



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1685063 B

(45) 授权公告日 2011.12.21

(21) 申请号 03823441.6

(22) 申请日 2003.07.18

(30) 优先权数据

60/402,769 2002.08.12 US

60/407,543 2002.08.30 US

60/467,541 2003.05.02 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2005.03.31

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2003/022540 2003.07.18

(87) PCT申请的公布数据

W02004/015062 EN 2004.02.19

(73) 专利权人 新英格兰生物实验室公司

地址 美国麻萨诸塞州

(72) 发明人 G·采齐尼斯 G·菲何利 C·塔奇

C·诺伦 L·麦克雷诺兹

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

公司 11245

代理人 赵蓉民 路小龙

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006.01)

C07H 21/04(2006.01)

(56) 对比文件

WO 02/44321 A2, 2002.06.06, 说明书全文.

US 2002/0086356 A1, 2002.07.04, 说明书全文.

Dun Yang et al. Short RNA duplexes produced by hydrolysis with Escherichiacoli RNase III mediate effective RNA interference in mammalian cells. PNAS vol. 99 no. 15. 2002, 99(15), 9942-9947.

Eric Billy et al. Specific interference with gene expression induced by long, double-stranded RNA in mouse embryonal teratocarcinoma cell lines. PNAS vol. 98 no. 25. 2001, 98(25), 14428-14433.

审查员 唐莉

权利要求书 3 页 说明书 28 页

序列表 4 页 附图 25 页

(54) 发明名称

与基因沉默相关的方法和组合物

(57) 摘要

一种通过在特定条件下酶促剪切双链大 RNA 来获得用于基因沉默的不均一短双链 RNA 分子 (hsiRNA) 的混合物的方法。所得到的混合物不需任何分级分离步骤便能包含有更多的大小为 21-22 个核苷酸的片断。这些片断包含的序列集合起来便总体上覆盖了作为这些片断来源的整个长度的大双链 RNA 分子。具有可以单独地代表目标 mRNA 的片断的序列的双链 RNA 可以用这里描述的方法来分析, 以鉴定可以对某基因或转录序列产生基因沉默效应的最具活性的一部分 hsiRNA 片段或者单独的 siRNA 片断。另外提供了制备和克隆编码所选的 siRNA、hsiRNA 混合物或者发夹序列的 DNA 的方法, 从而提供了源自长双链 RNA 的基因沉默试剂的源源不断的供应。

1. 一种生成 hsiRNA 混合物的方法,包括:
 - (a) 在含有选自锰、镍和钴的过渡金属阳离子和 RNaseIII 的反应混合物中消化大双链 RNA 制备物;以及
 - (b) 生成 hsiRNA 混合物。
2. 根据权利要求 1 的方法,其中所述 hsiRNA 混合物是大双链 RNA 制备物被完全消化的产物。
3. 根据权利要求 1 的方法,其中反应混合物中 RNaseIII 和大双链 RNA 的质量比范围是 0.005 : 1 到 25 : 1。
4. 根据权利要求 1 的方法,其中反应混合物中 RNaseIII 和大双链 RNA 的质量比范围是 0.0125 : 1 到 10 : 1。
5. 根据权利要求 1 的方法,其中过渡金属阳离子是锰离子。
6. 根据权利要求 5 的方法,其中所述反应混合物含有浓度范围为 5-100mM 的锰离子。
7. 根据权利要求 1 的方法,其中过渡金属阳离子是镍和钴。
8. 根据权利要求 2 的方法,其中完全消化是在少于 6 小时的时间内完成的。
9. 根据权利要求 2 的方法,其中完全消化是在少于 2 小时的时间内完成的。
10. 根据权利要求 2-9 任一项所述的方法,其中反应混合物中酶与底物的质量比为大于或者等于 0.25。
11. 一种沉默目标基因的表达的方法,包括:

向宿主细胞中导入根据权利要求 1 或者权利要求 10 的方法制备的 hsiRNA 混合物,其中在该混合物中每个 siRNA 的核苷酸序列都具有与目标基因互补的序列。
12. 根据权利要求 1 的方法制备的一系列双链 RNA 片断,其包含大小为 5-30 个核苷酸的多个重叠片断,该系列中的片断集合起来代表了一个或多个大双链 RNA 的序列的实质部分,这些片断是在产生 15%以上的、经溴化乙啶染色的天然聚丙烯酰胺凝胶分析测得长度为 18-25 个核苷酸的双链 RNA 片段的条件下,用纯化的酶通过体外剪切从所述的大双链 RNA 获得的,所述的每一个大双链 RNA 的一条链具有与信使 RNA 的部分或者全部互补的序列。
13. 根据权利要求 12 的一系列双链 RNA 片断,其中所述实质部分的比例大于大双链 RNA 的序列的 50%。
14. 根据权利要求 12 的一系列双链 RNA 片断,其中所述实质部分的比例大于大双链 RNA 的序列的 65%。
15. 根据权利要求 12 的一系列双链 RNA 片断,其中超过 30%的 RNA 片断具有 18-25 个碱基对的片断大小。
16. 根据权利要求 12 的一系列双链 RNA 片断,其中该系列中有至少一个片断、至多 100%的片断能够在细胞中导致目标 mRNA 的剪切。
17. 根据权利要求 16 的一系列双链 RNA 片断,其中有至少 50%的片断能够导致 mRNA 的剪切。
18. 根据权利要求 16 的一系列双链 RNA 片断,其中有至少 75%的片断能够导致 mRNA 的剪切。
19. 根据权利要求 12 的一系列双链 RNA 片断,其在被导入到真核细胞中时可以在体内条件下导致 RNA 沉默。

20. 由根据权利要求 1 的方法制备的 hsiRNA 混合物生成 DNA 克隆文库的方法,其中每个克隆表达来自 hsiRNA 混合物的一个或多个双链 RNA 片断,该方法包括:

(a) 使 hsiRNA 混合物变性以形成未配对 RNA 链的混合物;

(b) 将第一单链 DNA 引物连接到未配对 RNA 链的 3' 端,第二单链 DNA 引物连接到未配对 RNA 链的 5' 端;

(c) 反转录步骤 (b) 中的嵌合 DNA-RNA 产物以形成互补的 DNA 片断;以及

(d) 将一个或者多个 DNA 片断插入到载体中以形成克隆文库。

21. 根据权利要求 20 的方法,其中步骤 (c) 进一步包括对 DNA 片断进行聚合酶依赖型的扩增。

22. 根据权利要求 20 的方法,其中步骤 (b) 中的 RNA 链的 5' 端被去磷酸化。

23. 根据权利要求 22 的方法,其中步骤 (b) 中的 RNA 链的 3' 端是 3' 端羟基末端,而第一单链 DNA 引物在 5' 端和 3' 端都含有磷酸根基团时,第一单链 DNA 引物在第二单链 DNA 引物连接之前与所述 3' 端连接。

24. 根据权利要求 23 的方法,其中步骤 (b) 中连接到第一单链 DNA 引物上的 RNA 链被磷酸化,然后连接到第二单链 DNA 引物上,其中第二单链 DNA 引物在其 3' 端没有被磷酸化。

25. 生成克隆文库的方法,其中每个克隆对应于来自根据权利要求 1 的方法制备的 hsiRNA 混合物的一个或多个双链 RNA 片断,该方法包括:

(a) 使 hsiRNA 混合物变性以形成未配对 RNA 链的混合物;

(b) 用酶除去混合物中每条链上的 5' 端磷酸基团;

(c) 将各条链的 3' 羟基端连接到 DNA 引物上,该 DNA 引物在 5' 端和 3' 端都含有磷酸基团;

(d) 用酶磷酸化所得到的产物的 5' 端;

(e) 将各条链的磷酸化的 5' 端连接到第二 DNA 引物上,该第二 DNA 引物具有未磷酸化的 3' 末端;

(f) 反转录步骤 (e) 中的 DNA-RNA 嵌合产物以形成互补的 DNA 片断;以及

(g) 将一个或多个 DNA 片断插入到载体中以形成序列的文库。

26. 根据权利要求 25 的方法,其中步骤 (f) 进一步包括对 DNA 片断进行聚合酶依赖型的扩增。

27. 根据权利要求 25 的方法,其中所述载体是 pUC19 或者 Litmus 载体。

28. 制备 hsiRNA 混合物的试剂盒,包括:RNaseIII 的制备物、含有浓度范围为 5mM-100mM 的锰离子的 RNase 缓冲液。

29. 根据权利要求 28 的试剂盒,还包括:合成大双链 RNA 所需要的体外转录试剂。

30. 根据权利要求 1-9 的任一方法生成的 hsiRNA 混合物在制备药剂中的用途,当所述药剂导入真核细胞时,降低目标基因的表达。

31. 根据权利要求 30 的用途,其中所述药剂具有导致表型变化的特性。

32. 根据权利要求 31 的用途,其中所述表型变化可以是实施治疗或期望的特征的增强。

33. 根据权利要求 32 的用途,其中所述表型变化是对特定表型的诊断。

34. 根据权利要求 30 的用途,其中降低基因的表达是一种分析该基因产物在其中发挥

功能的生化途径的工具。

35. 根据权利要求 34 的用途,其中所述生化途径可以通过与诊断试剂组合来被进一步分析。

36. 根据权利要求 35 的用途,其中所述诊断试剂是一种或者多种抗体。

37. 根据权利要求 30 的用途,其中所述真核细胞是转基因动物的组分,该转基因动物是从含有所述 DNA 序列的受精卵细胞产生的。

38. 用于体外鉴定能够增加目标基因的基因沉默的 hsiRNA 混合物的快速探索方法,包括:

(a) 合成多个大双链 RNA,每个大双链 RNA 都具有与目标基因的片断互补的序列;

(b) 在锰离子存在的条件下用 RNaseIII 消化各个大双链 RNA 以产生对应的 hsiRNA 混合物;

(c) 体外将各 hsiRNA 混合物导入到真核细胞中以测定基因沉默是否发生;以及

(d) 确定所述 hsiRNA 混合物中哪些混合物导致了增强的基因沉默。

39. 根据权利要求 38 的方法,进一步包括:

从 hsiRNA 混合物中选择一个单独的 siRNA 片断,并将这些单个的 siRNA 片断体外导入到真核细胞中以实现所需的基因沉默。

与基因沉默相关的方法和组合物

[0001] 交叉参考

[0002] 本申请要求了提交于 2002 年 8 月 12 日的美国临时专利申请 60/402,769、提交于 2002 年 8 月 30 日的美国临时专利申请 60/407,543、提交于 2003 年 5 月 2 日的美国临时专利申请 60/467,541 的优先权。这些专利申请在此引入作为参考。

[0003] 发明背景

[0004] 采用短的双链 RNA(siRNA) 的 RNA 干扰 (RNAi) 是在哺乳动物细胞中沉默 (silencing) 基因表达的一种强大工具 (参见,例如美国专利号 6,506,559、国际公开号 WO 01/29058、国际公开号 WO 01/68836、国际公开号 WO 01/75164、美国公开号 20020224784、美国公开号 20030125281、美国公开号 2002162126、美国公开号 20030108923、美国公开号 20020173478、Fire, et al. *Nature* 391 :806-811(1998) ;Yang, et al., *Mol. Cell. Biol.* 21 :7807-7816(2001) ;Elbashir, et al., *Nature*411 :494-498(2001) ;Hammond et al. *Nat. Rev. Genet.* 2 :110-119(2001) ;Sharp, *Genes Dev.* 15 :485-490(2001))。

[0005] 获得 siRNA 的标准方法依赖于预先确定的短序列的昂贵的化学合成。由于并不是目标序列的所有部分在沉默过程中都是等效的,因此有必要生成化学合成片断的文库来鉴定那些有效的序列 (Holen et al. *Nucleic Acids Res.* 30/20 :e46(2002))。

[0006] 另外一种获得 siRNA 的方法依赖于体外转录 (参见, Donze and Picard, *Nucleic Acids Res.* 30 :1757-1766(2002) 和 Paddison et al. *Genes and Dev.* 16 :948-958(2002))。虽然这种方法不需要化学合成,但是它依然需要挑选和检测单独的短序列以鉴定哪些是最有效力的。

[0007] 数种将双链 RNA 分子剪切成短片断的酶学方法已经被报道了。一种据信能够在体内条件下剪切大的 dsRNA 以产生 siRNA 的进化保守的酶已经被鉴定为 DICER (Bernstein, et al., *Nature* 409 :363-366(2001))。这种酶含有解旋酶基序 (motif)、PAZ (PIWI-ARGONAUT-ZWILLE) 结构域和与 RNase III 类似的催化结构域的串联重复。可能含有 DICER 的果蝇抽提物与大的 dsRNA 在体外条件下混合,可以产生在一定大小范围内的短 dsRNA。在这种混合物中对于 RNAi 应用的优先大小已经被 Tuschl 等人确定,是 21-23 个核苷酸 (国际公开号 WO 01/75164)。采用含有假定的剪切酶的粗细胞抽提物所带来的相关问题是,比如,不清楚蛋白混合物中什么蛋白是必要的,而且足够可以产生上述观察到的效应。另外,这种抽提物在剪切大的双链 RNA 时显得不是非常有效,只有相对少量的起始材料会在体外条件下被剪切成所需要的大小,甚至是在经过延长的处理时间之后 (Paddison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99 :1443(2002))。

[0008] 最近,哺乳动物的 Dicer 已经由杆状病毒细胞表达系统重组获得。在杆状病毒侵染的昆虫细胞中产生的重组 DICER 的裂解物被报道可以在镁离子缓冲液存在的情况下由大的双链 RNA 生成短的双链 RNA 片断。经过纯化的 siRNA 片断被用于在培养的哺乳动物细胞系中“沉默”同源基因的表达 (Myers et al. *Nature Biotechnology*, 21 :324-328(2003))。这种方法的局限包括昂贵的杆状病毒表达系统、双链 RNA 起始材料的不完全消化,以及需要基于胶的纯化或者其它纯化步骤以便在进行沉默实验之前除去前体

RNA。

[0009] 另外一种生成小的双链 RNA 的酶学方法是采用大肠杆菌的 RNaseIII 在镁离子存在的条件下部分消化大的双链 RNA (Yang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99 : 9942-9947 (2002))。与这种方法相关的问题包括在大于大约 15 个核苷酸的特定大小范围内双链片断的低回收量, 以及为了避免消化过度或者消化不足而要进行滴定的相关的不方便。除非消化被仔细地监控, 否则在镁离子存在的条件下用 RNaseIII 剪切大的双链 RNA 会生成非常小的片断, 这一般被认为在 RNAi 中是没有用途的。仔细的滴定和掌握最佳的部分消化时间会在整个胶上出现拖尾 (smear), 之后, 具有特定大小的部分就可以被分离出来, 用于培养的哺乳动物细胞的 RNA 沉默 (Yang, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99 : 9942-9947 (2002))。这种方法的问题是在下述一些方面缺少确定性: (a) 终止产物, 在这里终止产物涉及具有大于大约 15 个核苷酸的特定大小的 dsRNA 的产率, (b) 剪切产物所代表的大双链 RNA 序列的范围。后者可能很重要, 因为并不是长的双链 RNA 序列的所有部分都被认为在基因沉默中具有等同的效应, 也许重要的序列所占的比例不够, 而不重要的序列所占的比例过大。

[0010] 由于基因沉默已经成为理解细胞和生物体中分子功能的重要方法, 这就需要有一种快速、费用低廉和可靠的方法来获得适合于任何基因的沉默的双链 RNA。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明的一个实施方案提供了用于产生不均一 siRNA (hsiRNA) 混合物的方法, 这个方法包括在含有二价过渡金属阳离子和 RNaseIII 的反应混合物中消化大的双链 RNA 的制备物。在过渡金属离子存在的条件下用 RNaseIII 消化大的双链 RNA, 可以在 RNaseIII 与大双链 RNA 的重量比为大约 0.005 : 1 到 25 : 1 之间时进行。在更加特别的情况下, 这个重量比在大约 0.0125 : 1 到 10 : 1 之间。可以用于制备 hsiRNA 混合物的过渡金属离子包括锰、镍、钴、锌和镉。二价过渡金属离子的合适浓度大约是 5-100mM。尽管浓度不是非常关键的, 但 10-20mM 的锰离子是优选的范围。hsiRNA 的生成可能在大约 6 小时之内就完成了, 优选在大约 2 小时之内完成, 或者更优选在 1 个小时之内或者甚至在大约 5 分钟的时间内完成。

[0013] 本发明的一个实施方案提供了产生不均一 siRNA (hsiRNA) 混合物的方法, 这个方法包括在含有 RNaseIII 的反应混合物中在酶与底物的重量比高于或者等于大约 0.25 : 1 时消化大的双链 RNA 的制备物。

[0014] 在本发明的一个实施方案中, 沉默或者降低一个或者多个目标基因的表达的方法包括向宿主细胞中导入能够沉默或者降低目标基因的表达的 hsiRNA 混合物。相应地, 这种 hsiRNA 可以通过下面两种方法制备: (a) 在含有二价过渡金属阳离子和 RNaseIII 的反应混合物中消化大双链 RNA 的制备物, 或者 (b) 在含有 RNaseIII 的反应混合物中在酶与底物的重量比高于或者等于大约 0.25 : 1 时消化大双链 RNA 的制备物。一系列不均一双链 RNA 片断可以被导入到宿主细胞中, 其中这些片断具有重叠的序列, 而且大小为大约 15-30 个碱基。通过应用 RNaseIII 的体外酶切由大双链 RNA 获得了 hsiRNA, 这套 hsiRNA 所具有的序列则代表了上述大双链 RNA 的序列的实质部分。在上述这些方法中, 大双链 RNA 具有的核苷酸序列与整个或部分的目标基因或 mRNA 互补。

[0015] 本发明的一个实施方案提供了一系列双链 RNA 片断, 其中包括多个大小为大约

15-30 个核苷酸的重叠片断,这些重叠片断来自于一个或者多个大双链 RNA 的体外酶切,其中酶优选纯化的,所述重叠片断代表了所述的一个或者多个大双链 RNA 的序列的实质部分。大双链 RNA 的其中一条链特征地具有与目标信使 RNA 的部分或者整个序列互补的序列。优选地,在任何胶纯化步骤之前,这一系列片断中至少有大约 50% 的片断的大小在 21-22 个核苷酸之间。

[0016] 大双链 RNA 的序列中被这一系列双链 RNA 片断代表的实质部分的比例可以超过 50%,或者优选超过 65%。另外,这一系列 RNA 片段中有超过 30% 的 RNA 片断可以具有大约 18-25 个碱基对的片段大小。此系列中至少一个片断,但多达至少 50%,或者 75% 或者甚至是 100% 的片断都可以导致目标 mRNA 的剪切。这些片断另外还可以在导入到真核细胞的时候导致基因沉默。

[0017] 本发明的另外一个实施方案提供了构建 DNA 克隆文库的方法,其中,每个克隆对应于来自于 hsiRNA 混合物的一个或者多个双链 RNA 片断。这个方法包括步骤:(a) 将 hsiRNA 混合物变性,形成未配对的 RNA 链的混合物;(b) 将第一单链 DNA 引物连接到未配对的 RNA 链的 3' 端,将第二单链 DNA 引物连接到未配对的 RNA 链的 5' 端;(c) 反转录嵌合的 DNA-RNA 产物,形成互补 DNA 片断;(d) 采用第二单链引物来合成第二链,从而由被反转录的 DNA-RNA 产物合成双链 DNA,或者采用依赖于聚合酶的扩增方法来扩增这种 DNA-RNA 产物;以及 (e) 将一个或者多个 DNA 片断插入到载体中,形成 DNA 克隆文库。这个实施方案还可以包括在第一个连接步骤之前用酶学方法去除各条链 5' 端磷酸的步骤,以及在第二引物连接之前将第一引物连接的产物的 5' 端通过酶学方法进行磷酸化的步骤。

[0018] 在上述 (b) 步骤中, RNA 链的 5' 端可以被去磷酸化,而 RNA 链的 3' 端可以含有羟基。上述的第一 DNA 引物可以在 5' 端和 3' 端都含有磷酸基团,它在第二引物被连接到 5' 端之前连接到 RNA 链的 3' 端。另外,已与第一引物连接的 RNA 链可以进一步被磷酸化,然后再与第二引物连接。在这个反应中第二引物可以在其 3' 端没有被磷酸化。在上述方法中用到的载体可以是 pUC19 或者 Litmus 载体。然而,任何适合于克隆 DNA 片断的载体都可以使用,包括那些用于在真核细胞中表达的载体。

[0019] 通过上述方法产生的 DNA 克隆可以用于降低真核细胞中一种或者多种目标基因的表达。在细胞或者生物体中降低目标基因的表达提供了分析在这样的细胞或者含有这样的细胞的组织或者整个生物体中由此导致的表型变化的手段。对基因表达在表型中的作用的理解可以了解疾病的机理和治疗和诊断疾病的方法提供深入的认识。它还可以为增强生物体中某种需要的特性提供途径。利用上述的 hsiRNA 混合物或者 DNA 克隆进行的基因沉默所导致的基因表达的改变可以为分析该基因产物在其中发挥功能的生化通路提供有价值的工具,而且可以与其它试剂比如抗体一起使用。

[0020] 上述 DNA 克隆的可用性为制造非人类的转基因动物创造了机会,其中特定目标基因的表达由于可表达特定 siRNA 片断的重组 DNA 的存在而被改变。

[0021] 在本发明的一个实施方案中,提供了制备 hsiRNA 混合物的试剂盒,其中包括 RNaseIII 的制备物、含有浓度范围为大约 5mM-100mM 的锰离子的 RNase 缓冲液,以及用于合成大双链 RNA 的可选的试剂。

[0022] 本发明的一个实施方案提供了获得大双链 RNA 分子的方法,它包括:(a) 将编码双链 RNA 的 DNA 片断或 DNA 片断文库插入到载体中,该载体的克隆位点的两侧具有相反方向

的启动子比如 T7 启动子 ;(b) 进行体外或者体内转录 ;以及 (c) 获得大的双链 RNA 分子。

[0023] 在本发明的一个实施方案中,提供了用于鉴定 hsiRNA 混合物是否能够增加目标基因沉默的快速发现方法,它包括:(a) 合成一系列大双链 RNA,每个大双链 RNA 都具有与目标基因的一个片段互补的序列;(b) 在锰离子存在的情况下用 RNaseIII 消化各个大双链 RNA,生成相应的 hsiRNA 混合物;(c) 将各 hsiRNA 混合物导入到真核细胞中检测是否有基因沉默发生;以及 (d) 确定哪一种 hsiRNA 混合物导致了增强的基因沉默。可以通过组合一种预选的 hsiRNA 混合物和第二种被挑选的 hsiRNA 混合物,或者,基于沉默作用的活性 (silencing activity),将来自于 hsiRNA 混合物或其一部分的各个 siRNA 片断组合起来以进一步增强基因沉默的效果。这些片断可以被组合,形成一种具备所需的基因沉默活性的新的混合物。

[0024] 本发明的一个实施方案提供了由 mRNA 中的剪切位点来鉴定对应于 siRNA 的序列的方法,这个方法包括:(a) 通过酶学方法获得 hsiRNA 混合物;(b) 将 hsiRNA 导入到细胞中;(c) 从该细胞中提取被剪切的 mRNA;(d) 确定被 siRNA 剪切的 mRNA 的剪切位点处的末端核苷酸的序列;以及 (e) 通过剪切位点的序列和邻近的核苷酸由完整的 mRNA 鉴定出 siRNA 的序列。这种方法可以被利用以获得一系列的 siRNA 片断,其包括大小为约 15-30 个核苷酸的与 mRNA 特异性地结合以起始 mRNA 的剪切的双链 RNA。

附图说明

[0025] 图 1A 显示的是 Mn^{2+} 离子浓度对 hsiRNA 混合物的生成的影响。

[0026] 20 微升的反应混合物中含有对应于人类 PKR 基因的 400bp 的双链 RNA (0.25 微克)、大肠杆菌 RNaseIII (终浓度 $0.05 \mu g / \mu l$),以及 5、10、20、50mM 的氯化锰缓冲液 (泳道 2-5) 或者 10mM 的氯化镁缓冲液 (泳道 6),将反应物在 37 摄氏度温浴 20 分钟。消化产物用 20% 的 TBE 丙烯酰胺凝胶分析。在各种浓度的锰离子存在的情况下获得的 20-25bp 的片断的量都比在镁离子存在的情况下要多。

[0027] 图 1B 显示的是不同的 RNase 浓度在 20mM 锰离子缓冲液中对 hsiRNA 混合物的形成的影响。

[0028] 50 微升的反应混合物中含有对应于萤火虫荧光素酶的 1000bp 的双链 RNA ($2.5 \mu g$),以及 0、0.5、1、2、4、8 和 16 微升的 RNaseIII ($1.36mg/ml$),在 37 摄氏度消化 20 分钟。反应被终止以后,将每个反应的 $40 \mu l$ 样品用 20% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。大小在 20-25 个碱基对之间的 hsiRNA 混合物 (用括号标示) 的量用荧光密度计检测溴化乙锭染色的胶来确定,结果如直方图所示 (荧光强度 \times 面积)。4 微升的 RNaseIII ($1.36mg/ml$) 就足以产生一定比例的在所需大小范围内的片断。

[0029] 图 1C 表示的是如何确定 RNaseIII 和底物的优化比例以有效地产生 hsiRNA 混合物,其中使用可变数量的 RNaseIII 和固定量的底物。

[0030] 50 微升的反应混合物中含有对应于线虫几丁质合成酶的 1000bp 的双链 RNA ($0.56 \mu g$),用不同量的 RNaseIII 消化。泳道 2-5 的 RNaseIII 和底物的重量比分别被计算出来,为 1.7、0.8、0.4 和 0.2。该剪切缓冲液含有 10mM 的氯化锰。泳道 2-9 的每个 50 微升样品中含有的酶的数量是 0.1、0.05、0.025、0.012、0.006、0.003、0.0015、0.0007 $\mu g / \mu l$ 。泳道 1 含有双链 DNA 标记分子,泳道 10 不含有酶。

[0031] 图 1D 表示的是如何确定 RNaseIII 和底物的优化比例以有效地产生 hsiRNA 混合物,其中使用固定量的 RNaseIII 和可变数量的底物。

[0032] 50 微升的反应混合物中含有浓度为 $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的 RNaseIII 和可变数量的几丁质合成酶双链 RNA,其中泳道 1-4 中的底物浓度分别是 $0.69 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、 $0.37 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、 $0.17 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 和 $0.06 \mu\text{g}/\mu\text{l}$,RNaseIII 和底物的比例(重量比)分别是 0.2、0.4、0.8 和 1.7。

[0033] 图 1E 表示的是在 10mM 锰离子存在的条件下温浴时间对 hsiRNA 混合物形成的影响。5.6 微克的双链 RNA(1000bp) 在 100 微升溶液中用 10 微克总 RNaseIII 消化。每个泳道含有反应混合物的十分之一,对应的反应时间为 1、10、20、30、40、60、90、120 和 180 分钟(泳道 1-9)。泳道 10 含有双链 DNA 标记分子。

[0034] 图 1F 显示的是在 Pharmacia Q Sepharose HP 阴离子交换柱上纯化 hsiRNA。将 1 毫克 CREB 双链 RNA(800bp) 在 50mM Tris-HCl,pH 7.5、20mM MnCl_2 、1mM 二硫苏糖醇中于 37 摄氏度用 1 毫克 RNaseIII 消化 20 分钟。消化后的样品直接上样到 1 毫升的 Q Sepharose HP 柱子上,用 5 毫升的 10mM Tris-HCl,pH 7.5(缓冲液 A)清洗,用梯度为 0-2.0M NaCl 的缓冲液 A 进行洗脱。使用的流速为 2ml/分钟。RNaseIII 在 NaCl 浓度为 0.025-0.2M 之间时从柱子上洗脱下来。泳道 1-10 显示的是来自于柱子的 hsiRNA 洗脱物的谱图,箭头(泳道 6)对应于主要是大约 18-25 个碱基长度的 hsiRNA 被洗脱下来的梯度(0.40-0.45M NaCl)的位置。

[0035] 图 2 显示的是 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 和 Ni^{2+} 对 RNaseIII 消化 GFP 双链 RNA(800bp) 的影响。

[0036] 每个终体积为 50 微升缓冲液的反应混合物中含有 1 微克 GFP 双链 RNA,以及终浓度为 10mM 的金属离子: Mg^{2+} (泳道 1 和 2)、 Mn^{2+} (泳道 3 和 4)、 Co^{2+} (泳道 5 和 6)、 Ni^{2+} (泳道 7 和 8),对于每种金属离子分别使用 $0.04 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 和 $0.02 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的 RNaseIII。泳道 9 是全长的 GFP 双链 RNA。泳道 M 含有的标记是 20、40、60、80bp 长的双链 DNA。

[0037] 图 3A 显示的是用嵌入染料检测的 DNA 片断(左边)与用放射性标记的 hsiRNA 片断作为探针检测的 DNA 片断之间的相关性,其中 hsiRNA 片断来自于对应于 DNA 底物的双链 RNA。

[0038] p53 的 DNA 片断被用作模板来生成 hsiRNA 混合物,如实施例 VII 所示。泳道 1 显示的是未消化的 DNA;泳道 2 显示的用 AclI 消化的 DNA;泳道 3 显示的是 100 个碱基的梯度标记。DNA 样品在琼脂糖凝胶上分离之后,用溴化乙锭染色(左图),然后根据实施例 III 再被转移到膜上。然后这些 DNA 被经胶纯化的标记 hsiRNA 混合物检测(右图)。

[0039] 图 3B 显示的是图 3A 中第二泳道中各条带的溴化乙锭荧光强度(线)和放射性活性(条形图)的定量分析。染色胶和放射性胶上的条带的强度对应于基于片断大小的预测信号。DNA 杂交的信号表明,放射性 hsiRNA 可以代表母本 RNA 的整个长度。

[0040] 图 4A 是克隆 RNaseIII 消化产物的方法示意图。

[0041] 图 4B 是 malE 转录子的序列(SEQ ID NO:1),其两侧为被反向的 T7 启动子围住的 Litmus 28i 多接头序列(polylinker sequence)。开始被用来将 malE 克隆到 Litmus 的限制性位点被标记出来。箭头对应于如图 4A 中所示的被克隆的序列;箭头所指的方向标示着该序列对应于所示的序列(从左到右)或者其互补链(从右到左)。

[0042] 图 4C 是 GFP 转录子的序列(SEQ ID NO:2),其两侧为被反向的 T7 启动子围住的

Litmus 28i 多接头序列 (polylinker sequence)。开始被用来将 GFP 克隆到 Litmus 的限制性位点被标记出来。箭头对应于如图 4A 中所示的被克隆的序列;箭头所指的方向标示着该序列对应于所示的序列(从左到右)或者其互补链(从右到左)。

[0043] 图 4D 是一个直方图和表格形式的总结,它报告了插入到各个 DNA 克隆中的插入物的长度。这些数字是通过分析所有 malE 和 GFP 克隆而得到的。y 轴代表克隆的数目,而 x 轴表示的是插入物的长度。

[0044] 图 5 表示的是,用 Ffluc 的 hsiRNA 混合物转染果蝇细胞(实施例 VI),基本上沉默了 GL-2 萤火虫荧光素酶,而在 Mg^{2+} 存在和 Mn^{2+} 缺乏的条件下获得的 RNaseIII 消化产物没有这样的效果。

[0045] 特异的目标基因沉默是通过比较在同时表达萤火虫荧光素酶和海肾(Renilla)荧光素酶的果蝇细胞被针对萤火虫荧光素酶的 hsiRNA 混合物转染之后其细胞提取物的发光来证明的。该比较是用直方图来表示萤火虫荧光素酶发光和海肾荧光素酶发光的比值,即相对发光单位(RLU)。在直方图中显示的是:对照细胞,没有转染任何形式的双链 RNA 片断;对应于荧光素酶的未消化的双链 RNA(luc:1.2kb);在镁离子存在的条件下用 RNaseIII 剪切后的 Ffluc 双链 RNA(luciiimg);转染了 Ffluc hsiRNA 的细胞(luciii mn);和转染了 22bp 的化学合成的针对 GL3 荧光素酶的 siRNA 的细胞(siluc)。

[0046] 图 6A 显示的是,用荧光显微技术观察到的 GFP hsiRNA 混合物有效地沉默绿色荧光蛋白(GFP)在 HEK-293 细胞中的表达。(i)对照,其中细胞已经转染了含有 GFP cDNA 的质粒;以及(ii)转染了含有 GFP cDNA 和对应于 GFP 的 hsiRNA 的质粒的细胞(实施例 III)。

[0047] 图 6B 显示的是,对于所使用的 hsiRNA,基因沉默是特异性的。HEK-293 细胞中荧光素酶的量通过发光强度(RLU)来测量,在没有转染双链 RNA(ctrl)的细胞和转染了来源于 GFP 双链 RNA 的 hsiRNA(GFP-RNasesIII)混合物的细胞中都没有观察到对荧光素酶活性的影响。

[0048] 图 6C 显示,hsiRNA 混合物和合成的 hsiRNA 同样有效地沉默荧光素酶。HEK-293 细胞中的荧光素酶是通过发光强度(RLU)来测量的。没有转染双链 RNA 的细胞(ctrl);转染了来自于萤火虫荧光素酶双链 RNA 的 hsiRNA 混合物的细胞(Ffluc-hsiRNase);转染了针对 GL3 荧光素酶的合成 siRNA 的细胞(GL3-siRNA)。hsiRNA 混合物和 siRNA 混合物结果都导致目标荧光素酶的沉默。

[0049] 图 7 显示的是在 COS-7 细胞中用 GFP hsiRNA 进行目标基因沉默的潜力。荧光显微技术显示,转染了表达 GFP 的质粒和 6ng GFP hsiRNA 的细胞有基因沉默发生(b),转染了表达 GFP 的质粒和 30ng GFP hsiRNA 的细胞有基因沉默发生(c),而在对照细胞(没有转染双链 RNA)(a)、用 5ng PKR hsiRNA 转染的细胞(d)或者用 30ng PKRhsiRNA 转染的细胞(e)中都没有可检测到的基因沉默发生。

[0050] 图 8 显示的是,猴 COS-7 细胞在用人 p53hsiRNA 混合物或者 Rluc-hsiRNA 混合物转染之后内源性的猴 p53 和转染的人 p53 的表达沉默。COS-7 细胞同时转染了表达海肾荧光素酶(Rluc)的质粒。

[0051] 图 8A 显示的是用抗 p53 抗体对细胞抽提物的蛋白质印记分析。E > 指示的是内源 p53 的位置,而 T > 指示的是转染的 p53 片断(氨基酸 100-353)的位置。蛋白质印记反映了细胞中转染的 p53 和内源的 p53 的数量:用 50ng Rluc-hsiRNA 转染之后(泳道 1);用

50ng 人类 p53hsiRNA 混合物转染之后 (泳道 2);用 100ng 人类 p53hsiRNA 混合物转染之后 (泳道 3);以及没有转染 (泳道 4)。

[0052] 图 8B 显示的是, Rluc-hsiRNA 沉默所转染的细胞中的海肾荧光素酶表达,如图 8A 中所示,而 p53-hsiRNA 混合物对于荧光素酶的表达没有任何影响。直方图中标记着 1、2 和 3 的条柱对应于图 6A 中的泳道 1、2 和 3,这里测量的是海肾荧光素酶的表达水平 (RLU)。直方图显示,在泳道 1, Rluc-hsiRNA 混合物沉默了荧光素酶的表达,但没有沉默 p53;在泳道 2 和 3,有效地沉默内源 p53 和人类 p53 的 p53-hsiRNA 混合物对海肾荧光素酶没有明显的沉默效应。

[0053] 图 9 是试剂盒的示意,该试剂盒可以用于制备任何所需的大双链 RNA,它在锰存在的条件下用 RNaseIII 剪切,这样就形成了可以转染到细胞中以用于基因沉默研究的 hsiRNA 混合物。

[0054] 图 10A 是使用了抗 DnMt1 抗体的蛋白质印记,它说明了三种 hsiRNA 混合物对 DnMt1 的基因敲除效应,其中每一种混合物对应于一段不同的 DnMt1 片断。这种基因敲除效应是通过对应蛋白条带的减弱或者消失来检测的。

[0055] 泳道 1 含有来自未转染细胞的抽提物;

[0056] 泳道 2 含有转染了表达 DnMt1 的质粒的细胞的抽提物;

[0057] 泳道 3 含有转染了表达 DnMt1 的质粒和对应于荧光素酶的 100ngsiRNA 的细胞的抽提物;

[0058] 泳道 4 含有转染了表达 DnMt1 的质粒和对应于 DnMt1 片断 1 的 100ng hsiRNA 的细胞的抽提物;

[0059] 泳道 5 含有转染了表达 DnMt1 的质粒和对应于 DnMt1 片断 3 的 100ng hsiRNA 的细胞的抽提物;

[0060] 泳道 6 含有转染了表达 DnMt1 的质粒和对应于 DnMt1 片断 2 的 100ng hsiRNA 的细胞的抽提物。

[0061] 图 10B 是使用了抗 p53 抗体的蛋白质印记,它表明在图 10A 中所示的三种混合物缺乏对 p53 表达的基因敲除效应。泳道 1-6 含有的抽提物如图 10A 所述。

[0062] 图 11 是用于鉴定目标 mRNA 中 siRNA 诱导的剪切位点的示意:

[0063] (a) 具有已知序列的目标 mRNA,它将接受 hsiRNA 混合物的处理,所述的 hsiRNA 混合物是在 20mM 锰离子存在的条件下用 RNaseIII 剪切大双链 RNA 而获得的 hsiRNA 混合物。

[0064] (b) 剪切后的 mRNA 片断。

[0065] (c) 被标记过的延伸 DNA 引物和延伸产物。

[0066] (d) 引物延伸产物在测序凝胶上被分析。

[0067] 实施方案描述

[0068] 在存在含有锰离子或者其他二价过渡金属离子的缓冲液和 / 或高的酶与底物比的条件下,用 RNaseIII 消化得到不均一的小双链 (ds)RNA 片断的混合物,其含有相互重叠的序列,代表着大双链 RNA 序列的实质上的一部分,这些片断可以有效地沉默基因表达。

[0069] 由大双链 RNA 生成用于基因沉默的小双链 RNA 的酶学方法比化学合成方法具有优势。然而, DICER 抽提物或者重组 DICER 只能够以较低的量获得,而且其在体外条件下的剪切相对不是很有效。另外, DICER 剪切 RNA 的机制可能导致在所产生的混合物中只

有很少的能够作为用于沉默的潜在 siRNA (Zhang et al. *EMBO J.* 21 :5875-5885 (2002) ; Amarzguiouri, et al., *Nucleic Acids Res.* 31 :589-595 (2003))。

[0070] 相反,可快速地大量制备且活性很高的 RNaseIII 却迅速地将大双链 RNA 剪切成对于基因沉默没有效果的片断。

[0071] RNaseIII 的酶学特性已经由于基因沉默之外的其它原因而被研究过了。在这些实验中,一些实验用其他二价阳离子代替了酶缓冲液中的镁离子。然而,结论是这样的替换对于 RNaseIII 活性来说,其效果还不如镁。(Li et al. *Nucleic Acids Res.* 21 :1919-1925 (1993) ;Yang, et al., *Mol. Cell. Biol.* 21 :7807-7816 (2001) ;Zhang, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 :13437-13441 (1997) ;Robertson, et al., *J. Biol. Chem.* 243 :82-91 (1968) ;J. J. Dunn, "The Enzymes", (P. D. Boyer, ed.), p. 485, Academic Press, New York (1982) ;D. Court, "Control of Messenger RNA Stability" (J. G. Belasco and G. Brawerman, eds.), p. 71 Academic Press, New York (1993) ;and Nicholson, *FEMS Microbiol. Rev.*, 23 :371 (1999))。Sun 和 Nicholson (*Biochem.* 40 :5102-5110 (2001)) 利用 Mn²⁺ 离子阐明了这种酶与一个 60 个碱基长的发夹 RNA 的反应机制,所述的 RNA 对应于 RNaseIII 的一种已知的天然底物。这篇文献报道说在锰离子存在的条件下, RNaseIII 的活性高峰是在 3mM 的锰离子浓度时,然后随着锰离子浓度的升高活性急剧下降。锰被认为在高浓度时会结合到该酶的抑制位点上。

[0072] 尽管在现有技术中用其它的二价阳离子替换镁离子带来的结果并不是乐观,锰离子对 RNaseIII 活性的影响还是在这里被研究,以确定其对大双链 RNA 的剪切的影响。在此报道的发现为制备新的耗费低的、生物上有效的基因沉默试剂的新方法提供了基础。

[0073] 在此描述的方法具有的优势包括:

[0074] (a) 通过一个快速且耗费低的程序获得增加浓度的具有适合于基因表达沉默的大小的双链 RNA 片断,而且这个流程不依赖于基于胶的大小分离步骤。这种方法提供了 hsiRNA 混合物,其含有一系列的双链 RNA 片断,其中少于大约 5% 是未被剪切的大双链 RNA,多于大约 8% 是具有 18-25 个碱基对之间的片段大小。事实上,在这种方法的一个实施方案中,混合物可以含有超过 15%、20% 或者 40% 的片断具有的大小在 18-25 个碱基对之间。由于它的简单性,这个方法可以胜任自动化和高通量;

[0075] (b) 形成具有基因沉默活性的双链 RNA 片断的制备物,而不需要鉴定引起基因沉默效应的特定片段;

[0076] (c) 提供了利用该方法的产物的一种手段,即克隆单个的片断或者形成克隆文库或克隆阵列,使得能够将这些片段相对于它们所源自的 RNA 进行作图,以及检测这些单个的片断的基因沉默活性;

[0077] (d) 提供 siRNA 试剂以用作以下应用:采用标准的核酸转染或者转化技术来沉默真核细胞或者生物体中的单个基因或者基因家族以研究其功能;以及

[0078] (e) 利用这些 siRNA 试剂作为治疗药物或者将其应用于治疗试剂筛选或者目标的确认分析。

[0079] 在说明书和相应的权利要求中使用的下面这些术语已经在下面被定义。除非在这些术语被使用的上下文中另有规定,这些定义应该都是适用的。

[0080] "hsiRNA 混合物"意指不均一 (h) 小双链 RNA 片断的混合物,这种混合物含有至少

一个适合于沉默基因表达的片断 (siRNA)。hsiRNA 混合物中的这些 RNA 片断中总是有一部分 (超过片断总数目的 15%) 片断具有 18-25 个碱基对的长度,这是通过溴化乙锭染色的非变性聚丙烯酰胺胶分析得到的结果。大于 25 个核苷酸或者小于 18 个核苷酸的片断的存在并不被排除。这种 hsiRNA 混合物优选在二价过渡金属离子——优选锰离子——存在的条件下,通过 RNaseIII 消化“大”双链 RNA 而得到。

[0081] “沉默”意指通过有目标地抑制细胞中的基因表达而导致部分或者全部的功能丧失,也可以称为“敲除”。根据环境和关注的生物学问题,部分地降低基因表达可能是优选的。作为选择,可能需要最大程度地降低基因表达。沉默的程度可以通过本领域已知的任何方法来确定,所述方法的一部分被总结于国际公开号 WO 99/32619,这篇文献在此引入作为参考。根据分析方法的不同,基因表达的定量允许检测不同程度的抑制,比如大于 10%、33%、50%、90%、95% 或者 99%。

[0082] “大双链 RNA”意指长度大于大约 40 个碱基对的任何双链 RNA,比如大于 100bp 的双链 RNA,或者更加特定的情况,大于 300bp 的双链 RNA。大双链 RNA 的序列可以代表 mRNA 的一个片断或者整个 mRNA。大双链 RNA 的最大长度在这里没有限制。双链 RNA 可以包括修饰的碱基,其中所述修饰可以是在磷酸-糖骨架上或者是在核苷上。这样的修饰可以包括氮或者硫杂原子或者本领域已知的任何其它修饰。双链 RNA 可以通过酶学方法、通过重组技术和 / 或通过化学合成 或采用商业化的试剂盒比如 MEGASCRIP[®] (Ambion, Austin, TX) 以及本领域已知的方法来制备。本发明的一个实施方案是利用 HiScribe[™] (新英格兰生物实验室公司,贝佛利,麻萨诸塞州) 来制备大双链 RNA。其它的制备和储存大双链 RNA 的方法在国际公开号 WO 99/32619 中有所描述。

[0083] 双链结构可以由自身互补的 RNA 链来形成,比如发夹 (hairpin) 结构或者微 RNA (micro RNA) 中出现的情况,或者通过两个不同的互补 RNA 链的退火来形成。

[0084] “不均一 (heterogeneous)”在用于 hsiRNA 混合物时,意指在二价过渡金属离子存在的条件下单个大双链 RNA 或者大双链 RNA 混合物经过 RNaseIII 剪切所产生的具有不同序列的双链 RNA 片断。这些片断从总体来看包含了来自于整个长度的大 RNA 的序列,因而形成了不均一的混合物。

[0085] “RNaseIII”意指自然发生的酶或者它的重组形式,而且可以包括突变体和衍生物或者同源物。在此描述的细菌 RNaseIII 可以在哺乳动物细胞中用于沉默操作的实用性也支持了在本实施方案中采用来自于真核生物或者原核生物的 RNase。本发明的实施方案并不排斥使用多于一种的 RNase 来制备 hsiRNA 混合物。在此定义的 RNaseIII 的特征是蛋白上的氨基酸保守序列 [DEQ]-[kRQT]-[LM]-E-[FYW]-[LV]-G-D-[SARH] (PROSITE : PDOC00448 文档,关于 RNaseIII)。

[0086] 在本实验中,当单位 (units) 被用于描述 RNaseIII 的浓度时,转换成重量 / 体积的公式为 :32 个单位 = 1 μ g / μ l RNaseIII。可溶的细菌 RNaseIII 酶可以从重组来源方便地纯化,而且现在已经商业化了 (新英格兰生物实验室公司,贝佛利,麻萨诸塞州)。

[0087] “完全消化”意指这样的 RNaseIII 反应,其中大于大约 50 个碱基对的双链 RNA 片断 (除了滞留在上样孔中或者与酶结合的消化物质之外) 已经不再能够在 20% 聚丙烯酰胺凝胶上用溴化乙锭染色检测得的。

[0088] “宿主细胞”意指培养的真核细胞或者动物细胞,包括脊椎动物比如哺乳动物,包

括人类,以及无脊椎动物比如昆虫。宿主细胞也意指来自植物或者微生物的细胞。

[0089] “重叠 (overlapping)”意指此时两个 RNA 片断具有的序列可以通过多个核苷酸重叠在一条链上,比如,其中所述的多个核苷酸 (nt) 的数目可以少至 2-5 个核苷酸或者是 5-10 个核苷酸或者更多。

[0090] “互补序列”意指这样的序列,它不一定要与与之杂交的序列 100%相同,但是在严紧条件 (stringent conditions) 下与特定的核酸杂交,其中所述的严紧条件可以包括:400mM NaCl、40mM PIPES pH6.4、1mM EDTA、50°C或者 70°C温浴 12-16 个小时之后清洗。序列差异可以被容忍,比如这些差异是由于遗传突变、株系多样性、进化差异或者化学修饰造成的。

[0091] 信使 RNA 的“部分或者全部”意指 mRNA 上与大双链 RNA 互补的部分。

[0092] “实质部分 (substantial portion)”意指大双链 RNA 序列中被 hsiRNA 混合物中含有的序列所代表的序列的量。在一个实施方案中,代表的序列的比例超过 20%。在另外一个实施方案中,代表的序列的比例可以大于 30%、40%、50%、60%、70%、80%或者 90%。

[0093] “一个或者多个双链 RNA”意指就序列而言彼此不同的双链 RNA。

[0094] “目标基因或 mRNA”意指任何感兴趣的基因或者 mRNA。事实上,以前通过遗传学鉴定或者通过测序鉴定的任何基因都可以代表一个目标。目标基因或者 mRNA 可以包括发育基因和调控基因,以及代谢基因或结构基因,或者编码酶的基因。目标基因可以在那些其表型正在被研究的细胞或者生物体中以一种直接或者间接影响表型特征的方式表达。目标基因可以是内源也可以是外源的。这样的细胞包括成年动物或者胚胎期动物体内的任何细胞,或者包括接合体在内的植物的任何细胞,或者是任何分离出的细胞,比如无限传代 (immortal) 细胞系或者原代培养细胞。

[0095] 要将 hsiRNA 混合物导入到脊椎动物、无脊椎动物、植物或者原生质体细胞或者微生物,可以将其直接引入细胞或者导入到细胞外的腔室或者肠道空间中,使其进入生物体的循环体系,可以通过口服、通过浸泡、通过透皮途径、通过穿透黏膜的途径、通过局部施用或者通过采用病毒载体来使 DNA 侵染宿主。

[0096] 转染或者转化的标准程序可以用于将 siRNA 导入到培养的细胞中,比如采用 Lipofectamine 2000、Oligofectamine (Invitrogen, Carlsbad, CA)、TRANS-IT **TKO**[®] (Mirus Corp., Madison, WI)、Targefect (Targeting Systems, Santee, CA)、磷酸钙或者电穿孔的程序。经过改造的含有 hsiRNA 片断或者 siRNA 片断的载体可以包括细菌载体、质粒或者用于转化或者转染整个生物体的病毒载体。可以利用用于植物的基因枪,比如导入双链 RNA 到叶绿体中。导入外源核酸到生物体或者细胞的方法已经在本领域广为人知。将 hsiRNA 混合物的 DNA 克隆导入到整个动物中可以通过用于导入核酸的标准技术来实现,所述的 DNA 克隆表达来自于特定的 hsiRNA 混合物的单个片断。

[0097] 在本说明书以及权利要求中,单数形式“一个”(a 或者 an)、“这个”或“那个”(the) 包括了对复数形式的引用,除非上下文清楚地另有说明。

[0098] 剪切的条件

[0099] 虽然下面提供了剪切的特定条件,但这些条件并不是限制性的。等同的配方和缓冲液可以方便地替代目前的实施方案。

[0100] hsiRNA 混合物可以由大双链 RNA、RNaseIII 酶和标准的含有二价过渡金属的缓冲

液形成。优选的过渡金属是锰而不是钴、镍、镉、锌或者其它也可能用于生成 hsiRNA 混合物的过渡金属离子（实施例 II）。所需反应产物的形成对于金属离子浓度不是非常敏感（实施例 I）。图 1A 显示，锰离子浓度在大约 5-50mM 之间的 $MnCl_2$ 浓度产生了所需的 hsiRNA 混合物。优选的浓度似乎在大约 10 到 20mM 锰离子浓度之间。

[0101] 为了消化大双链 RNA 底物以形成 hsiRNA 混合物，对不同的酶反应参数进行了优化，如下所述：

[0102] (a) 缓冲液条件：在实施例中使用的缓冲溶液是 50mM NaCl、10mM Tris-HCl, pH 7.9 (25°C)、1mM DTT, 以及进一步包括所选的过渡金属，或者是 100mM NaCl、50mM Tris-HCl、1mM DTT 和 10mM $MnCl_2$, pH 7.5 (25°C)。然而，使用其它的缓冲液和不同浓度的盐也在本实施方案的范围之内。类似地，对 pH 的改变也在本实施方案的范围之内。优选的 pH 范围在大约 pH 7 到 8.5。

[0103] (b) 反应时间：在过渡金属离子特别是锰离子存在的条件下用 RNaseIII 产生 hsiRNA 混合物的剪切反应在 10 分钟之内（图 1E）。当反应时间延长到 180 分钟时，得到的是类似量的 hsiRNA 混合物（图 1E）。需要正视的是，反应时间并不是一个极其关键的参数，根据实验者的方便，反应时间可以低于 10 分钟或者长于 180 分钟，比如 4 个小时或者 6 个小时或者更长。低于 1 分钟的反应时间或者只有 5 秒钟的反应时间都被应用，而且都得到了成功的结果。

[0104] (c) 反应混合物中酶的浓度：当酶被滴定且反应产物在胶上被分析时，图 1B 表明，RNaseIII 终浓度高于 $0.025 \mu g/\mu l$ 的时候就足以完全消化 $2.5 \mu g$ 大小为 1000 个碱基的双链 RNA（总体积是 $50 \mu l$ ）。在实施例 I 中，hsiRNA 的最大产量是用 $0.1 \mu g/\mu l$ 的 RNaseIII 在 37°C 消化 $0.056 \mu g/\mu l$ 1000bp 的双链 RNA 30 分钟之后得到的（这对应于大约一个 RNaseIII 单体对每 22bp 的双链 RNA 等同物）。

[0105] (d) RNaseIII 酶对底物的量（重量比）：

[0106] RNaseIII 酶对底物的比例（重量比）可以在大约 0.005 : 1 到 25 : 1 这个范围内被应用，在二价过渡金属离子存在的情况下将大双链 RNA 剪切成 hsiRNA 混合物。事实上，相对于底物的高浓度 RNaseIII 比如质量比在 2 : 1 到 3 : 1 之间可以有效地用于在没有过渡金属二价阳离子存在的情况下，在聚丙烯酰胺凝胶上得到对应于 21-23 个核苷酸的条带。这个条带中物质的数量随着酶与底物比例的增加而增加。然而，在没有过渡金属二价阳离子存在的情况下获得的产量一般要低于有过渡金属二价阳离子存在的情况下的产量。

[0107] 图 1B 描述的是采用大约 0.0125 : 1 到 8.8 : 1 范围的酶与底物比例得到的剪切产物，优选的比例是高于或者等于 0.25 : 1。图 1B 显示，在锰离子存在的条件下图 1B 中重量比为 0.5 : 1 的酶与底物可完全消化大双链 RNA。在 RNaseIII 和大双链 RNA 为高浓度比时的剪切（比如，0.25 : 1 到 2 : 1 到 15 : 1 的质量比）使得对应于 15-30 个核苷酸，特别是 21-23 个核苷酸的组份的产量增加。在锰离子存在的条件下，高浓度的酶进一步增加所需大小片断的产量。

[0108] (e) 除了锰之外使用其它的过渡金属二价阳离子：

[0109] hsiRNA 混合物可以在除了锰离子之外的其它二价过渡金属离子如 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cd^{2+} 或者 Fe^{2+} 存在的情况下生成（比如图 2 和实施例 II 中所示）。比如， $MnCl_2$ 、 $CoCl_2$ 、 $NiSO_4$ 、 $CdCl_2$ 或者 $FeSO_4$ 可以以 0.1-100mM，更优先的是 5-100mM，比如 10-20mM 的浓度，加入到反

应混合物中。在这里已经针对锰离子存在的情况详细描述了可优化反应的参数,可以肯定的是,也可以针对在其它二价过渡金属存在的情况下的 RNaseIII,确定优化反应条件,可以采用实施例 I-VII 中描述的方法确定 pH、缓冲液条件、温度、反应时间、酶和底物的浓度以及比例。在 10mM 浓度的各种二价过渡金属阳离子存在的条件下 RNaseIII 生成 hsiRNA 混合物的表现已经与在镁离子存在的情况下的表现进行了比较(图 1A 和图 2)。

[0110] 基因沉默领域内一个问题就是鉴定能够达到有效地切割特定信使 RNA 的目标的短双链 RNA (15-30bp)。在本发明的实施方案中,这个问题是这样解决的:利用大双链 RNA,该大双链 RNA 具有的序列和包括未翻译的 mRNA 在内的目标 mRNA 的整个序列或者部分序列相同,然后再将该大 RNA 剪切成多个重叠的大小适合于基因沉默的片断。实施例 III 和 IV 证明,这种剪切产物代表了大双链 RNA 的整个长度,实施例 VI 表明,这种 hsiRNA 混合物其中含有能够导致基因沉默的片断,这是通过转染包括昆虫细胞和哺乳动物细胞在内的各种细胞实现的。

[0111] 一旦 hsiRNA 混合物被获得,就有可能制备含有对应于混合物中单个双链 RNA 片断的 DNA 序列的克隆文库(实施例 IV)。如果提供合适的启动子,各个克隆都可以用于转染细胞,这样就提供了用于长时间地沉默基因所需要的源源不断的短双链 RNA。相比于通过向细胞转染双链 RNA 本身所达到的暂时基因沉默效果,向目标细胞或者生物体中转染单个克隆或者所选的克隆的混合物所导致的基因表达沉默可以例如在治疗应用方面具有特别的优势。这为医疗应用提供了新的试剂,提供了特异性地调控特定基因的表达的源源不断的药物。

[0112] 获得单个片断的克隆的其它优点是,正如在这里描述的,包括:(a) 为了解在通过双链 RNA 的剪切而得到的片断混合物中哪一个片断或哪一部分片断可以导致基因沉默,而其它片断不可以导致沉默提供了资源;(b) 为研究为什么一些 RNA 片断在基因沉默中有效,而其它则无效提供了工具;(c) 确定特定的 hsiRNA 针对特定的 mRNA 的特异性;(d) 确定由一种特定 RNaseIII 产生的 hsiRNA 混合物与不同的 RNaseIII 相比的独特特征,以及(e) 表征目标 mRNA 上被 hsiRNA 诱导剪切发生的位点;以及(f) 基于克隆片断的统计分析,产生用于设计合成的 siRNA 的计算机算法。

[0113] 基因沉默的特异性

[0114] 对于特定的目标 mRNA 的基因沉默特异性可以通过应用目标 mRNA 序列的 BLAST 分析,确定在该 RNA 中没有延伸的区域(超过 20 个碱基长度)与其它基因转录子相同以避免非特异性的基因沉默来确认。

[0115] 采用在这里描述的方法,针对基因家族中的单个成员具有特异性而不沉默这个基因家族的其它成员的 mRNA 的 hsiRNA 制备物可以由长双链 RNA 制备,所述长双链 RNA 与目标 mRNA 的一个片断(也称为长双链 RNA 片断)序列互补。另外,也可以制备对一个基因家族中的任何基因都有特异性而对该基因家族以外的其它基因没有特异性的 hsiRNA 制备物。

[0116] 合适的基因沉默效果可以通过以独特的 mRNA 序列或者形成一个 mRNA 家族的保守区域的部分或者全部的 mRNA 序列作为目标来完成。

[0117] 可以根据本方法制备“具超级潜力”的 siRNA 片断混合物,其中可选择性地被克隆且已经被鉴定能在目标 mRNA 的位点上诱发剪切的单个 siRNA 片断被组合在一起,从而获得具有所需要的基因沉默效果的混合物。

[0118] 本实施方案的一个优势是能够快速制备 hsiRNA 片断的混合物,这些 hsiRNA 片断可以在体内条件下被检测其活性,其中具有特定的序列特异性的一部分片断可以按照需要被挑选出来,而无需昂贵的化学合成来合成寡聚核苷酸片断,也无需由部分酶解或者含有天然发生的 DICER 的细胞粗提物所提供的更具偶然性的方法。在二价阳离子存在的条件下 RNaseIII 消化的一个优点就是整个大双链 RNA 基本上都被重叠的片断所代表。图 4 表示,超过 50%的 NheI-BsrGI GFP 序列被 hsiRNA 混合物中互补的 siRNA 片断所覆盖。已经预料,这一百分比还被低估了。一条链获得的克隆与另一条链获得的克隆相比较,发现有明显的偏差,这可能是涉及作为连接子的特异性引物或者克隆片断的部分取样。

[0119] 对基因沉默的深入认识可以通过改变由 DNA 模板表达得到的大 RNA 相对于目标 mRNA 的大小和序列特征来获得。比如,被进行一系列缺失操作或者被随机剪切的 DNA 模板可以用于生成不同大小的双链 RNA,经过在此描述的 RNaseIII 消化之后,可以检测它们在沉默中的效果(实施例 VIII)。

[0120] 实施例 VIII 说明了,对应于 mRNA 的片断并在二价阳离子存在的条件下被 RNaseIII 降解的双链 RNA 是如何有效地敲除培养细胞的基因表达的。不同的片断可能产生具有不同的敲除活性的混合物。比如,这个方法可以用来理解 mRNA 中与翻译序列相邻的长末端重复(LTR)区域的调控功能。

[0121] 对应于 DnMT 的片断 1、3 或 2(按有效性增加的顺序)的 hsiRNA 对 DnMT1 的敲除是通过对应的蛋白条带的降低或者消失(比较泳道 4、5、6 与泳道 2、3(上部的图))来检测的。在所有被检测的三种情况中,(片断 1、2 和 3) hsiRNA 处理的细胞都表现出目标 DnMT1 表达的有效敲除。片断 2 hsiRNA 的沉默效果要高于片断 1 和 3 hsiRNA。相反地,p53 条带的强度不被所有对应于 DnMT1 的 hsiRNA 混合物影响(图 10C)。

[0122] 检测来自于不同片断的 hsiRNA 是简单的,这为确定不均一 siRNA 混合物中 siRNA 分子的活性提供了目标序列的快速初步筛选。

[0123] 这里描述的方法还可以应用于生成可以用于同时沉默多个基因的多 hsiRNA 混合物。额外的用途包括用 hsiRNA 来靶向上游或下游调控区域以调节表达。相应地,通过一系列 DNA 模板的转录得到的大双链 RNA 的混合物可以在单个(多重化)反应中在二价过渡金属离子存在的条件下用 RNaseIII 消化和/或用高浓度酶消化。制备大双链 RNA 的方法在实施例 VII 中提供。

[0124] 上述的用于制备选择性的 siRNA 片断的 hsiRNA 混合物或其克隆的产生可以部分或者全部通过利用在实施例 VII 中所描述的试剂盒来实现。制备所需的大双链 RNA、生成 hsiRNA 混合物和用这样的混合物转染细胞的说明书已经被提供。实施例 IV 描述了这些混合物中的单个片断可以如何被克隆,以及它们的序列如何被分析和作图。

[0125] 目标 mRNA 的位点特异性剪切

[0126] 正如在这里描述的,通过用 RNaseIII 在高浓度或者过渡金属离子存在的条件下剪切大双链 RNA 得到的一系列双链 RNA 片断是重叠片断的不均一混合物。这种混合物可以通过剪切目标基因的 mRNA 转录子来沉默基因,其中大双链 RNA 与该 mRNA 中的序列互补。采用如实施例 IV 和 VI 中提供的方法来分析产生的 hsiRNA 混合物,允许最有效的目标序列的特征可以用单个核苷酸的分辨率来限定。

[0127] 对 RNAi 的机制研究已经证明,活性 siRNA 导致目标 mRNA 的位点特异性剪切,这

是通过将含有特定核酸酶的 RISC 复合物引导至目标序列来实现的 (Hannon et al. Nature 418 :244-251(2002), Zamore et al. Cell 101 :25-33(2000) 和 Elabshir et al. Genes Dev. 15 :188-200(2001))。被 RISC 复合物剪切的 mRNA 片断可以用 RNA 杂交来检测 (Amarzguioui, et al., Nucleic Acids Res. 31 :589-595(2003))。剪切事件发生的核苷酸位置被发现是在离相应的 mRNA 末端 10 个碱基的位置,其对应于 21 个核苷酸的 siRNA 的中间的序列位置 (Martinez et al. Cell 110 :563-574(2002))。mRNA 上的 RISC 剪切位点因此可以用于推测指导剪切发生的对应 siRNA 的序列。

[0128] 从如实施例 VI 和 VIII 所述的具有基因沉默活性的 hsiRNA 混合物开始,有可能应用标准的方法比如 RNase 保护分析 (Rnase protection assay) 和引物延伸分析 (primer extension analysis) 来分析目标 mRNA 上的一个或者多个剪切位点 (Sambrook and Russell. Molecular Cloning :A Laboratory Manual, (3rded.) Cold Spring Harbor Press(2001))。比如,由目标 mRNA (i) 上核苷酸 X 处的假定剪切位点可以推测出一个 siRNA (ii)。单个的被推测出来的 siRNA 序列然后可以被合成,并进一步检验其有效性:

[0129] (i) 目标 RNA

[0130] NNNNNNNN₋₁₀NNNNNNNNXNNNNNNNNN₊₁₀NNNN

[0131] (ii) siRNA

[0132] N₋₁₀NNNNNNNNXNNNNNNNNN₊₁₀

[0133] 上述方法已经在实施例 IX 和图 11 中被举例说明。

[0134] 本实施方案的另外一个优势是,一旦单个 siRNA 片断或者特异性的 hsiRNA 片断混合物或者一系列 hsiRNA 片断获得以后,它们就可以按照实施例 IV 和 V 中描述的方法被克隆,这样就为这些核酸提供了连续的供应或体内调节的供应,而不需要为每个实验从头合成。

[0135] 示范性的应用

[0136] 克隆片断的可用性不但提供了试剂或者治疗药剂的连续来源,而且还提供了一种新的治疗方法,其中所需的敲除效果可以通过在整个生物体内应用基因治疗技术来实现,而不再需要重复施用 siRNA 片断。表达 siRNA 片断或 hsiRNA 混合物的克隆可以用于目标基因的完全的、被控制的或暂时的沉默。

[0137] 来源于任何病原体的基因都可以被定向地抑制。比如,该基因可以直接导致宿主的免疫抑制,或者该基因对于病原体的复制、转移或侵染的维持是必需的。抑制性 RNA 可以在体外或者离体导入细胞中,然后被置于在生物体中实施治疗,或者该生物体可以直接通过体内施用的方式被治疗。比如,有被病原体侵染的危险的细胞或者已经被侵染的细胞,特别是人类免疫缺陷病毒 (HIV) 的侵染,可以根据本发明导入 RNA 来有目标地进行治疗。目标基因可以是病原体进入其宿主、病原体或者宿主进行药物代谢、病原体基因组复制或整合、侵染在宿主中建立和传播、或者下一代病原体组装所需的病原体基因或者宿主基因。预防的方法(即是,预防侵染或者降低侵染的危险),以及降低与侵染相关的综合症的发生频率或严重性的方法,都可以被预想到。

[0138] 本发明可以用于治疗或者发展对任何癌症的治疗方法,包括固体肿瘤和白血病,其中的一些实例已经在国际公开号 W0 99/32619 中列出。

[0139] 本发明用下面的实施例进一步说明。提供这些实施例是为了帮助理解本发明,但

是并不表示本发明受其限制。

[0140] 在上文和下文引用的文献在此整入作为参考。

[0141] 实施例 I

[0142] 制备 hsiRNA 混合物

[0143] 测定锰离子对用 RNaseIII 剪切双链 RNA 的影响

[0144] 使用 HiScribe™ RNAi 转录试剂盒（新英格兰生物实验室公司，贝佛利，麻萨诸塞州）产生对应于感兴趣的基因的全长双链 RNA (dsRNA)，在本实施例中该基因是 hu PKR。生成双链 RNA 的方法在实施例 VII 中被详细地描述。

[0145] 0.4kb 的双链 RNA 分子 (0.25 μg) 用 30 个单位的大肠杆菌 RNaseIII (0.9 μg)（新英格兰生物实验室公司，贝佛利，麻萨诸塞州）在 37℃ 消化，20 μl 的反应缓冲液由 100mM NaCl, 50mM Tris-HCl, 5、10、20 或 50mM MnCl₂ 或者 10mM MgCl₂（对照），1mM 二硫苏糖醇 (pH 7.5, 25℃) 组成。含有 50-100mM MnCl₂ 的样本也被检测以提供长双链 RNA 的完全消化。

[0146] 在不同浓度的锰离子存在的条件下 RNaseIII 的消化产物中大小为 18-25bp 的被富集。这样获得的片断混合物在这里被标记为 hsiRNA 混合物。相反，在没有锰离子、含有 10mM Mg²⁺ 的缓冲液中用 RNaseIII 消化双链 RNA 产生了大小参差的片断混合物，这是由部分消化导致的，其中主要的片断大小小于所需的被认为是 hsiRNA 特征的 20-40bp（图 1A 和 2）。这种在镁离子存在的条件下 RNaseIII 的消化产物被发现在基因沉默中没有效果（图 1A, 2 和 5）。

[0147] 用不同量的 RNaseIII 由 1kb 的双链 RNA 产生 hsiRNA

[0148] 来自于 GL3 荧光素酶的 1kb 的片断 (SphI-NgoMIV) 被克隆到 Litmus 38i 中。双链 RNA 是从按照实施例 VII 描述的方法（利用生物素标记的 T7 引物 PCR）生成的 DNA 模板，采用 HiScribe™ 试剂盒（新英格兰生物实验室公司，贝佛利，麻萨诸塞州）生成的。2.5 μg 的双链 RNA 在 50 μl 的反应混合物中用 0.5、1、2、4、8、16 μl 1.36mg/ml 的 RNaseIII 储液（对应于反应混合物中的终浓度为 0.012、0.025、0.05、0.11、0.22 和 0.44 μg/μl）消化，反应在含有 50mM NaCl, 50mM Tris-HCl, 20mM MnCl₂, 1mM 二硫苏糖醇 (pH 7.5, 25℃) 的缓冲液中进行 20 分钟，加入 EDTA 使其终浓度达到 25mM 来终止反应。每个反应中的 40 μl 样品在 20% 的非变性 PAGE 胶上分析（图 1B）。检测到的主要消化产物与单一序列的合成 siRNA 共迁移（图 1B, 将泳道 5、6、7、8 与泳道 1 比较）。当至少 2 μl 的 RNaseIII 被使用时，消化反应被判断为完全进行（图 1B, 泳道 5, 使用 0.05 μg/μl 终浓度的 RNaseIII）。荧光凝胶密度计被用来测量作为 RNaseIII 浓度的函数的所产生的 hsiRNA 的相对量。实验中 hsiRNA 的最大产量是用 4 μl 的 RNaseIII (0.11 μg/μl 终浓度) 获得的。

[0149] RNaseIII 对底物的优化比例的相关性和普遍化

[0150] 为了进一步确定 RNaseIII 生成 hsiRNA 的优化浓度，在用不同浓度的 RNaseIII 消化另一种底物时，监测 hsiRNA 的产量。浓度范围从 0.025 到 3.2 单位 / μl（其中 32 个单位对应于 1 μg 的 RNaseIII，这样终浓度范围是 0.0007 到 0.1 μg/μl）的 RNaseIII 被用来消化 0.056 μg/μl 的双链 DNA 底物 (1000bp, 线虫几丁质合成酶基因的一部分)，反应是在含有 50mM Tris-HCl, pH 7.5, 100mM NaCl, 1mM DTT, 10mM MnCl₂ 的 10 μl 溶液中进行的。该反应混合物在 37℃ 温浴 30 分钟。RNaseIII 消化通过加入 0.5 μl 0.5M 的 EDTA 来终止。每个反应的一部分 (2.5 μl, 相当于 0.14 μg 双链 RNA 底物)，连同 1 μl 上样缓冲液（含有

二甲苯青和溴酚蓝)在20%非变性PAGE上分析(图1C)。

[0151] 在另外一个实验中,双链RNA的浓度为0.06、0.12、0.24和0.47 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$,用3.2单位/ μl 的RNaseIII(0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)在如上描述的同样条件下消化(图1D)。

[0152] 在本实施例中,hsiRNA的最大产量是通过用0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的RNaseIII消化0.056 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的双链RNA底物得到的,或者说是57个单位的RNaseIII用于每微克双链RNA(图1C泳道2)。在这个浓度比例,大约每22bp长度的双链RNA片断对应一个RNaseIII单体分子。这个酶-底物比例的一半产生了稍微减少的hsiRNA(图1C,泳道3)。类似地,在图1D中,泳道3或4得到了最大量的hsiRNA。降低RNaseIII的用量,hsiRNA的积累量会降低,双链RNA被剪切成更大的片断。

[0153] 这些实验表明在10 μl 反应体积中25-50个单位的RNaseIII用于每微克双链RNA,可以产生产量最优的hsiRNA。

[0154] 双链RNA剪切的时间进程的研究

[0155] 生成hsiRNA的动力学通过时间进程研究来监测。消化反应进行不同的时间长度,反应采用优化的RNaseIII:dsRNA比例(双链RNA浓度为0.056 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$,RNaseIII浓度为3.2单位/ μl (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)),在含有10mM锰离子的缓冲液中进行。加完所有成分之后,反应液轻轻涡旋混匀,在37°C温浴。经过不同的温浴时间,其中的10 μl 反应液被移出,并用0.5 μl 0.5M的EDTA终止。样品在用20%的非变性PAGE胶分析(图1E)之前在冰上保存。

[0156] 从这些实验可以明显的看出,在锰离子存在的条件下RNaseIII消化能够非常快速地产生hsiRNA的条带。经过10分钟的温浴之后,所产生的hsiRNA便可以定量了,而且没有大于hsiRNA的双链RNA可以检测得到。

[0157] 制备纯化的hsiRNA

[0158] 大量纯化的hsiRNA通过高效阴离子交换柱色谱获得,将RNaseIII消化的双链RNA在10mM Tris-HCl,pH7.5中经过一个Q Sepharose柱(Pharmacia,Piscataway,NJ)(图1F)。大小在大约18-25个碱基之间的纯化的hsiRNA在梯度为0.40-0.45M NaCl的时候从柱子上洗脱下来,与RNaseIII(在0.025-0.2M NaCl之间被洗脱下来)和大小为30-1000个碱基的双链RNA(在0.5M NaCl或者更高浓度NaCl时被洗脱下来)分开。泳道5和6显示的主要条带含有大量的hsiRNA和量不是十分明显的其他大小的RNA。

[0159] 基于上样和梯度的调整,浓度范围为1 μg 到1mg/ml或者更高浓度的hsiRNA可以被获得,而且不含有蛋白质杂质和高分子量的双链RNA或者DNA。这样的高浓度的纯化hsiRNA可以用作体内试剂或者治疗试剂,其中与任何污染物质的分离对于FDA认证是必要的。

[0160] 实施例 II

[0161] 用不同的二价金属离子制备hsiRNA

[0162] 为了测定不同的二价阳离子对RNaseIII的剪切产物的影响,进行了如下实验:1 μg 大双链RNA分子(800bp)分别在两个不同的大肠杆菌RNaseIII浓度(0.04 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 或者0.02 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)消化30分钟,其中pH7.5(25°C),50 μl 的缓冲液中含有100mM NaCl、50mM Tris-HCl、1mM二硫苏糖醇,金属离子是10mM MgCl_2 37°C(泳道1和2)、10mM MnCl_2 (泳道3和4)、10mM CoCl_2 (泳道5和6),或者10mM NiSO_4 (泳道7和8)。结果如图2所示。大双

链 RNA 在 $0.04 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ RNaseIII 和 10mM 锰离子存在条件下被完全消化,得到的双链 RNA 产物的大小大约是 22bp (在 20-40bp 之间)。用 $0.04 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ RNaseIII 在含有 10mM 镁离子而不含锰离子的缓冲液中消化得到的片断小于所需的 18-25bp 的长度 (泳道 1 和 2), 这些片段被发现不适合于 RNAi 沉默实验。相反,在存在钴和镍时所产生的片断中提供了比在存在镁离子时更多的所需的长度为 18-25bp 的片断。

[0163] 实施例 III

[0164] RNaseIII 消化得到的短双链 RNA 剪切产物含有代表了整个母本序列的序列

[0165] 用于转录 p53 的 DNA 模板 (1.1kb 的编码氨基酸 100-393 的片断) 用限制性内切酶 AclI 消化,产生的片断在琼脂糖胶上分离。用溴化乙锭染色,照相,接着转移到尼龙膜上 (Hybond® N+, Amersham, Piscataway, NJ)。

[0166] 通过体外转录合成的 1.1kb 的双链 RNA 片断用终浓度为 $0.04 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的 RNaseIII 在含有 10mM 锰离子, pH 7.5 的反应液中于 25 摄氏度温浴 30 分钟消化,如实施例 II 所示,产物在 20% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶上分离。

[0167] 这种消化产物 (hsiRNA 混合物) 用溴化乙锭染色来显示,对应于大约 21bp 的条带以小胶块的形式被剪切下来,然后在用透析膜密封的小管子中电洗脱 20 分钟,按照下面实施例 IV 中描述的方法酒精沉淀。纯化的短 RNA 用胞苷 3',5' 双 (磷酸根) [$5' -^{32}\text{P}$] 和 T4RNA 连接酶根据制造商 (New England Biolabs, Inc., Beverly MA) 推荐的方法标记。该 ^{32}P 标记的 RNA 被用于探测同样的胶的 DNA 印记,在 0.5M 磷酸钠, pH 7.5、7% SDS、1% BSA 中于 48 摄氏度过夜处理。在同样的温度下在 50mM 磷酸钠, pH 7.5、0.1% SDS 中清洗三次,然后对 X 射线胶片曝光。

[0168] 放射自显影显示,用于生成 hsiRNA 混合物的 DNA 模板的所有片断都可以与探针杂交,而分子量标记物中大量不相关的 DNA 片断不与探针杂交 (图 3A, 比较泳道 2 和 3)。

[0169] 胶片被扫描以确定探针的相对量。放射性强度对条带的大小作图。图 3B 显示,每个条带的探针数量与片断的大小成正比,而且与对应于每个片断的溴化乙锭荧光的量相似。这些结果表明,在锰离子存在时由 RNaseIII 消化产生的大小为 15-30bp 的短 RNA 片断含有来自于整个母本序列的片断。

[0170] 实施例 IV

[0171] hsiRNA 片断的克隆和测序

[0172] 来自于 RNaseIII 消化的产物被克隆,在采用的策略中引物退火位点被顺序地连接到被消化的 RNA 的一条链的每一端 (图 4A)。连接的顺序通过参与连接物质的不同磷酸化状态而被精确地控制,这同时可以防止在各连接步骤中各物质的多聚化。结果得到的 RNA-DNA 嵌合物被 RT-PCR 扩增,然后克隆到测序质粒中。作为选择,可以利用单个引物合成 cDNA 第二链,以替代所述 PCR 步骤。

[0173] 连接好的寡聚核苷酸由确定的序列 (没有被多腺苷酸化) 组成,它们由非常不同于那些出现在以下文献中的 DNA 的 DNA 构成,这些文献是: Elbashir, et al., Genes and Development 15:188-200 (2001); Lau, et al., Science, 294:858-862 (2001) and Lee, et al., Science, 294:862-864 (2001)。同样,为了防止连接反应中自身多聚化,引物 1 合成之后带有 5' 和 3' 端的磷酸基团。为了从由 RT-PCR 生成的 cDNA 构建出最终文库, DNA 片断被扩增,然后直接克隆到质粒 pUC19 (克隆之前没有被串联在一起)。

[0174] 1. 双链 RNA 的生成：

[0175] 对应于麦芽糖结合蛋白 (malE) 的全长双链 RNA (dsRNA) 是采用 HiScribe™ RNAi 转录试剂盒 (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA) 生成的。为了生成体外转录所需的模板, 含有 malE 的 808bp 的 BglIII-EcoRI 片断的 pLITMUS28i 质粒被用于 PCR 反应扩增该基因片断。PCR 反应是采用 Vent® DNA 聚合酶 (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA) 在 1X ThermoPol 反应缓冲液 [20mM Tris-HCl, pH8.8、10mM KCl、10mM (NH₄)₂SO₄、2mM MgSO₄、0.1% Triton X-100] 中进行的, 50 μl 的反应体积中还包括 0.4 μM 的 T7 最小引物 d(5'-TAAACGACTCACTATAGG-3' (SEQ ID NO :3))、400 μM 的 dNTPs 和大约 20ng 的质粒 DNA。PCR 程序采用 25 个循环, 每个循环包括 94 摄氏度 30 秒, 50 摄氏度 30 秒, 72 摄氏度 30 秒。消化反应和 PCR 反应的产物都用酚 / 氯仿抽提, 采用标准的分子生物学技术用酒精沉淀, 然后再在 TE 缓冲液 (10mM Tris-HCl, pH8.0、1mM EDTA) 中重新溶解使得终浓度为 1mg/ml (限制性酶切产物) 或者 125 μg/ml (PCR 产物)。这些模板然后被用于大规模体外转录反应以生成大双链 RNA。

[0176] 大规模体外转录反应被放大到反应总体积为 300 μl 或者如制造商所述的中级规模反应的 10 倍。双链 DNA 模板也类似地从含有 GFP 的 731bp 的 NheI-BsrGI 片断的质粒中制备出来。对于 GFP 的双链 RNA, 10 μl 的消化好的模板被使用, 对于 malE 基因片段, 则每个反应使用 40 μl PCR 反应产物。反应液中含有 40mM Tris-HCl, pH8.1、19mM MgCl₂、5mM DTT、1mM 亚精胺、4mM 的每种 rNTP、50 μg/ml BSA、3 单位 / μl 的酵母无机焦磷酸酶、400 单位 / ml 的胎盘 RNase 抑制剂, 和 5000 单位 / ml 的 T7RNA 聚合酶。反应在 42 摄氏度温浴 2 个小时, 65 摄氏度 10 分钟, 然后在 -20 摄氏度保存。为了准备进行 RNaseIII 消化, 双链 RNA 在 8% 的聚丙烯酰胺胶上电泳纯化之后, 对应正确大小的条带被剪切下来 (对于 GFP 或者 malE 分别是 829bp 和 908bp)。通过在 400 μl 的 RNA 洗脱缓冲液 (0.1M 醋酸钠, pH4.8、1mM EDTA、0.1% SDS) 中于 37 摄氏度振荡温浴过夜, 然后再在另外 400 μl 洗脱液中处理 4 个小时, 将双链 RNA 从胶块上洗脱下来。洗脱物样品被混合到一起, 酚 / 氯仿抽提以去除残留的胶和 SDS, 之后酒精沉淀, 然后再溶于 100 μl Tris EDTA (TE) 缓冲液。

[0177] 2. malE 全长双链 RNA 的 RNaseIII 消化

[0178] 进行 RNaseIII 消化, 从 malE 序列中生成长度为 22bp 的小 RNA 双链。总体积为 160 μl 的反应液含有在 0.1M NaCl、50mM Tris-HCl, pH7.9、10mM MnCl₂、1mM 二硫苏糖醇、4 μg 全长 malE 双链 RNA 和 4 μg RNaseIII (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA), 反应在 37 摄氏度温浴 30 分钟。然后样本用酚 / 氯仿抽提和酒精沉淀, 去除 RNaseIII, 回收 RNA 片断。小 RNA 片断然后用小牛肠碱性磷酸酶 (CIP) (RocheDiagnostics, Mannheim, Germany) 处理以防止后续连接反应中的多聚化。这是通过先将样品预热到 50 摄氏度 5 分钟, 然后按照制造商的描述在一个标准反应中用 CIP 处理来完成的, 其中在 50mM Tris-HCl, pH8.5、0.1mM EDTA 中每微克 RNA 使用 2.5 个单位的 CIP。反应在 50 摄氏度进行 1 个小时之后用酚 / 氯仿抽提, 再用酒精沉淀。去磷酸化的 RNA 片断然后在 25 μl 的 TE 缓冲液中溶解。

[0179] 3. 小 RNA 片断连接到引物 1 上：

[0180] 小 RNA 片断 (从上获得的总共 4 μg 的样品) 然后在其 3' 端与引物 1, d(5' p-CTGCAGGATATCTGGATCCAC-p-3') 连接, 其中引物 1 含有 BamHI 限制性位点 (下划线)。RNA 片断双链首先被加热到 70 摄氏度变性 5 分钟, 然后再放在冰上。连接反应在 60 μl 的含有

50mM Tris-HCl, pH 7.8、10mM MgCl₂、10mM 二硫苏糖醇、1mM ATP 和 10% (v/v) DMSO、10 μg 的引物 1 和 120 单位的 T4RNA 连接酶 (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA) 的反应液中在 20 摄氏度进行了 24 小时。连接反应的产物然后在含有 7M 尿素的 12% 聚丙烯酰胺变性胶上电泳纯化, 然后把对应于大约 45 个核苷酸长度的条带剪切下来。连接产物用 RNA 洗脱缓冲液从胶上洗脱下来, 如上所述用酒精沉淀回收, 再用 10 μl 的 TE 缓冲液重新溶解。

[0181] 4. 将中间体与引物 2 连接:

[0182] 上述连接产物的 5' RNA 端用无 3' 磷酸酶活性的 T4 多聚核苷酸激酶 (T4PNK, (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)) 磷酸化以避免在后续连接反应中多聚化。对来自上面步骤的整个样品进行磷酸化, 反应在 20 μl 的含有 50mM Tris-HCl, pH7.8、10mM MgCl₂、10mM 二硫苏糖醇、1mM ATP (1X T4RNA 连接酶缓冲液, 来自于 New England Biolabs, Inc., Beverly, MA) 和 10 单位的 T4PNK 的反应液中于 37 摄氏度进行 30 分钟。然后 T4PNK 在 65 摄氏度加热 20 分钟使之失活。

[0183] 磷酸化的被连接到引物 1 上的小 RNA 片断然后在其 5' 端连接到引物 2, d(5' CATG CCGGGTACCTTTCTATTCTC-3' (SEQ ID NO:5)), 该引物含有一个 Acc65I 限制性酶切位点 (下划线标示)。连接反应在 30 μl 的含有 10% DMSO、1 μg 引物 2 和 60 个单位的 T4RNA 连接酶的 1X T4RNA 连接酶缓冲液中于 20 摄氏度进行 24 个小时。该连接产物然后在含有 7M 尿素的 12% 聚丙烯酰胺变性胶上电泳纯化, 然后把对应于大约 70 个核苷酸长度的条带剪切下来。连接产物用 RNA 洗脱缓冲液从胶上洗脱下来, 如上所述用酒精沉淀回收, 用 10 μl 的 TE 缓冲液重新溶解。

[0184] 5. 为了克隆而进行的 RNA/ 引物杂合物的反转录和 PCR 扩增反应:

[0185] 在小 RNA 的 5' 端和 3' 端分别连接引物 2 和引物 1 的产物被反转录, 生成用于后续 PCR 扩增的双链。反转录是利用引物 3, d(5' -GTGGATCCAGATATCCTGCAG-3' (SEQ ID NO:6)) 来进行, 这种引物也被称为 Litmus 28/38 反向测序引物 (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA), 其带有一个 BamHI 位点 (下划线标示)。从上一步得到的整个样品与 0.1 μM 引物 3 和 0.5mM dNTPs 混合, 然后在 65 摄氏度加热 5 分钟, 接着在冰上冷却使得引物 3 和连接产物的 3' 端退火 (引物 3 和引物 1 互补)。19 μl 的反应体积中含有 50mM Tris-HCl, pH 8.3、75mM KCl、3mM MgCl₂ 和 10mM 二硫苏糖醇, 在加入 200 单位的 M-MuLV 反转录酶 (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA) 之前将其在 42 摄氏度温浴 2 分钟, 然后再在 25 摄氏度反应 10 分钟, 42 摄氏度反应 50 分钟, 70 摄氏度反应 15 分钟。然后双链 DNA 通过反转录得到的 cDNA 产物的 PCR 扩增得到。PCR 反应采用 Deep Vent® DNA 聚合酶 (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA) 在含有 0.2 μM 引物 2 和引物 3、400mM dNTPs 和 2 μl 反转录产物的总体积为 100 μl 的 1X ThermoPol 反应缓冲液中进行。PCR 流程采用 25 个循环, 每个循环包括 94 摄氏度 30 秒, 60 摄氏度 30 秒, 72 摄氏度 30 秒。约 70bp 的 PCR 产物按照之前描述的办法从 8% 的非变性聚丙烯酰胺胶上剪切下来, 经过胶纯化, 用酒精沉淀回收, 在 50 μl TE 缓冲液中重新溶解。

[0186] 6. 将 PCR 片断克隆到 pUC 19 中:

[0187] 利用标准的分子克隆技术通过 BamHI 和 Acc65I 限制性位点将 PCR 片断克隆到质粒 pUC 19 (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA) 中。简单来说, pUC19 消化在 1X NEBuffer 3 (0.1M NaCl、50mM Tris-HCl, pH 7.9、10mM MgCl₂、1mM 二硫苏糖醇) 中进行, 反

应中还含有 0.1mg/ml BSA,每微克 pUC19 使用 8 个单位的 BamHI 和 4 个单位的 Acc65I。消化在 37 摄氏度进行 3 个小时。消化之后的 pUC19 质粒在 1%低熔点琼脂糖胶上电泳,再根据制造商的说明用 β -琼脂糖酶 (NewEngland Biolabs, Inc., Beverly, MA) 从被剪切下来的胶块中回收 DNA,由此进行胶纯化。PCR 片断在同样的条件下消化,不同的是,每微克 DNA 使用 20 单位的 BamHI 和 10 单位的 Acc65I,酚/氯仿抽提,去除限制性内切酶,用酒精沉淀回收。消化后的 PCR 片断被连接到 pUC19 载体中,其中插入片段与载体的比例为 10 : 1,在 20 μ l 的反应中含有 100ng 载体,含有或者不含有插入片段,和 400 个单位的 T4DNA 连接酶 (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA)。在 16 摄氏度温浴过夜之后,每个连接反应 (含有和不含有插入片段) 中的 10 μ l 通过在 65 摄氏度加热 15 分钟而终止,然后用 SmaI 消化使得任何自连接的载体被线性化。消化反应 (总共 50 μ l) 中含有在 1X NEBuffer 4 (20mM Tris-acetate, pH7.9、50mM 醋酸钾、10mM 醋酸镁、1mM DTT) 中的 10 μ l 连接反应产物和 20 个单位的 SmaI,反应在 20 摄氏度温浴 3 个小时。在 65 摄氏度热变性 15 分钟之后,每 1 μ l 的消化产物采用 Bio-Rad Gene **Pulser**[®] (Bio-Rad, Hercules, CA) 设备电转到大肠杆菌 ER2738 中。刚刚电转完毕的细胞在 1.0ml 的 SOC 培养液中 37 摄氏度摇晃 1 个小时。细胞被涂在含有 100 μ g/ml 氨苄青霉素以及 40 μ g/ml 异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG) 和 40 μ g/ml 5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-吡喃半乳糖苷 (X-gal) 的 LB 琼脂培养基上,在 37 摄氏度过夜培养。蓝色和白色克隆都被观察到,而且蓝色和白色克隆的数量分别比没有插入片断的对照高 5-10 倍和 > 20 倍。

[0188] 7. 测序和分析

[0189] 采用 **QiaQuick**[®] (Qiagen, Studio City, CA) spin 柱将来自总共 126 个克隆的 DNA 从 1.5ml 的培养液中分离出来,终体积为 50 μ l。限制性分析和自动 Sanger DNA 测序 (ABI 377 或者 3100 仪器) 表明,126 个测序克隆中有 9 个没有插入片断,而剩下的 117 个克隆含有对应于两个引物序列 (引物 1 和 2) 的插入片断,它们之间所包围的对应于被克隆的 RNA 序列的序列的量有所不同 (图 4D)。这些克隆序列的长度分布如下所示 (克隆的数目在括号内): 13 个碱基 (2), 14 个碱基 (1), 15 个碱基 (3), 16 个碱基 (1), 17 个碱基 (6), 18 个碱基 (5), 19 个碱基 (4), 20 个碱基 (15), 21 个碱基 (38), 22 个碱基 (38), 23 个碱基 (1) 和 24 个碱基 (2)。这些序列可以利用引物序列分离出来,并与母本 Litmus-malE 或者 GFP 构建物的转录部分匹配 (图 4B 和 4C)。这些结果明确地证明,克隆片断覆盖了整个双链 RNA 起始材料,含有大双链 RNA 序列的相当一部分,这表明 RNaseIII 消化是随机的。在图 4B 和 4C 中箭头对应克隆序列;箭头的方向表明该序列是对应于所显示的序列 (从左到右) 还是其互补链 (从右到左)。

[0190] 来自于各个克隆的 DNA 插入片断被提取出来并测序,所述克隆携带有根据图 4A 的流程通过 RNaseIII 消化生成的片断。插入片断的长度通过确定在克隆方法中使用的引物之后计算片断中剩下的核苷酸数目来确定。来自于两个不同的转录子 (Litmus 28i 中的 malE 和 Litmus 38i 中的 gfp) 的总共 126 个克隆通过用插入片断长度对比出现频率来作图,在图 4D 中的图表中显示。

[0191] 如图 4D 中的表格所示,65%的克隆,或者说是 117 个含有插入片断的克隆中有 76 个具有长度为 21 或者 22 个核苷酸的插入片断。这 117 个克隆中有 1 个具有长度为 5 个核苷酸的插入片断,即,该片段短于 11 个核苷酸,这样大小的片断是在采用现有技术的条件

在含有镁离子而不是锰离子的缓冲液中用 RNaseIII 消化时经常产生的。上述克隆实验进一步确认,在含有锰离子的缓冲液中用 RNaseIII 消化生成的片断有相当一部分是 21-22 个核苷酸长度。

[0192] 实施例 V

[0193] 克隆的 RNaseIII 产物的文库的生成

[0194] (a) 通过对各个片断进行 PCR 扩增之后将多个 cDNA 克隆到 Litmus 28i、Litmus 38i (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA) 或其它反向 T7 启动子载体中,或者通过使用商业上可获得的 cDNA 片断,可以获得一个克隆文库。该克隆文库被用于生成双链 RNA,所述双链 RNA 对应于用 T7 聚合酶体外转录的克隆序列,然后双链 RNA 再用 RNaseIII 剪切,其方法在前面的实施例中已经被描述过。

[0195] (b) 大双链 RNA 的 RNaseIII 消化产物按照如上的描述或者实施例 IV 中描述的方法获得并纯化,然后可以按照实施例 IV 中描述的方法被克隆到 Litmus 28i 载体中。这样,每个克隆都代表了 RNaseIII 剪切原始长序列所产生的一个短序列,而且其可以用于体外转录以生成一个短序列的双链 RNA 片断(比如 18-25bp)。检测多个克隆的有效性可以通过高通量的形式来实现,因为所有的步骤(PCR、体外转录、RNaseIII 剪切和转染)都可以采用标准的方法以微量滴定板的形式完成。最好的片断(在沉默中最有效果)就可以这样被鉴定,并可以导入到特殊的载体(发夹、腺病毒/反转录病毒),或者,这些片段可以被化学合成以用于特定的下游应用。

[0196] 这样的短双链 RNA 产物可以用于细胞转染实验或者针对同源序列的基因敲除的转基因动物研究。合适的试验可以被进行以评估沉默效果,比如细胞形态、存活、共转染报告基因表达、药物治疗的敏感性等等。所有这些步骤都可以以微量滴定板的形式自动化进行。

[0197] 实施例 VI

[0198] HsiRNA 混合物对于昆虫细胞或者哺乳动物细胞的转染基因和内源基因的基因沉默是有效的

[0199] 为了检测在二价过渡金属阳离子的缓冲液中用 RNaseIII 消化产生的 hsiRNA 在抑制基因表达中的效果,长双链 RNA 的制备物通过萤火虫 GL3 荧光素酶 cDNA (F-Luc) (1.2.kb)、绿色荧光蛋白 (GFP) cDNA (0.8kb)、p53cDNA (1.1kb) 和 PKR cDNA (0.4kb) 的溢出转录 (run-off transcription) 来合成,采用的是 HiScirbe™ 试剂盒 (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA) 和标准的重组 DNA 技术,如试剂盒使用手册和 NewEngland Biolabs, Inc., Beverly, MA 提供的参考文献中所建议的。这些双链 RNA 被酚抽提,用酒精沉淀。

[0200] 10 μ g 的 GFP 双链 RNA 和 F-Luc 双链 RNA 分别在 100 μ l 反应液中在 37 摄氏度消化 30 分钟,其中反应液包括 50mM Tris-HCl, pH 7.5、1mM 二硫苏糖醇,还含有 10mM MnCl₂ 或 10mM MgCl₂ 和 RNaseIII (20 μ g)。消化产物用酒精沉淀,沉淀再被溶解于无菌 TE 缓冲液 (10mM Tris-HCl, pH 7.5、1mM EDTA)。这些由 RNaseIII 生成的双链 RNA 在降低或去除荧光素酶、GFP 或 p53 的表达中的效果在下列细胞中被检测:(a) 培养的果蝇 Schneider SL2 培养细胞;(b) 人类胚胎肾 293 细胞,或者 (c) 猴上皮 Cos-7 细胞。所有的培养都在 24 孔板中用 0.5ml 合适的培养液进行。

[0201] (a) 果蝇 Schneider SL2 培养细胞在 27 摄氏度在含有 10% 胎牛血清的 Schneider 培养基中培养。这些细胞在转染前 16 个小时以 0.2×10^6 个细胞 /ml/ 孔的量被转移到 24 孔板上以准备转染。将由 0.1 μ g 基于 pGL2 的荧光素酶报告质粒、0.05 μ g 海肾荧光素酶报告质粒和 0.05–0.5 μ g——常是 0.1 μ g——的如上所述地用 RNaseIII 消化或者未消化的 GL3 荧光素酶双链 RNA 组成的混合物与 3 μ l Cellfectin (Invitrogen, Carlsbad, CA) 转染试剂混合于 100 μ l 的不含血清的 Schneider 培养液中, 在室温下温浴 30 分钟, 然后加到转染板的一个孔中。在 27 摄氏度培养 40 个小时之后, 采用双荧光素酶报告系统 (Promega, Madison, WI) 按照双荧光素酶使用手册中描述的方法分析细胞的荧光素酶活性。相对荧光素酶活性用萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶的比值来表示 (图 5)。

[0202] (b) 人类胚胎肾细胞 (HEK-293 细胞) 在补充有 10% 胎牛血清的 Dulbecco 氏改良 Eagle 培养液 (DMEM) 中在 37 摄氏度, 5% CO₂ 中培养。这些细胞在转染前 16 个小时以每孔 0.2×10^6 个细胞的量被转移到 6 孔板上以准备转染。将 0.1 μ g 基于 pGL3 的荧光素酶报告质粒、0.1 μ g 的 pEGFP、0.05 μ g 海肾荧光素酶报告质粒和 0.1–0.5 μ g (一般是 0.1 μ g) 的 hsiRNA (如上所述用 RNaseIII 消化的 dsRNA) 或者 10pmol 的 GFP-22siRNA ((正义链) 5'GCAAGCUGACCCUGAAGUUCAU3' (SEQ ID NO :7) 和 (反义链) 5'GAACUUCAGGGUCAGCUUGCCG (SEQ ID NO :8)) (Xeragon ;Huntsville, AL) 组成的混合物与 6 μ l **CELLFECTIN®** (Invitrogen, Carlsbad, CA) 转染试剂混合于 150 μ l 的不含有血清的 DMEM 培养基中, 在室温温浴 30 分钟, 然后加到转染板的一个孔中。GFP 和荧光素酶的表达分别通过荧光强度和发光强度来检测 (图 6A 和 6B)。对于更加有效的转染, 按如上所述制备的荧光素酶 hsiRNA (0.025 μ g–14nM 的终浓度) 或 GL3 荧光素酶 hsiRNA (20pmol) ((正义链) 5'CUUACGCUGAGUACUUCGATT3' (SEQ ID NO :9) 和 (反义链) 5'UCGAAGUACUCAGCGUAAAGTT (SEQ ID NO :10)) (Xeragon ;Huntsville, AL) 被转染到 HEK293 细胞中, 采用的是 Lipofectamine 2000 和 OPTIMEM 培养液 (Invitrogen, Carlsbad, CA), 24 孔板中每孔用 2 μ l 的 Lipofectamine 2000 和 100 μ l 的 OPTIMEM 培养液。然后按照制造商的说明用双荧光素酶试剂盒 (Promega, Madison, WI) 对细胞进行荧光素酶活性检测 (图 6C)。

[0203] (c) 猴上皮细胞 (COS-7) 在补充有 5% 胎牛血清的 Dulbecco 氏改良 Eagle 培养液 (DMEM) 中于 37 摄氏度, 5% CO₂ 中培养。这些细胞在转染之前 24 小时以 0.2×10^6 个细胞 /0.5ml/ 孔的量转移到 24 孔板中, 或者在转染之前 6 小时达到 85% 的铺满率 (confluency)。对于每个细胞培养孔, 由 0.1 μ g pEGFP 和大双链 RNA 消化生成并用酒精沉淀纯化的 1 或 5 μ l hsiRNA (6ng/ μ l) 组成的混合物与 2 μ l Lipofectamine2000 转染试剂 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 按照制造商的说明混合在终体积为 100 μ l 的 OPTIMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA) 中, 在室温下温浴 20 分钟, 然后加入到细胞中。GFP 的表达通过荧光显微镜来检测, 其它内源目标的表达用合适的抗体对细胞抽提物进行的蛋白质印记分析来检测。在另外的实验中, 如上所述地由 p53 双链 RNA 产生的 0.5 或 10 μ l hsiRNA (5ng/ μ l) 或者由海肾双链 RNA 产生的 10 μ l hsiRNA (5ng/ μ l) 连同在 pCDNA 载体中表达人类 p53 的截短形式 (残基 100–393) 的质粒和表达海肾荧光素酶的质粒一起被转染到细胞中。这些细胞在转染之后 48 小时, 被裂解并采用双荧光素酶系统 (Promega, Madison, WI) 进行荧光素酶活性检测。来自于各个孔的裂解液也用抗 p53 多克隆抗体 (Cell Signaling Technologies, Beverly, MA) 进行蛋白质印记分析。这些被检测的细胞表现出

- [0218] 30X 高分子量组分混合物 (HMW) (参见下面的配方) 20 μ l
- [0219] BT-7 最小引物 (19 聚体) 5' - 生物素
- [0220] -dCTCGAGTAATACGACTCACTATAG-3' (SEQ ID NO :11) (10 μ M) 25 μ l
- [0221] 10X 核糖核酸酶 III (1.4 μ g/ μ l) 100 μ l
- [0222] 10X hsiRNA 缓冲液 (参见下面的配方)
- [0223] 10X $MnCl_2$ (200mM) 1000 μ l
- [0224] 10X EDTA (250mM) 1000 μ l
- [0225] Litmus 38iluc 对照模板 1 μ g
- [0226] 无 RNase 的糖原 10 μ g/ μ l 50 μ l
- [0227] 质粒 DNA 500 μ g/ml, 在 TE 缓冲液 (10mM Tris-HCl, pH8.0, 1mM EDTA) 中。
- [0228] 另外, 这个试剂盒可以包含转染试剂、RNA 大小标记和链霉抗生物素包被珠。
- [0229] 缓冲液组成
- [0230] (a) 10X 缓冲液 /NTPs :
- [0231] 400mM Tris-HCl, pH8.1
- [0232] 190mM $MgCl_2$
- [0233] 50mM DTT
- [0234] 10mM 亚精胺
- [0235] 40mM 的每种 NTP
- [0236] (b) 30X 高分子量 (HMW) 混合物 :
- [0237] 20mM Tris-HCl, pH8.1
- [0238] 1.5mg/ml BSA
- [0239] 100 单位 /ml 的无机焦磷酸酶 (酵母)
- [0240] 12000 单位 /ml 的胰核糖核酸酶抑制剂
- [0241] 50% 甘油
- [0242] (c) 10X hsiRNA 缓冲液 :
- [0243] 0.5M Tris-HCl, pH7.5
- [0244] 10mM DTT

[0245] 该试剂盒利用在优化的缓冲液中的 RNaseIII 从长双链 RNA 中产生大小范围为 18-25 个核苷酸的片断。双链 RNA 产物用 RNaseIII 来剪切, 这样可以重复地得到适合于沉默基因表达的 hsiRNA 混合物。该混合物中不同的 siRNA 片断的序列覆盖了整个目标基因的序列。该 hsiRNA 混合物可以通过酒精沉淀而纯化, 之后用于转染。

[0246] 除 RNaseIII 之外, 该试剂盒可以包括用于从两侧是 T7 启动子的 DNA 模板得到高产量的大双链 RNA 的体外转录试剂, 以及使用说明, 还可选配进行反应的反应试管。

[0247] 伴随试剂盒的说明书的一个实例包括下面所列 :

[0248] (1) 在体外转录生成双链 RNA 之前克隆 DNA 模板

[0249] 制备用于转录的 DNA 模板的一种方法是将感兴趣的 DNA 克隆到 Litmus 28i/38i 双向转录载体 (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA) 中。该感兴趣的 DNA 然后用一个 T7 启动子特异性引物比如 BT7 最小引物来进行 PCR 扩增, 得到带有目标序列的线性产品, 其中 T7 启动子位于所述目标序列的两侧并界定了其末端。

[0250] 其它的带有 T7 启动子的目标基因特异性引物可以用于扩增任何特定的 cDNA 序列,比如,扩增引物是:

[0251] 5' TAATACGACTCACTATAGaaggacagatggttaagtac-3'

[0252] T7 启动子 (SEQ ID NO:12) 其中 T7 启动子 (下划线) 定位在 5' 端,其后是目标特异性的序列 (黑体),它可以用于扩增任何 cDNA 模板。

[0253] 生物素标记的 BT7 引物可以用于扩增任何两侧为 T7 启动子的序列。可选择进行的做法是,这种被扩增的生物素标记的 DNA 模板可以通过结合链霉抗生物素标记的磁珠 (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA) 来分离,然后直接用作转录的模板。为了形成固定化的 DNA 模板,25-50 μ l 的链霉抗生物素标记磁珠悬浮液被加入到扩增 (PCR) 反应中,与等体积的 1M NaCl 混合,然后在室温温浴 10-15 分钟。在磁体存在的条件下去除上清,用 0.5ml TE、0.5M NaCl 清洗珠子。重悬的珠子可以直接用于转录反应,固定化 DNA 模板的体外转录可以得到无 DNA 的双链 RNA。

[0254] 扩增可以通过任何依赖于聚合酶的方法比如 PCR 实现。扩增后的产物用酒精沉淀纯化,或者通过色谱方法纯化 (比如 QiaQuick® 柱 (Qiagen, Studio City, CA)),然后重新溶解在 TE 缓冲液 (10mM Tris-HCl, pH8.0, 1mM EDTA, 用 Milli-Q 水或者等质量的水制备) 中至终浓度约 500 μ g/ml。

[0255] 含有 GL3 荧光素酶的对照可以用 Litmus 38iLuc 质粒来制备,其中 1.0kbp 的 GL3 荧光素酶基因片断被克隆进 Litmus 38i 的 SphI 和 NgoMIV 位点。用 MfeI 和 StuI (在分开的反应中) 进行线性化,接着对混合的线性模板进行体外转录,产生长度为 1.0kbp 的双链 RNA。

[0256] 为了提供用于特定基因沉默的 hsiRNA 混合物,可以进行引导性的 (pilot) 研究,其中使用通过剪切大小为 100-600bp 的双链 RNA 而获得的一个或多个片断,所述双链 RNA 包括源自于 cDNA 的限制性酶切片断的 RNA,所述 cDNA 已经亚克隆到 Litmus28i/38i 载体 (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA) 中。

[0257] 体外转录

[0258] 体外转录是采用如上所述地制备的 DNA 模板进行的。转录反应中所用的模板体积依赖于纯化的方法。对于未纯化的 PCR 产物,每 30 μ l 反应液中使用不超过 5 μ l。加入的模板 DNA 不应该超过 1 μ g 每 30 μ l 反应体积。

[0259] 无 RNase 水 50-x μ l

[0260] 10X 缓冲液 /NTPs 6 μ l

[0261] DNA 模板 (约 0.5-1 μ g) x μ l

[0262] 30X HMV 混合物 2 μ l

[0263] T7RNA 聚合酶 2 μ l

[0264] 60ul

[0265] 在 42 摄氏度的温浴可以提高含有大量二级结构的 RNA 转录子的产量。由于估计特定转录子中的二级结构的组成比较困难,我们建议所有的转录尽可能地在 42 摄氏度进行。转录产量在第一个 90 分钟内线性增加 (近似),2-3 个小时之后达到最大值。反应可以过夜进行,如果需要的话,不过产量不会高出多少。双链 RNA 在 37 摄氏度长时间温浴时是稳定的。

[0266] 该转录反应可以在 1% 的琼脂糖胶上分析, 注意避免 RNase 污染。双链 RNA 的迁移近似于反应中所使用的 DNA 模板。从 Litmus 38iluc 对照模板上得到的转录子的期待长度是 1000bp。

[0267] 双链 RNA 转录产物通过酒精沉淀纯化。十分之一体积的 pH 为 5.5 的 3M NaOAc 和 2 倍体积的冷 95% 乙醇被加入。在冰上放置 15 分钟, 或者在 -20 摄氏度保存过夜。以 14000rpm 的速度在台式离心机上离心 15 分钟。去除上清, 加入两倍体积的 80% 乙醇, 在室温放置 10 分钟, 离心 5 分钟, 然后再去除上清, 让试管内液体流干。沉淀空气中干燥。将干的 RNA 溶解在 10mM Tris-HCl, pH8.0、1mM EDTA 中, 或者水中。

[0268] 形成 hsiRNA 混合物

[0269] 消化反应采用浓度为 0.14 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的 1X (被稀释 10 倍) 的 RNaseIII, 和 0.07 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的双链 RNA, 如下面的实例。

[0270] 将下列试剂组合:

[0271]	dH ₂ O	105-x μl
[0272]	10X hsiRNA 缓冲液	15 μl
[0273]	双链 RNA	x μl (10ug)
[0274]	RNaseIII	15 μl
[0275]	10X MnCl ₂	15 μl
[0276]		150 μl

[0277] 在 37 摄氏度下温育 20 分钟。

[0278] 适当的时候加入 15 μl 的 10X EDTA 来终止反应。

[0279] 为了监测消化反应产物, 10-20% 的非变性聚丙烯酰胺胶是合适的。消化产物显示, 长双链 RNA 已经被剪切成 hsiRNA 混合物, 其中的片断大小范围是 18-25 个核苷酸, 这与起始长双链 RNA 的长度无关。这种混合物可以在用于转染之前通过一步酒精沉淀被纯化。

[0280] hsiRNA 片断的酒精沉淀

[0281] 加入十分之一体积的 pH 为 5.5 的 3M NaOAc、2 μl 的糖原溶液, 和三倍体积的 95% 冷乙醇。在 -70 摄氏度放置 30 分钟, 或者 -20 摄氏度放置 2 个小时甚至至过夜。以 14000rpm 的速度在台式离心机上离心 15 分钟。小心地去除上清以避免扰动小的沉淀颗粒, 加入 2 倍体积的 80% 乙醇, 在室温放置 10 分钟, 离心 5 分钟, 倒出上清, 让试管流干。让沉淀在空气中干燥。将干的 RNA 溶解在 10mM Tris-HCl, pH8.0、1mMEDTA 中, 或者水中。

[0282] 测定双链 RNA 的浓度

[0283] 这可以通过使用紫外分光光度计 (260nm 处的 10D 对应于 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的双链 RNA) 来测量, 或者使用荧光光度计 (采用 **RIBOGREEN®**, Molecular Probes, Eugene, OR), 或者与本领域使用的 siRNA 标准比较。

[0284] 转染指南

[0285] 酒精沉淀之后, hsiRNA 混合物可以直接转染到哺乳动物细胞中, 其中可以使用适合于寡聚核苷酸转染的试剂和程序, 比如 lipofectin2000、oligofectamine、TRANS-IT **TKO®** (Mirus Corp., Madison, WI) 和 Targefect (Targeting Systems, Santee, CA)。另外, 磷酸钙和电穿孔也被报道在转染短 RNA 时有效。

[0286] 对于每个转染孔 (24 孔形式), 可以使用 25-100ng hsiRNA 这样的用量作为初始

量,其可以根据实验发现来调整。

[0287] 大双链 RNA 可以如上所述地通过体外转录来合成,其中可以采用修饰过的转录缓冲液,其含有修饰过的核糖核苷酸以代替上述 10X 缓冲液中的 NTP,比如这些修饰过的核苷酸是 2-氟-核糖-CTP、2-氟-核糖-UTP、2-氧-甲基-核糖-CTP、2-氧-甲基-核糖-UTP、2-氧-甲基-核糖-ATP、2-氧-甲基-核糖-GTP 或者其它 2' 修饰的核苷酸,这样的修饰核苷酸可以使双链 RNA 更加稳定或者更加不易于降解。一种被称为 **DURASCRIBE®** 的试剂盒 (Epicentre Technologies, Madison, WI) 可以用于这种目的。

[0288] 实施例 VIII

[0289] 对应于目标 mRNA 的不同序列片断的 hsiRNA 混合物在沉默目标 mRNA 的过程中是有效的

[0290] 使用如实施例 VI 中描述的在 10mM 锰离子存在的条件下 RNaseIII 消化得到的混合物,测定了来自于与目标基因的不同片断互补的大双链 RNA 的 hsiRNA 混合物抑制基因表达的有效性。大双链 RNA 制备物是通过人类 DNA 甲基转移酶 (DnMt1) (Acc. X63692) 的 3 个 cDNA 片断的溢出转录合成的。对应于核苷酸 (1737-2113) 的片断 1、对应于核苷酸 (2114-3230) 的片断 2、对应于核苷酸 (3231-4391) 的片断 3,都通过 PCR 被扩增,然后被克隆到 Litmus 28i 中。双链 RNA 是采用 HiScrib™ 试剂盒 (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA) 和在试剂盒手册和 New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA) 提供的参考文献中给出的标准重组 DNA 技术得到的。双链 RNA 经过酒精沉淀之后,在 10mM 的 $MnCl_2$ 存在的条件下用 RNaseIII 处理。

[0291] 这些由 RNaseIII 生成的 hsiRNA 混合物降低 DnMT1 的表达的有效性在猴上皮 COS-7 细胞中被检测。细胞按照实施例 VI 中的描述培养,以每孔 $1 \mu g$ 的量用表达质粒 (pcDNA-4, 含有融合了六聚组氨酸标记的全长人 DnMT1 序列) 转染,并以如下形式转染:a: 单独转染,或者 b: 与 100ng 合成的针对荧光素酶的 siRNA 一起转染,或者 c: 与 100ng 来自于 DnMT1 片断 1 的 hsiRNA 一起转染,或者 d: 与 100ng 来自于 DnMT1 片断 2 的 hsiRNA 一起转染,或者 e: 与 100ng 来自于 DnMT1 片断 3 的 hsiRNA 一起转染,按照实施例 VI 中的描述用 Lipofectamine 2000 转染。hsiRNA 的终浓度是 15nM。细胞在转染的 48 小时之后裂解,每个裂解液的一部分都用抗 DnMT1 抗体 (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA) 进行蛋白质印记分析,以测定特异性的沉默效应,并用抗 p53 抗体来检测非特异性的沉默效应。

[0292] 蛋白质印记分析的结果 (图 10A 和 10B) 表明,所有三个片段所产生的 hsiRNA 混合物都在降低 DnMT1 的表达过程中有效,但却不影响 p53 的表达 (泳道 4、5 和 6)。这些结果还表明来自于片断 2 (泳道 6) 的 hsiRNA 混合物与来自于其它两个片断的相比,在基因沉默中是更为有效,蛋白质印记上对应的条带与来自于其它片断的产物相比信号的减少说明了这一点。

[0293] 实施例 IX

[0294] 采用由 RNaseIII 消化的大双链 RNA 发现有效的 siRNA 序列的方法:

[0295] 确定针对 DnMT1 有活性的单个 siRNA

[0296] 对应于人类 DNA 甲基转移酶 (DnMt1) (Acc. X63692) 核苷酸片断 2 (2114-3230) 的 hsiRNA 混合物在浓度为 200ng/ml 时采用 Lipofectamine 2000 导入到 HEK293 细胞中,以诱导 DnMT1 mRNA 的 RNAi 介导的沉默,正如实施例 VIII 所述。对照细胞用靶向非目标基因比

如 GFP 的 hsiRNA 混合物处理。来自于被处理细胞和对照细胞的总 RNA 在转染之后 6 个小时首先用 RNAwiz 试剂 (Ambion, Austin, TX) 抽提出来, 然后再用 poly-A-spin 试剂盒 (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA) 按照制造商的实验流程来分离 mRNA。使用标准的合成方法合成 DNA 反义链:

[0297] 引物 1:(gtcagtctcattgggcctgccgtt) (SEQ ID NO:13)

[0298] 引物 2:(gaaggcctcagggggcaggtacaca) (SEQ ID NO:14)

[0299] 引物 3:(tcataccacagctggtagaagtaggt) (SEQ ID NO:15),

[0300] 并用 α 32P-ATP 和高活性的多聚核苷酸激酶 (PNK) (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA) 根据制造商提供的流程标记其 5' 端。引物延伸是在两个系列的三个独立反应中进行的。一个系列采用的是来自于用 hsiRNA 混合物处理过的细胞的 RNA, 第二个系列采用的是用针对 GFP 的 siRNA 处理的阴性对照细胞的 RNA。每个引物延伸反应都是采用 1 μ g A+-RNA 和 Promega 引物延伸系统 (Promega, Madison, WI) 根据制造商的指南和分子克隆手册 (Molecular Cloning Manual) (Sambrook et al. (2001)) 中描述的标准流程进行的。引物延伸的产物用聚丙烯酰胺测序胶分析, 并且在胶上与利用引物 1、2 和 3 和利用片断 2 的 Litmus 构建物作为 DNA 模板而生成的 Sanger 测序梯度相邻, 这就允许产物以单个核苷酸的分辨率被鉴定。目标 DNMT1RNA 上的剪切位点通过比较引物延伸产物条带与测序梯度中那些共迁移的条带的迁移率来鉴定, 比如将引物 1 的延伸产物与用引物 1 生成的测序梯度相比较。上述程序被概括在图 11 中。这些结果提供了 mRNA 剪切位点处的序列。根据 siRNA 以在对应于 siRNA 中央部位的位置导致剪切的方式结合到 mRNA 这些知识 (Martinez et al., Cell 110:563-574(2002)), 就可能由剪切位点处的序列确定与 mRNA 被检测到的剪切相关的 siRNA 片断的全长序列。一旦导致剪切的 siRNA 片断的序列被鉴定出来, 就可以制备具有所述被鉴定的序列的 DNA, 使用标准技术将 DNA 插入到具有可以表达双链 RNA 的启动子的载体中, 就可以获得克隆。被克隆的编码 siRNA 的 DNA 序列可以作为研究基因沉默的试剂或者用作治疗试剂。

[0301] 除了以上所述, 编码 siRNA 序列的已克隆的 DNA 可以被克隆。这种 DNA 会表达具有发卡结构的 RNA。这种 DNA 可以作为基因沉默的试剂。另外, DNA 可以被化学合成, 以用于体外转录。在这种情况下, 所需 siRNA 的序列以具有重复序列且其间插入有连接片断 (spacer) 的 DNA 的形式被合成。一旦被转录之后, 这种方向相反的 RNA 重复就可以生成发卡产物, 而所述连接片断则对应于环形区 (Milligan, et al., Nucleic Acids Res., 15: 8783-8798(1987))。

[0001]

序列表

<110> 新英格兰生物实验室公司 (New England Biolabs, Inc.)

<120> 与基因沉默相关的方法和组合物

<130> NEB-208/9-PCN

<150> US 60/402, 769
<151> 2002-08-12

<150> US 60/407, 543
<151> 2002-08-30

<150> US 60/467, 541
<151> 2003-05-02

<160> 15

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1
<211> 908
<212> DNA
<213> 未知

<220>
<223> malE转录物

<400> 1
gggcagatct gctgccgaac ccgcaaaaa cctgggaaga gatccccgcg ctggataaag 60
aactgaaagc gaaaggtaag agcgcgctga tgttcaacct gcaagaaccg tacttcacct 120
ggccgctgat tgctgctgac gggggttatg cgttcaagta tgaaaacggc aagtacgaca 180
ttaaagacgt gggcgtggat aacgctggcg cgaagcggg tctgaccttc ctggttgacc 240
tgattaaaaa caaacacatg aatgcagaca ccgattactc catcgcagaa gctgccttta 300
ataaaggcga aacagcgatg accatcaacg gcccggtggc atggtecaac atcgacacca 360
gcaaagttaa ttatggtgta acggtactgc cgacctcaa gggtaacca tccaaacctg 420
tcgttggcgt gctgagcgc ggtattaacg ccgccagtcc gaacaaagag ctggcaaaag 480
agttcctcga aaactatctg ctgactgatg aaggctgga agcggttaat aaagacaac 540
cgctgggtgc cgtagcgtg aagtccttac aggaagagt ggcaagat ccacgtattg 600
ccgccactat ggaaacgcc cagaaagggt aatcatgcc gaacatccc cagatgtccg 660
ctttctggta tgccgtgctg actgcggtga tcaacgccg cagcggctg cagactgtcg 720
atgaagccct gaaagacgc cagactaatt cgagctcgaa caacaacaac aataacaata 780
acaacaacct cgggatcgag ggaaggattt cagaattcct gcaggatatt tggatccacg 840
aagcttccca tggtagcgtc accggttcta gatacctagg tgagctctgg taccctctag 900
tcaaggcc 908

<210> 2
<211> 868
<212> DNA
<213> 未知

<220>
<223> 绿色荧光蛋白转录物

<400> 2
taatacgact cactataggg gcccggtcaa ttgaagccgg ctggcgccaa gcttctctgc 60
aggatatctg gatccacgaa ttcgctagcc taccggctgc caccatggtg agcaaggggc 120

[0002]

aggagctggtt caccggggtg gtgccatcc tggtegagct ggacggcgac gtaaaccggc	180
acaagttcag cgtgtccggc gaggcgagg gcgatgccac ctacggcaag ctgaccctga	240
agttcatctg caccaccggc aagctgccc lgccctggcc caccctctg accaccctga	300
cctacggcgt gcagtgttc agccgctacc ccgaccacat gaagcagcac gacttcttca	360
agtccgceat gcccgaaggc tacgtccagg agcgcacat ctcttcaag gacgacggca	420
actacaagac ccgcccggag gtgaagttcg agggcgacac cctggtgaac cgcacgagc	480
tgaagggcat cgacttcaag gaggacggca acatcctggg gcacaagctg gagtacaact	540
acaacagcca caacgtctat atcatggccg acaagcagaa gaacggcacc aaggtgaact	600
tcaagatccg ccacaacatc gaggacggca gcgtgcagct cggcgaccac taccagcaga	660
acaccccat cggcgacggc cccgtgtgc tgcggacaa ccaactacctg agcaccctg	720
ccgccctgag caaagacccc aacgagaagc gcgatcacat ggtcctgctg gagttcgtga	780
ccgccccgg gatcactctc ggcatggag agctgtacag gcacgctgc accctctagt	840
caaggcctat agtgagtctg attacgga	868
<210> 3	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 未知	
<220>	
<223> 引物	
<400> 3	
taaacgactc actatagg	18
<210> 4	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 未知	
<220>	
<223> 引物	
<400> 4	
ctgcaggata tctggatcca c	21
<210> 5	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 未知	
<220>	
<223> 引物	
<400> 5	
catgcccggg tacctttcta ttctc	25
<210> 6	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 未知	
<220>	
<223> 引物	
<400> 6	
gtggatccag atacctgca g	21
<210> 7	

[0003]

<211> 22	
<212> RNA	
<213> 未知	
<220>	
<223> 正义链绿色荧光蛋白siRNA	
<400> 7	22
gcaagcugac ccugaaguuc au	
<210> 8	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 未知	
<220>	
<223> 反义链绿色荧光蛋白siRNA	
<400> 8	22
gaacuucagg gucagcuugc cg	
<210> 9	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 未知	
<220>	
<223> 正义链荧光素酶GL3 siRNA	
<400> 9	21
cuuacgcuga guacuucgat t	
<210> 10	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 未知	
<220>	
<223> 反义链荧光素酶GL3 siRNA	
<400> 10	21
ucgaaguacu cagcuaagt t	
<210> 11	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 未知	
<220>	
<223> 引物	
<400> 11	24
ctcgagtaat acgactcact atag	
<210> 12	
<211> 38	
<212> DNA	
<213> 未知	
<220>	
<223> 扩增引物	
<400> 12	38
taatacgact cactatagaa ggacagatgg ttaagtac	
<210> 13	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 未知	

[0004]

<220>		
<223>	DNA反义引物1	
<400>	13	
	gtcagtctca ttgggcctgc cgtt	24
<210>	14	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	未知	
<220>		
<223>	DNA反义引物2	
<400>	14	
	gaaggcctca gggggcaggt acaca	25
<210>	15	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	未知	
<220>		
<223>	DNA反义引物3	
<400>	15	
	tcataccaca gctggtagaa gtaggt	26

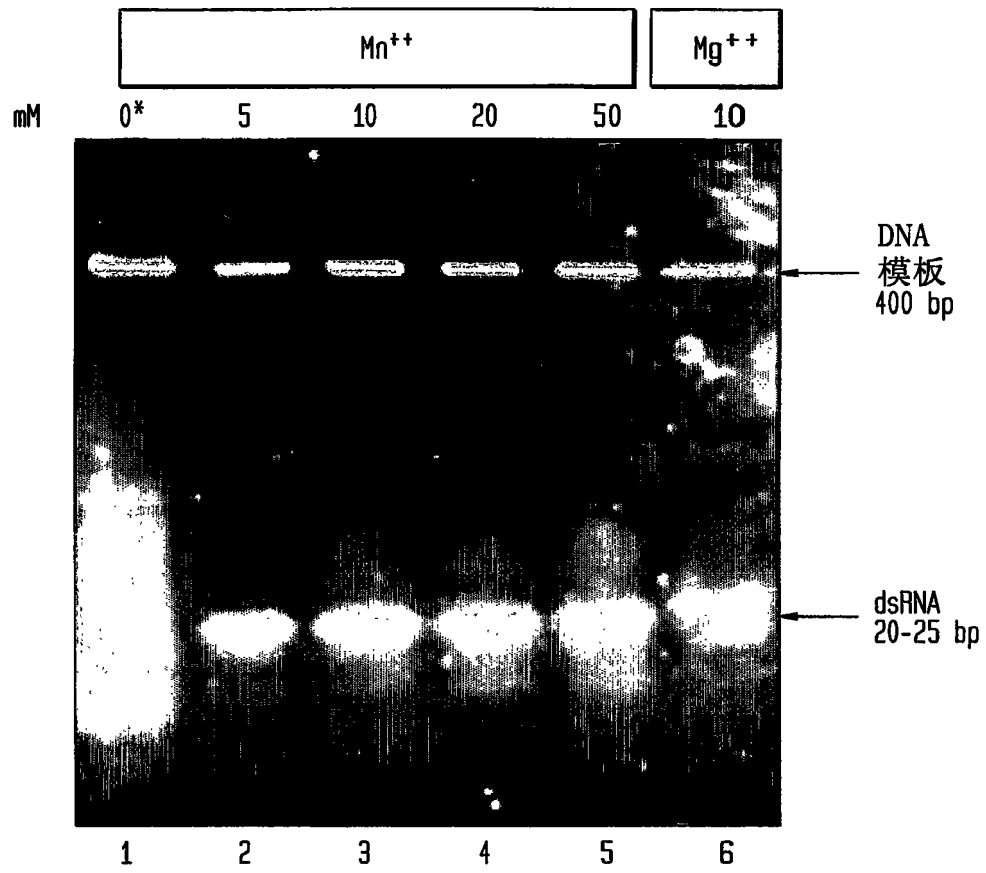


图 1A

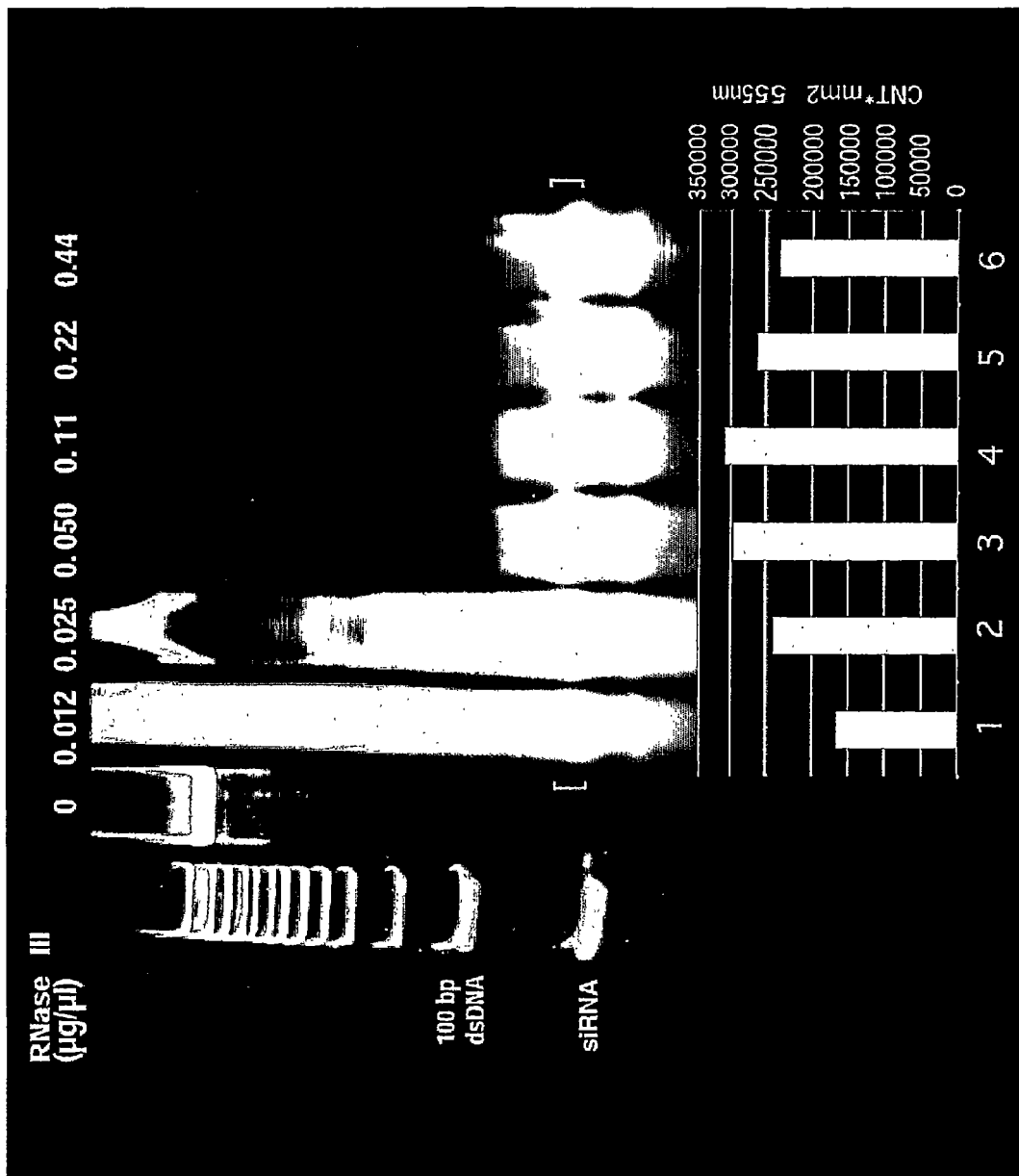


图1B

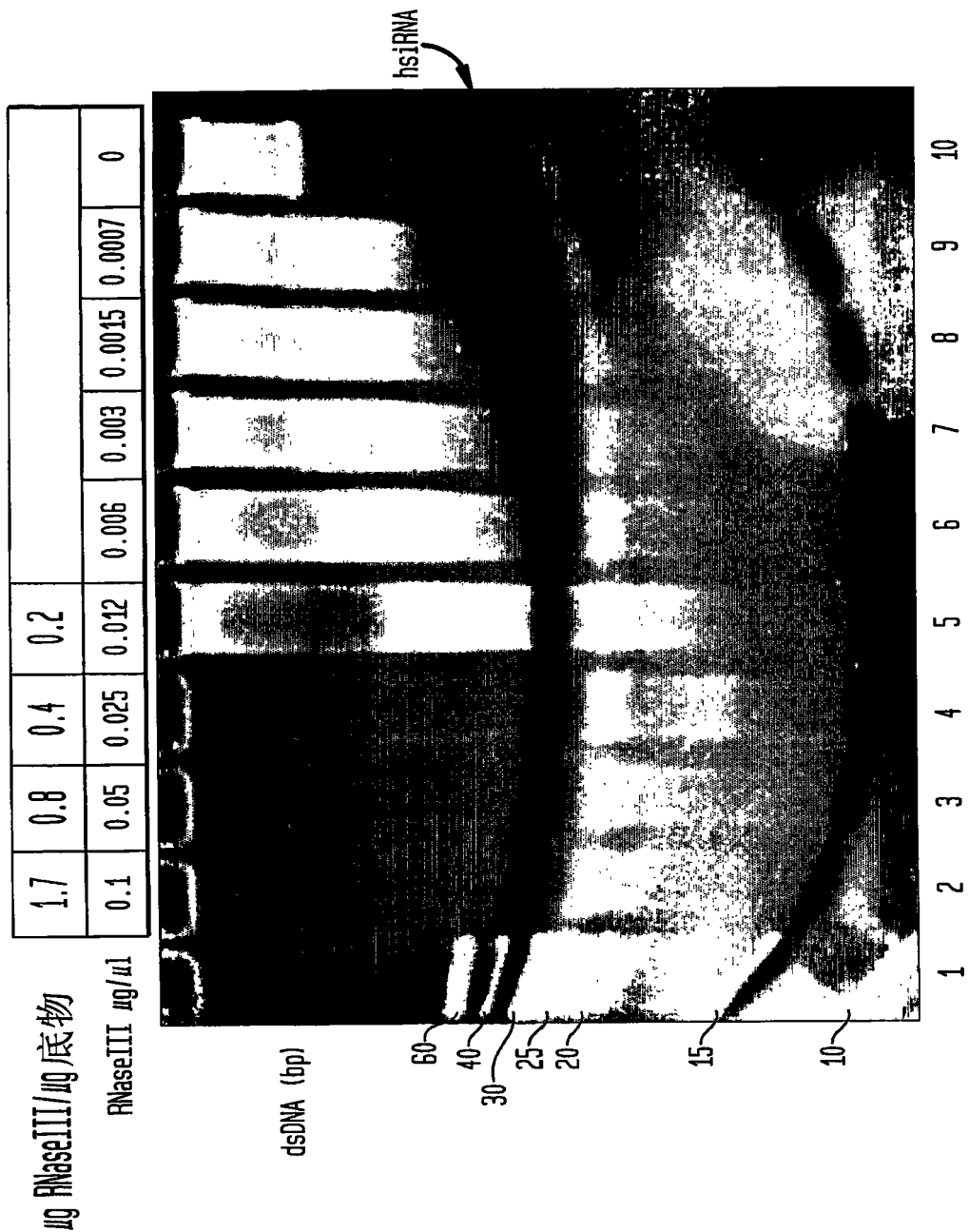


图1C

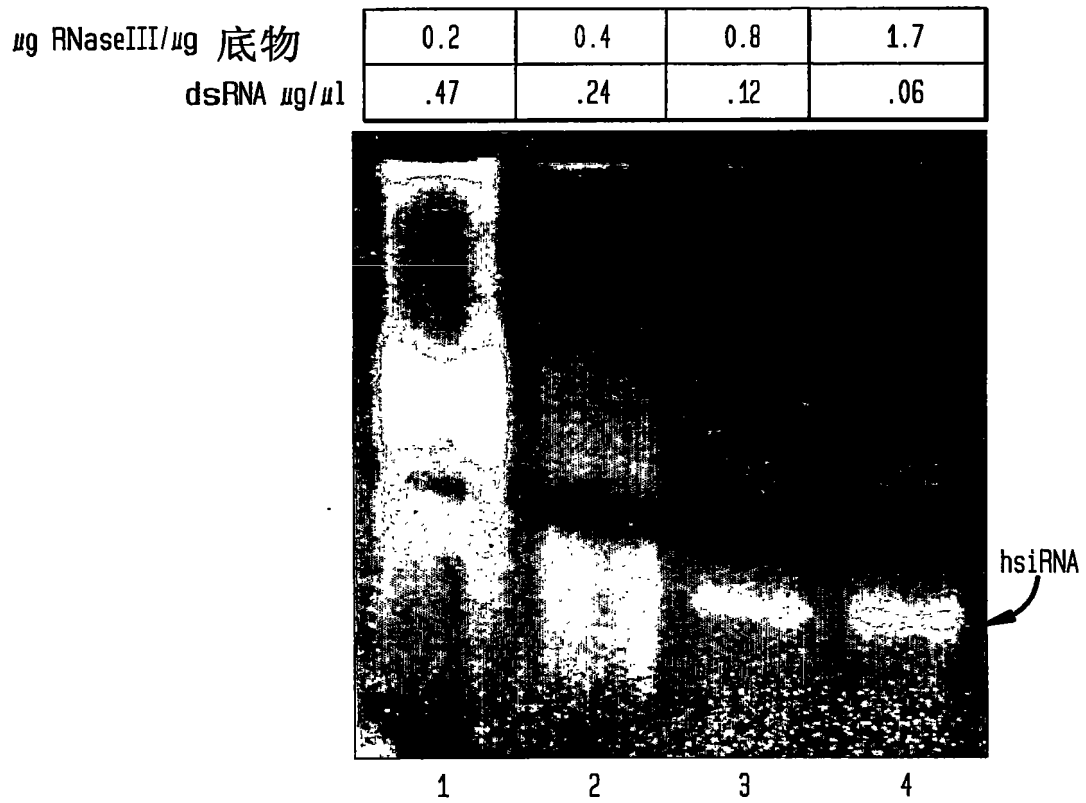


图 1D

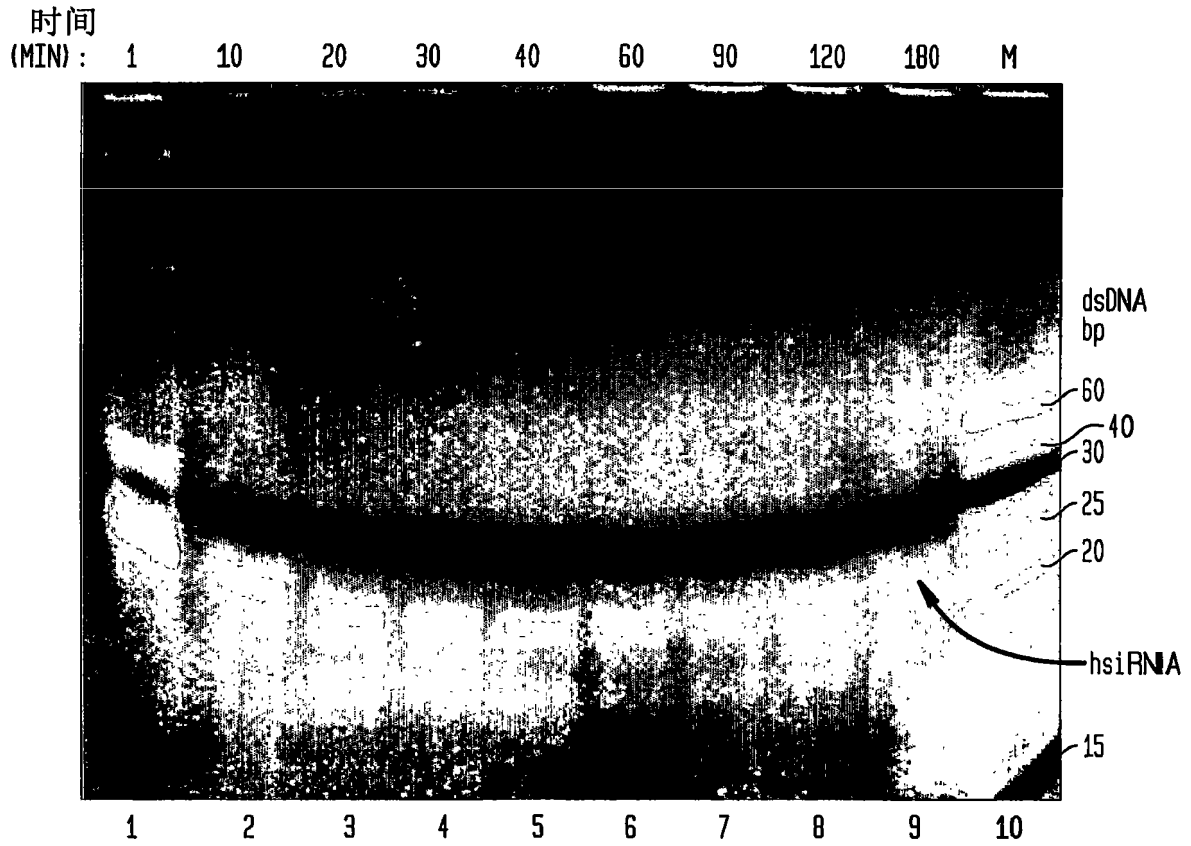
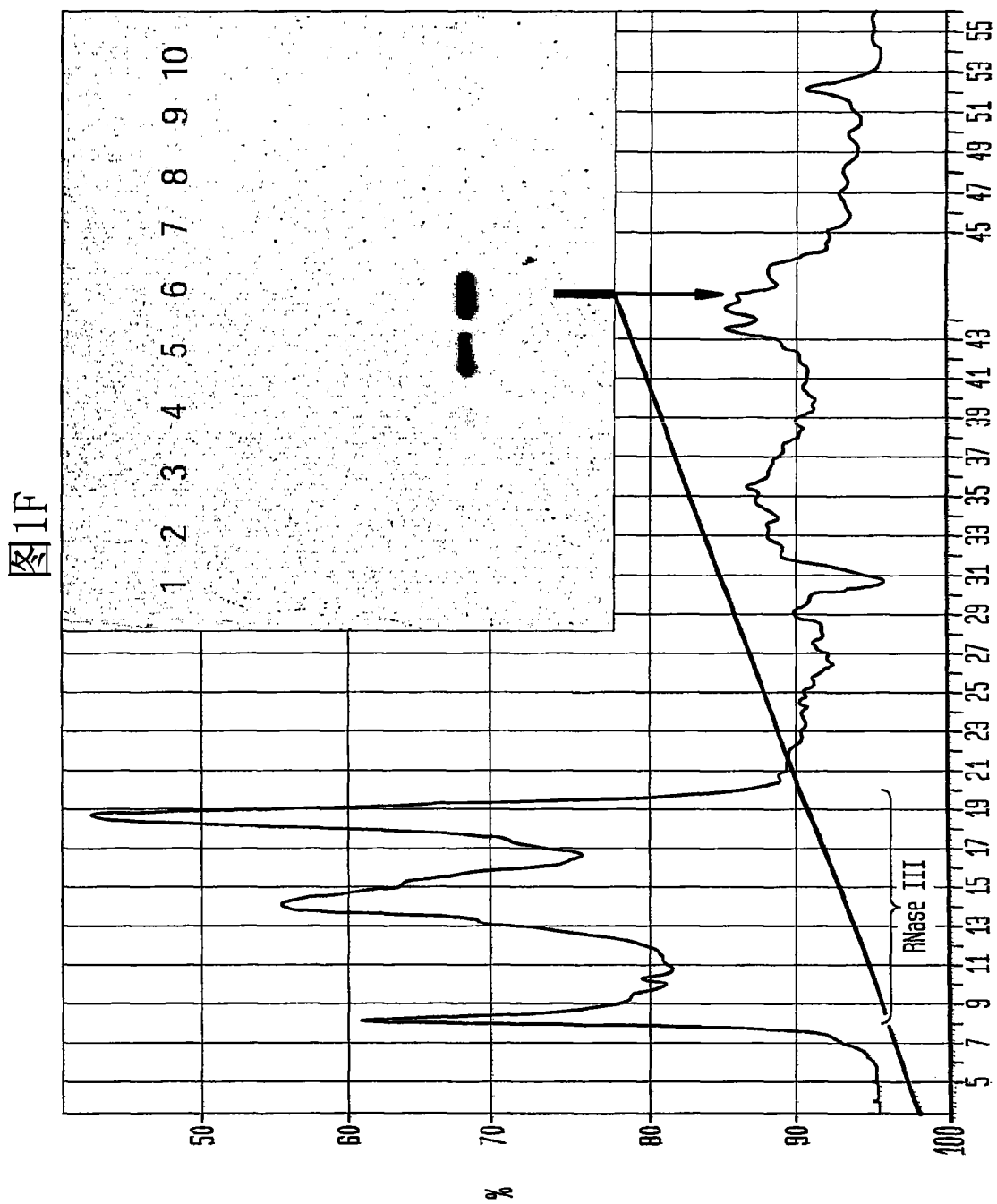


图 1E



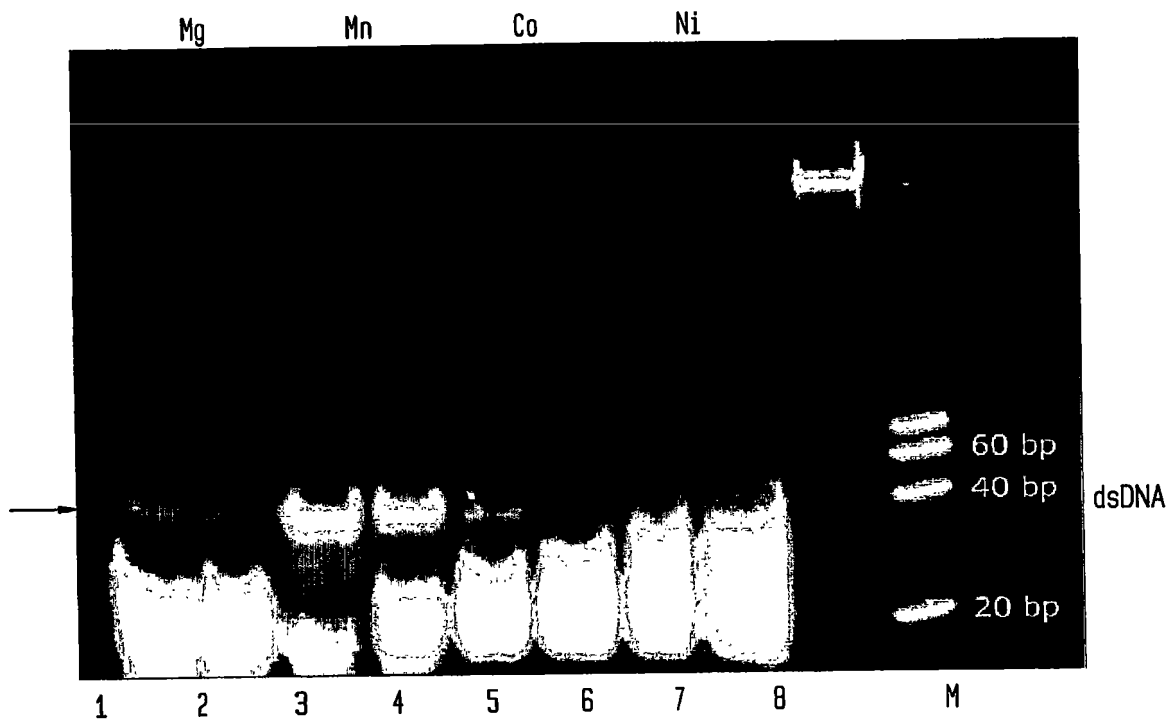


图 2

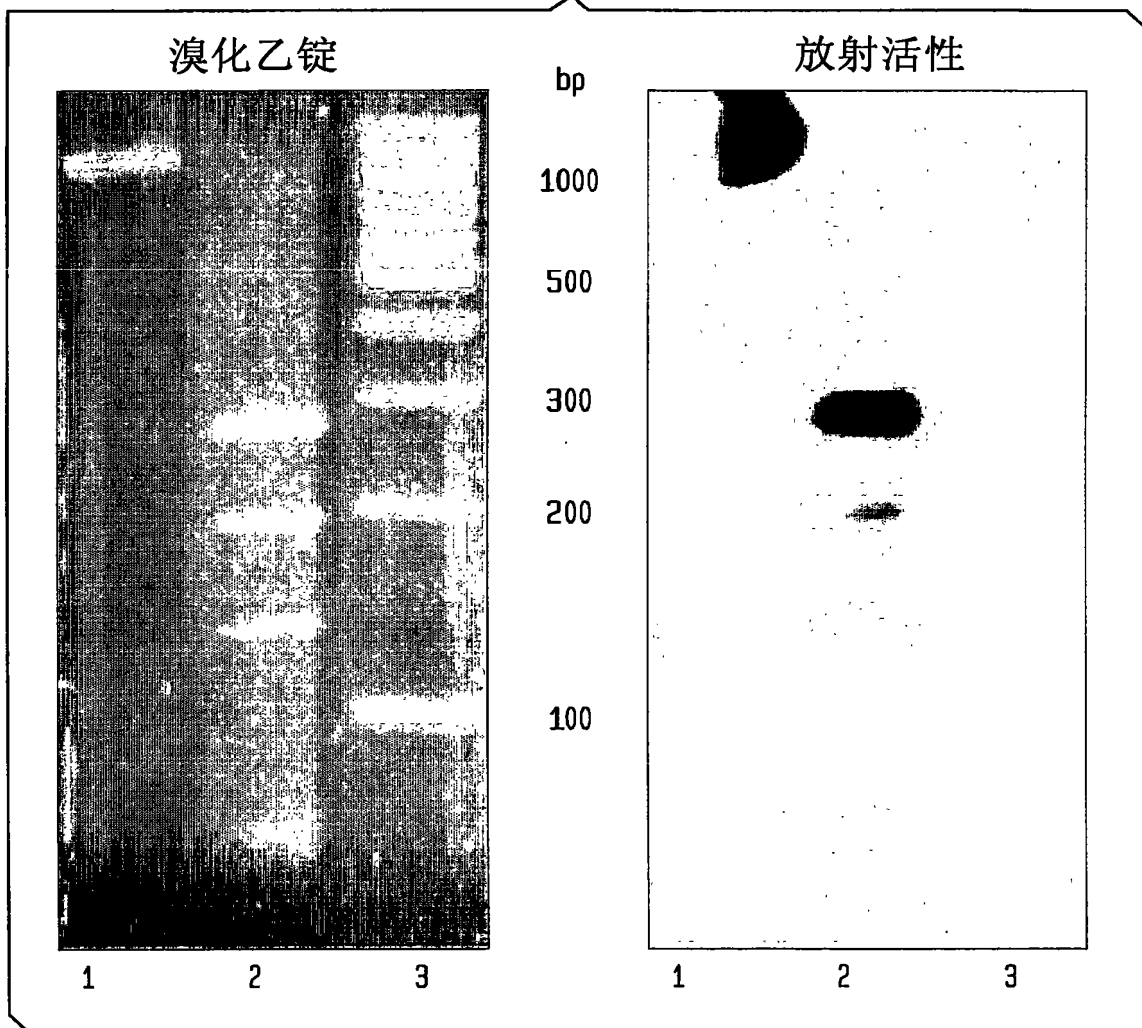


图 3A

溴化乙锭和放射性强度

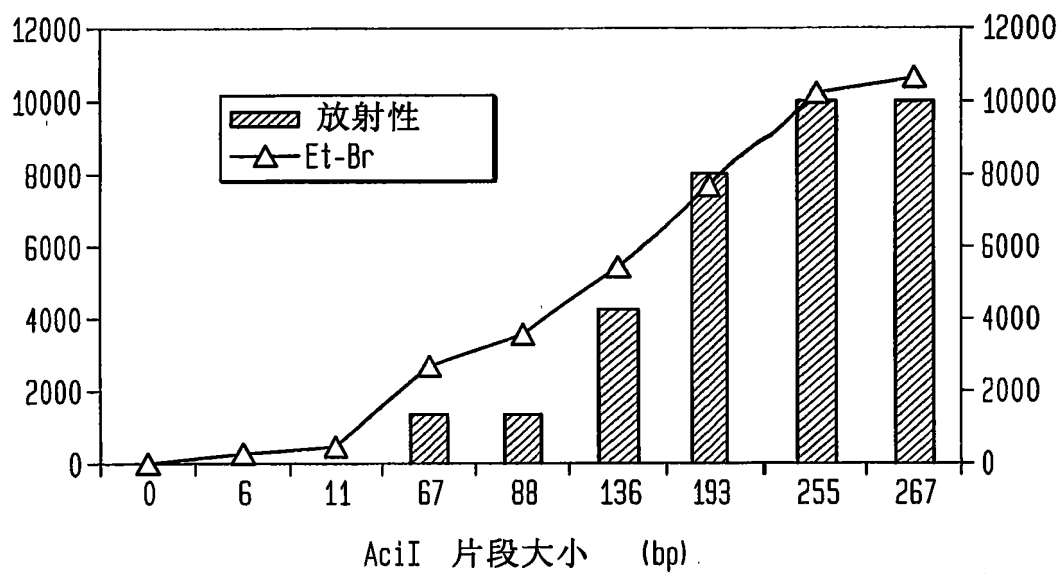


图 3B

RNase III 消化产物的克隆

图4A-1

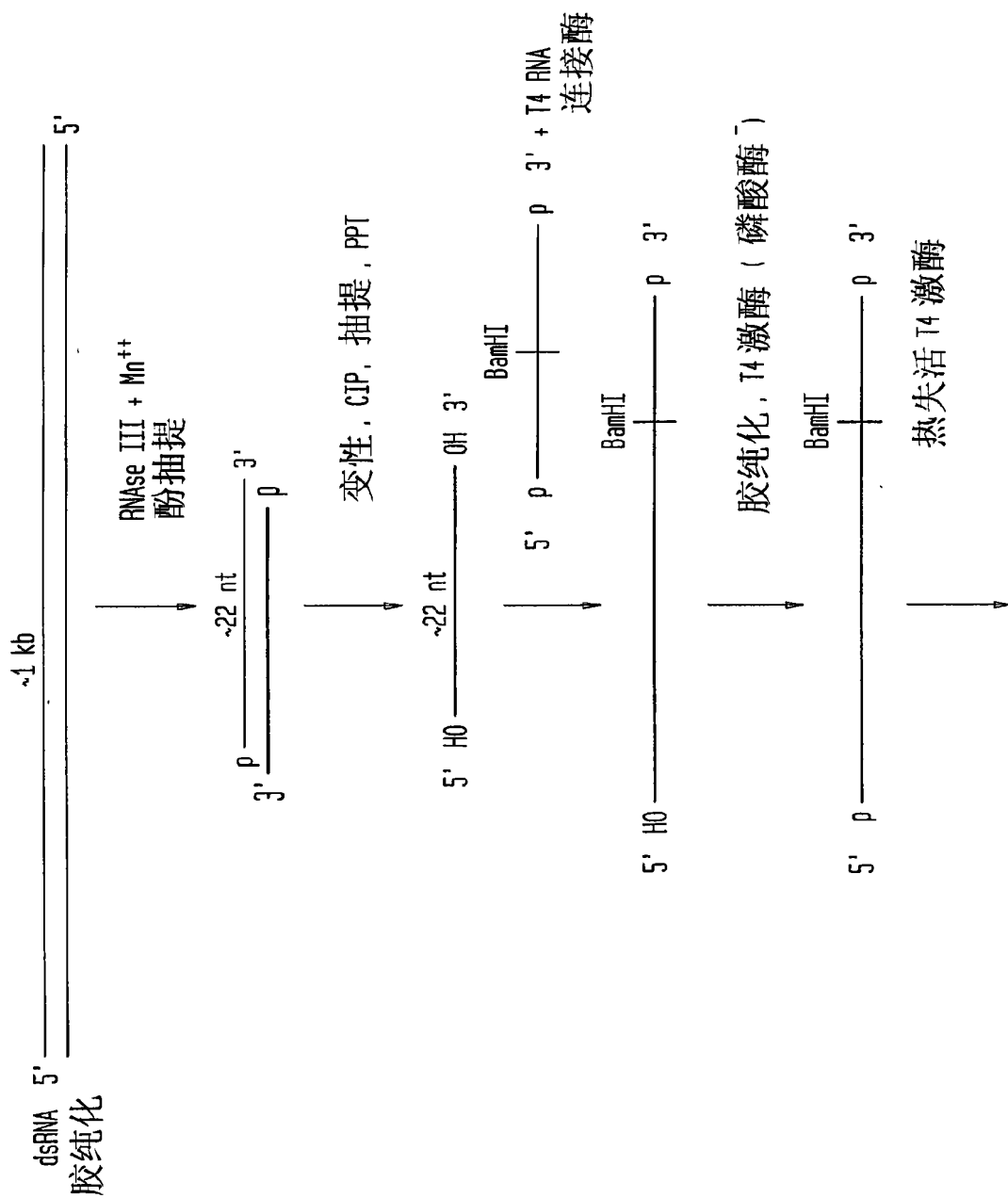
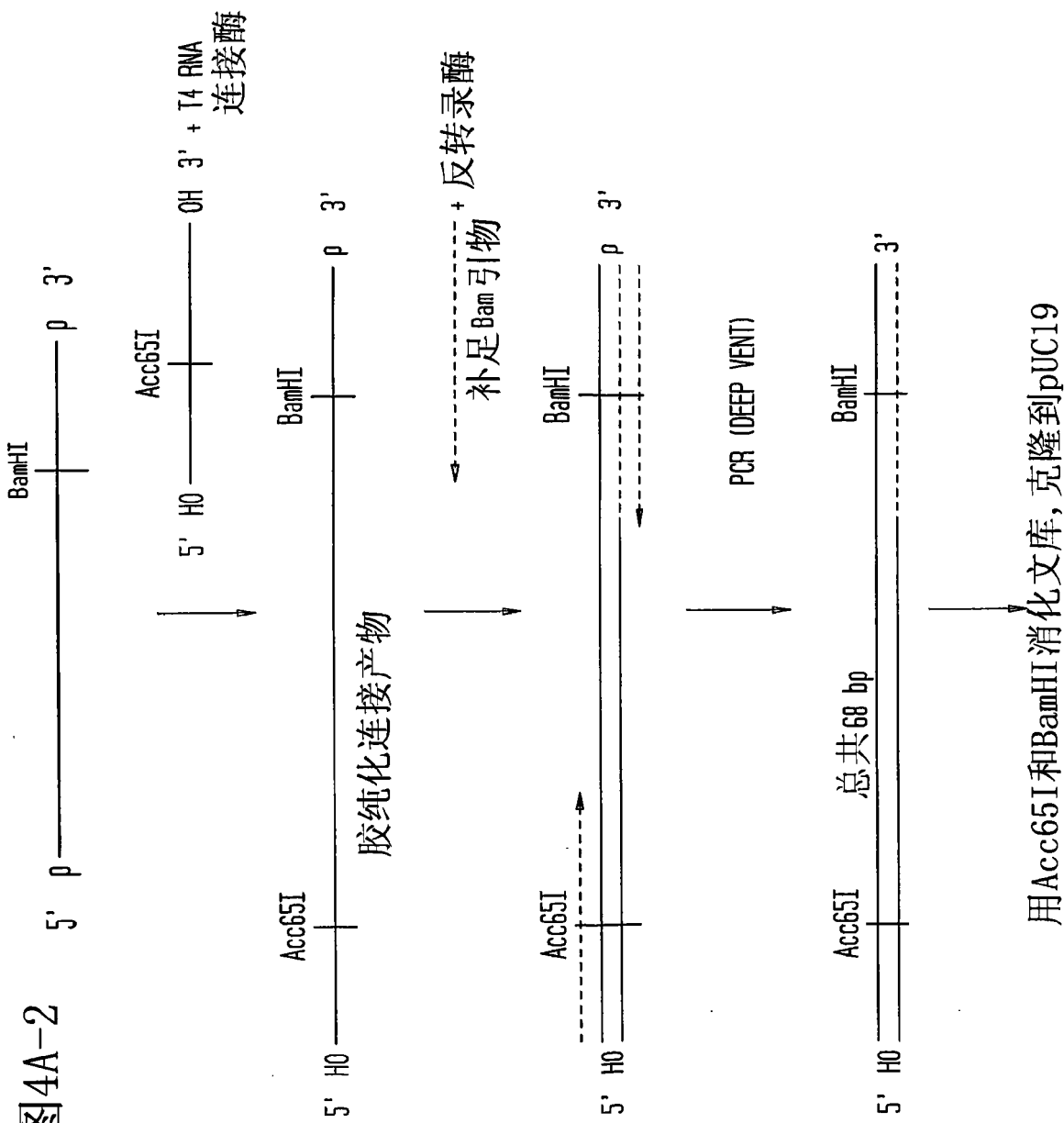


图4A-2



克隆到LITMUS 28i中的BglII-EcoRI malE片段:

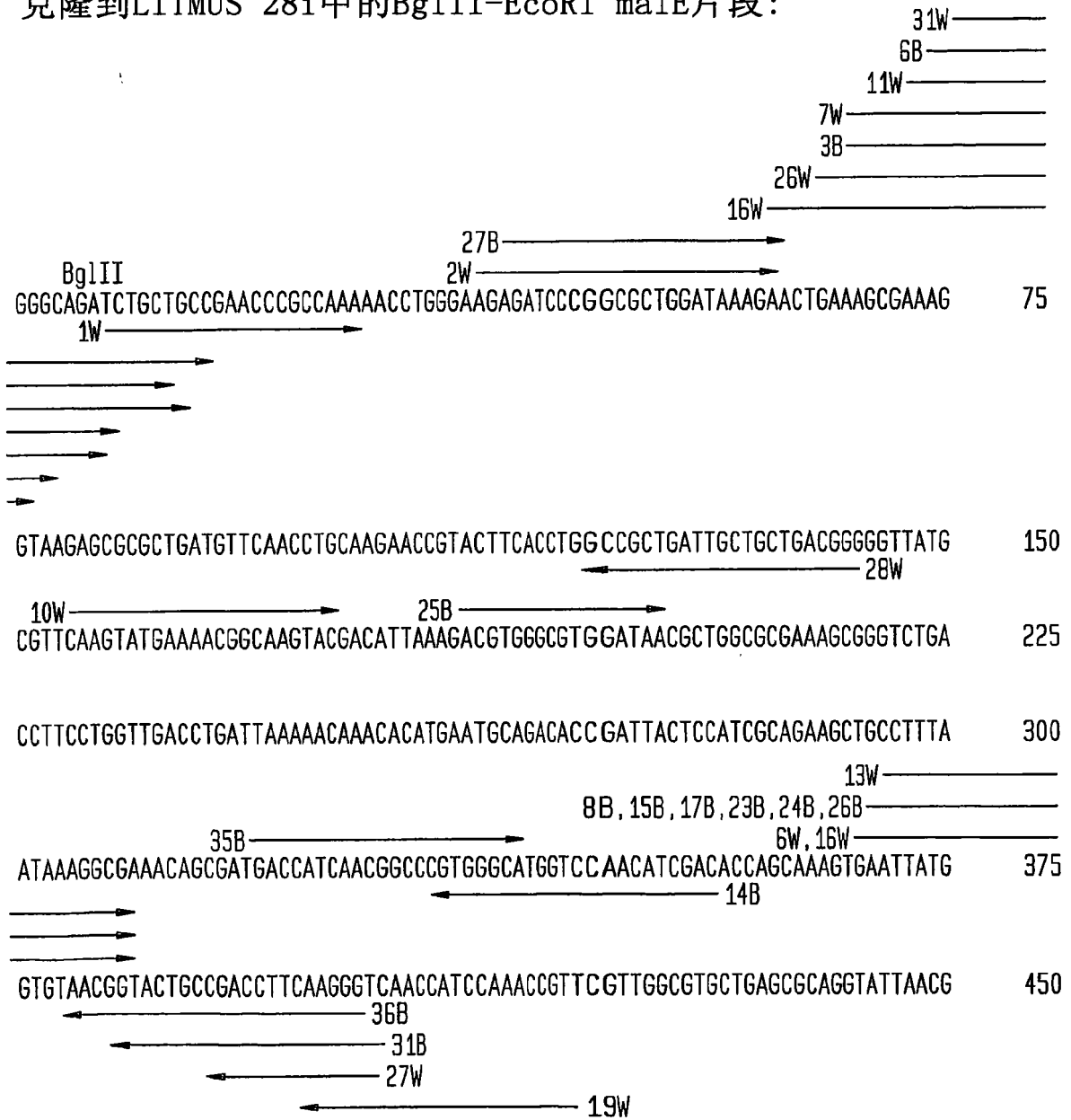


图 4B-1

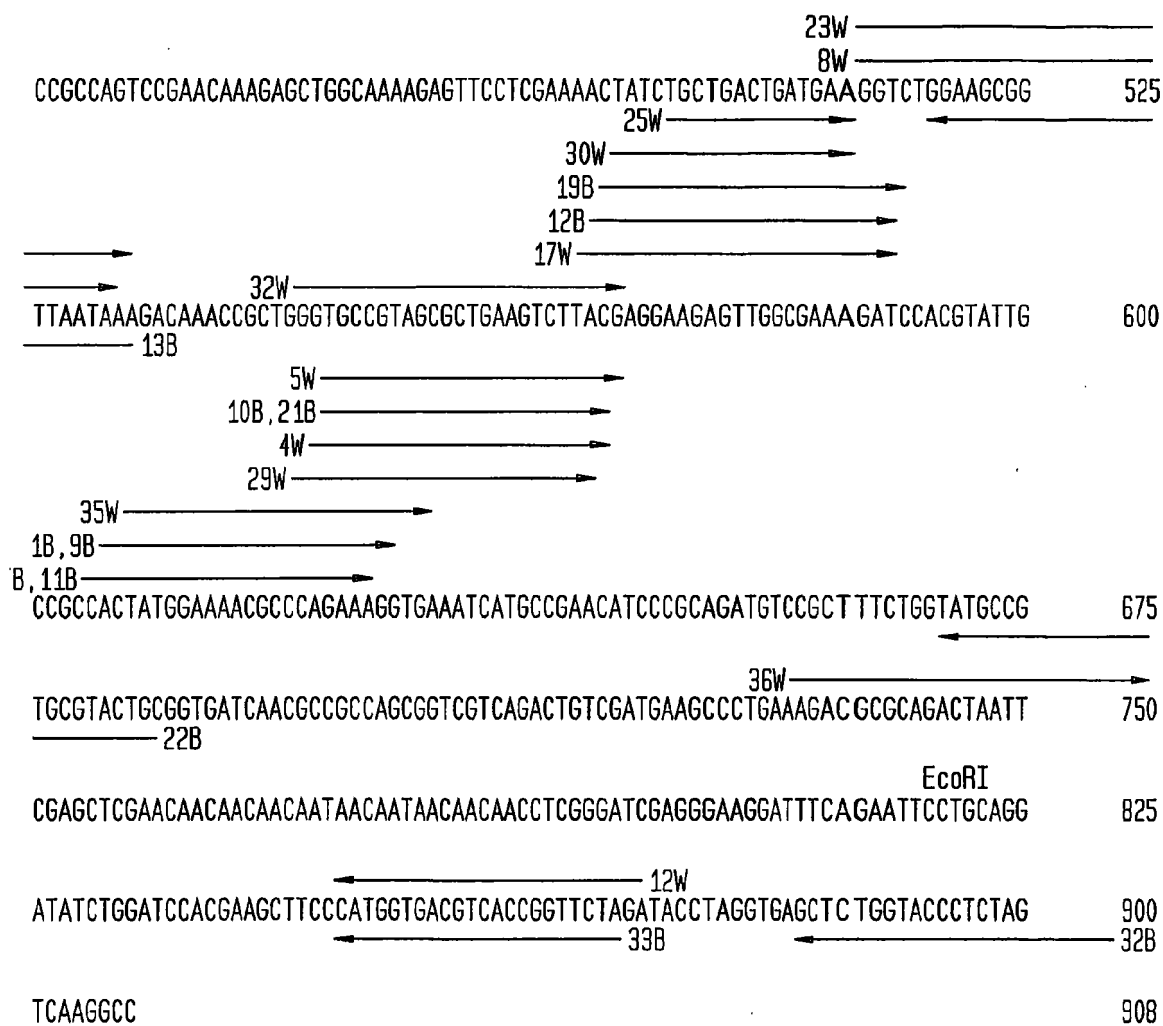


图 4B-2

克隆到LITMUS 38i中的NheI-BsrGI GFP片段:

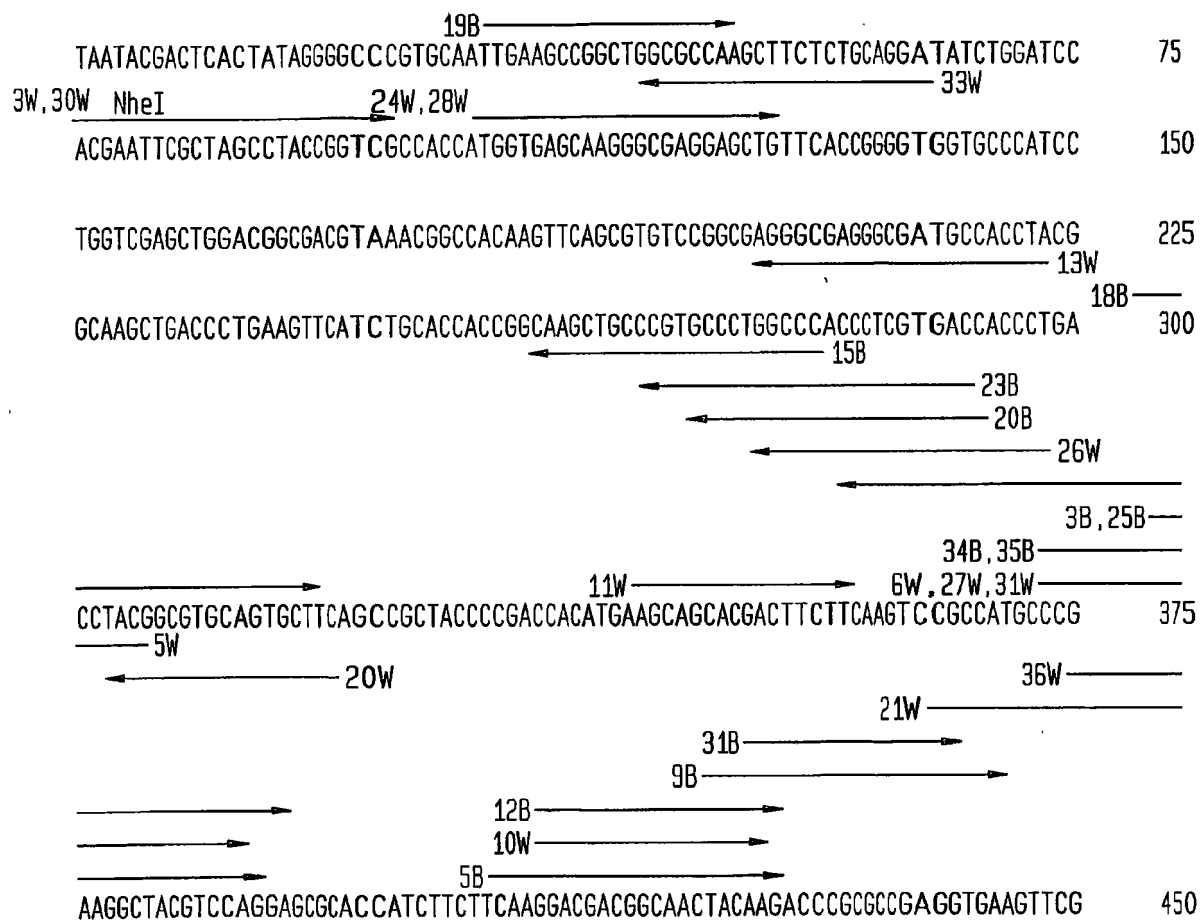


图 4C-1

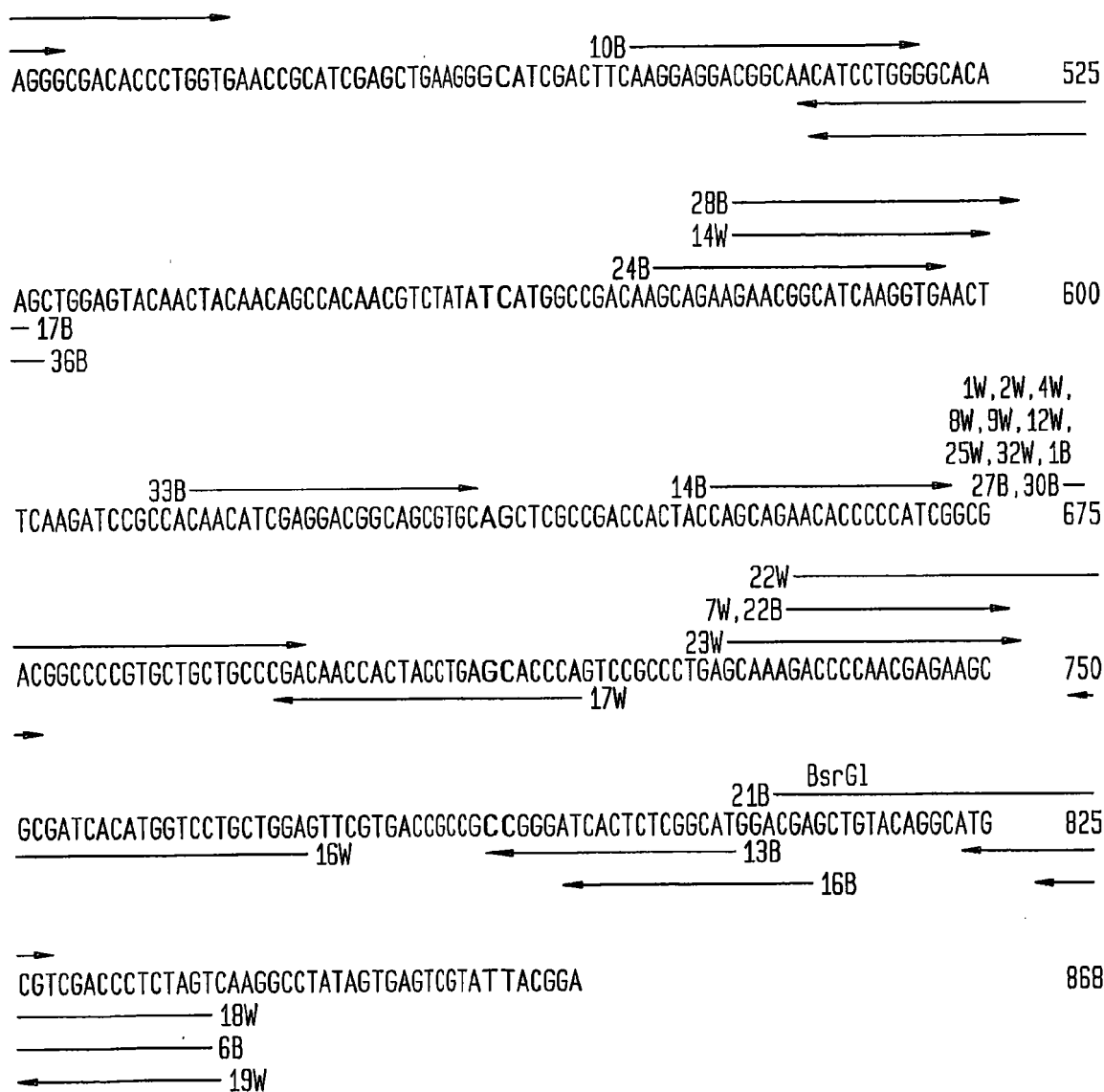


图 4C-2

图4D

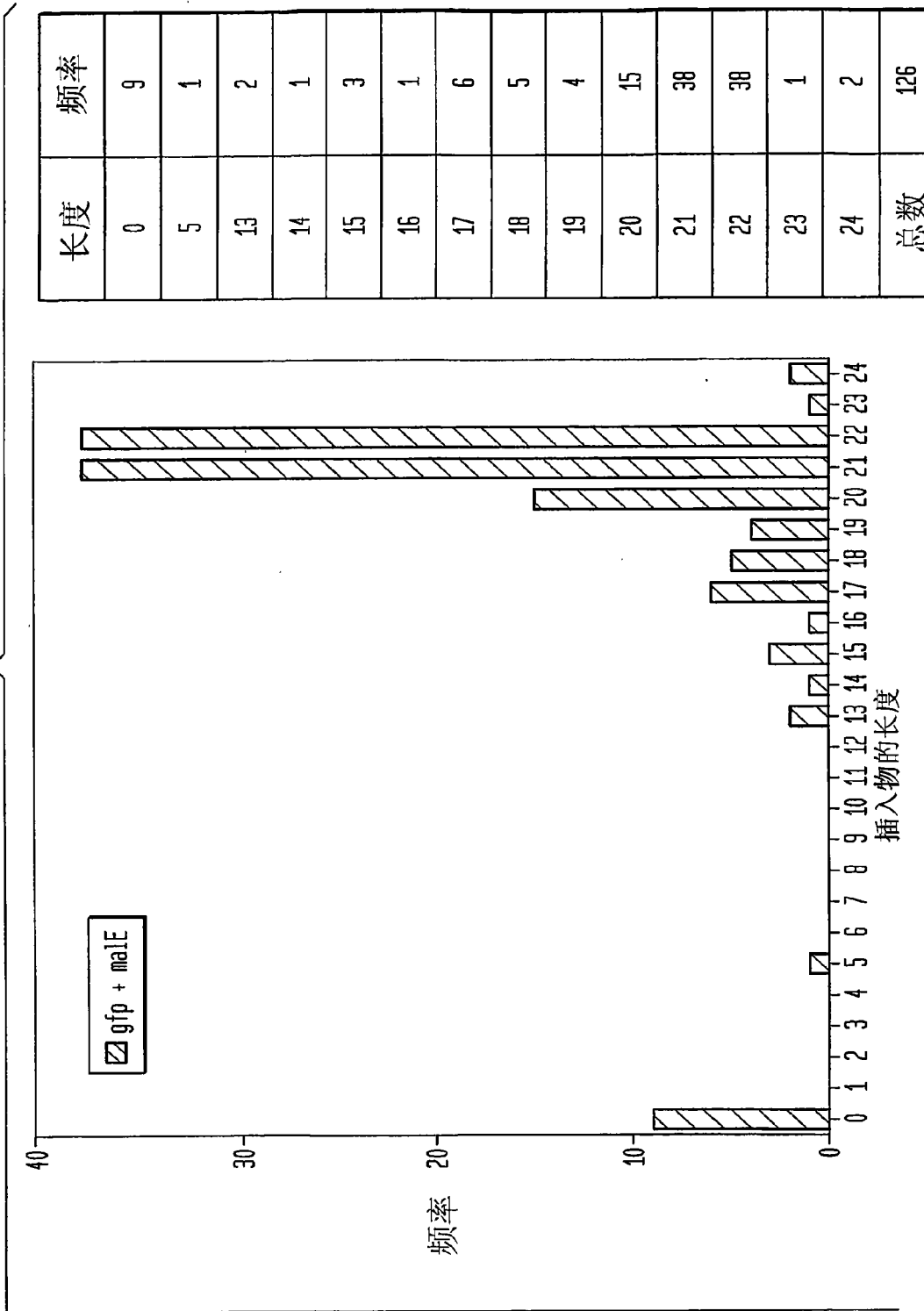


图5
果蝇S2细胞中萤火虫荧光素酶的沉默

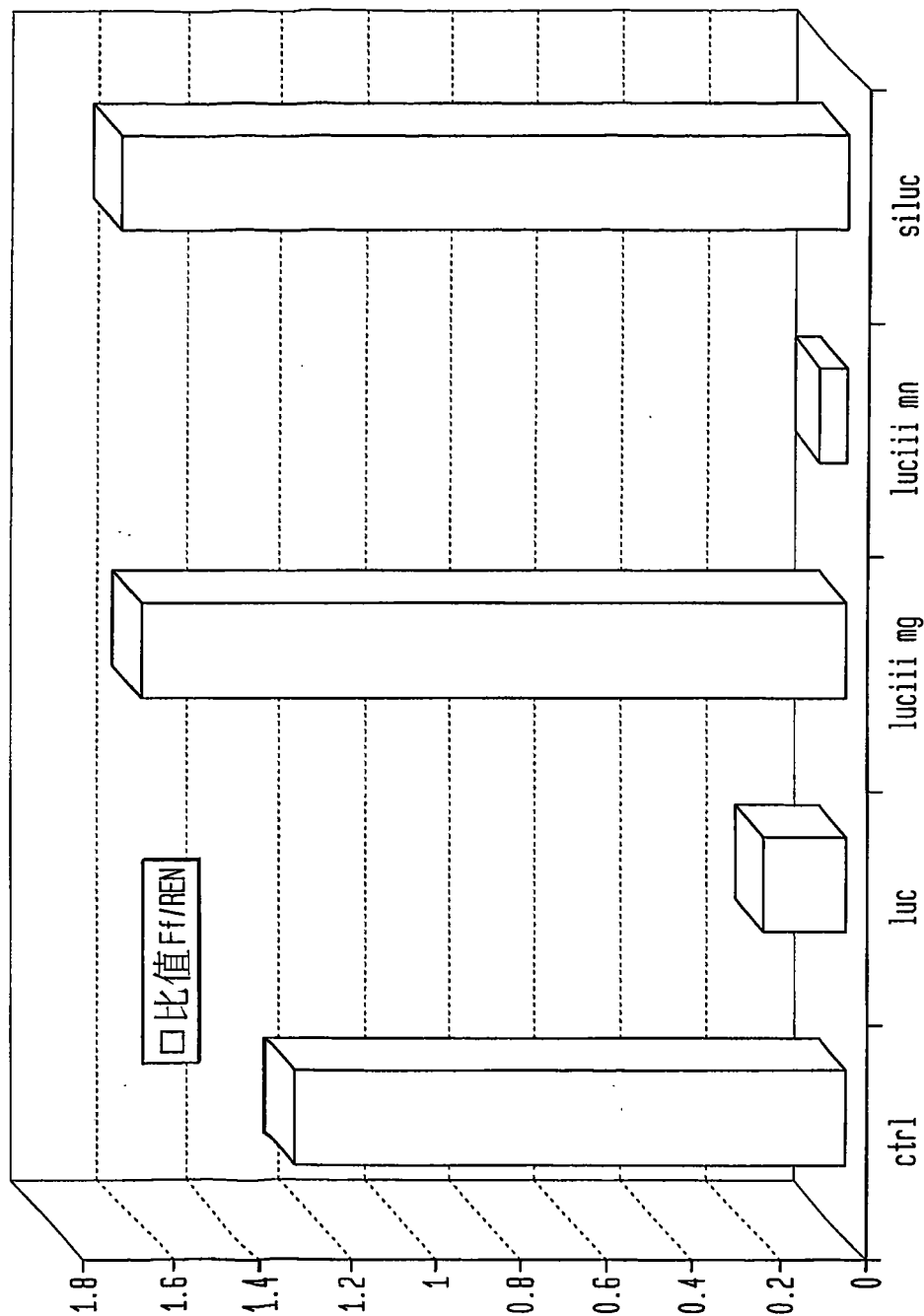
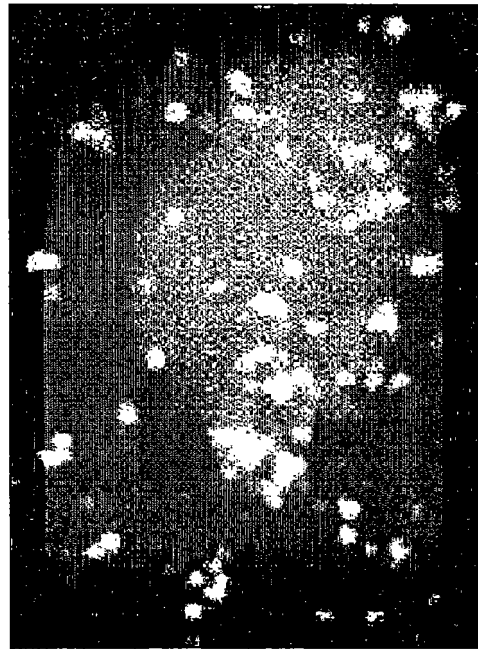
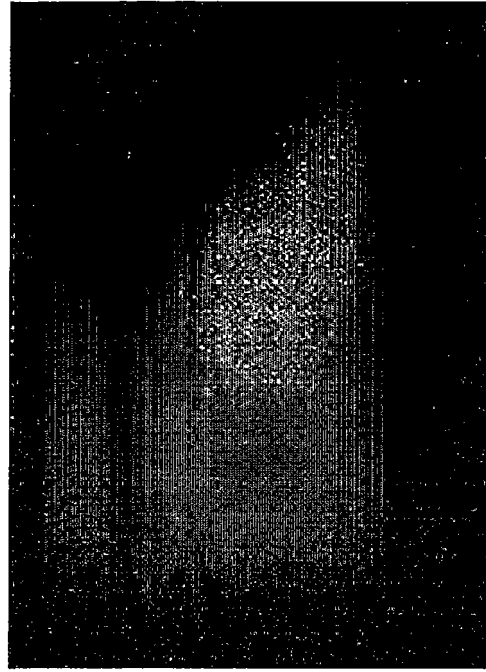


图6A

HEK-293细胞中EGFP的沉默



对照



GFP dsRNA RNaseIII Mn⁺⁺

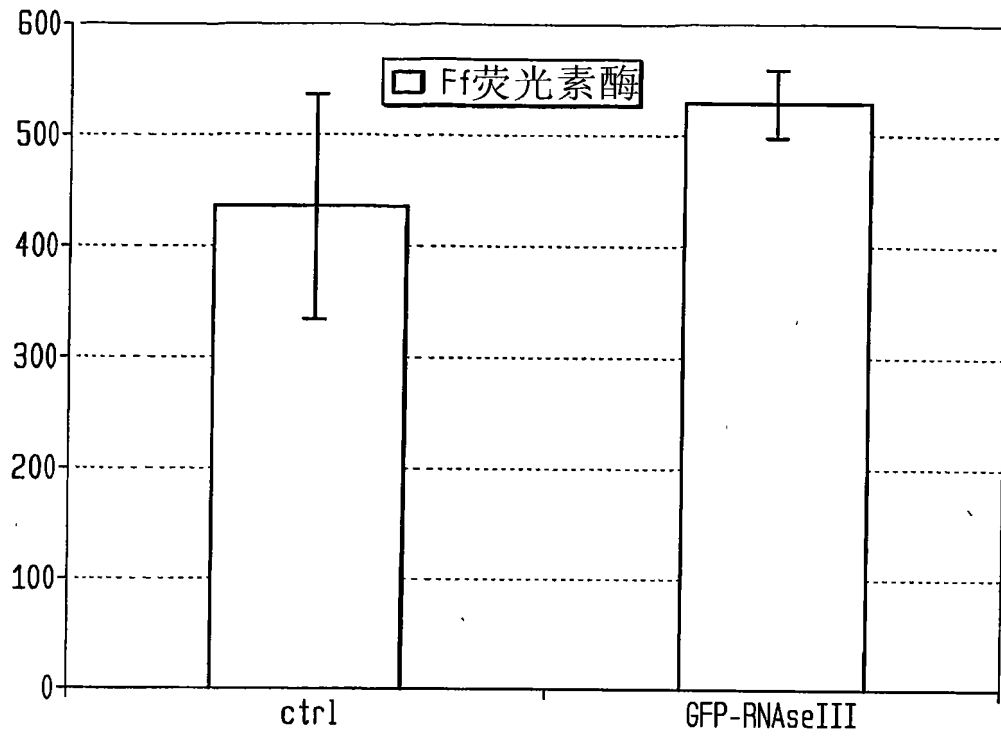


图 6B

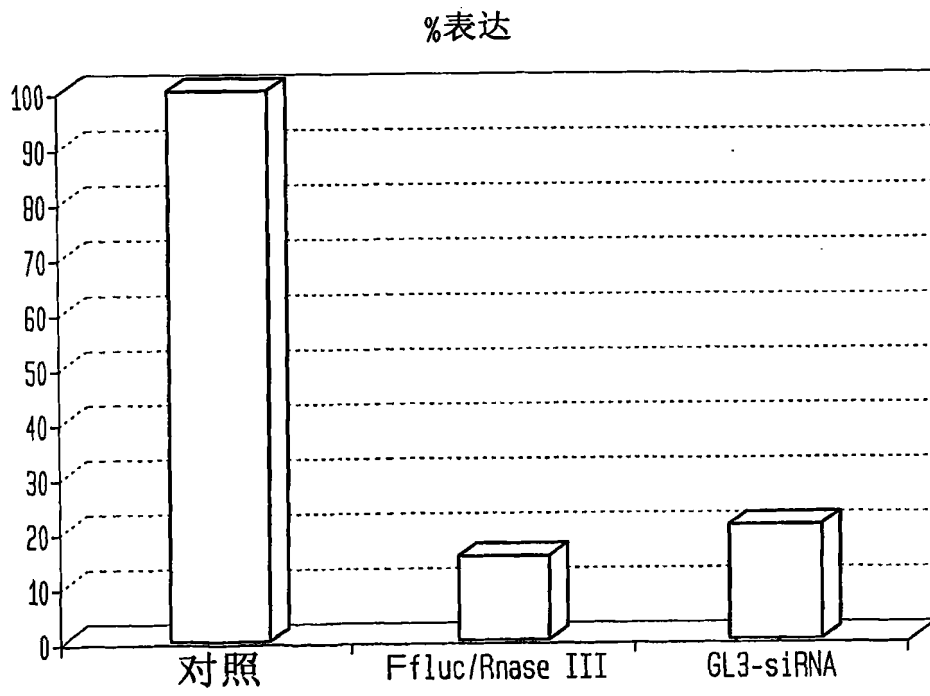


图 6C

图7A

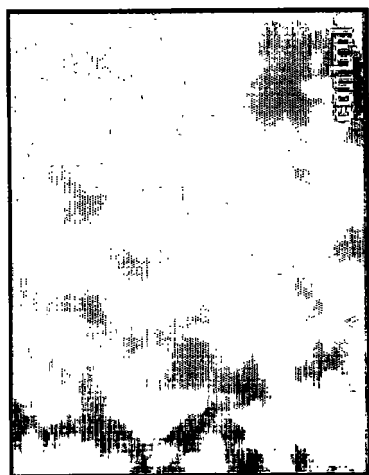


图7B

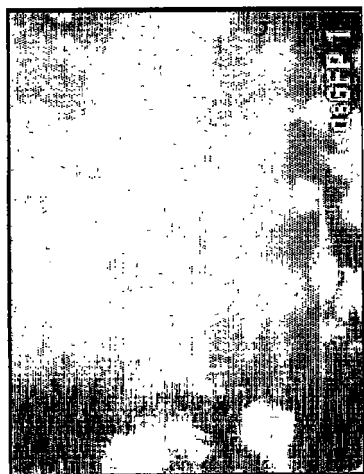


图7C

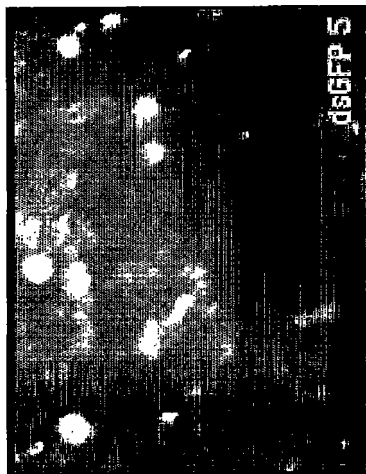


图7D

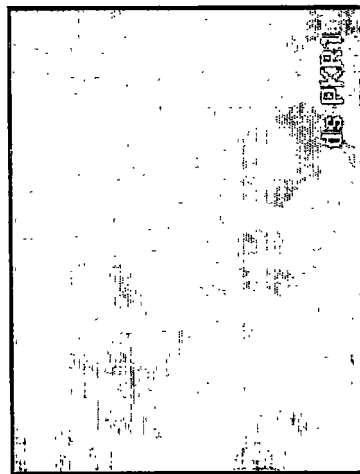
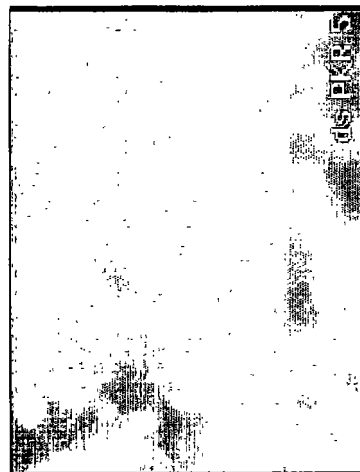


图7E



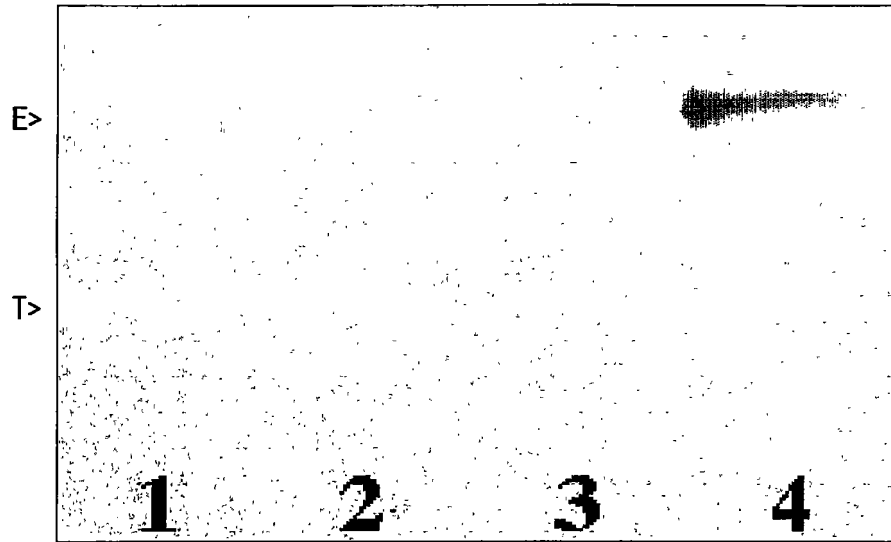


图 8A

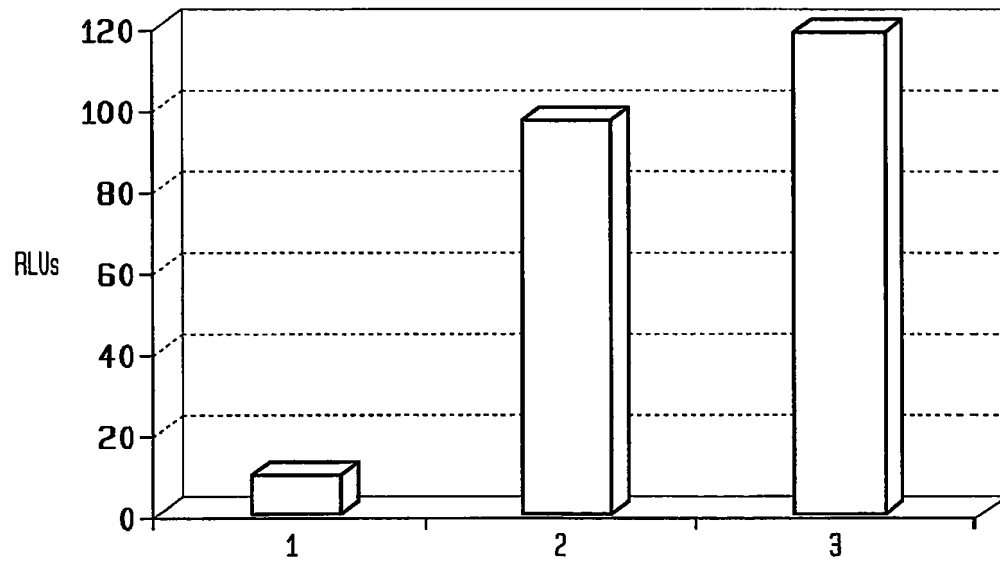
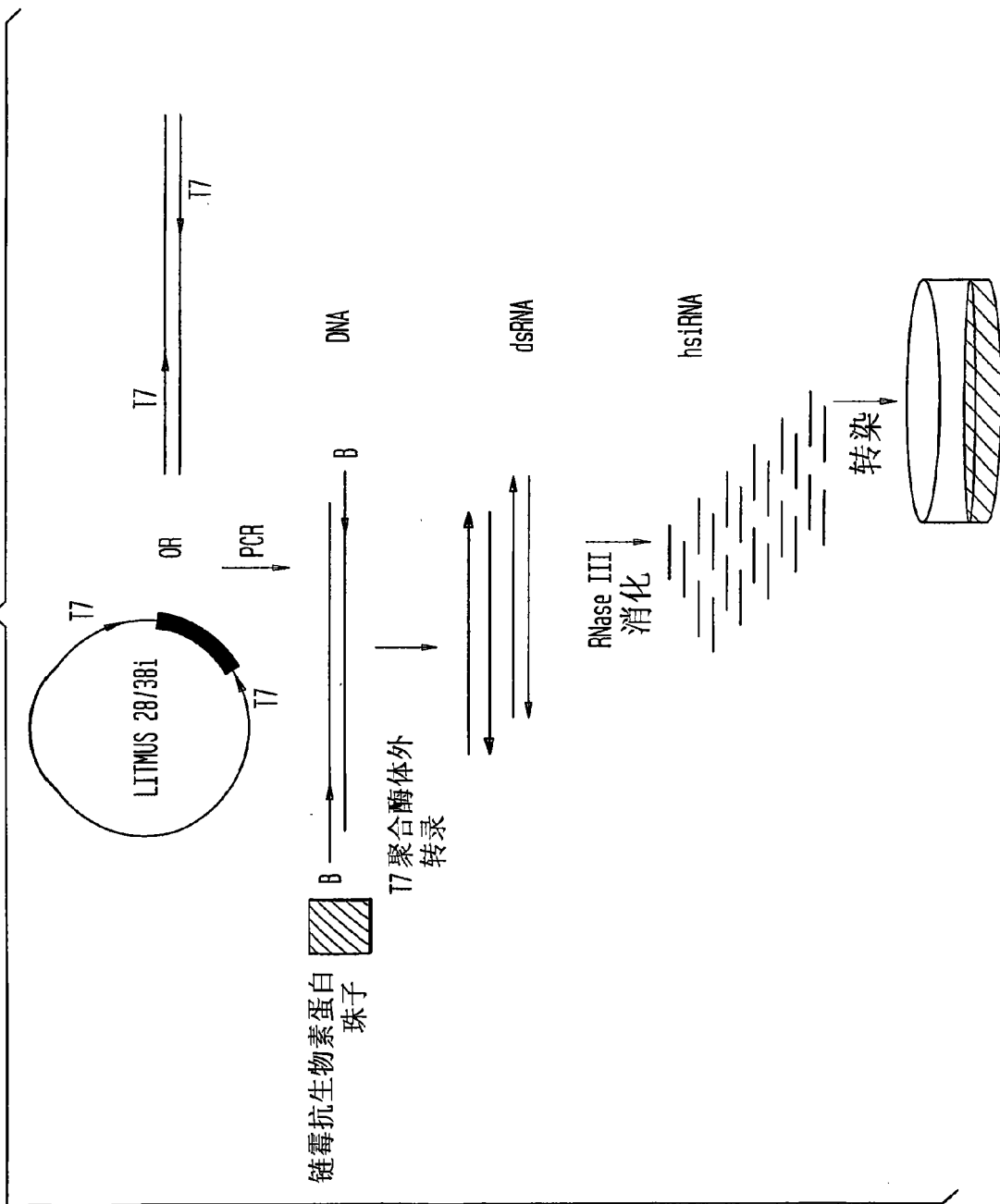


图 8B

图9A



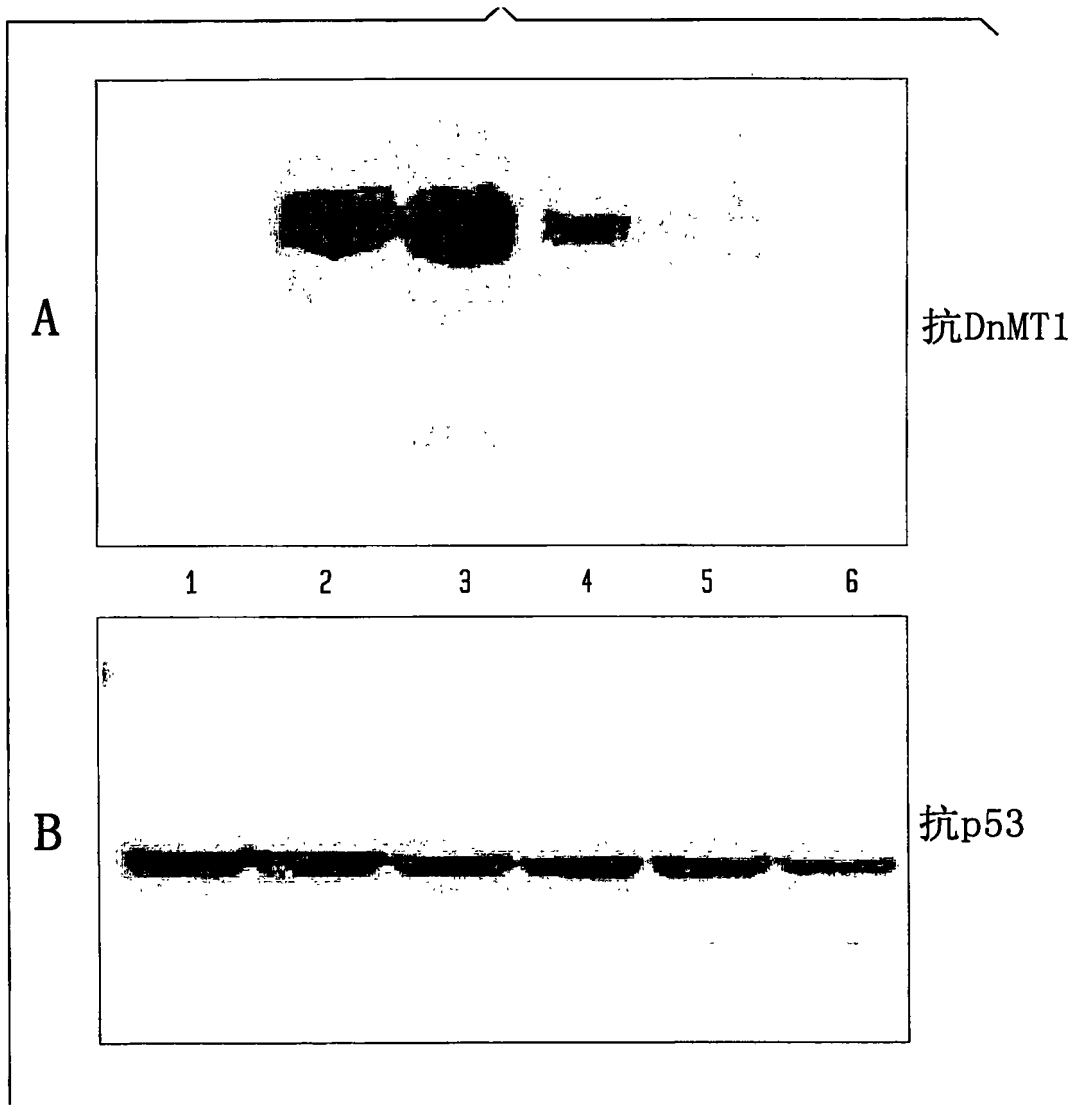


图 10

图11

