

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
C07K 16/18 (2006.01)  
G01N 33/53 (2006.01)



## [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610150095.0

[43] 公开日 2008年4月30日

[11] 公开号 CN 101168566A

[22] 申请日 2006.10.26

[21] 申请号 200610150095.0

[71] 申请人 北京市肿瘤防治研究所

地址 100036 北京市海淀区阜成路52号

[72] 发明人 吕有勇 许小青 李文梅 梁云燕  
樊晓军 王代树

[74] 专利代理机构 北京天昊联合知识产权代理有限公司

代理人 罗会英 刘榜美

权利要求书1页 说明书10页 附图6页

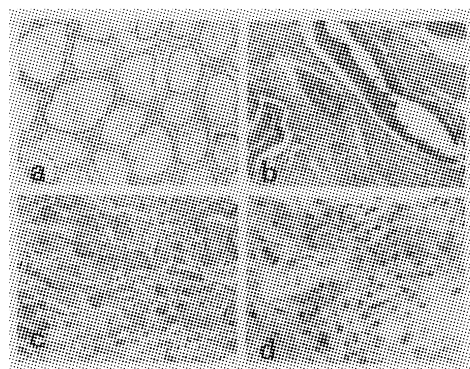
### [54] 发明名称

抗肿瘤特异性标志蛋白 TS/MEDP 的抗体制备及用途

### [57] 摘要

本发明公开了抗肿瘤特异性标志蛋白 TS/MEDP 的抗体制备及用途。利用分子细胞生物学技术,在胃癌细胞中克隆出一个新基因,命名为 TS/MDEP。制备了抗 TS/MDEP 的多克隆抗体,通过抗体纯化技术获得了高特异性抗体。从 mRNA 和蛋白质水平验证了 TS/MDEP 基因在肿瘤细胞系和组织中的表达特征,确定其在包括胃癌细胞系在内的 14 株肿瘤细胞系中表达,并呈现细胞周期依赖性,在胃癌、乳腺癌和宫颈癌组织中过量表达而相应正常组织不表达,且在多种胚胎组织中表达。证实了 TS/MDEP 在细胞增殖旺盛的胚胎组织中高表达,成年后此基因被关闭,在肿瘤细胞中又出现高表达。TS/MDEP 为周期特异性表达,提示 TS/MDEP 高表达导致细胞周期调控异常和参与肿瘤的发生发展。

首次获得的抗 TS/MDEP 的抗体可用于监测细胞周期进程和胃肠肿瘤的临床生物学行为。



1、抗肿瘤特异性标志蛋白 TS/MDEP 的抗体制备，其特征在于：克隆了一个新的肿瘤相关基因 *TS/MDEP* 并提交到 Genebank，接受号为 (DQ150361)，证实为细胞周期和肿瘤特异性表达，并且制备了具有高度特异性的抗体。

2、抗 TS/MDEP 的抗体的用途，其特征在于：该抗体可以用 Western blot 和免疫组织化学检测细胞和组织中 TS/MDEP 蛋白的表达水平。

3、根据权利要求 2 所述的抗 TS/MDEP 的抗体的用途，其特征在于：在多种细胞系 TS/MDEP 蛋白质呈现周期依赖性表达，即在 M 期表达最高，随着细胞分裂的完成，其表达水平逐渐降低。

4、根据权利要求 2 所述抗 TS/MDEP 的抗体的用途，其特征在于：TS/MDEP 蛋白可能成为肿瘤诊治的分子靶标。

## 抗肿瘤特异性标志蛋白 TS/MEDP 的抗体制备及用途

### 技术领域

本发明涉及多种细胞和分子生物学技术，包括细胞同步化技术、mRNA 差异显示技术、RACE 技术、原核表达蛋白质、RT-PCR、mRNA 原位杂交、多克隆抗体制备、免疫化学、Western blot、流式细胞、RNAi 和动物实验。

### 背景技术

世界上与肿瘤相关的疾病中，胃癌占第二位，并且是亚洲人群中最常见的恶性肿瘤，严重的危害着人类的健康。人们期望能阐明胃癌的发生发展机制，从而有效的预防和治疗这一恶性肿瘤。尽管大量的研究证实胃癌的发生与多种因素有关包括饮食、环境以及细菌或病毒感染，如幽门螺旋杆菌的感染，近年来分子机制研究发现众多基因参与胃癌的发生发展，如 E-cadherin 表达的缺失、p53 基因、TGF- $\beta$ 、c-met、erbB-2 和 RUNX3 等，这些研究解释了胃癌部分发病机制，对于胃癌的详细的分子发病机制我们还知之甚少。

与正常细胞相比，肿瘤细胞的最根本的特征之一就是细胞周期调控异常，正常细胞向恶性细胞转化过程中，多基因变异积累赋予了肿瘤细胞特有的功能，如肿瘤细胞产生许多自身的生长因子，对于抑止细胞生长的信号不敏感，逃避凋亡，具有无限的复制潜能，均能归结到变异的基因导致细胞周期调控异常，特别是细胞周期 checkpoint 异常，从而赋予肿瘤细胞失控性生长的特性。尽管 Cyclin 和 CDK 的发现已经阐明了细胞周期的基本调控机制，对于 G1-S 期 checkpoint 也有了较多的了解，如 P53、P21、GADD45、TGF- $\beta$ 、P27、P16、Rb、E2F 参与 G1-S 期 checkpoint 的调控，但是距我们对于认识细胞周期调控的详细分子调控机制还甚远。

### 发明内容

本发明的目的是综合利用上述技术，需要找到参与与胃癌发生发展，并且参与细胞周期调控的关键基因，从而阐明胃癌发生发展的分子机制，进一步筛选到胃癌分子标志物及治疗胃癌的分子靶点。此项研究将 mRNA 差异显示技术和细胞同步化技术结合，以胃癌细胞系 BGC823 为研究对象，获得了一个

周期差异性表达基因,将其全长 mRNA 克隆并命名为 *TS/MDEP*,提交至 Genbank, 基因号为 DQ150361, *TS/MDEP* 基因编码 389aa 蛋白质,分子量 42.3kd,生物软件预测包含多个磷酸化位点,一个可与具有 SH3 Domain 的蛋白质结合脯氨酸富集区,一个与 CC 结构域,因此推测 *TS/MDEP* 基因具有重要的生物学功能。

基因差异性表达提示其具有特定的生物学功能,因此我们采用不同的技术,在细胞和组织水平验证了 *TS/MEDP* 基因的表达特征,此基因在 14/17 株肿瘤细胞中表达,并且呈现周期特异性表达,*TS/MEDP* 蛋白在 M 期的 BGC823 中表达最高,随着细胞分裂的完成,其表达量逐渐降低。更重要的是在配对的胃癌组织中表达,而正常胃粘膜中未见表达,还证实 *TS/MEDP* 基因在多种细胞增殖旺盛的胚胎组织中表达,因此 *TS/MEDP* 基因在组织中具有如下表达特征:*TS/MDEP* 在细胞增殖旺盛的胚胎组织高表达,成年后组织细胞中此基因被关闭,在肿瘤细胞中又出现高表达,符合癌基因的表达规律,因此 *TS/MEDP* 基因是一个新的候选癌基因。

特别是在 BGC823 中 RNAi 干扰 *TS/MEDP* 基因后,细胞形态发生明显的变化,细胞增殖受到明显抑制,细胞集落形成能力和致瘤性显著降低,并且干扰后细胞出现 G2/M 期阻滞。这一结果表明 *TS/MEDP* 基因在参与细胞增殖调控和肿瘤的发生发展中具有重要的生物学功能。并且可能成为预测胃癌生物学行为的分子标志物。

本发明的技术内容是:克隆了周期依赖性表达的新基因 *TS/MEDP* (Tumor Specificity and Mitosis Phase-dependent Expression protein),提交到 Genebank 接受号为 DQ150361。通过合成多肽并与大分子蛋白质 KLH 连接后,免疫新西兰白兔,ELISA 测定抗体滴度后,取兔血清,并用原核表达的 *TS/MDEP* 蛋白质进行亲和层析,细胞周期和肿瘤特异性表达,经过纯化制备了抗 *TS/MEDP* 的特异性多克隆抗体。

此抗体可以通过 Western blot 和免疫组织化学技术,检测到 *TS/MEDP* 蛋白的表达。

通过检测基因的表达,发现其在细胞及组织中的表达规律,在细胞中呈现周期特异性表达,*TS/MEDP* 蛋白在 M 期的 BGC823 中表达最高,随着细胞分裂的完成,其表达量逐渐降低,在组织中,*TS/MDEP* 在细胞增殖旺盛的胚胎组织高表达,更重要的是,*TS/MEDP* 基因在胃癌组织中表达,而正常的胃粘

膜不表达。

进一步功能研究表明 *TS/MEDP* 基因在细胞增殖中具有重要的作用并和细胞分裂密切相关，在肿瘤肿瘤的发生发展中具有重要的生物学功能。因为细胞周期调控异常是肿瘤细胞的根本特征，因此 *TS/MEDP* 是一个候选癌基因。利用我们制备的抗 *TS/MDEP* 的抗体可以对胃癌进行诊断，并且基于我们阐明的此基因的功能，*TS/MEDP* 基因可能成为诊断胃癌的分子标志物或者治疗胃癌的分子靶点。

采用本发明提供的技术方案，利用分子细胞生物学技术，在胃癌细胞中克隆出一个新基因，命名为 *TS/MDEP* (Tumor Specificity and Mitosis Phase-dependent Expression protein, DQ150361)。制备了抗 *TS/MDEP* 的多克隆抗体，通过抗体纯化技术获得了高特异性抗体。从 mRNA 和蛋白质水平验证了 *TS/MDEP* 基因在肿瘤细胞系和组织中的表达特征，确定其在包括胃癌细胞系在内的 14 株肿瘤细胞系中表达，并呈现细胞周期依赖性，在胃癌、乳腺癌和宫颈癌组织中过量表达而相应正常组织不表达，且在多种胚胎组织中表达。因此，我们证实了 *TS/MDEP* 在细胞增殖旺盛的胚胎组织中高表达，成年后此基因被关闭，在肿瘤细胞中又出现高表达。进一步研究发现，*TS/MDEP* 为周期特异性表达，提示 *TS/MDEP* 高表达导致细胞周期调控异常和参与肿瘤的发生发展。我们首次获得的抗 *TS/MDEP* 的抗体可用于监测细胞周期进程和胃肠肿瘤的临床生物学行为。

#### 附图说明

图 1 是筛选到差异表达 cDNA 片断 A54-3, Northern blot 预测其 mRNA 全长，并通过 RACE 技术获得 *TS/MDEP* 基因的 mRNA 全长。

图 2 是制备的多克隆抗体可与原核表达的 *TS/MDEP* 蛋白质特异结合，说明其具有很高的特异性。

图 3 是 *TS/MDEP* 基因在多种肿瘤细胞系中表达，并呈现周期特异性表达。G1/M 期的 mRNA 表达水平高于 G2/S 期；而蛋白质水平在 M 期表达最高，随着细胞分裂的完成，表达逐渐降低。

图 4 是 *TS/MDEP* 基因在组织中表达特征：*TS/MDEP* 基因在 mRNA 和蛋白质水平均呈现显著的差异性表达，胃肿瘤组织中表达而正常胃粘膜中不表达；在多种胚胎组织中 *TS/MDEP* 基因表达。

图 5 是抑制 *TS/MDEP* 基因表达对细胞形态和周期的影响。RNAi 抑制 *TS/MDEP* 基因表达后，细胞形态发生明显的变化，细胞扁平、变大、出现巨细胞、有突触样伪足出现，并且细胞出现 G2/M 期阻滞。

图 6 是 *TS/MDEP* 基因被干扰后抑制了细胞的增殖和成瘤能力。干扰后细胞比对照增殖明显降低，而且软琼脂和裸鼠成瘤实验证实，干扰后细胞在体内和体外的致瘤能力均显著降低。

### 具体实施方式

下面结合附图说明本发明的具体实施方式。

#### 材料方法

##### 一、细胞培养

胃癌细胞系 BGC823、MGC803、SGC7901、PAMC82、MKN45、SNU1、SNU5、SNU16、RF1、RF48 在 5% 胎牛血清 DMEM 培养基中培养，AGS、N87 和结肠癌细胞系 LOVO 在 10% 胎牛血清 DMEM 培养基中培养，乳腺癌细胞系 PC-3，肝癌细胞系 BEL7421，乳腺癌细胞系 MCF7，食管癌细胞系 EC9706 在 10% 胎牛血清 1640 培养基中培养，培养基中均还有终浓度为 100,000 units/L 青霉素和 100mg/L 链霉素，在 5% CO<sub>2</sub> 中 37℃ 培养。

##### 二、细胞同步化

将胃癌细胞系 BGC823 以 20% 密度接种于若干个直径 100mm 培养皿中，37℃ CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 小时达对数生长期，在细胞密度为 40%-80% 时换 2.5mM TdR/DMEM 条件培养基，继续在 37℃ 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 18 小时，然后弃掉 TdR 条件培养基，用常规培养基洗一遍，加入常规培养基 37℃ 培养 6 小时。其后将培养皿放入本所细胞室自行研制的高压 N<sub>2</sub>O 罐中，向罐中注入 CO<sub>2</sub> 400ml，将盖子密封。打开 N<sub>2</sub>O 入口开关，放出上层伪气后，缓缓向管中充气，在 30 分钟内使其压力达到 0.55MP，然后将 N<sub>2</sub>O 罐放入 37℃ 培养箱中放置 18 小时，满 18 小时后将 N<sub>2</sub>O 罐取出并放出 N<sub>2</sub>O。倒置显微镜下见大量（90%）变圆，这些细胞为 M 期细胞，部分已经漂浮在培养液中，轻轻摇晃培养瓶，使 M 期细胞悬浮于培养液中，吸出细胞培养液，离心后弃上清，收集的细胞即为 M 期细胞。剩余 M 期细胞继续培养 5 小时后可收集 G1 期细胞。部分 G1 期细胞换 TdR 条件培养基继续培养 18 小时。18 小时后换常规培养基再继续培

养 5 小时即可收获 S 期细胞, S 期细胞继续培养 7 小时后可收获 G2 期细胞。收获的不同周期细胞用 PROFILE II 流式细胞仪 (COULTER 公司) 检测。

### 三, mRNA 差异显示

采用酸性酚-异硫氰胍一步法提取 G1 和 S 期的胃癌细胞系 BGC823 总 RNA, 根据用于 mRNA 差异显示 *HIEROGLYPH™ mRNA Profile Kit* (Genomix Corporation) 说明书进行操作, 具体如下, 逆转录反应体系 20  $\mu$ l: DEPC-H<sub>2</sub>O 8.8  $\mu$ l, 5 $\times$  buffer 4.0  $\mu$ l, dNTP (250  $\mu$ M) 2.0  $\mu$ l, DTT (100mM) 2.0  $\mu$ l, DNase 处理后的总 RNA (0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l) 1.0  $\mu$ l, 3' 锚定引物 AP 2.0  $\mu$ l, MMLV (200u/ $\mu$ l) 0.2  $\mu$ l; 反应如下: RNA 加入 3' 锚定引物 AP 70 $^{\circ}$ C 孵育 5 分钟, 立即插冰冷却, 然后加入其它成分 (DEPC-H<sub>2</sub>O, dNTP, DTT, MMLV, buffer), 42 $^{\circ}$ C 5 分钟, 50 $^{\circ}$ C 50 分钟, 70 $^{\circ}$ C 15 分钟, 逆转录产物-20 $^{\circ}$ C 保存。DD-PCR 反应体系 20  $\mu$ l 如下: dH<sub>2</sub>O 8.2  $\mu$ l, 10 $\times$  buffer 2.0  $\mu$ l, MgCl<sub>2</sub> (25Mm) 1.2  $\mu$ l, dNTP (250  $\mu$ M) 1.6  $\mu$ l, 3' 锚定引物 AP (2.5  $\mu$ M) 2.0  $\mu$ l, 5' 锚定引物 ARP (2.5  $\mu$ M) 2.0  $\mu$ l, TaqE (5u/ $\mu$ l) 0.2  $\mu$ l, RT-Mix 2.0  $\mu$ l, [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]Datp (12  $\mu$ ci/ $\mu$ l) 0.8  $\mu$ l, PCR 程序: 95 $^{\circ}$ C 2 分钟, 92 $^{\circ}$ C 15 秒, 50 $^{\circ}$ C 30 秒, 72 $^{\circ}$ C 2 分钟, 4 个循环, 92 $^{\circ}$ C 15 秒, 60 $^{\circ}$ C 30 秒, 72 $^{\circ}$ C 2 分钟, 25 个循环, 72 $^{\circ}$ C 7 分钟, 产物-20 $^{\circ}$ C 保存。DD-PCR 产物 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳: 配制 6% 聚丙烯酰胺凝胶, 聚合过夜, 加样前预电泳 30 分钟, 温度 55 $^{\circ}$ C, 电压 1760v, 电流 28mA, 恒功率 50W; 样品 6  $\mu$ l 变性后上样, 电泳 4 小时后揭胶, 80 $^{\circ}$ C 真空干燥 2 小时, 进行放射自显影。在 X 光片上找到 G1 与 S 期差异表达的 cDNA 片断, 并切胶回收进行 PCR 再扩增, 之后产物测序鉴定。见图 1A, mRNA 差异显示获得了 G1/S 期差异表达 cDNA 片断 A54-3, 此片断在 G1 期高表达。

### 四, Northern Blot

提取的细胞系总 RNA, 依据 OD 值计算得到的浓度, 取 20  $\mu$ g 总 RNA, 经 RNA 变性胶分离, 将电泳 RNA 胶用蒸馏水冲洗若干次去甲醛, 10 $\times$  SSC 100ml 摇洗 1 小时解链, 用 150ml 20 $\times$  SSC 做转移液, 利用毛细管吸作用将 RNA 转移到硝酸纤维素膜, 80 $^{\circ}$ C 于烤箱中烘干 2 小时; 65 $^{\circ}$ C 杂交液中预杂交过夜, 杂交前标记探针如下: 取探针 150ng 加水 (试剂盒提供) 至 30  $\mu$ l, 置沸水中

变性 5 分钟后, 迅速插冰冷却, 约三分钟后, 依次加入以下试剂, Labeling 5 × buffer 10 μl, Mix dA(G, T)TP 2 μl, 10mg/ml BSA 2 μl, α-<sup>32</sup>P dCTP (50 μci) 5 μl, Klenow enzyme (5u/μl) 1 μl, 混匀室温放置 2 小时, 根据纯化柱说明将探针纯化。标记的探针 70℃ 变性, 换新的杂交液 10ml 后加入变性的探针, 65℃ 杂交过夜。洗脱液洗脱后-70℃ 暴光 2 周显影。见图 1B, 在五株肿瘤细胞系中, 证实均有 *TS/MDEP* 基因的表达, 且其 mRNA 全长约 4.0kb。

## 五, RT-PCR

按说明 TRIZOL 提取肿瘤细胞系和组织总 RNA, 分光光度计定量, 分别取 5 μg 总 RNA 反转录, 各加入 0.4 μl oligodT, 加 DEPC-treated H<sub>2</sub>O 至 20 μl, 70℃, 10 分钟变性, 迅速插冰冷却, 各加入 5 × RT buffer 6 μl, dNTP 2 μl (2.5mM), RNase 抑制剂 0.5 μl (40u/μl), 充分混匀, 加入 M-MLV 逆转录酶各 1 μl 混匀, 37℃ 孵育 1 小时, 70℃ 15 分钟灭活, 分装后-20℃ 保存备用。然后 PCR 扩增, 所用引物, 上游引物序列: 5' -TGGCATCTTTACTGGACTGG-3', 下游引物序列: 5' -TGGCACCTCGTGGATAGAGC-3', 扩增片段长度为 385bp, 包含 SAGE tag。PCR 反应体系 20 μL: dH<sub>2</sub>O 15.0 μl, 10 × Buffer (含 MgCl<sub>2</sub>) 2.0 μl, dNTP (2.5 mM) 0.5 μl, 上游引物 (5 μM) 0.5 μl, 下游引物 (5 μM) 0.5 μl, Taq DNA 聚合酶 (5U/μL) 0.5 μl, DNA 模板 (100ng/μL) 0.5 μl。PCR 扩增条件, 参数如下: 95℃ 预变性 2min30sec, 循环反应程序为 94℃ 变性 500sec, 退火 50sec; 72℃ 延伸 50sec, 30 cycles, 循环反应结束后, 72℃, 10min 充分延伸, 4℃ 保存, PCR 产物行 1.2% 琼脂糖凝胶鉴定。以 β-actin 为内对照, Mock 为阴性对照。见图 3A 和图 4A, 分别证实了, *TS/MDEP* 基因在多种肿瘤细胞系中表达, 并呈现细胞周期依赖性表达, RT-PCR 证实其 mRNA 表达在 G1/M 期高于阿哥、Q/S 期; 在组织中证实此基因在多种胚胎组织中表达, 如胃、小肠、大肠等, 最重要的是在配对的胃癌组织中证实 *TS/MDEP* 基因在胃癌组织中表达而配对的正常胃组织表达阴性。

## 六, 抗体制备

通过软件分析 T/MDEP 的亲水性区域和抗原表位性区域, 参照使用多肽制备抗体的一般原则, 选择出三个肽段, 分别位于蛋白质的 N 末端、中间段

和 C 末端。因为合成的多肽分子量较小，不能充分引发免疫反应，因此需要选择合适的载体，增强其免疫原性。我们将合成的多肽连接到 KLH 上，通过在新西兰白兔脊柱两侧多点注射，第一次免疫，注射 500ug 多肽，以后剂量减半，每周注射一次，共免疫四次。最后，取兔的全血，分离血清，分装保存。采用抗体纯化技术 (CNBr-activated Sepharose 4B) 将多抗纯化后，通过免疫组化和 Western blot 验证多抗的特异性和检测 TS/MDEP 蛋白的表达特征。见图 2，原核表达并纯化后获得 TS/MDEP 蛋白质，并用质谱鉴定，与含有抗 TS/MDEP 抗体的血清杂交后，证实我们多肽制备的抗体可与表达的全蛋白特异性结合，因此，我们进一步采用亲和层析的方法，用原核表达的抗体纯化血清中的抗体，显著的提高了抗体的特异性。

### 七，免疫组化

采用 ABC 法，细胞系滴片后 2% 甲醛固定，0.3%  $H_2O_2$  甲醇室温 10 分钟，PBS 洗 3 次  $\times$  5 分钟。滴加一抗 (1: 50)，湿盒 4℃ 过夜，PBS 洗 3 次  $\times$  5 分钟，滴加二抗 1: 200 稀释，室温孵育 30 分钟，PBS 洗 3 次  $\times$  5 分钟，滴加三抗 1: 400 稀释，室温孵育 30 分钟，PBS 洗 3 次  $\times$  5 分钟，DAB- $H_2O_2$  显色，镜下控制 3-5 分钟，PBS 漂洗，终止显色，苏木素复染 45 秒，1% 盐酸酒精分色，温热的自来水冲洗反蓝，95% 和 100% 乙醇脱水各 5 分钟，二甲苯透明，中性树脂封片。见图 4C，使用纯化后的抗体对胃癌及正常组织制备的组织阵列进行染色，证实，在胃的肿瘤组织中 TS/MDEP 蛋白表达，而正常胃组织中不表达，统计数据见表 2。

### 八，mRNA 原位杂交

用上述同样的引物，在 BGC823 中 RT-PCR 大量扩增 TS/MEDP 基因片断，割胶回收纯化后，将此 cDNA 片断插入 pGEM-T Easy 载体 T/A 克隆 (Promega)，转化感受态 DH5  $\alpha$ ，小量提取质粒，测序鉴定。然后标记探针：使用地高辛探针标记试剂盒 (Boehringer Mannheim 公司产品)，根据说明书操作，将地高辛标记在探针上，分别用 RNA polymerase Sp6 和 RNA polymerase T7 标记出正义探针和反义探针，标记好的探针 -20℃ 保存。按如下过程进行 mRNA 原位杂交：切片脱蜡，逐级乙醇回水，0.2 N HCl 平衡切片，切片于 2  $\times$  SSC (预热) 70℃ 孵育 15 分钟，用 DEPC 处理的 PBS 液洗切片 2 分钟，切片于 4% PFA (预

冷)中 4℃平衡 5 分钟,用 DEPC 处理的 PBS 液洗切片 2 次,每次 2 分钟。切片于 2×SSC 中平衡 5 分钟,在每张切片上加适量的预杂交液,湿盒 70℃孵育 8 分钟再 37℃ 1 小时,2×SSC 洗切片 2 次,每次 2 分钟。逐级乙醇脱水,将探针加热到 70℃加入到冰冷的预杂交液中(按 10ng/μl),制备单链探针,加 200 μl 杂交液在切片上,盖上盖玻片,湿盒 43℃孵育过夜,切片滴加 2×SSC 移去盖玻片,室温 2×SSC 洗切片 20 分钟,1×SSC 洗 20 分钟,43℃ 0.5×SSC 洗 20 分钟,室温 0.5×SSC 洗 20 分钟。切片于洗涤溶液平衡 5 分钟,在每张切片上加封闭溶液稀释的绵羊血清(1:20 用封闭溶液配置),湿盒室温孵育 20 分钟,弃去封闭液,在每张切片上加封闭溶液稀释的碱性磷酸酶抗地高辛抗体(1:500),湿盒室温孵育 1 小时或 4℃过夜,弃去抗体液,切片于洗涤溶液中洗 2 次,每次 15 分钟,切片于底物溶液中平衡 5 分钟,在每张切片上加新鲜配制的彩色溶液,湿盒室温孵育,避光半小时,当染色理想时,用终止溶液终止反应,将终止溶液冲洗后,逐级乙醇脱水、封片(地高辛核酸检测试剂和亦为 Boehringer Mannheim 公司产品)。见图 4B,在包含大样本的组织阵列中,采用不同的方法再次证实 *TS/MDEP* 基因的 mRNA 在胃癌组织中表达,而在正常胃粘膜中表达阴性。以正义探针为对照,证实我们选择的探针有很好的特异性。统计数据见表 1。

### + RACE

使用 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (CLONTECH) 进行 5' 末端和 3' 末端 RACE,具体过程按使用说明:提取胃癌细胞系 BGC823 的总 RNA,变性胶电泳鉴定,将 mRNA 分别反转录成 5'-RACE-Ready cDNA 和 3'-RACE-Ready cDNA,均采用巢式 PCR,5' RACE 使用的引物: GSP1: GGATCGGTCCCCTCGTCCACCCG, NGSP1: CCCACGGCGACAATAGCGACTACTT, PCR 反应体系 50 μl: 5'-RACE-Ready cDNA 2.5 μl, UPM(10×) 5 μl, GSP1(或者 NGSP1) 1 μl, Master Mix 41.5 μl, PCR 反应程序: 95℃ 3 分钟充分变性, 95℃ 2 分钟, 退火温度梯度 62℃, 63.4℃, 64.4℃ 50 秒, 延伸 72℃ 50 秒, 共扩增 30 个循环, 充分延伸 72℃ 10 分钟; 3' RACE 使用的引物: GSP2: TCCCAGCACTTGAGGCCAGGAGT, PCR 反应体系 50 μl: 3'-RACE-Ready cDNA 2.5 μl, UPM(10×) 5 μl, GSP2 1 μl, Master Mix 41.5 μl, PCR 反应程序: 95℃ 2 分钟充分变性, 95℃ 1

分钟 30 秒, 退火温度梯度 56℃, 58.4℃, 60℃ 50 秒, 延伸 72℃ 50 秒, 共扩增 30 个循环, 充分延伸 72℃ 10 分钟。将扩增的片断切胶回收纯化, T/A 克隆后测序验证。见图 1C, D, 通过 RACE 技术, 得到了 TS/MDEP mRNA 的全长 (3877bp), 其包含了 5' 端的 G-Capping 结构, 3' 端的加尾信号, 此 mRNA 包含了一个完整的 CDS (编码序列), 并且在翻译起始位点含有 Kozak 序列。

### 十一, RNA 干扰

根据 siRNA 靶序列设计的共同标准及 psiRNA-hH1neo 质粒特征应用软件 siRNA Wizard™ v2.4 设计 TS/MDEP 基因的寻靶序列, 选择 TS/MDEP 基因 cDNA 上符合条件的 3 段序列并经 BLAST 分析排除同源序列, 根据质粒说明, 设计合成发夹结构, 退火形成双链结构, 末端带有 BbsI 酶切的酶切位点, 之后与 BbsI 酶切后的 psiRNA-hH1neo 质粒连接, 转化细菌, 抗生素筛选后, 挑取克隆, 测序鉴定后, 大提质粒分装 -70℃ 储存。转染胃癌肿瘤细胞系 BGC823, 48 小时加选择性培养基 (400μg/ml G418), 每 3 天换液, 筛选 69 天后, 挑取单克隆, 每个片断挑取 6 个扩大培养, 然后提取 RNA 和蛋白质, 进行 RT-PCR 和 Western blot 验证, 证实 3c 克隆中 TS/MDEP 基因被干扰, 并且观察细胞形态, MTT 证实 TS/MDEP 基因被干扰后细胞生长状况, 及细胞流式检测细胞周期改变, 软琼脂集落形成实验观察细胞集落形成能力, 以及裸鼠致瘤实验观察 TS/MDEP 基因被干扰后细胞致瘤性的变化。见图 5、6, RNAi 抑制 TS/MDEP 基因表达后, 细胞形态发生明显的变化, 细胞扁平、变大、出现巨细胞、有突触样伪足出现, 并且细胞出现 G2/M 期阻滞; TS/MDEP 基因被干扰后抑制了细胞的增殖和成瘤能力, 干扰后细胞比对照增殖明显降低, 而且软琼脂和裸鼠成瘤实验证实, 干扰后细胞在体内和体外的致瘤能力均显著降低。

附:

表 1, 原位杂交证实 TS/MDEP 基因在胃正常黏膜和胃癌中存在差异表达。

<b>Histology</b>	<b>TS/MDEP expression</b>		<b>Total cases</b>
	<b>Positive</b>	<b>Negative</b>	
<b>Tumor</b>	<b>53 (53%)</b>	<b>47(47%)</b>	<b>100</b>
<b>Normal</b>	<b>0</b>	<b>20 (100%)</b>	<b>20</b>

$\chi^2$  test,  $p < 0.01$

表 2, 免疫组织化学证实 TS/MDEP 基因在胃正常黏膜和胃癌中存在差异表达。

<b>Histology</b>	<b>TS/MDEP expression</b>		<b>Total cases</b>
	<b>Positive</b>	<b>Negative</b>	
<b>Tumor</b>	<b>20 (48.7%)</b>	<b>21(51.3%)</b>	<b>41</b>
<b>Normal</b>	<b>0</b>	<b>8 (100%)</b>	<b>8</b>

$\chi^2$  test,  $p = 0.01$

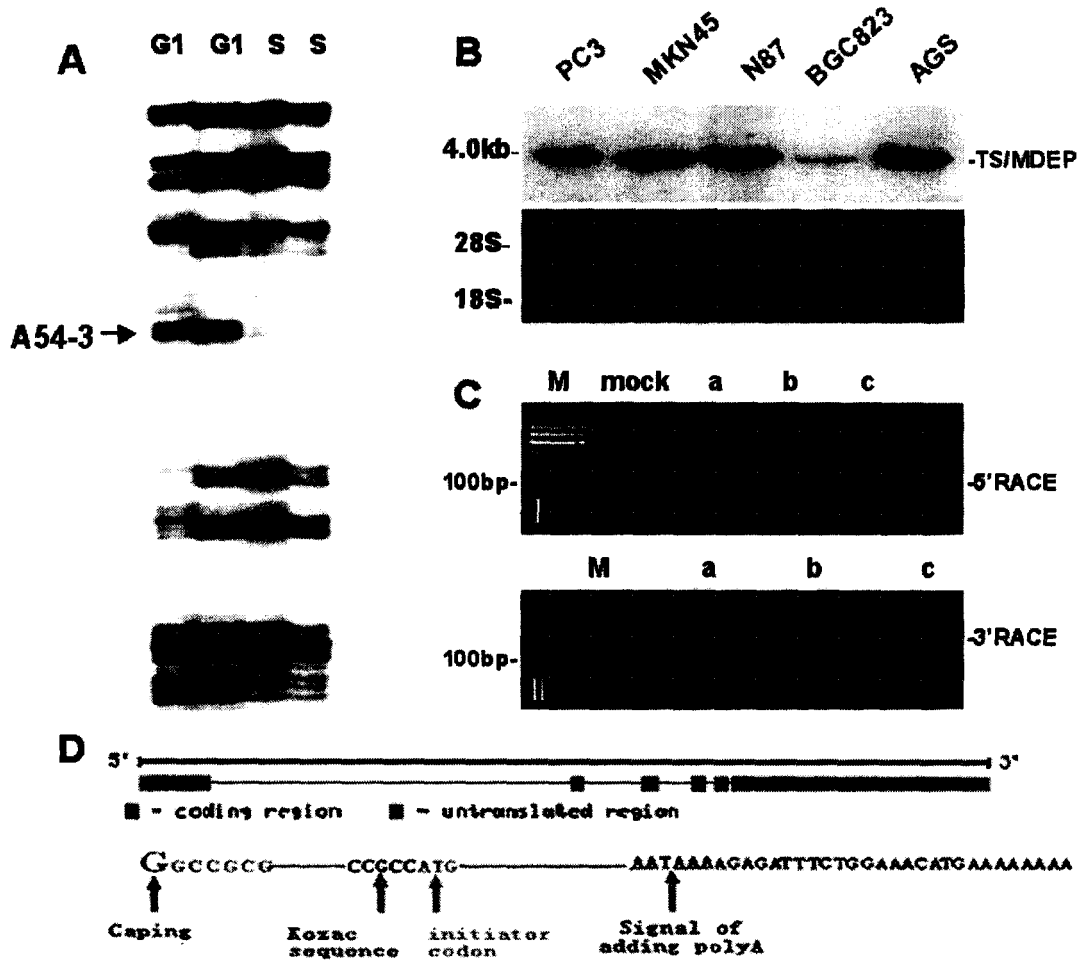


图 1

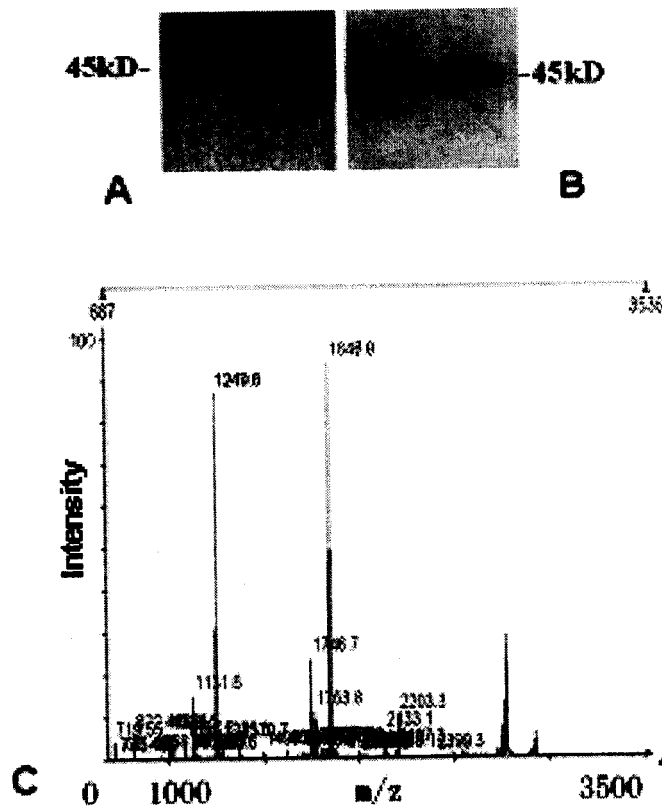


图 2

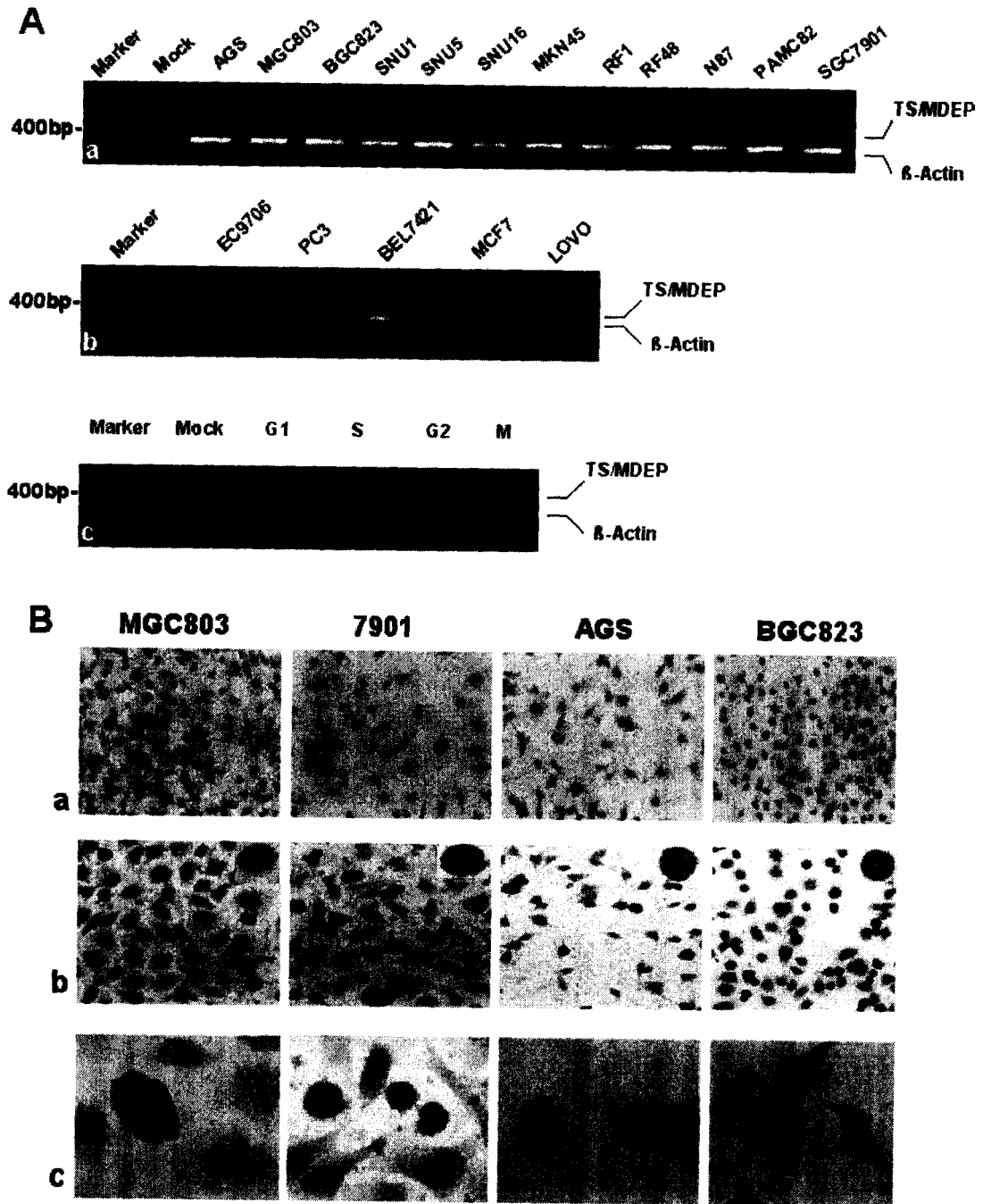


图 3

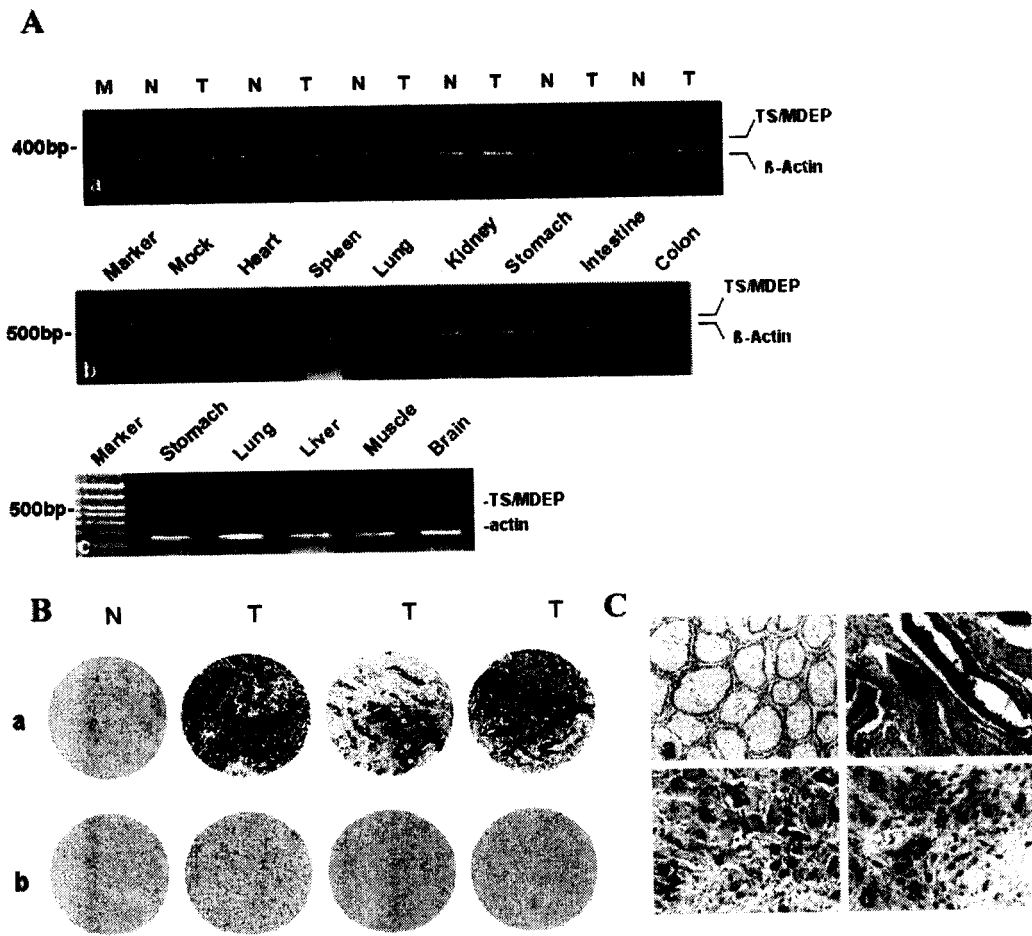


图 4

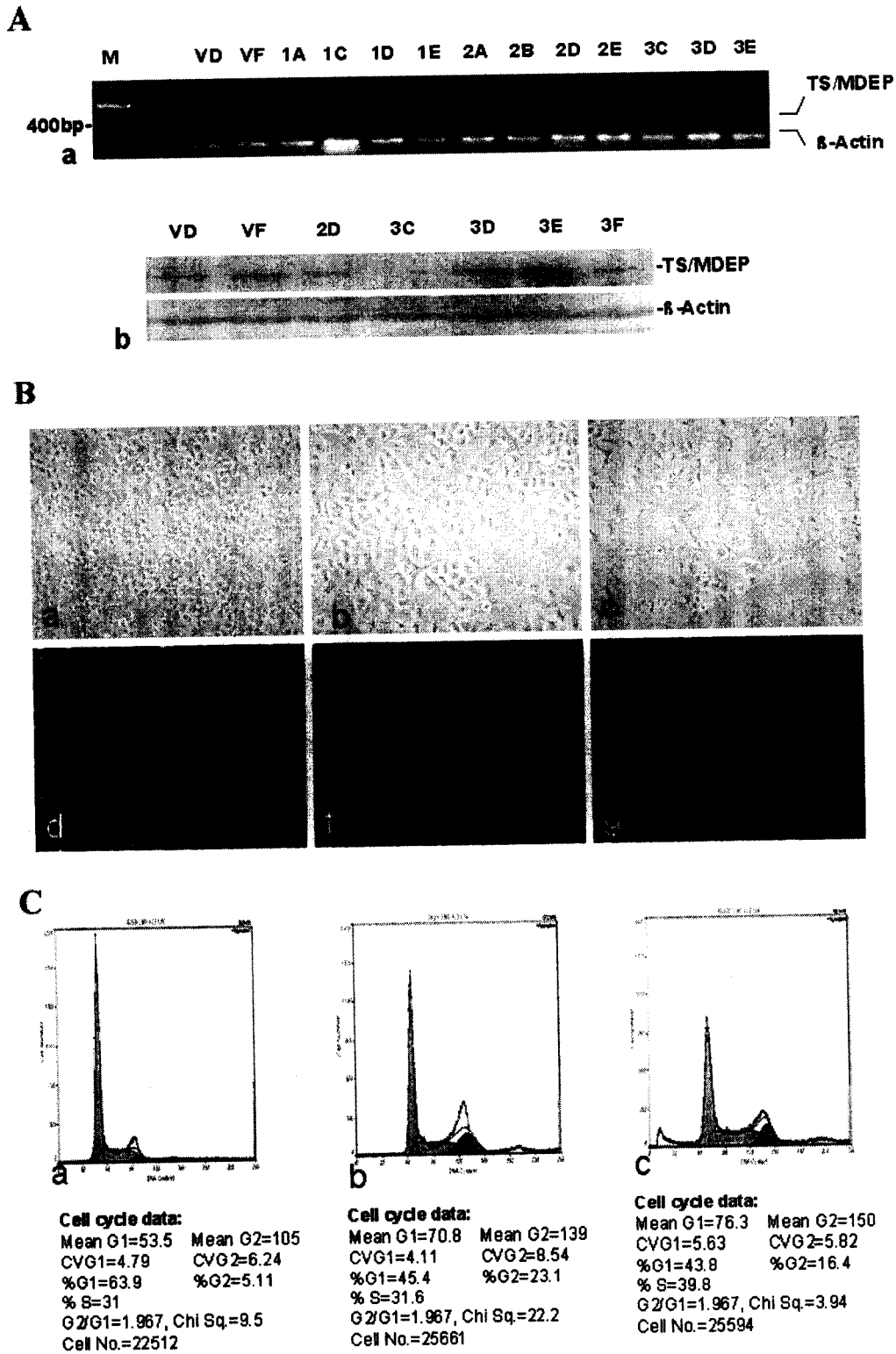


图 5

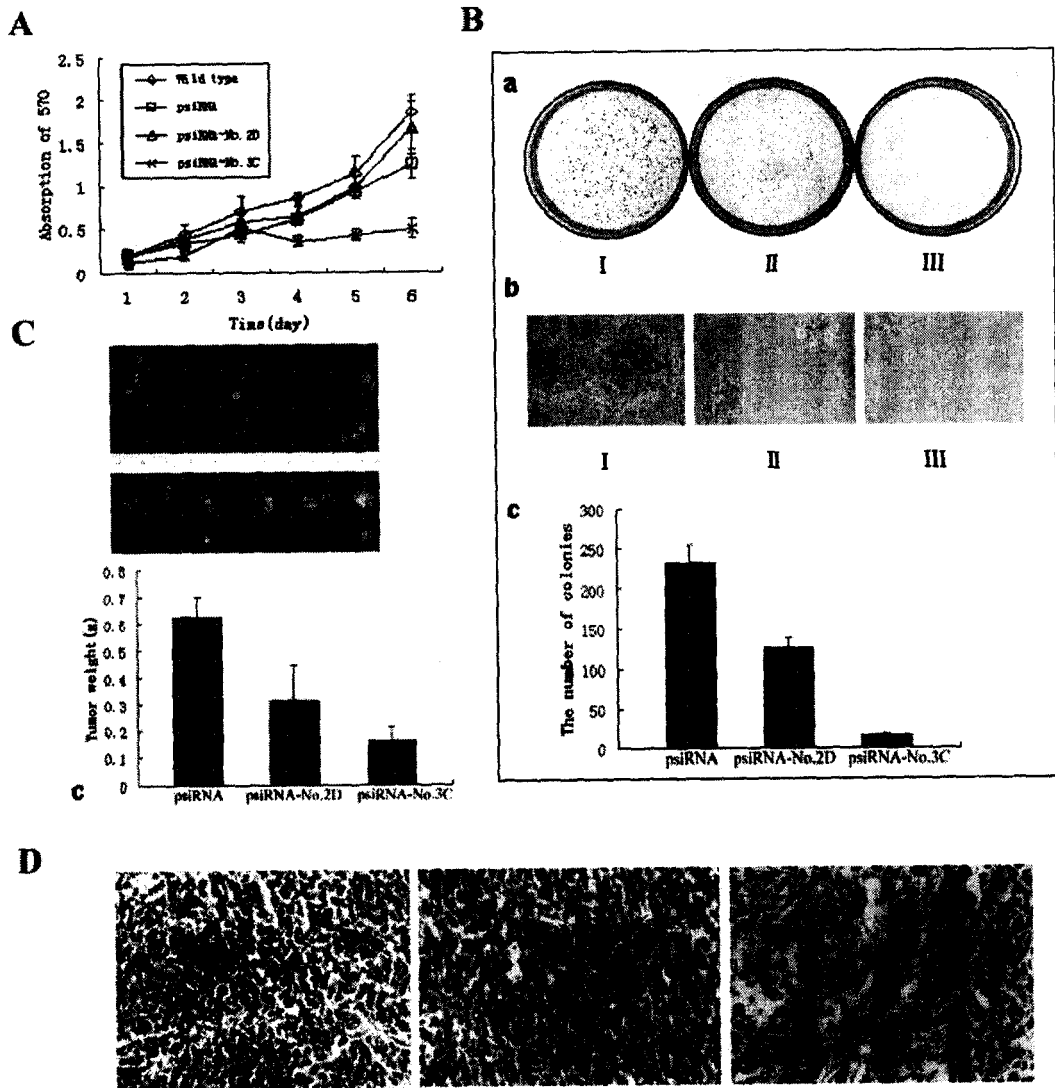


图 6

专利名称(译)	抗肿瘤特异性标志蛋白TS/MEDP的抗体制备及用途		
公开(公告)号	<a href="#">CN101168566A</a>	公开(公告)日	2008-04-30
申请号	CN200610150095.0	申请日	2006-10-26
[标]申请(专利权)人(译)	北京市肿瘤防治研究所		
申请(专利权)人(译)	北京市肿瘤防治研究所		
当前申请(专利权)人(译)	北京市肿瘤防治研究所		
[标]发明人	吕有勇 许小青 李文梅 梁云燕 樊晓军 王代树		
发明人	吕有勇 许小青 李文梅 梁云燕 樊晓军 王代树		
IPC分类号	C07K16/18 G01N33/53		
代理人(译)	罗会英		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了抗肿瘤特异性标志蛋白TS/MEDP的抗体制备及用途。利用分子细胞生物学技术，在胃癌细胞中克隆出一个新基因，命名为TS/MDEP。制备了抗TS/MDEP的多克隆抗体，通过抗体纯化技术获得了高特异性抗体。从mRNA和蛋白质水平验证了TS/MDEP基因在肿瘤细胞系和组织中的表达特征，确定其在包括胃癌细胞系在内的14株肿瘤细胞系中表达，并呈现细胞周期依赖性，在胃癌、乳腺癌和宫颈癌组织中过量表达而相应正常组织不表达，且在多种胚胎组织中表达。证实了TS/MDEP在细胞增殖旺盛的胚胎组织中高表达，成年后此基因被关闭，在肿瘤细胞中又出现高表达。TS/MDEP为周期特异性表达，提示TS/MDEP高表达导致细胞周期调控异常和参与肿瘤的发生发展。首次获得的抗TS/MDEP的抗体可用于监测细胞周期进程和胃肠肿瘤的临床生物学行为。

