



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117980501 A

(43) 申请公布日 2024.05.03

(21) 申请号 202280058479.7

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限

(22) 申请日 2022.07.29

公司 11227

(30) 优先权数据

专利代理人 张珊珊 韩晓帆

21382725.6 2021.07.30 EP

(51) Int.Cl.

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

C12Q 1/6855 (2006.01)

2024.02.27

C12Q 1/6806 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2022/071413 2022.07.29

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/006978 EN 2023.02.02

(71) 申请人 4倍思生物责任有限公司

权利要求书3页 说明书89页
序列表（电子公布） 附图30页

地址 西班牙

申请人 4倍思生物英有限责任公司

(72) 发明人 安杰尔·皮歇尔 海基·兰克雷

艾米·沃克尔

(54) 发明名称

具有增强的针对外切核酸酶抗性的线性DNA
和用于其产生的方法

(57) 摘要

提供了用于产生具有增强的核酸酶消化抗性的线性脱氧核糖核酸(DNA)产物的方法。该方法包括：(a)使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积；以及(b)孵育所述单个连续水性体积以产生线性DNA产物。还提供了具有增强的核酸酶消化抗性的线性脱氧核糖核酸(DNA)产物及其用途。

1. 用于产生闭合的线性脱氧核糖核酸(DNA)产物的方法,其中所述方法包括:

(a) 将包含至少一个内切核酸酶靶序列的DNA模板分子进行扩增以产生双链DNA分子,其中所述DNA模板分子通过滚环扩增来扩增;

(b) 使所述双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一衔接子分子和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积;以及

(c) 孵育所述单个连续水性体积以产生所述闭合的线性DNA产物,其中所述闭合的线性DNA产物包含线性双链区,其中所述线性双链区包含所述双链DNA分子的线性部分,并且其中所述线性双链区在第一末端处由所述第一衔接子分子闭合,在第二末端处由所述第二衔接子分子闭合。

2. 权利要求1所述的方法,其中所述闭合的线性DNA产物包含间隔区,任选地其中所述间隔区为至少20个碱基对长。

3. 权利要求1或2所述的方法,其中所述内切核酸酶是IIS型限制性内切核酸酶,任选地其中所述内切核酸酶是:

Bbs1, Bsa1, BsmB1, BspQ1, BtgZ1, Esp31, Sap1, Aar1, Acc361, Ac1W1, Acul, Ajul, Alol, Alw261, Alw1, Ars1, AsuHP1, Bae1, Bar1, Bbv1, Bcc1, BceA1, Bcg1, BciV1, BcoD1, BfuA1, Bfu1, Bmr1, Bms1, Bmu1, Bpi1, Bpm1, BpuE1, BsaX1, Bse11, Bse3D1, BseG1, BseM1, BseM11, BseN1, BseR1, BseX1, Bsg1, Bs1F1, BsmA1, BsmF1, Bsm1, Bso311, BspCN1, BspM1, BspP1, BspQ1, BspTN1, BsrD1, Bsrl, Bst61, BstF51, BstMA1, BstV11, BstV21, Bsul, BtgZ1, BtsC1, Bts1-v2, BtsMut1, Bve1, Cse1, CspC1, Eam11041, Earl, Ecil, Eco311, Eco571, Esp31, Faql, Faul, Fok1, Gsul, Hgal, Hph1, HpyAV, Lgul, Lmn1, Lsp11091, Lwe1, Mb011, Mly1, Mme1, Mn11, Mva12691, NmeA111, PaqC1, PciS1, Pct1, Ple1, Pps1, Psrl, Sch1, SfaN1, Taq11, TspDT1和/或TspGW1限制性内切核酸酶。

4. 权利要求1至3中任一项所述的方法,其中所述第一衔接子分子和/或所述第二衔接子分子是核酸衔接子分子。

5. 权利要求1至4中任一项所述的方法,其中所述第一衔接子分子包含发夹和/或所述第二衔接子分子包含发夹。

6. 权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述第一衔接子分子和/或所述第二衔接子分子包含具有突出端的双链区。

7. 用于产生线性脱氧核糖核酸(DNA)产物的方法,其中所述方法包括:

(a) 将包含至少一个内切核酸酶靶序列的DNA模板分子进行扩增以产生双链DNA分子,其中所述DNA模板分子通过滚环扩增来扩增;

(b) 使所述双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一衔接子分子和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积;以及

(c) 孵育所述单个连续水性体积以产生所述线性DNA产物,其中所述线性DNA产物包含线性双链区,其中所述线性双链区包含所述双链DNA分子的线性部分,并且其中所述第一衔接子分子与所述线性双链区的第一末端连接,所述第二衔接子分子与所述线性双链区的第二末端连接,并且其中所述第一衔接子分子和第二衔接子分子是包含一个或更多个核酸酶抗性核苷酸的核酸分子。

8. 用于产生部分闭合的脱氧核糖核酸(DNA)产物的方法,其中所述方法包括:

(a) 将包含至少一个内切核酸酶靶序列的DNA模板分子进行扩增以产生双链DNA分子，其中所述DNA模板分子通过滚环扩增来扩增；

(b) 使所述双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一衔接子分子和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积；以及

(c) 孵育所述单个连续水性体积以产生所述部分闭合的线性DNA产物，其中所述部分闭合的线性DNA产物包含线性双链区，其中所述线性双链区包含所述双链DNA分子的线性部分，并且其中所述第一衔接子分子与所述线性双链区的第一末端连接，所述第二衔接子分子与所述线性双链区的第二末端连接，并且其中所述第一衔接子分子是包含一个或更多个核酸酶抗性核苷酸的核酸分子，并且其中所述线性双链区在第二末端处由所述第二衔接子分子闭合。

9. 权利要求7或权利要求8所述的方法，其中所述一个或更多个核酸酶抗性核苷酸是一个或更多个硫代磷酸酯核苷酸。

10. 用于体外转录闭合的线性脱氧核糖核酸(DNA)产物或线性DNA产物的方法，其中所述方法包括：

(a) 根据权利要求1至6中任一项所述的方法产生闭合的线性DNA产物，根据权利要求7或权利要求9所述的方法产生线性DNA产物，或者根据权利要求8或权利要求9所述的方法产生部分闭合的线性DNA产物；

(b) 使所述闭合的线性DNA产物、所述线性DNA产物或所述部分闭合的线性DNA产物与聚合酶接触；以及

(c) 产生由所述闭合的线性DNA产物、所述线性DNA产物或所述部分闭合的线性DNA产物所编码的转录产物。

11. 用于产生蛋白质的方法，其中所述方法包括：

(a) 根据权利要求1至6中任一项所述的方法产生闭合的线性DNA产物，根据权利要求7或权利要求9所述的方法产生线性DNA产物，或者根据权利要求8或权利要求9所述的方法产生部分闭合的线性DNA产物；以及

(b) 将所述闭合的线性DNA产物、所述线性DNA产物或所述部分闭合的线性DNA产物引入到细胞或无细胞表达系统中，以产生由所述闭合的线性DNA产物、所述线性DNA产物或所述部分闭合的线性DNA产物所编码的蛋白质；以及

其中步骤(b)在体外进行。

12. 用于将闭合的线性脱氧核糖核酸(DNA)产物、线性DNA产物或部分闭合的线性DNA产物细胞转染到细胞中的方法，其中所述方法包括：

(a) 根据权利要求1至6中任一项所述的方法产生闭合的线性DNA产物，根据权利要求7或权利要求9所述的方法产生线性DNA产物，或者根据权利要求8或权利要求9所述的方法产生部分闭合的线性DNA产物；

(b) 使细胞与所述闭合的线性DNA产物、所述线性DNA产物或所述部分闭合的线性DNA产物接触；以及

(c) 将所述闭合的线性DNA产物、所述线性DNA产物或所述部分闭合的线性DNA产物转染到所述细胞的胞质溶胶中；以及

其中步骤(b)和(c)在体外进行。

13. 权利要求12所述的方法,其中将所述闭合的线性DNA产物或所述线性DNA产物转染到所述细胞的胞质溶胶中是通过电穿孔进行的。

14. 闭合的线性DNA产物、线性DNA产物或部分闭合的线性DNA产物在产生病毒递送系统或非病毒递送系统中的用途,其中所述闭合的线性DNA产物通过进行权利要求1至6中任一项所述的方法产生,所述线性DNA产物通过权利要求7或权利要求9所述的方法产生,以及所述部分闭合的线性DNA产物通过权利要求8或权利要求9所述的方法产生。

具有增强的针对外切核酸酶抗性的线性DNA和用于其产生的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及用于产生具有增强的核酸酶消化抗性的线性脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid,DNA)产物(例如,闭合的线性DNA产物)的方法。本发明涉及包括以下步骤的方法:(a)使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积;以及(b)孵育单个连续水性体积以产生线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)。本发明还涉及具有增强的核酸酶消化抗性的线性脱氧核糖核酸(DNA)产物(例如闭合的线性DNA产物)及其用途。

背景技术

[0002] DNA易于被核酸酶降解,核酸酶是生物体内天然存在的酶,并且核酸酶在许多细胞过程的调节中具有重要作用,同时还保护免受外来DNA种类的影响。酶促DNA降解可以使基因治疗无效,并且是开发基因治疗或DNA疫苗时的重要考虑因素。

[0003] 已经进行了相当大的努力以通过提高核酸分子对胞外和胞内核酸酶二者的抗性来延长核酸的有效分子寿命。

[0004] 对于线性分子,提出的解决方案之一包括使用硫代磷酸酯核苷酸(即2'-脱氧核苷酸-5'-(α -硫代)-三磷酸)。

[0005] 硫代磷酸酯核苷酸包含硫原子而不是非桥接氧原子。这些经修饰的核苷酸显示出与相应的未经修饰的核苷酸相当的物理和化学特征,但是对外切核酸酶消化具有抗性。因此,硫代磷酸酯官能团的并入可以延长核酸分子的半衰期。

[0006] 硫代磷酸酯修饰用于核酸药物开发计划。在治疗性核酸中,将硫代磷酸酯核苷酸并入到短的单链多核苷酸链中。例如,反义寡核苷酸福米韦生(fomivirsen)是用于治疗巨细胞病毒性视网膜炎的21聚体硫代磷酸酯寡脱氧核苷酸(Stein and Castanotto, "FDA-approved oligonucleotide therapies in 2017." Molecular Therapy 25.5 (2017) : 1069-1075)。类似地,哌加他尼(pegaptanib)(商标名Macugen)是用于治疗视网膜的年龄相关黄斑变性的具有硫代磷酸酯3'-3'脱氧胸苷帽(cap)的短(27个核苷酸)适配体。

[0007] 硫代磷酸酯修饰也已用于在线性双链多核苷酸链(例如双链DNA)的情况下向多核苷酸链的末端加帽,从而提高对外切核酸酶消化的抗性(Putney et al. "A DNA fragment with an alpha-phosphorothioate nucleotide at one end is asymmetrically blocked from digestion by exonuclease III and can be replicated in vivo." Proceedings of the National Academy of Sciences 78.12 (1981) : 7350-7354)。为了向多核苷酸链的末端加帽,将末端用限制酶消化,并用脱氧核糖核苷三磷酸(deoxyribonucleotide triphosphate,dNTP)的混合物和DNA聚合酶处理,至少一种类型的脱氧核糖核苷三磷酸是与突出链(overhanging strand)中的核苷酸互补的硫代磷酸酯核苷酸。由于DNA聚合酶在5'到3'方向添加核苷酸,因此该处理的结果是这样的平端多核苷酸片段,其具有位于每条链的3'末端(即在“帽”中)的硫代磷酸酯核苷酸。

[0008] 核酸酶消化抗性也可通过使用闭合的DNA分子,例如质粒或微环来实现。然而,由于质粒和微环中被来源于细胞组分的毒性物质的常见污染、改变目的序列的保真度问题、和不同种类(超螺旋、线性和开环)的存在,质粒和微环在体内的效用有限。

[0009] 或者,核酸酶消化抗性可通过产生闭合的线性DNA分子来实现。例如,W02010/086626 A1描述了用于通过利用前端粒酶产生闭合的线性DNA的方法。然而,该方法在前端粒酶在闭合的线性DNA分子的两个末端处产生相同的序列的作用方面是受限的。

[0010] 因此,需要更灵活的方法用于产生具有增强的对核酸酶(例如外切核酸酶)消化的抗性的线性DNA产物。

发明内容

[0011] 本发明提供了用于产生具有增强的核酸酶消化抗性的线性脱氧核糖核酸(DNA)产物(例如闭合的线性DNA产物)的方法。本发明基于向双链DNA分子添加衔接子分子。本发明的方法依赖于在单个反应体积(或单个连续水性体积)中向双链DNA分子添加衔接子分子、内切核酸酶和连接酶。因此,用于产生线性DNA产物的方法包括以下步骤:(a)使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积;以及(b)孵育单个连续水性体积以产生线性DNA产物。优选地,线性DNA产物对外切核酸酶(例如外切核酸酶I、外切核酸酶III和/或外切核酸酶VIII)消化具有增强的抗性。线性DNA产物可以是闭合的线性DNA产物。线性DNA产物可包含核酸酶抗性核苷酸(即受保护核苷酸),例如硫代磷酸酯核苷酸。线性DNA产物可以是部分闭合的线性DNA产物。部分闭合的线性DNA产物可包含核酸酶抗性核苷酸(即受保护核苷酸),例如硫代磷酸酯核苷酸。线性DNA产物可包含盒。盒可包含编码序列。

[0012] 本发明提供了用于产生线性DNA产物的方法,其中该方法包括:

[0013] (a)使双链DNA分子与内切核酸酶以及第一和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积;以及

[0014] (b)孵育单个连续水性体积以产生线性DNA产物,其中线性DNA产物包含线性双链区,其中线性双链区包含双链DNA分子的一部分,并且其中第一衔接子分子附加至线性双链区的第一末端,以及第二衔接子分子附加至线性双链区的第二末端。

[0015] 第一和第二衔接子分子可以是相同的分子,或者其可以是不同的分子。例如,第一衔接子分子和/或第二衔接子分子可包含发夹(hairpin)。第一衔接子分子和/或第二衔接子分子可以是包含一个或更多个核酸酶抗性核苷酸的双链线性核酸分子。第一衔接子分子可包含发夹,并且第二衔接子分子可以是包含一个或更多个核酸酶抗性核苷酸的双链线性核酸分子。因此,通过本文中所述的方法产生的线性DNA产物对核酸酶(例如外切核酸酶)消化是有抗性的。

[0016] 使双链DNA分子与内切核酸酶以及第一和第二衔接子分子接触的步骤优选在存在连接酶的情况下进行。因此,本发明提供了用于产生线性脱氧核糖核酸(DNA)产物的方法,其中该方法包括:

[0017] (a)使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积;以及

[0018] (b)孵育单个连续水性体积以产生线性DNA产物,其中线性DNA产物包含线性双链

区,其中线性双链区包含双链DNA分子的线性部分,并且其中第一衔接子分子附加至线性双链区的第一末端,以及第二衔接子分子附加至线性双链区的第二末端。

[0019] 第一衔接子分子和/或第二衔接子分子的附加(或连接或闭合)可通过衔接子分子与线性双链区末端的杂交或连接来进行。因此,第一衔接子分子可与线性双链区的第一末端杂交。第二衔接子分子可与线性双链区的第二末端杂交。第一衔接子分子可与线性双链区的第一末端连接。第二衔接子分子可与线性双链区的第二末端连接。第一衔接子分子和第二衔接子分子的附加可通过衔接子分子与线性双链区末端的杂交和连接二者来进行。因此,第一衔接子分子可与线性双链区的第一末端杂交和连接。第二衔接子分子可与线性双链区的第二末端杂交和连接。可通过接头或间隔区分子进行附加,所述接头或间隔区分子有助于衔接子分子与线性双链区的第一和/或第二末端的连接。

[0020] 该方法还可包括,在步骤(a)(即,使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触的步骤)之前,扩增DNA模板分子以产生双链DNA分子的步骤。因此,本发明提供了用于产生线性DNA产物的方法,该方法包括:

[0021] (a) 将包含至少一个可切割(例如内切核酸酶)靶序列的DNA模板分子进行扩增以产生双链DNA分子;

[0022] (b) 使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积;以及

[0023] (c) 孵育单个连续水性体积以产生线性DNA产物,其中线性DNA产物包含线性双链区,其中线性双链区包含双链DNA分子的线性部分,并且其中第一衔接子分子附加至线性双链区的第一末端,以及第二衔接子分子附加至线性双链区的第二末端。

[0024] 扩增可以是体外或体内扩增。优选地,扩增是体外扩增。例如,扩增可通过滚环扩增(rolling circle amplification,RCA)、MALBAC方法、传统的聚合酶链反应(polymerase chain reaction,PCR)、基于核酸序列的扩增(nucleic acid sequence-based amplification,NASBA)、环介导的等温扩增(loop-mediated isothermal amplification,LAMP)、解旋酶依赖性扩增(helicase-dependent amplification,HDA)、多重置换扩增(multiple displacement amplification,MDA)和重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification,RPA)来进行。优选地,扩增是滚环扩增。因此,本发明提供了用于产生线性脱氧核糖核酸(DNA)产物的方法,该方法包括:

[0025] (a) 将包含至少一个可切割(例如内切核酸酶)靶序列的DNA模板分子进行滚环扩增以产生双链DNA分子;

[0026] (b) 使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积;以及

[0027] (c) 孵育单个连续水性体积以产生线性DNA产物,其中线性DNA产物包含线性双链区,其中线性双链区包含双链DNA分子的线性部分,并且其中第一衔接子分子附加至线性双链区的第一末端,以及第二衔接子分子附加至线性双链区的第二末端。

[0028] 该方法还可包括(在扩增的步骤之后并且在使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触的步骤之前)热失活的步骤。因此,本发明提供了用于产生线性DNA产物的方法,该方法包括:

[0029] (a) 将包含至少一个可切割(例如内切核酸酶)靶序列的DNA模板分子进行扩增以

产生双链DNA分子；

[0030] (b) 步骤(a)的反应的热失活；

[0031] (c) 使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积；以及

[0032] (d) 孵育单个连续水性体积以产生线性DNA产物，其中线性DNA产物包含线性双链区，其中线性双链区包含双链DNA分子的线性部分，并且其中第一衔接子分子附加至线性双链区的第一末端，以及第二衔接子分子附加至线性双链区的第二末端。

[0033] 优选地，扩增是滚环扩增。

[0034] 热失活的步骤可以在足以使扩增反应期间使用的试剂无活性的条件下进行。热失活的步骤可在至少50°C、至少55°C、至少60°C、至少65°C、至少70°C、至少75°C、至少80°C、至少85°C、至少90°C、至少95°C或至少100°C的温度下进行。热失活的步骤可进行至少1分钟、至少3分钟、至少5分钟、至少10分钟、至少15分钟或至少20分钟。

[0035] 本申请的发明人出乎意料地发现滚环扩增反应的大的多联产物可用于产生本文中所述的DNA产物。这是出乎意料地，因为滚环扩增的产物具有高黏度，并且在产物可用于下游应用之前通常必须经过纯化步骤。

[0036] 在本文中所述的方法中，在扩增的步骤之后，可在不纯化扩增反应的产物的情况下，进行使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积的步骤。换言之，使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触的步骤可以在扩增的步骤之后直接进行。使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触的步骤可以在热失活的步骤之后直接进行。

[0037] 本申请的发明人发现了需要非常少的步骤来产生本文中所述的DNA产物的方法。本文中所述的方法非常省时。这是部分上由于扩增反应后不需要纯化步骤的事实。任选地，扩增反应的产物可以是热失活的。出乎意料的是，当与其中通过纯化扩增产物将两个步骤分开的方法相比时，其中使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触的步骤在扩增步骤之后直接进行(即没有纯化步骤)的本文中所述方法产生了更高产率的本文中所述的DNA产物。

[0038] 该方法还可包括，在孵育单个连续水性体积的步骤之后，纯化线性DNA产物的步骤。

[0039] 该方法还可包括，在孵育单个连续水性体积的步骤之后，核酸酶消化的步骤。核酸酶消化可以是外切核酸酶消化，例如外切核酸酶I和/或外切核酸酶III消化。核酸酶消化的步骤可发生在纯化的步骤之前或之后。核酸酶消化的步骤可允许去除没有用于产生线性DNA产物的任何双链DNA分子和/或衔接子分子。因此，用于产生线性DNA产物的方法可包括以下步骤：

[0040] (a) 使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积；

[0041] (b) 孵育单个连续水性体积以产生线性DNA产物，其中线性DNA产物包含线性双链区，其中线性双链区包含双链DNA分子的线性部分，并且其中第一衔接子分子附加至线性双链区的第一末端，以及第二衔接子分子附加至线性双链区的第二末端；以及

[0042] (c) 用核酸酶(例如外切核酸酶)孵育单个连续水性体积。

- [0043] 用于产生线性DNA产物的方法可包括以下步骤：
- [0044] (a) 将包含至少一个可切割(例如内切核酸酶)靶序列的DNA模板分子进行扩增以产生双链DNA分子；
- [0045] (b) 使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积；
- [0046] (c) 孵育单个连续水性体积以产生线性DNA产物，其中线性DNA产物包含线性双链区，其中线性双链区包含双链DNA分子的线性部分，并且其中第一衔接子分子附加至线性双链区的第一末端，以及第二衔接子分子附加至线性双链区的第二末端；以及
- [0047] (d) 用核酸酶(例如外切核酸酶)孵育单个连续水性体积。
- [0048] 用于产生线性DNA产物的方法可包括以下步骤：
- [0049] (a) 将包含至少一个可切割(例如内切核酸酶)靶序列的DNA模板分子进行扩增以产生双链DNA分子；
- [0050] (b) 使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积；
- [0051] (c) 孵育单个连续水性体积以产生线性DNA产物，其中线性DNA产物包含线性双链区，其中线性双链区包含双链DNA分子的线性部分，并且其中第一衔接子分子附加至线性双链区的第一末端，以及第二衔接子分子附加至线性双链区的第二末端；
- [0052] (d) 纯化线性DNA产物；以及
- [0053] (e) 用核酸酶(例如外切核酸酶)孵育步骤(d)的产物。
- [0054] 用于产生线性DNA产物的方法可包括以下步骤：
- [0055] (a) 将包含至少一个可切割(例如内切核酸酶)靶序列的DNA模板分子进行扩增以产生双链DNA分子；
- [0056] (b) 使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触，以形成单个连续水性体积；
- [0057] (c) 孵育单个连续水性体积以产生线性DNA产物，其中线性DNA产物包含线性双链区，其中线性双链区包含双链DNA分子的线性部分，并且其中第一衔接子分子附加至线性双链区的第一末端，以及第二衔接子分子附加至线性双链区的第二末端；
- [0058] (d) 用核酸酶(例如外切核酸酶)孵育单个连续水性体积；以及
- [0059] (e) 纯化线性DNA产物。
- [0060] 内切核酸酶可以是限制酶内切核酸酶。内切核酸酶可以是IIS型限制酶。内切核酸酶可以是识别DNA序列并在识别序列的外部切割的任意酶。例如，内切核酸酶可以是：
- [0061] BbsI, BsaI, BsmBI, BspQI, BtgZI, Esp3I, SapI, AarI, Acc36I, Ac1WI, AcuI, AjuI, AloI, Alw26I, AlwI, ArsI, AsuHPI, BaeI, BarI, BbvI, BccI, BceAI, BcgI, BciVI, BcoDI, BfuAI, BfuI, BmrI, BmsI, BmuI, BpiI, BpmI, BpuEI, BsaXI, Bse1I, Bse3DI, BseGI, BseMI, BseMII, BseNI, BseR1, BseXI, BsgI, Bs1FI, BsmAI, BsmFI, BsmI, Bso31I, BspCNI, BspMI, BspPI, BspQI, BspTNI, BsrDI, BsrI, Bst6I, BstF5I, BstMAI, BstV1I, BstV2I, BsuI, BtgZI, BtsCI, BtsI-v2, BtsMutI, BveI, CseI, CspCI, Eam1104I, EarI, EciI, Eco31I, Eco57I, Esp3I, FaqI, FauI, FokI, GsuI, HgaI, HphI, HpyAV, LguI, LmnI, Lsp1109I, LweI, MboII, MlyI, MmeI, MnII, Mva1269I, NmeAIII, PaqCI, PciSI, PctI, PleI, PpsI, PsrI, SchI, SfaNI, TaqII, TspDTI

和/或TspGWI限制酶。

[0062] IIS型限制性内切核酸酶在识别序列(即内切核酸酶靶序列)的外部切割双链DNA分子,这意指识别序列(即内切核酸酶靶序列)不包含在线性DNA产物中。

[0063] 本发明人出乎意料地发现了用于产生具有增强的核酸酶消化抗性的线性DNA产物的方法。具体而言,通过本文中所述的方法产生的线性DNA产物具有增强的对外切核酸酶消化(例如,外切核酸酶III消化)的抗性。增强的对外切核酸酶消化的抗性延长了线性DNA产物在细胞中的寿命(即线性DNA产物具有增强的对胞内外切核酸酶的抗性)和在无细胞系统中的寿命(即线性DNA产物具有增强的对胞外外切核酸酶的抗性)。本发明人开发了依赖于将衔接子分子(即第一衔接子分子和第二衔接子分子)添加至双链DNA分子的两个末端的方法。衔接子分子可包含发夹或环,以形成具有增强的对核酸酶(例如外切核酸酶)消化的抗性的闭合的线性DNA产物。另外,本发明人发现了用于在线性DNA产物的线性双链区的两个末端处以第一衔接子分子和第二衔接子分子的形式高效引入受保护核苷酸的方法。本文中所述的方法可在DNA产物的一个末端上使用发夹衔接子或环衔接子,以及在DNA产物的另一末端上使用包含受保护核苷酸的线性衔接子。换言之,可使用本文中所述的任何类型的衔接子,只要最终的DNA产物受保护免于核酸酶(例如外切核酸酶)消化。本发明的方法提供了避免被切割3'末端核苷酸的外切核酸酶(例如外切核酸酶III)和切割5'末端核苷酸的外切核酸酶(例如外切核酸酶VIII)消化的保护。因此,当与不包含本文中所述的衔接子分子的线性DNA产物相比时,通过本发明的方法产生的线性DNA产物具有延长的体内表达。

[0064] 本文中使用的术语“受保护核苷酸”或“核酸酶抗性核苷酸”旨在包括提供或增强核酸酶消化(尤其是外切核酸酶消化)抗性的任何类型的分子。尽管衔接子分子在本文中被描述为包含硫代磷酸酯核苷酸,但技术人员将理解衔接子分子可以替代地包含提供核酸酶消化(例如外切核酸酶III消化)抗性的任何分子。例如,衔接子分子可包含核酸酶抗性核苷酸,即提供或提高对核酸酶(例如外切核酸酶)的抗性的经修饰的核苷酸。衔接子分子可包含提供或提高对核酸酶(例如外切核酸酶)消化的抗性的肽、多肽或蛋白质。衔接子分子可包含2'-0-甲基核苷酸或2'-0-甲氧基乙基(methoxyethyl, MOE)核苷酸。

[0065] 本文中使用的术语“硫代磷酸酯核苷酸”是指具有经改变的磷酸骨架的核苷酸,其中糖部分通过硫代磷酸酯键连接。在寡核苷酸序列的磷酸骨架中,硫代磷酸酯键含有硫原子作为非桥接氧原子的替代物。该修饰使得核苷酸间键联对核酸酶降解具有抗性。

[0066] 通过本发明的方法产生的线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)具有另外的有利特性,例如基本上没有细菌骨架和/或抗生素抗性基因。这些特征的缺乏在产生细胞递送系统(例如病毒载体或纳米粒,例如其用于细胞治疗)中特别有益。这些特征的缺乏使得通过本发明的方法产生的线性DNA产物特别适合用于药物组合物。

[0067] 出乎意料的是,本发明人发现了用于产生具有增强的核酸酶消化抗性的线性DNA产物的方法,该方法允许高效产生大量的具有增强的对外切核酸酶消化的抗性的线性DNA产物。可以在无细胞系统中大规模制备该产物,这导致包含基本上不含细菌污染物(例如细胞裂解后所残留的)的线性DNA产物的纯样品的产生。

[0068] 1. 用于产生闭合的线性DNA产物的方法

[0069] 本文中所述的方法可用于产生闭合的线性DNA产物,例如共价闭合的线性DNA产物。

[0070] 本发明提供了用于产生闭合的线性DNA产物的方法,该方法包括:

[0071] (a) 使双链DNA分子与内切核酸酶以及第一和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积;以及

[0072] (b) 孵育单个连续水性体积以产生闭合的线性DNA产物,其中闭合的线性DNA产物包含线性双链区,其中线性双链区包含双链DNA分子的线性部分,并且其中线性双链区在第一末端处由第一衔接子分子闭合,以及在第二末端处由第二衔接子分子闭合。

[0073] 使双链DNA分子与内切核酸酶以及第一和第二衔接子分子接触的步骤优选在存在连接酶的情况下进行。因此,本发明提供了用于产生闭合的线性DNA产物的方法,其中该方法包括:

[0074] (a) 使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积;以及

[0075] (b) 孵育单个连续水性体积以产生闭合的线性DNA产物,其中闭合的线性DNA产物包含线性双链区,其中线性双链区包含双链DNA分子的线性部分,并且其中线性双链区在第一末端处由第一衔接子分子闭合,以及在第二末端处由第二衔接子分子闭合。

[0076] 线性双链区可以是双链DNA分子的线性部分。

[0077] 本发明提供了用于产生闭合的线性DNA产物的方法,其中该方法包括:

[0078] (a) 使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积;以及

[0079] (b) 孵育单个连续水性体积以产生闭合的线性DNA产物,其中闭合的线性DNA产物包含双链DNA分子的线性部分,并且其中双链DNA分子的线性部分在第一末端处由第一衔接子分子闭合,以及在第二末端处由第二衔接子分子闭合。

[0080] 闭合的线性DNA产物作为可用于体内表达基因产物的治疗剂(即DNA治疗)具有特定的效用。这是因为与具有暴露DNA末端的“开放的”DNA分子相比,其闭合结构(例如共价闭合结构)阻止了通过酶例如外切核酸酶的攻击,从而导致了基因表达的稳定性和长久性增强。已经证明,当线性双链开放末端的盒被引入到宿主组织中时,其在基因表达方面是低效的。这被认为是由于外切核酸酶在胞外空间中的作用而导致的盒不稳定性。

[0081] 将DNA末端隔离在闭合结构内还具有其他优点。DNA末端被阻止与基因组DNA整合,并且闭合的线性DNA产物因此提供了提高的安全性。另外,闭合的线性结构降低了宿主细胞内DNA产物的多联体化(concatamerisation),并且基因产物的表达水平因此可以以更灵敏的方式来调节。

[0082] 本发明的方法可用于在宿主细胞中产生用于体外表达的DNA,例如在DNA疫苗中。DNA疫苗通常编码感染性生物体的DNA的经修饰形式。将DNA疫苗施用于对象,然后DNA疫苗在对象中表达感染性生物体的所选蛋白质,从而引发通常为保护性的针对该蛋白质的免疫应答。DNA疫苗也可以在癌症免疫治疗方法中编码肿瘤抗原。

[0083] 该方法可产生其他类型的治疗性DNA分子,例如用于基因治疗的那些DNA分子。例如,这样的DNA分子可用于在具有由功能基因的功能失调变体所引起的遗传病症的对象中表达该基因。这样的疾病的一些实例包括镰状细胞贫血、囊性纤维化、亨廷顿病(Huntington disease)、迪谢内肌营养不良(Duchenne's Muscular Dystrophy)、血友病A、 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶缺乏症、原发性纤毛运动不良症或早产儿呼吸窘迫综合征。基因治疗可用于

的另一些疾病包括代谢疾病、呼吸系统疾病、炎性疾病，自身免疫、慢性和感染性疾病，包括这样的病症例如AIDS、癌症、神经系统疾病、心血管疾病、高胆固醇血症，多种血液病症包括多种贫血、地中海贫血和血友病，以及肺气肿。对于实体瘤的治疗，可表达编码毒性肽(即化学治疗剂例如蓖麻毒蛋白、白喉毒素和眼镜蛇毒因子)的基因；肿瘤抑制基因例如p53；编码与转化癌基因、抗肿瘤肽(例如肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF))及其他细胞因子反义的mRNA序列的基因，或者编码转化癌基因的反式显性负变株的基因。

[0084] 由第一衔接子分子和/或第二衔接子分子对线性双链区的闭合可通过衔接子分子与线性双链区末端的杂交或连接来进行。因此，第一衔接子分子可与线性双链区的第一末端杂交。第二衔接子分子可与线性双链区的第二末端杂交。第一衔接子分子可与线性双链区的第一末端连接。第二衔接子分子可与线性双链区的第二末端连接。由第一衔接子分子和第二衔接子分子对线性双链区的闭合可通过衔接子分子与线性双链区末端的杂交和连接二者来进行。因此，第一衔接子分子可与线性双链区的第一末端杂交并连接。第二衔接子分子可与线性双链区的第二末端杂交并连接。

[0085] 孵育单个连续水性体积以产生闭合的线性DNA产物的步骤可包括通过用内切核酸酶消化双链DNA分子来产生双链DNA分子的线性部分。

[0086] 孵育单个连续水性体积的步骤可在促进第一和第二衔接子分子附加(或连接)至线性双链区的条件下进行以产生闭合的线性DNA产物。可通过在第一和/或第二衔接子分子与线性双链区的第一和/或第二末端之间建立共价键来进行附加。

[0087] 孵育单个连续水性体积的步骤可在促进消化双链DNA分子的条件下进行以产生双链DNA分子的线性部分。消化双链DNA分子以产生双链DNA分子的线性部分可在1°C至100°C、1°C至80°C、5°C至70°C、10°C至60°C、15°C至55°C、20°C至50°C、25°C至45°C、30°C至40°C、35°C至39°C、36°C至38°C或在约37°C的第一温度下进行。消化可以是内切核酸酶消化，优选IIS型内切核酸酶消化。

[0088] 孵育单个连续水性体积的步骤可在促进线性双链区与第一和第二衔接子分子连接的条件下进行。连接可以是至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少82%、至少85%、至少90%或至少95%有效的。例如，至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少82%、至少85%、至少90%或至少95%的线性双链区(或双链DNA分子的部分)可被并入到闭合的线性DNA产物中。优选地，连接是至少15%有效的。

[0089] 连接效率可基于在消化/连接反应之前和之后的DNA定量值来确定。因此，连接效率可基于以下等式来确定：(起始扩增的DNA量)/(最终线性DNA量)×100%。

[0090] 连接效率也可基于在消化/连接反应以及随后的外切核酸酶处理之前和之后的DNA定量值来确定，所述外切核酸酶处理以去除剩余开放的DNA构建体和衔接子分子过量。

[0091] 例如，首先将通过滚环扩增产生的双链DNA分子定量，使得在消化/连接反应期间用作起始物质的双链DNA分子的量是已知的。在所有的酶促反应之后，将线性DNA产物定量，以按照以上等式来计算连接效率。

[0092] DNA定量方法是本领域技术人员已知的。例如，可使用来自Thermo Fisher的Qubit

dsDNA BR测定(<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/Q32850#/Q32850>)来进行DNA定量。

[0093] 可在1°C至90°C、2°C至70°C、5°C至60°C、8°C至55°C、9°C至50°C、10°C至45°C、11°C至40°C、12°C至37°C、13°C至30°C、14°C至25°C、15°C至20°C或在约16°C的第二温度下进行线性双链区与第一和第二衔接子分子的连接的步骤

[0094] 孵育单个连续水性体积的步骤可包括在第一温度下孵育，并随后在第二温度下孵育。第一温度可以是1°C至100°C、1°C至80°C、5°C至70°C、10°C至60°C、15°C至55°C、20°C至50°C、25°C至45°C、30°C至40°C、35°C至39°C、36°C至38°C、或约37°C。第二温度可以是1°C至90°C、2°C至70°C、5°C至60°C、8°C至55°C、9°C至50°C、10°C至45°C、11°C至40°C、12°C至37°C、13°C至30°C、14°C至25°C、15°C至20°C、或在约16°C。优选地，第一温度是35°C至39°C并且第二温度是14°C至18°C。使用这些条件，内切核酸酶可以是IIS型限制性内切核酸酶(例如BsaI)，并且连接酶可以是T4 DNA连接酶，T7 DNA连接酶，哺乳动物DNA连接酶I、III和IV，Taq DNA连接酶，Tth DNA连接酶，或大肠杆菌(E.coli)DNA连接酶。

[0095] 孵育单个连续水性体积的步骤可等温进行。孵育单个连续水性体积的步骤可包括在恒定温度下孵育。恒定温度促进双链DNA分子的同时消化以产生双链DNA分子的线性部分，并且促进线性双链区与第一和第二衔接子分子的连接。例如，恒定温度可以是20°C、21°C、22°C、23°C、24°C、25°C、26°C、27°C、28°C、29°C、30°C、31°C、32°C、33°C、34°C、35°C、36°C、37°C、38°C、39°C、或40°C。优选地，恒定温度是30°C。恒定温度旨在意指在反应期间温度没有显著变化。恒定温度旨在意指，在孵育单个连续水性体积的步骤期间，温度变化小于10°C、小于9°C、小于8°C、小于7°C、小于6°C、小于5°C、小于4°C、小于3°C、小于2°C、或小于1°C。在优选的实施方案中，在孵育单个连续水性的步骤期间，温度偏差不超过5°C，优选不超过3°C，甚至更优选不超过1°C。因此，恒定温度可以是在20°C至30°C、22°C至32°C、24°C至34°C、26°C至36°C、28°C至38°C、30°C至40°C、22°C至28°C、32°C至38°C、25°C至35°C、26°C至34°C、27°C至33°C、27.5°C至32.5°C、28°C至32°C、28.5°C至31.5°C、29°C至31°C、或29.5°C至30.5°C范围内的温度。优选地，恒定温度是在27.5°C至32.5°C范围内的温度。或者，恒定温度可以是在32°C至42°C、33°C至41°C、34°C至40°C、35°C至39°C、36°C至38°C范围内的温度。优选地，恒定温度是在34.5°C至39.5°C范围内的温度。

[0096] 孵育单个连续水性体积的步骤可包括在第一温度和第二温度之间循环。孵育单个连续水性体积的步骤可包括在第一温度和第二温度之间循环至少2次、至少3次、至少4次、至少5次、至少6次、至少7次、至少8次、至少9次、至少10次、至少15次、至少20次、至少25次、至少30次、至少35次、至少40次、至少45次、至少50次、至少55次、至少60次、至少65次、至少70次、至少80次、至少90次、或至少100次，优选至少20次。孵育单个连续水性体积的步骤可包括在第一温度和第二温度之间循环少于40次、少于35次、少于30次、少于29次、少于25次。孵育单个连续水性体积的步骤可包括在第一温度和第二温度之间循环2至100次、5至80次、10至70次、20至60次、或30至60次。孵育单个连续水性体积的步骤可包括在第一温度和第二温度之间循环2至20次、5至29次、61至100次、或65至80次。

[0097] 该方法还可包括，在步骤(a)(即，使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触的步骤)之前，扩增DNA模板分子以产生双链DNA分子的步骤。因此，本发明提供了用于产生闭合的线性DNA产物的方法，该方法包括：

[0098] (a) 将包含至少一个可切割(例如内切核酸酶)靶序列的DNA模板分子进行扩增以产生双链DNA分子；

[0099] (b) 使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积；以及

[0100] (c) 孵育单个连续水性体积以产生闭合的线性DNA产物，其中闭合的线性DNA产物包含线性双链区，其中线性双链区包含双链DNA分子的线性部分，并且其中线性双链区在第一末端处由第一衔接子分子闭合，以及在第二末端处由第二衔接子分子闭合。

[0101] 扩增的步骤可通过体外或体内扩增来进行。优选地，扩增的步骤通过体外扩增来进行。例如，扩增的步骤可通过滚环扩增(RCA)、MALBAC方法、传统的聚合酶链反应(PCR)、基于核酸序列的扩增(NASBA)、环介导等温扩增(LAMP)、解旋酶依赖性扩增(HDA)、多重置换扩增(MDA)和重组酶聚合酶扩增(RPA)来进行。优选地，通过滚环扩增来进行扩增的步骤。因此，本发明提供了用于产生闭合的线性DNA产物的方法，该方法包括：

[0102] (a) 将包含至少一个可切割(例如内切核酸酶)靶序列的DNA模板分子进行扩增以产生双链DNA分子，其中所述DNA模板分子通过滚环扩增来扩增；

[0103] (b) 使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积；以及

[0104] (c) 孵育单个连续水性体积以产生闭合的线性DNA产物，其中闭合的线性DNA产物包含线性双链区，其中线性双链区包含双链DNA分子的线性部分，并且其中线性双链区在第一末端处由第一衔接子分子闭合，以及在第二末端处由第二衔接子分子闭合。

[0105] 滚环扩增可在没有任何引物的情况下，或存在一种引物或多种引物的情况下进行。例如，引物可以是合成的引物。引物可以是随机引物。滚环扩增可在存在引发酶的情况下进行。引发酶可以是TthPrimPol。优选地，如果滚环扩增在没有任何引物的情况下进行，则其是在存在引发酶(例如TthPrimPol)的情况下进行的。类似地，如果在扩增反应期间使用引物，则不使用引发酶。双链DNA产物可使用合适的核酸聚合酶，例如Phi29DNA聚合酶，在等温条件下通过体外的滚环扩增来产生。

[0106] 在本文中所述的方法中，DNA模板分子可包含至少一个可切割的靶序列。可切割的靶序列可以是内切核酸酶靶序列。因此，DNA模板分子可包含至少一个内切核酸酶靶序列。优选地，DNA模板分子包含至少两个内切核酸酶靶序列。内切核酸酶靶序列可以是相同的或不同的。优选地，至少一个内切核酸酶靶序列是限制性内切核酸酶靶序列。不同的限制性内切核酸酶靶序列将是技术人员已知的。可切割靶序列可以是IIS型限制性内切核酸酶靶序列。例如，限制性内切核酸酶靶序列可以是

[0107] BbsI, BsaI, BsmBI, BspQI, BtgZI, Esp3I, SapI, AarI, Acc36I, Ac1W1, AcuI, AjuI, AloI, Alw26I, AlwI, ArsI, AsuHPI, BaeI, BarI, BbvI, BccI, BceAI, BcgI, BciVI, BcoDI, BfuAI, BfuI, BmrI, BmsI, BmuI, BpiI, BpmI, BpuEI, BsaXI, Bse1I, Bse3DI, BseGI, BseMI, BseMII, BseNI, BseRI, BseXI, BsgI, Bs1FI, BsmAI, BsmFI, BsmI, Bso31I, BspCNI, BspMI, BspPI, BspQI, BspTNI, BsrDI, BsrI, Bst6I, BstF5I, BstMAI, BstV1I, BstV2I, BsuI, BtgZI, BtsCI, BtsI-v2, BtsMutI, BveI, CseI, CspCI, Eam1104I, EarI, EciI, Eco31I, Eco57I, Esp3I, FaqI, FauI, FokI, GsuI, HgaI, HphI, HpyAV, LguI, LmnI, Lsp1109I, LweI, MboII, MlyI, MmeI, MnII, Mva1269I, NmeAIII, PaqCI, PciSI, PctI, PleI, PpsI, PsrI, SchI, SfaNI, TaqII, TspDTI

和/或TspGWI靶序列。至少一个可切割序列(例如内切核酸酶靶序列)可以是天然可切割序列(即模板分子中存在的可切割序列)。或者,至少一个可切割序列(例如内切核酸酶靶序列)可在产生闭合的线性DNA产物之前被引入至DNA模板分子中。

[0108] 内切核酸酶可以是限制酶内切核酸酶。内切核酸酶可以是IIS型限制酶。内切核酸酶可以是识别DNA序列并在识别序列的外部切割的任何酶。例如,内切核酸酶可以是:

[0109] BbsI, BsaI, BsmBI, BspQI, BtgZI, Esp3I, SapI, AarI, Acc36I, Ac1WI, AcuI, AjuI, AloI, Alw26I, AlwI, ArsI, AsuHPI, BaeI, BarI, BbvI, BccI, BceAI, BcgI, BciVI, BcoDI, BfuAI, BfuI, BmrI, BmsI, BmuI, BpiI, BpmI, BpuEI, BsaXI, Bse1I, Bse3DI, BseGI, BseMI, BseMII, BseNI, BseRI, BseXI, BsgI, Bs1FI, BsmAI, BsmFI, BsmI, Bso31I, BspCNI, BspMI, BspPI, BspQI, BspTNI, BsrDI, BsrI, Bst6I, BstF5I, BstMAI, BstV1I, BstV2I, BsuI, BtgZI, BtsCI, BtsI-v2, BtsMutI, BveI, CseI, CspCI, Eam1104I, EarI, EciI, Eco31I, Eco57IEsp3I, FaqI, FauI, FokI, GsuI, HgaI, HphI, HpyAV, LguI, LmnI, Lsp1109I, LweI, MboII, MlyI, MmeI, MnII, Mva1269I, NmeAIII, PaqCI, PciSI, PctI, PleI, PpsI, PsrI, SchI, SfaNI, TaqII, TspDTI 和/或TspGWI限制酶。

[0110] 连接酶可以是DNA连接酶,例如T4 DNA连接酶,T7 DNA连接酶,哺乳动物DNA连接酶I、III和IV,Taq DNA连接酶,Tth DNA连接酶,或大肠杆菌DNA连接酶。

[0111] 本文中所述的方法中使用的DNA模板分子可以是单链的或双链的。优选地,DNA模板分子是双链的。DNA模板分子可以是天然的环状DNA分子。例如,DNA模板分子可以是(i)质粒,(ii)微环,(iii)黏粒,(iv)细菌人工染色体(bacterial artificial chromosome,BAC),或(v)分子倒置探针(molecular inversion probe,MIP)。DNA模板分子可以是酶促产生的环状DNA分子。例如,DNA模板分子可以是(i)从重组酶反应中获得的环状DNA分子,所述重组酶反应优选Cre重组酶反应,或(ii)从连接酶反应中获得的环状DNA分子,所述连接酶反应优选使用golden gate assembly。DNA模板分子可以是酶促产生的共价闭合的线性DNA分子。例如,DNA模板分子可以是(i)用TelN前端粒酶处理的DNA分子;或(ii)通过DNA末端与衔接子的连接所产生的DNA分子。DNA模板分子可包含双链的元件和单链的元件。例如,模板DNA分子可包含双链DNA和单链发夹环。

[0112] DNA模板分子可以是线性的。如果DNA模板分子是线性的,在扩增(例如滚环扩增)之前,可以将DNA模板分子环化以产生适合用于本文中所述的方法的DNA模板分子。

[0113] 模板DNA分子可包含盒。盒可以是哺乳动物表达盒。盒还可包含启动子。启动子可以是CMV启动子。盒还可包含增强子。盒还可包含报道基因,例如eGFP报道基因或萤光素酶报道基因。盒还可包含同聚序列。盒还可包含LoxP序列,优选两个LoxP序列。如果两个LoxP序列以相同的方向来定向,则两个LoxP序列之间的DNA序列经切除成为DNA的圆环。如果两个LoxP序列以相反的方向来定向,则两个LoxP序列之间的DNA序列被倒置。因此,优选地,两个LoxP序列在模板DNA分子中处于相同的定向(即相同的方向)。

[0114] DNA模板分子可在5'末端或3'末端处或者5'末端和3'末端两处包含同聚序列。在环化之前,可将同聚序列添加至DNA模板分子中。同聚序列可以是polyA、polyC、polyG或polyT序列。同聚序列的长度可以为3至200个核苷酸。同聚序列可用于促进线性DNA产物的纯化,在这种情况下,同聚序列的长度可以为4至12个核苷酸,或可以为5至10个核苷酸。同聚序列可用于提高mRNA表达,在这种情况下,同聚序列的长度可以为10至200个核苷酸,优

选地长度可以为80至150个核苷酸。同聚序列的长度可以为至少10个、至少20个、至少30个、至少40个、至少50个、至少60个、至少70个、至少80个、至少90个、至少100个、至少110个、至少120个、至少130个、至少140个、至少150个、至少160个、至少170个、至少180个、至少190个或至少200个核苷酸。优选地，同聚序列的长度为至少100个核苷酸。更加优选地，同聚序列的长度为至少120个核苷酸。例如，同聚序列可包含至少120个核苷酸的polyA序列。

[0115] 该方法还可包括(在扩增的步骤之后并且在使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触的步骤之前)热失活的步骤。因此，本发明提供了用于产生闭合的线性DNA产物的方法，该方法包括：

[0116] (a) 将包含至少一个可切割(例如内切核酸酶)靶序列的DNA模板分子进行扩增以产生双链DNA分子；

[0117] (b) 步骤(a)的反应的热失活；

[0118] (c) 使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积；以及

[0119] (d) 孵育单个连续水性体积以产生闭合的线性DNA产物，其中闭合的线性DNA产物包含线性双链区，其中线性双链区包含双链DNA分子的线性部分，并且其中线性双链区在第一末端处由第一衔接子分子闭合，以及在第二末端处由第二衔接子分子闭合。

[0120] 优选地，扩增是滚环扩增。

[0121] 热失活的步骤可在足以使扩增反应期间使用的试剂无活性的条件下进行。热失活的步骤可以在至少50°C、至少55°C、至少60°C、至少65°C、至少70°C、至少75°C、至少80°C、至少85°C、至少90°C、至少95°C或至少100°C的温度下进行。热失活的步骤可进行至少1分钟、至少3分钟、至少5分钟、至少10分钟、至少15分钟或至少20分钟。

[0122] 在本文中所述的方法中，在扩增的步骤之后，使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积的步骤可在不纯化扩增反应的产物的情况下进行。换言之，使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触的步骤可在扩增的步骤之后直接进行。使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触的步骤可在热失活的步骤之后直接进行。

[0123] 该方法还可包括，在孵育单个连续水性体积的步骤之后，纯化闭合的线性DNA产物的步骤。

[0124] 该方法还可包括，在孵育单个连续水性体积的步骤之后，核酸酶消化的步骤。核酸酶消化可以是外切核酸酶消化，例如外切核酸酶I和/或外切核酸酶III的消化。核酸酶消化的步骤可发生在纯化的步骤之前或之后。这个步骤允许去除在进行该方法的过程中没有使用过的任何双链DNA分子和/或衔接子分子。因此，方法可包括以下步骤：

[0125] (a) 将包含至少一个可切割(例如内切核酸酶)靶序列的DNA模板分子进行扩增以产生双链DNA分子；

[0126] (b) 使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积；

[0127] (c) 孵育单个连续水性体积以产生闭合的线性DNA产物，其中闭合的线性DNA产物包含线性双链区，其中线性双链区包含双链DNA分子的线性部分，并且其中线性双链区在第一末端处由第一衔接子分子闭合，以及在第二末端处由第二衔接子分子闭合；以及

[0128] (d) 用核酸酶(例如外切核酸酶)孵育单个连续水性体积。

[0129] 在本文中所述的方法中,在扩增的步骤之后,使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积的步骤可在不纯化扩增反应的产物的情况下进行。换言之,使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触的步骤可在扩增的步骤之后直接进行。使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触的步骤可在热失活的步骤之后直接进行。

[0130] 该方法可包括以下步骤:

[0131] (a) 将包含至少一个可切割(例如内切核酸酶)靶序列的DNA模板分子进行扩增以产生双链DNA分子;

[0132] (b) 使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积;

[0133] (c) 孵育单个连续水性体积以产生闭合的线性DNA产物,其中闭合的线性DNA产物包含线性双链区,其中线性双链区包含双链DNA分子的线性部分,并且其中线性双链区在第一末端处由第一衔接子分子闭合,以及在第二末端处由第二衔接子分子闭合;

[0134] (d) 纯化闭合的线性DNA产物;以及

[0135] (e) 用核酸酶(例如外切核酸酶)孵育步骤(d)的纯化产物。

[0136] 该方法可包括以下步骤:

[0137] (a) 将包含至少一个可切割(例如内切核酸酶)靶序列的DNA模板分子进行扩增以产生双链DNA分子;

[0138] (b) 步骤(a)的反应的热失活;

[0139] (c) 使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积;

[0140] (d) 孵育单个连续水性体积以产生闭合的线性DNA产物,其中闭合的线性DNA产物包含线性双链区,其中线性双链区包含双链DNA分子的线性部分,并且其中线性双链区在第一末端处由第一衔接子分子闭合,以及在第二末端处由第二衔接子分子闭合;

[0141] (e) 纯化闭合的线性DNA产物;以及

[0142] (f) 用核酸酶(例如外切核酸酶)孵育步骤(d)的纯化产物。

[0143] 该方法可包括以下步骤:

[0144] (a) 将包含至少一个可切割(例如内切核酸酶)靶序列的DNA模板分子进行扩增以产生双链DNA分子;

[0145] (b) 使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积;

[0146] (c) 孵育单个连续水性体积以产生闭合的线性DNA产物,其中闭合的线性DNA产物包含线性双链区,其中线性双链区包含双链DNA分子的线性部分,并且其中线性双链区在第一末端处由第一衔接子分子闭合,以及在第二末端处由第二衔接子分子闭合;

[0147] (d) 用核酸酶(例如外切核酸酶)孵育单个连续水性体积;以及

[0148] (e) 纯化闭合的线性DNA产物。

[0149] 该方法可包括以下步骤:

[0150] (a) 将包含至少一个可切割(例如内切核酸酶)靶序列的DNA模板分子进行扩增以

产生双链DNA分子；

[0151] (b) 步骤(a)的反应的热失活；

[0152] (c) 使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积；

[0153] (d) 孵育单个连续水性体积以产生闭合的线性DNA产物，其中闭合的线性DNA产物包含线性双链区，其中线性双链区包含双链DNA分子的线性部分，并且其中线性双链区在第一末端处由第一衔接子分子闭合，以及在第二末端处由第二衔接子分子闭合；

[0154] (e) 用核酸酶(例如外切核酸酶)孵育单个连续水性体积；以及

[0155] (f) 纯化闭合的线性DNA产物。

[0156] 用核酸酶孵育单个连续水性体积(或步骤(d)的纯化产物)的步骤可在5至90°C、10至80°C、15至70°C、20至60°C、25至50°C、30至45°C或35至40°C的温度下进行。用核酸酶孵育单个连续水性体积(或步骤(d)的纯化产物)的步骤可进行至少10、至少20、至少30、至少40、至少50、或至少60分钟。孵育单个连续水性体积(或步骤(d)的纯化产物)的步骤可在两个不同的温度下进行。例如，孵育单个连续水性体积(或步骤(d)的纯化产物)的步骤可在15°C至40°C下进行10至60分钟，然后在60°C至90°C的温度下进行10至30分钟。较高的温度通常会使核酸酶(例如外切核酸酶)失活。因此，该方法还提供了使核酸酶(例如外切核酸酶)失活的步骤。孵育单个连续水性体积(或步骤(d)的纯化产物)的步骤可在37°C下进行30分钟，以及在80°C下进行20分钟。优选地，使核酸酶(例如外切核酸酶)失活的步骤在70°C至80°C的温度下进行。使核酸酶(例如外切核酸酶)失活的步骤可进行至少1、至少5、至少10、至少20或至少30分钟。优选地，使核酸酶(例如外切核酸酶)失活的步骤进行至少5分钟。

[0157] 该方法可以是无细胞的方法。

[0158] 闭合的线性DNA产物可以是部分双链的和/或部分单链的。闭合的线性DNA产物可包含是双链的部分和是单链的部分。

[0159] 闭合的线性DNA产物可包含盒。盒可包含编码序列。该编码序列可编码目的基因，例如编码蛋白质的基因。盒可包含编码序列和启动子的至少一部分。盒可包含启动子和编码序列。盒可包含启动子、编码序列、核糖体结合位点和翻译终止序列。盒可另外包含辅助蛋白质表达的序列，例如不依赖帽的翻译元件。盒可包含(或编码)修复模板(或编辑模板)。修复模板(或编辑模板)可用于CRISPR-Cas介导的同源定向修复(homology directed repair, HDR)。盒可编码CRISPR指导RNA。盒可以是哺乳动物表达盒。启动子可以是CMV启动子。盒还可包含增强子。盒还可包含报道基因，例如eGFP报道基因或萤光素酶报道基因。盒还可包含同聚序列，例如polyA、polyC、polyT或polyG序列。同聚序列的长度可以为3至200个核苷酸。同聚序列可用于促进盒的纯化，在这种情况下，同聚序列的长度可以为4至12个核苷酸，或长度可以为5至10个核苷酸。同聚序列可用于提高mRNA表达，在这种情况下，同聚序列的长度可以为10至200个核苷酸，优选长度可以为80至150个核苷酸。同聚序列的长度可以为至少10个、至少20个、至少30个、至少40个、至少50个、至少60个、至少70个、至少80个、至少90个、至少100个、至少110个、至少120个、至少130个、至少140个、至少150个、至少160个、至少170个、至少180个、至少190个或至少200个核苷酸。例如，同聚序列可包含至少120个核苷酸的polyA序列。

[0160] 闭合的线性DNA产物可包含间隔区。间隔区可以是至少10个、至少20个、至少30个、

至少40个、至少50个、至少60个、至少70个、至少80个、至少90个、至少100个、至少125个、至少150个、至少175个或至少200个碱基对长。

[0161] 闭合的线性DNA产物可包含反向末端重复序列。

[0162] 闭合的线性DNA产物可以为至少50个、至少100个、至少250个、至少500个、至少1000个、至少2000个、至少3000个、至少4000个、至少5000个、至少6000个、至少7000个、至少8000个、至少9000个、至少10,000个、至少11,000个、至少12,000个、至少13,000个、至少14,000个、或至少15,000个碱基对长。优选地，闭合的线性DNA产物为至少50个碱基对长。

[0163] 双链DNA分子可以是环状的或分支的。

[0164] 双链DNA分子可不包含衔接子。双链DNA分子可不包含发夹、环或茎环结构。

[0165] 双链DNA分子可包含盒。盒可包含编码序列。该编码序列可编码目的基因，例如编码蛋白质的基因。盒可包含编码序列和启动子的至少一部分。盒可包含启动子和编码序列。盒可包含启动子、编码序列、核糖体结合位点和翻译终止序列。盒可另外包含辅助蛋白质表达的序列，例如不依赖帽的翻译元件。盒可包含(或编码)修复模板(或编辑模板)。修复模板(或编辑模板)可用于CRISPR-Cas介导的同源定向修复(HDR)。盒可编码CRISPR指导RNA。盒可以是哺乳动物表达盒。启动子可以是CMV启动子。盒还可包含增强子。盒还可包含报道基因，例如eGFP报道基因或萤光素酶报道基因。盒还可包含同聚序列，例如polyA、polyC、polyT或polyG序列。同聚序列的长度可以为3至200个核苷酸。同聚序列可用于促进盒的纯化，在这种情况下，同聚序列的长度可以为4至12个核苷酸，或长度可以为5至10个核苷酸。同聚序列可用于提高mRNA表达，在这种情况下，同聚序列的长度可以为10至200个核苷酸，优选长度可以为80至150个核苷酸。同聚序列的长度可以为至少10个、至少20个、至少30个、至少40个、至少50个、至少60个、至少70个、至少80个、至少90个、至少100个、至少110个、至少120个、至少130个、至少140个、至少150个、至少160个、至少170个、至少180个、至少190个或至少200个核苷酸。优选地，同聚序列的长度为至少100个核苷酸。更加优选地，同聚序列的长度为至少120个核苷酸。例如，同聚序列可包含至少120个核苷酸的polyA序列。

[0166] 双链DNA分子可包含间隔区。间隔区可以是至少10个、至少20个、至少30个、至少40个、至少50个、至少60个、至少70个、至少80个、至少90个、至少100个、至少125个、至少150个、至少175个或至少200个碱基对长。间隔区可提高双链DNA分子的扩增产率。

[0167] 双链DNA分子可以是至少50个、至少100个、至少250个、至少500个、至少1000个、至少2000个、至少3000个、至少4000个、至少5000个、至少6000个、至少7000个、至少8000个、至少9000个、至少10,000个、至少11,000个、至少12,000个、至少13,000个、至少14,000个或至少15,000个碱基对长。优选地，双链DNA分子为至少50个碱基对长。

[0168] 双链DNA分子可包含一个或更多个可切割的(例如内切核酸酶)靶序列。双链DNA分子可包含两个可切割的(例如内切核酸酶)靶序列。一个或更多个可切割的(例如内切核酸酶)靶序列可以是IIS型内切核酸酶靶序列。一个或更多个可切割的(例如内切核酸酶)靶序列可以是

[0169] BbsI, BsaI, BsmBI, BspQI, BtgZI, Esp3I, SapI, AarI, Acc36I, Ac1W1, AcuI, AjuI, AloI, Alw26I, AlwI, ArsI, AsuHPI, BaeI, BarI, BbvI, BccI, BceAI, BcgI, BciVI, BcoDI, BfuAI, BfuI, BmrI, BmsI, BmuI, BpiI, BpmI, BpuEI, BsaXI, Bse1I, Bse3DI, BseGI, BseMI, BseMII, BseNI, BseRI, BseXI, BsgI, Bs1FI, BsmAI, BsmFI, BsmI, Bso31I, BspCNI, BspMI,

BspPI, BspQI, BspTNI, BsrDI, BsrI, Bst6I, BstF5I, BstMAI, BstV1I, BstV2I, BsI, BtgZI, BtsCI, BtsI-v2, BtsMutI, BveI, CseI, CspCI, Eam1104I, EarI, EciI, Eco31I, Eco57I, Esp3I, FaqI, FauI, FokI, GsuI, HgaI, HphI, HpyAV, LguI, LmnI, Lsp1109I, LweI, MboII, MlyI, MmeI, MnII, Mva1269I, NmeAIII, PaqCI, PciSI, PctI, PleI, PpsI, PsrI, SchI, SfaNI, TaqII, TspDTI 和/或 TspGWI 鞣序列。

[0170] 双链DNA分子可以是扩增的产物。优选地，扩增是滚环扩增。

[0171] 线性双链区(例如双链分子的线性部分)可以是至少50个、至少100个、至少250个、至少500个、至少1000个、至少2000个、至少3000个、至少4000个、至少5000个、至少6000个、至少7000个、至少8000个、至少9000个、至少10,000个、至少11,000个、至少12,000个、至少13,000个、至少14,000个或至少15,000个碱基对长。优选地，双链DNA分子为至少50个碱基对长。

[0172] 线性双链区(例如双链分子的线性部分)可包含与双链DNA分子的序列具有至少40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%同一性的序列。

[0173] 线性双链区(例如双链分子的线性部分)的第一末端和第二末端可对核酸酶消化具有抗性。优选地，线性双链区的第一末端和第二末端对外切核酸酶消化具有抗性，核酸酶消化例如外切核酸酶III消化和/或外切核酸酶I消化。

[0174] 线性双链区可在第一和/或第二末端处包含3' -OH基团。3' -OH基团可促进与第一和/或第二衔接子分子(其可包含5' 磷酸)的连接。线性双链区可在第一和/或第二末端处包含5' 磷酸。5' 磷酸可促进与第一和/或第二衔接子分子(其可包含3' -OH基团)的连接。

[0175] 线性双链区(例如双链分子的线性部分)可包含突出端。例如，线性双链区可包含5' 突出端或3' 突出端。线性双链区可包含一个或更多个平端。线性双链区可包含：5' 突出端和平端，两个5' 突出端，3' 突出端和平端，两个3' 突出端，或者5' 突出端和3' 突出端。突出端可具有至少3个核苷酸(优选4至8个核苷酸)。突出端可以在线性双链区的有义链或反义链中。

[0176] 双链DNA分子的线性部分(例如双链分子的线性部分)可以为至少50个、至少100个、至少250个、至少500个、至少1000个、至少2000个、至少3000个、至少4000个、至少5000个、至少6000个、至少7000个、至少8000个、至少9000个、至少10,000个、至少11,000个、至少12,000个、至少13,000个、至少14,000个或至少15,000个碱基对长。优选地，双链DNA分子为至少50个碱基对长。

[0177] 第一衔接子分子和/或第二衔接子分子可以是合成的衔接子分子。

[0178] 第一衔接子分子可以是核酸衔接子分子。第二衔接子分子可以是核酸衔接子分子。第一衔接子分子和/或第二衔接子分子可包含产生环的自身互补的元件，例如发夹环或茎环。因此，第一衔接子分子可包含发夹或茎环。第二衔接子分子可包含发夹或茎环。第一和第二衔接子分子二者均可包含发夹或茎环。衔接子分子可各自包含双链部分，该双链部分含有有义链和反义链，其中有义链和反义链在发夹中连接在一起，使得有义链与反义链杂交。衔接子的双链部分可包含至少1个、至少2个、至少3个、至少4个或至少5个核苷酸的3' 突出端或5' 突出端。优选地，3' 突出端或5' 突出端是4至8个核苷酸。线性双链区(或双链DNA分子的线性部分)的各末端可包含3' 或5' 突出端。第一衔接子分子的一部分(例如突出端)

可与线性双链区的第一末端互补。第二衔接子分子的一部分可与线性双链区的第二末端互补。

[0179] 闭合的线性DNA产物可以是共价闭合的线性DNA产物。因此，在包含环(例如发夹)的衔接子分子的一些实施方案中，衔接子分子闭合线性双链区的末端，以形成共价闭合的线性DNA产物。

[0180] 本发明提供了用于产生共价闭合的线性DNA产物的方法，其中该方法包括：

[0181] (a) 使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积，其中第一和第二衔接子分子是各自包含发夹的核酸衔接子分子；以及

[0182] (b) 孵育单个连续水性体积以产生共价闭合的线性DNA产物，其中共价闭合的线性DNA产物包含线性双链区，其中线性双链区包含双链DNA分子的线性部分，其中线性双链区在第一末端处由第一衔接子分子闭合，以及在第二末端处由第二衔接子分子闭合，其中(i)第一衔接子分子包含与线性双链区的第一末端处的突出端互补并退火的突出端，从而闭合线性双链区的第一末端，以及(ii)第二衔接子分子包含与线性双链区第二末端处的突出端互补并退火的突出端，从而闭合线性双链区的第二末端。

[0183] 本发明提供了用于产生共价闭合的线性DNA产物的方法，其中该方法包括：

[0184] (a) 使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触，以形成单个连续水性体积，其中第一和第二衔接子分子是各自包含发夹的核酸衔接子分子；以及

[0185] (b) 孵育单个连续水性体积以产生共价闭合的线性DNA产物，其中共价闭合的线性DNA产物包含线性双链区，其中线性双链区包含双链DNA分子的线性部分，其中线性双链区在第一末端处由第一衔接子分子闭合，以及在第二末端处由第二衔接子分子闭合，其中(i)第一衔接子分子包含突出端，突出端与线性双链区第一末端处的突出端互补并退火，从而闭合线性双链区的第一末端，以及(ii)第二衔接子分子包含突出端，突出端与线性双链区第二末端处的突出端互补并退火，从而闭合线性双链区的第二末端，并且其中第一衔接子分子与线性双链区的第一末端连接，以及第二衔接子分子与线性双链区的第二末端连接。

[0186] 本发明提供了用于产生共价闭合的线性DNA产物的方法，其中该方法包括：

[0187] (a) 使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积，其中第一和第二衔接子分子是各自包含发夹的核酸衔接子分子；以及

[0188] (b) 孵育单个连续水性体积以产生共价闭合的线性DNA产物，其中共价闭合的线性DNA产物包含双链DNA分子的线性部分，其中双链DNA分子的线性部分在第一末端处由第一衔接子分子闭合，以及在第二末端处由第二衔接子分子闭合，其中(i)第一衔接子分子包含突出端，所述突出端与双链DNA分子的线性部分第一末端处的突出端互补并退火，从而闭合双链DNA分子的线性部分的第一末端，以及(ii)第二衔接子分子包含突出端，所述突出端与双链DNA分子的线性部分第二末端处的突出端互补并退火，从而闭合双链DNA分子的线性部分的第二末端，并且其中第一衔接子分子与双链DNA分子的线性部分的第一末端连接，以及第二衔接子分子与双链DNA分子的线性部分的第二末端连接。

[0189] 第一衔接子分子和/或第二衔接子分子可以不是质粒或载体DNA。

[0190] 第一衔接子分子和/或第二衔接子分子可包含单链部分。单链部分可形成发夹或茎环。因此，第一衔接子分子和/或第二衔接子分子可包含环部分。单链部分可包含少于10

个、9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个核苷酸。优选地，单链部分包含5个核苷酸。

[0191] 第一衔接子分子和/或第二衔接子分子可包含双链部分。双链部分可包含少于50个、少于45个、少于40个、少于35个、少于30个、少于25个、少于20个、少于15个或少于10个碱基对。双链部分可包含至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个或至少15个碱基对。

[0192] 第一衔接子分子和/或第二衔接子分子可包含5' 磷酸。5' 磷酸可促进与线性双链区(其可在第一和/或第二末端处包含3' -OH基团)的连接。第一衔接子分子和/或第二衔接子分子可包含3' -OH。3' -OH可促进与线性双链区(其可在第一和/或第二末端处包含5' 磷酸)的连接。

[0193] 第一衔接子分子和/或第二衔接子分子可包含SEQ ID NO:1的序列或SEQ ID NO:1序列的部分。第一衔接子分子和/或第二衔接子分子可包含SEQ ID NO:1的至少13个、至少14个、至少15个、至少16个、至少17个、至少18个或至少19个连续核苷酸。第一衔接子分子和/或第二衔接子分子的双链部分可包含SEQ ID NO:2的序列或SEQ ID NO:2序列的部分。第一衔接子分子和/或第二衔接子分子的双链部分可包含SEQ ID NO:2的至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个或至少15个连续核苷酸。第一衔接子分子和/或第二衔接子分子的单链部分可包含ACTCA的序列。第一衔接子分子和/或第二衔接子分子的单链部分可包含序列ACTCA的至少1个、至少2个、至少3个、至少4个或至少5个连续核苷酸。第一和第二衔接子分子可包含相同的核酸序列。第一和第二衔接子分子可包含不同的核酸序列。

[0194] 第一衔接子分子可包含与线性双链区(或双链DNA分子的线性部分)的第一末端互补的部分。第二衔接子分子可包含与线性双链区(或双链DNA分子的线性部分)的第二末端互补的部分。第一衔接子分子可包含与线性双链区(或双链DNA分子的线性部分)的第一末端退火的部分。第二衔接子分子可包含与线性双链区(或双链DNA分子的线性部分)的第二末端退火的部分。第一衔接子分子可包含与线性双链区(或双链DNA分子的线性部分)的第一末端互补并退火的部分。第二衔接子分子可包含与线性双链区(或双链DNA分子的线性部分)的第二末端互补并退火的部分。

[0195] 与线性双链区(或双链DNA分子的线性部分)的第一或第二末端互补或退火的部分可以是第一和/或第二衔接子分子的5' 突出端或3' 突出端。第一衔接子分子的突出端可与线性双链区的第一末端互补，并且/或者第二衔接子分子的突出端可与双链区的第二末端互补。第一衔接子分子的突出端可与线性双链区的第一末端退火，并且/或者第二衔接子分子的突出端可与线性双链区的第二末端退火。第一衔接子分子的突出端可与线性双链区的第一末端互补并退火，并且/或者第二衔接子分子的突出端可与线性双链区的第二末端互补并退火。

[0196] 第一衔接子分子和/或第二衔接子分子可不包含IIS型内切核酸酶靶序列。第一衔接子分子和/或第二衔接子分子可不包含

[0197] BbsI, BsaI, BsmBI, BspQI, BtgZI, Esp3I, SapI, AarI, Acc36I, Ac1W1, AcuI, AjuI, AloI, Alw26I, AlwI, ArsI, AsuHPI, BaeI, BarI, BbvI, BccI, BceAI, BcgI, BciVI, BcoDI, BfuAI, BfuI, BmrI, BmsI, BmuI, BpiI, BpmI, BpuEI, BsaXI, Bse1I, Bse3DI, BseGI, BseMI, BseMII, BseNI, BseRI, BseXI, BsgI, Bs1F1, BsmAI, BsmFI, BsmI, Bso31I, BspCNI, BspMI,

BspPI, BspQI, BspTNI, BsrDI, BsrI, Bst6I, BstF5I, BstMAI, BstV1I, BstV2I, BsI, BtgZI, BtsCI, BtsI-v2, BtsMutI, BveI, CseI, CspCl, Eam1104I, EarI, EciI, Eco31I, Eco57I, Esp3I, FaqI, FauI, FokI, GsuI, HgaI, HphI, HpyAV, LguI, LmnI, Lsp1109I, LweI, MboII, MlyI, MmeI, MnII, Mva1269I, NmeAIII, PaqCI, PciSI, PctI, PIeI, PpsI, PsrI, SchI, SfaNI, TaqII, TspDTI 和/或 TspGWI 靶序列。

[0198] 第一衔接子分子和/或第二衔接子分子可包含一个或更多个锁核酸 (locked nucleic acid, LNA)。

[0199] 第一衔接子分子和/或第二衔接子分子可包含一个或更多个受保护核苷酸 (即核酸酶抗性核苷酸), 例如硫代磷酸酯核苷酸。受保护核苷酸可位于单链部分 (例如发夹部分) 或双链部分。受保护核苷酸可位于衔接子分子的突出端部分。

[0200] 闭合的线性DNA产物在每条链中的内部位置处可包含多个硫代磷酸酯核苷酸。例如, 闭合的线性DNA产物在每条链中的内部位置处可包含至少2个、至少4个、至少6个、至少8个、至少10个、至少12个、至少14个、至少16个、至少18个、至少20个、至少30个、至少40个、至少50个、至少60个、至少70个、至少80个、至少90个、至少100个、至少125个、至少150个、至少175个、至少200个、至少250个、至少300个、至少350个、至少400个、至少450个或至少500个受保护核苷酸 (例如硫代磷酸酯核苷酸)。优选地, 闭合的线性DNA产物在每条链中的内部位置处包含至少2个受保护核苷酸 (例如硫代磷酸酯核苷酸)。

[0201] 内部位置可不位于闭合的线性DNA产物的第二个和倒数第二个核苷酸之间。

[0202] 线性双链区 (或双链分子的线性部分) 在每条链中的内部位置处可包含多个硫代磷酸酯核苷酸。例如, 线性双链区 (或双链分子的线性部分) 在每条链中的内部位置处可包含至少2个、至少4个、至少6个、至少8个、至少10个、至少12个、至少14个、至少16个、至少18个、至少20个、至少30个、至少40个、至少50个、至少60个、至少70个、至少80个、至少90个、至少100个、至少125个、至少150个、至少175个、至少200个、至少250个、至少300个、至少350个、至少400个、至少450个或至少500个受保护核苷酸 (例如硫代磷酸酯核苷酸)。优选地, 线性双链区 (或双链分子的线性部分) 在每条链中的内部位置处包含至少2个受保护核苷酸 (例如硫代磷酸酯核苷酸)。内部位置可不位于线性双链区 (或双链分子的线性部分) 的第二个和倒数第二个核苷酸之间。

[0203] 适合用于本文中所述的方法的对外切核酸酶消化具有抗性的核苷酸 (即受保护核苷酸) 可以是硫代磷酸酯核苷酸。例如, 硫代磷酸酯核苷酸可以是 α -S-dATP (即2' - 脱氧腺苷-5' - (α -硫代) - 三磷酸)、 α -S-dCTP (即2' - 脱氧胞苷-5' - (α -硫代) - 三磷酸)、 α -S-dGTP (即2' - 脱氧鸟苷-5' - (α -硫代) - 三磷酸)、 α -S-dTTP (即2' - 脱氧胸苷-5' - (α -硫代) - 三磷酸)、 α -S-dUTP (即2' - 脱氧尿苷-5' - (α -硫代) - 三磷酸) 和/或尿苷2',3' - 硫代环磷酸酯。

[0204] 硫代磷酸酯核苷酸可以是Sp-异构体、Rp-异构体或者Sp-异构体和Rp-异构体二者的混合物。

[0205] 对外切核酸酶消化具有抗性的核苷酸 (即受保护核苷酸) 可以是2' -0-甲基核苷酸或2' -0-甲氧基乙基 (MOE) 核苷酸。例如, MOE核苷酸可以是2' -0-甲氧基-乙基鸟苷、2' -0-甲氧基-乙基胞苷、2' -0-甲氧基-乙基腺苷和/或2' -0-甲氧基-乙基胸苷。

[0206] 线性双链区的第一末端可与第一衔接子分子的一部分互补。线性双链区的第二末端可与第二衔接子分子的一部分互补。线性双链区的第一末端和/或第二末端可通过内切

核酸酶消化来生成。

[0207] 第一衔接子分子和/或第二衔接子分子可包含功能部分。功能部分可以是结合分子、靶向序列或探针。

[0208] 功能部分可以是探针。本文中使用的术语“探针”是指可变长度(例如3至1000个碱基长)的DNA、RNA或DNA/RNA嵌合体的片段,其用于检测与探针中的序列互补的靶核苷酸序列的存在。通常来说,探针与这样的单链核酸杂交:所述单链核酸的碱基序列允许由于在探针与靶标之间的互补性引起的探针-靶标碱基配对。因此,功能部分可以是DNA序列、RNA序列或DNA/RNA嵌合体序列。本文中使用的术语“互补”是指根据沃森/克里克(Watson/Crick)配对规则的核苷酸序列的配对。例如,序列5'-GCGGTCCCA-3'的互补序列为5'-TGGGACCGC-3'。互补序列也可以是与DNA序列互补的RNA的序列。

[0209] 功能部分可以是结合分子。术语“结合分子”是指能够与本文中所述的线性DNA产物结合和/或能够与另外的分子或靶标结合的任何分子。结合分子可以是蛋白质、多肽或肽。结合分子可以是抗体,例如单克隆抗体或多克隆抗体。结合分子可以是抗体片段。

[0210] 功能部分可通过与捕获分子(例如,通过蛋白质-蛋白质相互作用结合的捕获抗体)结合来促进DNA产物的检测。功能部分可与细胞靶标(例如细胞受体)结合。

[0211] 功能部分可以是标签。“标签”可以是能够通过物理、化学和/或生物方法检测双链核酸分子的任何化学实体。标签可以是发色团、荧光团和/或放射性分子。

[0212] 功能部分可以是靶向序列。靶向序列可以是可变长度的DNA或RNA的片段,其用于将DNA产物靶向至细胞中的特定位置。凭借闭合的线性DNA产物的增强的核输入,靶向序列可用于提高非病毒基因递送的转染效率。例如,靶向序列可以是DNA核靶向序列(即针对内源DNA结合蛋白的识别序列),例如SV40增强子序列(优选在盒的下游)。

[0213] 为了促进DNA产物的检测和/或定量,功能部分可包含荧光团、放射性化合物或条码(barcode)。

[0214] 可使用条码测量与闭合的线性DNA产物的存在、不存在和/或水平相对应的信号。条码可包含至少一个与条码化部分连接的结合部分,其中条码化部分包含至少一个核苷酸(即其中条码化部分包含长度为至少一个核苷酸的核苷酸序列),并且其中结合部分能够与闭合的线性DNA产物的3'突出端、5'突出端或平端结合。结合部分能够与闭合的线性DNA产物的3'和/或5'末端结合。可以通过确定条码的条码化部分的存在、不存在和/或水平(例如,通过测序或PCR)来测量信号。条码化部分可包含至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个或至少10个核苷酸。条码可包含至少2个结合部分(例如,第一结合部分和第二结合部分)。例如,与第一条码化部分连接的第一结合部分可与闭合的线性DNA产物的3'末端结合,以及与第二条码化部分连接的第二结合部分可与闭合的线性DNA产物的5'末端结合。3'和5'末端可包括3'突出端、5'突出端或平端。

[0215] 可使用荧光团(即荧光标记的分子)测量与闭合的线性DNA产物的存在、不存在和/或水平相对应的信号,所述荧光团与闭合的线性DNA产物的3'突出端、5'突出端或平端连接或结合。该信号可以通过流式细胞术和/或荧光激活细胞分选来测量。

[0216] 功能部分也可促进DNA测序。例如,功能部分可以是测序衔接子。术语“测序衔接子”旨在涵盖一个或更多个核酸结构域,其包含目的测序平台所利用的核酸序列(或其互补序列)的至少一部分,所述目的测序平台例如由 Illumina®(例如HiSeq™、MiSeq™和/或

Genome AnalyzerTM测序系统)、Oxford NanoporeTM Technologies(例如MinION测序系统)、Ion TorrentTM(例如Ion PGMTM和/或Ion ProtonTM测序系统)、Pacific Biosciences(例如PACBIO RS II测序系统)、Life TechnologiesTM(例如SOLiD测序系统)、Roche(例如454GS FLX+和/或GS初级测序系统)提供的测序平台或任何其他目的测序平台。

[0217] 第一衔接子分子和/或第二衔接子分子可包含反向末端重复序列。第一衔接子分子和第二衔接子分子的反向末端重复序列可以是对称的(即相对于彼此具有相同的对称三维结构)或不对称的(即相对于彼此具有不同的三维结构)。第一衔接子分子和第二衔接子分子的反向末端重复序列可来自相同或不同的血清型。反向末端重复序列可包含末端解链位点和Rep结合位点。

[0218] 第一衔接子分子和/或第二衔接子分子可包含适配体。

[0219] 第一衔接子分子和/或第二衔接子分子可赋予核酸酶消化抗性,例如外切核酸酶消化(例如外切核酸酶I和/或外切核酸酶III消化)。

[0220] 线性双链区(或双链DNA分子的线性部分)在第一末端处的闭合可产生闭合的线性DNA产物的第一闭合末端。线性双链区(或双链DNA分子的线性部分)在第二末端处的闭合可产生闭合的线性DNA产物的第二闭合末端。闭合的线性DNA产物的第一闭合末端和第二闭合末端可对核酸酶消化具有抗性。核酸酶消化可以是外切核酸酶消化。优选地,核酸酶消化是外切核酸酶III消化和/或外切核酸酶I消化。

[0221] 2. 用于产生包含核酸酶抗性核苷酸的线性DNA产物的方法

[0222] 本文中所述的方法可用于产生包含核酸酶抗性(即受保护核苷酸)的线性DNA产物。

[0223] 本发明提供了用于产生线性脱氧核糖核酸(DNA)产物的方法,其中该方法包括:

[0224] (a) 使双链DNA分子与内切核酸酶以及第一和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积;以及

[0225] (b) 孵育单个连续水性体积以产生线性DNA产物,其中线性DNA产物包含线性双链区,其中线性双链区包含双链DNA分子的线性部分,并且其中第一衔接子分子附加至线性双链区的第一末端,以及第二衔接子分子附加至线性双链区的第二末端,并且其中第一和第二衔接子分子是包含一个或更多个核酸酶抗性核苷酸(即受保护核苷酸)的核酸分子。

[0226] 双链DNA分子与内切核酸酶以及第一和第二衔接子分子接触的步骤优选地在存在连接酶的情况下进行。因此,用于产生线性DNA产物的方法可包括以下步骤:

[0227] (a) 使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积;以及

[0228] (b) 孵育单个连续水性体积以产生线性DNA产物,其中线性DNA产物包含线性双链区,其中线性双链区包含双链DNA分子的线性部分,并且其中第一衔接子分子附加至线性双链区的第一末端,以及第二衔接子分子附加至线性双链区的第二末端,并且其中第一和第二衔接子分子是包含一个或更多个核酸酶抗性核苷酸(即受保护核苷酸)的核酸分子。

[0229] 通过本文中所述的方法产生的线性DNA产物具有增强的对核酸酶(例如外切核酸酶)消化的抗性。例如,当与不含受保护核苷酸的线性DNA产物相比时,线性DNA产物具有延长的体内表达。

[0230] 第一衔接子分子和/或第二衔接子分子的附加可通过衔接子分子与线性双链区末

端的杂交或连接来进行。因此,第一衔接子分子可与线性双链区的第一末端杂交。第二衔接子分子可与线性双链区的第二末端杂交。第一衔接子分子可与线性双链区的第一末端连接。第二衔接子分子可与线性双链区的第二末端连接。第一衔接子分子和第二衔接子分子的附加可通过衔接子分子与线性双链区末端的杂交和连接二者来进行。因此,第一衔接子分子可与线性双链区的第一末端杂交和连接。第二衔接子分子可与线性双链区的第二末端杂交和连接。杂交基于第一和/或第二衔接子分子的一部分与线性双链区的第一和/或第二末端的互补性。

[0231] 用于产生线性DNA产物的方法可包括以下步骤:

[0232] (a) 使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积;以及

[0233] (b) 孵育单个连续水性体积以产生线性DNA产物,其中线性DNA产物包含线性双链区,其中线性双链区包含双链DNA分子的线性部分,并且其中第一衔接子分子与线性双链区的第一末端连接,以及第二衔接子分子与线性双链区的第二末端连接,并且其中第一和第二衔接子分子是包含一个或更多个核酸酶抗性核苷酸(即受保护核苷酸)的核酸分子。

[0234] 用于产生线性DNA产物的方法可包括以下步骤:

[0235] (a) 使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积;以及

[0236] (b) 孵育单个连续水性体积以产生线性DNA产物,其中线性DNA产物包含双链DNA分子的线性部分,并且其中第一衔接子分子与双链DNA分子的线性部分的第一末端连接,以及第二衔接子分子与双链DNA分子的线性部分的第二末端连接,并且其中第一和第二衔接子分子是包含一个或更多个核酸酶抗性核苷酸(即受保护核苷酸)的核酸分子。

[0237] 本文中使用的术语“互补”是指根据沃森/克里克配对规则的核苷酸序列的配对。例如,序列5' -GCGGTCCCA-3' 的互补序列为5' -TGGGACCGC-3'。互补序列也可以是与DNA序列互补的RNA的序列。

[0238] 优选地,使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触的步骤在单个反应中进行(即单个步骤)。

[0239] 孵育单个连续水性体积以产生线性DNA产物的步骤可包括通过用内切核酸酶消化双链DNA分子来产生双链DNA分子的线性部分。

[0240] 可在促进第一和第二衔接子分子附加(或连接)至线性双链区的条件下,进行孵育单个连续水性体积的步骤,以产生线性DNA产物。可通过在第一和/或第二衔接子分子与线性双链区(或双链DNA分子的线性部分)的末端之间建立共价连接来进行附加。

[0241] 可在促进双链DNA分子的消化的条件下,进行孵育单个连续水性体积的步骤,以产生双链DNA分子的线性部分。产生双链DNA分子的线性部分的双链DNA分子的消化可在1°C至100°C、1°C至80°C、5°C至70°C、10°C至60°C、15°C至55°C、20°C至50°C、25°C至45°C、30°C至40°C、35°C至39°C、36°C至38°C或在约37°C的第一温度下进行。消化可以是内切核酸酶消化,优选IIS型内切核酸酶消化。

[0242] 孵育单个连续水性体积的步骤可在促进线性双链区与第一和第二衔接子分子连接的条件下进行。连接可以是至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少

80%、至少82%、至少85%、至少90%或至少95%有效的。例如,可将至少5%、至少10%、至少15、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40、至少45%、至少50%、至少55%、至少60、至少65、至少70%、至少75、至少80%、至少82%、至少85%、至少90%或至少95%的线性双链区(或双链DNA分子的部分)并入到闭合的线性DNA产物中。优选地,连接为至少15%有效的。

[0243] 线性双链区与第一和第二衔接子分子连接的步骤可在1°C至90°C、2°C至70°C、5°C至60°C、8°C至55°C、9°C至50°C、10°C至45°C、11°C至40°C、12°C至37°C、13°C至30°C、14°C至25°C、15°C至20°C或在约16°C的第二温度下进行。

[0244] 孵育单个连续水性体积的步骤可包括在第一温度下孵育,并随后在第二温度下孵育。第一温度可以是1°C至100°C、1°C至80°C、5°C至70°C、10°C至60°C、15°C至55°C、20°C至50°C、25°C至45°C、30°C至40°C、35°C至39°C、36°C至38°C、或约37°C。第二温度可以是1°C至90°C、2°C至70°C、5°C至60°C、8°C至55°C、9°C至50°C、10°C至45°C、11°C至40°C、12°C至37°C、13°C至30°C、14°C至25°C、15°C至20°C或在约16°C下。优选地,第一温度是35°C至39°C。优选地,第二温度是14°C至18°C。

[0245] 孵育单个连续水性体积的步骤可包括在第一温度和第二温度之间循环。孵育单个连续水性体积的步骤可包括在第一温度和第二温度之间循环至少2次、至少3次、至少4次、至少5次、至少6次、至少7次、至少8次、至少9次、至少10次、至少15次、至少20次、至少25次、至少30次、至少35次、至少40次、至少45次、至少50次、至少55次、至少60次、至少65次、至少70次、至少80次、至少90次或至少100次,优选至少20次。孵育单个连续水性体积的步骤可包括在第一温度和第二温度之间循环少于40次、少于35次、少于30次、少于29次、少于25次。孵育单个连续水性体积的步骤可包括在第一温度和第二温度之间循环2至100次、5至80次、10至70次、20至60次、或30至60次。孵育单个连续水性体积的步骤可包括在第一温度和第二温度之间循环2至20次、5至29次、61至100次、或65至80次。

[0246] 孵育单个连续水性体积的步骤可等温进行。孵育单个连续水性体积的步骤可包括在恒定温度下孵育。恒定温度促进双链DNA分子的同时消化以产生双链DNA分子的线性部分,并且促进线性双链区与第一和第二衔接子分子的连接。例如,恒定温度可以是20°C、21°C、22°C、23°C、24°C、25°C、26°C、27°C、28°C、29°C、30°C、31°C、32°C、33°C、34°C、35°C、36°C、37°C、38°C、39°C或40°C。优选地,恒定温度是30°C。恒定温度旨在意指在反应期间温度没有显著变化。恒定温度旨在意指,在孵育单个连续水性体积的步骤期间,温度变化小于10°C、小于9°C、小于8°C、小于7°C、小于6°C、小于5°C、小于4°C、小于3°C、小于2°C、或小于1°C。在一个优选实施方案中,在孵育单个连续水性的步骤期间温度偏差不超过5°C,优选不超过3°C,甚至更优选不超过1°C。因此,恒定温度可以是在20°C至30°C、22°C至32°C、24°C至34°C、26°C至36°C、28°C至38°C、30°C至40°C、22°C至28°C、32°C至38°C、25°C至35°C、26°C至34°C、27°C至33°C、27.5°C至32.5°C、28°C至32°C、28.5°C至31.5°C、29°C至31°C、或29.5°C至30.5°C范围内的温度。优选地,恒定温度是在27.5°C至32.5°C范围内的温度。或者,恒定温度可以是在32°C至42°C、33°C至41°C、34°C至40°C、35°C至39°C、36°C至38°C的范围内的温度。优选地,恒定温度是在34.5°C至39.5°C范围内的温度。

[0247] 第一和第二衔接子分子可包含一个或更多个硫代磷酸酯核苷酸,使得一旦将衔接子分子附加(例如连接)至线性双链区,则线性DNA产物对核酸酶消化具有抗性或对核酸酶

消化具有改善或增强的抗性。线性DNA产物可对3'末端外切核酸酶消化(例如通过外切核酸酶III)和/或5'末端外切核酸酶消化(例如通过外切核酸酶VIII)具有抗性。

[0248] 衔接子分子可包含多个硫代磷酸酯核苷酸。例如,衔接子分子在每条链中可包含至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个或至少16个硫代磷酸酯核苷酸。

[0249] 衔接子分子可以是核酸衔接子分子。衔接子分子可以是双链的。衔接子分子可包含是双链的部分。

[0250] 第一和/或第二衔接子分子可包含至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个或至少16个碱基对。

[0251] 衔接子分子在每条链中可包含多个硫代磷酸酯核苷酸。例如,衔接子分子在每条链中可包含至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个或至少16个硫代磷酸酯核苷酸。

[0252] 衔接子分子可在每条链中的内部位置处包含多个硫代磷酸酯核苷酸。例如,衔接子分子可在每条链中的内部位置处包含至少1个、至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个或至少16个硫代磷酸酯核苷酸。优选地,衔接子分子在每条链中的内部位置处包含至少2个硫代磷酸酯核苷酸。

[0253] 内部位置可不位于衔接子分子的第二个和倒数第二个核苷酸之间。内部位置可以是衔接子分子中除了在每条链的末端处最后的核苷酸以外的任何位置。

[0254] 衔接子分子可包含至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少100%的受保护核苷酸。

[0255] 一旦将衔接子分子附加至线性双链区,则线性DNA产物在一条或两条链的5'末端(或5'末端区)处可包含受保护核苷酸(例如,硫代磷酸酯核苷酸)。优选地,线性DNA产物在一条或两条链的5'末端(或5'末端区)处包含硫代磷酸酯核苷酸。线性DNA产物可在一条或两条链的5'末端(或5'末端区)处包含硫代磷酸酯核苷酸。由于大多数外切核酸酶,例如外切核酸酶III,从多核苷酸链的3'末端去除核苷酸,线性DNA产物可在一条或两条链的3'末端(或3'末端区)处包含受保护核苷酸。优选地,线性DNA产物在一条或两条链的3'末端(或3'末端区)处包含硫代磷酸酯核苷酸。线性DNA产物可在一条或两条链的3'末端(或3'末端区)处包含至少一个硫代磷酸酯核苷酸,并且在5'末端(或5'末端区)处包含至少一个硫代磷酸酯核苷酸。线性DNA产物可在一条或两条链的3'末端(或3'末端区)和5'末端(或5'末端区)处包含硫代磷酸酯核苷酸。

[0256] 线性DNA产物在每条链中的内部位置处可另外包含多个受保护核苷酸(例如,硫代磷酸酯核苷酸)。例如,线性DNA产物可在每条链中的内部位置处包含至少2个、至少4个、至少6个、至少8个、至少10个、至少12个、至少14个、至少16个、至少18个、至少20个、至少30个、至少40个、至少50个、至少60个、至少70个、至少80个、至少90个、至少100个、至少125个、至少150个、至少175个、至少200个、至少250个、至少300个、至少350个、至少400个、至少450个或至少500个受保护核苷酸(例如硫代磷酸酯核苷酸)。优选地,线性DNA产物在每条链中的

内部位置处包含至少2个受保护核苷酸(例如硫代磷酸酯核苷酸)。

[0257] 内部位置可不位于线性DNA产物的第二个和倒数第二个核苷酸之间。内部位置可以是衔接子分子中除了每条链的末端处最后的核苷酸以外的任何位置。

[0258] 线性双链区(或双链分子的线性部分)可在每条链中的内部位置处包含多个硫代磷酸酯核苷酸。例如,线性双链区(或双链分子的线性部分)可在每条链中的内部位置处包含至少2个、至少4个、至少6个、至少8个、至少10个、至少12个、至少14个、至少16个、至少18个、至少20个、至少30个、至少40个、至少50个、至少60个、至少70个、至少80个、至少90个、至少100个、至少125个、至少150个、至少175个、至少200个、至少250个、至少300个、至少350个、至少400个、至少450个或至少500个受保护核苷酸(例如硫代磷酸酯核苷酸)。优选地,线性双链区(或双链分子的线性部分)在每条链中的内部位置处包含至少2个受保护核苷酸(例如硫代磷酸酯核苷酸)。内部位置可不位于线性双链区(或双链分子的线性部分)的第二个和倒数第二个核苷酸之间。

[0259] 对外切核酸酶消化具有抗性的核苷酸(即受保护核苷酸)可以是至少一种类型的硫代磷酸酯核苷酸。例如,至少一种类型的硫代磷酸酯核苷酸是 α -S-dATP(即2' -脱氧腺昔-5' -(α -硫代)-三磷酸)、 α -S-dCTP(即2' -脱氧胞昔-5' -(α -硫代)-三磷酸)、 α -S-dGTP(即2' -脱氧鸟昔-5' -(α -硫代)-三磷酸)、 α -S-dTTP(即2' -脱氧胸昔-5' -(α -硫代)-三磷酸)、 α -S-dUTP(即2' -脱氧尿昔-5' -(α -硫代)-三磷酸)和/或尿昔2',3' -硫代环磷酸酯。

[0260] 衔接子分子可包含至少两种类型的硫代磷酸酯核苷酸。例如,至少两种类型的硫代磷酸酯核苷酸是: α -S-dATP和 α -S-dCTP、 α -S-dATP和 α -S-dGTP、 α -S-dATP和 α -S-dTTP、 α -S-dCTP和 α -S-dGTP、 α -S-dCTP和 α -S-dTTP、或者 α -S-dGTP和 α -S-dTTP。

[0261] 衔接子分子可包含至少三种类型的硫代磷酸酯核苷酸。例如,至少三种类型的硫代磷酸酯核苷酸是:

- [0262] (a) α -S-dATP、 α -S-dCTP和 α -S-dGTP;
- [0263] (b) α -S-dATP、 α -S-dCTP和 α -S-dTTP;
- [0264] (c) α -S-dATP、 α -S-dGTP和 α -S-dTTP;或者
- [0265] (d) α -S-dCTP、 α -S-dGTP和 α -S-dTTP。

[0266] 衔接子分子可包含至少四种类型的硫代磷酸酯核苷酸。例如,至少四种类型的受保护核苷酸是 α -S-dATP、 α -S-dCTP、 α -S-dGTP和 α -S-dTTP。

[0267] 硫代磷酸酯核苷酸可以是Sp-异构体、Rp-异构体或者Sp-异构体和Rp-异构体二者的混合物。

[0268] 对外切核酸酶消化具有抗性的核苷酸(即受保护核苷酸)可以是至少一种类型或者至少两种、三种或四种类型的MOE核苷酸。例如,MOE核苷酸可以是2' -0-甲氧基-乙基鸟昔、2' -0-甲氧基-乙基胞昔、2' -0-甲氧基-乙基腺昔和/或2' -0-甲氧基-乙基胸昔。

[0269] 该方法还可包括,在步骤(a)(即,使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触的步骤)之前,扩增DNA模板分子以产生双链DNA分子的步骤。因此,本发明提供了用于产生线性DNA产物的方法,该方法包括:

[0270] (a) 将包含至少一个可切割(例如内切核酸酶)靶序列的DNA模板分子进行扩增以产生双链DNA分子;

[0271] (b) 使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触以形成

单个连续水性体积;以及

[0272] (c) 孵育单个连续水性体积以产生线性DNA产物,其中线性DNA产物包含线性双链区,其中线性双链区包含双链DNA分子的线性部分,并且其中第一衔接子分子附加至线性双链区的第一末端,以及第二衔接子分子附加至线性双链区的第二末端,并且其中第一和第二衔接子分子是包含一个或更多个核酸酶抗性核苷酸(即受保护核苷酸)的核酸分子。

[0273] 扩增的步骤可通过体外或体内扩增来进行。优选地,扩增的步骤通过体外扩增来进行。例如,扩增的步骤可通过滚环扩增(RCA)、MALBAC方法、传统的聚合酶链反应(PCR)、基于核酸序列的扩增(NASBA)、环介导等温扩增(LAMP)、解旋酶依赖性扩增(HDA)、多重置换扩增(MDA)和重组酶聚合酶扩增(RPA)来进行。优选地,通过滚环扩增来进行扩增的步骤。因此,本发明提供了用于产生线性DNA产物的方法,该方法包括:

[0274] (a) 将包含至少一个可切割(例如内切核酸酶)靶序列的DNA模板分子进行扩增以产生双链DNA分子,其中所述DNA模板分子通过滚环扩增来扩增;

[0275] (b) 使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积;以及

[0276] (c) 孵育单个连续水性体积以产生线性DNA产物,其中线性DNA产物包含线性双链区,其中线性双链区包含双链DNA分子的线性部分,并且其中第一衔接子分子附加至线性双链区的第一末端,以及第二衔接子分子附加至线性双链区的第二末端,并且其中第一和第二衔接子分子是包含一个或更多个核酸酶抗性核苷酸(即受保护核苷酸)的核酸分子。

[0277] 滚环扩增可在没有任何引物的情况下,或存在一种引物或多种引物的情况下进行。例如,引物可以是合成的引物。引物可以是随机引物。滚环扩增可在存在引发酶的情况下进行。引发酶可以是TthPrimPol。优选地,如果滚环扩增在没有任何引物的情况下进行,则其是在存在引发酶(例如TthPrimPol)的情况下进行的。类似地,如果在扩增反应期间使用引物,则不使用引发酶。双链DNA产物可使用合适的核酸聚合酶,例如Phi29DNA聚合酶,在等温条件下通过体外的滚环扩增来产生。

[0278] 在本文中所述的方法中,DNA模板分子可包含至少一个可切割的靶序列。可切割的靶序列可以是内切核酸酶靶序列。因此,DNA模板分子可包含至少一个内切核酸酶靶序列。优选地,DNA模板分子包含至少两个内切核酸酶靶序列。内切核酸酶靶序列可以是相同的或不同的。优选地,至少一个内切核酸酶靶序列是限制性内切核酸酶靶序列。不同的限制性内切核酸酶靶序列是技术人员已知的。可切割靶序列可以是IIS型限制性内切核酸酶靶序列。例如,限制性内切核酸酶靶序列可以是:

[0279] BbsI, BsaI, BsmBI, BspQI, BtgZI, Esp3I, SapI, AarI, Acc36I, Ac1WI, AcuI, AjuI, A1oI, A1w26I, A1wI, ArsI, AsuHPI, BaeI, BarI, BbvI, BccI, BceAI, BcgI, BciVI, BcoDI, BfuAI, BfuI, BmrI, BmsI, BmuI, BpiI, BpmI, BpuEI, BsaXI, Bse1I, Bse3DI, BseGI, BseMI, BseMII, BseNI, BseRI, BseXI, BsgI, BslFI, BsmAI, BsmFI, BsmI, Bso31I, BspCNI, BspMI, BspPI, BspQI, BspTNI, BsrDI, BsrI, Bst6I, BstF5I, BstMAI, BstV1I, BstV2I, BsuI, BtgZI, BtsCI, BtsI-v2, BtsMutI, BveI, CseI, CspCI, Eam1104I, EarI, EciI, Eco31I, Eco57I, Esp3I, FaqI, FauI, FokI, GsuI, HgaI, HphI, HpyAV, LguI, LmnI, Lsp1109I, LweI, MbosI, MlyI, MmeI, MnII, Mva1269I, NmeAIII, PaqCI, PciSI, PctI, PIeI, PpsI, PsrI, SchI, SfaNI, TaqII, TspDTI 和/或TspGWI靶序列。至少一个可切割序列(例如内切核酸酶靶序列)可以是天然可切割序

列(即模板分子中存在的可切割序列)。或者,至少一个可切割序列(例如内切核酸酶靶序列)可在产生线性DNA产物之前引入至DNA模板分子。

[0280] 内切核酸酶可以是限制酶内切核酸酶。内切核酸酶可以是IIS型限制酶。内切核酸酶可以是识别DNA序列并在识别序列的外部切割的任意酶。例如,内切核酸酶可以是:

[0281] BbsI, BsaI, BsmBI, BspQI, BtgZI, Esp3I, SapI, AarI, Acc36I, AclWI, AcuI, AjuI, AIoI, A1w26I, A1wI, ArsI, AsuHPI, BaeI, BarI, BbvI, BccI, BceAI, BcgI, BciVI, BcoDI, BfuAI, BfuI, BmrI, BmsI, BmuI, BpiI, BpmI, BpuEI, BsaXI, Bse1I, Bse3DI, BseGI, BseMI, BseMII, BseNI, BseRI, BseXI, BsgI, Bs1FI, BsmAI, BsmFI, BsmI, Bso31I, BspCNI, BspMI, BspPI, BspQI, BspTNI, BsrDI, BsrI, Bst6I, BstF5I, BstMAI, BstV1I, BstV2I, BsI, BtgZI, BtsCI, BtsI-v2, BtsMutI, BveI, CseI, CspCI, Eam1104I, EarI, EciI, Eco31I, Eco57I, Esp3I, FaqI, FauI, FokI, GsuI, HgaI, HphI, HpyAV, LguI, LmnI, Lsp1109I, LweI, MboII, MlyI, MmeI, MnII, Mva1269I, NmeAIII, PaqCI, PciSI, PctI, PleI, PpsI, PsrI, SchI, SfaNI, TaqII, TspDTI 和/或TspGWI限制酶。

[0282] 连接酶可以是DNA连接酶,例如T4 DNA连接酶,T7 DNA连接酶,哺乳动物DNA连接酶I、III和IV,Taq DNA连接酶,Tth DNA连接酶,或大肠杆菌DNA连接酶。

[0283] 本文中所述的方法中使用的DNA模板分子可以是单链的或双链的。优选地,DNA模板分子是双链的。DNA模板分子可以是天然的环状DNA分子。例如,DNA模板分子可以是(i)质粒,(ii)微环,(iii)黏粒,(iv)细菌人工染色体(BAC),或(v)分子倒置探针(MIP)。DNA模板分子可以是酶促产生的环状DNA分子。例如,DNA模板分子可以是(i)从重组酶反应中获得的环状DNA分子,所述重组酶反应优选Cre重组酶反应,或(ii)从连接酶反应中获得的环状DNA分子,所述连接酶反应优选使用golden gate assembly。DNA模板分子可以是酶促产生的共价闭合的线性DNA分子。例如,DNA模板分子可以是(i)用TelN前端粒酶处理的DNA分子;或(ii)通过DNA末端与衔接子的连接所产生的DNA分子。DNA模板分子可包含双链的元件和单链的元件。例如,模板DNA分子可包含双链DNA和单链发夹环。

[0284] DNA模板分子可以是线性的。如果DNA模板分子是线性的,在扩增(例如滚环扩增)之前,可以将DNA模板分子环化以产生适合用于本文中所述的方法的DNA模板分子。

[0285] 模板DNA分子可包含盒。盒可以是哺乳动物表达盒。盒还可包含启动子。启动子可以是CMV启动子。盒还可包含增强子。盒还可包含报道基因,例如eGFP报道基因或萤光素酶报道基因。盒还可包含同聚序列。盒还可包含LoxP序列,优选两个LoxP序列。如果两个LoxP序列以相同的方向来定向,则两个LoxP序列之间的DNA序列经切除成为DNA的圆环。如果两个LoxP序列以相反的方向来定向,则两个LoxP序列之间的DNA序列被倒置。因此,优选地,两个LoxP序列在模板DNA分子中处于相同的定向。

[0286] DNA模板分子可在5'末端或3'末端处或者5'末端和3'末端两处包含同聚序列。在环化之前,可将同聚序列添加至DNA模板分子中。同聚序列可以是polyA、polyC、polyG或polyT序列。同聚序列的长度可以为3至200个核苷酸。同聚序列可用于促进线性DNA产物的纯化,在这种情况下,同聚序列的长度可以为4至12个核苷酸,或可以为5至10个核苷酸。同聚序列可用于提高mRNA表达,在这种情况下,同聚序列的长度可以为10至200个核苷酸,优选地长度可以为80至150个核苷酸。同聚序列的长度可以为至少10个、至少20个、至少30个、至少40个、至少50个、至少60个、至少70个、至少80个、至少90个、至少100个、至少110个、至

少120个、至少130个、至少140个、至少150个、至少160个、至少170个、至少180个、至少190个或至少200个核苷酸。优选地，同聚序列的长度为至少100个核苷酸。更加优选地，同聚序列的长度为至少120个核苷酸。例如，同聚序列可包含至少120个核苷酸的polyA序列。

[0287] 该方法还可包括，在孵育单个连续水性体积的步骤之后，纯化线性DNA产物的步骤。

[0288] 该方法还可包括，在孵育单个连续水性体积的步骤之后，核酸酶消化的步骤。核酸酶消化可以是外切核酸酶消化，例如外切核酸酶I和/或外切核酸酶III消化。核酸酶消化的步骤可以发生在纯化的步骤之前或之后。这个步骤允许去除在进行该方法的过程中没有使用过的任何双链DNA分子和/或衔接子分子。因此，该方法可包括以下步骤：

[0289] (a) 将包含至少一个可切割(例如内切核酸酶)靶序列的DNA模板分子进行扩增以产生双链DNA分子；

[0290] (b) 使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积；

[0291] (c) 孵育单个连续水性体积以产生线性DNA产物，其中线性DNA产物包含线性双链区，其中线性双链区包含双链DNA分子的线性部分，并且其中第一衔接子分子附加至线性双链区的第一末端，以及第二衔接子分子附加至线性双链区的第二末端，并且其中第一和第二衔接子分子是包含一个或更多个核酸酶抗性核苷酸(即受保护核苷酸)的核酸分子；以及

[0292] (d) 用核酸酶(例如外切核酸酶)孵育单个连续水性体积。

[0293] 该方法可包括以下步骤：

[0294] (a) 将包含至少一个可切割(例如内切核酸酶)靶序列的DNA模板分子进行扩增以产生双链DNA分子；

[0295] (b) 使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积；

[0296] (c) 孵育单个连续水性体积以产生线性DNA产物，其中线性DNA产物包含线性双链区，其中线性双链区包含双链DNA分子的线性部分，并且其中第一衔接子分子附加至线性双链区的第一末端，以及第二衔接子分子附加至线性双链区的第二末端，并且其中第一和第二衔接子分子是包含一个或更多个核酸酶抗性核苷酸(即受保护核苷酸)的核酸分子；

[0297] (d) 纯化闭合的线性DNA产物；以及

[0298] (e) 用核酸酶(例如外切核酸酶)孵育步骤(d)的纯化产物。

[0299] 该方法可包括以下步骤：

[0300] (a) 将包含至少一个可切割(例如内切核酸酶)靶序列的DNA模板分子进行扩增以产生双链DNA分子；

[0301] (b) 使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积；

[0302] (c) 孵育单个连续水性体积以产生线性DNA产物，其中线性DNA产物包含线性双链区，其中线性双链区包含双链DNA分子的线性部分，并且其中第一衔接子分子附加至线性双链区的第一末端，以及第二衔接子分子附加至线性双链区的第二末端，并且其中第一和第二衔接子分子是包含一个或更多个核酸酶抗性核苷酸(即受保护核苷酸)的核酸分子；

[0303] (d) 用核酸酶(例如外切核酸酶)孵育单个连续水性体积；以及

[0304] (e) 纯化闭合的线性DNA产物。

[0305] 用核酸酶孵育单个连续水性体积(或步骤(d)的纯化产物)的步骤可在5°C至90°C、10°C至80°C、15°C至70°C、20°C至60°C、25°C至50°C、30°C至45°C、或35°C至40°C的温度下进行。用核酸酶孵育单个连续水性体积(或步骤(d)的纯化产物)的步骤可进行至少10、至少20、至少30、至少40、至少50或至少60分钟。孵育单个连续水性体积(或步骤(d)的纯化产物)的步骤可在两个不同的温度下进行。例如,孵育单个连续水性体积(或步骤(d)的纯化产物)的步骤可在15°C至40°C下进行10至60分钟,然后在60°C至90°C的温度下进行10至30分钟。较高的温度通常会使核酸酶(例如外切核酸酶)失活。因此,该方法还提供了使核酸酶(例如外切核酸酶)失活的步骤。孵育单个连续水性体积(或步骤(d)的纯化产物)的步骤可在37°C下进行30分钟,以及在80°C下进行20分钟。优选地,使核酸酶(例如外切核酸酶)失活的步骤在70°C至80°C的温度下进行。使核酸酶(例如外切核酸酶)失活的步骤可进行至少1、至少5、至少10、至少20或至少30分钟。优选地,使核酸酶(例如外切核酸酶)失活的步骤进行至少5分钟。

[0306] 第一衔接子分子和/或第二衔接子分子可包含突出端。线性双链区的末端可包含3'或5'突出端。第一衔接子分子的一部分(例如突出端)可与线性双链区的第一末端互补。第二衔接子分子的一部分可与线性双链区的第二末端互补。

[0307] 线性双链区的第一末端和第二末端可对核酸酶消化具有抗性。优选地,线性双链区的第一末端和第二末端对外切核酸酶消化具有抗性,例如外切核酸酶III消化和/或外切核酸酶I消化。

[0308] 线性DNA产物可以是部分双链的和/或部分单链的。线性DNA产物可包含是双链的部分和是单链的部分。

[0309] 线性DNA产物可包含盒。盒可包含编码序列。该编码序列可编码目的基因,例如编码蛋白质的基因。盒可包含编码序列和启动子的至少一部分。盒可包含启动子和编码序列。盒可包含启动子、编码序列、核糖体结合位点和翻译终止序列。盒可另外包含辅助蛋白质表达的序列,例如不依赖帽的翻译元件。盒可包含(或编码)修复模板(或编辑模板)。修复模板(或编辑模板)可用于CRISPR-Cas介导的同源定向修复(HDR)。盒可编码CRISPR指导RNA。盒可以是哺乳动物表达盒。启动子可以是CMV启动子。盒还可包含增强子。盒还可包含报道基因,例如eGFP报道基因或萤光素酶报道基因。盒还可包含同聚序列,例如polyA、polyC、polyT或polyG序列。同聚序列的长度可以为3至200个核苷酸。同聚序列可用于促进盒的纯化,在这种情况下,同聚序列的长度可以为4至12个核苷酸,或长度可以为5至10个核苷酸。同聚序列可用于提高mRNA表达,在这种情况下,同聚序列的长度可以为10至200个核苷酸,优选长度可以为80至150个核苷酸。同聚序列的长度可以为至少10个、至少20个、至少30个、至少40个、至少50个、至少60个、至少70个、至少80个、至少90个、至少100个、至少110个、至少120个、至少130个、至少140个、至少150个、至少160个、至少170个、至少180个、至少190个或至少200个核苷酸。优选地,同聚序列的长度为至少100个核苷酸。更加优选地,同聚序列的长度为至少120个核苷酸。例如,同聚序列可包含至少120个核苷酸的polyA序列。

[0310] 线性DNA产物可包含间隔区。间隔区可以是至少10个、至少20个、至少30个、至少40个、至少50个、至少60个、至少70个、至少80个、至少90个、至少100个、至少125个、至少150个、至少175个或至少200个碱基对长。间隔区可提高第一和第二衔接子分子与线性双链区

的连接效率。间隔区可提高细胞转染产率。

[0311] 线性DNA产物可包含反向末端重复序列。

[0312] 线性DNA产物可以是至少50个、至少100个、至少250个、至少500个、至少1000个、至少2000个、至少3000个、至少4000个、至少5000个、至少6000个、至少7000个、至少8000个、至少9000个、至少10,000个、至少11,000个、至少12,000个、至少13,000个、至少14,000个或至少15,000个碱基对长。优选地，线性DNA产物为至少50个碱基对长。

[0313] 双链DNA分子可以是环状的或分支的。

[0314] 双链DNA分子可不包含衔接子分子。双链DNA分子可不包含发夹、环或茎环结构。

[0315] 双链DNA分子可包含盒。盒可包含编码序列。该编码序列可编码目的基因，例如编码蛋白质的基因。盒可包含编码序列和启动子的至少一部分。盒可包含启动子和编码序列。盒可包含启动子、编码序列、核糖体结合位点和翻译终止序列。盒可另外包含辅助蛋白质表达的序列，例如不依赖帽的翻译元件。盒可包含(或编码)修复模板(或编辑模板)。修复模板(或编辑模板)可用于CRISPR-Cas介导的同源定向修复(HDR)。盒可编码CRISPR指导RNA。盒可以是哺乳动物表达盒。启动子可以是CMV启动子。盒还可包含增强子。盒还可包含报道基因，例如eGFP报道基因或萤光素酶报道基因。盒还可包含同聚序列，例如polyA、polyC、polyT或polyG序列。同聚序列的长度可以为3至200个核苷酸。同聚序列可用于促进盒的纯化，在这种情况下，同聚序列的长度可以为4至12个核苷酸，或长度可以为5至10个核苷酸。同聚序列可用于提高mRNA表达，在这种情况下，同聚序列的长度可以为10至200个核苷酸，优选长度可以为80至150个核苷酸。同聚序列的长度可以为至少10个、至少20个、至少30个、至少40个、至少50个、至少60个、至少70个、至少80个、至少90个、至少100个、至少110个、至少120个、至少130个、至少140个、至少150个、至少160个、至少170个、至少180个、至少190个或至少200个核苷酸。优选地，同聚序列的长度为至少100个核苷酸。更加优选地，同聚序列的长度为至少120个核苷酸。例如，同聚序列可包含至少120个核苷酸的polyA序列。

[0316] 双链DNA分子可包含间隔区。间隔区可以是至少10个、至少20个、至少30个、至少40个、至少50个、至少60个、至少70个、至少80个、至少90个、至少100个、至少125个、至少150个、至少175个或至少200个碱基对长。间隔区可提高双链DNA分子的扩增产率。间隔区可提高第一和第二衔接子分子与线性双链区的连接效率。间隔可提高细胞转染产率。

[0317] 双链DNA分子可以是至少50个、至少100个、至少250个、至少500个、至少1000个、至少2000个、至少3000个、至少4000个、至少5000个、至少6000个、至少7000个、至少8000个、至少9000个、至少10,000个、至少11,000个、至少12,000个、至少13,000个、至少14,000个或至少15,000个碱基对长。优选地，双链DNA分子为至少50个碱基对长。

[0318] 双链DNA分子可包含一个或更多个可切割的(例如内切核酸酶)靶序列。双链DNA分子可包含两个可切割的(例如内切核酸酶)靶序列。一个或更多个内切核酸酶靶序列可以是IIS型内切核酸酶靶序列。一个或更多个内切核酸酶靶序列可以是

[0319] BbsI, BsaI, BsmBI, BspQI, BtgZI, Esp3I, SapI, AarI, Acc36I, AcIWI, AcuI, AjuI, AloI, Alw26I, AlwI, ArsI, AsuHPI, BaeI, BarI, BbvI, BccI, BceAI, BcgI, BciVI, BcoDI, BfuAI, BfuI, BmrI, BmsI, BmuI, BpiI, BpmI, BpuEI, BsaXI, Bse1I, Bse3DI, BseGI, BseMI, BseMII, BseNI, BseRI, BseXI, BsgI, Bs1FI, BsmAI, BsmFI, BsmI, Bso31I, BspCNI, BspMI, BspPI, BspQI, BspTNI, BsrDI, BsrI, Bst6I, BstF5I, BstMAI, BstV1I, BstV2I, BsuI, BtgZI,

BtsCI, BtsI-v2, BtsMutI, BveI, CseI, CspCI, Eam1104I, EarI, EciI, Eco31I, Eco57I, Esp3I, FaqI, FauI, FokI, GsuI, HgaI, HphI, HpyAV, LguI, LmnI, Lsp1109I, LweI, MboII, MlyI, MmeI, MnII, Mva1269I, NmeAIII, PaqCI, PciSI, PctI, PleI, PpsI, PsrI, SchI, SfaNI, TaqII, TspDTI 和/或 TspGWI 靶序列。

[0320] 双链DNA分子可以是扩增的产物。优选地，扩增是滚环扩增。

[0321] 线性双链区可以是至少50个、至少100个、至少250个、至少500个、至少1000个、至少2000个、至少3000个、至少4000个、至少5000个、至少6000个、至少7000个、至少8000个、至少9000个、至少10,000个、至少11,000个、至少12,000个、至少13,000个、至少14,000个或至少15,000个碱基对长。优选地，双链DNA分子为至少50个碱基对长。

[0322] 线性双链区可在第一和/或第二末端处包含3' -OH基团。3' -OH基团可促进与第一和/或第二衔接子分子(其可包含5' 磷酸)的连接。线性双链区可在第一和/或第二末端处包含5' 磷酸。5' 磷酸可促进与第一和/或第二衔接子分子(其可包含3' -OH基团)的连接。

[0323] 线性双链区(例如，双链分子的线性部分)可包含突出端。例如，线性双链区可包含5' 突出端或3' 突出端。线性双链区可包含一个或更多个平端。线性双链区可包含：一个5' 突出端和一个平端、两个5' 突出端、一个3' 突出端和一个平端、两个3' 突出端、或者一个5' 突出端和一个3' 突出端。突出端可具有至少3个核苷酸(优选4至8个核苷酸)。突出端可以在线性双链区的有义链或反义链中。

[0324] 双链DNA分子的线性部分(例如双链分子的线性部分)可以是至少50个、至少100个、至少250个、至少500个、至少1000个、至少2000个、至少3000个、至少4000个、至少5000个、至少6000个、至少7000个、至少8000个、至少9000个、至少10,000个、至少11,000个、至少12,000个、至少13,000个、至少14,000个或至少15,000个碱基对长。优选地，双链DNA分子为至少50个碱基对长。

[0325] 第一衔接子分子和/或第二衔接子分子可以是合成的衔接子分子。

[0326] 第一衔接子分子和/或第二衔接子分子可以不是质粒或载体DNA。

[0327] 第一衔接子分子和/或第二衔接子分子可包含单链部分。单链部分可包含少于10个、9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个核苷酸。优选地，单链部分包含5个核苷酸。

[0328] 第一衔接子分子和/或第二衔接子分子可包含双链部分。双链部分可包含少于50个、少于45个、少于40个、少于35个、少于30个、少于25个、少于20个、少于15个或少于10个碱基对。双链部分可包含至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个或至少15个碱基对。

[0329] 第一衔接子分子和/或第二衔接子分子可包含5' 磷酸。5' 磷酸可促进与线性双链区的连接。

[0330] 第一衔接子分子可包含与线性双链区的第一末端互补的部分。第二衔接子分子可包含与线性双链区的第二末端互补的部分。第一衔接子分子可包含与线性双链区的第一末端退火的部分。第二衔接子分子可包含与线性双链区的第二末端退火的部分。

[0331] 第一衔接子分子和/或第二衔接子分子可包含突出端。例如，第一衔接子分子和/或第二衔接子分子可包含5' 突出端或3' 突出端。第一衔接子分子和/或第二衔接子分子可包含平端。突出端可具有至少3个核苷酸(优选4至6个核苷酸)。第一衔接子分子和/或第二衔接子分子的突出端可与线性双链区的第一和/或第二末端互补。第一衔接子分子和/或第

二衔接子分子的突出端可与线性双链区的第一和/或第二末端退火。

[0332] 第一衔接子分子和/或第二衔接子分子可不包含IIS型内切核酸酶靶序列。第一衔接子分子和/或第二衔接子分子可不包含

[0333] BbsI, BsaI, BsmBI, BspQI, BtgZI, Esp3I, SapI, AarI, Acc36I, AclWI, AcuI, AjuI, AloI, Alw26I, AlwI, ArsI, AsuHPI, BaeI, BarI, BbvI, BccI, BceAI, BcgI, BciVI, BcoDI, BfuAI, BfuI, BmrI, BmsI, BmuI, BpiI, BpmI, BpuEI, BsaXI, Bse1I, Bse3DI, BseGI, BseMI, BseMII, BseNI, BseRI, BseXI, BsgI, Bs1FI, BsmAI, BsmFI, BsmI, Bso31I, BspCNI, BspMI, BspPI, BspQI, BspTNI, BsrDI, BsrI, Bst6I, BstF5I, BstMAI, BstV1I, BstV2I, BsI, BtgZI, BtsCI, BtsI-v2, BtsMutI, BveI, CseI, CspCI, Eam1104I, EarI, EciI, Eco31I, Eco57I, Esp3I, FaqI, FauI, FokI, GsuI, HgaI, HphI, HpyAV, LguI, LmnI, Lsp1109I, LweI, MboII, MlyI, MmeI, MnII, Mva1269I, NmeAIII, PaqCI, PciSI, PctI, PIeI, PpsI, PsrI, SchI, SfaNI, TaqII, TspDTI 和/或 TspGWISapI 靶序列。

[0334] 第一衔接子分子和/或第二衔接子分子可包含功能部分。功能部分可以是结合分子、靶向序列或探针。

[0335] 功能部分可以是探针。本文中使用的术语“探针”是指可变长度(例如3至1000个碱基长)的DNA、RNA或DNA/RNA嵌合体的片段,其用于检测与探针中的序列互补的靶核苷酸序列的存在。通常来说,探针与这样的单链核酸杂交:所述单链核酸的碱基序列允许由于在探针与靶标之间的互补性引起的探针-靶标碱基配对。因此,功能部分可以是DNA序列、RNA序列或DNA/RNA嵌合体序列。本文中使用的术语“互补”是指根据沃森/克里克(Watson/Crick)配对规则的核苷酸序列的配对。例如,序列5' -GCGGTCCCA-3' 的互补序列为5' -TGGGACCGC-3'。互补序列也可以是与DNA序列互补的RNA的序列。

[0336] 功能部分可以是结合分子。术语“结合分子”是指能够与本文中所述的线性DNA产物结合和/或能够与另外的分子或靶标结合的任何分子。结合分子可以是蛋白质、多肽或肽。结合分子可以是抗体,例如单克隆抗体或多克隆抗体。结合分子可以是抗体片段。

[0337] 功能部分可通过与捕获分子(例如,通过蛋白质-蛋白质相互作用结合的捕获抗体)结合来促进DNA产物的检测。功能部分可与细胞靶标(例如细胞受体)结合。

[0338] 功能部分可以是标签。“标签”可以是能够通过物理、化学和/或生物方法检测双链核酸分子的任何化学实体。标签可以是发色团、荧光团和/或放射性分子。

[0339] 功能部分可以是靶向序列。靶向序列可以是可变长度的DNA或RNA的片段,其用于将DNA产物靶向至细胞中的特定位置。凭借线性DNA产物的增强的核输入,靶向序列可用于提高非病毒基因递送的转染效率。例如,靶向序列可以是DNA核靶向序列(即针对内源DNA结合蛋白的识别序列),例如SV40增强子序列(优选在盒的下游)。

[0340] 为了促进DNA产物的检测和/或定量,功能部分可包含荧光团、放射性化合物或条码。

[0341] 可使用条码测量与线性DNA产物的存在、不存在和/或水平相对应的信号。条码可包含至少一个与条码化部分连接的结合部分,其中条码化部分包含至少一个核苷酸(即其中条码化部分包含长度为至少一个核苷酸的核苷酸序列),并且其中结合部分能够与线性DNA产物的3'突出端、5'突出端或平端结合。结合部分能够与线性DNA产物的3'和/或5'末端结合。可以通过确定条码的条码化部分的存在、不存在和/或水平(例如,通过测序或PCR)来

测量信号。条码化部分可包含至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个或至少10个核苷酸。条码可包含至少两个结合部分(例如,第一结合部分和第二结合部分)。例如,与第一条码化部分连接的第一结合部分可与线性DNA产物的3'末端结合,以及与第二条码化部分连接的第二结合部分可与线性DNA产物的5'末端结合。3'和5'末端可包括3'突出端、5'突出端或平端。

[0342] 可使用荧光团(即荧光标记的分子)测量与线性DNA产物的存在、不存在和/或水平相对应的信号,所述荧光团与线性DNA产物的3'突出端、5'突出端或平端连接或结合。该信号可以通过流式细胞术和/或荧光激活细胞分选来测量。

[0343] 功能部分也可促进DNA测序。例如,功能部分可以是测序衔接子。术语“测序衔接子”旨在涵盖一个或更多个核酸结构域,其包含目的测序平台所利用的核酸序列(或其互补序列)的至少一部分,所述目的测序平台例如由 Illumina®(例如HiSeq™、MiSeq™和/或Genome Analyzer™测序系统)、Oxford Nanopore™ Technologies(例如MinION测序系统)、Ion Torrent™(例如Ion PGM™和/或Ion Proton™测序系统)、Pacific Biosciences(例如PACBIO RS II测序系统)、Life Technologies™(例如SOLiD测序系统)、Roche(例如454GS FLX+和/或GS初级测序系统)提供的测序平台或任何其他目的测序平台。

[0344] 提供了参见图3的该方法的实例,其示出了从通过环状DNA模板的滚环扩增而获得经扩增的DNA开始,通过在单个步骤中消化和连接衔接子分子来获得线性DNA产物的工作流程,所述环状DNA模板由Cre重组酶对底物的作用而生成,所述底物包含以相同方向位于目的DNA侧翼的两个LoxP序列。

[0345] 还描述了参见图4的方法,其示出了在该过程的每个循环中,经扩增的双链DNA分子的BsaI消化之后,序列驱动衔接子分子连接。BsaI消化在表达盒的两侧在5'处产生了4-核苷酸突出末端(TCCC 5')。衔接子分子连接在表达盒的两侧,产生了线性受保护的DNA产物,这是因为在表达盒的两侧和两条链上存在受保护核苷酸(用星号标记),其防止了外切核酸酶降解线性DNA产物。

[0346] 3. 用于产生包含核酸酶抗性核苷酸的部分闭合的线性DNA产物的方法

[0347] 本文中所述的方法可用于产生包含核酸酶抗性(即受保护核苷酸)的部分闭合的线性DNA产物。

[0348] 本发明提供了用于产生部分闭合的脱氧核糖核酸(DNA)产物的方法,其中该方法包括:

[0349] (a) 使双链DNA分子与内切核酸酶以及第一和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积;以及

[0350] (b) 孵育单个连续水性体积以产生部分闭合的线性DNA产物,其中部分闭合的线性DNA产物包含线性双链区,其中线性双链区包含双链DNA分子的线性部分,并且其中第一衔接子分子附加至线性双链区的第一末端以及第二衔接子分子附加至线性双链区的第二末端,并且其中第一衔接子分子是包含一个或更多个核酸酶抗性核苷酸(即受保护核苷酸)的核酸分子,并且其中线性双链区在第二末端处由第二衔接子分子闭合。

[0351] 使双链DNA分子与内切核酸酶以及第一和第二衔接子分子接触的步骤优选在存在连接酶的情况下进行。因此,用于产生部分闭合的线性DNA产物的方法可包括以下步骤:

[0352] (a) 使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触以形成

单个连续水性体积;以及

[0353] (b) 孵育单个连续水性体积以产生部分闭合的线性DNA产物,其中部分闭合的线性DNA产物包含线性双链区,其中线性双链区包含双链DNA分子的线性部分,并且其中第一衔接子分子附加至线性双链区的第一末端以及第二衔接子分子附加至线性双链区的第二末端,并且其中第一衔接子分子是包含一个或更多个核酸酶抗性核苷酸(即受保护核苷酸)的核酸分子,并且其中线性双链区在第二末端处由第二衔接子分子闭合。

[0354] 通过本文中所述的方法产生的部分闭合的线性DNA产物具有增强的对核酸酶(例如,外切核酸酶)消化的抗性。

[0355] 第一衔接子分子和/或第二衔接子分子的附加可通过衔接子分子与线性双链区末端的杂交或连接来进行。因此,第一衔接子分子可与线性双链区的第一末端杂交。第二衔接子分子可与线性双链区的第二末端杂交。第一衔接子分子可与线性双链区的第一末端连接。第二衔接子分子可与线性双链区的第二末端连接。第一衔接子分子和第二衔接子分子的附加可通过衔接子分子与线性双链区末端的杂交和连接二者来进行。因此,第一衔接子分子可与线性双链区的第一末端杂交和连接。第二衔接子分子可与线性双链区的第二末端杂交和连接。杂交基于第一和/或第二衔接子分子的一部分与线性双链区的第一和/或第二末端的互补性。

[0356] 用于产生部分闭合的线性DNA产物的方法可包括以下步骤:

[0357] (a) 使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积;以及

[0358] (b) 孵育单个连续水性体积以产生部分闭合的线性DNA产物,其中部分闭合的线性DNA产物包含线性双链区,其中线性双链区包含双链DNA分子的线性部分,并且其中第一衔接子分子与线性双链区的第一末端连接以及第二衔接子分子与线性双链区的第二末端连接,并且其中第一衔接子分子是包含一个或更多个核酸酶抗性核苷酸(即受保护核苷酸)的核酸分子,并且其中线性双链区在第二末端处由第二衔接子分子闭合。

[0359] 用于产生部分闭合的线性DNA产物的方法可包括以下步骤:

[0360] (a) 使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积;以及

[0361] (b) 孵育单个连续水性体积以产生部分闭合的线性DNA产物,其中部分闭合的线性DNA产物包含双链DNA分子的线性部分,并且其中第一衔接子分子与双链DNA分子的线性部分的第一末端连接以及第二衔接子分子与双链DNA分子的线性部分的第二末端连接,并且其中第一衔接子分子是包含一个或更多个核酸酶抗性核苷酸(即受保护核苷酸)的核酸分子,并且其中线性双链区在第二末端处由第二衔接子分子闭合。

[0362] 本文中使用的术语“互补”是指根据沃森/克里克配对规则的核苷酸序列的配对。例如,序列5' -GCGGTCCCA-3' 的互补序列为5' -TGGGACCGC-3' 。互补序列也可以是与DNA序列互补的RNA的序列。

[0363] 优选地,使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触的步骤在单个反应中进行(即单个步骤)。

[0364] 孵育单个连续水性体积以产生部分闭合的线性DNA产物的步骤可包括通过用内切核酸酶消化双链DNA分子来产生双链DNA分子的线性部分。

[0365] 可在促进第一和第二衔接子分子附加(或连接)至线性双链区的条件下,进行孵育单个连续水性体积的步骤,以产生部分闭合的线性DNA产物。可通过在第一和/或第二衔接子分子与线性双链区(或双链DNA分子的线性部分)的末端之间建立共价连接来进行附加。

[0366] 可在促进双链DNA分子的消化的条件下,进行孵育单个连续水性体积的步骤,以产生双链DNA分子的线性部分。产生双链DNA分子的线性部分的双链DNA分子的消化可在1°C至100°C、1°C至80°C、5°C至70°C、10°C至60°C、15°C至55°C、20°C至50°C、25°C至45°C、30°C至40°C、35°C至39°C、36°C至38°C或在约37°C的第一温度下进行。消化可以是内切核酸酶消化,优选IIS型内切核酸酶消化。

[0367] 孵育单个连续水性体积的步骤可在促进线性双链区与第一和第二衔接子分子连接的条件下进行。连接可以是至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少82%、至少85%、至少90%或至少95%有效的。例如,可将至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少82%、至少85%、至少90%或至少95%的线性双链区(或双链DNA分子的部分)并入到闭合的线性DNA产物中。优选地,连接为至少15%有效的。

[0368] 线性双链区与第一和第二衔接子分子连接的步骤可在1°C至90°C、2°C至70°C、5°C至60°C、8°C至55°C、9°C至50°C、10°C至45°C、11°C至40°C、12°C至37°C、13°C至30°C、14°C至25°C、15°C至20°C或在约16°C的第二温度下进行。

[0369] 孵育单个连续水性体积的步骤可包括在第一温度下孵育,并随后在第二温度下孵育。第一温度可以是1°C至100°C、1°C至80°C、5°C至70°C、10°C至60°C、15°C至55°C、20°C至50°C、25°C至45°C、30°C至40°C、35°C至39°C、36°C至38°C、或约37°C。第二温度可以是1°C至90°C、2°C至70°C、5°C至60°C、8°C至55°C、9°C至50°C、10°C至45°C、11°C至40°C、12°C至37°C、13°C至30°C、14°C至25°C、15°C至20°C或在约16°C下。优选地,第一温度是35°C至39°C。优选地,第二温度是14°C至18°C。

[0370] 孵育单个连续水性体积的步骤可包括在第一温度和第二温度之间循环。孵育单个连续水性体积的步骤可包括在第一温度和第二温度之间循环至少2次、至少3次、至少4次、至少5次、至少6次、至少7次、至少8次、至少9次、至少10次、至少15次、至少20次、至少25次、至少30次、至少35次、至少40次、至少45次、至少50次、至少55次、至少60次、至少65次、至少70次、至少80次、至少90次或至少100次,优选至少20次。孵育单个连续水性体积的步骤可包括在第一温度和第二温度之间循环少于40次、少于35次、少于30次、少于29次、少于25次。孵育单个连续水性体积的步骤可包括在第一温度和第二温度之间循环2至100次、5至80次、10至70次、20至60次、或30至60次。孵育单个连续水性体积的步骤可包括在第一温度和第二温度之间循环2至20次、5至29次、61至100次、或65至80次。

[0371] 孵育单个连续水性体积的步骤可等温进行。孵育单个连续水性体积的步骤可包括在恒定温度下孵育。恒定温度促进双链DNA分子的同时消化以产生双链DNA分子的线性部分,并且促进线性双链区与第一和第二衔接子分子的连接。例如,恒定温度可以是20°C、21°C、22°C、23°C、24°C、25°C、26°C、27°C、28°C、29°C、30°C、31°C、32°C、33°C、34°C、35°C、36°C、37°C、38°C、39°C或40°C。优选地,恒定温度是30°C。恒定温度旨在意指在反应期间温度

没有显著变化。恒定温度旨在意指，在孵育单个连续水性体积的步骤期间，温度变化小于10 °C、小于9°C、小于8°C、小于7°C、小于6°C、小于5°C、小于4°C、小于3°C、小于2°C、或小于1°C。在一个优选实施方案中，在孵育单个连续水性的步骤期间温度偏差不超过5°C，优选不超过3°C，甚至更优选不超过1°C。因此，恒定温度可以是在20°C至30°C、22°C至32°C、24°C至34 °C、26°C至36°C、28°C至38°C、30°C至40°C、22°C至28°C、32°C至38°C、25°C至35°C、26°C至34 °C、27°C至33°C、27.5°C至32.5°C、28°C至32°C、28.5°C至31.5°C、29°C至31°C、或29.5°C至30.5°C范围内的温度。优选地，恒定温度是在27.5°C至32.5°C范围内的温度。或者，恒定温度可以是在32°C至42°C、33°C至41°C、34°C至40°C、35°C至39°C、36°C至38°C的范围内的温度。优选地，恒定温度是在34.5°C至39.5°C范围内的温度。

[0372] 第一和第二衔接子分子可包含一个或更多个硫代磷酸酯核苷酸，使得一旦将衔接子分子附加(例如连接)至线性双链区，则部分闭合的线性DNA产物对核酸酶消化具有抗性或对核酸酶消化具有改善或增强的抗性。部分闭合的线性DNA产物可对3'末端外切核酸酶消化(例如通过外切核酸酶III)和/或5'末端外切核酸酶消化(例如通过外切核酸酶VIII)具有抗性。

[0373] 衔接子分子可包含多个硫代磷酸酯核苷酸。例如，衔接子分子在每条链中可包含至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个或至少16个硫代磷酸酯核苷酸。

[0374] 衔接子分子可以是核酸衔接子分子。衔接子分子可以是双链的。衔接子分子可包含是双链的部分。

[0375] 第一和/或第二衔接子分子可包含至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个或至少16个碱基对。

[0376] 衔接子分子在每条链中可包含多个硫代磷酸酯核苷酸。例如，衔接子分子在每条链中可包含至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个或至少16个硫代磷酸酯核苷酸。

[0377] 衔接子分子可在每条链中的内部位置处包含多个硫代磷酸酯核苷酸。例如，衔接子分子可在每条链中的内部位置处包含至少1个、至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个或至少16个硫代磷酸酯核苷酸。优选地，衔接子分子在每条链中的内部位置处包含至少2个硫代磷酸酯核苷酸。

[0378] 内部位置可不位于衔接子分子的第二个和倒数第二个核苷酸之间。内部位置可以是衔接子分子中除了在每条链的末端处最后的核苷酸以外的任何位置。

[0379] 衔接子分子可包含至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少100%的受保护核苷酸。

[0380] 一旦衔接子分子附加至线性双链区，则部分闭合的线性DNA产物可在一条链或两条链的5'末端处(或5'末端区处)包含受保护核苷酸(例如硫代磷酸酯核苷酸)。优选地，部分闭合的线性DNA产物在一条链的5'末端处(或5'末端区处)包含硫代磷酸酯核苷酸。部分闭合的线性DNA产物可在一条链的5'末端处(或5'末端区处)包含硫代磷酸酯核苷酸。由于

大多数外切核酸酶,例如外切核酸酶III,从多核苷酸链的3'末端去除核苷酸,线性DNA产物可在一条链的3'末端处(或3'末端区处)包含受保护核苷酸。优选地,部分闭合的线性DNA产物在一条链的3'末端处(或3'末端区处)包含硫代磷酸酯核苷酸。部分闭合的线性DNA产物可在3'末端处(或3'末端区处)包含至少一个硫代磷酸酯核苷酸并且在一条链的5'末端处(或5'末端区处)包含至少一个硫代磷酸酯核苷酸。部分闭合的线性DNA产物可在有义链的3'末端处(或3'末端区处)包含至少一个硫代磷酸酯核苷酸,并且如果为反义链,则可在5'末端处(或5'末端区处)包含至少一个硫代磷酸酯核苷酸。部分闭合的线性DNA产物可在有义链的5'末端处(或5'末端区处)包含至少一个硫代磷酸酯核苷酸并且如果为反义链,可在3'末端处(或3'末端区处)包含至少一个硫代磷酸酯核苷酸。因此,双链的部分闭合的线性DNA产物中的有义链和反义链二者可通过在部分闭合的线性DNA产物的一个末端处使用核酸酶抗性核苷酸来被保护免受核酸酶消化。

[0381] 用于本文中所述方法的衔接子分子中的一者可包含产生环(例如发夹环或茎环)的自身互补的元件。因此,衔接子分子中的一者可包含发夹或茎环。衔接子分子可包含含有有义链和反义链的双链部分,其中有义链和反义链在发夹中连接在一起,使得有义链与反义链杂交。衔接子的双链部分可包含至少1个、至少2个、至少3个、至少4个、或至少5个核苷酸的3'突出端或5'突出端。优选地,3'突出端或5'突出端为4至8个核苷酸。线性双链区(或双链DNA分子的线性部分)的每个末端可包含3'或5'突出端。衔接子分子的部分(例如突出端)可与线性双链区的第一末端或第二末端互补。

[0382] 本文中所述的方法可使用第一衔接子分子和第二衔接子分子,所述第一衔接子分子是包含核酸酶抗性核苷酸的线性核酸分子,所述第二衔接子分子包含发夹环或茎环,或任何其他能够使线性DNA分子的一个末端闭合以产生部分闭合的线性DNA产物的结构。

[0383] 部分闭合的线性DNA产物可以是部分共价闭合的DNA产物。因此,在一些其中衔接子分子包含环(例如发夹)的实施方案中,衔接子分子使线性双链区的一个末端闭合,从而形成了部分共价闭合的DNA产物。

[0384] 衔接子分子可包含单链部分。单链部分可形成发夹或茎环。单链部分可包含少于10个、9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个核苷酸。优选地,单链部分包含5个核苷酸。

[0385] 部分闭合的线性DNA产物在每条链中的内部位置处可另外包含多个受保护核苷酸(例如,硫代磷酸酯核苷酸)。例如,线性DNA产物可在每条链中的内部位置处包含至少2个、至少4个、至少6个、至少8个、至少10个、至少12个、至少14个、至少16个、至少18个、至少20个、至少30个、至少40个、至少50个、至少60个、至少70个、至少80个、至少90个、至少100个、至少125个、至少150个、至少175个、至少200个、至少250个、至少300个、至少350个、至少400个、至少450个或至少500个受保护核苷酸(例如硫代磷酸酯核苷酸)。优选地,部分闭合的线性DNA产物在每条链中的内部位置处包含至少2个受保护核苷酸(例如硫代磷酸酯核苷酸)。

[0386] 内部位置可不位于部分闭合的线性DNA产物的第二个和倒数第二个核苷酸之间。内部位置可以是衔接子分子中除了每条链的末端处最后的核苷酸以外的任何位置。

[0387] 线性双链区(或双链分子的线性部分)可在每条链中的内部位置处包含多个硫代磷酸酯核苷酸。例如,线性双链区(或双链分子的线性部分)可在每条链中的内部位置处包含至少2个、至少4个、至少6个、至少8个、至少10个、至少12个、至少14个、至少16个、至少18个、至少20个、至少30个、至少40个、至少50个、至少60个、至少70个、至少80个、至少90个、至

少100个、至少125个、至少150个、至少175个、至少200个、至少250个、至少300个、至少350个、至少400个、至少450个或至少500个受保护核苷酸(例如硫代磷酸酯核苷酸)。优选地,线性双链区(或双链分子的线性部分)在每条链中的内部位置处包含至少2个受保护核苷酸(例如硫代磷酸酯核苷酸)。内部位置可不位于线性双链区(或双链分子的线性部分)的第二个和倒数第二个核苷酸之间。

[0388] 对外切核酸酶消化具有抗性的核苷酸(即受保护核苷酸)可以是至少一种类型的硫代磷酸酯核苷酸。例如,至少一种类型的硫代磷酸酯核苷酸是 α -S-dATP(即2'-脱氧腺苷-5'-(α -硫代)-三磷酸)、 α -S-dCTP(即2'-脱氧胞苷-5'-(α -硫代)-三磷酸)、 α -S-dGTP(即2'-脱氧鸟苷-5'-(α -硫代)-三磷酸)、 α -S-dTTP(即2'-脱氧胸苷-5'-(α -硫代)-三磷酸)、 α -S-dUTP(即2'-脱氧尿苷-5'-(α -硫代)-三磷酸)和/或尿苷2',3'-硫代环磷酸酯。

[0389] 衔接子分子可包含至少两种类型的硫代磷酸酯核苷酸。例如,至少两种类型的硫代磷酸酯核苷酸是: α -S-dATP和 α -S-dCTP、 α -S-dATP和 α -S-dGTP、 α -S-dATP和 α -S-dTTP、 α -S-dCTP和 α -S-dGTP、 α -S-dCTP和 α -S-dTTP、或者 α -S-dGTP和 α -S-dTTP。

[0390] 衔接子分子可包含至少三种类型的硫代磷酸酯核苷酸。例如,至少三种类型的硫代磷酸酯核苷酸是:

- [0391] (e) α -S-dATP、 α -S-dCTP和 α -S-dGTP;
- [0392] (f) α -S-dATP、 α -S-dCTP和 α -S-dTTP;
- [0393] (g) α -S-dATP、 α -S-dGTP和 α -S-dTTP;或者
- [0394] (h) α -S-dCTP、 α -S-dGTP和 α -S-dTTP。

[0395] 衔接子分子可包含至少四种类型的硫代磷酸酯核苷酸。例如,至少四种类型的受保护核苷酸是 α -S-dATP、 α -S-dCTP、 α -S-dGTP和 α -S-dTTP。

[0396] 硫代磷酸酯核苷酸可以是Sp-异构体、Rp-异构体或者Sp-异构体和Rp-异构体二者的混合物。

[0397] 对外切核酸酶消化具有抗性的核苷酸(即受保护核苷酸)可以是至少一种类型或者至少两种、三种或四种类型的MOE核苷酸。例如,MOE核苷酸可以是2'-0-甲氧基-乙基鸟苷、2'-0-甲氧基-乙基胞苷、2'-0-甲氧基-乙基腺苷和/或2'-0-甲氧基-乙基胸苷。

[0398] 该方法还可包括,在步骤(a)(即使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触的步骤)之前,将DNA模板分子进行扩增以产生双链DNA分子的步骤。因此,本发明提供了用于产生部分闭合的线性DNA产物的方法,该方法包括:

[0399] (a) 将包含至少一个可切割的(例如内切核酸酶)靶序列的DNA模板分子进行扩增以产生双链DNA分子;

[0400] (b) 使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积;以及

[0401] (c) 孵育单个连续水性体积以产生部分闭合的线性DNA产物,其中部分闭合的线性DNA产物包含线性双链区,其中线性双链区包含双链DNA分子的线性部分,并且其中第一衔接子分子附加至线性双链区的第一末端以及第二衔接子分子附加至线性双链区的第二末端,并且其中第一衔接子分子是包含一个或更多个核酸酶抗性核苷酸(即受保护核苷酸)的核酸分子,并且其中线性双链区在第二末端处由第二衔接子分子闭合。

[0402] 扩增的步骤可通过体外或体内扩增来进行。优选地,扩增的步骤通过体外扩增来

进行。例如,扩增的步骤可通过滚环扩增(RCA)、MALBAC方法、传统聚合酶链反应(PCR)、基于核酸序列的扩增(NASBA)、环介导等温扩增(LAMP)、解旋酶依赖性扩增(HDA)、多重置换扩增(MDA)和重组酶聚合酶扩增(RPA)来进行。优选地,扩增的步骤通过滚环扩增来进行。因此,本发明提供了用于产生部分闭合的线性DNA产物的方法,该方法包括:

[0403] (a) 将包含至少一个可切割的(例如内切核酸酶)靶序列的DNA模板分子进行扩增以产生双链DNA分子,其中DNA模板分子通过滚环扩增来扩增;

[0404] (b) 使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积;以及

[0405] (c) 孵育单个连续水性体积以产生部分闭合的线性DNA产物,其中部分闭合的线性DNA产物包含线性双链区,其中线性双链区包含双链DNA分子的线性部分,并且其中第一衔接子分子附加至线性双链区的第一末端以及第二衔接子分子附加至线性双链区的第二末端,并且其中第一衔接子分子是包含一个或更多个核酸酶抗性核苷酸(即受保护核苷酸)的核酸分子,并且其中线性双链区在第二末端处由第二衔接子分子闭合。

[0406] 滚环扩增可在没有任何引物,或者在存在一种引物或多种引物的情况下进行。例如,引物可以是合成的引物。引物可以是随机的引物。滚环扩增可在存在引发酶的情况下进行。引发酶可以是TthPrimPol。优选地,如果滚环扩增在没有任何引物的情况下进行,则其是在存在引发酶(例如TthPrimPol)的情况下进行的。类似地,如果在扩增反应期间使用引物,则不使用引发酶。双链DNA产物可使用合适的核酸聚合酶(例如Phi29DNA聚合酶)在等温条件下通过体外的滚环扩增产生。

[0407] 在本文中所述的方法中,DNA模板分子可包含至少一个可切割的靶序列。可切割的靶序列可以是内切核酸酶靶序列。因此,DNA模板分子可包含至少一个内切核酸酶靶向序列。优选地,DNA模板分子包含至少两个内切核酸酶靶序列。内切核酸酶靶序列可以是相同的或不同的。优选地,至少一个内切核酸酶靶序列是限制性内切核酸酶靶序列。不同的限制性内切核酸酶靶序列将是技术人员已知的。可切割的靶序列可以是IIS型限制性内切核酸酶靶序列。例如,限制性内切核酸酶靶序列可以是

[0408] BbsI, BsaI, BsmBI, BspQI, BtgZI, Esp3I, SapI, AarI, Acc36I, AclWI, AcuI, AjuI, AloI, Alw26I, AlwI, ArsI, AsuHPI, BaeI, BarI, BbvI, BccI, BceAI, BcgI, BciVI, BcoDI, BfuAI, BfuI, BmrI, BmsI, BmuI, BpiI, BpmI, BpuEI, BsaXI, Bse1I, Bse3DI, BseGI, BseMI, BseMII, BseNI, BseRI, BseXI, BsgI, BslFI, BsmAI, BsmFI, BsmI, Bso31I, BspCNI, BspMI, BspPI, BspQI, BspTNI, BsrDI, BsrI, Bst6I, BstF5I, BstMAI, BstV1I, BstV2I, BsuI, BtgZI, BtsCI, BtsI-v2, BtsMutI, BveI, CseI, CspCI, Eam1104I, EarI, EciI, Eco31I, Eco57I, Esp3I, FaqI, FauI, FokI, GsuI, HgaI, HphI, HpyAV, LguI, LmnI, Lsp1109I, LweI, MboII, MIyI, MmeI, MnII, Mva1269I, NmeAIII, PaqCI, PciSI, PctI, PItI, PpsI, PsrI, SchI, SfaNI, TaqII, TspDTI 和/或TspGWI靶序列。至少一个可切割的序列(例如内切核酸酶靶序列)可以是天然可切割的序列(即在模板分子中存在的可切割序列)。或者,至少一个可切割的序列(例如内切核酸酶靶序列)可在产生部分闭合的线性DNA产物之前引入至DNA模板分子。

[0409] 内切核酸酶可以是限制酶内切核酸酶。内切核酸酶可以是IIS型限制酶。内切核酸酶可以是识别DNA序列并在识别序列的外部切割的任何酶。例如,内切核酸酶可以是:

[0410] BbsI, BsaI, BsmBI, BspQI, BtgZI, Esp3I, SapI, AarI, Acc36I, AclWI, AcuI, AjuI,

AloI, Alw26I, AlwI, ArsI, AsuHPI, BaeI, BarI, BbvI, BccI, BceAI, BcgI, BciVI, BcoDI, BfuAI, BfuI, BmrI, BmsI, BmuI, BpiI, BpmI, BpuEI, BsaXI, Bse1I, Bse3DI, BseGI, BseMI, BseMII, BseNI, BseRI, BseXI, BsgI, Bs1FI, BsmAI, BsmFI, BsmI, Bso31I, BspCNI, BspMI, BspPI, BspQI, BspTNI, BsrDI, BsrI, Bst6I, BstF5I, BstMAI, BstV1I, BstV2I, BsuI, BtgZI, BtsCI, BtsI-v2, BtsMutI, BveI, CseI, CspCI, Eam1104I, EarI, EciI, Eco31I, Eco57I, Esp3I, FaqI, FauI, FokI, GsuI, HgaI, HphI, HpyAV, LguI, LmnI, Lsp1109I, LweI, MboII, MlyI, MmeI, MnII, Mva1269I, NmeAIII, PaqCI, PciSI, PctI, PleI, PpsI, PsrI, SchI, SfaNI, TaqII, TspDTI 和/或 TspGWI 限制酶。

[0411] 连接酶可以是DNA连接酶,例如T4 DNA连接酶,T7 DNA连接酶,哺乳动物DNA连接酶I、III和IV,Taq DNA连接酶,Tth DNA连接酶,或大肠杆菌DNA连接酶。

[0412] 本文中所述的方法中使用的DNA模板分子可以是单链的或双链的。优选地,DNA模板分子是双链的。DNA模板分子可以是天然的环状DNA分子。例如,DNA模板分子可以是(i)质粒,(ii)微环,(iii)黏粒,(iv)细菌人工染色体(BAC),或(v)分子倒置探针(MIP)。DNA模板分子可以是酶促产生的环状DNA分子。例如,DNA模板分子可以是(i)从重组酶反应中获得的环状DNA分子,所述重组酶反应优选Cre重组酶反应,或(ii)从连接酶反应中获得的环状DNA分子,所述连接酶反应优选使用golden gate assembly。DNA模板分子可以是酶促产生的共价闭合的线性DNA分子。例如,DNA模板分子可以是(i)用TelN前端粒酶处理的DNA分子;或(ii)通过DNA末端与衔接子的连接所产生的DNA分子。DNA模板分子可包含双链的元件和单链的元件。例如,模板DNA分子可包含双链DNA和单链发夹环。

[0413] DNA模板分子可以是线性的。如果DNA模板分子是线性的,在扩增(例如滚环扩增)之前,可以将DNA模板分子环化以产生适合用于本文中所述的方法的DNA模板分子。

[0414] 模板DNA分子可包含盒。盒可以是哺乳动物表达盒。盒还可包含启动子。启动子可以是CMV启动子。盒还可包含增强子。盒还可包含报道基因,例如eGFP报道基因或萤光素酶报道基因。盒还可包含同聚序列。盒还可包含LoxP序列,优选两个LoxP序列。如果两个LoxP序列以相同的方向来定向,则两个LoxP序列之间的DNA序列经切除成为DNA的圆环。如果两个LoxP序列以相反的方向来定向,则两个LoxP序列之间的DNA序列被倒置。因此,优选地,两个LoxP序列在模板DNA分子中处于相同的定向。

[0415] DNA模板分子可在5'末端或3'末端处或者5'末端和3'末端两处包含同聚序列。在环化之前,可将同聚序列添加至DNA模板分子中。同聚序列可以是polyA、polyC、polyG或polyT序列。同聚序列的长度可以为3至200个核苷酸。同聚序列可用于促进部分闭合的线性DNA产物的纯化,在这种情况下,同聚序列的长度可以为4至12个核苷酸,或可以为5至10个核苷酸。同聚序列可用于提高mRNA表达,在这种情况下,同聚序列的长度可以为10至200个核苷酸,优选地长度可以为80至150个核苷酸。同聚序列的长度可以为至少10个、至少20个、至少30个、至少40个、至少50个、至少60个、至少70个、至少80个、至少90个、至少100个、至少110个、至少120个、至少130个、至少140个、至少150个、至少160个、至少170个、至少180个、至少190个或至少200个核苷酸。优选地,同聚序列的长度为至少100个核苷酸。更加优选地,同聚序列的长度为至少120个核苷酸。例如,同聚序列可包含至少120个核苷酸的polyA序列。

[0416] 该方法还可包括,在孵育单个连续水性体积的步骤之后,纯化部分闭合的线性DNA

产物的步骤。

[0417] 该方法还可包括,在孵育单个连续水性体积的步骤之后,核酸酶消化的步骤。核酸酶消化可以是外切核酸酶消化,例如外切核酸酶I和/或外切核酸酶III消化。核酸酶消化的步骤可发生在纯化的步骤之前或之后。该步骤允许去除任何在进行该方法的过程中未经使用的双链DNA分子和/或衔接子分子。因此,该方法可包括以下步骤:

[0418] (a) 将包含至少一个可切割的(例如内切核酸酶)靶序列的DNA模板分子进行扩增以产生双链DNA分子;

[0419] (b) 使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积;

[0420] (c) 孵育单个连续水性体积以产生部分闭合的线性DNA产物,其中部分闭合的线性DNA产物包含线性双链区,其中线性双链区包含双链DNA分子的线性部分,并且其中第一衔接子分子与线性双链区的第一末端连接以及第二衔接子分子与线性双链区的第二末端连接,并且其中第一衔接子分子是包含一个或更多个核酸酶抗性核苷酸的核酸分子,并且其中线性双链区在第二末端处由第二衔接子分子闭合;以及

[0421] (d) 用核酸酶(例如外切核酸酶)孵育单个连续水性体积。

[0422] 该方法可包括以下步骤:

[0423] (a) 将包含至少一个可切割的(例如内切核酸酶)靶序列的DNA模板分子进行扩增以产生双链DNA分子;

[0424] (b) 使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积;

[0425] (c) 孵育单个连续水性体积以产生部分闭合的线性DNA产物,其中部分闭合的线性DNA产物包含线性双链区,其中线性双链区包含双链DNA分子的线性部分,并且其中第一衔接子分子与线性双链区的第一末端连接以及第二衔接子分子与线性双链区的第二末端连接,并且其中第一衔接子分子是包含一个或更多个核酸酶抗性核苷酸的核酸分子,并且其中线性双链区在第二末端处由第二衔接子分子闭合;

[0426] (d) 纯化闭合的线性DNA产物;以及

[0427] (e) 用核酸酶(例如外切核酸酶)孵育步骤(d)的纯化产物。

[0428] 该方法可包括以下步骤:

[0429] (a) 将包含至少一个可切割的(例如内切核酸酶)靶序列的DNA模板分子进行扩增以产生双链DNA分子;

[0430] (b) 使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积;

[0431] (c) 孵育单个连续水性体积以产生部分闭合的线性DNA产物,其中部分闭合的线性DNA产物包含线性双链区,其中线性双链区包含双链DNA分子的线性部分,并且其中第一衔接子分子与线性双链区的第一末端连接以及第二衔接子分子与线性双链区的第二末端连接,并且其中第一衔接子分子是包含一个或更多个核酸酶抗性核苷酸的核酸分子,并且其中线性双链区在第二末端处由第二衔接子分子闭合;

[0432] (d) 用核酸酶(例如外切核酸酶)孵育单个连续水性体积;以及

[0433] (e) 纯化闭合的线性DNA产物。

[0434] 用核酸酶孵育单个连续水性体积(或步骤(d)的纯化产物)的步骤可在5°C至90°C、10°C至80°C、15°C至70°C、20°C至60°C、25°C至50°C、30°C至45°C、或35°C至40°C的温度下进行。用核酸酶孵育单个连续水性体积(或步骤(d)的纯化产物)的步骤可进行至少10、至少20、至少30、至少40、至少50或至少60分钟。孵育单个连续水性体积(或步骤(d)的纯化产物)的步骤可在两个不同的温度下进行。例如,孵育单个连续水性体积(或步骤(d)的纯化产物)的步骤可在15°C至40°C下进行10至60分钟,然后在60°C至90°C的温度下进行10至30分钟。较高的温度通常会使核酸酶(例如外切核酸酶)失活。因此,该方法还提供了使核酸酶(例如外切核酸酶)失活的步骤。孵育单个连续水性体积(或步骤(d)的纯化产物)的步骤可在37°C下进行30分钟,以及在80°C下进行20分钟。优选地,使核酸酶(例如外切核酸酶)失活的步骤在70°C至80°C的温度下进行。使核酸酶(例如外切核酸酶)失活的步骤可进行至少1、至少5、至少10、至少20或至少30分钟。优选地,使核酸酶(例如外切核酸酶)失活的步骤进行至少5分钟。

[0435] 第一衔接子分子和/或第二衔接子分子可包含突出端。线性双链区的末端可包含3'或5'突出端。第一衔接子分子的一部分(例如突出端)可与线性双链区的第一末端互补。第二衔接子分子的一部分可与线性双链区的第二末端互补。

[0436] 线性双链区的第一末端和第二末端可对核酸酶消化具有抗性。优选地,线性双链区的第一末端和第二末端对外切核酸酶消化具有抗性,例如外切核酸酶III消化和/或外切核酸酶I消化。

[0437] 线性DNA产物可以是部分双链的和/或部分单链的。线性DNA产物可包含是双链的部分和是单链的部分。

[0438] 部分闭合的线性DNA产物可包含盒。盒可包含编码序列。该编码序列可编码目的基因,例如编码蛋白质的基因。盒可包含编码序列和启动子的至少一部分。盒可包含启动子和编码序列。盒可包含启动子、编码序列、核糖体结合位点和翻译终止序列。盒可另外包含辅助蛋白质表达的序列,例如不依赖帽的翻译元件。盒可包含(或编码)修复模板(或编辑模板)。修复模板(或编辑模板)可用于CRISPR-Cas介导的同源定向修复(HDR)。盒可编码CRISPR指导RNA。盒可以是哺乳动物表达盒。启动子可以是CMV启动子。盒还可包含增强子。盒还可包含报道基因,例如eGFP报道基因或萤光素酶报道基因。盒还可包含同聚序列,例如polyA、polyC、polyT或polyG序列。同聚序列的长度可以为3至200个核苷酸。同聚序列可用于促进盒的纯化,在这种情况下,同聚序列的长度可以为4至12个核苷酸,或长度可以为5至10个核苷酸。同聚序列可用于提高mRNA表达,在这种情况下,同聚序列的长度可以为10至200个核苷酸,优选长度可以为80至150个核苷酸。同聚序列的长度可以为至少10个、至少20个、至少30个、至少40个、至少50个、至少60个、至少70个、至少80个、至少90个、至少100个、至少110个、至少120个、至少130个、至少140个、至少150个、至少160个、至少170个、至少180个、至少190个或至少200个核苷酸。优选地,同聚序列的长度为至少100个核苷酸。更加优选地,同聚序列的长度为至少120个核苷酸。例如,同聚序列可包含至少120个核苷酸的polyA序列。

[0439] 部分闭合的线性DNA产物可包含间隔区。间隔区可以是至少10个、至少20个、至少30个、至少40个、至少50个、至少60个、至少70个、至少80个、至少90个、至少100个、至少125个、至少150个、至少175个或至少200个碱基对长。间隔区可提高第一和第二衔接子分子与

线性双链区的连接效率。间隔区可提高细胞转染产率。

[0440] 部分闭合的线性DNA产物可包含反向末端重复序列。

[0441] 部分闭合的线性DNA产物可以是至少50个、至少100个、至少250个、至少500个、至少1000个、至少2000个、至少3000个、至少4000个、至少5000个、至少6000个、至少7000个、至少8000个、至少9000个、至少10,000个、至少11,000个、至少12,000个、至少13,000个、至少14,000个或至少15,000个碱基对长。优选地，部分闭合的线性DNA产物为至少50个碱基对长。

[0442] 双链DNA分子可以是环状的或分支的。

[0443] 双链DNA分子可不包含衔接子分子。双链DNA分子可不包含发夹、环或茎环结构。

[0444] 双链DNA分子可包含盒。盒可包含编码序列。该编码序列可编码目的基因，例如编码蛋白质的基因。盒可包含编码序列和启动子的至少一部分。盒可包含启动子和编码序列。盒可包含启动子、编码序列、核糖体结合位点和翻译终止序列。盒可另外包含辅助蛋白质表达的序列，例如不依赖帽的翻译元件。盒可包含(或编码)修复模板(或编辑模板)。修复模板(或编辑模板)可用于CRISPR-Cas介导的同源定向修复(HDR)。盒可编码CRISPR指导RNA。盒可以是哺乳动物表达盒。启动子可以是CMV启动子。盒还可包含增强子。盒还可包含报道基因，例如eGFP报道基因或萤光素酶报道基因。盒还可包含同聚序列，例如polyA、polyC、polyT或polyG序列。同聚序列的长度可以为3至200个核苷酸。同聚序列可用于促进盒的纯化，在这种情况下，同聚序列的长度可以为4至12个核苷酸，或长度可以为5至10个核苷酸。同聚序列可用于提高mRNA表达，在这种情况下，同聚序列的长度可以为10至200个核苷酸，优选长度可以为80至150个核苷酸。同聚序列的长度可以为至少10个、至少20个、至少30个、至少40个、至少50个、至少60个、至少70个、至少80个、至少90个、至少100个、至少110个、至少120个、至少130个、至少140个、至少150个、至少160个、至少170个、至少180个、至少190个或至少200个核苷酸。优选地，同聚序列的长度为至少100个核苷酸。更加优选地，同聚序列的长度为至少120个核苷酸。例如，同聚序列可包含至少120个核苷酸的polyA序列。

[0445] 双链DNA分子可包含间隔区。间隔区可以是至少10个、至少20个、至少30个、至少40个、至少50个、至少60个、至少70个、至少80个、至少90个、至少100个、至少125个、至少150个、至少175个或至少200个碱基对长。间隔区可提高双链DNA分子的扩增产率。间隔区可提高第一和第二衔接子分子与线性双链区的连接效率。间隔可提高细胞转染产率。

[0446] 双链DNA分子可以是至少50个、至少100个、至少250个、至少500个、至少1000个、至少2000个、至少3000个、至少4000个、至少5000个、至少6000个、至少7000个、至少8000个、至少9000个、至少10,000个、至少11,000个、至少12,000个、至少13,000个、至少14,000个或至少15,000个碱基对长。优选地，双链DNA分子为至少50个碱基对长。

[0447] 双链DNA分子可包含一个或更多个可切割的(例如内切核酸酶)靶序列。双链DNA分子可包含两个可切割的(例如内切核酸酶)靶序列。一个或更多个内切核酸酶靶序列可以是IIS型内切核酸酶靶序列。一个或更多个内切核酸酶靶向序列可以是

[0448] BbsI, BsaI, BsmBI, BspQI, BtgZI, Esp3I, SapI, AarI, Acc36I, AcIWI, AcuI, AjuI, AloI, Alw26I, AlwI, ArsI, AsuHPI, BaeI, BarI, BbvI, BccI, BceAI, BcgI, BciVI, BcoDI, BfuAI, BfuI, BmrI, BmsI, BmuI, BpiI, BpmI, BpuE1, BsaXI, Bse1I, Bse3DI, BseGI, BseMI, BseMII, BseNI, BseRI, BseXI, BsgI, BslFI, BsmAI, BsmF1, BsmI, Bso31I, BspCNI, BspMI,

BspPI, BspQI, BspTNI, BsrDI, BsrI, Bst6I, BstF5I, BstMAI, BstV1I, BstV2I, BsU I, BtgZI, BtsCI, BtsI-v2, BtsMutI, BveI, CseI, CspCI, Eam1104I, EarI, EciI, Eco31I, Eco57I, Esp3I, FaqI, FauI, FokI, GsuI, HgaI, HphI, HpyAV, LguI, LmnI, LspI109I, LweI, MboII, MlyI, MmeI, MnII, Mva1269I, NmeAIII, PaqCI, PciSI, PctI, PleI, PpsI, PsrI, SchI, SfaNI, TaqII, TspDTI 和/或 TspGWI 靶序列。

[0449] 双链DNA分子可以是扩增的产物。优选地，扩增是滚环扩增。
[0450] 线性双链区可以是至少50个、至少100个、至少250个、至少500个、至少1000个、至少2000个、至少3000个、至少4000个、至少5000个、至少6000个、至少7000个、至少8000个、至少9000个、至少10,000个、至少11,000个、至少12,000个、至少13,000个、至少14,000个或至少15,000个碱基对长。优选地，双链DNA分子为至少50个碱基对长。

[0451] 线性双链区可在第一和/或第二末端处包含3' -OH基团。3' -OH基团可促进与第一和/或第二衔接子分子(其可包含5' 磷酸)的连接。线性双链区可在第一和/或第二末端处包含5' 磷酸。5' 磷酸可促进与第一和/或第二衔接子分子(其可包含3' -OH基团)的连接。

[0452] 线性双链区(例如，双链分子的线性部分)可包含突出端。例如，线性双链区可包含5' 突出端或3' 突出端。线性双链区可包含一个或更多个平端。线性双链区可包含：一个5' 突出端和一个平端、两个5' 突出端、一个3' 突出端和一个平端、两个3' 突出端、或者一个5' 突出端和一个3' 突出端。突出端可具有至少3个核苷酸(优选4至8个核苷酸)。突出端可以在线性双链区的有义链或反义链中。

[0453] 双链DNA分子的线性部分(例如双链分子的线性部分)可以是至少50个、至少100个、至少250个、至少500个、至少1000个、至少2000个、至少3000个、至少4000个、至少5000个、至少6000个、至少7000个、至少8000个、至少9000个、至少10,000个、至少11,000个、至少12,000个、至少13,000个、至少14,000个或至少15,000个碱基对长。优选地，双链DNA分子为至少50个碱基对长。

[0454] 第一衔接子分子和/或第二衔接子分子可以是合成的衔接子分子。

[0455] 第一衔接子分子和/或第二衔接子分子可以不是质粒或载体DNA。

[0456] 衔接子分子可包含双链部分。双链部分可包含少于50个、少于45个、少于40个、少于35个、少于30个、少于25个、少于20个、少于15个或少于10个碱基对。双链部分可包含至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个或至少15个碱基对。

[0457] 衔接子分子可包含5' 磷酸。5' 磷酸可促进与线性双链区的连接。

[0458] 第一衔接子分子可包含与线性双链区的第一末端互补的部分。第二衔接子分子可包含与线性双链区的第二末端互补的部分。第一衔接子分子可包含与线性双链区的第一末端退火的部分。第二衔接子分子可包含与线性双链区的第二末端退火的部分。

[0459] 第一衔接子分子和/或第二衔接子分子可包含突出端。例如，第一衔接子分子和/或第二衔接子分子可包含5' 突出端或3' 突出端。第一衔接子分子和/或第二衔接子分子可包含平端。突出端可具有至少3个核苷酸(优选4至6个核苷酸)。第一衔接子分子和/或第二衔接子分子的突出端可与线性双链区的第一和/或第二末端互补。第一衔接子分子和/或第二衔接子分子的突出端可与线性双链区的第一和/或第二末端退火。

[0460] 第一衔接子分子和/或第二衔接子分子可以不包含IIS型内切核酸酶靶序列。第一

衔接子分子和/或第二衔接子分子可以不包含

[0461] BbsI, BsaI, BsmBI, BspQI, BtgZI, Esp3I, SapI, AarI, Acc36I, AclWI, AcuI, AjuI, AloI, Alw26I, AlwI, ArsI, AsuHPI, BaeI, BarI, BbvI, BccI, BceAI, BcgI, BciVI, BcoDI, BfuAI, BfuI, BmrI, BmsI, BmuI, BpiI, BpmI, BpuEI, BsaXI, Bse1I, Bse3DI, BseGI, BseMI, BseMII, BseNI, BseRI, BseXI, BsgI, BslFI, BsmAI, BsmFI, BsmI, Bso31I, BspCNI, BspMI, BspPI, BspQI, BspTNI, BsrDI, BsrI, Bst6I, BstF5I, BstMAI, BstV1I, BstV2I, BsI, BtgZI, BtsCI, BtsI-v2, BtsMutI, BveI, CseI, CspCI, Eam1104I, EarI, EciI, Eco31I, Eco57I, Esp3I, FaqI, FauI, FokI, GsuI, HgaI, HphI, HpyAV, LguI, LmnI, Lsp1109I, LweI, MboII, MlyI, MmeI, MnII, Mva1269I, NmeAIII, PaqCI, PciSI, PctI, PleI, PpsI, PsrI, SchI, SfaNI, TaqII, TspDTI 和/或 TspGWI SapI 靶序列。

[0462] 第一衔接子分子和/或第二衔接子分子可包含功能部分。功能部分可以是结合分子、靶向序列或探针。

[0463] 功能部分可以是探针。本文中使用的术语“探针”是指可变长度(例如3至1000个碱基长)的DNA、RNA或DNA/RNA嵌合体的片段,其用于检测与探针中的序列互补的靶核苷酸序列的存在。通常来说,探针与这样的单链核酸杂交:所述单链核酸的碱基序列允许由于在探针与靶标之间的互补性引起的探针-靶标碱基配对。因此,功能部分可以是DNA序列、RNA序列或DNA/RNA嵌合体序列。本文中使用的术语“互补”是指根据沃森/克里克(Watson/Crick)配对规则的核苷酸序列的配对。例如,序列5' -GCGGTCCCA-3' 的互补序列为5' -TGGGACCGC-3'。互补序列也可以是与DNA序列互补的RNA的序列。

[0464] 功能部分可以是结合分子。术语“结合分子”是指能够与本文中所述的线性DNA产物结合和/或能够与另外的分子或靶标结合的任何分子。结合分子可以是蛋白质、多肽或肽。结合分子可以是抗体,例如单克隆抗体或多克隆抗体。结合分子可以是抗体片段。

[0465] 功能部分可通过与捕获分子(例如,通过蛋白质-蛋白质相互作用结合的捕获抗体)结合来促进DNA产物的检测。功能部分可与细胞靶标(例如细胞受体)结合。

[0466] 功能部分可以是标签。“标签”可以是能够通过物理、化学和/或生物方法检测双链核酸分子的任何化学实体。标签可以是发色团、荧光团和/或放射性分子。

[0467] 功能部分可以是靶向序列。靶向序列可以是可变长度的DNA或RNA的片段,其用于将DNA产物靶向至细胞中的特定位置。凭借部分闭合的线性DNA产物的增强的核输入,靶向序列可用于提高非病毒基因递送的转染效率。例如,靶向序列可以是DNA核靶向序列(即针对内源DNA结合蛋白的识别序列),例如SV40增强子序列(优选在盒的下游)。

[0468] 为了促进DNA产物的检测和/或定量,功能部分可包含荧光团、放射性化合物或条码。

[0469] 可使用条码测量与部分闭合的线性DNA产物的存在、不存在和/或水平相对应的信号。条码可包含至少一个与条码化部分连接的结合部分,其中条码化部分包含至少一个核苷酸(即其中条码化部分包含长度为至少一个核苷酸的核苷酸序列),并且其中结合部分能够与部分闭合的线性DNA产物的3'突出端、5'突出端或平端结合。结合部分能够与部分闭合的线性DNA产物的3'和/或5'末端结合。可以通过确定条码的条码化部分的存在、不存在和/或水平(例如,通过测序或PCR)来测量信号。条码化部分可包含至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个或至少10个核苷酸。条码可包含至少两个结

合部分(例如,第一结合部分和第二结合部分)。例如,与第一条码化部分连接的第一结合部分可与部分闭合的线性DNA产物的3'末端结合,以及/或者与第二条码化部分连接的第二结合部分可与部分闭合的线性DNA产物的5'末端结合。

[0470] 可使用荧光团(即荧光标记的分子)测量与部分闭合的线性DNA产物的存在、不存在和/或水平相对应的信号,所述荧光团与部分闭合的线性DNA产物的3'突出端、5'突出端或平端连接或结合。该信号可以通过流式细胞术和/或荧光激活细胞分选来测量。

[0471] 功能部分也可促进DNA测序。例如,功能部分可以是测序衔接子。术语“测序衔接子”旨在涵盖一个或更多个核酸结构域,其包含目的测序平台所利用的核酸序列(或其互补序列)的至少一部分,所述目的测序平台例如由 Illumina®(例如HiSeq™、MiSeq™和/或Genome Analyzer™测序系统)、Oxford Nanopore™ Technologies(例如MinION测序系统)、Ion Torrent™(例如Ion PGM™和/或Ion Proton™测序系统)、Pacific Biosciences(例如PACBIO RS II测序系统)、Life Technologies™(例如SOLiD测序系统)、Roche(例如454GS FLX+和/或GS初级测序系统)提供的测序平台或任何其他目的测序平台。

[0472] 提供了参见图17的该方法的实例,其示出了从通过环状DNA模板的滚环扩增而获得经扩增的DNA开始,通过在单个步骤中消化和连接衔接子分子来获得部分闭合的线性DNA产物的工作流程,所述环状DNA模板由Cre重组酶对底物的作用而生成,所述底物包含以相同方向位于目的DNA侧翼的两个LoxP序列。

[0473] 还描述了参见图18的方法,其示出了在该过程的每个循环中,经扩增的双链DNA分子的BsaI消化之后,序列驱动衔接子分子连接。BsaI消化在表达盒的每一侧的5'处产生了4-核苷酸突出末端(上游TCCC 5' 和下游TTTT 5')。自身互补的衔接子分子(在5'处含有4-核苷酸突出末端(GGGA 5')的SEQ ID NO:4)随后连接在表达盒的上游侧。下游衔接子通过含有硫代磷酸酯核苷酸间键联(以星号标记)的互补的寡核苷酸(SEQ ID NO:13和14)的杂交而形成,并且其在5'处形成4-核苷酸突出末端(AAAA 5')。互补衔接子分子连接在表达盒的每一侧,产生了部分闭合的线性DNA产物,所述部分闭合的线性DNA产物对外切核酸酶具有增强的抗性,这是因为在表达盒一侧的硫代磷酸酯核苷酸间键联阻止了外切核酸酶降解部分闭合的线性DNA产物。

[0474] 4. 用于转录和蛋白质表达的方法

[0475] 本发明提供了用于体外转录线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物或部分闭合的线性DNA产物)的方法,其中该方法包括使通过本文中所述方法产生的线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物或部分闭合的线性DNA产物)与聚合酶接触,并产生由线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物或部分闭合的线性DNA产物)编码的转录产物。

[0476] 本发明提供了用于体外转录线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物或部分闭合的线性DNA产物)的方法,其中该方法包括:

[0477] (a) 通过本文中所述的任何方法产生线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物或部分闭合的线性DNA产物);

[0478] (b) 使线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物或部分闭合的线性DNA产物)与聚合酶接触;以及

[0479] (c) 产生由线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物或部分闭合的线性DNA产物)编码的转录产物。

[0480] 本发明提供了用于体外转录线性DNA产物的方法,其中该方法包括:

[0481] (a) 使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积;以及

[0482] (b) 孵育单个连续水性体积以产生线性DNA产物,其中线性DNA产物包含线性双链区,其中线性双链区包含双链DNA分子的线性部分,并且其中第一衔接子分子附加至线性双链区的第一末端以及第二衔接子分子附加至线性双链区的第二末端;以及

[0483] (c) 使线性DNA产物与聚合酶接触;以及

[0484] (d) 产生由线性DNA产物编码的转录产物。

[0485] 该方法可使用产生闭合的线性DNA产物的衔接子分子,例如本文中所述的衔接子分子。用于体外转录闭合的线性DNA产物的方法可包括:

[0486] (a) 使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积;

[0487] (b) 孵育单个连续水性体积以产生闭合的线性DNA产物,其中闭合的线性DNA产物包含线性双链区,其中线性双链区包含双链DNA分子的线性部分,并且其中线性双链区在第一末端处由第一衔接子分子闭合并在第二末端处由第二衔接子分子闭合;

[0488] (c) 使闭合的线性DNA产物与聚合酶接触;以及

[0489] (d) 产生由闭合的线性DNA产物编码的转录产物。

[0490] 该方法可使用包含受保护核苷酸的衔接子分子,例如本文中所述的衔接子分子。用于体外转录线性DNA产物的方法可包括:

[0491] (a) 使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积;

[0492] (b) 孵育单个连续水性体积以产生线性DNA产物,其中线性DNA产物包含线性双链区,其中线性双链区包含双链DNA分子的线性部分,并且其中第一衔接子分子与线性双链区的第一末端连接以及第二衔接子分子与线性双链区的第二末端连接,并且其中第一和第二衔接子分子是包含一个或更多个核酸酶抗性核苷酸(即受保护核苷酸)的核酸分子;

[0493] (c) 使线性DNA产物与聚合酶接触;以及

[0494] (d) 产生由线性DNA产物编码的转录产物。

[0495] 该方法可使用包含受保护核苷酸的衔接子分子以及包含发夹或茎环的衔接子分子,例如本文中所述的衔接子分子。用于体外转录部分闭合的线性DNA产物的方法可包括:

[0496] (a) 使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积;

[0497] (b) 孵育单个连续水性体积以产生部分闭合的线性DNA产物,其中部分闭合的线性DNA产物包含线性双链区,其中线性双链区包含双链DNA分子的线性部分,并且其中第一衔接子分子与线性双链区的第一末端连接以及第二衔接子分子与线性双链区的第二末端连接,并且其中第一衔接子分子是包含一个或更多个核酸酶抗性核苷酸的核酸分子,并且其中线性双链区在第二末端处由第二衔接子分子闭合;

[0498] (c) 使部分闭合的线性DNA产物与聚合酶接触;以及

[0499] (d) 产生由部分闭合的线性DNA产物编码的转录产物。

[0500] 本发明提供了用于产生蛋白质的方法,其中所述方法包括将通过本文中所述方法

产生的线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物或部分闭合的线性DNA产物)引入到细胞(例如原核细胞或真核细胞)或无细胞表达系统中以产生由线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物或部分闭合的线性DNA产物)编码的蛋白质。

[0501] 本发明提供了用于产生蛋白质的方法,其中该方法包括:

[0502] (a) 通过本文中所述的任何方法产生线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物或部分闭合的线性DNA产物);以及

[0503] (b) 将线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物或部分闭合的线性DNA产物)引入到细胞(例如原核细胞或真核细胞)或无细胞表达系统中以产生由线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物或部分闭合的线性DNA产物)编码的蛋白质。

[0504] 本发明提供的用于产生蛋白质的方法包括:

[0505] (a) 使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积;以及

[0506] (b) 孵育单个连续水性体积以产生线性DNA产物,其中线性DNA产物包含线性双链区,其中线性双链区包含双链DNA分子的线性部分,并且其中第一衔接子分子附加至线性双链区的第一末端以及第二衔接子分子附加至线性双链区的第二末端;以及

[0507] (c) 将线性DNA产物引入到细胞(例如原核细胞或真核细胞)或无细胞表达系统中以产生由线性DNA产物编码的蛋白质。

[0508] 该方法可使用产生闭合的线性DNA产物的衔接子分子,例如本文中所述的衔接子分子。用于产生蛋白质的方法可包括:

[0509] (a) 使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积;

[0510] (b) 孵育单个连续水性体积以产生闭合的线性DNA产物,其中闭合的线性DNA产物包含线性双链区,其中线性双链区包含双链DNA分子的线性部分,并且其中线性双链区在第一末端处由第一衔接子分子闭合并在第二末端处由第二衔接子分子闭合;以及

[0511] (c) 将闭合的线性DNA产物引入到细胞(例如原核细胞或真核细胞)或无细胞表达系统中以产生由闭合的线性DNA产物编码的蛋白质。

[0512] 该方法可使用包含受保护核苷酸的衔接子分子,例如本文中所述的衔接子分子。用于产生蛋白质的方法可包括:

[0513] (a) 使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积;

[0514] (b) 孵育单个连续水性体积以产生线性DNA产物,其中线性DNA产物包含线性双链区,其中线性双链区包含双链DNA分子的线性部分,并且其中第一衔接子分子与线性双链区的第一末端连接以及第二衔接子分子与线性双链区的第二末端连接,并且其中第一和第二衔接子分子是包含一个或更多个核酸酶抗性核苷酸(即受保护核苷酸)的核酸分子;以及

[0515] (c) 将线性DNA产物引入到细胞(例如原核细胞或真核细胞)或无细胞表达系统中以产生由线性DNA产物编码的蛋白质。

[0516] 该方法可使用产生部分闭合的线性DNA产物的衔接子分子,例如本文中所述的衔接子分子。用于产生蛋白质的方法可包括:

[0517] (a) 使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触以形成

单个连续水性体积；

[0518] (b) 孵育单个连续水性体积以产生部分闭合的线性DNA产物，其中部分闭合的线性DNA产物包含线性双链区，其中线性双链区包含双链DNA分子的线性部分，并且其中第一衔接子分子与线性双链区的第一末端连接以及第二衔接子分子与线性双链区的第二末端连接，并且其中第一衔接子分子是包含一个或更多个核酸酶抗性核苷酸的核酸分子，并且其中线性双链区在第二末端处由第二衔接子分子闭合；以及

[0519] (c) 将部分闭合的线性DNA产物引入到细胞(例如原核细胞或真核细胞)或无细胞表达系统中以产生由部分闭合的线性DNA产物编码的蛋白质。

[0520] 无细胞表达系统可源自(或来源于)原核细胞或真核细胞。例如，无细胞表达系统可源自(或来源于)兔网织红细胞、小麦胚芽或大肠杆菌(*Escherichia coli*)。

[0521] 细胞可以是原核细胞或真核细胞。细胞可以是动物细胞，例如哺乳动物细胞(例如人细胞)；真菌细胞；微生物的细胞(例如原核细胞或真核细胞)；或植物细胞。优选地，细胞是人细胞。

[0522] 线性DNA产物或闭合的线性DNA产物可包含盒。所期望的蛋白质可由盒来编码。

[0523] 将线性DNA产物引入到细胞中的步骤可体内或体外进行。

[0524] 核酸酶抗性核苷酸(即受保护核苷酸)可以是本文中所述的任何受保护核苷酸。

[0525] 5. 用于细胞转染的方法和细胞转染组合物

[0526] 本发明提供了用于将由本文中所述的任何方法产生的线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物或部分闭合的线性DNA产物)细胞转染到细胞中的方法。

[0527] 本发明提供了用于将线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物或部分闭合的线性DNA产物)细胞转染到细胞中的方法，其中该方法包括：

[0528] (a) 通过本文中所述的任何方法产生线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物或部分闭合的线性DNA产物)；

[0529] (b) 使细胞与线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物或部分闭合的线性DNA产物)接触；以及

[0530] (c) 将线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物或部分闭合的线性DNA产物)转染到细胞的胞质溶胶中。

[0531] 本发明提供了用于将线性DNA细胞转染到细胞中的方法，其中该方法包括：

[0532] (a) 使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积；以及

[0533] (b) 孵育单个连续水性体积以产生线性DNA产物，其中线性DNA产物包含线性双链区，其中线性双链区包含双链DNA分子的线性部分，并且其中第一衔接子分子附加至线性双链区的第一末端以及第二衔接子分子附加至线性双链区的第二末端；

[0534] (c) 使线性DNA产物与细胞接触；以及

[0535] (d) 将线性DNA产物转染到细胞的胞质溶胶中。

[0536] 该方法可使用产生闭合的线性DNA产物的衔接子分子，例如本文中所述的衔接子分子。用于将闭合的线性DNA产物细胞转染到细胞中的方法可包括：

[0537] (a) 使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积；

[0538] (b) 孵育单个连续水性体积以产生闭合的线性DNA产物,其中闭合的线性DNA产物包含线性双链区,其中线性双链区包含双链DNA分子的线性部分,并且其中线性双链区在第一末端处由第一衔接子分子闭合并在第二末端处由第二衔接子分子闭合;

[0539] (c) 使闭合的线性DNA产物与细胞接触;以及

[0540] (d) 将闭合的线性DNA产物转染到细胞的胞质溶胶中。

[0541] 该方法可使用包含受保护核苷酸的衔接子分子,例如本文中所述的衔接子分子。用于将线性DNA产物细胞转染到细胞中的方法可包括:

[0542] (a) 使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积;

[0543] (b) 孵育单个连续水性体积以产生线性DNA产物,其中线性DNA产物包含线性双链区,其中线性双链区包含双链DNA分子的线性部分,并且其中第一衔接子分子与线性双链区的第一末端连接以及第二衔接子分子与线性双链区的第二末端连接,并且其中第一和第二衔接子分子是包含一个或更多个核酸酶抗性核苷酸(即受保护核苷酸)的核酸分子;

[0544] (c) 使线性DNA产物与细胞接触;以及

[0545] (d) 将线性DNA产物转染到细胞的胞质溶胶中。

[0546] 该方法可使用包含受保护核苷酸的衔接子分子,例如本文中所述的衔接子分子。用于将部分闭合的线性DNA产物细胞转染到细胞中的方法可包括:

[0547] (a) 使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积;

[0548] (b) 孵育单个连续水性体积以产生部分闭合的线性DNA产物,其中部分闭合的线性DNA产物包含线性双链区,其中线性双链区包含双链DNA分子的线性部分,并且其中第一衔接子分子与线性双链区的第一末端连接以及第二衔接子分子与线性双链区的第二末端连接,并且其中第一衔接子分子是包含一个或更多个核酸酶抗性核苷酸的核酸分子,并且其中线性双链区在第二末端处由第二衔接子分子闭合;

[0549] (c) 使部分闭合的线性DNA产物与细胞接触;以及

[0550] (d) 将部分闭合的线性DNA产物转染到细胞的胞质溶胶中。

[0551] 本发明提供了细胞转染组合物,其包含通过本文中所述的方法产生的(或可由此获得的)线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)。

[0552] 细胞转染组合物可包含或可不包含载体,例如试剂或制剂。优选地,载体促进了线性DNA产物在靶位点处的累积并且/或者保护了线性DNA产物免受与生物环境组分的不期望相互作用并且/或者保护了线性DNA产物免受代谢和/或降解。

[0553] 本发明还提供了细胞转染方法,其包括(在体外)使待被转染的细胞与由本发明的方法所产生的线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)接触,并且其中将线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)转染到细胞的胞质溶胶中。

[0554] 可在(例如培养皿、培养瓶或培养孔等中的)细胞培养基中提供待被转染的一种或更多种细胞。可将线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)直接添加至细胞培养基中或者可将细胞添加至包含线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)的溶液中,所述溶液例如盐水、缓冲溶液或细胞培养基。

[0555] 载体可以是病毒载体或非病毒载体。病毒载体包括用于递送线性DNA产物的慢病

毒载体、腺病毒载体、逆转录病毒载体、或腺相关病毒载体。非病毒载体(carrier) (或载体(vector)) 包括线性DNA产物与阳离子物质复合, 所述阳离子物质例如阳离子细胞穿膜肽(cell penetrating peptide, CPP); DNA结合阳离子组分, 例如聚赖氨酸链; 阳离子聚合物或树状聚合物, 例如聚乙烯亚胺(polyethylenimine, PEI)、聚-D,L-丙交酯-co-乙交酯(poly-D,L-lactide-co-glycolide, PLGA)、以及PEG和聚赖氨酸的嵌段共聚物, 以及/或者阳离子脂质(例如脂质转染胺(lipofectamine))。

[0556] 载体可以是与线性DNA产物缀合的适配体(例如RNA) 和/或小分子(例如, 胆固醇、胆汁酸、和/或脂质)、聚合物、蛋白质(例如抗体)。载体可以是用于包封线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物) 的纳米粒制剂。

[0557] 载体可以是用靶向配体(例如抗体)、肽、小分子(叶酸和/或生物素)、或存在于胞外基质的聚合物(例如透明质酸和/或硫酸软骨素)对线性DNA产物的修饰, 或者对双链核酸分子的疏水修饰(例如使用胆固醇和/或 α -生育酚)。

[0558] 细胞转染组合物可包含或可不包含选自光增敏剂和/或自由基引发剂(例如光敏引发剂)的物质。优选地, 这种物质改善了线性DNA产物在靶位点处的功能并且/或者保护了线性DNA产物免受代谢和/或降解。

[0559] 本发明还提供了可由本发明的方法而获得的细胞。因此, 细胞可包含由本发明的方法所产生的线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)。

[0560] 本发明还提供了用由本发明的方法而产生的用线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)所转染的细胞。

[0561] 细胞可以是动物细胞, 例如哺乳动物细胞(例如人细胞); 真菌细胞; 微生物的细胞(例如原核细胞或真核细胞); 或植物细胞。优选地, 细胞是人细胞。

[0562] 使细胞与线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)接触的步骤可在体内进行。例如可将线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)施用于有此需要的生物体(例如对象)。生物体(例如对象)可以是动物, 例如哺乳动物(例如人); 真菌; 微生物; 或植物。

[0563] 本文中所述的任何或所有线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)可通过递送颗粒例如脂质体、纳米粒、外排体、大囊泡(macrovesicle)、病毒载体或非病毒载体来递送至细胞。本文中所述的任何或所有线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)可使用基因枪来递送至细胞。本文中所述的任何或所有线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)可通过电穿孔来递送至细胞。本文中所述的任何或所有线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)可通过流体动力针来递送至细胞。本文中所述的线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)可在没有载体的情况下经递送至细胞。

[0564] 纳米粒优选是自组装的纳米粒。纳米粒可以是由这样的过程产生的纳米粒, 在该过程中, 在没有外部指导的情况下, 由于在组分自身中的特异性、局部的相互作用, 预先存在的组分(例如脂质组分、本文中所述的DNA产物)形成有组织的结构。

[0565] DNA产物与脂质组分可进行可逆的相互作用以形成自组装的纳米粒。DNA产物与脂质组分可在自组装的纳米粒中通过分子间力来进行可逆的相互作用。DNA产物与脂质组分可在自组装的纳米粒中通过非共价相互作用来进行可逆的相互作用。DNA产物与脂质组分可在自组装的纳米粒中通过氢键、范德瓦耳斯(van der Waals)、疏水性和/或静电的相互作用来进行可逆的相互作用。DNA产物与脂质组分可以不通过除了自组装的纳米粒中的分

子间力之外的力来缀合或连接。

[0566] 6. 药物组合物和用于产生药物组合物的方法

[0567] 本发明提供了包含本文中所述的线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)以及可药用载体或赋形剂的药物组合物。

[0568] 本发明提供了包含通过本文中所述的方法产生(或可由此获得)的线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)以及可药用载体或赋形剂的药物组合物。

[0569] 本发明提供了用于产生药物组合物的方法,所述药物组合物包含线性DNA产物,其中所述方法包括进行本文中所述的方法并且将所得的线性DNA产物与可药用载体或赋形剂进行配制。

[0570] 本发明提供了用于产生药物组合物的方法,其中该方法包括:

[0571] (a) 通过本文中所述的任何方法来产生线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物);

[0572] (b) 将线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)与可药用载体或赋形剂进行配制。

[0573] 本发明提供了用于产生药物组合物的方法,其中该方法包括:

[0574] (a) 使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积;以及

[0575] (b) 孵育单个连续水性体积以产生线性DNA产物,其中线性DNA产物包含线性双链区,其中线性双链区包含双链DNA分子的线性部分,并且其中第一衔接子分子附加至线性双链区的第一末端以及第二衔接子分子附加至线性双链区的第二末端;以及

[0576] (c) 将线性DNA产物与可药用载体或赋形剂进行配制。

[0577] 该方法可使用产生闭合的线性DNA产物的衔接子分子,例如本文中所述的衔接子分子。用于产生药物组合物的方法可包括:

[0578] (a) 使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积;

[0579] (b) 孵育单个连续水性体积以产生闭合的线性DNA产物,其中闭合的线性DNA产物包含线性双链区,其中线性双链区包含双链DNA分子的线性部分,并且其中线性双链区在第一末端处由第一衔接子分子闭合并在第二末端处由第二衔接子分子闭合;以及

[0580] (c) 将闭合的线性DNA产物与可药用载体或赋形剂进行配制。

[0581] 该方法可使用包含受保护核苷酸的衔接子分子,例如本文中所述的衔接子分子。用于产生药物组合物的方法可包括:

[0582] (a) 使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积;

[0583] (b) 孵育单个连续水性体积以产生线性DNA产物,其中线性DNA产物包含线性双链区,其中线性双链区包含双链DNA分子的线性部分,并且其中第一衔接子分子与线性双链区的第一末端连接以及第二衔接子分子与线性双链区的第二末端连接,并且其中第一和第二衔接子分子是包含一个或更多个核酸酶抗性核苷酸(即受保护核苷酸)的核酸分子;

[0584] (c) 将线性DNA产物与可药用载体或赋形剂进行配制。

[0585] 该方法可使用产生部分闭合的线性DNA产物的衔接子分子,例如本文中所述的衔接子分子。用于产生药物组合物的方法可包括:

[0586] (a) 使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一和第二衔接子分子接触以形成

单个连续水性体积；

[0587] (b) 孵育单个连续水性体积以产生部分闭合的线性DNA产物，其中部分闭合的线性DNA产物包含线性双链区，其中线性双链区包含双链DNA分子的线性部分，并且其中第一衔接子分子与线性双链区的第一末端连接以及第二衔接子分子与线性双链区的第二末端连接，并且其中第一衔接子分子是包含一个或更多个核酸酶抗性核苷酸的核酸分子，并且其中线性双链区在第二末端处由第二衔接子分子闭合；以及

[0588] (c) 将部分闭合的线性DNA产物与可药用载体或赋形剂进行配制。

[0589] 药物组合物可配制成与一种或更多种可药用固态载体结合的丸剂、片剂或胶囊剂，或者配制在一种或更多种可药用溶剂中的溶液剂，或者配制在一种或更多种可药用溶剂或载体中的乳剂、混悬剂或分散剂。制剂还可包含另一些可药用赋形剂例如稳定剂、抗氧化剂、黏合剂、着色剂或者乳化剂或味道改变剂以及延长释放制剂。

[0590] 药物组合物可经口、表面、肠胃外或经皮或通过吸入施用。药物组合物可使用合适的无菌溶液剂通过注射或静脉内输注施用。表面剂型可以是乳膏剂、软膏剂、贴剂、或适合于经皮和表面剂型的类似载体。

[0591] 药物组合物可溶解或混悬于液体载体中，或者配制为颗粒剂（小颗粒或晶粒（grain））、丸粒剂（在有或没有赋形剂的情况下，由高度纯化的组合物组成的小的无菌固体块，其通过形成颗粒剂或通过压缩和成型制成）、或经包衣延长释放的丸粒剂（其中组合物本身为已施加不同量的包衣的颗粒剂形式的固体剂型，并且其以这样的方式释放组合物：与呈现为常规剂型的组合物相比，允许降低给药频率）。

[0592] 药物组合物的另一些形式包括丸剂（包含旨在经口施用的组合物的小、圆的固体剂型）、散剂（干燥、细碎的组合物与一种或更多种可药用添加剂的紧密混合物，其旨在可内部或外部使用）、酏剂（包含经溶解的组合物的透明、有令人愉快的风味、甜的水醇液体；其旨在经口使用）、口香糖（chewing gum）（多种形状的甜的和矫味的不溶性塑料物质，其在被咀嚼时将组合物释放到口腔中）、糖浆剂（包含组合物和高浓度的蔗糖或其他糖的经口溶液剂；所述术语还用于包括在甜且黏的载体中制备的任何其他液体剂型，包括经口混悬剂）、片剂（包含组合物、有或没有合适的稀释剂的固体剂型）、可咀嚼片剂（包含组合物、有或没有合适的稀释剂的固体剂型，其旨在用于咀嚼，在口腔中产生令人愉快的味道残留，易于吞咽且不留下苦涩或不愉快的余味）、包衣片剂或延迟释放片剂、分散片剂、泡腾片剂、延长释放片剂、膜包衣片剂、或膜包衣延长释放片剂，其中所述片剂以这样的方式配制：使得所包含的组合物在摄入之后在延长的时间段内可用。

[0593] 在药物组合物的另一些形式中，可提供用于溶液剂的片剂、用于混悬剂的片剂、多层片剂、延长释放多层片剂，其中所述片剂以这样的方式配制：与呈现为常规剂型的组合物相比，使得允许至少降低给药频率。经口崩解片剂、延迟释放经口崩解片剂、可溶性片剂、糖包衣片剂、渗透片剂（osmotic）等也是合适的。

[0594] 除组合物之外，经口剂型药物组合物还可包含一种或更多种非活性药物成分，例如稀释剂、增溶剂、醇类、黏合剂、控制释放聚合物、肠溶聚合物、崩解剂、赋形剂、着色剂、矫味剂、甜味剂、抗氧化剂、防腐剂、颜料（pigment）、添加剂、填充剂、助悬剂、表面活性剂（例如，阴离子的、阳离子的、两性的和非离子的）等。多种经FDA批准的表面非活性成分存在于FDA的“非活性成分数据库（The Inactive Ingredients Database）”中，其中包含如由制造

商特别指定的非活性成分。

[0595] 本文中使用的可注射和输注剂型包括但不限于：脂质体可注射剂型，其由脂质体（通常由磷脂构成的脂质双层囊泡，用于包封组合物）组成或形成脂质体；注射剂，其包含旨在肠胃外使用的无菌制剂；乳剂注射剂，其包含旨在肠胃外施用的由无菌、无热原制剂组成的乳剂；或脂质复合物注射剂。

[0596] 例如，线性DNA产物（例如闭合的线性DNA产物）可通过鼓室内注射（例如到中耳中）以及/或者注射到外耳、中耳、和/或内耳中来施用。这样的方法在本领域中是常规使用的，例如，用于将类固醇和抗生素施用于人耳中。例如，可通过耳的圆窗（round window）或通过耳蜗囊进行注射。

[0597] 药物组合物的另一些形式包括：用于溶液注射剂的散剂，其是旨在重构以形成用于肠胃外使用的溶液的无菌制剂；用于混悬注射剂的散剂，其是旨在重构以形成用于肠胃外使用的混悬液的无菌制剂；用于脂质体混悬注射剂的冻干散剂，其是旨在重构以用于肠胃外使用的无菌冷冻干燥制剂，所述无菌冷冻干燥制剂已以允许在重构时形成脂质体（通常由磷脂构成的脂质双层囊泡，用于将组合物包封在脂质双层内或水性空间中）的方式配制；或者用于溶液注射剂的冻干散剂，其中冻干（“冷冻干燥”）是涉及在极低压力下从冷冻状态下的产物中除去水的过程。

[0598] 混悬注射剂包含适合于注射的液体制剂，其由分散在整个液相中的固体颗粒组成（所述颗粒在液相中不可溶），还可由分散在整个水相中的油相组成，反之亦然。混悬脂质体注射剂包含适合于注射的液体制剂，其由以形成脂质体（通常由磷脂构成的脂质双层囊泡，用于将组合物包封在脂质双层内或水性空间中）这样的方式分散在整个水相中的油相组成。声处理的混悬注射剂包含适合于注射的液体制剂，其由分散在整个液相中的固体颗粒组成，所述颗粒在液相中不可溶。另外，对产品进行声处理，同时使气体鼓泡通过混悬液，并且这导致由固体颗粒形成微球。

[0599] 在另一施用的模式中，药物组合物可经导管或泵原位施用。导管或泵可以例如引导组合物进入靶位置中。

[0600] 肠胃外载体系统可包含一种或更多种药学上合适的赋形剂，例如溶剂和共溶剂、增溶剂、润湿剂、助悬剂、增稠剂、乳化剂、螯合剂、缓冲剂、pH调节剂、抗氧化剂、还原剂、抗微生物防腐剂、填充剂、保护剂、张度调节剂和特殊添加剂。适合用于肠胃外施用的制剂方便地包含组合物的无菌油性或水性制剂，其优选与接受者的血液等张，但这不是必需的。

[0601] 本文中使用的吸入剂型包括但不限于气雾剂（在压力下被包装并且包含组合物的产品，所述组合物在启动合适的阀系统之后被释放，旨在表面施加于皮肤以及局部施加到鼻（鼻气雾剂）、口（舌和舌下气雾剂）或肺（吸入气雾剂）中）。泡沫气雾剂是包含组合物、表面活性剂、水性或非水性液体和抛射剂的剂型，因此如果抛射剂在内（非连续的）相（即水包油型的）中，则排出稳定的泡沫，并且如果抛射剂在外（连续的）相（即油包水型的）中，则排出喷雾或快速破裂的泡沫。计量气雾剂是由计量剂量阀组成的加压剂型，其允许在每次启动之后递送均匀量的喷雾。粉末气雾剂是在压力下包装并且包含散剂形式的组合物的产品，所述组合物在启动合适的阀系统之后被释放。气溶胶喷雾剂是气雾剂产品，其利用压缩气体作为抛射剂以提供必要的力以将产品作为湿喷雾喷出，并且适用于在水性溶剂中的组合物溶液剂。

[0602] 经皮剂型可包括但不限于贴剂,即通常包含通常施加于身体上的外部部位的黏着背衬(adhesive backing)的药物递送系统,其中成分(包含组合物)从贴剂的一些部分被动扩散或主动运输,并从而凭借贴剂,成分(包含组合物)被递送至身体的外表面或身体中。多种类型的经皮贴剂例如基质、储库和其他是本领域已知的。

[0603] 表面剂型可包括本领域已知的多种剂型,例如洗剂(乳剂、液体剂型,其中该剂型通常用于外部施加于皮肤)、增强洗剂(增强组合物递送的洗剂剂型,其中增强不是指剂型中组合物的强度)、凝胶剂(半固体剂型,其包含胶凝组合物以为溶液或胶体分散体提供挺度,其中凝胶剂可包含悬浮颗粒)和软膏剂(半固体剂型,通常包含小于20%水和挥发物以及大于50%碳氢化合物,蜡或多元醇作为载剂,其中该剂型通常用于外部施加于皮肤或黏膜)。另一些实施方案包括增强软膏剂(增强组合物递送的软膏剂型,其中增强不是指剂型中组合物的强度)、乳膏剂(乳剂,半固体剂型,通常包含大于20%水和挥发物和/或小于50%碳氢化合物,蜡或多元醇也可用作载剂,其中该剂型通常用于外部施加于皮肤或黏膜)和增强乳膏剂(增强组合物递送的乳膏剂型,其中增强不是指剂型中组合物的强度)。本文中使用的“乳剂”是指由两相系统组成的剂型,所述两相系统包含至少两种不混溶的液体,其中一种作为液滴、内相或分散相分散在另一种液体内,外相或连续相通常用一种或更多种乳化剂稳定,其中乳剂用作剂型术语,除非更具体的术语是适用的(例如乳膏剂、洗剂、软膏剂)。另一些实施方案包括混悬剂(液体剂型,其包含分散于液体载剂中的固体颗粒)、延长释放的混悬剂、糊剂(半固体剂型,包含细分散于脂肪载剂中的大比例(20%至50%)固体,其中该剂型通常用于外部施加于皮肤或黏膜)、溶液剂(澄清均质液体剂型,其包含溶解于溶剂或相互混溶的溶剂的混合物中的一种或更多种化学物质)以及散剂。

[0604] 表面剂型组合物包含组合物和一种或更多种非活性药物成分,例如赋形剂、着色剂、颜料、添加剂、填充剂、软化剂、表面活性剂(例如,阴离子、阳离子、两性和非离子表面活性剂)、渗透促进剂(例如,醇、脂肪醇、脂肪酸、脂肪酸酯和多元醇)等。多种经FDA批准的表面非活性成分存在于FDA的“非活性成分数据库”中,其中包含如由制造商特别指定的非活性成分。

[0605] 7. 线性DNA产物

[0606] 本发明提供了本文中所述的线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)。

[0607] 本发明提供了闭合的线性DNA产物,其包含线性双链区,其中线性双链区包含双链DNA分子的线性部分,并且其中线性双链区在第一末端处由第一衔接子分子闭合并在第二末端处由第二衔接子分子闭合。

[0608] 本发明提供了闭合的线性DNA产物,其包含双链DNA分子的线性部分,其中双链DNA分子的线性部分在第一末端处由第一衔接子分子闭合并在第二末端处由第二衔接子分子闭合。

[0609] 本发明提供了线性DNA产物,其包含线性双链区,其中线性双链区包含双链DNA分子的线性部分,并且其中第一衔接子分子与线性双链区的第一末端连接以及第二衔接子分子与线性双链区的第二末端连接,并且其中第一和第二衔接子分子是包含一个或更多个核酸酶抗性核苷酸的核酸分子。

[0610] 本发明提供了线性DNA产物,其包含双链DNA分子的线性部分,其中第一衔接子分子与双链DNA分子的线性部分的第一末端连接以及第二衔接子分子与双链DNA分子的线性

部分的第二末端连接，并且其中第一和第二衔接子分子是包含一个或更多个核酸酶抗性核苷酸的核酸分子。

[0611] 本发明提供了部分闭合的线性DNA产物，其包含双链DNA分子的线性部分，其中第一衔接子分子与双链DNA分子的线性部分的第一末端连接以及第二衔接子分子与双链DNA分子的线性部分的第二末端连接，并且其中第一衔接子分子是包含一个或更多个核酸酶抗性核苷酸的核酸分子，并且其中双链DNA分子的线性部分在第二末端处由第二衔接子分子闭合。因此，本发明提供了部分闭合的线性DNA产物，其在第二末端处闭合(或共价闭合)并在第一末端处开放。部分闭合的线性DNA产物在开放末端区中和/或在第一末端处包含一个或更多个核酸酶抗性核苷酸。开放末端区可在分子的3'末端或5'末端处。

[0612] 开放末端区是指位于最靠近DNA产物的开放末端的至少5个、至少10个、至少15个、或至少20个碱基对。部分闭合的线性DNA产物可在有义链和/或反义链中包含一个或更多个核酸酶抗性核苷酸。因此，例如，位于最靠近部分闭合的线性DNA产物的开放末端的20个碱基对的一个或更多个核苷酸可以是核酸酶抗性核苷酸。优选地，部分闭合的线性DNA产物在开放末端区中包含至少5个核酸酶抗性核苷酸。

[0613] 部分闭合的线性DNA产物可包含在第一末端处闭合并在第二末端处开放的双链DNA部分。部分闭合的线性DNA产物可包含在第一末端处由单链部分(即其在第一末端处可包含第一发夹)闭合并在第二末端处开放的双链DNA部分。部分闭合的线性DNA产物可在与第二末端相邻的开放末端区中包含一个或更多个核酸酶抗性核苷酸。与第二末端相邻的开放末端区可在分子的3'末端或5'末端。与第二末端相邻的开放末端区可包含位于部分闭合的线性DNA产物的第二末端处的至少1个、至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个、至少16个、至少17个、至少18个、至少19个、至少20个、至少25个、至少30个、至少35个、至少40个、至少45个、或至少50个核苷酸。换言之，与第二末端相邻的开放末端区可包含介于并包括在第二末端的末端核苷酸与从第二末端的末端核苷酸起计数的第2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、或50位处的核苷酸之间的任何核苷酸。

[0614] 与第二末端相邻的开放末端区可包含有义链和反义链。与第二末端相邻的开放末端区可在有义链或反义链中包含一个或更多个核酸酶抗性核苷酸。与第二末端相邻的开放末端区可在有义链和反义链二者中包含一个或更多个核酸酶抗性核苷酸。与第二末端相邻的开放末端区可在有义链和反义链二者中包含两个或更多个、三个或更多个、四个或更多个、或者五个或更多个核酸酶抗性核苷酸。优选地，与第二末端相邻的开放末端区在有义链和反义链二者中包含五个核酸酶抗性核苷酸。

[0615] 部分闭合的线性DNA产物可在5'末端或3'末端处包含发夹环。部分闭合的线性DNA产物可在第一末端处包含第一衔接子分子以及在第二末端处包含第二衔接子分子。第一衔接子分子可包含发夹并且第二衔接子可包含一个或更多个受保护核苷酸(即对核酸酶(例如外切核酸酶)消化具有抗性的核苷酸)。发夹可赋予对核酸酶(例如外切核酸酶)消化的抗性。受保护核苷酸的存在可赋予对核酸酶(例如外切核酸酶)消化的抗性。部分闭合的线性DNA产物可以是这样的DNA分子：所述DNA分子具有在第一末端处通过第一衔接子(例如发夹衔接子)与第一末端连接而闭合的双链部分，并且在第二末端处包含含有受保护核苷酸(即

对核酸酶(例如外切核酸酶)消化具有抗性的核苷酸)的双链线性衔接子。

[0616] 部分闭合的线性DNA产物可包含(i)盒,其中盒包含有义链和反义链;以及(ii)部分闭合的线性DNA产物的开放末端区中的一个或更多个核酸酶抗性核苷酸,其中开放末端区是盒的有义链的5'。部分闭合的线性DNA产物可包含(i)盒,其中盒包含有义链和反义链;以及(ii)部分闭合的线性DNA产物的开放末端区中的一个或更多个核酸酶抗性核苷酸,其中开放末端区是盒的反义链的5'。部分闭合的线性DNA产物可包含(i)盒,其中盒包含有义链和反义链;以及(ii)部分闭合的线性DNA产物的开放末端区中的一个或更多个核酸酶抗性核苷酸,其中开放末端区是盒的有义链的3'。部分闭合的线性DNA产物可包含(i)盒,其中盒包含有义链和反义链;以及(ii)部分闭合的线性DNA产物的开放末端区中的一个或更多个核酸酶抗性核苷酸,其中开放末端区是盒的反义链的3'。

[0617] 部分闭合的线性DNA产物可包含(i)盒,其中盒包含有义链和反义链;(ii)部分闭合的线性DNA产物的开放末端区中的一个或更多个核酸酶抗性核苷酸,其中开放末端区是盒的有义链的5';以及(iii)部分闭合的线性DNA产物的开放末端区中的一个或更多个核酸酶抗性核苷酸,其中开放末端区是盒的反义链的3'。

[0618] 部分闭合的线性DNA产物可包含(i)盒,其中盒包含有义链和反义链;(ii)部分闭合的线性DNA的开放末端区中的一个或更多个核酸酶抗性核苷酸,其中开放末端区是盒的有义链的3';以及(iii)部分闭合的线性DNA产物的开放末端区中的一个或更多个核酸酶抗性核苷酸,其中开放末端区是盒的反义链的5'。

[0619] 闭合的线性DNA产物、线性DNA产物或部分闭合的线性DNA产物可包含盒,任选的单个盒。双链DNA分子(闭合的线性DNA产物、线性DNA产物或部分闭合的线性DNA产物)的线性部分可包含盒,任选单个盒。因此,该盒(或单个盒)位于第一和第二衔接子分子之间。

[0620] 本文中使用的术语“单个盒”旨在涵盖这样的分子:不包含多个盒或不由多个盒组成。换言之,闭合的线性DNA产物、线性DNA产物、或部分闭合的线性DNA产物包含仅单个盒,该单个盒可包含目的基因的单个编码序列。单个盒可以不包含以下或不由以下组成:多个串联重复序列、和/或多联体DNA。本文中使用的术语“单个盒”旨在涵盖目的DNA序列的单个拷贝,例如编码序列的单个拷贝。因此,“单个盒”可以不涵盖包含串联连接的相同DNA序列的多个拷贝或由串联连接的相同DNA序列的多个拷贝组成的盒。单个盒可包含目的基因的集合。例如,单个盒可包含至少两个、三个、四个、或五个目的基因的序列。目的基因在单个盒中可以不是相同的。

[0621] 本发明提供了通过本文中所述的任何方法可获得的线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物或部分闭合的线性DNA产物)。

[0622] 8. 用途与应用

[0623] 本发明提供了本文中所述的线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)在产生病毒递送系统或非病毒递送系统中的用途。

[0624] 本发明提供了线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)在产生病毒递送系统或非病毒递送系统中的用途,其中线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)通过进行本文中所述的方法来产生。

[0625] 本发明提供了包含本文中所述的线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)的病毒递送系统或非病毒递送系统。本发明提供了包含线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)的

病毒递送系统或非病毒递送系统,其中线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)通过进行本文中所述的方法来产生。

[0626] 病毒载体

[0627] 产生病毒载体(例如AAV载体)的方法是本领域已知的。最普遍使用的方法包括通过三个细菌质粒共转染HEK293。第一个质粒编码Rep和Cap元件,第二个质粒是辅助质粒,而第三个质粒编码具有末端反向重复(inverted terminal repeat, ITR)的目的遗传有效载荷。围绕用于病毒制备(例如AAV)的质粒的用途有数个问题,即:1)质粒的产生是耗时并昂贵的,2)在大肠杆菌中ITR序列的增殖是有难度的,3)将质粒骨架并入到病毒衣壳(例如AAV衣壳)中可具有挑战性(例如关于抗生素抗性标志物的问题)。产生病毒载体的方法可使用其他细胞系。例如,适合用于产生病毒载体的细胞系可以是Vero细胞,或任何其他稳定的细胞系。这些问题共同代表了在产生病毒载体(例如AAV产生)中的主要瓶颈。因此,本文中所述的方法提供了适合用于产生病毒载体的线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)。线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)用质粒载体克服了以上问题。

[0628] 本发明提供了产生病毒载体的方法,所述方法包括在使得产生病毒载体的条件下将通过本文中所述的方法产生的线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)引入到细胞中。线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)可编码至少一种产生病毒载体所需的元件。例如,线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)可编码Rep和/或Cap元件。线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)可编码辅助质粒元件。线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)可编码Rep、Cap和辅助质粒元件。线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)可编码转基因。方法可以是体内的或体外方法。细胞可以是动物细胞,优选哺乳动物细胞,例如人细胞(例如HEK293T、HEK293、CAP、CAP-T、或CHO)。细胞可以是在组织培养细胞系中体外培养的细胞。

[0629] 优选地,载体是AAV载体或慢病毒载体。

[0630] 本发明还提供了将病毒载体(例如闭合的线性DNA产物)递送至细胞的方法,其包括使通过本文中所述的方法产生的病毒载体与细胞接触。细胞可以是动物细胞,优选哺乳动物细胞,例如人细胞。

[0631] 本发明还提供了通过本文中所述的方法可获得的细胞。

[0632] 非病毒载体

[0633] 产生非病毒载体的方法是本领域已知的。非病毒载体的用途具有超越病毒载体的数个优势,包括由于其非免疫原性、无限制的包装能力和低相关的毒性而有机会重复给药。大多数用于产生非病毒载体的方法使用质粒DNA。因此,通过本文中所述的方法产生的线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)适合用于产生非病毒载体。由本发明的方法产生的线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)克服了在制备非病毒载体中使用质粒载体的问题。例如,不像质粒DNA,线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)不包含细菌骨架,从而允许更多转基因拷贝/mg DNA。另外,线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)不包含抗生素抗性基因和细菌污染物。此外,线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)提供了持久的转基因表达(由于外切核酸酶抗性核苷酸的存在),以及产生非病毒载体的更成本有效的过程。

[0634] 本发明提供了将非病毒载体递送至细胞的方法,其包括使包含线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)的非病毒载体与细胞接触。细胞可以是动物细胞,优选哺乳动物细胞,例如人细胞。

[0635] 本发明还提供了通过本文中所述的方法可获得的细胞。

[0636] 一般治疗和诊断用途

[0637] 通过本文中所述的方法产生的线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)尤其适合用于治疗。本发明提供了本文中所述的用于治疗的线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)。本发明提供了通过本文中所述的方法可获得的用于治疗的线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)。线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)可编码治疗蛋白的序列、疫苗的部分、或遗传改造机制的元件,其用于治疗对象中的疾病或感染。

[0638] 本发明还提供了本文中所述的用作药剂的线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)。本发明还提供了通过本文中所述的方法可获得的用作药物的线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)。本发明还提供了本文中所述的线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)用于制备用于治疗疾病的药物的用途。本发明还提供了通过本文中所述的方法可获得的线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)用于制备用于治疗疾病的药物的用途。

[0639] 线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)可编码治疗性蛋白的序列、疫苗的部分、或遗传改造机制的元件,其用于治疗对象中的疾病或感染。

[0640] 本发明还提供了通过本文中所述的方法产生的用于治疗疾病的线性DNA产物。

[0641] 本发明还提供了在对象中治疗疾病的方法,其包括向对象施用本文中所述的线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)。本发明还提供了在对象中治疗疾病的方法,其包括向对象施用通过本文中所述的方法可获得的线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)。优选地,施用于对象的线性DNA产物的量是治疗活性量。

[0642] 本文中所述的线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)可用于治疗任何疾病或病症。例如,线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)可用于治疗一种或更多种疾病和/或病症,所述疾病和/或病症选自遗传病症(例如单基因病症)、癌症、HIV、其他病毒感染(例如由冠状病毒(例如COVID-19)导致的感染、甲型肝炎、乙型肝炎、2型单纯疱疹病毒、流行性感冒、麻疹和/或呼吸道合胞病毒)、神经退行性疾病(例如帕金森病(Parkinson's disease)和/或多聚谷氨酰胺病(例如亨廷顿病))、眼部疾病(例如黄斑变性)和肝衰竭。优选地,将线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)用于治疗遗传病症。甚至更优选地,将线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)用于治疗单基因病。例如,线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)可用于治疗镰状细胞贫血、囊性纤维化、亨廷顿病、和迪谢内肌营养不良、血友病A、 α 1-抗胰蛋白酶缺乏症、原发性纤毛运动不良症、或早产儿呼吸窘迫综合征。

[0643] 用线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)治疗的对象可接受本文中所述的呈任何药物组合物的形式的线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)。

[0644] 用线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)治疗的对象可接受线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)与用于相关病症的其他治疗形式的组合,包括用通常用于治疗该病症的药物来治疗。药物可以以一个或数个剂量单元来施用。技术人员(例如医学从业人员)能够很好地根据对象的具体状况为对象确定适当的剂量方案。

[0645] 本文中使用的“施用”意指按照以上更详细的描述(参见“用于产生药物组合物的方法”),将线性DNA产物引入到对象的身体中。一些实例包括但不限于经口、表面、经颊、舌下、经肺、经皮、经黏膜,以及皮下、腹膜内、静脉内和肌内注射或者经过消化管以液体或固体剂量的形式。

[0646] 本文中使用的短语“治疗活性量”意指当施用于对象以用于治疗疾病时足以实现这样的疾病治疗的线性DNA产物的量。“治疗活性量”将根据例如以下因素而不同,例如使用的具体产物、对象的疾病的严重性、对象的年龄和相对健康以及施用的途径和形式。基于这样的因素为具体对象确定相关的治疗活性量对于本领域的技术人员(例如主治医疗人员)而言是常规的。本文中所述的疾病的治疗应理解为意指一种或更多种疾病的症状的改善。

[0647] 本发明还提供了如本文中所述的线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)在诊断疾病和/或病症的方法中的用途。本发明还提供了通过本文中所述的方法可获得的线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)在诊断疾病和/或病症的方法中的用途。

[0648] 本发明提供了线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)在“体外”疾病诊断中的用途。本发明提供了通过本文中所述的方法可获得的线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)在“体外”疾病诊断中的用途。

[0649] 本发明还提供了用于疾病的“体内”诊断的方法中的用途的线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)。

[0650] 方法可用于诊断任何疾病和/或病症。例如,疾病和/或病症可选自遗传病症(例如单基因病)、癌症、HIV、其他病毒感染(例如由冠状病毒(例如COVID-19)导致的感染、甲型肝炎、乙型肝炎、2型单纯疱疹病毒、流行性感冒、麻疹和/或呼吸道合胞病毒)、神经退行性疾病(例如帕金森病和/或多聚谷氨酰胺病(例如亨廷顿病))、眼部疾病(例如黄斑变性)和肝衰竭。优选地,将线性DNA产物用于诊断遗传病症。甚至更优选地,将线性DNA产物用于诊断单基因病。例如,线性DNA产物可用于诊断镰状细胞贫血、囊性纤维化、亨廷顿病、和迪谢内肌营养不良、血友病A、 α 1-抗胰蛋白酶缺乏症、原发性纤毛运动不良症、或早产儿呼吸窘迫综合征。

[0651] 本文中所述的诊断和治疗方法可以是体外方法或体内方法。

[0652] 诊断方法可依赖于检测和/或定量线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)。

[0653] 为了促进检测和/或定量线性DNA产物,可将线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)与功能部分连接或结合。功能部分可以是本文中所述的任何功能部分。例如功能部分可以是探针。功能部分可包含荧光团、放射性化合物或条码。功能部分可以是蛋白质,例如抗体。

[0654] 诊断可依赖于检测与线性DNA产物的存在、不存在和/或水平相对应的信号。例如,信号可通过对与荧光探针连接的线性DNA产物进行流式细胞术和/或荧光激活细胞分选法来测量。

[0655] 线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)可通过与捕获部分结合来检测,例如在侧向流动测定(lateral flow assay)中。在该实例中,功能部分是蛋白质,例如对于捕获部分具有特异性的抗体。捕获与线性DNA产物连接的抗体可产生视觉信号(例如不同颜色的带)。

[0656] 本发明还提供了将疾病的诊断与疾病的治疗组合的方法。

[0657] 细胞治疗

[0658] 通过本发明的方法产生的产物可以比质粒DNA受到大体上更少的污染。另外,通过本发明的方法产生的产物性质上非常简单(例如无细菌骨架),这意味着其通常易于处理。本文中所述的产物的纯净和简单的性质使其尤其适合用于细胞治疗。例如,可将包含线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)的细胞注射或以其他方式移植到患者内以引起所期望

的作用。一种或更多种细胞可以有能力对抗癌细胞,例如在免疫治疗的过程中经细胞介导的免疫。可移植一种或更多种细胞以使患病组织再生。

[0659] 本发明提供了本文中所述的用于细胞治疗的线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)。本发明提供了通过本文中所述的方法可获得的用于细胞治疗的线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)。

[0660] 本发明提供了本文中所述的用于细胞治疗的线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)。本发明提供了通过本文中所述的方法可获得的用于细胞治疗的线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)。

[0661] 优选地,细胞治疗是离体细胞治疗。细胞可以是动物细胞,优选哺乳动物细胞,例如人细胞。

[0662] 本发明还提供了通过本文中所述的任何方法可获得的细胞,例如,细胞可适合用于细胞治疗。

[0663] 疫苗

[0664] 由本文中所述的方法产生的线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)尤其适合用于产生疫苗。疫苗可包含本文中所述的线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)。疫苗可包含由本文中所述的方法可获得的线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)。或者,线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)可用于产生疫苗,优选基于mRNA的疫苗。例如,疫苗例如针对COVID-19的BioNTech和Moderna mRNA疫苗。

[0665] 因此,本发明提供了本文中所述的线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)在产生疫苗中的用途。本发明还提供了通过本文中所述的方法可获得的线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)在产生疫苗中的用途。

[0666] 线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)可编码抗原,这可引起对象中的免疫应答。对象可以是人。优选地,抗原在盒上编码。

[0667] CAR-T细胞

[0668] 本发明提供了本文中所述的线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)在产生CAR-T细胞中的用途。本发明提供了通过本文中所述的方法可获得的线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)在产生CAR-T细胞中的用途。

[0669] 本发明提供了用于产生经遗传改造的CAR-T细胞的方法,其包括:(a)将本文中所述的线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)引入到T细胞中;以及(b)表达由线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)编码的目的基因。优选地,目的基因是肿瘤特异性CAR。

[0670] 本发明提供了用于产生经遗传改造的CAR-T细胞的方法,其包括:(a)将通过本文中所述的方法可获得的线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)引入到T细胞中;以及(b)表达由线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)编码的目的基因。优选地,目的基因是肿瘤特异性CAR。

[0671] 该方法还可包括,在步骤(a)之前,将单核细胞从患者中移除的步骤。优选地,使用白细胞除去术进行移除的步骤。优选地,单核细胞是T细胞。该方法还可包括,在步骤(b)之后,将经遗传改造的细胞返还给患者的步骤。

[0672] 本发明还提供了通过本文中所述的任何方法可获得的经改造的T细胞。经改造的T细胞可适合用于CAR T细胞治疗。

[0673] CRISPR递送

[0674] 通过本文中所述的方法产生的产物特别适合用于将CRISPR机制递送至细胞,例如在细胞治疗或体内治疗中。

[0675] 多种不同的载物(cargo)和递送载体通常使用于递送CRISPR机制,包括物理递送方法(例如显微注射、电穿孔)、病毒递送方法(例如腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)、全尺寸的腺病毒和慢病毒)、和非病毒递送方法(例如脂质体、聚合复合物、金颗粒)。

[0676] 线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)可包含编码CRISPR机制的任何组分的基因序列。线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)可编码CRISPR机制的所有组分。

[0677] 线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)可包含(或编码)修复模板(或编辑模板)。修复模板(或编辑模板)可用于编辑基因组,例如使用CRISPR-Cas系统。修复模板(或编辑模板)可包含以下或由以下组成:与所期望的DNA区(即靶分子)同源的同源区(例如同源臂)。修复模板(或编辑模板)可用于CRISPR-Cas介导的同源定向修复(HDR)。修复模板(或编辑模板)可用于修复具有链断裂(例如单链断裂或双链断裂)的靶分子。链断裂可由CRISPR系统的核酸酶(例如Cas9、Cpf1、或MAD7)引起。修复模板(或编辑模板)可在所期望的DNA区(即靶分子)中引入至少一个突变(例如插入、缺失、和/或替换)。修复模板(或编辑模板)可以是至少10个、20个、30个、40个、50个、100个、200个、300个、400个、500个、600个、700个、800个、900个、1000个、1500个、2000个、2500个、3000个、3500个、4000个、4500个、5000个、5500个、6000个、6500个、7000个、7500个、8000个、8500个、9000个、9500个、或10000个碱基对长。可将编码修复模板的线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)通过纳米粒、非病毒载体或病毒载体或者在无任何载体的辅助下递送至细胞。可将编码修复模板的线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)通过电穿孔递送至细胞。可将编码修复模板的线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)通过水动力针递送至细胞。

[0678] 线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)可包含(或还包含)编码CRISPR系统的核酸酶蛋白(例如Cas9、Cpf1、或MAD7)和/或指导RNA的基因序列。线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)可包含(或还包含)编码CRISPR系统的核酸酶蛋白(例如Cas9、Cpf1、或MAD7)的基因序列。线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)可包含(或还包含)编码指导RNA的基因序列。线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)可包含(或还包含)编码CRISPR系统的核酸酶蛋白(例如Cas9、Cpf1、或MAD7)和指导RNA的基因序列。线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)可包含(或还包含)编码待被修饰的基因组靶标的基因序列(例如间隔区)。线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)可连接至载体。载体可包含CRISPR系统的一些组分的序列。载体可包含指导RNA的序列或指导RNA的部分的序列。如果载体包含指导RNA的部分的序列,则线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)可包含指导RNA的缺失序列部分,使得在连接之后,经连接的载体包含指导RNA的全序列。CRISPR系统的核酸酶和指导RNA可在单个载体上或在两个不同载体上编码。线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)可编码CRISPR系统的核酸酶和指导RNA。一种线性DNA产物(例如一种闭合的线性DNA产物)可编码CRISPR系统的核酸酶,并且另一种线性DNA产物(例如另一种闭合的线性DNA产物)可编码指导RNA。

[0679] 线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)可通过重组、同源定向修复、或非同源末端连接以用于CRISPR-Cas介导的修复。

[0680] 如果CRISPR系统的核酸酶和指导RNA通过不同的线性DNA产物(例如不同的闭合的

线性DNA产物)编码,则其可以是不同或相同递送机制的部分。例如,编码CRISPR系统的核酸酶的线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)可通过第一纳米粒、非病毒载体或病毒载体递送至细胞,而编码指导RNA的线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)可通过第二纳米粒、非病毒载体或病毒载体递送至细胞。例如,编码CRISPR系统的核酸酶的线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)和编码指导RNA的线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)可通过相同的纳米粒、非病毒载体或病毒载体递送至细胞。

[0681] 如果CRISPR系统的核酸酶和指导RNA通过相同的线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)(或通过包含线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)的载体)编码,则其可以是相同递送机制的部分。例如,编码CRISPR系统的核酸酶和指导RNA的线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)或载体可通过纳米粒、非病毒载体或病毒载体递送至细胞。

[0682] 编码CRISPR系统的核酸酶的线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)和编码指导RNA的线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)可通过电穿孔递送至细胞。编码CRISPR系统的核酸酶的线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)和编码指导RNA的线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)可通过水动力针递送至细胞。

[0683] 因此,本发明提供了用于将CRISPR系统递送至细胞的本文中所述的线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)。本发明提供了将CRISPR系统递送至细胞的方法,其包括使本文中所述的线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)与细胞接触。本发明还提供了通过本文中所述的方法可获得的用于将CRISPR系统递送至细胞的线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)。本发明提供了将CRISPR系统递送至细胞的方法,其包括使通过本文中所述的方法可获得的线性DNA产物(例如闭合的线性DNA产物)与细胞接触。

[0684] 细胞可以是动物细胞,优选哺乳动物细胞,例如人细胞。

[0685] 本发明还提供了通过本文中所述的方法可获得的细胞。该细胞尤其适合用于细胞治疗和/或体内治疗。

[0686] 通过本文中所述的方法产生的线性DNA产物可用于在体外或体内转录以产生RNA,优选mRNA。

[0687] 9. 药盒

[0688] 本发明提供了药盒,所述药盒包含进行本文中所述的方法而所需的组分。所述药盒包含至少:

[0689] (a) 第一和第二衔接子分子;

[0690] (b) 内切核酸酶;以及

[0691] (c) 连接酶。

[0692] 药盒可另外包含DNA聚合酶、至少一种缓冲液和/或核酸酶。

[0693] 第一衔接子分子和/或第二衔接子分子可包含SEQ ID NO:1的序列或其部分。第一衔接子分子和/或第二衔接子分子可包含SEQ ID NO:1的至少13个、至少14个、至少15个、至少16个、至少17个、至少18个、或至少19个连续核苷酸。第一和第二衔接子分子可包含相同的核酸序列。第一和第二衔接子分子可包含不同的核酸序列。第一衔接子分子可包含一个或更多个受保护核苷酸并且第二衔接子分子可包含发夹或茎环区。

[0694] 第一和第二衔接子分子可在药盒内一起提供或分开提供。

[0695] 第一衔接子分子和/或第二衔接子分子可包含一个或更多个锁核酸(LNA)。

[0696] 第一衔接子分子和/或第二衔接子分子可包含一个或更多个受保护核苷酸(即核酸酶抗性核苷酸),例如硫代磷酸酯核苷酸。

[0697] 内切核酸酶可以是限制酶内切核酸酶。内切核酸酶可以是IIS型限制酶。内切核酸酶可以是识别DNA序列并在识别序列的外部切割的任何酶。

[0698] 例如,内切核酸酶可以是

[0699] BbsI, BsaI, BsmBI, BspQI, BtgZI, Esp3I, SapI, AarI, Acc36I, Ac1WI, AcuI, AjuI, AloI, Alw26I, AlwI, ArsI, AsuHPI, BaeI, BarI, BbvI, BccI, BceAI, BcgI, BciVI, BcoDI, BfuAI, BfuI, BmrI, BmsI, BmuI, BpiI, BpmI, BpuEI, BsaXI, Bse1I, Bse3DI, BseGI, BseMI, BseMII, BseNI, BseRI, BseXI, BsgI, Bs1FI, BsmAI, BsmFI, BsmI, Bso31I, BspCNI, BspMI, BspPI, BspQI, BspTNI, BsrDI, BsrI, Bst6I, BstF5I, BstMAI, BstV1I, BstV2I, BsuI, BtgZI, BtsCI, BtsI-v2, BtsMutI, BveI, CseI, CspCI, Eam1104I, EarI, EciI, Eco31I, Eco57I, Esp3I, FaqI, FauI, FokI, GsuI, HgaI, HphI, HpyAV, LguI, LmnI, Lsp1109I, LweI, MboII, MlyI, MmeI, MnII, Mva1269I, NmeAIII, PaqCI, PciSI, PctI, PleI, PpsI, PsrI, SchI, SfaNI, TaqII, TspDTI 和/或TspGWI限制酶。

[0700] 连接酶可以是DNA连接酶,例如T4 DNA连接酶,T7 DNA连接酶,哺乳动物DNA连接酶I、III和IV,Taq DNA连接酶,Tth DNA连接酶,或大肠杆菌DNA连接酶。

[0701] 核酸酶可以是外切核酸酶,例如外切核酸酶I、外切核酸酶III和/或外切核酸酶VIII。

[0702] 除非明确指出相反的情况,否则本文中限定的各个方面或实施方案可与任何另外的方面或者实施方案组合。特别地,任何指示为优选的或有利的特征可以与被指示为优选的或有利的任何另外一个或更多个特征组合。

[0703] 上述的详细描述已通过解释和举例说明的方式提供,并且不旨在限制所附权利要求的范围。在本文中示出的目前优选的实施方案中的许多变化将对本领域中的普通技术人员而言明显,并且保留在所附权利要求及其等同方案的范围内。

附图说明

[0704] 图1示出了从通过环状DNA模板的滚环扩增(RCA)而获得经扩增的DNA开始,通过在单个步骤中消化和连接衔接子分子来获得闭合的线性DNA产物的工作流程,所述环状DNA模板通过Cre重组酶对底物的作用而产生,所述底物包含以相同方向位于目的DNA侧翼的两个LoxP序列(SEQ ID NO:3)。

[0705] 图2示出了在该过程的每个循环中,经扩增的双链DNA分子的BsaI消化之后,序列驱动衔接子分子连接。BsaI消化在表达盒的两侧的5'处产生了4-核苷酸突出末端(TCCC 5')。自身互补的衔接子分子(在5'处含有4-核苷酸突出末端(GGGA 5')的SEQ ID NO:4)随后被连接在表达盒的两侧,产生了共价闭合的线性DNA产物。

[0706] 图3示出了从通过环状DNA模板的滚环扩增(RCA)而获得的经扩增的双链DNA分子开始,通过在单个步骤中消化和连接衔接子分子来获得包含受保护核苷酸的线性DNA产物的工作流程,所述环状DNA模板由Cre重组酶对底物的作用而生成,所述底物包含以相同方向位于目的DNA侧翼的两个LoxP序列(SEQ ID NO:3)。

[0707] 图4示出了在该过程的每个循环中,经扩增的双链DNA分子的BsaI消化之后,序列

驱动衔接子分子连接。BsaI消化在表达盒的两侧的5'处产生了4-核苷酸突出末端(TCCC 5')。衔接子由含有硫代磷酸酯核苷酸间键联(以星号标记)的互补寡核苷酸(SEQ ID NO:5和6)的杂交而形成,并且其在5'处形成了4-核苷酸突出末端(GGGA 5')。衔接子分子连接在表达盒的两侧,产生了对外切核酸酶具有增强的抗性的线性DNA产物,这是因为表达盒的两侧和两条链上的硫代磷酸酯核苷酸间键联阻止了外切核酸酶降解线性DNA产物。

[0708] 图5示出了三种构建体(A、B和C)的序列元件。哺乳动物表达盒由CMV启动子(SEQ ID NO:7)和增强子(SEQ ID NO:8)、eGFP报道基因(SEQ ID NO:9)和SV40 polyA信号(SEQ ID NO:10)形成。在盒侧翼为两个具有相同取向的LoxP序列(SEQ ID NO:3)和两个末端反向重复(ITR, SEQ ID NO:11),这是腺相关病毒-AAV的复制以及DNA衣壳化至病毒颗粒中所需的。三种盒之间的差异在于盒的两个末端处ITR和BsaI限制位点之间不存在(A)或存在(B: 20bp; C: 100bp)DNA序列。

[0709] 图6示出了从Cre来源的环状DNA分子中获得的构建体A、构建体B、构建体C(参见图5)的扩增产率的Picogreen定量。

[0710] 图7描述了在消化和衔接子分子连接的过程期间经扩增的DNA(构建体A和构建体B,参见图5)通过琼脂糖凝胶电泳(0.8%)进行的分析。

[0711] 图8总结了从两次独立的测定中获得的每种DNA分子(即构建体A、构建体B和构建体C,参见图5)的连接产率。

[0712] 图9示出了用编码eGFP报道基因的共价闭合的线性DNA分子(即构建体A和构建体B,参见图5)转染的HEK293细胞。将细胞使用JetOptimus转染,并在转染之后48小时分析GFP的表达。

[0713] 图10示出了对HEK293细胞进行的流式细胞术分析,所述HEK293细胞用编码eGFP报道基因的共价闭合的线性DNA分子转染。将细胞使用Lipofectamine 2000转染,并在转染之后48小时分析GFP的表达。图10a示出了在无GFP表达的情况下代表性未经转染样品的直方图和散点图。图10b示出了由细胞所产生的GFP表达,所述细胞用具有ITR的编码eGFP报道基因的共价闭合的线性DNA分子(构建体A)转染。图10c示出了由细胞所产生的GFP表达,所述细胞用具有ITR+20bp间隔区的编码eGFP报道基因的共价闭合的线性DNA分子(构建体B)转染。

[0714] 图11示出了HEK293悬浮细胞的GFP转染效率和中位荧光强度,HEK293悬浮细胞使用PeiPro用编码GFP的线性共价闭合的DNA分子(构建体B)vs编码GFP的pDNA构建体进行转染。在转染之后72小时通过流式细胞术测量GFP的表达。

[0715] 图12示出了如通过qPCR测量的AAV颗粒的rAAV5病毒基因组滴度(VG/ml),所述AAV颗粒使用共价闭合的DNA转基因构建体(构建体A至C)产生。将HEK293悬浮细胞使用PeiPro转染试剂用线性共价闭合的DNA转基因构建体与RepCap和辅助pDNA(Help pDNA)一起转染,并在转染之后72小时收获。

[0716] 图13示出了与pDNA对照相比,用线性共价闭合的DNA转基因构建体(构建体A和B)产生的AAV颗粒的空:载比(Full:Empty ratio)(主坐标轴)。用Ad5共给药的HeLaRC32细胞中的TCID50/ml(半数组织培养物感染剂量,Median Tissue Culture Infectious Dose)在次坐标轴上表示。

[0717] 图14总结了编码萤光素酶报道基因(SEQ ID NO:12)的共价闭合的线性DNA分子的

产生。

[0718] 图15示出了萤光素酶在6周龄瑞士(Swiss)雌性小鼠中的表达。使小鼠接受编码萤光素酶转基因的共价闭合的线性DNA产物(1cDNA)的肌内注射,随后进行电穿孔。在肌内注射之后的第1至15天,在进行观察之前10分钟使小鼠接受D-萤光素(150mg/kg,在100ul PBS中)的腹膜内注射。在异氟烷麻醉下通过IVIS光谱系统(IVIS Spectrum system)观察光学生物发光。

[0719] 图16示出了在该过程的每个周期中,经扩增的双链DNA分子的BsaI消化之后,序列驱动衔接子分子连接。BsaI消化在表达盒的每一侧的5'处产生了4-核苷酸突出末端(上游TCCC 5'和下游TTTT 5')。上游衔接子通过含有硫代磷酸酯核苷酸间键联(以星号标记)的互补寡核苷酸(SEQ ID NO:22和23)的杂交而形成,并且其在5'处形成4-核苷酸突出末端(GGGA 5')。下游衔接子通过含有硫代磷酸酯核苷酸间键联(以星号标记)的互补寡核苷酸(SEQ ID NO:13和14)的杂交而形成,并且其在5'处形成4-核苷酸突出末端(AAAA 5')。互补衔接子分子连接在表达盒的每一侧,产生了线性DNA产物,所述线性DNA产物对外切核酸酶具有增强的抗性,这是因为表达盒的两侧和两条链处的硫代磷酸酯核苷酸间键联阻止了线性DNA产物的外切核酸酶降解。

[0720] 图17示出了从通过环状DNA模板的滚环扩增(RCA)而获得经扩增的双链DNA分子开始,通过在单个步骤中消化和连接衔接子分子,从而获得在一个末端包含受保护核苷酸的线性部分开放的DNA产物的工作流程,所述环状DNA模板由Cre重组酶对底物的作用而产生,所述底物包含以相同方向位于目的DNA侧翼的两条LoxP序列(SEQ ID NO:3)。

[0721] 图18示出了在该过程的每个周期中,经扩增的双链DNA分子的BsaI消化之后,序列驱动衔接子分子连接。BsaI消化在表达盒的每一侧的5'处产生了4-核苷酸突出末端(上游TCCC 5'和下游TTTT 5')。自身互补的衔接子分子(在5'处含有4-核苷酸突出末端(GGGA 5')的SEQ ID NO:4)随后连接在表达盒的上游侧。下游衔接子通过含有硫代磷酸酯核苷酸间键联(以星号标记)的互补寡核苷酸(SEQ ID NO:13和14)的杂交而形成,并且其在5'处形成4-核苷酸突出末端(AAAA 5')。互补衔接子分子连接在表达盒的每一侧,产生了线性部分开放的DNA产物,所述线性部分开放的DNA产物对外切核酸酶具有增强的抗性,这是因为在表达盒一侧的硫代磷酸酯核苷酸间键联阻止了线性DNA产物的外切核酸酶降解。

[0722] 图19总结了部分闭合的线性DNA产物(opDNA)和包含受保护核苷酸的线性DNA产物(oeDNA)的产生,所述二者DNA产物编码用于IVT的萤光素酶报道基因(SEQ ID NO:24)。

[0723] 图20总结了部分闭合的线性DNA产物(opDNA)和包含受保护核苷酸的线性DNA产物(oeDNA)的产生,所述二者DNA产物编码用于IVT的GFP报道基因(SEQ ID NO:25)。

[0724] 图21总结了闭合的线性DNA产物(hpDNA)和包含受保护核苷酸的线性DNA产物(oeDNA)的产生,所述二者DNA产物编码用于哺乳动物表达的萤光素酶报道基因(SEQ ID NO:12)。

[0725] 图22示出了从使用T7 RNA聚合酶和本文中所述的不同DNA产物的体外转录的mRNA所产生的产率。opDNA:部分闭合的线性DNA产物,oeDNA:包含受保护核苷酸的线性DNA产物。

[0726] 图23示出了通过非变性(native)的0.8%琼脂糖凝胶电泳成像的图22体外转录的mRNA样品。

[0727] 图24示出了通过变性的0.8%琼脂糖凝胶电泳来成像的图21体外转录的mRNA样

品。

[0728] 图25示出了从使用T7 RNA聚合酶和如图22中的不同DNA模板体外转录的mRNA所产生的产率。

[0729] 图26示出了通过非变性的0.8%琼脂糖凝胶电泳来成像的体外转录的mRNA样品。mRNA样品从具有不同衔接(adapted)末端的DNA模板来转录。

[0730] 图27示出了通过变性的0.8%琼脂糖凝胶电泳来成像的体外转录的mRNA样品。mRNA样品从具有不同衔接末端的DNA模板来转录。

[0731] 图28示出了用可商购的转染试剂Lipofectamine2000所转染的HEK293细胞中的萤光素酶表达,所述Lipofectamine2000包封来源于部分闭合的线性DNA产物(opDNA)和包含受保护核苷酸的线性DNA产物(oeDNA)的mRNA。

[0732] 图29示出了在用可商购的转染试剂Lipofectamine2000所转染的HEK293细胞中的GFP表达,所述Lipofectamine2000包封来源于部分闭合的线性DNA产物(opDNA)和包含受保护核苷酸的线性DNA产物(oeDNA)的mRNA。

[0733] 图30示出了用可商购的转染试剂Lipofectamine2000所转染的HEK293细胞中的萤光素酶表达,所述Lipofectamine2000包封编码萤光素酶报道基因的闭合的线性DNA(hpDNA)或包含受保护核苷酸的线性DNA产物(oeDNA)。

[0734] 本申请中讨论的序列提供于以下表格中:

[0735] 表1.本申请中讨论的序列

[0736]

SEQ ID NO	序列
SEQ ID NO: 1	AGGGCTAACATTGTTGCC
SEQ ID NO: 2	GGCCAACAAATGTTAG
SEQ ID NO: 3	ATAACTTCGTATAATGTATG CTATACGAAG TTAT
SEQ ID NO: 4	AGGGCTAACATTGTTGCC ACTCAGGCCA ACAAATGTTAG
SEQ ID NO: 5	GGCCAACAAATGTTAG
SEQ ID NO: 6	AGGGCTAACATTGTTGCC
SEQ ID NO: 7	TGATGCGGTTTGGCAGTACATCAATGGCGTGGATAGCGGTTGACTC ACGGGGATTCCAAGTCTCCACCCCCATTGACGTCAATGGGAGTTGTTT GGCACCAAAATCAACGGGACTTCCAAAATGTCGTACAACACTCCGCCCCA TTGACGCAAATGGCGGTAGGCAGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCA GAGCT
SEQ ID NO: 8	CGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGAC CCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAAT AGGGACTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTACGGTAAACTGCC ACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCTATTGAC GTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTT ATGGGACTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTAC CATG
SEQ ID NO: 9	ATGGTCAGCAAGGGCGAGGAACGTGTTCACCGGGGTGGTGCCTACCTG GTCGAGCTGGACGGCAGTAAACGGCCACAAGTTAGCGTGTCCGGC GAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCTGAAGTTCATCT GTACCACCGGCAAGCTGCCGTGCCCTGGCCCACCCCTCGTGACCAACCC TGACCTACGGCGTGAATGCTTCAGCCGTACCCGACCACATGAAGCA GCACGACTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGA ACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGA AGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCG ACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCA CAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATC AAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAAC TCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATGGCGACGGCCCCGTGC TGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGA CCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCC GCCGGGATCACTCTGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAG
SEQ ID NO:10	TAAGATACATTGATGAGTTGGACAAACCAACTAGAATGCAGTGAAAA AAATGCTTATTGTGAAATTGTGATGCTATTGCTTATTGTAACCATTA TAAGCTGCAATAAACAGTT

SEQ ID NO:11	TGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGCAAAG CCCAGGGCGTCGGCGACCTTGGTCGCCGCCCTCAGTGAGCGAGCGA GCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTTCCCT
SEQ ID NO:12	[0737] ATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGGCCGCCATTCTATCCGC TGGAAAGATGGAACCGCTGGAGAGCAACTGCATAAGGCTATGAAGAGATA CGCCCTGGTTCTGGAACAATTGCTTTACAGATGCACATATCGAGGTGG ACATCACTTACGCTGAGTACTTCGAAATGTCGTTGGCAGAAGCT ATGAAACGATATGGGCTGAATACAAATCACAGAACGTCGTATGCAGTGA AAACTCTCTCAATTCTTATGCCGGTGGCGCGTTATTTCAGGAGT TGCAGTTGCCGCCCGAACGACATTATAATGAACGTGAATTGCTCAACA GTATGGCATTTCGAGCCTACCGTGGTGGCTTCCAAAAAGGGGTT GCAAAAAAATTTAACGTGCAAAAAAGCTCCAAATCATCCAAAAAATTAT TATCATGGATTCTAAAACGGATTACCAGGGATTTCAGTCGATGTACACGT TCGTCACATCTCATCTACCTCCGGTTTAATGAATACGATTTCAGGAGT AGTCCTCGATAGGGACAAGACAATTGCACTGATCATGAACCTCTGG TCTACTGGCTGCCTAAAGGTGTCGCTCGCCTAGAACACTGCCTGCGT GAGATTCTCGCATGCCAGAGATCCTATTTGGCAATCAAATCATTCCGG ATACTGCGATTTAACGTGTTCCATTCCATCACGGTTTGGAAATGTTA CTACACTCGGATATTGATATGTGGATTTCAGTCGCTTAATGTATAGAT TTGAAGAAGAGCTGTTCTGAGGAGCCTCAGGATTACAAGATTCAAAGT GCGCTGCTGGTGCCAAACCTATTCTCCTCTCGCCAAAAGCACTCTGAT TGACAAATACGATTCTAATTACACGAAATTGCTCTGGTGGCGCTCC CCTCTCTAAGGAAGTCGGGAAGCGGTTGCCAAGAGGTTCCATCTGCCA GGTATCAGGCAAGGATATGGGCTCACTGAGACTACATCAGCTATTCTGAT TACACCCGAGGGGGATGATAAACCGGGCGCGTCGGTAAAGTTGTTCCA TTTTTGAAAGCGAAGGTTGTGGATCTGGATACCGGGAAACGCTGGCG TTAATCAAAGAGGCGAACTGTGTGAGAGGTCTATGATTATGTCGGT TATGTAACAAATCCGGAAGCGACCAACGCCCTGATTGACAAGGATGGATG GCTACATTCTGGAGACATAGCTTACTGGGACGAAGACGAACACTCTCA TCGTTGACCGCCTGAAGTCTCTGATTAAGTACAAAGGCTATCAGGTGGCT CCCGCTGAATTGGAATCCATCTGCTCCAAACACCCCAACATCTCGACGC AGGTGTCGCAAGGTCTCCGACGATGACGCCGGTGAACCTCCGCCGC CGTTGTTGGAGACGGAAAGACGATGACGGAAAAAGAGATCGT GATTACGTCGCCAGTCAAGTAACAACCGCGAAAAAGTTGCGCGGAGGAG TTGTGTTGTGGACGAAGTACCGAAAGGTCTTACCGGAAACTCGACGCA AGAAAAATCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCG CCGTGTAA
SEQ ID NO:13	AAAAAAAAAAAAAAAAAA
SEQ ID NO:14	TTTTTTTTTTTTTT
SEQ ID NO:15	NAGGGCTAACATTGTTGCCACTCAGGCCAACAAATGTTAGCCCTN

SEQ ID NO:16	AAAAAAAAAAAAA
SEQ ID NO:17	TTTTTTTTTTTTTTT
SEQ ID NO:18	GGTCTCGCCCTN
SEQ ID NO:19	NAGGGCGAGACC
SEQ ID NO:20	AAAACGAGACC
SEQ ID NO:21	GGTCTCGTTTT
SEQ ID NO:22	GGCCAACAAATGTTAGCCCTN
SEQ ID NO:23	NAGGGCTAACATTGTTGGCC
SEQ ID NO: 24	ATGGAAGATGCCAAAACATTAAGAAGGGCCCAGCGCCATTCTACCCACT CGAAGACGGGACCGCCGGCGAGCAGCTGCACAAAGCCATGAAGCGCTA CGCCCTGGTCCCCGGCACCATCGCCTTACCGACGCACATATCGAGGTG GACATTACCTACGCCGAATACTTCGAGATGAGCGTTGGCTGGCAGAAG CTATGAAGCGCTATGGGCTGAATAACAAACCATCGGATCGTGGTGTGCAG CGAGAAATAGCTTGCAGTTCTCATGCCCGTGTGGGTGCCCTGTTCATCG GTGTGGCTGTGGCCCCAGCTAACGACATCTACAACGAGCGCGAGCTGCT GAACAGCATGGGCATCAGCCAGCCCACCGCTGTATTGAGCAAGAAA GGGCTGCAAAAGATCCTAACGTGCAAAAGAAGCTACCGATCATACAAA GATCATCATCATGGATAGCAAGACCGACTACCAGGGCTCAAAGCATGT ACACCTTCTGTGACTTCCCATTGCCACCCGGCTCAACGAGTACGACTTC GTGCCCGAGAGCTTCGACCGGGACAAAACCATGCCCTGATCATGAACA GTAGTGGCAGTACCGGATTGCCAAGGGCGTAGCCCTACCGCACCGCA CCGCTTGTGTCGATTCACTGCCCCGACCCATCTCGGCAACCA GATCATCCCCGACACCGCTATCCTCAGCGTGGTGCCATTCAACCACGGC TTCGGCATGTTACCACGCTGGCTACTTGATCTGGCTTGGTGC TGCTCATGTACCGCTTCGAGGAGGAGCTATTCTGCGCAGCTTGCAAGA CTATAAGATTCAATCTGCCCTGCTGGTCCCCACACTATTTAGCTTCTCG CTAAGAGCACTCTCATCGACAAGTACGACCTAACGCAACTTGCACGAGATC GCCAGCGGGCGCCGCTCAGCAAGGAGGTAGGTGAGGCCGTGGC CAAACGCTTCCACCTACCAGGCATCCGACAGGGCTACGCCCTGACAGAA ACAACCAGCGCCATTCTGATCACCCCCGAAGGGGACGACAAGCCTGGC GCAGTAGGCAAGGTGGTGCCTTCTCGAGGCTAAGGTGGTGGACTTG ACACCGGTAAAGACACTGGGTGTAACCAGCGCGGAGCTGTGCGTCC GTGGCCCCATGATCATGAGCGGCTACGTTAACACCCCGAGGCTACAAA CGCTCTCATCGACAAGGACGGCTGGCTGCACAGCGGCCGACATGCC CTGGGACGAGGACGAGCACTTCTCATCGTGGACCGGCTGAAGTCC ATCAAATACAAGGGCTACCAGGTAGCCCCAGCCGAACGGAGAGCATCC TGCTGCAACACCCCAACATCTCGACGCCGGGTCGCCGGCTGCC ACGACGATGCCGGCGAGCTGCCGCCGAGTCGTCGTGCTGGACAC GTAAAACCATGACCGAGAAGGAGATGTTGGACTATGTGGCCAGCCAGGT TACAACCGCCAAGAAGCTGCGCGGTGGTGTTCGTGGACGAGGTG

[0738]

	CCTAAAGGACTGACCGGCAAGTTGGACGCCGCAAGATCCCGAGATT TCATTAAGGCCAAGAAGGGCGGCAAGATGCCGTGTAA
[0739]	SEQ ID NO: 25 ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTG GTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGC GAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCCTGAAGTTCATCT GCACCAACCGGCAAGCTGCCGTGCCCTGGCCCACCCCTCGTGACCACCC TGACCTACGGCGTGCAGTGCTCAGCCGCTACCCCCGACCACATGAAGCA GCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGC ACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGA AGTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCG ACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTA CAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATH AAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGC TCGCCGACCACCTACCGCAGAACACCCCCATCGGCACGGCCCCGTGC TGCTGCCCGACAACCAACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGA CCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCC GCCGGGATCACTCTGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA

[0740] 条款

[0741] 1. 用于产生线性脱氧核糖核酸(DNA)产物的方法,其中所述方法包括:

[0742] (a) 使双链DNA分子与内切核酸酶以及第一衔接子分子和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积;以及

[0743] (b) 孵育所述单个连续水性体积以产生所述线性DNA产物,其中所述线性DNA产物包含线性双链区,其中所述线性双链区包含所述双链DNA分子的线性部分,并且其中所述第一衔接子分子附加至所述线性双链区的第一末端,以及所述第二衔接子分子附加至所述线性双链区的第二末端。

[0744] 2. 条款1所述的方法,其中所述附加是通过连接和/或杂交来进行的。

[0745] 3. 用于产生闭合的线性脱氧核糖核酸(DNA)产物的方法,其中所述方法包括:

[0746] (a) 使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一衔接子分子和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积;以及

[0747] (b) 孵育所述单个连续水性体积以产生所述闭合的线性DNA产物,其中所述闭合的线性DNA产物包含线性双链区,其中所述线性双链区包含所述双链DNA分子的线性部分,并且其中所述线性双链区在第一末端处由所述第一衔接子分子闭合,在第二末端处由所述第二衔接子分子闭合。

[0748] 4. 用于产生闭合的线性脱氧核糖核酸(DNA)产物的方法,其中所述方法包括:

[0749] (a) 使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一衔接子分子和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积;以及

[0750] (b) 孵育所述单个连续水性体积以产生所述闭合的线性DNA产物,其中所述闭合的线性DNA产物包含所述双链DNA分子的线性部分,并且其中所述双链DNA分子的线性部分在第一末端处由所述第一衔接子分子闭合,在第二末端处由所述第二衔接子分子闭合。

[0751] 5. 条款3或条款4所述的方法,其中所述双链DNA分子的线性部分在第一末端和第二末端处通过与所述第一衔接子分子和第二衔接子分子的连接来闭合。

[0752] 6. 条款3至5中任一项所述的方法,其中第一闭合的末端和第二闭合的末端对核酸酶消化具有抗性。

[0753] 7. 条款6所述的方法,其中所述核酸酶消化是外切核酸酶消化,任选地外切核酸酶III消化和/或外切核酸酶I消化。

[0754] 8. 条款3至7中任一项所述的方法,其中所述闭合的线性DNA产物是共价闭合的线性DNA产物。

[0755] 9. 条款3至8中任一项所述的方法,其中所述闭合的线性DNA产物是部分双链的和/或部分单链的。

[0756] 10. 条款3至9中任一项所述的方法,其中所述闭合的线性DNA产物以长度计包含至少500个、至少1000个、至少2000个、至少3000个、至少4000个、至少5000个、至少6000个、至少7000个、至少8000个、至少9000个、至少10,000个、至少11,000个、至少12,000个、至少13,000个、至少14,000个或至少15,000个核苷酸。

[0757] 11. 条款1至10中任一项所述的方法,其中所述双链DNA分子是环状的或分支的。

[0758] 12. 条款1至11中任一项所述的方法,其中所述双链DNA分子包含盒,任选地其中所述盒包含编码序列。

[0759] 13. 条款1至12中任一项所述的方法,其中所述双链DNA分子包含间隔区,任选地其中所述间隔区为至少10个、至少20个、至少30个、至少40个、至少50个、至少60个、至少70个、至少80个、至少90个、至少100个、至少125个、至少150个、至少175个或至少200个碱基对长。

[0760] 14. 条款3至13中任一项所述的方法,其中所述闭合的DNA产物包含同聚序列,例如polyA、polyC、polyT或polyG序列。

[0761] 15. 条款3至14中任一项所述的方法,其中所述闭合的DNA产物包含反向末端重复序列。

[0762] 16. 条款1至15中任一项所述的方法,其中所述双链DNA分子包含一个或更多个内切核酸酶靶序列,任选地其中所述一个或更多个内切核酸酶靶序列是IIS型内切核酸酶靶序列,例如

[0763] BbsI, BsaI, BsmBI, BspQI, BtgZI, Esp3I, and/or SapI, AarI, Acc36I, AcIWI, AcuI, AjuI, AloI, Alw26I, AlwI, ArsI, AsuHPI, BaeI, BarI, BbvI, BccI, BceAI, BcgI, BciVI, BcoDI, BfuAI, BfuI, BmrI, BmsI, BmuI, BpiI, BpmI, BpuEI, BsaXI, Bse1I, Bse3DI, BseGI, BseMI, BseMII, BseNI, BseRI, BseXI, BsgI, BslFI, BsmAI, BsmFI, BsmI, Bso31I, BspCNI, BspMI, BspPI, BspQI, BspTNI, BsrDI, BsrI, Bst6I, BstF5I, BstMAI, BstV11, BstV2I, BsuI, BtgZI, BtsCI, BtsI-v2, BtsMutI, BveI, CseI, CspCI, Eam1104I, EarI, EciI, Eco31I, Eco57I, Esp3I, FaqI, FauI, FokI, GsuI, HgaI, HphI, HpyAV, LguI, LmnI, Lsp1109I, LweI, MboII, MlyI, MmeI, MnII, Mva1269I, NmeAIII, PaqCI, PciSI, PctI, PleI, PpsI, PsrI, SchI, SfaNI, TaqII, TspDTI 和/或TspGWI靶序列。

[0764] 17. 条款1至16中任一项所述的方法,其中所述双链DNA分子是扩增的产物,任选地是滚环扩增的产物。

[0765] 18. 条款1至17中任一项所述的方法,其中所述内切核酸酶是限制酶内切核酸酶,任选地其中所述内切核酸酶是IIS型限制酶内切核酸酶,例如:

[0766] BbsI, BsaI, BsmBI, BspQI, BtgZI, Esp3I, SapI, AarI, Acc36I, AcIWI, AcuI, AjuI,

AloI, AIw26I, AlwI, ArsI, AsuHPI, BaeI, BarI, BbvI, BccI, BceAI, BcgI, BciVI, BcoDI, BfuAI, BfuI, BmrI, BmsI, BmuI, BpiI, BpmI, BpuEI, BsaXI, Bse1I, Bse3DI, BseGI, BseMI, BseMII, BseNI, BseRI, BseXI, BsgI, Bs1FI, BsmAI, BsmFI, BsmI, Bso31I, BspCNI, BspMI, BspPI, BspQI, BspTNI, BsrDI, BsrI, Bst6I, BstF5I, BstMAI, BstV1I, BstV2I, BsuI, BtgZI, BtsCI, BtsI-v2, BtsMutI, BveI, CseI, CspCI, EamI104I, EarI, EciI, Eco31I, Eco57I, Esp3I, FaqI, FauI, FokI, GsuI, HgaI, HphI, HpyAV, LguI, LmnI, Lsp1109I, LweI, MboII, MlyI, MmeI, MnII, Mva1269I, NmeAIII, PaqCI, PciSI, PctI, PleI, PpsI, PsrI, SchI, SfaNI, TaqII, TspDTI 和/或 TspGWI 限制酶内切核酸酶。

[0767] 19. 条款1至18中任一项所述的方法,其中所述连接酶是DNA连接酶,任选地其中所述DNA连接酶是T4 DNA连接酶,T7 DNA连接酶,哺乳动物DNA连接酶I、III和IV,Taq DNA连接酶,Tth DNA连接酶或者大肠杆菌DNA连接酶。

[0768] 20. 条款1至19中任一项所述的方法,其中所述第一衔接子分子和/或所述第二衔接子分子是合成的衔接子分子。

[0769] 21. 条款1至20中任一项所述的方法,其中所述第一衔接子分子包含发夹以及/或者所述第二衔接子分子包含发夹。

[0770] 22. 条款1至21中任一项所述的方法,其中所述第一衔接子分子是核酸衔接子分子。

[0771] 23. 条款1至22中任一项所述的方法,其中所述第二衔接子分子是核酸衔接子分子。

[0772] 24. 条款1至23中任一项所述的方法,其中所述第一衔接子分子和/或所述第二衔接子分子包含单链部分,任选地其中:

[0773] (a) 所述单链部分形成发夹;

[0774] (b) 所述单链部分包含少于10个、9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个核苷酸;以及/或者

[0775] (c) 所述单链部分包含5个核苷酸。

[0776] 25. 条款1至24中任一项所述的方法,其中所述第一衔接子分子和/或所述第二衔接子分子包含双链部分,任选地其中:

[0777] (a) 所述双链部分包含少于50个、45个、40个、35个、30个碱基对;以及/或者

[0778] (b) 所述双链部分包含至少10个、11个、12个、13个、14个、15个碱基对。

[0779] 26. 条款1至25中任一项所述的方法,其中所述第一衔接子分子和/或所述第二衔接子分子包含5' 磷酸。

[0780] 27. 条款1至26中任一项所述的方法,其中所述第一衔接子分子和/或所述第二衔接子分子包含SEQ ID NO:1的序列。

[0781] 28. 条款1至26中任一项所述的方法,其中所述第一衔接子分子和/或所述第二衔接子分子包含SEQ ID NO:1的至少13个、至少14个、至少15个、至少16个、至少17个、至少18个或至少19个连续核苷酸。

[0782] 29. 条款25所述的方法,其中所述第一衔接子分子和/或所述第二衔接子分子的双链部分包含SEQ ID NO:2的序列。

[0783] 30. 条款25所述的方法,其中所述第一衔接子分子和/或所述第二衔接子分子的双

链部分包含SEQ ID NO:2的至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个或至少15个连续核苷酸。

[0784] 31. 条款24所述的方法,其中所述第一衔接子分子和/或所述第二衔接子分子的单链部分包含ACTCA的序列。

[0785] 32. 条款24所述的方法,其中所述第一衔接子分子和/或所述第二衔接子分子的单链部分可包含ACTCA的至少1个、至少2个、至少3个、至少4个或至少5个连续核苷酸。

[0786] 33. 条款1至32中任一项所述的方法,其中所述第一衔接子分子和第二衔接子分子是不同的。

[0787] 34. 条款1至33中任一项所述的方法,其中所述第一衔接子分子包含与所述线性双链区的第一末端互补的部分。

[0788] 35. 条款1至34中任一项所述的方法,其中所述第二衔接子分子包含与所述线性双链区的第二末端互补的部分。

[0789] 36. 条款1至35中任一项所述的方法,其中所述第一衔接子分子包含与所述线性双链区的第一末端退火的部分。

[0790] 37. 条款1至37中任一项所述的方法,其中所述第二衔接子分子包含与所述线性双链区的第二末端退火的部分。

[0791] 38. 条款1至37中任一项所述的方法,其中所述第一衔接子分子和/或所述第二衔接子分子包含突出端。

[0792] 39. 条款1至38中任一项所述的方法,其中所述第一衔接子分子和/或所述第二衔接子分子包含功能部分,任选地其中所述功能部分是结合分子、靶向序列或探针。

[0793] 40. 条款1至39中任一项所述的方法,其中所述第一衔接子分子和/或所述第二衔接子分子包含核定位序列。

[0794] 41. 条款1至40中任一项所述的方法,其中所述第一衔接子分子和/或所述第二衔接子分子包含条码。

[0795] 42. 条款1至41中任一项所述的方法,其中所述第一衔接子分子和/或所述第二衔接子分子包含荧光团。

[0796] 43. 条款1至42中任一项所述的方法,其中所述第一衔接子分子和/或所述第二衔接子分子包含放射性化合物。

[0797] 44. 条款1至43中任一项所述的方法,其中所述第一衔接子分子和/或所述第二衔接子分子包含促进测序、检测或定量的部分。

[0798] 45. 条款1至44中任一项所述的方法,其中所述第一衔接子分子和/或所述第二衔接子分子包含反向末端重复序列。

[0799] 46. 条款1至45中任一项所述的方法,其中所述第一衔接子分子和/或所述第二衔接子分子包含适配体。

[0800] 47. 条款1至46中任一项所述的方法,其中所述第一衔接子分子和/或所述第二衔接子分子赋予对核酸酶消化的抗性,任选地对外切核酸酶消化(例如外切核酸酶I和/或外切核酸酶III消化)的抗性。

[0801] 48. 条款1至47中任一项所述的方法,其中所述第一衔接子分子和第二衔接子分子与所述线性双链区连接。

[0802] 49. 条款48所述的方法,其中连接为至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少82%、至少85%、至少90%或至少95%有效的。

[0803] 50. 条款1至49中任一项所述的方法,其中所述孵育单个连续水性体积的步骤包括在第一温度下孵育,并随后在第二温度下孵育;任选地其中:

[0804] (a) 所述第一温度是1°C至100°C、4°C至70°C、10°C至60°C、16°C至55°C、20°C至50°C、25°C至45°C、30°C至40°C、或35°C至39°C;以及/或者

[0805] (b) 所述第二温度是1°C至100°C、4°C至70°C、8°C至60°C、10°C至55°C、23°C至50°C、14°C至40°C、14°C至30°C、或15°C至18°C。

[0806] 51. 条款50所述的方法,其中所述第一温度是35°C至39°C,并且所述第二温度是15°C至18°C。

[0807] 52. 条款50或51所述的方法,其中所述第一温度是37°C,并且所述第二温度是16°C。

[0808] 53. 条款1至52中任一项所述的方法,其中所述孵育单个连续水性体积的步骤包括在所述第一温度和所述第二温度之间循环,任选地其中所述孵育单个连续水性体积的步骤包括在所述第一温度和所述第二温度之间循环至少2、至少3、至少4、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9、至少10、至少15、至少20、至少25、至少30、至少35、至少40、至少45、至少50、至少55、至少60、至少65、至少70、至少80、至少90或至少100次,优选至少20次。

[0809] 54. 条款1至52中任一项所述的方法,其中所述孵育单个连续水性体积的步骤包括在恒定温度下孵育。

[0810] 55. 权利要求54所述的方法,其中所述恒定温度为约30°C或约37°C。

[0811] 56. 条款1至55中任一项所述的方法,其中所述方法还包括:在步骤(a) (即,所述使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一衔接子分子和第二衔接子分子接触的步骤)之前,扩增DNA模板分子以产生所述双链DNA分子的步骤,任选地其中扩增是滚环扩增。

[0812] 57. 条款1至56中任一项所述的方法,其中所述方法还包括:在步骤(b) (即所述孵育单个连续水性体积的步骤)之后,纯化所述线性DNA产物或闭合的线性DNA产物的步骤。

[0813] 58. 条款1至57中任一项所述的方法,其中所述方法还包括:在步骤(b) (即所述孵育所述单个连续水性体积的步骤)之后,核酸酶消化的步骤,任选地其中所述核酸酶消化是外切核酸酶消化,例如外切核酸酶I和/或外切核酸酶III消化。

[0814] 59. 条款58所述的方法,其中所述核酸酶消化的步骤发生在纯化的步骤之前或之后。

[0815] 60. 用于产生线性脱氧核糖核酸(DNA)产物的方法,其中所述方法包括:

[0816] (a) 使双链DNA分子与内切核酸酶以及第一衔接子分子和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积;以及

[0817] (b) 孵育所述单个连续水性体积以产生所述线性DNA产物,其中所述线性DNA产物包含线性双链区,其中所述线性双链区包含所述双链DNA分子的线性部分,并且其中所述第一衔接子分子附加至所述线性双链区的第一末端,以及所述第二衔接子分子附加至所述线性双链区的第二末端,并且其中所述第一衔接子分子和第二衔接子分子是包含一个或更多个核酸酶抗性核苷酸的核酸分子。

[0818] 61. 条款60所述的方法,其中步骤(a)包括使所述双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一衔接子分子和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积。

[0819] 62. 条款60或61所述的方法,其中所述第一衔接子分子与所述线性双链区的第一末端连接,所述第二衔接子分子与所述线性双链区的第二末端连接。

[0820] 63. 条款60至62中任一项所述的方法,其中所述线性DNA产物对核酸酶消化具有抗性,任选地其中所述核酸酶消化是外切核酸酶消化,例如外切核酸酶III消化和/或外切核酸酶I消化。

[0821] 64. 条款60至63中任一项所述的方法,其中所述核酸酶抗性核苷酸是硫代磷酸酯核苷酸。

[0822] 65. 用于产生闭合的线性脱氧核糖核酸(DNA)产物的方法,所述方法包括:

[0823] (a) 将包含至少一个内切核酸酶靶序列的DNA模板分子进行滚环扩增以产生双链DNA分子;

[0824] (b) 使所述双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一衔接子分子和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积;以及

[0825] (c) 孵育所述单个连续水性体积以产生所述闭合的线性DNA产物,其中所述闭合的线性DNA产物包含线性双链区,其中所述线性双链区包含所述双链DNA分子的线性部分,并且其中所述线性双链区在第一末端处由所述第一衔接子分子闭合,在第二末端处由所述第二衔接子分子闭合。

[0826] 66. 用于产生部分闭合的脱氧核糖核酸(DNA)产物的方法,其中所述方法包括:

[0827] (a) 使双链DNA分子与内切核酸酶以及第一衔接子分子和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积;以及

[0828] (b) 孵育所述单个连续水性体积以产生所述部分闭合的线性DNA产物,其中所述部分闭合的线性DNA产物包含线性双链区,其中所述线性双链区包含所述双链DNA分子的线性部分,并且其中所述第一衔接子分子附加至所述线性双链区的第一末端,以及所述第二衔接子分子附加至所述线性双链区的第二末端,并且其中所述第一衔接子分子是包含一个或更多个核酸酶抗性核苷酸的核酸分子,并且其中所述线性双链区在第二末端处由所述第二衔接子分子闭合。

[0829] 67. 条款66所述的方法,其中步骤(a)包括使所述双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一衔接子分子和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积。

[0830] 68. 条款66或67所述的方法,其中所述第一衔接子分子与所述线性双链区的第一末端连接,所述第二衔接子分子与所述线性双链区的第二末端连接。

[0831] 69. 条款66至68中任一项所述的方法,其中所述线性DNA产物对核酸酶消化具有抗性,任选地其中所述核酸酶消化是外切核酸酶消化,例如外切核酸酶III消化和/或外切核酸酶I消化。

[0832] 70. 条款66至69中任一项所述的方法,其中所述核酸酶抗性核苷酸是硫代磷酸酯核苷酸。

[0833] 71. 用于产生部分闭合的脱氧核糖核酸(DNA)产物的方法,所述方法包括:

[0834] (a) 将包含至少一个内切核酸酶靶序列的DNA模板分子进行滚环扩增以产生双链DNA分子;

[0835] (b) 使所述双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一衔接子分子和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积;以及

[0836] (c) 孵育所述单个连续水性体积以产生所述部分闭合的线性DNA产物,其中所述部分闭合的线性DNA产物包含线性双链区,其中所述线性双链区包含所述双链DNA分子的线性部分,并且其中所述第一衔接子分子与所述线性双链区的第一末端连接,所述第二衔接子分子与所述线性双链区的第二末端连接,并且其中所述第一衔接子分子是包含一个或更多个核酸酶抗性核苷酸的核酸分子,并且其中所述线性双链区在第二末端处由所述第二衔接子分子闭合。

[0837] 71. 用于体外转录闭合的线性脱氧核糖核酸(DNA)产物的方法,所述方法包括:

[0838] (a) 使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一衔接子分子和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积;

[0839] (b) 孵育所述单个连续水性体积以产生所述闭合的线性DNA产物,其中所述闭合的线性DNA产物包含线性双链区,其中所述线性双链区包含所述双链DNA分子的线性部分,并且其中所述线性双链区在第一末端处由所述第一衔接子分子闭合,以及在第二末端处由第二衔接子分子闭合;

[0840] (c) 使所述闭合的线性DNA产物与聚合酶接触;以及

[0841] (d) 产生转录产物。

[0842] 72. 用于蛋白质表达的方法,所述方法包括:

[0843] (a) 使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一衔接子分子和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积;

[0844] (b) 孵育所述单个连续水性体积以产生所述闭合的线性DNA产物,其中所述闭合的线性DNA产物包含线性双链区,其中所述线性双链区包含所述双链DNA分子的线性部分,并且其中所述线性双链区在第一末端处由所述第一衔接子分子闭合,在第二末端处由所述第二衔接子分子闭合;以及

[0845] (c) 将所述闭合的线性DNA产物引入到原核细胞或真核细胞或无细胞蛋白质表达系统中,以产生所期望的RNA或蛋白质。

[0846] 73. 用于将闭合的线性脱氧核糖核酸(DNA)产物细胞转染到细胞中的方法,所述方法包括:

[0847] (a) 使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一衔接子分子和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积;

[0848] (b) 孵育所述单个连续水性体积以产生所述闭合的线性DNA产物,其中所述闭合的线性DNA产物包含线性双链区,其中所述线性双链区包含所述双链DNA分子的线性部分,并且其中所述线性双链区在第一末端处由所述第一衔接子分子闭合,在第二末端处由所述第二衔接子分子闭合;

[0849] (c) 使所述闭合的线性DNA产物与所述细胞接触;以及

[0850] (d) 将所述闭合的线性DNA产物转染到所述细胞的胞质溶胶中。

[0851] 73. 用于产生包含闭合的线性DNA产物的药物组合物的方法,所述方法包括进行条款3至59中任一项所述的方法,并用可药用载体或赋形剂配制所得的闭合的线性DNA产物。

[0852] 74. 用于产生包含线性DNA产物的药物组合物的方法,所述方法包括进行条款60至

64中任一项所述的方法，并用可药用载体或赋形剂配制所得的线性DNA产物。

[0853] 75. 用于产生包含部分闭合的线性DNA产物的药物组合物的方法，所述方法包括进行条款66至71中任一项所述的方法，并用可药用载体或赋形剂配制所得线性DNA产物。

[0854] 76. 闭合的线性DNA产物在制备用于通过治疗来治疗人或动物体的药物中的用途，其中所述制备包括进行条款3至59中任一项所述的方法。

[0855] 77. 线性DNA产物在制备用于通过治疗来治疗人或动物体的药物中的用途，其中所述制备包括进行条款60至64中任一项所述的方法。

[0856] 78. 部分闭合的线性DNA产物在制备用于通过治疗来治疗人或动物体的药物中的用途，其中所述制备包括进行条款66至71中任一项所述的方法。

[0857] 79. 闭合的线性DNA产物在产生病毒递送系统或非病毒递送系统中的用途，其中所述闭合的线性DNA产物通过进行条款3至59中任一项所述的方法产生。

[0858] 80. 线性DNA产物在产生病毒递送系统或非病毒递送系统中的用途，其中所述线性DNA产物通过进行条款60至64中任一项所述的方法产生。

[0859] 81. 部分闭合的线性DNA产物在产生病毒递送系统或非病毒递送系统中的用途，其中所述部分闭合的线性DNA产物通过进行条款66至71中任一项所述的方法来产生。

[0860] 82. 可通过条款3至59中任一项所述的方法获得的闭合的线性DNA产物。

[0861] 83. 可通过条款60至64中任一项所述的方法获得的线性DNA产物。

[0862] 84. 可通过条款66至71中任一项所述的方法获得的部分闭合的线性DNA产物。

[0863] 85. 可通过条款3至59中任一项所述的方法获得的闭合的线性DNA产物，其用于治疗中。

[0864] 86. 可通过条款60至64中任一项所述的方法获得的线性DNA产物，其用于治疗中。

[0865] 87. 可通过条款66至71中任一项所述的方法获得的部分闭合的线性DNA产物，其用于治疗中。

[0866] 88. 药盒，其包含：

[0867] (a) 第一衔接子分子和第二衔接子分子；

[0868] (b) 内切核酸酶；以及

[0869] (c) 连接酶。

[0870] 89. 药盒，其包含：

[0871] (a) 第一衔接子分子；

[0872] (b) 第二衔接子分子；

[0873] (c) 内切核酸酶；和

[0874] (d) 连接酶。

[0875] 90. 用于产生闭合的线性脱氧核糖核酸(DNA)产物的方法，其中所述方法包括：

[0876] (a) 使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一衔接子分子和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积；以及

[0877] (b) 孵育所述单个连续水性体积以产生所述闭合的线性DNA产物，其中所述闭合的线性DNA产物包含线性双链区，其中所述线性双链区包含所述双链DNA分子的线性部分，并且其中所述线性双链区在第一末端处由所述第一衔接子分子闭合，在第二末端处由所述第二衔接子分子闭合。

[0878] 91. 权利要求90所述的方法,其中所述闭合的线性DNA产物包含间隔区,任选地其中所述间隔区为至少20个碱基对长。

[0879] 92. 权利要求90或91所述的方法,其中所述内切核酸酶是IIS型限制性内切核酸酶,任选地其中所述内切核酸酶是:

[0880] BbsI, BsaI, BsmBI, BspQI, BtgZI, Esp3I, SapI, AarI, Acc36I, AclWI, AcuI, AjuI, AloI, Alw26I, AlwI, ArsI, AsuHPI, BaeI, BarI, BbvI, BccI, BceAI, BcgI, BciVI, BcoDI, BfuAI, BfuI, BmrI, BmsI, BmuI, BpiI, BpmI, BpuEI, BsaXI, Bse1I, Bse3DI, BseGI, BseMI, BseMII, BseNI, BseRI, BseXI, BsgI, Bs1FI, BsmAI, BsmFI, BsmI, Bso31I, BspCNI, BspMI, BspPI, BspQI, BspTNI, BsrDI, BsrI, Bst6I, BstF5I, BstMAI, BstV1I, BstV2I, BsI, BtgZI, BtsCI, BtsI-v2, BtsMutI, BveI, CseI, CspCI, Eam1104I, EarI, EciI, Eco31I, Eco57I, Esp3I, FaqI, FauI, FokI, GsuI, HgaI, HphI, HpyAV, LguI, LmnI, Lsp1109I, LweI, MboII, MlyI, MmeI, Mn11, Mva1269I, NmeAIII, PaqCI, PciSI, PctI, PsrI, PpsI, psrI, SchI, SfaNI, TaqII, TspDTI 和/或TspGWI限制性内切核酸酶。

[0881] 93. 权利要求90至92中任一项所述的方法,其中所述第一衔接子分子和/或所述第二衔接子分子是核酸衔接子分子。

[0882] 94. 权利要求90至93中任一项所述的方法,其中所述第一衔接子分子包含发夹,以及/或者所述第二衔接子分子包含发夹。

[0883] 95. 权利要求90至94中任一项所述的方法,其中所述第一衔接子分子和/或所述第二衔接子分子包含具有突出端的双链区。

[0884] 96. 权利要求90至95中任一项所述的方法,其中所述方法包括以下步骤:

[0885] (a) 对包含至少一个内切核酸酶靶序列的DNA模板分子进行扩增以产生所述双链DNA分子,其中所述DNA模板分子通过滚环扩增来扩增;

[0886] (b) 使所述双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一衔接子分子和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积;以及

[0887] (c) 孵育所述单个连续水性体积以产生所述闭合的线性DNA产物,其中所述闭合的线性DNA产物包含线性双链区,其中所述线性双链区包含所述双链DNA分子的线性部分,并且其中所述线性双链区在第一末端处由所述第一衔接子分子闭合,在第二末端处由所述第二衔接子分子闭合。

[0888] 97. 用于产生线性脱氧核糖核酸(DNA)产物的方法,其中所述方法包括:

[0889] (a) 使双链DNA分子与内切核酸酶、连接酶以及第一衔接子分子和第二衔接子分子接触以形成单个连续水性体积;以及

[0890] (b) 孵育所述单个连续水性体积以产生所述线性DNA产物,其中所述线性DNA产物包含线性双链区,其中所述线性双链区包含所述双链DNA分子的线性部分,并且其中所述第一衔接子分子与所述线性双链区的第一末端连接,所述第二衔接子分子与所述线性双链区的第二末端连接,并且其中所述第一衔接子分子和第二衔接子分子是包含一个或更多个核酸酶抗性核苷酸的核酸分子。

[0891] 98. 权利要求97所述的方法,其中所述一个或更多个核酸酶抗性核苷酸是一个或更多个硫代磷酸酯核苷酸。

[0892] 99. 用于体外转录闭合的线性脱氧核糖核酸(DNA)产物或线性DNA产物的方法,其

中所述方法包括：

- [0893] (a) 根据权利要求90至96中任一项所述的方法产生闭合的线性DNA产物,或根据权利要求97或权利要求98所述的方法产生线性DNA产物；
- [0894] (b) 使所述闭合的线性DNA产物或所述线性DNA产物与聚合酶接触;以及
- [0895] (c) 产生由所述闭合的线性DNA产物或所述线性DNA产物编码的转录产物。
- [0896] 100. 用于产生蛋白质的方法,其中所述方法包括:
- [0897] (a) 根据权利要求90至96中任一项所述的方法产生闭合的线性DNA产物,或根据权利要求97或权利要求98所述的方法产生线性DNA产物；
- [0898] (b) 将所述闭合的线性DNA产物或所述线性DNA产物引入到细胞表达系统或无细胞表达系统中,以产生由所述闭合的线性DNA产物或所述线性DNA产物编码的蛋白质。
- [0899] 101. 用于将闭合的线性脱氧核糖核酸(DNA)产物或线性DNA产物细胞转染到细胞中的方法,其中所述方法包括:
- [0900] (a) 根据权利要求90至96中任一项所述的方法产生闭合的线性DNA产物,或根据权利要求97或权利要求98所述的方法产生线性DNA产物；
- [0901] (b) 使细胞与所述闭合的线性DNA产物或所述线性DNA产物接触;以及
- [0902] (c) 将所述闭合的线性DNA产物或所述线性DNA产物转染到所述细胞的胞质溶胶中。
- [0903] 102. 权利要求101所述的方法,其中将所述闭合的线性DNA产物或所述线性DNA产物转染到所述细胞的胞质溶胶中是通过电穿孔进行的。
- [0904] 103. 闭合的线性DNA产物或线性DNA产物在产生病毒递送系统或非病毒递送系统中的用途,其中所述闭合的线性DNA产物通过进行权利要求90至96中任一项所述的方法产生,并且所述线性DNA产物通过权利要求97或权利要求98所述的方法产生。

实施例

- [0905] 实施例1:Cre来源的环状DNA的滚环扩增
- [0906] 来自P1噬菌体的Cre重组酶是I型拓扑异构酶。该酶催化loxP位点(SEQ ID N0:3)之间的DNA的位点特异性重组。LoxP识别位点(34bp)由位于8bp间隔区侧翼的两个13bp反向重复组成,这赋予了方向性。Cre介导的重组的产物取决于loxP位点的位置和相对取向。将包含单个loxP位点的两个DNA种类进行融合。以相同方向取向的两个loxP位点之间存在的DNA被切除为DNA的圆环,而相反loxP位点之间的DNA相对于外部序列被倒置。Cre重组酶不需要用于其功能的另外的辅因子或辅助蛋白。
- [0907] Cre反应条件:反应体积50μl,在限制酶消化之后从琼脂糖凝胶电泳中纯化目的DNA(100ng),Cre重组酶(NEB,4个单位),孵育时间和温度:37°C下30分钟以及80°C下20分钟。接下来,为了在扩增的步骤之前去除剩余的非环状DNA分子,添加大肠杆菌外切核酸酶I(NEB,20个单位)和III(NEB,100个单位)并且将该反应在37°C下孵育30分钟以及在80°C下孵育20分钟。
- [0908] 滚环扩增(RCA)是基于Phi29 DNA聚合酶(Phi29DNAPol)的可信赖且等温的DNA扩增方法。Phi29DNAPol是负责从枯草杆菌(Bacillus subtilis)中对噬菌体phi29的线性双链DNA进行复制的单体酶(Blanco and Salas,1984)。该酶是极度进行性的聚合酶(每个结

合事件多达超过70kb),具有强大的链置换能力(Blanco et al, 1989)。该酶显示出3' ->5'的校对性外切核酸酶活性(Garmendia et al, 1992),这导致合成的极高精确性(Esteban et al, 1993)。这些特殊的特征使这种酶成为用于等温DNA扩增的完美选择。

[0909] RCA可由随机合成引物(Dean et al, 2001)或类似TthPrimPol(Picher et al, 2016)的DNA引发酶来起始,其在扩增反应期间合成用于Phi29DNAPol的引物。

[0910] 在图6中示出的是构建体A、构建体B、和构建体C(参见图5)的扩增产率,所述构建体从在图2中设计的程序之后获得的Cre来源的环状DNA分子获得。

[0911] 在扩增之前,首先通过添加1体积的缓冲液D(400mM KOH, 10mM EDTA)并在室温下孵育3分钟使环化的DNA样品变性。随后通过添加1体积的缓冲液N(400mM HC1, 600mM Tris-HCl pH 7.5)中和样品。滚环扩增条件:10ml反应体积,1ml TruePrime WGA反应缓冲液10×(4basebio), 500μl变性的DNA样品, 1ml TthPrimPol(1μM), 160μlQualiPhi Phi29DNAPol(12.5μM), 2.5个单位的PPA酶(Thermo)和1ml dNTP(10mM)。孵育时间和温度:30°C下20小时以及65°C下10分钟。

[0912] 将经扩增的DNA用II型限制酶BsaI、T4 DNA连接酶和这样的衔接子来孵育,所述衔接子与由BsaI在经扩增的DNA上所产生的5'突出末端互补。消化和连接反应条件:反应体积100μl, 10μl反应缓冲液T4 DNA连接酶10×(NEB), 3μg DNA, 60个单位的BsaI-HFv2(NEB), 2000个单位的T4 DNA连接酶(NEB), 480ng DNA衔接子(1:20摩尔过量), 孵育时间和温度:37°C下5分钟以及16°C下5分钟(60次循环)。外切核酸酶清除反应条件:随后添加15个单位的大肠杆菌外切核酸酶I(NEB)和75个单位的大肠杆菌外切核酸酶III(NEB)以去除剩余的衔接子和开放的DNA分子。孵育时间和温度:37°C下30分钟以及80°C下20分钟。

[0913] 在图7中示出的是将经扩增的DNA(泳道1和7)用限制酶BsaI消化(泳道2和8)的琼脂糖凝胶电泳分析,用限制酶BsaI消化释放了单位尺寸的表达盒(参见图5)。经扩增的DNA和衔接子被外切核酸酶I和III降解(泳道3和9),以及经扩增的DNA被BsaI消化(泳道4和10),这是由于所述经扩增的DNA和衔接子中没有一者在两个末端处是共价闭合以阻止外切核酸酶降解的。向反应中添加T4 DNA连接酶(泳道5和11)使得衔接子连接至由BsaI消化所产生的每个表达盒的两个末端。最后,外切核酸酶I和III降解剩余的开放DNA和衔接子,得到了对外切核酸酶降解具有抗性的共价闭合的线性DNA分子(泳道6和12)。

[0914] 从两个独立的测定中获得的每种DNA分子的连接产率总结于图8。

[0915] 实施例2

[0916] 将具有ITR的有或没有20bp间隔区的编码eGFP报道基因的闭合线性DNA产物转染到HEK293细胞中。将细胞使用JetOptimus转染,并在转染之后48小时分析GFP的表达。图9显示了表达从闭合的线性DNA构建体A和B(参见图5)中表达的GFP蛋白的细胞的明视野和荧光显微图像。

[0917] 图10示出了用编码eGFP报道基因的共价闭合的线性DNA分子转染的HEK293细胞的流式细胞术分析。将细胞使用Lipofectamine 2000转染,并在转染之后48小时分析GFP表达。图10a示出了在无GFP表达的情况下代表性未经转染样品的直方图和散点图。图10b示出了由用具有ITR的编码eGFP报道基因的共价闭合的线性DNA分子(构建体A,图5)转染的细胞产生的GFP表达。转染效率为54.43%。图10c示出了由用具有ITR和20bp间隔区的编码eGFP报道基因的共价闭合的线性DNA分子(构建体B,图5)转染的细胞产生的GFP表达。转染效率

为44.45%。

[0918] 图11示出了HEK293悬浮细胞的GFP转染效率和中位荧光强度,所述HEK293悬浮细胞使用PeiPro用编码GFP的线性共价闭合的DNA分子(构建体B剂量1和构建体B剂量2)vs编码GFP的pDNA构建体(pDNA剂量1和pDNA剂量2)进行转染,剂量为1 μ g/ml或1.5 μ g/ml。在转染之后72小时通过流式细胞术测量GFP的表达。线性共价闭合的DNA分子在剂量为1 μ g/ml时提供64%的转染效率,相比于pDNA的47%。中位荧光强度(median fluorescent intensity, MFI)为155,556,相比于pDNA的51,345。在剂量为1.5 μ g/ml时,线性共价闭合的DNA分子提供53.7%的转染效率,相比于pDNA的60.6%。MFI为143,353.8,相比于pDNA的83,856。

[0919] 图12示出了通过qPCR测量的AAV颗粒的rAAV5病毒基因组滴度(VG/ml),所述AAV颗粒使用线性共价闭合的DNA转基因构建体(构建体A、B和C,参见图5)来产生。将HEK293悬浮细胞使用PeiPro转染试剂用线性共价闭合的DNA转基因构建体与RepCap和辅助pDNA一起转染,并在转染之后72小时收获细胞。在线性共价闭合的DNA转基因构建体中,病毒滴度为1.78E+11至2.38E+11。

[0920] 图13示出了与pDNA对照相比,用线性共价闭合的DNA转基因构建体(构建体A和构建体B,参见图5)产生的AAV颗粒的空:载比(主坐标轴)。用Ad5共给药的HeLaRC32细胞中的TCID50/ml(半数组织培养物感染剂量)在次坐标轴上表示。线性共价闭合的DNA转基因构建体A和B的空:载比分别为57.1%和68.38%,相比于pDNA对照的46.3%。这表明了用线性共价闭合的DNA转基因构建体所产生的AAV颗粒具有更高比例的包含全长所期望转基因的衣壳,而较低的空:载比表明了其具有更多的空衣壳,这可以抑制病毒颗粒的转导并因此抑制AAV的效力。这些杂质也可提高AAV产物的免疫原性。线性共价闭合的DNA转基因构建体A和B的TCID50/ml值分别为5.01E+07和5.2E+08,相比于pDNA对照的3.16E+09。这表明了用线性共价闭合的DNA转基因构建体产生的AAV颗粒更加强效,并且需要较低的浓度来展现在HeLaRC32细胞中的致细胞病变作用(cytopathic effect,CPE)。

[0921] 图14总结了编码萤光素酶报道基因的共价闭合的线性DNA分子的产生。使包含图14中所示的表达盒的质粒经历图1中描述的步骤。Cre反应条件:反应体积50 μ l,在限制酶消化之后从琼脂糖凝胶电泳中纯化的目的DNA(100ng),Cre重组酶(NEB,4个单位),孵育时间和温度:37°C下30分钟以及80°C下20分钟。接下来,为了在扩增的步骤之前去除剩余的非环状DNA分子,添加大肠杆菌外切核酸酶I(NEB,20个单位)和III(NEB,100个单位)并且将该反应在37°C下孵育30分钟以及在80°C下孵育20分钟。在扩增之前,首先通过添加1体积的缓冲液D(400mM KOH,10mM EDTA)并在室温下孵育3分钟使环化的DNA变性。然后将样品通过添加1体积的缓冲液N(400mM HCl,600mM Tris-HCl pH 7.5)中和。滚环扩增条件:10ml反应体积,1ml TruePrime WGA反应缓冲液10×(4basebio),500 μ l变性的DNA样品,1ml TthPrimPol(1 μ M),160 μ l QualiPhi Phi29DNAPol(12.5 μ M),2.5个单位的PPA酶(Thermo)和1ml dNTP(10mM)。孵育时间和温度:30°C下20小时以及65°C下10分钟。随后将经扩增的DNA用II型限制酶BsaI、T4 DNA连接酶和这样的衔接子(SEQ ID NO:4)来孵育,所述衔接子与由BsaI在经扩增的DNA上所产生的5'突出末端互补。消化和连接反应条件:反应体积100 μ l,10 μ l反应缓冲液T4 DNA连接酶10×(NEB),3 μ g DNA,60个单位的BsaI-HFv2(NEB),2000个单位的T4 DNA连接酶(NEB),480ng DNA衔接子(1:20摩尔过量),孵育时间和温度:37°C下5分钟以及16°C下5分钟(60次循环)。外切核酸酶清除反应条件:随后添加15个单位的大肠杆菌外

切核酸酶I (NEB) 和75个单位的大肠杆菌外切核酸酶III (NEB) 以去除剩余的衔接子和开放的DNA分子。孵育时间和温度:37°C下30分钟以及80°C下20分钟。图14中示出的是所产生的线性闭合的DNA的琼脂糖凝胶电泳分析。图14中的表格示出了线性闭合的DNA产生过程的效率。

[0922] 图15示出了萤光素酶在6周龄瑞士雌性小鼠中的表达。使小鼠接受编码萤光素酶转基因的共价闭合的线性DNA分子的肌内注射,随后进行电穿孔。在肌内注射之后的第1至15天,在进行观察之前的10分钟使小鼠接受D-萤光素(100ul的PBS中为150mg/kg)的腹膜内注射。在异氟烷麻醉下通过IVIS谱系统观察光学生物发光。来自编码萤光素酶转基因的共价闭合的线性DNA分子的萤光素酶蛋白的表达在第2天达到峰值,并在15天的进程中逐渐下降。

[0923] 实施例3

[0924] 图3、16、17和18总结了部分闭合的线性DNA产物和包含受保护核苷酸的线性DNA产物的产生。两种DNA产物编码用于IVT的GFP报道基因 (SEQ ID NO:25)。使包含图20中所示的表达盒的质粒经历图3、16、17和18中描述的程序以分别产生部分闭合的线性DNA产物和包含受保护核苷酸的线性DNA产物。Cre反应条件:反应体积1ml,在限制酶消化之后纯化的目的DNA (2ng/ μ l),Cre重组酶 (NEB, 0.08个单位/ μ l),孵育时间和温度:37°C下30分钟以及80°C下20分钟。接下来,为了在扩增步骤之前去除剩余的非环状DNA分子,添加大肠杆菌外切核酸酶I (NEB, 0.4个单位/ μ l) 和III (NEB, 2个单位/ μ l) 并将该反应在37°C下孵育30分钟以及在80°C下孵育20分钟。在扩增之前,首先通过添加1体积的缓冲液D (400mM KOH, 10mM EDTA) 并在室温下孵育3分钟使环化的DNA变性。然后将样品通过添加1体积的缓冲液N (400mM HCl, 600mM Tris-HCl pH 7.5) 中和。滚环扩增条件:20ml反应体积,2ml TruePrime WGA反应缓冲液10× (4basebio),3ml变性的DNA样品,2ml TthPrimPol (1 μ M),320 μ l QualiPhi Phi29DNAPol (12.5 μ M),5个单位的PPA酶 (Thermo) 和2ml dNTP (10mM)。孵育时间和温度:30°C下20小时以及65°C下10分钟。随后将经扩增的DNA用II型限制酶BsaI、T4 DNA连接酶和这样的衔接子 (SEQ ID NO:4、13和14或者SEQ ID NO:1、2、13和14的任一者) 来孵育,所述衔接子与由BsaI在经扩增的DNA上所产生的5' 突出末端互补。消化和连接反应条件:反应体积20ml,2ml反应缓冲液T4 DNA连接酶10× (NEB),120ng/ μ l经扩增的DNA,0.6个单位/ μ l的BsaI-HFv2 (NEB),20个单位/ μ l的T4 DNA连接酶 (NEB),DNA衔接子 (1:10摩尔过量),孵育时间和温度:30°C下23小时。外切核酸酶清除反应条件:随后添加0.15个单位/ μ l的大肠杆菌外切核酸酶I (NEB) 和0.75个单位/ μ l的大肠杆菌外切核酸酶III (NEB) 以去除剩余的衔接子和开放的DNA分子。孵育时间和温度:37°C下2小时。图19中示出的是所产生的部分闭合的线性DNA产物和包含受保护核苷酸的线性DNA产物的琼脂糖凝胶电泳分析。图20中的表格示出了部分闭合的线性DNA产物和包含受保护核苷酸的线性DNA产物的产生过程的效率。

[0925] 图3、16、17和18总结了部分闭合的线性DNA产物和包含受保护核苷酸的线性DNA产物的产生,所述二者线性DNA产物编码用于IVT的萤光素酶报道基因 (SEQ ID NO:24)。使包含图19中所示的表达盒的质粒经历图3、16、17和18中描述的程序以产生部分闭合的线性DNA产物和包含受保护核苷酸的线性DNA产物。Cre反应条件:反应体积1ml,在限制酶消化之后纯化的目的DNA (2ng/ μ l),Cre重组酶 (NEB, 0.08个单位/ μ l),孵育时间和温度:37°C下30

分钟以及80°C下20分钟。接下来,为了在扩增步骤之前去除剩余的非环状DNA分子,添加大肠杆菌外切核酸酶I (NEB, 0.4个单位/ μ l) 和III (NEB, 2个单位/ μ l) 并将该反应在37°C下孵育30分钟以及在80°C下孵育20分钟。在扩增之前,首先通过添加1体积的缓冲液D (400mM KOH, 10mM EDTA) 并在室温下孵育3分钟使环化的DNA变性。随后通过添加1体积的缓冲液N (400mM HCl, 600mM Tris-HCl pH 7.5) 中和样品。滚环扩增条件:20ml反应体积, 2ml TruePrime WGA反应缓冲液10× (4basebio), 3ml变性的DNA样品, 2ml TthPrimPol (1 μ M), 320 μ l QualiPhi Phi29DNAPol (12.5 μ M), 5个单位的PPA酶 (Thermo) 和2ml dNTP (10mM)。孵育时间和温度:30°C下20小时以及65°C下10分钟。随后用II型限制酶BsaI、T4 DNA连接酶和这样的衔接子 (SEQ ID NO:4、13和14或者SEQ ID NO:1、2、13和14的任一者) 来孵育经扩增的DNA, 所述衔接子与由BsaI在经扩增的DNA上所产生的5' 突出末端互补。消化和连接反应条件:反应体积20ml, 2ml反应缓冲液T4 DNA连接酶10× (NEB), 120ng/ μ l经扩增的DNA, 0.6个单位/ μ l的BsaI-HFv2 (NEB), 20个单位/ μ l的T4 DNA连接酶 (NEB), DNA衔接子 (1:10摩尔过量), 孵育时间和温度:30°C下23小时。外切核酸酶清除反应条件:随后添加0.15个单位/ μ l的大肠杆菌外切核酸酶I (NEB) 和0.75个单位/ μ l的大肠杆菌外切核酸酶III (NEB) 以去除剩余的衔接子和开放的DNA分子。孵育时间和温度:37°C下2小时。图19中示出的是所产生的部分闭合的线性DNA产物以及包含受保护核苷酸的线性DNA产物的琼脂糖凝胶电泳分析。图19中的表格示出了部分闭合的线性DNA产物以及包含受保护核苷酸的线性DNA产物的产生过程的效率。

[0926] 图21总结了闭合的线性DNA产物和包含受保护核苷酸的线性DNA产物的产生, 所述二者DNA产物编码用于哺乳动物细胞表达的萤光素酶报道基因 (SEQ ID NO:12)。使包含图21中所示的表达盒的质粒经历图1至4中描述的程序以产生闭合的线性DNA产物 (hpDNA) 和包含受保护核苷酸的线性DNA产物 (oeDNA)。Cre反应条件:反应体积1ml, 在限制酶消化之后纯化的目的DNA (2ng/ μ l), Cre重组酶 (NEB, 0.08个单位/ μ l), 孵育时间和温度:37°C下30分钟以及80°C下20分钟。接下来,为了在扩增步骤之前去除剩余的非环状DNA分子, 添加大肠杆菌外切核酸酶I (NEB, 0.4个单位/ μ l) 和III (NEB, 2个单位/ μ l) 并将该反应在37°C下孵育30分钟以及在80°C下孵育20分钟。在扩增之前,首先通过添加1体积的缓冲液D (400mM KOH, 10mM EDTA) 并在室温下孵育3分钟使环化的DNA变性。随后通过添加1体积的缓冲液N (400mM HCl, 600mM Tris-HCl pH 7.5) 中和样品。滚环扩增条件:20ml反应体积, 2ml TruePrime WGA反应缓冲液10× (4basebio), 3ml变性的DNA样品, 2ml TthPrimPol (1 μ M), 320 μ l QualiPhi Phi29DNAPol (12.5 μ M), 5个单位的PPA酶 (Thermo) 和2ml dNTP (10mM)。孵育时间和温度:30°C下20小时以及65°C下10分钟。随后用II型限制酶BsaI、T4 DNA连接酶和这样的衔接子 (SEQ ID NO:4或者SEQ ID NO:1和2的任一者) 来孵育经扩增的DNA, 所述衔接子与由BsaI在经扩增的DNA上所产生的5' 突出末端互补。消化和连接反应条件:反应体积20ml, 2ml反应缓冲液T4DNA连接酶10× (NEB), 120ng/ μ l扩增的DNA, 0.6个单位/ μ l的BsaI-HFv2 (NEB), 20个单位/ μ l的T4 DNA连接酶 (NEB), DNA衔接子 (1:10摩尔过量), 孵育时间和温度:30°C下23小时。外切核酸酶清除反应条件:随后添加0.15个单位/ μ l的大肠杆菌外切核酸酶I (NEB) 和0.75个单位/ μ l的大肠杆菌外切核酸酶III (NEB) 以去除剩余的衔接子和开放的DNA分子。孵育时间和温度:37°C下2小时。图21中示出的是所产生的闭合的线性DNA产物和包含受保护核苷酸的线性DNA产物的琼脂糖凝胶电泳分析。图21中的表格示出了线性部分

开放的和开放的受保护的DNA产生过程的效率。

[0927] 实施例4-体外转录

[0928] 每份样品使用1 μ g的输入DNA模板,随后是2 μ L 10 \times T7-FlashScribeTM转录缓冲液(CellScript),9mM ATP,9mM CTP(CellScript),9mM N1-甲基假-UTP(TriLink),8mM ARCA帽结构类似物(NEB),9mM GTP,10mM DTT(CellScript),0.2U无机焦磷酸酶(Thermo Scientific),20U ScriptGuardTM RNA酶抑制剂,2 μ L T7-FlashScribeTM酶溶液(CellScript)。孵育时间和温度:37°C下1.5小时。随后应用1U的DNA酶I处理,孵育时间和温度:37°C下15分钟。

[0929] 实施例5-甲醛变性的琼脂糖凝胶电泳

[0930] 用0.7%甲醛制备0.8%琼脂糖凝胶。样品使用甲醛上样染料(formaldehyde load dye)(Invitrogen)制备并在65°C下热变性持续5分钟,然后将样品添加至孔。将样品在80V下运行70分钟,随后进行成像。

[0931] 实施例6-HEK细胞的转染-萤光素酶mRNA

[0932] 将HEK293细胞在具有10%胎牛血清(Fetal Bovine Serum,FBS)(Gibco,目录号:16140-071)和1%青霉素/链霉素(Gibco目录号:15070-063)的Dulbecco改良Eagle培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium,DMEM)(Gibco目录号:11965084)中培养。

[0933] HEK293细胞中的转染用可商购转染试剂Lipofectamine2000(ThermoFisher目录号:11668019)进行。

[0934] 转染在96孔板中进行,所述96孔板在转染之前一天以25 \times 103个细胞/孔的密度接种。

[0935] 将每个孔300ng的mRNA稀释于50 μ l的OptiMEM中,而将0.5 μ l的Lipofectamine2000稀释到50 μ l的OptiMEM中。将组分分别孵育5分钟,随后完全混合并孵育另外25分钟,随后添加100 μ l OptiMEM至孔。

[0936] 所有条件均进行三次。将细胞在37°C下用5% CO₂孵育。在转染之后4小时,将细胞在PBS中漂洗,然后重悬于报道裂解缓冲液(Promega)中。将板在4°C下孵育20分钟,然后在-80°C下孵育40分钟。解冻之后,在ClarioSTAR plus板阅读器(BMG Labtech,Aylesbury,UK)上注射萤光素酶测定底物,随后测量萤光素酶的活性。使用Pierce BCA蛋白质测定,将萤光素酶表达归一化为蛋白质含量,在562nm处测量吸光度。萤光素酶活性以每mg蛋白质的相对光单位(Relative Light Units per mg of protein,RLU/mg)来表示。

[0937] 图25示出了从使用T7 RNA聚合酶和不同DNA模板而体外转录的mRNA中所产生的产率。具体地,该图表明了使用部分闭合的线性DNA产物(opDNA)、包含受保护核苷酸的线性DNA产物(oeDNA)和线性化质粒来作为体外转录模板而对mRNA产率的影响。传统的DNA线性化质粒模板已用于对照。反应条件:每份样品使用1 μ g的输入DNA模板,最终反应体积为20 μ L,2 μ L 10 \times T7-FlashScribeTM转录缓冲液(CellScript),10mM NTP(CellScript),8mM CleanCap AG(TriLink),10mM DTT(CellScript),0.2U无机焦磷酸酶(Thermo Scientific),20U ScriptGuardTM RNA酶抑制剂,2 μ L T7-FlashScribeTM酶溶液(CellScript)。孵育时间和温度:37°C下2小时。随后应用1U的DNA酶I处理(CellScript),孵育时间和温度:37°C下15分钟。通过Qubit RNA宽范围试剂盒(Invitrogen)使用Qubit定量(n=1)来测量mRNA产率。

[0938] 图25中示出的是使用不同的DNA模板所获得的体外转录mRNA产率,表明了使用部分闭合的线性DNA产物部分闭合的线性DNA产物(opDNA)、包含受保护核苷酸的线性DNA产物(oeDNA)和线性化质粒来作为体外转录模板而对mRNA产率的影响。从oeDNA模板中实现了最小产率180 μ g,并且从opDNA模板实现了最小产率190 μ g。部分闭合的线性DNA产物(opDNA)和包含受保护核苷酸的线性DNA产物(oeDNA)二者均产生了与传统线性化质粒相当的mRNA产率。反应条件:每份样品使用1 μ g的输入DNA模板,最终反应体积为20 μ L,2 μ L 10 \times T7-FlashScribeTM转录缓冲液(CellScript),10mM NTP(CellScript),8mM CleanCap AG(TriLink),10mM DTT(CellScript),0.2U无机焦磷酸酶(Thermo Scientific),20U ScriptGuardTM RNA酶抑制剂,2 μ L T7-FlashScribeTM酶溶液(CellScript)。孵育时间和温度:37°C下2小时。随后应用1U的DNA酶I处理(CellScript),孵育时间和温度:37°C下15分钟。

[0939] 图26示出了通过非变性的0.8%琼脂糖凝胶电泳所成像的体外转录的mRNA样品。mRNA样品从具有不同衔接末端的DNA模板中转录。将样品上样至相等质量的1000ng。将来源于传统线性化质粒的mRNA作为对照上样。

[0940] 图26中示出的是通过非变性的0.8%琼脂糖凝胶电泳所成像的体外转录的mRNA样品。mRNA样品从具有不同衔接末端的DNA产物中转录。约0.75kb的靶条带可在所有样品中观察到。独立于经衔接的DNA模板末端,所有样品产生了相似的条带强度和纯度。还可以观察到第二高分子量条带,其与自然条件下mRNA的天然二级结构折叠相对应。

[0941] 图27示出了通过变性的0.8%琼脂糖凝胶电泳所成像的体外转录的mRNA样品。mRNA样品从具有不同衔接末端的DNA产物中转录。将样品上样至相等质量的1000ng。将来源于传统线性化质粒的mRNA作为对照上样。将所有样品在70°C下热变性5分钟,并用甲酰胺进行处理,然后添加至凝胶。

[0942] 图27中示出的是通过变性的0.8%琼脂糖凝胶电泳所成像的体外转录的mRNA样品。mRNA样品从具有不同衔接末端的DNA产物中转录。约0.75kb的主要条带可在所有样品中观察到,表明了部分闭合的线性DNA产物和包含受保护核苷酸的线性DNA产物适合用于转录过程。

[0943] 图28示出了用可商购的转染试剂Lipofectamine2000所转染的HEK293细胞中的萤光素酶表达,所述Lipofectamine2000包封了来源于部分闭合的线性DNA产物和包含受保护核苷酸的线性DNA产物的mRNA。在转染之后4小时测量萤光素酶的表达。所有实验中n=3,误差棒=SD。使用线性化质粒DNA模板和Trilink mRNA作为阳性对照。

[0944] 图28中示出了用可商购的转染试剂Lipofectamine2000所转染的HEK293细胞中的萤光素酶表达,所述Lipofectamine2000包封了来源于部分闭合的线性DNA产物和包含受保护核苷酸的线性DNA产物的mRNA。使用线性化质粒来源的mRNA和Trilink mRNA作为阳性对照。与线性化质粒相比,在部分闭合的线性DNA产物(opDNA)和包含受保护核苷酸的线性DNA产物(oeDNA)来源的mRNA之间等同的情况下,萤光素酶表达为2.25 \times 10⁸至6.05 \times 10⁸RLU/mg蛋白质。

[0945] 实施例7-HEK293细胞的转染-GFP mRNA

[0946] 将HEK293细胞在具有10%胎牛血清(FBS)(Gibco,目录号:16140-071)和1%青霉素/链霉素(Gibco目录号:15070-063)的Dulbecco改良Eagle培养基(DMEM)(Gibco目录号:

11965084) 中培养。

[0947] HEK293细胞中的转染用可商购转染试剂例如Lipofectamine2000(ThermoFisher 目录号:11668019) 进行。

[0948] 转染在96孔板中进行,所述96孔板在转染之前一天以 25×10^3 个细胞/孔的密度接种。

[0949] 将每个孔 300ng 的GFP mRNA稀释于 $50\mu\text{l}$ 的OptiMEM中,而将 $0.5\mu\text{l}$ 的 Lipofectamine2000稀释到 $50\mu\text{l}$ 的OptiMEM中。将组分分别孵育5分钟,随后完全混合并孵育另外25分钟,然后将 $100\mu\text{l}$ OptiMEM添加至孔。

[0950] 所有条件均进行三次。将细胞在 37°C 下用 5% CO₂孵育。在转染之后4小时,将细胞在PBS中漂洗,然后在 0.05% 胰蛋白酶、 0.53mM EDTA(Corning, 目录号:25-052-CV) 中孵育以使细胞脱离。将细胞重悬于PBS中,以用于使用Aligent Novocyte流式细胞仪通过流式细胞术进行分析。

[0951] 图22示出了从使用T7 RNA聚合酶和不同DNA模板而体外转录的mRNA中所产生的产率。具体地,该图示出了使用部分闭合的线性DNA产物(opDNA) 和包含受保护核苷酸的线性DNA产物(oeDNA) 和线性化质粒来作为体外转录模板而对mRNA产率的影响。传统的DNA线性化质粒模板已用于对照。反应条件:每份样品使用 $1\mu\text{g}$ 的输入DNA模板,最终反应体积为 $40\mu\text{l}$, $4\mu\text{l}$ $10 \times$ T7-FlashScribeTM转录缓冲液(CellScript), 10mM NTP(CellScript), 8mM CleanCap AG(TriLink), 10mM DTT(CellScript), 0.4U 无机焦磷酸酶(Thermo Scientific), 40U ScriptGuardTM RNA酶抑制剂, $4\mu\text{l}$ T7-FlashScribeTM酶溶液(CellScript)。孵育时间和温度: 37°C 下2小时。随后应用 1U 的DNA酶I处理(CellScript),孵育时间和温度: 37°C 下15分钟。通过Qubit RNA宽范围试剂盒(Invitrogen) 使用Qubit定量($n=3$) 来测量mRNA产率。

[0952] 图22示出了使用不同的DNA模板所获得的体外转录mRNA产率,表明了使用部分闭合的线性DNA产物(opDNA) 和包含受保护核苷酸的线性DNA产物(oeDNA) 和线性化质粒来作为体外转录模板而对mRNA产率的影响。从包含受保护核苷酸的线性DNA产物(oeDNA) 中实现了最小产率 $280\mu\text{g}$,并且从部分闭合的线性DNA产物(opDNA) 中实现了最小产率 340 。两种形式的DNA产物产生了与传统线性化质粒相当的mRNA产率。反应条件:每份样品使用 $1\mu\text{g}$ 的输入DNA模板,最终反应体积为 $40\mu\text{l}$, $4\mu\text{l}$ $10 \times$ T7-FlashScribeTM转录缓冲液(CellScript), 10mM NTP(CellScript), 8mM CleanCap AG(TriLink), 10mM DTT(CellScript), 0.4U 无机焦磷酸酶(Thermo Scientific), 40U ScriptGuardTM RNA酶抑制剂, $4\mu\text{l}$ T7-FlashScribeTM酶溶液(CellScript)。孵育时间和温度: 37°C 下2小时。随后应用 1U 的DNA酶I处理(CellScript),孵育时间和温度: 37°C 下15分钟。

[0953] 图23示出了通过非变性的 0.8% 琼脂糖凝胶电泳所成像的体外转录的mRNA样品。mRNA样品从具有不同衔接末端的DNA模板中转录。将样品上样至相等质量的 1000ng 。将来源于传统线性化质粒的mRNA作为对照上样。

[0954] 图23中示出的是通过非变性的 0.8% 琼脂糖凝胶电泳所成像的体外转录的mRNA样品。mRNA样品从具有不同衔接末端的DNA模板中转录。约 2kb 的靶条带可在所有样品中观察到。独立于经衔接的DNA模板末端,所有样品产生了相似的条带强度和纯度。还可以观察到第二高分子量的条带,其与自然条件下mRNA的天然二级结构折叠相对应。

[0955] 图24示出了通过变性的0.8%琼脂糖凝胶电泳所成像的体外转录的mRNA样品。mRNA样品从具有不同衔接末端的DNA模板中转录。将样品上样至相等质量的1000ng。将来源于传统线性化质粒的mRNA作为对照上样。将样品在70°C下热变性持续5分钟，并用甲酰胺进行处理，然后添加至凝胶。

[0956] 图24中示出的是通过变性的0.8%琼脂糖凝胶电泳所成像的体外转录的mRNA样品。mRNA样品从具有不同衔接末端的DNA模板中转录。约2kb的主要条带可在所有样品中观察到，表明了部分闭合的线性DNA产物(opDNA)和包含受保护核苷酸的线性DNA产物(oeDNA)适合用于转录过程。

[0957] 图29示出了用可商购的转染试剂Lipofectamine2000所转染的HEK293细胞中的GFP表达，所述Lipofectamine2000包封了来源于部分闭合的线性DNA产物(opDNA)和包含受保护核苷酸的线性DNA产物(oeDNA)的mRNA。在转染之后4小时测量GFP的表达。所有实验中n=3，误差棒=SD。使用线性化质粒DNA模板和Trilink mRNA作为阳性对照。

[0958] 图29中示出的是用可商购的转染试剂Lipofectamine2000所转染的HEK293细胞中的GFP表达，所述Lipofectamine2000包封了来源于部分闭合的线性DNA产物(opDNA)和包含受保护核苷酸的线性DNA产物(oeDNA)的mRNA。使用线性化质粒DNA模板和Trilink mRNA作为阳性对照。与线性化质粒相比，在部分闭合的线性DNA产物(opDNA)和包含受保护核苷酸的线性DNA产物(oeDNA)来源的mRNA之间相等的情况下，所有mRNA的GFP表达在70%以上。

[0959] 实施例8-HEK细胞的转染-萤光素酶闭合的线性DNA(hpDNA) vs包含受保护核苷酸的线性DNA产物(oeDNA)

[0960] 将HEK293细胞在具有10%胎牛血清(FBS)(Gibco,目录号:16140-071)和1%青霉素/链霉素(Gibco目录号:15070-063)的Dulbecco改良Eagle培养基(DMEM)(Gibco目录号:11965084)中培养。

[0961] HEK293细胞中的转染用可商购转染试剂Lipofectamine2000(ThermoFisher目录号:11668019)进行。

[0962] 转染在96孔板中进行，所述96孔板在转染之前一天以 25×10^3 个细胞/孔的密度接种。

[0963] 将每个孔300ng的闭合的线性DNA产物(productor)、包含受保护核苷酸的线性DNA产物稀释于50ul的OptiMEM中，而将0.5ul的Lipofectamine2000稀释到50ul的OptiMEM中。将组分分别孵育5分钟，随后完全混合并孵育另外25分钟，然后将100ul OptiMEM添加至孔。

[0964] 所有条件均进行三次。将细胞在37°C下用5% CO₂孵育。在转染之后48小时，将细胞在PBS中漂洗，然后重悬于报道裂解缓冲液(Promega)中。将板在4°C下孵育20分钟，然后在-80°C下孵育40分钟。解冻之后，在ClarioSTAR plus板阅读器(BMG Labtech,Aylesbury, UK)上注射萤光素酶测定底物，随后测量萤光素酶的活性。使用Pierce BCA蛋白质测定将萤光素酶表达归一化为蛋白质含量，在562nm处测量吸光度。萤光素酶活性以每mg蛋白质的相对光单位(RLU/mg)来表示。

[0965] 图30示出了用可商购的转染试剂Lipofectamine2000所转染的HEK293细胞中的萤光素酶表达，所述Lipofectamine2000包封了编码萤光素酶报道基因的闭合的线性DNA产物(hpDNA)或包含受保护核苷酸的线性DNA产物(oeDNA)。在转染之后48小时测量GFP的表达。所有实验中n=3，误差棒=SD。

[0966] 图30中示出的是用可商购的转染试剂Lipofectamine2000所转染的HEK293细胞中的萤光素酶表达,所述Lipofectamine2000包封了编码萤光素酶报道基因的闭合的线性DNA产物 (hpDNA) 或包含受保护核苷酸的线性DNA产物 (oeDNA) 。萤光素酶表达为oeDNA的 $3.85E+10$ vs hpDNA的 $1.20E+11$,这表明了高的萤光素酶表达与线性DNA产物无关。

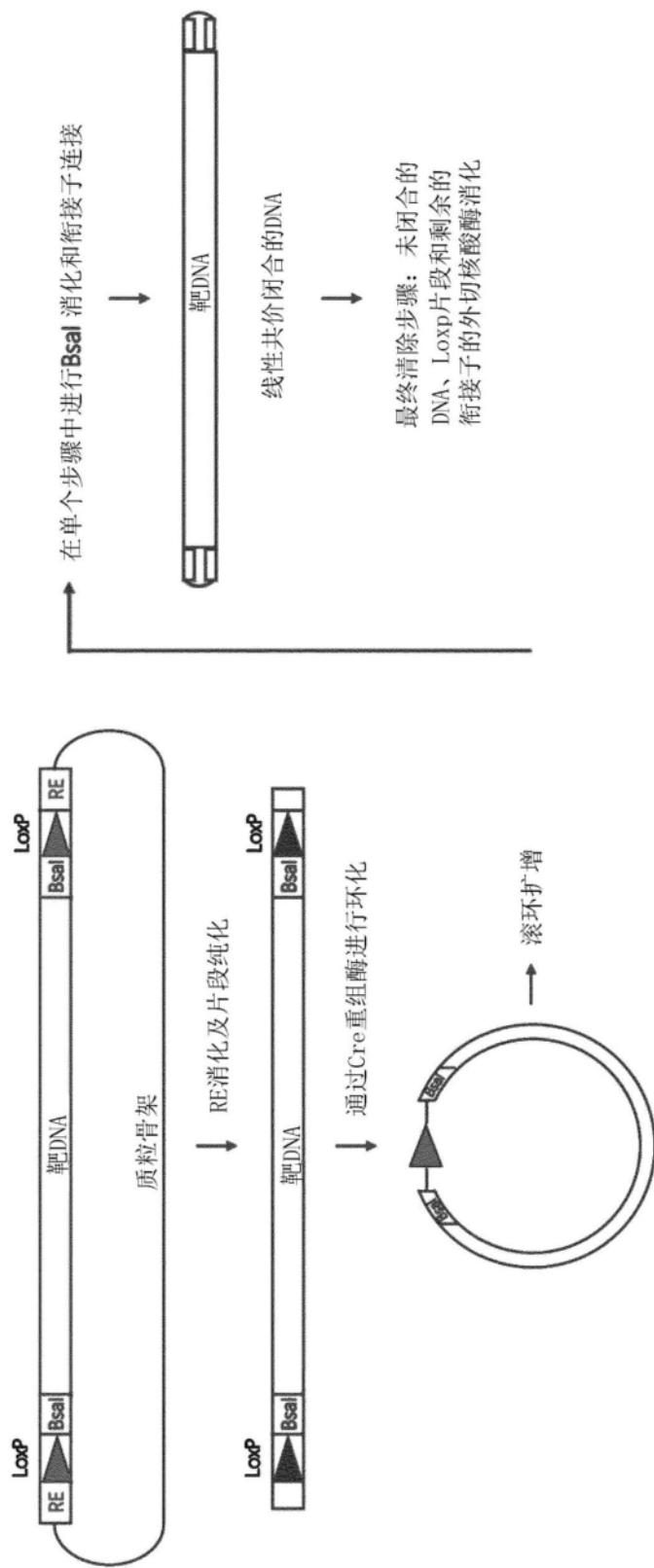


图1

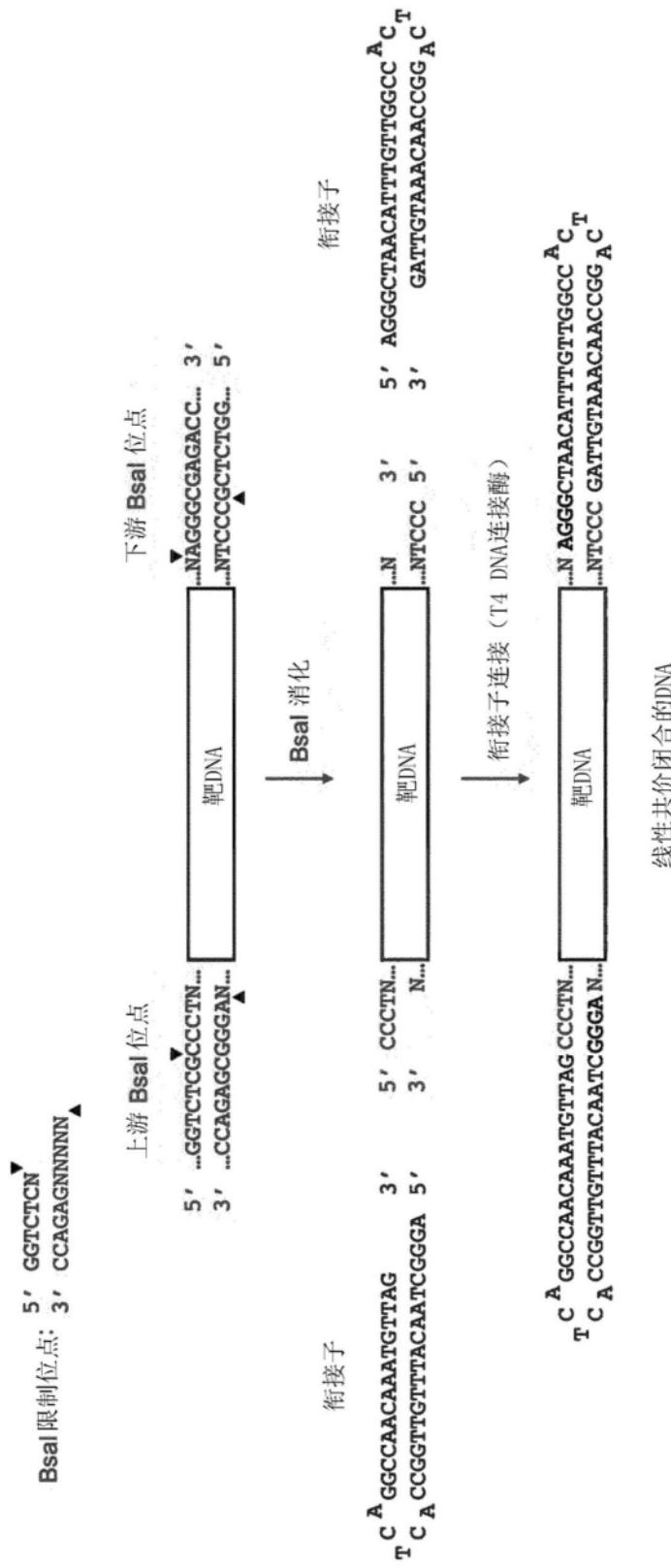


图2

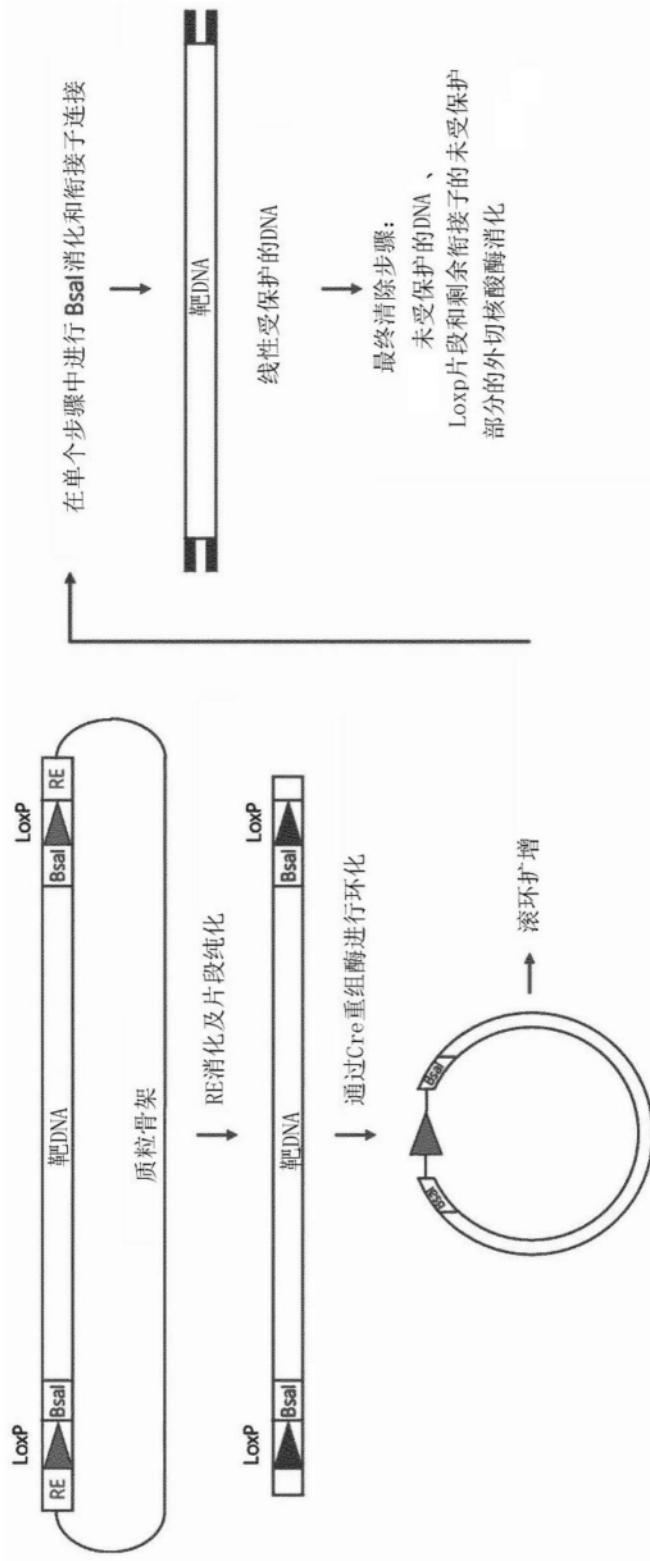


图3

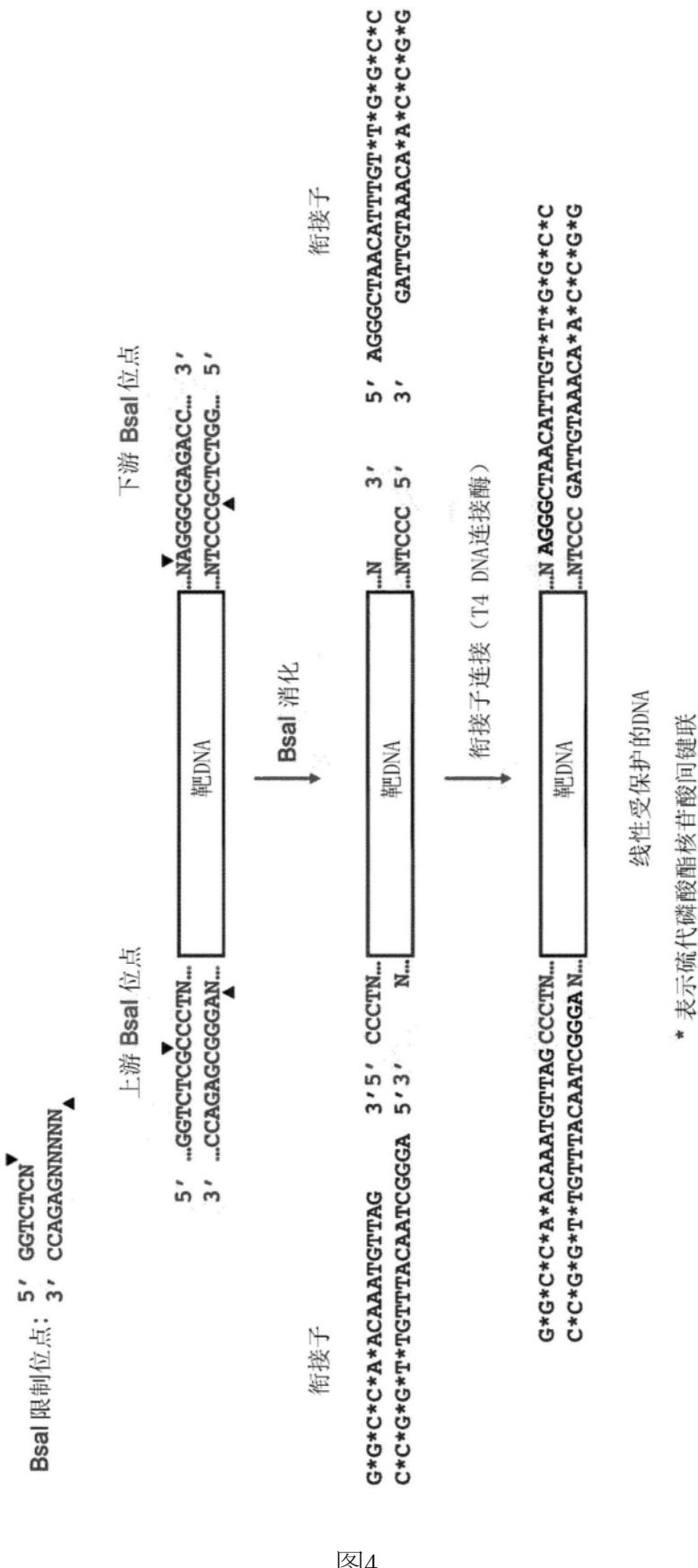


图4

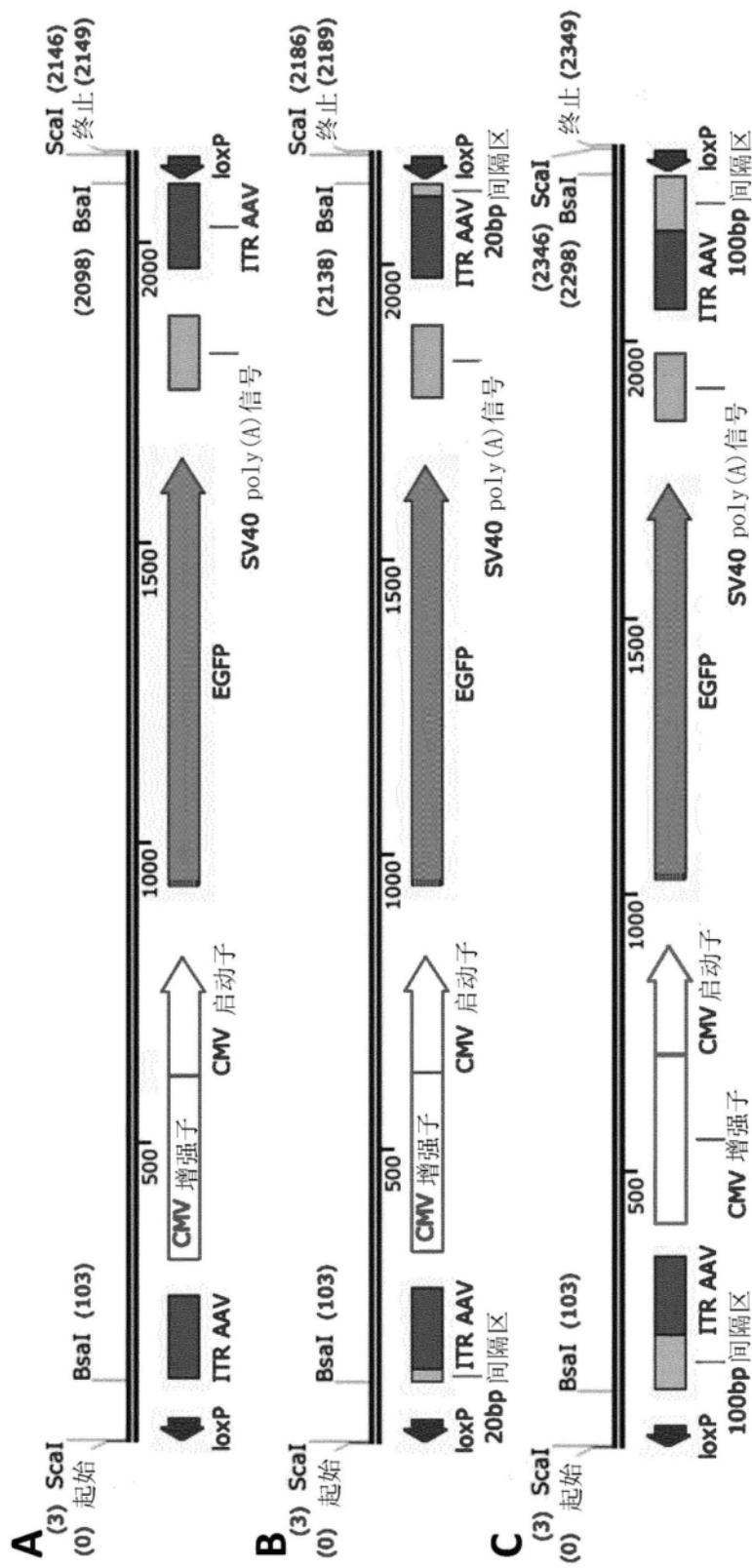


图5

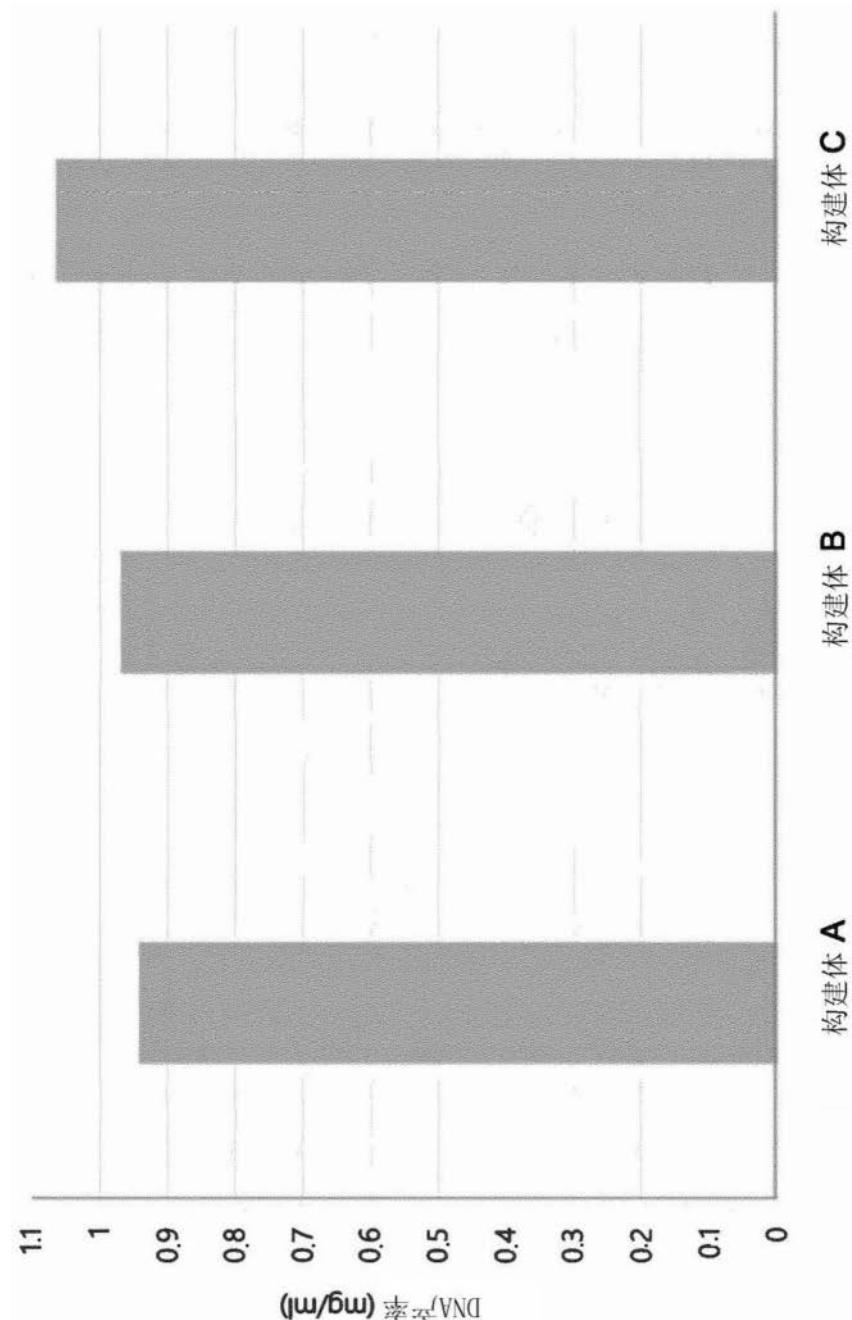


图6

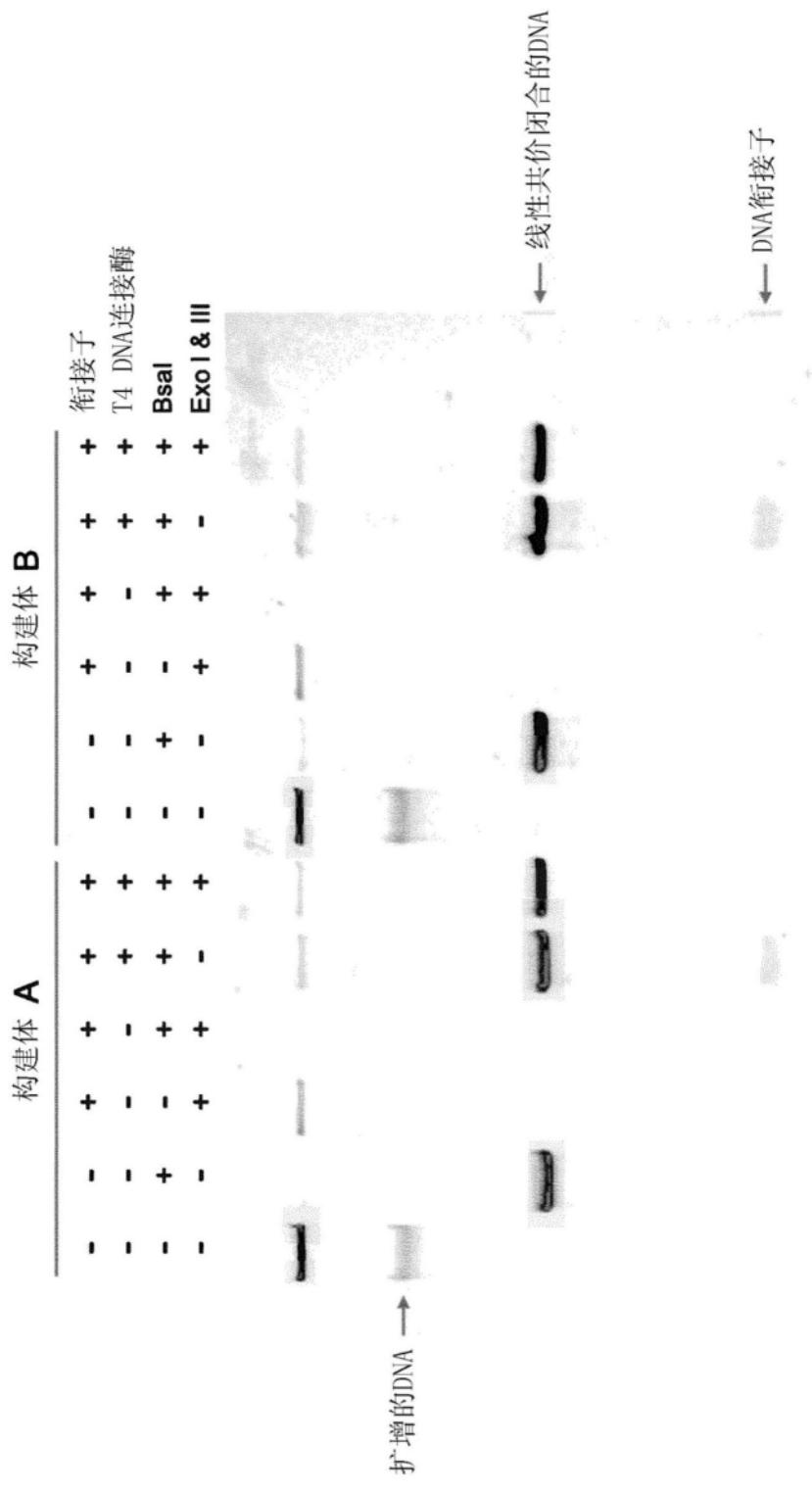
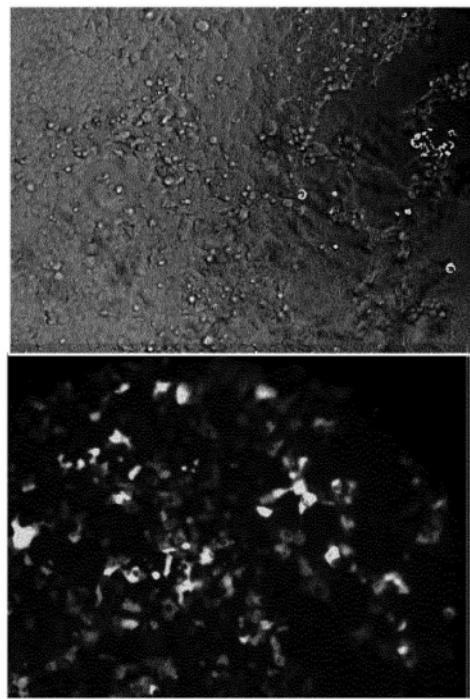


图7

DNA构建体	起始扩增的DNA	连接产率		产生的线性共价 闭合的DNA
		577 μg	577 μg	
A		82%	84%	470 μg 484 μg
B		61%	77%	350 μg 445 μg
C		61%	88%	354 μg 507 μg

图8

构建体 A



构建体 B

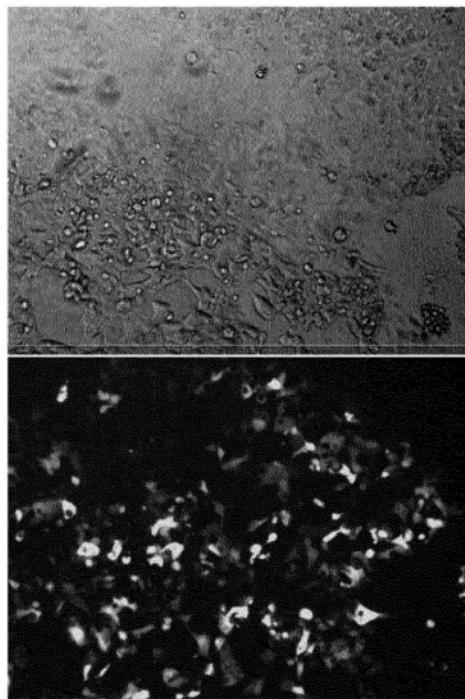


图9

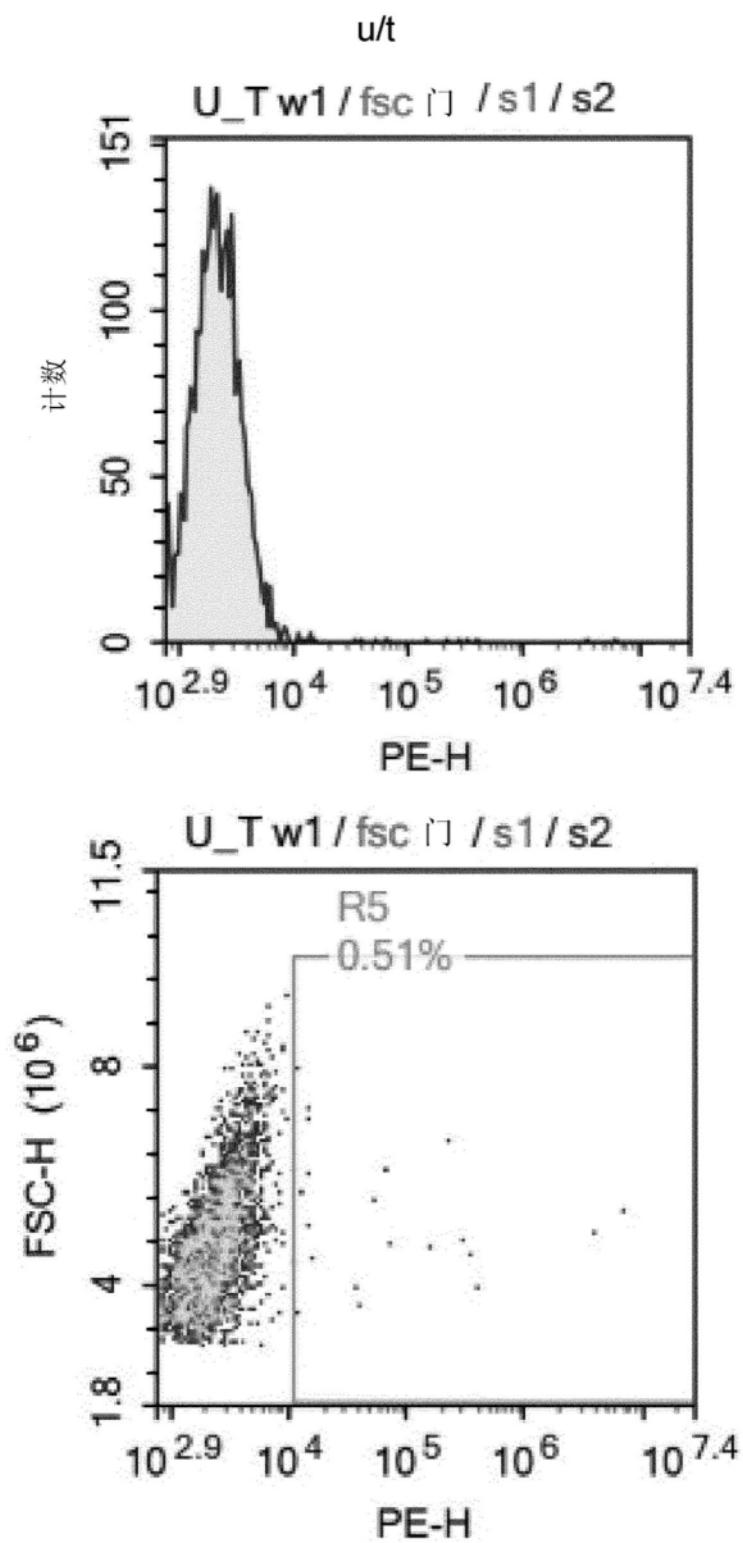


图10a

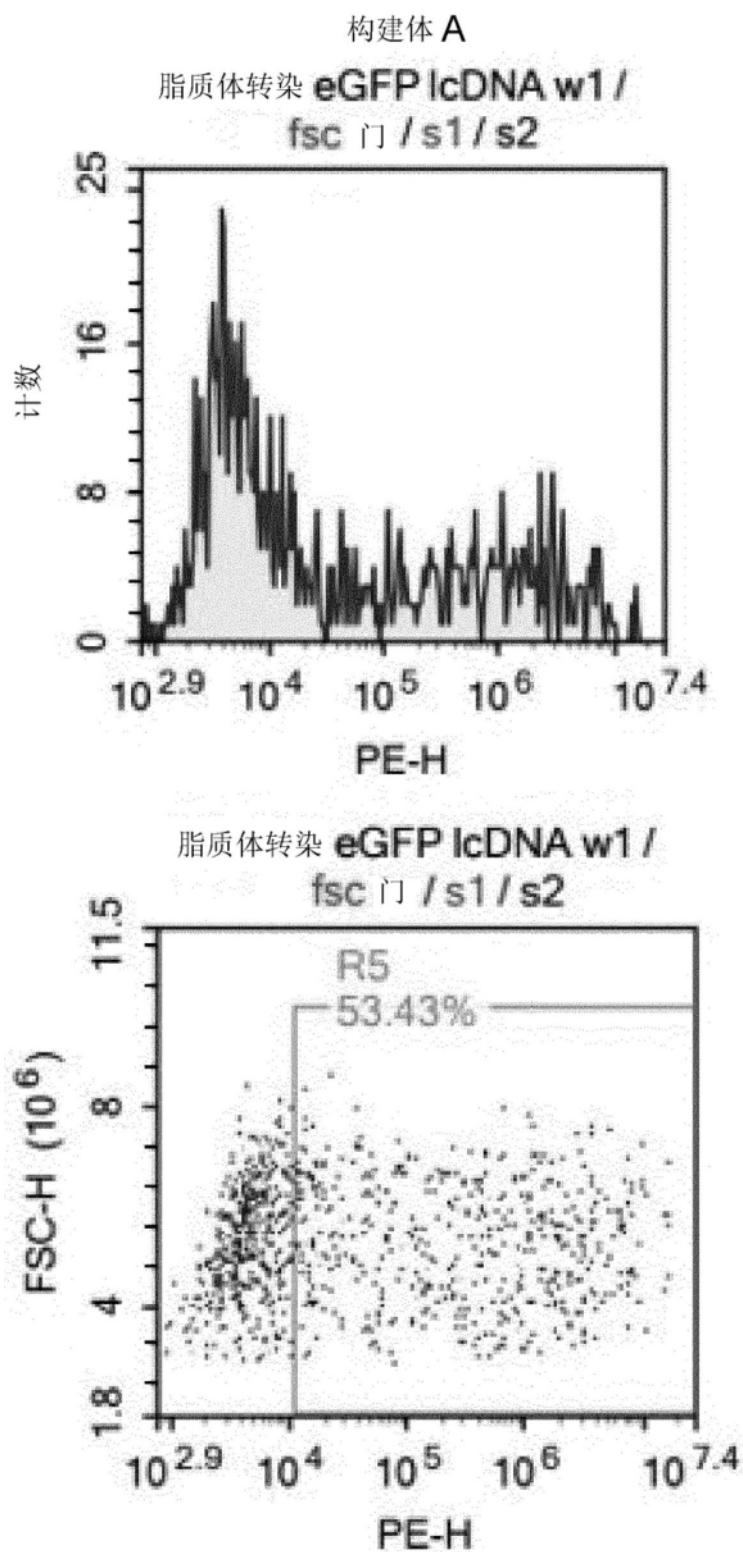


图10b

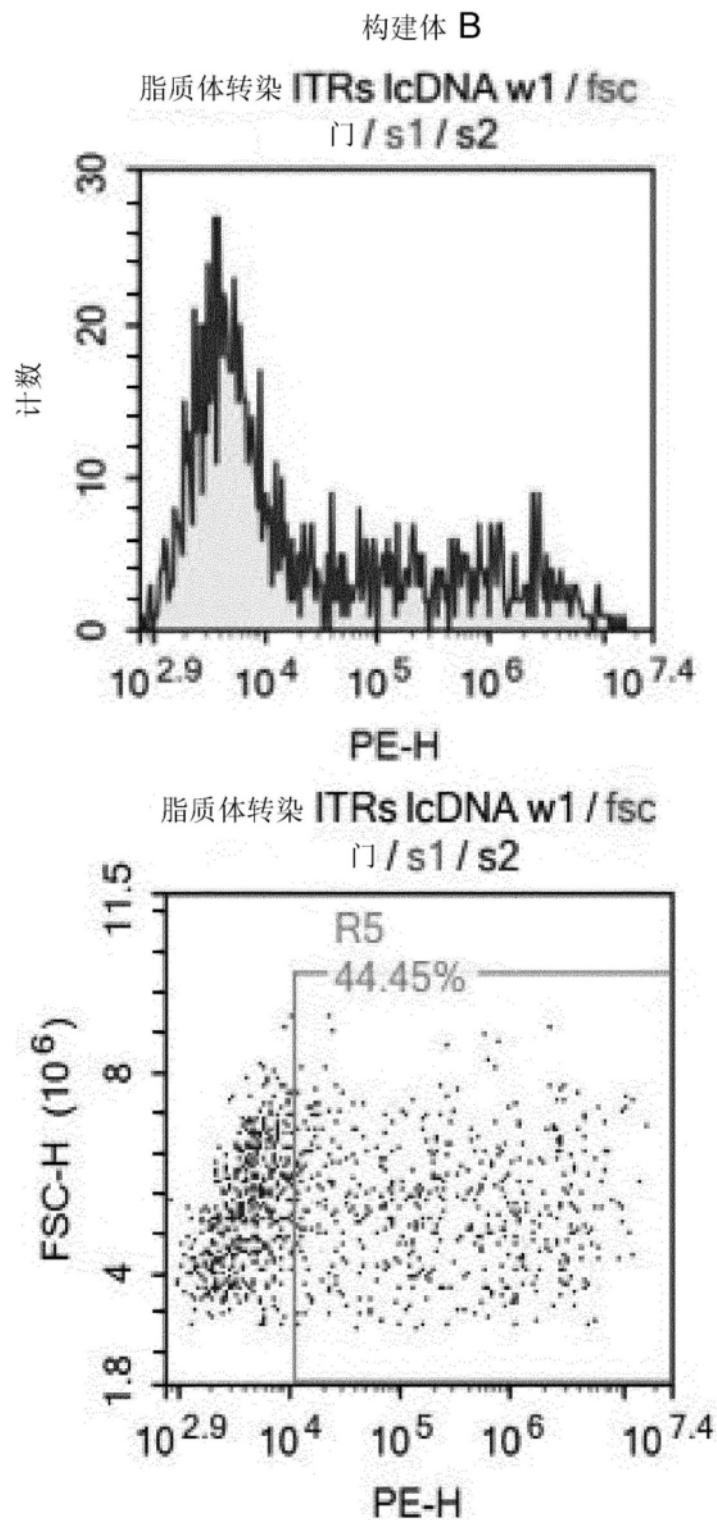


图10c

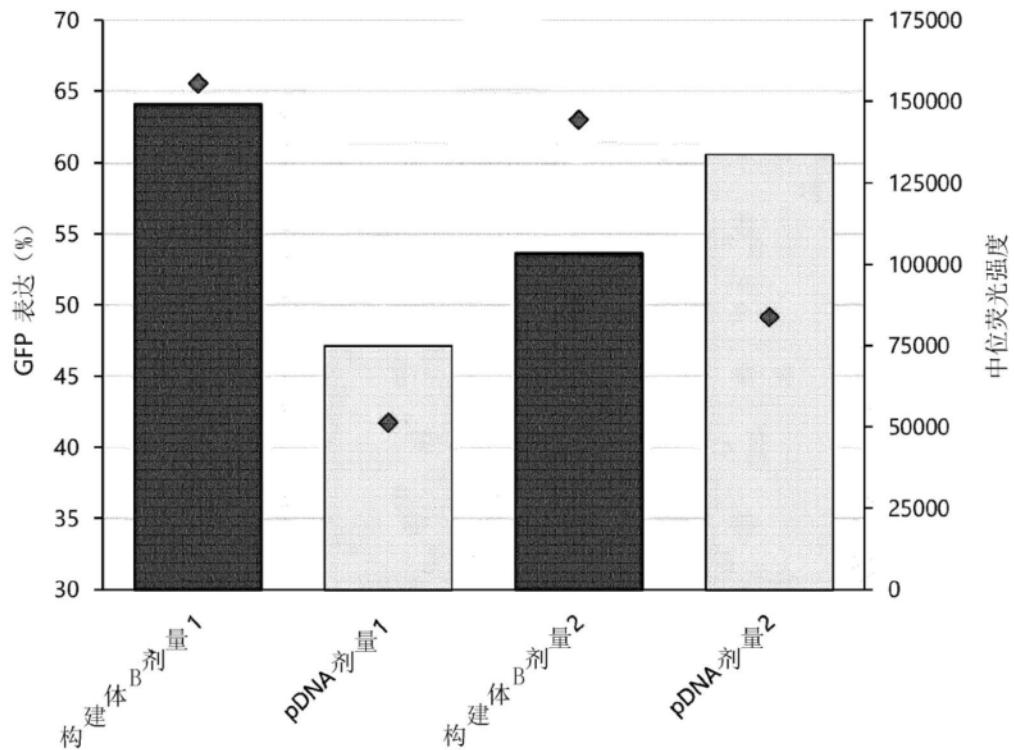
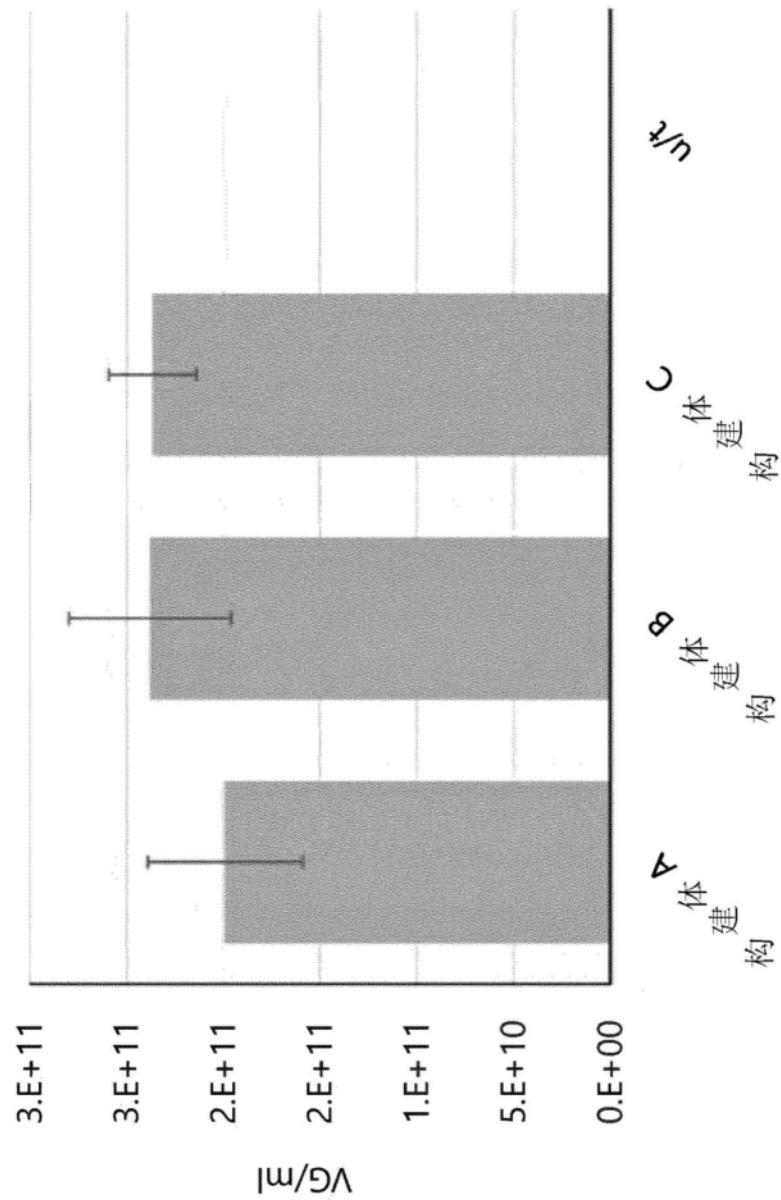


图11



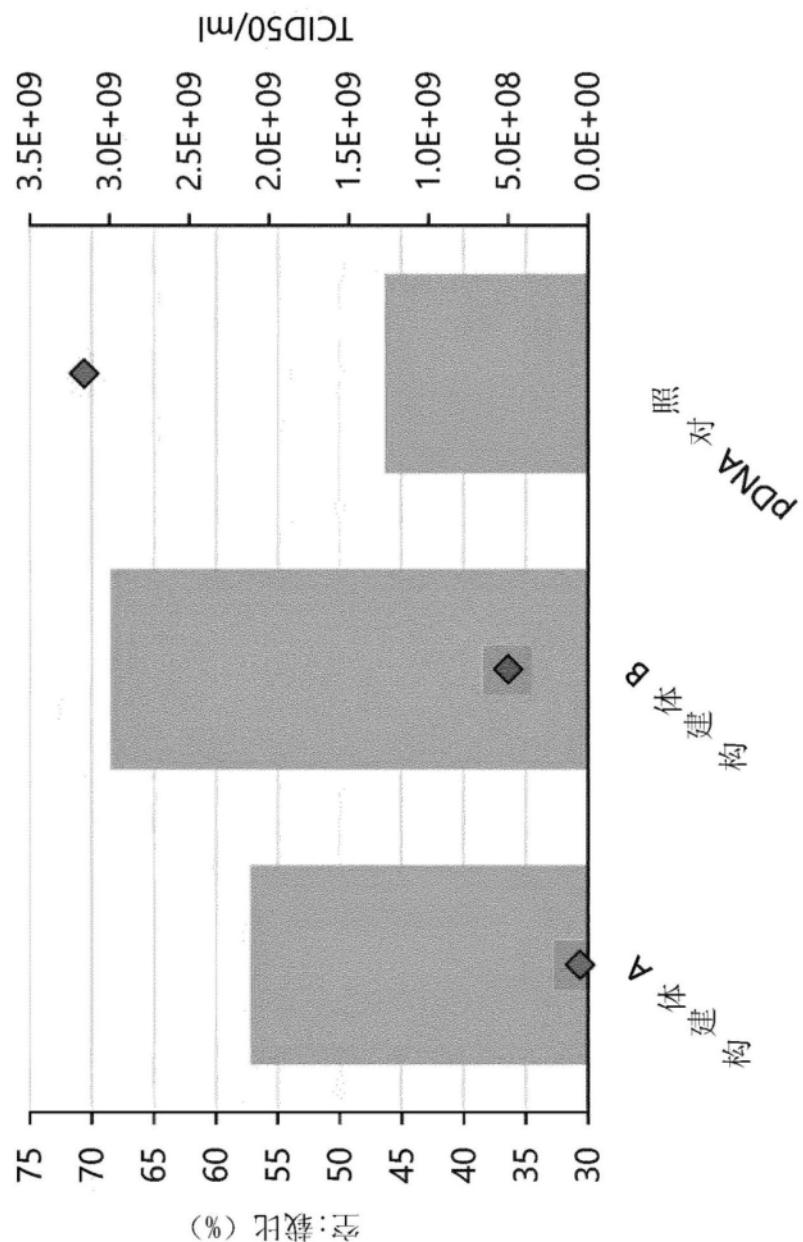


图13

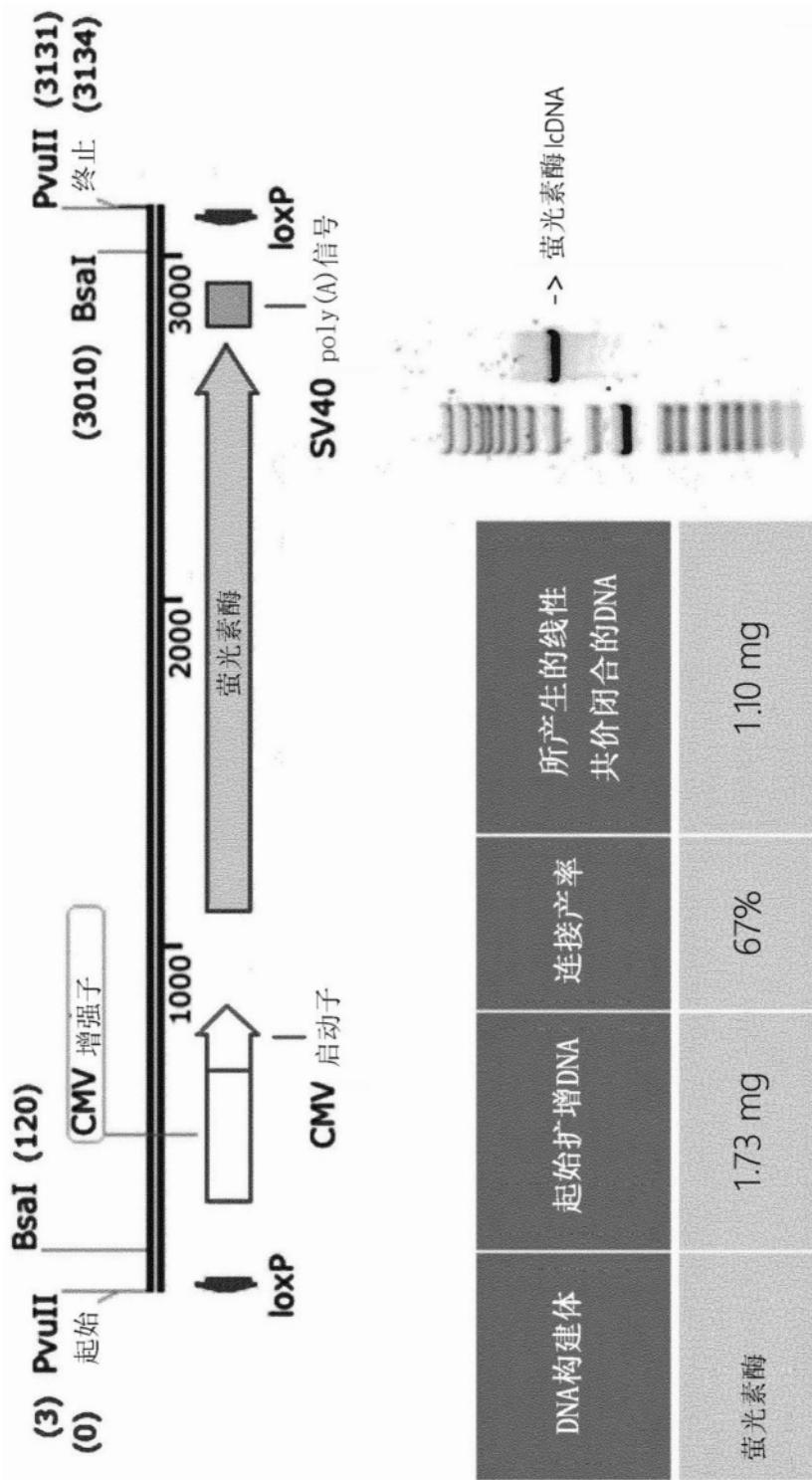


图14

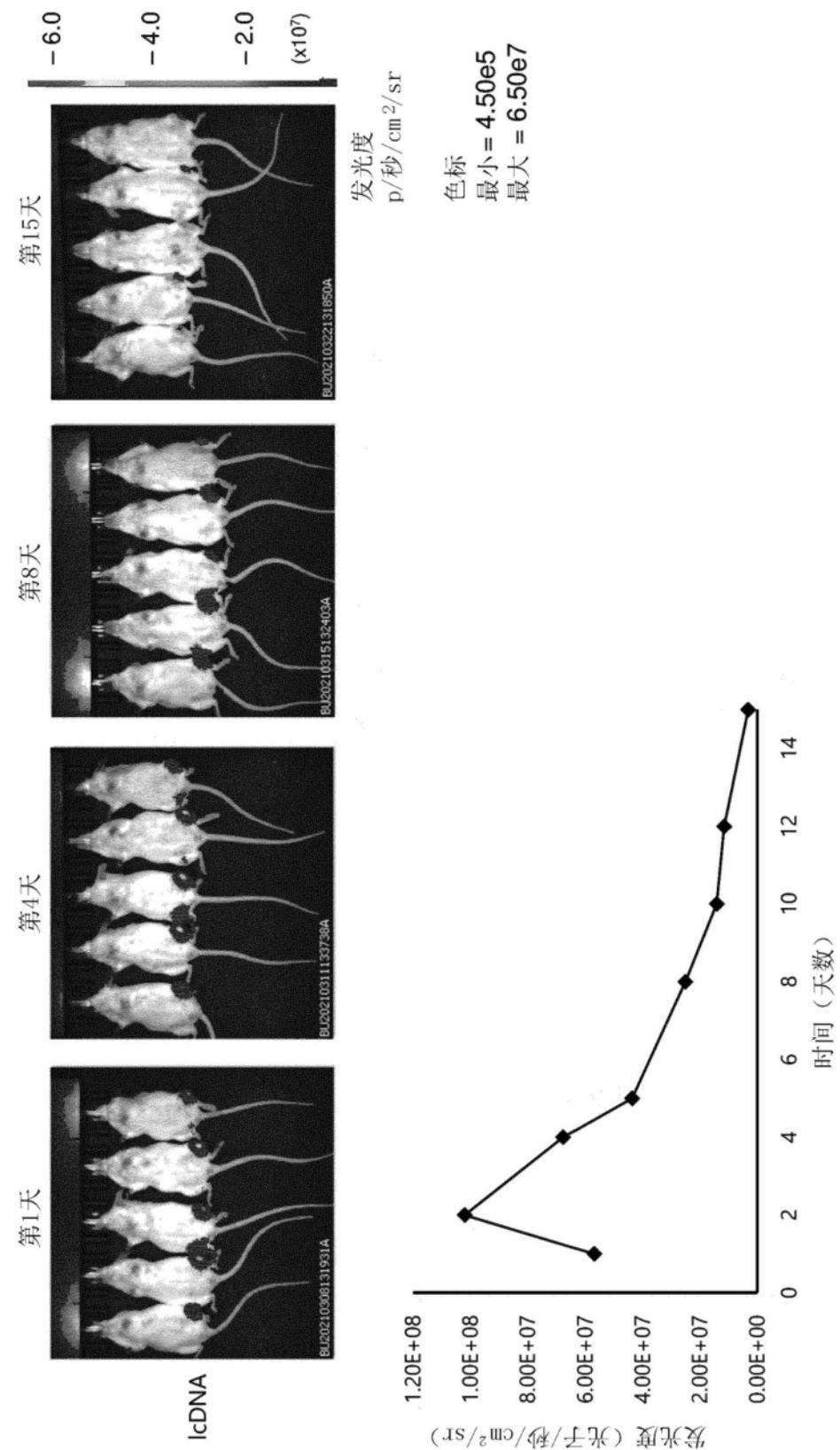
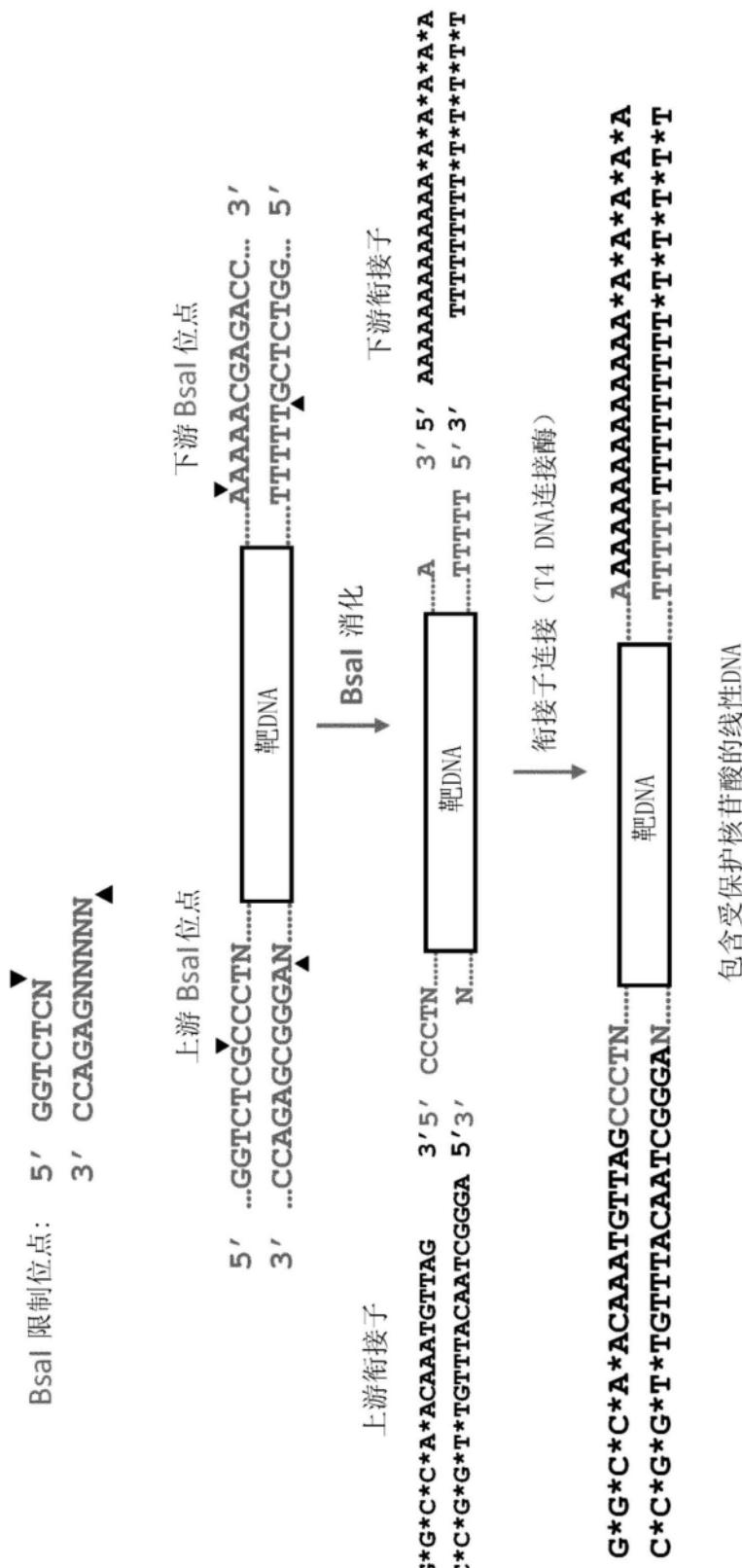


图15



包含受保护核苷酸的线性DNA

* 表示硫代磷酸酯核苷酸间键联

图16

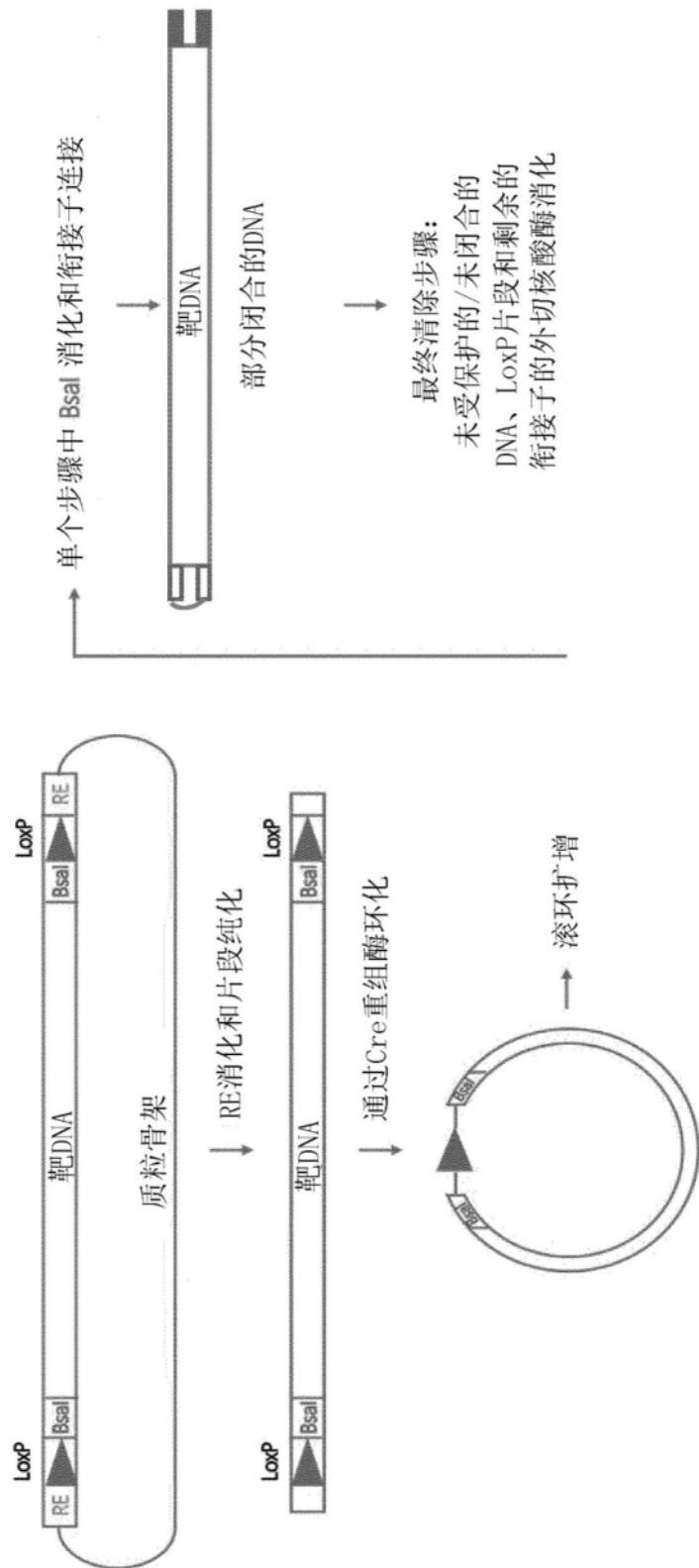


图17

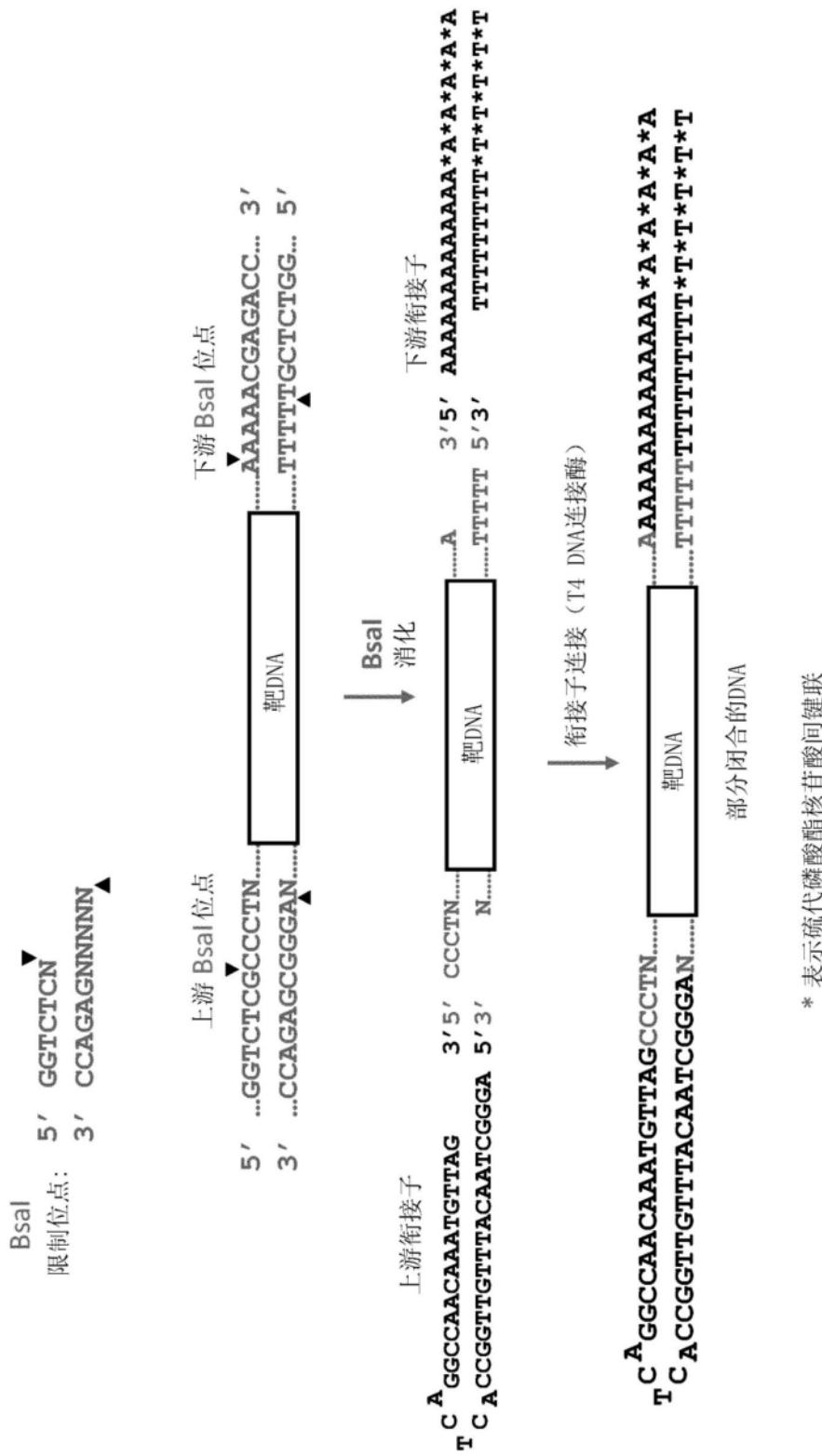


图18

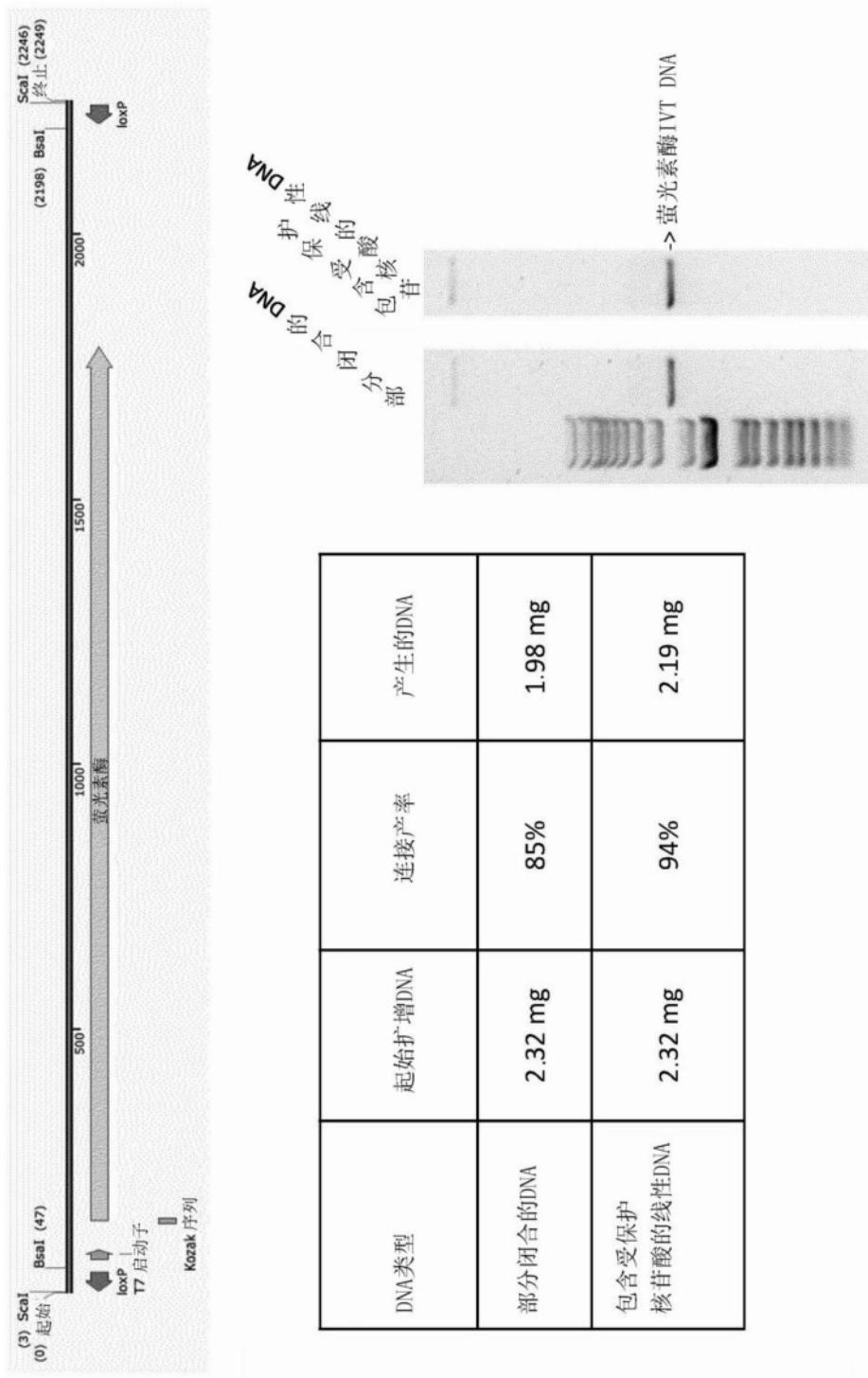


图19

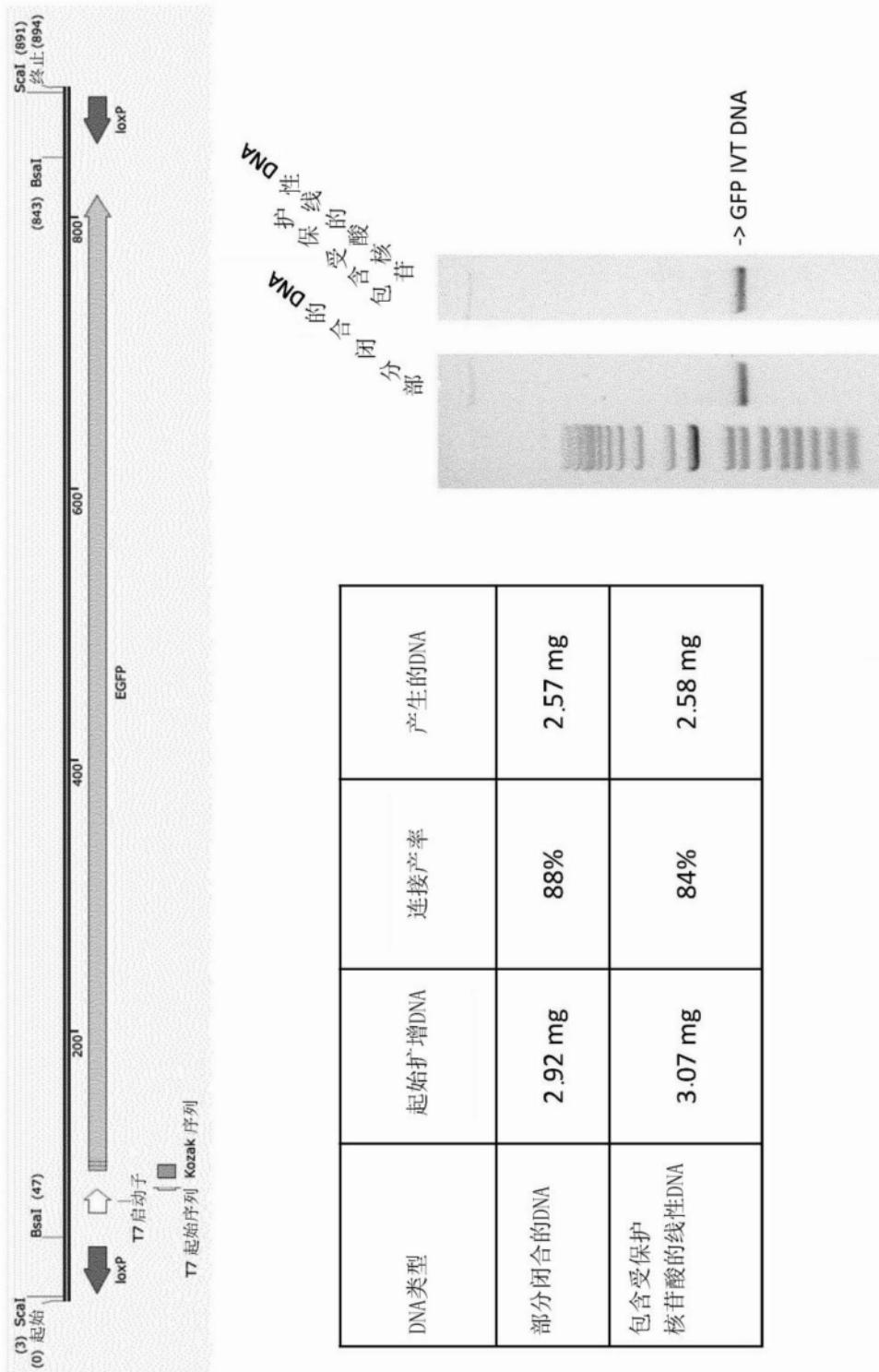


图20

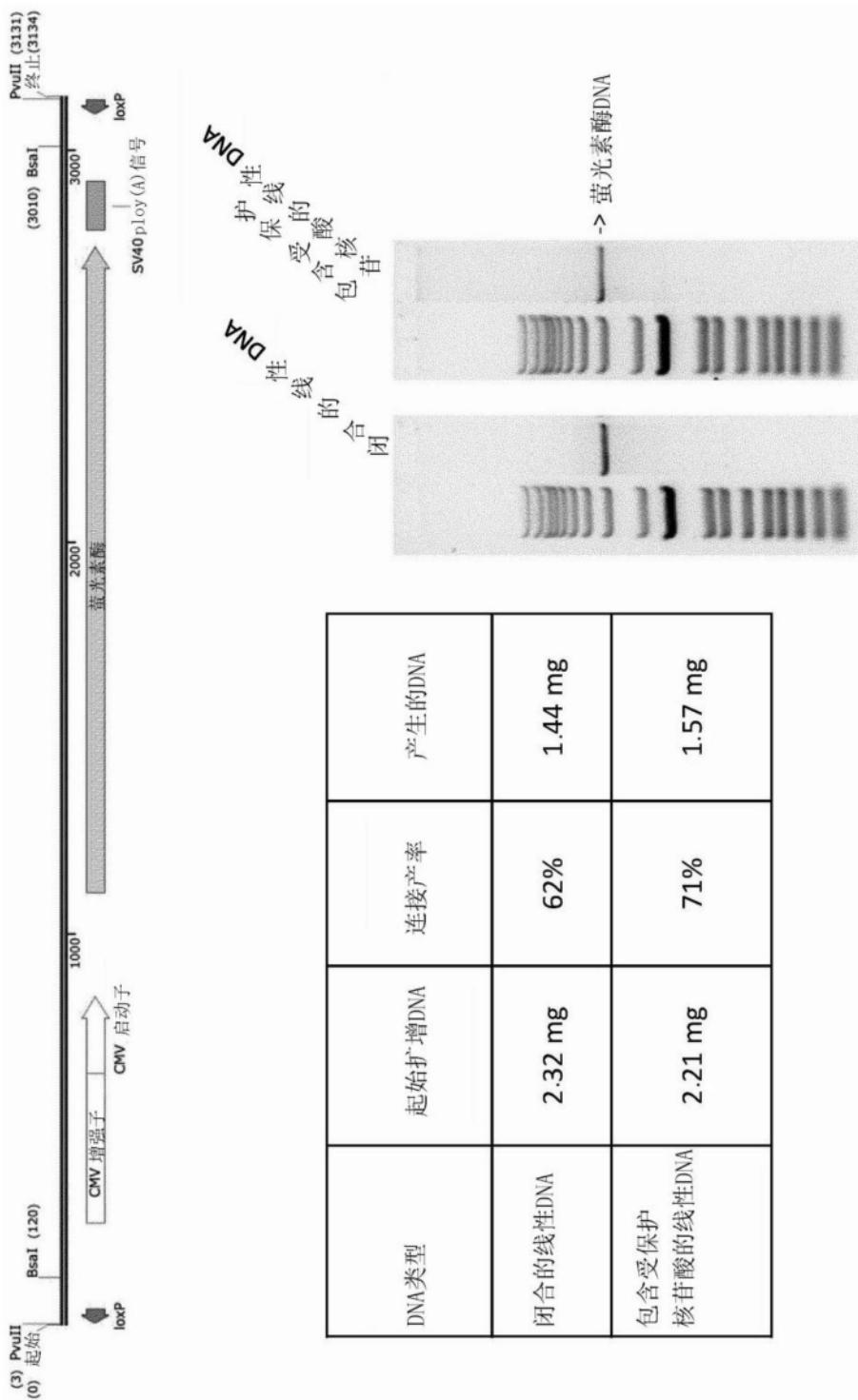
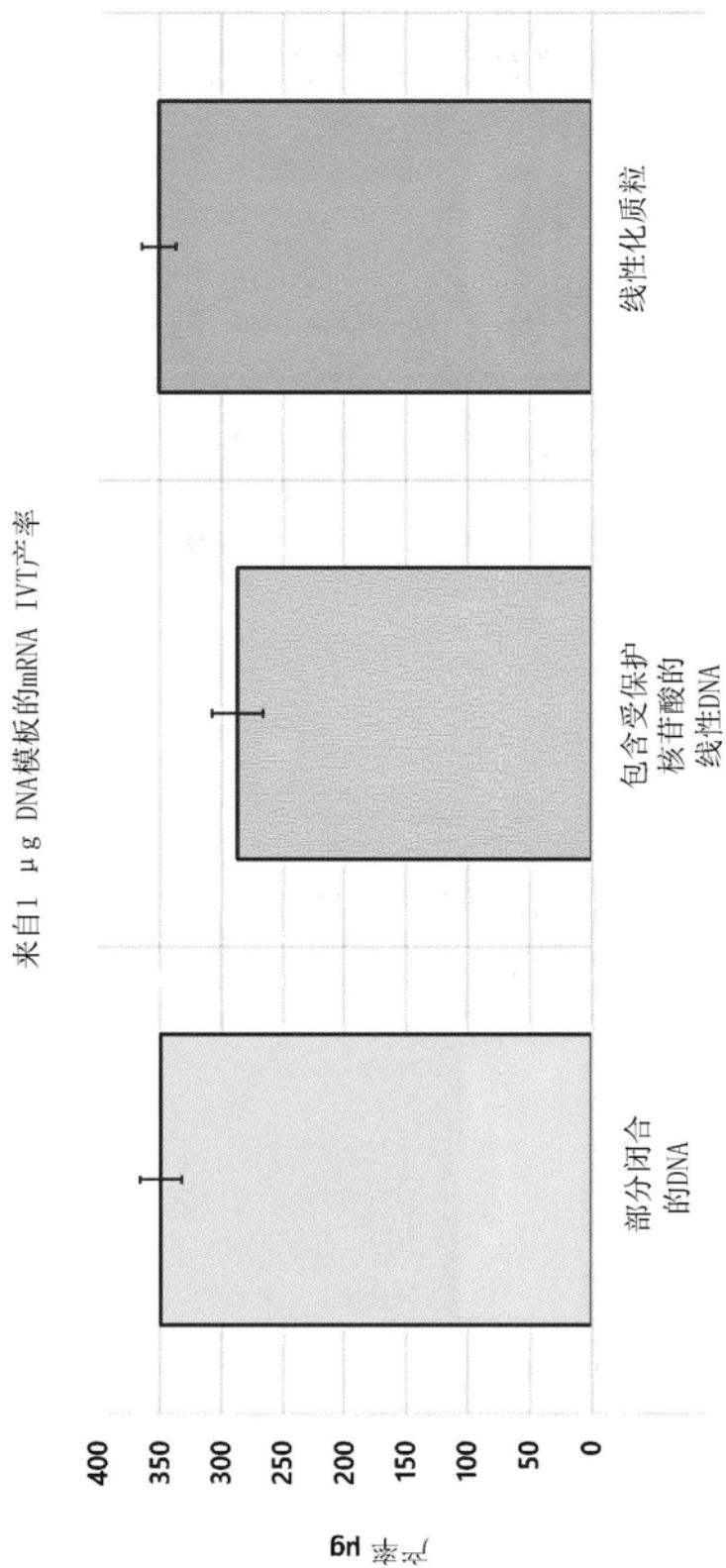


图21



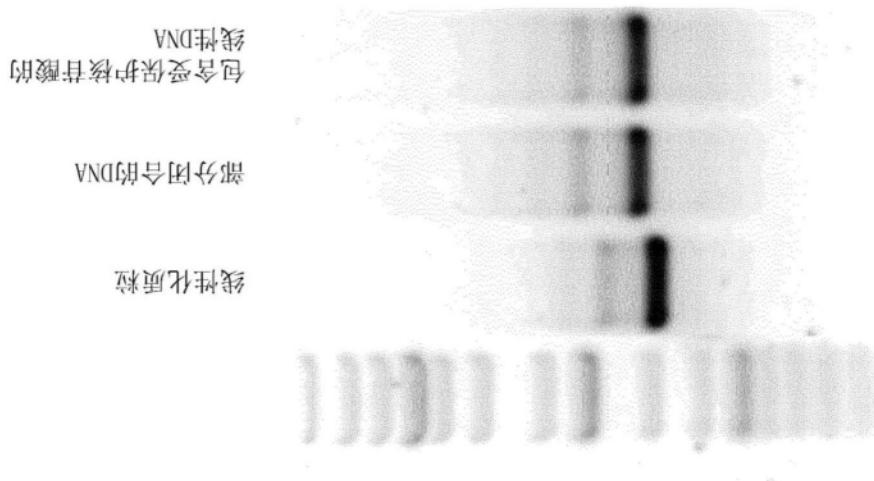


图23

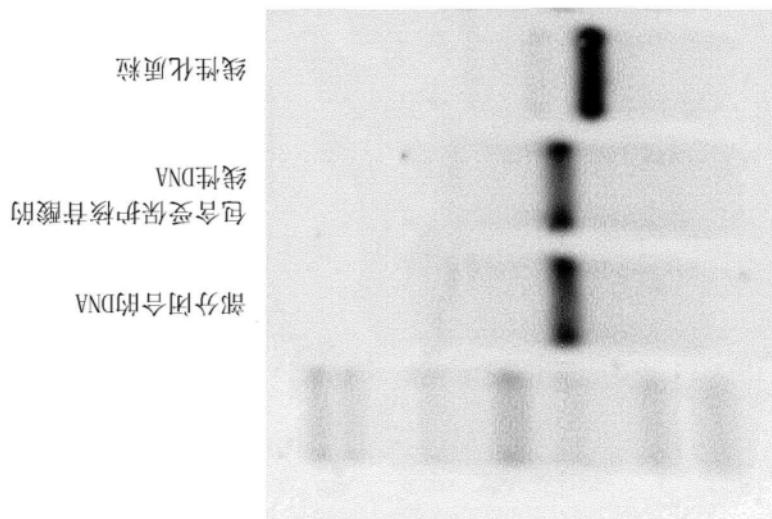


图24

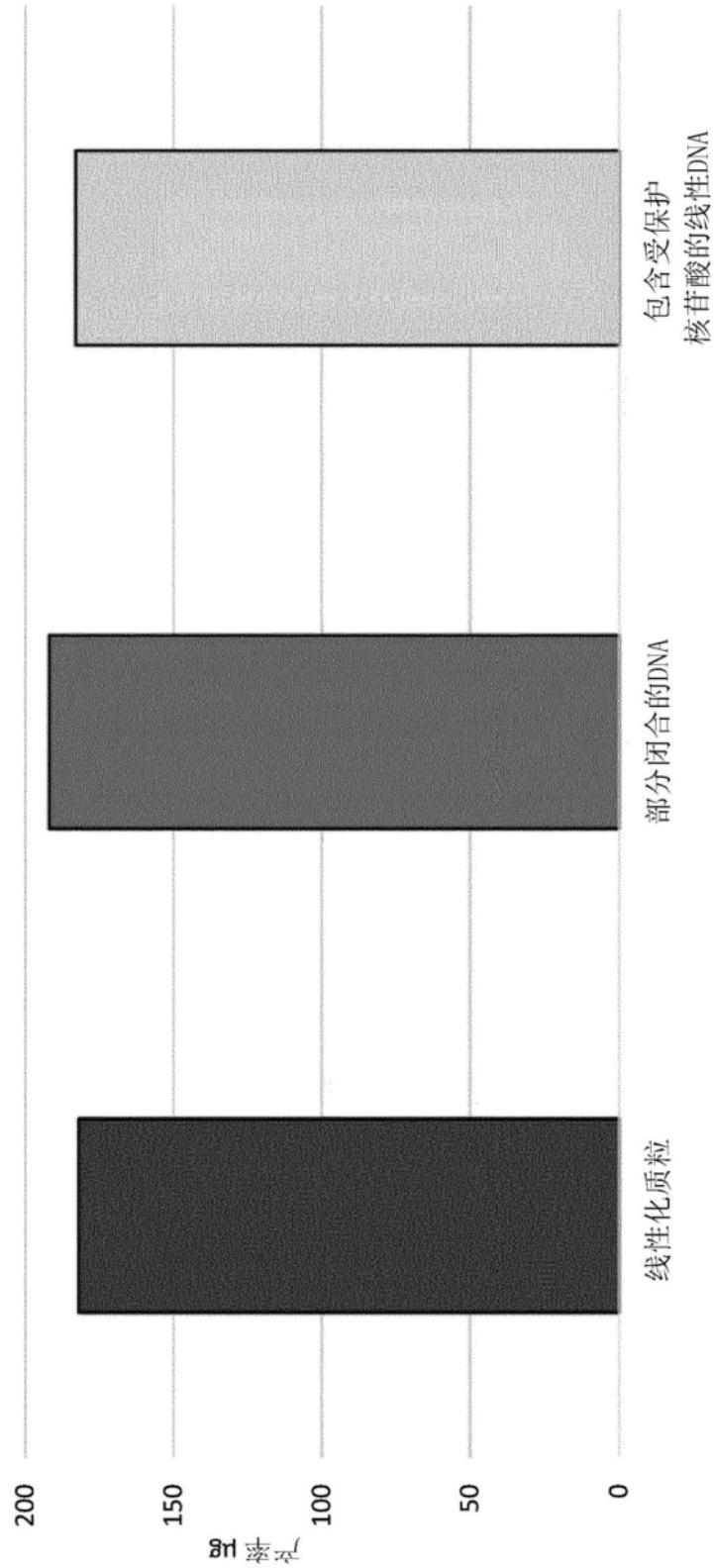
来自1 μ g DNA模板的mRNA IVT^{rx}率

图25

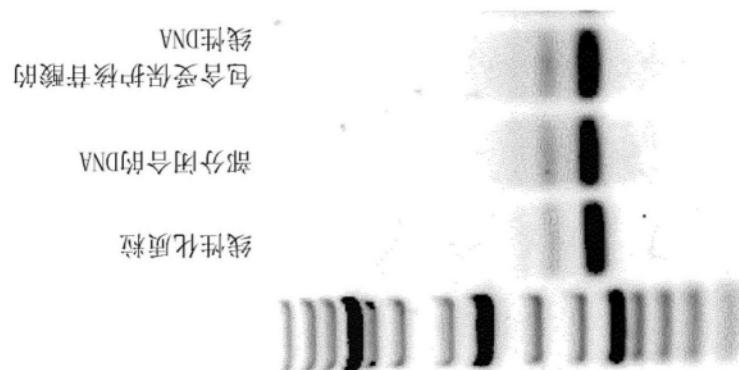


图26

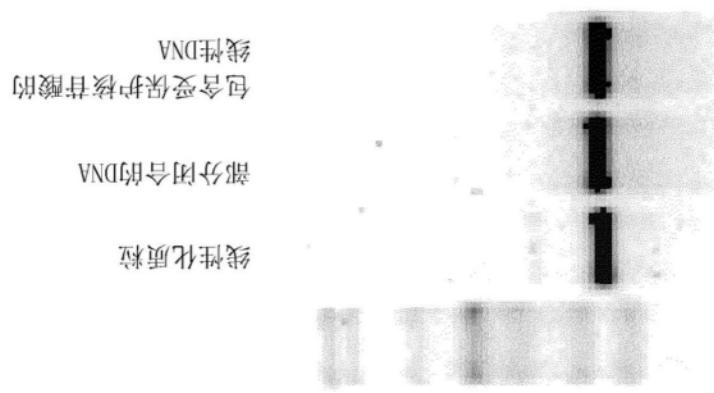


图27

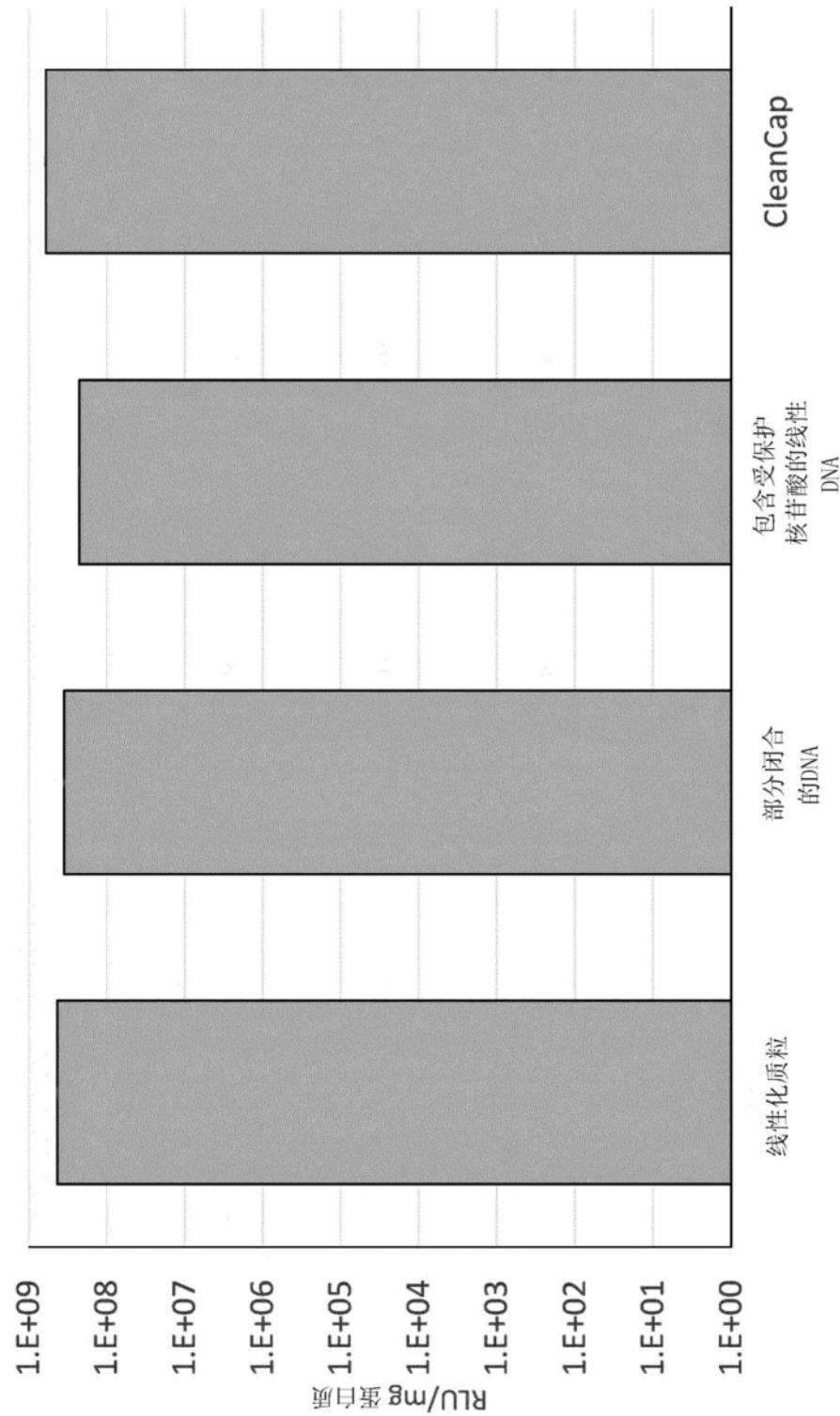


图28

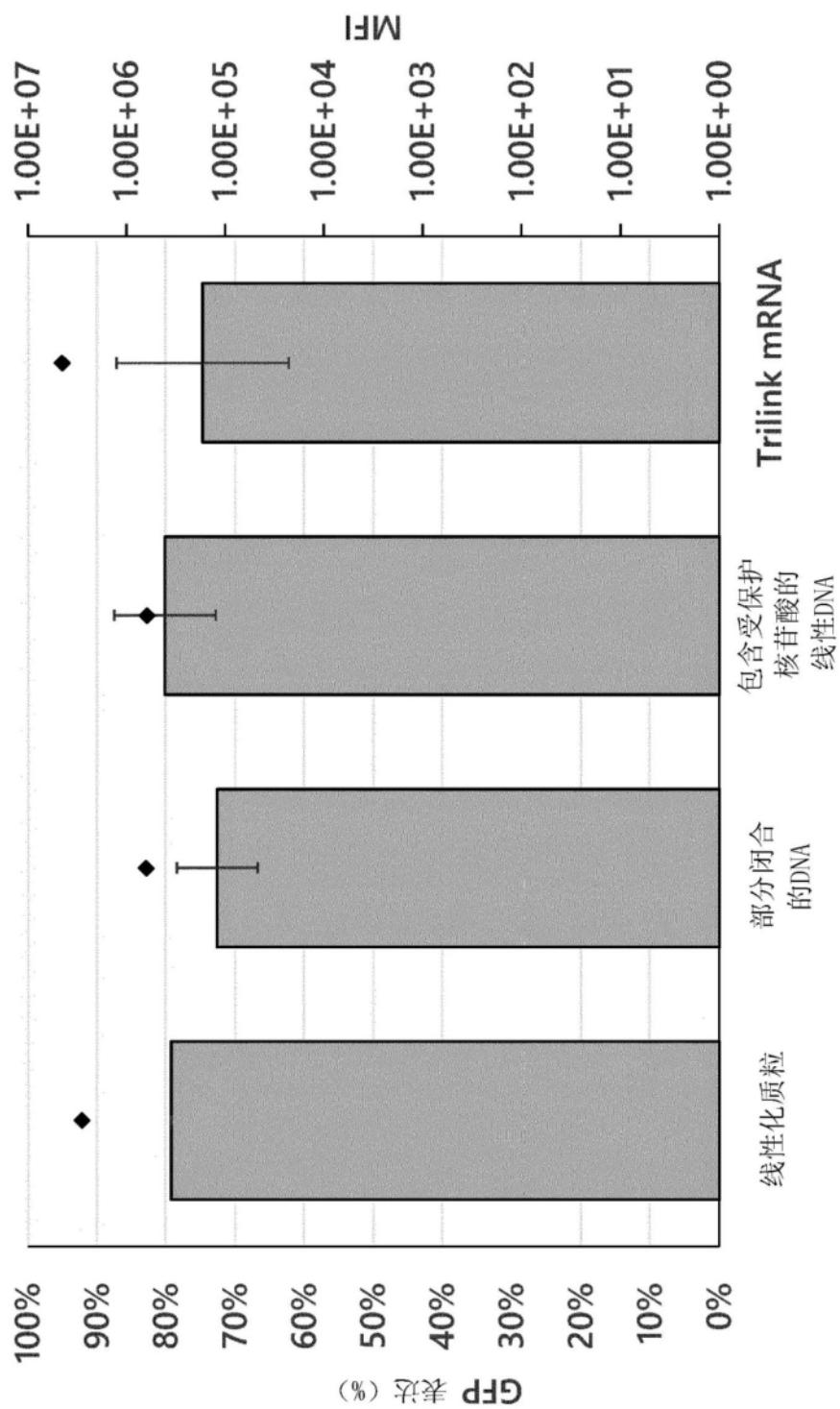


图29

