



(21) 申请号 202310162747.6

(22) 申请日 2023.02.24

(71) 申请人 北京大学人民医院

地址 100044 北京市西城区西直门南大街
11号

(72) 发明人 邱满堂 李浩然 刘政 蔡景升

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

专利代理师 白艳

(51) Int. Cl.

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/64 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

权利要求书1页 说明书5页
序列表(电子公布) 附图1页

(54) 发明名称

一种改良的I型内含子核酶序列用于构建环状RNA的方法及应用

(57) 摘要

本发明公开了一种改良的I型内含子核酶序列用于构建环状RNA的方法及应用。本发明提供了一种I型内含子核酶序列骨架片段,为在鱼腥藻I型内含子序列的基础上,将柯萨奇病毒内部核糖体进入位点CVB3_IRES序列拆分模拟E1和E2序列,得到具有自我剪接的特性的I型内含子核酶序列骨架片段。本发明首次利用基于鱼腥藻(Anabaena) tRNA的I型内含子核酶序列创造性的提出了解决引入多余序列的体外合成circRNA的模式,优化序列设计模式,在不影响成环的前提下,简化了序列的结构成分,保留了关键的成环序列。

1. 一种I型内含子核酶序列骨架片段,为在鱼腥藻I型内含子序列的基础上,将CVB3_IRES序列拆分并优化以模拟E1和E2序列,得到具有自我剪接特性的I型内含子核酶序列骨架片段。

2. 根据权利要求1所述的I型内含子核酶序列骨架片段,其特征在于:

所述I型内含子核酶序列骨架片段依次包括:5'同源臂、鱼腥藻T4内含子3'端、CVB3_IRES_1、外源基因、CVB3_IRES_2、鱼腥藻T4内含子5'端和3'同源臂;

所述CVB3_IRES_1的核苷酸序列为序列1第185-934位;

所述CVB3_IRES_2的核苷酸序列为序列1第1655-1697位。

3. 根据权利要求2所述的I型内含子核酶序列骨架片段,其特征在于:

所述5'同源臂的核苷酸序列为序列1第24-53位;

所述鱼腥藻T4内含子3'端的核苷酸序列为序列1第54-184位;

所述外源基因的核苷酸序列替换序列1第935-1654位所在位置;

所述鱼腥藻T4内含子5'端的核苷酸序列为序列1第1698-1813位;

所述3'同源臂的核苷酸序列为序列1第1814-1848位。

4. 根据权利要求2或3所述的I型内含子核酶序列骨架片段,其特征在于:

所述I型内含子核酶序列骨架片段还包括位于所述5'同源臂上游的转录启动子。

5. 根据权利要求4所述的I型内含子核酶序列骨架片段,其特征在于:所述转录启动子为T7启动子;

所述T7启动子为序列1第1-23位。

6. 一种用于制备环化RNA的质粒,为如下任一种:

1) 为含有权利要求4或5所述I型内含子核酶序列骨架片段的质粒;所述I型内含子核酶序列骨架片段利用其自身的转录启动子转录;

2) 为将权利要求1-3中任一所述的I型内含子核酶序列骨架片段插入表达载体中的启动子下游,得到的质粒;所述I型内含子核酶序列骨架片段利用所述表达载体中的转录启动子转录。

7. 一种制备环化RNA的方法,包括如下步骤:

1) 将权利要求6中所述质粒线性化,得到线性化质粒;

所述线性化采用的酶的酶切位点存在于权利要求6中所述质粒中I型内含子核酶序列骨架片段除外的区域;

2) 从所述线性化质粒中扩增所述I型内含子核酶序列骨架片段,得到I型内含子核酶序列骨架片段扩增产物;

3) 体外转录所述I型内含子核酶序列骨架片段扩增产物,得到转录产物;

4) 向所述转录产物中添加GTP孵育,实现环化,得到环化RNA。

8. 一种制备环化RNA的试剂盒,其包括如下:

1) 权利要求1-5中任一所述的I型内含子核酶序列骨架片段和权利要求6中所述表达载体;或,权利要求6中所述质粒;

2) 权利要求7中线性化所用的酶;

3) 权利要求7中扩增所需的引物;

4) 体外转录所需的试剂和/或仪器;

5) GTP。

一种改良的I型内含子核酶序列用于构建环状RNA的方法及应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,涉及一种改良的I型内含子核酶序列用于构建环状RNA的方法及应用。

背景技术

[0002] I型内含子核酶是最早被发现的RNA催化剂,其具有高度保守的二级结构,在镁离子和外源鸟苷酸存在情况下可发生两次转酯反应导致内含子的自我剪接和外显子的连接。已有众多学者利用重排的I型内含子核酶序列进行合成circRNA。Puttaraju M等人证实利用来自鱼腥藻(Anabaena) tRNA的I型内含子核酶序列和外显子序列可合成circRNA(Nucleic Acids Res,1992,20,5357-5364)。2018年,Anderson等人在Nature Communications上报道利用鱼腥藻(Anabaena) I型内含子体外转录环化成环状RNA并可以高效表达相应蛋白,其工作模式如图1A所示。但是Anderson等人报道的序列具有固有的缺点,即引入不必要的多余的序列(图1A中的E2、5' 内部同源序列、5' 分隔序列,3' 内部同源序列、3' 分隔序列和E1等序列(又称为“瘢痕”序列))。

发明内容

[0003] 本发明的目的是提供一种改良型鱼腥藻(Anabaena) I型内含子序列,其利用拆分的柯萨奇病毒内部核糖体进入位点(CVB3_IRES)序列模拟鱼腥藻内含子序列的E1和E2序列;改良后的I型内含子序列可以有效完成目的序列的环化,并且无鱼腥藻外显子序列的残留,并能实现目的序列的成功表达。

[0004] 第一方面,本发明提供了一种I型内含子核酶序列骨架片段,为在鱼腥藻I型内含子序列的基础上,将CVB3_IRES序列拆分并优化以模拟E1和E2序列,得到具有自我剪接特性的I型内含子核酶序列骨架片段。

[0005] 上文所述I型内含子核酶序列骨架片段依次包括:5' 同源臂、鱼腥藻T4内含子3' 端、CVB3_IRES_1、外源基因、CVB3_IRES_2、鱼腥藻T4内含子5' 端和3' 同源臂;

[0006] 所述CVB3_IRES_1的核苷酸序列为序列1第185-934位;

[0007] 所述CVB3_IRES_2的核苷酸序列为序列1第1655-1697位。

[0008] 上文所述的I型内含子核酶序列骨架片段中,

[0009] 所述5' 同源臂的核苷酸序列为序列1第24-53位;

[0010] 所述鱼腥藻T4内含子3' 端的核苷酸序列为序列1第54-184位;

[0011] 所述外源基因的核苷酸序列替换序列1第935-1654位所在位置;

[0012] 所述鱼腥藻T4内含子5' 端的核苷酸序列为序列1第1698-1813位;

[0013] 所述3' 同源臂的核苷酸序列为序列1第1814-1848位。

[0014] 上文所述的I型内含子核酶序列骨架片段(记作带有转录启动子的I型内含子核酶序列骨架片段)还包括位于所述5' 同源臂上游的转录启动子。

- [0015] 上文所述的I型内含子核酶序列骨架片段中，
- [0016] 所述转录启动子为T7启动子；
- [0017] 所述T7启动子的核苷酸序列为序列1第1-23位。
- [0018] 进一步地，在本发明的实施例中，所述外源基因以EGFP编码基因为例，所述I型内含子核酶序列骨架片段的核苷酸序列为序列1。
- [0019] 在本发明的实施例中，可以直接合成I型内含子核酶序列骨架片段。
- [0020] 第二方面，本发明提供了一种用于制备环状RNA的质粒。
- [0021] 本发明提供的质粒，为如下任一种：
- [0022] 1) 为含有第一方面中带有转录启动子的I型内含子核酶序列骨架片段的质粒；所述I型内含子核酶序列骨架片段利用其自身的转录启动子转录；
- [0023] 具体委托公司合成，含有带有转录启动子的I型内含子核酶序列骨架片段的质粒；
- [0024] 2) 为将第一方面中不带有转录启动子的I型内含子核酶序列骨架片段插入表达载体中的启动子下游，得到的质粒；所述I型内含子核酶序列骨架片段利用所述表达载体中的转录启动子转录。
- [0025] 在本发明的实施例中，采用第一种方式构建质粒，且表达载体具体为pUC57，上述含有第一方面中带有转录启动子的I型内含子核酶序列骨架片段的质粒具体为质粒pUC57-cEGFP。
- [0026] 第三方面，本发明提供了一种制备环状RNA的方法，包括如下步骤：
- [0027] 1) 将第二方面所述质粒线性化，得到线性化质粒；
- [0028] 所述线性化采用的酶的酶切识别位点存在于第二方面所述质粒中I型内含子核酶序列骨架片段除外的区域，也就是说，上文所述酶切识别位点不存在于所述骨架片段上；
- [0029] 进一步地，在本发明的实施例中，所述表达载体为pUC57；本实施例在所述pUC57中选择的酶切识别位点为NdeI。
- [0030] 2) 从所述线性化质粒中扩增所述I型内含子核酶序列骨架片段，得到I型内含子核酶序列骨架片段扩增产物；
- [0031] 上文所述扩增采用的引物为如下：
- [0032] Forward primer:TGCATCTAGATTAATACGACTCACT
- [0033] Reverse primer:CTAGATATGCTGTTATCCGTCGATT。
- [0034] 3) 体外转录所述I型内含子核酶序列骨架片段扩增产物，得到转录产物；
- [0035] 在本发明的实施例中，上述转录采用RNA合成试剂盒(E2040S, NEB, USA)。
- [0036] 4) 向所述转录产物中添加GTP孵育，实现环化，得到环化RNA。
- [0037] 在本发明的实施例中，上述GTP在孵育体系中的终浓度为2mM，孵育的条件为55℃ 15min。
- [0038] 第四方面，本发明提供了一种制备环状RNA的试剂盒，其包括如下：
- [0039] 1) 第一方面所述的I型内含子核酶序列骨架片段和表达载体；或，第二方面所述质粒；
- [0040] 2) 第三方面中线性化所用的酶；
- [0041] 3) 第三方面中扩增所需的引物；
- [0042] 4) 第三方面中体外转录所需的试剂和/或仪器；

[0043] 5)GTP。

[0044] 本发明首次利用基于鱼腥藻(*Anabaena*) tRNA的I型内含子核酶序列创造性的提出了解决引入多余序列的体外合成circRNA的模式,具有以下优势:

[0045] (1)优化序列设计模式,在不影响成环的前提下,简化了序列的结构成分,保留了关键的成环序列;

[0046] (2)除促进翻译的IRES原件和编码区外不再引入多余序列,理论上可以降低因外源多余序列的引入激发的机体固有免疫的排斥反应,以促进编码序列的稳定翻译,达到治疗目的;

[0047] (3)本发明构建了序列的基本框架,选取了公认的翻译效果良好的IRES原件,即CVB3_IRES原件,在此基础上如果需要新的靶点只要将编码区更换即可,操作简单易行。

附图说明

[0048] 图1为I型催化核酶成环策略图;(A)目前常见的成环策略示意图;(B)改造之后的成环体系示意图。

[0049] 图2为成环的鉴定;(A)RNA凝胶电泳示意图;(B)PCR凝胶电泳示意图;(C)接头位点示意图;(D)western检测EGFP的表达情况;其中,IVT表示体外转录后产物;circRNA表示纯化后产物;circRNA+Rnase R表示Rnase R酶处理后产物。

具体实施方式

[0050] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0051] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0052] 实施例1、制备表达环状RNA的质粒

[0053] 1、I型内含子核酶序列骨架及cEGFP环化模板质粒的构建

[0054] 本发明采用改进的基于鱼腥藻(*Anabaena*) tRNA的I型内含子核酶的策略构建cEGFP环化模板质粒。

[0055] 改进的基于鱼腥藻(*Anabaena*) tRNA的I型内含子核酶是在以往报道的序列基础上,本发明针对已报道的I型内含子核酶自我剪接的固有不足上,充分思考和重新设计。本发明研究已经有的序列的基础上充分认识到外显子E1和外显子E2在I型内含子核酶自我剪接中的重要性,并将促进翻译的IRES元件(本发明采用的是CVB3)准确拆分并优化以模拟E1和E2的序列(如图1B所示)。本发明在不改变I型内含子核酶自我剪接的特性的同时,将不引入额外外源序列(即:图1A中的E2、5'内部同源序列、5'分隔序列,3'内部同源序列、3'分隔序列和E1等序列(又称为“瘢痕”序列)),以使得机体细胞对外源RNA的固有免疫反应降低。

[0056] 本发明重新设计的含有外源基因的基于鱼腥藻(*Anabaena*) tRNA的I型内含子核酶序列骨架从5'至3'依次包括如下元件:5'同源臂、鱼腥藻T4内含子3'端、CVB3_IRES_1、外源基因、CVB3_IRES_2、鱼腥藻T4内含子5'端和3'同源臂;也可以在5'同源臂的上游连接转录启动子如T7启动子。

[0057] 待外源基因为EGFP编码基因时,EGFP编码基因的I型内含子核酶序列骨架的核苷酸序列为序列1。

[0058] 其中,序列1第1-23位为T7启动子,序列1第24-53位为5'同源臂、序列1第54-184位

为鱼腥藻T4内含子3'端、序列1第185-934位为CVB3_IRES_1、序列1第935-1654位为外源基因所在位置(此处为EGFP编码基因)、序列1第1655-1697位为CVB3_IRES_2、序列1第1698-1813位为鱼腥藻T4内含子5'端,序列1第1814-1848位为3'同源臂。

[0059] 委托南京金斯瑞科技有限公司合成质粒pUC57-cEGFP,该质粒含有EGFP编码基因的I型内含子核酶序列骨架,具体为将EGFP编码基因的I型内含子核酶序列骨架克隆至pUC57表达载体,I型内含子核酶序列骨架片段利用其自身的转录启动子转录。

[0060] 再将pUC57-cEGFP质粒导入大肠杆菌中,得到重组菌,培养后,提取重组菌的质粒,得到cEGFP环化模板质粒。

[0061] 2、模板扩增及纯化回收

[0062] 1)、线性化

[0063] 将上述cEGFP环化模板质粒经核酸内切酶NdeI(该酶不存在于EGFP编码基因的I型内含子核酶序列骨架中,但是位于pUC57质粒上)切割成为线性化质粒。

[0064] 2) 扩增EGFP编码基因的I型内含子核酶序列骨架

[0065] 设计用于扩增EGFP编码基因的I型内含子核酶序列骨架的引物,以上述线性化质粒为模板,使用KOD-Plus-Neo(KOD-401,TOYOBO,JAPAN)高保真PCR扩增。

[0066] Forward primer:TGCATCTAGATTAATACGACTCACT

[0067] Reverse primer:CTAGATATGCTGTTATCCGTCGATT

[0068] PCR反应完毕后,扩增产物经由DNA模板纯化回收柱(DP214,TIANGEN,China)备用,得到纯化的模板DNA(带有T7启动子)。

[0069] 3、体外转录与成环

[0070] 上述纯化的模板DNA使用带有T7启动子序列引物的RNA合成试剂盒(E2040S,NEB,USA)进行体外转录,并使用DNA酶I消化多余的模板DNA后纯化回收(T2030S,NEB,USA),得到纯化后的线性RNA前体(体外转录后产物IVT,浓度约为2000ng/u1)。

[0071] 向上述纯化后的线性RNA前体中加入GTP,使GTP终浓度为2mM,55℃下孵育15min,进行体外成环,得到孵育后的RNA产物,将孵育后的RNA产物再次过柱纯化,得到环化产物(记作circRNA)。

[0072] 4、成环的鉴定

[0073] 根据circRNA对Rnase R耐受的特点,使用Rnase R处理上述3得到的环化产物,以去除环化反应中剩余的线性RNA前体,随后进行再一次的过柱纯化,得到Rnase R酶处理后产物(记作circRNA+Rnase R)。

[0074] 1) 琼脂糖凝胶电泳

[0075] 上述3得到的环化产物、上述3得到的体外转录后产物和Rnase R酶处理后产物进行琼脂糖凝胶电泳。

[0076] 结果如图2A所示,IVT为体外转录后产物;circRNA为环化产物;circRNA+Rnase R为Rnase R酶处理后产物,线性对照为由CVB3_IRES序列和EGFP编码基因序列(序列1第935-1654位)组成的DNA分子(这2部分序列紧密相邻拼接)经体外转录所得的线性RNA,并加Poly A尾;

[0077] 上述CVB3_IRES序列为原始未拆分的序列,详见参考文献:Wesselhoeft RA, Kowalski PS, Anderson DG.Engineering circular RNA for potent and stable

translation in eukaryotic cells. Nat Commun. 2018;9(1):2629. Published 2018 Jul 6. doi:10.1038/s41467-018-05096-6)。

[0078] 从图中可以看出,与线性对照相比,体外转录后产物和Rnase R酶处理环化产物后的产物均成环,表明RNA明显成环。

[0079] 2) 逆转录后验证

[0080] 将上述3得到的体外转录后产物 (IVT) 和Rnase R酶处理后产物 (图中记作circRNA +Rnase R) 按照如下体系和程序进行逆转录反应,得到逆转录产物。

[0081] 上述逆转录的体系如下表1 (PrimeScript™ RT Master Mix, Takara, RR036A)。

[0082] 表1

试剂	使用量
5X PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time)	4 μ l
总 RNA	1 μ g (X μ l)
无酶水	总体积 20 μ l (20-4-X μ l)

[0084] 逆转录的程序如下:

[0085] 37°C 15min (反转录反应)

[0086] 85°C 5sec (反转录酶的失活反应)

[0087] 4°C

[0088] 再以各个逆转录产物为模板,通过设计接头位点的引物PCR扩增,得到PCR扩增产物。

[0089] 上述接头位点的引物如下:

[0090] Forward primer: GGATCACTCTCGGCATGGAC

[0091] Reverse primer: GCTAGCGCCCAATGGTAAGA

[0092] 结果如图2B所示,可以看出,获得明显的单一条带PCR产物。

[0093] 将上述PCR产物进行Sanger测序,结果如图2C所示,可见成环位点 (箭头所示的接头位点,首尾相接的地方)。

[0094] 3) 外源基因表达蛋白

[0095] 将线性对照 (由CVB3_IRES序列和EGFP编码基因序列 (序列1第935-1654位) 组成的DNA分子 (这2部分序列紧密相邻拼接) 经体外转录所得的线性RNA,并加Poly A尾)、上述3) 得到的体外转录后产物IVT、上述3) 得到的环化后产物 (circRNA) 和Rnase R酶处理后的产物 (circRNA+Rnase R) 分别转入肺腺癌细胞系H1299细胞中,转染24小时后,收集细胞。使用Western及IP裂解液 (P0013, Beyotime, China) 冰上裂解30min, 12000g离心20分钟,收集上清。

[0096] 提取的蛋白,western检测EGFP的表达情况。

[0097] 结果如图2D所示,可以看出,EGFP在IVT、circRNA和circRNA+Rnase R组均明显表达。

[0098] 基于以上证据,本发明不仅可以创造性的解决外源多余序列的引入问题,并且仍然可以检测到明显的EGFP蛋白的表达。

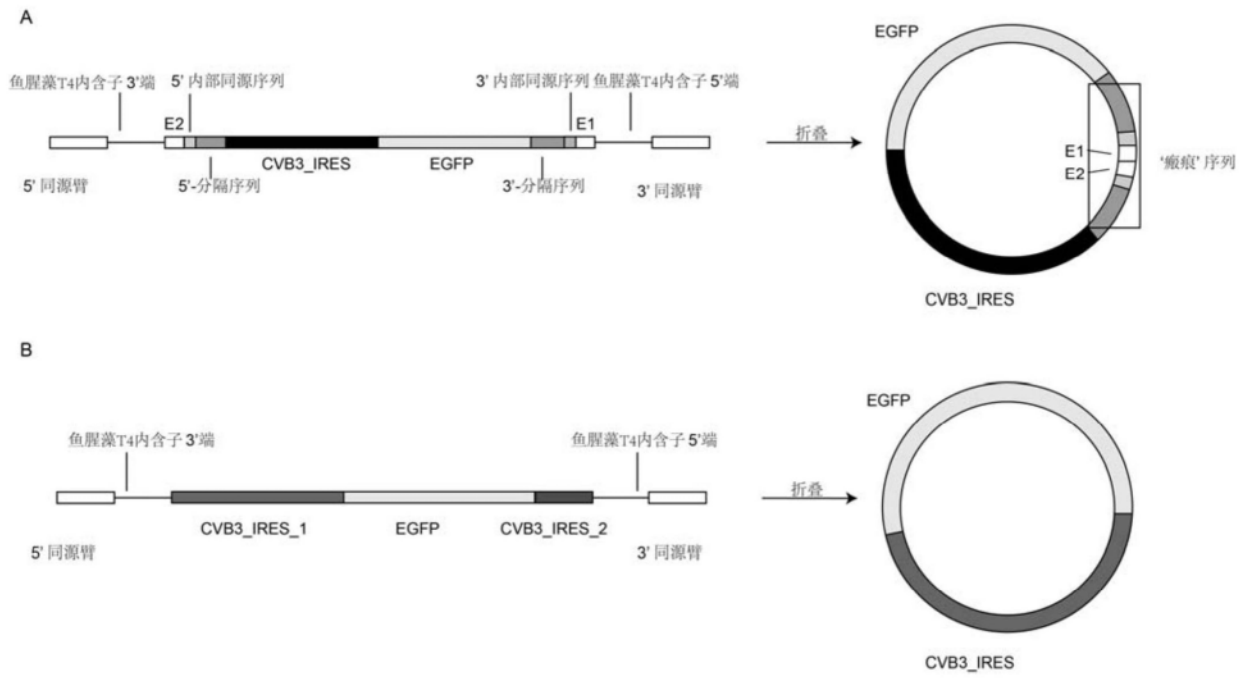


图1

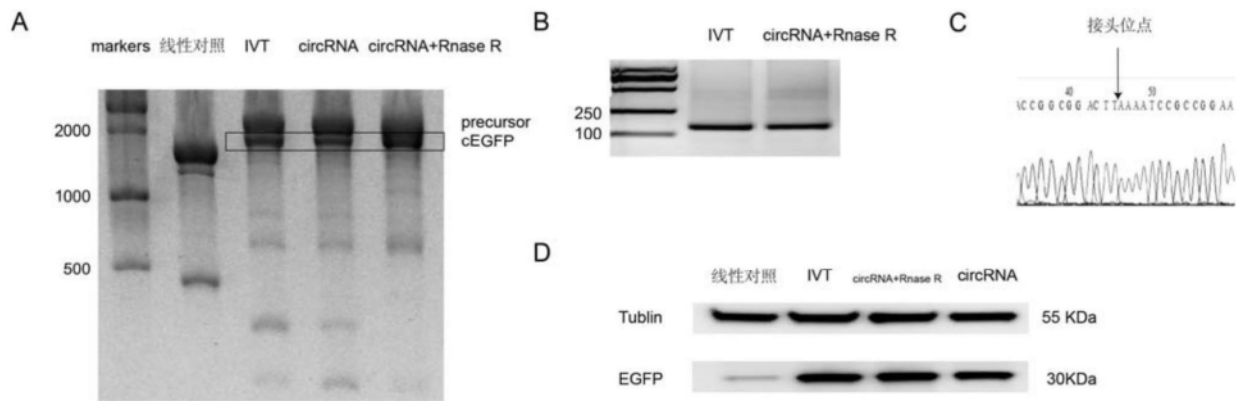


图2