



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106480098 A

(43)申请公布日 2017. 03. 08

(21)申请号 201610979293.1

(22)申请日 2016.11.08

(71)申请人 同济大学苏州研究院

地址 215100 江苏省苏州市吴中区木渎镇
金枫南路198号2号楼

(72)发明人 房健民 郭佳 蒋明 尹衍新
于丽华 蒋韵

(51)Int.Cl.

C12N 15/867(2006.01)

A61K 48/00(2006.01)

A61K 31/713(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页
序列表2页 附图2页

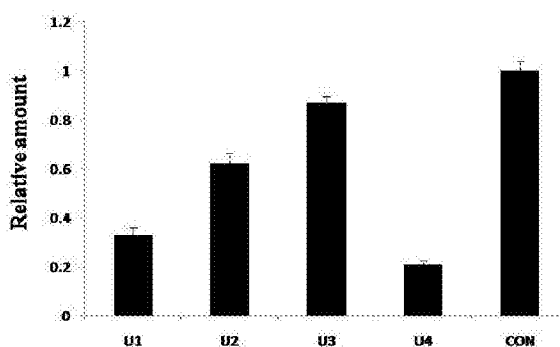
(54)发明名称

靶向VEGFA基因RNA干扰重组慢病毒载体及其构建方法

(57)摘要

本发明涉及靶向VEGFA基因RNA干扰重组慢病毒载体的构建、筛选及其用途。本发明利用RNA干扰技术,针对VEGFA基因的不同靶序列,构建了四个能在293细胞中表达siRNA的慢病毒真核表达载体,干扰慢病毒是由pLv-VEGFAshRNA、pMD2.G和pSPAX2载体共转染293T细胞培养获得。本发明靶向VEGFA基因RNA干扰重组慢病毒载体能高效特异性的抑制VEGFA基因表达,可用于制备治肿瘤相关性基因药物。

VEGFA基因mRNA表达水平



1. 一种靶向VEGFA基因的siRNA重组慢病毒表达载体, 是用于肿瘤VEGFA基因相关治疗性物质, 干扰慢病毒是由pLv-VEGFAshRNA、pMD2.G和pSPAX2载体共转染293T细胞培养获得; 其中,

所述的pLv-VEGFAshRNA重组载体是在pLv-shRNA载体的多克隆位点中连接双链DNA片段构建而得, 酶切位点是BamHI和EcoRI; 所述的双链DNA片段为以下序列中的一种:

(1) VEGFA-homo-U1寡核苷酸序列1:

正义链:

5' GATCCAGGGCAGAATCATCACGAAGTCTCGAGACTTCGTGATGATTCTGCCCTTTTTTG3'

反义链:

5' AATTCAAAAAAGGGCAGAATCATCACGAAGTCTCGAGACTTCGTGATGATTCTGCCCTG3'

(2) VEGFA-homo-U2寡核苷酸序列2:

正义链:

5' GATCCGCGCAAGAAATCCCGGTATAACTCGAGTTATACCGGGATTTCTTGCGCTTTTTTG3'

反义链:

5' AATTCAAAAAAGCGCAAGAAATCCCGGTATAACTCGAGTTATACCGGGATTTCTTGCGCG3'

(3) VEGFA-homo-U3寡核苷酸序列3:

正义链:

5' GATCCCGAACGTACTTGCAGATGTGACTCGAGTCACATCTGCAAGTACGTTCTTTTTTG3'

反义链:

5' AATTCAAAAAACGAACGTACTTGCAGATGTGACTCGAGTCACATCTGCAAGTACGTTCTGG3'

(4) VEGFA-homo-U4寡核苷酸序列4:

正义链:

5' GATCCGATAGAGCAAGACAAGAAACTCGAGTTTCTTGTCTTGCTCTATCTTTTTTG3'

反义链:

5' AATTCAAAAAAGATAGAGCAAGACAAGAAACTCGAGTTTCTTGTCTTGCTCTATCG3'。

2. 根据权利要求1所述的靶向VEGFA基因的siRNA重组慢病毒表达载体的构建方法, 包括步骤如下:

a. 根据VEGFA mRNA序列, 设计合成双链DNA片段, 所述的双链DNA片段为所述的VEGFA-homo-U1、VEGFA-homo-U2、VEGFA-homo-U3及VEGFA-homo-U4核酸序列中的一种;

b. 然后将所述的双链DNA片段连接到pLv-shRNA载体的多克隆位点中构建成pLv-VEGFAshRNA重组载体;

c. 再将所述的pLv-VEGFAshRNA重组载体与pMD2.G和pSPAX2载体共转染293T细胞培养, 得靶向VEGFA基因RNA干扰的重组慢病毒载体系统。

3. 权利要求1所述的靶向VEGFA基因的siRNA重组慢病毒表达载体在制备治疗肿瘤相关性基因药物中的应用。

靶向VEGFA基因RNA干扰重组慢病毒载体及其构建方法

技术领域

[0001] 本发明涉及靶向血管内皮生长因子A (vascular endothelial growth factor, VEGFA) 基因的RNA干扰重组慢病毒载体及其构建,属于生物医药技术领域。

背景技术

[0002] 肿瘤血管是肿瘤生长和转移的必要条件,没有血管生成,肿瘤最大也只能长至直径约1-2mm大小。因此研究肿瘤血管生成对了解恶性肿瘤的发生、发展、侵袭和转移的生物学特性和机理及抗肿瘤血管生成质粒有重要的理论意义和临床应用价值。Folkman等依据大量的实验证据,提出肿瘤的生长和转移都依赖于新生血管的形成。以后相继发现并分离了多种促进血管形成的调控因子。其中血管内皮生长因子A (vascular endothelial growth factor, VEGFA) 及其受体能特异性的促进细胞分裂、增殖和迁移,在肿瘤新生血管生成过程中起着至关重要的作用。已有研究结果证实VEGFA与肺癌的增殖、浸润和转移密切相关。因此,阻止或抑制VEGFA在肿瘤组织中的表达可能是抑制肿瘤生长和转移有重要作用。

[0003] RNA干扰技术能特异性降解mRNA,沉默靶基因,在转录后水平抑制基因的表达,从而可用来进行基因功能的研究和药物靶标的研究。目前通过siRNA诱导哺乳动物细胞内RNA干扰的操作方法有两种,分别为化学合成的siRNA和细胞内表达的siRNA。化学合成法人工制备siRNA,一般是分别合成21个碱基的正义链和反义链,体外适当的温度下使互补链配对,形成siRNA。然后,采用传统转染的方法,如Lipofectamine转染、磷酸钙、电打孔等将siRNA导入细胞,诱导RNA干扰。此方法操作简单、快速,但引起的RNA干扰效应往往是暂时的,难以持久。因此,目前更倾向于在哺乳动物细胞内表达siRNA,以维持长久的RNA干扰效应。细胞内表达法是将表达siRNA的载体转染细胞,在细胞内表达siRNA。慢病毒载体作为常用的病毒载体之一,其特点是免疫原性低,能感染分裂相和非分裂相细胞,能自身携带片段整合入宿主细胞基因组,并在哺乳动物各类细胞稳定表达siRNA,长期抑制基因表达。

发明内容

[0004] 本发明提供一种靶向VEGFA基因的RNA干扰重组病毒载体构建、筛选及其用途。

[0005] 本发明以RNA干扰技术为主,针对VEGFA基因的不同靶序列,构建了四个能在293T细胞中表达siRNA的慢病毒真核表达载体pLv-VEGFAshRNA,该载体是自身失活的慢病毒载体,其示意图谱见图1,能特异性的抑制VEGFA基因表达。

[0006] 本发明的技术方案如下:

一种靶向VEGFA基因的siRNA重组慢病毒表达载体,是用于肿瘤VEGFA基因相关性治疗性物质,慢病毒是由pLv-VEGFAshRNA、pMD2.G和pSPAX2载体共转染293T细胞培养获得;其中,所述的pLv-VEGFAshRNA重组载体是在pLv-shRNA载体的多克隆位点中连接双链DNA片段构建而得,酶切位点是BamHI和EcoRI,所述的双链DNA片段为以下序列中的一种:

(1) VEGFA-homo-U1寡核苷酸序列1:

正义链:

5' GATCCAGGGCAGAATCATCACGAAGTCTCGAGACTTCGTGATGATTCTGCCCTTTTTTG3'

反义链:

5' AATTCAAAAAAGGGCAGAATCATCACGAAGTCTCGAGACTTCGTGATGATTCTGCCCTG3'

(2) VEGFA-homo-U2寡核苷酸序列2:

正义链:

5' GATCCGCGCAAGAAATCCCGGTATAACTCGAGTTATACCGGGATTTCTTGCCTTTTTG3'

反义链:

5' AATTCAAAAAAGCGCAAGAAATCCCGGTATAACTCGAGTTATACCGGGATTTCTTGCCTG3'

(3) VEGFA-homo-U3寡核苷酸序列3:

正义链:

5' GATCCCGAACGTACTTGCAGATGTGACTCGAGTCACATCTGCAAGTACGTTTCGTTTTG3'

反义链:

5' AATTCAAAAAACGAACGTACTTGCAGATGTGACTCGAGTCACATCTGCAAGTACGTTTCG3'

(4) VEGFA-homo-U4寡核苷酸序列4:

正义链:

5' GATCCGATAGAGCAAGACAAGAAACTCGAGTTTCTTGTCTTGCTCTATCTTTTTG3'

反义链:

5' AATTCAAAAAAGATAGAGCAAGACAAGAAACTCGAGTTTCTTGTCTTGCTCTATCG3'

根据本发明,所述的靶向VEGFA基因的siRNA重组慢病毒表达载体的构建方法,包括步骤如下:

a. 根据VEGFA mRNA序列,设计合成双链DNA片段,所述的双链DNA片段为所述的VEGFA-homo-U1、VEGFA-homo-U2、VEGFA-homo-U3及VEGFA-homo-U4核酸序列中的一种;

b. 然后将所述的双链DNA片段连接到pLv-shRNA载体的多克隆位点中构建成pLv-VEGFashRNA重组载体;

c. 再将所述的pLv-VEGFashRNA重组载体与pMD2.G和pSPAX2载体共转染293T细胞培养,得靶向VEGFA基因RNA干扰的重组慢病毒载体系统。

[0007] 为了对靶向VEGFA基因RNA干扰的重组慢病毒载体对VEGFA基因的抑制效果进行鉴定,将pLv-VEGFashRNA与包装质粒共转染293T细胞后进行荧光定量PCR检测目的基因表达水平,筛选出有效干扰质粒。

附图说明

[0008] 图1为实施例中慢病毒表达载体pLv-shRNA结果示意图。

[0009] 图2 VEGFA干扰RNA慢病毒载体瞬转293T细胞48h图片(荧光、可见光)。其中(a)为普通光镜(100×);(b)为荧光光镜(100×)。

[0010] 图3不同干扰序列下的VEGFA表达水平。

具体实施方式

[0011] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明

而不适用于限制本发明的范围。此外应理解,在阅读了本发明讲授的内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

[0012] 主要材料:

293T细胞购自中国科学院上海细胞生物研究所;大肠杆菌感受态DH5 α 购自北京全式金生物技术有限公司;慢病毒载体pLv-shRNA购自Clontech公司,含有人U6启动子,编码绿色荧光蛋白报告基因;各种限制性核酸内切酶、T4DNA连接酶及Taq DNA聚合酶均为美国NEB公司产品;SYBR Green I q RT-PCR Mixs购与上海生工生物工程技术服务公司;胎牛血清及DMEM培养液购自美国Gibico公司。

[0013] 实施例1

靶向VEGFA基因的慢病毒载体构建

1.寡聚核酸的设计与合成

设计靶向VEGFA基因(NM_001025366.2)的4个干扰序列(表1),并合成相应的单链DNA

表1靶向 VEGFA基因RNA干扰序列

序列名称	序列信息	起始位置
U1	AGGGCAGAATCATCACGAAGT	639
U2	GCGCAAGAAATCCCGGTATAA	1002
U3	CGAACGTACTTGCAGATGTGA	1203
U4	GATAGAGCAAGACAAGAAA	943

shRNA寡核苷酸的3'末端是TTTTT,作为RNA聚合酶III型启动子U6的终止信号,其5'和3'末端分别是BamHI和EcoRI的限制性酶切位点,pLv-shRNA模板中的loop结构选用了CTCGAG。各自单链DNA合成片段如下:

(1) VEGFA-homo-U1寡核苷酸序列1:

正义链:

5' GATCCAGGGCAGAATCATCACGAAGTCTCGAGACTTCGTGATGATTCTGCCCTTTTTTG3'

反义链:

5' AATTCAAAAAAGGGCAGAATCATCACGAAGTCTCGAGACTTCGTGATGATTCTGCCCTG3'

(2) VEGFA-homo-U2寡核苷酸序列2:

正义链:

5' GATCCGCGCAAGAAATCCCGGTATAACTCGAGTTATACCGGGATTTCTTGCCTTTTTTG3'

反义链:

5' AATTCAAAAAAGCGCAAGAAATCCCGGTATAACTCGAGTTATACCGGGATTTCTTGCCTG3'

(3) VEGFA-homo-U3寡核苷酸序列3:

正义链:

5' GATCCCGAACGTACTTGCAGATGTGACTCGAGTCACATCTGCAAGTACGTTCTTTTG3'

反义链:

5' AATTCAAAAAACGAACGTACTTGCAGATGTGACTCGAGTCACATCTGCAAGTACGTTCTG3'

(4) VEGFA-homo-U4寡核苷酸序列4:

正义链:

5' GATCCGATAGAGCAAGACAAGAACTCGAGTTTCTTGTCTTGCTCTATCTTTTG3'

反义链:

5' AATTCAAAAAGATAGAGCAAGACAAGAACTCGAGTTTCTTGTCTTGCTCTATCG3'

2. 寡聚核酸退火

将合成的寡聚核酸分别用无酶水溶解,浓度为20 μ M。取相应正义链和反义链溶液,按照如下配比配制退火反应体系

组分	体积 (μ L)
退火缓冲液	5
正义链 (20 μ M)	5
反义链 (20 μ M)	5
水 至终体积	50

在PCR仪上按照如下程序进行退火处理:95 $^{\circ}$ C 5min; 85 $^{\circ}$ C 5min; 75 $^{\circ}$ C 5min; 70 $^{\circ}$ C 5 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。

[0014] 3. p1-shRNA载体线性化

取2 μ g p1v-shRNA载体,按照如下体系进行酶切处理:

组分	体积 (μ L)
10 $\times$ 缓冲液	5
BamHI	1
EcoRI	1
水 至终体积	50

37 $^{\circ}$ C酶切1小时,1.5%琼脂糖电泳,使用DNA纯化试剂盒回收,核酸蛋白浓度测定仪测定回收质量。

[0015] 4. p1v-VEGFA-shRNA载体的构建

利用T4DNA连接酶,按照如下体系进行载体连接反应:

组分	体积 (μ L)
10 $\times$ T4连接缓冲液	2
载体回收	2
shDNA	2
T4DNA连接酶	1
水至终体积	20

20 $^{\circ}$ C连接过夜,转化质大抽杆菌感受态DH5 α ,挑选阳性克隆送去测序。本步骤得到的产物是p1v-VEGFA-shRNA。

[0016] 实施例2

RNA干扰慢病毒质粒瞬转293T细胞

将4种干扰慢病毒质粒,采用瞬时转染的方法转染293T细胞。293T细胞采用含10%FBS的高糖DMEM培养基,置于37 $^{\circ}$ C,5%CO₂培养箱内培养。转染前1天消化293T细胞,计数,将细胞接种至35mm培养皿内,每个培养皿接种 6×10^5 个细胞;次日用不含FBS的DMEM培养基分别配制钙转试剂和RNA干扰质粒,每84 μ l培养基内加入16 μ l钙转试剂,每100 μ l培养基内加入4 μ g质粒,分别混匀后将钙转溶液和质粒溶液轻轻混匀,室温静置10分钟,逐滴加入培养皿内,在

37℃,5%CO₂培养箱内培养24h,更换新鲜的含10% FBS的高糖DMEM培养基继续培养48h,收集细胞,提取细胞RNA。

[0017] 实施例3

1.总RNA的提取、cDNA的合成及RNA干扰效应的RT-PCR检测

分别取1μg RNA反转录cDNA,采用荧光定量PCR法检测VEGFA的表达水平,以beta-actin作为内参,荧光定量PCR所采用的引物序列见表2,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 相对定量方法计算不同RNA干扰序列样品的VEGFA表达水平。筛选出表达水平最低的RNA干扰序列。检测结果(见图3)表明U4序列的VEGFA基因表达水平最低,说明U4序列的RNA干扰效果最好。

[0018] 2. VEGFA和beta-actin引物探针设计

引物名称	序列
F-VEGFA	CTGGAGCGTGACGTTGGTGC
R-VEGFA	GTTTCGTTTAACTCAAGCTGCCTC
F-actinb	TATCGCCGCGCTCGTCGTC
R-actinb	TCTTGCTCTGGGCCTCGTC

SEQUENCE LISTING

<110> 同济大学苏州研究院

<120> 靶向VEGFA基因RNA干扰重组慢病毒载体及其构建方法

<130> 2016

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 59

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 1

gatccagggc agaatcatca cgaagtctcg agacttcgtg atgattctgc ctttttttg 59

<210> 2

<211> 59

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 2

aattcaaaaa agggcagaat catcacgaag tctcgagact tcgtgatgat tctgccctg 59

<210> 3

<211> 59

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 3

gatccgcgca agaaatcccg gtataactcg agttataccg ggatttcttg cgctttttg 59

<210> 4

<211> 59

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 4

aattcaaaaa gcgcaagaaa tcccgtata actcgagtta taccgggatt tcttgcgcg 59

<210> 5

<211> 59

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 5

gatcccgaac gtacttgcag atgtgactcg agtcacatct gcaagtacgt tcgtttttg 59

<210> 6

<211> 59

<212>	DNA	
<213>	人工合成	
<400>	6	
aattcaaaaa	cgaacgtact tgcagatgtg actcgagtca catctgcaag tacgttcgg	59
<210>	7	
<211>	55	
<212>	DNA	
<213>	人工合成	
<400>	7	
gatccgatag	agcaagacaa gaaactcgag tttettgtet tgetctatct ttttg	55
<210>	8	
<211>	55	
<212>	DNA	
<213>	人工合成	
<400>	8	
aattcaaaaa	gatagagcaa gacaagaaac tcgagtttct tgtcttgctc tatcg	55

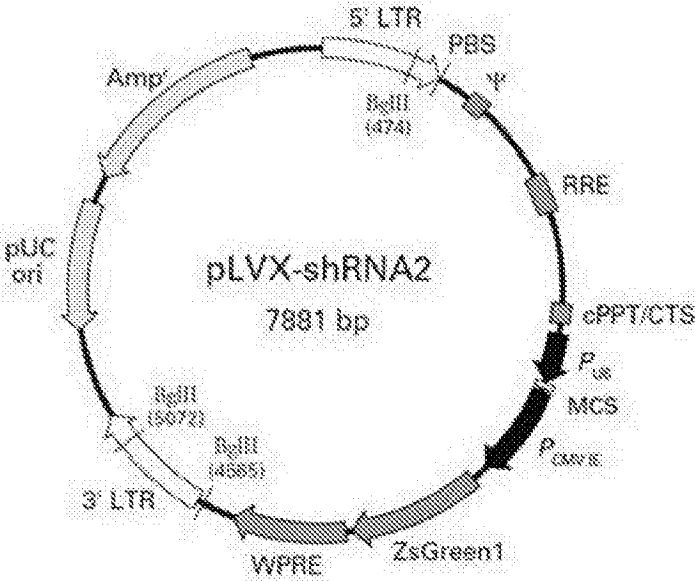


图1

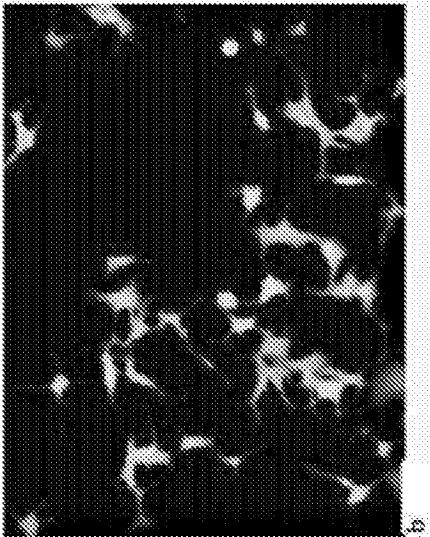


图2

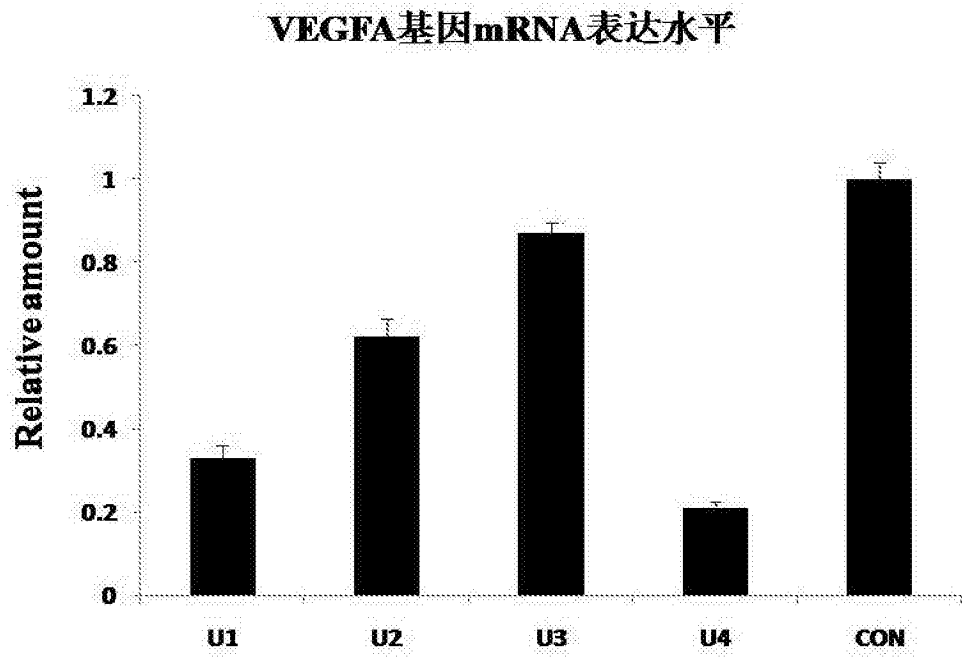


图3