



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110724712 A

(43)申请公布日 2020.01.24

(21)申请号 201910954646.6

(22)申请日 2019.10.09

(71)申请人 重庆医科大学附属第一医院
地址 400016 重庆市渝中区友谊路1号

(72)发明人 王小文 黄春 向小勇 蒋迎九
吴庆琛

(74)专利代理机构 上海光华专利事务所(普通
合伙) 31219

代理人 朱凌娇 许亦琳

(51) Int. Cl.

C12N 15/861(2006.01)

C12N 15/66(2006.01)

权利要求书2页 说明书8页
序列表2页 附图3页

(54)发明名称

一种miRNA海绵表达载体的构建方法及其应
用

(57)摘要

本发明涉及一种miRNA海绵表达载体的构建方法,至少包括如下步骤:(1)在表达载体骨架中引入包含第一酶切位点的接头序列;(2)将与目标miRNA相互匹配的竞争性抑核苷酸序列的两端分别引入与所述第一酶切位点相匹配的粘端;(3)将(2)中得到的序列插入到(1)中得到的表达载体中,得到miRNA海绵表达载体。本发明只需通过一次单酶切反应即可获得数量可观定向插入MBS的“海绵”,此方法即简化了实验步骤降低,又保证了MBS与载体的定向插入,从而减少了MBS无意义的反向连接,增加了miRNA海绵表达载体构建的成功率。

1. 一种miRNA海绵表达载体的构建方法,其特征在于,所述制备方法至少包括如下步骤:

(1) 在表达载体骨架中引入包含第一酶切位点的接头序列;

(2) 将与目标miRNA相互匹配的竞争性抑核苷酸序列的两端分别引入与所述第一酶切位点相匹配的粘端;

(3) 将(2)中得到的序列插入到(1)中得到的表达载体中,得到miRNA海绵表达载体。

2. 根据权利要求1所述的miRNA海绵表达载体的构建方法,其特征在于:步骤(1)中,所述第一酶切位点选自PpuMI酶切位点或SanDI酶切位点。

3. 根据权利要求2所述的miRNA海绵表达载体的构建方法,其特征在于:步骤(2)中,所述粘端选自5'-GTC粘端和3'-CAG粘端。

4. 根据权利要求2所述的miRNA海绵表达载体的构建方法,其特征在于:步骤(1)中,所述接头序列中还包括PspXI酶切位点、EcoRV酶切位点、XbaI酶切位点、Bgl II酶切位点中的一种或多种。

5. 根据权利要求4所述的miRNA海绵表达载体的构建方法,其特征在于:所述接头序列依次包括PspXI酶切位点、EcoRV酶切位点、PpuMI酶切位点、XbaI酶切位点、Bgl II酶切位点。

6. 根据权利要求1所述的miRNA海绵表达载体的构建方法,其特征在于,还包括以下特征中的一项或多项:

1) 步骤(2)中,所述竞争性抑核苷酸序列的数量不小于2个;

2) 所述竞争性抑核苷酸序列与目标miRNA的第9-12位碱基错配;

3) 所述目标miRNA选自miR-17~92中的一种或多种;

4) 所述表达载体骨架选自慢病毒载体、腺病毒载体、逆转录病毒载体和AAV中的一种或多种。

7. 根据权利要求6所述的miRNA海绵表达载体的构建方法,其特征在于:还包括以下特征中的一项或多项:

1) 特征1)中,各个竞争性抑核苷酸序列之间通过间隔序列相连接;

2) 特征3)中,所述目标miRNA选自miR-17、miR-18a、miR-20a、miR-19a/b和miR-92a中的一种或多种。

8. 根据权利要求7所述的miRNA海绵表达载体的构建方法,其特征在于,特征2)中,miR-17和miR-20a的竞争性抑核苷酸序列相同,和/或,miR-19a和miR-19b的竞争性抑核苷酸序列相同。

9. 一种miRNA海绵表达载体,包括表达载体骨架、竞争性抑核苷酸序列、包含第一酶切位点的接头序列;所述竞争性抑核苷酸序列两端分别设有与所述第一酶切位点相匹配的粘端;所述竞争性抑核苷酸序列位于所述接头序列中;所述接头序列与所述表达载体骨架相连。

10. 如权利要求9所述的miRNA海绵表达载体,其特征在于,所述miRNA海绵表达载体由权利要求1-8任一所述的miRNA海绵表达载体的构建方法制得。

11. 一种宿主细胞,能够表达如权利要求9或10所述的miRNA海绵表达载体。

12. 如权利要求1-8任一所述的miRNA海绵表达载体的构建方法在miRNA功能研究中的

用途。

一种miRNA海绵表达载体的构建方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,特别是涉及一种miRNA海绵表达载体的构建方法及其应用。

背景技术

[0002] 微小RNA (microRNA, miRNA) 是广泛存在生物体内长度约为19~24个核苷酸的非编码小RNA,主要功能是通过与靶基因mRNA的不完全或完全互补从而沉默或切割靶mRNA在转录后水平抑制靶基因的表达,从而介导转录后负调控。在人类基因组中miRNA的数量约为整个基因组的1%,但却能够调控至少30%以上基因的表达。miRNA大部分位于编码或非编码蛋白mRNA转录本的内含子区域,在控制器官发育、细胞分化、凋亡以及肿瘤形成与转移等方面发挥着重要的作用。近年来的研究发现miRNA参与了心血管病领域很多重要的生理和病理过程,如心脏发育、心肌重构、血管重塑、心力衰竭和心律失常等。miRNA在调控心血管相关疾病,如VSMC和内皮细胞的发育、分化和在组织中稳态等发挥着重要的调控作用。随着对microRNA生物学功能的深入理解,越来越多参与调控VSMC生物学功能和行为的microRNA也不断被发现。

[0003] miRNA功能研究的常用且重要手段是功能获得和功能缺失,目前miRNA功能缺失的主要方法有基因敲除、寡核苷酸抑制剂、Sponge (海绵) 技术。寡核苷酸抑制技术主要用于短期实验研究,基因敲除技术虽然可以用于长期实验研究,但有相当数目的miRNA位于蛋白编码区内或在miRNA簇中,因此基因敲除无论在时间、花费还是技术上都面临挑战;而Sponge技术包含多个针对特异性miRNA的反义结合位点,即与目标miRNA相互匹配的竞争性抑核苷酸序列(miRNA antisense binding sites, MBS), MBS可以有效的抑制目标miRNA的表达水平,可作为理想的替代基因敲除方法。2007年, Ebert MS等首次报道miRNA Sponge构建方法,将含有多个串联的MBS插入到表达载体中,在细胞中表达后,可以特异性的“吸附”目标miRNA,从而有效的降低目标miRNA水平,导致miRNA靶基因去抑制化。miRNA Sponge具有抑制所有具有相同种子序列家族成员的潜力。因此,在研究miRNA种子家族的功能时,miRNA Sponge技术具有其独特优势。而且,可以通过引入不同的MBS,miRNA Sponge技术可以同时研究不同miRNA的功能。

[0004] 如何将设计好的MBS,通过酶切反应定向的插入到载体相应位置,最大程度的减少无意义的反向连接,从而快速的获得有效的海绵表达载体,是miRNA海绵构建技术的一个重要难点。

发明内容

[0005] 鉴于以上所述现有技术的缺点,本发明的目的在于提供一种miRNA海绵表达载体的构建方法及其应用。

[0006] 为实现上述目的及其他相关目的,本发明第一方面提供一种miRNA海绵表达载体的构建方法,所述制备方法至少包括如下步骤:

- [0007] (1) 在表达载体骨架中引入包含第一酶切位点的接头序列；
- [0008] (2) 将与目标miRNA相互匹配的竞争性抑核苷酸序列的两端分别引入与所述第一酶切位点相匹配的粘端；
- [0009] (3) 将(2)中得到的序列插入到(1)中得到的表达载体中,得到miRNA海绵表达载体。
- [0010] 本发明第二方面提供一种miRNA海绵表达载体,包括表达载体骨架、竞争性抑核苷酸序列、包含第一酶切位点的接头序列;所述竞争性抑核苷酸序列两端分别设有与所述第一酶切位点相匹配的粘端;所述竞争性抑核苷酸序列位于所述接头序列中;所述接头序列与所述表达载体骨架相连。
- [0011] 本发明第三方面提供一种宿主细胞,能够表达前述miRNA海绵表达载体。
- [0012] 本发明第四方面提供前述miRNA海绵表达载体的构建方法在miRNA功能研究中的用途。
- [0013] 如上所述,本发明的miRNA海绵表达载体的构建方法及其应用,具有以下有益效果:
- [0014] 本研究设计了一种快速构建miRNA海绵的方法,只需通过一次单酶切反应即可获得数量可观定向插入MBS的“海绵”,此方法即简化了实验步骤降低,又保证了MBS与载体的定向插入,从而减少了MBS无意义的反向连接,增加了miRNA海绵表达载体构建的成功率。

附图说明

- [0015] 图1显示为本发明构建miRNA海绵重组表达质粒策略示意图。
- [0016] 图2显示为本发明miRNA-17~92MBS和海绵设计设计示意图。
- [0017] 图3显示为包含有PpuMI酶切位点的Linker设计序列。
- [0018] 图4显示为miRNA-17~92海绵重组腺病毒表达载体构建示意图。
- [0019] 图5显示为Linker重组质粒经PpuMI酶切鉴定。
- [0020] 图6显示为Ad-miR-17~92海绵重组质粒测序鉴定。
- [0021] 图7显示为包含不同MBS的miR-17~92海绵抑制VSMC中miR-17~92的表达情况。

具体实施方式

- [0022] 本发明提供的miRNA海绵表达载体的构建方法,所述制备方法至少包括如下步骤:
- [0023] (1) 在表达载体骨架中引入包含第一酶切位点的接头序列;
- [0024] (2) 将与目标miRNA相互匹配的竞争性抑核苷酸序列的两端分别引入与所述第一酶切位点相匹配的粘端;
- [0025] (3) 将(2)中得到的序列插入到(1)中得到的表达载体中,得到miRNA海绵表达载体。
- [0026] 在一种实施方式中,步骤(1)中,所述第一酶切位点选自PpuMI酶切位点或SanDI酶切位点。
- [0027] 与目标miRNA相互匹配的竞争性抑核苷酸序列是指,含有能够在严紧条件下与目标miRNA基因杂交的核苷酸序列。
- [0028] 与目标miRNA相互匹配是指,所述竞争性抑核苷酸序列与目标miRNA基因中的3-20

个连续的核苷酸序列基本互补。较佳的,所述竞争性抑核苷酸序列与目标miRNA中的8-18个连续的核苷酸序列基本互补;所述竞争性抑核苷酸序列与目标miRNA基因中的12、13或14个连续的核苷酸序列基本互补。

[0029] 在一种实施方式中,步骤(2)中,所述粘端选自5'-GTC粘端和3'-CAG粘端。

[0030] 在一种实施方式中,步骤(1)中,所述接头序列中还包括PspXI酶切位点、EcoRV酶切位点、XbaI酶切位点、Bgl II酶切位点中的一种或多种。

[0031] 在一种实施方式中,所述接头序列(Linker)依次包括所述接头序列依次包括PspXI酶切位点、EcoRV酶切位点、PpuMI酶切位点、XbaI酶切位点、Bgl II酶切位点。

[0032] 本发明首先在表达载体中引入包含PpuMI酶切位点的Linker,并在MBS的末端引入酶切位点5'-GTC和3'-CAG粘端,可以与经PpuMI酶切后的Linker互补连接,从而封死切口,且连接后的左侧形成非酶切序列,而右侧一直保留PpuMI酶切位点,继续酶切反应继续插入MBS,直到终止酶切反应,MBS的插入才停止,因此,单向定向连接方式产生带有不同数量MBS的Sponge。

[0033] 所述接头序列含有一个或多个前后重复的基序。例如,该基序可以是(5'-GTCGG-3', 3'-CCCAG-5')。优选地,该基序在接头序列中是相邻的,在重复之间没有插入氨基酸残基。接头序列可以包含1、2、3、4或5个重复基序组成。接头的长度可以是3~25个氨基酸残基,例如3~15、5~15、10~20个氨基酸残基。在某些实施方案中,接头序列是多甘氨酸接头序列。接头序列中甘氨酸的数量无特别限制,通常为2~20个,例如2~15、2~10、2~8个。除甘氨酸和丝氨酸来,接头中还可含有其它已知的氨基酸残基,例如丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、苏氨酸(T)、谷氨酸(E)、苯丙氨酸(F)、精氨酸(R)、谷氨酰胺(Q)等。

[0034] 在一种实施方式中,所述接头序列的核苷酸序列如SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2所示。

[0035] 具体的:

[0036] Linker:S 5' TCGAGCCTGGATATCGACGGTCCCGACTCTAGAGACA 3' (SEQ ID NO:1),

[0037] AS 3' CGGACCTATAGCTGCCAGGGCTGAGATCTCTGTCTAG 5' (SEQ ID NO:2)。

[0038] 在一种实施方式中,步骤(2)中,所述竞争性抑核苷酸序列(MBS)的数量不小于2个。

[0039] 在一种实施方式中,各个竞争性抑核苷酸序列之间通过间隔序列相连接。

[0040] 在一种实施方式中,所述间隔序列的长度为2-8nt。

[0041] 优选的,所述间隔序列的长度为4nt。

[0042] 可选的,所述间隔序列选自AATT、TTAA、CCTT或GGTT。

[0043] 在一种实施方式中,所述竞争性抑核苷酸序列与目标miRNA的第9-12位碱基错配。优选的,可以是第9-12位中的一个或多个碱基错配。

[0044] 碱基错配是指,所述竞争性抑核苷酸序列与目标miRNA之间的A与C或G配对,或T与G或C配对。错配采取减少一个碱基加错配的方式,或采用增加碱基的错配方式。防止被内源性酶的剪切和降解。

[0045] 在一种实施方式中,所述目标miRNA选自miR-17~92中的一种或多种。

[0046] 可选的,所述目标miRNA选自miR-17、miR-18a、miR-20a、miR-19a/b和miR-92a中的一种或多种。

[0047] 在一种实施方式中,miR-17和miR-20a的竞争性抑核苷酸序列相同,和/或,miR-19a和miR-19b的竞争性抑核苷酸序列相同。

[0048] 在一种实施方式中,miR-17和miR-20a的竞争性抑核苷酸序列如SEQ ID NO:3所示。具体的,miR-17/20a:5'-CTACCTGCACCCG-AGCACTTTA-3'。

[0049] 在一种实施方式中,miR-18的竞争性抑核苷酸序列如SEQ ID NO:4所示。具体的,miR-18a:5'-CTATCTGCACCCT-TGCACCTTA-3'。

[0050] 在一种实施方式中,miR-19a和miR-19b的竞争性抑核苷酸序列如SEQ ID NO:5所示。具体的,miR-19a/19b:5'-TCAGTTTTGCCCT-ATTTGCACA-3'。

[0051] 在一种实施方式中,miR-92a的竞争性抑核苷酸序列如SEQ ID NO:6所示。具体的,

[0052] miR-92a:5'-AGCATTGCGATCG-TCCCAACCT-3'。

[0053] 所述表达载体骨架是指能够连接酶切位点,插入外源DNA,将外源DNA导入到受体细胞并进行自我复制的DNA分子。

[0054] 进一步的,所述表达载体骨架可为质粒。在一种实施方式中,miRNA海绵表达载体选自慢病毒载体、腺病毒载体、逆转录病毒载体和AAV中的一种或多种。

[0055] 可选的,所述腺病毒选自腺病毒或腺相关病毒,如本发明实施例中所列举的腺病毒载体为Ad-EGFP。

[0056] 本发明提供的miRNA海绵表达载体,包括表达载体骨架、竞争性抑核苷酸序列、包含第一酶切位点的接头序列;所述竞争性抑核苷酸序列两端分别设有与所述第一酶切位点相匹配的粘端;所述竞争性抑核苷酸序列位于所述接头序列中;所述接头序列与所述表达载体骨架相连。

[0057] 进一步的,所述miRNA海绵表达载体由前述miRNA海绵表达载体的构建方法制得。

[0058] 本发明提供的宿主细胞,能够表达前述miRNA海绵表达载体。

[0059] 本发明还提供前述miRNA海绵表达载体的构建方法在miRNA功能研究中的用途。

[0060] 本发明的竞争性抑核苷酸序列或其片段通常可以用PCR扩增法、重组法或人工合成的方法获得。对于PCR扩增法,可根据本发明所公开的有关核苷酸序列,来设计引物,并用市售的cDNA库或按本领域技术人员已知的常规方法所制备的cDNA库作为模板,扩增而得有关序列。当序列较长时,常常需要进行两次或多次PCR扩增,然后再将各次扩增出的片段按正确次序拼接在一起。

[0061] 以下通过特定的具体实例说明本发明的实施方式,本领域技术人员可由本说明书所揭露的内容轻易地了解本发明的其他优点与功效。本发明还可以通过另外不同的具体实施方式加以实施或应用,本说明书中的各项细节也可以基于不同观点与应用,在没有背离本发明的精神下进行各种修饰或改变。

[0062] 在进一步描述本发明具体实施方式之前,应理解,本发明的保护范围不局限于下述特定的具体实施方案;还应当理解,本发明实施例中使用的术语是为了描述特定的具体实施方案,而不是为了限制本发明的保护范围;在本发明说明书和权利要求书中,除非文中另外明确指出,单数形式“一个”、“一”和“这个”包括复数形式。

[0063] 当实施例给出数值范围时,应理解,除非本发明另有说明,每个数值范围的两个端点以及两个端点之间任何一个数值均可选用。除非另外定义,本发明中使用的所有技术和科学术语与本技术领域技术人员通常理解的意义相同。除实施例中使用的具体方法、设备、

材料外,根据本技术领域的技术人员对现有技术的掌握及本发明的记载,还可以使用与本发明实施例中所述的方法、设备、材料相似或等同的现有技术的任何方法、设备和材料来实现本发明。

[0064] 除非另外说明,本发明中所公开的实验方法、检测方法、制备方法均采用本技术领域常规的分子生物学、生物化学、染色质结构和分析、分析化学、细胞培养、重组DNA技术及相关领域的常规技术。

[0065] 实施例1

[0066] 1.miRNA海绵重组表达质粒设计

[0067] 构建miRNA海绵重组表达质粒的总体策略如图1所示,首先在表达载体中引入包含PpuMI酶切位点的Linker,其次再将针对目标miRNA设计的MBS通过酶切反应定向插入Linker中。

[0068] 2.miR-17~92MBS和Linker设计

[0069] 此处以miR-17~92为目标研究对象进行试验设计。根据miRbase数据库中miR-17、miR-18a、miR-20a、miR-19a/b、miR-92a成熟序列设计合成与其相互匹配的竞争性抑核苷酸序列(MBS),其中miR-17和miR-20a,miR-19a和miR-19b的MBS设计是一致的。其中在9-12位点形成错配以防止被内源性酶剪切和降解,两个反义序列之间通过AATT四个碱基相连,构建出miR-21海绵,具体设计如图2。

[0070] 为了将PpuMI酶切位点引入腺病毒表达载体,设计了如图3所示的Linker,以便快速连续的定向插入mi-17~92MBS。

[0071] 3.miR-17~92海绵重组腺病毒表达载体的构建

[0072] miR-17~92海绵重组腺病毒表达载体的构建方法示意图如图4所示。

[0073] 具体实验步骤如下:

[0074] 1.1海绵反义序列和Linker核苷酸序列的Annealing反应

[0075] (1)按照合成的Oligo说明加入ddH₂O溶解,最终浓度为100uM;

[0076] (2)取一支PCR管,分别加入10ul正义链和反义链;

[0077] (3)Annealing反应如下:

[0078] 95°C ® 5min

[0079] 65°C ® 10min

[0080] 22°C ® 60min

[0081] 反应结束后保存在4°C冰箱中备用

[0082] (4)PNK反应

[0083] 将上一步实验所获得的实验产物按照如下体系行PNK反应:

	Annealed Oligo	1ul
	PNK	1ul
[0084]	T4 DNA Ligase Buffer	5ul
	ddH ₂ O up to Total	50ul

[0085] 将上述反应体系混合至EP管中,37°C水浴中反应1h,70°C灭活PNK酶;因PNK反应的Buffer与连接反应的一致,因此PNK反应无需过纯化即可进行下一步实验。

[0086] 1.2 Ad-GFP表达载体进行酶切,纯化

[0087] 1.2.1酶切反应体系:

BamHI	2ul
Ad-GFP	10ug

[0088] Buffer 3.1	10ul
ddH ₂ O	67.3ul
Total	100 ul

[0089] 将上述反应体系混合至EP管中,37℃水浴箱中酶切反应3h。

Pxp XI	1ul
Ad-GFP-Bgl II treated	30ul

[0090] Cutsmart Buffer	5ul
ddH ₂ O	14ul
Total	50ul

[0091] 将上述反应体系混合至EP管中,37℃水浴箱中酶切反应3h。

[0092] 1.2.2酶切产物纯化

[0093] 酶切产物行凝胶电泳后使用DNA片段回收试剂盒回收,紫外分光光度法测定浓度,-20℃保存待用。胶回收步骤如下:经琼脂糖凝胶电泳进行分离;切取目的条带,放入1.5mL离心管中;加入3倍体积溶胶液,使胶彻底融化;将溶液转移至离心柱中离心,12000rpm室温离心1分钟,倒掉收集管中的液体.再将吸附柱放入同一个收集管中;加入700μl的Washing Buffer A,13000rpm离心1min,倒掉收集管中的废液,吸附柱放入收集管中;13000rpm离心1min,去除吸附柱上残留的漂洗液;将吸附柱放入一个干净的1.5ml的离心管中,在吸附膜中央加入30-40μl缓冲液,室温静置1钟后,1300rpm室温离心1分钟。

[0094] 1.3 Ad-GFP+Linker连接反应

[0095] 将PNK的Linker和经过线性化处理的载体DNA连接,反应体系如下:

Ad-GFP	1ul
Linker-PNK treated	2ul

[0096] T4 DNA Ligase	1ul
T4 DNA Ligase Buffer	1ul

[0097] Total	5ul
--------------	-----

[0098] 室温下连接反应3小时,同时设立对照组,行连接转化,铺板。

[0099] 1.4 Ad-GFP-Linker表达载体的酶切、纯化

[0100] 1.4.1酶切反应体系如下:

Ppu MI	1ul
Ad-GFP-Linker	5ug

[0101] Cutsmart Buffer	5 ul
Total	50ul

[0102] 将上述反应体系混合至EP管中,37℃水浴箱中酶切反应3h。

[0103] 1.4.2酶切产物纯化:同实验步骤1.2

[0104] 1.5 Ad-GFP-Linker+miR-17~92-Sponge的链接

[0105] 将PNK的miR-17~92-Sponge和经过线性化处理的载体DNA连接,反应体系如下:

	Ad-GFP-Linker	1ul
	miR-17~92-Sponge-PNK treated	2ul
[0106]	T4 DNA Ligase	1ul
	T4 DNA Ligase Buffer	1ul
	Total	5ul

[0107] 室温下连接反应3小时,同时设立对照组,行连接转化,铺板。

[0108] 1.6连接转化,涂布平板

[0109] (1) -80℃冰箱中取出感受态大肠杆菌,置冰上5min融化;

[0110] (2) 向盛有4μl的质粒DNA (Ad-GFP-miR-17~92) 的EP管中加入50μl的感受态大肠杆菌,置冰上孵育30min;

[0111] (3) 将EP管移入42℃水浴中热激90s (需准确计时),注意不需要摇动;

[0112] (4) 迅速移至冰上2min;

[0113] (5) 加入500μl的LB液体培养基,37℃摇床以225rpm/min的转速复苏1h,使细菌复苏并表达质粒编码的抗生素抗标记基因;

[0114] (6) 以2000rpm/min-4000rpm/min离心2-10min,用移液枪吸出部分上清液,剩余约100μl,重悬后将细菌均匀的涂布在LB平板上,并将未加入质粒的感受态大肠杆菌涂布在另一LB平板上,做好标记;

[0115] (7) 37℃过夜培养,次日观察平板,比较菌落生长情况。

[0116] 1.7质粒小抽

[0117] 挑取上步实验检测的阳性菌落于5ml含氨苄抗生素LB培养基的FALCON管中,分别标记,37℃和320rpm/min条件下摇床培养过夜;使用质粒抽提试剂盒 (iNtRON公司) 提取质粒:

[0118] ①FALCON管,共5管,4000rpm/min,离心10min,弃上清液,在纸上轻拍是管壁干燥;

[0119] ②加入250μl的Resuspension Buffer用振荡器充分悬浮细胞;

[0120] ③加入250μl的Lysis Buffer,温和充分的上下翻转混合10次,至溶液变澄清,避免涡旋,室温放置3min;

[0121] ④加入350μl的Neutralization Buffer温和的上下翻转8-10次,室温静止5min,避免剧烈混合,加入后注意立即混合,避免产生局部沉淀;

[0122] ⑤13000rpm、4℃离心10min,小心吸取上清液至吸附柱上(吸附柱放入收集管中),注意不要吸出沉淀;

[0123] ⑥13000rpm离心1min,倒掉收集管中的废液,将吸附柱放入收集管中;

[0124] ⑦加入500μl的Washing Buffer A,13000rpm离心1min,倒掉收集管中的废液,将吸附柱放入收集管中;

[0125] ⑧加入700μl的Washing Buffer B,13000rpm离心1min,倒掉收集管中的废液,将吸附柱放入收集管中;

[0126] ⑨13000rpm离心1min,去除吸附柱上残留的漂洗液;

[0127] ⑩向吸附膜的中间部位滴加50μl的Elution Buffer,13000rpm离心1min,将质粒溶液收集到离心管中,测浓度。

[0128] 1.8 Linker酶切鉴定

[0129] 将质粒小量抽提获得的重组Linker质粒行Ppu MI酶切鉴定,已明确Linker是否插入Ad-GFP中,如果已经插入,因Linker中含有Ppu MI酶切位点,可将重组质粒切成线性化;并以未改造的Ad-GFP为对照;酶切鉴定反应体系如下:

	Ad-GFP-Linker	1ug
	Age I	1ul
[0130]	10X NEBuffer	5 ul
	ddH ₂ O up to Total	50ul

[0131] 将上述反应体系混合至EP管中,37℃水浴箱中酶切反应3h;酶切产物行琼脂糖凝胶电泳观察成像;根据酶切电泳选择送测序。

[0132] 1.9测序鉴定

[0133] 将上一步质粒小量抽提获得的重组后质粒,EGFP-F引物对重组质粒进行测序,测序有深圳华大基因公司完成。

[0134] 1.10 miR-17~92Sponge有效性验证

[0135] 将构建好的Ad-miR-17~92-Sponge重组腺病毒表达载体转染VSMC细胞,验证是否可以有效降低细胞内miR-17~92的表达水平。

[0136] 4.实验结果

[0137] (1)Linker酶切鉴定

[0138] 如图5所示,重组的Linker质粒经Ppu MI酶切,琼脂糖电泳可见一条清晰的条带,大小约5200bp,且无明显杂带。

[0139] (2)测序鉴定

[0140] 如图6所示,对重组质粒进行测序明确所插入目的片段序列未发生突变;测序结果表明miR-17~92Sponge序列成功插入到Ad-GFP载体中,核苷酸序列未发生突变或缺失。

[0141] (3)细胞实验验证

[0142] 如图7所示,为了验证miR-17~92Sponge的有效性,分别用含有4个MBS、8个MBS和12个MBS的miR-17~92Sponge预处理VSMC细胞(分别命名为miR-SP-6MBS、miR-SP-8MBS、miR-SP-12MBS),饥饿24h后给予20ng/ml的PDGF刺激。与对照组(Control-SP)和空白组(Vehicle)相比,miR-17~92Sponge能够显著的抑制miR-17、miR-18a、miR-20a、miR-19a、miR-19b和miR-92a在VSMC中的表达,并随着MBS数量的增加抑制效应更加明显。

[0143] 以上的实施例是为了说明本发明公开的实施方案,并不能理解为对本发明的限制。此外,本文所列出的各种修改以及发明中方法、组合物的变化,在不脱离本发明的范围和精神的前提下对本领域内的技术人员来说是显而易见的。虽然已结合本发明的多种具体优选实施例对本发明进行了具体的描述,但应当理解,本发明不应仅限于这些具体实施例。事实上,各种如上所述的对本领域内的技术人员来说显而易见的修改来获取发明都应包括在本发明的范围内。

序列表

<110> 重庆医科大学附属第一医院

<120> 一种miRNA海绵表达载体的构建方法及其应用

<160> 6

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 1

tcgagcctgg atatcgacgg gtcccgactc tagagaca 38

<210> 2

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 2

cggacctata gctgcccagg gctgagatct ctgtctag 38

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 3

ctacctgcac ccgagcactt ta 22

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 4

ctatctgcac ccttgacact ta 22

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 5

tcagttttgc cctatttgca ca 22

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 6

agcattgcga tcgtccaac ct 22

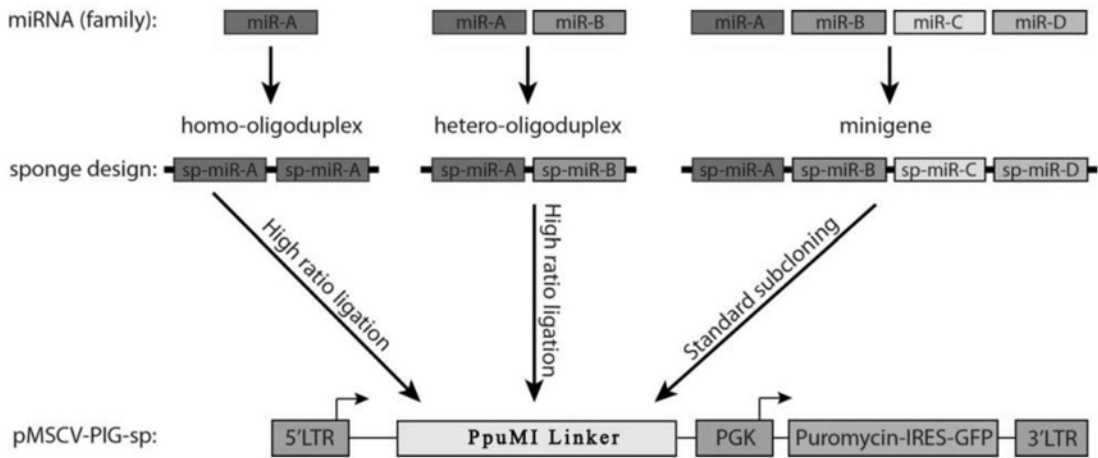


图1

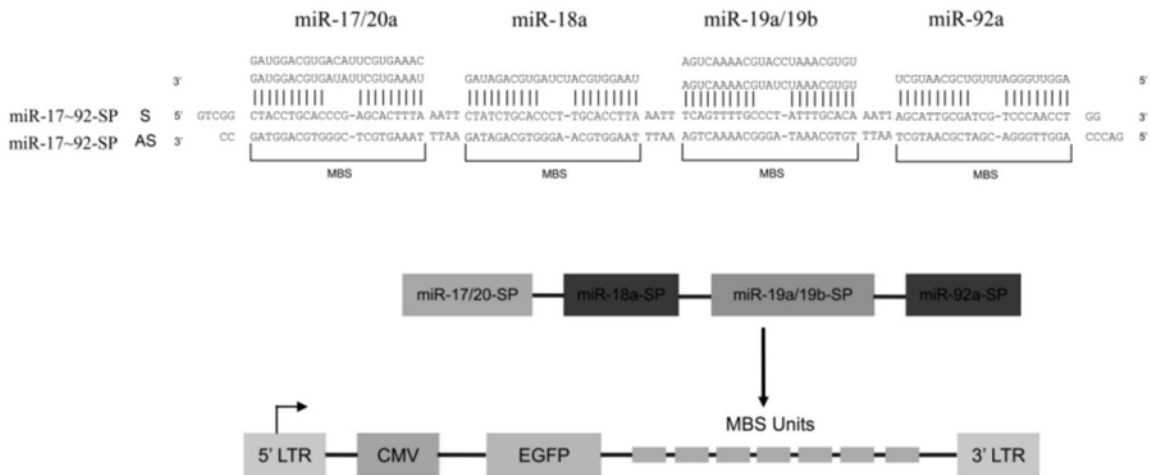


图2

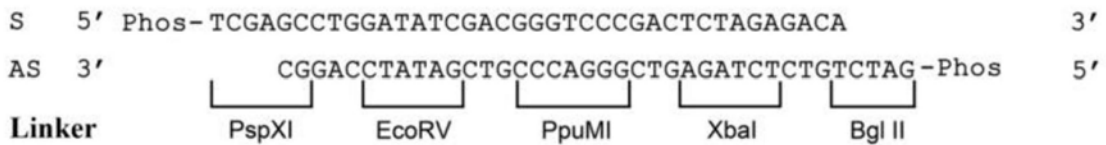


图3

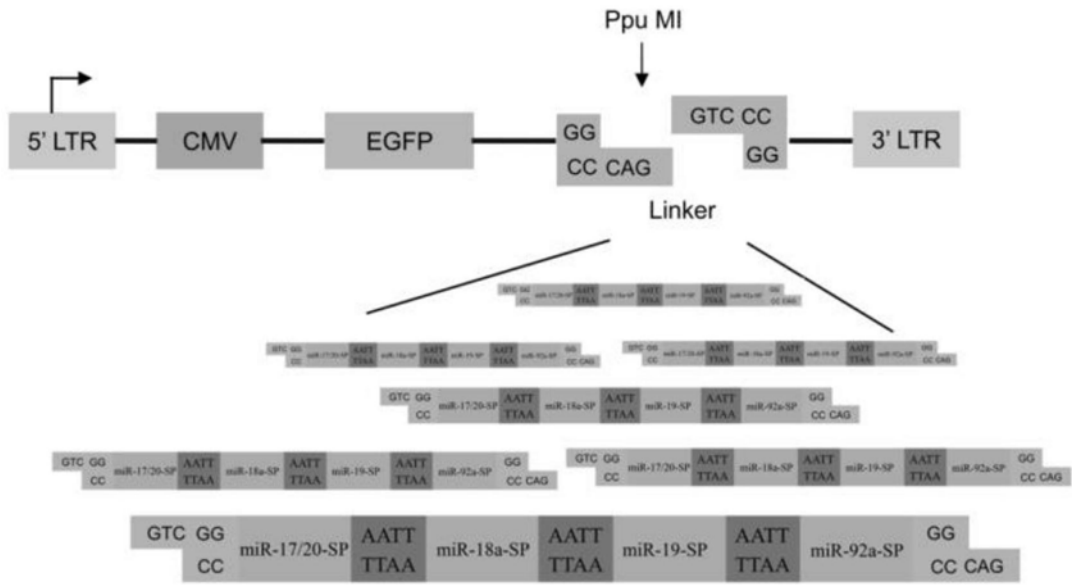


图4

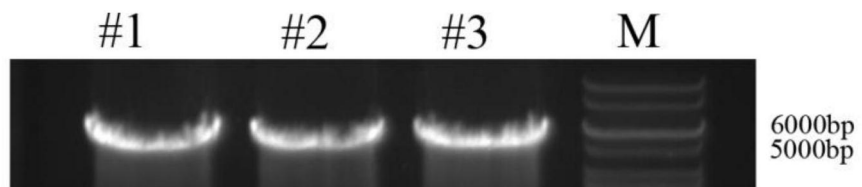


图5

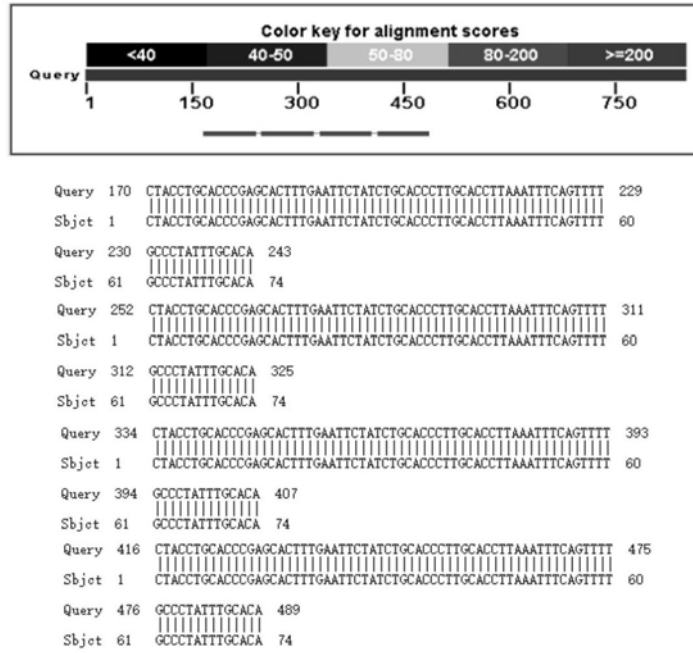


图6

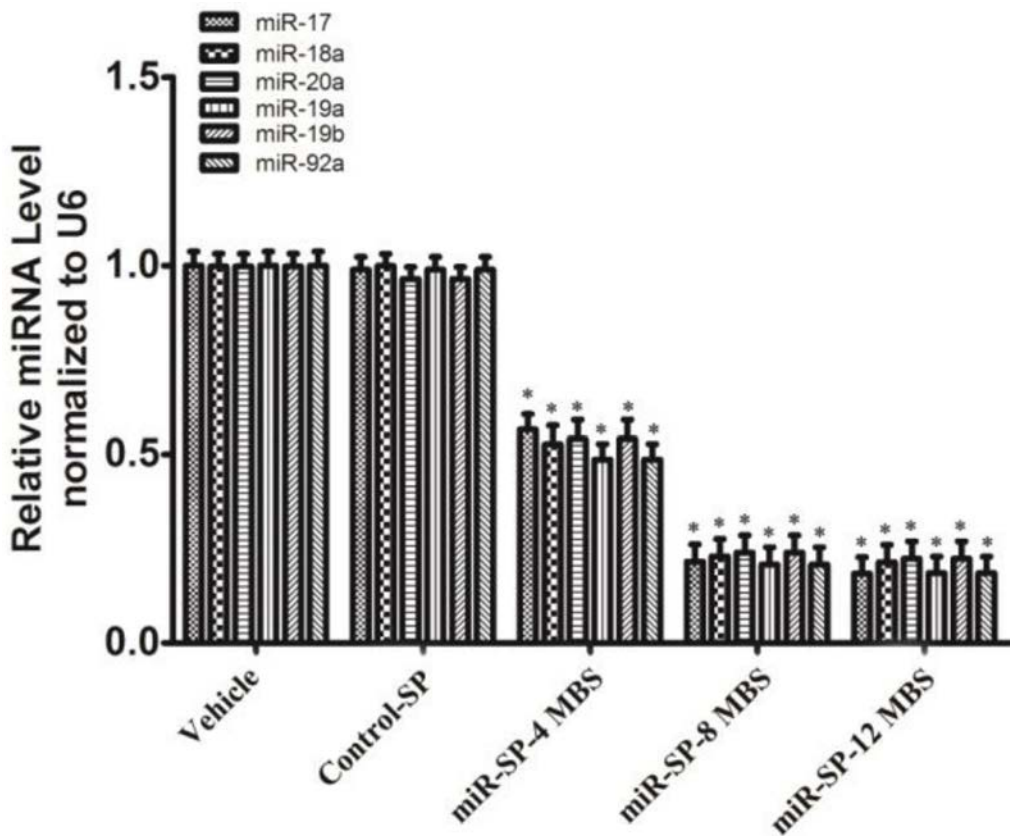


图7