

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
C12Q 1/68



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 00805845.8

[45] 授权公告日 2005 年 5 月 11 日

[11] 授权公告号 CN 1201018C

[22] 申请日 2000.4.6 [21] 申请号 00805845.8

[30] 优先权

[32] 1999.4.6 [33] GB [31] 9907812.3

[86] 国际申请 PCT/GB2000/001290 2000.4.6

[87] 国际公布 WO2000/060114 英 2000.10.12

[85] 进入国家阶段日期 2001.9.29

[71] 专利权人 医疗生物系统有限公司

地址 英国德文

[72] 发明人 D·H·丹斯哈姆

审查员 陈中伟

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

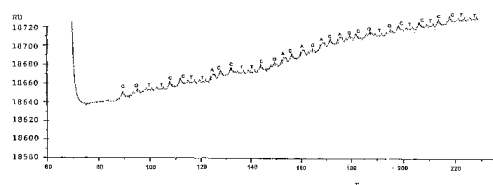
代理人 樊卫民

权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图 1 页

[54] 发明名称 使用解旋酶测定多核苷酸序列

[57] 摘要

一种测定多核苷酸序列的方法，包括以下步骤：
(i) 在适于酶活性的条件下，靶多核苷酸与解旋酶/引发酶(可以是固定化的)反应；
(ii) 通过测定辐射，检测酶与靶上的核苷酸之间的相互作用。



I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

- 1.一种测定多核苷酸序列的方法，包括以下步骤：
 - (i)在适于酶活性的条件下，使靶多核苷酸与解旋酶或引发酶反应；
 - (ii)通过测定电磁辐射，检测酶与靶多核苷酸上的核苷酸之间的相互作用。
2. 根据权利要求 1 的方法，其中步骤 (ii) 包括表面胞质共振的使用。
3. 根据权利要求 1 的方法，其中步骤 (ii) 包括核磁共振的使用。
4. 根据权利要求 1 的方法，其中解旋酶或引发酶固定在固相支持物上。

使用解旋酶测定多核苷酸序列

技术领域

本发明涉及一种测定多核苷酸序列的方法。

背景技术

人们对多核苷酸的序列测定有相当大的兴趣。可在 WO-A-99/05315 中找到一种有效的序列测定方法的简概及描述。

发明内容

本发明基于测定电磁辐射可用来检测解旋酶和/或者引发酶的构象和/或者质量变化，当解旋酶和/或者引发酶利用 NTP 水解产生的能量，将双链 DNA(dsDNA)解旋为单链 DNA(ssDNA)时，这些蛋白质内可发生构象和/或者质量变化。

根据本发明，测定多核苷酸序列的方法包括以下步骤：

(i) 在适于解旋酶活性的条件下，将靶多核苷酸与解旋酶/引发酶、NTP 源反应（即利用 NTP 水解产生的能量使 DNA 解旋）；以及

(ii) 通过测定辐射，检测经解旋酶的作用特定碱基或者碱基对的分离和/或者邻近。

使用解旋酶来测定多核苷酸序列为本方法的成功提供了一些有利条件。首先，减少了多核苷酸分子内存在的二级结构问题，因为解旋酶在其天然环境下，遇到并排除这些结构。其次，解旋酶可在室温下，直接测定双链 DNA 的序列。解旋酶的这种能力提供了可简化靶多核苷酸操作的有利条件，并提供了对长多核苷酸模板测序的可能性。

通过使用一些技术，可将辐射应用于样本。这些技术包括表面敏感检测技术（其中例如将解旋酶与固相支持物结合），在固相光学表面上光反应的变化用于指示表面上的结合相互作用。在本发明的一个优选的实

实施方案中，所用技术为损耗波光谱学，特别是表面胞质共振(surface plasmon resonance, SPR)波谱学。

发明描述

在本发明的一个实施方案中，解旋酶获得的以 NTP 方式提供的能量是在严格控制之下的。就是说：解旋酶沿着被测序之 DNA 链的移动是通过直接控制其结合位点区解旋酶分子可获得的能源分子的浓度而调节的。这样使得酶活性可调节，以促进对辐射的测定，从而识别解旋酶或者解旋酶复合体邻近区的一个碱基或者碱基对。

另外，由于解旋酶构象的变化可使它进行水解反应和/或沿着多核苷酸移动，可通过控制解旋酶经历构象变化的能力，完成对 DNA 解旋和测序进展的控制。通过设计（使用当今技术水平的基因操作技术）解旋酶，使该分子含有可使该分子将辐射转变或者转换为构象变化的化学/部分基团，可以实现上述目的。以可确保每一个核苷酸检出的方式对解旋酶活性进行选择控制。因此本方法是在实时基础上进行的，以获得快速的序列分析。以同样的名称，在同一天提交的共同未决的 PCT 申请描述了控制的优选方法，其中内容在此处引用作为参考。

本方法测定多核苷酸序列时，涉及到对解旋酶与靶多核苷酸之间构象/动力学相互作用的分析。通过监测如果反应进行时电磁或者其它辐射的改变或吸收来测定构象/动力学的相互作用。

此处用到的术语“多核苷酸”可以广义解释，包括 DNA 与 RNA，还包括经修饰的 DNA 与 RNA，以及其它的杂合核酸样分子，例如肽核酸（PNA）。

此处用到的术语“解旋酶”可以广义解释，它从属于使用或者不使用来自 NTP 水解的能量将双链多核苷酸解旋为单链多核苷酸的遍在蛋白质（Dean 等人，生物化学杂志(J.Biol.Chem.)(1992)267:14129-14137; Bramhill 等人，细胞(Cell)(1988)54:915-918; Schions 等人，细胞(1988)52:385-395)。

二十多年前，发现了第一个解旋酶并对其进行了分类（Abdel-Monem

等人, 欧洲生物化学杂志(*Eur.J.Biochem.*)(1976)65:411-449 & 65;431-440)。来自原核、真核和病毒系统的新解旋酶不断被发现, 并对其特征进行了描述。所有这些分子体系均在本发明的范围之内。

本发明使用的解旋酶可为任何已知类型的解旋酶。可以是任何 DNA 依赖的 DNA 解旋酶, 例如大肠杆菌 (*E.coli*) DnaB 解旋酶 (Xiong 等人, 分子生物学杂志 (*J.Mol.Biol.*) (1996) 259: 7-14)。如果靶多核苷酸是 RNA 分子, 那么解旋酶可以是 RNA 依赖的解旋酶或者是可以对两种形式的多核苷酸作用的解旋酶。也可以用消化酶, 例如外切酶或者拓扑异构酶。

在本发明的一个优选的实施方案中, 解旋酶为噬菌体 T7 gp4 解旋酶 (Egelman 等人, 美国国家科学院院报 (*Proc.Natl.Acad.Sci. USA*), (1995)92:3869-3873)。在本发明的一个更优选的实施方案中, 解旋酶或者为大肠杆菌 RuvB 解旋酶 (Stasiak 等人, 美国国家科学院院报, (1994)91:7618-7622)、大肠杆菌 DnaB 解旋酶 (Xiong 等人, 分子生物学杂志 (1996) 259: 7-14), 或者为猿病毒 40 大 T 解旋酶 (Dean 等人, 生物化学杂志 (1992)267:14129-14137)。

至今为止表征的大量解旋酶在其活性形式下显示出为寡聚体, 或者可认为情况就是如此。

目前, 解旋酶是根据其一级结构分类的 (Gorbalenya 等人, 结构生物学最新观点 (*Current.Opin.Struct.Biol*) (1993)3:419-429), 但是也可基于寡聚体的状态或者多核苷酸解旋的极性分组 (Lohman 等人, 生物化学年鉴 (*Annu.Rev.Biochem.*)(1996)65:169-214 & Bird 等人, 结构生物学最新观点(1998)8:14-18)。大量假定的解旋酶通过与原核生物、真核生物和病毒具序列同源性而得以鉴定 (Gorbalenya 等人, 结构生物学最新观点(1993)3:419-429)。虽然许多解旋酶发挥作用的形式似乎为六聚体或者二聚体 (Lohman 等人, 生物化学年鉴 (1996)65:169-214), 也有一些为单体形式, 例如 PcrA 解旋酶 (Bird 等人, 核酸研究(*Nucleic Acids Res.*)(1998)26:2686-2693) 和 NS3 解旋酶(Porter 等人, 生物化学杂志, (1998)273:18906-18914)。其它解旋酶, 如 Rep 解旋酶, 也可以单体形式

存在 (Bird 等人, 核酸研究, (1998)26:2686-2693)。

在本发明的一个优选的实施方案中, 使用了来自中度嗜热的嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Bacillus stearothermophilus*) 的 PcrA 解旋酶, 旨在利用单体系的操作稳定性。PcrA 解旋酶是枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) (Petit 等人, 分子微生物学 (Mol.Microbiol.) (1998)29:261-274) 和金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) (Lordanescu 等人, 普通分子遗传学 (Mol.Gen.Genet.) (1993)241:185-192) 的必须酶, 它参与了修复和滚环复制 (Petit 等人, 分子微生物学, (1998)29:261-274) & Soutanas 等人, 核酸研究(1999)256:350-355)。PcrA 与大肠杆菌 UvrD 和 Rep 具有较高的同源性。

本方法一般应用电磁辐射而进行, 使用的是表面胞质共振技术或者核磁共振技术。但是, 也可考虑其它测定辐射变化的技术, 例如全内反射荧光(TIRF)波谱学、衰减全反射(ATR)波谱学、破坏全反射(FTR)波谱学、布鲁斯特角度反射计、散射全内反射 (STIR) 或者损耗波椭圆光度法。

除了这些需要电磁辐射的技术外, 也考虑了其它技术, 特别是光化学技术 (如化学发光) 和包括共振系统的重量分析技术 (如表面声波 (SAW) 技术和石英晶体微平衡 (QCM) 技术)。

表面胞质共振 (SPR) 波谱学是一个优选的方法, 它通过检测溶液的体相与损耗波区折射率的差异来测定溶液的特性。入射的单色光以特定角度被对面的固相光学 (传感器芯片) 表面反射至待研究的样本中。光在样本中可延伸一小段距离, 它受到表面相互作用的影响。

目前合适的传感器芯片是本领域公知的, 它们一般包括光学透明物质 (如玻璃) 和薄的反射膜 (如银或者金)。可阅览 EP-A-0648328 中对 SPR 波谱学的一篇综述。

核磁共振 (NMR) 波谱学是另一个优选的方法, 它测定化合物的磁特性。在所应用的磁场与射频辐射的联合作用下, 化合物的核按能量定向。当施加于核的能量等于自旋状态间的能量差时 (差指的是所应用场的方向与正向平行或反平行之间的差) 可产生共知的共振。一般可通过射频

接受器检测从一种自旋状态到另一种自旋状态所吸收的能量和接下来能量的释放。

本发明的一个重要但并不必需的方面是将解旋酶/复合体固定在固相支持物上。固定解旋酶对本方法的成功提供了一些重要的有利条件。首先，大大降低了与测定可溶分子能量吸收相关的随机“噪音”。其次，降低了来自任一不直接参与与解旋酶相互作用的底物（例如 NTP 源）的噪音，因为解旋酶可被维持在一个与测定场有关的特异限定的区域内。如果用于测定辐射变化的技术需要测定荧光时（如 TIRF），随着新生链的延长，背景荧光会增加，这样固定解旋酶就尤其适用。同样，如果用 SPR 波谱学，解旋酶的反应维持在损耗波区内，不管多核苷酸的大小如何，均可进行准确的测定。最后，由于靶多核苷酸或寡核苷酸均非不可逆地附着在固相表面，再生表面相对较容易，同一被固定的解旋酶或者解旋酶复合体可用来进行进一步的测序反应。

可用本领域公知的标准程序进行固定。特别是用标准的氨基偶联步骤固定，将配体结合的氨基附着至例如葡聚糖或 N-羧基琥珀酰亚胺酯活化的表面。在本发明的一个优选的实施方案中，解旋酶固定在可测定折射系数改变的 SPR 传感器芯片表面。EP-A-0589867 和 Lofas 等人，生物传感器和生物电学（Biosens.Bioelectron.）(1995)10:813-822，给出了将生物分子固定在光学传感器的实施例。

在本发明的另一个实施方案中，DNA 分子可附着在珠上。例如将 DNA 一个末端生物素化，附着至链亲和素包被的聚苯乙烯球（Chu 等人，美国光学协会(Optical Society of America)，华盛顿，(1990) 8: 202），并约束在流动小池内的光学捕捉器中（Ashkin 等人，光学通讯（Opt.Lett.）(1986) 11; 288）。当解旋酶（在外部控制下）沿着被测序的多核苷酸移动时，多核苷酸经光学捕捉器（也称为光学镊子）中的空间移动，因此解旋酶保持于检测区内。本系统也可反向发挥作用，将结合的解旋酶约束在光学捕捉器中。

本发明进一步优选的实施方案是检测单酶/酶系统的使用和检测，用标记监测构象变化。例如，使用单标记的聚合酶可为本方法/实施方案的

成功提供一些重要条件。首先,大大减小非聚合酶分子(例如外切酶)在单一多核苷酸片段环境下的间歇持续合成能力问题。其次,避免了在流动流体中,检测单标记分子(即核苷酸)的问题,并避免了它固有的噪音问题。消除了核苷酸与模板多核苷酸相关表面或者模板多核苷酸内部的表面不受控制的结合问题。使用任何本领域公知的测定/监测单分子构象动力学、分子间相互作用、酶活性、反应动力学、分子运动自由度、活性改变和改变化学电稳定环境的技术均认为在本发明的范围内。这些技术包括,但不限于,荧光能量传递(FRET)(Ha 等人, (1996) 美国国家科学院院报 96: 893)、荧光长期显微术 (FLIM)、单分子极化/各向异性测定法和原子能显微术 (AFM) 测定法。

下列实施例对本发明进行了阐述。

附图说明

图1给出了序列测定实验的结果,它以反应点(RU)对时间(T; sec)作图。

具体实施方式

下列分析是在改进的 BIAcore® 2000 系统 (BIAcore AB,Uppsala,瑞典)进行的,以传感器芯片 CM5(研究级, BIAcore AB)作为光学传感器表面。仪器还配有整合的 m-射流盒 (IFC),使单样本注射可在四个小池中分析。

制备 PcrA 解旋酶

根据 Bird 等人,核酸研究 (1998) 26: 2686-2693,利用肝素-琼脂糖凝胶的疏水相互作用层析,在低盐浓度下进行解旋酶纯化,制备 PcrA 解旋酶。通过凝胶过滤,去除痕量的蛋白质污染物。在所计算的消光系数为 $0.76 \text{ OD mg}^{-1} \text{ mL}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 的 280nm 处如 Dillingham 等人,生物化学 (Biochemistry) (2000)39:205-212 所描述,用分光光度法测定 PcrA 的浓度。

解旋酶的固定

根据 Jonsson 等人, (生物技术(Biotechniques)(1991);11;620-627),将解旋酶固定在传感器芯片上。简而言之,用 Hepes 缓冲液 (10mM Hepes、150mM NaCl、0.05% 表面活性剂 P20 (BIAcore AB, Uppsala, 瑞典), pH7.4) 平衡传感器芯片环境。等体积混合 N-羧基琥珀酰亚胺 (溶

于水，浓度为 0.1M) 与 N-乙基-N' (二甲基氨基丙基) 碳二亚胺 (EDC) (溶于水，浓度为 0.1M)，然后横贯芯片表面 (CM5) 注射，使羧甲基化的葡聚糖活化。PcrA 解旋酶 (160 μ l) 与 10mM 乙酸钠 (100 μ l, pH5) 混合后，横贯注射至已活化的表面。最后，将传感器芯片表面残留的 N-羟基琥珀酰亚胺酯与乙醇胺 (35 μ l, 溶于水，浓度为 1M, pH8.5) 反应，并洗去未与表面结合的解旋酶。固定步骤是在 25 $^{\circ}$ C，Hepes 缓冲液连续流动 (5 μ l/min) 的条件下进行的。

寡核苷酸

使用 WO-A-99/05315 中定义的 SEQ ID No.1 和 SEQ ID No.2 作为靶寡核苷酸和引物寡核苷酸。在杂交条件下这两个多核苷酸反应，形成靶-引物复合体。

经处理的 DNA 重悬于含有 0.5mM 1-(硝基苯基) 乙基- 笼化 ATP (在 5' 位置笼化) 的缓冲液中 (20mM Tris-HCl, pH7.5, 8mM MgCl₂, 4%(V/V)甘油、5mM 二硫苏糖醇 (DTT)、40mg 牛血清白蛋白)。该 NPE-笼化 ATP 不可被水解，是 ATP 的光活化类似物。

然后，以流速 5 μ l/min 将经处理的 DNA 及 NPE-笼化的底物溶液注射至传感器芯片表面的 PcrA 解旋酶上，通过形成 PcrA/DNA/NPE-ATP 复合体与解旋酶结合。

为了防止模板从解旋酶/芯片表面解离，含 0.5mM ADP 的 Hepes 缓冲液应维持在小片表面连续流动。

DNA 的序列测定

使用 WO-A-99/05315 中描述的方法进行 DNA 的序列测定，所用的仪器设备如图 1 所示，但只用一个调焦装置 (5) 将单色光脉冲至小室中。

实验开始时，将温度为 25 $^{\circ}$ C，流速为 30 μ l/min 的含 0.5mM ADP 的 Hepes 缓冲液维持横贯小片表面，以 10Hz 的速率记录并收集数据。波长为 260nm 的单色光通过调焦装置 (5) 进行脉冲，以去除解旋酶反应位点处 ATP 分子的封闭基团，使解旋酶可将 ATP 水解为 ADP，所释放的能量可进一步用于从多核苷酸去除一个碱基对。用 SPR 装置的 p-偏振光检测与碱基运动相关的构象变化，其中的 SPR 装置可调制波长以产生

SPR 光谱。由于解旋酶不能获得可供水解的 ATP 作为能源，不能发生进一步的运动/解旋。

然后，将温度为 25℃ 的含 0.5mM NPE-笼化 ATP 的 Hepes 缓冲液以 30 μ l/min 的流速瞬时导入射流小池 (6)，这样，在芯片表面，它可与固定化的解旋酶形成新的 ATP-底物复合体。接下来，再将含 0.5mM ADP 的 Hepes 缓冲液导入流动小池，然后，将复合体上结合的 ATP 去笼化，底物 dsDNA 再次以单碱基对方式解旋，然后对单碱基进行测定。

附图给出了序列测定实验的结果，它以反应点 (RU) 对时间 (T;sec) 作图。该图显示了被掺入新生链的每一个核苷酸的检测结果。结果给出的是与靶多核苷酸互补的序列。

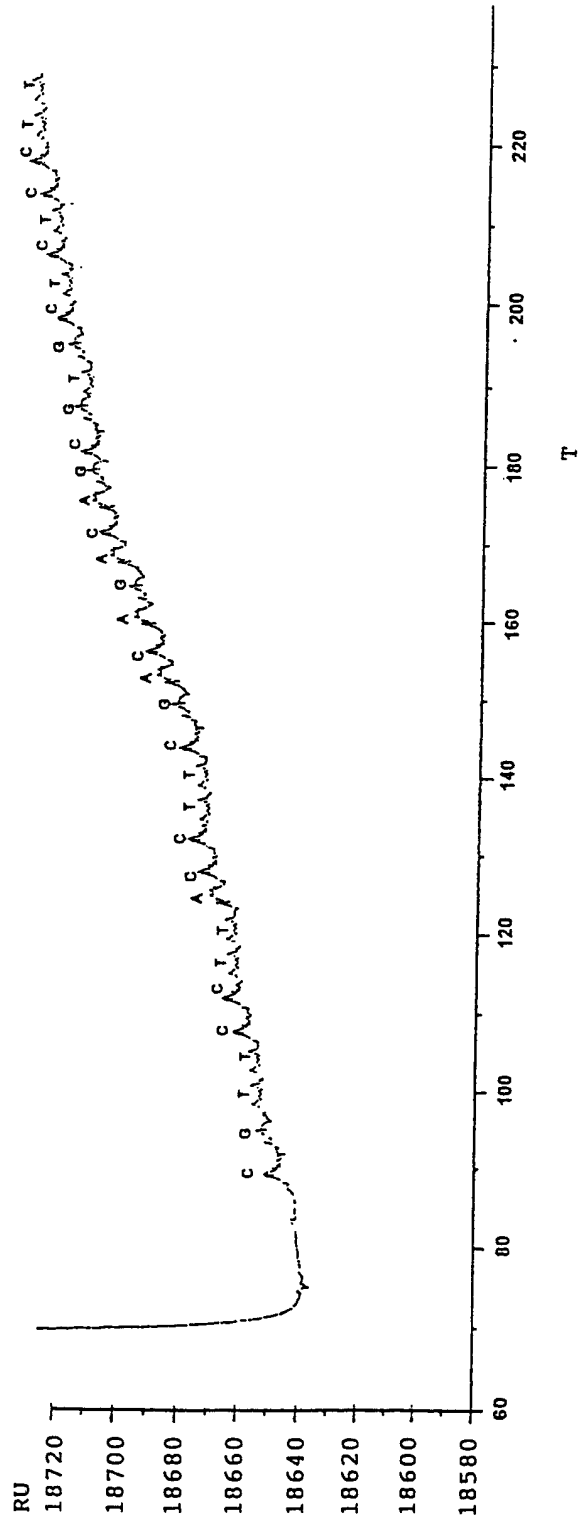


图 1