



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103119165 B

(45)授权公告日 2017.04.12

(21)申请号 201180046388.3

(22)申请日 2011.09.01

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 103119165 A

(43)申请公布日 2013.05.22

(30)优先权数据
10180435.9 2010.09.27 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2013.03.27

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2011/065117 2011.09.01

(87)PCT国际申请的公布数据
W02012/041633 EN 2012.04.05

(73)专利权人 威泊根私人有限公司
地址 丹麦哥本哈根

(72)发明人 N·J·V·汉森
A·B·克里斯滕森 L·K·拉森
F·A·斯勒克 L·K·彼得森
J·拉斯穆森-迪特沃斯特

P·布莱克斯克耶尔 T·H·汉森
J·霍尔姆奎斯特

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专
利商标事务所 11038
代理人 罗菊华

(51)Int.Cl.
C12N 15/10(2006.01)

(56)对比文件
张永钢等.DNA 展示技术的原理及应用.《国际生物制品学杂志》.2006,126-129.

Yonezawa et al.DNA display for in vitro selection of diverse peptide libraries.《Nucleic Acids Research》.2003, 1-6.

Doi et al.STABLE: protein-DNA fusion system for screening of combinatorial protein libraries in vitro.《FEBS Letters》.1999,227-230.

审查员 马骞

权利要求书2页 说明书56页
序列表17页 附图4页

(54)发明名称

制备富集文库的方法

(57)摘要

一种制备包含允许鉴定至少一种结合至少一种靶标的结合实体的特定核酸序列信息的富集文库的方法,其中所述特定结合实体已经存在于体外展示文库中。

1. 一种制备富集文库的方法,所述富集文库包含允许鉴定至少一种结合实体的特定核酸序列信息,所述结合实体结合至少一种靶标,其中所述特定结合实体已存在于体外展示文库,并且其中所述方法包括下述步骤:

(i):制备至少100种不同结合实体的体外展示文库,其中每个结合实体附加到核酸分子,所述核酸分子包括允许鉴定结合实体的特定核酸序列信息,其中人们一旦知晓所述核酸分子的所述特定核酸序列信息即可直接知晓附加到所述核酸分子的所述特定结合实体的结构,附加到所述核酸分子的所述结合实体的所述结构在本文中称为B-结构;

(ii):制备具有附加到核酸分子的至少一种靶标的核酸分子,所述核酸分子包括允许鉴定所述特定靶标的特定核酸序列信息,其中所述靶标能够结合存在于步骤(i)的文库的至少一种结合实体——附加到所述核酸分子的靶标的结构在本文中称为T-结构;

并且其中所述方法特征在于:

(iii):在结合条件下,将包括X个步骤(i)的文库的B-结构的溶液与包括Y个步骤(ii)的T-结构的溶液混合,其中X是大于 10^4 的数,Y是大于 10^2 的数,所述条件是含有能够结合靶标分子的结合实体的B-结构与含有不能够结合相同靶标分子的结合实体的B-结构相比更有效地结合相应的T-结构,并且其中人们得到至少一种结合实体与至少一种靶标的结合,从而生成称为 $B_{\text{结合至}}$ T-结构的包含B-结构结合到T-结构的复合物;

(iv):在结合条件下,应用体外区室化系统,所述条件是含有能够结合靶标分子的结合实体的B-结构与包括不能够结合相同靶标分子的结合实体的B-结构相比更有效地结合相应的T-结构,其中,在B-结构、T-结构和 $B_{\text{结合至}}$ T-结构已经被稀释至少2倍、随机进入单独的区室的条件下,所述区室化系统包括的单独的区室为步骤(iii)存在的Y个T-结构的至少2倍;和

(v):融合同时存在于相同单独的区室里的B-结构和T-结构的核酸分子,其中融合所述B-结构的核酸分子至所述T-结构的核酸分子,这个结构本文中称为 $BT_{\text{融合}}$ -结构,所述 $BT_{\text{融合}}$ -结构包括允许鉴定步骤(i)所述结合实体的特定核酸序列信息和允许鉴定步骤(ii)所述特定靶标的特定核酸序列信息;和

(vi):组合步骤(v)的所述单独的区室的内容物,以得到 $BT_{\text{融合}}$ -结构文库,该步骤在以下条件下进行:其中没有B-结构和T-结构的核酸分子的融合,其中在步骤(v)中没有生成任何新的 $BT_{\text{融合}}$ -结构,其中所述文库是与源自靶标与结合实体的未结合对的 $BT_{\text{融合}}$ -结构相比,为源自靶标与结合实体的结合对的 $BT_{\text{融合}}$ -结构种类的富集文库;以及

其中所述 $B_{\text{结合至}}$ T-结构在步骤(iv)的所述单独的区室中保持悬浮于溶液中;和/或

其中所述方法不依赖于固相载体上的靶标固定化。

2. 权利要求1的方法,其中步骤(i)的结合实体通过共价结合附加到所述核酸分子,并且其中步骤(ii)所述靶标通过共价结合附加到所述核酸分子,并且其中所述B-结构的所述核酸分子是DNA,所述T-结构的所述核酸分子是DNA。

3. 权利要求2的方法,其中所述B-结构中的所述DNA核酸分子是双链核酸分子,并且其中所述T-结构中的所述DNA核酸分子是双链核酸分子。

4. 前述任一项权利要求的方法,其中所述B-结构中附加到所述结合实体的所述核酸分子含有PCR引发位点,并且其中所述T-结构中附加到所述靶标的所述核酸分子含有PCR引发位点。

5. 权利要求1-2任一项的方法,其中步骤(i)的所述体外文库包括至少 10^5 种不同结合实体,并且其中步骤(i)的所述结合实体是平均分子量MW低于5000道尔顿的化合物。

6. 权利要求1-2任一项的方法,其中步骤(ii)中至少有两种不同靶标。

7. 权利要求1-2任一项的方法,其中至少一种靶标是蛋白质。

8. 权利要求1-2任一项的方法,其中权利要求1的步骤(iii)中有至少 10^5 拷贝的感兴趣的T-结构,其中“Y”是至少 10^5 ,并且其中权利要求1的步骤(iii)中的T-结构的浓度是至少 10^{-9} M。

9. 权利要求1-2任一项的方法,其中步骤(iii)在结合条件下进行,其中含有能够结合至靶标分子的结合实体的B-结构,与包含不能够结合至相同靶标的结合实体的B-结构相比,100倍有效地结合所述相应的T-结构。

10. 权利要求1-2任一项的方法,其中权利要求1的方法包括在权利要求1的所述步骤(iv)之前进行的额外的步骤(iii-b),包括:

(iii-b):在结合条件下稀释步骤(iii)的所述溶液至少100倍,所述条件是包含能够结合靶标分子的结合实体的B-结构与包含不能够结合相同靶标分子的结合实体的B-结构相比更有效地结合相应的T-结构。

11. 权利要求1-2任一项的方法,其中权利要求1的步骤(iv)中的单独的区室为存在于步骤(iii)的T-结构的Y数量的至少100倍,其中权利要求1的步骤(iv)中的单独的区室为步骤(iii)的B-结构的X数量的至少10的平方根倍。

12. 权利要求1-2任一项的方法,其中权利要求1的步骤(iv)的所述体外区室化系统是油包水乳液系统,并且其中平均区室体积小于 10^{-12} L。

13. 权利要求1-2任一项的方法,其中同时存在于权利要求1的步骤(v)的所述相同的单独区室里的B-结构和T-结构的所述核酸分子的所述融合是:

(a):通过DNA连接酶完成,其形成位于3'-OH和5'磷酸基团间的磷酸二酯键;或

(b):通过使用DNA聚合酶。

14. 权利要求12的方法,其中权利要求1的步骤(iv)的所述体外区室化系统是油包水乳液,其中权利要求1的步骤(v)的所述单独区室的所述内容物通过一种方法在权利要求1的步骤(vi)中被组合,其中所述油区室被破坏。

15. 权利要求1-2任一项的方法,其中存在额外的步骤(vii),其中存在于步骤(vi)的所述富集文库的BT融合-结构通过PCR扩增并随后进行DNA测序以鉴定至少一种结合至少一种感兴趣的靶标的单独的结合实体。

16. 权利要求1-2任一项的方法,其中存在额外的步骤(vii),包括使用步骤(vi)的所述富集文库鉴定至少一种结合至少一种感兴趣的靶标的单独的结合实体。

制备富集文库的方法

发明领域

[0001] 本发明涉及一种制备包含允许鉴定至少一种结合至少一种靶标的结合实体的特定核酸序列信息的富集文库(enriched library)的方法,其中所述特异结合实体已经存在于体外展示文库中。

[0002] 背景

[0003] 已经开发了展示技术以整合核酸的信息存储和扩增能力与其他化合物的功能活性。展示技术依赖于功能结合实体(即表型)和提供关于功能实体结构信息的核酸序列(基因型)之间的关联。注:虽然由于表型和基因型包含于同一分子(DNA或RNA),核酸适体(nucleic acid aptamer)技术被认为是一种展示技术。

[0004] 此类方法的优点是可以构建非常大型的文库,并就功能实体的所需活性进行探查。然后,具有所需活性的文库成员可以与不具有所需活性的文库成员分开,从而形成富集文库,其具有更大部分的具有所需活性的成员。这种方法被称为选择或富集。一些展示技术允许多轮选择,这种情况下,一轮富集文库被扩增并用于准备新的富集展示文库和用于下一轮选择,等等。随后,富集文库中的文库成员的结构可以通过其同族(cognate)核酸序列进行鉴定,从而甚至允许从微量的材料进行鉴定。

[0005] 本发明相关文库可根据现有技术称为“体外展示文库”。

[0006] 本发明中,术语“体外展示文库”应当根据现有技术来理解——即作为包含大量不同结合实体的文库,其中每个结合实体附加到核酸分子,所述核酸分子包含允许鉴定所述结合实体的特定核酸序列信息——即一旦人们知晓所述核酸分子的所述特定核酸序列信息即可直接知晓附加到所述核酸分子的所述特定结合实体的结构——附加到所述核酸分子(基因型)的所述结合实体(即表型)的结构在本发明中被称为B-结构。

[0007] 现有技术描述了大量制备这种体外展示文库的不同的方法——本发明合适的实施例包括例如EP1809743B1 (Vipergen)、EP1402024B1 (Nuevolution)、EP1423400B1 (David Liu)、Nature Chem.Biol.(2009),5:647-654 (Clark)、W000/23458 (Harbury)、Nature Methods (2006),3(7),561-570,2006 (Miller)、Nat.Biotechnol.2004;22,568-574 (Melkko)、Nature.(1990);346(6287),818-822 (Ellington)或Proc Natl Acad Sci USA (1997).94(23):12297-302 (Roberts)、W006053571A2 (Rasmussen)。

[0008] 例如上述提到的现有技术所描述的——今天人们可以制备包含非常多(例如 10^{15} 种)特定结合实体(例如不同的化合物)的体外展示文库。

[0009] 鉴于此——很明显,能够改进这些文库的选择/富集步骤来制备富集文库将是非常有趣的——例如更有效地能够鉴定结合到感兴趣的靶标(例如医学上重要的受体分子)的特定结合实体(例如化合物)的结构。

[0010] 本发明附图3显示EP1809743B1 (Vipergen)所述的体外展示技术的一个实例——如附图3所示——该实例的选择步骤通过固定靶标(例如受体)于固相表面(例如珠或玻璃盘)来进行。

[0011] 不限于理论——就我们所知,本发明附图3的实例可看做本发明相关体外展示技

术现有技术(例如上述现有技术)的实例——即就我们所知,在现有技术中存在于体外展示文库的合适的结合实体的选择通常在展示文库结合事件之前或之后通过固定靶标(例如受体)于固相载体(例如玻璃盘、柱、珠、硝酸纤维素膜、小室等)来实施。未结合物和低亲和性结合物通常被洗脱下来,而富集结合物群体从固相载体上回收。

[0012] 在现有技术中已被描述的体外区室化(*in vitro compartmentalization*, IVC)用于查询文库中表型和基因型联系的技术。这些现有技术可分成两组:a) IVC用于促进建立正确的表型和基因型联系,其允许之后(区室破坏后)的功能选择(例如特定靶标结合),和b) IVC用于促进基于区室里表型的活性建立正确的表型和基因型联系,即在区室里基因被转录和翻译并且区室里所得蛋白的功能直接或间接用于分选、生存或扩增。

[0013] 换句话说,本发明相关所谓IVC现有技术——可描述为:

[0014] 组a)——其中表型活性在区室化步骤之后查询;或

[0015] 组b)——其中表型活性在区室化步骤之中查询。

[0016] 现有技术属于组a)的IVC实例:

[0017] Bertschinger等人,(2007)Protein Engineering,Design & Selection vol.20no.2pp.57-68;

[0018] Miller OJ,Bernath K,Agresti JJ,Amitai G,Kelly BT,Mastrobattista E,Taly V,Magdassi S,Tawfik DS,Griffiths ADDirected evolution by *in vitro* compartmentalization.Nat Methods.2006Jul;3(7):561-70;

[0019] Doi,N.和Yanagawa,H.(1999)FEBS Lett.,457,227-230;和

[0020] Yonezawa,M.,Doi,N.,Kawahashi,Y.,Higashinakagawa,T.和Yanagawa,H.(2003)Nucleic Acids Res.,31,e118。

[0021] 现有技术属于组b)的IVC实例:

[0022] Tawfik,D.S.和Griffiths,A.D.(1998)Man-made cell-like compartments for molecular evolution.Nat.Biotechnol.,16,652-656;

[0023] Ghadessy,F.J.,Ong,J.L.和Holliger,P.(2001)Proc.Natl Acad.Sci.USA,98,4552-4557;

[0024] Tay Y,Ho C,Droge P,Ghadessy FJ.Selection of bacteriophage lambda integrases with altered recombination specificity by *in vitro* compartmentalization.Nucleic Acids Res.2010Mar;38(4):e25.Epub2009Dec4;

[0025] Zheng Y,Roberts RJ.Selection of restriction endonucleases using artificial cells.Nucleic Acids Res.2007;35(11):e83.Epub2007;

[0026] Mastrobattista E,Taly V,Chanudet E,Treacy P,Kelly BT,Griffiths AD.High-throughput screening of enzyme libraries:*in vitro* evolution of a beta-galactosidase by fluorescence-activated sorting of double emulsions.Chem Biol.2005Dec;12(12):1291-300;

[0027] Levy M,Griswold KE,Ellington AD.Direct selection of trans-acting ligase ribozymes by *in vitro* compartmentalization.RNA.2005 Oct;11(10):1555-62.Epub2005 Aug30;

[0028] Sepp A,Choo Y.Cell-free selection of zinc finger DNA-binding proteins

using in vitro compartmentalization. J Mol Biol. 2005 Nov 25; 354(2): 212-9. Epub 2005 Oct 3;

[0029] Bernath K, Magdassi S, Tawfik DS. Directed evolution of protein inhibitors of DNA-nucleases by in vitro compartmentalization (IVC) and nano-droplet delivery. J Mol Biol. 2005 Feb 4; 345(5): 1015-26. Epub 2004 Dec 7.

[0030] 现有技术进一步的 IVC 实例可发现于:

[0031] Bertschinger 等人, (2004) Protein Engineering, Design & Selection vol. 20 no. 2 pp. 699-707;

[0032] Chen Yu 等人, (November 2008) Nucleic Acid Research, Vol. 36, Nr. 19, Pages: Article No. E128;

[0033] Hansen 等人. J. Am. Chem. Soc., 2009, 131(3), pp 1322-1327.

发明内容

[0034] 本发明要解决的问题可以视为是提供改进的基于体外展示的方法来制备富集文库, 其包含至少一种结合到感兴趣的靶标 (例如药学上相关的受体) 的结合实体 (例如化合物)。

[0035] 在许多情况下, 治疗学发展中最显著的是, 结合实体 (药物) 的两个参数是特别重要的, 即效力 (亲和性) 和解离速率 (药物: 靶标复合物的解离半衰期)。本发明为在这两个重要的结合参数上富集的体外展示方法提供改进的解决办法。

[0036] 在其他情况下, 对于结合特性的结合速率属性是需要的。本发明为在对于结合特性的结合速率属性上富集的体外展示方法提供改进的解决办法。

[0037] 可以看出, 解决办法基于:

[0038] (i): 制备附加到核酸分子 (基因型) 的结合实体 (即表型) 的体外展示文库——该步骤可按照制备这样的体外展示文库的已知现有技术制备;

[0039] (ii): 制备包含附加到核酸分子 (基因型) 的靶标 (即表型) 的结构——该步骤可按照制备这样的结构的已知现有技术制备; 和

[0040] 其中, 本发明所述的方法可以视为特征在于:

[0041] (iii): 结合步骤在溶液 (例如在含水条件下) 中进行;

[0042] (iv): 使用合适的体外区室化系统 (例如油包水乳液系统) 产生比靶标分子更多的单独的区室;

[0043] (v): 融合共区室化的靶标和结合实体基因型;

[0044] (vi): 去区室化; 获得融合的基因型的富集体 (体外展示文库中的阳性结合物比未结合物具备更高的融合倾向); 和

[0045] (vii): 可选地, 例如纯化和/或优选扩增融合的基因型。

[0046] 基于本发明的详细描述和公知常识——本领域技术人员可以多种不同的方式执行步骤 (iii) 至步骤 (vi)。

[0047] 步骤 (vii) 是可选步骤——如本发明所述人们一旦获得步骤 (vi) 的富集文库即可按照现有技术以不同方式使用该文库——例如富集文库可被看做富集体外展示文库, 例如可用于第二轮的选择/富集或人们可以直接从步骤 (vi) 的富集文库鉴定感兴趣的特定结合

实体的结构。

[0048] 正如上面所讨论的——本发明相关所谓的IVC现有技术——可描述为：

[0049] 组a)——其中表型活性在区室化步骤之后查询；或

[0050] 组b)——其中表型活性在区室化步骤之中查询。

[0051] 显而易见的，从上述和如本发明进一步讨论的——本发明所述的方法从概念上与这样所谓的IVC现有技术不同——例如基于第一方面的步骤(iii)被查询的表型活性，其在第一方面的区室化步骤(iv)之前。

[0052] 一种简单的方式来解释本发明所述新方法的原理是，展示文库的未结合物随机分布于区室并因此以随机的方式与靶标共区室化，其频率基于区室的数量和靶标分子的数量比例。相反，基于结合活性，结合物会与靶标分子共区室化——独立于区室的数量和靶标分子的数量比例。因此，当区室的数量和靶标分子的数量比例大于1时结合物的富集得以实现——比例越高富集得越高。

[0053] 本发明的附图1和2提供本发明所述新方法的示例性实施例。

[0054] 本发明的实施例1和2提供本发明相关的例如结合实体和感兴趣的靶标的数量的实例——可以从实施例1和2的结论看出——人们可以通过本发明所述的方法从文库中获得例如1000倍富集的结合物。

[0055] 因此，本发明的第一方面涉及一种方法，一种制备富集文库的方法，所述富集文库包含允许鉴定至少一种结合实体的特定核酸序列信息，所述结合实体结合至少一种靶标，其中所述特定结合实体已存在于体外展示文库并且其中所述方法包括下述步骤：

[0056] (i)：制备至少100种不同结合实体(B_n ($n=100$ 或更多))的体外展示文库，其中每个结合实体附加到核酸分子，所述核酸分子包括允许鉴定结合实体的特定核酸序列信息——即人们一旦知晓所述核酸分子的所述特定核酸序列信息即可直接知晓附加到所述核酸分子的所述特定结合实体的结构——附加到所述核酸分子(基因型)的所述结合实体(即表型)的所述结构本发明称为B-结构。

[0057] (ii)：制备具有附加到核酸分子的至少一种靶标 T_n ($n=1$ 或更多)的核酸分子，所述核酸分子包括允许鉴定所述特定靶标的特定核酸序列信息，其中所述靶标能够结合存在于步骤(i)的文库的至少一种结合实体——附加到所述核酸分子(基因型)的靶标(即表型)的结构本文中称为T-结构；

[0058] 并且其中所述方法特征在于：

[0059] (iii)：在结合条件下，将包括 X (X 是大于 10^4 的数)个步骤(i)的文库的B-结构的溶液与包括 Y (Y 是大于 10^2 的数)个步骤(ii)的T-结构的溶液混合，所述条件是含有能够结合靶标分子的结合实体的B-结构与含有不能够结合相同靶标分子的结合实体的B-结构相比更有效地结合相应的T-结构，并且其中人们得到至少一种结合实体与至少一种靶标的结合，从而生成包含B-结构结合到T-结构的复合物(本文中称为 $B_{\text{结合至}}T$ -结构)；

[0060] (iv)：应用体外区室化系统——在结合条件下，所述条件是含有能够结合靶标分子的结合实体的B-结构与包括不能够结合相同靶标分子的结合实体的B-结构相比更有效地结合相应的T-结构——其中，在B-结构、T-结构和 $B_{\text{结合至}}T$ -结构随机进入单独的区室的条件下，所述区室化系统包括的单独的区室为步骤(iii)存在的 Y 个T-结构的至少2倍；和

[0061] (v)：融合同时存在于相同单独的区室里的B-结构和T-结构的核酸分子——即融

合所述B-结构的核酸分子至所述T-结构的核酸分子——这个结构本文中称为BT_{融合}-结构，所述BT_{融合}-结构包括允许鉴定步骤(i)所述结合实体的特定核酸序列信息和允许鉴定步骤(ii)所述特定靶标的特定核酸序列信息；和

[0062] (vi):组合步骤(v)的所述单独的区室的内容物，以得到BT_{融合}-结构文库，该步骤在以下条件下进行：其中没有B-结构和T-结构的核酸分子的融合——即在步骤(v)中没有生成任何新的BT_{融合}-结构，其中所述文库是与源自靶标与结合实体的未结合对的BT_{融合}-结构相比，为源自靶标与结合实体的结合对的BT_{融合}-结构种类的富集文库。

[0063] 本发明所述的第一方面的所述方法可称为通过共区室化的富集(ECC)。

[0064] 本发明所述的ECC方法的优点在于重要结合特征的富集可为分离而优化——因为ECC是同质性测试(homogenous assay)——靶标没有固定于固相载体。现有技术方法是异质性的——依赖于靶标固定于固相载体(例如珠、柱、小室、塑料、滤器等)。与同质性测试相比，异质性测试是极其难于控制的，因为例如亲和力效应、涂层密度和固相载体本身对测试的干扰。

[0065] 正如上面所讨论的，在本发明相关体外展示技术的现有技术(例如上述提到的现有技术)里——在体外展示文库里选择存在的合适的结合实体在现有技术中通常在所述展示结合事件之前或之后通过固定靶标(例如受体)于固相载体(例如玻璃盘、柱、珠、硝酸纤维素滤器、小室等)来进行。未结合物和低亲和力结合物通常被洗脱掉，而富集的结合物群体从固相载体上回收。

[0066] 因此，本领域技术人员所理解的，当本发明上述相关现有技术方法“依赖于靶标固定于固相载体”可被本领域技术人员以下述方式所理解，选择合适的结合实体依赖于这种固定靶标于固相载体作为获得选择合适的结合实体的要素。

[0067] 对本领域技术人员显而易见的是，第一方面所述的方法不是依赖于靶标固定于固相载体的这样的现有技术方法，因为所述结合实体的选择是基于第一方面的步骤(iv)所要求的所述B_{结合至}T-结构分离进入所述单独的区室的。

[0068] 基于上述讨论和作为本领域技术人员所理解的——在第一方面的所述方法中人们可以从理论上想象一种情形，其中所述靶标步骤(ii)的T-结构是例如包含珠的。理论上可以是T-结构，其中靶标结合至珠并且包含允许鉴定步骤(ii)的所述T-结构的特定靶标的所述特定核酸序列信息的所述特定核酸分子然后也结合至珠。

[0069] 对本领域技术人员显而易见的是——这种包含珠的特别的T-结构将不会改变第一方面的所述方法不是一种方法的事实，其中选择合适结合实体这种靶标固定于固相载体。

[0070] 基于上述讨论和在上下文中为本领域技术人员所理解的，所述第一方面的所述方法可被看做一种方法，其意味着所述B_{结合至}T-结构(即所述靶标结合实体复合物)在所述第一方面的步骤(iv)的所述单独的/分离的区室里保持悬浮于溶液中。

[0071] ECC允许在分离状态中优化结合实体结合靶标的主要结合特征。例如效力(亲和性)、关联速率(结合速率)或结合实体和靶标的解离半衰期(解离速率)。

[0072] 基于亲和力的选择通过使用平衡条件实现并由所述混合步骤(结合步骤)中的所述靶标浓度控制，即所述展示文库中K_d比所述靶标浓度小10倍的的结合实体的90%的分子是靶标结合的，而K_d与所述靶标浓度相同的结合实体的50%的分子是靶标结合的，以及K_d比

所述靶标浓度小10倍的结合实体的10%的分子是靶标结合的。因此,亲和富集很容易通过所述混合步骤的所述靶标浓度进行控制。

[0073] 本发明一个单独的方面涉及所述第一方面的步骤(vi)的富集文库并且其可通过所述第一方面的所述方法或本发明所述第一方面的相关实施方案获得。

[0074] 本发明的实施方案描述如下,仅通过实施例的方式。

附图说明

[0075] 图1:本发明所述方法的原理的原理的示例性实施例。

[0076] 图2:本发明所述方法的原理的原理的示例性实施例——它是一个示例性实施例其中乳状液PCR用于所述第一方面的所述融合步骤(v)。

[0077] 图3:此处显示的是描述于EP1809743B1(Vipergen)中的体外展示技术的实施例——可从图3中看出——这个实施例的所述选择步骤是通过固定靶标(例如受体)于固体表面(例如珠或玻璃盘)实施的。

[0078] 图4-7:这些图是本发明实施例中进一步讨论的。

[0079] 发明详述

[0080] 体外展示文库——第一方面的步骤(i)

[0081] 术语“体外展示文库”应当按照现有技术理解——即作为包括大量不同结合实体的文库,其中每个结合实体附加到核酸分子并且所述核酸分子包括允许鉴定所述结合实体的特定核酸序列信息——即人们一旦知晓所述核酸分子的所述特定核酸序列信息即可直接知晓附加到所述核酸分子的所述特定结合实体的结构——附加到所述核酸分子(基因型)的所述结合实体(即表型)的所述结构本发明称为B-结构。

[0082] 如本发明所讨论的——现有技术描述了大量制备这种体外展示文库的不同方法——即步骤(i)的体外展示文库。

[0083] 换句话说,今天正确制备附加到所述核酸分子(基因型)的所述结合实体(即表型)的结构对于本领域技术人员来说是常规工作——即所述结构本发明称为“B-结构”。

[0084] 正如本领域已知的——结合实体(即表型)可通过例如共价结合或例如高亲和性非共价结合被附加到所述核酸分子(基因型)。

[0085] 本发明优选的是所述结合实体(即表型)通过共价结合被附加到所述核酸分子(基因型)。

[0086] 步骤(i)的体外展示文库包括大量不同的B-结构——即上述的制备步骤(i)的体外展示文库对于本领域技术人员来说是常规工作。

[0087] 本发明中合适的实例包括例如EP1809743B1(Vipergen),EP1402024B1(Nuevolution),EP1423400B1(David Liu),Nature Chem.Biol.(2009),5:647-654(Clark),W000/23458(Harbury),Nature Methods(2006),3(7),561-570,2006(Miller),Nat.Biotechnol.2004;22,568-574(Melkko),Nature.(1990);346(6287),818-822(Ellington)或Proc Natl Acad Sci USA(1997).94(23):12297-302(Roberts)。

[0088] 换句话说,第一方面的步骤(i)的所述体外展示文库可通过现有技术所述的大量方式制备得到。

[0089] 不限于理论——本发明合适的体外展示文库技术的实例包括DNA编码化学文库技

术、适体 (Aptamer) 技术、RNA/DNA 展示技术例如 CIS 展示、核糖体展示、mRNA 展示或珠展示系统 (使用核酸用于编码)。

[0090] 如现有技术所述 (参见例如 EP1809743B1 (Vipergen))——所述 B-结构的所述核酸分子可以是例如 PNA、LNA、RNA、DNA 或它们的组合。优选地,所述 B-结构的所述核酸分子是 DNA。

[0091] 在本发明的一个优选的实施方案中,所述 B-结构中附加到所述结合实体 (表型) 的所述核酸分子 (基因型) 可为双链核酸分子。

[0092] 在本发明的一个优选的实施方案中,所述 B-结构中附加到所述结合实体 (表型) 的所述核酸分子 (基因型) 可为至少 0% 双链 (即单链), 可为至少 10% 双链、至少 20% 双链、至少 30% 双链、至少 40% 双链、至少 50% 双链、至少 60% 双链、至少 70% 双链、至少 80% 双链、至少 90% 双链或 100% 双链。

[0093] 在本发明的一个优选的实施方案中,所述 B-结构中附加到所述结合实体 (表型) 的所述核酸分子 (基因型) 可包含一个 PCR 引发位点或其一部分。

[0094] 在本发明的一个优选的实施方案中,所述 B-结构中附加到所述结合实体 (表型) 的所述核酸分子 (基因型) 可包含两个 PCR 引发位点或其一部分。

[0095] 在本发明的一个优选的实施方案中,所述 B-结构中附加到所述结合实体 (表型) 的所述核酸分子 (基因型) 可包含至少三个 PCR 引发位点或其一部分。

[0096] 在本发明的一些实施方案中,PCR 引发位点的部分包括至少 5 个核酸、至少 6 个核苷酸、至少 7 个核苷酸、至少 8 个核苷酸、至少 9 个核苷酸、至少 10 个核苷酸、至少 11 个核苷酸、至少 12 个核苷酸、至少 13 个核苷酸、至少 14 个核苷酸、至少 15 个核苷酸、至少 16 个核苷酸、至少 17 个核苷酸、至少 18 个核苷酸、至少 19 个核苷酸或至少 20 个核苷酸。

[0097] 在本发明的一些实施方案中,所述 B-结构中附加到所述结合实体 (表型) 的所述核酸分子 (基因型) 可包含与所述 B 结构的所述基因型的单链悬反向互补的单链悬。

[0098] 在本发明的一些实施方案中,所述 B-结构中附加到所述结合实体 (表型) 的所述核酸分子 (基因型) 可包含与所述 B 结构的所述基因型的单链悬反向互补的单链悬。所述单链悬可优选为 1 个核苷酸、2 个核苷酸、3 个核苷酸、4 个核苷酸、5 个核苷酸、6 个核苷酸、7 个核苷酸、8 个核苷酸、9 个核苷酸或 10 个核苷酸长。

[0099] 结合实体

[0100] 所述结合实体可为感兴趣的任何合适的结合实体。

[0101] 第一方面步骤 (i) 的记载“至少 100 种不同的结合实体 (B_n ($n=100$ 或更多))”。

[0102] 在实践中,在步骤 (i) 的文库中可存在更多倍多种不同结合实体——例如至少 10^4 、至少 10^5 或至少 10^6 种不同结合实体——即 $n=$ 至少 10^4 、 $n=$ 至少 10^5 或 $n=$ 至少 10^6 。

[0103] 因此,理论上,其中所述文库包括确切的 10^4 种不同结合实体——此处可将这个表达为 B_n ($n=10^4$) 或 B_{10^4} 。

[0104] 不限于理论地,可能很难制备有超过 10^{20} 种不同结合实体的文库。

[0105] 合适的实例可以是其中所述结合实体是选自下列组成的组中的至少一种结合实体: 蛋白质、多肽、核酸和化合物 (优选平均分子量 MW 低于 10000 道尔顿的小化合物,更优选平均分子量 MW 低于 5000 道尔顿,更加优选平均分子量 MW 低于 1000 道尔顿)。

[0106] 本发明相关结合实体 (例如化合物) 的合适的实例可被发现于现有技术——参见

例如EP1809743B1 (Vipergen), EP1402024B1 (Nuevolution), EP1423400B1 (David Liu), Nature Chem. Biol. (2009), 5:647-654 (Clark), W000/23458 (Harbury), Nature Methods (2006), 3(7), 561-570, 2006 (Miller), Nat. Biotechnol. 2004; 22, 568-574 (Melkko), Nature. (1990); 346(6287), 818-822 (Ellington) 或 Proc Natl Acad Sci USA (1997). 94(23):12297-302 (Roberts)。

[0107] 总之, 本领域技术人员知晓在上下文中可感兴趣的大量不同可能的结合实体。

[0108] 第一方面的步骤(ii)

[0109] 如本发明所述——靶标应当能够结合步骤(i)的所述文库中存在的至少一种结合实体——否则它不是一个能用于鉴定结合至少一种靶标的特定结合实体的合适的靶标。

[0110] 基于上述讨论——今天正确附加靶标(即表型)到核酸分子(基因型)对于本领域技术人员来说是常规工作并从而制备附加到所述核酸分子(基因型)的所述靶标(即表型)的结构——即在本发明中称为“T-结构”。

[0111] 换句话说, 人们可以基于例如上面所讨论的制备步骤(i)的所述体外展示文库的相同的现有技术制备本发明相关“T-结构”。

[0112] 正如本领域已知的一一靶标(即表型)可通过例如共价结合或例如高亲和性非共价结合被附加到所述核酸分子(基因型)。

[0113] 本发明中可优选所述靶标(即表型)通过共价结合附加到所述核酸分子(基因型)。

[0114] 第一方面步骤(i)记载“至少一种靶标 T_n ($n=1$ 或更多)”。

[0115] 如本发明所述——本发明所述方法的优点是人们可以有效和快速的方式同时筛选可能结合例如2种或更多靶标的结合实体。

[0116] 例如——所述靶标可以是2种不同受体分子, 然后本发明所述方法可同时鉴定结合受体之一的一种结合实体和结合另一种受体的另一种结合实体。

[0117] 在上面的实施例(2种不同例如受体靶标)里我们可以有一种情况, 其中所述靶标 T_n ($n=2$)或可选地表述为 T_2 。

[0118] 基于上述讨论——可能相关的是在步骤(ii)中有至少2种不同靶标(即 T_n ($n=2$ 或更多)、或在步骤(ii)中有至少3种不同靶标(即 T_n ($n=3$ 或更多)、或在步骤(ii)中有至少10种不同靶标(即 T_n ($n=10$ 或更多)、或在步骤(ii)中有至少100种不同靶标(即 T_n ($n=100$ 或更多))。

[0119] 不限于理论的, 很难在步骤(ii)中有多于100,000种不同靶标——即超过100,000种不同T-结构。

[0120] 如现有技术(参见例如EP1809743B1 (Vipergen))所述——所述T-结构的所述核酸分子可以是例如PNA、LNA、RNA、DNA或它们的组合。优选地, 所述T-结构的所述核酸分子是DNA。

[0121] 在本发明的一个优选的实施方案中, 所述T-结构中附加到所述靶标(表型)的所述核酸分子(基因型)可为至少5个核苷酸长、至少10个核苷酸长、至少20个核苷酸长、至少30个核苷酸长、至少40个核苷酸长、至少50个核苷酸长、至少60个核苷酸长、至少70个核苷酸长、至少80个核苷酸长、至少90个核苷酸长、至少100个核苷酸长、至少200个核苷酸长、至少300个核苷酸长、至少400个核苷酸长或至少500个核苷酸长。

[0122] 在本发明的一个优选的实施方案中, 所述T-结构中附加到所述靶标(表型)的所述

核酸分子(基因型)可为双链核酸分子。

[0123] 在本发明的一个优选的实施方案中,所述T-结构中附加到所述靶标(表型)的所述核酸分子(基因型)可为至少5个碱基对长、至少10个碱基对长、至少20个碱基对长、至少30个碱基对长、至少40个碱基对长、至少50个碱基对长、至少60个碱基对长、至少70个碱基对长、至少80个碱基对长、至少90个碱基对长、至少100个碱基对长、至少200个碱基对长、至少300个碱基对长、至少400个碱基对长或至少500个碱基对长。

[0124] 在本发明的一个优选的实施方案中,所述T-结构中附加到所述靶标(表型)的所述核酸分子(基因型)可为至少0%双链(即单链),可为至少10%双链、至少20%双链、至少30%双链、至少40%双链、至少50%双链、至少60%双链、至少70%双链、至少80%双链、至少90%双链或100%双链。

[0125] 在本发明的一个优选的实施方案中,所述T-结构中附加到所述靶标(表型)的所述核酸分子(基因型)可包含一个PCR引发位点或其一部分。

[0126] 在本发明的一个优选的实施方案中,所述T-结构中附加到所述靶标(表型)的所述核酸分子(基因型)可包含两个PCR引发位点或其一部分。

[0127] 在本发明的一个优选的实施方案中,所述T-结构中附加到所述靶标(表型)的所述核酸分子(基因型)可包含至少三个PCR引发位点或其一部分。

[0128] 在本发明的一些实施方案中,PCR引发位点包括至少5个核苷酸、至少6个核苷酸、至少7个核苷酸、至少8个核苷酸、至少9个核苷酸、至少10个核苷酸、至少11个核苷酸、至少12个核苷酸、至少13个核苷酸、至少14个核苷酸、至少15个核苷酸、至少16个核苷酸、至少17个核苷酸、至少18个核苷酸、至少19个核苷酸或至少20个核苷酸。

[0129] 在本发明的一些实施方案中,所述T-结构中附加到所述靶标(表型)的所述核酸分子(基因型)可包含与所述T结构的所述基因型的单链悬反向互补的单链悬。

[0130] 在本发明的一些实施方案中,所述T-结构中附加到所述靶标(表型)的所述核酸分子(基因型)可包含与所述T结构的所述基因型的单链悬反向互补的单链悬。所述单链悬可优选为1个核苷酸、2个核苷酸、3个核苷酸、4个核苷酸、5个核苷酸、6个核苷酸、7个核苷酸、8个核苷酸、9个核苷酸或10个核苷酸长。

[0131] 在本发明的一些实施方案中,所述T-结构中附加到所述靶标(表型)的所述核酸分子(基因型)可包含对每个靶标分子特异的独特序列(独特分子标识——UMI)。

[0132] 在本发明的一些实施方案中,所述T-结构中附加到所述靶标(表型)的所述核酸分子(基因型)可包含对每种靶标分子特异的独特序列(独特分子标识——UMI),其由至少16个N(N=A、C、G或T)、至少17个N、至少18个N、至少19个N、至少20个N、至少21个N、至少22个N、至少23个N、至少24个N、至少25个N、至少26个N、至少27个N、至少28个N、至少29个N或至少30个N组成。

[0133] 在本发明的一些实施方案中,所述T-结构中附加到所述靶标(表型)的所述核酸分子(基因型)可包含对每种靶标分子特异的独特序列(独特分子标识——UMI),其由连续的序列组成。

[0134] 在本发明的一些实施方案中,所述T-结构中附加到所述靶标(表型)的所述核酸分子(基因型)可包含对每种靶标分子特异的独特序列(独特分子标识——UMI),其由不连续的序列组成。

[0135] 在本发明的一些实施方案中,所述T-结构中附加到所述靶标(表型)的所述核酸分子(基因型)可包含不同于第二靶标的第二基因型序列的第一序列(允许多重PCR(multiplexing))。

[0136] 在本发明的一些实施方案中,所述T-结构中附加到所述靶标(表型)的所述核酸分子(基因型)可包含不同于第二靶标的第二基因型序列的第一序列(允许多重PCR),其中所述第一和第二靶标基因型包含不同PCR引发位点。

[0137] 靶标

[0138] 所述靶标可以是任何感兴趣的合适的靶标。

[0139] 在本发明的一个优选的实施方案中——促进鉴定所需性质的结合实体的富集的特定富集方法包括不限于:富集附加靶标分子的核酸。这种方法中所述靶标分子是例如DNA、RNA、蛋白、碳水化合物、有机或无机分子。

[0140] 正如现有技术已知的——合适的靶标可以存在于例如人体的例如受体分子并且人们将会对鉴定能够结合所述受体的结合实体(例如化合物)感兴趣。

[0141] 按照现有技术——合适的实例可为其中所述靶标是DNA、RNA、蛋白、碳水化合物、有机或无机分子或其片段。

[0142] 按照现有技术——合适的实施例可为其中所述靶标是自身抗原、细菌蛋白、血蛋白、细胞粘附蛋白、细胞因子、细胞骨架蛋白、DNA-结合蛋白、发育蛋白、工程蛋白、酶、细胞外基质蛋白、GTP-结合蛋白调节剂、糖蛋白、生长因子、热休克蛋白、脂蛋白、膜蛋白、金属蛋白、马达蛋白、磷蛋白、朊病毒、蛋白质复合物、蛋白结构域、RNA-结合蛋白、受体、重组蛋白质、种子贮藏蛋白、结构蛋白、转录共调节蛋白、转运蛋白、病毒蛋白或其片段。

[0143] 总之,本领域技术人员知晓在上下文中可感兴趣的大量不同可能的靶标。

[0144] 第一方面的步骤(iii):

[0145] 在本发明图1的所述示例性实施例中——该步骤(iii)对应于步骤“1结合”。

[0146] 正如上面所讨论的——步骤(iii)记载:

[0147] “混合包括X(X是大于 10^4 的数)个步骤(i)的文库的B-结构的溶液”

[0148] 术语相关于B-结构的数量的“X”应当理解为步骤(i)的文库的B-结构的总数量。

[0149] 例如——如果所述文库包括100种不同结合实体($B_n(n=100)$)并且每种所述100种不同B-结构有100个拷贝,那么数量“X”等于 $100 \times 100 = 10^4$ 。

[0150] 在实践中,数量X可以高很多倍——例如,如果所述文库包括 10^6 种不同结合实体($B_n(n=10^6)$)并且每种所述 10^6 种不同B-结构有 10^4 个拷贝,那么数量“X”等于 $10^6 \times 10^4 = 10^{10}$ 。

[0151] 正如上面所讨论的——步骤(iii)记载:

[0152] “包括Y(Y是大于 10^2 的数)个步骤(ii)的T-结构的溶液”

[0153] 术语相关于T-结构的数量的“Y”应当理解为步骤(ii)的文库的T-结构的总数量。

[0154] 例如——如果步骤(ii)仅有1种靶标($T_n(n=1)$)并且每种所述T-结构有 10^2 个拷贝,那么数量“Y”等于 $1 \times 10^2 = 10^2$ 。

[0155] 正如上面所讨论的——人们可以有例如2种不同靶标(例如两种不同受体分子)——在这种情况下步骤(ii)可以有二种靶标($T_n(n=2)$)并且如果每种所述两种不同T-结构有 10^2 个拷贝,那么数量“Y”等于 $2 \times 10^2 = 200$ 。

[0156] 在实践中,人们可以有相关T-结构特别多的拷贝——这种情况的原因是人们可能

想要相关T-结构的大量拷贝以提高T-结构上所述靶标结合B-结构的所述结合实体的可能性。

[0157] 因此,在优选的实施方案中,有至少 10^0 、至少 10^1 、至少 10^2 、至少 10^3 、至少 10^4 、至少 10^5 、至少 10^6 、至少 10^7 、至少 10^8 、至少 10^9 、至少 10^{10} 、至少 10^{11} 、至少 10^{12} 、至少 10^{13} 、至少 10^{14} 、至少 10^{15} 或至少 10^{16} 个感兴趣的T-结构拷贝。

[0158] 本发明所述的ECC方法的优点在于重要结合特征的富集可为分离而优化——因为ECC是同质性测试(homogenous assay)——靶标没有固定于固相载体。现有技术方法是异质性的——依赖于靶标固定于固相载体(例如珠、柱、小室、塑料、滤器等)。与同质性测试相比,异质性测试是极其难于控制的,因为例如亲和力效应、涂层密度和固相载体本身对测试的干扰。

[0159] ECC允许在分离状态中优化结合实体结合靶标的主要结合特征。例如效力(亲和性)、关联速率(结合速率)或结合实体和靶标的解离半衰期(解离速率)。

[0160] 基于亲和力的选择通过使用平衡条件实现并由所述混合步骤(结合步骤)中的所述靶标浓度控制,即所述展示文库中 K_d 比所述靶标浓度小10倍的结合实体的90%的分子是靶标结合的,而与所述靶标浓度相同 K_d 的结合实体的50%的分子是靶标结合的,以及 K_d 比所述靶标浓度小10倍的结合实体的10%的分子是靶标结合的。因此,亲和富集很容易通过所述混合步骤的所述靶标浓度进行控制。

[0161] 在本发明的一个优选的实施方案中——在所述“混合步骤(iii)”中T-结构的浓度为至少 10^{-15} M、至少 10^{-14} M、至少 10^{-13} M、至少 10^{-12} M、至少 10^{-11} M、至少 10^{-10} M、至少 10^{-9} M、至少 10^{-8} M、至少 10^{-7} M、至少 10^{-6} M、至少 10^{-5} M、至少 10^{-4} M或至少 10^{-3} M。

[0162] 另外,基于关联速率的选择通过控制混合步骤(iii)允许的时间来实现——因此,所述“混合步骤”可以比达到结合平衡条件所需的时间更短的时间周期来进行。

[0163] 步骤(iii)记载:

[0164] “在结合条件下,所述条件是含有能够结合靶标分子的结合实体的B-结构与含有不能够结合相同靶标分子的结合实体的B-结构相比更有效地结合相应的T-结构,并且其中人们得到至少一种结合实体与至少一个靶标的结合,从而生成包含B-结构结合到T-结构的复合物(本文中称为B_{结合至}T-结构)”

[0165] 术语“更有效地结合”应当按照普通实践理解,例如更高的亲和力、更快的结合速率或更低的解离速率。

[0166] 正如本领域技术人员已知的——在上下文中在条件下执行步骤(iii)对本领域技术人员来说是常规工作,其中人们得到这个“更有效地结合”的效果。

[0167] 例如——人们可以通过例如使用在步骤(iii)的所述结合条件下B和T-结构基因型基本上不结合(例如通过碱基对杂交)很容易地获得这种“更有效地结合”效果——对本领域技术人员显而易见的是这可例如通过使用例如没有或有非常小的单链碱基重叠作为B和T-结构的基因型的双链DNA来获得。

[0168] 优化步骤(iii)的所述结合条件以获得所需的步骤(iii)的“更有效地结合”对于本领域技术人员来说是常规工作。

[0169] 正如本领域技术人员已知的——本发明相关优化参数可以是例如离子强度、温度等。

[0170] 因此,在任何本发明相关实际情况中——无论本领域技术人员(在例如所述结合条件的适当的常规调整之后)在步骤(iii)的结合条件下工作与否,他将不会有任何合理的疑问。

[0171] 在优选的实施方案中,步骤(iii)在结合条件下进行,其中包含能够结合靶标分子的结合实体的B-结构,比包含不能够结合相同靶标的包含结合实体的B-结构可以10倍(更优选100倍、更加优选1000倍)更有效结合相应T-结构。

[0172] 步骤(iii-b)——稀释步骤——优选实施方案:

[0173] 在本发明图1的所述示例性实施例中——该可选步骤(iii-b)对应于所述步骤“2 稀释”。

[0174] 所述混合步骤(iii)可优选随后的稀释步骤——本发明术语称为步骤(iii-b)并在所述第一方面的步骤(iv)之前执行。

[0175] 因此,在所述第一方面的一个优选实施方案中,包括额外的在所述第一方面的步骤(iv)之前执行的步骤(iii-b),

[0176] 包括:

[0177] (iii-b):在结合条件下稀释步骤(iii)的所述溶液至少2倍,所述条件是包含能够结合靶标分子的结合实体的B-结构与包含不能够结合相同靶标分子的结合实体的B-结构相比更有效地结合相应的T-结构。

[0178] 引入的所述稀释溶液和所述稀释步骤(iii-b)的所述条件(如温度)可与所述混合步骤(iii)的所述结合条件不同——但上述效果应当在稀释步骤(iii-b)中得以保持。

[0179] 步骤(iii-b)中可优选步骤(iii)的所述溶液被稀释至少 10^2 倍、或步骤(iii)的所述溶液被稀释至少 10^3 倍、或步骤(iii)的所述溶液被稀释至少 10^4 倍、或步骤(iii)的所述溶液被稀释至少 10^5 倍、或步骤(iii)的所述溶液被稀释至少 10^6 倍、或步骤(iii)的所述溶液被稀释至少 10^7 倍、或步骤(iii)的所述溶液被稀释至少 10^8 倍或步骤(iii)的所述溶液被稀释至少 10^9 倍。

[0180] 该稀释步骤的优点在于富集可基于所述BT结构的解离半衰期来执行并很容易通过稀释度和孵育时间来控制。当步骤(iii)的所述混合溶液被稀释时,结合实体和靶标的结合(biding)是不太可能发生的事情即“未结合事件”——所述解离速率(所述解离半衰期)独立于稀释。所以,在极稀溶液(T-结构浓度 $\ll K_d$)中基本上只会发生解离。因此,所述BT-结构的解离半衰期富集很容易通过稀释度和孵育时间控制。

[0181] 所述解离半衰期与亲和力一起对结合实体的可用性非常重要。其中最引人注目的是,对于有效新药的开发来说,高亲和力和长解离半衰期是药理作用的关键参数(Nature Reviews Drug Discovery (2006) 5, 730-739, (Copeland))。因此,本新发明的所述方法以前所未有有效的和可控的方式在这两个参数上富集。此外,这两个参数可以彼此独立地控制。

[0182] 第一方面的步骤(iv):

[0183] 查看这个步骤的简单方式是步骤(iii)的结合实体与靶标的所述结合“转变”成B-结构和T-结构的共区室化。

[0184] 该步骤(iv)的所述条件应当是给出与步骤(iii)的所述效果一致的效果的“结合条件下”——参见上文。

[0185] 在本发明图1的所述示例性实施例中——该可选步骤(iii-b)对应于所述步骤“3

乳化w/o”。

[0186] 第一方面的步骤(iv)进一步记载：

[0187] “其中区室化系统包括的单独的区室为步骤(iii)存在的Y个T-结构的至少2倍”

[0188] 本发明中这可看做本发明所述方法的一个重要步骤——即“单独的区室为步骤(iii)存在的Y个T-结构的至少2倍”是重要的。

[0189] 本发明所述图1中——所述体外区室化系统可以是例如油包水乳液系统——如本发明下面进一步讨论的，合适的油包水乳液系统是本领域众所周知的。

[0190] 在图1的理论假设的示例性实施例中步骤(ii)仅有1种靶标 [$T_n(n=1)$] 并且每种所述T-结构有3个拷贝——即数量“Y”是3。

[0191] 因此，在图1的理论假设的示例性实施例中所述体外区室化系统里应当有至少 $(2 \times 3) = 6$ 个单独的区室(例如油滴)——请注意本发明图1中有少于30个单独的区室(即图1仅是本发明所述方法的一些因素的示例)。

[0192] 正如上面所讨论的——在实践中可有例如至少 10^4 个感兴趣的T-结构的拷贝——即在这种情况下Y可为 10^4 并且在这种情况下所述体外区室化系统里应当有至少 $(2 \times 10^4) = 2 \times 10^4$ 个单独的区室(例如油滴)。

[0193] 这个“单独的区室为步骤(iii)存在的Y个T-结构的至少2倍”的优点在于所述展示文库中未结合物随机分布于所述区室并因此以随机的方式与所述靶标共区室化，其频率依赖于区室的数量和靶标分子的数量的比例(在这种情况下为1比10，而由于其结合活性，结合物会独立于区室的数量和靶标分子的数量的比例(在这个理想情况下1比1)与靶标分子共区室化。因此，在这种情况下当与未结合物相比结合物富集2倍。

[0194] 基于上述讨论，人们可以说如果在所述体外区室化系统中相应有更多单独的区室人们可以获得更好的富集——因此，在一个优选的实施方案中，“单独的区室为步骤(iii)存在的Y个T-结构的至少10倍”、更优选“单独的区室为步骤(iii)存在的Y个T-结构的至少100倍”、更优选“单独的区室为步骤(iii)存在的Y个T-结构的至少10000倍”、更优选“单独的区室为步骤(iii)存在的Y个T-结构的至少100000倍”、更优选“单独的区室为步骤(iii)存在的Y个T-结构的至少1000000倍”。

[0195] 在本发明的一个优选的实施方案中，所述区室数量大于步骤(iii)的T-结构的所述Y数量的2、5、10、50、100、1000、5000、10000、50000、100000、500000、1000000、5000000或10000000倍。

[0196] 第一方面步骤(iv)进一步记载：

[0197] “在其中B-结构、T-结构和BT-结构随机进入单独的区室的条件下”

[0198] 这应当为本领域技术人员理解将在上下文中理解的——其涉及，为了获得本发明的有利富集，人们所需的条件，其中所述B-结构、T-结构和BT-结构随机进入单独的区室。

[0199] 换句话说——在任何给定的区室中的被区室化的任何B-结构、T-结构和BT-结构的倾向依赖于所述区室的体积和总体积。

[0200] 换句话说——如果几乎所有的B-结构、T-结构和BT-结构仅进入一个特定的单独的区室人们将显然不会得到上述讨论的有利富集。

[0201] 如下所讨论的——如果人们例如使用合适的油包水乳液系统作为所述体外区室化系统，人们能够很容易地确定条件，其中所述B-结构、T-结构和BT-结构随机进入单独的

区室(例如单独的油滴)——其实难以确定如下不是随机的条件——即其中几乎所有的B-结构、T-结构和BT-结构仅进入一个特定的单独的区室(例如单独的油滴)。

[0202] 在步骤(iv)的一个优选实施方案中——单独的区室为步骤(iii)中的B-结构的所述X数量的至少10的平方根(3.16)倍。

[0203] 泊松分布用于假定描述所述区室中B-结构的分布。这意味着所有区室具有相同的体积。具有n=0、1、2或更多B-结构分子的区室的概率可通过下式进行计算：

$$[0204] \quad f(n, \lambda) = \frac{e^{-\lambda} \lambda^n}{n!}$$

[0205] 其中 λ 是B-结构的X数量和区室数量的比例。当 λ 是10的平方根(3.16)时,小于5%(4.1%)的所述区室将有1种以上的B-结构。这意味着这个效果是降低阳性结合实体富集小于5%,这在大多数情况下是不显著的。

[0206] 正如上面所讨论的并在上下文中为本领域技术人员所理解的,所述第一方面的所述方法可被看做一种方法,其意味着B_{结合至}T-结构(即所述靶标-结合实体复合物)在所述第一方面的步骤(iv)的所述单独的/分离的区室里保持悬浮于溶液中。

[0207] 因此,只是为了使之100%清楚,人们可以将其表达为所述第一方面的所述方法并且本发明该方法的相关实施方案,是一种方法,其中所述B_{结合至}T-结构在所述第一方面的步骤(iv)的所述单独的区室里保持悬浮于溶液中。

[0208] 换句话说,而对于上述讨论的本发明相关现有技术方法来说,所述方法不依赖于靶标固定至固相载体上。

[0209] 体外区室化系统

[0210] 正如上述讨论的,本发明合适的体外区室化系统可以包括例如油包水乳液系统。

[0211] 在这种情况下,其中体外区室化系统是油包水乳液系统——人们可以说步骤(iv)的“应用体外区室化系统……步骤(iii)的所述溶液”可表述为“加入步骤(iii)的所述溶液至油包水乳液系统”。

[0212] 本发明合适的油包水乳液系统描述于现有技术例如Nat Methods.2006Jul;3(7):545-50(Williams等人)、Nat Methods.2006 Jul;3(7):551-9(Diehl等人)、Proc Natl Acad Sci U S A.2003Jul22;100(15):8817-22(Dressman等人)、J Biotechnol.2003Apr24;102(2):117-24.(Nakano等人)或者Biomacromolecules.6,1824-1828(2005)(Musyanovych等人)。

[0213] 对本领域技术人员显而易见——在使用乳液作为区室化系统的情况下和与相似大小的分布类比,所述区室体积分布可作为对数-正态分布建模,也被称为高尔顿分布。通过假定的对数-正态分布和检测实际液滴大小,可为特定实验计算预期值(平均)和标准差。根据这个分布,95%的区室体积将位于离均(对数)体积的L对数单位内,其中L是对数-体积的标准差的1.96倍。

[0214] 在本发明的一个优选的实施方案中,当分析数据时所述平均区室大小、变异和标准差是考虑到的。

[0215] 在本发明的一个优选的实施方案中,体积大于平均区室大小2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90或100倍的区室从所述实验中排除掉。

[0216] 在本发明的一个优选的实施方案中,体积小于平均区室大小1/100、1/90、1/80、1/

70、1/60、1/50、1/40、1/30、1/20、1/10、1/9、1/8、1/7、1/6、1/5、1/4、1/3、1/2的区室从所述实验中排除掉。

[0217] 对本领域技术人员显而易见的一—几种技术可被用于基于所述区室的所述体积从所述实验中排除区室,例如通过FACS分选、平衡离心、过滤或微流系统等。

[0218] 可选地,所述体外区室化系统可为琼脂糖液滴微流。(Lab Chip.2010Sep 13.[Epub ahead of print]Agarose droplet microfluidics for highly parallel and efficient single molecule emulsion PCR.Leng X,Zhang W,Wang C,Cui L,Yang CJ)。

[0219] 可选地,所述体外区室化系统可简单为分散所述溶液至例如“微滴定板”并且步骤(iii)的溶液可简单随机放入所述微滴定板的单独的孔中(例如单独的区室)——正如已知的,今天这可以通过例如合适的机器人机器或开放孔系统快速和有效地实现。这种系统的一个实施例是基于高密度阵列的纳升PCR检测,功能上与微滴定板等效,纳盘系统使一个装置、标准显微镜玻片大小中同时进行3072个PCR反应成为可能(Methods Mol Biol.2009;496:161-74.(Brennan等人))。另外一个实施例是提供微米-大小腔体的大阵列的硅装置,所述腔体可用于长时间紧紧封入低至毫微微升的溶液体积。微芯片保证腔室均匀及精确定位(Nat Biotechnol.2005Mar;23(3):361-5(Rondelez等人))。

[0220] 对本领域技术人员显而易见的一—微流体装置可用于所述体外区室化系统(综述参见例如Angew Chem Int Ed Engl.2010Aug9;49(34):5846-68(Theberge等人))。

[0221] 在本发明的一个优选的实施方案中,合适的平均区室体积小于 10^{-6} 升、小于 10^{-7} 升、小于 10^{-8} 升、小于 10^{-9} 升、小于 10^{-10} 升、小于 10^{-11} 升、小于 10^{-12} 升、小于 10^{-13} 升、小于 10^{-14} 升、小于 10^{-15} 升、小于 10^{-16} 升、小于 10^{-17} 升、小于 10^{-18} 升、小于 10^{-19} 升、小于 10^{-20} 升、小于 10^{-21} 升或小于 10^{-22} 升。

[0222] 对本领域技术人员显而易见的一—所述区室体积不能无限小因为所述区室应当大于区室化的分子。

[0223] 总之,本领域技术人员知晓比上下文中感兴趣更多的大量不同体外区室化系统。

[0224] 第一方面的步骤(v)

[0225] 第一方面步骤(v)记载:

[0226] “融合同时存在于相同单独的区室里的B-结构和T-结构的核酸分子——即融合所述B-结构的核酸分子至所述T-结构的核酸分子”

[0227] 查看这个步骤的简单方式是源自(iv)的B-结构和T-结构的共区室化“转变”为融合同族基因型。

[0228] 在上下文中“融合B-结构和T-结构的所述核酸分子”应当被理解为联合所述区室中的两个基因型携带的遗传信息。

[0229] 正如本领域技术人员已知的,这可通过几种方式完成,例如

[0230] 例如:

[0231] a) 信息通过例如重叠PCR或重叠基因组延伸(不使用外引物的重叠PCR)传递——源自一个基因型的一条链作为引物并且使用源自另一个基因型的一条链作为模板;

[0232] b) 信息由形成可扩增的促进键(facilitating bond)的酶催化联合——例如通过DNA连接酶而在每个基因组的至少一条链之间形成磷酸二酯键;

[0233] c) 信息由形成不可扩增的促进键(facilitating bond)的酶催化联合——例如在

每个基因组上的基团(moiety)从而在诱导下酶形成能够连接每个基因型的至少一条链的两个基团;

[0234] d) 信息不通过酶的催化联合——例如在每个基因组上有可诱导的化学活性基团从而在每个基因型的至少一条链间诱导形成化学键;和

[0235] e) 信息瞬时联合——例如在每个基因组上有亲和标签(可以不同也可相同)从而为两个标签提供亲和试剂形成包含两个基因型的三元复合物。

[0236] 在本发明图1的所述示例性实施例中——这个步骤(v)对应于融合存在于所述单独的区室里的所述B-结构和所述T-结构的所述核酸分子左起数字三。

[0237] 本发明非常重要的优点在于在这个步骤中人们可以说所述结合实体和靶标间的结合不再相关——即当人们在此进行所述核酸分子的所述融合步骤人们可以在条件下进行,其中人们不用担心结合实体与靶标结合及空间布局。查看这一步的简单方式是源自步骤(i)的靶标与结合实体的所述结合现在转变成B-结构和T-结构的共区室化。

[0238] 这可以看做本发明所述方法的非常大的优点。

[0239] 例如,如果人们想要通过重叠碱基区的杂交来融合所述B-结构和所述T-结构的所述核酸分子,人们在步骤(v)中可以充分改变例如温度来得到相关碱基对杂交而不用担心所述结合实体和靶标间的结合会被破坏。

[0240] 因此,步骤(v)可在如下条件下进行,其中基本上没有步骤(i)的所述结合实体与步骤(ii)的所述靶标结合。

[0241] 正如上文已经讨论过的——所述B-结构和所述T-结构的所述核酸分子的融合可通过例如重叠碱基对区域的杂交之外的不同方式实现。

[0242] 例如,如果例如为了获得融合的核酸分子在步骤(v)中使用的连接酶——然后人们不需要步骤(i)的所述B-结构的所述核酸分子(基因型)和步骤(ii)的所述T-结构的所述核酸分子(表型)之间存在任何碱基重叠区域。

[0243] 对本领域技术人员显而易见的——如果使用例如连接酶或聚合酶——为了正确地存在于步骤(v)的相应单独的区室里,该连接酶应当优选添加到步骤(iii)的所述溶液中或在优选的稀释步骤(iii-b)过程中。

[0244] 对本领域技术人员显而易见的——几种不同的酶反应可用于融合基因组——大量酶反应已被报道在文献中如Kabanov等人., *Biochimica et Biophysica Acta*, 996 (1989) 147-152, Salon等人. *Biochemistry* 1992, 31, 8072-8079, Anarbaev等人, *Biochimica et Biophysica Acta* 1384 1998. 315-324, Ong等人, (2006) . *J. Mol. Biol.* 361: 537-50, Ghadessy, F. J. Ong, J. L. 和 Holliger, P. (2001) .. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 4552-4557, Protein Engineering, Design & Selection vol. 17 no. 3 pp. 201-204, 2004, Levy等人, *RNA* (2005), 11: 1555-1562, Turner等人., *Nucleic Acids Res.* 2008 August; 36(13): e82。

[0245] 在本发明的一个优选实施方案中,所述共区室化的基因型通过酶融合。

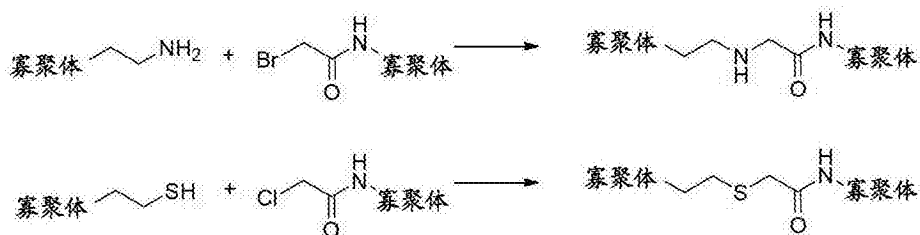
[0246] 对本领域技术人员显而易见的——尽管区室化之前溶液中的基因型的浓度可能非常低如皮摩尔-微摩尔范围而有共区室化基因型的区室里的基因型浓度可能高,例如当所述区室体积在飞升(10^{-15} L)范围时基因型的浓度在纳摩尔范围(10^{-9} M),当所述区室体积在阿升(10^{-18} L)范围时基因型浓度在微摩尔(10^{-6} M)范围,或当所述区室体积在仄升(10^{-21} L)

范围时基因型浓度在毫摩尔 (10^{-3}M) 范围。所以,区室中基因型浓度可通过促进酶反应或甚至传统化学反应得以控制。

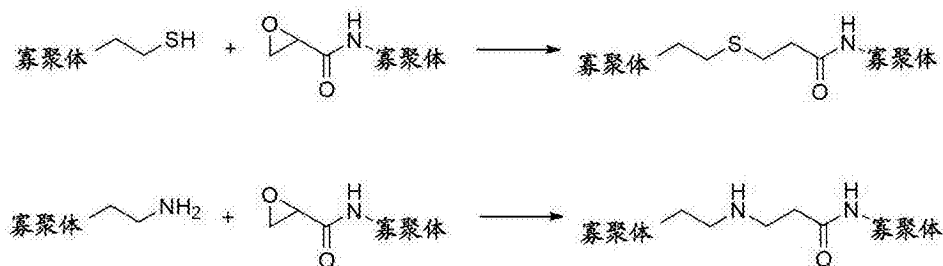
[0247] 对本领域技术人员显而易见——如果使用乳液中例如可诱导的化学交联——无论是诱导剂还是其他试剂在区室化之前均可不是必须的,因为这些可后来“递送”给形成的区室。例如诱导剂可以是光、温度或通过连续相递送的化学激活剂。当需要小区室时这样的实施方案可能是有利的。

[0248] 在本新发明的一个优选实施方案中,化学交联如下进行:

亲核取代 $\text{S}_{\text{N}}2$



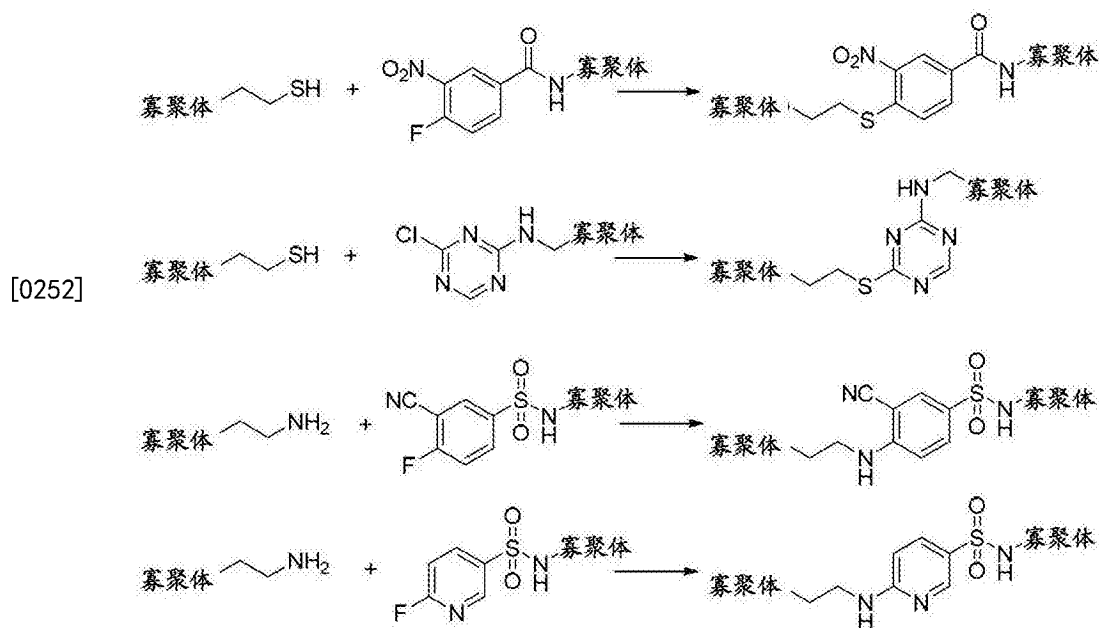
[0249]



[0250] 所述亲核取代反应可基本上按照Z.J.Gartner等人.J.Am.Chem.Soc.2001,123, 6961中描述的进行。

[0251] 在本新发明的一个优选实施方案中,化学交联如下进行:

亲核芳香取代

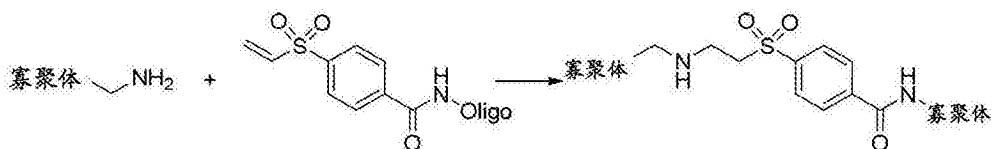


[0252]

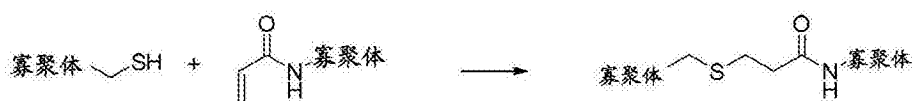
[0253] 所述亲核取代反应可基本上按照Clark等人,Nature Chemical Biology5,647-654(2009)中描述的进行

[0254] 在本新发明的一个优选实施方案中,化学交联如下进行:

共轭加成



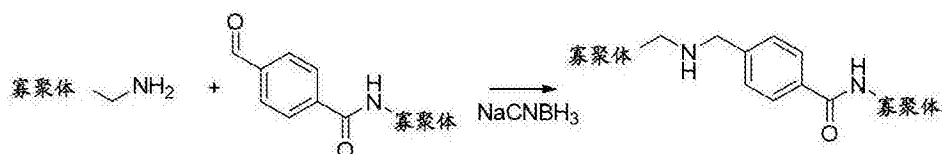
[0255]



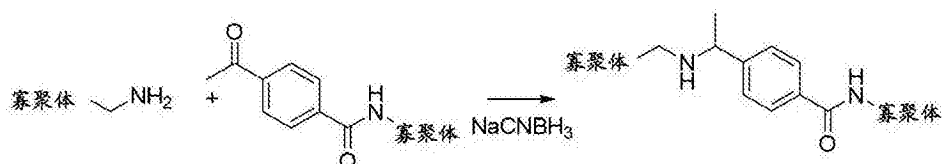
[0256] 所述亲核取代反应可基本上按照Z.J.Gartner,等人.J.Am.Chem.Soc.2001,123,6961中描述的进行。

[0257] 在本新发明的一个优选实施方案中,化学交联如下进行

还原氨化



[0258]

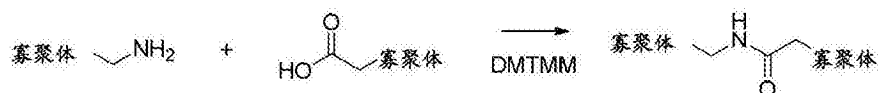


[0259] 所述还原氨化可基本上按照Z.J.Gartner等人.Angew.Chem.Int.Ed.2002,41,1796中描述的进行。

[0260] 在本新发明的一个优选实施方案中,化学交联如下进行

胺酰化

[0261]

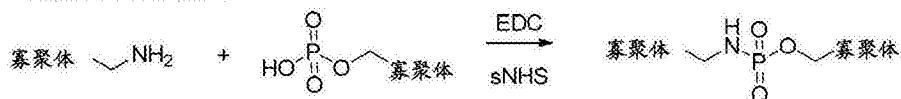


[0262] 所述胺酰化可基本上按照Z.J.Gartner等人.Angew.Chem.Int.Ed.2002,41,1796中描述的进行。

[0263] 在本新发明的一个优选实施方案中,化学交联如下进行氨基磷酸酯形成

氨基磷酸酯形成

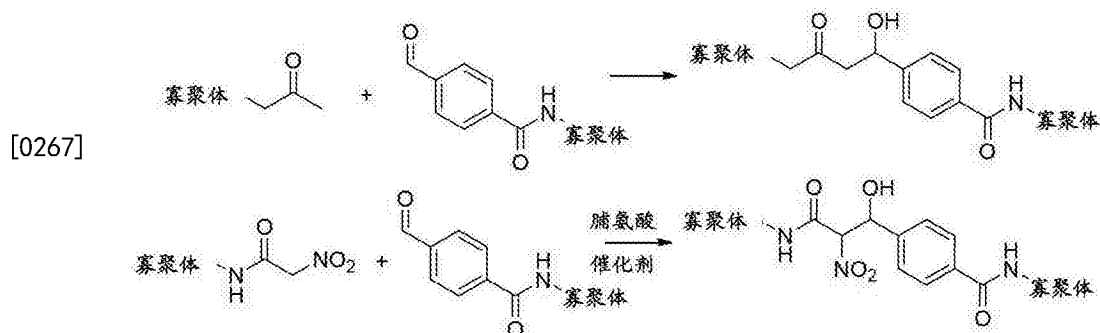
[0264]



[0265] 所述氨基磷酸酯形成可基本上按照Luther A等人.Nature1998,396:245-248中描述的进行。

[0266] 在本新发明的一个优选实施方案中,化学交联如下进行

羟醛缩合

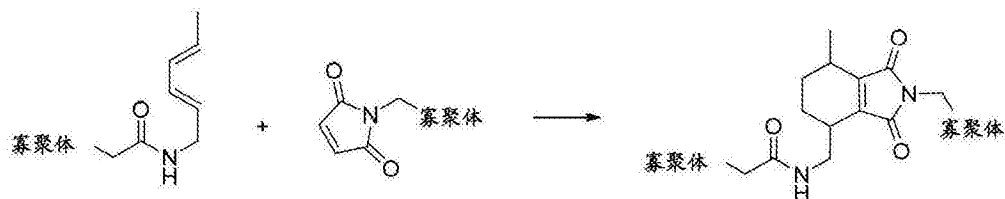


[0268] 所述羟醛缩合可基本上按照Zhuo Tang等人.Angew.Chem.Int.Ed.2007,46,7297-7300中描述的进行

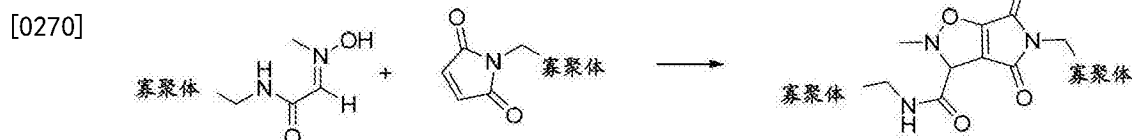
[0269] 在本新发明的一个优选实施方案中,化学交联如下进行

环加成交联

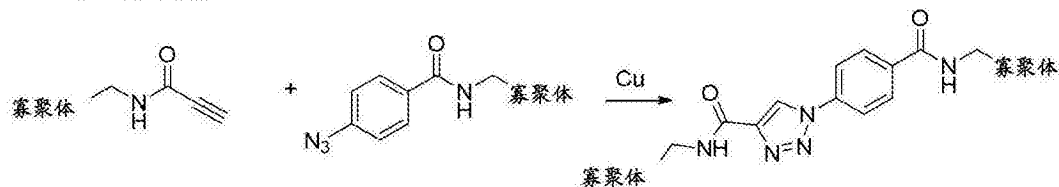
Diels-Alder环加成



1,3-偶极环加成



Huisgen环加成



[0271] 所述环加成反应可基本上按照如下中描述的进行:

[0272] Buller等人.Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 18(2008) 5926-5931

[0273] Fujimoto K,J Am Chem Soc 2000,122:5646-5647.

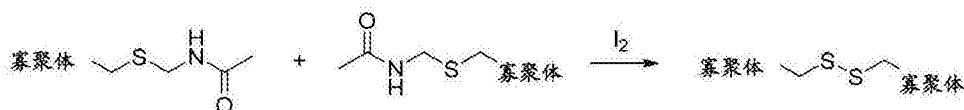
[0274] Gartner Z. J.等人.Angew Chem Int Ed Engl 2002,41:1796-1800.

[0275] Gartner Z.J.等人.Angew Chem Int Ed Engl 2003,42:1370-1375.

[0276] Poulin-Kerstien A.T.等人.J Am Chem Soc 2003,125:15811-15821.

[0277] 在本新发明的一个优选实施方案中,化学交联如下进行

二硫键交联



[0278]



Tr = 三苯甲基 = C(Ph)₃

[0279] 所述二硫键交联可基本上按照如下中描述的进行:

[0280] Mays, J.R.等人.Tetrahedron Lett.2007,48,4579.

[0281] Theodoropoulos, D.等人.Journal of Medicinal Chemistry,1985,vol.28,10, p.1536-1539

[0282] Lorenz, Katrin B.等人.Journal of Organic Chemistry,2004,vol.69, 11p.3917-3927

[0283] 在本新发明的一个优选实施方案中,化学交联如下进行

脲交联



偶联试剂: 双-(4-硝基苯基)碳酸酯

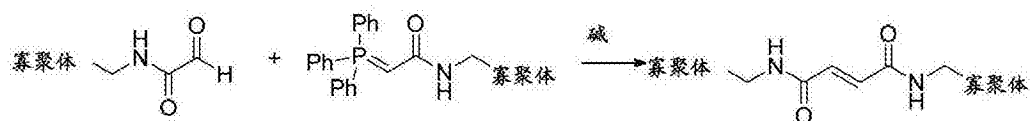
[0285] 所述尿素交联可基本上按照EP1809743B1 (Vipergen)中描述的进行

[0286] 在本新发明的一个优选实施方案中,化学交联如下进行

烯化交联

Wittig 烯化

[0287]



[0288] 所述Wittig烯化反应可基本上按照Gartner Z.J.等人.Angew Chem Int Ed Engl 2002,41:1796-1800中描述的进行

[0289] 在本新发明的一个优选实施方案中,化学交联如下进行

烯化交联

Wittig 烯化

[0290]



[0291] 所述Wittig烯化反应可基本上按照Gartner Z.J.等人.Angew Chem Int Ed Engl

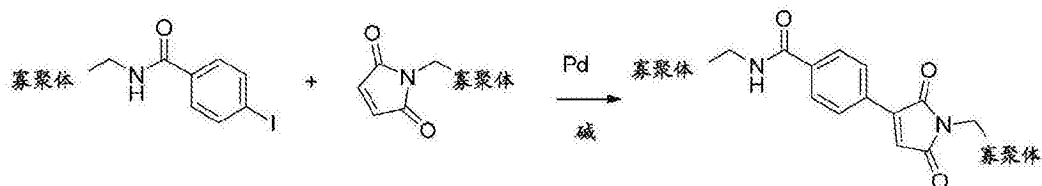
2002, 41:1796-1800中描述的进行。

[0292] 在本新发明的一个优选实施方案中,化学交联如下进行

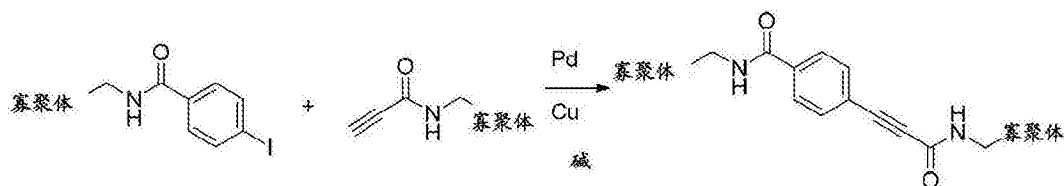
[0293]

过渡金属催化的交联

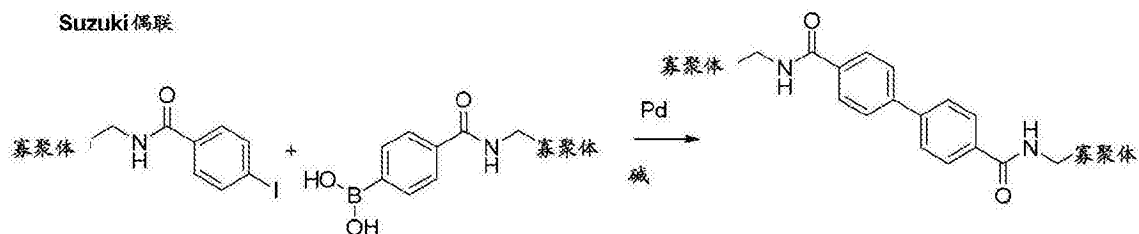
Heck 偶联



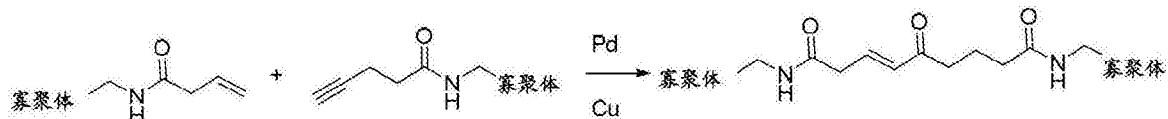
Sonogashira 偶联



Suzuki 偶联



烯炔偶联



[0294] 过渡金属催化反应可基本上按照如下中描述的进行:

[0295] Czapinski J.L.等人.J Am Chem Soc 2001,123:8618-8619.

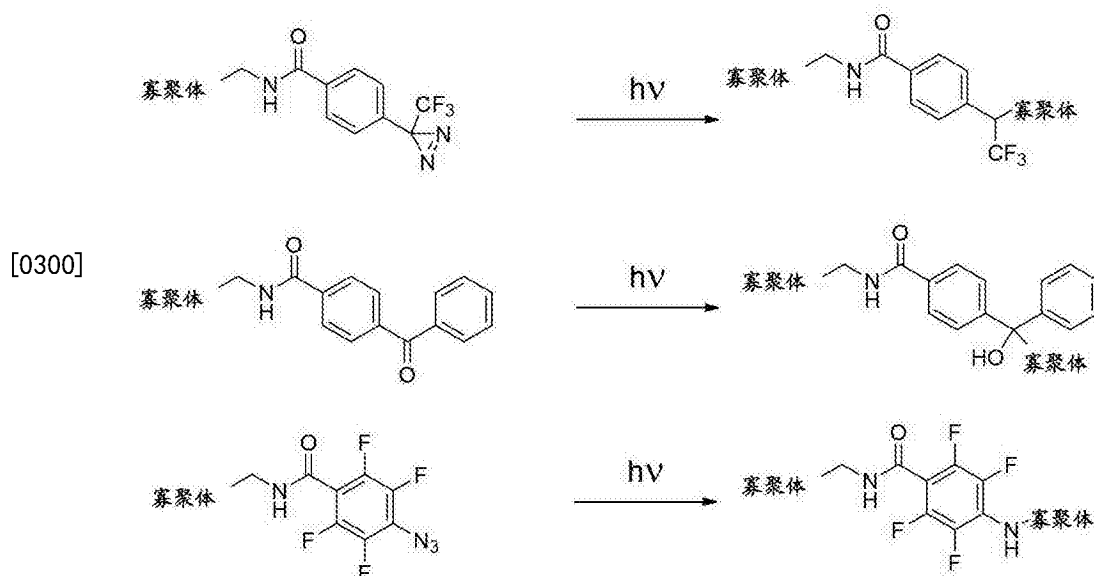
[0296] Gartner Z.J.等人..Angew Chem Int Ed Engl 2002,41:1796-1800

[0297] Calderone C.T.等人.Angew Chem Int Ed Engl 2005,44:1-5

[0298] Kanan M.W.等人.Nature 431,545-549,2004

[0299] 在本新发明的一个优选实施方案中,化学交联如下进行

光偶联



[0301] 光交联可基本上按照如下中描述的进行：

[0302] Quamrul, A.等人. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 18(2008)5923-5925

[0303] Weber, T.等人. *Journal of the American Chemical Society*; 117; 11; (1995); 3084-3095

[0304] Chee, G.等人. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*; 18; 2; (2010); 830-838

[0305] Nassal, M. *Journal of the American Chemical Society*; 106; (1984); 7540-7545

[0306] Pandurangi, R.S.等人. *Bioorganic Chemistry*; 25; 2; (1997); 77-87

[0307] Patent; KENT STATE UNIVERSITY; LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY;

[0308] US2010/29952; (2010); (A1)

[0309] 总之，本领域技术人员知晓大量不同的融合B-结构和T-结构的所述核酸分子的方式，所述结构同时存在于同一个单独的区室中。

[0310] 在上下文中为本领域技术人员所理解的——本发明优选所述第一方面的所述方法的所述步骤(iii)和(iv)中的B-结构和T-结构的所述核酸分子没有显著的结合——换句话说，在步骤(v)前优选没有显著的所述BT_{融合}-结构产生。

[0311] 第一方面的步骤(vi)

[0312] 步骤(vi)记载：

[0313] “组合步骤(v)的所述单独的区室的内容物……”

[0314] 很明显“组合步骤(v)的所述单独的区室的内容物”基于步骤(iv)中使用的所述体外区室化系统以合适的方式完成。

[0315] 例如，如果步骤(iv)中使用的所述体外区室化系统是微升盘样形式(参见上文)单独孔中的所述内容物简单组合(放到一起)。

[0316] 例如，如果步骤(iv)中使用的所述体外区室化系统是合适的油包水乳液——单独的油区室可简单通过例如离心、提高温度或通过加入合适的有机溶剂破坏。

[0317] 总之,在本发明上下文中,组合步骤(v)的所述单独的区室的内容物对于本领域技术人员来说是常规工作。

[0318] 步骤(vi)进一步记载:

[0319] “以得到BT_{融合}-结构文库,该步骤在以下条件下进行:其中没有B-结构和T-结构的核酸分子的融合——即在步骤(v)中没有生成任何新的BT_{融合}-结构……”

[0320] 正如上面所讨论的——人们可以说本发明想要的BT_{融合}-结构的富集早已通过上述步骤获得了一——因此,对本领域技术人员来说显而易见的是在这步中人们对于创造更多“新”BT_{融合}-结构本身并不感兴趣。

[0321] 对本领域技术人员来说在如下条件下进行步骤(vi)是常规工作——例如,如果连接酶已用于步骤(v)来获得所需的BT_{融合}-结构,该连接酶可以在步骤(vi)进行前是灭活的(例如通过适当提高温度)。

[0322] 鉴于本发明所讨论的——对于本领域技术人员来说显而易见的是该步骤(vi)会产生BT_{融合}-结构的文库。

[0323] 对本领域技术人员显而易见的一——当与源自靶标和结合物实体的未结合对的BT_{融合}-结构相比BT_{融合}-结构的文库可描述为源自靶标和结合物实体的结合对的BT_{融合}-结构的富集文库,包括允许鉴定所述结合实体和所述靶标的核酸序列信息——即步骤(i)和(ii)的所述序列信息。

[0324] 可选步骤(vii)——即随后使用第一方面的步骤(iv)的富集文库。

[0325] 正如上面所讨论的——步骤(vii)是一个可选步骤。

[0326] 如本发明所述一旦人们已经获得步骤(vi)的所述富集文库,人们可以依照现有技术以不同的方式使用这个文库——例如所述富集文库可认为是富集的体外展示文库例如可被用于第二轮选择/富集或人们可以从步骤(vi)的所述富集文库直接鉴定特定结合实体的结构。

[0327] 因此,本发明的一个实施方案涉及本发明所述方法,其中有一个额外的步骤(vii)包括使用步骤(vi)的所述富集文库来鉴定至少一个与至少一个感兴趣的靶标结合的单独的结合实体。

[0328] 纯化融合基因型:

[0329] 在本发明的一个合适的实施方案中,所述融合基因型(即BT_{融合}-结构)可被纯化。

[0330] 本领域技术人员能够为了纯化所述融合基因型而常规地鉴定大量不同的策略,例如但不限于:琼脂糖凝胶电泳、聚丙烯酰胺凝胶电泳、离心柱(spun-column)、酶处理、HPLC纯化、亲和纯化或毛细管电泳(Molecular Cloning:A Laboratory Manual(3-Volume Set),3rd Edition,2001-01by Joseph Sambrook,David W.Russell,Publisher:Cold Spring Harbor Laboratory Press)

[0331] 在本发明的一个优选的实施方案中,在区室化后所述融合基因型通过例如凝胶纯化或酶法降解不需要的核酸来进行纯化。对于本领域技术人员来说设计这些程序是明显的。例如在利用重叠PCR进行基因型融合的情况下,基因型的大小可选来促进凝胶纯化例如展示文库基因型的长度可选为大约250bp而靶标基因型的长度可为大约100bp以及重叠区域大约20碱基,然后所得到的融合基因型将为大约330bp,其易于通过标准琼脂糖凝胶电泳或聚丙烯酰胺凝胶电泳从原本未融合的中分离和纯化。此外,未使用的引物和来自使用为

融合基因型作为模板的引物延伸得到的ssDNA可方便地酶法降解例如通过ExoSAP-IT (Amersham Biosciences)。此种情况的另一个实施例是为基因型融合使用连接酶或化学交联或瞬时交联,基因型的大小可选来促进凝胶纯化例如展示文库基因型的长度可选为大约250bp而靶标基因型的长度可以是大约100bp,然后所得到的融合基因型将为大约350bp,其易于通过标准琼脂糖凝胶电泳或聚丙烯酰胺凝胶电泳从原本未融合的中分离和纯化。

[0332] 在本发明的一个优选实施方案中,所述融合基因型是凝胶纯化的。

[0333] 总之,本领域技术人员知晓大量不同的纯化B-结构和T-结构的融合核酸分子的方式,所述结构同时存在于同一个单独的区室中。

[0334] 补齐(polish)融合基因型:

[0335] 在本发明的一个优选的实施方案中,所述融合基因型可被补齐(在那些基因型没有通过与DNA扩增相容的方法融合的情况下),即为了在融合的两个基因组之间形成一个可扩增的键——可扩增的键是在所述融合基因型的一个基因型的3'末端和另一个基因型的5'末端之间的磷酸二酯键(或类似的)。

[0336] 本领域技术人员能够为了纯化所述融合基因型而常规地鉴定大量不同的策略,例如但不限于:酶地(例如大肠杆菌DNA连接酶、TaqDNA连接酶、9°N™DNA连接酶、T4DNA连接酶、T4RNA连接酶1(ssRNA连接酶)、T4RNA连接酶2(dsRNA连接酶)、截短的T4RNA连接酶2)或化学地。

[0337] 对本领域技术人员显而易见的一一在区室化后在同族基因型(基因型源自同一个区室)间形成正确的磷酸二酯键(或类似的)很容易控制,因为这些是假分子内反应,因而独立于基因型的浓度。相反,非同族基因型间没有形成正确的磷酸二酯键(或类似的)则依赖于基因型的浓度。

[0338] 在本发明的一个优选的实施方案中,DNA连接酶用于补齐。

[0339] 总之,本领域技术人员知晓大量不同的补齐B-结构和T-结构的融合核酸分子的方式,所述结构同时存在于同一个单独的区室中。

[0340] 附加到核酸的所述靶标的去除或灭活

[0341] 在本发明的一个优选的实施方案中,附加到所述融合基因型的所述靶标可被去除或灭活。

[0342] 本领域技术人员能够为了去除或灭活所述附加到融合基因型的所述靶标而常规地鉴定大量不同的策略,例如但不限于:热、蛋白酶处理、6M盐酸胍或在靶标通过可裂解的连接物附加情况下连接物裂解。

[0343] 在本发明的一个优选的实施方案中,附加到所述融合基因型的所述靶标可通过热蛋白酶处理或6M盐酸胍去除或灭活。

[0344] 在本发明的一个优选的实施方案中,附加到所述融合基因型的所述靶标可通过蛋白酶K处理去除。

[0345] 在本发明的一个优选的实施方案中,附加到所述融合基因型的所述靶标可通过通过引物延伸去除移位。

[0346] 总之,本领域技术人员知晓大量不同的去除或破坏附加到所述融合基因型的所述靶标的方式,所述结构同时存在于同一个单独的区室中。

[0347] 下一轮ECC:

[0348] 在本发明的一个优选的实施方案中,所述融合基因型可经历下一轮ECC,即在下一轮所述融合基因型会与新的靶标的基因型融合——所述新靶标可与先前的靶标种类相同或不同。

[0349] 本领域技术人员能够明白步骤(iv)的融合基因型的所述富集文库是一个体外展示文库。

[0350] 在本发明的一个优选的实施方案中,前一轮的附加到核酸的ECC靶标在下一轮ECC之前被去除或破坏。

[0351] 在本发明的一个优选的实施方案中,下一轮ECC的靶标与前一轮ECC的相同。

[0352] 在本发明的一个优选的实施方案中,下一轮ECC的靶标与前一轮ECC的不相同。

[0353] 在本发明的一个优选的实施方案中,下一轮ECC的靶标的基因型对于结合实体融合到原始基因型的自由末端。

[0354] 在本发明的一个优选的实施方案中,下一轮ECC的靶标的基因型融合到前一轮ECC靶标基因型的自由末端。

[0355] 传统选择/富集方法:

[0356] 在本发明的一个优选的实施方案中,所述融合基因型可以经历一轮现有技术已知的传统选择/富集方法。

[0357] 在本发明的一个优选的实施方案中,所述前一轮ECC附加到核酸的靶标在传统选择/富集方法的一轮之前被去除或破坏。

[0358] 本领域技术人员能够为了执行一轮一轮的传统选择/富集方法而常规地鉴定大量不同的策略,例如但不限于:EP1809743B1 (Vipergen), EP1402024B1 (Nuevolution), EP1423400B1 (David Liu), Nature Chem. Biol. (2009), 5:647-654 (Clark), W000/23458 (Harbury), Nature Methods (2006), 3 (7), 561-570, 2006 (Miller), Nat. Biotechnol. 2004; 22, 568-574 (Melkko), Nature. (1990); 346 (6287), 818-822 (Ellington) 或 Proc Natl Acad Sci USA (1997). 94 (23): 12297-302 (Roberts)。

[0359] 总之,本领域技术人员知晓大量不同的执行一轮传统选择/富集方法的方式,该方法融合B-结构和T结构的核酸分子的文库,所述结构同时存在于同一个单独的区室中。

[0360] 扩增融合基因型:

[0361] 在本发明的一个优选的实施方案中,所述融合基因型的所述核酸可被扩增——即存在于步骤(vi)的所述富集文库的BT_{融合}-结构可被扩增。

[0362] 本领域技术人员能够为了扩增所述融合基因型中的所述核酸而常规地鉴定大量不同的策略,例如但不限于:PCR (United States Patent 4,683,202; Mullis), 微乳滴PCR (Nakano 等人., J Biotechnol. 2003; 102 (2): 117-24), 数字PCR (Vogelstein, B; Kinzler KW (1999). "Digital PCR". Proc Natl Acad Sci U S A. 96 (16): 9236-41), NASBA (Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification. Nature. 1991; 350 (6313): 91-2), 或滚环扩增 (American Journal of Pathology. 2001; 159: 63-69)

[0363] 在本发明的一个优选的实施方案中,所述融合基因型中的所述核酸接着去区室化步骤之后被扩增。

[0364] 在本发明的一个优选的实施方案中,所述融合基因型中的所述核酸接着通过PCR执行区室化步骤之后被扩增。

[0365] 在本发明的一个优选的实施方案中,所述融合基因型中的所述核酸接着通过PCR执行区室化步骤之后被扩增,而正向PCR引物起始位点位于所述B-结构基因型并且反向引物起始位点位于所述T-结构基因型。

[0366] 在本发明的一个优选的实施方案中,所述融合基因型中的所述核酸接着通过PCR执行区室化步骤之后被扩增,而正向PCR引物起始位点位于所述B-结构基因型并且一部分反向引物起始位点位于所述第一T-结构基因型及其余部分位于所述第二T-结构基因型。

[0367] 在本发明的一个优选的实施方案中,所述融合基因型中的所述核酸接着通过PCR执行区室化步骤之后被扩增,而部分正向PCR引物起始位点位于所述第一T-结构基因型和正向PCR引物起始的其余部分位于所述B-结构并且一部分反向引物起始位点位于所述B-结构基因型及其余部分位于所述第二T-结构基因型。

[0368] 在本发明的一个优选的实施方案中,所述融合基因型中的所述核酸接着通过PCR执行区室化步骤之后被扩增,而正向PCR引物起始位点位于所述B-结构基因型并且30-70%反向引物起始位点位于所述第一T-结构基因型及其余30-70%位于所述第二T-结构基因型。

[0369] 在本发明的一个优选的实施方案中,所述融合基因型中的所述核酸接着通过PCR执行区室化步骤之后被扩增,而正向PCR引物起始位点位于所述第一T-结构基因型并且30-70%反向引物起始位点位于所述B-结构基因型及其余30-70%位于所述第二T-结构基因型。

[0370] 在本发明的一个优选的实施方案中,所述融合基因型中的所述核酸接着通过PCR执行区室化步骤之后被扩增,而30-70%正向PCR引物起始位点位于所述第一T-结构基因型和正向PCR引物起始的其余30-70%位于所述B-结构并且30-70%反向引物起始位点位于所述B-结构基因型及其余30-70%位于所述第二T-结构基因型。

[0371] 总之,本领域技术人员知晓大量不同的扩增融合的B-结构和T-结构的核酸分子中的所述核酸的方式,所述结构同时存在于同一个单独的区室中。

[0372] 翻译:

[0373] 在本发明的一个优选的实施方案中,融合基因型的所述核酸可被扩增并经历翻译过程,而富集的融合基因型文库被翻译为新的富集的体外展示文库。

[0374] 本领域技术人员能够为了扩增并使所述融合基因型进入翻译过程而常规地鉴定大量不同的策略,例如但不限于:EP1809743B1 (Vipergen), EP1423400B1 (David Liu), W000/23458 (Harbury), Nature Methods (2006), 3 (7), 561-570, 2006 (Miller), Nature. (1990); 346 (6287), 818-822 (Ellington) 或 Proc Natl Acad Sci USA (1997). 94 (23): 12297-302 (Roberts)。

[0375] 总之,本领域技术人员知晓大量不同的扩增并翻译融合的B-结构和T-结构的核酸分子的方式,所述结构同时存在于同一个单独的区室中。

[0376] 分析同一性和组成:

[0377] 在本发明的一个优选的实施方案中,融合基因型的所述核酸可分析其同一性和组成。

[0378] 本领域技术人员能够为了分析所述融合基因型的所述核酸的同一性而常规地鉴定大量不同的策略,例如但不限于:测序(参见综述:Metzker, Michael L. (2010). "Sequencing technologies-the next generation". Nat Rev Genet 11 (1): 31-46.), DNA杂交技术 (Science 270 (5235): 467-470), 限制性酶消化, PCR, 方法参见 EP1809743B1

(Vipergen), EP1402024B1 (Nuevolution), EP1423400B1 (David Liu), Nature Chem. Biol. (2009), 5:647-654 (Clark), W000/23458 (Harbury), Nature Methods (2006), 3(7), 561-570, 2006 (Miller), Nat. Biotechnol. 2004; 22, 568-574 (Melkko), Nature. (1990); 346 (6287), 818-822 (Ellington), 或 Proc Natl Acad Sci USA (1997). 94(23):12297-302 (Roberts), W006053571A2 (Rasmussen)。

[0379] 在本发明的一个优选的实施方案中,融合基因型的所述核酸可通过DNA测序分析其同一性和组成。

[0380] 在本发明的一个优选的实施方案中,融合基因型的所述核酸可通过使用454技术 (Margulies M, Egholm M, Altman WE, 等人 (September 2005). "Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors". Nature 437 (7057): 376-80) 的DNA测序分析其同一性和组成。

[0381] 总之,本领域技术人员知晓大量不同的分析B-结构和T-结构的融合基因型的所述核酸的同一性和组成的方式,所述结构同时存在于同一个单独的区室中。

[0382] 本发明的一个单独的独立方面

[0383] 本发明的一个单独的独立方面如下所述。

[0384] 正如本领域技术人员所理解的——本发明的这个单独的独立方面的所述方法使用本发明如上所述的第一方面及相关实施方案的相同的基本技术原理。

[0385] 基于上述讨论并正如本领域技术人员所理解的——本发明第一方面的特定优选实施方案(例如步骤(iv)体外区室化系统是油包水乳液系统)也可以是本发明的这个单独的独立方面相应的优选实施方案。

[0386] 因此,本发明的一个单独的独立方面涉及制备富集文库的方法,该文库包括允许鉴定至少一种结合实体的特定核酸序列信息,所述结合实体与至少一种靶标结合,其中所述特定结合实体已存在于体外展示文库并且其中所述方法包括下述步骤:

[0387] (i) 制备至少100种不同结合实体(B_n ($n=100$ 或更多))的体外展示文库,其中每个结合实体附加到核酸分子,所述核酸分子包括允许鉴定结合实体的特定核酸序列信息——即人们一旦知晓所述核酸分子的所述特定核酸序列信息即可直接知晓附加到所述核酸分子的所述特定结合实体的结构——附加到所述核酸分子(基因型)的所述结合实体(即表型)的所述结合实体本文称为B-结构;

[0388] (ii) 制备具有附加到酶的靶标T的结构,该酶能够融合两个DNA分子,其中所述靶标能够结合至少一种存在于步骤(i)的所述文库的所述结合实体——附加到能够融合两个DNA分子的所述靶标的结构本文称为T-结构;

[0389] 并且其中所述方法特征在于:

[0390] (iia) 在结合条件下,将包括X(X 是大于 10^4 的数)个步骤(i)的文库的B-结构的溶液与包括Y(Y 是大于 10^2 的数)个步骤(ii)的T-结构的溶液混合,所述条件是包括能够结合靶标分子的结合实体的B-结构与包括不能够结合相同靶标分子的结合实体的B-结构相比能够更有效地结合相应的T-结构,并且其中人们得到结合至少一个结合实体至至少一个靶标从而生成包含B-结构结合到T-结构的复合物(本发明称为 $B_{结合至}T$ -结构);

[0391] (iib) 将步骤(iia)的溶液与包括与步骤(iia)存在的T-结构的所述Y大至少2倍的核酸分子的溶液混合,其中所述核酸分子包括允许鉴定所述特定靶标(本文称为靶标-

DNA)的特定核酸序列信息。

[0392] (iv)应用体外区室化系统——在结合条件下,即所述条件是包括能够结合靶标分子的结合实体的B-结构与包括不能够结合相同靶标分子的结合实体的B-结构相比能够更有效地结合相应的T-结构——其中在其中B-结构、T-结构和B_{结合至}T-结构随机进入单独的区室的条件下区室化系统包括比步骤(iii)存在的Y个T-结构多至少2倍的单独的区室;和

[0393] (v):融合同时存在于相同单独的区室里的B-结构和T-结构的核酸分子——即融合所述B-结构的核酸分子至所述T-结构的核酸分子——这个结构本发明称为BT_{融合}-结构并且所述BT_{融合}-结构包括允许鉴定步骤(i)所述结合实体的特定核酸序列信息和允许鉴定步骤(ii)所述特定靶标的特定核酸序列信息;和

[0394] (vi):在为了得到BT_{融合}-结构文库的条件下组合步骤(v)的所述单独的区室的内容物,其中没有B-结构和T-结构的核酸分子的融合——即没有生成任何新的BT_{融合}-结构没有已生成在步骤(v)中——为了得到BT_{融合}-结构文库,其中所述文库是与源自未结合的靶标与结合物实体的对的BT_{融合}-结构相比为富集的源自结合的靶标与结合物实体的对的BT_{融合}-结构种类文库。

[0395] 正如本领域技术人员已知的——能够融合两个DNA分子的酶的合适的实例是例如连接酶或聚合酶。

[0396] 基于本发明第一方面的上述讨论和本发明涉及这的实施方案——优选本发明相关核酸分子是DNA分子,并且基于此优选连接酶或聚合酶是DNA连接酶或DNA聚合酶。

[0397] 在上下文中如本领域技术人员所理解的——本发明的这个单独的独立方面的步骤(v)的B-结构和靶标-DNA的核酸分子的融合是通过能够融合本发明的这个单独的独立方面的步骤(ii)的T-结构的两个DNA分子(例如连接酶或聚合酶)的酶实现的,

[0398] 与本发明第一方面所讨论的方法相反(其中可以有多于一种不同的靶标T存在)——本发明的这个单独的独立方面里仅有一种靶标T存在。

[0399] 因此,允许鉴定本发明的这个单独的独立方面的步骤(iiib)的核酸分子的特定靶标的所述特定核酸序列信息可简单为本发明相关表征的单一序列。

[0400] 基于上述本发明的第一方面所讨论的,优选这个允许鉴定所述特定靶标的特定核酸序列信息是PCR可扩增的序列,因为步骤(v)的所述BT_{融合}-结构可为经PCR扩增的。

实施例

[0401] 实施例1:

[0402] 为基因型-基因型(genotype-genotype)融合使用重叠ePCR通过共区室化富集——掺入(Spiking)实验。

[0403] 概述参见附图2。

[0404] 方法

[0405] 所使用的DNA寡核苷酸

[0406] Yoctoreactor类似物的连续链DNA [Hansen等人,J.Am.Chem.Soc.,2009,131(3), pp1322-1327]:

[0407]

CGCTAAtggtccctggcagtcctccTTAGCGgaccGACTCcTgctcGAAGACAACGGTgttttacACCGTTGTCTTCg

agcTgtACCTGCgcAAGTGCgttttacGCACTTgcGCAGGTacTgtGCATCgacAAGACCgttttacGGTCTTgtcG
ATGCacTgGAGTCggtcCTGTTTCGATCTTGGGCGTAT

[0408] vip1461:ATACGCCCAAGATCGAACAG

[0409] vip2501:x-TGGTCCCTGGCAGTCTCC(x=5'-生物素-TEG)

[0410] vip2504:

[0411] CTGTTTCGATCTTGGGCGTATGAGAAGAGCCAGAAACGTGGCTTCAGGCACCAAGGAAGAC

[0412] vip2512:

[0413] GCCTTGCCAGCCCGCTCAGGCAAGTCTTACAGCCGATCAGTCTTCCTTGGTGCCTGAAG

[0414] vip2502:CTGTTTCGATCTTGGGCGTAT

[0415] vip2500:x-GCCTTGCCAGCCCGCTCAG(x=5' 羧基)

[0416] vip157:GCCTTGCCAGCCCGCTCAG

[0417] vip660:TGGTCCCTGGCAGTCT

[0418] vip1481:GAACAGGACCGA

[0419] vip1471:CTGTTTCGATCTTGGGCGTAT

[0420] Yoctoreactor文库的制备

[0421] 文库基本依照Hansen等人.J.Am.Chem.Soc.,2009,131(3),pp1322-1327构建并作下述修改:夹板寡核苷酸(splint oligonucleotide)vip1481和寡核苷酸vip1471用于引入反向引物起始位点。

[0422] 附加到编码DNA的已知靶标结合物(生物素)的制备

[0423] Yoctoreactor文库序列的类似物的连续链DNA使用vip1461引物和vip2501引物用于PCR,vip2501引物有5'-生物素。因此,5'-生物素引入yoctoreactor DNA类似物中。

[0424] 操作步骤

[0425] PCR混合物:

[0426] 50μL 2X PCR标准混合物(40mM Tris-HCl,20mM(NH₄)₂SO₄,20mM KCl,16mM MgSO₄,0.2%Triton X-100,0.2mg/mLBSA,0.4mM每种dATP,dTTP,dGTP和dCTP,pH8.8@25°C)

[0427] 10μL 5M甜菜碱(终浓度0.5M)

[0428] 1μL 50μM vip2501(终浓度0.5μM)

[0429] 1μL 50μM vip1461(终浓度0.5μM)

[0430] 1μL (10⁷摩尔)的yoctoreactor类似物的连续链DNA

[0431] 1μL (2u/μL)Vent(外-)聚合酶

[0432] 36μL 水

[0433] 所述混合物在PCR仪上应用如下程序进行热循环:

[0434] 92度2min,25个循环的(92度30秒,72度1min),72度2min。

[0435] 185bp DNA片段按照标准程序(Molecular Cloning:A Laboratory Manual(3-Volume Set),3rd Edition,2001-01by Joseph Sambrook,David W.Russell,Publisher:Cold Spring Harbor Laboratory Press)通过PAGE纯化方法纯化出来并乙醇沉淀。

[0436] 靶标DNA(TD)的制备

[0437] 99-mer靶标DNA通过一步重叠PCR操作步骤制备并随后用10%TBE-PAGE天然凝胶纯化。

[0438] 操作步骤

[0439] PCR混合物

[0440] 50μL 2X PCR标准混合物 (40mM Tris-HCl, 20mM (NH₄)₂SO₄, 20mM KCl, 16mM MgSO₄, 0.2% Triton X-100, 0.2mg/mL BSA, 0.4mM 每种 dATP, dTTP, dGTP 和 dCTP, pH8.8@25°C)

[0441] 10μL 5M 甜菜碱 (终浓度 0.5M)

[0442] 1μL 50μM vip2500 (终浓度 0.5μM)

[0443] 1μL 50μM vip2502 (终浓度 0.5μM)

[0444] 1μL 20pM vip2504 (终浓度 0.2pM)

[0445] 1μL 20pM vip2512 (终浓度 0.2pM)

[0446] 1μL (2u/μL) Vent (外-) 聚合酶

[0447] 35μL 水

[0448] 所述混合物在PCR仪上应用如下程序进行热循环:

[0449] 92度 2min, 25个循环的 (92度 30秒, 72度 1min), 72度 2min。

[0450] 99bp DNA片段按照标准程序 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3-Volume Set), 3rd Edition, 2001-01 by Joseph Sambrook, David W. Russell, Publisher: Cold Spring Harbor Laboratory Press) 通过PAGE纯化方法纯化出来并乙醇沉淀。

[0451] DNA-靶标缀合

[0452] 材料

[0453] 1-乙基-3-[3-二甲基氨基丙基] 碳二亚胺盐酸盐 (EDC, 100mM 新鲜制备的储液, Aldrich E6383)

[0454] N-羟基琥珀酰亚胺 (s-NHS, 200mM 储液, Aldrich 56485)

[0455] 吗啉乙磺酸, MES 缓冲液 pH6.0, 500mM

[0456] β-巯基乙醇, 500mM 储液

[0457] 下链带有 5' 羧基的 PCR 产物 (见上)

[0458] 链霉亲和素蛋白 (AbCam78833) (靶标蛋白)

[0459] 操作步骤

[0460] 羧基修饰的寡核苷酸 (ssDNA) 或有末端羧基的 PCR 产物可在与靶标蛋白反应之前用 EDC/s-NHS 系统预激活 (参考激活多种羧基的实施例)。靶标蛋白暴露于 EDC 可使其非活动, 例如通过修饰酪氨酸或胱氨酸残基。因此, 在混合激活的 DNA-羧基与靶标蛋白之前, 残留的 EDC 可选通过添加例如终浓度为 20mM 的 β-巯基乙醇来淬灭。

[0461] 预激活混合物的实施例

[0462] 终浓度

[0463] 10μL DNA (ssDNA 或 dsDNA)

[0464] 10μL 500mM MES, pH6 100mM

[0465] 2.5μL 100mM EDC 5mM

[0466] 2.5μL 200mM s-NHS 10mM

[0467] 25μL 水

[0468] 总体积 50μL

[0469] 羧基激活可在 20°C 孵育 15-30min。

[0470] 可选:为了淬灭残留的EDC,加入2 μ L500mM的 β -巯基乙醇水溶液(终浓度20mM)。

[0471] 随后,s-NHS-激活的酯应当立即使用。

[0472] 预激活测试

[0473] 一份预激活混合物(25皮摩尔ssDNA)可用水和1%的溶于MeCN(淬灭激活的酯的伯胺)的苯乙胺稀释。该混合物可反应15min,然后用乙醇沉淀。溶解于100mM三乙基乙酸铵(TEAA,pH7)后,DNA产物可使用溶于100mM TEAA的梯度MeCN通过RP-HPLC进行分析。从初始保留时间到更高的保留时间的位移显示1)将羧基转化 $\rightarrow$ NHS酯以及2)随后与胺反应。

[0474] 与靶标蛋白反应

[0475] 检查酶运输缓冲液成分中的伯胺。该操作步骤应当允许在蛋白储存溶液中存在例如DTT或EDTA,但伯胺必须例如通过透析去除。伯胺会淬灭激活的酯从而破坏DNA-蛋白交联。

[0476] 否则,混合预激活混合物与酶尽可能浓缩以驱动化学反应。

[0477] 应使该步骤在20 $^{\circ}$ C孵育1-2h(在慢反应的情况下可以过夜)然后通过例如电泳纯化DNA-蛋白复合物。

[0478] 组合混合物

[0479] 由 10^6 个不同分子组成的多样化YoctoReactor文库和总共 10^9 个分子即结合双链(ds)DNA的潜在配体,掺入结合dsDNA(已知靶标结合物)的 10^6 个生物素分子。掺入文库与结合dsDNA的 10^7 个链霉亲和素分子(附加到DNA的靶标)混合。混合物中的分子在总体积3 μ L的结合缓冲液(PBS,0.05%吐温20,0.2%BSA中室温结合1小时达到平衡。链霉亲和素(所述靶标)的浓度大约6pM,其比所报告的生物素-链霉亲和素复合物的 $K_d \sim 10^{-14}$ mol/L高100倍以上,这意味着实际上在平衡时所有的生物素将会是链霉亲和素结合的。

[0480] PCR混合物

[0481] 67mM Tris-HCl(pH8.8),16.6mM NH_4SO_4 ,6.7mM MgCl_2 ,10mM2-巯基乙醇,1mM每种dNTP,7,5 μ M每种引物(vip157和vip660),45单位Taq聚合酶于总体积610 μ L

[0482] 微乳滴PCR

[0483] 由每毫升大约 5×10^9 个区室的2mL乳液用与Dressman等人.,2003中描述的方法类似的方法制备。分别结合到靶标(链霉亲和素)或配体(未结合或结合)的DNA片段有重叠区域导致所述三个片段向组合的片段的可能的组装,即通过每个混合物的组装PCR可生成两种组合的片段;片段(A)意味着链霉亲和素和生物素已存在于同一个区室而片段(B)意味着链霉亲和素和随机文库分子(不是生物素连接的)已存在于同一个区室。这两种片段可通过测序或限制性位点消化区分开。

[0484] 1mL和500 μ L(1.5mL)连续相通过溶解4.5%(vol/vol)司盘80(Span80)矿物油溶液制备,随后用0.40%(vol/vol)吐温80和0.05%(vol/vol)Triton X-100在5ml圆底Cryo小瓶中持续搅拌(1,400rpm),使用带有枢轴环的磁力搅拌棒搅拌。连续相在单独的5ml圆底Cryo小瓶中分成2次600 μ L。

[0485] 通过加入597 μ L PCR混合物至3 μ L结合混合物制得水相。300 μ L水相使用带有枢轴环的磁力搅拌棒持续搅拌(1400rpm)下逐渐加入(每15s10 μ L)所述两个连续相中的每一个中。在添加水相后,搅拌持续30min。

[0486] 乳液分装入96孔PCR板的大约20个孔中,每个包含100 μ L。扩增程序包括30个循环

步骤如下：起始变性92℃ 2min；dsDNA的20个循环变性92℃ 30s，引物退火和延伸72℃ 2min30s；及最终延伸72℃ 2min。

[0487] 破乳

[0488] 微乳滴PCR产生的DNA片段通过收集乳液并于25℃ 13,000g离心5min回收。油相弃去。残留的矿物油和表面活性剂通过下述两次提取从乳液中去除：加入1ml水饱和的乙醚，涡旋试管，并弃去上层（溶剂）相。

[0489] 预期的结果

[0490] 假定：相同大小的球形区室，区室中分子和复合物的随机分布，链霉亲和素-生物素复合物的100%结合，没有链霉亲和素-生物素复合物的解离，假定yR文库中没有或是只有很少的能与链霉亲和素充分亲和结合的结合物，PCR反应没有偏差，并且在PCR循环过程中“引物延伸”（只存在一个引物起始位点——没有共区室化）的反应效率为100%以及当两个引物起始位点存在时（共区室化）有10000倍的扩增。

[0491] 微乳滴PCR之后不同DNA种类的理论量为：

[0492] 链霉亲和素片段（100bp）： 10^7 个分子

[0493] 链霉亲和素片段（100nt）：20循环乘以 10^7 个分子= 2×10^8 个分子

[0494] YoctoReactor片段（250bp）： 10^9 个分子

[0495] YoctoReactor片段（250nt）：20循环乘以 10^9 个分子= 2×10^{10} 个分子

[0496] （最初生物素片段假定全部转变成下述融合种类）

[0497] 融合基因型——已知结合物：片段A（链霉亲和素-生物素DNA片段）（330bp）： 10000×10^6 个分子= 10^{10} （PCR扩增乘以生物素片段数）——上述假定共区室化中生物素片段结合靶标DNA的几率为1。

[0498] 融合基因型——未结合物：片段B（随机共区室化片段）（330bp）： $10000 \times 10^{-3} \times 10^9$ 个分子= 10^{10} （PCR扩增乘以随机共区室化的几率乘以初始yR文库分子数）——上述假定共区室化中未结合物的几率是#靶标分子/#区室= $10^7/10^{10}=10^{-3}$

[0499] 所以，该步骤后330bp片段的50%包含源自生物素的DNA。此外，所述330bp片段组成为约15ng并且组成全部双链DNA的绝大多数。单链DNA可按照制造商的说明通过ExoSAP-IT（Amersham Biosciences）很方便地去除并且330bp片段可通过标准步骤用PAGE很方便地纯化。

[0500] 使用454测序技术通过DNA测序分析富集物

[0501] 454测序引物起始位点使用末端A和B序列的引物通过PCR引入。所得到的片段通过PAGE纯化并使用制造商的操作步骤进行454DNA测序。

[0502] 分析DNA的序列并计算生物素基因型的频率。

[0503] 结论

[0504] 正如从上面可以理解的——通过本发明所述的方法人们可以得到1000倍的富集——从上述计算可以预期生物素基因型会观察到高频～二分之一而每个假定未结合yoctoreactor文库成员会观察到～平均二百万分之一。所以，与每个未结合物相比结合物可被富集1000倍。这将证明本新发明的可行性。

[0505] 实施例2：

[0506] 为遗传型-基因型（genotype-genotype）融合使用e连接通过共区室化富集——掺

入实验。

[0507] 概述参见附图1。

[0508] 方法

[0509] 所使用的DNA寡核苷酸

[0510] vip1481:GAACAGGACCGA

[0511] vip1471:CTGTTGATCTTGGGCGTAT

[0512] vip2513:ACGCCAAGATCGAACAG

[0513] Yotoreactor的生物素修饰的连续单链DNA类似物:x-CGCTAAtggtccctggcagtcctcc
TTAGCGgaccGACTCcTgctcGAAGACAACGGTgtttttacACCGTTGTCTTCgagcTgtACCTGCgcAAGTGCgttt
tacGCACTTgcGCAGGTacTgtGCATCgacAAGACCgtttttacGGTCTTgtcGATGCacTgGAGTCggtcCTGTTTCG
ATCTTGGGCGTAT (x=5'-生物素-TEG)

[0514] Yoctoreactor的生物素修饰的连续单链DNA类似物可通过更小的寡核苷酸组装,
基本上如Hansen等人.J.Am.Chem.Soc.,2009,131(3),pp1322-1327所描述,使用5'-生物素
TEG于5'位置修饰的寡核苷酸

[0515] vip2514:

[0516] x-GCCTTGCCAGCCCGCTCAGGGGAAGGACGTTGGTGTAGAAGCGTTCACCTGGTGAAGTAT (x=5'
羧基)

[0517] vip2515:ACTTCCACCAAGTGAACGCT

[0518] vip157:GCCTTGCCAGCCCGCTCAG

[0519] vip660:TGGTCCCTGGCAGTCT

[0520] yoctoreactor文库的制备

[0521] 文库按照Hansen等人.J.Am.Chem.Soc.,2009,131(3),pp1322-1327构建并作如下
修饰:

[0522] 1) 掺入(splint)寡核苷酸vip1481和寡核苷酸vip1471用于引入反向引物起始位
点

[0523] 2) 寡核苷酸vip2513用于通过引物延伸拆卸yoctoreactor

[0524] 附加到编码DNA的已知靶标结合物(生物素)的制备

[0525] 附加到双链编码DNA的已知靶标结合物(生物素)通过使用vip2513引物延伸拆卸
yoctoreactor的生物素修饰的连续单链DNA类似物来制备。(Hansen等人.J.Am.Chem.Soc.,
2009,131(3),pp1322-1327)。选择了引物,因此制备2nt的3'悬。3'悬会促进随后的连接。

[0526] 双链DNA片段按照标准程序(Molecular Cloning:A Laboratory Manual (3-
Volume Set),3rd Edition,2001-01by Joseph Sambrook,David W.Russell,Publisher:
Cold Spring Harbor Laboratory Press)通过PAGE纯化方法纯化,并乙醇沉淀。

[0527] 靶标DNA(TD)的制备

[0528] 操作步骤

[0529] 61-mer靶标DNA通过引物延伸制备并随后用10%TBE-PAGE天然凝胶纯化。选择了引
物,因此制备与yoctoreactor的3'悬的3'悬互补的2nt的3'悬。此外,通过磷酸化所述引物
实现连接。

[0530] 实例:

- [0531] 引物磷酸化
- [0532] 2 μ L (200皮摩尔) vip2515
- [0533] 20 μ L 10X缓冲液0 (50mM Tris-HCl (pH7.5at37 $^{\circ}$ C), 10mMMgCl₂,
- [0534] 100mM NaCl, 0.1mg/ml BSA)
- [0535] 2 μ L 100mM ATP (终浓度2mM)
- [0536] 10 μ L T4多聚核苷酸激酶 (100u)
- [0537] 66 μ L 无核酸酶的水
- [0538] 磷酸化反应在37 $^{\circ}$ C孵育30分钟, 并且激酶通过在75 $^{\circ}$ C孵育10分钟灭活
- [0539] DNA通过乙醇沉淀, 用70%的乙醇洗涤, 并用10 μ L TE缓冲液重悬。
- [0540] 引物延伸:
- [0541] 10 μ L 磷酸化的vip2515 (200皮摩尔)
- [0542] 10 μ L 10X缓冲液0 (New England Biolabs)
- [0543] 2 μ L 10mM dNTP混合物 (终浓度0.2mM的dATP, dCTP, dGTP和dTTP)
- [0544] 77 μ L 水
- [0545] 1 μ L (5u) Klenow (外-, 5u/ μ L)
- [0546] 反应进行15分钟, 并且双链DNA按照标准程序 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3-Volume Set), 3rd Edition, 2001-01 by Joseph Sambrook, David W. Russell, Publisher: Cold Spring Harbor Laboratory Press) 通过15%丙烯酰胺凝胶提取纯化并乙醇沉淀。
- [0547] DNA-靶标结合
- [0548] 材料
- [0549] 1-乙基-3-[3-二甲基氨基丙基] 碳二亚胺盐酸盐 (EDC, 100mM新鲜制备的储液, Aldrich E6383)
- [0550] N-羟基琥珀酰亚胺 (s-NHS, 200mM储液, Aldrich 56485)
- [0551] 吗啉乙磺酸, MES缓冲液 pH6.0, 500mM
- [0552] β -巯基乙醇, 500mM储液
- [0553] 下链带有5' 羧基的PCR产物 (见上)
- [0554] 链霉亲和素蛋白 (AbCam78833) (靶标蛋白)
- [0555] 操作步骤
- [0556] 羧基修饰的寡核苷酸 (ssDNA) 或有末端羧基的PCR产物可在与靶标蛋白反应之前用EDC/s-NHS系统预激活 (参考激活多种羧基的实施例)。靶标蛋白暴露于EDC可使其非活动, 例如通过修饰酪氨酸或胱氨酸残基。因此, 在混合激活的DNA-羧基与靶标蛋白之前, 残留的EDC可选通过添加例如终浓度为20mM的 β -巯基乙醇来淬灭。
- [0557] 预激活混合物的实施例
- [0558] 终浓度
- [0559] 10 μ L DNA (ssDNA或dsDNA)
- [0560] 10 μ L 500mM MES, pH6 100mM
- [0561] 2.5 μ L 100mM EDC 5mM
- [0562] 2.5 μ L 200mM s-NHS 10mM

[0563] 25 μ L 水

[0564] 总体积50 μ L

[0565] 羧酸激活可在20 $^{\circ}$ C孵育15-30min。

[0566] 可选:为了淬灭残留的EDC,加入2 μ L500mM的 β -巯基乙醇水溶液(终浓度20mM)。

[0567] 随后,s-NHS-激活的酯应当立即使用。

[0568] 预激活测试

[0569] 一份预激活混合物(25皮摩尔ssDNA)可用水和1%的溶于MeCN(淬灭激活的酯的伯胺)的苯乙胺稀释。该混合物可反应15min,然后用乙醇沉淀。溶解于100mM三乙基铵乙酸盐(TEAA,pH7)后,DNA产物可使用溶于100mM TEAA的梯度MeCN通过RP-HPLC进行分析。从初始保留时间到更高的保留时间的位移显示1)羧基转化 $\rightarrow$ NHS酯以及2)随后与胺反应。

[0570] 与靶标蛋白反应

[0571] 检查酶运输缓冲液成分中的伯胺。该操作步骤应当允许在蛋白储存溶液中存在例如DTT或EDTA,但伯胺必须例如通过透析去除。伯胺会淬灭激活的酯从而破坏DNA-蛋白交联。

[0572] 否则,混合预激活混合物与酶尽可能浓缩以驱动化学反应。

[0573] 应使该步骤在20 $^{\circ}$ C孵育1-2h(在慢反应的情况下可以过夜)然后通过例如电泳纯化DNA-蛋白复合物。

[0574] 组合混合物

[0575] 由 10^6 个不同分子组成的多种YoctoReactor文库和总共 10^9 个分子即结合双链(ds)DNA的潜在配体,掺入结合dsDNA(已知靶标结合物)的 10^6 个生物素分子。掺入文库与结合dsDNA的 10^7 个链霉亲和素分子(附加到DNA的靶标)混合。混合物中的分子在总体积3 μ L的结合缓冲液(PBS,0.05%吐温20,0.2%BSA中室温结合1小时达到平衡。链霉亲和素(所述靶标)的浓度大约6pM,其比所报告的生物素-链霉亲和素复合物的 $K_d \sim 10^{-14}$ mol/L高100倍,这意味着实际上在平衡时所有的生物素将会是链霉亲和素结合的。

[0576] 连接混合物

[0577] 1 $\times$ Tag连接缓冲液(20mM Tris-HCl,25mM醋酸钾,10mM醋酸镁,1mM NAD,10mM二硫苏糖醇0.1%Triton X-100pH7.6@25 $^{\circ}$ C)加入2 μ L(40u/ μ L)Taq DNA连接酶于总体积610 μ L。

[0578] 67mM Tris-HCl(pH8.8),16.6mM NH_4SO_4 ,6.7mM MgCl_2 ,10mM2-巯基乙醇,1mM每种dNTP,7,5 μ M每种引物(vip157和vip660),45单位Taq聚合酶于总体积610 μ L

[0579] 乳液中连接

[0580] 由每毫升大约 5×10^9 个区室的2mL乳液用与Dressman等人.,2003中描述的方法类似的方法制备。分别结合到靶标(链霉亲和素)或配体(未结合或结合)的DNA片段可连接到一条链上,即通过连接可生成两种组合片段;片段(A)意味着链霉亲和素和生物素已存在于同一个区室而片段(B)意味着链霉亲和素和随机文库分子(不是生物素连接的)已存在于同一个区室。这两种片段可通过测序或限制性位点消化区分开。

[0581] 1mL和500 μ L(1.5mL)连续相通过溶解4.5%(vol/vol)司盘80(Span80)矿物油溶液制备,随后用0.40%(vol/vol)吐温80和0.05%(vol/vol)Triton X-100在5mL圆底Cryo小瓶中持续搅拌(1,400rpm),使用带有枢轴环的磁力搅拌棒搅拌。连续相在单独的5mL圆底Cryo小瓶中分成2次600 μ L并保持保持冰冷。通过加入597 μ L冰冷的连接混合物至3 μ L结合混合物

制得水相。300 μ L水相使用带有枢轴环的磁力搅拌棒持续搅拌(1400rpm)下逐渐加入(每15s10 μ L)所述两个连续相中的每一个中。在添加水相后,搅拌在冰冷条件下持续30min。

[0582] 乳液加热到45℃并连接一小时。

[0583] 破乳

[0584] 连接混合物每个加入30 μ L500mM EDTA并简单涡旋。DNA片段通过收集乳液并于25℃13,000g离心5min回收。弃去油相。残留的矿物油和表面活性剂通过下述两次提取从乳液中去除:加入1ml水饱和的乙醚,涡旋试管,并弃去上层(溶剂)相。

[0585] 所述DNA通过沉淀浓缩,按大小在变性10%聚丙烯酰胺凝胶上分离并且所述连接片段按照标准程序(Molecular Cloning:A Laboratory Manual(3-Volume Set),3rd Edition,2001-01by Joseph Sambrook,David W.Russell,Publisher:Cold Spring Harbor Laboratory Press)通过PAGE纯化方法纯化出来,乙醇沉淀并重悬于10 μ L TE缓冲液。

[0586] 所连接的DNA的扩增

[0587] 最后,所连接的片段通过PCR扩增

[0588] 实例:

[0589] PCR混合物:

[0590] 10 μ L纯化的连接DNA

[0591] 50 μ L2X PCR标准混合物(40mM Tris-HCl,20mM(NH₄)₂SO₄,20mM KCl,16mM MgSO₄,0.2%Triton X-100,0.2mg/mLBSA,0.4mM每种dATP,dTTP,dGTP和dCTP,pH8.8@25℃)

[0592] 10 μ L 5M甜菜碱(终浓度0.5M)

[0593] 1 μ L 50 μ M vip167(终浓度0.5 μ M)

[0594] 1 μ L 50 μ M vip660(终浓度0.5 μ M)

[0595] 1 μ L (2u/ μ L)Vent(外-)聚合酶

[0596] 27 μ L 水

[0597] 所述混合物在PCR仪上应用如下程序进行热循环:

[0598] 92℃2min,25个循环的(92℃30秒,72℃1min),72℃2min。

[0599] 所得DNA片段文库测序,并且计算结合片段的富集。

[0600] 预期的结果

[0601] 假定:相同大小的球形区室,区室中分子和复合物的随机分布,链霉亲和素-生物素复合物的100%结合,没有链霉亲和素-生物素复合物的解离,假定yR文库中没有或是只有很少的能与链霉亲和素充分亲和结合的结合物,连接反应或随后的PCR反应没有偏差,——没有共区室化)在连接过程中以及当文库和靶标DNA片段共区室化时有100反应效率。

[0602] 微乳滴PCR之后,不同连接DNA种类的理论量为:

[0603] (最初生物素片段假定全部转变成下述融合种类)

[0604] 连接基因型——已知结合物:片段A(链霉亲和素-生物素DNA片段)(250bp):10⁶个分子——上述假定共区室化中生物素片段结合靶标DNA的几率为1。

[0605] 融合基因型——未结合物:片段B(随机共区室化片段)(250bp):10⁻³×10⁹个分子=10⁶(随机共区室化的几率乘以初始yR文库分子数)——上述假定共区室化中未结合物的几率是#靶标分子/#区室=10⁷/10¹⁰=10⁻³

[0606] 最终PCR扩增预期两种分子效率相同,所以,该步骤后330bp片段的50%包含源自生物素-链霉亲和素结合的DNA。

[0607] 使用454测序技术通过DNA测序分析富集物

[0608] 454测序引物起始位点使用末端A和B序列的引物通过PCR引入。所得到的片段通过PAGE纯化并使用制造商的操作步骤进行454DNA测序。

[0609] 分析DNA的序列并计算生物素基因型的频率。

[0610] 结论

[0611] 正如从上面可以理解的——通过本发明所述的方法人们可以得到1000倍的富集——从上述计算可以预期生物素基因型会观察到高频~二分之一而每个假定未结合yoctoreactor文库成员会观察到~平均二百万分之一。所以,与每个未结合物相比结合物可被富集1000倍。这将证明本新发明的可行性。

[0612] 下述实施例:

[0613] 所有下述实施例基于上述公开的技术信息(例如上述实施例)加上基于本领域技术人员的公知常识进行。

[0614] 实施例3:

[0615] 为遗传型-基因型(genotype-genotype)融合使用e连接通过共区室化富集

[0616] ECC的基本原理,结合伙伴和作为本发明的结果的它们附加的DNA的融合的共区室化,已被使用生物素和链霉亲和素(SA)作为结合伙伴所证明。生物素DNA缀合物(yR_生物素)使用SA结合DNA(SA_TD001)作为靶标进行ECC。作为阴性对照,ECC用与生物素预孵育的SA_TD001作为靶标来进行平行实验。概述参见附图2。

[0617] 方法

[0618] 所应用的DNA寡核苷酸:

[0619] 应用于yoctoreactor类似物的连续链DNA(Hansen等人.J. Am. Chem. Soc., 2009, 131 (3), pp1322-1327):

[0620]

CGCTAAtgggtccctggcagttctccTTAGCGgaccGACTCcTgctcGAAGACAACGGTgtttttacACCGTTGTCTTCg
agcTgtACCTGCgcAAGTGCgtttttacGCACTTgcGCAGGTacTgtGCATCgacAAGACCgtttttacGGTCTTgtcG
ATGCacTgGAGTCggtcCTGTTTCGATCTTGGGCGTAT

[0621] vip1481:GAACAGGACCGA

[0622] vip1471:CTGTTTCGATCTTGGGCGTAT

[0623] 应用于yR_生物素

[0624] vip1461:ATACGCCCAAGATCGAACAG

[0625] vip2501:x-TGGTCCCTGGCAGTCTCC(x=生物素-TEG)

[0626] 应用于微乳滴PCR

[0627] vip157:GCCTTGCCAGCCCGCTCAG

[0628] vip660:TGGTCCCTGGCAGTCT

[0629] 应用于TD001

[0630] vip2500:x-GCCTTGCCAGCCCGCTCAG(x=羧基修饰)

[0631] vip2502:CTGTTTCGATCTTGGGCGTAT

- [0632] vip2512:
[0633] GCCTTGCCAGCCCGCTCAGGCAAGTCTTACAGCCGATCAGTCTTCCTTGGTGCCTGAAG
[0634] vip2507:
[0635] CTGTTTCGATCTTGGGCGTATTGTTTTAGCTGCCCCAACTCCTTCAGGCACCAAGGAAGAC
[0636] 应用于营救PCR
[0637] vip2549:GCAAGTCTTACAGCCGATCA
[0638] vip660:TGGTCCCTGGCAGTCT
[0639] yR的制备
[0640] yoctoreactor类似物的连续链DNA如实施例1中描述的构建
[0641] yR_生物素的制备
[0642] 附加到yR的已知靶标结合物(生物素)的制备如实施例1中描述的构建
[0643] 靶标DNA (TD001)的制备
[0644] TD001如实施例1中描述的构建除了寡核苷酸vip2507用于替换Vip2504。
[0645] 材料
[0646] MOPS3-(N-吗啉代)丙磺酸(Sigma-Aldrich)
[0647] 有机硅聚醚/环戊硅氧烷(Dow Corning,DC5225C)
[0648] 环戊硅氧烷/三甲基甲硅烷氧基硅酸(Dow Corning,DC749)
[0649] AR20硅油(Sigma-Aldrich)
[0650] 1-乙基-3-[3-二甲基氨基丙基] 碳二亚胺盐酸盐(EDC,100mM新鲜制备的储液,Aldrich E6383)
[0651] N-羟基硫代琥珀酰亚胺(s-NHS,200mM储液,Aldrich56485)
[0652] 吗啉乙磺酸,MES缓冲液pH6.0,500mM
[0653] β -巯基乙醇,500mM储液
[0654] 下链带有5' 羧基的PCR产物(见上)
[0655] 链霉亲和素蛋白(AbCam78833)(靶标蛋白)
[0656] 迷你Slide-A-lyzer(Pierce)
[0657] TissueLyzer II(Qiagen)
[0658] DNA-靶标结合
[0659] 预激活
[0660] 预激活通过混合5.4 μ l TD001 [9.3 μ M] 和1 μ l MOPS pH6 [1M],1 μ l EDC [50mM],1 μ l s-NHS [100mM] 和1.6 μ l水。
[0661] 羧酸激活于20℃孵育30min。
[0662] 为了淬灭残留的EDC,加入1 μ l250mM β -巯基乙醇的水溶液。
[0663] 与靶标蛋白反应
[0664] 缀合之前,SA按照制造商说明(Pierce)使用迷你Slide-A-Lyzer透析装置用透析缓冲液(10mM MOPS(pH8),50mM NaCl)30min透析2次。
[0665] 5 μ l透析的SA [58 μ M] 加至1.6 μ l MOPS pH6 [1M],1.6 μ l NaCl水溶液 [1M] 和11 μ l TD001 [4.6 μ M]。反应于20℃反应2小时。
[0666] 为了淬灭反应,加入2 μ l Tris pH8 [1M]。SA-TD001缀合物用PAGE在6%TBE胶上于

200V运行40min从反应物中分离。

[0667] 条带在500 μ l提取缓冲液(50mM Tris pH8,150mM NaCl,0.1%吐温20)中4℃提取3次(30min/o.n./30min)。

[0668] 残留的胶通过过滤去除,并且样品按照制造商说明(Millipore)在Microcon YM30装置中浓缩。缀合物的浓度使用Picogreen按照制造商说明(Molecular Probes)通过测定DNA浓度估计为0.38 μ M。

[0669] 结合(association)反应(结合(binding)反应)

[0670] 在yR_生物素和SA_TD001结合之前,6e8个分子SA_TD001分子/ μ l于总体积50 μ l结合缓冲液(10mM Tris-HCl(pH7.8),0.05%Triton-X100.)在存在或不存在1 μ M生物素(6e11分子生物素/ μ l)的情况下于20℃孵育30min。

[0671] 下述结合反应是在结合缓冲液中进行的:

[0672] 1) 3e8yR_生物素分子/ μ l和3e8SA_TD001分子/ μ l于总体积50 μ l,使用没有与生物素预孵育的SA_TD001

[0673] 2) 3e8yR_生物素分子/ μ l和3e8SA_TD001分子/ μ l于总体积50 μ l,使用与生物素预孵育的SA_TD001。

[0674] 结合反应于20℃孵育1h并随后稀释至浓度为3e6分子/ μ l的yR_生物素和3e6分子/ μ l的SA_TD001于结合缓冲液中。

[0675] 微乳滴PCR(ePCR)

[0676] 组装yR和TD001并且在乳液中使用PCR扩增yR_TD001融合分子。

[0677] 连续相

[0678] 连续相按照描述(Turner和Hurles,Nat Protoc.2009;4(12):1771-1783)的制备。

[0679] 每个反应制备1200 μ l连续相

[0680] 480 μ l有机硅聚醚/环戊硅氧烷(DC5225C)

[0681] 360 μ l环戊硅氧烷/三甲基甲硅烷氧基硅酸(DC749)

[0682] 360 μ l AR20硅油

[0683] PCR水相

[0684] 每个反应制备600 μ l PCR水相:

[0685] 60 μ l Pfu缓冲液(10x)

[0686] 12 μ l BSA(50mg/ml)

[0687] 12 μ l dNTP(10mM)

[0688] 3 μ l Vip157(100 μ M)

[0689] 3 μ l Vip660(100 μ M)

[0690] 4 μ l Pfu-turbo(2.5u/ μ l)

[0691] 446 μ l水

[0692] 60 μ l模板,所得到的yR_生物素和SA_TD001浓度为每个3e5个分子/ μ l

[0693] 乳化

[0694] 在2ml的Eppendorf管中,每个反应加入1000 μ l连续相和500 μ lPCR相以及5mm钢珠

[0695] 反应通过在Tissulyser II于20℃30Hz混合乳化8min

[0696] 100 μ l乳液加入每个PCR管中并且混合物在PCR仪上应用如下程序进行热循环:

[0697] 92℃2min,30个循环(92℃30秒,55℃1min和72℃1.5min),72℃5min。

[0698] DNA回收

[0699] 每个PCR管加入100μl1-丁醇破乳。每个条件取8个PCR管的内容物收集到一起并加入600μl NaCl水溶液[4M]。通过最高速涡旋10sec来混合内容物,并且在14000g离心1min后去除有机相。另外800μl1-丁醇加入所收集的PCR产物并重复涡旋和离心步骤。用1-丁醇再一次重复提取。

[0700] DNA按照制造商说明通过PCR纯化柱(Macherey-Nagel)进一步纯化。每个条件用50μl洗脱缓冲液洗脱

[0701] 所洗脱的DNA在营救PCR之前用稀释缓冲液(10mM Tris(pH7.8),20mM NaCl,0.1% Triton-X100)稀释20倍。

[0702] 营救PCR

[0703] yR_TD001融合分子的扩增

[0704] 每个反应的PCR混合物:

[0705] 50μL2X PCR标准混合物(40mM Tris-HCl,20mM(NH₄)₂SO₄,20mM KCl,16mM MgSO₄,0.2%Triton X-100,0.2mg/mLBSA,0.4mM每种dATP,dTTP,dGTP和dCTP,pH8.8于25℃)

[0706] 1μL 50μM vip2549(终浓度0.5μM)

[0707] 1μL 50μM vip660(终浓度0.5μM)

[0708] 1μL(2u/μL)Vent(外-)聚合酶

[0709] 10μL 模板

[0710] 37μL 水

[0711] 所述混合物在PCR仪上应用如下程序进行热循环:

[0712] 92℃2min,20个循环的(92℃30秒,55℃1min并且72℃1.5min),72℃5min。

[0713] 结果

[0714] 所述融合产物yR_TD001预测长度245bp。使DNA产物于10%TBE PAGE于200V呈现40min。结果显示,如果进行没有与生物素的预孵育(泳道1)的结合反应则存在预期大小的条带,如果已经与生物素预孵育(泳道2)的分子进行结合反应则缺失条带,参见附图4。

[0715] 结论

[0716] 该结果证明结合伙伴和作为本发明的结果的它们附加的DNA的融合的共区室化。

[0717] 实施例4:

[0718] 为遗传型-基因型(genotype-genotype)融合使用重叠微乳滴PCR通过共区室化富集——掺入(Spiking)实验

[0719] ECC已通过yR_生物素的富集证实,该yR_生物素使用SA_TD001作为靶标掺入多种yR文库。作为阴性对照,ECC用与生物素预孵育的SA_TD001作为靶标来进行平行实验。

[0720] 方法

[0721] 所应用的DNA寡核苷酸:

[0722] 应用于yoctoreactor类似物的连续链DNA(Hansen等人.J.Am.Chem.Soc.,2009,131(3),pp1322-1327):

[0723]

CGCTAAtggtccctggcagtcctccTTAGCGgaccGACTCcTgctcGAAGACAACGGTgttttacACCGTTGTCTTCg

agcTgtACCTGCgcAAGTGCgttttacGCACTTgcGCAGGTacTgtGCATCgacAAGACCgttttacGGTCTTgtcG
ATGCacTgGAGTCggtcCTGTTTCGATCTTGGGCGTAT

- [0724] vip1481:GAACAGGACCGA
- [0725] vip1471:CTGTTTCGATCTTGGGCGTAT
- [0726] 应用于yR_生物素
- [0727] vip1461:ATACGCCCAAGATCGAACAG
- [0728] vip2501:x-TGGTCCCTGGCAGTCTCC(x=生物素-TEG)
- [0729] 应用于微乳滴PCR
- [0730] vip157:GCCTTGCCAGCCCGCTCAG
- [0731] vip660:TGGTCCCTGGCAGTCT
- [0732] 应用于TD001
- [0733] vip2500:x-GCCTTGCCAGCCCGCTCAG(x=羧基修饰)
- [0734] vip2502:CTGTTTCGATCTTGGGCGTAT
- [0735] vip2512:
- [0736] GCCTTGCCAGCCCGCTCAGGCAAGTCTTACAGCCGATCAGTCTTCCTTGGTGCCTGAAG
- [0737] vip2507:
- [0738] CTGTTTCGATCTTGGGCGTATTGTTTTAGCTGCCCCAACTCCTTCAGGCACCAAGGAAGAC
- [0739] 应用于营救PCR
- [0740] vip2549:GCAAGTCTTACAGCCGATCA
- [0741] vip660:TGGTCCCTGGCAGTCT
- [0742] 应用于yR多种文库的PCR
- [0743] vip341:TGGTCCCTGGCAGTCTCC
- [0744] vip1461:ATACGCCCAAGATCGAACAG
- [0745] 应用于454PCR
- [0746] vip2593:
- [0747] CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGGTCTTCCTTGGTGCCTGAAG
- [0748] vip2465:
- [0749] CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAGGTTGGTCCCTGGCAGTCTCC
- [0750] vip2467:
- [0751] CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGATCGTGGTCCCTGGCAGTCTCC
- [0752] vip2468:
- [0753] CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGATGCTGGTCCCTGGCAGTCTCC
- [0754] vip2469:
- [0755] CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCACTTGGTCCCTGGCAGTCTCC
- [0756] vip2470:
- [0757] CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCAGATGGTCCCTGGCAGTCTCC
- [0758] vip2471:
- [0759] CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCCATTGGTCCCTGGCAGTCTCC
- [0760] yR_生物素的制备

- [0761] yR_生物素的制备如实施例1所述。
- [0762] 多种yoctoreactor文库的制备
- [0763] yR文库基本依照(Hansen等人.J.Am.Chem.Soc.,2009,131(3),pp1322-1327)所述构建。多种yR文库通过下述方法进行PCR扩增;
- [0764] 每个反应的PCR混合物:
- [0765] 50 μ L 2X PCR标准混合物(40mM Tris-HCl,20mM(NH₄)₂SO₄,20mM KCl,16mM MgSO₄,0.2%Triton X-100,0.2mg/mLBSA,0.4mM每种dATP,dTTP,dGTP和dCTP,pH8.8于25 $^{\circ}$ C)
- [0766] 10 μ L 5M甜菜碱(终浓度0.5M)
- [0767] 1 μ L 50 μ M vip341(终浓度0.5 μ M)
- [0768] 1 μ L 50 μ M vip1461(终浓度0.5 μ M)
- [0769] 1 μ L (10⁸摩尔)的yoctoreactor类似物的连续链DNA
- [0770] 1 μ L (2u/ μ L)Vent(外-)聚合酶
- [0771] 36 μ L 水
- [0772] 所述混合物在PCR仪上应用如下程序进行热循环:
- [0773] 92 $^{\circ}$ C 2min,15个循环的(92 $^{\circ}$ C 30秒,72 $^{\circ}$ C 1min),72 $^{\circ}$ C 2min。
- [0774] 185bp DNA片段按照标准程序(Molecular Cloning:A Laboratory Manual(3-Volume Set),3rd Edition,2001-01by Joseph Sambrook,David W.Russell,Publisher:Cold Spring Harbor Laboratory Press)通过PAGE纯化方法纯化出来并乙醇沉淀。
- [0775] 结合(association)反应(结合(binding)反应)
- [0776] 结合反应如实施例3中所述的进行,进行如下修改。
- [0777] 在yR_生物素和SA_TD001结合之前,6e8个分子SA_TD001分子/ μ l于总体积50 μ l结合缓冲液在存在或不存在1 μ M生物素(6e11分子生物素/ μ l)的情况下于20 $^{\circ}$ C孵育30min。
- [0778] 下述结合反应是在结合缓冲液中进行的:
- [0779] 1)3e7yR_生物素分子/ μ l和3e8SA_TD001分子/ μ l于总体积50 μ l,使用没有与生物素预孵育的SA_TD001
- [0780] 2)3e7yR_生物素分子/ μ l和3e8SA_TD001分子/ μ l于总体积50 μ l,使用与生物素预孵育的SA_TD001。
- [0781] 结合反应于20 $^{\circ}$ C孵育1h。
- [0782] 在下文中设置如下条件:
- [0783] A)不与生物素预孵育:结合(binding)反应(1)稀释1000倍至浓度为3e4分子/ μ l的yR_生物素和3e5分子/ μ l的SA_TD001于含有3e7文库/ μ l(终浓度)的结合缓冲液中。
- [0784] B)与生物素预孵育:结合(association)反应(2)稀释1000倍至浓度为3e4分子/ μ l的yR_生物素和3e5分子/ μ l的SA_TD001于含有3e7文库/ μ l(终浓度)的结合缓冲液中。
- [0785] C)没有yR-生物素:制备包含3e7文库/ μ l和3e5分子/ μ l的SA_TD001于结合缓冲液的结合缓冲液。
- [0786] 微乳滴PCR
- [0787] 微乳滴PCR如实施例3所述进行,但按一式两份进行并有40个PCR循环
- [0788] DNA回收
- [0789] 破乳如实施例3所述进行,但通过收集16个PCR管的乳液并每个条件用100 μ l洗脱

缓冲液洗脱

[0790] 营救PCR

[0791] 营救PCR如实施例3所述进行,但PCR扩增按如下如循环:92℃2min,20个循环的(92℃30秒,72℃1.5min),72℃5min。

[0792] 454-测序的制备

[0793] 本发明的yR_TD001融合分子的PCR扩增操作步骤包括454序列标签进入序列产生预期大小309bp。对每个条件和重复应用一个独特(unique)的正向引物。

[0794] 每个反应的PCR混合物:

[0795] 50μL 2X PCR标准混合物(40mM Tris-HCl,20mM(NH₄)₂SO₄,20mM KCl,16mM MgSO₄,0.2%Triton X-100,0.2mg/mLBSA,0.4mM每种dATP,dTTP,dGTP和dCTP,pH8.8于25℃)

[0796] 10μL 5M 甜菜碱(终浓度0.5M)

[0797] 1μL 50μM vip2593(终浓度0.5μM)

[0798] 2μL 25μM vip2465,vip2467,vip2468,vip2469,vip2470或vip2471(终浓度0.5μM)

[0799] 5μL 从每个条件和重复的模板

[0800] 1μL (2u/μL) Vent (外-) 聚合酶

[0801] 31 μL 水

[0802] DNA按照制造商说明通过PCR纯化柱(Macherey-Nagel)纯化并且DNA浓度使用分光光度计(Eppendorf)测定。浓度通过在10%TBE胶上200V运行40min的产物经过比较目视检查来调节。收集DNA产物使所有的DNA产物以相似量的DNA代表。所收集的DNA在10%TBE PAGE胶上运行并且大约309bp的DNA片段按照标准程序(Molecular Cloning:A Laboratory Manual(3-Volume Set),3rd Edition,2001-01 by Joseph Sambrook,David W.Russell, Publisher:Cold Spring Harbor Laboratory Press)通过PAGE纯化方法纯化,并乙醇沉淀。

[0803] 454-测序

[0804] 454-测序按照(Hansen等人.J.Am.Chem.Soc.,2009,131(3),pp1322-1327)所述进行。

[0805] 结果

[0806] 测序结果显示,参见附图5,虽然yR_生物素以比yR文库低1000倍的浓度掺入到yR文库,yR_生物素计得的百分比为:

[0807] 37.6%以及条件(A)的重复为32%,即SA_TD001不与生物素预孵育的富集。

[0808] 0.30%以及条件(B)的重复为0.72%,即SA_TD001与生物素预孵育的富集。

[0809] 0.02%以及条件(C)的重复为0.05%,即相同样品中没有yR_生物素的富集。

[0810] 因此,观察到使用SA_TD001作为靶标有超过300倍的yR_生物素的富集。相反,阴性对照靶标,SA_TD001与生物素预孵育,提供了3-7倍富集。

[0811] 结论

[0812] ECC已通过yR_生物素的富集证实,该yR_生物素使用SA_TD001作为靶标掺入多种yR文库。

[0813] 实施例5:

- [0814] 为基因型-基因型融合使用e连接通过共区室化富集
- [0815] ECC的基本原理,结合伙伴和作为本发明的结果的它们附加的DNA的融合的共区室化,已被使用脱硫生物素(desBio)和链霉亲和素(SA)作为结合伙伴所证明。脱硫生物素DNA结合物(yR_desBio)使用SA结合DNA(SA_TD002)作为靶标经受ECC。作为阴性对照ECC用与生物素预孵育的SA_TD002作为靶标来进行平行实验。
- [0816] 概述参见附图1。
- [0817] 方法
- [0818] 所使用的DNA寡核苷酸描述于实施例2中。此外,应用如下的:
- [0819] 应用于用脱硫生物素标记的yR(desBio_yR):
- [0820] vip2815:x-TGGTCCCTGGCAGTCTCC(x=脱硫生物素)
- [0821] vip2535:
- [0822] CACCACGATGGCAATGCATTCTTCGCTGCCATTCTG
- [0823] 应用于营救PCR:
- [0824] vip660:TGGTCCCTGGCAGTCT
- [0825] vip2824:CGATGTCCTGAGGTGGAAGT
- [0826] 应用于‘清道夫DNA’:
- [0827] vip2554:
- [0828] GGCAAGTGATTGTCCATGTGCATGAGAAGAGGCCACATT
- [0829] vip2555:CACATGGACAATCACTTGCC
- [0830] vip2556:AATGTGGGCCTCTTCTCATG
- [0831] 应用于TD002
- [0832] vip2528:TCCACATCCTCCAGTTCA
- [0833] vip2529:
- [0834] ACTTCCACCTCAGGACATCGAGCTGGAGCTTGCTGTTAGC
- [0835] vip2530:
- [0836] AGGTTCGCTCCCTCCTTAAGTCAGGAGGATGTGACACCAA
- [0837] vip2531:
- [0838] CGATGTCCTGAGGTGGAAGTTGAACTGGAGGATGTGGACA
- [0839] vip2532:
- [0840] CTTAAGGAGGGAGCGAACCTGCTAACAGCAAGCTCCAGCT
- [0841] vip2558:x-TTGGTGTACATCCTCCTGA(x=C6-氨基修饰)
- [0842] 用脱硫生物素标记的yR(desBio_yR)的制备
- [0843] 通过引物vip2815和vip2535与yoctoreactor文库序列的连续链DNA类似物作为模板进行PCR将5'-脱硫生物素引入yR类似物(Hansen等人.J.Am.Chem.Soc.,2009,131(3),pp1322-1327)。为了生成合适连接到结合链霉亲和素的靶标DNA的2bp悬,PCR产物用BseMI消化。
- [0844] 靶标DNA(TD002)的制备
- [0845] 操作步骤
- [0846] TD002(具有GA核苷酸悬和下链具有5'羧基的98bp双链DNA)通过磷酸化的寡核苷

酸vip2528、vip2529、vip2530、vip2531和vip2532以及未磷酸化的寡核苷酸vip2558连接组装而成。T4多聚核苷酸激酶的磷酸化和T4DNA连接酶的连接按照制造商说明 (Fermentas) 进行。双链DNA片段按照标准程序 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3-Volume Set), 3rd Edition, 2001-01 by Joseph Sambrook, David W. Russell, Publisher: Cold Spring Harbor Laboratory Press) 通过PAGE纯化方法纯化出来并乙醇沉淀。连接之前, 修饰vip2559以具有5' 羧基。因此, 简单C6-氨基修饰通过辛二酸二琥珀酰亚胺酯 (DSS, C8-di-NHS酯, Pierce#21580) 与羧酸互换。寡核苷酸用40mMDSS的HEPBS缓冲液pH9处理, 水-NMP1:1混合过夜, 随后通过LiOH处理以水解剩余的NHS酯。中和和沉淀后, 羧基修饰的寡核苷酸粗品不用进一步修饰即可使用。

[0847] 结合链霉亲和素的靶标DNA (SA_TD002) 的制备

[0848] SA_TD002如实施例3所述的方法进行制备

[0849] 结合 (association) 反应 (结合 (binding) 反应)

[0850] 材料

[0851] 1M Tris-HCl, pH7.5

[0852] 4M NaCl

[0853] 10% Triton X-100

[0854] 10 μ M生物素

[0855] SA_TD002

[0856] desBio_yR

[0857] 操作步骤

[0858] 在总体积0.5 μ l结合缓冲液 (10mM Tris-HCl (pH7.5), 50mM NaCl, 0.1% Triton), 3E8desBio_yR分子在存在或不存在1 μ M生物素 (抑制剂) 的情况下与1.4E9分子SA_TD002混合。分子结合在冰上通过孵育结合混合物1小时获得。

[0859] 解离反应 (稀释)

[0860] 材料

[0861] 标准连接缓冲液:

[0862] 50mM Tris-HCl, pH7.5

[0863] 50mM NaCl

[0864] 0.1% Triton X-100

[0865] 0.75 μ M BSA

[0866] 9mM KCL

[0867] 4.5%甘油

[0868] 0.2mM EDTA

[0869] 1mM DTT

[0870] 2mM ATP

[0871] 1 μ M T4DNA连接酶 (Fermentas)

[0872] 0.01 μ M '清道夫DNA' (40-mer缺口dsDNA片段):

[0873] 包含一个单缺口的40-mer dsDNA片段是通过组装寡核苷酸vip2554、磷酸化的vip2555和vip2556制备的。

[0874] 如实施例3所述方法制备连续相

[0875] 带螺旋盖的2mL微管

[0876] 操作步骤

[0877] 0.12 μ L体积的结合混合物转到2mL Eppendorf管的盖子上,管中包含600 μ L含有1 μ M T4DNA连接酶的水相(标准连接缓冲液)。解离反应通过混合结合混合物与水相起始,所述混合通过颠倒管子两次随后涡旋管子10秒进行。在微量离心机中短暂离心之后,500 μ L的混合物转到含有1mL连续相的冰冷的2mL微管并在剩余的时间中将其置于冰上最终获得2分钟的解离时间。

[0878] 乳化

[0879] 材料

[0880] 诱导缓冲液:

[0881] 50mM Tris-HCl, pH7.5

[0882] 50mM NaCl

[0883] 0.1%Triton X-100

[0884] 1.5 μ M BSA

[0885] 10mM KCL

[0886] 5%甘油

[0887] 0.2mM EDTA

[0888] 1mM DTT

[0889] 2mM ATP

[0890] 135mM MgCl₂

[0891] 操作步骤

[0892] 解离反应终止于起始之后恰好2min,通过混合连续相(1mL)和水相(0.5mL)在Precellys24(Bertin Technologies)上5500rpm3x20秒(20秒运行之间暂停10秒)进行乳化。平行实验中,包含镁但没有连接酶激活T4DNA连接酶的诱导乳液通过1mL连续相和0.5mL包含135mM MgCl₂的水相(诱导缓冲液)在5500rpm3x20秒乳化制备。

[0893] 乳液中连接

[0894] 操作步骤

[0895] 包含MgCl₂的150 μ L体积的诱导-乳液加入每个乳液并在室温旋转一个小时混合以激活T4DNA连接酶。desBio_yR和SA_TD002在乳液中的连接通过将乳液(1650 μ L)在加热块中于16℃和300rpm孵育16小时进行。

[0896] 破乳和DNA回收

[0897] 材料

[0898] 1-丁醇

[0899] 异丙醇

[0900] 100%乙醇

[0901] 100bp没有限制的DNA

[0902] PCR纯化(clean-up)试剂盒(NucleoSpin ExtractII, Macherey-Nagel)

[0903] 10%Triton X-100

[0904] 操作步骤

[0905] 连接反应通过将管子在65℃孵育30分钟随后在微量离心机中短暂离心停止。为了破乳,一半体积的每个乳液转到干净的2mLeppendorf管中。对于每个管子,850μL 1-丁醇加上15ng 100bp没有限制的DNA [10ng/μL] 加入并充分涡旋10秒混合。管子14,000g离心1min并弃去上清。再一次添加1体积1-丁醇通过1-丁醇提取来从乳液中除去残留的硅油和表面活性剂。先前均分的乳液的所回收的水相收集到一个管子里并且DNA片段(desBio_yR_TD002_SA融合分子)按照供应商的建议使用PCR纯化试剂盒(NucleoSpin ExtractII, Macherey-Nagel)通过纯化进行回收(rescue)。DNA洗脱进含有0.1%Triton X-100的EB缓冲液(5mM Tris/HCl, pH8.5)。qPCR分析之前,所洗脱的DNA在稀释缓冲液(10mM Tris-HCl pH7.5, 10mM NaCl, 0.05%Triton-X100)中稀释10倍。

[0906] 连接DNA的扩增与分析(营救PCR)

[0907] 材料

[0908] 2x PCR标准混合物(pH8.8, 25℃):

[0909] 40mM Tris-HCl

[0910] 20mM (NH₄)₂SO₄

[0911] 20mM KCl

[0912] 16mM MgSO₄,

[0913] 0.2%Triton X-100,

[0914] 0.2mg/mL BSA

[0915] 0.4mM的适合热启动PCR的每种dATP、dTTP、dGTP和dCTP (CleanAmp, TriLink)

[0916] 操作步骤

[0917] 为了分析存在于不同乳液中的desBio_yR_TD002_SA融合分子的数量,进行以引物vip660和vip2824以及5μL 10倍稀释的纯化的回收DNA样品作为模板的qPCR。为了制作标准曲线,3E8、3E7、3E6、3E5或3E4拷贝的预连接的yR_TD002(对照模板)加入每个qPCR反应。

[0918] 每个反应的qPCR混合物:

[0919] 5μL模板

[0920] 10μL 2X PCR标准混合物

[0921] 2μL 5M甜菜碱(终浓度0.5M)

[0922] 0.4μL SyBR Green(终浓度2,5E-5%)

[0923] 0.2μL 100μM vip660(终浓度1μM)

[0924] 0.2μL 100μM vip2824(终浓度1μM)

[0925] 0.2μL (2u/μL) Vent(外-)聚合酶(Fermentas)

[0926] 2μL 水

[0927] 所述混合物在qPCR仪上应用如下程序进行热循环:

[0928] 92℃ 10min

[0929] 30个循环: 92℃ 30秒和72℃ 2分钟30秒

[0930] 72℃ 5min

[0931] 结果

[0932] 为了计算存在于不同qPCR反应中融合分子的数量,定义了标准曲线。所计算的

desBio_yR_TD002_SA融合分子的数量翻译为柱状图,以使在存在或不存在1 μ M生物素的情况下孵育结合反应所得到的信号间的差异可视化(附图6)。结果显示,与如果结合反应在存在抑制剂生物素的情况下进行相比,如果结合反应在没有生物素的情况下进行时融合分子的数量显著更高。

[0933] 结论

[0934] 该结果表明源自脱硫生物素-链霉亲和素结合和作为本发明结果的它们附加的DNA连接的desBio_yR和SA_TD002分子的共区室化。

[0935] 实施例6:

[0936] 为基因型-基因型融合使用e连接通过共区室化富集——掺入实验

[0937] ECC通过N-苄基-4-氨磺酰基-苯甲酰胺与yR DNA结合(BSB_yR)证实使用人碳酸酐酶II作为靶标掺入多种yR文库。作为阴性对照ECC用与BSB作为靶标预孵育的靶标来进行平行实验。此外,依赖于富集的解离时间在同一系统中得到证实。

[0938] 概述参见附图1。

[0939] 方法

[0940] 所使用的DNA寡核苷酸描述于实施例2和5。此外,应用了如下:

[0941] 用于BSB标记的yR(BSB_yR):

[0942] vip2260:ATGAAAGACGTGGCCATTGC

[0943] vip2724_vip2607:

[0944] CTGACATGGTCCCTGGCAGTCTCCTGTCAGGACCGACTCCXGCTCGAAGAC(x=dT-C6-氨基修饰)

[0945] vip2970:

[0946] CTATCGGTTTTACCGATAGGTCTTCGAGCTGTACCTGCGC

[0947] vip2973:

[0948] AGCTAGGTTTTACCTAGCTGCGCAGGTACTGTGCATCGAC

[0949] vip2980:

[0950] CTATCGGTTTTACCGATAGGTGATGCACTGGAGTCGGTC

[0951] 用于TD003:

[0952] vip2536:CTTATGCTGGCAGTTTCA

[0953] vip2529:

[0954] ACTTCCACCTCAGGACATCGAGCTGGAGCTTGCTGTTAGC

[0955] vip2538:

[0956] AGGTTGCTCCCTCCTTAAGCCAGCAGTGGTAATTCGACA

[0957] vip2996:

[0958] CGATGTCCTGAGGTGGAAGTTGAAACTGCCAGCATAAGGA

[0959] vip2532:

[0960] CTTAAGGAGGGAGCGAACCTGCTAACAGCAAGCTCCAGCT

[0961] vip2559:x-TGTCGAATTACCACTGCTGG(x=C6-氨基修饰)

[0962] 用于454-测序:

[0963] Vip3018:

[0964] CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGCGATGTCCTGAGGTGGAAGT

[0965] vip2459:
[0966] CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAACCTGGTCCCTGGCAGTCTCC
[0967] vip2460:
[0968] CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAAGGTGGTCCCTGGCAGTCTCC
[0969] vip2461:
[0970] CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACACTGGTCCCTGGCAGTCTCC
[0971] vip2462:
[0972] CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACTGTGGTCCCTGGCAGTCTCC
[0973] vip2463:
[0974] CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAGAGTGGTCCCTGGCAGTCTCC
[0975] vip2464:
[0976] CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAGCATGGTCCCTGGCAGTCTCC
[0977] vip2465:
[0978] CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAGGTTGGTCCCTGGCAGTCTCC
[0979] vip2466:
[0980] CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAGTCTGGTCCCTGGCAGTCTCC
[0981] vip2467:
[0982] CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGATCGTGGTCCCTGGCAGTCTCC
[0983] vip2468:
[0984] CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGATGCTGGTCCCTGGCAGTCTCC
[0985] vip2469:
[0986] CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCACTTGGTCCCTGGCAGTCTCC
[0987] vip2470:
[0988] CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCAGATGGTCCCTGGCAGTCTCC
[0989] vip2471:
[0990] CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCCATTGGTCCCTGGCAGTCTCC
[0991] vip2472:
[0992] CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCCTATGGTCCCTGGCAGTCTCC
[0993] vip2473:
[0994] CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCGAATGGTCCCTGGCAGTCTCC
[0995] vip2474:
[0996] CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTACTGGTCCCTGGCAGTCTCC
[0997] vip2475:
[0998] CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTCATGGTCCCTGGCAGTCTCC
[0999] vip2476:
[1000] CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTGTTGGTCCCTGGCAGTCTCC
[1001] vip2477:
[1002] CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTTGTGGTCCCTGGCAGTCTCC
[1003] vip2478:

- [1004] CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGGAAGTGGTCCCTGGCAGTCTCC
- [1005] vip2479:
- [1006] CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGGACATGGTCCCTGGCAGTCTCC
- [1007] vip2480:
- [1008] CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGGAGTTGGTCCCTGGCAGTCTCC
- [1009] vip2481:
- [1010] CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGGATGTGGTCCCTGGCAGTCTCC
- [1011] vip2482:
- [1012] CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGGCAATGGTCCCTGGCAGTCTCC
- [1013] vip2483:
- [1014] CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGGTCTTGGTCCCTGGCAGTCTCC
- [1015] vip2484:
- [1016] CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGGTGATGGTCCCTGGCAGTCTCC
- [1017] vip2485:
- [1018] CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTACGTGGTCCCTGGCAGTCTCC
- [1019] vip2486:
- [1020] CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTAGCTGGTCCCTGGCAGTCTCC
- [1021] vip2487:
- [1022] CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCAGTGGTCCCTGGCAGTCTCC
- [1023] vip2488:
- [1024] CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCCATGGTCCCTGGCAGTCTCC
- [1025] vip2489:
- [1026] CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCGTTGGTCCCTGGCAGTCTCC
- [1027] vip2490:
- [1028] CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTCTGGTCCCTGGCAGTCTCC
- [1029] vip2491:
- [1030] CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTGACTGGTCCCTGGCAGTCTCC
- [1031] vip2492:
- [1032] CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTGTGTGGTCCCTGGCAGTCTCC
- [1033] vip2493:
- [1034] CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCCTGGTCCCTGGCAGTCTCC
- [1035] vip2494:
- [1036] CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTGGTGGTCCCTGGCAGTCTCC
- [1037] yoctoreactor文库的制备
- [1038] 所述文库按照(Hansen等人.J. Am. Chem. Soc., 2009, 131 (3), pp1322-1327)构建, 但以四聚体形式代替三聚体形式。
- [1039] BSB标记的yR (BSB_yR)的制备
- [1040] 材料
- [1041] 10 mM Fmoc-NH-PEG (12) -CO₂H

[1042] 100 mM 4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基吗啉盐酸盐 (DMT-MM)

[1043] 200 mM N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-(4-丁磺酸) pH9 (HEPBS)

[1044] N-甲基-2-吡咯烷酮 (NMP)

[1045] 0.5 M 哌啶溶于NMP

[1046] 10 mM Fmoc-L-苯甘氨酸 (Fmoc-L-Phg)

[1047] 10 mM 4-对羧基苯磺酰胺

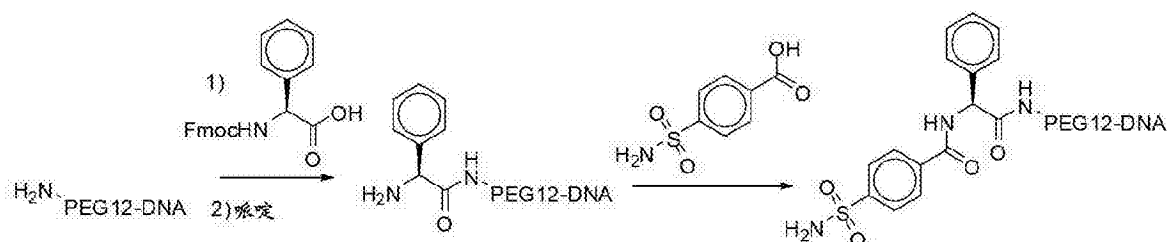
[1048] 0.1 M 乙腈/三乙基铵乙酸盐 (pH 7)

[1049] BSB: BSB按照 (Drabovich等人., Anal.Chem.2009,81,490-494) 合成

[1050] 操作步骤

[1051] BSB_yR通过连接制备。位置2寡核苷酸vip2970,位置3寡核苷酸vip2973和位置4寡核苷酸vip2980按照制造商说明 (Fermentas) 通过T4多聚核苷酸激酶磷酸化连接制备。BSB标记的位置1寡核苷酸vip2724_vip2607按照如下反应式合成:

[1052]



[1053] 氨基-PEG12衍生的寡核苷酸从51mer寡核苷酸(vip2724_vip2607) [5 nmol] 和内部修饰dT(氨基-C6-dT)合成,其与Fmoc-NH-PEG(12)-CO₂H [10 mM] 于100 mM DMT-MM, 200 mM HEPBS pH9, 200 μ L NMP:水1:1的溶液偶合。1小时后乙醇沉淀混合物并溶于100 μ L水。加入1体积100 μ L溶于NMP的0.5M哌啶并于25℃孵育2hr。氨基-PEG12-寡核苷酸通过乙醇沉淀分离并没有进一步纯化用于下一步的偶合。

[1054] BSB-PEG12标记位置1缀合物通过结合Fmoc-L-Phg至51mer氨基修饰寡核苷酸来合成,其中伯胺通过PEG12连接子连接到内部修饰dT上。氨基-PEG12衍生的寡核苷酸与Fmoc-L-Phg [10mM] 于100mM DMT-MM, 200mM HEPBS pH9, 200 μ L NMP:水1:1的溶液偶合。1小时乙醇沉淀混合物并溶于100 μ L水。加入100 μ L溶于NMP的0.5M哌啶并于25℃孵育2hr。最终偶合的4-对羧基苯磺酰胺通过以于100mM DMT-MM和200mM HEPBS pH9, 200 μ L NMP:水1:1的溶液的4-对羧基苯磺酰胺处理L-Phg-PEG12衍生的寡核苷酸的溶液制得。25℃孵育1小时后,寡核苷酸结合物粗品通过乙醇沉淀分离并以乙腈/三乙基铵乙酸盐 (pH7, 0.1M) 梯度6-50%乙腈超过20min于C-18Waters Xbridge柱上通过反相HPLC纯化。收集合适的组分并真空蒸发及得到1680pmol的BSB标记的vip2724_vip2607。

[1055] 等量的结合BSB的干互补位置1寡核苷酸vip2724_vip2607,位置2,位置3和位置4寡核苷酸混合并连接形成yR (Hansen等人., J. Am. Chem. Soc., 2009, 131 (3), pp1322-1327)。以T4DNA连接酶连接按照制造商说明 (Fermentas) 进行。BSB-yR被解折叠并按照制造商说明 (Fermentas) 使用位于Klenow (外-) 驱动的反应的磷酸化的vip2260通过引物延伸制成双链。

[1056] 靶标DNA (TD003) 的制备

[1057] 如实施例5中所述, TD003以与TD002相似方法制备。

- [1058] 碳酸酐酶II与TD003的缀合(CAII_TD003)
- [1059] 重组人CAII (RnD systems;2184CA)
- [1060] 操作步骤
- [1061] TD003标记CAII与实施例3中所述类似的方法完成。
- [1062] 为用CAII标记含有靶标DNA的预激活混合物。预激活通过混合21 μ L TD003 [4.7 μ M] 与3 μ L MOPS pH6 [1M], 3 μ L EDC [50mM], 和3 μ L s-NHS [100mM] 完成。
- [1063] 羧酸激活于20℃孵育30min。
- [1064] 缓冲液按照制造商说明 (GE Healthcare) 使用G25Illustra柱去除。
- [1065] 缀合之前,蛋白质用透析缓冲液于4℃使用迷你Slide-A-Lyzer透析装置按照制造商说明 (Pierce) 透析2x30min。
- [1066] 对于缀合反应,1 μ L MOPS [1M] pH8.0, 1 μ L NaCl [1M] 和1 μ L水加入9 μ L透析的CAII蛋白。大约35 μ L激活的DNA加入该混合物。反应4℃孵育20h。
- [1067] 缀合反应通过加入Tris (pH8) 至终浓度50mM淬灭。CAII_TD003缀合物通过如实施例3所述的6%TBE胶的PAGE从反应物中分离。标记物的浓度使用Picogreen按照制造商说明 (Molecular Probes) 通过测定DNA浓度估计为0.21 μ M。
- [1068] 结合 (association) 反应 (结合 (binding) 反应)
- [1069] 材料
- [1070] 1M Tris-HCl, pH7.5
- [1071] 4M NaCl
- [1072] 10%Triton
- [1073] 10 μ M BSB
- [1074] 操作步骤
- [1075] 在总体积的1.5 μ l结合缓冲液 (10mM Tris-HCl (pH7.5), 50mMNaCl, 0.1%Triton X-100), 6.5E10文库分子和3.3E5BSB_yR分子 (由1E12分子掺入1至200000与5E6BSB_yR分子组成的YoctoReactor文库) 与9E9分子CAII_TD003在存在或不存在1 μ M BSB (抑制剂) 的情况下混合。分子的结合在冰上孵育结合混合物1小时。
- [1076] 解离反应 (稀释)
- [1077] 材料
- [1078] 标准连接缓冲液:
- [1079] 50mM Tris-HCl, pH7.5
- [1080] 50mM NaCl
- [1081] 0.1%Triton X-100
- [1082] 0.75 μ M BSA
- [1083] 9mM KCL
- [1084] 4.5%甘油
- [1085] 0.2mM EDTA
- [1086] 1mM DTT
- [1087] 2mM ATP
- [1088] 1 μ M T4DNA连接酶 (Fermentas)

[1089] 0.01 μ M ‘清道夫’ DNA

[1090] 如实施例3所述方法制备的连续相

[1091] 2mL带螺旋盖的微管

[1092] 操作步骤

[1093] 0.12 μ L体积的结合混合物转到2mLEppendorf管的盖子上,管中包含600 μ L含有1 μ M T4DNA连接酶的水相(标准连接缓冲液)。解离反应通过混合结合混合物与水相起始,所述混合通过颠倒管子两次随后涡旋管子10秒进行。在微量离心机中短暂离心之后,500 μ L的混合物转到含有1mL连续相的冰冷的2mL微管并在剩余的时间中将其置于冰上最终获得2或30分钟的解离时间。

[1094] 乳化

[1095] 材料

[1096] 诱导缓冲液:

[1097] 50mM Tris-HCl,pH7.5

[1098] 50mM NaCl

[1099] 0.1%Triton X-100

[1100] 1.5 μ M BSA

[1101] 10mM KCL

[1102] 5%甘油

[1103] 0.2mM EDTA

[1104] 1mM DTT

[1105] 2mM ATP

[1106] 135mM MgCl₂

[1107] 操作步骤

[1108] 解离反应终止于起始之后恰好2min或30min,通过混合连续相(1mL)和水相(0.5mL)在Precellys24(Bertin Technologies)上5500rpm3x20秒(20秒运行之间暂停10秒)进行乳化。平行实验中,包含镁但没有连接酶激活T4DNA连接酶的诱导乳液通过1mL连续相和0.5mL包含135mM MgCl₂(诱导缓冲液)在5500rpm3x20秒乳化制备。

[1109] 乳液中连接

[1110] 操作步骤

[1111] 包含MgCl₂的150 μ L体积的诱导-乳液加入每个乳液并在室温旋转一个小时混合以激活T4DNA连接酶。连接通过将乳液(1650 μ L)在加热块中于16℃和300rpm孵育16小时进行。

[1112] 破乳和DNA回收

[1113] 材料

[1114] 1-丁醇

[1115] 异丙醇

[1116] 100%乙醇

[1117] 100bp没有限制的DNA

[1118] TissueLyser II (Qiagen)

[1119] PCR纯化(clean-up)试剂盒(NucleoSpin ExtractII,Macherey-Nagel)

[1120] 10%Triton X-100

[1121] 操作步骤

[1122] 连接反应通过将管子在65℃孵育30分钟随后在微量离心机中短暂离心停止。为了破乳,300μL1-丁醇,150μL异丙醇,50μL乙醇和20ng100bp没有限制的DNA [10ng/μL] 加入每个乳液并于TissueLyserII (Qiagen) 15Hz1min混合。随后,管子室温旋转1小时,14,000g离心2min并弃去上清。从乳液中除去残留的硅油和表面活性剂同过下述2次提取:加入1体积1-丁醇,在TissueLyser上15Hz混合1min,并弃去上层相。DNA片段按照供应商的建议使用PCR纯化试剂盒 (NucleoSpin ExtractII, Macherey-Nagel) 通过纯化进行回收 (rescue)。DNA洗脱进含有0.1%Triton的EB缓冲液 (5mMTris/HCl, pH8.5)。

[1123] 连接DNA的扩增与分析 (营救PCR)

[1124] 材料

[1125] 2x PCR标准混合物 (pH8.8, 25℃):

[1126] 40mM Tris-HCl

[1127] 20mM (NH₄)₂SO₄

[1128] 20mM KCl

[1129] 16mM MgSO₄,

[1130] 0.2%Triton X-100,

[1131] 0.2mg/mL BSA

[1132] 0.4mM的适合热启动PCR的每种dATP, dTTP, dGTP和dCTP (CleanAmp, TriLink)

[1133] 操作步骤

[1134] 所连接的片段使用10μL纯化的回收DNA样品作为模板在总体积100μL中通过PCR扩增。

[1135] PCR混合物:

[1136] 10μL模板DNA

[1137] 50μL2X PCR标准混合物

[1138] 10μL5M甜菜碱 (终浓度0.5M)

[1139] 1μL100μM vip660 (终浓度1μM)

[1140] 1μL100μM vip2824 (终浓度1μM)

[1141] 1μL (2u/μL) Vent (外-) 聚合酶 (Fermentas)

[1142] 27μL水

[1143] 所述混合物在PCR仪上应用如下程序进行热循环:

[1144] 10min于95℃

[1145] 32个循环:30sec于95℃和2min30sec于72℃

[1146] 2min于72℃

[1147] 454-测序的制备

[1148] 操作步骤

[1149] 454-测序的样品如实施例4的yR_TD001融合分子制备。454-测序标签为扩增yR_TD003融合分子使用独特的正向引物vip2459至vip2494引入PCR。

[1150] DNA测序

[1151] 操作步骤

[1152] 454-测序如(Hansen等人.J.Am.Chem.Soc.,2009,131(3),pp1322-1327)所示进行。分析DNA序列并计算BSB基因型的频率。

[1153] 结果

[1154] 测序结果(附图7)显示BSB_yR通过CA II使用2分钟解离时间成功富集。相反,当使用30分钟解离时间或当CA II在结合步骤之前与BSB预孵育时,没有观察到BSB_DNA的富集。

[1155] 结论

[1156] ECC证实BSB_yR以解离时间依赖形式富集,其使用CAII作为靶标掺入多种yR文库。

[1157] 参考文献列表

[1158] 1:EP1809743B1 (Vipergen)

[1159] 2:EP1402024B1 (Nuevolution)

[1160] 3:EP1423400B1 (David Liu)

[1161] 4:Nature Chem.Biol.(2009),5:647-654(Clark)

[1162] 5:W000/23458 (Harbury)

[1163] 6:Nature Methods(2006),3(7),561-5707:2006(Miller)

[1164] 7:Nat.Biotechnol.2004;22,568-574(Melkko)

[1165] 8:Nature.(1990);346(6287),818-822(Ellington)

[1166] 9:Proc Natl Acad Sci USA(1997).94(23):12297-302(Roberts)

[1167] 10:W006053571A2 (Rasmussen)

[1168] 11:Bertschinger et al,(2007)Protein Engineering,Design & Selection vol.20no.2pp.57-68

[1169] 12:Miller OJ,Bernath K,Agresti JJ,Amitai G,Kelly BT,Mastrobattista E,Taly V,Magdassi S,Tawfik DS,Griffiths ADDirected evolution by in vitro compartmentalization.Nat Methods.2006Jul;3(7):561-70

[1170] 13:Doi,N.and Yanagawa,H.(1999)FEBS Lett.,457,227-230

[1171] 14:Yonezawa,M.,Doi,N.,Kawahashi,Y.,Higashinakagawa,T.and Yanagawa,H.

[1172] (2003)Nucleic Acids Res.,31,e118.

[1173] 15:Tawfik,D.S.and Griffiths,A.D.(1998)Man-made cell-like compartments for molecular evolution.Nat.Biotechnol.,16,652-656

[1174] 16:Ghadessy,F.J.,Ong,J.L.and Holliger,P.(2001)Proc.Natl Acad.Sci.USA,98,4552-4557;

[1175] 17:Tay Y,Ho C,Droge P,Ghadessy FJ.Selection of bacteriophage lambda integrases with altered recombinationspecificity by in vitro compartmentalization.Nucleic Acids Res.2010Mar;38(4):e25.Epub2009Dec4

[1176] 18:Zheng Y,Roberts RJ.Selection of restriction endonucleases using artificial

[1177] cells.Nucleic Acids Res.2007;35(11):e83.Epub2007

[1178] 19:Mastrobattista E,Taly V,Chanudet E,Treacy P,Kelly BT,Griffiths AD.High-throughput screening of enzyme libraries:in vitro evolution of a

beta-galactosidase by fluorescence-activated sorting of double emulsions. *Chem Biol.* 2005Dec;12(12):1291-300

[1179] 20:Levy M,Griswold KE,Ellington AD.Direct selection of trans-acting ligase

[1180] ribozymes by in vitro compartmentalization. *RNA.* 2005Oct;11(10):1555-62. Epub 2005Aug30;

[1181] 21:Sepp A,Choo Y.Cell-free selection of zinc finger DNA-binding proteins using in vitro compartmentalization. *J Mol Biol.* 2005Nov25;354(2):212-9. Epub 2005Oct3;

[1182] 22:Bernath K,Magdassi S,Tawfik DSDirected evolution of protein inhibitors of DNA-nucleases by in vitro compartmentalization(IVC)and nano-droplet delivery. *J Mol Biol.* 2005Feb4;345(5):1015-26. Epub 2004Dec7.

[1183] 23:Bertschinger et al, (2004) *Protein Engineering, Design & Selection* vol.17no.9pp.699-707

[1184] 24:Chen Yu et al, (November2008) *Nucleic Acid Research*, Vol.36, Nr.19, Pages:Article No.E128

[1185] 25:Hansen et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, 131 (3), pp1322-1327

[1186] 26:Drabovich et al., *Anal. Chem.* 2009, 81, 490-494

[1187] 27:Turner and Hurles, *Nat Protoc.* 2009;4(12):1771-1783

序列表

<110> Vipergen
 <120> 制备富集文库的方法
 <130> P1797PC00
 <150> EP10180435.9
 <151> 2010-09-27
 <160> 78
 <170> BISSAP 1.0
 <210> 1
 <211> 191
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <222> 1..191
 <223> /分子类型="DNA"
 /备注="引物"
 /生物体="人工序列"
 <400> 1
 cgctaatggt ccttggcagt ctcttiageg gacgcactec tgctcgaaga caacgggtgtt 60
 ttacaccgtt gtcttcgagc tgtacctgcg caagtgcgtt ttacgcactt gcgcaggtac 120
 tgtgcacga caagaccgtt ttacggctct gtgatgcac tggagtcggt cctgttcgat 180
 ctggggcgta t 191

[0001]

<210> 2
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <222> 1..20
 <223> /分子类型="DNA"
 /备注="引物"
 /生物体="人工序列"
 <400> 2
 atacgcccga gatcgaacag 20
 <210> 3
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <222> 1..18
 <223> /分子类型="DNA"
 /备注="引物"
 /生物体="人工序列"
 <400> 3
 tggtcctgg cagtcctc 18
 <210> 4
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源

	<222> 1..60 <223> /分子类型="DNA" /备注="引物" /生物体="人工序列"	
	<400> 4 ctgttcgate ttggcggtat gagaagagcc agaaaegtgg ettcaggcac caaggaagac	60
	<210> 5 <211> 59 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <221> 来源 <222> 1..59 <223> /分子类型="DNA" /备注="引物" /生物体="人工序列"	
	<400> 5 gccttgccag cccgctcagg caagtcttac agccgateag tcitctctgg tgectgaag	59
	<210> 6 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <221> 来源 <222> 1..20 <223> /分子类型="DNA" /备注="引物" /生物体="人工序列"	
[0002]	<400> 6 ctgttcgate ttggcggtat	20
	<210> 7 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <221> 来源 <222> 1..19 <223> /分子类型="DNA" /备注="引物" /生物体="人工序列"	
	<400> 7 gccttgccag cccgctcag	19
	<210> 8 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <221> 来源 <222> 1..19 <223> /分子类型="DNA" /备注="引物" /生物体="人工序列"	
	<400> 8 gccttgccag cccgctcag	19
	<210> 9 <211> 16 <212> DNA	

[0003]	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<222> 1..16	
	<223> /分子类型="DNA"	
	/备注="引物"	
	/生物体="人工序列"	
	<400> 9	
	tggtccctgg cagtct	16
	<210> 10	
	<211> 12	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<222> 1..12	
	<223> /分子类型="DNA"	
	/备注="引物"	
	/生物体="人工序列"	
	<400> 10	
	gaacaggacc ga	12
	<210> 11	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<222> 1..20	
	<223> /分子类型="DNA"	
	/备注="引物"	
	/生物体="人工序列"	
	<400> 11	
	ctgttcgatac ttggcgctat	20
	<210> 12	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<222> 1..18	
	<223> /分子类型="DNA"	
	/备注="引物"	
	/生物体="人工序列"	
	<400> 12	
	acgccccaga tcgaacag	18
	<210> 13	
	<211> 61	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<222> 1..61	
	<223> /分子类型="DNA"	
	/备注="引物"	
	/生物体="人工序列"	
	<400> 13	
	gccttgccag cccgtcagg ggaaggacgt tgggttagaa gcgticactt ggtggaagta	60

	t	61
	<210> 14 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <221> 来源 <222> 1..20 <223> /分子类型="DNA" /备注="引物" /生物体="人工序列"	
	<400> 14 acttccacca agtgaacgt	30
	<210> 15 <211> 60 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <221> 来源 <222> 1..60 <223> /分子类型="DNA" /备注="引物" /生物体="人工序列"	
	<400> 15 ctgttcgaic ttggcgctat tgttttaget gccccaactc cticaggcac caaggaagac	60
[0004]	<210> 16 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <221> 来源 <222> 1..20 <223> /分子类型="DNA" /备注="引物" /生物体="人工序列"	
	<400> 16 gcaagtcttta cagccgatca	20
	<210> 17 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <221> 来源 <222> 1..18 <223> /分子类型="DNA" /备注="引物" /生物体="人工序列"	
	<400> 17 tggtcceetgg cagtctcc	18
	<210> 18 <211> 50 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <221> 来源 <222> 1..50 <223> /分子类型="DNA"	

	/备注="引物" /生物体="人工序列"	
	<400> 18 cctatccctt gigtgccttg gcagtcacag gtcttcttg gtgcctgaag	50
	<210> 19 <211> 52 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <221> 来源 <222> 1..52 <223> /分子类型="DNA" /备注="引物" /生物体="人工序列"	
	<400> 19 ccattccttc cctgcgtgac tcgactcag aggttggtcc ctggcagtct cc	52
	<210> 20 <211> 52 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <221> 来源 <222> 1..52 <223> /分子类型="DNA" /备注="引物" /生物体="人工序列"	
[0005]	<400> 20 ccattccttc cctgcgtgac tcgactcag atcgttggtcc ctggcagtct cc	52
	<210> 21 <211> 52 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <221> 来源 <222> 1..52 <223> /分子类型="DNA" /备注="引物" /生物体="人工序列"	
	<400> 21 ccattccttc cctgcgtgac tcgactcag atcgttggtcc ctggcagtct cc	52
	<210> 22 <211> 52 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <221> 来源 <222> 1..52 <223> /分子类型="DNA" /备注="引物" /生物体="人工序列"	
	<400> 22 ccattccttc cctgcgtgac tcgactcag caatttggtcc ctggcagtct cc	52
	<210> 23 <211> 52 <212> DNA <213> 人工序列	

[0006]	<230>		
	<221>	来源	
	<222>	1..52	
	<223>	/分子类型="DNA" /备注="引物" /生物体="人工序列"	
	<400>	23	
		ccatctcacc cctgcgtgtc tccgaactcag cagaagggtcc ctggcagttt cc	52
	<210>	24	
	<211>	52	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<221>	来源	
	<222>	1..52	
	<223>	/分子类型="DNA" /备注="引物" /生物体="人工序列"	
	<400>	24	
		ccatctcacc cctgcgtgtc tccgaactcag ccattgggtcc ctggcagttt cc	52
	<210>	25	
	<211>	18	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<221>	来源	
	<222>	1..18	
	<223>	/分子类型="DNA" /备注="引物" /生物体="人工序列"	
	<400>	25	
		tggtccctgg cagtctcc	18
	<210>	26	
	<211>	36	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<221>	来源	
	<222>	1..36	
	<223>	/分子类型="DNA" /备注="引物" /生物体="人工序列"	
	<400>	26	
		caccacgatg gcaatgcatt cttegetgcc attctg	36
	<210>	27	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<221>	来源	
	<222>	1..20	
	<223>	/分子类型="DNA" /备注="引物" /生物体="人工序列"	
	<400>	27	
		cgatgtcctg aggtggaagt	20
	<210>	28	

[0007]	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<222> 1. 40	
	<223> /分子类型="DNA"	
	/备注="引物"	
	/生物体="人工序列"	
	<400> 28	
	ggcaagtgat igtccatgtg catgagaaga ggcccacatt	40
	<210> 29	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<222> 1. 20	
	<223> /分子类型="DNA"	
	/备注="引物"	
	/生物体="人工序列"	
	<400> 29	
	cacatggaca atcaattgcc	20
[0007]	<210> 30	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<222> 1. 20	
	<223> /分子类型="DNA"	
	/备注="引物"	
	/生物体="人工序列"	
	<400> 30	
	aatgtgggcc tcttctcatg	20
	<210> 31	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<222> 1. 18	
	<223> /分子类型="DNA"	
	/备注="引物"	
	/生物体="人工序列"	
	<400> 31	
	tccacatctt ccagtcca	18
[0007]	<210> 32	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<222> 1. 40	
	<223> /分子类型="DNA"	
	/备注="引物"	
	/生物体="人工序列"	
	<400> 32	

	acttccacct caggacateg agctggagct tgetgttagc	40
	<210> 33 <211> 40 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <221> 来源 <222> 1..40 <223> /分子类型="DNA" /备注="引物" /生物体="人工序列"	
	<400> 33 aggttcctc cctccitaag tcaggaggat gtgacacca	40
	<210> 34 <211> 40 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <221> 来源 <222> 1..40 <223> /分子类型="DNA" /备注="引物" /生物体="人工序列"	
	<400> 34 cgatgtctg aggtggaagt tgaactggag gatgtggaca	40
[0008]	<210> 35 <211> 40 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <221> 来源 <222> 1..40 <223> /分子类型="DNA" /备注="引物" /生物体="人工序列"	
	<400> 35 cttaaggagg gagegaacct getaacaga agctccagct	40
	<210> 36 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <221> 来源 <222> 1..20 <223> /分子类型="DNA" /备注="引物" /生物体="人工序列"	
	<400> 36 ttggtgtcac atctctctga	20
	<210> 37 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <221> 来源 <222> 1..20 <223> /分子类型="DNA"	

[0009]	/备注="引物" /生物体="人工序列"	
	<400> 37	
	atgaaagacg tggccattgc	20
	<210> 38	
	<211> 50	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<222> 1..50	
	<223> /分子类型="DNA" /备注="引物" /生物体="人工序列"	
	<230>	
	<221> misc_特征	
	<222> 41	
	<400> 38	
	ctgacatggt ccttggcagt ctctgtcag gaccgactcc gctcgaagac	50
[0009]	<210> 39	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<222> 1..40	
	<223> /分子类型="DNA" /备注="引物" /生物体="人工序列"	
	<400> 39	
	ctatcggttt taccgatagg tcttcgagct gtacctgcgc	40
	<210> 40	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<222> 1..40	
	<223> /分子类型="DNA" /备注="引物" /生物体="人工序列"	
	<400> 40	
	agctaggttt tacctagctg cgcaggtaact gtgcacgac	40
[0009]	<210> 41	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<222> 1..40	
	<223> /分子类型="DNA" /备注="引物" /生物体="人工序列"	
	<400> 41	
	ctatcggttt taccgatagg tcgatgcact ggagtcgctc	40
	<210> 42	

[0010]	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<222> 1..18	
	<223> /分子类型="DNA"	
	/备注="引物"	
	/生物体="人工序列"	
	<400> 42	
	cttatgctgg cagtttca	18
	<210> 43	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<222> 1..40	
	<223> /分子类型="DNA"	
	/备注="引物"	
	/生物体="人工序列"	
	<400> 43	
	acttccacct caggacatcg agctggagct tgcgtttage	40
[0010]	<210> 44	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<222> 1..40	
	<223> /分子类型="DNA"	
	/备注="引物"	
	/生物体="人工序列"	
	<400> 44	
	aggttcgcte cctccttaag ccagcagtgg taattcgaca	40
	<210> 45	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<222> 1..40	
	<223> /分子类型="DNA"	
	/备注="引物"	
	/生物体="人工序列"	
	<400> 45	
	cgaigtctcg aggiggaagt tgaaactgcc agcataagga	40
[0010]	<210> 46	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<222> 1..40	
	<223> /分子类型="DNA"	
	/备注="引物"	
	/生物体="人工序列"	
	<400> 46	

	cttaaggagg gagcgaacct gctaacagca agctccagct	40
	<210> 47 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <221> 来源 <222> 1..20 <223> /分子类型="DNA" /备注="引物" /生物体="人工序列"	
	<400> 47 tgtcgaatta ccactgcigg	20
	<210> 48 <211> 50 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <221> 来源 <222> 1..50 <223> /分子类型="DNA" /备注="引物" /生物体="人工序列"	
	<400> 48 ccataccctt gtgtgccttg gcagttctag cgatgtcctg aggtggaagt	50
[0011]	<210> 49 <211> 52 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <221> 来源 <222> 1..52 <223> /分子类型="DNA" /备注="引物" /生物体="人工序列"	
	<400> 49 ccattcctc cctgcgtgtc tccgactcag aacctgggtc ctggcagtct cc	52
	<210> 50 <211> 52 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <221> 来源 <222> 1..52 <223> /分子类型="DNA" /备注="引物" /生物体="人工序列"	
	<400> 50 ccattcctc cctgcgtgtc tccgactcag aaggtgggtc ctggcagtct cc	52
	<210> 51 <211> 52 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <221> 来源 <222> 1..52 <223> /分子类型="DNA"	

/备注="引物" /生物体="人工序列"	
<400> 51 ccatctcattc cctgcgtgtc tccgaatcag acactgggtcc ctggcagtct cc	52
<210> 52 <211> 52 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 来源 <222> L. 52 <223> /分子类型="DNA" /备注="引物" /生物体="人工序列"	
<400> 52 ccatctcattc cctgcgtgtc tccgaatcag acgttggtcc ctggcagtct cc	52
<210> 53 <211> 52 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 来源 <222> L. 52 <223> /分子类型="DNA" /备注="引物" /生物体="人工序列"	
<400> 53 ccatctcattc cctgcgtgtc tccgaatcag agagtgggtcc ctggcagtct cc	52
[0012]	
<210> 54 <211> 52 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 来源 <222> L. 52 <223> /分子类型="DNA" /备注="引物" /生物体="人工序列"	
<400> 54 ccatctcattc cctgcgtgtc tccgaatcag agcatgggtcc ctggcagtct cc	52
<210> 55 <211> 52 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 来源 <222> L. 52 <223> /分子类型="DNA" /备注="引物" /生物体="人工序列"	
<400> 55 ccatctcattc cctgcgtgtc tccgaatcag agtctgggtcc ctggcagtct cc	52
<210> 56 <211> 52 <212> DNA <213> 人工序列	

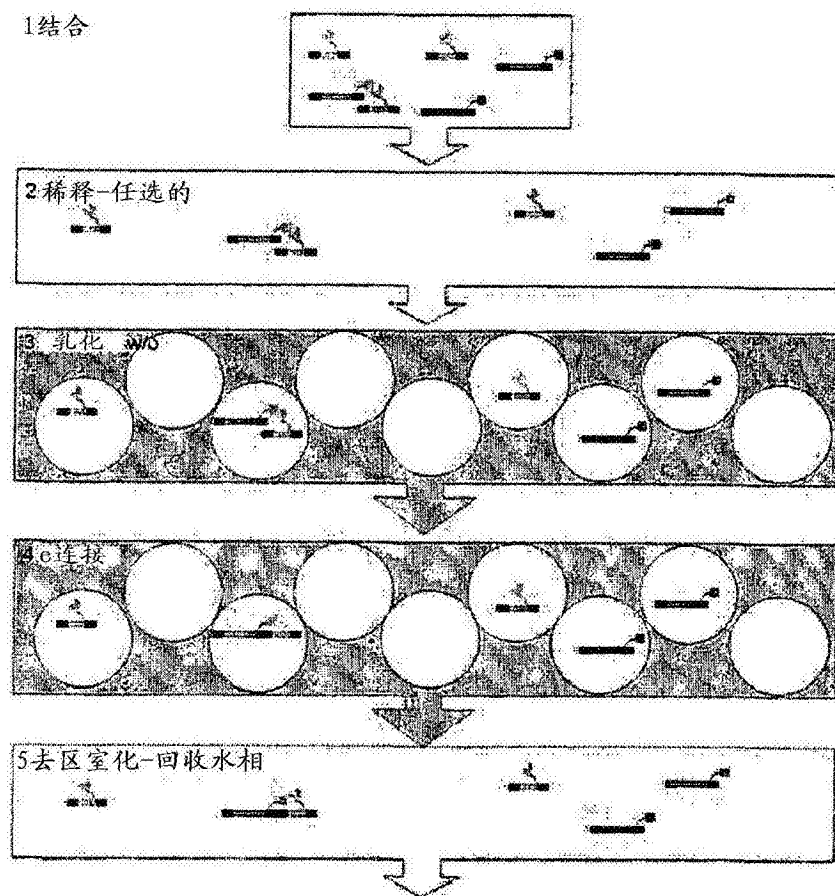
[0013]	<220>		
	<221>	来源	
	<222>	1..52	
	<223>	/分子类型="DNA" /备注="引物" /生物体="人工序列"	
	<400>	56	
	ccatctc	catc cctgcgtg	tc tccga
	ctcag	cctatgg	ctc ctggcag
	tct cc		52
	<210>	57	
	<211>	52	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<221>	来源	
	<222>	1..52	
	<223>	/分子类型="DNA" /备注="引物" /生物体="人工序列"	
	<400>	57	
	ccatctc	catc cctgcgtg	tc tccga
	ctcag	cgaatgg	ctc ctggcag
	tct cc		52
	<210>	58	
	<211>	52	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<221>	来源	
	<222>	1..52	
	<223>	/分子类型="DNA" /备注="引物" /生物体="人工序列"	
	<400>	58	
	ccatctc	catc cctgcgtg	tc tccga
	ctcag	ctactgg	ctc ctggcag
	tct cc		52
	<210>	59	
	<211>	52	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<221>	来源	
	<222>	1..52	
	<223>	/分子类型="DNA" /备注="引物" /生物体="人工序列"	
	<400>	59	
	ccatctc	catc cctgcgtg	tc tccga
	ctcag	ctcatgg	ctc ctggcag
	tct cc		52
	<210>	60	
	<211>	52	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<221>	来源	
	<222>	1..52	
	<223>	/分子类型="DNA" /备注="引物" /生物体="人工序列"	
	<400>	60	
	ccatctc	catc cctgcgtg	tc tccga
	ctcag	ctgttgg	ctc ctggcag
	tct cc		52
	<210>	61	

[0014]	<211> 52	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<222> 1..52	
	<223> /分子类型="DNA"	
	/备注="引物"	
	/生物体="人工序列"	
	<400> 61	
	ccatctcattc cctgggtgtc tccgactcag cttgtgggtc ctggcagtct cc	52
	<210> 62	
	<211> 52	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<222> 1..52	
	<223> /分子类型="DNA"	
	/备注="引物"	
	/生物体="人工序列"	
	<400> 62	
	ccatctcattc cctgggtgtc tccgactcag gaactgggtc ctggcagtct cc	52
[0014]	<210> 63	
	<211> 52	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<222> 1..52	
	<223> /分子类型="DNA"	
	/备注="引物"	
	/生物体="人工序列"	
	<400> 63	
	ccatctcattc cctgggtgtc tccgactcag gacatgggtc ctggcagtct cc	52
	<210> 64	
	<211> 52	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<222> 1..52	
	<223> /分子类型="DNA"	
	/备注="引物"	
	/生物体="人工序列"	
	<400> 64	
	ccatctcattc cctgggtgtc tccgactcag gagttgggtc ctggcagtct cc	52
[0014]	<210> 65	
	<211> 52	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<222> 1..52	
	<223> /分子类型="DNA"	
	/备注="引物"	
	/生物体="人工序列"	
	<400> 65	

	ccatctcacc cctgcgtgtc tccgactcag gatgtgggtc ctggcagtct cc	52
	<210> 66 <211> 52 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <221> 来源 <222> 1..52 <223> /分子类型="DNA" /备注="引物" /生物体="人工序列"	
	<400> 66 ccatctcacc cctgcgtgtc tccgactcag gcaatgggtc ctggcagtct cc	52
	<210> 67 <211> 52 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <221> 来源 <222> 1..52 <223> /分子类型="DNA" /备注="引物" /生物体="人工序列"	
	<400> 67 ccatctcacc cctgcgtgtc tccgactcag gtcttgggtc ctggcagtct cc	52
[0015]	<210> 68 <211> 52 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <221> 来源 <222> 1..52 <223> /分子类型="DNA" /备注="P引物" /生物体="人工序列"	
	<400> 68 ccatctcacc cctgcgtgtc tccgactcag gtgatgggtc ctggcagtct cc	52
	<210> 69 <211> 52 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <221> 来源 <222> 1..52 <223> /分子类型="DNA" /备注="引物" /生物体="人工序列"	
	<400> 69 ccatctcacc cctgcgtgtc tccgactcag tacgtgggtc ctggcagtct cc	52
	<210> 70 <211> 52 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <221> 来源 <222> 1..52 <223> /分子类型="DNA"	

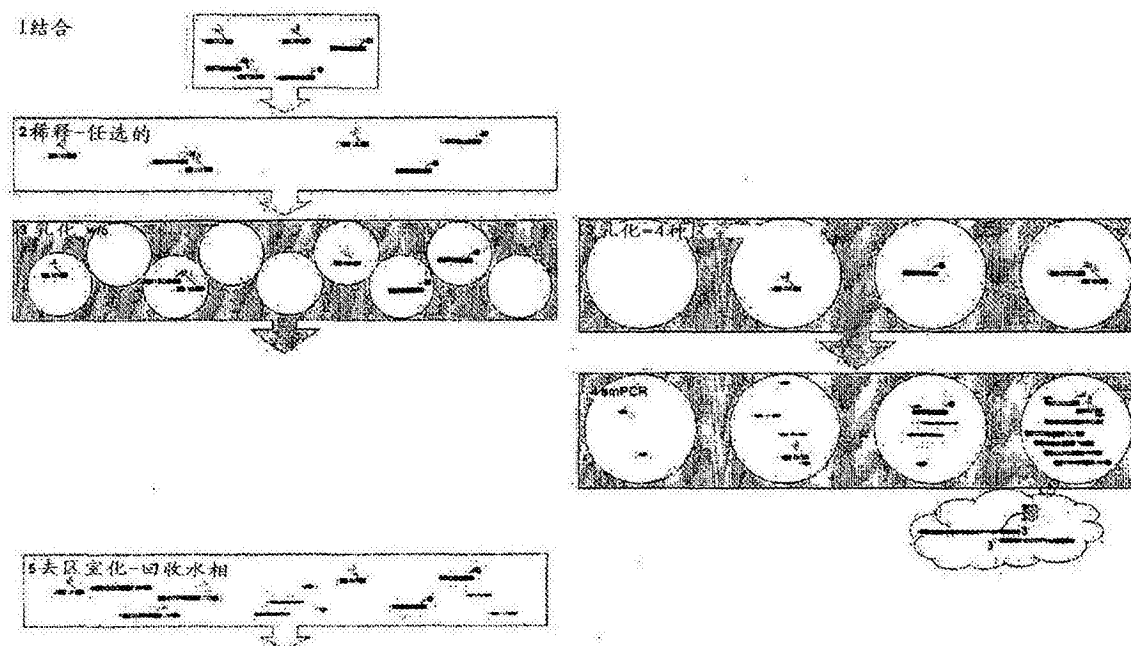
/备注="引物" /生物体="人工序列"	
<400> 70 ccatctcacc cctggcgtgc tccgactcag tagctgggcc ctggcagctc cc	52
<210> 71 <211> 52 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 来源 <222> 1..52 <223> /分子类型="DNA" /备注="引物" /生物体="人工序列"	
<400> 71 ccatctcacc cctggcgtgc tccgactcag tcagtgggcc ctggcagctc cc	52
<210> 72 <211> 52 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 来源 <222> 1..52 <223> /分子类型="DNA" /备注="引物" /生物体="人工序列"	
[0016] <400> 72 ccatctcacc cctggcgtgc tccgactcag tccatgggcc ctggcagctc cc	52
<210> 73 <211> 52 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 来源 <222> 1..52 <223> /分子类型="DNA" /备注="引物" /生物体="人工序列"	
<400> 73 ccatctcacc cctggcgtgc tccgactcag tcgttgggcc ctggcagctc cc	52
<210> 74 <211> 52 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 来源 <222> 1..52 <223> /分子类型="DNA" /备注="引物" /生物体="人工序列"	
<400> 74 ccatctcacc cctggcgtgc tccgactcag tccttgggcc ctggcagctc cc	52
<210> 75 <211> 52 <212> DNA <213> 人工序列	

	<220> <221> 来源 <222> 1..52 <223> /分子类型="DNA" /备注="引物" /生物体="人工序列"	
	<400> 75 ccatctcacc cctgcgtggtc tccgactcag tgactgggtcc ctggcagtct cc	52
	<210> 76 <211> 52 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <221> 来源 <222> 1..52 <223> /分子类型="DNA" /备注="引物" /生物体="人工序列"	
	<400> 76 ccatctcacc cctgcgtggtc tccgactcag tgtgtgggtcc ctggcagtct cc	52
[0017]	<210> 77 <211> 52 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <221> 来源 <222> 1..52 <223> /分子类型="DNA" /备注="引物" /生物体="人工序列"	
	<400> 77 ccatctcacc cctgcgtggtc tccgactcag ttcctgggtcc ctggcagtct cc	52
	<210> 78 <211> 52 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <221> 来源 <222> 1..52 <223> /分子类型="DNA" /备注="引物" /生物体="人工序列"	
	<400> 78 ccatctcacc cctgcgtggtc tccgactcag ttggtgggtcc ctggcagtct cc	52



ECC原理的示例性实例

图1



使用微乳滴PCR的ECC原理的示例性实例

图2

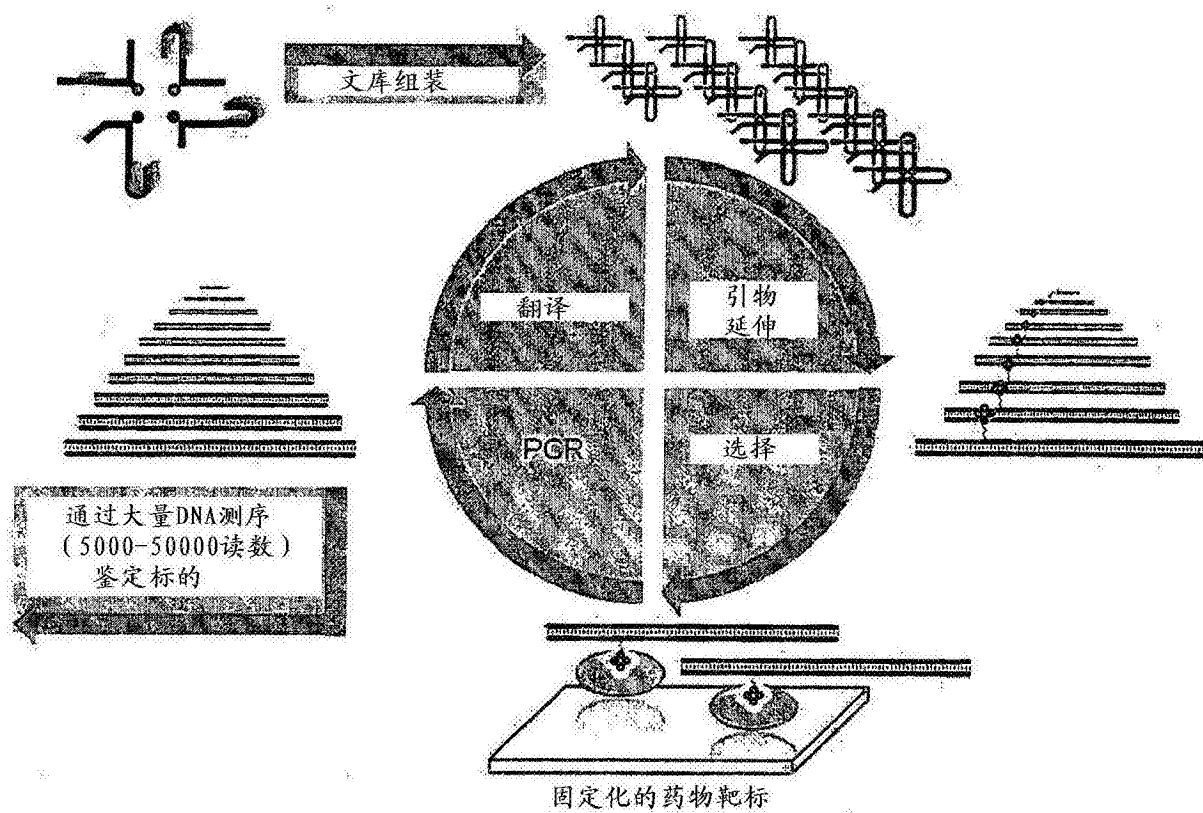
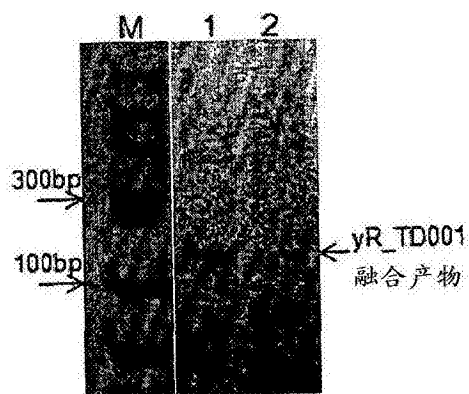


图3



低范围DNA标记物 (Fermentas) 加载于泳道M。在泳道1中，加载来自未与生物素预孵育的结合反应的PCR产物。在泳道2中，加载来自与生物素预孵育的结合反应的PCR产物。

图4

条件	掺入 (1:1000)	与生物素 预孵育	总计数	#生物素_yR 计数	%生物素_yR	富集倍数
A	Yes	No	6339	2385	37.62	376
A	Yes	No	7032	2250	32.00	320
B	Yes	Yes	6897	21	0.30	3
B	Yes	Yes	7195	52	0.72	7
C	No	No	5750	1	0.02	0
C	No	No	6425	3	0.05	0

DNA测序结果

图5

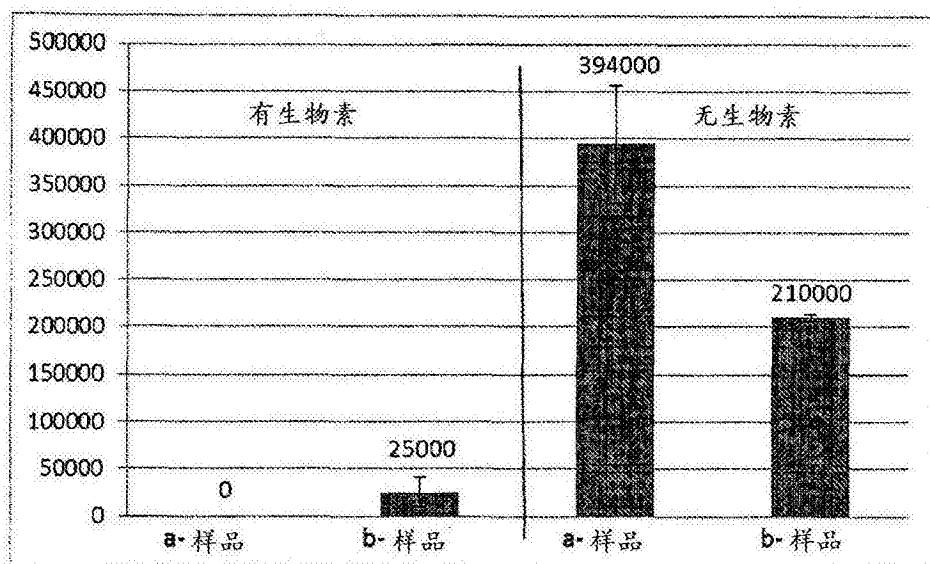


图6

样品	文库	BSB_YR 插入	靶标	靶标浓度 (nM)	以 10M BSB 稀释的靶标	乳化力 (rpm)	解离时间 (min)	读数总数	最高计数	第2最高计数	BSB_YR 计数	频率 (BSB_YR)	富集倍数
1	Lib01651	0.000005	CAII	10	1	5500	2	7808	54	24	54	0.0069	1383
2	Lib01651	0.000005	CAII	10	1	5500	2	7970	17	15	0	<0.0001	NA
3	Lib01651	0.000005	CAII	10	1	5500	30	10470	15	14	0	<0.0001	NA
4	Lib01651	0.000005	CAII	10	1	5500	30	7053	18	15	0	<0.0001	NA
5	Lib01651	0.000005	CAII	10	1	NA	NA	15864	15	12	0	<0.0001	NA

图7