



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110199020 B

(45) 授权公告日 2024.06.18

(21) 申请号 201780082232.8

(22) 申请日 2017.11.03

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 110199020 A

(43) 申请公布日 2019.09.03

(30) 优先权数据

62/416,802 2016.11.03 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2019.07.03

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/059816 2017.11.03

(87) PCT国际申请的公布数据

W02018/144087 EN 2018.08.09

(73) 专利权人 坦普尔大学-高等教育联盟

地址 美国宾夕法尼亚州

(72) 发明人 奥斯卡·M·佩雷斯-莱亚尔

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

专利代理人 郑斌 刘振佳

(51) Int.CI.

C12N 15/10 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12N 15/81 (2006.01)

A01K 67/0276 (2024.01)

A01K 67/0278 (2024.01)

C12N 15/85 (2006.01)

(56) 对比文件

US 5464764 A, 1995.11.07

EP 3078676 A1, 2016.10.12

US 2011212090 A1, 2011.09.01

Bjarte Aarmo Lund等.A high-throughput, restriction-free cloning and screening strategy based on ccdB-gene replacement.《Microb Cell Fact》.2014, 第13卷(第1期), 第13-38页.

Yasuyoshi Kimura等.CRISPR/Cas9-mediated reporter knock-in in mouse haploid embryonic stem cells.《Sci Rep》.2015, 第5卷第10710页.

审查员 张晓霞

权利要求书1页 说明书25页

序列表3页 附图13页

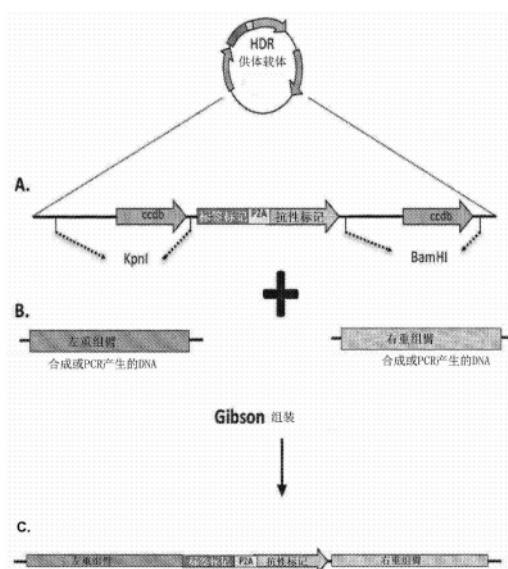
## (54) 发明名称

用于快速产生用于细胞系开发的同源重组载体的DNA质粒

## (57) 摘要

本发明提供了用于将转基因DNA插入细胞中的同源重组载体。这些载体缩短了生产时间并允许容易地产生经遗传修饰的细胞。本发明允许用户使用所述同源重组载体来测试多种标签并产生纯合的经修饰细胞系。本发明可用于产生敲除细胞、产生具有敲入基因的细胞系、产生用于针对任何靶标进行药物筛选的细胞系、产生转基因动物，或用于基因治疗。

CN 110199020 B



1. 同源定向修复HDR供体载体,其包含核酸分子,其中所述核酸分子包含插入盒的核苷酸序列,其中所述插入盒包含待插入到细胞的基因组中的核酸序列,并且其中所述插入盒的两侧是编码两个负选择标记的两个核苷酸序列,其中所述两个负选择标记中的每个包含侧翼是限制性酶切割位点的ccdb基因。
2. 权利要求1所述的HDR供体载体,其中所述插入盒包含外源基因序列。
3. 权利要求1所述的HDR供体载体,其中所述插入盒包含选自以下的一种或更多种序列:细胞选择标记序列、蛋白质纯化标签、报道序列、启动子序列、P2A接头序列、终止序列、mRNA稳定序列或其组合。
4. 权利要求2或3所述的HDR供体载体,其中所述插入盒包含选自以下的蛋白质纯化标签:几丁质结合蛋白CBP、麦芽糖结合蛋白MBP、谷胱甘肽-S-转移酶GST、聚His、生物素/链霉亲和素、V5标签、Myc标签、HA标签、NE标签、His标签、Flag标签、Halo标签、Snap标签、Fc标签、Nus标签、BCCP、硫氧还蛋白、Snoopr标签、Spy标签、Isopep标签、SBP标签、S标签、Avi标签、钙调蛋白。
5. 权利要求2或3所述的HDR供体载体,其中所述插入盒包含选自以下的报道标记:氯霉素-乙酰基转移酶CAT、β-半乳糖基转移酶、辣根过氧化物酶、萤光素酶、碱性磷酸酶和荧光蛋白。
6. 权利要求2或3所述的HDR供体载体,其中所述插入盒包含NanoLuc®。
7. 权利要求5所述的HDR供体载体,其中所述插入盒包含选自以下的荧光蛋白:绿色荧光蛋白GFP、红色荧光蛋白RFP、mCherry、mRuby3、mtagBFP2和mClover3。
8. 权利要求2或3所述的HDR供体载体,其中所述插入盒包含选自以下的细胞选择标记序列:Zeocin™抗性标记、新霉素抗性标记、嘌呤霉素抗性标记、杀稻瘟素抗性标记和潮霉素抗性标记。
9. 权利要求1所述的HDR供体载体,其包含选自SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的核酸序列。

## 用于快速产生用于细胞系开发的同源重组载体的DNA质粒

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2016年11月3日提交的美国临时申请No. 62/416,802的优先权，其通过引用整体并入本文。

[0003] 关于联邦政府资助的研究或开发的声明

[0004] 本发明是在国立卫生研究院(NIH)授予的R03DK105267的政府支持下完成的。政府拥有本发明的某些权利。

### 背景技术

[0005] 用于靶向活细胞中DNA的特定序列的酶系统(TALENS、锌指内切核酸酶、CRISPR)的最近发现和发展已经显著地使得对真核生物的基因组进行修饰成为可能。这些酶系统的共同特征是，一旦识别并切割靶DNA序列，则内源DNA修复机器将尝试通过两个主要过程修复双链断裂：第一个过程称为非同源末端连接(Non-Homologous End Joining, NHEJ)，其以非常易错的多步骤过程重新连接切割DNA的两端，从而在修复的序列中留下核苷酸的小的插入或缺失。这种天然机制允许通过促进靶基因的第一个外显子的序列中NHEJ来产生基因敲除，从而利用随机突变改变用于蛋白质翻译的阅读框。第二个过程称为同源定向修复(Homology Directed Repair, HDR)，其需要与双链断裂的两端具有同源性的DNA模板来修复切割。该过程不易出错，并且已广泛用于修复或插入遗传疾病的特定突变，或敲入蛋白质标记(例如纯化标签或荧光蛋白)的序列。

[0006] 用于在DNA的双链断裂后促进HDR的供体模板的大小不同。它们可以简单至小于200个碱基对的单链DNA分子(ssDNA)，或者大至作为供体质粒包含用于切割位点的5'和3'末端的同源重组臂。这些供体载体还包含插入的蛋白质标记的序列和用于表达抗性基因的重组盒，以辅助经修饰细胞克隆的分离。这些供体质粒的构建被认为是费力的并且需要多步骤过程，这可需要数天才能完成。此外，一旦在细胞中诱导基因组修饰，则选择纯细胞克隆可需要使用昂贵的细胞分选设备，这不是每个实验室都具备的；或者依赖于利用针对抗真核抗生素的抗性盒的细胞选择，然后是单细胞稀释，该过程可需要数周才能完成。

[0007] 因此，本领域需要加速载体产生和纯克隆细胞选择过程的方法和组合物。本发明解决了本领域中这种未满足的需求。

### 发明内容

[0008] 在一个实施方案中，本发明涉及同源定向重组(HDR)供体载体，其包含核酸分子，其中所述核酸分子包含编码负选择标记的一个或更多个核苷酸序列和包含插入盒的核苷酸序列，其中所述插入盒包含待插入到细胞的基因组中的核酸序列。

[0009] 在一个实施方案中，插入盒包含以下的一种或更多种：细胞选择标记序列、蛋白质纯化标签、报道标记序列、启动子序列、P2A接头序列、终止序列、mRNA稳定序列、报道标记序列、细胞选择标记序列、外源基因或其组合。

[0010] 在一个实施方案中，蛋白质标签是以下之一：几丁质结合蛋白(chitin binding

protein, CBP)、麦芽糖结合蛋白 (maltose binding protein, MBP)、谷胱甘肽-S-转移酶 (glutathione-S-transferase, GST)、聚 (His)、生物素/链霉亲和素、V5标签、Myc标签、HA标签、NE标签、His标签、Flag标签、Halo标签、Snap标签、Fc标签、Nus标签、BCCP、硫氧还蛋白、Snoopr标签、Spy标签、Isopep标签、SBP标签、S标签、Avi标签、钙调蛋白。

[0011] 在一个实施方案中,报道标记是以下之一:氯霉素-乙酰基转移酶 (CAT)、 $\beta$ -半乳糖基转移酶、辣根过氧化物酶、萤光素酶, **NanoLuc®**、碱性磷酸酶和荧光蛋白。在一个实施方案中,荧光蛋白选自绿色荧光蛋白 (GFP)、红色荧光蛋白 (RFP)、mCherry、mRuby3、mtagBFP2和mClover3。

[0012] 在一个实施方案中,插入盒是以下之一:Zeocin<sup>TM</sup>抗性标记、新霉素抗性标记、嘌呤霉素抗性标记、杀稻瘟素抗性标记和潮霉素抗性标记。

[0013] 在一个实施方案中,一种或更多种负选择标记包含ccdb基因。在一个实施方案中, HDR供体载体包含在插入盒侧翼的两个编码负选择标记的核酸序列。在一个实施方案中, HDR供体载体包含如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2所示的核酸序列。

[0014] 在一个实施方案中,本发明涉及HDR载体,其包含核酸分子,其中所述核酸分子包含一个或更多个重组臂,其中所述重组臂包含与靶核苷酸序列具有同源性的核苷酸序列和包含插入盒的核苷酸序列,其中所述插入盒包含待插入到细胞的基因组中的核酸序列。

[0015] 在一个实施方案中,插入盒包含选自以下的一种或更多种序列:细胞选择标记序列、蛋白质纯化标签、报道标记序列、启动子序列、终止序列、mRNA稳定序列、报道标记序列、细胞选择标记序列、外源基因或其组合。

[0016] 在一个实施方案中,蛋白质标签是以下之一:CBP、MBP、GST、聚 (His)、生物素/链霉亲和素、V5标签、Myc标签、HA标签、NE标签、His标签、Flag标签、Halo标签、Snap标签、Fc标签、Nus标签、BCCP、硫氧还蛋白、Snoopr标签、Spy标签、Isopep标签、SBP标签、S标签、Avi标签、钙调蛋白。

[0017] 在一个实施方案中,报道标记是以下之一:CAT、 $\beta$ -半乳糖基转移酶、辣根过氧化物酶、萤光素酶, **NanoLuc®**、碱性磷酸酶和荧光蛋白。在一个实施方案中,荧光蛋白选自 GFP、RFP、mCherry、mRuby3、mtagBFP2和mClover3。

[0018] 在一个实施方案中,细胞选择标记序列是以下之一:Zeocin<sup>TM</sup>抗性标记、新霉素抗性标记、嘌呤霉素抗性标记、杀稻瘟素抗性标记和潮霉素抗性标记。

[0019] 在一个实施方案中,本发明涉及产生经遗传修饰细胞的方法,其包括:使包含内源染色体靶DNA序列的细胞与本发明的HDR载体接触,以使得所述HDR载体的一个或更多个重组臂与所述内源染色体靶DNA序列之间的同源重组促进所述HDR载体的所述插入盒整合到所述细胞的基因组中。

[0020] 在一个实施方案中,接触方法包括用HDR载体转染所述细胞。

[0021] 在一个实施方案中,该方法还包括提供包含内切核酸酶结构域的核酸酶,所述内切核酸酶结构域在细胞中所述内源染色体靶DNA内的特定核苷酸序列处切割DNA;以及在所述细胞内使所述内源染色体靶DNA序列与所述核酸酶接触,以使得所述核酸酶在所述细胞中对所述内源染色体靶DNA序列内的核苷酸序列进行切割或产生切口,从而提高所述内源染色体靶DNA序列与所述HDR载体的一个或更多个重组臂之间的同源重组频率。

[0022] 在一个实施方案中,所述细胞来自人。在一个实施方案中,所述细胞来自小鼠。

[0023] 在一个实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法制备的经遗传修饰细胞。在一个实施方案中,经遗传修饰细胞是敲除细胞。在一个实施方案中,经遗传修饰细胞是敲入细胞。在一个实施方案中,细胞是人细胞。在一个实施方案中,细胞是小鼠细胞。

[0024] 在一个实施方案中,本发明涉及产生其中引入了期望核酸的经遗传修饰动物的方法,其包括:获得包含内源染色体靶DNA序列的原代细胞,其中期望向所述内源染色体靶DNA序列引入所述核酸;使所述细胞与本发明的HDR载体接触,以使得所述HDR载体的一个或更多个重组臂与所述内源染色体靶DNA序列之间的同源重组促进所述HDR载体的所述插入盒整合到所述细胞的基因组中;以及从其中已发生同源重组的原代细胞产生动物。

[0025] 在一个实施方案中,该方法还包括提供包含内切核酸酶结构域的核酸酶,所述内切核酸酶结构域在所述细胞种所述内源染色体靶DNA内的特定核苷酸序列处切割DNA;以及在所述细胞内使所述内源染色体靶DNA序列与所述核酸酶接触,以使得所述核酸酶在所述原代细胞中对所述内源染色体靶DNA序列内的核苷酸序列进行切割或产生切口,从而提高所述内源染色体靶DNA序列与所述HDR载体的一个或更多个重组臂之间的同源重组频率。

[0026] 在一个实施方案中,所述动物是哺乳动物、有袋类、禽类、两栖动物和鱼类之一。

[0027] 在一个实施方案中,插入盒包含选自以下的核苷酸序列:在同源重组之后破坏基因的核苷酸序列、在同源重组之后替换基因的核苷酸序列、在同源重组之后引入基因的核苷酸序列、和在同源重组之后引入调节位点的核苷酸序列。

[0028] 在一个实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法制备的经遗传修饰动物。

[0029] 在一个实施方案中,本发明涉及治疗疾病的方法,其包括将本发明的HDR载体引入患有疾病的对象中,其中所述HDR载体的插入盒包含选自以下的核苷酸序列:在同源重组之后破坏基因的核苷酸序列、在同源重组之后替换基因的核苷酸序列、在同源重组之后引入基因的核苷酸序列、和在同源重组之后引入调节位点的核苷酸序列,其中所述基因与疾病相关。

[0030] 在一个实施方案中,本发明涉及筛选化合物对基因或蛋白质的一种或更多种活性的作用的方法,其包括使一种或更多种本发明的经遗传修饰细胞与所述化合物接触并评价基因或蛋白质的一种或更多种活性。在一个实施方案中,该方法包括使本发明的多个经遗传修饰细胞与所述化合物接触。

[0031] 在一个实施方案中,本发明涉及治疗疾病的方法,其包括向有此需要的对象施用通过本发明筛选化合物作用的方法鉴定为具有对治疗所述疾病有益作用的化合物。在一个实施方案中,所述疾病与低水平的血红素加氧酶I (H0-1) 表达相关,并且其中所述化合物是双硫仑、硫链丝菌肽、三甲双酮、金诺芬、硫柳汞、盐酸卤泛群和伏立诺他之一。

[0032] 附图简述

[0033] 当结合附图阅读时,将更好地理解本发明的优选实施方案的以下详细描述。出于说明本发明的目的,在附图中示出了目前优选的实施方案。然而,应该理解,本发明不限于附图中所示实施方案的精确布置和手段。

[0034] 图1包括图1A至图1C,描绘了构建用于C末端标记的HDR载体的组件的图。图1A描绘了首先用限制酶消化HDR供体载体(或骨架载体)以切割具有ccdB(控制细胞死亡B基因)盒的片段(在这种情况下为KpnI和BamHI)。图1B描绘了设计与靶DNA序列具有同源性的合成重

组臂。通过使用Gibson组装方法将重组臂与消化的骨架载体混合并克隆。图1C描绘了HDR载体产物。

[0035] 图2包括图2A至图2C,描绘了构建用于N-末端标记的HDR载体所需的组件的图。图2A描绘了首先用限制酶消化骨架载体以切割具有CDDB盒的片段(在这种情况下我们使用KpnI和BamHI)。图2B描绘了通过使用Gibson组装方法将先前设计的合成重组臂与消化的骨架载体混合并克隆。图2C描绘了HDR载体产物。

[0036] 图3包括图3A至图3C,描绘了构建具有内部启动子的HDR载体所需的组件的图。图3A描绘了首先用限制酶消化具有在内部启动子控制下的报道序列和抗生素抗性基因的HDR供体载体以切割具有CDDB盒的片段(在这种情况下我们使用KpnI和BamHI)。图3B描绘了设计与靶DNA序列具有同源性的合成重组臂。通过使用Gibson组装方法将重组臂与消化的骨架载体混合并克隆。图3C描绘了HDR载体产物。

[0037] 图4包括图4A至图4B,描绘了蛋白质标签的实例的图,所述蛋白质标签可用于通过促进同源重组来标记内源蛋白质。图4A描绘了用于在靶基因的C末端位点中插入标记标签的示例性构建体。图4B描绘了用于在靶基因的N-末端位点中插入标记标签的示例性构建体。

[0038] 图5描绘了用于开发同源重组载体和选择经修饰细胞系的方案。

[0039] 图6描绘了具有用mRuby3标记的内源组蛋白3并用Zeocin<sup>TM</sup>(100μg/ml)选择的细胞系的代表性图像。

[0040] 图7描绘了具有用mClover3标记的内源性β微管蛋白并用嘌呤霉素(5μM)选择的细胞系的代表性图像。

[0041] 图8描绘了具有多重标记的细胞系。内源组蛋白3用mRuby3标记,β微管蛋白用mClover3标记。用Zeocin<sup>TM</sup>和嘌呤霉素的混合物选择细胞。

[0042] 图9包括图9A至图9C,描绘了用三重标记显色的细胞系的代表性图像。图9A描绘了用mRuby3标记的内源组蛋白3。图9B描绘了用mTagBFP2标记的ATP5B。图9C描绘了用mClover3标记的β微管蛋白。用Zeocin<sup>TM</sup>、嘌呤霉素和杀稻瘟素的混合物选择细胞。

[0043] 图10描绘了用NanoLuc<sup>®</sup>萤光素酶标记的血红素加氧酶I(HO-1)显色的细胞系。用NanoLuc<sup>®</sup>萤光素酶标记的HO-1的内源基因修饰HEK293T细胞系。用HO-1表达的已知激活剂刺激后测量HO-1蛋白表达的变化。

[0044] 图11描绘了证明对HO-1表达的强效诱导物的鉴定的实验结果。使用HO-1 NanoLuc<sup>®</sup> HEK293T细胞系评价用具有氧化剂或抗氧化剂能力的84种化合物的文库处理16小时后HO-1表达的变化。

[0045] 图12描绘了证明对激活HO-1表达的FDA批准的药物的鉴定的实验结果。使用HO-1 NanoLuc<sup>®</sup> HEK293T细胞系评价用1200种FDA批准的化合物处理16小时后HO-1表达的变化。七种化合物能够使HO-1的表达提高超过1.5倍。

[0046] 发明详述

[0047] 在一个实施方案中,本发明提供了用于降低基因的一个或更多个等位基因的表达的方法和试剂。在一个实施方案中,本发明提供了用于标记基因的一个或更多个等位基因的方法和试剂。

[0048] 在一个实施方案中,本发明提供了DNA分子,其用于靶向对应于外源序列的多核苷

酸区域的方法。在一个实施方案中,DNA分子是预重组载体或HDR供体载体。在一个实施方案中,DNA分子是重组载体或HDR载体。在一个实施方案中,本发明的HDR供体载体包含插入盒。在一个实施方案中,通过消化HDR供体载体并将HDR供体载体的插入盒连接至一个或更多个与靶核酸序列具有同源性的核酸序列来产生本发明的HDR载体。

[0049] 在一个实施方案中,HDR供体载体包含CCDB盒和插入盒中的一种或更多种。在一个实施方案中,HDR供体载体包含第一CCDB盒、插入盒和第二CCDB盒,所述第一CCDB盒的侧翼为用于通过第一限制酶切割的限制酶切割位点,所述第二CCDB盒侧翼为用于通过第二限制酶切割的限制酶切割位点。在一个实施方案中,CCDB盒包含编码CcdB毒素的ccdB基因。

[0050] 在一个实施方案中,HDR供体载体的插入盒包含编码标签的多核苷酸序列、接头序列和抗生素抗性基因中的一种或更多种。在一个实施方案中,接头序列是P2A序列。在一个实施方案中,包含标签、接头序列和抗生素抗性基因的HDR供体载体的示例性核苷酸序列示于SEQ ID NO:1中。

[0051] 在一个实施方案中,插入盒包含编码标签的多核苷酸序列、启动子序列和抗生素抗性基因中的一种或更多种。在一个实施方案中,启动子是EF-1 $\alpha$ 启动子。在一个实施方案中,包含标签、启动子序列和抗生素抗性基因的HDR供体载体的示例性核苷酸序列示于SEQ ID NO:2中。

[0052] 在一个实施方案中,通过将HDR供体载体的插入盒连接至一个或更多个与靶核酸序列具有同源性的核酸序列或重组臂来产生HDR载体。在一个实施方案中,HDR载体包含与两个靶核酸序列具有同源性的两个区域,或两个重组臂。在一个实施方案中,HDR载体包含侧翼为两个重组臂的插入盒。

[0053] 在一个实施方案中,HDR载体包含具有对应于外源序列的多核苷酸序列的第一区域、插入盒和具有对应于外源序列的多核苷酸序列的第二区域。在一个实施方案中,重组载体(或HDR载体)包含具有对应于外源序列的多核苷酸序列的第一区域、编码标签的多核苷酸序列、接头序列、编码用于抗生素抗性的蛋白质的多核苷酸序列、和具有对应于外源序列的多核苷酸序列的第二区域。在一些实施方案中,载体包含启动子。在一个实施方案中,载体包含条件调节的启动子。

[0054] 在一个实施方案中,本发明提供了用于标记细胞中的基因或基因产物的方法,其包括:(a)将HDR载体引入细胞,其中所述HDR载体包含至少一个对应于所述基因的外显子序列的多核苷酸序列。(b)选择其中来自HDR载体的插入盒已整合到基因组中的细胞。

[0055] 在一个实施方案中,本发明提供用于敲低或敲除细胞中的基因的方法,其包括:(a)将HDR载体引入细胞,其中所述HDR载体包含至少一个对应于基因的启动子或外显子序列的多核苷酸序列,(b)选择其中来自HDR载体的插入盒已整合到基因组中的细胞。

[0056] 在一个实施方案中,本发明提供了用于标记细胞中的多种基因或基因产物的方法,其包括:(a)将多种HDR载体引入细胞,其中每种HDR载体包含至少一个对应于基因的外显子的多核苷酸序列和独特的插入盒,(b)选择其中来自HDR载体的多种插入盒已整合到基因组中的细胞。

[0057] 在另一个实施方案中,本发明提供了产生细胞文库的方法,其包括:(a)将多个HDR载体引入多个细胞中,其中所述HDR载体各自包含对应于基因的启动子或外显子序列的多核苷酸序列;(b)选择其中HDR载体已整合到基因组中的细胞。在一个实施方案中,细胞文库

是标记的细胞文库。在一个实施方案中，文库是敲低细胞文库。在一个实施方案中，文库是敲除细胞文库。

[0058] 在一个实施方案中，本发明包括通过本发明的方法产生的细胞。在一个实施方案中，细胞是哺乳动物细胞，并且其可以是人细胞。在某些实施方案中，本发明包括含有本发明HDR载体的整合插入盒的细胞。本发明还提供了本发明细胞的文库、阵列和集合。

[0059] 在另一个实施方案中，本发明提供了通过本发明的方法产生的动物。在某些实施方案中，动物是哺乳动物，并且在一个实施方案中，动物是小鼠。

[0060] 在一个实施方案中，HDR载体的多核苷酸序列对应于基因的一部分。在一个实施方案中，该基因是报道基因。在另一个实施方案中，该基因与疾病或病症相关。

[0061] 在本发明的某些实施方案中，HDR载体的整合插入盒在重组后在框内位于基因的5'或3'，用于标记靶基因或蛋白质。在本发明的某些实施方案中，HDR载体的整合插入盒在重组后位于基因的转录区中，用于敲低或敲除靶基因或蛋白质。

[0062] 在一个实施方案中，本发明的细胞包含被破坏的基因。在一些实施方案中，基因被HDR载体的整合插入盒破坏。在某些实施方案中，插入盒还包含启动子，并且在一个实施方案中，启动子是诱导型启动子。在一个实施方案中，插入盒整合到细胞的基因组中。

[0063] 在一个实施方案中，细胞包含在重组后具有整合插入盒的基因的单个等位基因。在另一个实施方案中，细胞包含在重组后具有整合插入盒的基因的两个等位基因。本发明还提供了本发明的细胞集合，其中每个细胞包含不同的破坏的基因。

[0064] 定义

[0065] 除非另外定义，否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同含义。尽管与本文描述的那些类似或等同的任何方法和材料可用于本发明的实践或测试，但描述了优选的方法和材料。

[0066] 如本文所用，以下术语中的每一个具有与本部分中相关的含义。

[0067] 未用数量词限定的名词是指一个/种或更多个/种指示对象。举例来说，“要素”表示一个要素或多于一个要素。

[0068] 当提及例如量、时间持续时间等可测量值时，本文所用的“约”意味着包括相对于指示值的±20%、±10%、±5%、±1%或±0.1的变化，因为这样的变化适合于执行所公开的方法。

[0069] 等位基因：“等位基因”是基因的单拷贝，可以是基因的一对或一系列拷贝或变体形式中的一种。

[0070] 等位基因的：术语“等位基因的”意味着存在特定基因的多于一个拷贝或形式。因此，如果基因具有多于一个等位基因，则称该基因是等位基因的。

[0071] 如本文所使用的，“阵列”是可以以系统方式或以某种预定方式排列的对象的整体集合。“阵列”可以是例如容器的整体集合或孔的整体集合。也就是说，“阵列”可以是对象的集合，其与另一部分形成为单元。“阵列”也可以是表面，物质的整体集合以系统方式在其上排列。

[0072] “细胞的阵列”是以系统方式排列的细胞的集合。“细胞的阵列”或“细胞阵列”表示例如包含在容器或孔的整体集合内的其中基因被破坏的细胞类型或细胞的非随机排列。

[0073] 本发明的“细胞”可以是，但不限于，宿主细胞、靶细胞、健康细胞、突变细胞、具有

疾病或病症特征的细胞(“患病细胞”)、经转化细胞或经修饰细胞。本说明书中的“细胞”也可以表示这样的细胞的培养物。经修饰细胞可以是在其基因组内包含整合的“构建体”或整合的“外源区段”的细胞。这样的细胞可以被认为是“敲除”。经修饰细胞可以包含其表达受生物因子或这样的因子的组调节的多核苷酸。在这方面,经修饰细胞可以是包含可调节基因的细胞。

[0074] “克隆”是来自单个祖细胞的具有相同基因组的许多细胞。因此,通过来自一个原始细胞的有丝分裂产生的一组遗传上相同的细胞是“克隆”。根据本发明,克隆代表至少一个培养的、优选非冷冻的细胞,或多个这样的细胞,每个追踪其谱系至一个细胞。

[0075] 术语“构建体”表示人工组装的多核苷酸分子,例如克隆载体或质粒,其可以以线性或环状形式存在。通常来说,构建体包含例如基因、基因片段或特别感兴趣的多核苷酸序列的元件,每个与构建体中的其他元件并置,所述其他元件例如细胞选择标记、报道标记、适当的控制序列、启动子、终止序列、剪接受体位点、剪接供体位点和限制性内切核酸酶识别序列。构建体可以是例如“HDR供体载体”或“HDR载体”。构建体或其一部分可以整合到细胞的基因组中或整合到体外制备的细胞基因组制备物中。“破坏”意指阻碍内源基因产物的表达。在一个实施方案中,如果等位基因核苷酸序列的任何部分含有构建体,则基因的等位基因被“破坏”。因此,天然存在于细胞基因组中的核苷酸序列可以通过在该序列的5'末端和3'末端之间整合另一核苷酸序列而“破坏”。破坏细胞基因组中的基因的核苷酸序列的侧翼可以是这样的区域:在不存在该序列时,所述区域一起编码多肽。通过构建体破坏基因例如可导致细胞中基因产物不表达或表达部分或完全非功能性基因产物或改变的基因产物。

[0076] 如果前一序列的5'末端位于后一序列的3'末端之后,则构建体中的该多核苷酸序列被认为在构建体中第二多核苷酸序列的下游或3'。

[0077] 如果核苷酸序列不天然地作为细胞基因组的一部分,或者其被有意插入到细胞的基因组中,则核苷酸序列对细胞是“外源的”。可以通过人为干预或自动化手段将核苷酸序列有意地插入到细胞基因组中。

[0078] 外源核苷酸序列(例如构建体的序列或其部分)可以称为“外源区段”。外源区段可以包含存在于完整构建体中的功能元件,例如抗生素抗性基因。

[0079] “基因”不仅包含基因的外显子和内含子,还包含其他非编码和调节序列,例如增强子、启动子和转录终止序列(例如多腺苷酸化序列)。如本说明书中所用,基因不包含通过人为干预或通过自动化插入其中的任何构建体。基因本质上可以是等位基因。

[0080] 细胞的“基因组”包括细胞染色体中的总DNA内容(content),包括细胞的其他细胞器(例如线粒体,或者植物细胞的叶绿体)中的DNA内容。

[0081] 细胞的“基因组序列”是指细胞的基因组DNA片段的核苷酸序列。

[0082] 合适的宿主细胞可以是非哺乳动物真核细胞,例如酵母,或优选原核细胞,例如细菌。例如,宿主细胞可以是大肠杆菌菌株。

[0083] 术语“同源重组”是指基于构建体中的核酸序列与基因组或DNA制备物中的靶序列(例如靶等位基因)的序列同源性进行的DNA重组过程。因此,存在于构建体中的核酸序列与位于细胞基因组内的靶序列是相同的或高度同源的,即其具有大于60%,优选大于70%,非常优选大于80%,最优选大于90%的列同一性。在一个具体实施方案中,同源重组载体与位于细胞基因组内的靶序列具有95%至98%的序列同一性。

[0084] 词语“整合”意味着与另一部分形成单元。因此,将“整合”特征应用于元件(例如孔或容器)的集合是指以某种预定方式排列的相关元件的有目的的累积。例如,“整合”多个元件可以是指阵列的一些但不一定是所有元件。“整合”也可用于描述本发明阵列的孔或容器内的内容物。

[0085] “分离的”是指与另一种物质分离以获得纯的或处于游离状态。因此,“分离的多核苷酸”是已经与其他核酸分离的多核苷酸,例如与细胞基因组或与基因组DNA制备物或与其他细胞组合物分离。

[0086] “敲低”意指造成一种或更多种靶基因或等位基因的表达降低。敲低可以通过多种“敲低试剂”或“敲低分子”中的任何一种来完成,并且这些术语可互换使用。“敲低试剂”包括例如反义RNA、核酶和dsRNA。“敲低细胞”是指包含敲低试剂的细胞,“敲低动物”是指包含敲低试剂的动物。类似地,“敲低植物”是指包含敲低试剂的植物。

[0087] “敲除”意指通过遗传操作从基因组中破坏特定单个基因或基因的等位基因。因此,“单等位基因敲除细胞”是指其中基因的单个等位基因被破坏从而不表达其基因产物的细胞。类似地,转基因“敲除小鼠”或其他动物是包含含有破坏的基因或等位基因的细胞的动物。

[0088] 在本说明书中,“文库”表示两种或更多种成分的整体集合。成分意指文库的“必不可少的部分”。文库的成分可以是细胞或核酸。例如,除了细胞文库外,文库可以包含构建体、多核苷酸或RNA分子的集合。文库可包含选择的药物或化合物的集合。文库可以包含物理上存在于一个容器中的“合并”成分的整体集合。或者,文库可以是由本发明方法产生的成分的整体集合,其彼此分开存储。

[0089] “标记序列”是指细胞选择标记序列或报道标记序列。选择标记序列编码选择标记,并且可以是宿主细胞选择标记或靶细胞选择标记。报道标记序列编码报道标记。

[0090] 术语“天然存在”意味着如此限定的对象可以在自然界中找到并且没有通过人为干预进行修饰的事实。因此,如果核苷酸序列存在于自然界中并且未通过人为干预进行修饰,则该核苷酸序列是“天然存在的”。如果多核苷酸是天然存在的,则多核苷酸的核苷酸序列也是“天然存在的”。同样,如果细胞的基因组是“天然存在的”,则基因组的核苷酸序列是“天然存在的”。

[0091] “核酸”是指DNA和RNA分子。因此,载体、质粒、构建体、多核苷酸、mRNA或cDNA都是核酸的实例。

[0092] 可以通过执行将多核苷酸与其他核酸(例如细胞基因组)物理分离的步骤来“获得”多核苷酸。或者,可以通过进行PCR反应从核酸模板“获得”多核苷酸以产生多核苷酸的特定拷贝。此外,可以通过使用核苷酸序列信息(例如数据库中可获得的信息)设计和化学合成多核苷酸来“获得”多核苷酸。

[0093] 术语“可操作地连接”是指遗传元件以允许其以其预期方式发挥作用的关系并置。这样的元件包括例如启动子、调节序列、目的多核苷酸和终止序列,其在“可操作地连接”时如预期的那样发挥作用。“可操作地连接”的元件也彼此“在框内”。

[0094] 复制起点:指启动复制的DNA序列。

[0095] 多核苷酸文库:多核苷酸文库是至少两个多核苷酸的整体集合。

[0096] 术语“随机插入”是指核酸整合到基因组或DNA制备物的未指定区域中的过程。

[0097] “可调节基因”是其转录被修饰或其所得mRNA转录物被降解的基因或多核苷酸序列,以使得转录物不被转录以产生由基因或多核苷酸序列编码的完整蛋白质。可调节基因可以是其完整的mRNA不被宿主细胞酶翻译的基因。通常来说,可调节基因是允许其在特定时间或在特定条件下表达的基因。例如,可调节基因是由诱导型启动子驱动的基因。

[0098] “插入盒”是包含功能元件的构建体,所述功能元件促进插入构建体已整合的转化细胞的标记、选择或其两者。这样的元件可包括“标记序列”和“抗生素抗性基因”核苷酸序列。“插入盒”可以设计成整合到基因的任何部分中。在这方面,“插入盒”可以设计成在框内整合在靶基因的下游。或者,“插入盒”可以设计成整合到基因的编码序列中,从而破坏基因。

[0099] 如果前一序列的3'末端位于后一序列的5'末端之前,则构建体中的该多核苷酸序列被认为是构建体中第二多核苷酸序列的上游或5'。

[0100] 范围:贯穿本公开内容,本发明的多个方面可以以范围形式呈现。应当理解,范围形式的描述仅仅是为了方便和简洁,不应该被解释为对本发明范围的不可改变的限制。因此,应该认为范围的描述已经具体公开了该范围内的所有可能的子范围以及各个数值。例如,应当认为对例如1至6的范围的描述具有特定公开了子范围,例如1至3、1至4、1至5、2至4、2至6、3至6等,以及该范围内的单个数字,例如,1、2、2.7、3、4、5、5.3和6,无论范围的广度如何,这都适用。

#### [0101] 描述

[0102] 本发明涉及可以在细胞中对基因进行标记、调节、突变、“敲除”或其他方式破坏或者“敲入”外源基因表达的材料和方法。本发明涉及HDR供体载体,其是模块化骨架,其可以容易地容纳任何标签和任何选择抗生素。本发明的HDR供体载体与重组臂组合用于形成HDR载体,其靶向标签和选择标记并将其重组到靶细胞的基因组中。因此,本发明还涉及使用HDR载体产生包含一个或更多个标记或失活的基因等位基因的细胞的方法。使用本发明方法产生的细胞在评价在这些细胞中标记、失活或表达的基因的治疗或诊断效用方面是有价值的。

#### [0103] 组成

[0104] 在一个实施方案中,本发明涉及用于本发明方法的载体。在另外的实施方案中,本发明涉及其中一种或更多种基因等位基因已经使用本发明的方法进行标记、灭活的细胞,或者其中一种或更多种基因等位基因使用本发明的方法进行表达的细胞。

#### [0105] HDR供体载体

[0106] 本发明的HDR供体载体提供了包含插入盒的核酸分子。在一个实施方案中,插入盒包含报道标记或用于识别经标记基因的标记。在一个实施方案中,插入盒包含用于纯化经标记基因的标记。

[0107] 在一个实施方案中,插入盒位于至少一个负选择标记盒的下游。在一个实施方案中,插入盒位于至少一个负选择标记盒的上游。在一个实施方案中,插入盒的两侧是两个负选择标记盒。在一个实施方案中,负选择标记盒包含毒素基因或用于表达毒性产物的核苷酸序列。在一个实施方案中,毒素基因是ccdB。在一个实施方案中,包含ccdB基因的负选择盒是CCDB盒。在一个实施方案中,负选择盒的侧翼是切割位点。在一个实施方案中,切割位点是限制性酶切割位点。

[0108] 在一个实施方案中,本发明的HDR供体载体包含两个负选择盒,以使重组臂的克隆加速以形成HDR载体。在一个实施方案中,HDR供体载体以5'至3'的顺序包含第一负选择盒、插入盒和第二负选择盒。在示例性实施方案中,HDR供体载体以5'至3'的顺序包含第一CCDB盒、插入盒和第二CCDB盒。在一个实施方案中,每个负选择盒的侧翼是切割位点。在一个实施方案中,切割位点是限制性酶切割位点。在一个实施方案中,两个负选择盒的侧翼是同一限制性酶切割位点。

[0109] 在一个示例性实施方案中,插入盒以5'至3'的顺序包含报道标记和细胞选择标记。在一个实施方案中,使用P2A融合序列连接报道标记和细胞选择标记。

[0110] 在一个实施方案中,HDR供体载体可包含以下的组合:复制起点、细胞选择标记序列、mRNA稳定序列、外源基因序列、终止序列、内部核糖体进入序列(IRES)、启动子序列、翻译起始序列、重组酶识别位点,以及其他功能要素。

[0111] 报道标记是分子,包括多肽以及多核苷酸,其在细胞中的表达赋予细胞以可检测的性状。在多个实施方案中,报道标记包括但不限于氯霉素-乙酰基转移酶(CAT)、 $\beta$ -半乳糖基转移酶、辣根过氧化物酶、萤光素酶、NanoLuc®、碱性磷酸酶,以及荧光蛋白,其包括但不限于绿色荧光蛋白(例如GFP、TagGFP、T-Sapphire、Azami Green、Emerald、mWasabi、mClover3)、红色荧光蛋白(例如mRFP1、JRed、HcRed1、AsRed2、AQ143、mCherry、mRuby3、mPlum)、黄色荧光蛋白(例如EYFP、mBanana、mCitrine、PhiYFP、TagYFP、Topaz、Venus)、橙色荧光蛋白(例如DsRed、Tomato、Kusabria Orange、mOrange、mTangerine、TagRFP)、青色荧光蛋白(例如CFP、mTFP1、Cerulean、CyPet、AmCyan1)、蓝色荧光蛋白(例如Azurite、mtagBFP2、EBFP、EBFP2、Y66H)、近红外荧光蛋白(例如iRFP670、iRFP682、iRFP702、iRFP713和iRFP720)、红外荧光蛋白(例如IFP1.4)和光激活荧光蛋白(例如Kaede、Eos、IrisFP、PS-CFP)。

[0112] 在一个实施方案中,插入盒可包括标签,例如,以便于鉴定和/或纯化靶蛋白。用于本发明方法的标签包括但不限于几丁质结合蛋白(CBP)、麦芽糖结合蛋白(MBP)、谷胱甘肽-S-转移酶(GST)、聚(His)、生物素/链霉亲和素、V5-标签、Myc-标签、HA-标签、NE-标签、His-标签、Flag标签、Halo-标签、Snap-标签、Fc-标签、Nus-标签、BCCP、硫氧还蛋白、SnooprTag、Spy标签、Isopep标签、SBP-标签、S-标签、Avi标签、钙调蛋白,或适用于标记蛋白质的方法的任意序列组合。可以通过本领域已知的用于纯化多肽的任何方法从靶细胞或靶细胞培养基中纯化靶蛋白和相关标签。这些方法的实例包括盐分级分离、高压液相色谱法、抗体柱色谱法、亲和标签柱色谱法和丙烯酰胺凝胶电泳。这些方法是本领域技术人员公知的。

[0113] 选择标记序列可用于消除其中插入盒未被正确插入的靶细胞或消除其中HDR载体未被正确转染的宿主细胞。选择标记序列可以是正选择标记报道标记或负选择标记。正选择标记允许选择其中表达标记的基因产物的细胞。这通常包括使细胞与适当的试剂接触,所述试剂如果没有表达正选择标记,则杀伤细胞或以其他方式针对细胞进行选择。对于合适的正选择和负选择标记,参见美国专利No.5,464,764中的表I。

[0114] 选择标记的实例还包括但不限于赋予对化合物(例如抗生素)的抗性的蛋白质、赋予在所选基底上生长的能力的蛋白质、产生可检测信号(例如发光)的蛋白质、催化性RNA和反义RNA。已知且可获得的多种此类标记包括例如Zeocin™抗性标记、杀稻瘟素抗性标记、新霉素抗性(neo)标记(Southern&Berg, J. Mol. Appl. Genet. 1:327-41 (1982))、嘌呤霉素

(puro) 抗性标记;潮霉素抗性(hyg)标记(Te Riele等,Nature 348:649-651(1990))、胸昔激酶(tk)、次黄嘌呤磷酸核糖转移酶(hprt),以及允许在MAX(霉酚酸,腺嘌呤和黄嘌呤)培养基上生长的细菌鸟嘌呤/黄嘌呤磷酸核糖转移酶(gpt)。参见Song等,Proc.Nat'l Acad.Sci.U.S.A.84:6820-6824(1987)。其他选择标记包括组氨醇-脱氢酶,氯霉素-乙酰基转移酶(CAT)、二氢叶酸还原酶(DHFR)、 $\beta$ -半乳糖基转移酶和荧光蛋白(例如GFP)。

[0115] 可使用荧光激活细胞分选仪(FACS)检测荧光蛋白的表达。 $\beta$ -半乳糖基转移酶的表达也可以通过FACS分选,与用适当的 $\beta$ -半乳糖苷酶底物进行的活细胞染色相结合。选择标记也可以是细胞-底物黏附分子,例如整联蛋白,其通常不由小鼠胚胎干细胞、小型猪胚胎干细胞,以及小鼠、猪和人造造血干细胞表达。靶细胞选择标记可以是哺乳动物来源的,并且可以是胸昔激酶、氨基糖苷磷酸转移酶、天冬酰胺合成酶、腺苷脱氨酶或金属硫蛋白。细胞选择标记也可以是新霉素磷酸转移酶、潮霉素磷酸转移酶或嘌呤霉素磷酸转移酶,它们分别赋予对G418、潮霉素和嘌呤霉素的抗性。

[0116] 合适的原核和/或细菌选择标记包括提供对抗生素(例如卡那霉素、四环素和氨基青霉素)抗性的蛋白质。在一个实施方案中,细菌选择标记包括能够赋予原核宿主细胞和哺乳动物靶细胞二者以可选择性状的蛋白质。

[0117] 负选择标记允许针对其中表达标记之基因产物的细胞进行选择。在一些实施方案中,适当试剂的存在导致表达“负选择标记”的细胞被杀伤或以其他方式对其进行选择。或者,单独的负选择标记的表达杀伤细胞或针对细胞进行选择。

[0118] 此类负选择标记包括多肽或多核苷酸,其在细胞中表达时允许对细胞进行负选择。合适的负选择标记的例证是(i)用于在任何核苷类似物阿昔洛韦、更昔洛韦和5-氟碘氨基-尿嘧啶(FIAU)存在下的负选择的单纯疱疹病毒胸昔激酶(HSV-TK)标记、(ii)多种毒素蛋白,例如白喉毒素、破伤风毒素、霍乱毒素和百日咳毒素、(iii)用于在6-硫鸟嘌呤存在下进行负选择的次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HPRT)、(iv)细胞凋亡或程序性细胞死亡的激活剂(例如bc12结合蛋白(BAX))、(v)大肠杆菌(E.coli)的胞苷脱氨酶(codA)基因,以及(vi)磷脂酰胆碱磷脂酶D。在一个实施方案中,负选择标记需要宿主基因型修饰(例如ccdB、tolC、thyA、rpsL和胸昔激酶)。

[0119] 根据本发明,通常根据进行选择的细胞的类型来选择选择标记。例如,其可以是真核的(例如酵母)、原核的(例如细菌性的)或病毒性的。在这样的一个实施方案中,选择标记序列与适合于该类细胞的启动子可操作地连接。

[0120] 在另外的实施方案中,使用多于一种的选择标记。在这样的一个实施方案中,可以引入选择标记,其中至少一种选择标记适于靶细胞或宿主细胞中的一种或更多种。在一个实施方案中,宿主细胞选择标记序列和靶细胞选择标记序列在同一开放阅读框内并表达为单一蛋白质。例如,宿主细胞和靶细胞选择标记序列可以编码相同的蛋白质,例如杀稻瘟素S脱氨酶,其赋予原核和真核细胞二者对杀稻瘟素的抗性。宿主细胞和靶细胞标记序列也可以表达为融合蛋白。在另外的实施方案中,宿主细胞和靶细胞选择标记序列表达为单独的蛋白质。

[0121] 在一个实施方案中,在将本发明的插入盒整合到基因组中后,可以由内源启动子驱动由所述盒编码的内源基因、选择标记或报道子的表达。作为替选或补充,标记或报道子的表达可以由包含在HDR载体的插入盒内的启动子驱动,所述启动子与标记或报道序列一

起整合到基因组中。在某些实施方案中，该启动子驱动标记或报道基因的组成型高水平表达，从而有助于选择或鉴定已经历HDR事件的细胞。这种启动子的一个实例是EF-1 $\alpha$ 启动子。在另一些实施方案中，启动子可以是诱导型的并且仅在满足特定条件时驱动表达。

[0122] 可以基于宿主细胞或靶细胞的类型或外源基因的期望表达水平来选择启动子。合适的启动子包括但不限于泛素启动子、单纯疱疹胸苷激酶启动子、人巨细胞病毒(CMV)启动子/增强子、EF-1 $\alpha$ 启动子、SV40启动子、 $\beta$ -肌动蛋白启动子、免疫球蛋白启动子、可调节启动子(例如金属硫蛋白启动子)、腺病毒晚期启动子、以及痘苗病毒7.5K启动子。还可以选择启动子序列以提供组织特异性转录。

[0123] 在某些实施方案中，IRES序列可包含在插入盒中以提高下游基因的翻译。在一个实施方案中，IRES可提高外源基因序列、靶细胞选择标记序列或报道标记序列的翻译。IRES位点可位于插入盒内，并且可以是哺乳动物内部核糖体进入位点，例如免疫球蛋白重链结合蛋白内部核糖体结合位点。在一个实施方案中，IRES序列选自脑心肌炎病毒、脊髓灰质炎病毒、微小RNA病毒、微小相关病毒(picorna-related virus)，以及甲型和丙型肝炎。合适的IRES序列的实例可分别在美国专利No.4,937,190中、欧洲专利申请585983中和PCT申请W09611211、W009601324和W009424301中找到。

[0124] 在一个实施方案中，HDR供体载体包含翻译起始序列或增强子，例如所谓的“Kozak序列”(Kozak, J. Cell Biol. 108:229-41 (1989))或“Shine-Delgarno”序列。这些序列可位于插入盒中，位于IRES位点的3'而位于内源基因序列、报道标记序列或选择标记序列的5'。

[0125] 在一个实施方案中，本发明的插入盒包含一种或更多种mRNA稳定序列。mRNA稳定序列可以改变编码靶基因并与该序列融合的mRNA分子的半衰期，从而维持阅读框。在一个实施方案中，mRNA稳定序列是提高所连接mRNA的半衰期的多核苷酸序列。在一个实施方案中，mRNA稳定序列是降低所连接mRNA的半衰期的多核苷酸序列。在一个实施方案中，mRNA稳定序列是poly(A)尾，其保护mRNA分子免于细胞质中的酶促降解。在一个实施方案中，mRNA稳定序列是MALAT1 3'稳定序列。

[0126] 在一个实施方案中，HDR供体载体包含转录终止序列。典型的转录终止序列包括多腺苷酸化位点(poly A位点)。在一个实施方案中，poly A位点是SV40poly A位点。这些序列可位于插入盒中，位于内源基因序列、报道标记序列或选择标记序列的3'。

[0127] 在一个实施方案中，HDR供体载体包含在位于内源基因序列、报道标记序列或选择标记序列的3'末端的一个或更多个阅读框中的一个或更多个终止/终止密码子，以使得如果这些序列编码多肽，则这些序列的翻译在终止密码子处终止。

[0128] 重组酶识别位点可用于DNA序列的插入、倒位或置换，或用于产生染色体重排，例如倒位、缺失和易位。例如，在插入载体中的两个重组酶识别位点可以处于相同的取向，以允许在与重组酶接触时去除或置换这两个重组酶识别位点之间的序列。两个重组酶识别位点也可以以相反的取向并入，以允许这两个位点之间的序列在与重组酶接触时进行倒位。这种倒位可用于调节插入盒或其一部分的功能。因此，改变构建体的取向可以打开或关闭构建体的作用。例如，两个重组酶识别位点可以位于选择标记序列的侧翼，允许去除选择标记序列或使其失活。合适的重组酶识别位点的实例包括frt位点和lox位点，其可分别通过f1p和cre重组酶识别。

[0129] 在一个实施方案中，HDR供体载体包含能够在合适的宿主细胞中启动DNA合成的复

制起点。优选地，基于宿主细胞的类型选择复制起点。例如，其可以是真核的(例如酵母)或原核的(例如细菌的)，或者可使用合适的病毒复制起点。优选地，复制起点能够在宿主细胞中启动DNA合成，但在靶细胞中不起作用。

[0130] 所有上述功能要素可以在任何组合中使用以产生合适的HDR供体载体。

[0131] HDR载体

[0132] 在一个实施方案中，本发明的HDR载体包含插入盒，所述插入盒的一端或两端侧接有内源核酸序列。内源核酸序列允许HDR载体序列与所期望的DNA序列重组。重组事件导致插入盒的核酸序列整合到靶DNA中。在一个实施方案中，靶DNA是靶细胞的基因组DNA，因此插入盒被整合到靶细胞的基因组中。

[0133] 在一个实施方案中，包含插入盒的核酸序列位于与靶细胞的基因组区域具有同源性的至少一种核苷酸序列或者重组臂的下游。在一个实施方案中，插入盒位于至少一个重组臂的上游。在一个实施方案中，插入盒的两侧是两个重组臂。

[0134] 在一个示例性实施方案中，HDR载体以5'至3'的顺序包含第一重组臂、插入盒和第二重组臂，并且插入盒包含报道标记序列和细胞选择标记序列。在一个实施方案中，报道标记序列和细胞选择标记序列与编码P2A融合序列的核酸序列连接。因此，在一个实施方案中，HDR载体以5'至3'的顺序包含第一重组臂、报道标记序列、P2A融合序列、细胞选择标记序列和第二重组臂。这样的实施方案可用于例如在内源基因的C端插入标记或标签。

[0135] 在另外的示例性实施方案中，HDR载体以5'至3'的顺序包含第一重组臂、插入盒和第二重组臂，并且插入盒包含细胞选择标记序列和报道标记序列。在一个实施方案中，细胞选择标记序列和报道标记序列与编码P2A融合序列的核酸序列连接。因此，在一个实施方案中，HDR载体以5'至3'的顺序包含第一重组臂、细胞选择标记序列、P2A融合序列、报道标记序列和第二重组臂。这样的实施方案可用于例如在内源基因的N端插入标记或标签。

[0136] 在另外的示例性实施方案中，HDR载体以5'至3'的顺序包含第一重组臂、插入盒和第二重组臂，并且插入盒包含报道标记序列、启动子序列和细胞选择标记序列。在一个实施方案中，报道标记序列和细胞选择标记序列与编码启动子序列的核酸序列连接。因此，在一个实施方案中，HDR载体以5'至3'的顺序包含第一重组臂、报道标记序列、启动子序列、细胞选择标记序列和第二重组臂。

[0137] 在多个实施方案中，如以上所详述的，HDR载体的插入盒可包括但不限于外源基因序列、报道标记序列、细胞选择标记序列、mRNA稳定序列、终止序列、IRES、启动子序列、翻译起始序列、重组酶识别位点和其他功能元件的任意组合。

[0138] 在多个实施方案中，重组臂可以是至少约25bp、至少25至50bp、至少50至100bp、至少100至300bp、至少300至1000bp、至少1000至2000bp、至少2000至5000bp、至少5000至7000bp或多于7000bp。在多个实施方案中，重组臂包含与靶核酸序列具有多于60%、多于70%、多于80%、多于90%、多于95%、多于98%，或100%序列同一性的核酸序列。在一个实施方案中，靶核酸序列是基因组DNA序列。本发明不限于重组臂靶向的基因组位置。即，重组臂可以与外显子序列、内含子序列、基因间序列、3' UTR序列、5' UTR序列、启动子序列、染色体序列或染色体外序列具有多于60%、多于70%、多于80%、多于90%、多于95%、多于98%、或100%的序列同一性。

[0139] 在一个实施方案中，HDR载体具有位于插入盒侧翼的两个重组臂。在一个实施方案

中,两个重组臂可以靶向彼此接近的序列。在整合插入盒之前,两个重组臂靶向的基因组序列可在靶细胞的基因组中非连续或连续。如本文所用,如果一个核苷酸序列的3'末端与另一个核苷酸序列的5'末端共价连接而没有任何插入的核苷酸残基,则两个核苷酸序列是连续的。在一个实施方案中,两个重组臂靶向相距小于10kb、小于9kb、小于8kb、小于7kb、小于6kb、小于5kb、小于4kb、小于3kb、小于2kb或小于1kb的基因组序列。在一个实施方案中,两个重组臂靶向相距多于10kb、多于9kb、多于8kb、多于7kb、多于6kb、多于5kb、多于4kb、多于3kb、多于2kb或多于1kb的基因组序列。

[0140] 可以以多种方式制备HDR载体。例如,第一和第二重组臂可以从针对人或其他物种的可用基因组数据库或基因表达数据库获得。使用本领域已知的方法,这两个序列可以用设计成并入限制性酶切割位点的引物扩增,用限制酶消化,并随后将其连接到经消化的HDR供体载体中。在一个实施方案中,使用Gibson组装方法(Gibson等,Nat Methods,2009,6:343-345)将两个重组臂与经消化的HDR供体载体连接以产生HDR载体。在一个实施方案中,使用Gibson组装方法产生的HDR载体是线性的,以使得该线性化产物包含:(1)第一重组臂;(2)具有报道标记、选择标记或其组合的插入盒;以及(3)第二重组臂。该线性化产物是本发明的优选的HDR载体。

[0141] 细胞

[0142] 本发明的HDR载体可用于标记、敲入或敲除任何类型靶细胞的基因组中的基因。可以通过本领域已知的任何方法将HDR载体引入到靶细胞中,所述方法包括但不限于电穿孔、病毒感染、逆转录转座(retrotransposition)、显微注射、脂质体转染、脂质体介导的转染、磷酸钙沉淀、DEAE-右旋糖酐、和弹道或“基因枪”穿透。

[0143] 可以提供特殊化学物质或构建体以提高重组水平并因此促进插入盒的整合。在一个实施方案中,这样的构建体可以在HDR载体的一个或更多个重组臂的靶序列处或附近提供切口(双链DNA分子的一条链的切割)或切割(双链DNA分子的两条链的切割)。因此,在一个实施方案中,本发明的HDR载体可以与编码TALENS、锌指内切核酸酶、CRISPR的一种或更多种构建体或者在该HDR载体的一个或更多个重组臂的靶序列附近产生切口或切割的其他方法组合提供。

[0144] 在一个实施方案中,靶细胞是原核细胞。在一个实施方案中,靶细胞是真核细胞。在一个实施方案中,靶细胞是哺乳动物细胞,例如鼠或人细胞。靶细胞可以是体细胞或生殖细胞。生殖细胞可以是干细胞,例如胚胎干细胞(ES细胞),包括鼠胚胎干细胞。靶细胞可以是非分裂细胞,例如神经元,或者作为替代,靶细胞可以在某些培养条件下体外增殖。

[0145] 靶细胞可选自市售的哺乳动物细胞系。靶细胞可以是分离自对象的原代细胞。靶细胞可以是任何类型的患病细胞,包括具有可使用生物学或生物化学测定确定的异常表型的细胞。例如,患病细胞可以是肿瘤细胞。

[0146] 在一个实施方案中,HDR载体的插入序列中的报道序列在靶细胞基因组DNA中至少一个基因的至少一个等位基因的框内下游整合,用于标记该基因。具有通过插入构建体标记的单个基因的细胞已经被单独标记。具有通过插入多个构建体标记的多个基因的细胞已经被多重标记。在一个实施方案中,本发明涉及经单一或多重标记细胞的文库。

[0147] 文库

[0148] 基于本文中提供的信息,可以产生许多多核苷酸和细胞文库。这些文库包括但不

限于以下的文库：(i) HDR供体载体、(ii) HDR载体、(iii) 具有单一经标记基因的细胞、(iv) 通过将插入盒整合到基因中而产生的单基因敲除细胞、(v) 通过将用于表达外源基因的插入盒整合到细胞基因组中而产生的单基因敲入细胞、(vi) 具有多个经标记基因的细胞、(vii) 通过将多个插入盒整合到多个基因中而产生的多基因敲除细胞，以及(viii) 通过将用于表达多种外源基因的插入盒整合到细胞的基因组中而产生的多基因敲入细胞。

[0149] 在一个实施方案中，可使用基因组数据库或基因表达数据库内的信息构建HDR载体文库。例如，可以确定基因组数据库或基因表达数据库中的每个基因，然后可以制备针对该基因的HDR载体。在一个实施方案中，HDR载体文库可包含用于标记基因的载体。在一个实施方案中，HDR载体文库可包含用于产生敲入细胞的载体。在一个实施方案中，HDR载体文库可包含用于产生敲除细胞的载体。如此制备的HDR载体构成载体文库，代表基因组数据库或基因表达数据库中的整个基因的集合或其任何子集。靶细胞选择标记序列、报道标记序列或其组合可包含在每个HDR载体中。

[0150] 本发明的细胞文库可包含例如至少2种或更多种细胞。细胞文库可包含5至10种细胞、10至20种细胞、20至30种细胞、30至40种细胞、40至50种细胞、50至100种细胞、100至500种细胞、500至1,000种细胞、1,000至5,000种细胞、5,000至10,000种细胞、10,000至20,000种细胞、20,000至50,000种细胞或多于50,000种细胞。

[0151] 例如，细胞文库可代表以下中的任一种情况：1至25个被标记、表达、修饰或破坏的基因、至少约25种不同的基因、或至少约50种不同的基因、优选至少约100种不同的基因、更优选1,000种不同的基因、更优选5,000种不同的基因、最优选10,000种不同的基因，例如至少20,000种不同的基因。例如，细胞文库可代表至少约40,000，或至少约75,000种不同的基因。这些被代表的基因中的每一种对应于细胞文库中的一种细胞，并且该基因的至少一个等位基因通过插入盒在相应的细胞中被标记、表达、修饰或破坏，优先地，该基因的多于一个等位基因被标记、表达、修饰或破坏。在一个实施方案中，细胞文库由单个亲本细胞的克隆组成。细胞文库中的被标记、表达、修饰或破坏的基因的数量可多至亲本细胞基因组中存在的最大基因数。

[0152] 细胞文库基本上可以是保持在单独的液体储备中或作为混合的单一液体储备培养的细胞的集合。因此，细胞文库可以是细胞培养物的集合，每种细胞培养物代表包含通过本发明方法标记、修饰或破坏的等位基因的细胞。在这方面，包含被本发明的构建体标记、修饰或破坏的等位基因的细胞文库也可以包含在培养皿中的生长培养基上分离的细胞集落。例如，培养皿上的每个集落可以包含被标记、表达、修饰或破坏的基因，其可以是在储存在同一培养皿上的其他集落中被标记、表达、修饰或破坏的相同基因。

[0153] 在一个实施方案中，细胞文库可以包含一种液体储备溶液中的细胞培养物的混合物。细胞培养物可以包含与文库中另一种细胞培养物相同或不同的被标记、表达、修饰或破坏的基因。因此，在一个实施方案中，细胞文库中给定细胞中的被标记、表达、修饰或破坏的基因不同于文库的任何其他细胞中的被标记、表达、修饰或破坏的基因。该实施方案的细胞文库可以是另一个细胞文库的一部分或其子集。

[0154] 在一个实施方案中，细胞文库可包含细胞，每种细胞包含相同的被标记、修饰或破坏的基因。在这种情况下，插入盒的功能（例如，全长蛋白质的表达与蛋白质片段的表达）对于每种细胞可以是相同的或不同的。

[0155] 在一个实施方案中,可以通过将HDR载体的文库引入到多种靶细胞中来制备本发明的细胞文库。包含靶细胞选择标记序列的这些HDR载体可以插入到靶细胞的基因组中,标记、表达或破坏基因组中的不同的基因。可以针对由靶细胞选择标记序列赋予的可选择性状选择经修饰的细胞。

[0156] 在一个实施方案中,小鼠ES细胞(例如早期传代小鼠ES细胞)用于构建本发明的细胞文库。由此制成的细胞文库成为用于小鼠基因组的综合研究的遗传工具。由于ES细胞可以注射回胚泡和并入正常发育和最终并入种系中,因此文库中的突变ES细胞有效地代表突变转基因小鼠品系的集合。可以迅速确定和表征突变的转基因小鼠品系的所得表型和由此被破坏的基因的功能。所得的转基因小鼠也可与其他小鼠品系一起繁殖并回交以产生同类或重组的同类动物,其允许评价不同遗传背景中的靶基因。可用于实践本发明的上述方面(包括ES细胞文库)的多种品系和遗传操作的代表性列表可见于Genetic Variants and Strains of the Laboratory Mouse,第3版,第1和2卷,Oxford University Press,New York,1996中。

[0157] 类似的方法可用于构建几乎任何非人转基因或敲除动物。这些非人转基因或敲除动物包括猪、大鼠、兔、牛、山羊、非人灵长类(例如黑猩猩)和其他动物物种,特别是哺乳动物物种。

[0158] 如上所述,本发明中描述的任何HDR载体可用于制备细胞、细胞文库,或转基因或敲除动物。

#### [0159] 方法

[0160] 本发明提供了用于在细胞中标记蛋白质或产生融合蛋白的方法。通常来说,该方法包括以下步骤:(a)将本发明的HDR载体插入到细胞中,其中所述HDR载体包含插入盒,所述插入盒包含报道标记、靶细胞选择标记序列,或其二者;以及(B)将细胞置于选择由HDR载体的插入盒编码的细胞选择标记的条件下或监测报道标记序列的表达。

[0161] 在一个实施方案中,HDR载体的重组臂与同源基因组区域杂交,并且HDR载体的重组臂与基因组之间的重组允许将HDR载体的插入盒整合到靶细胞的基因组中。在一个优选的实施方案中,将包含报道标记、靶细胞选择标记序列或其二者的插入盒以一定方式整合在开放阅读框的下游使得阅读框不被破坏(即框内整合),允许产生经标记或融合蛋白。

[0162] 在一个实施方案中,该方法还包括将DNA核酸酶插入到靶细胞中。在一个实施方案中,核酸酶特异性用于在HDR载体的一个或更多个重组臂的同源基因组序列处或附近产生切口或切割。核酸酶可以是但不限于兆核酸酶(meganuclease)、Cas-9核酸酶、TALEN、ZFN,或可用于基因组编辑方法的其他核酸酶。

[0163] 在一个实施方案中,通过本发明的方法修饰基因的一个等位基因。在另外的实施方案中,通过本发明的方法修饰细胞中同一基因的所有等位基因。

[0164] 本发明提供了通过将插入盒引入到内源基因中,以使得基因的表达被破坏,从而降低细胞、植物或动物中内源基因表达的方法。因此,本发明提供了高效且精确的方法来产生不能够产生转录物或不能够表达基因产物的“敲除”细胞。由此制备的靶细胞可用于评价灭活基因的治疗或诊断用途,且可用于筛选影响基因之表达和功能的化合物。

[0165] 在一个实施方案中,本发明的方法可用于间接调节其表达受靶基因调节(例如激活或抑制)的基因的表达。靶基因对受调节基因的作用可以是正常的,或其可以是由疾病状

态诱导的异常失衡的结果。

[0166] 本发明还提供了在细胞、植物或动物中表达外源基因或多核苷酸序列(例如转基因)的方法。因此,在一个实施方案中,本发明提供了用于在细胞中表达基因的敲入方法。外源序列可以在插入盒上并整合到细胞、植物或动物的基因组中。在一个实施方案中,包含外源基因的插入盒的整合位点是基因间的。外源基因在细胞中的转录可通过外源启动子或内源启动子调节。因此,在一个实施方案中,包含外源基因的插入盒还包含启动子序列。在某些实施方案中,通过任何可用的方法(包括上述那些)来条件化地调节驱动外源基因表达的启动子。在本发明的一些实施方案中,外源基因可以与标签、报道标记、选择标记或如前所述的功能要素的任何组合可操作地连接。

[0167] 可以将多种外源基因引入到细胞、植物或动物中,并根据本发明的方法进行调节。例如,可以将与疾病或病症相关的基因引入到细胞中。在某些情况下,本发明提供了替换缺失的、突变的或在其他情况下功能失调的基因的方法。在另一些实施方案中,可以将治疗性多核苷酸引入到细胞中。除了提供缺失的基因或蛋白质之外,治疗性分子还可以通过多种其他方式中的任一种发挥作用,包括例如抑制另一种分子的功能,例如,显性负效的(dominant-negative)。

[0168] 使用细胞的方法

[0169] 可以制备HDR载体并用于激活、灭活或标记细胞中基因的任一种或组合。在一个实施方案中,基因或基因的组合与疾病表型相关。在一个实施方案中,基因或基因组合与已知的患病表型无关。可筛选如此修饰的细胞的患病表型,以鉴定可能参与表型发育的基因。具有报道标记的HDR载体也可用于标记与疾病表型相关的基因或基因组合。

[0170] 当HDR载体包含靶细胞选择标记序列或报道标记序列并插入到靶细胞基因组中的基因中,以使得选择或报道标记序列在多种情况下表达时,则靶细胞可用于药物发现和功能基因组学。可以确定报道响应于多种刺激(例如激素和其他生理信号)的选择标记或报道标记序列的表达的调节的靶细胞。因此,在靶细胞中被破坏的基因参与对刺激的响应。这些刺激可涉及由已知或未知调节剂调节的多种已知或未知途径。还可以确定调节靶细胞对刺激的响应的化学物质。

[0171] 在一个实施方案中,本发明的经修饰细胞可用于筛选调节(例如降低或提高)靶基因表达的药物或化合物。在一个实施方案中,HDR载体还包含报道标记序列。可以将药物或化合物文库施用于其中报道标记序列插入到所表达基因中的靶细胞,以筛选可以调节报道标记序列表达并由此调节基因表达的候选物。

[0172] 在一个实施方案中,其中一个、两个或多个基因被来自HDR载体的插入盒破坏或标记的细胞可用于筛选调节一个经标记基因的表达但不调节另一个的表达的化合物。例如,以确定调节与疾病表型相关但不是特家基因或密切相关基因的经标记基因的表达的化合物。因此,在一个实施方案中,本发明可用于确定药物候选物对所选靶基因的特异性。

[0173] 在一个实施方案中,本发明的经修饰细胞可用于确定能够在靶细胞中诱导沉默基因的表达的化合物。例如,可以将可整合在靶细胞中的来自HDR载体的插入盒整合到靶细胞的基因组中。在这样的一个实施方案中,由整合盒编码的选择标记可以与启动子序列可操作地连接,并由此独立于用于标记靶基因的报道标记而表达。因此,可以通过筛选报道标记来确定能够诱导非活性转录的基因组序列的转录的化合物或药物。

[0174] 制剂和施用

[0175] 可以将本发明的HDR载体分子施用于对象。因此,根据本发明,HDR载体可以配制在合适的制剂中用于体内施用。对象可以是任何动物,例如小鼠或大鼠,或者对象可以是人。HDR载体可以在体内作为药物发挥作用,从某种意义上说,在一些实施方案中,整合盒的插入可以(1)诱导非正常表达的基因的表达或(2)降低由于某些遗传性疾病或异常而过度表达的基因的表达。在这方面,施用有效调节特定基因的表达模式的量的本发明的HDR载体代表治疗应用。

[0176] 可以将多于一种HDR载体分子同时或依次施用于对象或在体外施用于细胞。例如,设计用于基因的不同序列或区域的HDR载体可以合并并作为一种制剂施用。

[0177] 为了有助于本发明的HDR载体作为治疗剂的用途,可通过许多已知技术中的任一种(例如,在施用之前包封在脂质体内)来保护分子(例如线性dsDNA)免于核酸降解。例如,核酸和聚乙二醇的制剂也可以提高核酸在体内的半衰期,任何已知的缓释核酸制剂也能如此。其他方法可用于保护核酸和提高核酸的生物利用度。例如,通过替换核苷酸的磷基团,可以将硫醇基团并入到多核苷酸中,例如并入到RNA或DNA分子中。当如此并入到核酸的“骨架”中时,硫醇可以防止DNA在该位点的切割,并由此提高核酸分子的稳定性。其他修饰包括,例如,核酸分子骨架可以被修饰以包含:具有正常3' -5' 键联的硫代磷酸酯、手性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基烷基磷酸三酯、甲基和其他烷基磷酸酯,包括3' -亚氨基磷酸酯和手性膦酸酯、次膦酸酯、氨基磷酸酯,包括3' -氨基氨基磷酸酯和氨基烷基氨基磷酸酯、硫代氨基磷酸酯、硫代烷基磷酸酯、硫代烷基磷酸三酯和硼烷磷酸酯;这些的2' -5' 连接的类似物;以及具有相反极性的那些,其中相邻的核苷单元对3' -5' 至5' -3' 或2' -5' 至5' -2' 地连接。还包含多种盐、混合盐和游离酸形式。另一种修饰本发明核酸的方法包括产生“锁核酸”(locked nucleic acid,LNA)。

[0178] 化合物的用途

[0179] 在一个实施方案中,使用经遗传修饰的细胞在筛选中鉴定的化合物或分子可用于治疗与被本发明的HDR载体靶向的基因的活性相关的疾病。因此,本发明涉及治疗疾病的方法,其包括向有此需要的对象施用通过筛选本发明化合物的作用的方法鉴定的化合物。在一个实施方案中,在筛选中化合物被鉴定为对靶基因表达或活性中的一种或更多种具有作用。在一个实施方案中,作用是靶基因的表达或活性提高。在一个实施方案中,作用是靶基因的表达或活性降低。在一个实施方案中,提高或降低基因的表达或活性有益于疾病的治疗。

[0180] 在一个实施方案中,疾病与低水平的血红素加氧酶I (HO-1) 表达相关。在一个实施方案中,在用本发明的HDR载体标记的细胞的筛选中双硫仑、硫链丝菌肽、三甲双酮、金诺芬、硫柳汞、盐酸卤泛群和伏立诺他被鉴定提高HO-1的表达水平。因此,在一个实施方案中,可将双硫仑、硫链丝菌肽、三甲双酮、金诺芬、硫柳汞、盐酸卤泛群和伏立诺他中的一种施用于对象,对于该对象,HO-1表达水平提高将有益于疾病的治疗。

[0181] 药物组合物

[0182] 本发明包括药物组合物,其包含被本发明的HDR载体靶向的基因的一种或更多种调节剂。本文中所述药物组合物的制剂可通过药理学领域中已知或此后开发的任何方法制备。一般来说,这样的制备方法包括将活性成分与载体或者一种或更多种其他辅助成分联

合的步骤，并随后（如果有必要或期望的话）将产品成型或包装成期望的单剂量或多剂量单位。

[0183] 尽管本文中提供的药物组合物的描述主要涉及适合伦理施用于人的药物组合物，但本领域技术人员将理解的是，这样的组合物通常适合施用于各种各样的动物。对适合施用于人的药物组合物进行修饰以使组合物适合施用于多种动物是很好理解的，并且普通技术的兽医药理学家可仅通过普通的（如果有的话）实验来设计和进行这样的修饰。考虑本发明的药物组合物所施用的对象包括但不限于人和其他灵长类，哺乳动物包括商业上相关的哺乳动物，例如非人灵长类、牛、猪、马、绵羊、猫和狗。

[0184] 可用于本发明方法的药物组合物可以适合于眼科、经口、直肠、阴道、肠胃外、表面（topical）、肺、鼻内、含服、瘤内、硬膜外、脑内、脑室内或其他施用途径的制剂制备、包装或销售。其他考虑的制剂包括投射的纳米颗粒、脂质体制剂、含有活性成分的重新密封的红细胞和基于免疫学的制剂。

[0185] 本发明的药物组合物可作为单一单位剂量或作为多个单一单位剂量大量制备、包装或销售。本文中使用的“单位剂量”是药物组合物的离散量，其包含活性成分的预定量。活性成分的量通常等于待施用于对象的活性成分的剂量或这样的剂量的方便的分数，例如这样的剂量的一半或三分之一。

[0186] 本发明药物组合物中活性成分、可药用载体和任何另外的成分的相对量将根据所治疗对象的身份、体型大小和病情并且还根据待施用该组合物的途径而变化。举例来说，组合物可包含0.1%至100%（w/w）的活性成分。

[0187] 除活性成分之外，本发明的药物组合物还可包含一种或更多种另外的药物活性剂。

[0188] 可使用常规技术来制备本发明药物组合物的控释或缓释制剂。

[0189] 适合于肠胃外施用的药物组合物的制剂包含与可药用载体（例如无菌水或无菌等张盐水）组合的活性成分。这样的制剂可以适于推注施用或连续施用的形式制备、包装或销售。可以以单位剂量形式（例如安瓿或含有防腐剂的多剂量容器）制备、包装或销售可注射制剂。用于肠胃外施用的制剂包括但不限于混悬剂、溶液剂、油性或水性载剂中的乳剂、糊剂和可植入的缓释或可生物降解的制剂。这样的制剂还可包含一种或更多种另外的成分，其包括但不限于助悬剂、稳定剂或分散剂。在用于肠胃外施用的制剂的一个实施方案中，活性成分以干燥（即粉末或颗粒）形式提供，用于在肠胃外施用重构组合物之前用合适的载剂（例如无菌无热原水）重建。

[0190] 药物组合物可以以无菌可注射水性或油性混悬剂或溶液剂的形式制备、包装或销售。该混悬剂或溶液剂可根据已知技术配制，并且除活性成分之外，还可包含另外的成分，例如本文中所述的分散剂、润湿剂或助悬剂。例如，这样的无菌可注射制剂可使用无毒的肠胃外可接受的稀释剂或溶剂（例如水或例如1,3-丁二醇）制备。其他可接受的稀释剂和溶剂包括但不限于林格溶液（Ringer's solution）、等张氯化钠溶液和固定油（例如合成的甘油单酯或甘油二酯）。其他可用的可肠胃外施用的制剂包括包含以微晶形式的、在脂质体制剂中的或作为可生物降解聚合物体系的组分的活性成分的那些。用于缓释或植入的组合物可包含可药用聚合或疏水材料，例如乳剂、离子交换树脂、微溶聚合物或微溶盐。

[0191] 实验实施例

[0192] 通过参考以下实验实施例进一步详细描述本发明。提供这些实施例仅用于举例说明的目的，并且除非另有指明，否则不旨在为限制性的。因此，本发明决不应解释为限于以下实施例，而是应解释为涵盖由于本文中提供的教导而变得明显的任何和所有变化。

[0193] 无需进一步描述，相信本领域普通技术人员可使用前述说明和以下举例说明性实施例制备并利用本发明化合物并实施所要求保护的方法。因此，以下工作实施例特别指出了本发明的一些优选实施方案，并且不应解释为以任何方式限制本公开内容的其余部分。

[0194] 实施例1：用于快速产生用于细胞系开发的同源重组载体的高效方法

[0195] 已开发新的一组质粒和简化方法，该方法允许在单步骤中构建用于HDR修复的供体载体。新载体允许插入多个标签用于下游应用，例如荧光标记(mClover3和mRuby3)、发光(NanoLuc®)和蛋白质纯化标签(3x-flag, Halo-tag)。此外，这些载体允许真核生物抗生素(嘌呤霉素、Zeocin™、杀稻瘟素等)的框内表达，用于迅速选择经修饰细胞。

[0196] 开发骨架质粒以促进用于基因敲入或敲除产生细胞系和生物体的同源重组载体的产生。

[0197] 该系统包含多个特征，以加速载体产生和纯克隆细胞选择的过程。这包括在单步骤中以100%的准确度克隆左和右重组臂。由于并入有毒蛋白CcdB的双表达盒，这是可能的。必须用重组臂替换两个CcdB盒，以获得活的大肠杆菌(E.coli)菌落(图1至图3)。

[0198] 可快速修饰骨架以包括用于蛋白质标记的任何蛋白质标记物。例如，具有荧光蛋白(mClover3, mRuby3)、发光(NanoLuc®)和纯化标签(HaloTag和3X-Flag)的载体(图4)均已产生。

[0199] 可快速修饰骨架以包括针对真核细胞的毒性抗生素的任何抗性基因。例如，具有针对嘌呤霉素、杀稻瘟素和Zeocin的抗性基因的载体均已产生(图4)。

[0200] 该系统允许通过仅在通过同源重组修饰的细胞中表达抗性基因，在少于10天内选择经修饰细胞的纯克隆。

[0201] 该系统允许使用者通过仅设计一组同源重组臂并用每种目的标签克隆不同载体中的那些标签来测试针对相同靶基因的多个标签(荧光、发光、用于蛋白质纯化的标签等)。

[0202] 该系统允许使用者通过使用相同的同源重组载体产生纯合的经修饰细胞克隆，所述同源重组载体具有针对真核细胞的抗生素的两种不同的抗性基因。

[0203] 现在描述这些实验中采用的材料和方法。

[0204] 材料和方法

[0205] 将选定的骨架HDR供体载体(500ng)用KpnI和BamHI消化，终体积为20μL。将合成的左和右重组臂在TE缓冲液中进行稀释，终浓度为25ng/μL。通过将2μL经消化载体反应物、1.5μL的每种重组臂和5μL的NeBuilder主混合物(New England Biolabs)混合进行Gibson组装反应。将反应混合物在50℃下孵育1小时。将4μL Gibson组装反应物转化到对CcdB基因敏感的化学感受态大肠杆菌菌株(例如DH5α、JM109、STLB3等)中。使细胞在35℃下培养过夜。提取质粒并通过测序验证HDR重组质粒(图5)。

[0206] 现在描述实验结果。

[0207] 具有蛋白质组蛋白3的红色荧光蛋白标签的细胞系的产生。

[0208] CRISPR表达载体设计成表达用于在人细胞中切割组蛋白3基因(基因符号:H3F3B)

的最后外显子的sgRNA。

[0209] 在切割侧旁边选择左和右重组臂(~440-600bp长),并将其作为双链合成DNA片段产生,以产生载体以在切割的DNA中诱导同源重组并促进在组蛋白3蛋白的C末端处框内插入红色荧光蛋白(mRuby3)。

[0210] 将CRISPR载体和组蛋白3-mRuby3HDR载体共转染到HEK293T细胞中,并且48小时之后,评价细胞的细胞核中的mRuby3表达。转染之后72小时收获细胞,并用含有真核细胞的毒性抗生素(Zeocin<sup>TM</sup>)的培养基给所述细胞接种。在转染之后7天,验证含有红色荧光核的阳性集落的形成(图6)。

[0211] 具有蛋白质组蛋白3的红色荧光蛋白标签的细胞系的产生。

[0212] CRISPR表达载体设计成表达用于在人细胞中切割β微管蛋白基因(基因符号:TUBB)的最后外显子的sgRNA。

[0213] 在切割侧旁边选择左和右重组臂(~440-600bp长),并将其作为双链合成DNA片段产生,以产生载体以在切割的DNA中诱导同源重组并促进在β微管蛋白蛋白质的C末端处框内插入绿色荧光蛋白(mClover3)。

[0214] 将CRISPR载体和TUBB-Clover3HDR载体共转染到HEK293T细胞中,并且48小时之后,评价细胞的细胞中mClover3表达。转染之后72小时收获细胞,并用含有真核细胞的毒性抗生素(嘌呤霉素)的培养基给所述细胞接种。在转染之后7天,验证含有绿色荧光微管的阳性集落的形成(图7)。

[0215] 双标记细胞系的产生。

[0216] 先前在组蛋白3蛋白质中修饰成具有红色荧光蛋白标签(mRuby3)的HEK293T细胞进一步修饰成在β微管蛋白基因中包含另外的绿色荧光标签。为此,用靶向β微管蛋白基因(基因符号:TUBB)的最后一个外显子的CRISPR质粒和HDR载体共转染细胞,以在切割的DNA中诱导同源重组并促进在β微管蛋白蛋白质的C末端处框内插入绿色荧光蛋白(mClover3)。48小时之后,在细胞中评价mClover3表达。转染之后72小时收获细胞,并用含有真核细胞的毒性抗生素(嘌呤霉素)的培养基给所述细胞接种。在转染之后7天,验证含有绿色荧光微管和核中的红色荧光组蛋白3的阳性集落的形成(图8)。

[0217] 三重标记的细胞系的产生。

[0218] 先前在组蛋白3蛋白质中修饰成具有红色荧光蛋白标签(mRuby3)和在β微管蛋白蛋白质中修饰成具有绿色荧光蛋白(mClover3)标签的HEK293T细胞进一步修饰成在线粒体蛋白线粒体ATP合酶β亚基中包含另外的蓝色荧光标签。为此,用靶向线粒体ATP合酶β亚基(基因符号:ATP5B)的最后一个外显子的CRISPR质粒和HDR载体共转染细胞,以在切割的DNA中诱导同源重组并促进在ATP合酶β亚基的C末端处框内插入蓝色荧光蛋白(mTagBFP2)。48小时之后,评价细胞的mTagBFP2表达。转染之后72小时收获细胞,并用含有真核细胞的毒性抗生素(杀稻瘟素)的培养基给所述细胞接种。在转染之后7天,验证含有绿色荧光微管、核中的红色荧光组蛋白3、以及蓝色荧光线粒体的阳性集落的形成(图9)

[0219] 具有用 NanoLuc® 萤光素酶标记的血红素加氧酶1的细胞系的产生。

[0220] 血红素加氧酶1(HO-1)是抗氧化剂应答途径的基因靶标。通过用 NanoLuc® 萤光素酶标记蛋白质产生经修饰的细胞系以快速地对HO-1表达的变化进行量化。为此,用具

有靶向最后一个密码子附近的H0-1基因的最后一个外显子的sgRNA序列的CRISPR载体和含有重组臂(~630bp)的HDR载体共转染HEK293T细胞,以通过同源重组诱导DNA修复。HDR载体允许 NanoLuc® 萤光素酶的框内标记,并且还含有在外源启动子控制下的嘌呤霉素抗性基因(例如图3)。在选择对嘌呤霉素具有抗性的纯克隆之后,验证了在用已知的H0-1表达激活剂(合成的三萜类化合物2-氰基-3,12-二氧杂齐墩果烷-1,9(11)-二烯-28-酸(CDDO))处理细胞之后,新细胞系允许快速检测H0-1表达的微小变化的能力(图10)。然后使用H0-1 NanoLuc® 细胞系筛选氧化剂和抗氧化剂化合物的库,并鉴定H0-1蛋白表达的强效激活剂(图11)。另外,H0-1 NanoLuc® 细胞系用于筛选1200种经FDA批准的化合物的库,并鉴定7种能够提高H0-1的蛋白质表达的化合物(图12)。

[0221] 实施例2:Fast-HDR供体质粒骨架的序列。

[0222] 具有接头肽的Fast-HDR供体质粒骨架:

[0223] 具有下划线的:KpnI (SEQ ID NO:1的第1至6位核苷酸和SEQ ID NO:1的第682至687位核苷酸),EcoRI (SEQ ID NO:1的第700至705位核苷酸和SEQ ID NO:1的第781至786位核苷酸),XbaI (SEQ ID NO:1的第853至858位核苷酸和SEQ ID NO:1的第934至939位核苷酸),BamHI (SEQ ID NO:1的第1116至1121位核苷酸和SEQ ID NO:1的第1797至1802位核苷酸);斜体:CCDB基因 (SEQ ID NO:1的第336至641位核苷酸);小写体:接头 (SEQ ID NO:1的第689至699位核苷酸);NNNN:插入位点1(例如,用于插入编码标签、标记、外源基因、荧光蛋白、可选择标记、抗生素抗性基因和/或纯化标签的序列) (SEQ ID NO:1的第706至780位核苷酸);小写斜体:P2A肽序列 (SEQ ID NO:1的第797至852位核苷酸);NNNN:插入位点2(例如,用于插入编码标签、标记、外源基因、荧光蛋白、可选择标记、抗生素抗性基因和/或纯化标签的序列) (SEQ ID NO:1的第859至933位核苷酸);粗体:mRNA稳定化序列 (SEQ ID NO:1的第942至1115位核苷酸);斜体:CCDB基因 (SEQ ID NO:1的第1451至1756位核苷酸)

[0224] (SEQ ID NO:1)

GGTACCGGCTTACTAAAAGCCAGATAACAGTATGCGTATTGCGCGCTGATT  
TTGCGGTATAAGAATATATACTGATATGTATACCCGAAGTATGTCAAAAAGA  
GGTGTGCTATGAAGCAGCGTATTACAGTGACAGTTGACAGCGACAGCTATCA  
GTTGCTCAAGGCATATATGATGTCAATATCTCCGGTCTGGTAAGCACAAACCAT  
GCAGAATGAAGCCCGTCGTCTGCGTGCCGAACGCTGGAAAGCGGAAAATCA  
GGAAGGGATGGCTGAGGTCGCCGGTTATTGAAATGAACGGCTTTTGCT  
[0225] GACGAGAACAGGGACTGGTGAAATGCAGTTAACGTTTACACCTATAAAAGAGA  
GAGCCGTTATCGTCTGTTGTGGATGTACAGAGTGATATTATTGACACGCCGGGC  
GACGGATGGTGATCCCCCTGGCCAGTGCACGTCTGCTGTCAGATAAGTCTCCCG  
TGAACCTTACCCGGTGGTGCATATCGGGGATGAAAGCTGGCGCATGATGACCACC  
GATATGCCAGTGTGCCGGTCTCCGGTATCGGGGAAGAAGTGGCTGATCTCAGCC  
ACCGCGAAAATGACATCAAAACGCCATTAAACCTGATGTTCTGGGGAAATATAAATG  
TCAGGCTCCGTTATACACAGCCAGTCTGCAGGTGACGGTACCCaaggcggtggaG

[0227] 具有内部启动子的Fast-HDR供体质粒骨架:

[0228] 具有下划线的:KpnI (SEQ ID NO:2的第1至6位核苷酸和SEQ ID NO:2的第682至687位核苷酸),EcoRI (SEQ ID NO:2的第700至705位核苷酸和SEQ ID NO:2的第756至761位核苷酸),AgeI (SEQ ID NO:2的第1303至1308位核苷酸),XbaI (SEQ ID NO:2的第1359至1364位核苷酸),BamHI (SEQ ID NO:2的第1541至1546位核苷酸和SEQ ID NO:2的第2222至2227位核苷酸);斜体:CCDB基因 (SEQ ID NO:2的第336至641位核苷酸);小写体:接头 (SEQ ID NO:2的第689至699位核苷酸);NNNNN:插入位点1(例如,用于插入编码标签、标记、外源基因、荧光蛋白、可选择标记、抗生素抗性基因和/或纯化标签的序列) (SEQ ID NO:2的第706至755位核苷酸);具有下划线的粗体:EF1 $\alpha$ 启动子序列 (SEQ ID NO:2的第811至1293位核苷酸);NNNN:插入位点2(例如,用于插入编码标签、标记、外源基因、荧光蛋白、可选择标记、抗生素抗性基因和/或纯化标签的序列) (SEQ ID NO:2的第1309至1358位核苷酸);粗体:mRNA稳定化序列 (SEQ ID NO:2的第1368至1540位核苷酸);斜体:CCDB基因 (SEQ ID NO:2的第1876至2181位核苷酸)

[0229] (SEQ ID NO:2)

[0230]

GGTACCGGCTACTAAAAGCCAGATAACAGTATGCGTATTGCGCGCTGATT  
TTGCGGTATAAGAATATATACTGATATGTATACCGAAGTATGTCAAAAGA  
GGTGTGCTATGAAGCAGCGTATTACAGTGACAGTTGACAGCGACAGCTATCA  
GTTGCTCAAGGCATATATGATGTCAATATCTCCGGTCTGGTAAGCACAACCAT  
GCAGAACATGAAGCCCCTCGTCTCGTGCGAACGCTGGAAAGCGGAAATCA  
GGAAGGGATGGCTGAGGTCGCCCGTTATTGAAATGAACGGCTCTTGCT  
GACGAGAACAGGGACTGGTAAATGCAGTTAACGGTTACACCTATAAAAGAGA  
GAGCCGTTATCGCTGTTGTGGATGTACAGAGTGATATTATTGACACGCCGGGC  
GACGGATGGTATCCCCCTGGCCAGTCACGTCTGCTGTCAGATAAAGTCTCCCG  
TGAACCTTACCGGTGGTGCATATCGGGATGAAAGCTGGCGCATGATGACCACC  
GATATGCCAGTGTGCCGGTCTCCGTTATCGGGAAAGAAGTGGCTGATCTCAGCC  
ACCGCGAAAATGACATCAAAACGCCATTAACCTGATGTTCTGGGAATATAATG  
TCAGGCTCCGTTATACACAGCCAGTCTGCAGGTCGACGGTACCCAaggcggtggaG  
AATTCCNN  
NNNNNGAATTCAATAAAAGATCTTATTTCATTAGATCTGTGTGTTGGTTTT  
TTGTGTTCGCTACAATATTTCCTGAACGGAAAGAATAAAATAAAACTTGT  
CCTGTAAAGAAAACCCAGGTAAAGGAAAGTGGCAGTCCAGACTGCCGG  
AAGTTCCCTGGAGGCTAAGGCCTCACCCCCGTCGCTTGATAGGACCTGCT  
GAGCCACATGACTAAGGCACGATCGCCTCCGCACGTGTAAAGGTGCTGG  
GTTCCAAGATGGCTGCCCGCCGAGGGCCGACTTAAGTATGTCACTT  
CCGCACCAGCGAGAAAGGCGGACCCCTCAGCCAATGAGGCCATAGGGC  
GGGGCTAGGCCATGATGGCTTCAAACACTACCCAAATAGGGCGTCCGAAC

TAAAGCGCCTACAAAGTAACGTCACGTCGAGTTGCAGAGCGCCGGCAGG  
CGGGGCAGAGGTGCCAAGCCAATGCGATGGCTGGGCGGGGTCGGAC  
GCTCTATAAGTTGTCGATAGGCGGCACTCCGCCCTAGATTCTAAGGAC  
CGCCGCCACCACCGTNNNTCTAGAtaaATTCGTCAGTAGGGTTGCTAAAGGTTT  
TTCTTTCTGAGAAAACAACCTTTGTTCTCAGGTTTGCTTTGGC  
CTTICCTAGCTTtAAAAAAAAGCAAAAGACGCTGGTGGCTGGCAC  
TCCTGGTTCCAGGACGGGTTCAAGTCCCTGCGGTGTCTTGCTTGGAT  
CCGGCTTACTAAAAGCCAGATAACAGTATGCGTATTGCGCGCTGATTTGCG  
GGTATAAGAATATATACTGATATGTATACCCGAAGTATGTCAAAAAGAGGTG  
TGCTATGAAGCAGCGTATTACAGTGACAGTGACAGCGACAGCTATCAGTTG  
CTCAAGGCATATATGATGTCAATATCTCCGGTCTGGTAAGCACAACCATGCA  
GAATGAAGCCCCTCGTCTGCGTGCCAACGCTGGAAAGCGGAAATCAGGA  
AGGGATGGCTGAGGTCGCCCGTTATTGAAATGAACGGCTTTGCTGAC  
GAGAACAGGGACTGGTGAAATGCAAGTTAAGGTTACACCTATAAAAGAGAG  
CCGTTATCGTCGTTGTTGGAATGTACAGAGTGATATTGACACGCCGGCGAC  
GGATGGTGATCCCCCTGGCCAGTGCACGTCGCTGTCAGATAAGTCCTCCGTGA  
ACTTTACCCGGTGGTGCATATCGGGATGAAAGCTGGCCATGATGACCACCGAT  
ATGGCCAGTGTGCCGGTCTCCGTTATCGGGGAAGAAGTGGCTGATCTCAGGCCACC  
GCGAAAATGACATCAAAAACGCCATTAAACCTGATGTTCTGGGAATATAAATGTCA  
GGCTCCGTTACACAGCCAGTCTGCAGGTCGACGGATCC

[0232] 本文中引用的每个专利、专利申请和出版物的公开内容均在此通过引用整体并入本文。虽然已经参考一些具体实施方案公开了本发明，但明显的是，在不脱离本发明的真实精神和范围的情况下，本领域的其他技术人员可以设计出本发明的另一些实施方案和变体。所附权利要求书旨在被解释为包括所有这样的实施方案和等同变体。



[0042]	aaaggaaaaa ctttcctga gaaaacaacc ttttgggt tcaggtttg cttttggcc	1020
[0043]	tttcccttagc tttaaaaaaa aaaaagcaaa agacgctgg ggctggact cctggttcc	1080
[0044]	aggacggggt tcaagtccct gcgggtgtt tgctggatc cggttacta aaagccagat	1140
[0045]	aacagtatgc gtatttgcgc gctgatttt gcggataaag aatataact gatatgtata	1200
[0046]	cccgaagttat gtcaaaaaaga ggtgtgctat gaagcagcg attacagtga cagttgacag	1260
[0047]	cgcacgctat cagttgctca aggcatatat gatgtcaata tctccggct ggtaagcaca	1320
[0048]	accatgcaga atgaagcccc tcgtctgcgt gccgaacgct ggaaagcgaa aatcaggaa	1380
[0049]	gggatggctg aggtcgcccc gtttattgaa atgaacggct ctggatgtga cgagaacagg	1440
[0050]	gactggtgaa atgcagttt aggtttacac ctataaaaaga gagagccgtt atcgtctgtt	1500
[0051]	tgtggatgtc cagagtata ttattgacac gcccggcgaa cggatgggtga tccccctggc	1560
[0052]	cagtgcacgt ctgcgttcag ataaagtctc ccgtgaactt taccgggtgg tgcatatcg	1620
[0053]	ggatgaaagc tggcgcatga tgaccaccga tatggccagt gtgcggct ccgttatcg	1680
[0054]	ggaagaagtg gctgatctca gccaccgcga aaatgacatc aaaaacgcca ttaacctgat	1740
[0055]	gttctgggaa atataaatgt caggctccgt tatacacagc cagttgcag gtcgacggat	1800
[0056]	cc	1802
[0057]	<210> 2	
[0058]	<211> 2227	
[0059]	<212> DNA	
[0060]	<213> 人工序列	
[0061]	<220>	
[0062]	<223> 具有内部启动子的Fast-HDR供体质粒骨架	
[0063]	<220>	
[0064]	<221> misc_feature	
[0065]	<222> (706) .. (755)	
[0066]	<223> n是a、c、g或t	
[0067]	<220>	
[0068]	<221> misc_feature	
[0069]	<222> (1309) .. (1358)	
[0070]	<223> n是a、c、g或t	
[0071]	<400> 2	
[0072]	ggtaccggct tactaaaagc cagataacag tatgcgtatt tgccgcgtga ttttgcgg 60	
[0073]	ataagaatat atactgatat gtataccga agtatgtcaa aaagagggtgt gctatgaagc 120	
[0074]	agcgttattac agtgcacagtt gacagcgaca gctatcgtt gctcaaggca tatatgtat 180	
[0075]	caatatctcc ggtctggtaa gcacaaccat gcagaatgaa gcccgtcg tcgtgccg 240	
[0076]	acgctggaaa gcggaaaatc aggaagggat ggctgaggc gcccggttt tggaaatgaa 300	
[0077]	cggctttt gctgacgaga acaggactg gtgaaatgca gtttaagggt tacacctata 360	
[0078]	aaagagagag ccgttatcgt ctgtttgtgg atgtacagag tggatattt gacacgccc 420	
[0079]	ggcgacggat ggtgatcccc ctggccagtg cacgtctgt gtcagataaa gtctcccg 480	
[0080]	aactttaccc ggtggtgcat atcggggatg aaagctggcg catgtgacc accgatatgg 540	
[0081]	ccagtgtgcc ggtctccgtt atcggggaaag aagtggctga tctcggccac cgccaaaaatg 600	
[0082]	acatcaaaaa cggcattaaac ctgatgttct gggaaatata aatgtcaggc tccgttatac 660	
[0083]	acagccagtc tgcaggtcga cggtaaaaaa ggcgggtggag aattcnnnnnnnnnnnnnnn 720	

[0084]	nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnngaatt caataaaaga tctttatTTT 780	
[0085]	cattagatct gtgtgttgtt ttTTgtgt tcgctacaat atttcctga acggaagaat 840	
[0086]	aaataaaaact tgtcctgtaa agaaaaccca ggtaaaggaa agtgcagtc cagactgcc 900	
[0087]	ggaagttcct ggaggctaag gcctcacccc cgtcgcttga taggacctgc tgagccacat 960	
[0088]	gactaaggca cgatgcctc cgcacgtgta aaggtgctgg gttccaagat ggctgccccg 1020	
[0089]	ccgcgaggcc cgacttaagt atgtcacttc cgccaccagcg agaaaggcgg acccTTcagc 1080	
[0090]	caatgaggcc atagggcggg gctaggccat gatgggctt caaactaccc aatagggcgt 1140	
[0091]	ccgaactaaa gcgcctacaa agtaacgtca cgtcgagttg cagagcGCCg gcaggcgggg 1200	
[0092]	cagaggtggc caagccaatg cgatggctgg ggcggggtcg gacgcttat aagttgtcga 1260	
[0093]	taggcggca ctccgccta gattctaagg accgcccaca ccaccgtnn nnnnnnnnnn 1320	
[0094]	nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnntc tagataaatt cgtcagtagg 1380	
[0095]	gttgtaaagg ttttcttt cctgagaaaa caacctttt gtttctcagg ttttgctttt 1440	
[0096]	tggcTTTCC ctagcttta aaaaaaaaaa gcaaaagacg ctggggctg gcactcctgg 1500	
[0097]	tttccaggac ggggttcaag tccctgcgtt gtcttgctt ggatccggct tactaaaagc 1560	
[0098]	cagataacag tatgcgtatt tgcgcgtga ttttgcgtt ataagaatat atactgatat 1620	
[0099]	gtatacccgaa agtatgtcaa aaagaggtgt gctatgaacg agcgtattac agtgcacgat 1680	
[0100]	gacagcgaca gctatcagtt gctcaaggca tatatgatgt caatatctcc ggtctggtaa 1740	
[0101]	gcacaaccat gcagaatgaa gcccgtcgtc tgcgtgccga acgctggaaa gcggaaaatc 1800	
[0102]	aggaagggat ggctgaggc gcccggTTA ttgaaatgaa cggctctttt gctgacgaga 1860	
[0103]	acagggactg gtgaaatgca gtttaaggTT tacacctata aaagagagag ccgttatcgt 1920	
[0104]	ctgtttgtgg atgtacagag tgatattatt gacacgccccg ggcgcacggat ggtgatcccc 1980	
[0105]	ctggccagtG cacgtctgt gtcagataaa gtctccgtg aactttaccc ggtggtgcat 2040	
[0106]	atcggggatg aaagctggcg catgatgacc accgatATGG ccagtgtgcc ggtctccgtt 2100	
[0107]	atcggggaaag aagtggctga tctcagccac cgcgaaaatg acataaaaaa cgccattaaac 2160	
[0108]	ctgatgttct gggaaatata aatgtcaggc tccgttatac acagccagtc tgcaggtcga 2220	
[0109]	cggatcc 2227	

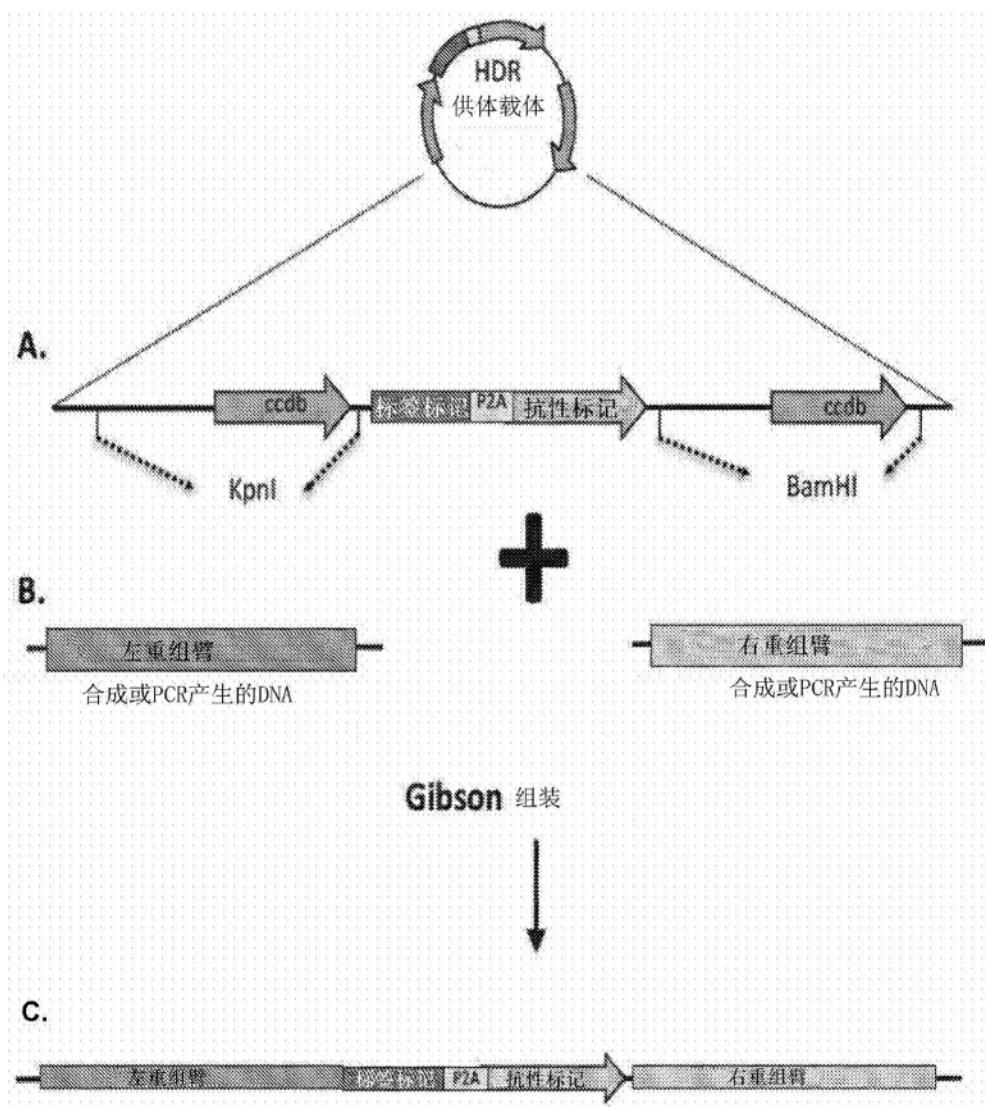


图1A-1C

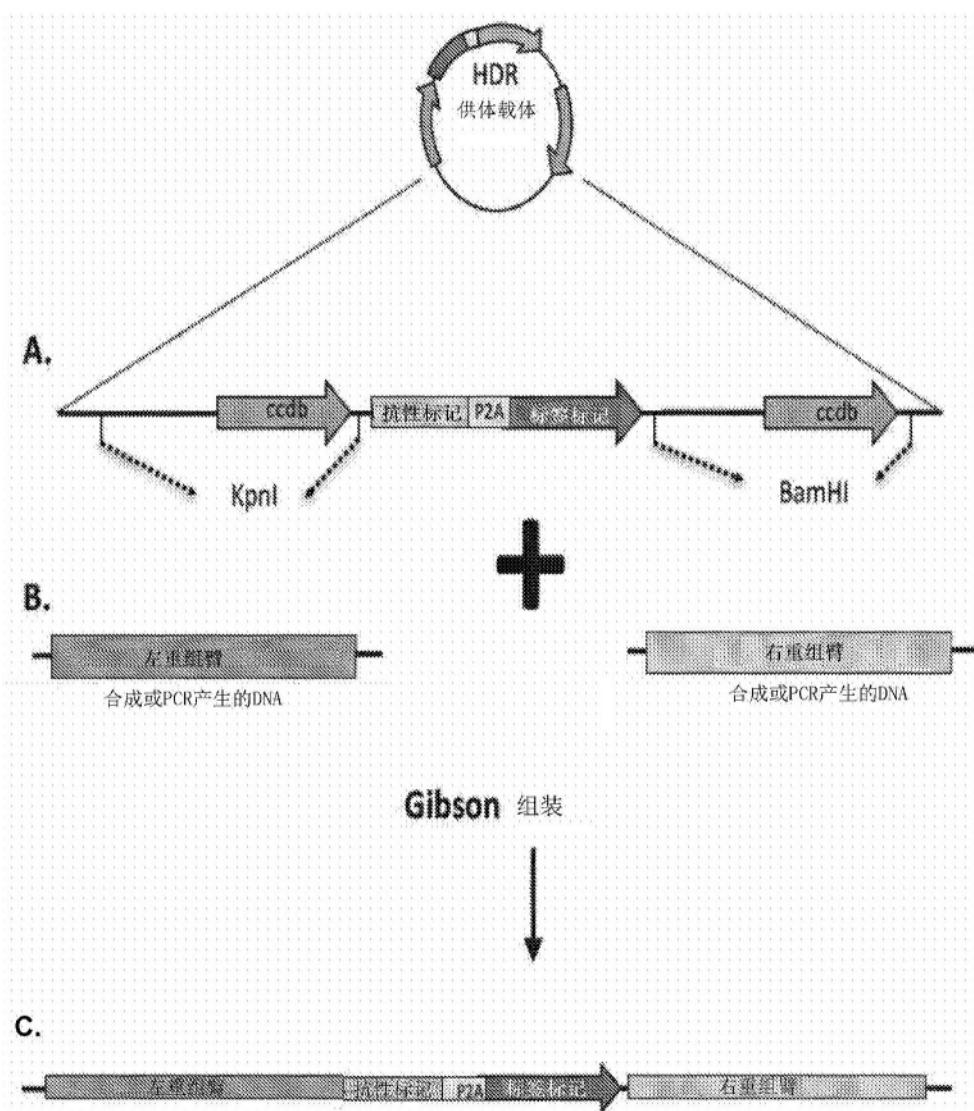


图2A-2C

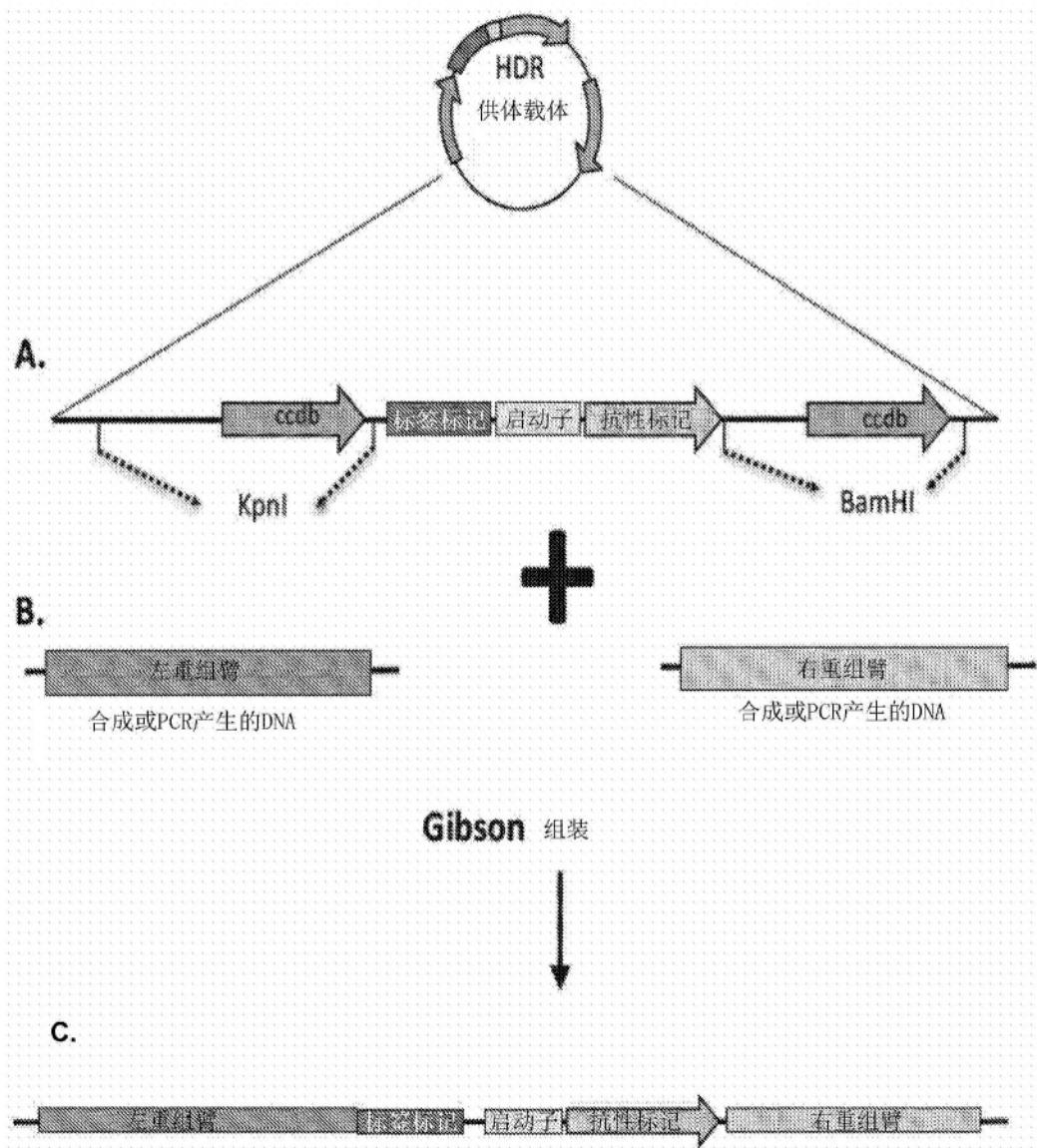


图3A-3C

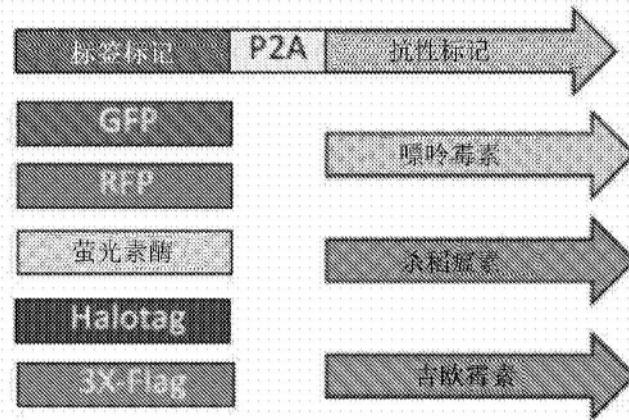
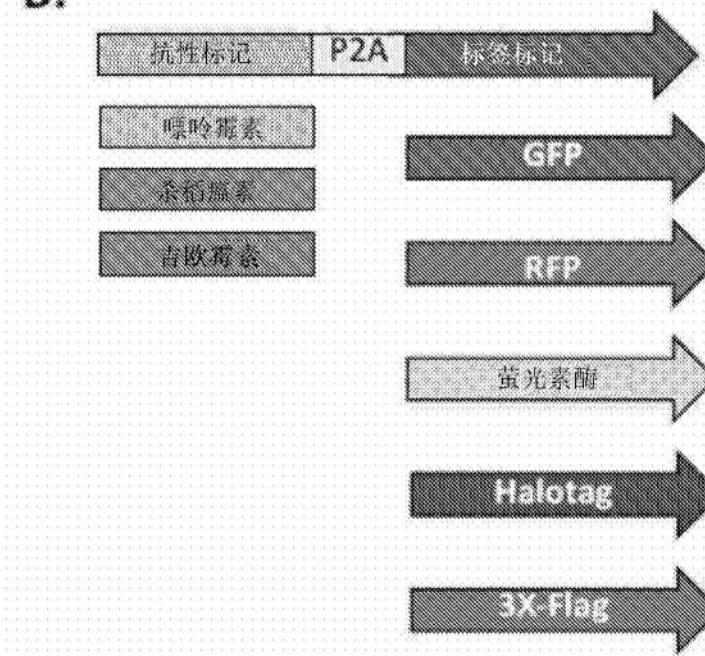
**A.****B.**

图4A-4B

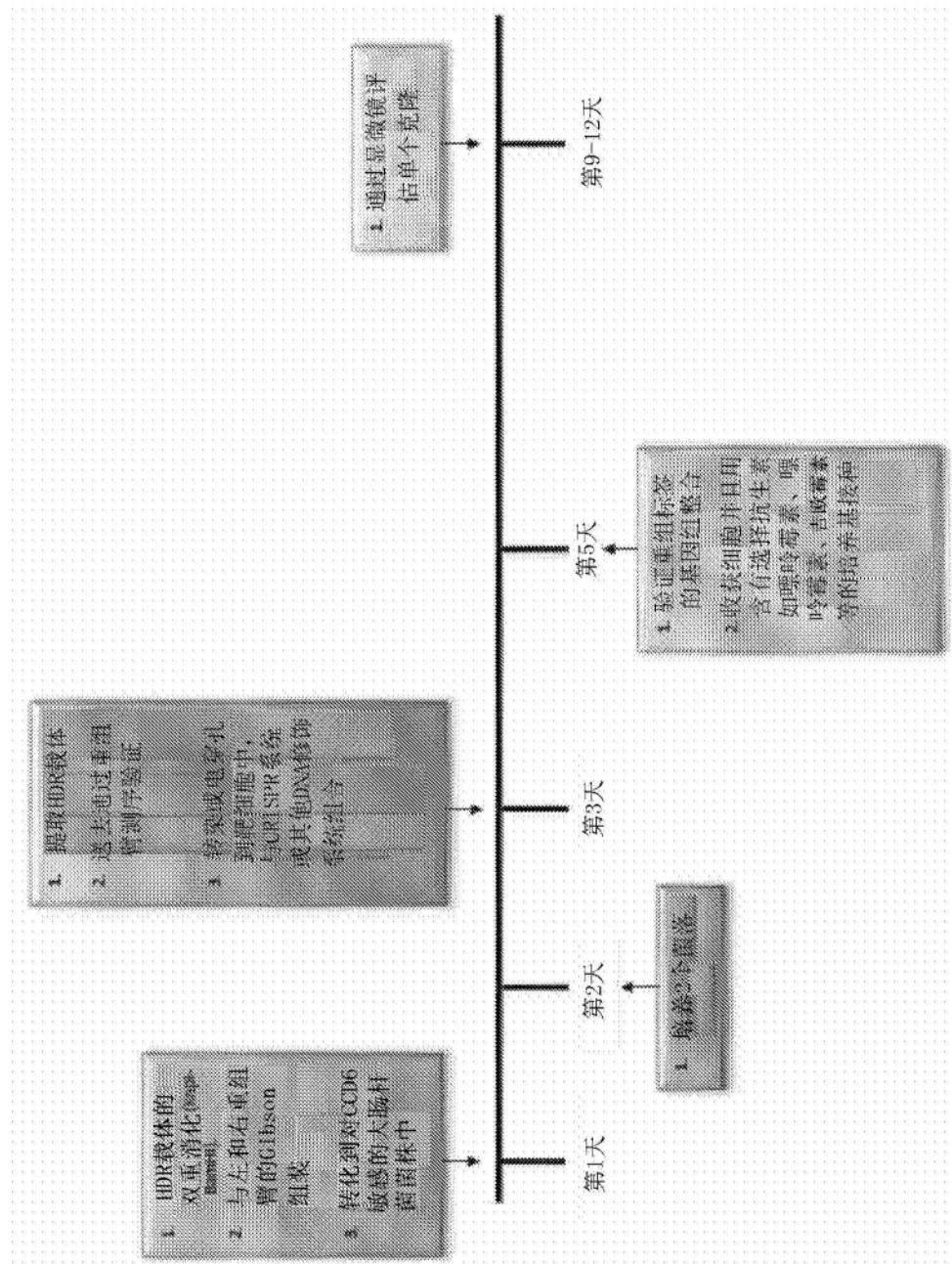
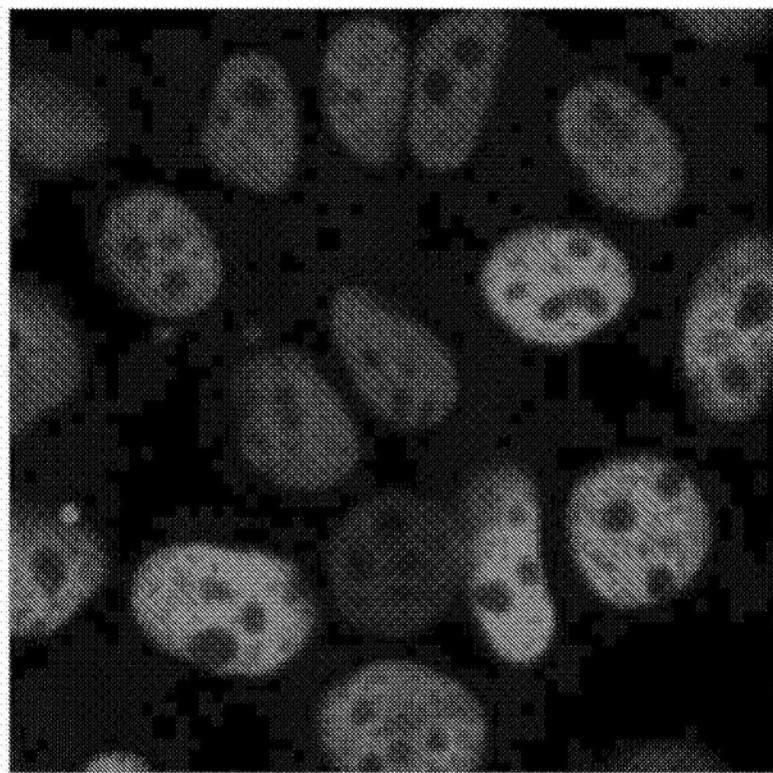


图5



组蛋白3-mRuby3核荧光

图6

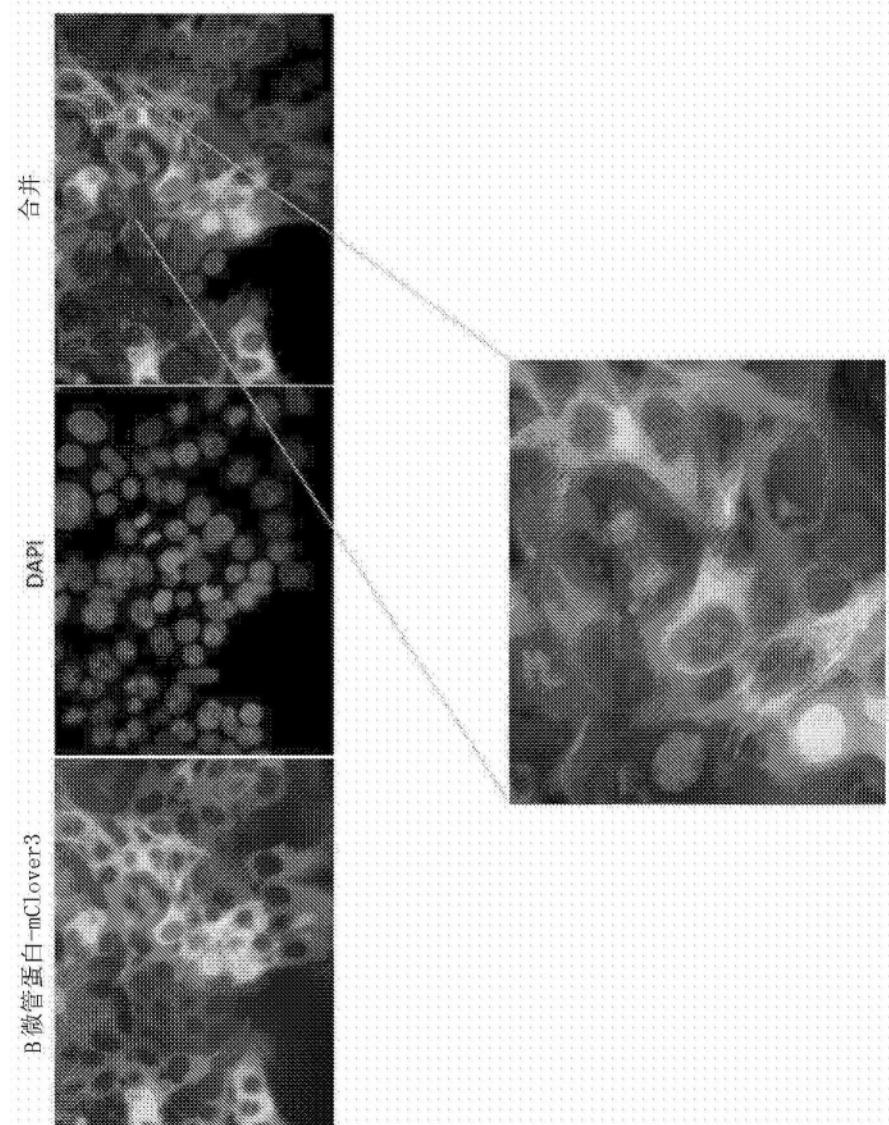


图7

绿色: B-微管蛋白-mClover3

红色: H3-mRuby3

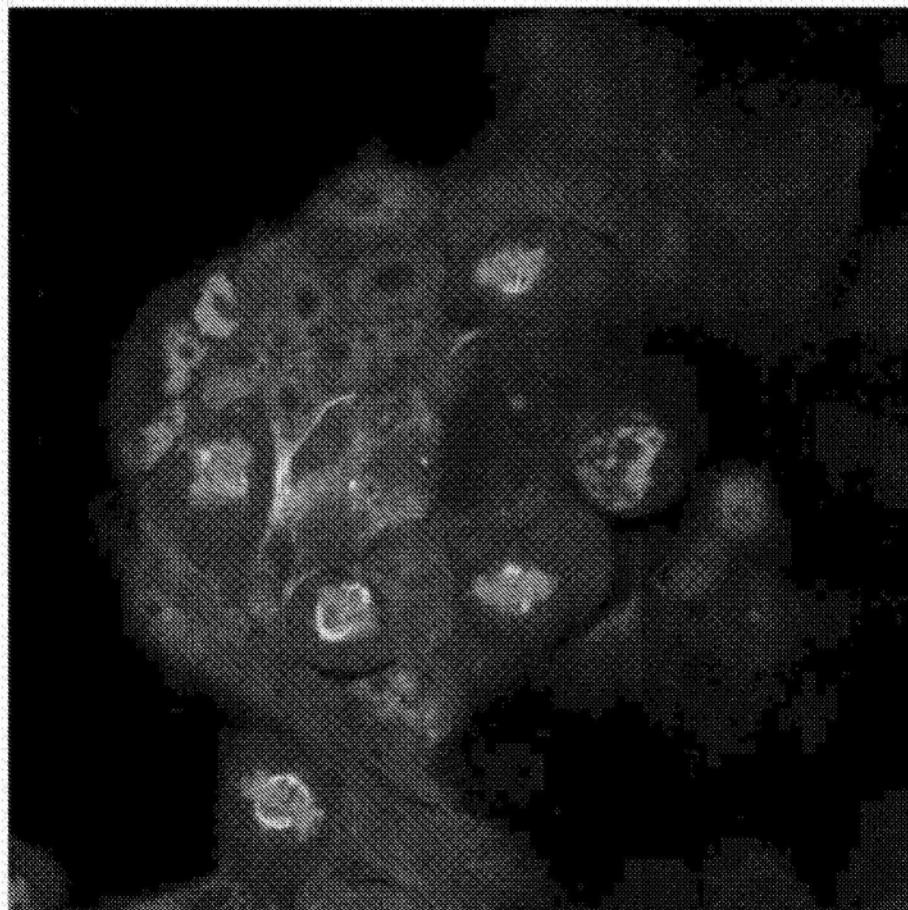


图8

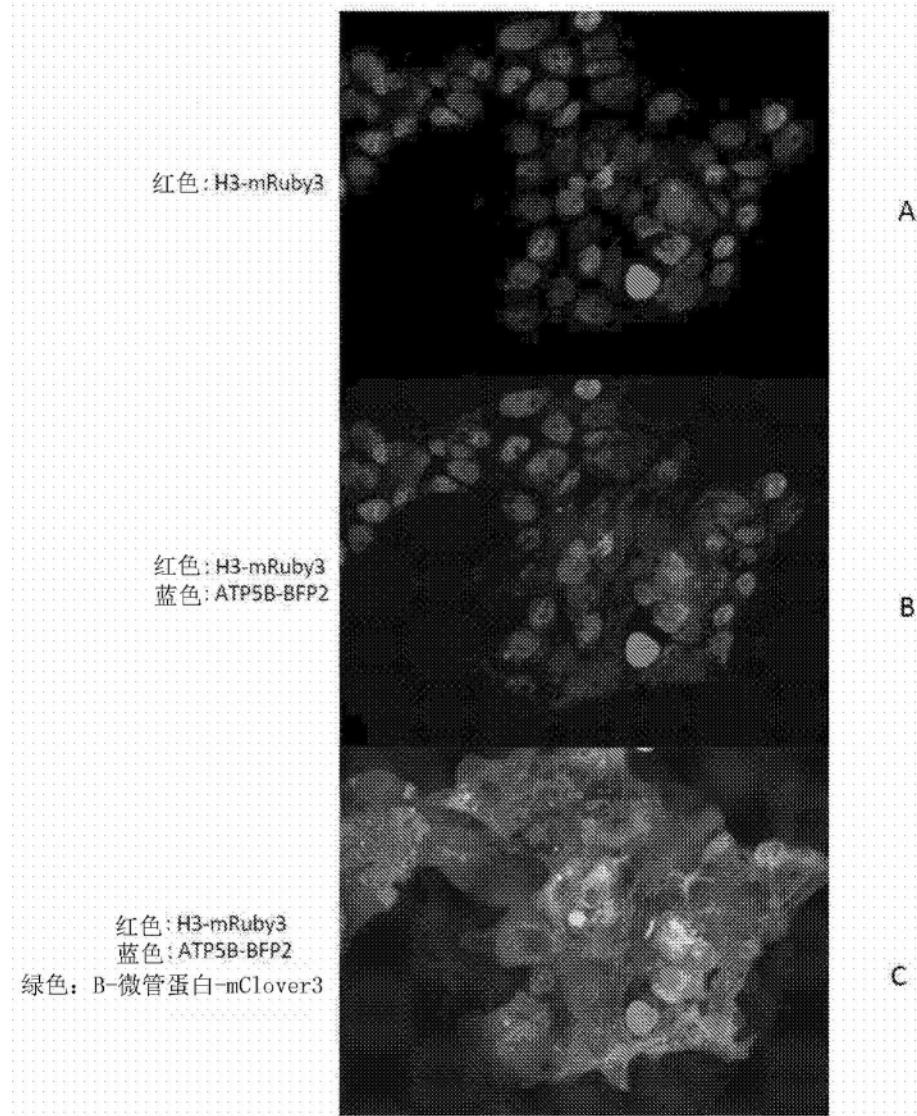


图9A-9C

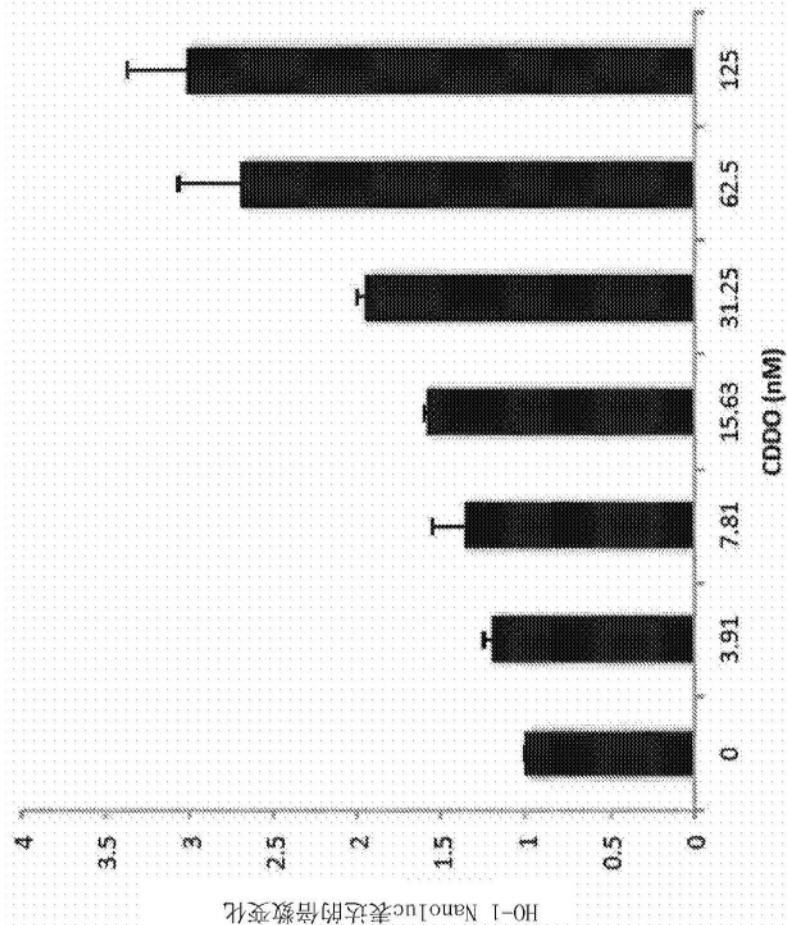


图10

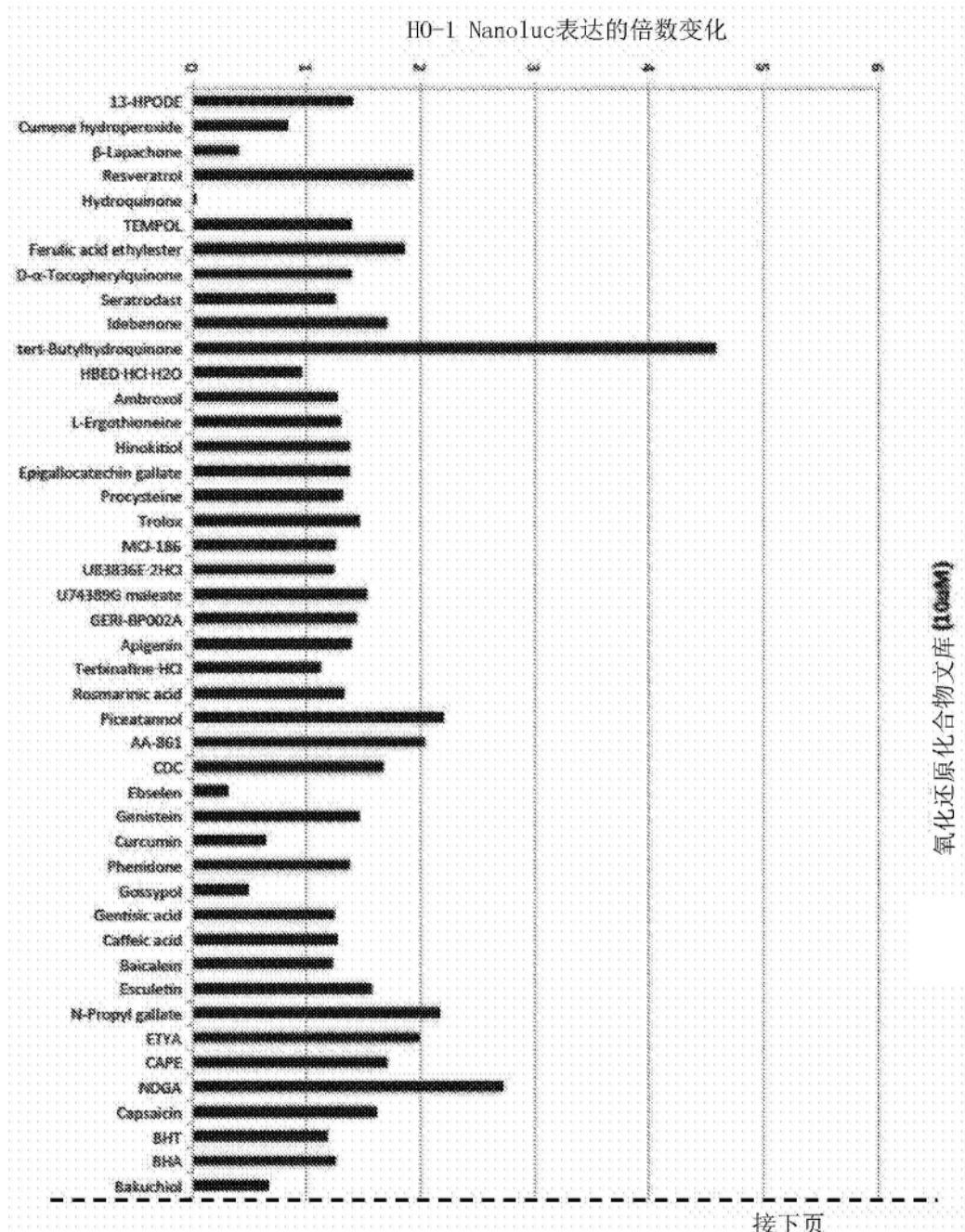


图11

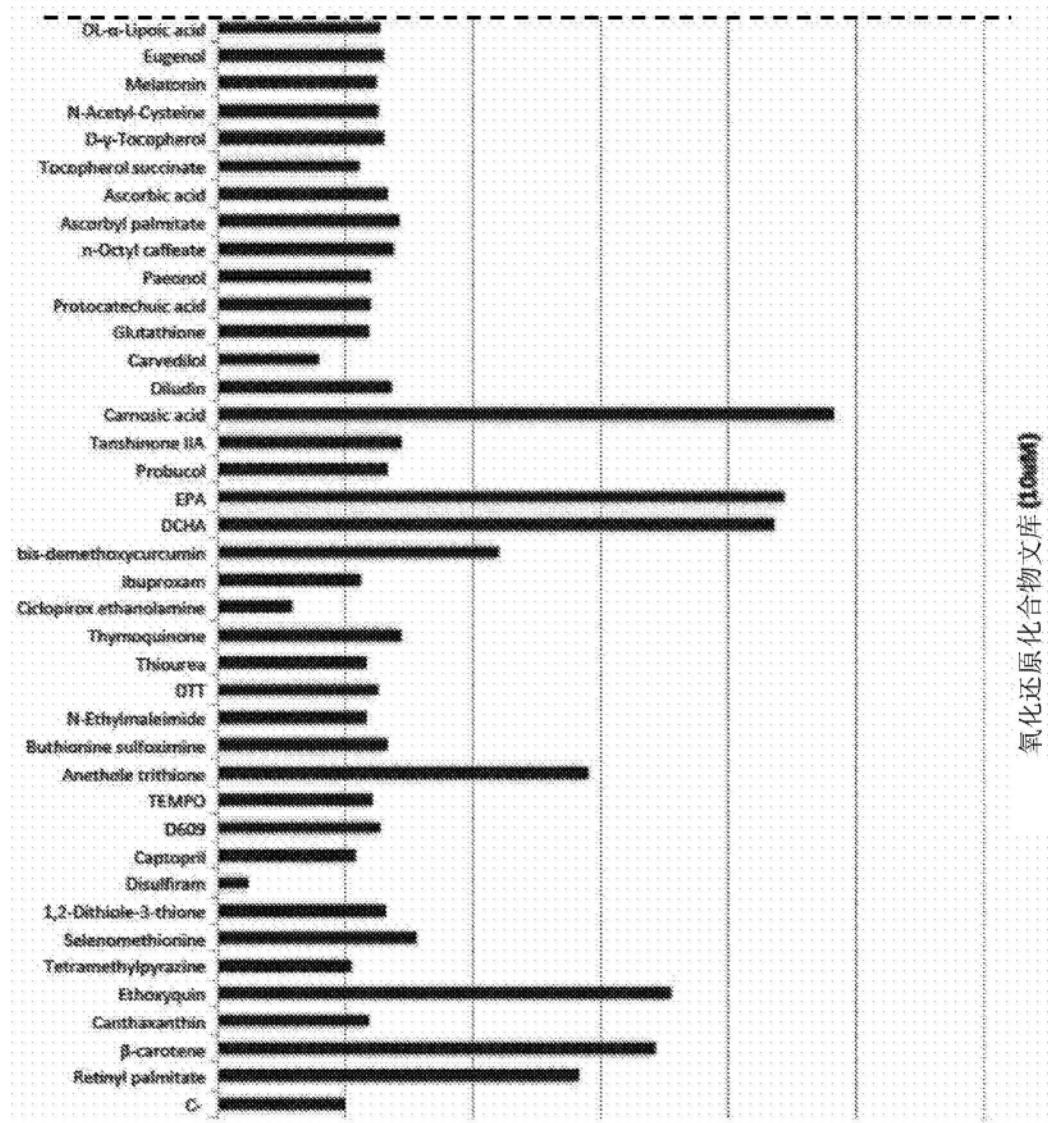


图11(续)

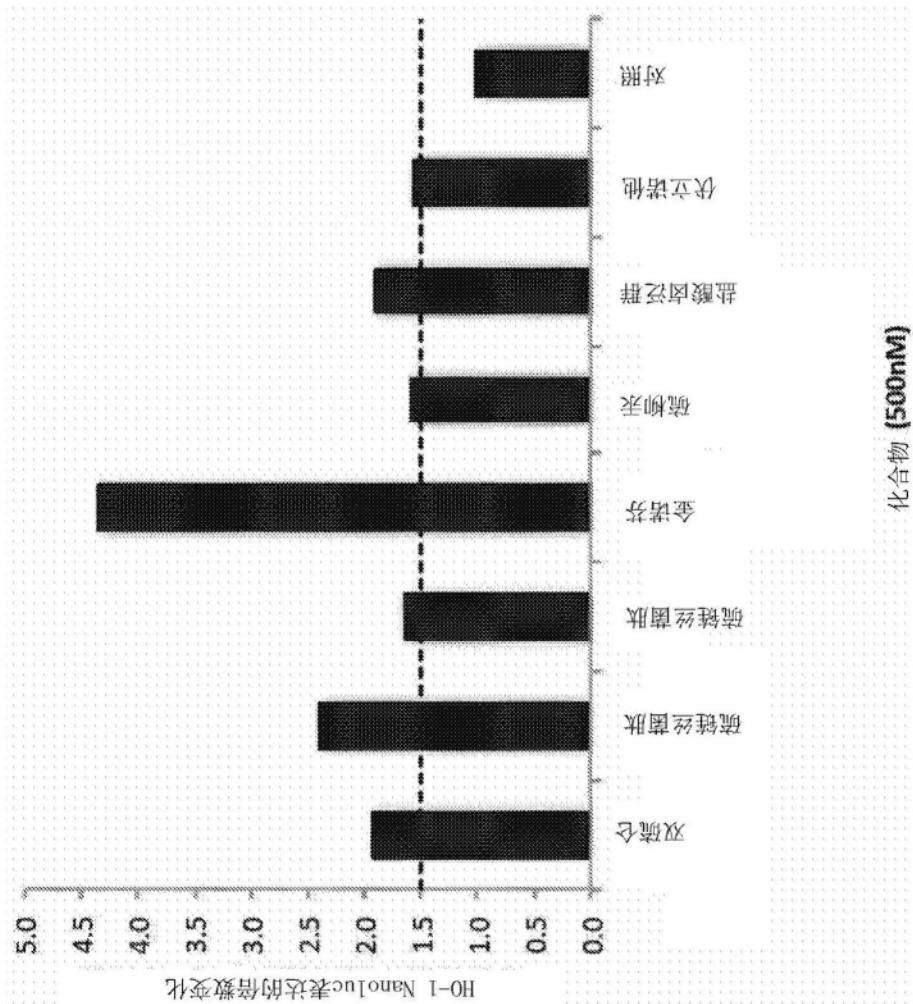


图12