

说明书

发明名称: 一种利用活性tRNA在大肠杆菌中嵌合表达重组小RNA的方法及应用

技术领域

[0001] 本发明属于分子生物学及医学技术领域，具体涉及一种利用活性tRNA在大肠杆菌中嵌合表达重组小RNA的方法及应用。

背景技术

[0002] 近年来，RNA疗法凭借其设计简便、研发周期短、候选靶点丰富等优势，成为受科学研究和产业界关注的新型疗法。越来越多的研究发现，tRNAs除了参与蛋白质合成，还广泛参与各类疾病的发生发展；由成熟或前体tRNAs切割可产生tRNA来源的小RNA(tsRNAs)，tsRNAs被检测到在各类疾病中异常表达，提示了tRNAs和tsRNAs在疾病治疗中的潜在作用。

[0003] 已有研究表明，tRNA可被成功地用作支架在大肠杆菌中生产小ncRNA(Luc Ponchon,et al.,Recombinant RNA technology:the tRNA scaffold[J].Nature Methods,2007,4(7):571-576；Luc Ponchon,et al.,A generic protocol for the expression and purification of recombinant RNA in Escherichia coli using a tRNA scaffold[J].Nature Protocols,2007,4(6):947-959)。Ponchon et.al.的方法是使用甲硫氨酰tRNA和人赖氨酸tRNA直接嵌合小ncRNA前体进行表达，重组RNA被RNase H切割之后，再用离子交换色谱纯化成熟小ncRNA片段。然而，此种生物表达方法，已被证明其适用范围有限，多种小RNA在该策略下无法表达或表达量过低。西北工业大学Qian et.al等人提供了一种重组小RNA的生产方法，用人丝氨酸tRNA嵌合前体microRNA表达短片段RNA(CN110964726B)。Qian et.al.的方法较Luc Ponchon,et.al.方法普适性更强，人丝氨酸tRNA为人源tRNA，用其作为支架生产的重组小RNA开发前景更好，因人体细胞中本身含有丝氨酸tRNA，但无细菌来源的甲硫氨酰tRNA，因此该发明降低了毒性和免疫原性。以tRNA直接嵌合前体小RNA无法表达

的多个小RNA，使用Qian et.al.的方法均可表达。以上方法中，tRNA作为支架表现出提高重组小RNA表达量和稳定性的作用，不具有生物活性。

发明内容

- [0004] 本发明所要解决的技术问题在于针对上述现有技术的不足，提供一种利用活性tRNA在大肠杆菌中嵌合表达重组小RNA的方法及应用。
- [0005] 本发明以人活性tRNA嵌合hsa-miR-34a前体，人源tRNA作为支架生产的重组小RNA的开发前景更好，因为人体细胞中本身含有该tRNA，因此用人源tRNA为支架其毒性及免疫原性均可能更低；并且以活性tRNA为支架，可以起到靶向治疗疾病的效果，可与所携带的小RNA起到协同增效作用。本发明不仅降低了细胞毒性，提高了表达量，还获得了具有活性的tRNA支架，使其与嵌合的小RNA协同发挥治疗效果。
- [0006] 为解决上述技术问题，本发明采用的技术方案是：一种利用活性tRNA在大肠杆菌中嵌合表达重组小RNA的方法，所述方法包括：以活性tRNA嵌合功能型miRNA前体为支架，在大肠杆菌中表达目标小RNA。
- [0007] 本发明所述方法，其中所述小RNA为长度小于200nt的RNA。
- [0008] 本发明所述方法，其中所述tRNA的序列为与人谷氨酸tRNA序列相似度达90%以上的序列，所述人谷氨酸tRNA序列为SEQ ID NO.2。
- [0009] 本发明所述方法，其中所述miRNA前体的序列为与hsa-miR-34a前体序列相似度达90%以上的序列，hsa-miR-34a前体序列为SEQ ID NO.3。
- [0010] 本发明所述方法，其中所述miRNA前体嵌合于tRNA反密码子环处，嵌合序列为与SEQ ID NO.1序列相似度达90%以上的序列。
- [0011] 具体的，本发明所述方法，包括以下步骤：
- [0012] 步骤一、利用pBSMrnaSeph质粒在tRNA反密码子环处具有的酶切位点，将hsa-miR-34a前体的表达序列插入pBSMrnaSeph质粒中，构建表达载体；
- [0013] 步骤二、将构建的表达载体中miR-34a的成熟序列部分替换为目标小RNA序列，构建嵌合目标序列的表达载体；将嵌合目标序列的表达载体转化感受态大肠杆菌；

- [0014] 步骤三、大肠杆菌培养扩增后，用饱和酚法提取菌内总RNA，以FPLC分离纯化目标小RNA。
- [0015] 本发明所述方法，其中所述小RNA为shRNA、miRNA、siRNA或RNA适配体。
- [0016] 本发明所述方法，其中步骤二中所述大肠杆菌为HST08菌株或DH5 α 菌株。
- [0017] 本发明所述方法，其中步骤三中大肠杆菌采用TB培养基培养，培养至OD为1.1~1.7，饱和酚法提取菌内总RNA所用饱和酚的体积与菌泥的质量之比为(2~6):1，其中体积单位为mL，质量的单位为g。
- [0018] 另外，本发明还提供使用人谷氨酸tRNA嵌合hsa-miR-34a前体构建tRNA支架的用于，以及使用该支架制备重组小RNA。
- [0019] 本发明进一步提供，采用本发明的方法生产的重组小RNA在制备诊断试剂、科研试剂、前药、药物、原料药或药物组合物中的应用。
- [0020] 以下是对本发明中出现的名词、术语作出进一步的解释：
- [0021] 活性tRNA：除发挥转运功能以外，同时还具备其他功能活性的tRNA，本发明提及的活性tRNA指tRNA可以作为短的非编码RNA的来源，即tRNA来源的小RNA，进而tRNA通过降解为小RNA发挥调控功能。
- [0022] 嵌合表达：将miRNA序列插入tRNA某一部位后一同进行表达的方式。
- [0023] 小RNA：一类长度在20-30个核苷酸左右的非编码RNA分子。
- [0024] 人谷氨酸tRNA：来源于人的负责转运谷氨酸的tRNA。
- [0025] miRNA前体序列：含有发卡结构的miRNA序列。
- [0026] hsa-miR-34a前体序列：hsa-miR-34a发卡结构对应的序列。
- [0027] tRNA反密码子环：tRNA三叶草结构中反密码子处通常会形成一个环状结构，即反密码子环。
- [0028] pBSMrnaSeph质粒：一种质粒载体的名称。
- [0029] miR-34a的成熟序列：细胞内切酶对hsa-miR-34a前体序列进行精确剪切后得到的序列。
- [0030] 感受态大肠杆菌：受CaCl₂或电击处理,非常容易吸入附在大肠杆菌细胞表面的外源DNA的一种特定形态。

- [0031] 大肠杆菌为HST08菌株：是mrr,hsdRMS,mcrBC,mcrA(这些基因是大肠杆菌切除外源甲基化DNA所必需的基因)缺失的菌株。
- [0032] 大肠杆菌为DH5 α 菌株：DH5 α 菌株是一种经诱变的菌株，其基本特性是： R^- 、 M^- 、 AMP^- 。 M^- 是指DH5 α 菌株缺乏DNA修饰，即其自身DNA不会被修饰。 R^- 是指其缺乏“免疫”机制，不会对导入的外源DNA切割。 AMP^- 是指其对氨苄青霉素敏感。
- [0033] 原料和试剂皆是市场可以购买到的或者NCBI中可以直接查询到序列。
- [0034] 本发明与现有技术相比，具有以下优点：
- [0035] 1、以人谷氨酸tRNA嵌合hsa-miR-34a前体构建用于表达重组小RNA的tRNA支架，人谷氨酸tRNA为人源tRNA，用其作为支架生产的重组小RNA的开发前景更好，因为人体细胞中本身含有谷氨酸tRNA，因此用人谷氨酸tRNA为支架其毒性及免疫原性均可能更低，从而降低了细胞毒性，提高了表达量；并且人谷氨酸tRNA具有治疗乳腺癌活性，因此，本发明使得重组tRNA部分及其所携带得小RNA部分均可发挥生物活性，具有双重治疗效果。
- [0036] 2、本发明通过生物工程技术设计制备重组小RNA，具有设备简便、生产快速、产量高、成本低、功能性好等优势。
- [0037] 3、本发明还优化了大肠杆菌培养条件，以TB培养基替代LB或2 $\times$ YT，延长大肠杆菌进入生长衰亡期的时间，提高单位体积内获得的菌体总量；此外，确定了大肠杆菌培养后菌体收集的最佳细菌浓度为OD=1.1~1.7，该密度和培养条件下可获得最多的总RNA，即提高了重组小RNA产量。
- [0038] 4、本发明也优化了细菌总RNA提取时加入的水饱和酚体积，找到了获得最佳RNA提取效率所需的最小饱和酚体积，从而优化了效益成本比。
- [0039] 5、经多种技术手段检测表明，本发明的方法能构建活性重组小RNA，并且该重组小RNA具有更好的生物功能。生产制备的重组小RNA满足科学研究及药物研发的需求。
- [0040] 下面结合附图和实施例，对本发明的技术方案做进一步的详细描述。

附图说明

- [0041] 图1是本发明实施例2利用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测大肠杆菌中重组小RNA的表达。
- [0042] 图2是本发明实施例4利用Bio-Rad NGC™ Chromatography System纯化重组小RNA，以变性聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定所收集组分的纯度。
- [0043] 图3是本发明实施例5重组has-tRNA^{Glu}-miR-34a对MDA-MB-231细胞的抑制作用。
- [0044] 图4是本发明实施例6不同重组miR-34a转染MDA-MB-231细胞中后利用qPCR技术检测相应tRNA的细胞内水平。
- [0045] 图5是本发明实施例6利用qPCR技术检测重组miR-34a在MDA-MB-231细胞中的被加工为成熟体(数值以“均值±标准差”表示)。
- [0046] 图6是本发明实施例7利用CCK8检测hsa-tRNA^{Glu}-miR-34a的IC₅₀值。
- [0047] 图7是本发明实施例8利用Chou-Talalay方法分析has-tRNA^{Glu}支架与miR-34a的协同作用结果图。
- [0048] 图8是本发明实施例9利用细胞克隆形成实验测定hsa-tRNA^{Glu}-miR-34a对MDA-MB-231单个细胞增殖能力结果图。
- [0049] 图9是本发明实施例10通过免疫荧光技术检测hsa-tRNA^{Glu}-miR-34a对细胞凋亡影响结果图。
- [0050] 图10是本发明实施例11通过划痕愈合实验检测hsa-tRNA^{Glu}-miR-34a对细胞迁移能力影响结果图。
- [0051] 图11是本发明实施例12利用Transwell侵袭实验检测hsa-tRNA^{Glu}-miR-34a对细胞侵袭能力影响结果图。
- [0052] 图12是本发明实施例13利用小动物活体成像在动物水平检测hsa-tRNA^{Glu}-miR-34a对乳腺癌动物模型小鼠的治疗效果图。

具体实施方式

- [0053] 以下通过具体实施例来说明本发明的实施方式，除非另外说明，本发明中所公开的实验方法均采用本技术领域常规技术。
- [0054] 以重组miR-34a的设计表达为例进行说明。

- [0055] 实施例1：在GtRNAdb(<http://gtrnadb.ucsc.edu/>)中检索文献报道的具有抗乳腺癌活性的人源tRNA^{Glu}序列，嵌合miR-34a前体，设计重组has-tRNA^{Glu}-miR-34a(E-miR-34a)的表达质粒。
- [0056] 使用CentroidFold(<http://www.ncrna.org/centroidfold>)在线预测工具对所设计的人源活性tRNA^{Glu}支架嵌合表达的重组miR-34a的二级结构进行预测，通过调整支架与miR-34a嵌合的位置，并对个别核苷酸进行调整，选择具有最优二级结构的序列构建重组后的表达质粒。
- [0057] 实施例2：以活性tRNA支架重组表达hsa-miR-34a
- [0058] (1)小量提取重组E-miR-34a表达质粒
- [0059] 100ng重组E-miR-34a表达质粒转化HST08或DH5 α 感受态细菌后，加入5mL LB培养基在37℃，200rpm震荡培养过夜。菌液经10000g离心2min后，收集沉淀。于沉淀中加入180 μ L 10mM醋酸镁-Tris HCl溶液重悬，再加入200 μ L的饱和苯酚，室温振摇20~60min。10000g离心10min后收集水相，加入0.1倍水相体积的5M NaCl沉淀大分子杂质。上清液再加入2倍体积无水乙醇，10000g离心10min后，弃掉上清。吸水纸吸弃残留乙醇，待RNA干燥后加入DEPC水溶解RNA，测定浓度，-80℃冰箱保存。
- [0060] (2)变性聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定
- [0061] 将RNA样品与RNA上样缓冲液混合，加入变性胶样品孔内。80~100V电泳50~80min后，放入含0.5 μ g/mL溴化乙锭的溶液中轻摇10~30min，于凝胶成像系统下观测，拍照保存。
- [0062] 图1是本发明利用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测大肠杆菌中重组E-miR-34a的表达。将合成的重组质粒转化大肠杆菌HST08感受态细菌，经尿素变性聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定表达量，以用细菌甲硫氨酸tRNA(btRNA^{Met})支架表达的重组miR-34a(btRNA^{Met}-miR-34a即M-miR-34a)作为阳性对照。如图1所示，若转化了重组miR-34a表达质粒的大肠杆菌在150-300nt之间多了一条条带，则说明重组小RNA表达成功；条带的粗细则反应了表达量的多少。结果显示，E-miR-34a重组质粒在大肠杆菌HST08和DH5 α 中均可见表达条带，表明重组的E-miR-

34a表达质粒在大肠杆菌中可以高效地表达重组小RNA。重组E-miR-34a质粒中的有效序列为SEQ ID NO.1。

[0063] 实施例3：大肠杆菌培养条件及总RNA提取方法优化

[0064] (1)采用TB培养基替代“实施例2中(1)”的LB培养基，培养至菌体密度达OD为1.1以上，离心收集细菌。经比较，该培养方案收获的菌量较LB培养基培养法提高约2倍以上。

[0065] (2)优化“实施例2中(1)，通过水饱和酚裂解大肠杆菌提取总RNA”中的水饱和酚用量，使用更规范更标准的裂解液配比进行大肠杆菌细胞裂解，以寻找充分裂解细菌所需的最少水饱和酚体积，优化成本效益比。经比较，饱和酚与菌泥的比例在2~6(v/w)时(如1g收集到的菌泥中加入2mL水饱和酚)，可将总RNA提取率自3.5%提高至>7%。

[0066] 实施例4：FPLC纯化重组E-miR-34a

[0067] (1)采用Bio-Rad NGC™ Chromatography System，以离子交换柱(ENrich™Q10 × 100Column)纯化重组E-miR-34a。

[0068] 流动相A：10mM NaH₂PO₄溶液，pH7.0。

[0069] 流动相B：10mM NaH₂PO₄溶液，1M NaCl溶液，pH7.0。

[0070] 流速为2.0mL/min。以DEPC水，流动相A，流动相B分别交替冲洗色谱柱约1h。每次冲洗5柱体积。

[0071] 运行以下程序对总RNA进行分离：0-8.9min(0%B)，8.9-13.7min(55%B)，13.7-53.7min(55-75%B)，73.7-83.7min(100%B)，83.7-93.7min(0%B)。以260nm的吸光度检测RNA，并收集重组RNA所对应的峰。用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定纯度。

[0072] (2)RNA样品处理方法

[0073] 总RNA提取步骤同上。所提取的总RNA于4℃，13000rpm离心10min后，上清液经0.45 μm微孔滤膜过滤后，每次进样5~10mg。

[0074] (3)FPLC组分收集及浓缩去盐

[0075] 以变性聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定所收集组分的纯度。混合后的各组分用2倍体积无水乙醇沉淀RNA，-80℃冰箱放置约1h。以10000g转速于4℃离心10min收集

RNA。将所得RNA沉淀用DEPC水溶解，用Ultra-2mL Centrifugal Filters 4℃7500g离心10min，去滤液，重复此步骤直至所有溶液离心完，再将Filters倒置，2000g离心2min，收集所得溶液，测定浓度后于-80℃保存。

[0076] 图2是本发明利用Bio-Rad NGC™ Chromatography System纯化重组miR-34a，以变性聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定所收集组分的纯度。图2A的色谱图显示了目标峰的位置及所收集的组分，结果显示重组E-miR-34a与大肠杆菌内其他内源性RNA得到良好的分离，进一步的尿素变性聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定结果显示(图2B)，经过纯化的重组E-miR-34a与未纯化的总RNA相比，条带单一，无杂带与拖尾现象，证明了重组E-miR-34a的纯度良好，即经FPLC纯化后，可得到纯的重组E-miR-34a。

[0077] 实施例5：重组has-Glu-miR-34a对MDA-MB-231细胞的抑制作用

[0078] 使用细胞增殖毒性检测试剂盒CCK8检测重组E-miR-34a对乳腺癌细胞MDA-MB-231细胞增殖及活力的作用，具体实验操作如下：

[0079] (1)接种细胞至96孔板中，每组设6个重复孔，等待细胞贴壁后按照实验分组进行RNA的转染；

[0080] (2)转染24h、48h、72h和96h后，加入10% CCK8检测液，酶标仪检测450nm处各孔的吸光度值，进行数据分析。

[0081] 如图3所示，在72h和96h时间点，重组E-miR-34a具有明显抑制细胞活性的效果。

[0082] 使用经验证的、可用于小RNA高效重组表达的细菌甲硫氨酸tRNA构建btRNA^{Met}-miR-34a、以及人丝氨酸tRNA构建hsa-tRNA^{Ser}-miR-34a，以这两种“惰性”(因未见文献报告该两种tRNA具有显著抗乳腺癌活性，所以该两种tRNA在本发明的乳腺癌疾病中为相对无活性tRNA，本文以惰性称之)tRNA支架携带的重组miR-34a作为对照；为探究tRNA支架是否与miRNA具有协同治疗效果，以tRNA支架构建对照。由btRNA^{Met}、hsa-tRNA^{Ser}和hsa-tRNA^{Glu}支架构建的对照重组RNA(NC^{Met}；NC^{Ser}；NC^{Glu})。因此后续实验分组设置为：Blank，Mock，NC^{Met}，btRNA^{Met}-miR-34a(M-miR-34a)，NC^{Ser}，hsa-tRNA^{Ser}-miR-34a(S-miR-34a)，NC^{Glu}和hsa-tRNA^{Glu}-miR-34a(E-miR-34a)。

- [0083] 实施例6：重组miR-34a在细胞内的加工成熟
- [0084] (1)MDA-MB-231细胞的转染
- [0085] 将细胞以10000个/孔接种于24孔板。按照Engreen(Entranster™-R4000)转染试剂操作说明书进行细胞转染。重组miR-34a的转染浓度为50nM。
- [0086] (2)RNA的提取(E.Z.N.A miRNA Kit,OMEGA miRNA提取试剂盒)
- [0087] 按照试剂盒说明书进行操作。所得miRNA测定浓度后，于-80℃冰箱保存备用。
- [0088] (3)荧光定量PCR(q-PCR)检测重组miR-34a在细胞内的加工成熟
- [0089] 使用TAKARA逆转录试剂盒将所提RNA反转录为cDNA。反转录条件为：37℃ 15min；80℃ 15s。取各组的cDNA为模板，以U6为内参，采用qPCR检测miR-34a在细胞中的表达量。qPCR反应条件为：95℃30s，变性；95℃10s；60℃30s，44个循环。所用引物序列如表2(其中的序列见SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.5、SEQ ID NO.6、SEQ ID NO.7、SEQ ID NO.8、SEQ ID NO.9、SEQ ID NO.10、SEQ ID NO.11、SEQ ID NO.12、SEQ ID NO.13、SEQ ID NO.14、SEQ ID NO.15、SEQ ID NO.16)。
- [0090] 表2重组miR-34a逆转录及Q-PCR检测中所用引物序列

引物名称	序列 (5'to3')
Stem-loop	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTC GCACTGGATACGACACAACC
U6	Fow- ACGTAGCTCAGTTGGTTAGAGCAG Rev- AAAATATGGAACGCTTCACGAA
Mature-miR-34a	Fow- CACGCATGGCAGTGTCTT Rev- CCAGTGCAGGGTCCGAGGTA
18S	Fow-ACGTAGCTCAGTTGGTTAGAGCAG Rev- AAAATATGGAACGCTTCACGAA
tRNA ^{Met}	Fow-ACGTAGCTCAGTTGGTTAGAGCAG Rev-GTGGCTACGACGGGATTCGA
tRNA ^{Ser}	Fow-GGCAGTGTCTTAGCTGGTTG Rev-GCAGCACTTCTAGGGCAGTAT
tRNA ^{Glu}	Fow-GGCAGTGTCTTAGCTGGTTG Rev-GCAGCACTTCTAGGGCAGTAT

- [0091] 如图4所示，与Mock组相比，E-miR-34a和NC^{Glu}中hsa-tRNA^{Glu}支架均显著表达。其他两种tRNA支架的表达也表现出一致的趋势，证明，三种重组小RNA能成功转染细胞。
- [0092] 图5是本发明利用qPCR技术检测重组miR-34a在MDA-MB-231细胞中的加工和成熟(数值以“均值±标准差”表示)。与Mock组相比，三组重组miR-34a中成熟miR-34a水平均显著升高；与NC^{Glu}组相比，E-miR-34a转染后细胞表达miR-34a成熟体水平显著升高，且其显著高于另外两种重组miR-34a(M-miR-34a和S-miR-34a)，3个tRNA支架对照与Mock组相比无显著性差异。因此，结果表明，利用新型人源化tRNA支架hsa-tRNA^{Glu}携带miR-34a构建的重组miR-34a能够成功转染至细胞，且在细胞中被加工成熟。
- [0093] 实施例7：hsa-tRNA^{Glu}-miR-34a抑制MDA-MB-231的IC₅₀值测定。
- [0094] 使用细胞增殖毒性检测试剂盒CCK8检测重组miR-34a对乳腺癌细胞MDA-MB-231细胞增殖及活力的作用，具体实验操作如下：

- [0095] (1)接种细胞至96孔板中，每孔细胞 3.5×10^3 个，每组设6个重复孔，放置于细胞培养箱中培养；
- [0096] (2)等待细胞贴壁后按照实验分组：Blank、Mock、NC^{Glu}、E-miR-34a、NC^{Ser}、S-miR-34a、NC^{Met}、M-miR-34a进行RNA的转染；
- [0097] (3)72h后，加入10% CCK8检测液，37℃培养箱培养2h；
- [0098] (4)轻微振荡孔板，酶标仪机器检测450nm处各孔的吸光度值，进行数据分析。
- [0099] 如图6和表3，其中E-miR-34a组的IC₅₀值为51.44nM<SmiR-34a的IC₅₀值(56.39nM)<M-miR-34a的IC₅₀值(60.39nM)，结果表明E-miR-34a能发挥最强的抑制乳腺癌细胞MDA-MB-231的效果；三种tRNA支架对照组的IC₅₀值均较大，结果排序为：NC^{Met}(111.9nM)<NC^{Ser}(116nM)<NC^{Glu}(118.9nM)，表明tRNA支架在细胞增殖方面作用效果弱于相应的重组miR-34a。每对重组RNA的IC₅₀比值为IC₅₀平移值(IC₅₀shift)，其大于1.5即认为出现明显的IC₅₀平移，E-miR-34a与NC^{Glu}的IC₅₀0平移值为2.31，S-miR-34a与NC^{Ser}的IC₅₀平移值为2.06，M-miR-34a与NC^{Met}的IC₅₀平移值为1.825，这提示重组miR-34a相较于其tRNA支架对照均能产生更显著的抑制效果，即miR-34a嵌合于三种tRNA支架均具有生物活性，证明生物合成重组小RNA策略具有普适性，并且E-miR-34a与NC^{Glu}的IC₅₀平移值最大，证明miR-34a与hsa-tRNA^{Glu}组合的活性最佳，发挥更好的效果。

[0100] 表3重组miR-34a抑制MDA-MB-231细胞的IC₅₀值

	IC ₅₀ (nM)
E-miR-34a	51.44±1.0261
NC ^{Glu}	118.9±1.0556
M-miR -34a	60.39±1.0430
NC ^{Met}	111.9±1.0189
S-miR -34a	56.39±1.0337
NC ^{Ser}	116.0±1.0260

- [0101] 实施例8：重组miR-34a中has-tRNA^{Glu}支架与miR-34a的协同作用
- [0102] Chou-Talalay是目前被广泛认可的药物协同作用定量分析方法。两药联合指数的公式 $CI = \frac{(D)1}{(Dx)1} + \frac{(D)2}{(Dx)2}$ 式中D为单用剂量，Dx为联用剂量。
- [0103] 通过对CCK8获得的量-效关系数据进行药物联合作用定性和定量描述。使用CompuSyn软件根据公式计算出CI值，通过CI值大小可以定量判断药物间相互作用的强度以及性质(CI>1为拮抗作用，CI=1为相加作用，CI<1为协同作用)，与此同时，CompuSyn软件会根据所得数据绘制等价剂量效应比的Fa-CI图，可以直观地判断联用药物效果的变化趋势。图7分析结果表明，E-miR-34a的CI值<1，证明has-tRNA^{Glu}支架与miR-34a具有强协同效果。
- [0104] 实施例9：hsa-tRNA^{Glu}-miR-34a对MDA-MB-231细胞增殖能力的影响
- [0105] 克隆形成实验是利用结晶紫染液对细胞克隆团进行染色与计数的实验方法，能够反应细胞的增殖能力，具体操作步骤如下：
- [0106] (1)按照实验分组：Blank，Mock，NC^{Met}，M-miR-34a，NC^{Ser}，S-miR-34a，NC^{Glu}，G-miR-34a，化学合成的miR-34a前体与成熟体，进行RNA转染，转染后12h后，将细胞消化、吹打并重悬，每孔500个MDA-MB-231细胞接种于6孔板中，每组3个重复孔；
- [0107] (2)观察细胞状态，每3天换一次液，直到出现克隆团，该过程大概需要14天左右；
- [0108] (3)对细胞进行固定后，接着利用结晶紫溶液进行染色；
- [0109] (4)扫描拍照，并对细胞克隆团数量进行计数。
- [0110] 图8结果表明，与化学合成miR-34a成熟体相比，各组生物合成重组miR-34a的细胞克隆形成均显著减少，表明生物活性重组miR-34a活性强于化学合成miR-34a，细胞克隆团数量排序为E-miR-34a<S-miR-34a<M-miR-34a，说明E-miR-34a抑制细胞的增殖最强。NC^{Met}、NC^{Ser}和NC^{Glu}也有一定的抑制细胞克隆形成的能力，其中NC^{Glu}的效果更强。同时，结果显示三种重组miR-34a的效果均优于其对应的tRNA支架对照组，证明miR-34a与tRNA支架嵌合，具有协同抑制细胞增殖的作用。

- [0111] 实施例10: hsa-tRNA^{Glu}-miR-34a对MDA-MB-231细胞凋亡的作用
- [0112] 细胞凋亡早期和晚期阶段公认的最佳生化标志是半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(caspases)的激活, Caspase3是半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶家族中一个进化保守的成员, 在细胞凋亡中起着明确的作用, 细胞凋亡的分子机制是由属于Caspase3的蛋白水解酶触发的。当可诱导的Caspase3裂解并激活成Cleaved-Caspase-3时, 进入细胞核内将染色体DNA以核小体为单位切成梯状片段, 就会发生细胞凋亡的进展。因此, 检测Cleaved-Caspase-3对检测细胞凋亡很重要。按照实验分组对细胞进行RNA转染后, 进行免疫荧光染色, 并在荧光显微镜下检测各组细胞中Cleaved Caspase-3蛋白的表达(图9)。
- [0113] (1)细胞爬片: 将细胞接种至提前放置了14mm玻片的24孔板中, 待细胞贴壁并恢复细胞正常形态后, 按照实验分组进行RNA转染, 培养48h, 弃去原培养基, 使用预热的PBS清洗2次, 预热的4%多聚甲醛固定15min;
- [0114] (2)PBS清洗3次, 每次3min;
- [0115] (3)使用0.5% Triton-X100孵育10min;
- [0116] (4)使用0.1% Triton-X100清洗3次, 每次5min;
- [0117] (5)使用封闭液封闭10min;
- [0118] (6)遵照抗体说明书, 用封闭液按照相应倍数稀释抗体, 每孔加入80 μL抗体稀释液, 4℃过夜孵育;
- [0119] (7)0.1% Triton-X100清洗3次, 每次5min;
- [0120] (8)按照说明书要求使用封闭液以相应倍数稀释带有荧光标记的二抗, 每孔加入80 μL抗体稀释液, 避光孵育2h;
- [0121] (9)0.1% Triton-X100清洗3次, 每次5min;
- [0122] (10)使用PBS稀释Hoechst至5 μg/mL, 每孔加入100 μL, 室温下染色10min;
- [0123] (11)0.1% Triton-X100清洗3次, 每次5min;
- [0124] (12)取出细胞爬片, 细胞朝下, 使用封片剂将其固定在载玻片上;
- [0125] (13)两周内完成荧光显微镜下拍照, 防止荧光淬灭。
- [0126] 实验结果表明, 生物合成重组miR-34a及对应的tRNA支架对照均有不同程度的荧光强度, 荧光由强至弱排序为: E-miR-34a>NC^{Glu}>M-miR-34a>NC^{Met}>

S-miR-34a>NC^{Ser}，其中E-miR-34a和NC^{Glu}的荧光强度最强且多出现在核内，表明E-miR-34a和NC^{Glu}具有明显上调caspase-3的作用，能够更有效的促进细胞凋亡，并且重组miR-34a的上调效果均优于各组tRNA支架对照组，验证了tRNA支架与miR-34a具有协同治疗效果。而Blank、Mock、化学合成miR-34a前体和化学合成miR-34a成熟体组中，无明显荧光信号，提示生物合成重组miR-34a上调Cleaved Caspase-3的能力优于化学合成miR-34a。

[0127] 实施例11：hsa-tRNA^{Glu}-miR-34a对MDA-MB-231细胞迁移的作用

[0128] 划痕愈合实验是一种简单的用于研究细胞体外迁移的方法之一，该方法模拟了细胞在体内愈合过程中的迁移过程，基本步骤为在细胞单层中创建一个“创口”，在细胞迁移过程中定期捕获图像以及比较图像来确定细胞迁移速率。

[0129] (1)使用Marker笔在24孔板底部笔直地划两条横线，将孔均匀地分为3部分，用于后续拍照定位；

[0130] (2)在划过线的孔板中接种70%左右的细胞，按照分组进行RNA转染；

[0131] (3)细胞单层长满孔板底部后便使用枪头垂直底部横线划线，使用预热的PBS清洗去除脱落的细胞，加入不含血清的培养基，放入细胞培养箱中继续培养；

[0132] (4)划线后0h，24h，在光学显微镜下拍照，使用Image J软件计算细胞迁移率。

[0133] 实验结果显示(图10)，与Blank组相比，化学合成miR-34a前体、化学合成miR-34a成熟体、NC^{Met}、M-miR-34无明显抑制细胞迁移作用；与NC^{Met}相比，另外两种tRNA支架对照组(NC^{Ser}，NC^{Glu})具有显著抑制细胞迁移作用，其中NC^{Glu}效果最佳，提示has-tRNA^{Glu}支架具有较强抑制细胞迁移的作用；对于重组miR-34a，抑制迁移能力排序如下E-miR-34a>S-miR-34a>M-miR-34a，E-miR-34a的抑制迁移能力最佳；并且S-miR-34a迁移抑制作用强于NC^{Ser}，E-miR-34a迁移抑制作用强于NC^{Glu}，再次提示，miR-34a与活性tRNA支架结合能够具有协同增效。

[0134] 实施例12：hsa-tRNA^{Glu}-miR-34a对MDA-MB-231细胞侵袭的调控

[0135] Transwell侵袭实验是检测肿瘤细胞侵袭能力最常用的实验方法，其原理是用一层聚碳酸酯膜将高营养的培养液和低营养的培养液隔开，细胞接种到低营养的培养液里，膜孔被Matrigel覆盖，模仿细胞外基质，肿瘤细胞必须分泌水解酶并

通过变形运动才能穿过铺有Matrigel的滤膜，计数进入下室的细胞量可反应肿瘤细胞的侵袭能力。

[0136] (1)将稀释后的Matrigel加于transwell小室上层的膜上，于37℃培养箱中静置0.5-1h使其凝固，下室加入500 μ L完全培养基；

[0137] (2)将预先转染好RNA的细胞消化，用不含血清的培养基重悬，取100 μ L细胞悬液加入上室，注意上室和下室之间不要出现气泡，放入细胞培养箱里继续培养；

[0138] (3)培养18h后，取出小室，弃去上清，用棉签轻轻擦去小室内侧未侵袭的细胞；使用PBS清洗小室，4%多聚甲醛固定15min；

[0139] (4)弃去固定液，使用0.1%结晶紫染色液对小室下层细胞进行染色10min，PBS洗涤3次，等待小室干燥后，在光学显微镜下拍照。

[0140] 实验结果表明(图11)，与Mock组相比，化学合成miR-34a前体、化学合成miR-34a成熟体、NC^{Met}和M-miR-34a均无明显抑制细胞侵袭作用。hsa-tRNA^{Glu}(NC^{Glu})和hsa-tRNA^{Ser}(NC^{Ser})支架能够显著抑制MDA-MB-231细胞的侵袭，并且其对应的重组miR-34a(S-miR-34a和E-miR-34a)具有更强的抑制侵袭能力，验证了tRNA支架嵌合miR-34a具有协同疗效，并且E-miR-34a和NC^{Glu}的抑制能力最佳，同时也说明生物合成miR-34a效果优于化学合成miR-34a。

[0141] 实施例13：hsa-tRNA^{Glu}-miR-34a对乳腺癌原位动物模型小鼠的治疗作用

[0142] 为进一步在动物水平探究E-miR-34a的治疗效果，我们构建了乳腺癌原位小鼠肿瘤模型，并给与了治疗。

[0143] 将 5×10^6 稳定表达GFP和luciferase的MDA-MB-231细胞注射至8-9周大的BALB/C nu雌性小鼠乳房垫内(第四对乳腺)，构建乳腺癌原位动物模型。建模10天后，按照肿瘤的体积大小将小鼠随机分成7组，分别为生理盐水组(saline)、NC^{Met}组、NC^{Ser}组、NC^{Glu}组、M-miR-34a组、S-miR-34a组，E-miR-34a组，每组小鼠数量为8只，并给与每组相应的药物治疗。每三天给药1次，共给药6次，给药剂量根据小鼠体重按照1mg/kg进行给药。治疗过程中对肿瘤的体积进行监测，同时在治疗结束后对原位肿瘤的活体成像荧光信号强度进行检测，评估重组小RNA动物水平的治疗效果。实验结果显示(图12A，小动物活体成像，图12

B, 生物发光信号强度统计分析), 与Saline组相比, NC^{Met} 组小鼠肿瘤处的生物发光信号强度无显著变化, 其余5组小鼠肿瘤处的生物发光信号强度均显著下降; 与 NC^{Met} 组相比, 另外两种tRNA支架对照(NC^{Ser} 、 NC^{Glu})组小鼠肿瘤处的生物发光信号强度显著下调, 其中 NC^{Glu} 治疗效果最好, 提示has-tRNA^{Glu}支架具有抑制肿瘤生长的作用; 对于重组miR-34a, 小鼠肿瘤处的生物发光信号强度排序 $\text{E-miR-34a} < \text{S-miR-34a} < \text{M-miR-34a}$, E-miR-34a治疗效果最佳; 同时E-miR-34a组的生物发光信号强度低于 NC^{Glu} 组, 即E-miR-34a动物水平的治疗效果强于 NC^{Glu} , 提示在动物水平, miR-34a与活性tRNA支架结合同样具有协同增效的作用。

[0144] 以上所述, 仅是本发明的较佳实施例, 并非对本发明做任何限制, 凡是根据发明技术实质对以上实施例所作的任何简单修改、变更以及等效结构变化, 均仍属于本发明技术方案的保护范围内。

权利要求书

- [权利要求 1] 一种利用活性tRNA在大肠杆菌中嵌合表达重组小RNA的方法，其特征在于，包括：以活性tRNA嵌合功能型miRNA前体为支架，在大肠杆菌中表达目标小RNA。
- [权利要求 2] 根据权利要求1所述的一种利用活性tRNA在大肠杆菌中嵌合表达重组小RNA的方法，其特征在于，所述小RNA为长度小于200nt的RNA。
- [权利要求 3] 根据权利要求1所述的一种利用活性tRNA在大肠杆菌中嵌合表达重组小RNA的方法，其特征在于，所述tRNA的序列为与人谷氨酸tRNA序列相似度达90%以上的序列，人谷氨酸tRNA序列为SEQ ID NO.2。
- [权利要求 4] 根据权利要求3所述的一种利用活性tRNA在大肠杆菌中嵌合表达重组小RNA的方法，其特征在于，所述miRNA前体的序列为与hsa-miR-34a前体序列相似度达90%以上的序列，hsa-miR-34a前体序列为SEQ ID NO.3。
- [权利要求 5] 根据权利要求4所述的一种利用活性tRNA在大肠杆菌中嵌合表达重组小RNA的方法，其特征在于，所述miRNA前体嵌合于tRNA反密码子环处，嵌合序列为与SEQ ID NO.1序列相似度达90%以上的序列。
- [权利要求 6] 根据权利要求5所述的一种利用活性tRNA在大肠杆菌中嵌合表达重组小RNA的方法，其特征在于，包括以下步骤：
步骤一、利用pBSMrnaSeph质粒在tRNA反密码子环处具有的酶切位点，将hsa-miR-34a前体的表达序列插入pBSMrnaSeph质粒中，构建表达载体；
步骤二、将构建的表达载体中miR-34a的成熟序列部分替换为目标小RNA序列，构建嵌合目标序列的表达载体；将嵌合目标序列的表达载体转化感受态大肠杆菌；

步骤三、大肠杆菌培养扩增后，用饱和酚法提取菌内总RNA，以FPLC分离纯化目标小RNA。

[权利要求 7] 根据权利要求1、2、3、4、5或6所述的一种利用活性tRNA在大肠杆菌中嵌合表达重组小RNA的方法，其特征在于，所述小RNA为shRNA、miRNA、siRNA或RNA适配体。

[权利要求 8] 根据权利要求6所述的一种利用活性tRNA在大肠杆菌中嵌合表达重组小RNA的方法，其特征在于，步骤二中所述大肠杆菌为HST08或DH5 α 菌株。

[权利要求 9] 根据权利要求6所述的一种利用活性tRNA在大肠杆菌中嵌合表达重组小RNA的方法，其特征在于，步骤三中大肠杆菌采用TB培养基培养，培养至OD为1.1~1.7，饱和酚法提取菌内总RNA所用饱和酚的体积与菌泥的质量之比为(2~6):1，其中体积单位为mL，质量的单位为g。

[权利要求 10] 一种采用如权利要求1、2、3、4、5或6所述的一种利用活性tRNA在大肠杆菌中嵌合表达重组小RNA的方法生产的重组小RNA在制备诊断试剂、科研试剂、前药、药物、原料药或药物组合物中的应用。