(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 117604038 A
(43)申请公布日 2024.02.27

(21)申请号 202311037444.8
(22)申请日 2023.08.17
(66)本国优先权数据
202211009870.6 2022.08.22 CN
(71)申请人 北京三诺佳邑生物技术有限责任公司
地址 100176 北京市大兴区北京经济技术开发区经海二路36号5幢401室
(72)发明人 宋晓朋 范婷婷 沈丙权
(51)Int.Cl.
C12N 15/867(2006.01)
C12N 15/65(2006.01)
C12N 15/113(2010.01)
C12N 5/10(2006.01)
C12Q 1/6897(2018.01)
C12Q 1/02(2006.01)

权利要求书3页 说明书11页
序列表（电子公布） 附图4页

(54)发明名称

一种检测siRNA或shRNA的生物学活性的方法

(57)摘要

本发明提供了一种灵敏检测siRNA或shRNA生物学活性的方法,所述方法包括构建一种携带报告基因的重组表达载体,所述重组表达载体包含Tet-on表达调控系统、报告基因以及一个或多个siRNA或shRNA靶序列,构建相应的稳转细胞系,然后通过Tet-on表达调控系统及报告基因的表达,检测siRNA或shRNA的活性。本发明还提供方法中所述重组表达载体,以及相应稳转细胞系。本发明提供的方法操作简单、适用性广,并且可使siRNA或shRNA活性检测灵敏度得到明显提升,特别是对于表达量低或活性低的siRNA或shRNA基因药物的沉默活性提供了有效的检测手段。

CN 117604038 A

1.一种检测siRNA或shRNA的生物学活性的方法,其特征在于,所述方法包括如下步骤:

(1)构建携带报告基因的重组表达载体,所述重组表达载体包含Tet-on表达调控系统、报告基因以及一个或多个siRNA或shRNA靶序列;

(2)将上述重组表达载体导入细胞系,以获得包含上述重组表达载体的稳转细胞系;

(3)向上述稳转细胞系加入待测的siRNA或shRNA,以及加入四环素或四环素类似物以诱导报告基因的表达;

(4)通过检测报告基因的表达量,确定siRNA或shRNA的生物学活性。

2.如权利要求1中所述的方法,其特征在于,所述Tet-on表达调控系统由调节元件和反应元件组成。

3.如权利要求2中所述的方法,其特征在于,所述调节元件包括启动子和反义Tet转录活化因子(rtTA),所述反应元件包括Tet应答元件(TRE)和用于驱动报告基因表达的启动子。

4.如权利要求3所述的方法,其特征在于,所述报告基因位于反应元件中驱动报告基因表达的启动子的下游,优选地,所述报告基因与上述启动子可操作地连接。

5.如权利要求1-4中任一项所述的方法,其特征在于,所述siRNA或shRNA靶序列位于报告基因下游,优选位于报告基因的3'端非翻译区。

6.如权利要求1-5中任一项所述的方法,其特征在于,所述siRNA或shRNA靶向HIV基因组或HBV基因组。

7.如权利要求1-6中任一项所述的方法,其特征在于,所述siRNA或shRNA靶向HIV基因组,优选HIV基因组中的Gag和/或LTR。

8.如权利要求1-7中任一项所述的方法,其特征在于,所述siRNA或shRNA的靶序列如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中任一项所示或其组合。

9.如权利要求1-8中任一项所述的方法,其特征在于,所述shRNA的序列如SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6中任一项所示或其组合。

10.如权利要求1-9中任一项所述方法,其特征在于,所述报告基因选自荧光素酶编码基因、Gaussia荧光素酶(Gluc)编码基因、绿色荧光蛋白(GFP)编码基因、增强型绿色荧光蛋白(EGFP)编码基因、蓝色荧光蛋白(BFP)编码基因、红色荧光蛋白(RFP)编码基因、黄色荧光蛋白(YFP)编码基因、mCherry荧光蛋白编码基因、分泌型碱性磷酸酶(SEAP)编码基因、氯霉素乙酰基转移酶(CAT)编码基因、β-半乳糖苷酶编码基因、二氢叶酸还原酶编码基因、谷氨酰胺合成酶编码基因、胸苷激酶编码基因、人生长激素(hGH)编码基因。

11.如权利要求1-10中任一项所述的方法,其特征在于,所述携带报告基因的重组表达载体选自质粒载体、噬菌体载体、病毒载体或脂质体载体,优选病毒载体。

12.如权利要求11所述的方法,其特征在于,所述病毒载体选自慢病毒载体、腺相关病毒载体、腺病毒载体或杂合病毒载体,优选慢病毒载体。

13.如权利要求1-12中任一项所述的方法,其特征在于,所述细胞系选自HEK 293T细胞系、HEK 293细胞系、Hela细胞系、Vero细胞系、BHK-21细胞系、HepG2细胞系、T24细胞系、NIH3T3细胞系、T98G细胞系、HCT116细胞系、HCT8细胞系、b.End3细胞系、A549细胞系、H1299细胞系、PC9细胞系、HCC827细胞系、Neuro-2a细胞系、SMMC-7721细胞系、Huh6细胞系、Huh7细胞系、L-02细胞系、U251细胞系、B16F10细胞系、MCF-7细胞系、MCF-10A细胞系、U87细胞

系、U251细胞系或其组合。

14.如权利要求1-13中任一项所述的方法,其特征在于,所述向稳转细胞系中加入待测的siRNA或shRNA的方法包括:直接转染或将携带有siRNA或shRNA编码序列的重组载体导入稳转细胞系中。

15.一种携带报告基因的重组表达载体,其特征在于,所述重组表达载体包含Tet-on表达调控系统、报告基因以及一个或多个siRNA或shRNA靶序列。

16.如权利要求15所述的重组表达载体,其特征在于,所述Tet-on表达调控系统由调节元件和反应元件组成。

17.如权利要求16所述的重组表达载体,其特征在于,所述调节元件包括启动子和反义Tet转录活化因子(rtTA),所述反应元件包括Tet应答元件(TRE)和用于驱动报告基因表达的启动子。

18.如权利要求17所述的重组表达载体,其特征在于所述报告基因位于反应元件中驱动报告基因表达的启动子的下游,优选地,所述报告基因与上述启动子可操作地连接。

19.如权利要求15-18中任一项所述的重组表达载体,其特征在于,所述siRNA或shRNA靶序列位于报告基因下游,优选位于报告基因的3'端非翻译区。

20.如权利要求15-19中任一项所述的重组表达载体,其特征在于,所述siRNA或shRNA靶向HIV基因组或HBV基因组。

21.如权利要求15-20中任一项所述的重组表达载体,其特征在于,所述siRNA或shRNA靶向HIV基因组,优选Gag和/或LTR。

22.如权利要求15-21中任一项所述的重组表达载体,其特征在于,所述siRNA或shRNA的靶序列如SEQID NO:1或SEQ ID NO:2中任一项所示或其组合。

23.如权利要求15-22中任一项所述的重组表达载体,其特征在于,所述shRNA的序列如SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6中任一项所示或其组合。

24.如权利要求15-23中任一项所述的重组表达载体,其特征在于,所述报告基因选自荧光素酶编码基因、Gaussia荧光素酶(Gluc)编码基因、绿色荧光蛋白(GFP)编码基因、增强型绿色荧光蛋白(EGFP)编码基因、蓝色荧光蛋白(BFP)编码基因、红色荧光蛋白(RFP)编码基因、黄色荧光蛋白(YFP)编码基因、mCherry荧光蛋白编码基因、分泌型碱性磷酸酶(SEAP)编码基因、氯霉素乙酰基转移酶(CAT)编码基因、β-半乳糖苷酶编码基因、二氢叶酸还原酶编码基因、谷氨酰胺合成酶编码基因、胸苷激酶编码基因、人生长激素(hGH)编码基因。

25.如权利要求15-24中任一项所述的重组表达载体,其特征在于,所述载体选自质粒载体、噬菌体载体、病毒载体或脂质体载体,优选病毒载体。

26.如权利要求25所述的重组表达载体,其特征在于,所述病毒载体选自慢病毒载体、腺相关病毒载体、腺病毒载体或杂合病毒载体,优选慢病毒载体。

27.一种稳转细胞系,其特征在于,所述稳转细胞系包含权利要求15-26中任一项所述的重组表达载体。

28.如权利要求27所述的稳转细胞系,其特征在于,所述稳转用的细胞系选自HEK 293T细胞系、HEK 293细胞系、Hela细胞系、Vero细胞系、BHK-21细胞系、HepG2细胞系、T24细胞系、NIH3T3细胞系、T98G细胞系、HCT116细胞系、HCT8细胞系、b.End3细胞系、A549细胞系、H1299细胞系、PC9细胞系、HCC827细胞系、Neuro-2a细胞系、SMMC-7721细胞系、Huh6细胞系、

Huh7细胞系、L-02细胞系、U251细胞系、B16F10细胞系、MCF-7细胞系、MCF-10A细胞系、U87细胞系、U251细胞系或其组合。

29.权利要求1-14中任一项所述的方法、权利要求15-26中任一项所述的重组表达载体和/或权利要求27或28所述的稳转细胞系在检测siRNA或shRNA的生物学活性中的应用。

一种检测siRNA或shRNA的生物学活性的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体涉及一种siRNA或shRNA的生物学活性检测方法。

背景技术

[0002] RNA干扰(RNA interference,RNAi)是双链RNA介导的序列特异性的转录后基因沉默过程。当外源的双链RNA进入细胞后,被Dicer核酸内切酶识别并切割成21-25个核苷酸的小双链RNA,即小干扰RNA(small interference RNA,siRNA)。siRNA与RNA介导的沉默复合体(RISC)结合,由RISC介导切割靶mRNA中与siRNA反义链互补区域,从而特异地抑制目的基因的表达(Sun X等,2008,Nat Biotechnol,26(12):1379-1382)。小发夹RNA(small hairpin RNA,shRNA)表达载体也称为siRNA表达载体,可在哺乳动物细胞中转录出shRNA,经Dicer酶切除loop结构而成为siRNA。siRNA表达载体主要包括质粒载体、腺病毒、腺相关病毒载体和慢病毒系统,由表达载体介导的siRNA可以引发较长时间或稳定的基因沉默,是进行RNAi研究的常用方法(Prabhu Mathiyalagan等,2019,Circulation,139(4):518-532;Megan S Keiser等,2021,Nat Med,27(11):1982-1989;Priti Kumar等,2008,Cell,134(4):577-586)。

[0003] 除直接检测靶基因表达水平外,也可用荧光素酶报告系统间接评价siRNA的活性,并从候选的siRNA序列中筛选出有活性的siRNA(单志新,2009,南方医科大学学报,29(8):1577-1581)。该方法将siRNA的靶序列片段克隆到荧光素酶基因3'端非翻译区,制备融合表达载体,随后利用该载体构建能够稳定表达融合了shRNA靶序列的荧光素酶的细胞系。候选siRNA介导的基因沉默复合体能够与带有靶序列的荧光素酶mRNA结合,抑制荧光素酶的表达,通过siRNA作用细胞系前后荧光表达的变化指示载体中shRNA的活性。该方法对活性检测过程中实验室硬件要求低,让简单、方便地在体外评价siRNA或shRNA的生物学活性成为现实。

[0004] 然而,该方法采用的是组成型表达荧光素酶系统的稳转细胞系,在此类细胞系中,报告分子的表达量通常较高且不可控,siRNA或shRNA的量必须达到一定程度才能够采用该方法。对于siRNA含量较低或shRNA表达量较低,或者生物活性较低的药物,此类细胞系无法准确、灵敏地评估其活性。

发明内容

[0005] 为解决以上技术问题,本发明提供一种灵敏检测siRNA或shRNA的生物学活性的方法。

[0006] 所述方法包括:

[0007] (1)构建携带报告基因的重组表达载体,所述重组表达载体包含Tet-on表达调控系统、报告基因以及一个或多个siRNA或shRNA靶序列;

[0008] (2)将上述重组表达载体导入细胞系,以获得包含上述重组表达载体的稳转细胞系;

[0009] (3)向上述稳转细胞系加入待测的siRNA或shRNA,以及加入四环素或四环素类似物以诱导报告基因的表达;

[0010] (4)通过检测报告基因的表达量,确定siRNA或shRNA的生物学活性。

[0011] 在本发明的一些具体实施方案中,所述报告基因表达由Tet-On表达调控系统进行调控和驱动。

[0012] 在本发明的一些具体实施方案中,所述Tet-on表达调控系统由调节元件和反应元件组成。在另一些具体实施方案中,所述调节元件包括启动子和反义Tet转录活化因子(rtTA)。在另一些具体实施方案中,所述反应元件包括Tet应答元件(TRE)和用于驱动目的基因表达的启动子,优选地,所述启动子是真核细胞启动子,更优选地,所述启动子是RNA聚合酶Ⅱ类启动子,例如CMV启动子。

[0013] 在本发明的一些具体实施方案中,其中所述报告基因位于Tet-on表达调控系统的下游,在另一些具体的实施方案中,所述报告基因与Tet-on表达调控系统可操作地连接。

[0014] 在本发明的一些具体实施方案中,所述报告基因位于上述反应元件中的启动子的下游,该报告基因的表达由该启动子驱动。在另一些具体的实施方案中,所述报告基因与上述反应元件中的启动子可操作地连接。

[0015] 在本发明的一些具体实施方案中,其中所述siRNA或shRNA靶序列位于报告基因的下游,优选位于报告基因的3’端非翻译区。

[0016] 在本发明的一些具体实施方案中,其中所述siRNA或shRNA靶向人类免疫缺陷病毒(HIV)基因组或人类乙型肝炎病毒(HBV)基因组。在本发明优选的一些具体实施方案中,其中所述siRNA或shRNA靶向HIV基因组,优选HIV基因组中的Gag和/或LTR。在本发明的一些具体实施方案中,其中所述siRNA或shRNA靶序列如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中任一项所示或其组合。在本发明的一些具体实施方案中,其中所述shRNA序列如SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6中任一项所示或其组合。

[0017] 在本发明的一些具体实施方案中,其中所述报告基因选自荧光素酶编码基因、Gaussia荧光素酶(Gluc)编码基因、绿色荧光蛋白(GFP)编码基因、增强型绿色荧光蛋白(EGFP)编码基因、蓝色荧光蛋白(BFP)编码基因、红色荧光蛋白(RFP)编码基因、黄色荧光蛋白(YFP)编码基因、mCherry荧光蛋白编码基因、分泌型碱性磷酸酶(SEAP)编码基因、氯霉素乙酰基转移酶(CAT)编码基因、β-半乳糖苷酶编码基因、二氢叶酸还原酶编码基因、谷氨酰胺合成酶编码基因、胸苷激酶编码基因、人生长激素(hGH)编码基因,优选荧光素酶编码基因。

[0018] 在本发明的一些具体实施方案中,其中所述携带报告基因的重组表达载体选自质粒载体、噬菌体载体、病毒载体或脂质体载体,优选病毒载体。在本发明的一些具体实施方案中,其中所述病毒载体选自慢病毒载体、腺相关病毒载体、腺病毒载体或杂合病毒载体,优选慢病毒载体。

[0019] 在本发明的一些具体实施方案中,其中所述细胞系选自HEK 293T细胞、HEK 293细胞、Hela细胞系、Vero细胞系、BHK-21细胞系、HepG2细胞系、T24细胞系、NIH3T3细胞系、T98G细胞系、HCT116细胞系、HCT8细胞系、b.End3细胞系、A549细胞系、H1299细胞系、PC9细胞系、HCC827细胞系、Neuro-2a细胞系、SMMC-7721细胞系、Huh6细胞系、Huh7细胞系、L-02细胞系、U251细胞系、B16F10细胞系、MCF-7细胞系、MCF-10A细胞系、U87细胞系、U251细胞系或其组

合。

[0020] 在本发明的一些具体实施方案中,其中所述向稳转细胞系中加入待测的siRNA或shRNA的方法包括:直接转染或将携带有siRNA或shRNA编码序列的重组载体导入稳转细胞系中。

[0021] 另一方面,本发明提供一种重组表达载体,所述重组表达载体包含Tet-on表达调控系统、报告基因以及一个或多个siRNA或shRNA靶序列。

[0022] 在本发明的一些实施方案中,所述重组表达载体的报告基因表达由Tet-On表达调控系统进行调控和驱动。

[0023] 在本发明的一些具体实施方案中,所述Tet-on表达调控系统由调节元件和反应元件组成。在另一些具体实施方案中,所述调节元件包括启动子和反义Tet转录活化因子(rtTA)。在另一些具体实施方案中,所述反应元件包括Tet应答元件(TRE)和用于驱动目的基因表达的启动子,优选地,所述启动子是真核细胞启动子,更优选地,所述启动子是RNA聚合酶Ⅱ类启动子,例如CMV启动子。

[0024] 在本发明的一些具体实施方案中,其中所述重组表达载体的报告基因位于Tet-on表达调控系统的下游,在另一些具体的实施方案中,所述报告基因与Tet-on表达调控系统可操作地连接。

[0025] 在本发明的一些具体实施方案中,所述重组表达载体的报告基因位于上述反应元件中的启动子的下游,该报告基因的表达由该启动子驱动。在另一些具体的实施方案中,所述报告基因与上述反应元件中的启动子可操作地连接。

[0026] 在本发明的一些实施方案中,所述siRNA或shRNA靶序列位于报告基因的下游,优选位于报告基因的3’端非翻译区。

[0027] 在本发明的一些具体实施方案中,其中所述重组表达载体包含的siRNA或shRNA靶向人类免疫缺陷病毒(HIV)基因组或人类乙型肝炎病毒(HBV)基因组。在本发明优选地的一些具体实施方案中,其中所述siRNA或shRNA靶向HIV基因组,优选HIV基因组中的Gag和/或LTR。在本发明的一些具体实施方案中,其中所述siRNA或shRNA靶序列如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中任一项所示或其组合。在本发明的一些具体实施方案中,其中所述shRNA序列如SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6中任一项所示或其组合。

[0028] 在本发明的一些具体实施方案中,其中所述重组表达载体包含的报告基因选自荧光素酶编码基因、Gaussia荧光素酶(Gluc)编码基因、绿色荧光蛋白(GFP)编码基因、增强型绿色荧光蛋白(EGFP)编码基因、蓝色荧光蛋白(BFP)编码基因、红色荧光蛋白(RFP)编码基因、黄色荧光蛋白(YFP)编码基因、mCherry荧光蛋白编码基因、分泌型碱性磷酸酶(SEAP)编码基因、氯霉素乙酰基转移酶(CAT)编码基因、β-半乳糖苷酶编码基因、二氢叶酸还原酶编码基因、谷氨酰胺合成酶编码基因、胸苷激酶编码基因、人生长激素(hGH)编码基因,优选荧光素酶编码基因。

[0029] 在本发明的一些具体实施方案中,其中所述携带报告基因的重组表达载体选自质粒载体、噬菌体载体、病毒载体或脂质体载体,优选病毒载体。在本发明的一些具体实施方案中,其中所述病毒载体选自慢病毒载体、腺相关病毒载体、腺病毒载体或杂合病毒载体,优选慢病毒载体。

[0030] 另一方面,本发明还提供一种稳转细胞系,所述稳转细胞系包含本发明中所述的

重组表达载体。

[0031] 在本发明的一些具体实施方案中,其中所述细胞系选自HEK 293T细胞、HEK 293细胞、Hela细胞系、Vero细胞系、BHK-21细胞系、HepG2细胞系、T24细胞系、NIH3T3细胞系、T98G细胞系、HCT116细胞系、HCT8细胞系、b.End3细胞系、A549细胞系、H1299细胞系、PC9细胞系、HCC827细胞系、Neuro-2a细胞系、SMMC-7721细胞系、Huh6细胞系、Huh7细胞系、L-02细胞系、U251细胞系、B16F10细胞系、MCF-7细胞系、MCF-10A细胞系、U87细胞系、U251细胞系或其组合。

[0032] 另一方面本发明还提供如上所述的方法、重组表达载体和/或稳转细胞系在检测siRNA或shRNA生物学活性方面的应用。

[0033] 为了便于理解本公开内容的各个实施方案,提供了特定术语的以下解释:

[0034] 本文所述“shRNA”即短发夹RNA或小发夹RNA。是一种具有发夹结构的人工RNA分子,可用于通过RNA干扰(RNAi)使目标基因表达沉默。

[0035] 本文所述“siRNA”即小干扰RNA,是一种具有约18-25个完全配对碱基对的核糖核苷酸双链体,并且能够降解具有完全互补程度的靶向基因转录物。

[0036] 本文所述“多核苷酸”或“核酸”、“核酸分子”可互换使用,包括但不限于DNA、RNA、cDNA(互补DNA)、mRNA(信使RNA)、rRNA(核糖体RNA)、siRNA(小干扰RNA)、shRNA(小发夹RNA)、snRNA(小核RNA)、snoRNA(短核仁RNA)、miRNA(微小RNA)、基因组DNA、合成DNA、合成RNA和/或tRNA。

[0037] 本文所述“可操作地连接”是指当第一核酸序列与第二核酸序列被放置为具有功能关系时,第一核酸序列与第二核酸序列可操作地连接。例如,如果启动子影响编码序列的转录或表达,则启动子与编码序列可操作地连接。通常,可操作地连接的DNA序列是连续的,并且当有必要连接两个蛋白质编码区时,其在相同阅读框中。

[0038] 本文所述的“重组”用在重组核酸分子是指其具有非天然存在的序列,或者具有两个或多个序列片段的人为组合制备的序列。这种人为组合可以通过化学合成或者通过分离的核酸分子片段的人为操作(如通过基因工程技术)实现。术语“重组”还包括仅通过天然核酸分子、蛋白质或病毒的一部分的添加、置换或缺失而改变的核酸、蛋白质和病毒。

[0039] 本文所述的“重组病毒”包含非天然存在的序列或通过至少两个不同来源的序列的人为组合制备的序列的病毒。本文使用的“重组慢病毒”是指其中包装有重组核酸分子(例如,编码shRNA重组核酸分子)的慢病毒颗粒。

[0040] 本文所述的“载体”、“克隆载体”和“表达载体”是指通过其可以将多核苷酸序列(例如外来基因)引入宿主细胞中,以转化宿主并促进引入序列的表达(例如转录和翻译)的载体。载体包括质粒载体、噬菌体载体、病毒载体或脂质体载体等,优选为病毒载体,更优选为慢病毒载体。

[0041] 本文所述的“慢病毒”属于逆转录病毒亚属,以人类免疫缺陷病毒(HIV)为代表,可以感染分裂细胞并整合其基因组中,还具有感染包括神经元细胞、巨噬细胞、肝细胞、心肌细胞和干细胞在内的能力。本文所述的“慢病毒载体”是以灵长类免疫缺陷病毒来源的一种病毒载体,已作为基因转移的有效工具,广泛应用于基因治疗的研究。示例性的慢病毒载体包括灵长类的重组慢病毒载体,例如人免疫缺陷病毒载体(human immunodeficiency virus,HIV)或猴免疫缺陷病毒载体(simian immunodeficiency virus,SIV),或非灵长类

的重组慢病毒载体。

[0042] 本文所述的“活性”、“生物学活性”是指siRNA或shRNA对相应靶基因的沉默活性或抑制靶基因表达活性,或切割/降解靶基因转录物的活性。

[0043] 本文所用术语“一种”或“一个”是指一种(个)或多种(个)。由此,术语“一种”(或“一个”)、“一种或多种”和“至少一种”在本文中可互换使用。

[0044] 本文所用术语“包含”、“具有”、“包括”、“含有”应解释为包含性的而非排他性的。术语“由……组成”或“基本上由……组成”应解释为排他性的而非包含性的。

[0045] 本文所用术语“约”是指与给定参考值相差10%(±10%)的近似范围,除非另行规定。

[0046] 本文所用的术语“和/或”是指涵盖相关的所列项目中的一种或多种的任何和所有可能的组合,以及当在替代方案(“或”)中解释为不具有组合。

[0047] 本文所用术语“或”是指所列项目中的任何一个成员,并且还包括所述项目成员的任何组合。

[0048] 本文所述的“Tet-on表达调控系统”是四环素(Tet)表达调控系统中的一种。四环素(Tet)表达调控系统是以大肠杆菌Tn10转座子中特异的Tet抗性操纵子为基础而建立起来的一种用于诱导和调控外源基因表达的系统。Tet-on表达调控系统是本领域技术人员所熟知的,关于Tet-On表达调控系统的定义和组成,可参见文献,例如Das AT等,2016,Curr Gene Ther,16(3):156-167。一般而言,Tet-On表达调控系统主要由调节元件和反应元件组成。常用的示例性调节元件包含人巨细胞病毒早期启动子(PhCMV)和反义Tet转录活化因子(reverse tetracycline controlled transcriptional activator,rtTA)。其中rtTA由反义TetR(reverse TetR,rTetR)和单纯疱疹病毒(HSV)VP16蛋白C端的一段转录激活区域融合而成。常用的示例性反应元件由Tet应答元件(Tet-responsive element,TRE)、CMV启动子(minimal CMV promoter,PminCMV)组成,其中,CMV启动子用于驱动目的基因的表达。其中TRE是7个重复的Tet操纵子(Tet operator,TetO)序列。由于PminCMV缺少增强子,因此rtTA未与TRE结合时,目的基因不表达,当rtTA与TRE结合时,VP16会使PminCMV活化从而使基因表达。当Dox不存在时,rtTA不能与TRE结合,导致基因表达被抑制;而当Dox存在时,rtTA与TRE结合,进而使得目的基因表达。随着研究发展,Tet-on 3G和rtTA2S-M2等也逐渐广泛应用于Tet-on表达调控系统。

[0049] 本发明提供的方法构建了含有Tet-on表达调控系统、报告基因以及一个或多个siRNA或shRNA靶序列的重组表达载体,并将其导入细胞系中,以构建稳转细胞系。其中,报告基因位于Tet-On表达调控系统的反应元件中启动子的下游,而siRNA或shRNA的靶序列则位于报告基因下游的3’端非翻译区。如果未加入四环素或四环素类似物如强力霉素/多西环素(Dox),则该重组表达载体所携带的报告基因并不会被转录和翻译。当加入四环素或四环素类似物如强力霉素/多西环素(Dox)后,该重组表达载体中所携带的报告基因可被诱导转录得到携带有siRNA或shRNA靶序列的报告基因mRNA。此时加入siRNA或shRNA,将在细胞内形成靶向上述mRNA的基因沉默复合物,从而抑制或沉默报告基因的表达。因此,根据检测报告基因的表达情况,可确定siRNA或shRNA的生物学活性。

[0050] 相比起现有技术中的siRNA或shRNA生物学活性检测方法,本发明提供的检测方法采用了诱导性表达系统来表达报告基因,不仅具有风险低,操作简单等优势,其检测灵敏度

还得到了明显提升,且其适用性更广,对于各种表达量或活性(高/低)的siRNA或shRNA基因药物活性检测均适用,特别是对于表达量/含量或活性较低的siRNA或shRNA基因药物的生物学活性检测提供了更加有效的手段。

附图说明

[0051] 图1为pLVX-TetOne-Puro-Luc-Control载体图谱。

[0052] 图2为pLVX-TetOne-Puro-Luc-shRNAT-Gag3-LTR2载体图谱。

[0053] 图3为pGL4.5-Luc2-CMV-Hygro载体图谱。

[0054] 图4为构建的稳转细胞系(HEK293T-Lenti-Luc-shRNAT-Gag3-LTR2)经DOX诱导后荧光素酶表达情况。图5为不同浓度的DOX诱导下,在HEK293T-Lenti-Luc-shRNAT-Gag3-LTR2稳转细胞系中重组慢病毒载

[0055] 体SIV-G3L2中shRNA的活性检测结果。

[0056] 图6为DOX不同诱导时间下,在HEK293T-Lenti-Luc-shRNAT-Gag3-LTR2稳转细胞系中重组慢病毒载体

[0057] SIV-G3L2中shRNA的活性检测结果。

[0058] 图7为在HEK 293T-Luc-shRNAT-Gag3-LTR2稳转细胞系中重组慢病毒载体SIV-G3L2中shRNA的活性检

[0059] 测结果(对比例)。

具体实施方式:

[0060] 以下所举实施例只用于解释本申请,并非用于限定本申请的保护范围。

[0061] 下述实施例中所述试剂原料除特别注明来源外,均为市售的常见原料,试剂的配制采用常规方法。实施例中未详述的方法均为本领域常规操作。

[0062] 本申请的实施例中,对于携带有报告基因的重组表达载体,采用慢病毒载体作为示例性的载体。本申请实施例中构建携带shRNA编码序列的重组慢病毒载体,将该载体感染细胞,作为向细胞系中导入shRNA的示例性方法。

[0063] 本申请实施例中所使用的携带报告基因或shRNA编码序列的重组载体均是基于慢病毒载体包装系统制备而成。

[0064] 实施例1慢病毒穿梭质粒的构建

[0065] (1)构建包含报告基因、siRNA或shRNA靶序列和Tet-on表达调控系统的慢病毒穿梭质粒

[0066] 选择荧光素酶编码基因作为示例性的报告基因,选择HIV的基因序列(Gag,LTR)作为示例性的siRNA或shRNA靶序列。

[0067] 本实施例中所使用的两条shRNA靶序列分别如shRNAT-Gag3(SEQ ID NO:1)和shRNAT-LTR2(SEQ ID NO:2)所示。根据上述序列设计如表1所示的核酸序列ShRNAT-Gag3-LTR2 F-1(SEQ ID NO:3)和ShRNAT-Gag3-LTR2 R-1(SEQ ID NO:4),其包含串联的两个拷贝的shRNAT-Gag3和shRNAT-LTR2,在该核酸序列末端具有NotI和BamHI酶切位点黏性末端。

[0068] 根据上述的ShRNAT-Gag3-LTR2 F-1和ShRNAT-Gag3-LTR2 R-1核酸序列分别合成相应的核酸片段(生工生物工程(上海)股份有限公司),二者经变性退火后形成双链DNA靶

片段,插入到经NotI和BamHI双酶切的pLVX-TetOne-Puro-Luc-Control质粒载体中(北纳生物,货号:BNCC360026,其质粒图谱如图1所示),使其位于荧光素酶基因的3'端非翻译区,从而获得慢病毒穿梭质粒pLVX-TetOne-Puro-Luc-shRNAT-Gag3-LTR2,其质粒图谱如图2所示。

[0069] 靶序列及相应的DNA靶片段的具体序列如下表1所示:

[0070] 表1

[0071]

名称	序列
shRNAT-Gag3	5'-ATAGTAAGAATGTATAGCC-3'(SEQ ID NO:1)
shRNAT-LTR2	5'-TGCTTCAAGCTAGTACCAG-3'(SEQ ID NO:2)
ShRNAT-Gag3-LTR2 F-1:	5'-GGCCGCATAGTAAGAATGTATAGCC*ATCCTC*ATAGTAAGAATGTATAGCC*ATCCTC* TGCTTCAAGCTAGTACCAG*ATCCTC*TGCTTCAAGCTAGTACCAGG-3'(SEQ ID NO:3)
ShRNAT-Gag3-LTR2 R-1:	3'-CGTATCATTCTTACATATCGG*TAGGAG*TATCATTCTTACATATCGG*TAGGAG* ACGAAGTTCGATCATGGTC*TAGGAG*ACGAAGTTCGATCATGGTCCCTAG-5'(SEQ ID NO:4)

[0072] *斜体表示连接序列,下划线字体表示酶切位点的黏性末端序列。

[0073] (2)构建携带有shRNA编码序列的慢病毒穿梭质粒

[0074] 根据表2中的序列合成H1-Gag3-U6-LTR2的双链DNA片段,然后基于pGTV-PEDF载体(该载体的制备方法详见专利文献CN200680012905.4中实施例1中的第1-1节,该专利文献通过引用其全文并入本文中),通过酶切、连接、转化等方法,获得携带上述双链DNA片段的重组慢病毒穿梭质粒pGTV-shGag3-shLTR2。

[0075] 阴性对照pGTV-EGFP为携带针对EGFP的编码序列的慢病毒穿梭质粒,其构建方法与pGTV-shGag3-shLTR2相同。

[0076] 核酸片段合成、酶切、连接、转化等质粒构建步骤及方法是本领域常规技术,可参照例如J.萨姆布鲁克等编著,分子克隆实验指南,第三版,科学出版社,2002,或按照制造厂商说明书进行操作。

[0077] 表2

[0078]

序列说明	具体序列（5'-3'）
针对 Gag 的 shRNA 核酸序列（RNA）	AUAGUAAGAAUGUAUAGCCUUCAAGAGAGGCUAUACAUUCUUACU AU（SEQ ID NO：5）
针对 LTR 的 shRNA 核酸序列（RNA）	UGCUUCAAGCUAGUACCAGUUCAAGAGACUGGUACUAGCUUGAAGC A（SEQ ID NO：6）
编码针对 Gag 的 shRNA 的编码核酸序列（DNA）	ATAGTAAGAATGTATAGCCTTCAAGAGAGGCTATACATTCTTACTAT （SEQ ID NO：7）
编码针对 LTR 的 shRNA 的编码核酸序列（DNA）	TGCTTCAAGCTAGTACCAGTTCAAGAGACTGGTACTAGCTTGAAGCA （SEQ ID NO：8）
H1 启动子序列（DNA）	GAACGCTGACGTCATCGACCCGCTCCAAGGAATCGCGGGCCCAGTGTC ACTAGGCGGGAACACCCAGCGCGCGTGCGCCCTGGCAGGAAGATGGC TGTGAGGGACAGGGGAGTGGCGCCCTGCAATATTTGCATGTCGCTATG TGTTCTGGGAAATCACCATAAACGTGAAATGTCTTTGGATTTGGGAATC TTATAAGTTCTGTATGAGACCAC（SEQ ID NO：9）
U6 启动子序列（DNA）	GATCCTACCAAGGTCGGGCAGGAAGAGGGCCTATTTCCCATGATTCCT TCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAATTAGAATTAA TTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAA GTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGG ACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTCGATTTCTTGGCTTTAT ATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCG（SEQ ID NO：10）

[0079] 实施例2慢病毒载体的包装及滴度测定

[0080] (1)携带报告基因的重组慢病毒载体包装与滴度测定

[0081] 在50ml离心管中加入2×HBS,分别将如下表3所示用于慢病毒包装的质粒依次加入离心管中;再向离心管中加入$CaCl_2$,涡旋后在室温条件下静置。用适量Opti-MEM漂洗HEK293T细胞。将质粒混合物缓慢加入细胞瓶中,37℃、5% CO_2培养箱中培养3h。缓慢加入适量含30%胎牛血清(FBS)的DMEM完全培养基,置于37℃、CO_2培养箱中培养过夜。转染24h后用DMEM漂洗细胞,再加入适量的含有10mM丁酸钠的DMEM培养基,置于37℃、CO_2培养箱中培养。转染48h后,收获病毒上清,经过病毒过滤、浓缩后,加入适量的GHH溶液溶解病毒。溶解后的病毒通过慢病毒滴度快速检测试剂盒(北京博奥龙免疫技术有限公司,BF06202)检测病毒滴度,检测方法见试剂盒说明书,结果如下表3所示。最后分装-70℃冰箱保存备用。

[0082] 表3慢病毒包装所用质粒

[0083]

包装用质粒	包装后获得的病毒载体	包装滴度 TU/ml
pLenti-P2A	Lenti-Luc-shRNAT-Gag3-LTR2	1×10^7
pLenti-P2B		
pLVX-TetOne-Puro-Luc-shRNAT-Gag3-LTR2		

[0084] (2)携带shRNA编码序列的慢病毒载体及其阴性对照载体的包装与滴度测定

[0085] 包装载体、rev表达载体、VSV-G表达载体的构建方法详见专利ZL200680012905.4实施例1中的方法。

[0086] 慢病毒包装步骤可参见上述第(1)节。所获得的慢病毒载体及其阴性对照载体分别称为SIV-shGag3-shLTR2(下称SIV-G3L2)和SIV-EGFP。

[0087] 随后检测所获得的慢病毒载体的基因组滴度。具体操作步骤参见中国专利ZL201210078288.5的实施例4中第4-3节的,该专利文献通过引用其全文并入本文中。

[0088] 经检测,本实施例中包装出的重组慢病毒载体SIV-G3L2的基因组滴度约为3×10^{10}Vg/ml,阴性对照重组慢病毒载体SIV-EGFP的基因组滴度约为2.9×10^{10}Vg/ml。

[0089] 实施例3:构建包含报告基因、shRNA靶序列的组成型表达重组质粒(对比例)

[0090] 选择荧光素酶编码基因作为示例性的报告基因,选择HIV的基因序列(Gag,LTR)作为示例性的shRNA靶序列。

[0091] 本实施例中所使用的两条shRNA靶序列分别如shRNAT-Gag3(SEQ ID NO:1)和shRNAT-LTR2(SEQ ID NO:2)所示。参照实施例1中第(1)节的策略设计包含串联两个拷贝的shRNAT-Gag3和shRNAT-LTR2的核酸序列ShRNAT-Gag3-LTR2 F-2(SEQ ID NO:11)和ShRNAT-Gag3-LTR2 R-2(SEQ ID NO:12),所不同的是该核酸序列的末端具有FseI酶切位点黏性末端。具体序列参见表4。

[0092] 参照实施例1中第(1)节的方法合成相应的核酸片段,变性退火后形成相应的双链DNA片段,插入到经FseI酶切后的pGL4.5-Luc2-CMV-Hygro质粒载体中(Promega,货号:E1310,其质粒图谱如图3所示,),使其位于荧光素酶基因的3'端非翻译区,从而获得重组质粒载体pGL4.5-Luc-shRNAT-Gag3-LTR2-Hygro,作为本申请的对比例。

[0093] 上述DNA片段的具体序列如下表4所示:

[0094] 表4

[0095]

名称	序列
ShRNAT-Gag3-LTR2 F-2	5'-CCATAGTAAGAATGTATAGCC*ATCCTC*ATAGTAAGAATGTATAGCC*ATCCTC* TGCTTCAAGCTAGTACCAG*ATCCTC*TGCTTCAAGCTAGTACCAGGGCCGG-3'(SEQ ID NO:11)
ShRNAT-Gag3-LTR2 R-2	3'-GGCCGGTATCATTCTTACATATCGG*TAGGAG*TATCATTCTTACATATCGG*TAGGAG* ACGAAGTTCGATCATGGTC*TAGGAG*ACGAAGTTCGATCATGGTCCC-5'(SEQ ID NO:12)

[0096] *斜体表示连接序列,下划线字体表示酶切位点的黏性末端序列。

[0097] 实施例4表达荧光素酶的稳转细胞系的建立

[0098] 1、包含Tet-On表达调控系统的稳转细胞系的建立

[0099] (1)Puromycin筛选稳转细胞系

[0100] 采用实施例2包装的重组慢病毒载体Lenti-Luc-shRNAT-Gag3-LTR2感染HEK 293T细胞,培养72h。再采用含有终浓度为4μg/mL的Puromycin(ThermoFisher,A1113803)的DMEM完全培养基筛选细胞,连续培养14天后能稳定增殖的细胞即为通过Puromycin筛选出的稳转细胞系。

[0101] (2)DOX诱导筛选可诱导荧光素酶表达的稳转细胞系

[0102] 采用含有不同浓度的DOX(MedChemExpress,HY-N0565)的DMEM完全培养基培养上述获得的稳转细胞系48h后,收集细胞。将细胞反复冻融裂解,并从中取出20μL上清液,加入96孔白微板中,再加入荧光素酶底物,充分混匀,上酶标仪(Molecular Devices,型号:

Spectra Max M5)检测全波长的发光值,采集时间200ms。具体操作参见荧光素酶检测试剂盒操作说明(Luciferase Assay System Freezer Pack,Promega E4530)。

[0103] 结果如图4所示,随着DOX浓度的升高,诱导表达的荧光素酶含量升高,荧光素酶活性增加,并表现出了剂量依赖关系。上述结果表明本发明成功构建了可诱导表达荧光素酶的稳转细胞系HEK293T-Lenti-Luc-shRNAT-Gag3-LTR2,并且荧光素酶的表达量随着DOX诱导浓度的增加而稳定升高。

[0104] 2、包含组成型表达载体的稳转细胞系的建立(对比例)

[0105] 采用实施例3构建的重组质粒载体pGL4.5-Luc-shRNAT-Gag3-LTR2-Hygro转染HEK293T细胞系,24h后用终浓度为100ng/μL Hygromycin B(SIGMA,Cat:H7772)的细胞培养基加压筛选2周后能稳定增殖的细胞即为稳定细胞系,即HEK 293T-Luc-shRNAT-Gag3-LTR2稳转细胞系。

[0106] 实施例5在含有Tet-on表达调控系统的稳转细胞系中进行shRNA生物学活性检测

[0107] 利用实施例4所构建的可诱导表达荧光素酶的稳转细胞系HEK293T-Lenti-Luc-shRNAT-Gag3-LTR2对重组慢病毒载体SIV-G3L2的生物学活性进行检测。分别采用重组慢病毒载体SIV-G3L2和重组慢病毒载体SIV-EGFP感染稳转细胞系HEK293T-Lenti-Luc-shRNAT-Gag3-LTR2,其中SIV-G3L2感染的稳转细胞系作为实验组,SIV-EGFP感染的稳转细胞系作为对照组。在细胞的铺板密度为1.0×10^5个细胞/孔,DOX诱导时间为48h,病毒的感染量为MOI=5以及病毒感染时间为72h的条件下,检测在不同浓度的DOX诱导下荧光素酶的活性。其中,荧光素酶活性检测方法如实施例4所述,同时,根据以下公式计算shRNA的抑制率:抑制率=1-实验组荧光素酶活性/对照组荧光素酶活性。

[0108] 结果如图5所示,当MOI=5时,在DOX为10ng/mL浓度下,实验组显示出较高的抑制率,达0.37。

[0109] 在确定10ng/mL的DOX诱导浓度后,对细胞的铺板密度(1.0×10^5个细胞/孔)、病毒感染量(MOI=2)以及感染时间(72h)进行严格控制,检测不同DOX诱导时间下,荧光素酶的活性。荧光素酶活性检测方法如实施例4所述。

[0110] 结果如图6所示,MOI=2时,在DOX诱导24h条件下,实验组显示出较高的抑制率,达0.46。

[0111] 以上结果表明,本发明的方法通过Tet-on表达调控系统调控靶标的表达,能够在很低的感染滴度(MOI=2或5)下检测出携带shRNA的重组病毒载体中shRNA的生物学活性。由此可见,即便对于较低含量和/或较低活性的siRNA或shRNA,本发明的方法也能够灵敏、准确地检测其生物学活性。

[0112] 实施例6在包含组成型表达载体的稳转细胞系中进行shRNA生物学活性检测(对比例)

[0113] 利用实施例4所构建的稳转细胞系HEK 293T-Luc-shRNAT-Gag3-LTR2对重组慢病毒载体SIV-G3L2的生物学活性进行检测。采用重组慢病毒载体SIV-G3L2和重组慢病毒载体SIV-EGFP分别以MOI=2、MOI=5、MOI=20的感染剂量分别感染稳转细胞系HEK 293T-Luc-shRNAT-Gag3-LTR2,其中重组慢病毒载体SIV-G3L2感染的稳转细胞系作为实验组,重组慢病毒载体SIV-EGFP感染的稳转细胞系作为对照组,感染72h后,根据实施例4所述方法检测荧光素酶活性。同时,根据以下公式计算shRNA的抑制率:抑制率=1-实验组荧光素酶活性/

对照组荧光素酶活性。

[0114] 结果如图7所示,在HEK 293T-Luc-shRNA-Gag3-LTR2稳转细胞系中,仅在重组慢病毒载体SIV-G3L2感染剂量为MOI＝20时检测到荧光素酶活性的下降,且抑制率仅为0.2,而在MOI＝2或5时,均未检测到荧光素酶活性的下降。

[0115] 以上结果表明,在包含组成型表达载体的稳转细胞系中,其虽然检测出重组病毒载体中shRNA的生物学活性,但需要较高感染滴度(MOI＝20)的重组病毒载体。在更低的感染滴度下(MOI＝2或5),包含组成型表达载体的细胞系无法准确检测和确定携带shRNA编码序列的重组病毒载体中shRNA的生物学活性。

[0116] 结合实施例5和6的结果可知,相比起现有技术中的采用组成型表达载体的检测方法,本发明的检测方法相对于现有技术具有更高的灵敏度和准确性,对于较低含量和/或较低活性的siRNA或shRNA,也能够灵敏、准确地检测和确定其生物学活性。

[0117] 以上所述本申请的实施例,并不用以限制本申请,凡在本申请的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本申请的保护范围之内。

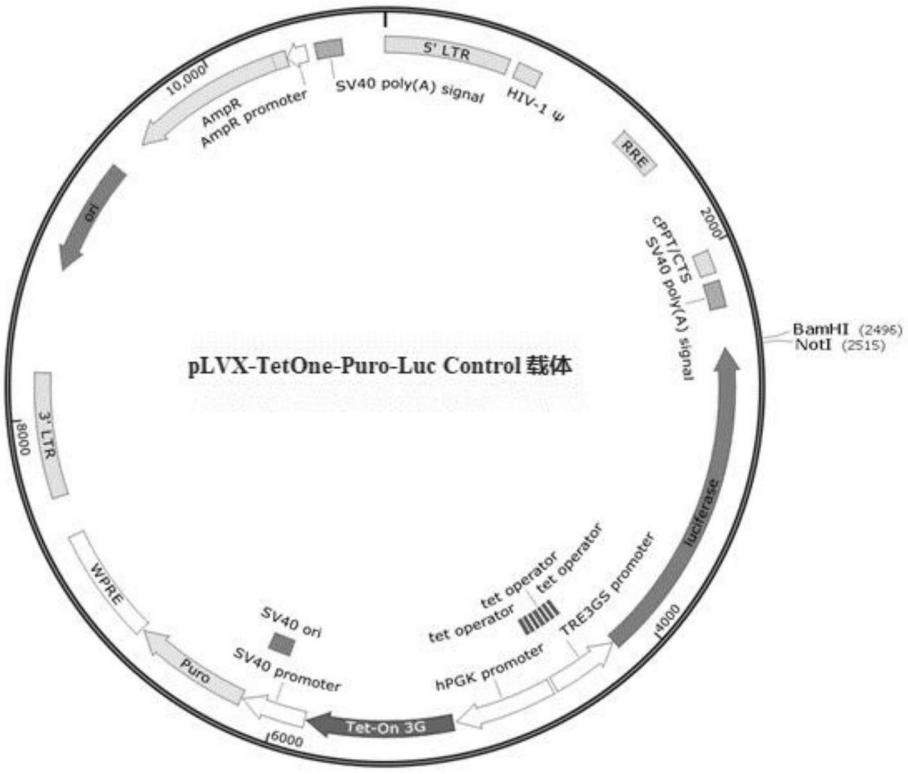
pLVX-TetOne-Puro-Luc Control 载体
5' LTR
HIV-1 ψ
RRE
cPPT/CTS
SV40 poly(A) signal
BamHI (2496)
NotI (2515)
luciferase
TRE3GS promoter
tet operator
tet operator
hPGK promoter
Tet-On 3G
SV40 promoter
Puro
SV40 ori
WPRE
3' LTR
ori
AmpR
AmpR promoter
SV40 poly(A) signal
2000
4000
6000
8000
10,000

图1

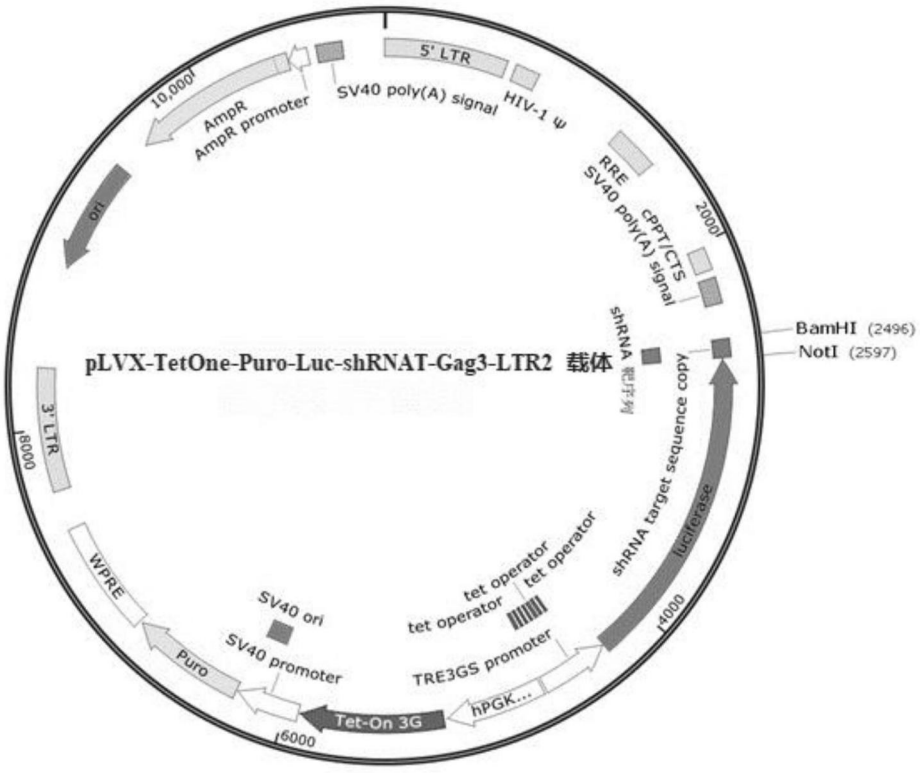
pLVX-TetOne-Puro-Luc-shRNAT-Gag3-LTR2 载体
5' LTR
HIV-1 ψ
RRE
cPPT/CTS
SV40 poly(A) signal
shRNA
shRNA target sequence copy
BamHI (2496)
NotI (2597)
luciferase
TRE3GS promoter
tet operator
tet operator
hPGK...
Tet-On 3G
SV40 promoter
Puro
SV40 ori
WPRE
3' LTR
ori
AmpR
AmpR promoter
SV40 poly(A) signal
2000
4000
6000
8000
10,000

图2

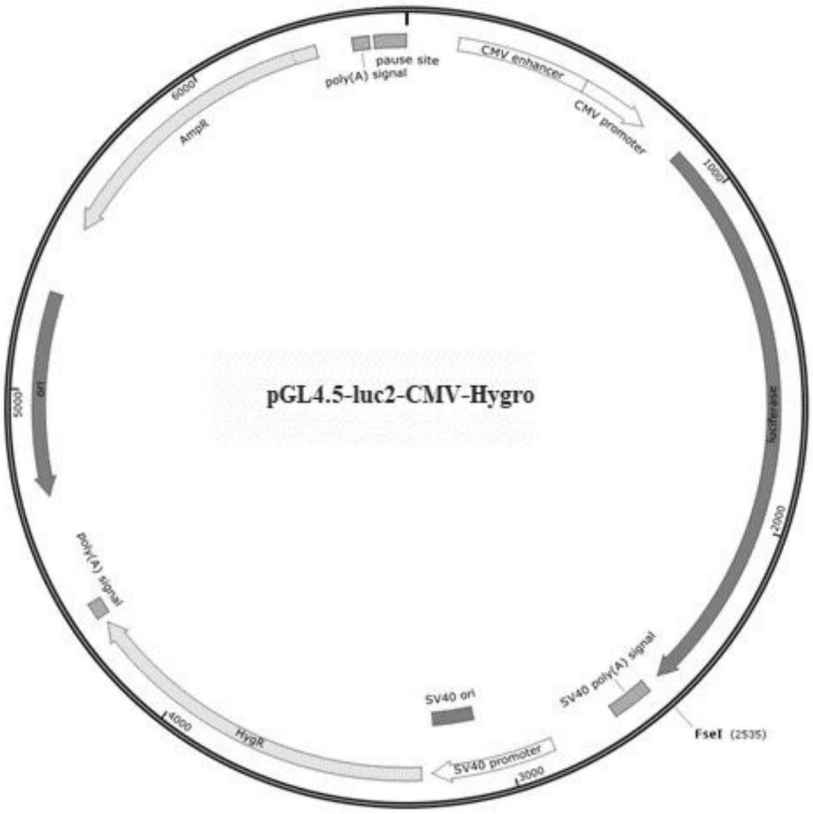
pGL4.5-luc2-CMV-Hygro
pause site
poly(A) signal
CMV enhancer
CMV promoter
1000
luciferase
2000
SV40 poly(A) signal
FseI (2535)
SV40 ori
3000
SV40 promoter
HygR
4000
poly(A) signal
5000
ori
6000
AmpR

图3

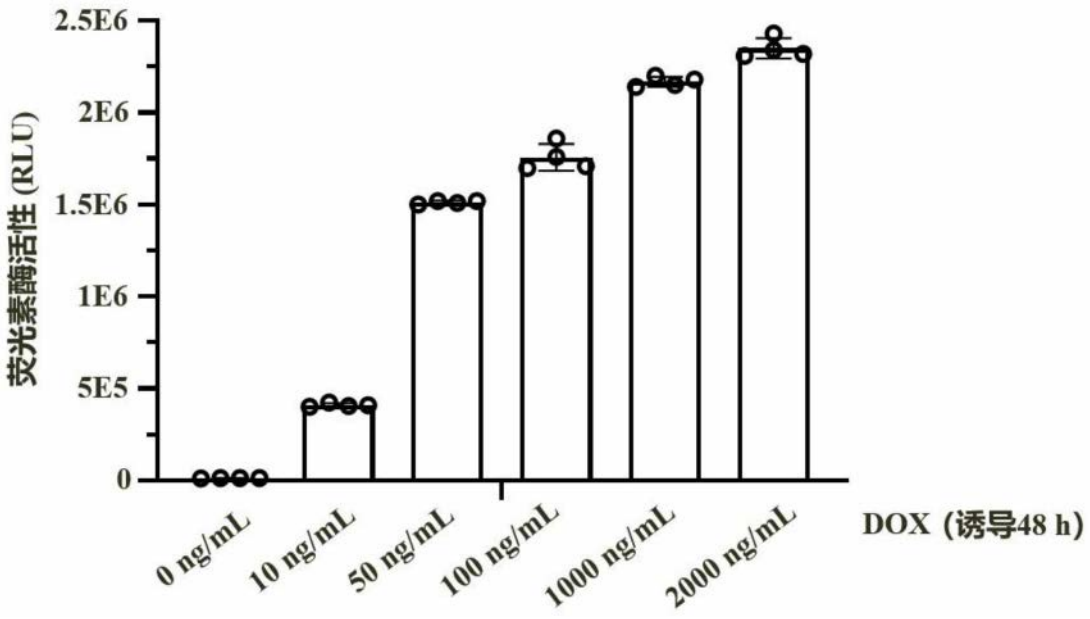
荧光素酶活性 (RLU)
2.5E6
2E6
1.5E6
1E6
5E5
0
0 ng/mL
10 ng/mL
50 ng/mL
100 ng/mL
1000 ng/mL
2000 ng/mL
DOX (诱导48 h)

图4

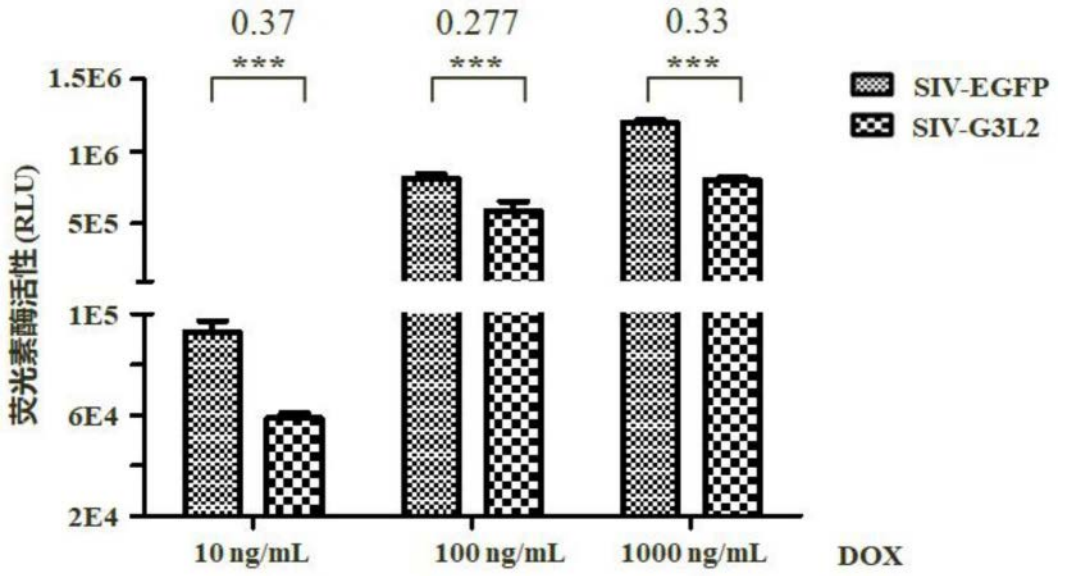
0.37
0.277
0.33
***
***
***
1.5E6
1E6
5E5
1E5
6E4
2E4
荧光素酶活性(RLU)
SIV-EGFP
SIV-G3L2
10 ng/mL
100 ng/mL
1000 ng/mL
DOX

图5

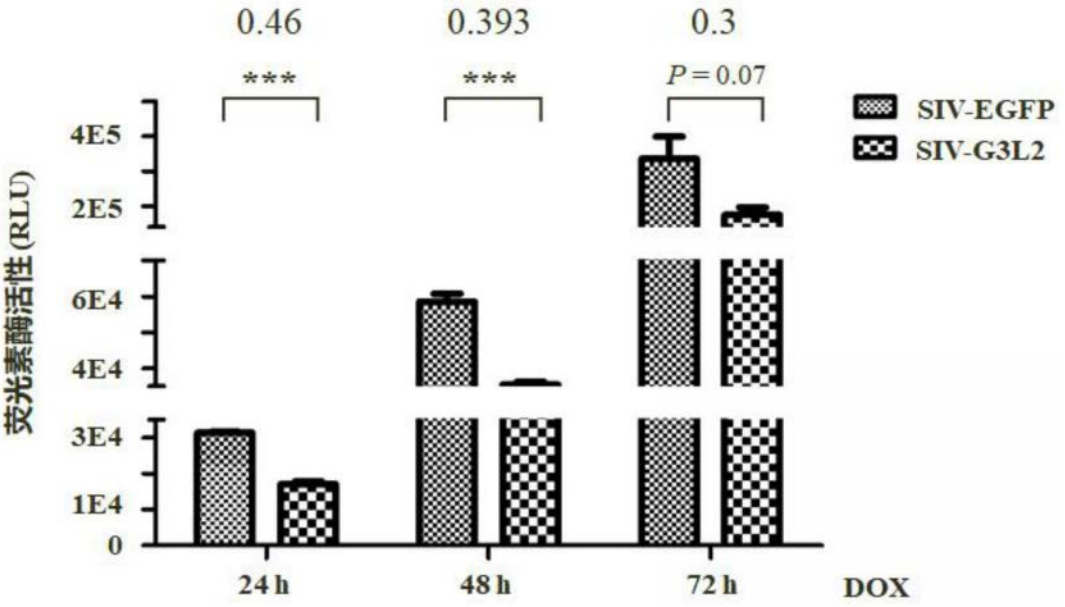
0.46
0.393
0.3
***
***
P = 0.07
4E5
2E5
6E4
4E4
3E4
1E4
0
荧光素酶活性(RLU)
SIV-EGFP
SIV-G3L2
24 h
48 h
72 h
DOX

图6

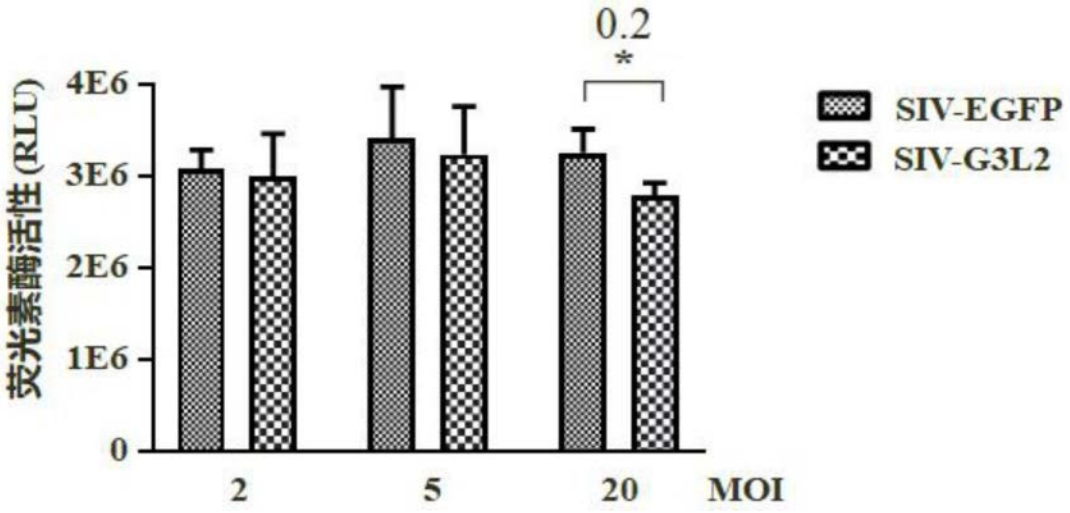

图7