



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108165631 A

(43)申请公布日 2018.06.15

(21)申请号 201711448755.8

(22)申请日 2017.12.27

(71)申请人 北京泱深生物信息技术有限公司
地址 100080 北京市海淀区善缘街1号立方
庭大厦3103室

(72)发明人 杨承刚 常鹏 孙耀兰

(51)Int. Cl.

C12Q 1/6886(2018.01)

A61K 31/7105(2006.01)

A61K 48/00(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

C12N 15/113(2010.01)

G01N 33/574(2006.01)

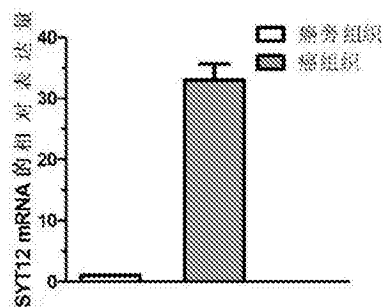
权利要求书1页 说明书10页
序列表2页 附图2页

(54)发明名称

一种骨肉瘤的生物标志物SYT12及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种骨肉瘤的生物标志物SYT12及其应用,本发明通过实验证明了SYT12在骨肉瘤患者中表达上调,干扰SYT12的表达可以抑制细胞的增殖和侵袭,提示SYT12可以应用于骨肉瘤的临床诊断和治疗中。本发明同时提供了一种筛选治疗骨肉瘤潜在物质的方法。



1. SYT12的如下任一项所述的应用：
 - a. SYT12在制备早期诊断骨肉瘤的产品中的应用；
 - b. SYT12在筛选治疗骨肉瘤的潜在物质中的应用；
 - c. SYT12在制备治疗骨肉瘤的药物组合物中的应用；
 - d. SYT12在制备治疗骨肉瘤侵袭、转移的药物组合物中的应用。
2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,a中所述产品包括用RT-PCR、实时定量PCR、原位杂交、芯片或免疫测定技术检测SYT12的试剂。
3. 根据权利要求2所述的应用,其特征在于,用实时定量PCR检测SYT12的试剂包括特异性扩增SYT12的引物。
4. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,c或d中所述的药物组合物包括SYT12的抑制剂。
5. 一种诊断骨肉瘤的产品,其特征在于,所述产品包括检测SYT12的试剂。
6. 根据权利要求5所述的产品,其特征在于,所述试剂包括:
特异性识别SYT12的探针;或
特异性扩增SYT12的引物;或
特异性结合SYT12编码的蛋白的抗体或配体。
7. 根据权利要求6所述的产品,其特征在于,所述特异性扩增SYT12的引物如序列SEQ ID NO.1~2所示。
8. 一种治疗骨肉瘤的药物组合物,其特征在于,所述药物组合物包括SYT12的抑制剂,和/或药学上可接受的载体。
9. 根据权利要求8所述的药物组合物,其特征在于,抑制剂为siRNA;优选的,siRNA序列如SEQ ID NO.7~8所示。
10. 一种筛选治疗骨肉瘤潜在物质的方法,其特征在于,步骤包括:
测试组中,在培养体系中添加测试化合物,并观察所述测试组的细胞中SYT12的表达量和/或活性;在对照组中,在相同的培养体系中不添加测试化合物,并观察对照组的所述细胞中SYT12的表达量和/或活性。

一种骨肉瘤的生物标志物SYT12及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药领域,涉及一种骨肉瘤的生物标志物SYT12及其应用。

背景技术

[0002] 骨肉瘤又称成骨肉瘤,是一种常见于儿童和青少年时期的恶性原发性骨肿瘤。骨肉瘤在恶性肿瘤中的发病率约占0.4%,起源于间叶组织,组织学特点是能够产生肿瘤样骨、不成熟骨甚至不产生骨样基质等。典型的发病部位是四肢长管状骨,好发于胧骨近端、股骨远端和胫骨近端等部位,偶也见于脊柱、骸骨等部位。其血行转移率较高,最常见部位为肺部,大多数骨肉瘤患者预后很差,肺转移是最常见的致死原因。目前对于骨肉瘤的治疗,临床上主要是手术联合放、化疗,生存率及预后较以前有所改善,随着新辅助化疗、保肢手术等的开展,5年生存率可提高到50%~60%(Wafa H,Grimer RJ.Expert Rev Anticancer Ther.2006;6(2):239-248.),但骨肉瘤极易发生肺转移,加之长时间化疗的毒副作用对于儿童、青少年来说,影响很大,难以耐受(Ferrari S,Serra M.Expert Opin Pharmacother.2015;16(18):2727-2736.)。此外个体对常规化疗药物存在耐药性,导致化疗效果差(Sevelde F,Mayr L,Kubista B,et al.J Exp Clin Cancer Res.2015;34:134.),因此寻找新的特异高效的骨肉瘤治疗方法是目前骨肉瘤研究的热点问题。

[0003] 骨肉瘤是一种复杂分子机制的骨与软组织的恶性肿瘤,其病因和发病机制尚不清楚。近些年,从分子水平研究骨肉瘤成为治疗骨肉瘤的新突破。这些分子在骨肉瘤不同的生理和病理过程中发挥着重要作用,包括改变癌基因和抑癌基因的表达,参与肿瘤细胞的增殖、侵袭、迁移、血管生成、免疫逃逸、耐药性和细胞凋亡等过程,甚至参与破骨细胞的功能等。研究这些分子的表达及作用机制将为骨肉瘤基因治疗提供新的潜在靶点和思路,如专利CN201510075917.2、CN201510075920.4、CN201510075918.7、CN201510075919.1中就公开了靶向骨肉瘤相关基因,改变相关基因的表达,对骨肉瘤细胞的增殖具有抑制作用,从而提出了相关基因作为骨肉瘤可能的靶标可以用于骨肉瘤的诊断和治疗。

[0004] 基因治疗是指将外源正常基因通过载体转染入有缺陷的靶细胞中,以纠正或补偿基因缺陷和异常而发挥治疗作用。分子靶向治疗具有较高的特异性,减少了对肿瘤周围正常组织细胞的毒副作用,具有非常好的应用前景,尽管寻找骨肉瘤的分子靶标越发受到重视,但是已经报道的分子靶标还比较少,不能满足临床上的需求,因此寻找新的特异高效的骨肉瘤的分子靶标具有重要的意义。

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骨肉瘤发生发展相关的基因标志物,将其应用到临床中,从而实现骨肉瘤的早期诊断和靶向治疗。

[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SYT12的如下任一项所述的应用:

[0008] a.SYT12在制备早期诊断骨肉瘤的产品中的应用;

- [0009] b. SYT12在筛选治疗骨肉瘤的潜在物质中的应用;
- [0010] c. SYT12在制备治疗骨肉瘤的药物组合物中的应用;
- [0011] d. SYT12在制备治疗骨肉瘤侵袭、转移的药物组合物中的应用。
- [0012] 进一步, a中所述产品包括用RT-PCR、实时定量PCR、原位杂交、芯片或免疫测定技术检测SYT12的试剂。
- [0013] 进一步, 用实时定量PCR检测SYT12的试剂包括特异性扩增SYT12的引物。
- [0014] 进一步, 特异性扩增SYT12的引物序列如SEQ ID NO.1~2所示。
- [0015] 进一步, b中筛选治疗骨肉瘤的潜在物质的步骤如下:
- [0016] 用候选物质处理表达或含有SYT12基因或其编码的蛋白的体系; 和
- [0017] 检测所述体系中SYT12基因或其编码的蛋白的表达或活性;
- [0018] 其中, 若所述候选物质可以抑制SYT12基因或其编码的蛋白的表达或活性, 则表明该候选物质是预防或治疗骨肉瘤的潜在物质。
- [0019] 进一步, c中所述的药物组合物包括SYT12的抑制剂。其中, SYT12的抑制剂包括核酸抑制物, 蛋白抑制剂, 蛋白水解酶, 蛋白结合分子。其中核酸抑制物选自: 以SYT12或其转录本为靶序列、且能够抑制SYT12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。蛋白结合分子选自: 与SYT12蛋白特异性结合的物质, 如能够抑制SYT12蛋白活性的抗体或配体。
- [0020] 进一步, 所述抑制剂为siRNA。
- [0021] 本发明提供了一种诊断骨肉瘤的产品, 所述产品包括检测SYT12的试剂。所述产品包括(但不限于)芯片、制剂、试剂盒。
- [0022] 进一步, 所述试剂包括
- [0023] 特异性识别SYT12的探针; 或
- [0024] 特异性扩增SYT12的引物; 或
- [0025] 特异性结合SYT12编码的蛋白的抗体或配体。
- [0026] 进一步, 所述特异性扩增SYT12的引物如序列SEQ ID NO.1~2所示。
- [0027] 在本发明中, 所述诊断骨肉瘤的产品可用于检测包括SYT12在内的与骨肉瘤相关的多个基因和/或其表达产物的表达水平。多个基因联合诊断, 可以增加骨肉瘤诊断的准确性。
- [0028] 本发明提供了治疗骨肉瘤的药物组合物, 所述药物组合物包括SYT12的抑制剂, 和/或药学上可接受的载体。
- [0029] 其中, 所述抑制剂包括核酸抑制物, 蛋白抑制剂, 蛋白水解酶, 蛋白结合分子。其中核酸抑制物选自: 以SYT12或其转录本为靶序列、且能够抑制SYT12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。蛋白结合分子选自: 与SYT12蛋白特异性结合的物质, 如能够抑制SYT12蛋白活性的抗体或配体。所述药学上可接受的载体, 包括(但不限于)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。
- [0030] 进一步, 所述抑制剂为siRNA。

[0031] 进一步,所述siRNA的序列如SEQ ID NO.7~8所示。

[0032] 本发明提供了一种筛选治疗骨肉瘤潜在物质的方法,步骤包括:

[0033] 测试组中,在培养体系中添加测试化合物,并观察所述测试组的细胞中SYT12的表达量和/或活性;在对照组中,在相同的培养体系中不添加测试化合物,并观察对照组的所述细胞中SYT12的表达量和/或活性。

[0034] 其中,如果测试组中细胞的SYT12的表达量和/或活性低于对照组,就表明该测试化合物是对SYT12的表达和/或活性有抑制作用的治疗骨肉瘤的潜在物质。

[0035] 作为本发明的一种实施方式,所述的步骤还包括:对获得的潜在物质进行进一步的细胞实验和/或动物试验,以从潜在物质中进一步选择和确定对于预防、缓解或治疗骨肉瘤有用的物质。

[0036] 所述潜在物质包括(但不限于):针对SYT12基因或其上游或下游基因设计的核酸促进物或抑制物、蛋白抑制剂、蛋白结合分子。

附图说明

[0037] 图1是利用QPCR检测SYT12基因在骨肉瘤组织中的表达情况图;

[0038] 图2是利用Western blot检测SYT12蛋白在骨肉瘤组织中的表达情况图;

[0039] 图3是SYT12在骨肉瘤细胞中的转染情况图;其中,图A是利用QPCR检测转染对骨肉瘤细胞中SYT12 mRNA表达的影响图;图B是利用Western blot检测转染对骨肉瘤细胞中SYT12蛋白的影响图;

[0040] 图4是用MTT法检测SYT12基因对骨肉瘤细胞增殖的影响图;

[0041] 图5是用流式细胞仪检测SYT12对骨肉瘤细胞凋亡的影响图;

[0042] 图6是利用细胞划痕实验检测SYT12对骨肉瘤细胞迁移的影响图;

[0043] 图7是利用Transwell小室检测SYT12对骨肉瘤细胞侵袭的影响图。

[0044] 具体的实施方式

[0045] 本发明经过广泛而深入的研究,采用高通量测序技术,检测骨肉瘤标本中基因在肿瘤组织和癌旁组织的表达,发现其中具有明显表达差异的基因,探讨其与骨肉瘤的发生之间的关系,从而为骨肉瘤的早期检测及靶向治疗寻找更好的途径和方法。通过筛选,首次发现了骨肉瘤患者中SYT12显著性上调。实验证明,通过沉默SYT12,能够有效的抑制骨肉瘤细胞的增殖和侵袭,提示SYT12可用于骨肉瘤的临床诊断和治疗。

[0046] SYT12基因

[0047] SYT12是位于人11号染色体长臂1区3带上,本发明中的SYT12包括野生型、突变型或其片段。一种代表性的SYT12基因序列如目前国际公共核酸数据库GeneBank中SYT12基因(NC_000011.10)所示。

[0048] 本发明的人SYT12核苷酸全长序列或其片段通常可以用PCR扩增法、重组法或人工合成的方法获得。对于PCR扩增法,可根据已公开的有关核苷酸序列,尤其是开放阅读框序列来设计引物,并用市售的cDNA库或按本领域技术人员已知的常规方法所制备的cDNA库作为模板,扩增而得有关序列。当序列较长时,常常需要进行两次或多次PCR扩增,然后再将各次扩增出的片段按正确次序拼接在一起。

[0049] 本发明可以利用本领域内已知的任何方法测定基因表达。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。可以在转录或表达水平上检测生物标志物的水平。

[0050] 诊断产品

[0051] 在本发明中,诊断骨肉瘤的产品可以是任何形式,包括(但不限于)芯片、制剂、试剂盒,只要其能够检测SYT12基因或其表达产物的表达水平即可。

[0052] 本发明中的芯片包括: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或抗体,所述的寡核苷酸探针或抗体特异性结合SYT12基因或蛋白。

[0053] 具体地,可根据本发明所述的基因,设计出适合的探针,固定在固相载体上,形成“寡核苷酸阵列”。所述的“寡核苷酸阵列”是指具有可寻址位置(即以区别性的,可访问的地址为特征的位置)的阵列,每个可寻址位置均含有一个与其相连的特征性寡核苷酸。根据需要,可将寡核苷酸阵列分成多个亚阵。

[0054] 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。

[0055] 所述的SYT12芯片的制备可采用本领域已知的生物芯片的常规制造方法。例如,如果固相载体采用的是修饰玻片或硅片,探针的5'端含有氨基修饰的聚dT串,可将寡核苷酸探针配制成溶液,然后采用点样仪将其点在修饰玻片或硅片上,排列成预定的序列或阵列,然后通过放置过夜来固定,就可得到本发明的基因芯片。

[0056] 本发明中的特异性抗体包括单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)、及抗体片段、组合抗体等,只要它们展现出期望的生物学活性。

[0057] 本发明中所述固相载体可采用芯片领域的各种常用材料,例如包括但不限于塑料制品、微颗粒、膜载体等。所述塑料制品可通过非共价或物理吸附机制与抗体或蛋白抗原相结合,最常用的塑料制品为聚苯乙烯制成的小试管、小珠和微量反应板;所述微颗粒是由高分子单体聚合成的微球或颗粒,其直径多为微米,由于带有能与蛋白质结合的功能团,易与抗体(抗原)形成化学偶联,结合容量大;所述膜载体包括硝酸纤维素膜、玻璃纤维素膜及尼龙膜等微孔滤膜。

[0058] 本发明提供了一种试剂盒,所述试剂盒可用于检测SYT12的表达。优选的,所述的制剂或试剂盒中还含有用于标记RNA样品的标记物,以及与所述标记物相对应的底物。此外,所述的试剂盒中还可包括用于提取RNA、PCR、杂交、显色等所需的各种试剂,包括但不限于:抽提液、扩增液、杂交液、酶、对照液、显色液、洗液等。此外,所述的试剂盒中还包括使用说明书和/或芯片图像分析软件。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。

[0059] 药物组合物

[0060] 基于发明人的发现,本发明提供了一种所述SYT12抑制剂,所述抑制剂包括降低SYT12基因或其表达产物稳定性、下调SYT12基因或其表达产物的表达水平、减少SYT12基因或其表达产物有效作用时间的物质。所述抑制剂可以是SYT12核酸抑制物,蛋白抑制剂,蛋白水解酶,蛋白结合分子。

[0061] 本发明还提供了一种药物组合物,它含有有效量的所述的SYT12的抑制剂,以及药学上可接受的载体。所述的组合物可用于治疗骨肉瘤。任何前述的SYT12的抑制剂均可用于组合物的制备。本发明的药物组合物通过降低SYT12基因或蛋白的表达,从而治疗因SYT12增加导致的骨肉瘤。

[0062] 所述药学上可接受的载体,包括(但不限于)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、稳定剂、杀菌剂、缓冲剂、等渗剂、螯合剂、pH控制剂及表面活性剂。

[0063] 本发明所述药物组合物可口服给药、非胃肠道给药、通过吸入喷雾给药、局部给药、直肠给药、鼻给药、颊给药、阴道给药或通过植入的贮药装置给药。优选口服给药或注射给药。本发明药物组合物可含有任何常用的无毒可药用载体、辅料或赋形剂。

[0064] 本发明的药物导入组织或者细胞的方式可以分为体外或者体内的方式。体外方式包括将含有SYT12 mRNA或蛋白抑制剂的药物导入细胞中,再将细胞移植或回输到体内。体内方式包括直接将含有SYT12 mRNA或蛋白质抑制剂的药物注入体内肿瘤组织中。

[0065] 在治疗过程中,可以根据症状的严重程度、复发的频率和治疗方案的生理应答,调整本发明药物组合物的剂量。

[0066] 在本发明中,术语“治疗”是指包括但不限于治愈,减缓(减少)靶定的病理状况或病症或防止复发。包括但不限于,(1)抑制作用,在一定程度上抑制疾病进展,其包括减缓以及完全抑制;(2)减少疾病发作和/或症状的数量;(3)减少病灶尺寸;(4)抑制(即减少、减缓或完全阻止)疾病细胞渗透到相邻的周边器官和/或组织;(5)抑制(即减少、减缓或完全阻止)疾病传播;(6)在一定程度上缓解与疾病相关联的一种或多种症状;(7)治疗后增加无病表现的时间长度;(8)在治疗后的给定时间点减少死亡率;和/或(9)治疗后无副作用。

[0067] 本发明的药物组合物还可以与其他治疗骨肉瘤的药物联用,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。还可以以单独的组合物或与主要的活性成分不同的剂量形式单独给予其它治疗性化合物。

[0068] 在本发明的具体实施例中,实验都是按照至少重复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,采用SPSS18.0统计软件来进行统计分析的,癌组织与癌旁组织的配对比较采用t检验,认为当 $P < 0.05$ 时具有统计学意义。

[0069] 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适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,例如Sambrook等人,分子克隆:实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。

[0070] 实施例1与骨肉瘤相关的基因标志物的筛选

[0071] 1、样品收集

[0072] 分别收集6例骨肉瘤组织及癌旁组织样本,组织样本的取得获得患者的知情同意,并且取得均通过组织伦理委员会的同意。

[0073] 2、RNA样品的制备

[0074] 取出冻存于液氮中的组织样本,把组织样本放入已预冷的研钵中进行研磨,按照试剂盒中的说明书提取分离RNA。具体如下:

[0075] 1) 加入Trizol,室温放置5min;

- [0076] 2) 加入氯仿0.2ml,用力振荡离心管,充分混匀,室温下放置5-10min;
- [0077] 3) 12000rpm离心15min,将上层水相移到另一新的离心管中(注意不要吸到两层水相之间的蛋白质),加入等体积的-20℃预冷的异丙醇,充分颠倒混匀,置于冰上10min;
- [0078] 4) 12000rpm高速离15min后小心弃掉上清液,按1ml/ml Trizol的比例加入75% DEPC乙醇洗涤沉淀(4℃保存),洗涤沉淀物,振荡混匀,4℃,12000rpm离心5min;
- [0079] 5) 弃去乙醇液体,室温下放置5min,加入DEPC水溶解沉淀;
- [0080] 6) 用Nanodrop2000紫外分光光度计测量RNA纯度及浓度,冻存于-70℃冰箱。
- [0081] 3、RNA样品的质量分析
- [0082] 利用Nanodrop2000对所提取的RNA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。浓度 $\geq 200\text{ng}/\mu\text{l}$,OD260/280介于1.8~2.2之间。
- [0083] 4、高通量测序
- [0084] 使用Ribo-Zero试剂盒除去总RNA中的核糖体RNA,利用利用Illumina的Truseq RNA sample Prep Kit进行cDNA文库的构建,使用HiSeq4000测序平台对cDNA文库进行测序。
- [0085] 5、高通量转录组测序数据分析
- [0086] 对测序结果进行生物信息学分析及处理,使用cuffquant定量mRNA的表达量,cuffdiff比较对照组跟肿瘤组的表达差异,差异基因的筛选标准为 $\text{fdr} < 0.05$,两组的fpkm平均值之差大于5。
- [0087] 6、结果
- [0088] RNA-seq结果显示,与癌旁组织相比,骨肉瘤组织中的SYT12表达水平显著上调,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。
- [0089] 实施例2 QPCR测序验证SYT12基因的差异表达
- [0090] 1、对SYT12基因差异表达进行大样本QPCR验证。按照实施例1中的样本收集方式选择骨肉瘤患者癌旁组织和骨肉瘤组织各50例。
- [0091] 2、RNA提取 具体步骤如实施例1所述。
- [0092] 3、逆转录
- [0093] 采用FastQuant cDNA第一链合成试剂盒(货号:KR106)进行mRNA反转录。具体步骤如下:
- [0094] 在冰浴条件下配置20 μl 反应体系:4 \times FQ-RT Super Mix 5 μl ,RNA 1 μg ,Rnase Free ddH₂O补足至20 μl ,42℃孵育15min,95℃孵育3min之后放于冰上。
- [0095] 4、QPCR扩增
- [0096] (1) 引物设计
- [0097] 根据Genbank中SYT12基因和管家基因GAPDH基因的序列设计QPCR扩增引物,由博迈德公司合成。
- [0098] 其中,SYT12的扩增引物序列如SEQ ID NO.1~2所示,管家基因GAPDH的扩增引物序列如SEQ ID NO.3~4所示。
- [0099] (2) PCR反应体系:正向引物和反向引物各0.6 μl ,2 \times SuperReal PreMix Plus 10 μl ,DNA模板2 μl ,ddH₂O 7.4 μl ,50 \times ROX Reference Dye²2 μl ,灭菌蒸馏水4.8 μl 。
- [0100] (3) PCR反应条件:95℃15min,(95℃10s,55℃30s,72℃32s) \times 40个循环,95℃15s,

60℃60s,95℃15s。在ABI 7300型荧光定量PCR仪上进行PCR反应,通过融解曲线分析和电泳确定目的条带,ΔΔCT法进行相对定量。

[0101] 5、结果

[0102] 结果如图1所示,与癌旁组织相比,SYT12 mRNA在骨肉瘤组织中表达上调,差异具有统计学意义(P<0.05)。

[0103] 实施例3蛋白免疫印记实验检测SYT12蛋白的差异表达

[0104] 1、组织总蛋白的提取

[0105] 将组织用剪刀剪碎,放入玻璃匀浆器中,加入RIPA裂解液,玻璃匀浆器碾碎组织直至其充分裂解,将裂解后的液体吸至EP管中,4℃下14000rpm离心5min,收集上清。

[0106] 2、总蛋白浓度测定

[0107] 按照BCA蛋白浓度测定试剂盒的说明书进行蛋白浓度的测定。

[0108] 3、SDS-PAGE电泳

[0109] 按照SDS-PAGE凝胶配制试剂盒的说明书配制8%的分离胶和5%的浓缩胶并进行电泳。

[0110] 4、Western blot检测

[0111] 1) 电转移

[0112] 将PVDF膜放入甲醇溶液中激活5min,放入转膜缓冲液中平衡20min。取出PAGE胶放入转膜缓冲液中,切下相应的PAGE胶,按照由下到上依次为滤纸、PVDF膜、PAGE胶、滤纸的顺序放到半干的转膜仪中,恒压25V转膜1.5h;

[0113] 2) 免疫杂交

[0114] 取出PVDF膜,PBS冲洗后置于5%BSA溶液中室温下摇动封闭2h,将PVDF膜放入杂交袋中,加入一抗过夜,用TBST缓冲液洗涤PVDF膜,再加入相应的二抗,室温下孵育2h,TBST缓冲液洗涤。

[0115] 3) DAB显色

[0116] PVDF膜稍干后滴加新鲜配制的DAB显色液,PVDF膜显色后扫描记录。以β-actin作为内参照,采用Quantity One凝胶成像分析系统对条带进行半定量灰度分析,实验重复3次,结果取平均灰度值。

[0117] 5、结果

[0118] 结果如图2所示,骨肉瘤组织中SYT12蛋白表达水平显著高于癌旁组织,差异具有统计学意义(P<0.05)

[0119] 实施例4 siRNA对骨肉瘤细胞中SYT12的影响

[0120] 1、细胞培养

[0121] 人骨肉瘤细胞株U-20S,以含10%胎牛血清和1%P/S的DMEM培养基在37℃、5%CO₂、相对湿度为90%的培养箱中培养。2-3天换液1次,细胞生长良好,呈单层贴壁生长,使用0.25%含EDTA的胰蛋白酶常规消化传代。

[0122] 2、转染

[0123] 1) 转染前细胞的处理

[0124] 转染前一天,6孔培养板上种3~5×10⁵个细胞/孔,在无抗生素培养基中培养一天,转染时细胞密度为30~50%,于转染前换成无血清培养基。

[0125] 2) siRNA的设计

[0126] 根据SYT12的基因序列设计干扰RNA, siRNA-NC的序列如SEQ ID NO.5~6所示, siRNA1的序列如SEQ ID NO.7~8所示, siRNA2的序列如SEQ ID NO.9~10所示, siRNA3的序列如SEQ ID NO.11~12所示。

[0127] 将实验分为三组:对照组(U-2 OS)、阴性对照组(siRNA-NC)和实验组(siRNA1、siRNA2、siRNA3),其中阴性对照组siRNA与SYT12基因的序列无同源性。

[0128] 3) 转染

[0129] 采用Invitrogen公司的Lipofectamine 3000进行转染,具体操作按照说明书进行,转染之后观察干扰RNA的沉默效应。

[0130] 3、QPCR检测SYT12基因的转录水平

[0131] 3.1细胞总RNA的提取

[0132] 1) 胰酶消化贴壁细胞,吹打获得的细胞经离心、重悬、清洗后,以1640培养基(10%小牛血清)重悬;

[0133] 2) 将重悬的细胞转移至6孔板(/孔),添加培养基至2ml/孔,轻摇6孔板使细胞均匀重悬;

[0134] 3) 细胞贴壁生长48h,去培养基;

[0135] 4) 以1ml Trizol试剂裂解细胞,反复吹打6孔板壁,尽量使细胞完全裂解;

[0136] 5) 转移细胞裂解液至1.5ml DEPC处理过的EP管中,置于冰上。加入0.2ml氯仿,剩余操作步骤同组织中RNA提取过程。

[0137] 3.2逆转录 步骤同实施例2。

[0138] 3.3QPCR扩增 步骤同实施例2

[0139] 4、Western检测

[0140] 4.1细胞总蛋白的提取

[0141] 收集处于对数期的不同处理组的细胞,用预冷的PBS洗涤细胞,加入RIPA裂解液,冰上放置30min,使用细胞刮刀将裂解的细胞刮下来,使用移液器将裂解后的液体吸至EP管中,4℃下14000rpm离心5min,收集离心后的上清。

[0142] 4.2总蛋白浓度的测定

[0143] 按照BCA蛋白浓度测定试剂盒的说明书进行蛋白浓度的测定。

[0144] 4.3SDS-PAGE电泳

[0145] 按照SDS-PAGE凝胶配制试剂盒的说明书配制8%的分离胶和5%的浓缩胶并进行电泳。

[0146] 4.4Western检测 步骤详见实施例3。

[0147] 5、结果

[0148] 结果如图3显示,与非转染组与转染siRNA-NC组相比,实验组SYT12水平所下降,其中siRNA1的干扰效果最为明显,因此选择siRNA1进行后续的实验。

[0149] 实施例5 SYT12基因对骨肉瘤细胞增殖的影响

[0150] 1、取生长状况良好的细胞,胰酶消化成单细胞悬液后计数,将细胞稀释成合适浓度的细胞悬液。

[0151] 2、于96孔培养板中,将稀释后的不同处理组细胞每孔接种2000细胞,至少设3个平

行孔和无细胞培养基对照,37℃、5%CO₂培养24h。

[0152] 3、于接种后1、2、3、4、5天每天取出3孔细胞以MTT法检测其490nm的OD值,进行计数,计算平均值。

[0153] 4、检测前弃去上清液,培养液洗3次,每孔加入MTT无血清培养基溶液(5mg/ml)10μl,37℃培养箱中继续培养4h,终止培养。

[0154] 5、每孔加入100μl Formazan溶解液,摇床慢摇1min。在酶标仪上用波长为490nm测定测定光密度(OD)值,以时间为横轴,光密度值为纵轴绘制细胞生长曲线。

[0155] 6、结果

[0156] 结果如图4所示,与对照相比,实验组在转染siRNA1后,细胞的增殖明显受到了抑制,差异具有统计学意义(P<0.05),说明在骨肉瘤的发生发展过程中,SYT12可以促进细胞的增殖。

[0157] 实施例6 SYT12基因对骨肉瘤细胞凋亡的影响

[0158] 使用流式细胞仪检测SYT12基因对细胞凋亡的影响。

[0159] 1、细胞培养 步骤同实施例3。

[0160] 2、细胞转染 步骤同实施例3。

[0161] 3、流式细胞仪检测

[0162] 1)将处于对数生长期的不同处理组的细胞经胰酶消化后吹打成细胞悬液并计数。取10⁶量的细胞悬液,1000rpm离心5min;

[0163] 2)弃上清,加入195μl Annexin V-FITC结合液轻轻重悬细胞;

[0164] 3)加入5μl的Annexin V-FITC,轻柔混匀,室温下避光孵育10min;

[0165] 4)1000rpm离心5min,弃上清,加入190μl的Annexin V-FITC结合液轻轻重悬细胞;

[0166] 5)加入10μl碘化丙啶(PI)染色液,轻柔混匀,冰浴避光放置,进行流式细胞仪检测细胞凋亡情况,所有实验均重复3次,结果取平均值。

[0167] 4、结果:

[0168] 结果如图5所示,与对照组相比,实验组的细胞的凋亡率增加,说明SYT12抑制骨肉瘤细胞的凋亡。

[0169] 实施例7 SYT12对细胞迁移的影响

[0170] 1、向6孔板中每孔加入1ml 50μg/ml的纤连蛋白,并置于4℃冰箱中过夜。

[0171] 2、弃去剩余的纤连蛋白溶液,用无血清培养基清洗,将处于对数生长期的不同处理组细胞经胰酶消化重悬后,接种于铺有纤连蛋白的6孔板中,每组细胞设2个复孔,每孔5×10⁵个细胞,37℃、5%CO₂培养箱中培养过夜。

[0172] 3、待细胞长至约90%融合时,用10μl的Tip头划出一条无细胞的划痕,PBS溶液洗去脱落的细胞,加入无血清培养基继续培养。

[0173] 4、分别于划痕后0h、48h观察细胞划痕处的愈合情况并拍照。实验重复3次,结果取平均值。

[0174] 5、结果

[0175] 结果如图6所示,实验组相比对照组而言,细胞体外划痕后的迁移距离明显降低,而对照组之间无显著差异,说明SYT12与骨肉瘤细胞的迁移有关。

[0176] 实施例8 SYT12对细胞侵袭的影响

[0177] 1、Transwell小室制备

[0178] 将50mg/L的Matrigel胶用4℃预冷的无血清培养基以1:8的比例稀释、混匀,包被Transwell小室的底部膜的上室面,4℃风干。取60μl~80μl稀释的Matrigel胶(3.9μg/μl)置于孔径为8μm的Transwell上室的聚碳酸酯膜上,使膜上的所有的微孔均被Matrigel覆盖,置于37℃30min使Matrigel聚合成凝胶。

[0179] 2、配置细胞悬液

[0180] 将处于对数生长期的不同处理组的细胞经胰酶消化,无血清培养基重悬后,调整细胞浓度为 5×10^4 个/ml。

[0181] 3、细胞接种

[0182] 在Transwell上室加入2ml的细胞悬液,下室加入1ml的含10%胎牛血清的完全培养基,放置于配套的6孔板上,37℃、5%CO₂条件下培养20-24h;取出Transwell小室,棉签擦尽上室面的Matrigel胶和未穿透膜的细胞。

[0183] 4、染色

[0184] 细胞培养结束后,取出Transwell小室,棉签擦尽上室面的Matrigel胶和未穿透膜的细胞,下室面用95%酒精固定15min后,苏木素染色2min,倒置显微镜下随机取5个高倍镜视野观察、计数并拍照。

[0185] 计数小室下室面的细胞数即为穿透Matrigel胶的细胞数,取平均数作为实验结果,并以该细胞数代表肿瘤细胞的侵袭力,实验重复3次,每组细胞设3个复孔。

[0186] 5、结果

[0187] 结果如图7所示,与对照组相比,实验组的细胞穿过Transwell小室聚碳酸酯膜的细胞数明显减少,而对照组之间无明显差异,说明SYT12与骨肉瘤细胞的侵袭有关。

[0188] 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。

序列表

- <110> 北京洪深生物信息技术有限公司
<120> 一种骨肉瘤的生物标志物SYT12及其应用
<160> 12
<170> SIPOSequenceListing 1.0
<210> 1
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 1
aatgcctact ccatcttc 18
<210> 2
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 2
cgatgcaaaa tacagaaa 18
<210> 3
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 3
ggagcgagat ccctcaaaa t 21
<210> 4
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 4
ggctgttgtc atacttctca tgg 23
<210> 5
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 5
uucuccgaac gugucacgu 19
<210> 6
<211> 19
<212> RNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 6
acgugacacg uucggagaa 19
<210> 7
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 7
aaaaacggac ccgauacugc g 21
<210> 8
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 8
caguaucggg uccguuuuuu a 21
<210> 9
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 9
acuacuugcc ccagaauccc c 21
<210> 10
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 10
ggauucuggg gcaaguaguu u 21
<210> 11
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 11
ucuugaucug guaaguuuu c 21
<210> 12
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 12
gaaacuuacc agaucaagaa a 21

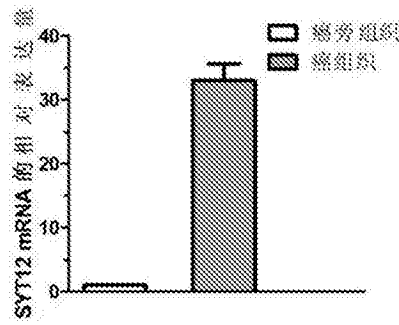


图1

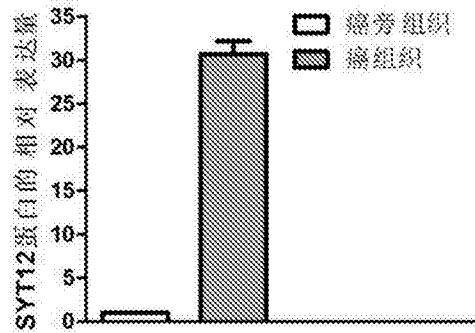


图2

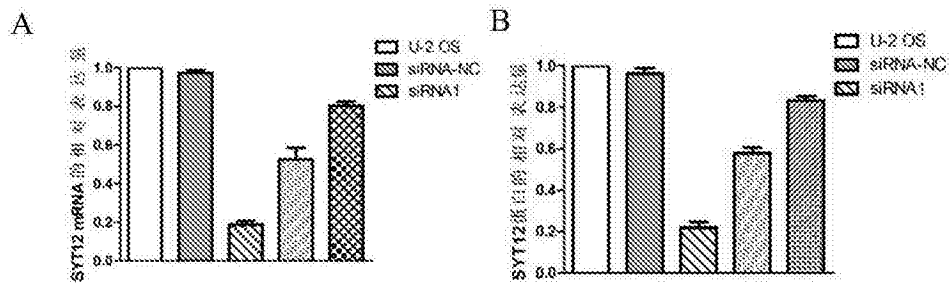


图3

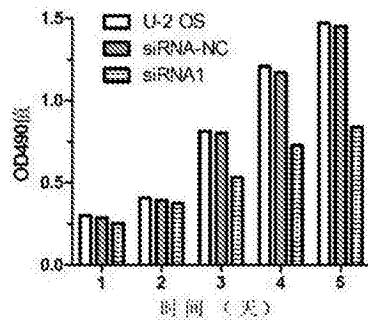


图4

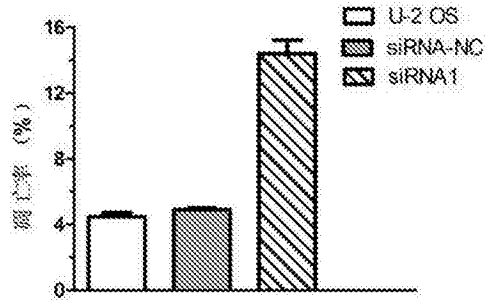


图5

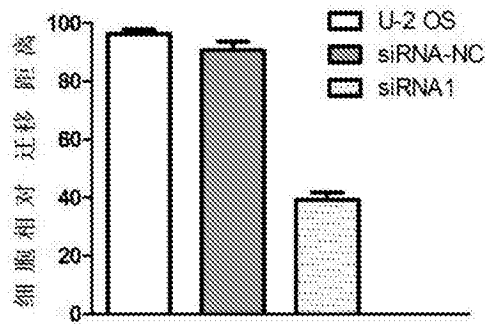


图6

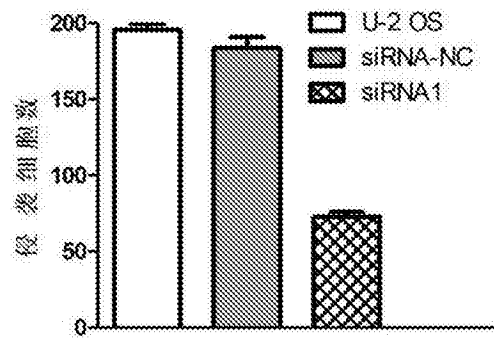


图7