



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 115820603 B

(45) 授权公告日 2024.07.05

(21) 申请号 202211427547.0

(22) 申请日 2022.11.15

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 115820603 A

(43) 申请公布日 2023.03.21

(73) 专利权人 吉林大学
地址 130012 吉林省长春市前进大街2699号

(72) 发明人 隋婷婷 张涛 李占军 赵飞宇
李金泽 孙小迪 张曦匀 范鹏
王鹤均

(74) 专利代理机构 天津市尚文知识产权代理有限公司 12222
专利代理师 黄静

(51) Int. Cl.

C12N 9/22 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

A61K 38/46 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 105408497 A, 2016.03.16

CN 112410377 A, 2021.02.26

审查员 王楚晗

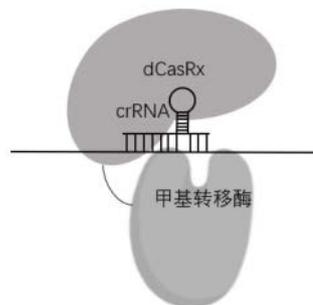
权利要求书1页 说明书11页
序列表(电子公布) 附图5页

(54) 发明名称

一种基于dCasRx-NSUN6单基因特异性M5C修饰编辑方法

(57) 摘要

本发明提供了一种靶向RNA的5-甲基胞嘧啶修饰编辑系统,所述编辑系统包括失活的CasRx核酸酶融合5-甲基胞嘧啶修饰酶及其酶活性功能区的蛋白表达载体、靶向RNA至少一个位点的crRNA表达载体。进一步的本发明还靶向RPSA的mRNA的CDS区中一个位点的crRNA表达载体。本发明还提供了靶向RNA的5-甲基胞嘧啶修饰载体系统的制备方法及其应用。采用本发明提供的编辑系统,可以对RNA 5-甲基胞嘧啶修饰位点进行靶向修饰5-甲基胞嘧啶,准确高效。



1. 一种靶向RNA 5-甲基胞嘧啶修饰的编辑系统,包括失活的CasRx核酸酶系统和crRNA系统,其特征在于,所述失活的CasRx核酸酶系统中所述失活的CasRx核酸酶与5-甲基胞嘧啶修饰酶和/或5-甲基胞嘧啶修饰酶活性功能区融合,所述失活的CasRx核酸酶系统包括失活的CasRx核酸酶蛋白表达载体,所述失活的CasRx核酸酶蛋白表达载体包括PCS2-EF1 α -dCasRx-NSUN6-T2A-EGFP载体和/或PCS2-EF1 α -dCasRx-NSUN6酶活性功能区-T2A-EGFP载体,包括如下序列:(a)如SEQ ID NO.1所示的EF1 α -SV40-NLS-dCasRx序列;(b)如SEQ ID NO.2所示的NSUN6序列和/或如SEQ ID NO.3所示的NSUN6酶活性功能区序列;(c)如SEQ ID NO.4所示的EGFP序列;所述crRNA系统为序列如SEQ ID NO.15所示的crRNA表达载体。

2. 一种权利要求1所述的靶向RNA5-甲基胞嘧啶修饰的编辑系统的制备方法,包括以下步骤:

1) 从载体pXR002:EF1 α -dCasRx-T2A-EGFP,扩增出EF1 α -dCasRx-T2A-EGFP序列,通过PCR扩增、重组、连接、转化,将EF1 α -dCasRx-T2A-EGFP序列连接至pCS2+载体,得到失活的CasRx核酸酶的蛋白表达载体;所述失活的CasRx核酸酶的蛋白表达载体包括如:SEQ ID NO.1所示的EF1 α -SV40-NLS-dCasRx序列和如SEQ ID NO.4所示的EGFP序列;

2) 从HEK 293细胞中扩增出NSUN6酶和/或其活性区域序列,通过PCR扩增、重组、连接、转化,将NSUN6酶和/或其活性区域序列连接至PCS2-EF1 α -dCasRx-T2A-EGFP载体,得到失活的CasRx核酸酶融合5-甲基胞嘧啶修饰酶和/或5-甲基胞嘧啶修饰酶活性功能区的蛋白表达载体;所述NSUN6酶序列如SEQ ID NO.2所示;所述NSUN6酶活性区域序列如SEQ ID NO.3所示;

3) 构建包括酶切位点序列和crRNA支架序列的crRNA支架结构;合成基于靶点序列的crRNA;将所述crRNA支架结构和基于靶点序列的crRNA克隆至表达载体中,得到包括启动子序列、基于靶点序列的crRNA、crRNA支架序列和酶切位点序列的表达载体,所述基于靶点序列的crRNA如SEQ ID NO.15所示;

得到所述靶向RNA 5-甲基胞嘧啶修饰的编辑系统包括所述失活的CasRx核酸酶融合5-甲基胞嘧啶修饰酶和/或5-甲基胞嘧啶修饰酶活性功能区的蛋白表达载体、以及包括启动子序列的基于靶点序列的crRNA、crRNA支架序列和酶切位点序列的表达载体。

一种基于dCasRx-NSUN6单基因特异性m5C修饰编辑方法

技术领域

[0001] 本发明涉及RNA编辑技术领域,尤其是靶向RNA甲基化的dCasRx-m5C修饰载体系统及其构建方法和应用。

背景技术

[0002] 胞嘧啶5-甲基化(即m5C)是RNA中比较常见的修饰,研究证实m5C修饰主要发生在细胞核内,部分发生在线粒体中,由NOL1/NOP2/SUN(NSUN)家族和DNMT2(m5C‘Writer’,m5C编码器)作为甲基转移酶和去甲基转移酶Tet2(m5C‘Eraser’,m5C消码器)动态催化调节。m5C可以通过结合ALYREF和YBX1(m5C‘Reader’,m5C读码器)发挥其生物学作用。

[0003] RPSA是一种重要的跨膜蛋白受体,属于非整合素家族,又称为层粘连蛋白受体1,由295个氨基酸组成,包括分别由85、16、194个氨基酸组成的胞内段、跨膜段和胞外段。研究证实RPSA作为II型跨膜受体,是多种信号通路的关键节点,参与多种生物学过程,包括细胞粘附、分化、迁移、信号传导、神经突生长和转移,在多种肿瘤发生发展中起重要作用,其在癌细胞中的上调与其侵袭性和转移性表型之间存在相关性。我们前期查阅资料发现RPSA的CDS存在m5C甲基化修饰。

[0004] CRISPR/Cas13系统是细菌和古细菌为抵御外源病毒或质粒入侵而进化的一种获得性免疫系统。在CRISPR/Cas13系统中,crRNA与Cas13蛋白形成复合体后,Cas13蛋白被激活,可以靶向并切割RNA,使RNA发生断裂损伤。而Cas13拥有两个催化活性中心,在将其突变后使其丧失核酸内切酶活性,只能与RNA结合,无法切割RNA,从而通过dCasRx技术可识别内源性RNA,并能用于靶向的RNA示踪。

发明内容

[0005] 本发明提供了一种靶向RNA 5-甲基胞嘧啶修饰的编辑系统,包括失活的CasRx核酸酶系统和crRNA系统,所述失活的CasRx核酸酶系统中所述失活的CasRx核酸酶与5-甲基胞嘧啶修饰酶和/或5-甲基胞嘧啶修饰酶活性功能区融合。

[0006] 优选的是,所述失活的CasRx核酸酶系统包括失活的CasRx核酸酶蛋白表达载体,所述失活的CasRx核酸酶蛋白表达载体包括失活的CasRx核酸酶融合5-甲基胞嘧啶修饰酶和/或5-甲基胞嘧啶修饰酶活性功能区的蛋白表达载体,所述crRNA系统包括crRNA表达载体,所述crRNA表达载体靶向RNA位点。

[0007] 上述任一项优选的是,所述失活的CasRx核酸酶系统和crRNA系统为dCasRx-NSUN6蛋白和crRNA复合体和/或dCasRx-NSUN6酶活性功能区和crRNA复合体。能精确定位靶向RNA序列,靶向相应的修饰位点。优选的,所述编辑系统能够在细胞内或细胞外进行RNA的m5C修饰调控。

[0008] 上述任一项优选的是,所述失活的CasRx核酸酶蛋白表达载体包括PCS2-EF1 α -dCasRx-NSUN6-T2A-EGFP载体和/或PCS2-EF1 α -dCasRx-NSUN6酶活性功能区-T2A-EGFP载体。EF1 α 是启动子的名字,作用是启动序列表达的。

[0009] 上述任一项优选的是,所述失活的CasRx核酸酶蛋白表达载体包括如下序列:(a)如SEQ ID NO.1所示的EF1 α -SV40-NLS-dCasRx序列;(b)如SEQ ID NO.2所示的NSUN6酶序列和/或如SEQ ID NO.3所示的NSUN6酶活性功能区序列;(c)如SEQ ID NO.4所示的EGFP序列。

[0010] 上述任一项优选的是,所述编辑系统能够在细胞内或细胞外进行RNA的5-甲基胞嘧啶修饰调控。

[0011] 上述任一项优选的是,所述细胞包括真核细胞和原核细胞;所述真核细胞包括哺乳动物细胞和植物细胞;所述哺乳动物细胞包括中国仓鼠卵巢细胞、幼仓鼠肾细胞、小鼠Sertoli细胞、小鼠乳腺癌细胞、buffalo大鼠肝细胞、大鼠肝癌细胞、由SV40转化的猴肾CV1系、猴肾细胞、犬肾细胞、人宫颈癌细胞、人肺细胞、人肝细胞、HIH/3T3细胞、人U2-OS骨肉瘤细胞、人A5413细胞、人K562细胞、人HEK2133细胞、人HEK2133T细胞、人HCT116细胞或人MCF-7细胞或TRI细胞。

[0012] 上述任一项优选的是,所述crRNA序列基于靶点序列的改变而改变,针对不同的靶点,对包含mRNA、tRNA、rRNA、ncRNA在内的RNA进行修饰和调控。优选的是,所述的“基于”是指crRNA的表达序列是与靶点完全互补。

[0013] 上述任一项优选的是,所述crRNA系统靶向RPSA的mRNA的CDS区中至少一个位点。

[0014] 上述任一项优选的是,所述crRNA系统为crRNA表达载体。

[0015] 上述任一项优选的是,所述crRNA表达载体的序列如SEQ ID NO.15所示。

[0016] 本发明还提供了上述任一项所述的靶向RNA 5-甲基胞嘧啶修饰的编辑系统的制备方法,包括以下步骤:

[0017] 1) 从载体pXR002:EF1 α -dCasRx-T2A-EGFP, addgene#60954, 扩增出EF1 α -dCasRx-T2A-EGFP序列,通过PCR扩增、重组、连接、转化,将EF1 α -dCasRx-T2A-EGFP序列连接至pCS2+载体,得到失活的CasRx核酸酶的蛋白表达载体;所述失活的CasRx核酸酶的蛋白表达载体包括如SEQ ID NO.1所示的EF1 α -SV40-NLS-dCasRx序列和如SEQ ID NO.4所示的EGFP序列;

[0018] 2) 从HEK 293细胞中扩增出NSUN6酶和/或其活性区域序列,通过PCR扩增、重组、连接、转化,将NSUN6酶和/或其活性区域序列连接至PCS2-EF1 α -dCasRx-T2A-EGFP载体,得到失活的CasRx核酸酶融合5-甲基胞嘧啶修饰酶和/或5-甲基胞嘧啶修饰酶活性功能区的蛋白表达载体;所述NSUN6酶序列如SEQ ID NO.2所示;所述NSUN6酶活性功能区序列如SEQ ID NO.3所示;

[0019] 3) 构建包括酶切位点序列和crRNA支架序列的crRNA支架结构;合成基于靶点序列的crRNA;将所述crRNA支架结构和基于靶点序列的crRNA克隆至表达载体中,得到包括启动子序列、基于靶点序列的crRNA、crRNA支架序列和酶切位点序列的表达载体,所述基于靶点序列的crRNA如SEQ ID NO.15所示;(所述酶切位点为常规的酶切连接应用的酶切位点)

[0020] 得到所述靶向RNA 5-甲基胞嘧啶修饰的编辑系统包括所述失活的CasRx核酸酶融合5-甲基胞嘧啶修饰酶和/或5-甲基胞嘧啶修饰酶活性功能区的蛋白表达载体、以及包括启动子序列的基于靶点序列的crRNA、crRNA支架序列和酶切位点序列的表达载体。

[0021] 优选的是,步骤2)中的表达载体为pCS2+质粒载体。

[0022] 本发明还提供了上述任一项所述的编辑系统在制备治疗RNA修饰异常引起的疾病的药物中的应用。

[0023] 本发明还提供了一种治疗RNA修饰异常引起的疾病的药物,所述药物包含上述任

一项所述的编辑系统。

[0024] 基于现有技术,为了寻找治疗RNA m5C修饰异常引起的疾病的新思路,本发明首次将m5C修饰酶或其酶活性功能域连接到dCasRx的C端,通过设计crRNA,将其特异靶向到RNA上,从而对特异位点进行m5C修饰(如图4所示);本发明通过工程RNA修饰酶特异靶向底物以改变RNA m5C修饰这一策略,为RNA m5C修饰异常引起的人类疾病防治提供了新的途径。

[0025] 作为本发明的第一个方面,本发明提供了靶向RNA的5-甲基胞嘧啶修饰载体系统,所述载体系统包括失活的CasRx核酸酶融合5-甲基胞嘧啶修饰酶或其酶活性功能区的蛋白表达载体、靶向RPSA的mRNA的CDS区中至少一个位点的crRNA表达载体。

[0026] 应当说明的是,本发明中的CasRx,又称为Cas13即核酸酶;CDS指信使RNA(mRNA)分子的编码片段;crRNA是指核酸酶CasRx的引导RNA(CRISPR guide RNA)。其中,crRNA表达载体可以靶向RPSA的mRNA的CDS区中一个位点、两个位点、或者三个位点,甚至更多位点,可以根据需要进行选择。

[0027] 优选地,所述5-甲基胞嘧啶修饰酶或其酶活性功能区域对应的核苷酸序列与核酸酶失活的CasRx对应的核苷酸序列的C端连接,由此,表达的融合蛋白(即失活的CasRx核酸酶融合5-甲基胞嘧啶修饰酶或其酶活性功能区域对应的蛋白质)可在crRNA的引导下对特定的RNA进行5-甲基胞嘧啶修饰。

[0028] 优选地,所述5-甲基胞嘧啶修饰酶为NSUN6酶;所述5-甲基胞嘧啶修饰酶的酶活性功能区域为NSUN6酶活性区域序列。

[0029] 优选地,本发明所述失活的CasRx核酸酶系统包括的核糖核酸为环状的DNA,包括真核表达载体及插入所述真核表达载体的核定位序列(所述核定位序列为SV40-NLS序列,为SEQ ID NO.1中第250-270个碱基序列)和NSUN6酶或其活性区域序列。由此,表达的NSUN6酶可以对特殊基序—CUCCA中的第一位胞嘧啶进行甲基催化,即本发明中的胞嘧啶5-甲基(即m5C)修饰。优选的,所述失活的CasRx核酸酶系统包括的环状的DNA为本发明所述失活的CasRx核酸酶融合5-甲基胞嘧啶修饰酶及其酶活性功能区的蛋白表达载体。

[0030] 优选地,所述真核表达载体插入有EGFP序列。EGFP序列作为在细胞内成功表达的标签。

[0031] 作为本发明的第二个方面,本发明提供了靶向mRNA的5-甲基胞嘧啶修饰载体系统的制备方法,包括以下步骤:

[0032] (1) 从载体pXR002:EF1 α -dCasRx-T2A-EGFP扩增出EF1 α -dCasRx-T2A-EGFP序列,通过PCR扩增、重组、连接、转化,将EF1 α -dCasRx-T2A-EGFP序列连接至pCS2+载体,得到失活的CasRx核酸酶的蛋白表达载体;所述失活的CasRx核酸酶的蛋白表达载体包括:EF1 α -SV40-NLS-dCasRx序列如SEQ ID NO.1所示;所述EGFP序列如SEQ ID NO.4所示;

[0033] (2) 从HEK 293细胞中扩增出NSUN6酶及其活性区域序列,通过PCR扩增、重组、连接、转化,将NSUN6酶和/或其活性区域序列连接至PCS2-EF1 α -dCasRx-T2A-EGFP载体,得到失活的CasRx核酸酶融合5-甲基胞嘧啶修饰酶的蛋白表达载体和/或失活的CasRx核酸酶融合5-甲基胞嘧啶修饰酶活性功能区的蛋白表达载体;所述NSUN6酶序列如SEQ ID NO.2所示;所述NSUN6酶活性区域序列如SEQ ID NO.3所示;

[0034] (3) 构建包括酶切位点序列和crRNA支架序列的crRNA支架结构;合成基于靶点序列的crRNA;将所述crRNA支架结构和基于靶点序列的crRNA克隆至表达载体中,得到包括启

动子序列、基于靶点序列的crRNA、crRNA支架序列和酶切位点序列的表达载体,所述基于靶点序列的crRNA如SEQ ID NO.15所示;

[0035] 作为本发明的第三个方面,本发明提供了上述任一项编辑系统及所述载体在制备治疗RNA修饰异常引起的疾病的药物中的应用。对于5-甲基胞嘧啶的甲基化异常修饰导致的疾病,本发明提供了准确而高效药物的制备方法和应用。

[0036] 作为本发明的第四个方面,本发明提供了一种治疗RNA修饰异常引起的疾病的药物,所述药物包含上述编辑系统及所提供的载体。其中,RNA修饰异常引起的疾病对应的患者可以是人,也可以是动物、植物等,优选为人。

[0037] 本发明的有益效果为:采用本发明的编辑系统可以对RNA修饰异常引起的疾病进行靶向修饰5-甲基胞嘧啶,准确而高效,可以从根本上治疗RNA修饰缺陷引起的疾病。

[0038] 本发明所述CasRx核酸酶即为Cas13d核酸酶,dCasRx为失活的CasRx核酸酶即失活的Cas13d核酸酶。

[0039] 本发明序列表中包含的核苷酸序列均为常规核苷酸序列,不包括支链结构及核苷酸类似物。

附图说明

[0040] 图1为本发明优选实施例1中PCS2-EF1 α -dCasRx-NSUN6-T2A-EGFP载体图谱。

[0041] 图2为本发明优选实施例1中PCS2-EF1 α -dCasRx-NSUN6活性区域-T2A-EGFP载体图谱。

[0042] 图3为本发明优选实施例2中crRNA载体图谱。

[0043] 图4为本发明对特异位点进行m5C修饰的技术示意图。

[0044] 图5为本发明优选实施例3中BSP实验后所富集的m5C修饰的RPSA mRNA结果。

[0045] 图6为本发明优选实施例3中共转染质粒PCS2-EF1 α -dCasRx-NSUN6-T2A-EGFP和质粒RPSA crRNA backbone后RPSA的mRNA表达水平。

[0046] 图7为本发明优选实施例3中共转染质粒PPCS2-EF1 α -dCasRx-NSUN6酶活性功能区-T2A-EGFP和质粒RPSA crRNA backbone后的RPSA的mRNA表达水平。

具体实施方式

[0047] 本发明通过以下实施例进行更加清晰、完整的描述,但所描述的实例仅是本发明一部分实施例,并非全部。所述实施例为帮助理解本发明,不应依此来局限本发明的保护范围。

[0048] 实施例1

[0049] 构建靶向RNA的dCasRx-2 \times NLS(NLS为本发明所述SV40-NLS)、NSUN6/NSUN6酶活性区域以及EGFP融合表达载体PCS2-EF1 α -dCasRx-NSUN6-T2A-EGFP。

[0050] 1、引物设计

[0051] 从载体pXR002:EF1 α -dCasRx-T2A-EGFP(addgene#60954)中扩增EF1 α -dCasRx-T2A-EGFP序列,其中EF1 α -SV40 NLS-dCasRx序列如SEQ ID NO.1所示。

[0052] NSUN6酶及其活性区域序列扩增于HEK 293细胞,NSUN6酶序列如SEQ ID NO.2所示,NSUN6酶活性区域序列如SEQ ID NO.3所示。

[0053] 利用无缝克隆引物设计工具设计三段序列的PCR引物,引物序列由上海生工生物公司进行合成。引物序列列表如下表1:

[0054] 表1引物序列列表

EF1 α -SV40 NLS-dCasRx-F	CAAAGCAACCATAGTGGCTCCGGTGCCCGTCAG SEQ ID NO.5
EF1 α -SV40 NLS-dCasRx-R	GCTTCCACCTCCTCCGGATCCGGAATTGCCGGACACCTTCT SEQ ID NO.6
dCasRx-NSUN6-F	GTCCGGCAATTCGGATCCGGAGGAGGTGGAAGCATGTTCCATAAGCGTG SEQ ID NO.7
dCasRx-NSUN6-R	TTTTTCTTAGGTCCGGATCCTGTGCTTTTGCATTTTACAA SEQ ID NO.8
EGFP-F	ATGCAAAAGCACAGGATCCGGACCTAAGAAAAA SEQ ID NO.9
EGFP-R	TATAGTTCTAGATTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGA SEQ ID NO.10
NSUN6-F	ATGTTCCATAAGCGTGGCAAGAAAAATGGGAAG SEQ ID NO.11
NSUN6-R	TATTGCAAAATTTGTAATAAGCAAAAGCACA SEQ ID NO.12
NSUN6-PUA-F	GTCCGGCAATTCGGATCCGGAGGAGGTGGAAGCGAAGCCATTGTTGGAGCCCAGT SEQ ID NO.13
NSUN6-PUA-R	TTTTTCTTAGGTCCGGATCCTGTGCTTTTGCATTTTACAA SEQ ID NO.14

[0055] 2、PCR扩增相关基因序列

[0056] PCR反应体系,总计50 μ l:

试剂	使用量	终浓度
Prime STAR Max Premix (2 \times)	25 μ l	1X
[0057] 上游引物 F	10-15 pmol	0.2-0.3 μ M
下游引物 R	10-15 pmol	0.2-0.3 μ M
DNA 模板	<200 ng	
[0058] 灭菌水	补至 50 μ l	

[0059] PCR扩增条件:

98°C 10 sec	} 30~35 Cycles
[0060] 55°C 5 sec or 15 sec	
72°C 30~60 sec/kb	

[0061] 3、PCR产物回收

[0062] (1) PCR产物经电泳后,在紫外条件下,手术刀切取含目的片段的凝胶条带至干净1.5mlEP管中,按100mg凝胶对应100 μ l溶液PN的比例向离心管中加入等体积的溶液PN(天根生化科技(北京)有限公司)。

[0063] (2) 将含有胶块的离心管放置于50°C水浴锅中,其间不断温和地上下翻转离心管,以确保胶块充分溶解。

[0064] (3) 柱平衡步骤:向吸附柱中(吸附柱放入收集管中)加入500 μ l平衡液BL,12,000rpm离心1min,倒掉收集管中的废液,将吸附柱重新放回收集管中。

[0066] (4) 将第二步所得溶液加入到一个吸附柱中(吸附柱放入收集管中),室温放置2min,12,000rpm离心30-60sec,倒掉收集管中的废液,将吸附柱CA2放入收集管中。

[0067] (5) 向吸附柱中加入600 μ l漂洗液PW,12,000rpm离心30-60sec,倒掉收集管中的废液,将吸附柱放入收集管中。

[0068] (6) 重复操作步骤5。

[0069] (7) 将吸附柱放回收集管中,12,000rpm离心2min,尽量除尽漂洗液。将吸附柱CA2置于室温放置数分钟,彻底地晾干,以防止残留的漂洗液影响下一步的实验。

[0070] (8) 将吸附柱放到一个干净离心管中,向吸附膜中间位置悬空滴加适量洗脱缓冲液EB,室温放置2min。12,000rpm离心2min收集DNA溶液。

[0071] 4、目的片段重组回收

[0072] 将两端携带有同源臂的两个PCR片段利用ClonExpress技术克隆至pCS2+载体中,操作步骤同诺唯赞公司的ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit (Vazyme C115-01)试剂盒说明书。

[0073] 5、连接产物的转化

[0074] (1) 将连接产物加入至50 μ l DH5 α 感受态细胞中,轻轻吹打混匀,冰浴30min。

[0075] (2) 42 $^{\circ}$ C水浴热激90s,快速将EP管转移至冰浴中,冰浴5min。

[0076] (3) 加入200 μ l LB液体培养基,混匀,37 $^{\circ}$ C、200r/min振荡培养30min。

[0077] (4) 将1.5ml EP管中的菌液全部涂布于含氨苄青霉素(Amp) (100 μ g/ml)的LB平板表面。倒置平板,放入37 $^{\circ}$ C生化培养箱过夜培养。

[0078] 6、测序鉴定阳性克隆:

[0079] 分别从平板上面挑取5个菌落于10ml含有氨苄青霉素的LB液体培养基中,37 $^{\circ}$ C,220r/min,振荡培养8h后,于超净台中倒取1ml菌液于1.5ml离心管中,送至上海生工生物公司进行测序。

[0080] 7、对测序正确的菌液进行扩大培养,提取无内毒素质粒。

[0081] 8、测序正确的载体命名为PCS2-EF1 α -dCasRx-NSUN6-T2A-EGFP,PCS2-EF1 α -dCasRx-NSUN6活性区域-T2A-EGFP载体,图谱如图1、2所示。

[0082] 实施例2

[0083] 构建靶向RPSA RNA的crRNA表达载体

[0084] 1、设计crRNA序列

[0085] 所述crRNA载体图谱如图3所示,针对RPSA m5C位点,利用<https://cas13design.nygenome.org/>设计靶向效率较高的crRNA,所述crRNA序列如SEQ ID NO.15所示;

[0086] 表2 crRNA序列

[0087]	<p>RPSA-0-crRNA</p> <p>Gagggcctatttcccatgattccttcattatattgcatatacgatacaaggctgtagagagataat tgaattaatttgactgtaaacacaaagatattagtagcaaaaatcgtgacgtagaaagtaataat ttcttgggtagtttgcagttttaaattatgttttaaaatggactatcatatgcttaccgtaact tgaaagtatttcgatttcttggctttatatatcttgtggaaaggacgaaacaccgaaccctacc aactggtcggggtttgaaacgaggatataaactgacatcagctttt SEQ ID NO. 15</p>
--------	--

[0088] 2、将设计好的crRNA序列加上酶切接头,由上海生工生物公司合成,寡核苷酸链如SEQ ID NO.16~17所示;

[0089] 表3寡核苷酸链

[0090]	RPSA-0-crRNA-F	AAACgaggatataacactgacatcagc SEQ ID NO.16
	RPSA-0-crRNA-R	AAAAGctgatgtcagtgttatctctc SEQ ID NO.17

[0091] 3、crRNA骨架载体线性化

[0092] 利用BbsI内切酶对质粒pXR003:CasRx gRNA cloning backbone((addgene#109053)进行酶切,37°C酶切过夜,酶切体系如下:

	试剂	使用量
	DNA 载体	20 μ g
[0093]	BbsI	3 μ l
	10x NEB buffer 2.1	10 μ l
	灭菌水	补至 200 μ l

[0094] 37°C酶切后跑胶验证并进行回收纯化(同实施例1第3步)。

[0095] 4、退火

[0096] 将合成的寡核苷酸链进行退火,放置于PCR仪中,95°C5min,退火体系如下:

	试剂	使用量
	Oligo F(100 μ M)	10 μ l
[0097]	Oligo R(100 μ M)	10 μ l
	10x NEB buffer 3	5 μ l
	灭菌水	25 μ l

[0098] 退火结束后,将其从PCR中拿出,室温放置30min。

[0099] 5、连接

[0100] 将退火后的寡核苷酸链连接至酶切后的载体pXR003:CasRx gRNA cloning backbone,放置于连接仪中16°C连接过夜,连接体系如下:

	试剂	使用量
	寡核苷酸链	4 μ l
[0101]	2x Solution I	5 μ l
	线性化载体	1 μ l

[0102] 6、连接产物的转化

[0103] 将连接后的质粒转化至感受态细胞DH5 α 中,方法同实施例1第5步。

[0104] 7、测序鉴定阳性克隆:

[0105] 分别从平板上面挑取3个菌落于10ml含有氨苄青霉素的LB液体培养基中,37°C,220r/min,振荡培养8h后,于超净台中倒取1ml菌液于1.5ml离心管中,送至上海生工生物公

司进行测序。

[0106] 8、对测序正确的菌液进行扩大培养,提取无内毒素质粒。

[0107] 9、测序正确的载体命名为RPSA crRNA backbone (即为本发明所述crRNA表达载体,即包括启动子序列的基于靶点序列的crRNA、crRNA支架序列和酶切位点序列的表达载体)。

[0108] 实施例3靶向RNA的5-甲基胞嘧啶修饰载体系统

[0109] 本发明的靶向mRNA的5-甲基胞嘧啶修饰载体系统的一种实施例,包括PCS2-EF1 α -dCasRx-NSUN6-T2A-EGFP,载体图谱如图1所示;PCS2-EF1 α -dCasRx-NSUN6酶活性中心-T2A-EGFP,载体图谱如图2所示;RPSA crRNA backbone,载体图谱如图3所示。

[0110] RNA BSP测序和QPCR

[0111] 1、瞬时转染细胞

[0112] (1) 培养293T细胞,并将适量细胞分于6孔板中,过夜培养使细胞密度达到80%左右。

[0113] (2) 将实验分为三组命名为A,B,C组。A组按2:1共转染质粒PCS2-EF1 α -dCasRx-NSUN6-T2A-EGFP和质粒RPSA crRNA backbone,其中质粒PCS2-EF1 α -dCasRx-NSUN6-T2A-EGFP 2 μ g;B组按2:1共转染质粒PCS2-EF1 α -dCasRx-NSUN6活性中心-T2A-EGFP和质粒RPSA crRNA backbone,其中质粒PCS2-EF1 α -dCasRx-NSUN6活性中心-T2A-EGFP 2 μ g;C组按2:1共转染质粒PCS2-EF1 α -dCasRx-EGFP和质粒RPSA crRNA backbone,其中质粒PCS2-EF1 α -dCasRx-EGFP 2 μ g。

[0114] (3) 按Yeasen公司Hieff TransTM Liposomal Transfection Reagent操作说明进行转染。

[0115] (4) 转染后的细胞培养48h后,用PBS清洗细胞。

[0116] 2、用Trizol法提取总RNA

[0117] 加入1ml Trizol吹打细胞,移入1.5ml离心管中,依据产品提供的步骤说明书提取RNA。

[0118] 3.RNA的亚硫酸氢盐处理

[0119] 使用ZYMO RESEACH公司的EZ RNA Methylation kit试剂盒,根据其产品说明书对RNA进行处理,最终得到BSP后的RNA。

[0120] 4.cDNA的合成

[0121] 将处理前和处理后的RNA进行反转录,用反转录试剂盒依据产品提供的步骤进行反转录,反应体系如下:

	试剂	20 μ l 体系
[0122]	5x FastKing-RT SuperMix	4 μ l
	Total RNA	1 μ g
	RNase-Free ddH2O	补足至 20 μ l

[0123] 反应条件为42 $^{\circ}$ C15min,95 $^{\circ}$ C3min。

[0124] 5.RT-PCR

[0125] 利用设计好的PCR引物进行RT-PCR,RT-PCR引物如SEQ ID NO:20-SEQ ID NO:21所示,反应体系如下:

	试剂	使用量	终浓度
	Taq plus mix (2X)	25 μ l	1X
	上游引物 F	1 μ l	10 μ M
[0126]	下游引物 R	1 μ l	10 μ M
	cDNA 模板	2 μ l	
	灭菌水	补至 50 μ l	

[0127] 反应程序如下:

95°C 5min
 95°C 30s
 55-45°C 30 sec

} 38~45 Cycles

72°C 30 sec

[0129] 72°C 5min

[0130] 表3RT-PCR引物序列

[0131]	RPSA-BSP-F	AAATTTTAAGAGGATTTGGGAGAAGTTTTTG SEQ ID NO.20
	RPSA-BSP-R	CAACCCTAAAATCAATAACCACAAAAACCATA SEQ ID NO.21

[0132] 6. 琼脂糖凝胶电泳

[0133] 将上述的PCR产物经浓度2%的琼脂糖凝胶进行电泳,120V 35min,切取目的条带放入1.5ml离心管中进行PCR产物的回收,具体方法见实施例1第3步。

[0134] 7. 目的片段的连接

[0135] 将回收后的目的片段连接到T载体上,使用北京天根生化科技的pGM-T克隆试剂盒,按照试剂盒说明书上的具体步骤进行操作,16°C过夜连接,连接体系如下:

	试剂	使用量
	PGM-T 载体	1 μ l
[0136]	10×T4 DNA Ligation Buffer	1 μ l
	T4 DNA Ligase (3 U/ μ l)	1 μ l
	目的 PCR 片段	7 μ l

[0137] 8、连接产物的转化

[0138] 将连接后的质粒转化至感受态细胞DH5 α 中,并加入x-Gal和IPTG共同筛选,方法同实施例1第5步。

[0139] 9、测序鉴定阳性克隆:

[0140] 分别从平板上面挑取20个白色菌落于10ml含有氨苄青霉素的LB液体培养基中,37°C,220r/min,振荡培养8h后,于超净台中倒取1ml菌液于1.5ml离心管中,送至上海生工生

物公司进行测序。

[0141] 10、RT-QPCR

[0142] 将未进行BSP处理的RNA反转录形成的cDNA进行RT-QPCR,QPCR引物SEQ ID NO:22-SEQ ID NO:25如表4所示,反应体系如下:

	试剂	20 μ l 体系
	上游引物 F	0.8 μ l
	下游引物 R	0.8 μ l
[0143]	SYBR Green Master (2x)	10 μ l
	cDNA 模板	1 μ l
	Rnase free H2O	7.4 μ l

[0144] Q-RTPCR运行程序如下:

	预变性	95°C	15 min
		95°C	10 sec
[0145]	40X 循环	60°C	30 sec
	熔解曲线分析		

[0146] 表4 RT-QPCR引物序列

[0147]	RPSA-E23-89-F	GCAGCTCGTGCAATTGTT SEQ ID NO.22
	RPSA-E23-89-R	GTGGCAGCAGCAAACCTTC SEQ ID NO.23
	RPSA-E34-101-F	CGTGCAATTGTTGCCATTGA SEQ ID NO.24
	RPSA-E34-101-R	GCAGCAAACCTTCAGCACAG SEQ ID NO.25

[0148] 11、实验结果分析:

[0149] 如图5所示,共转染质粒PCS2-EF1 α -dCasRx-NSUN6-T2A-EGFP和质粒RPSA crRNA backbone的实验组与共转染质粒PCS2-EF1 α -dCasRx-NSUN6酶活性中心-T2A-EGFP和质粒RPSA crRNA backbone的实验组,通过BSP实验后,所富集的m5C修饰的RPSA mRNA明显高于对照组($p < 0.05$),该实验结果说明我们所构建的实施例1的载体系统可以有效地对RPSA特异位点进行m5C修饰(其中,WT为未转染的野生型细胞对照组,dCasRx-NSUN6为共转染质粒PCS2-EF1 α -dCasRx-NSUN6-T2A-EGFP和质粒RPSA crRNA backbone的实验组,dCasRx-NSUN6-PUA mtase为共转染质粒PCS2-EF1 α -dCasRx-NSUN6酶活性中心-T2A-EGFP和质粒RPSA crRNA backbone的实验组)。同时,如图6所示,RT-QPCR结果显示共转染质粒PCS2-EF1 α -dCasRx-NSUN6-T2A-EGFP和质粒RPSA crRNA backbone的实验组RPSA的mRNA表达水平相较于对照组明显升高($p < 0.05$)(其中,WT为未转染的野生型细胞对照组,RPSA-crRNA为共转染实验组,E23-89为用引物RPSA-E23-89检测结果,E34-101为用引物RPSA-E34-101检测结果)。如图7所示,RT-QPCR结果显示共转染质粒PPCS2-EF1 α -dCasRx-NSUN6酶活性中心-T2A-EGFP和质粒RPSA crRNA backbone的实验组RPSA的mRNA表达水平相较于对照组明显升高($p < 0.05$)(其中,WT为未转染的野生型细胞对照组,RPSA-crRNA为共转染实验组,E23-89为用

引物RPSA-E23-89检测结果,E34-101为用引物RPSA-E34-101检测结果)。

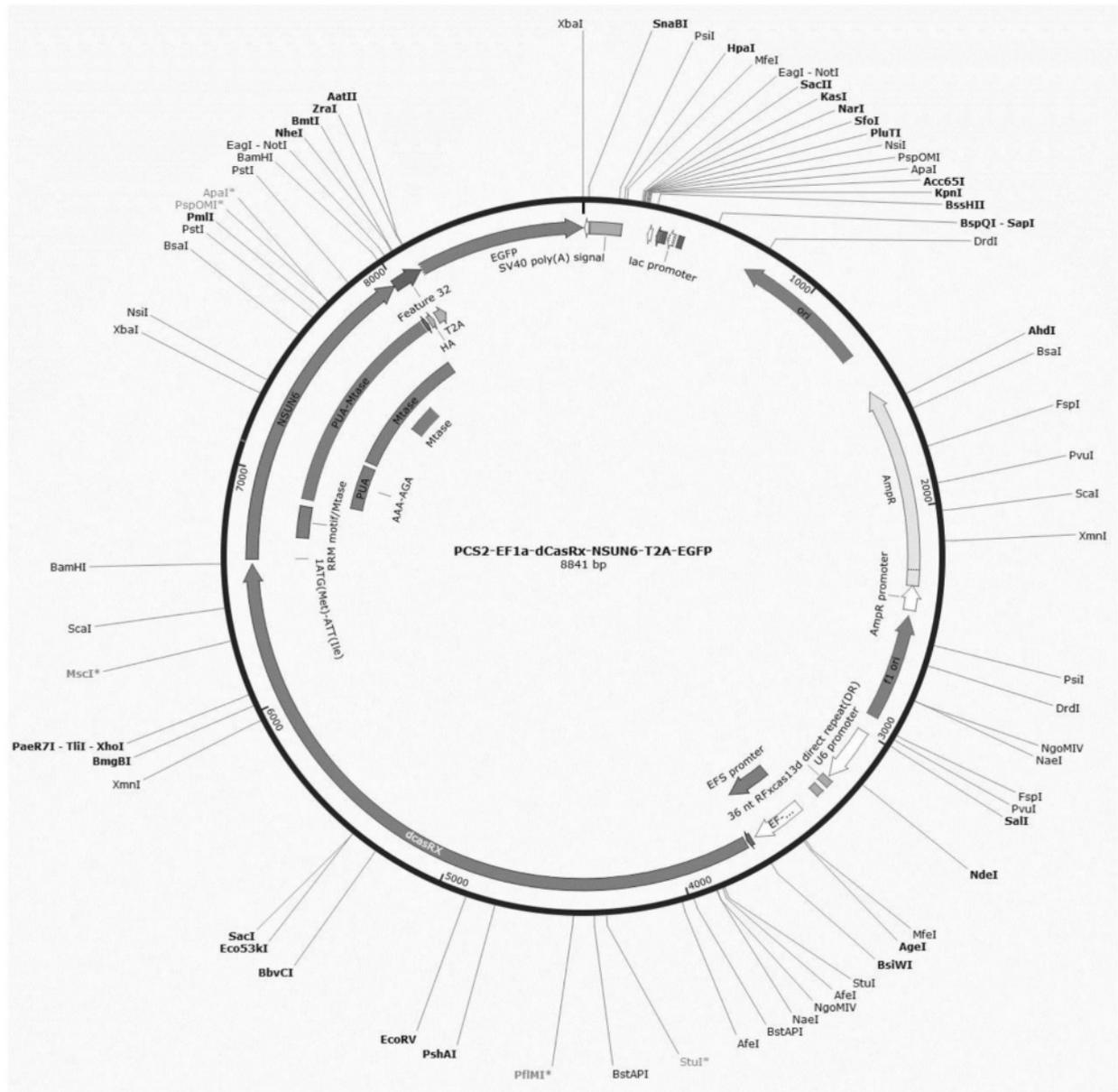


图1

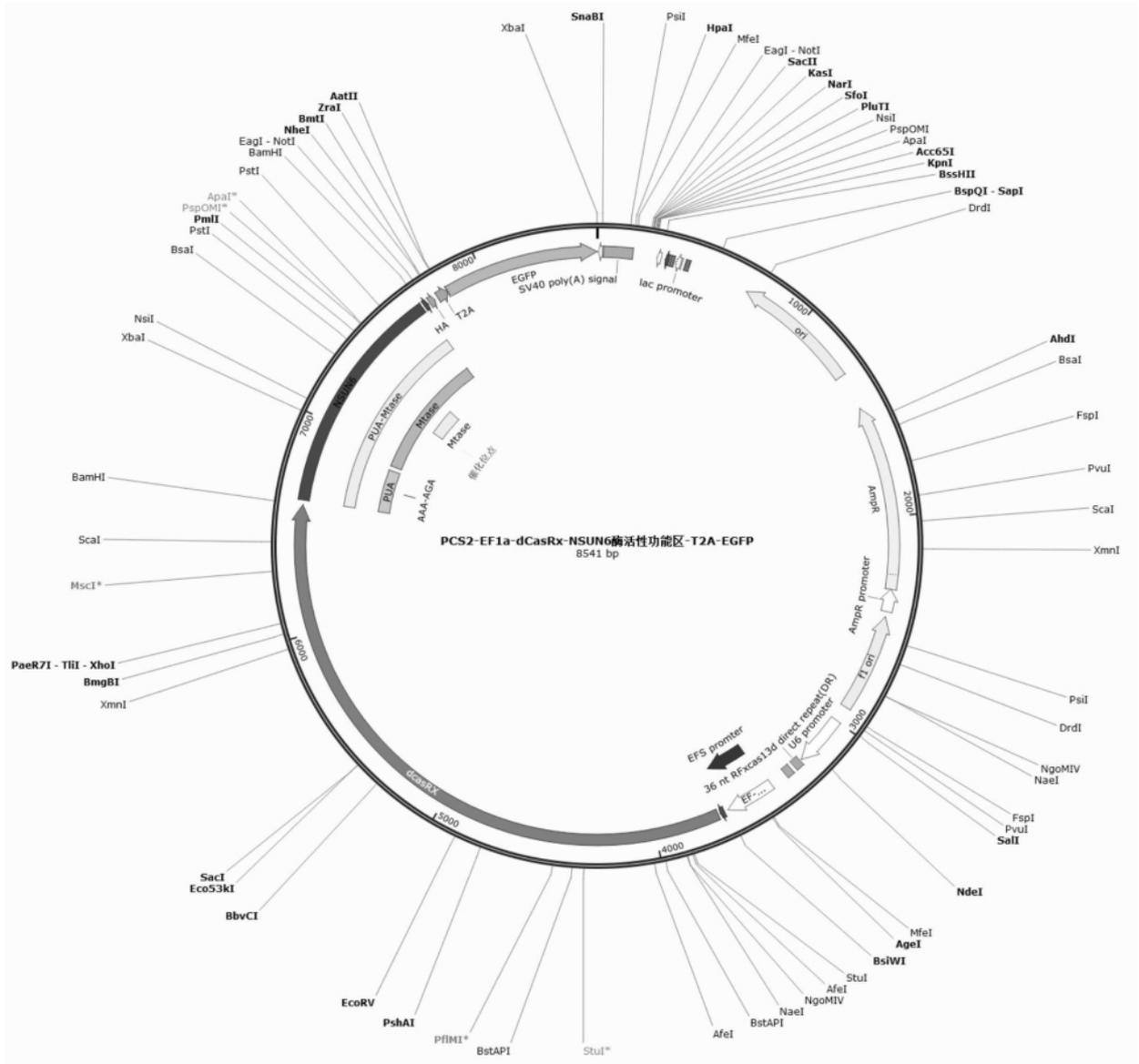


图2

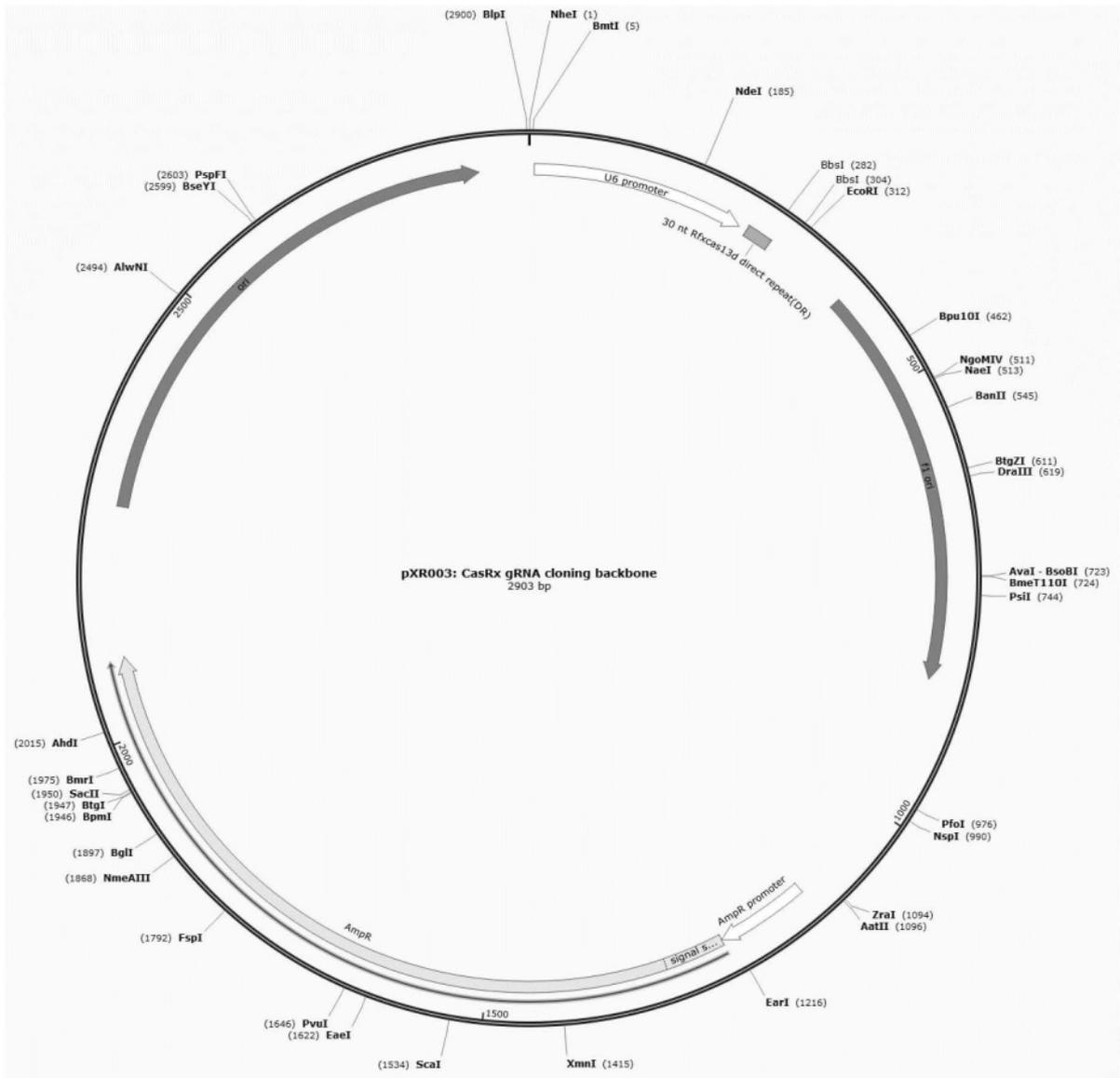


图3

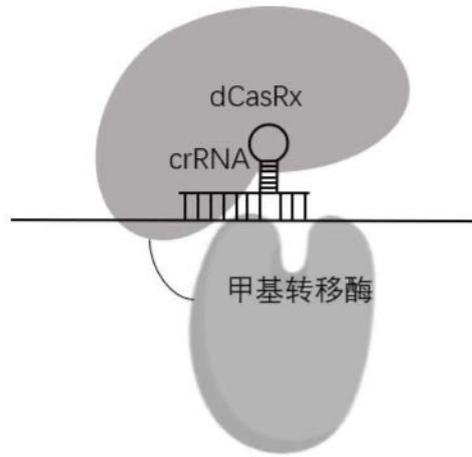


图4

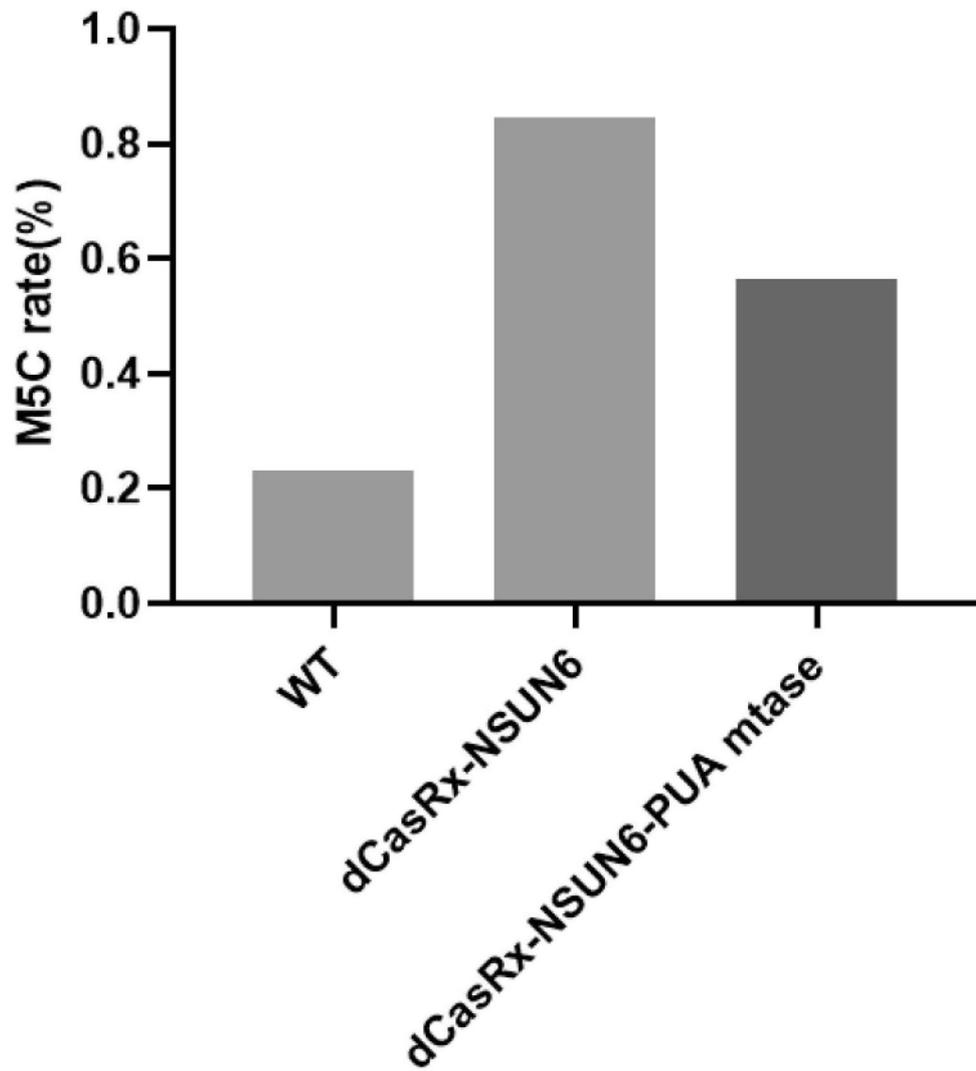


图5

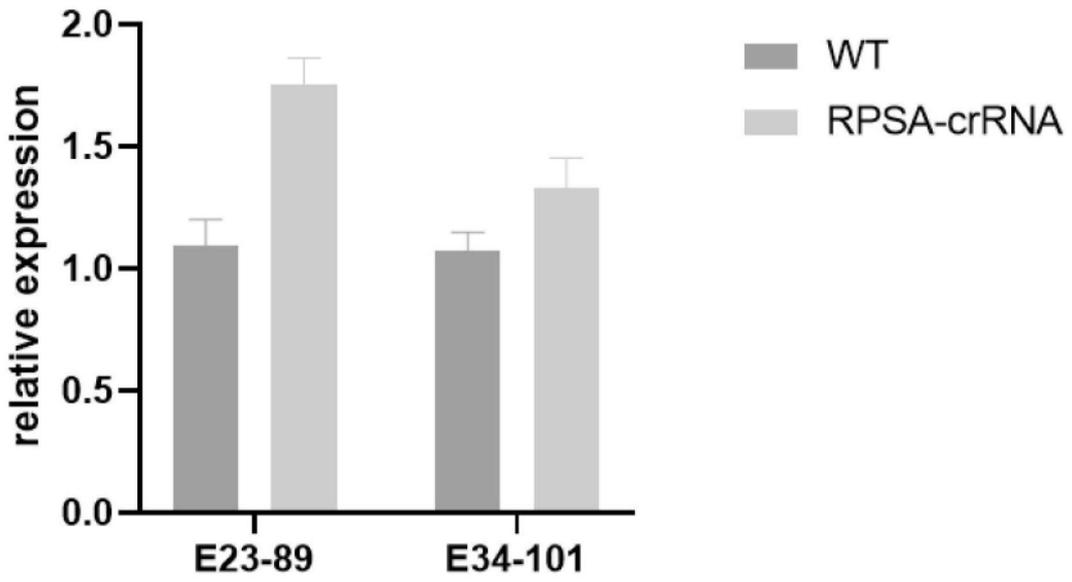


图6

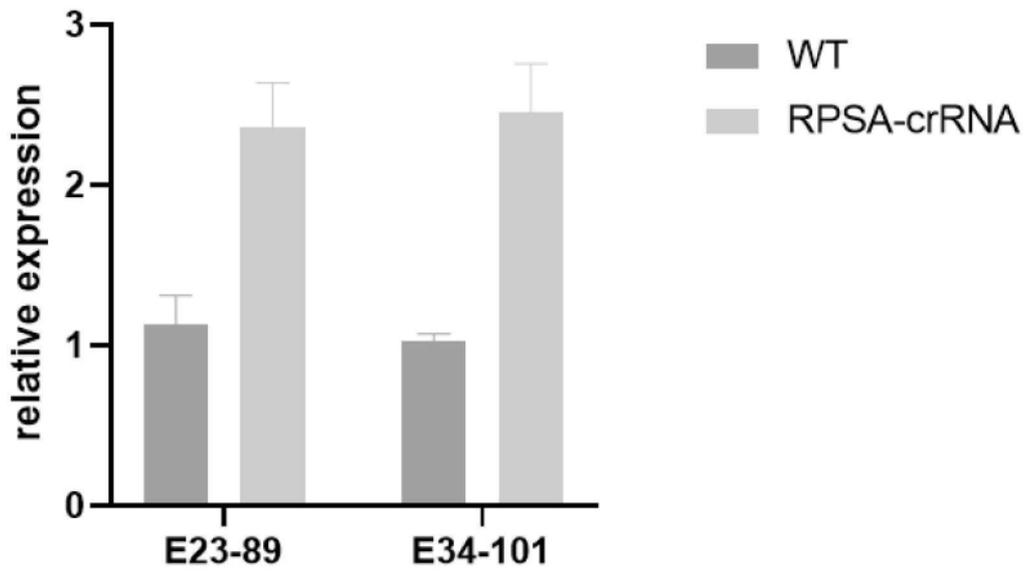


图7