[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C12N 15/867 (2006.01)

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910062850.3

[43] 公开日 2010 年 3 月 31 日

[11] 公开号 CN 101684478A

[22] 申请日 2009.6.26
[21] 申请号 200910062850.3
[71] 申请人 武汉大学
地址 430072 湖北省武汉市武昌珞珈山
[72] 发明人 郭德银 柳 叶 陈 宇 申彦森
[74] 专利代理机构 武汉宇晨专利事务所
代理人 王敏锋
权利要求书 2 页 说明书 12 页 附图 2 页

[54] 发明名称

一种串联表达小干扰 RNA 重组慢病毒载体的构建方法

[57] 摘要

本发明公开了一种串联表达 siRNA 重组慢病毒载体的构建方法，主要步骤如下：(1)单靶点的 siRNA 重组慢病毒载体的构建：a. 化学合成寡核苷酸链；b. 有义链、反义链退火；c. 退火片段连接至载体(2)双靶点的 siRNA 重组慢病毒载体的构建：a. 利用 PCR 从单靶点的 siRNA 重组慢病毒载体中扩增 U6/H1 – siRNA 表达框；b. 将表达框连接至经 XhoI 酶切的单靶点的 siRNA 重组慢病毒载体；c. 酶切鉴定筛选表达框正向插入的克隆；(3)多靶点的串联 siRNA 重组慢病毒载体的构建：将 U6/H1 – siRNA 表达框插入至双靶点的 siRNA 重组慢病毒载体，构建出三靶点的 siRNA 重组慢病毒载体，同法可获得多靶点串联的 siRNA 重组慢病毒载体。 本发明适用于同时表达针对多个靶基因的 siRNA，适用于长期沉默多个靶基因的研究。

1、一种改造的慢病毒载体 pLLU6，其特征在于：*Escherichia coli* Stbl3/pLLU6 CCTCC M 209135。

2、一种改造的慢病毒载体 pLLH1，其特征在于：*Escherichia coli* Stbl3/pLLH1 CCTCC M 209136。

3、一种串联表达 siRNA 重组慢病毒载体的构建方法，包括以下步骤：

（1）单靶点的siRNA重组慢病毒载体的构建：

a、化学合成寡核苷酸链，格式如下：

有义链：5'-(19N)-(TTCAAGAGA)-(N91)-TTTTTTC-3'

反义链：与有义链互补，在5' 端添加上TCGA以产生*Xho*1粘性突出末端；

b、有义链、反义链退火,形成带*Xho*1粘性末端和平末端的片段；

c、将以上片段连接至载体pLLU6或pLLH1；

d、转化大肠杆菌Stbl3感受态细胞；

e、筛选阳性克隆，并测序鉴定；

（2）双靶点的siRNA重组慢病毒载体的构建：

a、利用PCR从单靶点的siRNA重组慢病毒载体中扩增U6/H1-siRNA表达框，并用*Sal*1、*Xho*1双酶切使其带有*Xho*1粘性末端

对于U6-siRNA表达框，PCR引物序列如下：

上游引物：U6-siR-1 (5'- TAACGC<u>GTCGAC</u>CCCCAGTGGAAAGACGCGCA -3')

*Sal*1

下游引物：U6-siR-2 (5'- ATACCG<u>CTCGAG</u>CTCGTGAAGCGAGCTTATCGATACC -3')

*Xho*1

对于H1-siRNA表达框，PCR引物序列如下：

上游引物：H1-siR-1 (5'- TAACGC<u>GTCGAC</u>AATTCATATTTGCATGTCGC -3')

*Sal*1

下游引物：H1-siR-2 (5'- ATACCG<u>CTCGAG</u>CTCGTGAAGCGAGCTTATCGATACC -3')

*Xho*1

b、将U6/H1-siRNA表达框连接至经*Xho*I酶切的单靶点的siRNA重组慢病毒载

体，并转化大肠杆菌Stbl3感受态细胞，菌落PCR筛选阳性克隆；

c、酶切鉴定筛选片段正向插入的克隆，该步骤只挑选正向插入的克隆，具体鉴定方法是：用*Xba*1、*Xho*1双酶切待测克隆，设未插入片段的载体为对照，酶切片段大小大于对照，为正向插入，酶切片段大小与对照相同，为反向插入；

d、测序鉴定；

（3）多靶点的串联 siRNA 重组慢病毒载体的构建：

将 U6/H1-siRNA 表达框插入至双靶点的 siRNA 重组慢病毒载体，即构建出三靶点的 siRNA 重组慢病毒载体，以此构建策略，可获得多靶点串联的 siRNA 重组慢病毒载体。

一种串联表达小干扰RNA重组慢病毒载体的构建方法

技术领域

本发明涉及分子生物学领域。更具体地涉及一种串联表达小干扰 RNA 重组慢病毒载体的构建方法。

背景技术

RNA 干扰（RNA interference, RNAi）是指由双链 RNA 触发的序列特异性的转录后基因沉默（post-transcriptional gene silencing, PTGS）的过程。目前，RNA 干扰的机制已基本阐明：内源或外源的双链 RNA 在细胞质中被 Dicer 切割成带 2 个碱基突出 3’ 末端的 21～23nt 的小干扰 RNA（siRNA），后者与 RNA 诱导的沉默复合体（RNA-induced silencing complex, RISC）结合。siRNA 在 RISC 中被解链，其中反义链引导 RISC 靶向与之互补的 mRNA，RISC 则在互补序列中间切割 mRNA，从而抑制靶基因的表达。

尽管从 RNAi 现象发现至今仅 11 年时间，但 RNAi 作为一种基因沉默工具已广泛应用于生物学基础研究及应用领域。目前较为常用的 5 种制备 siRNA 的方法包括：1）化学合成；2）体外转录；3）长片断 dsRNAs 经 RNase III 酶降解；4）PCR 制备的 siRNA 表达框在细胞中表达；5）siRNA 表达载体在细胞中表达 siRNA。以上方法都有各自的优缺点：前 4 种方法制备的 siRNAs 或 siRNA 表达框经转染或电转导入细胞，可以实现瞬时基因沉默，对于半衰期较长的蛋白则不太适用。siRNA 表达载体则可以利用载体上的抗生素标记建立相对稳定的长期基因沉默细胞株，持续抑制靶基因的表达。多数的 siRNA 表达载体利用Ⅲ型 RNA 聚合酶启动子操纵 siRNA 在哺乳动物细胞中表达，而通常采用的Ⅲ型启动子包括人源和鼠源 U6 启动子和人源 H1 启动子。目前，很多生物公司已经研发出基于 U6 或 H1 启动子的 siRNA 表达载体，具代表性的产品包括：Ambion 公司的 pSilencer 系列；Promega 公司的 siLentGene 系列；Invitrogen 公司的 BLOCK-iT 系列，等。

siRNA 表达载体可以分为质粒载体和病毒载体两类。对于某些难转染的细胞

质粒载体存在转染效率低的缺点，于是近年来许多生物公司开始研发病毒载体表达 siRNA，其优势在于可以直接高效率感染细胞进行基因沉默的研究，避免由于质粒转染效率低而带来的不便。目前常用的病毒载体包括：逆转录病毒载体、腺病毒载体、慢病毒载体。其中慢病毒载体有诸如能感染分裂和非分裂期细胞，能整合于宿主基因组等优点而被越来越广泛的应用。具代表性的 siRNA 慢病毒载体如 pLentiLox 3.7,该载体含有一个由鼠源 U6 启动子来操纵 siRNA 表达。

然而，目前已经研发出的基于III型启动子的 siRNA 慢病毒表达载体只适合于单一靶点的 siRNA 的表达，而越来越多的基础研究和应用研究需要同时沉默多个靶基因，为了解决这一问题，本发明设计出了一种串联表达 siRNA 的慢病毒载体的构建方法，适用于长期沉默多个靶基因的实验研究及应用研究。

发明内容

本发明的目的是在于提供了一种串联表达 siRNA 重组慢病毒载体的构建方法，克服了现有的 siRNA 表达载体只适用于表达单一靶点的 siRNA 的局限性，能同时表达针对多个靶基因的 siRNA，且适合于稳定细胞系的建立，从而适用于长期沉默多个靶基因的实验研究及应用研究。

该串联表达 siRNA 重组慢病毒载体的构建方法，包括以下步骤：

1、慢病毒载体的启动子改造：

申请人改造的慢病毒载体是 pLentiLox 3.7 (Rubinson and Dillon, Nature Genetics, 2003)。该载体含有一个鼠源 U6 启动子用来控制 siRNA 的表达。为了避免串联 siRNA 的启动子单一而引起同源重组导致 siRNA 表达框的丢失，申请人将该载体的鼠源 U6 启动子分别置换为人源 U6 启动子和人源 H1 启动子，改造后的慢病毒载体分别命名为 pLLU6、pLLH1（*Escherichia coli* Stbl3/pLLU6 CCTCC M 209135; *Escherichia coli* Stbl3/pLLH1 CCTCC M 209136，保藏日期：2009 年 6 月 25 日，保藏单位：中国典型培养物保藏中心，地址：中国.武汉.武汉大学)

2、串联表达 siRNA 重组慢病毒载体的构建方法

2.1 单靶点的siRNA重组慢病毒载体的构建

2.1.1 化学合成寡核苷酸链，格式如下：

有义链：5'-(19N)-(TTCAAGAGA)-(N91)-TTTTTTC-3'

反义链：与有义链互补，且在5' 端添加上TCGA以产生*Xho*1粘性突出末端

注：19N表示siRNA靶点的19个碱基序列，N19表示19N的反向互补序列；

2.1.2 有义链、反义链退火,形成带*Xho*1粘性末端和平末端的片段;

2.1.3 将以上片段连接至载体pLLU6或pLLH1（载体由*Ksp*A1和*Xho*1双酶切）;

2.1.4 转化大肠杆菌Stbl3感受态细胞;

2.1.5 筛选阳性克隆，并测序鉴定;

2.2 双靶点的siRNA重组慢病毒载体的构建

2.2.1 利用PCR从单靶点的siRNA重组慢病毒载体中扩增"U6/H1-siRNA"表达框，并用*Sal*1、*Xho*1双酶切使其带有*Xho*1粘性末端

对于"U6-siRNA" 表达框，PCR引物序列如下:

上游引物：U6-siR-1 (5'- TAACGCGTCGACCCCCAGTGGAAAGACGCGCA -3')

*Sal*1

下游引物：U6-siR-2 (5'- ATACCGCTCGAGCTCGTGAAGCGAGCTTATCGATACC -3')

*Xho*1

对于"H1-siRNA" 表达框，PCR引物序列如下:

上游引物：H1-siR-1 (5'- TAACGCGTCGACAATTCATATTTGCATGTCGC -3')

*Sal*1

下游引物：H1-siR-2 (5'- ATACCGCTCGAGCTCGTGAAGCGAGCTTATCGATACC -3')

*Xho*1

2.2.2 将"U6/H1-siRNA"表达框连接至经*Xho*I酶切的单靶点的siRNA重组慢病毒载体，并转化大肠杆菌Stbl3感受态细胞，菌落PCR筛选阳性克隆;

2.2.3 酶切鉴定筛选 "片段正向插入" 的克隆

由于"U6/H1-siRNA"表达框片段的插入存在正反两个方向的可能，为了适合串联siRNA重组慢病毒载体的构建及筛选鉴定，该步骤只挑选正向插入的克隆。具体鉴定方法是：用*Xba*1、*Xho*1双酶切待测克隆，设未插入片段的载体为对照，如果酶切片段大小大于对照，则为 "正向插入"；如果酶切片段大小与对照相同，则为 "反向插入"；

2.2.4 测序鉴定

2.3 多靶点的串联 siRNA 重组慢病毒载体的构建

将"U6/H1-siRNA"表达框插入至双靶点的 siRNA 重组慢病毒载体，即构建出三靶点的 siRNA 重组慢病毒载体，以此构建策略，可获得多靶点串联的 siRNA 重组

慢病毒载体。

在一组干扰艾滋病毒的应用实例中，申请人构建了针对 3 个靶点的串联 siRNA 重组慢病毒载体，实验结果证实该慢病毒载体能正常工作，且串联的 siRNA 表达框是独立工作的（参见实施例 3）。

本发明的有益效果是：(1)本发明所提供的串联表达 siRNA 的慢病毒载体适用于同时沉默多个靶基因，适合于有如此需求的基础研究和应用研究，比如：在艾滋病治疗领域，用 siRNA 同时靶向多个病毒基因或靶向同一病毒基因的不同靶点，可以有效防止或延缓病毒逃逸；(2)本发明适合于稳定细胞系的建立，从而可以长期稳定地沉默靶基因；(3)易于实现 siRNA 表达框定向插入；(4)本发明提供的串联表达 siRNA 的慢病毒载体提供 U6、H1 两种启动子供选择，在一定程度上能避免了因同一种启动子的多次重复而引起的同源重组导致 siRNA 表达框的丢失。

附图说明

图 1 是慢病毒载体的启动子改造示意图。用来自 pSilencer 质粒的人源 U6 和人源 H1 启动子分别取代 pLentiLox 3.7 上的鼠源 U6 启动子，获得 pLLU6、pLLH1 载体。

图 2 是串联表达小干扰 RNA 重组慢病毒载体的构建流程图。首先，通过 KspA1 和 Xho1 酶切位点将化学合成的编码 siRNA 的寡核苷酸片段连接至 pLLU6、pLLH1 载体，获得单靶点的 siRNA 重组慢病毒载体；然后，PCR 扩增“U6/H1-siRNA”表达框，连接至 Xho1 酶切的单靶点的 siRNA 重组慢病毒载体，从而获得双靶点的 siRNA 重组慢病毒载体；最后，依此策略构建出串联表达 siRNA 的重组慢病毒载体。

图 3 是串联表达小干扰 RNA 的慢病毒载体应用实例。该实例选取艾滋病毒基因 rev、pol、tat 以及病毒侵染细胞所需的宿主细胞膜蛋白 CCR5 作为靶点，构建出单靶点、双靶点、三靶点的 siRNA 重组慢病毒载体。该实例结果表明：本发明提供的串联表达小干扰 RNA 的慢病毒载体能正常工作，且串联的 siRNA 表达框是独立工作的。

具体实施方式

下面结合附图和实施例对本发明进行进一步说明。

实施例 1：慢病毒载体的启动子改造

申请人改造的慢病毒载体是 pLentiLox 3.7 (Rubinson and Dillon, Nature Genetics, 2003)。该载体含有一个鼠源 U6 启动子用来控制 siRNA 的表达,同时还含有报告基因 EGFP 便于流式细胞仪分选。为了避免串联 siRNA 的启动子单一而引起同源重组导致 siRNA 表达框的丢失，申请人将该载体的鼠源 U6 启动子分别置换为人源 U6 启动子和人源 H1 启动子（人源 U6 启动子和人源 H1 启动子从 Ambion 公司产品 pSilencer2.0_U6 和 pSilencer3.0_H1 经 PCR 获得），改造后的慢病毒载体分别命名为 pLLU6、pLLH1（*Escherichia coli* Stbl3/pLLU6 CCTCC M 209135; *Escherichia coli* Stbl3/pLLH1 CCTCC M 209136）。启动子改造示意图见图 1 所示。具体改造过程如下:

1.1 PCR扩增U6及H1启动子片段;

对于U6启动子，PCR引物如下:

上游引物: U6-1 (5'- ACATCTAGACCCCAGTGGAAAGACGCGCAG -3')

*Xba*1

下游引物: U6-2 （5'- ACGGTTAACGATCCCGCGTCCTTTCCACAA -3'）

*Ksp*A1

对于H1启动子，PCR引物如下:

上游引物: H1-1 (5'- CGGTCTAGAAATTCATATTTGCATGTCGCTA -3')

*Xba*1

下游引物: H1-2 （5'- AGCGTTAACCGAGTGGTCTCATACAGAACTT -3'）

*Ksp*A1

1.2 用T-A克隆策略将以上启动子片段克隆到pEGM-T载体(购自Promega公司);

1.3 用 *Xba*1 和 *Ksp*A1 双酶切以上重组pEGM-T载体,分离出带粘性末端的U6/H1启动子片段;

1.4 用 *Xba*1 和 *Ksp*A1 双酶切 pLentiLox 3.7，获得带相应粘性末端的载体;

1.5 将 U6/H1 启动子片段连接到以上载体，获得启动子改造的慢病毒载体，分别命名为 pLLU6、pLLH1（*Escherichia coli* Stbl3/pLLU6 CCTCC M 209135; *Escherichia coli* Stbl3/pLLH1 CCTCC M 209136）。

实施例 2: 串联表达 siRNA 重组慢病毒载体的构建方法

2.1 单靶点的siRNA重组慢病毒载体的构建（参见图2步骤Ⅰ）

2.1.1 化学合成寡核苷酸链，格式如下：

有义链：5'-(19N)-(TTCAAGAGA)-(N91)-TTTTTTC-3'

反义链：与有义链互补，且在5' 端添加上TCGA以产生*Xho*1粘性突出末端

注：1）19N表示siRNA靶点的19个碱基序列，N19表示19N的反向互补序列；

2）(TCAAGAGA)指导生成siRNA前体shRNA（小发夹RNA）的"环"区域，该序列选自（Brummelkamp *et al.*, Science, 2002）

2.1.2 有义链、反义链退火,形成带*Xho*1粘性末端和平末端的片段；

2.1.3 将以上片段连接至载体pLLU6或pLLH1（载体由*Ksp*A1和*Xho*1双酶切）；

2.1.4 转化大肠杆菌Stbl3感受态细胞（Stbl3菌株购自Invitrogen公司）；

2.1.5 筛选阳性克隆，并测序鉴定；

2.2 双靶点的siRNA重组慢病毒载体的构建（参见图2步骤Ⅱ）

2.2.1 利用PCR从单靶点的siRNA重组慢病毒载体中扩增"U6/H1-siRNA"表达框，并用*Sal*1、*Xho*1双酶切使其带有*Xho*1粘性末端

对于"U6-siRNA"表达框，PCR引物序列如下：

上游引物：U6-siR-1 (5'- TAACGCGTCGACCCCCAGTGGAAAGACGCGCA -3')

*Sal*1

下游引物：U6-siR-2 (5'- ATACCGCTCGAGCTCGTGAAGCGAGCTTATCGATACC -3')

*Xho*1

对于"H1-siRNA"表达框，PCR引物序列如下：

上游引物：H1-siR-1 (5'- TAACGCGTCGACAATTCATATTTGCATGTCGC -3')

*Sal*1

下游引物：H1-siR-2 (5'- ATACCGCTCGAGCTCGTGAAGCGAGCTTATCGATACC -3')

*Xho*1

2.2.2 将"U6/H1-siRNA"表达框连接至经*Xho*I酶切的单靶点的siRNA重组慢病毒载体，并转化大肠杆菌Stbl3感受态细胞，菌落PCR筛选阳性克隆；

2.2.3 酶切鉴定筛选"片段正向插入"的克隆

由于"U6/H1-siRNA"表达框片段的插入存在正反两个方向的可能（以图2步骤Ⅱ所示连接方向为正向），为了适合串联siRNA重组慢病毒载体的构建及筛选鉴定，该步骤只挑选正向插入的克隆。具体鉴定方法是：用*Xba*1、*Xho*1双酶切待

测克隆，设未插入片段的载体为对照，如果酶切片段大小大于对照，则为“正向插入”；如果酶切片段大小与对照相同，则为“反向插入”；

2.2.4 测序鉴定

测序引物：5'- CAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGAC -3'

(Rubinson and Dillon, Nature Genetics, 2003);

2.3 多靶点的串联 siRNA 重组慢病毒载体的构建（参见图 2 步骤III）

将“U6/H1-siRNA”表达框插入至双靶点的 siRNA 重组慢病毒载体，即构建出三靶点的 siRNA 重组慢病毒载体，以此构建策略，可获得多靶点串联的 siRNA 重组慢病毒载体。

实施例 3：串联表达 siRNA 的慢病毒载体应用实例

为了验证串联表达 siRNA 的慢病毒载体是否能正常工作，申请人以干扰艾滋病毒的应用实例加以说明：

在此实施例中，申请人选取艾滋病毒基因 rev、pol、tat 以及病毒侵染细胞所需的宿主细胞膜蛋白 CCR5 作为靶点，利用本发明所提供的串联表达 siRNA 的慢病毒载体构建出单靶点、双靶点、三靶点的 siRNA 重组慢病毒载体。siRNA 表达框组合方式如下表所示：

单靶点	H1 CCR5 U6 rev U6 pol U6 tat
双靶点	H1 CCR5_U6 rev H1 CCR5_U6 pol H1 CCR5_U6 tat
三靶点	H1 CCR5_U6 rev_U6 pol H1 CCR5_U6 rev_U6 tat H1 CCR5_U6 pol_U6 tat

申请人将以上 siRNA 重组慢病毒载体分别与 pNL4-3.Luc.R-E-（Landau NR,

Viology,1995）共转染 HEK-293T 细胞，24 小时后检测相对荧光素酶活性，结果如图 3（A）所示（注：pNL4-3.Luc.R-E-是带荧光素酶报告基因的 HIV 复制子，其复制水平可以由荧光素酶活性代表）。结果表明：各 siRNA 重组慢病毒载体对 HIV 的复制都有不同程度的抑制作用，其中 rev-pol、rev-tat、pol-tat siRNA 的组合的效果高于其各自单独发挥的作用，说明 rev、pol、tat siRNA 表达框能独立工作，且当两两组合后作用效果具有叠加效应。具体结果分析数据如下表所示：

	siRNA 表达框组合方式	抑制 HIV 复制水平
单靶点	U6 rev	81.4%
	U6 pol	67.8%
	U6 tat	64.7%
三靶点	H1 CCR5_U6 rev_U6 pol	84.5%
	H1 CCR5_U6 rev_U6 tat	88.9%
	H1 CCR5_U6 pol_U6 tat	77.2%

（注：CCR5 siRNA 表达框在上述实验中不发挥作用，因为所用的 HEK-293T 细胞不表达 CCR5 膜蛋白，且 pNL4-3.Luc.R-E-为脂质体转染进入细胞，无需膜受体 CCR5 介导）

为了验证CCR5 siRNA表达框的能否独立工作，申请人利用所构建的siRNA重组慢病毒载体pLLH1 CCR5及pLLH1 CCR5_U6 rev_U6 tat建立了基于Ghost CD4/CCR5的稳定细胞系(KewalRamani V and Littman DR, J Virol, 1999)(该细胞系可以稳定表达膜蛋白CCR5)。然后用PE标记的CCR5抗体（购自eBioscience公司）对以上建立的稳定细胞系进行了流式检测（结果如图3（B）所示，灰色区域为样品，空心区域为阴性对照）。结果显示：由pLLH1 CCR5和pLLH1 CCR5_U6 rev_U6 tat表达的CCR5 siRNA均能有效下调CCR5表达水平，且二者无明显差异（分别下调77.5%和79.9%），从而说明：串联表达的siRNA重组慢病毒载体中的CCR5 siRNA表达框的能独立工作。

综上所述，本实施例涉及的应用实例说明：本发明提供的串联表达 siRNA 的慢病毒载体能正常工作，且串联的 siRNA 表达框是独立工作的。

实施例 4：串联表达 siRNA 的慢病毒的包装。

4.1 转染前 24 小时铺 HEK-293T 细胞（购自 CCTCC）于一个直径 7.5cm 的细胞培养皿中；

4.2 转染时细胞汇合度以 40～60%为宜,以标准的磷酸钙转染操作将以下质粒共转染细胞:

4μg siRNA 重组慢病毒载体

2μg pLP1

2μg pLP2

2μg pVSVG

（注：pLP1、pLP2、pVSVG 是慢病毒辅助包装质粒，购自 Invitrogen 公司）;

4.3 转染后 24 小时、48 小时、72 小时分别收集病毒上清（即细胞培养基），并补足培养基；之后混合 3 次收集的病毒上清;

4.4 病毒滴度检测：将病毒上清以 10 倍梯度稀释，分别感染 HEK-293T 细胞（培养基中加 polybrene（购自 SIGMA 公司），终浓度为 8μg/ml），48 小时之后流式检测 GFP 阳性细胞比率，并以比率在 0.1-10%之间的稀释度计算出病毒滴度。

实施例 5：利用串联表达 siRNA 的慢病毒建立稳定细胞系。

5.1 用实施例 4 中所包装的慢病毒以梯度 m.o.i.感染 Ghost CD4/CCR5 细胞，感染 48 小时后流式检测 GFP 阳性细胞比率，择其比率 10％以下者进行无菌流式分选（注：之所以选择比率 10％以下者，是为了避免细胞被慢病毒复感染而影响后续实验的准确性）;

5.2 传代培养分选的细胞至细胞数量适宜;

5.3 再次流式检测 GFP 阳性细胞比率，以确定稳定细胞系的纯度。

SEQUENCE LISTING

<110> 武汉大学

<120> 一种串联表达小干扰 RNA 重组慢病毒载体的构建方法

<130> 一种串联表达小干扰 RNA 重组慢病毒载体的构建方法

<140> 2009100628503

<141> 2009-06-26

<160> 9

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 32

<212> DNA

<213> 化学合成

<400> 1

taacgcgtcg acccccagtg gaaagacgcg ca 32

<210> 2

<211> 37

<212> DNA

<213> 化学合成

<400> 2

ataccgctcg agctcgtgaa gcgagcttat cgatacc 37

<210> 3

<211> 32

<212> DNA

<213> 化学合成

<400> 3

taacgcgtcg acaattcata tttgcatgtc gc 32

<210> 4

<211> 37

<212> DNA

<213> 化学合成

<400> 4

ataccgctcg agctcgtgaa gcgagcttat cgatacc 37

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> 化学合成

<400> 5

acatctagac cccagtggaa agacgcgcag 30

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> 化学合成

<400> 6

acggttaacg atcccgcgtc ctttccacaa 30

<210> 7

<211> 31

<212> DNA

<213> 化学合成

<400> 7

cggtctagaa attcatattt gcatgtcgct a 31

<210> 8

<211> 31

<212> DNA

<213> 化学合成

<400> 8

agcgttaacc gagtggtctc atacagaact t 31

<210> 9

<211> 25

<212> DNA

<213> 化学合成

<400> 9

cagtgcaggg gaaagaatag tagac 25

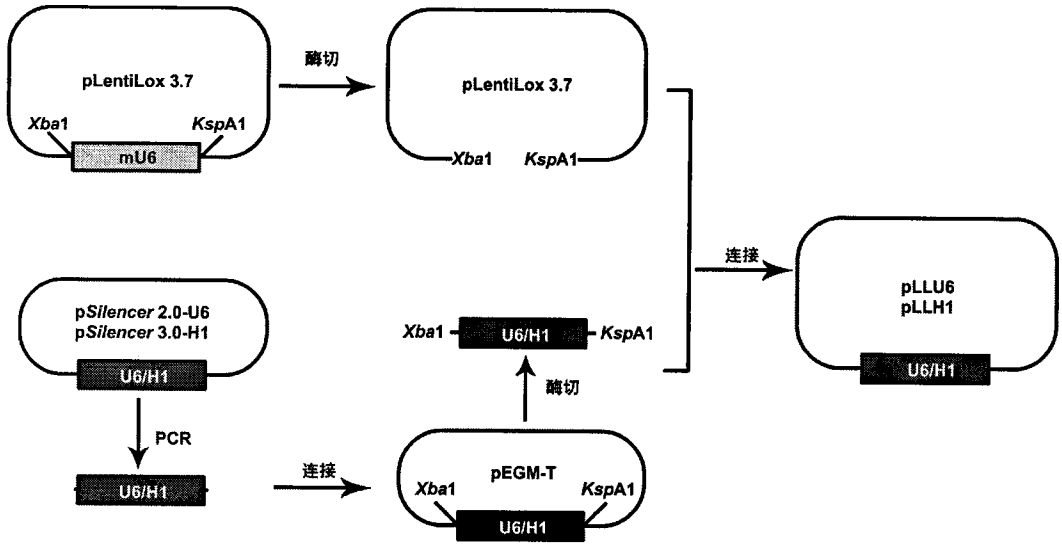

pLentiLox 3.7
Xba1
KspA1
mU6
酶切
pLentiLox 3.7
Xba1
KspA1
连接
pLLU6
pLLH1
U6/H1
pSilencer 2.0-U6
pSilencer 3.0-H1
U6/H1
PCR
U6/H1
连接
pEGM-T
Xba1
KspA1
U6/H1
Xba1
U6/H1
KspA1
酶切

图 1

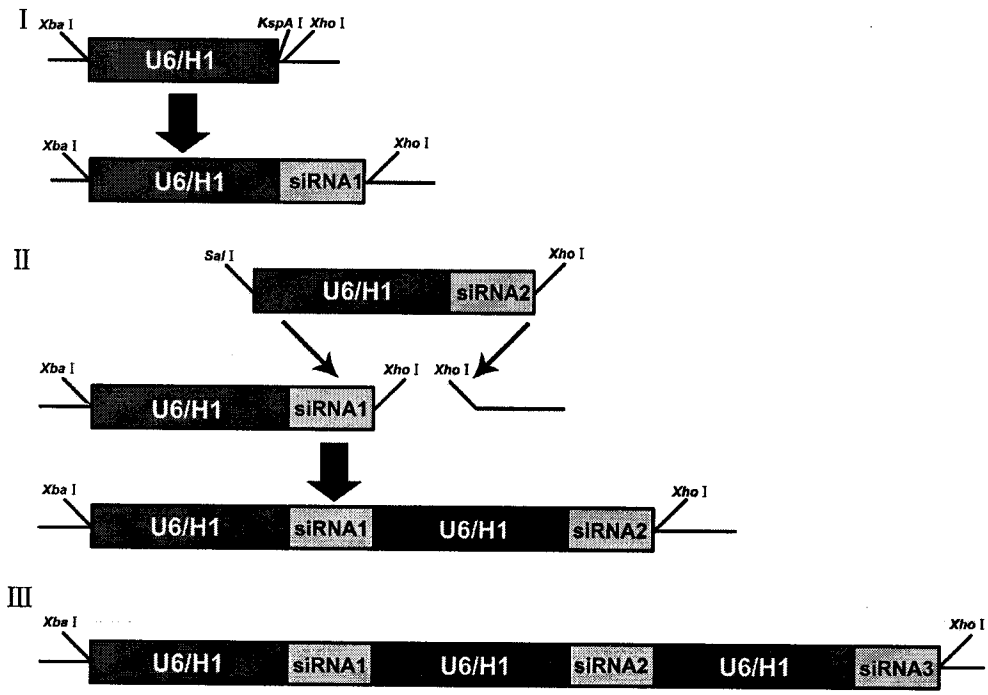
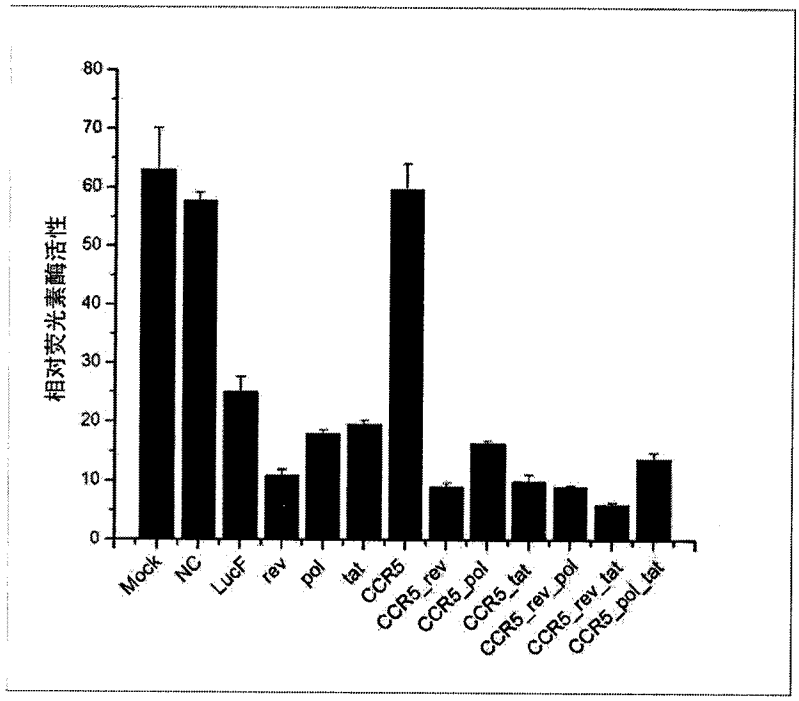

I
Xba I
KspA I
Xho I
U6/H1
Xba I
Xho I
U6/H1
siRNA1
II
Sal I
Xho I
U6/H1
siRNA2
Xba I
Xho I
Xho I
U6/H1
siRNA1
Xba I
Xho I
U6/H1
siRNA1
U6/H1
siRNA2
III
Xba I
Xho I
U6/H1
siRNA1
U6/H1
siRNA2
U6/H1
siRNA3

图 2

A


相对荧光素酶活性
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Mock
NC
LucF
rev
pol
tat
CCR5
CCR5_rev
CCR5_pol
CCR5_tat
CCR5_rev_pol
CCR5_rev_tat
CCR5_pol_tat

B

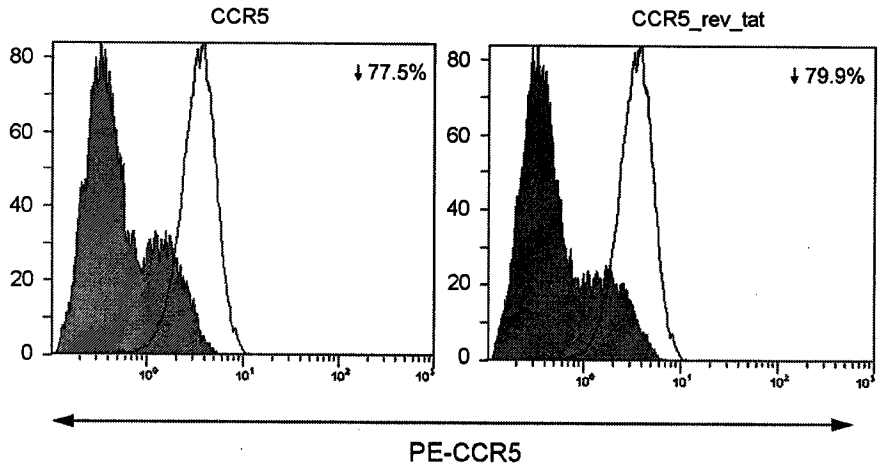

CCR5
CCR5_rev_tat
↓77.5%
↓79.9%
80
60
40
20
0
PE-CCR5

图 3