(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 111394464 B
(45)授权公告日 2021.03.16

(21)申请号 202010331629.X

(22)申请日 2020.04.24

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111394464 A

(43)申请公布日 2020.07.10

(73)专利权人 青岛市中心医院
地址 266042 山东省青岛市北区四流南路127号

(72)发明人 于维松　宋学术

(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 李红伟　孟祥斌

(51)Int.Cl.
C12Q 1/6886(2018.01)
C12N 15/11(2006.01)
A61K 45/00(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

(56)对比文件
WO 2019018537 A1,2019.01.24
CN 110129444 A,2019.08.16
CN 104762374 A,2015.07.08
US 2014329704 A1,2014.11.06

审查员 封丽娜

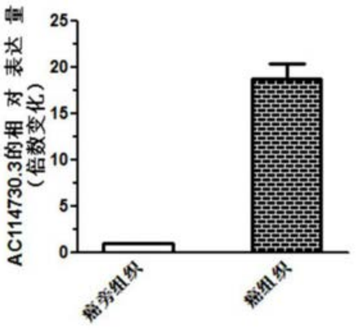
权利要求书1页　说明书7页
序列表2页　附图1页

(54)发明名称

放射性损伤疾病的检测试剂及其应用

(57)摘要

本发明公开了放射性损伤疾病的检测试剂及其应用，具体的涉及AC114730.3的检测试剂及其在制备诊断乳腺癌的产品中的应用；同时本发明还公开了靶向AC114730.3的试剂及其在制备治疗乳腺癌的药物组合物中的应用。



1.检测AC114730.3的试剂在制备诊断乳腺癌的产品中的应用。

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AC114730.3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,所述试剂选自:特异性识别AC114730.3的探针;或特异性扩增AC114730.3的引物。

4.根据权利要求3所述的应用,其特征在于,特异性扩增AC114730.3的引物序列如SEQ ID NO.1~2所示。

5.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、试剂盒、核酸膜条。

6.根据权利要求5所述的应用,其特征在于,所述芯片包括特异性识别AC114730.3的寡核苷酸探针;所述试剂盒包括特异性扩增AC114730.3的引物,或特异性识别AC114730.3的寡核苷酸探针;所述核酸膜条包括特异性识别AC114730.3的寡核苷酸探针。

7.AC114730.3的抑制剂在制备治疗乳腺癌的药物组合物中的应用,其特征在于,所述抑制剂为降低AC114730.3表达水平的试剂。

8.根据权利要求7所述的应用,其特征在于,所述试剂为siRNA。

9.根据权利要求8所述的应用,其特征在于,所述siRNA的序列如SEQ ID NO.5~6所示。

10.检测AC114730.3表达水平的产品在筛选治疗乳腺癌的候选药物中的应用。

放射性损伤疾病的检测试剂及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药领域,涉及放射性损伤疾病的检测试剂及其应用。

背景技术

[0002] 放射性疾病(radiation disease)是指电离辐射所致不同类型和不同程度损伤和疾病的总称。电离辐射诱发的癌症称为放射性癌症或放射性肿瘤。辐射致癌是辐射因素与机体交互作用的结果,是一个渐进式的发展过程,发生机理上包括基因组不稳定性和与细胞增殖相关的多个信号转导通路机制的异常。放射性肿瘤与其它因素诱发的肿瘤在临床及病理上无区别。因此实现癌症的早期诊断,对于不同病因如放射性诱发的疾病的早期治疗具有重要的意义。

[0003] 乳腺癌是一种复杂的疾病,通常认为乳腺癌是环境、基因、生殖因素共同作用的结果。许多研究结果显示:不健康生活方式、初潮年龄早、绝经年龄晚、未哺乳、乳腺癌家族史等环境、生殖因素与乳腺癌相关。越来越多的证据显示基因的改变在乳腺癌中起到重要作用。

[0004] 长链非编码RNA(long non-coding RNA,LncRNA))是一种长度大于200bp,缺少开放阅读框,不能编码蛋白质的RNA,与mRNA类似,1ncRNAs由RNA pol II转录,可以进行加帽、聚腺苷酸化和剪接等转录后修饰,与细胞的增殖、分化、代谢、免疫和凋亡相关。越来越多的研究表明,1ncRNAs在不同肿瘤及肿瘤不同组织类型中呈现异常表达,并作为癌基因或抑癌基因,直接或间接调节肿瘤相关信号途径,在肿瘤发生发展过程中发挥重要作用。目前,关于疾病相关1ncRNAs的研究已成为国内外学者关注的热点,研究与乳腺癌发生发展相关的lncRNA对于揭示乳腺癌的分子机制,实现乳腺癌的早期诊断和治疗具有重要的意义。

发明内容

[0005] 为了弥补现有技术的不足,本发明的目的在于提供一种与放射性疾病-乳腺癌相关的lncRNA标志物,将其应用到临床中,可以实现乳腺癌的早期诊断和治疗。

[0006] 为了实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0007] 本发明提供了检测AC114730.3的试剂在制备诊断早期乳腺癌的产品中的应用。

[0008] 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AC114730.3表达水平的试剂。

[0009] 进一步,所述试剂选自:特异性识别AC114730.3的探针;或特异性扩增AC114730.3的引物。

[0010] 进一步,特异性扩增AC114730.3的引物序列如SEQ ID NO.1～2所示。

[0011] 本发明提供了一种诊断早期乳腺癌的产品,所述产品包括检测AC114730.3的试剂。

[0012] 进一步,所述产品包括芯片、试剂盒、核酸膜条。

[0013] 进一步,所述芯片包括特异性识别AC114730.3的寡核苷酸探针;所述试剂盒包括

特异性扩增AC114730.3的引物,或特异性识别AC114730.3的寡核苷酸探针;所述核酸膜条包括特异性识别AC114730.3的寡核苷酸探针。

[0014] 进一步,特异性扩增AC114730.3的引物序列如SEQ ID NO.1～2所示。

[0015] 本发明提供了AC114730.3在构建预测乳腺癌的计算模型中的应用。

[0016] 正如熟练技术人员知道的,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,在数学上组合标志物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。

[0017] 本发明提供了AC114730.3在制备治疗乳腺癌的药物组合物中的应用。

[0018] 进一步,所述药物组合物包括AC114730.3的抑制剂。

[0019] 进一步,所述抑制剂为降低AC114730.3表达水平的试剂。

[0020] 进一步,所述试剂为siRNA。

[0021] 进一步,所述siRNA的序列如SEQ ID NO.5～6所示。

[0022] 本发明提供了一种药物组合物,所述药物组合物包括AC114730.3的抑制剂。

[0023] 进一步,所述抑制剂选自:核酸分子、碳水化合物、脂类、小分子化学药或干扰慢病毒。

[0024] 进一步,所述核酸分子包括但不限于:反义寡核苷酸、双链RNA(dsRNA)、小干扰RNA(siRNA)或者短发夹RNA(shRNA)。

[0025] 作为本发明的一种优选的实施方式,所述AC114730.3的抑制剂是一种AC114730.3特异性的小干扰RNA分子。如本文所用,所述的"小干扰RNA"是指一种短片段双链RNA分子,能够以同源互补序列的mRNA为靶目标降解特定的mRNA,这个过程就是RNA干扰(RNA interference)过程。小干扰RNA可以制备成双链核酸的形式,它含有一个正义链和一个反义链,这两条链仅在杂交的条件下形成双链。一个双链RNA复合物可以由相互分离的正义链和反义链来制备。因此,举例来讲,互补的正义链和反义链是化学合成的,其后可通过退火杂交,产生合成的双链RNA复合物。

[0026] 在本发明的具体实施方式中,所述siRNA的序列如SEQ ID NO.5～6所示。

[0027] 进一步,所述药物组合物还包括药学上可接受的载体,药学上可接受的载体包括(但并不限于)稀释剂、粘合剂、表面活性剂、致湿剂、吸附载体、润滑剂、填充剂、崩解剂。

[0028] 本发明的药物组合物还可与其他治疗乳腺癌的药物联用,其他治疗性化合物可以与主要的活性成分同时给药,甚至在同一组合物中同时给药。

[0029] 本发明提供了AC114730.3在筛选治疗乳腺癌的候选药物中的应用。若待筛选物质可以特异性降低AC114730.3的水平,则待筛选物质为治疗乳腺癌的候选药物。

[0030] 在本发明中,"标志物"、"生物标志物""基因标志物"可以通用,指代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。

[0031] 在本发明中,转录AC114730.3的基因是位于人2号染色体上,本发明中的AC114730.3包括野生型、突变型或其片段。目前AC114730.3存在三个转录本,序列分别如ENST00000413820.1、ENST00000420272.2、ENST00000439270.1所示,一种代表性的AC114730.3序列如ENST00000413820.1所示。熟悉本领域的技术人员可以了解,对测序结果

进行生物信息学分析时，通常会将测序结果和已知的基因组进行比对，只要测序片段可以比对到相关的基因上，就可以看做是该基因的表达。

[0032] 本发明可以利用本领域内已知的任何方法测定基因的表达水平。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。

[0033] lncRNA水平的一些检测或定量方法是本领域已知的并且都适合用于本文提供的方法以测量生物标志物的水平。示例性的方法包括但不限于RNA印迹(northern blots)、核糖核酸酶保护试验和基于PCR的方法。

[0034] 本发明可在检测前或与检测同时地对核酸(例如，ncRNA)进行扩增。核酸扩增技术的示例性非限制性实例包括但不限于：聚合酶链式反应(PCR)、逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)、转录介导的扩增(TMA)、连接酶链式反应(LCR)、链置换扩增(SDA)和基于核酸序列的扩增(NASBA)。本领域的普通技术人员将认识到，某些扩增技术(例如，PCR)需要在扩增前将RNA逆转录成DNA(例如，RT-PCR)，而其他扩增技术则直接扩增RNA(例如，TMA和NASBA)。

[0035] 通常称为PCR的聚合酶链式反应使用变性、引物对与相反链的退火以及引物延伸的多个循环，以指数方式增加靶核酸序列的拷贝数；TMA的转录介导的扩增(在基本上恒定的温度、离子强度和pH的条件下自身催化地合成靶核酸序列的多个拷贝，其中靶序列的多个RNA拷贝自身催化地生成另外的拷贝；LCR的连接酶链式反应使用与靶核酸的相邻区域杂交的两组互补DNA寡核苷酸；其他扩增方法包括例如：通常称为NASBA的基于核酸序列的扩增；使用RNA复制酶(通常称为Qβ复制酶)扩增探针分子本身的扩增；基于转录的扩增方法；以及自我维持的序列扩增。

[0036] 本发明的优点与有益效果：

[0037] 本发明首次发现了AC114730.3的差异表达与乳腺癌的发生发展相关，通过检测AC114730.3的表达水平可以判断受试者是否患有早期乳腺癌，从而实现早发现，早治疗，提高患者的生活质量。

[0038] 本发明同时验证了通过改变AC114730.3的水平可以影响乳腺癌细胞的能力，说明AC114730.3可能作为分子靶点应用于乳腺癌的治疗。

附图说明

[0039] 图1是AC114730.3基因在乳腺癌组织中的表达情况图。

[0040] 图2是AC114730.3对乳腺癌增殖的影响图。

[0041] 具体的实施方式

[0042] 下面结合具体的实施例进一步说明本发明，本发明的实施例仅用于解释本发明，并不意味着限制本发明的保护范围。

[0043] 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。

[0044] 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。

[0045] 实施例1筛选与早期乳腺癌相关的基因标志物

[0046] 1、样品收集

[0047] 收集31例I-II期的乳腺癌组织样本及与之相对应的癌旁组织样本(距离肿瘤边缘2公分)，从中随机选取4例进行高通量测序，全部病例排除其他肿瘤性疾病、自身免疫疾病

和严重的慢性疾病。

[0048] 2、RNA样品的制备

[0049] 使用Trizol法提取组织中的RNA，步骤如下：

[0050] 1)用剪刀组织剪碎，加入1ml Trizol，振荡器上震荡1min；常温放置10min。

[0051] 2)加入200μl三氯甲烷(氯仿)，盖紧管盖，剧烈震荡15s，常温静置10min。

[0052] 3)4℃，11000rpm离心15min。

[0053] 4)将水样层转移到一个新的离心管中，加入500μl异丙醇；颠倒混匀后，常温静置10min。

[0054] 5)4℃，11000rpm离心15min。

[0055] 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。

[0056] 7)4℃，8000rpm离心5min。

[0057] 8)将上清小心去掉，干燥沉淀10min，加入适量的水溶解沉淀10min。

[0058] 3、总RNA定量与纯度分析

[0059] 将提取的RNA进行琼脂糖凝胶电泳，利用Nanodrop2000对所提RNA的浓度和纯度进行检测，琼脂糖凝胶电泳检测RNA完整性，Agilent2100测定RIN值。单次建库要求RNA总量5μg，浓度≥200ng/μL，OD260/280介于1.8～2.2之间。

[0060] 4、构建cDNA文库

[0061] 1)使用Epicentre的Ribo-Zero试剂盒除去总RNA中的核糖体RNA。

[0062] 2)对完整的RNA序列，利用金属离子进行随机打断，将RNA随机断裂成200bp左右的小片段。

[0063] 3)采用Illumina TruseqTM RNA sample Prep Kit进行cDNA文库的构建。

[0064] 5、测序

[0065] 使用Illumina X-Ten测序平台，进行2*150bp测序。

[0066] 6、高通量转录组测序数据分析

[0067] 删除不易检测到的lncRNA，使用R-3.3.3工具中的DESeq2的对reads数进行差异表达分析，差异表达lncRNA筛选标准：FDR<0.05，abs(log2FC)>2。

[0068] 7、结果

[0069] 高通量测序结果显示，与癌旁组织相比，AC114730.3在早期乳腺癌组织中的表达水平显著上调。

[0070] 实施例2QPCR测序验证AC114730.3基因的差异表达

[0071] 1、利用前面收集的31例早期乳腺癌的组织样本和癌旁组织样本对AC114730.3进行大样本QPCR验证。

[0072] 2、RNA提取操作步骤同实施例1

[0073] 3、qRT-PCR扩增检验

[0074] 3.1逆转录

[0075] 使用TAKARA公司的反转录试剂盒(Takara code:DRR047A)进行操作。

[0076] 1)去除基因组DNA

[0077] 在试管中加入5×gDNA Eraser Bμffer 2.0μl，gDNA Eraser 1.0μl，总RNA 1μg，

加Rnase Free ddH_2O使总体积至10μl，水浴锅中42℃加热2min。
[0078] 2)反转录反应
[0079] 将5×PrimeScript®Buffer 2 4.0μl，PrimeScript®RT Enzyme Mix I 1.0μl，RT Primer Mix 1.0μl，RNase Free ddH_2O 4.0μl加入上述试管中一起混合共20μl，水浴锅中37℃ 15min，85℃5s。
[0080] 3.2QPCR扩增
[0081] 1)引物设计
[0082] 根据AC114730.3和GADPH的基因序列设计引物，具体引物序列如下：
[0083] AC114730.3(5' to 3')
[0084] TTAGAGATGAGAAGAATTGAAT(SEQ ID NO.1)；
[0085] AGACCAACTCCAGATTAC(SEQ ID NO.2)。
[0086] GAPDH(5' to 3')：
[0087] AATCCCATCACCATCTTCCAG(SEQ ID NO.3)；
[0088] GAGCCCCAGCCTTCTCCAT(SEQ ID NO.4)。
[0089] 2)QPCR扩增检验
[0090] 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。
[0091] 配置25μl反应体系：
[0092] SYBR®Premix Ex TaqTM II(2×)12.5μl，正(反)向引物各1μl，DNA模板2μl，灭菌蒸馏水8.5μl。
[0093] 反应条件：95℃30s，(95℃5s，60℃30s)×40
[0094] 4、结果
[0095] QPCR结果如图1所示，与癌旁组织相比，AC114730.3在早期乳腺癌组织中表达上调，差异具有统计学意义(P<0.05)，提示AC114730.3可作为分子标志物应用于乳腺癌的诊断和治疗。
[0096] AC114730.3在31例样本中表达上调，其中，在乳腺癌组织中表达上调的有26例，癌旁组织中表达上调的有5例。以表达上调视为阳性(+)，无显著变化或者下调视为阴性(-)，具体统计情况如表1所示。
[0097] 表1基因在样本中的表达情况表
[0098]

基因	阳/阴(+/-)	实际患病情况	
		患病（癌组织）	健康（癌旁组织）
AC114730.3	阳性(+)	26	5
	阴性(-)	5	26

[0099] 实施例3AC114730.3的功能性验证
[0100] 1、细胞培养
[0101] 培养乳腺癌的BT474细胞系，细胞在含10％胎牛血清(Gibco公司)的DMEM培养液中，于5％CO_2，37℃的恒温培养箱中进行培养。

[0102] 2、转染

[0103] 本申请所用的通用siRNA-NC、siRNA-AC114730.3购自上海吉码制药技术有限公司,沉默AC114730.3的siRNA-AC114730.3序列如下所示:

[0104] 5' to 3':

[0105] UUGCUUAAUCCUAAACGGGUC(SEQ ID NO.5)

[0106] CCCGUUUAGGAUUAAGCAAGU(SEQ ID NO.6)

[0107] 将实验分为三组,将实验分为3组,分别为对照组(BT474)、阴性对照组(siRNA-NC)和实验组(siRNA-AC114730.3)。按照Invitrogen公司的lipofectamine 2000转染试剂说明书进行转染。具体步骤如下:

[0108] 实验前一天使用无双抗含血清培养基铺6孔板,细胞密度为6×10^5/孔。细胞融合度达70%时开始转染。取1.5ml EP管,每管各加入OPTI-MEM 50μL,分别加入siRNA-AC114730.3、siRNA-NC以及培养液各5μL,室温静置5min。另取1.5ml EP管,每管各加入OPTI-MEM 30μL,加入Lipofectamine 2000 2μL,室温静置5min;将稀释好的siRNA与Lipofectamine2000轻轻混合,室温静置20min。将混合液加入到每个已经含有OPTI-MEM的6孔板中,前后左右轻轻混匀;培养箱中箱孵育6h后,将转染液换为无双抗含血清培养基。

[0109] 3、Real-time PCR检测

[0110] 各组细胞转染培养48h后,使用Trizol法提取细胞总RNA,按照实施例2中的方法进行逆转录以及实时定量PCR检测。

[0111] 4、CCK-8检测

[0112] 收集对数生长期细胞,每孔加入细胞的数量为5000个,每组设置5个复孔,同时设置调零孔,放入37℃,5%CO_2培养箱中培养,于48h取出细胞,每孔加入10μl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。

[0113] 5、Transwell检测

[0114] 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。上室加入数量为1×10^5的100μl细胞悬液,下室加入600μl含10%FBS的培养基,每组设置3个复孔,37℃下恒温培养箱内培养48h。然后,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。

[0115] 6、统计学分析

[0116] 实验都是按照重复3次来完成的,结果数据都是以平均值±标准差的方式来表示,两者之间的差异采用配对t检验,认为当$P<0.05$时具有统计学意义。

[0117] 7、结果

[0118] 1)以AC114730.3在对照组中(BT474)的表达量作为基准定为1,相比对照组和阴性对照组(0.947±0.0379),实验组在转染siRNA-AC114730.3后,AC114730.3的表达水平(0.14±0.0625)显著低于对照组和阴性对照组(BT474 vs siRNA-AC114730.3,P值=0.0018,**;siRNA-NC vs siRNA-AC114730.3,P值=0.0037,**),而转染siRNA-NC的阴性对照中的AC114730.3的表达水平(0.947±0.0379)则无显著变化(BT474 vs siRNA-NC,P值=0.135,ns)

[0119] 2)CCK-8检测结果显示，相比阴性对照组的OD值，实验组的OD值显著降低(图2)，差异具有统计学意义(siRNA-NC vs siRNA-AC114730.3，P＝0.0022，**)，表明敲低AC114730.3后BT474细胞的增殖明显受到抑制。

[0120] 3)细胞侵袭实验结果显示，敲低AC114730.3后，穿过基底膜的细胞数目为(73.33±8.622)，与阴性对照组(136±10.82)相比明显减少，差异具有统计学意义(siRNA-AC114730.3vs siRNA-NC，P＝0.0223，*)，以上结果表明，敲低AC114730.3后能够抑制癌细胞BT474在体外的侵袭能力。

[0121] 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> 青岛市中心医院
[0003] <120> 放射性损伤疾病的检测试剂及其应用
[0004] <160> 6
[0005] <170> SIPOSequenceListing 1.0
[0006] <210> 1
[0007] <211> 22
[0008] <212> DNA
[0009] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0010] <400> 1
[0011] ttagagatga gaagaattga at 22
[0012] <210> 2
[0013] <211> 18
[0014] <212> DNA
[0015] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0016] <400> 2
[0017] agaccaactc cagattac 18
[0018] <210> 3
[0019] <211> 21
[0020] <212> DNA
[0021] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0022] <400> 3
[0023] aatcccatca ccatcttcca g 21
[0024] <210> 4
[0025] <211> 19
[0026] <212> DNA
[0027] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0028] <400> 4
[0029] gagccccagc cttctccat 19
[0030] <210> 5
[0031] <211> 21
[0032] <212> RNA
[0033] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0034] <400> 5
[0035] uugcuuaauc cuaaacgggu c 21
[0036] <210> 6
[0037] <211> 21
[0038] <212> RNA

[0039] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0040] <400> 6

[0041] cccguuuagg auuaagcaag u 21

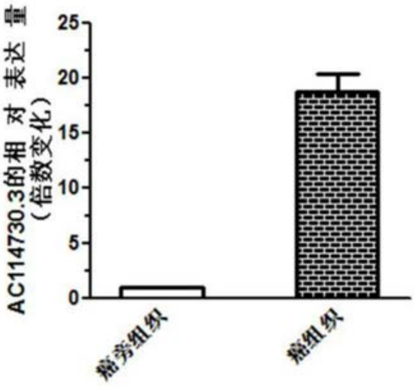

AC114730.3的相对表达量
（倍数变化）
25
20
15
10
5
0
癌旁组织
癌组织

图1

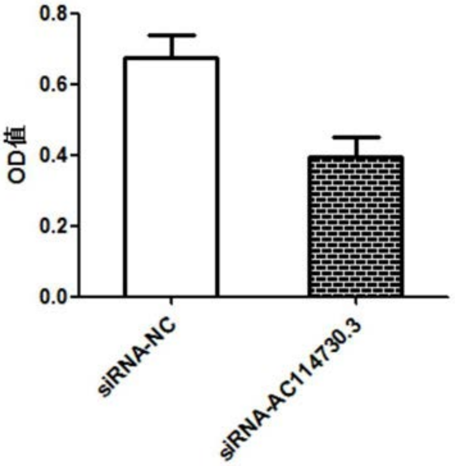

OD值
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
siRNA-NC
siRNA-AC114730.3

图2