(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118804974 A
(43)申请公布日 2024.10.18

(21)申请号 202280091507.5
(22)申请日 2022.12.16
(30)优先权数据
63/290,320 2021.12.16 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.08.12
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2022/081871 2022.12.16
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/115040 EN 2023.06.22
(71)申请人 安萨生物技术公司
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 E·埃斯特林 S·帕尔鲁克 D·阿洛
(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所 11256
专利代理师 陈文平 王北南
(51)Int.Cl.
C12N 9/12(2006.01)
C12Q 1/6844(2006.01)
C12N 9/16(2006.01)
C12P 19/34(2006.01)

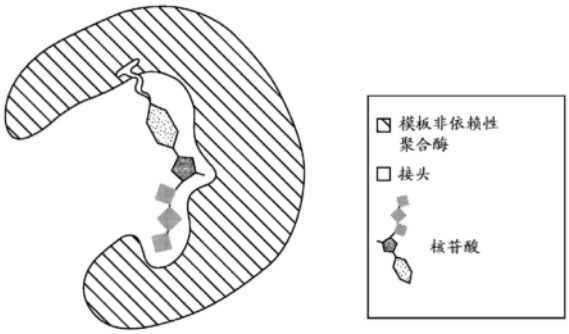
权利要求书2页 说明书27页
序列表（电子公布） 附图9页

(54)发明名称

多核苷酸合成的方法

(57)摘要

本文公开了用于核酸分子的从头酶促合成的组合物和方法。特别地并且除其它事项外,本公开的组合物和方法提供了通过从头酶促合成产生的核酸分子产物中的非终止的减少。本公开的组合物和方法还包括使用磷酸酶来促进非终止的减少。



CN 118804974 A

1.一种核酸合成的方法,所述方包括:

(i)提供包含多个聚合酶-核苷酸缀合物的缀合物试剂,其中所述缀合物各自包含通过接头共价连接至聚合酶的核苷酸;以及

(ii)使包含多核苷酸的样品与所述缀合物试剂接触,其中所述缀合物的所述聚合酶催化所述聚合酶-核苷酸缀合物的所述核苷酸共价添加到所述多核苷酸的3'羟基上,并且其中所述缀合物试剂与或已经与磷酸酶一起孵育,并且

其中所述缀合物试剂与或已经与磷酸酶一起孵育,其中所述磷酸酶能够去除未遮蔽的核苷酸的末端5'磷酸。

2.一种方法,所述方法包括:

(i)提供包含聚合酶-核苷酸缀合物的缀合物试剂;以及

(ii)使所述缀合物试剂与磷酸酶接触,

其中所述缀合物包含通过接头共价连接至聚合酶的核苷酸,并且

其中所述磷酸酶能够去除未遮蔽的核苷酸的末端5'磷酸。

3.如权利要求1或权利要求2所述的方法,其中所述核苷酸是经修饰的核苷酸。

4.如权利要求1所述的方法,所述方法进一步包括在添加所述缀合物之后裂解所述接头以去除连接至所述多核苷酸的所述聚合酶。

5.如权利要求1所述的方法,所述方法进一步包括将所述缀合物试剂与所述磷酸酶一起孵育,并且所述孵育水解至少一个未遮蔽的核苷酸的至少一个末端5'磷酸。

6.如权利要求5所述的方法,其中在使所述样品与所述缀合物试剂接触之前进行所述缀合物试剂与所述磷酸酶的所述孵育。

7.如权利要求6所述的方法,其中在使所述样品与所述缀合物试剂接触之前从所述缀合物试剂中去除所述磷酸酶。

8.如权利要求5所述的方法,其中在使所述样品与所述缀合物试剂接触之后进行所述缀合物试剂与所述磷酸酶的所述孵育。

9.如权利要求1或3-8中任一项所述的方法,所述方法进一步包括重复如权利要求1或3-8中任一项中所述的每个步骤一次或多次以合成延长的多核苷酸。

10.如权利要求1或2所述的方法,其中所述磷酸酶不会去除所述缀合物的遮蔽的核苷酸的末端5'磷酸。

11.如权利要求1或2所述的方法,其中所述未遮蔽的核苷酸不与聚合酶连接。

12.如权利要求1或2所述的方法,其中所述未遮蔽的核苷酸是缀合物的一部分:

其中所述聚合酶是未折叠的或不正确折叠的,

其中所述核苷酸连接至所述聚合酶,使得所述核苷酸不被所述磷酸酶遮蔽,或者其中多个核苷酸连接至所述聚合酶。

13.如权利要求1或2所述的方法,其中所述磷酸酶是碱性磷酸酶或非碱性磷酸酶。

14.如权利要求1或2所述的方法,其中所述聚合酶包含模板非依赖性聚合酶。

15.如权利要求14所述的方法,其中所述模板非依赖性聚合酶是末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)或其变体。

16.如权利要求1或2所述的方法,其中所述聚合酶包含模板依赖性聚合酶。

17.如权利要求16所述的方法,其中所述聚合酶包含DNA聚合酶。

18.如权利要求16所述的方法,其中所述聚合酶包含RNA聚合酶。

19.如权利要求9所述的方法,其中与使用未与磷酸酶一起孵育的在其它方面相同的缀合物试剂的相同合成相比,所述多核苷酸合成中的非终止率降低。

20.如权利要求1或2所述的方法,其中所述接头是可裂解接头。

21.如权利要求1或2所述的方法,其中所述磷酸酶去除所述未遮蔽的核苷酸的所述末端5'磷酸。

22.一种包含多个缀合物的组合物,其中每个缀合物包含连接至聚合酶的核苷酸或经修饰的核苷酸,其中由所述组合物的连接的聚合酶遮蔽的核苷酸的纯度相对于所述组合物中的核苷酸的总量大于约80%、约85%、约90%、约95%、约97%、约98%、约99%、约99.5%、或约99.9%、或约99.9%。

23.如权利要求22所述的组合物,其中所述多个缀合物包含小于约5%、小于约4%、小于约3%、小于约2%、小于约1%、小于约0.5%、小于约0.1%、小于约0.05%或小于约0.01%的未遮蔽的核苷酸或经修饰的核苷酸。

24.如权利要求22或权利要求23所述的组合物,所述组合物还包含磷酸酶。

25.如权利要求22至24中任一项所述的组合物,其中所述多个缀合物能够将核酸分子延伸一个核苷酸。

26.如权利要求22至24中任一项所述的组合物,其中所述多个缀合物能够将核酸分子延伸不超过一个核苷酸。

27.如权利要求25或权利要求26所述的组合物,其中所述核酸分子是单链的。

28.如权利要求25或权利要求26所述的组合物,其中所述核酸是双链的。

29.一种合成包含预定序列的多核苷酸的方法,所述方法包括使核酸分子与权利要求22至26中任一项所述的组合物接触。

30.如权利要求29所述的方法,其中所述方法产生包含所述预定序列的多核苷酸产物。

31.如权利要求30所述的方法,其中与所述产物中的所有多核苷酸相比,所述多核苷酸产物具有小于约5%、小于约4%、小于约3%、小于约2%、小于约1%、小于约0.5%、小于约0.1%、小于约0.05%或小于约0.01%的包含不是所述预定序列的序列的多核苷酸。

32.如权利要求29所述的方法,其中所述核酸分子是单链的。

33.如权利要求29所述的方法,其中所述核酸分子是双链的。

34.一种方法,所述方法包括:处理包含聚合酶-核苷酸缀合物的组合物,包括使所述组合物与磷酸酶接触的步骤,其中所述磷酸酶能够去除未遮蔽的核苷酸的末端5'磷酸。

35.一种减少核酸分子合成中的一个或多个非终止反应的方法,其中所述合成在包含一个或多个未遮蔽的核苷酸的环境中进行,并且其中所述减少包括:使包含聚合酶-核苷酸缀合物的缀合物试剂与磷酸酶接触,其中所述聚合酶-核苷酸缀合物包含通过接头栓系至所述聚合酶的核苷酸,并且其中所述磷酸酶能够去除所述一个或多个未遮蔽的核苷酸的所述末端5'磷酸。

36.如权利要求36所述的方法,其中与在相同条件下但不存在磷酸酶的情况下进行的合成相比,在磷酸酶存在下进行的合成反应中发生的非终止的数量减少。

37.如权利要求34-37中任一项所述的方法,其中所述核苷酸是经修饰的核苷酸。

多核苷酸合成的方法

技术领域

[0001] 本公开涉及包括核酸合成的方法的技术。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2021年12月16日提交的美国临时专利申请第63/290,320号的优先权和权益,所述临时专利申请的全部内容出于所有目的通过引用并入本文。

[0004] 对序列表的引用

[0005] 本申请含有序列表(XML文件,名为ABB-006WO_SL.xml,于2022年12月13日生成,并且大小为15,606字节),所述序列表已经以电子方式提交并且通过引用并入本文。

背景技术

[0006] 酶促多核苷酸合成可通过迭代数轮的模板非依赖性核酸聚合酶(例如末端脱氧核苷酸转移酶)与DNA底物结合、掺入待添加的核苷酸(例如受保护的核苷酸)、随后的脱保护步骤来实现,从而允许核苷酸掺入的未来轮次。酶促核酸合成可能由于添加核苷酸后的非终止而导致不想要的额外插入。这可能导致在单个延伸步骤中添加多于一个核苷酸。在每个步骤中实现精确的一个核苷酸添加对于产生寡核苷酸的准确合成是至关重要的,即使是小的插入错误率也会导致较长寡核苷酸的高比例的不准确序列。因此,需要开发改进的酶促核酸合成方法和/或技术,以防止导致每个步骤多于一个核苷酸添加的过程。

发明内容

[0007] 除其它事项外,本公开提供了多核苷酸合成的方法。例如,此类方法可用于提高寡核苷酸合成的准确度和精确度,包括通过提高单核苷酸添加的精确度。

[0008] 如本文所提供,在一些方面是减少寡核苷酸合成反应中的非终止的方法。

[0009] 在一些方面,本公开提供了包括使缀合物试剂与磷酸酶接触的方法。例如,在一些实施方案中,方法包括:使包含多个聚合酶-核苷酸缀合物的缀合物试剂与磷酸酶接触,其中所述缀合物包含通过接头共价连接至聚合酶的核苷酸或经修饰的核苷酸,并且其中所述磷酸酶能够去除未遮蔽的核苷酸的一个或多个末端5'磷酸。

[0010] 在一些实施方案中,本公开的方法包括:使包含多个聚合酶-核苷酸缀合物的缀合物试剂接触,其中所述缀合物包含通过接头共价连接至聚合酶的核苷酸;以及使包含多核苷酸的样品与所述缀合物试剂接触,其中所述缀合物的所述聚合酶催化所述缀合物的核苷酸共价添加到所述多核苷酸的3'羟基上,并且其中所述缀合物试剂与或已经与磷酸酶一起孵育,其中所述磷酸酶能够去除未遮蔽的核苷酸的末端5'磷酸。在一些实施方案中,共价添加的核苷酸是遮蔽的核苷酸。在一些实施方案中,末端5'磷酸可以是例如未遮蔽的核苷酸的α-磷酸、β-磷酸、χ-磷酸、δ-磷酸、ε-磷酸、φ-磷酸或γ-磷酸。

[0011] 在一些实施方案中,本发明的方法包括使包含聚合酶-核苷酸缀合物组合物的所述缀合物试剂与磷酸酶接触,其中所述缀合物包含通过接头共价连接至聚合酶的核苷酸或经修饰的核苷酸,并且其中所述磷酸酶能够去除未遮蔽的核苷酸的末端5'磷酸。

[0012] 在一些实施方案中,本公开提供了核酸合成的方法,所述方法包括:(i)提供包含多个聚合酶-核苷酸缀合物的缀合物试剂,其中所述缀合物各自包含通过接头共价连接至聚合酶的核苷酸;以及(ii)使包含多核苷酸的样品与所述缀合物试剂接触,其中所述缀合物的所述聚合酶催化所述聚合酶-核苷酸缀合物的核苷酸共价添加到所述多核苷酸的3'羟基上,并且其中所述缀合物试剂与或已经与磷酸酶一起孵育,其中所述磷酸酶能够去除未遮蔽的核苷酸的末端5'磷酸。在一些实施方案中,共价添加的核苷酸是遮蔽的核苷酸。

[0013] 在一些实施方案中,本公开提供了方法,所述方法包括:(i)提供包含聚合酶-核苷酸缀合物的缀合物试剂;以及(ii)使所述缀合物试剂与磷酸酶接触,其中所述缀合物包含通过接头共价连接至聚合酶的核苷酸,并且其中所述磷酸酶能够去除未遮蔽的核苷酸的末端5'磷酸。

[0014] 在一些实施方案中,接头是可裂解接头。

[0015] 在一些实施方案中,本公开提供了一种核酸合成的方法,所述方法包括:提供包含多个聚合酶-核苷酸缀合物的缀合物试剂,其中所述缀合物包含通过接头共价连接至聚合酶的核苷酸或经修饰的核苷酸;以及使包含多核苷酸的样品与所述缀合物试剂接触,其中所述缀合物的所述聚合酶催化所述缀合物的遮蔽的核苷酸共价添加到所述多核苷酸的3'羟基上,并且其中所述缀合物试剂与或已经与磷酸酶一起孵育,其中所述磷酸酶能够从未遮蔽的核苷酸去除一个或多个末端5'磷酸。在一些实施方案中,本文提供的方法包括在添加所述缀合物之后裂解所述接头以去除(例如,通过将核苷酸栓系至聚合酶的接头)连接至多核苷酸的聚合酶。在一些实施方案中,本文提供的方法包括重复所述方法的每个步骤一次或多次以合成多核苷酸。

[0016] 在一些实施方案中,本文提供的方法包括将所述缀合物试剂与所述磷酸酶一起孵育,并且所述孵育水解至少一个未遮蔽的核苷酸的至少一个末端5'磷酸。在一些实施方案中,本文提供的方法包括将所述缀合物试剂与所述磷酸酶一起孵育。在一些实施方案中,在将所述样品与所述缀合物试剂一起孵育之前进行所述缀合物试剂与所述磷酸酶的所述孵育。在一些实施方案中,在将所述样品与所述缀合物试剂一起孵育之前,从所述缀合物试剂中去除所述磷酸酶。在一些实施方案中,在使所述样品与所述缀合物试剂接触之后进行所述缀合物试剂与所述磷酸酶的所述孵育。

[0017] 在一些实施方案中,与使用未与磷酸酶接触的在其它方面相同的缀合物试剂的相同合成相比,所述多核苷酸合成中的非终止率降低。

[0018] 在一些实施方案中,所述磷酸酶不会去除所述缀合物的遮蔽的核苷酸的末端5'磷酸。

[0019] 在一些实施方案中,所述未遮蔽的核苷酸不与聚合酶连接。在一些实施方案中,所述未遮蔽的核苷酸是缀合物的一部分:其中聚合酶是未折叠的或不正确折叠的,其中所述核苷酸连接至所述聚合酶,使得所述核苷酸不被所述磷酸酶遮蔽,或者其中多个核苷酸连接至所述聚合酶。在一些实施方案中,磷酸酶去除未遮蔽的核苷酸的末端5'磷酸。

[0020] 在一些实施方案中,所述聚合酶包含模板非依赖性聚合酶。在一些实施方案中,所述模板非依赖性聚合酶是末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)或其变体。

[0021] 在一些实施方案中,所述磷酸酶是碱性磷酸酶或非碱性磷酸酶。

[0022] 在一些实施方案中,所述聚合酶包含模板依赖性聚合酶。在一些实施方案中,所述

聚合酶包含DNA聚合酶。在一些实施方案中,所述聚合酶包含RNA聚合酶。

[0023] 本公开提供了一种包含多个缀合物的组合物,其中每个缀合物包含连接至聚合酶的核苷酸或经修饰的核苷酸,其中由所述组合物的连接的聚合酶遮蔽的核苷酸的纯度相对于所述组合物中的核苷酸(遮蔽的和未遮蔽的核苷酸)的总量大于约80%、约85%、约90%、约95%、约97%、约98%、约99%、约99.5%、或约99.9%、或约99.9%。

[0024] 在一些实施方案中,所述多个缀合物包含小于约5%、小于约4%、小于约3%、小于约2%、小于约1%、小于约0.5%、小于约0.1%、小于约0.05%或小于约0.01%的未遮蔽的核苷酸或经修饰的核苷酸。

[0025] 在一些实施方案中,本文提供的组合物包含至少一种磷酸酶。在一些实施方案中,磷酸酶是碱性磷酸酶或非碱性磷酸酶。

[0026] 在一些实施方案中,多个缀合物能够将核酸分子延伸一个核苷酸。在一些实施方案中,多个缀合物能够将核酸分子延伸不超过一个核苷酸。

[0027] 在一些实施方案中,核酸分子是单链的。在一些实施方案中,核酸是双链的。

[0028] 在一些方面,本公开提供了合成包含预定序列的多核苷酸的方法,所述方法包括使核酸分子与本文提供的组合物接触。

[0029] 在一些实施方案中,所述方法产生包含预定序列的多核苷酸产物。在一些实施方案中,与产物中的所有多核苷酸相比,多核苷酸产物具有小于约5%、小于约4%、小于约3%、小于约2%、小于约1%、小于约0.5%、小于约0.1%、小于约0.05%或小于约0.01%的包含不是预定序列的序列的多核苷酸。

[0030] 在一些实施方案中,核酸分子是单链的。在一些实施方案中,核酸分子是双链的。在一些实施方案中,本文提供的方法包括处理包含聚合酶-核苷酸缀合物的组合物,包括使所述组合物与磷酸酶接触的步骤,其中所述磷酸酶能够去除未遮蔽的核苷酸的末端5'磷酸。

[0031] 在一些实施方案中,本公开的方法是减少核酸分子合成中的一个或多个非终止反应的方法,其中所述合成在包含一个或多个未遮蔽的核苷酸的环境中进行,并且其中所述减少包括使包含聚合酶-核苷酸缀合物的缀合物试剂与磷酸酶接触,其中所述聚合酶-核苷酸缀合物包含通过接头栓系至聚合酶的核苷酸,其中每个核苷酸包含一个或多个磷酸,并且其中每个核苷酸包含末端5'磷酸,并且其中所述磷酸酶能够从一个或多个未遮蔽的核苷酸去除所述末端5'磷酸。

[0032] 在一些实施方案中,与在相同条件下但不存在磷酸酶的情况下进行的合成相比,在磷酸酶存在下进行的合成反应中发生的非终止的数量减少。

[0033] 在一些实施方案中,核苷酸是经修饰的核苷酸。

附图说明

[0034] 前述和其它目的、特征以及优点将是从如在附图中示出的本公开的特定实施方案的以下描述清楚的,在附图中相同参考符号贯穿不同视图指代相同部分。附图不一定按比例绘制,而是将重点放在示出本公开的各种实施方案的原理上。

[0035] 图1A、1B和1C是可能存在于聚合酶-核苷酸缀合物试剂中的示例性未遮蔽的核苷酸的图表。图1A示出具有栓系在错误位置的示例性未遮蔽的核苷酸(例如,脱氧核苷三磷酸

或“dNTP”)的示例性模板非依赖性聚合酶。

[0036] 图1B示出具有示例性栓系的核苷酸(例如,dNTP)的示例性未折叠的模板非依赖性聚合酶。

[0037] 图1C示出示例性缀合物试剂中存在的示例性“游离”(或未栓系)核苷酸(例如,dNTP)。此类游离dNTP可例如由于核苷酸与聚合酶之间的接头的裂解(例如,由于不稳定性)或例如由于缀合物合成后从缀合物中不完全去除游离核苷酸而存在于此类聚合酶-核苷酸缀合物试剂中。图1A、图1B和图1C中的每个核苷酸均具有可通过磷酸酶催化去除的5’磷酸基团。

[0038] 图1D示出包含示例性遮蔽的核苷酸(例如,dNTP)的示例性聚合酶-核苷酸缀合物。在此图中,示例性核苷酸被栓系在折叠的聚合酶的催化位点中,并且通过栓系的聚合酶在空间上进行阻隔免受其5’磷酸处的磷酸酶裂解。

[0039] 图2A示出在存在(+Phos)或不存在(-Phos)磷酸酶的情况下,使用A、C、T或G聚合酶缀合物在示例性单链DNA底物上的示例性单核苷酸添加反应的结果。通过毛细管电泳分析所得的合成的寡核苷酸。x轴显示寡核苷酸的近似核苷酸长度,并且y轴表示517nm处的相对荧光。反应在所示时间点终止。

[0040] 图2B显示在存在或不存在磷酸酶的情况下来自图2A的21分钟41秒时间点结果的扩展视图。在每组图上指示了特定核苷酸。箭头表示+2添加。

[0041] 图3A示出在存在来自以下的示例性磷酸酶变体的情况下使用T-聚合酶缀合物对单链DNA底物上的单核苷酸添加反应的毛细管电泳分析的结果的图形表示:家牛(Quick CIP,NEB)、北极虾(虾碱性磷酸酶,NEB)、南极细菌TAB5(南极磷酸酶,NEB)或大肠杆菌(Takara Bio)磷酸酶。合成反应在室温(24℃)下进行。在没有磷酸酶的情况下进行对照合成反应。反应在所示时间点终止。x轴显示寡核苷酸的相对电泳迁移(通过近似核苷酸长度),并且y轴表示517nm处的相对荧光。

[0042] 图3B在存在示例性磷酸酶变体的情况下使用T-聚合酶缀合物对单链DNA底物上的示例性单核苷酸添加反应的毛细管电泳分析的结果的图形表示:家牛(Quick CIP,NEB)、北极虾(虾碱性磷酸酶,NEB)、南极细菌TAB5(南极磷酸酶,NEB)或大肠杆菌(Takara Bio)磷酸酶。合成反应在37℃(+和-磷酸酶)下进行,并且在30分钟后终止。箭头表示+2添加的预期大小。

[0043] 图4示出在存在或不存在磷酸酶的情况下进行的示例性50聚体多核苷酸的示例性基于缀合物的多核苷酸合成的结果的图形表示,其中使用SeqStudio遗传分析仪根据沿x轴的大小区分所得的合成的多核苷酸。标记了对应于起始物寡核苷酸和正确的50聚体合成产物的峰。

具体实施方式

[0044] 本公开的各种实施方案的细节在以下描述中阐述。本公开的其它特征、目的和优点将是从描述和附图以及权利要求书清楚的。

[0045] 定义

[0046] 如本文所用,术语“核苷酸”是指包含核苷和一个或多个磷酸基团的分子。“核苷”是指包含核碱基(例如腺嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶、鸟嘌呤或尿嘧啶)和五碳糖(例如核糖或

2'-脱氧核糖)的分子。示例性核苷酸可以是或包括但不限于单磷酸核苷、二磷酸核苷、三磷酸核苷、四磷酸核苷、五磷酸核苷或六磷酸核苷。如本文所提供的,在一些实施方案中,TdT和TdT变体可掺入任何多磷酸核苷,包括包含对核碱基的修饰的核苷酸类似物。

[0047] 如本文所用,"非终止"或"插入"在循环核苷酸延伸的单个步骤期间添加多于一个核苷酸时发生。当具有未裂解的5'磷酸的未遮蔽的核苷酸被添加至寡核苷酸时可发生这种情况。

[0048] 如本文所用,术语"磷酸酶"是指能够去除核苷酸的5'磷酸的酶,尤其是作为不正确形成的缀合物的一部分未被遮蔽的核苷酸或未栓系至聚合酶的核苷酸。当不指特定磷酸酶时,如本文所用,磷酸酶还意在包括能够从核苷酸中去除一个或多个磷酸基团的所有磷酸酶、具有磷酸酶活性的工程化酶或其功能片段。磷酸酶还可指能够从核苷酸中去除一个或多个磷酸基团的任何生物分子(例如,多肽或核酶),包括具有磷酸酶活性的工程化酶或其功能片段。

[0049] 如本文所用,术语"受保护的核苷酸"或"遮蔽的核苷酸"是指通过栓系的聚合酶(或其它实体或组分,诸如例如封闭基团)在空间上进行阻隔免受能够去除其5'磷酸的磷酸酶影响的核苷酸。在一些实施方案中,此类核苷酸很可能在添加至寡核苷酸之后并且在去除所述栓系的聚合酶之前抑制后续核苷酸添加。

[0050] 如本文所用,术语"未受保护的核苷酸"或"未遮蔽的核苷酸"是指未通过栓系的聚合酶(或其它实体或组分,诸如例如封闭基团)在空间上进行阻隔免受能够去除其5'磷酸的磷酸酶影响的核苷酸。在一些实施方案中,未遮蔽的核苷酸可被栓系至聚合酶,诸如栓系在错误折叠的聚合酶中或栓系在不正确位置。未遮蔽的核苷酸可从聚合酶解除栓系(或游离)。在正确添加了遮蔽的核苷酸后,尚未暴露于磷酸酶的未遮蔽的核苷酸更有可能作为插入错误地添加至多核苷酸中。

[0051] 聚合酶-核苷酸缀合物和多核苷酸合成

[0052] 除其它事项外,本公开提供了聚合酶核苷酸缀合物。如本领域技术人员所理解的,存在与精确和准确的多核苷酸合成相关的各种挑战。例如,除其它事项外,聚合酶可错误地催化核苷酸的共价添加,这可能导致在受控的、逐步的核酸合成中使用聚合酶-核苷酸缀合物时每个步骤添加多于一个核苷酸(例如,插入或非终止)。本文提供的技术,包括将此类缀合物与磷酸酶组合(例如,在磷酸酶存在下提供聚合酶-核苷酸缀合物)克服了此类挑战。这些技术有助于实现更准确且精确的逐步添加,与之前描述的合成方法(例如,在没有磷酸酶的情况下进行的那些方法)相比减少错误。

[0053] 在一些实施方案中,在磷酸酶存在下提供缀合物。在一些实施方案中,本公开提供了包含多个聚合酶-核苷酸缀合物的缀合物试剂,其中聚合酶和核苷酸通过接头连接。在一些实施方案中,接头是可裂解的。

[0054] 在一些实施方案中,缀合物试剂在存在磷酸酶的情况下存在。

[0055] 在一些实施方案中,在磷酸酶存在下,聚合酶-核苷酸缀合物与模板(例如,起始寡核苷酸或初始寡核苷酸)组合。

[0056] 多核苷酸的典型逐步合成过程包括通过循环步骤将单个核苷酸逐步添加至起始物寡核苷酸(即,初始寡核苷酸)中。例如,在一些实施方案中,步骤包括:聚合酶-核苷酸缀合物添加至寡核苷酸,通过聚合酶催化的核苷酸共价添加至寡核苷酸的3'端,以及从添加

的核苷酸裂解聚合酶。可重复这些步骤,直到合成所需的伸长的多核苷酸,使得伸长的多核苷酸的长度比重复所述步骤一次或多次之前的多核苷酸长一个或多个核苷酸。

[0057] 除其它事项外,本文提供了核酸合成的方法。在一些实施方案中,核酸合成的方法包括在一种或多个磷酸酶存在下接触(例如,孵育)包含聚合酶-核苷酸缀合物(例如,多个聚合酶-核苷酸缀合物)的缀合物试剂的步骤。在一些实施方案中,多个聚合酶-核苷酸缀合物中的核苷酸是相同的核苷酸(例如,A、G、T或C等)。在一些实施方案中,核苷酸是不同的核苷酸(例如,A、G、T和/或C等)。在一些此类实施方案中,在磷酸酶存在下进行的合成与不存在磷酸酶的情况下的相同合成相比在一种或多种方面得到改善(例如,更精确、更有效、更准确)。

[0058] 在一些实施方案中,在磷酸酶存在下进行的合成防止未遮蔽的核苷酸添加至核酸中。本文提供的方法包括将包含多个聚合酶-核苷酸缀合物的缀合物试剂与磷酸酶接触(例如,孵育)的步骤,其中与没有磷酸酶或没有用磷酸酶处理缀合物试剂的合成相比,当在核酸合成中使用聚合酶-核苷酸缀合物时,导致每个步骤添加多于一个核苷酸的过程(例如,导致额外核苷酸插入的非终止)的比率降低。

[0059] 非终止

[0060] 在逐步核酸合成的每个步骤中精确地实现一个核苷酸添加对于产生较长寡核苷酸的准确合成是必不可少的。精确且准确地进行这些添加仍然是行业中的挑战。例如,使用聚合酶-核苷酸缀合物的逐步核酸合成可能容易发生插入和/或非终止,从而导致在循环核苷酸延伸的单个步骤中向核酸添加多于一个核苷酸。

[0061] 未遮蔽的核苷酸未通过栓系的聚合酶在空间上进行阻隔或仅部分地通过栓系的聚合酶在空间上进行阻隔免受其5’磷酸处的磷酸酶裂解。在寡核苷酸合成过程中,聚合酶可错误地催化未遮蔽的核苷酸的共价添加,这可能导致在核酸合成中使用聚合酶-核苷酸缀合物时每个步骤添加多于一个核苷酸(例如,插入或非终止)。本文提供的技术有助于克服这一挑战,与之前描述的合成方法相比,实现了准确且精确的逐步添加并减少了错误。

[0062] 在一些实施方案中,当具有未裂解的5’磷酸的未遮蔽的核苷酸被添加至寡核苷酸时可发生非终止。如本文所提供的,在一些实施方案中,磷酸酶水解核苷酸(例如,三磷酸核苷酸等)的5’磷酸(例如,末端5’磷酸)。在一些实施方案中,末端5’磷酸是在核苷酸的α-磷酸、β-磷酸、χ-磷酸、δ-磷酸、ε-磷酸、φ-磷酸或γ-磷酸上。在一些实施方案中,如本文公开的磷酸酶水解聚合酶-核苷酸缀合物中的核苷酸或游离核苷酸的5’磷酸(例如,末端5’磷酸)。在一些实施方案中,如本文公开的磷酸酶水解核苷酸的5’磷酸,例如多个聚合酶-核苷酸缀合物中的核苷酸的一个或多个5’末端磷酸,并且防止水解的核苷酸在寡核苷酸合成过程中添加至核酸中。在一些实施方案中,磷酸酶水解聚合酶-核苷酸缀合物的未遮蔽的核苷酸的5’磷酸。在一些此类实施方案中,5’磷酸的水解防止未遮蔽的核苷酸在寡核苷酸合成过程中添加至核酸中。在一些实施方案中,如本文公开的磷酸酶水解多个聚合酶-核苷酸缀合物中的未遮蔽的核苷酸的一个或多个5’末端磷酸,并且防止所述未遮蔽的核苷酸在寡核苷酸合成过程中添加至核酸中。在一些实施方案中,如本文公开的磷酸酶水解包含一种或多个聚合酶-核苷酸缀合物的组合物中的一个或多个游离核苷酸的一个或多个5’磷酸,并且防止所述游离核苷酸在寡核苷酸合成过程中添加至核酸中。在一些实施方案中,磷酸酶水解包含一个或多个聚合酶-核苷酸缀合物的组合物中存在的一个或多个游离核苷酸的5’

磷酸。在一些此类实施方案中,5'磷酸的水解防止一个或多个游离核苷酸在寡核苷酸合成过程中添加至核酸中。

[0063] 未遮蔽的核苷酸

[0064] 缀合物试剂中未遮蔽的核苷酸的存在可导致寡核苷酸合成中的非终止(即插入)。在一些实施方案中,未遮蔽的核苷酸在核酸合成过程中被添加至寡核苷酸之后不太可能抑制后续核苷酸添加。

[0065] 在一些实施方案中,多个聚合酶-核苷酸缀合物中的一部分核苷酸未被聚合酶遮蔽。在一些实施方案中,聚合酶-核苷酸缀合物包含未遮蔽的核苷酸。在一些实施方案中,聚合酶-核苷酸缀合物中的聚合酶分子不会在空间上阻隔磷酸酶接近栓系的核苷酸的5'磷酸。在一些实施方案中,栓系的核苷酸是未遮蔽的核苷酸。在一些实施方案中,聚合酶-核苷酸缀合物中的未遮蔽的核苷酸未通过栓系的聚合酶在空间上进行阻隔免受能够去除其5'磷酸的磷酸酶的影响。在一些实施方案中,去除聚合酶-核苷酸缀合物中的核苷酸的5'磷酸(例如,末端5'磷酸)防止核苷酸在核酸合成过程中添加至核酸中。在一些实施方案中,磷酸酶水解聚合酶-核苷酸缀合物中的未遮蔽的核苷酸的5'磷酸(例如,末端5'磷酸)。在一些此类实施方案中,去除多于一个5'末端磷酸,例如,其中连续去除5'末端磷酸,即从第一个核苷酸,然后从第二个核苷酸等去除。因此,在一些此类实施方案中,可去除一个或多个5'末端磷酸,尽管在给定核苷酸中,单个5'末端磷酸存在并且被去除,此时不同的磷酸变成具有至少一个5'末端磷酸的核苷酸的5'末端磷酸。

[0066] 在一些实施方案中,未遮蔽的核苷酸是不正确形成的缀合物的一部分。在一些实施方案中,不正确形成的缀合物包含错误折叠的聚合酶、其中核苷酸连接在错误位置的聚合酶和/或其中连接多个核苷酸的聚合酶。在一些实施方案中,由于不稳定性或不完全纯化,核苷酸是游离的或从聚合酶解除栓系。在一些实施方案中,游离的或未栓系的核苷酸是未遮蔽的核苷酸。

[0067] 未遮蔽的核苷酸的实例

[0068] 由于在聚合酶-核苷酸缀合物的制备过程中或在添加反应本身的过程中的许多过程,可能发生聚合酶-核苷酸缀合物中核苷酸遮蔽的缺乏。在包含聚合酶-核苷酸缀合物的组合物中未连接至聚合酶的核苷酸被视为未遮蔽的核苷酸。可产生包含未遮蔽的核苷酸的聚合酶-核苷酸缀合物的过程的非限制性实例包括:核苷酸与聚合酶之间的接头的自发裂解(参见例如图1A-1D中的接头)、聚合酶的解折叠(参见例如图1B)、具有连接在错误位置的核苷酸的聚合酶(参见例如图1A)、包含多个连接的核苷酸(即,在单个聚合酶上)或未栓系的游离核苷酸的聚合酶(参见例如图1C)。在一些实施方案中,由于不稳定性,可能发生核苷酸与聚合酶之间的接头的自发裂解,从而在缀合物试剂中产生游离核苷酸。

[0069] 遮蔽的核苷酸

[0070] 在一些实施方案中,多个聚合酶-核苷酸缀合物中的一部分核苷酸被聚合酶遮蔽。遮蔽的核苷酸的非限制性实例包括栓系在正确折叠的聚合酶的催化位点中的核苷酸(参见例如图1D中的示例性示意图)。在一些实施方案中,聚合酶-核苷酸缀合物包含遮蔽的核苷酸。在一些实施方案中,聚合酶-核苷酸缀合物中的聚合酶分子在空间上阻隔磷酸酶接近栓系的核苷酸的5'磷酸(例如,5'末端磷酸)。在一些实施方案中,5'磷酸(例如,5'末端磷酸)可例如α-磷酸、β-磷酸、χ-磷酸、δ-磷酸、ε-磷酸、φ-磷酸或γ-磷酸上。在一些实施方案中,

栓系的核苷酸是遮蔽的核苷酸。在一些实施方案中,聚合酶-核苷酸缀合物中的遮蔽的核苷酸通过栓系的聚合酶在空间上进行阻隔免受能够去除其5'磷酸的磷酸酶的影响。在一些实施方案中,磷酸酶不能水解聚合酶-核苷酸缀合物中的遮蔽的核苷酸的5'磷酸(例如,5'末端磷酸)。

[0071] 磷酸酶

[0072] 磷酸酶通常使用水来将磷酸单酯裂解为磷酸根离子和醇。磷酸酶催化其底物的水解。

[0073] 聚合酶-核苷酸缀合物中的核苷酸的5'磷酸是通过聚合酶将核苷酸添加至寡核苷酸所必需的。在一些实施方案中,去除聚合酶-核苷酸缀合物中的核苷酸的5'磷酸防止核苷酸在寡核苷酸合成过程中添加至核酸中。

[0074] 本文公开了包括将磷酸酶添加至缀合物试剂中以水解聚合酶-核苷酸缀合物中的核苷酸的5'磷酸基团的方法。在一些实施方案中,磷酸酶从聚合酶-核苷酸缀合物中的未遮蔽的核苷酸去除磷酸部分。在一些实施方案中,所述方法包括将能够水解未遮蔽的核苷酸的5'磷酸基团的磷酸酶添加至聚合酶-核苷酸缀合物中。

[0075] 磷酸酶的类型

[0076] 本公开考虑了用于本文所述的方法的任何合适的磷酸酶、具有磷酸酶活性的工程化酶或其功能片段。在一些实施方案中,磷酸酶是核苷酸酶。具有磷酸酶活性的酶包括在酶类别E.C 3.1.3.-.,作用于酯键的水解酶,例如磷酸单酯水解酶中。然而,具有合适的磷酸酶活性的酶(如三磷酸腺苷双磷酸酶)可在其它酶类别中找到。在一些实施方案中,磷酸酶可以任选地能够水解无机磷酸盐底物,例如焦磷酸盐。

[0077] 在一些实施方案中,磷酸酶被固定至固体载体上。在一些实施方案中,磷酸酶是融合蛋白。在一些实施方案中,磷酸酶包含可检测标记。在一些实施方案中,磷酸酶是重组多肽。在一些实施方案中,磷酸酶是野生型磷酸酶。在一些实施方案中,野生型磷酸酶是从其天然表达的生物体中分离的。

[0078] 碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase)(ALP、ALKP、ALPase、Alk Phos)或碱性磷酸酶(basic phosphatase)是质膜结合的糖蛋白,其催化磷酸单酯的水解并且在碱性pH环境下活性最佳。碱性磷酸酶是86千道尔顿的同二聚体蛋白酶。每个单体含有对其催化功能至关重要的五个半胱氨酸残基、两个锌原子和一个镁原子。

[0079] 碱性磷酸酶的非限制性实例包括:家牛(快速小牛肠碱性磷酸酶,或CIP,NEB)、北极虾(虾碱性磷酸酶,NEB)、南极细菌TAB5(南极磷酸酶,NEB)和大肠杆菌(Takara Bio)磷酸酶。碱性磷酸酶的另外非限制性实例包括:胎盘碱性磷酸酶(PLAP)和人肠碱性磷酸酶。

[0080] 非碱性磷酸酶可以是酸性磷酸酶。非碱性磷酸酶的非限制性实例是抗酒石酸酸性磷酸酶。

[0081] 表1中显示(但不限于)用于本文所述的方法中的编码磷酸酶的示例性氨基酸序列。

[0082] 表1.示例性碱性磷酸酶序列

[0083]

磷酸酶	氨基酸序列	SEQ ID NO
碱性磷酸酶(大肠杆菌)	MKQSTIALALLPLLFTPVTKARTPE MPVLENRAAQGDITAPGGARRLTG DQTAALRDSLSDKPAKNIILLIGDG MGDSEITAARNYAEGAGGFFKGID ALPLTGQYTHYALNKKTGKPDYV TDSAASATAWSTGVKTYNGALGV DIHEKDHPTILEMAKAAGLATGNV STAELQDATPAALVAHVTSRKCYG PSATSEKCPGNALEKGGKGSITEQL LNARADVTLGGGAKTFAETATAG EWQGKTLREQAQARGYQLVSDAA SLNSVTEANQQKPLLGLFADGNMP VRWLGPKATYHGNIDKPAVTCTPN PQRNDSVPTLAQMTDKAIELLSKN EKGFFLQVEGASIDKQDHAANPCG QIGETVDLDEAVQRALEFAKKEGN TLVIVTADHAHASQIVAPDTKAPG LTQALNTKDGAVMVMSYGNSEED SQEHTGSQLRIAAYGPHAANVVGL TDQTDLFYTMKAALGLK	2
碱性磷酸酶-同工酶1(大	RTPEMPVLENRAAQGDITAPGGAR RLTGDQTAALRDSLSDKPAKNIILL	3

[0084]

磷酸酶	氨基酸序列	SEQ ID NO
肠杆菌)	IGDGMGDSEITAARNYAEGAGGFF KGIDALPLTGQYTHYALNKKTGKP DYVTDSAASATAWSTGVKTYNGA LGVDIHEKDHPTILEMAKAAGLAT GNVSTAELQDATPAALVAHVTSRK CYGPSATSEKCPGNALEKGGKGSI TEQLLNARADVTLGGGAKTFAETA TAGEWQGKTLREQAQARGYQLVS DAASLNSVTEANQQKPLLGLFADG NMPVRWLGPKATYHGNIDKPAVT CTPNPQRNDSVPTLAQMTDKAIEL LSKNEKGFFLQVEGASIDKQDHAA NPCGQIGETVDLDEAVQRALEFAK KEGNTLVIVTADHAHASQIVAPDT KAPGLTQALNTKDGAVMVMSYG NSEEDSQEHTGSQLRIAAYGPHAA NVVGLTDQTDLFYTMKAALGLK	
碱性磷酸酶-同工酶 2 (*大肠杆菌*)	TPEMPVLENRAAQGDITAPGGARR LTGDQTAALRDSLSDKPAKNIILLI GDGMGDSEITAARNYAEGAGGFF KGIDALPLTGQYTHYALNKKTGKP DYVTDSAASATAWSTGVKTYNGA LGVDIHEKDHPTILEMAKAAGLAT GNVSTAELQDATPAALVAHVTSRK CYGPSATSEKCPGNALEKGGKGSI TEQLLNARADVTLGGGAKTFAETA TAGEWQGKTLREQAQARGYQLVS DAASLNSVTEANQQKPLLGLFADG NMPVRWLGPKATYHGNIDKPAVT CTPNPQRNDSVPTLAQMTDKAIEL LSKNEKGFFLQVEGASIDKQDHAA NPCGQIGETVDLDEAVQRALEFAK KEGNTLVIVTADHAHASQIVAPDT KAPGLTQALNTKDGAVMVMSYG NSEEDSQEHTGSQLRIAAYGPHAA NVVGLTDQTDLFYTMKAALGLK	4
碱性磷酸酶 (*家牛*)	MQGACVLLLLGLWLQLSLAFIPVE EEDPAFWNRQAAQALDVAKKLQP IQKAAKNVILFLGDGMGVPTVTAT RILKGQMNDKLGPETPLAMDQFPY VALSKTYNVDRQVPDSAGTATAY	5

[0085]

磷酸酶	氨基酸序列	SEQ ID NO
	LCGVKGNYRTIGVSAAARYNQCN TTRGNEVTSVMNRAKKAGKSVGV VTTTRVQHASPAGAYAHTVNRDW YSDADLPADAQTYGCQDIATQLVN NMDIDVILGGGRKYMFPEGTPDPE YPHDASVNGVRKDKRNLVQEWQ AKHQGAQYVWNRTELLQAANDSS VTHLMGLFEPADMKYNVQQDPTK DPTLEEMTEAALQVLSRNPQGFYL FVEGGRIDHGHHDSKAYMALTEA VMFDNAIAKANELTSELDTLILVTA DHSHVFSFGGYTLRGTSIFGLAPSK ASDKKSYTSILYGNGPGYVLGGGS RPDVNDSISEDPSYRQQAAVPLSSE THGGEDVAVFARGPQAHLVHGVQ EETFVAHVMAFAGCVEPYTDCNLP APSGLSDAAHLAASAPSLALLAGA MLLLLAPALY	
碱性磷酸酶(*北极虾*)	KAYWNKDAQDALDKQLGIKLREK QAKNVIFFLGDGMSLSTVTAARIY KGGLTGKFEREKISWEEFDFAALS KTYNTDKQVTDSAASATAYLTGV KTNQGVIGLDANTVRTNCSYQLDE SLFTYSIAHWFQEAGRSTGVVTSTR VTHATPAGTYAHVADRDWENDSD VVHDREDPEICDDIAEQLVFREPGK NFKVIMGGGRRGFFPEEALDIEDGI PGEREDGKHLITDWLDDKASQGAT ASYVWNRDDLLAVDIRNTDYLMG LFSYTHLDTVLTRDAEMDPTLPEM TKVAIEMLTKDENGFFLLVEGGRI DHMHHANQIRQSLAETLDMEEAV SMALSMTDPEETIILVTADHGHTLT ITGYADRNTDILDFAGISDLDDRRY TILDYGSGPGYHITEDGKRYEPTEE DLKDINFRYASAAPKHSVTHDGTD VGIWVNGPFAHLFTGVYEENYIPH ALAYAACVGTGRTFCDEK	6
肠型碱性磷酸酶	VIPAEEENPAFWNRQAAEALDAAK KLQPIQKVAKNLILFLGDGLGVPTV TATRILKGQKNGKLGPETPLAMDR	7

[0086]

磷酸酶	氨基酸序列	SEQ ID NO
(智人)	FPYLALSKTYNVDRQVPDSAATAT AYLCGVKANFQTIGLSAAARFNQC NTTRGNEVISVMNRAKQAGKSVG VVTTTRVQHASPAGTYAHTVNRN WYSDADMPASARQEGCQDIATQLI SNMDIDVILGGGRKYMFPMGTPDP EYPADASQNGIRLDGKNLVQEWL AKHQGAWYVWNRTELMQASLDQ SVTHLMGLFEPGDTKYEIHRDPTL DPSLMEMTEAALRLLSRNPRGFYL FVEGGRIDHGHHEGVAYQALTEA VMFDDAIERAGQLTSEEDTLTLVT ADHSHVFSFGGYTLRGSSIFGLAPS KAQDSKAYTSILYGNGPGYVFNSG VRPDVNESESGSPDYQQQAAVPLS SETHGGEDVAVFARGPQAHLVHG VQEQSFVAHVMAFAACLEPYTAC DLAPPACTTD	

[0087] 多核苷酸合成

[0088] 在一些实施方案中,合成多核苷酸的方法包括使聚合酶-核苷酸缀合物与核酸接触(例如,孵育),其中所述聚合酶-核苷酸缀合物的聚合酶使用其栓系的核苷酸延长核酸。

[0089] 如上所述,本文公开了核酸合成的方法,所述方法包括使包含多个聚合酶-核苷酸缀合物的缀合物试剂与磷酸酶接触(例如,孵育)的步骤。在一些实施方案中,使包含多个聚合酶-核苷酸缀合物的缀合物试剂与磷酸酶接触在循环延伸反应之前或期间发生。在一些实施方案中,核酸合成的逐步方法中磷酸酶的存在减少非终止和导致每个步骤添加多于一个核苷酸的过程。在一些实施方案中,当缀合物试剂用于核酸合成的逐步方法中时,与未处理的缀合物试剂相比,使用用磷酸酶处理(例如,与磷酸酶一起孵育)的缀合物试剂减少非终止。

[0090] 添加或去除磷酸酶的时间

[0091] 聚合酶-核苷酸缀合物可与磷酸酶一起储存并保留在系统中(也在DNA延伸反应期间),或者可在缀合物添加至DNA之前和DNA添加反应开始后的一定孵育期内去除磷酸酶。

[0092] 在一些实施方案中,将磷酸酶与包含多个聚合酶-核苷酸缀合物的缀合物试剂一起孵育。在一些实施方案中,在使样品与缀合物试剂接触之前进行缀合物试剂与磷酸酶的孵育。在一些实施方案中,在使样品与缀合物试剂接触之前从所述缀合物试剂中去除磷酸酶。在一些实施方案中,在使样品与缀合物试剂接触之后进行缀合物试剂与磷酸酶的孵育。

[0093] 磷酸酶浓度

[0094] 与聚合酶-核苷酸缀合物(例如,缀合物试剂)接触或孵育的磷酸酶的浓度可以例如磷酸酶与缀合物的化学计量比、相对于缀合物浓度的倍数增加、磷酸酶的活性单位、摩尔

浓度或mg/mL表示。

[0095] 任何合适的缀合物与磷酸酶的化学计量比可用于本文所述的方法中。在一些实施方案中,缀合物与磷酸酶的化学计量比是约1:1至约1:500。在一些实施方案中,缀合物与磷酸酶的化学计量比是约1:1、约1:2、约1:3、约1:4、约1:5、约1:10、约1:15、约1:20、约1:25、约1:30、约1:35、约1:40、约1:45、约1:50、约1:55、约1:60、约1:65、约1:70、约1:75、约1:80、约1:85、约1:90、约1:95、约1:100、约1:105、约1:110、约1:115、约1:120、约1:125、约1:130、约1:135、约1:140、约1:145、约1:150、约1:155、约1:160、约1:165、约1:170、约1:175、约1:180、约1:185、约1:190、约1:195、约1:200、约1:225、约1:250、约1:275、约1:300、约1:325、约1:350、约1:375、约1:400、约1:425、约1:450、约1:475或约1:500。

[0096] 任何合适的磷酸酶与缀合物的化学计量比可用于本文所述的方法中。在一些实施方案中,磷酸酶与缀合物的化学计量比是约1:1至约1:500。在一些实施方案中,缀合物与磷酸酶的化学计量比是约1:1、约1:2、约1:3、约1:4、约1:5、约1:10、约1:15、约1:20、约1:25、约1:30、约1:35、约1:40、约1:45、约1:50、约1:55、约1:60、约1:65、约1:70、约1:75、约1:80、约1:85、约1:90、约1:95、约1:100、约1:105、约1:110、约1:115、约1:120、约1:125、约1:130、约1:135、约1:140、约1:145、约1:150、约1:155、约1:160、约1:165、约1:170、约1:175、约1:180、约1:185、约1:190、约1:195、约1:200、约1:225、约1:250、约1:275、约1:300、约1:325、约1:350、约1:375、约1:400、约1:425、约1:450、约1:475或约1:500。

[0097] 任何合适的磷酸酶浓度可用于本文所述的方法中。在一些实施方案中,磷酸酶浓度是约0.01mg/mL至约10.5mg/mL。在一些实施方案中,磷酸酶浓度是约0.1mg/mL、约0.15mg/mL、约0.25mg/mL、约0.5mg/mL、约0.75mg/mL、约1mg/mL、约1.25mg/mL、约1.5mg/mL、约1.75mg/mL、约2mg/mL、约2.25mg/mL、约2.5mg/mL、约2.75mg/mL、约3、约3.25mg/mL、约3.5mg/mL、约3.75mg/mL、约4mg/mL、约4.25mg/mL、约4.5mg/mL、约4.75mg/mL、约5、约5.25mg/mL、约5.5mg/mL、约5.75mg/mL、约6mg/mL、约6.25mg/mL、约6.5mg/mL、约6.75mg/mL、约7、约7.25mg/mL、约7.5mg/mL、约7.75mg/mL、约8mg/mL、约8.25mg/mL、约8.5mg/mL、约8.75mg/mL、约9、约9.25mg/mL或约9.5mg/mL、约9.75mg/mL、约10mg/mL、约10.25mg/mL或约10.5mg/mL。

[0098] 任何合适的磷酸酶相对于缀合物的倍数增加可用于本文所述的方法中。在一些实施方案中,磷酸酶相对于缀合物的倍数增加是约2倍至约500倍。在一些实施方案中,磷酸酶相对于缀合物的倍数增加是约2倍、约3倍、约4倍、约5倍、约10倍、约15倍、约20倍、约25倍、约30倍、约35倍、约40倍、约45倍、或约50倍、约55倍、约60倍、约65倍、约70倍、约75倍、约80倍、约85倍、约90倍、约95倍、约100倍、约105倍、约110倍、约115倍、约120倍、约125倍、约130倍、约135倍、约140倍、约145倍、或约150倍、约155倍、约160倍、约165倍、约170倍、约175倍、约180倍、约185倍、约190倍、约195倍、约200倍、约225倍、约250倍、约275倍、约300倍、约325倍、或约350倍、约375倍、约400倍、约425倍、约450倍、约475倍或约500倍。

[0099] 任何合适的缀合物相对于磷酸酶的倍数增加可用于本文所述的方法中。在一些实施方案中,缀合物相对于磷酸酶的倍数增加是约2倍至约500倍。在一些实施方案中,缀合物相对于磷酸酶的倍数增加是约2倍、约3倍、约4倍、约5倍、约10倍、约15倍、约20倍、约25倍、约30倍、约35倍、约40倍、约45倍、或约50倍、约55倍、约60倍、约65倍、约70倍、约75倍、约80倍、约85倍、约90倍、约95倍、约100倍、约105倍、约110倍、约115倍、约120倍、约125倍、约130

倍、约135倍、约140倍、约145倍、或约150倍、约155倍、约160倍、约165倍、约170倍、约175倍、约180倍、约185倍、约190倍、约195倍、约200倍、约225倍、约250倍、约275倍、约300倍、约325倍、或约350倍、约375倍、约400倍、约425倍、约450倍、约475倍或约500倍。

[0100] 任何合适的磷酸酶的浓度可用于本文所述的方法中。在一些实施方案中,磷酸酶的浓度是约0.5μM至约500μM。在一些实施方案中,磷酸酶的浓度是约0.5μM、约1μM、约2μM、约5μM、约10μM、约15μM、约20μM、约25μM、约30μM、约35μM、约40μM、约45μM、约50μM、约55μM、约60μM、约65μM、约70μM、约80μM、约85μM、约90μM、约95μM、约100μM、约105μM、约110μM、约115μM、约120μM、约125μM、约130μM、约135μM、约140μM、约145μM、约150μM、约155μM、约160μM、约165μM、约170μM、约180μM、约185μM、约190μM、约195μM、约200μM、约225μM、约250μM、约275μM、约300μM、约325μM、约350μM、约375μM、约400μM、约425μM、约450μM、约475μM或约500μM。

[0101] 非终止率

[0102] 在一些实施方案中,核酸合成的逐步方法中磷酸酶的存在减少非终止和导致每个步骤添加多于一个核苷酸的过程。如果发生了非终止事件,则认为在本文所述的方法中产生的多核苷酸或核酸含有插入。在一些实施方案中,与磷酸酶不存在下的核酸合成相比,在磷酸酶存在下的核酸合成使非终止率降低约50%至约100%。在一些实施方案中,与磷酸酶不存在下的核酸合成相比,非终止率降低约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%。在一些实施方案中,在磷酸酶存在下产生的具有插入的核酸合成产物的总量小于约5%、小于约4%、小于约3%、小于约2%、小于约1%、小于约0.5%、小于约0.1%、小于约0.05%或小于约0.01%。在一些实施方案中,在磷酸酶存在下产生的核酸合成产物不存在具有插入的核酸合成产物。

[0103] 最终产物

[0104] 在一些实施方案中,本文公开了合成包含预定序列的多核苷酸的方法,所述方法包括使包含多个聚合酶-核苷酸缀合物的缀合物试剂与磷酸酶接触。在一些实施方案中,接触包括将缀合物试剂与磷酸酶一起孵育。在一些实施方案中,所述方法产生包含预定序列的多核苷酸产物的异质群体。包含预定序列的多核苷酸产物的异质群体可被称为“最终产物”。

[0105] 在一些实施方案中,使包含多个聚合酶-核苷酸缀合物的缀合物试剂与磷酸酶接触防止核苷酸的插入(即非终止),使得这些插入不存在于预定序列中。在一些实施方案中,最终产物包含核酸,所述核酸中一定百分比的核酸包含靶序列,并且所述核酸中一定百分比的核酸不包含靶序列。在一些实施方案中,与包含为预定(靶)序列的序列的多核苷酸相比,最终产物包含小于约99%、小于约95%、小于约90%、小于约85%、小于约80%、小于约75%、小于约70%、小于约65%、小于约60%、小于约55%、小于约50%、小于约45%、小于约40%、小于约35%、小于约30%、小于约25%、小于约20%、小于约15%、小于约10%、小于约5%、小于约4%、小于约3%、小于约2%、小于约1%、小于约0.5%、小于约0.1%、小于约0.05%或小于约0.01%的包含不为预定序列(即,不为“靶”序列)的序列的多核苷酸。在一些实施方案中,最终产物基本上不存在包含不为预定(“靶”)序列的序列的多核苷酸。

[0106] 最终产物的分析

[0107] 本领域已知的任何合适的方法可用于分析最终产物。可通过在延伸反应开始后的任何时间(例如反应时间过程)分析核酸合成产物来评估最终产物。分析可通过例如如先前所展示的毛细管电泳(CE)进行(Smith和Nelson.Curr Protoc Nucleic Acid Chem.第10章:第10.9.单元2003;Durney等人Anal Bioanal Chem.407:6923-6938.2015)。CE可以单核苷酸分辨率分离并报告多核苷酸产物的丰度。可通过CE分析通过本文提供的核酸合成的方法产生的每种核酸产物的相对丰度。通过比较起始材料(即核苷酸被掺入的初始多核苷酸或寡核苷酸)和延伸产物的丰度,有可能确定延伸反应完成的程度。如本文所述,起始材料和延伸的物质随时间推移的变化指示周转率。这种确定周转率的方法先前已经得到证明(Palluk等人Nat Biotech.36(7):645-650.2018)。或者,可使用如先前所描述的反相高效液相色谱法(RP-HPLC)来进行核酸合成产物的分析(Jensen和Davis.Biochemistry.57(12):1821-1832.2018)。

[0108] CE和RP-HPLC也可用于通过分别测定CE和RP-HPLC的电泳图和色谱图中峰的曲线下面积来测定核酸合成产物中每种物质的纯度。任何适合于将曲线拟合至电泳图和色谱图并计算曲线下面积(AUC)的合适软件包均可用于确定多种核苷酸产物中的每种多核苷酸产物的丰度。

[0109] 任何合适的多核苷酸测序方法均可用于分析(例如,多核苷酸产物,例如中间体产物,例如最终产物等的序列的分析)。例如,测序方法可以是长读长测序(long-read sequencing)、下一代测序、短读长测序(short-read sequencing)、鸟枪法测序、桑格测序、高通量测序、合成法测序、连接法测序、杂交测序和/或质谱法测序。测序可适合于鉴定最终产物中的预定义序列。测序可适合于确定最终产物中不为预定义序列的序列的百分比。

[0110] 本领域已知的用于分析最终产物的大小的任何方法均可用于确定最终产物的纯度。例如,可使用凝胶电泳和/或质谱法来确定最终产物的纯度。

[0111] 缀合物

[0112] 本文公开了包含缀合物的组合物,所述缀合物包含连接至聚合酶的核苷酸,其中与所述组合物中的总核苷酸相比,由所述组合物的连接的聚合酶遮蔽的核苷酸的纯度是大于约80%、约85%、约90%、约95%、约97%、约98%、约99%、约99.5%或约99.9%的遮蔽的核苷酸。在一些实施方案中,由连接的聚合酶遮蔽的核苷酸的纯度基本上不含杂质。

[0113] 本文提供了使用缀合物的核酸合成的方法,其中所述缀合物包含聚合酶和核苷酸,并且其中所述聚合酶和所述核苷酸通过接头连接。在一些实施方案中,接头包含可选择性裂解的键联。在一些实施方案中,核苷酸是经修饰的核苷酸。接头可连接至核苷酸(例如,野生型核苷酸、经修饰的核苷酸,例如,相对于野生型核苷酸包含一个或多个修饰等)的碱基、糖或磷酸。在一些实施方案中,核苷酸是核苷酸类似物。缀合物的聚合酶部分可通过添加其连接的核苷酸来延长核酸(即,聚合酶可催化其所连接的核苷酸连接到核酸的3'端上),并且通过接头保持与延长的核酸连接,直到接头被裂解。

[0114] 在一些实施方案中,聚合酶和核苷酸共价连接,并且核苷酸的连接的原子与其所连接的聚合酶之间的距离可例如在约4-100 Å、约15-40 Å或约20-30 Å的范围内,或对于核苷酸或核苷酸类似物所栓系的TdT变体上的位置而言适当的距离。

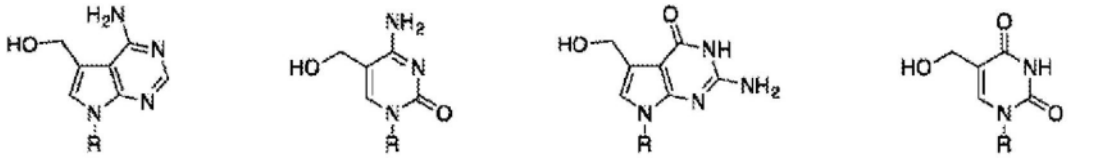
[0115] 当将包含聚合酶和核苷酸的缀合物与核酸一起孵育时,它优先使用其栓系的核苷酸(而不是使用另一个缀合物分子的核苷酸)来延长核酸。

[0116] 接头-核苷酸连接

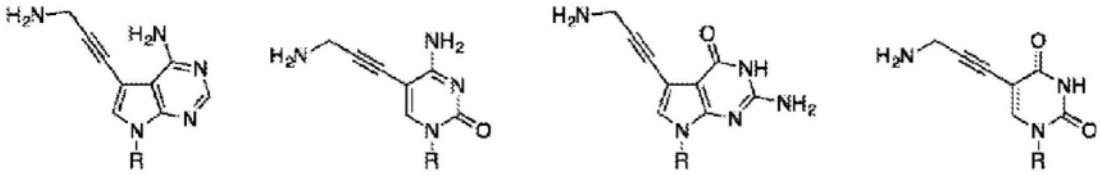
[0117] 在一些实施方案中,本公开的接头连接至嘧啶的“5”位置或7-脱氮嘌呤的“7”位置。在其它实施方案中,接头可连接至核碱基的环外胺,例如如下文所论述通过用硝基苄基部分将胞嘧啶的环外胺N-烷基化。如对于本领域技术人员来说将是显而易见的,接头可连接至核苷酸的任何合适的原子以形成缀合物,如核苷酸的磷酸、糖或碱基。在一些实施方案中,接头连接至核苷酸的α-磷酸、糖或碱基,使得聚合酶在添加至寡核苷酸的3’端后保持连接至核苷酸。在一些实施方案中,接头连接至核苷酸的α-磷酸、β-磷酸、χ-磷酸、δ-磷酸、ε-磷酸、φ-磷酸或γ-磷酸。在一些实施方案中,接头连接至核苷酸的末端磷酸。

[0118] 某些聚合酶对核苷酸的某些部分的修饰具有高耐受性,例如,一些聚合酶良好地耐受嘧啶的5位和嘌呤的7位的修饰(He和Seela,Nucleic Acids Research 30.24(2002):5485-5496.;或Hottin等人,Chemistry.2017Feb 10;23(9):2109-2118)。在一些实施方案中,接头连接至这些位置。

[0119] 在一些实施方案中,通过首先合成包含接头和核苷酸的中间体化合物(本文中称为“接头-核苷酸”),然后将中间体化合物连接至聚合酶来制备聚合酶-核苷酸缀合物。作为非限制性实例,在一些实施方案中,与天然核苷相比具有取代的核苷,例如具有5-羟甲基或5-炔丙基氨基取代基的嘧啶、或具有7-羟甲基或7-炔丙基氨基取代基的7-脱氮嘌呤可以是用于制备接头-核苷酸的有用起始材料。可用于制备接头-核苷酸的具有5-和7-羟甲基取代基的核苷的示例性集合如下所示:

[0120] 

[0121] 可用于制备接头-核苷酸的具有5-和7-脱氮-7-炔丙基氨基取代基的核苷的示例性集合如下所示:

[0122] 

[0123] 这些核苷也可作为脱氧核糖核苷三磷酸商购获得。

[0124] 在一些实施方案中,制备方法(例如,包含中间体化合物),缀合物包含接头-核苷酸。可使用任何合适的核苷酸。在一些实施方案中,接头-核苷酸包含多磷酸核苷酸或经修饰的多磷酸核苷酸。在一些实施方案中,接头-核苷酸包含三磷酸核苷酸或经修饰的三磷酸核苷酸。在一些实施方案中,接头-核苷酸包含四磷酸核苷酸或经修饰的四磷酸核苷酸。在一些实施方案中,接头-核苷酸包含五磷酸核苷酸或经修饰的五磷酸核苷酸。在一些实施方案中,接头-核苷酸包含六磷酸核苷酸或经修饰的六磷酸核苷酸。在一些实施方案中,接头-核苷酸包含经修饰的核碱基。在一些实施方案中,接头-核苷酸包含经修饰的核碱基。在一些实施方案中,经修饰的核碱基包含O-或N-连接的修饰。在一些实施方案中,O-或N-连接的修饰可在将接头-核苷酸的核苷酸部分掺入多核苷酸中后去除。在一些实施方案中,O-或N-连接的修饰可通过光解过程去除。在一些实施方案中,光解过程包括暴露于UV光,其中UV光

包括365nm和/或405nm下的波长。在一些实施方案中,O-或N-连接的修饰可通过化学过程去除。在一些实施方案中,化学过程选自β消除反应、Pd催化的脱烯丙基化和还原反应。在一些实施方案中,O-或N-连接的修饰可通过酶促过程去除。在一些实施方案中,酶促过程包括通过烷基转移酶或甲基转移酶去除。

[0125] 在一些实施方案中,O-或N-连接的修饰减少或消除包含经修饰的核碱基的多核苷酸中的沃森-克里克碱基配对。在一些实施方案中,O-或N-连接的修饰减少或消除包含经修饰的核碱基的多核苷酸中的二级结构。在所述方法的一些实施方案中,在去除O-或N-连接的修饰之后,经修饰的核碱基包含天然核碱基。在一些实施方案中,天然核碱基是鸟嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤、胸腺嘧啶或尿嘧啶。

[0126] 接头-聚合酶连接

[0127] 本文提供的缀合物包含通过接头栓系至核苷酸的聚合酶。

[0128] 用于将核苷酸栓系至聚合酶的任何合适的接头均被考虑用于本文所述的方法中。在一些实施方案中,使用巯基特异性连接化学将接头特异性地连接至聚合酶的半胱氨酸残基。说明性的巯基特异性连接化学包括但不限于邻-吡啶基二硫化物(OPSS)、马来酰亚胺官能团、3-芳基丙炔腈官能团、丙二烯酰胺官能团、卤代乙酰基官能团(如碘乙酰基或溴乙酰基)、烷基卤化物或全氟芳基,它们可有利地与被特定氨基酸序列包围的巯基反应(Zhang,Chi,等人Nature chemistry 8,(2015)120-128.)。用于特异性标记半胱氨酸残基的其它连接化学对于本领域技术人员来说将是显而易见的,或者在相关文献和教科书中有所描述(例如,Kim,Younggyu,等人,Bioconjugate chemistry 19.3(2008):786-791.)。

[0129] 在一些实施方案中,接头通过胺反应性官能团(例如NHS酯、磺基-NHS酯、四氟苯基酯或五氟苯基酯、异硫氰酸酯、磺酰氯等)连接至赖氨酸残基。在一些实施方案中,接头通过连接至遗传插入的非天然氨基酸(例如,可进行叠氮化物-炔烃胡伊斯根(Huisgen)环加成反应的对炔丙基氧基苯丙氨酸或对叠氮基苯丙氨酸)而连接至聚合酶,尽管存在许多适合于位点特异性标记的合适的非天然氨基酸并且可在文献中找到(例如,如Lang和Chin.,Chemical reviews 114.9(2014):4764-4806.中所述)。

[0130] 在一些实施方案中,接头可以特异性地连接至聚合酶N末端。在一些实施方案中,聚合酶被突变为具有N末端丝氨酸或苏氨酸残基,所述残基可被特异性氧化以产生N末端醛,用于随后与例如酰肼偶联。在一些实施方案中,聚合酶被突变为具有可用醛特异性标记以形成噻唑烷的N末端半胱氨酸残基。在一些实施方案中,N末端半胱氨酸残基可通过天然化学连接用肽接头进行标记。

[0131] 在一些实施方案中,可将肽标签序列插入聚合酶中,所述聚合酶可通过酶用合成基团特异性标记,例如,如文献中使用生物素连接酶、转谷氨酰胺酶、硫辛酸连接酶、细菌分选酶和磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶所证明的(例如如Stephanopoulos和Francis Nat.Chem.Biol.7,(2011)876-884的参考文献74-78中所述)。

[0132] 在一些实施方案中,接头连接至与聚合酶融合的标记结构域。例如,具有相应反应性部分的接头可用于共价标记SNAP标签、CLIP标签、HaloTag和酰基载体蛋白结构域(例如如Stephanopoulos和Francis Nat.Chem.Biol.7,(2011)876-884的参考文献79-82中所述)。

[0133] 在一些实施方案中,接头连接至聚合酶内特异性产生的醛,如Carrico等人

(Nat.Chem.Biol.3,(2007)321-322)中所述。例如,将被酶甲酰基甘氨酸生成酶(FGE)识别的氨基酸序列插入至聚合酶中后,它可能暴露于FGE,所述FGE会将识别序列中的半胱氨酸残基特异性地转化为甲酰基甘氨酸(即,产生醛)。然后可用例如接头的酰肼或氨氧基部分特异性地标记该醛。

[0134] 在一些实施方案中,接头可通过接头的部分与融合至聚合酶的部分的非共价结合而连接至聚合酶。此类连接策略的实例包括将聚合酶与可结合接头的生物素部分的链霉亲和素融合,或者将聚合酶与可结合接头的地高辛部分的抗地高辛融合。在一些实施方案中,位点特异性标记可导致可容易地逆转的接头与聚合酶的连接(例如,与半胱氨酸形成二硫键的邻吡啶基二硫化物(OPSS)基团,其可使用还原剂,例如使用TCEP裂解),其它连接化学将产生永久性连接。

[0135] 在一些实施方案中,如对于本领域技术人员来说将是显而易见的,聚合酶被突变以确保栓系的核苷酸与聚合酶的特定位置的特异性连接。例如,使用巯基特异性连接化学如马来酰亚胺或邻吡啶基二硫化物,野生型聚合酶中的可接近半胱氨酸残基可被突变为非半胱氨酸残基,以防止那些位置处的标记。在这种"无反应性半胱氨酸"背景下,可通过突变在所需的连接位置引入半胱氨酸残基。这些突变优先不干扰聚合酶的活性。

[0136] 对于本领域技术人员来说,将合成基团位点特异性连接至蛋白质的其它策略将是显而易见的,并且在文献中进行了综述(例如Stephanopoulos和Francis Nat.Chem.Biol.7,(2011)876-884)。

[0137] 遮蔽

[0138] 如本文所述,在一些实施方案中,聚合酶(例如,模板非依赖性聚合酶)通过与添加的核苷酸的系链保持与核酸连接,直到暴露于引起与添加的核苷酸的键联的裂解的一些刺激物。在这种情况下,当:1)连接的聚合酶分子阻碍其它缀合物接近延伸的DNA分子的3'OH,和2)系统中的其它核苷酸被阻碍接近聚合酶的催化位点,所述聚合酶保持连接至延伸的核酸的3'端时,聚合酶-核苷酸缀合物的进一步延伸受到阻碍(即,核苷酸被"遮蔽")。(遮蔽的程度可被描述为这两种相互作用受到阻碍的程度。)为了实现后续延伸,可裂解将掺入的核苷酸栓系至聚合酶的接头,从而从核酸释放聚合酶,并且因此重新暴露其3'OH基团用于后续延长。

[0139] 在采用遮蔽的一些实施方案中,如对于本领域技术人员来说将是显而易见的,接头可连接至核碱基、糖或α-磷酸中的任何原子。

[0140] 本文提供的采用遮蔽效应来实现终止的核酸合成的方法包括延伸步骤,其中核酸优先在不存在游离(即,未栓系的)三磷酸核苷的情况下暴露于缀合物,因为遮蔽的终止机制可能不会阻止它们掺入核酸中。

[0141] 在一些实施方案中,进一步延长的终止可以是"完全的",这意味着在核酸分子已通过缀合物延长之后,在反应过程中不能发生进一步延长。在其它实施方案中,进一步延长的终止可以是"不完全的",这意味着在反应期间可发生进一步延长,但与初始延长相比,以显著降低的速率发生,例如,慢100倍、或慢1000倍、或慢10,000倍或更多。当反应在适当量的时间后停止时,实现不完全终止的缀合物仍然可以用于主要通过单个核苷酸来延伸核酸(例如,在核酸合成和测序的方法中)。在一些实施方案中,含有缀合物的试剂可能还含有不含栓系的核苷酸的聚合酶,但那些聚合酶不应显著影响反应,因为混合物中没有游离dNTP。

[0142] 基于采用遮蔽效应来实现终止的缀合物的试剂优先仅含有其中所有聚合酶保持以活性构象折叠的聚合酶-核苷酸缀合物。在一些情况下,如果缀合物的聚合酶部分是未折叠的,则其栓系的核苷酸可能变得更容易接近其它缀合物分子的聚合酶部分。在这些情况下,未遮蔽的核苷酸可能更容易被其它缀合物分子掺入,从而绕过终止机制。

[0143] 采用遮蔽效应来实现终止的聚合酶-核苷酸缀合物优先仅用单个核苷酸部分标记。用多个可接近催化位点的核苷酸标记的聚合酶-核苷酸缀合物在一些情况下可将多个核苷酸掺入同一核酸中。因此,额外的栓系的核苷酸可导致反应过程中额外的、不期望的核苷酸掺入核酸中。此外,一次仅一个栓系的核苷酸可占据其聚合酶的(包埋的)催化位点,因此一个或多个其它栓系的核苷酸可具有对其它缀合物分子的聚合酶部分的增加的可及性,如下文所讨论的。

[0144] 采用遮蔽效应来实现终止的聚合酶-核苷酸缀合物优先包含尽可能短的接头,所述接头仍然能够使核苷酸以生产性构象频繁地接近其栓系的聚合酶分子的催化位点,以便能够将核苷酸快速掺入核酸中。此类缀合物还可优先采用接头与聚合酶的连接位置尽可能靠近催化位点,从而能够使用较短的接头。接头的长度将决定栓系的核苷酸或栓系的核酸能够达到的距连接点的最大距离。较小的距离可导致栓系的部分对其它聚合酶-核苷酸分子的可及性降低,如下文所论述。在一些实施方案中,接头是大约24 Å和28 Å长。较短的接头(例如长度为8-15 Å的接头)可增加遮蔽;而较长的接头(例如长于50 Å、70 Å或100 Å的接头)可减少遮蔽。遮蔽效应可受多种因素的组合影响,所述因素包括但不限于聚合酶的结构、接头的长度、接头的结构、接头与聚合酶的连接位置、核苷酸与聚合酶的催化位点的结合亲和力、核酸与聚合酶的结合亲和力、聚合酶的优选构象以及接头的优选构象。

[0145] 对遮蔽的一个贡献可以是空间效应,所述空间效应阻止已通过缀合物延长的核酸的3'OH到达另一缀合物的聚合酶部分的催化位点。空间效应也可能阻碍栓系的核苷酸到达另一聚合酶-核苷酸缀合物分子的催化位点,这是由于在此类方法过程中将发生的缀合物之间的冲突所致。如果这些空间效应完全阻断了一个缀合物分子的栓系的核苷酸(或延长的核酸)与另一缀合物分子之间的有效相互作用,则所述空间效应可能导致完全终止,或者如果这些空间效应仅阻碍此类分子间相互作用,则所述空间效应可能导致不完全终止。

[0146] 对遮蔽的另一贡献来自于栓系的核苷酸与聚合酶的催化位点的结合亲和力。缀合物的栓系的核苷酸将相对于其栓系的聚合酶的催化位点具有高有效浓度,因此它可能在大部分时间内保持与所述位点结合。当核苷酸与其栓系的聚合酶分子的催化位点结合时,它不能被其它聚合酶分子掺入。因此,栓系降低可用于分子间掺入(即由核苷酸未栓系的聚合酶分子催化的掺入)的核苷酸的有效浓度。这种遮蔽效应可通过降低使用一个缀合物分子的核苷酸部分通过另一缀合物分子的聚合酶部分延长核酸的速率来增强终止。

[0147] 对遮蔽的另一贡献来自于核酸分子的3'区域与聚合酶分子的催化位点的结合亲和力。在通过缀合物延长后,核酸通过其3'末端核苷酸栓系至缀合物,并且将相对于其栓系的聚合酶的催化位点具有高有效浓度,因此它可能在大部分时间内保持与所述位点结合。当核酸与其栓系的聚合酶分子的催化位点结合时,它不能通过其它缀合物分子延长。这种效应可通过降低已被第一缀合物延长的核酸被其它缀合物分子进一步延长的速率来增强终止。

[0148] 在一些实施方案中,聚合酶-核苷酸缀合物包含在空间上阻碍栓系的核苷酸(或延

长后的栓系的核酸)接近另一缀合物分子的催化位点的额外部分。此类部分包括可插入聚合酶的环中的多肽或蛋白质结构域,以及可位点特异性连接至例如插入的非天然氨基酸或特定多肽标签的那些和其它大分子如聚合物。

[0149] 聚合酶

[0150] 如上所述,当将包含聚合酶(例如,模板非依赖性聚合酶)和核苷酸的缀合物与核酸或多核苷酸一起孵育时,它优先通过将栓系的核苷酸或经修饰的核苷酸(而不是使用另一个缀合物分子的核苷酸或经修饰的核苷酸)掺入核酸或多核苷酸中来延长(即延伸)核酸或多核苷酸。在一些实施方案中,聚合酶-核苷酸缀合物中的聚合酶以活性构象折叠。在其它实施方案中,聚合酶-核苷酸缀合物中的聚合酶是未折叠的。

[0151] 设想能够延伸多核苷酸、将核苷酸掺入多核苷酸中、或将核苷酸类似物掺入多核苷酸中的任何聚合酶用于本文所述的方法中。在一些实施方案中,多核苷酸是单链的。在一些实施方案中,多核苷酸是双链的。在一些实施方案中,多核苷酸被固定在固体载体上。

[0152] 对于DNA合成应用,可使用特别是模板非依赖性聚合酶,例如末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)或DNA核苷酸外切转移酶,所述术语可互换使用来指具有如针对E.C.类别2.7.7.31所描述的活性的酶。

[0153] 在一些实施方案中,本公开的方法使用包含模板非依赖性聚合酶的缀合物。在一些实施方案中,缀合物包含Pol-X家族聚合酶。在一些实施方案中,缀合物包含聚合酶末端脱氧核苷酸转移酶(TdT),或其变体(例如,非野生型TdT,例如经修饰的TdT)。在一些实施方案中,模板非依赖性聚合酶是TdT或其变体(即,经修饰的TdT)。在一些实施方案中,TdT或其变体包含与SEQ ID NO:1共有至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的序列。在所述方法的一些实施方案中,TdT包含与SEQ ID NO:1或其一部分相同的序列。例如,在一些实施方案中,TdT包含与特定TdT(例如,SEQ ID NO:1的TdT,例如,SEQ ID NO:1的TdT等)的一部分相同的序列。例如,在一些实施方案中,给定TdT可相对于特定TdT(如SEQ ID NO:1中所示的TdT)的长度被截短。在一些实施方案中,TdT可以是SEQ ID NO:1的环状变换。在一些实施方案中,TdT变体相对于参考TdT(例如,野生型TdT、经修饰的TdT等)包含一个或多个氨基酸取代、插入、缺失,和/或是其环状排列变换体。

[0154] 在所述方法的一些实施方案中,聚合酶是融合蛋白。在所述方法的一些实施方案中,融合蛋白包含麦芽糖结合蛋白(MBP)。

[0155] 在所述方法的一些实施方案中,TdT或其变体可以可操作地连接至接头部分,包括共价或非共价键;氨基酸标签(例如,聚氨基酸标签、聚His标签、6His标签(SEQ ID NO:8));化学化合物(例如,聚乙二醇);蛋白质-蛋白质结合对(例如,生物素-抗生物素蛋白);亲和偶联;捕获探针;或这些的任何组合。接头部分可与TdT变体分离,或者可以是TdT变体的一部分。

[0156] >末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)

[0157] MGGRDIVDGSEFSPSPVPGSQNVPAPAVKKISQYACQRRTTLNNYNQLFTDALDILAENDELRENEGSALAFMRASSVLKSLPFPITS MKDTEGIPSLGDKVKSIIEGIIEDGESSEAKAVLNDERYKSFKLFTSVFGVGLKTAEKWFRMGFRTLSKIQSDKSLRFTQMQKAGFLYYEDLVSCVNRPEAEAVSMLVKEAVVTFLPDALVTMTGGFRRGKMTGHDVDFLITSPEATEDEEQQLLHKVTDFWKQQGLLLYADILESTFEKFKQPSRKVDALDHFQKCFLILKLDHGR

VHSEKSGQQEGKGWKAIRVDLVMSPYDRRAFALLGWTGSRQFERDLRRYATHERKMMLDNHALYDRTKRVFLEAES EEEIFAHLGLDYIEPWERNA(SEQ ID NO:1)

[0158] 具有延伸单链核酸的能力的聚合酶的说明性实例包括但不限于聚合酶θ(Kent等人,eLife 5(2016):e13740.)、聚合酶μ(Juarez等人,Nucleic acids research 34.16(2006):4572-4582.;或McElhinny等人,Molecular cell 19.3(2005):357-366.)或诱导模板非依赖性活性的聚合酶,例如通过插入模板非依赖性聚合酶的元素(Juarez等人,Nucleic acids research 34.16(2006):4572-4582)。在其它DNA合成应用中,聚合酶可以是模板非依赖性聚合酶,即DNA指导的DNA聚合酶(所述术语可互换使用来指使用IUBMB命名法具有活性2.7.7.7的酶)。

[0159] 在一些实施方案中,如RNA合成应用,可使用栓系的核糖核苷酸。在一些此类实施方案中,可采用RNA特异性核苷酸转移酶,如大肠杆菌Poly(A)聚合酶(IUBMB EC 2.7.7.19)或Poly(U)聚合酶等。RNA核苷酸转移酶可含有修饰(例如单点突变),所述修饰影响针对特定rNTP的底物特异性(Lunde等人,Nucleic acids research 40.19(2012):9815-9824.)。在一些实施方案中,RNA核苷酸转移酶与核糖核苷酸之间的非常短的系链可用于诱导核苷酸的高有效浓度,从而迫使可能不是核苷酸转移酶的天然底物的rNTP的掺入。

[0160] 接头

[0161] 在一些实施方案中,在包含接头的本公开的缀合物中,接头包含将核苷酸连接至聚合酶的原子。接头可连接至聚合酶的核苷酸或经修饰的核苷酸的碱基、糖或α-磷酸。在一些实施方案中,聚合酶和核苷酸共价连接,并且核苷酸的连接的原子与其所连接的聚合酶之间的距离可例如在约4-100 Å、约15-40 Å或约20-30 Å的范围内,或对于核苷酸所栓系的聚合酶上的位置而言适当的距离。本文所述的方法中考虑了用于将核苷酸或经修饰的核苷酸栓系至聚合酶的任何合适的接头。在一些实施方案中,接头包含聚醚或聚乙二醇(PEG)。在一些实施方案中,接头包含一个或多个肽键。在一些实施方案中,接头包含一个或多个肌氨酸。在一些实施方案中,接头包含一个或多个甘氨酸。在一些实施方案中,接头包含一个或多个脯氨酸。在一些实施方案中,接头包含氨基甲酸酯。在一些实施方案中,接头在核碱基的不参与碱基配对的原子处连接至核苷酸。在此类实施方案中,接头被认为至少是将聚合酶连接至单环或多环环系统中与糖(例如嘧啶或嘌呤或7-脱氮嘌呤或8-氮杂-7-脱氮嘌呤)的Γ位置键合的任何原子的原子。在一些实施方案中,接头在核碱基的参与碱基配对的原子处连接至核苷酸。在一些实施方案中,接头连接至核苷酸的糖或α-磷酸。在一些实施方案中,接头足够长以允许核苷酸接近其所栓系的聚合酶的活性位点。如本文更详细地描述的,缀合物的聚合酶能够催化将其所连接的核苷酸添加到核酸的3'端上。

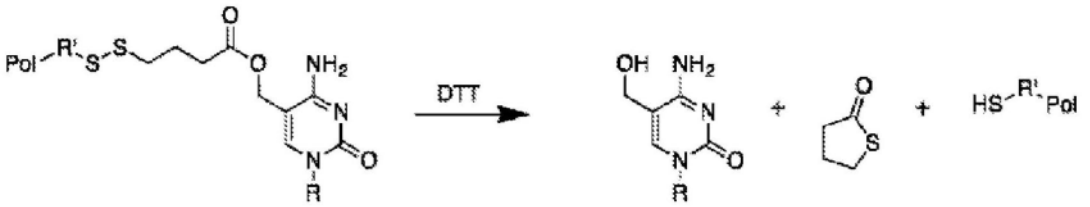
[0162] 接头的裂解

[0163] 如本文所述,接头可连接至核苷酸(例如,本公开的缀合物的核苷酸)上的各个位置,并且可使用多种裂解策略。应当理解,裂解策略将由连接核苷酸或经修饰的核苷酸和聚合酶的接头的类型决定。本文描述的方法中考虑了用于裂解接头的任何合适的方法。

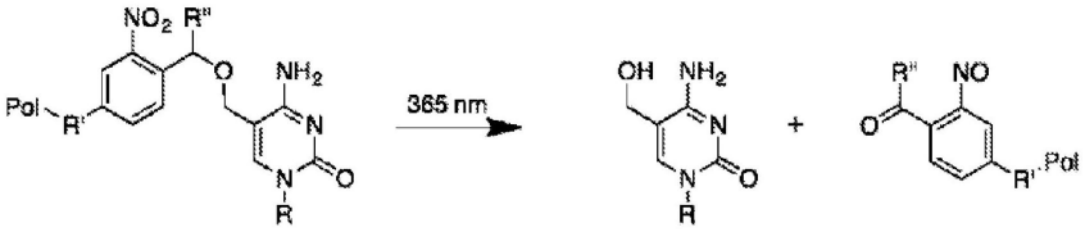
[0164] 在一些实施方案中,接头被裂解,其中在接头裂解之后,形成包含来自接头的保留部分的化学基团(即瘢痕)的核苷酸。接头裂解后的说明性非限制性化学基团(即瘢痕)如下所示。在一些实施方案中,通过化学、光解或酶促过程去除化学基团。

[0165] 在一些实施方案中,可通过暴露于任何合适的还原剂如二硫苏糖醇(DTT)、β-巯基

乙醇或三(2-羧乙基)膦(TCEP)来裂解接头。例如,连接至嘧啶的5位或7-脱氮嘌呤的7位的包含4-(二硫烷基)丁酰氧基-甲基的接头可通过还原剂(例如DTT)裂解以在核碱基上产生4-巯基丁酰氧基甲基瘢痕。该瘢痕可能发生分子内硫代内酯化以消除2-氧代硫杂环戊烷,从而在核碱基上留下较小的羟甲基瘢痕。下文描绘了连接至胞嘧啶的5位的这种接头的一个实例,但该策略适用于任何合适的核碱基:

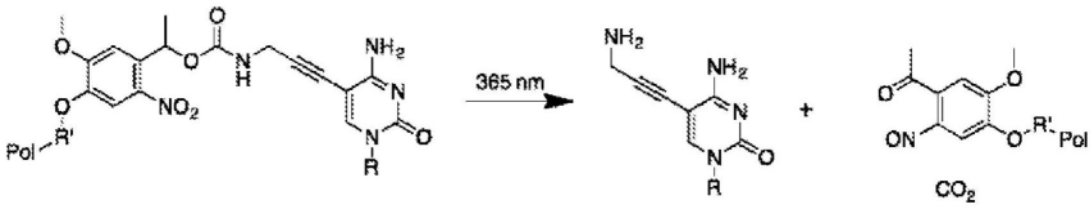
[0166] 

[0167] 在其它实施方案中,接头可通过暴露于光而裂解。例如,包含(2-硝基苄基)氧基甲基的接头可用365nm光裂解,留下羟甲基瘢痕,例如如下文针对胞嘧啶所描绘,但该策略适用于任何合适的核碱基:

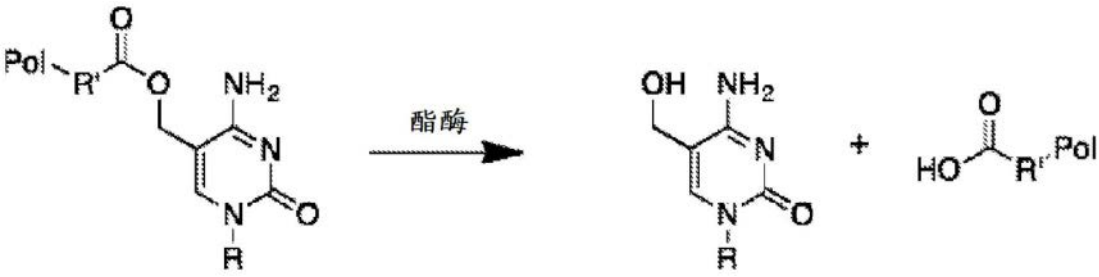
[0168] 

[0169] (其中,例如,R"=H或R"=CH3或R'=i-Bu。)

[0170] 在其它实施方案中,接头可包含3-(((2-硝基苄基)氧基)羰基)氨基炔丙基,其可用365nm光裂解以释放具有炔丙基氨基瘢痕的核碱基。该策略适用于任何合适的核碱基:

[0171] 

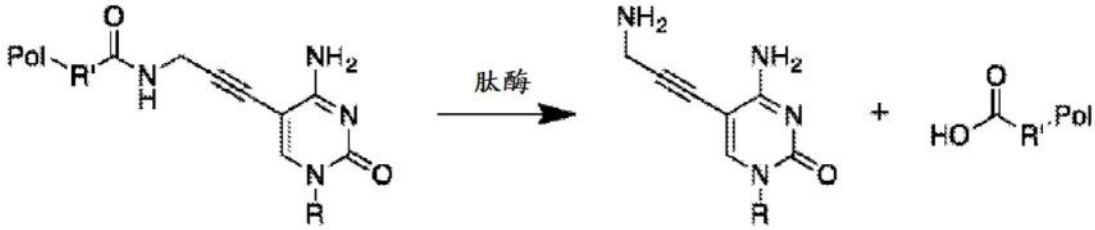
[0172] 在其它实施方案中,接头可包含酰基氧基甲基,其可用合适的酯酶裂解以释放具有羟甲基瘢痕的核碱基,例如如下文针对胞嘧啶所描绘,但该策略适用于任何合适的核碱基:

[0173] 

[0174] 在此类实施方案中,接头可包含与酯相邻的额外原子(包括在上面的R'中),所述额外原子增加酯酶对酯键的活性。

[0175] 在其它实施方案中,接头可包含N-酰基-氨基炔丙基,其可用肽酶裂解以释放具有炔丙基氨基瘢痕的核碱基,例如如下文针对5-炔丙基氨基胞嘧啶所描绘,但该策略适用于

任何合适的核碱基：

[0176] 

[0177] 在此类实施方案中，接头可包含与酰胺相邻的额外原子（包括在上面的R'中），所述额外原子增加肽酶对酰胺键的活性。

[0178] 等效物和范围

[0179] 本领域的技术人员将认识到，或仅使用常规实验就能够确定根据本文提供的技术的具体实施方案的许多等效物。本公开的范围不意图限于本文的公开内容，而是如所附权利要求书中所阐述。

[0180] 在权利要求书中，除非相反地指示或从上下文另外显而易见，否则冠词诸如“一个/种(a/an)”和“所述(the)”可意指一个/种或多于一个/种。除非相反地指示或从上下文另外显而易见，否则如果一个、多于一个或所有组成员存在于、被用于或以其它方式关联于给定产物或方法，则视为满足在组的一个或多个成员之间包括“或”的权利要求或描述。本公开包括其中恰有组中的一个成员存在于、被用于或以其它方式关联于给定产物或方法的实施方案。本公开包括其中多于一个或所有组成员存在于、被用于或以其它方式关联于给定产物或方法的实施方案。

[0181] 还应该注意术语“包含”意图为开放的并且容许但并非要求包括另外的要素或步骤。当本文中使用术语“包含”时，因此还涵盖并且公开术语“由……组成”。

[0182] 在给出范围的情况下，包括端点值。此外，应理解，除非另外指出或另外从上下文和本领域普通技术人员的理解显而易见，否则在本公开的不同实施方案中，表述为范围的值可假定为任何特定值或所述范围内的子范围，到所述范围的下限的单位的十分之一，除非在上下文中另有明确规定。

[0183] 如本文所用的术语“约”是指本领域技术人员容易地已知的每个值的正常误差范围。本文中的术语“约”值或对参数的引用包括(并描述)所述值或参数本身的实现。举例来说，提及“约X”的描述包括对“X”的描述。在一些实施方案中，“约”是指至多为所述值的+/-10％，例如+/-1％、+/-2％、+/-3％、+/-4％、+/-5％、+/-6％％、±8％、±9％或±10％的值。

[0184] 所有引用的来源，例如本文引用的参考文献、出版物、数据库、数据库条目和技术通过引用并入本申请中，即使在引用中没有明确陈述。如果所引用来源中的陈述与本申请中的陈述冲突，则以本申请中的陈述为准。

[0185] 章节标题和表格标题并非旨在进行限制。

[0186] 实施例

[0187] 以下是用于进行本公开所提供的技术的具体实施方案的实施例。所述实施例仅出于说明性目的提供，并且不意图以任何方式限制本公开的范围。对于所使用的数字(例如，量、温度等)，已尽力确保准确性，但是当然应该允许一些实验误差和偏差。

[0188] 除非另外指示，否则本文公开内容的实践将采用本领域技术范围内的蛋白质化学、生物化学、重组DNA技术和药理学的常规方法。此类技术在文献中有充分的解释。参见例

如,T.E.Creighton,Proteins:Structures and Molecular Properties(W.H.Freeman and Company,1993);A.L.Lehninger,Biochemistry(Worth Publishers,Inc.,current addition);Sambrook,等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(第2版,1989);Methods In Enzymology(S.Colowick和N.Kaplan编辑,Academic Press,Inc.);Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版(Easton,Pennsylvania:Mack Publishing Company,1990);Carey和Sundberg Advanced Organic Chemistry第3版(Plenum Press)第A卷和B卷(1992)。

[0189] 实施例1:聚合酶-核苷酸缀合物的制备

[0190] 1.聚合酶(TdT)的产生

[0191] 产生了表达鼠TdT的诱导型质粒,所述TdT具有位于位置182处的单个半胱氨酸(关于完整方案,参见Palluk等人,Nature Biotechnology,2018)。有关聚合酶-核苷酸缀合物制备的更多细节,还参见美国专利公布第2019/0112627号,"Nucleic Acid Synthesis and Sequencing Using Tethered Nucleoside Triphosphates",其通过引用以其整体并入本文中。

[0192] 2.聚合酶的蛋白质表达和纯化

[0193] 使用BL21(DE3)Gold细胞(Agilent)在TB培养基中进行TdT表达,所述TB培养基含有用于质粒的抗性标记物的抗生素。50mL的过夜培养物用于以1/20vol接种400mL表达培养物。将细胞在37℃和200rpm振荡下生长,直到它们达到OD 0.6。添加IPTG至0.5mM的最终浓度,并且在16℃下进行表达持续16-20小时。通过以8000G离心10分钟收获细胞并将其重悬浮于20mL缓冲液A(20mM Tris-HCl,0.5M NaCl,pH 8)+5mM咪唑中。细胞裂解使用超声处理进行,然后在30,000G下离心20分钟。将上清液施加至含有1mL Ni-NTA琼脂糖(Qiagen)的重力柱中。用20体积的缓冲液A+40mM咪唑洗涤柱,并且使用4mL缓冲液A+500mM咪唑洗脱结合的蛋白质。使用Vivaspin 20柱(MWCO 10kDa,Sartorius)将蛋白质浓缩至约0.15mL,然后使用Pur-A-Lyzer™透析试剂盒Mini 12000管(Sigma)用200mL TdT储存缓冲液(100mM NaCl、200mM K2HPO4,pH 6.5)进行透析过夜。

[0194] 将Ni纯化的样品施加至HiTrap Q HP阴离子柱。将蛋白质用从100%Q缓冲液A(100mM NaCl、20mM K2HPO4,pH 6.5)至100%Q缓冲液B(1M NaCl、20mM K2HPO4,pH 6.5)的线性梯度洗脱。使用SDS-PAGE分析来鉴定含有TdT的级分,汇集并浓缩这些样品。

[0195] 3.栓系的核苷酸连接至聚合酶

[0196] 为了制备TdT-核苷酸缀合物,首先合成了可裂解的接头-核苷酸,所述接头-核苷酸具有能够位点特异性缀合至半胱氨酸(即马来酰亚胺)的部分。示例性接头-核苷酸在美国专利公布第2019/0112627号,"Nucleic Acid Synthesis and Sequencing Using Tethered Nucleoside Triphosphates"中进行了描述。然后,将等摩尔的TdT和接头-核苷酸在500mM NaCl、20mM K_2HPO_4(pH 6.5)中在4℃下孵育过夜。使用在20mM Tris乙酸盐、50mM乙酸钾(pH 7.9)中预平衡的S200尺寸排阻柱(Cytiva)将TdT缀合物与未反应的接头-核苷酸分离。所得缀合物包括含有至少一个连接(或栓系)至聚合酶的TdT-核苷酸的缀合物。

[0197] 实施例2:磷酸酶在基于缀合物的多核苷酸合成过程中防止不想要的插入,而不会影响合成动力学

[0198] 如本文所述,聚合酶-核苷酸缀合物可用于将给定缀合物的单个核苷酸掺入到寡

核苷酸的游离3'端上,而聚合酶可在掺入之后保持连接,包括以受控的方式防止后续核苷酸添加。然而,当使用缀合物溶液进行多核苷酸合成时,可能发生多于一个核苷酸的插入,从而不利地影响基于缀合物的多核苷酸合成准确性。为了测试磷酸酶是否可通过防止基于缀合物的多核苷酸合成过程中的插入来提高合成准确性,我们使用有和没有磷酸酶的A、T、C或G核苷酸聚合酶缀合物在游离寡核苷酸的3'端进行了单核苷酸掺入反应,如下所示:

[0199] 将实施例1中制备的与A、T、C或G接头-核苷酸缀合的1μM TdT溶液在pH 8的Tris或HEPES缓冲液中与二价金属(例如,镁或钴)、50mM盐(例如,乙酸钾或NaCl)、50nM的两种起始物DNA寡核苷酸中的一种(对于A,使用5′-6-FAM-T35-3′(SEQ ID NO:9),并且对于T、C和G,使用5′-6-FAM-T41GCGGCGCGTTTCGCGCCGC-3′(SEQ ID NO:10))在存在或不存在从NEB购得的2μM小牛碱性肠磷酸酶的情况下一起孵育。将磷酸酶预先缓冲液交换到含有pH 8的缓冲剂(例如Tris或HEPES缓冲剂)和盐(例如,50mM NaCl或乙酸钾)的溶液中。将反应物在24℃下孵育,直到通过添加40mM EDTA在6.6秒、11.6秒、19.2秒、65秒、3分21秒、9分52秒和21分41秒停止反应。

[0200] 反应完成后,使用诸如裂解酶或还原剂的试剂裂解缀合物中连接核苷酸和TdT的接头,以从寡核苷酸去除TdT。然后通过毛细管电泳分析寡核苷酸,以根据长度区分反应产物。具体来说,通过检测与起始物寡核苷酸结合的6-FAM荧光素的荧光来确定所得寡核苷酸添加反应产物的大小。结果在图2A中示出。结果显示第一个峰(起始物寡核苷酸),第二个峰(添加了单个核苷酸的起始物寡核苷酸,即"+1添加"),以及在稍后时间点出现的第三个峰(添加了两个核苷酸的起始物寡核苷酸,即"+2添加"。也就是说,在初始时间点,延伸了+1寡核苷酸(单核苷酸掺入,右峰)的比例相对于起始物寡核苷酸(左峰)增加,直到达到完成。

[0201] 如稍后的时间点所示,在图2B中再次显示的最后的21分41秒时间点,在不存在磷酸酶的情况下,由于向起始物寡核苷酸中添加2个核苷酸(+2)所致的另一个峰开始出现。+2额外峰在图2B中进行了标记并且对应于不想要的插入。然而,当反应在磷酸酶存在下进行时,+2添加的出现显著减少,而+1添加的比率没有受到显著影响。因此,使用经磷酸酶处理的缀合物试剂进行合成(例如,在磷酸酶存在下进行合成)可提高通过聚合酶-核苷酸缀合物将A、C、T和G核苷酸的单核苷酸添加至底物的准确性,并且抑制不想要的插入。

[0202] 实施例3:几种磷酸酶变体在基于缀合物的多核苷酸合成过程中防止不想要的插入,而不会影响合成动力学

[0203] 将实施例1中制备的与T接头-核苷酸缀合的2μM TdT溶液在pH 8的Tris或HEPES缓冲液中与二价金属(例如,镁或钴)、50mM盐(例如,乙酸钾或NaCl)、2μM磷酸酶(或无磷酸酶作为对照)和50nM DNA寡核苷酸(5′-6-FAM-T32CCC-3′)(SEQ ID NO:11)一起在24℃(图3A)或37℃(图3B)下孵育。在3.8秒、11.6秒、19.2秒、65秒、3分21秒、9分52秒、21分41秒和30分钟时通过添加40mM EDTA淬灭反应。将磷酸酶预先缓冲液交换到含有pH 8的缓冲剂(例如Tris或HEPES)和盐(例如,50mM NaCl或乙酸钾)的溶液中。对以下磷酸酶变体进行了测试:家牛(Quick CIP,NEB)、北极虾(虾碱性磷酸酶,NEB)、南极细菌TAB5(南极磷酸酶,NEB)或大肠杆菌(Takara Bio)磷酸酶。

[0204] 反应完成后,使用诸如裂解酶或还原剂的试剂裂解缀合物中连接核苷酸和TdT的接头,以从寡核苷酸去除TdT。通过毛细管电泳对图3A中的所得合成的寡核苷酸进行分析,以根据长度区分寡核苷酸群体,其中"0"指定为代表起始物寡核苷酸的峰,并且"+1"代表在

其3'端具有单个掺入的T的起始物寡核苷酸的峰;并且在图3B中,结果显示在"无磷酸酶"对照中具有2个掺入的核苷酸的寡核苷酸("+2添加")的可见峰。

[0205] 具体来说,通过毛细管电泳对寡核苷酸进行分析,并使用与起始寡核苷酸结合的6-FAM荧光素的荧光检测来根据长度区分反应产物。在24℃下在3.8秒至21分41秒之间的不同添加时间之后所得的寡核苷酸添加反应产物显示在图3A中。在37℃下30分钟的添加时间后所得的寡核苷酸添加反应产物显示在图3B中,其中箭头表示+2添加的预期大小。

[0206] 如所示,与"无磷酸酶"相比,到所有测试时间点+2添加的出现均显著减少(图3B),而到21分41秒时间点+1添加在所有磷酸酶存在下完成(图3A)。此外,与"无磷酸酶"相比,除TAB5磷酸酶变体外,所有磷酸酶变体均未明显影响核苷酸掺入的动力学。因此,所有测试的磷酸酶变体都适合用于抑制多核苷酸合成过程中不想要的插入,其中大多数变体也适用于需要快速掺入动力学的情况。

[0207] 实施例4.磷酸酶在使用聚合酶-核苷酸缀合物的50聚体多核苷酸的逐步受控合成过程中抑制不想要的插入

[0208] 使用核苷酸-聚合酶缀合物进行循环多核苷酸合成,以产生限定的50聚体序列:

[0209] 5′-AACCGACCAAGCTACGGTTCAGAAAATTCGCGATGCAA TTCGCGATCAGC-3′(SEQ ID NO:12)。

[0210] 合成从FAM标记的DNA寡核苷酸(起始物寡核苷酸)的3'端开始进行:

[0211] 与连接至表面的DNA杂交的5′-6-FAM-CTGACAGAGATGATGAAGTCACATGAGACATGAACTGAGTCTTTT-3′(SEQ ID NO:13)。

[0212] 进行了两次50聚体合成反应,一次在磷酸酶存在下进行,并且另一次在没有磷酸酶的情况下进行。DNA延伸是通过经由TdT-核苷酸缀合物循环添加核苷酸在起始分子上进行的。如下进行将一个核苷酸添加至与表面结合的多核苷酸的3'端的每个DNA延伸循环(在24℃-37℃之间的温度下):

[0213] 1.核苷酸添加:将TdT-核苷酸缀合物(对应于A、T、C或G)、二价金属(例如,钴或镁)和50mM盐(例如,乙酸钾或NaCl)于pH 8的Tris或HEPES缓冲液中的溶液(含或不含3μM大肠杆菌磷酸酶)添加至与表面结合的DNA(例如起始物寡核苷酸)中。

[0214] 2.去除寡核苷酸结合的TdT:孵育足够时间以将TdT-核苷酸缀合物添加至表面结合的寡核苷酸后,添加40mM EDTA以终止TdT延伸反应,并且使用诸如裂解酶或还原剂的试剂裂解缀合物中连接核苷酸和TdT的接头。

[0215] 3.表面的再生:然后使用NaOH pH 11与0.5M NaCl的溶液从表面洗去所有未结合的反应组分。

[0216] 重复步骤1-3以产生所需的多核苷酸序列。

[0217] 将所得的合成的多核苷酸从表面去处,并通过在SeqStudio遗传分析仪(ThermoFisher)DNA分析仪上检测FAM荧光进行分析,以根据长度区分多核苷酸群体。结果显示在图4中。

[0218] 如图4所示,无磷酸酶的合成显示具有大于50个碱基的产物(代表具有1个或多个非终止事件或插入的产物),占总底物的约40%。然而,在存在磷酸酶的情况下,合成的大于50个碱基的寡核苷酸仅占合成的群体的约10%,表明每个合成步骤的插入率显著降低。此外,在存在或不存在磷酸酶的情况下,缺失(没有发生添加的循环)没有可检测的变化。

[0219] 上述结果表明,与没有磷酸酶的反应相比,在基于缀合物的多核苷酸合成过程中磷酸酶的存在导致多步合成反应中的插入显著(至少4倍)减少,而对缺失率没有影响。这代表通过聚合酶-核苷酸缀合物对多核苷酸合成质量的显著改善。

[0220] 其它实施方案

[0221] 应理解,已使用的措辞为描述性措辞,而不是限制性措辞,并且可在随附权利要求的范围内做出改变,而不脱离在本发明的更宽的方面内的本公开的真实范围和精神。

[0222] 虽然已关于若干所描述的实施方案相当详细并相当具体地描述了本公开,但是并不预期本公开应限于任何所述细节或实施方案或任何具体实施方案,而是参考随附权利要求进行说明,以便考虑到现有技术提供所述权利要求的最广泛的可能解释,并且因此有效地涵盖本公开的预期范围。

[0223] 本文提及的所有公布、专利申请、专利以及其它参考文献通过引用以其整体并入。在出现冲突的情况下,将以包括定义在内的本说明书为准。另外,章节标题、材料、方法和实施例仅为说明性的并且不旨在具有限制性。

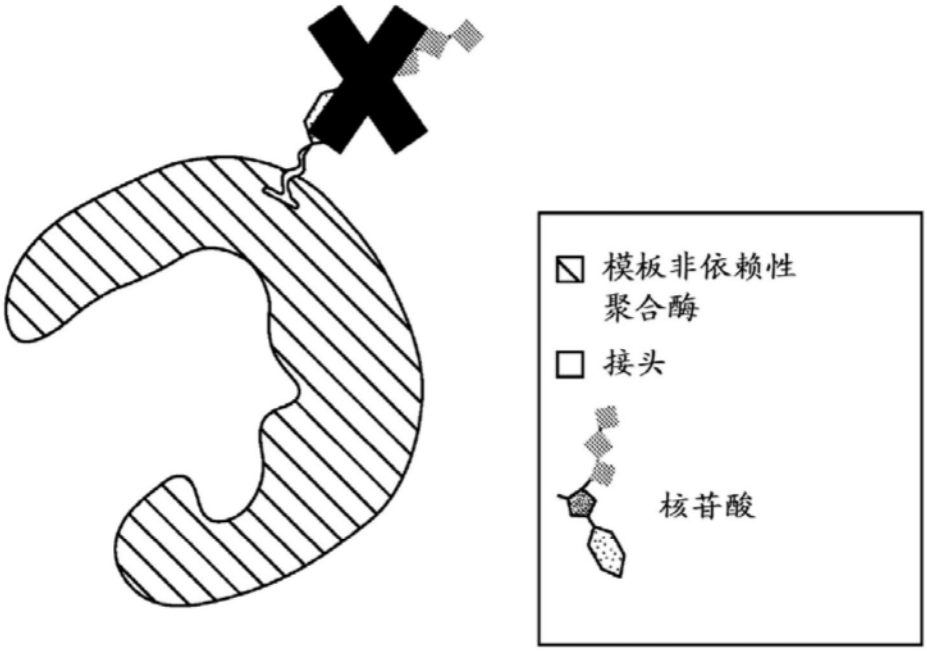


图1A

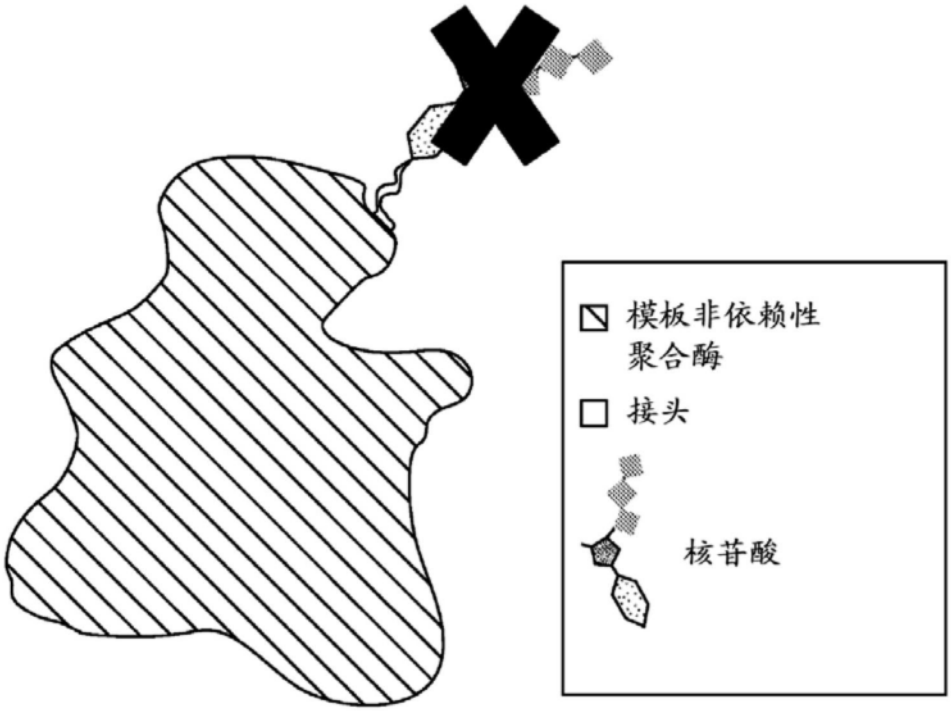


图1B

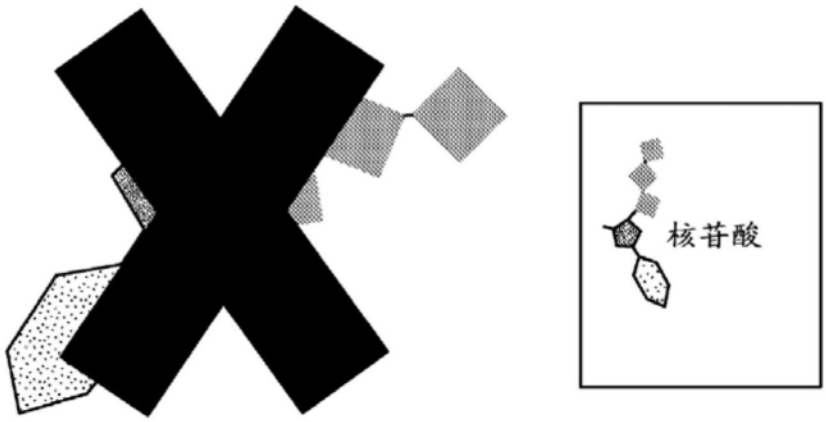


图1C

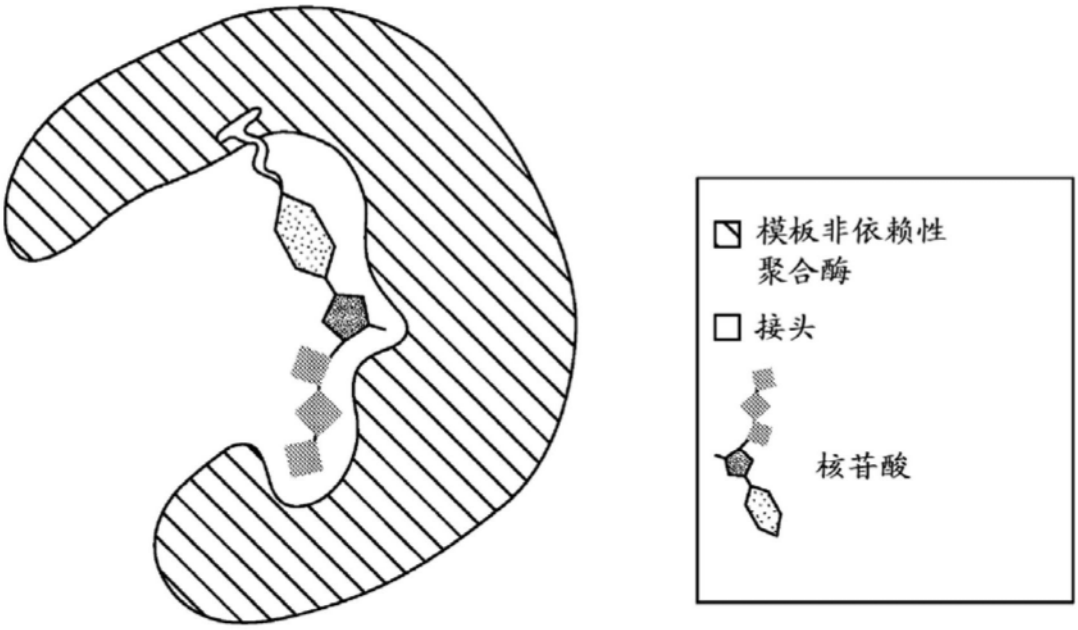


图1D

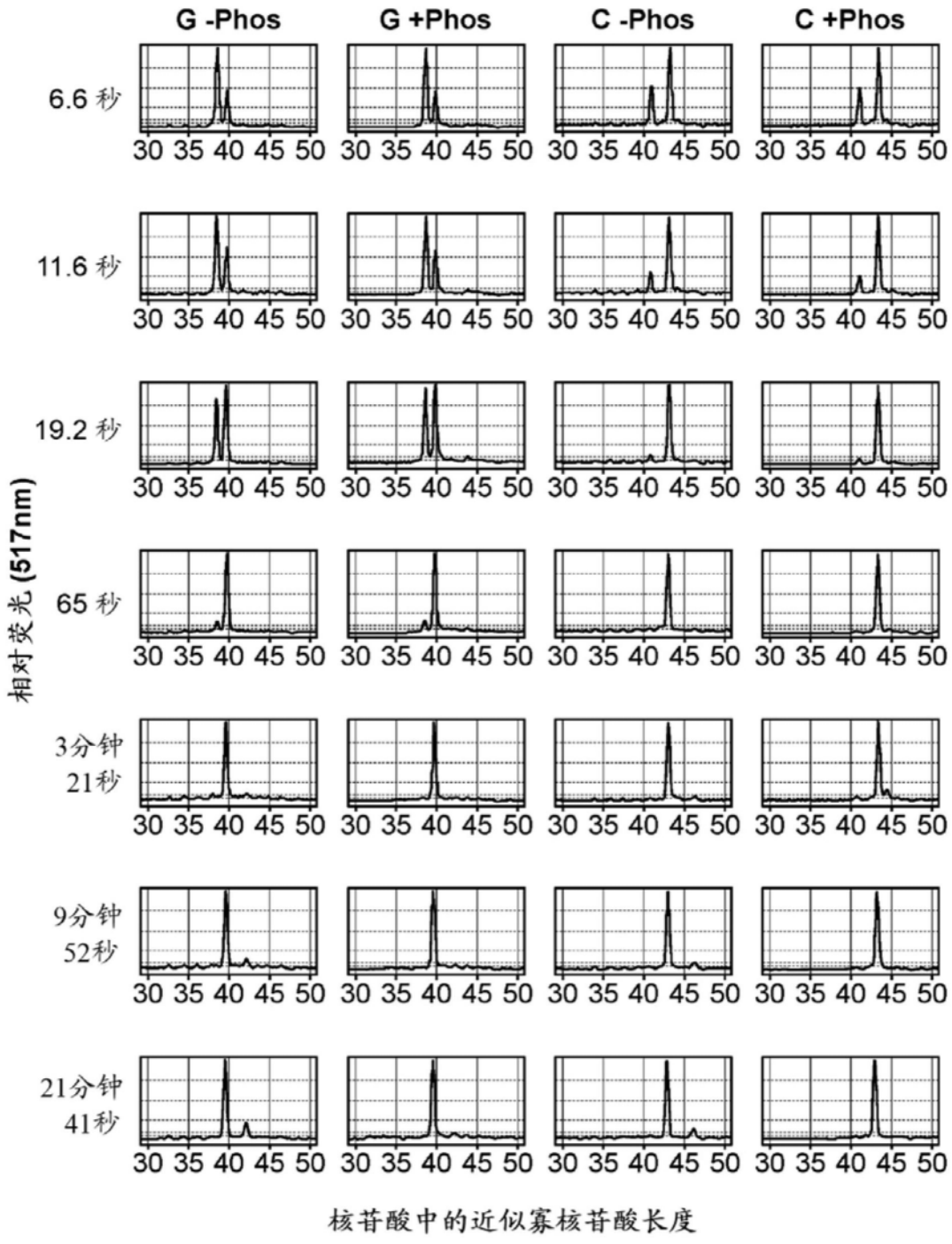

G -Phos
G +Phos
C -Phos
C +Phos
6.6 秒
11.6 秒
19.2 秒
65 秒
3分钟
21秒
9分钟
52秒
21分钟
41秒
30 35 40 45 50
相对荧光 (517nm)
核苷酸中的近似寡核苷酸长度

图2A

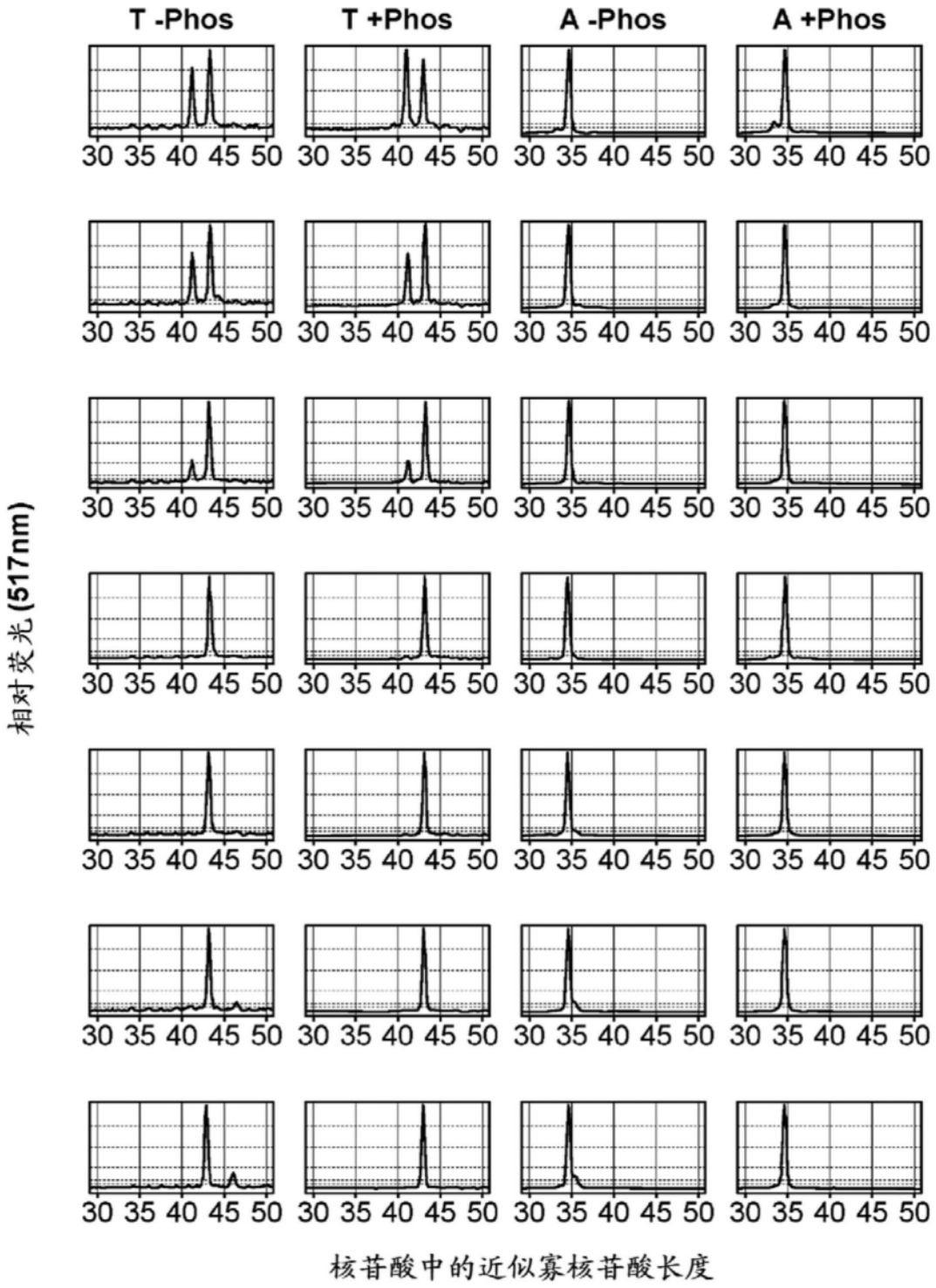

T -Phos
T +Phos
A -Phos
A +Phos
30 35 40 45 50
相对荧光(517nm)
核苷酸中的近似寡核苷酸长度

图2A(续)

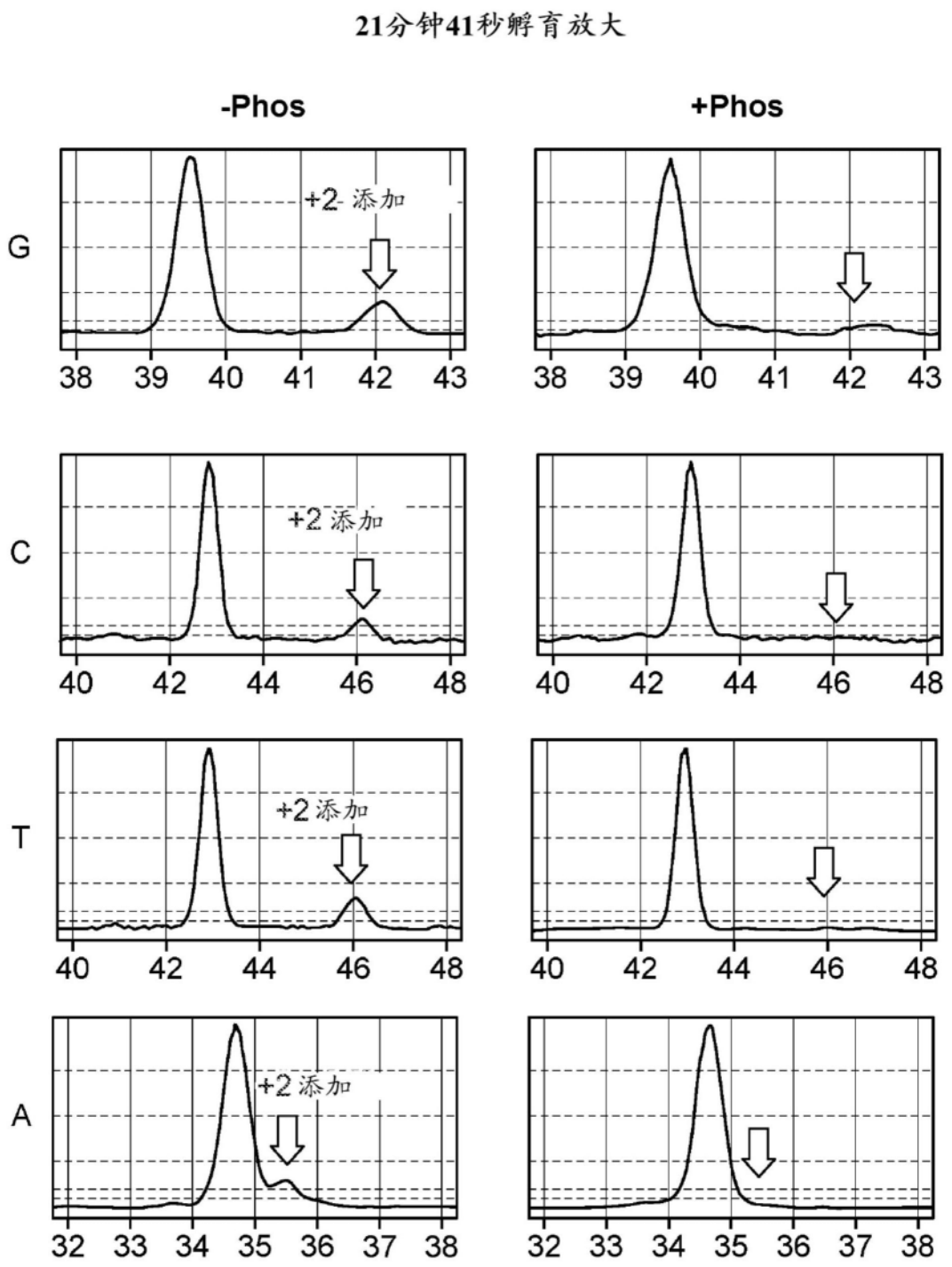

21分钟41秒孵育放大
-Phos
+Phos
G
C
T
A
+2 添加
38 39 40 41 42 43
40 42 44 46 48
32 33 34 35 36 37 38

图2B

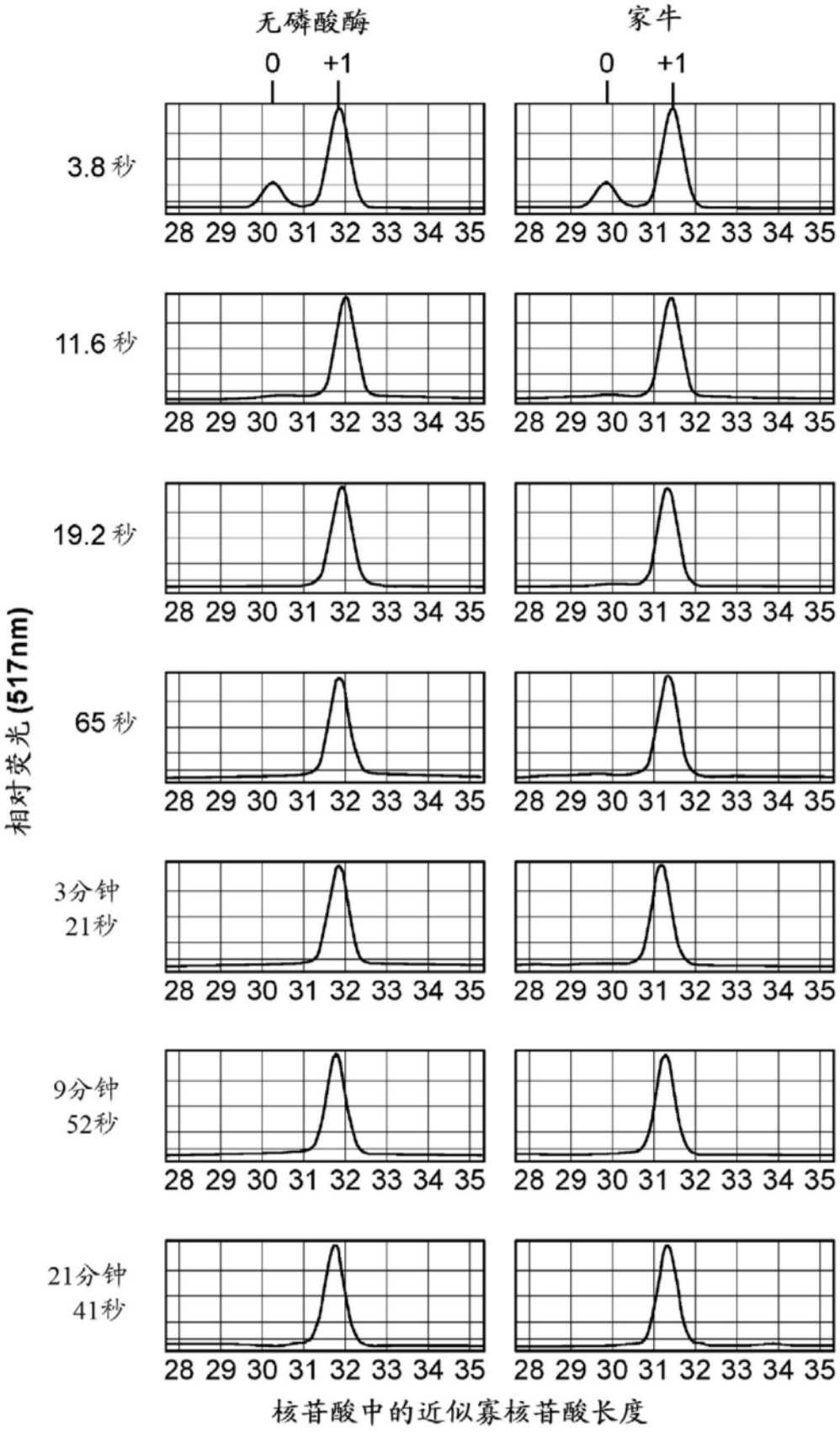

无磷酸酶
家牛
0
+1
3.8秒
11.6秒
19.2秒
65秒
3分钟 21秒
9分钟 52秒
21分钟 41秒
28 29 30 31 32 33 34 35
相对荧光(517nm)
核苷酸中的近似寡核苷酸长度

图3A

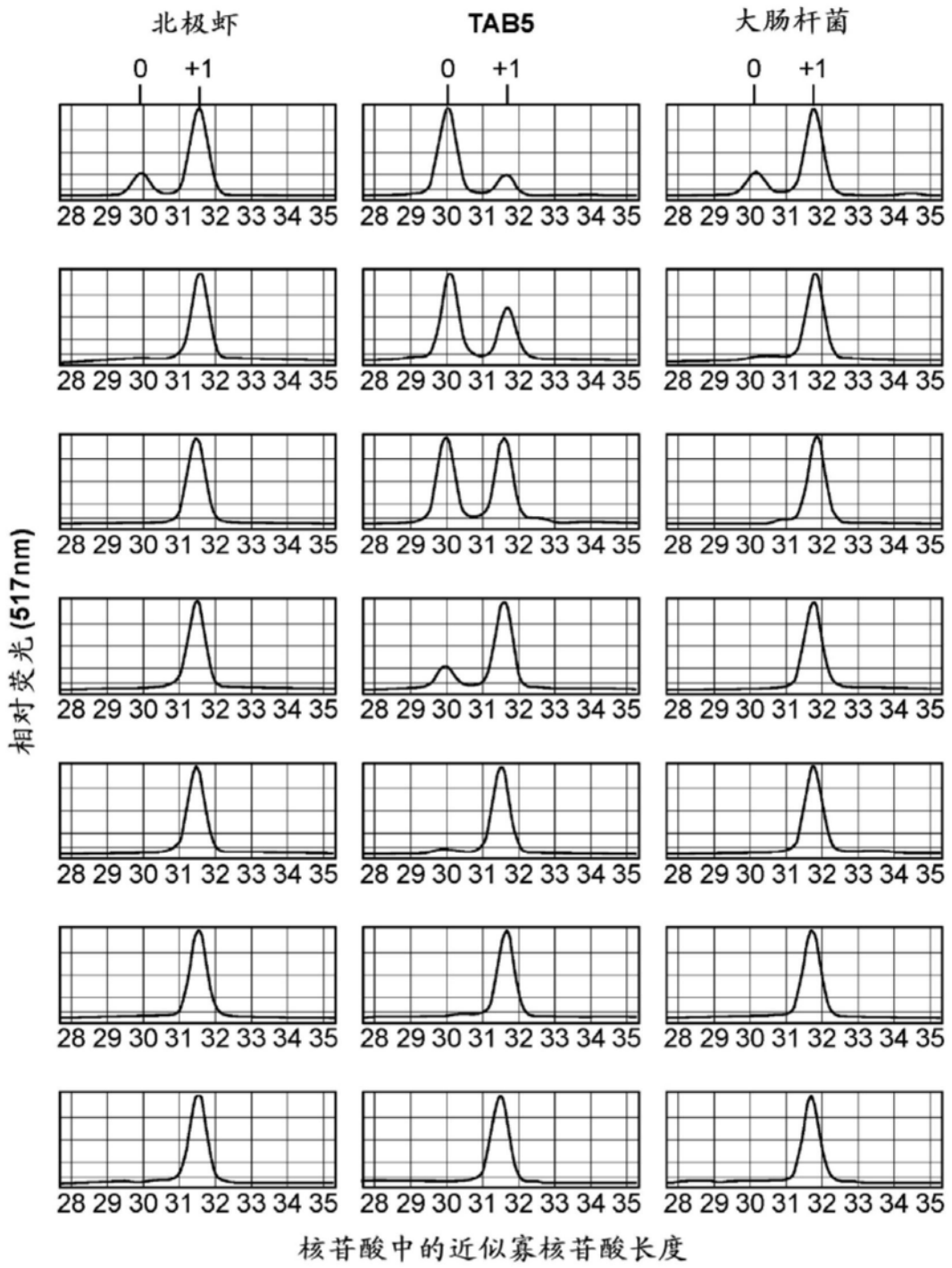

北极虾
TAB5
大肠杆菌
0
+1
28 29 30 31 32 33 34 35
相对荧光(517nm)
核苷酸中的近似寡核苷酸长度

图3A(续)

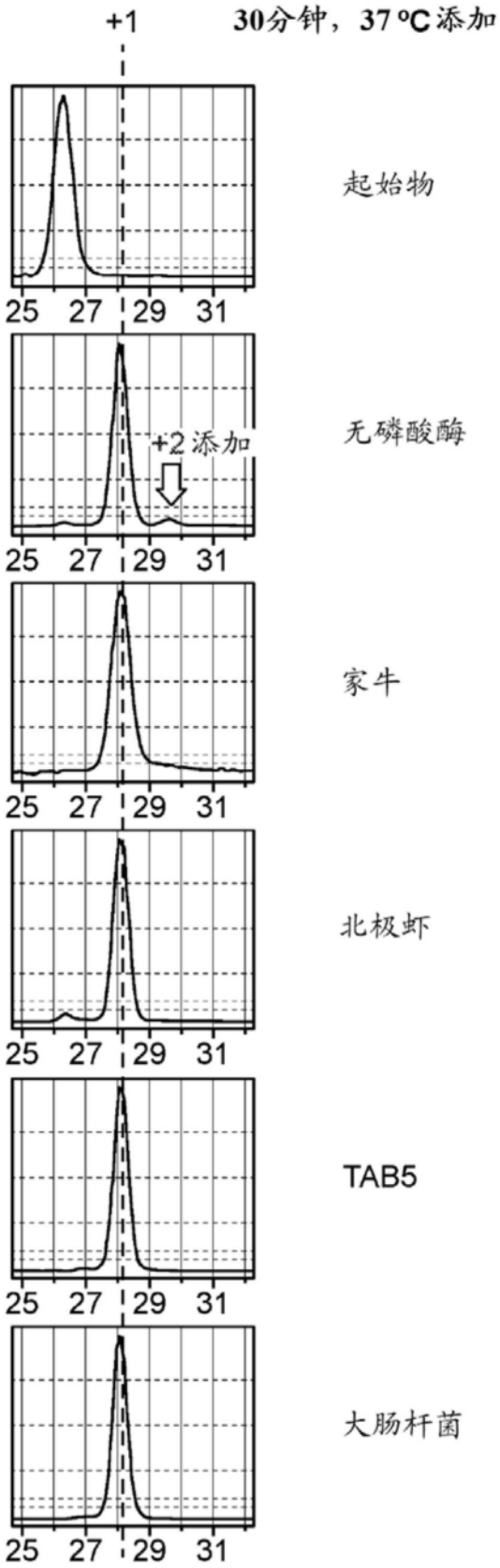


图3B

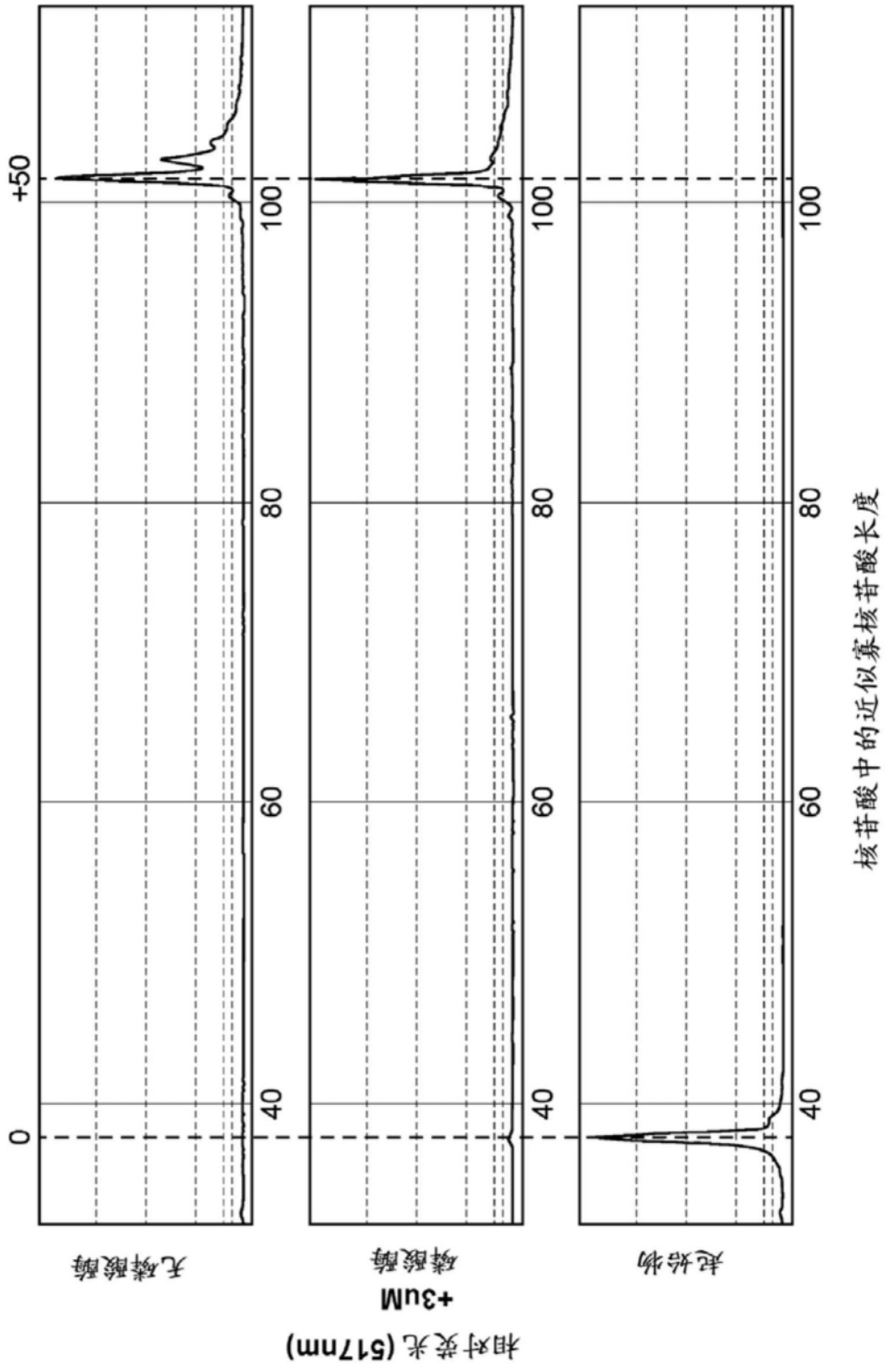


图4