



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105132413 B

(45)授权公告日 2018.06.19

(21)申请号 201510505278.9

C12N 15/10(2006.01)

(22)申请日 2015.08.17

C12N 15/867(2006.01)

C12N 15/66(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105132413 A

(43)申请公布日 2015.12.09

(73)专利权人 深圳大学

地址 518060 广东省深圳市南山区南海大道3688号

(72)发明人 苟德明 康康 李洁璇 黄炼

(74)专利代理机构 深圳市恒申知识产权事务所
(普通合伙) 44312

代理人 王利彬

(51)Int.Cl.

C12N 15/11(2006.01)

C12N 15/113(2010.01)

(56)对比文件

CN 101418311 A,2009.04.29,

CN 101935670 A,2011.01.05,

Xue-jun Wang等.A Simple and Robust Vector-Based shRNA Expression System Used for RNA Interference.《PLOS ONE》.2013,第8卷(第2期),1-8.

Xiao-Xia Li等.An efficient approach for constructing shRNA expression vectors based on short oligonucleotide synthesis.《Analytical Biochemistry》.2008,第381卷163-165.

审查员 孙婷婷

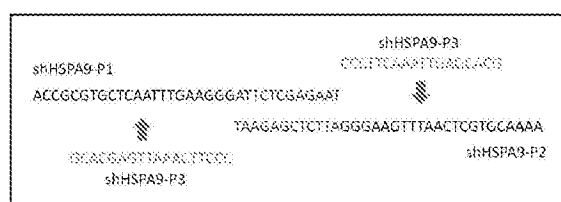
权利要求书2页 说明书13页 附图4页

(54)发明名称

用于制备shRNA的引物及制备方法、载体及构建方法

(57)摘要

本发明公开一种用于制备shRNA的引物及制备方法、载体及构建方法,用于制备shRNA的引物包括引物P1、P2、P3;P1长度为34nt,从5'端开始,依次为突出的粘性末端ACCG,21nt的siRNA正向序列,loop序列,以及与siRNA正向序列3'末端3个碱基反向互补的碱基;P2,5'端4个碱基由ACCG改变为AAAA,其余序列与P1相同;P3是siRNA正向序列5'末端18nt序列的反向互补序列。三条引物长度均不超过35nt,可有效避免长引物合成过程中发生的碱基错误,提高了shRNA的保真性,成本低,适用于高通量制备shRNA。



1. 一种用于制备shRNA的引物,其特征在于,包括三条引物P1、P2、P3;引物P1长度为34nt,从5'端开始,依次为突出的粘性末端ACCG,21nt的siRNA正向序列,loop序列,以及与siRNA正向序列3'末端3个碱基反向互补的碱基;引物P2,5'端4个碱基由ACCG改变为AAAA,其余序列与P1相同;引物P3是siRNA正向序列5'末端18nt序列的反向互补序列;其中,loop序列为CTCGAG或TTCAAGAGA。

2. 一种shRNA的制备方法,其特征在于,采用如权利要求1所述的三条引物退火合成双链shRNA,包括以下步骤:

针对目的基因设计和合成引物后,将引物P1、P2和P3分别稀释为10 μ M的浓度后,以1:1:2的比例混合,再加入占总体积1/10的1M NaCl进行退火;

将上述混合充分的试剂置于已停止加热的沸水中,然后待其自然降至室温。

3. 一种shRNA的表达载体,其特征在于,所述表达载体为慢病毒干扰载体,其中包含shRNA表达框、绿色荧光蛋白表达框;所述shRNA表达框包含shRNA表达启动子,采用如权利要求2所述的shRNA的制备方法制备得到的shRNA,以及致死基因ccdB;所述绿色荧光蛋白表达框包含EF1a启动子和copGFP绿色荧光蛋白表达基因;

所述shRNA表达启动子为启动子U6、H1或7SK之一。

4. 一种如权利要求3所述的shRNA的表达载体的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:
制备载体骨架;

在载体骨架上插入shRNA表达启动子;

在载体骨架上插入ccdB序列;

在载体骨架上插入如权利要求2所述的shRNA的制备方法制备得到的shRNA。

5. 根据权利要求4所述的shRNA的表达载体的制备方法,其特征在于,制备载体骨架的过程如下:

以pCDF1-MCS2-EF1a-copGFP载体为模板,PCR扩增得到EF1a-copGFP片段,用MluI和AfeI双酶切PCR产物,然后插入到同样经过MluI和AfeI双酶切的慢病毒载体pLVX-Puro上,得到载体骨架pLVX-EF1a-copGFP-PGK-Puro;

其中,用于扩增EF1a-copGFP的寡核苷酸引物为EF1a-copGFP-F: 5'-CGACGCGTCTGAAGGATCTGCGATCGCTCCG-3'; EF1a-copGFP-R: 5'-AGCGCTTTAGCGAGATCCGGTGGAGCCGG-3'。

6. 根据权利要求5所述的shRNA的表达载体的制备方法,其特征在于,插入shRNA表达启动子的过程如下:

用ClaI和XhoI双酶切载体pLVX-EF1a-copGFP-PGK-Puro,去磷酸后电泳回收;扩增shRNA表达启动子的PCR产物,用ClaI和XhoI双酶切扩增产物;将shRNA表达启动子连接到pLVX-EF1a-copGFP-Puro线性载体的相应位点上,转入大肠杆菌感受态细胞中,涂LB平板,培养过夜,鉴定后得到的载体为pLVX-hU6/H1/7SK-EF1a-copGFP-PGK-Puro。

7. 根据权利要求6所述的shRNA的表达载体的制备方法,其特征在于,插入ccdB序列的过程如下:

以pLenti6载体为模板,扩增出含有大肠杆菌ccdB致死基因的片段,将扩增得到的ccdB基因片段用XhoI和MluI双酶切后,与经过XhoI和MluI双酶切的pLVX-hU6/H1/7SK-EF1a-copGFP-PGK-Puro线性载体连接,转入大肠杆菌感受态细胞中,涂LB/amp平板,培养过夜,进

行菌落PCR及酶切鉴定,得到载体pLVX-hU6/H1/7SK-ccdB-EF1a-copGFP-PGK-Puro。

8. 根据权利要求7所述的shRNA的表达载体的制备方法,其特征在于,插入shRNA的过程如下:

用BsmBI单酶切shRNA慢病毒干扰载体pLVX-hU6/H1/7SK-ccdB-EF1a-copGFP-PGK-Puro,得到pLVX-hU6/H1/7SK-EF1a-copGFP-PGK-Puro载体骨架;将退火合成的shRNA序列与pLVX-hU6/H1/7SK-EF1a-copGFP-PGK-Puro载体骨架通过相应的酶切位点连接;转入大肠杆菌感受态细胞stable3,涂LB-Amp平板培养过夜,随机挑取一个单克隆进行测序,构建得到表达shRNA的慢病毒干扰载体pLVX-hU6/H1/7SK-shRNA-EF1a-copGFP-PGK-Puro。

9. 根据权利要求6所述的shRNA的表达载体的制备方法,其特征在于,用于扩增hU6启动子的寡核苷酸引物为hU6-ClaI-F:5'-CCATCGATGGAAGGTCGGCAGGAAGAGG-3',hU6-XhoI-R:5'-CCGCTCGAGCGGTCGTCCTTTCCACAA-3';用于扩增H1启动子的寡核苷酸引物为H1-ClaI-F:5'-CCATCGATGGCCGAACGCTGACGTCATCAAC-3',H1-XhoI-R:5'-CCGCTCGAGCGGGAGTGGTCTCATACAG-3';用于扩增7SK启动子的寡核苷酸引物为7SK-ClaI-F:5'-CCATCGATGGCTGCAGTATTAGCATG-3',7SK-XhoI-R:5'-CCGCTCGAGCGGTGGGTCCGCCGCGTGTTCG-3'。

10. 根据权利要求4~9任一所述的shRNA的表达载体的制备方法,其特征在于,shRNA的目的基因为HSPA9,REDD1或SRC。

用于制备shRNA的引物及制备方法、载体及构建方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,尤其涉及一种用于制备shRNA的引物及制备方法、载体及构建方法。

背景技术

[0002] RNA干扰(RNA interference, RNAi)是一种普遍存在于生物体内、序列特异性强、转录后水平的基因沉默机制。目前,采用RNAi技术快速实现生物体内基因沉默已经成为动植物基因功能研究中一种有力的实验工具。

[0003] 由于动植物体内各自的特点及其RNAi作用机制的差异,当今用于动植物基因功能研究的RNAi的作用分子也有所不同。目前,应用较为普遍的发挥干扰作用的小RNA分子在动物体内主要有siRNA(small interfering RNA)、shRNA(short hairpin RNA)以及amiRNA(artificial microRNA)等。而植物体内主要有hpRNA(hairpin RNA)和amiRNA。最早采用RNAi技术研究生物体内基因功能的方法是将体外制备好单链siRNA分子直接注入线虫体内,虽然后来在动植物的基因功能研究中被沿用,但是这种方法的干扰时效性相对较短,为达到有效干扰而提高siRNA浓度又往往有细胞毒性。现在的RNAi技术采用的方法多为构建一个特定的RNAi表达载体,该载体导入动植物细胞后能由RNA聚合酶II型或III型启动子转录出相应的shRNA、amiRNA以及hpRNA(hairpin RNA)等,进而干扰与其靶基因的表达(Plant Cell.2006.May;18(5):1121-33.)。

[0004] 目前,普遍用于构建shRNA干扰表达载体的方法主要有两种:(I)寡核苷酸退火法,普遍做法是化学合成两条特定的寡核苷酸引物,在离体条件下退火形成两端带有黏性末端的双链shRNA片段,然后与经过酶切处理同样带有黏性末端的载体连接转化,得到含有shRNA干扰表达单元的重组质粒。(II)PCR扩增法:设计一对扩增控制shRNA表达启动子的PCR引物,其中正向引物与启动子特异性匹配,反向引物5'末端额外加上针对目的基因的干扰靶序列,将PCR产物克隆到相应的载体上,得到shRNA干扰表达载体(Physiol Genomics.2007Nov14;31(3):554-62.)。

[0005] 以上两种方法虽然都能构建各种RNA干扰表达载体,但也存在不足之处,主要表现在以下几个方面:

[0006] 一、引物设计过长,容易产生突变,克隆效率低。方法(I)中使用的寡核苷酸单链通常为60-100nt,合成这种长度的寡核苷酸单链不仅合成费用大幅提高,而且碱基合成过程中的错误率也会明显增加,进而增加了重组质粒筛选的工作量,费时费力。二、操作繁琐,不适合高通量构建RNA干扰载体。

[0007] 以上两类制备shRNA序列的方法,对于构建单个或少数RNA干扰载体虽然可行,但是对于大批量构建RNA干扰载体来讲,工作量大,操作繁琐,效率低下。方法(II)需要在PCR引物中加上针对靶基因的干扰序列,通常需要长引物(通常大于70nt)或者多轮的PCR扩增反应,扩增后的PCR产物也需要经过复杂的双酶切、回收等步骤,因外源片段一般都较小(200bp以内),回收纯化效率较低,而且载体与非目的片段连接或自连的几率很高,使后续

的筛选鉴定过程复杂化,致使工作量增加。

[0008] 因此,现有技术还有待于改进和发展。

发明内容

[0009] 鉴于上述现有技术的不足,本发明的目的在于提供一种用于制备shRNA的引物及制备方法、载体及构建方法,本发明所提供的shRNA制备方法可快速、高效、低成本、高通量制备高保真性shRNA,尤其适合于大规模地构建动植物RNA干扰(RNA interference, RNAi)表达载体,用于动植物基因的功能研究,旨在解决现有技术中引物设计过长、克隆效率低、操作繁琐等问题。

[0010] 一种用于制备shRNA的引物,其中,包括三条引物P1、P2、P3;引物P1长度为34nt,从5'端开始,依次为突出的粘性末端ACCG,21nt的siRNA正向序列,loop序列,以及与siRNA正向序列3'末端3个碱基反向互补的碱基;引物P2,5'端4个碱基由ACCG改变为AAAA,其余序列与P1相同;引物P3是siRNA正向序列5'末端18nt序列的反向互补序列;其中,loop序列为CTCGAG或TTCAAGAGA。

[0011] 一种shRNA的制备方法,其中,采用如上所述的三条引物退火合成双链shRNA,包括以下步骤:

[0012] 针对目的基因设计和合成引物后,将引物P1、P2和P3分别稀释为10 μ M的浓度后,以1:1:2的比例混合,再加入占总体积1/10的1M NaCl进行退火;

[0013] 将上述混合充分的试剂置于已停止加热的沸水中,然后待其自然降至室温。

[0014] 一种shRNA的表达载体,其中,所述表达载体为慢病毒干扰载体,其中包含shRNA表达框、绿色荧光蛋白表达框;所述shRNA表达框包含shRNA表达启动子,采用如上所述的shRNA的制备方法制备得到的shRNA,以及致死基因ccdB;所述绿色荧光蛋白表达框包含EF1a启动子和copGFP绿色荧光蛋白表达基因;

[0015] 所述shRNA表达启动子为启动子U6、H1或7SK之一。

[0016] 一种如上所述的shRNA的表达载体的制备方法,其中,包括以下步骤:

[0017] 制备载体骨架;

[0018] 在载体骨架上插入shRNA表达启动子;

[0019] 在载体骨架上插入ccdB序列;

[0020] 在载体骨架上插入如权利要求2所述的shRNA的制备方法制备得到的shRNA。

[0021] 所述的shRNA的表达载体的制备方法,其中,制备载体骨架的过程如下:

[0022] 以pCDF1-MCS2-EF1-copGFP载体为模板,PCR扩增得到EF1a-copGFP片段,用MluI和AfeI双酶切PCR产物,然后插入到同样经过MluI和AfeI双酶切的慢病毒载体pLVX-Puro上,得到载体骨架pLVX-EF1a-copGFP-PGK-Puro;

[0023] 其中,用于扩增EF1a-copGFP的寡核苷酸引物为EF1a-copGFP-F:5'-CGACGCGTCGAAGGATCTGCGATCGCTCCG-3';EF1a-copGFP-R:5'-AGCGCTTTAGCGAGATCCGGTGGAGCCGG-3'。

[0024] 所述的shRNA的表达载体的制备方法,其中,插入shRNA表达启动子的过程如下:

[0025] 用ClaI和XhoI双酶切载体pLVX-EF1a-copGFP-PGK-Puro,去磷酸后电泳回收;扩增shRNA表达启动子的PCR产物,用ClaI和XhoI双酶切扩增产物;将shRNA表达启动子连接到

pLVX-EF1a-copGFP-Puro线性载体的相应位点上,转入大肠杆菌感受态细胞中,涂LB平板,培养过夜,鉴定后得到的载体为pLVX-hU6/H1/7SK-EF1a-copGFP-PGK-Puro。

[0026] 所述的shRNA的表达载体的制备方法,其中,插入ccdB序列的过程如下:

[0027] 以pLenti6载体为模板,扩增出含有大肠杆菌ccdB致死基因的片段,将扩增的到的ccdB基因片段用XhoI和Mlu I双酶切后,与经过XhoI和Mlu I双酶切的pLVX-hU6/H1/7SK-EF1a-copGFP-PGK-Puro线性载体连接,转入大肠杆菌感受态细胞中,涂LB/amp平板,培养过夜,进行菌落PCR及酶切鉴定,得到载体pLVX-hU6/H1/7SK-ccdB-EF1a-copGFP-PGK-Puro。

[0028] 所述的shRNA的表达载体的制备方法,其中,插入shRNA的过程如下:

[0029] 用BsmBI单酶切shRNA慢病毒干扰载体pLVX-hU6/H1/7SK-ccdB-EF1a-copGFP-PGK-Puro,得到pLVX-hU6/H1/7SK-EF1a-copGFP-PGK-Puro载体骨架;将退火合成的shRNA序列与pLVX-hU6/H1/7SK-EF1a-copGFP-PGK-Puro载体骨架通过相应的酶切位点连接;转入大肠杆菌感受态细胞stable3,涂LB-Amp平板培养过夜,随机挑取一个单克隆进行测序,构建得到表达shRNA的慢病毒干扰载体pLVX-hU6/H1/7SK-shRNA-EF1a-copGFP-PGK-Puro。

[0030] 所述的shRNA的表达载体的制备方法,其中,用于扩增hU6启动子的寡核苷酸引物为hU6-ClaI-F:5'-CCATCGATGGAA GGTCGGGCAGGAAGAGG-3',hU6-XhoI-R:5'-CCGCTCGAGCGGT CGTCCTTTCCACAA-3';用于扩增H1启动子的寡核苷酸引物为H1-ClaI-F:5'-CCATCGATGGCCGAACGCTGACGT CATCAAC-3',H1-XhoI-R:5'-CCGCTCGAGCGGGAGTGGTCTCATACAG-3';用于扩增7SK启动子的寡核苷酸引物为7SK-ClaI-F:5'-CCATCGATGGCTGCAGTATTTAGCATG-3',7SK-XhoI-R:5'-CCGCTCGAGCGGTGGTCCGCCGCTGTTCG-3'。

[0031] 所述的shRNA的表达载体的制备方法,其中,shRNA基因为HSPA9,REDD1和SRC。

[0032] 有益效果:本发明中公开了一种用于制备shRNA的引物及制备方法、载体及构建方法。与现有技术相比,本发明具有一定明显优势:

[0033] 1.本发明用于制备shRNA的三条引物长度均不超过35nt,这种设计可有效避免长引物合成过程中发生的碱基错误,提高了shRNA的保真性;

[0034] 2.本发明三引物退火法制备shRNA的引物P1、P2和P3的碱基数量总共为86nt,比传统用于退火合成shRNA的两条引物(每条至少50nt)的碱基数量少,因此本方法成本更低;

[0035] 3.本发明三引物退火合成shRNA的方法操作简单快捷,退火过程使用的试剂廉价、易制备,适用于高通量制备shRNA;

[0036] 4.本发明使用三引物退火制备的shRNA构建慢病毒载体的方法,经大量实践证明,shRNA序列的突变率很低,任意挑取一个单克隆均含有正确shRNA序列,可省却测序鉴定,直接进行慢病毒包装。

附图说明

[0037] 图1为本发明三引物退火法制备shRNA的结构示意图(以shHSPA9为例)。

[0038] 图2为本发明实施例2中使用三引物退火法制备的shHSPA9的慢病毒干扰载体随机挑取一个单克隆的测序结果。

[0039] 图3为本发明实施例2中使用三引物退火法制备的shREDD1的慢病毒干扰载体随机挑取一个单克隆的测序结果。

[0040] 图4为本发明实施例2中使用三引物退火法制备的shSRC的慢病毒干扰载体随机挑取一个单克隆的测序结果。

[0041] 图5为本发明实施例4中shHSPA9对目的基因的干扰效果的蛋白电泳图。

[0042] 图6为本发明实施例4中目的基因HSPA9的相对表达量。

[0043] 图7为本发明实施例4中shREDD1对目的基因的干扰效果的蛋白电泳图。

[0044] 图8为本发明实施例4中目的基因REDD1的相对表达量。

[0045] 图9为本发明实施例4中shSRC对目的基因的干扰效果的蛋白电泳图。

[0046] 图10为本发明实施例4中目的基因SRC的相对表达量。

具体实施方式

[0047] 本发明提供一种用于制备shRNA的引物及制备方法、载体及构建方法,为使本发明的目的、技术方案及效果更加清楚、明确,以下对本发明进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0048] 本发明所提供的用于制备shRNA的引物,由三条引物组成,采用三条引物的设计,可以有助于提高shRNA退火产物的序列准确度和保真性,可以有效减少链内互补或其他碱基错配的情况。

[0049] 具体地,所述三条引物为针对目的基因siRNA序列所设计的,所述三条引物分别命名为P1,P2,P3,结构分别如下:

[0050] P1:5'-ACCG-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-loop-nnn-3'

[0051] P2:5'-AAAA-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-loop-nnn-3'

[0052] P3:5'-nnnnnnnnnnnnnnnnnnnn-3'

[0053] 其中,引物P1长度为34nt,从5'端开始,依次为突出的粘性末端ACCG,siRNA正向序列(21nt),loop序列,以及与siRNA正向序列3'末端3个碱基反向互补的碱基。引物P2与P1序列结构相似,除了其5'端4个碱基由ACCG改变为AAAA,其余序列与P1相同。P3是siRNA正向序列5'末端18nt序列的反向互补序列。loop序列为CTCGAG或TTCAAGAGA。

[0054] 本发明中提供所述shRNA的制备方法,采用如上所述的三条引物退火合成双链shRNA,具体包括以下步骤:

[0055] 针对目的基因设计和合成引物后,将引物P1、P2和P3分别稀释为10 μ M的浓度后,以1:1:2的比例混合,再加入占总体积1/10的1M NaCl进行退火;

[0056] 将上述混合充分的试剂置于已停止加热的沸水中,然后待其自然降至室温(4~6h)。

[0057] 结合图1所示,以shHSPA9为例,在退火过程中,P1和P2通过NNN-Loop-nnn互补区域结合,当Loop为CTCGAG时,NNN-Loop-nnn互补结合的碱基数为12nt;当Loop为TTCAAGAGA时NNN-Loop-nnn互补结合的碱基数为15nt。P3分别与P1和P2上除NNN-Loop-nnn以外的序列互补结合。最终形成的双链shRNA序列的两端分别有四个碱基突出,正义链5'端突出碱基为ACCG,反义链5'端突出碱基为AAAA,用于后续RNAi慢病毒载体的构建。

[0058] 采用本发明三引物退火法,仅需要合成3条长度小于40nt的寡核苷酸引物序列,不需要PCR仪即可进行退火程序,退火产物能形成突出的黏性末端,可与有相应粘性末端的线性载体连接,得到RNAi重组质粒。该方法能简便快捷,经济直观地制备高保真性的shRNA退

火产物,尤其适合于大批量构建动植物RNA干扰(RNA interference, RNAi)表达载体。

[0059] 本发明中还提供一种shRNA的表达载体,所述表达载体为慢病毒干扰载体,其中包含shRNA表达框、绿色荧光蛋白表达框;所述shRNA表达框包含启动子U6(或H1,或7SK),采用上述方法制备得到的shRNA,以及致死基因ccdB;所述绿色荧光蛋白表达框包含EF1a启动子和copGFP绿色荧光蛋白表达基因。

[0060] 本发明三引物退火法可以快捷、低成本、高质量制备双链shRNA序列的三引物退火合成法,使用这种设计结构和退火体系制备的shRNA可以灵活运用在构建各种shRNA表达载体中。本发明所提供的shRNA的表达载体,利用致死基因ccdB在大肠杆菌表达中的特性,省却PCR鉴定或测序鉴定的步骤,从而快速构建shRNA文库。

[0061] 优选地,所述的ccdB致死基因的两端分别带有限制性酶切位点BsmBI,识别5'-CGTCTC(N1)-3'序列。

[0062] 本发明中还提供一种shRNA的表达载体的构建方法,具体包括以下步骤:

[0063] (1) 制备载体骨架pLVX-EF1-copGFP-Puro:

[0064] 以pCDF1-MCS2-EF1-copGFP(SBI公司)载体为模板,PCR扩增得到EF1a-copGFP片段(引物序列见表1,SEQ NO.1~2),用MluI和AfeI双酶切PCR产物,然后插入到同样经过MluI和AfeI双酶切的慢病毒载体pLVX-Puro(Clontech公司)上,得到载体骨架pLVX-EF1a-copGFP-PGK-Puro。

[0065] 表1 用于扩增EF1a-copGFP的寡核苷酸引物

[0066]

引物名称	引物序列
EF1a-copGFP-F	CGACGCGTCGAAGGATCTGCGATCGCTCCG
EF1a-copGFP-R	AGCGCTTTAGCGAGATCCGGTGGAGCCGG

[0067] (2) 插入shRNA表达启动子:

[0068] 用ClaI和XhoI双酶切步骤(1)得到的载体pLVX-EF1a-copGFP-PGK-Puro,去磷酸后电泳回收;用ClaI和XhoI双酶切扩增hU6、H1或7SK启动子的PCR产物后(引物序列见表2,SEQ NO.3~8),连接到pLVX-EF1a-copGFP-Puro载体的相应位点上,转入大肠杆菌感受态细胞中,涂LB平板,培养过夜,鉴定后得到的载体为pLVX-hU6/H1/7SK-EF1a-copGFP-PGK-Puro。

[0069] 表2 用于扩增hU6启动子的寡核苷酸引物(H1和7SK)

[0070]

引物名称	引物序列
hU6-ClaI-F	CCATCGATGGAAGGTCGGGCAGGAAGAGG
hU6-XhoI-R	CCGCTCGAGCGGTCTCCTTTCCACAA
H1-ClaI-F	CCATCGATGGCCGAACGCTGACGTCATCAAC
H1-XhoI-R	CCGCTCGAGCGGGAGTGGTCTCATACAG
7SK-ClaI-F	CCATCGATGGCTGCAGTATTTAGCATG
7SK-XhoI-R	CCGCTCGAGCGGTGGGTCCGCCGCGTGTTCG

[0071] (3) 插入ccdB序列得到三引物退火shRNA慢病毒干扰载体:

[0072] 以pLenti6载体(Invitrogen公司)为模板,扩增出含有大肠杆菌ccdB致死基因的片段,将扩增的到的ccdB用XhoI和Mlu I双酶切后,与经过XhoI和Mlu I双酶切的pLVX-hU6/

H1/7SK-EF1a-copGFP-PGK-Puro载体连接,转入大肠杆菌感受态细胞中,涂LB/amp平板,培养过夜,进行菌落PCR及酶切鉴定,得到用于构建三引物退火shRNA的慢病毒干扰载体,载体骨架是pLVX-hU6/H1/7SK-ccdB-EF1a-copGFP-PGK-Puro。

[0073] (4) 插入shRNA:

[0074] 用BsmBI单酶切shRNA慢病毒干扰载体pLVX-hU6/H1/7SK-ccdB-EF1a-copGFP-PGK-Puro,得到pLVX-hU6/H1/7SK-EF1a-copGFP-PGK-Puro载体骨架,将退火合成的shRNA序列与pLVX-hU6/H1/7SK-EF1a-copGFP-PGK-Puro载体骨架通过相应的酶切位点连接,转入大肠杆菌感受态细胞stable3,涂LB-Amp平板37℃培养过夜,随机挑取一个单克隆进行测序,构建得到可以表达shRNA的慢病毒干扰载体pLVX-hU6/H1/7SK-shRNA-EF1a-copGFP-PGK-Puro。

[0075] 载体pLVX-hU6/H1/7SK-ccdB-EF1a-copGFP-PGK-Puro经BsmBI酶切之后,载体骨架形成的粘性末端分别为5'-CGGT-3'和5'-TTTT-3',可以分别与shRNA退火之后的粘性末端5'-ACCG-3'和5'-AAAA-3'互补配对,经连接后转入大肠杆菌感受态细胞,涂LB平板,37℃培养过夜,得到相应的shRNA慢病毒干扰载体pLVX-hU6/H1/7SK-shRNA-EF1a-copGFP-PGK-Puro。

[0076] 在上述方案中,本发明提供了一种可以快速、低成本、高质量制备双链shRNA序列的三引物退火合成法,使用这种设计结构和退火体系制备的shRNA可以灵活运用在构建各种shRNA表达载体中。本发明还利用致死基因ccdB在大肠杆菌表达中的特性,省却PCR鉴定或测序鉴定的步骤,从而快速构建shRNA文库。

[0077] 以下通过具体的实施例对本发明作进一步说明。

[0078] 本发明实施例所用的实验材料来源见表3。

[0079] 表3 实验材料及来源

[0080]

实验材料	公司
慢病毒载体pLVX-puro	Clontech公司
pLenti6	Invitrogen公司
pCDF1-MCS2-EF1-copGFP	SBI公司
DMEM	Hyclone公司
胎牛血清FBS	Gibco公司
限制性内切酶	NEB公司
T4DNA连接酶	Fermentas公司
Endo-Free质粒提取试剂盒	Omega公司
A549细胞	American Type Culture Collection
293T细胞	American Type Culture Collection
HSPA9抗体	翰林抗体公司
REDD1抗体	武汉三鹰公司
SRC抗体	翰林抗体公司
β-actin一抗	Invitrogen公司

[0081] 实施例1:构建含有ccdB的shRNA慢病毒干扰载体

[0082] (1) 制备载体骨架pLVX-EF1a-copGFP-Puro:

[0083] 以pCDF1-MCS2-EF1-copGFP (SBI公司) 载体为模板,PCR扩增得到EF1a-copGFP片段(引物序列见表1),用MluI和AfeI双酶切PCR产物,然后插入到同样经过MluI和AfeI双酶切的慢病毒载体pLVX-Puro (Clontech公司) 上,得到载体骨架pLVX-EF1a-copGFP-PGK-Puro。

[0084] (2) 插入shRNA表达启动子:

[0085] 用ClaI和XhoI双酶切步骤(1)得到的载体pLVX-EF1a-copGFP-PGK-Puro,去磷酸后电泳回收;用ClaI和XhoI双酶切扩增hU6启动子的PCR产物后(引物序列见表2),连接到pLVX-EF1a-copGFP-Puro载体的相应位点上,转入大肠杆菌感受态细胞中,涂LB平板,培养过夜,鉴定后得到的载体为pLVX-hU6-EF1a-copGFP-PGK-Puro。

[0086] (3) 插入ccdB序列得到三引物退火shRNA慢病毒干扰载体:

[0087] 以pLenti6载体 (Invitrogen公司) 为模板,扩增出含有大肠杆菌ccdB致死基因的片段,将扩增的到的ccdB用XhoI和Mlu I双酶切后,与经过XhoI和Mlu I双酶切的pLVX-hU6-EF1a-copGFP-PGK-Puro载体连接,转入大肠杆菌感受态细胞中,涂LB/amp平板,培养过夜,进行菌落PCR及酶切鉴定,得到用于构建三引物退火shRNA的慢病毒干扰载体,载体骨架是pLVX-hU6-ccdB-EF1a-copGFP-PGK-Puro。

[0088] 实施例2:利用本发明三引物退火法制备基因HSPA9,REDD1和SRC的shRNA

[0089] 本实施例首先分别针对目的基因HSPA9,REDD1和SRC的siRNA序列各设计3条引物(见表4,SEQ NO.12~23)。其中,HSPA9的siRNA序列是CGTGCTCAATTTGAAGGGATT (SEQ NO.9),REDD1的siRNA序列是TGATGCCTAGCCAGTTGGTAA (SEQ NO.10),SRC的siRNA序列是GACAGACCTGTCCTTCAAGAA (SEQ NO.11),再设计一组不相关序列作为上述基因的shRNA沉默效果对照(shcontrol)。

[0090] 表4 用于三引物退火合成shRNA的寡核苷酸引物

[0091]

引物名称	引物序列
shHSPA9-P1	ACCGCGTGCTCAATTTGAAGGGATTCTCGAGAAT
shHSPA9-P2	AAAACGTGCTCAATTTGAAGGGATTCTCGAGAAT
shHSPA9-P3	CCCTTCAAATTGAGCACG
shREDD1-P1	ACCGTGATGCCTAGCCAGTTGGTAACTCGAGTTA
shREDD1-P2	AAAATGATGCCTAGCCAGTTGGTAACTCGAGTTA
shREDD1-P3	CCAACTGGCTAGGCATCA
shSRC-P1	ACCGGACAGACCTGTCCTTCAAGAACTCGAGTTC
shSRC-P2	AAAAGACAGACCTGTCCTTCAAGAACTCGAGTTC
shSRC-P3	TTGAAGGACAGGTCTGTC
shcontrol-P1	ACCGCCTAAGGTTAAGTCGCCCTCACTCGAGTGA
shcontrol-P2	AAAACCTAAGGTTAAGTCGCCCTCACTCGAGTGA
shcontrol-P3	GGGCGACTTAACCTTAGG

[0092] 根据上述三引物退火法的设计方案设计并合成shRNA引物后,分别将目的基因的3条寡核苷酸引物按照表5的体系进行加样,充分混合后,置于已停止加热的沸水中,静置待其降至室温(4~6h)。

[0093] 表5 三引物shRNA的退火合成体系

[0094]

试剂	用量 (μL)
----	---------

[0095]

shRNA-P1 (10μM)	5
shRNA-P2 (10μM)	5
shRNA-P3 (10μM)	10
1M NaCl	3
ddH ₂ O	7
Total	30

[0096] 实施例3:构建基因HSPA9, REDD1和SRC的shRNA慢病毒干扰载体

[0097] 用BsmBI单酶切shRNA慢病毒干扰载体pLVX-U6-ccdB-EF1a-copGFP-PGK-Puro,得到9.0kb的pLVX-U6-EF1a-copGFP-PGK-Puro载体骨架,将实施例2中退火合成的shHSPA9, shREDD1和shSRC分别与pLVX-U6-EF1a-copGFP-PGK-Puro载体骨架通过相应的酶切位点连接,转入大肠杆菌感受态细胞stable3,涂LB-Amp平板37℃培养过夜,随机挑取一个单克隆进行测序,测序结果如图3~5所示,分别构建得到基因HSPA9, REDD1和SRC的shRNA慢病毒干扰载体pLVX-U6-shHSPA9-EF1a-copGFP-PGK-Puro, pLVX-U6-shREDD1-EF1a-copGFP-PGK-Puro和pLVX-U6-shSRC-EF1a-copGFP-PGK-Puro。同时,以shcontrol为阴性对照,构建pLVX-U6-shcontrol-EF1a-copGFP-PGK-Puro。

[0098] 实施例4:shRNA慢病毒干扰载体对目的基因HSPA9, REDD1和SRC的沉默效果

[0099] 以实施例3制备的shRNA慢病毒干扰载体为例,进行shRNA慢病毒干扰载体对目的基因的沉默效果的实验,具体包括以下步骤:

[0100] 1.shRNA慢病毒干扰载体的慢病毒包装:

[0101] (1.1) 使用无四环素的细胞培养液培养293T细胞,转染细胞前一天接种293T细胞于100mm板(10ml无四环素DMEM),培养12~24h。

[0102] (1.2) 待细胞的密度达到80~90%,该转染体系每组需要的质粒混合液为17.1μg包装质粒(Addgene公司)和6.9μg pLVX-U6-shRNA (HSPA9/REDD1/SRC)-EF1a-copGFP-PGK-Puro的shRNA慢病毒重组质粒,将上述质粒充分混匀后,补加NaCl (150mM)使总体积为500μl;每组另加入转染试剂63μl PEI和437μl NaCl (150mM)。实验以不相关序列的shcontrol慢病毒载体为阴性对照。

[0103] (1.3) 将转染试剂加入到DNA溶液中,混合均匀,室温静置10min。

[0104] (1.4) 将体积为1mL的混合液均匀缓缓滴加到100mm的培养皿中,37℃培养箱培养8~12h后,换新鲜的无四环素细胞培养液;为了提高病毒的滴度,换液时可以改为8ml培养液。

[0105] (1.5) 继续培养48h后收集上清,更换新鲜的无四环素培养液,3500rpm离心10min,收集的上清液,得到相应的慢病毒液,并按照0.7~1.5ml/管分装到灭菌的EP管中。

[0106] (1.6) 培养到72h后以同样方法收集和分装病毒上清液。

[0107] 2.shRNA慢病毒感染A549细胞系:

[0108] (2.1) 将A549细胞种于6孔板,细胞密度为 1.5×10^5 个细胞/孔。

[0109] (2.2) 培养12~24h后,用500μl DMEM+500μl shRNA慢病毒液(含终浓度为10μg/μl

的Polybrene)对A549细胞进行病毒感染。以不相关序列的shcontrol慢病毒载体作为阴性对照。

[0110] (2.3) 感染病毒24h后换新鲜培养液。

[0111] (2.4) 细胞感染病毒72h后,用荧光显微镜观察绿色荧光蛋白的表达,并加入终浓度为 $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的嘌呤霉素(puromycin)培养液继续培养细胞,直至筛选出稳定感染shRNA慢病毒的细胞系。

[0112] 3. Western blot检测蛋白质的表达水平:

[0113] (3.1) 裂解稳定转染目的基因的shHSPA9, shREDD1, shSRC和shcontrol慢病毒的A549细胞,收集蛋白样品,进行蛋白质定量后,取 $40\mu\text{g}$ 的蛋白质样品上样,在100v恒压进行SDS-PAGE电泳。

[0114] (3.2) 转膜:200mA恒流1.5h,转膜后,将膜放置于5%脱脂奶粉封闭液中封闭1h,再用TBST将膜洗两遍。

[0115] (3.3) 加入用3%脱脂奶粉配制的ID1一抗(1:1000稀释),放置于摇床中,4℃过夜。

[0116] (3.4) 第二天用TBST将膜洗三次,每次5min,加入用3%脱脂奶粉配制的鼠的二抗(1:5000稀释),置室温杂交1h后进行显色(或化学发光自显影反应)。

[0117] 4、结果

[0118] 本实施例选取三个内源基因HSPA9, REDD1和SRC,分别针对每个基因的siRNA设计3条shRNA寡核苷酸引物,然后使用本发明三引物法退火合成双链shRNA,分别插入shRNA慢病毒干扰载体pLVX-U6-ccdB-EF1a-copGFP-PGK-Puro,针对每个基因的shRNA慢病毒载体随机挑取一个单克隆进行测序鉴定,提取质粒进行慢病毒包装;将shRNA慢病毒分别感染A549细胞,通过抗生素Puro筛选出shHSPA9, shREDD1和shSRC的A549稳转细胞系;分别提取稳转细胞系的总蛋白,用Western-Blot技术对基因HSPA9, REDD1和SRC的蛋白表达水平进行分析。结果如图5~图10所示,与对照组shcontrol相比,shHSPA9, shREDD1和shSRC对其目的基因均有明显的沉默效果,而相应shRNA慢病毒干扰载体的单克隆测序结果显示shRNA序列完整无突变,说明使用本发明设计的shRNA引物及其退火方法合成的shRNA保真性高,后续使用可省去shRNA慢病毒干扰载体的测序步骤,直接挑取任意一个单克隆进行下游实验,适用于大批量构建动植物RNA干扰载体。

[0119] 应当理解的是,本发明的应用不限于上述的举例,对本领域普通技术人员来说,可以根据上述说明加以改进或变换,所有这些改进和变换都应属于本发明所附权利要求的保护范围。

SEQUENCE LISTING

<110>	深圳大学	
<120>	用于制备 shRNA 的引物及制备方法、载体及构建方法	
<160>	23	
<170>	PatentIn version 3.5	
<210>	1	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用于扩增 EF1a-copGFP 的寡核苷酸引物序列 EF1a-copGFP-F	
<400>	1	
	cgacgcgtcg aaggatctgc gatcgctcgg	30
<210>	2	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用于扩增 EF1a-copGFP 的寡核苷酸引物序列 EF1a-copGFP-R	
<400>	2	
	agcgcttttag cgagatccgg tggagccgg	29
<210>	3	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
[0120] <220>		
<223>	用于扩增 U6 启动子的寡核苷酸引物序列 hU6-ClaI-F	
<400>	3	
	ccatcgatgg aaggtcgggc aggaagagg	29
<210>	4	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用于扩增 U6 启动子的寡核苷酸引物序列 hU6-XhoI-R	
<400>	4	
	ccgctcgagc ggtcgtcctt tcacaa	27
<210>	5	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用于扩增 H1 启动子的寡核苷酸引物序列 H1-ClaI-F	
<400>	5	
	ccatcgatgg ccgaacgctg acgtcatcaa c	31
<210>	6	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用于扩增 H1 启动子的寡核苷酸引物序列 H1-XhoI -R	

	<400> 6	
	ccgctcgagc gggagtggtc tcatacag	28
	<210> 7	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于扩增 7SK 启动子的寡核苷酸引物序列 7SK-ClaI-F	
	<400> 7	
	ccatcgatgg ctgcagtatt tagcatg	27
	<210> 8	
	<211> 31	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于扩增 7SK 启动子的寡核苷酸引物序列 7SK- XhoI-R	
	<400> 8	
	ccgctcgagc ggtgggtccg ccgcgtgttc g	31
	<210> 9	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> HSPA9 的 siRNA 序列	
	<400> 9	
[0121]	cgtgctcaat ttgaagggat t	21
	<210> 10	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> REDD1 的 siRNA 序列	
	<400> 10	
	tgatgcctag ccagttggta a	21
	<210> 11	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> SRC 的 siRNA 序列	
	<400> 11	
	gacagacctg tccttcaaga a	21
	<210> 12	
	<211> 34	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于三引物退火合成 shRNA 的寡核苷酸引物 shHSPA9-P1	
	<400> 12	
	accgcgtgct caatttgaag ggattctcga gaat	34
	<210> 13	
	<211> 34	

	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于三引物退火合成 shRNA 的寡核苷酸引物 shHSPA9-P2	
	<400> 13	
	aaaacgtgct caatttgaag ggattctcga gaat	34
	<210> 14	
	<211> 18	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于三引物退火合成 shRNA 的寡核苷酸引物 shHSPA9-P3	
	<400> 14	
	cccttcaaat tgagcacg	18
	<210> 15	
	<211> 34	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于三引物退火合成 shRNA 的寡核苷酸引物 shREDD1-P1	
	<400> 15	
	accgtgatgc ctagccagtt ggtaactcga gtta	34
	<210> 16	
	<211> 34	
	<212> RNA	
[0122]	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于三引物退火合成 shRNA 的寡核苷酸引物 shREDD1-P2	
	<400> 16	
	aaaatgatgc ctagccagtt ggtaactcga gtta	34
	<210> 17	
	<211> 18	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于三引物退火合成 shRNA 的寡核苷酸引物 shREDD1-P3	
	<400> 17	
	ccaactggct aggcatca	18
	<210> 18	
	<211> 34	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于三引物退火合成 shRNA 的寡核苷酸引物 shSRC-P1	
	<400> 18	
	accggacaga cctgtccttc aagaactcga gttc	34
	<210> 19	
	<211> 34	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于三引物退火合成 shRNA 的寡核苷酸引物 shSRC-P2	

	<400> 19 aaaagacaga cctgtccttc aagaactega gttc	34
	<210> 20	
	<211> 18	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于三引物退火合成 shRNA 的寡核苷酸引物 shSRC-P3	
	<400> 20 ttgaaggaca ggtctgtc	18
	<210> 21	
	<211> 34	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于三引物退火合成 shRNA 的寡核苷酸引物 shcontrol-P1	
[0123]	<400> 21 accgcctaag gttaagtcgc cctcactega gtga	34
	<210> 22	
	<211> 34	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于三引物退火合成 shRNA 的寡核苷酸引物 shcontrol-P2	
	<400> 22 aaaacctaaag gttaagtcgc cctcactega gtga	34
	<210> 23	
	<211> 18	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于三引物退火合成 shRNA 的寡核苷酸引物 shcontrol-P3	
	<400> 23 gggcgactta accttagg	18

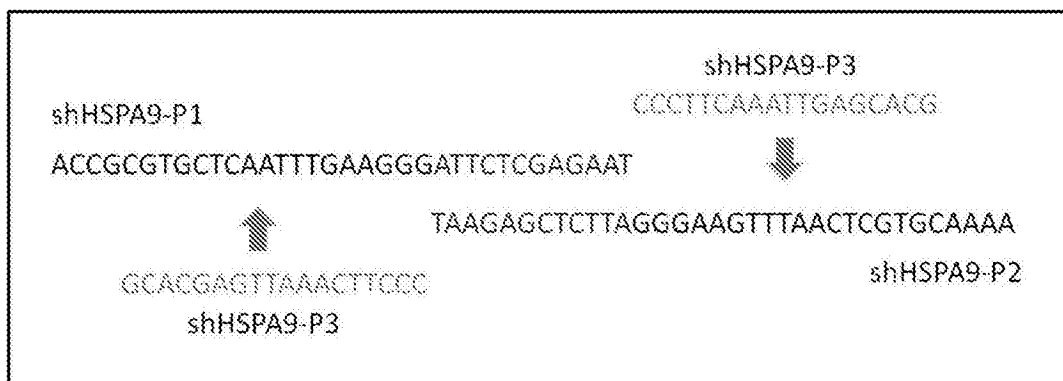


图1

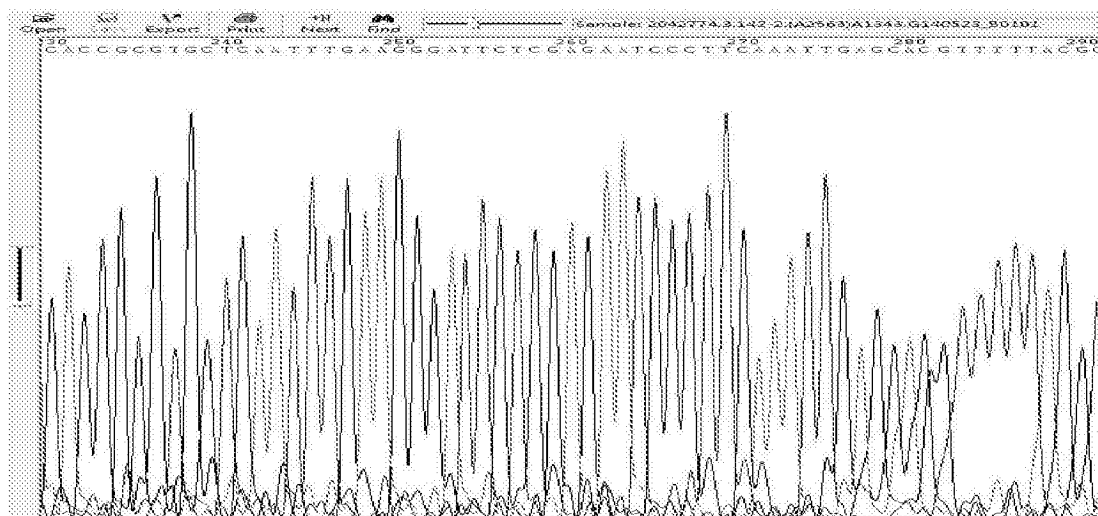


图2

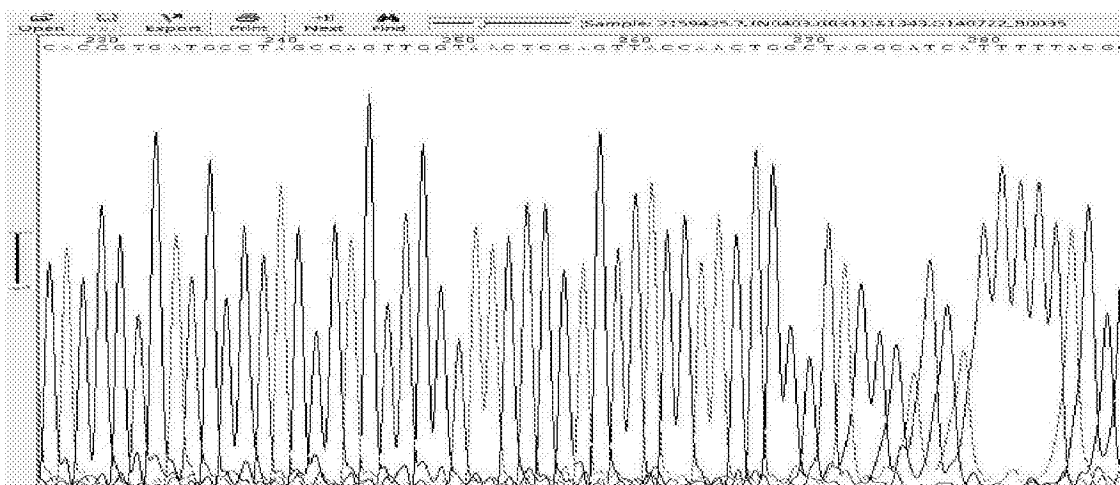


图3

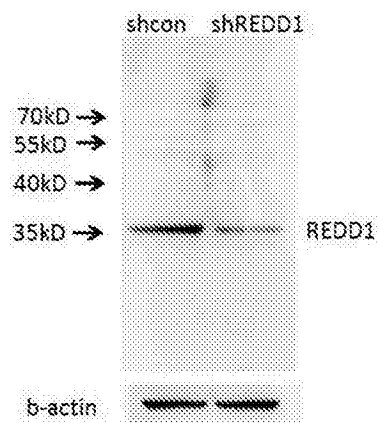


图7

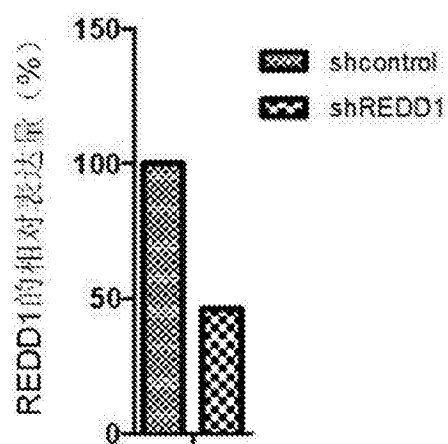


图8

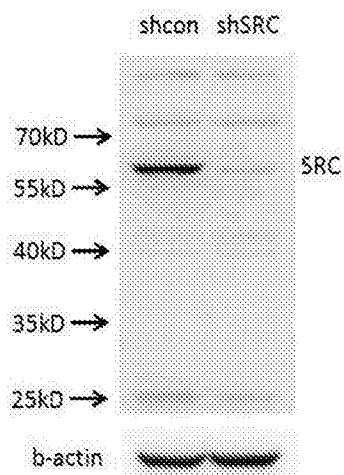


图9

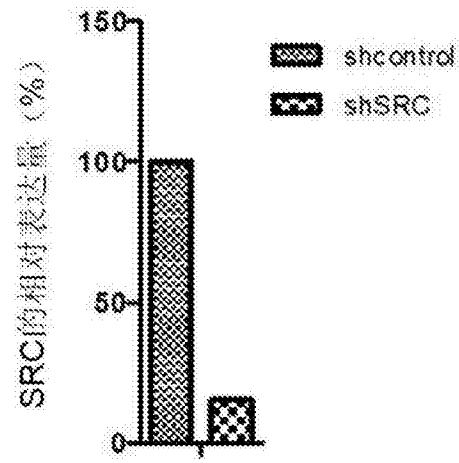


图10