(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 102363781 A
(43)申请公布日 2012.02.29

(21)申请号 201110317490.4

(22)申请日 2011.10.19

(71)申请人 海南大学
地址 570228 海南省海口市人民大道58号

(72)发明人 王凤阳 杜丽 雷明 焦寒伟
成鹰 张冬琳 郝永昌

(74)专利代理机构 西安弘理专利事务所 61214
代理人 罗笛

(51)Int.Cl.
C12N 15/113(2010.01)
C12N 15/10(2006.01)
C12Q 1/68(2006.01)
G01N 33/53(2006.01)

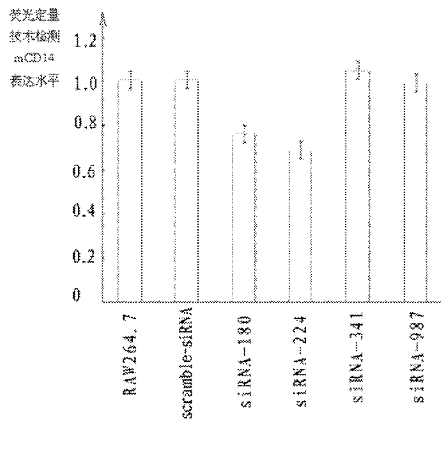
权利要求书 3 页 说明书 7 页
序列表 1 页 附图 2 页

(54)发明名称

一种有效抑制小鼠mCD14基因表达的小干扰核糖核酸分子

(57)摘要

本发明的一种能有效抑制小鼠mCD14基因表达的小干扰核糖核酸分子，其核糖核酸分子序列信息是：正义，gggcaguucacugauauuatt(5'-3')，反义，uaauaucagugaacugcccctt(5'-3')，其通过生物学方法筛选得到的步骤是：合成不同的针对膜结合型白细胞分化抗原14的小干扰核糖核酸分子；按照高效转染试剂操作方法，将这些小干扰核糖核酸分子转染小鼠巨噬细胞；实时荧光定量聚合酶链式反应，检测膜结合型白细胞分化抗原14信使核糖核酸的表达水平；进行蛋白质印迹检测膜结合型白细胞分化抗原14蛋白表达水平以确定干扰效果；最后筛选得到了本发明的小干扰核糖核酸分子。本发明的小干扰核糖核酸分子，能特异且高效阻断膜结合型白细胞分化抗原14蛋白表达。



CN 102363781 A

1. 一种能有效抑制小鼠 mCD14 基因表达的小干扰核糖核酸分子，其特征在于，其基因序列是：

正义，gggcaguucacugauauuatt(5’-3’)，

反义，uaauaucagugaacugccctt(5’-3’)。

2. 一种能有效抑制小鼠 mCD14 基因表达的小干扰核糖核酸分子的生物学用途，其特征在于，该小干扰核糖核酸分子的基因序列是：

正义，gggcaguucacugauauuatt(5’-3’)，

反义，uaauaucagugaacugccctt(5’-3’)，

该小干扰核糖核酸分子能够有效抑制小鼠 mCD14 基因表达。

3. 一种能有效抑制小鼠 mCD14 基因表达的小干扰核糖核酸分子的生物学筛选方法，其特征在于，该筛选方法按照以下步骤实施：

步骤 1、根据膜结合型白细胞分化抗原 14 基因的序列，按照小干扰核糖核酸分子合成的基本原则，合成多个不同的针对膜结合型白细胞分化抗原 14 的小干扰核糖核酸分子，选理论值最好的四对进行实验；

步骤 2、按照高效转染试剂操作说明书的方法，将四对小干扰核糖核酸分子转染小鼠巨噬细胞 RAW264.7，具体步骤是：

2.1) 用 200 微升完全培养基将 5×10^5 个细胞铺于 12 孔板内；

2.2) 分别用 100 微升无血清的 Opti-MEM Ⅰ培养基稀释 2 微升浓度为 20 微摩尔浓度的小干扰核糖核酸分子，用 100 微升无血清的 Opti-MEM Ⅰ培养基稀释 9 微升高效转染试剂转染试剂，

将两个稀释物混合，充分搅拌均匀后形成转染复合物，在室温放置 5-10 分钟；

2.3) 将上步得到的转染复合物滴入细胞培养孔内，与小鼠巨噬细胞 RAW264.7 混合，十字形轻摇以混合均匀，放入二氧化碳培养箱培养；

2.4) 在培养箱 37℃培养 6 小时后，添加 700 微升杜比克改良伊格氏完全培养基；

步骤 3、实时荧光定量聚合酶链式反应，检测膜结合型白细胞分化抗原 14 信使核糖核酸的表达水平，具体的步骤是：

转染 48 小时后，吸出培养液，用磷酸盐缓冲液洗涤细胞层 1-2 次，用 0.125％的胰酶进行常规消化，收集细胞，根据核糖核酸提取试剂盒说明书分离出高品质的总核糖核酸；并测定纯化的核糖核酸浓度，采用溴化乙锭染色电泳鉴定其完整性；使用第一链试剂盒合成互补脱氧核糖核酸；采用 ABI-7500 系统，使用荧光定量聚合酶链式反应试剂盒，利用比较 CT 法来测定膜结合型白细胞分化抗原 14 的表达水平，所用引物为，

针对膜结合型白细胞分化抗原 14：

上游引物为：5′ -AACTCGCTCAATCTGTCTTTCAC-3′，

下游引物为：5′ -GCTCATCTGGGCTAGGGTTC-3′；

针对甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶：

上游引物为：5′ -TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3′，

下游引物为：5′ -CCTGCTTCACCACCTTCTTGA-3′，

按照能特异抑制小鼠膜结合型白细胞分化抗原 14mRNA 水平，抑制效率为最佳的标准，筛选小干扰核糖核酸分子；

步骤 4、进行蛋白质印迹检测膜结合型白细胞分化抗原 14 蛋白表达水平以确定干扰效果，具体步骤是：

转染 48 小时后，吸出培养液，磷酸盐缓冲液洗涤细胞层 1-2 次，0.125％的胰酶常规消化，收集细胞；

根据细胞沉淀的多少，依次加入：

细胞裂解液 50 毫摩尔浓度的三羟甲基氨基甲烷盐酸盐、

150 纳摩尔浓度氯化钠、

1％聚乙二醇辛基苯基醚、

0.2％叠氮钠、

0.5％脱氧胆酸钠、

10 微克／毫升抑肽酶 aprotinin、

1 微克／毫升苯甲基磺酰氟；

利用二喹林甲酸蛋白测定试剂盒测定总蛋白浓度，将总蛋白等量上样，在 12％的分离胶的浓度下进行聚丙烯酰胺凝胶电泳，电泳完毕后进行蛋白质印迹，采用的抗体是，

一抗为：兔抗膜结合型白细胞分化抗原 14 多克隆抗体，1 ∶ 300 倍稀释，兔抗甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶单抗，1 ∶ 1000 倍稀释；

二抗为：辣根过氧化物酶标记山羊抗兔免疫球蛋白 G，1 ∶ 1000 倍稀释，

按照小干扰核糖核酸分子能特异抑制小鼠膜结合型白细胞分化抗原 14 蛋白表达，抑制效率最佳的标准，筛选得到了下述的小干扰核糖核酸分子，能特异且高效阻断膜结合型白细胞分化抗原 14 蛋白表达，该小干扰核糖核酸分子序列信息是：

正义，gggcaguucacugauauuatt(5’-3’)，

反义，uaauaucagugaacugccctt　(5’-3’)。

4. 根据权利要求 3 所述的能有效抑制小鼠 mCD14 基因表达的小干扰核糖核酸分子的生物学筛选方法，其特征在于，所述的合成小干扰核糖核酸分子 (siRNAs) 基本原则包括以下几种：

1)GC 含量 30％ -52％；

2)sense 链的 15-19 碱基中至少含有 3 个 A/U；

3) 不含有反向重复序列；

4)sense 链的第 19 碱基为 A；

5)sense 链的第 3 碱基为 A；

6)sense 链的第 10 碱基为 U；

7)sense 链的第 19 碱基不是 G/C；

8)sense 链的第 13 碱基不是 G。

5. 根据权利要求 3 所述的能有效抑制小鼠 mCD14 基因表达的小干扰核糖核酸分子的生物学筛选方法，其特征在于，

步骤 1 中的针对膜结合型白细胞分化抗原 14 合成的四对小干扰核糖核酸分子序列是，

起始位点	正义（5’-3’）	反义(5’-3’)
阴性对照	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT	ACGUGACACGUUCGGAGAATT
180号	GCCUGGAAUACCUUCUAAATT	UUUAGAAGGUAUUCCAGGCTT
224号	GGGCAGUUCACUGAUAUUATT	UAAUAUCAGUGAACUGCCCTT
341号	CAGGAACUGACUCUUGAAATT	UUUCAAGAGUCAGUUCCUGTT
987号	CCCACUCGGAGAAGUUUAATT	UUAAACUUCUCCGAGUGGGTT

。

一种有效抑制小鼠 mCD14 基因表达的小干扰核糖核酸分子

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术中的基因表达、核糖核酸干扰和检测技术领域，具体涉及一种有效抑制小鼠 mCD14 基因表达的小干扰核糖核酸分子；本发明还涉及该种有效抑制小鼠 mCD14 基因表达的小干扰核糖核酸分子的生物学筛选方法。

背景技术

[0002] 白细胞分化抗原 14(cluster of differentiation antigen，CD14) 是一种存在于单核细胞、巨噬细胞等细胞表面的分化抗原，为体内介导脂多糖 (lipopolysaccharide，LPS) 生物效应的重要受体之一。白细胞分化抗原 14(CD14) 包括膜结合型白细胞分化抗原 14(membrane bound CD14，mCD14) 和可溶性白细胞分化抗原 14(soluble CD14，sCD14) 两种形式：膜结合型白细胞分化抗原 14(mCD14) 是分子量为 55 千道尔顿 (KD) 的糖蛋白，其 C- 末端借助糖基磷酯酰肌醇 (glucose phosphatidylinositol，GPI) 结构锚附于细胞膜表面；可溶性白细胞分化抗原 14(sCD14) 分子有 49KD 和 55KD 两种形式，缺乏糖基磷酯酰肌醇 (GPI) 锚。膜结合型白细胞分化抗原 14(mCD14) 是由含有白细胞分化抗原 14(CD14) 基因的单核细胞、巨噬细胞，自行转录、翻译蛋白质多肽链，在高尔基复合体内糖化后，其羧基端再与磷酯酰肌醇 (phosphatidylinositol，PI) 结合，并由磷酯酰肌醇的磷脂部分与细胞膜连接。生理条件下，膜结合型白细胞分化抗原 14(mCD14) 主要表达于成熟的单核巨噬细胞，微弱表达于中性粒细胞、肾小球膜细胞、乳房细胞和 B 细胞，介导脂多糖 (lipopolysaccharide，LPS) 对这些细胞的激活作用。

[0003] 内毒素是革兰氏阴性菌细胞外膜的组成部分，其主要成分为脂多糖 (LPS)，脂多糖一旦进入体内，将诱导机体产生多种炎症介质的反应，导致机体的严重损伤。在革兰氏阴性细菌引起的炎症反应过程中，脂多糖受体起着关键作用，是脂多糖作用的重要门户。白细胞分化抗原 14(CD14) 被认为是脂多糖信号转导中最重要的脂多糖受体，白细胞分化抗原 14(CD14) 在介导脂多糖激活靶细胞及炎症反应中起关键作用；研究表明，通过抑制白细胞分化抗原 14(CD14) 破坏脂多糖所激活的靶细胞炎症反应是一个可行的治疗方法。

[0004] 核糖核酸干扰 (RNA interference，RNAi) 是指由特定双链核糖核酸 (double stranded RNA，dsRNA) 引发同源信使核糖核酸 (messenger RNA，mRNA) 降解的转录后基因静默机制，这类特定双链核糖核酸被裂解成小干扰核糖核酸分子 (siRNAs)，并能导致同源信使核糖核酸 (mRNA) 在核糖核酸诱导的静默复合体 (RNA-induced silencing complex，RISC) 作用下降解。核糖核酸干扰 (RNAi，Ribonucleic acid interference)RNA 是目前简单而高效地阻断哺乳动物细胞内特异基因表达的最有效方法之一，可达到基因敲除效果，且安全性好。但对于核糖核酸干扰 (RNAi) 来说，并不是所有针对靶基因信使核糖核酸 (mRNA) 序列随机合成的小干扰核糖核酸分子 (siRNAs) 都能引起有效的基因沉默，干扰靶序列的选择对干扰效率的影响是至关重要的。因此，对能有效抑制特异基因表达的小干扰核糖核酸分子 (siRNAs) 的筛选是应用核糖核酸干扰 (RNAi) 技术进行基因功能、基因治疗等相关研究的重要基础。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种有效抑制小鼠 mCD14 基因表达的小干扰核糖核酸分子，能够有效、特异性的抑制小鼠 mCD14 基因表达，解决了现有靶基因 mRNA 序列随机合成的 siRNA 并不都能引起有效基因沉默的问题。

[0006] 本发明的另一目的是提供一种有效抑制小鼠 mCD14 基因表达的小干扰核糖核酸分子的生物学筛选方法。

[0007] 本发明所采用的技术方案是，一种能有效抑制小鼠 mCD14 基因表达的小干扰核糖核酸分子，其基因序列是：

[0008] 正义，gggcaguucacugauauuatt(5’-3’)，

[0009] 反义，uaauaucagugaacugcccctt(5’-3’)。

[0010] 本发明所采用的另一技术方案是，一种能有效抑制小鼠 mCD14 基因表达的小干扰核糖核酸分子的生物学筛选方法，该筛选方法按照以下步骤实施：

[0011] 步骤 1、根据膜结合型白细胞分化抗原 14 基因的序列，按照小干扰核糖核酸分子合成的基本原则，合成多个不同的针对膜结合型白细胞分化抗原 14 的小干扰核糖核酸分子，选理论值最好的四对进行实验；

[0012] 步骤 2、按照高效转染试剂操作说明书的方法，将四对小干扰核糖核酸分子转染小鼠巨噬细胞 RAW264.7，具体步骤是：

[0013] 2.1) 用 200 微升完全培养基将 5×10^5 个细胞铺于 12 孔板内；

[0014] 2.2) 分别用 100 微升无血清的 Opti-MEM I 培养基稀释 2 微升浓度为 20 微摩尔浓度的小干扰核糖核酸分子，用 100 微升无血清的 Opti-MEM I 培养基稀释 9 微升高效转染试剂转染试剂，

[0015] 将两个稀释物混合，充分搅拌均匀后形成转染复合物，在室温放置 5-10 分钟；

[0016] 2.3) 将上步得到的转染复合物滴入细胞培养孔内，与小鼠巨噬细胞 RAW264.7 混合，十字形轻摇以混合均匀，放入二氧化碳培养箱培养；

[0017] 2.4) 在培养箱 37℃培养 6 小时后，添加 700 微升杜比克改良伊格氏完全培养基；

[0018] 步骤 3、实时荧光定量聚合酶链式反应，检测膜结合型白细胞分化抗原 14 信使核糖核酸的表达水平，具体的步骤是：

[0019] 转染 48 小时后，吸出培养液，用磷酸盐缓冲液洗涤细胞层 1-2 次，用 0.125％的胰酶进行常规消化，收集细胞，根据核糖核酸提取试剂盒说明书分离出高品质的总核糖核酸；并测定纯化的核糖核酸浓度，采用溴化乙锭染色电泳鉴定其完整性；使用第一链试剂盒合成互补脱氧核糖核酸；采用 ABI-7500 系统，使用荧光定量聚合酶链式反应试剂盒，利用比较 CT 法来测定膜结合型白细胞分化抗原 14 的表达水平，所用引物为，

[0020] 针对膜结合型白细胞分化抗原 14：

[0021] 上游引物为：5′ -AACTCGCTCAATCTGTCTTTCAC-3′，

[0022] 下游引物为：5′ -GCTCATCTGGGCTAGGGTTC-3′；

[0023] 针对甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶：

[0024] 上游引物为：5′ -TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3′，

[0025] 下游引物为：5′ -CCTGCTTCACCACCTTCTTGA-3′，

[0026]　按照能特异抑制小鼠膜结合型白细胞分化抗原 14mRNA 水平，抑制效率为最佳的标准，筛选小干扰核糖核酸分子；

[0027]　步骤 4、进行蛋白质印迹检测膜结合型白细胞分化抗原 14 蛋白表达水平以确定干扰效果，具体步骤是：

[0028]　转染 48 小时后，吸出培养液，磷酸盐缓冲液洗涤细胞层 1-2 次，0.125％的胰酶常规消化，收集细胞；

[0029]　根据细胞沉淀的多少，依次加入：

[0030]　细胞裂解液 50 毫摩尔浓度的三羟甲基氨基甲烷盐酸盐、

[0031]　150 纳摩尔浓度氯化钠、

[0032]　1％聚乙二醇辛基苯基醚、

[0033]　0.2％叠氮钠、

[0034]　0.5％脱氧胆酸钠、

[0035]　10 微克／毫升抑肽酶 aprotinin、

[0036]　1 微克／毫升苯甲基磺酰氟；

[0037]　利用二喹林甲酸蛋白测定试剂盒测定总蛋白浓度，将总蛋白等量上样，在 12％的分离胶的浓度下进行聚丙烯酰胺凝胶电泳，电泳完毕后进行蛋白质印迹，采用的抗体是，

[0038]　一抗为：兔抗膜结合型白细胞分化抗原 14 多克隆抗体，1 ∶ 300 倍稀释，兔抗甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶单抗，1 ∶ 1000 倍稀释；

[0039]　二抗为：辣根过氧化物酶标记山羊抗兔免疫球蛋白 G，1 ∶ 1000 倍稀释，

[0040]　按照小干扰核糖核酸分子能特异抑制小鼠膜结合型白细胞分化抗原 14 蛋白表达，抑制效率最佳的标准，筛选得到了下述的小干扰核糖核酸分子，能特异且高效阻断膜结合型白细胞分化抗原 14 蛋白表达，该小干扰核糖核酸分子序列信息是：

[0041]　正义，gggcaguucacugauauuatt(5’-3’)，

[0042]　反义，uaauaucagugaacugccctt　(5’-3’)。

[0043]　本发明的有益效果是，根据膜结合型白细胞分化抗原 14 基因的序列，合成四对不同的针对膜结合型白细胞分化抗原 14 的小干扰核糖核酸分子 (siRNAs)，再应用高效转染试剂将四对小干扰核糖核酸分子 (siRNAs) 转染小鼠单核巨噬细胞 (RAW264.7)，实时荧光定量聚合酶链式反应技术检测膜结合型白细胞分化抗原 14 信使核糖核酸 (mRNA) 表达水平、蛋白质印迹检测膜结合型白细胞分化抗原 14 蛋白表达量，以确定干扰效果，从而筛选出一种能够有效抑制小鼠 mCD14 基因表达的小干扰核糖核酸分子 (siRNA)，为开展靶向小鼠膜结合型白细胞分化抗原 14 基因表达的基因功能、基因治疗等相关研究提供依据。

附图说明

[0044]　图 1 是本发明筛选过程中的实时荧光定量聚合酶链式反应 (real time PCR) 检测转染小干扰核糖核酸分子 (siRNAs) 后，膜结合型白细胞分化抗原 14(mCD14) 信使核糖核酸 (mRNA) 的表达水平图；

[0045]　图 2 是本发明筛选过程中的蛋白质印迹 (western blot) 检测转染小干扰核糖核酸分子 (siRNAs) 后膜结合型白细胞分化抗原 14(mCD14) 蛋白表达量的变化图。

具体实施方式

[0046] 下面结合附图和具体实施方式对本发明进行详细说明。

[0047] 本发明的目的是提供一种有效抑制小鼠 mCD14 基因表达的小干扰核糖核酸分子，其序列信息表达为：

[0048] 正义，GGGCAGUUCACUGAUAUUATT(5’-3’)，

[0049] 反义，UAAUAUCAGUGAACUGCCCTT(5’-3’)。

[0050] 本发明的上述的小干扰核糖核酸分子(siRNAs)，能够有效抑制膜结合型白细胞分化抗原 14(mCD14) 基因表达，该小干扰核糖核酸分子(siRNAs)按照生物学方法筛选的步骤是，

[0051] 步骤 1、根据膜结合型白细胞分化抗原 14(mCD14) 基因的序列，按照以下基本原则合成小干扰核糖核酸分子(siRNAs)：

[0052] 1)GC 含量 30％ -52％；

[0053] 2)sense 链的 15-19 碱基中至少含有 3 个 A/U；

[0054] 3) 不含有反向重复序列；

[0055] 4)sense 链的第 19 碱基为 A；

[0056] 5)sense 链的第 3 碱基为 A；

[0057] 6)sense 链的第 10 碱基为 U；

[0058] 7)sense 链的第 19 碱基不是 G/C；

[0059] 8)sense 链的第 13 碱基不是 G，

[0060] 现有技术条件下，根据相关理论能够合成许多个不同的针对膜结合型白细胞分化抗原 14(mCD14) 的小干扰核糖核酸分子(siRNAs)，但是所合成制作出来的并不全有效，本发明实施例特别针对膜结合型白细胞分化抗原 14(mCD14) 合成的四对小干扰核糖核酸分子(siRNAs)序列，如表 1 所示，由上海吉玛制药技术有限公司进行了试验性合成，合成出来后，保藏条件是，置于焦碳酸二乙酯(DEPC，diethypyrocarbonate)DEPC 水中，-20℃保存，以下选取理论值最好的该四对小干扰核糖核酸分子(siRNAs)进行筛选，并进行实验证明；

[0061] 表 1 小干扰核糖核酸分子(siRNAs)序列

[0062]

起始位点	正义 (5’-3’)	反义(5’-3’)
阴性对照	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT	ACGUGACACGUUCGGAGAATT
180号	GCCUGGAAUACCUUCUAAATT	UUUAGAAGGUAUUCCAGGCTT
224号	GGGCAGUUCACUGAUAUUATT	UAAUAUCAGUGAACUGCCCTT
341号	CAGGAACUGACUCUUGAAATT	UUUCAAGAGUCAGUUCCUGTT
987号	CCCACUCGGAGAAGUUUAATT	UUAAACUUCUCCGAGUGGGTT

[0063] 步骤 2、按照高效转染试剂(HiPerfect)操作说明书的方法，将四对小干扰核糖核酸分子(siRNAs)转染小鼠巨噬细胞(RAW264.7)，具体步骤是：

[0064] 2.1) 用 200 微升(ul)完全培养基将 5×10^5 个细胞铺于 12 孔板内；

[0065] 2.2) 分别用 100 微升(ul)无血清的 Opti-MEM I 培养基稀释 2 微升(ul)浓度为

20 微摩尔浓度 (uM) 的小干扰核糖核酸分子 (siRNAs),用 100 微升 (ul) 无血清的 Opti-MEM I 培养基稀释 9 微升 (ul) 高效转染试剂 (HiPerfect) 转染试剂,将两个稀释物混合,充分搅拌均匀后形成转染复合物,在室温放置 5-10 分钟 ;

[0066] 2.3) 将上步得到的转染复合物滴入细胞培养孔内,与小鼠巨噬细胞 (RAW264.7) 混合,十字形轻摇以混合均匀,放入二氧化碳培养箱培养 ;

[0067] 2.4) 在培养箱 37℃培养 6 小时后,添加 700 微升 (ul) 杜比克改良伊格氏完全培养基 (Dulbecco′s Modified Eagle′s Medium,DMEM) ;

[0068] 步骤 3、转染 48 小时后,实时荧光定量聚合酶链式反应 (real time PCR),技术检测膜结合型白细胞分化抗原 14(mCD14) 信使核糖核酸 (mRNA) 的表达水平,具体的步骤是 :

[0069] 转染 48 小时后,吸出培养液,用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤细胞层 1-2 次,用 0.125%的胰酶进行常规消化,收集细胞,根据核糖核酸提取试剂盒 (PureLink TM RNA Mini Kit) 说明书分离出高品质的总核糖核酸 (RNA) ;并测定纯化的核糖核酸 (RNA) 浓度,采用溴化乙锭染色电泳鉴定其完整性 ;使用第一链试剂盒 (M-MLV first strand Kit) 合成互补脱氧核糖核酸 (cDNA) ;采用 ABI-7500 系统,使用荧光定量聚合酶链式反应试剂盒 (Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG Kit),利用比较 CT 法来测定膜结合型白细胞分化抗原 14 的 (mCD14) 表达水平,所用引物为,

[0070] 针对膜结合型白细胞分化抗原 14(mCD14) :

[0071] 上游引物为 :5′-AACTCGCTCAATCTGTCTTTCAC-3′,

[0072] 下游引物为 :5′-GCTCATCTGGGCTAGGGTTC-3′ ;

[0073] 针对甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) :

[0074] 上游引物为 :5′-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3′,

[0075] 下游引物为 :5′-CCTGCTTCACCACCTTCTTGA-3′,

[0076] 结果见图 1,图 1 中的横坐标是所使用的小干扰核糖核酸分子 (siRNAs) 及对照物, scramble-siRNA 是相对 mCD14 无关的非特异小干扰核糖核酸分子,纵坐标是荧光强度的相对值。图 1 中的实时荧光定量聚合酶链式反应 (real time PCR) 分析结果表明 :224 号小干扰核糖核酸分子 (siRNA) 能特异抑制小鼠膜结合型白细胞分化抗原 14mRNA 水平,抑制效率为 30%。

[0077] 步骤 4、进行蛋白质印迹 (western blot) 检测膜结合型白细胞分化抗原 14(mCD14) 蛋白表达水平以确定干扰效果,具体步骤是 :

[0078] 转染 48 小时后,吸出培养液,磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤细胞层 1-2 次,0.125%的胰酶常规消化,收集细胞 ;根据细胞沉淀的多少,依次加入 :

[0079] 细胞裂解液 50 毫摩尔浓度 (mM) 的三羟甲基氨基甲烷盐酸盐 (Tris-HCL)(pH8.0)、

[0080] 150 纳摩尔浓度 (nM) 氯化钠 (NaCl)、

[0081] 1%聚乙二醇辛基苯基醚 (TritonX-100)、

[0082] 0.2%叠氮钠 (Sodium azide)、

[0083] 0.5%脱氧胆酸钠 (Sodium deoxycholate sodium deoxycholate)、

[0084] 10 微克 / 毫升 (μg/ml) 抑肽酶 (aprotinin)、

[0085] 1 微克 / 毫升 (μg/ml) 苯甲基磺酰氟 (phenylmethanesulfonyl fluoride) ;

[0086]　利用二喹林甲酸(bicinchoninic acid,BCA)蛋白测定试剂盒测定总蛋白浓度,将总蛋白等量上样,在12%的分离胶的浓度下进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),电泳完毕后进行蛋白质印迹(western blot),采用的抗体是,

[0087]　一抗为:兔抗小鼠膜结合型白细胞分化抗原14(mCD14)多克隆抗体(rabbit polyclonal anti-mCD14,1 ∶ 300倍稀释),兔抗小鼠甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)单抗(GAPDH rabbit mAB,1 ∶ 1000倍稀释);

[0088]　二抗为:辣根过氧化物酶标记山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)(HRP labeled goat anti-rabbit IgG,1 ∶ 1000倍稀释),

[0089]　结果见图2,图2中的上半图是蛋白质印迹(western blot)结果图;图2中的下半段的横坐标是所使用的小干扰核糖核酸分子(siRNAs)及对照,纵坐标是根据蛋白质印迹(western blot)实验获得的条带灰度经软件分析换算成的蛋白表达量相对值。图2中的蛋白质印迹(western blot)分析结果表明:224号小干扰核糖核酸分子(siRNA)能特异抑制小鼠膜结合型白细胞分化抗原14蛋白表达,抑制效率约为50%.

[0090]　图1、图2中的实验数据显示了通过筛选发现的224号是四种小干扰核糖核酸分子中最有效的一种,该224号小干扰核糖核酸分子(siRNAs)在信使核糖核酸(mRNA)和蛋白水平的抑制效率分别达到30%和50%,这个比例是根据图1和图2的纵坐标的值得出的。

[0091]　综上所述,将上述的四对针对膜结合型白细胞分化抗原14(mCD14)基因的小干扰核糖核酸分子(siRNAs),转染小鼠单核巨噬细胞(RAW264.7),根据步骤3和步骤4的结果,根据经小干扰核糖核酸分子(siRNAs)处理后,膜结合型白细胞分化抗原14(mCD14)的信使核糖核酸(mRNA)和蛋白水平的降低的多少,最终从四对小干扰核糖核酸分子中筛选得到了本发明的,能特异且高效阻断膜结合型白细胞分化抗原14(mCD14)蛋白表达的224号小干扰核糖核酸分子(siRNAs),224号小干扰核糖核酸分子(siRNAs)序列信息是:

[0092]　正义,GGGCAGUUCACUGAUAUUATT(5’-3’),

[0093]　反义,UAAUAUCAGUGAACUGCCCTT (5’-3’)。

[0094]　本发明实施例中的224号(试验序号为224号)小干扰核糖核酸分子(siRNAs),为研究CD14在免疫及炎症反应中作用的分子机制,应用核糖核酸干扰(RNAi)技术通过干预膜结合型白细胞分化抗原14(mCD14)的表达进行基因治疗研究提供了重要依据。

[0095]　附录是本发明上述方法得到的小干扰核糖核酸分子(siRNAs)的基因序列计算机可读版本。

[0096]　附录:

[0097]　本发明的有效抑制小鼠mCD14基因表达的小干扰核糖核酸分子(siRNAs)的基因序列计算机可读版本是:

[0098]　<110>王凤阳

[0099]　<120>有效抑制小鼠mCD14基因表达的小干扰核糖核酸分子

[0100]　<160>1

[0101]　<210>1

[0102]　<211>21

[0103]　<212>RNA

[0104]　<213>小鼠

[0105] <400>1

[0106] gggcaguuca cugauauuat t 21

[0001]

本发明的有效抑制小鼠 mCD14 基因表达的小干扰核糖核酸分子(siRNAs)的基因序列计算机可读版本是：

<110> 王凤阳

<120> 有效抑制小鼠 mCD14 基因表达的小干扰核糖核酸分子

<160> 1

<210> 1

<211> 21

<212> RNA

<213> 小鼠

<400> 1

gggcaguuca cugauauuat t 21

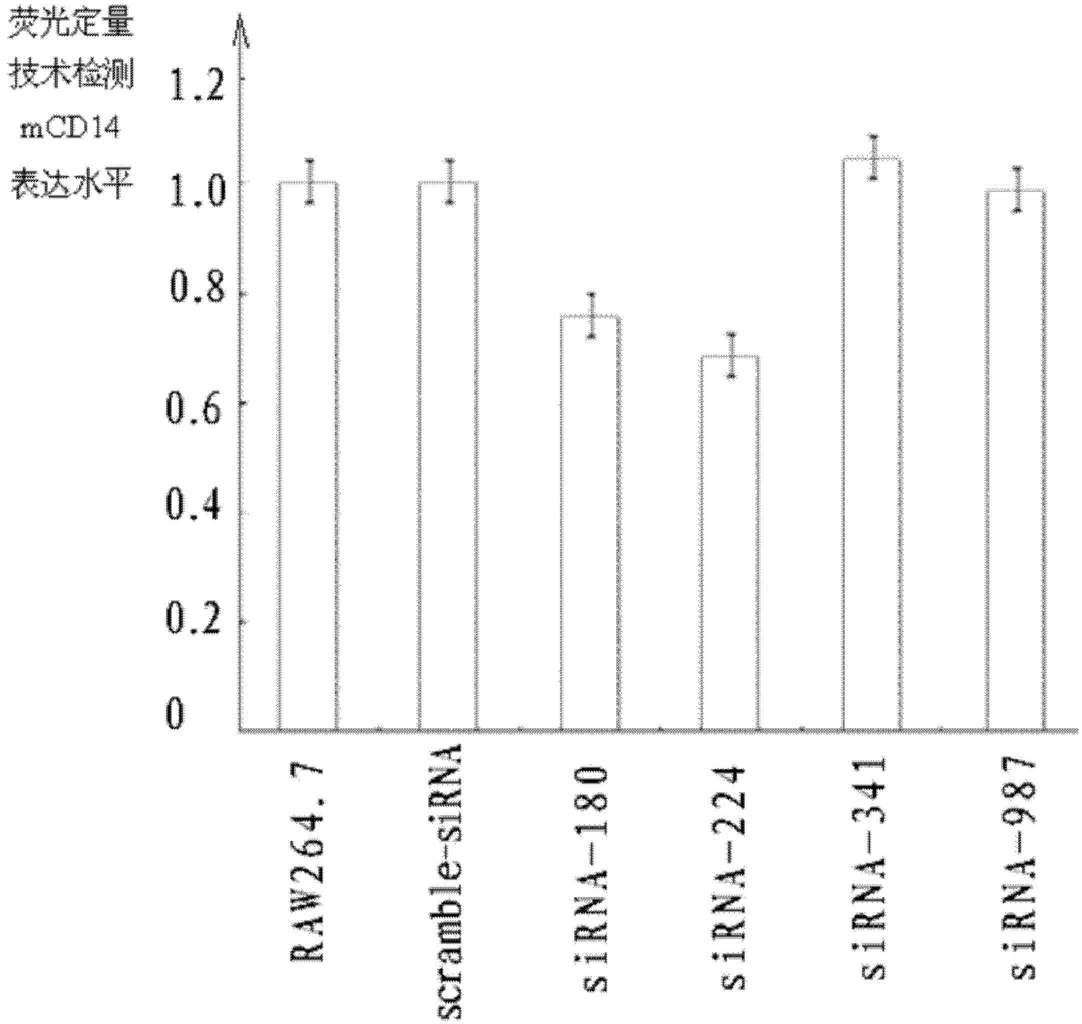

荧光定量
技术检测
mCD14
表达水平
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0
RAW264.7
scramble-siRNA
siRNA-180
siRNA-224
siRNA-341
siRNA-987

图 1

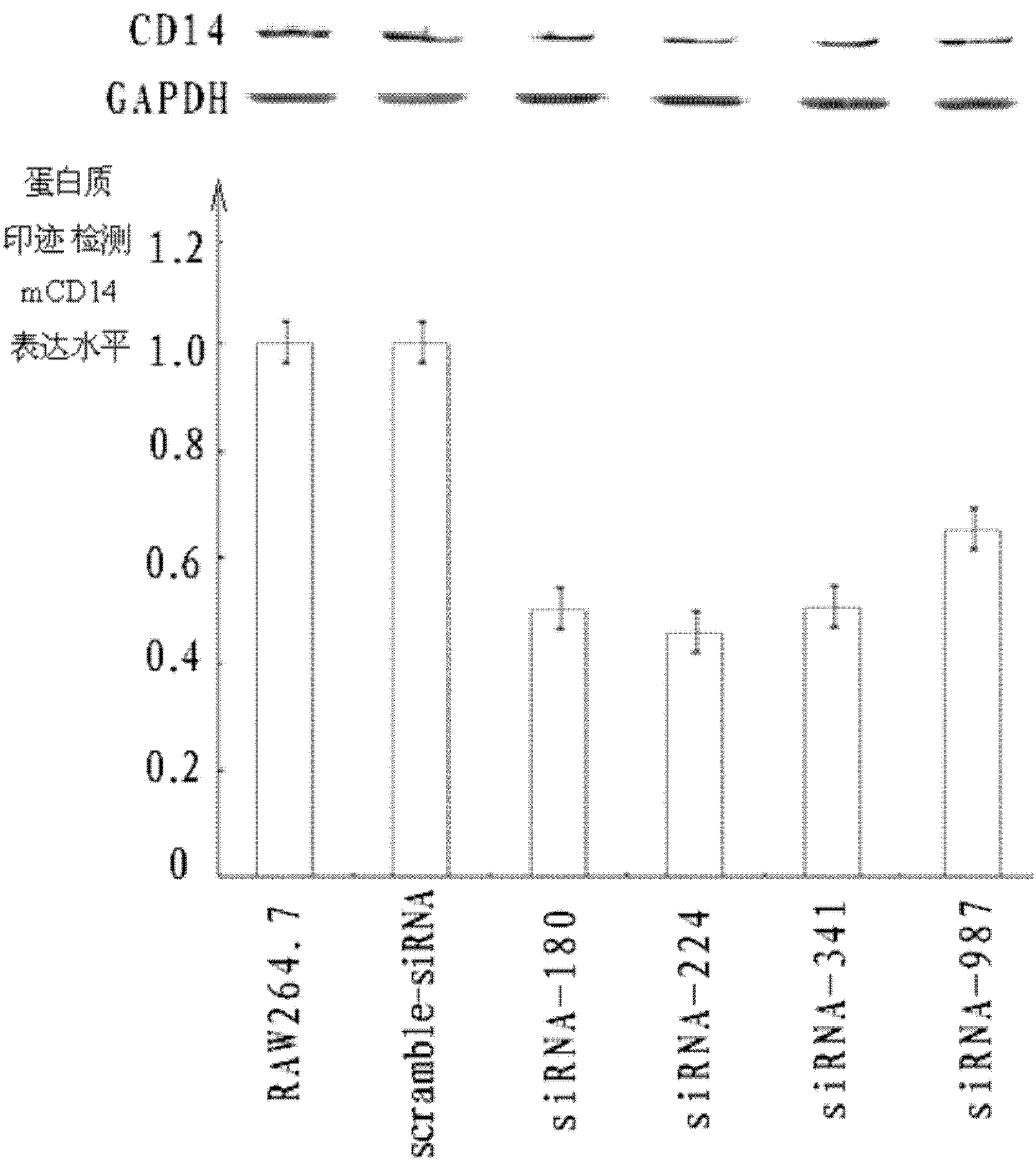

CD14
GAPDH
蛋白质
印迹 检测
mCD14
表达水平
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0
RAW264.7
scramble-siRNA
siRNA-180
siRNA-224
siRNA-341
siRNA-987

图 2

专利名称(译)	一种有效抑制小鼠mCD14基因表达的小干扰核糖核酸分子		
公开(公告)号	CN102363781A	公开(公告)日	2012-02-29
申请号	CN201110317490.4	申请日	2011-10-19
[标]申请(专利权)人(译)	海南大学		
申请(专利权)人(译)	海南大学		
当前申请(专利权)人(译)	海南大学		
[标]发明人	王凤阳 杜丽 雷明 焦寒伟 成鹰 张冬琳 郝永昌		
发明人	王凤阳 杜丽 雷明 焦寒伟 成鹰 张冬琳 郝永昌		
IPC分类号	C12N15/113 C12N15/10 C12Q1/68 G01N33/53		
代理人(译)	罗笛		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明的一种能有效抑制小鼠mCD14基因表达的小干扰核糖核酸分子，其核糖核酸分子序列信息是：正义，gggcaguucacugauauuatt(5'-3')，反义，uaauaucagugaacugccctt(5'-3')，其通过生物学方法筛选得到的步骤是：合成不同的针对膜结合型白细胞分化抗原14的小干扰核糖核酸分子；按照高效转染试剂操作方法，将这些小干扰核糖核酸分子转染小鼠巨噬细胞；实时荧光定量聚合酶链式反应，检测膜结合型白细胞分化抗原14信使核糖核酸的表达水平；进行蛋白质印迹检测膜结合型白细胞分化抗原14蛋白表达水平以确定干扰效果；最后筛选得到了本发明的小干扰核糖核酸分子。本发明的小干扰核糖核酸分子，能特异且高效阻断膜结合型白细胞分化抗原14蛋白表达。