



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106947809 B

(45)授权公告日 2019.08.02

(21)申请号 201710149350.8

G01N 33/574(2006.01)

(22)申请日 2017.03.14

A61K 45/00(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

A61K 39/395(2006.01)

申请公布号 CN 106947809 A

A61P 35/00(2006.01)

(43)申请公布日 2017.07.14

(56)对比文件

(73)专利权人 青岛山大齐鲁医院(山东大学齐鲁医院(青岛))

US 2014141996 A1,2014.05.22,全文.

Song SH et al..Gene Expression

地址 266035 山东省青岛市市北区合肥路758号

Analysis in Nasal Polyp Using Microarray.

《Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck

专利权人 济南市中心医院

Surg》.2011,第54卷第55-61页.

北京泱深生物信息技术有限公司

审查员 王胜佳

(72)发明人 杨中军 董莉莉 杨承刚

(51)Int.Cl.

C12Q 1/6886(2018.01)

G01N 33/68(2006.01)

权利要求书1页 说明书8页

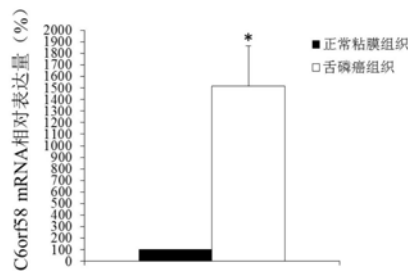
序列表3页 附图2页

(54)发明名称

C6orf58基因在制备舌鳞癌诊治产品中的应用

(57)摘要

本发明公开了C6orf58基因可以作为舌鳞癌早期诊断的分子标志物。本发明的实验证明,与正常粘膜组织相比,舌鳞癌组织中的C6orf58基因表达显著升高,且经过RNA干扰实验证明C6orf58能够影响舌鳞癌细胞的增殖。根据本发明的研究成果,可以研发能够抑制C6orf58基因表达的药物,从而实现临床上对于舌鳞癌的预防和治疗。



1. 定量检测口腔粘膜组织中C6orf58基因表达的产品在制备诊断舌鳞癌的工具中的应用,其特征在于,C6orf58基因的编码序列是SEQ ID NO.1所示的DNA序列。

2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述产品包括:通过反转录PCR、实时定量PCR、免疫检测、原位杂交、芯片或高通量测序平台检测C6orf58 基因表达以诊断舌鳞癌的产品;所述通过反转录PCR检测C6orf58基因表达以诊断舌鳞癌的产品至少包括一对特异扩增C6orf58基因的引物;所述通过实时定量PCR检测C6orf58基因表达以诊断舌鳞癌的产品至少包括一对特异扩增C6orf58基因的引物;所述通过免疫检测检测C6orf58基因表达以诊断舌鳞癌的产品包括:与C6orf58蛋白特异性结合的抗体;所述通过原位杂交检测C6orf58基因表达以诊断舌鳞癌的产品包括:与C6orf58基因的核酸序列杂交的探针;所述通过芯片检测C6orf58基因表达以诊断舌鳞癌的产品包括:蛋白芯片和基因芯片;其中,蛋白芯片包括与C6orf58蛋白特异性结合的抗体,基因芯片包括与C6orf58基因的核酸序列杂交的探针。

3. 根据权利要求2所述的应用,其特征在于,所述通过实时定量PCR检测C6orf58基因表达以诊断舌鳞癌的产品至少包括的一对特异扩增C6orf58基因的引物如SEQ ID NO.3和SEQ ID NO.4所示。

4. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述工具包括检测C6orf58基因表达的试剂;所述试剂包括检测C6orf58基因mRNA的引物和/或探针、检测C6orf58蛋白的抗体。

5. 根据权利要求4所述的应用,其特征在于,所述检测C6orf58基因mRNA的引物包括SEQ ID NO.3和SEQ ID NO.4所示的引物对。

6. C6orf58基因的抑制剂和/或C6orf58基因表达产物的抑制剂在制备治疗舌鳞癌的药物中的应用,其特征在于,C6orf58基因的抑制剂是针对C6orf58基因的siRNA,C6orf58基因表达产物的抑制剂是针对C6orf58蛋白的抗体。

7. 根据权利要求6所述的应用,其特征在于,所述针对C6orf58基因的siRNA序列如SEQ ID NO.7和SEQ ID NO.8所示。

## C6orf58基因在制备舌鳞癌诊治产品中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体地涉及C6orf58基因在舌鳞癌的诊断、治疗中的用途。

### 背景技术

[0002] 口腔鳞癌是头颈部肿瘤最常见的恶性肿瘤,约占全身肿瘤的3%,占口腔肿瘤的90%,而舌癌占口腔鳞癌发病率的首位。虽然近几年在发达国家口腔癌的发病率呈现缓慢下降趋势,但总的发病率却在增加。患者多数为40岁以上男性,好发部位多在舌、颊、牙龈等。舌鳞癌的发生是个多因素、多步骤、多阶段的复杂过程,病因学也复杂多样,涉及理化因素、微生物感染、遗传、种族等方面。虽然有关舌鳞癌病因学及相关机制一直是研究的热点,也取得一定成果,但舌鳞癌仍然具有较高的死亡率及预后差。而预后较差的原因往往是诊断和治疗的不及时,由于舌鳞癌早期一般无任何症状,患者往往因疼痛、难以愈合溃疡、不明原因的出血、口腔或者颈部肿块等临床症状就诊,这时病情较晚,生存率较低。有报道认为早期病例及时治疗,5年生存率可达到85%,而一旦出现症状,五年生存率在50%左右。另外病灶面积大,手术切除范围广,也将严重影响患者术后生活质量。研究舌鳞癌生物学行为、发生和发展机制,有助于疾病早诊断、预防和治疗;寻找有效的分子靶基因,降低舌癌的死亡率,是迫切需要解决的问题;同时具有广阔的临床医用前景及重大的科学价值。

### 发明内容

[0003] 本发明的目的在于提供一种可用于舌鳞癌早期诊断的分子标志物。相比现有的舌鳞癌的诊断方法,使用基因标志物来诊断舌鳞癌的具有及时性、特异性和灵敏性,从而使患者在疾病早期就能知晓疾病风险,针对风险高低,采取相应的预防和治疗措施。

[0004] 为了实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0005] 本发明提供了检测C6orf58基因表达的产品在制备诊断舌鳞癌的工具中的应用。

[0006] 进一步,所述检测C6orf58基因表达的产品包括检测C6orf58基因mRNA水平的产品、和/或检测C6orf58蛋白水平的产品。

[0007] 进一步,所述检测C6orf58基因表达的产品包括:通过RT-PCR、实时定量PCR、免疫检测、原位杂交或芯片检测C6orf58基因表达以诊断舌鳞癌的产品。

[0008] 进一步,所述用RT-PCR诊断舌鳞癌的产品至少包括一对特异扩增C6orf58基因的引物;所述用实时定量PCR诊断舌鳞癌的产品至少包括一对特异扩增C6orf58基因的引物;所述用免疫检测诊断舌鳞癌的产品包括:与C6orf58蛋白特异性结合的抗体;所述用原位杂交诊断舌鳞癌的产品包括:与C6orf58基因的核酸序列杂交的探针;所述用芯片诊断舌鳞癌的产品包括:蛋白芯片和基因芯片;其中,蛋白芯片包括与C6orf58蛋白特异性结合的抗体,基因芯片包括与C6orf58基因的核酸序列杂交的探针。

[0009] 所述用实时定量PCR诊断舌鳞癌的产品至少包括的一对特异扩增C6orf58基因的引物如SEQ ID NO.3和SEQ ID NO.4所示。

[0010] 所述检测C6orf58基因表达的产品可以是检测C6orf58基因表达的试剂、也可以是包含所述试剂的试剂盒、芯片、试纸等,也可以是使用所述试剂的高通量测序平台。

[0011] 所述诊断舌鳞癌的工具包括但不限于芯片、试剂盒、试纸、或高通量测序平台;高通量测序平台是一种特殊的诊断舌鳞癌的工具,随着高通量测序技术的发展,对一个人的基因表达谱的构建将成为十分便捷的工作。通过对比疾病患者和正常人群的基因表达谱,容易分析出哪个基因的异常与疾病相关。因此,在高通量测序中获知C6orf58基因的异常与舌鳞癌相关也属于C6orf58基因的用途,同样在本发明的保护范围之内。

[0012] 本发明还提供了一种诊断舌鳞癌的工具,所述工具包括检测C6orf58基因表达的试剂;所述试剂包括检测C6orf58基因mRNA的引物和/或探针、检测C6orf58蛋白的抗体。

[0013] 所述工具包括但不限于芯片、试剂盒、试纸、或高通量测序平台。

[0014] 其中,所述芯片包括基因芯片、蛋白质芯片;所述基因芯片包括固相载体以及固定在固相载体的寡核苷酸探针,所述寡核苷酸探针包括用于检测C6orf58基因转录水平的针对C6orf58基因的寡核苷酸探针;所述蛋白质芯片包括固相载体以及固定在固相载体的C6orf58蛋白的特异性抗体;所述基因芯片可用于检测包括C6orf58基因在内的多个基因(例如,与舌鳞癌相关的多个基因)的表达水平。所述蛋白质芯片可用于检测包括C6orf58蛋白在内的多个蛋白质(例如与舌鳞癌相关的多个蛋白质)的表达水平。通过将多个与舌鳞癌的标志物同时检测,可大大提高舌鳞癌诊断的准确率。

[0015] 其中,所述试剂盒包括基因检测试剂盒和蛋白免疫检测试剂盒;所述基因检测试剂盒包括用于检测C6orf58基因转录水平的试剂;所述蛋白免疫检测试剂盒包括C6orf58蛋白的特异性抗体。进一步,所述试剂包括使用RT-PCR、实时定量PCR、免疫检测、原位杂交或芯片方法检测C6orf58基因表达水平过程中所需的试剂。优选度,所述试剂包括针对C6orf58基因的引物和/或探针。根据C6orf58基因的核苷酸序列信息容易设计出可以用于检测C6orf58基因表达水平的引物和探针。

[0016] 所述试纸包括检测C6orf58基因表达的试剂。

[0017] 所述高通量测序平台包括检测C6orf58基因表达的试剂。

[0018] 与C6orf58基因的核酸序列杂交的探针可以是DNA、RNA、DNA-RNA嵌合体、PNA或其它衍生物。所述探针的长度没有限制,只要完成特异性杂交、与目的核苷酸序列特异性结合,任何长度都可以。所述探针的长度可短至25、20、15、13或10个碱基长度。同样,所述探针的长度可长至60、80、100、150、300个碱基对或更长,甚至整个基因。由于不同的探针长度对杂交效率、信号特异性有不同的影响,所述探针的长度通常至少是14个碱基对,最长一般不超过30个碱基对,与目的核苷酸序列互补的长度以15-25个碱基对最佳。所述探针自身互补序列最好少于4个碱基对,以免影响杂交效率。

[0019] 进一步,所述C6orf58蛋白的特异性抗体包括单克隆抗体、多克隆抗体。所述C6orf58蛋白的特异性抗体包括完整的抗体分子、抗体的任何片段或修饰(例如,嵌合抗体、scFv、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv等。只要所述片段能够保留与C6orf58蛋白的结合能力即可。用于蛋白质水平的抗体的制备时本领域技术人员公知的,并且本发明可以使用任何方法来制备所述抗体。

[0020] 在本发明的具体实施方案中,所述检测C6orf58基因mRNA的引物包括SEQ ID NO.3和SEQ ID NO.4所示的引物对。

[0021] 本发明还提供了C6orf58基因和/或其表达产物的抑制剂在制备治疗舌鳞癌的药物中的应用。所述抑制剂包括抑制C6orf58基因表达的试剂、和/或抑制C6orf58基因表达产物的试剂。

[0022] 进一步,所述抑制C6orf58基因表达的试剂包括抑制基因转录的试剂、抑制基因翻译的试剂;所述抑制C6orf58基因表达产物的试剂包括抑制C6orf58基因mRNA的试剂、抑制C6orf58蛋白的试剂。所述抑制C6orf58基因mRNA的试剂包括抑制mRNA稳定性的试剂、抑制mRNA翻译活性的试剂。所述抑制C6orf58蛋白的试剂包括抑制C6orf58蛋白稳定性的试剂、抑制C6orf58蛋白活性的试剂、抑制C6orf58蛋白功能的试剂。

[0023] 进一步,抑制C6orf58基因mRNA的试剂包括针对C6orf58基因mRNA的双链核糖核酸;抑制C6orf58蛋白功能的试剂包括C6orf58抗原蛋白的肿瘤疫苗、抑制C6orf58蛋白功能的抗体。所述抗体可以是多克隆抗体,或是单克隆抗体。

[0024] 在本发明的具体实施方案中,所述针对C6orf58基因mRNA的双链核糖核酸是siRNA。为了确保C6orf58基因能够被高效剔除或沉默,根据C6orf58基因的mRNA序列设计了siRNA特异性片段。siRNA的设计根据已发表的通用设计原则(Elbashir et.al 2001, Schwarz et.al 2003, Khvorova et.al 2003, Reynolds et.al 2004, Hsieh et.al 2004, Ui-Tei et.al 2004),通过在线工具完成设计,该在线工具为:siRNA Selection Program of Whitehead Institute (Bingbing Yuan et.al 2004, <http://jura.wi.mit.edu/bioc/siRNAext/>) 和BLOCK-iTTM RNAi Designer of INVITROGEN (winner of the 2004 Frost & Sullivan Excellence in Research Award, <https://rnaidesigner.invitrogen.com/sirna/>)。为了进一步提高siRNA片断的有效性,综合两个在线设计工具的优点来设计用于筛选的siRNA片断。最后,通过同源性比对(NCBI BLAST)来过滤siRNA序列,以提高siRNA片断的特异性并减少RNAi干扰的脱靶效应。

[0025] 优选地,所述siRNA的序列如SEQ ID NO.7和SEQ ID NO.8所示。

[0026] 本发明还提供了一种用于治疗舌鳞癌的药物组合物,所述药物组合物包括上面所述的C6orf58基因和/或其表达产物的抑制剂。

[0027] 本发明的药物组合物还包括药学上可接受的载体,其中该载体可为赋形剂、稀释剂、增稠剂、填充剂、结合剂、崩解剂、润滑剂、油脂或非油脂的基剂、表面活性剂、悬浮剂、胶凝剂、辅助剂、防腐剂、抗氧化剂、稳定剂、着色剂或香料其中之一或两者以上的混合。

[0028] 本发明的药物组合物可用于制造治疗舌鳞癌的药剂。

[0029] 本发明的药物组合物首选应用于哺乳动物,其中该哺乳动物优选为人类病患。

[0030] 本发明的药物组合物可例如以口服、注射等方式给予至该人类病患体内。

[0031] 本发明的药物组合物还可与其他治疗舌鳞癌的药物联用,多种药物联合使用可以大大提到治疗的成功率。

[0032] 在本发明的上下文中,“C6orf58基因”包括C6orf58基因以及C6orf58基因的任何功能等同物的多核苷酸。C6orf58基因包括与目前国际公共核酸序列数据库GeneBank中C6orf58基因(NC\_000006.12) DNA序列具有70%以上同源性,且编码相同功能蛋白质的DNA序列;

[0033] 优选地,C6orf58基因的编码序列包括以下任一种DNA分子:

[0034] (1) 序列表中SEQ ID NO.1所示的DNA序列;

[0035] (2) 在严格条件下与1)限定的DNA序列杂交且编码相同功能蛋白质的DNA序列;

[0036] (3) 与(1)或(2)限定的DNA序列具有70%、优选地,90%以上同源性,且编码相同功能蛋白质的DNA分子。

[0037] 在本发明的具体实施方案中,所述C6orf58基因的编码序列是SEQ ID NO.1所示的DNA序列。

[0038] 在本发明的上下文中,C6orf58基因表达产物包括C6orf58蛋白以及C6orf58蛋白的部分肽。所述C6orf58蛋白的部分肽含有与舌鳞癌相关的功能域。

[0039] “C6orf58蛋白”包括C6orf58蛋白以及C6orf58蛋白的任何功能等同物。所述功能等同物包括C6orf58蛋白保守性变异蛋白质、或其活性片段,或其活性衍生物,等位变异体、天然突变体、诱导突变体、在高或低的严紧条件下能与C6orf58的DNA杂交的DNA所编码的蛋白质。

[0040] 优选地,C6orf58蛋白是具有下列氨基酸序列的蛋白质:

[0041] (1) 由序列表中SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列组成的蛋白质;

[0042] (2) 将SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列经过一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加且与SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列具有相同功能的由SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列衍生的蛋白质。取代、缺失或者添加的氨基酸的个数通常为1-50个,更佳地1-30个,更佳地1-20个,最佳地1-10个。

[0043] (3) 与SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列具有至少80%同源性(又称为序列同一性),更优选地,与SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列至少约90%至95%的同源性,常为96%、97%、98%、99%同源性的氨基酸序列构成的多肽。

[0044] 在本发明的具体实施方案中,所述C6orf58蛋白是具有SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列的蛋白质。

[0045] 通常,已知的是,一个蛋白质中一个或多个氨基酸的修饰不会影响蛋白质的功能。本领域技术人员会认可改变单个氨基酸或小百分比的氨基酸或对氨基酸序列的个别添加、缺失、插入、替换是保守修饰,其中蛋白质的改变产生具有相似功能的蛋白质。提供功能相似的氨基酸的保守替换表是本领域公知的。

[0046] 通过添加一个氨基酸或多个氨基酸残基修饰的蛋白质的例子是C6orf58蛋白的融合蛋白。对于与C6orf58蛋白融合的肽或者蛋白质没有限制,只要所得的融合蛋白保留C6orf58蛋白的生物学活性即可。

[0047] 本发明的C6orf58蛋白也包括对SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列的非保守修饰,只要经过修饰的蛋白质仍然能够保留C6orf58蛋白的生物学活性即可。在此类修饰蛋白质中突变的氨基酸数目通常是10个或者更少,例如6个或者更少,例如3个或者更少。

[0048] 在本发明的上下文中,“诊断舌鳞癌”既包括判断受试者是否已经患有舌鳞癌、也包括判断受试者是否存在患有舌鳞癌的风险。

[0049] 在本发明的上下文中,“治疗舌鳞癌”从疾病的状态变化来分,可以包括疾病的缓解、疾病的完全治愈,还包括用于评价疾病的治疗效果。

[0050] 本发明的优点和有益效果:

[0051] 本发明首次发现了C6orf58基因表达与舌鳞癌相关,通过检测受试者组织中C6orf58的表达,可以判断受试者是否患有舌鳞癌、或者判断受试者是否存在患有舌鳞癌的

风险,从而指导临床医师给受试者提供预防方案或者治疗方案。

[0052] 在基因水平上进行口腔癌的早期诊断已经成为了口腔癌领域的发展趋势,申请号为:201611136247.1、201511009921.5、201511009794.9、201610245087.8、201610277716.5、201511009921.5、201610798012.2专利文献均披露了可以用于口腔癌或者舌鳞癌诊断的基因标志物,本发明发现了一种新的分子标记物-C6orf58基因,能够实现舌鳞癌的早期诊断,从而降低舌鳞癌的死亡率。

## 附图说明

[0053] 图1显示利用基因芯片检测C6orf58基因在舌鳞癌组织与正常粘膜组织中的表达情况;

[0054] 图2显示利用Western blot检测C6orf58蛋白在舌鳞癌组织与正常粘膜组织中的表达情况;

[0055] 图3显示利用QPCR检测siRNA对C6orf58基因mRNA表达的影响;

[0056] 图4显示利用Western blot检测siRNA对C6orf58蛋白表达的影响;

[0057] 图5显示抑制C6orf58蛋白功能对舌鳞癌细胞增殖的影响。

[0058] 具体的实施方式

[0059] 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。

[0060] 实施例1C6orf58基因的差异表达

[0061] 1、实验材料:

[0062] 舌鳞癌组织标本取自舌鳞癌根治术患者,共50例,正常粘膜组织取自于口腔外伤患者,共50例,所有组织取材经过病理组织学确诊,并签署自愿捐献供本次试验使用同意书。取材时癌组织为肿瘤的中心区正常粘膜为不含粘膜下的上皮组织。所有标本分别置入1.5ml EP管放入液氮罐保存。收集所有标本患者术前未经过任何形式的抗肿瘤治疗及无其他部位肿瘤病史。

[0063] 2、舌鳞癌组织和正常粘膜组织的RNA的获取

[0064] 使用Trizol一步法提取舌鳞癌组织和正常粘膜组织的总RNA,通过Nanodrop ND-1000读取260nm和280nm处的吸光度值(A)测定RNA溶液的纯度。经1%甲醛变性琼脂糖凝胶电泳,紫外透射光下观察,检测RNA的完整性。

[0065] 3、基因芯片杂交及扫描

[0066] 总RNA经线性化扩增后,cy3-UTP标记,荧光标记后的cRNAs采用RNEASY Mini Kit纯化,用Amhion的RNA Fragmentation Reagents对标记好的cRNAs进行片段化处理。采用美国Agilent公司的人全基因表达谱芯片(4x 44K基因),在芯片杂交炉中65℃杂交17h,然后洗脱、染色,最后用Agilent DNA MicroarrayScanner扫描仪扫描。

[0067] 4、芯片数据处理与分析

[0068] 杂交后的芯片经芯片扫描仪读取数据点后,将数据导入分析软件,对于两组比值的自然对数绝对值大于2.0或小于0.5的基因作为差异表达基因。

[0069] 5、统计学处理

[0070] 采用SPSS 13.0统计软件进行数据分析,组间差异比较采用单因素方差分析法, $P < 0.05$ 差异有显著性意义。

[0071] 6、结果

[0072] 结果显示(如图1所示),与正常粘膜组织相比,舌鳞癌组织中C6orf58基因的mRNA水平显著增加,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。

[0073] 实施例2C6orf58蛋白的差异表达

[0074] 1、研究对象同实施例1。

[0075] 2、提取组织总蛋白

[0076] 按照EpiQuik组织/细胞总蛋白提取试剂盒的说明书进行蛋白提取的操作。

[0077] 3、Western blot检测

[0078] 将提取的蛋白定量进行SDS-PAGE电泳,之后进行转膜、封闭、一抗孵育、二抗孵育、显色。

[0079] 4、统计学处理

[0080] 将蛋白条带的灰度值使用Image J软件进行分析,以 $\beta$ -actin为内参,将C6orf58蛋白条带的灰度值进行归一化处理。结果数据都是以平均值 $\pm$ 标准差的方式来表示,采用SPSS13.0统计软件来进行统计分析的,两者之间的差异采用t检验,认为当 $P < 0.05$ 时具有统计学意义。

[0081] 5、结果

[0082] 结果如图2所示,与正常粘膜组织相比,舌鳞癌组织中C6orf58蛋白的表达水平显著增加,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。

[0083] 实施例3抑制C6orf58基因表达

[0084] 1、siRNA设计合成

[0085] 针对C6orf58的siRNA序列:

[0086] siRNA-C6orf58:

[0087] 正义链为5'-AGUACUUCAACAGAUAUCAAA-3'(SEQ ID NO.7);

[0088] 反义链为5'-GAUGAUCUGUUGAAGUACUUA-3'(SEQ ID NO.8),

[0089] 以上siRNA序列与阴性对照siRNA序列(siRNA-NC)(阴性对照组siRNA与C6orf58基因的序列无同源性)均由上海吉玛制药技术有限公司提供:

[0090] 2、舌鳞癌细胞的培养与转染

[0091] 2.1细胞培养

[0092] 舌鳞癌细胞系Tca8113接种于含小牛血清10%,青霉素100 $\mu$ /ml,链霉素100mg/ml的RPMI-1640培养液中,将其放置于37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>培养箱内培养,待细胞达85%融合时,用0.25%胰蛋白酶消化传代。

[0093] 2.2细胞转染

[0094] 将舌鳞癌细胞按 $1 \times 10^4$ /孔接种到24孔细胞培养板中,培养24h后,使用脂质体转染试剂2000进行siRNA的转染,实验分为阴性对照组和实验组(20nM),siRNA浓度为20nM/孔。

[0095] 2、利用QPCR实验检测siRNA的干扰效率。

- [0096] 2.1提取细胞总RNA利用常规方法进行操作。
- [0097] 2.2逆转录
- [0098] 利用TAKARA公司的逆转录试剂盒进行RNA的逆转录。
- [0099] 2.3QPCR
- [0100] (1)引物设计
- [0101] 根据C6orf58基因和GAPDH基因的编码序列设计QPCR引物,由上海生工生物工程技术有限公司合成。具体引物序列如下:
- [0102] C6orf58基因:
- [0103] 正向引物为5'-GGTTGATTCTGGTGTAAT-3'(SEQ ID NO.3);
- [0104] 反向引物为5'-AACTTCCTCTCATTCTTG-3'(SEQ ID NO.4),
- [0105] GAPDH基因:
- [0106] 正向引物为5'-TTTAACTCTGGTAAAGTGGATAT-3'(SEQ ID NO.5);
- [0107] 反向引物为5'-GGTGGAATCATATTGGAACA-3'(SEQ ID NO.6)。
- [0108] (2)配制PCR反应体系:正向引物1 $\mu$ l;反向引物1 $\mu$ l;SYBR Green聚合酶链式反应体系12.5 $\mu$ l;模板2 $\mu$ l;去离子水补足25 $\mu$ l;其中,SYBR Green聚合酶链式反应体系购自Invitrogen公司。
- [0109] (3)PCR反应:95 $^{\circ}$ C 10min,(95 $^{\circ}$ C 10s,60 $^{\circ}$ C 40s)\*45个循环。以SYBR Green作为荧光标记物,在Light Cycler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, $\Delta\Delta$ CT法进行相对定量。
- [0110] 2.4统计学方法
- [0111] 实验都是按照重复3次来完成的,结果数据都是以平均值 $\pm$ 标准差的方式来表示,采用SPSS13.0统计软件来进行统计分析的,干扰C6orf58基因表达组与对照组之间的差异采用t检验,认为当 $P<0.05$ 时具有统计学意义。
- [0112] 2.5结果
- [0113] 结果如图3所示,siRNA-C6orf58能够更有效的抑制C6orf58基因的表达,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。
- [0114] 3、Western blot实验检测siRNA-C6orf58的干扰效率
- [0115] 步骤同实施例2。
- [0116] 结果如图4所示,与转染siRNA-NC组相比,转染siRNA-C6orf58的细胞中C6orf58蛋白的含量明显降低,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。
- [0117] 实施例4C6orf58基因的表达对舌鳞癌细胞增殖能力的测定
- [0118] 使用Cell Counting kit-8(cck-8)试剂盒用于检测舌鳞癌细胞增殖
- [0119] 1、步骤
- [0120] 按照前面实施例的方法进行舌鳞癌细胞的培养和转染,细胞分为二个实验组:
- [0121] 组1:转染siRNA-NC细胞组;
- [0122] 组2:转染siRNA-C6orf58细胞组。
- [0123] 待细胞转染24h后,用胰蛋白酶消化,完全培养基终止消化,离心(1000rpm,7分钟)后调整细胞密度,以100 $\mu$ l/孔接种到96孔培养板中,细胞数量为 $2\times 10^3$ 个/孔,每组设6个平行孔,继续培养24h;

[0124] (2) 将上述细胞取出,向每孔加入10 $\mu$ l的CCK-8溶液,以加入相应不含细胞的细胞培养液和CCK-8溶液为空白组;

[0125] (3) 继续将96孔培养板放置细胞培养箱中培养2小时,用酶标仪检测吸光度。

[0126] 2、统计学方法

[0127] 实验都是按照重复3次来完成的,结果数据都是以平均值 $\pm$ 标准差的方式来表示,采用SPSS13.0统计软件来进行统计分析的,两者之间的差异采用t检验,认为当 $P < 0.05$ 时具有统计学意义。

[0128] 3、结果

[0129] 转染siRNA-NC组测定的OD值(光密度)值为 $1.857 \pm 0.112$ ,转染siRNA-C6orf58组测定的OD值(光密度)值为 $0.982 \pm 0.087$ 。上述结果可知,与转染siRNA-NC组相比,转染siRNA-C6orf58细胞组细胞增殖缓慢,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。上述实验结果表明,C6orf58基因表达促进了舌鳞癌细胞的增殖。

[0130] 实施例5舌鳞癌细胞抗体中和实验

[0131] 1、步骤:

[0132] 将舌鳞癌细胞接种于96孔细胞培养板中,每孔 $2 \times 10^3$ 个细胞/孔/200 $\mu$ l,细胞贴壁后进行如下处理:

[0133] 实验组1(对照组):舌鳞癌细胞中加入无关单抗(1:50);

[0134] 实验组2:舌鳞癌细胞中加入抗人C6orf58单抗(1:50)。

[0135] 将细胞在37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>培养箱孵育24h后,加入<sup>3</sup>H-TdR(1 $\mu$ Ci/孔),再培养24h,收集细胞,加液体闪烁液, $\beta$ 计数器检测cpm值。

[0136] 2、统计学方法

[0137] 实验都是按照重复3次来完成的,结果数据都是以平均值 $\pm$ 标准差的方式来表示,采用SPSS13.0统计软件来进行统计分析的,两者之间的差异采用t检验,认为当 $P < 0.05$ 时具有统计学意义。

[0138] 3、结果

[0139] 结果如图5所示,相比于对照组,加入抗人C6orf58单抗的细胞组细胞增殖减缓。上述实验结果表明,抑制C6orf58蛋白的功能可以抑制舌鳞癌细胞增殖。

[0140] 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] SEQUENCE LISTING
- [0002] <110> 山东大学第二医院;济南市中心医院;北京洪深生物信息技术有限公司
- [0003] <120> C6orf58基因在制备舌鳞癌诊治产品中的应用
- [0004] <160> 8
- [0005] <170> PatentIn version 3.5
- [0006] <210> 1
- [0007] <211> 993
- [0008] <212> DNA
- [0009] <213> 人源
- [0010] <400> 1
- [0011] atggcttttc ttccttctcg ggtttgtgta ctagttgggt ccttttctgc ttccttagca 60
- [0012] gggacttcca atctctcaga gacagagccc cctctgtgga aggagagtc tggtcagctc 120
- [0013] agtgactaca ggggtggagaa cagcatgtac attattaatc cctgggtata ccttgagaga 180
- [0014] atggggatgt ataaaatcat attgaatcag acagccaggt attttgcaaa atttgcacca 240
- [0015] gataatgaac agaatatatt atgggggttg cctctgcagt atggctggca atataggaca 300
- [0016] ggcagattag ctgatccaac ccgaaggaca aactgtggct atgaatctgg agatcatatg 360
- [0017] tgcactctcg tggacagttg gtgggctgat ttgaattatt ttctgtcttc attacccttt 420
- [0018] cttgctgcgg ttgattctgg tgtaatgggg atatcatcag accaagtcag gcttttgccc 480
- [0019] ccaccaaga atgagaggaa gttttgttat gatgtttcta gctgtcgttc atccttcctc 540
- [0020] gagacaatga acaagtggaa caccttttac cagtatttgc agtcaccttt tagtaagttt 600
- [0021] gatgatctgt tgaagtactt atgggctgca cacacttcaa ccttggcaga taatatcaaa 660
- [0022] agttttgaag acagatatga ttattattct aaagcagaag cgcattttga gagaagttgg 720
- [0023] gtactggctg tggatcattt agctgcagtc ctctttccta caaccttgat tagatcatat 780
- [0024] aagttccaga agggcatgcc accacgaatt cttcttaata ctgatgtagc ccctttcatc 840
- [0025] agtgacttta ctgcttttca gaatgtagtc ctggttcttc taaatatgct tgacaatgtg 900
- [0026] gataaatcta taggttatct ttgtacagaa aaatctaata tatatagaga tcattcggaa 960
- [0027] tctagctcta gaagttatgg aaataactcc tga 993
- [0028] <210> 2
- [0029] <211> 330
- [0030] <212> PRT
- [0031] <213> 人源
- [0032] <400> 2
- [0033] Met Ala Phe Leu Pro Ser Trp Val Cys Val Leu Val Gly Ser Phe Ser
- [0034] 1 5 10 15
- [0035] Ala Ser Leu Ala Gly Thr Ser Asn Leu Ser Glu Thr Glu Pro Pro Leu
- [0036] 20 25 30
- [0037] Trp Lys Glu Ser Pro Gly Gln Leu Ser Asp Tyr Arg Val Glu Asn Ser
- [0038] 35 40 45

[0039]	Met Tyr Ile Ile Asn Pro Trp Val Tyr Leu Glu Arg Met Gly Met Tyr
[0040]	50 55 60
[0041]	Lys Ile Ile Leu Asn Gln Thr Ala Arg Tyr Phe Ala Lys Phe Ala Pro
[0042]	65 70 75 80
[0043]	Asp Asn Glu Gln Asn Ile Leu Trp Gly Leu Pro Leu Gln Tyr Gly Trp
[0044]	85 90 95
[0045]	Gln Tyr Arg Thr Gly Arg Leu Ala Asp Pro Thr Arg Arg Thr Asn Cys
[0046]	100 105 110
[0047]	Gly Tyr Glu Ser Gly Asp His Met Cys Ile Ser Val Asp Ser Trp Trp
[0048]	115 120 125
[0049]	Ala Asp Leu Asn Tyr Phe Leu Ser Ser Leu Pro Phe Leu Ala Ala Val
[0050]	130 135 140
[0051]	Asp Ser Gly Val Met Gly Ile Ser Ser Asp Gln Val Arg Leu Leu Pro
[0052]	145 150 155 160
[0053]	Pro Pro Lys Asn Glu Arg Lys Phe Cys Tyr Asp Val Ser Ser Cys Arg
[0054]	165 170 175
[0055]	Ser Ser Phe Pro Glu Thr Met Asn Lys Trp Asn Thr Phe Tyr Gln Tyr
[0056]	180 185 190
[0057]	Leu Gln Ser Pro Phe Ser Lys Phe Asp Asp Leu Leu Lys Tyr Leu Trp
[0058]	195 200 205
[0059]	Ala Ala His Thr Ser Thr Leu Ala Asp Asn Ile Lys Ser Phe Glu Asp
[0060]	210 215 220
[0061]	Arg Tyr Asp Tyr Tyr Ser Lys Ala Glu Ala His Phe Glu Arg Ser Trp
[0062]	225 230 235 240
[0063]	Val Leu Ala Val Asp His Leu Ala Ala Val Leu Phe Pro Thr Thr Leu
[0064]	245 250 255
[0065]	Ile Arg Ser Tyr Lys Phe Gln Lys Gly Met Pro Pro Arg Ile Leu Leu
[0066]	260 265 270
[0067]	Asn Thr Asp Val Ala Pro Phe Ile Ser Asp Phe Thr Ala Phe Gln Asn
[0068]	275 280 285
[0069]	Val Val Leu Val Leu Leu Asn Met Leu Asp Asn Val Asp Lys Ser Ile
[0070]	290 295 300
[0071]	Gly Tyr Leu Cys Thr Glu Lys Ser Asn Val Tyr Arg Asp His Ser Glu
[0072]	305 310 315 320
[0073]	Ser Ser Ser Arg Ser Tyr Gly Asn Asn Ser
[0074]	325 330
[0075]	<210> 3
[0076]	<211> 18
[0077]	<212> DNA

- [0078] <213> 人工序列  
[0079] <400> 3  
[0080] ggttgattct ggtgtaat 18  
[0081] <210> 4  
[0082] <211> 18  
[0083] <212> DNA  
[0084] <213> 人工序列  
[0085] <400> 4  
[0086] aacttcctct cattcttg 18  
[0087] <210> 5  
[0088] <211> 23  
[0089] <212> DNA  
[0090] <213> 人工序列  
[0091] <400> 5  
[0092] tttaactctg gtaaagtgga tat 23  
[0093] <210> 6  
[0094] <211> 20  
[0095] <212> DNA  
[0096] <213> 人工序列  
[0097] <400> 6  
[0098] ggtggaatca tattggaaca 20  
[0099] <210> 7  
[0100] <211> 21  
[0101] <212> RNA  
[0102] <213> 人工序列  
[0103] <400> 7  
[0104] aguacuucaa cagaucauca a 21  
[0105] <210> 8  
[0106] <211> 21  
[0107] <212> RNA  
[0108] <213> 人工序列  
[0109] <400> 8  
[0110] gaugaucugu ugaaguacuu a 21

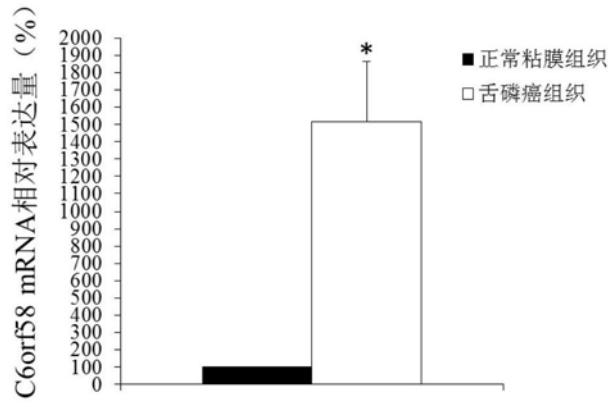


图1

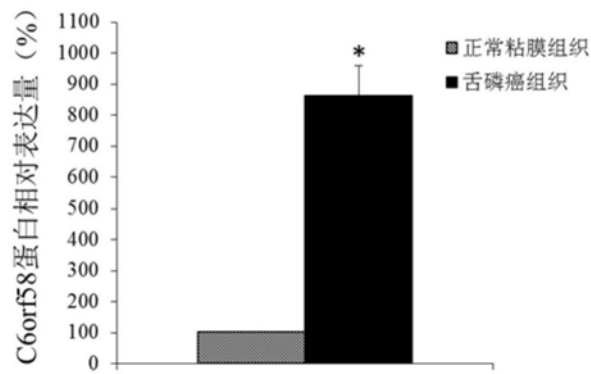


图2

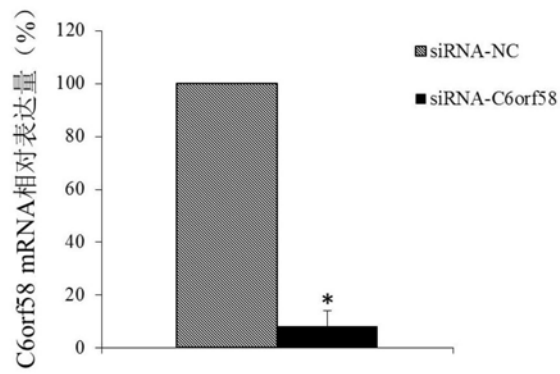


图3

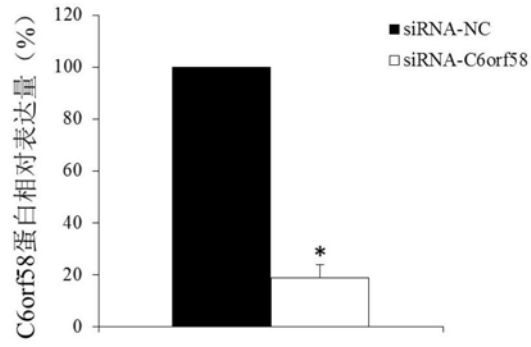


图4

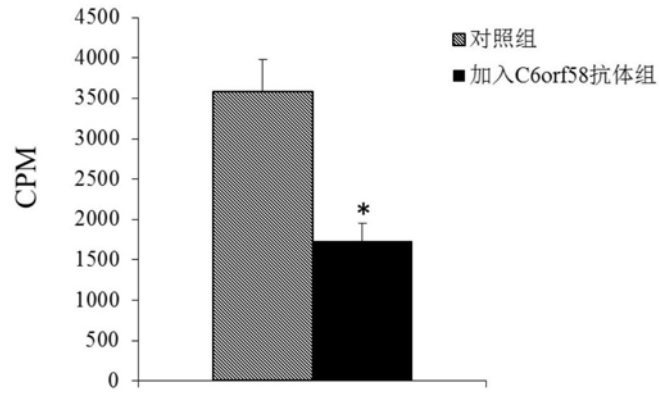


图5