



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104911177 A

(43) 申请公布日 2015. 09. 16

(21) 申请号 201510314041. 2

(22) 申请日 2010. 02. 01

(30) 优先权数据

0901593. 4 2009. 01. 30 GB

(62) 分案原申请数据

201080006024. 8 2010. 02. 01

(71) 申请人 触光基因学有限公司

地址 英国伦敦

(72) 发明人 瓦萨·希尔

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限
责任公司 11240

代理人 张英 宫传芝

(51) Int. Cl.

C12N 15/10(2006. 01)

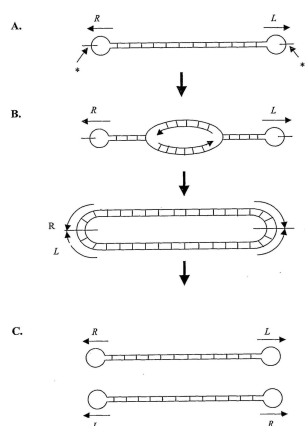
权利要求书2页 说明书30页 附图6页

(54) 发明名称

用于制备闭合线状 DNA 的体外无细胞方法的
试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及用于制备闭合线状 DNA 的体外无细胞方法的试剂盒。该试剂盒包含至少一种 DNA 聚合酶和至少一种原核端粒酶。本文还公开了一种用于制备闭合线状脱氧核糖核酸 (DNA) 的体外方法, 包括:(a) 在一种或多种引物存在下, 使包含至少一个原核端粒酶靶序列的 DNA 模板与至少一种 DNA 聚合酶在促进所述模板扩增的条件下接触; 和 (b) 使 (a) 中制备的扩增 DNA 与至少一种原核端粒酶在促进闭合线状 DNA 制备的条件下接触。



1. 一种适用于制备闭合线状脱氧核糖核酸的体外无细胞方法的试剂盒, 包含至少一种 DNA 聚合酶和至少一种原核端粒酶。

2. 根据权利要求 1 所述的试剂盒, 其中, 所述 DNA 聚合酶是链置换型 DNA 聚合酶。

3. 根据权利要求 2 所述的试剂盒, 其中, 所述 DNA 聚合酶是滚环扩增 DNA 聚合酶。

4. 根据权利要求 3 所述的试剂盒, 其中, 所述 DNA 聚合酶是 SEQ ID NO:2 的 phi29 或包含与全长 SEQ ID NO:2 的至少 80% 同一性的所述 phi29 的变异体。

5. 根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的试剂盒, 其中, 所述原核端粒酶是 SEQ ID NO:15 的噬菌体 N15Te1N 或包含与全长 SEQ ID NO:15 的至少 80% 同一性的所述噬菌体 N15Te1N 的变异体。

6. 根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的试剂盒, 包含 dNTP、合适的缓冲剂和一种或多种引物。

7. 根据权利要求 6 所述的试剂盒, 其中, 所述引物是随机引物。

8. 根据权利要求 6 所述的试剂盒, 其中, 所述引物是特异性引物。

9. 根据权利要求 6 至 8 中任一项所述的试剂盒, 其中, 所述引物包含化学改性的核苷酸。

10. 根据权利要求 1 至 9 中任一项所述的试剂盒, 包含焦磷酸酶。

11. 一种用于体外无细胞制备闭合线状 DNA 的方法, 包括:

- 由包含多于一种原核端粒酶靶序列的 DNA 模板扩增 DNA, 以及
- 使扩增的所述 DNA 与至少一种原核端粒酶在促进闭合线状 DNA 制备的条件下接触。

12. 根据权利要求 11 所述的方法, 其中, 同时或并行进行所述 DNA 模板的所述扩增和闭合线状 DNA 的所述制备。

13. 包括 DNA 模板的多个重复的多联体 DNA, 所述 DNA 模板包含至少一种原核端粒酶靶序列。

14. 根据权利要求 13 所述的多联体 DNA, 其中, 所述 DNA 模板包括一种或多种由原核端粒酶靶序列侧接在任一侧的表达盒。

15. 根据权利要求 14 所述的多联体 DNA, 其中, 所述表达盒包含可操作地连接至编码 mRNA 或蛋白质的序列的真核启动子。

16. 根据权利要求 14 或权利要求 15 所述的多联体 DNA, 其中, 所述表达盒进一步包含真核转录终止序列。

17. 根据权利要求 14 至 16 中任一项所述的多联体 DNA, 其中, 所述表达盒缺失选自以下组成的组中的一种或多种细菌或载体序列:

- (i) 细菌的复制起点;
- (ii) 细菌的选择标记; 和
- (iii) 未甲基化的 CpG 基序。

18. 根据权利要求 13 至 17 中任一项所述的多联体 DNA, 其中, 所述多联体 DNA 包含 10 个或更多个单位的扩增的 DNA 模板。

19. 根据权利要求 13 至 18 中任一项所述的多联体 DNA, 其中, 所述多联体 DNA 的大小为至少 5kb。

20. 根据权利要求 13 至 19 中任一项所述的多联体 DNA, 其中, 所述多联体 DNA 是具有

模板 DNA 的多个重复的线状单链 DNA。

21. 根据权利要求 13 至 20 中任一项所述的多联体 DNA, 其中, 所述多联体 DNA 是在体外。

22. 根据权利要求 13 至 21 中任一项所述的多联体 DNA, 其中, 所述 DNA 模板包含多于一种原核端粒酶靶序列。

用于制备闭合线状 DNA 的体外无细胞方法的试剂盒

[0001] 本申请是申请日为 2010 年 2 月 1 日的题为“闭合线状 DNA 的制备”的中国专利申请号 201080006024.8 的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及一种用于制备闭合线状脱氧核糖核酸 (DNA) 的体外、无细胞方法。

背景技术

[0003] 用于大量扩增 DNA 的传统的基于细胞的方法成本较高。例如,细菌的使用需要它们在昂贵的发酵罐内大体积生长,发酵罐需要保持在无菌状态以防止培养物的污染。还需要裂解细菌以释放扩增的 DNA 并且需要将所述 DNA 从其他细菌组分中清洗并且纯化出来。特别是在制备 DNA 疫苗或其他治疗性 DNA 药物时,需要高纯度以除去对哺乳动物具有毒性的内毒素。

[0004] 除了成本问题之外,细菌的使用在许多情况下为扩增方法的保真度造成困难。在细菌细胞复杂的生物化学环境中,难以控制所需 DNA 产物的质量和收率。细菌有时会改变克隆在扩增 DNA 中的所需基因并且使其对于所需目的无用。重组事件还可能会导致感兴趣的 DNA 的忠实制备中存在问题。用于扩增 DNA 的无细胞酶法避免了使用宿主细胞,所以是有利的。

[0005] 例如,制备药用 DNA 表达盒几乎不例外地依赖于将它们插入细菌质粒并且在细菌发酵过程中进行扩增。

[0006] 该现有技术方法在许多方面限制了改进此类 DNA 药物制备的机会。此外,质粒产物主要是粗 DNA 分子,因为其包含药用功能不需要的核苷酸序列。因此,在制备 DNA 产物例如 DNA 药物的领域中,需要提供用于大量扩增 DNA 的改进方法。特别是需要提供用于扩增特定形式的 DNA 例如闭合线状 DNA 的改进方法。由于闭合线状 DNA 分子与其他形式的 DNA 相比具有更高的稳定性和安全性,所以在治疗应用中具有特别的用途。

发明内容

[0007] 本发明涉及体外、无细胞制备线状共价闭合 DNA (闭合线状 DNA) 的方法。该方法与涉及细胞处理和质粒内扩增的传统方法相比能够增强线状共价闭合 DNA 的制备。这显著增加了该方法的生产力并同时降低产品纯化的成本。

[0008] 根据本发明,在无宿主细胞的条件下用酶从 DNA 模板制备线状共价闭合 DNA。该模板 DNA 包含至少一个原核端粒酶 (protelomerase, 一种噬菌体编码的酶) 靶序列。使该模板 DNA 与至少一种 DNA 聚合酶在促进该模板扩增的条件下在一种或多种引物存在下接触。使从该模板扩增的 DNA 与至少一种原核端粒酶在促进闭合线状 DNA 制备的条件下接触。

[0009] 因此,本发明提供用于制备闭合线状脱氧核糖核酸 (DNA) 的体外无细胞方法,其包括:

[0010] (a) 使包含至少一个原核端粒酶靶序列的 DNA 模板与至少一种 DNA 聚合酶在一种

或多种引物存在下在促进所述模板扩增的条件下接触 ;和

[0011] (b) 使 (a) 中制备的扩增 DNA 与至少一种原核端粒酶在促进闭合线状 DNA 制备的条件下接触。

[0012] 本发明还涉及提供对于本发明方法必要的组分的试剂盒。因此,本发明提供包含至少一种 DNA 聚合酶和至少一种原核端粒酶以及本发明方法的使用说明的试剂盒。

附图说明

[0013] 图 1 :噬菌体中线状共价闭合 DNA 的复制以及原核端粒酶的作用。A. 染色体外噬菌体线状共价闭合 DNA 的示意图。* = 端粒回文序列的中心。R 序列是 L 序列的反转回文重复。B. 宿主内噬菌体 DNA 的复制 :泡表示 DNA 链复制。对于 R 和 L 的互补链的合成得到了相同的双链 RL 序列。C. 在原核端粒酶作用下形成的产物。原核端粒酶结合至 RL 序列并且在回文序列的中心点切割并连接相反链从而重新形成端粒并且完成原始线状共价闭合 DNA 的复制。

[0014] 图 2 :大肠杆菌噬菌体 N15 原核端粒酶 (TelN) 对包含其靶位点 telRL 的环状双链 DNA 的作用。TelRL 是具有由箭头指出的 28bp 右臂 (telR) 和左臂 (telL) 的反转回文序列。下划线示出的序列表示 telRL 回文序列中的缺陷。中间 22bp 的完整反转回文序列 Tel10 对于酶 TelN 的结合是必需的。TelN 在其中点裂解该 22bp 序列并且将互补序列的末端连接形成共价闭合末端。

[0015] 图 3 :比较存在于各种生物体中的原核端粒酶靶序列。加框序列表示完整的或不完整的回文序列的范围。下划线表示该回文序列中的缺陷。突出显示的碱基对序列是所有原核端粒酶靶序列共有的,表明它们对于原核端粒酶结合和发挥作用的重要性。A. 大肠杆菌噬菌体 N15。B. 克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*) 噬菌体 Phi K02。C. 耶尔森菌属 (*Yersinia*) 噬菌体 Py54。D. 盐单胞菌属 (*Halomonas*) 噬菌体 Phi HAP。E. 弧菌属 (*Vibrio*) 噬菌体 VP882。F. 伯氏疏螺旋体 (*Borrelia burgdorferi*) 质粒 lpB31.16。加框序列表示每一种噬菌体的完整或不完整的回文序列的范围。G. 示出了用于噬菌体原核端粒酶结合并发挥作用的共有反转回文序列。其为具有 22 个碱基对的完整反转重复序列 (切割位点每一边各 11 个碱基对)。该共有序列衍生自 A-E 的突出显示的保守残基。显示出保守碱基对以及它们在回文序列中的位置。短横线表示序列组成中的可变性,即碱基可能为 N(A、T、C 或 G) 的情况。

[0016] 图 4 :使用 RCA 链置换 DNA 聚合酶以及 TelN 原核端粒酶体外扩增线状双链共价闭合 DNA 的具体方法。A. 闭合线状 DNA 模板。R 和 L 表示 TelN 原核端粒酶结合序列的右臂和左臂的 DNA 序列。B. 起始模板变性形成环状单链 DNA。C. 引物结合。D-E. 通过 RCA 链置换 DNA 聚合酶从单链 DNA 模板进行滚环扩增。F. 形成长多联体双链 DNA,其包含被原核端粒酶结合序列 (RL) 分离的单个单元的已扩增模板。G. 与对 RL 序列具有特异性的 TelN 原核端粒酶接触。原核端粒酶在 RL 位点裂解多联体 DNA 并且连接互补链以产生原始线状共价闭合 DNA 模板的扩增拷贝。

[0017] 图 5 :从长双链 DNA 分子切割表达感兴趣的基因的 DNA 表达盒以产生闭合线状 DNA 表达盒。A. 线状双链 DNA 分子,其包含的 DNA 表达盒包含感兴趣的基因,其两侧侧接原核端粒酶靶序列。B. 以线状共价闭合 DNA 分子切割所述 DNA 表达盒。

[0018] 图 6 :扩增闭合线状 DNA 和用于“狗骨状 (doggybone)”表达盒的报告基因表达。

[0019] A. 通过琼脂糖凝胶电泳验证 RCA 扩增的多联体的 Te1N 裂解以形成闭合线状 DNA。泳道 1-3 表示 RCA 扩增的 pUC18。泳道 1 :3 微升未消化的 RCA 扩增的 pUC18。泳道 2 :2 微升用 Pvu1 消化的 RCA 扩增的 pUC18。泳道 3 :2 微升用 Te1N 处理的 RCA 扩增的 pUC18 (阴性对照)。泳道 4-6 表示 RCA 扩增的 pUC18te1RL。泳道 4 :3 微升未消化的 RCA 扩增的 pUC18te1RL。泳道 5 :1 微升用 Pvu1 消化的 RCA 扩增的 pUC18te1RL。泳道 6 :4 微升用 Te1N 处理的 RCA 扩增的 pUC18te1RL。示出了用 Te1N 处理生成的 2.7kb 闭合线状 DNA。两侧的泳道为 DNA 大小标准物。

[0020] B. 显示闭合线状 DNA 对热变性的耐性的 Lab-On-A-Chip (LOC) 分析。泳道 1 :DNA 大小标准物。泳道 2 和 3 :100ng PCR DOG。泳道 4 和 5 :100ng 变性的 PCR DOG。泳道 6 和 7 :“狗骨状”DNA- 用 Te1N 处理的 100ng pGL DOG。泳道 6 和 7 :“狗骨状 DNA”- 用 Te1N 处理并且变性的 100ng pGL DOG。

[0021] C. 通过转染验证闭合线状 DNA 在细胞内的表达。y 轴 :平均萤火虫 / 海肾比 (Firefly/Renilla ratio) ;x- 轴 :在转染中使用的线状 DNA 构建体。PCR pGL :来自 luc 基因中的 pGL4.13 的开放线状 PCR 片段。PCR DOG :用侧接 te1RL 位点的引物从 pGL DOG 扩增的开放线状 PCR 片段。“狗 MP” :分离自用 PvuI 消化 (除去污染性载体 DNA) 并且用 Te1N 裂解的小量制备 DNA 的 pGL DOG 的闭合线状 DNA。“狗 RCA” :用 PvuI 消化并且用 Te1N 裂解的通过 RCA 扩增的 pGL DOG 的闭合线状 DNA。

具体实施方式

[0022] 序列描述

[0023] SEQ ID NO:1 是杆菌属噬菌体 phi29DNA 聚合酶的核酸序列。

[0024] SEQ ID NO:2 是由 SEQ ID NO:1 编码的杆菌属噬菌体 phi29DNA 聚合酶的氨基酸序列。

[0025] SEQ ID NO:3 是火球菌属 (Pyrococcus sp) Deep Vent DNA 聚合酶的氨基酸序列。

[0026] SEQ ID NO:4 是嗜热脂肪芽胞杆菌 (Bacillus stearothermophilus) DNA 聚合酶 I 的核酸序列。

[0027] SEQ ID NO:5 是由 SEQ ID NO:4 编码的嗜热脂肪芽胞杆菌 DNA 聚合酶 I 的氨基酸序列。

[0028] SEQ ID NO:6 是盐单胞菌属 (Halomonas) 噬菌体 phiHAP-1 原核端粒酶核酸序列的核酸序列。

[0029] SEQ ID NO:7 是由 SEQ ID NO:6 编码的盐单胞菌属噬菌体 phiHAP-1 原核端粒酶的氨基酸序列。

[0030] SEQ ID NO:8 是耶尔森菌属 (Yersinia) 噬菌体 PY54 原核端粒酶的核酸序列。

[0031] SEQ ID NO:9 是由 SEQ ID NO:8 编码的耶尔森菌属噬菌体 PY54 原核端粒酶的氨基酸序列。

[0032] SEQ ID NO:10 是克雷伯氏菌属 (Klebsiella) 噬菌体 phiK02 原核端粒酶的核酸序列。

[0033] SEQ ID NO:11 是由 SEQ ID NO:10 编码的克雷伯氏菌属噬菌体 phiK02 原核端粒酶

的氨基酸序列。

[0034] SEQ ID NO:12 是弧菌属 (*Vibrio*) 噬菌体 VP882 原核端粒酶的核酸序列。

[0035] SEQ ID NO:13 是由 SEQ ID NO:12 编码的弧菌属噬菌体 VP882 原核端粒酶的氨基酸序列。

[0036] SEQ ID NO:14 是大肠杆菌噬菌体 N15 原核端粒酶 (telN) 和二次免疫抑制物 (cA) 核酸序列的核酸序列。

[0037] SEQ ID NO:15 是由 SEQ ID NO:14 编码的大肠杆菌噬菌体 N15 原核端粒酶 (telN) 的氨基酸序列。

[0038] SEQ ID NO:16 是存在于噬菌体原核端粒酶靶序列中的完整反转重复序列的共有核酸序列。

[0039] SEQ ID NO:17 是来自大肠杆菌噬菌体 N15 和克雷伯氏菌属噬菌体 phiK02 的 22 碱基完整反转重复核酸序列。

[0040] SEQ ID NO:18 是来自耶尔森菌属噬菌体 PY54 的 22 碱基完整反转重复核酸序列。

[0041] SEQ ID NO:19 是来自盐单胞菌属噬菌体 phiHAP-1 的 22 碱基完整反转重复核酸序列。

[0042] SEQ ID NO:20 是来自弧菌属噬菌体 VP882 的 22 碱基完整反转重复核酸序列。

[0043] SEQ ID NO:21 是来自伯氏疏螺旋体 (*Borrelia burgdorferi*) 质粒 lpB31.16 的 14 碱基完整反转重复核酸序列。

[0044] SEQ ID NO:22 是来自弧菌属噬菌体 VP882 的 24 碱基完整反转重复核酸序列。

[0045] SEQ ID NO:23 是来自耶尔森菌属噬菌体 PY54 的 42 碱基完整反转重复核酸序列。

[0046] SEQ ID NO:24 是来自盐单胞菌属噬菌体 phiHAP-1 的 90 碱基完整反转重复核酸序列。

[0047] SEQ ID NO:25 是包含原核端粒酶靶序列的来自大肠杆菌噬菌体 N15 的核酸序列。

[0048] SEQ ID NO:26 是包含原核端粒酶靶序列的来自克雷伯氏菌属噬菌体 phiK02 的核酸序列。

[0049] SEQ ID NO:27 是包含原核端粒酶靶序列的来自耶尔森菌属噬菌体 PY54 的核酸序列。

[0050] SEQ ID NO:28 是包含原核端粒酶靶序列的来自弧菌属噬菌体 VP882 的核酸序列。

[0051] SEQ ID NO:29 是包含原核端粒酶靶序列的来自伯氏疏螺旋体质粒 lpB31.16 的核酸序列。

[0052] SEQ ID NO:30 是用于 TelN 扩增的经修饰的寡核苷酸引物。

[0053] SEQ ID NO:31 是用于 TelN 扩增的经修饰的寡核苷酸引物。

[0054] SEQ ID NO:32 是包含 TelN 识别位点 telRL 的合成寡核苷酸。

[0055] SEQ ID NO:33 是包含 TelN 识别位点 telRL 的合成寡核苷酸。

[0056] SEQ ID NO:34 是用于 PCR DOG 扩增的引物序列。

[0057] SEQ ID NO:35 是用于 PCR DOG 扩增的引物序列。

[0058] 本发明涉及用于制备线状双链共价闭合 DNA 即闭合线状 DNA 分子的方法。闭合线状 DNA 分子通常包括还被描述为发夹环的共价闭合末端,其中互补 DNA 链之间不存在碱基配对。发夹环连接互补 DNA 链的末端。这一类型的结构通常形成于染色体的端粒末端,从

而通过将末端核苷酸隔离在闭合的结构中防护染色体 DNA 的丢失或损伤。在本文所述的闭合线状 DNA 分子的实例中,发夹环侧接互补的碱基配对的 DNA 链,形成“狗骨”状结构(如图 1 所示)。

[0059] 本发明的方法通过并入将扩增的 DNA 转化成闭合线状 DNA 的单一加工步骤提供闭合线状 DNA 分子的高通量制备。此外,本发明的方法在体外、无细胞环境中进行,因此不受限于具有细菌增殖必需的额外序列的 DNA 模板的使用。如下文所示,本发明方法可因此被用于制备不包含问题载体序列并且特别适用于治疗用途的闭合线状 DNA 分子。

[0060] 闭合 DNA 分子作为治疗药物,即可用于体内表达基因产物的 DNA 药物,具有特殊的用途。这是因为它们的共价闭合结构可防止诸如核酸外切酶的酶的攻击,导致与具有暴露 DNA 末端的“开放”DNA 分子相比基因表达的稳定性和寿命增强。已证明当引入宿主组织时,线状双链开放末端表达盒就基因表达而言是无效的。这归因于由胞外间隙中的核酸外切酶的作用引起的表达盒的不稳定性。

[0061] 将 DNA 末端隔离在共价闭合结构内还具有其他优势。可防止 DNA 末端整合入基因组 DNA,所以闭合线状 DNA 分子具有提高的安全性。而且,闭合线状结构可防止 DNA 分子在宿主细胞内的多联体化并且因此能够以更灵敏的方式调节基因产物的表达水平。本发明提供制备闭合线状 DNA 分子的体外、无细胞方法,其包括模板定向(template-directed)DNA 扩增和原核端粒酶对已扩增 DNA 的特异加工。

[0062] 典型地,本发明方法可用于在宿主细胞内制备体外表达 DNA,特别是 DNA 疫苗。DNA 疫苗通常编码经修饰形式的感染性生物体的 DNA。将 DNA 疫苗给予个体,在个体内它们表达感染性生物体的所选蛋白,引起通常为保护性的对该蛋白质的免疫应答。DNA 疫苗还能编码癌症免疫疗法中的肿瘤抗原。

[0063] DNA 疫苗可包含编码抗原的核酸序列,用于治疗或预防许多病症,包括但不限于癌症、变态反应、毒性和诸如但不限于以下病原体引起的感染:真菌;病毒包括人乳头瘤病毒(HPV)、HIV、HSV2/HSV1、流感病毒(甲型、乙型和丙型)、脊髓灰质炎病毒、RSV 病毒、鼻病毒、轮状病毒、甲型肝炎病毒、诺沃克病毒组、肠病毒、星状病毒、麻疹病毒、副流感病毒、腮腺炎病毒、水痘-带状疱疹病毒、细胞巨化病毒、EB 病毒、腺病毒、风疹病毒、人 T 细胞淋巴瘤 I 型病毒(HTLV-I)、乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)、丁型肝炎病毒、痘病毒、马尔堡病毒以及埃博拉病毒;细菌包括结核分支杆菌、衣原体、淋病奈瑟菌、志贺氏菌、沙门氏菌、霍乱弧菌、梅毒螺旋体、假单胞菌属、百日咳杆菌、布鲁氏菌、土拉弗朗西斯菌、幽门螺旋杆菌、问号钩端螺旋体、嗜肺性军团病杆菌、鼠疫耶尔森菌、链球菌(A型和B型)、肺炎球菌、脑膜炎双球菌、流感嗜血杆菌(b型)、鼠弓形体、弯曲菌、粘膜炎莫拉菌、腹股沟肉芽肿以及放线菌病;真菌病原体包括念珠菌病和曲菌病菌;寄生虫病原体包括绦虫、吸虫、线虫、阿米巴、贾第鞭毛虫、隐孢子虫、血吸虫属、卡氏肺孢子虫、滴虫和旋毛虫。

[0064] DNA 疫苗可包含编码来自以下成员的抗原的核酸序列:腺病毒科(包括例如人腺病毒)、疱疹病毒科(包括例如 HSV-1、HSV-2、EBV、CMV 和 VZV)、乳多空病毒科(包括例如 HPV)、痘病毒科(包括例如天花病毒和牛痘病毒)、微小病毒科(包括例如细小病毒 B19)、呼肠孤病毒科(包括例如轮状病毒)、冠状病毒科(包括例如 SARS)、黄病毒科(包括例如黄热病、西尼罗病毒、登革热病毒、丙型肝炎病毒和蜱传脑炎病毒)、小核糖核酸病毒科(包括脊髓灰质炎病毒、鼻病毒和甲型肝炎病毒)、披膜病毒科(包括例如风疹病毒)、纤丝病毒

科（包括例如马尔堡病毒和埃博拉病毒）、副粘病毒科（包括例如副流感病毒、呼吸道合胞病毒、腮腺炎病毒和麻疹病毒）、弹状病毒科（包括例如狂犬病病毒）、本扬病毒科（包括例如汉坦病毒）、正粘病毒科（包括例如甲型、乙型、丙型流感病毒）、逆转录病毒科（包括例如 HIV 和 HTLV）以及肝脱氧核糖核酸病毒科（包括例如乙型肝炎病毒）。

[0065] 所述抗原可能来自引起兽病的病原体，特别是可能来自病毒病原体，包括例如呼肠病毒（例如非洲马病病毒或蓝舌病毒）和疱疹病毒（包括马疱疹病毒）。所述抗原可能来自以下病毒之一：口蹄病病毒、蜱传脑炎病毒、登革热病毒、SARS、西尼罗病毒和汉坦病毒。所述抗原可能来自免疫缺陷病毒并且例如可能来自 SIV 或猫免疫缺陷病毒。

[0066] 通过本发明方法制备的 DNA 疫苗还可包含编码肿瘤抗原的核酸序列。肿瘤相关抗原的实例包括但不限于睾丸癌抗原例如 MAGE 家族成员（MAGE 1、2、3 等）、NY-ESO-1 和 SSX-2，分化抗原例如酪氨酸酶、gp100、PSA、Her-2 和 CEA，突变的自身抗原以及病毒肿瘤抗原例如来自致癌性 HPV 型的 E6 和 / 或 E7。具体肿瘤抗原的其他实例包括 MART-1、Melan-A、p97、beta-HCG、GaINAc、MAGE-1、MAGE-2、MAGE-4、MAGE-12、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC18、CEA、DDC、P1A、EpCam、黑素瘤抗原 gp75、Hker 8、高分子量黑素瘤抗原、K19、Tyr1、Tyr2、pMel17 基因家族成员、c-Met、PSM（前列腺粘蛋白抗原）、PSMA（前列腺特异膜抗原）、前列腺分泌蛋白、甲胎蛋白、CA125、CA19.9、TAG-72、BRCA-1 和 BRCA-2 抗原。

[0067] 此外，本发明的方法还可制备其他类型的治疗性 DNA 分子，例如用于基因疗法的那些。例如，当个体患有由基因的功能障碍形式引起的遗传疾病时，此类 DNA 分子可用于表达功能基因。此类疾病的实例包括进行性假肥大性肌营养不良、纤维囊泡症、高歇病（Gaucher' Disease）和腺苷脱氨酶（ADA）缺陷症。可使用基因疗法的其他疾病包括炎症性疾病、自身免疫病、慢性和传染性疾病，包括诸如以下病症：AIDS、癌症、神经性疾病、心血管疾病、高胆固醇血症、各种血液病包括各种贫血、珠蛋白生成障碍性贫血和血友病以及肺气肿。对于实体瘤的治疗，可表达编码毒性肽（即诸如蓖麻毒素、白喉毒素和眼镜蛇蛇毒因子的化疗药物）、肿瘤抑制基因例如 p53、编码与转化癌基因反义的 mRNA 序列的基因、抗肿瘤肽例如肿瘤坏死因子（TNF）和其他细胞因子，或转化癌基因的反式显性负突变体。

[0068] 还设想通过本发明方法制备其他类型的治疗性 DNA 分子。例如，可根据本发明方法制备转录成活性 RNA 形式例如小干扰 RNA（siRNA）的 DNA 分子。

[0069] 在涉及制备具有治疗用途的 DNA 分子的实施方式中，DNA 模板通常包括包含一个或多个启动子或增强子元件和编码感兴趣的 mRNA 或蛋白质的基因或其他编码序列的表达盒。在涉及生成 DNA 疫苗分子或用于基因疗法的 DNA 分子的具体实施方式中，所述 DNA 模板包含由与编码感兴趣的蛋白质的序列可操作地连接的真核启动子以及可选的增强子和 / 或真核转录终止序列组成的表达盒。通常，所述 DNA 模板为通常用于容纳基因的载体形式，例如染色体外遗传元件例如质粒。

[0070] “启动子”为起始并调节多聚核苷酸转录的核苷酸序列。启动子包括诱导型启动子（与该启动子可操作地连接的多聚核苷酸序列的表达受到分析物、辅因子、调节蛋白等的诱导）、阻抑启动子（与该启动子可操作地连接的多聚核苷酸序列的表达受到分析物、辅因子、调节蛋白等的阻抑）和组成型启动子。术语“启动子”或“控制元件”意图包括全长启动子区和这些区的功能性（例如控制转录或翻译）片段。

[0071] “可操作地连接”指元件的一种排列，其中如此描述的组分被设置成能够执行它们

的正常功能。因此,与核酸序列可操作地连接的特定启动子在适合的酶存在下能够引起该序列的表达。只要能够引导序列的表达,启动子不一定与该序列毗连。因此,例如,在启动子序列和核酸序列之间可以存在间插的不翻译但是却可以被转录的序列,并且仍然认为该启动子序列与编码序列“可操作地连接”。因此,术语“可操作地连接”意图包括在转录复合物识别启动子元件之后,能够起始(引发)感兴趣的 DNA 序列的转录的启动子元件和感兴趣的 DNA 序列的任意间隔或方向性。

[0072] 根据本发明,通过原核端粒酶对从包含至少一个原核端粒酶靶序列的 DNA 模板扩增的 DNA 的作用生成闭合线状 DNA 分子。原核端粒酶靶序列是存在于 DNA 模板中使得能够通过原核端粒酶的酶活性将其转化成闭合线状 DNA 的任何 DNA 序列。换言之,原核端粒酶靶序列对于通过原核端粒酶裂解并再连接双链 DNA 以形成共价闭合线状 DNA 是必需的。

[0073] 典型地,原核端粒酶靶序列包括任何完整回文序列,即任何具有双重旋转对称的双链 DNA 序列,在本文中还被称作完整反转重复序列。如图 3 所示,来自各种常温噬菌体以及细菌质粒的原核端粒酶靶序列均具有包含完整反转重复序列的共有特征。完整反转重复序列的长度视具体生物体而不同。在伯氏疏螺旋体中,完整反转重复序列的长度为 14 个碱基对。在各种常温噬菌体中,完整反转重复序列的长度为 22 个碱基对或更长。此外,在一些情况下,例如大肠杆菌 N15,中心完整反转回文序列侧接反转重复顺序,即形成了更大的不完整反转回文序列的一部分(见图 2 和图 3;具有下划线的碱基表明该反转重复序列的对称被中断)。

[0074] 如本发明中所使用的原核端粒酶靶序列优选包含长度至少为 14 个碱基对的双链回文(完整反转重复)序列。优选的完整反转重复序列包括 SEQ ID NOs:16-21 的序列及其变异体。SEQ ID NO:16(NCATNNTANNCGNNTANNATGN) 为常温噬菌体完整反转重复序列的 22 碱基共有序列。如图 3 所示,不同噬菌体之间的完整反转重复序列的碱基对在某些位点是保守的,而在其他位点可能存在序列可变性。因此,SEQ ID NO:16 是与本发明方法中的噬菌体原核端粒酶一起使用的完整反转重复序列的最小共有序列。

[0075] 由 SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17(CCATTATACGCGGTATAATGG) 确定的共有序列内存在与大肠杆菌噬菌体 N15(SEQ ID NO:15) 和克雷伯氏菌属噬菌体 Phi K02(SEQ ID NO:11) 原核端粒酶一起使用的特别优选的反转重复序列。而且由 SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18-20:

[0076] SEQ ID NO:18(GCATACTACGCGGTAGTATGC),

[0077] SEQ ID NO:19(CCATACTATACGTATAGTATGG),

[0078] SEQ ID NO:20(GCATACTATACGTATAGTATGC),

[0079] 确定的共有序列中存在与来自耶尔森菌属噬菌体 PY54(SEQ ID NO:9)、盐单胞菌属噬菌体 phiHAP-1(SEQ ID NO:7) 和弧菌属噬菌体 VP882(SEQ ID NO:13) 一起使用的特别优选的完整反转重复序列。SEQ ID NO:21(ATTATATATATAAT) 是与伯氏疏螺旋体原核端粒酶一起使用的特别优选的完整反转重复序列。该完整反转重复序列来自包含于伯氏疏螺旋体内的线状共价闭合质粒 1pB31.16。该 14 碱基序列短于噬菌体(SEQ ID NO:16) 的 22bp 共有完整反转重复序列,表明细菌原核端粒酶与噬菌体原核端粒酶在具体靶序列要求上存在差异。然而,所有的原核端粒酶靶序列均具有完整反转重复序列的共有结构基序。

[0080] 所述完整反转重复序列的长度可大于 22bp,视用于本发明方法中的具体原核端

粒酶的要求而定。因此,在一些实施方式中,所述完整反转重复序列的长度为至少 30、至少 40、至少 60、至少 80 或至少 100 个碱基对。此类完整反转重复序列的实例包括 SEQ ID NO:22-24 及其变异体。

[0081] SEQ ID NO:22 (GGCATACTATACGTATAGTATGCC)

[0082] SEQ ID NO:23

[0083] (ACCTATTTTCAGCATACTACGCGCGTAGTATGCTGAAATAGGT)

[0084] SEQ ID NO:24

[0085] (CCTATATTGGGCCACCTATGTATGCACAGTTCGCCCATACTATACGT

[0086] ATAGTATGGGCGAACTGTGCATACATAGGTGGCCCAATATAGG)

[0087] SEQ ID NO:22-24 及其变异体特别优选分别与来自弧菌属噬菌体 VP882 (SEQ ID NO:13)、耶尔森菌属噬菌体 PY54 (SEQ ID NO:9) 和盐单胞菌属噬菌体 phi HAP-1 (SEQ ID NO:7) 的原核端粒酶一起使用。

[0088] 完整反转重复序列侧接另外的反转重复序列。该侧接的反转重复序列可为完整的或不完整的重复序列,即可为完全对称或部分对称。该侧接的反转重复序列可与中心回文序列毗连或不毗连。原核端粒酶靶序列可包括包含长度至少为 14 个碱基对的完整反转重复序列的不完整反转重复序列。一个实例为 SEQ ID NO:29。所述不完整反转重复序列可包含长度至少为 22 个碱基对的完整反转重复序列。一个实例为 SEQ ID NO:25。

[0089] 特别优选的原核端粒酶靶序列包括 SEQ ID NO:25-29 的序列及其变异体。

[0090] SEQ ID NO:25

[0091] (TATCAGCACACAATTGCCCATTATACGCGCGTATAATGGACTATTGTGTGCTGATA)

[0092] SEQ ID NO:26

[0093] (ATGCGCGCATCCATTATACGCGCGTATAATGGCGATAATACA) SEQ ID NO:27

[0094] (TAGTCACCTATTTTCAGCATACTACGCGCGTAGTATGCTGAAATAGGTTACTG)

[0095] SEQ ID NO:28

[0096] (GGGATCCCGTTCCATACATACATGTATCCATGTGGCATACTATACGTATAGTATGCCGATGTTACATATGGTATCATTCGGGATCCCGTT)

[0097] SEQ ID NO:29

[0098] (TACTAAATAAATATTATATATATAATTTTTTATTAGTA)

[0099] SEQ ID NO:25-29 的序列包含如上文所述的完整反转重复序列并且另包含来自相关生物体的侧接序列。包含 SEQ ID NO:25 的序列及其变异体的原核端粒酶靶序列优选与 SEQ ID NO:15 的大肠杆菌 N15Te1N 原核端粒酶及其变异体组合使用。包含 SEQ ID NO:26 的序列或其变异体的原核端粒酶靶序列优选与 SEQ ID NO:11 的克雷伯氏菌属噬菌体 Phi K02 原核端粒酶及其变异体组合使用。包含 SEQ ID NO:27 的序列或其变异体的原核端粒酶靶序列优选与 SEQ ID NO:9 的耶尔森菌属噬菌体 PY54 原核端粒酶及其变异体组合使用。包含 SEQ ID NO:28 的序列或其变异体的原核端粒酶靶序列优选与 SEQ ID NO:13 的弧菌属噬菌体 VP882 原核端粒酶及其变异体组合使用。包含 SEQ ID NO:29 的序列或其变异体的原核端粒酶靶序列优选与伯氏疏螺旋体原核端粒酶组合使用。

[0100] 上文所述任何回文序列或原核端粒酶靶序列的变异体包括其同源物或突变体。突变体包括相对于天然序列的截短、置换或缺失。变异体序列是存在于 DNA 模板中使得能够

通过原核端粒酶的酶活性将其转化成闭合线状 DNA 的任何序列。这可通过使用用于闭合线状 DNA 形成的适当的测定法容易地确定。可使用本领域描述的任何适合的测定法。适合的测定法的实例描述于 Deneke 等人, PNAS (2000) 97, 7721-7726。优选地, 所述变异体能够使原核端粒酶结合并且具有与所观察到的天然序列的活性可比的活性。本文所述回文序列的优选变异体的实例包括保留了完整重复结构并且仍然能够促使形成闭合线状 DNA 的截短的回文序列。然而, 只要能够充当原核端粒酶活性的底物, 可修饰变异体原核端粒酶靶序列从而使得它们不再保留完整的回文序列。

[0101] 应理解技术人员根据上文所列结构原理能够容易地鉴定用于本发明的适合的原核端粒酶靶序列。可使用上文所述测定法筛选候选原核端粒酶靶序列促进形成闭合线状 DNA 的能力。

[0102] 所述 DNA 模板可包含多于一个原核端粒酶靶序列, 例如两个、三个、四个、五个、十个或更多个原核端粒酶靶序列。使用多个原核端粒酶靶序列使得能够从较大的 DNA 分子剪切包含感兴趣的序列的短闭合线状 DNA。具体而言, 可将原核端粒酶靶序列侧接到 DNA 模板中的一个或多个感兴趣的序列的任一侧 (即 5' 和 3')。两个侧接原核端粒酶序列可接着在原核端粒酶的作用下 (如图 5 所示) 介导从已扩增的 DNA 以闭合线状 DNA 剪切各感兴趣的短序列。所述 DNA 模板可包含一个或多个在任一侧侧接原核端粒酶靶序列的感兴趣的序列 (优选表达盒)。所述 DNA 模板可包含两个、三个、四个、五个或更多个如上文所述侧接原核端粒酶靶序列的感兴趣的序列。

[0103] 在优选的实施方式中, 本发明的方法使用包含在任一侧侧接原核端粒酶靶序列的表达盒的 DNA 模板。该表达盒优选包含与感兴趣的编码序列可操作地连接的真核启动子和可选地真核转录终止序列。在该实施方式中, 根据本发明扩增模板 DNA 并且与原核端粒酶接触后, 以闭合线状 DNA 从扩增的模板释放表达盒。结果同时从产物中去除了模板 DNA 中的不必要序列。

[0104] 这些不必要的或额外的序列 (还被称作细菌或载体序列) 包括细菌的复制起点、细菌的选择标记 (例如抗生素抗性基因) 以及未甲基化的 CpG 二核苷酸。这些序列的缺失产生了不包含额外遗传物质的“最小的”表达盒。此外, 该类型的细菌序列会在一些治疗方法中引起问题。例如, 在哺乳动物细胞中, 细菌 / 质粒 DNA 会引起克隆基因关闭使得不能实现感兴趣的蛋白质的持续表达。而且, 用于细菌增殖中的抗生素抗性基因可引起对人类健康的威胁。另外, 细菌质粒 / 载体 DNA 会触发不利的非特异的免疫应答。细菌 DNA 序列的一个特异性质即通常被称作 CpG 基序的未甲基化的胞嘧啶 - 鸟嘌呤二核苷酸的存在还可能导致不期望的免疫应答。

[0105] 在一些实施方式中, 特别是闭合线状 DNA 产物为 DNA 疫苗时, 可在产物序列中保留 CpG 基序。这是因为它们对编码蛋白质的免疫应答具有有益的辅助作用。

[0106] 因此, 本发明提供制备闭合线状表达盒 DNA 的体外方法。该方法包括: a) 使包含至少一个在任一侧侧接原核端粒酶靶序列的表达盒的 DNA 模板与至少一种 DNA 聚合酶在促进所述模板扩增的条件下在一种或多种引物存在下接触; 和 b) 使 a) 中制备的已扩增的 DNA 与至少一种原核端粒酶在促进闭合线状表达盒 DNA 形成的条件下接触。所述闭合线状表达盒 DNA 产物可包含与感兴趣的编码序列可操作地连接的真核启动子和可选地真核转录终止序列, 或由它们组成或基本由它们组成。所述闭合线状表达盒 DNA 产物可另外缺少一个

或多个细菌或载体序列,其通常选自:(i) 细菌复制起点;(ii) 细菌选择标记(通常为抗生素抗性基因)和(iii) 未甲基化的 CpG 基序。

[0107] 如上文所述,可根据本发明方法扩增任何包含至少一种原核端粒酶靶序列的 DNA 模板。因此,尽管优选 DNA 疫苗产物和其他治疗性 DNA 分子的制备,但是本发明方法可用于制备任何类型的闭合线状 DNA。所述 DNA 模板可为双链(ds)或单链(ss)DNA。双链 DNA 模板可为开放环状双链 DNA、闭合环状双链 DNA、开放线状双链 DNA 或闭合线状双链 DNA。优选地,所述模板为闭合环状双链 DNA。特别优选与 RCA DNA 聚合酶一起使用闭合环状 dsDNA 模板。环状 dsDNA 模板可为通常用于容纳用于细菌增殖基因的质粒或其他载体形式。因此,本发明方法可用于扩增任何商购质粒或其他载体,例如商购 DNA 药物并且接着将扩增的载体 DNA 转化成闭合线状 DNA。

[0108] 当 DNA 聚合酶是能够起始从带切口 DNA 链的扩增的链置换聚合酶时,可将开放环状 dsDNA 用作模板。在该实施方式中,预先将所述模板与一种或多种在一个或多个位点切割该模板内的 DNA 链的酶温育。还可将闭合线状 dsDNA 用作模板。该闭合线状 dsDNA 模板(起始物质)可与闭合线状 DNA 产物相同。当将闭合线状 DNA 用作模板时,可将其在变性条件下温育以在促进所述模板 DNA 扩增的条件之前或之中形成单链环状 DNA。

[0109] 如上所述,DNA 模板通常包含如上文所述的表达盒,即包含与编码感兴趣的蛋白质的序列可操作地连接的真核启动子和可选地真核转录终止序列,或由它们组成或基本由它们组成。可选地所述表达盒为如上文定义的最小表达盒,即缺失一个或多个细菌或载体序列,其通常选自:(i) 细菌复制起点;(ii) 细菌选择标记(通常为抗生素抗性基因)和(iii) 未甲基化的 CpG 基序。

[0110] 可通过本领域已知的任何方法提供足够用于本方法的量的 DNA 模板。例如,可通过聚合酶链式反应(PCR)制备所述 DNA 模板。当 DNA 模板是 dsDNA 时,通过预先在至少 94 摄氏度的温度下温育以提供用于扩增步骤的变性单链。因此,本发明方法优选包括将 dsDNA 模板变性以提供单链 DNA 的步骤。或者,可以双链形式提供所述 dsDNA 模板。可在该反应中扩增完整的 DNA 模板或其所选部分。

[0111] 使 DNA 模板与至少一种 DNA 聚合酶在促进所述模板扩增的条件下接触。可使用任何 DNA 聚合酶。任何商购 DNA 聚合酶均适用于本发明方法。可使用两种、三种、四种、五种或更多种不同的 DNA 聚合酶,例如具有校正功能者和一种或多种不具有该功能的其他 DNA 聚合酶。可使用具有不同作用机制的 DNA 聚合酶,例如链置换型聚合酶和通过其他方法复制 DNA 的 DNA 聚合酶。不具有链置换活性的 DNA 聚合酶的适合的实例为 T4DNA 聚合酶。

[0112] 优选 DNA 聚合酶是高度稳定的,从而使得处理条件下的长时间温育基本不会降低其活性。因此,该酶优选在包括但不限于温度和 pH 的多种处理条件下具有长半衰期。还优选 DNA 聚合酶具有一种或多种适合制备方法的特性。该 DNA 聚合酶优选具有高保真度,例如具有校正活性。此外,优选 DNA 聚合酶表现出高核苷酸掺入效率、高链置换活性以及对 dNTP 和 DNA 的低 K_m 。DNA 聚合酶能够利用环状和/或线状 DNA 作为模板。DNA 聚合酶能够利用 dsDNA 或 ssDNA 作为模板。优选 DNA 聚合酶不表现出非特异的外切核酸酶活性。

[0113] 技术人员可通过与商购 DNA 聚合酶所表现出的特性进行比较以确定特定的 DNA 聚合酶是否表现出如上文所定义的特性,所述商购 DNA 聚合酶是例如 phi29、Deep Vent® 和嗜热脂肪芽胞杆菌(Bst)DNA 聚合酶 I,分别为 SEQ ID NOs:2、3 和 5。Bst DNA 聚合酶 I 可商

购自 New England Biolabs, Inc. 当提及高核苷酸掺入效率时,这通常表示每一次与模板结合 / 分离时, DNA 聚合酶加入核苷酸的平均数量,即一次结合事件获得的引物延长的长度。

[0114] 优选链置换型聚合酶。优选的链置换型聚合酶是 Phi 29 (SEQ ID NO:2)、Deep Vent® (SEQ ID NO:3) 和 Bst DNA 聚合酶 I (SEQ ID NO:5) 或任何一种的变异体。SEQ ID NO:2、3 和 5 的变异体如下文相对于原核端粒酶进行定义。术语“链置换”在本文中用于描述在 DNA 合成中遇到双链 DNA 区时 DNA 聚合酶置换互补链的能力。应理解链置换扩增法与基于 PCR 的方法的差异在于变性循环对于有效的 DNA 扩增不是必需的,因为双链 DNA 不会阻碍新 DNA 链的持续合成。相反,PCR 法在扩增过程中需要变性循环(即将温度升高至 94 摄氏度或更高)以熔化双链 DNA 并提供新的单链模板。

[0115] 用于本发明方法中的链置换 DNA 聚合酶优选具有至少 20kb、更优选至少 30kb、至少 50kb 或至少 70kb 或更大的核苷酸掺入率(引物延伸长度)。在特别优选的实施方式中,链置换 DNA 聚合酶具有与 phi29 聚合酶可比的或更大的核苷酸掺入效率。

[0116] 优选的链置换复制方法是滚环扩增(RCA)。术语 RCA 描述 RCA-型 DNA 聚合酶(在本文中还称作 RCA 聚合酶)持续沿着环状 DNA 模板向前移位同时延伸杂交引物的能力。这导致形成具有已扩增 DNA 的多个重复的线状单链产物。这些线状单链产物充当多次杂交、引物延伸和链置换事件的基础,导致形成多联体双链 DNA 产物,其再次包含扩增 DNA 的多个重复。因此在多联体双链 DNA 产物中存在每一个已扩增的“单个单元”DNA 的多个拷贝。

[0117] 特别优选将 RCA 聚合酶用于本发明的方法中。RCA-型链置换复制过程的产物通常需要进行复杂的加工以释放单个单元 DNA。有利的是,根据本发明,使用原核端粒酶催化功能使得能够在单一步骤中进行该加工。使用原核端粒酶还可直接生成所需的闭合线状 DNA 结构而不需要另外的加工步骤以形成具有这一结构的分子。

[0118] 为了能够根据本发明进行扩增,优选使 DNA 模板与一种或多种引物接触。所述引物可为非特异性的(即序列是随机的)或对包含于 DNA 模板内的一个或多个序列具有特异性。优选所述引物为随机序列从而能够在 DNA 模板上的任何位点进行非特异起始。这使得能够通过多次起始反应从每一条模板链进行高效率扩增。随机引物的实例为六聚体、七聚体、八聚体、九聚体、十聚体或长度更长例如 12、15、18、20 或 30 个核苷酸的序列。随机引物的长度可为 6-30、8-30 或 12-30 个核苷酸。通常以代表例如 DNA 模板中的六聚体、七聚体、八聚体或九聚体的所有可能组合的寡核苷酸混合物提供随机引物。

[0119] 在其他实施方式中,所述引物是特异性的。这意味着它们具有与需要从其起始扩增的 DNA 模板中的序列互补的序列。在该实施方式中,可使用一对引物特异扩增位于两个引物结合位点之间的一部分 DNA 模板。引物可为非标记的或包含一个或多个标记,例如放射性核素或荧光染料。引物还可包含化学修饰的核苷酸。通常基于温度考虑选择引物长度 / 序列,即在用于扩增步骤的温度下能够结合模板。

[0120] DNA 模板与 DNA 聚合酶以及一种或多种引物接触发生在促进引物与 DNA 模板复性的条件下。该条件包括存在使引物能够杂交的单链 DNA。所述条件还包括使引物能够与模板复性的温度和缓冲液。可根据引物性质选择合适的复性 / 杂交条件。用于本发明的优选的复性条件的实例是缓冲液 30mM Tris-HCl pH 7.5、20mM KCl、8mM MgCl₂。可在变性之后通过逐渐冷却至所需反应温度进行复性。

[0121] 一旦 DNA 模板与 DNA 聚合酶以及一种或多种引物接触,接下来是在促进所述模板

扩增的条件下的温育步骤。优选地,所述条件通过另一条链的链置换复制来置换被复制链从而促进所述模板的扩增。所述条件包括使用允许 DNA 扩增的任何温度,通常为 20-90 摄氏度。优选的温度范围为约 20- 约 40 摄氏度或约 25- 约 35 摄氏度。

[0122] 通常,基于具体 DNA 聚合酶具有最佳活性的温度选择适合的温度。这一信息容易获得并且为技术人员公知的部分。例如,当使用 phi29DNA 聚合酶时,适合的温度范围是约 25- 约 35 摄氏度,优选约 30 摄氏度。技术人员通常能够确定根据本发明方法进行有效扩增的适合的温度。例如,可在一定的温度范围内进行该方法并且可监测扩增 DNA 的产率以确定给定 DNA 聚合酶的最佳温度范围。

[0123] 促进 DNA 模板扩增的其他条件包括存在 DNA 聚合酶以及一种或多种引物。所述条件还包括存在所有四种 dNTP 即 ATP、TTP、CTP 和 GTP、适合的缓冲剂 /pH 以及酶性能或稳定性所要求的其他因素。适合的条件包括本领域已知的用于提供 DNA 聚合酶活性的任何条件。

[0124] 例如, pH 可在 3-10, 优选 5-8 的范围内或约为 7, 例如约为 7.5。通过使用一种或多种缓冲剂将 pH 维持在这一范围内。此类缓冲剂包括但不限于 MES、Bis-Tris、ADA、ACES、PIPES、MOBS、MOPS、MOPSO、Bis-Tris 丙烷、BES、TES、HEPES、DIPSO、TAPSO、Trizma、HEPPSO、POPSO、TEA、EPPS、Tricine、Gly-Gly、Bicine、HEPBS、TAPS、AMPD、TABS、AMPSO、CHES、CAPSO、AMP、CAPS、CABS、磷酸盐、柠檬酸-磷酸氢钠、柠檬酸-柠檬酸钠、醋酸钠-醋酸、咪唑以及碳酸钠-碳酸氢钠。该反应还可包含二价金属盐例如但不限于镁 (Mg^{2+}) 和锰 (Mn^{2+}) 盐, 包括氯化物、醋酸盐和硫酸盐。还可包含一价金属盐, 例如钠盐和钾盐, 例如氯化钾。还可包含其他盐例如铵盐特别是硫酸铵。

[0125] 还可包含去污剂。适合的去污剂的实例包括 Triton X-100、Tween 20 以及每一种的衍生物。还可在该反应中包含稳定剂。可使用任何适合的稳定剂, 特别是牛血清白蛋白 (BSA) 和其他稳定化蛋白质。还可通过加入松弛 DNA 并且使模板变性更容易的物质改进反应条件。此类物质包括例如二甲基亚砜 (DMSO)、甲酰胺、甘油和甜菜碱。

[0126] 应理解技术人员能够基于他们的公知常识修饰并且优化用于本发明方法的扩增和温育条件。同样可基于本领域已有的实例选择特定物质的具体浓度并且基于公知常识进一步优化。用于本领域中基于 RCA 的方法的适合的反应缓冲液的实例为 50mM Tris HCl pH 7.5、10mM $MgCl_2$ 、20mM $(NH_4)_2SO_4$ 、5% 甘油、0.2mM BSA、1mM dNTPs。用于本发明的 RCA 扩增中的优选反应缓冲液为 35mM Tris-HCl、50mM KCl、14mM $MgCl_2$ 、10mM $(NH_4)_2SO_4$ 、4mM DTT、1mM dNTP。该缓冲液特别适合与 phi29RCA 聚合酶一起使用。

[0127] 所述反应条件还可包括使用一种或多种另外的蛋白质。可在至少一种焦磷酸酶例如酵母无机焦磷酸酶存在下扩增 DNA 模板。可使用两种、三种、四种、五种或更多种不同的焦磷酸酶。这些酶能够在链复制过程中降解由 DNA 聚合酶从 dNTP 生成的焦磷酸。反应中焦磷酸盐的积累会引起对 DNA 聚合酶的抑制并且降低 DNA 扩增的速度和效率。焦磷酸酶能够将焦磷酸盐降解成非抑制性的磷酸盐。用于本发明方法中的适合的焦磷酸酶的实例为酿酒酵母焦磷酸酶, 可商购自 New England Biolabs, Inc。

[0128] 可将任何单链结合蛋白 (SSBP) 用于本发明方法中以稳定单链 DNA。SSBP 是活细胞中的必要组分并且参与涉及 ssDNA 的所有过程, 例如 DNA 复制、修复和重组。在这些过程中, SSBP 结合至暂时形成的 ssDNA 并且辅助稳定 ssDNA 结构。用于本发明方法中适合的

SSBP 的实例为 T4 基因 32 蛋白,可商购自 New England Biolabs, Inc。

[0129] 除了扩增步骤之外,本发明方法还包括制备闭合线状 DNA 的加工步骤。使扩增的 DNA 与至少一种原核端粒酶在促进闭合线状 DNA 制备的条件下接触。该基于原核端粒酶的单一加工步骤优于用于制备闭合线状 DNA 分子的其他方法。可同时或并行进行扩增和加工步骤。然而,优选按次序进行扩增和加工步骤,在扩增步骤之后进行加工步骤(即对扩增的 DNA 进行加工)。

[0130] 用于本发明的原核端粒酶为能够裂解并且再连接包含原核端粒酶靶位点以制备共价闭合线状 DNA 分子的任何多肽。因此,所述原核端粒酶具有 DNA 裂解和连接功能。具有原核端粒酶-型活性的酶还被描述为端粒解离酶(例如在伯氏疏螺旋体中)。原核端粒酶的典型底物为环状双链 DNA。如果该 DNA 包含原核端粒酶靶位点,该酶能够在该位点切割该 DNA 并且连接末端形成线状双链共价闭合 DNA 分子。对原核端粒酶靶位点的要求如上文所述。还如上文所述,可使用本领域记载的任何适合的测定法测定特定多肽催化从包含原核端粒酶靶位点的模板生成闭合线状 DNA 的能力。

[0131] 已记载了噬菌体中的原核端粒酶。在一些溶原性细菌中,噬菌体以染色体外 DNA 存在,其包含具有共价闭合末端的线状双链。该 DNA 的复制以及共价闭合末端(或端粒末端)的维持依赖于原核端粒酶的活性。原核端粒酶在病毒 DNA 复制中的作用显示于图 1。该催化活性的一个实例为来自感染大肠杆菌的 N15 噬菌体的酶 TelN。TelN 识别环状双链 DNA 中的特异核苷酸序列。该序列是被称作 telRL 的略微不完整的反转回文结构,其包含 telR 和 telN 两个一半,侧接 22 碱基对反转完整重复序列(tel0)(见图 2)。通过作用于线状原噬菌体 DNA 的特异 DNA 聚合酶的初始活性在环状双链 DNA 中形成两个 telRL 位点。TelN 将该环状 DNA 转化成两个相同的线状原噬菌体 DNA 分子,完成了复制循环。telR 和 telL 包括线状原噬菌体 DNA 的闭合末端,使得能够进一步以相同的方式复制 DNA。

[0132] 本发明方法要求使用至少一种原核端粒酶。本发明方法可包括使用多于一种原核端粒酶,例如两种、三种、四种、五种或更多种不同的原核端粒酶。适合的原核端粒酶的实例包括来自噬菌体的那些,例如来自海水盐单胞菌的 phiHAP-1(SEQ ID NO:7)、来自小肠炎耶尔森菌属(*Yersinia enterocolitica*)的 PY54(SEQ ID NO:9)、来自催产克雷伯氏菌(*Klebsiella oxytoca*)的 phiK02(SEQ ID NO:11)、来自弧菌属的 VP882(SEQ ID NO:13)以及来自大肠杆菌的 N15(SEQ ID NO:15),或任何一种的变异体。特别优选使用噬菌体 N15 原核端粒酶(SEQ ID NO:15)或其变异体。

[0133] SEQ ID NO:7、9、11、13 和 15 的变异体包括它们的同源物或突变体。突变体包括相对于天然序列的截短、置换或缺失。变异体必需能够从包含如上所述的原核端粒酶靶位点的模板制备闭合线状 DNA。

[0134] 本文提及的任何同源物通常为功能性同源物并且通常与天然蛋白质的相关区域具有至少 40% 的同源性。例如 UWGCG 软件包提供了可用于计算同源性(例如使用其默认设置)的 BESTFIT 程序(Devereux 等人,(1984) *Nucleic Acids Research* 12, 387-395)。PILEUP 和 BLAST 算法可用于计算同源性或比对序列(通常使用它们的默认设置),如 Altschul S.F. (1993) *J Mol Evol* 36:290-300; Altschul, S, F 等人, (1990) *J Mol Biol* 215:403-10 中所记载。进行 BLAST 分析的软件可通过美国国家生物技术信息中心(National Center Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 公开

获得。

[0135] BLAST 算法进行两个序列之间相似性的统计学分析；参见，例如，Karlin 和 Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787。BLAST 提供的相似性的一个量度为最小相加概率 ($P(N)$)，其指明两条核苷酸或氨基酸序列之间匹配的概率。例如，当第一条序列与第二条序列的最小相加概率小于 1，优选小于约 0.1，更优选小于约 0.01，并且最优选小于约 0.001 时，认为一序列与另一序列相似。

[0136] 变异体多肽包含（或由其组成）与天然蛋白质具有至少 40%一致性的序列。在优选的实施方式中，变异体序列在至少 20、优选至少 30 例如至少 40、60、100、200、300、400 或更多个连续氨基酸或甚至该变异体的全部序列上与原始蛋白质具有至少 55%、65%、70%、75%、80%、85%、90% 并且更优选至少 95%、97% 或 99% 同源性。或者，变异体序列与全长天然蛋白质具有至少 55%、65%、70%、75%、80%、85%、90% 并且更优选至少 95%、97% 或 99% 同源性。通常变异体序列与天然蛋白质的相关区域的差异至少为或小于 2、5、10、20、40、50 或 60 处突变（每一处均可作为置换、插入或缺失）。本发明的变异体序列与全长天然蛋白质的具体区域的一致性百分数可能与上文所提及的任何序列长度内的任何具体的同源性百分数数值相同（即其具有至少 40%、55%、80% 或 90% 并且更优选至少 95%、97% 或 99% 一致性）。

[0137] 天然蛋白质的变异体还包括截短形式。可使用任何截短形式只要该变异体仍能够产生如上文所述的闭合线状 DNA。通常制备截短形式以除去对于催化活性不必要的和 / 或不影响已折叠蛋白质构象特别是活性位点折叠的序列。还可选择截短形式以提高原核端粒酶多肽的溶解性。可通过从 N 端或 C 端系统性截短不同长度的序列常规鉴定适合的截短形式。

[0138] 天然蛋白质的变异体还包括相对于天然蛋白质的具体区域具有一个或多个例如 2、3、4、5-10、10-20、20-40 或更多个氨基酸插入、置换或缺失的变异体。优选在催化结构域之外进行缺失和插入。通常在衍生自天然蛋白质的序列的 N- 或 C- 端进行插入，例如用于重组表达。还通常在对于催化活性不必要和 / 或不影响已折叠蛋白质构象的区域进行置换。可进行此类置换以提高酶的稳定性或其他特性。尽管在一般情况下不是优选的，还可在活性位点或在中心外围 (second sphere) 即影响或接触活性位点内的一个或多个氨基酸的位置或方向的残基上进行置换。可进行这些置换以提高催化性质。

[0139] 置换优选引入一个或多个保守变化，用具有相似的化学结构、相似的化学性质或相似的侧链体积的其他氨基酸替换氨基酸。被引入的氨基酸与它们所取代的氨基酸具有相似的极性、亲水性、疏水性、碱性、酸性、中性或电荷。或者，所述保守变化可在原本为芳香族或脂肪族氨基酸的位置引入另一芳香族或脂肪族氨基酸。保守氨基酸变化为本领域熟知并且可根据表 A 中定义的 20 种氨基酸的性质进行选择。

[0140] 表 A- 氨基酸的化学性质

[0141]

Ala	脂肪族、疏水、中性	Met	疏水、中性
Cys	极性、疏水、中性	Asn	极性、亲水、中性
Asp	极性、亲水、带电荷 (-)	Pro	疏水、中性
Glu	极性、亲水、带电荷 (-)	Gln	极性、亲水、中性
Phe	芳香族、疏水、中性	Arg	极性、亲水、带电荷 (+)
Gly	脂肪族、中性	Ser	极性、亲水、中性
His	芳香族、极性、亲水、带电荷 (+)	Thr	极性、亲水、中性
Ile	脂肪族、疏水、中性	Val	脂肪族、疏水、中性
Lys	极性、亲水、带电荷 (+)	Trp	芳香族、疏水、中性
Leu	脂肪族、疏水、中性	Tyr	芳香族、极性、疏水

[0142] 特别优选所述变异体能够以与天然蛋白质可比或相同的效率产生如上文所述的闭合线状 DNA。

[0143] 如上文所述,优选通过链置换 DNA 聚合酶,更优选 RCA DNA 聚合酶实现根据本发明方法的 DNA 扩增。在体外无细胞方法中组合使用 RCA DNA 聚合酶和原核端粒酶使得闭合线状 DNA 的制备具有令人惊奇的效率和简单性。

[0144] 如上文所述,首先在链置换反应中形成长的线状单链 DNA 分子,其接着充当新的模板从而使得形成双链分子(图 4)。该双链分子包含通过链置换聚合酶的核苷酸掺入作用形成的扩增 DNA 的一系列连续的串联单位(多联体)。这些多联体 DNA 产物包括已扩增模板 DNA 的多个重复。因此在本发明方法中生成的多联体包含多个单位的从 DNA 模板扩增的序列。所述多联体可包含 10、20、50、100、200、500 或 1000 或更多个单位的扩增序列,视被扩增的单个单元的长度而定。多联体的大小可为至少 5kb、至少 10kb、至少 20kb、更优选至少 30kb、至少 50kb 或至少 70kb 或更大。

[0145] 在许多实施方式中,例如在 DNA 药物的制备中,需要以单个单元使用扩增的 DNA。因此,需要将此类多联体进行加工以释放单个单元的扩增 DNA。为了将该多联体 DNA 转化成单个单元的扩增 DNA,需要将其准确地切割并且需要延长配对链的末端。通常,这可通过在 DNA 模板中掺入限制性内切酶位点实现。因此,可将限制性核酸内切酶与多联体温育以在它们的识别位点进行裂解并且释放单个单元。可接着将通过限制性内切核酸酶的作用形成的开放线状双链 DNA 与 DNA 连接酶温育以共价闭合单个单元 DNA。

[0146] 根据本发明,通过使用一种酶即原核端粒酶实现将多联体 DNA 加工成闭合线状单个单元 DNA。这代表了生成闭合线状 DNA 分子方法中的有利的简单性和经济性。首先,通过与单一的酶温育实现单个单元的裂解和再连接。第二,以具有所需闭合线状结构的形式释放单个单元,因此不需要另外的步骤用于生成该结构(即形成共价闭合环状单个单元 DNA)。

[0147] 将从 DNA 模板扩增的 DNA 与至少一种原核端粒酶在促进闭合线状 DNA 制备的条件下温育。换言之,所述条件促进包含原核端粒酶靶序列的双链 DNA 的裂解和再连接以形成具有发夹末端的共价闭合线状 DNA。促进闭合线状 DNA 制备的条件包括使用允许制备闭合线状 DNA 的任何温度,通常在 20-90 摄氏度的范围内。温度优选在 25-40 摄氏度的范围内,例如约 25- 约 35 摄氏度,或约 30 摄氏度。可根据上文所列与 DNA 聚合酶的温度条件相关的原理选择具体原核端粒酶的适当温度。与 SEQ ID NO:15 的大肠杆菌噬菌体 TelN 原核端粒酶一起使用的适合的温度是约 25- 约 35 摄氏度,例如约 30 摄氏度。

[0148] 促进闭合线状 DNA 制备的条件还包括存在原核端粒酶和适合的缓冲剂 /pH 以及对酶的性能和稳定性必需的其他因素。适合的条件包括本领域已知的用于提供原核端粒酶活性的任何条件。例如,当使用大肠杆菌噬菌体 TelN 原核端粒酶时,适合的缓冲剂为 20mM TrisHCl, pH 7.6 ;5mM CaCl₂;50mM 谷氨酸钾 ;0.1mM EDTA ;1mM 二硫苏糖醇 (DTT)。还可选择针对 DNA 聚合酶所列的那些选择用于维持最佳活性和稳定性的试剂和条件。

[0149] 在一些实施方式中,可能使用与用于 DNA 扩增的相同的条件提供原核端粒酶活性。具体而言,已记载当同时或并行进行 DNA 扩增和原核端粒酶加工时使用相同的条件。在其他实施方式中,当所使用的提供最佳 DNA 聚合酶活性的条件导致次最佳的原核端粒酶活性时有必要改变反应条件。可通过过滤、透析和本领域已知的其他方法实现除去特定试剂和改变反应条件。技术人员应能够容易地鉴定提供最佳 DNA 聚合酶活性和 / 或原核端粒酶活性的条件。

[0150] 在特别优选的实施方式中,通过 RCA DNA 聚合酶优选 phi29 扩增 DNA,进行 DNA 扩增的缓冲条件与以下条件基本相同或基本由其组成 :35mM Tris-HCl、50mM KCl、14mM MgCl₂、10mM (NH₄)₂SO₄、4mM DTT、1mM dNTP,温度为 25-35 摄氏度例如约 30 摄氏度。接着优选用 TelN 和 / 或优选在与以下条件基本相同或基本由其组成的缓冲条件下实现用原核端粒酶进行的加工步骤 :20mM TrisHCl, pH 7.6 ;5mM CaCl₂;50mM 谷氨酸钾 ;0.1mM EDTA ;1mM 二硫苏糖醇 (DTT),温度为 25-35 摄氏度例如约 30 摄氏度。

[0151] 所有用于本发明方法的酶和蛋白质可为例如在细菌中重组制备。可使用技术人员已知的能够重组表达的任何方法。可将包含编码感兴趣的蛋白质的核酸序列的质粒或其他形式的表达载体引入细菌中,从而使得它们表达所编码的蛋白质。例如,对于 SEQ ID NO : 2、5、7、9、11、13 或 15 的表达,所述载体可分别包含 SEQ ID NO :1、4、6、8、10、12 或 14 的序列。然后通常通过例如使用亲和标记以纯化足够量的表达蛋白质并且以适合用于本发明方法中的形式提供。技术人员根据它们的公知常识可常规性获得用于重组蛋白质制备的此类方法。以上论述适用于提供本文所述任何蛋白质。

[0152] 可在与原核端粒酶接触前纯化通过使 DNA 模板与 DNA 聚合酶接触获得的扩增 DNA。因此,本发明方法还包括纯化从 DNA 模板扩增的 DNA 的步骤。但是,在优选的实施方式中,实施该方法而未在与原核端粒酶接触前纯化已扩增的 DNA。这意味着通常可在相同的容器或溶液中连续进行扩增和加工步骤。在一些此类实施方式中,该方法涉及加入提供原核端粒酶活性的缓冲剂,即提供促进形成闭合线状 DNA 的条件。

[0153] 通过原核端粒酶的作用产生闭合线状 DNA 之后,本发明方法还包括纯化线状共价闭合 DNA 产物的步骤。通常进行上文所述的纯化用于除去任何不需要的产物。可通过本领域已知的任何适合的方法进行纯化。例如,对扩增 DNA 或线状共价闭合 DNA 的加工可包括

酚 / 氯仿核酸纯化或使用选择性结合核酸的柱子例如可从 Qiagen 商购的那些。技术人员可常规地确定用于分离扩增 DNA 的适合的纯化技术。

[0154] 一旦生成了线状共价闭合 DNA 并且纯化了足够的量,该方法还包括将其制成 DNA 组合物,例如治疗性 DNA 组合物。治疗性 DNA 组合物包含上文所述类型的治疗性 DNA 分子。此类组合物包含为适合通过所需途径给药的形式的治疗有效量的 DNA,所述形式是例如气雾剂、注射剂组合物或适合口腔、粘膜或局部给药的制剂。

[0155] 可使用本领域技术人员可获得的标准药物制剂化学和方法以常规药物制剂制备 DNA 制剂。可使用任何药学可接受的载体或赋形剂。诸如润湿剂或乳化剂、pH 缓冲物质等的辅助性物质可存在于赋形剂或溶媒中。这些赋形剂、溶媒和辅助性物质通常为制药级物质,可将它们给药而不引起异常毒性并且在疫苗组合物的情况中不会在接受该组合物的个体中诱导免疫应答。适合的载体可为脂质体。

[0156] 药学可接受的赋形剂包括但不限于液体例如水、盐水、聚乙烯二醇、透明质酸、甘油和乙醇。还可在其中包含药学可接受的盐,例如矿物酸盐例如盐酸盐、氢溴酸盐、磷酸盐、硫酸盐等;以及有机酸的盐,例如醋酸盐、丙酸盐、丙二酸盐、苯甲酸盐等。尽管不是必要的,当所述组合物中包含肽、蛋白质或其他类似分子时还优选所述制剂包含充当特别是用于这些分子的稳定剂的药学可接受的赋形剂。还可充当肽稳定剂的适合的载体的实例包括但不限于制药级的右旋糖、蔗糖、乳糖、海藻糖、甘露醇、山梨醇、肌醇、葡聚糖等。其他适合的载体包括但不限于淀粉、纤维素、磷酸钠或磷酸钙、柠檬酸、酒石酸、甘氨酸、高分子量聚乙二醇 (PEG) 及其组合。对药学可接受的赋形剂、溶媒和辅助性物质的全面论述可参见 REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Pub. Co., N. J. 1991), 其通过引用并入本文。

[0157] 本发明方法在体外无细胞环境中进行。因此,该方法在无宿主细胞存在下进行并且通常包括使用纯化的酶组分。因此,模板 DNA 的扩增和通过原核端粒酶的加工通常通过在适合的容器内使溶液中的反应组分接触进行。可选地,可以固定形式例如结合至固体载体提供特定组分。

[0158] 应理解可以任何规模实施本发明的方法。然而,优选以商业或工业规模实施该方法用于扩增 DNA,即以毫克或更大的量生成扩增 DNA。优选所述方法生成至少一毫克、至少 10 毫克、至少 20 毫克、至少 50 毫克或至少 100 毫克扩增 DNA。还优选以毫克或更大的量生成衍生自扩增 DNA 的最终闭合线状 DNA 产物。优选所述方法生成至少一毫克、至少 2 毫克、至少 5 毫克、至少 10 毫克、至少 20 毫克、至少 50 毫克或至少 100 毫克闭合线状 DNA。

[0159] 本发明还提供包含实施本发明方法所需要的组分的试剂盒。该试剂盒包含至少一种 DNA 聚合酶和至少一种原核端粒酶以及可选地本文所述方法的使用说明。所述试剂盒可包含两种、三种、四种、五种或更多种不同的 DNA 聚合酶。优选地,所述试剂盒包含至少一种链置换型 DNA 聚合酶,还更优选 RCA DNA 聚合酶。特别优选所述试剂盒包含 phi29DNA 聚合酶 (SEQ ID NO:2)、Deep Vent® DNA 聚合酶 (SEQ ID NO:3) 或 Bst 1DNA 聚合酶 (SEQ ID NO:5) 或任何一种变异体。在一些实施方式中,还可包含以其他方法复制 DNA 的 DNA 聚合酶。所述试剂盒包含至少一种原核端粒酶。所述试剂盒可包含两种、三种、四种或更多种不同的原核端粒酶。所述原核端粒酶可选自 SEQ ID NO:5、7、9、11、13 或 15 中的任何一种或任何一种的变异体。特别优选所述试剂盒包含大肠杆菌 N15TelN (SEQ ID NO:15) 或其变异体。

[0160] 所述试剂盒还包含至少一种单链结合蛋白 (SSBP)。优选的 SSBP 为可商购自 New England Biolabs, Inc 的 T4 基因 32 蛋白。可在试剂盒中包含两种、三种、四种或更多种不同的 SSBP。该试剂盒可能还包含焦磷酸酶。优选的焦磷酸酶为可商购自 New England Biolabs, Inc 的酿酒酵母焦磷酸酶。在一些实施方式中,可包含两种、三种、四种、五种或更多种焦磷酸酶。所述试剂盒还可能包含本文所述的任何 DNA 聚合酶、原核端粒酶、SSBP 或焦磷酸酶。所述试剂盒还可能包含 dNTP、适合的缓冲剂以及如上文所述 DNA 聚合酶和 / 或原核端粒酶的酶性能或稳定性所需的其它因素。

[0161] 实施例

[0162] 实施例 1- 表达 TelN 并且生成包含原核端粒酶靶序列的载体构建体

[0163] 使用经修饰的寡核苷酸引物:

[0164] PT1F 5' ATGAGCAAGGTAAAAATCGGTG 3' (SEQ ID NO:30)

[0165] PT1R 5' TTAGCTGTAGTACGTTTCCCAT 3' (SEQ ID NO:31)

[0166] 从商购克隆载体 pJAZZ (Lucigen) PCR 扩增 TelN 用于定向框内克隆至商购 pQE-30 载体 (Qiagen) 内。该系统使得能够从 lac 启动子诱导表达 6X N- 端 His 标记蛋白质同时提供来自 lacI- 表达质粒 pREP4 的反向强抑制。已在大肠杆菌 M15 中鉴定出许多推定的重组克隆并且通过测序进行验证以证明 TelN 的框内插入。在小规模诱导实验中进一步表征了六个克隆。所有克隆均表达了分子量对应于重组 TelN 原核端粒酶的 74.5kDa 蛋白质。

[0167] 通过用 IPTG 诱导 pQE-30 的蛋白质表达从大肠杆菌 M15pREP4 表达 TelN 并且将诱导的细胞进行超声处理 (100% 爆破 6 次, 每次 30 秒) 并离心 (25000g, 30min), 以从细胞裂解物获得可溶性和不溶性组分。凝胶分析显示 TelN 存在于可溶性组分中。使用 Akta Prime 系统 (GE Healthcare) 并且以 0-100% (0.5M) 咪唑梯度洗脱, 在 HisTrap 柱上纯化 TelN。将已纯化的 TelN 透析以除去咪唑并且保存在由 10mM Tris HCl pH 7.4、75mM NaCl、1mM DTT、0.1mM EDTA 和 50% 甘油组成的缓冲液中。

[0168] 通过将包含 TelN 识别位点 telRL:

[0169] RL1

[0170] 5' AGCTTTATCAGCACACAATTGCCATTATACGCGCGTATAATGGACTATTGTGTGCTGATAG 3' (SEQ ID NO:32)

[0171] RL2

[0172] 5' GATCCTATCAGCACACAATAGTCCATTATACGCGCGTATAATGGGCAATTGTGTGCTGATAA 3' (SEQ ID NO:33)

[0173] 的合成寡核苷酸定向克隆至质粒 pUC18 和 pBR329 的 BamHI 和 HindIII 位点内生成能够验证 TelN 活性的载体构建体。pUC18 的 Genbank 登录号为 L09136 并且可商购自 Fermentas Cat no. SD0051; pBR329 的 Genbank 登录号为 J01753 并且可商购自 DSMZ Cat no. 5590。

[0174] 此外, 用于转染试验, 将两个拷贝的 telRL 识别位点克隆至荧光素酶表达质粒 pGL4.13 (Promega) 中侧接萤火虫荧光酶基因表达盒的独特的 SacI 和 BamHI 限制性位点。在 telRL 合成寡核苷酸与 SacI 突出端复性后将第一个 telRL 位点克隆至 SV40 启动子上游的独特的 SacI 位点。使用具有 BamHI 突出端的 telRL 合成寡核苷酸将第二个 telRL 位点克隆至 SV40 多腺苷酸化信号下游的独特的 BamHI 位点内。将所得构建体表示为 pGL DOG, 因

为它使得能够形成编码表达于哺乳动物细胞中的荧光素酶的共价闭环线状（狗骨状）DNA。

[0175] 实施例 2- 验证 TelN 裂解

[0176] 验证 TelN 对超螺旋、环状 pUC18telRL 和 pGL DOG 载体构建体的裂解。将 100ng 各底物与 4.5pmol TelN 在 30 摄氏度温育 1 小时 40 分钟。在 TelN 缓冲液 [10mM Tris HCl pH 7.6、5mM CaCl₂、50mM 谷氨酸钾、0.1mM EDTA、1mM DTT] 中进行该反应。

[0177] 通过非变性琼脂糖凝胶电泳使裂解产物可视化。超螺旋、环状 pUC18telRL 与 TelN 温育释放了表明裂解的 2.7kb 线状片段。超螺旋、环状 pGL DOG 与 TelN 温育释放了表明在两个 telRL 位点裂解的两个 2.4kb 片段。

[0178] 此外，通过限制性消化将 pUC18telRL 和 pGL DOG 线性化，然后与 TelN 温育以进一步验证在 telRL 位点的特异裂解。用 XmnI 将 100ng pUC18telRL 线性化，然后与 TelN 温育。这释放了预期的 1.9kb 和 0.8kb 片段。用 PvuI 将 100ng pGL DOG 线性化，然后与 TelN 温育。这释放了预期的 2.4kb、1.6kb 和 0.7kb 片段。相似地，用 PstI 线性化 pGL DOG 然后与 TelN 温育释放了预期的 2.4kb、1.1kb 和另一 1.1kb 片段。这证明了 TelN 对包含原核端粒酶靶序列的环状和线状 DNA 底物的核酸内切酶活性。

[0179] 在对裂解活性的初期评价中，发现 3.4pmol 的过量 TelN 可在 1 小时内切割至少 200ng pUC18telRL。在时段试验中，在约 10 分钟内切割相同量的 DNA。

[0180] 实施例 3- 验证 TelN 的再连接活性和闭环线状 DNA 的形成

[0181] 用变性凝胶电泳验证 TelN 裂解产物的闭环线状 DNA 结构。如实施例 3 将 pGL DOG 与 TelN 温育。将对应于包含在狗骨状 (doggybone) 内的区域但是具有开放 DNA 末端的合成 PCR 产物 (PCR DOG) 作为对照。使用侧接 telRL 位点的引物从 pGL DOG 扩增 PCR DOG 线性片段：

[0182] Sac pGL 5' GTGCAAGTGCAGGTGCCAGAAC 3' (SEQ ID NO:34)；

[0183] Bam pGL 5' GATAAAGAAGACAGTCATAAGTGC GGC 3' (SEQ ID NO:35)

[0184] 在非变性琼脂糖凝胶上 [TAE 缓冲液 (40mM Tris-醋酸盐, 1mM EDTA) 中 0.8% 琼脂糖]，通过将 100ng pGL DOG 与 TelN 温育获得的 2.4kb 裂解产物迁移至与 PCR DOG (2.7kb) 相似的大小，因为两种产物仍然是双链的。

[0185] 然而，当进行能够将双链 DNA 变性并且分离成为单链 DNA 的变性琼脂糖凝胶 [在 H₂O 中 1% 琼脂糖, 50mM NaOH、0.1mM EDTA 中电泳并且电泳后在 1M Tris HCl pH 7.6、1.5M NaCl 内中和] 时，TelN “狗骨状” 片段与开放末端 PCR 对照或用 XmnI 线性化的 pUC18telRL (均为 2.7kb) 相比以更高的分子量 [大约 5kb] 迁移。

[0186] 该迁移差异表明通过 TelN 形成了闭环线状“狗骨状”结构。将“狗骨状”结构变性会产生单链开放环，其在凝胶中比变性开放末端线状 PCR 产物释放的线状单链迁移得更慢。

[0187] 还可在通过芯片上实验室 (Lab-On-a-Chip, LOC) 毛细管电泳进行的热变性分析中显示对通过 TelN 形成的产物的闭环线状结构的验证。LOC 分析代表了用于快速分离生物分子的毛细管电泳平台。具有 DNA7500 芯片的 Agilent 生物分析仪 (Agilent, UK) 可用于分离并且近似分选长达 7000bp 的 DNA 片段。

[0188] 该芯片系统不能检测单链 DNA。在低盐条件下例如在 H₂O 中将常规双链 DNA 热变性 (95℃, 5mins) 并且以 1℃ /s 快速 (<1℃ /s) 冷却得到了不能在 LOC 系统上可视化的单

链 DNA。然而,“狗骨状”DNA(通过 TelN 裂解获得)中共价连接的 DNA 末端不能在变性后分离并且因此复性形成仍然可视的双链 DNA。因此比较被快速冷却的热变性 DNA 使得区分共价闭合线状(ccl)狗骨状 DNA 和常规开放线状(ol)双链 DNA。

[0189] 在热循环仪(Biorad I-cycler, Biorad, UK)中的薄壁 PCR 管内将 H₂O 中的 DNA 样品(100ng)变性(95°C, 5mins)并快速(<1°C /s)冷却至 4°C。对于与 TelN 裂解的比较,首先在 1X Tel N 缓冲液中将样品与 1 微升纯化的原核端粒酶于 30°C 温育 10min。以相同的但不包含酶的方法处理对照样品。根据使用说明使用具有 DNA 7500 芯片的 Agilent 生物分析仪分析样品(1 微升)。

[0190] 结果显示于图 6 的 B 中。这些结果表明通过将 pGL DOG 和 TelN 温育获得的闭合线状“狗骨状”DNA 与相当的常规开放线状 DNA(PCR DOG)相比对热变性具有抗性。使用由 RCA 扩增和 TelN 裂解获得的 RCA 扩增狗骨状 DNA 也获得了相同的对热变性的抗性。

[0191] 在其他实验中,在开放末端 PCR DOG 上进行 TelN 裂解。这引起形成 2.8kb 的热稳定裂解产物“狗骨状”DNA,以及 0.09 和 0.14kb 的热稳定“狗骨状”末端。

[0192] 在 LOC 分析中,与预测 2.4kb 和 2.7kb 近似大小的序列数据相比,“狗骨”和 PCR DOG 的估算大小分别为 2.8kb-3.0kb 和 3.1-3.5kb。这反映了出现在非变性 LOC 分析中基于构象的迁移差异。

[0193] 实施例 4- 从通过 RCA(滚环扩增)形成的多联体 DNA 形成闭合线状 DNA

[0194] 实施用于扩增 DNA 模板并将该扩增的 DNA 转化成闭合线状“狗骨状”DNA 的体外无细胞方法。在各种条件下通过使用来自枯草芽孢杆菌噬菌体 phi29 的 phi29 酶和作为引物的随机六聚体的 RCA 扩增具有和不具有 telRL 位点的共价闭合质粒模板。这导致通过 phi29 的核苷酸掺入链置换活性扩增多联体 DNA。根据使用说明使用 TempliPhi 试剂盒(GE Healthcare)进行最初的研究。但是之后用内部方法(使用由 NEB 提供的 phi29)取代该试剂盒,得到纯度增加的更高的产物收率。

[0195] 在 10 微升复性/变性缓冲液(30mM Tris-HCl pH 7.5、20mM KCl、8mM MgCl₂、20 微摩尔随机六聚体)中进行 40pg-200ng 闭合环状模板的变性和引物的退火。通过加热至 95°C 1 分钟然后经 30min 冷却至室温进行变性和退火。

[0196] 然后向 10 微升退火的 DNA/引物反应液中加入 10 微升反应缓冲液[35mM Tris-HCl、50mM KCl、14mM MgCl₂、10mM(NH₄)₂SO₄、4mM DTT、10U phi29、0.002U PPI(酵母无机焦磷酸酶)、1mM dNTP]。

[0197] 将 20 微升反应液于 30°C 温育 18 小时。将样品在凝胶上电泳以检验多联体的形成,然后用限制性酶或 TelN 消化反应混合物以检验产物。

[0198] 然后将通过 RCA 扩增的多联体 DNA 与 TelN 温育。通常,将 RCA 扩增的 DNA 底物在水和 10x TelN 缓冲液中稀释至 20 微升的终体积。pUC18telRL 的结果显示于图 6 的 A 中。

[0199] 从泳道 1 的凝胶可以看出,未消化的多联体扩增 DNA 形成不能进入凝胶的网状物。然而, TelN 能够裂解 RCA 物质引起 2.7kb 狗骨状片段(泳道 6)的释放。通过用 PvuI 限制性消化(泳道 2 和 5)实现了验证由 RCA 扩增的 DNA 是用于该反应中的起始模板。pUC18(无 telRL)充当 TelN 活性的阴性对照(泳道 3)。

[0200] 相似地,在其他实验中,也用 TelN 裂解 RCA 生成的 pGL DOG 多联体。因此,证明本发明方法可以有效地从起始模板扩增闭合线状 DNA。另外,有可能在连续步骤中使用 RCA 聚

合酶和原核端粒酶以简单的方式扩增闭合线状 DNA 而不需要间插扩增 DNA 的纯化。

[0201] 实施例 5- 表达扩增的闭合线状 DNA

[0202] 用 HeLa 细胞进行转染试验以研究根据本发明生成的闭合线状“狗骨状”DNA 的荧光素酶报告基因的表达。将共价闭合线状 DNA 和线状 PCR DOG 对照作为对照。

[0203] 在 20mm 直径孔内在 RPMI 中于 60% 汇合度时进行转染, 并且根据使用说明使用 **Transfectam®** (Promega)。每一次转染使用 400ng 构建体 DNA。通过在每一次转染中包括 40ng 海肾 (Renilla) 荧光素酶表达质粒 pGL4. 73 (包含来自海肾的 hRluc 基因) 作为内对照, 将实验内和实验之间的转染频率标准化。使用 **Dual-Luciferase® Reporter (DLR™)** 测试系统 (Promega) 依次测量萤火虫荧光素酶 (来自萤火虫的发光) 和海肾荧光素酶活性。使用 GloMax Multi 光度计 (Promega) 测量相对光单位并且将结果表示为萤火虫荧光素酶 / 海肾荧光素酶比。所有试验均一式三份进行。

[0204] 在转染中检测的构建体为:

[0205] pGL4. 13luc 对照 DNA

[0206] pGL4. 73hRluc

[0207] PCR DOG

[0208] PCR 对照 (来自 pGL4. 13 跨越 luc 基因的片段)

[0209] pGL DOG (包含 2 个 telRL 位点的 pGL4. 13)

[0210] “狗骨状”MP (分离自用 PvuI 消化 (以除去污染性载体 DNA) 然后用 TelN 裂解的小量制备 DNA 的 pGL DOG)。

[0211] “狗骨状”RCA (用 PvuI 消化然后用 TelN 裂解的通过 RCA 扩增的 pGL DOG)。

[0212] RCA pGL DOG - 在 pGL DOG 的初始 RCA 扩增中生成的多联体 DNA。

[0213] 结果示于图 6 的 C 中。证明包括通过 RCA 扩增的那些在内的闭合线状 DNA 比开放线状 PCR 构建物表达更高水平的荧光素酶。这证明当引入哺乳动物细胞时, 根据本发明制备的闭合线状 DNA 可用于成功表达荧光素酶。

[0214] 本发明的序列

[0215] 表 A

[0216]

杆菌属噬菌体 phi29 DNA 聚合酶核酸序列(SEQ ID NO: 1)

```

atgaagcata tgccgagaaa gatgtatagt tgtgactttg agacaactac taaagtgga    60
gactgtaggg tatggcgta tggttatatg aatatagaag atcacagtga gtacaaaata    120
ggtaatagcc tggatgagtt tatggcgtgg gtgttgaagg tacaagctga tctatatctc    180
cataacctca aatttgacgg agcttttate attaactggt tggaacgtaa tggttttaag    240
tggtcggctg acggattgcc aaacacatat aatacgatca tatctcgcat gggacaatgg    300
tacatgattg atatatgttt aggcctacaa gggaaacgta agatacatag agtgatatat    360
gacagcttaa agaaactacc gtttctgtt aagaagatag ctaaagactt taaactaact    420
gttcttaag gtgatattga ttaccacaaa gaaagaccag tcggctataa gataacaccc    480
gaagaatacg cctatatata aaacgatatt cagattattg cggaacgtct gtaattcag    540
ttaaagcaag gtttagaccg gatgacagca ggcagtgaca gtctaaaagg tttaaggat    600
attataacca ctaagaaatt caaaaagggt ttctctacat tgagtcttgg actcgataag    660
gaagtgatag acgcctatag aggtgggttt acatggtaa atgataggtt caaagaaaaa    720
gaaatcggag aaggcatggt ctctgatgtt aatagtctat atctgcaca gatgtatagc    780
cgtctccttc catatggtga acctatagta ttcgagggta aatacgtttg ggacgaagat    840
taccactac acatacagca tatcagatgt gagttcgaat tgaagagggt ctatataccc    900
actatacaga taaaagaag taggttttat aaaggtaatg agtacctaaa aagtagcggc    960
ggggagatag ccgacctctg gtttcaaat gtagacctag aattaatgaa agaactact    1020
gatttatata acgttgaata tatcagcggc ttaaaattta aagcaactac aggtttgttt    1080
aaagatttta tagataaatg gacgtacatc aagacgacat cagaaggagc gatcaagcaa    1140
ctagcaaac tgatgttaa cagtctatag ggtaaattcg ctagtaacc tgatgttaca    1200
gggaaagtc cttatttaa agagaatggg gcgctaggtt tcgacttgg agaagaggaa    1260
acaaaagacc ctgtttatc acctatgggc gtttcatca ctgcatgggc tagatacacg    1320
acaattacag cggcacaggc ttgttatgat cggataatat actgtgatac tgacagcata    1380
catttaacgg gtacagagat acctgatgta ataaaagata tagttgacc taagaattg    1440
ggatactggg cacatgaaag tacattcaaa agagttaaat atctgagaca gaagacctat    1500
atacaagaca tctatfatga agaagtagat ggtaagttag tagaaggtag tccagatgat    1560
tacactgata taaatttag tgttaaatgt gcgggaatga ctgacaagat taagaaagag    1620
gttacgtttg agaattcaaa agtcggatc agtcggaaaa tgaagcctaa gcctgtgcaa    1680
gtgccggcg ggggtgttct gggtgatgac acattcaca tcaataa    1728

```

杆菌属噬菌体 phi29 DNA 聚合酶氨基酸序列(SEQ ID NO: 2)

```

MKHMPRKMYS CDFETTTKVE DCRVWAYGYM NIEDHSEYKI GNSLDEFMAW VLKVQADLYF    60
HNLKFDGAFI INWLERNFGK WSADGLPNTY NTIISRMGQW YMIDICLGKY GKRKIHTVIY    120
DSLKKLPFPV KKIADFKLT VLKGDIDYHK ERPVGKITP EEYAYIKNDI QIIAERLLIQ    180
FKQGLDRMTA GSDSLKGFKD IITKKFKKV FPTLSLGLDK EVRYAYRGGF TWLNDRFKEK    240
EIGEGMVFDV NSLYPAQMYS RLLPYGPIV FEGKYVWDED YPLHIQHIRC EFELKEGYIP    300
TIQIKRSRFY KGNEYLKSSG GEIADLWLSN VDLELMKEHY DLYNVEYISG LKFKATTGLF    360
KDFIDKWTYI KTTSEGAIKQ LAKLMLNSLY GKFNPNPDVT GKVPYLKENG ALGFRLGEEE    420
TKDPVYTPMG VFITAWARYT TITAAQACYD RIICYDTSI HLTGTEIPDV IKDIVDPKKL    480
GYWAHESTFK RVKYLRQKTY IQDIYMKEVD GKLVEGSPDD YTDIKFSVKC AGMTDKIKKE    540
VTFENFKVGF SRKMKPKPVQ VPGGVVLVDD TFTIK    575

```

[0217] 表 B

[0218]

火球菌属 Deep Vent DNA 聚合酶氨基酸序列(SEQ ID NO: 3)

MILDADYITE DGKPIIRIFK KENGEFKVEY DRNFRPYIYA LLKDDSQIDE VRKITAERHG	60
KIVRIIDAEK VRKKFLGRPI EVWRLYFEHP QDVPAIRDKI REHSAVIDIF EYDIPFAKRY	120
LIDKGLIPME GDEELKLLAF DIETLYHEGE EFAKGPIIMI SYADEEEAKV ITWKKIDLPY	180
VEVVSSEREM IKRFLKVIRE KDPDVIITYN GDSFDLPYLV KRAEKLGIKL PLGRDGSEPK	240
MQRLGDMTAV EIKGRIHFDL YHVIRRTINL PTYTLAVYE AIFGKPKEKV YAHEIAEAW	300
TGKGLERVAK YSMEDAKVTY ELGREFFPME AQLSRLVGQP LWDVSRSSSTG NLVEWYLLRK	360
AYERNELAPN KPDEREYERR LRESYAGGYV KEPEKGLWEG LVSLDFRSLY PSIIITHNVS	420
PDTLNREGCR EYDVAPEVGH KFCKDFPGFI PSLLKRLLE RQEIKRKMKA SKDPIEKKML	480
DYRQRAIKIL ANSYYGYGYG AKARWYCKEC AESVTAWGRE YIEFVRKELE EKFGFKVLYI	540
DTDGLYATIP GAKPEEIKKK ALEFVDYINA KLPGLLELEY EGFYVRGFFV TKKKYALIDE	600
EGKIITRGLE IVRRDWSEIA KETQAKVLEA ILKHGNVEEA VKIVKEVTEK LSKYEIPPEK	660
LVIYEQITRP LHEYKAIGPH VAVAKRLAAR GVKVRPGMVI GYIVLRGDGP ISKRAILAE	720
FDLRKHKYDA EYYIENQVLP AVLRILEAFG YRKEDLRWQK TKQTGLTAWL NIKKK	775

[0219] 表 C

[0220]

嗜热脂肪芽胞杆菌 DNA 聚合酶 I (polA) 核酸序列(SEQ ID NO: 4)

atgaagaaga agctagtact aattgatggc aacagtgtgg cataccgcgc ctttttgcc	60
ttgccattt tgcataacga caaaggcatt catacgaatg cggtttacgg gtttacgatg	120
atgttgaaca aaattttggc ggaagaacaa ccgaccatt tactttagc gttgacgcc	180
ggaaaaacga cgttcggca tgaacgttt caagagtata aagcgggacg gcaacaaact	240
cccccggaac tgcccgagca gttccgctg ttgcgcgagc tattaaaagc gtaccgcatt	300
cccgttatg aacttgatca ttacgaagcg gacgatatta tcgggacgct cgtgcccgc	360
gctgagcaag aagggttga agtgaaatc attccggcg accgcgatt aacccagctc	420
gcctcccgtc atgtgacggt cgatattacg aaaaaaggga ttaccgacat tgagccgat	480
acgccagaga ccgttcgga aaaatacgcg ctgactccgg agcaaatagt ggattaaaa	540
ggattgatgg gcgataatc cgacaacatc ccgggcgtgc ccggcatcgg ggaaaaaacg	600
gcggtcaagc tgctgaagca atttggtacg gtggaaaatg tgctgcacg gattgatgag	660
gtgaaagggg aaaaactgaa agaaaacttg cgccaacacc gggatttagc tctcttgagc	720
aaacagctgg cgtccatttg ccgcgacgcc ccggttagc tgctgttaga tgacattgtc	780
tacgaaggac aagaccgcga aaaagtcac gcgttatta aagaactcgg gtttcagtcg	840
ttcttgaaa aaatggccgc gccggcagcc gaaggggaga aaccgcttga ggagatggag	900
tttgccatcg ttgacgtcat taccgaagag atgcttgccg acaaggcagc gctgtcgtt	960
gaggtgatgg aagaaaaacta ccacgatgcc ccgattgtcg gaatgcact agtgaacgag	1020
catggcgcat ttttatgcg cccggagacc gcgctggtg attcgcaatt ttagcatgg	1080
cttgccgatg aaacgaagaa aaaaagcatg ttgacgcc aagcgggcagt cgttgcccta	1140
aagtggaaag gaattgagct tcgcggcgtc gcccttgatt tattgctgc tgcctatttg	1200
ctcaatccgg ctcaagatgc cggcgatgc gtcggttg cgaaaatgaa acaatatgaa	1260
gcggtgcggt cggatgaagc ggtctatgca aaaggcgta agcggtcgct gccggacgaa	1320
cagacgcttg ctgagcatct cgttcgcaaa gcggcagcca ttgggcgct tgagcagccg	1380
tttatggacg atttgcgaa caacgaacaa gatcaattat taacgaagct tgagcagccg	1440
ctggcggcga ttttgctga aatggaatc actggggtga acgtggatc aaagcggctt	1500
gaacagatgg gttcggagct cgccgaacaa ctgcgtgcca tcgagcagcg catttacgag	1560
ctagccggcc aagagttcaa cattaaacta ccaaaacagc tcggagtcatt tttattgaa	1620
aagctgcagc taccggtgct gaagaagacg aaaacaggct attcgacttc ggctgatgtg	1680
cttgagaagc ttgcgcgca tcatgaaatc gtcgaaaaca tttgcatta ccgccagctt	1740
ggcaaacatgc aatcaacgta tattgaagga ttgtgaaag ttgtgcgcc tgataccggc	1800
aaagtgcata cgatgttcaa ccaagcgctg acgcaaatg ggccgctcag ctgcggcgag	1860
ccgaacttcg aaacattcc gattcggtc gaagaggggc ggaaatccg ccaagcgttc	1920
gtcccgctcag agccggactg gtcattttc gccgccgatt actcacaat tgaattgcgc	1980

[0221]

```

gtcctcgccc atatcgccga tgacgacaat ctaattgaag cgtccaacg cgatttggat 2040
attcacacaa aaacggcgat ggacatttcc catgtgagcg aagaggaagt cacggccaac 2100
atgcgcggcc aggcaaagge cgtaacttc ggtatcggtt acggaattag cgattacgga 2160
ttggcgcaaa acttgaacat tacgcgcaaa gaagctgccg aatttatcga acgttacttc 2220
gccagcttcc cgggcgtaaa gcagtatatg gaaaacattg tgcaagaagc gaaacagaaa 2280
ggatatgtga caacgctgtt gcacggcgcg cgctatttgc ctgatattac aagccgcaat 2340
ttcaacgtcc gcagttttgc agagcggacg gccatgaaca cgccaattca aggaagcgcc 2400
gctgacatta ttaaaaaagc gatgattgat ttagcggcac ggctgaaaga agagcagctt 2460
caggctcgte ttttgcgca agtgcacgac gagtcattt tggaagcgcc aaaagaggaa 2520
attgagcgat tatgtgagct tgttcgggaa gtgatggagc aggccgttac gctccgctg 2580
ccgctgaaag tcgactacca ttacggccca acatggtatg atcccaata a 2631

```

嗜热脂肪芽胞杆菌 DNA 聚合酶 I (polA)氨基酸序列(SEQ ID NO: 5)

```

MKKKLVLDG NSVAYRAFFA LPLLHNDKGI HTNAVYGFTM MLNKILAEQ PTHLLVAFDA
60
GKTTFRHETF QEYKGGRRQT PPELSEQFPL LRELLKAYRI PAYELDHYE DDIIGTLAAR 120
AEQEGFEVKI ISGDRDLTQL ASRHVTVDIT KKGITDIEPY TPETVREKYG LTPEQIVDLK 180
GLMGDKSDNI PGVPGIGEKT AVKLLKQFGT VENVLASIDE VKGEKLKENL RQHRDLALLS
240
KQLASICRDA PVELSLDDIV YEGQDREKVI ALFKELGFQS FLEKMAAPAA EGEKPLEEME 300
FAIVDVITEE MLADKAALVV EVMEENYHDA PIVGIALVNE HGRFFMRPET ALADSQFLAW
360
LADETKKKSM FDAKRAVVAL KWKGIELRGV AFDLLLAAYL LNPAQDAGDI AAVAKMKQYE
420
AVRSDEAVYG KGVKRSPLDE QTLAEHLVRK AAIIWALEQP FMDDLNRNEQ DQLLTKLEQP
480
LAAILAEMEF TGVNVDTKRL EQMGSELAEQ LRAIEQRIYE LAGQEFNINS PKQLGVILFE 540
KLQLPVLKKT KTGYSTADV LEKLAPHHEI VENILHYRQL GKLQSTYIEG LLKVVRPDTG 600
KVHTMFNQAL TQTGRLSSAE PNLQNIPIRL EEGRKIRQAF VPSEPDLWIF AADYSQIELR 660
VLAHIADDDN LIEAFQRDL D IHTKTAMDIF HVSEEEVTAN MRRQAKAVNF GIVYGISDYG
720
LAQNLNITRK EAAEFIERF ASFPGVKQYM ENIVQEAKQK GYVTLLHRR RYLPDITSRN 780
FNVRSFAERT AMNTPIQGSA ADIHKAMID LAARLKEEQ LQARLLLQVHD ELILEAPKEE 840
IERLCELVE VMEQAVTLRV PLKVDYHYGP TWYDAK
876

```

[0222] 表 D

[0223]

盐单胞菌属噬菌体 phiHAP-1 原核端粒酶核酸序列(SEQ ID NO:6)

```

atgagcgggtg agtcacgtag aaaggtcgat ttagcggaat tgatagagt gttgctcagc      60
gagatcaaag agatcgacgc cgtatgatgag atgccacgta aagagaaaac caagcgcgtg      120
gcgcggctgg cacgtagctt caaaacgcgc ctgcatgatg acaagcgccg caaggattct      180
gagcggatcg cggtcacgac ctttcgccgc tacatgacag aagcgcgcaa ggcggtgact      240
gcgcagaact ggcgccaatc cagcttcgac cagcagatcg agcggctggc cagccgctac      300
ccggcttatg ccagcaagct ggaagcgctc ggcaagctga ccgatatcag cgccattcgt      360
atggcccacc gcgagctgct cgaccagatc cgcaacgatg acgacgctta tgaggacatc      420
cgggcgatga agctggacca tgaatcatg cgccacctga cgttgagctc tgcacagaaa      480
agcacgctgg ctgaagaggc cagcgagacg ctggaagagc gcgcgggtgaa cacggtcgag      540
atcaactacc actggttgat ggagacgggt tacgagctgc tgagtaaccg ggagagaatg      600
gtcgatgggg agtatcgccg cttttcagt tacctagcgc ttgggctggc gctggccacc      660
gggcgtcgct cgtatcgagg gctgaagacc ggacggatca cgaagggtgg cgagtatgag      720
ctggagtcca gcggccaggc gaaaaagcgc ggcgcgctcg actatagcga ggcttaccac      780
atttataccc tggtgaaagc tgacctgggt atcgaagcgt gggatgagct tcgctcgctg      840
ccggaagctg ctgagctgca gggcatggac aacagcgatg tgaaccgcgc cacggcgaag      900
acgtcaaca cgtcactaa cgggatcttt aacaacgatg agcgcgtttt caaggacagc      960
cgggcgatct ggcgcgggct ggtgttgag ctgcacttct cgcgcgacaa gcgctggaag     1020

```

[0224]

```

aaagtcaccg aggacgtgtt ctggcgtag atgctggggc atgaggacat ggatacacag      1080
cgcagctacc gcgcctttaa aatcgactac gacgagccgg atcaagccga ccaggaagat      1140
tacgaacacg ctagccgctt gcgcgcgtg caggcgctgg acggccatga gcagcttgag      1200
agcagcgacg cccagcgcg tgtgcatgcc tgggtgaaag cgcagatcga gcaggagcct      1260
gacgcgaaaa ttacgcagtc tctgacgac cgggagctgg gcgtttatcg ccttgccata      1320
aaagcgtacc tggagctggc gcgagaggcg ctcgacgcgc cgaacgtcga tctggacaag      1380
gtcgcggcgg cagtgccgaa ggaagtagcc gagcggaagc cccggctgaa cgcccacca      1440
caaggggatg gcaggtgggt cggggtggct tcaatcaacg ggggtggaag tgcacgggtg      1500
ggcaaccagg caggccggat cgaagcgatg aaagcgcct ataaagcggc ggggtggcgc      1560
tga

```

1563

盐单胞菌属噬菌体 phiHAP-1 原核端粒酶氨基酸序列 (SEQ ID NO:7)

```

MSGESRRKVD LAELIEWLLS EIKEIDADDE MPRKEKTKRM ARLARFKTR LHDDKRRKDS      60
ERIAVTTFRY YMTEARKAVT AQNWRHHSFD QQIERLASRY PAYASKLEAL GKLTDISAIR      120
MAHRELLDQI RNDDDAYEDI RAMKLDHEIM RHLTLSSAQK STLAEASET LEERAVNTVE      180
INYHWLMETV YELLSNRERM VDGEYRGFFS YLALGLALAT GRRSIEVLKT GRITKVG EYE      240
LEFSGQAKKR GGVDYSEAYH IYTLVKADLV IEAWDELRLS PEAAELQGMD NSDVNRRTAK      300
TLNTLTKRIF NNDERVFKDS RAIWARLVFE LHFSRDKRWK KVTEDVFWRE MLGHEDMDTQ      360
RSYRAFKIDY DEPDQADQED YEHASRLAAL QALDGHEQLE SSDAQARVHA WVKAQIEQEP      420
DAKITQSLIS RELGVYRPAI KAYLELAREA LDAPNVLDK VAAAVPKEVA EAKPRLNAHP      480
QGDGRWVGVA SINGVEVARV GNQAGRIEAM KAAYKAAGGR
520

```

120

[0225] 表 E

[0226]

耶尔森菌属噬菌体 PY54 原核端粒酶核酸序列(SEQ ID NO:8)

```

atgaaaatcc attttcgca tttagttagt ggttttagtta aagagatcga tgaaatagaa      60
aatcagacc gggcgcgagg tgacaaaact cggcggttate agggcgcggc cagaaagttc      120
aaaaatgccg tgtttatgga taaacggaaa tatcgcggtgta acggtatgaa gaatagaata      180
tcgttaacaa catttaataa atatttaagt cgagcacgtt ctcggtttga agaaaggctt      240
caccatagtt ttctcaate tatagcaact atctcaata aatatcctgc attcagcgaa      300
ataataaaag atctggataa tagaccgct catgaagtta gaataaaact taaagaatta      360
ataactcacc ttgaatccgg tgftaattha ttgaaaaaaa taggtagctt agggaaaata      420
aaaccatcta cagctaaaaa aatagtttagc ttaaaaaaaa tgtaccatc atgggctaata      480
gatctagata cttaattag tactgaagat gctacagaat tacaacaaaa gttagagcaa      540
gggaccgacc tacttaacgc attacattct ctaaaagtaa accatgaagt tatgtatgca      600
ttaacgatgc agccttctga cagagctgca ttaaaagcta ggcatgacgc tgcccttcac      660
tttaaaaage gtaacatcgt acctatcgat tatcccggtc atatgcaacg aatgacggac      720
atactacatc ttccagatat agcttttgaa gattcgatgg catcactgc ccctttagca      780
tttgccttag cagctgctag cggtcgcaga caaattgaaa tactaattac tggtagtttt      840
gacgccaaaa ataaaagcat cattaaattt tctggacaag caaaaaaaag aatggccgtt      900
tcaggtggac attatgaaat atacagtcta atgactcag agctattcat tcaacggtta      960
gagtttttac gttctcatag ctcaatactt cgattacaaa atttggaat agcacaatgat      1020
gaacatcgta ctgaactatc tgftattaac ggtttttag ccaaaccctt aaatgatgca      1080
gcaaaacagt tctttgtcga tgacagaaga gtatttaaag atacccgtgc aatttacgct      1140
cgcatagcat atgaaaaatg gtttagaaca gatctcgcct gggcggaagt cgacgaagat      1200
gtttttctct ctgaattatt aggcctagac gaccagata ctcagctggc atataacaa      1260
ttcaagctgg taaatttcaa tccaaaatgg acacctaata tatcatagta aaacctcgg      1320
ttagctgcac ttaagagct tgacaatgat atgcccggcc tagcacgtgg cgatcgcgca      1380
gttcgcatac atgagtggtg taaagagcaa ctggcgcgaga accctgcggc aaaaaaact      1440
gcataccaaa tcaagaaaaa tttaattgt cgaatgact tgccagccg atacatggca      1500
tgggtgtctg acgcgctagg ggtgtgtatt ggtgatgatg gacaggcaag gccagaagaa      1560
ctcccaccat cgctcgtgct tgataattaac gctgatgaca ctgacgtgta agaagatgaa      1620
atagaggaag actttactga tgaggaaata gacgacaccg aattcgacgt atcagataac      1680
gccagtgatg aagataagcc cgaagataaa cctcgctttg cagcaccaat tcgtagaagt      1740
gaggactctt ggctgattaa atttgaattt gctggcaage aatatagctg ggagggtaat      1800
gccgaaagtg ttatgatgc gatgaaacaa gcattggactg aaaatatgga gtaa      1854

```

耶尔森菌属噬菌体 PY54 原核端粒酶氨基酸序列 (SEQ ID NO:9)

```

MKIHFRDLVS GLVKEIDEIE KSDRAQDKT RRYQGAARKF KNAVFMDKRK YRGNGMKNRI      60
SLTTFNKYLS RARSFEERL HHSFPQSIAT ISNKYPAFSE IIKDLNRP A HEVRIKLKEL      120
ITHLESGVNL LEKIGSLGKI KPSTAKKIVS LKKMYP SWAN DLDTLISTED ATELQKLEQ      180
GTDLLNALHS LKVNHEVMYA LTMQPSDRAA LKARHDAALH FKRNIVPID YPGYMQRMTD      240
ILHLPDIAFE DSMASLAPLA FALAAASGRR QIEILITGEF DAKNKSIIKF SGQAKKRMV      300
SGGHYEIYSL IDSELFQRL EFLRSHSSIL RLQNLEIAHD EHRTLSVIN GFVAKPLNDA      360
AKQFFVDDRR VFKDTRAIYA RIAYEKWFRT DPRWAKCDED VFFSELLGHD DPDTQLAYKQ      420
FKLVNFPKW TPNISDENPR LAALQELDND MPGLARGDAA VRIHEWVKEQ LAQNPAAKIT      480
AYQIKKNLNC RNDLASRYMA WCADALGVVI GDDGQARPEE LPPSLVLDIN ADDTDAEED E      540
IIEEDFTDEEI DDTEFDVSDN ASDEDKPEDK PRFAAPIRRS EDSWLKFEF AGKQYSWEGN      600
AESVIDAMKQ AWTENME

```

[0227] 表 F

[0228]

克雷伯氏菌属噬菌体 phiKO2 原核端粒酶核酸序列(SEQ ID NO:10)

```

atgcgtaagg tgaattgg tgagctaac aatcgcttg tgagcgaggt cgaggcaatc      60
gatgcctctg atcgccgca aggcgataaa acgaagaaaa ttaaagccgc agcattaaaa    120
tataagaatg cattatttaa tgacaaaaga aagtttcgcg gtaaagggtt agaaaaaaga    180
atttcgcca acacgttcaa ctctatatg agtcgggcaa ggaaaagatt tgatgataga    240
ttgcatcata actttgaaaa gaatgtaatt aaactatcag aaaaatatcc ttatatagt    300
gaagaattat ctcgtggct ttctatgctt gcgcatcaa ttgacagca tatgtcaaga    360
ttgcaagcca agctaaaaga gataatgcca ttggcagaag acttatccaa tataagatt    420
ggtaaaaaaa atagcggaagc aaaaataaat aaactcgcta ataaatatcc tgaatggcaa    480
ttcgtatta gtattttaa tagcgaagat tggaaggata aaagagatta tctttataaa    540
ctattccaac aaggtttctt gctcctggaa gacttgaata acctgaaagt aaacctgag    600
gttctctate atctgcagct tagttctgcc gacggaacct ctatccagca gcgctgggcc    660
aacgtctca gcgagaaaaa gcgcaacgtt gtcgtgattg actatccgcg ctatatgcag    720
gccatctacg atataatcaa caagcctata gtttcgttcg atttgactac tcgtcgtggt    780
atggccccgc tggcgttcgc cctgcccgcg ctatctggtc gccgaatgat tgaaatcatg    840
ctccagggtg aattttcgt cgcaggtaaa tatacagtaa cattcctggg gcaagctaaa    900
aaacgctcgg aagataaagg tatatcaagg aaaatatata ccttatgcga cgctacttta    960
tttgtagttt tggtaaatga acttcgctca tgcgccgctg ctgcggattt tgatgaagta   1020
ataaaaggat atggcgaaaa tgacactcgc tcagaaaatg ggcgtattaa tgcaattctc   1080
gctacagctt ttaattcgtg ggtaaaaact ttcttagcgc atgaccgccg cgtttataaa   1140
gatagccgcg ctatttacgc ccgtattgcc tatgaaatgt tcttcgcgct tgaccctcgg   1200
tggaagaatg ttgatgagga tgtattcttc atggagattc tcggccatga cgatgaaaac   1260
acccaactgc actataagca gtttaaatg gctaacttct ccagaacatg gcgaccaaat   1320
gtcggcgagg agaatgccg cctagcggcg ctgcaaaagc tggatagcat gatgccagat   1380
tttgccaggg gcgacgccgg ggttcgtatt catgagaccg tgaagcagct ggtggagcag   1440
gaccatcga taaaaatcac aaacagcacc ctgcgaccgt ttaacttcag taccaggctg   1500
attcctcgtc acctggagtt tgccgccgat gcattgggcc agttcgtcgg tgaatatggg   1560
caatggcaac tgaaagatga ggccgctgca atagtcctgc ctgatgagga aattcttgag   1620
cctatggacg acgtcgatct cgatgacgaa aacctgatg atgaacgct ggatgacgat   1680
gagatcgaa gggacgaaag cgaaggagag gaactggagg aagcgggcga cgctgaagag   1740
gccgaggtgg ctgaacagga agagaagcac cctggcaagc caaactttaa agcgccgagg   1800
gataatggcg atggtacctt catggtggaa ttgaattcg gtggccgctc ttacgcctgg   1860
tccggtgccg ccggtaatcg ggtagaggca atgcaatctg cctggagtgc ctactcaag   1920
tga

```

1923

克雷伯氏菌属噬菌体 phiKO2 原核端粒酶氨基酸序列 (SEQ ID NO:11)

```

MRKVKIGELI NSLVSEVEAI DASDRPQGDK TKKIKAAALK YKNALFNDKR KFRGKGLEKR    60
ISANTFNSYM SRARKRFDDR LHHNFEKNVI KLSEKYPLYS EELSSWLSMP AASIRQHMSR    120
LQAKLKEIMP LAEDLSNIKI GTKNSEAKIN KLANKYPEWQ FAISDLNSED WKDKRDYLYK    180
LFQQGSSLE DLNNLKVNHE VLYHLQLSSA ERTSIQQRWA NVLSEKKRNV VVIDYPRYMQ    240
AIYDIINKPI VSFDLTTRRG MAPLAFALAA LSGRRMIEIM LQGEFSVAGK YTVTFLGQAK    300
KRSEDKGISR KIYTLCDATL FVSLVNELRS CPAAADFDEV IKGYGENDTR SENGRIINAIL    360
ATAFNPWVKT FLGDDRRVYK DSRAIYARIA YEMFFRVDPR WKNVDEDEVF MEILGHDDEN    420
TQLHYKQFKL ANFSRTWRPN VGEENARLAA LQKLDSMMPD FARGDAGVRI HETVKQLVEQ    480
DPSIKITNST LRPFNFSTRL IPRYLEFAAD ALGQFVGENG QWQLKDEAPA IVLPDEEILE    540
PMDDVDLDD EIEVDESEGE ELEEAGDAEE AEVAEQEEKH PGKPNFKAPR    600
DNGDGTYMVE FEFGRHYAW SGAAGNRVEA MQSAWSAYFK
640

```

[0229] 表 G

[0230]

弧菌属噬菌体 VP882 原核端粒酶核酸序列 (SEQ ID NO:12)

```

atgagcggcg aaagtagaca aaaggtaaac ctcgaggagt taataaatga gctcgtcgag    60
gaggtgaaaa ccatacgatga caatgaggcg attactcggg ctgaaaaaac caagttgatc    120
accaggcgcg cgactaaatt caagaccaag ctgcacgacg ataagcgccg gaaggatgag    180
accagaatcg ctctgagcac ctatcgtaag tacatgacaa tggccaggcg agcagttact    240
gagcagaact ggaaacacca cagtctcgag cagcagatag agcggctggc caaaaagcac    300
ccgcaatacg ctgagcagct ggtggccatc ggggccatgg ataactcac cgagttgcgc    360
ctggcgcatc ggcacctct gaagagcatc aaggacaacg atgaagcctt cgaggatac    420
cgcagcatga agttagacca cgaggtaatg cgccatctga cgctaccag tgcgcaaaag    480
gcgagactgg cagaggaagc cgccgaggcg ttgaccgaga agaaaaccgc cacggtcgac    540
atcaactatc acgagctgat ggccggcggtg gtggagctgt tgaccaagaa gaccaagacg    600
gtcggcagcg acagcaccta cagcttcagc cggctggcgc ttggtattgg cctggctacc    660
ggctcgtcgt ctatcgagat actgaagcag ggcgagttca aaaaggtgga tgacgagcgg    720
ctcgagttct ctggccaagc gaaaaagcgc ggcggtgccg actattcaga gacctatacc    780
atttacacc ttgctgactc cgacctggta ctgatggcgc tgaagaacct gcgagagttg    840
ccagaagttc ggcactgga tgagtacgac caactggcg agattaagcg gaacgacgcc    900
atcaataaac gctgtgcaaa aacgctcaac caaacgccca agcagttctt tggcagcgac    960
gagcgctgt tcaaatagat tcgtgccatc tggcgcgctc tggcttatga gttgttttt    1020
caactgatc cgcgctggaa aaagaaagac gaggacgttt tctggcagga gatgtgggc    1080
cacgaggaca tcgagactca gaaagcctat aagcaattca aggtcgacta cagcgaacct    1140
gagcagccgg tgcacaagcc tggcaaat t aagagcagag ctgaagccct cgcggcgctc    1200
gactcaaatg aggacattac caccctgca tccatggcca agatccacga ctgggtgaaa    1260
gagcgtattg cggagagccc cgaggcgaac atcacacagt cactcatcac cggggaactg    1320
ggctcaggcc gtaaggtgat caaggactac ctcgacctgg ctgacgatgc cttgctgtg    1380
gtgaatactc ctgctgatga cgcagtcgc gaggttcag ctgatgtgcc ggcagcagaa    1440
aaacagccga agaaagcgca gaagccaga ctcgtggctc accaggttga tgatgagcac    1500
tgggaagcct gggcgctggt ggaaggcgag gaggtggcca gggtgaaaat caagggcacc    1560
cgcgttgagg caatgacagc cgcattggag gccagccaaa aggcactcga tgactaa    1617

```

弧菌属噬菌体 VP882 原核端粒酶氨基酸序列 (SEQ ID NO:13)

```

MSGESRQKVN LEELINELVE EVKTIDDNEA ITRSEKTKLI TRAATKFKTK LHDDKRRKDA    60
TRIALSTYRK YMTMARAAVT EQNWKHHSLE QQIERLAKKH PQYAEQLVAI GAMDNITELR    120
LAHRDLLKSI KDNDEAFEDI RSMKLDHEVM RHLTLPSAQK ARLAEEAAEA LTEKKTATVD    180
INYHELMAGV VELLTKKTKT VGSDSTYSFS RLALGIGLAT GRRSIEILKQ GEFKKVDEQR    240
LEFSGQAKKR GGADYSETYT IYTLVSDSLV LMALKNLREL PEVRALDEYD QLGEIKRND    300
INKRCAKTLN QTAKQFFGSD ERVFKDSRAI WARLAYELFF QRDPRWKKKD EDVFWQEMLG    360
HEDIETQKAY KQFKVDYSEP EQPVHKPGKF KSRAEALAAL DSNEDITTRS SMAKIHVWVK    420
ERIAEDPEAN ITQSLITREL GSGRKVIKDY LDLADDALAV VNTPVDDAVV EVPADVPAEE    480
KQPKKAQKPR LVAHQVDDEH WEAVALVEGE EVARVKIKGT RVEAMTAAWE ASQKALDD    538

```

[0231] 表 H

[0232]

大肠杆菌噬菌体 N15 端粒酶(teIN)和二次免疫抑制物(cA)核酸序列(SEQ ID NO:14)

```

catatgcact ataatcatatc tcaattacgg aacatatcag cacacaattg cccattatac      60
gcgcgtataa tggactattg tgtgctgata aggagaacat aagcgcagaa caatatgtat      120
ctattccggt gttgtgttcc ttgttattc tgctattatg ttctcttata gtgtgacgaa      180
agcagcataa ttaatcgtca ctgttcttt gattgtgtta cgataccag agacttagaa      240
acggggggaac cgggatgagc aaggtaaaaa tcggtgagtt gatcaacacg ctgtgtaag      300
aggtagaggc aattgatgcc tcagaccgcc cacaaggcga caaacgaag agaattaaag      360
ccgcagccgc acgttataag aacgcgttat ttaatgataa aagaaagttc cgtgggaaag      420
gattgcagaa aagaataacc gcgaatactt ttaacgccta tatgacgagg gcaagaaagc      480
ggtttgatga taaattacat catagctttg ataaaaatat taataaatta tcggaaaagt      540
atcctcttta cagcgaagaa ttacttcat ggctttctat gectacggct aatattcgcc      600
agcacatgic atcgttaca tctaaattga aagaaatat gccgcttgc gaagagttat      660
caaagtgaag aataggctct aaaggcagtg atgcaaaaat agcaagacta ataaaaaat      720
atccagattg gagtttctct cttagtgatt taaacagtga tgattggaag gagcgccgtg      780
actatcttta taagtattc caacaaggct ctgcgttgtt agaagaacta caccagctca      840
aggtaacca tgaggttctg taccatctgc agctaagccc tgcggagcgt acatctatac      900
agcaacgatg ggccgatgtt ctgcgcgaga agaagcgtaa tgttgtgtt attgactacc      960
caacatacat gcagtctate tatgatattt tgaataatcc tgcgacttta tttagtttaa      1020
acactcgttc tggatggca cctttggcct ttgctctggc tgcggtatca gggcgaagaa      1080
tgattgagat aatgtttcag ggtgaatttg ccgttcagg aaagtatacg gttatttct      1140
cagggcaagc taaaaaacgc tctgaagata aaagcgtaac cagaacgatt tatactttat      1200
gcgaagcaaa attattcgtt gaattattaa cagaattgcg ttcttgctct gctgcactcg      1260
atttcgatga ggttgtaaa ggatatggaa aggatgatac aaggctgag aacggcagga      1320
taaatgctat tttagcaaaa gcatttaacc ctgggttaa atcattttc ggccgatgacc      1380
gtcgtgttta taaagatage cgcgtattt acgctcgcat cgcttatgag atgtcttcc      1440
gcgtcgatcc acgggtgaaa aacgtcgacg aggatgtgtt ctcatggag attctcgac      1500
acgacgatga gaacaccag ctgcactata agcagttcaa gctggccaac ttctccagaa      1560
cctggcgacc tgaagtggg gatgaaaaca ccaggctggt ggctctcgag aaactggacg      1620
atgaaatgcc aggccttccc agagggtgacg ctggcgctccg tctccatgaa accgttaagc      1680
agctggtgga gcaggacca tcagcaaaaa taaccaacag cactctccgg gcctttaat      1740
ttagcccagc gatgattagc cggtaacctg agtttgcgc tgatgcattg gggcagttcg      1800
ttggcgagaa cgggcagtg cagctgaaga tagagacacc tgcaatcgtc ctgcctgatg      1860
aagaatccgt tgagaccatc gacgaaccgg atgatgagtc ccaagacgac gagctggatg      1920
aagatgaaat tgagctcgac gagggtggcg gcgatgaacc aaccgaagag gaagggccag      1980
aagaacatca gccaatgct ctaaaaccgg tctcaagcc tgcaaaaaat aacggggacg      2040
gaacgtacaa gatagagttt gaatacgatg gaaagcatta tgcttggtcc gggcccgcg      2100
atagccctat ggccgcaatg cgatccgat gggaaacgta ctacagctaa aagaaaagcc      2160
accggtgtta atcgttggtt ttttattga ggctgtccc taccatccc ctgcaaggga      2220
cggaaggatt agcgggaaac tgcagtgca actacggaca tcgccgtccc gactgcaggg      2280
acttcccgcg gtaaaaggcg gcttaaatc gggtgggcca accctattt tctgcaatcg      2340
ctggcgatgt tagttctgt gatagcgtt ccagctttc aatggccagc tcaaaatgtg      2400
ctggcagcac ctctccagt tccgtatcaa taccgtgat cggcagctct ccacaagaca      2460
tactccggcg accgccagc actacatgc gcagcagtc cgttcgtag acacgcatgt      2520
tgcccagagc cgtttctgca gccgttaata tccggcgcac gtcggcgatg attgccggga      2580
gatcatccac ggttattggg ttcggtgatg ggttctgca ggcgcggcgg agagccatcc      2640
agacccgct aacctatgcg ttacggtact gaaaactttg tgctatgtcg ttatcaggc      2700
ccgaagtct tcttctgcc gccagtcag tggttaccg cgtttctag gctcaggtc      2760
gacaaaagca tactcgccgt tttccggat agctggcaga acctcgttcg tcaccactt      2820
gcggaaccgc caggctgtcg tccctgttt caccgctcg cggcagcgga ggattatggt      2880
gtagagacca gatccgata ccacatttac tccctggcc atccgatcaa gttttgtgc      2940
ctcggftaaa ccgagggtca attttcatc atgacccagc ttacgcaatg catcagaagg      3000
gttggtctata ttaaatgcag cacagatata cagcgccaca aaccacgggt caccaccgac      3060
aagaaccacc cgtatagggt ggtttctctg aaatgaaaag acggagagag ccttcattgc      3120
gcctcccggg atttcagctg ctacaaaagg gacagggagc agcccgagagc ttctgcgtg      3180

agttcgcgcg cgacctgcag aagtccgca gcttctgca aatacagcgt ggcctcataa      3240
ctggagatag tgcggtgagc agagcccaca agcgttcaa cctgcagcag gcgttctca      3300

```

[0233]

```

atcgtctcca gcaggccctg ggcgtttaac tgaatctggt tcatgcgac acctcgtga      3360
ccgggatacg ggctgacaga acgaggacaa aacggctggc gaactggcga cgagcttctc      3420
gctcggatga tgcaatggtg gaaaggcggg ggatatggga tttttgtcc gtgcggacga      3480
cagctgcaaa ttgaatttg aacatggtat gcattctat cttgtatagg gtgctaccac      3540
cagagttgag aatctctata ggggtggtag ccagacagg gttctcaaca ccgtacaag      3600
aagaaaccgg cccaaccgaa gttggcccca tctgagccac cataattcag gtatgcgcag      3660
atttaacaca caaaaaaaca cgctggcgcg tgttgtcgc tcttgtcat tcgggggtga      3720
gaggcccgge tgcagatttt gctgcagcgg ggtaactcta ccgcaaaage agaacgcacg      3780
tcaataattt aggtggatat ttaccccggt gaccagtcac gtgcacaggt gttttatag      3840
tttctttac tgactgatca gaacctgate agttattgga gtcggtaat cttattgatg      3900
accgcagcca ccttagatgt tgtctcaaac cccatacgge cagcaatgag cactggaac      3960
ggaatagtcg gcaggtacag cggaaacgaac cacaacgggt tcagacgctg ccagaacgtc      4020
gcatcacgac gttccatcca ttcggtattg tcgac                                4055

```

大肠杆菌噬菌体 N15 原核端粒酶氨基酸序列(SEQ ID NO:15)

```

MSKVKIGELI NTLVNEVEAI DASDRPQGDK TKRIKAAAAR YKNALFNDKR KFRGKGLQKR
60
ITANTFNAYM SRARKRFDDK LHHSFDKNIN KLSEKYPLYS EELSSWLSMP TANIRQHMSS      120
LQSKLKEIMP LAEELSNVRI GSKGSDAKIA RLIKKYPDWS FALSDLNSDD WKERRDYLYK      180
LFQQGSALLE ELHQLKVNHE VLYHLQLSPA ERTSIQQRWA DVLREKKRNV VVIDYPTYMQ
240
SIYDILNMPA TLFSLNTRSG MAPLAFALAA VSGRRMIEIM FQGEFAVSGK YTVNFSGQAK      300
KRSEDKSVTR TIYTLCEAKL FVELLTELRS CSAASDFDEV VKGYGKDDTR SENGRINAIL      360
AKAFNPWVKS FFGDDRRVYK DSRAIYARIA YEMFFRVDPR WKNVDEDVFF MEILGHDDEN
420
TQLHYKQFKL ANFSRTWRPE VGDENTRLVA LQKLDDEMPG FARGDAGVRL HETVKQLVEQ
480
DPSAKITNST LRAFKFSPTM ISRYLEFAAD ALGQFVGENG QWQLKIETPA IVLPDEESVE      540
TIDEPDESQ DDELEDEIE LDEGGGDEPT EEEGPPEHQ TALKPVFKPA KNNGDGTYKI      600
EFEYDGKHYA WSGPADSPMA AMRSAWETYY S
631

```

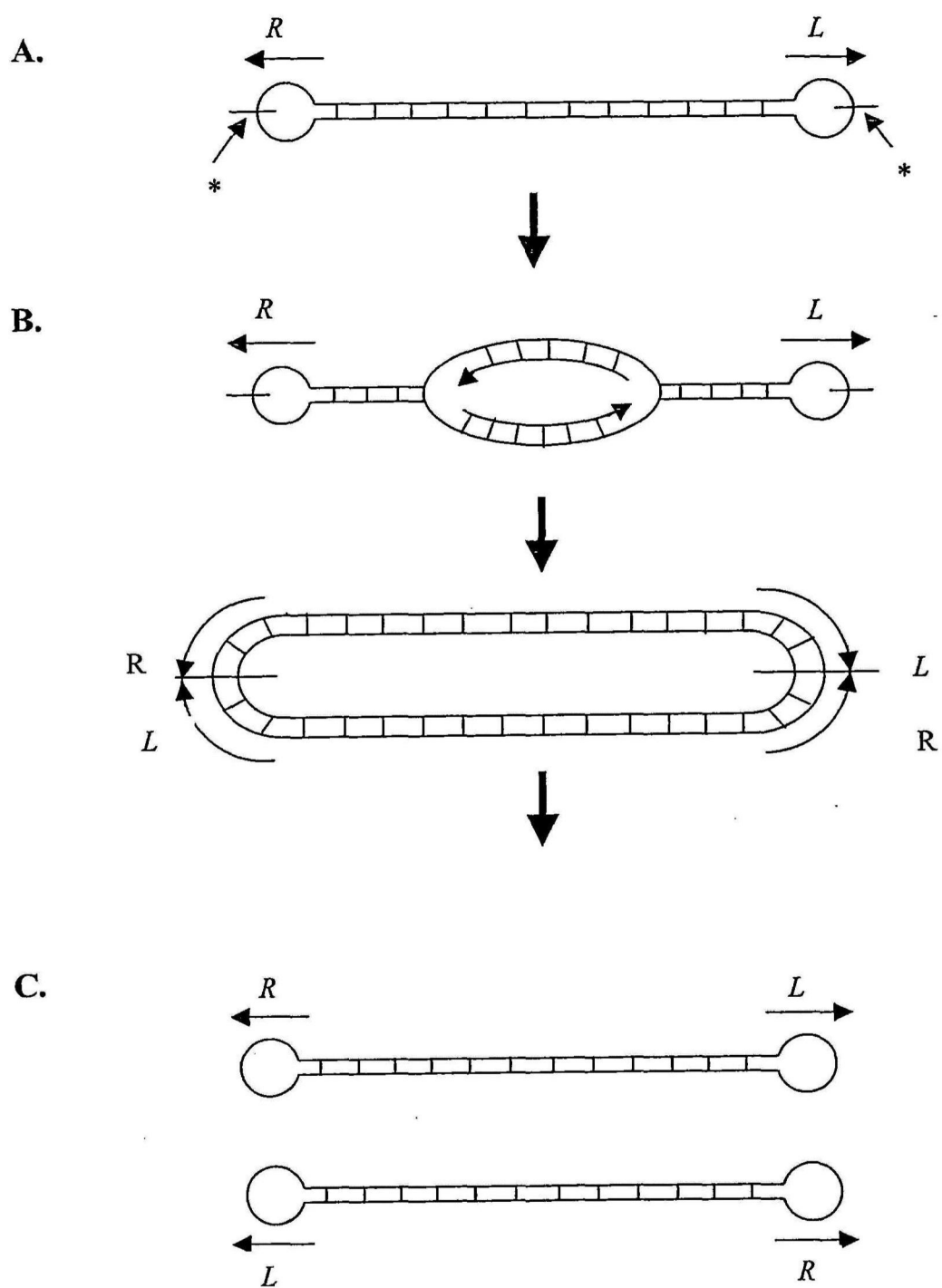


图 1

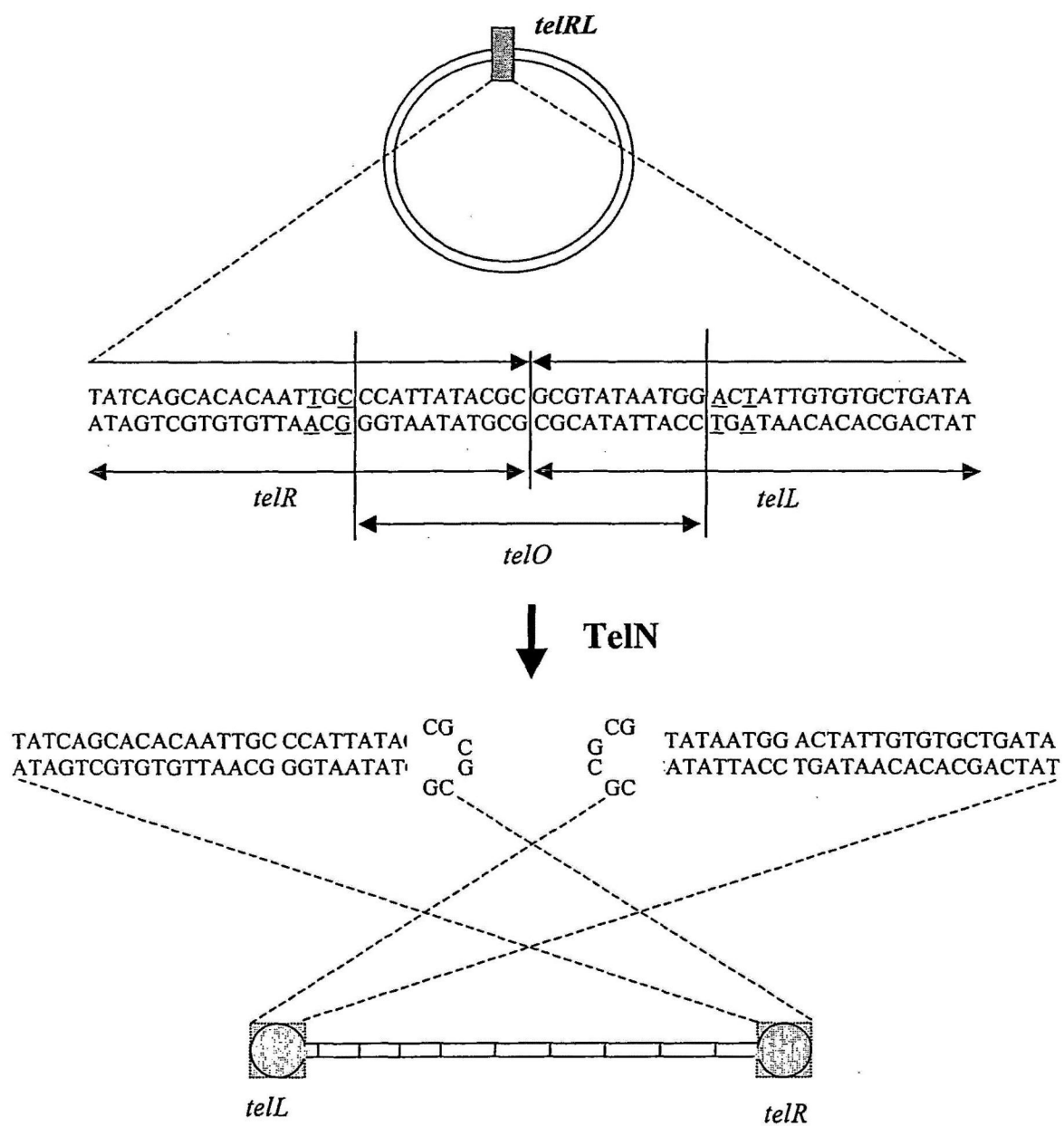


图 2

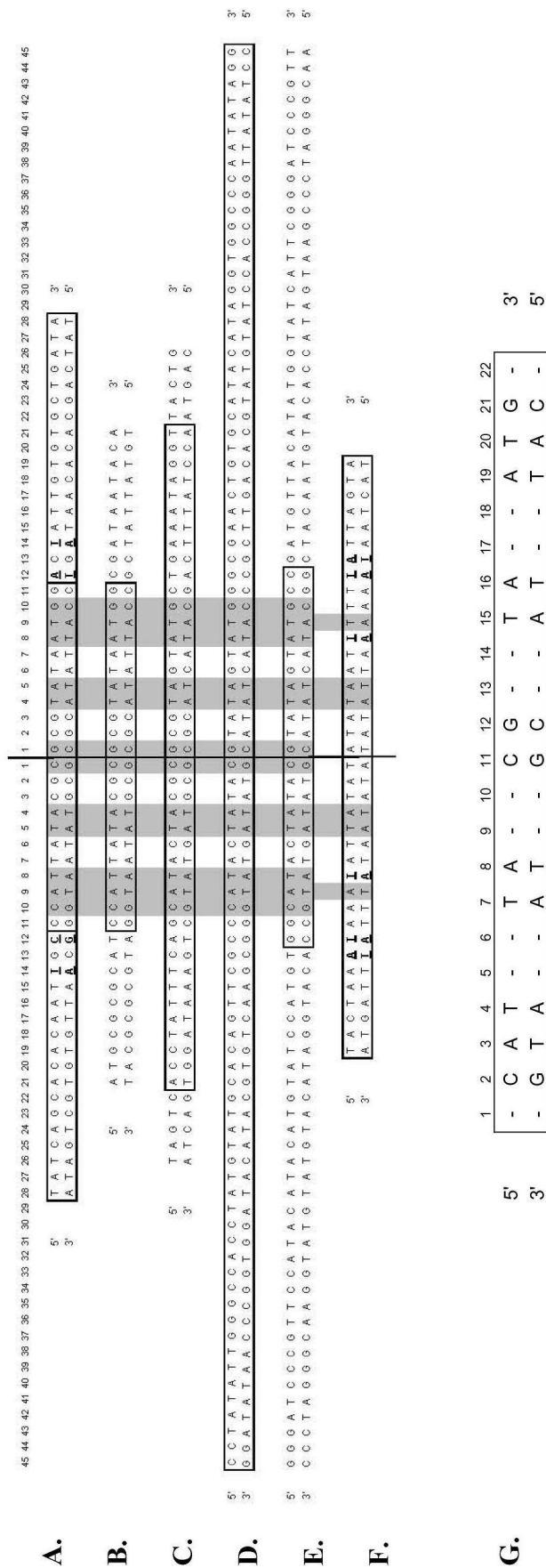


图 3

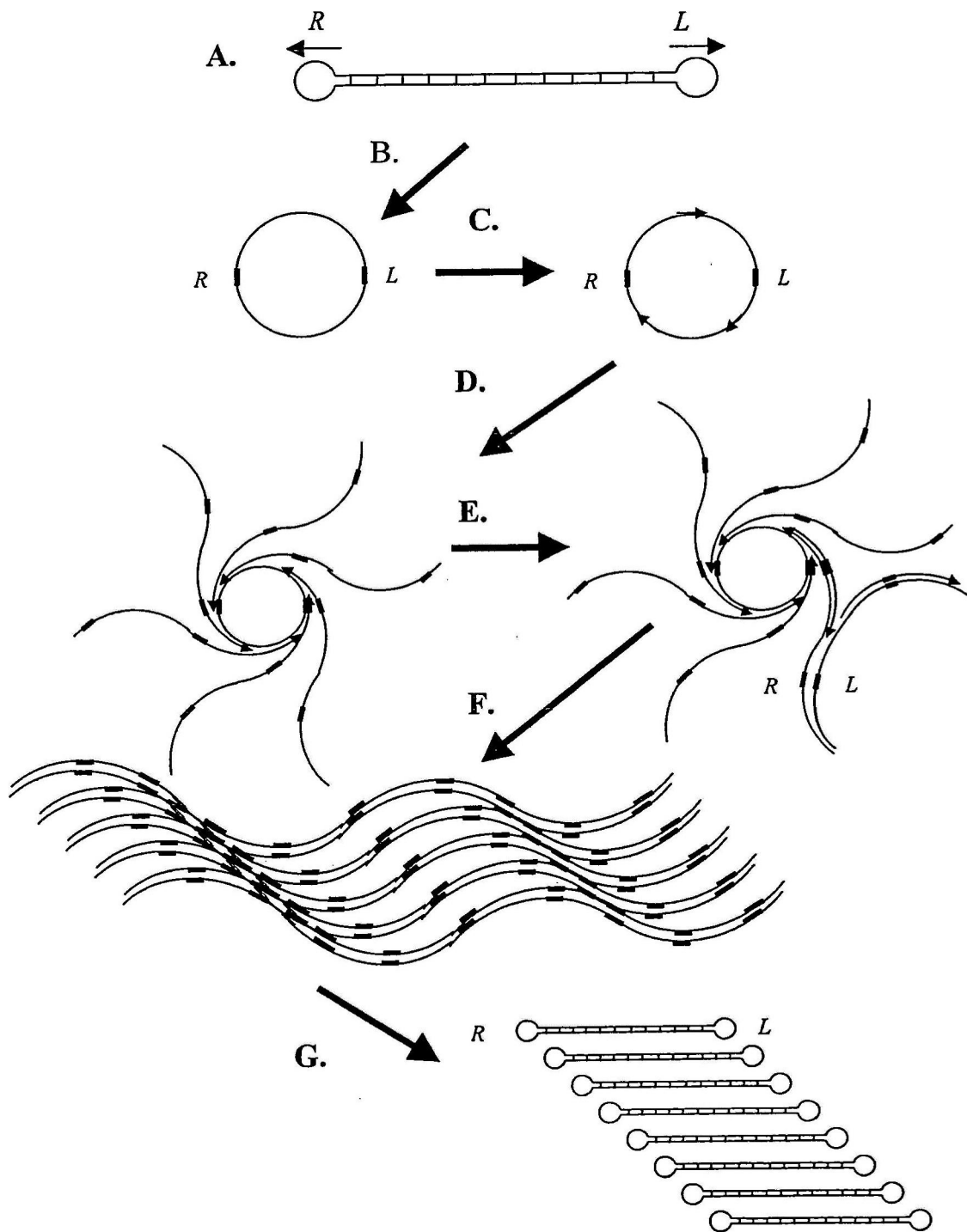


图 4

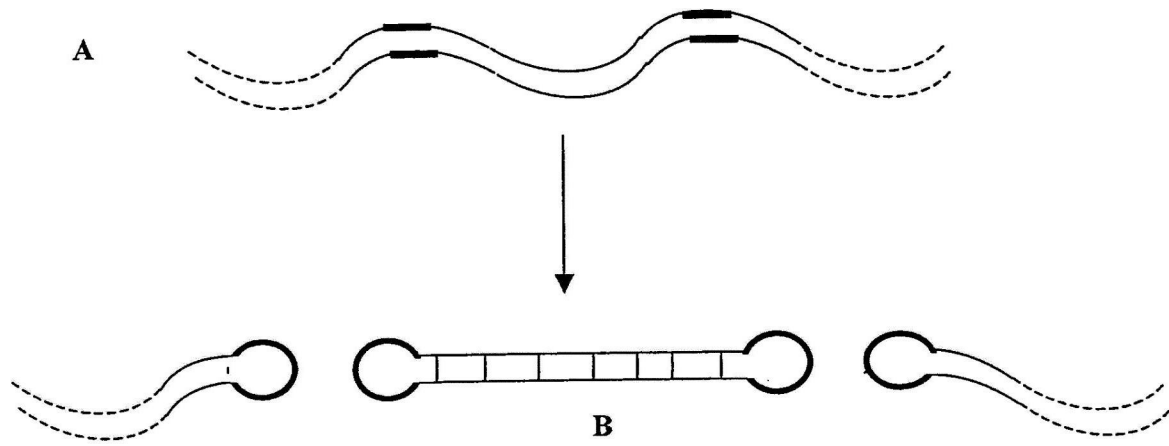
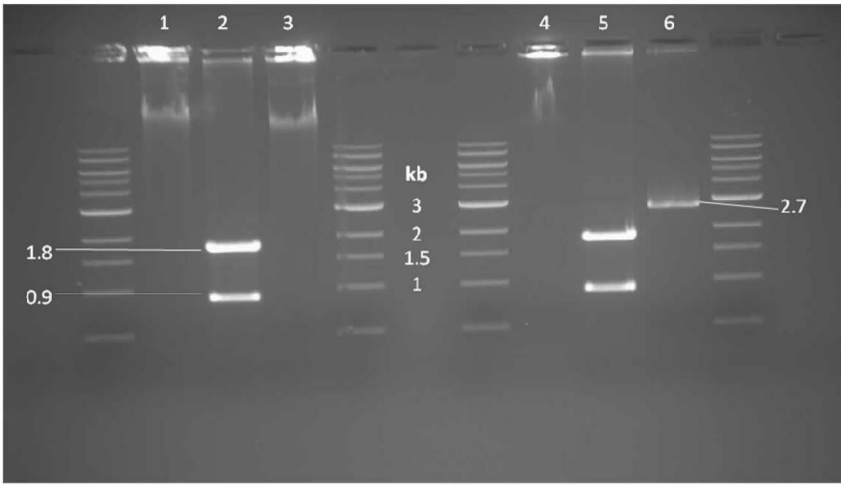


图 5

A.



B.



C.

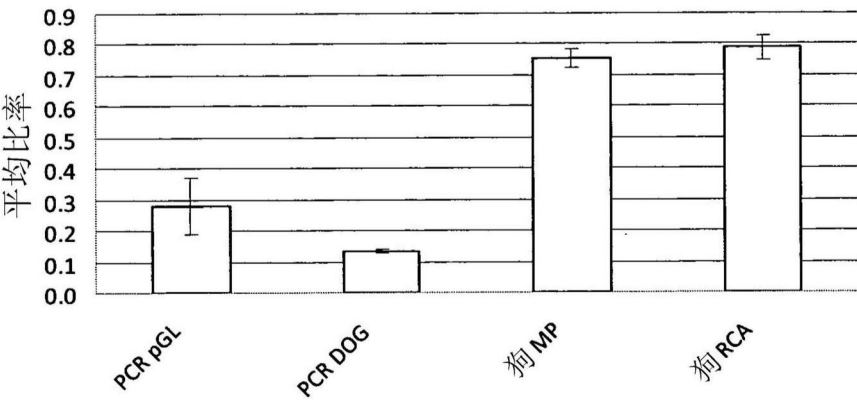


图 6

Abstract

An in vitro process for the production of closed linear deoxyribonucleic acid (DNA) comprises (a) contacting a DNA template comprising at least one protelomerase target sequence with at least one DNA polymerase in the presence of one or more primers under conditions promoting amplification of said template; and (b) contacting amplified DNA produced in (a) with at least one protelomerase under conditions promoting production of closed linear DNA. A kit provides components necessary in the process.