



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102732515 B

(45) 授权公告日 2014. 01. 15

(21) 申请号 201210243379. X

(22) 申请日 2012. 07. 13

(66) 本国优先权数据

201210061723. 3 2012. 03. 09 CN

(73) 专利权人 泸州医学院

地址 646000 四川省泸州市忠山路 3 段 319 号

(72) 发明人 傅俊江 张连美

(74) 专利代理机构 成都高远知识产权代理事务所 (普通合伙) 51222

代理人 李高峡 全学荣

(51) Int. Cl.

C12N 15/11 (2006. 01)

C12N 15/63 (2006. 01)

C12N 15/113 (2010. 01)

C12Q 1/68 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

A61K 45/06 (2006. 01)

A61K 48/00 (2006. 01)

A61K 31/165 (2006. 01)

A61P 35/00 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101501055 A, 2009. 08. 05,

Fu et al. The TWIST/Mi2/NuRD protein

complex and its essential role in cancer metastasis. 《Cell Research》. 2011, (第 21 期), 275-289.

Vesuna F et al., Twist contributes to hormone resistance in breast cancer by downregulating estrogen receptor- α . 《Oncogene》. 2011, 第 31 卷 3223-3234.

Vesuna F et al., Twist contributes to hormone resistance in breast cancer by downregulating estrogen receptor- α . 《Oncogene》. 2011, 第 31 卷 3223-3234.

Fu junjiang et al. TWIST Represses Estrogen Receptor- α Expression by Recruiting the NuRD Protein Complex in Breast Cancer Cells. 《Int. J. Sci. 》. 2012, 第 8 卷 (第 4 期), 522-532.

Lai and Wade. Cancer biology and NuRD: a multifaceted chromatin remodelling complex. 《EPIGENETICS AND GENETICS》. 2011, 第 11 卷 588-596.

审查员 于仁涛

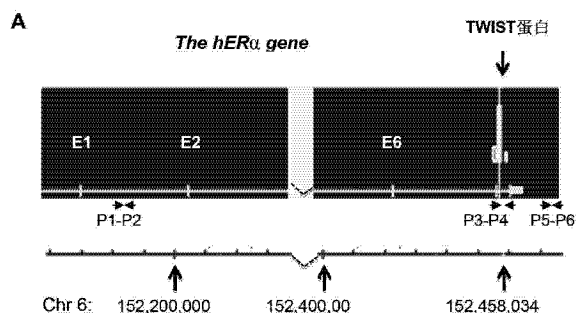
权利要求书 1 页 说明书 12 页
序列表 3 页 附图 4 页

(54) 发明名称

一种核苷酸序列及其用途

(57) 摘要

本发明公开了 SEQ ID NO. 1 或者 SEQ ID NO. 2 所示的核苷酸序列, 包含所述核苷酸序列的重组载体, 以及所述核苷酸序列在制备检测恶性乳腺癌的试剂中的用途。本发明还公开了一种检测恶性乳腺癌的检测试剂盒和治疗恶性乳腺癌的药物。本发明公开的核苷酸序列是诊断恶性乳腺癌的靶标位点, 可用于快速筛选诊断和治疗乳腺癌的试剂, 公开的试剂盒可用于早期监控和检测恶性乳腺癌, 公开的药物可用于治疗恶性乳腺癌, 具有实际应用价值。



1. 一种如 SEQ ID NO. 2 所示的核苷酸序列。
2. 一种如 SEQ ID NO. 1 所示的核苷酸序列。
3. 一种重组载体,其特征在于:它由 SEQ ID NO. 1 或者 SEQ ID NO. 2 所示的核苷酸序列与 BamHI 和 SalI 双酶切后的 pGL3-Pro-Luc 载体组成。
4. SEQ ID NO. 7~8 所示的核苷酸序列在制备检测恶性乳腺癌的试剂中的用途。
5. 一种检测恶性乳腺癌的试剂盒,其特征在于:包括任选的用于检测 TWIST 蛋白与 SEQ ID NO. 1 或者 SEQ ID NO. 2 所示核苷酸序列的结合物的试剂。
6. 根据权利要求 5 所述的试剂盒,其特征在于:所述的试剂为染色质免疫共沉淀技术用试剂和扩增 SEQ ID NO. 1 或者 SEQ ID NO. 2 所示核苷酸序列的试剂。
7. 根据权利要求 6 所述的试剂盒,其特征在于:所述染色质免疫共沉淀技术用试剂包括抗 TWIST 蛋白抗体;所述扩增 SEQ ID NO. 1 或者 SEQ ID NO. 2 所示核苷酸序列的试剂包括 SEQ ID NO. 7~8 所示的引物对 2。

一种核苷酸序列及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及一种核苷酸序列,具体涉及调控 ER α 表达的核苷酸序列。

背景技术

[0002] 乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤之一,好发于 40~60 岁绝经前后的妇女,发病率仅次于胃癌和肺癌,并有逐年上升的趋势。乳腺癌的治疗方式众多,包括外科治疗、化学治疗、放射治疗和中医中药治疗。外科治疗主要方式是手术切除,化学治疗包括手术前、中和后的化疗,放射治疗是作为手术后补充治疗或晚期、复发病例的姑息治疗,中医中药治疗是我国传统治疗方法,可改善患者的全身情况,减轻化、放疗的反应,常作为手术、放射治疗的辅助手段。大量研究表明,不同亚型的乳腺癌之间具有不同的生物学特征,并不是任何一种乳腺癌治疗方法对所有的患者都适用。

[0003] 雌激素受体 (ER α) 是与乳腺癌密切相关的小分子,大多数乳腺癌发生最初,表达雌激素受体 (ER α),并依赖雌激素生长,对激素敏感、抗性弱,预后好,治疗难度小。随着病程发展,一些乳腺癌不再表达 ER α ,获得非依赖雌激素的特征,对激素的敏感性差、抗性强,预后差,治疗难度大,属于恶性乳腺癌,恢复 ER α 表达后可以恢复乳腺癌恢复激素治疗的敏感性,治疗难度降低。

[0004] 因此,可以通过检测乳腺癌细胞 ER α 表达水平,判断乳腺癌是否为恶性乳腺癌,还可以通过控制 ER α 的表达改善乳腺癌的恶性程度。

发明内容

[0005] 本发明的发明目的之一是提供 ER α 基因上的 TWIST 蛋白结合位点。本发明另一发明目的是提供检测前述结合位点与 TWIST 蛋白是否结合的试剂盒,以及抑制前述结合位点与 TWIST 蛋白结合的药物。

[0006] 上述 ER α 基因上的 TWIST 蛋白结合位点,其核苷酸序列如 SEQ ID NO. 1 所示,该位点含有 601 个碱基,其中,长度为 332bp 的序列是 TWIST 蛋白结合的关键序列,核苷酸序列如 SEQ ID NO. 2 所示。用基因工程的方法,可将 SEQ ID NO. 1 或者 SEQ ID NO. 2 所示的核苷酸序列克隆到其他载体上,形成重组载体,如, pGL-332ER α -Pro-Luc 重组质粒。

[0007] NuRD 复合体是一个多亚基的复合体,包括 ATP 酶部分和组蛋白脱乙酰酶部分,广泛参与基因转录抑制, TWIST 蛋白通过募集 NuRD 复合体,结合到 ER α 基因的 SEQ ID NO. 1 或者 SEQ ID NO. 2 所示序列区域上,抑制 ER α 表达,导致乳腺癌恶化。

[0008] 因此,一方面,可以通过检测 TWIST 蛋白是否结合到 ER α 基因的 SEQ ID NO. 1 或者 SEQ ID NO. 2 所示序列的区域上,确定待检乳腺癌是否为恶性乳腺癌,检测试剂盒包括任选的用于检测 TWIST 蛋白与 SEQ ID NO. 1 或者 SEQ ID NO. 2 所示核苷酸序列的结合物的试剂。该检测试剂可以为染色质免疫共沉淀技术用试剂和扩增 SEQ ID NO. 1 或者 SEQ ID NO. 2 所示核苷酸序列的试剂。优选地,所述染色质免疫共沉淀技术用试剂包括抗 TWIST 蛋白抗体,所述扩增 SEQ ID NO. 1 或者 SEQ ID NO. 2 所示核苷酸序列的试剂包括 SEQ ID NO. 7~8 所示

的引物对 2。

[0009] 另一方面,可以通过抑制 TWIST 蛋白或者 NuRD 复合体结合到 ER α 基因的 SEQ ID NO.1 或者 SEQ ID NO.2 所示序列的区域上,使 ER α 表达阳性,恢复恶性乳腺癌对激素敏感性。TWIST 基因沉默剂可抑制 TWIST 基因表达,降低 TWIST 蛋白含量,抑制 TWIST 蛋白结合到 ER α 基因上,可以作为治疗恶性乳腺癌的药物。组蛋白脱乙酰酶抑制剂及其衍生物可以抑制被募集到 ER α 基因上的 NuRD 复合体的活性,也可以作为治疗恶性乳腺癌的药物。优选地,所述的 TWIST 基因沉默剂为沉默 TWIST 基因的 shRNA (shTWIST 或者 shT),其中,与 TWIST 基因相匹配的特异性核苷酸序列如 SEQ ID NO.19 所示,shRNA 全长如 SEQ ID NO.20 所示;所述的组蛋白脱乙酰酶抑制剂为曲古抑素 A。SEQ ID NO.19 所示的核苷酸序列是与 TWIST 基因相匹配的特异性核苷酸序列,能与 TWIST 特异性结合而沉默 TWIST 基因,该段序列为 shRNA 的核心序列,得到该序列后,本领域普通技术人员可以根据 shRNA 核心序列及载体性质设计得到其余核苷酸序列,也可以人工合成小分子干扰 RNA (Small interfering RNA, siRNA) 试剂。

[0010] 本发明所述恶性乳腺癌,是指乳腺癌细胞中 ER α 表达呈阴性;TWIST 蛋白(即 TWIST1 蛋白),是一种转录因子,为高度保守的碱性螺旋-环-螺旋蛋白,在动物与人类的胚胎发育中起关键调控作用, TWIST 基因,编码 TWIST 蛋白的核苷酸序列;shRNA 是 short hairpin RNA 的缩写,译为“短发夹 RNA”;与 TWIST 基因相匹配的特异性核苷酸序列:是指能与 TWIST 特异性结合而沉默 TWIST 基因的核苷酸序列。

[0011] 本发明提供的 SEQ ID NO.1 或者 SEQ ID NO.2 所示序列,是 TWIST 蛋白的结合位点,可作为恶性肿瘤乳腺癌患诊断和治疗的靶标基因,用于制备恶性乳腺癌检测试剂,筛选治疗恶性乳腺癌的药物,具有实际利用价值。本发明提供的恶性乳腺癌检测试剂盒能准确检测待检组织是否为恶性乳腺癌,可用于早期监控和检测恶性乳腺癌,实施早期预防和治疗,减少损害。本发明提供的药物可以重启 ER α 基因表达,恢复恶性乳腺癌对激素的敏感性,具有良好的市场应用前景。

[0012] 显然,根据本发明的上述内容,按照本领域的普通技术知识和惯用手段,在不脱离本发明上述基本技术思想前提下,还可以做出其它多种形式的修改、替换或变更。

[0013] 以下通过实施例形式的具体实施方式,对本发明的上述内容再作进一步的详细说明。但不应将此理解为本发明上述主题的范围仅限于以下的实例。凡基于本发明上述内容所实现的技术均属于本发明的范围。

附图说明

[0014] 图 1 检测 TWIST 蛋白在 FLAG-TWIST HEK293 细胞中 ER α 结合位点的 ChIP 高通量测序图谱。(ChIP 即染色质免疫沉淀)。

[0015] 图 2ChIP-PCR 检测结果。

[0016] 图 3 使用 HA 抗体和 β -actin (下)进行 Western blot 和荧光素酶活性测定(上)进行了三次重复试验, $p < 0.001$ 。

[0017] 图 4ChIP-re-ChIP 实验分析 FLAG-TWIST 的 HEK293 和 FLAG 的 HEK293 对照细胞的结果。

[0018] 图 5 表达无靶向性 shRNA(shCtrl) 或靶向干扰 TWIST mRNA(shT) 的 shRNA

MDA-MB-435 细胞用标明的 TWIST 蛋白, MTA2, HDAC2 或 RbAp46 抗体做 ChIP 分析结果图。

[0019] 图 6 shCtrl 或 shT 的 MDA-MB-435 细胞用乙酰化或甲基化的组蛋白 H3K9 抗体的 ChIP 分析结果图。

[0020] 图 7 在 SUM1315, MDA-MB-435 (MDA435), MDA-MB-231 (MDA231), T47D 和 MCF-7 人类乳腺癌细胞系进行实时定量检测逆转录 PCR 分析 TWIST 的 mRNA 水平 (T) 和 ER α (E), 数据规范化到 GAPDH 的 mRNA 水平, 表现为 $\pm$ 平均标准差。

[0021] 图 8 Western blot 分析人类乳腺癌细胞系的 TWIST 蛋白和 ER α 表达, β -actin 作为内参蛋白。

[0022] 图 9 在 TWIST 阴性的 T47D 人类乳腺癌细胞系中过表达 TWIST 后的 TWIST 和 ER α 的 mRNAs 由实时 RT-PCR 测定, $p < 0.001$ 。注意过表达 TWIST 后 ER α 的 mRNA 表达降低了。

[0023] 图 10 转染对照载体或 TWIST 蛋白表达载体的 MCF-7 细胞中 Western blot 分析 ER α 、E-cadherin、TWIST 蛋白和 β -actin。

[0024] 图 11 在表达非靶性 shRNA (shCtrl) 或 shRNA TWIST mRNA (shT) 的 4T1 和 MDA-MB-435 (MDA435) 乳腺癌细胞中实时 RT-PCR 检测 ER α mRNA 水平, **, $p < 0.001$ 。

[0025] 图 12 TSA 对 ER α 表达的调节作用。shTWIST 或对照 shRNA (shCtrl) 的 4T1 和 MDA-MB-435 细胞用 330nM 的 TSA(+) 处理。使用 ER α 和 β -actin 蛋白抗体进行印迹分析。

[0026] 图 13 半定量 RT-PCR 分析中国人女性乳腺浸润性导管癌中 ER α , TWIST 和 GAPDH 的 mRNA 表达。

[0027] 图 14 免疫组化分析 (棕色) 人类乳腺浸润性导管癌中 ER α , TWIST 蛋白表达。用 ER α , TWIST 蛋白抗体对 28 位人类乳腺浸润性导管癌的组织免疫染色, 图片在显微镜 400 倍放大倍数下拍摄。

[0028] 图 15 28 个人类乳腺浸润性导管癌组织的免疫组织化学的 TWIST 蛋白和 ER α 的统计数据汇总。

[0029] 图 16 MDA-MB-435 乳腺癌细胞内源性表达 TWIST 蛋白的 ChIP 实验检测结果。

具体实施方式

[0030] 实施例 1 TWIST 蛋白与 ER α 基因 TWIST 蛋白结合位点结合可以抑制 ER α 基因表达

[0031] 1、实验材料

[0032] (1) 细胞系

[0033] HEK293 稳定细胞系, HEK293T 细胞系, 均为市售品; 可被 Doxycycline (DOX) 诱导的 FLAG-TWIST 或者 FLAG 的 HEK293 稳定细胞系, 按照文献 Fu Junjiang, Li Qin, Tao He, Jun Qin, Jun Hong, Jiemin Wong, Lan Liao and Jian ming Xu. The TWIST/Mi2/NuRD Protein Complex and its Essential Role in Cancer Metastasis. Cell Res: 275-289 (2011). 所述方法制备。

[0034] 2、实验方法

[0035] (一) FLAG-TWIST 标签和单独 FLAG 对照标签的 HEK293 细胞的 ChIP (染色质免疫共沉淀技术) 实验

[0036] (1) 将带有 FLAG-TWIST 标签和单独 FLAG 对照标签的 HEK293 细胞在 15cm 的培养

皿中培养到细胞密度达到 65% 时,加入 0.1 μ g/ml 的 DOX 诱导 16h;

[0037] (2) 步骤(1) 细胞用福尔马林交联固定并溶解在 1ml 包含有蛋白酶抑制剂的细胞裂解液中,3000g 离心 5 分钟;

[0038] (3) 洗涤沉淀物,用 600 μ l 含有蛋白酶抑制剂的溶液重悬沉淀物,后用超声波破碎至 DNA 片段长度为 200-500bp;

[0039] (4) 用 1.4ml 含有 2mM 的 EDTA,100mM 的 NaCl,20mM 的 Tris-HCl(pH8.0),0.5%Triton X-100 和蛋白酶抑制剂的溶液重新洗涤和稀释步骤(3)所得上清液,得样本;

[0040] (5)每 0.4ml 步骤(4)所得样本与 6 μ l 的 M2-FLAG 标签抗体珠混合,复合物在 4℃ 旋转孵育过夜;

[0041] (6) 抗体珠连续用 ChIP I, II 和 III 缓冲液和含有 1mM DTT 的 TEbuffer 洗涤;

[0042] (7) 用 5 μ g 蛋白酶 K 洗脱和 65℃ 消化蛋白-DNA 复合物过夜, DNA 从交联蛋白中释放出来;

[0043] (8) 用酚和氯仿抽提 DNA,沉淀溶解在 20 μ l 的 ddH₂O 中用于做 PCR 分析和如下高通量测序及分析。

[0044] (9) 高通量测序及分析:将得到的 DNA 片段用 T4DNA 连接酶连接到 oligo 上构建 DNA 库后,高通量测序仪测序,序列读数分析用 BWA 法在人类 Mar. 2006 汇编(hg18)中映出,用 MACS 鉴定出峰值和用整合的基因组浏览器(IGB)来观察,详见

[0045] http://www.affymetrix.com/partners_programs/programs/developer/tools/download_igb.affx。

[0046] 10)根据步骤(9)的结果,分离和测定出调控 ER α 表达的 DNA 序列,序列如 SEQ ID NO. 2 所示的核苷酸序列。根据 SEQ ID NO. 2 所示的核苷酸序列,设计三对引物进行实时定量 PCR,分析 ChIP 结果,验证步骤(9)的结论。

[0047] (二) 重组质粒的构建及荧光素报告分析

[0048] (1) 质粒构建

[0049] 目的基因:位于人类 ER α 中内含子 7 的 TWIST 蛋白结合区域的 332bp 的 DNA 片段。以人类基因组 DNA 为模板,PCR 扩增得到,扩增引物(SEQ ID NO. 3~4 所示的引物):

[0050] ER α -BamHI-F(5'-cgcggtatccGGGGGAGGTTCTTCTTC-3')

[0051] ER α -SalI-R(5'-acgcgtcgacTTATTGCTCAGAAATAGTCATG-3')。

[0052] 将 PCR 扩增获得的目的基因片段用 BamHI 和 SalI 在 37℃ 双酶切 3-5 小时,用胶回收试剂盒回收纯化酶切产物,与相同 BamHI 和 SalI 双酶切和纯化的 pGL3-Pro-Luc 载体(promega 公司)连接和筛选阳性克隆,从而亚克隆到 pGL3-Pro-Luc 载体,从而构建 pGL-332ER α -Pro-Luc 质粒,克隆的 DNA 片段的序列正确性用 DNA 测序法证实,与 SEQ ID NO. 2 相同。

[0053] (2) 荧光素报告基因分析

[0054] HEK293T 细胞在 12 孔板培养到密度为 40% 时,将一定量 50ng 的 pGL3-Pro-Luc 或 pGL-332ER α -Pro-Luc,一定量 120ng 的 pSG5-HA-TWIST 质粒或 pSG5 空质粒和 30ng 的 β -半乳糖 β -Gal 表达质粒用脂质体共转染。

[0055] 转染 2 天后检测荧光素酶效果和 β -gal 活性,每个样本的荧光素酶活性都是被

β -gal 活性所标准化的,所有的实验均重复三次。

[0056] 3、实验结果

[0057] (一) FLAG-TWIST 标签和单独 FLAG 对照标签的 HEK293 细胞的 ChIP 结果

[0058] (1) 关于 FLAG-TWIST 标签和单独 FLAG 对照标签的 HEK293 细胞的 ChIP- 高通量 DNA 测序结果如图 1 所示,该图说明人类 ER α 基因上只有一个 TWIST 蛋白结合位点,且该结合位点位于 ER α 基因内含子 7 内,定位在 6 号染色体上第 152458103 位,左右 300bp,如 SEQ ID NO. 1 所示。进一步对其进行序列分析,显示该结合位点存在 6 个潜在的 TWIST 蛋白结合 E-boxes (CANNTG)。根据该结果,设计三对引物:

[0059] 引物对 1:

[0060] P1 (5' -tcacaccttgcttcgcatag-3')

[0061] P2 (5' -tgagctcagaaatccacttcc-3')

[0062] 用于扩增 ER α 基因的内含子 1 区域,确定该区域是否是阴性对照区域;

[0063] 引物对 2:

[0064] P3 (5' -agctgggctcactcacacat-3')

[0065] P4 (5' -gaggcatagagcagagtcacc-3')

[0066] 用于扩增 ER α 基因的内含子 7 区域,确定该区域是否含有 TWIST 蛋白结合位点;

[0067] 引物对 3:

[0068] P5 (5' -acctgtgagcagggtgactt-3')

[0069] P6 (5' -acaaaaacccgcaacttct-3')

[0070] 用于扩增 ER α 基因的 3' 端

[0071] 用于扩增 ER α 基因 3' 端区域,确定该区域是否是阴性对照区域。

[0072] (2)如图 2 所示:用引物对 2 (P3/P4)扩增 ChIP 分离的 DNA 样本,比较 FLAG-TWIST 标签细胞和 FLAG 标签细胞,前者的扩增量是后者的 1200 倍,而以引物对 1 (P1/P2)和引物对 3 (P5/P6)扩增 ChIP 分离的 DNA 样本,均难以增得扩增条带。进一步验证了前述结论是正确的,也说明引物对 2 可以准确扩增包含 TWIST 蛋白结合位点的区域。

[0073] (二) 荧光素报告基因分析结果

[0074] 如图 3 所示:

[0075] 当 pGL3-332ER α -Pro-Luc 报告基因质粒和 TWIST 对照空载体共转染入 HEK293T 细胞时, TWIST 蛋白不表达,荧光强度高;当 pGL3-332ER α -Pro-Luc 报告基因质粒和 TWIST 表达载体共转染入 HEK293T 细胞时, TWIST 蛋白表达,荧光强度显著低于前者。

[0076] 当 pGL3-Pro-Luc 报告基因质粒和 TWIST 对照空载体共转染入 HEK293T 细胞时, TWIST 蛋白不表达,荧光强度高;当 pGL3-Pro-Luc 报告基因质粒和 TWIST 表达载体共转染入 HEK293T 细胞时, TWIST 蛋白表达,荧光强度与前者无显著差异。

[0077] 实验说明,存在 332bp 的 ER α 序列时,过表达的 TWIST 蛋白显著地抑制了报告基因的活性,缺乏 332bp 的 ER α 序列时, TWIST 蛋白的过表达没有抑制报告基因的活性,证明 TWIST 蛋白可以结合在如 SEQ ID NO. 2 所示的长度为 332bp 的序列上,也就是说, SEQ ID NO. 2 所示的基因片段上面有 TWIST 蛋白结合位点, ER α 基因的 TWIST 蛋白结合位点有转录抑制功能。

[0078] 实验证明:人类 ER α 基因上存在 TWIST 蛋白结合位点,位于内含子 7 内,定位在 6

号染色体上第 152458103 位,左右 300bp,如 SEQ ID NO.1 所示,其 TWIST 蛋白结合关键位点为 SEQ ID NO.2 所示的序列。而且,该 TWIST 蛋白结合位点与 TWIST 蛋白结合后,会抑制 ER α 基因的转录,因而,可以通过检测 ER α 基因上的 TWIST 蛋白结合位点上是否结合了 TWIST 蛋白,确定 ER α 基因是否表达,也可以通过抑制 ER α 基因上的 TWIST 蛋白结合位点结合 TWIST 蛋白,恢复 ER α 的表达。

[0079] 实施例 2 TWIST 蛋白通过募集 NuRD 复合物到 ER α 基因 TWIST 蛋白结合区域上抑制 ER α 基因表达

[0080] 1、实验材料

[0081] (1) 细胞系:被 Doxycycline (DOX) 诱导的 FLAG-TWIST 或者 FLAG 的 HEK293 稳定细胞系,同实施例 1。

[0082] MDA-MB-435 乳腺癌细胞系,是人乳腺癌高转移细胞系,能稳定表达内源性 TWIST 蛋白,市售品。

[0083] 表达无靶向性的短发夹 RNA (shRNA) 或者可以表达能特异干扰 TWIST 信使 RNA (mRNAs) 的 shRNA 稳定的 MDA-MB-435 细胞系。按照文献 Fu Junjiang, Li Qin, Tao He, Jun Qin, Jun Hong, Jiemin Wong, Lan Liao and Jianming Xu. The TWIST/Mi2/NuRD Protein Complex and its Essential Role in Cancer Metastasis. Cell Res:275-289(2011). 所述方法制备。

[0084] 2、实验方法

[0085] (一) FLAG-TWIST 标签和单独 FLAG 对照标签的 HEK293 细胞的 ChIP-re-ChIP 实验

[0086] (1) 将带有 FLAG-TWIST 标签和单独 FLAG 对照标签的 HEK293 细胞在 15cm 的培养皿中培养到细胞密度达到 65% 时,加入 0.1 μ g/ml 的 DOX 诱导 16h;

[0087] (2) 步骤(1) 细胞用福尔马林交联固定并溶解在 1ml 包含有蛋白酶抑制剂的细胞裂解液中,3000g 离心 5 分钟;

[0088] (3) 洗涤沉淀物,用 600 μ l 含有蛋白酶抑制剂的溶液重悬沉淀物,后用超声波破碎至 DNA 片段长度为 200-500bp;

[0089] (4) 用 1.4ml 含有 2mM 的 EDTA, 100mM 的 NaCl, 20mM 的 Tris-HCl (pH8.0), 0.5% Triton X-100 和蛋白酶抑制剂的溶液重新洗涤和稀释步骤(3) 所得上清液,得样本;

[0090] (5) 每 0.4ml 步骤(4) 所得样本与 6 μ l 的 M2-FLAG 标签抗体珠混合,复合物在 4 $^{\circ}$ C 旋转孵育过夜;

[0091] (6) 抗体珠连续用 ChIP I, II 和 III 缓冲液和含有 1mM DTT 的 TEbuffer 洗涤;

[0092] (7) 用 Tris-buffered saline 进一步洗涤,用 3 $\times$ FLAG 肽溶液将复合物洗脱下来;

[0093] (8) 被洗脱下来的材料用抗 MTA2, HDAC2 或 Mi2 抗体和琼脂糖 A/G 珠抗体 (Mi-2, MTA2 和 HDAC2 是 NuRD 复合物的标准成分,) 稀释,4 $^{\circ}$ C 旋转孵育过夜;

[0094] (9) 用 5 μ g 蛋白酶 K 洗脱和 65 $^{\circ}$ C 消化蛋白-DNA 复合物过夜, DNA 从交联蛋白中释放出来;

[0095] (10) 用酚和氯仿抽提 DNA, 沉淀溶解在 20 μ l 的 ddH₂O 中用于做 PCR 分析;

[0096] (11) 得 ChIP-re-ChIP 中分离出来的 DNA 样本;

[0097] (12) 以引物对 2

[0098] P3(5' agctgggctcactcacacat-3')

[0099] P4(5' -gaggcatagagcagagtcacc-3') 为引物,进行实时定量 PCR,分析 ChIP 结果。

[0100] (二)表达无靶向性的短发夹 RNA (shRNA) 或者可以表达能特异干扰 TWIST 信使 RNA (mRNAs) 的 shRNA (shT) 稳定的 MDA-MB-435 细胞的 ChIP-re-ChIP 实验

[0101] (1)表达无靶向性的短发夹 RNA (shRNA) 或者可以表达能特异干扰 TWIST 信使 RNA (mRNAs) 的 shRNA 稳定的 MDA-MB-435 细胞在 15cm 的培养皿中培养到细胞密度至 100%;

[0102] (2)步骤(1)细胞用福尔马林交联固定并溶解在 1ml 包含有蛋白酶抑制剂的细胞裂解液中,3000g 离心 5 分钟;

[0103] (3)洗涤沉淀物,用 600 μ l 含有蛋白酶抑制剂的溶液重悬沉淀物,后用超声波破碎至 DNA 片段长度为 200-500bp;

[0104] (4) 用 1.4ml 含有 2mM 的 EDTA,100mM 的 NaCl,20mM 的 Tris-HCl(pH8.0),0.5%Triton X-100 和蛋白酶抑制剂的溶液重新洗涤和稀释步骤(3)所得上清液,得样本;

[0105] (5)每 0.4ml 步骤(4)所得样本与 6 μ l 的抗 TWIST 蛋白抗体珠混合,4℃旋转孵育过夜;

[0106] (6)抗体珠连续用 ChIP I, II 和 III 缓冲液和含有 1mM DTT 的 TEbuffer 洗涤;

[0107] (7)用 Tris-buffered saline 进一步洗涤,用 3 $\times$ FLAG 肽溶液将复合物洗脱下来。

[0108] (8)被洗脱下来的材料用抗 MTA2, HDAC2, RbAp46, 乙酰化组蛋白 H3K9 和甲基化组蛋白 H3K9 的抗体(MTA2, HDAC2 和 RbAp46 是 NuRD 复合物的标准成分)混合,4℃旋转孵育过夜;

[0109] (9)用 5 μ g 蛋白酶 K 洗脱和 65℃消化蛋白-DNA 复合物过夜, DNA 从交联蛋白中释放出来;

[0110] (10)用酚和氯仿抽提 DNA,沉淀溶解在 20 μ l 的 ddH₂O 中用于做 PCR 分析;

[0111] (11)得 ChIP-re-ChIP 中分离出来的 DNA 样本;

[0112] (12)以引物对 2

[0113] P3(5' -agctgggctcactcacacat-3')

[0114] P4(5' -gaggcatagagcagagtcacc-3') 为引物,进行实时定量 PCR,分析 ChIP 结果。

[0115] 3、实验结果

[0116] (一)FLAG-TWIST 标签和单独 FLAG 对照标签的 HEK293 细胞的 ChIP-re-ChIP 实验结果

[0117] 如图 4 所示,比较 FLAG-TWIST 标签细胞与 FLAG 标签细胞中, ER α 基因的 TWIST 蛋白结合部位上 Mi-2, MTA2 和 HDAC2 的量,前者是后者的 100 倍以上。说明了 HEK293 细胞中, TWIST 蛋白可以有效地将 NuRD 复合物募集到 ER α 基因上的 TWIST 蛋白结合区域。

[0118] (二)表达无靶向性的短发夹 RNA (shRNA) 或者可以表达能特异干扰 TWIST 蛋白信使 RNA (mRNAs) 的 shRNA 稳定的 MDA-MB-435 细胞的 ChIP-re-ChIP 实验结果

[0119] 如图 5 所示,表达无靶向性的 shRNA 的 MDA-MB-435 细胞中, ER α 基因上 MTA2, HDAC2 和 RbAp46 均有募集, shRNA 干扰使 TWIST 蛋白基因沉默的 MDA-MB-435 细胞中, 这些因子几乎未被募集到 ER α 基因上。NuRD 复合物的核心成分能否结合到 ER α 基因上, 与 TWIST 蛋白是否存在紧密相关, 证实 NuRD 复合物的核心成分确实是与 TWIST 蛋白相互作

用而募集到 ER α 基因上的 TWIST 蛋白结合区域。

[0120] 如图 6 所示,表达无靶向性的 shRNA 的 MDA-MB-435 细胞中,检测出染色质相关的组蛋白 H3K9 乙酰化和单甲基化,说明 NuRD 复合物募集到了 ER α 基因上,但是 TWIST 基因沉默的 MDA-MB-435 细胞中乙酰化的组蛋白 H3K9 增加,单甲基化的组蛋白 H3K9 减少,说明 NuRD 复合物没有募集到 ER α 基因上。结果证明 TWIST 蛋白调节的 NuRD 复合物募集情况与 ER α 基因上 TWIST 蛋白结合染色质区域被抑制的表观遗传染色质修饰是一致的。

[0121] NuRD 复合体是一个多亚基的复合体,包括 ATP 酶部分和组蛋白去乙酰化(HDAC)酶部分,广泛参与基因转录抑制,特别是表观遗传调控的转录抑制。实验证明 NuRD 复合物的核心成分是与 TWIST 蛋白相互作用而募集到 ER α 基因 TWIST 蛋白结合区域上,进一步抑制 ER α 基因的表达。

[0122] 实施例 3 TWIST 和 NuRD 复合物抑制 ER α 表达,沉默 TWIST 基因和 HDAC 活性抑制物能重新恢复乳腺癌细胞中 ER α 的表达

[0123] 1、实验材料

[0124] (1) 细胞系:

[0125] 高分化的非转移性乳腺癌细胞系:高表达 ER α 的 T47D 细胞系和 MCF-7 细胞系,它们为非恶性乳腺癌细胞系;

[0126] 低分化的转移性乳腺癌细胞系:ER α 表达阴性的 SUM1315 细胞系、MDA-MB-435 细胞系和 MDA-MB-231 细胞系,它们为恶性乳腺癌细胞系。

[0127] 表达无靶向性的短发夹 RNA (shRNA) 或者可以表达能特异干扰 TWIST 信使 RNA (mRNAs) (其核苷酸序列如 SEQ ID NO. 20 所示) 的 shRNAs 稳定的 4T1 和 MDA-MB-435 细胞系,按照文献 Fu Junjiang, Li Qin, Tao He, Jun Qin, Jun Hong, Jiemin Wong, Lan Liao and Jian ming Xu. The TWIST/Mi2/NuRD Protein Complex and its Essential Role in Cancer Metastasis. Cell Res:275-289(2011). 所述方法制备。

[0128] 2、实验方法

[0129] (1) ER α 和 TWIST 表达水平的测量

[0130] 通过 RT-PCR 和 Western blot 分析方法,检测 T47D 细胞系、MCF-7 细胞系、SUM1315 细胞系、MDA-MB-435 细胞系和 MDA-MB-231 细胞系中 ER α 、TWIST 的 mRNA 水平和 ER α 、TWIST 的蛋白水平。

[0131] RT-PCR:

[0132] 以 1 μ g 的人乳腺癌细胞总 RNA 为模板,用逆转录试剂盒构建 cDNA 文库。

[0133] 用 qPCR MasterMix Plus (Eurogentec) 和 StepOnePlus 实时 PCR 系统来进行实时 PCR:

[0134] 引物 5'-tcctaacttgcctcttgacagg-3' 和 5'-gtagccagcagcatgtcg-3' 和 TaqManprobe22 用来测量 cDNA 文库中 ER α cDNA 的水平。

[0135] 引物 5'-gggccggagacctagatg-3' 和 5'-tttccaagaaaatctttggcata-3' 和 TaqMan 探针 50 用来检测 cDNA 文库中 TWIST cDNA 水平。

[0136] 每个样本的 GAPDH mRNA 在同样的条件下反应作为内参来标准化检测 ER α 和 TWIST mRNAs 的水平。

[0137] Western blot:

[0138] TWIST1, E-cadherin, β -actin 和 HA-tag 抗体、单克隆 ER α 抗体(D-12)均为市售品。蛋白印迹方法的文献见—傅俊江主编:精编医学分子生物学实验指导,中国医药科技出版社,2012年2月。

[0139] (2)TWIST 蛋白募集 NuRD 复合物包含有组蛋白脱乙酰酶,比如 HDAC2。Trichostatin A (TSA), 曲古抑素 A 是一种 HDAC 抑制物。

[0140] 将 TSA 加入表达无靶向性的短发夹 RNA (shRNA) 或者可以表达能特异干扰 TWIST 信使 RNA (mRNAs) 的 shRNA 稳定的 4T1 和 MDA-MB-435 细胞系中,检测 ER α 的表达水平。

[0141] 3、实验结果

[0142] 如图 7~8 所示,在 ER α 表达阴性的 SUM1315 和 MDA-MB-435 细胞系中检出高水平的 TWIST mRNA 和蛋白质,在 ER α 表达阴性的 MDA-MB-231 细胞系中也检出低水平的 TWIST 蛋白;高表达 ER α 的 T47D 和 MCF-7 细胞中没有检测出 TWIST 的 mRNA 和蛋白质水平。如图 9~10 所示, T47D 细胞中,过表达 TWIST 抑制了 ER α 的 mRNA 的表达;MCF-7 细胞中,过表达 TWIST 蛋白抑制了 ER α 的蛋白水平;如图 11 所示,细胞系中 TWIST 基因沉默,使 ER α 的 mRNA 表达提高了 2.5-3 倍。结果显示在这些细胞系中 ER α 的表达与 TWIST 蛋白的表达呈负相关。

[0143] 如图 12 所示,同它们各自的空白处理组相比,表达无靶向性 shRNA 的 TSA 处理 4T1 和 MDA-MB-435 细胞中表达出更高水平的 ER α 蛋白 (Compare lane 1 with lane 2 and lane 5 with lane 6);TSA 分别处理 shRNA 沉默 TWIST 基因的 4T1 和 MDA-MB-435 细胞中, ER α 蛋白水平并没有显著增加。(compare the ratios of ER α to β -actin in lane 4 with lanes 2 and 3 and in lane 8 with lanes 6 and 7)。实验一方面说明 ER α 的表达与 TWIST 的表达呈负相关,另一方面说明沉默 TWIST 基因或抑制 NuRD 中 HDAC 的活性都能够有效地减轻 ER α 基因的转录抑制。

[0144] 因此,实验证明,ER α 的表达被 TWIST 蛋白抑制,且 TWIST 蛋白是通过募集 NuRD 复合物来抑制 ER α 的表达。另一方面,HDAC 酶抑制剂 -TSA 能够阻断 TWIST 和 NuRD 复合物的功能。

[0145] 基于 ER α 的丢失导致乳腺癌细胞在内分泌激素治疗中所获得的抗药性,对乳腺癌治疗是个巨大的挑战,重新恢复 ER α 的表达对乳腺癌恢复激素治疗的敏感性具有重大意义。因而,TSA 及其衍生物和沉默 TWIST 基因的 shRNA (TWIST 基因相匹配的特异性核苷酸序列如 SEQ ID NO. 19 所示的),均可以阻断 TWIST 和 NuRD 复合物对 ER α 表达的抑制,可重新恢复乳腺癌细胞中 ER α 的表达,而恢复乳腺癌对激素治疗的敏感性。

[0146] 实施例 4 人体乳腺癌细胞中 TWIST 蛋白抑制 ER α 表达

[0147] 1、实验材料:乳腺癌肿瘤和总 RNA 分离

[0148] 在取得知情同意书的情况下,在泸州医学院附属医院收集了 28 个乳腺侵袭性导管癌的组织样本。所有的实验设计过程得到了泸州医学院的同意。所有患者年龄是 33 到 72 岁的中国妇女。在这一阶段,没有患者的存活数据是可用的。取下的乳腺癌组织立刻用液氮速冻,放 -80 $^{\circ}$ C 保存。用 TRIzol 试剂盒从细胞中分离总 RNA 一样从乳腺癌组织中分离出总 RNA,放 -80 $^{\circ}$ C 保存。

[0149] 2、实验方法

[0150] (1)用半定量 PCR 来分析 mRNA 表达

- [0151] 以 1 μ g 的人乳腺癌细胞总 RNA 为模板,用逆转录试剂盒构建 cDNA 文库。
- [0152] 设计特定引物,用乳腺癌 mRNA 样本做半定量 RT-PCR:
- [0153] RT-ER α -5(5'-gtgcctggctagagatcctg-3') 和 RT-ER α -3(5'-agagacttcagggtgcttga-3') 来逆转录和半定量 PCR 来检测 ER α 的 mRNA;
- [0154] RT-TWIST-5(5'-acgagctggactccaagatg-3') 和 RT-TWIST-3(5'-cacgccctgtttctttgaat-3') 用来检测 TWIST 的 mRNA。
- [0155] 每个样本的 GAPDH mRNA 在同样的条件下反应作为内参来标准化检测 ER α 和 TWIST mRNAs 的水平。
- [0156] 总 RNA 逆转录反应和聚合酶链式反应 (PCR) 方法的文献见—傅俊江主编:精编医学分子生物学实验指导,中国医药科技出版社,2012 年 2 月)。
- [0157] (2) 免疫组化
- [0158] 乳腺癌组织被固定在 10% 的福尔马林中,石蜡包埋用来做免疫组化:
- [0159] 取 4 μ m 厚的上述乳腺癌组织在二甲苯中去石蜡,在梯度酒精和蒸馏水中水化;
- [0160] 抗原修复后,用 0.3% 过氧化氢在甲醇中封阻内源性过氧化物酶活性,30 分钟,用 1 $\times$ PBS 洗涤,5% 兔血清孵育 30min 来封阻非特异性背景;
- [0161] 载玻片用 TWIST 单克隆抗体或 ER α 抗体在含有 2% 血清和 1%BSA 的 Tris-buffered saline 中 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜:
- [0162] 漂洗过的载玻片用适当的二抗以 1:100 稀释,室温孵育 30min,之后用与过氧化物酶结合的过氧化物酶复合物孵育:
- [0163] 用 DAB 染色法来进行免疫染色,用苏木精复染,在光学显微镜下观察。用包含有 2% 兔血清和 1%BSA 而没有一抗的 TBS 来孵育对照载玻片作为阴性对照。
- [0164] 3、实验结果
- [0165] 如图 13~15 所示,有 17 位 (61%) 的肿瘤患者具有高水平的 TWIST 的 mRNA 与蛋白,和低水平或者无法检测到 ER α 的 mRNA 和蛋白水平,7 位 (25%) 的肿瘤患者具有低或者无法检测到 TWIST 的 mRNA 和蛋白质水平以及高水平的 ER α ,2 位 (7%) 肿瘤患者 TWIST 和 ER α 的 mRNA 和蛋白质水平都增高,剩下 2 位 (7%) 肿瘤患者 TWIST 和 ER α 的 mRNA 和蛋白质水平都降低。这些结果显示在 85.7% 的侵袭性乳腺癌中 TWIST 的表达与 ER α 表达呈负相关。
- [0166] 临床实验证明,TWIST 与 ER α 在临床患者乳腺癌肿瘤中表达呈负相关,提示 TWIST 过表达会抑制 ER α 基因的表达。
- [0167] 实施例 4 恶性乳腺癌细胞检测试剂盒及其使用方法
- [0168] 1、试剂盒的组成
- [0169] ①染色质免疫共沉淀技术用试剂:抗 TWIST 蛋白抗体和其他染色质免疫共沉淀技术常用试剂;
- [0170] ②扩增 SEQ ID NO.1 或者 SEQ ID NO.2 所示核苷酸序列的试剂:
- [0171] 引物对 2:
- [0172] 上游引物:5'-agctgggctcactcacacat-3'
- [0173] 下游引物:5'-gaggcatagagcagagtcacc-3'
- [0174] 和其他扩增核苷酸的常用试剂。
- [0175] 2、使用方法

[0176] (1) 取待测样本组织和细胞；

[0177] (2) 用本发明染色质免疫沉淀技术用试剂对待测样本进行染色质免疫沉淀，获得 DNA 分子混合物；

[0178] (3) 以步骤(2)所得 DNA 分子混合物为模板，提取 DNA，用扩增 SEQ ID NO. 1 或者 SEQ ID NO. 2 所示核苷酸序列的试剂进行扩增；

[0179] (4) 检测 PCR 扩增结果，若 PCR 扩增结果为阳性，则待测样本中存在 TWIST 蛋白与 SEQ ID NO. 1 或者 SEQ ID NO. 2 所示核苷酸序列的结合物，若 PCR 扩增结果为阴性，则待测样本中不存在 TWIST 蛋白与 SEQ ID NO. 1 或者 SEQ ID NO. 2 所示核苷酸序列的结合物。

[0180] 3、验证实验：用本发明试剂盒检测 MDA-MB-435 乳腺癌细胞

[0181] I、实验材料：MDA-MB-435 乳腺癌细胞系，市售品，是人乳腺癌高转移细胞系，ER α 表达阴性，为恶性乳腺癌，能稳定表达内源性 TWIST 蛋白，其细胞内存在 TWIST 蛋白与 ER α 基因上 TWIST 蛋白结合位点的结合物，用本发明试剂盒扩增应当得到扩增产物。

[0182] 实验方法：

[0183] (1) MDA-MB-435 细胞在 15cm 的培养皿中培养到细胞密度至 100%；

[0184] (2) 步骤(1) 细胞用福尔马林交联固定并溶解在 1ml 含有蛋白酶抑制剂的细胞裂解液中，3000g 离心 5 分钟；

[0185] (3) 洗涤沉淀物，用 600 μ l 含有蛋白酶抑制剂的溶液重悬沉淀物，后用超声波破碎至 DNA 片段长度为 200-500bp；

[0186] (4) 用 1.4ml 含有 2mM 的 EDTA，100mM 的 NaCl，20mM 的 Tris-HCl(pH8.0)，0.5%Triton X-100 和蛋白酶抑制剂的溶液重新洗涤和稀释步骤(3)所得上清液，得样本；

[0187] (5) 每 0.4ml 步骤(4) 所得样本与 6 μ l 的抗 TWIST 蛋白抗体珠或者 IgG 抗体珠(其作为阴性对照) 混合，复合物在 4℃ 旋转孵育过夜；

[0188] (6) 抗体珠连续用 ChIP I, II 和 III 缓冲液和含有 1mM DTT 的 TEbuffer 洗涤；

[0189] (7) 用 5 μ g 蛋白酶 K 混合和 65℃ 消化蛋白-DNA 复合物过夜，DNA 从交联蛋白中释放出来；

[0190] (8) 用酚和氯仿抽提 DNA，沉淀溶解在 20 μ l 的 ddH₂O 中用于做 PCR 分析；

[0191] (9) 以引物对 2：

[0192] P3(5' -agctgggctcactcacacat-3')

[0193] P4(5' -gaggcatagagcagagtcacc-3')

[0194] 为引物，定量 PCR 分析 CHIP 结果。

[0195] II、实验结果

[0196] 用本发明试剂盒检测该细胞系，以抗 TWIST 蛋白抗体作为抗体珠，阴性对照以 IgG 抗体作为抗体株，检测结果如图 16 所示，本发明试剂盒确实可以扩增得到扩增产物，而阴性对照则基本无扩增产物，说明本发明试剂盒可以准确地检测待检样本是否为恶性乳腺癌细胞。

[0197] 综上，本发明提供了 ER α 基因上的 TWIST 蛋白结合位点，可用于恶性乳腺癌诊断试剂和治疗药物的开发；并提供了检测 TWIST 蛋白是否结合在 ER α 基因上的试剂盒，可以准确检测待检样本是否为恶性乳腺癌；还提供了抑制 TWIST 蛋白和 NuRD 复合物结合到

ER α 基因上的药物,可用于治疗恶性乳腺癌,临床应用前景良好。

[0001]

SEQUENCE LISTING

<110> 泸州医学院

<120> 一种核苷酸序列及其用途

<130> GY184-12P1137

<150> 201210061723.3

<151> 2012-03-09

<160> 20

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 601

<212> DNA

<213> ER α 基因TWIST结合位点

<400> 1

```

atgtgtccag agtgatcatt ctagaaccaa atctgatgta atctctctgc ttaaaacct      60
taagttctca ttgcttttag ataaaatata aaccttttca ctttgttttt attactcctt    120
atgattcage ccttacttag cttaacaagga ctctctcatg tetgagctct agccataata    180
gctgactgtt ggatgagtc tgggggggag gtctctcttc aggetgcaga ttggcgggtca    240
gccctcttga cctcagctgg gctcactcac acatctggga ggcagctgcc tgaggccagg    300
gtgactctgc tctatgctc atgtctctta tctctcttgt acccactatg tagctgggac    360
atgttctcat cgcaatggca gaggcatgag aaagtgatcc tgtttgggca agtgcatttt    420
actcttttct ttcaactatg tccactgaca ttcatcttgc caagcaagca ttgggggtgt    480
ccagagtcaa agagggacat gtgcggggg tcatgactat ttctgagcaa taatetaacc    540
tatcatagct cagatctcac tcttgcagg aagcatctcc taatccttaa gacctagttg    600
g                                          601

```

<210> 2

<211> 332

<212> DNA

<213> ER α 基因TWIST结合位点关键序列

<400> 2

```

cggggggagg ttctcttca ggetgcagat tggcggtcag cctctctgac ctacgtggg      60
ctcactcaca catctgggag gcagctgcct gaggccaggg tgactctgct ctatgcctca    120
tgtctcttat cctctcttga cccacatggt agctgggaca tgttctcatt gcaatggcag    180
aggcatgaga aagtgatcct gtttgggcaa gtgcatttta ctcttttctt tcactcatgt    240
ccactgacat ttcatctgcc aagcaagcat gtggggtgtc cagagtcaaa gagggacatg    300
ttgcgggggt catgactatt tetgagcaat aa                                     332

```

<210> 3

<211> 27

<212> DNA

<213> 扩增ER α 基因TWIST结合位点关键序列的上游引物

<400> 3

```

cgcgatccg gggggagggt cttcttc      27

```

<210> 4

<211> 32

<212> DNA

[0002]

<213> 扩增ER α 基因TWIST结合位点关键序列的下游引物	
<400> 4 acgcgtcgac ttattgtca gaaatagtca tg	32
<210> 5 <211> 20 <212> DNA <213> 引物对1上游引物	
<400> 5 tcacaccttg ctctgcatag	20
<210> 6 <211> 21 <212> DNA <213> 引物对1下游引物	
<400> 6 tgagctcaga aatccacttc c	21
<210> 7 <211> 20 <212> DNA <213> 引物对2上游引物	
<400> 7 agctgggctc actcacacat	20
<210> 8 <211> 21 <212> DNA <213> 引物对2下游引物	
<400> 8 gaggcataga gcagagtcac c	21
<210> 9 <211> 20 <212> DNA <213> 引物对3上游引物	
<400> 9 acctgtgagc agggtgactt	20
<210> 10 <211> 20 <212> DNA <213> 引物对3下游引物	
<400> 10 acaaaaaccc gcaacttcct	20
<210> 11 <211> 22 <212> DNA <213> 测定cDNA文库中ER α cDNA的水平的上游引物	
<400> 11 tcctaacttg ctcttgaca gg	22
<210> 12 <211> 18 <212> DNA <213> 测定cDNA文库中ER α cDNA的水平的下游引物	
<400> 12	

[0003]

gtagccagca gcatgtcg	18
<210> 13	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 检测cDNA文库中TWIST cDNA水平的上游引物	
<400> 13	
gggcggaga cctagatg	18
<210> 14	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 检测cDNA文库中TWIST cDNA水平的下游引物	
<400> 14	
tttccaagaa aatctttggc ata	23
<210> 15	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 逆转录和半定量PCR来检测Er α 的mRNA的上游引物	
<400> 15	
gtgcctggct agagatcctg	20
<210> 16	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 逆转录和半定量PCR来检测Er α 的mRNA的下游引物	
<400> 16	
agagacttca gggtgctgga	20
<210> 17	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 逆转录和半定量PCR来检测TWIST 的mRNA的上游引物	
<400> 17	
acgagctgga ctccaagatg	20
<210> 18	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 逆转录和半定量PCR来检测TWIST 的mRNA的下游引物	
<400> 18	
cagccctgt ttctttgaat	20
<210> 19	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 沉默TWIST基因的shRNA中, 与TWIST基因相匹配的特异性核苷酸序列	
<400> 19	
ggugucuaaa ugcauacua u	21
<210> 20	
<211> 97	
<212> RNA	
<213> 沉默TWIST基因的shRNA的核苷酸序列	
<400> 20	
ugcuguugac agugagcgag gugucuaau gcauacua uagugaagcc acagauguaa	60
uauaauugca uuugacacc gugccuacug ccucgga	97

[0004]

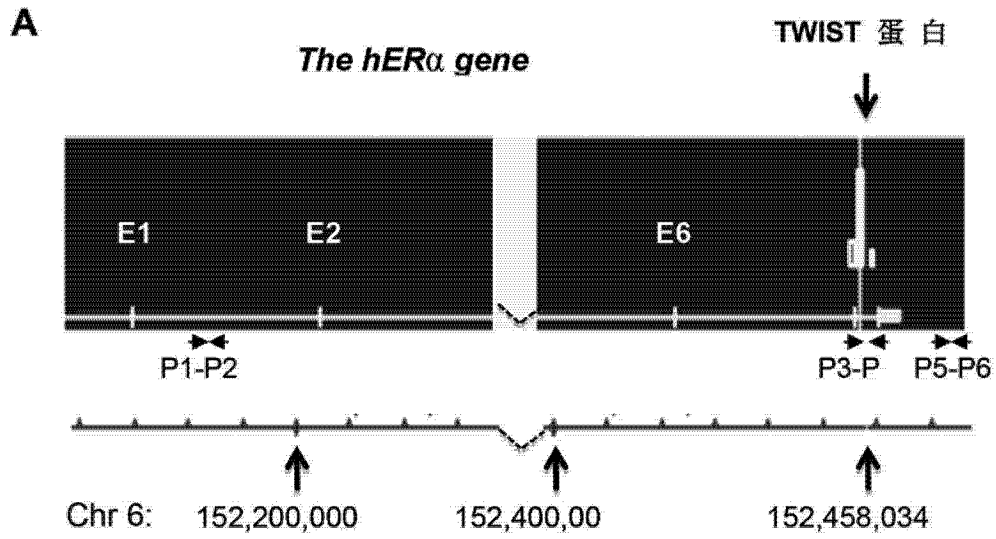


图 1

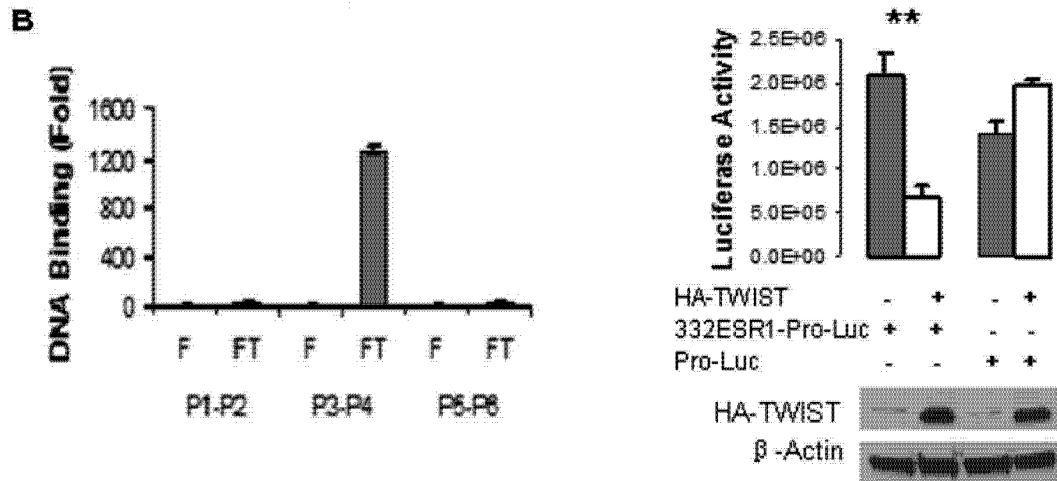


图 2

图 3

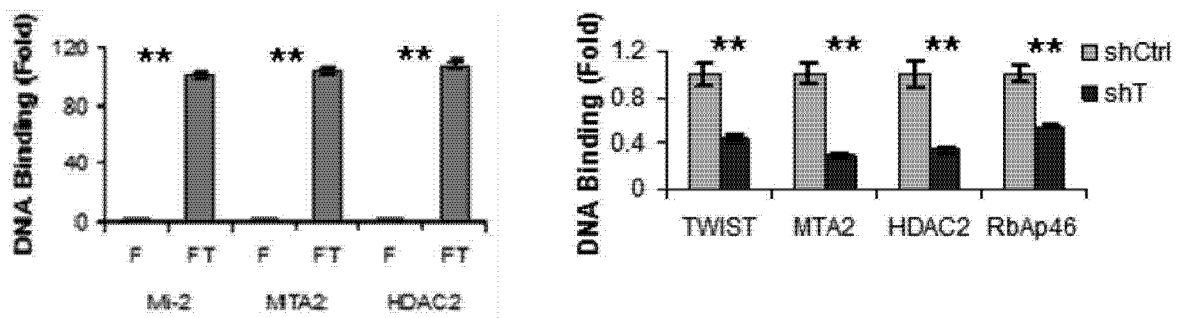


图 4

图 5

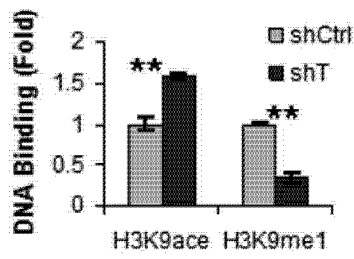


图 6

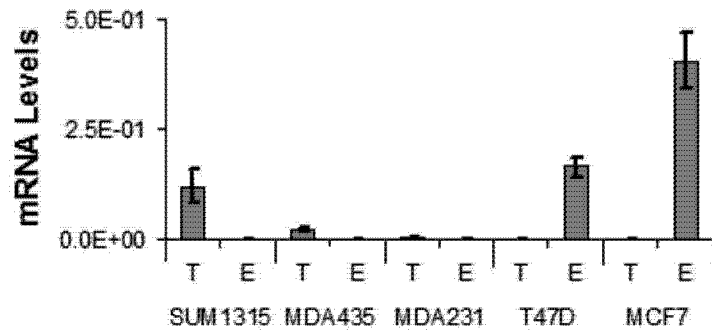


图 7

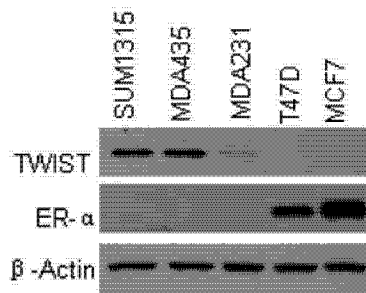


图 8

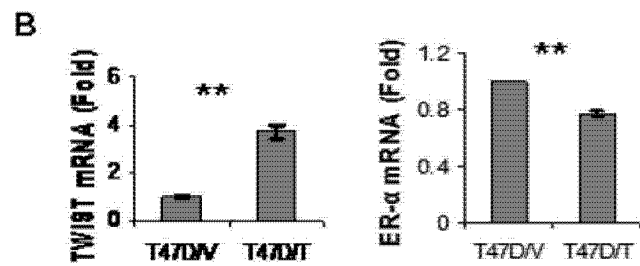


图 9

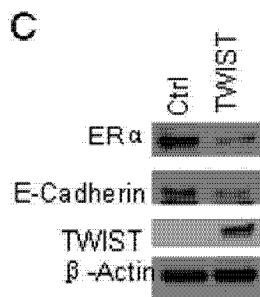


图 10

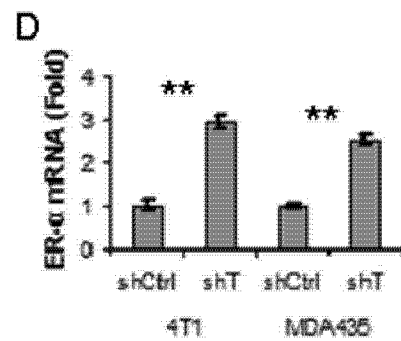


图 11

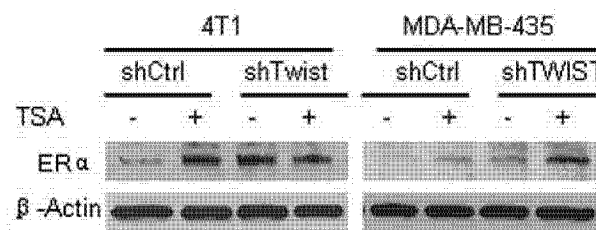


图 12

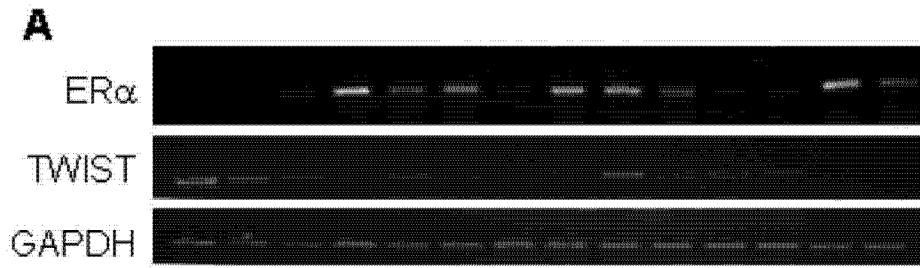


图 13

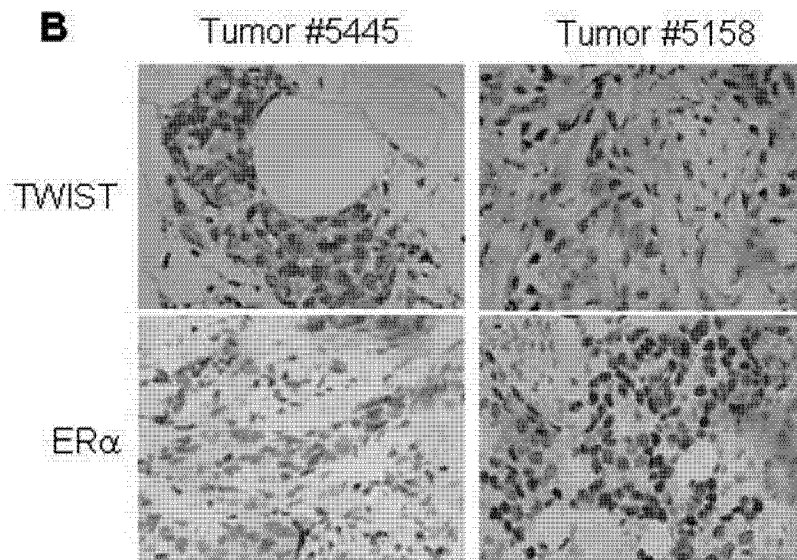


图 14

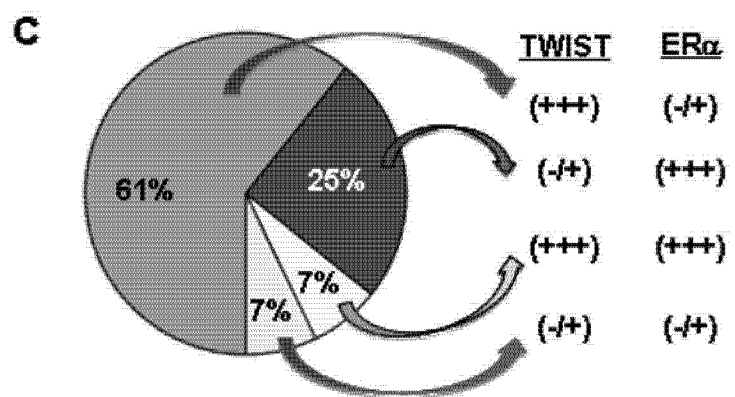


图 15

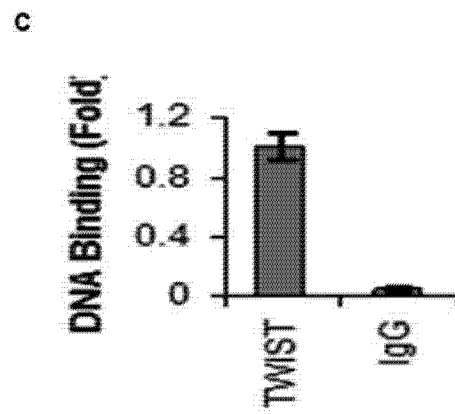


图 16

专利名称(译)	一种核苷酸序列及其用途		
公开(公告)号	CN102732515B	公开(公告)日	2014-01-15
申请号	CN201210243379.X	申请日	2012-07-13
[标]申请(专利权)人(译)	泸州医学院		
申请(专利权)人(译)	泸州医学院		
当前申请(专利权)人(译)	泸州医学院		
[标]发明人	傅俊江 张连美		
发明人	傅俊江 张连美		
IPC分类号	C12N15/11 C12N15/63 C12N15/113 C12Q1/68 G01N33/53 A61K45/06 A61K48/00 A61K31/165 A61P35/00		
CPC分类号	A61K31/165 A61K48/005 C12N15/1138		
优先权	201210061723.3 2012-03-09 CN		
其他公开文献	CN102732515A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了SEQ ID NO.1或者SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列，包含所述核苷酸序列的重组载体，以及所述核苷酸序列在制备检测恶性乳腺癌的试剂中的用途。本发明还公开了一种检测恶性乳腺癌的检测试剂盒和治疗恶性乳腺癌的药物。本发明公开的核苷酸序列是诊断恶性乳腺癌的靶标位点，可用于快速筛选诊断和治疗乳腺癌的试剂，公开的试剂盒可用于早期监控和检测恶性乳腺癌，公开的药物可用于治疗恶性乳腺癌，具有实际应用价值。

