(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 120202295 A
(43)申请公布日 2025.06.24

(21)申请号 202380075995.5
(22)申请日 2023.08.30
(30)优先权数据
2022-138632 2022.08.31 JP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2025.04.28
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2023/031631 2023.08.30
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2024/048684 JA 2024.03.07
(71)申请人 基因设计有限公司
地址 日本
(72)发明人 佐野坂真人 斋藤惠美 南海浩一
(74)专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事务所(普通合伙) 11277
专利代理师 刘新宇 李茂家
(51)Int.Cl.
C12N 15/10(2006.01)
C12N 15/11(2006.01)

权利要求书4页 说明书56页
序列表（电子公布） 附图22页

(54)发明名称

核酸分子的制造方法

(57)摘要

本公开提供核酸分子的制造方法。详细而言,本公开使用核酸夹板实现了过程的缩短、连接中的显著的效率提高。即,本公开为生产具有特定序列的多聚核苷酸分子的方法,该方法包含以下工序:1)提供两个以上的包含该特定序列的一部分的多聚核苷酸片段分子的工序;以及2)在两个以上的核酸夹板存在的情况下连接该两个以上的多聚核苷酸片段分子的工序,其中,使该两个以上的多聚核苷酸片段分子的各序列集合则构成该特定序列,该核酸夹板与该多聚核苷酸分子实质上互补,该核酸夹板中的至少两个核酸夹板包含与该特定序列对齐时实质上没有缺失的序列。

CN 120202295 A

1.一种生产具有特定序列的多聚核苷酸分子的方法,该方法包含以下工序:

1)提供两个以上的包含该特定序列的一部分的多聚核苷酸片段分子的工序;以及

2)在两个以上的核酸夹板存在的情况下连接该两个以上的多聚核苷酸片段分子的工序,

其中,

使该两个以上的多聚核苷酸片段分子的各序列集合则构成该特定序列,

该核酸夹板与该多聚核苷酸分子实质上互补,

该核酸夹板中的至少两个核酸夹板包含与该特定序列对齐时实质上没有缺失的序列。

2.根据权利要求1所述的方法,其中,所述使用的多聚核苷酸片段分子存在3个以上。

3.根据权利要求1所述的方法,其中,所述核酸夹板与所述多聚核苷酸分子互补8mer以上。

4.根据权利要求1所述的方法,其中,与所述特定序列对齐了的核酸夹板和与该特定序列对齐了的核酸夹板相邻的核酸夹板之间的距离为2个碱基以下。

5.根据权利要求1所述的方法,其中,所述缺失为2个碱基以下。

6.根据权利要求1所述的方法,其中,所述核酸夹板具有从多聚核苷酸片段分子的连接部分突出的序列。

7.根据权利要求1所述的方法,其中,所述多聚核苷酸片段分子的至少一个末端具有载体和键。

8.根据权利要求7所述的方法,其中,所述载体为聚苯乙烯、CPG(可控微孔玻璃珠)或磁珠。

9.一种多聚核苷酸分子,其是通过权利要求1~8中任一项所述的方法生产。

10.一种用于生产具有特定序列的多聚核苷酸分子的试剂盒,其包含:

1)两个以上的包含该特定序列的一部分的多聚核苷酸片段分子,以及

2)两个以上的核酸夹板,

使该两个以上的多聚核苷酸片段分子的各序列集合则构成该特定序列,

该核酸夹板与该多聚核苷酸分子实质上互补,

该核酸夹板中的至少两个核酸夹板包含与该特定序列对齐时实质上没有缺失的序列。

11.根据权利要求10所述的试剂盒,其中,所述核酸夹板与所述多聚核苷酸分子互补8mer以上。

12.根据权利要求10所述的试剂盒,其中,与所述特定序列对齐了的核酸夹板和与该特定序列对齐了的相邻的核酸夹板之间的距离为2个碱基以下。

13.根据权利要求10所述的试剂盒,其中,所述缺失为2个碱基以下。

14.根据权利要求10所述的方法,其中,所述核酸夹板具有从多聚核苷酸片段分子的连接部分突出的序列。

15.根据权利要求10所述的试剂盒,其中,所述多聚核苷酸片段分子的至少一个末端具有载体和键。

16.根据权利要求15所述的试剂盒,其中,所述载体为聚苯乙烯、CPG(可控微孔玻璃珠)或磁珠。

17.一种生产具有特定序列的多聚核苷酸分子的方法,该方法包含以下工序:

A)根据该特定序列设计两个以上的包含该所需要的序列的一部分的多聚核苷酸片段分子的工序;

B)根据该特定序列设计两个以上的核酸夹板的工序;

C)提供所设计的多聚核苷酸片段分子和核酸夹板的工序;以及

D)在该所设计的核酸夹板存在的情况下连接该所设计的多聚核苷酸片段分子的工序,

其中,

使该两个以上的多聚核苷酸片段分子的各序列集合则构成该特定序列,

该核酸夹板与该多聚核苷酸分子实质上互补,

该核酸夹板中的至少两个核酸夹板包含与该特定序列对齐时实质上没有缺失的序列。

18.一种用于生产具有特定序列的多聚核苷酸分子的多肽片段和核酸夹板的生产方法,该方法包含以下工序:

A)根据该特定序列设计两个以上的包含该所需要的序列的一部分的多聚核苷酸片段分子的工序;

B)根据该特定序列设计两个以上的核酸夹板的工序;以及

C)生产所设计的多聚核苷酸片段分子和两个以上的核酸夹板的工序,

其中,

使该两个以上的多聚核苷酸片段分子的各序列集合则构成该特定序列,

该核酸夹板与该多聚核苷酸分子实质上互补,

该核酸夹板中的至少两个核酸夹板包含与该特定序列对齐时实质上没有缺失的序列。

19.根据权利要求17或18所述的方法,其中,所述核酸夹板与所述多聚核苷酸分子互补8mer以上。

20.根据权利要求17或18所述的方法,其中,与所述特定序列对齐了的核酸夹板和与该特定序列对齐了的核酸夹板相邻的核酸夹板之间的距离为2个碱基以下。

21.根据权利要求17或18所述的方法,其中,所述缺失为2个碱基以下。

22.根据权利要求17或18所述的方法,其中,所述核酸夹板具有从多聚核苷酸片段分子的连接部分突出的序列。

23.根据权利要求17所述的方法,其中,所述多聚核苷酸片段分子的至少一个末端具有载体和键。

24.根据权利要求23所述的方法,其中,所述载体为聚苯乙烯、CPG(可控微孔玻璃珠)或磁珠。

25.一种用于生产具有特定序列的多聚核苷酸分子的多肽片段和核酸夹板的设计方法,该方法包含以下工序:

A)根据该特定序列设计两个以上的包含该所需要的序列的一部分的多聚核苷酸片段分子的工序;以及

B)根据该特定序列设计两个以上的核酸夹板的工序,

其中,

使该两个以上的多聚核苷酸片段分子的各序列集合则构成该特定序列,

该核酸夹板与该多聚核苷酸分子实质上互补,

该核酸夹板中的至少两个核酸夹板包含与该特定序列对齐时实质上没有缺失的序列。

26.根据权利要求25所述的设计方法,其中,所述核酸夹板与所述多聚核苷酸分子互补8mer以上。

27.根据权利要求25所述的设计方法,其中,与所述特定序列对齐了的核酸夹板和与该特定序列对齐了的核酸夹板相邻的核酸夹板之间的距离为2个碱基以下。

28.根据权利要求27所述的设计方法,其中,所述缺失为2个碱基以下。

29.根据权利要求25所述的设计方法,其中,所述核酸夹板为10mer～50mer。

30.根据权利要求25所述的设计方法,其中,所述多聚核苷酸片段分子为10mer～50mer。

31.根据权利要求25所述的设计方法,其中,所述核酸夹板具有从多聚核苷酸片段分子的连接部分突出的序列。

32.根据权利要求25所述的设计方法,其中,所述多聚核苷酸片段分子的至少一个末端具有载体和键。

33.根据权利要求32所述的设计方法,其中,所述载体为聚苯乙烯、CPG(可控微孔玻璃珠)或磁珠。

34.一种用于使计算机执行用于生产具有特定序列的多聚核苷酸分子的多肽片段和核酸夹板的设计方法的程序,该方法包含以下工序:

A)根据该特定序列设计两个以上的包含该所需要的序列的一部分的多聚核苷酸片段分子的工序;以及

B)根据该特定序列设计两个以上的核酸夹板的工序,

其中,

使该两个以上的多聚核苷酸片段分子的各序列集合则构成该特定序列,

该核酸夹板与该多聚核苷酸分子实质上互补,

该核酸夹板中的至少两个核酸夹板包含与该特定序列对齐时实质上没有缺失的序列。

35.根据权利要求34所述的程序,其中,所述核酸夹板与所述多聚核苷酸分子互补8mer以上。

36.根据权利要求34所述的程序,其中,与所述特定序列对齐了的核酸夹板和与该特定序列对齐了的核酸夹板相邻的核酸夹板之间的距离为2个碱基以下。

37.根据权利要求34所述的程序,其中,所述缺失为2个碱基以下。

38.根据权利要求34所述的程序,其中,所述核酸夹板为10mer～50mer。

39.根据权利要求34所述的程序,其中,所述多聚核苷酸片段分子为10mer～50mer。

40.根据权利要求34所述的程序,其中,所述核酸夹板具有从多聚核苷酸片段分子的连接部分突出的序列。

41.根据权利要求34所述的程序,其中,所述多聚核苷酸片段分子的至少一个末端具有载体和键。

42.根据权利要求41所述的程序,其中,所述载体为聚苯乙烯、CPG(可控微孔玻璃珠)或磁珠。

43.一种记录介质,该记录介质存储有下述程序,所述程序用于使计算机执行用于生产具有特定序列的多聚核苷酸分子的多肽片段和核酸夹板的设计方法,该方法包含以下工序:

A)根据该特定序列设计两个以上的包含该所需要的序列的一部分的多聚核苷酸片段分子的工序;以及

B)根据该特定序列设计两个以上的核酸夹板的工序,

其中,

使该两个以上的多聚核苷酸片段分子的各序列集合则构成该特定序列,

该核酸夹板与该多聚核苷酸分子实质上互补,

该核酸夹板中的至少两个核酸夹板包含与该特定序列对齐时实质上没有缺失的序列。

44.根据权利要求43所述的记录介质,其中,所述核酸夹板与所述多聚核苷酸分子互补8mer以上。

45.根据权利要求43所述的记录介质,其中,与所述特定序列对齐了的核酸夹板和与该特定序列对齐了的核酸夹板相邻的核酸夹板之间的距离为2个碱基以下。

46.根据权利要求43所述的记录介质,其中,所述缺失为2个碱基以下。

47.根据权利要求43所述的记录介质,其中,所述核酸夹板具有从多聚核苷酸片段分子的连接部分突出的序列。

48.根据权利要求43所述的记录介质,其中,所述多聚核苷酸片段分子的至少一个末端具有载体和键。

49.根据权利要求48所述的记录介质,其中,所述载体为聚苯乙烯、CPG(可控微孔玻璃珠)或磁珠。

核酸分子的制造方法

技术领域

[0001] 本公开涉及用于合成长链的寡核苷酸或多聚核苷酸或其改造体的连接反应及其应用。

背景技术

[0002] 在基因工程中,DNA的切割与连接是最重要的基本方法之一,并且存在各种方法。此外,RNA的切断与连接也是重要的基本方法之一,并且存在各种方法。

发明内容

[0003] 发明要解决的问题

[0004] 本公开使用核酸夹板实现了过程的缩短、连接中的显著的效率提高。即,本公开发现,在核酸的连接反应中,通过添加两个以上的与该核酸具有互补序列的核酸夹板,可实质上消除缺失,显著提高核酸3’端侧与核酸的5’端侧的连接效率。

[0005] 本发明例如提供以下项目。

[0006] (项目1)

[0007] 一种生产具有特定序列的多聚核苷酸分子的方法,该方法包含以下工序:

[0008] 1)提供两个以上的包含该特定序列的一部分的多聚核苷酸片段分子的工序;以及2)在两个以上的核酸夹板存在的情况下连接该两个以上的多聚核苷酸片段分子的工序,

[0009] 其中,

[0010] 使该两个以上的多聚核苷酸片段分子的各序列集合则构成该特定序列,

[0011] 该核酸夹板与该多聚核苷酸分子实质上互补,

[0012] 该核酸夹板中的至少两个核酸夹板包含与该特定序列对齐时实质上没有缺失的序列。

[0013] (项目2A)

[0014] 根据前述项目中任一项所述的方法,其中,所述使用的多聚核苷酸片段分子存在3个以上。

[0015] (项目2B)

[0016] 根据前述项目中任一项所述的方法,其中,所述使用的多聚核苷酸片段分子存在4个以上。

[0017] (项目2C)

[0018] 根据前述项目中任一项所述的方法,其中,所述使用的多聚核苷酸片段分子存在5个以上。

[0019] (项目2D)

[0020] 根据前述项目中任一项所述的方法,其中,所述使用的多聚核苷酸片段分子存在10个以上。

[0021] (项目2E)

[0022] 根据前述项目中任一项所述的方法,其中,所述使用的多聚核苷酸片段分子存在50个以下。

[0023] (项目2AA)

[0024] 根据前述项目中任一项所述的方法,其中,所述多聚核苷酸片段分子为RNA或修饰RNA,所述核酸夹板为DNA,所述连接通过RNA连接酶进行。

[0025] (项目2AB)

[0026] 根据前述项目中任一项所述的方法,其中,所述修饰包含卤代(氟、氯、碘等)、取代(包含烷氧基等)或未取代的烷基(如甲基)、核酸或修饰核酸(如BNA、LNA)、硫代磷酸酯等。

[0027] (项目2AC)

[0028] 根据前述项目中任一项所述的方法,其中,所述多聚核苷酸片段分子为单磷酸体。

[0029] (项目2AD)

[0030] 根据前述项目中任一项所述的方法,其中,所述多聚核苷酸片段分子为RNA的单磷酸体。

[0031] (项目2AE)

[0032] 根据前述项目中任一项所述的方法,其中,所述多聚核苷酸片段分子通过选自由化学合成和转录合成组成的组中的至少一种方法提供。

[0033] (项目2AF)

[0034] 根据前述项目中任一项所述的方法,其中,所述多聚核苷酸片段分子通过化学合成和转录合成两种方法提供。

[0035] (项目2AG)

[0036] 根据前述项目中任一项所述的方法,其中,该方法包含所述多聚核苷酸片段分子通过转录合成提供,并且包含在该转录合成后对该多聚核苷酸片段分子的5'端进行单磷酸化,所述连接通过RNA连接酶进行。

[0037] (项目3)

[0038] 根据前述项目中任一项所述的方法,其中,所述核酸夹板与所述多聚核苷酸分子互补8mer以上。

[0039] (项目4)

[0040] 根据前述项目中任一项所述的方法,其中,与所述特定序列对齐了的核酸夹板和与该特定序列对齐了的核酸夹板相邻的核酸夹板之间的距离为2个碱基以下。

[0041] (项目5)

[0042] 根据前述项目中任一项所述的方法,其中,所述缺失为2个碱基以下。

[0043] (项目6A)

[0044] 根据前述项目中任一项所述的方法,其中,所述核酸夹板为10mer～50mer。

[0045] (项目6B)

[0046] 根据前述项目中任一项所述的方法,其中,所述多聚核苷酸片段分子为10mer～50mer。

[0047] (项目7)

[0048] 根据前述项目中任一项所述的方法,其中,所述核酸夹板具有从多聚核苷酸片段分子的连接部分突出的序列。

[0049] (项目7A)

[0050] 根据前述项目中任一项所述的方法,其中,所述核酸夹板具有从多聚核苷酸片段分子的连接部分突出2～8mer以上的序列。

[0051] (项目7B)

[0052] 根据前述项目中任一项所述的方法,其中,所述核酸夹板具有从多聚核苷酸片段分子的连接部分突出5mer以上的序列。

[0053] (项目7C)

[0054] 根据前述项目中任一项所述的方法,其中,所述两个以上的核酸夹板和所述多聚核苷酸片段分子具有被设计为在与所述特定序列对齐了的情况下错开一个以上碱基的序列。

[0055] (项目8)

[0056] 根据前述项目中任一项所述的方法,其中,所述多聚核苷酸片段分子的至少一个末端具有载体和键。

[0057] (项目9)

[0058] 根据前述项目中任一项所述的方法,其中,所述载体为聚苯乙烯、CPG(Controlled pore glass,可控微孔玻璃珠)或磁珠。

[0059] (项目9A)

[0060] 根据前述项目中任一项所述的方法,其中,所述连接通过酶连接反应进行。

[0061] (项目9B)

[0062] 根据前述项目中任一项所述的方法,其中,所述酶连接反应同时进行或不同时进行。

[0063] (项目9C)

[0064] 根据前述项目中任一项所述的方法,其中,所述酶连接反应同时进行。

[0065] (项目9D)

[0066] 根据前述项目中任一项所述的方法,其特征在于,所述酶连接反应中,(A)以所述多聚核苷酸片段分子的、成为比特定序列短的组合进行一次连接反应后,使用该一次连接反应的产物进行下一次连接反应,(B)根据需要重复(A)。

[0067] (项目9E)

[0068] 根据前述项目中任一项所述的方法,其中,为使所述总延伸成为175～200mer的组合。

[0069] (项目10)

[0070] 一种多聚核苷酸分子,其通过前述项目中任一项所述的方法生产。

[0071] ＜试剂盒＞

[0072] (项目A1)

[0073] 一种用于生产具有特定序列的多聚核苷酸分子的试剂盒,其包含:

[0074] 1)两个以上的包含该特定序列的一部分的多聚核苷酸片段分子,以及

[0075] 2)两个以上的核酸夹板,

[0076] 使该两个以上的多聚核苷酸片段分子的各序列集合则构成该特定序列,

[0077] 该核酸夹板与该多聚核苷酸分子实质上互补,

[0078] 该核酸夹板中的至少两个核酸夹板包含与该特定序列对齐时实质上没有缺失的序列。

[0079] (项目A1A)

[0080] 根据前述项目中任一项所述的试剂盒,其中,所述使用的多聚核苷酸片段分子存在3个以上。

[0081] (项目A1B)

[0082] 根据前述项目中任一项所述的试剂盒,其中,所述使用的多聚核苷酸片段分子存在4个以上。

[0083] (项目A1C)

[0084] 根据前述项目中任一项所述的试剂盒,其中,所述使用的多聚核苷酸片段分子存在5个以上。

[0085] (项目A1D)

[0086] 根据前述项目中任一项所述的试剂盒,其中,所述使用的多聚核苷酸片段分子存在10个以上。

[0087] (项目A1E)

[0088] 根据前述项目中任一项所述的试剂盒,其中,所述使用的多聚核苷酸片段分子存在50个以下。

[0089] (项目A1AA)

[0090] 根据前述项目中任一项所述的试剂盒,其中,所述多聚核苷酸片段分子为RNA或修饰RNA,所述核酸夹板为DNA,所述连接通过RNA连接酶进行。

[0091] (项目A1AB)

[0092] 根据前述项目中任一项所述的试剂盒,其中,所述修饰包含卤代(氟、氯、碘等)、取代(包含烷氧基等)或未取代的烷基(如甲基)、核酸或修饰核酸(如BNA、LNA)、硫代磷酸酯等。

[0093] (项目A1AC)

[0094] 根据前述项目中任一项所述的试剂盒,其中,所述多聚核苷酸片段分子为单磷酸体。

[0095] (项目A1AD)

[0096] 根据前述项目中任一项所述的试剂盒,其中,所述多聚核苷酸片段分子为RNA的单磷酸体。

[0097] (项目A1AE)

[0098] 根据前述项目中任一项所述的试剂盒,其中,所述多聚核苷酸片段分子通过选自由化学合成和转录合成组成的组中的至少一种试剂盒提供。

[0099] (项目A1AF)

[0100] 根据前述项目中任一项所述的试剂盒,其中,所述多聚核苷酸片段分子通过化学合成和转录合成这两种试剂盒提供。

[0101] (项目A1AG)

[0102] 根据前述项目中任一项所述的试剂盒,其中,该方法包含所述多聚核苷酸片段分子通过转录合成提供,并且包含在该转录合成后对该多聚核苷酸片段分子的5'端进行单磷

酸化,所述连接通过RNA连接酶进行。

[0103] (项目A2)

[0104] 根据前述项目中任一项所述的试剂盒,其中,所述核酸夹板与所述多聚核苷酸分子互补8mer以上。

[0105] (项目A3)

[0106] 根据前述项目中任一项所述的试剂盒,其中,与所述特定序列对齐了的核酸夹板和与该特定序列对齐了的相邻的核酸夹板之间的距离为2个碱基以下。

[0107] (项目A4)

[0108] 根据前述项目中任一项所述的试剂盒,其中,所述缺失为2个碱基以下。

[0109] (项目A5)

[0110] 根据前述项目中任一项所述的试剂盒,其中,所述核酸夹板为10mer～50mer。

[0111] (项目A6)

[0112] 根据前述项目中任一项所述的试剂盒,其中,所述多聚核苷酸片段分子为10mer～50mer。

[0113] (项目A7)

[0114] 根据前述项目中任一项所述的试剂盒,其中,所述核酸夹板具有从多聚核苷酸片段分子的连接部分突出的序列。

[0115] (项目A7A)

[0116] 根据前述项目中任一项所述的试剂盒,其中,所述核酸夹板具有从多聚核苷酸片段分子的连接部分突出2～8mer以上的序列。

[0117] (项目A7B)

[0118] 根据前述项目中任一项所述的试剂盒,其中,所述核酸夹板具有从多聚核苷酸片段分子的连接部分突出5mer以上的序列。

[0119] (项目A7C)

[0120] 根据前述项目中任一项所述的试剂盒,其中,所述两个以上的核酸夹板和所述多聚核苷酸片段分子具有被设计为在与所述特定序列对齐了的情况下错开一个以上碱基的序列。

[0121] (项目A8)

[0122] 根据前述项目中任一项所述的试剂盒,其中,所述多聚核苷酸片段分子的至少一个末端具有载体和键。

[0123] (项目A9)

[0124] 根据前述项目中任一项所述的试剂盒,其中,所述载体为聚苯乙烯、CPG(可控微孔玻璃珠)或磁珠。

[0125] (项目A9A)

[0126] 根据前述项目中任一项所述的试剂盒,其中,所述连接通过酶连接反应进行。

[0127] (项目A9B)

[0128] 根据前述项目中任一项所述的试剂盒,其中,所述酶连接反应同时进行或不同时进行。

[0129] (项目A9C)

[0130] 根据前述项目中任一项所述的试剂盒,其中,所述酶连接反应同时进行。

[0131] (项目A9D)

[0132] 根据前述项目中任一项所述的试剂盒,其特征在于,所述酶连接反应中,(A)以所述多聚核苷酸片段分子的、成为比特定序列短的组合进行一次连接反应后,使用该一次连接反应的产物进行下一次连接反应,(B)根据需要重复(A)。

[0133] (项目A9E)

[0134] 根据前述项目中任一项所述的试剂盒,其中,为使所述总延伸成为175～200mer的组合。

[0135] ＜材料提供＞

[0136] (项目B1)

[0137] 一种生产具有特定序列的多聚核苷酸分子的方法,该方法包含以下工序:

[0138] A)根据该特定序列设计两个以上的包含该所需要的序列的一部分的多聚核苷酸片段分子的工序;

[0139] B)根据该特定序列设计两个以上的核酸夹板的工序;

[0140] C)提供所设计的多聚核苷酸片段分子和核酸夹板的工序;以及

[0141] D)在该所设计的核酸夹板存在的情况下连接该所设计的多聚核苷酸片段分子的工序,

[0142] 其中,

[0143] 使该两个以上的多聚核苷酸片段分子的各序列集合则构成该特定序列,

[0144] 该核酸夹板与该多聚核苷酸分子实质上互补,

[0145] 该核酸夹板中的至少两个核酸夹板包含与该特定序列对齐时实质上没有缺失的序列。

[0146] (项目B2)

[0147] 一种用于生产具有特定序列的多聚核苷酸分子的多肽片段和核酸夹板的生产方法,该方法包含以下工序:

[0148] A)根据该特定序列设计两个以上的包含该所需要的序列的一部分的多聚核苷酸片段分子的工序;

[0149] B)根据该特定序列设计两个以上的核酸夹板的工序;以及

[0150] C)生产所设计的多聚核苷酸片段分子和两个以上的核酸夹板的工序,

[0151] 其中,

[0152] 使该两个以上的多聚核苷酸片段分子的各序列集合则构成该特定序列,

[0153] 该核酸夹板与该多聚核苷酸分子实质上互补,

[0154] 该核酸夹板中的至少两个核酸夹板包含与该特定序列对齐时实质上没有缺失的序列。

[0155] (项目B2A)

[0156] 根据前述项目中任一项所述的方法,其中,所述使用的多聚核苷酸片段分子存在3个以上。

[0157] (项目B2B)

[0158] 根据前述项目中任一项所述的方法,其中,所述使用的多聚核苷酸片段分子存在4

个以上。

[0159] (项目B2C)

[0160] 根据前述项目中任一项所述的方法,其中,所述使用的多聚核苷酸片段分子存在5个以上。

[0161] (项目B2D)

[0162] 根据前述项目中任一项所述的方法,其中,所述使用的多聚核苷酸片段分子存在10个以上。

[0163] (项目B2E)

[0164] 根据前述项目中任一项所述的方法,其中,所述使用的多聚核苷酸片段分子存在50个以下。

[0165] (项目B2AA)

[0166] 根据前述项目中任一项所述的方法,其中,所述多聚核苷酸片段分子为RNA或修饰RNA,所述核酸夹板为DNA,所述连接通过RNA连接酶进行。

[0167] (项目B2AB)

[0168] 根据前述项目中任一项所述的方法,其中,所述修饰包含卤代(氟、氯、碘等)、取代(包含烷氧基等)或未取代的烷基(如甲基)、核酸或修饰核酸(如BNA、LNA)、硫代磷酸酯等。

[0169] (项目B2AC)

[0170] 根据前述项目中任一项所述的方法,其中,所述多聚核苷酸片段分子为单磷酸体。

[0171] (项目B2AD)

[0172] 根据前述项目中任一项所述的方法,其中,所述多聚核苷酸片段分子为RNA的单磷酸体。

[0173] (项目B2AE)

[0174] 根据前述项目中任一项所述的方法,其中,所述多聚核苷酸片段分子通过选自由化学合成和转录合成组成的组中的至少一种方法提供。

[0175] (项目B2AF)

[0176] 根据前述项目中任一项所述的方法,其中,所述多聚核苷酸片段分子通过化学合成和转录合成两种方法提供。

[0177] (项目B2AG)

[0178] 根据前述项目中任一项所述的方法,其中,该方法包含所述多聚核苷酸片段分子通过转录合成提供,并且包含在该转录合成后对该多聚核苷酸片段分子的5'端进行单磷酸化,所述连接通过RNA连接酶进行。

[0179] (项目B3)

[0180] 根据前述项目中任一项所述的方法,其中,所述核酸夹板与所述多聚核苷酸分子互补8mer以上。

[0181] (项目B4)

[0182] 根据前述项目中任一项所述的方法,其中,与所述特定序列对齐了的核酸夹板和与该特定序列对齐了的核酸夹板相邻的核酸夹板之间的距离为2个碱基以下。

[0183] (项目B5)

[0184] 根据前述项目中任一项所述的方法,其中,所述缺失为2个碱基以下。

[0185] (项目B6)

[0186] 根据前述项目中任一项所述的方法,其中,所述核酸夹板为10mer～50mer。

[0187] (项目B7)

[0188] 根据前述项目中任一项所述的方法,其中,所述多聚核苷酸片段分子为10mer～50mer。

[0189] (项目B7-1)

[0190] 根据前述项目中任一项所述的方法,其中,所述核酸夹板具有从多聚核苷酸片段分子的连接部分突出的序列。

[0191] (项目B7A)

[0192] 根据前述项目中任一项所述的方法,其中,所述核酸夹板具有从多聚核苷酸片段分子的连接部分突出2～8mer以上的序列。

[0193] (项目B7B)

[0194] 根据前述项目中任一项所述的方法,其中,所述核酸夹板具有从多聚核苷酸片段分子的连接部分突出5mer以上的序列。

[0195] (项目B7C)

[0196] 根据前述项目中任一项所述的方法,其中,所述两个以上的核酸夹板和所述多聚核苷酸片段分子具有被设计为在与所述特定序列对齐了的情况下错开一个以上碱基的序列。

[0197] (项目B8)

[0198] 根据前述项目中任一项所述的方法,其中,所述多聚核苷酸片段分子的至少一个末端具有载体和键。

[0199] (项目B9)

[0200] 根据前述项目中任一项所述的方法,其中,所述载体为聚苯乙烯、CPG(可控微孔玻璃珠)或磁珠。

[0201] (项目B9A)

[0202] 根据前述项目中任一项所述的方法,其中,所述连接通过酶连接反应进行。

[0203] (项目B9B)

[0204] 根据前述项目中任一项所述的方法,其中,所述酶连接反应同时进行或不同时进行。

[0205] (项目B9C)

[0206] 根据前述项目中任一项所述的方法,其中,所述酶连接反应同时进行。

[0207] (项目B9D)

[0208] 根据前述项目中任一项所述的方法,其特征在于,所述酶连接反应中,(A)以所述多聚核苷酸片段分子的、成为比特定序列短的组合进行一次连接反应后,使用该一次连接反应的产物进行下一次连接反应,(B)根据需要重复(A)。

[0209] (项目B9E)

[0210] 根据前述项目中任一项所述的方法,其中,为使所述总延伸成为175～200mer的组合。

[0211] ＜设计系＞

[0212] (项目C1)

[0213] 一种用于生产具有特定序列的多聚核苷酸分子的多肽片段和核酸夹板的设计方法,该方法包含以下工序:

[0214] A)根据该特定序列设计两个以上的包含该所需要的序列的一部分的多聚核苷酸片段分子的工序;和

[0215] B)根据该特定序列设计两个以上的核酸夹板的工序;

[0216] 其中,

[0217] 使该两个以上的多聚核苷酸片段分子的各序列集合则构成该特定序列,

[0218] 该核酸夹板与该多聚核苷酸分子实质上互补,

[0219] 该核酸夹板中的至少两个核酸夹板包含与该特定序列对齐时实质上没有缺失的序列。

[0220] (项目C2A)

[0221] 根据前述项目中的任一项所述的设计方法,其中,所述使用的多聚核苷酸片段分子存在3个以上。

[0222] (项目C2B)

[0223] 根据前述项目中的任一项所述的设计方法,其中,所述使用的多聚核苷酸片段分子存在4个以上。

[0224] (项目C2C)

[0225] 根据前述项目中的任一项所述的设计方法,其中,所述使用的多聚核苷酸片段分子存在5个以上。

[0226] (项目C2D)

[0227] 根据前述项目中的任一项所述的设计方法,其中,所述使用的多聚核苷酸片段分子存在10个以上。

[0228] (项目C2E)

[0229] 根据前述项目中的任一项所述的设计方法,其中,所述使用的多聚核苷酸片段分子存在50个以下。

[0230] (项目C2AA)

[0231] 根据前述项目中的任一项所述的设计方法,其中,所述多聚核苷酸片段分子为RNA或修饰RNA,所述核酸夹板为DNA,所述连接通过RNA连接酶进行。

[0232] (项目C2AB)

[0233] 根据前述项目中的任一项所述的设计方法,其中,所述修饰包含卤代(氟、氯、碘等)、取代(包含烷氧基等)或未取代的烷基(如甲基)、核酸或修饰核酸(如BNA、LNA)、硫代磷酸酯等。

[0234] (项目C2AC)

[0235] 根据前述项目中的任一项所述的设计方法,其中,所述多聚核苷酸片段分子为单磷酸体。

[0236] (项目C2AD)

[0237] 根据前述项目中的任一项所述的设计方法,其中,所述多聚核苷酸片段分子为RNA的单磷酸体。

[0238] (项目C2AE)

[0239] 根据前述项目中的任一项所述的设计方法,其中,所述多聚核苷酸片段分子通过选自由化学合成和转录合成组成的组中的至少一种方法提供。

[0240] (项目C2AF)

[0241] 根据前述项目中的任一项所述的设计方法,其中,所述多聚核苷酸片段分子通过化学合成和转录合成两种方法提供。

[0242] (项目C2AG)

[0243] 根据前述项目中的任一项所述的设计方法,其中,该方法包含所述多聚核苷酸片段分子通过转录合成提供,并且包含在该转录合成后对该多聚核苷酸片段分子的5'端进行单磷酸化,所述连接通过RNA连接酶进行。

[0244] (项目C2)

[0245] 根据前述项目中的任一项所述的设计方法,其中,所述核酸夹板与所述多聚核苷酸分子互补8mer以上。

[0246] (项目C3)

[0247] 根据前述项目中的任一项所述的设计方法,其中,与所述特定序列对齐了的核酸夹板和与该特定序列对齐了的核酸夹板相邻的核酸夹板之间的距离为2个碱基以下。

[0248] (项目C4)

[0249] 根据前述项目中的任一项所述的设计方法,其中,所述缺失为2个碱基以下。

[0250] (项目C5)

[0251] 根据前述项目中的任一项所述的设计方法,其中,所述核酸夹板为10mer～50mer。

[0252] (项目C6)

[0253] 根据前述项目中的任一项所述的设计方法,其中,所述多聚核苷酸片段分子为10mer～50mer。

[0254] (项目C7)

[0255] 根据前述项目中的任一项所述的设计方法,其中,所述核酸夹板具有从多聚核苷酸片段分子的连接部分突出的序列。

[0256] (项目C7A)

[0257] 根据前述项目中的任一项所述的设计方法,其中,所述核酸夹板具有从多聚核苷酸片段分子的连接部分突出2～8mer以上的序列。

[0258] (项目C7B)

[0259] 根据前述项目中的任一项所述的设计方法,其中,所述核酸夹板具有从多聚核苷酸片段分子的连接部分突出5mer以上的序列。

[0260] (项目C7C)

[0261] 根据前述项目中任一项所述的设计方法,其中,所述两个以上的核酸夹板和所述多聚核苷酸片段分子具有被设计为在与所述特定序列对齐了的情况下错开一个以上碱基的序列。

[0262] (项目C8)

[0263] 根据前述项目中的任一项所述的设计方法,其中,所述多聚核苷酸片段分子的至少一个末端具有载体和键。

[0264] (项目C9)

[0265] 根据前述项目中的任一项所述的设计方法,其中,所述载体为聚苯乙烯、CPG(可控微孔玻璃珠)或磁珠。

[0266] (项目C9A)

[0267] 根据前述项目中的任一项所述的设计方法,其中,所述连接通过酶连接反应进行。

[0268] (项目C9B)

[0269] 根据前述项目中的任一项所述的设计方法,其中,所述酶连接反应同时进行或不同时进行。

[0270] (项目C9C)

[0271] 根据前述项目中的任一项所述的设计方法,其中,所述酶连接反应同时进行。

[0272] (项目C9D)

[0273] 根据前述项目中的任一项所述的设计方法,其特征在于,所述酶连接反应中,(A)以所述多聚核苷酸片段分子的、成为比特定序列短的组合进行一次连接反应后,使用该一次连接反应的产物进行下一次连接反应,(B)根据需要重复(A)。

[0274] (项目C9E)

[0275] 根据前述项目中的任一项所述的设计方法,其中,为使所述总延伸成为175～200mer的组合。

[0276] ＜程序＞

[0277] (项目D1)

[0278] 一种用于使计算机执行用于生产具有特定序列的多聚核苷酸分子的多肽片段和核酸夹板的设计方法的程序,该方法包含以下工序:

[0279] A)根据该特定序列设计两个以上的包含该所需要的序列的一部分的多聚核苷酸片段分子的工序;和

[0280] B)根据该特定序列设计两个以上的核酸夹板的工序;

[0281] 其中,

[0282] 使该两个以上的多聚核苷酸片段分子的各序列集合则构成该特定序列,

[0283] 该核酸夹板与该多聚核苷酸分子实质上互补,

[0284] 该核酸夹板中的至少两个核酸夹板包含与该特定序列对齐时实质上没有缺失的序列。

[0285] (项目D2A)

[0286] 根据前述项目中的任一项所述的程序,其中,所述使用的多聚核苷酸片段分子存在3个以上。

[0287] (项目D2B)

[0288] 根据前述项目中的任一项所述的程序,其中,所述使用的多聚核苷酸片段分子存在4个以上。

[0289] (项目D2C)

[0290] 根据前述项目中的任一项所述的程序,其中,所述使用的多聚核苷酸片段分子存在5个以上。

[0291] (项目D2D)

[0292] 根据前述项目中的任一项所述的程序,其中,所述使用的多聚核苷酸片段分子存在10个以上。

[0293] (项目D2E)

[0294] 根据前述项目中的任一项所述的程序,其中,所述使用的多聚核苷酸片段分子存在50个以下。

[0295] (项目D2AA)

[0296] 根据前述项目中的任一项所述的程序,其中,所述多聚核苷酸片段分子为RNA或修饰RNA,所述核酸夹板为DNA,所述连接通过RNA连接酶进行。

[0297] (项目D2AB)

[0298] 根据前述项目中的任一项所述的程序,其中,所述修饰包含卤代(氟、氯、碘等)、取代(包含烷氧基等)或未取代的烷基(如甲基)、核酸或修饰核酸(如BNA、LNA)、硫代磷酸酯等。

[0299] (项目D2AC)

[0300] 根据前述项目中的任一项所述的程序,其中,所述多聚核苷酸片段分子为单磷酸体。

[0301] (项目D2AD)

[0302] 根据前述项目中的任一项所述的程序,其中,所述多聚核苷酸片段分子为RNA的单磷酸体。

[0303] (项目D2AE)

[0304] 根据前述项目中的任一项所述的程序,其中,所述多聚核苷酸片段分子通过选自由化学合成和转录合成组成的组中的至少一种方法提供。

[0305] (项目D2AF)

[0306] 根据前述项目中的任一项所述的程序,其中,所述多聚核苷酸片段分子通过化学合成和转录合成两种方法提供。

[0307] (项目D2AG)

[0308] 根据前述项目中的任一项所述的程序,其中,该方法包含所述多聚核苷酸片段分子通过转录合成提供,并且包含在该转录合成后对该多聚核苷酸片段分子的5'端进行单磷酸化,所述连接通过RNA连接酶进行。

[0309] (项目D2)

[0310] 根据前述项目中的任一项所述的程序,其中,所述核酸夹板与所述多聚核苷酸分子互补8mer以上。

[0311] (项目D3)

[0312] 根据前述项目中的任一项所述的程序,其中,与所述特定序列对齐了的核酸夹板和与该特定序列对齐了的核酸夹板相邻的核酸夹板之间的距离为2个碱基以下。

[0313] (项目D4)

[0314] 根据前述项目中的任一项所述的程序,其中,所述缺失为2个碱基以下。

[0315] (项目D5)

[0316] 根据前述项目中的任一项所述的程序,其中,所述核酸夹板为10mer～50mer。

[0317] (项目D6)

[0318] 根据项目D1所述的程序,其中,所述多聚核苷酸片段分子为10mer～50mer。

[0319] (项目D7)

[0320] 根据前述项目中的任一项所述的程序,其中,所述核酸夹板具有从多聚核苷酸片段分子的连接部分突出的序列。

[0321] (项目D7A)

[0322] 根据前述项目中的任一项所述的程序,其中,所述核酸夹板具有从多聚核苷酸片段分子的连接部分突出2～8mer以上的序列。

[0323] (项目D7B)

[0324] 根据前述项目中的任一项所述的程序,其中,所述核酸夹板具有从多聚核苷酸片段分子的连接部分突出5mer以上的序列。

[0325] (项目D7C)

[0326] 根据前述项目中任一项所述的程序,其中,所述两个以上的核酸夹板和所述多聚核苷酸片段分子具有被设计为在与所述特定序列对齐了的情况下错开一个以上碱基的序列。

[0327] (项目D8)

[0328] 根据前述项目中的任一项所述的程序,其中,所述多聚核苷酸片段分子的至少一个末端具有载体和键。

[0329] (项目D9)

[0330] 根据前述项目中的任一项所述的程序,其中,所述载体为聚苯乙烯、CPG(可控微孔玻璃珠)或磁珠。

[0331] (项目D9A)

[0332] 根据前述项目中的任一项所述的程序,其中,所述连接通过酶连接反应进行。

[0333] (项目D9B)

[0334] 根据前述项目中的任一项所述的程序,其中,所述酶连接反应同时进行或不同时进行。

[0335] (项目D9C)

[0336] 根据前述项目中的任一项所述的程序,其中,所述酶连接反应同时进行。

[0337] (项目D9D)

[0338] 根据前述项目中的任一项所述的程序,其特征在于,所述酶连接反应中,(A)以所述多聚核苷酸片段分子的、成为比特定序列短的组合进行一次连接反应后,使用该一次连接反应的产物进行下一次连接反应,(B)根据需要重复(A)。

[0339] (项目D9E)

[0340] 根据前述项目中的任一项所述的程序,其中,为使所述总延伸成为175～200mer的组合。

[0341] ＜记录介质＞

[0342] (项目E1)

[0343] 一种记录介质,该记录介质存储有下述程序,所述程序用于使计算机执行用于生产具有特定序列的多聚核苷酸分子的多肽片段和核酸夹板的设计方法,该方法包含以下工序:

[0344] A)根据该特定序列设计两个以上的包含该所需要的序列的一部分的多聚核苷酸片段分子的工序;以及

[0345] B)根据该特定序列设计两个以上的核酸夹板的工序,

[0346] 其中,

[0347] 使该两个以上的多聚核苷酸片段分子的各序列集合则构成该特定序列,

[0348] 该核酸夹板与该多聚核苷酸分子实质上互补,

[0349] 该核酸夹板中的至少两个核酸夹板包含与该特定序列对齐时实质上没有缺失的序列。

[0350] (项目E2A)

[0351] 根据前述项目中的任一项所述的记录介质,其中,所述使用的多聚核苷酸片段分子存在3个以上。

[0352] (项目E2B)

[0353] 根据前述项目中的任一项所述的记录介质,其中,所述使用的多聚核苷酸片段分子存在4个以上。

[0354] (项目E2C)

[0355] 根据前述项目中的任一项所述的记录介质,其中,所述使用的多聚核苷酸片段分子存在5个以上。

[0356] (项目E2D)

[0357] 根据前述项目中的任一项所述的记录介质,其中,所述使用的多聚核苷酸片段分子存在10个以上。

[0358] (项目E2E)

[0359] 根据前述项目中的任一项所述的记录介质,其中,所述使用的多聚核苷酸片段分子存在50个以下。

[0360] (项目E2AA)

[0361] 根据前述项目中的任一项所述的记录介质,其中,所述多聚核苷酸片段分子为RNA或修饰RNA,所述核酸夹板为DNA,所述连接通过RNA连接酶进行。

[0362] (项目E2AB)

[0363] 根据前述项目中的任一项所述的记录介质,其中,所述修饰包含卤代(氟、氯、碘等)、取代(包含烷氧基等)或未取代的烷基(如甲基)、核酸或修饰核酸(如BNA、LNA)、硫代磷酸酯等。

[0364] (项目E2AC)

[0365] 根据前述项目中的任一项所述的记录介质,其中,所述多聚核苷酸片段分子为单磷酸体。

[0366] (项目E2AD)

[0367] 根据前述项目中的任一项所述的记录介质,其中,所述多聚核苷酸片段分子为RNA的单磷酸体。

[0368] (项目E2AE)

[0369] 根据前述项目中的任一项所述的记录介质,其中,所述多聚核苷酸片段分子通过选自由化学合成和转录合成组成的组中的至少一种方法提供。

[0370] (项目E2AF)

[0371] 根据前述项目中的任一项所述的记录介质,其中,所述多聚核苷酸片段分子通过化学合成和转录合成两种方法提供。

[0372] (项目E2AG)

[0373] 根据前述项目中的任一项所述的记录介质,其中,该方法包含所述多聚核苷酸片段分子通过转录合成提供,并且包含在该转录合成后对该多聚核苷酸片段分子的5'端进行单磷酸化,所述连接通过RNA连接酶进行。

[0374] (项目E2)

[0375] 根据前述项目中的任一项所述的记录介质,其中,所述核酸夹板与所述多聚核苷酸分子互补8mer以上。

[0376] (项目E3)

[0377] 根据前述项目中的任一项所述的记录介质,其中,与所述特定序列对齐了的核酸夹板和与该特定序列对齐了的核酸夹板相邻的核酸夹板之间的距离为2个碱基以下。

[0378] (项目E4)

[0379] 根据前述项目中的任一项所述的记录介质,其中,所述缺失为2个碱基以下。

[0380] (项目E5)

[0381] 根据前述项目中的任一项所述的记录介质,其中,所述核酸夹板为10mer～50mer。

[0382] (项目E6)

[0383] 根据前述项目中的任一项所述的记录介质,其中,所述多聚核苷酸片段分子为10mer～50mer。

[0384] (项目E7)

[0385] 根据前述项目中的任一项所述的记录介质,其中,所述核酸夹板具有从多聚核苷酸片段分子的连接部分突出的序列。

[0386] (项目E7A)

[0387] 根据前述项目中的任一项所述的记录介质,其中,所述核酸夹板具有从多聚核苷酸片段分子的连接部分突出2～8mer以上的序列。

[0388] (项目E7B)

[0389] 根据前述项目中的任一项所述的记录介质,其中,所述核酸夹板具有从多聚核苷酸片段分子的连接部分突出5mer以上的序列。

[0390] (项目E7C)

[0391] 根据前述项目中任一项所述的记录介质。其中,所述两个以上的核酸夹板和所述多聚核苷酸片段分子具有被设计为在与所述特定序列对齐了的情况下错开一个以上碱基的序列。

[0392] (项目E8)

[0393] 根据前述项目中的任一项所述的记录介质,其中,所述多聚核苷酸片段分子的至少一个末端具有载体和键。

[0394] (项目E9)

[0395] 根据前述项目中的任一项所述的记录介质,其中,所述载体为聚苯乙烯、CPG(可控微孔玻璃珠)或磁珠。

[0396] (项目E9A)

[0397] 根据前述项目中的任一项所述的记录介质,其中,所述连接通过酶连接反应进行。

[0398] (项目E9B)

[0399] 根据前述项目中的任一项所述的记录介质,其中,所述酶连接反应同时进行或不同时进行。

[0400] (项目E9C)

[0401] 根据前述项目中的任一项所述的记录介质,其中,所述酶连接反应同时进行。

[0402] (项目E9D)

[0403] 根据前述项目中的任一项所述的记录介质,其特征在于,所述酶连接反应中,(A)以所述多聚核苷酸片段分子的、成为比特定序列短的组合进行一次连接反应后,使用该一次连接反应的产物进行下一次连接反应,(B)根据需要重复(A)。

[0404] (项目E9E)

[0405] 根据前述项目中的任一项所述的记录介质,其中,为使所述总延伸成为175～200mer的组合。

[0406] 在本公开中,本意在于:上述一个或多个技术特征除明确说明的组合外,还可以进一步组合提供。根据需要,本领域技术人员在阅读并理解以下详细描述后,会认识到本公开的进一步实施方式和优点。

[0407] 发明的效果

[0408] 提供使用核酸夹板且使用实质上没有缺失的互补序列的核酸连接反应。通过采用本连接反应,与以往连接反应相比能够提高收率。本公开还提供mRNA及可以在其3'端连接DNA的技术,从而提供改善效率的方法。本公开还提供也可使用体外病毒法的技术,从而提供有助于基因工程的发展,用于DNA特异性切割和连接的更高效的加工技术。

附图说明

[0409] 图1-1示出了用于实施例1的序列。

[0410] 图1-2示出了ssRNA(短链RNA)100mer分6段RNA连接酶2的酶连接的变性PAGE(Denatured-PAGE)的结果。

[0411] 图2示出了ssRNA(短链RNA)100mer分6段RNA连接酶2的酶连接的基于HPLC、LC-MS的测定结果。

[0412] 图3示出了ssRNA(短链RNA)100mer分6段RNA连接酶2的酶连接的基于UHPLC的反应跟踪结果。

[0413] 图4示出了ssRNA220mer分10段RNA连接酶2的酶连接的变性PAGE的结果。

[0414] 图5示出了实施例4的UHPLC、LC-MS的结果。

[0415] 图6-1示出了用于实施例5的序列。

[0416] 图6-2示出了实施例5的变性PAGE的结果。

[0417] 图7-1示出了用于实施例1的序列。

[0418] 图7-2示出了实施例6的变性PAGE结果和活性测定结果。

[0419] 图8-1示出了用于实施例6的序列。

[0420] 图8-2示出了用于实施例6的序列。

[0421] 图8-3示出了实施例6的变性PAGE结果和活性测定结果。

[0422] 图9示出了本公开的方法的示意图。

[0423] 图10示出了采用本公开的研究方法对转录合成长链RNA和化学合成RNA进行连接的方法。图中化学合成中的星号表示修饰。本公开的方法通过以与作为特定序列的目标序列整体形成互补链的形式设计核酸夹板(在此为DNA夹板)的基础上,与现有技术不同,分段进行而不是一条链进行,从而与一条链(ss)RNA相比核酸夹板的链长非常短,容易纯化。

[0424] 图11示出了不使用模板DNA而是以相互之间的链为模版的方式进行制造的示例。

[0425] 图12示出了ssRNA100mer分6段RNA连接酶2的酶连接反应的应用例。例如,其可用于采用CRISPR-Cas9方法的基因组DNA的切割、编辑。

[0426] 图13示出了使用DNA夹板对转录产物和化学合成RNA进行连接的试验的概况。

[0427] 图14为目标物质和起始物质的示意图。

[0428] 图15示出了使用DNA夹板对转录产物和化学合成RNA进行连接_反应试验的概况。

[0429] 图16示出了实施例8的结果。实现了36个片段、共计790mer的连接。采用不是基于转录合成RNA和化学合成RNA的连接的RNA合成方法的方法实现了比上述实施例(560mer)更长的产物的合成(1)。另外,确定在连接部分以外也组装DNA夹板时,连接反应进行(1)。另外,如果在连接位点以外没有组装互补链,则连接反应难以进行。发现也会引起非特异性连接(2)。

[0430] 图17为使用DNA夹板对转录产物和化学合成RNA进行连接的实验的示意图。

[0431] 图18示出了使用DNA夹板对转录产物和化学合成RNA进行连接的实验的结果。

具体实施方式

[0432] 以下对本公开进一步进行详细说明。

[0433] 在整个说明书中,单数形式的表示在没有特别声明时,应理解为还包含其复数形式的概念。因此,单数形式的冠词(例如,英语的情况“a”、“an”、“the”等)在没有特别声明时,应理解为还包含其复数形式的概念。另外,本说明书中使用的术语在没有特别声明时,应理解为以在该领域中通常使用的意思来使用。因此,只要没有定义为其它意思,则本说明书中使用的全部专业术语和科学技术术语具有与本发明所属的领域的本领域技术人员通常理解相同的意思。在矛盾的情况下,本说明书(包括定义)优先。

[0434] (定义)

[0435] 本说明书中,“核苷酸”和“核苷酸分子”是指:糖部分形成了磷酸酯的核苷。本说明书中“核苷”是指碱基和糖通过N-糖苷键连接的化合物。糖部分为D-核糖的称为核糖核苷酸,通过RNA水解获得。糖部分为D-2’-脱氧核糖的称为脱氧核糖核苷酸,通过DNA的酶解获得。本说明书中,核苷酸可以是天然的或非天然的,也可以是人工合成的。“核苷酸”可以被改造,改造可以在碱基、糖部分和磷酸基团部分中的任一者或其组合上进行,优选地可以修饰核苷酸的糖部分、磷酸基团部分,和/或可以在核苷酸的3’位置处用磷酸基团修饰。核苷酸的改造体中,核苷酸的3’位置处用磷酸基团修饰,磷酸基团的至少一个氧原子可以被硫原子、硼(硼磷化)、甲基(甲基化)等取代。

[0436] 本说明书中,“寡核苷酸”、“寡核苷酸分子”、“多聚核苷酸”和“多聚核苷酸分子”可互换使用,是指两个以上核苷酸的聚合物,包括常用的核苷酸的聚合物或寡聚物。有时也将

“寡核苷酸”、“寡核苷酸分子”、“多聚核苷酸”和“多聚核苷酸分子”称为“oligo”、“核酸”或“核酸链”。“寡核苷酸”、“寡核苷酸分子”、“多聚核苷酸”和“多聚核苷酸分子”可以被改造。

[0437] 本说明书中,核酸的上下文中使用的“改造”(也称为“修饰”,英语中通常均为modification/modify,包含substitution、substitute、displacement、displace、replacement,replace的概念。)是指,核酸的结构单元或其末端的部分或全部被其它原子团取代,或添加官能团的状态。含有此类“改造”的物质被称为(DNA、RNA、核酸或寡核苷酸等的)“改造体”。改造在核苷酸中可以在碱基、糖部分和磷酸基团部分的任一者或其组合上进行,优选地可以修饰寡核苷酸或多聚核苷酸的糖部分、磷酸基团部分,和/或寡核苷酸或多聚核苷酸的3’端的3’位置处用磷酸基团修饰。在寡核苷酸或多聚核苷酸的改造体中,可以在寡核苷酸或多聚核苷酸的3’端的3’位置处用磷酸基团修饰,磷酸基团的至少一个氧原子被硫原子取代。本说明书中,“寡核苷酸的改造体”和“多聚核苷酸的改造体”可互换使用,是指核苷酸和/或核苷酸的改造体的聚合物或寡聚物。作为寡核苷酸的改造体可列举出所有可被甲基化等烷基化的改造体,可举出包含本说明书中公开的任意的改造(通过各种取代基的改造)的改造形式,除此之外,在该领域中例如可列举出BNA(Bridged Nucleic Acid)、LNA(Locked Nucleic Acid)等,关于这种人工核酸等的改造体,参见Wengel et al., Eur.J.Org.Chem.2297-2321(2005)。将该文献作为本说明书的参考加以引用。本公开的“寡核苷酸”、“寡核苷酸分子”、“多聚核苷酸”和“多聚核苷酸分子”可以包含这种改造。

[0438] 本说明书中,“片段分子”是指在假定本公开的合成技术中作为合成目标的分子的情况下,将其作为整体考虑时比其分子整体短的分子,通过连接生成作为对象的分子整体的分子。在某个多聚核苷酸的情况下,通过连接该多聚核苷酸的片段分子,可以制造具有所需要的序列的(作为整体的)多聚核苷酸。

[0439] 本说明书中,“脱氧核糖核酸(DNA)”是指包含至少一个脱氧核糖核苷酸单体部分的分子。DNA可以用任意的官能团改造,作为DNA的改造体,包括但不限于交联型核酸:2’,4’-BNA/LNA、2’,4’-BNANC[N-Me]、2’-O,4’-C-乙烯-桥联型核酸(ENA)、酰胺-交联型核酸(AmNA)等。这样的改造型DNA也在本公开的”寡核苷酸”、“寡核苷酸分子”、“多聚核苷酸”和“多聚核苷酸分子”的范围内。

[0440] 本说明书中,“核糖核酸(RNA)”是指包含至少一个核糖核苷酸单体部分的分子。“核糖核苷酸”是指在β-D-核糖呋喃糖部分的2’位置处具有羟基的核苷酸。RNA可以用任意的官能团改造,作为RNA的改造体,包括但不限于2’-O-甲基RNA,2’-氟-RNA,2’-甲氧基乙基-RNA(MOE)等。这样的改造型RNA也在本公开的”寡核苷酸”、“寡核苷酸分子”、“多聚核苷酸”和“多聚核苷酸分子”的范围内。

[0441] 本说明书中“核酸碱基”或“碱基”是指构成核酸的碱基成分,例如,包括但不限于腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)、胞嘧啶(C)、胸腺嘧啶(T)、尿嘧啶(U)、次黄嘌呤(肌苷)、5-甲基胞嘧啶,N6-甲基腺嘌呤、1-甲基腺嘌呤、假尿苷、1-甲基假尿苷、5-溴尿嘧啶、5-碘尿嘧啶、6-硫腺嘌呤、6-硫鸟嘌呤、4-硫尿嘧啶,2-氨基嘌呤、2,6-二氨基嘌呤等。

[0442] 本说明书中,“模板核酸”是指具有与作为本公开的生产方法等技术的对象的多聚核苷酸或寡核苷酸或其改造体互补的序列的核酸。

[0443] 本说明书中,寡核苷酸(或多聚核苷酸)或其改造体的“3’端”是指与寡核苷酸(或多聚核苷酸)或其改造体的3’侧结合的末端单体部分。

[0444] 本说明书中寡核苷酸(或多聚核苷酸)或其改造体的“5’端”是指与寡核苷酸(或多聚核苷酸)或其改造体的5’侧结合的末端单体部分。

[0445] 本说明书中“连接”是指借助任意的化学键、连接体等进行连接,或连接的行为,作为该化学键,通常是共价键,但不限于此。

[0446] 本说明书中,“发生连接的条件”是指能够连接寡核苷酸(或多聚核苷酸)或其改造体的条件。在本公开中,“发生连接的条件”设想为使用连接酶等具有核酸连接活性的酶的条件和化学连接条件。发生化学连接的条件可列举出温度、pH、溶剂、盐浓度(缓冲液、氯化钠等)等,本领域技术人员可以进行适当调整。使用酶的条件也是适合于发生所使用的酶催化的所需反应的条件,例如,可列举出核酸片段等底物的浓度、酶的浓度、温度、pH、溶剂、盐浓度(缓冲液、氯化钠等)等,本领域技术人员可以进行适当调整。

[0447] 本说明书中,“集合”是指包含两个以上的片段分子的序列的集合体。该片段分子是寡核苷酸(或多聚核苷酸)或其改造体的片段分子。

[0448] 本说明书中“夹板”或“核酸夹板”可互换使用,是指核酸分子,其是在与其它核酸分子一起使用时,具有与该其它核酸分子的一部分互补的序列的核酸分子。核酸夹板可以是DNA也可以是RNA,但优选为DNA,在这种情况下称为DNA夹板。

[0449] 本说明书中,“互补”是指对于某一个核酸区域而言的、与另一个核酸区域之间的关系,是指两者具有可以以一定程度的亲和性相互作用的关系,典型而言,是指两个单链核酸的相似区域或同一单链核酸的两个不同区域中的核苷酸序列具有能够杂交的核酸碱基组成。相互杂交的序列可以通过标准核酸碱基对(例如,G:C、A:T或A:U的配对)与预想的靶序列完全互补或部分互补。“实质上互补”是指只要是杂交能够进行的条件,可以不是完全相同,尤其是在本公开的核酸分子的情况下,5’端或3’端的两者或任一者都可以缺损。例如,已证实5’端和3’端的两端缺损数个碱基,反应毫无影响仍可进行(参见实施例、图6-1、7-1、8-1等。)

[0450] 本说明书中,“杂交”是指核酸互补而形成复合物。

[0451] 本说明书中“实质上互补”是指在核酸夹板与单链核酸可形成双链的范围内具有互补序列。

[0452] 本说明书中“连接部分”是指片段分子连接而成的部分。在本公开中,多聚核苷酸片段分子借助连接部分连接从而形成多聚核苷酸。

[0453] 本说明书中,“突出”是指核酸的3’端超过与其杂交的另一个互补核酸的5’端而延伸出的部分,或相反,核酸的5’端超过与其杂交的另一个互补核酸的3’端而延伸出的部分。这种情况也可以称为:两个以上的核酸夹板和所述多聚核苷酸片段分子具有被设计为在与特定序列对齐时(优选核酸的3’端超出与其杂交的另一个互补核酸的5’端)错开1个碱基以上(例如,2～8mer等)的序列。

[0454] 本说明书中,“对齐”(以及其英文名词形式的比对)是指多聚核苷酸片段分子与核酸夹板杂交时,使多个多聚核苷酸片段分子或核酸夹板以发生相互作用的形式进行排序,通常是指一定程度的互补序列以一致的方式进行排列。对齐也可以通过该领域中所使用的任意的软件进行,例如可以利用BLAST等公众可利用的软件,但是可利用的软件不限于此。

[0455] 本说明书中,“缺失”一般是指本应存在的序列不再存在,在涉及本公开的关系中,典型而言,是指在多聚核苷酸片段分子与核酸夹板杂交时,部分(可以是1个碱基)碱基序列

不存在。

[0456] 本说明书中,“实质上没有缺失”一般是指存在本应存在的序列,或即使在不存在的情况下也仅存在不干扰实现目的程度的缺失,在涉及本公开的关系中,典型而言,是指在核酸夹板与单链核酸形成双链时,该核酸夹板之间相对于该单链核酸的序列优选缺失3个碱基以下。更优选为缺失2个碱基以下(例如,2个碱基、1个碱基或0个碱基),进一步更优选为缺失1个碱基以下。在此,单链核酸的两端互补这一点并非必需。此外,在使用多个核酸夹板的情况下,该多个核酸夹板可以不覆盖对应的特定序列。即,应当理解,在使用多个核酸夹板的情况下,核酸夹板与对应的特定序列比较,可以存在缺失部分。

[0457] 本说明书中,“相邻”是指两个核酸的位置关系,典型而言,某一个核酸与另一个核酸之间的位置关系以2个碱基以下(例如2个碱基、1个碱基或0个碱基)的形式并列。

[0458] 本说明书中,在涉及本公开的多聚核苷酸分子等的关系中,“距离”是指各分子之间的长度,典型而言,以核酸的碱基数量表示。

[0459] 本说明书中,“载体”是指连接核苷酸分子时,用于固定核苷酸分子的物质。载体的例子可列举出聚苯乙烯、CPG(可控微孔玻璃珠)或磁珠等,但是只要能够固定核苷酸分子即可,并不限于这些。

[0460] 本说明书中,“试剂盒”是指通常分为两个以上的隔间,并提供所应提供的部分的单元。当目的是提供由于稳定性等原因不应混合提供,优选在即将使用前混合并加以使用的组合物时,优选该试剂盒形式。

[0461] 本说明书中,“设计”是指提供具有所需要的序列的核酸和/或制作这种核酸的示意图。

[0462] 在本说明书中使用的情况下,“疾病”(disease)、“障碍”(disorder)和“状态”或“症状”(均为condition)可互换使用,是指研究对象偏离正常状态(正常或健康)的任意的状态。

[0463] (优选的实施方式)

[0464] 以下对本公开的优选的实施方式进行说明。应当理解,以下所提供的实施方式是为了更好的理解本公开的而提供的,本公开的范围不应局限于以下记载。因此,本领域技术人员可以参考本说明书中的记载,在本发明的范围内进行适宜变更是显而易见的。另外,可以理解,本发明的以下实施方式可以单独使用或组合它们来使用。

[0465] (使用核酸夹板的多聚核苷酸的连接)

[0466] 在一个方式中,本公开提供生产具有特定序列的多聚核苷酸分子的方法,该方法包含以下工序:1)提供两个以上的包含特定序列的一部分的多聚核苷酸片段分子的工序;以及2)在两个以上的核酸夹板存在的情况下连接两个以上的多聚核苷酸片段分子的工序,其中,使两个以上的多聚核苷酸片段分子的各序列集合则构成该特定序列,核酸夹板与多聚核苷酸分子实质上互补,核酸夹板中的至少两个核酸夹板包含与该特定序列对齐时实质上没有缺失的序列。本公开的示意图如图9所示。如图所示,在一个实施方式中,本公开的方法具有如下特征:通过以与作为特定序列的目标序列整体形成互补链的形式设计核酸夹板(在此为DNA夹板)的基础上,与现有技术不同,分段进行而不是以一条链进行,从而与单链(ss)RNA相比核酸夹板的链长非常短,容易纯化。示意图如图10所示。

[0467] 如图10所例示,在一个实施方式中,本公开的方法具有如下特征:通过以与作为特

定序列的目标序列整体形成互补链的形式设计核酸夹板(在此为DNA夹板)的基础上,与现有技术不同,分段而不是一条链,并以不连续的形式准备分段的夹板并实施,从而与单链(ss)RNA相比核酸夹板的链长非常短,容易纯化。本方法也可用于通过体外转录合成的RNA。通过对包含化学修饰的合成寡核酸进行部分连接,能够合成在任意位置插入化学修饰的长链核酸。

[0468] 在本公开中,特定序列可以是以生产或合成为目的的任何所需要的序列。特定序列的一部分只要是用于生产或合成的特定序列的一部分,则可以是任何部分,优选地,可以是5'端,也可以是序列的中间部分。关于包含特定序列的一部分的多聚核苷酸片段分子,一旦确定了特定序列,就可以通过合成等制备包含该序列的多聚核苷酸。

[0469] 在一个优选的实施方式中,所使用的片段为3个以上、4个以上、5个以上、6个以上、7个以上、8个以上、9个以上、10个以上。通过使用3个以上的片段,能够使连接反应的效率良好。

[0470] 在本公开中,在两个以上的核酸夹板存在的情况下,连接如上所述这样制备的两个以上的多聚核苷酸片段分子。该连接可以通过任意的方法进行,例如,使用促进连接酶、聚合酶等酶连接或化学连接的条件,本领域技术人员可以使用适当的条件。在本公开的连接过程中,通常,使两个以上的多聚核苷酸片段分子的各序列集合则实质上构成该特定序列。在此,所使用的核酸夹板与多聚核苷酸分子实质上互补,核酸夹板中的至少两个核酸夹板包含与该特定序列对齐时实质上没有缺失的序列是比较有利的。

[0471] 根据本公开的技术,通过采用使用核酸夹板连接多聚核苷酸的技术,能够实现多聚核苷酸间的反应性的提高和高反应收率。另外,通过采用本公开的技术,能够同时启动多个或所有的连接反应,从而能够实现反应性的提高和高反应收率。

[0472] 在一个实施方式中,本公开所使用的多聚核苷酸片段分子为RNA或修饰RNA。在本实施方式中,修饰可以是卤代(氟、氯、碘等)、取代(包含甲基等烷基;甲氧基、乙氧基等烷氧基等)或未取代的烷基(例如,甲基、乙基等)、核酸或修饰核酸(例如,BNA、LNA等)、硫代磷酸酯等等,其它修饰的示例在本说明书的其它地方描述。

[0473] 在一个实施方式中,本公开所使用的核酸夹板为DNA。DNA夹板可以被修饰。

[0474] 在一个实施方式中,本公开所使用的多聚核苷酸片段分子为RNA或修饰RNA,本公开所使用的核酸夹板为DNA。在这种情况下,可以使用RNA片段作为连接分子,使用DNA夹板,在这种情况下,通常连接使用RNA连接酶进行。

[0475] 在优选的实施方式中,使用的RNA连接酶可列举出T4 RNA连接酶、RtcB连接酶、T4 DNA连接酶(已知具有RNA连接作用者)、Splint(注册商标)连接酶等。

[0476] 在一个实施方式中,本公开所使用的多聚核苷酸片段分子为单磷酸体,更优选为RNA的单磷酸体。为单磷酸体这点有利于在使用连接酶等的合成反应中使用。单磷酸基团可存在于5'端或3'端或这两者。在一个实施方式中,本公开所使用的多聚核苷酸片段分子也可以不是磷酸体。

[0477] 在一个实施方式中,本公开所使用的多聚核苷酸片段分子通过选自由化学合成和转录合成组成的组中的至少一个方法提供。在通过化学合成提供的多聚核苷酸片段分子的情况下,不仅可以使用未修饰的RNA或DNA,也可以使用修饰的RNA或DNA,故而优选。在特定的实施方式中,可以使用化学合成的RNA或修饰RNA。这种化学合成的RNA或修饰RNA可使用

该领域公知的方法实现(例如,不限于Roy,S.;Caruthers,M.Synthesis of DNA/RNA and Their Analogs via Phosphoramidite and H-Phosphonate Chemistries.Molecules 2013,18,14268-14284.https://doi.org/10.3390/molecules181114268)。

[0478] 在另一个实施方式中,本公开所使用的多聚核苷酸片段分子通过化学合成和转录合成的两种方法提供。本公开的技术可以使用化学合成和转录合成中的任一者,也可以在混合两者的情况下进行使用。

[0479] 在一个具体实施方式中,包含本公开所使用的多聚核苷酸片段分子通过转录合成提供,并且包含在该转录合成后对该多聚核苷酸片段分子的5'端进行单磷酸化,所述连接通过RNA连接酶进行。因为通过单磷酸化,可以有利地使用RNA连接酶。单磷酸化可以通过使用RppH(RNA 5'焦磷酸水解酶(5'Pyrophosphohydrolase))等酶来实现,但不限于此。

[0480] 在一个实施方式中,本公开中所使用的核酸夹板与本公开中所使用的多聚核苷酸分子互补8mer以上。优选互补9mer以上、10mer以上、11mer以上、12mer以上、13mer以上、14mer以上、15mer以上、16mer以上、17mer以上、18mer以上、19mer以上、20mer以上。通过使用核酸夹板,能够通过纯化容易去除,也可以对核酸夹板进行再利用。观察发现,通过具有一定程度的互补长度,可提高酶促脱水缩合反应的效率。

[0481] 在一个实施方式中,与本公开中所使用的特定序列对齐了的核酸夹板和与本公开中所使用的特定序列对齐了的核酸夹板的相邻核酸夹板之间的距离为2个碱基以下。与仅部分互补地形成碱基对的情况相比,通过以与相邻的核酸夹板之间的距离为2个碱基以下的形式将核酸夹板与片段组装,能够实现反应性的提高和高反应收率。通过使距离合适,可实现反应性的提高和更高的反应收率,优选为2个碱基以下,更优选为1个碱基以下。

[0482] 在一个实施方式中,本公开中所使用的缺失为2个碱基以下,优选为1个碱基以下。虽然不希望受理论的约束,但优选缺失为1个以下的原因在于缺失少时连接活性高。

[0483] 在一个实施方式中,本公开中所使用的多聚核苷酸片段分子为10mer～50mer。优选为10mer～30mer。

[0484] 本公开中所使用的多聚核苷酸片段分子的长度没有特别限制。这些多聚核苷酸片段分子优选为例如能够与核酸夹板形成双链的长度。虽然不希望受理论的约束,但这是因为通过设为能够与核酸夹板形成双链的长度,本公开的反应高效进行。本领域技术人员考虑序列信息、反应条件等后可适当设置这样的能够与核酸夹板形成双链的长度。

[0485] 在一个实施方式中,本公开中所使用的核酸夹板为10mer～50mer。优选为12mer～35mer。通过使用多个分段的核酸夹板而不是使用长的全匹配单链核酸夹板,能够实现反应性的提高和高反应收率。

[0486] 本公开中所使用的核酸夹板的长度没有特别限制。这些核酸夹板例如优选为能够与多聚核苷酸片段分子形成双链的长度。

[0487] 在一个实施方式中,本公开中所使用的核酸夹板具有从多聚核苷酸片段分子的连接部分突出的序列。只要本公开的技术能够进行,则突出的碱基数量可以是任何长度,可以是1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个碱基等,只要确保核酸夹板和多聚核苷酸片段分子的互补序列为适当长度(例如,8mer等本说明书其他地方所描述的长度)可以是任何长度,例如优选为1～15mer、1～10mer、2～8mer、3～8mer等,例如可以是5mer以上。虽然不希望受理论的约束,但优选为突出5mer以上是因为连接活性高。

[0488] 在一个实施方式中,构成本公开的核苷酸的碱基通常是构成生物学存在的多聚核苷酸分子的天然碱基(例如,腺嘌呤和鸟嘌呤等嘌呤碱基、胞嘧啶、尿嘧啶和胸腺嘧啶等嘧啶碱基),根据情况也可以使用不是构成生物学存在的多聚核苷酸分子的碱基(本说明书中称为"非天然碱基")。作为该非天然碱基,可列举出肌苷、黄嘌呤、次黄嘌呤、努布拉林(nubularine)、异鸟嘌呤核苷(isoguanisine)、杀结核菌素(tubercidine)等,或例示出本公开中所说明的碱基的改造体。

[0489] 作为碱基的例子,作为天然碱基,例如可列举出腺嘌呤和鸟嘌呤等嘌呤碱基;胞嘧啶、尿嘧啶和胸腺嘧啶等嘧啶碱基等。除此以外,碱基可列举出肌苷、黄嘌呤、次黄嘌呤、努布拉林(nubularine)、异鸟嘌呤核苷(isoguanisine)、杀结核菌素(tubercidine)等。所述碱基例如可列举出2-氨基腺嘌呤、6-甲基化嘌呤等烷基衍生物;2-丙基化嘌呤等烷基衍生物;5-卤尿嘧啶和5-卤胞嘧啶;5-丙炔基尿嘧啶和5-丙炔基胞嘧啶;6-偶氮尿嘧啶、6-偶氮胞嘧啶和6-偶氮胸腺嘧啶;5-尿嘧啶(假尿嘧啶)、4-硫尿嘧啶、5-卤尿嘧啶、5-(2-氨基丙基)尿嘧啶、5-氨基烯丙基尿嘧啶;8-卤化、氨基化、硫醇化、硫烷基化、羟基化和其它8-取代的嘌呤;5-三氟甲基化和其它5-取代的嘧啶;7-甲基鸟嘌呤;5-取代的嘧啶;6-氮杂嘧啶;N-2、N-6和O-6取代的嘌呤(包含2-氨基丙基腺嘌呤);5-丙炔基尿嘧啶和5-丙炔基胞嘧啶;二氢尿嘧啶;3-脱氮-5-氮杂胞嘧啶;2-氨基嘌呤;5-烷基尿嘧啶;7-烷基鸟嘌呤;5-烷基胞嘧啶;7-脱氮腺嘌呤;N6,N6-二甲基腺嘌呤;2,6-二氨基嘌呤;5-氨基-烯丙基-尿嘧啶;N3-甲基尿嘧啶;取代的1,2,4-三唑;2-吡啶酮;5-硝基吲哚;3-硝基吡咯;5-甲氧基尿嘧啶;尿嘧啶-5-氧乙酸;5-甲氧基羰基甲基尿嘧啶;5-甲基-2-硫尿嘧啶;5-甲氧基羰基甲基-2-硫尿嘧啶;5-甲基氨基甲基-2-硫尿嘧啶;3-(3-氨基-3-羧丙基)尿嘧啶;3-甲基胞嘧啶;5-甲基胞嘧啶;N4-乙酰胞嘧啶;2-硫胞嘧啶;N6-甲基腺嘌呤;N6-异戊基腺嘌呤;2-甲基硫-N6-异戊烯基腺嘌呤;N-甲基鸟嘌呤;O-烷基化碱基等。另外,嘌呤碱基和嘧啶碱基中包含例如美国专利第3,687,808号、"Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering",858~859页,Kroschwitz J.I.编,John Wiley&Sons,1990,和Englisch et al.,Angewandte Chemie,International Edition,1991,30卷,p.613中公开的碱基。

[0490] 在一个实施方式中,本公开中所使用的多聚核苷酸片段分子的至少一个末端具有载体和键。优选本公开中所使用的载体为聚苯乙烯、CPG(可控微孔玻璃珠)或磁珠。通过使用载体能够增加收量。

[0491] 在一个实施方式中,本公开中所使用的多聚核苷酸连接反应在多个位置同时启动。虽然不希望受理论的约束,但优选同时启动的原因可以举出连接反应工序的简化,但不限于此。

[0492] 在一个实施方式中,本公开中所使用的多聚核苷酸连接反应顺序启动。虽然不希望受理论的约束,但优选顺序启动的原因在于通过顺序启动进行反应,有时收率会高。

[0493] 在优选的实施方式中,更优选本公开的生产具有特定序列的多聚核苷酸分子的方法的特征在于实施以下方法:

[0494] 1)提供两个以上的包含特定序列的一部分的多聚核苷酸片段分子的工序中,提供3个以上片段分子,

[0495] 2)在两个以上的核酸夹板存在的情况下连接两个以上的多聚核苷酸片段分子的工序中,提供3个以上核酸夹板,连接通过脱水缩合等进行,

[0496] 使两个以上的多聚核苷酸片段分子的各序列集合则构成该特定序列,核酸夹板与多聚核苷酸分子互补,核酸夹板中的至少两个核酸夹板包含与该特定序列对齐时没有缺失的序列。

[0497] 在一个实施方式中,连接通过酶连接反应实施。在这种情况下,酶连接反应可以同时或不同时实施。优选酶连接反应同时实施,但确认到即使不同时,反应也不受影响,仍可进行,并无特别限定。酶连接反应中,可以(A)以所述多聚核苷酸片段分子的、成为比特定序列短的组合进行一次连接反应后,使用该一次连接反应的产物进行下一次连接反应,(B)根据需要重复(A)。总延伸成为175～200mer的组合可以是任意长度,例如,可以是100～500mer、150～400mer或175～200mer、50～300mer、80～500mer、200～400mer等。

[0498] 本公开的技术被认为具有以下特征。作为一个非限定性的特征,确认到通过同时启动所有的酶连接反应,例如在长序列(例如560mer)的合成中,启动较短序列(例如175～200maer)的反应效率会较好,即使同时启动的情况下也可以确认反应产物。另外,作为非限定性的特征,通过以目标序列中所含的所有的碱基形成碱基对的方式设计核酸夹板(例如DNA夹板),并使用分成多段的核酸夹板(例如DNA夹板)而不是单纯地使用长的全匹配单链核酸夹板(例如DNA夹板),且设计为连接位点突出数个碱基方式,从而通过固相合成和连接的组合,成功地提供了例如长(500mer以上等)单链RNA的合成,这是过去从未见过的。

[0499] 因此应当理解,在本公开中,作为非限定性的特征,与在连接位点±数个碱基程度处组装核酸夹板(例如DNA夹板)相比,本公开的酶连接反应效率良好,并且,与单纯地使用长的全匹配单链核酸夹板(例如DNA夹板)的情况相比,酶连接反应的效率良好。另外,作为非限定性的特征,应当理解,与碱基对形成发生部分缺损的情况相比,针对所有的片段组装核酸夹板(例如DNA夹板)的方式的反应效率良好,这是优选的。另外,本公开不作限定,但作为一个典型的例子,核酸夹板(例如DNA夹板)的链长比最终产物短,因此通过纯化容易去除。应当理解,从原理上来说,也可以进行核酸夹板(例如DNA夹板)的再利用。作为本公开的非限定性的特征,例如,在通过连续合成来合成单链长链的目标序列核酸(RNA等)时不能使用聚苯乙烯等负载量高的载体,但在短目标序列核酸(RNA等)中可以使用,可期待每批次RNA合成的收量增加。

[0500] 在一个方式中,本公开提供通过本说明书所述连接反应进行连接的多聚核苷酸。虽然不希望受理论的约束,但该多聚核苷酸具有以多个化学合成的短链多聚核苷酸为起始物质的长链多聚核苷酸的特征,这可以是以往无法提供的多聚核苷酸。

[0501] (制造试剂盒)

[0502] 在另一个方式中,本公开提供用于生产本说明书所述的具有特定序列的多聚核苷酸分子的试剂盒,其包含:1)两个以上的包含本说明书所述的特定序列的一部分的多聚核苷酸片段分子,以及2)两个以上的核酸夹板,使该两个以上的多聚核苷酸片段分子的各序列集合则构成本说明书所述的特定序列,本说明书所述的核酸夹板与该多聚核苷酸分子实质上互补,核酸夹板中的至少两个核酸夹板包含与该特定序列对齐时实质上没有缺失的序列。应当理解,在此所述的各种实施方式可以适当组合应用(使用核酸夹板的多聚核苷酸的连接)中所述的任意方式。

[0503] 在一个优选的实施方式中,所使用的片段为3个以上、4个以上、5个以上、6个以上、7个以上、8个以上、9个以上、10个以上。通过使用3个以上的片段,能够使连接反应的效率良

好。对此不作限定,所使用的多聚核苷酸片段分子可以是100个以下、90个以下、80个以下、70个以下、60个以下、50个以下、40个以下等,但不限于此,也可以使用此数量以上的数量。

[0504] 在一个实施方式中,提供本公开的试剂盒中所使用的核酸夹板与本公开中所使用的多聚核苷酸分子互补8mer以上的试剂盒。优选为互补9mer以上、10mer以上、11mer以上、12mer以上、13mer以上、14mer以上、15mer以上、16mer以上、17mer以上、18mer以上、19mer以上、20mer以上。通过使用核酸夹板,比最终产物短,因此能够通过纯化容易去除,也可以对核酸夹板进行再利用。在配置于试剂盒的情况下,这些核酸夹板除了实际使用的核酸夹板外,还可以包含备用的核酸夹板、序列稍有不同的核酸夹板、长度不同的核酸夹板。本领域技术人员可以在使用时适当选择合适的核酸夹板来实施本公开的方法。

[0505] 在一个实施方式中,在本公开的试剂盒中,与特定序列对齐了的核酸夹板和与本公开中所使用的特定序列对齐了的核酸夹板的相邻核酸夹板之间的距离为2个碱基以下。与仅部分互补地形成碱基对的情况相比,通过以与相邻的核酸夹板之间的距离为2个碱基以下的形式将核酸夹板与片段组装,能够实现反应性的提高和高反应收率。在配置于试剂盒的情况下,这些核酸夹板除了实际使用的核酸夹板外,还可以包含备用的核酸夹板、序列稍有不同的核酸夹板、长度不同的核酸夹板。本领域技术人员可以在使用时适当选择合适的核酸夹板来实施本公开的方法。

[0506] 在一个实施方式中,本公开的试剂盒中所使用的核酸夹板在与特定序列对齐时,缺失为2个碱基以下。

[0507] 在一个实施方式中,本公开的试剂盒中所使用的多聚核苷酸片段分子为14mer～46mer。优选为10mer～30mer。通过使用分成多段的核酸夹板而不是使用长的全匹配单链核酸夹板,能够实现反应性的提高和高反应收率。在配置于试剂盒的情况下,这些多聚核苷酸片段分子除了实际使用的多聚核苷酸片段分子外,还可以包含备用的多聚核苷酸片段分子、序列稍有不同的多聚核苷酸片段分子、长度不同的多聚核苷酸片段分子。本领域技术人员可以在使用时适当选择合适的多聚核苷酸片段分子来实施本公开的方法。

[0508] 在一个实施方式中,本公开的试剂盒中所使用的核酸夹板具有从多聚核苷酸片段分子的连接部分突出4mer以上的序列。在配置于试剂盒的情况下,这些核酸夹板和多聚核苷酸片段分子除了实际使用的核酸夹板和多聚核苷酸片段分子外,还可以包含备用的核酸夹板和多聚核苷酸片段分子、序列稍有不同的核酸夹板和多聚核苷酸片段分子、长度不同的核酸夹板和多聚核苷酸片段分子,可以贴上易于找到合适的组合的标签。本领域技术人员可以在使用时适当选择合适的多聚核苷酸片段分子来实施本公开的方法。

[0509] 在一个实施方式中,本公开的试剂盒中所包含的多聚核苷酸片段分子的至少一个末端具有载体和键。优选本公开的试剂盒中所包含的载体为聚苯乙烯、CPG(可控微孔玻璃珠)或磁珠。通过使用载体能够增加收量。

[0510] (材料提供、设计程序)

[0511] 在配置于试剂盒的情况下,这些载体除了实际使用的载体外,还可以包含备用的载体、种类不同的载体,可以贴上易于找到合适的组合的标签。本领域技术人员可以在使用时适当选择合适的载体来实施本公开的方法。

[0512] 在另一个方式中,本公开提供用于生产本说明书所述的具有特定序列的多聚核苷酸分子的方法,该方法包含以下工序:A)根据该特定序列设计两个以上的包含所需要的序

列的一部分的多聚核苷酸片段分子的工序;B)根据该特定序列设计两个以上的核酸夹板的工序;C)提供所设计的多聚核苷酸片段分子和核酸夹板的工序;以及D)在该所设计的核酸夹板存在的情况下连接该所设计的多聚核苷酸片段分子的工序,其中,使该两个以上的多聚核苷酸片段分子的各序列集合则构成该特定序列,该核酸夹板与该多聚核苷酸分子实质上互补,该核酸夹板中的至少两个核酸夹板包含与该特定序列对齐时实质上没有缺失的序列。应当理解,在此所述的各种实施方式可以适当组合应用(使用核酸夹板的多聚核苷酸的连接)中所述的任意方式。

[0513] 在另一个方式中,本公开提供用于生产本说明书所述的具有特定序列的多聚核苷酸分子的多肽片段和核酸夹板的生产方法,该方法包含以下工序:A)根据该特定序列设计两个以上的包含该所需要的序列的一部分的多聚核苷酸片段分子的工序;B)根据该特定序列设计两个以上的核酸夹板的工序;以及C)生产所设计的多聚核苷酸片段分子和两个以上的核酸夹板的工序,其中,使该两个以上的多聚核苷酸片段分子的各序列集合则构成该特定序列,该核酸夹板与该多聚核苷酸分子实质上互补,该核酸夹板中的至少两个核酸夹板包含与该特定序列对齐时实质上没有缺失的序列。应当理解,在此所述的各种实施方式可以适当组合应用(使用核酸夹板的多聚核苷酸的连接)中所述的任意方式。

[0514] 在另一个方式中,本公开提供用于生产具有特定序列的多聚核苷酸分子的多肽片段和核酸夹板的设计方法,该方法包含以下工序:A)根据该特定序列设计两个以上的包含所需要的序列的一部分的多聚核苷酸片段分子的工序;以及B)根据该特定序列设计两个以上的核酸夹板的工序,其中,使该两个以上的多聚核苷酸片段分子的各序列集合则构成该特定序列,该核酸夹板与该多聚核苷酸分子实质上互补,该核酸夹板中的至少两个核酸夹板包含与该特定序列对齐时实质上没有缺失的序列。应当理解,在此所述的各种实施方式可以适当组合应用(使用核酸夹板的多聚核苷酸的连接)中所述的任意方式。

[0515] 在另一个方式中,本公开提供用于使计算机执行一种用于生产具有特定序列的多聚核苷酸分子的多肽片段和核酸夹板的设计方法的程序,该方法包含以下工序:A)根据该特定序列设计两个以上的包含所需要的序列的一部分的多聚核苷酸片段分子的工序,以及B)根据该特定序列设计两个以上的核酸夹板的工序,其中,使该两个以上的多聚核苷酸片段分子的各序列集合则构成该特定序列,该核酸夹板与该多聚核苷酸分子实质上互补,该核酸夹板中的至少两个核酸夹板包含与该特定序列对齐时实质上没有缺失的序列。应当理解,在此所述的各种实施方式可以适当组合应用(使用核酸夹板的多聚核苷酸的连接)中所述的任意方式。

[0516] (药物方面等的应用)

[0517] 本发明可以作为药物应用。

[0518] 例如,本公开的组合物和方法可用于对有需要的个体的处置。在特定的实施方式中,个体为哺乳动物,例如人类等,或非人类哺乳动物。当向动物,例如人类等给药时,组合物或化合物优选作为例如包含本公开的化合物和药学上可接受的载体的药物组合物进行给药。药学上可接受的载体可列举出本技术领域所熟知的、例如水或缓冲生理盐水等水溶液,或者其它溶剂或赋形剂,例如乙二醇、甘油、橄榄油等油,或者注射用的有机酯。在优选的实施方式中,这种药物组合物在用于对人给药,尤其是通过侵入性途径给药的情况下(即,例如,避免借助上皮屏障的运输或扩散的注射或植入等途径),水溶液不含热原或实质

上不含热原。例如,可以选择赋形剂来实现药剂的延迟释放或选择性地靶向一个或多个细胞、组织或器官。药物组合物可以是单位剂型,例如片剂、胶囊剂(包括微丸胶囊剂和明胶胶囊剂)、颗粒剂、冻干复溶剂、散剂、液体制剂、糖浆剂、栓剂或注射等。组合物还可以存在于透皮递送系统,例如皮肤贴片中。组合物还可以存在于适合局部给药的液体制剂,例如滴眼液等中。

[0519] 本公开还可广泛应用于基因组编辑技术中。对此不作限定,例如,可以应用于基因组编辑中使用的sgRNA,特别是其生产中(J.Filippova et al.,Biochimie 167 2019 49-60,Ayal Hendel et al.nature biotechnology 33 2015985-989)。虽然不希望受理论的约束,但通过使用包含本公开的改造(修饰)碱基的寡核苷酸或其改造体(寡核酸),可能会增加活性,因此可以作为一个用途设想将使用本公开的技术合成的包含修饰碱基的寡核酸的片段连接起来进行制作。作为另一个实施方式,也可以设想不使用模板DNA而是以相互之间的链成为模版的方式制造T.Seya et al.Advanced Drug Delivery Reviews 147 2019 37-43中所描述的比较长的双链(图11)。

[0520] 作为另一个实施方式,例如,可以将长链非编码RNA(long non-coding RNA;lncRNA)、mRNA作为对象。

[0521] 在将通过本公开生产的多聚核苷酸分子作为药物使用时,可考虑给药的“对象”包含但不限于人类(即,任意年龄组的男性或女性,例如,儿科的对象(例如婴儿、儿童、青少年)或成人的对象(例如青年人、中年人或老年人))和/或其它非人类动物,例如哺乳动物(例如灵长类动物(例如食蟹猴、恒河猴)、商业相关哺乳动物例如牛、猪、马、绵羊、山羊、猫和/或狗)和禽类(例如商业相关禽类,例如鸡、鸭类、鹅和/或火鸡)、爬行类、两栖类和鱼类。在某些实施方式中,非人类动物为哺乳动物。非人类动物可以是处于任何发育时期的雄性或雌性。非人类动物可以是转基因动物。

[0522] 在本说明书中使用的情况下,除非另有特别限定说明,术语“进行治疗”、“所进行的治疗”,和“治疗”(英语中为treat、treating、treatment)是在对象患有疾病、障碍或状态期间发生的,用于减少疾病、障碍或状态的严重程度或延迟或减缓疾病、障碍或状态进展的行为(狭义的“治疗”(therapy)),或者还包含对象在患有障碍之前,阻止成为疾病、障碍或状态或在实际发展成为疾病、障碍或状态的情况下减轻其严重程度的行为(“预防”)。

[0523] 一般而言,化合物的“有效量”是指引起所需生物反应,例如,足以治疗疾病、障碍或状态的量。本领域技术人员当然可以理解,本公开的化合物的有效量可以根据所需生物学终点、化合物的药代动力学、所要治疗的疾病、障碍或状态、给予的方式、以及年龄、健康和对象等因素发生变化。有效量包含治疗和预防性治疗。

[0524] 在本说明书中所使用的情况下,除非另有特别限定说明,化合物的“治疗有效量”是指足以在治疗疾病、障碍或状态时提供治疗效果,或者足以延缓或减轻疾病、障碍或状态相关的一种或两种以上的症状的量。化合物的治疗有效量是指单独或与其他疗法联合,在治疗疾病、障碍或状态时提供治疗效果的治疗剂的量。术语“治疗有效量”可以涵盖改善整体疗法、减少或防止疾病、障碍或状态的症状或原因、或者增强其他的治疗剂的治疗有效性的量。

[0525] 在本说明书中所使用的情况下,除非另有特别限定说明,化合物的“预防有效量”是指足以预防疾病、障碍或状态,或者与疾病、障碍或状态相关的一种或两种以上的症状,

或者足以预防其复发的量。化合物的预防有效量是指单独或与其他药剂组合,在预防疾病、障碍或状态时提供预防效果的治疗剂的量。术语“预防有效量”可以涵盖改善整体预防或增强其他的预防剂的预防有效性的量。

[0526] 示例性疾病、障碍或状态包括但不限于增生性、神经性、免疫性、内分泌性、心血管性、血液性、炎症性和以细胞死亡为特征的障碍。

[0527] 在本说明书中所使用的情况下,增殖性的疾病、障碍或状态包括但不限于癌症、造血系统肿瘤、增生性乳腺疾病、肺增生性障碍、结肠增生性障碍、肝脏增生性障碍和卵巢增生性障碍。

[0528] 本说明书所述的寡核苷酸或其改造体可用于核酸药物。

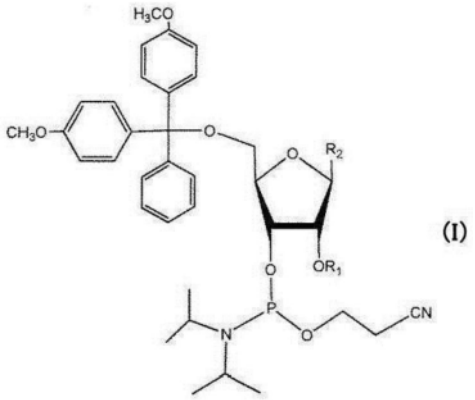
[0529] (本公开的化合物的制造方法)

[0530] 以下关于本公开的化合物的制造方法,在实施例中列举了具体的合成例,但并不限于此,以下列举代表性方案进行说明,但本公开原本就不限于此。

[0531] 本公开的化合物例如可以通过以下所述制造方法进行制造,但不限于此。这些制造方法可以根据熟练掌握有机合成化学的人员的知识进行适当改进。在下述制备方法中,用作原料的化合物只要不干扰反应,就可以使用其盐。

[0532] 本公开的多聚核苷酸片段分子和核酸夹板例如可以通过固相合成法制备。更具体而言,可以根据亚磷酰胺法,使用核酸合成仪(nS-8II;株式会社GeneDesign制,Oligopilot;Cytiva公司制)制备。亚磷酰胺法是将解封、偶联和氧化三个阶段作为一个循环重复该循环直至得到所需碱基序列的方法。关于各试剂,例如,可以使用多孔玻璃或聚苯乙烯作为固相载体,使用二氯乙酸甲苯溶液或三氯乙酸二氯甲烷溶液作为解封溶液,使用5-苄硫基-1H-四氮唑作为偶联剂,使用碘溶液作为氧化剂,使用乙酸酐溶液和N-甲基咪唑溶液作为加帽溶液来进行。关于从固相合成后的固相载体进行切取和脱保护,例如,可以加入氨水溶液,氨水溶液和乙醇的混合物,甲胺和氨水溶液的混合物,进行碱基部分和磷酸基的脱保护以及从固相载体的切取后,过滤固相载体,然后,使用四丁基氟化铵或用三乙胺中和的氢氟酸进行2′-羟基的脱保护,从而制备多聚核苷酸片段分子和核酸夹板。

[0533] 作为该固相合成法中所使用的AMIDITE,没有特别限制,例如,也可以使用下述结构式(I)中的R1被叔丁基二甲基硅基(TBDMS)基团、双(2-乙酰氧基)甲基(ACE)基团、(三异丙基硅氧基)甲基(TO M)基团、(2-氰基乙氧基)乙基(CEE)基团、(2-氰基乙氧基)甲基(CEM)基团、对甲苯磺酰基乙氧基甲基(TEM)基团、(2-氰基乙氧基)甲氧基甲基(EMM)基等保护的TBDMS AMIDITE(TBDMS RNA Amidites、商品名ChemGenes Corporation)、ACE AMIDITE、TOM AMIDITE、CEE AMIDITE、CEM AMIDITE、TEM AMIDITE(Chakhmakhcheva的综述:Protective Groups in the Chemical Synthesis of Oligoribonucleotides,Russian Journal of Bioorganic Chemistry,2013,Vol.39,No.1,pp.1-21.)、EMM AMIDITE(记载于国际公开第2013/027843号)等。

[0534] 

(I)

[0535] 体外转录反应是通常使用T7 RNA聚合酶或SP6 RNA聚合酶,以具有由该酶特异性识别的启动子区域序列的双链DNA为模板,合成单链RNA的反应(例如参见Beckert B,Masquida B.Synthesis of RNA by in vitro transcription.Methods Mol Biol.2011;703:29-41.doi:10.1007/978-1-59745-248-9_3.PMID:21125481.)。

[0536] 以上为了便于理解示出优选的实施方式对本公开进行了说明。以下根据实施例对本公开进行说明,但上述说明和以下的实施例仅出于示例性的目的提供,而并非出于限定本公开的目的提供。因此,本公开的范围不限于本说明书具体记载的实施方式也不限于实施例,仅通过专利请求书进行限定。

[0537] 实施例

[0538] 在本实施例中,对涉及本公开的化合物的制造、用途的实施例进行说明。

[0539] (实施例1)在使用核酸链无间隙填补时的连接反应的跟踪

[0540] 在本实施例中,使用核酸链无间隙填补进行连接反应。具体如下。

[0541] (材料和步骤)

[0542] 使用以下的试剂、片段。

[0543] • 试剂

[0544] T4 RNA连接酶2(New England biolab公司制,10U/μL)

[0545] 1M Tris-HCl(pH 7.5)(NIPPON GENE公司制)

[0546] 1M $MgCl_2$(NIPPON GENE公司制)

[0547] 100mM ATP(富士胶片和光纯药公司制)

[0548] 1M DTT(Sigma-Aldrich公司制)

[0549] • 核酸片段

[0550] • 核酸链

[0551] (通用)

[0552] 1.Sg1 5'-GGAAAUUAGGUGCGCUUGGC-3'(序列号1)

[0553] 2.sg2 5'-pGUUUUAGAGCUAGAA-3'(序列号2)

[0554] 3.sg3 5'-pAUAGCAAGUUAAAAUAAGG-3'(序列号3)

[0555] 4.sg4 5'-pCUAGUCCGUUAUCAACUU-3'(序列号4)

[0556] 5.sg5 5'-pGAAAAAGUGGCACC-3'(序列号5)

[0557] 6.sg6 5'-pGAGUCGGUGCUUUU-3'(序列号6)

[0558] (新方法)

[0559] 7.Spsg1 5'-ctaaaacgccaagcgcacctaatttcc-3'(序列号7)

[0560] 8.Spsg2 5'-ttttaacttgctatttctagct-3'(序列号8)

[0561] 9.Spsg3 5'-ctttttcaagttgataacggactagcctta-3'(序列号9)

[0562] 10.Spsg4 5'-aaaagcaccgactcggtgcca-3'(序列号10)

[0563] (现有方法1)11.Spsg1_16 5'-tctaaaacgccaagcg-3'(序列号11)

[0564] 12.Spsg2_14 5'-ttgctatttctagc-3'(序列号12)

[0565] 13.Spsg3_18 5'-acggactagccttatttt-3'(序列号13)

[0566] 14.Spsg4_14 5'-ctttttcaagttga-3'(序列号14)

[0567] 15.Spsg5_14 5'-ccgactcggtgcca-3'(序列号15)

[0568] (现有方法2)

[0569] 16.Spsg1005'-aaaagcaccgactcggtgccacttttcaagttgataacggactagccttatttt aacttgctatttctagctctaaaacgccaagcgcacctaatttcc-3'(序列号16)

[0570] 所使用的核酸组合如图1-1所示。

[0571] 按照以下步骤进行酶连接。

[0572] (本公开的方法)

[0573] 本例在所有的RNA上组装了分段的互补链核酸夹板。

[0574] 步骤的具体情况如下。

[0575] (1)将核酸链1～6混合至最终浓度各为25μM,7～10混合至最终浓度各为37.5μM,在80℃下加热3分钟后,用25分钟冷却至5℃。

[0576] (2)按以下浓度混合核酸链、反应试剂。

[0577] 10μM核酸链1～6

[0578] 15μM核酸链7～10

[0579] [将(1)的溶液稀释2.5倍]

[0580] 50mM Tris-HCl(pH7.5)

[0581] 2mM $MgCl_2$

[0582] 0.4mM ATP

[0583] 1mM DTT

[0584] 0.5U/μL T4 RNA连接酶2

[0585] (3)使在(2)中混合的溶液在25℃下进行连接反应。

[0586] (4)在反应开始1、4、24、48小时后对连接反应溶液进行适当采样,并与等量的5mM EDTA溶液混合,用于后续分析。

[0587] (比较例1:现有方法1)

[0588] 从连接部分起以每次数个碱基的方式组装互补链核酸夹板。

[0589] 步骤的详细情况如下。

[0590] (方法)

[0591] (1)将核酸链1～6混合至最终浓度各为25μM,11～15混合至最终浓度各为37.5μM,在80℃下加热3分钟后,用25分钟冷却至5℃。

[0592] (2)按以下浓度混合核酸链、反应试剂。

[0593] 10μM核酸链1～6

[0594] 15μM核酸链11～15

[0595] [将(1)的溶液稀释2.5倍。]

[0596] 50mM Tris-HCl(pH7.5)

[0597] 2mM $MgCl_2$

[0598] 0.4mM ATP

[0599] 1mM DTT

[0600] 0.5U/μL T4 RNA连接酶2

[0601] (3)使在(2)中混合的溶液在25℃下进行连接反应。

[0602] (4)在反应开始1、4、24、48小时后对连接反应溶液进行适当采样,并与等量的5mM EDTA溶液混合,用于后续分析。

[0603] (比较例2:现有方法2)

[0604] 除了使用单链的长链互补链核酸夹板以外,采用与上述实施例实质上相同的条件。

[0605] (方法)

[0606] 步骤的详细情况如下。

[0607] (1)将核酸链1～6混合至最终浓度各为25μM,16混合至最终浓度各为37.5μM,在80℃下加热3分钟后,用25分钟冷却至5℃。

[0608] (2)按以下浓度混合核酸链、反应试剂。

[0609] 10μM核酸链1～6

[0610] 15μM核酸链16

[0611] [将(1)的溶液稀释2.5倍。]

[0612] 50mM Tris-HCl(pH7.5)

[0613] 2mM $MgCl_2$

[0614] 0.4mM ATP

[0615] 1mM DTT

[0616] 0.5U/μL T4 RNA连接酶2

[0617] (3)使在(2)中混合的溶液在25℃下进行连接反应。

[0618] (4)在反应开始1、4、24、48小时后对连接反应溶液进行适当采样,并与等量的5mM EDTA溶液混合,用于后续分析。

[0619] (变性PAGE)

[0620] 步骤的详细情况如下。

[0621] (1)将酶连接反应样品1μL与含有溴酚蓝的甲酰胺混合,在80℃下加热5分钟。将加热后的样品立即在冰中骤冷。

[0622] (2)将2μL(1)的溶液上样到含有7.5M尿素和1xTBE的8％丙烯酰胺凝胶上,使用1xTBE缓冲液在300V的电压下电泳20分钟。

[0623] (3)用溴化乙锭对电泳后的凝胶进行染色后,用透射仪拍照。

[0624] (基于UHPLC、LC-MS的测定)

[0625] 步骤的详细情况如下。

[0626] 通过以下条件对由苯酚、氯仿萃取等去除酶蛋白的酶连接反应溶液进行UHPLC、

LC-MS分析。

[0627] • 柱:ACQUITY UPLC Oligonucleotide BEH C18 Column、130A、1.7μm、2.1mm x 100mm

[0628] • 流动相:A)100mM六氟-2-丙醇(HFIP)-8mM三乙胺(TEA)、B)甲醇(MeOH)

[0629] • 分析条件:B5-20%、60分、80℃、0.2ml/min

[0630] (通过UHPLC的反应跟踪)

[0631] 步骤的详细情况如下

[0632] 按照以下条件进行UHPLC分析。

[0633] • 柱:ACQUITY UPLC Oligonucleotide BEH C18 Column、130A、1.7μm、2.1mm x 100mm

[0634] • 流动相:A)100mM六氟-2-丙醇(HFIP)-8mM三乙胺(TEA)、B)甲醇(MeOH)

[0635] • 分析条件:B5-20%、60分、80℃、0.2ml/min

[0636] (结果)

[0637] ssRNA(短链RNA)100mer分6段RNA连接酶2的酶连接的结果如图1-2所示。

[0638] 另外,变性PAGE的结果如图1所示

[0639] 如图1-2所示,可明确:在新方法中,与现有方法1相比,在短时间内生成100mer的连接反应产物。

[0640] 另外,基于HPLC、LC-MS的测定结果如图2所示。

[0641] 本试验中的目标产物的理论分子量为32285.2。LC-MS分析中实测质量为32285.5。因此可明确本试验中的酶连接产物为目标100mer RNA。

[0642] 接下来,通过UHPLC进行反应跟踪的结果如表1和图3所示。

[0643] 本试验中的100mer酶连接产物的UHPLC面积%如图3所示。与现有方法1和2相比,通过新方法进行连接反应的情况下,反应速度高。

[0644] [表1]

[0645]

反应产物量(UHPLC面积%)			
	新方法	现有方法1	现有方法2
0h	0	0	0
1h	1.79	0.62	1
4h	64.69	12.38	22.88
24h	76.14	46.91	33.21
48h	75.24	58.24	33.57

[0646] (实施例2)使用修饰碱基(PS化,2'-OMe,2'-F等)的实施例

[0647] 接下来,使用修饰碱基(PS化,2'-OMe,2'-F等)进行同样的连接实验。

[0648] 以下示出其步骤。

[0649] (材料)

[0650] 使用的寡核酸

[0651] [表2]

[0652]

	序列名称	5' 修饰	序列(5' → 3')	3' 修饰
1	sg1_1		GGAAAUUAGGUGCGCUUGGC（序列号17）	
2	sg2_1	p	GUUUUAGAGCUAGAA（序列号18）	
3	sg3_1	p	AUAGCAAGUUAAAAUAAGG（序列号19）	
4	sg4_1	p	CUAGUCCGUUAUCAACUU（序列号20）	
5	sg5_1	p	GAAAAAGUGGCACC（序列号21）	
6	sg6_1	p	GAGUCGGUGCUUUU（序列号22）	
7	sg1_1_PS_OMe_3		G(M)^G(M)^A(M)^AAUUAGGUGCGCUUGGC（序列号23）	
8	sg6_1_PS_OMe_3	p	GAGUCGGUGCU^U(M)^U(M)^U(M)（序列号24）	
9	sg1_1_C20		G(M)^G(M)^A(M)^A(M)A(M)U(M)U(M)A(M)G(M)G(M)U(F)G(F)C(F)G(F)C^U^U(F)G(F)G^C(M)（序列号25）	
10	sg2_1_C20	p	G(M)U^U^U^U(F)A(F)G(M)A(M)G(M)C(M)U(M)A(M)G(M)A(M)A(M)（序列号26）	
11	sg3_1_T2	p	A(M)U(M)A(M)G(M)C(M)A(M)A(M)G(M)UUA(M)AA(M)A(M)UA(M)A(M)G(M)G(M)（序列号27）	
12	sg4_1_T2	p	CUA(M)GUCC(M)GUUA(M)U(M)C(M)A(M)A(M)C(M)U(M)U(M)（序列号28）	
13	sg5_1_T2	p	G(M)A(M)A(M)A(M)A(M)A(M)G(M)U(M)G(M)G(M)C(M)A(M)C(M)C(M)（序列号29）	
14	sg6_1_T2	p	G(M)A(M)G(M)U(M)C(M)G(M)G(M)U(M)G(M)C(M)^U(M)^U(M)^U(M)^U(M)（序列号30）	
15	sg3_1_T8	p	A(M)U(M)A(M)G(M)C(M)A(M)A(M)G(M)U(F)U(F)A(M)A(F)A(M)A(M)U(F)A(M)A(M)G(M)G(M)（序列号31）	
16	sg4_1_T8	p	C(F)U(F)A(M)G(F)U(F)C(F)C(M)G(F)U(F)U(F)A(M)U(M)C(M)A(M)A(M)C(M)U(M)U(M)（序列号32）	
17	sg2_1_C20_LNA	p	G(L)U^U^U^U(F)A(F)G(M)A(M)G(M)C(M)U(M)A(M)G(M)A(M)A(M)（序列号33）	
18	sg2_1_C20_BNA	p	G(E)U^U^U^U(F)A(F)G(M)A(M)G(M)C(M)U(M)A(M)G(M)A(M)A(M)（序列号34）	
19	sg2_1_C20_MOE	p	G(m)U^U^U^U(F)A(F)G(M)A(M)G(M)C(M)U(M)A(M)G(M)A(M)A(M)（序列号35）	
20	Spsg1_2		ctaaaacgccaagcgcacctaatttcc（序列号36）	
21	Spsg2_2		ttttaacttgctatttctagct（序列号37）	
22	Spsg_3_1		ctttttcaagttgataacggactagcctta（序列号38）	
23	Spsg_4_1		aaaagcaccgactcggtgcca（序列号39）	

[0653] 序列符号:Upper Case＝RNA/N(M)＝2'-OMe RNA/N(F)＝2'-F RNA/N(L)＝LNA/N(E)＝BNANC-NMe/N(m)＝2'-MOE/p＝Phosphorylation/^＝Phosphorothioated

[0654] 连接反应中的核酸组合如下所示。

[0655] [表3]

[0656]

	使用的RNA片段
天然型	1,2,3,4,5,6
末端PS,2'-OMe化	2,3,4,5,7,8
高度修饰1	9,10,11,12,13,14

高度修饰2	9,10,13,14,15,16
高度修饰3-含LNA	9,11,12,13,14,17
高度修饰4-含BNA-NC(N-Me)	9,11,12,13,14,18
高度修饰5-含2'-MOE	9,11,12,13,14,19

[0657] 连接反应后的序列如下。

[0658] [表4-1]

[0659]

	反应后序列
天然型	GGAAAUUAGGUGCGCUUGGCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU （序列号40）
末端PS，2'-OMe化	G(M)^G(M)^A(M)^AAUUAGGUGCGCUUGGCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAA GUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCG GUGCU^U(M)^U(M)^U(M) （序列号41）

[0660] [表4-2]

[0661]

高度修饰1	G(M)^G(M)^A(M)^A(M)A(M)U(M)U(M)A(M)G(M)G(M)U(F)G(F)C(F)G(F)C^U^U(F) G(F)G^C(M)G(M)U^U^U^U(F)A(F)G(M)A(M)G(M)C(M)U(M)A(M)G(M)A(M)A(M) A(M)U(M)A(M)G(M)C(M)A(M)A(M)G(M)UUA(M)AA(M)A(M)UA(M)A(M)G(M)G(M) CUA(M)GUCC(M)GUUA(M)U(M)C(M)A(M)A(M)C(M)U(M)U(M)G(M)A(M)A(M)A(M) A(M)A(M)G(M)U(M)G(M)G(M)C(M)A(M)C(M)C(M)G(M)A(M)G(M)U(M)C(M)G(M) G(M)U(M)G(M)C(M)^U(M)^U(M)^U(M)^U(M) （序列号42）
高度修饰2	G(M)^G(M)^A(M)^A(M)A(M)U(M)U(M)A(M)G(M)G(M)U(F)G(F)C(F)G(F)C^U^U(F) G(F)G^C(M)G(M)U^U^U^U(F)A(F)G(M)A(M)G(M)C(M)U(M)A(M)G(M)A(M)A(M) A(M)U(M)A(M)G(M)C(M)A(M)A(M)G(M)U(F)U(F)A(M)A(F)A(M)A(M)U(F)A(M)A(M) G(M)G(M)C(F)U(F)A(M)G(F)U(F)C(F)C(M)G(F)U(F)U(F)A(M)U(M)C(M)A(M)A(M) C(M)U(M)U(M)G(M)A(M)A(M)A(M)A(M)A(M)G(M)U(M)G(M)G(M)C(M)A(M)C(M) C(M)G(M)A(M)G(M)U(M)C(M)G(M)G(M)U(M)G(M)C(M)^U(M)^U(M)^U(M)^U(M) （序列号43）
高度修饰3-含LNA	G(M)^G(M)^A(M)^A(M)A(M)U(M)U(M)A(M)G(M)G(M)U(F)G(F)C(F)G(F)C^U^U(F) G(F)G^C(M)G(L)U^U^U^U(F)A(F)G(M)A(M)G(M)C(M)U(M)A(M)G(M)A(M)A(M)CU A(M)GUCC(M)GUUA(M)U(M)C(M)A(M)A(M)C(M)U(M)U(M)G(M)A(M)A(M)A(M)A(M) A(M)G(M)U(M)G(M)G(M)C(M)A(M)C(M)C(M)G(M)A(M)G(M)U(M)C(M)G(M)G(M)U(M) G(M)C(M)^U(M)^U(M)^U(M)^U(M)A(M)U(M)A(M)G(M)C(M)A(M)A(M)G(M)UUA(M)A A(M)A(M)UA(M)A(M)G(M)G(M) （序列号44）
高度修饰4-含BNA-NC(N-Me)	G(M)^G(M)^A(M)^A(M)A(M)U(M)U(M)A(M)G(M)G(M)U(F)G(F)C(F)G(F)C^U^U(F)G(F) G^C(M)G(E)U^U^U^U(F)A(F)G(M)A(M)G(M)C(M)U(M)A(M)G(M)A(M)A(M)CUA(M)GU CC(M)GUUA(M)U(M)C(M)A(M)A(M)C(M)U(M)U(M)G(M)A(M)A(M)A(M)A(M)A(M)G(M) U(M)G(M)G(M)C(M)A(M)C(M)C(M)G(M)A(M)G(M)U(M)C(M)G(M)G(M)U(M)G(M) C(M)^U(M)^U(M)^U(M)^U(M)A(M)U(M)A(M)G(M)C(M)A(M)A(M)G(M)UUA(M)AA(M) A(M)UA(M)A(M)G(M)G(M) （序列号45）
高度修饰5-含2'-MOE	G(M)^G(M)^A(M)^A(M)A(M)U(M)U(M)A(M)G(M)G(M)U(F)G(F)C(F)G(F)C^U^U(F)G(F) G^C(M)G(m)U^U^U^U(F)A(F)G(M)A(M)G(M)C(M)U(M)A(M)G(M)A(M)A(M)CUA(M)GU CC(M)GUUA(M)U(M)C(M)A(M)A(M)C(M)U(M)U(M)G(M)A(M)A(M)A(M)A(M)A(M)G(M) U(M)G(M)G(M)C(M)A(M)C(M)C(M)G(M)A(M)G(M)U(M)C(M)G(M)G(M)U(M)G(M) C(M)^U(M)^U(M)^U(M)^U(M)A(M)U(M)A(M)G(M)C(M)A(M)A(M)G(M)UUA(M)AA(M) A(M)UA(M)A(M)G(M)G(M) （序列号46）

[0662] (步骤)

[0663] 5'-、3'-两端3～5个碱基左右被2'-O-甲基化的sgRNA(Hendel et al.,Nat Biotechnol,33;985-989,2015):虽然没有关于高度修饰的sgRNA的报告,但是表明可以参考例如修饰的两段式向导RNA(Mir et al.,Nat Commun,9;2641,2018)来合成高度修饰的sgRNA。

[0664] 步骤的详细情况如下。

[0665] (1)将表2所述的核酸链1～19按照表3的组合混合至最终浓度各为25μM,20～23混合至最终浓度各为37.5μM,在80℃下加热3分钟后,用25分钟冷却至5℃。

[0666] (2)按以下浓度混合核酸链、反应试剂。

[0667] 10μM核酸链1～19(表3的组合)

[0668] 15μM核酸链20～23

[0669] [将(1)的溶液稀释2.5倍]

[0670] 50mM Tris-HCl(pH7.5)

[0671] 2mM $MgCl_2$

[0672] 0.4mM ATP

[0673] 1mM DTT

[0674] 0.5U/μL T4 RNA 连接酶2

[0675] (3)使在(2)中混合的溶液在25℃下进行连接反应。

[0676] (4)在反应开始1、4、24、48小时后对连接反应溶液进行适当采样,并与等量的5mM EDTA溶液混合,用于后续分析。

[0677] (结果)

[0678] 将反应开始48小时后的反应产物用于LC-MS分析。

[0679] 结果如下。

[0680] [表5]

[0681]

	理论分子量	实测值 (反卷积后)
天然型	32285.12	32283.9
末端PS,2'-OMe 化	32465.68	32264.3
高度修饰1	33547.87	33546.0
高度修饰2	33571.77	33570.8
高度修饰3-含LNA	33545.86	33544.6
高度修饰4-含BNA-NC(N-Me)	33574.90	33573.6
高度修饰5-含2'-MOE	33591.93	33590.8

[0682] 综上可知,包含修饰核酸的长链核酸也可以通过本方法进行连接。

[0683] 通过该方法合成的RNA例如可以用于基于CRISPR-Cas9法的基因组DNA的切割、编辑。具体而言,将通过本方法合成的100mer的RNA和以其5'端20个碱基作为靶的任意链长的双链DNA与Cas9蛋白在合适的缓冲液中混合,可以研究DNA的切割活性。另外,还可以使用合适的DDS将RNA-Cas9复合物施用于培养细胞和生物体内,对基因组DNA进行编辑。(图12)。

[0684] (实施例4)ssRNA 220mer分10段RNA连接酶2的酶连接

[0685] 接下来,进行ssRNA 220mer分10段RNA连接酶2的酶连接。

[0686] 详细如下。

[0687] (材料)

[0688] 除使用以下表6所示的核酸片段以外,与实施例1同样。

[0689] (步骤)

[0690] 除使用以下表6所示的核酸片段以外,与实施例1同样。

[0691] [表6]

[0692]

U3-1_1		GGGAAGACUAUACUUUCAGGGAUCA(序列号47)
U3-2_2	p	UUUCUAUAGUGUGUUACUAGA(序列号48)
U3-3_2	p	GAAGUUUCUCUGAACGUGUAGAGC(序列号49)
U3-4_1	p	ACCGAAAACCACGAGGAAGAG(序列号50)
U3-5_1	p	AGGUAGCGUUUUCUCCUGAGCGUGA(序列号51)
U3-6_1	p	AGCCGGCUUUCUGGCGUUG(序列号52)
U3-7_1	p	CUUGGCUGCAACUGCCGUCAGCCAU(序列号53)
U3-8_1	p	UGAUGAUCGUUCUUCUCUC(序列号54)
U3-9_1	p	CGUAUUGGGGAGUGAGAGGGAGAGA(序列号55)
U3-10_1	p	ACGCGGUCUGAGUGGU(序列号56)

[0693] [表7]

[0694]

SpU3-1_1		tgaaagtatagtcttccc(序列号57)
SpU3-2_1		acttctctagtaacacactatagaaatgatccc(序列号58)
SpU3-3_1		acgttcagagaa(序列号59)
SpU3-4_2		tacctctcttcctcgtggttttcggtgctctac(序列号60)
SpU3-5_2		aggagaaaacgc(序列号61)
SpU3-6_1		ccaagcaacgccagaaagccggcttcacgctc(序列号62)
SpU3-7_1		acggcagttgcag(序列号63)
SpU3-8_1		aatacggagagaagaacgatcatcaatggctg(序列号64)
SpU3-9_1		ctctcactcccc(序列号65)
SpU3-10_1		accactcagaccgcgttctctcc(序列号66)

[0695] (结果)

[0696] 图4示出了变性PAGE的结果。

[0697] 将分10段的片段用于酶连接反应。对反应72小时后的产物进行变性PAGE分析。作为对照,同时分析与连接产物相同序列的体外转录产物。结果如图4所示。确认到被认为与220mer转录产物相同的酶连接产物。

[0698] 接下来,UHPLC、LC-MS结果如图5所示。

[0699] 本试验中的目标产物的理论分子量为71035.9。LC-MS分析中实测质量为71035.3。因此,可明确本试验中的酶连接产物为作为目标的220mer RNA。

[0700] (实施例5)基于各种序列的实验

[0701] 接下来,进行基于各种序列的实验。实验使用如表3所示的序列进行。(一部分使用上述实施例的序列)

[0702] 详细如下。

[0703] (材料)

[0704] 除使用表8所示的核酸夹板以外,与实施例4同样。

[0705] [表8]

[0706] ①

[0707]

SpU3-1_1		tgaaagtatagtcttccc(序列号67)
SpU3-2_1		acttctctagtaacacactatagaaatgatccc(序列号68)
SpU3-3_1		acgttcagagaa(序列号69)
SpU3-4_2		tacctctcttcctcgtggttttcggtgctctac(序列号70)
SpU3-5_2		aggagaaaacgc(序列号71)
SpU3-6_1		ccaagcaacgccagaaagccggcttcacgctc(序列号72)
SpU3-7_1		acggcagttgcag(序列号73)
SpU3-8_1		aatacggagagaagaacgatcatcaatggctg(序列号74)
SpU3-9_1		ctctcactcccc(序列号75)
SpU3-10_1		accactcagaccgcgttctctcc(序列号76)

[0708] [表9]

[0709] ②

[0710]

SpU3-1_13		tgaaagtatagtc(序列号77)
SpU3-2_1		acttctctagtaacacactatagaaatgatccc(序列号78)
SpU3-3_1		acgttcagagaa(序列号79)
SpU3-4_2		tacctctcttcctcgtggttttcggtgctctac(序列号80)
SpU3-5_2		aggagaaaacgc(序列号81)
SpU3-6_1		ccaagcaacgccagaaagccggcttcacgctc(序列号82)
SpU3-7_1		acggcagttgcag(序列号83)
SpU3-8_1		aatacggagagaagaacgatcatcaatggctg(序列号84)
SpU3-9_1		ctctcactcccc(序列号85)
SpU3-10_18		tcagaccgcgttctctcc(序列号86)

[0711] [表10]

[0712] ③

[0713]

SpU3-2_1		acttctctagtaacacactatagaaatgatccc(序列号87)
SpU3-42		tacctctcttcctcgtggttttcggtgctctac(序列号88)
SpU3-6_1		ccaagcaacgccagaaagccggcttcacgctc(序列号89)
SpU3-8_1		aatacggagagaagaacgatcatcaatggctg(序列号90)
SpU3-10_1		accactcagaccgcgttctctcc(序列号91)

[0714] [表11]

[0715] ④

[0716]

SpU3-1_18		ctatagaaatgatccctg(序列号92)
SpU3-2_18		agaaacttctctagtaac(序列号93)
SpU3-3_18		gttttcggtgctctacac(序列号94)
SpU3-4_18		acgctacctctcttcctc(序列号95)
SpU3-5_18		aagccggcttcacgctca(序列号96)
SpU3-6_18		gcagccaagcaacgccag(序列号97)
SpU3-7_18		cgatcatcaatggctgac(序列号98)

SpU3-8_18		cccaatacggagagaaga(序列号99)
SpU3-9_18		agaccgcgttctctccct(序列号100)

[0717] [表12]

[0718] ⑤

[0719]

SpU3-1_4		gaaagtatagtcttcc(序列号101)
SpU3-2_4		cttctctagtaacacactatagaaatgatcc(序列号102)
SpU3-3_4		cgttcagaga(序列号103)
SpU3-4_4		acctctcttcctcgtggttttcggtgctcta(序列号104)
SpU3-5_4		ggagaaaacg(序列号105)
SpU3-6_4		caagcaacgccagaaagccggcttcacgct(序列号106)
SpU3-7_4		cggcagttgca(序列号107)
SpU3-8_4		atacggagagaagaacgatcatcaatggct(序列号108)
SpU3-9_4		tctcactccc(序列号109)
SpU3-10_4		ccactcagaccgcgttctctc(序列号110)

[0720] (步骤)

[0721] 除使用表8至12所示的核酸夹板以外,与实施例4同样。

[0722] 1为使用与实施例4相同的核酸夹板的实验(核酸夹板与所有片段形成碱基对)。

[0723] 2为使5’、3’两端侧核酸夹板的链长缩短5个碱基的实验。

[0724] 3为在一个核酸夹板中仅使用链长23～33mer的长链的实验。

[0725] 4为在连接位点前后以9mer形成碱基对的实验。

[0726] 5为使核酸夹板的两端均缩短1个碱基的实验。

[0727] 所使用的序列如图6-1所示。

[0728] (结果)

[0729] 变性PAGE的结果如图6-2所示。

[0730] 示出了实施例5中的酶连接产物的变性PAGE的结果。与1比较,在2的试验中,全长产物量没有变化。即,显示即使核酸夹板两末端相对于全长缩短,连接反应也同等进行。在3的试验中,全长产物量显著下降。显示与连接部分不相关的核酸夹板对连接反应来说也是重要的。在4的试验中,全长反应产物量略有下降。另外,抗分子量的副反应产物增加。在5的试验中,全长产物量显著下降。可以得出启示:核酸夹板与RNA片段之间的双链形成存在间隙时,反应难以进行。

[0731] (实施例6)ssRNA 560mer分28段RNA连接酶2的酶连接

[0732] 接下来,进行ssRNA 560mer分28段RNA连接酶2的酶连接。序列信息如表13、14所示。

[0733] 详细如下。

[0734] (材料)

[0735] [表13]

NL-1_1		GGCAAUCCGGUACUGUUGGUAAAGC（序列号111）
NL-2_1	p	CACCAUGGUCUUCAC（序列号112）
NL-3_1	p	ACUCGAAGAUUUCGUUGGGGACUGG（序列号113）
NL-4_1	p	CGACAGACAGCCGGC（序列号114）
NL-5_2	p	UACAACCUGGACCAAGUCCUUGAACAG（序列号115）
NL-6_2	p	GGAGGUGUGUCCA（序列号116）
NL-7_1	p	GUUUGUUUCAGAAUCUCGGGGUGUC（序列号117）
NL-8_1	p	CGUAACUCCGAUCCA（序列号118）
NL-9_1	p	AAGGAUUGUCCUGAGCGGUGAAAAUG（序列号119）
NL-10_1	p	GGCUGAAGAUCGAC（序列号120）
NL-11_4	p	AUCCAUGUCAUCAUCCCGUAUGAAGG（序列号121）
NL-12_4	p	UCUGAGCGGCGACCA（序列号122）
NL-13_2	p	AAUGGGCCAGAUCGAAAAAAUUUUUAAGGU（序列号123）
NL-14_2	p	GGUGUACCCUGU（序列号124）
NL-15_2	p	GGAUGAUCAUCACUUUAAG（序列号125）
NL-16_2	p	GUGAUCCUGCACUAUGGC（序列号126）
NL-17_1	p	ACACUGGUAAUCGACGGGGUUACGC（序列号127）
NL-18_1	p	CGAACAUGAUCGACU（序列号128）
NL-19_1	p	AUUUCGGACGGCCGUAUGAAGGCAU（序列号129）
NL-20_1	p	CGCCGUGUUCGACG（序列号130）
NL-21_1	p	GCAAAAAGAUCACUGUAACAGGGA（序列号131）
NL-22_1	p	CCCUGUGGAACGGCAA（序列号132）
NL-23_1	p	CAAAAUUAUCGACGAGCGCCUGAUCA（序列号133）
NL-24_1	p	ACCCCGACGGCUCCCU（序列号134）
NL-25_1	p	GCUGUUCCGAGUAACCAUCAACGG（序列号135）
NL-26_1	p	AGUGACCGGCUGG（序列号136）
NL-27_1	p	CGGCUGUGCGAACGCAUUCUGGCGUAA（序列号137）
NL-28_1	p	UUCUAGAGUCGGGGC（序列号138）

[0736]

[0737] [表14]

[0738]

SpNL-1_1		accaacagtaccggattgcc（序列号139）
SpNL-2_1		cgagtgtgaagaccatggtggcttt（序列号140）
SpNL-3_1		ccccaacgaaatctt（序列号141）
SpNL-4_1		gttgtagccggctgtctgtcgccagt（序列号142）
SpNL-5_1		aggacttggtccag（序列号143）
SpNL-6_1		caaactggacacacctccctgttca（序列号144）
SpNL-7_1		cccgagattctgaaa（序列号145）
SpNL-8_1		tcctttggatcggagttacggacac（序列号146）
SpNL-9_1		accgctcaggacaa（序列号147）
SpNL-10_1		tggatgtcgatcttcagcccattttc（序列号148）
SpNL-11_2		cgggatgatgaca（序列号149）
SpNL-12_2		ccatttggtcgccgctcagaccttcata（序列号150）
SpNL-13_1		aaaatttttcgatctggc（序列号151）
SpNL-14_2		catccacagggtacaccacctta（序列号152）
SpNL-15_2		atcaccttaaagtgatgat（序列号153）
SpNL-16_2		agtgtgccatagtgcagg（序列号154）
SpNL-17_1		accccgtcgattacc（序列号155）
SpNL-18_1		cgaaatagtcgatcatgttcggcgta（序列号156）
SpNL-19_1		ttcatacggccgtc（序列号157）
SpNL-20_1		ttttgccgtcgaacacggcgatgcc（序列号158）
SpNL-21_1		gttacagtgatct（序列号159）
SpNL-22_1		attttgttgccgttccacagggtccct（序列号160）
SpNL-23_1		aggcgctcgtcgata（序列号161）
SpNL-24_1		acagcagggagccgtcggggttgatc（序列号162）
SpNL-25_1		gatggttactcgga（序列号163）
SpNL-26_1		agccgccagccggtcactccgtt（序列号164）
SpNL-27_1		ccagaatgcgttcgcac（序列号165）
SpNL-28_1		gccccgactctagaattacg（序列号166）

[0739] 所使用的序列如图7-1所示。

[0740] (步骤)

[0741] (1)将RNA链和核酸夹板混合后,在80℃下加热3分钟后,用25分钟冷却至5℃。

[0742] (2)按以下浓度混合核酸链、反应试剂。

[0743] 1(共计560mer)

[0744] 1μM RNA核酸链1-28 28种

[0745] 1.5μM核酸夹板1-28 28种

[0746] 50mM Tris-HCl(pH7.5)

[0747] 2mM $MgCl_2$

[0748] 0.4mM ATP

[0749] 1mM DTT

[0750] 5% PEG8000

[0751] 0.5U/μL T4 RNA连接酶2

[0752] 2__1-10(共计200mer)

[0753] 2.8μM RNA核酸链1-10 10种

[0754] 4.2μM核酸夹板1-10 10种

[0755] 50mM Tris-HCl(pH7.5)

[0756] 2mM $MgCl_2$

[0757] 0.4mM ATP

[0758] 1mM DTT

[0759] 5% PEG8000

[0760] 0.5U/μL T4 RNA连接酶2

[0761] 2__11-19(共计185mer)

[0762] 3.1μM RNA核酸链11-19 9种

[0763] 4.7M核酸夹板11-19 9种

[0764] 50mM Tris-HCl(pH7.5)

[0765] 2mM $MgCl_2$

[0766] 0.4mM ATP

[0767] 1mM DTT

[0768] 5% PEG8000

[0769] 0.5U/μL T4 RNA连接酶2

[0770] 2__20-28(共计175mer)

[0771] 3.1μM RNA核酸链20-28 9种

[0772] 4.7M核酸夹板20-28 9种

[0773] 50mM Tris-HCl(pH7.5)

[0774] 2mM $MgCl_2$

[0775] 0.4mM ATP

[0776] 1mM DTT

[0777] 5% PEG8000

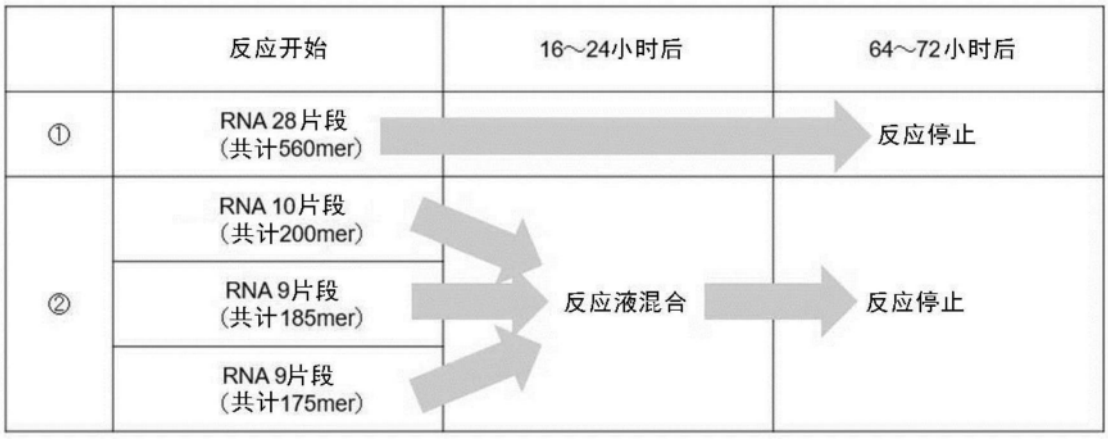
[0778] 0.5U/μL T4 RNA连接酶2

[0779] (3)使在(2)中混合的溶液在25℃下进行连接反应。

[0780] (4)在反应开始16小时后,将2的反应溶液混合,使其与1组成相同,继续反应。方案如表4所示。

[0781] [表15]

[0782]



[0783] (体外翻译)

[0784] (1)将纯化的连接产物用于体外翻译。使用PURExpress(注册商标)2.0(Genefrontier公司制),按照制造商推荐的方法将试剂和RNA混合。

[0785] (2)在37℃反应6小时。

[0786] (3)将反应后的产物保存于-30℃,用于后续测定。

[0787] (荧光素酶测定)

[0788] (1)将翻译产物与Nano-Glo(注册商标)Lusiferase Assay System(Promega公司制)混合,通过GloMax Explorer(Promega公司制)测定发光强度。

[0789] (结果)

[0790] 变性PAGE结果、活性测定结果如图7所示。

[0791] 在1和2的试验中都确认到了560mer的全长反应产物。确认到2的试验中全长反应产物量多。将2的连接反应产物用HPLC纯化后,将纯化产物用于体外翻译反应。将翻译溶液用于荧光素酶测定,对发光活性进行测定时,观察到发光,确定由连接反应产物翻译的蛋白质具有活性。

[0792] (实施例7)多聚核苷酸片段分子的长度的比较和核酸夹板的间隔

[0793] 在本实施例中,进行了多聚核苷酸片段分子的长度的比较和研究核酸夹板的间隔的实验。

[0794] (材料和步骤)

[0795] (材料)

[0796] [表16-1]

1	U3-1_1		GGGAAGACUAUACUUUCAGGGAUCA（序列号１６７）
2	U3-2_2	p	UUUCUAUAGUGUGUUACUAGA（序列号１６８）
3	U3-3_2	p	GAAGUUUCUCUGAACGUGUAGAGC（序列号１６９）
4	U3-4_1	p	ACCGAAAACCACGAGGAAGAG（序列号１７０）
5	U3-5_1	p	AGGUAGCGUUUUCUCCUGAGCGUGA（序列号１７１）
6	U3-6_1	p	AGCCGGCUUUCUGGCGUUG（序列号１７２）
7	U3-7_1	p	CUUGGCUGCAACUGCCGUCAGCCAU（序列号１７３）
8	U3-8_1	p	UGAUGAUCGUUCUUCUCUC（序列号１７４）
9	U3-9_1	p	CGUAUUGGGGAGUGAGAGGGAGAGA（序列号１７５）
10	U3-10_1	p	ACGCGGUCUGAGUGGU（序列号１７６）
11	U3-1-2_1		GGGAAGACUA UACUUUCAGG GAUCAUUUCU AUAGUGUGUU ACUAGA（序列号１７７）
12	U3-2-3_1	p	UUUCU AUAGUGUGUU ACUAGAGAAG UUUCUCUGAA CGUGUAGAGC（序列号１７８）
13	SpU3-1_1		tgaaagtatagtcttccc（序列号１７９）
14	SpU3-2_1		acttctctagtaacacactatagaaatgatccc（序列号１８０）
15	SpU3-3_1		acgttcagagaa（序列号１８１）
[0797] 16	SpU3-4_2		tacctctcttcctcgtggttttcggtgctctac（序列号１８２）
17	SpU3-5_2		aggagaaaacgc（序列号１８３）
18	SpU3-6_1		ccaagcaacgccagaaagccggcttcacgctc（序列号１８４）
19	SpU3-7_1		acggcagttgcag（序列号１８５）
20	SpU3-8_1		aatacggagagaagaacgatcatcaatggctg（序列号１８６）
21	SpU3-9_1		ctctcactcccc（序列号１８７）
22	SpU3-10_1		accactcagaccgcgttctctcc（序列号１８８）
23	SpU3-1_4		gaaagtatagtcttcc（序列号１８９）
24	SpU3-2_4		cttctctagtaacacactatagaaatgatcc（序列号１９０）
25	SpU3-3_4		cgttcagaga（序列号１９１）
26	SpU3-4_4		acctctcttcctcgtggttttcggtgctcta（序列号１９２）
27	SpU3-5_4		ggagaaaacg（序列号１９３）
28	SpU3-6_4		caagcaacgccagaaagccggcttcacgct（序列号１９４）
29	SpU3-7_4		cggcagttgca（序列号１９５）
30	SpU3-8_4		atacggagagaagaacgatcatcaatggct（序列号１９６）
31	SpU3-9_4		tctcactccc（序列号１９７）
32	SpU3-10_4		ccactcagaccgcgttctctc（序列号１９８）
33	SpU3-1_18		ctatagaaatgatccctg（序列号１９９）

[0798] [表16-2]

[0799]

34	SpU3-2_18		agaaacttctctagtaac（序列号２００）
35	SpU3-3_18		gttttcggtgctctacac（序列号２０１）
36	SpU3-4_18		acgctacctctcttcctc（序列号２０２）
37	SpU3-5_18		aagccggcttcacgctca（序列号２０３）
38	SpU3-6_18		gcagccaagcaacgccag（序列号２０４）
39	SpU3-7_18		cgatcatcaatggctgac（序列号２０５）
40	SpU3-8_18		cccaatacggagagaaga（序列号２０６）
41	SpU3-9_18		agaccgcgttctctccct（序列号２０７）
42	SpU3-1_5		aaagtatagtcttccc（序列号２０８）
43	SpU3-2_5		actatagaaatgatccctg（序列号２０９）
44	SpU3-3_5		cagagaaacttctctagtaacac（序列号２１０）
45	SpU3-4_5		tggttttcggtgctctacacgtt（序列号２１１）
46	SpU3-5_5		gaaaacgctacctctcttcctcg（序列号２１２）
47	SpU3-6_5		aaagccggcttcacgctcagga（序列号２１３）
48	SpU3-7_5		gttgcagccaagcaacgccag（序列号２１４）
49	SpU3-8_5		cgatcatcaatggctgacggca（序列号２１５）
50	SpU3-9_5		actccccaatacggagagaagaa（序列号２１６）
51	SpU3-10_5		agaccgcgttctctccctctc（序列号２１７）
52	SpU3-11_5		accactc（序列号２１８）
53	SpU3-2-4_1		tacctctcttcctcgtggttttcggtgctctacacgttcagagaa acttctctagtaacacactatagaaatgatccc（序列号２１９）

[0800] 所使用的序列如图8-1和图8-2所示。

[0801] (步骤)

[0802] 除使用上述表16所示的核酸片段以外，与实施例1同样。使用的核酸片段的组合如表17所示。

[0803] [表17]

[0804]

	RNA	核酸夹板
①	1～10	13～22
⑤	1～10	23～32
⑥	1～10	14,16,18、20,22,23,25,27,29,31
⑦	1～10	13,15,17,19,21,24,,26,28,30,32
④	1～10	33～41
⑧	1～10	42～52
⑨	2～10、11	13,53,17～22
⑩	1、3～10、12	13,53,17～22

[0805] (结果)

[0806] 变性PAGE的结果如图6-2所示。确认到被认为与220mer转录产物相同的酶连接产物。

[0807] (实施例8：使用DNA夹板对转录产物和化学合成RNA进行的连接)

[0808] 接下来,使用DNA夹板进行转录产物和化学合成RNA的连接。

[0809] 在本实施例中,通过转录合成的长链RNA和化学合成RNA的组合进行连接反应,尝试了向更长链的RNA合成的应用。另外,通过将DNA夹板也组装到连接部分以外,研究连接效率会如何变化,从而证实了本方法的优越性。

[0810] (步骤)

[0811] (化学合成)

[0812] (1)NL537-p以外的寡核酸通过亚磷酰胺法的常规方法合成。

[0813] (537mer RNA的转录合成)

[0814] (1)通过PCR法合成在5'端侧添加有T7启动子序列的转录合成用模板ds DNA。

[0815] (2)使用在(1)中合成的模板,通过体外转录合成537mer RNA。

[0816] (3)用RppH焦磷酸酶(New England Biolabs公司制)对在(2)中合成的RNA进行处理,将RNA的5'端转化为单磷酸。

[0817] (连接反应)

[0818] (1)将RNA链和核酸夹板混合后,在80℃下加热3分钟后,用25分钟冷却至5℃。

[0819] (2)按以下浓度混合核酸链、反应试剂。

[0820] (1)将RNA链和核酸夹板混合后,在80℃下加热3分钟后,用25分钟冷却至5℃。

[0821] (2)按以下浓度混合核酸链、反应试剂。

[0822] 1(共计560mer)

[0823] 1μM RNA核酸链37种(参见下表)

[0824] 1.5μM核酸夹板37种(参见下表)

[0825] 50mM Tris-HCl(pH7.5)

[0826] 2mM $MgCl_2$

[0827] 0.4mM ATP

[0828] 1mM DTT

[0829] 5% PEG8000

[0830] (3)使在(2)中混合的溶液在25℃下进行连接反应。

[0831] (变性PAGE)

[0832] 步骤的详细情况如下。

[0833] (1)将1μL酶连接反应样品与含有溴酚蓝的甲酰胺混合,在80℃下加热5分钟。将加热后的样品立即在冰中骤冷。

[0834] (2)将2μL(1)的溶液上样到含有7.5M尿素和1xTBE的5%丙烯酰胺凝胶上,使用1xTBE缓冲液在300V的电压下电泳15分钟或70分钟。

[0835] (3)通过SYBR Gold(Thermo fisher公司制)对电泳后的凝胶染色后,用透射仪拍照。

[0836] (4)测定拍摄的电泳图像中的连接产物的条带强度,并将相对强度数值化。

[0837] 步骤的详细情况如图13所示。

[0838] 目标产物和起始物质的示意图如图14所示。

[0839] (使用DNA夹板对转录产物和化学合成RNA进行连接_反应试验)

[0840] 接下来,示出使用DNA夹板对转录产物和化学合成RNA进行连接_反应试验的概况

(图15)。

[0841] 以下示出了所使用的序列信息。

[0842] [表18]

[0843]

1	NL790-1		GGGAGGUCUAUAUAAGCAGAGCUCG	序列号220
2	NL790-2	p	UUUAGUGAACCGUCAG	序列号221
3	NL790-3	p	AUCACUAGAAGCUUUAUUGCGGUA	序列号222
4	NL790-4	p	GUUUAUCACAGUUAAA	序列号223
5	NL790-5	p	UUGCUAACGCAGUCAGUGGG	序列号224
6	NL790-6	p	CCUCGGCGGCCAAGCUU	序列号225
7	NL790-8	p	GCUUCGAGCAGACAUGAUAAGAUACAUUGAUG	序列号226
8	NL790-9	p	AGUUUGGACAAACCACAACUAGAAUGC	序列号227
9	NL790-10	p	AGUGAAAAAAAAUGCUUUAUUUGUG	序列号228
10	NL790-11	p	AAAUUUGUGAUGCUAUUGCUU	序列号229
11	NL-1_3(790)	p	GGCAAUCCGGUACUGUUGGUAAAGCCACCAU	序列号230
12	NL-2-3_3(790)	p	GGUCUUCACACUCGAAGAUUUCGUUGGGGACUGG	序列号243

[0844] [表19]

[0845]

13	NL537-p	p	GGUCUUCACACUCGAAGAUUUCGUUGGGGACUGGCG ACAGACAGCCGGCUACAACCUGGACCAAGUCCUUGAA CAGGGAGGUGUGUCCAGUUUGUUUCAGAAUCUCGGG GUGUCCGUAACUCCGAUCCAAAGGAUUGUCCUGAGC GGUGAAAAUGGGCUGAAGAUCGACAUCCAUGUCAUCA UCCCGUAUGAAGGUCUGAGCGGCGACCAAAUGGGCC AGAUCGAAAAAAUUUUUAAGGUGGUGUACCCUGUGGA UGAUCAUCACUUUAAGGUGAUCCUGCACUAUGGCACA CUGGUAAUCGACGGGGUUACGCCGAACAUGAUCGAC UAUUUCGGACGGCCGUAUGAAGGCAUCGCCGUGUUC GACGGCAAAAAGAUCACUGUAACAGGGACCCUGUGGA ACGGCAACAAAAUUAUCGACGAGCGCCUGAUCAACCC CGACGGCUCCCUGCUGUUCCGAGUAACCAUCAACGG AGUGACCGGCUGGCGGCUGUGCGAACGCAUUCUGGC GUAAUUCUAGAGUCGGGGCGGCCGGCC	序列号231

[0846] [表20]

[0847]

14	SpNL790-1		tctgcttatatagacctccc	序列号232
15	SpNL790-2		gtgatctgacggttcactaaacgagc	序列号233
16	SpNL790-3		caataaagcttcta	序列号234
17	SpNL790-4		agcaatttaactgtgataaactaccg	序列号235
18	SpNL790-5		cgaggcccactgactgcgtt	序列号236
19	SpNL790-6		ttgccaagcttggccgc	序列号237
20	SpNL790-9		tcactgcattctagttgtggtttgtccaaactcatcaa	序列号238
21	SpNL790-10		taaagcatttttt	序列号239
22	SpNL790-11		aagcaatagcatcacaaatttcacaaa	序列号240
23	SpNL-1_2		accaacagtaccgga	序列号241
24	SpNL790-7-8		tgtatcttatcatgtctgctcgaagcggccggccgccccgactctagaattacg	序列号242

[0848] [表21]

[0849]

25	SpNL-3_1		ccccaacgaaatctt	序列号141
26	SpNL-4_1		gttgtagccggctgtctgtcgccagt	序列号142
27	SpNL-5_1		aggacttggtccag	序列号143
28	SpNL-6_1		caaactggacacacctccctgttca	序列号144
29	SpNL-7_1		cccgagattctgaaa	序列号145
30	SpNL-8_1		tcctttggatcggagttacggacac	序列号146
31	SpNL-9_1		accgctcaggacaa	序列号147
32	SpNL-10_1		tggatgtcgatcttcagcccattttc	序列号148
33	SpNL-11_2		cgggatgatgaca	序列号149
34	SpNL-12_2		ccatttggtcgccgctcagaccttcata	序列号150
35	SpNL-13_1		aaaatttttcgatctggc	序列号151
36	SpNL-14_2		catccacagggtacaccacctta	序列号152
37	SpNL-15_2		atcaccttaaagtgatgat	序列号153
38	SpNL-16_2		agtgtgccatagtgcagg	序列号154
39	SpNL-17_1		accccgtcgattacc	序列号155
40	SpNL-18_1		cgaaatagtcgatcatgttcggcgta	序列号156
41	SpNL-19_1		ttcatacggccgtc	序列号157
42	SpNL-20_1		ttttgccgtcgaacacggcgatgcc	序列号158
43	SpNL-21_1		gttacagtgatct	序列号159
44	SpNL-22_1		attttgttgccgttccacagggtccct	序列号160
45	SpNL-23_1		aggcgctcgtcgata	序列号161

46	SpNL-24_1		acagcagggagccgtcggggttgatc	序列号162
47	SpNL-25_1		gatggttactcgga	序列号163
48	SpNL-26_1		agccgccagccggtcactccgtt	序列号164
49	SpNL-27_1		ccagaatgcgttcgcac	序列号165

[0850] (结果)

[0851] 结果如图16所示。

[0852] 在本实施例中,如图16所示,实现了36个片段、共计790mer的连接。使用基于转录合成RNA和化学合成RNA的连接的RNA合成法以外的方法,可以合成比上述实施例(560mer)长的产物(1)。如图16所示,确定了在连接部分以外也组装DNA夹板时,连接反应也会进行(2)。另外,如果不在连接部分以外组装互补链,则连接反应难以进行。确定也会引起非特异性连接(3)。

[0853] 这样,表明了针对所有RNA序列组装DNA夹板的本公开的方法的优越性。

[0854] 由本实施例的结果可以理解,虽不作限定,但是,对长链RNA而言,在除连接部分以外也全部组装DNA夹板时,连接反应易于进行。另外,应当理解,虽不作限定但在连接部分以外不组装互补链,则连接反应难以进行,此外,也会引起非特异性连接,因此并不优选。虽不作限定但显示即使在链长比较长的转录产物的连接反应中,使用短链的DNA夹板在长链RNA的所有部分组装互补链也是有效的。

[0855] (使用DNA夹板对转录产物和化学合成RNA进行的连接)

[0856] 如图17所示,进行使用DNA夹板对转录产物和化学合成RNA进行连接的实验。其中,研究了去除一部分DNA夹板时反应会变得如何。大致如下。

[0857] 如图17的试验区1~27所示,进行了将除连接长链转录合成RNA的部分以外也组装的互补链25个片段中的DNA夹板逐一从反应中去除的实验。即,以除连接长链转录合成RNA的部分以外,不组装互补链DNA夹板的方式进行实验。

[0858] 其DNA夹板的组合如下。

[0859] (试验区、使用的核酸序列号)

[0860] [表22]

[0861]

试验区编号	RNA	DNA夹板
1	1~11、13	14~49
2	1~11、13	14~24
3	1~11、13	14~24、26~49
4	1~11、13	14~25、27~49
5	1~11、13	14~26、28~49
6	1~11、13	14~27、29~49
7	1~11、13	14~28、30~49
8	1~11、13	14~29、31~49
9	1~11、13	14~30、32~49
10	1~11、13	14~31、33~49
11	1~11、13	14~32、34~49
12	1~11、13	14~33、35~49

13	1～11、13	14～34、36～49
14	1～11、13	14～35、37～49
15	1～11、13	14～36、38～49
16	1～11、13	14～37、39～49
17	1～11、13	14～38、40～49
18	1～11、13	14～39、41～49
19	1～11、13	14～40、42～49
20	1～11、13	14～41、43～49
21	1～11、13	14～42、44～49
22	1～11、13	14～43、45～49
23	1～11、13	14～44、46～49
24	1～11、13	14～45、47～49
25	1～11、13	14～46、48～49
26	1～11、13	14～47、49
27	1～11、13	14～48

[0862] (结果)

[0863] 结果如图18所示。图18示出了改性PAGE结果和相对条带强度。如图所示,将除连接长链转录合成RNA的部分以外也组装的互补链25个片段中的DNA夹板逐一从反应中去除进行实验的结果显示:存在没有组装DNA夹板的部分时,反应效率根据其位置而变化。

[0864] 另外,在连接位点附近存在没有组装DNA夹板的部分时,可看到反应效率下降。虽然可以认为该反应效率的下降在可接受的范围内,但考虑到研究可以去除哪个位置的DNA夹板的时间、成本,认为在连接长链转录合成RNA的部分以外也组装的效率会比较高。

[0865] (实施例9:制剂示例)

[0866] 本公开的化合物可以以适当的剂型提供。以下示出了其中一例。

[0867] 可列举出片剂、胶囊剂、散剂、颗粒剂、液体制剂、混悬剂、注射剂、贴剂、湿敷剂等。另外,可以采用包括使用用作常规药品辅料的添加剂,对其进行适当混合等工序的公知方法来制造这些制剂。

[0868] (实施例10:动物实验)

[0869] 使用患有疾病的小鼠(例如,荷瘤小鼠),在腹腔内施用本公开的多聚核苷酸或安慰剂。

[0870] 然后,可以进行安慰剂和多聚核苷酸的比较,对本公开的多聚核苷酸对抗小鼠体内疾病的有效性进行评价。

[0871] (附记)

[0872] 如上所述,采用本公开的优选的实施方式对本公开进行了示例,但应当理解,本公开的范围仅通过权利要求书进行解释。应当理解,本说明书中所引用的专利、申请及其它文献的内容应当作为本说明书的参考进行引用,就像其内容本身具体记载在本说明书中一样。本申请要求2022年8月31日向日本专利局提交的日本特愿2022-138632的优先权,根据需要其内容全部作为本申请的参考加以引用。

[0873] 产业上的可利用性

[0874] 本公开所提供的技术能够用于利用多聚核苷酸连接技术的所有领域中。

[0875] 序列表自由文本

[0876] 序列号1:sg1

[0877] 序列号2:sg2

[0878] 序列号3:sg3

[0879] 序列号4:sg4

[0880] 序列号5:sg5

[0881] 序列号6:sg6

[0882] 序列号7:Spsg1

[0883] 序列号8:Spsg2

[0884] 序列号9:Spsg3

[0885] 序列号10:Spsg4

[0886] 序列号11:Spsg1__16

[0887] 序列号12:Spsg2__14

[0888] 序列号13:Spsg3__18

[0889] 序列号14:Spsg4__14

[0890] 序列号15:Spsg5__14

[0891] 序列号16:Spsg100

[0892] 序列号17:sg1__1

[0893] 序列号18:sg2__1

[0894] 序列号19:sg3__1

[0895] 序列号20:sg4__1

[0896] 序列号21:sg5__1

[0897] 序列号22:sg6__1

[0898] 序列号23:sg1__1__PS__OMe__3

[0899] 序列号24:sg6__1__PS__OMe__3

[0900] 序列号25:sg1__1__C20

[0901] 序列号26:sg2__1__C20

[0902] 序列号27:sg3__1__T2

[0903] 序列号28:sg4__1__T2

[0904] 序列号29:sg5__1__T2

[0905] 序列号30:sg6__1__T2

[0906] 序列号31:sg3__1__T8

[0907] 序列号32:sg4__1__T8

[0908] 序列号33:sg2__1__C20__LNA

[0909] 序列号34:sg2__1__C20__BNA

[0910] 序列号35:sg2__1__C20__MOE

[0911] 序列号36:Spsg1__2

[0912] 序列号37:Spsg2__2

[0913] 序列号38:Spsg__3__1

[0914] 序列号39:Spsg__4__1

[0915] 序列号40:天然型

[0916] 序列号41:末端PS,2'-OMe化

[0917] 序列号42:高度修饰1.

[0918] 序列号43:高度修饰2.

[0919] 序列号44:高度修饰3.含有LNA

[0920] 序列号45:高度修饰4.含有BNA-NC(N-Me)

[0921] 序列号46:高度修饰5.含有2'-MOE

[0922] 序列号47:U3-1__1

[0923] 序列号48:U3-2__2

[0924] 序列号49:U3-3__2

[0925] 序列号50:U3-4__1

[0926] 序列号51:U3-5__1

[0927] 序列号52:U3-6__1

[0928] 序列号53:U3-7__1

[0929] 序列号54:U3-8__1

[0930] 序列号55:U3-9__1

[0931] 序列号56:U3-10__1

[0932] 序列号57:SpU3-1__1

[0933] 序列号58:SpU3-2__1

[0934] 序列号59:SpU3-3__1

[0935] 序列号60:SpU3-4__2

[0936] 序列号61:SpU3-5__2

[0937] 序列号62:SpU3-6__1

[0938] 序列号63:SpU3-7__1

[0939] 序列号64:SpU3-8__1

[0940] 序列号65:SpU3-9__1

[0941] 序列号66:SpU3-10__1

[0942] 序列号67:SpU3-1__1

[0943] 序列号68:SpU3-2__1

[0944] 序列号69:SpU3-3__1

[0945] 序列号70:SpU3-4__2

[0946] 序列号71:SpU3-5__2

[0947] 序列号72:SpU3-6__1

[0948] 序列号73:SpU3-7__1

[0949] 序列号74:SpU3-8__1

[0950] 序列号75:SpU3-9__1

[0951] 序列号76:SpU3-10__1

[0952] 序列号77:SpU3-1__13

[0953] 序列号78:SpU3-2__1

[0954] 序列号79:SpU3-3__1

[0955] 序列号80:SpU3-4__2

[0956] 序列号81:SpU3-5__2

[0957] 序列号82:SpU3-6__1

[0958] 序列号83:SpU3-7__1

[0959] 序列号84:SpU3-8__1

[0960] 序列号85:SpU3-9__1

[0961] 序列号86:SpU3-10__18

[0962] 序列号87:SpU3-2__1

[0963] 序列号88:SpU3-4__2

[0964] 序列号89:SpU3-6__1

[0965] 序列号90:SpU3-8__1

[0966] 序列号91:SpU3-10__1

[0967] 序列号92:SpU3-1__18

[0968] 序列号93:SpU3-2__18

[0969] 序列号94:SpU3-3__18

[0970] 序列号95:SpU3-4__18

[0971] 序列号96:SpU3-5__18

[0972] 序列号97:SpU3-6__18

[0973] 序列号98:SpU3-7__18

[0974] 序列号99:SpU3-8__18

[0975] 序列号100:SpU3-9__18

[0976] 序列号101:SpU3-1__4

[0977] 序列号102:SpU3-2__4

[0978] 序列号103:SpU3-3__4

[0979] 序列号104:SpU3-4__4

[0980] 序列号105:SpU3-5__4

[0981] 序列号106:SpU3-6__4

[0982] 序列号107:SpU3-7__4

[0983] 序列号108:SpU3-8__4

[0984] 序列号109:SpU3-9__4

[0985] 序列号110:SpU3-10__4

[0986] 序列号111:NL-1__1

[0987] 序列号112:NL-2__1

[0988] 序列号113:NL-3__1

[0989] 序列号114:NL-4__1

[0990] 序列号115:NL-5__2

[0991] 序列号116:NL-6__2

[0992] 序列号117:NL-7__1

[0993] 序列号118:NL-8__1

[0994] 序列号119:NL-9__1

[0995] 序列号120:NL-10__1

[0996] 序列号121:NL-11__4

[0997] 序列号122:NL-12__4

[0998] 序列号123:NL-13__2

[0999] 序列号124:NL-14__2

[1000] 序列号125:NL-15__2

[1001] 序列号126:NL-16__2

[1002] 序列号127:NL-17__1

[1003] 序列号128:NL-18__1

[1004] 序列号129:NL-19__1

[1005] 序列号130:NL-20__1

[1006] 序列号131:NL-21__1

[1007] 序列号132:NL-22__1

[1008] 序列号133:NL-23__1

[1009] 序列号134:NL-24__1

[1010] 序列号135:NL-25__1

[1011] 序列号136:NL-26__1

[1012] 序列号137:NL-27__1

[1013] 序列号138:NL-28__1

[1014] 序列号139:SpNL-1__1

[1015] 序列号140:SpNL-2__1

[1016] 序列号141:SpNL-3__1

[1017] 序列号142:SpNL-4__1

[1018] 序列号143:SpNL-5__1

[1019] 序列号144:SpNL-6__1

[1020] 序列号145:SpNL-7__1

[1021] 序列号146:SpNL-8__1

[1022] 序列号147:SpNL-9__1

[1023] 序列号148:SpNL-10__1

[1024] 序列号149:SpNL-11__2

[1025] 序列号150:SpNL-12__2

[1026] 序列号151:SpNL-13__1

[1027] 序列号152:SpNL-14__2

[1028] 序列号153:SpNL-15__2

[1029] 序列号154:SpNL-16__2

[1030] 序列号155:SpNL-17__1

[1031] 序列号156:SpNL-18__1

[1032] 序列号157:SpNL-19__1

[1033] 序列号158:SpNL-20__1

[1034] 序列号159:SpNL-21__1

[1035] 序列号160:SpNL-22__1

[1036] 序列号161:SpNL-23__1

[1037] 序列号162:SpNL-24__1

[1038] 序列号163:SpNL-25__1

[1039] 序列号164:SpNL-26__1

[1040] 序列号165:SpNL-27__1

[1041] 序列号166:SpNL-28__1

[1042] 序列号167:U3-1__1

[1043] 序列号168:U3-2__2

[1044] 序列号169:U3-3__2

[1045] 序列号170:U3-4__1

[1046] 序列号171:U3-5__1

[1047] 序列号172:U3-6__1

[1048] 序列号173:U3-7__1

[1049] 序列号174:U3-8__1

[1050] 序列号175:U3-9__1

[1051] 序列号176:U3-10__1

[1052] 序列号177:U3-1-2__1

[1053] 序列号178:U3-2-3__1

[1054] 序列号179:SpU3-1__1

[1055] 序列号180:SpU3-2__1

[1056] 序列号181:SpU3-3__1

[1057] 序列号182:SpU3-4__2

[1058] 序列号183:SpU3-5__2

[1059] 序列号184:SpU3-6__1

[1060] 序列号185:SpU3-7__1

[1061] 序列号186:SpU3-8__1

[1062] 序列号187:SpU3-9__1

[1063] 序列号188:SpU3-10__1

[1064] 序列号189:SpU3-1__4

[1065] 序列号190:SpU3-2__4

[1066] 序列号191:SpU3-3__4

[1067] 序列号192:SpU3-4__4

[1068] 序列号193:SpU3-5__4

[1069] 序列号194:SpU3-6__4

[1070] 序列号195:SpU3-7__4

[1071] 序列号196:SpU3-8__4

[1072] 序列号197:SpU3-9__4

[1073] 序列号198:SpU3-10__4

[1074] 序列号199:SpU3-1__18

[1075] 序列号200:SpU3-2__18

[1076] 序列号201:SpU3-3__18

[1077] 序列号202:SpU3-4__18

[1078] 序列号203:SpU3-5__18

[1079] 序列号204:SpU3-6__18

[1080] 序列号205:SpU3-7__18

[1081] 序列号206:SpU3-8__18

[1082] 序列号207:SpU3-9__18

[1083] 序列号208:SpU3-1__5

[1084] 序列号209:SpU3-2__5

[1085] 序列号210:SpU3-3__5

[1086] 序列号211:SpU3-4__5

[1087] 序列号212:SpU3-5__5

[1088] 序列号213:SpU3-6__5

[1089] 序列号214:SpU3-7__5

[1090] 序列号215:SpU3-8__5

[1091] 序列号216:SpU3-9__5

[1092] 序列号217:SpU3-10__5

[1093] 序列号218:SpU3-11__5

[1094] 序列号219:SpU3-2-4__1

[1095] 序列号220:NL790-1

[1096] 序列号221:NL790-2

[1097] 序列号222:NL790-3

[1098] 序列号223:NL790-4

[1099] 序列号224:NL790-5

[1100] 序列号225:NL790-6

[1101] 序列号226:NL790-8

[1102] 序列号227:NL790-9

[1103] 序列号228:NL790-10

[1104] 序列号229:NL790-11

[1105] 序列号230:NL-1__3(790)

[1106] 序列号231:NL537-p

[1107] 序列号232:SpNL790-1

[1108] 序列号233:SpNL790-2

[1109] 序列号234:SpNL790-3

[1110] 序列号235:SpNL790-4

[1111] 序列号236:SpNL790-5

[1112] 序列号237:SpNL790-6

[1113] 序列号238:SpNL790-9

[1114] 序列号239:SpNL790-10

[1115] 序列号240:SpNL790-11

[1116] 序列号241:SpNL-1__2

[1117] 序列号242:SpNL790-7-8

[1118] 序列号243:NL-2-3__3(790)

① 新方法-将分段的互补链DNA夹板组装到全部的RNA的方法
sg1_1 (20) sg2_1 (15) sg3_1 (19) sg4_1 (18) sg5_1 (14) sg6_1 (14)
sgRNA-100 5' GGAAA UUAGG UGCGC UUGGC GUUUU AGAGC UAGAA AUAGC AAGUU AAAAU AAGGC UAGUC CGUUA UCAAC UUGAA AAAGU GGCAC CGAGU CGGUG CUUUU 3'
SpDNA 3' ctttt aatcc acgcg aaccg caaaa tctcg atctt tatcg ttcaa tttta ttccg atcag gcaat agttg aactt tttca ccgtg gctca gccac gaaaa 5'
Spsg1_2 (27) Spsg2_2 (22) Spsg3_1 (30) Spsg4_1 (21)
② 现有方法1-从连接部分起每次数个碱基地组装互补链DNA夹板的方法
sg1_1 (20) sg2_1 (15) sg3_1 (19) sg4_1 (18) sg5_1 (14) sg6_1 (14)
sgRNA-100 5' GGAAA UUAGG UGCGC UUGGC GUUUU AGAGC UAGAA AUAGC AAGUU AAAAU AAGGC UAGUC CGUUA UCAAC UUGAA AAAGU GGCAC CGAGU CGGUG CUUUU 3'
SpDNA 3' gcg aaccg caaaa tctcg atctt tatcg tt tttta ttccg atcag gca agttg aactt tttca ccgtg gctca gcc 5'
Spsg1_16_1(16) Spsg2_14_1 (14) Spsg3_18_1 (18) Spsg4_14_1 (14) Spsg5_14_1 (14)
③ 现有方法2-使用单链的长链互补链DNA夹板的方法
sg1_1 (20) sg2_1 (15) sg3_1 (19) sg4_1 (18) sg5_1 (14) sg6_1 (14)
sgRNA-100 5' GGAAA UUAGG UGCGC UUGGC GUUUU AGAGC UAGAA AUAGC AAGUU AAAAU AAGGC UAGUC CGUUA UCAAC UUGAA AAAGU GGCAC CGAGU CGGUG CUUUU 3'
SpDNA 3' cttt aatcc acgcg aaccg caaaa tctcg atctt tatcg ttcaa tttta ttccg atcag gcaat agttg aactt tttca ccgtg gctca gccac gaaaa 5'
Spsg100 (100)

图1-1

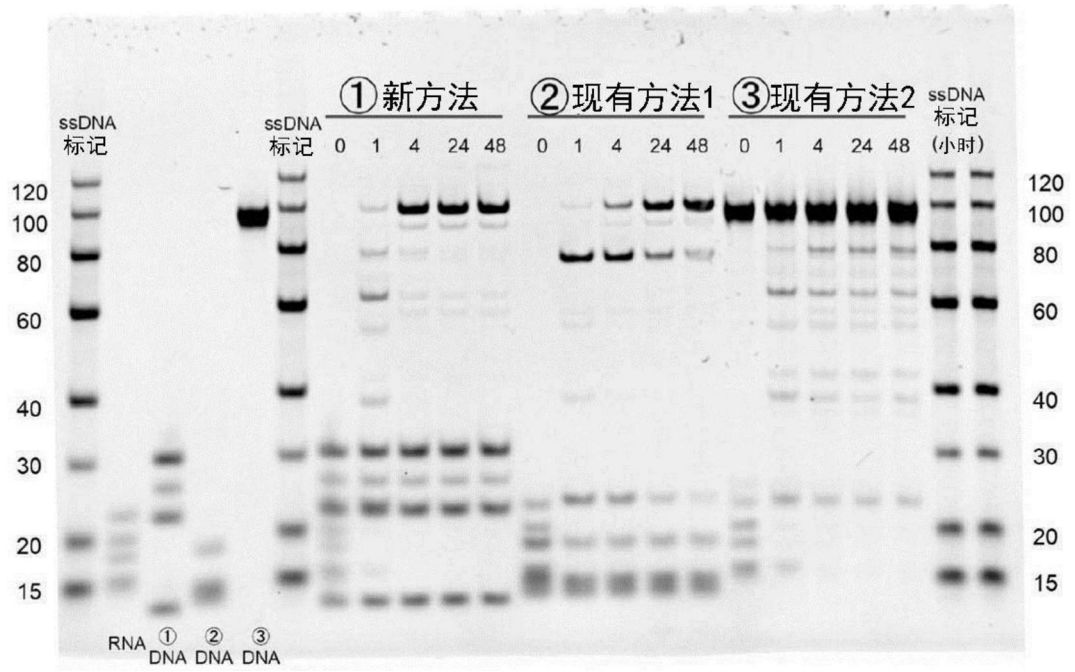

①新方法
②现有方法1
③现有方法2
ssDNA 标记
ssDNA 标记
ssDNA 标记 (小时)
0 1 4 24 48
0 1 4 24 48
0 1 4 24 48
120
100
80
60
40
30
20
15
RNA
① DNA
② DNA
③ DNA

图1-2

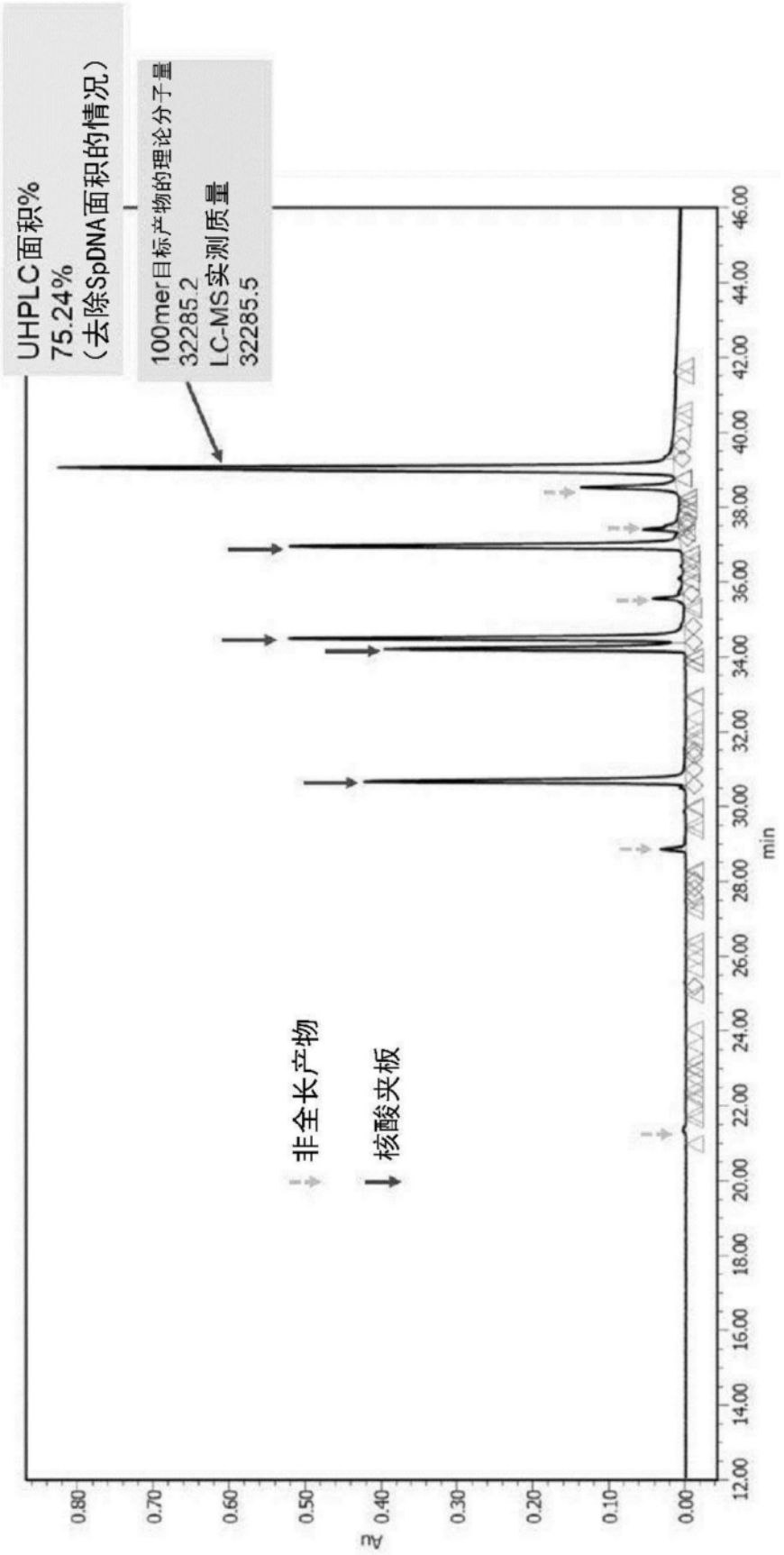

UHPLC面积%
75.24%
（去除SpDNA面积的情况）
100mer目标产物的理论分子量
32285.2
LC-MS实测质量
32285.5
非全长产物
核酸夹板
min
AU

图2

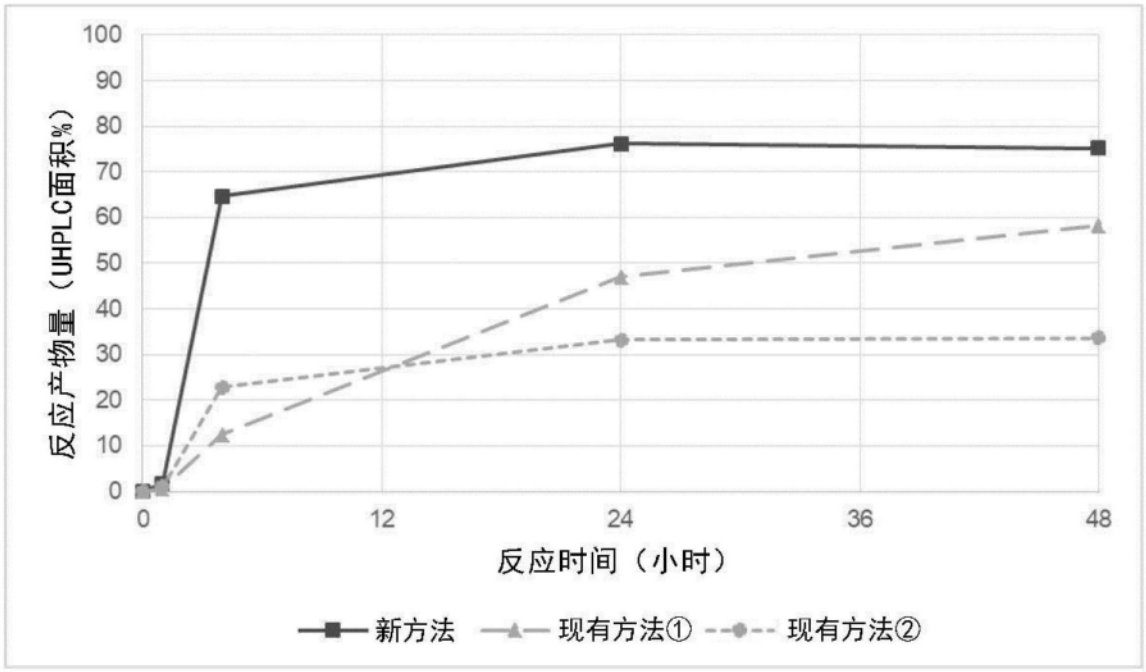

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
反应产物量（UHPLC面积%）
0
12
24
36
48
反应时间（小时）
新方法
现有方法①
现有方法②

图3

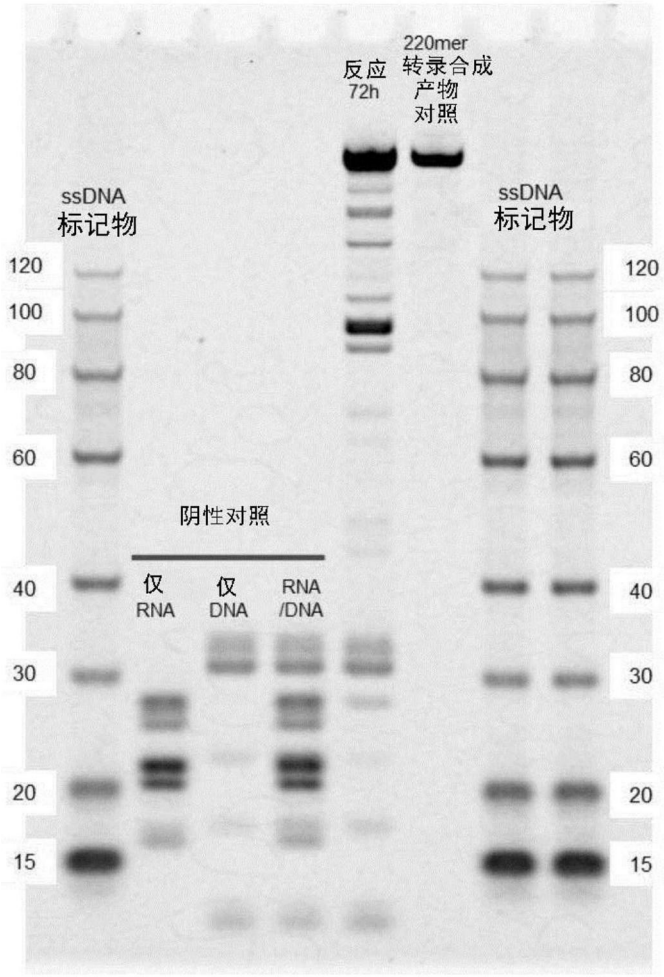

反应
72h
220mer
转录合成
产物
对照
ssDNA
标记物
ssDNA
标记物
120
100
80
60
40
30
20
15
阴性对照
仅
RNA
仅
DNA
RNA
/DNA

图4

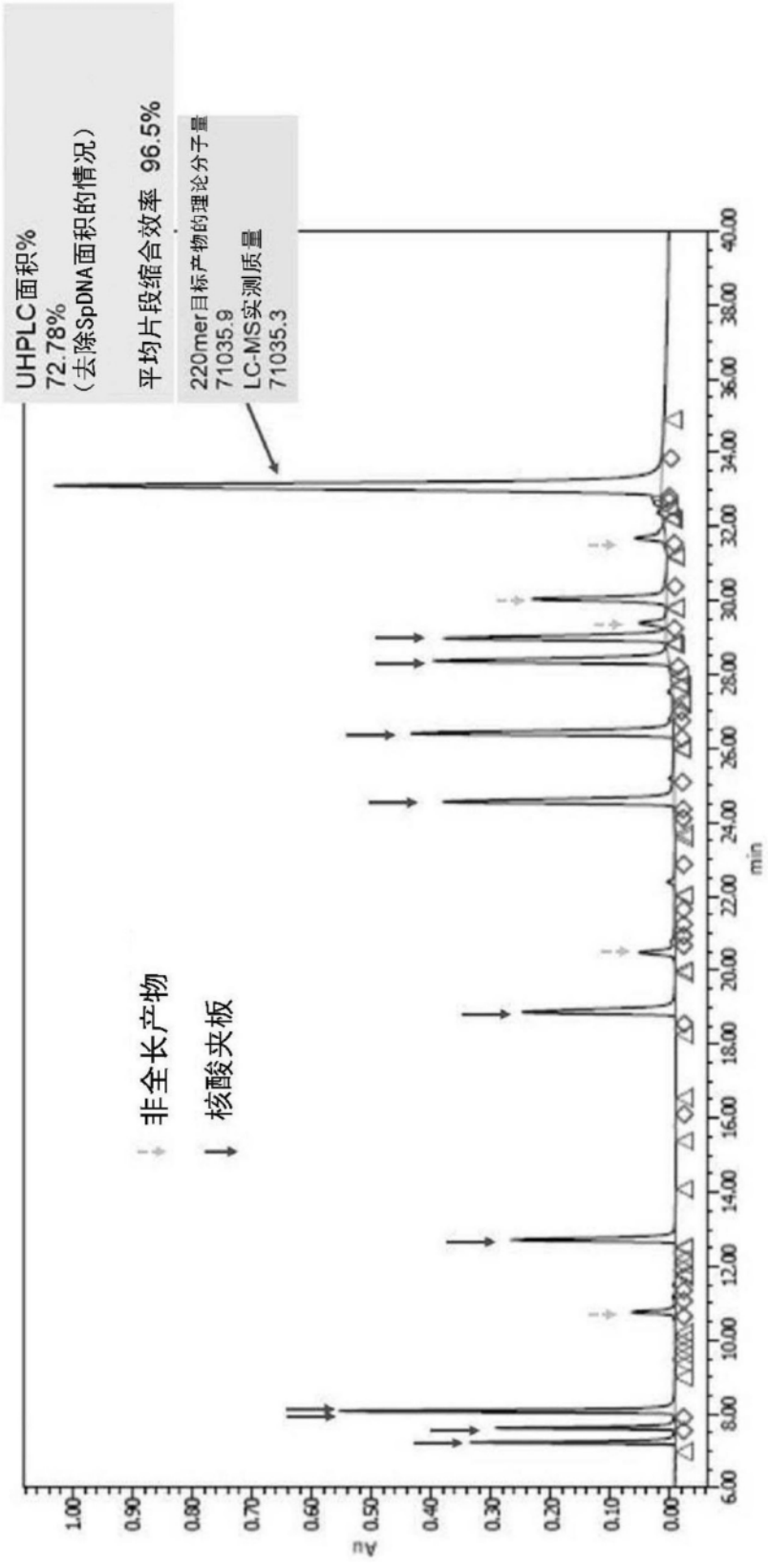

UHPLC面积%
72.78%
（去除SpDNA面积的情况）
平均片段缩合效率 96.5%
220mer目标产物的理论分子量
71035.9
LC-MS实测质量
71035.3
非全长产物
核酸夹板
AU
min

图5

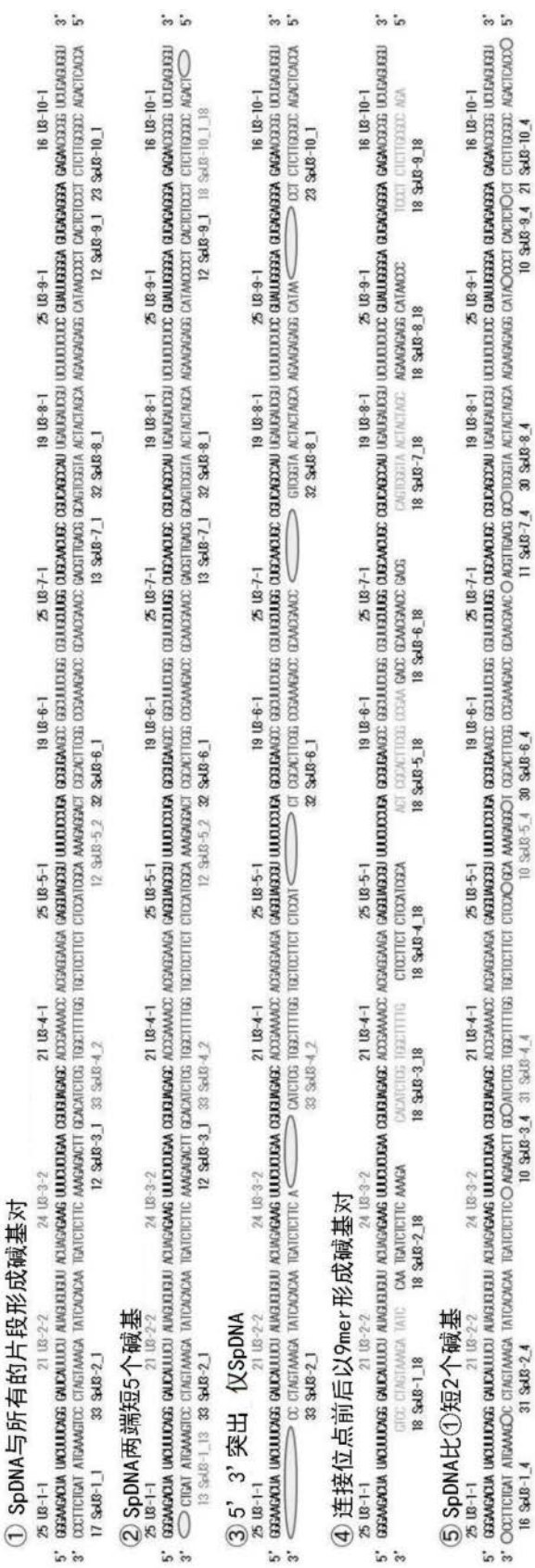

① SpDNA与所有的片段形成碱基对
② SpDNA两端短5个碱基
③5’ 3’突出 仅SpDNA
④连接位点前后以9mer形成碱基对
⑤ SpDNA比①短2个碱基
：没有形成碱基对的部分

图6-1

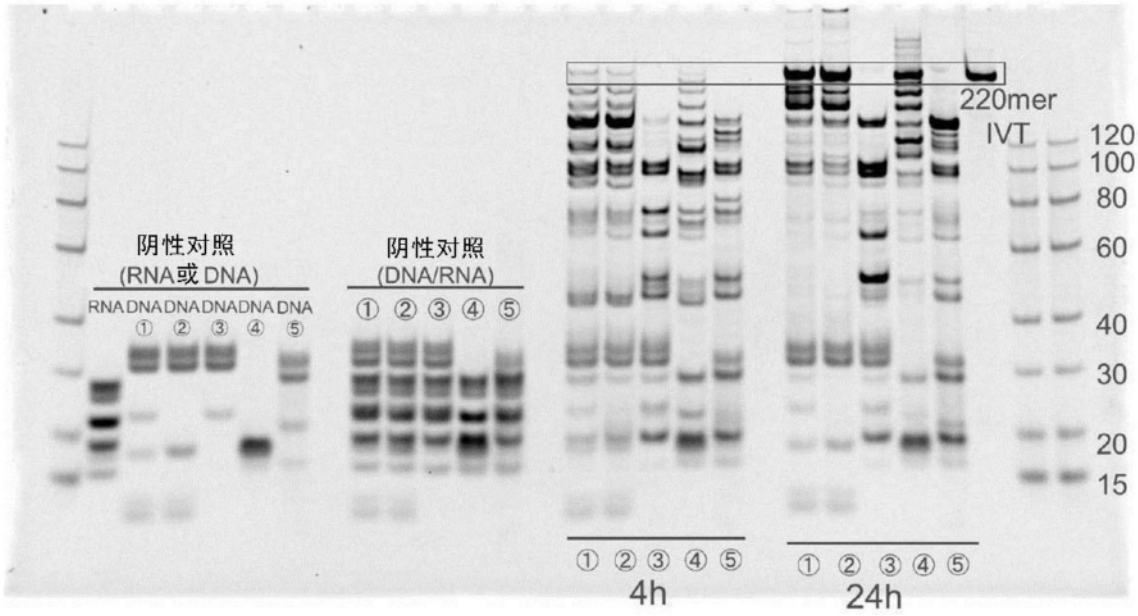

阴性对照
(RNA或DNA)
RNA DNA DNA DNA DNA DNA
① ② ③ ④ ⑤
阴性对照
(DNA/RNA)
① ② ③ ④ ⑤
220mer
IVT
120
100
80
60
40
30
20
15
① ② ③ ④ ⑤
4h
① ② ③ ④ ⑤
24h

图6-2

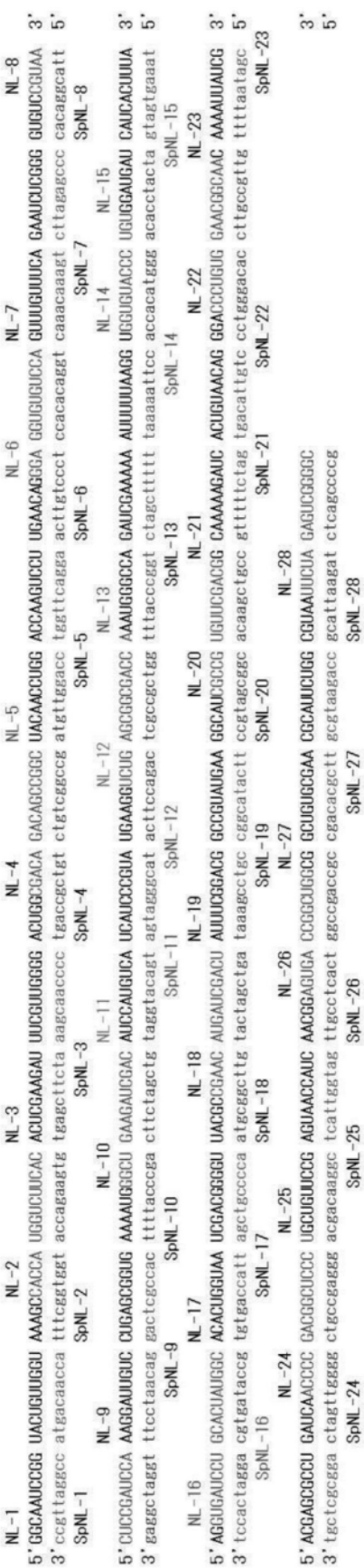

NL-1
NL-2
NL-3
NL-4
NL-5
NL-6
NL-7
NL-8
5' GGCAAUCCGG UACUGUUGGU AAAGCCACCA UGGUCUUCAC ACUCGAAAGAU UUCGUUGGGG ACUGGCGACA GACAGCCGGC UACAACCUCG ACCAAGUCCU UGAACAGGGA GGUGUGUCCA GUUUGUUUCA GAAUCUCGGG GUGUCCGUAA 3'
3' ccgttaggcc atgacaacca tttcgtggt accagaagtg tgagcttcta aagcaacccc tgaccgctgt ctgtcggccg atgttggacc tggttcagga acttgtccct ccacacaggt caaacaaagt cttagagccc cacaggcatt 5'
SpNL-1
SpNL-2
SpNL-3
SpNL-4
SpNL-5
SpNL-6
SpNL-7
SpNL-8
NL-9
NL-10
NL-11
NL-12
NL-13
NL-14
NL-15
5' CUCCGAUCCA AAGGAUUGUC CUGAGCGGUG AAAAUGGGCU GAAGAUCGAC AUCCAUGUCA UCAUCCCGUA UGAAGGUCUG AGCGGCGACC AAAUGGGCCA GAUCGAAAAA AUUUUUAAGG UGGUGUACCC UGUGGAUGAU CAUCACUUUA 3'
3' gaggctaggt ttcctaacag gactcgccac tttttacccga cttctagctg taggtacagt agtagggcat acttccagac tcgccgctgg tttaccccgt ctagcttttt taaaaattcc accacatggg acacctacta gtagtgaaat 5'
SpNL-9
SpNL-10
SpNL-11
SpNL-12
SpNL-13
SpNL-14
SpNL-15
NL-16
NL-17
NL-18
NL-19
NL-20
NL-21
NL-22
NL-23
5' AGGUGAUCCU GCACUAUGGC ACACUGGUAA UCGACGGGGU UACGCCGAAC AUGAUCGACU AUUUUCGGACG GCCGUAUGAA GGCAUCGCCG UGUUCGACGG CAAAAGAUC ACUGUAACAG GGACCCUGUG GAACGGCAAC AAAAUUAUCG 3'
3' tccactagga cgtgataccg tgtgaccatt agctgcccca atgcggcttg tactagctga taaagcctgc cggcatactt ccgtagcggc acaagctgcc gtttttctag tgacattgtc cctgggacac cttgccgttg tttaatagc 5'
SpNL-16
SpNL-17
SpNL-18
SpNL-19
SpNL-20
SpNL-21
SpNL-22
SpNL-23
NL-24
NL-25
NL-26
NL-27
NL-28
5' ACGAGCGCCU GAUCAACCCC GACGGCUCCC UGCUGUUCCG AGUAACCAUC AACGGAGUGA CCGGCUGGCG GCUGUGCGAA CGCAUUCUGG CGUAAUUCUA GAGUCGGGGC 3'
3' tgctcgcgga ctagttgggg ctgccgaggg acgacaaggc tcattggtag ttgcctcact ggccgaccgc cgacacgctt gcgtaagacc gcattaagat ctcagccccg 5'
SpNL-24
SpNL-25
SpNL-26
SpNL-27
SpNL-28

图7-1

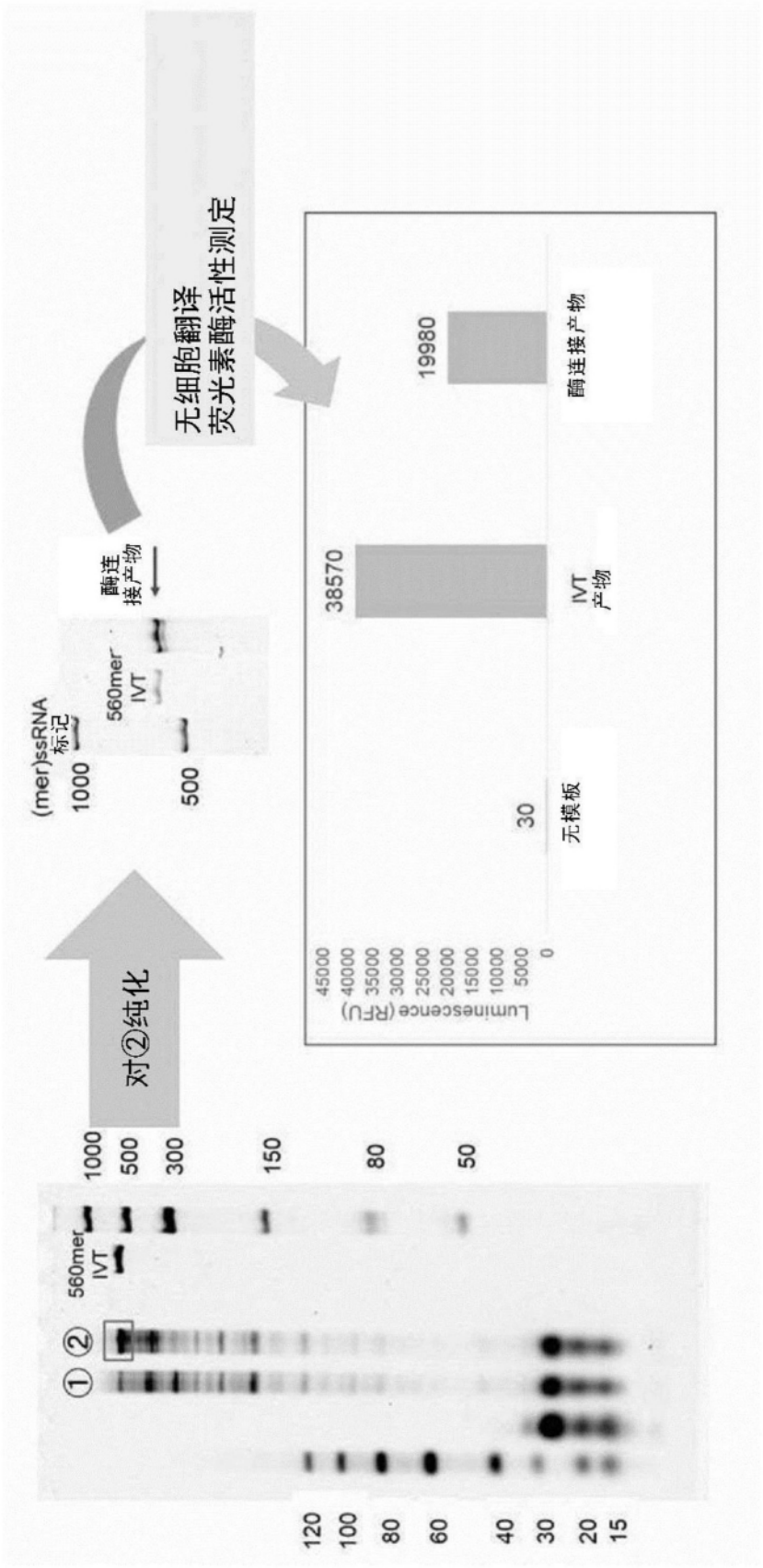

无细胞翻译
荧光素酶活性测定
酶连接产物
(mer)ssRNA标记
1000
500
560mer IVT
对②纯化
1000
500
300
150
80
50
560mer IVT
②
①
120
100
80
60
40
30
20
15
Luminescence (RFU)
45000
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
38570
19980
30
无模板
IVT产物
酶连接产物

图7-2

① SpDNA与所有的片段形成碱基对
⑤核酸夹板没有形成碱基对的间隙为2个碱基
⑥核酸夹板没有形成碱基对的间隙为1个碱基-（1）（在连接位点突出且形成碱基对的长度与①一样）
⑦核酸夹板没有形成碱基对的间隙为1个碱基-（2）（在连接位点突出且形成碱基对的长度比①短1个碱基）

图8-1

④ 在连接位点前后以9mer形成碱基对（现有方法）
⑧对④中核酸夹板没有形成碱基对的间隙进行填补
⑨片段RNA和核酸夹板的链长加长-（1）（5’端的片段RNA为46mer、SpDNA为78mer）
⑩片段RNA和核酸夹板的链长加长-（2）（非末端的片段RNA为45mer、SpDNA为78mer）

图8-2

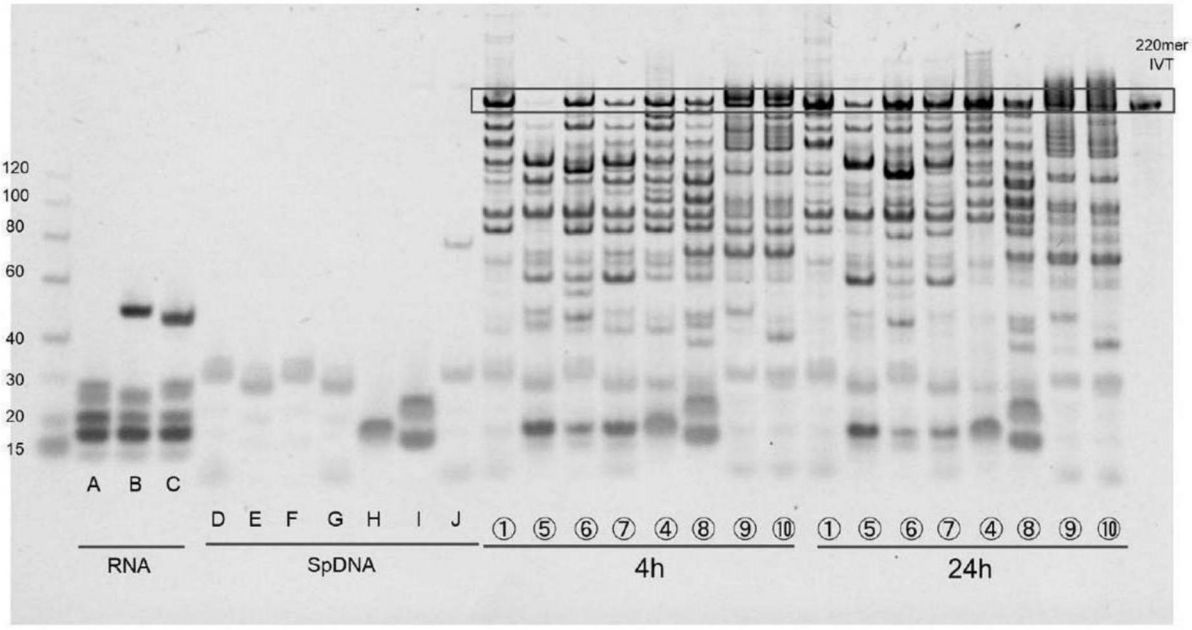

220mer
IVT
120
100
80
60
40
30
20
15
A B C
D E F G H I J
① ⑤ ⑥ ⑦ ④ ⑧ ⑨ ⑩
① ⑤ ⑥ ⑦ ④ ⑧ ⑨ ⑩
RNA
SpDNA
4h
24h

图8-3


使用分段的互补DNA 夹板 通过短链片段连续缩合而合成长单链（ss）RNA
RNA
p RNA
p RNA
SpDNA
SpDNA
SpDNA
酶（T4 RNA连接酶2）连接
纯化

图9

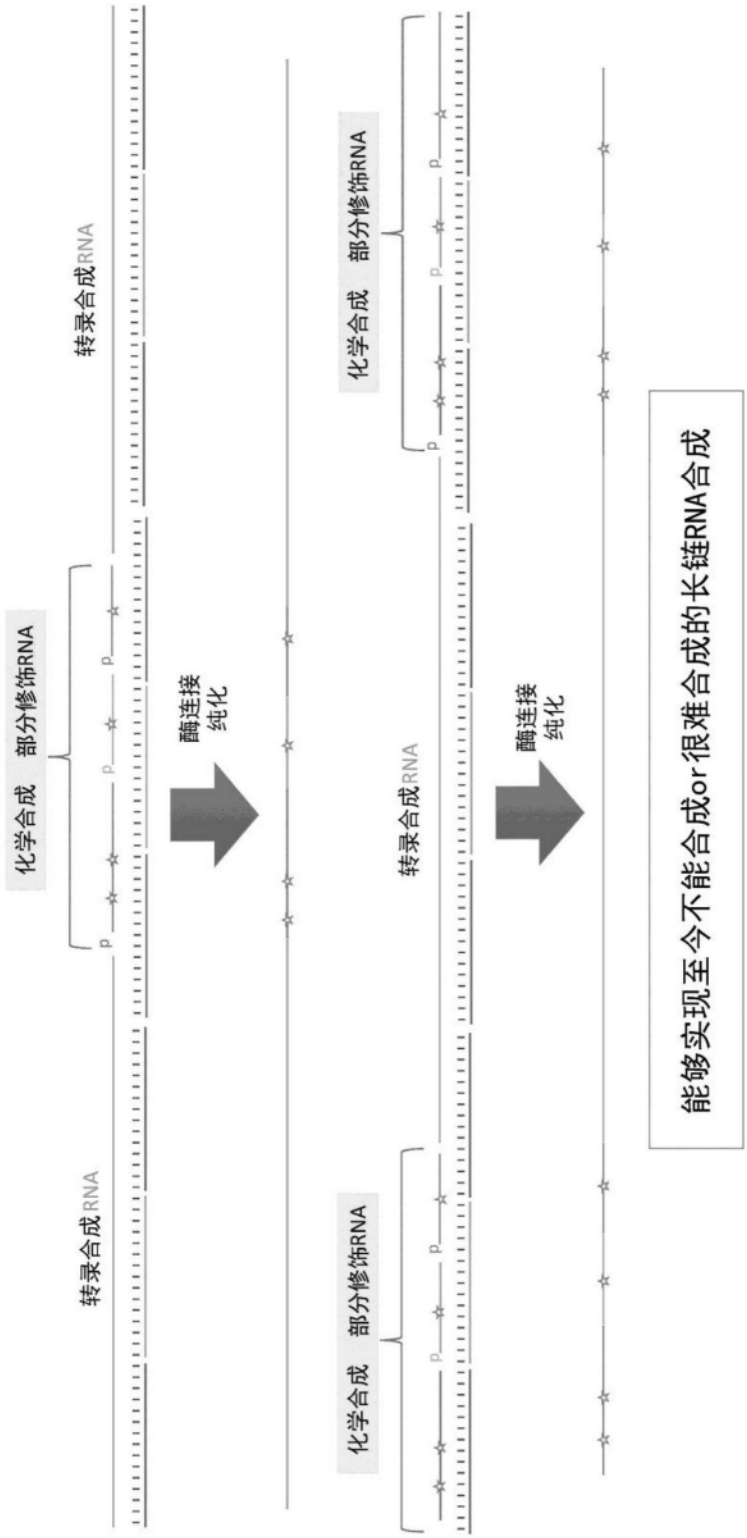

化学合成 部分修饰RNA
转录合成RNA
酶连接
纯化
转录合成RNA
化学合成 部分修饰RNA
化学合成 部分修饰RNA
转录合成RNA
酶连接
纯化
能够实现至今不能合成or很难合成的长链RNA合成

图10

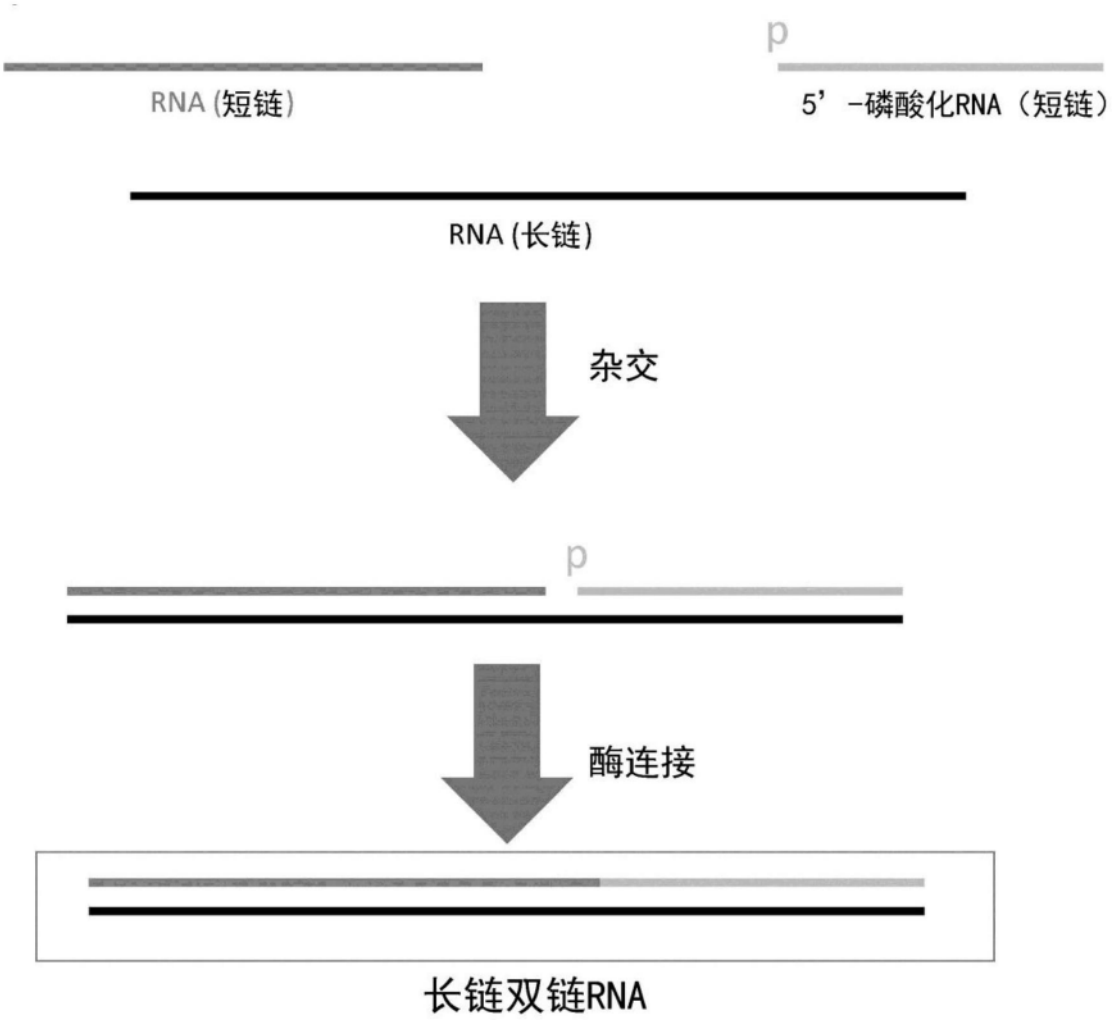

RNA (短链)
p
5’ -磷酸化RNA（短链）
RNA (长链)
杂交
p
酶连接
长链双链RNA

图11

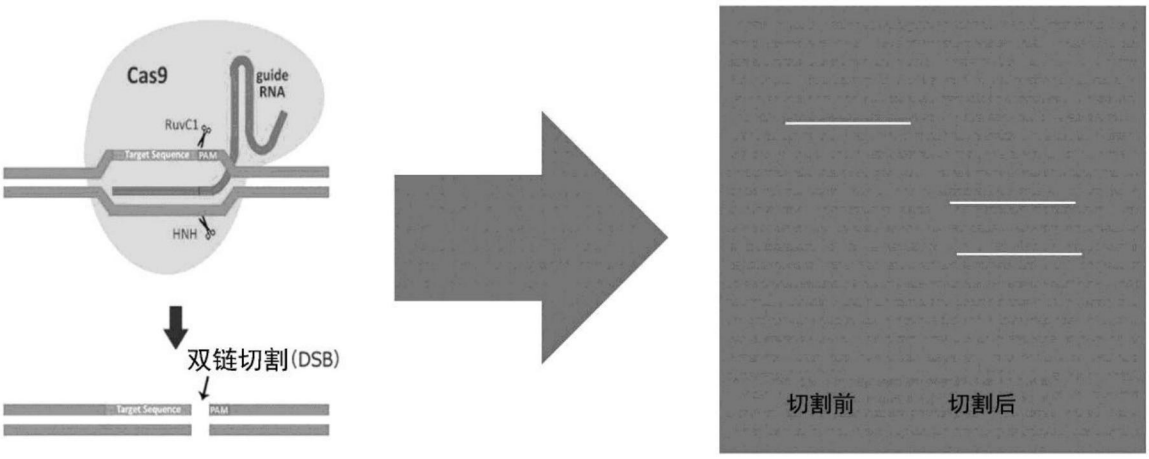

Cas9
guide RNA
RuvC1
Target Sequence
PAM
HNH
双链切割(DSB)
Target Sequence
PAM
切割前
切割后

图12

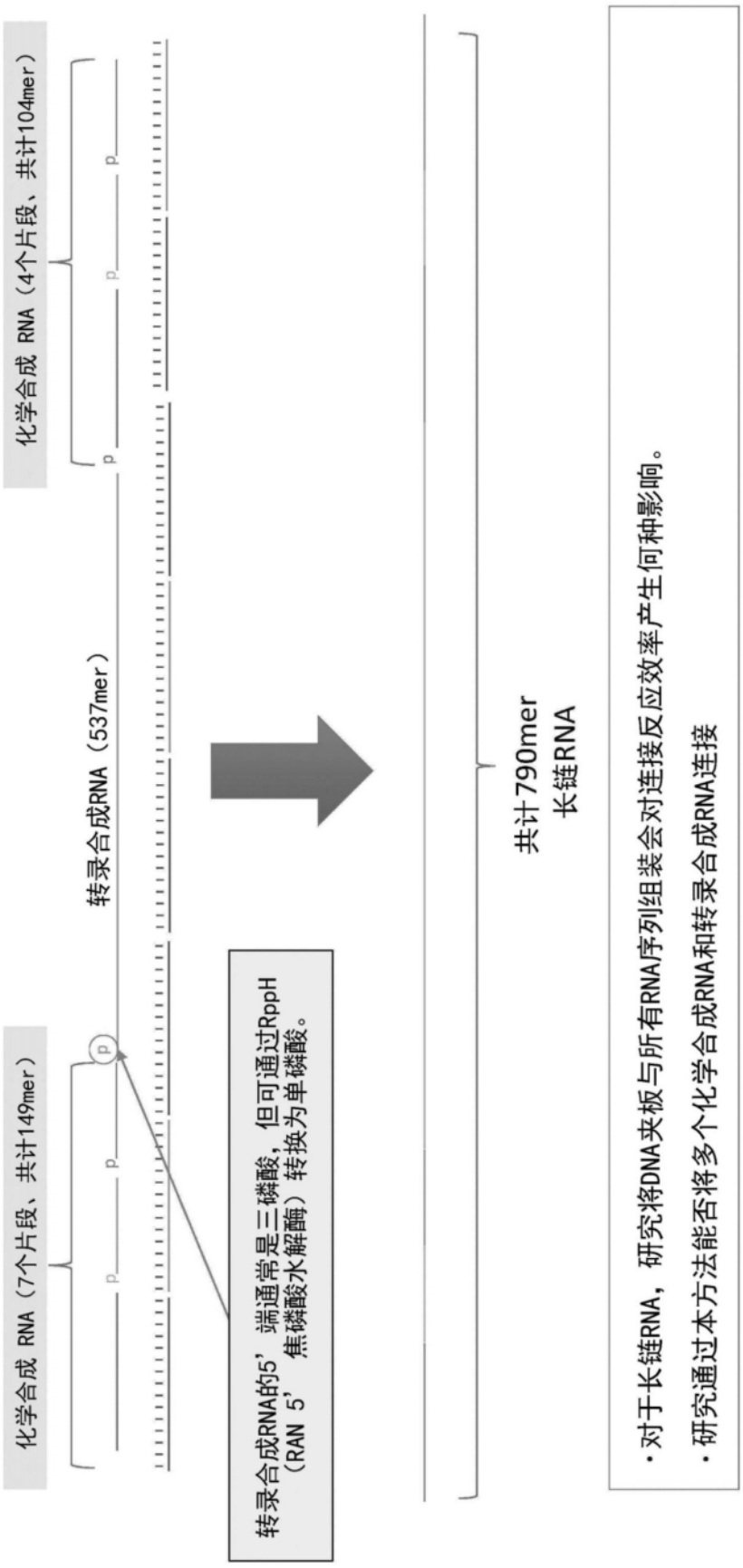

化学合成 RNA（7个片段、共计149mer）
化学合成 RNA（4个片段、共计104mer）
转录合成RNA（537mer）
转录合成RNA的5’端通常是三磷酸，但可通过RppH（RAN 5’ 焦磷酸水解酶）转换为单磷酸。
共计790mer
长链RNA
·对于长链RNA，研究将DNA夹板与所有RNA序列组装会对连接反应效率产生何种影响。
·研究通过本方法能否将多个化学合成RNA和转录合成RNA连接

图13

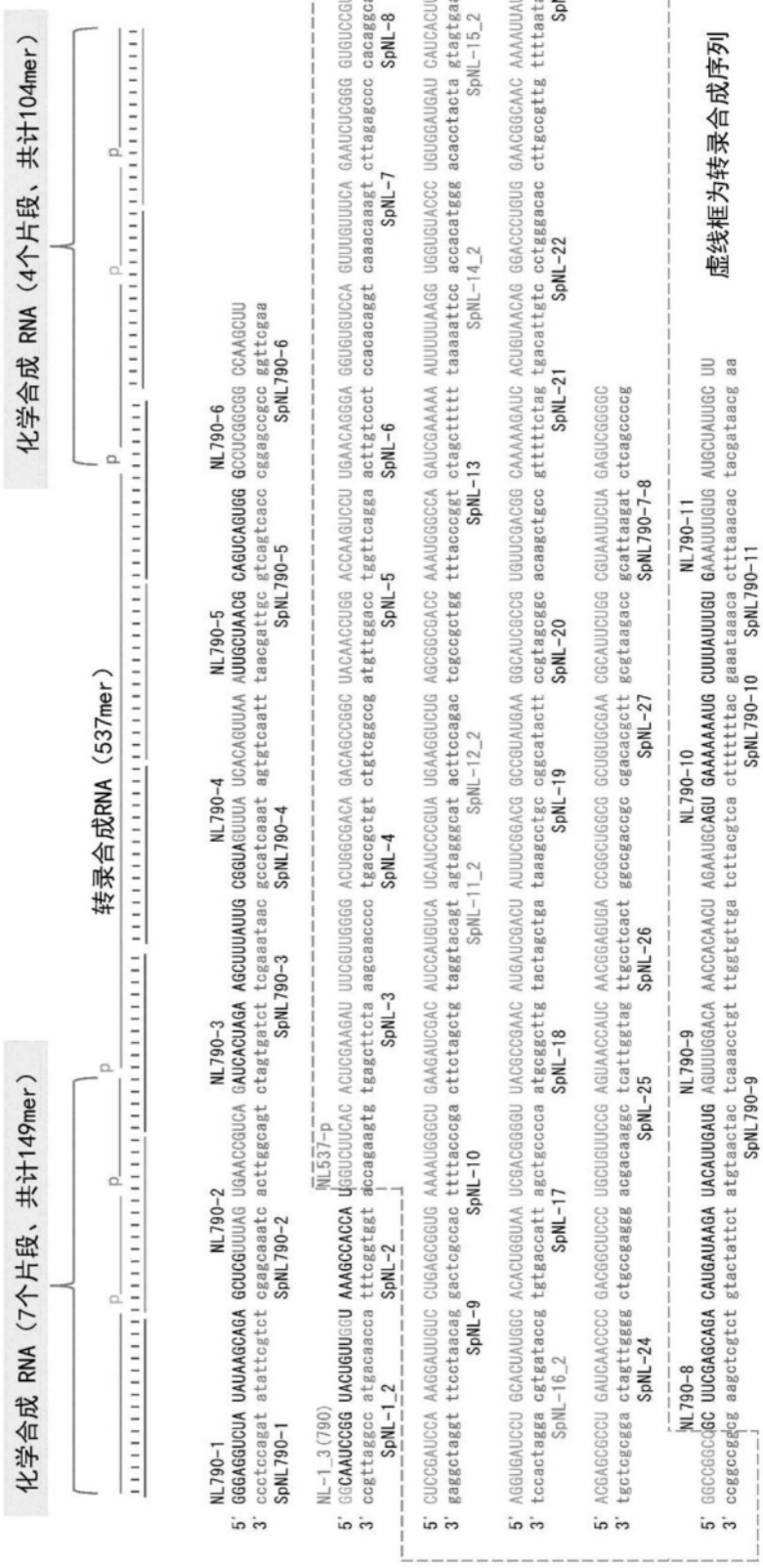

化学合成 RNA（7个片段、共计149mer）
化学合成 RNA（4个片段、共计104mer）
转录合成RNA（537mer）
虚线框为转录合成序列

图14

①使用DNA夹板对转录产物和化学合成RNA进行连接_反应试验概况。

试验区编号	连接反应产物碱基数(mer)	片段RNA数	DNA夹板数	试验区概况
1	790	36	37	全部使用化学合成的RNA，使790mer连接
2	790	7 + IVT-RNA + 4	37	除连接长链转录合成RNA的部分以外也组装互补链DNA夹板
3	790	7 + IVT-RNA + 4	12	除连接长链转录合成RNA的部分以外不组装互补链DNA夹板

：在除连接长链转录合成RNA的部分以外设计的互补链DNA夹板

：在连接长链转录合成RNA的部分设计的互补链DNA夹板

图15

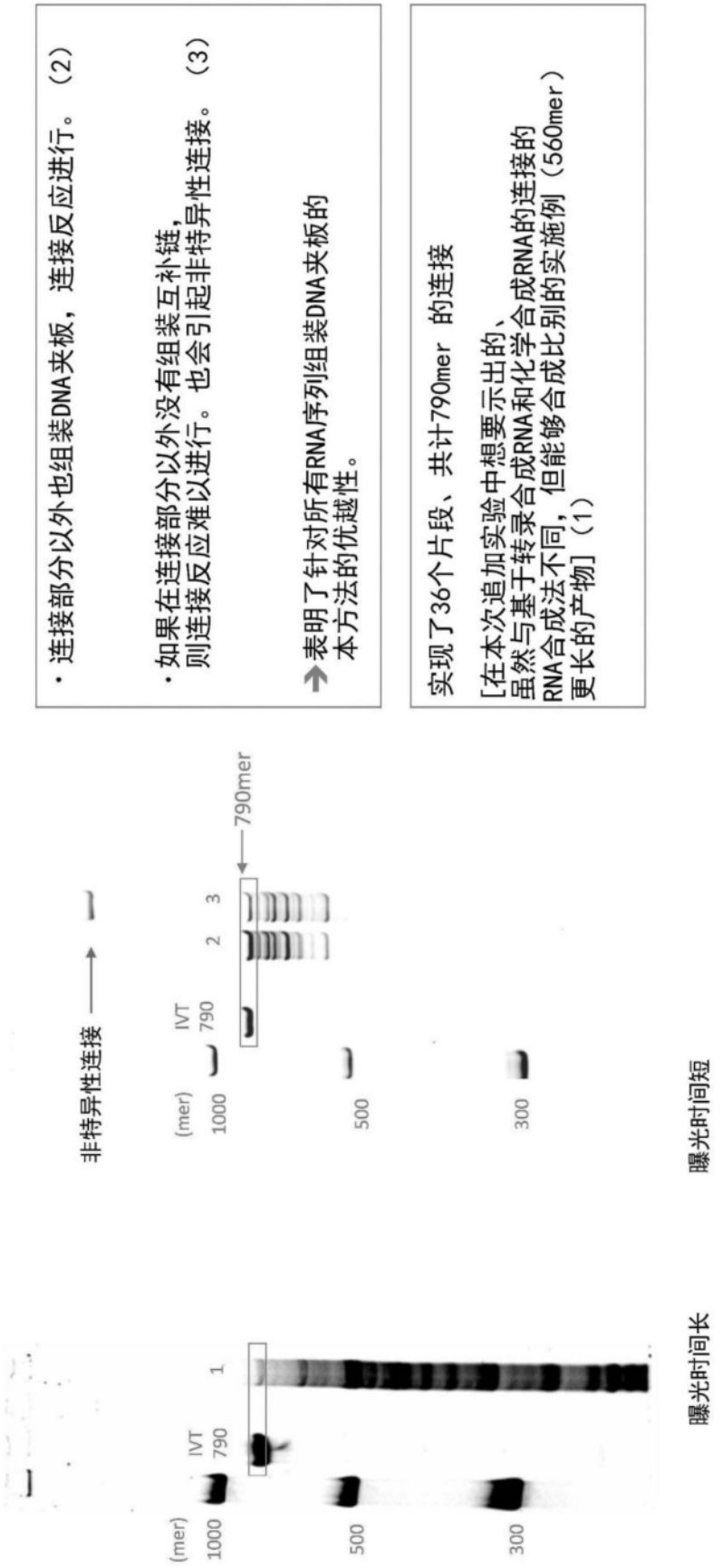

・连接部分以外也组装DNA夹板，连接反应进行。（2）
・如果在连接部分以外没有组装互补链，
则连接反应难以进行。也会引起非特异性连接。（3）
➔表明了针对所有RNA序列组装DNA夹板的
本方法的优越性。
实现了36个片段、共计790mer 的连接
[在本次追加实验中想要示出的、
虽然与基于转录合成RNA和化学合成RNA的连接的
RNA合成法不同，但能够合成比别的实施例（560mer）
更长的产物]（1）
非特异性连接
IVT
790
1
2
3
790mer
(mer)
1000
500
300
曝光时间短
曝光时间长

图16

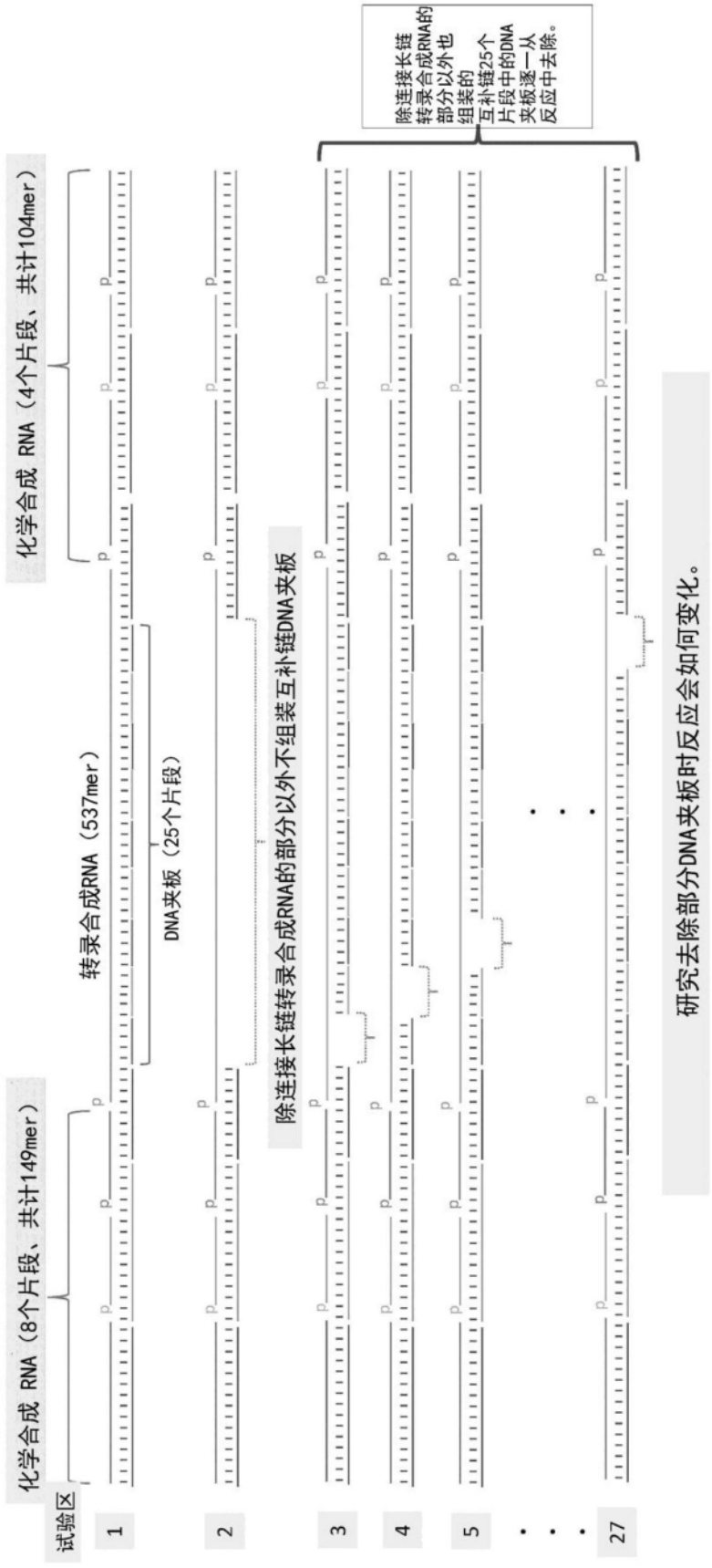
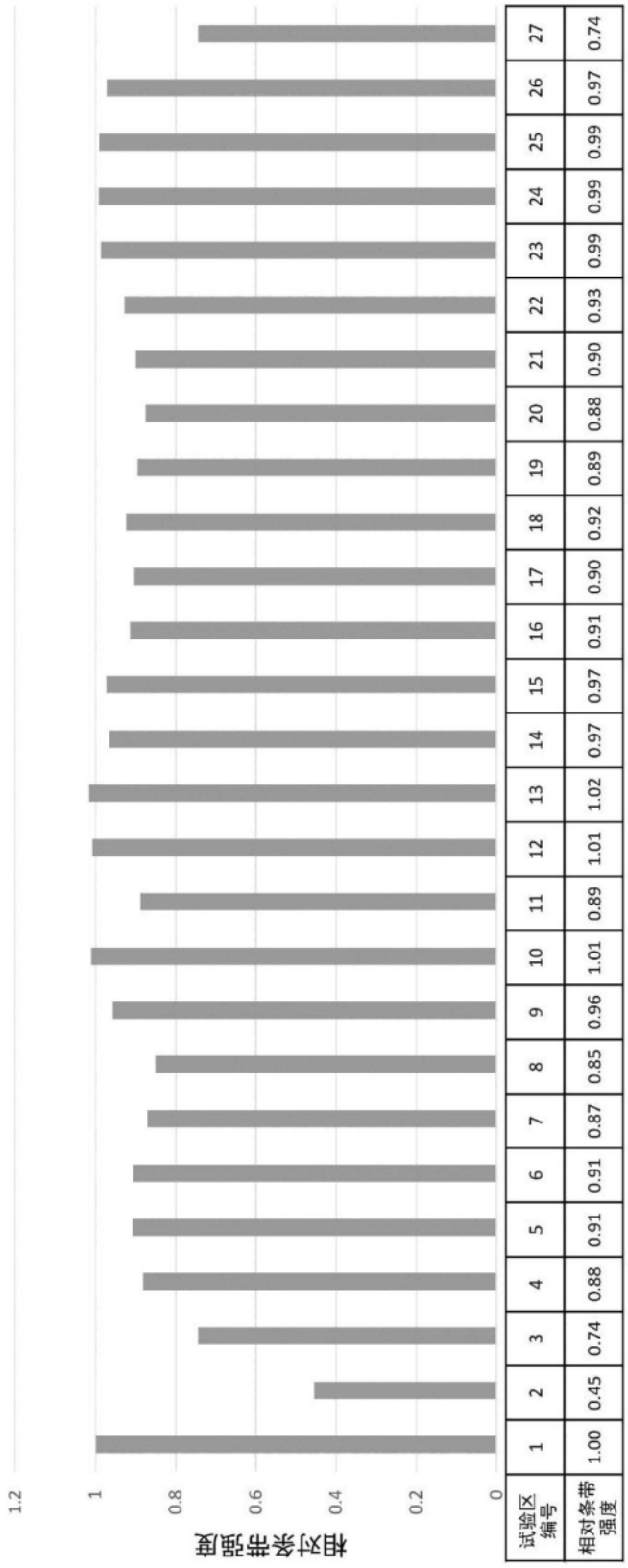

化学合成 RNA（8个片段、共计149mer）
试验区
转录合成RNA（537mer）
化学合成 RNA（4个片段、共计104mer）
DNA夹板（25个片段）
除连接长链转录合成RNA的部分以外不组装互补链DNA夹板
除连接长链转录合成RNA的部分以外也组装的互补链25个片段中的DNA夹板逐一从反应中去除。
研究去除部分DNA夹板时反应会如何变化。
1
2
3
4
5
27

图17



试验区编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
相对条带强度	1.00	0.45	0.74	0.88	0.91	0.91	0.87	0.85	0.96	1.01	0.89	1.01	1.02	0.97	0.97	0.91	0.90	0.92	0.89	0.88	0.90	0.93	0.99	0.99	0.99	0.97	0.74

图18