



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106811548 B

(45)授权公告日 2020.06.16

(21)申请号 201710233329.6

G01N 33/574(2006.01)

(22)申请日 2017.04.11

A61K 48/00(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

A61K 31/713(2006.01)

申请公布号 CN 106811548 A

A61P 35/00(2006.01)

(43)申请公布日 2017.06.09

审查员 贾星航

(73)专利权人 成都望路医药技术有限公司

地址 610015 四川省成都市高新区天府三

街219号2栋8、9、10、14、17楼

(72)发明人 杨承刚 董东 任静

(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)

G01N 33/68(2006.01)

权利要求书1页 说明书8页

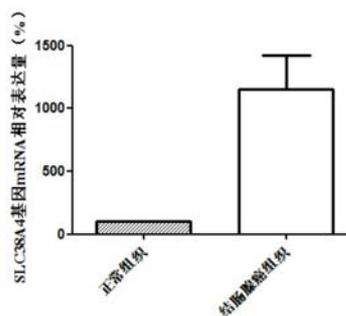
序列表2页 附图1页

(54)发明名称

SLC38A4作为结肠腺癌的诊治靶标

(57)摘要

本发明公开了SLC38A4作为结肠腺癌的诊治靶标。据此可将SLC38A4用于开发诊断结肠腺癌的产品、开发治疗结肠腺癌的药物。本发明的研究成果为临床医师制定个性化治疗方案提供理论基础、并且能够为结肠腺癌药物的开发提供新的药物靶点。



1. 检测SLC38A4基因或SLC38A4蛋白的产品在制备诊断结肠腺癌或预测结肠腺癌预后的工具中的应用。

2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述检测SLC38A4基因或SLC38A4蛋白的产品包括检测SLC38A4基因或SLC38A4蛋白的表达水平的产品。

3. 根据权利要求1或2所述的应用,其特征在于,所述产品包括能够结合SLC38A4基因的核酸或者能够结合SLC38A4蛋白的物质;所述核酸能够检测SLC38A4基因的表达水平;所述物质能够检测SLC38A4蛋白的表达水平。

4. 根据权利要求3所述的应用,其特征在于,所述核酸是实时定量PCR中使用的特异扩增SLC38A4基因的引物如SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2所示。

5. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述工具包括能够检测SLC38A4基因或SLC38A4蛋白的表达水平的工具。

6. 根据权利要求5所述的应用,其特征在于,所述工具包括能够结合SLC38A4 基因的核酸或者能够结合SLC38A4蛋白的物质;所述核酸能够检测SLC38A4基因的表达水平;所述物质能够检测SLC38A4蛋白的表达水平。

7. 根据权利要求6所述的应用,其特征在于,所述核酸是实时定量PCR中使用的特异扩增SLC38A4基因的引物如SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2所示。

8. SLC38A4基因和/或其表达产物的抑制剂在制备治疗结肠腺癌的药物中的应用。

9. 根据权利要求8所述的应用,其特征在于,所述抑制剂包括抑制SLC38A4基因表达的试剂、和/或抑制SLC38A4基因表达产物的试剂。

SLC38A4作为结肠腺癌的诊治靶标

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体地涉及SLC38A4基因在结肠腺癌的诊断、治疗中的用途。

背景技术

[0002] 结肠腺癌是人类最常见的恶性肿瘤之一,近年来,其发病率逐渐升高,占有所有恶性肿瘤的第二位。

[0003] 结肠腺癌的发生,发展是一个涉及多基因改变的复杂过程。其发病过程与细胞分裂、分化、基因群的时空表达异常及其蛋白质的相互作用有关。鉴定与结肠腺癌发病相关的癌基因或抑癌基因,对研究结肠腺癌癌变机理及其诊断、治疗和预防具有重要意义

发明内容

[0004] 本发明的目的之一在于提供一种通过检测SLC38A4基因或蛋白表达差异来诊断结肠腺癌的方法。

[0005] 本发明的目的之二在于提供一种通过检测SLC38A4基因或蛋白表达差异来预测结肠腺癌预后的方法。

[0006] 本发明的目的之三在于提供一种通过抑制SLC38A4基因或SLC38A4蛋白来治疗结肠腺癌的方法。

[0007] 本发明的目的之四在于提供一种用于筛选治疗结肠腺癌的药物方法。

[0008] 本发明的目的之五在于提供一种用于治疗结肠腺癌的药物。

[0009] 为了实现上述目的,本发明采用了如下技术方案:

[0010] 本发明提供了检测SLC38A4基因或SLC38A4蛋白的产品在制备结肠腺癌诊断工具中的用途。

[0011] 本发明还提供了检测SLC38A4基因或SLC38A4蛋白的产品在制备预测结肠腺癌预后工具中的用途。

[0012] 进一步,所述检测SLC38A4基因或SLC38A4蛋白的产品包括检测SLC38A4基因或SLC38A4蛋白的表达水平的产品。所述产品包括能够结合SLC38A4基因的核酸或者能够结合SLC38A4蛋白的物质(例如抗体)。所述核酸能够检测SLC38A4基因的表达水平;所述物质能够检测SLC38A4蛋白的表达水平。

[0013] 本发明的检测SLC38A4基因的产品可基于使用核酸分子的已知方法来发挥其功能:如PCR、如Southern杂交、Northern杂交、点杂交、荧光原位杂交(FISH)、DNA微阵列、ASO法、高通量测序平台等。使用该产品可以定性地、定量地、或半定量地实施分析。

[0014] 包含在上述产品中的核酸可以通过化学合成来获得,或通过从生物材料制备含有期望核酸的基因,然后使用设计用于扩增期望核酸的引物扩增它来获得。

[0015] 进一步,所述PCR方法为已知方法,例如,ARMS (Amplification Refractory Mutation System,扩增不应突变系统)法、RT-PCR(逆转录酶-PCR)法、嵌套PCR法等等。扩增

的核酸可以通过使用点印迹杂交法、表面等离子共振法 (SPR法)、PCR-RFLP法、原位RT-PCR法、PCR-SSO (序列特异性寡核苷酸) 法、PCR-SSP法、AMPFLP (可扩增片段长度多态性) 法、MVR-PCR法、和PCR-SSCP (单链构象多态性) 法来检测。

[0016] 上面所述的核酸包括扩增SLC38A4基因的引物, 产品中包括的引物可以通过通过化学合成来制备, 通过使用本领域技术人员知道的方法参考已知信息来适当地设计, 并通过化学合成来制备。

[0017] 在本发明的具体实施方案中, 所述核酸为QPCR实验中使用的扩增引物, 所述引物的序列如SEQ ID NO.1 (正向序列) 和SEQ ID NO.2 (反向序列) 所示。

[0018] 上面所述的核酸还可包括探针, 所述探针可以通过化学合成来制备, 通过使用本领域技术人员知道的方法参考已知信息来恰当设计, 并通过化学合成来制备, 或者可以通过从生物材料制备含有期望核酸序列的基因, 并使用设计用于扩增期望核酸序列的引物扩增它来制备。

[0019] 本发明的检测SLC38A4蛋白的产品可基于使用抗体的已知方法来发挥其功能: 例如, 可以包括ELISA、放射免疫测定法、免疫组织化学法、Western印迹等。

[0020] 本发明的检测SLC38A4蛋白的产品包括特异性结合SLC38A4蛋白的抗体或其片段。可以使用任何结构、尺寸、免疫球蛋白类别、起源等的抗体或其片段, 只要它结合靶蛋白质即可。本发明的检测产品中包括的抗体或其片段可以是单克隆的或多克隆的。抗体片段指保留抗体对抗原的结合活性的抗体一部分 (部分片段) 或含有抗体一部分的肽。抗体片段可以包括F(ab')₂、Fab'、Fab、单链Fv (scFv)、二硫化物键合的Fv (dsFv) 或其聚合物、二聚化V区 (双抗体)、或含有CDR的肽。本发明的检测SLC38A4蛋白的产品可以包括编码抗体或编码抗体片段的氨基酸序列的分离的核酸, 包含该核酸的载体, 和携带该载体的细胞。

[0021] 抗体可以通过本领域技术人员公知的方法来获得。例如, 制备保留整个或部分靶蛋白质的多肽或整合编码它们的多核苷酸的哺乳动物细胞表达载体作为抗原。使用抗原免疫动物后, 从经过免疫的动物获得免疫细胞并融合骨髓瘤细胞以获得杂交瘤。然后从杂交瘤培养物收集抗体。最后可以通过使用被用作抗原的SLC38A4蛋白或其部分对获得的抗体实施抗原特异性纯化来获得针对SLC38A4蛋白的单克隆抗体。可以如下制备多克隆抗体: 用与上文相同的抗原免疫动物, 从经过免疫的动物收集血液样品, 从血液中分离出血清, 然后使用上述抗原对血清实施抗原特异性纯化。可以通过用酶处理获得的抗体或通过使用获得的抗体的序列信息来获得抗体片段。

[0022] 标记物与抗体或其片段的结合可以通过本领域普遍知道的方法来实施。例如, 可以如下荧光标记蛋白质或肽: 用磷酸盐缓冲液清洗蛋白质或肽, 添加用DMSO、缓冲剂、等准备的染料, 然后混合溶液, 再于室温放置10分钟。另外, 标记可使用商品化的标记试剂盒, 诸如生物素标记试剂盒, 如生物素标记试剂盒-NH₂、生物素标记试剂盒-SH (Dojindo Laboratories); 碱性磷酸酶标记试剂盒诸如碱性磷酸酶标记试剂盒-NH₂、碱性磷酸酶标记试剂盒-SH (Dojindo Laboratories); 过氧化物酶标记试剂盒诸如过氧化物酶标记试剂盒-NH₂、过氧化物酶标记试剂盒-NH₂ (Dojindo Laboratories); 藻胆蛋白标记试剂盒诸如藻胆蛋白标记试剂盒-NH₂、藻胆蛋白标记试剂盒-SH、B-藻红蛋白标记试剂盒-NH₂, B-藻红蛋白标记试剂盒-SH、R-藻红蛋白标记试剂盒-NH₂、R-藻红蛋白标记试剂盒SH (Dojindo Laboratories); 荧光标记试剂盒诸如荧光素标记试剂盒-NH₂、HiLyte Fluor (TM)

555标记试剂盒-NH₂、HiLyte Fluor (TM) 647标记试剂盒-NH₂ (Dojindo Laboratories);及DyLight 547和DyLight647 (Techno Chemical Corp.)、Zenon (TM)、Alexa Fluor (TM) 抗体标记试剂盒、Qdot (TM) 抗体标记试剂盒 (Invitrogen Corporation) 和EZ-标记物蛋白质标记试剂盒 (Funakoshi Corporation)。为了正确标记,可以使用适宜的仪器来检测经过标记的抗体或其片段。

[0023] 作为依照本发明的检测产品的样品,可以使用例如自活检受试者获得的组织样品或流体。样品不受特别限制,只要它适于本发明的测定;例如,它可以包括组织、血液、血浆、血清、淋巴液、尿液、浆膜腔液、脊髓液、滑液、房水、泪液、唾液、或其级分或经过处理的材料。

[0024] 在本发明的具体实施方案中,所述样品来自受试者的组织。

[0025] 在本发明中,“预后”是指肿瘤患者在通过手术处理等抑制或缓解肿瘤生长后的过程或结果。在本说明书中,预后可以是手术处理抑制或缓解肿瘤生长后1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20年或更久时的生机状态。预后可以通过检查生物标志物即SLC38A4蛋白或编码SLC38A4蛋白的基因来预测。预后预测可以这样进行:根据生物标志物的有或无,或者升高或降低,确定患者的预后是良好还是不良,或者确定良好预后或不良预后的概率。

[0026] 在本发明中,“预后良好”是指在通过手术处理等为患者抑制或缓解肿瘤生长之后,患者长时期(例如3、5、6、7、8、9、10、15、20年或更长)没有危急状况。或者,预后好可以意指在这样长时间内存活、无转移、无复发、或无再发。例如,预后良好可以意指至少3年或尤其是至少5年存活,优选没有转移或复发。预后良好最优选的状态是长期无疾病的存活。如本文中所使用的,“预后良好”还可以包括任何这样的状态,其中可以发现疾病如转移,但是恶性低且不严重地影响生存能力。

[0027] 在本发明中,“预后不良”是指患者在通过手术处理等抑制或缓解肿瘤生长后的短时期(例如1、2、3、4、5年或更短)内发生致命状况。或者,预后差是指在这样的短时期里死亡、转移、复发、或再发。例如,预后差可以意指至少3年或尤其至少5年内复发、转移、或死亡。

[0028] 预测预后是指预测患者状况的过程或结果,并不意味着能以100%的准确度预测患者状况的过程或结果。预测预后是指确定某些过程或结果的可能性是否增加,而并不意味着通过与某些过程或结果不发生的情况比较来确定发生某些过程或结果的可能性。如本发明而言,本发明中SLC38A4基因或SLC38A4蛋白的水平升高的患者中,与不显示该特征的患者相比,更有可能观察到特定过程或结果。

[0029] 进一步,所述检测SLC38A4基因或SLC38A4蛋白的产品可以是检测SLC38A4基因或SLC38A4蛋白的试剂、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。

[0030] 本发明还提供了一种诊断结肠腺癌的工具,所述工具能够检测SLC38A4基因或SLC38A4蛋白的表达水平。所述工具包括能够结合SLC38A4基因的核酸或者能够结合SLC38A4蛋白的物质(例如抗体)。所述核酸能够检测SLC38A4基因的表达水平;所述物质能够检测SLC38A4蛋白的表达水平。

[0031] 进一步,所述核酸和所述物质的性质同前面所述。

[0032] 进一步,所述诊断结肠腺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结肠腺癌的工具，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SLC38A4基因的异常与结肠腺癌相关也属于SLC38A4基因的用途，同样在本发明的保护范围之内。

[0033] 本发明还提供了一种预测结肠腺癌预后的工具，所述预测结肠腺癌预后工具包括能够结合SLC38A4基因的核酸或者能够结合SLC38A4蛋白的物质（例如抗体）。所述核酸能够检测SLC38A4基因的mRNA水平；所述物质能够检测SLC38A4蛋白的表达水平。

[0034] 进一步，所述核酸和所述物质的性质同前面所述。

[0035] 进一步，所述预测结肠腺癌预后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结肠腺癌的工具，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SLC38A4基因的异常与结肠腺癌相关也属于SLC38A4基因的用途，同样在本发明的保护范围之内。

[0036] 本发明的检测产品、诊断工具中使用的抗SLC38A4抗体或其片段所识别的氨基酸的数目没有特别限制，只要抗体能够结合SLC38A4即可。

[0037] 本发明还提供了一种诊断结肠腺癌或预测结肠腺癌预后的方法，所述方法包括如下步骤：

[0038] (1) 获取受试者的样品；

[0039] (2) 检测受试者样品中SLC38A4基因或蛋白的表达水平；

[0040] (3) 将测得的SLC38A4基因或蛋白的表达水平与受试者的患病与否关联起来。

[0041] (4) 与对照相比，SLC38A4基因或蛋白的表达水平升高，则该受试者被诊断为结肠腺癌，或该受试者被确定为预后不良。

[0042] 本发明还提供了SLC38A4基因和/或其表达产物的抑制剂在制备治疗结肠腺癌的药物中的应用。所述抑制剂包括抑制SLC38A4基因表达的试剂、和/或抑制SLC38A4基因表达产物的试剂。

[0043] 进一步，所述抑制SLC38A4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SLC38A4基因表达产物的试剂包括抑制SLC38A4基因mRNA的试剂、抑制SLC38A4蛋白的试剂。所述抑制SLC38A4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SLC38A4蛋白的试剂包括抑制SLC38A4蛋白稳定性的试剂、抑制SLC38A4蛋白活性的试剂、抑制SLC38A4蛋白功能的试剂。

[0044] 进一步，抑制SLC38A4基因mRNA的试剂包括针对SLC38A4基因mRNA的双链核糖核酸；抑制SLC38A4蛋白功能的试剂包括SLC38A4抗原蛋白的肿瘤疫苗、抑制SLC38A4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。

[0045] 在本发明的具体实施方案中，所述针对SLC38A4基因mRNA的双链核糖核酸是siRNA。为了确保SLC38A4基因能够被高效剔除或沉默，根据SLC38A4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：siRNASelectionProgram of

Whitehead Institute (BingbingYuan 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。

[0046] 优选地,所述siRNA的序列如SEQ ID NO.5和SEQ ID NO.6所示。

[0047] 本发明还提供了一种用于治疗结肠腺癌的药物组合物,所述药物组合物包括上面所述的SLC38A4基因和/或其表达产物的抑制剂。

[0048] 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。

[0049] 本发明的药物组合物可用于制造治疗结肠腺癌的药剂。

[0050] 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。

[0051] 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。

[0052] 本发明的药物组合物还可与其他治疗结肠腺癌的药物联用,多种药物联合使用可以大大提到治疗的成功率。

[0053] 本发明还提供了一种肿瘤药物的筛选方法,可以通过在对癌细胞添加测试药物后或在对肿瘤模型动物施用测试药物后的某个时期测量SLC38A4基因或者SLC38A4蛋白的表达水平来测定肿瘤药物改善肿瘤预后的效果。更具体地说,当SLC38A4基因或者SLC38A4蛋白的表达水平在添加或施用测试药物后降低或者恢复正常水平时,可选择该药物作为改善肿瘤预后的治疗药物。

[0054] 本发明的优点和有益效果:

[0055] 本发明首次发现了SLC38A4基因表达与结肠腺癌相关,通过检测受试者组织中SLC38A4的表达,可以判断受试者是否患有结肠腺癌、或者判断受试者是否存在患有结肠腺癌的风险,从而指导临床医师给受试者提供预防方案或者治疗方案。

附图说明

[0056] 图1显示利用QPCR检测SLC38A4基因在结肠腺癌组织与正常组织中的表达差异图;

[0057] 图2显示利用MTT法检测SLC38A4基因表达对结肠腺癌细胞增殖的影响;

[0058] 图3显示利用流式细胞仪检测SLC38A4基因表达对结肠腺癌细胞凋亡的影响。

[0059] 具体的实施方式

[0060] 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并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,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。

[0061] 实施例1 SLC38A4基因的差异表达

[0062] 1、实验材料

[0063] 选择医院行手术治疗且病史资料完整的10例结肠癌患者的病灶切除组织标本,已

经病理科诊断为结肠腺癌,男5例、女5例;根据按美国癌症联合委员会(AJCC,2009)制定的结肠直肠癌分期标准:I-II期6例,III-IV期4例。组织学分级:高分化3例,中分化4例,低分化3例。术前均未行放疗、化疗及生物剂治疗。正常对照组织为正常的远端结肠黏膜组织10例,均来自健康肠镜体检者。

[0064] 2、RNA提取、cDNA合成

[0065] 按照Trizol说明书操作抽提组织细胞总RNA,然后按照逆转录试剂盒说明书将mRNA反转录为cDNA。

[0066] 3、生物素标记cRNA杂交

[0067] 以cDNA为模板,应用MessageAmp™ II-Biotin Arna Amplification Kit(Ambion公司)体外转录合成生物素标记cRNA,纯化后按Affymetrix公司的真核生物表达谱单轮芯片扩增程序加入5×片段化缓冲液得到大小分布在35~200nt的片段化cRNA;靶标制备完成后,应用真核生物Hybridization Control Kit(Affymetrix公司)配制杂交液,注入杂交液的芯片平衡放置于杂交炉中,45℃,60r/min旋转杂交16h(Hybridization Oven 640, Affymetrix公司),然后在Affymetrix公司提供的洗涤工作站中(Fluidics Station 450, Affymetrix公司)完成芯片的清洗染色;

[0068] 4、扫描和分析

[0069] 应用GeneChip® Scanner 3000(Affymetrix公司)扫描仪扫描图像。扫描图像首先用GeneChip® Operating Software Version1.4(GCOS 1.4, Affymetrix公司)软件进行图像到信号值的转换,转换成原始数据文件。然后使用软件dChip 2006中的invariant set Normalization方法和Model-base Expression Index模型对GCOS输出结果进行进一步的数据分析。根据在各芯片中检测到的P值,当数据集的检测值Call值(Absolute Call, Abs Call)为不存在A(Absent)或者临界值M(Marginal)时,被视为不表达,只有Abs Call值为存在P(present)的数据集才被用于进一步的分析。

[0070] 5、组织差异表达基因的筛选

[0071] 差异表达基因的筛选利用Significant Analysis of Microarray Software (SAM)算法进行。

[0072] 6、结果

[0073] 芯片共筛选出485个差异表达基因。与正常组织相比,结肠腺癌组织中表达上调的基因为289个,表达下调的基因为196个。

[0074] 实施例2差异表达基因在大样本中的验证

[0075] 1、研究对象

[0076] 选择医院行手术治疗且病史资料完整的50例结肠癌患者的病灶切除组织标本,已经病理科诊断为结肠腺癌,男20例、女30例;根据按美国癌症联合委员会(AJCC,2009)制定的结肠直肠癌分期标准:I-II期15例,III-IV期35例。组织学分级:高分化17例,中分化15例,低分化18例。术前均未行放疗、化疗及生物剂治疗。正常对照组织为正常的远端结肠黏膜组织40例,均来自健康肠镜体检者。

[0077] 2、RNA提取和cDNA合成

[0078] 按照实施例1的方法进行RNA提取和cDNA合成。

[0079] 3、QPCR

[0080] 引物是由引物设计软件Primer 5.0设计,大连宝生物公司与上海英骏公司合成。SLC38A4基因及内参基因所用引物序列如下:

[0081] SLC38A4基因引物序列

[0082] 5'-AAGTAATCAGAGCATTCAT-3' (SEQ ID NO.1),

[0083] 5'-GTATAGCCAAGATAACCTAA-3' (SEQ ID NO.2);

[0084] GAPDH基因引物序列

[0085] 5'-AAGGTCGGAGTCAACGGATTTG-3' (SEQ ID NO.3),

[0086] 5'-CCATGGGTGGAATCATATTGGAA-3' (SEQ ID NO.4)。

[0087] 采用cDNA 2.0 μ l进行QPCR反应。扩增程序为:95 $^{\circ}$ C5min, (95 $^{\circ}$ C15s,60 $^{\circ}$ C60s)*45个循环。以SYBR Green作为荧光标记物,在Light Cycler荧光实时定量PCR仪上进行PCR反应, $\Delta\Delta$ CT法进行相对定量。

[0088] 4、Western blot检测

[0089] 提取细胞总蛋白。采用BCA蛋白浓度试剂盒对提取的总蛋白进行定量。每个样本取50 μ g总蛋白,12%SDS-PAGE电泳1.5h后,转膜。5%脱脂奶粉封闭,一抗4 $^{\circ}$ C孵育过夜,二抗37 $^{\circ}$ C孵育2h。电化学法发光ECL发光液显色,凝胶成像系统曝光显色;灰度分析,目的蛋白的相对表达量取其与GAPDH的灰度值比值。

[0090] 5、结果

[0091] (1) QPCR结果

[0092] 如图1所示,与正常组织相比,结肠腺癌组织中SLC38A4基因mRNA水平显著升高,差异具有统计学意义($P<0.05$)。

[0093] (2) Western blot结果

[0094] 正常组织中SLC38A4蛋白相对表达量为 0.64 ± 0.07 ,结肠腺癌组织中SLC38A4蛋白相对表达量 1.39 ± 0.16 ,差异具有统计学意义($P<0.05$)。

[0095] 实施例3 SLC38A4基因的表达对结肠腺癌细胞增殖能力的影响

[0096] 1、干扰SLC38A4基因表达

[0097] 1.1 siRNA合成

[0098] 根据SLC38A4mRNA序列,利用在线siRNA设计软件(<http://www.ambion.com>)。根据Ambion公司提供的设计原则,筛选出1对特异性靶向SLC38A4基因的siRNA序列。siRNA序列由广州市锐博生物科技有限公司合成。上述序列通过BLAST分析验证与人类其他编码序列无同源性。阴性对照序列(siRNA-NC)由广州锐博生物科技有限公司提供。

[0099] siRNA-SLC38A4:

[0100] 正义链为5'-UUUCCUAUCCCGAUGUAGCUA-3' (SEQ ID NO.5);

[0101] 反义链为5'-GCUACAUCGGGAUAGGAAAUU-3' (SEQ ID NO.6),

[0102] 1.2结肠腺癌细胞的培养与转染

[0103] HT-29细胞于含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基中培养,培养参数:37 $^{\circ}$ C、体积分数为5%CO₂饱和湿度。采用脂质体Lipofectamine2000为转染试剂。实验分2组:阴性对照组(转染siRNA-NC);实验组(转染siRNA-SLC38A4)。取对数生长期的HT-29细胞,接种于6孔细胞培养板。24h后细胞培养板覆盖率约为70%-80%。转染方式参照Lipofectamine2000说明书进行。

[0104] 1.3 Western blot实验检测siRNA-SLC38A4的干扰效率

[0105] 步骤同实施例2。

[0106] 1.4结果

[0107] 阴性对照组(转染siRNA-NC)细胞中SLC38A4蛋白相对表达量为 1.27 ± 0.08 , 实验组(转染siRNA-SLC38A4)细胞中SLC38A4蛋白相对表达量 0.58 ± 0.04 , 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

[0108] 2、MTT实验分析细胞增殖活性

[0109] 收集对数生长期的各组细胞,调整细胞密度为 1×10^4 /ml,接种于96孔板中,每孔100 μ L,置于37 $^{\circ}$ C、体积分数为5%CO₂、饱和湿度的培养箱内培养。分别于24、48、72h后进行MTT检测:每孔加MTT溶液10 μ l(5%),置于37 $^{\circ}$ C、体积分数为5%CO₂、饱和湿度的培养箱内培养。培养3h后,小心去除上清,每孔加150 μ L的DMSO,水平摇床上放置30min。酶标仪测定波长490nm下的A值。

[0110] 3、实验结果

[0111] 结果如图2所示,与阴性对照组(转染siRNA-NC)细胞相比,实验组(转染siRNA-SLC38A4)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,SLC38A4基因表达促进了结肠腺癌细胞的增殖。

[0112] 实施例4 SLC38A4基因的表达对结肠腺癌细胞凋亡的影响

[0113] 1、步骤:收集转染24h后的各组细胞,冰磷酸盐缓冲液洗涤2次,1xBinding Buffer调整细胞浓度为 10^4 /ml,加入5 μ L的AnnexinV稀释液混匀后,再加入2.5 μ L的碘化丙啶,混匀。冰盒上避光静置10min,加入1xBinding Buffer 400 μ L,上机检测凋亡比例。

[0114] 2、实验结果

[0115] 结果如图3所示,与阴性对照组(转染siRNA-NC)细胞相比,实验组(转染siRNA-SLC38A4)细胞凋亡率升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。上述实验结果表明,SLC38A4基因表达抑制了结肠腺癌细胞的凋亡。

[0116] 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> 北京泱深生物信息技术有限公司
- [0003] <120> SLC38A4作为结肠腺癌的诊治靶标
- [0004] <160> 6
- [0005] <170> PatentIn version 3.5
- [0006] <210> 1
- [0007] <211> 19
- [0008] <212> DNA
- [0009] <213> 人工序列
- [0010] <400> 1
- [0011] aagtaatcag agcattcat 19
- [0012] <210> 2
- [0013] <211> 20
- [0014] <212> DNA
- [0015] <213> 人工序列
- [0016] <400> 2
- [0017] gtatagccaa gataacctaa 20
- [0018] <210> 3
- [0019] <211> 22
- [0020] <212> DNA
- [0021] <213> 人工序列
- [0022] <400> 3
- [0023] aaggtcggag tcaacggatt tg 22
- [0024] <210> 4
- [0025] <211> 23
- [0026] <212> DNA
- [0027] <213> 人工序列
- [0028] <400> 4
- [0029] ccatgggtgg aatcatattg gaa 23
- [0030] <210> 5
- [0031] <211> 21
- [0032] <212> RNA
- [0033] <213> 人工序列
- [0034] <400> 5
- [0035] uuuccuaucc cgauguagcu a 21
- [0036] <210> 6
- [0037] <211> 21
- [0038] <212> RNA

-
- [0039] <213> 人工序列
[0040] <400> 6
[0041] gcuacaucgg gauaggaaau u 21

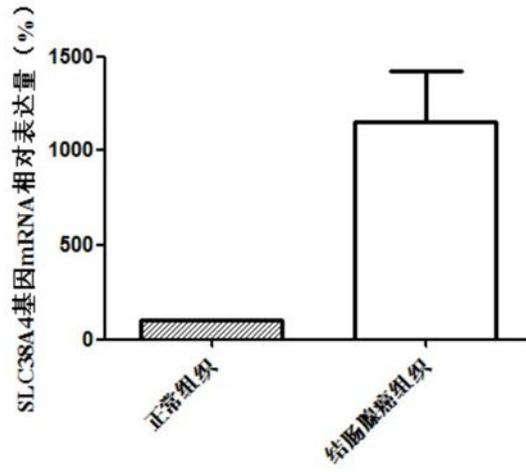


图1

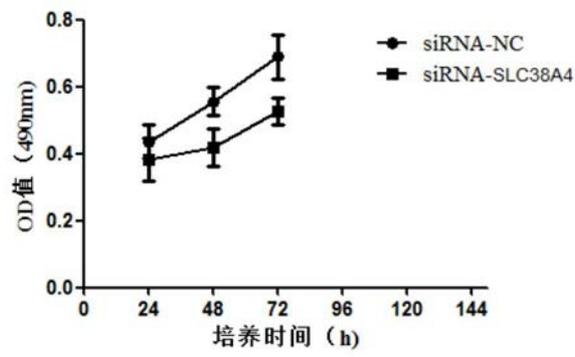


图2

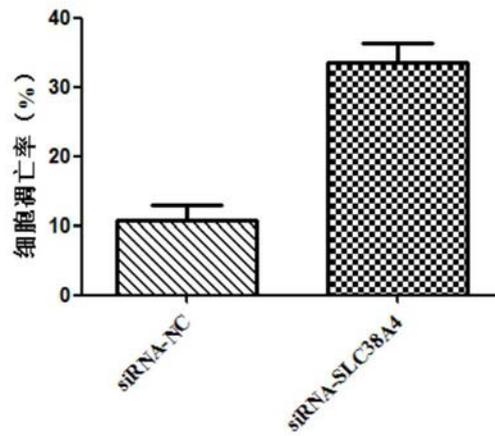


图3