



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110699407 A

(43)申请公布日 2020.01.17

(21)申请号 201910989379.6

(22)申请日 2019.10.17

(71)申请人 复旦大学附属肿瘤医院
地址 200032 上海市徐汇区东安路270号

(72)发明人 顾宏周 张俏 夏凯

(74)专利代理机构 上海容慧专利代理事务所
(普通合伙) 31287

代理人 于晓菁

(51)Int.Cl.

C12P 19/34(2006.01)

C12N 9/22(2006.01)

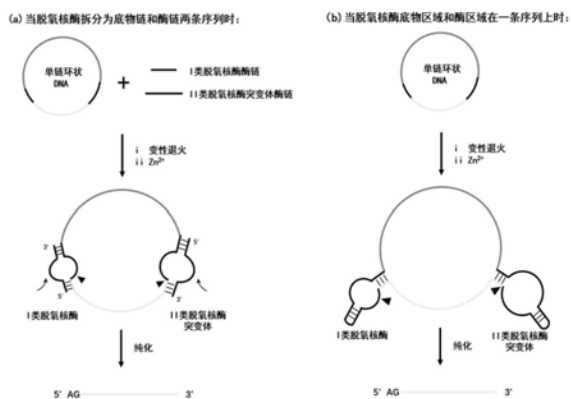
权利要求书1页 说明书7页
序列表4页 附图4页

(54)发明名称

一种长单链DNA的制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种借助I类和II类水解性脱氧核酶高效制备长单链DNA的方法。该方法主要包括设计并构建重组噬菌粒,获得噬菌粒环状单链DNA步骤,同时采用I类脱氧核酶和II类脱氧核酶突变体切割环状单链DNA,纯化回收酶切得到的所述长单链DNA。利用这两类能快速水解DNA的脱氧核酶,可代替限制性内切酶,低成本的实现对辅助噬菌体法制备出的DNA序列的特异性切割,大量、经济、高纯度制备任意长度和序列的单链DNA。



1. 一种长单链DNA的制备方法,其特征在于,包括同时采用I类脱氧核酶和II类脱氧核酶突变体切割环状单链DNA的步骤。

2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述I类脱氧核酶为I-R3,其底物域序列如SEQ ID NO:1所示,酶域序列如SEQ ID NO:2所示的序列。

3. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述II类脱氧核酶突变体为II-R1a, II-R1b, II-R1c, II-R1d中的一种。

4. 根据权利要求3所述的制备方法,其特征在于,

所述II类脱氧核酶突变体为II-R1a的底物域序列如SEQ ID NO:3所示,酶域序列如SEQ ID NO:4所示的序列;或

所述II类脱氧核酶突变体为II-R1b的底物域序列如SEQ ID NO:5所示,酶域序列如SEQ ID NO:6所示的序列;或

所述II类脱氧核酶突变体为II-R1c的底物域序列如SEQ ID NO:7所示,酶域序列如SEQ ID NO:8所示的序列;或

所述II类脱氧核酶突变体为II-R1d的底物域序列如SEQ ID NO:9所示,酶域序列如SEQ ID NO:10所示的序列。

5. 根据权利要求3或4所述的制备方法,其特征在于,在所述切割环状单链DNA的步骤之前,还包括设计并构建重组噬菌粒,以及获得噬菌粒环状单链DNA步骤。

6. 根据权利要求5所述的制备方法,其特征在于,所述设计并构建重组噬菌粒,包括在目标单链DNA序列的5'端和3'端分别添加I类脱氧核酶和II类脱氧核酶突变体的底物域序列,或分别添加I类脱氧核酶和II类脱氧核酶突变体序列。

7. 根据权利要求5所述的制备方法,其特征在于,所述获得噬菌体环状单链DNA,包括将构建好的重组噬菌粒转化大肠杆菌细胞内进行复制,之后通过辅助噬菌体的侵染,离心去除大肠杆菌,收集上清并沉淀噬菌体颗粒,再利用碱裂解法剥去噬菌体蛋白外壳,即可得到所述环状单链DNA。

8. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,在切割环状单链DNA的步骤之后,还包括纯化回收酶切得到的所述长单链DNA。

9. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述切割环状单链DNA的温度为37℃-50℃,时间为0.5h-24h。

10. 权利要求1-9任一项所述的制备方法或权利要求1-9任一项的制备方法制得的长单链DNA,在DNA纳米、基因编辑、基因治疗、DNA探针等方面的应用。

一种长单链DNA的制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物化学与分子生物学领域,具体涉及一种利用两类能快速水解DNA的脱氧核酶,结合辅助噬菌体制备长单链DNA的方法。

背景技术

[0002] 目前,DNA纳米技术,基因编辑如knock in(基因敲入)等生物医学研究领域对单链DNA(Single strand DNA,ssDNA),尤其对长单链DNA(>100个碱基)具有广泛需求。然而,受化学合成方法的限制,长单链DNA的合成难以保证产率、产量和满意的性价比,因此对于长单链DNA需要借助于生物酶的体内或体外作用以及一些辅助变性的手段,目前常用的长单链DNA的制备方法主要有反转录法,酶降解法,变性高效液相色谱(HPLC)法,磁珠生物素(Biotin)修饰法,非对称PCR法,RCA法等。但在实际应用中,这些方法都存在产率低下、成本高昂等问题。

[0003] 辅助噬菌体法是一种较新的制备单链DNA的方法。其基本原理是构建一个含有M13复制起始点(M13ori)或者f1复制起始点(f1ori)的质粒,转入到含有F'因子的宿主细胞中,再用一个有缺陷的辅助噬菌体去感染。辅助噬菌体可以帮助该质粒形成单链DNA并包裹成噬菌体,分泌出宿主细胞(如图1所示)。该方法成本低、产量高,是一种非常合适长单链DNA序列制备的方法。但其形成的单链DNA为环状,且含有一段必需的M13ori/f1ori保守序列。若采用传统的限制性内切酶酶切的方法获得想要的单链DNA部分,则会极大提高制备成本。同时该方法受限于内切酶对DNA识别序列的依赖性。

[0004] 而脱氧核酶(Deoxyribozyme)是一种具有催化功能的单链DNA片段,具有高效的催化活性和结构识别能力,可以催化包括DNA的磷酸化、腺苷化、去糖基化等多种化学反应。近年来,也有研究者筛选出了以Zn²⁺作为辅助因子、能够在特定位点水解DNA磷酸二酯键的脱氧核酶,并利用脱氧核酶水解单链DNA。但是现有技术中利用I类脱氧核酶进行切割反应,所得单链DNA 5'端残留AG两个碱基,3'端残留GTTGA五个碱基,并不能实现单链DNA序列完全自定义,不能完全满足探针制备等实际应用中的需求。

发明内容

[0005] 为了解决上述技术问题,本发明利用两类能快速水解DNA的脱氧核酶代替限制性内切酶,可以低成本的实现对辅助噬菌体法制备出的DNA序列的特异性切割,获得任意长度和序列的单链DNA。

[0006] 一方面,本发明提供了一种长单链DNA的制备方法,包括同时采用I类脱氧核酶和II类脱氧核酶突变体切割环状单链DNA的步骤。

[0007] 可选择地,所述I类脱氧核酶为I-R3,其底物域序列如SEQ ID NO:1所示,酶域序列如SEQ ID NO:2所示的序列。

[0008] 可选择地,所述II类脱氧核酶突变体为II-R1a,II-R1b,II-R1c,II-R1d中的一种。所述II类脱氧核酶突变体为II-R1a的底物域序列如SEQ ID NO:3所示,酶域序列如SEQ ID

NO:4所示的序列;所述II类脱氧核酶突变体为II-R1b的底物域序列如SEQ ID NO:5所示,酶域序列如SEQ ID NO:6所示的序列;所述II类脱氧核酶突变体为II-R1c的底物域序列如SEQ ID NO:7所示,酶域序列如SEQ ID NO:8所示的序列;所述II类脱氧核酶突变体为II-R1d的底物域序列如SEQ ID NO:9所示,酶域序列如SEQ ID NO:10所示的序列。所述II类脱氧核酶突变体的茎干区域序为任意核苷酸序列。

[0009] 可选地,在所述切割环状单链DNA的步骤中,在收集的环状单链DNA中,加入脱氧核酶切割反应缓冲液1(50mM HEPES,100mM LiCl,pH 7.0)。

[0010] 若脱氧核酶以两条链的形式,即拆分成底物链和酶链发生切割,通过PCR分别在目的序列两端加入I类脱氧核酶和II类脱氧核酶突变体的底物域序列,脱氧核酶水解切割时则另加入相应的脱氧核酶酶序列。其中,根据所要制备的单链序列3'端最后一个碱基,选择相对应的II类脱氧核酶突变体。如3'端最后一个碱基为G,选择II-R1a;如3'端最后一个碱基为A,选择II-R1b;如3'端最后一个碱基为T,选择II-R1c;如3'端最后一个碱基为C,选择II-R1d。

[0011] 若脱氧核酶底物域和酶域在一条序列上,以一条序列的形式发生切割时,通过PCR分别在目的序列两端加入I类脱氧核酶和II类脱氧核酶突变体序列。

[0012] 变性退火后加入脱氧核酶切割反应缓冲液2(50mM HEPES,100mM LiCl,20mM MgCl₂,4mM ZnCl₂,pH 7.0),在37℃至50℃范围内进行切割,具体反应温度视脱氧核酶茎干区域长度而定,切割时间根据实际需求半小时至24小时不等。

[0013] 可选择地,在切割环状单链DNA的步骤之前,还包括设计并构建重组噬菌粒,以及获得噬菌粒环状单链DNA步骤。

[0014] 可选择地,所述设计并构建重组噬菌粒,可根据不同的应用需求,设计目标单链DNA的长度和序列。可以使用不同质粒或不同生物基因组为模板进行PCR扩增以获得DNA片段,或直接化学合成DNA片段;DNA片段长度可设计为从几十个碱基对至几万个碱基对不等。

[0015] 可选择地,所述设计并构建重组噬菌粒包括,在目标单链DNA序列的5'端和3'端分别添加I类脱氧核酶和II类脱氧核酶突变体序列,或者分别添加I类脱氧核酶和II类脱氧核酶突变体底物域序列。在此基础上,在DNA片段两边添加酶切位点或载体同源序列。所扩增的DNA片段可以通过酶切、连接反应或同源重组法连接到含有M13ori或f1ori的噬菌粒载体上,构建重组噬菌粒。

[0016] 可选择地,所述获得噬菌体环状单链DNA包括,将上述构建好的重组噬菌粒转化进入含有F因子的大肠杆菌细胞(如JM109,XL-1blue)中,在大肠杆菌体内进行大量复制。之后通过辅助噬菌体(如M13K07,VCSM13)的侵染,重组噬菌粒将以单链的形式包裹于噬菌体中,并一同被分泌到细胞培养液中。通过离心除去大肠杆菌,收集上清并沉淀噬菌体颗粒,再利用碱裂解法剥去噬菌体蛋白外壳,即可得到对应的环状单链DNA。

[0017] 可选择地,在切割环状单链DNA的步骤之后,还包括纯化回收酶切得到的所述长单链DNA,具体为在切割反应完成之后,根据目标单链DNA序列长度,选择合适浓度的琼脂糖凝胶或聚丙烯酰胺凝胶进行纯化,去除多余的载体序列和脱氧核酶序列。通过胶回收试剂盒或凝胶洗脱缓冲液可回收得到目标单链DNA。

[0018] 第二方面,本发明还提供了所述的长单链DNA的制备方法在DNA纳米、基因编辑、基因治疗等方面的应用。

[0019] 第三方面,本发明还提供了所述的长单链DNA的制备方法制得的长单链DNA,在DNA纳米、基因编辑、基因治疗、DNA探针等方面的应用。可选地,在knock in实验中的应用。

[0020] 本发明相对于现有技术的有益效果:

[0021] 1) 现有技术中利用I类脱氧核酶进行切割反应,所得单链DNA5'端残留AG两个碱基,3'端残留GTTGA五个碱基,而本发明利用I类脱氧核酶和II类脱氧核酶突变体同时进行切割反应,所制备出的单链DNA仅5'端残留AG两个碱基,3'端无残留碱基,且切割效率均可达70%以上。在实际应用中,5'端残留的AG碱基可设计包含在所需制备的单链DNA序列中,从而实现单链DNA序列完全自定义。本发明相比于现有技术,更能满足对目的单链两端碱基序列有要求的应用(如DNA探针等)的需求。

[0022] 2) 本发明的方法同时利用两类能快速水解DNA的脱氧核酶,可代替限制性内切酶,低成本的实现对辅助噬菌体法制备出的DNA序列的特异性切割。

[0023] 3) 本发明的方法可以根据不同的实验需求,将环状DNA切割为长度定制化的DNA单链,且切割效果高效,切割片段纯度高。

[0024] 4) 本发明提供了能够高效制备长单链DNA的II类水解性脱氧核酶突变体,能够快速提高切割速率。

附图说明

[0025] 图1是现有技术中辅助噬菌体法制备单链DNA示意图;

[0026] 图2是本发明中脱氧核酶切割单链DNA示意图;

[0027] 图3是本发明和现有技术制备单链DNA优势对比图;

[0028] 图4是本发明制备出的不同序列与大小的单链DNA电泳图,单链DNA长度分别为1500nt和517nt;

[0029] 图5是本发明制备出的不同序列与大小的单链DNA电泳图,单链DNA长度分别为160nt和60nt;同时,图5(a)及图5(b)分别显示了实施例2中单链DNA纯度对比结果;

[0030] 图6是knock in原理示意图;

[0031] 图7是实例3中细胞毒性实验结果图;

[0032] 图8是实例3中细胞转染后的激光共聚焦显微镜成像结果图。

具体实施方式

[0033] 下面将对本发明技术方案的实施例进行详细的描述。以下实施例仅用于更加清楚地说明本发明的技术方案,因此只是作为示例,而不能以此来限制本发明的保护范围。需要注意的是,除非另有说明,本申请使用的技术术语或者科学术语应当为本发明所属领域技术人员所理解的通常意义。

[0034] 实施例1脱氧核酶结合辅助噬菌体制备单链DNA

[0035] 以mEGFP为模板,设计PCR引物扩增目的片段。

[0036] 如图2中(a)所示,当将脱氧核酶拆分成底物链和酶链,以两条序列的形式发生切割时,在正向引物中加入I类脱氧核酶底物序列,在反向引物中加入II类脱氧核酶突变体底物序列,并在此基础上在正向和反向引物5'端分别加入BamH I和Hind III酶切位点。其中,根据所要制备的单链序列3'端最后一个碱基,选择相对应的II类脱氧核酶突变体。如3'端

最后一个碱基为G,选择II-R1a;如3'端最后一个碱基为A,选择II-R1b;如3'端最后一个碱基为T,选择II-R1c;如3'端最后一个碱基为C,选择II-R1d。

[0037] 如图2中(b)所示,当脱氧核酶底物域和酶域在一条序列上,以一条序列的形式发生切割时,通过PCR分别在目的序列两端加入I类脱氧核酶和II类脱氧核酶突变体序列,并在此基础上加入BamH I和Hind III酶切位点。PCR扩增目的片段后,通过琼脂糖凝胶电泳或聚丙烯酰胺凝胶电泳切胶回收的方式进行纯化。

[0038] 以所制备的60nt单链DNA序列为例,该序列为:

[0039] AGTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGT (SEQ ID NO:11),I类脱氧核酶选用I-R3,II类脱氧核酶突变体选用II-R1c,

[0040] 当将脱氧核酶拆分成底物链和酶链,以两条序列的形式发生切割时:通过PCR分别在目的序列两端加入I-R3和II-R1c底物域,并在此基础上加入BamH I和Hind III酶切位点,所得序列如下:

[0041] CGCGGATCCGACGTTGAAGTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCC CACCCTCGTAGTATCTTTTGCCTAAGCTTGGG (SEQ ID NO:12)。

[0042] 其中,加粗碱基为对应的脱氧核酶底物域,斜体碱基为目的序列,对应的脱氧核酶酶序列为:

[0043] classI-酶:

[0044] TGAACTTCAGGGTCATAGTTGAGCTGTCCGATCCACTAGT (SEQ ID NO:13)

[0045] classII-酶:

[0046] CACACGCAAGCTTAAGCTAGGGGAATAAATCTTTGGGTGACGAGGGTGGGCCAGG (SEQ ID NO:14),其中,加粗碱基为对应的脱氧核酶酶域。

[0047] 当脱氧核酶底物域和酶域在一条序列上,以一条序列的形式发生切割时:

[0048] 通过PCR分别在目的序列两端加入I-R3和II-R1c序列,并在此基础上加入BamH I和Hind III酶切位点,所得序列如下:

[0049] CGCGGATCCGACTGAACTTCAGGGTCATAGTTGAGCTGTCTGCATCAGAATGATGCAGACGTTGAAGT GACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTAGTATCTTTTGCCTGTACA ATCAGGAACTGATTGTACAAGCTAGGGGAATAAATCTTTGGGTGACGAGGGTGGGCCAGGGCGTAAGCTTGGG (SEQ ID NO:15),其中,加粗碱基为对应的脱氧核酶酶域和底物域,斜体碱基为目的序列。

[0050] 将纯化后的DNA片段以及含有M13ori或flori的噬菌粒载体分别进行双酶切,进行连接反应,将连接体系转化进入大肠杆菌中。在含有氨苄抗性的LB平板上初步筛选阳性克隆,并进一步通过DNA测序验证含有正确序列的重组噬菌粒。

[0051] 将经测序验证的重组噬菌粒转化进入大肠杆菌JM109细胞中。挑选单菌落至含有氨苄青霉素的2×YT培养基中,于37℃振荡培养。至OD600为0.4左右时,加入VCSM13辅助噬菌体,30min后加入卡那霉素,继续在37℃培养3.5h。在3000rcf下离心15min除去大肠杆菌。收集上清并加入3%聚乙二醇8000(PEG-8000)和0.5M NaCl沉淀噬菌体颗粒,冰浴30min后在5000rcf下离心30min收集噬菌体。将沉淀重悬于Tris-EDTA缓冲液(10mM Tris,1mM EDTA,pH 8.0)中,16000rcf再次离心10min以除去残留的细菌细胞碎片。使用碱裂解法剥去噬菌体蛋白外壳,即先加入两倍体积的PPB2(0.2M NaOH,1%SDS),混匀后室温下静置3min,再加入1.5倍体积的PPB3(3M KOAc,pH 5.5),混匀后在冰上孵育10min,16000rcf离心30min

后收集上清,加一倍体积的100%乙醇离心沉降,所得沉淀即重组噬菌粒所对应的环状单链DNA。

[0052] 在上一步获得的环状单链DNA中,加入对应的脱氧核酶酶序列和切割反应缓冲液1(50mM HEPES,100mM LiCl,pH 7.0)混匀,90℃加热5min,缓慢降至室温,然后加入等体积的切割反应缓冲液2(50mM HEPES,100mM LiCl,20mM MgCl₂,4mM ZnCl₂,pH7.0),在37℃下切割过夜。乙醇沉降后通过琼脂糖凝胶电泳或聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离纯化,去除多余的载体序列和脱氧核酶序列。通过胶回收试剂盒或聚丙烯酰胺凝胶洗脱缓冲液,最终回收得到目标单链DNA。本实施例和现有技术制备单链DNA优势对比如图3所示,其中(a)是现有技术利用I类脱氧核酶进行切割反应,所得单链DNA5'端残留AG两个碱基,3'端残留GTTGA五个碱基;其中(b)是本实施例利用I类脱氧核酶和II类脱氧核酶突变体同时进行切割反应,所制备出的单链DNA仅5'端残留AG两个碱基,3'端无残留碱基。

[0053] 同时,本实施例制备的长单链DNA电泳结果见图4及图5所示,图4中(a)电泳图泳道A为本实施例制备出的长度为1500nt的单链DNA,图4中(b)电泳图泳道A为本实施例制备出的长度为517nt的单链DNA,图5中(a)电泳图泳道C为本实施例制备出的长度为60nt的单链DNA,图5中(b)电泳图泳道B为本实施例制备出的长度为160nt的单链DNA。可见,本发明可制备出不同长度的单链DNA分子。

[0054] 实施例2

[0055] 以60nt和160nt序列为例,将采用本发明制备的单链DNA与化学合成的单链DNA进行纯度对比。

[0056] 采用实施例1所述的方法制备60nt单链DNA。从公司订购化学合成的相同序列,纯化方式为聚丙烯酰胺凝胶纯化。取一部分样品在实验室内再次进行聚丙烯酰胺凝胶纯化。通过进行12%聚丙烯酰胺凝胶(Acr/Bis 19:1)电泳,比较本方法制备的单链样品和化学合成纯化后单链样品的纯度。结果如图5(a)所示,泳道A为化学合成纯化一次所得60nt单链,泳道B为化学合成纯化两次所得60nt单链,泳道C为本方法制备出的60nt单链样品,可见,本发明制备的条带单一,而化学合成纯化一次甚至纯化两次后的单链样品,电泳条带下方仍残留碱基缺失的混杂条带,由此可证明本方法制备的单链样品比化学合成纯化后单链样品纯度更高。

[0057] 采用本发明所述方法制备160nt单链DNA。由于化学合成法难以合成100nt以上的单链DNA,从公司化学合成两条80nt DNA序列,通过T4连接酶连接反应并经过聚丙烯酰胺凝胶纯化后得到相同的160ntDNA序列。通过进行8%聚丙烯酰胺凝胶电泳,比较本方法制备的单链样品和连接纯化后单链样品的纯度。结果如图5(b)所示,泳道A为两条化学反应合成序列连接纯化后的单链,泳道B为本方法制备出的160nt单链,可以明显看出,本方法制备出的单链样品电泳条带单一,而连接纯化后的单链样品,电泳条带下方仍残留碱基缺失的混杂条带,由此可证明本方法制备的单链样品比连接纯化后单链样品纯度更高。

[0058] 实施例3

[0059] mEGFP靶向微管TUBA1B基因的knock in实验,其实验原理如图6所示。采用本发明实施例1制备的长度为1570nt的单链DNA作为单链DNA修复模板,在knock in实验中的应用。具体步骤如下,

[0060] 1、细胞培养。Hek293T细胞购自中国科学院上海典型培养物保藏委员会细胞库。培

养条件为含10%FBS(灭活)的DMEM培养基,其中含青霉素50units/mL,链霉素50 μ g/mL,谷氨酰胺4mM。置于37 $^{\circ}$ C,5%CO₂浓度的恒温培养箱中培养。

[0061] 2、靶向微管TUBA1B基因的CRISPR/Cas9质粒载体的构建。

[0062] (1) sgRNA双链片段的合成。靶向人TUBA1B基因的sgRNA序列为TGGAGATGCACTCACGCTGC(SEQ ID NO:16)(选用自文献:Theodore L.roth, et al.Reprogramming human T cell function and specificity with non-viral genome targeting.Nature,2018.),根据选择的sgRNA靶点序列,合成一对序列互补的DNA寡核苷酸链,其序列如下:

[0063] sg-R:5' -CACCGTGGAGATGCACTCACGCTGC-3' (SEQ NO.17)

[0064] sg-F:5' -AAACGCAGCGTGAGTGCATCTCCAC-3' (SEQ NO.18)

[0065] 将这对DNA寡核苷酸链退火成双链DNA,待用。

[0066] (2) 线性化Cas9蛋白和sgRNA共表达载体质粒pX330(Addgene plasmid#42230),使用BbsI酶进行单酶切获得线性化质粒。

[0067] (3) 连接退火双链DNA和线性化质粒。使用T4DNA连接酶将线性化的pX330质粒和退火双链DNA进行连接。将连接产物转化入大肠杆菌DH5 α 感受态细胞中,涂含氨苄青霉素抗性平板,过夜培养后,挑取单克隆,扩大培养,提取单克隆质粒,测序鉴定阳性克隆。

[0068] 3、同源修复模板的制备。同源修复模板质粒为TUBA1B-mEGFP(Addgene plasmid#87421),该模板质粒含有TUBA1B基因的上下游同源臂和mEGFP的表达序列。利用本发明所述方法制备的长度为1570nt的单链DNA作为单链DNA修复模板(ssDNA donor)。其中5'端同源臂为404bp,3'端同源臂为343bp,插入的mEGFP基因为743bp。其引物序列为:

[0069] 正向引物:5' -CCCGGTTTAGGATGGGAAGGTA-3' (SEQ NO.19)

[0070] 反向引物:5' -AGTGCGAACTTCATCTGGAGGA-3' (SEQ NO.20)

[0071] 同时通过PCR从TUBA1B-mEGFP模板质粒上扩增获得与单链DNA序列相同的双链DNA作为双链DNA修复模板(dsDNA donor)。

[0072] 4、细胞毒性实验。Hek293T细胞以 25×10^4 /孔的密度接种于24孔板中。设置ssDNA donor实验组和dsDNA donor实验组,分别将ssDNA和dsDNA转入细胞中。DNA用量设置梯度,分别为0.5、1、2、4和6 μ g,每组三个复孔。同时以不做任何处理的细胞作为空白对照。孵育48h后,在倒置显微镜下观察细胞状态。并使用MTT比色法测定细胞活力,按OD(实验组)/OD(对照组)的百分比计算细胞存活率。

[0073] 结果如图7所示,ssDNA donor实验组与空白对照组的细胞存活率基本一致,同时比dsDNA donor实验组细胞存活率高,且随DNA用量增加,ssDNA donor实验组细胞存活率基本不变,而dsDNA donor实验组细胞存活率逐渐下降,表明单链DNA对细胞的毒性更低。

[0074] 5、细胞转染及观察。Hek293T细胞以 25×10^4 /孔的密度接种于共聚焦显微镜观察的细胞培养皿中,使用Lipo3000脂质体转染试剂(Invitrogen Lipofectamine 3000)将靶向TUBA1B基因的pX330质粒(500ng)和同源修复模板(dsDNA donor或ssDNA donor,500ng)共转染入细胞中,孵育48h后,使用激光共聚焦显微镜(Lecia TCS SP8)成像(激发波长488nm,发射波长505-570nm),观察knock in效果。结果如图8所示,以单链DNA为同源修复模板,可看到knock in后仅表达微管TUBA1B基因的区域有明显的绿色荧光信号,微管结构清晰,而不表达TUBA1B基因的细胞核区域无绿色荧光信号;以双链DNA为同源修复模板,knock

in后整个细胞区域都非特异性表达绿色荧光信号。表明相比于双链DNA,以单链DNA为同源修复模板脱靶率更低。

[0075] 除非另外具体说明,否则在这些实施例中阐述的数值并不限制本发明的范围。在这里示出和描述的所有示例中,除非另有规定,任何具体值应被解释为仅仅是示例性的,而不是作为限制,因此,示例性实施例的其他示例可以具有不同的值。

[0076] 最后应说明的是:以上各实施例仅用以说明本发明的技术方案,而非对其限制;尽管参照前述各实施例对本发明进行了详细的说明,本领域的普通技术人员应当理解:其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分或者全部技术特征进行等同替换;而这些修改或者替换,并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的范围,其均应涵盖在本发明的权利要求和说明书的范围当中。

SEQUENCE LISTING

<110> 复旦大学附属肿瘤医院

<120> 一种长单链DNA的制备方法

<130> 2019

<160> 20

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 7

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

gttgaag 7

<210> 2

<211> 10

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

tagttgagct 10

<210> 3

<211> 13

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 3

gagcatctta gta 13

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 4

gattggggaa tagatctttg ggact 25

<210> 5

<211> 13

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 5

aagcatctta gta 13

<210> 6

<211> 25

<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 6
gattggggaa tagatctttg ggact 25
<210> 7
<211> 13
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 7
tagtatcttt tgc 13
<210> 8
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 8
agctagggga ataaatcttt gggatga 26
<210> 9
<211> 13
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 9
cagcatctta gta 13
<210> 10
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 10
gattggggaa tagatctttg ggacg 25
<210> 11
<211> 60
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 11
agtgaccctg aagttcatct gcaccaccgg caagctgccc gtgccctggc ccaccctcgt 60
<210> 12
<211> 100
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<400> 12

cgcggatccg acgttgaagt gaccctgaag ttcatctgca ccaccggcaa gctgcccgtg 60
ccctggccca ccctcgtagt atcttttgcg taagcttggg 100

<210> 13

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<400> 13

tgaacttcag ggtcatagtt gagctgtcgg atccactagt 40

<210> 14

<211> 55

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<400> 14

cacacgcaag cttaagctag gggaataaat ctttgggtga cgagggtggg ccagg 55

<210> 15

<211> 217

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<400> 15

cgcggatccg actgaacttc agggatcatag ttgagctgtc tgcacagaa tgatgcagac 60
gttgaagtga ccctgaagtt catctgcacc accggcaage tgcccgtgcc ctggcccacc 120
ctcgtagtat cttttgcgtg tacaatcagg aactgattgt acaagctagg ggaataaatc 180
tttgggtgac gaggggtggg cagggcgtaa gcttggg 217

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<400> 16

tggagatgca ctcacgctgc 20

<210> 17

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<400> 17

caccgtggag atgcactcac gctgc 25

<210> 18

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<400> 18
aaacgcagcg tgagtgcac tccac 25
<210> 19
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<400> 19
cccggttag gatggaagg ta 22
<210> 20
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<400> 20
agtgcgaact tcactggag ga 22

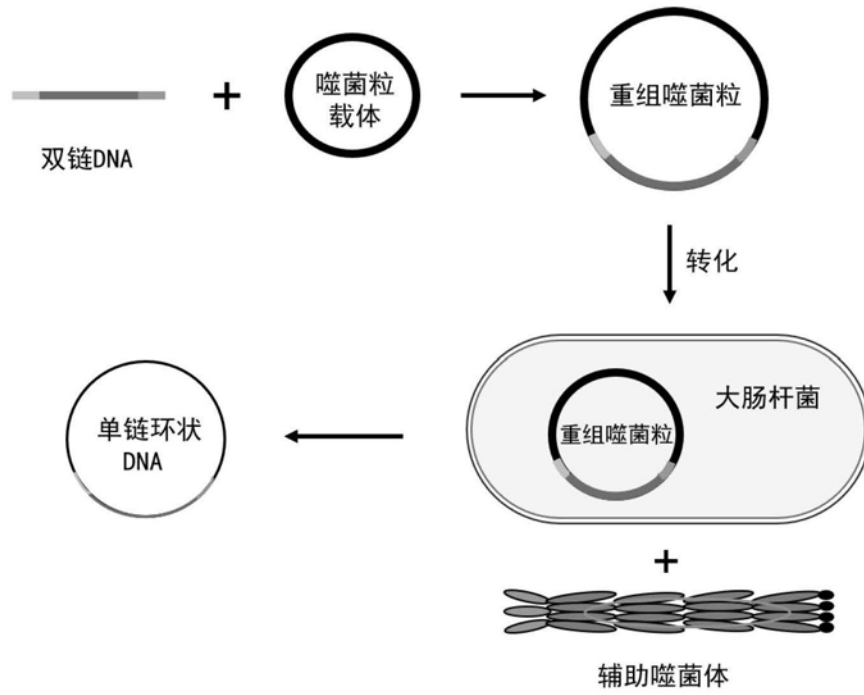
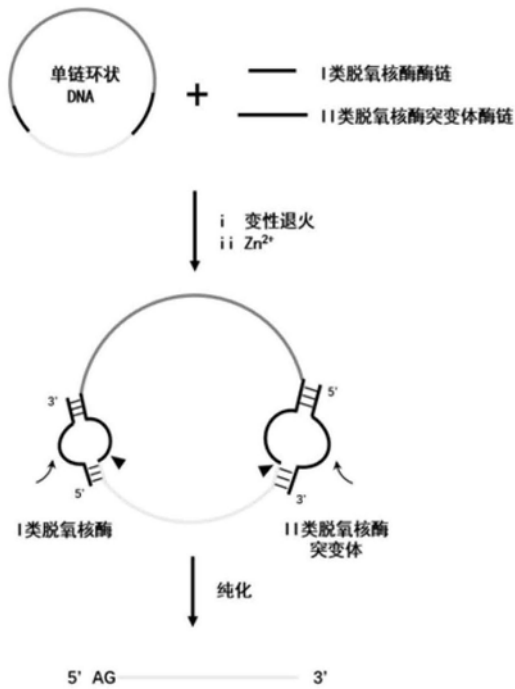


图1

(a) 当脱氧核酶拆分为底物链和酶链两条序列时:



(b) 当脱氧核酶底物区域和酶区域在一条序列上时:

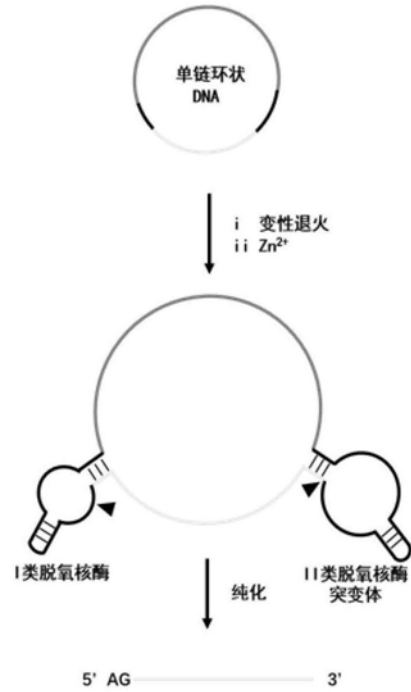


图2

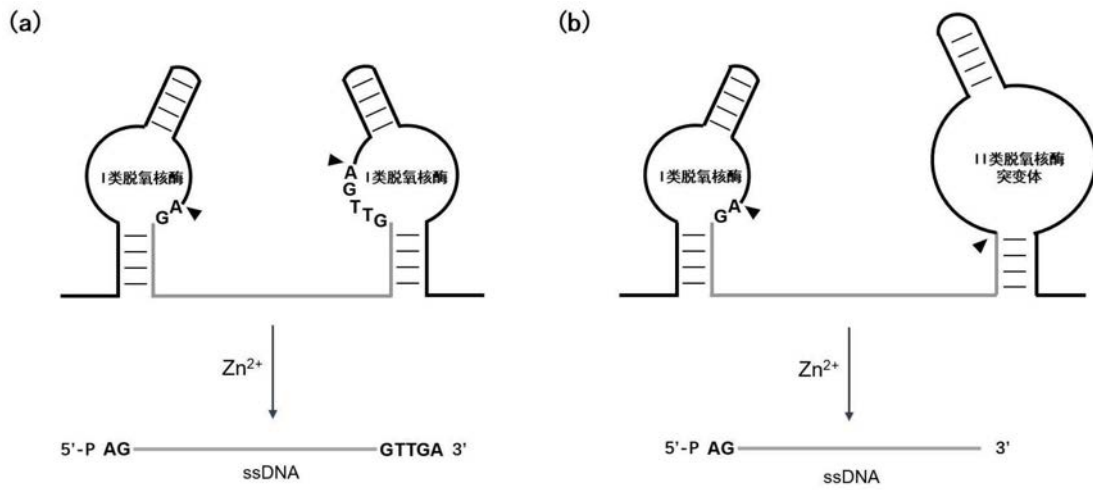


图3

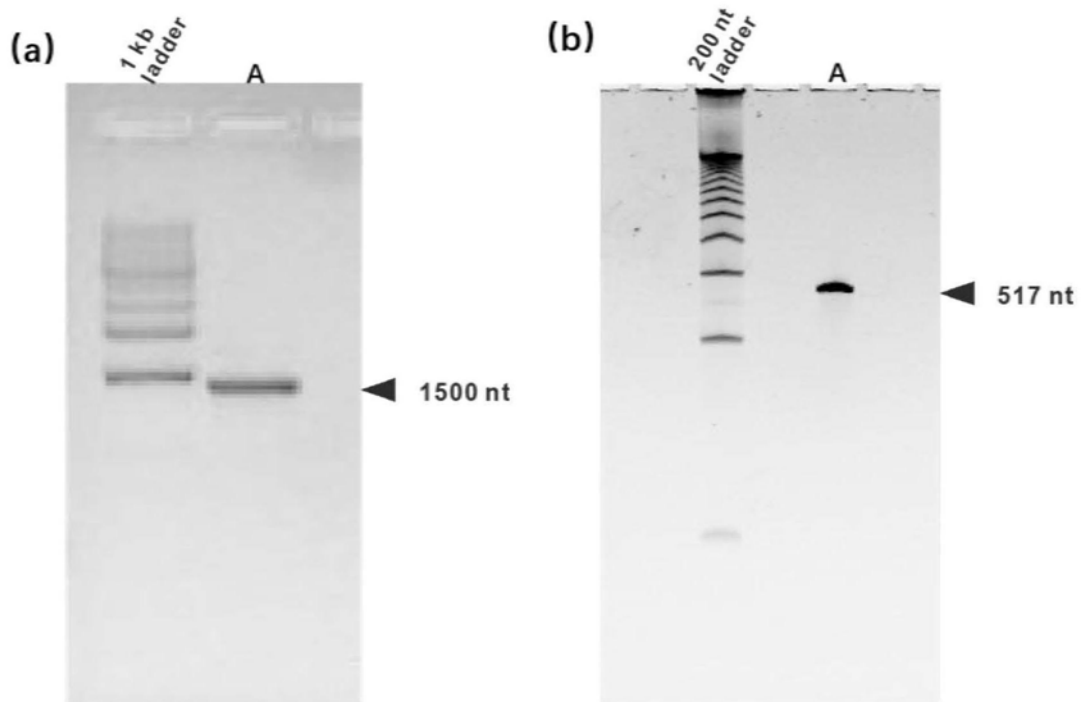


图4

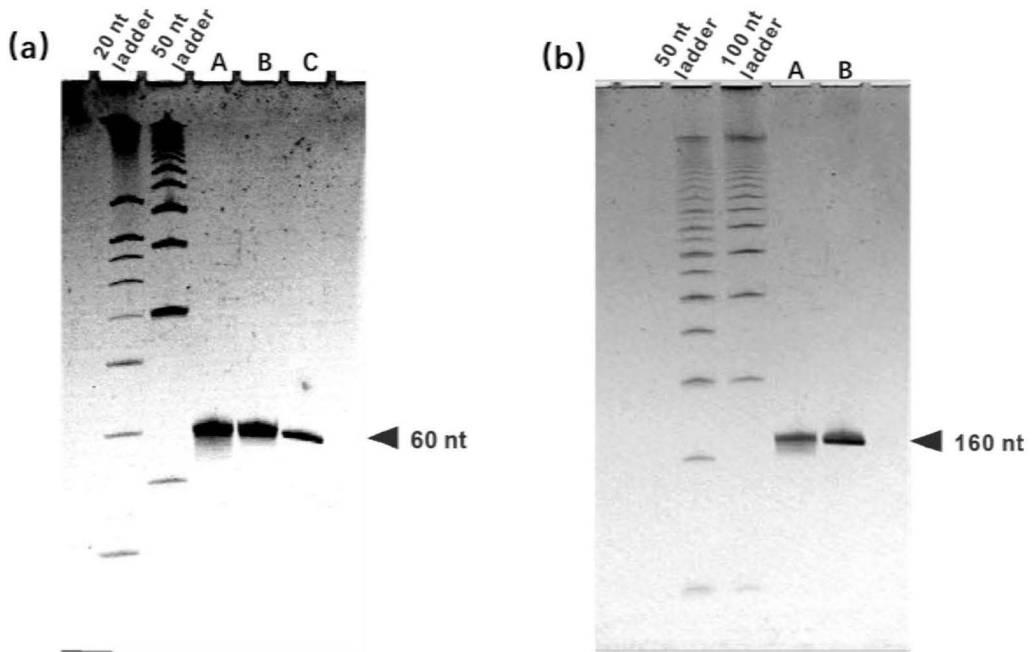


图5

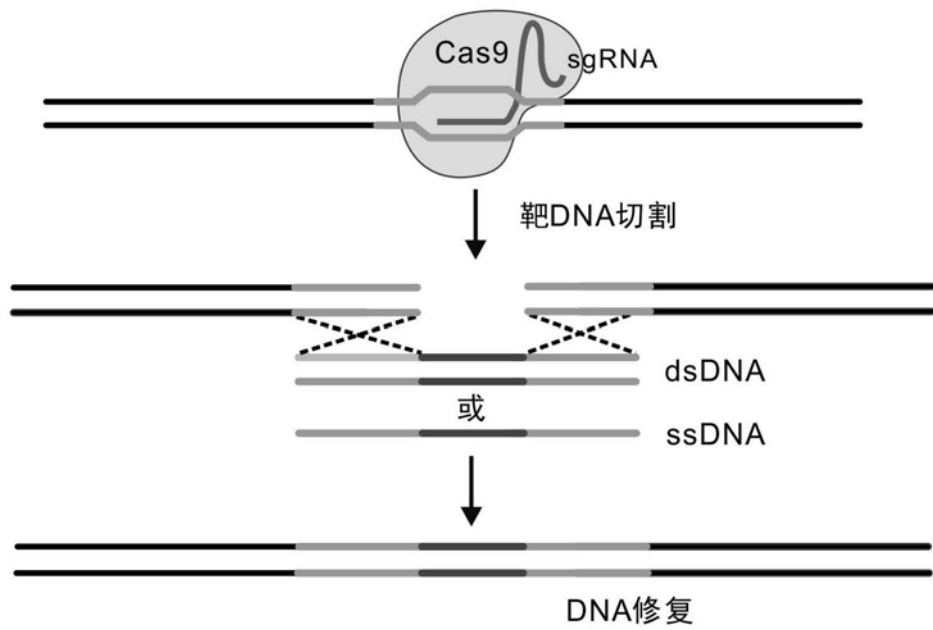


图6

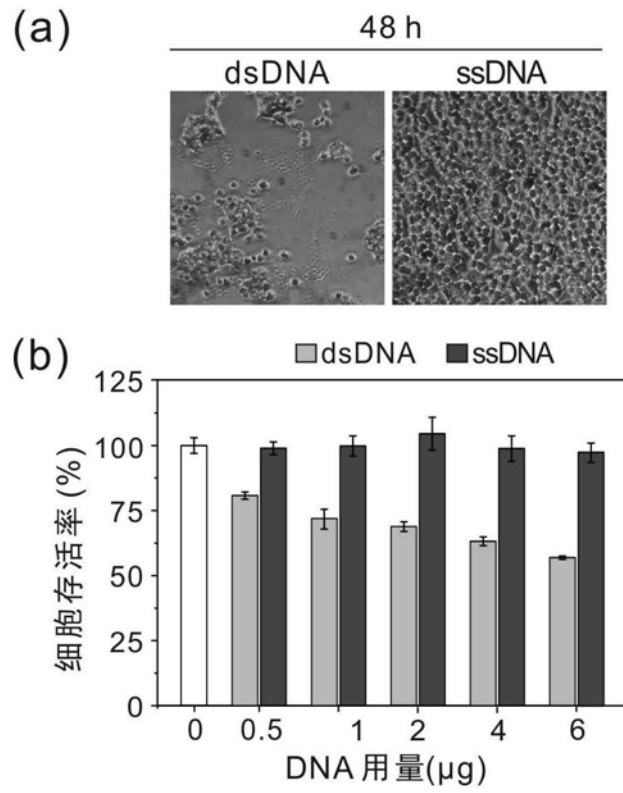


图7

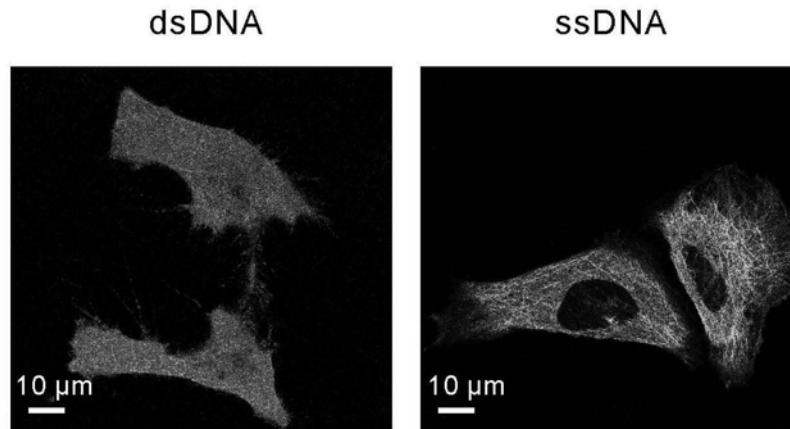


图8