



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110709514 B

(45) 授权公告日 2024.03.08

(21) 申请号 201880025960.X

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

(22) 申请日 2018.04.19

专利代理人 初明明 林毅斌

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 110709514 A

(51) Int.CI.

C12N 15/10 (2006.01)

(43) 申请公布日 2020.01.17

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

15/491125 2017.04.19 US

WO 2016073990 A2, 2016.05.12

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

WO 2012168307 A2, 2012.12.13

2019.10.18

WO 2016057961 A1, 2016.04.14

(86) PCT国际申请的申请数据

Wujin Sun. Self-Assembled DNA

PCT/US2018/028366 2018.04.19

Nanoclews for the Efficient Delivery of CRISPR-Cas9 for Genome Editing.

(87) PCT国际申请的公布数据

《Angew.Chem.》.2015, 第12197-12201页.

W02018/195313 EN 2018.10.25

Gratz, Scott J.. Highly Specific and Efficient CRISPR/Cas9-Catalyzed Homology-Directed Repair in Drosophila.《Genetics》.2014, 第961-971页.

(73) 专利权人 环球生命科技咨询美国有限责任公司

(续)

地址 美国马萨诸塞州

审查员 熊壮壮

(72) 发明人 J.R.纳尔逊 R.S.达西

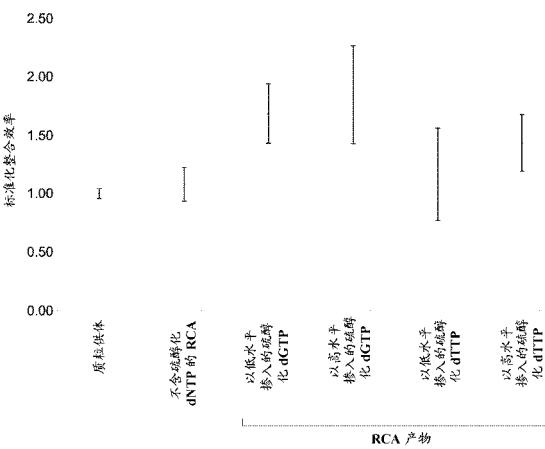
权利要求书2页 说明书19页

P.M.思普奈尔 J.A.席尔
L.A.罗威利 A.J.史密斯

序列表3页 附图8页

(54) 发明名称

使用具有串联重复序列的供体DNA修复模板的位点特异性DNA修饰



(57) 摘要

提供了真核细胞的内源性靶标DNA的位点特异性修饰的方法。该方法包括使具有预定修饰位点的内源性靶标DNA与(i)基因编辑系统和(ii)包含多个串联重复序列的供体DNA修复模板接触,所述基因编辑系统被配置为在预定修饰位点或其附近引入内源性靶标DNA的双链断裂。在该方法中,所述多个串联重复序列中的每一个包含由供体5'侧翼序列和供体3'侧翼序列侧接的外源性供体DNA序列。供体5'侧翼序列和供体3'侧翼序列与内源性靶标DNA中的预定修饰位点的任一侧上的连续DNA序列同源。

CN 110709514 B

[转续页]

[接上页]

(56) 对比文件

Van Trung. Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells.《Nature biotechnology》.2015,第543-548页.

Patrick D. Hsu. Development and

Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering.《Cell》.2014,第1262-1278页.

Kulkarni, A. S.. Stimulation of Homology-Directed Repair at ISceI-Induced DNA Breaks during the Permissive Life Cycle of Human Cytomegalovirus.《Journal of Virology》.2011,第1-2页.

1. 一种真核细胞的内源性靶标DNA的位点特异性修饰的方法,该方法包括:
使具有预定修饰位点的内源性靶标DNA与以下接触:
 - (i) 基因编辑系统,其被配置为在内源性靶标DNA的预定修饰位点或其附近引入双链断裂,和
 - (ii) 供体DNA修复模板,
 - a. 其中所述供体DNA修复模板是滚环扩增(RCA)产物DNA,其包含多个串联重复序列;
 - b. 其中多个串联重复序列中的每一个包含由供体5'侧翼序列和供体3'侧翼序列侧接的外源性供体DNA序列,
 - c. 其中供体5'侧翼序列和供体3'侧翼序列与内源性靶标DNA中的预定修饰位点的任一侧上的连续DNA序列同源,和
 - d. 其中多个串联重复序列中的每一个包含硫醇化核苷酸;和
 - e. 其中RCA产物DNA被加工成单一拷贝DNA片段,随后将其用作供体DNA修复模板。
 2. 根据权利要求1所述的方法,其还包括通过将真核细胞与基因编辑系统和供体DNA修复模板一起孵育,将基因编辑系统和供体DNA修复模板引入真核细胞。
 3. 根据权利要求2所述的方法,其中基因编辑系统和供体DNA修复模板被同时引入真核细胞。
 4. 根据权利要求1所述的方法,其中基因编辑系统选自大范围核酸酶、转录激活物样效应物核酸酶(TALEN)、锌指核酸酶(ZFN)和规律成簇间隔短回文重复序列(CRISPR)-CRISPR-相关系统(Cas)。
 5. 根据权利要求2所述的方法,其中基因编辑系统是CRISPR-Cas9系统。
 6. 根据权利要求5所述的方法,其中引入CRISPR-Cas9系统包括:
使真核细胞与一个或多个DNA构建体一起孵育,所述构建体包含:
 - a) 可在真核细胞中操作的第一调节元件,其可操作地连接到编码包含crRNA序列和tracrRNA序列的指导RNA的核苷酸序列,和
 - b) 可在真核细胞中操作的第二调节元件,其可操作地连接到编码Cas9蛋白的核苷酸序列,其中组分(a)和(b)位于相同或不同的DNA构建体上。
 7. 根据权利要求5所述的方法,其中引入CRISPR-Cas9系统包括将Cas9蛋白和以下任一引入真核细胞:单一指导RNA(sgRNA),或crRNA和tracrRNA的组合。
 8. 根据权利要求1所述的方法,其中外源性供体DNA序列的大小在从10个碱基对至1kb范围内。
 9. 根据权利要求1所述的方法,其中RCA产物DNA是加工的RCA产物DNA或未加工的RCA产物DNA。
 10. 根据权利要求1所述的方法,其中供体DNA修复模板是双链DNA、单链DNA,或单链和双链DNA的组合。
 11. 根据权利要求10所述的方法,其中供体DNA修复模板是单链DNA。
 12. 根据权利要求11所述的方法,其中供体DNA修复模板是包含硫醇化核苷酸的单链RCA产物DNA。
 13. 根据权利要求10所述的方法,其中供体DNA修复模板是包含硫醇化核苷酸的双链RCA产物DNA。

14. 根据权利要求1所述的方法,其中供体DNA修复模板是由多个重复的极简DNA序列组成的单链或双链RCA产物DNA,所述极简DNA序列由供体5'侧翼序列和供体3'侧翼序列侧接的外源性供体DNA序列组成。

15. 根据权利要求1所述的方法,其中内源性靶标DNA的位点特异性修饰包括在双链断裂处将外源性供体DNA序列整合到内源性靶标DNA中。

16. 一种真核细胞的内源性靶标DNA的位点特异性修饰的方法,该方法包括:

将DNA修饰系统和供体DNA修复模板引入包含内源性靶标DNA的真核细胞中,

其中内源性靶标DNA包含用于基因编辑系统引入由5'侧翼序列和3'侧翼序列侧接的双链断裂的靶标位点,

其中供体DNA修复模板是滚环扩增(RCA)产物DNA并且包含多个串联重复序列,其中多个串联重复序列中的每一个包含由供体5'侧翼序列和供体3'侧翼序列侧接的外源性供体DNA序列并且包含硫醇化核苷酸,并且其中RCA产物DNA被加工成单一拷贝DNA片段,随后将其用作供体DNA修复模板,

其中供体5'侧翼序列与内源性靶标序列的5'侧翼序列同源,和供体3'侧翼序列与内源性靶标序列的3'侧翼序列同源,和

从而通过同源定向修复将外源性供体DNA序列在双链断裂处整合到内源性靶标DNA中,以修饰内源性靶标DNA。

17. 根据权利要求16所述的方法,其中供体DNA修复模板是由多个串联重复的极简DNA序列组成的单链或双链RCA产物DNA,其中每个极简DNA序列由供体5'侧翼序列和供体3'侧翼序列侧接的外源性供体DNA序列组成。

18. 根据权利要求16所述的方法,其中外源性供体DNA序列的大小在从10个碱基对至1kb范围内。

使用具有串联重复序列的供体DNA修复模板的位点特异性DNA修饰

[0001] 序列表

[0002] 本申请包括序列表,其已按ASCII格式以电子方式提交,并在此通过引用以其整体并入本文。所述ASCII副本,于2017年4月4日创建,名为315642-1_SL.txt,大小为2,937字节。

发明领域

[0003] 本公开内容一般涉及使用包含多个串联重复序列的供体DNA修复模板,真核细胞中的靶标DNA的位点特异性修饰。本公开内容特别涉及利用滚环扩增 (RCA) 产物DNA,通过双链断裂 (DSB) 修复,真核细胞的内源性靶标DNA的位点特异性修饰。

[0004] 背景

[0005] 工程核酸酶通过靶向细胞的特定DNA序列,作为细胞遗传操作的有力工具而引起了广泛的关注。通过靶向特定的DNA序列,工程核酸酶允许靶向的基因缺失、替换和修复,或将外源性序列(例如转基因)插入到基因组中。例如,具有融合在一起的序列-非特异性DNA核酸内切酶结构域和工程DNA结合结构域的嵌合核酸内切酶通过在基因组中诱导靶向双链断裂 (DSB),能够进行有效和精确的遗传修饰。这样的DSB刺激细胞DNA修复机制,包括非同源末端连接 (NHEJ) 和同源定向修复 (HDR)。然而,为靶向不同的基因组基因座而产生不同类型的嵌合核酸内切酶,既费时又昂贵。反义技术和RNA干扰 (RNAi) 也被用于靶向任意基因进行调控。然而, RNAi 在重要的脱靶效应和毒性方面具有局限性。

[0006] 规律成簇间隔短回文重复序列 (CRISPR) - CRISPR-相关系统 (CRISPR-Cas) 最近已经被探索用于基因组修饰。CRISPR-Cas9作为一种基因编辑工具,主要由于其简单性引起了广泛的关注。例如,II型CRISPR只包含单一Cas9蛋白和两种RNA;成熟CRISPR RNA (crRNA) 和部分互补的反式作用RNA (tracrRNA)。细胞中的靶标DNA的体内或体外位点特异性修饰可以通过用crRNA、tracrRNA,以及Cas9表达载体(例如,编码Cas9蛋白的表达构建体)、Cas9蛋白或Cas9 mRNA中的至少一种共转染细胞来实现。表达Cas9的细胞中的靶标DNA的位点特异性修饰可通过crRNA和tracrRNA的共转染实现。crRNA和tracrRNA也可以融合在一起,生成嵌合的RNA分子,即单一指导RNA (sgRNA),而不影响它在CRISPR-Cas9系统中的功能。在CRISPR-Cas9系统中,通过Cas9在靶标DNA中形成的DSB通过NHEJ和/或HDR途径得到修复。NHEJ途径以高频率发生,但更易于出错。相反,HDR使用供体DNA与受损靶标DNA的序列同源性来修复DNA损伤,从而更准确地用于DSB修复。通过适当选择在DSB处与靶标DNA序列具有较高同源性的供体DNA修复模板,可以进一步使HDR过程无错误。然而,尽管HDR可以用来将非常特异性的突变(例如点突变、缺失或插入)引入靶标DNA中,但与竞争NHEJ相比,它的效率要低得多。

[0007] 特别需要合适的供体DNA修复模板,其允许更容易地精确和高效整合到内源性靶标DNA中的特定位置,并具有最少的脱靶产物。

[0008] 简要描述

[0009] 在一个或多个实施方案中,提供了一种真核细胞的内源性靶标DNA的位点特异性修饰的方法。该方法包括使具有预定修饰位点的内源性靶标DNA与(i)基因编辑系统和(ii)包含多个串联重复序列的供体DNA修复模板接触,所述基因编辑系统被配置为在预定修饰位点或其附近引入内源性靶标DNA的双链断裂。在该方法中,多个串联重复序列中的每一个包含由供体5'侧翼序列和供体3'侧翼序列侧接的外源性供体DNA序列。供体5'侧翼序列和供体3'侧翼序列与内源性靶标DNA中的预定修饰位点的任一侧上的连续DNA序列同源。

[0010] 在一些实施方案中,提供了一种真核细胞的内源性靶标DNA的位点特异性修饰的方法。该方法包括将DNA修饰系统和供体DNA修复模板引入包含内源性靶标DNA的真核细胞中,其中内源性靶标DNA包含用于基因编辑系统引入双链断裂的靶标位点。靶标位点由5'侧翼序列和3'侧翼序列侧接。供体DNA修复模板包含多个串联重复序列,其中多个串联重复序列中的每一个包含由供体5'侧翼序列和供体3'侧翼序列侧接的外源性供体DNA序列,其中供体5'侧翼序列与内源性靶标序列的5'侧翼序列同源和供体3'侧翼序列与内源性靶标序列的3'侧翼序列同源。引入DNA修饰系统和供体DNA修复模板,从而在双链断裂处通过同源定向修复将外源性供体DNA序列整合到内源性靶标DNA中,以修饰内源性靶标DNA。

[0011] 在某些其它实施方案中,提供了一种真核细胞的内源性靶标DNA的位点特异性修饰的方法。该方法包括使具有预定修饰位点的内源性靶标DNA与基因编辑系统和供体DNA修复模板接触。基因编辑系统被配置为在预定修饰位点或其附近引入内源性靶标DNA的双链断裂。供体DNA修复模板包含由供体5'侧翼序列和供体3'侧翼序列侧接的外源性供体DNA序列,并且还包含硫醇化核苷酸。供体5'侧翼序列和供体3'侧翼序列与内源性靶标DNA中的预定修饰位点的任一侧上的连续DNA序列同源。

[0012] 附图

[0013] 当参考附图阅读下面的详细描述时,本发明的这些和其它特征、方面和优点将得到更好理解。

[0014] 图1是说明与作为供体DNA修复模板的质粒DNA比较,具有硫醇化核苷酸的加工的双链RCA产物DNA的整合效率的图。

[0015] 图2是说明与作为供体DNA修复模板的质粒DNA比较,具有硫醇化核苷酸的加工的单链RCA产物DNA的整合效率的图。

[0016] 图3是说明与作为供体DNA修复模板的质粒DNA比较,具有硫醇化核苷酸的加工的双链和单链RCA产物DNA的整合效率的图。

[0017] 图4是说明与作为供体DNA修复模板的质粒DNA比较,具有硫醇化核苷酸的未加工的双链和单链RCA产物DNA的整合效率的图。

[0018] 图5是说明与作为供体DNA修复模板的质粒DNA比较,具有硫醇化核苷酸的双链PCR产物DNA的整合效率的图。

[0019] 图6是说明各种供体DNA修复模板的整合效率的图,所述供体DNA修复模板包括从DNA小环模板生成的具有硫醇化核苷酸的双链RCA产物DNA、从质粒DNA模板生成的具有硫醇化核苷酸的双链RCA产物DNA和质粒DNA。

[0020] 图7是包含TurboGFP基因插入的质粒SEC61B (pHR-EGFP-SEC61B) 的构建体的示意图。

[0021] 图8是包含EGFP基因插入的质粒LMNA (pHR-EGFP-LMNA) 的构建体的示意图。

[0022] 详细描述

[0023] 下面的详细描述是示例性的,并不意图限制本发明或本发明的应用。纵贯说明书,特定术语的举例说明应被视为非限制性实例。单数形式“一”、“一个”或“该”包括复数对象,除非上下文中另外清楚地指明。在本说明书和权利要求书中自始至终使用的近似语言可用于修饰任何可允许变化的量化表示,而不会导致与其相关的基本功能的变化。因此,由术语例如“约”修饰的值不限于指定的精确值。除非另外指明,在本说明书和权利要求书中使用的所有表示成分的量、性质如分子量、反应条件等的数字均应理解为在所有情况下用术语“约”修饰。因此,除非有相反的说明,以下说明书和所附的权利要求书中所列的数值参数都是近似的,其可根据本发明寻求获得的所需性质而变化。在必要的情况下,已经提供了范围,且这些范围包括所有在其之间的子范围。为了更清楚和简明地描述和指出所要求的发明主题,为用于以下描述和所附的权利要求书中的特定术语提供了以下定义。

[0024] 缩写“CRISPR”指规律成簇间隔短回文重复序列。CRISPR也被称为SPIDR - 间隔散在同向重复。CRISPR/SPIDR构成一个DNA基因座家族,其通常由短而高度保守的DNA重复序列(例如,重复达到40次的24-50个碱基对)组成,这些重复序列为至少部分回文性的。重复序列通常是物种特异性的,并被恒定长度(例如,20-58个碱基对)的可变序列间隔。CRISPR基因座也可以编码一种或多种蛋白和一种或多种不翻译成蛋白的RNA。

[0025] 缩写“Cas”指CRISPR-相关系统。II型CRISPR-Cas9系统通常包括Cas9蛋白、反式激活RNA (tracrRNA) 和靶向CRISPR RNA (crRNA)。Cas9蛋白构成一个RNA指导DNA核酸内切酶家族,其依赖于在tracrRNA和crRNA之间形成的碱基配对结构来裂解双链靶标DNA。在天然存在的tracrRNA:crRNA二级结构(例如,化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*))中,在crRNA (42个核苷酸) 的3'-端22个核苷酸与成熟tracrRNA (74个核苷酸) 的5'端附近的片段之间有碱基配对。这种碱基配对创建了一种结构,其中crRNA的5'端20个核苷酸可以在不同的crRNA中变化,并且当crRNA与Cas蛋白结合时可与靶标DNA结合。“CRISPR-Cas”系统是与细菌或古细菌相同或来源于细菌或古细菌并包含至少一种由CRISPR基因座编码或获得的Cas蛋白的系统。例如,化脓性链球菌(*S. Pyogenes*) SF370 II型CRISPR基因座由4种基因构成,包括Cas9核酸酶的基因,以及两种非编码的RNA;tracrRNA和前-crRNA阵列,其包含由相同重复序列间隔的核酸酶指导序列(间隔序列)。

[0026] 缩写“crRNA”指CRISPR RNA。crRNA通常作为单一长RNA从CRISPR阵列组成性转录,其然后在特定的位点被加工。crRNA也可经化学合成。crRNA分子包含DNA靶向片段。crRNA的DNA靶向片段可以被设计成包含一段与靶标DNA位点互补的核苷酸序列(例如,至少10个核苷酸),以便与CRISPR-cas系统结合并随后由CRISPR-Cas系统修饰。crRNA的长度可在从约25个核苷酸至约60个核苷酸的范围内。crRNA也可被设计成包括核糖核苷酸类似物或其修饰形式,或修饰形式的类似物,或非-天然核苷。

[0027] 缩写“tracrRNA”指反式激活crRNA (tracrRNA)。tracrRNA是小反式编码RNA。tracrRNA也可经化学合成。tracrRNA可被设计成包括核糖核苷酸类似物或其修饰形式,或修饰形式的类似物,或非-天然核苷。

[0028] 如本文所用的,术语“单一指导RNA”或“sgRNA”指包含crRNA和tracrRNA的多核苷酸序列。在sgRNA中,crRNA和tracrRNA以其天然形式或者修饰形式存在。sgRNA的长度可以是约60个核苷酸至约120个核苷酸。sgRNA可以使用表达载体表达或经化学合成。合成的

sgRNA可包含核糖核苷酸或其类似物。合成的单一指导RNA也可包含含有非天然核苷间键的修饰骨架。

[0029] 首字母缩略词“PAM”是指前间区序列邻近基序。PAM的长度通常为3-5个核苷酸并位于CRISPR基因序列中的前间区序列附近,非靶向链下游或非靶向链上的3'端。前间区序列是与靶标序列互补的sgRNA或crRNA序列的一部分。PAM序列和位置可以根据CRISPR-Cas系统类型而变化。例如,在化脓性链球菌II型系统中,PAM具有NGG共有序列,其包含两个G:C碱基对并在靶标DNA中的前间区序列-衍生的序列的下游出现一个碱基对。PAM序列存在于靶标DNA(前间区序列)的非互补链上,而PAM的反向互补序列位于靶标DNA序列的5'处。

[0030] 本公开内容提供了用于真核细胞的内源性靶标DNA的位点特异性修饰的方法。在一些实施方案中,通过使用供体核酸和DNA修饰系统来进行真核基因组的修饰。所公开的DNA修饰系统通过在体外或体内插入具有所需水平特异性的供体DNA,可以有效和高效地修饰真核基因组。所公开的DNA修饰方法使用供体DNA模板,其包含多个串联重复序列以确保供体DNA与真核基因组以位点-特异性方式的较高整合效率。在一个或多个实施方案中,DNA修饰系统包括基因编辑系统。

[0031] 一种真核细胞的内源性靶标DNA的位点特异性修饰的方法被提供。该方法包括使具有预定修饰位点的内源性靶标DNA与(i)基因编辑系统和(ii)包含多个串联重复序列的供体DNA修复模板接触,所述基因编辑系统被配置为在预定修饰位点或其附近引入内源性靶标DNA的双链断裂。在该方法中,多个串联重复序列中的每一个包含由供体5'侧翼序列和供体3'侧翼序列侧接的外源性供体DNA序列。供体5'侧翼序列和供体3'侧翼序列与内源性靶标DNA中的预定修饰位点的任一侧上的连续DNA序列同源。

[0032] 真核细胞的内源性靶标DNA的位点特异性修饰可包括修饰真核细胞的至少一个靶标序列。在一些实施方案中,位点特异性修饰包括编辑真核细胞的多个基因。在一些实施方案中,位点特异性修饰包括在真核细胞的基因组中的特定DNA基因座处的至少一个核苷酸取代、插入。这样的位点特异性基因组修饰可用于基因沉默、基因激活或靶标可视化。在一些实施方案中,内源性靶标DNA的位点特异性修饰是具有期望效率的单核苷酸多态性(SNP)。使用SNP的基因编辑可以帮助开发针对多种疾病例如癌症、心血管疾病和糖尿病的新的疾病模型。

[0033] 在一些实施方案中,包含内源性靶标DNA的真核细胞提取物可与供体DNA修复模板和基因编辑系统接触,以促进内源性靶标DNA的位点特异性修饰。在一些实施方案中,真核细胞中的内源性靶标DNA与基因编辑系统和供体DNA修复模板接触,以促进真核细胞中的内源性靶标DNA的位点特异性修饰。在这样的实施方案中,基因编辑系统和供体DNA修复模板从外部被引入真核细胞(例如通过转染、转导或微注射),以使基因编辑系统、供体DNA修复模板和内源性靶标DNA共定位在细胞内。在一些实施方案中,供体DNA修复模板和基因编辑系统的至少一个组分可被引入真核细胞,该真核细胞包含作为真核细胞基因组的一部分的所述基因编辑系统的其余组分。在某些其它实施方案中,基因编辑系统的所有组分和供体DNA修复模板从外面被引入真核细胞,以使内源性靶标DNA与基因编辑系统和供体DNA修复模板接触,以有利于真核细胞的内源性靶标DNA的位点特异性修饰。

[0034] 基因编辑系统和供体DNA修复模板可同时或者顺序地引入真核细胞。在一些实施方案中,基因编辑系统或基因编辑系统的一个或多个组分和供体DNA修复模板被同时引入

真核细胞。在这样的实施方案中,当DSB由基因编辑系统生成时,理想的是希望供体DNA修复模板存在于修复位点。这有助于利用DSB修复的HDR途径,因为当在供体DNA修复模板的不存在下创建DSB时,细胞更可能易于通过NHEJ进行DNA修复。在某些实施方案中,基因编辑系统的一个或多个组分和供体DNA修复模板被同时引入真核细胞,其中相同基因编辑系统的剩余组分已存在于真核细胞中(例如,编码基因编辑系统的蛋白质组分的基因可以在真核基因组中预先存在或者预先整合)。在引入一个或多个组分时,在真核细胞内形成一个完全功能的基因编辑系统,以将DSB在预定修饰位点或其附近引入。例如,在CRISPR-Cas系统中,crRNA和tracrRNA可与供体修复模板一起被引入真核细胞,其中Cas 9基因已被整合到真核基因组中。在备选方面,单一指导RNA (sgRNA) 可与供体DNA修复模板一起被引入Cas9整合的真核细胞,以促进内源性靶标DNA的定点修饰。

[0035] 在某些其它实施方案中,完整的基因编辑系统或基因编辑系统的一个或多个组分和供体DNA修复模板被顺序引入真核细胞。在一些这样的实施方案中,可在供体DNA修复模板被引入真核细胞之前,引入基因编辑系统。在一些这样的实施方案中,可在引入供体DNA修复模板之后,将基因编辑系统引入真核细胞。

[0036] 在一些实施方案中,通过使真核细胞与基因编辑系统和供体DNA修复模板一起孵育,将基因编辑系统和供体DNA修复模板引入真核细胞。供体DNA修复模板和基因编辑系统可以通过用于将外部分子引入真核细胞的任何一种技术引入真核细胞,包括但不限于转染和转导。在一些实施方案中,供体DNA修复模板通过转染来引入。例如,可以使用编码Cas9和sgRNA的质粒并连同供体DNA修复模板一起转染真核细胞,以促进内源性靶标DNA的位点特异性修饰。在某些其它实施方案中,通过使用病毒构建体介导的转导,将供体DNA修复模板和/或sgRNA引入细胞。例如,将CRISPR/Cas9组分传递给许多很难转染的人类细胞类型,可通过病毒转导来实现。病毒转导的一个例子是腺相关病毒 (AAV) 介导的转导。在某些其它实施方案中,慢病毒传递可被用于引入供体DNA修复模板以供基因编辑。例如,慢病毒DNA构建体可用作锌指核酸酶 (ZFN) 蛋白的载体,在细胞系和原代细胞中提供有效的靶向基因断裂。ZFN蛋白与供体DNA被共包装在慢病毒颗粒中,ZFN蛋白和供体DNA修复模板可被共同传递以供同源定向修复,导致靶向供体DNA修复模板插入和基因修饰。

[0037] 本文公开的基因编辑系统能够在内源性靶标DNA中引入DSB。可以以各种方式在真核细胞中构建完整的基因编辑系统,以在其内源性靶标DNA中有效地产生双链断裂。在一些方面,基因编辑系统的不同组分可被共转染至真核细胞,并在真核细胞内用作单一基因编辑系统,以将DSB引入内源性靶标序列。例如,CRISPR/Cas基因编辑系统被配置为在预定修饰位点或其附近引入内源性靶标DNA的双链断裂。在CRISPR-Cas系统中,单一指导RNA或两种RNA (crRNA和tracrRNA) 和Cas9基因可被共转染至细胞并用作完整的CRISPR-Cas系统。在某些其它实施方案中,配对的gRNA可与Cas9蛋白一起使用,以在内源性靶标DNA中产生双链断裂。在一些其它实例中,CRISPR-Cas系统的crRNA和tracrRNA可在表达Cas9的真核细胞中共转染。这些不同的方法被用来将DSB引入内源性靶标DNA中。此外,在CRISPR-Cas系统中,用两种RNA与Cas 9表达构建体、Cas9蛋白或者Cas9 mRNA一起共转染细胞,已显示在体内和体外诱导靶标DNA的双链断裂,以及随后的位点特异性修饰。

[0038] 在一些实施方案中,DSB是在内源性靶标DNA的预定修饰位点生成的。在预定修饰位点的DSB处插入供体DNA修复模板。在CRISPR-Cas基因编辑系统的情况下,在一些实施方

案中,由于靶向序列(即crRNA)或PAM序列的序列互补性,内源性靶标DNA在预定修饰位点被Cas9以高特异性裂解。

[0039] 在某些其它实施方案中,DSB位点和预定修饰位点可以是不同的。在这些实施方案中,DSB可在预定修饰位点附近的内源性靶标DNA中产生。例如,在CRISPR-Cas系统中,由于内源性靶标DNA序列的定位是PAM-依赖的,因此不可能总是将预期的修饰位点紧邻着DSB位点。在这样的实施方案中,预定修饰位点可以位于距DSB位点一定距离的位置。如果DSB位点与预定修饰位点之间的距离小于100 bp核苷酸,则使用供体DNA修复模板的HDR定向DNA修复通常实现可接受的效率。“bp核苷酸”在下文中被称为“bp”(碱基对)。DSB可以在预定修饰位点的上游序列,或在预定修饰位点的下游序列生成。在一些实施方案中,内源性靶标DNA的预定修饰位点距DSB位点的距离小于10 bp核苷酸。在某些其它实施方案中,DSB位点和预定修饰位点之间的距离在20 bp内。在某些其它实施方案中,DSB位点和预定修饰位点之间的距离在20 bp至100 bp之间。在某些实施方案中,内源性靶标DNA的预定修饰位点可能距DSB位点的距离大于100 bp(例如,1000 bp或更多)。一般来说,当DSB和预定修饰位点之间的距离较长时,供体DNA修复模板的插入可能会以较低的整合效率发生。DSB和预定修饰位点之间的最佳距离也可能是物种-依赖的。

[0040] 在一些实施方案中,基因编辑系统选自大范围核酸酶、转录激活物样效应物核酸酶(TALEN)、锌指核酸酶(ZFN)和规律成簇间隔短回文重复序列(CRISPR)-CRISPR-相关系统(Cas)。大范围核酸酶、ZFN和TALEN已被广泛应用于各种不同细胞类型和生物体的基因组编辑。大范围核酸酶是天然存在的限制酶的工程化版本,其通常具有延长的DNA识别序列(例如,14-40 bp)。ZFN和TALEN是由与来自FokI限制酶的非特异性核酸酶结构域融合的工程化DNA结合结构域组成的人工融合蛋白。锌指和具有定制的特异性的TALEN重复结构域,可以一起连接到与延长的DNA序列结合的阵列中。由于这些酶的DNA识别和裂解功能在单一的结构域内缠结在一起,所以大范围核酸酶的工程化一直是具有挑战性的。

[0041] 在一些实施方案中,基因编辑系统是CRISPR-Cas9系统,和真核细胞的内源性靶标DNA的位点特异性修饰的方法包括引入CRISPR-Cas9系统。在一些实施方案中,引入CRISPR-Cas9系统包括使真核细胞与一个或多个DNA构建体一起孵育,所述构建体包含:a)可在真核细胞中操作的第一调节元件,其可操作地连接到编码包含crRNA序列和tracrRNA序列的指导RNA的核苷酸序列,和b)可在真核细胞中操作的第二调节元件,其可操作地连接到编码Cas9蛋白的核苷酸序列,其中组分(a)和(b)位于相同或不同的DNA构建体上。在一些实施方案中,真核细胞的内源性靶标DNA的位点特异性修饰的方法还可包括通过向真核细胞中引入包含crRNA序列和tracrRNA的指导RNA(sgRNA)和Cas9蛋白,引入CRISPR-Cas9系统。在这样的实施方案中,引入真核细胞的指导RNA可以是单一指导RNA(sgRNA,在单个RNA分子中包含crRNA序列和tracrRNA序列),或单独的crRNA和tracrRNA的组合。

[0042] 供体DNA修复模板在同源重组的过程中用作模板。供体DNA修复模板是线性DNA序列。供体DNA修复模板可以是单链、双链或单链和双链DNA的组合。在一些实施方案中,供体DNA修复模板是单链DNA。在一些实施方案中,单链供体DNA修复模板是滚环扩增(RCA)产物。在某些其它实施方案中,供体DNA修复模板是双链DNA。在一些实施方案中,双链供体DNA修复模板是滚环扩增(RCA)产物。

[0043] 供体DNA修复模板是包含多个串联重复序列的多联DNA,其可以通过将供体DNA修

复模板插入到预定修饰位点处或其附近来修复内源性靶标DNA序列。供体DNA修复模板包含两个同源臂,和外源性供体DNA序列。在外源性供体DNA序列的任一侧上构建供体DNA修复模板的同源臂。供体DNA修复模板的同源臂在此被称为供体5'-侧翼序列和供体3'-侧翼序列。5'侧翼序列是左侧同源臂和3'侧翼序列是右侧同源臂。供体DNA修复模板的多个串联重复序列中的每一个包含由供体5'侧翼序列和供体3'侧翼序列侧接的外源性供体DNA序列。

[0044] 供体5'-侧翼序列通常与crRNA靶标序列上游的序列同源或可与crRNA靶标序列部分或完全重叠。或者,供体3'-侧翼序列通常与crRNA靶标序列下游的序列同源或可与crRNA靶标序列部分或完全重叠。在一些实施方案中,供体DNA修复模板可被引入Cas9-诱导的DSB-位点,以使DSB-位点的序列集中在具有供体5'侧翼序列和供体3'侧翼序列的供体DNA修复模板内。供体DNA修复模板可用于修复、插入、缺失或替换。例如,供体DNA修复模板可被用于序列的修饰和/或引入单点突变和/或直到~20,000 bp突变序列。

[0045] 利用供体DNA序列作为修复模板,通过同源重组,可将在供体DNA中编码的遗传信息转移到真核基因组的内源性靶标DNA序列中。在一些情况下,供体DNA修复模板的序列基本上可以与要替换的内源性靶标DNA序列的部分相同,但一个核苷酸除外,这个核苷酸是不同的,并且在同源重组时导致了点突变的引入。在一些方面,供体DNA修复模板的序列基本上可与要替换的内源性靶标DNA序列的部分相同,除了它可以由先前不存在于内源性靶标DNA序列中的另外序列或基因组成之外。供体DNA修复模板与内源性靶标DNA序列的长度、碱基组成和相似性取决于内源性靶标DNA序列需要如何修饰。

[0046] 通过同源重组整合到真核细胞基因组DNA中的供体DNA修复模板可被不同的特征表征。所述特征可包括:(i) 供体DNA序列,其由供体5'-侧翼序列在上游(5'端)侧接和由供体3'-侧翼序列在下游(3'端)侧接,(ii) 供体5'-侧翼序列可不同于供体3'-侧翼序列,(iii) 供体5'-侧翼序列和供体3'-侧翼序列的每一个与预定修饰位点的任一侧上的连续DNA序列同源。然而,对于同源重组,侧翼序列和DSB的任一侧上的连续DNA序列之间的同源性不必为100%。在一些实施方案中,供体5'-侧翼序列和供体3'-侧翼序列是存在于基因编码区的任一侧上的非编码序列,其包含各种调节序列。

[0047] 在一些实施方案中,供体DNA修复模板包含多个串联重复序列,其中多个串联重复序列中的每一个包括一个或多个修饰的核苷酸。修饰的核苷酸可包括它们的核碱基的修饰或糖-磷酸酯部分的修饰。修饰的碱基可以通过利用扩增反应随机地引入到DNA骨架中,例如使用滚环扩增(RCA)反应或聚合酶链反应(PCR)。例如,α-硫代磷酸化核苷酸可通过在RCA或PCR反应中使用α-硫代磷酸化核苷酸而包括在DNA中。在一些实施方案中,供体DNA修复模板的多个串联重复序列中的每一个包含一个或多个硫代磷酸化修饰的核苷酸。术语“硫代磷酸化修饰的核苷酸”在此通常被称为“硫醇化核苷酸”。在一些实施方案中,供体DNA修复模板是包含一个或多个硫醇化核苷酸的单链DNA。在某些其它实施方案中,供体DNA修复模板是包含一个或多个硫醇化核苷酸的双链DNA。

[0048] 供体DNA修复模板的总长度包括供体5'侧翼序列和供体3'侧翼序列(同源臂)的长度和外源性供体DNA序列的长度。在一个或多个实施方案中,外源性供体DNA序列的大小是在从约10个碱基对至约10 kb的范围内。在一些实施方案中,供体DNA修复模板的大小是在从约100 bp至约200 bp的范围内。在一些实施方案中,每个串联重复序列的外源性供体DNA序列的大小为至少1 kb。

[0049] 外源性供体DNA序列的任一侧上的供体5'侧翼序列和供体3'侧翼序列可具有相同的长度或不同的长度。在一个或多个实施方案中,预定修饰位点的任一侧上的供体5'侧翼序列和供体3'侧翼序列的长度在从约40 bp至约80 bp范围内。在某些其它实施方案中,预定修饰位点的任一侧上的供体5'侧翼序列和供体3'侧翼序列在从约50 bp至约60 bp范围内。在示例性实施方案中,供体DNA修复模板的长度在从约100 bp至约200 bp范围内,其中预定修饰位点的任一侧上的供体5'侧翼序列和供体3'侧翼序列各自为至少40 bp。对于较大的插入物,可以使用包含供体5'侧翼序列和供体3'侧翼序列的供体DNA修复模板,每个侧翼序列各自为800 bp或更大。本方法的例子使用SEC61B基因靶(图7),其中供体DNA修复模板具有714 bp的Turbo GFP插入物、各自1,004个核苷酸的供体5'侧翼序列和供体3'侧翼序列。在说明的例子中,Turbo GFP与SEC61B基因的整合导致产生位于内质网(ER)中的GFP融合蛋白。本方法的另一个例子利用LMNA基因靶(图8),其中供体DNA修复模板具有750 bp的EGFP插入物、577 bp的供体5'侧翼序列和450 bp的供体3'侧翼序列。在说明的例子中,LMNA基因中EGFP插入物的整合导致位于细胞核中的GFP融合蛋白。

[0050] 在一个或多个实施方案中,供体DNA修复模板是滚环扩增(RCA)产物DNA。RCA导致多联串联重复DNA序列。供体DNA修复模板可以是单链RCA产物或双链RCA产物。多个多联串联重复序列的每个串联重复单位包括供体5'侧翼序列和供体3'侧翼序列和外源性DNA序列。RCA可被用来产生单链和双链形式的大的DNA供体(~ 1,000 bp)。与传统质粒相比,当在HDR中用作供体DNA修复模板时,RCA产物DNA显示出增加的整合效率和更好的易用性(如实例2-5,图1-3、5-6中所示)。

[0051] 用作基因编辑的供体DNA模板的RCA产物DNA可被加工,或者可以未加工的形式使用。RCA产物DNA的“加工”可包括限制性消化、化学变性、热变性、自裂解、酶促裂解的行为,或感兴趣的RCA产物DNA的纯化。在一些实施方案中,RCA产物可用作供体DNA修复模板,而不经任何纯化。在一些实施方案中,在将RCA产物用作供体DNA修复模板之前,其不经受任何种类的限制性消化或自裂解以形成较小的片段。在某些其它实施方案中,在使用RCA产物作为供体DNA修复模板之前,其不经过任何化学变性或热变性来使RCA产物DNA变性。在一些实施方案中,RCA产物被转染或引入真核细胞,而无需任何进一步的加工。

[0052] 在一个或多个实施方案中,供体DNA修复模板是包含硫醇化核苷酸的单链RCA产物。在一些实施方案中,供体DNA修复模板是包含硫醇化核苷酸的双链RCA产物DNA。在一些这样的实施方案中,向RCA反应混合物中补充硫醇化dNTP,以形成含硫醇化核苷酸的RCA产物。硫醇化dNTP可包括,但不限于,cc-S-dGTP、a-S-dCTP、cc-S-dATP和cc-S-dTTP。硫醇化dNTP例如cc-S-dATP或a-S-dTTP可被加入到dNTP混合物中,以便在RCA反应中随机掺入硫醇化碱基,以产生RCA产物DNA的修饰DNA骨架。

[0053] 当与非硫醇化RCA产物相比时,包含硫醇化核苷酸的RCA产物DNA在体外或体内增加供体DNA修复模板与真核基因组的整合效率。例如,dsRCA供体DNA与硫醇化碱基的整合效率比无硫醇化碱基的RCA产物的效率更高,如图1中所示。此外,在另一个例子中,含硫醇化碱基的ssRCA供体DNA比不含硫醇化碱基的RCA产物的效率显示出相对更高的整合效率(图2)。在另一个例子中,通过掺入硫醇化dATP和硫醇化dCTP到PCR扩增产物中分别增加整合效率约10%和12%,如图5中所示。

[0054] 在某些实施方案中,供体DNA修复模板是单链或双链RCA产物DNA,其基本上由极简

DNA序列的多个串联重复序列组成。极简DNA序列基本上由供体5'-侧翼序列和供体3'-侧翼序列侧接的外源性供体DNA序列组成。极简DNA序列至少包括由供体5'-侧翼序列和供体3'-侧翼序列侧接的外源性供体DNA序列。此外,它可能含有不实质影响HDR修饰真核细胞的内源性靶标DNA的序列。RCA产物的极简DNA序列不包括任何可能对真核细胞的内源性靶标DNA的修饰产生负面影响的另外的序列。例如,主要由极简DNA序列的多个串联重复序列组成的供体DNA修复模板没有细菌繁殖所需的序列。例如,RCA产物DNA排除任何无关的序列,例如复制起点、抗生素选择基因、多克隆位点,或通常用于在宿主细胞中克隆、选择、筛选和/或复制的任何其它附属序列。此类无关序列在RCA产物DNA (供体DNA修复模板) 中的存在可对供体DNA修复模板的整合效率产生重大影响。此外,在RCA产物DNA (供体DNA修复模板) 中这些无关序列的存在导致被掺入宿主细胞中的可能性低。使用极简DNA序列消除了一些与使用编码基因的DNA (如抗生素抗性和复制起点) 有关的问题。此外,使用极简表达序列提高供体DNA修复模板的特异性活性。使用极简表达序列也减少了与体内靶标DNA修饰事件相关的安全性问题。

[0055] 在一个或多个实施方案中,RCA产物是由DNA小环作为模板生成的,其中DNA小环基本上是由极简DNA序列组成的。在一些实施方案中,DNA小环的极简DNA序列由供体5'侧翼序列和供体3'侧翼序列侧接的外源性供体DNA序列组成。RCA产物可以是线性的或分支的多联体,包括从DNA小环中衍生的极简DNA序列的串联重复序列。DNA小环仅包括极简DNA序列并排除极简DNA序列以外的任何序列,例如细菌繁殖所需的任何无关序列。在一个实施方案中,包含极简DNA序列的RCA线性多联体是双链的。在另一个实施方案中,包含极简DNA序列的RCA线性多联体是单链的。

[0056] 一种真核细胞的内源性靶标DNA的位点特异性修饰的方法被提供。该方法包括将DNA修饰系统和供体DNA修复模板引入包含内源性靶标DNA的真核细胞,其中内源性靶标DNA包含用于基因编辑系统引入双链断裂的靶标位点。靶标位点被5'侧翼序列和3'侧翼序列侧接。供体DNA修复模板包含多个串联重复序列,其中多个串联重复序列中的每一个包含由供体5'侧翼序列和供体3'侧翼序列侧接的外源性供体DNA序列。供体5'侧翼序列与内源性靶标序列的5'侧翼序列同源,和供体3'侧翼序列与内源性靶标序列的3'侧翼序列同源。引入DNA修饰系统和供体DNA修复模板,从而使外源性供体DNA序列通过同源定向修复在双链断裂处整合到内源性靶标DNA中,以修饰内源性靶标DNA。在此采用的供体DNA修复模板是基本上由极简DNA序列的多个串联重复序列组成的单链或双链RCA产物DNA。每个极简DNA序列基本上由供体5'侧翼序列和供体3'侧翼序列侧接的外源性供体DNA序列组成。在这样的实施方案中,外源性供体DNA序列的大小在从10个碱基对到10 kb的范围内。

[0057] 一种真核细胞的内源性靶标DNA的位点特异性修饰的方法被提供。该方法包括使具有预定修饰位点的内源性靶标DNA与基因编辑系统和供体DNA修复模板接触。基因编辑系统被配置为在预定修饰位点或其附近引入内源性靶标DNA的双链断裂。供体DNA修复模板包含由供体5'侧翼序列和供体3'侧翼序列侧接的外源性供体DNA序列,其中供体5'侧翼序列和供体3'侧翼序列与内源性靶标DNA中的预定修饰位点的任一侧上的连续DNA序列同源,且其中供体DNA修复模板还包含硫醇化核苷酸。

[0058] 该方法使用的供体DNA修复模板可以是聚合酶链反应(PCR)扩增产物DNA或RCA产物DNA。在一些实施方案中,供体DNA修复模板是包含至少一个硫醇化核苷酸的PCR扩增产

物。在一些实施方案中,该方法包括使存在于真核细胞提取物中的内源性靶标DNA与基因编辑系统和供体DNA修复模板接触。在某些其它实施方案中,该方法包括通过使真核细胞与基因编辑系统和供体DNA修复模板一起孵育,将基因编辑系统和供体DNA修复模板引入真核细胞,以在真核细胞内的内源性靶标DNA中引入DSB。使用PCR产物DNA作为供体修复模板,不同的基因编辑系统可用于内源性靶标DNA的位点特异性修饰。合适的基因编辑系统包括,但不限于,大范围核酸酶、转录激活物样效应物核酸酶(TALEN)、锌指核酸酶(ZFN)和规律成簇间隔短回文重复序列(CRISPR) - CRISPR-相关系统(Cas)。在一个实施方案中,基因编辑系统是CRISPR-Cas9系统,内源性靶标DNA的位点特异性修饰包括在双链断裂处或在双链断裂附近的位置将外源性供体DNA序列整合到内源性靶标DNA中。

[0059] 真核细胞的内源性靶标DNA的位点特异性修饰通过同源定向修复(HDR)来进行。HDR利用序列同源性修复内源性靶标序列上的DNA损伤或断裂。由于供体DNA修复模板中受损的供体链与完整的供体链之间需要较高的序列同源性,因此HDR对基于DSB的修复途径是更准确的。如果用于修复的供体DNA修复模板与DSB任一侧的内源性靶标DNA序列的同源臂具有相同序列,则基因修饰过程变得没有错误,否则它可以在受损DNA中引入非常特定的突变(例如点突变、缺失或插入)。

[0060] 实施例:

[0061] 除非另有规定,实施例中描述的成分可从普通化学品供应商经市售获得。实施例部分中使用的一些缩写扩展如下:“mg”:毫克;“ng”:毫微克;“pg”:微微克;“fg”:毫微微克;“mL”:毫升;“mg/mL”:毫克每毫升;“mM”:毫摩尔浓度;“mmol”:毫摩尔;“pM”:皮摩尔浓度;“pmol”:皮摩尔;“μL”:微升;“min.”:分钟和“h.”:小时。

[0062] 材料和方法:

[0063] 材料:Cas-9整合的细胞系(U20S-Cas9细胞、HEK293T-Cas9细胞)、CRISPR RNA (crRNA)、反式激活crRNA (tracrRNA)、质粒SEC61B (EGFP) 和LMNA (EGFP) (其被用作RCA反应的模板) 和DharmaFECTTM DUO转染试剂(在图中缩写为DUO) 从Dharmacon, GE Healthcare获得。微量离心管和96孔细胞培养板从Fisher Scientific获得。dNTP和随机六聚体引物从GE Healthcare Life Sciences (Piscataway, NJ, USA) 获得和 α -硫醇-dNTP的Sp异构体(例如Sp-dTTPaS、Sp-dGTPaS、Sp-dATPaS和Sp-dCTPaS) 从Biolog - Life Science Institute (Bremen, Germany) 获得。Phi29 DNA聚合酶(1 mg/ml) 从Enzymatics (Beverly, MA, USA) 获得。寡核苷酸(例如用于PCR的正向和反向引物,用于RCA的引物) 购自Integrated DNA Technologies (IDT Inc, Iowa, USA)。LongAmp[®] Taq PCR试剂盒、T4 DNA连接酶、限制酶PvuI、HindIII、BamHI和BglII,和核酸外切酶(λ 核酸外切酶和核酸外切酶I) 从New England Biolabs[®] (NEB Inc., MA, USA) 获得。MEM-RS (减血清培养基)、Hanks平衡盐溶液(HBSS)、HEPES购自HyClone, GE Healthcare (Utah, US) 和Tris缓冲液pH 8从Ambion[®] (MA, US) 获得。D-葡萄糖购自Sigma Aldrich (MO, USA), 和10% FBS购自Thermo Fisher Scientific (MA, USA)。

[0064] 按照制造商的指示,将crRNA和tracrRNA在10 mM Tris (pH 8) 中重新悬浮(100 μ M)。10 mM Tris (pH 8.0) 从1 M Tris (pH 8) 的储备液(Ambion[®], MA, US) 制备。包含10% 胎牛血清(FBS) 和2 mM L-谷氨酰胺的高葡萄糖DMEM用于培养细胞。对于流式细胞术,采用包含Hanks平衡盐溶液(HBSS) 加20 mM HEPES (pH 8)、16.8 mM D-葡萄糖和10% FBS的培养

基。用于制备为了基因编辑的PCR DNA和RCA DNA修复模板的较低水平和较高水平的dNTP的Sp-异构体和dNTP混合物是1:400 (低水平) 和1:40 (高水平) 比例。

[0065] 细胞培养:

[0066] 采用贴壁细胞系U20S-Cas9和HEK293T-Cas9进行了以下实验,以评价供体多核苷酸(例如RCA供体DNA)的效率。在第0天,在细胞培养基-处理的96-孔板中接种细胞。U20S-Cas9细胞系的接种密度是每孔 15×10^3 个细胞,和HEK293T细胞系的接种密度是每孔 10×10^3 个细胞。这些细胞被允许于37°C、在5% CO₂孵化器中放置过夜,以诱导细胞附着在96-孔板的孔内表面。在第1天,培养的细胞用于细胞转染实验。制备转染混合物,将培养基从细胞抽出,然后将转染混合物添加到细胞。

[0067] 实施例1:使用RCA产物DNA或质粒DNA作为供体DNA修复模板的基因编辑

[0068] RCA产物DNA和供体质粒(100 ng/μl)均在10mM Tris (pH 8.0)中制备。crRNA和tracrRNA的2.5μM储备液分别在10 mM Tris (pH 8.0)中制备。基因编辑实验的对照和实验样品如表1所示制备。只含MEM (无转染对照或NTC,样品1号)、转染试剂(样本2号)、转染试剂和crRNA:tracr RNA (指导RNA或gRNA) (无供体DNA修复模板,样品3号)和转染试剂和供体DNA修复模板(无指导RNA,样品4号)的样品被用作阴性对照。阳性对照含有含GFP插入物的供体质粒DNA (SEC61B或LMNA) (样品5号),或者使用供体质粒作为模板产生的供体RCA产物DNA (样品6号)作为在转染试剂和gRNA的存在下的供体DNA修复模板。在样品5和6中,供体质粒DNA或供体RCA产物DNA的最终浓度是200 ng/孔。使用6个单独的微量离心管,按下表1所示混合试剂。将DharmaFECT™ DUO储备溶液在MEM-RS中稀释,并将稀释的DharmaFECT™ DUO在室温(30°C)下孵育5分钟,然后加入相应的孔中。在各孔中都使用35 μL稀释的DharmaFECT™ DUO进行转染。在加入稀释的DharmaFECT™ DUO后,将每孔中的混合物在30°C下孵育20分钟。除供体DNA修复模板外的试剂组合物的混合物以下被称为“转染混合物”。

[0069] 表1:用于供体DNA序列的基因编辑和插入的试剂组合物

样品	试验条件	MEM-RS (μ l)	10 mM Tris, pH8.0 (μ l)	DharmaFECT TM DUO/MEM-RS (μ l)	cr/tracrRNA (2.5 μ M 储液) (μ l)	供体 DNA 修复 模板(μ l)
[0070]	1 NTC	59.5	10.5	0	0.0	0.0
	2 DhamaFECT TM DUO	24.5	10.5	35	0.0	0.0
	3 DhamaFECT TM DUO + cr/tracr RNA	24.5	7	35	3.5	0.0
	4 DhamaFECT TM DUO +供体质粒	24.5	3.5	35	0.0	7.0
	5 DhramFECT TM DUO +供体质粒 + cr/tracr RNA	24.5	0	35	3.5	7.0
	6 DhamaFECT TM DUO +供体 RCA 产物 DNA + cr/tracr RNA	24.5	0	35	3.5	7.0

[0071] 减血清最低必需培养基 (MEM-RS) 在其应用于细胞培养前被带入室温。在细胞培养的第1天,从细胞吸出细胞培养基。将来自如表1所示的每个样品1-6的20 μ L试剂组合物用280 μ L DMEM培养基稀释,形成转染混合物。然后将100 μ L转染混合物按一式三份加入到细胞中。按照试验条件,在5% CO₂的存在下,将含细胞的96-孔板(重复3孔)于37℃培养。每天观察细胞的汇合,一旦细胞接近汇合,将细胞传代。在第7天(U20S细胞)或第8天(HEK细胞),将细胞用<100 μ E的胰蛋白酶进行胰蛋白酶消化,然后抽吸培养基。用流式细胞术培养基(如上文所示)稀释悬浮液中的细胞,获得最终体积>200 μ E。

[0072] 将200 μ L的各个细胞样品加入到96孔板中并使用流式细胞术分析。测量了总共50,000次事件,和/或运行了样品60秒。由于RCA产物供体DNA修复模板和质粒供体DNA修复模板包含GFP插入物,因此对GFP阳性细胞的百分比进行了量化,以评估基因编辑效率。附图表示标准化的GFP百分比或GFP百分比,其中GFP百分比是GFP阳性的细胞在总细胞群中的百分比,如实施例描述中所指定的。

[0073] 细胞样品使用CytoFLEXTM S (Beckman Coulter) 流式细胞仪分析。根据样品中的总细胞计数,在200-400 μ L缓冲液中稀释细胞。对细胞浓度进行优化,以使细胞浓度高到足以获得足够的信号,同时浓度低到足以在流式细胞仪的精确范围内读出。流式细胞仪通过从分析中删除所有非细胞碎片来突出显示所有被认为是细胞的事件。此外,从总细胞样品中解析出所有的GFP阳性细胞。从总细胞群计算GFP细胞百分比。GFP阳性细胞的强度可以从总细胞群以及GFP阳性细胞亚群来测量。

[0074] 实施例2:具有硫醇化核苷酸的加工的双链RCA产物DNA的整合效率

[0075] 质粒DNA的滚环扩增(RCA)

[0076] 试剂的制备:质粒DNA模板的RCA产生具有串联重复序列的高分子量、高分支的多联体。RCA试剂,包括水、反应缓冲液、引物和phi29酶,在加入连接模板和dNTP之前都进行了

预清洁,以尽量减少脱靶扩增。通过使引物-核苷酸混合物与核酸外切酶I、核酸外切酶III和单链DNA结合蛋白(SSB蛋白)的组合一起孵育,使包含核酸外切酶抵抗引物和核苷酸(dNTP)的引物-核苷酸溶液(引物-核苷酸混合物)去污染。含有DNA聚合酶的酶混合物通过与二价阳离子(例如,Mg²⁺)任选在核酸外切酶的存在下(如果使用DNA聚合酶,则包括非校对阅读DNA聚合酶)一起孵育来去污染。使用这样的去污染的酶混合物和引物-核苷酸混合物进行质粒DNA模板的扩增。例如,使包含200 ng Phi29 DNA聚合酶的聚合酶溶液与0.1单位的核酸外切酶III一起在包含15 mM KC1、20 mM MgCl₂、0.01% Tween-20和1 mM TCEP的5 μL 50 mM HEPES缓冲液(pH=8.0)中孵育。在30°C孵育约60 min或在4°C孵育12 h。将去污染的Phi29 DNA聚合酶溶液转移到冰浴中,然后在靶标RCA测定中使用,而不需要事先灭活核酸外切酶III。

[0077] 用于生成dsRCA产物的引物:用随机六聚体(SEQ. ID. No. 7)扩增双链RCA供体的质粒DNA模板。

[0078] dNTP和修饰的dNTP:使用来自质粒DNA模板的RCA反应制备单链(ssRCA)或双链(dsRCA)产物。双链和单链RCA供体二者使用一套完整的传统dNTP,或使用传统dNTP和α-硫醇-dNTP的Sp异构体(例如Sp-dTTPaS、Sp-dGTPaS、Sp-dATPaS和Sp-dCTPaS)的混合物合成。α-硫醇-dNTP的Sp异构体在这里可互换地作为a-S-dNTP使用。例如,40:1比例的传统dATP与Sp-ATPaS,以及其它3种传统dNTP包括在扩增中。

[0079] 质粒DNA模板:质粒SEC61B (pHR-EGFP-SEC61B) 包含EGFP基因的插入物,而质粒LMNA (pHR-EGFP-LMNA) 包含EGFP基因的插入物。对于pHR-EGFP-SEC61B,将10毫微克(10 ng)的质粒DNA加入到反应混合物中,以在0.8 mM的随机六聚体存在下生成dsRCA产物。

[0080] 模板DNA的制备:通过使质粒DNA进行碱性变性,首先在EDTA存在下用碱使质粒DNA变性。为了变性,将含有约22 μg再悬浮的质粒DNA模板的体积与0.4 N氢氧化钠和0.4 M EDTA的等体积在管中混合。于室温下孵育5分钟后,将3 M乙酸加入管中以使最终浓度为0.4 M,接着加入乙醇至最终浓度为总体积的75%。然后在干冰-乙醇浴中孵育管30分钟。沉淀的质粒DNA通过于室温(30°C)和在大于20,000倍的重力下离心30分钟来收集。将离心后得到的质粒DNA沉淀用约500 μl的冰冷的70% (v/v)乙醇洗涤,并在室温(30°C)和大于20,000倍的重力下再离心15分钟。再离心后,将变性的质粒DNA再悬浮于水中,用分光光度法测定浓度。用变性的质粒DNA在同一天进行RCA反应,得到ssRCA产物。为了通过扩增产生ssRCA,将模板质粒DNA以变性的形式使用,以使特异的寡核苷酸引物能够退火到质粒DNA模板。在产生双链RCA (dsRCA) 产物的情况下,使用非变性质粒DNA模板和较小的随机六聚体。

[0081] RCA方法:在产生ssRCA和dsRCA二者的扩增反应之前,将相应的模板DNA与扩增引物(例如随机六聚体)一起在含有10 mM Tris (pH 8)和50 mM氯化钠的缓冲液中,于50°C孵育10分钟,以将引物退火到相应的模板DNA。在含有50 mM HEPES (pH 8)、20 mM氯化镁、75 mM氯化钾、0.01% (v/v) Tween 20、1 mM TCEP和2.5% (v/v) 聚乙二醇的缓冲液中,完成了生成ssRCA和dsRCA二者的扩增反应。扩增反应混合物还包含2 μg Phi29 DNA聚合酶和800 μM的每一种dNTP。测试传统dNTP与α-硫醇-dNTP的Sp异构体的比例,其分别包括4:1、40:1和400:1。在Sp异构体中,在α-磷酸酯的S位上,非桥接氧之一被硫替代。后缀“p”表示R/S命名涉及磷。于30°C孵育扩增反应物18小时。在孵育结束时,反应混合物中的Phi29 DNA聚合酶通过于60°C加热反应混合物20分钟来灭活。

[0082] RCA产物的浓缩:在加入0.1体积的3 M乙酸钠和2.5体积的无水乙醇后,通过于室温下(30°C)孵育30分钟,使来自各个扩增反应的RCA产物DNA (ssRCA和dsRCA产物)沉淀。沉淀的RCA产物DNA通过于室温(30°C)和大于20,000倍的重力下离心30分钟来收集。将各DNA沉淀用约500 μ l的冰冷的70% (v/v)乙醇洗涤,并在室温(30°C)和大于20,000倍的重力下再离心15分钟。从沉淀吸出上清液,将各沉淀立即再悬浮在包含10 mM Tris (pH 8)、0.1 mM EDTA和0.01% (v/v) Tween 20的缓冲液(TET缓冲液)中。用分光光度法测定扩增的DNA的浓度,并将其在TET缓冲液中稀释至100 ng/ μ l以供转染。

[0083] 用于转染的dsRCA供体DNA制备:

[0084] dsRCA产物DNA作为长的多联体或在使用核酸内切酶进行限制性消化后转染。多联的dsRCA产物经历使用Pvu I的限制性消化,以产生线性单一拷贝DNA片段。在此提及的单一拷贝DNA片段是一个串联重复序列的单一序列。来自串联重复序列的单一序列使用限制酶(例如PvuI)对RCA进行限制性消化而形成。将dsRCA样品在37°C下孵育18小时,用于PvuI限制。在完全消化后,加工的DNA样品如上文所述进行乙醇沉淀,并再悬浮在TET缓冲液中。在乙醇沉淀后,使dsRCA扩增产物再悬浮于150 μ l TET缓冲液中。在此步骤后,收集10微升悬浮的dsRCA,用DNA凝胶电泳进行分析。其余140 μ l悬浮的dsRCA在含有150单位的Pvu I的适当缓冲液中如上所述进行消化。

[0085] 与作为供体的质粒DNA(对照)比较,具有硫醇化核苷酸的滚环扩增(RCA) dsDNA(试验)的整合效率使用基因编辑系统测定。向转染混合物加入100毫微克的各供体DNA,保持所有其它参数不变。如实施例1中所述,产生双链串联重复RCA DNA (dsRCA),并用限制性核酸内切酶(例如Pvu I、Hind III)处理。硫醇化dNTP和非-硫醇化正常dNTP的混合物在扩增反应期间被使用。将硫醇化dNTP以不同水平,例如(硫醇化dNTP: dNTP) 1:40 (高水平)和1:400 (低水平)掺入dsRCA产物中。U20S Cas9整合细胞系和SEC61p基因靶被用于转染。测定了硫醇化骨架对硫醇化dsRCA供体通过同源定向修复途径(HDR)的整合的影响。

[0086] 具有硫醇化的dsRCA供体DNA的整合效率高于没有硫醇化的RCA产物的效率。通过使用利用硫醇化-dGTP产生的dsRCA供体DNA,注意到整合效率达到两倍提高。此外,没有硫醇化的RCA产物的整合效率与用作对照的质粒供体相当。如图1中所示,具有硫醇化核苷酸(以不同的水平)的dsRCA供体DNA的整合效率的标准化值高于作为供体的质粒DNA。质粒DNA被用作对照供体。相同质粒被用作RCA的模板,以产生dsRCA供体DNA。通过使用流式细胞术跟踪GFP阳性细胞百分比来评价整合效率。将每个供体DNA的整合效率相对于作为对照并将整合效率视为1的质粒供体DNA的效率进行标准化。使用U20S Cas9整合细胞系和SEC61p基因靶的三次重复转染实验的平均值显示于图1中。误差条表示不同实验之间的标准偏差。

[0087] 实施例3:具有硫醇化核苷酸的加工的单链RCA产物DNA的整合效率

[0088] 质粒DNA模板:质粒pHR-EGFP-SEC61B (SEC61B)包含TurboGFP基因的插入物,而质粒LMNA (pHR-EGFP-LMNA)包含EGFP基因的插入物。将质粒pHR-EGFP-SEC61B和质粒pHR-EGFP-LMNA的500 ng质粒DNA加入到反应混合物中(最终体积100 μ l),用于产生ssRCA产物。

[0089] 如实施例2中所述,对质粒DNA进行碱性变性,接着再悬浮,以制备用于RCA反应的模板DNA,以产生ssRCA产物DNA。在用于产生ssRCA的扩增反应之前,将模板DNA与扩增引物在50°C,在含有10 mM Tris (pH 8)和50 mM氯化钠的缓冲液中一起孵育10分钟,以将引物退火到相应的模板DNA。在退火反应中使用10皮摩尔的引物进行扩增,以生成ssRCA。如实施

例2所述,对扩增反应的试剂进行预处理。用缓冲液、酶、dNTP和修饰的dNTP以及在实施例2中所述的其它试剂进行扩增反应,以产生ssRCA。如实施例2所述浓缩扩增的ssRCA DNA。用分光光度法测定扩增DNA的浓度,并将其在TET缓冲液中稀释至100 ng/μl以供转染。

[0090] 用于生成ssRCA产物的引物:利用如在表2中所列的寡核苷酸序列(SEQ. ID. No. 1-4)执行质粒DNA的扩增,以产生单链RCA供体。用序列特异性引物从永久变性质粒DNA模板中扩增DNA。在退火反应中使用10皮摩尔的引物,进行扩增以产生ssRCA。

[0091] 表2:用于RCA的代表性寡核苷酸引物序列

[0092]

SEQ ID No.	用于	序列
1	pSEC-Hd-F	5'-[ACT CTG CTT GAA AGC TT*T *A]-3'
2	pSEC-Hd-R	5'-[TAA AGC TTT CAA GCA GA*G *T]-3'
3	pSEC-Pvu-F	5'-[GGT CCT CCG ATC GTT G*T*C]-3'
4	pSEC-Pvu-R	5'-[GAC AAC GAT CGG AGG A*C*C]-3'
5	SEC61B反向Phos	5'-PO3-[CTA AGA GCT TTG GTA TCC CCC]-3'
6	SEC61B正向	5'-[C*T*G* C*AA CTT TAA ATG GGC CC]-3'
7	dsRCA随机六聚体	5'-[NNNNNN*N*]-3'
8	SEC61B正向	5'-[GCGCGCGCTAGCCGATCGATTACACGATCATTGACTGCAACTTAAATGGGCC]-3'
9	SEC61B反向	5'-[GCGCGCACTAGTCTAAGAGCTTGGTATCCCC]-3'
10	LMNA正向	5'-[GCGCGCGCTAGCCGATCGATTACACGATCATTGAAGTGCTGAGCAGGAG]-3'
11	LMNA反向	5'-[GCGCGCACTAGTCCACCATTCCCTATATCCTCC]-3'

[0093] 用于转染的ssRCA供体DNA的制备

[0094] ssRCA产物DNA作为长的多联体或在使用核酸内切酶进行限制性消化后转染。多联的ssRCA产物经历使用Pvu I的限制性消化,以产生单一拷贝DNA片段,如在实施例2中所述。ssRCA DNA样品在37°C下孵育18小时,用于Pvu I限制。完全消化后,加工的DNA样品如在实施例1中所述进行乙醇沉淀,并再悬浮于TET缓冲液中。在乙醇沉淀后,使ssRCA扩增产物再悬浮于50 μl TET缓冲液中。使用DNA凝胶电泳分析5微升悬浮的ssRCA。需要对ssRCA DNA进行以下处理,以消化串联重复RCA DNA,产生双链DNA限制性位点来使DNA造成缺口。将剩余45 μl悬浮的ssRCA加入到30皮摩尔的20碱基脱氧核糖寡核苷酸(oligo)序列中,所述序列与ssRCA产物上适当的限制性位点互补并以其为中心,用于使ssRCA产物DNA与20-碱基oligo序列退火。退火后,在Pvu I的存在下,ssRCA DNA: 20-碱基oligo杂交体于37°C孵育18小时。Pvu I处理的ssRCA DNA: 20-碱基oligo杂交体如上所述进行乙醇沉淀,并再悬浮于35 μl TET缓冲液中。一旦再悬浮,用分光光度法测定ssRCA的DNA浓度。与作为供体的质粒DNA(对照)比较,使用基因编辑系统测定具有硫醇化核苷酸的滚环扩增(RCA) ssDNA(试验)的整合效率。向转染混合物中加入100毫微克的各ssRCA供体DNA,保持所有其它参数不变。供体质粒被用作RCA的模板,以产生RCA供体DNA。串联重复ssRCA DNA(ssRCA供体DNA)被产生并经限制性核酸内切酶进行限制性消化,如在实施例1中所述。在扩增反应期间,使用dNTP和硫醇化dNTP的混合物。硫醇化核苷酸以不同水平(1:40-高水平、1:400-低水平)掺入ssRCA产物中,以评价硫醇化骨架对硫醇化ssRCA供体DNA通过同源定向修复途径(HDR)的整合的影响。U20S Cas9整合细胞系和SEC61p基因靶被用于转染。

[0095] 图2表示使用U20S Cas9整合细胞系和SEC61p基因靶的单次转染实验,误差条显示三个重复孔之间的标准偏差。结果表明,仅需要单链RCA供体DNA以通过HDR掺入供体DNA。具有硫醇化的ssRCA供体DNA的整合效率相对于没有硫醇化的RCA产物的效率更高。通过使用

利用硫醇化-dGTP产生的ssRCA供体DNA,注意到对于低水平(1:400)和高水平(1:40)的硫醇化二者,ssRCA的整合效率达到两倍提高。实施例3确定与作为对照的超螺旋质粒DNA供体比较,使用ssRCA DNA供体的硫醇化碱基的作用。

[0096] 实施例4:具有硫醇化核苷酸的加工的双链和单链RCA产物DNA的整合效率

[0097] 使用基因编辑系统,测定与作为供体的质粒DNA (对照)比较,具有硫醇化核苷酸的RCA DNA (试验),无论是单链还是双链的整合效率。串联重复dsRCA DNA和ssRCA DNA分别如实施例2和3中所述制备。向转染混合物中加入100毫微克dsRCA和ssRCA供体DNA,保持所有其它参数不变。供体质粒被用作RCA的模板,以产生RCA供体。串联重复dsRCA和ss RCA DNA经历使用Pvu I的限制性消化,如在实施例2中所述,以产生单一拷贝RCA供体DNA。硫醇化dNTP以不同水平掺入RCA产物中,以评价硫醇化骨架对供体DNA通过同源定向修复途径(HDR)的整合的影响。U20S Cas9整合细胞系和SEC6ip基因靶被用于转染。

[0098] 测定与作为供体的质粒DNA比较,具有dNTP和硫醇化dNTP的混合物的片段化RCA DNA的增加的效率。dsRCA供体DNA显示出比ssRCA供体DNA更高的整合效率,但有极少的例外。与具有未硫醇化dNTP的片段化RCA供体DNA相比,当使用具有硫醇化dNTP的片段化RCA供体DNA时,显示出标准化整合效率的提高。使用低(1:400)和高(1:40)水平的硫醇化二者,使用硫醇化-dNTP产生ssRCA和dsRCA供体DNA。图3显示出使用U20S Cas9整合细胞系和SEC6ip基因靶进行2次重复转染实验的平均值,误差条显示了平均标准偏差。ssRCA DNA的数据代表了有义链和反义链的2次重复实验结果的平均值。

[0099] 实施例5:具有硫醇化核苷酸的未加工的单链和双链RCA产物DNA的整合效率

[0100] 与作为供体的质粒DNA (对照)比较,使用基因编辑系统,测定具有硫醇化核苷酸的未加工的多联ssRCA和dsRCA DNA (试验)的整合效率。向转染混合物中加入100毫微克各多联ssRCA供体DNA和dsRCA供体DNA,保持所有其它参数与实施例2-4相同。供体质粒被用作RCA的模板,以产生作为供体DNA的ssRCA和dsRCA。如实施例1中所述,使用Pvu I限制性核酸内切酶产生具有串联重复序列的多联ssRCA供体DNA和dsRCA供体DNA。硫醇化dNTP以不同水平(1:40、1:400)掺入ssRCA产物和dsRCA产物中。测定了硫醇化骨架对供体DNA通过同源定向修复途径(HDR)的整合的影响。U20S Cas9整合细胞系和SEC6ip基因靶被用于转染。

[0101] 具有硫醇化的多联ssRCA供体DNA和dsRCA供体DNA二者的整合效率与没有硫醇化的dsRCA和ssRCA产物二者的效率以及与质粒DNA进行比较。dsRCA供体DNA显示出比单链RCA供体DNA更高的整合效率,但有极少的例外。串联重复dsRCA供体DNA和ssRCA供体DNA的整合效率与在用作HDR的模板时的超螺旋质粒供体DNA的效率相当。dsRCA和ssRCA供体DNA比质粒DNA更低的整合效率可能是由于培养细胞的变异、细胞传递效率低下或用于HDR的RCA供体DNA的能力降低。图4表示了使用U20S Cas9整合细胞系和SEC6ip基因靶的两次重复转染实验的平均值。误差条显示了平均标准偏差。ssRCA数据代表了有义链和反义链各自2次重复实验结果的平均值。

[0102] 实施例6:含或不含硫醇化核苷酸的双链PCR供体的整合效率

[0103] 作为用于基因编辑转染的供体DNA的PCR DNA的制备:聚合酶链反应 (PCR) 被用来制备用于转染实验的模板。这些模板使用一套完整的dNTP或者dNTP和 α -硫醇-dNTP的Sp异构体的混合物(例如,40:1比例的dATP与Sp-ATP-a-S)合成。各dNTP或dNTP和 α -硫醇-dNTP的混合物在PCR中的最终浓度是300 μ M。使用dNTP或不同比例的dNTP和 α -硫醇-dNTP的各PCR

按一式三份制备。正向引物是SEC61B正向λ抗性引物 (SEQ. ID No. 6), 而反向引物是SEC61B反向Phos (SEQ. ID No. 5), 如在表2中所列的。各引物以0.5 μM的浓度包括在PCR中。

[0104] 制备了含有除dNTP/a-S-dNTP以外的所有组分的整体混合物。将整体混合物的48.5 μl等分液加入到在冰上孵育的单个管中, 并将1.5 μl适当的dNTP/a-S-dNTP混合物加入到适当的管中。各dNTP/a-S-dNTP混合物按一式三份制备。封盖管, 混合和放置在预热的热循环仪中。

[0105] 按照生产商的指示, 使用LongAmp® Taq PCR试剂盒执行PCR。热循环模式包括: 1) 94°C 30秒, 2) 94°C 15秒, 3) 45°C 15秒, 4) 65°C 10分钟, 5) 步骤#2再29次, 6) 65°C 10分钟和最后7) 于+4°C维持反应。PCR扩增产物通过琼脂糖凝胶电泳分析(数据未显示)。将完成的各重复的PCR合并。使用在1X TBE缓冲液中制备的1%琼脂糖凝胶, 通过电泳分析各合并的重复, 用1:200稀释的SYBR金染色, 并在Typhoon扫描仪上显示。

[0106] 从dsDNA PCR产物制备ssDNA: 用琼脂糖凝胶电泳分析DNA后, 将PCR反应混合物按总反应混合物的体积大致分成两半(各~75 μl)。将λ核酸外切酶(5单位)加入到每份分开的反应混合物中。将核酸外切酶I(10单位)添加到分开的反应混合物的剩余部分中。所有的限制性消化混合物先在37°C下孵育1小时, 然后在80°C下孵育20分钟。在加入0.1体积的3 M乙酸钠和2.5体积的无水乙醇后, 通过在室温下放置30分钟沉淀来自各消化的DNA。沉淀的DNA通过在室温和大于20,000倍的重力下离心30分钟来收集。各DNA沉淀用约500 μl冰冷的70% (v/v)乙醇洗涤, 并在规定的温度和g-力下再离心15分钟。从沉淀吸出上清液, 将各沉淀再悬浮在包含10 mM Tris (pH 8)、0.1 mM EDTA和0.01% (v/v) Tween 20的缓冲液(TET缓冲液)中。用分光光度法测定PCR扩增的DNA的浓度, 并将PCR扩增的DNA在TET缓冲液中稀释至100 ng/μl以供转染。

[0107] 使用基因编辑系统, 与作为供体的质粒DNA(对照)比较, 测定dsPCR产物DNA(试验)的整合效率。向转染混合物中加入100毫微克PCR供体DNA, 保持所有其它参数与实施例2-4相同。供体质粒DNA被用作PCR的模板, 以产生PCR产物供体DNA。按照标准方案产生双链PCR产物DNA。dNTP和硫醇化dNTP的混合物以不同水平(例如高水平1:40, 低水平1:400)掺入PCR产物中, 以确定硫醇化骨架对供体DNA通过HDR的整合的影响。与超螺旋质粒DNA(作为对照)和非-硫醇化双链PCR产物DNA相比, 测定了具有硫醇化碱基的双链PCR产物DNA的整合效率。U20S Cas9整合细胞系和SEC61P基因靶被用于转染。

[0108] 图5表示了使用U20S Cas9整合细胞系和SEC61P基因靶的单次转染实验的结果, 误差条显示了用于转染的三次重复样品之间的标准偏差。图5的结果表明, 至少通过掺入硫醇化dATP和硫醇化dCTP到PCR扩增产物中, 作为供体DNA的整合效率分别提高了约10%和12%。在这项实验中, 在指导RNA的不存在下加入供体DNA, 以进一步测定GFP-标记的供体DNA的背景荧光。超螺旋质粒DNA(对照)所示的背景荧光在存在或不存在硫醇化的情况下, 对于线性PCR产物DNA几乎是无法检测到的。

[0109] 实施例7: 在硫醇化核苷酸的存在或不存在下从DNA小环产生的双链RCA供体DNA的整合效率

[0110] DNA小环模板的生成:

[0111] 通过PCR使用供体DNA质粒合成线性双链DNA。在供体DNA的侧翼同源臂上设计引

物,在5'和3'两个末端具有独特的限制性位点(分别为NheI和SpeI),如表2所示(SEQ. ID. No. 8-11)。为了建立DNA小环,dsDNA被两种核酸内切酶消化,以产生互补的粘性突出。这种消化的DNA使用T4 DNA连接酶连接。限制性消化和连接步骤按顺序(例如在不同的管中)或同时(例如在同一管中),使用含有20 U SpeI、10 U NheI、400 U T4连接酶、1 mM ATP、100 µg/mL牛血清白蛋白(BSA)、100 mM NaCl、10 mM MgCl₂、50 mM Tris-HCl (pH 7.5)和10 mM 二硫苏糖醇(DTT)的反应混合物进行。所有连接产物(DNA小环)随后用核酸外切酶I和核酸外切酶III处理,以消化任何剩余的线性DNA片段。通过将连接产物在80°C孵育20 min,使核酸外切酶热灭活。经热灭活核酸外切酶后,使用Phi29 DNA聚合酶,将5 µL (25 ng DNA)的完全连接反应物直接用于等温RCA反应。

[0112] DNA小环的扩增

[0113] DNA小环模板的RCA产生了串联重复的极简表达序列的高分子量、超分支多联体。如实施例2所述,在加入连接模板和dNTP之前,对RCA试剂(包括水、反应缓冲液、引物和phi29酶)进行了预清洁,以尽量减少脱靶扩增。用这种去污染的酶混合物和引物-核苷酸混合物进行了DNA小环的扩增。例如,包含200 ng Phi29 DNA聚合酶的聚合酶溶液与0.1单位的核酸外切酶III一起在包含15 mM KC1、20 mM MgCl₂、0.01% Tween-20和1 mM TCEP的5 µL 50 mM HEPES缓冲液(pH=8.0)中孵育。于30°C孵育约60 min或于4°C孵育12 h。将去污染的Phi29 DNA聚合酶溶液转移到冰浴中,然后用于靶标RCA检测,而不预先灭活核酸外切酶III。

[0114] 用于从DNA小环生成dsRCA产物的引物、dNTP和修饰的dNTP:使用随机六聚体(SEQ. ID No. 7)扩增DNA小环。使用一套完全的传统dNTP,或通过使用传统dNTP和α-硫醇-dNTP的Sp异构体(例如Sp-dTTPaS、Sp-dGTPaS、Sp-dATPaS和Sp-dCTPaS)的混合物,从DNA小环模板合成RCA供体DNA。例如,40:1比例的传统dATP与Sp-ATPaS(高水平)或400:1的传统dATP与Sp-ATPaS(低水平),加上其它3种传统dNTP包括在扩增中。

[0115] 通过将去污染的引物-核苷酸混合物和去污染的酶混合物与DNA小环模板在30°C下一起孵育约400 min,进行DNA扩增反应。扩增反应混合物包含40 µM引物、400 µM dNTP(dATP、dCTP、dGTP、dTTP各400 µM)或400 µM的修饰的dNTP和传统dNTP的混合物;1 pg DNA小环和200 ng phi29 DNA聚合酶。在含有15 mM KC1、20 mM MgCl₂、0.01% (v/v) Tween-20、1 mM TCEP的50 mM HEPES缓冲液(pH = 8.0)中孵育反应混合物。在孵育结束时,反应混合物中的Phi29 DNA聚合酶通过于65°C加热该反应混合物10分钟来灭活。

[0116] 硫醇化核苷酸对从DNA小环模板产生的dsRCA供体DNA的整合效率的影响

[0117] 测定了硫醇化碱基对从质粒DNA模板生成的dsRCA供体DNA或从合成制得的DNA小环模板生成的dsRCA供体DNA的整合效率的影响。在这个实施例中,超螺旋质粒DNA、线性化质粒DNA、DNA小环和线性化DNA小环被用作对照。将100毫微克的各供体DNA加入到转染混合物中,保持所有其它参数不变。超螺旋质粒DNA和合成的小环DNA被用作RCA的模板,以产生dsRCA供体DNA。HEK293T Cas9整合细胞系被用于转染。如在方法中所述产生dsRCA DNA。将硫醇化dNTP以不同水平(1:40, 1:400)掺入RCA产物中,以评价硫醇化骨架对dsRCA供体DNA通过HDR的整合的影响。

[0118] 图6表示了使用HEK293T Cas9整合细胞系和LMNA基因靶的单次转染实验,误差条显示了用于转染的三次重复样品之间的标准偏差。供体DNA的整合效率与GFP阳性细胞的百

分比相关。将使用合成的小环DNA作为模板产生的dsRCA供体DNA的整合效率与使用质粒DNA作为模板产生的RCA供体DNA进行比较。硫醇化核苷酸以不同水平(1:40-高水平,1:400-低水平)掺入RCA产物中,以评价硫醇化骨架对硫醇化RCA供体DNA通过同源定向修复(HDR)途径的整合效率的影响。图6显示了使用来自合成的小环DNA的RCA产物作为供体DNA修复模板的用途,其中合成的小环DNA包含HDR发生所必需的序列,并且不包含任何额外的DNA构建体序列,例如克隆和/或在细菌细胞中繁殖所需的序列。

序列表

<110> NELSON, JOHN RICHARD	
SMITH, ANJA	
SCHIEL, JOHN	
SPOONER, PATRICK MCCOY	
LOWERY, LISA	
DUTHIE, ROBERT	
<120> 使用具有串联重复序列的供体 DNA 修复模板的位点特异性 DNA 修饰	
<130> 315642-1	
<140>	
<141>	
<160> 11	
<170> PatentIn version 3.5	
<210> 1	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成引物	
<400> 1	
actctgcttg aaagcttta	19
<210> 2	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成引物	
<400> 2	
taaaggcttc aagcagagt	19
<210> 3	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成引物	
<400> 3	
ggtcctccga tcgttgtc	18
<210> 4	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成引物	
<400> 4	
gacaacgatc ggaggacc	18

<210> 5	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成引物	
<400> 5	
ctaagagctt tggtatcccc c	21
<210> 6	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成引物	
<400> 6	
ctgcaactt aaatggggcc	20
<210> 7	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成引物	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222> (1)..(6)	
<223> a, c, t, g, 未知或其它	
<400> 7	
nnnnnn	6
<210> 8	
<211> 56	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成引物	
<400> 8	
gcgcgcgcta gccgategga ttacacgatc attcgactgc aactttaat gggccc	56
<210> 9	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成引物	
<400> 9	
gcgcgcacta gtctaagagc tttggtatcc ccc	33
<210> 10	
<211> 52	

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成引物	
<400> 10	
gcgcgcgcta gccgatcgga ttacacgatc attcgaagtg ctgagcaggc ag	52
<210> 11	
[0003] <211> 34	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成引物	
<400> 11	
gcgcgcacta gtccccaccat tccttatatc ctcc	34

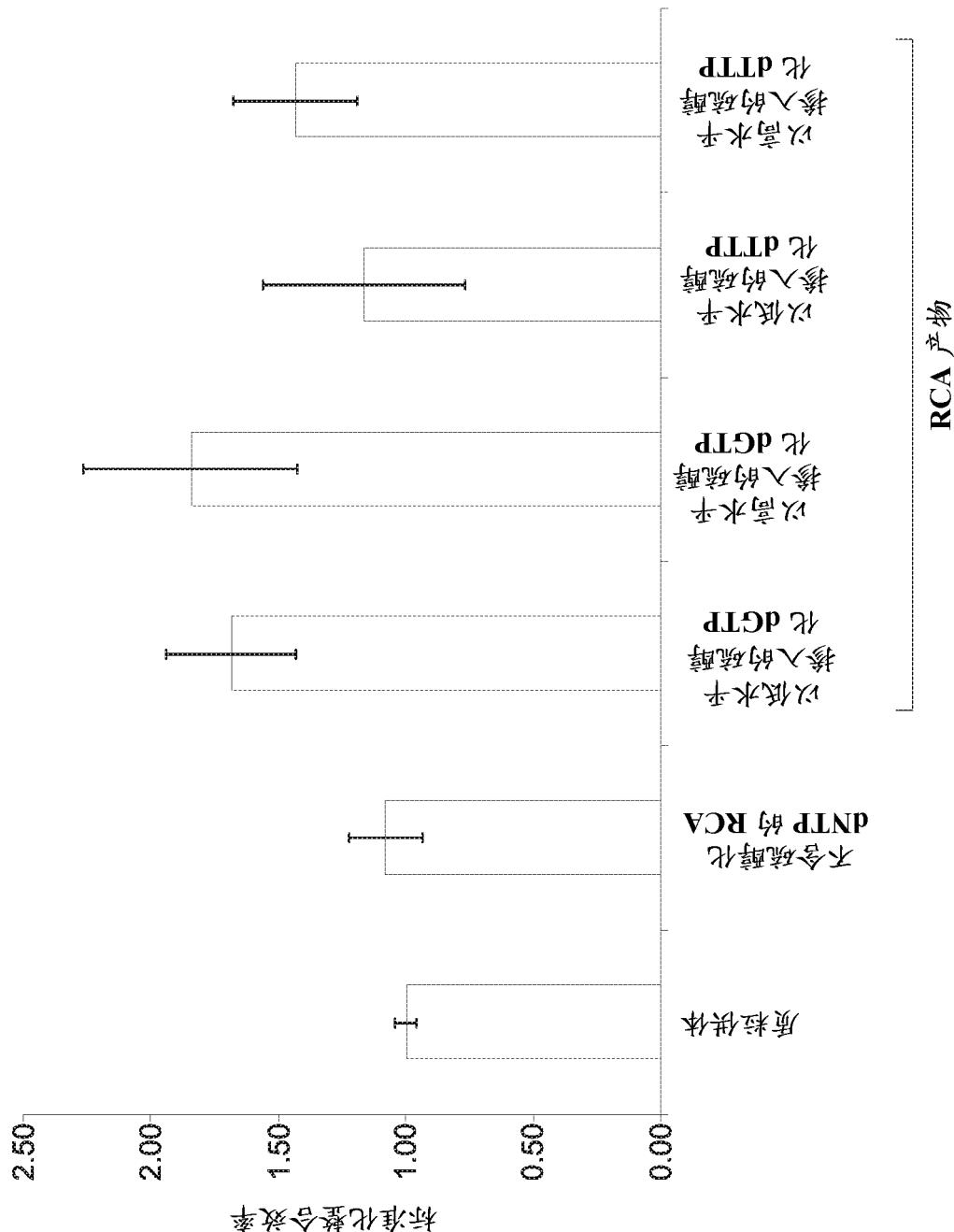


图 1

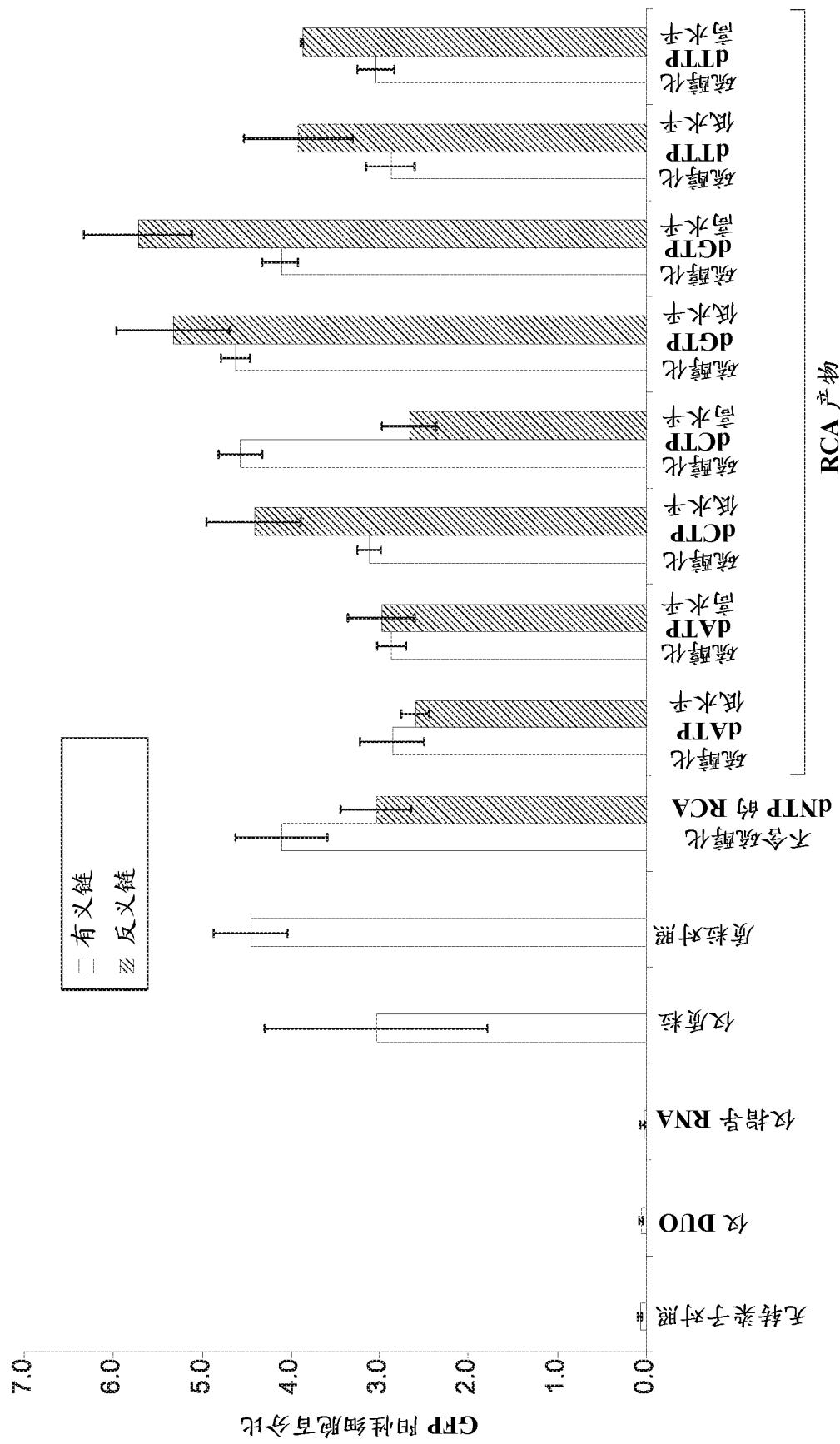


图 2

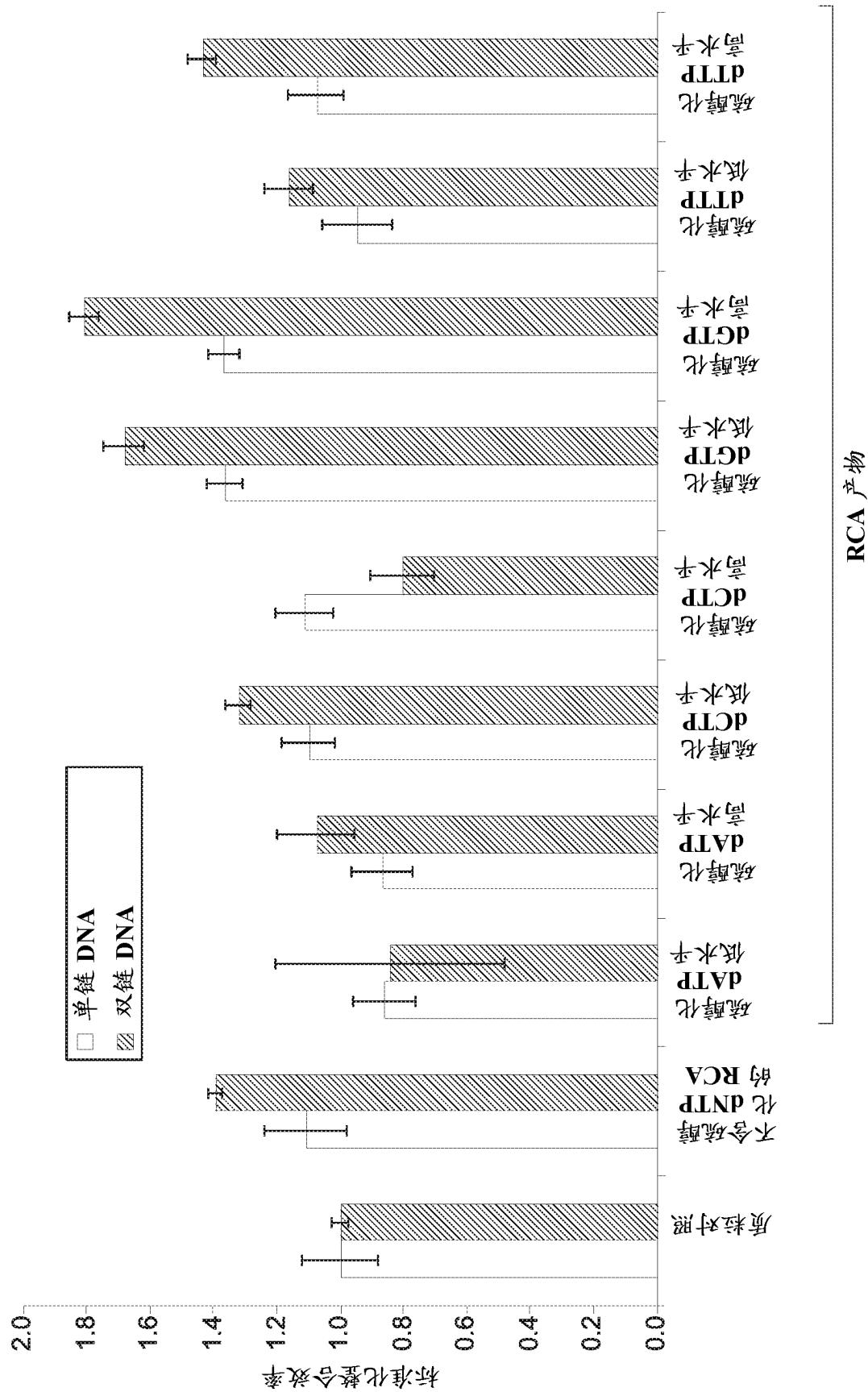


图 3

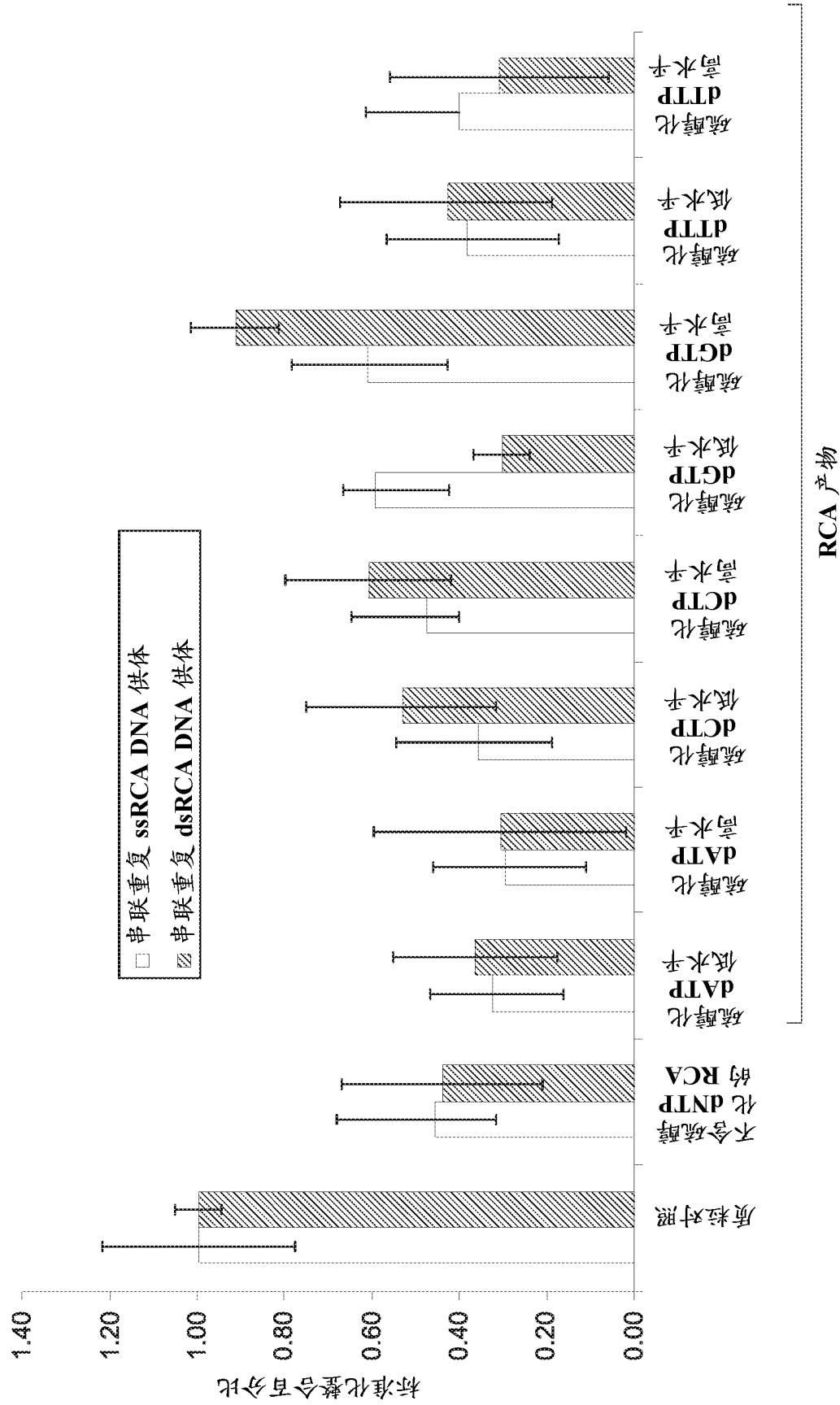
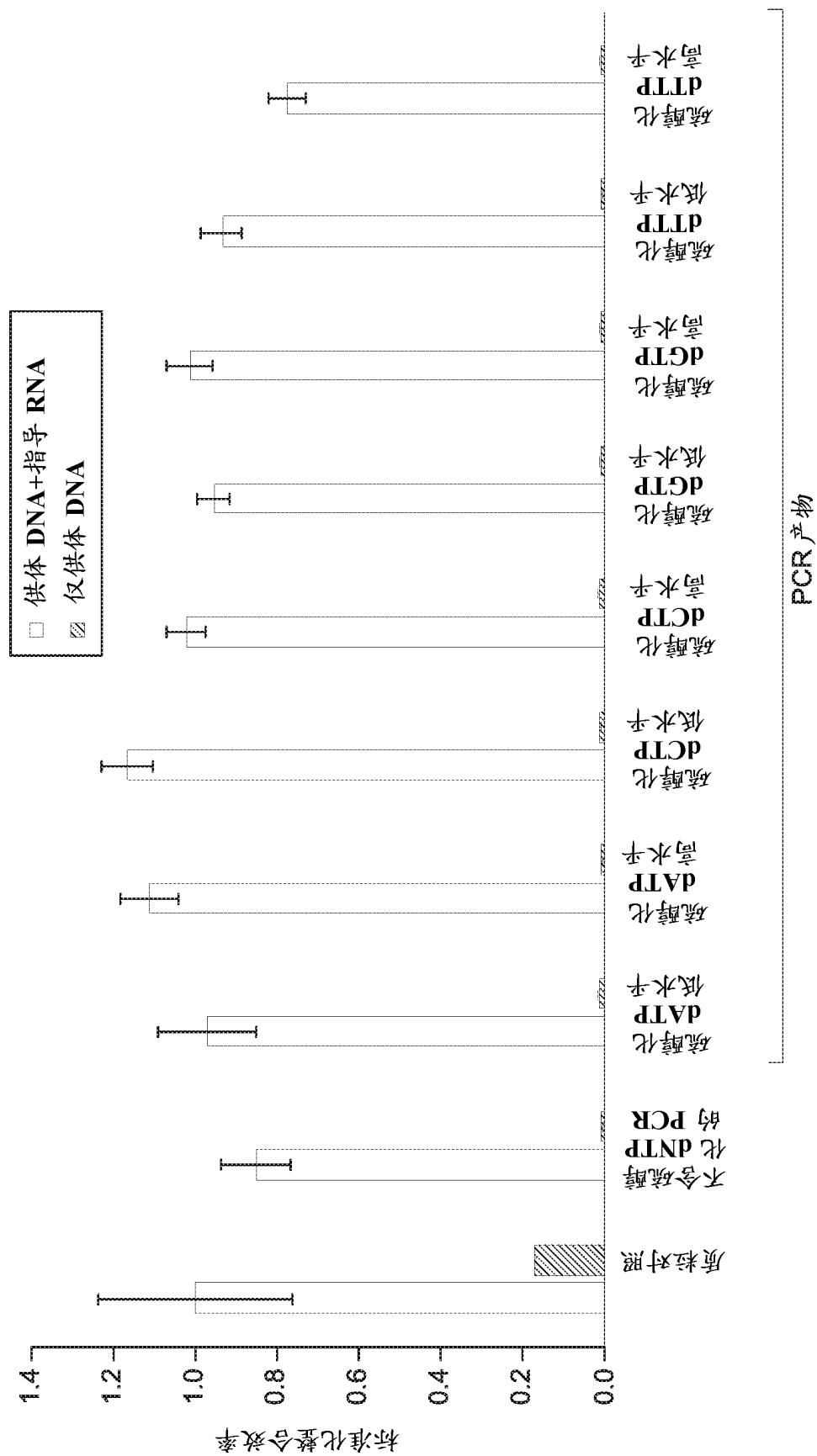


图 4



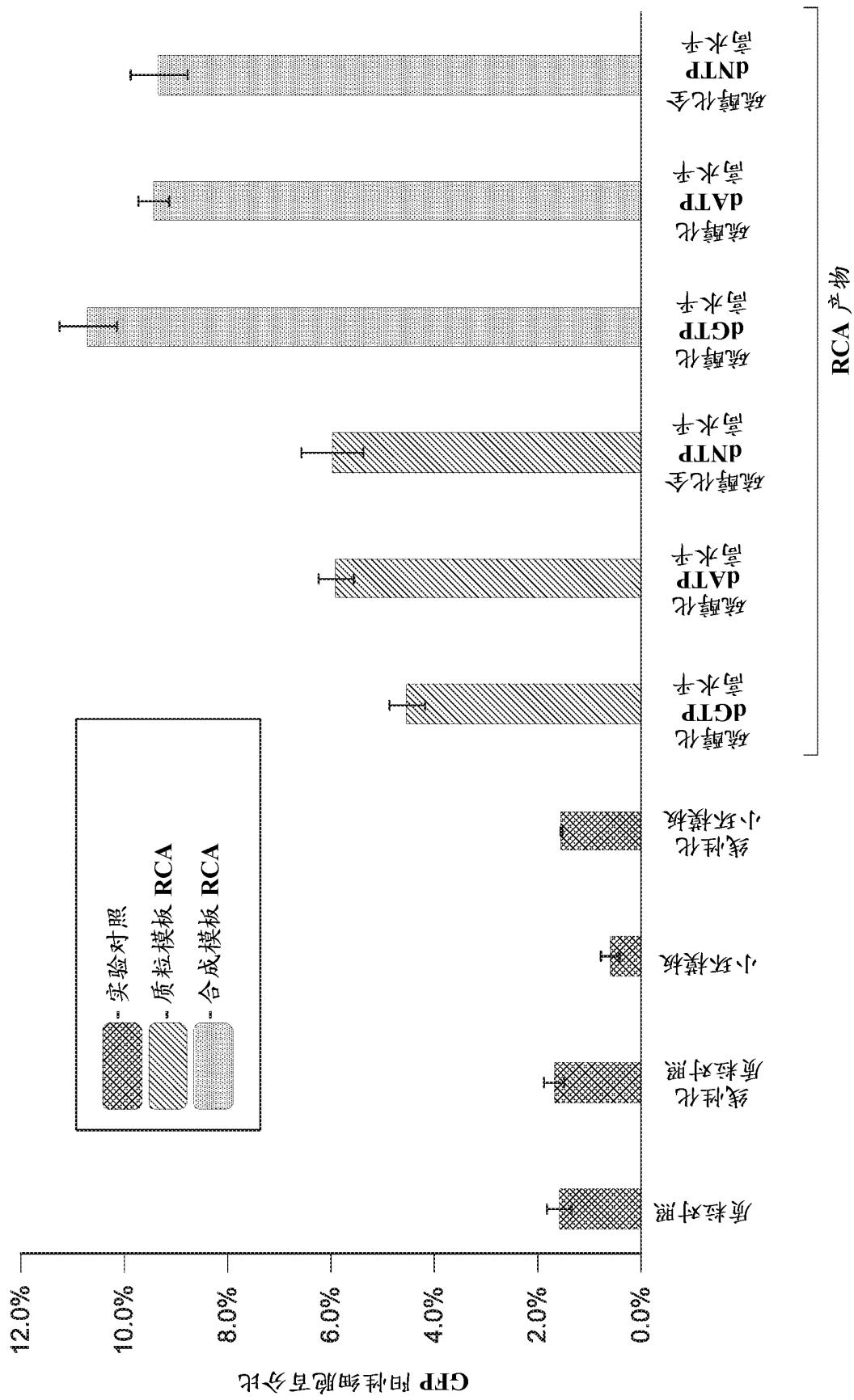


图 6

