



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110468134 A

(43)申请公布日 2019.11.19

(21)申请号 201910800013.X

(22)申请日 2019.08.28

(71)申请人 深圳大学

地址 518000 广东省深圳市南山区南海大道3688号

(72)发明人 翟日洪 杨文瀚 钱有辉 和琪涵

(74)专利代理机构 深圳中一联合知识产权代理有限公司 44414

代理人 方良

(51) Int. Cl.

C12N 15/113(2010.01)

C12Q 1/6886(2018.01)

A61K 31/7105(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

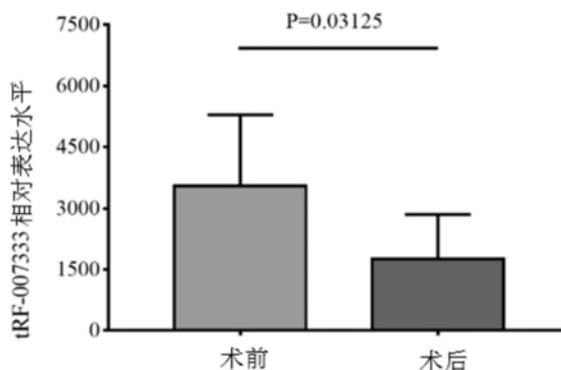
权利要求书1页 说明书11页
序列表2页 附图8页

(54)发明名称

一种与NSCLC相关的tRF及其应用

(57)摘要

本发明属于分子诊断技术领域,具体涉及一种与非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)相关的tRNA来源片段(tRNA-derived fragment, tRF)及其应用。本发明通过实验分析证明一种具有显著促癌活性的tRF(AS-tDR-007333,核苷酸序列如SEQ ID No.1所示),该tRF在NSCLC癌组织中、在NSCLC病人血浆中、以及在NSCLC细胞中的表达均分别显著高于癌旁组织、健康人血浆,以及正常支气管上皮细胞。研究结果表明该tRF具有显著的促进NSCLC细胞肿瘤活性的能力;抑制该tRF的表达可显著抑制NSCLC细胞的增殖。



1. 一种与NSCLC相关的tRF,其特征在于,所述tRF的核苷酸序列如SEQ ID No.1所示。
2. 一种tRF在制备用于诊断和/或预后评估NSCLC的试剂盒中的应用;其中,所述tRF的核苷酸序列如SEQ ID No.1所示。
3. 如权利要求2所述的应用,其特征在于,用于扩增所述tRF的引物如SEQ ID No.2和SEQ ID No.3所示。
4. 一种用于诊断和/或预后评估NSCLC的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒含有如SEQ ID No.1所示的tRF分子。
5. 如权利要求4所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括用于扩增所述tRF的引物,所述引物如SEQ ID No.2和SEQ ID No.3所示;和/或,所述试剂盒包括PCR扩增酶和PCR扩增缓冲液;和/或,所述试剂盒还包括如SEQ ID No.4所示的阴性对照。
6. 一种抑制如权利要求1所述的tRF表达的抑制剂,其特征在于,所述抑制剂为如SEQ ID No.5所示的RNA单链。
7. 一种tRF的抑制剂在制备用于预防和/或治疗NSCLC的药物中的应用;其中,所述tRF的核苷酸序列如SEQ ID No.1所示。
8. 如权利要求7所述的应用,其特征在于,所述抑制剂为如SEQ ID No.5所示的RNA单链。
9. 一种用于预防和/或治疗NSCLC的药物,其特征在于,所述药物含有能抑制如SEQ ID No.1所示的tRF表达的抑制剂以及药物学可接受的载体。
10. 如权利要求9所述的药物,其特征在于,所述抑制剂为如SEQ ID NO:5所示的RNA单链。

一种与NSCLC相关的tRF及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于分子诊断技术领域,具体涉及一种与NSCLC相关的tRF及其应用。

背景技术

[0002] 肺癌是世界上发病率及死亡率最高,对人类健康危害最大的恶性肿瘤之一。全球每年大约有160万人死于肺癌;其中,非小细胞肺癌(non-small cell lungcancer,NSCLC)约占肺癌总数的80%,是癌症导致死亡的最常见原因。在中国,肺癌不仅是最常见的恶性肿瘤,而且在过去的20多年里其发病率和死亡率均呈上升态势。根据世界卫生组织预测,如果不能采取有效的防治措施,中国到2025年每年将有超过一百万的新发肺癌患者,严重威胁国人的生命健康。

[0003] 在临床上,外科手术是治疗早期NSCLC的有效方法。病理分期为IA的患者,手术后5年生存率可达80-90%;而IIB的病人术后5年存活率仅有56%。但由于NSCLC早期无典型的临床症状和体征以及缺乏有效的早期诊断方法,70%以上的患者确诊时肿瘤已局部晚期或发生转移(III-IV期),失去了手术治疗的机会,5年存活率低于20%。虽然近年来在化疗、靶向药物、免疫治疗等中晚期NSCLC的治疗手段方面取得了明显的进步,但NSCLC总体治疗效果并不理想,NSCLC病人总的5年生存率仍然低于20%。因此,提高早期诊断水平,对病人进行早期治疗是提高NSCLC生存率的关键。

[0004] 目前,肺癌的诊断方法主要依靠影像学(X线胸片,CT和螺旋CT,PET,MRI等),痰脱落细胞检查,支气管镜检查,胸腔镜和纵隔镜检查等。这些检查方法虽然对指导临床诊断和制定治疗方案有较高的实用价值,但总的来说敏感性和特异性只有大约60%,误诊率接近40%。另外,这些检查方法所检测到的异常改变反映的是病变的终点而不是起点,因而早期诊断价值非常有限。为了能从分子水平上筛选出早期肺癌病人,为更有效的治疗提供依据,近年来,许多学者从RNA,DNA,以及蛋白质水平对NSCLC早期诊断分子标记物进行了大量研究,发现了一些有一定价值的分子标记物,如癌胚抗原(CEA),糖蛋白类抗原,细胞角蛋白19片段,组织多肽抗原,血清淀粉样蛋白A,EGFR、PKM2,癌基因与抑癌基因(p53、K-Ras)突变等。但这些分子标记物诊断NSCLC的敏感性及特异性均不够理想,而且研究结果常常不太一致。至今尚无一种分子标记物能在临床上用于NSCLC的早期诊断。因此,探索NSCLC病理过程中起关键作用的活性分子,寻找高敏感度和特异度的早期诊断标志物,仍然是当前NSCLC防治中亟待解决的重大公共卫生问题。

[0005] 转运RNA(transfer RNA,tRNA)是由73~90个核苷酸(nt)组成的小非编码RNA(small non-coding RNA,sncRNA)。其一级结构具有稀有碱基;二级结构是经典的三叶草形状,由D环、反密码子环、T ψ C环、D茎、反密码子茎、T ψ C茎、氨基酸接受茎和一个可变臂组成。不同的tRNA可变臂长短不一,核苷酸数从二到十几不等。除可变臂和D环外,其他各个部位的核苷酸数目和碱基对基本上是恒定的,这些成分对维系tRNA三级结构的倒“L”型具有重要作用。tRNA在人体内分布广泛且含量丰富,占细胞中RNA的4-10%,其经典作用是携带氨基酸进入核糖体,以mRNA为模板,将其中具有密码意义的核苷酸序列翻译成蛋白质中的氨

氨基酸序列。但近年来的研究发现,tRNA除了参与蛋白质合成的“经典”功能以外,还具有调控细胞代谢和细胞功能的“非经典作用”。tRNA的表达失调与癌症的发生发展有密切的关系。

[0006] 在细胞内,DNA分子上的tRNA基因在RNA聚合酶Ⅲ催化下转录成tRNA前体,然后加工为长度为70-90个核苷酸(nt)的成熟的tRNA。在特定的情况下,成熟的tRNA或tRNA前体被RNase Z、Dicer、Angiogenin等核酸内切酶特异性剪切,产生tRNA来源片段(tRNA-derived fragment,tRF,长度14-30nt)或tRNA半分子(tRNA halves,tiRNAs,长度29-50nt)。根据酶切位置的不同,tRNA相关片段可分为5'-tiRNA、3'-tiRNA、tRF-5、tRF-3、tRF-1、i-tRF等几大类。tRF最初被认为是tRNA的代谢降解产物,无任何生物学功能,其重要性长期为科研人员所忽视。直到最近两年,它们的生物学功能才逐渐被发现。有研究证据表明,tRF在多种肿瘤组织中异常表达,tRF的异常表达与沉默基因、基因翻译、核酸合成及细胞增殖等生物学过程有密切关系。但tRF在NSCLC发生发展中的调控作用及机制尚不清楚。

[0007] 因此,现有技术有待改进。

发明内容

[0008] 本发明的目的在于提供一种与NSCLC相关的tRF(AS-tDR-007333)及其应用,旨在解决现有非小细胞肺癌的诊断分子标志物有限的技术问题。

[0009] 为实现上述发明目的,本发明采用的技术方案如下:

[0010] 一方面,本发明提供一种与NSCLC相关的tRF,所述tRF的核苷酸序列如SEQ ID No.1所示。

[0011] 另一方面,本发明还提供一种tRF在制备用于诊断和/或预后评估NSCLC的试剂盒中的应用;其中,所述tRF的核苷酸序列如SEQ ID No.1所示。

[0012] 在一实施例中,用于扩增所述tRF的引物如SEQ ID No.2和SEQ ID No.3所示。

[0013] 相应地,本发明还提供一种用于诊断和/或预后评估NSCLC的试剂盒,所述试剂盒含有如SEQ ID No.1所示的tRF分子。

[0014] 在一实施例中,所述试剂盒还包括用于扩增所述tRF的引物,所述引物如SEQ ID No.2和SEQ ID No.3所示;和/或,

[0015] 所述试剂盒包括PCR扩增酶和PCR扩增缓冲液;和/或,

[0016] 所述试剂盒还包括如SEQ ID No.4所示的阴性对照。

[0017] 另一方面,本发明还提供一种抑制如本发明所述的tRF表达的抑制剂,所述抑制剂为如SEQ ID No.5所示的RNA单链。

[0018] 另一方面,本发明还提供一种tRF的抑制剂在制备用于预防和/或治疗NSCLC的药物中的应用;其中,所述tRF的核苷酸序列如SEQ ID No.1所示。

[0019] 在一实施例中,所述抑制剂为如SEQ ID No.5所示的RNA单链。

[0020] 最后,本发明还提供一种用于预防和/或治疗NSCLC的药物,所述药物含有能抑制如SEQ ID No.1所示的tRF表达的抑制剂以及药物学可接受的载体。

[0021] 在一实施例中,所述抑制剂为如SEQ ID NO.5所示的RNA单链。

[0022] 本发明通过实验分析,发现一种具有显著促癌活性的tRF(核苷酸序列如SEQ ID No.1所示),从而为NSCLC个体化精准治疗的新方案提供了新的靶点。该tRF在NSCLC病人手术前的血浆中高表达,手术后血浆中表达水平显著下降;而且进一步分析了NSCLC癌组织/

癌旁组织, NSCLC病人血浆/健康对照组血浆, NSCLC癌细胞/正常肺支气管上皮细胞之间如SEQ ID No.1所示tRF的表达差异。结果表明该tRF在NSCLC癌组织中、在NSCLC病人血浆中、以及在NSCLC细胞中的表达均分别显著高于癌旁组织、健康人血浆, 以及正常支气管上皮细胞, 检测结果证明该tRF在NSCLC中高表达, 而且研究结果表明该tRF具有显著的促进NSCLC细胞肿瘤活性的能力。因此, 该tRF可以用于制备诊断和/或预后评估NSCLC的试剂盒, 以及该tRF的抑制剂可以用于制备预防和/或治疗NSCLC的药物。而且提供了一种该tRF的抑制剂(inhibitor)的序列, 该抑制剂通过抑制如SEQ ID No.1所示的tRF的表达, 从而抑制了NSCLC细胞的增殖, 具有抗癌应用价值。

附图说明

- [0023] 图1是实施例1中NSCLC病人血浆各类tRF表达谱;
- [0024] 图2是实施例1中手术前/手术后血浆差异表达的tRF的分布情况;
- [0025] 图3是实施例1中AS-tDR-007333在手术前/手术后血浆表达水平的差异;
- [0026] 图4是实施例2中AS-tDR-007333在NSCLC癌组织/癌旁组织间表达差异的结果;
- [0027] 图5是实施例2中AS-tDR-007333在各类NSCLC细胞中与正常气管上皮细胞中表达差异的结果;
- [0028] 图6是实施例2中AS-tDR-007333在NSCLC病人血浆和正常对照血浆表达差异的结果;
- [0029] 图7是实施例3中AS-tDR-007333过表达促进PC9细胞增殖实验结果;
- [0030] 图8是本实施例3中敲除AS-tDR-007333后抑制PC9细胞增殖实验结果;
- [0031] 图9是实施例3中AS-tDR-007333过表达促进HCC827细胞增殖实验结果;
- [0032] 图10是实施例3中敲除AS-tDR-007333后抑制HCC827细胞增殖实验结果;
- [0033] 图11是实施例3中AS-tDR-007333过表达促进A549细胞增殖的实验结果;
- [0034] 图12是实施例3中敲除AS-tDR-007333后抑制A549细胞增殖的实验结果;
- [0035] 图13是实施例5中AS-tDR-007333和si-HSPB-1共转染PC9细胞后抑制细胞增殖的实验结果。

具体实施方式

[0036] 为了使本发明要解决的技术问题、技术方案及有益效果更加清楚明白, 以下结合实施例, 对本发明进行进一步详细说明。应当理解, 此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明, 并不用于限定本发明。

[0037] 一方面, 本发明实施例提供了一种与NSCLC相关的tRF, 本发明实施例中, 该tRF命名为AS-tDR-007333(或tDR-007333), 其核苷酸序列如下:

[0038] SEQ ID No.1:5'-GCAUUGGUGGUUCAGUGGUAGAAUUCUU-3';。

[0039] 针对该序列, 提供了一种用于qRT-PCR扩增所述tRF的引物, 序列如下:

[0040] SEQ ID No.2:F:AACAGCGCAGAGGCTATTATTC;

[0041] SEQ ID No.3:R:CCAAGGTGTAATTCGTTTCATCA。

[0042] 上述引物可检测生物标本中AS-tDR-007333的表达水平, 为进一步研究AS-tDR-007333在NSCLC中的功能及靶向AS-tDR-007333的药物研发提供了基础。

[0043] 另一方面,本发明实施例还提供一种tRF在制备用于诊断和/或预后评估NSCLC的试剂盒中的应用;其中,所述tRF的核苷酸序列如SEQ ID No.1所示。因本发明实施例提供的tRF具有显著促癌活性,从而为NSCLC个体化精准治疗的新方案提供了新的靶点,该tRF可以用于制备诊断和/或预后评估NSCLC的试剂盒。

[0044] 具体地,本发明实施例提供一种用于诊断和/或预后评估NSCLC的试剂盒,所述试剂盒含有如SEQ ID No.1所示的tRF分子。所述试剂盒还包括用于扩增所述tRF的引物,所述引物如SEQ ID No.2和SEQ ID No.3所示;所述试剂盒还包括PCR扩增酶和PCR扩增缓冲液;所述试剂盒还包括如SEQ ID No.4所示的阴性对照。

[0045] 上述tRF的阴性对照命名为AS-tDR-007333-NC,具体序列为:SEQ ID No.4:5'-GAGAATTTTGATGGCCGTTCTGTATGTG-3'。

[0046] 本发明实施例还提供一种抑制如SEQ ID No.1所示的tRF表达的抑制剂,所述抑制剂为如SEQ ID No.5所示的RNA单链。该抑制剂通过抑制如SEQ ID No.1所示的tRF的表达,从而抑制了NSCLC细胞的增殖,具有抗癌应用价值。

[0047] 具体地,所述抑制剂即AS-tDR-007333-inhibitor具体序列如下:

[0048] SEQ ID No.5:5'-AAGAAUUCUACCACUGAACCAACCAUGC-3'。

[0049] 相应地,上述抑制剂的阴性对照命名为AS-tDR-007333-inhibitor-NC,具体序列为SEQ ID NO:6:5'-CACAUACAGAACGGCCAUAAAAUUCUC-3'。

[0050] 本发明实施例还提供一种tRF的抑制剂在制备用于预防和/或治疗NSCLC的药物中的应用;其中,所述tRF的核苷酸序列如SEQ ID No.1所示。因该tRF具有显著的促进NSCLC细胞肿瘤活性的能力,所以其抑制剂可以用于制备预防和/或治疗NSCLC的药物。具体地,所述抑制剂为如SEQ ID No.5所示的RNA单链。

[0051] 最后,本发明实施例还提供一种用于预防和/或治疗NSCLC的药物,所述药物含有能抑制如SEQ ID No.1所示的tRF表达的抑制剂以及药理学可接受的载体。具体地,所述抑制剂为如SEQ ID NO:5所示的RNA单链。

[0052] 本发明实施例提供的药物是组合物,包括AS-tDR-007333的抑制剂、和/或与所述抑制剂配伍的其他药类以及药理学上可接受的载体和/或辅料。

[0053] 上述抑制剂是“有效量”,是指可对人和/或动物产生功能或活性的且可被人和/或动物所接受的量。“药理学上可接受的载体”指用于治疗剂给药的载体,包括各种赋形剂和稀释剂。该术语指这样一些药剂载体:它们本身并不是必要的活性成分,且施用后没有过分的毒性。合适的载体是本领域普通技术人员所熟知的。在组合物中药理学上可接受的载体可含有液体,如水、盐水、缓冲液。另外,这些载体中还可能存在辅助性的物质,如填充剂、润滑剂、助流剂、润湿剂或乳化剂、pH缓冲物质等。所述的载体中还可以含有细胞转染试剂。本发明实施例中,可以采用本领域熟知的多种方法来将所述的抑制剂或其转录基因、或其药物组合物给药于哺乳动物。包括但不限于:皮下注射、肌肉注射、经皮给予、局部给予、植入、缓释给予等;优选的,所述给药方式是非肠道给予的。

[0054] 在本发明一实施例中,通过采用RNA测序技术分析比较非小细胞肺癌(NSCLC)病人手术前/手术后血浆tRF表达差异,用定量PCR验证芯片检测结果。分析结果表明AS-tDR-007333在NSCLC病人手术前的血浆中高表达,手术后血浆中AS-tDR-007333表达水平显著下降。提示AS-tDR-007333与NSCLC肿瘤组织有高度相关性。

[0055] 在本发明一实施例中,用定量PCR技术分别分析NSCLC癌组织/癌旁组织,NSCLC病人血浆/健康对照组血浆,NSCLC癌细胞/正常肺支气管上皮细胞之间AS-tDR-007333的表达差异。结果表明AS-tDR-007333在NSCLC癌组织中、在NSCLC病人血浆中、以及在NSCLC细胞中的表达水平均分别显著高于癌旁组织、健康人血浆,以及正常支气管上皮细胞。检测结果证明AS-tDR-007333在NSCLC中高表达。

[0056] 在本发明一实施例中,将AS-tDR-007333分别转染PC9、HCC827、A549细胞系,发现AS-tDR-007333过表达显著促进了NSCLC细胞的增殖能力。研究结果表明AS-tDR-007333具有显著的促进NSCLC细胞肿瘤生长的能力,AS-tDR-007333是一个新发现的促进肿瘤生长的tRNA活性片段。

[0057] 在本发明一实施例中,合成针对AS-tDR-007333的抑制剂干扰RNA(inhibitor,如SEQ ID No.5所示),将AS-tDR-007333-inhibitor分别转染PC9、HCC827、A549细胞系后,发现敲低AS-tDR-007333的表达可显著抑制多种NSCLC细胞的增殖。

[0058] 在本发明一实施例中,RNA pull down及RIP(RNA Immunoprecipitation,RNA免疫沉淀)实验分析表明,AS-tDR-007333与HSPB-1(热休克蛋白B1)特异结合;实验证实AS-tDR-007333与HSPB1的交互作用影响NSCLC细胞的增殖。

[0059] 本发明先后进行过多次试验,现举一部分试验结果作为参考对发明进行进一步详细描述,下面结合具体实施例进行详细说明。

[0060] 实施例1AS-tDR-007333的发现

[0061] 1. 临床研究样本的选择

[0062] (1) 经病理学明确诊断的NSCLC病例;

[0063] (2) 病例采血前未经过手术和放、化疗;

[0064] (3) 与病例年龄匹配的健康对照组。

[0065] 采血时间:术前血在手术麻醉前采集,术后血在术后3-5天采集。

[0066] 采集标准:统一使用含EDTA抗凝剂的采血管采集10ml外周血,上下颠倒混匀,尽快放入4℃冰箱暂时保存。12小时内离心(3000rpm、5分钟),在超净工作台内使用一次性无菌滴管或移液枪分别收集上层血浆和下层血细胞,置于2ml外旋盖冻存管中,在管壁标记好患者姓名、日期,并以pre标记术前血,post标记术后血。置于液氮罐保存并做好相应记录。

[0067] Trizol试剂(Invitrogen,Carlsbad,CA)提取血清/血浆总RNA,按标准方法操作。每个标本提取RNA总量约1-2 μ g/10ml血清或血浆。

[0068] 2. 建库测序

[0069] (1) 建库前需要对RNA做些预处理提高反转录效率,以防被tRNA特殊的三叶草结构干扰测序;在3'端连一个专用接头3' adaptor,5'端连一个专用接头5' adaptor,同时m1A和m3C脱甲基;

[0070] (2) 进行逆转录,得到第一链的cDNA,再进行PCR扩增,最终得到了双链的测序文库;

[0071] (3) 通过安捷伦2100(RIN \geq 8),将建好的文库经过进一步的电泳胶分离,切胶回收,得到比较纯的、我们需要的小RNA;

[0072] (4) 将检测合格的文库稀释至终体积1.3ml、终浓度1.8pM;

[0073] (5) 上机,在Illumina NextSeq 500测序平台上运行单端测序程序。

[0074] 测序数据分析：

[0075] 采用Solexa pipeline v1.8 (Off-Line Base Caller software, v1.8) 分析流程；通过FastQC软件将下机原始数据进行质检；过滤原始数据，去除引物二聚体和含有多个N的序列；修整有效数据，去除低质量和污染的序列；将有效数据通过NovoAlign软件 (V2.07.11) 同GtRNADB数据和库比对，识别有效的tiRNAs和tRFs；同时比对miRBase数据库，识别miRNA；应用t检验分析差异表达的tiRNAs和tRFs，并绘制成图表。

[0076] 测序数据分析结果表明，如图1所示，人体血浆tRF表达谱约56%以上为tRF-5，其次为tiRNA-5 (约26%)，及tRF-3 (约9%)。如图2所示，NSCLC病人术前/术后血浆tRF表达谱有显著区别，其中，AS-tDR-007333在术后血浆中的表达水平比手术前血浆降低了2倍，如图3所示，相关数据如表1所示。

[0077] 表1

	tRF_ID	术前/术后血浆 tRF 表达	P 值
[0078]	AS-tDR-007333	2.0170	0.0313
	AS-tDR-010968	2.3117	0.0299
	AS-tDR-007245	2.3027	0.0244
[0079]	AS-tDR-008272	4.0227	0.0194

[0080] 实施例2AS-tDR-007333表达差异分析

[0081] 1. 提取细胞RNA

[0082] (1) 将细胞用PBS洗两遍后，加入1ml TRIzol试剂，室温放置10分钟；

[0083] (2) 加入200 μ l氯仿，盖紧管盖，大力震荡30秒，室温放置10分钟；

[0084] (3) 12000g、4 $^{\circ}$ C离心20分钟，吸取上层水相，加入新的1.5ml离心管，加入600 μ l预冷异丙醇沉淀RNA，混匀，室温放置10分钟；

[0085] (4) 12000g、4 $^{\circ}$ C离心10分钟，弃上清；

[0086] (5) 用DEPC水配制的75%乙醇缓慢轻柔地贴壁加入离心管清洗RNA；

[0087] (6) 7500g、4 $^{\circ}$ C离心10分钟，吸净管内乙醇，室温干燥5-10分钟，加入10-30 μ l DEPC水；

[0088] (7) 使用超微量分光光度计或Qubit3测定RNA质量及浓度，置于-80 $^{\circ}$ C保存。

[0089] 2. 提取血浆RNA

[0090] (1) 血浆样本置于4 $^{\circ}$ C冰箱解冻，12000g、4 $^{\circ}$ C、离心10分钟；

[0091] (2) 取250 μ l血浆液体，转至1.5ml的离心管，加入750 μ l的TRIzol LS试剂和20 μ l冰醋酸，剧烈振荡混匀，室温孵育5分钟；

[0092] (3) 加入200 μ l氯仿，盖紧管盖，大力震荡30秒，室温放置10分钟；

[0093] (4) 12000g、4 $^{\circ}$ C离心15分钟，吸取上层水相，加入新的1.5ml离心管，加入500 μ l异丙醇，5 μ l的糖元溶液，混匀后，室温孵育10分钟；

[0094] (5) 4 $^{\circ}$ C离心10分钟，小心将上清吸去，贴壁加入DEPC水配制的75%乙醇，清洗RNA；

[0095] (6) 7500g、4 $^{\circ}$ C离心10分钟，将管内乙醇吸净，室温干燥5-10分钟，加入10-30 μ l

DEPC水；

[0096] (7) 使用超微量分光光度计或Qubit3.0测定RNA质量及浓度,置于-80℃保存。

[0097] 3. 提取组织RNA

[0098] (1) 在生物安全柜或超净工作台内取出待测组织标本置于冰上；

[0099] (2) 在培养皿中切割组织,并称量40mg置于新的冻存管中,；

[0100] (3) 将组织转移中研钵,加入少量液氮进行反复研磨10分钟以上,直至看不到组织颗粒,期间反复添加液氮;加1ml TRIzol试剂裂解组织细胞;待TRIzol融化后,转移至1.5ml离心管；

[0101] (4) 后面提取流程与提取细胞RNA流程相同。

[0102] 4. 反转录PCR (RT-PCR)

[0103] (1) 使用Takara逆转录试剂盒RR047A进行反转录。

[0104] 配制体系1 (Total 10.0μl): 5x gDNA Eraser Buffer 2.0μl; gDNA Eraser 1.0μl; Total RNA 1.0μg; RNase Free dH₂O Up to 10.0μl。去基因组DNA,混匀后室温孵育30分钟。

[0105] 配制体系2 (Total 20.0μl): 体系1反应液10.0μl; PrimeScript RT Enzyme Mix I 1.0μl; RT Primer Mix/specific Primer 1.0μl; 5×PrimeScript Buffer 2 4.0μl; RNase Free dH₂O 4.0μl。PCR运行步骤如下: Step1 37℃15分钟; Step2 85℃5秒; Step3 4℃。

[0106] 反转录的cDNA做好标记后储存在-20℃冰箱。

[0107] 5. 实时荧光定量PCR (qRT-PCR)

[0108] (1) 使用Takara试剂盒RR820A检测。将体系 (TB Green Premix Ex Taq II 10.0μl; cDNA溶液2.0μl; 上游引物5μM 0.8μl; 下游引物5μM 0.8μl; ddH₂O 6.4μl; Total 20.0μl) 加入八联管,每个标本做3复孔,并根据目的基因选择内参基因GAPDH或U6; 扩增AS-tDR-007333的qRT-PCR上游引物为SEQ ID NO:2; 下游引物为: SEQ ID NO:3。

[0109] 上机实时荧光定量PCR仪,进行如下程序: 首先95℃10分钟,然后40个循环: 95℃15秒; 60℃15秒; 72℃30秒; 最后65℃6秒。

[0110] (2) 计算公式如下: $\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{内参基因}}$

[0111] 1. $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{实验组}} - \Delta Ct_{\text{对照组}}$

[0112] 2. 目的基因量 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$

[0113] 3. 实验组目的基因与对照组的相对表达变化倍数 = $\log_2^{-\Delta\Delta Ct}$

[0114] NSCLC癌组织和癌旁组织中AS-tDR-007333表达的检测: 用qRT-PCR技术检测AS-tDR-007333在癌组织和癌旁组织中的表达,结果如图4所示; 结果表明: AS-tDR-007333在癌组织中的表达水平显著高于癌旁组织。

[0115] NSCLC细胞中AS-tDR-007333表达的检测: 用qRT-PCR技术分别在A549、H226、HCC827、PC9四种NSCLC癌细胞系及一种正常支气管上皮细胞 (BEAS-2B) 系中检测AS-tDR-007333的表达,结果如图5所示; 结果表明: AS-tDR-007333在A549、H226、HCC827、PC9中的表达水平均显著高于正常支气管上皮细胞。

[0116] NSCLC病人血浆中及健康对照人群血浆中的AS-tDR-007333表达水平: 用qRT-PCR技术检测NSCLC病人血浆中及健康对照人群血浆中的AS-tDR-007333表达水平,结果如图6所示; 结果表明: AS-tDR-007333在NSCLC病人血浆中的表达水平显著高于健康对照组。

[0117] 因此,本发明实施例用实验证据证明了AS-tDR-007333在NSCLC中高表达。其中血浆AS-tDR-007333表达水平能够很好地将NSCLC病人和健康对照区分开,血浆AS-tDR-007333表达水平可能是新的NSCLC诊断分子标记物。

[0118] 实施例3 AS-tDR-007333过表达或低表达对细胞增殖的影响

[0119] 1. AS-tDR-007333对NSCLC细胞PC9增殖的影响。

[0120] 将AS-tDR-007333过表达单链 (SEQ ID No.1) 及其阴性对照AS-tDR-007333-NC (SEQ ID No.4) 分别转染入PC9细胞株,培养48小时,调整细胞密度为 2.5×10^4 /ml,按5000个细胞/孔的浓度铺入96孔板。每板留出5孔作为空白对照孔。

[0121] 将细胞放入培养箱培养6-12小时;待细胞贴壁后开始检测,记为D0时间点;以24小时为记录点,依此类推记为D1、D2、D3;3.5ml完全培养基+350 μ lCCK-8试剂充分混匀后,按每孔110 μ l体积加入实验孔和空白对照孔。加样完成后,置于培养箱孵育1小时;取出细胞,使用酶标仪检测OD450,同时检测OD600作为参比波长。细胞增殖结果如图7所示,结果说明:过表达AS-tDR-007333对PC9细胞系增殖起明显的促进作用。

[0122] 将AS-tDR-007333的inhibitor干扰链 (SEQ ID No.5) 及其阴性对照Inhibitor-NC (SEQ ID No.6) 分别转染入PC9细胞,细胞增殖结果如图8所示,结果表明:AS-tDR-007333的inhibitor对PC9细胞系的增殖起明显的抑制作用。

[0123] 2. AS-tDR-007333对NSCLC细胞HCC827增殖的影响

[0124] 采用如上述相同的步骤,将AS-tDR-007333过表达单链及其阴性对照分别转染入HCC827细胞株,分别在培养24h,48h,72h后加入CCK-8试剂并孵育1小时后用酶标仪检测OD450。细胞增殖结果如图9所示,结果说明:过表达AS-tDR-007333对HCC827细胞增殖起明显的促进作用。

[0125] 将AS-tDR-007333的inhibitor干扰链及其阴性对照分别转染入HCC827细胞,细胞增殖结果如图10所示,结果显示:AS-tDR-007333的inhibitor对HCC827细胞系的增殖起明显的抑制作用。

[0126] 3. AS-tDR-007333对NSCLC细胞A549增殖的影响

[0127] 采用如上述相同的步骤,将AS-tDR-007333过表达单链及其阴性对照分别转染入A549细胞株,分别在培养24h,48h,72h后加入CCK-8试剂并孵育1小时后用酶标仪检测OD450。细胞增殖结果如图11所示,过表达AS-tDR-007333对A549细胞增殖起明显的促进作用。

[0128] 将AS-tDR-007333的inhibitor干扰链及其阴性对照分别转染入A549细胞,细胞增殖结果如图12所示,结果显示:AS-tDR-007333的inhibitor对A549细胞系的增殖起明显的抑制作用。

[0129] 上述细胞实验结果证明,AS-tDR-007333的表达水平与NSCLC细胞的增殖生长呈正相关的关系,AS-tDR-007333可以作为诊断NSCLC的敏感标志物;敲低AS-tDR-007333的表达可抑制NSCLC肿瘤细胞的生长,AS-tDR-007333是一个新的肿瘤治疗靶标。

[0130] 实施例4 AS-tDR-007333过表达或低表达对细胞迁移、细胞凋亡的影响

[0131] 1. 用细胞划痕实验和Transwell小室检测AS-tDR-007333对细胞迁移的影响。通过瞬时转染AS-tDR-007333/NC和Inhibitor/NC,同时将未处理PC9细胞作为阴性对照。细胞划痕实验及transwell小室实验均显示AS-tDR-007333对的PC9细胞迁移没有显著影响。

[0132] 2.使用Annexin V-FITC方法检测AS-tDR-007333对PC9细胞凋亡的影响。将转染AS-tDR-007333的过表达组和AS-tDR-007333-inhibitor干扰组的细胞按照Fluor 488annexin V and PI试剂盒的使用方法处理后,使用流式细胞仪分析AS-tDR-007333对PC9细胞凋亡的影响。结果显示,AS-tDR-007333对PC9细胞凋亡没有显著影响。

[0133] 实施例5 RNA pulldown及RIP实验

[0134] 通过RNA pulldown实验,证明AS-tDR-007333与HSPB-1(热休克蛋白B1)特异结合,然后开展RIP实验,过程如下:

[0135] 1.蛋白免疫复合物制备

[0136] 分别取5ul目的抗体和5ul IgG蛋白,与细胞裂解液上清混合,在4℃缓慢颠倒混匀过夜,使目的蛋白从细胞裂解液中被特异性抗体免疫沉淀下来。

[0137] 2.protein G琼脂糖珠准备

[0138] 按总需量,取100μl protein G琼脂糖珠,加500ul裂解缓冲液洗涤3次,4℃,3000g离心30s留琼脂糖珠子,加裂解缓冲液重悬。

[0139] 3.捕获免疫复合物

[0140] (1)在EP管中分别加入100μL protein G琼脂糖珠,低速1000g离心1min除去储存液,并用100μL PBS洗涤两次,低速离心弃洗涤液;

[0141] (2)加入上述步骤1中的蛋白免疫复合物,体系用IP-RIPA buffer补齐至0.5ml,4℃混合孵育2h;

[0142] (3)1000g离心1min,加入200μL IP wash buffer,洗涤2-3次,去净上清。

[0143] 4.RNA纯化

[0144] (1)加入200μl RIPA,加入蛋白酶K(1%),58℃孵育30min,离心取上清;

[0145] (2)于每管加入等体积的水饱和酚,倒转摇匀,12000g,4℃,离心5分钟,吸取上清;

[0146] (3)上清液加等体积的酚氯仿(水饱和酚:氯仿:异戊醇=25:24:1),倒转混匀,12000g,离心5min,吸上层入另一新的EP管;

[0147] (4)上清液加等体积氯仿:异戊醇(24:1),倒转混匀10分钟,12000g,离心5min,取上清入另一管;

[0148] (5)加1/12体积3M醋酸钠,1ul核酸助沉剂,混匀后再加3倍体积的4℃冰箱冷却后的无水乙醇,轻柔振摇;

[0149] (6)-80℃放置过夜,12000g低温(4℃)离心10min,沉淀RNA,去上清;

[0150] (7)加1ml 75%乙醇洗涤,12000g低温(4℃)离心10min,去上清;自然干燥后,用DEPC水溶解,保存在-80℃备用,或直接进行逆转录。

[0151] 5.细胞共转染

[0152] (1)调整细胞密度,接种在6孔板中,按 1.5×10^5 /孔铺板。

[0153] (2)取出转染用单链RNA,用DEPC水配制为20μM母液。

[0154] (3)将此前接种的细胞用PBS润洗后贴壁加入1.75ml完全培养基,放入培养箱继续培养;

[0155] 共转染实验分组如下:

[0156] A过表达组,见表2。

[0157] 表2

[0158]

序号	组分	组分用量	Opti-MEM
1	tRF-007333+ (20 μ M) 过表达 HSPB-1-wt (100ng/ μ l)	2.5 μ l+12.5 μ l	110 μ l

[0159]

2	tRF-007333+ HSPB-1-control	2.5 μ l+12.5 μ l	110 μ l
3	tRF-007333-NC+ 过表达 HSPB-1-wt	2.5 μ l+12.5 μ l	110 μ l
4	tRF-007333-NC+ (20 μ M) HSPB-1-control (100ng/ μ l)	2.5 μ l+12.5 μ l	110 μ l

[0160] B. 干扰组,见表3 (si-HSPB-1:HSPB-1干扰小RNA)。

[0161] 表3

[0162]

序号	组分	组分用量	Opti-MEM
1	tRF-007333+ si-HSPB-1-A (20 μ M)	2.5 μ l+2.5 μ l	120 μ l
2	tRF-007333+ si-HSPB-1-B (20 μ M)	2.5 μ l+2.5 μ l	120 μ l
3	tRF-007333+ si-HSPB-1-control (20 μ M)	2.5 μ l+2.5 μ l	120 μ l

[0163] C. 组见表4。

[0164] 表4

[0165]

序号	Lipofectamine3000	P3000	Opti-MEM
1	4 μ l	2.5 μ l	118.5 μ l
2	4 μ l	/	121 μ l

[0166] (4) 将C组序号1加入A组序号1-4;将C组序号2加入B组序号1-2;每管体系为250 μ l;瞬时离心后,室温孵育10-15分钟。然后取出细胞,分别将转染物加入对应细胞孔,置于培养

箱继续培养48小时。

[0167] 细胞共转染实验结果如图13所示;结果表明:tRF-007333和si-HSPB1共转染PC9细胞后显著抑制肿瘤细胞的增殖,说明tRF-007333通过与HSPB-1交互作用促进肿瘤细胞的增殖,抑制HSPB-1的表达可能是抑制肿瘤细胞生长的一个重要途径。

[0168] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

序列表

<110> 深圳大学

<120> 一种与NSCLC相关的tRF及其应用

<160> 6

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 28

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

gcauuggugg uucaguggua gaauucuu 28

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> AS-tDR-007333上游引物序列

<400> 2

aacagcgcag aggctattat tc 22

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> AS-tDR-007333下游引物序列

<400> 3

ccaaggtgt aattcgttca tca 23

<210> 4

<211> 28

<212> RNA

<213> AS-tDR-007333阴性对照序列

<400> 4

gagaattttg atggccgttc tgtatgtg 28

<210> 5

<211> 28

<212> RNA

<213> AS-tDR-007333-inhibitor序列

<400> 5

aagaauucua ccacugaacc accaaugc 28

<210> 6

<211> 28

<212> RNA

<213> AS-tDR-007333-inhibitor阴性对照序列

<400> 6

cacauacaga acggccauga aaauucuc 28

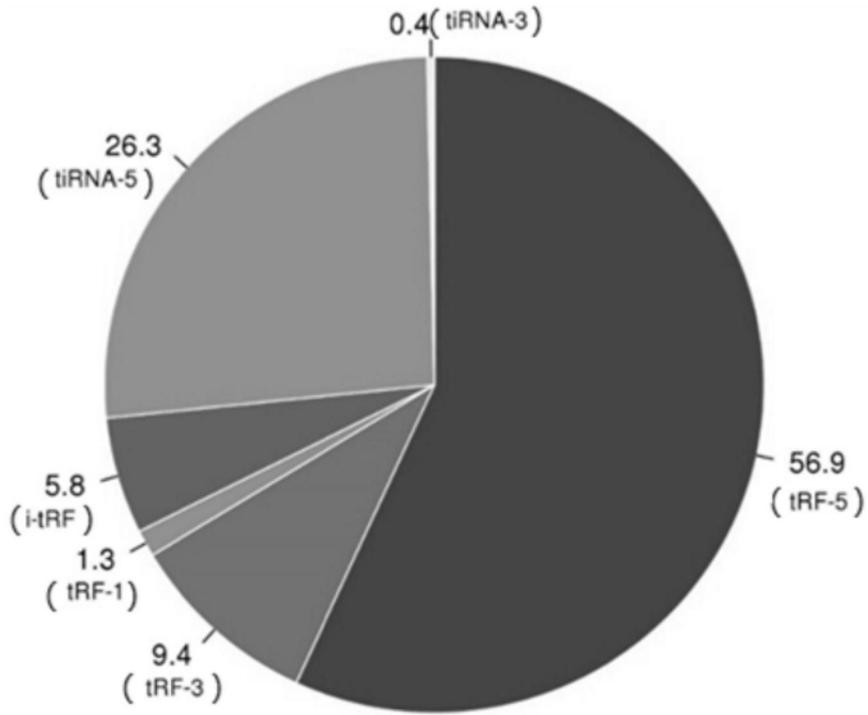


图1

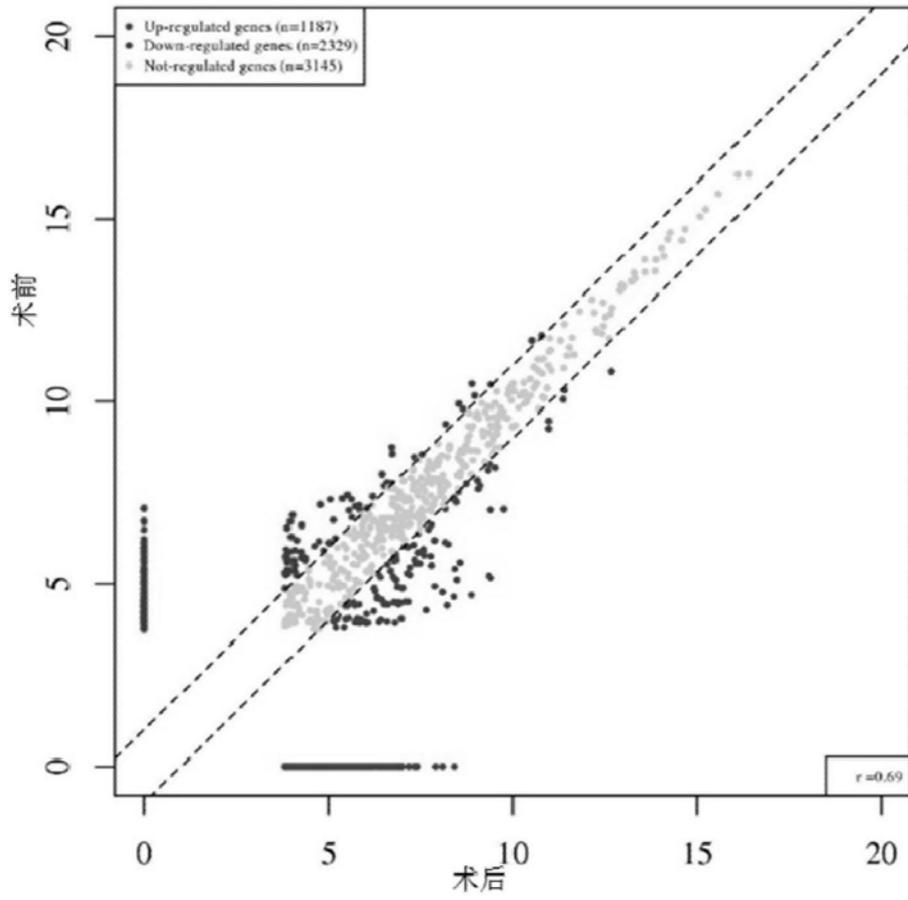


图2

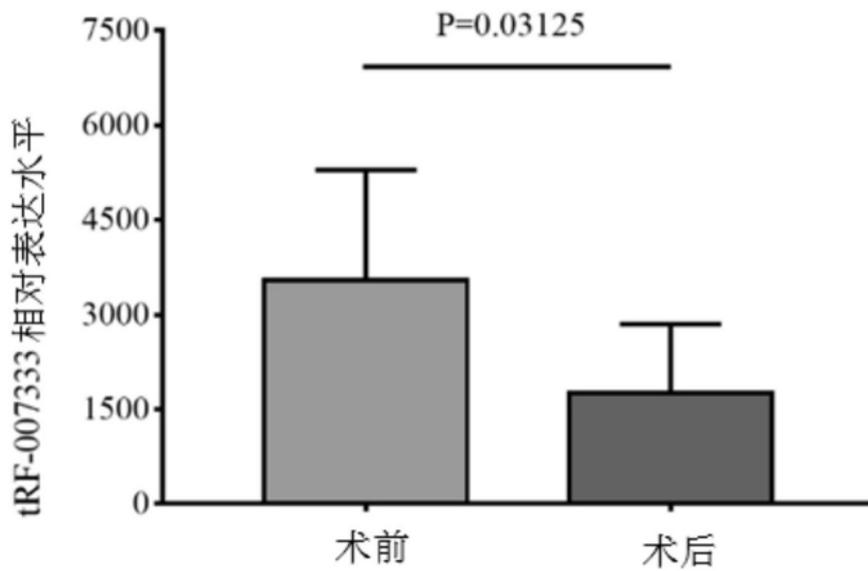


图3

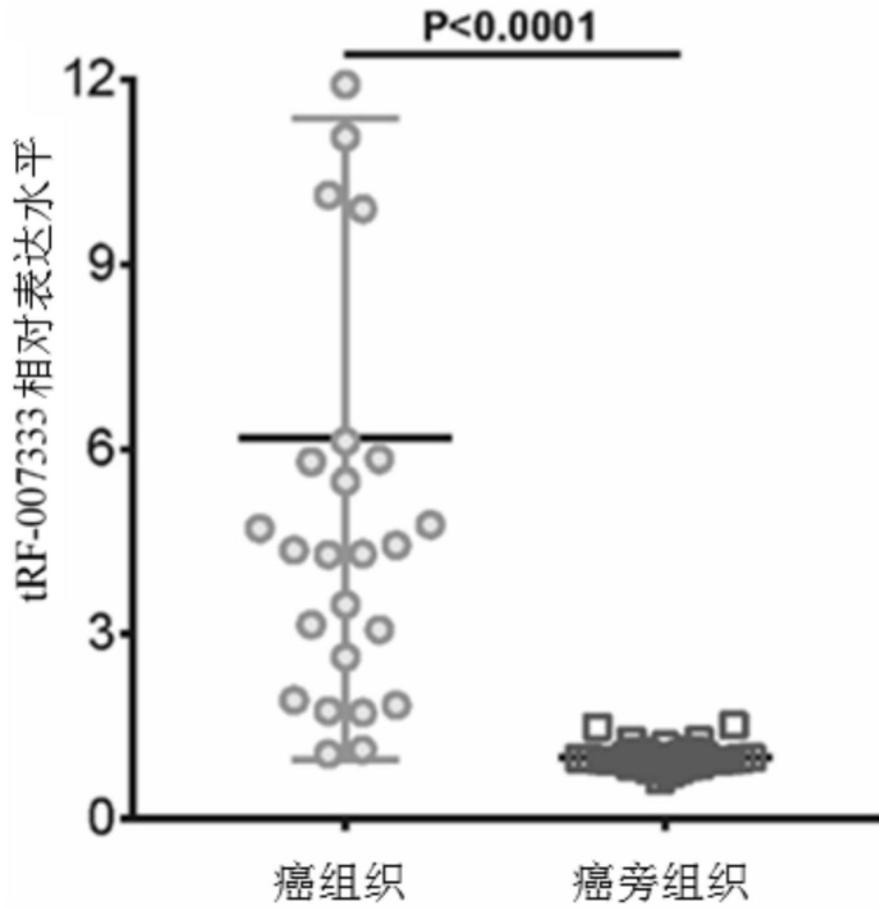


图4

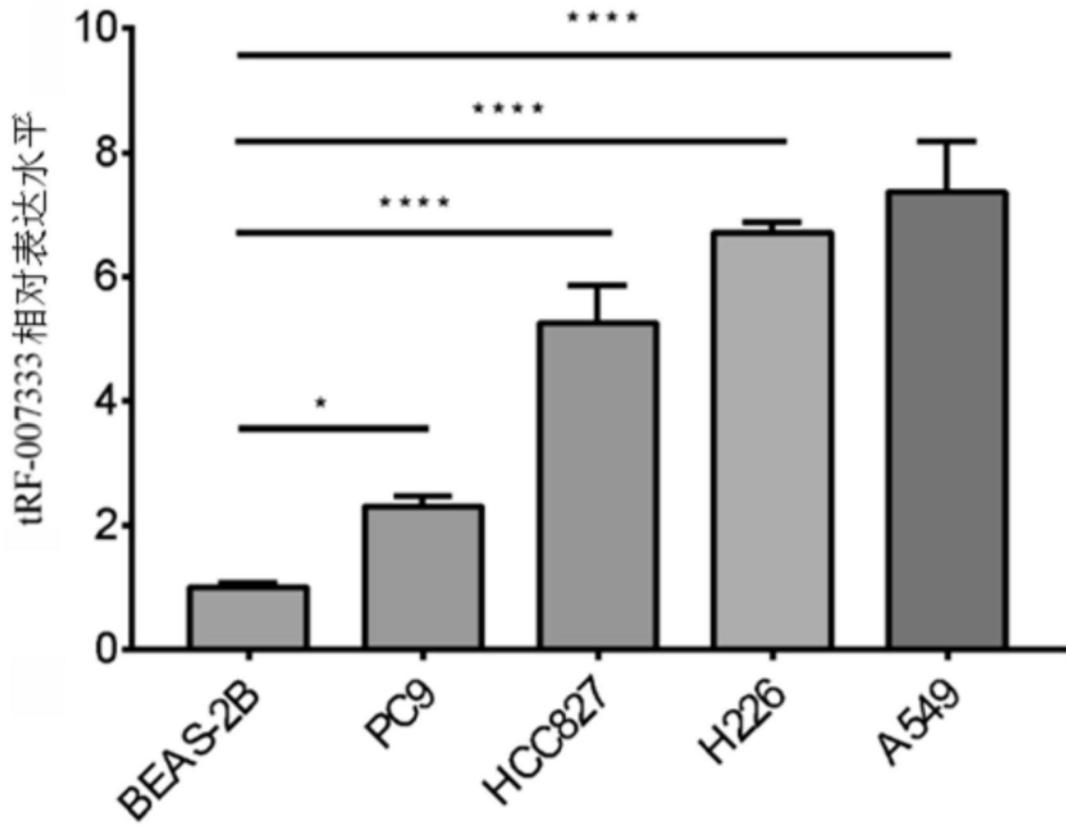


图5

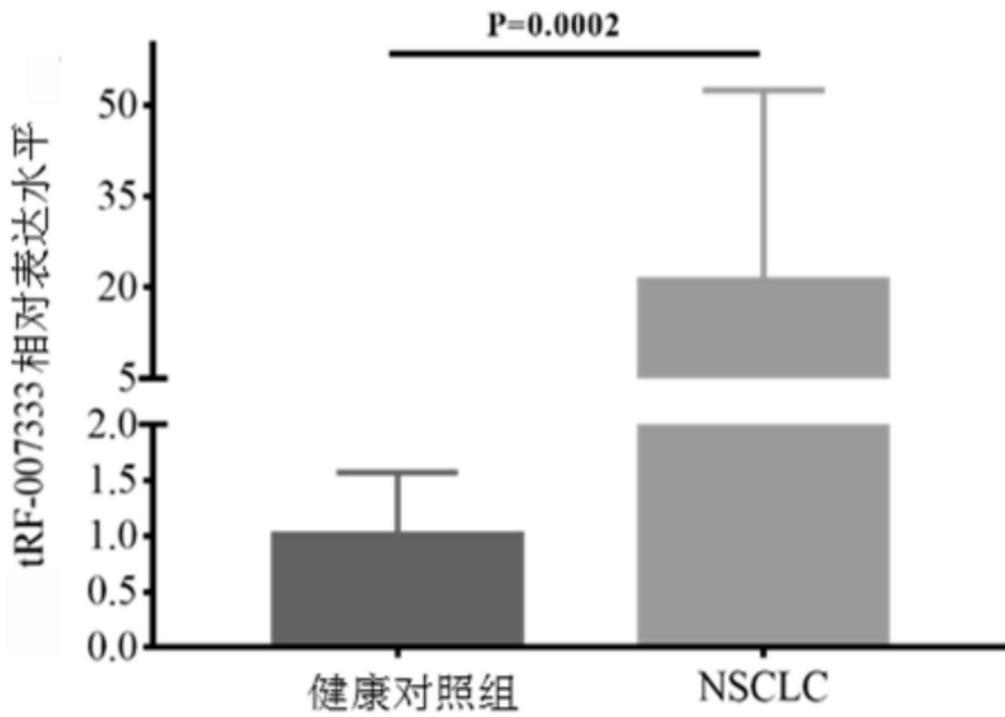


图6

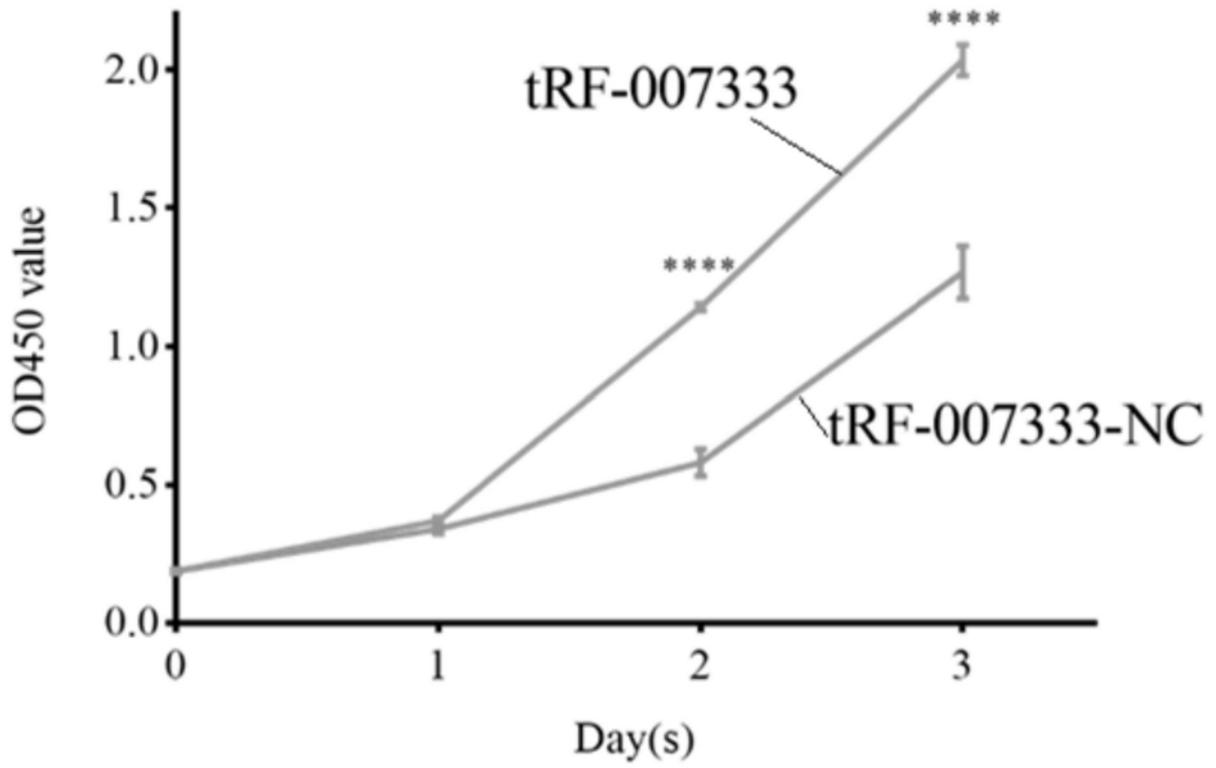


图7

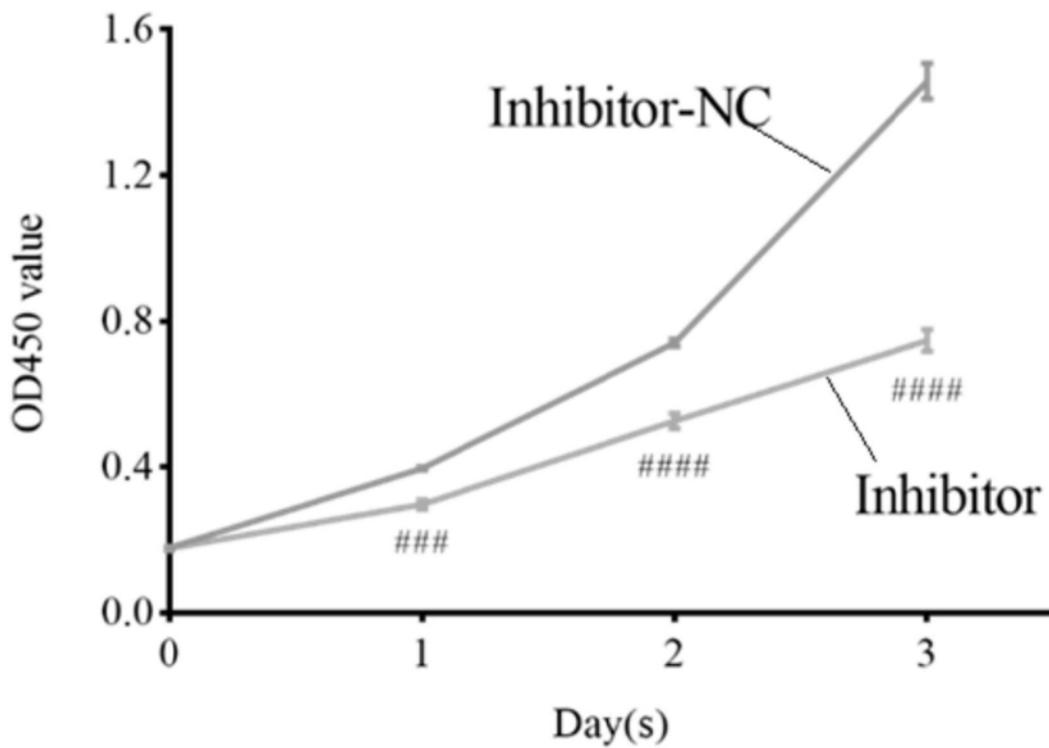


图8

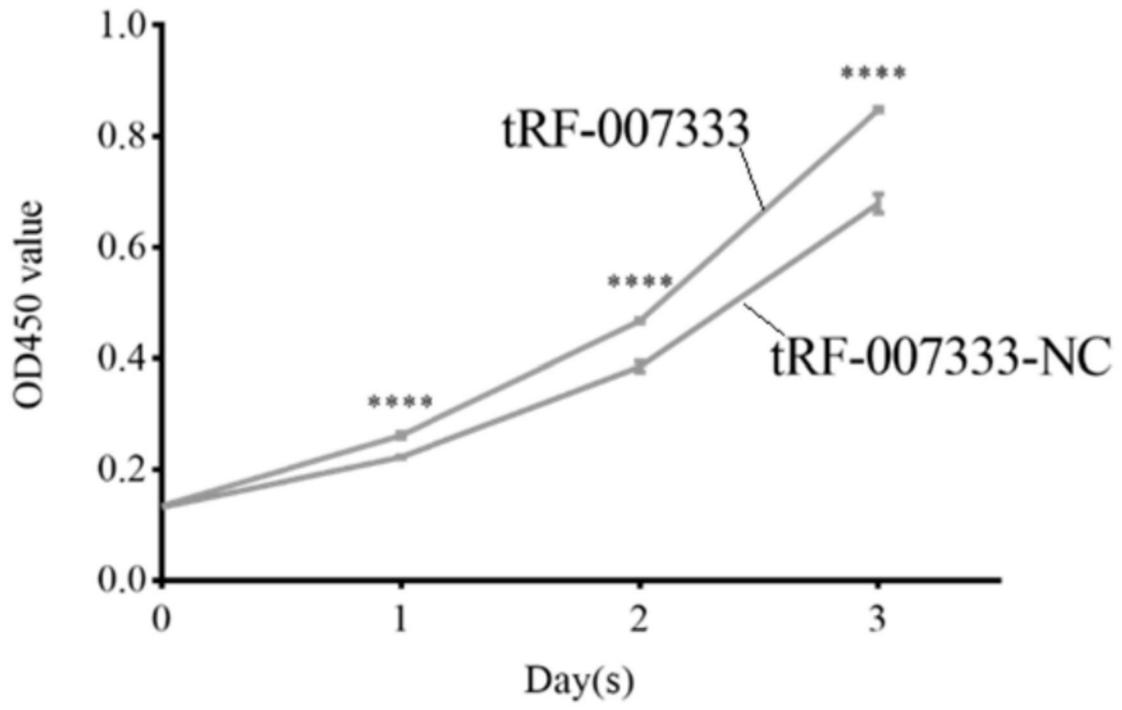


图9

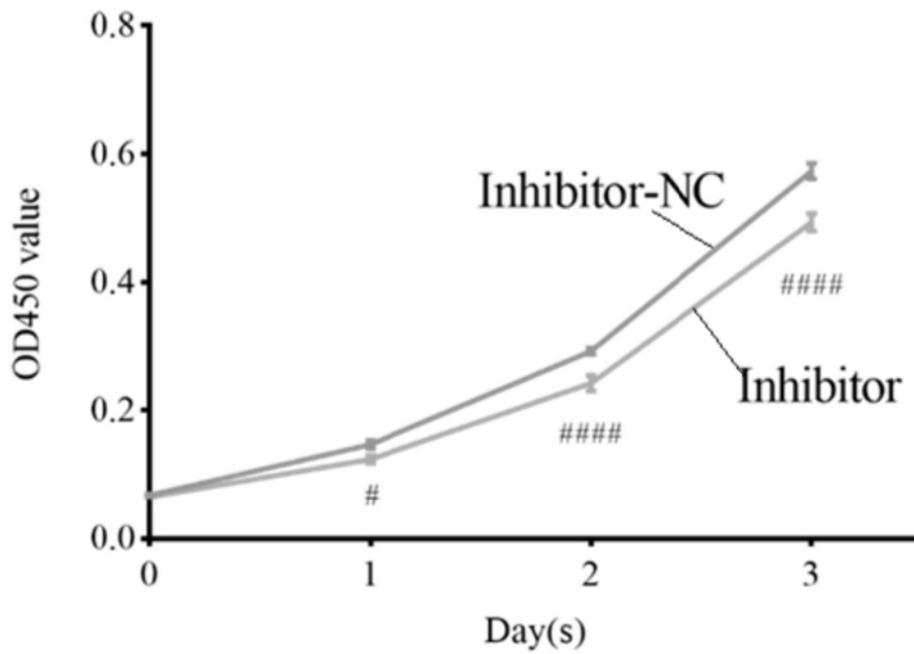


图10

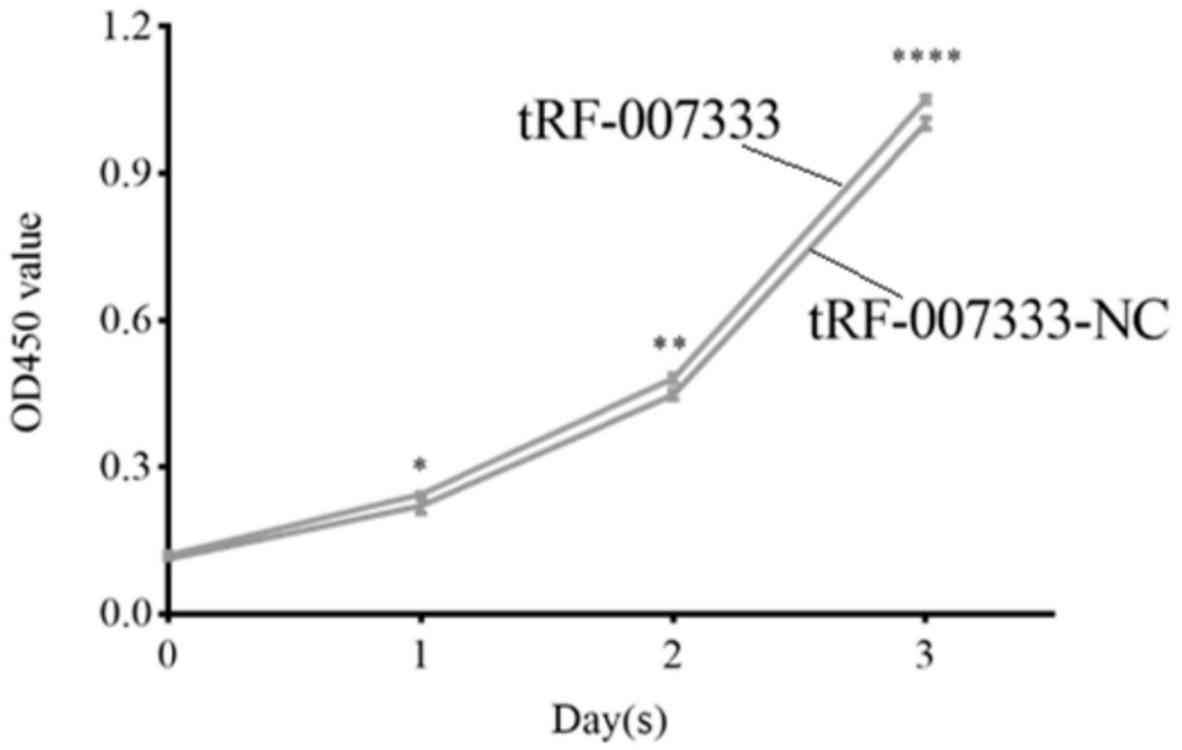


图11

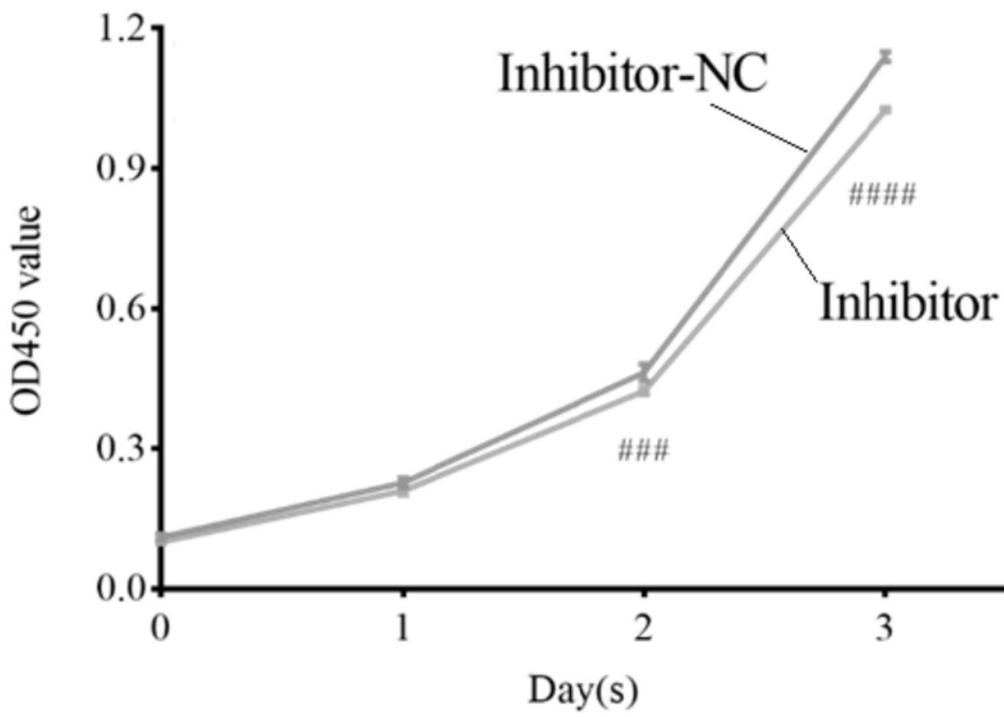


图12

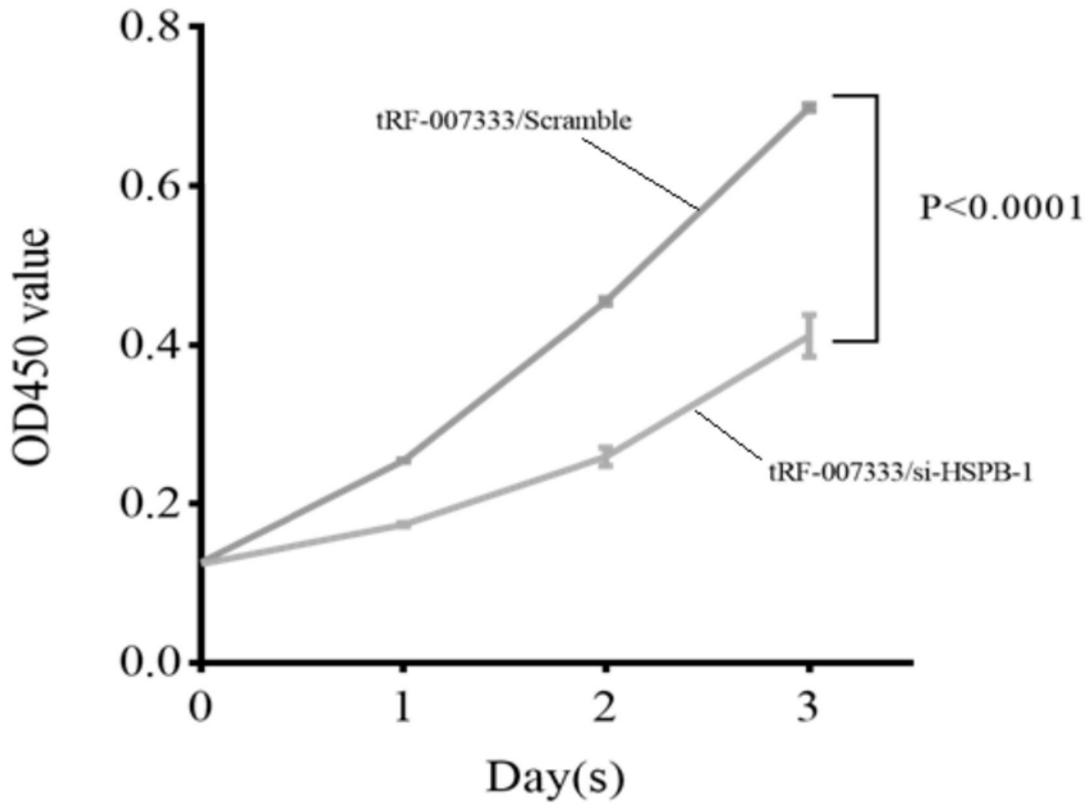


图13