第 N 个)或核酸内切酶VIII进行。

[0106] 在上文和本文所述的任何此类方法中,其中通用核苷酸占据位置 n ,并且其中支架多核苷酸的支持股在位置 n 和 $n-1$ 之间裂解,每个裂解步骤可包括一步裂解工艺,所述一步裂解工艺包括用裂解酶去除通用核苷酸,其中酶为核酸内切酶III、核酸内切酶VIII、甲酰嘧啶DNA糖基化酶(Fpg)或8-氧代鸟嘌呤DNA糖基化酶(hOGG1)。

[0107] 在上文和本文所述的任何此类方法中,其中通用核苷酸占据位置 $n+1$,并且其中支架多核苷酸的支持股在位置 n 和 $n-1$ 之间裂解,或者在上文和本文所述的任何此类方法中,其中通用核苷酸占据位置 n ,并且其中支架多核苷酸的支持股在位置 $n-1$ 和 $n-2$ 之间裂解,裂解步骤可包括用酶裂解支持股。酶可在靠近引物股部分的方向上与通用核苷酸相邻的核苷酸之后裂解支持股,从而在包括第一/下一核苷酸的合成股中产生悬垂端。这种酶可为内切

核酸酶V。

[0108] 在上文和本文所述的任何方法中,合成的双股多核苷酸的两条股可以是DNA股。合成股和支持股可以是DNA股。在这种情况下,掺入的核苷酸优选是dNTP,优选地是包括可逆终止子基团的dNTP。在任何此类方法中,包括可逆终止子基团的任何一种或多种或所有掺入的核苷酸可包括3'-O-烯丙基-dNTP或3'-O-叠氮基甲基-dNTP。

[0109] 在上文和本文所述的任何方法中,合成的双股多核苷酸的第一股可为DNA股,并且合成的双股多核苷酸的第二股可为RNA股。合成股可为RNA股,并且支持股可为DNA股。在这种情况下,掺入的核苷酸优选为NTP,优选地是包括可逆终止子基团的NTP。在任何此类方法中,包括可逆终止子基团的任何一种或多种或所有掺入的核苷酸可为3'-O-烯丙基-NTP或3'-O-叠氮基甲基-NTP。

[0110] 在上述和本文所述的涉及将核苷酸掺入包括DNA的合成股中例如掺入一种或多种dNTP的任何方法中,所述酶可为聚合酶,优选DNA聚合酶,更优选地是与未修饰的聚合酶相比具有增强的掺入包括可逆终止子基团的dNTP的能力的修饰的DNA聚合酶。聚合酶可为来自嗜热球菌(Thermococcus)物种9°N,优选地物种9°N-7的天然DNA聚合酶的变体。

[0111] 在上文和本文所述的涉及将核苷酸掺入包括RNA的合成股中例如掺入一种或多种NTP的任何方法中,所述酶可为聚合酶,优选RNA聚合酶,例如T3或T7 RNA聚合酶,更优选地是与未修饰的聚合酶相比具有增强的掺入包括可逆终止子基团的NTP的能力的修饰的RNA聚合酶。

[0112] 在上文和本文所述的任何方法中,合成的双股多核苷酸的第一股可为DNA股,合成的双股多核苷酸的第二股可为RNA股。或者,合成的双股多核苷酸的第一股可为RNA股,并且合成的双股多核苷酸的第二股可为DNA股。

[0113] 在上文和本文中所描述的方法中的任一种中,酶具有末端转移酶活性,任选地其中酶为末端核苷酸转移酶、末端脱氧核苷酸转移酶、末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)、pol γ、pol μ或Φ 29 DNA聚合酶。

[0114] 在上文和本文所述的任何方法中,从第一个/下一核苷酸去除可逆终止子基团的步骤可用三(羧乙基)膦(TCEP)进行。

[0115] 在上文和本文所述的任何方法中,将双股连接多核苷酸连接至裂解的支架多核苷酸的步骤优选连接酶进行。连接酶可为T3 DNA连接酶或T4 DNA连接酶。

[0116] 在上文和本文所述的任何方法中,在步骤(1)、(5)和/或(9)中,辅助股和与其杂交的支持股部分可通过发夹环连接。

[0117] 在上文和本文所述的任何方法中,在步骤(1)中,包括引物股部分和与其杂交的支持股部分的合成股可通过发夹环连接。

[0118] 在上文和本文描述的任何方法中,在步骤(1)、(5)和/或(9)中:

[0119] a) 辅助股和与其杂交的支持股部分可以通过发夹环连接;并且

[0120] b) 包括引物股部分的合成股和与其杂交的支持股部分可以通过发夹环连接。

[0121] 在上文和本文所述的任何方法中,至少一种或多种或所有连接多核苷酸可以作为单个分子提供,所述单个分子包括在与互补连接末端相对的末端连接支持股和辅助股的发夹环。在上文和本文所述的任何方法中,每个合成循环的连接多核苷酸可以作为单个分子提供,每个单个分子包括在与互补连接末端相对的末端连接支持股和辅助股的发夹环。

[0122] 在上文和本文所述的任何方法中,在步骤(1)中,包括引物股部分和与其杂交的支持股部分的合成股可系股到共同表面。引物股部分和与其杂交的支持股部分可各自包括可裂解的接头,其中接头可被裂解以在合成后从表面分离双股多核苷酸。

[0123] 在上文和本文所述的任何方法中,在步骤(1)中,合成股的引物股部分和与其杂交的支持股部分可以通过发夹环连接,并且其中发夹环系股到表面。

[0124] 在上文和本文所述的任何方法中,发夹环可以通过可裂解的接头与表面连接,其中可以裂解接头以在合成后从表面分离双股多核苷酸。可裂解接头可为UV可裂解接头。

[0125] 在上文和本文所述的任何方法中,多核苷酸所附着的表面可为微粒的表面或平的表面。

[0126] 在上文和本文所述的任何方法中,多核苷酸所附着的表面可包括凝胶。所述表面包括聚丙烯酰胺表面,例如约2%的聚丙烯酰胺,优选其中聚丙烯酰胺表面与固体载体如玻璃偶联。

[0127] 在上文和本文所述的任何方法中,包括引物股部分和与其杂交的支持股部分的合成股可以通过一个或多个共价键系股到共同表面。一个或多个共价键可以在共同表面上的官能团和支架分子上的官能团之间形成,其中支架分子上的官能团可为胺基、硫醇基、硫代磷酸酯基或硫代酰胺基。共同表面上的官能团可为溴乙酰基,任选地其中溴乙酰基在使用N-(5-溴乙酰基戊基)丙烯酰胺(BRAPA)衍生的聚丙烯酰胺表面上提供。

[0128] 在上文和本文所述的任何方法中,从预定义序列的核苷酸中去除可逆终止子基团的步骤可以在裂解步骤之前或在连接步骤之前进行。

[0129] 在上文和本文所述的任何方法中,与上文和本文所述的任何合成循环有关的反应可在微流体系统内以液滴进行。微流体系统可为电润湿系统。微流体系统可为电介质上电润湿系统(EWOD)。

[0130] 在上文和本文所述的任何方法中,在合成之后,可以分离双股多核苷酸的股,以提供具有预定义序列的单股多核苷酸。

[0131] 在上文和本文所述的任何方法中,在合成后,扩增双股多核苷酸或其区域,优选通过PCR扩增。

[0132] 本发明还提供了组装具有预定义序列的多核苷酸的方法,所述方法包括进行上述和本文所述的任何合成方法以合成具有预定义序列的第一多核苷酸和具有预定义序列的一种或多种另外的多核苷酸并将所述第一多核苷酸和所述一种或多种另外的多核苷酸连接在一起。所述第一多核苷酸和所述一种或多种另外的多核苷酸可优选地包括不同的预定义序列。所述第一多核苷酸和所述一种或多种另外的多核苷酸可为双股的或可为单股的。可首先裂解第一多核苷酸和一种或多种其它多核苷酸以产生相容的末端,然后例如通过连接将其连接在一起。第一多核苷酸和一种或多种其它多核苷酸可以在裂解位点被限制酶裂解以产生相容的末端。

[0133] 上文和本文所描述的用于合成具有预定义序列的双股多核苷酸的任何体外方法,和/或上文和本文所描述的用于组装具有预定义序列的多核苷酸的任何体外方法可以在微流体系统内的液滴中进行。在任何这样的方法中,组装方法可以包括组装步骤,其包括提供包括具有预定义序列的第一合成多核苷酸的第一液滴和包括其它一种或多种具有预定义序列的合成多核苷酸的第二液滴,其中使所述液滴彼此接触并且其中将合成多核苷酸连接

在一起,从而组装包括第一核苷酸和其它一种或多种多核苷酸的多核苷酸。在任何这样的方法中,合成步骤可以通过提供多个液滴来进行,每个液滴包括对应于合成循环步骤的反应试剂,并且根据合成循环的步骤将液滴依次递送到支架多核苷酸。在任何这样的方法中,在递送液滴之后并且在递送下一液滴之前,可以进行洗涤步骤以去除过量的反应试剂。在任何这样的方法中,微流体系统可为电润湿系统。在任何这样的方法中,微流体系统可为电介质上电润湿系统(EWOD)。在任何这样的方法中,合成和组装步骤可以在同一系统内进行。

[0134] 在一个相关方面,本发明进一步提供了通用核苷酸在合成具有预定义序列的双股多核苷酸的体外方法中的用途,其中通用核苷酸用于在每个合成循环期间产生多核苷酸裂解位点,其中在每个合成循环中,所述用途包括:提供包括合成股和与其杂交的支持股的支架多核苷酸,其中所述合成股包括引物股部分和任选地通过单股断裂与所述引物股部分分离的辅助股部分,并且其中通用核苷酸设置于支持股中以提供裂解位点;在裂解位点裂解支架多核苷酸,由此将通用核苷酸从支架多核苷酸中去除,并且在支架多核苷酸中形成裂解端;通过聚合酶或转移酶将包括可逆终止子基团的预定义序列的新核苷酸添加到支架多核苷酸的裂解的末端的合成股的末端中,将具有支持股和与其杂交的辅助股的连接多核苷酸连接到支架多核苷酸的裂解末端,支持股包括在支架多核苷酸的合成股中与新核苷酸配对的核苷酸,并且进一步包括新通用核苷酸以建立新的多核苷酸裂解位点用于合成下一循环,其中在裂解或连接步骤之后,可逆终止子基团从新核苷酸去除;并且任选地其中在下一循环的连接步骤之后和裂解步骤之前,去除辅助股。通用核苷酸在合成具有预定义序列的双股多核苷酸的方法中的这种用途可以使用上文和本文限定和描述的任何特定方法实施。

[0135] 在一个相关方面,本发明进一步提供了用预定核苷酸延伸多核苷酸分子的合成股的体外方法,所述方法包括:提供包括合成股和与其杂交的支持股的支架多核苷酸,其中所述合成股包括引物股部分和任选地通过单股断裂与所述引物股部分分离的辅助股部分,并且其中通用核苷酸设置于支持股中并且界定多核苷酸裂解位点;在裂解位点裂解支架多核苷酸,由此将通用核苷酸从支架多核苷酸中去除,并且在支架多核苷酸中形成裂解端;通过聚合酶或转移酶将包括可逆终止子基团的预定义序列的新核苷酸添加到支架多核苷酸的裂解的末端的合成股的末端中;其中支架多核苷酸的裂解的末端充当具有支持股和与其杂交的辅助股的连接多核苷酸的连接受体位点,支持股包括在支架多核苷酸的合成股中与预定核苷酸配对的核苷酸,并且进一步包括新通用核苷酸以建立新的多核苷酸裂解位点用于合成下一循环,其中在裂解或连接步骤之后,可逆终止子基团从新核苷酸去除;并且任选地其中在下一循环的连接步骤之后和裂解步骤之前,去除辅助股。在用预定的核苷酸延伸多核苷酸分子的合成股的任何这种方法中,所述方法可使用上文和本文限定和描述的任何特定方法实施。

[0136] 在一个相关方面,本发明进一步提供了合成具有预定义序列的双股多核苷酸的体外方法,所述方法包括合成循环,并且其中每一合成循环包括:提供包括合成股和与其杂交的支持股的支架多核苷酸,其中所述合成股包括引物股部分和任选地通过单股断裂与所述引物股部分分离的辅助股部分,并且其中通用核苷酸设置于支持股中并且界定多核苷酸裂解位点;在裂解位点裂解支架多核苷酸,由此将通用核苷酸从支架多核苷酸中去除,并且在支架多核苷酸中形成裂解端;通过聚合酶或转移酶将包括可逆终止子基团的预定义序列的新核苷酸添加到支架多核苷酸的裂解的末端的合成股的末端中;将具有支持股和与其杂交

的辅助股的连接多核苷酸连接到支架多核苷酸的裂解末端,支持股包括在支架多核苷酸的合成股中与新核苷酸配对的核苷酸,并且进一步包括新通用核苷酸以建立新的多核苷酸裂解位点用于合成下一循环;在裂解或连接步骤之后,可逆终止子基团从新核苷酸去除;并且任选地在下一循环的连接步骤之后和裂解步骤之前,去除辅助股。在合成具有预定义序列的双股多核苷酸的任何这种方法中,所述方法可以使用上文和本文限定和描述的任何特定方法实施。

[0137] 在一个相关方面,本发明进一步提供了在合成具有预定义序列的双股多核苷酸的循环期间,将包括通用核苷酸的连接多核苷酸连接到双股多核苷酸的体外方法,其中在合成循环期间,双股多核苷酸用预定的核苷酸和其搭配物延伸;所述方法包括提供包括合成股和与其杂交的支持股的支架多核苷酸,其中所述合成股包括引物股部分和任选地通过单股断裂与所述引物股部分分离的辅助股部分,并且其中通用核苷酸设置于支持股中,并且界定多核苷酸裂解位点;在裂解位点裂解支架多核苷酸,由此将通用核苷酸从支架多核苷酸中去除,并且在支架多核苷酸中形成裂解端;通过聚合酶或转移酶将包括可逆终止子基团的预定义序列的新核苷酸添加到支架多核苷酸的裂解端的合成股的末端中,所述可逆终止子基团将具有支持股和与其杂交的辅助股的连接多核苷酸连接到支架多核苷酸的裂解端;支持股包括在支架多核苷酸的合成股中与新核苷酸配对的核苷酸,并且进一步包括新通用核苷酸以建立新的多核苷酸裂解位点用于合成下一循环,由此建立新支架多核苷酸用于合成下一循环;在裂解或连接步骤之后,可逆终止子基团从新核苷酸去除;并且任选地在下一循环的连接步骤之后和裂解步骤之前,去除辅助股。在合成具有预定义序列的双股多核苷酸的循环期间,将包括通用核苷酸的连接多核苷酸连接至双股多核苷酸的任何此类方法中,所述方法可使用上文和本文限定和描述的任何特定方法实施。

[0138] 本发明另外提供了用于实施上文和本文所述的任何合成和/或组装方法的多核苷酸合成系统,其包括(a)反应区域阵列,其中每个反应区域包括至少一种支架多核苷酸;和(b)将反应试剂输送到反应区域的装置,和任选地,(c)从支架多核苷酸裂解合成的双股多核苷酸的装置。这种系统可进一步包括用于以液滴形式提供反应试剂的装置和用于根据合成循环将液滴输送到支架多核苷酸的装置。

[0139] 本发明进一步提供了与上文和本文所述的任何系统一起使用并且用于实施上文和本文所述的任何合成方法的试剂盒,所述试剂盒包括对应于合成循环的步骤的反应试剂的体积。

[0140] 本发明还提供了制备多核苷酸微阵列的方法,其中所述微阵列包括多个反应区域,每个区域包括一个或多个具有预定义序列的多核苷酸,所述方法包括:

[0141] a) 提供包括多个反应区域的表面,每个区域包括一个或多个双股锚或支架多核苷酸,并且

[0142] b) 在每个反应区域根据上述和本文所述的任何方法进行合成循环,从而在每个区域合成一种或多种具有预定义序列的双股多核苷酸。

[0143] 在此类方法中,在合成后,可分离双股多核苷酸的股以提供微阵列,其中每个区域包括一个或多个具有预定义序列的单股多核苷酸。

附图说明

[0144] 本文提供的和下文描述的相关图显示了使用包含本发明方法的方法的合成循环的一些或所有步骤,以及用于实施方法的方面的手段,例如寡核苷酸、表面、表面附着化学反应、连接子等。这些图以及其所有描述和所有相关方法、试剂和方案仅用于说明呈现而不应解释为限制。

[0145] 相关的图,例如图6、7、8、9、10、13a、14a、15a等显示合成循环的一些或所有步骤,包含掺入核苷酸(例如包含可逆终止子的核苷酸)、裂解(例如将支架多核苷酸裂解成第一部分和第二部分,其中第一部分包括通用核苷酸,并且第二部分包括掺入的核苷酸)、连接(例如将包括单股部分的多核苷酸构建体连接至包括掺入的核苷酸的裂解的支架多核苷酸的第二部分,其中单股部分包括与掺入的核苷酸互补的配偶体核苷酸)和去除保护基(例如从掺入的核苷酸中去除可逆终止子基团)。提供这些方法仅用于说明性支持,并且不在所要求保护的发明的范围内。图1至图5所示的方法方案是本发明的方法。如实例13所述,图51所示的数据涉及与本文所述的图1、2和4所示的合成方法版本1、2和4一致的本发明方法。

[0146] 图1.本发明的示例性方法版本1的方案

[0147] 显示根据本发明的示例性方法版本1的第一合成循环的方案。所述方法包括提供支架多核苷酸、裂解、掺入、去除保护基和连接的循环。所述方案显示提供在支持股中包括通用核苷酸的支架多核苷酸(101),所述通用核苷酸限定了合成股中的多核苷酸裂解位点和单股断裂(“切口”)。所述方案显示通过在支持股(102)中产生单股断裂裂解支持股,然后在支架多核苷酸的裂解端(103)处将胸腺嘧啶核苷酸添加到合成多核苷酸的末端,并且在保护步骤(104)期间去除可逆的封闭基团。在将连接多核苷酸连接到裂解的支架多核苷酸(105)之后,将新掺入的胸腺嘧啶核苷酸与其配偶体核苷酸腺嘌呤(104)配对。在连接步骤之后,为重组的支架多核苷酸提供了新掺入的核苷酸对(106),用于下一合成循环。显示A-T对仅用于说明目的而不具限制性,取决于所需的预定义序列,A-T对可以是任何对。H-I位置的核苷酸对可以是任何对。核苷酸X可为任何核苷酸。所述图还示出了对应于第二合成循环的参考标记。

[0148] 图2.本发明的示例性方法版本2的方案

[0149] 显示根据本发明的示例性方法版本2的第一合成循环的方案。所述方法包括提供支架多核苷酸、裂解、掺入、去除保护基和连接的循环。所述方案显示提供在支持股中包括通用核苷酸的支架多核苷酸(101),所述通用核苷酸限定了合成股中的多核苷酸裂解位点和单股断裂(“切口”)。所述方案显示通过在支持股(102)中产生单股断裂裂解支持股,然后在支架多核苷酸的裂解端(103)处将胸腺嘧啶核苷酸添加到合成多核苷酸的末端,并且在保护步骤(104)期间去除可逆的封闭基团。在将连接多核苷酸连接到裂解的支架多核苷酸(105)之后,将新掺入的胸腺嘧啶核苷酸与其配偶体核苷酸腺嘌呤(104)配对。在连接步骤之后,为重组的支架多核苷酸提供了新掺入的核苷酸对(106),用于下一合成循环。显示A-T对仅用于说明目的而不具限制性,取决于所需的预定义序列,A-T对可以是任何对。H-I和J-K位置的核苷酸对可以是任何对。核苷酸X可为任何核苷酸。所述图还示出了对应于第二合成循环的参考标记。

[0150] 图3.本发明的示例性方法版本3的方案

[0151] 显示根据本发明的示例性方法版本3的第一合成循环的方案。所述方法包括提供

支架多核苷酸、裂解、掺入、去除保护基和连接的循环。所述方案显示提供在支持股中包括通用核苷酸的支架多核苷酸(101),所述通用核苷酸限定了合成股中的多核苷酸裂解位点和单股断裂(“切口”)。所述方案显示通过在支持股(102)中产生单股断裂裂解支持股,然后在支架多核苷酸的裂解端(103)处将胸腺嘧啶核苷酸添加到合成多核苷酸的末端,并且在保护步骤(104)期间去除可逆的封闭基团。在将连接多核苷酸连接到裂解的支架多核苷酸(105)之后,将新掺入的胸腺嘧啶核苷酸与其配偶体核苷酸腺嘌呤(104)配对。在连接步骤之后,为重组的支架多核苷酸提供了新掺入的核苷酸对(106),用于下一合成循环。显示A-T对仅用于说明目的而不具限制性,取决于所需的预定义序列,A-T对可以是任何对。H-I和J-K位置的核苷酸对可以是任何对。核苷酸X可为任何核苷酸。所述图还示出了对应于第二合成循环的参考标记。

[0152] 图4.本发明的示例性方法版本4的方案

[0153] 显示根据本发明的示例性方法版本4的第一合成循环的方案。所述方法包括提供支架多核苷酸、裂解、掺入、去除保护基和连接的循环。所述方案显示提供在支持股中包括通用核苷酸的支架多核苷酸(101),所述通用核苷酸限定了合成股中的多核苷酸裂解位点和单股断裂(“切口”)。所述方案显示通过在支持股(102)中产生单股断裂裂解支持股,然后在支架多核苷酸的裂解端(103)处将胸腺嘧啶核苷酸添加到合成多核苷酸的末端,并且在保护步骤(104)期间去除可逆的封闭基团。在将连接多核苷酸连接到裂解的支架多核苷酸(105)之后,将新掺入的胸腺嘧啶核苷酸与其配偶体核苷酸腺嘌呤(104)配对。在连接步骤之后,为重组的支架多核苷酸提供了新掺入的核苷酸对(106),用于下一合成循环。显示A-T对仅用于说明目的而不具限制性,取决于所需的预定义序列,A-T对可以是任何对。H-I、J-K和L-M位置的核苷酸对可以是任何对。核苷酸X可为任何核苷酸。所述图还示出了对应于第二合成循环的参考标记。

[0154] 图5.本发明的示例性方法版本5的方案

[0155] 所述方案显示提供在支持股中包括通用核苷酸的支架多核苷酸(101),所述通用核苷酸限定了合成股中的多核苷酸裂解位点和单股断裂(“切口”)。所述方案显示通过在支持股(102)中产生单股断裂裂解支持股,然后在支架多核苷酸的裂解端(103)处将胸腺嘧啶核苷酸添加到合成多核苷酸的末端,并且在保护步骤(104)期间去除可逆的封闭基团。在将连接多核苷酸连接到裂解的支架多核苷酸(105)之后,将新掺入的胸腺嘧啶核苷酸与其配偶体核苷酸腺嘌呤(104)配对。在连接步骤之后,为重组的支架多核苷酸提供了新掺入的核苷酸对(106),用于下一合成循环。显示A-T对仅用于说明目的而不具限制性,取决于所需的预定义序列,A-T对可以是任何对。H-I、J-K和L-M位置的核苷酸对可以是任何对。核苷酸X可为任何核苷酸。所述图还示出了对应于第二合成循环的参考标记。

[0156] 图6.示例性方法版本1的方案

[0157] 显示根据实例部分的示例性方法版本1的第一合成循环的方案。提供这个方法仅用于说明性支持,并且不在所要求保护的发明的范围内。所述方法包括提供支架多核苷酸、掺入、裂解、连接和去除保护基的循环。所述方案显示在第一个合成循环(101、102)中掺入胸腺嘧啶核苷酸和其与配偶体腺嘌呤核苷酸(104)相对的配对,以及提供用于下一合成循环的支架多核苷酸(106)。显示此对仅用于说明目的而不具限制性,取决于所需的预定义序列,此对可以是任何对。核苷酸Z可为任何核苷酸。核苷酸X可为任何合适的核苷酸。所述图

还示出了对应于第二合成循环的参考标记。

[0158] 图7. 示例性方法版本2的方案

[0159] 显示根据实例部分的示例性方法版本2的第一合成循环的方案。提供这个方法仅用于说明性支持,并且不在所要求保护的发明的范围内。所述方法包括提供支架多核苷酸、掺入、裂解、连接和去除保护基的循环。所述方案显示在第一个循环(201、202)中掺入胸腺嘧啶核苷酸和其与配偶体腺嘌呤核苷酸(204)相对的配对,以及在下一合成循环中提供包括与胞嘧啶配对的鸟嘌呤的支架多核苷酸(206)。这些对仅用于说明目的而不是限制性的,取决于所需的预定义序列,它们可以是任何对。核苷酸Z可为任何核苷酸。核苷酸X可为任何合适的核苷酸。所述图还示出了对应于第二合成循环的参考标记。

[0160] 图8. 示例性方法版本3的方案

[0161] 显示根据实例部分的示例性方法版本3的第一合成循环的方案。提供这个方法仅用于说明性支持,并且不在所要求保护的发明的范围内。所述方法包括提供支架多核苷酸、掺入、裂解、连接和去除保护基的循环。所述方案显示在第一个循环(301、302)中掺入胸腺嘧啶核苷酸和其与配偶体腺嘌呤核苷酸(304)相对的配对,以及在下一合成循环中提供支架多核苷酸(306)。显示此对仅用于说明目的而不具限制性,取决于所需的预定义序列,此对可以是任何对。所述方案还显示胞嘧啶-鸟嘌呤对作为支架多核苷酸的组分并且不是预定义序列的一部分。此对还仅出于说明的目的展示,并且不具有限制性,其可为任何对。核苷酸Z可为任何核苷酸。核苷酸X可为任何合适的核苷酸。

[0162] 图9. 示例性方法版本4的方案

[0163] 显示根据实例部分的示例性方法版本4的第一合成循环的方案。提供这个方法仅用于说明性支持,并且不在所要求保护的发明的范围内。所述方法包括提供支架多核苷酸、掺入、裂解、连接和去除保护基的循环。所述方案显示在第一个循环(401、402)中掺入胸腺嘧啶核苷酸和其与配偶体腺嘌呤核苷酸(404)相对的配对,以及在下一合成循环中提供包括与胞嘧啶配对的鸟嘌呤的支架多核苷酸(406)。这些对仅用于说明目的而不是限制性的,取决于所需的预定义序列,它们可以是任何对。核苷酸X、Y和Z可以是任何核苷酸。

[0164] 图10. 示例性方法版本5的方案

[0165] 显示根据实例部分的示例性方法版本5的第一合成循环的方案。提供这个方法仅用于说明性支持,并且不在所要求保护的发明的范围内。所述方法包括提供支架多核苷酸、掺入、裂解、连接和去除保护基的循环。所述方案显示在第一个循环(501、502)中掺入胸腺嘧啶核苷酸和其与配偶体腺嘌呤核苷酸(504)相对的配对,以及在下一合成循环中提供包括与胞嘧啶配对的鸟嘌呤的支架多核苷酸(506)。所述方案还显示胞嘧啶-鸟嘌呤对(位置n-2)作为支架多核苷酸的组分并且不是预定义序列的一部分。这些对仅用于说明目的而不是限制性的,取决于所需的预定义序列,它们可以是任何对。核苷酸X、Y和Z可以是任何核苷酸。

[0166] 图11. 显示支架多核苷酸表面固定化的方案

[0167] 方案显示(a至h)支架多核苷酸的可能的示例发夹环构型和其到表面的固定。

[0168] 方案(i和j)显示了用于将多核苷酸连接到表面的表面化学的实例。实例显示了双股实施例,其中两条股通过发夹连接,但是相同的化学方法可用于附接未连接的双股多核苷酸的一条或两条股。

[0169] 图12.没有辅助股-掺入

[0170] a) 以虚线框悬垂显示掺入步骤的方案。

[0171] b) 对于与肌苷相对掺入3'-O-修饰的dTTP评估DNA聚合酶。所述图描绘了凝胶,其显示在50°C在Mn²⁺离子的存在下通过各种DNA聚合酶(BST、Deep Vent (Exo-)、Therminator I和Therminator IX)进行3'-O-改性dTTP掺入的结果。通道1:使用Bst DNA聚合酶掺入3'-O-烯丙基-dTTP。通道2:使用Bst DNA聚合酶掺入3'-O-叠氮基甲基-dTTP。通道3:使用Deep vent (exo-) DNA聚合酶掺入3'-O-烯丙基-dTTP。通道4:使用Deep vent (exo-) DNA聚合酶掺入3'-O-叠氮基甲基-dTTP。通道5:使用Therminator I DNA聚合酶掺入3'-O-烯丙基-dTTP。通道6:使用Therminator I DNA聚合酶掺入3'-O-叠氮基甲基-dTTP。通道7:使用Therminator IX DNA聚合酶掺入3'-O-烯丙基-dTTP。通道8:使用Therminator IX DNA聚合酶掺入3'-O-叠氮基甲基-dTTP。

[0172] c) 对于与肌苷相对掺入3'-O-修饰的dTTP评估DNA聚合酶。使用各种DNA聚合酶掺入的结果。

[0173] d) 使用Therminator IX DNA聚合酶评估掺入温度。所述图描绘了凝胶,其显示了在不同温度下使用Therminator IX DNA聚合酶在Mn²⁺离子存在下与肌苷相对掺入3'-O-修饰的dTTP的结果。通道1:在37°C掺入3'-O-烯丙基dTTP。通道2:在37°C掺入3'-O-叠氮基甲基dTTP。通道3:在50°C掺入3'-O-烯丙基dTTP。通道4:在50°C掺入3'-O-叠氮基甲基dTTP。通道5:在65°C掺入3'-O-烯丙基dTTP。通道6:在65°C掺入3'-O-叠氮基甲基dTTP。

[0174] e) 使用Therminator IX DNA聚合酶评估掺入温度。在不同温度下进行的掺入的结果。

[0175] f) 使用Therminator IX DNA聚合酶评估掺入时Mn²⁺的存在。所述图描绘了凝胶,其显示在65°C相对肌苷掺入3'-O-修饰的dTTP的结果。通道S:标准。通道1:没有Mn²⁺离子的3'-O-烯丙基-dTTP的掺入。通道2:没有Mn²⁺离子的3'-O-叠氮基甲基-dTTP的掺入。通道3:在Mn²⁺离子存在下掺入3'-O-烯丙基-dTTP。通道4:在Mn²⁺离子存在下掺入3'-O-叠氮基甲基-dTTP。

[0176] g) 使用Therminator IX DNA聚合酶评估掺入时Mn²⁺的存在。在存在和不存在Mn²⁺离子的情况下掺入的结果。

[0177] h) 用于研究掺入步骤的寡核苷酸。

[0178] 图13.没有辅助股-裂解

[0179] a) 显示在不存在辅助股的情况下裂解杂交的多核苷酸股的方案。裂解步骤以虚线框悬垂显示。

[0180] b) 凝胶显示分别在37°C和室温24°C下用hAAG和0.2M NaOH(强碱)裂解寡核苷酸。通道1.起始寡核苷酸.作为含有两条全长股的阳性对照的通道2显示出裂解与未裂解的DNA比率为90%:10%的更高产率。包含没有辅助股的裂解反应的通道3显示裂解与未裂解的DNA的比率为10%:90%的低百分比产率。

[0181] c) 凝胶显示寡核苷酸在37°C下用hAAG和Endo VIII裂解。作为含有两条全长股的阳性对照的通道2显示出裂解与未裂解的DNA比率为约90%:10%的更高产率。包括没有辅助股的裂解反应的通道3显示裂解与未裂解的DNA的比率为约7%:93%的低百分比产率。

[0182] d) 用hAAG/Endo VIII和hAAG/化学碱裂解寡核苷酸的总结。

[0183] e) 用于研究裂解步骤的寡核苷酸。

[0184] 图14. 没有辅助股-连接

[0185] a) 显示在不存在辅助股的情况下连接杂交的多核苷酸股的方案。在虚线框中悬垂显示连接步骤。

[0186] b) 凝胶显示在没有辅助股的情况下在室温 (24°C) 下用Quick T4 DNA连接酶连接寡核苷酸。通道1含有36聚体TAMRA单股寡核苷酸和18聚体TAMRA单股寡核苷酸的混合物。这些寡核苷酸用作参考条带。

[0187] c) 用于研究连接步骤的寡核苷酸。

[0188] 图15. 具有辅助股的版本1化学方法-掺入

[0189] a) 以虚线框悬垂显示掺入步骤的方案。

[0190] b) 适用于研究掺入步骤的寡核苷酸。

[0191] 图16. 具有辅助股的版本1化学方法-裂解

[0192] a) 显示在不存在辅助股的情况下裂解杂交的多核苷酸股的方案。裂解步骤以虚线框悬垂显示。

[0193] b) 凝胶显示分别在37°C和室温24°C下用hAAG和0.2M NaOH (强碱) 裂解寡核苷酸。通道1. 起始寡核苷酸. 作为含有两条全长股的阳性对照的通道2显示出裂解与未裂解的DNA比率为90%:10%的更高产率。包含没有辅助股的裂解反应的通道3显示裂解与未裂解的DNA的比率为10%:90%的低百分比产率。包含与辅助股的裂解反应的通道4显示裂解与未裂解的DNA的比率为50%:50%的相同百分比产率。

[0194] c) 评估内切核酸酶VIII裂解无碱基位点。凝胶显示寡核苷酸在37°C下用hAAG和Endo VIII裂解。作为含有两条全长股的阳性对照的通道2显示出裂解与未裂解的DNA比率为约90%:10%的更高产率。包含没有辅助股的裂解反应的通道3显示裂解与未裂解的DNA的比率为约7%:93%的低百分比产率。包含有辅助股的裂解反应的通道4显示裂解与未裂解的DNA的比率为10%:90%的低百分比产率。

[0195] d) 评估N,N'-二甲基乙二胺裂解无碱基位点。凝胶显示寡核苷酸用hAAG和100mM N,N'-二甲基乙二胺在37°C下裂解。通道1. 起始寡核苷酸. 作为含有两条全长股的阳性对照的通道2显示100%裂解的DNA。包含有辅助股的裂解反应的通道3显示裂解与未裂解的DNA的比率为90%:10%的较高百分比产率。

[0196] e) 用hAAG/Endo VIII、hAAG/化学碱和hAAG/替代化学碱裂解寡核苷酸的总结。

[0197] f) 用于研究裂解步骤的寡核苷酸。

[0198] 图17. 具有辅助股的版本1化学方法-连接

[0199] a) 显示在存在辅助股的情况下连接杂交的多核苷酸股的方案。在虚线框中悬垂显示连接步骤。

[0200] b) 凝胶显示在存在辅助股的情况下在室温 (24°C) 下用Quick T4 DNA连接酶连接寡核苷酸。通道1含有36聚体TAMRA单股寡核苷酸和18聚体TAMRA单股寡核苷酸的混合物。这些寡核苷酸用作参考条带。在通道2中, 在20分钟后存在预期条带大小为36聚体的可观察的连接产物。

[0201] c) 凝胶显示在辅助股存在下培育过夜后, 在室温 (24°C) 下用Quick T4 DNA连接酶连接寡核苷酸。通道1含有36聚体TAMRA单股寡核苷酸和18聚体TAMRA单股寡核苷酸的混合

物。这些寡核苷酸作为参考条带。在通道2中,存在可观察到的完全连接的产物,其预期条带大小为36聚体。

[0202] d) 用于研究连接步骤的寡核苷酸。

[0203] 图18. 具有辅助股的版本2化学方法-掺入

[0204] a) 显示掺入步骤的方案以橙色虚线框悬垂显示

[0205] b) 凝胶显示在27°C通过Therminator IX DNA聚合酶掺入3'-O-改性dTTP的结果。通道1:起始材料。通道2:1分钟后掺入,转化率为5%。通道3:2分钟后掺入,转化率10%。通道4:5分钟后掺入,转化率20%。通道5:10分钟后掺入,转化率30%。通道6:20分钟后掺入,转化率35%。

[0206] c) 所述图描绘了凝胶,其显示在37°C通过Therminator IX DNA聚合酶掺入3'-O-改性dTTP的结果。通道1:起始材料。通道2:1分钟后掺入,转化率为30%。通道3:2分钟后掺入,转化率60%。通道4:5分钟后掺入,转化率90%。通道5:10分钟后掺入,转化率90%。通道6:20分钟后掺入,转化率90%。

[0207] d) 凝胶显示在47°C通过Therminator IX DNA聚合酶掺入3'-O-改性dTTP的结果。通道1:起始材料。通道2:1分钟后掺入,转化率为30%。通道3:2分钟后掺入,转化率65%。通道4:5分钟后掺入,转化率90%。通道5:10分钟后掺入,转化率90%。通道6:20分钟后掺入,转化率90%。

[0208] e) 凝胶显示在27°C通过Therminator IX DNA聚合酶掺入3'-O-改性dTTP的结果。通道1:起始材料。通道2:1分钟后掺入,转化率为70%。通道3:2分钟后掺入,转化率85%。通道4:5分钟后掺入,转化率92%。通道5:10分钟后掺入,转化率96%。通道6:20分钟后掺入,转化率96%。

[0209] f) 凝胶显示在37°C通过Therminator IX DNA聚合酶掺入3'-O-改性dTTP的结果。通道1:起始材料。通道2:1分钟后掺入,转化率为85%。通道3:2分钟后掺入,转化率95%。通道4:5分钟后掺入,转化率96%。通道5:10分钟后掺入,转化率96%。通道6:20分钟后掺入,转化率96%。

[0210] g) 凝胶显示在47°C通过Therminator IX DNA聚合酶掺入3'-O-改性dTTP的结果。通道1:起始材料。通道2:1分钟后掺入,转化率为85%。通道3:2分钟后掺入,转化率90%。通道4:5分钟后掺入,转化率96%。通道5:10分钟后掺入,转化率96%。通道6:20分钟后掺入,转化率96%。

[0211] h) 在各种温度和 Mn^{2+} 离子存在下掺入3'-O-叠氮基甲基-dTTP的总结。

[0212] i) 凝胶显示在37°C在 Mn^{2+} 的存在下通过Therminator IX DNA聚合酶与互补碱基相对3'-O-改性的dNTP的掺入结果。通道1:起始材料。通道2:3'-O-叠氮基甲基-dTTP掺入5分钟。通道3:3'-O-叠氮基甲基-dATP掺入5分钟。通道4:3'-O-叠氮基甲基-dCTP掺入5分钟。通道5:3'-O-叠氮基甲基-dGTP掺入5分钟。

[0213] j) 用于研究掺入步骤的寡核苷酸。

[0214] 图19. 具有辅助股的版本2化学方法-裂解

[0215] a) 显示在辅助股存在下裂解杂交的多核苷酸股的方案。裂解步骤以橙色虚线框悬垂显示。

[0216] b) 凝胶显示用Endo V在37°C下裂解寡核苷酸。通道1.起始寡核苷酸.作为含有两

条全长股的阳性对照的通道2显示出裂解与未裂解的DNA比率为80%:20%的产率。包含没有辅助股的裂解反应的通道3显示出高得多的裂解的DNA产率>99%。包含有辅助股的裂解反应的通道4也显示出>99%的DNA裂解产率。

[0217] c) 内切核酸酶V的裂解研究总结。

[0218] d) 用于研究裂解步骤的寡核苷酸。

[0219] 图20. 具有辅助股的版本2化学方法-连接

[0220] a) 显示在不存在辅助股的情况下连接杂交的多核苷酸股的方案。连接步骤以橙色虚线框悬垂显示。

[0221] b) 用于研究连接步骤的寡核苷酸。

[0222] 图21. 具有辅助股的版本2化学方法-去除保护基

[0223] a) 显示去除保护基步骤的方案在橙色虚线框中悬垂显示。

[0224] b) 所述图描绘了凝胶,其显示在掺入3'-O-叠氮基甲基-dTTP后通过50mM TCEP去除保护基3'-O-叠氮基甲基的结果。通道1:起始引物通道2:在 Mn^{2+} 存在下掺入3'-O-叠氮基甲基-dTTP。通道3:通过添加所有天然dNTP在通道2中延伸产物。通道4:通过50mM TCEP将通道2中的产物(0.5 μ M)去除保护基。通道5:通过添加所有天然dNTP在通道4中延伸产物。

[0225] c) 所述图描绘了凝胶,其显示在掺入3'-O-叠氮基甲基-dTTP后通过300mM TCEP去除保护基3'-O-叠氮基甲基的结果。通道1:起始引物通道2:在存在 Mn^{2+} 下掺入3'-O-叠氮基甲基-dTTP。通道3:通过添加所有天然dNTP在通道2中延伸产物。通道4:通过300mM TCEP将通道2中的产物(0.5 μ M)去除保护基。通道5:通过添加所有天然dNTP在通道4中延伸产物。

[0226] d) 所述图描绘了凝胶,其显示在掺入3'-O-叠氮基甲基-dCTP后通过50mM TCEP去除保护基3'-O-叠氮基甲基的结果。通道1:起始引物通道2:在存在 Mn^{2+} 下掺入3'-O-叠氮基甲基-dCTP。通道3:通过添加所有天然dNTP在通道2中延伸产物。通道4:通过300mM TCEP将通道2中的产物(0.5 μ M)去除保护基。通道5:通过添加所有天然dNTP在通道4中延伸产物。

[0227] e) 所述图描绘了凝胶,其显示在掺入3'-O-叠氮基甲基-dCTP后通过300mM TCEP去除保护基3'-O-叠氮基甲基的结果。通道1:起始引物

[0228] 通道2:在存在 Mn^{2+} 下掺入3'-O-叠氮基甲基-dCTP。通道3:通过添加所有天然dNTP在通道1中延伸产物。通道4:通过300mM TCEP将通道1中的产物(0.5 μ M)去除保护基。通道5:通过添加所有天然dNTP在通道3中延伸产物。

[0229] f) 所述图描绘了凝胶,其显示在掺入3'-O-叠氮基甲基-dATP后通过300mM TCEP去除保护基3'-O-叠氮基甲基的结果。

[0230] 通道1:起始引物

[0231] 通道2:在存在 Mn^{2+} 下掺入3'-O-叠氮基甲基-dATP。通道3:通过添加所有天然dNTP在通道2中延伸产物。通道4:通过300mM TCEP将通道2中的产物(0.5 μ M)去除保护基。通道5:通过添加所有天然dNTP在通道4中延伸产物。

[0232] g) 所述图描绘了凝胶,其显示在掺入3'-O-叠氮基甲基-dGTP后通过300mM TCEP去除保护基3'-O-叠氮基甲基的结果。通道1:起始引物。通道2:在存在 Mn^{2+} 下掺入3'-O-叠氮基甲基-dGTP。通道3:通过添加所有天然dNTP在通道2中延伸产物。通道4:通过300mM TCEP将通道2中的产物(0.5 μ M)去除保护基。通道5:通过添加所有天然dNTP在通道4中延伸产物。

[0233] h) TCEP在0.2 μ M DNA上去除保护基的效率。

[0234] i) 用于研究裂解步骤的寡核苷酸。

[0235] 图22.具有双发夹模型的版本2化学方法-掺入

[0236] a) 以虚线框悬垂显示掺入步骤的方案。

[0237] b) 对于与它的天然对应物相对掺入3'-O-修饰的dTTP评估DNA聚合酶。所述图描绘了凝胶,其显示在37°C通过Therminator IX DNA聚合酶掺入3'-O-改性dTTP的结果。通道1:起始材料。通道2:掺入天然dNTP混合物。通道3:通过Therminator IX DNA聚合酶掺入3'-O-叠氮基甲基-dTTP。通道4:通过添加所有天然dNTP在通道3中延伸产物。

[0238] c) 对于与它的天然对应物相对掺入3'-O-修饰的dTTP评估DNA聚合酶。适用于研究掺入步骤的寡核苷酸。

[0239] 图23.具有双发夹模型的版本2化学方法-裂解

[0240] a) 显示发夹寡核苷酸裂解的方案。裂解步骤以虚线框悬垂显示。

[0241] b) 凝胶显示用Endo V在37°C下裂解发夹寡核苷酸。通道1.起始发夹寡核苷酸。作为在5分钟后的裂解的发夹寡核苷酸的通道2显示出高产率的消化DNA,比率为约98%。作为在10分钟后的裂解的发夹寡核苷酸的通道3显示出高产率的消化DNA,比率为约99%。作为在30分钟后的裂解的发夹寡核苷酸的通道4显示出高产率的消化DNA,比率为约99%,以及在作为在1小时后的裂解的发夹寡核苷酸的通道5显示出高产率的消化DNA,比率为约99%。

[0242] c) 用于研究裂解步骤的寡核苷酸。

[0243] 图24.具有双发夹模型的版本2化学方法-连接

[0244] a) 显示杂交发夹的连接的方案。在虚线框中悬垂显示连接步骤。

[0245] b) 凝胶显示在存在辅助股的情况下在室温(24°C)下将发夹寡核苷酸用Blunt/TA DNA连接酶连接。通道1含有起始发夹寡核苷酸。1分钟后连接的发夹寡核苷酸的通道2显示出高产率的连接DNA产物,比率为约85%。2分钟后连接的发夹寡核苷酸的通道3显示出高产率的消化DNA,比率为约85%。3分钟后连接的发夹寡核苷酸的通道4显示出高产率的连接DNA产物,比率为约85%。4分钟后连接的发夹寡核苷酸的通道5显示高产率的连接DNA产物,比率为约85%。

[0246] c) 用于研究连接步骤的发夹寡核苷酸。

[0247] 图25.版本2化学方法-双发夹模型的完整循环

[0248] a) 显示涉及酶掺入、裂解、连接和去除保护基步骤的完整循环的方案。

[0249] b) 对于与它的天然对应物相对掺入3'-O-修饰的dTTP评估DNA聚合酶。所述图描绘了凝胶,其显示在37°C通过Therminator IX DNA聚合酶掺入3'-O-改性dTTP的结果。通道1:起始材料。通道2:通过Therminator IX DNA聚合酶掺入3'-O-叠氮基甲基-dTTP。通道3:通过添加所有天然dNTP在通道2中延伸产物。通道4:通过内切核酸酶V在通道2中裂解产物。通道5:通过钝性TA连接酶试剂盒在通道4中连接产物。

[0250] c) 适用于研究掺入步骤的寡核苷酸。

[0251] 图26.版本2化学方法-使用辅助股的单发夹模型的完整循环

[0252] a) 显示涉及酶掺入、裂解、连接和去除保护基步骤的完整循环的方案。

[0253] b) 适用于研究掺入步骤的寡核苷酸。

[0254] 图27.版本3化学方法-双发夹模型的完整循环

[0255] a) 显示涉及酶掺入、裂解、连接和去除保护基步骤的完整循环的方案。

- [0256] b) 适用于研究掺入步骤的寡核苷酸。
- [0257] 图28.版本2化学方法-双发夹模型的完整双循环
- [0258] a) 显示涉及酶促掺入、去除保护基、裂解和连接步骤的第一个完整循环的方案。
- [0259] b) 显示第一个完整循环后的第二个完整循环的方案,涉及酶促掺入、去除保护基、裂解和连接步骤。
- [0260] c) 所述图描绘了凝胶,其显示完整双循环实验,包括:掺入、去除保护基、裂解和连接步骤。
- [0261] 通道1.起始材料。
- [0262] 通道2.用天然dNTP扩展起始材料。
- [0263] 通道3.通过Therminator IX DNA聚合酶掺入3'-O-叠氮基甲基-dTTP。
- [0264] 通道4.通过添加所有天然dNTP在通道3中延伸产物。
- [0265] 通道5.TCEP在通道3将产品去除保护基。
- [0266] 通道6.通过添加所有天然dNTP在通道5中延伸产物。
- [0267] 通道7.内切核酸酶V在通道5中裂解产物。
- [0268] 通道8.通过钝性TA连接酶试剂盒在通道7中连接产物。
- [0269] 通道9.通过 λ 外切核酸酶裂解通道8中的产物。
- [0270] 通道10.第二循环的起始材料-与通道9中的材料相同。
- [0271] 通道11.通过Therminator IX DNA聚合酶掺入3'-O-叠氮基甲基-dTTP。
- [0272] 通道12.通过添加所有天然dNTP在通道11中延伸产物。
- [0273] 通道13.TCEP在通道11将产品去除保护基。
- [0274] 通道14.通过添加所有天然dNTP在通道13中延伸产物。
- [0275] 通道15.内切核酸酶V在通道13中裂解产物。
- [0276] 通道16.通过钝性TA连接酶试剂盒在通道15中连接产物。
- [0277] d) 用于研究的寡核苷酸。
- [0278] 图29
- [0279] 显示从根据本文所述方法合成的预定义序列的多核苷酸的支架多核苷酸释放机制的实例。
- [0280] 图30
- [0281] 用于根据本发明合成RNA的示例性方法的示意图。示例性方法显示在不存在辅助股的情况下合成。
- [0282] 图31
- [0283] 用于根据本发明合成RNA的示例性方法的示意图。示例性方法显示在辅助股存在下的合成。
- [0284] 图32
- [0285] 用于根据本发明合成RNA的示例性方法的示意图。示例性方法显示在辅助股存在下的合成。
- [0286] 图33
- [0287] 根据具有单发夹模型的合成方法版本2合成DNA的示例性方法的第1个完整循环的示意图,涉及在掺入步骤之前使辅助股变性的步骤。

[0288] 图34

[0289] 根据具有单发夹模型的合成方法版本2合成DNA的示例性方法的第2个完整循环的示意图,涉及在掺入步骤之前使辅助股变性的步骤。

[0290] 图35

[0291] 根据具有单发夹模型的合成方法版本2合成DNA的示例性方法的第3个完整循环的示意图,涉及在掺入步骤之前使辅助股变性的步骤。

[0292] 图36

[0293] 实例9中详述的实验中使用的寡核苷酸。

[0294] 图37

[0295] 显示对应于实例9中详述的完整三循环实验的反应产物的凝胶。

[0296] 所述图描绘了凝胶,其显示了完整的三循环实验的结果,包括:掺入、解封闭、裂解和连接步骤。

[0297] 通道1:起始材料。

[0298] 通道2:用天然dNTP扩展起始材料

[0299] 通道3:通过终止子X DNA聚合酶掺入3'-O-叠氮基甲基-dTTP。

[0300] 通道4:通过添加所有天然dNTP延伸通道3中的产物

[0301] 通道5:TCEP在通道3中对产品进行解封闭

[0302] 通道6:通过添加所有天然dNTP延伸通道5中的产物

[0303] 通道7:内切核酸酶V对通道5中的产物的裂解。

[0304] 通道8:通过T3 DNA连接酶在通道7中连接产物

[0305] 通道9:第二循环的起始材料-与通道9中的材料相同。

[0306] 通道10:通过添加所有天然dNTP在通道9中延伸产物。

[0307] 通道11:通过终止子X DNA聚合酶掺入3'-O-叠氮基甲基-dTTP。

[0308] 通道12:通过添加所有天然dNTP在通道11中延伸产物。

[0309] 通道13:TCEP在通道11中对产品进行解封闭

[0310] 通道14:通过添加所有天然dNTP在通道13中延伸产物。

[0311] 通道15:核酸内切酶V在通道13中裂解产物

[0312] 通道16:通过T3 DNA连接酶在通道15中连接产物

[0313] 通道17:第三循环的起始材料-与通道16中的材料相同。

[0314] 通道18:通过添加所有天然dNTP在通道17中延伸产物。

[0315] 通道19:通过终止子X DNA聚合酶掺入3'-O-叠氮基甲基-dTTP。

[0316] 通道20:通过添加所有天然dNTP在通道19中延伸产物。

[0317] 通道21:TCEP在通道19中对产品进行解封闭

[0318] 通道22:通过添加所有天然dNTP在通道21中延伸产物。

[0319] 通道23:核酸内切酶V在通道21中裂解产物

[0320] 通道24:通过T3 DNA连接酶在通道23中连接产物

[0321] 图38

[0322] 来自聚丙烯酰胺凝胶表面的荧光信号掺入不同量的BRAPA,其暴露于FITC-PEG-SH和FITC-PEG-COOH。

[0323] [图39](#)

[0324] 来自聚丙烯酰胺凝胶表面上的荧光素通道的经测量的荧光信号,其掺入不同量的BRAPA,其暴露于FITC-PEG-SH和FITC-PEG-COOH。

[0325] [图40](#)

[0326] (a) 显示没有接头固定在不同的样品上的发夹DNA的序列。

[0327] (b) 显示接头固定在不同样品上的发夹DNA的序列。

[0328] [图41](#)

[0329] 来自具有和不具有固定到溴乙酰基官能化的聚丙烯酰胺表面上的接头的发夹DNA寡聚物的荧光信号。

[0330] [图42](#)

[0331] 来自具有和不具有固定到溴乙酰基官能化的聚丙烯酰胺表面上的接头的发夹DNA寡聚物的所测量的荧光。

[0332] [图43](#)

[0333] 在掺入三磷酸酯之后,来自具有和不具有固定到溴乙酰基官能化的聚丙烯酰胺表面上的接头的发夹DNA寡聚物的荧光信号。

[0334] [图44](#)

[0335] 在掺入三磷酸酯之后,来自具有和不具有固定到溴乙酰基官能化的聚丙烯酰胺表面上的接头的发夹DNA寡聚物的所测量的荧光。

[0336] [图45](#)

[0337] (a) 如实例12中详述的每个反应步骤的实验概述和结果。

[0338] (b) 实例12中详述的实验中使用的寡核苷酸。

[0339] [图46](#)

[0340] 显示在裂解反应之前和之后来自发夹DNA寡聚体的荧光信号(实例12)。

[0341] [图47](#)

[0342] 显示在裂解反应之前和之后测量的来自发夹DNA寡聚体的荧光信号(实例12)。

[0343] [图48](#)

[0344] 显示含肌苷的股和用于连接反应的互补“辅助”股的序列(实例12)。

[0345] [图49](#)

[0346] 与来自对应于连接反应监测的发夹DNA寡聚物的荧光信号有关的结果(实例12)。

[0347] [图50](#)

[0348] 与来自对应于连接反应监测的发夹DNA寡聚物的所测量荧光相关的结果(实例12)。

[0349] [图51](#)

[0350] 关于根据本发明的方法,例如本发明的合成方法版本1、2和4(分别为图1、图2和图4和实例13),使用掺入步骤通过终止子X DNA聚合酶掺入3'-O-经修饰的-dNTP的结果。

[0351] 图51a提供了引物股(合成股的引物股部分;SEQ ID NO:68)和模板股(支持股;SEQ ID NO:69)的核酸序列。

[0352] 图51b描绘展示在37°C下在Mn²⁺离子存在下通过终止子X DNA聚合酶掺入3'-O-经修饰的-dNTP的结果的凝胶。

[0353] 通道1:起始寡核苷酸。

[0354] 通道2:掺入3'-O-叠氮基甲基-dTTP(效率>99%)

[0355] 通道3:掺入3'-O-叠氮基甲基-dATP(效率>99%)。

[0356] 通道4:掺入3'-O-叠氮基甲基-dCTP(效率>90%)。

[0357] 通道5:掺入3'-O-叠氮基甲基-dGTP(效率>99%)。

[0358] 在添加后,新添加的3'-O-经修饰的-dNTP占据引物股部分中的位置n。因此,例如根据分别如图1、2和4所示的本发明方法版本1、2和4的步骤3,将引物股部分中的下一核苷酸位置命名为n-1。

[0359] 数字的解释

[0360] 图11、12a、13a、14a、15a、16a、17a、18a、19a、20a、21a、22a、23a、24a、25a、26a、27a、28a、28b、29、30、31、32、33、34和35中所描绘的结构将与图6、7、8、9和10中所描绘的结构一致地解释。因此,在这些图中,双股支架多核苷酸分子的每个左边股是指支持股(对应于图6到10中的股“a”);双股支架多核苷酸分子的每个右边股是指合成股(对应于图6到10中的股“b”);所有支架多核苷酸分子包含较低的合成股,所述合成股对应于包括引物股部分的股(对应于图6到10中的股“b”的实线和虚线);在掺入新核苷酸之前,显示了某些支架多核苷酸分子(例如图15a和23a),其中合成股对应于包括辅助股部分的股(对应于图6到10中股“b”的虚线);某些支架多核苷酸分子(例如图12a、13a和14a中)显示没有辅助股部分(对应于图6到10中不存在股“b”的虚线);并且在连接步骤后,显示了某些支架多核苷酸分子(例如图33、34和35中),其中上部合成股对应于包括辅助股部分的股(对应于图6到10中股“b”的虚线),并且其中在下一合成循环中掺入新核苷酸之前,去除辅助股部分。

[0361] 另外,在这些图中,在相关的情况下,显示每个新核苷酸与可逆终止子基团掺入在一起,标记为rtNTP并描绘为小的圆形结构(对应于图6到10中的小三角形结构),并且末端磷酸基团标记为“p”并且描绘为小的椭圆形结构。

[0362] 图11c、11d、11g、11h、22a、23a、24a、25a、27a、28a、28b和29展示支架多核苷酸分子,其中包括辅助股部分和支持股的股通过发夹环连接。图11b、22a、23a、24a、25a、26a、27a、28a、28b、29、33、34和35展示支架多核苷酸分子,其中包括引物股部分和支持股的股通过发夹环连接。

[0363] 例如图27a和28a的图显示了支架多核苷酸分子,其中包括辅助股部分(右上股)和支持股(左上股)的股通过发夹环连接,并且在同一分子中,通过发夹环连接引物引物股部分(右下股)和支持股(左下股)的股。

[0364] 图51中所示的数据应被解释为包括根据本发明的方法的掺入步骤,例如与本发明的合成方法版本1、2和4一致(分别为图1、2和4)。

具体实施方式

[0365] 本发明提供了根据预定的核苷酸序列从头合成多核苷酸分子的方法。合成的多核苷酸优选为DNA,并且优选为双股多核苷酸分子。与现有的合成方法相比,本发明提供了优点。例如,所有反应步骤可以在温和pH的含水条件下进行,不需要广泛的保护和去除保护基程序。此外,合成不依赖于复制包括预定的核苷酸序列的预先存在的模板股。

[0366] 本发明人已经确定,如本文所定义的通用核苷酸的使用允许新掺入的核苷酸在每

个合成循环期间与其期望的配偶体核苷酸正确配对。通用核苷酸的使用允许在合成区域内产生促进合成的裂解和重复循环的多核苷酸裂解位点。本发明提供了用于合成多核苷酸和用于组装包括此类合成多核苷酸的大片段的通用方法。

[0367] 本文中将参考包含本发明的五个示范性方法版本(图1到5)和某些变体的示范性方法更一般化地描述本发明的合成方法的某些实施例。应理解,包含本发明的五个示范性方法版本的所有示范性方法并不意图限制本发明。本发明提供合成具有预定义序列的双股多核苷酸分子的体外方法,所述方法包括进行合成循环,其中在每个循环中通过掺入预定义序列的核苷酸延伸第一多核苷酸股,然后通过掺入核苷酸延伸与第一股杂交的第二多核苷酸股,从而与第一股的掺入的核苷酸形成核苷酸对。优选地,所述方法用于合成DNA。提供本文描述的具体方法作为本发明的实施例。

[0368] 反应条件

[0369] 在一个方面,本发明提供了合成具有预定义序列的双股多核苷酸的方法。

[0370] 在一些实施例中,合成在适合于双股多核苷酸内的核苷酸杂交的条件下进行。通常在允许核苷酸与互补核苷酸杂交的条件下使多核苷酸与试剂接触。允许杂交的条件是本领域公知的(例如,Sambrook等人,2001,《分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning: a laboratory manual)》,第3版,冷泉港实验室出版社;以及《当代分子生物学实验手册(Current Protocols in Molecular Biology)》,格林出版与威利交叉科学出版社(Greene Publishing and Wiley-Interscience),纽约,(1995))。

[0371] 将核苷酸掺入到多核苷酸中可以在适合条件下进行,例如在适合的缓冲溶液存在下在适合温度(例如,约65°C)下使用聚合酶(例如,Therminator IX聚合酶)或末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)酶或其功能性变体以掺入修改的核苷酸(3'-O-修改的-dNTP)。在一个实施例中,缓冲溶液可以包括2mM Tris-HCl、1mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、1mM KCl、0.2mM MgSO_4 和0.01% Triton®X-100。

[0372] 多核苷酸的裂解可以在合适的条件下进行,例如在合适的缓冲溶液存在下,在与酶相容的温度(例如37°C)下使用多核苷酸裂解酶(例如内切核酸酶)。在一个实施例中,缓冲溶液可包括5mM乙酸钾、2mM Tris-乙酸盐、1mM乙酸镁和0.1mM DTT。

[0373] 多核苷酸的连接可以在合适的条件下进行,例如在合适的缓冲溶液存在下,在与酶相容的温度(例如室温)下使用连接酶(例如T4 DNA连接酶)。在一个实施例中,缓冲溶液可以包括4.4mM Tris-HCl、7mM MgCl_2 、0.7mM二硫苏糖醇、0.7mM ATP、5%聚乙二醇(PEG6000)。

[0374] 去除保护基可以在合适的条件下进行,例如使用还原剂(例如TCEP)。例如,可以使用Tris缓冲液中的TCEP(例如终浓度为300mM)进行去除保护基。

[0375] 锚多核苷酸和支架多核苷酸

[0376] 具有预定义序列的双股多核苷酸通过本发明的方法通过将预定的核苷酸掺入预先存在的多核苷酸中来合成,所述多核苷酸在本文中称为支架多核苷酸,其可附接于或能够附接于表面,如本文所述。如本文更详细描述,支架多核苷酸形成支持结构以容纳新合成的多核苷酸,并且如从本文的描述中显而易见的,其不包括如常规合成方法中那样复制的预先存在的模板股。如果支架多核苷酸附接于表面,则支架多核苷酸可称为锚多核苷酸。本文更详细地描述了用于将支架多核苷酸附接到表面以形成锚多核苷酸的表面附接化学。

[0377] 在一个实施例中, 支架多核苷酸包括与互补支持股杂交的合成股。合成股包括聚合酶引物股部分和任选的由单股断裂或“切口”分离的辅助股部分(例如图1到5)。合成股的引物股部分和辅助股部分都可以与互补支持股杂交提供。或者, 可以单独提供合成股的辅助股部分。可首先提供合成股的引物股部分, 然后提供支持股和辅助股。或者, 可以单独提供支架多核苷酸的组分。例如, 可首先提供支持股, 然后提供合成股的引物股部分, 然后提供辅助股。可首先提供支持股, 然后提供合成股的辅助股部分, 然后提供引物股。可以在裂解步骤之前提供辅助股部分。可以在裂解和掺入新的预定核苷酸之前从支架多核苷酸省略辅助股部分。可以在裂解和掺入新的预定核苷酸之前, 例如通过变性从支架多核苷酸中去除辅助股部分, 如本文中更详细地描述。在合适条件下混合组分后, 支架多核苷酸在单独组分杂交时形成。

[0378] 新合成通过单股断裂位点处的聚合酶或转移酶引发。因此, 聚合酶或转移酶将作用于在单股断裂位点处延伸引物股部分的末端核苷酸。合成股的辅助股部分与合成股的引物股部分之间的单股断裂或“切口”通常最初通过提供合成股的两个部分作为单独分子实现, 所述单独分子将在与支持股杂交之后与所述支持股对准。通常在缺乏磷酸基团的情况下提供单股断裂位点处的辅助股的(5')末端核苷酸。缺乏末端磷酸基团防止辅助股部分的末端核苷酸与单股断裂位点处的引物股部分的末端核苷酸连接, 从而维持单股断裂。单股断裂的产生和维持可以通过其它方式实现。例如, 辅助股部分的末端核苷酸可以具有合适的封闭基团, 其阻止与引物股部分的连接。优选地, 在单股断裂位点处提供缺少末端磷酸基团的辅助股。

[0379] 可以提供支架多核苷酸, 其中每个支持和合成股在相邻末端不连接。支架多核苷酸可以在支架多核苷酸的两端提供有支持和合成股, 它们在相邻末端连接, 例如通过发夹环。支架多核苷酸可以在支架多核苷酸或任何其它合适的接头的一端提供有支持和合成股, 它们在相邻末端连接, 例如通过发夹环。

[0380] 如本文中更详细描述(参见图11), 具有或不具有发夹的支架多核苷酸可固定到固体载体或表面。

[0381] 术语“发夹”或“发夹环”通常用于当前技术领域。术语“发夹环”通常也称为“茎环”。这些术语是指多核苷酸中的二级结构区域, 其包括未配对核碱基的环, 当多核苷酸分子的一条股由于分子内碱基配对而与相同股的另一部分杂交时形成。因此发夹可以类似于U形结构。这种结构的实例如图11所示。

[0382] 核苷酸和通用核苷酸

[0383] 可以通过本文描述的任何方法掺入合成多核苷酸中的核苷酸可为核苷酸、核苷酸类似物和经修饰的核苷酸。

[0384] 在本文定义和描述的本发明的任何合成方法中, 核苷酸优选作为包括如本文所述的可逆终止子基团的核苷酸掺入。

[0385] 核苷酸可包括天然核碱基或非天然核碱基。核苷酸可含有天然核碱基、糖和磷酸基团。天然核碱基包括腺苷(A)、胸腺嘧啶(T)、尿嘧啶(U)、鸟嘌呤(G)和胞嘧啶(C)。可进一步修饰核苷酸的一种组分。

[0386] 核苷酸类似物为在碱、糖或磷酸或其中的组合中结构上经修饰并且对于聚合酶仍可接受的核苷酸, 作为掺入到寡核苷酸股中的底物。

[0387] 非天然核碱基可为在一定程度上将键结,例如氢键结到目标多核苷酸中的所有核碱基的核碱基。非天然核碱基优选地是在一定程度上将键结,例如氢键结到包括核苷腺苷(A)、胸腺嘧啶(T)、尿嘧啶(U)、鸟嘌呤(G)和胞嘧啶(C)的核苷酸的核碱基。

[0388] 非天然核苷酸可为肽核酸(PNA)、锁核酸(LNA)和解锁核酸(UNA)、桥接核酸(BNA)或吗啉代、硫代磷酸酯或甲基膦酸酯。

[0389] 非天然核苷酸可以包括经修饰的糖和/或经修饰的核碱基。经修饰的糖包含但不限于2'-O-甲基核糖。经修饰的核碱基包含但不限于甲基化的核碱基。核碱基的甲基化是表观遗传修饰的公认形式,其具有改变基因和其它元件(如微RNA)的表达的能力。核碱基的甲基化发生在离散的基因座处,所述基因座主要是由CpG基序组成的二核苷酸,但也可以在CHH基序(其中H是A、C或T)处发生。通常,在甲基化过程中,将甲基加到胞嘧啶碱基的第五个碳上以产生甲基胞嘧啶。因此,修饰的核碱基包含但不限于5-甲基胞嘧啶。

[0390] 预定义序列的核苷酸可以与配偶体核苷酸相对掺入以形成核苷酸对。配偶体核苷酸可为互补核苷酸。互补核苷酸为在一定程度上能够键结,例如氢键结到预定义序列的核苷酸的核苷酸。

[0391] 通常,将预定义序列的核苷酸掺入多核苷酸中与天然互补的配偶体核碱基相对。因此,可以掺入腺苷,与胸腺嘧啶相对,反之亦然。可以掺入鸟嘌呤,与胞嘧啶相对,反之亦然。或者,预定义序列的核苷酸可以在一定程度上与其将键结,例如氢键结的配偶体核碱基相反。

[0392] 或者,配偶体核苷酸可为非互补核苷酸。非互补核苷酸是这样的核苷酸,其不能够键结,例如氢键结到预定义序列的核苷酸。因此,预定义序列的核苷酸可以与配偶体核苷酸相对掺入以形成错配,条件是合成的多核苷酸总体上是双股的,并且其中第一股通过杂交与第二股连接。

[0393] 术语“相对”应理解为涉及所述术语在核酸生物化学领域中的正常使用,并且具体地涉及常规的Watson-Crick碱基配对。因此,序列5'-ACGA-3'的第一核酸分子可与序列5'-TCGT-3'的第二核酸分子形成双股体,其中第一分子的G将位于与第二分子的C相对并与其形成氢键。序列5'-ATGA-3'的第一核酸分子可以与序列5'-TCGT-3'的第二核酸分子形成双股体,其中第一分子的T与第二分子的G错配,但仍然位于与其相对,并将作为配偶体核苷酸。所述原理适用于本文公开的任何核苷酸配偶体对关系,包含包括通用核苷酸的配偶体对。

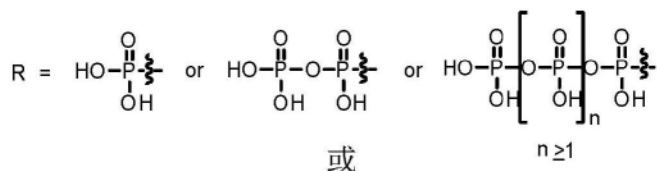
[0394] 在本文所述的所有方法中,支持股中的位置和合成股中的相对位置被指定为位置编号“n”。此位置是指支架多核苷酸的支持股中的核苷酸的位置,所述核苷酸在任何给定合成循环中与合成股中的核苷酸位置相对,所述合成股在所述循环中在步骤(3)或在后续循环的掺入步骤中将预定义序列的第一/下一核苷酸添加到引物股部分的末端之后由预定义序列的第一/下一核苷酸占据或由预定义序列的第一/下一核苷酸占据。位置“n”还指连接多核苷酸的支持股在连接步骤(5)处或在后续循环的连接步骤中的位置,所述位置是在第一循环的步骤(5)中或在后续循环的连接步骤中连接多核苷酸到裂解的支架多核苷酸之后将与预定义序列的第一/后续核苷酸相对的核苷酸位置。

[0395] 支持股中的位置和合成股中的相对位置都可以称为位置n。

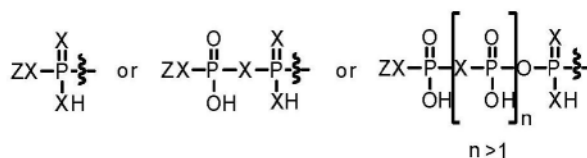
[0396] 关于位置“n”的定义的更多细节参考图1至图5及其相对于本文中更详细描述的五

个示例性合成方法版本1至5的描述提供。

[0397] 核苷酸和核苷酸类似物可以优选作为核苷三磷酸提供。因此,在本发明的方法中的任一种中,为了合成DNA多核苷酸,核苷酸可以例如通过DNA聚合酶的作用或例如通过具有脱氧核苷酸末端转移酶活性的酶的作用从2'-脱氧核糖核苷-5'-0-三磷酸(dNTP)掺入。在本发明的方法中的任一种中,为了合成RNA多核苷酸,核苷酸可以例如通过RNA聚合酶的作用或例如通过具有核苷酸末端转移酶活性的酶的作用掺入核糖核苷-5'-0-三磷酸(dNTP)。三磷酸可以被四磷酸或五磷酸(一般低聚磷酸)取代。这些低聚磷酸可以被其它烷基或酰基取代:



[0398]



[0399] X=O、S、NH Z=任何烷基或酰基

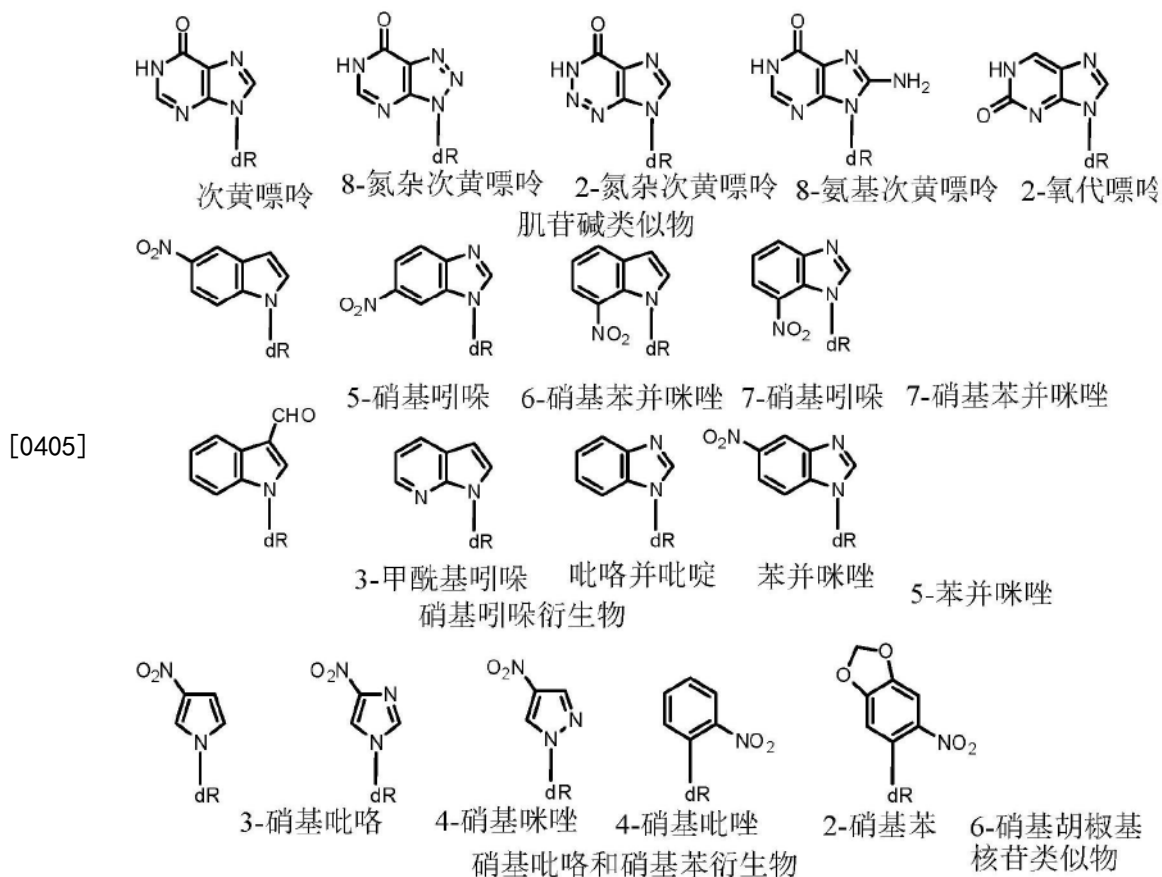
[0400] 和其盐

[0401] 本发明的方法可以使用通用核苷酸。通用核苷酸可以用作支架分子的支持股的组分,以促进新掺入的核苷酸正确地在合成的每一个循环期间与其期望的配偶体核苷酸配对。如果需要,通用核苷酸也可以作为预定核苷酸序列的组分掺入合成股中。

[0402] 通用核苷酸是其中核碱基将在某种程度上与预定义序列的任何核苷酸的核苷碱基键结,例如氢键结的核苷酸。通用核苷酸优选地是将在某种程度上与包括核苷腺苷(A)、胸腺嘧啶(T)、尿嘧啶(U)、鸟嘌呤(G)和胞嘧啶(C)的核苷酸键结,例如氢键结的核苷酸。与其它核苷酸相比,通用核苷酸可以更强地与一些核苷酸键结。例如,包括核苷2'-脱氧肌苷的通用核苷酸(I)将示出I-C>I-A>I-G约=I-T的优先配对顺序。

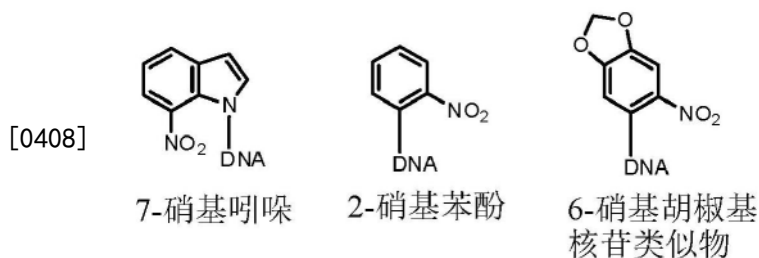
[0403] 可能的通用核苷酸的实例是肌苷或硝基肌苷。通用核苷酸优选地包括以下核碱基中的一个:次黄嘌呤、4-硝基肌苷、5-硝基肌苷、6-硝基肌苷、3-硝基吡咯、硝基咪唑、4-硝基吡唑、4-硝基苯并咪唑、5-硝基咪唑、4-氨基苯并咪唑或苯基(C6-芳环)。通用核苷酸更优选地包括以下核苷之一:2'-脱氧肌苷、肌苷、7-脱氮-2'-脱氧肌苷、7-脱氮-肌苷、2-氮杂-脱氧肌苷、2-氮杂-肌苷、4-硝基肌苷2'-脱氧核糖核苷、4-硝基肌苷核糖核苷、5-硝基肌苷2'-脱氧核糖核苷、5-硝基肌苷核糖核苷、6-硝基肌苷2'-脱氧核糖核苷、6-硝基肌苷核糖核苷、3-硝基吡咯2'-脱氧核糖核苷、3-硝基吡咯核糖核苷、次黄嘌呤的非环糖类似物、硝基咪唑2'-脱氧核糖核苷、硝基咪唑核糖核苷、4-硝基吡唑2'-脱氧核糖核苷、4-硝基吡唑核糖核苷、4-硝基苯并咪唑2'-脱氧核糖核苷、4-硝基苯并咪唑核糖核苷、5-硝基咪唑2'-脱氧核糖核苷、5-硝基咪唑核糖核苷、4-氨基苯并咪唑2'-脱氧核糖核苷、4-氨基苯并咪唑核糖核苷、苯基C-核糖核苷或苯基C-2'-脱氧核糖核苷。

[0404] 通用碱基的一些实例如下所示:

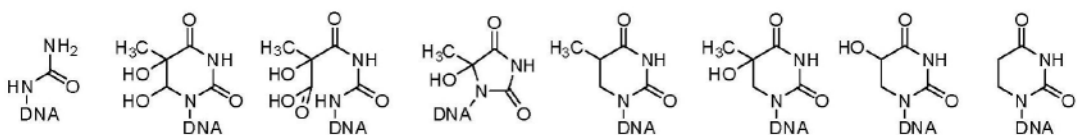


[0406] 还可以使用掺入可裂解碱基的通用核苷酸, 包含光可裂解碱基和酶可裂解碱基, 所述碱基的一些实例如下所示。

[0407] 光可裂解碱基:

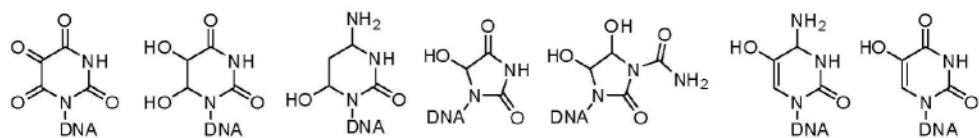


[0409] 可通过核酸内切酶III裂解的碱基类似物:



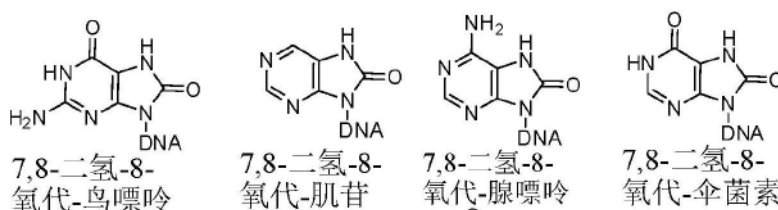
尿素 胸腺嘧啶 甲基酒 5-羟基-5- 5,6-二氢 5-羟基-6-氢 5-羟基-6- 5,6-二氢
(顺式和反式) 石尿素 甲基乙内酰脲 胸腺嘧啶 化胸腺嘧啶 氢化尿嘧啶 尿嘧啶

[0410]

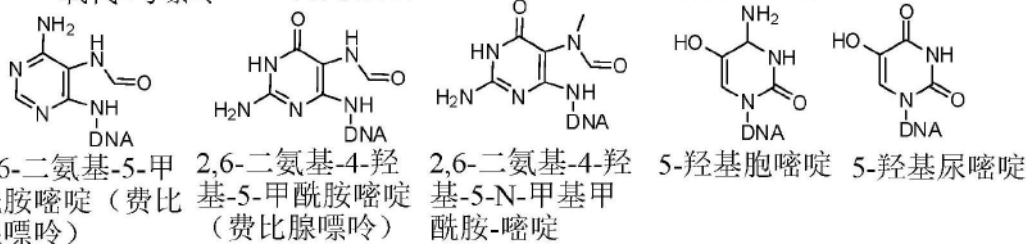


四氧嘧啶 尿嘧啶乙二 6-羟基-5,6- 5-羟基乙 反式-1-氨甲酰 5-羟基- 5-羟基-
醇 (顺式和 二氢胞嘧啶 内酰脲 基-2-氧代-4,5- 胞嘧啶 尿嘧啶
反式) 二氢-咪唑啉

[0411] 可通过甲酰胺基嘧啶DNA糖基化酶 (Fpg) 裂解的碱基类似物:

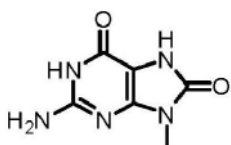


[0412]



4,6-二氨基-5-甲 2,6-二氨基-4-羟 2,6-二氨基-4-羟 5-羟基胞嘧啶 5-羟基尿嘧啶
酰胺嘧啶 (费比 基-5-甲酰胺嘧啶 基-5-N-甲基甲 嘧啶-嘧啶
腺嘌呤) (费比腺嘌呤)

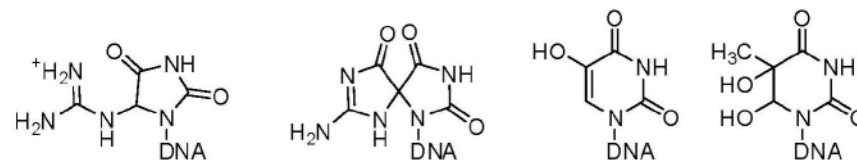
[0413] 可通过8-氧代鸟嘌呤DNA糖基化酶 (hOGG1) 裂解的碱基类似物:



[0414]

8-氧代鸟嘌呤

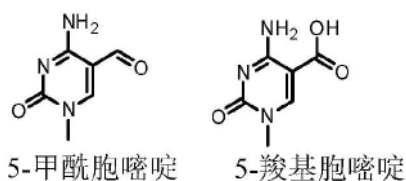
[0415] 可通过hNei11裂解的碱基类似物:



[0416]

鸟嘌呤乙内酰脲Gh 螺亚氨基乙 5-羟基- 胸腺嘧啶乙二醇
内酰脲Sp 尿嘧啶 (顺式和反式)

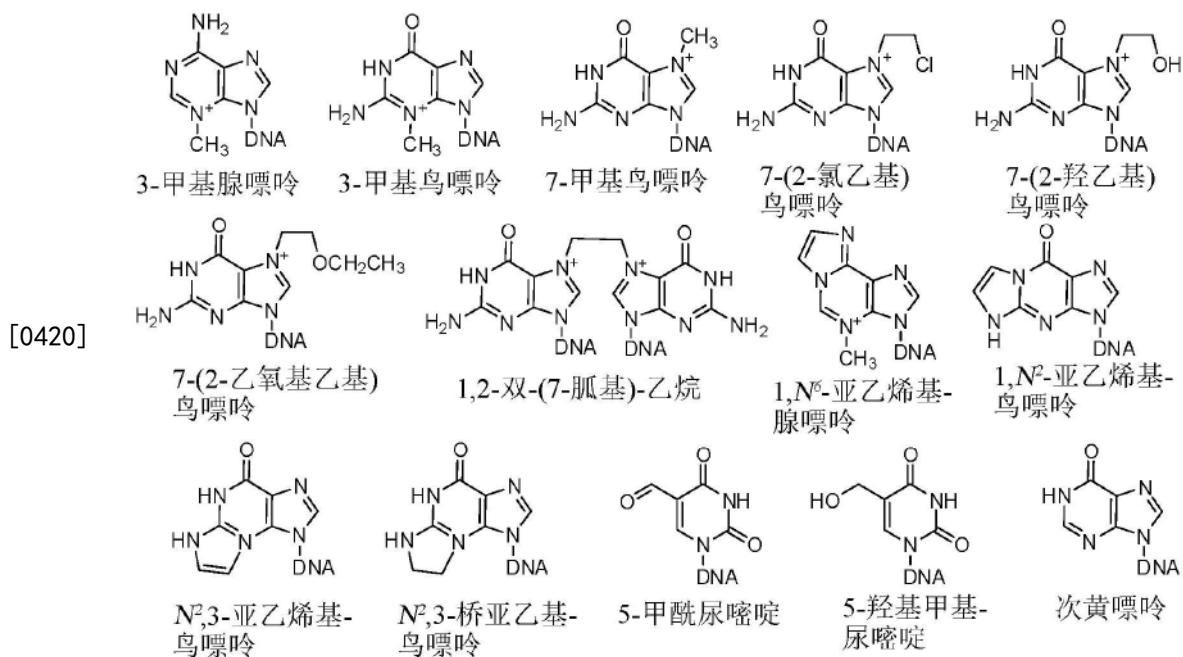
[0417] 可通过胸腺嘧啶DNA糖基化酶 (TDG) 裂解的碱基类似物:



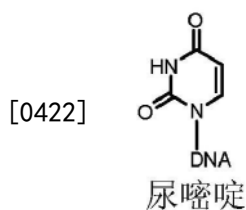
[0418]

5-甲酰胞嘧啶 5-羧基胞嘧啶

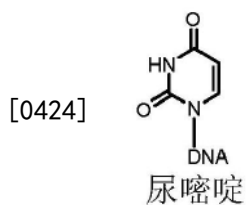
[0419] 可通过人烷基腺嘌呤DNA糖基化酶(hAAG)裂解的碱基类似物:



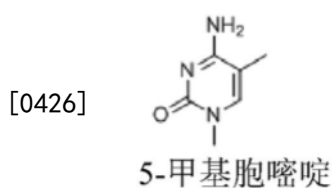
[0421] 可通过尿嘧啶DNA糖基化酶裂解的碱基:



[0423] 可通过人单股选择性单功能的尿嘧啶-DNA糖基化酶(SMUG1)裂解的碱基:



[0425] 可通过5-甲基胞嘧啶DNA糖基化酶(ROS1)裂解的碱基:



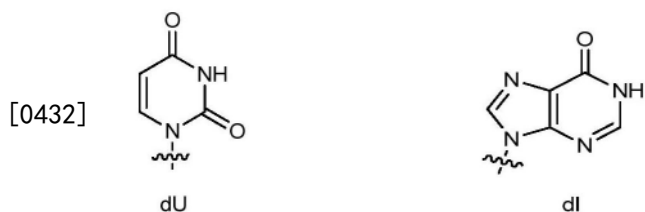
[0427] (参见S.S.David,S.D.Williams Chemical reviews 1998,98,1221-1262and M.I.Ponferrada-Marín,T.Roldán-Arjona,R.R.Ariza,Nucleic Acids Res 2009,37, 4264-4274)。

[0428] 在涉及支架多核苷酸的任何方法中,通用核苷酸最优选包括2'-脱氧肌苷。

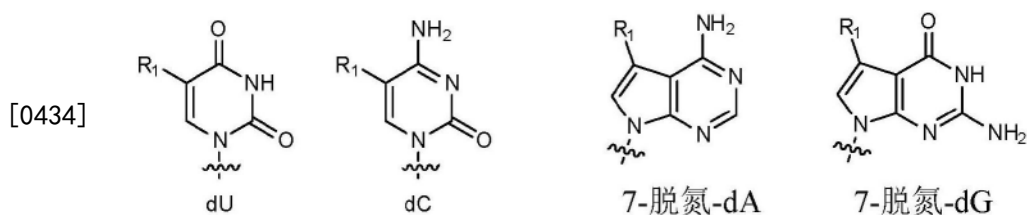
[0429] 可以使用本文描述的任何合成方法掺入的表观遗传碱基的实例包含以下:



[0431] 可以使用本文描述的任何合成方法掺入的修饰碱基的实例包含以下：

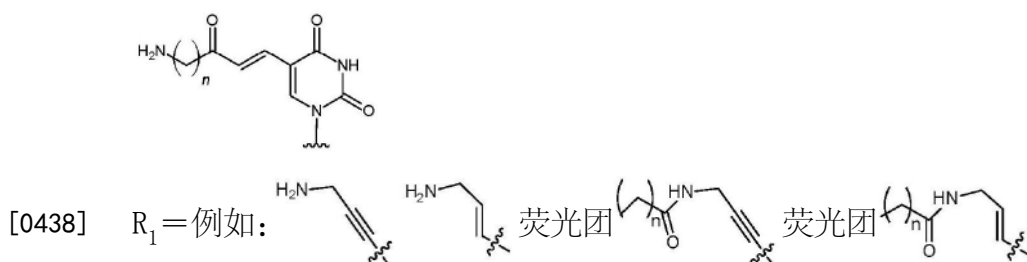
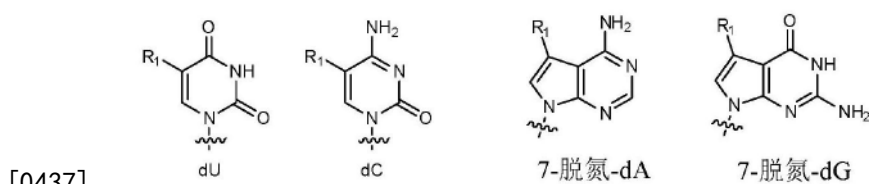


[0433] 可使用本文所述的任何合成方法掺入的卤代碱基的实例包含以下：



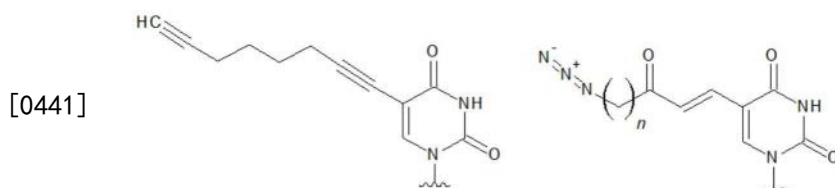
[0435] 其中R1=F、Cl、Br、I、烷基、芳基、荧光标记、氨基炔丙基、氨基烯丙基。

[0436] 其可以使用本文描述的任何合成方法掺入的可以用于例如附接/接头化学的氨基修饰的碱基的实例包含以下：

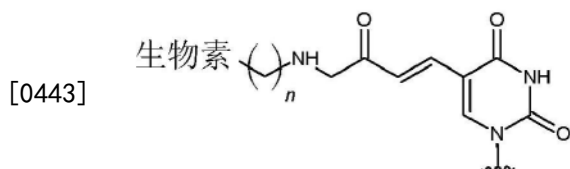


[0439] 其中碱基=A、T、G或C,具有炔烃或烯烃接头。

[0440] 其可以使用本文描述的任何合成方法掺入的可以用于例如点击化学的修饰的碱基的实例包含以下：

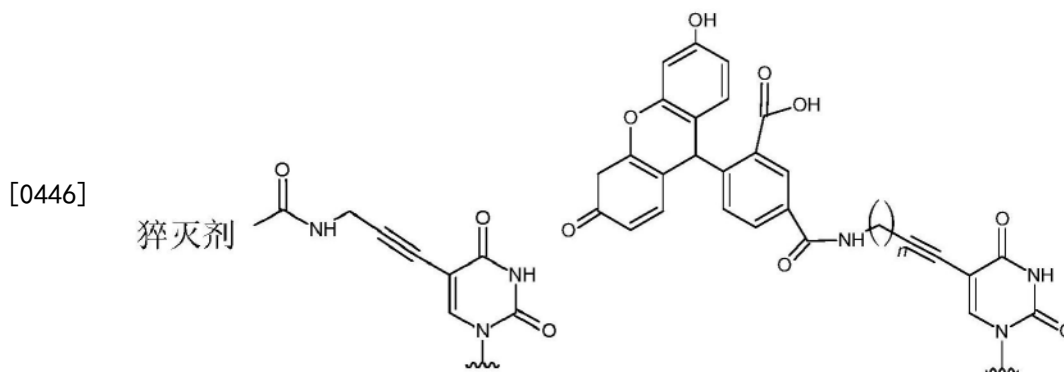


[0442] 可以使用本文描述的任何合成方法掺入的生物素修饰的碱基的实例包含以下：



[0444] 其中碱基=A、T、G或C,具有炔烃或烯烃接头。

[0445] 可以使用本文所述的任何合成方法掺入的带有荧光团和猝灭剂的碱基的实例包含以下:



[0447] 核苷酸掺入酶

[0448] 酶是可获得的,其能够通过添加核苷酸延伸双股多核苷酸分子的单股多核苷酸部分和/或能够延伸平端双股多核苷酸分子的一条股。这包含具有模板独立性酶活性的酶,如模板独立性聚合酶或模板独立性转移酶活性。

[0449] 因此,在本文所述的方法中的任一种中,用于添加预定义序列的核苷酸(例如,添加到支架多核苷酸的合成股的末端)的酶具有模板独立酶活性,如模板独立聚合酶或模板独立转移酶活性。

[0450] 可以使用任何适合的酶来使用本文所描述的方法添加预定核苷酸。因此,在本文中所定义和描述的所有方法中,参考聚合酶或转移酶的使用,聚合酶或转移酶可以用能够在本发明的方法的情形下与聚合酶或转移酶执行相同功能的另一种酶取代。

[0451] 聚合酶可用于本文所描述的方法中。聚合酶可以基于其掺入经修饰核苷酸的能力,确切地说,如本文所述的具有连接可逆终止子基团的核苷酸来选择。在本文所述的示例性方法中,作用于DNA的所有聚合酶必须不具有3'至5'外切核酸酶活性。聚合酶可具有股置换活性。

[0452] 因此,优选地,聚合酶为具有与未修饰聚合酶相比掺入包括可逆终止子基团的核苷酸的增强能力的经修饰的聚合酶。聚合酶更优选地是来自嗜热球菌(Thermococcus)物种9°N,优选地物种9°N-7的天然DNA聚合酶的基因工程变体。经过修饰的聚合酶的实例是可从新英格兰生物实验室(New England BioLab)获得的Therminator IX DNA聚合酶和终止子X DNA聚合酶。这个酶具有增强的掺入3'-O-修饰的dNTP的能力。

[0453] 可用于在本发明的任何方法中掺入可逆终止子dNTP的其它聚合酶的实例是Deep Vent (exo-)、Vent (Exo-)、9°N DNA聚合酶、终止子DNA聚合酶、Therminator IX DNA聚合酶、终止子X DNA聚合酶、Klenow片段(Exo-)、Bst DNA聚合酶、Bsu DNA聚合酶、Sulfolobus DNA聚合酶I和Taq聚合酶。

[0454] 可用于在本发明的任何方法中掺入可逆终止子NTP的其它聚合酶的实例为T3 RNA

聚合酶、T7 RNA聚合酶、SP6 RNA聚合酶、pol λ 、pol μ 或 Φ 29DNA聚合酶。

[0455] 对于包括DNA的这种多核苷酸合成分子的延伸,可以使用DNA聚合酶。可以使用任何合适的DNA聚合酶。

[0456] DNA聚合酶可以是例如Bst DNA聚合酶全长、Bst DNA聚合酶大片段、Bsu DNA聚合酶大片段、大肠杆菌DNA聚合酶DNA Pol I大(克列诺(Klenow))片段、M-MuLV逆转录酶、phi29 DNA聚合酶、硫化叶菌DNA聚合酶IV、Taq DNA聚合酶、T4 DNA聚合酶、T7 DNA聚合酶和具有逆转录酶活性的酶,例如M-MuLV逆转录酶。

[0457] DNA聚合酶可能缺乏3'到5'核酸外切酶活性。可以使用任何这种合适的聚合酶。这种DNA聚合酶可以是例如Bst DNA聚合酶全长、Bst DNA聚合酶大片段、Bsu DNA聚合酶大片段、DNA Pol I大(克列诺)片段(3'→5'体外-)、M-MuLV逆转录酶、硫化叶菌DNA聚合酶IV、Taq DNA聚合酶。

[0458] DNA聚合酶可具有股置换活性。可以使用任何这种合适的聚合酶。这种DNA聚合酶可以是例如Bst DNA聚合酶大片段、Bsu DNA聚合酶大片段、DNA Pol I大(克列诺)片段(3'→5'体外-)、M-MuLV逆转录酶、phi29 DNA聚合酶。

[0459] DNA聚合酶可能缺乏3'到5'核酸外切酶活性,并且可以具有股置换活性。可以使用任何这种合适的聚合酶。这种DNA聚合酶可以是例如Bst DNA聚合酶大片段、Bsu DNA聚合酶大片段、大肠杆菌DNA聚合酶DNA Pol I大(克列诺)片段、M-MuLV逆转录酶。

[0460] DNA聚合酶可能缺乏5'到3'核酸外切酶活性。可以使用任何这种合适的聚合酶。这种DNA聚合酶可以是例如,Bst DNA聚合酶大片段、Bsu DNA聚合酶大片段、DNA Pol I大(克列诺)片段、DNA Pol I大(克列诺)片段(3'→5'体外-)、M-MuLV逆转录酶、phi29 DNA聚合酶、硫化叶菌DNA聚合酶IV、T4 DNA聚合酶、T7 DNA聚合酶。

[0461] DNA聚合酶可能缺乏3'到5'和5'到3'核酸外切酶活性两者,并且可以具有股置换活性。可以使用任何这种合适的聚合酶。这种DNA聚合酶可以是例如Bst DNA聚合酶大片段、Bsu DNA聚合酶大片段、DNA Pol I大(克列诺)片段(3'→5'体外-)、M-MuLV逆转录酶。

[0462] DNA聚合酶也可以是经过基因工程化的变体。例如,DNA聚合酶可以是来自热球菌属(Thermococcus)物种9°N(,如物种9°N-7的天然DNA聚合酶的经基因工程化的变体。经过修饰的聚合酶的一个这种实例是可从新英格兰生物实验室(New England BioLabs)获得的Therminator IX DNA聚合酶。其它经过工程化或变体DNA聚合酶包含Deep Vent(exo-)、Vent(Exo-)、9°N DNA聚合酶、Therminator DNA聚合酶、克列诺片段(Exo-)、Bst DNA聚合酶、Bsu DNA聚合酶、硫化叶菌DNA聚合酶I和Taq聚合酶。

[0463] 对于包括RNA的这种多核苷酸合成分子的延伸,可以使用任何合适的酶。例如,可以使用RNA聚合酶。可以使用任何合适的RNA聚合酶。

[0464] RNA聚合酶可为T3 RNA聚合酶、T7 RNA聚合酶、SP6 RNA聚合酶、大肠杆菌RNA聚合酶全酶。

[0465] 酶可以具有末端转移酶活性,例如酶可以是末端核苷酸转移酶或末端脱氧核苷酸转移酶,并且其中多核苷酸合成分子经延伸以形成包括DNA或RNA,优选DNA的多核苷酸分子。这些酶中的任何一种酶可以用于本发明的方法中,其中需要延伸多核苷酸合成分子。

[0466] 一种此类酶是末端核苷酸转移酶,如末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)(参见例如,Motea等人,2010;Minhaz Ud-Dean,《合成系统生物技术(Syst.Synth.Biol.)》,2008,2(3-

4), 67-73)。TdT能够催化来自核苷三磷酸基质(NTP或dNTP)的核苷酸分子(核苷单磷酸)向多核苷酸合成分子的加成。TdT能够催化天然和非天然核苷酸的加成。其还能够催化核苷酸类似物的加成(Motea等人,2010)。还可以使用Pol λ 和pol μ 酶(Ramadan K等人,《分子生物学杂志(J.Mol.Biol.)》,2004,339(2),395-404),如可以使用 Φ 29DNA聚合酶。

[0467] 本领域已经广泛讨论了通过末端转移酶(例如,末端脱氧核苷酸转移酶;TdT)的作用在不存在模板的情况下延伸单股多核苷酸分子DNA和RNA两者以产生人工合成的单股多核苷酸分子的技术。这些技术在例如专利申请公开W02016/034807、W0 2016/128731、W02016/139477和W02017/009663,以及US2014/0363852、US2016/0046973、US2016/0108382和US2016/0168611中公开。这些文献描述了通过TdT的作用产生人工合成的单股多核苷酸分子的单股多核苷酸合成分子的受控延伸。描述了使用这种酶通过天然和非天然/人工核苷酸的延伸,如通过经过修饰的核苷酸的延伸,例如掺入封闭基团的核苷酸的延伸。这些文献中公开的任何末端转移酶和其任何酶片段、衍生物、类似物或功能等同物均可以应用于本发明的方法中,条件是末端转移酶功能被保存在所述酶中。

[0468] 定向进化技术、常规筛选、合理或半合理工程化/诱变方法或任何其它合适的方法可以用于改变任何此类酶以提供和/或优化所需功能。可使用能够在不使用模板的情况下用核苷酸延伸单股多核苷酸分子部分,例如包括DNA或RNA的分子的任何其它酶。

[0469] 因此,在本文定义的任何方法中,包括DNA的单股多核苷酸合成分子或包括DNA的平端双股多核苷酸可以通过酶延伸,所述酶具有模板独立性酶活性,如模板独立性聚合酶或转移酶活性。酶可以具有核苷酸转移酶活性,例如脱氧核苷酸转移酶,例如末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)或其酶片段、衍生物、类似物或功能等效物。通过这种酶的作用延伸的多核苷酸合成分子包括DNA。

[0470] 在本文定义的任何方法中,包括RNA的多核苷酸合成分子的单股部分或包括RNA的平端双股多核苷酸可通过酶延伸,所述酶具有核苷酸转移酶(例如,包括TdT)或其酶片段、衍生物、类似物或功能等同物。通过这种酶的作用延伸的多核苷酸合成分子可以包括RNA。对于包括RNA的单股多核苷酸合成分子或包括RNA的多核苷酸合成分子的单股部分的合成,可以使用任何合适的核苷酸转移酶。核苷酸转移酶,例如聚(U)聚合酶和聚(A)聚合酶(例如来自大肠杆菌)能够将核苷酸单磷酸单元不依赖模板地添加道多核苷酸合成分子。这些酶中的任何一种酶以及其任何酶片段、衍生物、类似物或功能等同物可以应用于本发明的方法中,条件是核苷酸转移酶功能被保存在所述酶中。定向进化技术、常规筛选、合理或半合理工程化/诱变方法或任何其它合适的方法可以用于改变任何此类酶以提供和/或优化所需功能。

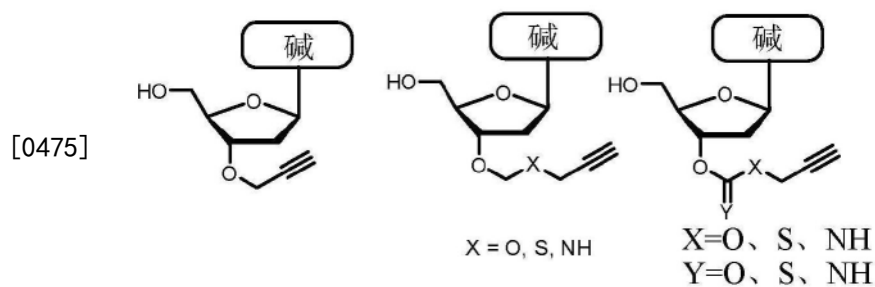
[0471] 可逆封闭基团

[0472] 本文限定和描述的所有方法均涉及可逆封闭基团或可逆终止子基团。这些基团的作用是阻止酶在给定的合成循环中进一步延伸作用,使得只有预定义序列的核苷酸可以可控制地用于延伸合成股,因此防止了非特异性核苷酸掺入。实现所述效果的任何功能可以用于本文限定和描述的任何方法中。与核苷酸连接的可逆封闭基团/可逆终止子基团和解封闭步骤是实现所述效果的优选方法。然而,这种效果可以通过适当的替代手段来实现。

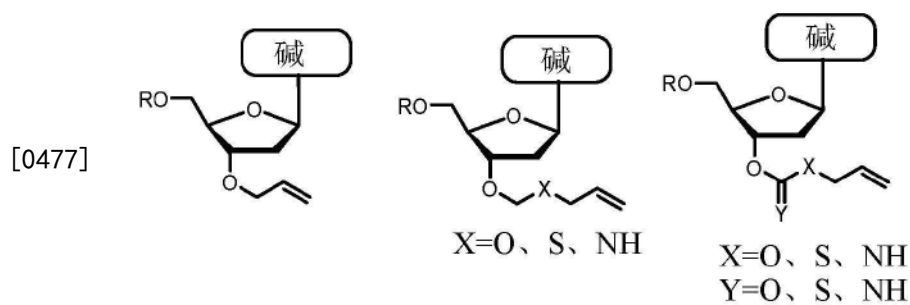
[0473] 任何合适的可逆封闭基团可以连接到核苷酸上,以防止在给定循环中掺入核苷酸后酶进一步延伸,并限制每个循环掺入至一个核苷酸。在本发明的任何方法中,可逆封闭基

团优选是可逆终止子基团,其起到防止聚合酶进一步延伸的作用。以下提供可逆终止子的实例。

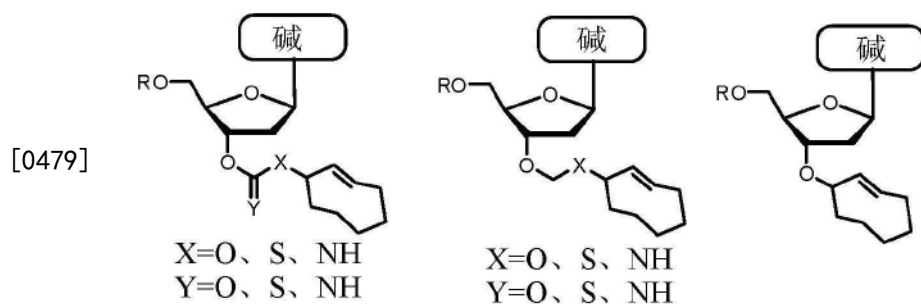
[0474] 炔丙基可逆终止子:



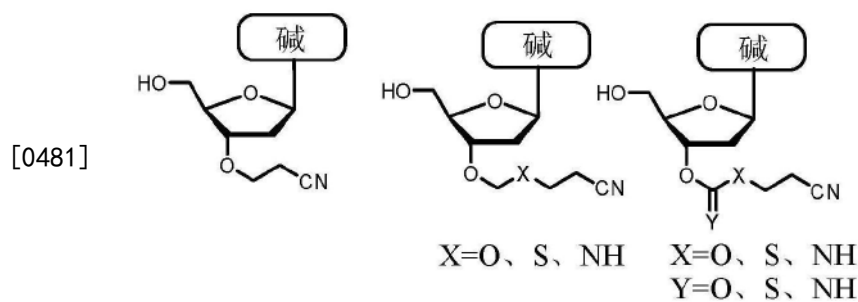
[0476] 烯丙基可逆终止子:



[0478] 环辛烯可逆终止子:

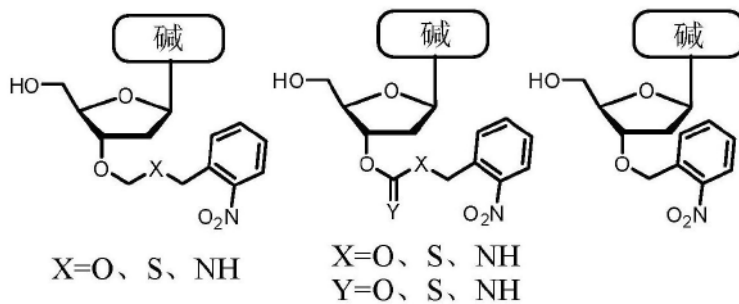


[0480] 氰乙基可逆终止子:



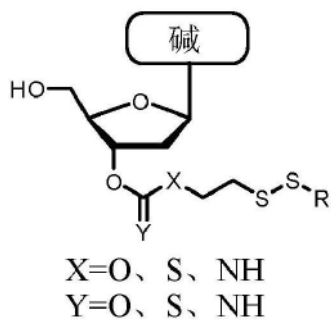
[0482] 硝基苄基可逆终止子:

[0483]



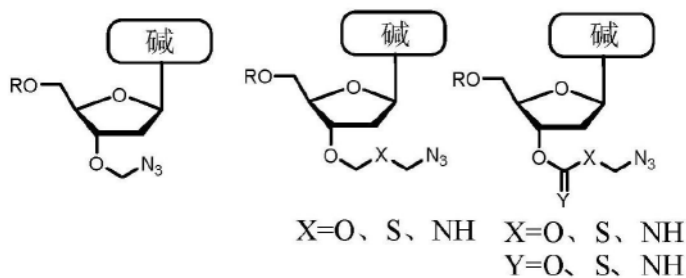
[0484] 二硫化物可逆终止子:

[0485]



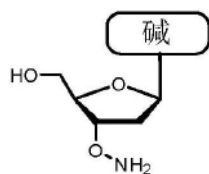
[0486] 叠氮基甲基可逆终止子:

[0487]

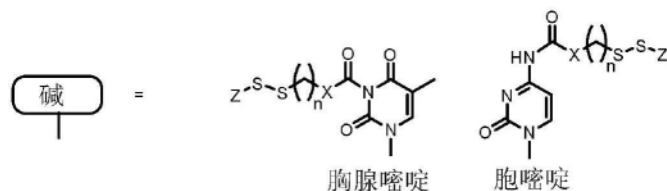


[0488] 氨基烷氧基可逆终止子:

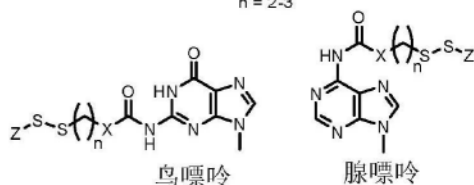
[0489]



[0490] 具有与碱基连接的庞大基团的核苷三磷酸可以作为3'-羟基上的可逆终止子基团的替代物并且可以阻止进一步掺入。所述基团可以通过TCEP或DTT去除保护基,产生天然核苷酸。



[0491]

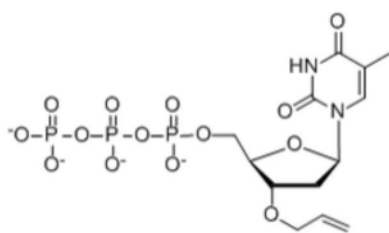
[0492] $X=O, S, NH, CH_2$ Z =大基团

[0493] 为了根据本发明的任何方法合成DNA多核苷酸,优选的修饰核苷是3'-O-修饰的-2'-脱氧核糖核苷-5'-O-三磷酸。为了根据本发明的任何方法合成RNA多核苷酸,优选的修饰核苷是3'-O-修饰的-核糖核苷-5'-O-三磷酸。

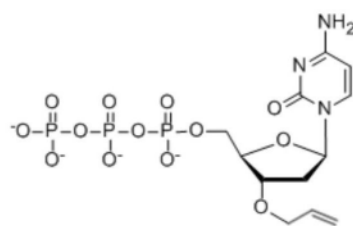
[0494] 优选的经修饰的dNTP是为3'-O-烯丙基-dNTP和3'-O-叠氮基甲基-dNTP的经修饰的dNTP。

[0495] 3'-O-烯丙基-dNTP如下所示。

3'-O-烯丙基-dTTP:

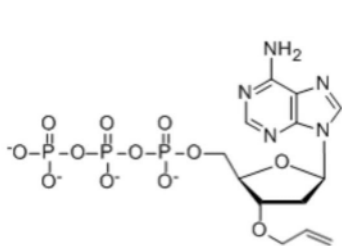


3'-O-烯丙基-dCTP:

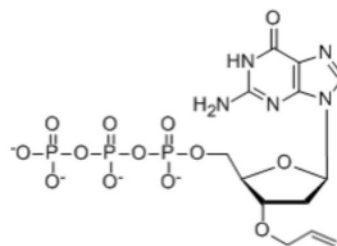


[0496]

3'-O-烯丙基-dATP:

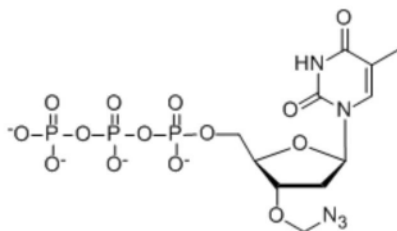


3'-O-烯丙基-dGTP:

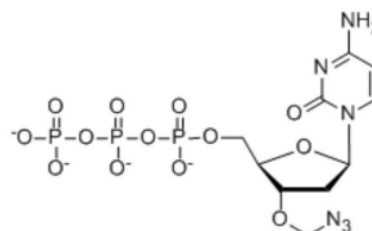


[0497] 3'-O-叠氮基甲基-dNTP如下所示。

3'-O-叠氮基甲基-dTTP:

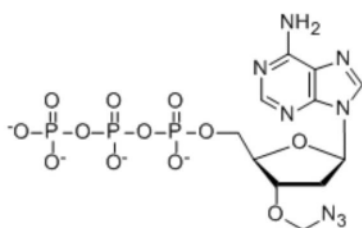


3'-O-叠氮基甲基-dCTP:

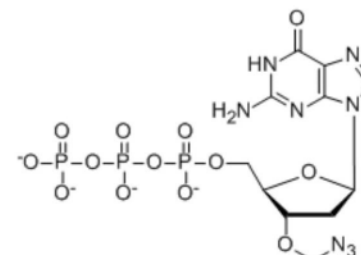


[0498]

3'-O-叠氮基甲基-dATP:



3'-O-叠氮基甲基-dGTP:



[0499] 本文描述和限定的本发明方法可以涉及去除保护基或解封闭步骤。这样的步骤涉及通过任何合适的方法去除可逆封闭基团(例如可逆终止子基团),或以其它方式逆转阻断/终止子基团的功能以抑制酶/聚合酶的进一步延伸作用。

[0500] 可以使用任何合适的试剂在去除保护基步骤中去除可逆终止子基团。

[0501] 优选的去除保护基试剂是三(羧乙基)膦(TCEP)。TCEP可用于在掺入后从3'-O-烯丙基-核苷酸(与Pd⁰结合)和3'-O-叠氮基甲基-核苷酸去除可逆终止子基团。

[0502] 以下提供了去除保护基试剂的实例。

[0503] 烯丙基可逆终止子:

[0504] 用Pd催化剂—Na₂PdCl₄、PdCl₂处理。

[0505] 可以使用配体,例如:三苯基膦-3,3',3''-三磺酸三钠盐。

[0506] 烯丙基可逆终止子:

[0507] 用Pd催化剂—Na₂PdCl₄、PdCl₂处理。

[0508] 可以使用配体,例如:三苯基膦-3,3',3''-三磺酸三钠盐。

[0509] 叠氮基甲基可逆终止子:

[0510] 通过硫醇(巯基乙醇或二硫苏糖醇)或三(2-羧乙基)膦—TCEP处理。

[0511] 氰乙基可逆终止子:

[0512] 通过氟化物—氟化铵、四丁基氯化铵(TBAF)处理。

[0513] 硝基苄基可逆终止子:

[0514] 暴露在UV光下

[0515] 二硫化物可逆终止子:

[0516] 通过硫醇(巯基乙醇或二硫苏糖醇)或三(2-羧乙基)膦—TCEP处理。

[0517] 氨基烷氧基可逆终止子:

[0518] 用亚硝酸盐(NO₂⁻、HNO₂) pH=5.5处理

[0519] 可逆封闭基团(例如可逆终止子基团)可以通过在掺入步骤之后和裂解步骤之前

立即进行的步骤去除,条件是去除掺入步骤中的不需要的试剂以防止在去除可逆终止子基团后进一步掺入。可逆封闭基团(例如可逆终止子基团)可以通过在裂解步骤之后和连接步骤之前立即进行的步骤去除。可逆封闭基团(例如可逆终止子基团)可以通过在连接步骤之后立即进行的步骤去除。

[0520] 合成多核苷酸

[0521] 具有根据本文所述方法合成的预定义序列的多核苷酸是双股的。合成的多核苷酸总体上是双股的,并且其中第一股通过杂交与第二股连接。只要整个第一股通过杂交与第二股连接,可以容忍错配和非杂交区域。

[0522] 杂交可以通过中等严格或严格杂交条件来定义。中等严格的杂交条件使用含有 $5\times$ 氯化钠/柠檬酸钠(SSC)、0.5%SDS、1.0mM EDTA(pH 8.0)、约50%甲酰胺的杂交缓冲液、 $6\times$ SSC和55°C杂交温度的预洗涤溶液(或其它类似的杂交溶液,例如含有约50%甲酰胺的溶液,杂交温度为42°C),并且洗涤条件为60°C在 $0.5\times$ SSC,0.1%SDS中进行。严格杂交条件在 $6\times$ SSC中在45°C下杂交,接着在 $0.1\times$ SSC、0.2%SDS中在68°C下进行一次或多次洗涤。

[0523] 具有根据本文所述方法合成的预定义序列的双股多核苷酸可以保留为双股多核苷酸。或者,可以分离双股多核苷酸的两条股以提供具有预定义序列的单股多核苷酸。允许双股多核苷酸的两条股分离的条件(熔融)是本领域公知的(例如,Sambrook等人,2001,《分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning:a laboratory manual)》,第3版,冷泉港实验室出版社;以及《当代分子生物学实验手册(Current Protocols in Molecular Biology)》,格林出版与威利交叉科学出版社(Greene Publishing and Wiley-Interscience),纽约,(1995))。

[0524] 具有根据本文所述方法合成的预定义序列的双股多核苷酸可以在合成后扩增。可以扩增双股多核苷酸的任何区域。双股多核苷酸的全部或任何区域可以与支架多核苷酸的全部或任何区域一起扩增。允许双股多核苷酸扩增的条件是本领域公知的(例如,Sambrook等人,2001,《分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning:a laboratory manual)》,第3版,冷泉港实验室出版社;以及《当代分子生物学实验手册(Current Protocols in Molecular Biology)》,格林出版与威利交叉科学出版社(Greene Publishing and Wiley-Interscience),纽约,(1995))。因此,本文所述的任何合成方法可以进一步包括扩增步骤,其中如上所述扩增具有预定义序列的双股多核苷酸或其任何区域。可以通过任何合适的方法执行扩增,如聚合酶链反应(PCR)、聚合酶螺旋反应(PSR)、环介导的等温扩增(LAMP)、基于核酸序列的扩增(NASBA)、自主序列复制(3SR)、滚环扩增(RCA)、股置换扩增(SDA)、多重置换扩增(MDA)、连接酶链反应(LCR)、解旋酶依赖性扩增(HDA)、网状分支扩增方法(RAM)等。优选地,通过聚合酶链反应(PCR)执行扩增。

[0525] 具有根据本文所述方法合成的预定义序列的双股或单股多核苷酸可以是任何长度。例如,多核苷酸的长度可以是至少10、至少50、至少100、至少150、至少200、至少250、至少300、至少350、至少400、至少450或至少500个核苷酸或核苷酸对。例如,长度上,多核苷酸可以是约10至约100个核苷酸或核苷酸对,约10至约200个核苷酸或核苷酸对,约10至约300个核苷酸或核苷酸对,约10至约400个核苷酸或核苷酸对和约10至约500个核苷酸或核苷酸对。多核苷酸可以是多达约1000个或更多个核苷酸或核苷酸对,长度多达约5000个或更多个核苷酸或核苷酸对或长度多达约100000个或更多个核苷酸或核苷酸对。

[0526] 支架多核苷酸的裂解

[0527] 在需要存在支架多核苷酸的方法和连接前的裂解步骤中,进行裂解步骤的试剂的选择将取决于所用的具体方法。裂解位点由支持股中通用核苷酸的特定位置以及一旦裂解需要平端支架多核苷酸或一旦裂解需要支架多核苷酸中的悬垂端限定。因此,所需裂解位点的构型和适当裂解试剂的选择将取决于所述方法中采用的特定化学方法,通过参考本文所述的示例性方法将很容易明白。

[0528] 识别经修饰的碱基的DNA裂解酶的一些实例展示于下表中。

DNA 糖基化酶/ 核酸内切酶	主底物	裂解位点	裂解形成的末端	
			5'-端	3'-端
APE1	AP 位点	第 1 个磷酸二酯键 5' 到损害	脱氧核糖-5'-磷酸	OH
核酸内切酶 III	AP 位点, 胸腺嘧啶乙二醇	第 1 个磷酸二酯键 3' 到损害	磷酸	3'-磷酸- α,β -不饱和醛
核酸内切酶 IV	AP 位点	第 1 个磷酸二酯键 5' 到损害	脱氧核糖-5'-磷酸	OH
内切核酸酶 V	肌苷	第 2 个磷酸二酯键 3' 到损害	磷酸	OH
核酸内切酶 VIII	AP 位点, 胸腺嘧啶乙二醇	第 1 个磷酸二酯键 5' 和 3'到损害	磷酸	磷酸
FpG	8-氧代鸟嘌呤	第 1 个磷酸二酯键 5' 和 3'到损害	磷酸	磷酸
hOGG1	8-氧代鸟嘌呤	第 1 个磷酸二酯键 3'	磷酸	3'-磷酸- α,β -不饱和醛
[0530]		到损害		和醛
	hNeil1	氧化嘌呤	第 1 个磷酸二酯键 5' 和 3'到损害	磷酸
	ROS1	5-甲基胞嘧啶	第 1 个磷酸二酯键 5' 和 3'到损害	磷酸
	尿嘧啶 DNA 糖基化酶	尿嘧啶	N-糖苷键	AP 位点 (未断裂)
	hSMUG	尿嘧啶	N-糖苷键	AP 位点 (未断裂)
	hAAG	肌苷	N-糖苷键	AP 位点 (未断裂)

[0531] 连接多核苷酸

[0532] 在需要支架多核苷酸存在的方法和裂解后连接步骤中,连接多核苷酸的构型和结构的选择也取决于所用的具体方法。连接多核苷酸通常包括如本文所述的支持股和如本文所述的辅助股。连接多核苷酸中使用的支持股和辅助股可以与初始支架多核苷酸构建体中使用的那些相同或不同。例如,在连接多核苷酸的连接末端的支持股中对单核苷酸或双核苷酸悬垂端的需求将取决于所用的方法。通过参考本文描述的示例性方法可以容易地实现适当的结构。

[0533] 连接多核苷酸的互补连接末端通常在与悬垂端相邻的辅助股中提供非磷酸化的末端核苷酸。这防止了合成股的辅助股部分与合成股的引物股部分的连接,从而保持合成股中的单股断裂。可以使用用于防止合成股中连接的替代方法。例如,封闭部分可以与辅助股中的末端核苷酸连接。此外,如本文进一步所描述,可以例如通过变性,在下一合成循环中的裂解和掺入下一预定核苷酸之前,从支架分子去除辅助股。

[0534] 连接

[0535] 在涉及连接步骤的本发明方法中,可以使用任何合适的方法实现连接。优选地,连接步骤将通过连接酶进行。连接酶可以是对单碱基悬垂端基质具有增强的活性的经过修饰的连接酶。连接酶可以是T3 DNA连接酶或T4 DNA连接酶。连接酶可以是平末端TA连接酶

(blunt TA ligase)。例如,可从新英格兰生物实验室(NEB)获得平末端TA连接酶。这是T4 DNA连接酶、连接增强子和优化的反应缓冲液的即用型预混合物溶液,其被专门调配以改善平末端和单碱基悬垂端基质两者的连接和转化。用于连接(连结)单股和双股多核苷酸的分子、酶、化学品和方法是本领域技术人员公知的。

[0536] 固相合成

[0537] 根据本发明的合成方法产生的合成多核苷酸可优选使用固相或可逆固相技术合成。各种这样的技术在本领域中是已知的并且可以使用。在开始合成预定义序列的新双股多核苷酸之前,可以将支架多核苷酸固定到表面上,例如平面,例如玻璃、基于凝胶的材料、或微粒例如珠子或官能化量子点的表面上。包括表面的材料本身可以与基底结合。例如,支架多核苷酸可以固定在基于凝胶的材料上,例如聚丙烯酰胺,并且其中基于凝胶的材料与支持基底如玻璃结合。

[0538] 多核苷酸可以直接或间接地固定或拴系到表面。例如,它们可以通过化学键合直接附着在表面上。它们可以通过中间表面间接地拴系在表面上,例如微粒或珠子的表面,例如在SPRI中或在电润湿系统中,如下所述。然后可以启动并完成合成循环,同时固定掺入新合成的多核苷酸的支架多核苷酸。

[0539] 在此类方法中,可以在掺入预定义序列的第一核苷酸之前将双股支架多核苷酸固定到表面。因此,这种固定的双股支架多核苷酸可以充当锚,以在合成期间和之后将预定义序列的双股多核苷酸连接到表面。

[0540] 这种双股锚/支架多核苷酸的仅一条股可以在分子同一端固定在表面上。或者,双股锚/支架多核苷酸的两条股可各自在分子同一末端固定在表面上。可以提供双股锚/支架多核苷酸,其中每条股在相邻末端连接,例如通过与新合成起始位点相对的末端的发夹环,并且连接的末端可以固定在表面上(例如如图11中示意性描绘的)。

[0541] 在涉及支架多核苷酸的方法中,如本文所述,支架多核苷酸可以在以预定义序列掺入第一核苷酸之前附着于表面。因此,包括引物股部分和与其杂交的支持股部分的合成股可以分别附着于表面,如图11(a)和(c)所示。包括引物股部分和与其杂交的支持股部分的合成股可以在相邻末端连接,例如通过发夹环,例如在新合成起始位点的相对末端,并且连接末端可以系股到表面上,如图11(b)和(d)所示。包括引物股部分和与其杂交的支持股部分的一条或另一条合成股可以分别附着于表面,如图11(e)到(h)所示。优选地,包括引物股部分和与其杂交的支持股部分的合成股附着于表面。

[0542] 平表面上的固相合成

[0543] 在开始合成预定义序列的新双股多核苷酸之前,合成锚/支架多核苷酸可通过本领域已知的方法合成,包含本文所述的那些,并拴在表面上。

[0544] 可以通过常用于产生附着于平表面的核酸微阵列的方法将预形成的多核苷酸拴在表面上。例如,可以产生锚/支架多核苷酸,然后将其点样或印刷到平表面上。可以使用接触印刷技术将锚/支架多核苷酸沉积在表面上。例如,可将固体或空心尖端或针浸入包括预形成的支架多核苷酸的溶液中并与平表面接触。或者,可以将寡核苷酸吸附到微型印模上,然后通过物理接触转移到平表面。非接触印刷技术包含热印刷或压电印刷,其中包括预形成的支架多核苷酸的亚纳升尺寸微滴可以使用与喷墨和喷泡印刷中使用的方法类似的方法从印刷尖端喷出。

[0545] 单股寡核苷酸可以直接在平表面上合成,例如使用用于产生微阵列的所谓“芯片上”方法。然后,此类单股寡核苷酸可以充当附着位点以固定预先形成的锚/支架多核苷酸。

[0546] 用于产生单股寡核苷酸的芯片上技术包含光刻法,其涉及使用通过光刻掩模引导的UV光来选择性地激活受保护的核苷酸,从而允许随后掺入新的受保护的核苷酸。UV介导的去除保护基和预定核苷酸偶联的循环允许原位产生具有所需序列的寡核苷酸。作为使用光刻掩模的替代方案,可以通过使用喷墨印刷技术顺序沉积核碱基并使用偶联、氧化和去除保护基的循环来产生具有所需序列的寡核苷酸,从而在平表面上产生寡核苷酸(对于综述,见Kosuri和Church,Nature Methods,2014,11,499-507)。

[0547] 在本文所述的任何合成方法中,包含如下所述的涉及可逆固定的方法,表面可由任何合适的材料制成。通常,表面可包括硅、玻璃或聚合物材料。表面可包括凝胶表面,例如聚丙烯酰胺表面,例如约2%聚丙烯酰胺,任选地使用N-(5-溴乙酰基戊基)丙烯酰胺(BRAPA)衍生的聚丙烯酰胺表面,优选地聚丙烯酰胺表面与固体载体比如玻璃偶联。

[0548] 可逆固定

[0549] 具有预定义序列的合成多核苷酸可以根据本发明使用促进可逆固定的结合表面和结构(例如微粒和珠子)来合成。固相可逆固定(SPRI)方法或改良方法是本领域已知的并且可以使用(例如参见DeAngelis M.M.等人(1995) Solid-Phase Reversible Immobilization for the Isolation of PCR Products,Nucleic Acids Research,23(22):4742-4743)。

[0550] 表面可以以微粒的形式提供,例如顺磁珠。顺磁珠可以在磁场的影响下聚集。例如,顺磁表面可以具有化学基团,例如羧基,其在适当的附着条件下将充当核酸的结合部分,如下面更详细描述。可以在适当的洗脱条件下从这些表面洗脱核酸。微粒和珠子的表面可以提供UV敏感的聚碳酸酯。在合适的固定缓冲液存在下,核酸可以与活化表面结合。

[0551] 可使微粒和珠粒在反应溶液中自由移动,然后可逆地固定,例如通过将珠粒保持在微孔或蚀刻到表面中的凹坑中。珠子可以定位为阵列的一部分,例如通过使用附着于珠子的独特核酸“条形码”或通过使用颜色编码。

[0552] 因此,在开始合成预定义序列的新双股多核苷酸之前,可以合成根据本发明的锚/支架多核苷酸,然后可逆地固定到这样的结合表面上。通过本发明方法合成的多核苷酸可以合成,同时可逆地固定在这样的结合表面上。

[0553] 微流体技术和系统

[0554] 表面可以是电介质上电润湿系统(EWOD)的一部分。EWOD系统提供电介质涂覆的表面,其有助于以微滴形式的非常小的液体体积的微流体操纵(例如参见Chou,W-L.等人(2015)Recent Advances in Applications of Droplet Microfluidics,Micromachines,6:1249-1271.)。通过电润湿技术可以可编程地在芯片上创建、移动、分区和组合液滴体积。因此,电润湿系统提供了在合成期间和之后可逆地固定多核苷酸的替代手段。

[0555] 具有预定义序列的多核苷酸可以通过本文所述的方法在固相中合成,其中多核苷酸固定在EWOD表面上,并且通过电润湿技术促进每个循环中所需的步骤。例如,在涉及支架多核苷酸并需要掺入、裂解、连接和去除保护基步骤的方法中,每个步骤所需的试剂以及用于去除用过的和不需要的试剂的任何所需洗涤步骤,可以通过电润湿技术在电场的影响下传输的微滴的形式提供。

[0556] 可以用于本发明的合成方法中的其它微流体平台是可用的。例如,可以使用通常用于核酸操作的基于乳液的微滴技术。在这样的系统中,微滴在通过混合两种不混溶的流体(通常是水和油)产生的乳液中形成。可以在微流体网络中可编程地创建、移动、分割和组合乳液微滴。水凝胶系统也可提供。在本文所述的任何合成方法中,微滴可以在任何合适的相容系统中操作,例如上述EWOD系统和其它微流体系统,例如包括基于弹性体材料的组件的结构微流体系统。

[0557] 微滴可具有任何合适的尺寸,条件是它们与本文的合成方法相容。微滴尺寸将根据所采用的特定系统和系统的相关架构而变化。因此适当地可以调整尺寸。在本文所述的任何合成方法中,液滴直径可以在约150nm到约5mm的范围内。低于1 μ m的液滴直径可通过本领域已知的方法验证,例如通过涉及毛细管喷射方法的技术,例如Gañán-Calvo等人(《自然物理学(Nature Physics)》,2007,3,pp737-742)中所述。

[0558] 中间或最终合成产物的测序。

[0559] 合成或组装的中间产物或最终多核苷酸合成产物可以作为质量控制检查测序,以确定所要多核苷酸是否已经正确地合成或组装。可以从固相合成平台上去除所关注的一种或多种多核苷酸,并通过多种已知的商业上可获得的测序技术中的任一种进行测序,例如使用牛津纳米孔技术有限公司出售的MinION™装置进行的纳米孔测序。测序可以在固相平台本身上进行,而无需将多核苷酸转移至单独的合成装置。测序可以方便地在相同的电润湿装置上进行,例如用于合成的所使用的EWOD装置,由此合成装置包括一个或多个测量电极对。包括所关注的多核苷酸的液滴可与电极对的电极中的一者接触,液滴形成具有与电极对的第二电极接触的第二液滴的液滴界面双层,其中液滴双层界面包括两性膜中的纳米孔。可使得多核苷酸例如在酶控制下定位纳米孔,并且可在多核苷酸穿过纳米孔的通道期间在电极对之间的电位差下测量穿过纳米孔的离子电流。可以记录随时间变化的离子电流测量值,并且用于确定多核苷酸序列。在测序之前,多核苷酸可以经历一个或多个样品制备步骤以便优化其用于测序,如专利申请案第PCT/GB2015/050140号所公开。可以适当地采用的酶、两性膜和纳米孔的实例公开于专利申请案中。PCT/GB2013/052767和PCT/GB2014/052736。可以通过样品入口端口将用于制备多核苷酸,纳米孔、两亲性膜等的样品所需的试剂提供给EWOD装置。样品入口端口可以连接到试剂室。

[0560] 表面附着化学方法

[0561] 尽管寡核苷酸通常是化学连接的,但它们也可以通过间接方式例如通过亲和相互作用附着于表面。例如,寡核苷酸可以用生物素官能化并结合到用抗生物素蛋白或股霉抗生物素蛋白包被的表面上。

[0562] 为了将多核苷酸固定到表面(例如平表面)、微粒和珠子等,可以使用各种表面附着方法和化学品。表面可以被官能化或衍生化以促进附着。这种功能化是本领域中已知的。例如,表面可以用以下各者进行功能化:多组氨酸标签(六组氨酸标签、6xHis-标签、His6标签或His-tag®)、Ni-NTA、股霉亲和素、生物素、寡核苷酸、多核苷酸(如DNA、RNA、PNA、GNA、TNA或LNA)、羧基、季胺基、硫醇基、叠氮基、炔基、DIBO、脂质、FLAG-标签(FLAG八肽)、多核苷酸结合蛋白、肽、蛋白质、抗体或抗体片段。表面可以用与锚/支架多核苷酸特异性地结合分子或基团进行功能化。

[0563] 适合于将多核苷酸连接到表面的化学物质的一些实例显示在图11i和图11j中。

[0564] 在本文所述的方法中的任一种中,可以通过一个或多个共价键将包括合成股的支架多核苷酸栓到共同表面,所述合成股包括引物股部分和与其杂交的支持股的部分。一个或多个共价键可以在共同表面上的官能团和支架分子上的官能团之间形成。支架分子上的官能团可以是例如胺基、硫醇基、硫代磷酸酯基或硫代酰胺基。共同表面上的官能团可以是溴乙酰基,任选地其中溴乙酰基在使用N-(5-溴乙酰基戊基)丙烯酰胺 (BRAPA) 衍生的聚丙烯酰胺表面上提供。

[0565] 在本发明的任何方法中,支架多核苷酸可以通过接头直接或间接附着于表面。可以使用任何合适的属性是生物相容且亲水的接头。

[0566] 接头可以是直股接头或支股接头。

[0567] 接头可包括烃股。烃股可包括2至约2000或更多个碳原子。烃股可包括亚烷基,例如C2至约2000或更多个亚烷基。烃股可具有通式 $-(CH_2)_n-$,其中n为2至约2000或更高。烃股可任选地被一个或多个酯基(即 $-C(O)-O-$)或一个或多个酰胺基团(即 $-C(O)-N(H)-$)中断。

[0568] 可以使用选自包括以下的组的任何接头:PEG、聚丙烯酰胺、聚(甲基丙烯酸2-羟乙酯)、聚-2-甲基-2-噁唑啉(PMOXA)、两性离子聚合物,例如聚(羧基甜菜碱甲基丙烯酸酯)(PCBMA)、聚[N-(3-磺丙基)-N-甲基丙烯酰氧基乙基-N,N二甲基铵甜菜碱](PSBMA)、糖聚合物和多肽。

[0569] 接头可包括具有以下通式的聚乙二醇(PEG):

[0570] $-(CH_2-CH_2-O)_n-$,其中n为1到约600或更大。

[0571] 接头可包括具有通式为 $-(CH_2-CH_2-O)_n-PO_2^--O]_m-$ 的低聚乙二醇磷酸酯单元,其中n是1到约600或更大,并且m可以是1-200或更大。

[0572] 任何上述接头可以在接头的一端连接至如本文所述的支架分子,并且在接头的另一端连接至第一官能团,其中第一官能团可以提供与表面的共价连接。第一官能团可以是例如胺基、硫醇基、硫代磷酸酯基或硫代酰胺基,如本文进一步描述的。表面可以用另外的官能团官能化以提供与第一官能团的共价键。另外的官能团可以是例如本文进一步描述的2-溴乙酰氨基。任选地,在使用N-(5-溴乙酰基戊基)丙烯酰胺 (BRAPA) 衍生的聚丙烯酰胺表面上提供溴乙酰基。表面上的进一步官能团可以是溴乙酰基,任选地其中溴乙酰基在使用N-(5-溴乙酰基戊基)丙烯酰胺 (BRAPA) 衍生的聚丙烯酰胺表面上提供,并且适当时第一官能团可以是例如胺基、巯基、硫代磷酸酯基或硫代酰胺基。多核苷酸附着的表面可包括凝胶。所述表面包括聚丙烯酰胺表面,例如约2%的聚丙烯酰胺,优选聚丙烯酰胺表面与固体载体如玻璃偶联。

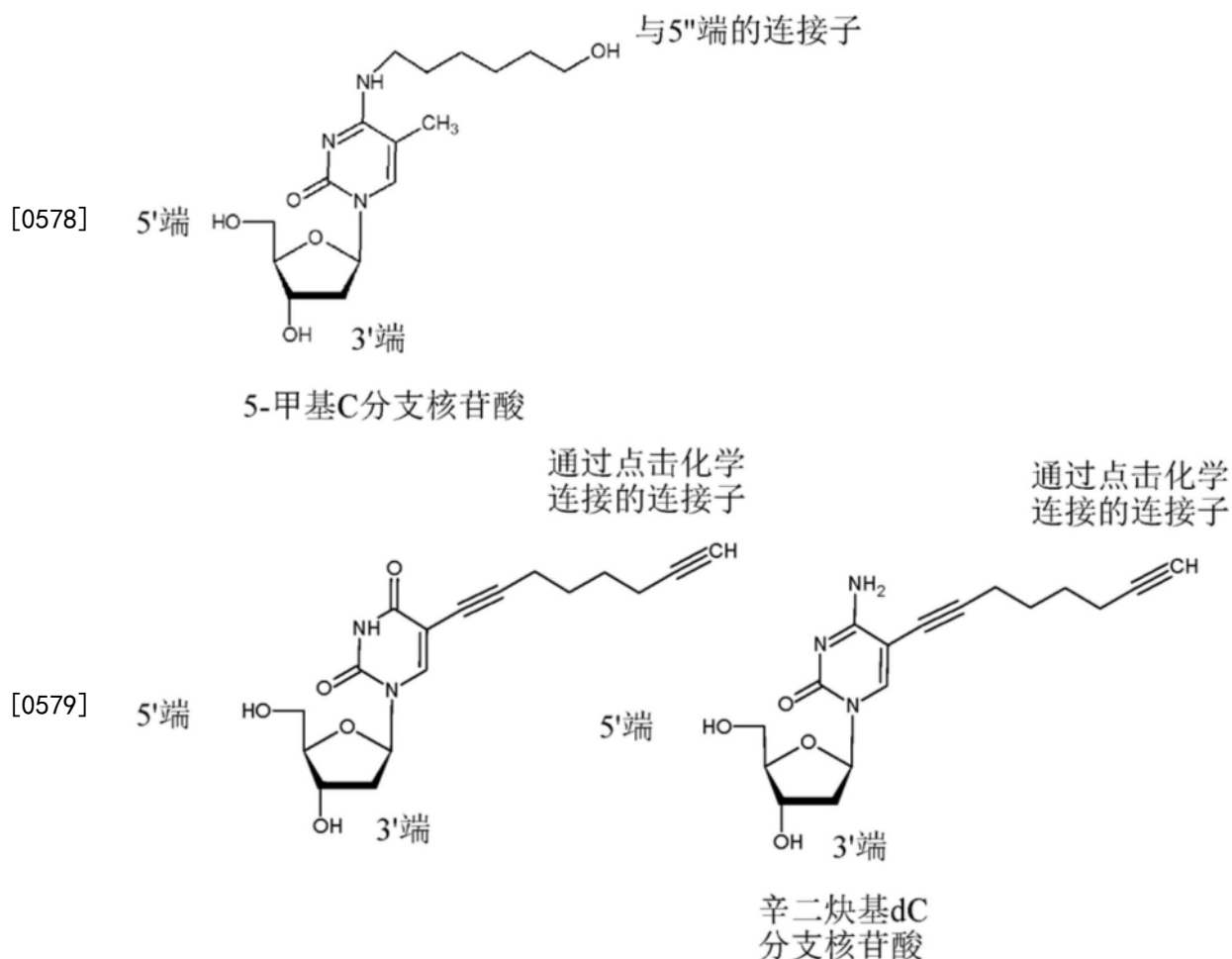
[0573] 在本发明的任何方法中,支架多核苷酸可任选地通过掺入支架多核苷酸中的支化核苷酸连接至接头。任何合适的支化核苷酸可以与任何合适的相容性接头一起使用。

[0574] 在开始本发明的合成循环之前,可以合成支架多核苷酸,其中一个或多个支化核苷酸被掺入支架多核苷酸中。将一个或多个支化核苷酸掺入支架多核苷酸中并因此可以连接接头的确切位置可以变化,并且可以根据需要选择。所述位置可以例如在支持股和/或合成股的末端或例如在包括发夹环的实施例中将支持股连接至合成股的环区域中。

[0575] 在支架多核苷酸的合成期间,可以将一个或多个支化核苷酸掺入支架多核苷酸中,其中封闭基团阻断支化部分的反应基团。然后可以在偶联至接头的分支部分之前去除(解封闭)封闭基团,或者如果接头包括多个单元,则将接头的第一单元(分子)去除。

[0576] 在支架多核苷酸的合成期间,可以将一个或多个支化核苷酸掺入支架多核苷酸中,所述支架多核苷酸具有适合用于随后的“点击化学”反应的基团,以与连接体的分支部分偶联,或者如果接头包括多个单元,与第一个单元偶联。这种基团的一个实例是乙炔基。

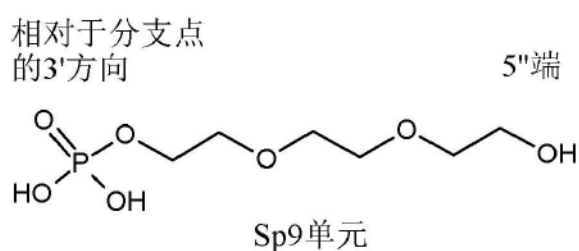
[0577] 一些非限制性示例性支化核苷酸如下所示。



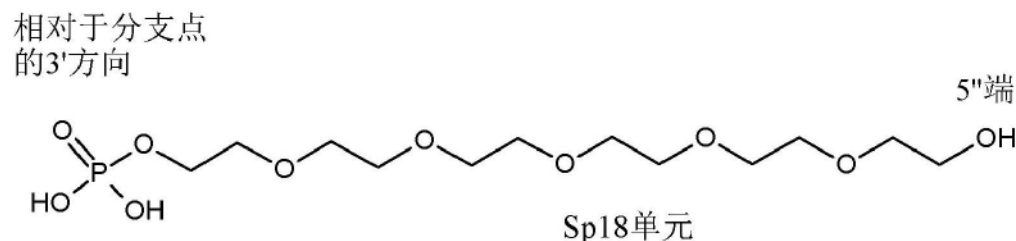
[0580] 接头可任选地包括一个或多个间隔分子(单元),例如SP9间隔基,其中第一间隔基单元被附接到分支核苷酸。

[0581] 接头可包括连接到第一间隔基团的一个或多个其它间隔基团。例如,接头可包括多个例如Sp9间隔基团。将第一间隔基团连接到支化部分,然后依次加入一个或多个另外的间隔基团以延伸包括多个间隔单元的间隔基股,所述间隔单元与其间的磷酸酯基团连接。

[0582] 下面显示的是间隔基单元(Sp3、Sp9和Sp13)的一些非限制性实例,其可以包括与分支核苷酸连接的第一间隔基单元,或者与已经与分支核苷酸连接的现有间隔基单元连接的另外的间隔基单元。



[0583]



[0584] 接头可包括一个或多个乙二醇单元。

[0585] 接头可包括寡核苷酸,其中多个单元是核苷酸。

[0586] 在上文描述的结构中,术语5"用于区分与支化部分连接的核苷酸的5'末端,其中5'具有本领域的普通含义。5"意指核苷酸上可以延伸接头的位置。5"的位置可能会有所不同。5"位置通常是核苷酸的核碱基中的位置。核碱基中的5"位置可以根据所需支化部分的性质而变化,如上述结构所示。

[0587] 微阵列

[0588] 本文描述的任何多核苷酸合成方法可用于制造多核苷酸微阵列(Trevino,V.等人,Mol.Med.2007 13,pp527-541)。因此,锚或支架多核苷酸可以连接到表面上的多个可单独寻址的反应位点,并且具有预定义序列的多核苷酸可以在微阵列上原位合成。

[0589] 合成后,在每个反应区域,可以为预定义序列的多核苷酸提供独特的序列。可以向锚或支架多核苷酸提供条形码序列以便于鉴定。

[0590] 除了合成预定义序列的多核苷酸的方法之外,可以使用本技术领域常用的技术,包含本文所述的技术,进行微阵列制造。例如,可以使用已知的表面附着方法和化学方法将锚或支架多核苷酸拴在表面上,包含本文所述的那些。

[0591] 在合成预定义序列的多核苷酸后,可以提供最终裂解步骤以从无栓系末端去除任何不需要的多核苷酸序列。

[0592] 可以双股形式在反应位点提供预定义序列的多核苷酸。或者,在合成之后,可以分离双股多核苷酸并去除一条股,在反应位点留下单股多核苷酸。可以提供股的选择性栓系以促进所述过程。例如,在涉及支架多核苷酸的方法中,合成股可以栓系在表面上,支持股可以不被栓系,反之亦然。合成股可以具有不可裂解的接头,并且支持股可以具有可裂解的接头,反之亦然。股的分离可以通过常规方法进行,例如热处理。

[0593] 合成多核苷酸的组装

[0594] 具有通过本文所述方法合成的预定义序列并且任选地通过本文所述方法扩增的多核苷酸可以与一种或多种其它此类多核苷酸连接以产生更大的合成多核苷酸。

[0595] 可以通过本领域公知的技术实现多个多核苷酸的连接。可以裂解通过本文所描述的方法合成的第一多核苷酸和一种或多种另外的多核苷酸以产生相容的末端,并且然后通过连接将多核苷酸连接在一起。可以通过任何合适的方法实现裂解。通常,可以在多核苷酸中产生限制性酶裂解位点,并且然后使用限制性酶执行裂解步骤,从而从任何锚/支架多核苷酸释放合成的多核苷酸。裂解位点可以被设计为锚/支架多核苷酸的一部分。或者,可以在新合成的多核苷酸内产生裂解位点,作为预定的核苷酸序列的一部分。

[0596] 多核苷酸的组装优选地使用固相方法进行。例如,在合成后,第一多核苷酸可以在远离表面固定位点的合适位置进行单一裂解。因此,第一多核苷酸将保持固定在表面上,并且单个裂解将产生与另一个多核苷酸连接相容的末端。另外的多核苷酸可以在两个合适的位置进行裂解,以在每个末端产生用于连接其它多核苷酸的相容末端,同时从表面固定中释放另外的多核苷酸。另外的多核苷酸可以与第一多核苷酸相容地连接,从而产生更大的固定化多核苷酸,其具有预定义序列并且具有与另一个额外多核苷酸连接相容的末端。因此,预选的裂解的合成多核苷酸的连接的迭代循环可以产生更长的合成多核苷酸分子。另外的多核苷酸的连接顺序将由所需的预定义序列测定。

[0597] 因此,本发明的组装方法可以允许产生长度为一个或多个Mb左右的合成多核苷酸分子。

[0598] 可以使用本领域已知的装置进行本发明的组装和/或合成方法。可获得的技术和装置允许非常小体积的试剂被选择性地移动、分配并与阵列的不同位置中的其它体积组合,通常以液滴的形式,可以使用电润湿技术,例如电介质上电润湿(EWOD),如上所述。例如在US8653832、US8828336、US20140197028和US20140202863中公开了可以在本发明中使用的能够操纵液滴的合适的电润湿技术和系统。

[0599] 可以通过在引物股部分和与其杂交的支持股部分中的一个或两个中提供可裂解接头来实现从固相裂解。可裂解接头可以是例如UV可裂解接头。

[0600] 涉及酶促裂解的裂解方法的实例显示在图29中。所述示意图显示了附着于表面(通过黑色金刚石结构显示)并且包括预定义序列的多核苷酸的支架多核苷酸。支架多核苷酸包括顶部和底部发夹。在每种情况下,可以使用通用核苷酸的裂解步骤裂解顶部发夹,以限定裂解位点。底部发夹可以通过限制性内切核酸酶经由设计到支架多核苷酸中的位点去除或者工程化到新合成的预定义序列的多核苷酸中。

[0601] 因此,如上所述,可以合成具有预定义序列的多核苷酸,同时固定在电润湿表面上。合成的多核苷酸可以从电润湿表面裂解下来并以液滴形式在电场的影响下移动。液滴可以在表面上的特定反应位点处组合,在所述特定反应位点其可以递送裂解的合成多核苷酸用于与其它裂解的合成多核苷酸连接。然后可以(例如通过连接)连接多核苷酸。使用这些技术,可以根据所期望的预定义序列合成并且依次连接不同多核苷酸的群体。使用这种系统,可以设计完全自动化的多核苷酸合成和组装系统。系统可以被编程为接收期望的序列、供应试剂、执行合成循环并随后根据期望的预定义序列组装期望的多核苷酸。

[0602] 系统和试剂盒

[0603] 本发明还提供了用于实施本文描述和限定的任何合成方法以及本文描述和限定的任何后续扩增和组装步骤的多核苷酸合成系统。

[0604] 通常,合成循环反应将通过将预定义序列的核苷酸掺入支架多核苷酸分子来进

行,所述支架多核苷酸分子通过本文描述和限定的方式与表面栓系。表面可以是如本文所述和限定的任何合适的表面。

[0605] 在一个实施方案中,将预定义序列的核苷酸掺入支架多核苷酸分子的反应涉及在反应区域内在支架多核苷酸上进行任何合成方法。

[0606] 反应区域是支架多核苷酸分子附着的合适基底的任何区域,并且其中可以递送用于进行合成方法的试剂。

[0607] 在一个实施方案中,反应区域可以是包括单个支架多核苷酸分子的表面的单个区域,其中单个支架多核苷酸分子可以用试剂寻址。

[0608] 在另一个实施例中,反应区域可以是包括多个支架多核苷酸分子的表面的单个区域,其中支架多核苷酸分子不能用彼此隔离的试剂单独寻址。因此,在这样的实施例中,反应区域中的多个支架多核苷酸分子暴露于相同的试剂和条件,因此可以产生具有相同或基本相同的核苷酸序列的合成多核苷酸分子。

[0609] 在一个实施例中,用于实施本文所述和限定的任何合成方法的合成系统可以包括多个反应区域,其中每个反应区域包括一个或多个附着的支架多核苷酸分子,并且其中每个反应区域可以与每个其它反应区域隔离地用试剂单独寻址。这种系统可以例如以阵列的形式配置,例如其中反应区域形成在基底上,通常是平面基底。

[0610] 具有包括单个反应区域或包括多个反应区域的基底的系统可包括在例如EWOD系统或微流体系统内,并且系统配置成将试剂递送至反应位点。本文更详细地描述了EWOD和微流体系统。例如,EWOD系统可以配置成在电控制下将试剂递送到反应位点。微流体系统,例如包括微制造结构,例如由弹性体或类似材料形成的微流体系统,可以配置成在流体压力和/或抽吸控制下或通过机械手段将试剂输送到反应位点。试剂可以通过任何合适的方式递送,例如通过用作试剂递送导管的碳纳米管。可以设想任何合适的系统。

[0611] EWOD、微流体和其它系统可以配置成将任何其它所需的试剂递送至反应位点,例如用于在合成后从支架多核苷酸裂解合成的双股多核苷酸的酶,和/或用于裂解接头以从基底释放整个支架多核苷酸的试剂和/或用于在合成后扩增多核苷酸分子的试剂或其任何区域或部分,和/或用于从较小多核苷酸分子组装较大多核苷酸分子的试剂,所述较小多核苷酸分子是根据本发明的合成方法合成的。

[0612] 本发明还提供了用于实施本文所述和限定的任何合成方法的试剂盒。试剂盒可含有任何所需的试剂组合,其用于进行本文所述和限定的本发明的任何合成和/或组装方法。例如,试剂盒可包括任何一个或多个体积的反应试剂,所述反应试剂包括支架多核苷酸、对应于本文所述和限定的合成循环的任何一个或多个步骤的反应试剂的体积、包括含有可逆封闭基团或可逆终止子基团的核苷酸的反应试剂的体积、用于在合成之后扩增一种或多种多核苷酸分子或其任何区域或部分的反应试剂的体积、用于从根据本发明的合成方法合成的较小多核苷酸分子组装较大多核苷酸分子的反应试剂的体积、用于在合成后从支架多核苷酸裂解合成的双股多核苷酸的反应试剂的体积、以及用于裂解一个或多个接头从基底释放完整的支架多核苷酸的反应试剂的体积。

[0613] 合成股

[0614] 在合成包含但不限于如在图1到5中并且进一步在本文中所描述的本发明的合成方法版本1到5的本文所述的多核苷酸或寡核苷酸的方法中,支架多核苷酸具备合成股。在

合成循环期间,将预定义序列的每个新核苷酸掺入合成股中。酶,例如聚合酶或具有末端转移酶活性的酶可以用于催化每个新核苷酸、核苷酸类似物/衍生物或非核苷酸的掺入/添加。合成股包括引物股部分,并且优选包括辅助股部分。

[0615] 辅助股

[0616] 可在支架多核苷酸中提供辅助股以促进裂解步骤中裂解酶的结合。可以在连接多核苷酸中提供辅助股以在连接步骤中促进连接多核苷酸与裂解的支架多核苷酸的连接。可以省略辅助股,条件是提供替代手段以确保在裂解步骤中裂解酶的结合并且如果需要的话确保在连接步骤中的连接。在本发明的优选方法中,合成股具有辅助股。优选地,连接多核苷酸具有辅助股,并且在裂解步骤中将辅助股保留在支架多核苷酸中,如图1到5所示。

[0617] 对辅助股的长度、序列和结构的参数没有特殊要求,条件是辅助股适合于促进裂解步骤中裂解酶的结合。

[0618] 辅助股可包括核苷酸、核苷酸类似物/衍生物和/或非核苷酸。

[0619] 优选地,应所述避免辅助股的序列区域内与支持股的错配,应避免富含GC和AT的区域,此外应避免二级结构的区域,例如发夹或凸起。

[0620] 辅助股的长度可以是10个碱基或更多。任选地,辅助股的长度可以是15个碱基或更多,优选30个碱基或更多。然而,辅助股的长度可以变化,条件是辅助股能够促进裂解和/或连接。

[0621] 辅助股必须与支持股的相应区域杂交。如果辅助股可以促进裂解步骤中裂解酶的结合和/或连接步骤中连接酶的结合,则整个辅助股与支持股的相应区域杂交不是必需的。因此,可以容忍辅助股和支持股的相应区域之间的错配。辅助股可以比支持股的相应区域长。支持股可以在远离引物股的方向上延伸超出与辅助股相对应的区域。辅助股可以例如通过发夹连接到支持股的相应区域。

[0622] 辅助股优选与支持股杂交,使得切口位点处的辅助股的末端核苷酸占据相对于切口位点处的引物股的末端核苷酸的在合成股中的下一连续核苷酸位置。因此,在所述构型中,辅助股和引物股之间没有核苷酸位置切口。然而,由于存在单股断裂或切口,辅助股和引物股将是物理分离的。优选地,切口位点处的辅助股的末端核碱基与支持股中的其配偶体核苷酸杂交。

[0623] 与通用核苷酸配对的辅助股中的核苷酸可以是任何合适的核苷酸。优选地,应所述避免可能扭曲分子螺旋结构的配对。优选地,胞嘧啶充当通用核苷酸的配偶体。在特别优选的实施例中,通用核苷酸是肌苷或其类似物、变体或衍生物,并且辅助股中通用核苷酸的配偶体核苷酸是胞嘧啶。

[0624] 去除辅助股

[0625] 尽管优选的是辅助股在合成步骤期间保留,但在本文所描述的本发明的任何合成方法(包含示例性方法版本1到5),在步骤(1)(即,在第一循环中)提供支架多核苷酸,所述支架多核苷酸包括合成股和与其杂交的支持股(101、201、301、401、501),可在无辅助股的情况下提供合成股。

[0626] 此外,在合成的任何一个或多个循环中,或在合成的所有循环中,在将双股连接多核苷酸连接到裂解的支架多核苷酸的步骤之后并且在支架多核苷酸(106、206、306、406、506)的裂解步骤之前,可以从支架多核苷酸去除合成股的辅助股部分。

[0627] 合成股的辅助股部分可以通过任何合适的方法从支架多核苷酸中去除,包括但不限于:(i)将支架多核苷酸加热至约80°C至约95°C的温度,并且将辅助股部分与支架多核苷酸分离,(ii)用尿素溶液(例如8M尿素)处理支架多核苷酸,并且将辅助股部分与支架多核苷酸分离,(iii)用甲酰胺或甲酰胺溶液(例如100%甲酰胺)处理支架多核苷酸,并且将辅助股部分与支架多核苷酸分离,或(iv)使支架多核苷酸与单股多核苷酸分子接触,所述单股多核苷酸分子包括与辅助股部分的序列互补的核苷酸序列区域,从而竞争性地抑制辅助股部分与支架多核苷酸的杂交。

[0628] 在将双股连接多核苷酸连接到裂解的支架多核苷酸的步骤之后和在支架多核苷酸的裂解的步骤之前,在其中将辅助股部分从支架多核苷酸去除的方法中,裂解步骤将包括在不存在由辅助股提供的双股区域的情况下裂解支持股。可以选择任何合适的酶来进行这样的裂解步骤,例如选自本文公开的任何合适的酶。

[0629] 引物股

[0630] 引物股部分应适合于允许酶,如具有末端转移酶活性的聚合酶或酶引发合成,即催化在切口位点处添加引物股末端处的新核苷酸。

[0631] 引物股可以包括可以用于引发新的多核苷酸合成的序列区域(例如如图1到5中的每一个中描绘的结构中的虚线所示)。引物股可由可作用于引发新多核苷酸合成的序列区域组成,因此引物股的全部可为可作用于引发如本文所述的新多核苷酸合成的序列。

[0632] 对引物股的长度、序列和结构的参数没有特殊要求,条件是引物股适合引发新的多核苷酸合成。

[0633] 引物股可包括核苷酸、核苷酸类似物/衍生物和/或非核苷酸。

[0634] 技术人员能够容易地构建能够引发新的多核苷酸合成的引物股。因此,在可以起到引发新的多核苷酸的作用的引物股的序列区域内,应所述避免与支持股的错配,应避免富含GC和AT的区域,以及此外应避免二级结构的区域,如发夹或凸起。

[0635] 本领域技术人员可根据需要和所用的聚合酶选择可用于引发新的多核苷酸合成的引导股的序列区域的长度。所述区域的长度可以是7个碱基或更多、8个碱基或更多、9个碱基或更多或10个碱基或更多。任选地,所述区域的长度为15个碱基或更多,优选30个碱基或更多。

[0636] 引物股必须与支持股的相应区域杂交。如果引物股能够引发新的多核苷酸合成,则整个引物股与支持股的相应区域杂交不是必需的。因此,引物股和支持股的相应区域之间的错配可以在一定程度上被容忍。优选地,可用于引发新多核苷酸合成的引物股序列区域应包括与支持股中相应核碱基互补的核碱基。

[0637] 引物股可以比支持股的相应区域长。支持股可以在远离辅助股的方向上延伸超出与引物股对应的区域。引物股可以例如通过发夹连接到支持股的相应区域。

[0638] 支持股

[0639] 在包含但不限于如上文所描述的本发明的合成方法版本1到5的本发明的方法中,支架多核苷酸具备支持股。支持股与合成股杂交。对支持股的长度、序列和结构的参数没有特殊要求,条件是支持股与引物股部分相容,并且如果包含的话,如上所述,与合成股的辅助股部分相容。

[0640] RNA合成

[0641] 描述用于DNA合成的方法可以适用于RNA的合成。在一种修改中,可修改针对本发明的合成方法版本1到5描述的合成步骤。因此,在合成方法1到5的每一种中,支架多核苷酸的支持股为DNA股,如上文所描述。支架多核苷酸的合成股的引物股部分是RNA股。如果存在,辅助股优选是RNA股。如果存在,辅助股可以是DNA股。

[0642] 核苷酸可以从核糖核苷-5'-0-三磷酸(NTP)掺入,其可以被修饰以包括可逆终止子基团,如上所述。优选使用3'-0-修饰的核糖核苷-5'-0-三磷酸。通过RNA聚合酶的作用掺入修饰的核苷酸。

[0643] 因此,关于本发明的合成方法版本1到5的描述可以针对RNA合成可以在必要的修正后应用,但如所述进行修改。

[0644] 图31和图32描述RNA合成的反应流程,其为分别如图6和图7中所描绘的实例的DNA合成方法1、2的修改。如分别在图1到5中所描绘,本发明的方法版本1到5可以相同方式修改。

[0645] 在任何适用于RNA合成的方法中,支持股、引物股、辅助股、连接多核苷酸和通用核苷酸的上述描述可以在必要的修正后应用,但如所述进行修改。如先前所描述的裂解步骤和裂解位置可以在必要的修正后应用,因为包括通用核苷酸的支持股是DNA股。在优选的实施例中,将SplintR DNA连接酶用于连接步骤。

[0646] 示例性方法

[0647] 本文描述了合成根据本发明的多核苷酸或寡核苷酸分子的示例性方法,其包含在所附权利要求中。

[0648] 在以下五个合成根据本发明的多核苷酸或寡核苷酸分子的示例性方法中,参考合成方法版本1、2、3、4和5将根据分别在图1、2、3、4和5中阐述的反应示意图而非根据在图6到10中的任一者中阐述的反应示意图或在实例部分中相同的描述来解释。图6到10中任一者中陈述的反应示意图和其在以下实例部分中的描述提供基于与本发明的方法相比经修改的反应方案对本发明的方法的说明性支持。因此,下文的文本中的附图标记与图1到5中的附图标记对应。

[0649] 在下文所描述的每一示例性方法中,在每一步骤中所描述的结构可在适当时借助于附图标记来参考特定图。然而,此类参考并不希望限于图式中展示的结构,并且相关结构的描述对应于如本文中所提供的全部描述,包含但不限于特定说明的那些。

[0650] 下文描述五个非限制性示例性方法,方法版本1到5(分别参见例如图1到5)。在这些示例性方法中的每一个的步骤(1)中,提供支架多核苷酸(参见图1到5中的每一个的步骤1中所描绘的结构)(101、201、301、401、501),其包括与互补支持股(参见图1到5中的每一个的步骤1中所描绘的结构中标记为“a”的股)杂交的合成股(参见图1到5中的每一个的步骤1中所描绘的结构中标记为“b”的股)。

[0651] 支架多核苷酸是双股的并且提供支持结构以适应合成多核苷酸的区域,因为它是从头合成的。支架多核苷酸包括合成股,所述合成股包括通过单股断口或“切口”分离的引物股部分(参见图1到5中的每一个的步骤1中所描绘的结构中标记为“b”的股的点线部分)和辅助股部分(参见图1到5中的每一个的步骤1中所描绘的结构中标记为“b”的股的虚线部分)。如本文中更详细描述,在本文中所描述的例示性方法版本1到5和其变体中的某些中,可以在裂解步骤(2)之前,例如通过变性去除辅助股。

[0652] 合成股的引物股部分和辅助股部分都与互补支持股杂交提供。

[0653] 在五个方法中的每一种中,在促进支架多核苷酸(102、202、302、402、502)裂解的支持股中提供通用核苷酸(在图1到5中描绘的结构中标记为“Un”)。通用核苷酸的作用将从以下每种方法的详细描述中显而易见。

[0654] 支架多核苷酸的裂解(步骤2)引起辅助股(如果在裂解之前立即存在)的损失,和包括通用核苷酸的支持股的损失。裂解将裂解的双股支架多核苷酸留在原位,所述双股支架多核苷酸在裂解位点包括支持股的裂解末端和包括裂解前切口位点的合成股的引物股部分的末端。

[0655] 合成股的引物股部分的末端提供引物位点以用于通过具有转移酶活性的酶引发合成。因此,酶将作用于延伸引物股部分的末端核苷酸。因此,这一末端核苷酸将通常定义引物股部分的3'端,例如允许通过聚合酶或转移酶延伸,所述聚合酶或转移酶在5'到3'方向上催化延伸。包括引物股部分的合成股的相对末端将因此通常定义合成股的5'端,并且与合成股的5'端相邻的支持股的末端核苷酸将因此通常定义支持股的3'端。

[0656] 位于单股断裂的位点处的合成股的辅助股部分的末端核苷酸通常将限定辅助股部分的5'末端,并且因此合成股的辅助股部分的相对末端通常将限定合成股的3'末端。

[0657] 合成股的辅助股部分与引物股部分之间的单股断裂或“切口”通常通过提供辅助股的(5')末端核苷酸以将在连接步骤中阻止其连接到引物股的形式实现。这通常可以通过在无磷酸酯基的情况下提供辅助股的(5')末端核苷酸来实现。断裂通常通过将支架多核苷酸与包括以下的单独组分组装来实现:(i)支持股;(ii)合成股的辅助股部分,其通常具有非磷酸化(5')末端核苷酸;以及(iii)包括引物股部分的合成股部分。在合适条件下混合组分后,支架多核苷酸在单独组分杂交时形成。

[0658] 在本文所述的某些方法中,辅助股可任选地在裂解步骤之前从支架多核苷酸去除,例如通过变性和从其先前杂交的支持股释放。

[0659] 裂解引起去除包括通用核苷酸的支持股和与支持股杂交的辅助股(如果在裂解之前立即存在)。

[0660] 在所述方法的步骤(3)中,通过具有转移酶活性的酶,如聚合酶或末端核苷酸基转移酶(102、202、302、402、502)的作用将预定核苷酸序列中的第一核苷酸掺入合成股中。第一核苷酸具备可逆终止子基团(描绘为图1到5中的每一个的步骤3中掺入的核苷酸的小三角形),其阻止酶进一步延伸。因此,在步骤(3)中仅掺入单个核苷酸。

[0661] 可以使用包括任何适合的可逆终止子基团的核苷酸。具有可逆终止子基团的优选核苷酸是如本文所述的3'-O-烯丙基-dNTP和/或3'-O-叠氮基甲基-dNTP。

[0662] 在所述方法的步骤(4)中,进行去除保护基步骤以从预定核苷酸序列(104、204、304、404、504)的掺入的第一核苷酸去除可逆终止子基团。或者,可在下文所描述的连接步骤(5)之后执行去除保护基步骤。

[0663] 在所述方法的步骤(5)中,进行连接步骤(105、205、305、405、505),其中将连接多核苷酸连接到包括预定核苷酸序列的第一核苷酸的裂解双股支架多核苷酸。连接多核苷酸包括支持股和与支持股杂交的辅助股。连接多核苷酸包括与包含第一核苷酸的裂解的双股支架多核苷酸的裂解的末端互补的互补连接末端。连接多核苷酸的支持股包括在互补连接末端处的预定核苷酸序列的第一核苷酸的配偶体核苷酸,其中在连接后,配偶体核苷酸与

预定核苷酸序列的第一核苷酸相对安置以形成核苷酸对。连接多核苷酸的支持股还在互补连接端处包括通用核苷酸,其将促进合成的下一循环中的裂解。提供在互补连接末端处的连接多核苷酸的辅助股的末端核苷酸,使得辅助股无法连接到引物股。这通常通过提供在无磷酸酯基的情况下提供辅助股的末端核苷酸来实现。因此,在连接连接多核苷酸的支持股与裂解的双股支架多核苷酸的支持股之后,在引物股部分与辅助股之间的合成股中提供单股断裂或“切口”。

[0664] 在将连接多核苷酸连接到裂解的双股支架多核苷酸后,完整双股支架多核苷酸重新形成,其包括新掺入的核苷酸对和用于促进下一合成循环中的裂解的通用核苷酸。

[0665] 进行包括与上文所述相同的步骤的合成的反复循环以便产生合成多核苷酸。

[0666] 具体方法在下文更详细地描述。

[0667] 合成方法版本1

[0668] 在本发明的合成方法的第一示例性版本中,提供双股支架多核苷酸,其包括安置于支持股中的通用核苷酸(图1的步骤1;101)。在合成的每一循环中,支架多核苷酸在由包括通用核苷酸的序列定义的裂解位点处裂解(图1的步骤2;102、107)。

[0669] 支架多核苷酸的裂解(步骤2)引起辅助股(如果在裂解之前立即存在)的损失,和包括通用核苷酸的支持股的损失。裂解将裂解的双股支架多核苷酸留在原位,所述双股支架多核苷酸在裂解位点包括支持股的裂解末端和包括裂解前切口位点的合成股的引物股部分的末端。裂解在裂解位点产生平末端裂解的双股支架多核苷酸,无悬垂端。

[0670] 在所述方法的步骤(3)中,通过具有转移酶活性的酶,如聚合酶或末端核苷酸基转移酶(103)的作用将预定核苷酸序列中的第一核苷酸添加到合成股的引物股部分的末端中。第一核苷酸具备可逆终止子基团,所述可逆终止子基团阻止酶进一步延伸。因此,在步骤(3)中仅掺入单个核苷酸。

[0671] 在所述方法的步骤(4)中,进行去除保护基步骤以从新掺入的核苷酸去除终止子基团。原则上,去除保护基步骤可在连接步骤(5)之后进行。优选进行作为步骤(4)的去除保护基步骤。

[0672] 在所述方法的步骤(5)中,将连接多核苷酸(参见在图1的上部部分的左上方所描绘的结构)连接到裂解的支架多核苷酸。连接将配偶体核苷酸掺入支架多核苷酸中并且允许新掺入的核苷酸与配偶体核苷酸配对(图1的步骤5;105),因此完成合成循环。

[0673] 在本发明的合成方法的第一示例性版本中,支架多核苷酸提供于如上文所描述的步骤(1)(101)中。在所述方法中,支架多核苷酸的支持股中的通用核苷酸安置于单股断裂位点(在图1的结构中标记为“X”)的辅助股的末端核苷酸的对面,并与其配对(参见图1的步骤1中描绘的结构)。

[0674] 在所述方法的步骤(2)中,支架多核苷酸在裂解位点被裂解(102)。裂解位点由包括支持股中的通用核苷酸的序列限定。裂解使得支架多核苷酸中的双股断裂。支架多核苷酸的裂解(步骤2)引起辅助股(如果在裂解之前立即存在)的损失,和包括通用核苷酸的支持股的损失。裂解将支架多核苷酸留在原位,所述裂解的双股支架多核苷酸在裂解位点包括支持股的裂解末端和包括裂解前切口位点的合成股的引物股部分的末端。

[0675] 在此示例性方法中,合成股已经具有单股断裂或“切口”,因此仅需要裂解支持股以在支架多核苷酸中提供双股断裂。

[0676] 在此示例性方法版本中,裂解产生了平末端裂解的双股支架多核苷酸,在合成股或支持股中均未悬垂。

[0677] 在所述方法中,通用核苷酸在裂解步骤之前占据支持股中的位置“n”。为了在通用核苷酸占据支持股中的位置n时获得此类平末端裂解的双股支架多核苷酸,支持股在相对于通用核苷酸的特定位置处裂解。支架多核苷酸的支持股在核苷酸位置n和n-1之间被裂解。

[0678] “n”意指与合成股中的位置相对的支持股中的核苷酸位置,所述合成股中的位置将在将其添加到所述合成循环中裂解的合成股的末端之后由预定义序列的核苷酸占据。“n”也意指在所述合成循环中合成股中核苷酸的位置在其被添加到合成股的引物股部分的末端时将被预定义序列的核苷酸占据。因此,在裂解步骤中,支持股中的位置n处的通用核苷酸与将由掺入合成的循环中的预定义序列的核苷酸占据的位置相反。在步骤(1)和(2)中,将由掺入在合成循环中的预定义序列的核苷酸占据的位置对应于合成股的辅助股部分的末端核苷酸(在图1中示出为“X”)。

[0679] “n-1”是指在辅助股的远侧/引物股的近侧方向(在位置n-1处标记为“H”的核苷酸,如图1的步骤(1)和(2)中示意性地示出)相对于被通用核苷酸占据或已被通用核苷酸占据的位置的下一核苷酸位置。n-1也可以指合成股中相应的位置。因此,在裂解步骤中,支持股中的位置n-1与合成股的引物股部分的末端核苷酸(即,在位置n-1处标记为“I”的核苷酸,如在图1的步骤(2)中示意性地展示)占据的位置相反。在根据版本1的方法中,占据位置H和I的核苷酸对可以是任何核苷酸对。

[0680] 在当核苷酸位置n和n-1之间的支持股被裂解后,通用核苷酸、辅助股(如果在裂解前存在)和与辅助股杂交的支持股部分从剩余的裂解支架多核苷酸中去除(参见图1的上部的右上角所示的结构)。

[0681] 磷酸基应该在裂解位点处继续连接到裂解的支架多核苷酸的支持股的末端核苷酸(如在图1的下部部分的中间所示的结构中所描绘)。这确保了连接多核苷酸的支持股可以在连接步骤中连接到裂解的支架多核苷酸的支持股上。

[0682] 因此,在方法版本1中,通用核苷酸在步骤(1)和(2)处占据支持股中的位置n,并且支持股在核苷酸位置n与n-1之间裂解。

[0683] 优选地,通过裂解核苷酸位置n和n-1之间的磷酸二酯键(在向辅助股的远侧/引物股的近侧的方向上相对于通用核苷酸的位置的支持股的第一磷酸二酯键)裂解支持股。

[0684] 可以通过裂解核苷酸位置n和n-1之间的磷酸二酯键的一个酯键来裂解支持股。

[0685] 优选地,通过相对于核苷酸位置n裂解第一酯键来裂解支持股。这将具有在裂解位置处在裂解的支架多核苷酸的支持股上保留末端磷酸酯基团的作用。

[0686] 当通用核苷酸占据位置n时,可以采用任何合适的机制来实现在核苷酸位置n和n-1之间的支持股的裂解。

[0687] 如上所述,在核苷酸位置n和n-1之间裂解支持股可以通过酶的作用进行。

[0688] 如上所述,核苷酸位置n和n-1之间的支持股的裂解可以作为两步裂解过程进行。

[0689] 两步裂解过程的第一裂解步骤可包括从支持股去除通用核苷酸,因此在位置n处形成无碱基位点,并且第二裂解步骤可包括在无碱基位点、在位置n与n-1之间裂解支持股。

[0690] 实例2中描述在由包括通用核苷酸的序列定义的裂解位点处裂解支持股的一个机

制,所述通用核苷酸占据支持股中的位置n。实例2中所描述的裂解机制为示例性的并且可采用其它机制,其限制条件为实现上文所描述的平末端裂解的双股支架多核苷酸。

[0691] 在两步裂解过程的第一裂解步骤中,从支持股去除通用核苷酸,同时使磷酸糖主股完整。这可以通过酶的作用来实现,所述酶可以从双股多核苷酸中特异性地切除单个通用核苷酸。在示例性裂解方法中,通用核苷酸是肌苷,并且通过酶的作用从支持股切除肌苷,从而形成无碱基位点。在示例性裂解方法中,酶是3-甲基腺嘌呤DNA糖基化酶,特别是人烷基腺嘌呤DNA糖基化酶(hAAG)。可以使用其它酶、分子或化学品,条件是形成无碱基位点。核苷酸切除酶可以是UDG DNA糖基化酶。

[0692] 在第二裂解步骤中,通过进行单股断裂,在无碱基位点裂解两步裂解过程支持股。在示例性方法中,支持股通过作为碱,如NaOH的化学物质的作用裂解。或者,可以使用有机化学品,如N,N'-二甲基乙二胺。或者,可使用具有无碱基位点裂解酶活性的酶,如AP核酸内切酶I、核酸内切酶III(第N个)或核酸内切酶VIII。可以使用其它酶、分子或化学品,条件是支持股在如上所述的无碱基位点处被裂解。

[0693] 因此,在其中通用核苷酸在(1)和(2)中位于支持股的位置n处并且支持股在位置n和n-1之间裂解的实施例,可以用核苷酸切除酶进行第一裂解步骤。这种酶的实例是3-甲基腺嘌呤DNA糖基化酶,例如人烷基腺嘌呤DNA糖基化酶(hAAG)。第二裂解步骤可以用作为碱的化学物质如NaOH进行。第二步可以用具有无碱基位点裂解活性的有机化学品如N,N'-二甲基乙二胺进行。第二步可以用具有无碱基位点裂解酶活性的酶如内切核酸酶VIII进行。

[0694] 如上所述,核苷酸位置n和n-1之间的支持股的裂解可以作为单步裂解过程进行。可用于任何此类方法的酶的实例包含核酸内切酶III、核酸内切酶VIII、甲酰胺基嘧啶DNA糖基化酶(Fpg)和8-氧代鸟嘌呤DNA糖基化酶(hOGG1)。

[0695] 在此本发明的示例性方法版本以及所有版本中,为了允许下一核苷酸掺入下一合成循环中,必须从第一核苷酸去除可逆终止子基团(去除保护基步骤;104)。这可以在第一循环的各个阶段执行。通常,并且优选地,其将在连接步骤(5)之前作为方法的步骤(4)进行,如图1(104)的步骤4中所示。然而,去除保护基步骤可以在掺入新核苷酸之后的任何步骤,例如在连接步骤(5)之后进行。无论在哪个阶段进行去除保护基步骤,应首先去除酶和残余未掺入的第一核苷酸以防止第一核苷酸的多次掺入。优选在连接步骤(步骤(5))之前去除酶和未掺入的第一核苷酸。

[0696] 从第一核苷酸中去除可逆终止子基团可以通过任何合适的方法进行。例如,可以通过使用化学物质,如三(羧乙基)膦(TCEP)进行去除。

[0697] 在所述方法的步骤(5)中,将双股连接多核苷酸连接(105)到裂解的支架多核苷酸。连接多核苷酸包括支持股和辅助股。连接多核苷酸进一步包括互补连接末端,所述互补连接末端在支持股中包括通用核苷酸和单一悬垂核苷酸,所述单一悬垂核苷酸悬垂辅助股的末端核苷酸并且为预定义序列的第一核苷酸的配偶体核苷酸。连接多核苷酸进一步在邻近悬垂端的辅助股中包括末端核苷酸,所述末端核苷酸经配置使得其无法连接到另一多核苷酸股(在图1的上部部分的左上方描绘的结构中标记为“X”的位置)。通常,此末端核苷酸将缺乏磷酸酯基。通常,如上文所描述,此辅助股的末端核苷酸将定义辅助股的5'端。

[0698] 互补连接端经配置使得其将在掺入步骤(3)之后在经历适合的连接条件时与裂解

的支架多核苷酸产物的悬垂端相容地连接。在连接支持股后,第一个核苷酸变成与其配偶体核苷酸配对。

[0699] 支持股的连接可以通过任何合适的方式进行。连接将产生仅支持股的连接,维持合成股中第一个核苷酸(即引物股部分)与邻近第一个核苷酸的辅助股的末端核苷酸之间的单股断裂。

[0700] 连接通常可以通过具有连接酶活性的酶进行。举例来说,连接可以用T3 DNA连接酶或T4 DNA连接酶或其功能变异体或等效物进行。此类酶的使用将引起合成股中的单股断裂的维持,因为提供辅助股的末端核苷酸使得其无法充当连接酶的底物,例如归因于不存在末端磷酸酯基。

[0701] 连接多核苷酸与裂解的支架多核苷酸的连接完成第一合成循环,其中步骤(1)的支架多核苷酸有效地重新构成,不同之处在于预定核苷酸序列的第一核苷酸掺入到与其配偶体核苷酸相对的支架多核苷酸中。

[0702] 在此示例性方法(105)的步骤(5)中,在连接多核苷酸的互补连接末端中,支持股中的通用核苷酸与辅助股的末端核苷酸相对安置并且与其配对。应注意,在连接多核苷酸的情形下,通用核苷酸位于位置 $n+1$ 处,并且位于紧邻支持股的末端核苷酸的位置(位置 n)处。在连接多核苷酸的情形下,位置 n 具有与上文在步骤(1)和(2)处支架多核苷酸的情形下所描述相同的含义。因此,在步骤(5)中,“ n ”意指在连接之后支持股中的核苷酸位置,所述核苷酸位置与合成股中的位置相反,在那个合成的循环中,合成股中的所述位置现在在将其添加到合成股的引物股部分的末端之后由预定义序列的核苷酸占据。“ n ”还意指在连接之后合成股中的核苷酸位置,在那个合成的循环中,合成股中的所述位置现在在将其添加到合成股的引物股部分的末端之后由预定义序列的核苷酸占据。

[0703] 应注意,通用核苷酸在步骤(1)和(2)期间占据支架多核苷酸中的位置 n (图1的101和102),而通用核苷酸占据相同合成循环中的连接多核苷酸中的位置 $n+1$ (图1的105)。这是因为在那个合成的循环中,在步骤(5)中裂解的双股支架多核苷酸在将其添加之后具备预定义序列的核苷酸,并且因为连接多核苷酸具备与预定义序列的核苷酸搭配的核苷酸;并且此外因为如本文中所定义,所以“ n ”始终是指合成股中的核苷酸位置,所述合成股中的核苷酸位置由掺入于所述循环中的预定义序列的核苷酸占据(或将由其占据)或是指的支持股中与其相对的核苷酸位置。因此,在合成的任何给定循环结束时,紧接在连接步骤(5)之后,由通用核苷酸占据的位置将为 $n+1$ 并且将已从 n 移动,通用核苷酸将在步骤(1)中占据所述位置。连接步骤(5)的产物(图1中标记为“连接产物”的结构)将为用于下一合成循环的支架多核苷酸。当连接产物被认为是用于下一合成循环的支架多核苷酸(106)时,应当理解,通用核苷酸占据的位置现在将同样称为位置 n (106),而非 $n+1$ (105),在下一循环(108)中,在将其添加到裂解的合成股的末端之后,由于下一合成循环(106)中通用核苷酸占据的位置将是支持股中的核苷酸位置,所述位置与合成股中将由预定义序列的下一核苷酸占据的位置相反。因此,在方法版本1中,由通用核苷酸在合成的任何给定循环(101、106等)开始时占据的位置始终被称作位置 n ,并且新掺入所述循环中的核苷酸始终占据被称作 n 的位置。

[0704] 在完成第一合成循环之后,使用相同方法步骤执行第二和后续循环。

[0705] 如在方法版本1的第一合成循环的步骤(2)中,在步骤(6)中支架多核苷酸在裂解位点处裂解(107)。裂解位点由包括支持股中的通用核苷酸的序列限定。裂解使得支架多核

苷酸中的双股断裂。裂解将支架多核苷酸留在原位,所述裂解的双股支架多核苷酸在裂解位点包括支持股的裂解末端和包括裂解前切口位点的合成股的引物股部分的末端。裂解引起去除包括通用核苷酸的支持股和与支持股杂交的辅助股(如果在裂解之前立即存在)。

[0706] 裂解步骤可以如上文针对第一循环的步骤(2)所描述进行。

[0707] 在步骤(7)中,如在第一循环的步骤(3)中一样,将下一核苷酸添加到合成股的裂解的引物股部分的末端。

[0708] 在步骤(8)中,从下一核苷酸去除可逆终止子基团(去除保护基步骤;109)。如上文针对第一循环所描述,这可在各个阶段执行。通常,并且优选地,其将在连接步骤(9)之前作为所述方法的步骤(8)进行。然而,去除保护基步骤可以在掺入新核苷酸之后的任何步骤,例如在连接步骤(9)之后进行。

[0709] 如上文关于第一合成循环所描述,可以进行下一循环(109)和随后循环中可逆终止子基团的去除保护基。

[0710] 在下一循环的步骤(9)中,将双股连接多核苷酸连接(110)到裂解的支架多核苷酸。可以配置下一和随后的合成循环的步骤(9)的连接多核苷酸,并且可以进行连接步骤,如上文针对第一合成循环的步骤(5)所述。

[0711] 如上文所描述根据需要重复合成循环多次,以合成具有预定核苷酸序列的双股多核苷酸。

[0712] 合成方法版本2

[0713] 本发明的合成方法的第二示例性版本以与第一版本类似的方式执行,不同之处在于相对于由待掺入于给定合成循环的新核苷酸占据的位置和相对于切口和裂解位点,通用核苷酸的位置的修改的结构布置。

[0714] 因此,如同版本1,在版本2中支架多核苷酸的裂解(步骤2,202)引起辅助股(如果在裂解之前立即存在)的损失,和包括通用核苷酸的支持股的损失。裂解将裂解的双股支架多核苷酸留在原位,所述双股支架多核苷酸在裂解位点包括支持股的裂解末端和包括裂解前切口位点的合成股的引物股部分的末端。裂解在裂解位点产生平末端裂解的双股支架多核苷酸,无悬垂端。

[0715] 在所述方法的步骤(3)中,通过具有转移酶活性的酶,如聚合酶或末端核苷酸基转移酶(203)的作用将预定核苷酸序列中的第一核苷酸添加到合成股的引物股部分的末端中。第一核苷酸具备可逆终止子基团,所述可逆终止子基团阻止酶进一步延伸。因此,在步骤(3)中,仅掺入单核苷酸。

[0716] 在所述方法的步骤(4)中,进行去除保护基步骤(204)以从新掺入的核苷酸去除终止子基团。原则上,去除保护基步骤可在连接步骤(5)之后进行。优选进行作为步骤(4)的去除保护基步骤。

[0717] 在所述方法的步骤(5)中,将连接多核苷酸(参见在图2的上部部分的左上方所描绘的结构)连接到裂解的支架多核苷酸。连接将配偶体核苷酸掺入支架多核苷酸中并且允许新掺入的核苷酸与配偶体核苷酸配对(图2的步骤5;205),因此完成合成循环。

[0718] 在本发明的合成方法的第二示例性版本中,支架多核苷酸提供于如上文所描述的步骤(1)(201)中。在这个方法中,支架多核苷酸的支持股中的通用核苷酸相对于邻近单股断裂位点(在图2的结构中标记为“X”)的辅助股的倒数第二个核苷酸安放,并与其配对(参

见图2的步骤1中描绘的结构)。

[0719] 在所述方法的步骤(2)中,支架多核苷酸在裂解位点处裂解(202)。裂解位点由包括支持股中的通用核苷酸的序列限定。裂解使得支架多核苷酸中的双股断裂。支架多核苷酸的裂解(步骤2)引起辅助股(如果在裂解之前立即存在)的损失,和包括通用核苷酸的支持股的损失。裂解将支架多核苷酸留在原位,所述裂解的双股支架多核苷酸在裂解位点包括支持股的裂解末端和包括裂解前切口位点的合成股的引物股部分的末端。

[0720] 合成股已经在此示例性方法中具备单股断裂或“切口”,因此仅需要支持股的裂解以在支架多核苷酸中提供双股断裂。

[0721] 在此例示性方法中,裂解产生在合成股或支持股中无悬垂端的平末端裂解的双股支架多核苷酸。

[0722] 在此方法中,通用核苷酸在裂解步骤之前占据支持股中的位置“n+1”。为了在通用核苷酸占据支持股中的位置n+1时获得此类平末端裂解的双股支架多核苷酸,支持股在相对于通用核苷酸的特定位置处裂解。支架多核苷酸的支持股在核苷酸位置n与n-1之间裂解。

[0723] “n”意指与合成股中的位置相对的支持股中的核苷酸位置,所述合成股中的位置将在将其添加到所述合成循环中裂解的合成股的末端之后由预定义序列的核苷酸占据。“n”也意指在所述合成循环中合成股中核苷酸的位置在其被添加到合成股的引物股部分的末端时将被预定义序列的核苷酸占据。因此,在裂解步骤中,通用核苷酸在支持股中的位置n+1处,所述位置与由邻近切口位点的辅助股的倒数第二个核苷酸占据的位置相对(在图2中的位置“X”处显示)。

[0724] 在步骤(1)和(2)中,将由掺入在合成循环中的预定义序列的核苷酸占据的位置对应于合成股的辅助股部分的末端核苷酸(在图2中示出为“T”)。

[0725] 相对于在辅助股的近侧/引物股的远侧的方向上的位置n,“n+1”意指在支持股中的下一核苷酸位置(如在图2的步骤(1)和(2)中示意性地示出,在位置n+1处标记为“Un”的核苷酸,其占据紧靠着在引物股的远侧的方向上在位置n处标记为“H”的位置的位置)。n+1还可指合成股中的对应位置(在图2的步骤(1)和(2)中,在位置n+1处标记为“X”)。因此,在裂解步骤中,支持股中的位置n+1与邻近切口位点的辅助股的倒数第二个核苷酸占据的位置相对。

[0726] 相对于在辅助股的近侧/引物股的远侧的方向上的位置n,“n-1”意指在支持股中的下一核苷酸位置(如在图2的步骤(1)和(2)中示意性地示出,在位置n-1处标记为“J”的位置)。n-1还可指合成股中的对应位置(即如在图2的步骤(2)中示意性地示出,在位置n-1处标记为“K”的位置)。因此,在裂解步骤中,支持股中的位置n-1与由合成股的引物股部分的末端核苷酸占据的位置相对。

[0727] 在根据版本2的方法中,占据位置H和I以及J和K的核苷酸对可以是任何核苷酸对。

[0728] 在当核苷酸位置n和n-1之间的支持股被裂解后,通用核苷酸、辅助股(如果存在)和与辅助股杂交的支持股部分从剩余的裂解支架多核苷酸中去除(参见图2的上部的右上角所示的结构)。

[0729] 磷酸基应该在裂解位点处继续连接到裂解的支架多核苷酸的支持股的末端核苷酸(如在图2的下部部分的中间所示的结构中所描绘)。这确保连接多核苷酸的支持股可以

在连接步骤中连接到裂解的支架多核苷酸的支持股。

[0730] 因此,在方法版本2中,通用核苷酸在步骤(1)和(2)中占据支持股中的位置 $n+1$,并且支持股在核苷酸位置 n 和 $n-1$ 之间裂解。

[0731] 优选地,支持股通过磷酸二酯键在核苷酸位置 n 与 $n-1$ 之间的裂解裂解(在辅助股的远侧/引物股的近侧方向上,相对于通用核苷酸的位置,支持股的第二磷酸二酯键)。

[0732] 可以通过裂解核苷酸位置 n 和 $n-1$ 之间的磷酸二酯键的一个酯键来裂解支持股。

[0733] 优选地,通过相对于核苷酸位置 n 裂解第一酯键来裂解支持股。这将具有在裂解位置处在裂解的支架多核苷酸的支持股上保留末端磷酸酯基团的作用。

[0734] 当通用核苷酸占据位置 $n+1$ 时,可以采用任何适合的机制来实现核苷酸位置 n 与 $n-1$ 之间的支持股的裂解。

[0735] 如上所述,在核苷酸位置 n 和 $n-1$ 之间裂解支持股可以通过酶的作用进行。

[0736] 如上文所描述,当通用核苷酸占据支持股中的位置 $n+1$ 时,核苷酸位置 n 与 $n-1$ 之间的支持股的裂解可以通过酶,例如核酸内切酶V的作用进行。

[0737] 在实例3中以类似方式描述了在由包含占据支持股中的位置 $n+1$ 的通用核苷酸的序列定义的裂解位点处在核苷酸位置 n 和 $n-1$ 之间裂解支持股的一种机制。所描述的机制为示例性的并且可采用其它机制,其条件是实现上文所描述的裂解布置。

[0738] 在此示例性机制中,采用核酸内切酶。在示例性方法中,酶为核酸内切酶V。可使用其它酶、分子或化学物质,其条件是当通用核苷酸占据支持股中的位置 $n+1$ 时,支持股在核苷酸位置 n 与 $n-1$ 之间裂解。

[0739] 在此本发明的示例性方法版本以及所有版本中,为了允许下一核苷酸掺入下一合成循环中,必须从第一核苷酸去除可逆终止子基团(去除保护基步骤;204)。这可以在第一循环的各个阶段执行。通常,并且优选地,其将在连接步骤(5)之前作为方法的步骤(4)进行,如图2(204)的步骤4中所示。然而,去除保护基步骤可以在掺入新核苷酸之后的任何步骤,例如在连接步骤(5)之后进行。无论在哪个阶段进行去除保护基步骤,应首先去除酶和残余未掺入的第一核苷酸以防止第一核苷酸的多次掺入。优选在连接步骤(步骤(5))之前去除酶和未掺入的第一核苷酸。

[0740] 从第一核苷酸去除可逆终止子基团可通过任何适合方式进行。举例来说,可通过使用化学物质(例如,三(羧乙基)膦(TCEP))来进行去除。

[0741] 在所述方法的步骤(5)中,将双股连接多核苷酸连接(205)到裂解的支架多核苷酸。连接多核苷酸包括支持股和辅助股。连接多核苷酸进一步包括互补连接末端,所述互补连接末端在支持股中包括通用核苷酸和单一悬垂核苷酸,所述单一悬垂核苷酸悬垂辅助股的末端核苷酸并且为预定义序列的第一核苷酸的配偶体核苷酸。连接多核苷酸进一步在邻近悬垂端的辅助股中包括末端核苷酸,所述末端核苷酸经配置使得其无法连接到另一多核苷酸股(在图2的上部部分的左上方描绘的结构中标记为“I”的位置)。通常,此末端核苷酸将缺乏磷酸酯基。通常,如上文所描述,此辅助股的末端核苷酸将定义辅助股的5'端。

[0742] 在连接多核苷酸的互补连接末端中,支持股中的通用核苷酸与辅助股的倒数第二个核苷酸相对安置(在图2的步骤(5)中标记为“X”的位置)并且与其配对。辅助股的末端核苷酸(在位置 $n+1$ 处在图2的步骤(5)中标记为“I”的位置)与支持股中的核苷酸配对,所述核苷酸占据位置 $n+2$ 处的通用核苷酸与位置 n 处的配偶体核苷酸之间的位置(在位置 $n+1$ 处在

图2的步骤(5)中标记为“H”的位置)。

[0743] 互补连接端经配置使得其将在掺入步骤(3)之后在经历适合的连接条件时与裂解的支架多核苷酸产物的悬垂端相容地连接。在连接支持股后,第一个核苷酸变成与其配偶体核苷酸配对。

[0744] 支持股的连接可以通过任何合适的方式进行。连接将产生仅支持股的连接,维持合成股中第一个核苷酸(即引物股部分)与邻近第一个核苷酸的辅助股的末端核苷酸之间的单股断裂。

[0745] 连接通常可以通过具有连接酶活性的酶进行。举例来说,连接可以用T3 DNA连接酶或T4 DNA连接酶或其功能变异体或等效物进行。此类酶的使用将引起合成股中的单股断裂的维持,因为提供辅助股的末端核苷酸使得其无法充当连接酶的底物,例如归因于不存在末端磷酸酯基。

[0746] 连接多核苷酸与裂解的支架多核苷酸的连接完成第一合成循环,其中步骤(1)的支架多核苷酸有效地重新构成,不同之处在于预定核苷酸序列的第一核苷酸掺入到与其配偶体核苷酸相对的支架多核苷酸中。

[0747] 在此示例性方法(205)的步骤(5)中,在连接多核苷酸的互补连接末端中,支持股中的通用核苷酸与辅助股的倒数第二个核苷酸相对安置(标记为“X”的位置)并且与其配对。应注意,在连接多核苷酸的情形下,通用核苷酸位于位置 $n+2$ 处,即,从支持股的末端核苷酸去除的两个位置(位置 n)处。在连接多核苷酸的情形下,位置 n 具有与上文在步骤(1)和(2)处支架多核苷酸的情形下所描述相同的含义。因此,在步骤(5)中,“ n ”意指在连接之后支持股中的核苷酸位置,所述核苷酸位置与合成股中的位置相反,由于合成的循环,合成股中的所述位置现在在将其添加到合成股的引物股部分的末端之后由预定义序列的核苷酸占据。“ n ”还意指在连接之后合成股中的核苷酸位置,在那个合成循环中,合成股中的所述位置现在在将其添加到合成股的引物股部分的末端之后由预定义序列的核苷酸占据。

[0748] 应注意,通用核苷酸在步骤(1)和(2)期间占据支架多核苷酸中的位置 $n+1$ (图2的201和202),而通用核苷酸占据相同合成循环中的连接多核苷酸中的位置 $n+2$ (图2的205)。这是因为在那个合成的循环中,在步骤(5)中裂解的双股支架多核苷酸在将其添加之后具备预定义序列的核苷酸,并且因为连接多核苷酸具备与预定义序列的核苷酸搭配的核苷酸;并且此外因为如本文中所定义,所以“ n ”始终是指合成股中的核苷酸位置,所述合成股中的核苷酸位置由掺入于所述循环中的预定义序列的核苷酸占据(或将由其占据)或是指的支持股中与其相对的核苷酸位置。因此,在合成的任何给定循环结束时,紧接在连接步骤(5)之后,由通用核苷酸占据的位置将为 $n+2$ 并且将已从 $n+1$ 移动,通用核苷酸将在步骤(1)中占据所述位置。连接步骤(5)的产物(图2中标记为“连接产物”的结构)将为用于下一合成循环的支架多核苷酸。当将连接产物视为用于下一合成循环(206)的支架多核苷酸时,应理解,由通用核苷酸占据的位置现在再次被称作位置 $n+1$ (206)而非 $n+2$ (205)。因此,在方法版本2中,由通用核苷酸在合成的任何给定循环(201、206等)开始时占据的位置始终被称作位置 $n+1$,并且新掺入所述循环中的核苷酸始终占据被称作 n 的位置。

[0749] 在完成第一合成循环之后,使用相同方法步骤执行第二和后续循环。

[0750] 如在方法版本2的第一合成循环的步骤(2)中,在步骤(6)中支架多核苷酸在裂解位点处裂解(207)。裂解位点由在支持股中包括通用核苷酸的序列定义。裂解在支架多核苷

酸中产生双股断裂。裂解将支架多核苷酸留在原位,所述裂解的双股支架多核苷酸在裂解位点包括支持股的裂解末端和包括裂解前切口位点的合成股的引物股部分的末端。裂解引起去除包括通用核苷酸的支持股和与支持股杂交的辅助股(如果在裂解之前立即存在)。

[0751] 裂解步骤可以如上文针对第一循环的步骤(2)所描述进行。

[0752] 在步骤(7)中,如在第一循环的步骤(3)中一样,将下一核苷酸添加到合成股的裂解的引物股部分的末端。

[0753] 在步骤(8)中,从下一核苷酸去除可逆终止子基团(去除保护基步骤;209)。如上文针对第一循环所描述,这可在各个阶段执行。通常,并且优选地,其将在连接步骤(9)之前作为所述方法的步骤(8)进行。然而,去除保护基步骤可以在掺入新核苷酸之后的任何步骤,例如在连接步骤(9)之后进行。

[0754] 如上文关于第一合成循环所描述,可以进行下一循环(209)和随后循环中可逆终止子基团的去除保护基。

[0755] 在下一循环的步骤(9)中,将双股连接多核苷酸连接(210)到裂解的支架多核苷酸。可以配置下一和随后的合成循环的步骤(9)的连接多核苷酸,并且可以进行连接步骤,如上文针对第一合成循环的步骤(5)所述。

[0756] 如上文所描述根据需要重复合成循环多次,以合成具有预定核苷酸序列的双股多核苷酸。

[0757] 合成方法版本3

[0758] 本发明的合成方法的第三示例性版本以与第一版本类似的方式执行,不同之处在于相对于裂解位点的通用核苷酸的位置的经修改的结构布置。

[0759] 因此,如同版本1,在版本3中支架多核苷酸的裂解(步骤2,302)引起辅助股(如果在裂解之前立即存在)的损失,和包括通用核苷酸的支持股的损失。裂解将裂解的双股支架多核苷酸留在原位,所述双股支架多核苷酸在裂解位点包括支持股的裂解末端和包括裂解前切口位点的合成股的引物股部分的末端。裂解在裂解位点产生具有单核苷酸悬垂端的平末端裂解的双股支架多核苷酸。

[0760] 在所述方法的步骤(3)中,通过具有转移酶活性的酶,如聚合酶或末端核苷酸基转移酶(303)的作用将预定核苷酸序列中的第一核苷酸添加到合成股的引物股部分的末端中。第一核苷酸具备可逆终止子基团,所述可逆终止子基团阻止酶进一步延伸。因此,在步骤(3)中,仅掺入单核苷酸。

[0761] 在所述方法的步骤(4)中,进行去除保护基步骤(304)以从新掺入的核苷酸去除终止子基团。原则上,去除保护基步骤可在连接步骤(5)之后进行。优选进行作为步骤(4)的去除保护基步骤。

[0762] 在所述方法的步骤(5)中,将连接多核苷酸(参见在图3的上部部分的左上方所描绘的结构)连接到裂解的支架多核苷酸。连接将配偶体核苷酸掺入支架多核苷酸中并且允许新并掺入的核苷酸与配偶体核苷酸配对(图3的步骤5;305),因此完成合成循环。

[0763] 在本发明的合成方法的第三示例性版本中,支架多核苷酸提供于如上文所描述的步骤(1)(301)中。在这个方法中,支架多核苷酸的支持股中的通用核苷酸相对于邻近单股断裂位点(在图3的结构中标记为“X”)的辅助股的末端核苷酸安放,并与其配对(参见图3的步骤1中描绘的结构)。

[0764] 在所述方法的步骤(2)中,支架多核苷酸在裂解位点处被裂解(302)。裂解位点由包括支持股中的通用核苷酸的序列限定。裂解使得支架多核苷酸中的双股断裂。支架多核苷酸的裂解(步骤2)引起辅助股(如果在裂解之前立即存在)的损失,和包括通用核苷酸的支持股的损失。裂解将支架多核苷酸留在原位,所述裂解的双股支架多核苷酸在裂解位点包括支持股的裂解末端和包括裂解前切口位点的合成股的引物股部分的末端。

[0765] 合成股已经在此示例性方法中具备单股断裂或“切口”,因此仅需要支持股的裂解以在支架多核苷酸中提供双股断裂。

[0766] 在此示例性方法版本中,裂解产生具有单核苷酸悬垂端的裂解的双股支架多核苷酸。因此,合成股的引物股部分的末端核苷酸悬垂支持股的末端核苷酸。

[0767] 在此方法中,通用核苷酸在裂解步骤之前占据支持股中的位置“n”。为了获得此类裂解的双股支架多核苷酸,其中当通用核苷酸占据支持股中的位置n时,合成股的引物股部分的末端核苷酸悬垂支持的末端核苷酸,支持股在相对于通用核苷酸并且相对于切口位点的特定位置处裂解。支架多核苷酸的支持股在核苷酸位置n-1与n-2之间裂解。

[0768] “n”意指与合成股中的位置相对的支持股中的核苷酸位置,所述合成股中的位置将在将其添加到所述合成循环中裂解的合成股的末端之后由预定义序列的核苷酸占据。“n”也意指在所述合成循环中合成股中核苷酸的位置在其被添加到合成股的引物股部分的末端时将被预定义序列的核苷酸占据。因此,在裂解步骤中,通用核苷酸在支持股中的位置n处,所述位置与由邻近切口位点的辅助股的末端核苷酸占据的位置相对(在图3中的位置“X”处显示)。

[0769] 在步骤(1)和(2)中,将由掺入在合成循环中的预定义序列的核苷酸占据的位置对应于合成股的辅助股部分的末端核苷酸(在图3中的位置“X”处显示)。

[0770] 相对于在辅助股的近侧/引物股的远侧的方向上的位置n,“n-1”意指在支持股中的下一核苷酸位置(如在图3的步骤(1)和(2)中示意性地示出,在位置n-1处标记为“H”的位置)。n-1还可指合成股中的对应位置(即如在图3的步骤(2)中示意性地示出,在位置n-1处标记为“I”的位置)。因此,在裂解步骤中,支持股中的位置n-1与由合成股的引物股部分的末端核苷酸占据的位置相对。因此,在图3的步骤(1)和(2)中,位置“J”和“K”处的核苷酸占据位置n-2。

[0771] 在根据版本3的方法中,占据位置H和I以及J和K的核苷酸对可以是任何核苷酸对。

[0772] 在当核苷酸位置n-1和n-2之间的支持股被裂解后,通用核苷酸、辅助股(如果存在)和与辅助股杂交的支持股部分从剩余的裂解支架多核苷酸中去除(参见图3的上部的右上角所示的结构)。

[0773] 磷酸基应该在裂解位点处继续连接到裂解的支架多核苷酸的支持股的末端核苷酸(如在图3的下部部分的中间所示的结构中所描绘)。这确保了连接多核苷酸的支持股可以在连接步骤中连接到裂解的支架多核苷酸的支持股上。

[0774] 因此,在方法版本3中,通用核苷酸在步骤(1)和(2)处占据支持股中的位置n,并且支持股在核苷酸位置n-1与n-2之间裂解。

[0775] 优选地,通过裂解核苷酸位置n-1和n-2之间的磷酸二酯键(在向辅助股的远端/引物股的近端的方向上相对于通用核苷酸的位置的支持股的第二磷酸二酯键)裂解支持股。

[0776] 可以通过裂解核苷酸位置n-1和n-2之间的磷酸二酯键的一个酯键来裂解支持股。

[0777] 优选地,通过相对于核苷酸位置 $n-1$ 裂解第一酯键来裂解支持股。这将具有在裂解位置处在裂解的支架多核苷酸的支持股上保留末端磷酸酯基团的作用。

[0778] 当通用核苷酸占据位置 n 时,可以采用任何合适的机制来实现在核苷酸位置 $n-1$ 和 $n-2$ 之间的支持股的裂解。

[0779] 如上所述,核苷酸位置 $n-1$ 和 $n-2$ 之间的支持股的裂解可以通过酶的作用进行。

[0780] 如上文所描述,当通用核苷酸占据支持股中的位置 n 时,核苷酸位置 $n-1$ 与 $n-2$ 之间的支持股的裂解可以通过酶,例如核酸内切酶 V 的作用进行。

[0781] 在实例3中以类似方式描述了在由包含占据支持股中的位置 n 的通用核苷酸的序列定义的裂解位点处在核苷酸位置 $n-1$ 和 $n-2$ 之间裂解支持股的一种机制。所描述的机制为示例性的并且可采用其它机制,其条件是实现上文所描述的单一核苷酸悬垂物的布置。

[0782] 在此示例性机制中,采用核酸内切酶。在示例性方法中,酶为核酸内切酶 V 。可使用其它酶、分子或化学物质,其条件是当通用核苷酸占据支持股中的位置 n 时,支持股在核苷酸位置 $n-1$ 与 $n-2$ 之间裂解。

[0783] 在此本发明的示例性方法版本以及所有版本中,为了允许下一核苷酸掺入下一合成循环中,必须从第一核苷酸去除可逆终止子基团(去除保护基步骤;304)。这可以在第一循环的各个阶段执行。通常,并且优选地,其将在连接步骤(5)之前作为方法的步骤(4)进行,如图3(304)的步骤4中所示。然而,去除保护基步骤可以在掺入新核苷酸之后的任何步骤,例如在连接步骤(5)之后进行。无论在哪个阶段进行去除保护基步骤,应首先去除酶和残余未掺入的第一核苷酸以防止第一核苷酸的多次掺入。优选在连接步骤(步骤(5))之前去除酶和未掺入的第一核苷酸。

[0784] 从第一核苷酸去除可逆终止子基团可通过任何适合方式进行。例如,可以通过使用化学物质如三(羧乙基)膦(TCEP)进行去除。

[0785] 在所述方法的步骤(5)中,将双股连接多核苷酸连接(305)到裂解的支架多核苷酸。连接多核苷酸包括支持股和辅助股。连接多核苷酸进一步包括互补连接末端,所述互补连接末端在支持股中包括通用核苷酸和两个悬垂核苷酸,所述悬垂核苷酸悬垂辅助股的末端核苷酸。在互补连接末端处的连接多核苷酸的支持股的倒数第二个核苷酸为预定义序列的第一核苷酸的配偶体核苷酸。连接多核苷酸进一步在邻近悬垂端的辅助股中包括末端核苷酸,所述末端核苷酸经配置使得其无法连接到另一多核苷酸股(在图3的上部部分的左上方描绘的结构中标记为“X”的位置)。通常,此末端核苷酸将缺乏磷酸酯基。通常,如上文所描述,此辅助股的末端核苷酸将定义辅助股的5'端。

[0786] 在连接多核苷酸的互补连接末端中,支持股中的通用核苷酸与辅助股的末端核苷酸相对安置($n+1$) (在图3的步骤(5)中标记为“X”的位置)并且与其配对。预定义序列的第一核苷酸的配偶体核苷酸在辅助股的远侧的方向上占据相对于通用核苷酸的下一核苷酸位置(位置 n),并且安置在通用核苷酸与连接多核苷酸的支持股的末端核苷酸之间(在图3的步骤(5)中在位置 $n-1$ 处标记为“H”的位置)。

[0787] 互补连接端经配置使得其将在掺入步骤(3)之后在经历适合的连接条件时与裂解的支架多核苷酸产物的悬垂端相容地连接。在连接支持股后,第一个核苷酸变成与其配偶体核苷酸配对。

[0788] 支持股的连接可以通过任何合适的方式进行。连接将产生仅支持股的连接,维持

合成股中第一个核苷酸(即引物股部分)与邻近第一个核苷酸的辅助股的末端核苷酸之间的单股断裂。

[0789] 连接通常可以通过具有连接酶活性的酶进行。举例来说,连接可以用T3 DNA连接酶或T4 DNA连接酶或其功能变异体或等效物进行。此类酶的使用将引起合成股中的单股断裂的维持,因为提供辅助股的末端核苷酸使得其无法充当连接酶的底物,例如归因于不存在末端磷酸酯基。

[0790] 连接多核苷酸与裂解的支架多核苷酸的连接完成第一合成循环,其中步骤(1)的支架多核苷酸有效地重新构成,不同之处在于预定核苷酸序列的第一核苷酸掺入到与其配偶体核苷酸相对的支架多核苷酸中。

[0791] 在此示例性方法(305)的步骤(5)中,在连接多核苷酸的互补连接末端中,支持股中的通用核苷酸与辅助股的末端核苷酸相对安置(标记为“X”的位置)并且与其配对。应注意,在连接多核苷酸的情形下,通用核苷酸位于位置 $n+1$ 处和从支持股的末端核苷酸去除的两个位置(位置 $n-1$)处。在连接多核苷酸的情形下,位置 n 具有与上文在步骤(1)和(2)处支架多核苷酸的情形下所描述相同的含义。因此,在步骤(5)中,“ n ”意指在连接之后支持股中的核苷酸位置,所述核苷酸位置与合成股中的位置相反,由于合成的循环,合成股中的所述位置现在在将其添加到合成股的引物股部分的末端之后由预定义序列的核苷酸占据。“ n ”还意指在连接之后合成股中的核苷酸位置,在那个合成循环中,合成股中的所述位置现在在将其添加到合成股的引物股部分的末端之后由预定义序列的核苷酸占据。

[0792] 应注意,通用核苷酸在步骤(1)和(2)期间占据支架多核苷酸中的位置 n (图3的301和302),而通用核苷酸占据相同合成循环中的连接多核苷酸中的位置 $n+1$ (图3的305)。这是因为在那个合成的循环中,在步骤(5)中裂解的双股支架多核苷酸在将其添加之后具备预定义序列的核苷酸,并且因为连接多核苷酸具备与预定义序列的核苷酸搭配的核苷酸;并且此外因为如本文中 so 定义,所以“ n ”始终是指合成股中的核苷酸位置,所述合成股中的核苷酸位置由掺入于所述循环中的预定义序列的核苷酸占据(或将由其占据)或是指在支持股中与其相对的核苷酸位置。因此,在合成的任何给定循环结束时,紧接在连接步骤(5)之后,由通用核苷酸占据的位置将为 $n+1$ 并且将已从 n 移动,通用核苷酸将在步骤(1)中占据所述位置。连接步骤(5)的产物(图3中标记为“连接产物”的结构)将为用于下一合成循环的支架多核苷酸。当将连接产物视为用于下一合成循环(306)的支架多核苷酸时,应理解,由通用核苷酸占据的位置现在再次被称作位置 n (306)而非 $n+1$ (305)。因此,在方法版本3中,由通用核苷酸在合成的任何给定循环(301、306等)开始时占据的位置始终被称作位置 n ,并且新掺入所述循环中的核苷酸始终占据被称作 n 的位置。

[0793] 在完成第一合成循环之后,使用相同方法步骤执行第二和后续循环。

[0794] 如在方法版本3的第一合成循环的步骤(2)中,在步骤(6)中支架多核苷酸在裂解位点处裂解(307)。裂解位点由包括支持股中的通用核苷酸的序列限定。裂解使得支架多核苷酸中的双股断裂。裂解将支架多核苷酸留在原位,所述裂解的双股支架多核苷酸在裂解位点包括支持股的裂解末端和包括裂解前切口位点的合成股的引物股部分的末端。裂解引起去除包括通用核苷酸的支持股和与支持股杂交的辅助股(如果在裂解之前立即存在)。

[0795] 裂解步骤可以如上文针对第一循环的步骤(2)所描述进行。

[0796] 在步骤(7)中,如在第一循环的步骤(3)中一样,将下一核苷酸添加到合成股的裂

解的引物股部分的末端。

[0797] 在步骤(8)中,从下一核苷酸去除可逆终止子基团(去除保护基步骤;309)。如上文针对第一循环所描述,这可在各个阶段执行。通常,并且优选地,其将在连接步骤(9)之前作为所述方法的步骤(8)进行。然而,去除保护基步骤可以在掺入新核苷酸之后的任何步骤,例如在连接步骤(9)之后进行。

[0798] 如上文关于第一合成循环所描述,可以进行下一循环(309)和随后循环中可逆终止子基团的去除保护基。

[0799] 在下一循环的步骤(9)中,将双股连接多核苷酸连接(310)到裂解的支架多核苷酸。可以配置下一和随后的合成循环的步骤(9)的连接多核苷酸,并且可以进行连接步骤,如上文针对第一合成循环的步骤(5)所述。

[0800] 如上文所描述根据需要重复合成循环多次,以合成具有预定核苷酸序列的双股多核苷酸。

[0801] 合成方法版本4

[0802] 本发明的合成方法的第四示例性版本以与第一版本类似的方式执行,不同之处在于相对于由待掺入于给定合成循环的新核苷酸占据的位置和相对于切口和裂解位点,通用核苷酸的位置的修改的结构布置。

[0803] 因此,如同版本1,在版本4中支架多核苷酸的裂解(步骤2,402)引起辅助股(如果在裂解之前立即存在)的损失,和包括通用核苷酸的支持股的损失。裂解将裂解的双股支架多核苷酸留在原位,所述双股支架多核苷酸在裂解位点包括支持股的裂解末端和包括裂解前切口位点的合成股的引物股部分的末端。裂解在裂解位点产生平末端裂解的双股支架多核苷酸,无悬垂端。

[0804] 在所述方法的步骤(3)中,通过具有转移酶活性的酶,如聚合酶或末端核苷酸基转移酶(403)的作用将预定核苷酸序列中的第一核苷酸添加到合成股的引物股部分的末端中。第一核苷酸具备可逆终止子基团,所述可逆终止子基团阻止酶进一步延伸。因此,在步骤(3)中,仅掺入单核苷酸。

[0805] 在所述方法的步骤(4)中,进行去除保护基步骤(404)以从新掺入的核苷酸去除终止子基团。原则上,去除保护基步骤可在连接步骤(5)之后进行。优选进行作为步骤(4)的去除保护基步骤。

[0806] 在所述方法的步骤(5)中,将连接多核苷酸(参见在图4的上部部分的左上方所描绘的结构)连接到裂解的支架多核苷酸。连接将配偶体核苷酸掺入支架多核苷酸中并且允许新并掺入的核苷酸与配偶体核苷酸配对(图4的步骤5;405),因此完成合成循环。

[0807] 在本发明的合成方法的第四示例性版本中,支架多核苷酸提供于如上文所描述的步骤(1)(401)中。在此方法中,支架多核苷酸的支持股中的通用核苷酸与核苷酸(图4的结构中标记为“X”)相对且配对安置,所述核苷酸是邻近单股断裂位点的辅助股(图4的步骤(1)中描绘的结构中标记为“K”)的末端核苷酸去除的两个位置。

[0808] 在所述方法的步骤(2)中,支架多核苷酸在裂解位点被裂解(402)。裂解位点由包括支持股中的通用核苷酸的序列限定。裂解使得支架多核苷酸中的双股断裂。支架多核苷酸的裂解(步骤2)引起辅助股(如果在裂解之前立即存在)的损失,和包括通用核苷酸的支持股的损失。裂解将支架多核苷酸留在原位,所述裂解的双股支架多核苷酸在裂解位点包

括支持股的裂解末端和包括裂解前切口位点的合成股的引物股部分的末端。

[0809] 合成股已经在此示例性方法中具备单股断裂或“切口”,因此仅需要支持股的裂解以在支架多核苷酸中提供双股断裂。

[0810] 在此示例性方法版本中,裂解产生不具有悬垂端的平末端裂解的双股支架多核苷酸。

[0811] 在此方法中,通用核苷酸在裂解步骤之前占据支持股中的位置“ $n+2$ ”。为了在通用核苷酸占据支持股中的位置 $n+2$ 时获得此类平末端裂解的双股支架多核苷酸,支持股在相对于通用核苷酸的特定位置和相对于切口位点处裂解。支架多核苷酸的支持股在核苷酸位置 n 与 $n-1$ 之间裂解。

[0812] “ n ”意指与合成股中的位置相对的支持股中的核苷酸位置,所述合成股中的位置将在将其添加到所述合成循环中裂解的合成股的末端之后由预定义序列的核苷酸占据。“ n ”也意指在所述合成循环中合成股中核苷酸的位置在其被添加到合成股的引物股部分的末端时将被预定义序列的核苷酸占据。因此,在裂解步骤,通用核苷酸在支持股中处于位置 $n+2$,其与核苷酸相对,所述核苷酸为从邻近单股断裂位点的辅助股的末端核苷酸去除的两个位置(在图4中的步骤(2)中在位置“X”处展示)。

[0813] 在步骤(1)和(2)中,将由掺入在所述合成循环中的预定义序列的核苷酸占据的位置对应于核苷酸,所述核苷酸为从邻近单股断裂位点的辅助股的末端核苷酸去除的两个位置(在图4的步骤(2)中在位置“X”处展示)。

[0814] 相对于在辅助股的近侧/引物股的远侧的方向上的位置 n ，“ $n+1$ ”意指在支持股中的下一核苷酸位置(如在图4的步骤(1)和(2)中示意性地示出,在位置 $n+1$ 处标记为“H”的核苷酸,其占据紧靠着在引物股的远侧的方向上在位置 n 处标记为“J”的位置的位置)。 $n+1$ 还可指合成股中的对应位置(在图4的步骤(1)和(2)中,在位置 $n+1$ 处标记为“I”)。因此,在裂解步骤中,支持股中的位置 $n+1$ 与邻近切口位点的辅助股的倒数第二个核苷酸占据的位置相对。

[0815] 相对于在辅助股的近侧/引物股的远侧的方向上的位置 n ，“ $n-1$ ”意指在支持股中的下一核苷酸位置(如在图4的步骤(1)和(2)中示意性地示出,在位置 $n-1$ 处标记为“L”的位置)。 $n-1$ 还可指合成股中的对应位置(即如在图4的步骤(1)和(2)中示意性地示出,在位置 $n-1$ 处标记为“M”的位置)。因此,在裂解步骤中,支持股中的位置 $n-1$ 与由合成股的引物股部分的末端核苷酸占据的位置相对。因此,在图4的步骤(1)和(2)中,位置“J”和“K”处的核苷酸占据位置 n 。

[0816] 在根据版本4的方法中,占据位置H和I;J和K以及L和M的核苷酸对可以是任何核苷酸对。

[0817] 在当核苷酸位置 n 和 $n-1$ 之间的支持股被裂解后,通用核苷酸、辅助股(如果存在)和与辅助股杂交的支持股部分从剩余的裂解支架多核苷酸中去除(参见图4的上部的右上角所示的结构)。

[0818] 磷酸基应该在裂解位点处继续连接到裂解的支架多核苷酸的支持股的末端核苷酸(如在图4的下部部分的中间所示的结构中所描绘)。这确保连接多核苷酸的支持股可以在连接步骤中连接到裂解的支架多核苷酸的支持股。

[0819] 因此,在方法版本4中,通用核苷酸在步骤(1)和(2)中占据支持股中的位置 $n+2$,并

且支持股在核苷酸位置n和n-1之间裂解。

[0820] 优选地,支持股通过磷酸二酯键在核苷酸位置n与n-1之间的裂解裂解(在辅助股的远侧/引物股的近侧方向上,相对于通用核苷酸的位置,支持股的第三磷酸二酯键)。

[0821] 可以通过裂解核苷酸位置n和n-1之间的磷酸二酯键的一个酯键来裂解支持股。

[0822] 优选地,通过相对于核苷酸位置n裂解第一酯键来裂解支持股。这将具有在裂解位置处在裂解的支架多核苷酸的支持股上保留末端磷酸酯基团的作用。

[0823] 当通用核苷酸占据位置n+2时,可以采用任何合适的机制来实现在核苷酸位置n和n-1之间的支持股的裂解。

[0824] 如上所述,在核苷酸位置n和n-1之间裂解支持股可以通过酶的作用进行。

[0825] 在此本发明的示例性方法版本以及所有版本中,为了允许下一核苷酸掺入下一合成循环中,必须从第一核苷酸去除可逆终止子基团(去除保护基步骤;404)。这可在第一循环的各个阶段执行。通常,并且优选地,其将在连接步骤(5)之前作为方法的步骤(4)进行,如图4(404)的步骤4中所示。然而,去除保护基步骤可以在掺入新核苷酸之后的任何步骤,例如在连接步骤(5)之后进行。无论在哪个阶段进行去除保护基步骤,应首先去除酶和残余未掺入的第一核苷酸以防止第一核苷酸的多次掺入。优选在连接步骤(步骤(5))之前去除酶和未掺入的第一核苷酸。

[0826] 从第一核苷酸中去除可逆终止子基团可以通过任何合适的方法进行。例如,可以通过使用化学物质如三(羧乙基)膦(TCEP)进行去除。

[0827] 在所述方法的步骤(5)中,将双股连接多核苷酸连接(405)到裂解的支架多核苷酸。连接多核苷酸包括支持股和辅助股。连接多核苷酸进一步包括互补连接末端,所述互补连接末端在支持股中包括通用核苷酸和单一悬垂核苷酸,所述悬垂核苷酸悬垂辅助股的末端核苷酸。悬垂的核苷酸是预定义序列的第一个核苷酸的配偶体核苷酸。连接多核苷酸进一步在邻近悬垂端的辅助股中包括末端核苷酸,所述末端核苷酸经配置使得其无法连接到另一多核苷酸股(在图4的上部部分的左上方描绘的结构中标记为“K”的位置)。通常,此末端核苷酸将缺乏磷酸酯基。通常,如上文所描述,此辅助股的末端核苷酸将定义辅助股的5'端。

[0828] 在连接多核苷酸的互补连接末端中,支持股中的通用核苷酸与核苷酸相对安置(n+3)(在图4的步骤(5)中标记为“X”的位置)并且与其配对,所述核苷酸为从辅助股的末端核苷酸去除的两个位置。预定义序列的第一核苷酸的配偶体核苷酸占据作为连接多核苷酸的支持股的末端核苷酸的位置(位置n)。从连接多核苷酸的支持股的末端核苷酸去除一个位置的核苷酸在图4的步骤(5)中在位置n+1处标记为“J”。从连接多核苷酸的支持股的末端核苷酸去除的两个位置的核苷酸在图4的步骤(5)中在位置n+2处标记为“H”。

[0829] 互补连接端经配置使得其将在掺入步骤(3)之后在经历适合的连接条件时与裂解的支架多核苷酸产物的悬垂端相容地连接。在连接支持股之后,第一核苷酸变成与配偶体核苷酸配对。

[0830] 支持股的连接可以通过任何合适的方式进行。连接将产生仅支持股的连结,维持合成股中第一个核苷酸(即引物股部分)与邻近第一个核苷酸的辅助股的末端核苷酸之间的单股断裂。

[0831] 连接通常可以通过具有连接酶活性的酶进行。举例来说,连接可以用T3 DNA连接

酶或T4 DNA连接酶或其功能变异体或等效物进行。此类酶的使用将引起合成股中的单股断裂的维持,因为提供辅助股的末端核苷酸使得其无法充当连接酶的底物,例如归因于不存在末端磷酸酯基。

[0832] 连接多核苷酸与裂解的支架多核苷酸的连接完成第一合成循环,其中步骤(1)的支架多核苷酸有效地重新构成,不同之处在于预定核苷酸序列的第一核苷酸掺入到与其配偶体核苷酸相对的支架多核苷酸中。

[0833] 在此示例性方法(305)的步骤(5)中,在连接多核苷酸的互补连接端中,支持股中的通用核苷酸与核苷酸相对地安放,所述核苷酸是从邻近单股断裂位点的辅助股的末端核苷酸去除的两个位置(在图4的步骤(5)中在位置“X”处展示)。应注意,在连接多核苷酸的情形下,通用核苷酸位于位置 $n+3$ 处并且从支持股的末端核苷酸去除三个位置(位置 n)。在连接多核苷酸的情形下,位置 n 具有与上文在步骤(1)和(2)处支架多核苷酸的情形下所描述相同的含义。因此,在步骤(5)中,“ n ”意指在连接之后支持股中的核苷酸位置,所述核苷酸位置与合成股中的位置相反,由于合成的循环,合成股中的所述位置现在在将其添加到合成股的引物股部分的末端之后由预定义序列的核苷酸占据。“ n ”还意指在连接之后合成股中的核苷酸位置,在那个合成循环中,合成股中的所述位置现在在将其添加到合成股的引物股部分的末端之后由预定义序列的核苷酸占据。

[0834] 应注意,通用核苷酸在步骤(1)和(2)期间占据支架多核苷酸中的位置 $n+2$ (图4的401和402),而通用核苷酸占据相同合成循环中的连接多核苷酸中的位置 $n+3$ (图4的405)。这是因为在那个合成的循环中,在步骤(5)中裂解的双股支架多核苷酸在将其添加之后具备预定义序列的核苷酸,并且因为连接多核苷酸具备与预定义序列的核苷酸搭配的核苷酸;并且此外因为如本文中所定义,所以“ n ”始终是指合成股中的核苷酸位置,所述合成股中的核苷酸位置由掺入于所述循环中的预定义序列的核苷酸占据(或将由其占据)或是指的支持股中与其相对的核苷酸位置。因此,在合成的任何给定循环结束时,紧接在连接步骤(5)之后,由通用核苷酸占据的位置将为 $n+3$ 并且将已从 $n+2$ 移动,通用核苷酸将在步骤(1)中占据所述位置。连接步骤(5)的产物(图4中标记为“连接产物”的结构)将为用于下一合成循环的支架多核苷酸。当将连接产物视为用于下一合成循环(406)的支架多核苷酸时,应理解,由通用核苷酸占据的位置现在再次被称作位置 $n+2$ (406)而非 $n+3$ (405)。因此,在方法版本4中,由通用核苷酸在合成的任何给定循环(401、406等)开始时占据的位置始终被称作位置 $n+2$,并且新掺入所述循环中的核苷酸始终占据被称作 n 的位置。

[0835] 在完成第一合成循环之后,使用相同方法步骤执行第二和后续循环。

[0836] 如在方法版本4的第一合成循环的步骤(2)中,在步骤(6)中支架多核苷酸在裂解位点处裂解(407)。裂解位点由在支持股中包括通用核苷酸的序列定义。裂解在支架多核苷酸中产生双股断裂。裂解将支架多核苷酸留在原位,所述裂解的双股支架多核苷酸在裂解位点包括支持股的裂解末端和包括裂解前切口位点的合成股的引物股部分的末端。裂解引起去除包括通用核苷酸的支持股和与支持股杂交的辅助股(如果在裂解之前立即存在)。

[0837] 裂解步骤可以如上文针对第一循环的步骤(2)所描述进行。

[0838] 在步骤(7)中,如在第一循环的步骤(3)中一样,将下一核苷酸添加到合成股的裂解的引物股部分的末端。

[0839] 在步骤(8)中,从下一核苷酸去除可逆终止子基团(去除保护基步骤;409)。如上文

针对第一循环所描述,这可在各个阶段执行。通常,并且优选地,其将在连接步骤(9)之前作为所述方法的步骤(8)进行。然而,去除保护基步骤可以在掺入新核苷酸之后的任何步骤,例如在连接步骤(9)之后进行。

[0840] 如上文关于第一合成循环所描述,可以进行下一循环(409)和随后循环中可逆终止子基团的去除保护基。

[0841] 在下一循环的步骤(9)中,将双股连接多核苷酸连接(410)到裂解的支架多核苷酸。可以配置下一和随后的合成循环的步骤(9)的连接多核苷酸,并且可以进行连接步骤,如上文针对第一合成循环的步骤(5)所述。

[0842] 如上文所描述根据需要重复合成循环多次,以合成具有预定核苷酸序列的双股多核苷酸。

[0843] 基于合成方法版本4的变体方法

[0844] 应了解,合成方法版本4是合成方法版本2的变体。两种方法都需要在位置 n 与 $n-1$ 之间裂解支架多核苷酸的支持股。在第一和第二循环的裂解步骤(步骤2和6)之前和当时的版本2中,通用核苷酸占据支架多核苷酸的支持股中的位置 $n+1$ 。与第一和第二循环的裂解步骤(步骤2和6)之前和当时的版本4相比,通用核苷酸占据支架多核苷酸的支持股中的位置 $n+2$ 。因此,合成方法版本4与合成方法版本2相同,不同之处在于在合成方法版本4中,通用核苷酸在引物股部分的远侧的方向上占据进一步从位置 n 去除的一个位置。

[0845] 设想合成方法版本4的其它变体,其中支架多核苷酸的支持股在位置 n 与 $n-1$ 之间裂解,并且其中在每个其它变化方法中,通用核苷酸在引物股部分的远侧的方向上占据递增地进一步从位置 n 去除的一个位置,在位置 $n+3$ 处开始并且根据式 $n+3+x$ 递增地增加,其中 x 为1到10之间或更大的整数。

[0846] 因此,提供合成方法版本4的“ $n+3$ ”变体,其中所述方法以与上文所描述的合成方法版本4相同的方式执行,不同之处在于以下变体。

[0847] 在第一循环的裂解步骤之前和当时(步骤1和2),通用核苷酸改为占据支架多核苷酸的支持股中的位置 $n+3$,其中相对于辅助股的近侧/引物股部分的远侧的方向上的位置 n , $n+3$ 是支持股中的第三核苷酸位置;并且支架多核苷酸的支持股在位置 n 与 $n-1$ 之间裂解。

[0848] 在第一循环的连接步骤(步骤5)中,对连接多核苷酸的互补连接末端进行结构化,使得通用核苷酸在支持股中改为占据位置 $n+4$,并且与在互补连接末端从辅助股的末端核苷酸去除3个位置的核苷酸配对;其中相对于在辅助股的近侧/引物股部分的远侧的方向上的位置 n ,位置 $n+4$ 是支持股中的位置4。

[0849] 在第二循环的裂解步骤之前和当时(步骤5和6)和所有后续循环的裂解步骤中,通用核苷酸占据支架多核苷酸的支持股的位置 $n+3$,并且支架多核苷酸的支持股在位置 n 和 $n-1$ 处裂解。

[0850] 最后,在第二循环的连接步骤(步骤9)和在所有后续循环的连接步骤中,连接多核苷酸的互补连接末端经结构化,以使得通用核苷酸占据支持股中的位置 $n+4$,并且与在互补连接末端从辅助股的末端核苷酸去除2个位置的核苷酸配对。

[0851] 除了上文所描述的“ $n+3$ ”方法,还提供合成方法版本4的“ $n+3+x$ ”变体,其中所述方法以与上文所描述的合成方法版本4相同的方式执行,不同之处在于以下变体。

[0852] 在第一循环的裂解步骤之前和当时(步骤1和2),通用核苷酸改为占据支架多核苷

酸的支持股中的位置 $n+3+x$,其中相对于辅助股的近侧/引物股部分的远侧的方向上的位置 n , $n+3$ 是支持股中的第三核苷酸位置;并且支架多核苷酸的支持股在位置 n 与 $n-1$ 之间裂解。

[0853] 在第一循环的连接步骤(步骤5)中,对连接多核苷酸的互补连接末端进行结构化,使得通用核苷酸在支持股中改为占据位置 $n+4+x$,并且与在互补连接末端从辅助股的末端核苷酸去除 $3+x$ 个位置的核苷酸配对;其中相对于在辅助股的近侧/引物股部分的远侧的方向上的位置 n ,位置 $n+4$ 是支持股中的位置4。

[0854] 在第二循环的裂解步骤之前和当时(步骤6)和所有后续循环的裂解步骤中,通用核苷酸占据支架多核苷酸的支持股的位置 $n+3+x$,并且支架多核苷酸的支持股在位置 n 和 $n-1$ 处裂解;

[0855] 最后,在第二循环的连接步骤(步骤9)和在所有后续循环的连接步骤中,连接多核苷酸的互补连接末端经结构化,以使得通用核苷酸占据支持股中的位置 $n+4+x$,并且与在互补连接末端从辅助股的末端核苷酸去除 $2+x$ 个位置的核苷酸配对。

[0856] 在所有这些方法中, x 为1到10之间或更大的整数,并且其中在步骤(1)、(2)、(5)、(6)和(9)中, x 为相同的整数。

[0857] 如同合成方法4一样,在基于版本4的变化方法的情况下,应注意,通用核苷酸在步骤(1)和(2)期间占据支架多核苷酸中的位置 $n+3$ (或 $n+3+x$,视具体变化方法而定),而通用核苷酸在相同合成循环中占据连接多核苷酸中的位置 $n+4$ (或 $n+4+x$,视具体变化方法而定)。这是因为在那个合成的循环中,在步骤(5)中裂解的双股支架多核苷酸在将其添加之后具备预定义序列的核苷酸,并且因为连接多核苷酸具备与预定义序列的核苷酸搭配的核苷酸;并且此外因为如本文中所定义,所以“ n ”始终是指合成股中的核苷酸位置,所述合成股中的核苷酸位置由掺入于所述循环中的预定义序列的核苷酸占据(或将由其占据)或是指的支持股中与其相对的核苷酸位置。因此,在合成的任何给定循环结束时,紧接在连接步骤(5)之后,由通用核苷酸占据的位置将为 $n+4$ (或 $n+4+x$)并且将已从 $n+3$ (或对应地从 $n+3+x$)移动,通用核苷酸将在步骤(1)中占据所述位置。连接步骤(5)的产物(图4中对应于“连接产物”标记的结构)将为用于下一合成循环的支架多核苷酸。当将连接产物视为用于下一合成循环的支架多核苷酸时,应理解,由通用核苷酸占据的位置现在再次被称作位置 $n+3$ (或 $n+3+x$)(参看406),而非 $n+4$ (或 $n+4+x$)(参看405。因此,在合成方法版本4的变体中,由通用核苷酸在合成的任何给定循环开始时占据的位置(参看401、406等)始终被称作位置 $n+3$ (或 $n+3+x$,这取决于特定变化方法,其中 x 为1到10之间的整数或更大),并且新掺入在所述循环中的核苷酸始终占据被称作 n 的位置。

[0858] 合成方法版本5

[0859] 本发明的合成方法的第五示例性版本以与第一版本类似的方式执行,不同之处在于相对于由待掺入于给定合成循环的新核苷酸占据的位置和相对于切口和裂解位点,通用核苷酸的位置的修改的结构布置。

[0860] 因此,如同版本1,在版本5中支架多核苷酸的裂解(步骤2,502)引起辅助股(如果在裂解之前立即存在)的损失,和包括通用核苷酸的支持股的损失。裂解将裂解的双股支架多核苷酸留在原位,所述双股支架多核苷酸在裂解位点包括支持股的裂解末端和包括裂解前切口位点的合成股的引物股部分的末端。裂解在裂解位点产生具有单核苷酸悬垂端的平末端裂解的双股支架多核苷酸。

[0861] 在所述方法的步骤(3)中,通过具有转移酶活性的酶,如聚合酶或末端核苷酸基转移酶(503)的作用将预定核苷酸序列中的第一核苷酸添加到合成股的引物股部分的末端中。第一核苷酸具备可逆终止子基团,所述可逆终止子基团阻止酶进一步延伸。因此,在步骤(3)中,仅掺入单核苷酸。

[0862] 在所述方法的步骤(4)中,进行去除保护基步骤(504)以从新掺入的核苷酸去除终止子基团。原则上,去除保护基步骤可在连接步骤(5)之后进行。优选进行作为步骤(4)的去除保护基步骤。

[0863] 在所述方法的步骤(5)中,将连接多核苷酸(参见在图5的上部部分的左上方所描绘的结构)连接到裂解的支架多核苷酸。连接将配偶体核苷酸掺入支架多核苷酸中并且允许新并掺入的核苷酸与配偶体核苷酸配对(图5的步骤5;505),因此完成合成循环。

[0864] 在本发明的合成方法的第五示例性版本中,支架多核苷酸提供于如上文所描述的步骤(1)(501)中。在这个方法中,支架多核苷酸的支持股中的通用核苷酸相对于邻近单股断裂位点的辅助股的倒数第二个核苷酸的核苷酸(在图5的步骤(1)的结构中标记为“X”)安放,并与其配对。

[0865] 在所述方法的步骤(2)中,支架多核苷酸在裂解位点处裂解(502)。裂解位点由在支持股中包括通用核苷酸的序列定义。裂解在支架多核苷酸中产生双股断裂。支架多核苷酸的裂解(步骤2)引起辅助股(如果在裂解之前立即存在)的损失,和包括通用核苷酸的支持股的损失。裂解将支架多核苷酸留在原位,所述裂解的双股支架多核苷酸在裂解位点包括支持股的裂解末端和包括裂解前切口位点的合成股的引物股部分的末端。

[0866] 合成股已经在此示例性方法中具备单股断裂或“切口”,因此仅需要支持股的裂解以在支架多核苷酸中提供双股断裂。

[0867] 在此示例性方法版本中,裂解产生具有单核苷酸悬垂端的裂解的双股支架多核苷酸。因此,合成股的引物股部分的末端核苷酸悬垂支持股的末端核苷酸。

[0868] 在此方法中,通用核苷酸在裂解步骤之前占据支持股中的位置“n+1”。为了获得此类裂解的双股支架多核苷酸,其中当通用核苷酸占据支持股中的位置n+1时,合成股的引物股部分的末端核苷酸悬垂支持的末端核苷酸,支持股在相对于通用核苷酸并且相对于切口位点的特定位置处裂解。支架多核苷酸的支持股在核苷酸位置n-1与n-2之间裂解。

[0869] “n”意指与合成股中的位置相对的支持股中的核苷酸位置,所述合成股中的位置将在将其添加到所述合成循环中裂解的合成股的末端之后由预定义序列的核苷酸占据。“n”也意指在所述合成循环中合成股中核苷酸的位置在其被添加到合成股的引物股部分的末端时将被预定义序列的核苷酸占据。因此,在裂解步骤中,通用核苷酸在支持股中处于位置n+1,其与核苷酸相对,所述位置为从邻近单股断裂位点的辅助股的末端核苷酸去除的两个位置(在图5中的步骤(2)中在位置“X”处展示)。

[0870] 在步骤(1)和(2)中,将由掺入在所述合成循环中的预定义序列的核苷酸占据的位置对应于作为邻近单股断裂位点的辅助股的倒数第二个核苷酸的核苷酸(在图5的步骤(2)中在位置“X”处展示)。

[0871] 相对于在辅助股的近侧/引物股的远侧的方向上的位置n,“n+1”意指在支持股中的下一核苷酸位置(如在图5的步骤(1)和(2)中示意性地示出,在位置n+1处标记为“Un”的核苷酸,其占据紧靠着在引物股的远侧的方向上在位置n处标记为“H”的位置的位置)。n+1

还可指合成股中的对应位置(在图5的步骤(1)和(2)中,在位置 $n+1$ 处标记为“X”)。因此,在裂解步骤中,支持股中的位置 $n+1$ 与邻近切口位点的辅助股的倒数第二个核苷酸占据的位置相对。

[0872] 相对于在辅助股的近侧/引物股的远侧的方向上的位置 n ，“ $n-1$ ”意指在支持股中的下一核苷酸位置(如在图5的步骤(1)和(2)中示意性地示出,在位置 $n-1$ 处标记为“J”的位置)。 $n-1$ 还可指合成股中的对应位置(即如在图5的步骤(1)和(2)中示意性地示出,在位置 $n-1$ 处标记为“K”的位置)。因此,在裂解步骤中,支持股中的位置 $n-1$ 与由合成股的引物股部分的末端核苷酸占据的位置相对。因此,在图5的步骤(1)和(2)中,位置“L”和“M”处的核苷酸占据位置 $n-2$ 。

[0873] 在根据版本5的方法中,占据位置H和I、J和K以及L和M的核苷酸对可以是任何核苷酸对。

[0874] 在当核苷酸位置 $n-1$ 和 $n-2$ 之间的支持股被裂解后,通用核苷酸、辅助股(如果存在)和与辅助股杂交的支持股部分从剩余的裂解支架多核苷酸中去除(参见图5的上部的右上角所示的结构)。

[0875] 磷酸基应该在裂解位点处继续连接到裂解的支架多核苷酸的支持股的末端核苷酸(如在图5的下部部分的中间所示的结构中所描绘)。这确保连接多核苷酸的支持股可以在连接步骤中连接到裂解的支架多核苷酸的支持股。

[0876] 因此,在方法版本5中,通用核苷酸在步骤(1)和(2)处占据支持股中的位置 $n+1$,并且支持股在核苷酸位置 $n-1$ 与 $n-2$ 之间裂解。

[0877] 优选地,支持股通过磷酸二酯键在核苷酸位置 $n-1$ 与 $n-2$ 之间的裂解裂解(在辅助股的远侧/引物股的近侧方向上,相对于通用核苷酸的位置,支持股的第三磷酸二酯键)。

[0878] 可以通过裂解核苷酸位置 $n-1$ 和 $n-2$ 之间的磷酸二酯键的一个酯键来裂解支持股。

[0879] 优选地,通过相对于核苷酸位置 $n-1$ 裂解第一酯键来裂解支持股。这将具有在裂解位置处在裂解的支架多核苷酸的支持股上保留末端磷酸酯基团的作用。

[0880] 当通用核苷酸占据位置 $n+1$ 时,可以采用任何适合的机制来实现核苷酸位置 $n-1$ 与 $n-2$ 之间的支持股的裂解。

[0881] 如上所述,核苷酸位置 $n-1$ 和 $n-2$ 之间的支持股的裂解可以通过酶的作用进行。

[0882] 在此本发明的示例性方法版本以及所有版本中,为了允许下一核苷酸掺入下一合成循环中,必须从第一核苷酸去除可逆终止子基团(去除保护基步骤;504)。这可在第一循环的各个阶段执行。通常,并且优选地,其将在连接步骤(5)之前作为方法的步骤(4)进行,如图5的步骤4中所示(504)。然而,去除保护基步骤可以在掺入新核苷酸之后的任何步骤,例如在连接步骤(5)之后进行。无论在哪个阶段进行去除保护基步骤,应首先去除酶和残余未掺入的第一核苷酸以防止第一核苷酸的多次掺入。优选在连接步骤(步骤(5))之前去除酶和未掺入的第一核苷酸。

[0883] 从第一核苷酸去除可逆终止子基团可通过任何适合方式进行。举例来说,可通过使用化学物质(例如,三(羧乙基)膦(TCEP))来进行去除。

[0884] 在所述方法的步骤(5)中,将双股连接多核苷酸连接(505)到裂解的支架多核苷酸。连接多核苷酸包括支持股和辅助股。连接多核苷酸进一步包括互补连接末端,所述互补连接末端在支持股中包括通用核苷酸和两个悬垂核苷酸,所述悬垂核苷酸悬垂辅助股的末

端核苷酸。在互补连接末端处的连接多核苷酸的支持股的倒数第二个核苷酸为预定义序列的第一核苷酸的配偶体核苷酸。连接多核苷酸进一步在邻近悬垂端的辅助股中包括末端核苷酸,所述末端核苷酸经配置使得其无法连接到另一多核苷酸股(在图5的上部部分的左上方描绘的结构中标记为“I”的位置)。通常,此末端核苷酸将缺乏磷酸酯基。通常,如上文所描述,此辅助股的末端核苷酸将定义辅助股的5'端。

[0885] 在连接多核苷酸的互补连接末端中,支持股中的通用核苷酸与辅助股的倒数第二个核苷酸相对安置(n+2)(在图5的步骤(5)中标记为“X”的位置)并且与其配对。辅助股的末端核苷酸(在图5的步骤(5)中标记为“I”的位置)占据位置n+1并且展示为与支持股中标记为“H”的位置处并且也在位置n+1处的核苷酸配对。预定义序列的第一核苷酸的配偶体核苷酸占据作为位置n处的连接多核苷酸的支持股的倒数第二个核苷酸的位置。最后,在图5的步骤(5)中,在n-1的位置处将连接多核苷酸的支持股的末端核苷酸标记为“J”。

[0886] 互补连接端经配置使得其将在掺入步骤(3)之后在经历适合的连接条件时与裂解的支架多核苷酸产物的悬垂端相容地连接。在连接支持股之后,第一核苷酸变成与配偶体核苷酸配对。

[0887] 支持股的连接可以通过任何合适的方式进行。连接将产生仅支持股的连结,维持合成股中第一个核苷酸(即引物股部分)与邻近第一个核苷酸的辅助股的末端核苷酸之间的单股断裂。

[0888] 连接通常可以通过具有连接酶活性的酶进行。举例来说,连接可以用T3 DNA连接酶或T4 DNA连接酶或其功能变异体或等效物进行。此类酶的使用将引起合成股中的单股断裂的维持,因为提供辅助股的末端核苷酸使得其无法充当连接酶的底物,例如归因于不存在末端磷酸酯基。

[0889] 连接多核苷酸与裂解的支架多核苷酸的连接完成第一合成循环,其中步骤(1)的支架多核苷酸有效地重新构成,不同之处在于预定核苷酸序列的第一核苷酸掺入到与其配偶体核苷酸相对的支架多核苷酸中。

[0890] 在此示例性方法(505)的步骤(5)中,在连接多核苷酸的互补连接端中,支持股中的通用核苷酸与核苷酸相对地安放,所述核苷酸是邻近单股断裂位点的辅助股的倒数第二个核苷酸(在图5的步骤(5)中在位置“X”处展示)。应注意,在连接多核苷酸的情形下,通用核苷酸位于位置n+2处并且从支持股的末端核苷酸去除三个位置(位置n-1)。在连接多核苷酸的情形下,位置n具有与上文在步骤(1)和(2)处支架多核苷酸的情形下所描述相同的含义。因此,在步骤(5)中,“n”意指在连接之后支持股中的核苷酸位置,所述核苷酸位置与合成股中的位置相反,由于合成的循环,合成股中的所述位置现在在将其添加到合成股的引物股部分的末端之后由预定义序列的核苷酸占据。“n”还意指在连接之后合成股中的核苷酸位置,在那个合成循环中,合成股中的所述位置现在在将其添加到合成股的引物股部分的末端之后由预定义序列的核苷酸占据。

[0891] 应注意,通用核苷酸在步骤(1)和(2)期间占据支架多核苷酸中的位置n+1(图5的501和502),而通用核苷酸占据相同合成循环中的连接多核苷酸中的位置n+2(图5的505)。这是因为在那个合成的循环中,在步骤(5)中裂解的双股支架多核苷酸在将其添加之后具备预定义序列的核苷酸,并且因为连接多核苷酸具备与预定义序列的核苷酸搭配的核苷酸;并且此外因为如本文中所定义,所以“n”始终是指合成股中的核苷酸位置,所述合成股

中的核苷酸位置由掺入于所述循环中的预定义序列的核苷酸占据(或将由其占据)或是指其在支持股中与其相对的核苷酸位置。因此,在合成的任何给定循环结束时,紧接在连接步骤(5)之后,由通用核苷酸占据的位置将为 $n+2$ 并且将已从 $n+1$ 移动,通用核苷酸将在步骤(1)中占据所述位置。连接步骤(5)的产物(图5中标记为“连接产物”的结构)将为用于下一合成循环的支架多核苷酸。当将连接产物视为用于下一合成循环(506)的支架多核苷酸时,应理解,由通用核苷酸占据的位置现在再次被称作位置 $n+1$ (506)而非 $n+2$ (505)。因此,在方法版本5中,由通用核苷酸在合成的任何给定循环(501、506等)开始时占据的位置始终被称作位置 $n+1$,并且新掺入所述循环中的核苷酸始终占据被称作 n 的位置。

[0892] 在完成第一合成循环之后,使用相同方法步骤执行第二和后续循环。

[0893] 如在方法版本5的第一合成循环的步骤(2)中,在步骤(6)中支架多核苷酸在裂解位点处裂解(507)。裂解位点由在支持股中包括通用核苷酸的序列定义。裂解在支架多核苷酸中产生双股断裂。裂解将支架多核苷酸留在原位,所述裂解的双股支架多核苷酸在裂解位点包括支持股的裂解末端和包括裂解前切口位点的合成股的引物股部分的末端。裂解引起去除包括通用核苷酸的支持股和与支持股杂交的辅助股(如果在裂解之前立即存在)。

[0894] 裂解步骤可以如上文针对第一循环的步骤(2)所描述进行。

[0895] 在步骤(7)中,如在第一循环的步骤(3)中一样,将下一核苷酸添加到合成股的裂解的引物股部分的末端。

[0896] 在步骤(8)中,从下一核苷酸去除可逆终止子基团(去除保护基步骤;509)。如上文针对第一循环所描述,这可在各个阶段执行。通常,并且优选地,其将在连接步骤(9)之前作为所述方法的步骤(8)进行。然而,去除保护基步骤可以在掺入新核苷酸之后的任何步骤,例如在连接步骤(9)之后进行。

[0897] 如上文关于第一合成循环所描述,可以进行下一循环(509)和随后循环中可逆终止子基团的去除保护基。

[0898] 在下一循环的步骤(9)中,将双股连接多核苷酸连接(510)到裂解的支架多核苷酸。可以配置下一和随后的合成循环的步骤(9)的连接多核苷酸,并且可以进行连接步骤,如上文针对第一合成循环的步骤(5)所述。

[0899] 如上文所描述根据需要重复合成循环多次,以合成具有预定核苷酸序列的双股多核苷酸。

[0900] 基于合成方法版本5的变体方法

[0901] 应了解,合成方法版本5是合成方法版本3的变体。两种方法都需要在位置 $n-1$ 与 $n-2$ 之间裂解支架多核苷酸的支持股。在第一和第二循环的裂解步骤(步骤2和6)之前和当时的版本3中,通用核苷酸占据支架多核苷酸的支持股中的位置 n 。与第一和第二循环的裂解步骤(步骤2和6)之前和之后的版本5相比,通用核苷酸占据支架多核苷酸的支持股中的位置 $n+1$ 。因此,合成方法版本5与合成方法版本3相同,不同之处在于在合成方法版本5中,通用核苷酸在引物股部分的远侧的方向上占据进一步从位置 n 去除的一个位置。

[0902] 设想合成方法版本5的其它变体,其中支架多核苷酸的支持股在位置 $n-1$ 与 $n-2$ 之间裂解,并且其中在每个其它变化方法中,通用核苷酸在引物股部分的远侧的方向上占据递增地进一步从位置 n 去除的一个位置,在位置 $n+2$ 处开始并且根据式 $n+2+x$ 递增地增加,其中 x 为1到10之间或更大的整数。

[0903] 因此,提供合成方法版本5的“ $n+2$ ”变体,其中所述方法以与上文所描述的合成方法版本5相同的方式执行,不同之处在于以下变体。

[0904] 在第一循环的裂解步骤(步骤2)中,通用核苷酸改为占据支架多核苷酸的支持股中的位置 $n+2$,其中相对于在辅助股的近侧/引物股部分的远侧的方向上的位置 n , $n+2$ 是支持股中的第二核苷酸位置;并且支架多核苷酸的支持股在位置 n 与 $n-1$ 之间裂解;

[0905] 在第一循环的连接步骤(步骤5)中,对连接多核苷酸的互补连接末端进行结构化,使得通用核苷酸在支持股中改为占据位置 $n+3$,并且与在互补连接末端从辅助股的末端核苷酸去除2个位置的核苷酸配对;其中相对于在辅助股的近侧/引物股部分的远侧的方向上的位置 n ,位置 $n+3$ 是支持股中的位置3。

[0906] 在第二循环的裂解步骤(步骤6)和所有后续循环的裂解步骤中,通用核苷酸占据支架多核苷酸的支持股的位置 $n+2$,并且支架多核苷酸的支持股在位置 n 和 $n-1$ 处裂解。

[0907] 最后,在第二循环的连接步骤(步骤9)和在所有后续循环的连接步骤中,连接多核苷酸的互补连接末端经结构化,以使得通用核苷酸占据支持股中的位置 $n+3$,并且与在互补连接末端从辅助股的末端核苷酸去除2个位置的核苷酸配对。

[0908] 除了上文所描述的方法,还提供合成方法版本5的“ $n+2+x$ ”变体,其中所述方法以与上文所描述的合成方法版本5相同的方式执行,不同之处在于以下变体。

[0909] 在第一循环的裂解步骤(步骤2)中,通用核苷酸改为占据支架多核苷酸的支持股中的位置 $n+2+x$,其中相对于在辅助股的近侧/引物股部分的远侧的方向上的位置 n , $n+2$ 是支持股中的第二核苷酸位置;并且支架多核苷酸的支持股在位置 n 与 $n-1$ 之间裂解;

[0910] 在第一循环的连接步骤(步骤5)中,对连接多核苷酸的互补连接末端进行结构化,使得通用核苷酸在支持股中改为占据位置 $n+3+x$,并且与在互补连接末端从辅助股的末端核苷酸去除 $2+x$ 个位置的核苷酸配对;其中相对于在辅助股的近侧/引物股部分的远侧的方向上的位置 n ,位置 $n+3$ 是支持股中的位置3。

[0911] 在第二循环的裂解步骤(步骤6)和所有后续循环的裂解步骤中,通用核苷酸占据支架多核苷酸的支持股的位置 $n+2+x$,并且支架多核苷酸的支持股在位置 n 和 $n-1$ 处裂解。

[0912] 最后,在第二循环的连接步骤(步骤9)和在所有后续循环的连接步骤中,连接多核苷酸的互补连接末端经结构化,以使得通用核苷酸占据支持股中的位置 $n+3+x$,并且与在互补连接末端从辅助股的末端核苷酸去除 $2+x$ 个位置的核苷酸配对。

[0913] 在所有这些方法中, x 为1到10之间或更大的整数,并且其中在步骤(2)、(5)、(6)和(9)中, x 为相同的整数。

[0914] 如同合成方法5一样,在基于版本5的变化方法的情况下,应注意,通用核苷酸在步骤(1)和(2)期间占据支架多核苷酸中的位置 $n+2$ (或 $n+2+x$,视具体变化方法而定),而通用核苷酸在相同合成循环中占据连接多核苷酸中的位置 $n+3$ (或 $n+3+x$,视具体变化方法而定)。这是因为在那个合成的循环中,在步骤(5)中裂解的双股支架多核苷酸在将其添加之后具备预定义序列的核苷酸,并且因为连接多核苷酸具备与预定义序列的核苷酸搭配的核苷酸;并且此外因为如本文中所定义,所以“ n ”始终是指合成股中的核苷酸位置,所述合成股中的核苷酸位置由掺入于所述循环中的预定义序列的核苷酸占据(或将由其占据)或是指在支持股中与其相对的核苷酸位置。因此,在合成的任何给定循环结束时,紧接在连接步骤(5)之后,由通用核苷酸占据的位置将为 $n+3$ (或 $n+3+x$)并且将已从 $n+2$ (或对应地从 $n+2+$

x) 移动,通用核苷酸将在步骤(1)中占据所述位置。连接步骤(5)的产物(图5中对应于“连接产物”标记的结构)将为用于下一合成循环的支架多核苷酸。当将连接产物视为用于下一合成循环的支架多核苷酸时,应理解,由通用核苷酸占据的位置现在再次被称作位置 $n+2$ (或 $n+2+x$)(参看506),而非 $n+3$ (或 $n+3+x$)(参看505)。因此,在合成方法版本5的变体中,由通用核苷酸在合成的任何给定循环开始时占据的位置(参看501、506等)始终被称作位置 $n+2$ (或 $n+2+x$,这取决于特定变化方法,其中 x 为1到10之间的整数或更大),并且新掺入在所述循环中的核苷酸始终占据被称作 n 的位置。

[0915] 实例

[0916] 以下实例对用于合成根据本发明的多核苷酸或寡核苷酸的方法以及用于所述方法的示例性构建体提供支持。实例不限制本发明。

[0917] 除实例13以外,以下实例描述根据与本发明的合成方法相关但不在根据本发明的合成方法的范围内的反应流程的合成方法。

[0918] 实例展现进行合成反应的能力,其涉及以下步骤:将预定义序列的核苷酸添加到支架多核苷酸的合成股;支架多核苷酸在由通用核苷酸所定义的裂解位点处的裂解;和包括用于预定义序列的所添加核苷酸的配偶体核苷酸的连接多核苷酸的连接;以及用于产生用于下一合成循环中的裂解位点的新通用核苷酸。本发明的方法以修改方式掺入这些步骤。因此,除实例13之外,以下实例提供本文所定义的本发明的方法的说明性支持。实例13提供关于根据本发明的方法,例如本发明的合成方法版本1、2和4(分别为图1、图2和图4)使用掺入步骤通过终止子X DNA聚合酶掺入3'-O-经修饰的-dNTP的数据。

[0919] 在以下实例中,并且在对应图12到50中,参考合成方法“版本1、2和3”或“版本1、2或3化学方法”将根据分别在图6、7和8中阐述的反应示意图而非根据在图1到5中的任一者中阐述的反应示意图或在本文中相同的描述来解释。将根据本发明的合成方法解释实例13和图51。确切地说,根据本发明的合成方法1、2和4和相关反应示意图在图1、2和4中陈述,并且更确切地说此类方法的掺入步骤3。

[0920] 实例1:不存在辅助股的合成。

[0921] 所述实例描述了使用4个步骤合成多核苷酸:

[0922] 在部分双股DNA上掺入3'-O-修饰的dNTP,裂解,连接和去除保护基,第一步发生在通用核苷酸的对面,在这种特殊情况下其是肌苷。

[0923] 第1步:掺入

[0924] 第一步描述了通过DNA聚合酶的酶促掺入将3'-O-保护的单核苷酸受控的添加到寡核苷酸中(图12a)。

[0925] 材料和方法

[0926] 材料

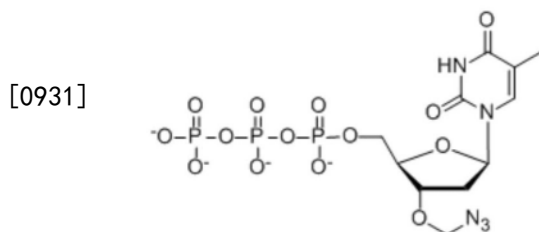
[0927] 1.3'-O-修饰的dNTP根据博士论文中描述的方案内部合成:Jian Wu:Molecular Engineering of Novel Nucleotide Analogues for DNA Sequencing by Synthesis, Columbia University,2008。用于合成的方案还描述于专利申请公开:J.William Efcavitch,Juliesta E.Sylvester,用于聚脱氧核苷酸合成的经修饰的模板独立性酶(Modified Template-Independent Enzymes for Polydeoxynucleotide Synthesis),《分子集合体(Molecular Assemblies)》US2016/0108382A1。

[0928] 2.寡核苷酸是内部设计的并从Sigma-Aldrich获得(图12h)。以100 μ M的浓度制备储备溶液。

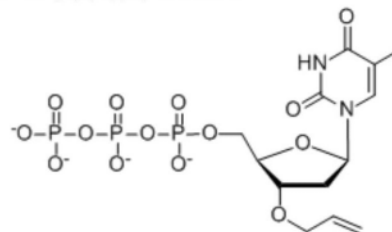
[0929] 3.使用Therminator IX DNA聚合酶,其由New England BioLabs工程化,具有增强的掺入3'-O-修饰的dNTP的能力。然而,可以使用任何可以掺入修饰的dNTP的DNA聚合酶。

[0930] 测试了两种类型的可逆终止剂:

3'-O-叠氮基甲基-dTTP:



3'-O-烯丙基-dTTP:



[0932] 方法

[0933] 1.将2 μ l的10x Thermopol®缓冲液(20mM Tris-HCl、10mM(NH₄)₂SO₄、10mM KCl、2mM MgSO₄、0.1% Triton®X-100, pH 8.8, 新英格兰生物实验室(New England BioLab))与12.25 μ l 无菌去离子水(ELGA VEOLIA)在1.5ml Eppendorf管中混合。

[0934] 2.将0.5 μ l的10 μ M引物(合成股)(5pmol, 1当量)(SEQ ID NO:1, 图12h)和0.75 μ l的10 μ M模板(支持股)(6pmol, 1.5当量)(SEQ ID NO:2, 图12h)加入到反应混合物中。

[0935] 3.加入3'-O-修饰的-dTTP(2 μ l的100 μ M)和MnCl₂(1 μ l的40mM)。

[0936] 4.然后加入1.5 μ l的Therminator IX DNA聚合酶(15U, 新英格兰生物实验室)。然而,可以使用任何可以掺入修饰的dNTP的DNA聚合酶。

[0937] 5.将反应物在65°C培育20分钟。

[0938] 6.将反应物通过加入TBE-尿素样品缓冲液(Novex)停止。

[0939] 7.将反应物在聚丙烯酰胺凝胶(15%)上用TBE缓冲液分离,并通过ChemiDoc MP成像系统(BioRad)进行可视化。

[0940] 凝胶电泳和DNA可视化:

[0941] 1.在无菌1.5ml Eppendorf管中将5 μ l反应混合物加入5 μ l的TBE-尿素样品缓冲液(Novex)中,并使用加热ThermoMixer(Eppendorf)加热至95°C,持续5分钟。

[0942] 2.然后将5 μ l样品加载到15%TBE-尿素凝胶1.0mmx10孔(Invitrogen)的孔中,所述凝胶含有预热的1X TBE缓冲液Thermo Scientific(89mM Tris, 89mM硼酸和2mM EDTA)。

[0943] 3.将X-cell sure lock模块(Novex)固定到位并在以下条件下进行电泳;260V, 90Amp, 室温下40分钟。

[0944] 4.将凝胶通过使用Cy3 LEDS的ChemiDoc MP(BioRad)可视化。可视化和分析在Image lab 2.0平台上进行。

[0945] 结果

[0946] 来自新英格兰生物实验室的定制工程化Therminator IX DNA聚合酶是一种有效的DNA聚合酶,其能够与通用核苷酸,例如肌苷相对地掺入3'-O-修饰的dNTP(图12b-c)。

[0947] 相对肌苷有效地掺入发生在65°C的温度(图12d-e)。

[0948] 相对肌苷掺入3'-O-修饰的dTTP需要存在Mn²⁺离子(图12f-g)。成功转换在图12c、

e、g和h中以粗体标记。

[0949] 结论

[0950] 3-0-修饰的dTTP与肌苷相对地掺入可用新英格兰生物实验室的定制工程化Therminator IX DNA聚合酶在Mn²⁺离子存在下和在65°C的温度下以特别高的效率实现。

[0951] 第二步:裂解

[0952] 第二步描述了用hAAG/Endo VIII或hAAG/化学碱两步裂解多核苷酸(图13a)。

[0953] 材料和方法

[0954] 材料

[0955] 1.实例1中使用的寡核苷酸是内部设计的并由Sigma Aldrich合成(参见图13(e)的序列表)。

[0956] 2.使用无菌蒸馏水(ELGA VEOLIA)将寡核苷酸稀释到100μM的储备浓度。

[0957] 方法

[0958] 使用以下程序对寡核苷酸进行裂解反应:

[0959] 1.用移液管(Gilson)将41μl无菌蒸馏水(ELGA VEOLIA)转移到1.5ml Eppendorf管中。

[0960] 2.然后将5μl的10X ThermoPol®反应缓冲液NEB(20mM Tris-HCl、10mM (NH₄)₂SO₄、10mM KCl、2mM MgSO₄、0.1% Triton®X-100, pH 8.8)加入同一Eppendorf管中。

[0961] 3.将1μl每种寡核苷酸(图13e);模板(SEQ ID NO:3)或任何荧光标记的长寡股,具有T(SEQ ID NO:4)的引物和对照(SEQ ID NO:5),均为5pmol添加到同一管中。

[0962] 4.将1μl人类烷基腺嘌呤DNA糖基化酶(hAAG)NEB(10单位/μl)添加到同一管中。

[0963] 5.然后将反应混合物通过用移液管重悬温和混合,13,000rpm下离心5秒钟并在37°C培育1小时。

[0964] 6.通常在培育时间过去之后,将反应物通过酶促热失活(即65°C下20分钟)终止。

[0965] 在环境条件下纯化。使用下面概述的方案纯化样品混合物:

[0966] 1.将500μl缓冲液PNI QIAGEN(5M氯化胍)加入到样品中并通过用移液管重悬浮温和混合。

[0967] 2.将混合物转移到QIAquick旋转柱(QIAGEN)并以6000rpm离心1分钟。

[0968] 3.离心后,弃去流过液,向旋转柱中加入750μl缓冲液PE QIAGEN(10mM Tris-HCl pH7.5和80%乙醇),并以6000rpm离心1分钟。

[0969] 4.将流过液丢弃并将旋转柱以13000rpm离心另外的1分钟以去除残余的PE缓冲液。

[0970] 5.然后将旋转柱置于无菌的1.5ml Eppendorf管中。

[0971] 6.对于DNA洗脱,将50μl缓冲液EB QIAGEN(10mM Tris.Cl, pH 8.5)加入柱膜中心并在室温下静置1分钟。

[0972] 7.然后将管以13000rpm离心1分钟。测量洗脱的DNA浓度并储存在-20°C下以备后用。

[0973] 使用以下方案测定纯化的DNA浓度的测量:

[0974] 1.加入2μl灭菌蒸馏水(ELGA VEOLIA)到基座平衡NanoDrop one(Thermo Scientific)。

- [0975] 2.平衡后,用不起毛的镜片清洁纸(Whatman)轻轻擦去水。
- [0976] 3.通过加入2 μ l缓冲液EB QIAGEN(10mM Tris·Cl, pH 8.5)掩蔽(blank)NanoDrop one。然后在掩蔽后重复第2步。
- [0977] 4.通过将2 μ l样品添加到基座上并在触摸屏上选择测量图标来测量DNA浓度。
- [0978] 使用以下程序进行产生的无碱基位点的裂解:
- [0979] 1.将2 μ l (10-100ng/ μ l) DNA加入无菌的1.5ml Eppendorf管中。
- [0980] 2.在同一管中加入40 μ l (0.2M) NaOH或1.5 μ l Endo VIII NEB(10单位/ μ l)和5 μ l的10X反应缓冲液NEB(10mM Tris-HCl, 75mM NaCl, 1mM EDTA, pH 8在25 $^{\circ}$ C)并通过再悬浮温和混合和在13000rpm离心5秒。
- [0981] 3.将得到的混合物在室温下培育5分钟以使NaOH处理样品,同时将Endo VIII反应混合物在37 $^{\circ}$ C下培育1小时。
- [0982] 4.培育时间过去之后,将反应混合物用如上面概述的纯化方案的步骤1-7纯化。
- [0983] 凝胶电泳和DNA可视化:
- [0984] 1.将5 μ l的DNA和TBE-尿素样品缓冲液(Novex)加入无菌1.5ml Eppendorf管中,并使用加热热块(Eppendorf)加热至95 $^{\circ}$ C,持续2分钟。
- [0985] 2.然后DNA混合物加载到15%TBE-尿素凝胶1.0mmx10孔(Invitrogen)的孔中,所述凝胶含有预热的1X TBE缓冲液Thermo Scientific(89mM Tris, 89mM硼酸和2mM EDTA)。
- [0986] 3.将X-cell sure lock模块(Novex)固定到位并在以下条件下进行电泳;260V, 90Amp, 室温下40分钟。
- [0987] 4.采用使用Cy3 LEDS的ChemiDoc MP (BioRad)进行检测和DNA在凝胶中的可视化。可视化和分析在Image lab 2.0平台上进行。
- [0988] 结果和结论
- [0989] 无辅助股的裂解反应展示约7%:93%的裂解与未裂解DNA比率的低百分比产率(图13b-d)。
- [0990] 裂解结果显示,在此具体实例中,并且基于所用的特定试剂,与阳性对照相比,在不存在辅助股的情况下获得了低产率的裂解DNA。此外,与EndoVIII裂解相比,使用化学碱来裂解无碱基位点的时间消耗较少。
- [0991] 第3步:连接
- [0992] 第三步描述了在不存在辅助股的情况下用DNA连接酶连接多核苷酸。图14中显示了示意图。
- [0993] 材料和方法
- [0994] 材料
- [0995] 1.实例1中使用的寡核苷酸是内部设计的并由Sigma Aldrich合成(参见图14c的序列列表)。
- [0996] 2.使用无菌蒸馏水(ELGA VEOLIA)将寡核苷酸稀释到100 μ M的储备浓度。
- [0997] 方法
- [0998] 使用以下程序进行寡核苷酸的连接反应:
- [0999] 1.用移液管(Gilson)将16 μ l无菌蒸馏水(ELGA VEOLIA)转移到1.5ml Eppendorf管中。

[1000] 2.然后将10 μ L的2X快速连接反应缓冲液NEB(132mM Tris-HCl、20mM MgCl₂、2mM二硫苏糖醇、2mM ATP、15%聚乙二醇(PEG6000)和pH 7.6,在25°C)加入到相同的Eppendorf管中。

[1001] 3.将1 μ L每种寡核苷酸(图14c);TAMRA或任何荧光标记的磷酸股(SEQ ID NO:7),具有T(SEQ ID NO:8)的引物和肌苷股(SEQ ID NO:9),均为5pmol添加到同一管中。

[1002] 4.将1 μ L的Quick T4 DNA连接酶NEB(400单位/ μ L)加入同一管中。

[1003] 5.然后将反应混合物通过用移液管重悬温和混合,13,000rpm下离心5秒钟并在室温培育20分钟。

[1004] 6.通常在培育时间过去后,加入TBE-尿素样品缓冲液(Novex)终止反应。

[1005] 7.使用如上所述的纯化步骤1-7中概述的方案纯化反应混合物。

[1006] 使用以下方案测定纯化的DNA浓度:

[1007] 1.加入2 μ L灭菌蒸馏水(ELGA VEOLIA)到基座平衡NanoDrop one(Thermo Scientific)。

[1008] 2.平衡后,用不起毛的镜片清洁纸(Whatman)轻轻擦去水。

[1009] 3.通过加入2 μ L缓冲液EB QIAGEN(10mM Tris.Cl,pH 8.5)掩蔽(blank)NanoDrop one,然后在掩蔽后重复步骤2。

[1010] 4.通过将2 μ L样品加到基座上并在触摸屏上选择测量图标来测量DNA浓度。

[1011] 5.将纯化的DNA在聚丙烯酰胺凝胶上运行,并按照上述步骤5-8中的程序可视化。没有引入条件或试剂的变化。

[1012] 结果和结论

[1013] 在所述具体实例中,并且基于所用的特定试剂,在没有辅助股的情况下,在室温(24°C)下用DNA连接酶(在所述特定情况下为快速T4 DNA连接酶)连接寡核苷酸产生减少量的连接产物(图14b)。

[1014] 实施例2用辅助股的版本1化学.

[1015] 所述实施例描述了使用4个步骤合成多核苷酸:掺入从切口位点裂解3'-O-修饰的dNTP,连接和去除保护基,其中第一步与通用核苷酸相对地进行,在所述特定情况下通用核苷酸为肌苷。所述方法使用辅助股,其提高了连接和裂解步骤的效率。

[1016] 第1步:掺入

[1017] 第一步描述了通过DNA聚合酶的酶促掺入将3'-O-保护的单核苷酸受控的添加到寡核苷酸中(图15a)。

[1018] 材料和方法

[1019] 材料

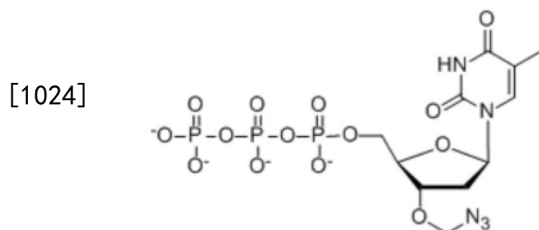
[1020] 1.根据描述于以下的方案内部合成3'-O-经修饰的dNTP:博士论文Jian Wu:用于通过合成进行DNA测序的新颖核苷酸类似物的分子工程改造(Molecular Engineering of Novel Nucleotide Analogues for DNA Sequencing by Synthesis).哥伦比亚大学,2008年。用于合成的方案还描述于专利申请公开:J.William Efcavitch,Juliesta E.Sylvester,用于聚脱氧核苷酸合成的经修饰的模板独立性酶(Modified Template-Independent Enzymes for Polydeoxynucleotide Synthesis),《分子集合体(Molecular Assemblies)》US2016/0108382A1。

[1021] 2.寡核苷酸是内部设计的并从Sigma-Aldrich获得。以100 μ M的浓度制备储备溶液。寡核苷酸显示在图15b中。

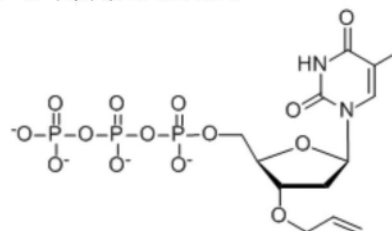
[1022] 3.使用Therminator IX DNA聚合酶,其由New England BioLabs工程化,具有增强的掺入3'-O-修饰的dNTP的能力。

[1023] 测试了两种类型的可逆终止剂:

3'-O-叠氮基甲基-dTTP:



3'-O-烯丙基-dTTP:



[1025] 方法

[1026] 1.将2 μ l的10xThermopol®缓冲液(20mM Tris-HCl、10mM(NH₄)₂SO₄、10mM KCl、2mM MgSO₄、0.1% Triton®X-100, pH 8.8, 新英格兰实验室)与10.25 μ l无菌去离子水(ELGA VEOLIA)在1.5ml Eppendorf管中混合。

[1027] 2.将0.5 μ l的10 μ M引物(5pmol, 1当量)(SEQ ID NO:10, 图15(b)中的表)、0.75 μ l的10 μ M模板(6pmol, 1.5当量)(SEQ ID NO:11, 图15(b)中的表)、2 μ l的10 μ M辅助股(SEQ ID NO:12, 图15(b)中的表)加入到反应混合物中。

[1028] 3.加入3'-O-修饰的-dTTP(2 μ l的100 μ M)和MnCl₂(1 μ l的40mM)。

[1029] 4.然后加入1.5 μ l的Therminator IX DNA聚合酶(15U, New England BioLabs)。

[1030] 5.将反应物在65°C培育20分钟。

[1031] 6.将反应物通过加入TBE-尿素样品缓冲液(Novex)停止。

[1032] 7.将反应物在聚丙烯酰胺凝胶(15%)上用TBE缓冲液分离,并通过ChemiDoc MP成像系统(BioRad)进行可视化。

[1033] 凝胶电泳和DNA可视化:

[1034] 1.在无菌1.5ml Eppendorf管中将5 μ l反应混合物加入5 μ l的TBE-尿素样品缓冲液(Novex)中,并使用加热ThermoMixer(Eppendorf)加热至95°C,持续5分钟。

[1035] 2.然后将5 μ l样品加载到15%TBE-尿素凝胶1.0mmx10孔(Invitrogen)的孔中,所述凝胶含有预热的1X TBE缓冲液Thermo Scientific(89mM Tris, 89mM硼酸和2mM EDTA)。

[1036] 3.将X-cell sure lock模块(Novex)固定到位并在以下条件下进行电泳;260V, 90Amp, 室温下40分钟。

[1037] 4.将凝胶通过使用Cy3 LEDS的ChemiDoc MP(BioRad)可视化。可视化和分析在Image lab 2.0平台上进行。

[1038] 可以根据上述方案研究掺入步骤。

[1039] 第二步:裂解

[1040] 第二步描述了用hAAG/Endo VIII或hAAG/化学碱(x2)的两步裂解多核苷酸(图16a)。

[1041] 材料和方法

[1042] 材料

[1043] 1.实例2中使用的寡核苷酸是内部设计的并由Sigma Aldrich合成(参见图16f序列)。

[1044] 2.使用无菌蒸馏水(ELGA VEOLIA)将寡核苷酸稀释到100 μ M的储备浓度。

[1045] 方法

[1046] 使用以下程序进行寡核苷酸的裂解反应:

[1047] 1.用移液管(Gilson)将41 μ l无菌蒸馏水(ELGA VEOLIA)转移到1.5ml Eppendorf管中。

[1048] 2.然后将5 μ l的10X ThermoPol®反应缓冲液NEB(20mM Tris-HCl、10mM (NH₄)₂SO₄、10mM KCl、2mM MgSO₄、0.1% Triton® X-100, pH 8.8)加入同一Eppendorf管中。

[1049] 3.将1 μ l每种寡核苷酸(图16f);模板(SEQ ID NO:13)或任何荧光标记的长寡股,具有T(SEQ ID NO:14)的引物,对照(SEQ ID NO:15)和辅助股(SEQ ID NO:16),均为5pmol添加到同一管中。

[1050] 4.将1 μ l人烷基腺嘌呤DNA糖基化酶(hAAG)NEB(10单位/ μ l)加入同一管中。

[1051] 5.在使用替代碱的反应中,加入1 μ l的人烷基腺嘌呤DNA糖基化酶(hAAG)NEB(100单位/ μ l)。

[1052] 6.然后将反应混合物通过用移液管重悬温和混合,13,000rpm下离心5秒钟并在37°C培育1小时。

[1053] 7.通常在培育时间过去之后,将反应物通过酶促热失活(即65°C下20分钟)终止。

[1054] 在环境条件下纯化。使用下面概述的方案纯化样品混合物:

[1055] 1.将500 μ l缓冲液PNI QIAGEN(5M氯化胍)加入到样品中并通过用移液管重悬浮温和混合。

[1056] 2.将混合物转移到QIAquick旋转柱(QIAGEN)并以6000rpm离心1分钟。

[1057] 3.离心后,弃去流过液,向旋转柱中加入750 μ l缓冲液PE QIAGEN(10mM Tris-HCl pH7.5和80%乙醇),并以6000rpm离心1分钟。

[1058] 4.将流过液丢弃并将旋转柱以13000rpm离心另外的1分钟以去除残余的PE缓冲液。

[1059] 5.然后将旋转柱置于无菌的1.5ml Eppendorf管中。

[1060] 6.对于DNA洗脱,将50 μ l缓冲液EB QIAGEN(10mM Tris.CL, pH 8.5)加入柱膜中心并在室温下静置1分钟。

[1061] 7.然后将管以13000rpm离心1分钟。测量洗脱的DNA浓度并储存在-20°C下以备后用。

[1062] 使用以下方案测定纯化的DNA浓度:

[1063] 1.加入2 μ l灭菌蒸馏水(ELGA VEOLIA)到基座平衡NanoDrop one(Thermo Scientific)。

[1064] 2.平衡后,用不起毛的镜片清洁纸(Whatman)轻轻擦去水。

[1065] 3.通过加入2 μ l缓冲液EB QIAGEN(10mM Tris.CL, pH 8.5)掩蔽(blank)NanoDrop one。然后在掩蔽后重复步骤2。

[1066] 4.通过将2 μ l样品加到基座上并在触摸屏上选择测量图标来测量DNA浓度。

[1067] 使用以下程序进行产生的无碱基位点的裂解:

[1068] 1. 将2 μ l (10-100ng/ μ l) DNA加入无菌的1.5ml Eppendorf管中。

[1069] 2. 在同一管中加入40 μ l (0.2M) NaOH或1.5 μ l Endo VIII NEB (10单位/ μ l) 和5 μ l的10X反应缓冲液NEB (10mM Tris-HCl, 75mM NaCl, 1mM EDTA, pH 8在25 $^{\circ}$ C下) 并通过再悬浮温和混合和在13000rpm离心5秒。

[1070] 3. 将得到的混合物在室温下培育5分钟以使0.2M NaOH处理样品, 同时将Endo VIII反应混合物在37 $^{\circ}$ C下培育1小时。

[1071] 4. 培育时间过去之后, 将反应混合物用如上面所述的纯化方案的步骤1-7纯化。

[1072] 使用以下程序进行使用替代碱性化学品的产生的无碱基位点的裂解:

[1073] 1. 将1 μ l (10-100ng/ μ l) DNA加入无菌的1.5ml Eppendorf管中。然后将在室温下用乙酸溶液sigma (99.8%) 缓冲至pH7.4的2 μ l的N,N'-二甲基乙二胺Sigma (100mM) 加入同一管中。

[1074] 2. 将20 μ l 无菌蒸馏水 (ELGA VEOLIA) 加入管中, 通过重悬浮轻轻混合和在13000rpm离心5秒。

[1075] 3. 将所得混合物在37 $^{\circ}$ C下培育20分钟。

[1076] 4. 培育时间过去之后, 将反应混合物用如上面所述的纯化方案的步骤1-7纯化。

[1077] 凝胶电泳和DNA可视化:

[1078] 1. 将5 μ l的DNA和TBE-尿素样品缓冲液 (Novex) 加入无菌1.5ml Eppendorf管中, 并使用加热热块 (Eppendorf) 加热至95 $^{\circ}$ C, 持续2分钟。

[1079] 2. 然后DNA混合物加载到15% TBE-尿素凝胶1.0mmx10孔 (Invitrogen) 的孔中, 所述凝胶含有预热的1X TBE缓冲液Thermo Scientific (89mM Tris, 89mM硼酸和2mM EDTA)。

[1080] 3. 将X-cell sure lock模块 (Novex) 固定到位并在以下条件下进行电泳; 260V, 90Amp, 室温下40分钟。

[1081] 4. 采用使用Cy3 LEDS的ChemIDoc MP (BioRad) 进行检测和DNA在凝胶中的可视化。可视化和分析在Image lab 2.0平台上进行。

[1082] 结果

[1083] 通过hAAG DNA糖基化酶在包括通用核苷酸 (在所述特定情况下为肌苷) 的裂解位点处的裂解效率从辅助股不存在时的10%显著增加至辅助股存在下的50% (图16b)。hAAG和核酸内切酶VIII以比hAAG和NaOH (50%) 更低的效率 (10%) 裂解肌苷。在使用带切口的DNA的所述系统中, 使用0.2M NaOH的化学裂解显示对于AP位点的裂解优于内切核酸酶VIII (图16c)。在中性pH下的温和N,N'-二甲基乙二胺具有如0.2M NaOH高的效率裂解无碱基位点, 并因此与内切核酸酶VIII和NaOH相比是优选的 (图16d-e)。

[1084] 结论

[1085] 对于裂解含有肌苷的DNA, 评估了三种方法。在实例2中对于DNA裂解研究了一种完全的酶促方法-hAAG/核酸内切酶VIII, 以及两种结合化学和酶促裂解的方法-hAAG/NaOH和hAAG/二甲基乙二胺。

[1086] hAAG/NaOH结果显示, 与不存在辅助股 (10%) 相比, 在辅助股存在下裂解DNA的产率 (50%) 高得多。在这些具体的实例中, 并且基于所用的特定试剂, 辅助股提高了DNA裂解的产率。

[1087] 在辅助股存在下,与NaOH(50%)相比,使用内切核酸酶VIII作为NaOH的替代物的酶促裂解效率较低(10%)。

[1088] 包含替代的温和化学碱N,N'-二甲基乙二胺导致AP位点的高裂解效率,与NaOH一样有效,并且与添加10x hAAG酶一起对裂解的DNA具有显著增加(参见图16e)。

[1089] 第3步:连接

[1090] 第三步描述了在辅助股存在下用DNA连接酶连接多核苷酸。图17a中示出了图解说

[1091] 材料和方法

[1092] 材料

[1093] 1.寡核苷酸是内部设计的并由Sigma Aldrich合成(参见图17d序列)。

[1094] 2.使用无菌蒸馏水(ELGA VEOLIA)将寡核苷酸稀释到100 μ M的储备浓度。

[1095] 方法

[1096] 使用以下程序进行寡核苷酸的连接反应:

[1097] 1.用移液管(Gilson)将16 μ l无菌蒸馏水(ELGA VEOLIA)转移到1.5ml Eppendorf管中。

[1098] 2.然后将10 μ L的2X快速连接反应缓冲液NEB(132mM Tris-HCl、20mM MgCl₂、2mM二硫苏糖醇、2mM ATP,15%聚乙二醇(PEG6000)和pH 7.6,在25°C)加入到相同的Eppendorf管中。

[1099] 3.将1 μ l每种寡核苷酸(图17d);TAMRA或任何荧光标记的磷酸酯股(SEQ ID NO:18),具有T(SEQ ID NO:19)和肌苷股(SEQ ID NO:20)和辅助股(SEQ ID NO:21)的引物,均为5pmol加入到同一管中。

[1100] 4.将1 μ l的Quick T4 DNA连接酶NEB(400单位/ μ l)加入同一管中。

[1101] 5.然后将反应混合物通过用移液管重悬温和混合,13,000rpm下离心5秒钟并在室温培育20分钟。

[1102] 6.通常在培育时间过去后,加入TBE-尿素样品缓冲液(Novex)终止反应。

[1103] 7.使用如上所述的纯化步骤1-7中概述的方案纯化反应混合物。

[1104] 使用以下方案测定纯化的DNA浓度:

[1105] 1.加入2 μ l灭菌蒸馏水(ELGA VEOLIA)到基座平衡NanoDrop one(Thermo Scientific)。

[1106] 2.平衡后,用不起毛的镜片清洁纸(Whatman)轻轻擦去水。

[1107] 3.通过加入2 μ l缓冲液EB QIAGEN(10mM Tris.CL,pH 8.5)掩蔽(blank)NanoDrop one。然后在掩蔽后重复步骤2。

[1108] 4.通过将2 μ l样品加到基座上并在触摸屏上选择测量图标来测量DNA浓度。

[1109] 5.将纯化的DNA在聚丙烯酰胺凝胶上运行,并按照上述步骤5-8中的程序可视化。没有引入条件或试剂的变化。

[1110] 结果和结论

[1111] 在所述具体实施例中,并且基于所使用的特定试剂,在没有辅助股的情况下观察到降低的连接活性(图17b),而在辅助股存在下连接以高效率进行(图17c)并且产物以高产率形成。

[1112] 实例3用辅助股的版本2化学.

[1113] 所述实施例描述了使用4个步骤合成多核苷酸:在部分双股DNA上掺入3'-O-修饰的dNTP;在第一步掺入与天然互补核苷酸相对地进行的情况下裂解、连接和去除保护基,所述天然互补核苷酸位于支持股中与通用核苷酸相邻,在所述特定情况下通用核苷酸为肌苷。

[1114] 第1步:掺入

[1115] 材料和方法

[1116] 材料

[1117] 第一步描述了通过DNA聚合酶的酶促掺入将3'-O-保护的单核苷酸受控的添加到寡核苷酸中(图18a)。

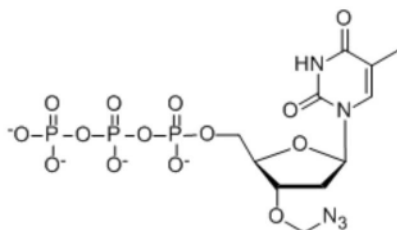
[1118] 1.根据描述于以下的方案内部合成3'-O-经修饰的dNTP:博士毕业论文Jian Wu:用于通过合成进行DNA测序的新颖核苷酸类似物的分子工程改造。哥伦比亚大学,2008年。用于合成的方案还描述于专利申请公开:J.William Efcavitch,Juliesta E.Sylvester,用于聚脱氧核苷酸合成的经修饰的模板独立性酶(Modified Template-Independent Enzymes for Polydeoxynucleotide Synthesis),《分子集合体(Molecular Assemblies)》US2016/0108382A1。

[1119] 2.寡核苷酸是内部设计的并从Sigma-Aldrich获得(图18j)。以100 μ M的浓度制备储备溶液。

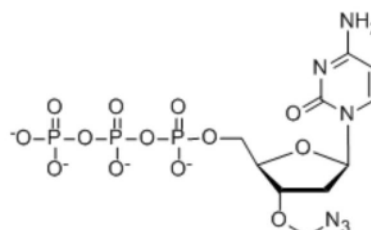
[1120] 3.使用Therminator IX DNA聚合酶,其由New England BioLabs工程化,具有增强的掺入3'-O-修饰的dNTP的能力。

[1121] 所有dNTP的3'-O-叠氮甲基可逆终止子独立测试其掺入:

3'-O-叠氮基甲基-dTTP:

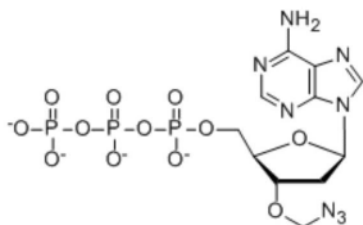


3'-O-叠氮基甲基-dCTP:

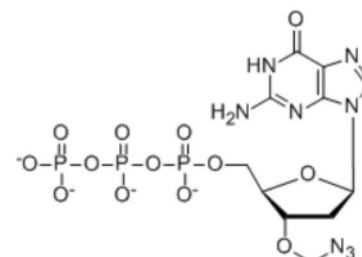


[1122]

3'-O-叠氮基甲基-dATP:



3'-O-叠氮基甲基-dGTP:



[1123] 方法

[1124] 1.将2 μ l的10x Thermopol®缓冲液(20mM Tris-HCl、10mM (NH₄)₂SO₄、10mM KCl、2mM MgSO₄、0.1% Triton® X-100, pH 8.8, 新英格兰实验室)与12.25 μ l无菌去离子水(ELGA

VEOLIA) 在1.5ml Eppendorf管中混合。

[1125] 2. 将0.5 μ l的10 μ M引物(5pmol, 1当量)(SEQ ID NO:22, 图18j)和0.75 μ l的10 μ M模板-A/G/T/C(6pmol, 1.5当量)(SEQ ID NOS:23-26, 图18j)以及1 μ l的10 μ M辅助股-T/C/A/G(10pmol, 2当量)(SEQ ID NOS:27-30, 图18j)加入反应混合物中。

[1126] 3. 加入3'-O-修饰的-dTTP/dCTP/dATP/dGTP(2 μ l的100 μ M)和MnCl₂(1 μ l的40mM)。

[1127] 4. 然后加入1.5 μ l的Therminator IX DNA聚合酶(15U, 新英格兰实验室)。

[1128] 5. 将反应物在65°C培育20分钟。

[1129] 6. 将反应物通过加入TBE-尿素样品缓冲液(Novex)停止。

[1130] 7. 将反应物在聚丙烯酰胺凝胶(15%)上用TBE缓冲液分离, 并通过ChemiDoc MP成像系统(BioRad)进行可视化。

[1131] 凝胶电泳和DNA可视化:

[1132] 1. 在无菌1.5ml Eppendorf管中将5 μ l反应混合物加入5 μ l的TBE-尿素样品缓冲液(Novex)中, 并使用加热ThermoMixer(Eppendorf)加热至95°C, 持续5分钟。

[1133] 2. 然后将5 μ l样品加载到15%TBE-尿素凝胶1.0mmx10孔(Invitrogen)的孔中, 所述凝胶含有预热的1X TBE缓冲液Thermo Scientific(89mM Tris, 89mM硼酸和2mM EDTA)。

[1134] 3. 将X-cell sure lock模块(Novex)固定到位并在以下条件下进行电泳260V, 90Amp, 室温下40分钟。

[1135] 4. 将凝胶通过使用Cy3 LEDS的ChemiDoc MP(BioRad)可视化。可视化和分析在Image lab 2.0平台上进行。

[1136] 结果和结论

[1137] 关于使用Therminator IX DNA聚合酶评估3'-O-叠氮甲基-dTTP掺入温度, 结果表明在用于连接的辅助股存在下3'-O-叠氮甲基-dTTP的掺入在5分钟后达到90%。在37°C和47°C下20分钟后, 10%的引物保持未延伸。

[1138] Therminator IX DNA聚合酶在2mM的Mn²⁺离子和37°C的温度下提供了在辅助股的存在下与DNA中互补碱基相对地高效率(从前一个循环开始的连接步骤)掺入3'-O-修饰的dNTP的良好条件。

[1139] 第二步: 裂解

[1140] 第二步描述了用核酸内切酶V一步裂解多核苷酸(图19a)。

[1141] 材料和方法

[1142] 材料

[1143] 1. 实例3中使用的寡核苷酸是内部设计的并由Sigma Aldrich合成(参见图19d的序列表)。

[1144] 2. 使用无菌蒸馏水(ELGA VEOLIA)将寡核苷酸稀释到100 μ M的储备浓度。

[1145] 方法

[1146] 使用以下程序进行寡核苷酸的裂解反应:

[1147] 1. 用移液管(Gilson)将41 μ l无菌蒸馏水(ELGA VEOLIA)转移到1.5ml Eppendorf管中。

[1148] 2. 然后将5 μ l的10X Reaction buffer® NEB(50mM的醋酸钾、20mM的Tris-乙酸盐、10mM的醋酸镁、1mM的DTT, pH值7.9在25°C下)加入到相同的Eppendorf管中。

[1149] 3. 将1 μ l每种寡核苷酸(图19d);模板(SEQ ID NO:31)或任何荧光标记的长寡股,具有T的引物(SEQ ID NO:32)和对照(SEQ ID NO:33)以及辅助股(SEQ ID NO:34),均为5pmol加入到同一管中。

[1150] 4. 将1 μ l人核酸内切酶V(Endo V)NEB(10单位/ μ l)加入到同一管中。

[1151] 5. 然后将反应混合物通过用移液管重悬温和混合,13,000rpm下离心5秒钟并在37 $^{\circ}$ C培育1小时。

[1152] 6. 通常在培育时间过去之后,将反应物通过酶促热失活(即65 $^{\circ}$ C下20分钟)终止。

[1153] 使用下面概述的方案纯化样品混合物:

[1154] 1. 将500 μ l缓冲液PNI QIAGEN(5M氯化胍)加入到样品中并通过用移液管重悬浮温和混合。

[1155] 2. 将混合物转移到QIAquick旋转柱(QIAGEN)并以6000rpm离心1分钟。

[1156] 3. 离心后,弃去流过液,向旋转柱中加入750 μ l缓冲液PE QIAGEN(10mM Tris-HCl pH7.5和80%乙醇),并以6000rpm离心1分钟。

[1157] 4. 将流过液丢弃并将旋转柱以13000rpm再离心1分钟以去除残余的PE缓冲液。

[1158] 5. 然后将旋转柱置于无菌的1.5ml Eppendorf管中。

[1159] 6. 对于DNA洗脱,将50 μ l缓冲液EB QIAGEN(10mM Tris.CL,pH 8.5)加入柱膜中心并在室温下静置1分钟。

[1160] 7. 然后将管以13000rpm离心1分钟。测量洗脱的DNA浓度并储存在-20 $^{\circ}$ C下以备后用。

[1161] 使用以下方案测定纯化的DNA浓度:

[1162] 1. 加入2 μ l灭菌蒸馏水(ELGA VEOLIA)到基座平衡NanoDrop one(Thermo Scientific)。

[1163] 2. 平衡后,用不起毛的镜片清洁纸(Whatman)轻轻擦去水。

[1164] 3. 通过加入2 μ l缓冲液EB QIAGEN(10mM Tris.CL,pH 8.5)掩蔽(blank)NanoDrop one。然后在掩蔽后重复第2步。

[1165] 4. 通过将2 μ l样品加到基座上并在触摸屏上选择测量图标来测量DNA浓度。

[1166] 凝胶电泳和DNA可视化:

[1167] 1. 将5 μ l的DNA和TBE-尿素样品缓冲液(Novex)加入无菌1.5ml Eppendorf管中,并使用加热热块(Eppendorf)加热至95 $^{\circ}$ C,持续2分钟。

[1168] 2. 然后DNA混合物加载到15%TBE-尿素凝胶1.0mmx10孔(Invitrogen)的孔中,所述凝胶含有预热的1X TBE缓冲液Thermo Scientific(89mM Tris、89mM硼酸和2mM EDTA)。

[1169] 3. 将X-cell sure lock模块(Novex)固定到位并在以下条件下进行电泳;260V,90Amp,室温下40分钟。

[1170] 4. 采用使用Cy3 LEDs的ChemiDoc MP(BioRad)进行检测和DNA在凝胶中的可视化。可视化和分析在Image lab 2.0平台上进行。

[1171] 结果和结论

[1172] 来自实例3的裂解结果显示,在存在或不存在辅助股的情况下,内切核酸酶V可以获得显著高的裂解DNA产量(图19c)。

[1173] 第3步:连接

[1174] 第三步描述了在辅助股存在下用DNA连接酶连接多核苷酸。图20a中示出了图解说

[1175] 材料和方法

[1176] 材料

[1177] 1.实例3中使用的寡核苷酸是内部设计的并由Sigma Aldrich合成(参见图20b的序列表)。

[1178] 2.使用无菌蒸馏水(ELGA VEOLIA)将寡核苷酸稀释到100 μ M的储备浓度。

[1179] 方法

[1180] 使用以下程序进行寡核苷酸的连接反应:

[1181] 1.用移液管(Gilson)将16 μ l无菌蒸馏水(ELGA VEOLIA)转移到1.5ml Eppendorf管中。

[1182] 2.然后将10 μ L的2X快速连接反应缓冲液NEB(132mM Tris-HCl、20mM MgCl₂、2mM二硫苏糖醇、2mM ATP,15%聚乙二醇(PEG6000)和pH 7.6,在25°C)加入到相同的Eppendorf管中。

[1183] 3.将1 μ l每种寡核苷酸(图20b);TAMRA或任何荧光标记的磷酸酯股(SEQ ID NO:35),具有T(SEQ ID NO:36)的引物和肌苷股(SEQ ID NO:37)和辅助股(SEQ ID NO:38),均为5pmol加入到同一管中。

[1184] 4.将1 μ l的Quick T4 DNA连接酶NEB(400单位/ μ l)加入同一管中。

[1185] 5.然后将反应混合物通过用移液管重悬温和混合,13,000rpm下离心5秒钟并在室温培育20分钟。

[1186] 6.通常在培育时间过去后,加入TBE-尿素样品缓冲液(Novex)终止反应。

[1187] 7.使用如上所述的纯化步骤1-7中概述的方案纯化反应混合物。

[1188] 使用以下方案测定纯化的DNA浓度:

[1189] 1.加入2 μ l灭菌蒸馏水(ELGA VEOLIA)到基座平衡NanoDrop one(Thermo Scientific)。

[1190] 2.平衡后,用不起毛的镜片清洁纸(Whatman)轻轻擦去水。

[1191] 3.通过加入2 μ l缓冲液EB QIAGEN(10mM Tris.CL,pH 8.5)掩蔽(blank)NanoDrop one。然后在掩蔽后重复步骤2。

[1192] 4.通过将2 μ l样品加到基座上并在触摸屏上选择测量图标来测量DNA浓度。

[1193] 5.将纯化的DNA在聚丙烯酰胺凝胶上运行,并按照上述步骤5-8中的程序可视化。没有引入条件或试剂的变化。

[1194] 凝胶电泳和DNA可视化:

[1195] 1.将5 μ l的DNA和TBE-尿素样品缓冲液(Novex)加入无菌1.5ml Eppendorf管中,并使用加热热块(Eppendorf)加热到95°C,持续2分钟。

[1196] 2.然后DNA混合物加载到15%TBE-尿素凝胶1.0mm x 10孔(Invitrogen)的孔中,所述凝胶含有预热的1X TBE缓冲液Thermo Scientific(89mM Tris,89mM硼酸和2mM EDTA)。

[1197] 3.将X-cell sure lock模块(Novex)固定到位并在以下条件下进行电泳;260V,90Amp,室温下40分钟。

[1198] 4.采用使用Cy3 LEDS的ChemiDoc MP (BioRad) 进行检测和DNA在凝胶中的可视化。可视化和分析在Image lab 2.0平台上进行。

[1199] 第4步:去除保护基

[1200] 在DNA模型上研究了去除保护基步骤(图21a),所述模型带有由通过Therminator IX DNA聚合酶掺入3'-O-叠氮基甲基-dNTP引入到DNA的3'-O-叠氮基甲基基团。通过三(羧乙基)膦(TCEP)进行去除保护基,并且当将所有天然dNTP的混合物加入到纯化的去除保护基DNA的溶液中时通过延伸反应进行监测。

[1201] 材料和方法

[1202] 材料

[1203] 1.实例3中使用的寡核苷酸是内部设计的并由Sigma Aldrich合成(参见图21i序列)。

[1204] 2.使用无菌蒸馏水(ELGA VEOLIA)将寡核苷酸稀释到100 μ M的储备浓度。

[1205] 3.酶购自新英格兰实验室。

[1206] 方法

[1207] 1.将2 μ l的10x Thermopol®缓冲液(20mM Tris-HCl、10mM(NH₄)₂SO₄、10mM KCl、2mM MgSO₄、0.1% Triton®X-100, pH 8.8, 新英格兰实验室)与12.25 μ l无菌去离子水(ELGA VEOLIA)在1.5ml Eppendorf管中混合。

[1208] 2.将1 μ l的10 μ M引物(10pmol, 1当量)(SEQ ID NO:39, 图21i)和1.5 μ l的10 μ M模板-A/G/T/C(15pmol, 1.5当量)(SEQ ID NO:40-43, 图21i)加入反应混合物中。

[1209] 3.加入3'-O-修饰的-dTTP/dCTP/dATP/dGTP(2 μ l的100 μ M)和MnCl₂(1 μ l的40mM)。

[1210] 4.然后加入1.5 μ l的终止IX DNA聚合酶(15U, 新英格兰实验室)。

[1211] 5.将反应物在37°C培育5分钟。

[1212] 6.取出4 μ L样品并与0.5 μ L的15 mM dNTP混合物混合并使其反应10分钟以进行对照反应。

[1213] 7.将在1M TRIS缓冲液pH 7.4中的40 μ L的500mM TCEP加入到反应混合物中,并使其在37°C反应10分钟。

[1214] 8.通过用20 μ L的1x Thermopol®缓冲液洗脱,使用QIAGEN核苷酸去除试剂盒纯化反应混合物。

[1215] 9.将1 μ L的5mM dNTP混合物和1 μ L的DeepVent (exo-) DNA聚合酶加入到纯化的反应混合物中并使其反应10分钟。

[1216] 10.将反应物通过加入TBE-尿素样品缓冲液(Novex)停止。

[1217] 11.将反应物在聚丙烯酰胺凝胶(15%)上用TBE缓冲液分离,并通过ChemiDoc MP 成像系统(BioRad)进行可视化。

[1218] 结果和结论

[1219] 50mM TCEP不足以在0.2 μ M DNA模型上高效裂解3'-O-叠氮甲基(图21h)。相反, 300mM TCEP成功地在0.2 μ M DNA模型上以95%的效率裂解3'-O-叠氮基甲基(图21h)。

[1220] 实例4有双发夹模型的版本2化学.

[1221] 所述实例描述了使用4个步骤在双发夹模型上合成多核苷酸:从切口位点掺入3'-O-修饰的dNTP;在第一步在与天然互补核苷酸相对地发生的情况下裂解、连接和去除保护

基,所述天然互补核苷酸位于支持股中与通用核苷酸相邻,在所述特定情况下通用核苷酸为肌苷。

[1222] 第1步:掺入

[1223] 第一步描述了通过DNA聚合酶的酶促掺入将3'-O-保护的单核苷酸受控的添加到寡核苷酸中(图22a)。

[1224] 材料和方法

[1225] 材料

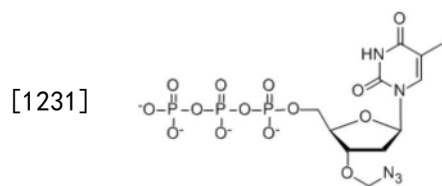
[1226] 1.根据描述于以下的方案内部合成3'-O-经修饰的dNTP:博士毕业论文Jian Wu:用于通过合成进行DNA测序的新颖核苷酸类似物的分子工程改造。哥伦比亚大学,2008年。用于合成的方案还描述于专利申请公开:J.William Efcavitch,Juliesta E.Sylvester,用于聚脱氧核苷酸合成的经修饰的模板独立性酶(Modified Template-Independent Enzymes for Polydeoxynucleotide Synthesis),《分子集合体(Molecular Assemblies)》US2016/0108382A1。

[1227] 2.寡核苷酸是内部设计的并从Sigma-Aldrich获得(图22c)。以100 μ M的浓度制备储备溶液。

[1228] 3.使用Therminator IX DNA聚合酶,其由新英格兰实验室工程化,具有增强的掺入3'-O-修饰的dNTP的能力。

[1229] 测试3'-O-叠氮甲基-dTTP的掺入:

[1230] 3'-O-叠氮甲基-dTTP:



[1232] 方法

[1233] 1.将2 μ l的10x Thermopol®缓冲液(20mM Tris-HCl、10mM(NH₄)₂SO₄、10mM KCl、2mM MgSO₄、0.1% Triton® X-100,pH 8.8,新英格兰生物实验室(New England BioLab))与10.25 μ l无菌去离子水(ELGA VEOLIA)在1.5ml Eppendorf管中混合。

[1234] 2.将0.5 μ l的10 μ M发夹寡核苷酸(5pmol,1当量)(SEQ ID NO:44,图22c)加入到反应混合物中。

[1235] 3.加入3'-O-修饰的-dTTP(2 μ l的100 μ M)和MnCl₂(1 μ l的40mM)。

[1236] 4.然后加入1.5 μ l的Therminator IX DNA聚合酶(15U,新英格兰实验室)。

[1237] 5.将反应物在65°C培育20分钟。

[1238] 6.将反应物通过加入TBE-尿素样品缓冲液(Novex)停止。

[1239] 7.将反应物在聚丙烯酰胺凝胶(15%)上用TBE缓冲液分离,并通过ChemiDoc MP成像系统(BioRad)进行可视化。

[1240] 凝胶电泳和DNA可视化:

[1241] 1.在无菌1.5ml Eppendorf管中将5 μ l反应混合物加入5 μ l的TBE-尿素样品缓冲液(Novex)中,并使用加热ThermoMixer(Eppendorf)加热至95°C,持续5分钟。

[1242] 2.然后将5 μ l样品加载到15%TBE-尿素凝胶1.0mmx10孔(Invitrogen)的孔中,所

述凝胶含有预热的1X TBE缓冲液Thermo Scientific(89mM Tris,89mM硼酸和2mM EDTA)。

[1243] 3.将X-cell sure lock模块(Novex)固定到位并在以下条件下进行电泳;260V, 90Amp,室温下40分钟。

[1244] 4.将凝胶通过使用Cy3 LEDS的ChemIDoc MP (BioRad)可视化。可视化和分析在Image lab 2.0平台上进行。

[1245] 结果

[1246] DNA聚合酶在发夹构建体中掺入与其天然互补碱基相对的3'-O-修饰的dTTP。

[1247] 第二步:裂解

[1248] 第二步描述了用内切核酸酶V在此特定情况下一步裂解发夹模型(图23a)。

[1249] 材料和方法

[1250] 材料

[1251] 1.实例4中使用的寡核苷酸是内部设计的并由Sigma Aldrich合成(参见图23c序列)。

[1252] 2.使用无菌蒸馏水(ELGA VEOLIA)将寡核苷酸稀释到100 μ M的储备浓度。

[1253] 方法

[1254] 发夹寡核苷酸的裂解反应使用以下步骤进行:

[1255] 1.用移液管(Gilson)将43 μ l无菌蒸馏水(ELGA VEOLIA)转移到1.5ml Eppendorf管中。

[1256] 2.然后将5 μ l的10X Reactionbuffer®NEB(50mM的醋酸钾,20mM的Tris-乙酸盐,10mM的醋酸镁,1mM的DTT,pH值7.9在25°C下)加入到相同的Eppendorf管中。

[1257] 3.将具有5pmol量的1 μ l发夹寡核苷酸(SEQ ID NO:45,图23c)加入同一管中。

[1258] 4.将1 μ l人核酸内切酶V(Endo V)NEB(30单位/ μ l)加入到同一管中。

[1259] 5.然后将反应混合物通过用移液管重悬温和混合,13,000rpm下离心5秒钟并在37°C培育1小时。

[1260] 6.通常在培育时间过去之后,将反应物通过酶促热失活(即65°C下20分钟)终止。

[1261] 使用下面概述的方案纯化样品混合物:

[1262] 1.将500 μ l缓冲液PNI QIAGEN(5M氯化胍)加入到样品中并通过用移液管重悬浮温和混合。

[1263] 2.将混合物转移到QIAquick旋转柱(QIAGEN)并以6000rpm离心1分钟。

[1264] 3.离心后,弃去流过液,向旋转柱中加入750 μ l缓冲液PE QIAGEN(10mM Tris-HCl pH7.5和80%乙醇),并以6000rpm离心1分钟。

[1265] 4.将流过液丢弃并将旋转柱以13000rpm再离心1分钟以去除残余的PE缓冲液。

[1266] 5.然后将旋转柱置于无菌的1.5ml Eppendorf管中。

[1267] 6.对于DNA洗脱,将50 μ l缓冲液EB QIAGEN(10mM Tris.CL,pH 8.5)加入柱膜中心并在室温下静置1分钟。

[1268] 7.然后将管以13000rpm离心1分钟。测量洗脱的DNA浓度并储存在-20°C下以备后用。

[1269] 使用以下方案测定纯化的DNA浓度:

[1270] 1.加入2 μ l灭菌蒸馏水(ELGA VEOLIA)到基座平衡NanoDrop One(Thermo

Scientific)。

[1271] 2.平衡后,用不起毛的镜片清洁纸(Whatman)轻轻擦去水。

[1272] 3.通过加入2 μ l缓冲液EB QIAGEN(10mM Tris.CL,pH 8.5)掩蔽(blank)NanoDrop One。然后在掩蔽后重复第2步。

[1273] 4.通过将2 μ l样品加到基座上并在触摸屏上选择测量图标来测量DNA浓度。

[1274] 凝胶电泳和DNA可视化:

[1275] 1.将5 μ l的DNA和TBE-尿素样品缓冲液(Novex)加入无菌1.5ml Eppendorf管中,并使用加热ThermoMixer(Eppendorf)加热至95 $^{\circ}$ C,持续2分钟。

[1276] 2.然后DNA混合物加载到15%TBE-尿素凝胶1.0mmx10孔(Invitrogen)的孔中,所述凝胶含有预热的1X TBE缓冲液Thermo Scientific(89mM Tris,89mM硼酸和2mM EDTA)。

[1277] 3.将X-cell sure lock模块(Novex)固定到位并在以下条件下进行电泳;260V,90Amp,室温下40分钟。

[1278] 4.采用使用Cy3 LEDS的ChemiDoc MP(BioRad)进行检测和DNA在凝胶中的可视化。可视化和分析在Image lab 2.0平台上进行。

[1279] 结果和结论

[1280] 来自实例4的裂解结果显示,使用内切核酸酶V在37 $^{\circ}$ C下获得了显著高的消化的发夹DNA产率(图23b)。

[1281] 第3步:连接

[1282] 第三步描述了用DNA连接酶连接发夹模型。示意图如图24a所示。

[1283] 材料和方法

[1284] 材料

[1285] 1.实例4中使用的寡核苷酸是内部设计的并由Sigma Aldrich合成(参见图24c序列)。

[1286] 2.使用无菌蒸馏水(ELGA VEOLIA)将寡核苷酸稀释到100 μ M的储备浓度。

[1287] 方法

[1288] 使用以下程序进行寡核苷酸的连接反应:

[1289] 1.使用移液管(Gilson)将1 μ l(5pmol)TAMRA或任何荧光标记磷酸发夹寡核苷酸(SEQ ID NO:46)转移入1.5毫升Eppendorf管中。

[1290] 2.然后将15 μ l(100pmol)含肌苷的发夹构建体(SEQ ID NO:47)加入到相同的管中,并通过用移液管重悬浮轻轻混合3秒。

[1291] 3.将40 μ l的Blunt/TA DNA连接酶NEB(180单位/ μ l)加入同一管中。

[1292] 4.然后将反应混合物通过用移液管重悬温和混合,13,000rpm下离心5秒钟并在室温培育20分钟。

[1293] 5.通常在培育时间过去后,加入TBE-尿素样品缓冲液(Novex)终止反应。

[1294] 6.使用上面的纯化步骤1-7中概述的方案纯化反应混合物。

[1295] 使用以下方案测定纯化的DNA浓度:

[1296] 1.加入2 μ l灭菌蒸馏水(ELGA VEOLIA)到基座平衡NanoDrop One(Thermo Scientific)。

[1297] 2.平衡后,用不起毛的镜片清洁纸(Whatman)轻轻擦去水。

[1298] 3.通过加入2 μ l缓冲液EB QIAGEN(10mM Tris.CL,pH 8.5)掩蔽(blank)NanoDrop One。然后在掩蔽后重复第2步。

[1299] 4.通过将2 μ l样品加到基座上并在触摸屏上选择测量图标来测量DNA浓度。

[1300] 5.将纯化的DNA在聚丙烯酰胺凝胶上运行,并按照上述步骤5-8中的方法可视化。没有引入条件或试剂的变化。

[1301] 凝胶电泳和DNA可视化。

[1302] 1.将5 μ l的DNA和TBE-尿素样品缓冲液(Novex)加入无菌1.5ml Eppendorf管中,并使用加热ThermoMixer(Eppendorf)加热至95 $^{\circ}$ C,持续2分钟。

[1303] 2.然后DNA混合物加载到15%TBE-尿素凝胶1.0mmx10孔(Invitrogen)的孔中,所述凝胶含有预热的1X TBE缓冲液Thermo Scientific(89mM Tris,89mM硼酸和2mM EDTA)。

[1304] 3.将X-cell sure lock模块(Novex)固定到位并在以下条件下进行电泳;260V,90Amp,室温下40分钟。

[1305] 4.采用使用Cy3 LEDs的ChemiDoc MP(BioRad)进行检测和DNA在凝胶中的可视化。可视化和分析在Image lab 2.0平台上进行。

[1306] 结果

[1307] 在辅助股的存在下,在室温(24 $^{\circ}$ C)下用发夹/TA DNA连接酶连接发夹寡核苷酸,得到高产率的连接产物。1分钟后连接的发夹寡核苷酸显示出高产率的连接DNA产物,比率为约85%。2分钟后连接的发夹寡核苷酸显示出高产率的连接DNA,比率为约85%。3分钟后连接的发夹寡核苷酸显示出高产率的连接DNA产物,比率为约85%。4分钟后连接的发夹寡核苷酸显示高产率的连接DNA产物,比率为约>85%(图24b)。

[1308] 实例5.版本2化学-双发夹模型的完整循环.

[1309] 所述实施例描述了使用4个步骤在双发夹模型上合成多核苷酸:从切口位点掺入3'-O-修饰的dNTP;在第一步在与天然互补核苷酸相对地发生的情况下裂解、连接和去除保护基,所述天然互补核苷酸位于支持股中与通用核苷酸相邻,在所述特定情况下通用核苷酸为肌苷。发夹的一端用作附着锚。

[1310] 所述方法首先是通过DNA聚合酶的酶促掺入,然后肌苷裂解、连接和去除保护基,将3'-O-保护的单核苷酸受控的添加到寡核苷酸中(图25a)。

[1311] 材料和方法

[1312] 材料

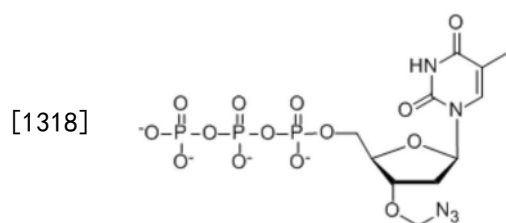
[1313] 1.根据描述于以下的方案内部合成3'-O-经修饰的dNTP:博士毕业论文Jian Wu:用于通过合成进行DNA测序的新颖核苷酸类似物的分子工程改造。哥伦比亚大学,2008年。用于合成的方案还描述于专利申请公开:J.William Efcavitch,Juliesta E.Sylvester,用于聚脱氧核苷酸合成的经修饰的模板独立性酶(Modified Template-Independent Enzymes for Polydeoxynucleotide Synthesis),《分子集合体(Molecular Assemblies)》US2016/0108382A1。

[1314] 2.寡核苷酸是内部设计的并从Sigma-Aldrich获得(图25c)。以100 μ M的浓度制备储备溶液。

[1315] 3.使用Therminator IX DNA聚合酶,其由新英格兰生物实验室工程化,具有增强的掺入3'-O-修饰的dNTP的能力。

[1316] 测试3'-O-叠氮甲基-dTTP的掺入:

[1317] 3'-O-叠氮甲基-dTTP:



[1319] 方法

[1320] 1. 将2 μ l的10x Thermopol®缓冲液 (20mM Tris-HCl、10mM (NH₄)₂SO₄、10mM KCl、2mM MgSO₄、0.1% Triton® X-100, pH 8.8, 新英格兰生物实验室 (New England BioLab)) 与12.5 μ l 无菌去离子水 (ELGA VEOLIA) 在1.5ml Eppendorf管中混合。

[1321] 2. 将2 μ l的10 μ M双发夹模型寡核苷酸 (20pmol, 1当量) (SEQ ID NO:48, 图25c) 加入到反应混合物中。

[1322] 3. 加入3'-O-修饰的-dTTP (2 μ l的100 μ M) 和MnCl₂ (1 μ l的40mM)。

[1323] 4. 然后加入1.5 μ l的Therminator IX DNA聚合酶 (15U, 新英格兰生物实验室)。

[1324] 5. 将反应物在37°C培育10分钟。

[1325] 6. 从反应混合物取出等分试样 (5 μ L), 以及加入0.5 μ l的天然dNTP混合物并使其反应10分钟。通过凝胶电泳分析反应。

[1326] 7. 使用纯化步骤1-7中概述的方案纯化反应混合物。

[1327] 8. 通过20 μ l的NEB反应缓冲液® (50mM乙酸钾, 20mM Tris-乙酸盐, 10mM乙酸镁, 1mM DTT, pH7.9, 25°C下) 将DNA样品洗脱到干净的Eppendorf管中。

[1328] 9. 将1 μ l人核酸内切酶V (Endo V) NEB (30单位/ μ l) 加入到同一管中。

[1329] 10. 然后将反应混合物通过用移液管重悬温和混合, 13,000rpm下离心5秒钟并在37°C培育1小时。

[1330] 11. 在培育时间过去之后, 将反应物通过酶促热失活 (即65°C下20分钟) 终止。

[1331] 12. 将等分试样 (5 μ L) 从反应混合物取出, 并在用TBE缓冲液的聚丙烯酰胺凝胶 (15%) 上分析, 并用ChemiDoc MP成像系统 (BioRad) 进行可视化。

[1332] 13. 使用上面纯化步骤1-7中概述的方案纯化反应混合物。

[1333] 14. 通过20 μ l的NEB反应缓冲液® (50mM乙酸钾, 20mM Tris-乙酸盐, 10mM乙酸镁, 1mM DTT, pH 7.9, 25°C下) 将DNA样品洗脱到干净的Eppendorf管中。

[1334] 15. 将10 μ l用于连接的100 μ M股 (1nmol) (SEQ ID NO:49, 图25c) 加入到反应混合物中。

[1335] 16. 将40 μ l的Blunt/TA DNA连接酶NEB (180单位/ μ l) 加入到纯化的DNA样品中。

[1336] 17. 然后将反应混合物通过用移液管重悬温和混合, 13,000rpm下离心5秒钟并在室温培育20分钟。

[1337] 18. 将在1M TRIS缓冲液pH 7.4中的40 μ L的500mM TCEP加入到反应混合物中, 并使其在37°C反应10分钟。

[1338] 19. 通过用20 μ L的1x Thermopol®缓冲液洗脱, 使用QIAGEN核苷酸去除试剂盒纯化

反应混合物。

[1339] 凝胶电泳和DNA可视化:

[1340] 1. 在无菌1.5ml Eppendorf管中将5 μ l反应混合物加入5 μ l的TBE-尿素样品缓冲液(Novex)中,并使用加热ThermoMixer (Eppendorf)加热至95°C,持续5分钟。

[1341] 2. 然后将5 μ l样品加载到15%TBE-尿素凝胶1.0mm x 10孔(Invitrogen)的孔中,所述凝胶含有预热的1X TBE缓冲液Thermo Scientific (89mM Tris, 89mM硼酸和2mM EDTA)。

[1342] 3. 将X-cell sure lock模块(Novex)固定到位并在以下条件下进行电泳;260V, 90Amp, 室温下40分钟。

[1343] 4. 将凝胶通过使用Cy3 LEDS的ChemiDoc MP (BioRad)可视化。可视化和分析在Image lab 2.0平台上进行。

[1344] 使用以下方案测定纯化的DNA浓度:

[1345] 1. 加入2 μ l灭菌蒸馏水(ELGA VEOLIA)到基座平衡NanoDrop One (Thermo Scientific)。

[1346] 2. 平衡后,用不起毛的镜片清洁纸(Whatman)轻轻擦去水。

[1347] 3. 通过加入2 μ l缓冲液EB QIAGEN (10mM Tris.CL, pH 8.5)掩蔽(blank)NanoDrop One。然后在掩蔽后重复第2步。

[1348] 4. 通过将2 μ l样品加到基座上并在触摸屏上选择测量图标来测量DNA浓度。

[1349] 5. 将纯化的DNA在聚丙烯酰胺凝胶上运行,并按照章节2步骤5-8中的程序可视化。没有引入条件或试剂的变化。

[1350] 使用下面概述的方案在每个步骤后纯化样品混合物:

[1351] 1. 将500 μ l缓冲液PNI QIAGEN (5M氯化胍)加入到样品中并通过用移液管重悬浮温和混合。

[1352] 2. 将混合物转移到QIAquick旋转柱(QIAGEN)并以6000rpm离心1分钟。

[1353] 3. 离心后,弃去流过液,向旋转柱中加入750 μ l缓冲液PE QIAGEN (10mM Tris-HCl pH7.5和80%乙醇),并以6000rpm离心1分钟。

[1354] 4. 将流过液丢弃并将旋转柱以13000rpm离心另外的1分钟以去除残余的PE缓冲液。

[1355] 5. 然后将旋转柱置于无菌的1.5ml Eppendorf管中。

[1356] 6. 对于DNA洗脱,将20 μ l适当的反应缓冲液加入到柱膜中心,并在室温下静置1分钟。

[1357] 7. 然后将管以13000rpm离心1分钟。测量洗脱的DNA浓度并储存在-20°C下以备后用。

[1358] 结果

[1359] DNA聚合酶在双发夹构建体中掺入与其天然互补碱基相对的3'-O-修饰的dTTP(图25b)。

[1360] 实例6. 版本2化学-使用辅助股的单发夹模型的完整循环.

[1361] 所述实施例描述了使用4个步骤在单发夹模型上合成多核苷酸:从切口位点掺入3'-O-修饰的dNTP;在第一步在与天然互补碱基相对地发生的情况下裂解、连接和去除保护

基。DNA合成在所述过程中使用辅助股。

[1362] 所述方法首先是通过DNA聚合酶的酶促掺入,然后肌苷裂解、连接和去除保护基,将3'-O-保护的单核苷酸受控的添加到寡核苷酸中(图26a)。

[1363] 材料和方法

[1364] 材料

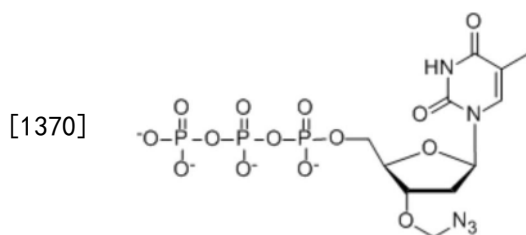
[1365] 1.根据描述于以下的方案内部合成3'-O-经修饰的dNTP:博士毕业论文Jian Wu:用于通过合成进行DNA测序的新颖核苷酸类似物的分子工程改造。哥伦比亚大学,2008年。用于合成的方案还描述于专利申请公开:J.William Efcavitch,Juliesta E.Sylvester,用于聚脱氧核苷酸合成的经修饰的模板独立性酶(Modified Template-Independent Enzymes for Polydeoxynucleotide Synthesis),《分子集合体(Molecular Assemblies)》US2016/0108382A1。

[1366] 2.寡核苷酸是内部设计的并从Sigma Aldrich获得(图26b)。以100 μ M的浓度制备储备溶液。

[1367] 3.使用Therminator IX DNA聚合酶,其由新英格兰生物实验室工程化,具有增强的掺入3'-O-修饰的dNTP的能力。

[1368] 测试3'-O-叠氮甲基-dTTP的掺入:

[1369] 3'-O-叠氮甲基-dTTP:



[1371] 方法

[1372] 1.将2 μ l的10x Thermopol®缓冲液(20mM Tris-HCl、10mM(NH₄)₂SO₄、10mM KCl、

[1373] 2mM MgSO₄、0.1% Triton® X-100, pH 8.8, 新英格兰实验室)与12.5 μ l无菌去离子水(ELGA VEOLIA)在1.5ml Eppendorf管中混合。

[1374] 2.将2 μ l的10 μ M单发夹模型寡核苷酸(20pmol, 1当量)(SEQ ID NO:50, 图26b)和辅助股(30pmol, 1.5当量)(SEQ ID NO:51, 图26b)加入到反应混合物中。

[1375] 3.加入3'-O-修饰的-dTTP(2 μ l的100 μ M)和MnCl₂(1 μ l的40mM)。

[1376] 4.然后加入1.5 μ l的Therminator IX DNA聚合酶(15U, 新英格兰实验室)。

[1377] 5.将反应物在37°C培育10分钟。

[1378] 6.从反应混合物取出等分试样(5 μ L),以及加入0.5 μ l的天然dNTP混合物并使其反应10分钟。通过凝胶电泳分析反应。

[1379] 7.使用上面纯化步骤1-7中概述的方案纯化反应混合物。

[1380] 8.通过20 μ l的NEB反应缓冲液®(50mM乙酸钾, 20mM Tris-乙酸盐, 10mM乙酸镁, 1mM DTT, pH 7.9, 25°C下)将DNA样品洗脱到干净的Eppendorf管中。

[1381] 9.将1 μ l人核酸内切酶V(Endo V)NEB(30单位/ μ l)加入到同一管中。

[1382] 10.然后将反应混合物通过用移液管重悬温和混合, 13,000rpm下离心5秒钟并在

37°C培育1小时。

[1383] 11.在培育时间过去之后,将反应物通过酶促热失活(即65°C下20分钟)终止。

[1384] 12.将等分试样(5 μ L)从反应混合物取出,并在使用TBE缓冲液的聚丙烯酰胺凝胶(15%)上分析,并用ChemiDoc MP成像系统(BioRad)进行可视化。

[1385] 13.使用上面纯化步骤1-7中概述的方案纯化反应混合物。

[1386] 14.通过20 μ L的NEB反应缓冲液®(50mM乙酸钾,20mM Tris-乙酸盐,10mM乙酸镁,1mM DTT,pH 7.9,25°C下)将DNA样品洗脱到干净的Eppendorf管中。

[1387] 15.将用于连接的10 μ L的100 μ M股(1nmol)(SEQ ID NO:52,图26b)和用于连接的10 μ L的100 μ M辅助股(1nmol)(SEQ ID NO:53,图26b)加入到反应混合物中。

[1388] 16.将40 μ L的Blunt/TA DNA连接酶NEB(180单位/ μ L)加入同一管中。

[1389] 17.然后将反应混合物通过用移液管重悬温和混合,13,000rpm下离心5秒钟并在室温培育20分钟。

[1390] 18.将在1M TRIS缓冲液pH 7.4中的40 μ L的500mM TCEP加入到反应混合物中,并使其在37°C反应10分钟。

[1391] 19.通过用20 μ L的1xNEB Thermopol®缓冲液洗脱,使用QIAGEN核苷酸去除试剂盒纯化反应混合物。

[1392] 20.通常在培育时间过去后,加入TBE-尿素样品缓冲液(Novex)终止反应。

[1393] 凝胶电泳和DNA可视化:

[1394] 1.在无菌1.5ml Eppendorf管中将5 μ L反应混合物加入5 μ L的TBE-尿素样品缓冲液(Novex)中,并使用加热ThermoMixer(Eppendorf)加热至95°C,持续5分钟。

[1395] 2.然后将5 μ L样品加载到15%TBE-尿素凝胶1.0mmx10孔(Invitrogen)的孔中,所述凝胶含有预热的1X TBE缓冲液Thermo Scientific(89mM Tris,89mM硼酸和2mM EDTA)。

[1396] 3.将X-cell sure lock模块(Novex)固定到位并在以下条件下进行电泳;260V,90amp,室温下40分钟。

[1397] 4.将凝胶通过使用Cy3 LEDS的ChemiDoc MP(BioRad)可视化。可视化和分析在Image lab 2.0平台上进行。

[1398] 使用以下方案测定纯化的DNA浓度:

[1399] 1.加入2 μ L灭菌蒸馏水(ELGA VEOLIA)到基座平衡NanoDrop One(Thermo Scientific)。

[1400] 2.平衡后,用不起毛的镜片清洁纸(Whatman)轻轻擦去水。

[1401] 3.通过加入2 μ L缓冲液EB QIAGEN(10mM Tris.CL,pH 8.5)掩蔽(blank)NanoDrop One。然后在掩蔽后重复第2步。

[1402] 4.通过将2 μ L样品加在基座上并在触摸屏上选择测量图标来测量DNA浓度。

[1403] 5.将纯化的DNA在聚丙烯酰胺凝胶上运行,并按照上述步骤5-8中的程序可视化。没有引入条件或试剂的变化。

[1404] 使用下面概述的方案在每个步骤后纯化样品混合物:

[1405] 1.将500 μ L缓冲液PNI QIAGEN(5M氯化胍)加入到样品中并通过用移液管重悬浮温和混合。

[1406] 2.将混合物转移到QIAquick旋转柱(QIAGEN)并以6000rpm离心1分钟。

[1407] 3.离心后,弃去流过液,向旋转柱中加入750 μ l缓冲液PE QIAGEN(10mM Tris-HCl pH7.5和80%乙醇),并以6000rpm离心1分钟。

[1408] 4.将流过液丢弃并将旋转柱以13000rpm离心另外的1分钟以去除残余的PE缓冲液。

[1409] 5.然后将旋转柱置于无菌的1.5ml Eppendorf管中。

[1410] 6.对于DNA洗脱,将20 μ l适当的反应缓冲液加入到柱膜中心,并在室温下静置1分钟。

[1411] 7.然后将管以13000rpm离心1分钟。测量洗脱的DNA浓度并储存在-20°C下以备后用。

[1412] 实例7.版本3化学-双发夹模型的完整循环.

[1413] 所述实例描述了使用4个步骤在双发夹构建体模型上合成多核苷酸:从切口位点掺入3'-O-修饰的dNTP;在第一步在与通用核苷酸相邻(在所述特定情况下是苷酸)相对地发生的情况下裂解、连接和去除保护基。

[1414] 所述方法首先是通过DNA聚合酶的酶促掺入,然后肌苷裂解、连接和去除保护基,将3'-O-保护的单核苷酸受控的添加到寡核苷酸中(图27a)。

[1415] 材料和方法

[1416] 材料

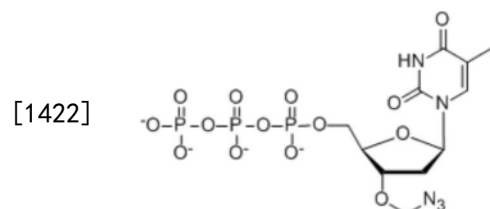
[1417] 1.根据描述于以下的方案内部合成3'-O-经修饰的dNTP:博士毕业论文Jian Wu:用于通过合成进行DNA测序的新颖核苷酸类似物的分子工程改造。哥伦比亚大学,2008年。用于合成的方案还描述于专利申请公开:J.William Efcavitch,Juliesta E.Sylvester,用于聚脱氧核苷酸合成的经修饰的模板独立性酶(Modified Template-Independent Enzymes for Polydeoxynucleotide Synthesis),《分子集合体(Molecular Assemblies)》US2016/0108382A1。

[1418] 2.寡核苷酸是内部设计的并从Sigma-Aldrich获得(图27b)。以100 μ M的浓度制备储备溶液。

[1419] 3.其由New England BioLabs工程化的Therminator IX DNA聚合酶具有增强的掺入3'-O-修饰的dNTP的能力。

[1420] 测试3'-O-叠氮甲基-dTTP的掺入:

[1421] 3'-O-叠氮甲基-dTTP:



[1423] 方法

[1424] 1.将2 μ l的10x Thermopol®缓冲液(20mM Tris-HCl、10mM (NH₄)₂SO₄、10mM KCl、2mM MgSO₄、0.1% Triton® X-100, pH 8.8, 新英格兰实验室)与12.5 μ l无菌去离子水(ELGA VEOLIA)在1.5ml Eppendorf管中混合。

[1425] 2.将2 μ l的10 μ M双发夹模型寡核苷酸(20pmol, 1当量)(SEQ ID NO:54, 图27b)加入

到反应混合物中。

[1426] 3. 加入3'-O-修饰的-dTTP (2 μ l的100 μ M) 和MnCl₂ (1 μ l的40mM)。

[1427] 4. 然后加入1.5 μ l的Therminator IX DNA聚合酶 (15U, 新英格兰实验室)。

[1428] 5. 将反应物在37°C培育10分钟。

[1429] 6. 从反应混合物取出等分试样 (5 μ L), 以及加入0.5 μ l的天然dNTP混合物并使其反应10分钟。通过凝胶电泳分析反应。

[1430] 7. 使用纯化步骤1-7中概述的方案纯化反应混合物。

[1431] 8. 通过20 μ l的NEB反应缓冲液® (50mM乙酸钾, 20mM Tris-乙酸盐, 10mM乙酸镁, 1mM DTT, pH 7.9, 25°C下) 将DNA样品洗脱到干净的Eppendorf管中。

[1432] 9. 将1 μ l人核酸内切酶V (Endo V) NEB (30单位/ μ l) 加入到同一管中。

[1433] 10. 然后将反应混合物通过用移液管重悬温和混合, 13,000rpm下离心5秒钟并在37°C培育1小时。

[1434] 11. 在培育时间过去之后, 将反应物通过酶促热失活 (即65°C下20分钟) 终止。

[1435] 12. 将等分试样 (5 μ L) 从反应混合物取出, 并在使用TBE缓冲液的聚丙烯酰胺凝胶 (15%) 上分析, 并用ChemiDoc MP成像系统 (BioRad) 进行可视化。

[1436] 13. 使用上面纯化步骤1-7中概述的方案纯化反应混合物。

[1437] 14. 通过20 μ l的NEB反应缓冲液® (50mM乙酸钾, 20mM Tris-乙酸盐, 10mM乙酸镁, 1mM DTT, pH 7.9, 25°C下) 将DNA样品洗脱到干净的Eppendorf管中。

[1438] 15. 将10 μ l用于连接的100 μ M股 (1nmol) (SEQ ID NO:55, 图27b) 加入到反应混合物中。

[1439] 16. 将40 μ l的Blunt/TA DNA连接酶NEB (180单位/ μ l) 加入同一管中。

[1440] 17. 然后将反应混合物通过用移液管重悬温和混合, 13,000rpm下离心5秒钟并在室温培育20分钟。

[1441] 18. 将在1M TRIS缓冲液pH 7.4中的40 μ L的500mM TCEP加入到反应混合物中, 并使其在37°C反应10分钟。

[1442] 19. 通过用20 μ L的1xNEBThermopol®缓冲液洗脱, 使用QIAGEN核苷酸去除试剂盒纯化反应混合物。

[1443] 20. 通常在培育时间过去后, 加入TBE-尿素样品缓冲液 (Novex) 终止反应。

[1444] 凝胶电泳和DNA可视化:

[1445] 1. 在无菌1.5ml Eppendorf管中将5 μ l反应混合物加入5 μ l的TBE-尿素样品缓冲液 (Novex) 中, 并使用加热ThermoMixer (Eppendorf) 加热至95°C, 持续5分钟。

[1446] 2. 然后将5 μ l样品加载到15% TBE-尿素凝胶1.0mmx10孔 (Invitrogen) 的孔中, 所述凝胶含有预热的1X TBE缓冲液Thermo Scientific (89mM Tris, 89mM硼酸和2mM EDTA)。

[1447] 3. 将X-cell sure lock模块 (Novex) 固定到位并在以下条件下进行电泳; 260V, 90amp, 室温下40分钟。

[1448] 4. 将凝胶通过使用Cy3 LEDS的ChemiDoc MP (BioRad) 可视化。可视化和分析在Image lab 2.0平台上进行。

[1449] 使用以下方案测定纯化的DNA浓度:

[1450] 1. 加入2 μ l灭菌蒸馏水(ELGA VEOLIA)到基座平衡NanoDrop One (Thermo Scientific)。

[1451] 2. 平衡后,用不起毛的镜片清洁纸(Whatman)轻轻擦去水。

[1452] 3. 通过加入2 μ l缓冲液EB QIAGEN(10mM Tris.CL,pH8.5)掩蔽(blank) NanoDrop One。然后在掩蔽后重复第2步。

[1453] 4. 通过将2 μ l样品加在基座上并在触摸屏上选择测量图标来测量DNA浓度。

[1454] 5. 将纯化的DNA在聚丙烯酰胺凝胶上运行,并按照章节2步骤5-8中的程序可视化。没有引入条件或试剂的变化。

[1455] 使用下面概述的方案在每个步骤后纯化样品混合物:

[1456] 1. 将500 μ l缓冲液PNI QIAGEN(5M氯化胍)加入到样品中并通过用移液管重悬浮温和混合。

[1457] 2. 将混合物转移到QIAquick旋转柱(QIAGEN)并以6000rpm离心1分钟。

[1458] 3. 离心后,弃去流过液,向旋转柱中加入750 μ l缓冲液PE QIAGEN(10mM Tris-HCl pH7.5和80%乙醇),并以6000rpm离心1分钟。

[1459] 4. 将流过液丢弃并将旋转柱以13000rpm离心另外的1分钟以去除残余的PE缓冲液。

[1460] 5. 然后将旋转柱置于无菌的1.5ml Eppendorf管中。

[1461] 6. 对于DNA洗脱,将20 μ l适当的反应缓冲液加入到柱膜中心,并在室温下静置1分钟。

[1462] 7. 然后将管以13000rpm离心1分钟。测量洗脱的DNA浓度并储存在-20 $^{\circ}$ C下以备后用。

[1463] 实例8.版本2化学-双发夹模型的完整双循环实验.

[1464] 所述实例描述了在双发夹模型上使用4个步骤合成多核苷酸的完整双循环实验:从切口位点掺入3'-O-修饰的dNTP;在第一步在与互补碱基相对地发生的情况下去除保护基、裂解和连接。

[1465] 所述方法首先是通过DNA聚合酶的酶促掺入,然后去除保护基、核苷裂解和连接,将3'-O-保护的单核苷酸受控地加入寡核苷酸,如图28a所示的第一个循环的反应示意图所示。图28b显示了第二循环的反应示意图。

[1466] 材料和方法

[1467] 材料

[1468] 1. 根据描述于以下的方案内部合成3'-O-经修饰的dNTP:博士毕业论文Jian Wu:用于通过合成进行DNA测序的新颖核苷酸类似物的分子工程改造。哥伦比亚大学,2008年。用于合成的方案还描述于专利申请公开:J.William Efcavitch,Juliesta E.Sylvester,用于聚脱氧核苷酸合成的经修饰的模板独立性酶(Modified Template-Independent Enzymes for Polydeoxynucleotide Synthesis),《分子集合体(Molecular Assemblies)》US2016/0108382A1。

[1469] 2. 寡核苷酸是内部设计的并从Sigma-Aldrich获得(图28d)。以100 μ M的浓度制备储备溶液。

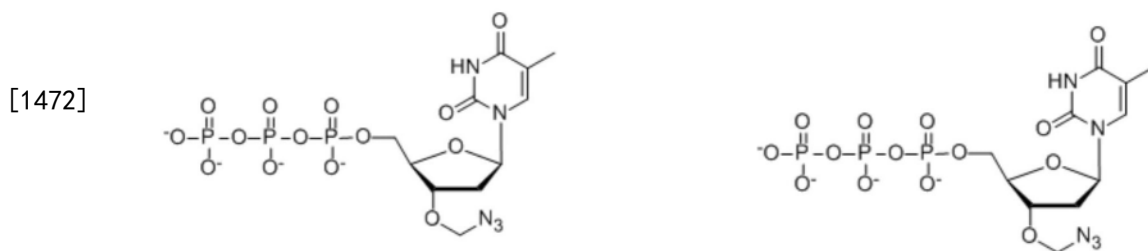
[1470] 3. 其由新英格兰实验室工程化的Therminator IX DNA聚合酶具有增强的掺入3'-

0-修饰的dNTP的能力。

[1471] 3'-O-叠氮甲基-dTTP和3'-O-叠氮甲基-dCTP被用于掺入：

3'-O-叠氮甲基-dTTP：

3'-O-叠氮甲基-dCTP：



[1473] 方法

[1474] 第一循环：

[1475] 1. 将2 μ l的10x Thermopol®缓冲液 (20mM Tris-HCl, 10mM (NH₄)₂SO₄, 10mM KCl, 2mM MgSO₄, 0.1% Triton® X-100, pH 8.8, 新英格兰实验室) 与12.5 μ l无菌去离子水 (ELGA VEOLIA) 在1.5ml Eppendorf管中混合。

[1476] 2. 将2 μ l的10 μ M双发夹模型寡核苷酸 (20pmol, 1当量) (SEQ ID NO:56, 图28d) 加入到反应混合物中。

[1477] 3. 加入3'-O-修饰的-dTTP (2 μ l的100 μ M) 和MnCl₂ (1 μ l的40mM)。

[1478] 4. 然后加入1.5 μ l的Therminator IX DNA聚合酶 (15U, New England BioLabs)。

[1479] 5. 将反应物在37°C培育10分钟。

[1480] 6. 从反应混合物取出等分试样 (5 μ L), 以及加入0.5 μ l的天然dNTP混合物并使其反应10分钟。通过凝胶电泳分析反应。

[1481] 7. 将在1M TRIS缓冲液pH 7.4中的40 μ L的500mM TCEP加入到反应混合物中, 并使其在37°C反应10分钟。

[1482] 8. 使用纯化步骤1-7中概述的方案纯化反应混合物。

[1483] 9. 通过20 μ l的NEB反应缓冲液® (50mM乙酸钾, 20mM Tris-乙酸盐, 10mM乙酸镁, 1mM DTT, pH 7.9, 25°C下) 将DNA样品洗脱到干净的Eppendorf管中。

[1484] 10. 将1 μ l人核酸内切酶V (Endo V) NEB (30单位/ μ l) 加入到同一管中。

[1485] 11. 然后将反应混合物通过用移液管重悬温和混合, 13,000rpm下离心5秒钟并在37°C培育1小时。

[1486] 12. 在培育时间过去之后, 将反应物通过酶促热失活 (即65°C下20分钟) 终止。

[1487] 13. 将等分试样 (5 μ L) 从反应混合物取出, 并在用TBE缓冲液的聚丙烯酰胺凝胶 (15%) 上分析, 并用ChemiDoc MP成像系统 (BioRad) 进行可视化。

[1488] 14. 使用QIAGEN核苷酸去除试剂盒, 使用纯化步骤1-7中概述的方案纯化反应混合物。

[1489] 15. 通过20 μ l的NEB反应缓冲液® (50mM乙酸钾, 20mM Tris-乙酸盐, 10mM乙酸镁, 1mM DTT, pH 7.9, 25°C下) 将DNA样品洗脱到干净的Eppendorf管中。

[1490] 16. 将10 μ l用于连接的100 μ M股 (1nmol) (SEQ ID NO:57, 图28d) 加入到反应混合物中。

- [1491] 17. 将40 μ l的Blunt/TA DNA连接酶NEB(180单位/ μ l)加入同一管中。
- [1492] 18. 然后将反应混合物通过用移液管重悬温和混合,13,000rpm下离心5秒钟并在室温培育20分钟。
- [1493] 19. 使用纯化步骤1-5中概述的方案,通过股霉抗生物素蛋白磁珠试剂盒纯化反应混合物。
- [1494] 20. 未连接的寡核苷酸用 λ 外切核酸酶消化。
- [1495] 21. 使用QIAGEN核苷酸去除试剂盒,使用纯化步骤1-7中概述的方案纯化反应混合物。
- [1496] 22. 通过20 μ l的NEB反应缓冲液®(50mM乙酸钾,20mM Tris-乙酸盐,10mM乙酸镁,1mM DTT,pH 7.9,25°C下)将DNA样品洗脱到干净的Eppendorf管中。
- [1497] 第二循环:
- [1498] 23. 加入3'-O-修饰的-dCTP(2 μ l的100 μ M)和MnCl₂(1 μ l的40mM)。
- [1499] 24. 然后加入1.5 μ l的Therminator IX DNA聚合酶(15U,新英格兰实验室)。
- [1500] 25. 将反应物在37°C培育10分钟。
- [1501] 26. 从反应混合物取出等分试样(5 μ L),以及加入0.5 μ l的天然dNTP混合物并使其反应10分钟。通过凝胶电泳分析反应。
- [1502] 27. 将在1M TRIS缓冲液pH 7.4中的40 μ L的500mM TCEP加入到反应混合物中,并使其在37°C反应10分钟。
- [1503] 28. 使用纯化步骤1-7中概述的方案纯化反应混合物。
- [1504] 29. 通过20 μ l的NEB反应缓冲液®(50mM乙酸钾,20mM Tris-乙酸盐,10mM乙酸镁,1mM DTT,pH 7.9,25°C下)将DNA样品洗脱到干净的Eppendorf管中。
- [1505] 30. 将1 μ l人核酸内切酶V(Endo V)NEB(30单位/ μ l)加入到同一管中。
- [1506] 31. 然后将反应混合物通过用移液管重悬温和混合,13,000rpm下离心5秒钟并在37°C培育1小时。
- [1507] 32. 在培育时间过去之后,将反应物通过酶促热失活(即65°C下20分钟)终止。
- [1508] 33. 将等分试样(5 μ L)从反应混合物取出,并在使用TBE缓冲液的聚丙烯酰胺凝胶(15%)上分析,并用ChemiDoc MP成像系统(BioRad)进行可视化。
- [1509] 34. 使用纯化步骤1-7中概述的方案纯化反应混合物。
- [1510] 35. 通过20 μ l的NEB反应缓冲液®(50mM乙酸钾,20mM Tris-乙酸盐,10mM乙酸镁,1mM DTT,pH 7.9,25°C下)将DNA样品洗脱到干净的Eppendorf管中。
- [1511] 36. 将10 μ l用于连接的100 μ M股(1nmol)(SEQ ID NO:58,图28d)加入到反应混合物中。
- [1512] 37. 将40 μ l的Blunt/TA DNA连接酶NEB(180单位/ μ l)加入同一管中。
- [1513] 38. 然后将反应混合物通过用移液管重悬温和混合,13,000rpm下离心5秒钟并在室温培育10分钟。
- [1514] 39. 在培育时间过去后,加入TBE-尿素样品缓冲液(Novex)终止反应。
- [1515] 凝胶电泳和DNA可视化:
- [1516] 1. 在无菌1.5ml Eppendorf管中将5 μ l反应混合物加入5 μ l的TBE-尿素样品缓冲液

(Novex) 中,并使用加热ThermoMixer (Eppendorf) 加热至95°C,持续5分钟。

[1517] 2.然后将5 μ l样品加载到15%TBE-尿素凝胶1.0mmx10孔 (Invitrogen) 的孔中,所述凝胶含有预热的1X TBE缓冲液Thermo Scientific (89mM Tris, 89mM硼酸和2mM EDTA)。

[1518] 3.将X-cell sure lock模块 (Novex) 固定到位并通过应用以下条件下进行电泳; 260V, 90amp, 室温下40分钟。

[1519] 4.将凝胶通过使用Cy3 LEDS的ChemiDoc MP (BioRad) 可视化。可视化和分析在Image lab 2.0平台上进行。

[1520] 使用以下方案测定纯化的DNA浓度:

[1521] 1.加入2 μ l灭菌蒸馏水 (ELGA VEOLIA) 到基座平衡NanoDrop One (Thermo Scientific)。

[1522] 2.平衡后,用不起毛的镜片清洁纸 (Whatman) 轻轻擦去水。

[1523] 3.通过加入2 μ l缓冲液EB QIAGEN (10mM Tris.CL, pH 8.5) 掩蔽(blank) NanoDrop One。然后在掩蔽后重复步骤2。

[1524] 4.通过将2 μ l样品加在基座上并在触摸屏上选择测量图标来测量DNA浓度。

[1525] 使用下面概述的方案,通过QIAGEN核苷酸去除试剂盒纯化样品混合物:

[1526] 1.将500 μ l缓冲液PNI QIAGEN (5M氯化胍) 加入到样品中并通过用移液管重悬浮温和混合。

[1527] 2.将混合物转移到QIAquick旋转柱 (QIAGEN) 并以6000rpm离心1分钟。

[1528] 3.离心后,弃去流过液,向旋转柱中加入750 μ l缓冲液PE QIAGEN (10mM Tris-HCl pH7.5和80%乙醇),并以6000rpm离心1分钟。

[1529] 4.将流过液丢弃并将旋转柱以13000rpm离心另外的1分钟以去除残余的PE缓冲液。

[1530] 5.然后将旋转柱置于无菌的1.5ml Eppendorf管中。

[1531] 6.对于DNA洗脱,将20 μ l适当的反应缓冲液加入到柱膜中心,并在室温下静置1分钟。

[1532] 7.然后将管以13000rpm离心1分钟。

[1533] 在连接步骤后,使用股霉抗生物素蛋白磁珠通过下面概述的方案纯化样品混合物:

[1534] 1.用200 μ l结合缓冲液 (20mM TRIS, 500mM NaCl, pH=7.4) 洗涤100 μ l股霉抗生物素蛋白磁珠 (新英格兰实验室) 3次。

[1535] 2.连接步骤之后反应混合物与10倍体积的结合缓冲液 (20mM的TRIS, 500mM的NaCl, pH值=7.4) 混合,并用股霉抗生物素蛋白磁珠在20°C培育15分钟。

[1536] 3.用200 μ l结合缓冲液 (20mM TRIS, 500mM NaCl, pH=7.4) 洗涤股霉抗生物素蛋白磁珠3次。

[1537] 4.用去离子水洗涤股霉抗生物素蛋白磁珠3次。

[1538] 5.通过加热至95°C持续3分钟将寡核苷酸用40 μ l去离子水洗脱。

[1539] 图28c中所示的结果证明了使用本发明的示例性方法的两个完整合成循环的性能。

[1540] 实例9.版本2化学-单发夹模型上的完整三循环实验。

[1541] 所述实例描述了在双发夹模型上使用5个步骤合成多核苷酸的完整三循环实验：从切口位点掺入3'-O-修饰的dNTP；在第一步在与互补碱基相对地发生的情况下去除保护基、裂解、连接和变性步骤。

[1542] 所述方法的示例性示意图概述显示在图33、34和35中。

[1543] 所述方法首先是通过DNA聚合酶的酶促掺入，然后肌苷去除保护基、裂解、连接和辅助股的变性，将3'-O-保护的单核苷酸受控的添加到寡核苷酸中。图33显示了涉及酶掺入、去除保护基、裂解、连接和变性步骤的第一个完整循环。在所述实施例中，寡核苷酸由T核苷酸延伸。图34显示了第一个循环后的第二个完整循环，涉及酶促掺入、去除保护基、裂解、连接步骤和变性步骤。在所述实施例中，寡核苷酸由T核苷酸延伸。图35显示了第二个循环后的第3个完整循环，涉及酶促掺入、去除保护基、裂解、连接和变性步骤。在所述实施例中，寡核苷酸由T核苷酸延伸。

[1544] 材料和方法

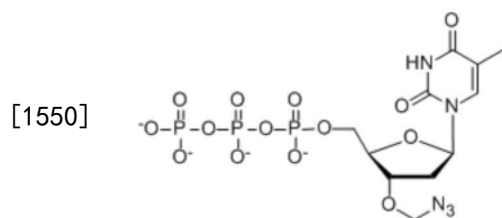
[1545] 材料

[1546] 1. 根据描述于以下的方案内部合成3'-O-经修饰的dNTP：博士毕业论文Jian Wu：用于通过合成进行DNA测序的新颖核苷酸类似物的分子工程改造，哥伦比亚大学，2008。用于合成的方案还描述于专利申请公开：J. William Efcavitch, Julieta E. Sylvester, 用于聚脱氧核苷酸合成的经修饰的模板独立性酶 (Modified Template-Independent Enzymes for Polydeoxynucleotide Synthesis), 《分子集合体 (Molecular Assemblies)》US2016/0108382A1。

[1547] 2. 寡核苷酸是内部设计的并从Integrated DNA Technologies, Sigma-Aldrich获得(图36)。以100 μ M的浓度制备储备溶液。

[1548] 3. 使用终止子X DNA聚合酶，其由新英格兰实验室工程化，具有增强的掺入3'-O-修饰的dNTP的能力。可以替代地使用任何可以掺入修饰的dNTP的DNA聚合酶或其它酶。

[1549] 使用3'-O-叠氮甲基-dTTP掺入：



[1551] 方法

[1552] 第一循环：

[1553] 1. 将20 μ l的10x Thermopol®缓冲液 (20mM Tris-HCl, 10mM (NH₄)₂SO₄, 10mM KCl, 2mM MgSO₄, 0.1% Triton®X-100, pH 8.8, 新英格兰实验室) 和MnCl₂溶液 (10 μ l的40mM) 与139 μ l无菌去离子水 (ELGA VEOLIA) 在1.5ml Eppendorf管中混合。

[1554] 2. 将20 μ l的100 μ M单发夹模型寡核苷酸 (2nmol, 1当量) (SEQ ID NO:59, 图36) 加入到反应混合物中。

[1555] 3. 从反应混合物取出等分试样 (4 μ l), 以及加入0.5 μ l的天然dNTP混合物 (4mM) 和0.5 μ l的Bst DNA聚合酶以及0.5 μ l的Sulfolobus DNA聚合酶IV并使其反应10分钟。通过凝胶电泳分析反应。

- [1556] 4. 加入3'-O-修饰的-dTTP(10 μ l, 2mM)。
- [1557] 5. 然后加入5 μ l的Therminator IX DNA聚合酶(50U, New England BioLabs)。然而, 可以使用任何可以掺入修饰的dNTP的DNA聚合酶或其它酶。
- [1558] 6. 将反应物在37 $^{\circ}$ C培育30分钟。
- [1559] 7. 使用在纯化步骤66-72中概述的QIAGEN核苷酸去除试剂盒纯化反应混合物。
- [1560] 8. 通过200 μ l的TE缓冲液将DNA样品洗脱到干净的Eppendorf管中。
- [1561] 9. 从反应混合物取出等分试样(4 μ l), 以及加入0.5 μ l的天然dNTP混合物(4mM)和0.5 μ l的Bst DNA聚合酶以及0.5 μ l的Sulfolobus DNA聚合酶IV并使其反应10分钟。通过凝胶电泳分析反应。
- [1562] 10. 将400 μ L的500mM TCEP加入到反应混合物中, 并使其在37 $^{\circ}$ C反应10分钟。
- [1563] 11. 使用在纯化步骤66-72中概述的QIAGEN核苷酸去除试剂盒纯化反应混合物。
- [1564] 12. 通过150 μ l的NEB反应缓冲液[®](50mM乙酸钾, 20mM Tris-乙酸盐, 10mM乙酸镁, 1mM DTT, pH 7.9, 25 $^{\circ}$ C下)将DNA样品洗脱到干净的Eppendorf管中。
- [1565] 13. 从反应混合物取出等分试样(4 μ l), 以及加入0.5 μ l的天然dNTP混合物(4mM)和0.5 μ l的Bst DNA聚合酶以及0.5 μ l的Sulfolobus DNA聚合酶IV并使其反应10分钟。通过凝胶电泳分析反应。
- [1566] 14. 将5 μ l的人核酸内切酶V(Endo V)NEB(30单位/ μ l)加入洗脱液并在37 $^{\circ}$ C培育30分钟。可以使用任何合适的替代性内切核酸酶。
- [1567] 15. 在培育时间过去之后, 将反应物通过在65 $^{\circ}$ C下酶促热失活20分钟终止。
- [1568] 16. 将等分试样(5 μ l)从反应混合物取出, 并在聚丙烯酰胺凝胶上分析。
- [1569] 17. 通过QIAGEN核苷酸去除试剂盒, 使用纯化步骤66-72中概述的方案纯化反应混合物。
- [1570] 18. 通过100 μ l的T3 DNA连接酶缓冲液(2x浓度)将DNA样品洗脱到干净的Eppendorf管中。
- [1571] 19. 将20 μ l的100 μ M用于连接的肌苷股(2nmol)和20 μ l的100 μ M用于连接的辅助股(2nmol)(SEQ ID NO:60, 51, 图36)以及40 μ l水加入到反应混合物中。
- [1572] 20. 将20 μ l的T3 DNA连接酶NEB(3000单位/ μ l)加入同一管中(这可包括任何DNA连接酶)并在室温下培育30分钟。
- [1573] 使用对于股霉抗生物素蛋白磁珠试剂盒的方案纯化反应混合物, 包括纯化步骤73-78中概述的变性步骤。
- [1574] 21. 使用在纯化步骤66-72中概述的QIAGEN核苷酸去除试剂盒的方案纯化反应混合物。
- [1575] 22. 通过100 μ l的TE缓冲液将DNA样品洗脱到干净的Eppendorf管中。
- [1576] 第二循环:
- [1577] 23. 加入15 μ l的10xThermopol[®]缓冲液(20mM Tris-HCl, 10mM(NH₄)₂SO₄, 10mM KCl, 2mM MgSO₄, 0.1% Triton[®]X-100, pH 8.8, New England BioLabs)、MnCl₂溶液(7.5 μ l, 40mM)和19 μ l去离子水。
- [1578] 24. 从反应混合物取出等分试样(4 μ l), 以及加入0.5 μ l的天然dNTP混合物(4mM)和0.5 μ l的Bst DNA聚合酶以及0.5 μ l的Sulfolobus DNA聚合酶IV并使其反应10分钟。通过凝

胶电泳分析反应。

[1579] 25. 加入3'-O-修饰的-dTTP (7.5 μ l, 2mM)。

[1580] 26. 然后加入5 μ l的Therminator IX DNA聚合酶 (50U, New England BioLabs)。可以使用任何可以掺入修饰的dNTP的DNA聚合酶。

[1581] 27. 将反应物在37 $^{\circ}$ C培育30分钟。

[1582] 28. 使用在纯化步骤66-72中概述的QIAGEN核苷酸去除试剂盒纯化反应混合物。

[1583] 29. 通过100 μ l的TE缓冲液将DNA样品洗脱到干净的Eppendorf管中。

[1584] 30. 从反应混合物取出等分试样 (4 μ l), 以及加入0.5 μ l的天然dNTP混合物 (4mM) 和0.5 μ l的Bst DNA聚合酶以及0.5 μ l的Sulfolobus DNA聚合酶IV并使其反应10分钟。通过凝胶电泳分析反应。

[1585] 31. 将200 μ l的500mM TCEP加入到反应混合物中, 并使其在37 $^{\circ}$ C反应10分钟。

[1586] 32. 使用在纯化步骤66-72中概述的QIAGEN核苷酸去除试剂盒纯化反应混合物。

[1587] 33. 通过100 μ l的NEB反应缓冲液® (50mM乙酸钾, 20mM Tris-乙酸盐, 10mM乙酸镁, 1mM DTT, pH7.9, 25 $^{\circ}$ C下) 将DNA样品洗脱到干净的Eppendorf管中。

[1588] 34. 从反应混合物取出等分试样 (4 μ l), 以及加入0.5 μ l的天然dNTP混合物 (4mM) 和0.5 μ l的Bst DNA聚合酶以及0.5 μ l的Sulfolobus DNA聚合酶IV并使其反应10分钟。通过凝胶电泳分析反应。

[1589] 35. 将5 μ l的人核酸内切酶V (Endo V) NEB (30单位/ μ l) 加入洗脱液并在37 $^{\circ}$ C培育30分钟。可以使用任何合适的替代性内切核酸酶。

[1590] 36. 在培育时间过去之后, 将反应物通过在65 $^{\circ}$ C下酶促热失活20分钟终止。

[1591] 37. 将等分试样 (5 μ l) 取出反应混合物, 并在聚丙烯酰胺凝胶上分析。

[1592] 38. 通过QIAGEN核苷酸去除试剂盒, 使用纯化步骤66-72中概述的方案纯化反应混合物。

[1593] 39. 通过60 μ l的T3 DNA连接酶缓冲液 (2x浓度) 将DNA样品洗脱到干净的Eppendorf管中。

[1594] 40. 将20 μ l的100 μ M用于连接的肌苷股 (2nmol) 和20 μ l的100 μ M用于连接的辅助股 (2nmol) (SEQ ID NO:60, 51, 图36) 以及10 μ l去离子水加入到反应混合物中。

[1595] 41. 将10 μ l的T3 DNA连接酶NEB (3000单位/ μ l) 加入同一管中并在室温下培育30分钟。可以使用任何合适的DNA连接酶。

[1596] 42. 使用对于股霉抗生物素蛋白磁珠试剂盒的方案纯化反应混合物, 包括纯化步骤73-78中概述的变性步骤。

[1597] 43. 使用在纯化步骤66-72中概述的QIAGEN核苷酸去除试剂盒的方案纯化反应混合物。

[1598] 44. 通过46 μ l的TE缓冲液将DNA样品洗脱到干净的Eppendorf管中。

[1599] 第三循环:

[1600] 45. 加入6 μ l的10x Thermopol®缓冲液 (20mM Tris-HCl, 10mM (NH₄)₂SO₄, 10mM KCl, 2mM MgSO₄, 0.1% Triton®X-100, pH 8.8, New England BioLabs)、MnCl₂溶液 (3 μ l, 40mM)。

[1601] 46. 从反应混合物取出等分试样 (4 μ l), 以及加入0.5 μ l的天然dNTP混合物 (4mM) 和0.5 μ l的Bst DNA聚合酶以及0.5 μ l的Sulfolobus DNA聚合酶IV并使其反应10分钟。通过凝

胶电泳分析反应。

[1602] 47. 加入3'-O-修饰的dTTP (6 μ l的200 μ M)。

[1603] 48. 然后加入3 μ l的Therminator IX DNA聚合酶 (30U, New England BioLabs)。可以使用任何可以掺入修饰的dNTP的DNA聚合酶或其它合适的酶。

[1604] 49. 将反应物在37 $^{\circ}$ C培育30分钟。

[1605] 50. 使用在纯化步骤66-72中概述的QIAGEN核苷酸去除试剂盒纯化反应混合物。

[1606] 51. 通过50 μ l的TE缓冲液将DNA样品洗脱到干净的Eppendorf管中。

[1607] 52. 从反应混合物取出等分试样 (4 μ l), 以及加入0.5 μ l的天然dNTP混合物 (4mM) 和0.5 μ l的Bst DNA聚合酶以及0.5 μ l的Sulfolobus DNA聚合酶IV并使其反应10分钟。通过凝胶电泳分析反应。

[1608] 53. 将100 μ L的500mM TCEP加入到反应混合物中, 并使其在37 $^{\circ}$ C反应10分钟。

[1609] 54. 使用在纯化步骤66-72中概述的QIAGEN核苷酸去除试剂盒纯化反应混合物。

[1610] 55. 通过49 μ l的NEB反应缓冲液® (50mM乙酸钾, 20mM Tris-乙酸盐, 10mM乙酸镁, 1mM DTT, pH7.9, 25 $^{\circ}$ C下) 将DNA样品洗脱到干净的Eppendorf管中。

[1611] 56. 从反应混合物取出等分试样 (4 μ l), 以及加入0.5 μ l的天然dNTP混合物 (4mM) 和0.5 μ l的Bst DNA聚合酶以及0.5 μ l的Sulfolobus DNA聚合酶IV并使其反应10分钟。通过凝胶电泳分析反应。

[1612] 57. 将5 μ l的人核酸内切酶V (Endo V) NEB (30单位/ μ l) 加入洗脱液并在37 $^{\circ}$ C培育30分钟。或者可以使用任何合适的内切核酸酶。

[1613] 58. 在培育时间过去之后, 将反应物通过在65 $^{\circ}$ C下酶促热失活20分钟终止。

[1614] 59. 将等分试样 (5 μ l) 取出反应混合物, 并在聚丙烯酰胺凝胶上分析。

[1615] 60. 通过QIAGEN核苷酸去除试剂盒, 使用纯化步骤66-72中概述的方案纯化反应混合物。

[1616] 61. 通过30 μ l的T3 DNA连接酶缓冲液 (2x浓度) 将DNA样品洗脱到干净的Eppendorf管中。

[1617] 62. 将10 μ l的100 μ M用于连接的肌苷股 (2nmol)、10 μ l的100 μ M用于连接的辅助股 (2nmol) (SEQ ID NO:60, 51, 图36) 以及5 μ l水加入到反应混合物中。

[1618] 63. 将5 μ l的T3 DNA连接酶NEB (3000单位/ μ l) 加入同一管中。(这可包含任何DNA连接酶) 并在室温下培育30分钟。

[1619] 64. 通过凝胶电泳分析反应混合物。

[1620] 使用下述方案在掺入、解封闭和裂解步骤后通过QIAGEN核苷酸去除试剂盒纯化反应混合物:

[1621] 65. 将10体积的缓冲液PNI QIAGEN (5M氯化胍) 加入到样品中并通过用移液管重悬浮温和混合。

[1622] 66. 将混合物转移到QIAquick旋转柱 (QIAGEN) 并以6000rpm离心1分钟。

[1623] 67. 离心后, 弃去流过液, 向旋转柱中加入750 μ l缓冲液PE QIAGEN (10mM Tris-HCl pH7.5和80%乙醇), 并以6000rpm离心1分钟。

[1624] 68. 将流过液丢弃并将旋转柱以13000rpm离心另外的1分钟以去除残余的PE缓冲液。

[1625] 69.然后将旋转柱置于无菌的1.5ml Eppendorf管中。

[1626] 70.对于DNA洗脱,将20-200 μ l适当的反应缓冲液加入到柱膜中心,并在室温下静置1分钟。

[1627] 71.然后将管以13000rpm离心1分钟。

[1628] 通过下面概述的方案,在使用涉及变性步骤的股霉抗生物素蛋白磁珠的连接步骤后进行反应的纯化:

[1629] 72.用100 μ l结合缓冲液(20mM TRIS,500mM NaCl,pH=7.4)洗涤200 μ l股霉抗生物素蛋白磁珠(New England BioLabs)3次。

[1630] 73.连接步骤之后反应混合物与10倍体积的结合缓冲液(20mM的TRIS,500mM的NaCl,pH值=7.4)混合,并用股霉抗生物素蛋白磁珠在20 $^{\circ}$ C使其培育15分钟。

[1631] 74.用200 μ l结合缓冲液(20mM TRIS,500mM NaCl,pH=7.4)洗涤股霉抗生物素蛋白磁珠3次。

[1632] 75.为了去除辅助股,在放置于磁体上的200 μ l结合缓冲液(20mM TRIS,500mM NaCl,pH=7.4)中将股霉抗生物素蛋白磁珠加热至80 $^{\circ}$ C,并将上清液迅速丢弃。

[1633] 76.用去离子水洗涤股霉抗生物素蛋白磁珠3次。

[1634] 77.通过加热至95 $^{\circ}$ C持续3分钟将寡核苷酸用50-100 μ l去离子水洗脱。

[1635] 结果和结论

[1636] 图37描绘了显示对应于完整三循环实验的反应产物的凝胶,所述实验包括:掺入、解封闭、裂解和连接步骤。所示结果证明了使用本发明的示例性方法的三个完整合成循环的性能。

[1637] 实例10.衍生化聚丙烯酰胺表面并随后固定分子。

[1638] 所述实施例描述了使用N-(5-溴乙酰胺基戊基)丙烯酰胺(BRAPA)在聚丙烯酰胺表面上呈现溴乙酰基,并且随后通过它们与溴乙酰基的共价偶联来表面固定硫醇化分子。

[1639] 材料和方法

[1640] 通过在丙酮、乙醇和水中依次超声处理,每次10分钟,并用氩气干燥,清洁玻璃显微镜载玻片和盖玻片。将清洁的盖玻片在聚苯乙烯培养皿中用三氯(1H,1H,2H,2H-全氟辛基)硅烷在气相中硅烷化,在乙醇中超声处理两次并用Ar干燥(下文‘氟化盖玻片’)。在玻璃显微镜载玻片上,将4%丙烯酰胺/N,N'-亚甲基双丙烯酰胺(19:1)溶液与100 μ l的10%(w/v)过硫酸铵(APS)、10 μ l的四甲基乙二胺(TEMED)混合,用0.0.1、0.2和0.3%(w/v)的N-(5-溴乙酰胺基戊基)丙烯酰胺(BRAPA)掺杂,并快速分配到4mm直径的橡胶垫圈中,随后用氟化盖玻片夹在中间,氟化面朝向丙烯酰胺溶液,并聚合10分钟。10分钟后,将表面浸入去离子水中并浸没总共4小时,在此期间小心地去除氟化盖玻片。聚合的聚丙烯酰胺表面用氩气干燥。

[1641] 随后将聚丙烯酰胺表面暴露于磷酸钠缓冲液(10mM,pH 8)中的硫醇化聚乙二醇(1kDa)荧光素(FITC-PEG-SH)和作为阴性对照的羧化聚乙二醇(1kDa)荧光素(FITC-PEG-COOH)1小时,然后依次用磷酸钠缓冲液(10mM,pH7)和含有0.05%Tween20/0.5M NaCl的相同缓冲液洗涤,以去除非特异性吸附的硫醇化和羧化荧光团。随后通过ChemiDoc(Bio-Rad)在荧光素通道中对表面成像。

[1642] 结果和结论

[1643] 图38显示荧光信号,并且图39显示从聚丙烯酰胺凝胶表面测量的荧光,其中掺入不同量的BRAPA,其暴露于FITC-PEG-SH和FITC-PEG-COOH。荧光素的固定仅在掺有BRAPA并且仅有硫醇化荧光素的聚丙烯酰胺表面成功,对羧化荧光素的非特异性吸附接近于零。

[1644] 与不含BRAPA(BRAPA 0%)的那些聚丙烯酰胺表面和含有BRAPA和羧化分子(FITC-PEG-COOH)的那些聚丙烯酰胺表面相比,含有(BRAPA 0.1、0.2和0.3%)和仅来自巯基化分子(FITC-PEG-SH)的聚丙烯酰胺表面获得了显著高的正荧光信号。结果表明,来自表面的溴乙酰基部分和来自荧光素标记分子的硫醇部分之间发生了特异性共价偶联。

[1645] 结果表明,分子,例如包括用于本发明方法的支持股和合成股的分子,可以容易地固定在与本文所述的多核苷酸合成反应相容的表面基底上。

[1646] 实例11. 发夹DNA寡聚体的表面固定和随后掺入荧光标记的脱氧核苷三磷酸。

[1647] 本实例描述:

[1648] (1) 在薄的聚丙烯酰胺表面上呈现溴乙酰基的方法;

[1649] (2) 随后通过硫代磷酸酯官能化的发夹DNA在有或没有接头下的共价偶联来固定发夹DNA;和

[1650] (3) 将2'-脱氧核苷酸三磷酸(dNTP)掺入发夹DNA中。

[1651] 所述方法几乎与任何类型的材料表面(例如金属、聚合物等)相容。

[1652] (1): 溴乙酰基官能化的薄聚丙烯酰胺表面的制备

[1653] 材料和方法

[1654] 首先在纯净的Decon 90(30分钟)、水(30分钟)、1M NaOH(15分钟)、水(30分钟)、0.1M HCl(15分钟)、水(30分钟)中通过超声处理清洁玻璃显微镜载玻片,最后用氩干燥。

[1655] 首先通过将1g丙烯酸酰胺单体溶解在50ml水中制备2% (w/v) 丙烯酸酰胺单体溶液。将丙烯酸酰胺单体溶液涡旋并在氩气中脱气15分钟。将N-(5-溴乙酰胺基戊基)丙烯酸酰胺(BRAPA, 82.5mg)溶解在825 μ l的DMF中,并加入到丙烯酸酰胺单体溶液中并进一步涡旋。最后,将1ml 5% (w/v) 过硫酸钾(KPS)和115 μ l纯四甲基乙二胺(TEMED)加入到丙烯酸酰胺溶液中,涡旋并将干净的玻璃显微镜载玻片暴露于所述丙烯酸酰胺聚合混合物中90分钟。90分钟后,用去离子水洗涤表面并用氩气干燥。在这个实例的下文中,这些表面将被称为“BRAPA改性表面”。作为阴性对照,通过排除向丙烯酸酰胺单体溶液中添加BRAPA溶液,也以与上述类似的方式制备不含BRAPA的聚丙烯酰胺表面。在这个实例的下文中,这些表面将被称为“BRAPA对照表面”。

[1656] (2): 硫代磷酸酯官能化的发夹DNA在聚丙烯酰胺表面上的共价偶联

[1657] 材料和方法

[1658] 将具有4mm直径圆形开口的橡胶垫圈放置并固定在BRAPA改性表面和BRAPA对照表面上。首先用磷酸钠缓冲液(10mM, pH 7)引发表面10分钟。随后去除缓冲液,并将表面暴露于5'-荧光标记的(Alexa 647)发夹DNA寡聚体,分别具有和不具有以1 μ M浓度用六种和单一硫代磷酸酯修饰的接头,并在黑暗中培育1小时。BRAPA改性表面也与具有和不具有接头但没有硫代磷酸酯作为对照的DNA寡聚体一起培育(在下文中称为“寡聚体对照表面”)。培育后,将表面用磷酸钠(100mM, pH7)冲洗,然后用Tris-EDTA缓冲液(10mM Tris, 10mM EDTA, pH8)冲洗,最后用水冲洗。为了去除任何非特异性吸附的DNA寡聚体,随后用含有1M氯化钠和0.05% (v/v) Tween20的水洗涤表面,用水洗涤并用氩气干燥。在ChemiDoc成像仪上在

Alexa 647通道中扫描表面。

[1659] 图40a显示了固定在不同样品上的没有接头的发夹DNA序列。图40b显示了固定在不同样品上的具有接头的发夹DNA序列。

[1660] 结果

[1661] 结果显示在图41和42中。图41显示源自发夹DNA寡聚体的荧光信号,其中有和没有接头固定在溴乙酰基官能化的聚丙烯酰胺表面上,但不是来自BRAPA或寡聚物对照。

[1662] 图42显示了在聚丙烯酰胺表面上DNA固定后测量的荧光强度。所述图显示了从各种聚丙烯酰胺表面获得的表面荧光信号,并显示由于DNA在溴乙酰基官能化的聚丙烯酰胺表面上成功的共价固定,与BRAPA和寡聚物对照表面(如(2)中所述)相比,从固定在BRAPA改性表面上的发夹DNA寡聚体获得显著更高的信号。

[1663] 结论

[1664] 来自DNA的荧光信号仅悬垂地存在于掺有BRAPA的BRAPA改性表面,表明通过硫代磷酸酯官能团将DNA成功共价偶联到表面上。与没有接头的DNA相比,从有接头的DNA获得同源和更高的信号。

[1665] (3):将三磷酸酯掺入具有接头的发夹DNA寡聚体中

[1666] 材料和方法

[1667] 将具有9mm直径的圆形开口的橡胶密封垫放在固定有具有接头的DNA寡聚体的BRAPA改性表面上,并用掺入缓冲液(50mM TRIS pH 8, 1mM EDTA, 6mM MgSO_4 , 0.05% tween20 and 2mM MnCl_2)引发10分钟。随后将表面暴露于含有DNA聚合酶(0.5U/ μl 终止子X DNA聚合酶)和三磷酸(20 μM Alexa 488标记的dUTP)的掺入缓冲液中并培育1小时(此后在所述实施例中称为“聚合酶表面”)。另外一组表面也暴露于没有终止子X DNA聚合酶的掺入缓冲液1小时作为阴性对照(在下文中称为“阴性表面”)。1小时后,将两种类型的样品在水中洗涤,随后暴露于含有1M氯化钠和0.05% (v/v) Tween20的水中,并再次用水洗涤。在Alexa647和Alexa 488通道中使用ChemiDoc测量来自表面的荧光信号,以监测发夹DNA(Alexa647)的存在和dUTP(Alexa 488)的掺入。

[1668] 结果

[1669] 图43显示在掺入Alexa 488标记的dUTP之前和之后从Alexa 647和Alexa 488通道检测到的荧光信号。在掺入之前和之后来自Alexa 647的未改变的阳性信号表明表面固定的发夹DNA在掺入反应期间是稳定的,而来自Alexa 488的阳性信号仅在掺入反应后从聚合酶表面观察到,显示仅在聚合酶存在时成功掺入dUTP。

[1670] 图44显示了如(3)中所述在掺入Alexa 488标记的dUTP之前和之后从‘聚合酶表面’和‘阴性表面’获得的Alexa 647(发夹DNA)和Alexa 488(dUTP)通道中的测量荧光信号。由于成功掺入,在聚合酶表面的掺入反应后获得Alexa 488荧光信号的显著增加,而由于不存在聚合酶,来自阴性表面的信号在掺入反应后保持相同。在掺入反应后,Alexa 647通道中的荧光信号基本保持不变,表明表面上存在发夹DNA。荧光信号的轻微降低可能归因于第二轮曝光引起的光漂白效应。

[1671] 结论

[1672] 结果表明,包括用于本发明方法的支持股和合成股的分子,可以容易地固定在与本文所述的多核苷酸合成反应相容的表面基底上。结果进一步证明,这种分子可以接受新

dNTP的掺入以延伸合成股,同时分子保持稳定并附着于基底。

[1673] 实例12.通过接头和硫代磷酸酯共价键连接固定于衍生化表面的发夹DNA寡聚体的裂解和连接。

[1674] 所述实例描述了用接头与硫代磷酸酯官能化的发夹DNA的衍生化表面的共价偶联,然后是裂解和连接反应。如实例11所述进行基底制备和发夹DNA的偶联。

[1675] (1):裂解具有接头的固定的发夹DNA寡聚体

[1676] 材料和方法

[1677] 如实例11中所述,将发夹DNA固定在表面BRAPA改性表面上。制备四组一式三份表面,包括用于裂解和连接反应的所有实验对照。实验条件如图45a所示。图45b显示固定在不同样品上的发夹DNA的序列。

[1678] 在DNA固定步骤后,将具有9mm直径圆形开口的橡胶垫圈放置在所有表面上,所述表面用在5'末端用Alexa 647标记的DNA固定,并用1X NEBuffer 4 (50mM醋酸钾,20mM Tris-乙酸盐,10mM乙酸镁,1mM DTT,pH7.9)引发10分钟。注意,对于样品D,固定的发夹DNA不含肌苷,肌苷被鸟嘌呤取代。随后将所有样品暴露于含有1.5U/ μ l内切核酸酶V的NEBuffer 4 (样品A、B和D) 或不含内切核酸酶V的NEBuffer 4 (样品C) 1小时。随后用1X T3 DNA连接酶缓冲液 (66mM Tris-HCl,10mM MgCl₂,1mM ATP,7.5%PEG6000,1mM DTT,pH 7.6)、含有1M氯化钠和0.05% (v/v) Tween20的1X T3 DNA连接酶缓冲液洗涤所有样品,再用1X T3 DNA连接酶缓冲液洗涤,并在Alexa 647通道中在ChemiDoc成像仪上扫描。

[1679] 结果

[1680] 图46显示了在裂解反应之前和之后来自发夹DNA寡聚体的荧光信号。

[1681] 图47显示了如上所述从DNA固定表面获得的在裂解反应之前和之后测量的荧光信号。仅从样品A和B观察到成功的裂解反应,而由于序列中没有内切核酸酶V (样品C) 或肌苷 (样品D),样品C和D的荧光信号强度保持几乎相同。

[1682] 从样品A和B中观察到荧光信号的显著降低是由于在内切核酸酶V存在下在DNA股内的肌苷位点的成功裂解反应。对于样品C和D,在DNA内没有内切核酸酶V和缺乏肌苷分别导致荧光信号保持与DNA固定后获得的初始信号几乎相同的水平。

[1683] (2):连接反应

[1684] 材料和方法

[1685] 在如(1)中所述的裂解反应后,将样品A和B (如图45a中所述) 暴露于含有MnCl₂ (2mM)、在5'末端用Alexa 647标记的肌苷股 (16 μ M) 和互补‘辅助’股 (16 μ M) (序列显示在下面的图48中) 的1X T3 DNA连接酶缓冲液,用于样品A用T3 DNA连接酶 (250U/ μ l),对于样品B,没有T3 DNA连接酶,作为阴性对照。将样品在各自的溶液中培育1小时。1小时后,将表面在水中洗涤,随后暴露于含有1M氯化钠和0.05% (v/v) Tween20的水中,并再次用水洗涤。在Alexa 647通道中使用ChemiDoc测量来自表面的荧光信号。图48显示了用于连接反应的含肌苷股和互补‘辅助’股的序列。

[1686] 结果

[1687] 图49显示了与连接反应监测有关的结果。在连接反应之前和之后从Alexa 647通道检测到荧光信号。连接后Alexa 647通道中荧光信号的增加仅从具有T3 DNA连接酶的样品A获得,而由于不存在T3 DNA连接酶,在样品B的连接反应后荧光信号保持在相同水平。

[1688] 图50显示,由于成功连接,样品A的连接反应后Alexa 647荧光信号显著增加,其中信号水平恢复到如图47所示的DNA固定后和裂解反应前的初始信号水平。由于不存在T3 DNA连接酶,来自样品B的荧光信号在连接反应后保持相同。

[1689] 结论

[1690] 所述实施例中的结果表明,包括用于本发明方法的支持股和合成股的分子,可以容易地固定在与本文所述的多核苷酸合成反应相容的表面基底上,并且可以在保持稳定以及附接于基底的同时进行裂解和连接反应。

[1691] 实例13将3'-O-叠氮基甲基-dNTP掺入平末端DNA的3'末端。

[1692] 所述实例描述了将3'-O-叠氮基甲基-dNTP掺入平末端双股DNA的3'末端。

[1693] 下面的步骤证明了通过DNA聚合酶的酶促掺入,将3'-O-保护的单核苷酸受控地添加到平末端双股寡核苷酸中。所述步骤与图1和图2(103、108、203、208)中的每一个所示的合并步骤3一致。

[1694] 材料和方法

[1695] 材料

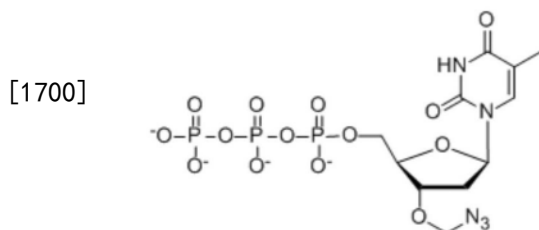
[1696] 1.内部合成的3'-O-叠氮基甲基-dNTP。

[1697] 2.已由新英格兰生物实验室工程改造以具有掺入3'-O-经修饰的dNTP的增强能力的终止子X DNA聚合酶。

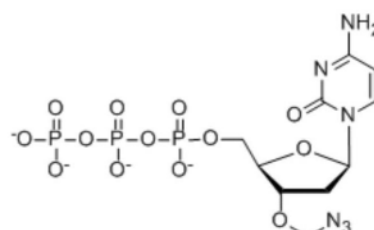
[1698] 3.平末端双股DNA寡核苷酸。

[1699] 测试四种类型的可逆终止子:

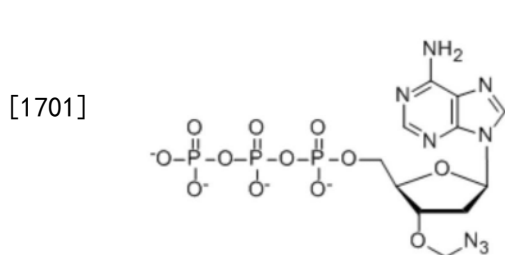
3'-O-叠氮基甲基-dTTP:



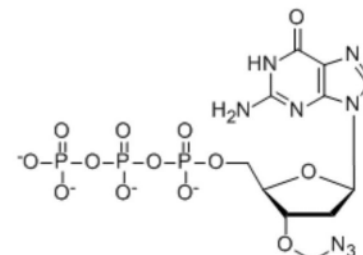
3'-O-叠氮基甲基-dCTP:



3'-O-叠氮基甲基-dATP:



3'-O-叠氮基甲基-dGTP:



[1702] 方法

[1703] 1.将5μl的10x Thermopol®缓冲液(20mM Tris-HCl,10mM(NH₄)₂SO₄,10mM KCl,2mM MgSO₄,0.1% Triton® X-100,pH 8.8,New England BioLabs)与33.5μl无菌去离子水(ELGA VEOLIA)在1.5ml Eppendorf管中混合。

[1704] 2.将2μl的20μM引物(40pmol,1当量)(SEQ ID:N0:68,图51a)和3μl的20μM模板(60pmol,1.5当量)(SEQ ID:N0:69,图51a)添加到反应混合物中。

- [1705] 3.加入3'-O-修饰的-dTTP (2 μ l的100 μ M)和MnCl₂ (2.5 μ l的40mM)。
- [1706] 4.然后加入2 μ l的Therminator IX DNA聚合酶 (20U, New England BioLabs)。
- [1707] 5.将反应物在37°C培育30分钟。
- [1708] 6.将反应物通过加入TBE-尿素样品缓冲液 (Novex) 停止。
- [1709] 7.将反应物在聚丙烯酰胺凝胶 (15%) 上用TBE缓冲液分离,并通过ChemiDoc MP成像系统 (BioRad) 进行可视化。

[1710] 结果

[1711] 图51b描绘展示在37°C下在Mn²⁺离子存在下通过终止子X DNA聚合酶掺入3'-O-经修饰的-dNTP的结果的凝胶。数据显示终止子X DNA聚合酶能够成功地将3'-O-修饰的dNTP掺入到平末端DNA寡核苷酸的3'末端以产生单一碱悬垂物。

[1712] 在上述实施例中,SEQ ID NO 1-69中所示的所有寡核苷酸在3'末端具有羟基。除了SEQ ID NO 7、SEQ ID NO 18和SEQ ID NO 35之外,SEQ ID NO 1-69中所示的所有寡核苷酸在5'末端缺少磷酸基团。

[1713] 应当理解,所公开方法和产品的不同应用可以根据本领域的特定需要而定制。还应理解,本文所使用的术语仅出于对本发明的特定实施例进行描述的目的而并不旨在是限制性的。

[1714] 如在本说明书和所附权利要求中所使用的,单数形式“一个(a)”、“一种(an)”和“所述(the)”包含复数指示物,除非上下文另外明确指明。因此,例如,提及“连接多核苷酸”包含两个或更多个这样的多核苷酸,提及“支架多核苷酸”包含两个或更多个这样的支架多核苷酸等。

[1715] 本文所引用的所有公开、专利和专利申请特此通过引用整体掺入。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 牛津纳米孔科技公司
- [0003] <120> 多核苷酸合成方法、系统和试剂盒
- [0004] <130> N413528W0
- [0005] <140> 待分配
- [0006] <141> 2019-05-23
- [0007] <150> GB1808474.9
- [0008] <151> 2018-05-23
- [0009] <160> 69
- [0010] <170> PatentIn版本3.5
- [0011] <210> 1
- [0012] <211> 18
- [0013] <212> DNA
- [0014] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0015] <220>
- [0016] <221> 来源
- [0017] <223> /注释="人工序列的描述:合成引物"
- [0018] <400> 1
- [0019] gcgacaggtg actgcagc 18
- [0020] <210> 2
- [0021] <211> 36
- [0022] <212> DNA
- [0023] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0024] <220>
- [0025] <221> 来源
- [0026] <223> /注释="人工序列的描述:合成寡核苷酸"
- [0027] <220>
- [0028] <221> 经修饰的碱基
- [0029] <222> (18) .. (18)
- [0030] <223> 2'-脱氧肌苷
- [0031] <400> 2
- [0032] cacatcacgt cgtagtcngc tgcagtcacc tgtcgc 36
- [0033] <210> 3
- [0034] <211> 36
- [0035] <212> DNA
- [0036] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0037] <220>
- [0038] <221> 来源

- [0039] <223> /注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”
- [0040] <220>
- [0041] <221> 经修饰的碱基
- [0042] <222> (18) .. (18)
- [0043] <223> 2'-脱氧肌苷
- [0044] <400> 3
- [0045] cacatcacgt cgtagtcngc tgcagtcacc tgtcgc 36
- [0046] <210> 4
- [0047] <211> 19
- [0048] <212> DNA
- [0049] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0050] <220>
- [0051] <221> 来源
- [0052] <223> /注释=“人工序列的描述:合成引物”
- [0053] <400> 4
- [0054] gcgacaggtg actgcagct 19
- [0055] <210> 5
- [0056] <211> 36
- [0057] <212> DNA
- [0058] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0059] <220>
- [0060] <221> 来源
- [0061] <223> /注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”
- [0062] <400> 5
- [0063] gcgacaggtg actgcagctg actacgacgt gatgtg 36
- [0064] <210> 6
- [0065] <211> 36
- [0066] <212> DNA
- [0067] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0068] <220>
- [0069] <221> 来源
- [0070] <223> /注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”
- [0071] <220>
- [0072] <221> 经修饰的碱基
- [0073] <222> (17) .. (17)
- [0074] <223> 2'-脱氧肌苷
- [0075] <400> 6
- [0076] cacatcacgt cgtagtnagc tgcagtcacc tgtcgc 36
- [0077] <210> 7

[0078] <211> 18
[0079] <212> DNA
[0080] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0081] <220>
[0082] <221> 来源
[0083] <223> /注释="人工序列的描述:合成寡核苷酸"
[0084] <400> 7
[0085] gctgcagtca cctgtcgc 18
[0086] <210> 8
[0087] <211> 19
[0088] <212> DNA
[0089] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0090] <220>
[0091] <221> 来源
[0092] <223> /注释="人工序列的描述:合成引物"
[0093] <400> 8
[0094] gcgacaggtg actgcagct 19
[0095] <210> 9
[0096] <211> 18
[0097] <212> DNA
[0098] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0099] <220>
[0100] <221> 来源
[0101] <223> /注释="人工序列的描述:合成寡核苷酸"
[0102] <220>
[0103] <221> 经修饰的碱基
[0104] <222> (17) .. (17)
[0105] <223> 2'-脱氧肌苷
[0106] <400> 9
[0107] cacatcacgt cgtagtna 18
[0108] <210> 10
[0109] <211> 18
[0110] <212> DNA
[0111] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0112] <220>
[0113] <221> 来源
[0114] <223> /注释="人工序列的描述:合成引物"
[0115] <400> 10
[0116] gcgacaggtg actgcagc 18

[0117] <210> 11
[0118] <211> 36
[0119] <212> DNA
[0120] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0121] <220>
[0122] <221> 来源
[0123] <223> /注释="人工序列的描述:合成寡核苷酸"
[0124] <220>
[0125] <221> 经修饰的碱基
[0126] <222> (18) .. (18)
[0127] <223> 2'-脱氧肌苷
[0128] <400> 11
[0129] cacatcacgt cgtagtcngc tgcagtcacc tgtcgc 36
[0130] <210> 12
[0131] <211> 18
[0132] <212> DNA
[0133] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0134] <220>
[0135] <221> 来源
[0136] <223> /注释="人工序列的描述:合成寡核苷酸"
[0137] <400> 12
[0138] cgactacgac gtgatgtg 18
[0139] <210> 13
[0140] <211> 36
[0141] <212> DNA
[0142] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0143] <220>
[0144] <221> 来源
[0145] <223> /注释="人工序列的描述:合成寡核苷酸"
[0146] <220>
[0147] <221> 经修饰的碱基
[0148] <222> (18) .. (18)
[0149] <223> 脱氧肌苷
[0150] <400> 13
[0151] cacatcacgt cgtagtcngc tgcagtcacc tgtcgc 36
[0152] <210> 14
[0153] <211> 19
[0154] <212> DNA
[0155] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0156] <220>
[0157] <221> 来源
[0158] <223> /注释="人工序列的描述:合成引物"
[0159] <400> 14
[0160] gcgacaggtg actgcagct 19
[0161] <210> 15
[0162] <211> 36
[0163] <212> DNA
[0164] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0165] <220>
[0166] <221> 来源
[0167] <223> /注释="人工序列的描述:合成寡核苷酸"
[0168] <400> 15
[0169] gcgacaggtg actgcagctg actacgacgt gatgtg 36
[0170] <210> 16
[0171] <211> 18
[0172] <212> DNA
[0173] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0174] <220>
[0175] <221> 来源
[0176] <223> /注释="人工序列的描述:合成寡核苷酸"
[0177] <400> 16
[0178] tgactacgac gtgatgtg 18
[0179] <210> 17
[0180] <211> 36
[0181] <212> DNA
[0182] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0183] <220>
[0184] <221> 来源
[0185] <223> /注释="人工序列的描述:合成寡核苷酸"
[0186] <220>
[0187] <221> 经修饰的碱基
[0188] <222> (17) .. (17)
[0189] <223> 2'-脱氧肌苷
[0190] <400> 17
[0191] cacatcacgt cgtagtnagc tgcagtcacc tgtcgc 36
[0192] <210> 18
[0193] <211> 18
[0194] <212> DNA

- [0195] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0196] <220>
[0197] <221> 来源
[0198] <223> /注释="人工序列的描述:合成寡核苷酸"
[0199] <400> 18
[0200] gctgcagtca cctgtcgc 18
[0201] <210> 19
[0202] <211> 19
[0203] <212> DNA
[0204] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0205] <220>
[0206] <221> 来源
[0207] <223> /注释="人工序列的描述:合成引物"
[0208] <400> 19
[0209] gcgacaggtg actgcagct 19
[0210] <210> 20
[0211] <211> 18
[0212] <212> DNA
[0213] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0214] <220>
[0215] <221> 来源
[0216] <223> /注释="人工序列的描述:合成寡核苷酸"
[0217] <220>
[0218] <221> 经修饰的碱基
[0219] <222> (17) .. (17)
[0220] <223> 2'-脱氧肌苷
[0221] <400> 20
[0222] cacatcacgt cgtagtna 18
[0223] <210> 21
[0224] <211> 17
[0225] <212> DNA
[0226] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0227] <220>
[0228] <221> 来源
[0229] <223> /注释="人工序列的描述:合成寡核苷酸"
[0230] <400> 21
[0231] cactacgacg tgatgtg 17
[0232] <210> 22
[0233] <211> 18

- [0234] <212> DNA
- [0235] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0236] <220>
- [0237] <221> 来源
- [0238] <223> /注释="人工序列的描述:合成引物"
- [0239] <400> 22
- [0240] gcgacaggtg actgcagc 18
- [0241] <210> 23
- [0242] <211> 37
- [0243] <212> DNA
- [0244] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0245] <220>
- [0246] <221> 来源
- [0247] <223> /注释="人工序列的描述:合成寡核苷酸"
- [0248] <220>
- [0249] <221> 经修饰的碱基
- [0250] <222> (18) .. (18)
- [0251] <223> 2'-脱氧肌苷
- [0252] <400> 23
- [0253] cacatcacgt cgtagtcnag ctgcagtcac ctgtcgc 37
- [0254] <210> 24
- [0255] <211> 37
- [0256] <212> DNA
- [0257] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0258] <220>
- [0259] <221> 来源
- [0260] <223> /注释="人工序列的描述:合成寡核苷酸"
- [0261] <220>
- [0262] <221> 经修饰的碱基
- [0263] <222> (18) .. (18)
- [0264] <223> 2'-脱氧肌苷
- [0265] <400> 24
- [0266] cacatcacgt cgtagtcngg ctgcagtcac ctgtcgc 37
- [0267] <210> 25
- [0268] <211> 37
- [0269] <212> DNA
- [0270] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0271] <220>
- [0272] <221> 来源

[0273] <223> /注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”
[0274] <220>
[0275] <221> 经修饰的碱基
[0276] <222> (18) .. (18)
[0277] <223> 2'-脱氧肌苷
[0278] <400> 25
[0279] cacatcacgt cgtagtcnag ctgcagtcac ctgtcgc 37
[0280] <210> 26
[0281] <211> 37
[0282] <212> DNA
[0283] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0284] <220>
[0285] <221> 来源
[0286] <223> /注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”
[0287] <220>
[0288] <221> 经修饰的碱基
[0289] <222> (18) .. (18)
[0290] <223> 2'-脱氧肌苷
[0291] <400> 26
[0292] cacatcacgt cgtagtcnag ctgcagtcac ctgtcgc 37
[0293] <210> 27
[0294] <211> 19
[0295] <212> DNA
[0296] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0297] <220>
[0298] <221> 来源
[0299] <223> /注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”
[0300] <400> 27
[0301] tcgactacga cgtgatgtg 19
[0302] <210> 28
[0303] <211> 19
[0304] <212> DNA
[0305] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0306] <220>
[0307] <221> 来源
[0308] <223> /注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”
[0309] <400> 28
[0310] ccgactacga cgtgatgtg 19
[0311] <210> 29

[0312] <211> 19
[0313] <212> DNA
[0314] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0315] <220>
[0316] <221> 来源
[0317] <223> /注释="人工序列的描述:合成寡核苷酸"
[0318] <400> 29
[0319] acgactacga cgtgatgtg 19
[0320] <210> 30
[0321] <211> 19
[0322] <212> DNA
[0323] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0324] <220>
[0325] <221> 来源
[0326] <223> /注释="人工序列的描述:合成寡核苷酸"
[0327] <400> 30
[0328] gcgactacga cgtgatgtg 19
[0329] <210> 31
[0330] <211> 37
[0331] <212> DNA
[0332] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0333] <220>
[0334] <221> 来源
[0335] <223> /注释="人工序列的描述:合成寡核苷酸"
[0336] <220>
[0337] <221> 经修饰的碱基
[0338] <222> (18) .. (18)
[0339] <223> 脱氧肌苷
[0340] <400> 31
[0341] cacatcacgt cgtagtcnag ctgcagtcac ctgtcgc 37
[0342] <210> 32
[0343] <211> 19
[0344] <212> DNA
[0345] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0346] <220>
[0347] <221> 来源
[0348] <223> /注释="人工序列的描述:合成引物"
[0349] <400> 32
[0350] gcgacaggtg actgcagct 19

- [0351] <210> 33
[0352] <211> 36
[0353] <212> DNA
[0354] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0355] <220>
[0356] <221> 来源
[0357] <223> /注释="人工序列的描述:合成寡核苷酸"
[0358] <400> 33
[0359] gcgacaggtg actgcagctg actacgacgt gatgtg 36
[0360] <210> 34
[0361] <211> 19
[0362] <212> DNA
[0363] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0364] <220>
[0365] <221> 来源
[0366] <223> /注释="人工序列的描述:合成寡核苷酸"
[0367] <400> 34
[0368] tcgactacga cgtgatgtg 19
[0369] <210> 35
[0370] <211> 18
[0371] <212> DNA
[0372] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0373] <220>
[0374] <221> 来源
[0375] <223> /注释="人工序列的描述:合成寡核苷酸"
[0376] <400> 35
[0377] gctgcagtca cctgtcgc 18
[0378] <210> 36
[0379] <211> 19
[0380] <212> DNA
[0381] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0382] <220>
[0383] <221> 来源
[0384] <223> /注释="人工序列的描述:合成引物"
[0385] <400> 36
[0386] gcgacaggtg actgcagct 19
[0387] <210> 37
[0388] <211> 19
[0389] <212> DNA

- [0390] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0391] <220>
[0392] <221> 来源
[0393] <223> /注释="人工序列的描述:合成寡核苷酸"
[0394] <220>
[0395] <221> 经修饰的碱基
[0396] <222> (17) .. (17)
[0397] <223> 2'-脱氧肌苷
[0398] <400> 37
[0399] cacatcacgt cgtagtnga 19
[0400] <210> 38
[0401] <211> 18
[0402] <212> DNA
[0403] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0404] <220>
[0405] <221> 来源
[0406] <223> /注释="人工序列的描述:合成寡核苷酸"
[0407] <400> 38
[0408] ccactacgac gtgatgtg 18
[0409] <210> 39
[0410] <211> 18
[0411] <212> DNA
[0412] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0413] <220>
[0414] <221> 来源
[0415] <223> /注释="人工序列的描述:合成引物"
[0416] <400> 39
[0417] gcgacaggtg actgcagc 18
[0418] <210> 40
[0419] <211> 36
[0420] <212> DNA
[0421] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0422] <220>
[0423] <221> 来源
[0424] <223> /注释="人工序列的描述:合成寡核苷酸"
[0425] <400> 40
[0426] cacatcacgt cgtagtcagc tgcagtcacc tgtcgc 36
[0427] <210> 41
[0428] <211> 36

[0429] <212> DNA
[0430] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0431] <220>
[0432] <221> 来源
[0433] <223> /注释="人工序列的描述:合成寡核苷酸"
[0434] <400> 41
[0435] cacatcacgt cgtagtcggc tgcagtcacc tgtcgc 36
[0436] <210> 42
[0437] <211> 36
[0438] <212> DNA
[0439] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0440] <220>
[0441] <221> 来源
[0442] <223> /注释="人工序列的描述:合成寡核苷酸"
[0443] <400> 42
[0444] cacatcacgt cgtagtctgc tgcagtcacc tgtcgc 36
[0445] <210> 43
[0446] <211> 36
[0447] <212> DNA
[0448] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0449] <220>
[0450] <221> 来源
[0451] <223> /注释="人工序列的描述:合成寡核苷酸"
[0452] <400> 43
[0453] cacatcacgt cgtagtccgc tgcagtcacc tgtcgc 36
[0454] <210> 44
[0455] <211> 78
[0456] <212> DNA
[0457] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0458] <220>
[0459] <221> 来源
[0460] <223> /注释="人工序列的描述:合成寡核苷酸"
[0461] <220>
[0462] <221> 经修饰的碱基
[0463] <222> (36) .. (36)
[0464] <223> 2'-脱氧肌苷
[0465] <220>
[0466] <221> 经修饰的碱基
[0467] <222> (58) .. (58)

- [0468] <223> Tamra-dT
- [0469] <400> 44
- [0470] tcgactacga cgtgactttt agtcacgtcg tagtcnagct gcagtcacct gctgcttntt 60
- [0471] gcagcaggtg actgcagc 78
- [0472] <210> 45
- [0473] <211> 79
- [0474] <212> DNA
- [0475] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0476] <220>
- [0477] <221> 来源
- [0478] <223> /注释="人工序列的描述:合成寡核苷酸"
- [0479] <220>
- [0480] <221> 经修饰的碱基
- [0481] <222> (36) .. (36)
- [0482] <223> 2'-脱氧肌苷
- [0483] <220>
- [0484] <221> 经修饰的碱基
- [0485] <222> (58) .. (58)
- [0486] <223> Tamra-dT
- [0487] <400> 45
- [0488] tcgactacga cgtgactttt agtcacgtcg tagtcnagct gcagtcacct gctgcttntt 60
- [0489] gcagcaggtg actgcagct 79
- [0490] <210> 46
- [0491] <211> 42
- [0492] <212> DNA
- [0493] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0494] <220>
- [0495] <221> 来源
- [0496] <223> /注释="人工序列的描述:合成寡核苷酸"
- [0497] <220>
- [0498] <221> 经修饰的碱基
- [0499] <222> (21) .. (21)
- [0500] <223> Tamra-dT磷酸
- [0501] <400> 46
- [0502] gctgcagtca cctgctgctt nttgcagcag gtgactgcag ct 42
- [0503] <210> 47
- [0504] <211> 38
- [0505] <212> DNA
- [0506] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

- [0507] <220>
[0508] <221> 来源
[0509] <223> /注释="人工序列的描述:合成寡核苷酸"
[0510] <220>
[0511] <221> 经修饰的碱基
[0512] <222> (36) .. (36)
[0513] <223> 2'-脱氧肌苷
[0514] <400> 47
[0515] ccgactacga cgtgactttt agtcacgtcg tagtcnga 38
[0516] <210> 48
[0517] <211> 78
[0518] <212> DNA
[0519] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0520] <220>
[0521] <221> 来源
[0522] <223> /注释="人工序列的描述:合成寡核苷酸"
[0523] <220>
[0524] <221> 经修饰的碱基
[0525] <222> (36) .. (36)
[0526] <223> 2'-脱氧肌苷
[0527] <220>
[0528] <221> 经修饰的碱基
[0529] <222> (58) .. (58)
[0530] <223> Tamra-dT
[0531] <400> 48
[0532] tcgactacga cgtgactttt agtcacgtcg tagtcnagct gcagtcacct gctgcttntt 60
[0533] gcagcaggtg actgcagc 78
[0534] <210> 49
[0535] <211> 38
[0536] <212> DNA
[0537] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0538] <220>
[0539] <221> 来源
[0540] <223> /注释="人工序列的描述:合成寡核苷酸"
[0541] <220>
[0542] <221> 经修饰的碱基
[0543] <222> (36) .. (36)
[0544] <223> 2'-脱氧肌苷
[0545] <400> 49

- [0546] ccgactacga cgtgactttt agtcacgtcg tagtcnga 38
- [0547] <210> 50
- [0548] <211> 58
- [0549] <212> DNA
- [0550] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0551] <220>
- [0552] <221> 来源
- [0553] <223> /注释="人工序列的描述:合成寡核苷酸"
- [0554] <220>
- [0555] <221> 经修饰的碱基
- [0556] <222> (16) .. (16)
- [0557] <223> 2'-脱氧肌苷
- [0558] <220>
- [0559] <221> 经修饰的碱基
- [0560] <222> (38) .. (38)
- [0561] <223> Tamra-dT
- [0562] <400> 50
- [0563] agtcacgtcg tagtcnagct gcagtcacct gctgcttntt gcagcaggtg actgcagc 58
- [0564] <210> 51
- [0565] <211> 17
- [0566] <212> DNA
- [0567] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0568] <220>
- [0569] <221> 来源
- [0570] <223> /注释="人工序列的描述:合成寡核苷酸"
- [0571] <400> 51
- [0572] tcgactacga cgtgact 17
- [0573] <210> 52
- [0574] <211> 18
- [0575] <212> DNA
- [0576] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0577] <220>
- [0578] <221> 来源
- [0579] <223> /注释="人工序列的描述:合成寡核苷酸"
- [0580] <220>
- [0581] <221> 经修饰的碱基
- [0582] <222> (16) .. (16)
- [0583] <223> 2'-脱氧肌苷
- [0584] <400> 52

[0585]	agtcacgtcg tagtcnga 18
[0586]	<210> 53
[0587]	<211> 17
[0588]	<212> DNA
[0589]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0590]	<220>
[0591]	<221> 来源
[0592]	<223> /注释="人工序列的描述:合成寡核苷酸"
[0593]	<400> 53
[0594]	ccgactacga cgtgact 17
[0595]	<210> 54
[0596]	<211> 78
[0597]	<212> DNA
[0598]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0599]	<220>
[0600]	<221> 来源
[0601]	<223> /注释="人工序列的描述:合成寡核苷酸"
[0602]	<220>
[0603]	<221> 经修饰的碱基
[0604]	<222> (35) .. (35)
[0605]	<223> 2'-脱氧肌苷
[0606]	<220>
[0607]	<221> 经修饰的碱基
[0608]	<222> (57) .. (57)
[0609]	<223> Tamra-dT
[0610]	<400> 54
[0611]	cgactacgac gtgactttta gtcacgtcgt agtcnagctg cagtcacctg ctgcttnttg 60
[0612]	cagcaggtga ctgcagct 78
[0613]	<210> 55
[0614]	<211> 37
[0615]	<212> DNA
[0616]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0617]	<220>
[0618]	<221> 来源
[0619]	<223> /注释="人工序列的描述:合成寡核苷酸"
[0620]	<220>
[0621]	<221> 经修饰的碱基
[0622]	<222> (35) .. (35)
[0623]	<223> 2'-脱氧肌苷

- [0624] <400> 55
[0625] cgactacgac gtgactttta gtcacgtcgt agtcnaa 37
[0626] <210> 56
[0627] <211> 78
[0628] <212> DNA
[0629] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0630] <220>
[0631] <221> 来源
[0632] <223> /注释="人工序列的描述:合成寡核苷酸"
[0633] <220>
[0634] <221> 经修饰的碱基
[0635] <222> (35) .. (35)
[0636] <223> 2'-脱氧肌苷
[0637] <220>
[0638] <221> 经修饰的碱基
[0639] <222> (52) .. (52)
[0640] <223> Tamra-dT
[0641] <220>
[0642] <221> 经修饰的碱基
[0643] <222> (57) .. (57)
[0644] <223> 生物素-dT
[0645] <400> 56
[0646] cgactacgac gtgactttta gtcacgtcgt agtcnagctg cagtcacctg cngcttnttg 60
[0647] cagcaggtga ctgcagct 78
[0648] <210> 57
[0649] <211> 38
[0650] <212> DNA
[0651] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0652] <220>
[0653] <221> 来源
[0654] <223> /注释="人工序列的描述:合成寡核苷酸"
[0655] <220>
[0656] <221> 经修饰的碱基
[0657] <222> (36) .. (36)
[0658] <223> 2'-脱氧肌苷
[0659] <400> 57
[0660] ccgactacga cgtgactttt agtcacgtcg tagtcnga 38
[0661] <210> 58
[0662] <211> 62

- [0663] <212> DNA
[0664] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0665] <220>
[0666] <221> 来源
[0667] <223> /注释="人工序列的描述:合成寡核苷酸"
[0668] <220>
[0669] <221> 经修饰的碱基
[0670] <222> (60) .. (60)
[0671] <223> 2'-脱氧肌苷
[0672] <400> 58
[0673] acgagtgacc tggttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttacc aggtcactcn 60
[0674] tg 62
[0675] <210> 59
[0676] <211> 58
[0677] <212> DNA
[0678] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0679] <220>
[0680] <221> 来源
[0681] <223> /注释="人工序列的描述:合成寡核苷酸"
[0682] <220>
[0683] <221> 经修饰的碱基
[0684] <222> (16) .. (16)
[0685] <223> 2'-脱氧肌苷
[0686] <220>
[0687] <221> 经修饰的碱基
[0688] <222> (33) .. (33)
[0689] <223> Tamra-dT
[0690] <220>
[0691] <221> 经修饰的碱基
[0692] <222> (38) .. (38)
[0693] <223> 生物素-dT
[0694] <400> 59
[0695] agtcacgtcg tagtcnagct gcagtcacct gcngetnttt gcagcaggtg actgcagc 58
[0696] <210> 60
[0697] <211> 18
[0698] <212> DNA
[0699] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0700] <220>
[0701] <221> 来源

- [0702] <223> /注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”
- [0703] <220>
- [0704] <221> 经修饰的碱基
- [0705] <222> (16) .. (16)
- [0706] <223> 2'-脱氧肌苷
- [0707] <400> 60
- [0708] agtcacgtcg tagtcnaa 18
- [0709] <210> 61
- [0710] <211> 67
- [0711] <212> DNA
- [0712] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0713] <220>
- [0714] <221> 来源
- [0715] <223> /注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”
- [0716] <220>
- [0717] <221> 经修饰的碱基
- [0718] <222> (16) .. (16)
- [0719] <223> 2'-脱氧肌苷
- [0720] <400> 61
- [0721] agtcacgtcg tagtcnagct gcagtcacct gctgcttttt ttttttttg cagcaggtga 60
- [0722] ctgcagc 67
- [0723] <210> 62
- [0724] <211> 67
- [0725] <212> DNA
- [0726] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0727] <220>
- [0728] <221> 来源
- [0729] <223> /注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”
- [0730] <220>
- [0731] <221> 经修饰的碱基
- [0732] <222> (16) .. (16)
- [0733] <223> 2'-脱氧肌苷
- [0734] <400> 62
- [0735] agtcacgtcg tagtcnagct gcagtcacct gctgcttttt ttttttttg cagcaggtga 60
- [0736] ctgcagc 67
- [0737] <210> 63
- [0738] <211> 58
- [0739] <212> DNA
- [0740] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

- [0741] <220>
[0742] <221> 来源
[0743] <223> /注释="人工序列的描述:合成寡核苷酸"
[0744] <220>
[0745] <221> 经修饰的碱基
[0746] <222> (16) .. (16)
[0747] <223> 2'-脱氧肌苷
[0748] <220>
[0749] <221> 经修饰的碱基
[0750] <222> (38) .. (38)
[0751] <223> 5''-硫代磷酸-Sp9-Sp9-Sp9-5-甲基C
[0752] <400> 63
[0753] agtcacgtcg tagtcnagct gcagtcacct gctgcttctt gcagcaggtg actgcagc 58
[0754] <210> 64
[0755] <211> 58
[0756] <212> DNA
[0757] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0758] <220>
[0759] <221> 来源
[0760] <223> /注释="人工序列的描述:合成寡核苷酸"
[0761] <220>
[0762] <221> 经修饰的碱基
[0763] <222> (16) .. (16)
[0764] <223> 2'-脱氧肌苷
[0765] <220>
[0766] <221> 经修饰的碱基
[0767] <222> (38) .. (38)
[0768] <223> 5''-磷酸-Sp9-Sp9-Sp9-5-甲基C
[0769] <400> 64
[0770] agtcacgtcg tagtcnagct gcagtcacct gctgcttctt gcagcaggtg actgcagc 58
[0771] <210> 65
[0772] <211> 59
[0773] <212> DNA
[0774] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0775] <220>
[0776] <221> 来源
[0777] <223> /注释="人工序列的描述:合成寡核苷酸"
[0778] <220>
[0779] <221> 经修饰的碱基

- [0780] <222> (16) .. (16)
- [0781] <223> 2'-脱氧肌苷
- [0782] <220>
- [0783] <221> 经修饰的碱基
- [0784] <222> (38) .. (38)
- [0785] <223> 5''-硫代磷酸-Sp9-Sp9-Sp9-5-甲基C
- [0786] <400> 65
- [0787] agtcacgtcg tagtcnagct gcagtcacct gctgcttctt gcagcaggtg actgcagct 59
- [0788] <210> 66
- [0789] <211> 59
- [0790] <212> DNA
- [0791] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0792] <220>
- [0793] <221> 来源
- [0794] <223> /注释="人工序列的描述:合成寡核苷酸"
- [0795] <220>
- [0796] <221> 经修饰的碱基
- [0797] <222> (38) .. (38)
- [0798] <223> 5''-硫代磷酸-Sp9-Sp9-Sp9-5-甲基C
- [0799] <400> 66
- [0800] agtcacgtcg tagtcgagct gcagtcacct gctgcttctt gcagcaggtg actgcagct 59
- [0801] <210> 67
- [0802] <211> 18
- [0803] <212> DNA
- [0804] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0805] <220>
- [0806] <221> 来源
- [0807] <223> /注释="人工序列的描述:合成寡核苷酸"
- [0808] <220>
- [0809] <221> 经修饰的碱基
- [0810] <222> (16) .. (16)
- [0811] <223> 2'-脱氧肌苷
- [0812] <400> 67
- [0813] agtcacgtcg tagtcnaa 18
- [0814] <210> 68
- [0815] <211> 18
- [0816] <212> DNA
- [0817] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0818] <220>

-
- [0819] <223> 引物序列-图51
[0820] <400> 68
[0821] gcgacaggtg actgcagc 18
[0822] <210> 69
[0823] <211> 18
[0824] <212> DNA
[0825] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0826] <220>
[0827] <223> 模板序列-图51
[0828] <400> 69
[0829] gctgcagtca cctgtcgc 18

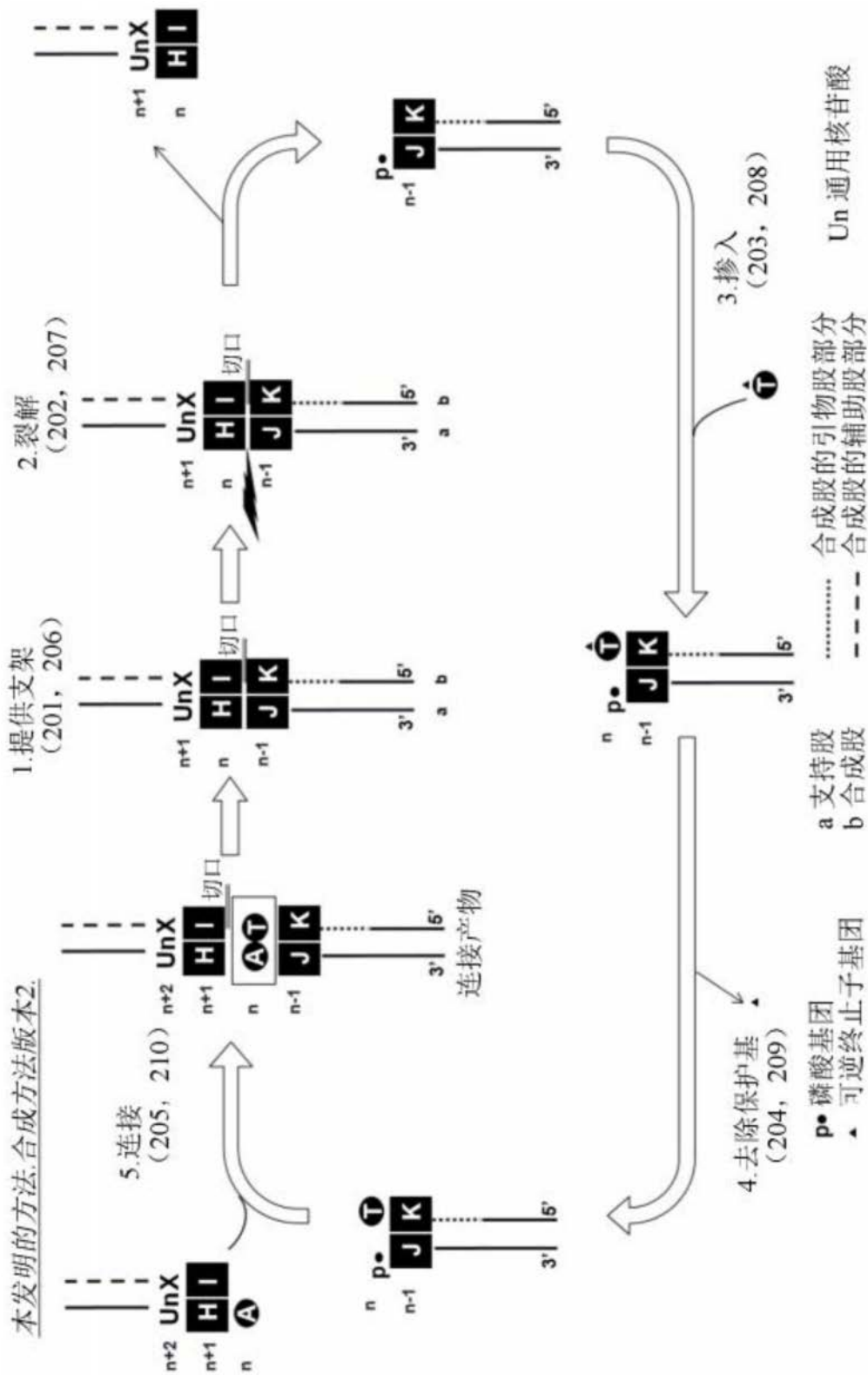


图2

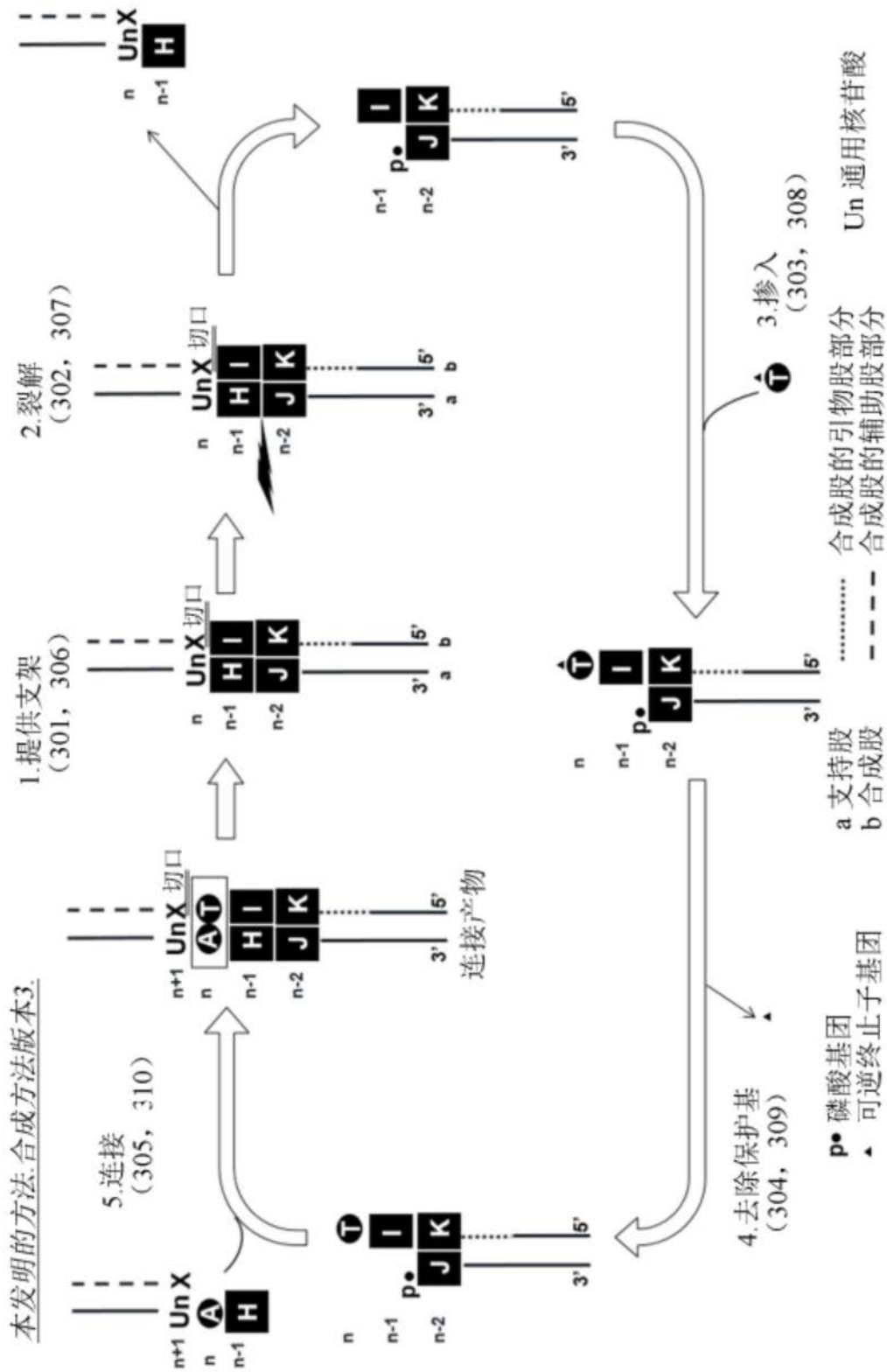


图3

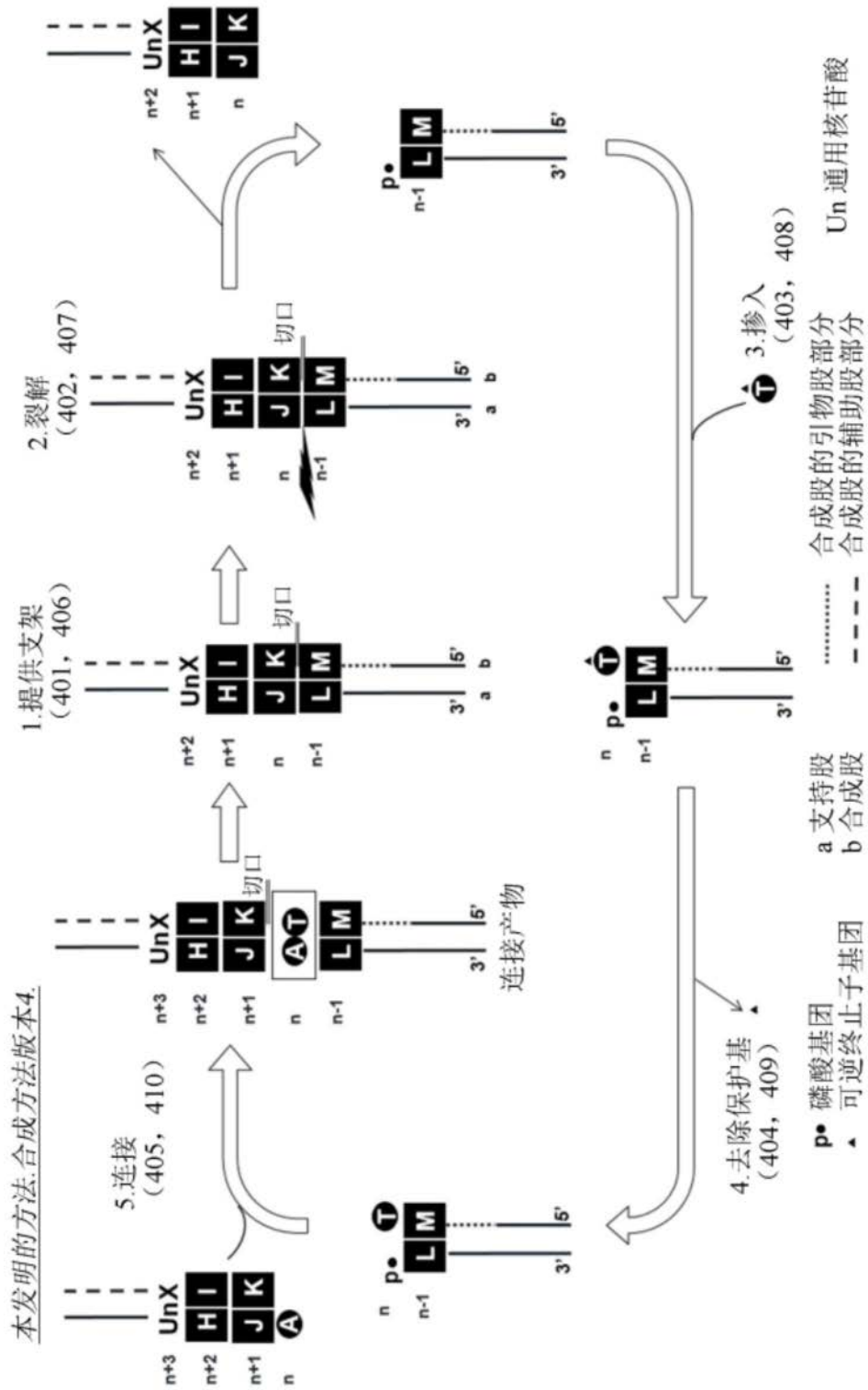


图4

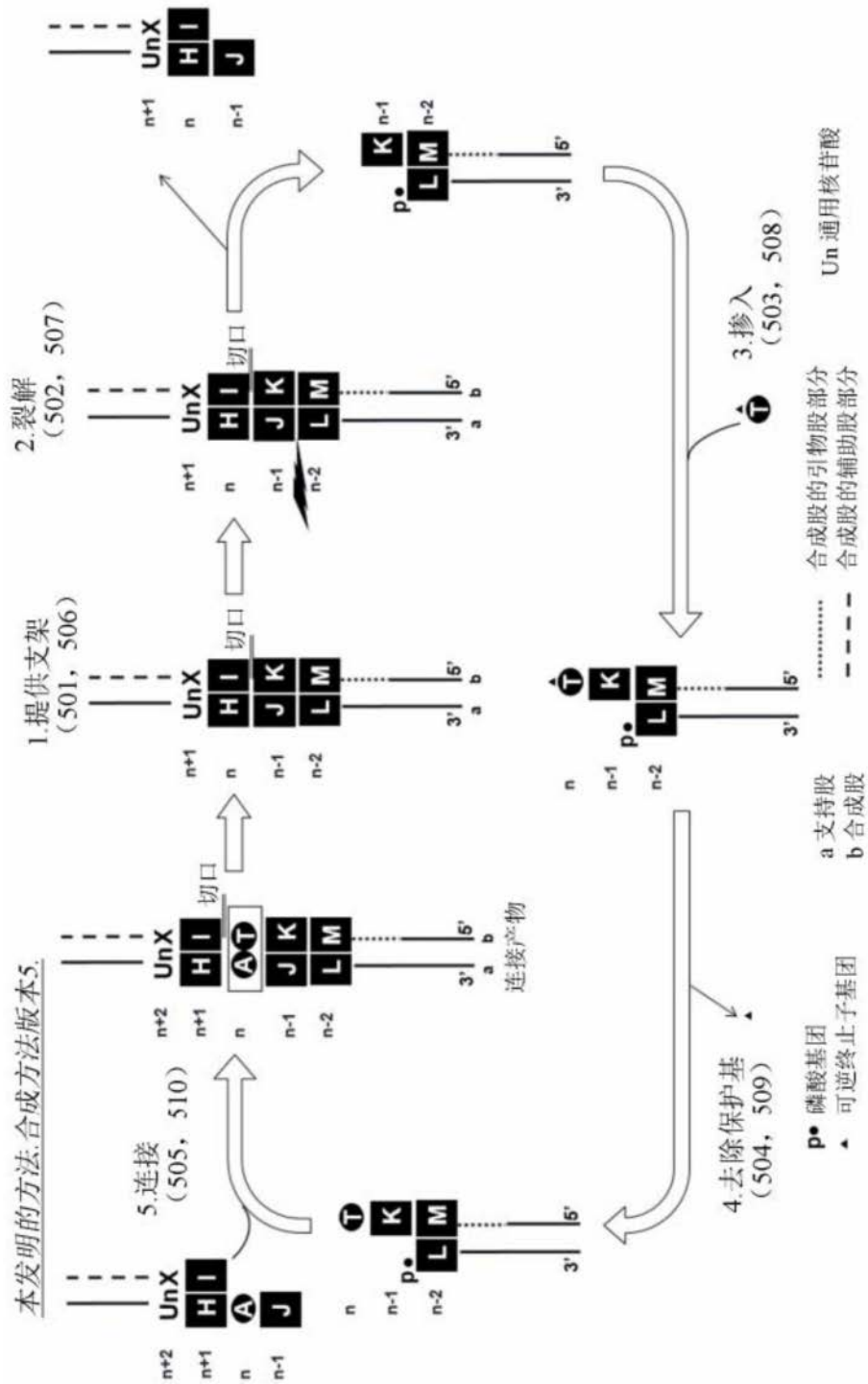


图5

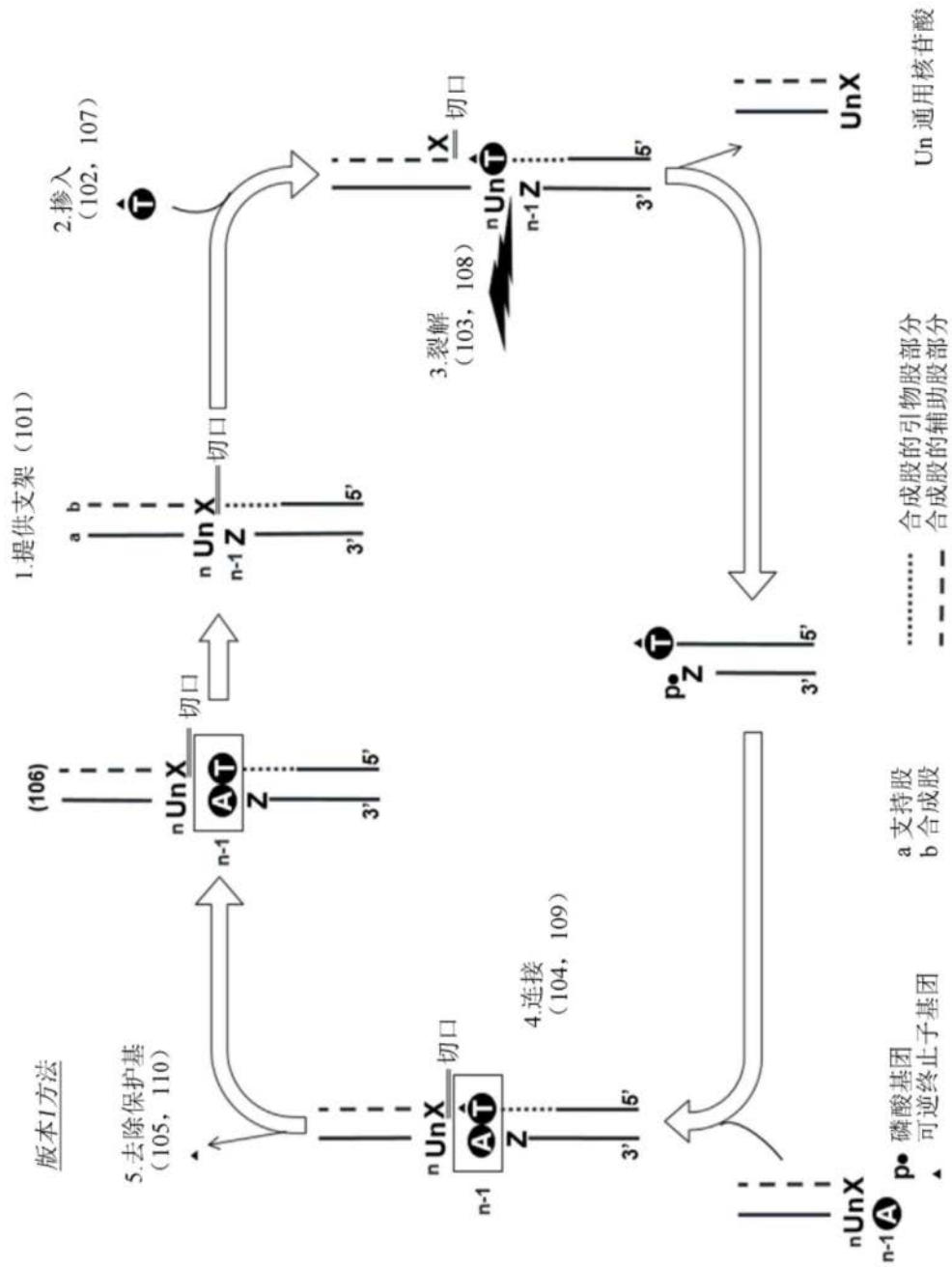


图6

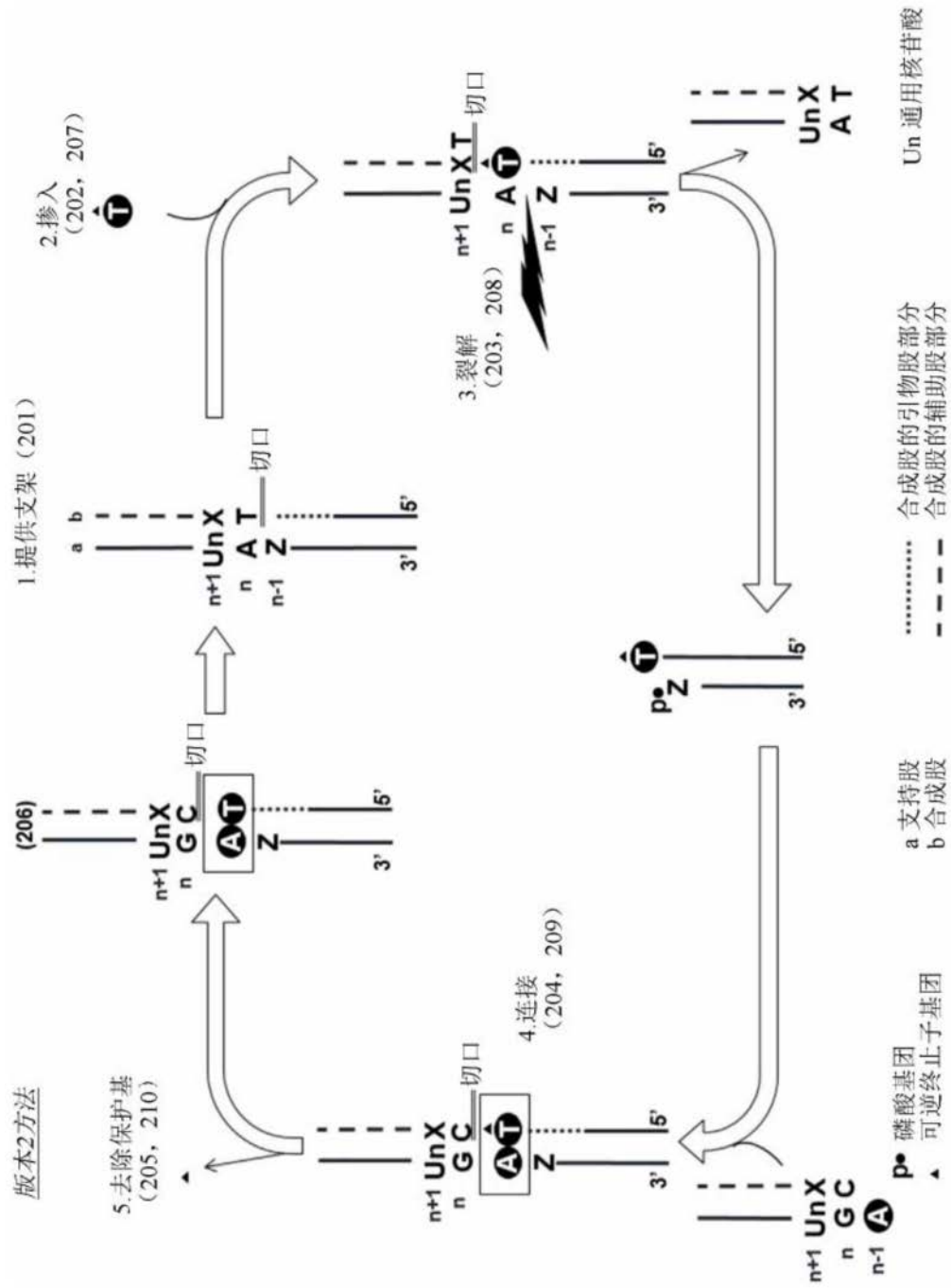


图7

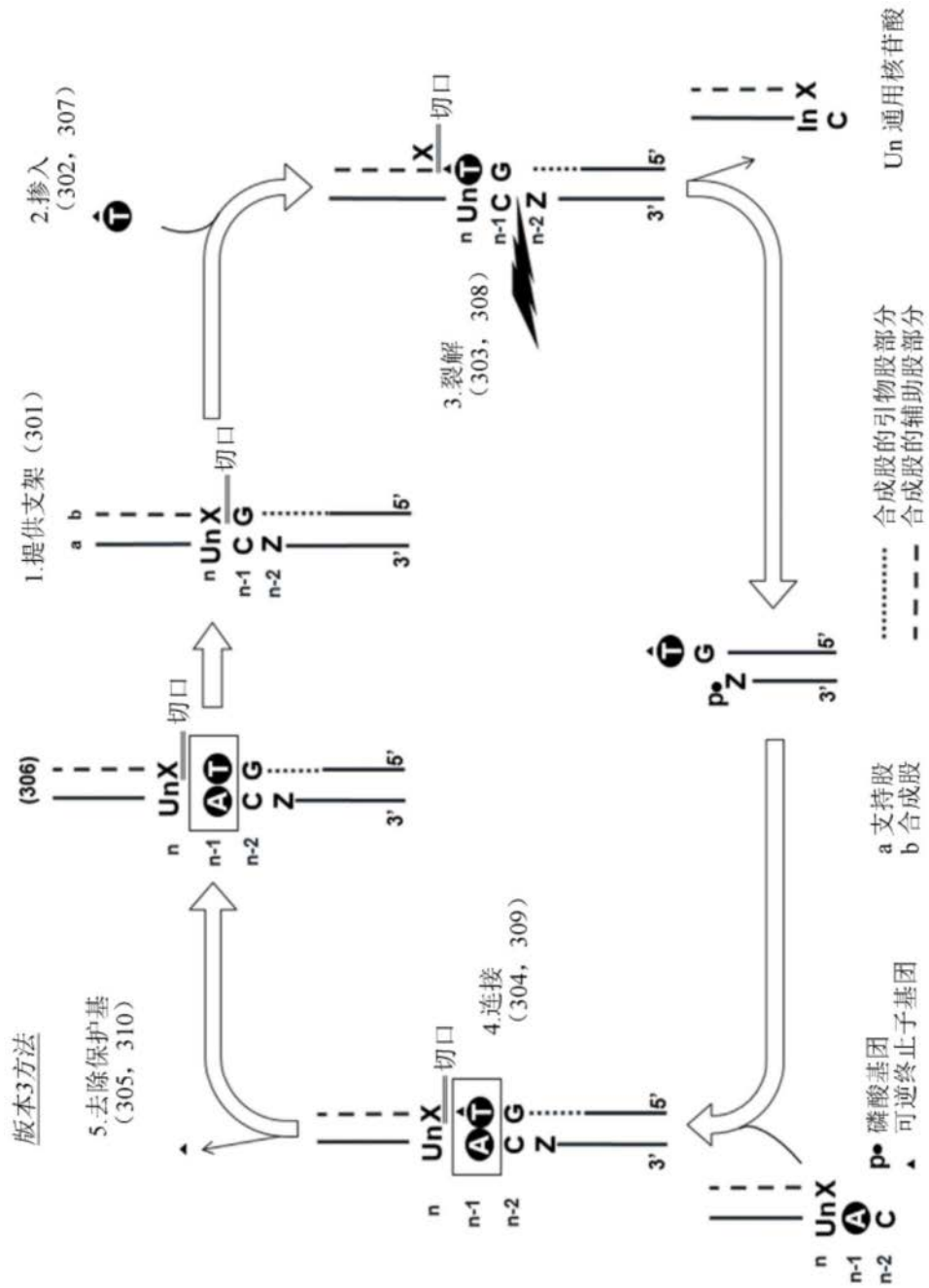


图8

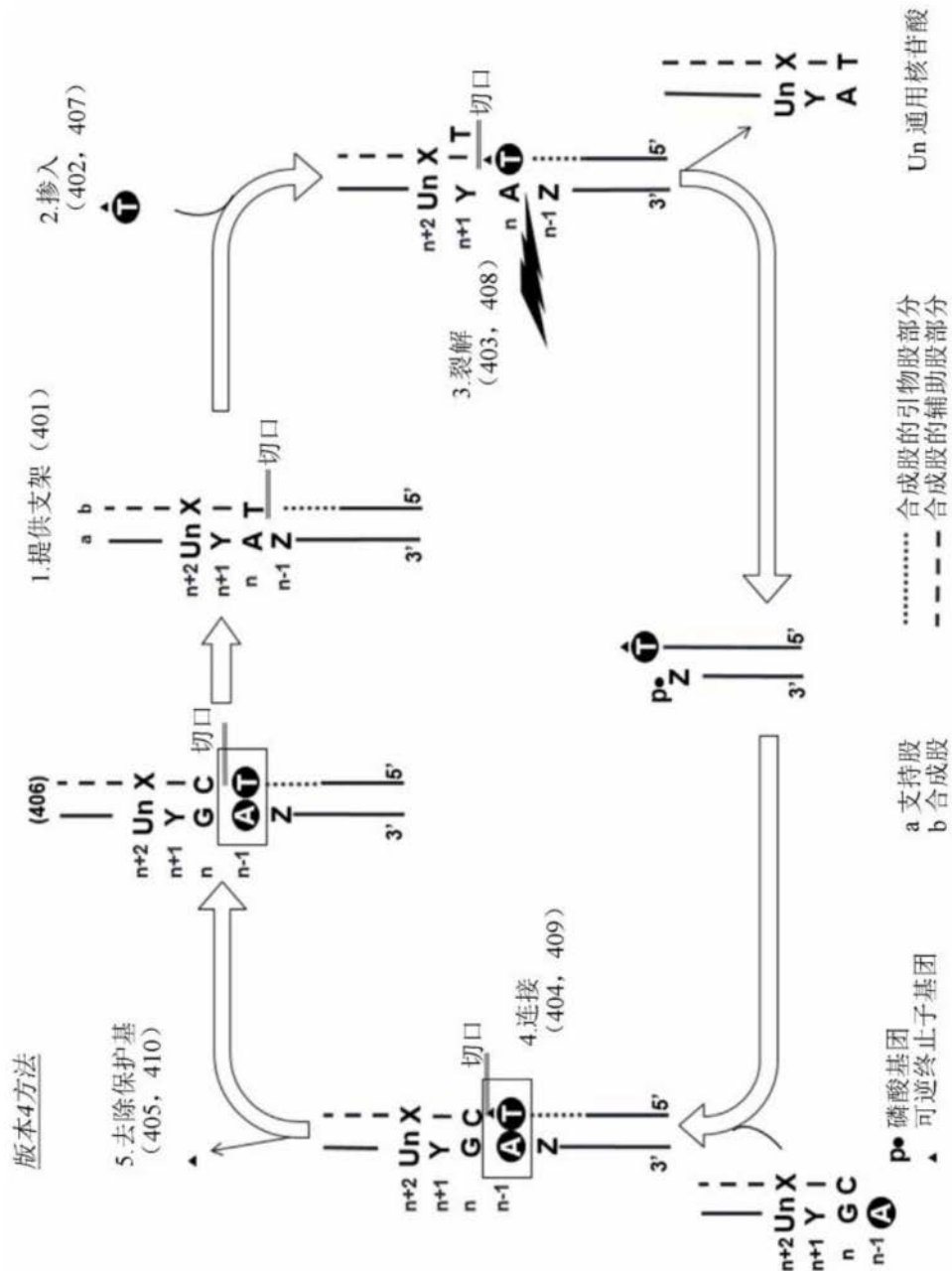


图9

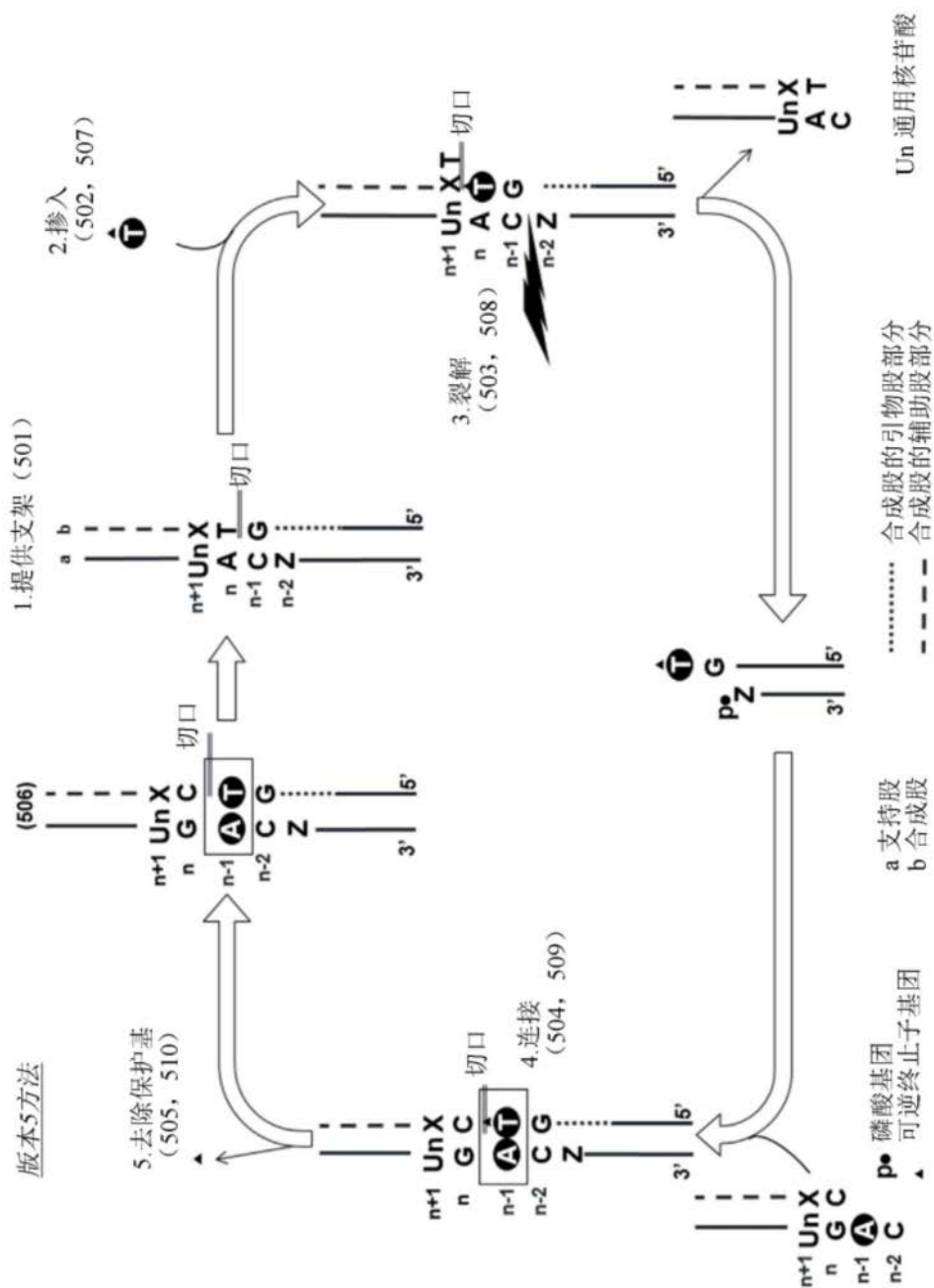


图10

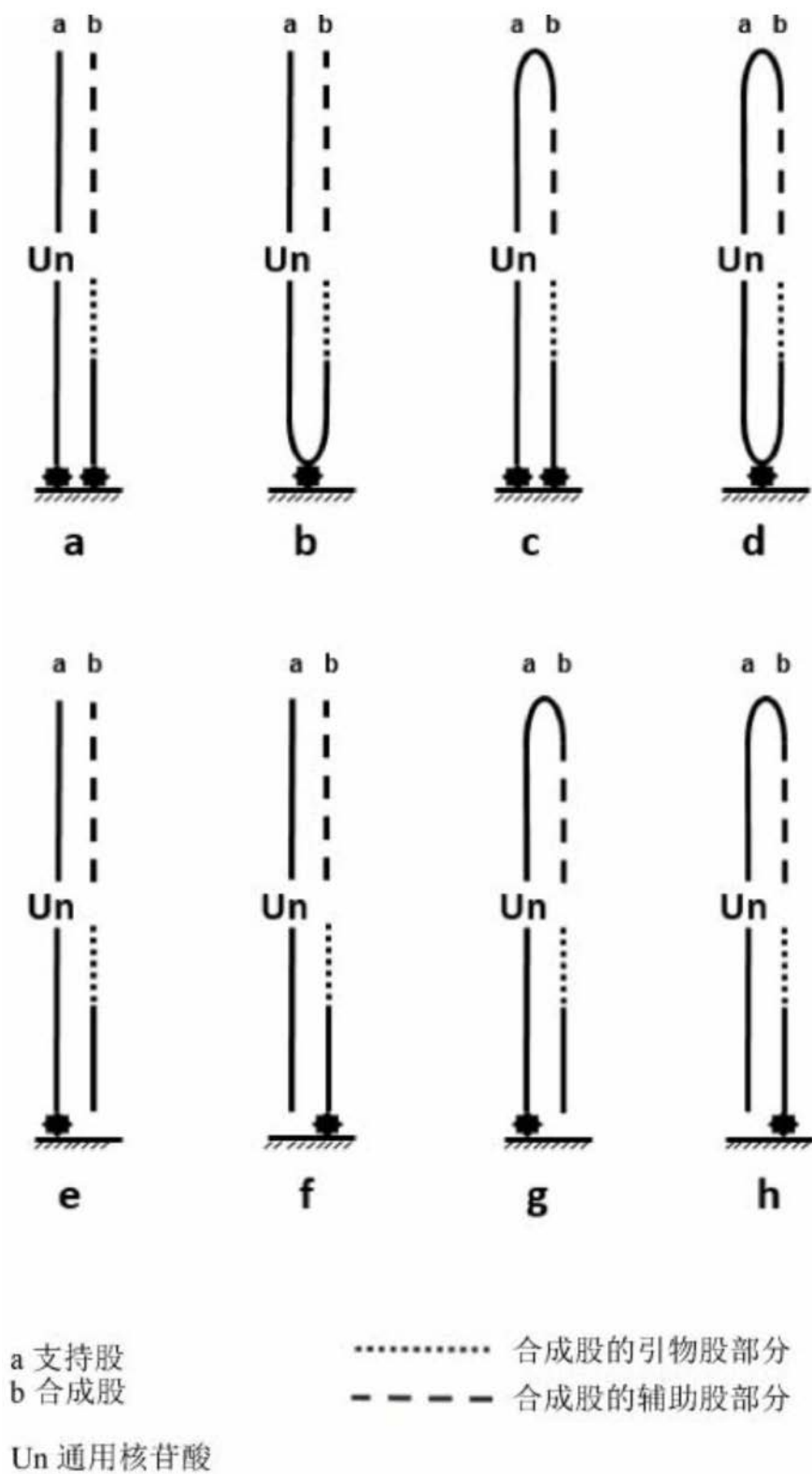


图11

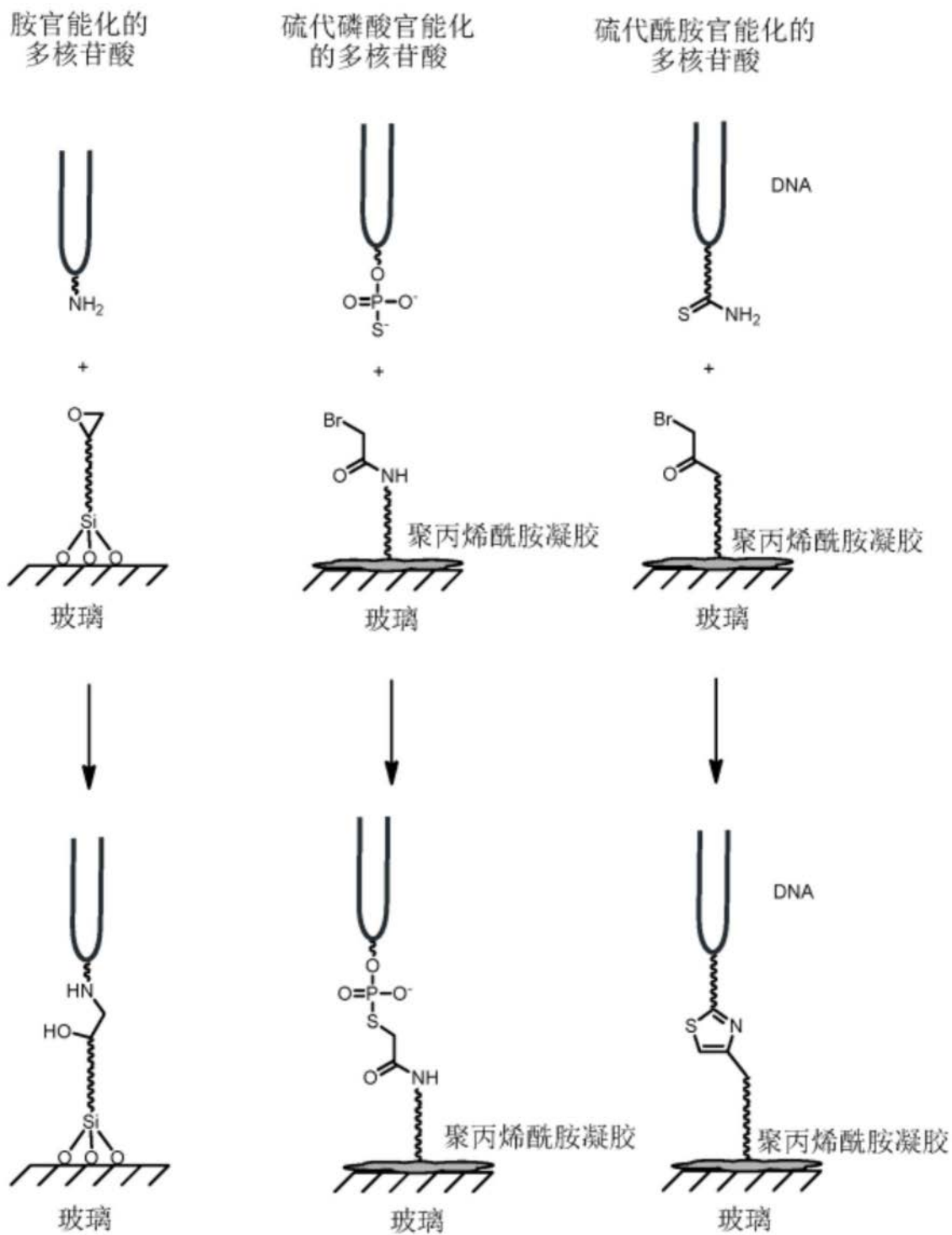
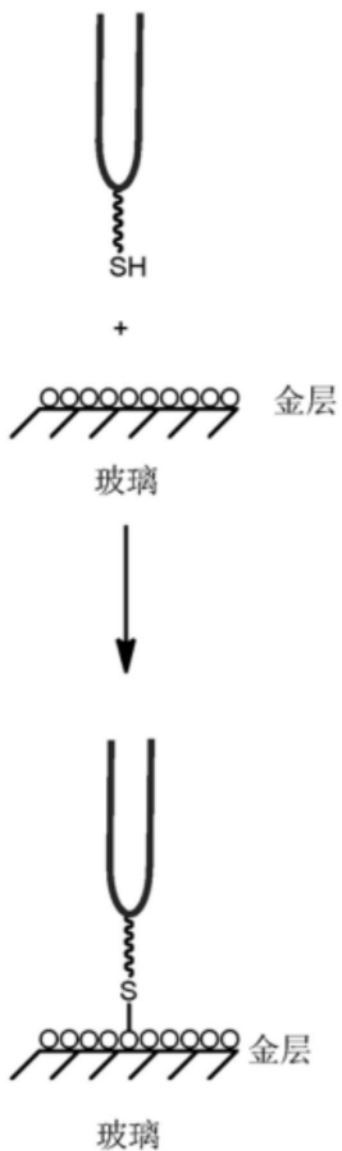


图11i

用于将多核苷酸连接到
金表面的实例方法：



用于通过生物素-链霉亲
和素结合来连接多核苷酸
的实例方法：

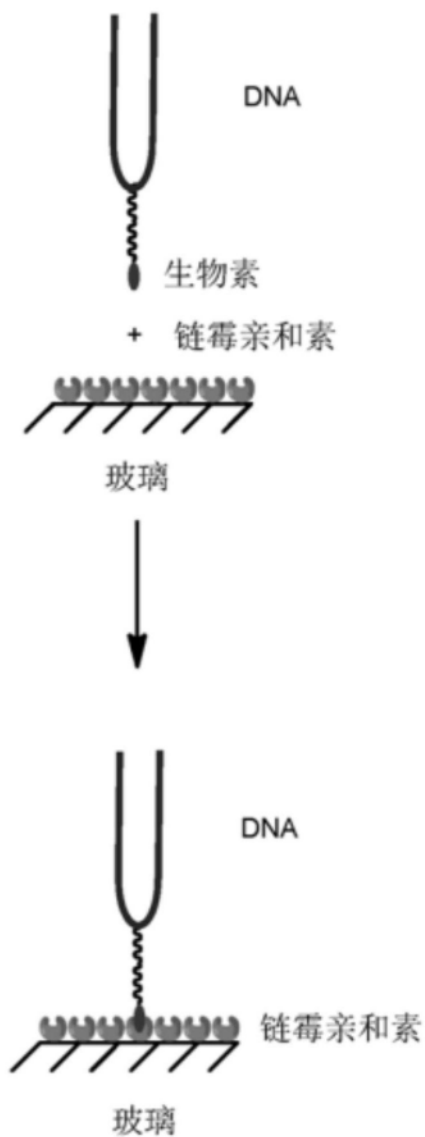


图11j

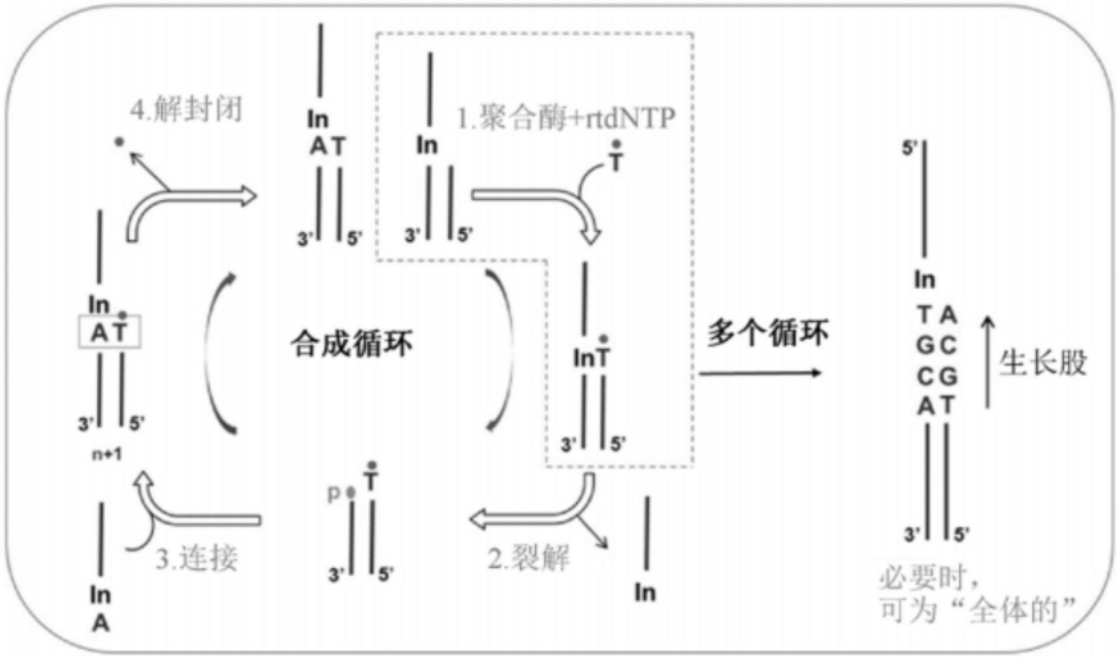


图12a

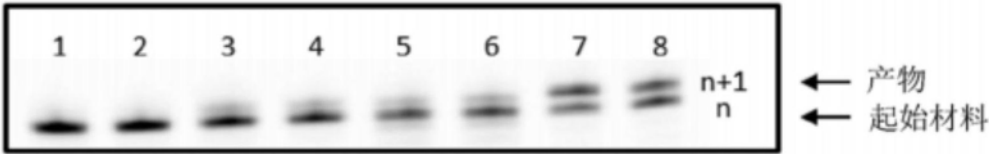


图12b

通道号	在50℃下掺入	DNA聚合酶	转化率
1	3'-O-烯丙基-dTTP	Bst	<1%
2	3'-O-叠氮基甲基-dTTP	Bst	<1%
3	3'-O-烯丙基-dTTP	Deep Vent (exo-)	5%
4	3'-O-叠氮基甲基-dTTP	Deep Vent (exo-)	5%
5	3'-O-烯丙基-dTTP通过	Therminator I	8%
6	3'-O-叠氮基甲基-dTTP	Therminator I	8%
7	3'-O-烯丙基-dTTP	Therminator IX	55%
8	3'-O-叠氮基甲基-dTTP	Therminator IX	48%

图12c

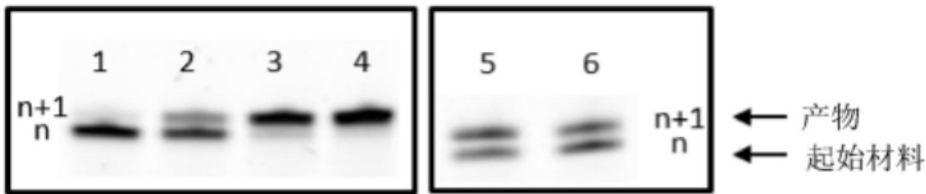


图12d

通道号	掺入	酶	温度	转化率
1	3'-O-烯丙基-dTTP	Terminator IX	37 °C	<5%
2	3'-O-叠氮基甲基-dTTP	Terminator IX	37 °C	15%
3	3'-O-烯丙基-dTTP	Terminator IX	50 °C	55%
4	3'-O-叠氮基甲基-dTTP	Terminator IX	50 °C	48%
5	3'-O-烯丙基-dTTP	Terminator IX	65 °C	>90%
6	3'-O-叠氮基甲基-dTTP	Terminator IX	65 °C	>90%

图12e

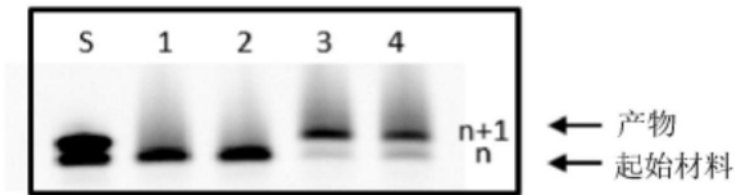


图12f

通道号	掺入	酶	温度	2mM Mn ²⁺	转化率
1	3'-O-烯丙基-dTTP	Terminator IX	65 °C	否	<1%
2	3'-O-叠氮基甲基-dTTP	Terminator IX	65 °C	否	<1%
3	3'-O-烯丙基-dTTP	Terminator IX	65 °C	是	>90%
4	3'-O-叠氮基甲基-dTTP	Terminator IX	65 °C	是	>90%

图12g

SEQ ID NO:	寡核苷酸名称	序列	修饰
1	引物	5'-GCGACAGGTGACTGCAGC-3'	在5'端的TAMRA (连接到末端鸟嘌呤)
2	模板	5'-CACATCACGTCGTAGTCXGCTGCAG TCACCTGTCGC-3'	X=2'-脱氧肌苷

图12h

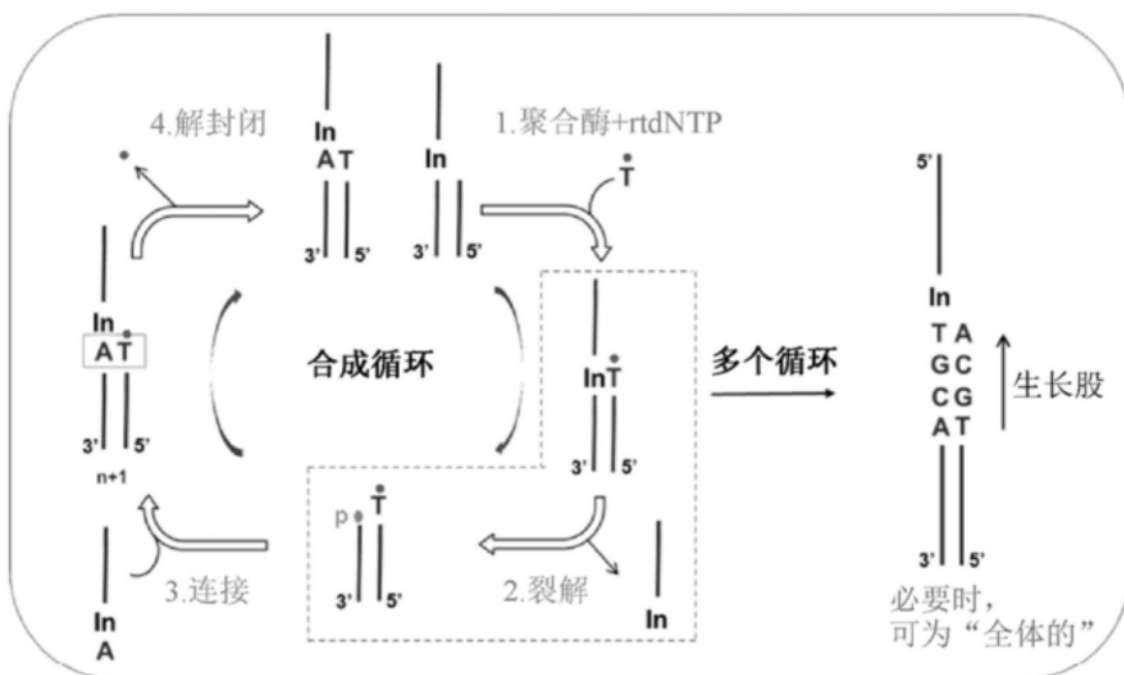


图13a

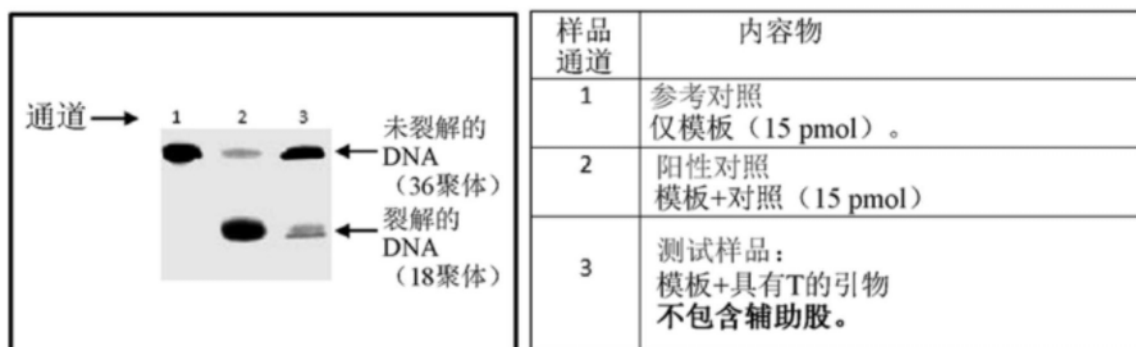


图13b



图13c

凝胶	裂解反应组合	没有辅助股的裂解DNA的转化率%
A	hAAG/ Chemical base	< 10
B	hAAG/Endo VIII	< 7

图13d

SEQ ID NO:	寡核苷酸名称	序列	修饰
3	模板	5'-CACATCACGTCGTAGTCXGCT GCAGTCACCTGTCGC-3'	在5'端的TAMRA X = 2'脱氧肌苷
4	具有T的引物	5'-GCGACAGGTGACTGCAGCT-3'	没有
5	对照	5'-GCGACAGGTGACTGCAGCTGA CTACGACGTGATGTG-3'	没有

图13e

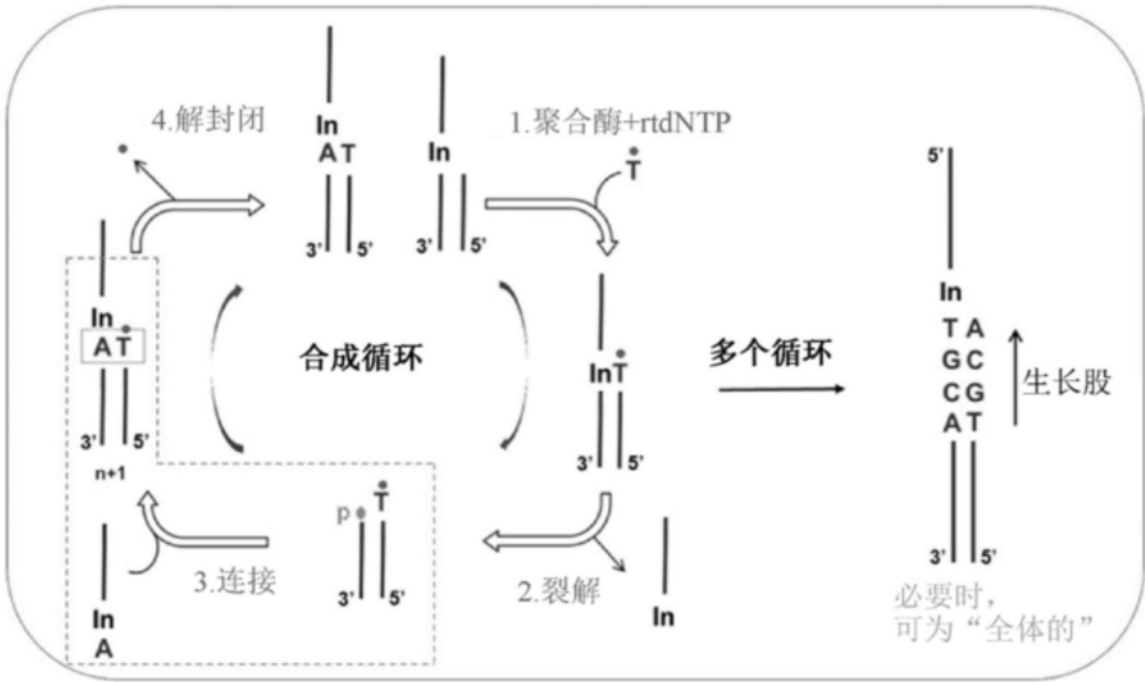


图14a

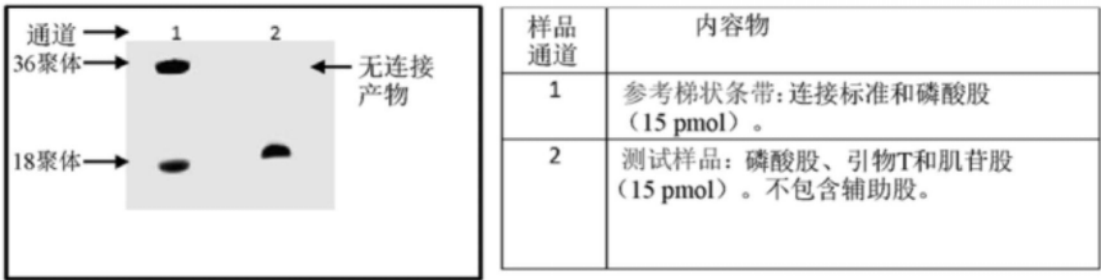


图14b

SEQ ID NO:	寡核苷酸名称	序列	修饰
6	连接标准	5'-CACATCACGTCGTAGTXA GCTGCAGTCACCTGTCGC-3'	X = 2'-脱氧肌苷
7	磷酸盐股	5'-GCTGCAGTCACCTGTCGC-3'	在3'端的TAMRA (连接到 末端胞嘧啶), 在5'端的磷酸
8	具有T的引物	5'-GCGACAGGTGACTGCAGCT-3'	没有
9	肌苷股	5'-CACATCACGTCGTAGTXA-3'	X = 2'-脱氧肌苷

图14c

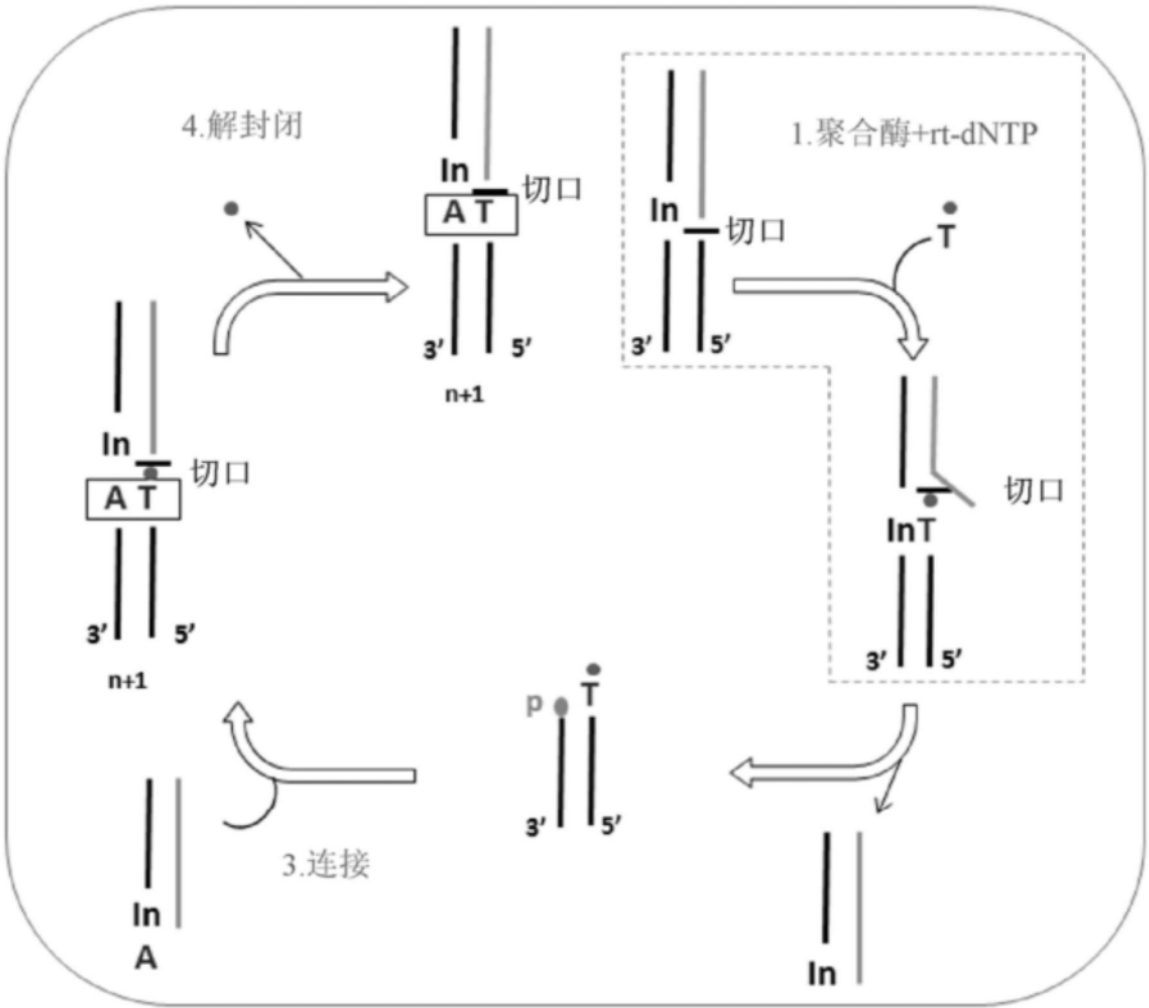


图15a

SEQ ID NO:	寡核苷酸名称	序列	修饰
10	引物	5'-GCGACAGGTGACTGCAGC-3'	在5'端的TAMRA (连接到末端鸟嘌呤)
11	模板	5'-CACATCACGTCGTAGTCXGCTGCAG TCACCTGTCGC-3'	X = 2'-脱氧肌苷
12	辅助股	5'-CGACTACGACGTGATGTG-3'	没有

图15b

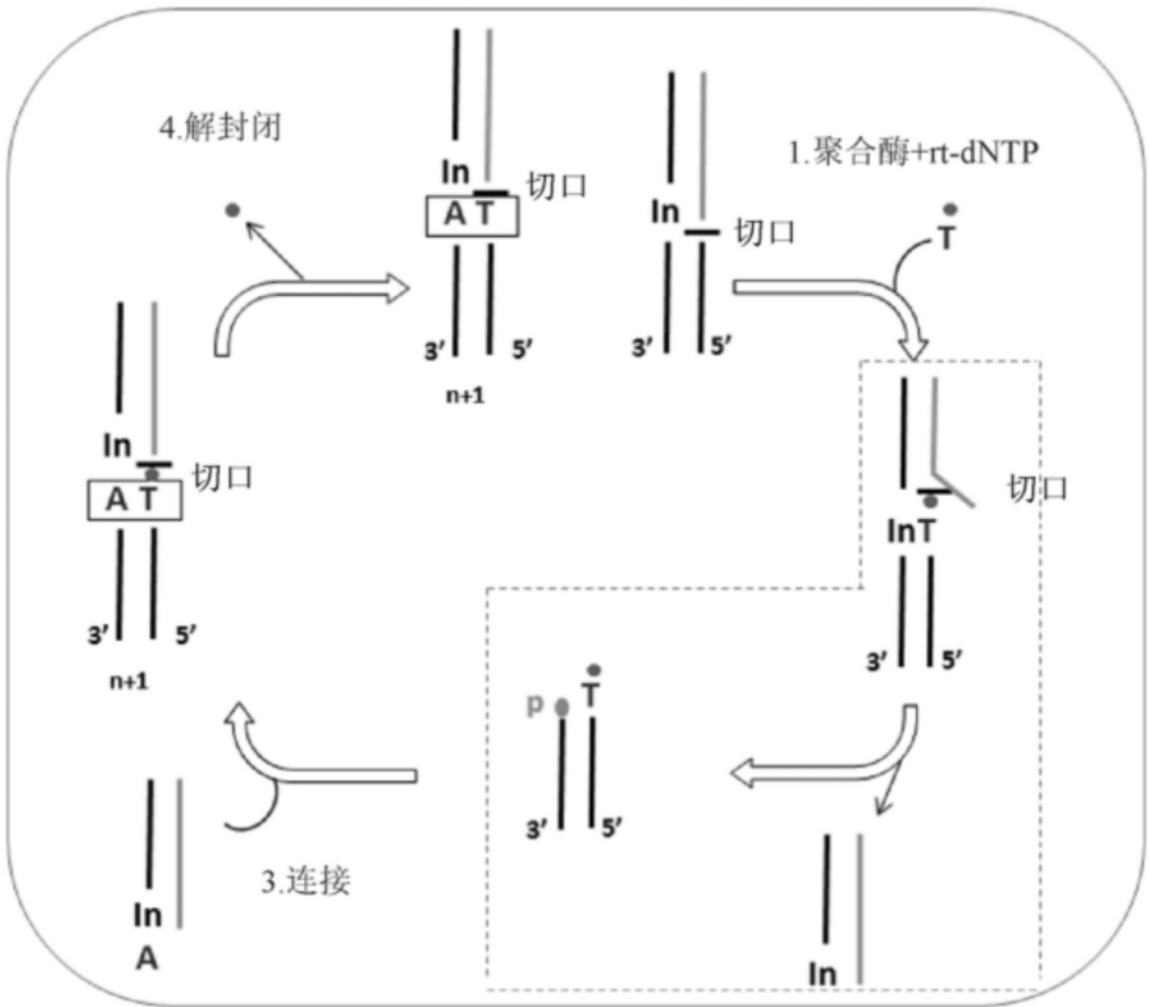


图16a

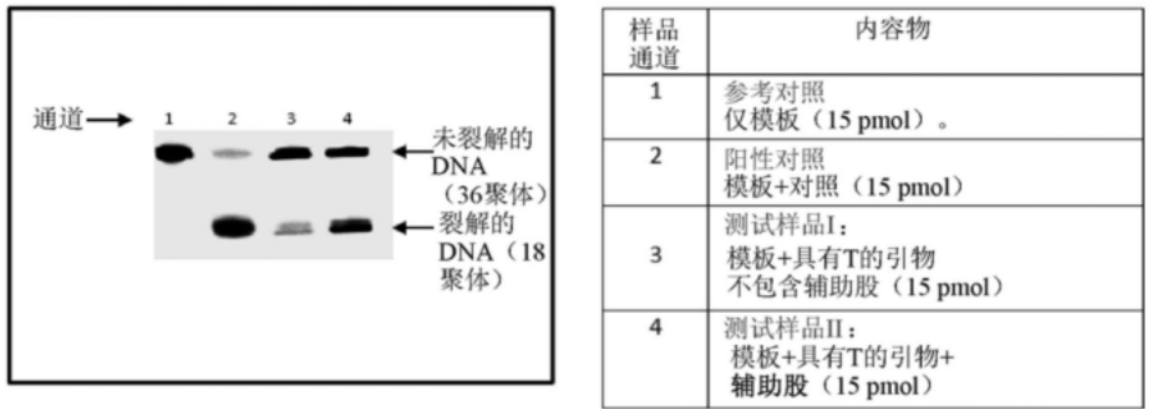


图16b

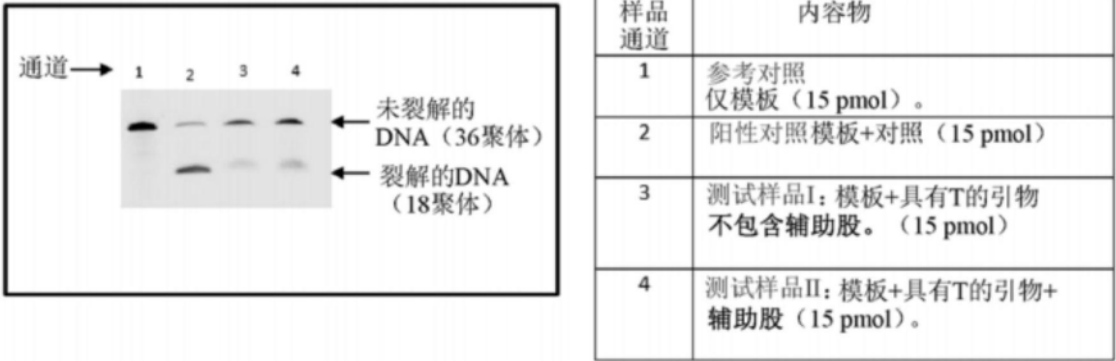


图16c



图16d

凝胶	裂解反应组合	有辅助股的裂解DNA的转化率%
A	hAAG/化学碱基	50
B	hAAG/Endo VIII	< 10
C	hAAG/替代化学碱基	90*

图16e

SEQ ID NO:	寡核苷酸名称	序列	修饰
13	模板	5'-CACATCACGTCGTAGTCXGCT GCAGTCACCTGTCGC-3'	在5'端的TAMRA（连接到 末端胞嘧啶）， X=脱氧肌苷
14	具有T的引物	5'-GCGACAGGTGACTGCAGCT-3'	没有
15	对照	5'-GCGACAGGTGACTGCAGCTGA CTACGACGTGATGTG-3'	没有
16	辅助股	5'-TGACTACGACGTGATGTG-3'	没有

图16f

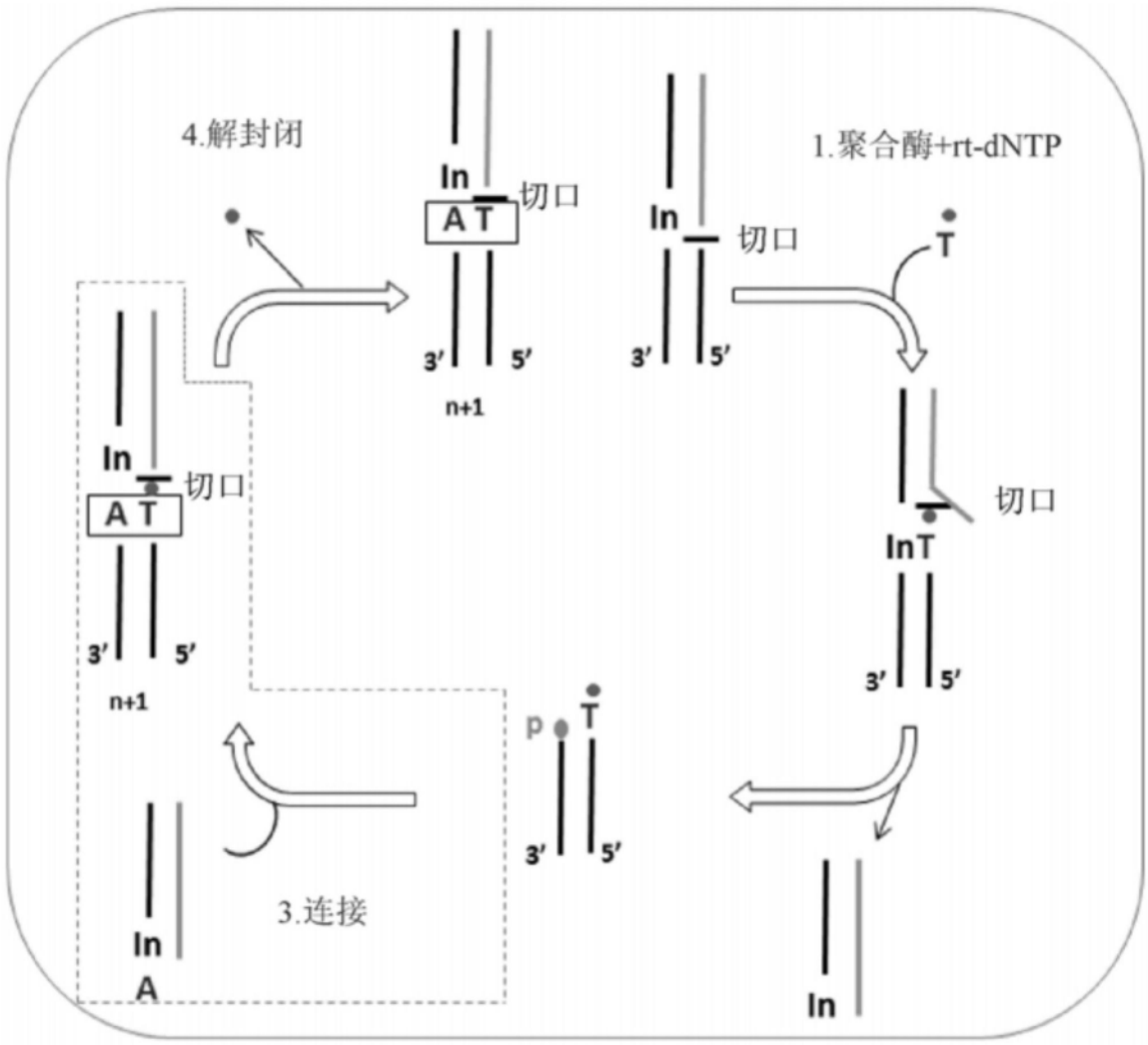


图17a

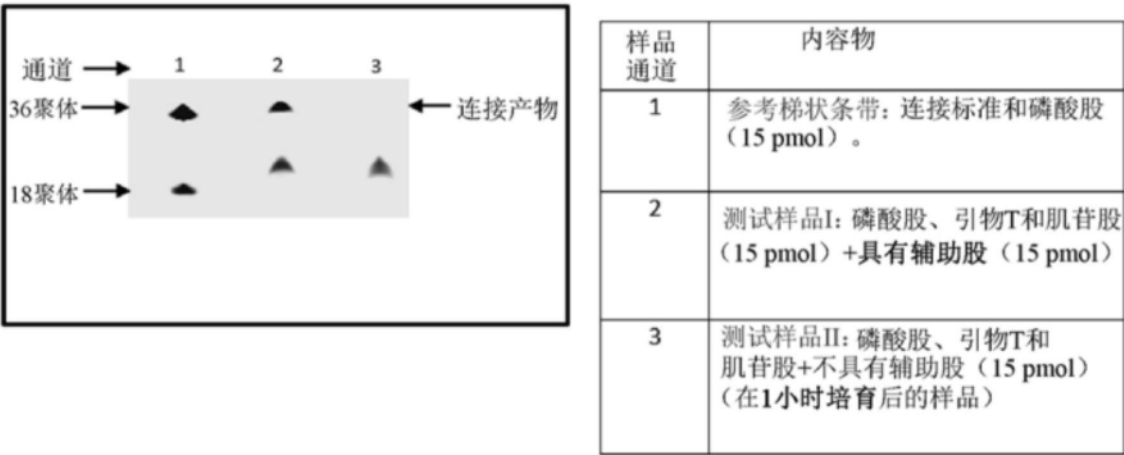


图17b

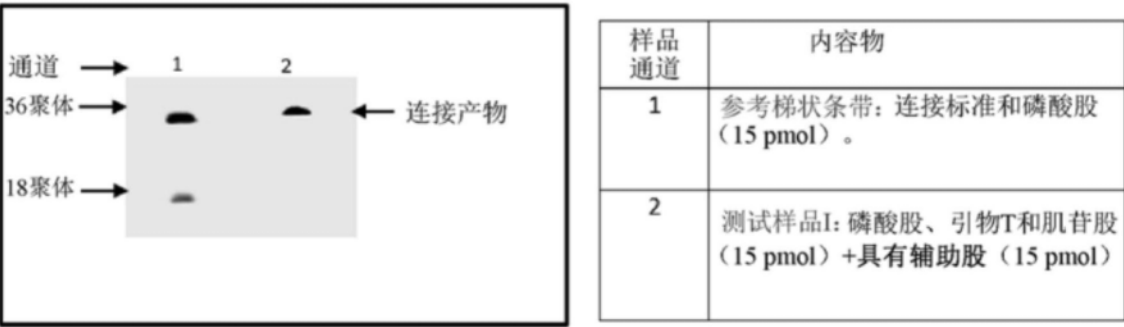


图17c

SEQ ID NO:	寡核苷酸名称	序列	修饰
17	连接标准	5'-CACATCACGTCGTAGT X A GCTGCAGTCACCTGTCGC-3'	X = 2'-脱氧肌苷
18	磷酸股	5'-GCTGCAGTCACCTGTCGC-3'	在3'端的TAMRA（连接到末端胞嘧啶）， 在5'端的磷酸
19	具有 T 的引物	5'-GCGACAGGTGACTGCAGCT-3'	没有
20	肌苷股	5'-CACATCACGTCGTAGT X A-3'	X = 2'-脱氧肌苷
21	辅助股	5'-CACTACGACGTGATGTG-3'	没有

图17d

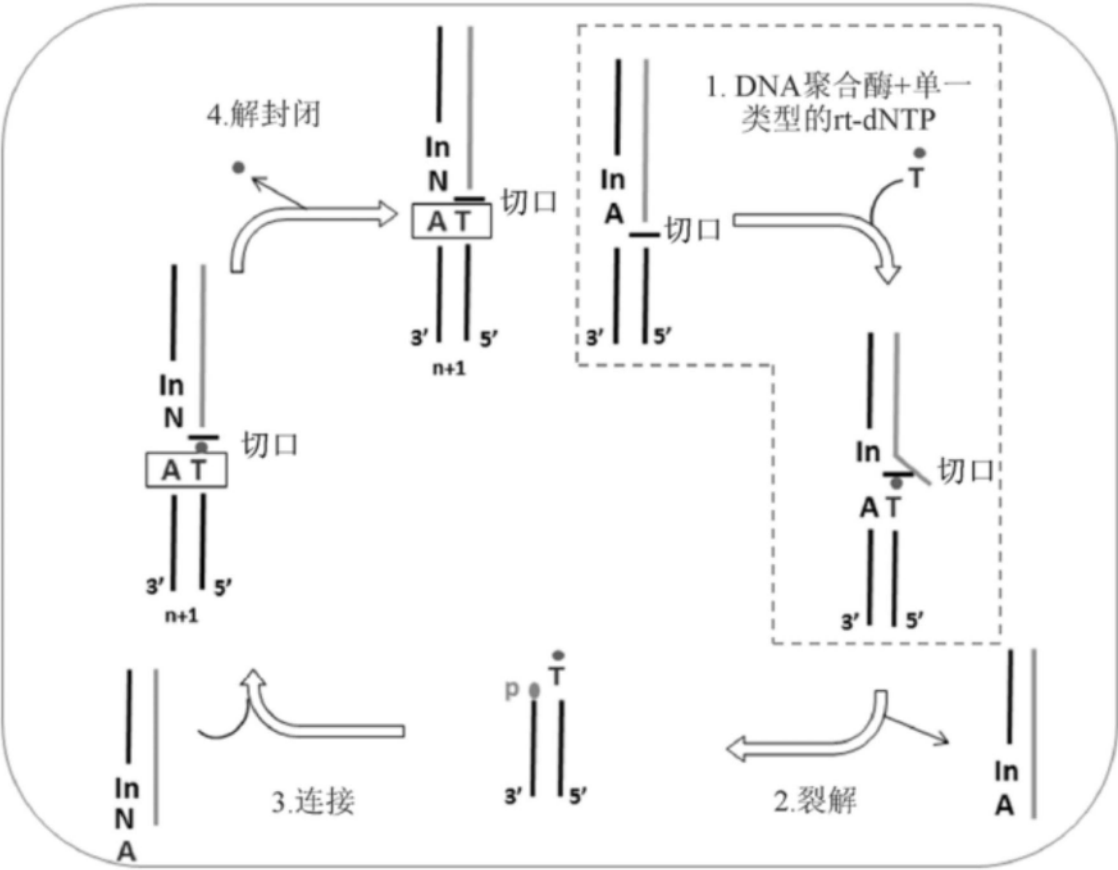


图18a

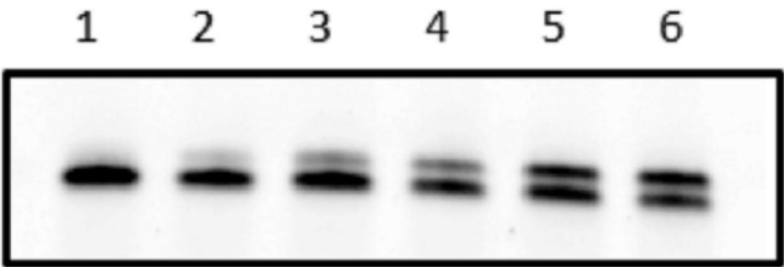


图18b

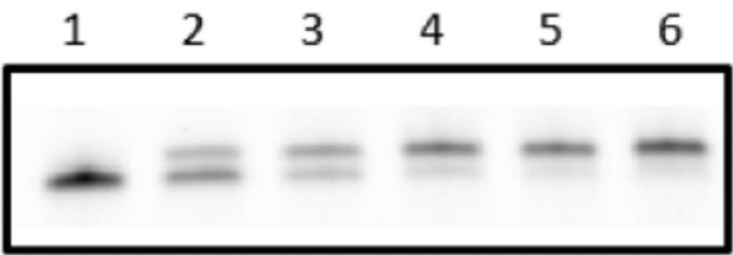


图18c

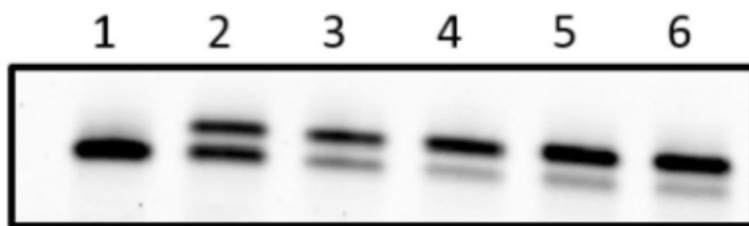


图18d

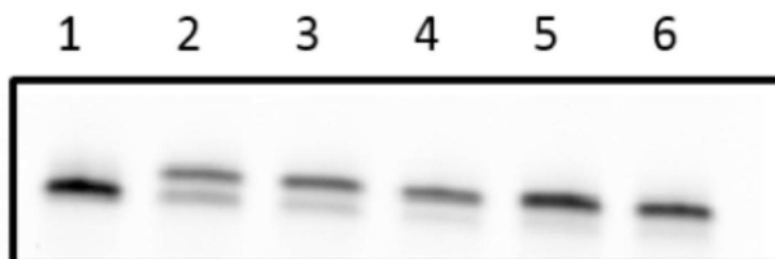


图18e

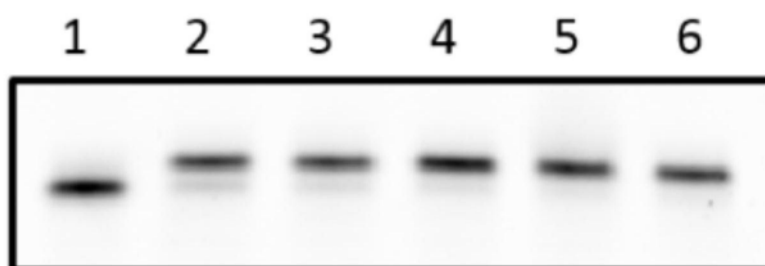


图18f

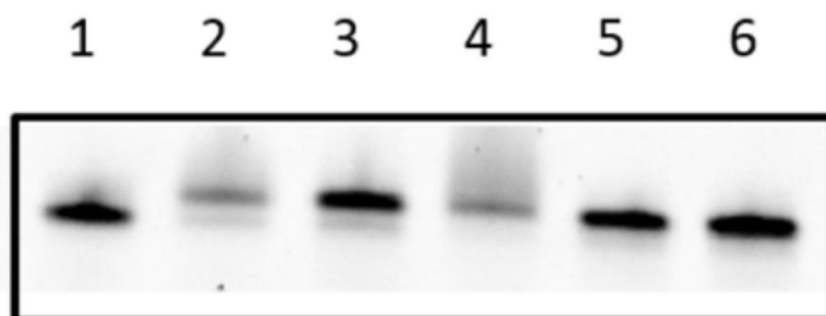


图18g

	0分钟	1分钟	2分钟	5分钟	10分钟	20分钟
27℃无Mn ²⁺	0	5	10	20	35	40
37℃无Mn ²⁺	0	30	58	90	90	90
47℃无Mn ²⁺	0	30	65	90	90	90
27℃有Mn ²⁺	0	70	85	92	95	95
37℃有Mn ²⁺	0	85	90	>96	>96	>96
47℃有Mn ²⁺	0	85	90	>96	>96	>96

图18h

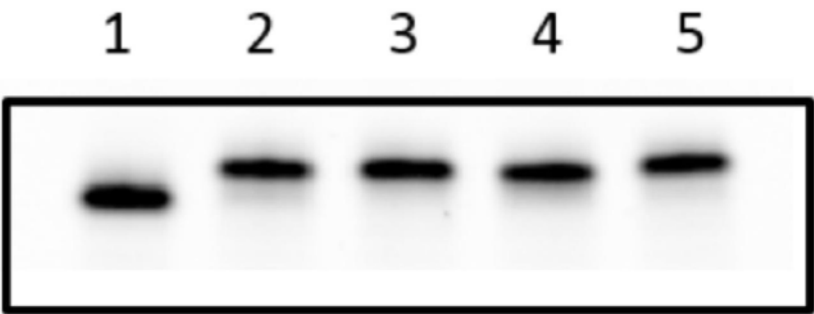


图18i

SEQ ID NO:	寡核苷酸名称	序列	修饰
22	引物	5'-GCGACAGGTGACTGCAGC-3'	在5'端的TAMRA (连接到末端鸟嘌呤)
23	模板-A	5'-CACATCACGTCGTAGTCXAGCTGCAG TCACCTGTCGC-3'	X = 2'-脱氧肌苷
24	模板-G	5'-CACATCACGTCGTAGTCXGGCTGCAG TCACCTGTCGC-3'	X = 2'-脱氧肌苷
25	模板-T	5'-CACATCACGTCGTAGTCXAGCTGCAG TCACCTGTCGC-3'	X = 2'-脱氧肌苷
26	模板-C	5'-CACATCACGTCGTAGTCXAGCTGCAG TCACCTGTCGC-3'	X = 2'-脱氧肌苷
27	辅助股-T	5'-TCGACTACGACGTGATGTG-3'	没有
28	辅助股-C	5'-CCGACTACGACGTGATGTG-3'	没有
29	辅助股-A	5'-ACGACTACGACGTGATGTG-3'	没有
30	辅助股-G	5'-GCGACTACGACGTGATGTG-3'	没有

图18j

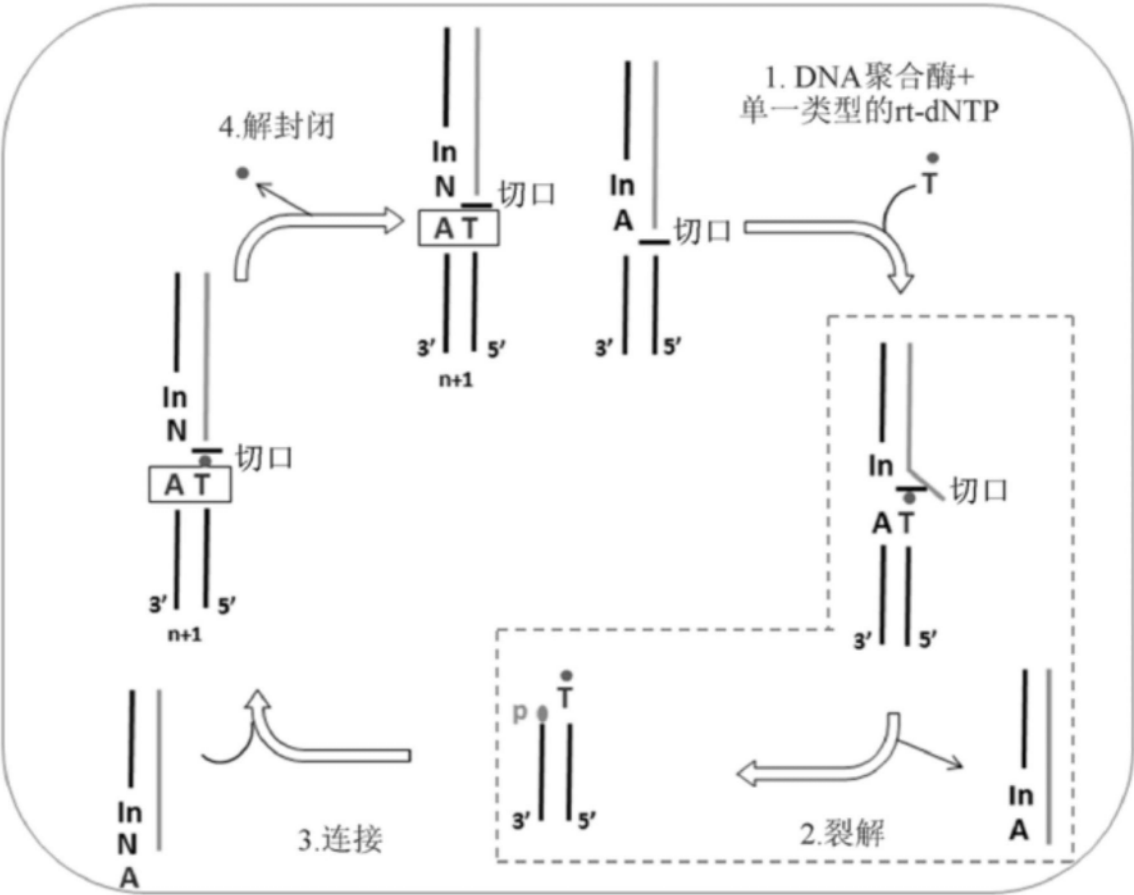


图19a

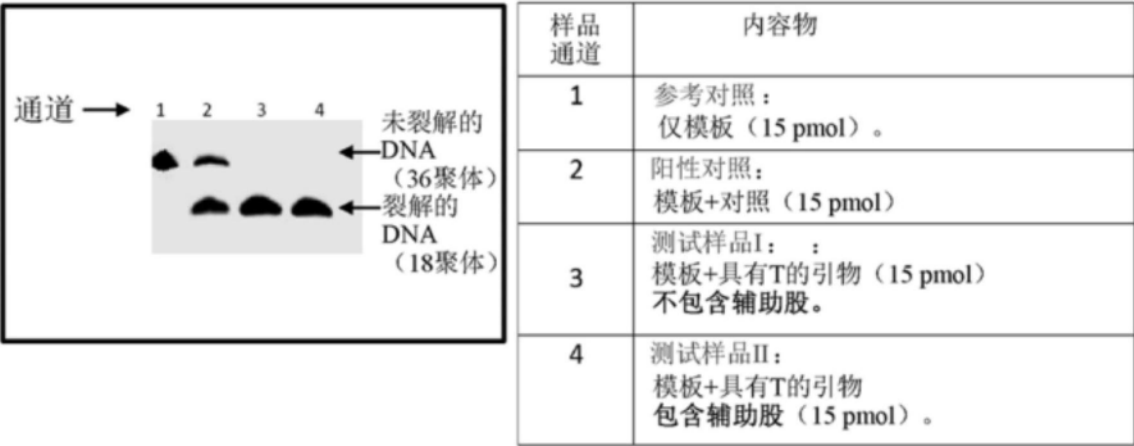


图19b

裂解反应组合	裂解DNA的转化率%
全长阳性对照	80
存在辅助股	>99
不存在辅助股	>99

图19c

SEQ ID NO:	寡核苷酸名称	序列	修饰
31	模板	5'-CACATCACGTCGTCGTCXAGCT GCAGTCACCTGTCGC-3'	在5'端的TAMRA (连接到末端胞嘧啶), X =脱氧肌苷
32	具有T的引物	5'-GCGACAGGTGACTGCAGCT-3'	没有
33	对照	5'-GCGACAGGTGACTGCAGCTGA CTACGACGTGATGTG-3'	没有
34	辅助股	5'-TCGACTACGACGTGATGTG-3'	没有

图19d

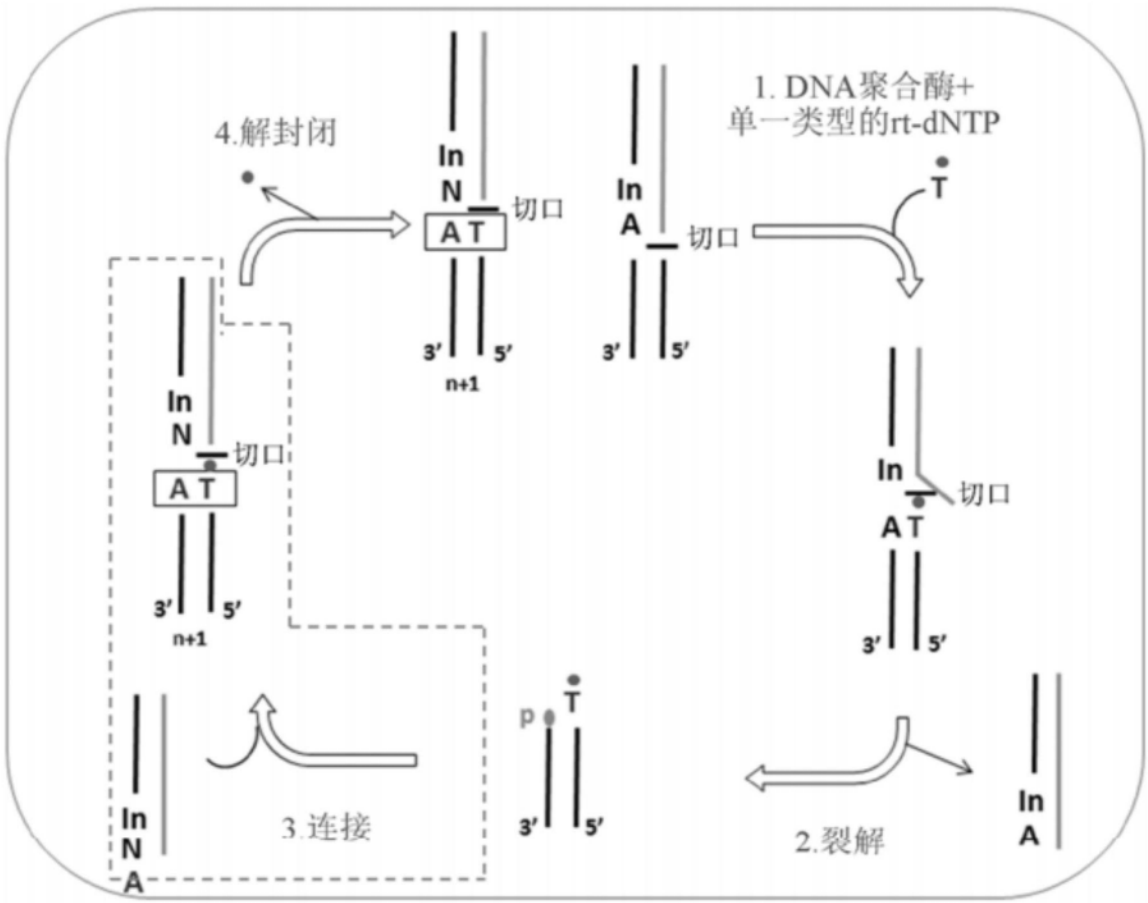


图20a

SEQ ID NO:	寡核苷酸名称	序列	修饰
35	磷酸股	5'-GCTGCAGTCACCTGTCGC-3'	在3'端的TAMRA（连接到末端胞嘧啶），在5'端的磷酸
36	具有T的引物	5'-GCGACAGGTGACTGCAGCT-3'	没有
37	肌苷股	5'-CACATCACGTCGTAGTXGA-3'	X = 2'-脱氧肌苷
38	辅助股	5'-CCACTACGACGTGATGTG-3'	没有

图20b

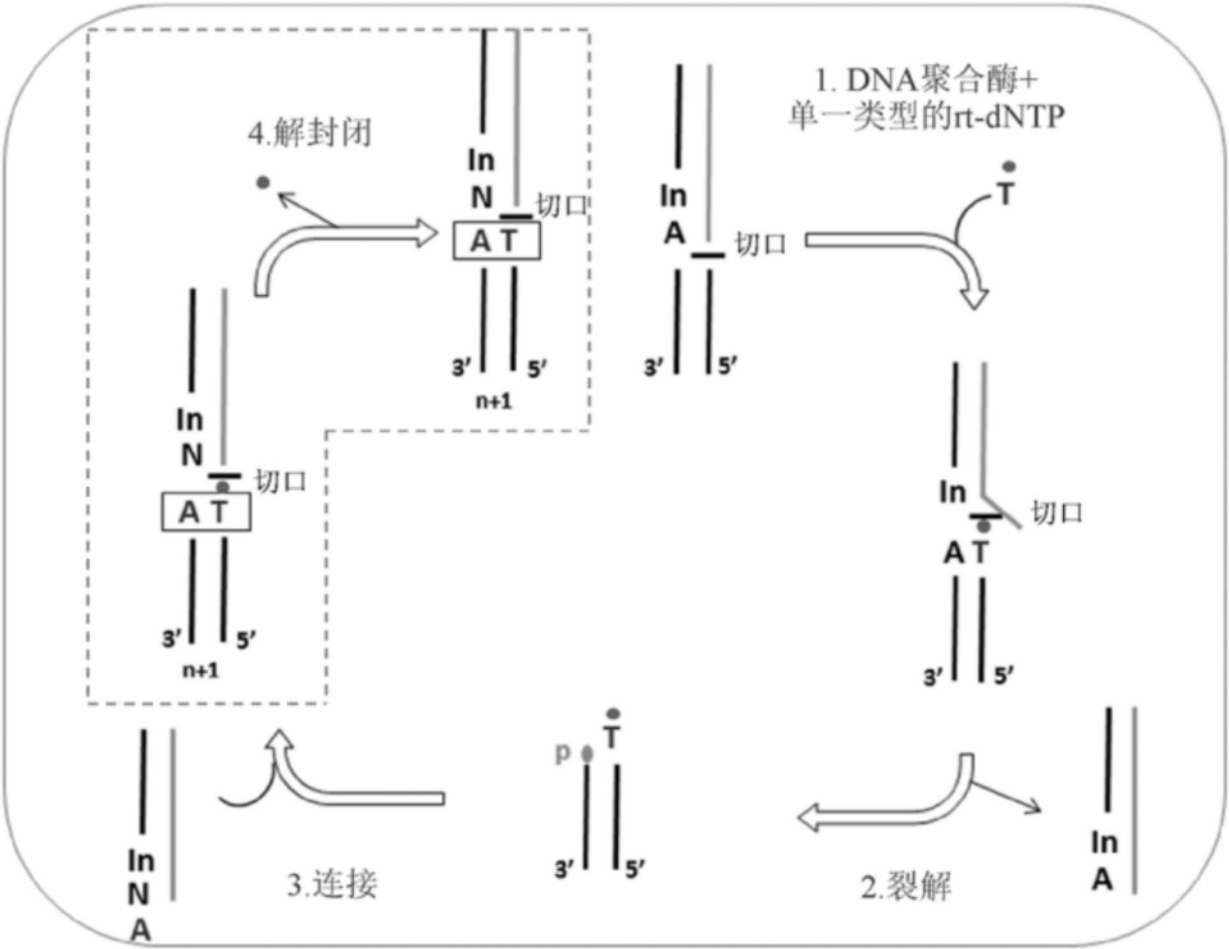


图21a

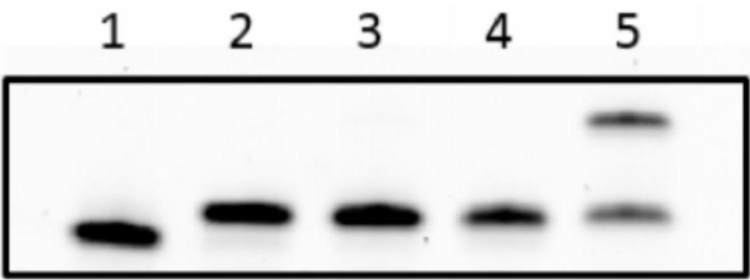


图21b

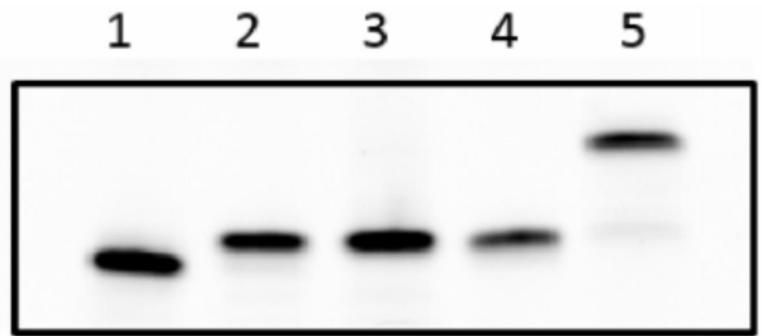


图21c

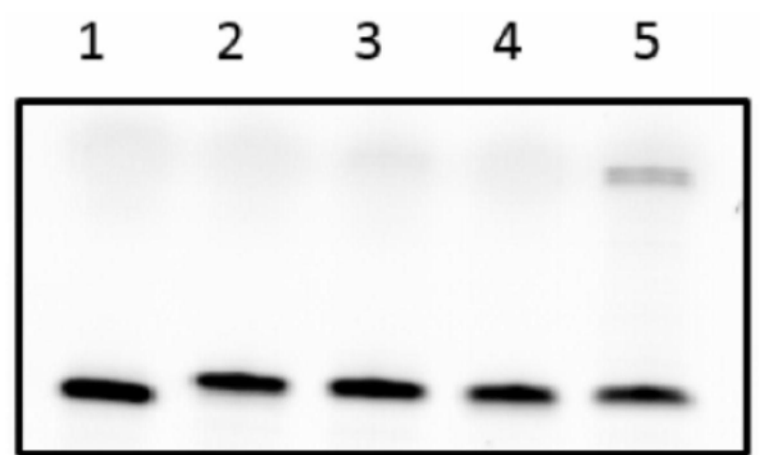


图21d

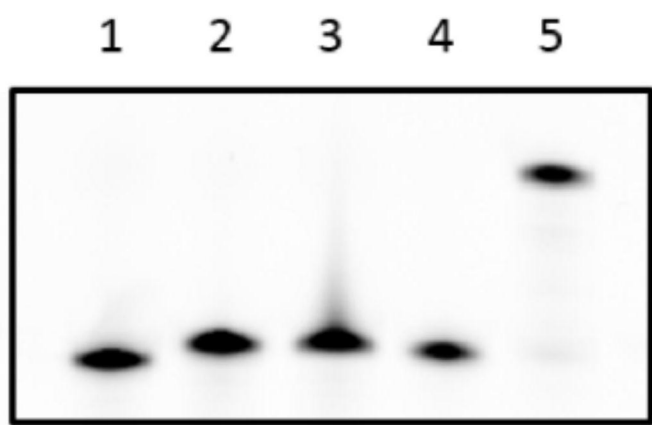


图21e

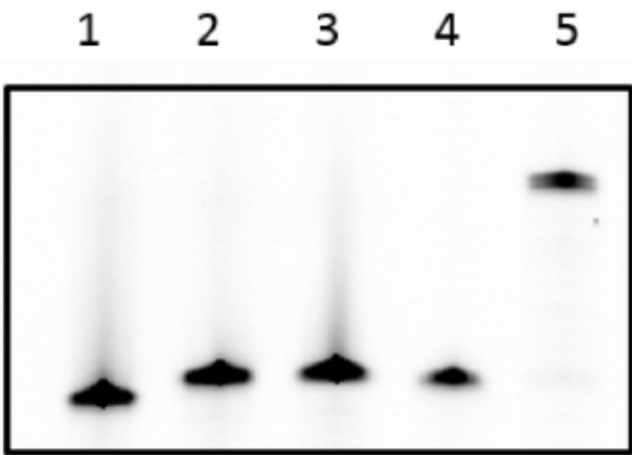


图21f

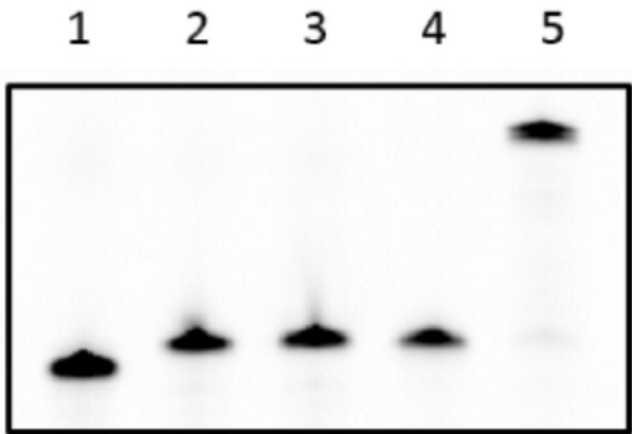


图21g

掺入	通过50mM TCEP 去除保护基	通过300mM TCEP 去除保护基
3'-O-叠氮基甲基-dTTP	50%	95%
3'-O-叠氮基甲基-dCTP	20%	95%
3'-O-叠氮基甲基-dATP	没有测试	95%
3'-O-叠氮基甲基-dGTP	没有测试	95%

图21h

SEQ ID NO:	寡核苷酸名称	序列	修饰
39	引物	5'-GCGACAGGTGACTGCAGC-3'	在5'端的TAMRA (连接到末端胞嘧啶)
40	模板-A	5'-CACATCACGTCGTAGTCAGCT GCAGTCACCTGTCGC-3'	没有
41	模板-G	5'-CACATCACGTCGTAGTCGGCT GCAGTCACCTGTCGC-3'	没有
42	模板-T	5'-CACATCACGTCGTAGCTTGCT GCAGTCACCTGTCGC-3'	没有
43	模板-C	5'-CACATCACGTCGTAGTCCGCT GCAGTCACCTGTCGC-3'	没有

图21i

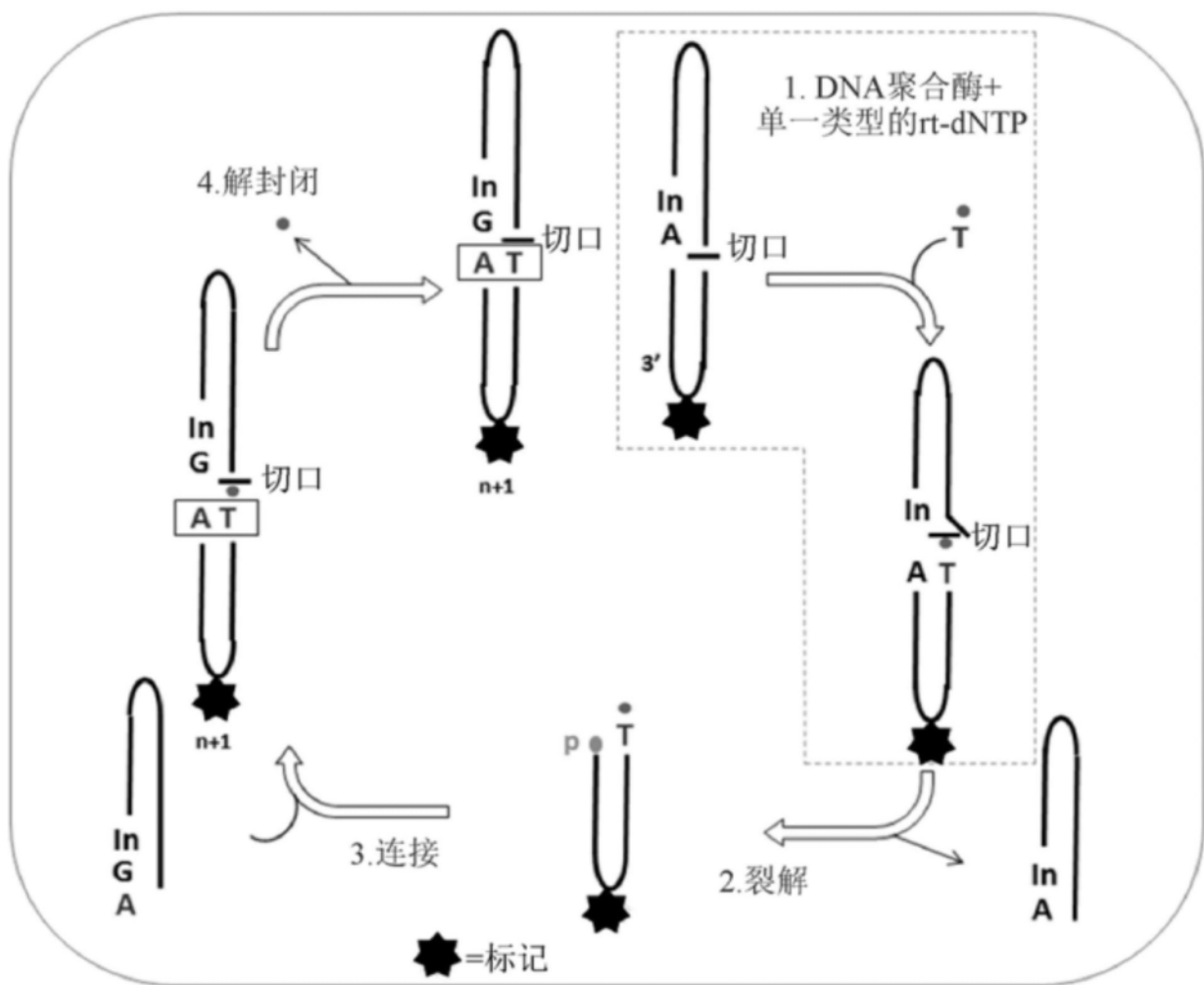


图22a

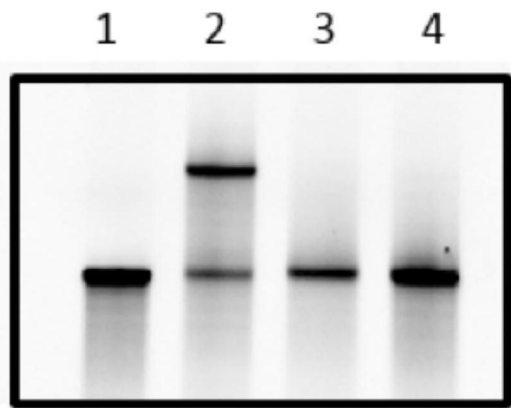


图22b

SEQ ID NO:	寡核苷酸名称	序列	修饰
44	用于掺入的双发夹模型	5'- TCGACTACGACGTGACTTTTAGTCACGTC GTAGTCXAGCTGCAGTCACCTGCTGCTTY TTGCAGCAGGTGACTGCAGC-3'	X = 2'-脱氧 肌苷 Y = Tamra-dT

图22c

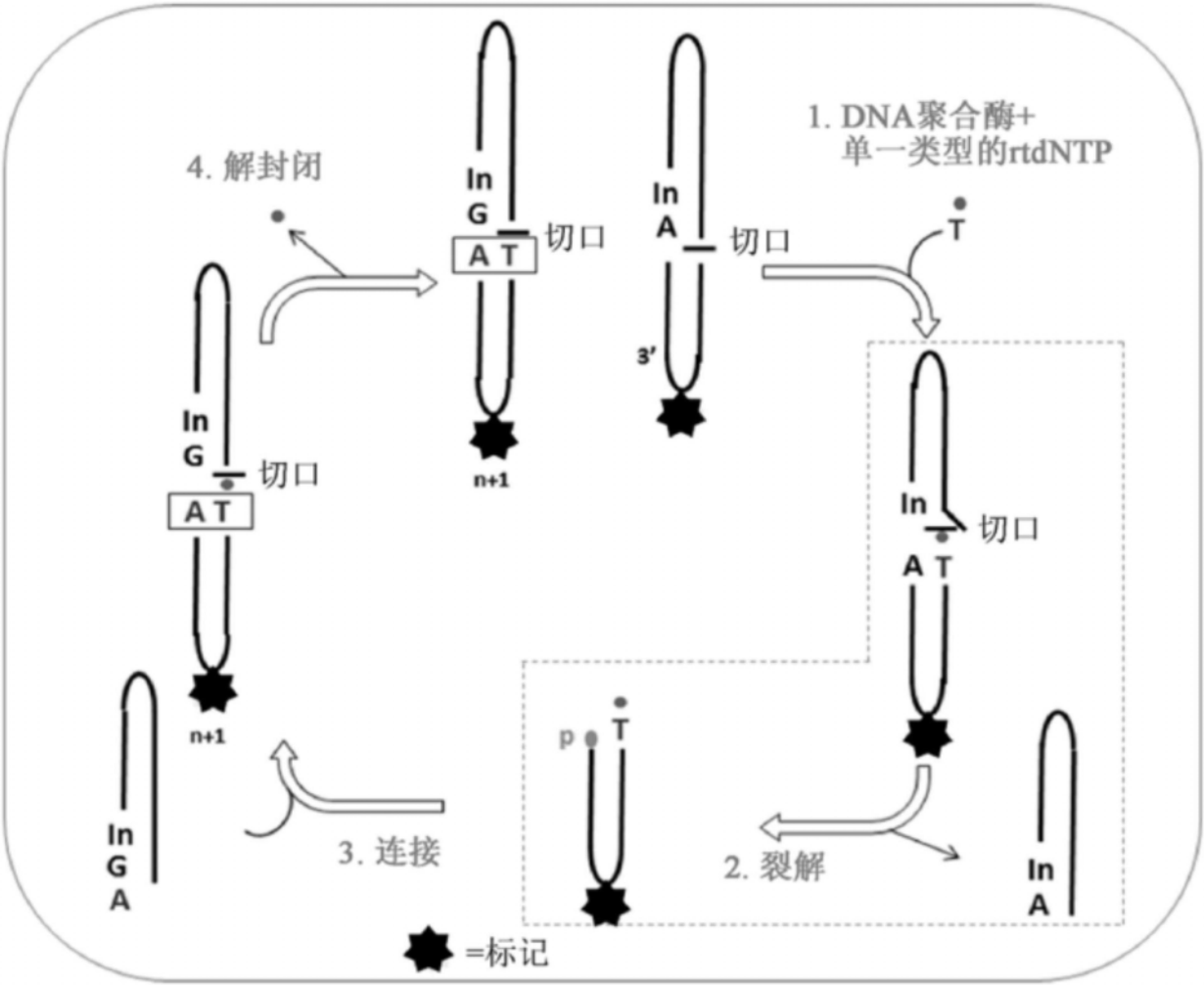
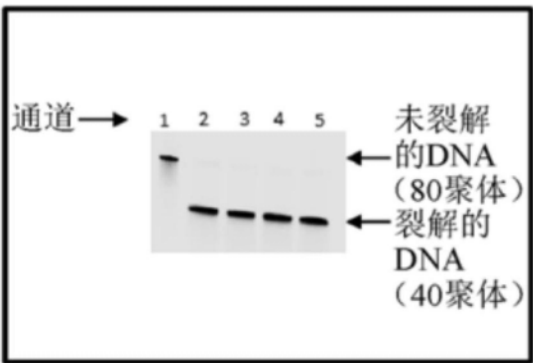


图23a



样品通道	内容物
1	参考对照: 仅模板 (15 pmol)。
2	测试样品I: 5分钟培育后的裂解的 发夹模板 (15 pmol)
3	测试样品I: 10分钟培育后的裂解的 发夹模板 (15 pmol)
4	测试样品I: 30分钟培育后的裂解的 发夹模板 (15 pmol)
5	测试样品I: 1小时培育后的裂解的 发夹模板 (15 pmol)

图23b

SEQ ID NO:	寡核苷酸名称	序列	修饰
45	用于掺入的双发夹模型	5'- TCGACTACGACGTGACTTTTAGTCAC GTCGTAGTCXAGCTGCAGTCACCTGCTG CTTYTTGCAGCAGGTGACTGCAGCT-3'	X = 2'-脱氧肌苷 Y = Tamra-dT

图23c

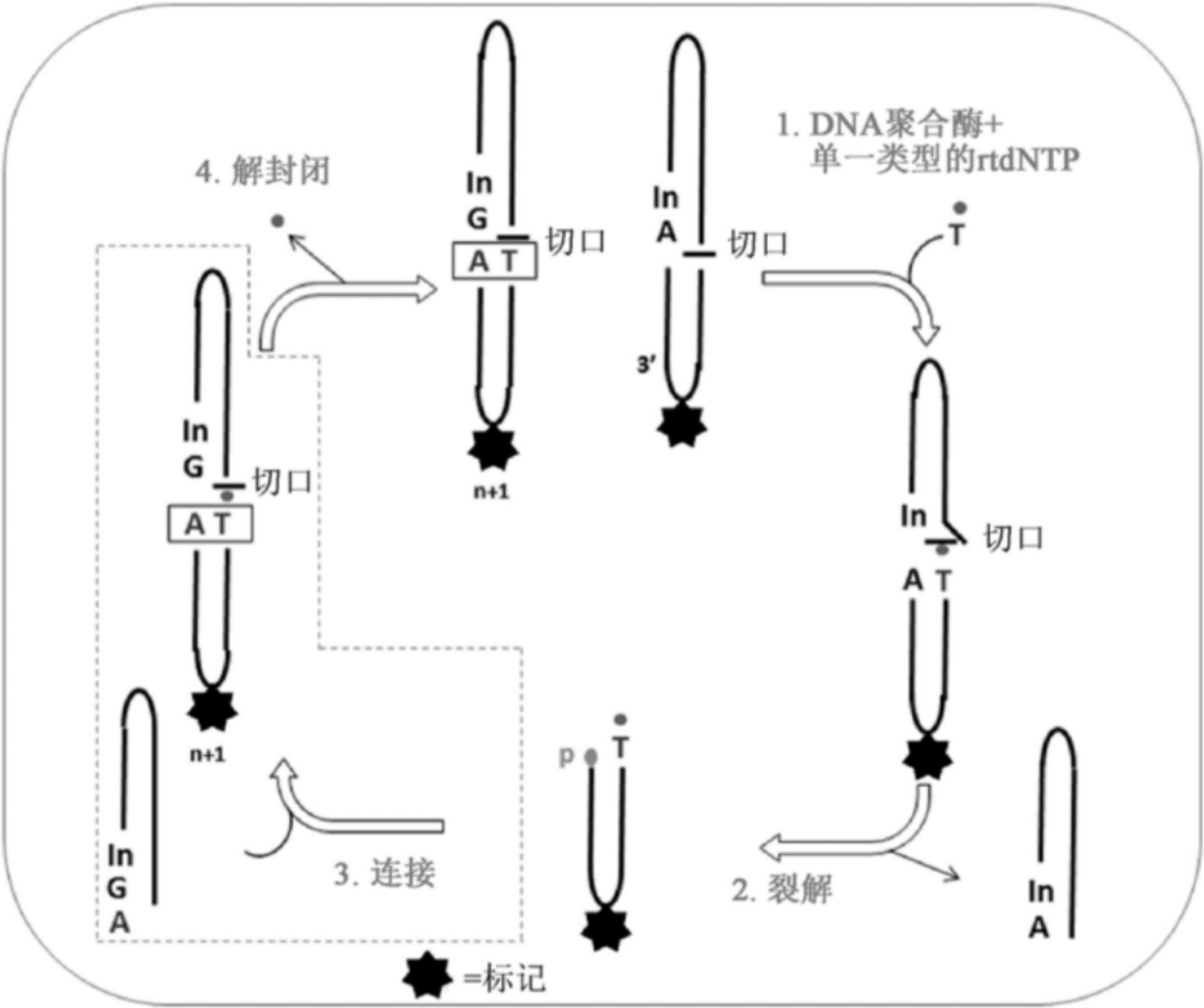


图24a

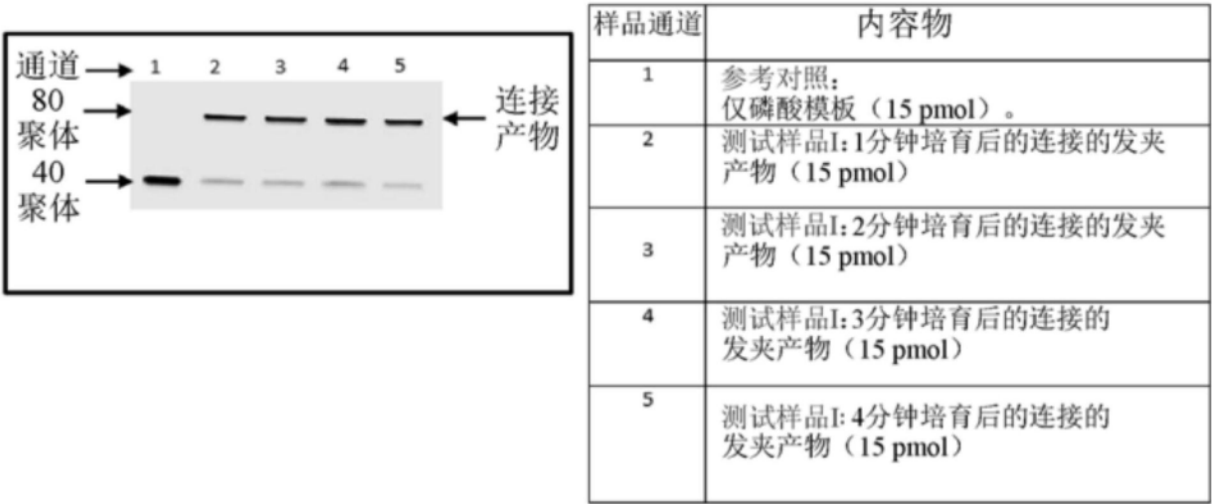


图24b

SEQ ID NO:	寡核苷酸名称	序列	修饰
46	磷酸发夹	5'-GCTGCAGTCACCTGCTGCTTYT TGCAGCAGGTGACTGCAGCT-3'	Y = Tamra-dT 磷酸
47	肌苷发夹	5'- CCGACTACGACGTGACTTTTAGT CACGTCGTAGTCXGA-3'	X = 2-脱氧肌苷

图24c

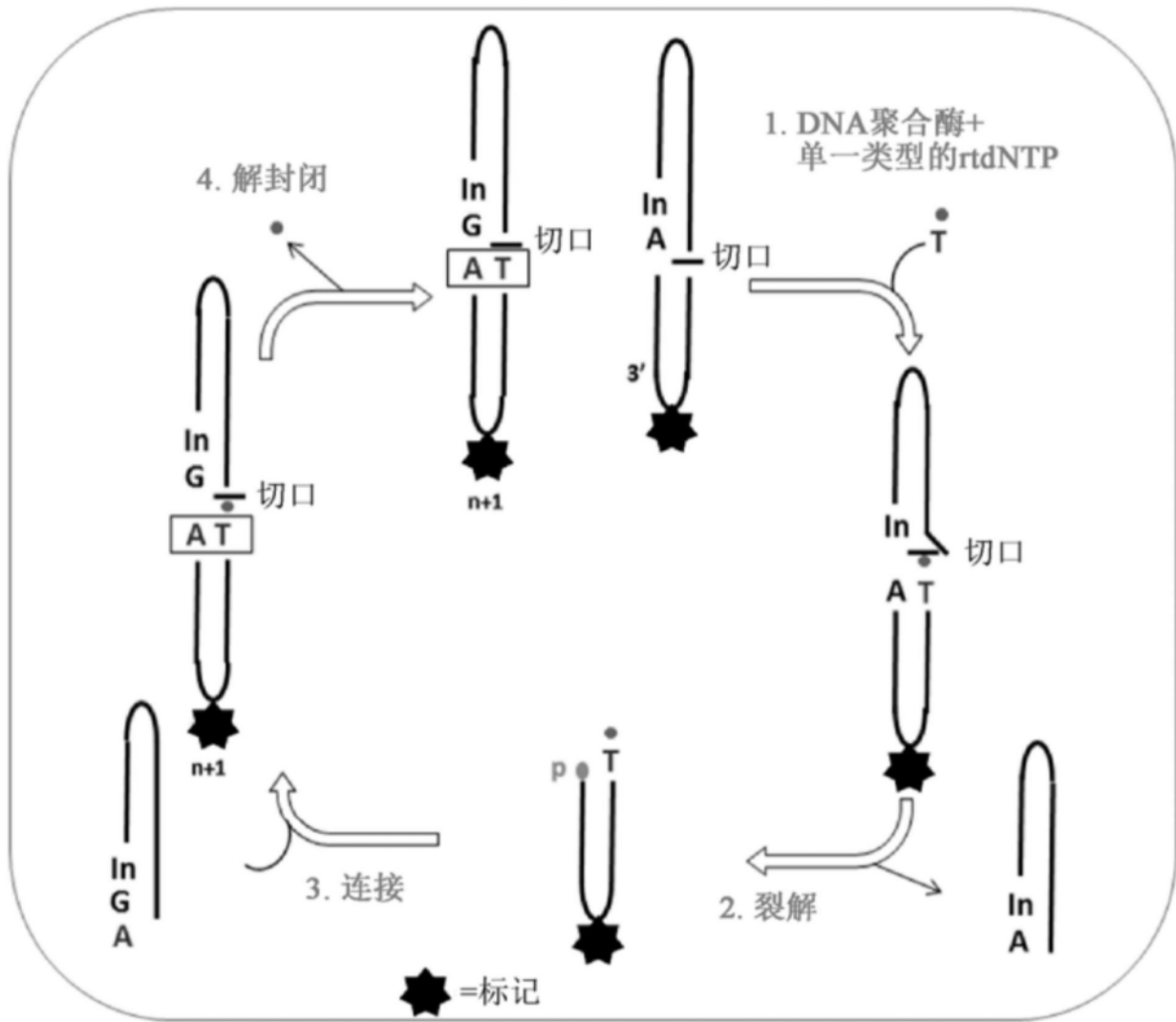


图25a

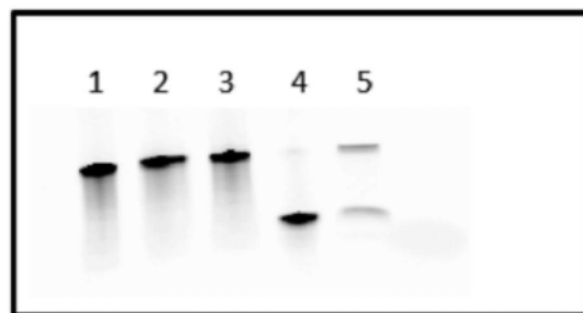


图25b

SEQ ID NO:	寡核苷酸名称	序列	修饰
48	双发夹模型	5'- TCGACTACGACGTGACTTTTAGTCAC GTCGTAGTCXAGCTGCAGTCACCTGCTGC TTYTTGCAGCAGGTGACTGCAGC-3'	X = 2'-脱氧 肌苷 Y = Tamra-dT
49	用于连接的股	5'- CCGACTACGACGTGACTTTTAGTCAC GTCGTAGTCXGA-3'	X = 2'-脱氧 肌苷

图25c

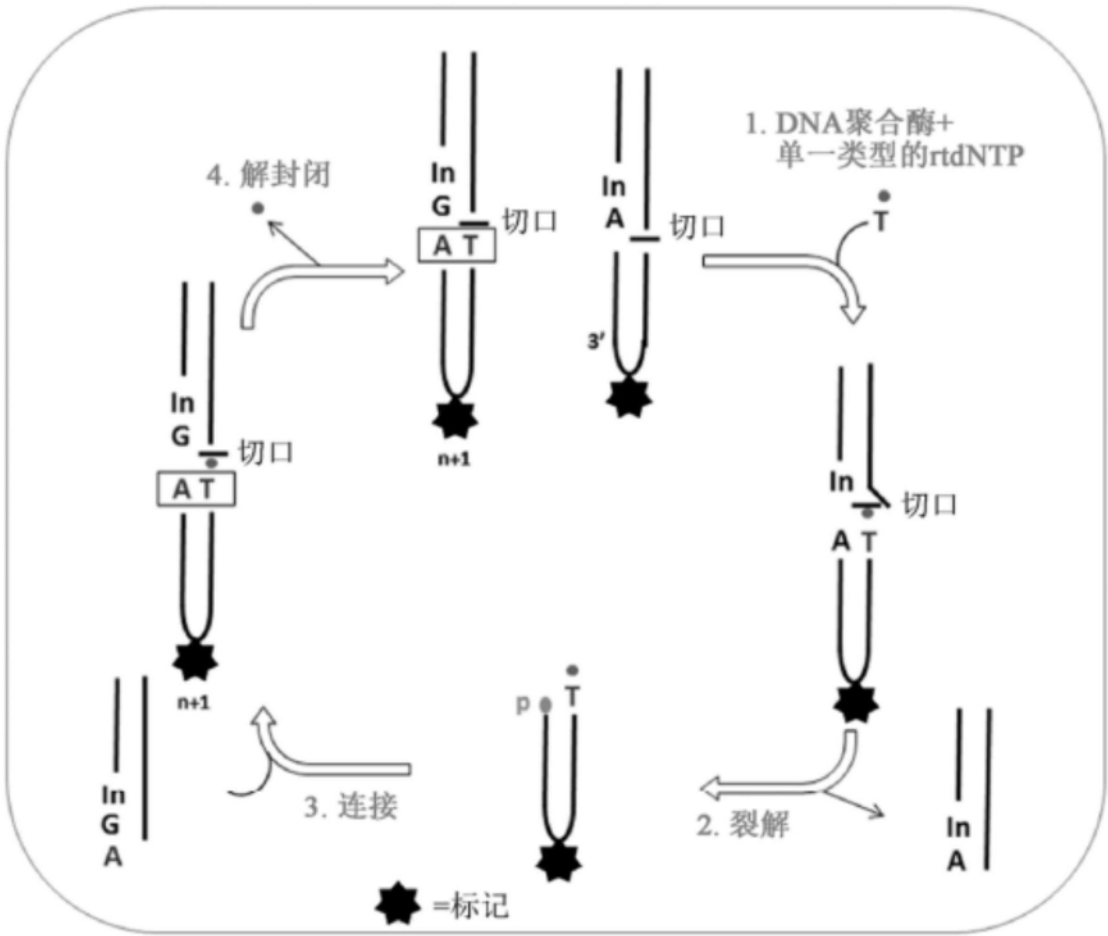


图26a

SEQ ID NO:	寡核苷酸名称	序列	修饰
50	用于掺入的单发夹模型	5'- AGTCACGTCGTAGTCXAGCTGCAGTCACCTGCTGCTTYYTTCAGCAGGTGACTGCAGC-3'	X = 2'-脱氧肌苷 Y = Tamra-dT
51	辅助股	5'- TCGACTACGACGTGACT-3'	
52	用于连接的股	5'- AGTCACGTCGTAGTCXGA	X = 2'-脱氧肌苷
53	用于连接的辅助股	5'- CCGACTACGACGTGACT-3'	

图26b

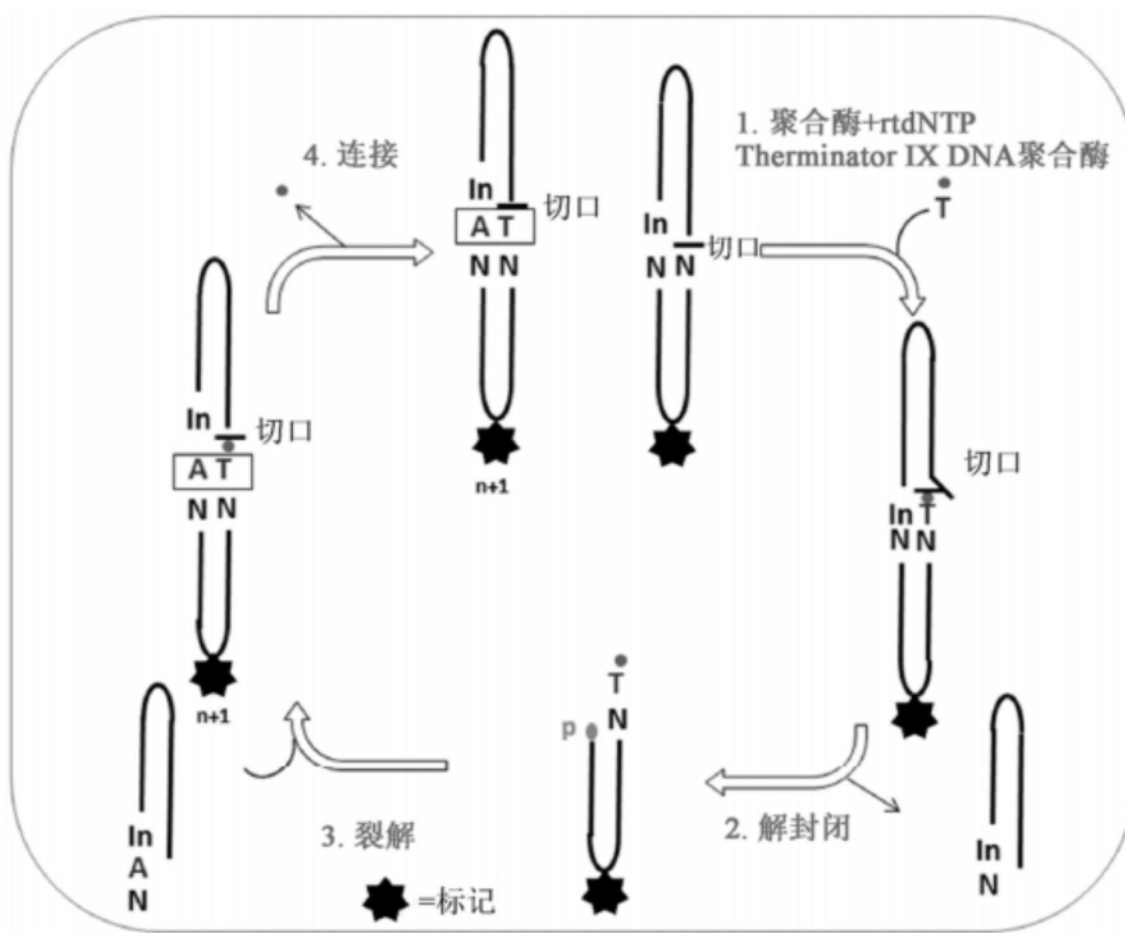


图27a

SEQ ID NO:	寡核苷酸名称	序列	修饰
54	双发夹模型	5'- CGACTACGACGTGACTTTTAGTCAC GTCGTAGTCXAGCTGCAGTCACCTGCTGC TTYTTGCAGCAGGTGACTGCAGCT-3'	X = 2'-脱氧肌苷 Y = Tamra-dT
55	用于连接的股	5'- CGACTACGACGTGACTTTTAGTCAC GTCGTAGTCXAA-3'	X = 2'-脱氧肌苷

图27b

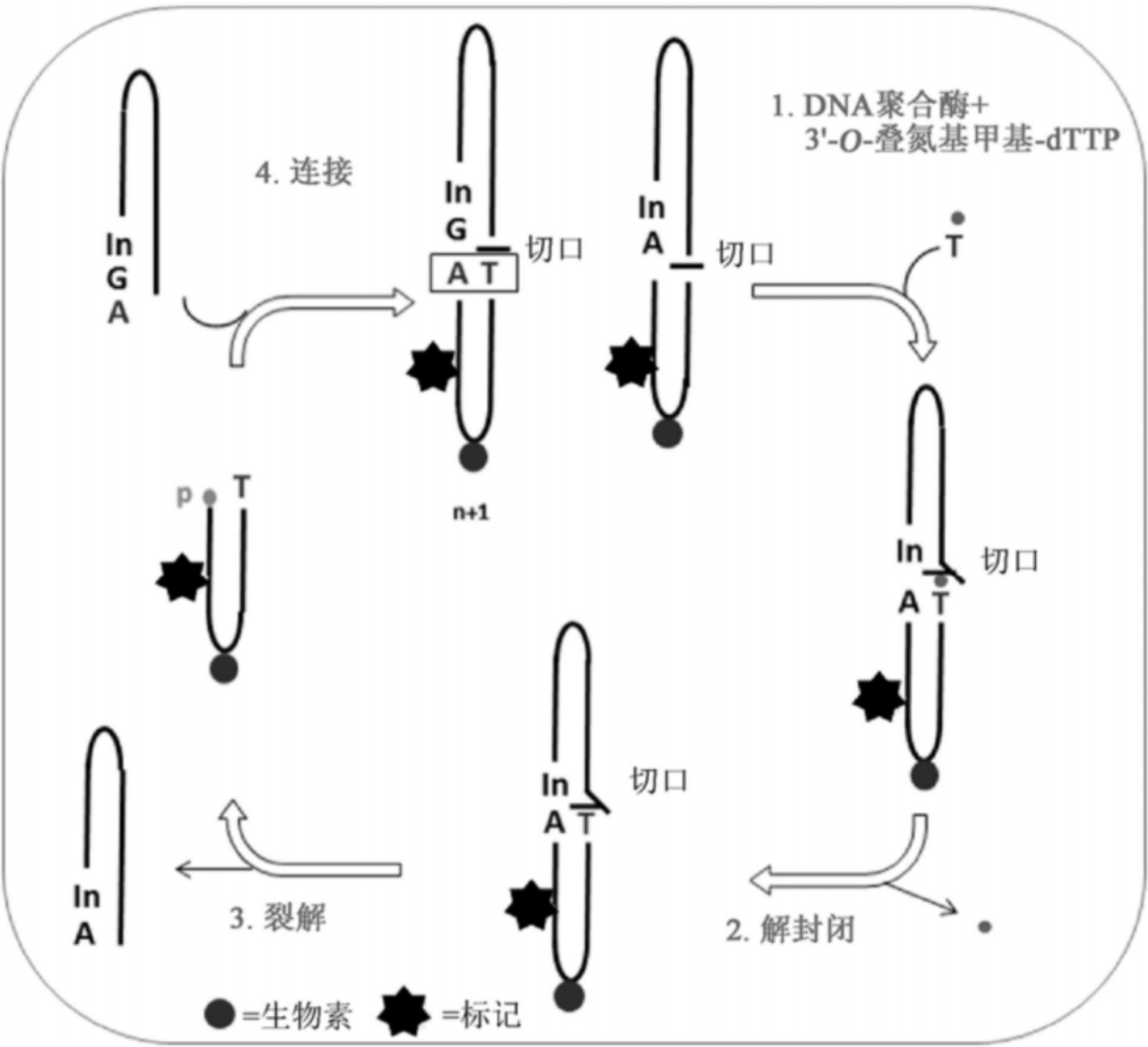


图28a

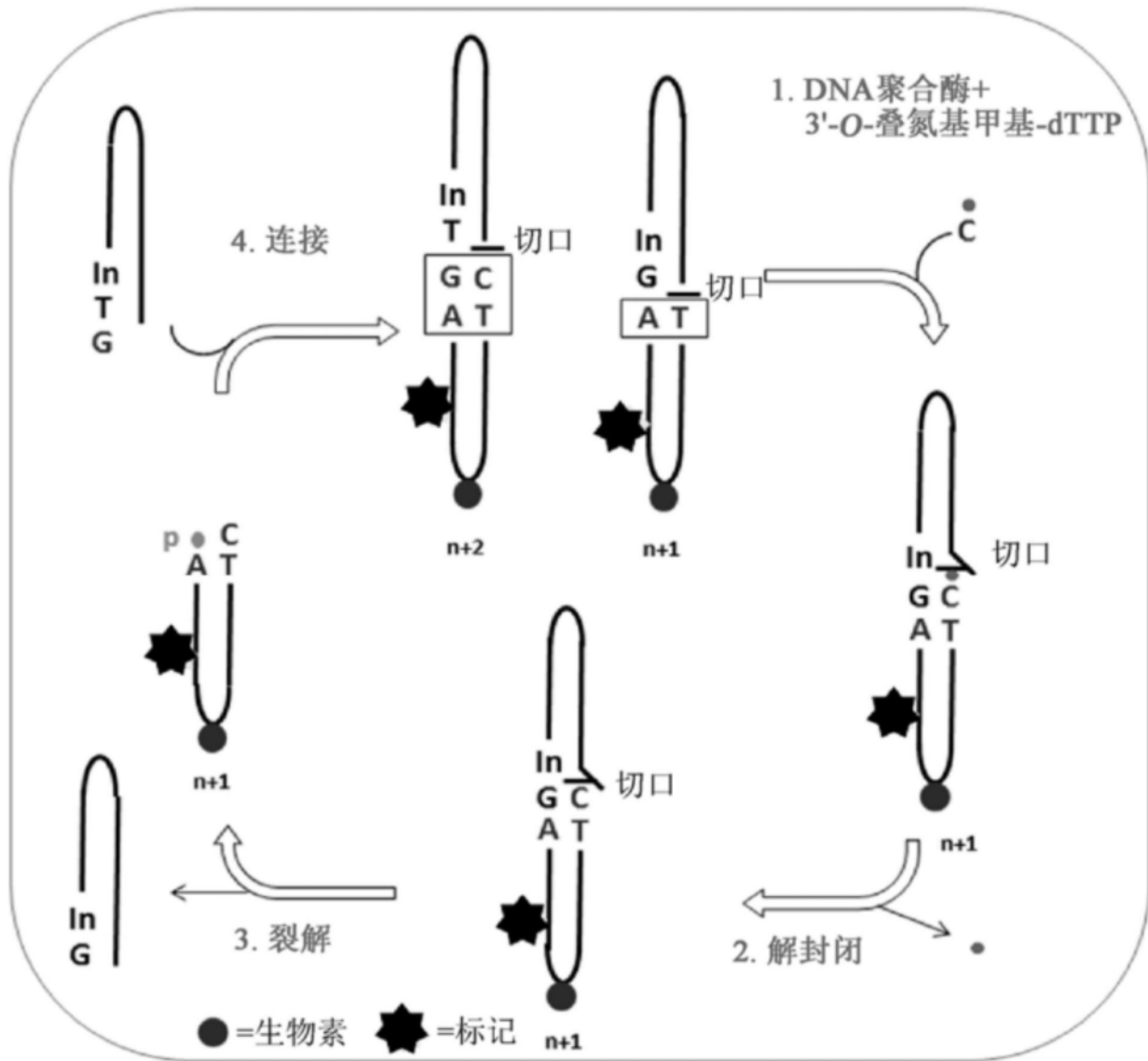


图28b

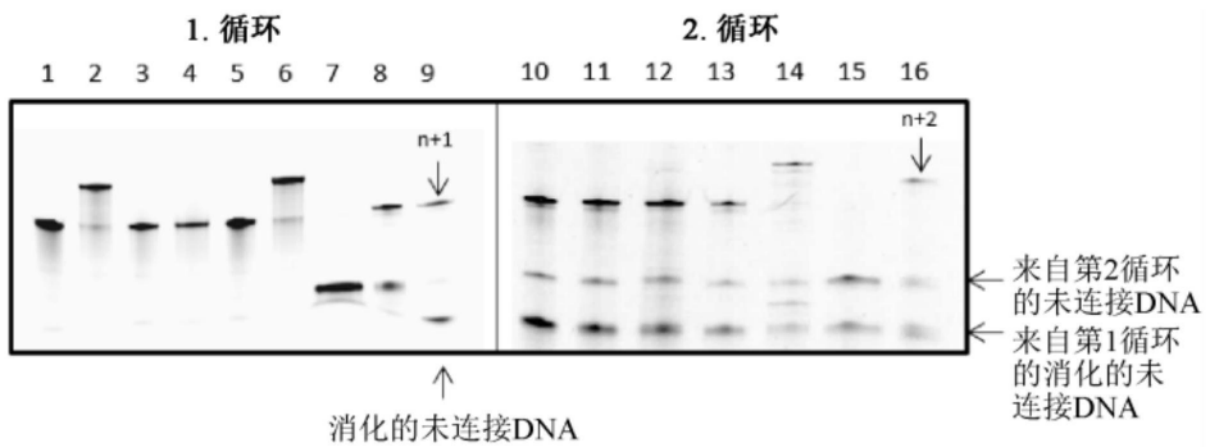


图28c

SEQ ID NO:	寡核苷酸名称	序列	修饰
56	双发夹模型	5'- CGACTACGACGTGACTTTTAGTCAC GTCGTAGTCXAGCTGCAGTCACCTGCGY CTTZZTGCAGCAGGTGACTGCAGCT-3'	X = 2'-脱氧肌苷 Y = Tamra-dT Z = 生物素-dT
57	在第1循环中用于 连接的股	5'- CCGACTACGACGTGACTTTTAGTCAC GTCGTAGTCXGA-3'	X = 2'-脱氧肌苷
58	在第2循环中用于 连接的股	5'- ACGAGTGACCTGGTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTACCAGGTCAC TCTG-3'	X = 2'-脱氧肌苷

图28d

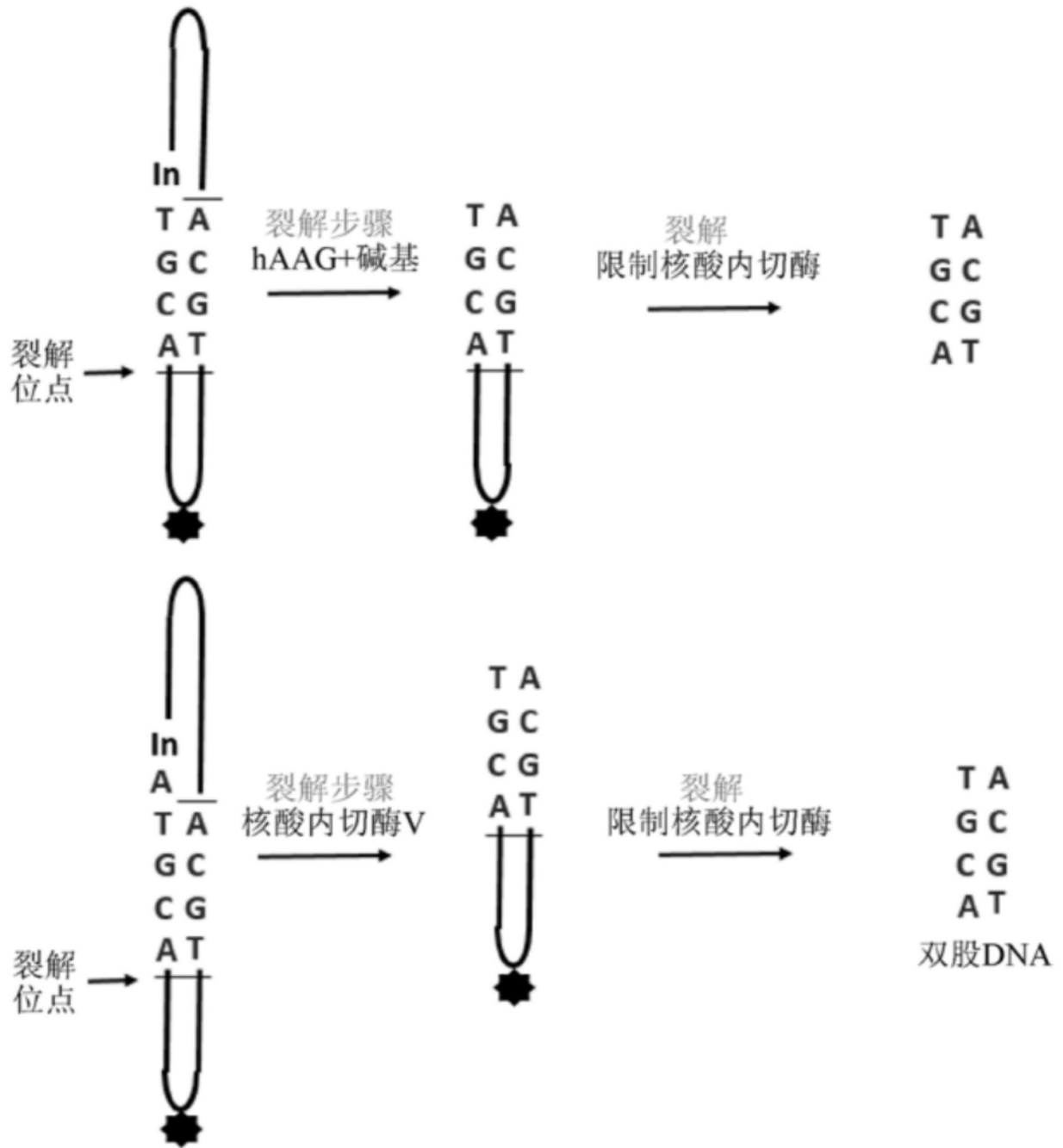


图29

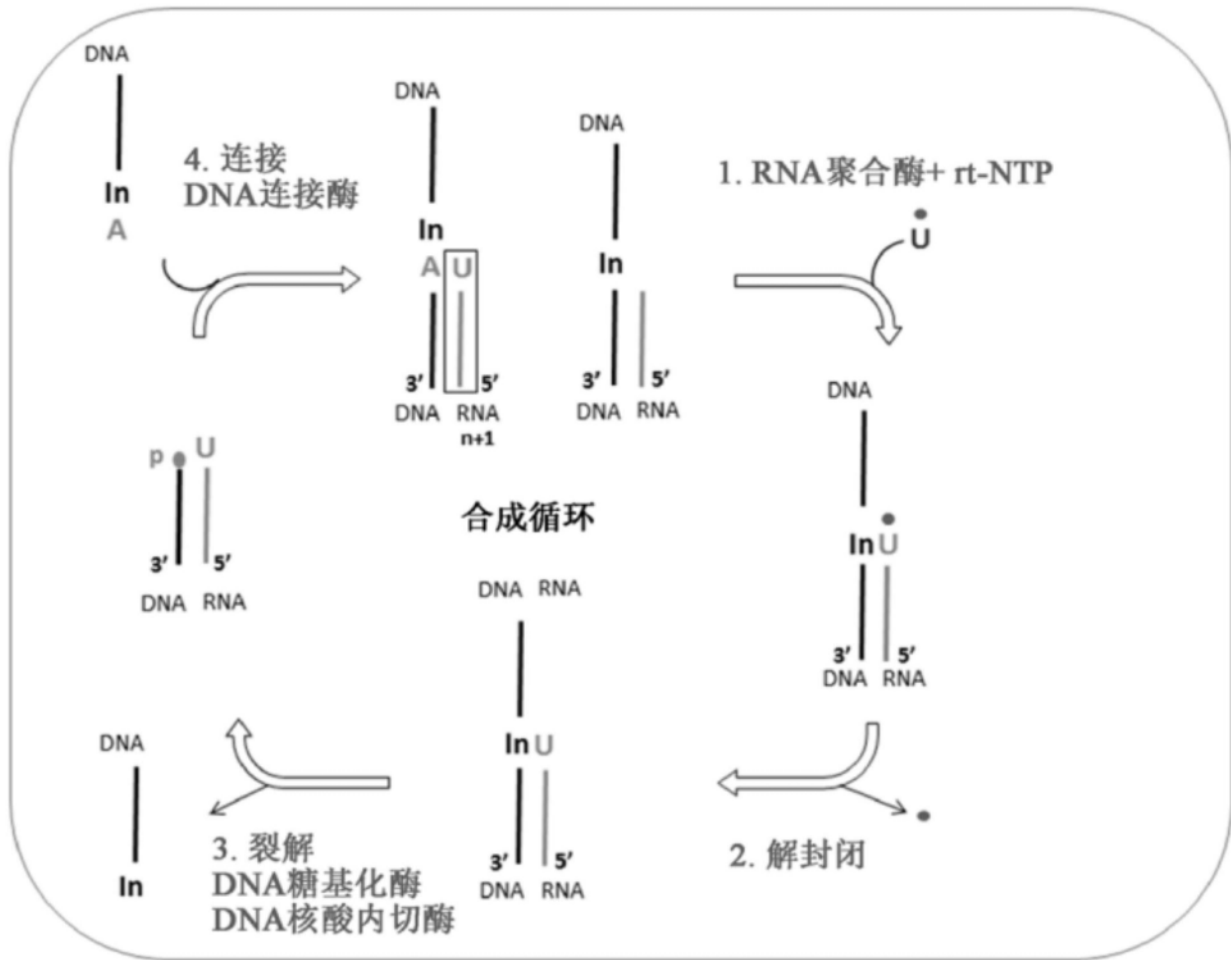


图30

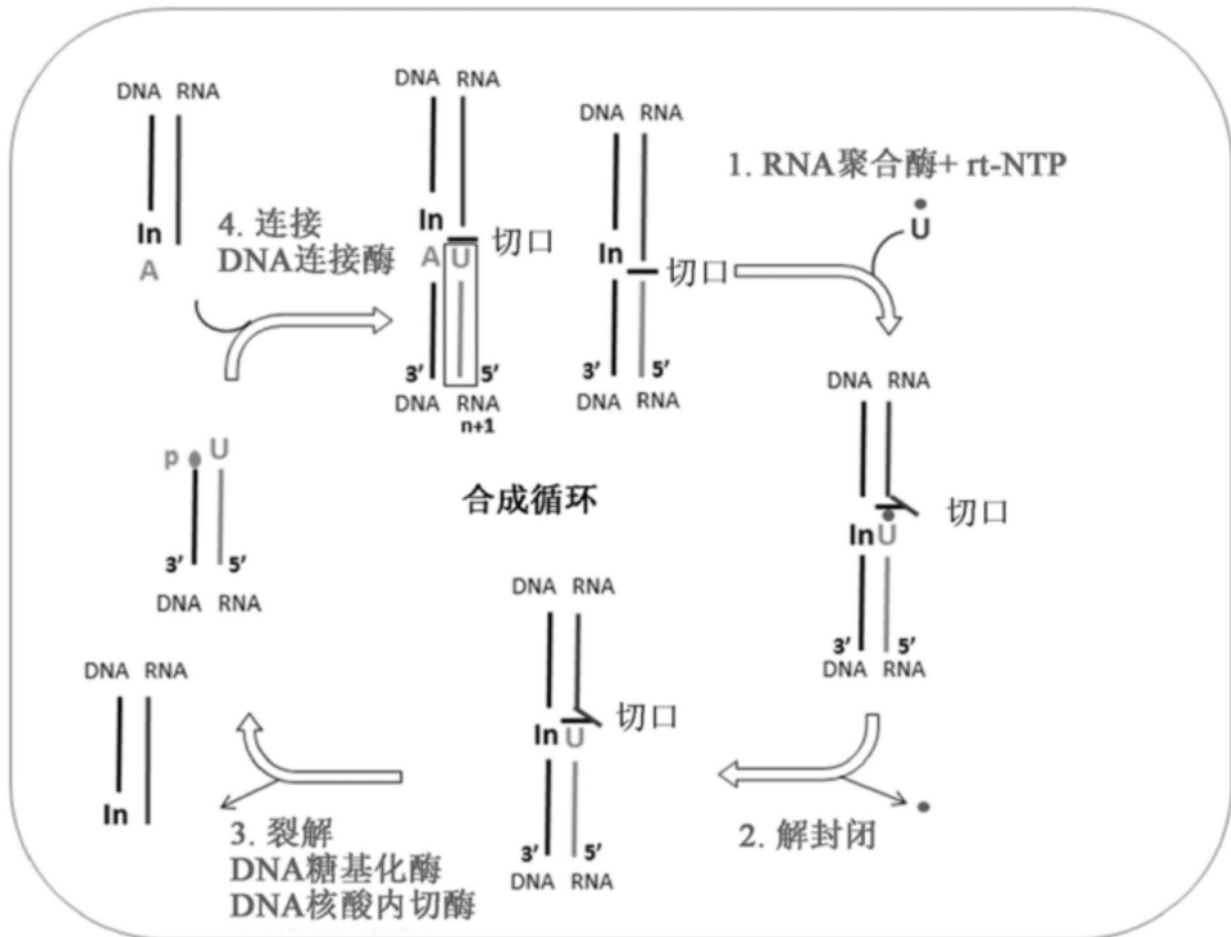


图31

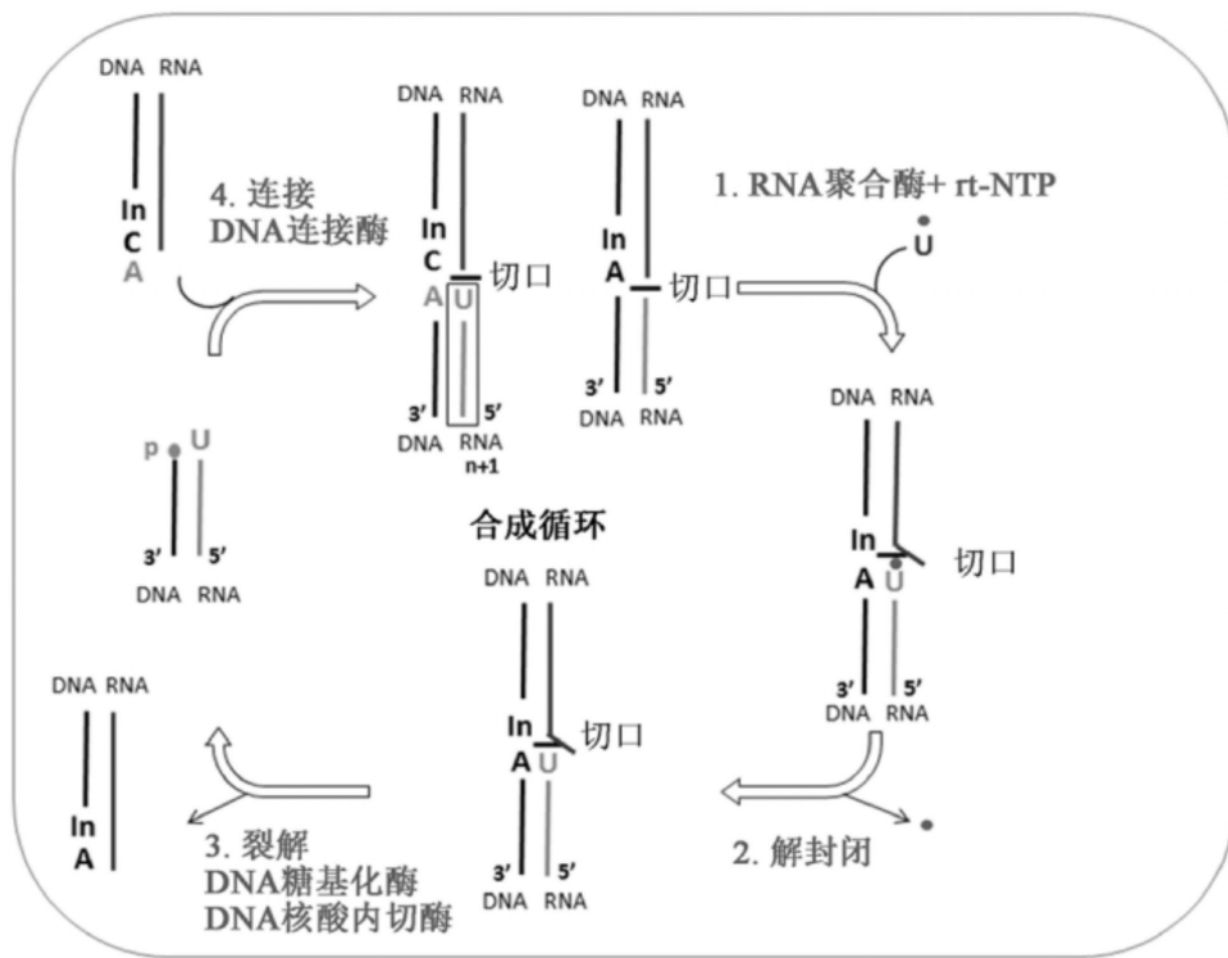


图32

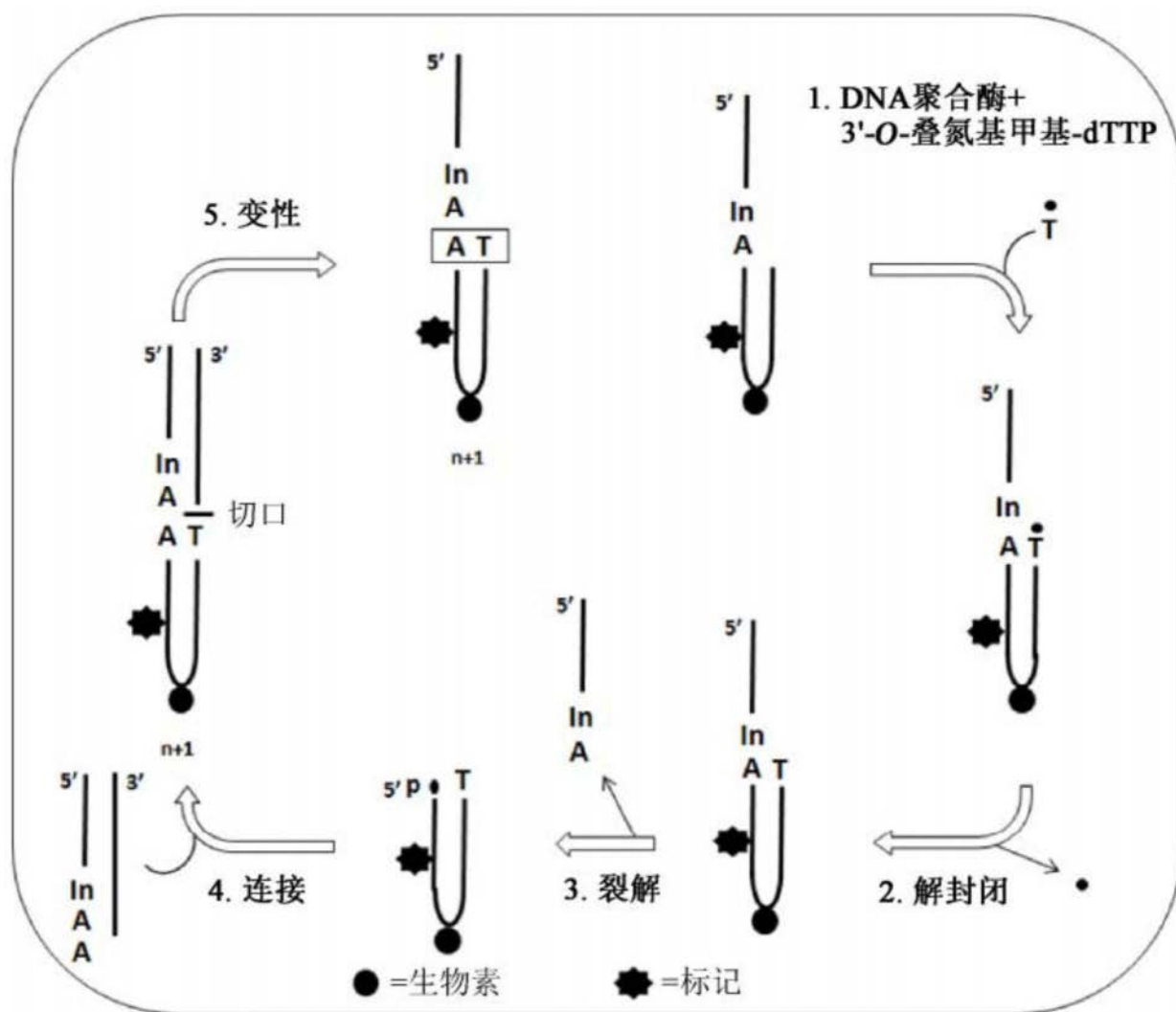


图33

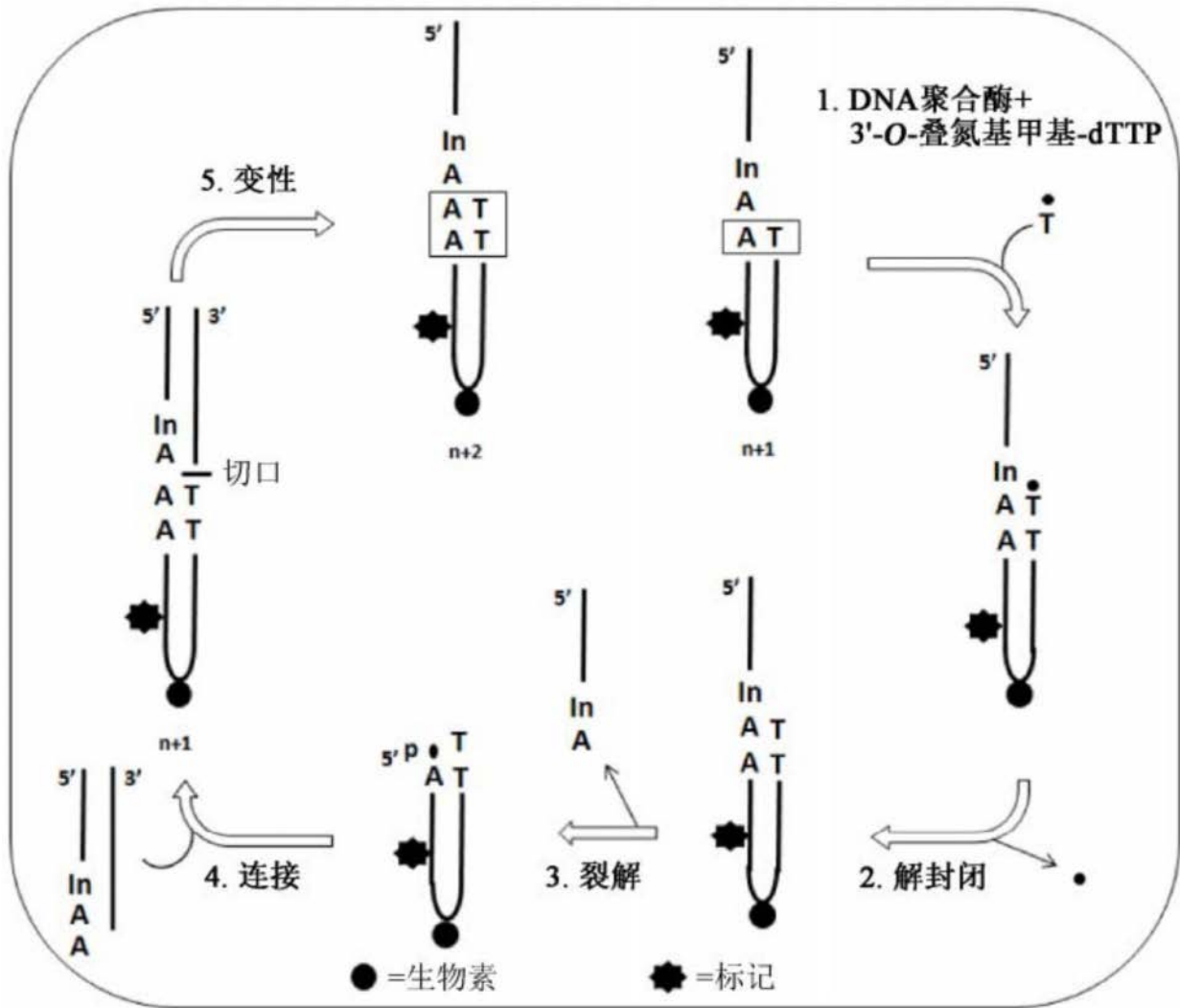


图34

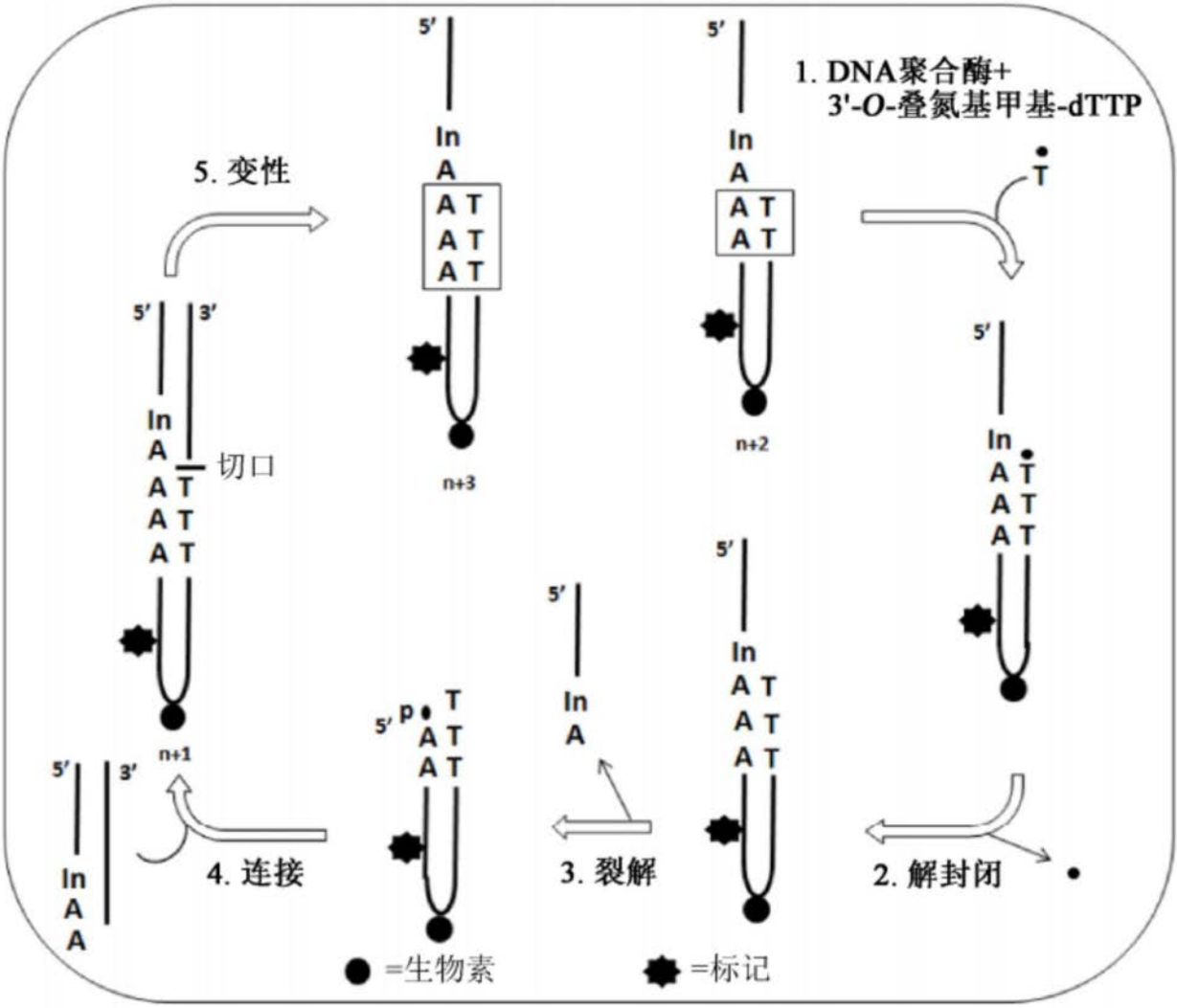


图35

SEQ ID NO:	寡核苷酸名称	序列	修饰
59	单发夹模型	5'- AGTCACGTCGTCAGTCXAGCTGCAGTC ACCTGCGCTTZZTTGCAGCAGGTGACTG CAGC-3'	X = 2'-脱氧肌苷 Y = Tamra-dT Z = 生物素-dT
60	用于连接的 肌苷股	5'- AGTCACGTCGTCAGTCXAA-3'	X = 2'-脱氧肌苷
51	用于连接的 辅助股	5'- TCGACTACGACGTGACT-3'	

图36

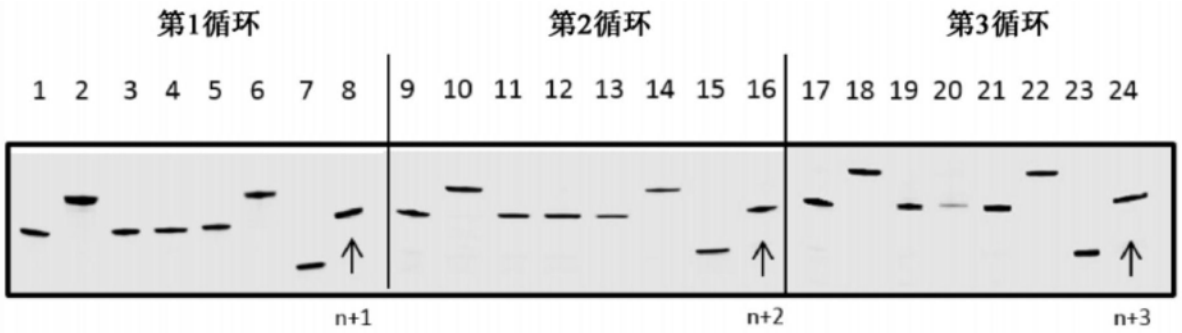


图37

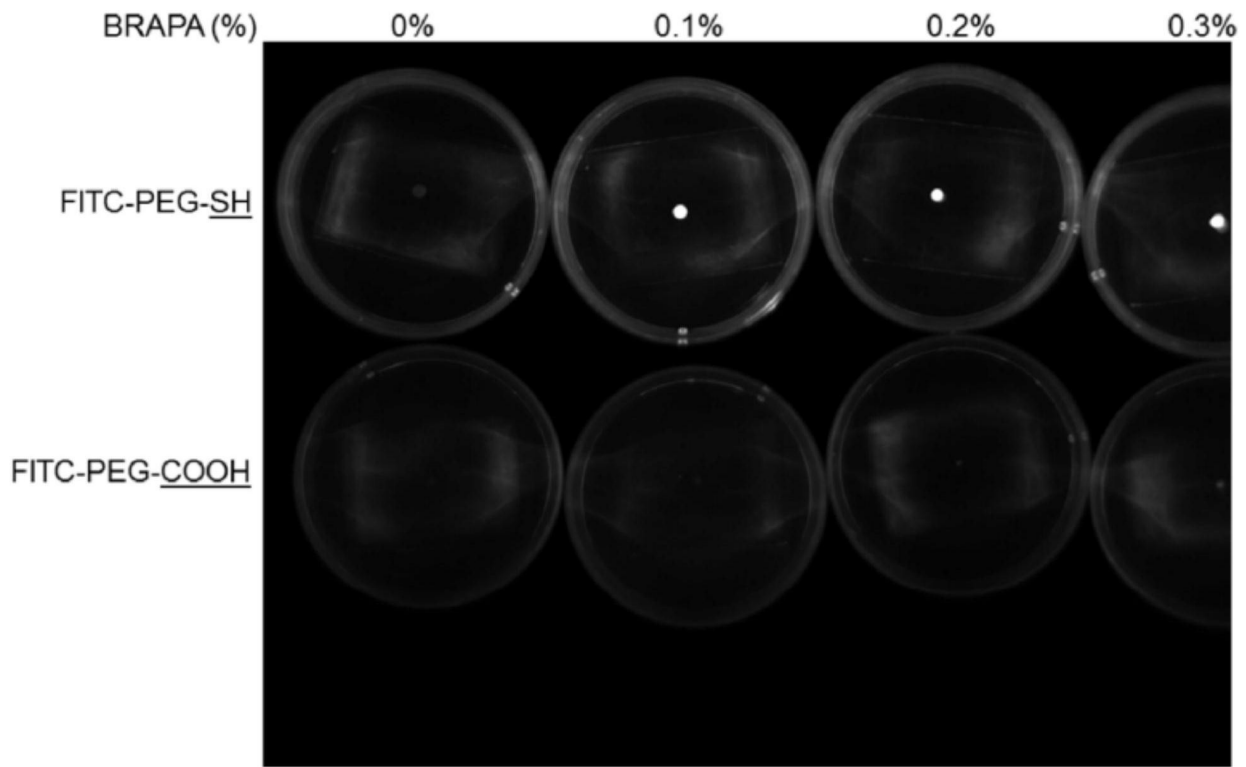


图38

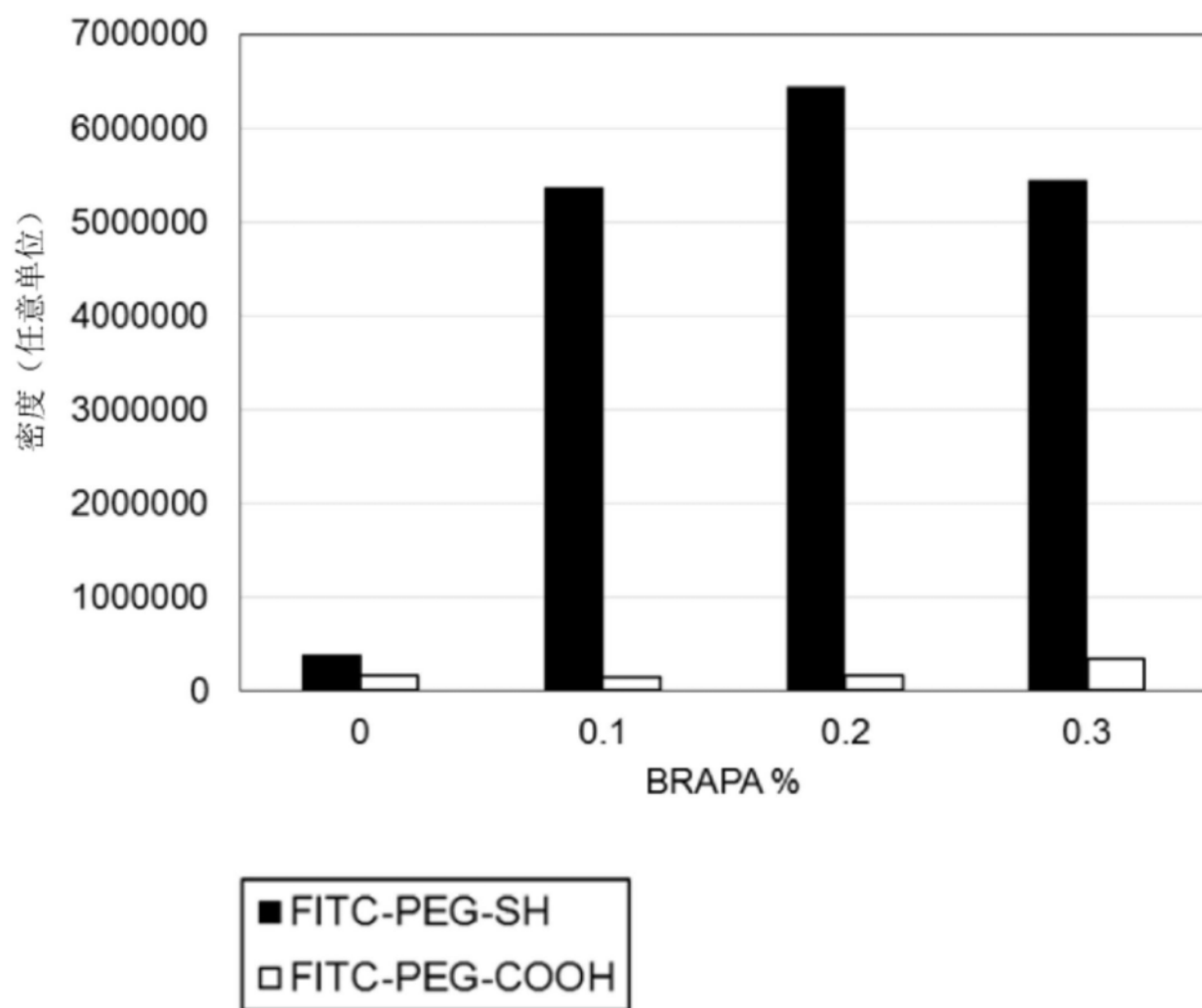


图39

样品ID	序列	SEQ ID NO:
A (BRAPA对照)	5'-Alexa647- AGTCACGTCGTAGTCIAGCTGCAGTCACCTGCTGCTTTT T*T*T*T*T*TTTGCAGCAGGTGACTGCAGC	SEQ ID NO: 61
B (经BRAPA修 饰的1)	5'-Alexa647- AGTCACGTCGTAGTCIAGCTGCAGTCACCTGCTGCTTTT T*T*T*T*T*TTTGCAGCAGGTGACTGCAGC	SEQ ID NO: 61
C (经BRAPA修 饰的2)	5'-Alexa647- AGTCACGTCGTAGTCIAGCTGCAGTCACCTGCTGCTTTT T*T*T*T*T*TTTGCAGCAGGTGACTGCAGC	SEQ ID NO: 61
D (寡聚物对照)	5'-Alexa647- AGTCACGTCGTAGTCIAGCTGCAGTCACCTGCTGCTTTT TTTTTTTTTGCAGCAGGTGACTGCAGC	SEQ ID NO: 62
*=硫代磷酸键; I=2'-脱氧肌苷		

图40a

样品ID	序列	SEQ ID NO:
A (BRAPA对照)	5'-Alexa647- AGTCACGTCGTAGTCIAGCTGCAGTCACCTGCTG CTTZTGCAGCAGGTGACTGCAGC-3'	SEQ ID NO: 63
B (经BRAPA修 饰的1)	5'-Alexa647- AGTCACGTCGTAGTCIAGCTGCAGTCACCTGCTG CTTZTGCAGCAGGTGACTGCAGC-3'	SEQ ID NO: 63
C (经BRAPA修 饰的2)	5'-Alexa647- AGTCACGTCGTAGTCIAGCTGCAGTCACCTGCTG CTTZTGCAGCAGGTGACTGCAGC-3'	SEQ ID NO: 63
D (寡聚物对照)	5'-Alexa647- AGTCACGTCGTAGTCIAGCTGCAGTCACCTGCTG CTTYTGCAGCAGGTGACTGCAGC-3'	SEQ ID NO: 64
Z=5"-硫代磷酸-Sp9-Sp9-Sp9-5-甲基C, Y=5"-磷酸-Sp9-Sp9-Sp9-5-甲基C; Sp9=间隔基9; I=2'-脱氧肌苷		

图40b

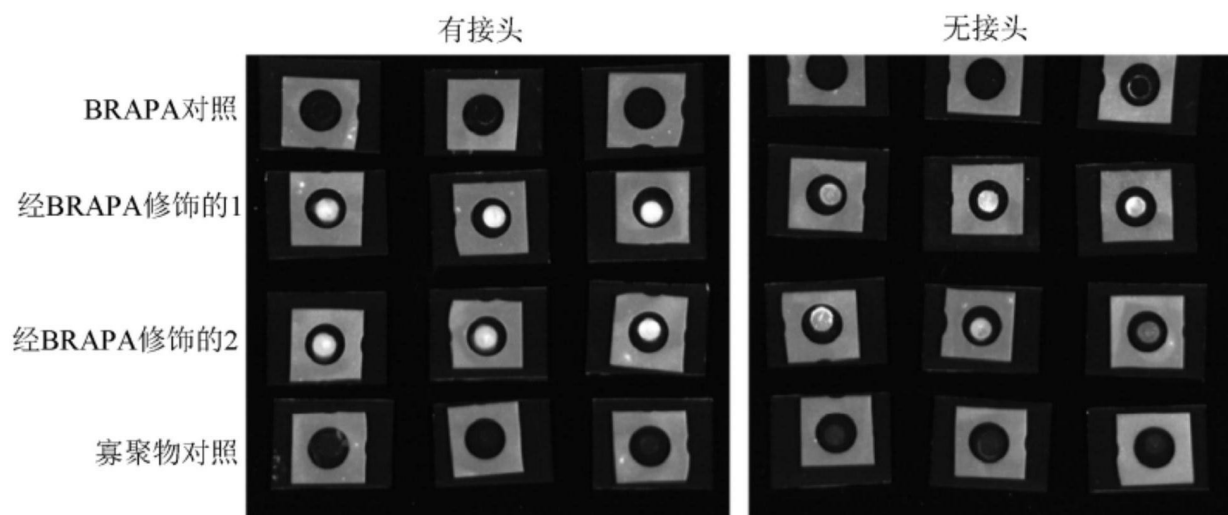


图41

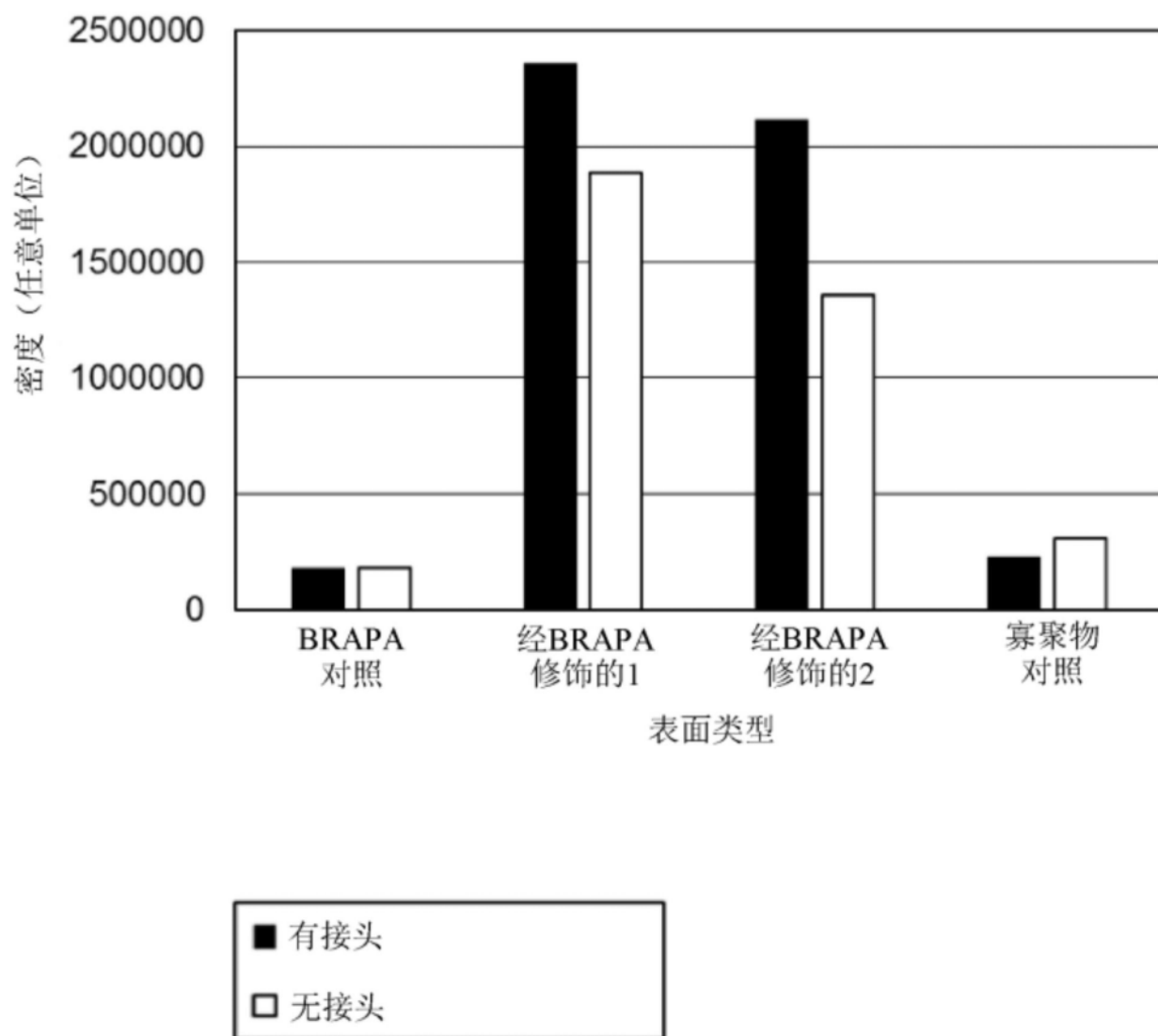


图42

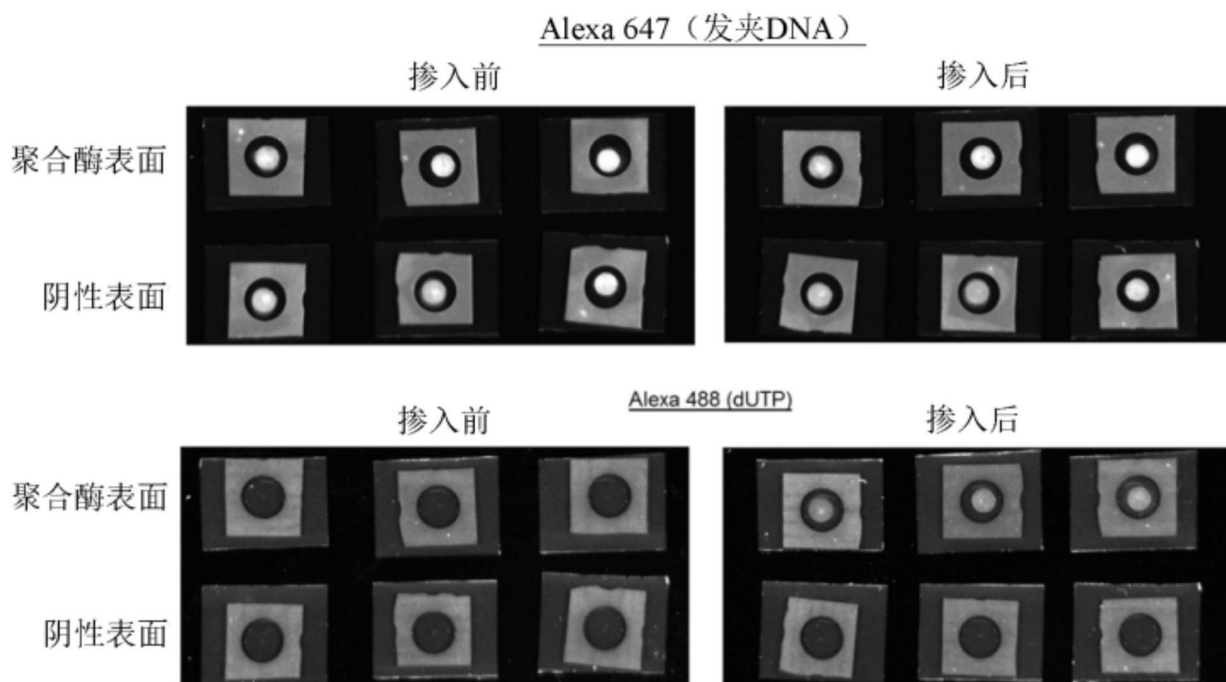


图43

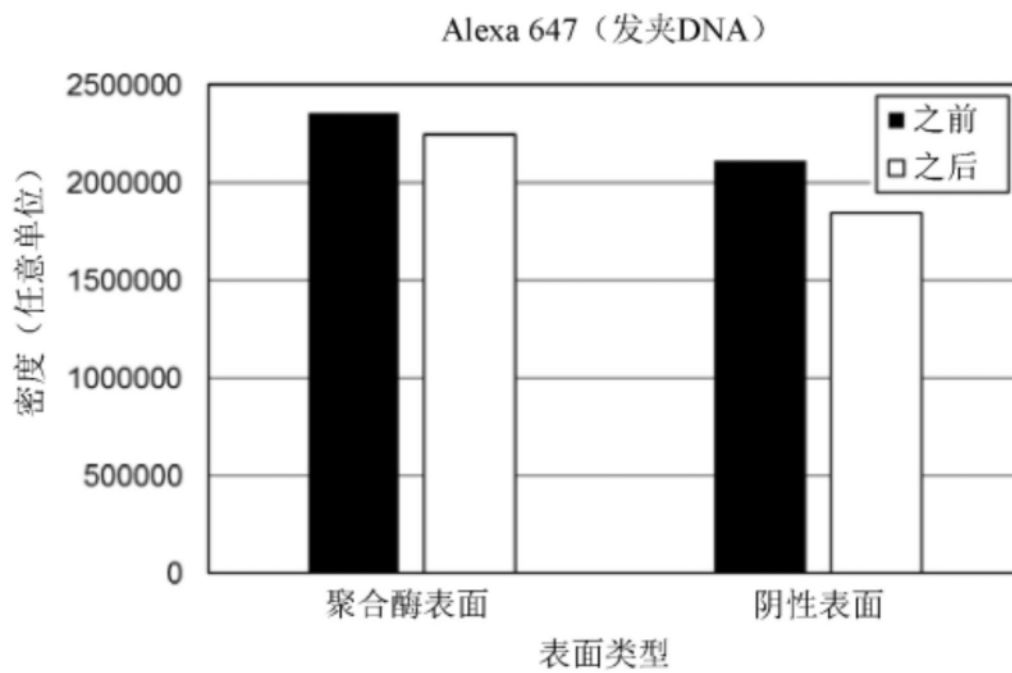


图44a

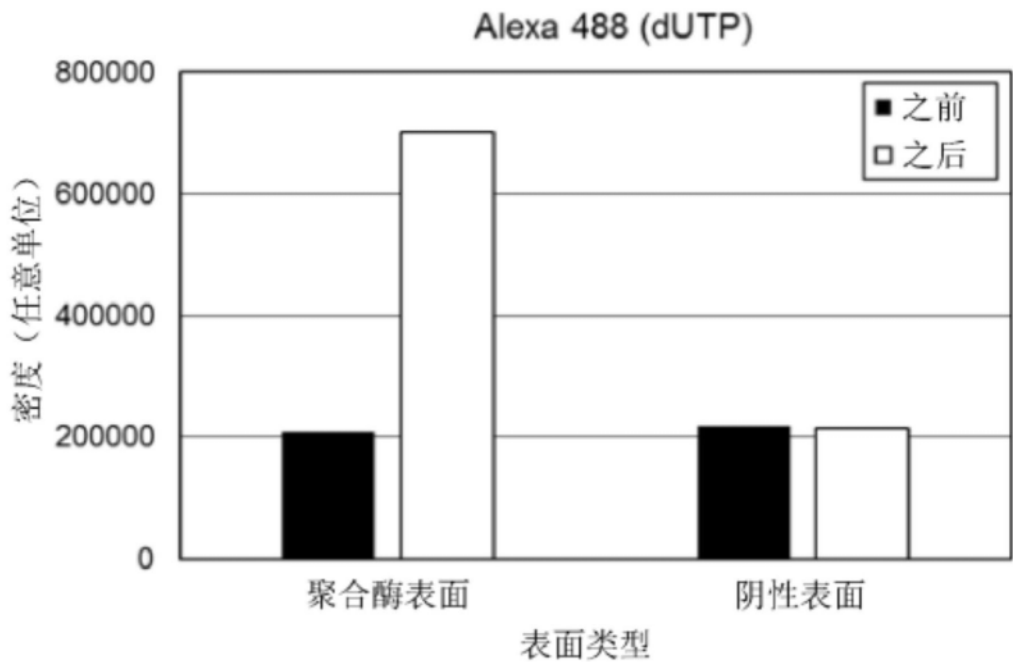


图44b

样品ID	样品描述 (实验结果)	裂解步骤	连接步骤
A (阳性)	裂解 (+) 连接 (+)	+肌苷 +核酸内切酶V	+辅助股 +连接酶
B (连接阴性对照)	裂解 (+) 连接 (+)	+肌苷 +核酸内切酶V	+辅助股 -连接酶
C (裂解阴性对照1)	裂解 (-) 连接 (N/A)	+肌苷 -核酸内切酶V	N/A
D (裂解阴性对照2)	裂解 (-) 连接 (N/A)	-肌苷 +核酸内切酶V	N/A

图45a

样品ID	序列	SEQ ID NO:
A (阳性样品)	5'-Alexa647-AGTCACGTCGTAGTCIAGCTGCAGTCACCTGCTGCTTZZTGCAGCAGGTGACTGCAGCT-3'	SEQ ID NO: 65
B (连接阴性对照)	5'-Alexa647-AGTCACGTCGTAGTCIAGCTGCAGTCACCTGCTGCTTZZTGCAGCAGGTGACTGCAGCT -3'	SEQ ID NO: 65
C (裂解阴性对照1)	5'-Alexa647-AGTCACGTCGTAGTCIAGCTGCAGTCACCTGCTGCTTZZTGCAGCAGGTGACTGCAGCT -3'	SEQ ID NO: 65
D (裂解阴性对照2)	5'-Alexa647-AGTCACGTCGTAGTCGAGCTGCAGTCACCTGCTGCTTZZTGCAGCAGGTGACTGCAGCT-3'	SEQ ID NO: 66
Z=5"-硫代磷酸-Sp9-Sp9-Sp9-5-甲基C； Sp9=间隔基9； I=2'-脱氧肌苷		

图45b

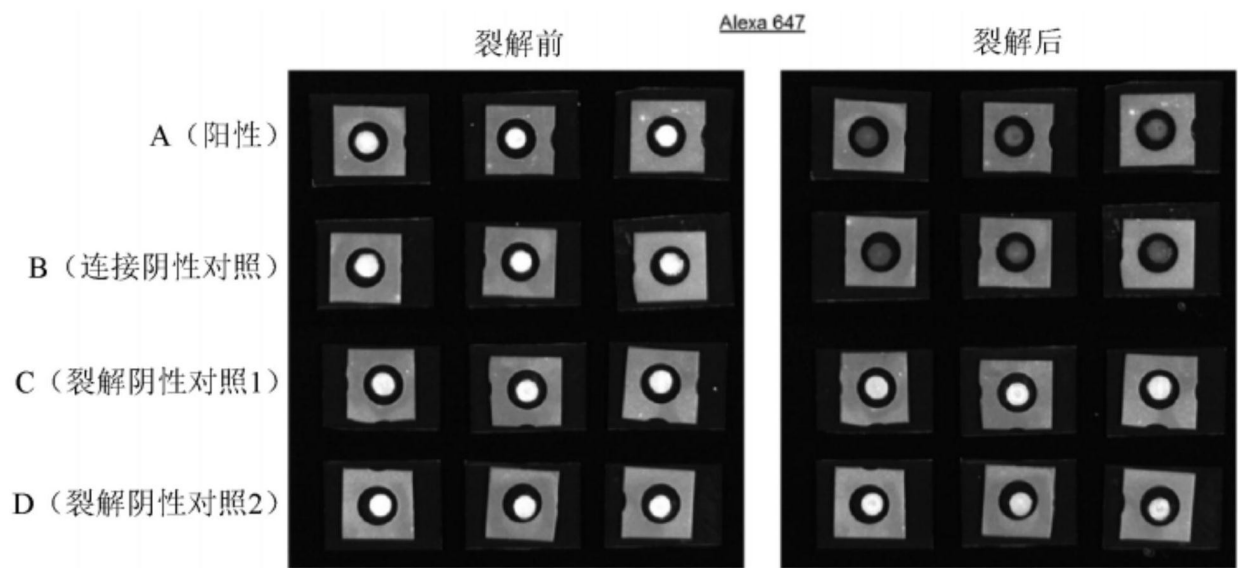


图46

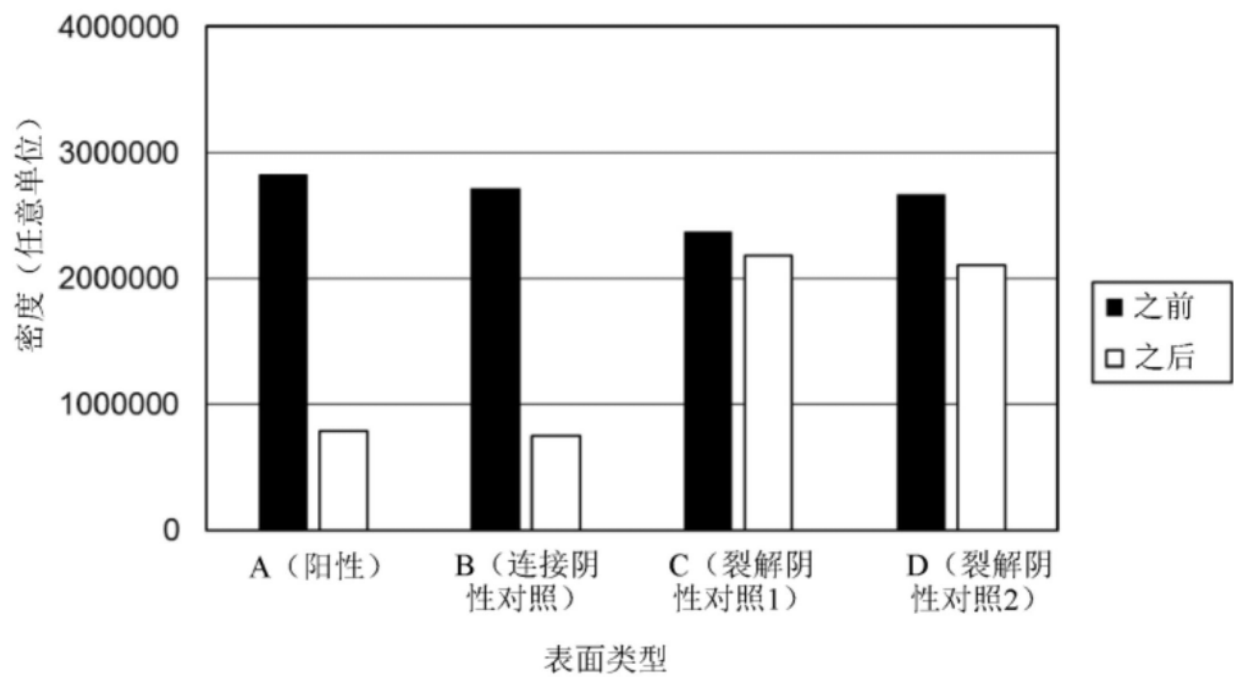


图47

DNA	序列	SEQ ID NO:
肌苷股	5'-Alexa647-AGTCACGTCGTAGTCIAA-3'	SEQ ID NO: 67
辅助股	5'-TCGACTACGACGTGACT-3'	SEQ ID NO: 51
I=2'-脱氧肌苷		

图48

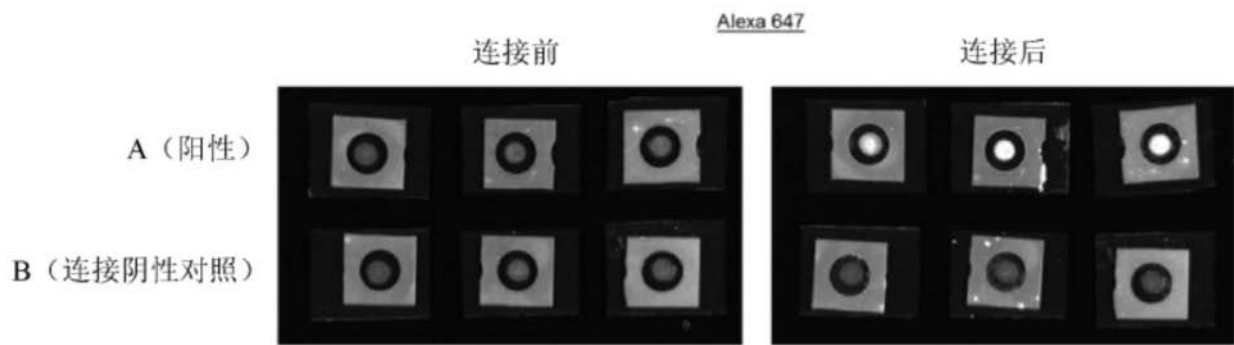


图49

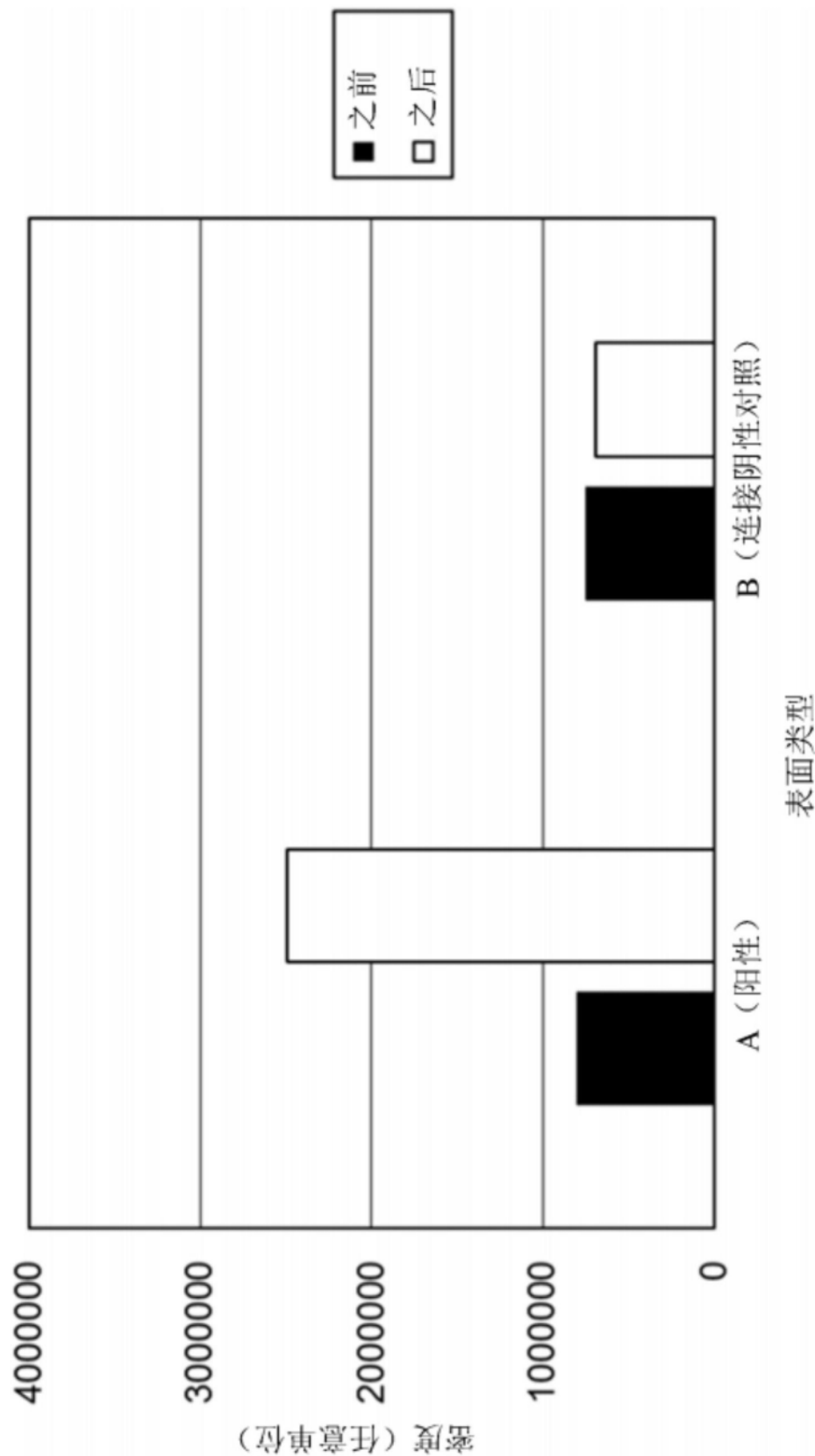


图50

A

SEQ ID NO:	寡核苷酸名称	序列	修饰
68	引物	5'-GCGACAGGTGACTGCAGC-3'	在5'端的TAMRA
69	模板	5'-GCTGCAGTCACCTGTCGC-3'	

B

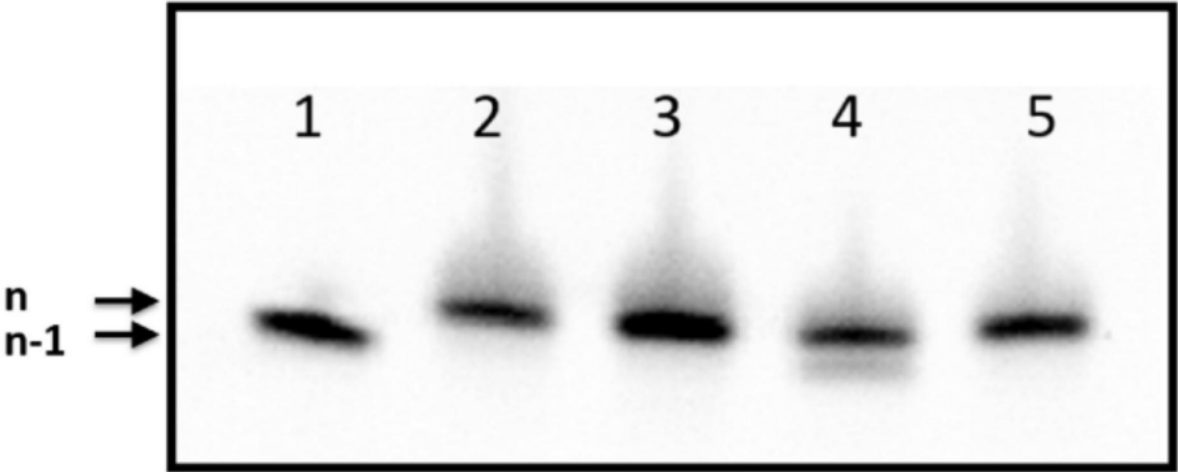


图51