



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110628913 B

(45) 授权公告日 2021.02.02

(21) 申请号 201911075429.6

(22) 申请日 2019.11.06

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110628913 A

(43) 申请公布日 2019.12.31

(66) 本国优先权数据
201910298612.6 2019.04.15 CN

(73) 专利权人 德阳市人民医院
地址 618000 四川省德阳市泰山北路173号

(72) 发明人 蒋香梅 秦碧媛 贾新建 鄂建飞
黎君彦

(74) 专利代理机构 北京预立生科知识产权代理
有限公司 11736

代理人 孟祥斌

(51) Int.Cl.

C12Q 1/6886 (2018.01)

A61K 45/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

审查员 彭郁葱

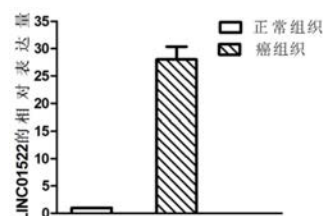
权利要求书1页 说明书10页
序列表2页 附图1页

(54) 发明名称

一种与乳腺癌相关的lncRNA标志物

(57) 摘要

本发明公开了一种与乳腺癌相关的lncRNA标志物,所述标志物为LINC01522。本发明公开了LINC01522在乳腺癌患者中的表达上调,通过检测LINC01522的表达水平可以判断受试者是否患有乳腺癌,同时通过靶向LINC01522,降低LINC01522的水平治疗乳腺癌。



1. 检测LINC01522表达水平的试剂的应用,其特征在于,用于制备诊断Luminal B型乳腺癌的产品,其中,与正常组织相比,LINC01522在癌组织中的表达水平上调。

2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述试剂包括通过反转录PCR、实时定量PCR、原位杂交、芯片技术检测LINC01522表达水平的试剂。

3. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述产品包括芯片或试剂盒,其中,所述芯片或试剂盒包括检测LINC01522表达水平的试剂。

4. 根据权利要求3所述的应用,其特征在于,芯片中检测LINC01522表达水平的试剂包括特异性识别LINC01522基因的探针;试剂盒中检测LINC01522表达水平的试剂包括特异性扩增LINC01522基因的引物或特异性识别LINC01522基因的探针。

5. 根据权利要求4所述的应用,其特征在于,特异性扩增LINC01522基因的引物序列如SEQ ID NO.1~2所示。

6. LINC01522的应用,其特征在于,用于构建预测Luminal B型乳腺癌的计算模型。

7. LINC01522的抑制剂的应用,其特征在于,用于制备治疗Luminal B型乳腺癌的药物组合物,其中所述抑制剂为特异性抑制LINC01522的siRNA。

一种与乳腺癌相关的lncRNA标志物

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药领域,涉及一种与乳腺癌相关的lncRNA标志物,所述标志物为LINC01522。

背景技术

[0002] 乳腺癌作为女性最常见的恶性肿瘤,已经成为我国乃至全球的重大健康问题。根据基因表达谱,Perou等人将乳腺癌分为五种亚型:人类表皮生长因子受体-2 (HER-2) 过表达型,基底样型乳腺癌,Luminal A型,Luminal B型,及与正常组织相似的肿瘤 (Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, et al. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012, Vol. 2015, 2015.)。乳腺癌所有亚型中,Luminal B型乳腺癌所占比例最高,我国近年来有部分研究显示,Luminal B型乳腺癌所占的比例为47.7%和52.8%。除了发病率较高以外,Luminal B型乳腺癌还有激素受体低表达 (Kenyon M, Mayer D K, Owens A K. Late and long-term effects of breast cancer treatment and surveillance management for the general practitioner [J]. J Obstet Gynecol Neonatal Nurs, 2014, 43 (3) : 382-398.)、增殖基因 (MKI67) 和细胞周期相关基因 (CCNB 1和MYBL2表达较高、组织学分级较高等特点。

[0003] Luminal B型乳腺癌由HER-2阳性型和HER-2阴性型两种亚型组成,是一类异质性的疾病。对于Luminal B型乳腺癌的治疗,应该更加注重综合性、个体化和精准化。应根据每位乳腺癌患者的病理特点,选择正确的治疗手段。乳腺癌的治疗包括局部治疗和全身治疗,其中局部治疗分手术治疗、放疗等,全身治疗包括个身化疗、内分泌治疗、和更有针对性的靶向治疗。

[0004] 近年来,随着高通量基因序列和基因芯片技术的研究发现,人类基因组中大约只有2%的基因序列具有编码功能性蛋白的能力,其余90%统称为非编码RNA (non-coding RNA, ncRNA)。lncRNA因不编码多肽而一度被认为是基因转录的“暗物质”,随着越来越多的lncRNA被发现,它的功能也逐渐被证实:lncRNA具有多个分子结合位点,能够影响特定基因的表达来调节蛋白结合因子的活性;lncRNA能作用于RNA聚合酶II等影响表观遗传学,在染色质修饰、调节转录水平和转录后水平等多方面调控细胞的生命活动。近几年的新证据表明,lncRNA可以激活PI3K/AKT, TGF- β 等信号通路,通过调控肿瘤的致癌或抑癌途径参与到肿瘤的进程中。由于lncRNA的种类繁多且作用模式多样,它们在肿瘤发生发展中的作用机制尚不明确,已成为继miRNAs以后新的研究热点。

[0005] 现阶段需要寻找更为准确、更多的肿瘤标志物和治疗靶点,改善传统的癌症评估方法,为乳腺癌的治疗制定个体化方案,评估疗效,预测预后。

发明内容

[0006] 为了弥补现有技术的不足,本发明的目的在于提供一种与乳腺癌发生发展相关的生物标志物,及该标志物在乳腺癌诊断和治疗中的应用,更具体的在Luminal B型乳腺癌诊

断和治疗中的应用。

[0007] 为了实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0008] 本发明提供了LINC01522的应用,用于制备诊断乳腺癌的产品。

[0009] 进一步,所述产品包括检测样本中LINC01522表达水平的试剂。

[0010] 进一步,所述试剂包括通过反转录PCR、实时定量PCR、原位杂交、芯片技术检测LINC01522表达水平的试剂。

[0011] 进一步,所述乳腺癌为Luminal B型乳腺癌。

[0012] 进一步,所述用实时定量PCR技术检测LINC01522表达水平的试剂包括特异性扩增LINC01522的引物。

[0013] 进一步,特异性扩增LINC01522的引物序列如SEQ ID NO.1~2所示。

[0014] 本发明提供了一种诊断乳腺癌的产品,包括芯片或试剂盒,其中,所述芯片或试剂盒包括检测LINC01522表达水平的试剂。

[0015] 进一步,芯片中检测LINC01522表达水平的试剂包括特异性识别LINC01522基因的探针;试剂盒中检测LINC01522表达水平的试剂包括特异性扩增LINC01522基因的引物或特异性识别LINC01522基因的探针。

[0016] 进一步,特异性扩增LINC01522基因的引物序列如SEQ ID NO.1~2所示。

[0017] 本发明提供了LINC01522的应用,用于构建预测乳腺癌的计算模型。

[0018] 本发明提供了LINC01522的应用,用于筛选治疗乳腺癌的候选药物。

[0019] 本发明提供了LINC01522的应用,用于制备治疗乳腺癌的药物组合物。

[0020] 进一步,所述药物组合物包括LINC01522的抑制剂,所述抑制剂以LINC01522其为靶序列、且能够抑制LINC01522表达水平的试剂,包括:shRNA(小发夹RNA)、小干扰RNA(siRNA)、dsRNA、微小RNA、反义核酸,或能表达或形成所述shRNA、小干扰RNA、dsRNA、微小RNA、反义核酸的构建物等。

[0021] 进一步,所述抑制剂为siRNA。

[0022] 作为一种优选的实施方式,所述siRNA的序列如SEQ ID NO.5~6所示。

附图说明

[0023] 图1是利用QPCR检测LINC01522基因在乳腺癌组织中的表达情况图。

[0024] 图2是利用QPCR检测siRNA沉默LINC01522的情况图。

[0025] 图3是利用CCK-8检测LINC01522对乳腺癌BT474细胞的增殖影响图。

[0026] 具体的实施方式

[0027] 本发明经过广泛而深入的研究,通过高通量测序的方法,检测乳腺癌标本中lncRNA在肿瘤组织和正常组织的表达,发现其中具有明显表达差异的lncRNA,探讨其与乳腺癌的发生之间的关系,从而为乳腺癌的诊断及靶向治疗寻找更好的途径和方法。通过筛选,本发明首次发现了LINC01522在乳腺癌组织中显著上调,提示LINC01522可作为乳腺癌的诊断标志物以及治疗靶标。

[0028] 术语“LINC01522”位于20号染色体上,基因ID为101927457,包括LINC01522基因及其的同源物,突变,和同等型。该术语涵盖全长,未加工的LINC01522,以及源自细胞中加工的任何形式的LINC01522。该术语涵盖LINC01522的天然发生变体(例如剪接变体或等位变

体)。该术语涵盖例如LINC01522基因,人LINC01522的基因序列(NR_110027.1),以及来自任何其它脊椎动物来源。

[0029] 本领域技术人员应当理解,测定基因表达的手段不是本发明的重要方面。可以在转录水平上检测生物标志物的表达水平。本发明可以利用本领域内已知的任何方法测定基因表达。

[0030] 如本文中使用的,术语“标志物”“生物标志物”指具有特异性生物学特性、生物化学特征或者方面的分子指示物,其可用于确定存在或不存在特定疾病或状况和/或特定疾病或状况的严重程度。本发明中的标志物指能在样品中检测且包括例如LINC01522的指标分子或分子集合(例如预测,诊断,和/或预后指标)。生物标志物可以是预测生物标志物且充当具有特定疾病或病症。生物标志物包括但不限于多核苷酸(例如DNA和/或RNA(例如mRNA)),多核苷酸拷贝数改变(例如DNA拷贝数)。

[0031] 如本文中使用的,生物标志物的“量”或“水平”是生物学样品中的可检测水平。这些可通过本领域技术人员已知的及本文中公开的方法来测量。

[0032] 本文所用术语“差异表达”表示与第二种样品中相同的一种或多种本发明生物标志物的表达水平比较,经测定RNA的量或水平,在一个样品中本发明的一种或多种生物标志物的RNA和/或所述生物标志物RNA的一种或多种剪接变体表达水平的差异。差异表达可以如本文所述和本领域技术人员理解的方法确定。术语“差异表达”或“表达水平的变化”表示与第二种样品中给定生物标志物的可测定表达水平比较,经测定RNA的量,样品中给定生物标志物可测定表达水平的增加或降低。术语“差异表达”或“表达水平的变化”还可以表示与第二个样品群中生物标志物的可测定表达水平比较,样品群中给定生物标志物可测定表达水平的增加或降低。本文所用“差异表达”可以用给定生物标志物的表达水平相对于对照中给定生物标志物的平均表达水平的比率进行测定,其中比率不等于1.0。还可以用p值测定差异表达。当使用p值时,当p值小于0.1时生物标志物被鉴定为在第一和第二群体之间差异表达。更优选p值小于0.05。甚至更优选p值小于0.01。还更优选p值小于0.005。最优选p值小于0.001。当基于比率确定差异表达时,如果第一种和第二种样品中表达水平的比率大于或小于1.0,则RNA是差异表达的。举例来说,大于1.2、1.5、1.7、2、3、4、10、20的比率,或小于1的比率,例如0.8、0.6、0.4、0.2、0.1、0.05。在本发明的另一个实施方案中,如果第一群体的平均表达水平与第二群体的平均表达水平的比率大于或小于1.0,则核酸转录本是差异表达的。举例来说,大于1.2、1.5、1.7、2、3、4、10、20的比率,或小于1的比率,例如0.8、0.6、0.4、0.2、0.1、0.05。在本发明的另一个实施方案中,如果第一个样品中表达水平与第二个群体中平均表达水平的比率大于或小于1.0,例如包括比率大于1.2、1.5、1.7、2、3、4、10、20,或比率小于1,例如0.8、0.6、0.4、0.2、0.1、0.05,则核酸转录本是差异表达的。

[0033] “表达差异增加”或“上调”表示基因相对于对照而言,基因表达(以RNA表达或蛋白质表达测定)显示增加至少10%或更多,例如20%、30%、40%或50%、60%、70%、80%、90%或更多或1.1倍、1.2倍、1.4倍、1.6倍、1.8倍或更多。

[0034] “表达差异降低”或“下调”表示基因相对于对照而言,基因表达(以RNA表达或蛋白质表达测定)显示降低至少10%或更多,例如20%、30%、40%或50%、60%、70%、80%、90%或少于1.0倍、0.8倍、0.6倍、0.4倍、0.2倍、0.1倍或更少的基因。例如,上调基因包括与从正常个体分离的RNA或蛋白的表达相比,从以患有乳腺癌为特征的个体分离的样本中RNA

或蛋白表达水平增加的基因。例如,下调基因包括与从正常个体分离的样本相比,从以患有乳腺癌为特征的个体分离的样本中RNA或蛋白表达水平降低的基因。

[0035] 在本发明中,LINC01522在乳腺癌患者中具有增加的表达水平。

[0036] 芯片、试剂盒

[0037] 本发明提供了检测中LINC01522基因的表达水平的产品,所述产品包括(但不限于)芯片或试剂盒。其中芯片包括:固相载体;以及有序固定在所述固相载体上的寡核苷酸探针,所述的寡核苷酸探针特异性地对应于LINC01522所示的部分或全部序列。

[0038] 所述固相载体包括无机载体和有机载体,所述无机载体包括但不限于有硅载体、玻璃载体、陶瓷载体等;所述有机载体包括聚丙烯薄膜、尼龙膜等。

[0039] 如本文中所使用的,“寡核苷酸”一般指短的,单链的多核苷酸,其在长度上小于约250个核苷酸,但这不是必须的。寡核苷酸可以是合成的。术语“寡核苷酸”和“多核苷酸”并不互相排斥。上文关于多核苷酸的描述同样且完全可适用于寡核苷酸。

[0040] 术语“探针”指能与另一分子的特定序列或亚序列或其它部分结合的分子。除非另有指出,术语“探针”通常指能通过互补碱基配对与另一多核苷酸(往往称为“靶多核苷酸”)结合的多核苷酸探针。根据杂交条件的严格性,探针能和与该探针缺乏完全序列互补性的靶多核苷酸结合。探针可作直接或间接的标记,其范围包括引物。杂交方式,包括,但不限于:溶液相、固相、混合相或原位杂交测定法。

[0041] 作为探针,可以使用荧光标记、放射标记、生物素标记等对癌检测用多核苷酸进行了标记的标记探针。多核苷酸的标记方法本身是公知的。可通过如下方法检查试样中是否存在受试核酸:固定受试核酸或者其扩增物,与标记探针进行杂交,洗涤,以及然后测定与固相结合标记。备选地,还可固定癌检测用多核苷酸,使受试核酸与其杂交,然后应用标记探针等检测结合于固相上的受试核酸。在这种情况下,结合于固相上的癌检测用多核苷酸也称为探针。使用多核苷酸探针测定受试核酸的方法在本领域也是公知的。可以如下进行该方法:在缓冲液中使多核苷酸探针与受试核酸在 T_m 或者其附近(优选在 $\pm 4^\circ\text{C}$ 以内)接触用于杂交,洗涤,然后测定杂交的标记探针或者与固相探针结合的模板核酸。

[0042] 在作为探针使用的多核苷酸的大小优选为18个或更多个核苷酸、更优选为20个或更多个核苷酸,以及编码区域的全长或更少。作为引物使用时,该多核苷酸大小优选为18个或更多个核苷酸,以及50个或更少核苷酸。这些探针具有与靶点基因的特定的碱基序列互补的碱基序列。这里,所谓“互补”,只要是杂交即可,可以不是完全互补。这些多核苷酸通常相对于该特定的碱基序列具有80%以上、优选90%以上、更优选95%以上、特别优选100%的同源性。这些探针可以是DNA,也可以是RNA,另外,可以为在其一部分或全部中核苷酸通过PN、LNA、ENA、GNA、TNA等人工核酸置换得到的多核苷酸。

[0043] 术语“引物”指短核酸序列,作为具有短的游离3'末端羟基(游离3'羟基)的核酸序列,它可以与互补模板(template)形成碱基对(basepair)并充当复制模板的起点。在本发明中,可以通过以下方式预测食管鳞癌预后:通过进行使用本发明的标记多核苷酸的有义和反义引物的PCR扩增,所需的产物是否产生。可以基于本领域已知内容修改PCR条件和有义引物和反义引物的长度。

[0044] 本发明的试剂盒包括检测LINC01522基因的试剂,选自下组的一种或多种物质:容器、使用说明书、阳性对照物、阴性对照物、缓冲剂、助剂或溶剂。

[0045] 本发明的试剂盒中还可附有试剂盒的使用说明书,其中记载了如何采用试剂盒进行检测,和如何利用检测结果对肿瘤发展进行判断、对治疗方案进行选择。

[0046] 试剂盒的组分可以以水介质的形式或以冻干的形式来包装。试剂盒中适当的容器通常至少包括一种小瓶、试管、长颈瓶、宝特瓶、针筒或其它容器,其中可放置一种组分,并且优选地,可进行适当地等分。在试剂盒中存在多于一种的组分时,试剂盒中通常也将包含第二、第三或其它附加的容器,其中分离地放置附加的组分。然而,不同组合的组分可被包含在一个小瓶中。本发明的试剂盒通常也将包括一种用于容纳反应物的容器,密封以用于商业销售。这种容器可包括注模或吹模的塑料容器,其中可保留所需的小瓶。

[0047] 本发明提供了LINC01522在制备预测乳腺癌的计算模型中的应用。正如熟练技术人员可以领会的,可以使用两种或更多种标志物的测量来改进调查中的诊断问题。生化标志物可以个别测定,或者在本发明的一个实施方案中,它们可以同时测定,例如使用芯片或基于珠的阵列技术。然后独立解读生物标志物的浓度,例如使用每种标志物的个别截留,或者它们组合进行解读。

[0048] 在本发明中,可以以不同方式实施和实现将标志物水平与某种可能性或风险关联起来的步骤。优选地,在数学上组合基因和一种或多种其它标志物的测定浓度,并将组合值与根本的诊断问题关联起来。可以通过任何适宜的现有技术数学方法将标志物值的测定组合。

[0049] 抑制剂

[0050] 在本发明中,LINC01522的抑制剂选自:以LINC01522或其转录本为靶序列、且能够抑制LINC01522基因表达或基因转录的干扰分子,包括:shRNA(小发夹RNA)、小干扰RNA(siRNA)、dsRNA、微小RNA、反义核酸,或能表达或形成所述shRNA、小干扰RNA、dsRNA、微小RNA、反义核酸的构建物。

[0051] 下面结合附图和实施例对本发明作进一步详细的说明。以下实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围。实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,或按照制造厂商所建议的条件。

[0052] 实施例1筛选与乳腺癌相关的基因标志物

[0053] 1、样品收集

[0054] 分别收集4例Luminal B型乳腺癌的癌组织及相对应的正常组织样本(距离肿瘤边缘5公分),进行高通量测序,所有患者术前未进行化疗、放疗以及内分泌治疗,所有患者均知情同意,上述所有标本的取得均通过组织伦理委员会的同意,病人信息如表1所示。

[0055] 表1样本信息

| 病人编码 | 转移 | 性别 | 年龄 | T | N | M | 样本名称 | 管数 | 样本类型 | 样本类别 |
|------|----|----|----|---|---|---|------|----|------|--------------------|
| 5 | 否 | 女 | 56 | 3 | 0 | 0 | 5A | 3 | 组织 | 癌组织 |
| | | | | | | | 5B | 3 | 组织 | 癌旁组织 (距离肿瘤边缘 2 公分) |
| | | | | | | | 5C | 3 | 组织 | 正常组织 (距离肿瘤边缘 5 公分) |
| 9 | 否 | 女 | 46 | 2 | 1 | 0 | 9A | 3 | 组织 | 癌组织 |
| | | | | | | | 9B | 3 | 组织 | 癌旁组织 (距离肿瘤边缘 2 公分) |
| | | | | | | | 9C | 3 | 组织 | 正常组织 (距离肿瘤边缘 5 公分) |
| 11 | 否 | 女 | 52 | 2 | 1 | 0 | 11A | 3 | 组织 | 癌组织 |
| | | | | | | | 11B | 3 | 组织 | 癌旁组织 (距离肿瘤边缘 2 公分) |
| | | | | | | | 11C | 3 | 组织 | 正常组织 (距离肿瘤边缘 5 公分) |
| 15 | 否 | 女 | 52 | 2 | 1 | 0 | 15A | 3 | 组织 | 癌组织 |
| | | | | | | | 15B | 3 | 组织 | 癌旁组织 (距离肿瘤边缘 2 公分) |
| | | | | | | | 15C | 3 | 组织 | 正常组织 (距离肿瘤边缘 5 公分) |

[0057] 2、RNA样品的制备及质量分析

[0058] 使用TRIZOL法提取组织总RNA

[0059] 1) 用剪刀组织剪碎,加入1ml Trizol,振荡器上震荡1min;常温放置10min,使核蛋白体完全分解。

[0060] 2) 加入200 μ l三氯甲烷(氯仿),盖紧管盖,剧烈震荡15s,常温静置10min。

[0061] 3) 4 $^{\circ}$ C,11000rpm离心15min。

[0062] 4) 将水样层转移到一个新的离心管中,加入500 μ l异丙醇;颠倒混匀后,常温静置10min。

[0063] 5) 4 $^{\circ}$ C,11000rpm离心15min。

[0064] 6) 用枪小心吸走液体,留沉淀在管底,加入1ml 75%的乙醇,在振荡器上震荡5s,洗涤沉淀一次。

[0065] 7) 4 $^{\circ}$ C,8000rpm离心5min。

[0066] 8) 将上清小心去掉,干燥沉淀10min,加入适量的水溶解沉淀10min。

[0067] 9) 检测RNA浓度,鉴定RNA的产量和纯度。

[0068] 3、cDNA文库的构建及测序

[0069] 1) 总RNA DNase I消化:利用DNase I消化Total RNA样品中存在的DNA片段,磁珠纯化回收反应产物,最后溶解于DEPC水;

[0070] 2) 去除rRNA:取消化好的Total RNA样品,使用Epicentre的Ribo-Zero试剂盒去除rRNA,去除之后进行Agilent 2100检测,验证rRNA去除效果;

[0071] 3) RNA打断:取上一步样品,加入打断Buffer,置于PCR仪中进行热打断,打断到140-160nt;

[0072] 4) 反转录一链的合成:向打断后的样品中加入适量引物,充分混匀后在Thermomixer适温反应一定时间,使之打开二级结构并与引物结合,再加入提前配制的一链合成反应体系Mix,在PCR仪上按相应程序合成一链cDNA;

[0073] 5) 反转录二链的合成:配制二链合成反应体系,在Thermomixer上适温反应一定时间,合成带有dUTP的二链cDNA,反应产物用磁珠进行纯化回收;

[0074] 6) 末端修复:配制末端修复反应体系,在Thermomixer中适温反应一定时间,在酶的作用下,对反转录得到的cDNA双链的粘性末端进行修复,末端修复产物用磁珠进行纯化回收,最后将样品溶于EB Solution;

[0075] 7) cDNA3' 末端加“A”:配制加“A”反应体系,在Thermomixer中适温反应一定时间,在酶的作用下,使末端修复的产物cDNA的3' 末端加上A碱基;

[0076] 8) cDNA5' adapter的连接:配制接头连接反应体系,在Thermomixer中适温反应一定时间,在酶的作用下,使接头与A碱基连接,产物用磁珠进行纯化回收;

[0077] 9) UNG消化cDNA二链:配制UNG消化反应体系,通过UNG酶消化掉双链DNA中的二链,并用磁珠对产物进行纯化回收;

[0078] 10) PCR反应及产物回收:配制PCR反应体系,选择适当的PCR反应程序,对上步骤得到的产物进行扩增,对PCR产物进行磁珠纯化回收,回收产物溶于EB溶液中,贴上标签。

[0079] 11) 文库质量检测:使用Agilent 2100Bioanalyzer和ABI StepOnePlus Real-Time PCR System对文库质量进行检测;

[0080] 12) 上机测序:检测合格的文库,加入NaOH变性成单链,按照预期上机数据量,稀释至一定的上机浓度。变性稀释后的文库加入到FlowCell内,与FlowCell上的接头杂交,在cBot上完成桥式PCR扩增,最后使用Illumina Hiseq x-ten平台进行测序。

[0081] 4、生物信息学分析

[0082] 1) 用cutadapt对reads的5' 和3' 段进行trim,trim掉质量<20的碱基,并且删掉N大于10%的reads;

[0083] 2) hisat2比对到参考基因组上。参考基因组来自于Ensembl数据库,基因组版本GRCh38,基因注释信息为Ensemble 92;

[0084] 3) stringtie定量lncRNA的表达量并标准化输出;

[0085] 4) edgeR包比较对照组跟疾病组lncRNA的表达差异,差异变动lncRNA的筛选标准是 $|\log_2FC| > 1$ 且 $pvalue < 0.05$ 。

[0086] 5、结果

[0087] 测序数据如表2所示,生物信息学分析发现,LINC01522在乳腺癌患者中表达显著上调,提示LINC01522可以作为可能的检测靶标应用于乳腺癌的早期诊断。

[0088] 表2测序数据

| 分组 | 样本编码 | 数据名称 | Clean Reads | Clean bases | Read length (bp) | Q20(%) | GC(%) | |
|--------|------|------|-------------|----------------|------------------|--------|--------|--------|
| [0089] | 5A | 5A1 | 68,006,922 | 10,201,038,300 | 150 | 98.52% | 49.72% | |
| | 癌组 | 9A | 67,740,702 | 10,161,105,300 | 150 | 98.53% | 49.95% | |
| | 织 | 11A | 11A1-2 | 67,797,572 | 10,169,635,800 | 150 | 98.50% | 49.62% |
| | | 15A | 15A1 | 67,600,076 | 10,140,011,400 | 150 | 98.53% | 49.70% |
| 正常 | 5C | 5C1 | 67,425,326 | 10,113,798,900 | 150 | 98.68% | 51.08% | |
| | 组织 | 9C | 9C2 | 67,033,800 | 10,055,070,000 | 150 | 98.75% | 51.80% |
| [0090] | 11C | 11C1 | 67,942,178 | 10,191,326,700 | 150 | 98.59% | 49.43% | |
| | 15C | 15C1 | 68,160,690 | 10,224,103,500 | 150 | 98.72% | 50.00% | |

- [0091] 实施例2 QPCR测序验证LINC01522基因的差异表达
- [0092] 1、按照实施例1的收集方式收集的25例luminal B型乳腺癌患者癌组织样本和正常组织样本对LINC01522基因差异表达进行大样本QPCR验证。
- [0093] 2、RNA提取
- [0094] 利用Trizol法提取组织RNA,具体步骤参见实施例1。
- [0095] 3、逆转录:使用TAKARA公司的反转录试剂盒(Takara code:DRR047A)进行操作。
- [0096] 1) 去除基因组DNA
- [0097] 在试管中加入5×gDNA Eraser Buffer 2.0μl,gDNA Eraser 1.0μl,总RNA 1μg,加Rnase Free ddH₂O使总体积至10μl,水浴锅中42℃加热2min。
- [0098] 2) 反转录反应
- [0099] 将5×PrimeScript®Buffer 2 4.0μl,PrimeScript®RT Enzyme Mix I 1.0μl,RT Primer Mix 1.0μl,RNase Free ddH₂O 4.0μl加入上述试管中一起混合共20μl,水浴锅中37℃15min,85℃5s。
- [0100] 4、QPCR扩增
- [0101] 1) 引物设计
- [0102] 根据LINC01522和GADPH的基因序列设计引物,具体引物序列如下:
- [0103] LINC01522基因:
- [0104] 正向引物为5'-CAACATCAACAGGACAAG-3'(SEQ ID NO.1);
- [0105] 反向引物为5'-GTTCTCATTCTCCATCTTC-3'(SEQ ID NO.2)。
- [0106] GAPDH基因:
- [0107] 正向引物为5'-AATCCCATCACCATCTTCCAG-3'(SEQ ID NO.3);
- [0108] 反向引物为5'-GAGCCCCAGCCTTCTCCAT-3'(SEQ ID NO.4)。
- [0109] 2) QPCR扩增检验
- [0110] 用SYBR®Premix Ex Taq™II(Takara Code:DRR081)试剂盒配置PCR反应体系,在Thermal Cycler Dice®Real Time System扩增仪上进行PCR扩增,反应结束后确认Real Time PCR的扩增曲线和溶解曲线,ΔΔCT法进行相对定量。
- [0111] 配置25μl反应体系:
- [0112] SYBR®Premix Ex Taq™II(2×)12.5μl,正(反)向引物各1μl,DNA模板2μl,灭菌蒸馏水8.5μl。
- [0113] 反应条件:95℃30s,(95℃5s,60℃30s)×40
- [0114] 5、结果
- [0115] QPCR结果如图1所示,与正常组织相比,LINC01522在乳腺癌组织中表达上调,差异具有统计学意义(P<0.05),同高通量测序结果一致,提示LINC01522可作为生物标志物应用于乳腺癌的诊断和治疗,也即通过检测LINC01522的水平可以判断受试者是否患有乳腺癌,当LINC01522的水平显著增加时,受试者患有乳腺癌或者存在患有乳腺癌的风险,通过LINC01522与乳腺癌之间的关系可以设计靶向LINC01522的shRNA、siRNA从而治疗乳腺癌。
- [0116] 其中,LINC01522在24例样本中表达上调,在26例样本中无显著性差异,24例上调样本中有21例为癌组织样本,3例为癌旁组织样本具体情况如表3所示。
- [0117] 表3基因在疾病中的阳性情况表

| | | 实际患病情况 | |
|---------------------|----|---------|----------|
| | | 患病（癌组织） | 健康（癌旁组织） |
| [0118] LINC01522 | 阳性 | 21 | 3 |
| | 阴性 | 4 | 22 |

[0119] 实施例3 LINC01522在乳腺癌细胞系中的表达情况

[0120] 1、细胞培养

[0121] 培养Luminal B型乳腺癌的BT474细胞系,细胞在含10%胎牛血清(Gibco公司)的DMEM培养液中,于5%CO₂,37℃的恒温培养箱中进行培养。

[0122] 2、转染

[0123] 本申请所用的通用siRNA-NC、siRNA-LINC01522购自上海吉码制药技术有限公司,沉默LINC01522的siRNA1和siRNA2序列如下所示。

[0124] siRNA1的序列:

[0125] 正义链为5' -UUCUCAUUCUCCAUCUCCUU-3' (SEQ ID NO.5)

[0126] 反义链为5' -GGAAGAUGGAGAAUGAGAACA-3' (SEQ ID NO.6)

[0127] siRNA2的序列:

[0128] 正义链为5' -UUGAUGUUGGCUUUGGUUGUG-3' (SEQ ID NO.7)

[0129] 反义链为5' -CAACCAAAGCCAACAUCAACA-3' (SEQ ID NO.8)

[0130] 使用Invitrogen公司的Lipofectamin™2000试剂盒提供的方法,将LINC01522的siRNA转染至生长对数期的乳腺癌BT474细胞,细胞转染前准备取培养箱中提前种植在6孔板中的细胞,转染后24h,对6孔板中细胞进行换液并继续培养。将实验分为3组,对照组(BT474)、阴性对照组(siRNA-NC)和实验组(siRNA1-3)。

[0131] 4、QPCR检测LINC01522的表达水平

[0132] 1) RNA的提取

[0133] 在细胞转染后48h,使用Trizol法提取细胞RNA。

[0134] 2) QPCR检测步骤同实施例2

[0135] 5、结果

[0136] 实验结果如图2所示,对照组(BT474)和阴性对照组(siRNA-NC)之间,LINC01522的表达水平无显著性差异($P>0.05$),相比对照组和阴性对照组,实验组能够显著降低LINC01522的表达水平,差异具有统计学意义($P<0.05$),其中siRNA1的效果最为显著,因此选择siRNA1进行后续的实验。

[0137] 实施例4CCK-8法检测LINC01522基因对乳腺癌细胞增殖的影响

[0138] 将转染siRNA1的乳腺癌细胞作为实验组,转染siRNA-NC的细胞作为对照组,加入到96孔板中,每孔加入的细胞数量为5000个,每组设置5个复孔。分别用于24h、48h、72h、96h检测时间点检测。

[0139] 检测时,细胞孔中加入10 μ l的CCK-8检测液,将96孔板继续放入细胞培养箱中孵育4h左右,用酶标仪检测各孔在450nm波长处的吸光度值并记录数据,根据检测的OD值的平均值,绘制生长曲线。

[0140] 生长曲线结果显示,实验组在转染siRNA后,细胞的增殖能力明显低于对照组(图3),说明LINC01522影响乳腺癌细胞的增殖,通过改变LINC01522的表达水平可以改变乳腺

癌细胞的增殖能力。

[0141] 实施例5Transwell小室检测LINC01522对细胞迁移及侵袭的影响

[0142] 1、Transwell小室制备

[0143] 无菌条件下Matrigel冰浴融化后按1:8比例稀释Matrigel胶,在Transwell上室内部缓慢加入上室底部,铺胶后迅速移入37℃的细胞培养箱中温育至其凝固成胶状。

[0144] 2、上室加入数量为 1×10^5 的100 μ l细胞悬液,下室加入600 μ l含10%胎牛血清培养基,每组设置3个复孔,37℃下恒温培养箱内培养24h。

[0145] 3、染色

[0146] 取出Transwell用PBS洗2遍,使用多聚甲醛进行固定,加入结晶紫染色,室温染色20min,用PBS漂洗2遍,放入荧光显微镜下观察并计数。

[0147] 4、结果

[0148] Transwell实验结果显示,转染siRNA的实验组细胞迁移和侵袭数目相比对照组并无显著变化($P > 0.05$),说明LINC01522对乳腺癌的侵袭和转移无显著作用。

[0149] 上述实施例的说明只是用于理解本发明的方法及其核心思想。应当指出,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以对本发明进行若干改进和修饰,这些改进和修饰也将落入本发明权利要求的保护范围内。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 德阳市人民医院
- [0003] <120> 一种与乳腺癌相关的lncRNA标志物
- [0004] <150> 2019102986126
- [0005] <151> 2019-04-15
- [0006] <160> 8
- [0007] <170> SIP0SequenceListing 1.0
- [0008] <210> 1
- [0009] <211> 18
- [0010] <212> DNA
- [0011] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0012] <400> 1
- [0013] caacatcaac aggacaag 18
- [0014] <210> 2
- [0015] <211> 19
- [0016] <212> DNA
- [0017] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0018] <400> 2
- [0019] gttctcattc tccatcttc 19
- [0020] <210> 3
- [0021] <211> 21
- [0022] <212> DNA
- [0023] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0024] <400> 3
- [0025] aatcccatca ccatcttcca g 21
- [0026] <210> 4
- [0027] <211> 19
- [0028] <212> DNA
- [0029] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0030] <400> 4
- [0031] gagccccagc cttctccat 19
- [0032] <210> 5
- [0033] <211> 21
- [0034] <212> RNA
- [0035] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0036] <400> 5
- [0037] uucucauucu ccaucuuccu u 21
- [0038] <210> 6

-
- [0039] <211> 21
[0040] <212> RNA
[0041] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0042] <400> 6
[0043] ggaagaugga gaaugagaac a 21
[0044] <210> 7
[0045] <211> 21
[0046] <212> RNA
[0047] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0048] <400> 7
[0049] uugauguugg cuuugguugu g 21
[0050] <210> 8
[0051] <211> 21
[0052] <212> RNA
[0053] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0054] <400> 8
[0055] caaccaaagc caacaucaac a 21

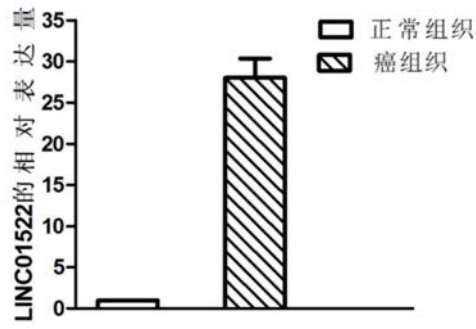


图1

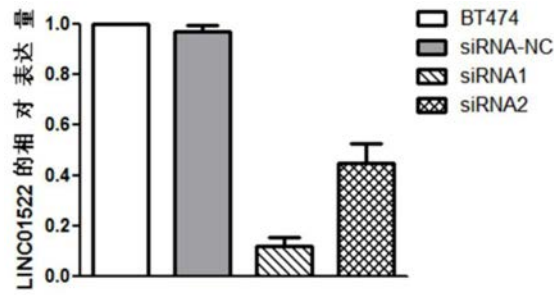


图2

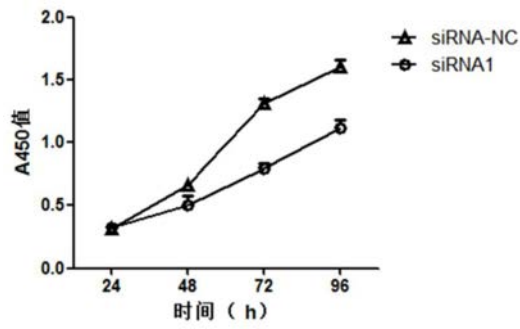


图3