

一种特异性降低人Aurora-A基因表达的shRNA及其应用

申请号 CN201210115006.4

申请日 2012.04.19

公开（公告）号 [CN102690826A](#)

公开（公告）日 2012.09.26

分类号 C12N15/113(2010.01);A61K48/00(2006.01);A61P35/00(2006.01)

申请（专利权）人 山西医科大学

www.innojoy.com



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102690826 A

(43) 申请公布日 2012.09.26

(21) 申请号 201210115006.4

A61P 35/00(2006.01)

(22) 申请日 2012.04.19

(71) 申请人 山西医科大学

地址 030001 山西省太原市新建南路 56 号

(72) 发明人 王晓霞 裴毅 李晓钟 路娜

陈显久 牛勃

(74) 专利代理机构 太原晋科知识产权代理事务
所(特殊普通合伙) 14110

代理人 王瑞玲

(51) Int. Cl.

C12N 15/113(2010.01)

A61K 48/00(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 5 页

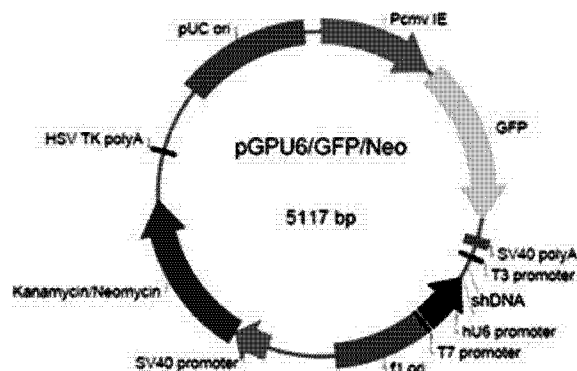
序列表 2 页 附图 6 页

(54) 发明名称

一种特异性降低人 Aurora-A 基因表达的
shRNA 及其应用

(57) 摘要

本发明涉及分子遗传学及生物医药领域,具体为一种特异性降低人 Aurora-A 基因表达的 shRNA 及其应用,本发明提供了一种可以特异性降低人 Aurora-A 基因表达的发夹型干扰 RNA,如 SEQIDNO.1 所示,针对的靶序列为人 Aurora-A mRNA 第 995 ~ 1015 位,如 SEQIDNO.2 所示,该 shRNA 在体内或体外可剪切形成含如 SEQIDNO.4 和 SEQIDNO.5 所示的 siRNA;还提供了编码该 shRNA 的 DNA 寡核苷酸链,如 SEQIDNO.3 所示,以及包含如 SEQIDNO.3 所示的 DNA 寡核苷酸链的质粒。本发明还证明了利用 Aurora-A-shRNA 干扰载体的药物转染人食管癌 EC9706 细胞后,细胞中 Aurora-A 基因的 mRNA 转录水平、蛋白表达水平明显降低,使食管癌细胞的侵袭能力显著降低,并能促进 UV 照射诱导的食管癌细胞凋亡,克服了体外化学合成的 siRNA 作用时间短暂的缺点,为新型抗肿瘤药物的开发提供了新途径。



1. 一种特异性降低人 Aurora-A 基因表达的 shRNA, 其特征在于, 其碱基序列如 SEQ ID NO. 1 所示, 即

5' - GCACCACUUGGAACAGUUUAUUUCAAGAGAAUAAACUGUCCAAGUGGUGC-3'。

2. 根据权利要求 1 所述的一种特异性降低人 Aurora-A 基因表达的 shRNA, 其特征在于其针对的靶序列为人 Aurora-A mRNA 的第 995 ~ 1015 位, 如 SEQ ID NO. 2 所示, 即

5' - GCACCACUUGGAACAGUUUAU-3'。

3. 根据权利要求 1 所述的一种特异性降低人 Aurora-A 基因表达的 shRNA, 其特征在于该 shRNA 通过如 SEQ ID NO. 3 所示的 DNA 寡核苷酸链转录生成, 即

5' - GCACCACTTGGAACAGTTTATTTCAAGAGAATAAACTGTTCCAAGTGGTGC-3'。

4. 根据权利要求 1 所述的一种特异性降低人 Aurora-A 基因表达的 shRNA, 其特征在于该 shRNA 通过包含如 SEQ ID NO. 3 所示的 DNA 寡核苷酸链的质粒转录生成。

5. 根据权利要求 1 所述的一种特异性降低人 Aurora-A 基因表达的 shRNA, 其特征在于该 shRNA 可剪切形成含如 SEQ ID NO. 4 和 SEQ ID NO. 5 所示的 siRNA 正义链和反义链, 即

SEQ ID NO. 4: 正义链为 5' - GCACCACUUGGAACAGUUUAU-3',

SEQ ID NO. 5: 反义链为 5' - AUAAACUGUCCAAGUGGUGC-3'。

6. 一种如权利要求 1 所述的特异性降低人 Aurora-A 基因表达的 shRNA 在治疗食管癌药物中的应用。

一种特异性降低人 Aurora-A 基因表达的 shRNA 及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及分子遗传学及生物医药技术领域,具体为一种特异性降低人 Aurora-A 基因表达的 shRNA 及其应用。

背景技术

[0002] RNA 干扰技术(RNAi)是指双链 RNA 特异性地诱发与其同源序列 mRNA 分子被降解,导致相应基因表达抑制的现象。人工化学合成或细胞内转录生成的小的双链 RNA (small interfering RNA, siRNA) 进入细胞后,能和与之互补的靶基因 mRNA 结合,从而介导特异性的切割酶将 mRNA 降解,达到降低目的基因表达的目的。

[0003] 目前,体外化学合成的 siRNA 虽然可以引起靶基因表达降低,但其作用相对短暂。为了对基因进行长效抑制,许多哺乳动物质粒表达载体已被作为研究工具,在细胞内指导合成 siRNA。这些载体包含依赖 RNA polymerase-III U6 或 H1 启动子,有一个明确的转录起始点和一个由连续 5 个胸腺嘧啶组成的转录终止信号(T5)。其中,一对特定的寡核苷酸来源于目标基因 mRNA 的一段长度为 19~21 个碱基的独特序列。当将正向和反向的 DNA 寡核苷酸退火,并克隆至载体的两个限制性内切酶位点之间时,正向 DNA 寡核苷酸将正确定位于 U6 启动子的下游。重组载体的转录产物即发夹型 RNA (small hairpin RNA, shRNA) 可以自身折叠配对形成茎长为 19~21 个碱基的茎环(Stem-loop)结构,这种茎环结构的前体在细胞内很快被切割形成有功能的 siRNA。这种载体表达的 shRNA 经剪切形成的 siRNA 具有表达量稳定、持续时间长的特点,从而可引起目标基因表达的长效抑制。

[0004] Aurora-A 是一种参与有丝分裂的丝氨酸/苏氨酸激酶,其生物学作用主要是通过调节中心体和微管的功能,确保中心体的正确分离和胞浆的完整分裂 [Bischoff JR, Plowman GD. The Aurora/Ipl1p kinase family: regulators of chromosome segregation and cytokinesis. Trends Cell Biol, 1999, 9(11):454-459.]. 近年来, Aurora-A 之所以倍受关注,是因为它与许多肿瘤的发生关系密切,是一种潜在的癌基因。例如在乳腺癌 [Zhou H, Kuang J, Zhong L, et al. Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. Nat Genet, 1998, 20(2): 189-193.], 肝癌 [Jeng YM, Peng SY, Lin CY, et al. Overexpression and amplification of Aurora-A in hepatocellular carcinoma. Clin Cancer Res, 2004, 10(6): 2065-2071.], 结肠癌 [Bischoff JR, Anderson L, Zhu Y, et al. A homologue of Drosophila aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. EMBO J, 1998, 17(11):3052-3065.], 膀胱癌 [Sen S, Zhou H, Zhang RD, et al. Amplification/overexpression of a mitotic kinase gene in human bladder cancer. J Natl Cancer Inst, 2002, 94(17): 1320-1329.] 以及食管癌 [Tong T, Zhong Y, Kong J, et al. Overexpression of Aurora-A contributes to malignant development of human esophageal squamous cell carcinoma. Clin Cancer Res, 2004, 10(21): 7304-7310. Tanaka E, Hashimoto Y, Ito T, et al. The

clinical significance of Aurora-A/STK15/BTAK expression in human esophageal squamous cell carcinoma. Clin Cancer Res, 2005,11(5): 1827-1834.] 等肿瘤中均发现有 Aurora-A 的过表达。Aurora-A 表达异常不仅与肿瘤的发生密切相关,而且与肿瘤的侵袭和转移也存在很大程度的相关性。例如,在膀胱癌、肝癌 [Jeng YM, Peng SY, Lin CY, et al. Overexpression and amplification of Aurora-A in hepatocellular carcinoma. Clin Cancer Res, 2004,10(6): 2065-2071. Sen S, Zhou H, Zhang RD, et al. Amplification/overexpression of a mitotic kinase gene in human bladder cancer. J Natl Cancer Inst, 2002,94(17): 1320-1329.] 中, Aurora-A 的表达水平与组织分级、侵袭和转移率呈正相关,并与病人的预后相关;在食管鳞癌中, Aurora-A 表达水平与肿瘤的组织学分级以及侵袭潜能呈正相关,并与远处淋巴结转移相关,而且还可作为判断病人预后的一个独立指标 [Tong T, Zhong Y, Kong J, et al. Overexpression of Aurora-A contributes to malignant development of human esophageal squamous cell carcinoma. Clin Cancer Res, 2004,10(21): 7304-7310. Tanaka E, Hashimoto Y, Ito T, et al. The clinical significance of Aurora-A/STK15/BTAK expression in human esophageal squamous cell carcinoma. Clin Cancer Res, 2005,11(5): 1827-1834.]。由此说明, Aurora-A 在肿瘤的发生发展中起着至关重要的作用。因此, Aurora-A 基因有可能成为治疗肿瘤发生发展的有效靶点之一。

[0005] 众所周知,我国食管癌的发病率目前居世界第一位,尤其以太行山周边的河北、河南及山西的部分地区为高发区。虽然手术切除以及术后放化疗使病人生存率得到了较大提高,但总体预后仍不乐观,导致病人死亡的主要原因是肿瘤的复发和转移。因此,研制治疗食管癌的新型药物具有重要的经济价值和社会效益,而采用 RNA 干扰技术将有可能成为治疗食管癌的有效途径之一。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种特异性降低人 Aurora-A 基因表达的 shRNA 及其应用。

[0007] 本发明是采用如下技术方案实现的:一种特异性降低人 Aurora-A 基因表达的 shRNA,其碱基序列如 SEQ ID NO.1 所示,即

5'-GCACCACUUGGAACAGUUUAUUUCAAGAGAAUAAACUGUCCAAGUGGUGC-3'。

[0008] 该 shRNA 可应用于治疗食管癌的药物中。

[0009] 本发明提供了一种可以特异性降低人 Aurora-A 基因表达的发夹型干扰 RNA (Aurora-A-shRNA),如 SEQ ID NO.1 所示,针对的靶序列为人 Aurora-A mRNA 的第 995 ~ 1015 位,如 SEQ ID NO.2 所示,该 shRNA 在体内或体外可剪切形成含如 SEQ ID NO.4 和 SEQ ID NO.5 所示的 siRNA;本发明还提供了编码该 shRNA 的 DNA 寡核苷酸链,如 SEQ ID NO.3 所示,以及包含如 SEQ ID NO.3 所示的 DNA 寡核苷酸链的质粒,利用该质粒可以直接在体内或者体外生成 Aurora-A-shRNA。而且本发明还证明了利用含 Aurora-A-shRNA 干扰载体的药物瞬时转染人食管癌 EC9706 细胞后,细胞中 Aurora-A 基因的 mRNA 转录水平明显降低,蛋白表达水平明显降低,使食管癌细胞的侵袭能力显著降低,并能促进 UV 照射诱导的食管癌细胞凋亡。

[0010] 总之,本发明利用 RNA 干扰技术,成功获得针对人 Aurora-A 基因的 shRNA;以此序

列为基础的真核表达载体在细胞中能稳定持续的抑制 Aurora-A mRNA 和蛋白表达水平,克服了体外化学合成的 siRNA 作用时间短暂的缺点;以此序列为基础的真核表达载体在细胞中能有效抑制食管癌细胞的侵袭以及促进 UV 照射诱导的食管癌细胞凋亡,因此,为新型抗肿瘤药物的开发提供了新途径。

附图说明

[0011] 图 1 为本发明 RNA 干扰载体的特征图;

图 2 为转染后普通显微镜下观察 EC9706 细胞图($\times 100$);

图 3 为转染后荧光镜下观察 EC9706 细胞中绿色荧光蛋白表达图($\times 100$);

图 4 为转染后 EC9706 细胞中 Aurora-A mRNA 表达的 RT-PCR 结果图;

图 5 为转染后 EC9706 细胞中 Aurora-A 蛋白表达的 Western blot 结果图;

图 6 为转染后对照组 Transwell 侵袭实验结果图($\times 100$);

图 7 为转染后实验组 Transwell 侵袭实验结果图($\times 100$);

图 8 为转染后 Transwell 侵袭实验结果统计图;

图 9 为转染后 UV 照射诱导的对照组细胞 DAPI 染色图($\times 200$);

图 10 为转染后 UV 照射诱导的实验组细胞 DAPI 染色图($\times 200$)。

具体实施方式

[0012] 以下实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围,下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件或者按照生产厂商所建议的条件。

[0013] 实施例 1:

可降低人 Aurora-A 基因表达的 shRNA 的设计

根据 NCBI 数据库中人 Aurora-A 基因(GeneBank 编号 NM_003600.2)的 mRNA 碱基序列,借助 siDirect 公司在 Internet 上提供的 siRNA 工具软件(siDirect version 2.0)选择靶点序列,靶点序列为人 Aurora-A mRNA 的第 995 ~ 1015 位,如 SEQ ID NO.2 所示,即 5'-GCACCACUUGGAACAGUUUUAU-3',

根据靶点序列设计的相应 shRNA 序列为:

SEQ ID NO.1:5'-GCACCACUUGGAACAGUUUUAUUAAGAGAAUAAACUGUCCAAGUGGUGC-3'

编码 shRNA 的 DNA 序列为:

SEQ ID NO.3:5'-GCACCACTTGGAACAGTTTATTTCAAGAGAATAAACTGTTCCAAGTGGTGC-3'

该 shRNA 序列在体内或体外可剪切形成含如 SEQ ID NO.4 和 SEQ ID NO.5 所示的 siRNA 正义链和反义链:

SEQ ID NO.4:正义链为 5'-GCACCACUUGGAACAGUUUUAU-3',

SEQ ID NO.5:反义链为 5'-AUAAACUGUCCAAGUGGUGC-3'。

[0014] 实施例 2:

可降低人 Aurora-A 基因表达的 shRNA 干扰载体的构建

根据以上序列,由上海吉玛有限公司通过化学合成法合成 SEQ ID NO:3 所示的 DNA,并在两端加上 BamH I 和 Bbs I 的酶切位点。将 DNA 寡核苷酸溶解在灭菌、无核酸酶的水中,终浓度为 3mg/mL。退火反应是将各 1mL 的正向和反向 DNA 寡核苷酸与 48mL 的退火缓

冲液(10mM Tris, pH 7.5-8.0, 50mM NaCl, 1mM EDTA)混合,在 90℃温育 4min,70℃温育 10min,慢慢冷却退火的寡核苷酸至 10℃。将退火产物与空的 pGPU6/GFP/Neo 质粒(上海吉玛有限公司提供)进行双酶切,采用 DNA 纯化试剂盒纯化酶切产物,各取 2μL 用 T4 DNA 连接酶连接。将重组的 pGPU6/GFP/Neo 载体转化含有氨苄青霉素的琼脂糖平板,挑取阳性克隆,通过测序来确定重组质粒中是否插入正确的序列。

[0015] 质粒特征如图 1 所示,其中 shDNA 代表编码本发明序列 shRNA (SEQ ID NO.1) 的 DNA 序列(SEQ ID NO.3)。测序证实插入序列完全正确。

[0016] 实施例 3:

含人 Aurora-A-shRNA 干扰载体药物的制备

将 8μg 质粒稀释于 500μL 无培养基中,轻轻混匀。取 Lipofectamine 2 000 (脂质体介导法) 8μL 稀释于 500μL 无血清培养基,混匀,室温孵育 5min。将稀释的脂质体与稀释的质粒 DNA 混合,室温孵育 20min。

[0017] 实施例 4:

利用含人 Aurora-A-shRNA 干扰载体的药物瞬时转染人食管癌 EC9706 细胞

取生长状态良好的细胞,于转染前一天将细胞接种于培养皿中,转染时细胞密度达到 70% 左右。将实施例 3 所制备的药物加入培养皿内,加无血清培养基至 2mL,轻轻混匀。6h 后补加含 20% 的 RPMI 1640 培养基 2mL,24h 后,弃去原培养基,换含 10% 的 RPMI 1640 培养基。48h 后收集细胞进行鉴定。

[0018] 实施例 5:

转染后显微镜下观察 EC9706 细胞中绿色荧光蛋白的表达

载体上带有 GFP 基因,表达绿色荧光蛋白,利于观察含重组载体的药物的转染效率。结果显示,随着转染时间的延长,绿色荧光逐渐增多增强。同一视野白光(图 2)和荧光镜下(图 3)对比观察细胞中绿色荧光蛋白的表达,经计算得出在 48h 时,含人 Aurora-A-shRNA 干扰载体的药物的转染效率约为 50-60%。

[0019] 实施例 6:

转染后半定量 RT-PCR 法检测对 Aurora-A mRNA 表达的干扰作用

转染 48h 后,用 Trizol 试剂抽提细胞总 RNA,取 RNA 7.5μg, random hexamers (500μg/mL) 2μL,10mM dNTP mix 1μL,加 DEPC 水至 10μL,混匀后 65℃作用 5min;置于冰上 3-5min,加入 10×RT buffer 2μL,25 mmol/L MgCl₂ 4μL,0.1mol/L DTT 2μL,混匀后 25℃作用 2min;在每管中加 SuperscriptII™ 逆转录酶 1μL,混匀,依次 25℃作用 10min,42℃作用 90min,70℃作用 15min,逆转录成 cDNA。再以 cDNA 为模板,PCR 扩增 Aurora-A 基因,上游引物为:5'-AATGATTGAAGGTCGGATGC-3';下游引物为:5'-TTCTCTGAGCATTGGCCTCT-3'。以看家基因 GAPDH 为内参照,上游引物为:5'-GCTGAGAACGGAAGCTTGT-3';下游:5'-GCCAGGGGTGCTAAGCAGTT-3'。引物由大连宝生物公司合成。PCR 反应体系如下:

组分	体积(μL)
10×PCRBBuffer	2.5
MgCl ₂	1
dNTP(5mmol/L)	2
TaqDNA 聚合酶	0.25

cDNA 模板	1
目的基因上 / 下游引物 (10mmol/L)	2
GAPDH 引物	1
去离子水	15.25
总体积	25

反应条件为 :94℃ 30 s,58℃ 30 s,72℃ 30 s,共 30 个循环。结果显示,与阴性质粒转染组比较,含人 Aurora-A-shRNA 干扰载体的药物处理细胞中 Aurora-A 基因的 mRNA 转录水平明显降低(见图 4)。

[0020] 实施例 7 :

转染后 Western blot 法检测对 Aurora-A 蛋白表达的干扰作用

转染 48h 后收集细胞,取 50 μ g 细胞总蛋白,经 10% SDS-PAGE 后,转移至硝酸纤维素膜,以免抗 Aurora-A 单抗(1:1000 稀释)为一抗,HRP 标记的羊抗鼠 IgG 为二抗,经孵育洗膜后 ECL 显影,检测细胞内 Aurora-A 蛋白的表达水平,以 β-actin 为内参照。结果显示,与阴性质粒转染组比较,含人 Aurora-A-shRNA 干扰载体的药物处理细胞中 Aurora-A 蛋白的表达水平明显降低(见图 5)。

[0021] 实施例 8 :

转染后 Transwell 侵袭实验检测对细胞侵袭能力的影响

稀释 Matrigel 至 250μg/mL,将 8μm 孔聚碳酸酯膜双面经细胞外基质 Matrigel 包被各 30min,取出风干备用。将 30μL RPMI 1640 培养基加在 Boyden 小室下室,Matrigel 包被好的 8μm 孔聚碳酸酯膜铺于下室上面,再加一层橡胶垫,并安装好 Boyden 小室上槽。取生长状态良好的细胞消化,将 50μL 2×10^4 个细胞种植于每个 Boyden 小室下室,于 37℃ 5%CO₂ 培养箱中培养。24h 后小心取下膜,刮去上层未发生迁移的细胞。以 75% 的甲醇固定膜上的细胞 15min。以 0.5% 结晶紫(甲醇配制)染色 20min 后,蒸馏水清洗。在显微镜下计数聚碳酸酯膜下表面的细胞数,进行统计学分析,同时拍照。结果显示,含人 Aurora-A-shRNA 干扰载体的药物处理细胞穿过膜的细胞数为 56±12 (图 7),对照组穿过膜的细胞数为 520±32 (图 6)。结果表明,与对照细胞相比,含人 Aurora-A-shRNA 干扰载体的药物处理细胞的体外侵袭能力明显减弱,经统计学分析,差异具有显著性(见图 8)。

[0022] 实施例 9 :

转染后 DAPI 染色法检测 UV 照射对细胞凋亡能力的影响

转染 48h 后 UV (30J/m²,254 nm 紫外灯)照射细胞,12h 后用 PBS 清洗细胞,冷甲醇固定细胞 30min。PBS 冲洗细胞,0.1 μ g/mL DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole hydrochloride,4,6- 联脒 -2- 苯基吲哚)染细胞核,室温孵育 15min。PBS 冲洗细胞,用滤纸吸去过量液体,封片。结果表明,与对照细胞相比(图 9),含人 Aurora-A-shRNA 干扰载体的药物处理后的细胞,经 UV 照射后,很多细胞出现细胞核染色质凝聚,边缘形成新月状,核膜崩溃及细胞溶解形成凝聚的凋亡小体,呈现典型的凋亡的特征(见图 10)。提示含人 Aurora-A-shRNA 干扰载体的药物能促进 UV 照射诱导的食管癌细胞凋亡。

序列表

<110> 山西医科大学

<120> 一种特异性降低人 Aurora-A 基因表达的 shRNA 及其应用

<160>5

<170> PaUentIn Version 3.5

<210> 1

<211> 51

<212> RNA

<213> 人工序列

<223> 根据 Aurora-A 基因 siRNA 设计的 shRNA 序列

<400> 1

gcaccacuug gaacaguuaa uuucaagaga auaaacuguu ccaaguggug c

<210> 2

<211> 21

<212> RNA

<213> 人(Homo sapiens)

<223> Aurora-A 靶基因序列

<400> 2

gcaccacttg gaacagttta t

<210> 3

<211> 51

<212> DNA

<213> 人工序列

<223> 编码 Aurora-A 基因 shRNA 的 DNA 序列

<400> 3

gcaccacttg gaacagttta tttcaagaga ataaactgtt ccaagtgggtg c

<210> 4

<211> 21

<212> RNA

<213> 人(Homo sapiens)

<223> shRNA 剪切产物 siRNA 正义链

<400> 4

gcaccacuug gaacaguuua u

<210> 5

<211> 21

<212> RNA

<213> 人(Homo sapiens)

<223> shRNA 剪切产物 siRNA 反义链

<400> 5

auaaacuguu ccaaguggug c

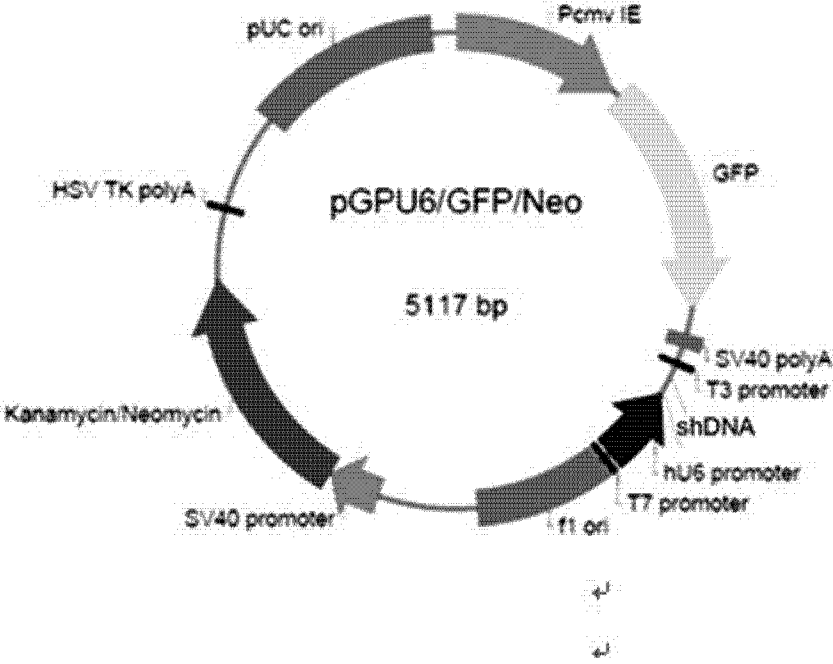


图 1

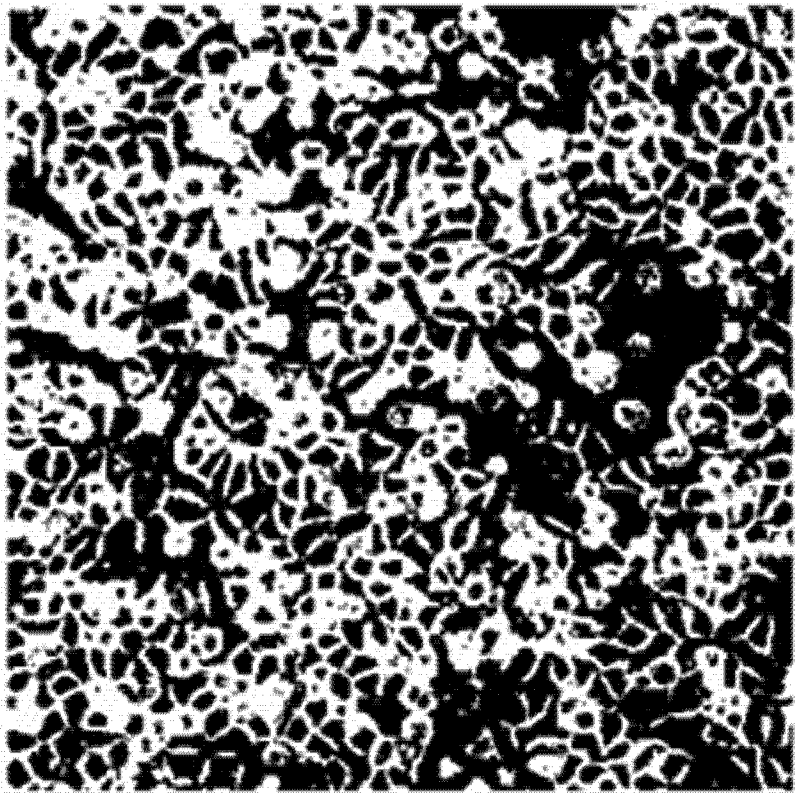


图 2

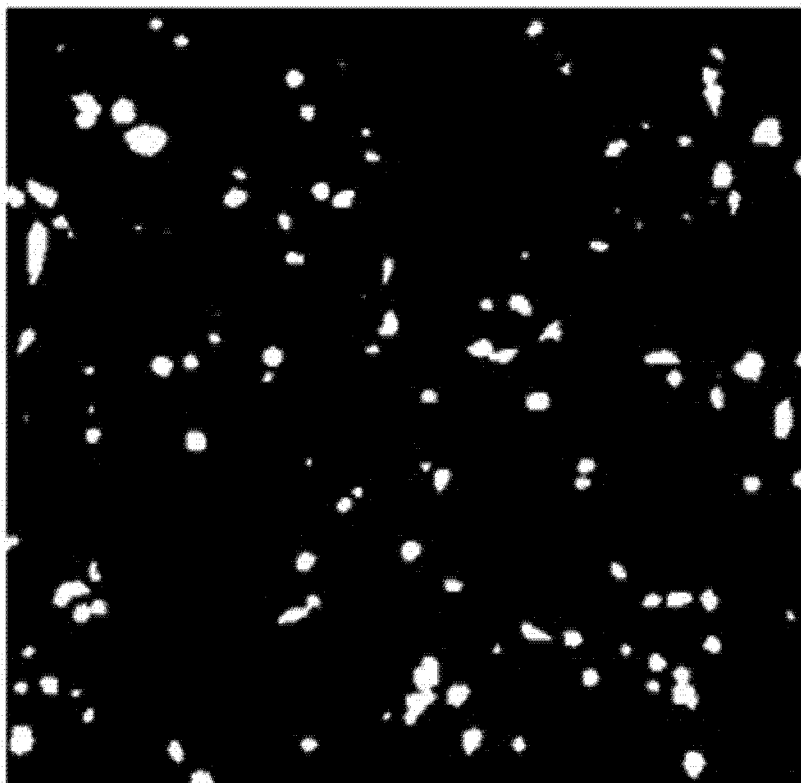


图 3

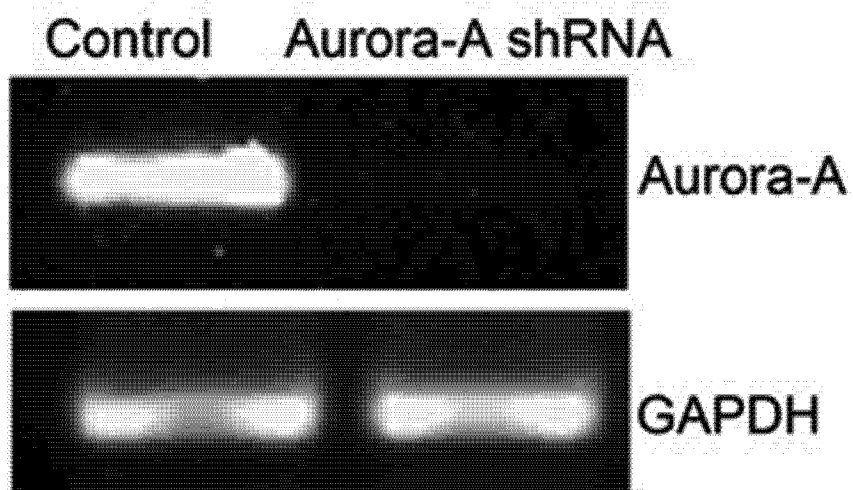


图 4

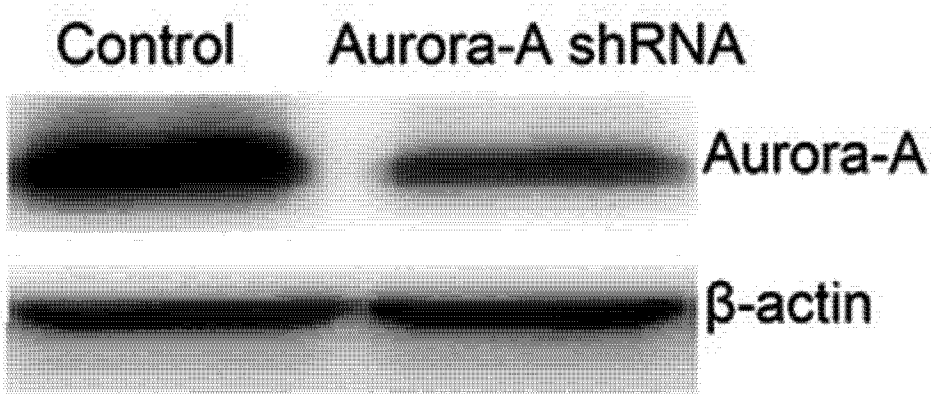


图 5

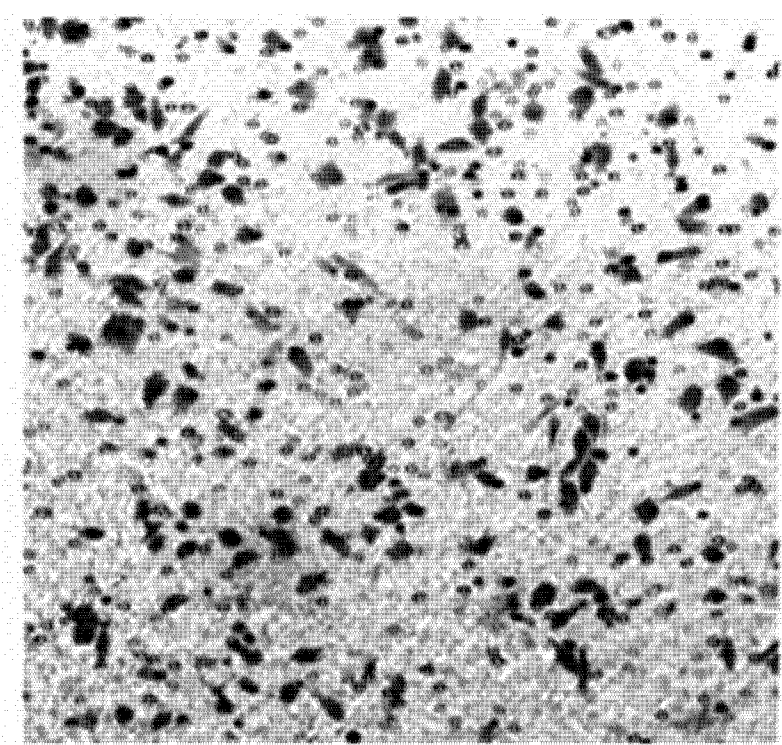


图 6

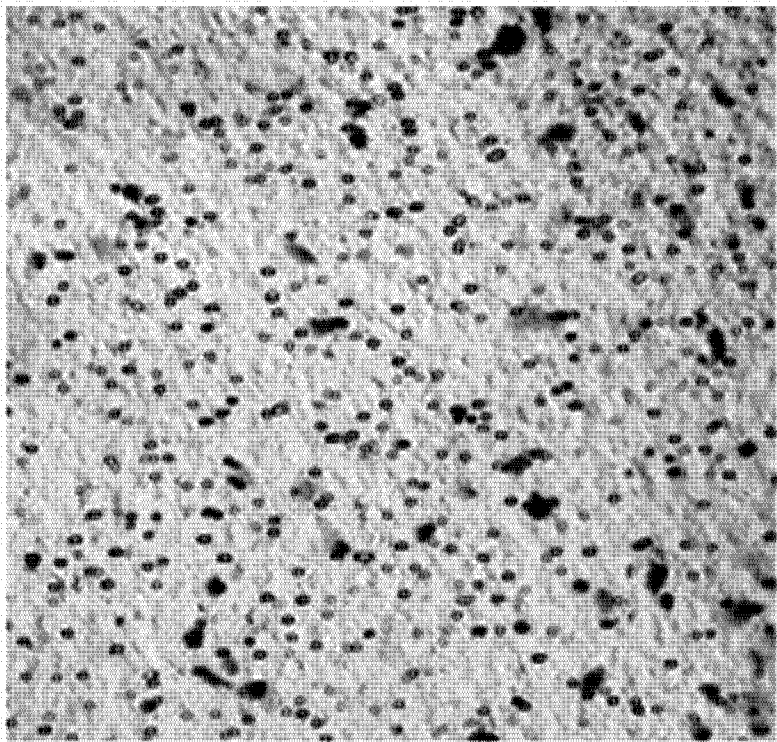


图 7

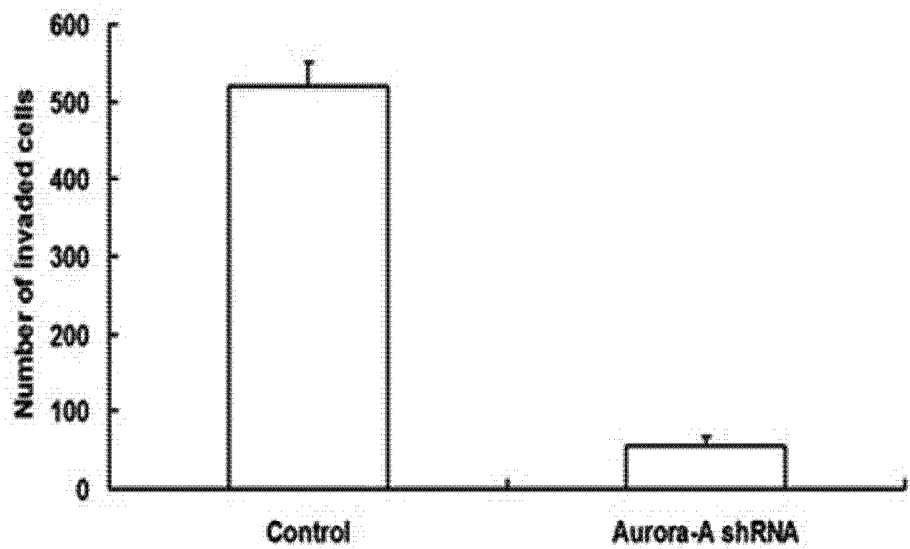


图 8

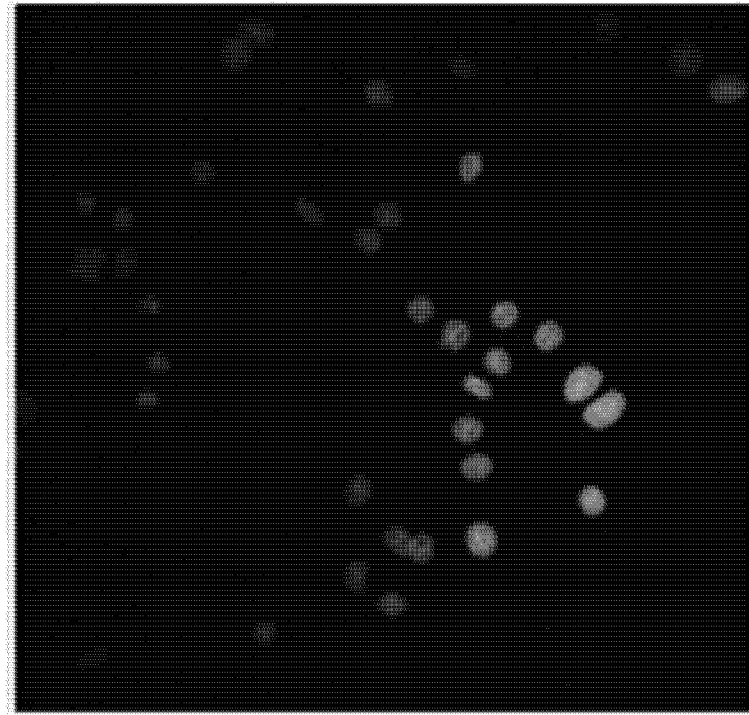


图 9

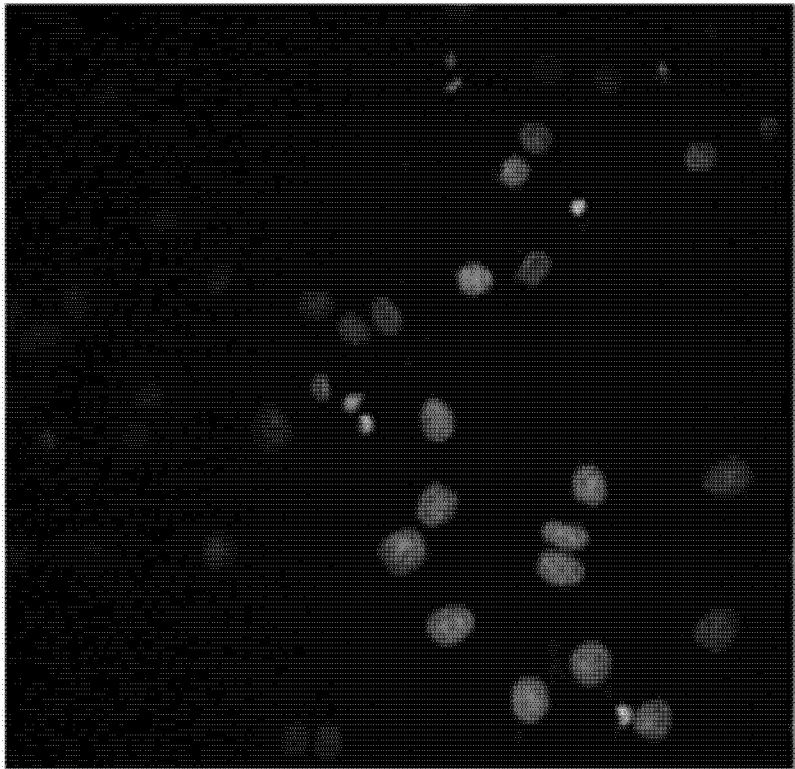


图 10