

(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 103705945 A

(43) 申请公布日 2014. 04. 09

(21) 申请号 201310731175. 5

(22) 申请日 2013. 12. 26

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所  
地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号

(72) 发明人 王会文 姬广聚 唐迎龙

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅

(51) Int. Cl.

*A61K 48/00* (2006. 01)

*A61P 21/00* (2006. 01)

*C12N 15/113* (2010. 01)

*C12N 15/11* (2006. 01)

*C12N 15/63* (2006. 01)

权利要求书2页 说明书7页  
序列表9页 附图2页

### (54) 发明名称

CUG-BP1 蛋白或其基因在制备调控治疗肌肉萎缩疾病产品中的应用

### (57) 摘要

本发明公开了 CUG-BP1 蛋白或其基因在制备调控治疗肌肉萎缩疾病产品中的应用。本发明提供了沉默 CUG-BP1 蛋白或其编码基因表达的物质在制备治疗肌肉萎缩疾病产品中的应用；所述 CUG-BP1 蛋白的氨基酸序列为序列表中的序列 7。本发明的实验证明，本发明通过沉默切神经诱导的小鼠肌肉萎缩模型小鼠中 CUG-BP1 蛋白，发现肌肉萎缩程度降低，说明沉默该蛋白或其编码基因表达可以降低肌肉萎缩，而用于沉默该蛋白或其编码基因表达的物质可以用来制备治疗肌肉萎缩疾病的产品。

1. 沉默 CUG-BP1 蛋白或其编码基因表达的物质在制备治疗肌肉萎缩疾病产品中的应用 ;所述 CUG-BP1 蛋白的氨基酸序列为序列表中的序列 10。

2. 根据权利要求 1 所述的应用,其特征在于:

所述沉默 CUG-BP1 蛋白或其编码基因表达的物质为如下 1)-3) 中任一种:

1) shRNA1 或 shRNA2 ;

2) 编码 shRNA1 的 DNA 分子或编码 shRNA2 的 DNA 分子;

3) 含有编码 shRNA1 的 DNA 分子的重组载体、表达盒、转基因细胞系或重组菌;

或含有编码 shRNA2 的 DNA 分子的重组载体、表达盒、转基因细胞系或重组菌;

所述 shRNA1 的核苷酸序列为序列表中的序列 1 ;

所述 shRNA2 的核苷酸序列为序列表中的序列 4。

3. 根据权利要求 2 所述的应用,其特征在于:

所述含有编码 shRNA1 的 DNA 分子的重组载体为将所述编码 shRNA1 的 DNA 分子插入表达载体中得到的重组载体;

所述含有编码 shRNA2 的 DNA 分子的重组载体为将所述编码 shRNA1 的 DNA 分子插入表达载体中得到的重组载体。

4. 根据权利要求 3 所述的应用,其特征在于:所述表达载体为 pSIREN-RetroQ。

5. 根据权利要求 2-4 中任一所述的应用,其特征在于:所述编码 shRNA1 的 DNA 分子为由单链 DNA 分子 1 和单链 DNA 分子 2 退火得到的双链 DNA 分子;

所述编码 shRNA2 的 DNA 分子为由单链 DNA 分子 3 和单链 DNA 分子 4 退火得到的双链 DNA 分子;

所述单链 DNA 分子 1 的核苷酸序列为序列表中的序列 2 ;

所述单链 DNA 分子 2 的核苷酸序列为序列表中的序列 3 ;

所述单链 DNA 分子 3 的核苷酸序列为序列表中的序列 5 ;

所述单链 DNA 分子 4 的核苷酸序列为序列表中的序列 6 ;

所述 CUG-BP1 蛋白的编码基因的核苷酸序列为序列表中的序列 11。

6. 根据权利要求 1-5 中任一所述的应用,其特征在于:所述产品为药物。

7. 一种沉默 CUG-BP1 蛋白或其编码基因表达的物质,为如下 1)-3) 中任一种:

1) shRNA1 或 shRNA2 ;

2) 编码 shRNA1 的 DNA 分子或编码 shRNA2 的 DNA 分子;

3) 含有编码 shRNA1 的 DNA 分子的重组载体、表达盒、转基因细胞系或重组菌;

或含有编码 shRNA2 的 DNA 分子的重组载体、表达盒、转基因细胞系或重组菌;

所述 shRNA1 的核苷酸序列为序列表中的序列 1 ;

所述 shRNA2 的核苷酸序列为序列表中的序列 4 ;

所述 CUG-BP1 蛋白的氨基酸序列为序列表中的序列 10。

8. 根据权利要求 7 所述的物质,其特征在于:

所述含有编码 shRNA1 的 DNA 分子的重组载体为将所述编码 shRNA1 的 DNA 分子插入表达载体中得到的重组载体;

所述含有编码 shRNA2 的 DNA 分子的重组载体为将所述编码 shRNA1 的 DNA 分子插入表达载体中得到的重组载体。

9. 根据权利要求 8 所述的物质,其特征在于:所述表达载体为 pSIREN-RetroQ;  
所述编码 shRNA1 的 DNA 分子为由单链 DNA 分子 1 和单链 DNA 分子 2 退火得到的双链 DNA 分子;  
所述编码 shRNA2 的 DNA 分子为由单链 DNA 分子 3 和单链 DNA 分子 4 退火得到的双链 DNA 分子;  
所述单链 DNA 分子 1 的核苷酸序列为序列表中的序列 2;  
所述单链 DNA 分子 2 的核苷酸序列为序列表中的序列 3;  
所述单链 DNA 分子 3 的核苷酸序列为序列表中的序列 5;  
所述单链 DNA 分子 4 的核苷酸序列为序列表中的序列 6;  
所述 CUG-BP1 蛋白的编码基因的核苷酸序列为序列表中的序列 11。
10. CUG-BP1 蛋白或其编码基因作为靶点在开发、设计或制备具有治疗肌肉萎缩疾病功能的产品中的应用。

## CUG-BP1 蛋白或其基因在制备调控治疗肌肉萎缩疾病产品中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,尤其涉及一种 CUG-BP1 蛋白或其基因在制备调控治疗肌肉萎缩疾病产品中的应用。

### 背景技术

[0002] 骨骼肌是人体最大的组织,骨骼肌的收缩和放松活动是人体运动功能的基础。骨骼肌的基本组成单位是骨骼肌细胞,骨骼肌细胞是一种特殊的多核细胞,呈纤维状,因此俗称骨骼肌纤维。骨骼肌纤维的类型、形态、数量以及代谢状态直接决定其运动能力。肌肉萎缩症(Muscular dystrophy, MD),指一组损坏人体肌肉的疾病。肌肉萎缩症表现为进行性骨骼肌萎缩,肌肉蛋白质缺失,和肌肉细胞或组织的死亡。随着肌肉萎缩发病率的逐年上升,受关注度也在不断提升。

[0003] 肌肉萎缩可以分为不同的类型:(1)按发病机理分类:由全身营养障碍,废用,内分泌异常而引起的肌肉变性,肌肉结构异常等病因产生的肌肉萎缩;遗传、中毒、代谢异常、感染、变态反应等引起的肌肉萎缩。(2)根据肌肉萎缩分布分类:全身弥漫性肌肉萎缩;头面部肌肉萎缩;头和上肢或上下肢近端肌肉萎缩;上下肢远端肌肉萎缩;局限性肌肉萎缩。(3)根据导致肌肉萎缩的原发病变分类:神经原性肌肉萎缩;肌原性肌肉萎缩;废用性肌肉萎缩。

[0004] 肌肉萎缩作为一种常见疾病(并发症),肌肉萎缩治疗性研究一直为人们所关注。在康复医学领域,运动锻炼已被普遍采用。它在很大程度上对肌肉萎缩起到积极的预防和治疗作用。但是,对于一些体弱、长期卧床或肢体固定的患者,由于受身体状况等因素的影响,自身活动受限,无法实现有效的运动锻炼,最终还是不可避免会导致骨骼肌萎缩的发生。当运动锻炼不能有效克服骨骼肌萎缩时,探索生物技术干预手段来实现有效预防和治疗就显得十分必要。

[0005] 目前,利用现代生物技术治疗肌肉萎缩方面已经取得一些进展。例如:

[0006] (1)神经干细胞移植延缓失神经肌肉萎缩;(2)近年来,Duchenne 型肌营养不良患者治疗领域有了新的进展,方法学上有所创新:外显子剪接(exon skipping)治疗。

[0007] RNA 结合蛋白(RNA binding protein)是一类通过结合特定 RNA 序列,调控 pre-mRNA 剪接的多家族、多形式的蛋白因子。通过 pre-mRNA 选择性剪接,单一的 pre-mRNA 可以形成不同的成熟 mRNA,从而发挥不同功能。最近的研究发现大约 92-94% 人类基因存在选择性剪接(Kwan et al. 2008;Wang et al. 2008)。同 DNA 转录一样,基因选择性剪接是基因表达调控的一个重要层次。CUG-BP1(cytosine-uridine-guanine-binding protein1)是一重要的 RNA 结合蛋白,通过结合富含 UG 的 pre-mRNA 序列,调控 RNA 稳定性(stability)、翻译(translation)以及剪接(splicing)等过程(Barreau et al. 2006)。

[0008] 一切神经诱导肌肉萎缩小鼠模型可以模拟临床上偏瘫、截瘫、脊髓损伤、运动神经损伤或肿瘤压迫运动神经造成的肌肉萎缩。尾部悬吊诱导肌肉萎缩的小鼠模型,模拟了长期

卧床、废用、宇航员失重引起的肌肉萎缩。

### 发明内容

[0009] 本发明的一个目的是提供沉默 CUG-BP1 蛋白或其编码基因表达的物质的应用。

[0010] 本发明提供的沉默 CUG-BP1 蛋白或其编码基因表达的物质在制备治疗肌肉萎缩疾病产品中的应用；所述 CUG-BP1 蛋白的氨基酸序列为序列表中的序列 10。

[0011] 上述应用中，所述沉默 CUG-BP1 蛋白或其编码基因表达的物质为如下 1) -3) 中任一种：

[0012] 1) shRNA1 或 shRNA2；

[0013] 2) 编码 shRNA1 的 DNA 分子或编码 shRNA2 的 DNA 分子；

[0014] 3) 含有编码 shRNA1 的 DNA 分子的重组载体、表达盒、转基因细胞系或重组菌；

[0015] 或含有编码 shRNA2 的 DNA 分子的重组载体、表达盒、转基因细胞系或重组菌；

[0016] 所述 shRNA1 的核苷酸序列为序列表中的序列 1；

[0017] 所述 shRNA2 的核苷酸序列为序列表中的序列 4。

[0018] 上述应用中，所述含有编码 shRNA1 的 DNA 分子的重组载体为将所述编码 shRNA1 的 DNA 分子插入表达载体中得到的重组载体；

[0019] 所述含有编码 shRNA2 的 DNA 分子的重组载体为将所述编码 shRNA1 的 DNA 分子插入表达载体中得到的重组载体。

[0020] 上述应用中，所述表达载体为 pSIREN-RetroQ。

[0021] 上述应用中，所述编码 shRNA1 的 DNA 分子为由单链 DNA 分子 1 和单链 DNA 分子 2 退火得到的双链 DNA 分子；

[0022] 所述编码 shRNA2 的 DNA 分子为由单链 DNA 分子 3 和单链 DNA 分子 4 退火得到的双链 DNA 分子；

[0023] 所述单链 DNA 分子 1 的核苷酸序列为序列表中的序列 2；

[0024] 所述单链 DNA 分子 2 的核苷酸序列为序列表中的序列 3；

[0025] 所述单链 DNA 分子 3 的核苷酸序列为序列表中的序列 5；

[0026] 所述单链 DNA 分子 4 的核苷酸序列为序列表中的序列 6；

[0027] 所述 CUG-BP1 蛋白的编码基因的核苷酸序列为序列表中的序列 11。

[0028] 上述应用中，所述产品为药物。

[0029] 上述应用中，所述肌肉萎缩由神经损伤引起的肌肉萎缩。

[0030] 本发明的另一个目的是提供一种沉默 CUG-BP1 蛋白或其编码基因表达的物质。

[0031] 本发明提供的物质，为如下 1) -3) 中任一种：

[0032] 1) shRNA1 或 shRNA2；

[0033] 2) 编码 shRNA1 的 DNA 分子或编码 shRNA2 的 DNA 分子；

[0034] 3) 含有编码 shRNA1 的 DNA 分子的重组载体、表达盒、转基因细胞系或重组菌；

[0035] 或含有编码 shRNA2 的 DNA 分子的重组载体、表达盒、转基因细胞系或重组菌；

[0036] 所述 shRNA1 的核苷酸序列为序列表中的序列 1；

[0037] 所述 shRNA2 的核苷酸序列为序列表中的序列 4；

[0038] 所述 CUG-BP1 蛋白的氨基酸序列为序列表中的序列 10。

- [0039] 上述物质中,所述含有编码 shRNA1 的 DNA 分子的重组载体为将所述编码 shRNA1 的 DNA 分子插入表达载体中得到的重组载体;
- [0040] 所述含有编码 shRNA2 的 DNA 分子的重组载体为将所述编码 shRNA1 的 DNA 分子插入表达载体中得到的重组载体。
- [0041] 上述物质中,所述表达载体为 pSIREN-RetroQ。
- [0042] 上述物质中,所述编码 shRNA1 的 DNA 分子为由单链 DNA 分子 1 和单链 DNA 分子 2 退火得到的双链 DNA 分子;
- [0043] 所述编码 shRNA2 的 DNA 分子为由单链 DNA 分子 3 和单链 DNA 分子 4 退火得到的双链 DNA 分子;
- [0044] 所述单链 DNA 分子 1 的核苷酸序列为序列表中的序列 2;
- [0045] 所述单链 DNA 分子 2 的核苷酸序列为序列表中的序列 3;
- [0046] 所述单链 DNA 分子 3 的核苷酸序列为序列表中的序列 5;
- [0047] 所述单链 DNA 分子 4 的核苷酸序列为序列表中的序列 6;
- [0048] 所述 CUG-BP1 蛋白的编码基因的核苷酸序列为序列表中的序列 11。
- [0049] 上述 CUG-BP1 蛋白或其编码基因作为靶点在开发、设计或制备具有治疗肌肉萎缩疾病功能的产品中的应用也是本发明保护的范畴。
- [0050] 本发明的实验证明,本发明通过沉默切神经诱导的小鼠肌肉萎缩模型小鼠中 CUG-BP1 蛋白,发现肌肉萎缩程度降低,说明沉默该蛋白或其编码基因表达可以降低肌肉萎缩,而用于沉默该蛋白或其编码基因表达的物质可以用来制备治疗肌肉萎缩疾病的产品。

#### 附图说明

- [0051] 图 1 为切神经诱导的小鼠肌肉萎缩模型中 CUG-BP1 蛋白表达检测结果图
- [0052] 图 2 为基因沉默 CUG-BP1 减轻肌肉萎缩程度。

#### 具体实施方式

- [0053] 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。
- [0054] 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。
- [0055] 本实验所用动物及实验过程获得中国科学院生物物理所实验动物的使用和护理委员会的认证许可。出生八周、体重约为 21g 的雄性 C57BL/6 小鼠购自维通利华实验动物公司。
- [0056] CUG-BP1 蛋白的氨基酸序列为序列表中的序列 10,其编码基因的核苷酸序列为序列表中的序列 11。
- [0057] 实施例 1、CUG-BP1 蛋白或其基因在调控治疗肌肉萎缩疾病中的应用
- [0058] 一、切神经小鼠肌肉萎缩模型的构建
- [0059] 小鼠腹腔注射 0.1ml5% 水合氯醛麻醉,后肢表皮除毛,皮肤表面用 75% 乙醇擦拭消毒。将小鼠两后肢用胶布固定,在后肢内侧表皮剪开 2-3mm 切口,钝性分离表皮及骨骼肌组织,直至暴露后肢总运动神经簇。将总运动神经簇剪除 2-3mm 的一段,随后立即缝合肌肉组织和表皮组织,得到切神经小鼠肌肉萎缩模型。对照组小鼠,同样暴露但不损伤后腿总运动神经簇,缝合肌肉及表皮。

[0060] 在切除小鼠后肢运动神经后的第 3, 7, 10, 14 天收集模型萎缩的肌肉样本及对照组小鼠样本。

[0061] 取 20mg 小鼠肌肉样本, 在含 1%  $\beta$ -巯基乙醇和 2% SDS 样品缓冲液中充分打碎匀浆。匀浆后的蛋白样品放于 80℃ 加热 5min, 12000rpm 离心 5min。取上清液加样于 10% 含 0.1% SDS 的变性聚丙烯酰胺凝胶, 设置 20mA 横流电泳。

[0062] 电泳后将丙烯酰胺凝胶铺于硝酸纤维素 (NC) 薄膜上, 胶和膜的两边各垫三张滤纸, 以丙烯酰胺凝胶靠近负极、NC 薄膜靠近正极的方式放置于电转槽中。将转膜槽置于冰水浴中, 设置 300mA 衡流电转 2 小时。

[0063] 转膜结束后将 NC 膜按分子量横向切开, 放置于含有 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液中封闭 1 小时。封闭结束后, 用 TBST 溶液洗膜 3 遍, 每遍 5min。洗膜结束后, 用含有 1% BSA 和 0.01%  $\text{NaN}_3$  的 TBST 溶液稀释一抗 (Anti-CUG-BP1, Eptomics; Anti-GAPDH, Invitrogen)。NC 膜放于一抗中 4℃ 孵育过夜。用 TBST 溶液洗膜 4 遍, 每遍 10min。用含有 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液封闭 30min。以 1:5000 的稀释倍数稀释二抗, 将膜放置于含有二抗的 TBST 封闭液里室温孵育 1 小时。用 TBST 溶液洗膜 4 遍, 每遍 10min。洗膜结束后, 配置 ECL 显影底物溶液, 按 1:1 的比例混合底物液。将底物溶液滴加在 NC 膜上, 将膜迅速封于塑料保鲜膜中并固定于显影暗盒中。在暗室中将 X-ray 胶片压于显影暗盒中, 显影 5-10min。依次在显影液和定影液中显影和定影, 室温晾干胶片。

[0064] 室温晾干的 X-ray 胶片用 Cannon super G3 扫描仪扫描。用 NIH imageJ 的 Analyze-gels 功能进行蛋白条带面积和灰度积分计算。计算得到的蛋白表达量由同一个样品的 GAPDH 蛋白量作为内参进行标准化。

[0065] 结果如图 1 所示, A 为 WB (western blot) 分析表明 CUG-BP1 蛋白表达 (control 为对照组小鼠, 3, 7, 10, 14 天为第 3, 7, 10, 14 天收集切神经小鼠肌肉萎缩模型小鼠萎缩的肌肉样本); B, 对 A 的统计结果 (con 为对照组小鼠, DenD3, DenD7 为第 3, 7 天收集切神经小鼠肌肉萎缩模型小鼠萎缩的肌肉样本); 可以看出, 与对照组小鼠相比, 切神经小鼠肌肉萎缩模型中 CUG-BP1 蛋白表达在萎缩发生后明显升高。

[0066] 二、基因沉默转基因小鼠的制备

[0067] 1、用于基因沉默的重组载体的构建

[0068] 利用 BLOCK-iT™ RNAi Designer (<http://rnaidesigner.lifetechnologies.com/rnaiexpress/>) 设计两个小鼠 CUG-BP1 基因沉默 shRNA 载体, 具体如下:

[0069] 合成沉默用 RNA 的基因序列:

[0070] shRNA-1 的核苷酸序列为 GCUCAACGUUCGAAGAA (序列 1);

[0071] 编码 shRNA-1 的 DNA 分子由单链 DNA 分子 1 和单链 DNA 分子 2 退火得到的双链 DNA 分子;

[0072] 单链 DNA 分子 1 的核苷酸序列为 5' GATCACGCGT GCTCAAACGTTCTGAAGAA TTCAAGAGA TTCTTCGAACGTTTGAGC TTTTTG3' (序列 2)

[0073] 单链 DNA 分子 2 的核苷酸序列为: 5' AATTCAAAAAA GCTCAAACGTTCTGAAGAA TCTCTTGAA TTCTTCGAACGTTTGAGC ACGCGT3' (序列 3)

[0074] shRNA-2 的核苷酸序列为 GAGCCAACUGUUCUAUCUA (序列 4),

[0075] 编码 shRNA-1 的 DNA 分子由单链 DNA 分子 3 和单链 DNA 分子 4 退火得到的双链

DNA 分子；

[0076] 单链 DNA 分子 3 的核苷酸序列为 5'GATCACGCGT GAGCCAACCTGTTTCATCTA TTCAAGAGA TAGATGAACAGGTTGGCTC TTTTTTG3' (序列 5)

[0077] 单链 DNA 分子 4 的核苷酸序列为 :5' AATTCAAAAA GAGCCAACCTGTTTCATCTA TCTCTTGAA TAGATGAACAGGTTGGCTC ACGCGT3' (序列 6)

[0078] eGFP 的核苷酸序列为 5' -AAAGGACGGAGGACATTAT-3' (序列 7)。

[0079] 编码 eGFP 的 DNA 分子也可以为由单链 DNA 分子 5 和单链 DNA 分子 6 退火得到的双链 DNA 分子；

[0080] 单链 DNA 分子 5 的核苷酸序列为 5'GATCACGCGT AAAGGACGGAGGACATTAT TTCAAGAGA ATAATGACCTCCGTCCTTT TTTTTTG3' (序列 8)

[0081] 单链 DNA 分子 6 的核苷酸序列为 :5' AATTCAAAAA AAAGGACGGAGGACATTAT TCTCTTGAA ATAATGACCTCCGTCCTTT ACGCGT3' (序列 9)

[0082] 上述 DNA 寡聚核苷酸为上海生物工程公司合成。

[0083] 1) 重组干扰载体

[0084] 重组干扰载体为将沉默 CUG-BP1 基因的 RNA 的基因克隆入 pSIREN-RetroQ 载体 (购自 Clontech, 产品目录号为 631526, 其中 CMV 启动子驱动下表达的红色荧光蛋白可作为质粒转化的指示), 在 U6 启动子驱动下表达, 具体如下：

[0085] 将编码 DNA 分子 1 和 DNA 分子 2 溶解于适量 10mM TE (pH8.0) 溶液中, 终浓度为 50uM。正向与反向 DNA 寡聚核苷酸在 DNA 退火缓冲液 (10uM Tris-HCl100mM NaCl1mMEDTA pH7.5) 中稀释, 至终浓度为 5uM。加热至 95℃ 5min, 1℃ /min, 缓慢降温至室温, 得到退火产物。取 1uL 退火产物通过 T<sub>4</sub>DNA 连接酶克隆入经 BamH I 和 EcoR I 酶切回收的 pSIREN-RetroQ 载体。在卡那霉素平板筛选转化链接产物的 DH5 细菌。挑取克隆斑, 摇菌, 提取质粒, 通过 MluI 和 AgeI 酶切鉴定 (得到 680bp 片段的为阳性), 得到重组干扰载体 pSIREN-RetroQ-shRNA-1。

[0086] 按照上述的方法, 将 DNA 分子 3 和 DNA 分子 4 退火后, 连入 pSIREN-RetroQ 载体, 得到重组干扰载体 pSIREN-RetroQ-shRNA-2 (MluI 和 AgeI 酶切鉴定, 得到 680bp 片段的为阳性)。

[0087] 2) 对照重组载体

[0088] 按照上述的方法, 将 DNA 分子 5 和 DNA 分子 6 退火后, 连入 pSIREN-RetroQ 载体,

[0089] 按照上述的方法, 将 DNA 分子 5 和 DNA 分子 6 退火后, 连入 pSIREN-RetroQ 载体, 得到克隆入 pSIREN-RetroQ, 构建对照载体 pSIREN-RetroQ-eGFP (MluI 和 AgeI 酶切鉴定, 得到 680bp 片段的为阳性)。

[0090] 2、电击法转化外源质粒 DNA 入 FDB 肌肉组织

[0091] 小鼠脚掌 FDB (Flexor digitorum brevis) 肌肉组织电激转化外源质粒 DNA 的方法是参照 Di Franco, M. 等人的文献进行, 将上述 1 制备的重组干扰载体 pSIREN-RetroQ-shRNA-1、pSIREN-RetroQ-shRNA-2 和对照载体 pSIREN-RetroQ-eGFP, 均电击导入切神经小鼠肌肉萎缩模型小鼠的脚掌 FDB 肌肉组织。

[0092] 具体如下：

[0093] 体重 21g 小鼠腹腔注射 0.1ml15% 水合氯醛麻醉。用针头直径为 0.33mm (29.5gauge)



的胰岛素注射器向小鼠脚掌皮下组织注射 30  $\mu$  l 2mg/ml 透明质酸酶。将小鼠放回鼠笼中，等候 1 小时。用胰岛素注射器将 20  $\mu$  g (体积不超过 40  $\mu$  l) 质粒注射进小鼠脚掌皮下组织。轻轻揉捏小鼠脚掌 10min，以保证含有质粒 DNA 的溶液在骨骼肌组织中扩散均匀，充分。将用电极固定于小鼠脚掌两端。按照下列电脉冲参数由程控电刺激器对小鼠脚掌电击：

[0094] 电脉冲波形：方波；电压强度：100volts/cm；电脉冲时程：20ms；电脉冲频率：1Hz；重复次数：20。

[0095] 电击结束后将小鼠放回鼠笼中，得到转基因小鼠。

[0096] 上述 1 制备的重组干扰载体 pSIREN-RetroQ-shRNA-1 转入切神经小鼠肌肉萎缩模型小鼠，得到基因沉默转 shRNA-1 小鼠；

[0097] 上述 1 制备的重组干扰载体 pSIREN-RetroQ-shRNA-2 转入切神经小鼠肌肉萎缩模型小鼠，得到基因沉默转 shRNA-2 小鼠；

[0098] 上述 1 制备的对照载体 pSIREN-RetroQ-eGFP 转入切神经小鼠肌肉萎缩模型小鼠，得到对照转基因小鼠。

[0099] 3、鉴定

[0100] 将上述 2 得到的 3 种转基因小鼠腹腔注射 0.1ml 5% 水合氯醛麻醉，切除小鼠脚掌皮肤，钝性分离 FDB 肌肉组织。

[0101] 取 20mg 小鼠肌肉样本，在含 1%  $\beta$ -巯基乙醇和 2% SDS 样品缓冲液中充分打碎匀浆。匀浆后的蛋白样品放于 80 $^{\circ}$ C 加热 5min，12000rpm 离心 5min。取上清液加样于 10% 含 0.1% SDS 的变性聚丙烯酰胺凝胶，设置 20mA 横流电泳。

[0102] 电泳后将丙烯酰胺凝胶铺于硝酸纤维素 (NC) 薄膜上，胶和膜的两边各垫三张滤纸，以丙烯酰胺凝胶靠近负极、NC 薄膜靠近正极的方式放置于电转槽中。将转膜槽置于冰水浴中，设置 300mA 衡流电转 2 小时。

[0103] 转膜结束后将 NC 膜按分子量横向切开，放置于含有 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液中封闭 1 小时。封闭结束后，用 TBST 溶液洗膜 3 遍，每遍 5min。洗膜结束后，用含有 1% BSA 和 0.01%  $\text{NaN}_3$  的 TBST 溶液稀释一抗 (Anti-CUG-BP1, Eptomics; Anti-GAPDH, Invitrogen)。NC 膜放于一抗中 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。用 TBST 溶液洗膜 4 遍，每遍 10min。用含有 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液封闭 30min。以 1:5000 的稀释倍数稀释二抗，将膜放置于含有二抗的 TBST 封闭液里室温孵育 1 小时。用 TBST 溶液洗膜 4 遍，每遍 10min。洗膜结束后，配置 ECL 显影底物溶液，按 1:1 的比例混合底物液。将底物溶液滴加在 NC 膜上，将膜迅速封于塑料保鲜膜中并固定于显影暗盒中。在暗室中将 X-ray 胶片压于显影暗盒中，显影 5-10min。依次在显影液和定影液中显影和定影，室温晾干胶片。

[0104] 如图 2C 所示，Denerv. +Con-shRNA 为对照转基因小鼠，Denerv. +GUG-BP1shRNA1 为基因沉默转 shRNA-1 小鼠，看出，与对照组 (eGFP) 相比，基因沉默转 shRNA-1 小鼠中的 CUG-BP1 蛋白表达明显降低。

[0105] 基因沉默转 shRNA-2 小鼠中的 CUG-BP1 蛋白表达与基因沉默转 shRNA-1 小鼠一样均明显降低。三、基因沉默转基因小鼠的的肌肉组织研究

[0106] 利用小鼠骨骼肌成像计算肌纤维横截面积的分布，具体如下：

[0107] 转基因 10 天后分别将基因沉默转 shRNA-1 小鼠、基因沉默转 shRNA-2 小鼠、对照转基因小鼠和切神经小鼠肌肉萎缩模型小鼠剥离 FDB 肌肉组织，用 Leca SP5 共聚焦显微

镜,在 543nm 激光下激发 DsRed 蛋白红色荧光。对 FDB 肌肉组织扫描成像。长度标尺由显微镜成像软件自动计算生成。

[0108] 肌纤维的宽度用 NIH imageJ 软件先计算成像素单位,然后换算为  $\mu\text{m}^2$  为单位的面积单位。数据录入到 Excel 软件中,统计实验对照组与 CUG-BP1 基因沉默组肌纤维直径的变化。实验重复 3 次,结果取平均值  $\pm$  标准差。

[0109] 结果如图 2A 所示,激光共聚焦成像分析 FDB 肌肉纤维细胞,可以看出,与切神经小鼠肌肉萎缩模型小鼠(Den+DsRed)相比,基因沉默转 shRNA-1 小鼠(Den+RNAi+CUGBP1)的 FDB 肌纤维细胞萎缩程度明显降低;

[0110] 具体统计如图 2B 所示,为对 A 的统计结果;切神经小鼠肌肉萎缩模型小鼠(Den+DsRed)FDB 肌纤维直径为  $24.8 \pm 0.9$  微米;基因沉默转 shRNA-1 小鼠(Den+RNAi+CUGBP1)肌纤维直径为  $29.7 \pm 0.6$  微米;

[0111] 转 shRNA-2 小鼠中的 FDB 肌纤维细胞萎缩程度与转 shRNA-1 小鼠结果无显著差异,与切神经小鼠肌肉萎缩模型小鼠(Den+DsRed)相比,一样均明显降低。

[0112] 上述结果表明基因沉默转 shRNA-1 小鼠、转 shRNA-2 小鼠均明显抑制肌肉萎缩。

[0001]

## 序列表

<110>	中国科学院生物物理研究所	
<120>	CUG-BP1 蛋白或其基因在制备调控治疗肌肉萎缩疾病产品中的应用	
<160>	11	
<210>	1	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>		
<400>	1	
	gcucaaacgu ucgaagaa	18
<210>	2	
<211>	62	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>		
<400>	2	
	gatcacgcgt gctcaaact tcgaagaatt caagagattc ttcgaacggt tgagcttttt	60
	tg	62
<210>	3	
<211>	62	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>		
<400>	3	

## [0002]

aattcaaaaa agctcaaacg ttcgaagaat ctcttgaatt cttcgaacgt ttgagcacgc 60

gt 62

<210> 4

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 4

gagccaaccu guucaucua 19

<210> 5

<211> 64

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 5

gatcacgegt gagccaacct gttcatctat tcaagagata gatgaacagg ttggctcttt 60

tttg 64

<210> 6

<211> 64

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

## [0003]

<400> 6  
 aattcaaaaa agageccaacc tgttcateta tctcttgaat agatgaacag gttggctcac 60

gcgt 64

<210> 7

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 7

aaaggacgga ggacattat 19

<210> 8

<211> 64

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 8

gatcacgcgt aaaggacgga ggacattatt tcaagagaat aatgacctcc gtcctttttt 60

tttg 64

<210> 9

<211> 64

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

[0004]

<223>		
<400>	9	
aattcaaaaa	aaaaggacgg	aggacattat tctcttgaaa taatgacctc cgtcctttac 60
gcgt		64
<210>	10	
<211>	1461	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>		
<400>	10	
atgaacggca	ccctggacca	ccagaccaa ccagatcttg atgctatcaa gatgtttgtg 60
ggccaggttc	caaggacctg	gtctgaaaag gacttgcggg aactcttcga acagtatggt 120
getgtgtatg	aaatcaacgt	cctaagggat aggagccaaa acccgctca gagcaaaggg 180
tgctgttttg	ttacatttta	caccgtaaa gctgcattag aagctcagaa tgetcttcac 240
aacatgaaag	tcctcccagg	gatgcatcac cctatacaga tgaaacctgc tgacagtgag 300
aagaacaatg	cagtggaaga	caggaagctg tttatttgta tgatttccaa gaagtgcact 360
gaaaatgaca	tccgagtcac	gttctcttcg tttggacaga ttgaagaatg ccgatattg 420
cggggacctg	atggcctgag	ccgaggttgt gcatttgtga cttttacaac aagagccatg 480
gcacagacgg	ctatcaagge	aatgcaccaa gcacagacca tggagggttg ctcatcacec 540
atggtggtaa	aatttgctga	tacacagaag gacaaagaac agaagagaat ggcccagcag 600
[0005]		

ctccagcage agatgcagca aatcagegeca gcatctgtgt ggggaaacct tgctggteta	660
aatactcttg gaccccagta tttagcactt tatttgcage tecttcagca gactgcetec	720
tctgggaacc teaacacct gagecagcte cacccaatgg gagggttgaa tgcaatgcag	780
ttacagaatt tggetgcact agctgctgca gctagtgcag ctccagaacac accaagtgg	840
accaatgctc tcactacatc cagcagtecc ctccagcgtgc tcactagttc agggtcctca	900
cctagctcta gcagcagtaa ttctgtcaac cccatagcct cacttggagc cctgcagaca	960
ttagctggag caacggctgg ctcaatggt ggctctttgg caggaatggc tgctttaaat	1020
ggtggcctgg gcagcagtgg cctttccaat ggcaccggga gcaccatgga ggcctcact	1080
caggcctact egggtatcca gcaatatget getgetgegc tccccactct gtacaaccag	1140
aatcttctga cacagcagag tattggtget gctggaagcc agaaggaagg tccagaggga	1200
gccaaectgt tcaotacea cctgceccag gagtttgggtg atcaggacct gctgcagatg	1260
tttatgecct ttgggaatgt cgtgtetgce aaggttttca tagacaagca gacaaaectg	1320
agcaagtgtt ttggttttgt aagttacgae aatcctgttt cggccaagc tgccatccag	1380
tccatgaacg gctttcagat tgccatgaag cggcttaaag tgcagctcaa acgttccaag	1440
aatgacagca agcctactg a	1461

<210> 11

[0006]





Gly Met Ile Ser Lys Lys Cys Thr Glu Asn Asp Ile Arg Val Met Phe  
 115 120 125

Ser Ser Phe Gly Gln Ile Glu Glu Cys Arg Ile Leu Arg Gly Pro Asp  
 130 135 140

Gly Leu Ser Arg Gly Cys Ala Phe Val Thr Phe Thr Thr Arg Ala Met  
 145 150 155 160

Ala Gln Thr Ala Ile Lys Ala Met His Gln Ala Gln Thr Met Glu Gly  
 165 170 175

Cys Ser Ser Pro Met Val Val Lys Phe Ala Asp Thr Gln Lys Asp Lys  
 180 185 190

Glu Gln Lys Arg Met Ala Gln Gln Leu Gln Gln Gln Met Gln Gln Ile  
 195 200 205

Ser Ala Ala Ser Val Trp Gly Asn Leu Ala Gly Leu Asn Thr Leu Gly  
 210 215 220

Pro Gln Tyr Leu Ala Leu Tyr Leu Gln Leu Leu Gln Gln Thr Ala Ser  
 225 230 235 240

[0008]

Ser Gly Asn Leu Asn Thr Leu Ser Ser Leu His Pro Met Gly Gly Leu  
 245 250 255

Asn Ala Met Gln Leu Gln Asn Leu Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Ser  
 260 265 270

Ala Ala Gln Asn Thr Pro Ser Gly Thr Asn Ala Leu Thr Thr Ser Ser  
 275 280 285

Ser Pro Leu Ser Val Leu Thr Ser Ser Gly Ser Ser Pro Ser Ser Ser  
 290 295 300

Ser Ser Asn Ser Val Asn Pro Ile Ala Ser Leu Gly Ala Leu Gln Thr  
 305 310 315 320

Leu Ala Gly Ala Thr Ala Gly Leu Asn Val Gly Ser Leu Ala Gly Met  
 325 330 335

Ala Ala Leu Asn Gly Gly Leu Gly Ser Ser Gly Leu Ser Asn Gly Thr  
 340 345 350

Gly Ser Thr Met Glu Ala Leu Thr Gln Ala Tyr Ser Gly Ile Gln Gln  
 355 360 365

[0009]

Tyr Ala Ala Ala Ala Leu Pro Thr Leu Tyr Asn Gln Asn Leu Leu Thr  
370 375 380

Gln Gln Ser Ile Gly Ala Ala Gly Ser Gln Lys Glu Gly Pro Glu Gly  
385 390 395 400

Ala Asn Leu Phe Ile Tyr His Leu Pro Gln Glu Phe Gly Asp Gln Asp  
405 410 415

Leu Leu Gln Met Phe Met Pro Phe Gly Asn Val Val Ser Ala Lys Val  
420 425 430

Phe Ile Asp Lys Gln Thr Asn Leu Ser Lys Cys Phe Gly Phe Val Ser  
435 440 445

Tyr Asp Asn Pro Val Ser Ala Gln Ala Ala Ile Gln Ser Met Asn Gly  
450 455 460

Phe Gln Ile Gly Met Lys Arg Leu Lys Val Gln Leu Lys Arg Ser Lys  
465 470 475 480

Asn Asp Ser Lys Pro Tyr  
485

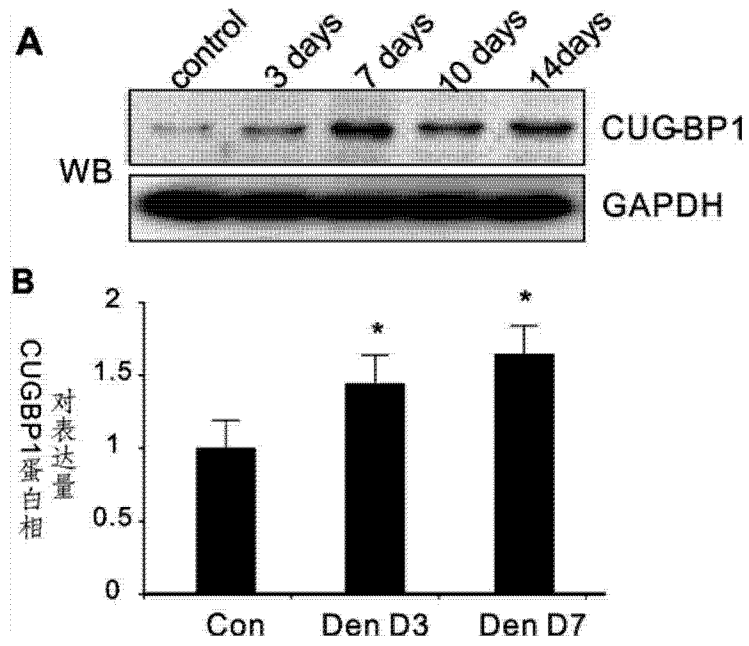


图 1

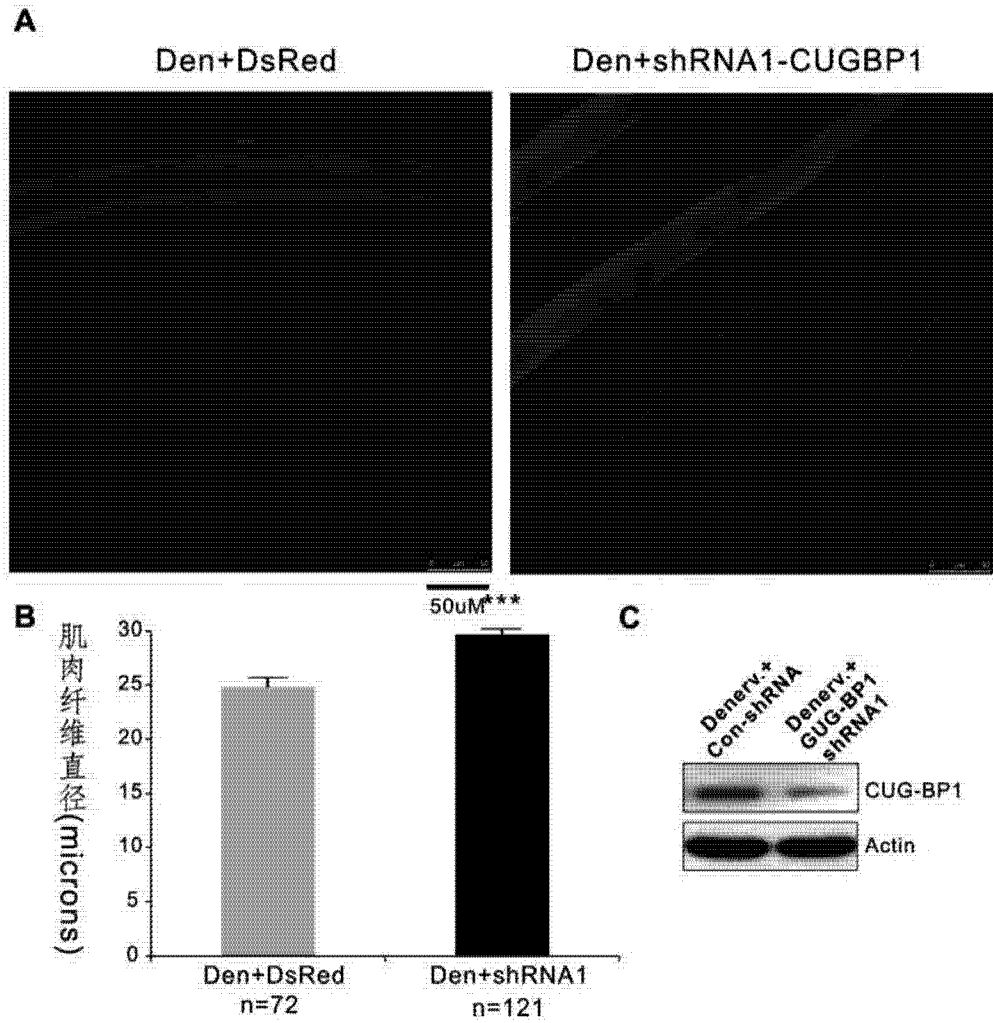


图 2