



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109001456 B

(45) 授权公告日 2021. 07. 06

(21) 申请号 201810600529.5

(22) 申请日 2018.06.11

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109001456 A

(43) 申请公布日 2018.12.14

(73) 专利权人 南通大学
地址 226019 江苏省南通市啬园路9号
专利权人 南通大学附属医院

(72) 发明人 王丹 朱俐 张筱静 黄剑飞
杨磊

(74) 专利代理机构 南京申云知识产权代理事务
所(普通合伙) 32274
代理人 邱兴天

(51) Int. Cl.
G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 45/00 (2006.01)

(56) 对比文件

WO 2017203008 A1,2017.11.30

CN 101798600 A,2010.08.11

CN 106521022 A,2017.03.22

CN 105518151 A,2016.04.20

CN 102656458 A,2012.09.05

CN 105624796 A,2016.06.01

Jun Liang 等.Identification of stage-specific biomarkers in lung adenocarcinoma based on RNA-seq data.《Tumor Biology》.2015,第36卷(第8期),第6391-6399页.

审查员 张建敏

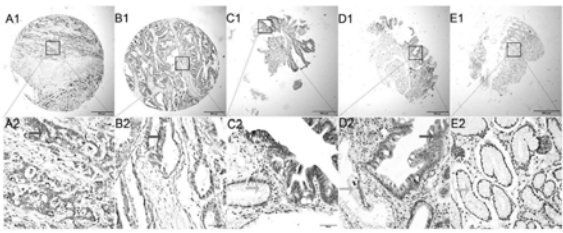
权利要求书1页 说明书10页 附图3页

(54) 发明名称

USH1G基因在制备抗胃癌药物及其诊断试剂盒中的应用

(57) 摘要

本发明公开了USH1G基因在制备抗胃癌药物及其诊断试剂盒中的应用。本发明通过临床胃癌临床样本组织芯片,免疫组化证实,USH1G在胃癌中表达增高,且与预后相关;同时通过临床胃癌组织样本,免疫印迹实验发现,USH1G在胃癌组织中的表达水平明显高于癌旁组织;此外通过体外细胞实验改变USH1G基因表达会影响胃癌细胞的生物学行为,利用特异性的siRNA序列有效抑制人胃癌细胞株USH1G蛋白的表达后,胃癌细胞株的侵袭能力降低。USH1G作为胃癌基因诊疗的靶点,在制备精准医疗的诊断试剂盒和用于治疗高表达USH1G的胃癌的药物中,将具有广泛的应用。



1. 靶向USH1G基因的siRNA在制备用于治疗胃癌的药物中的应用,其特征在于,所述药物包括以下三条siRNA序列:

USH1G#1:5' -CTGGGATGAGCTCGATTTA-3' ;

USH1G#2:5' -ATGGTGTTCCGCAGAAATT-3' ;

USH1G#3:5' -ACATGGAATGCGTGCGCTA-3' 。

USH1G基因在制备抗胃癌药物及其诊断试剂盒中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于癌症精准医疗药物技术领域,具体涉及USH1G基因在制备抗胃癌药物及其诊断试剂盒中的应用。

背景技术

[0002] 胃癌是全球常见的恶性肿瘤之一。胃癌的发病率和致死率在亚洲,尤其是中国、日本和韩国特别高。随着手术、化疗、放疗水平的提高,胃癌患者的生存率大幅提高。但是胃癌起病隐匿,缺乏特异性表现,早期诊断率低,确诊时多为中晚期,这些特征严重影响了胃癌患者的长期存活。随着对肿瘤发病机制分子水平研究的深入和分子生物学技术的发展,肿瘤治疗进入了一个全新分子靶向治疗时代。与传统全身化疗相比,肿瘤靶向治疗可以在无创或微创条件下高效、针对性地杀伤肿瘤细胞,具有患者易于接受、不良反应小,正常组织损伤少的优点。针对胃癌发生、发展有关的信号通路开发靶向药物应用于临床成为胃癌治疗研究的新热点。现已研发的一些针对不同靶点的药物在应用中显示了较好的疗效趋势,目前获准上市的胃癌靶向药物仅包含曲妥珠单抗(赫赛汀),该药针对的是Her2蛋白高表达的患者。第二种靶向药物是雷莫芦单抗,针对的是VEGFR2。探寻新的生物分子标志物来预测胃癌的进展,指导精准治疗,以改善患者生活质量,延长患者生命,具有重要的实际临床意义。

[0003] USH1G蛋白(Usher syndrome type IG,USH1G)是一种含锚蛋白重复序列和SAM域的支架蛋白,原名为SANS(scaffold protein containing ankyrin repeats and SAM domain,SANS)。目前仅有研究显示此基因突变能够引发IG型Usher综合症,故改名为USH1G。Usher综合征是一种常染色体隐性遗传疾病,临床表现为感音神经性听力损害和进行性视力丧失。USH1G的突变影响自身和myosin VIIA、USH1C以及CDH23的相互作用,从而导致疾病发生。但USH1G与人类恶性肿瘤的关系未见文献报道。

发明内容

[0004] 发明目的:本发明的目的是提供一种USH1G基因在制备用于胃癌诊断或预后判断的试剂盒中的应用。本发明的另一目的是提供一种上述USH1G基因在制备用于治疗胃癌药物中的应用,满足抗胃癌药物的使用需求。

[0005] 技术方案:为了实现上述发明目的,本发明采用的技术方案如下:

[0006] USH1G基因(NM 173477)在制备用于胃癌诊断的试剂盒中的应用。

[0007] USH1G基因在制备用于胃癌预后判断的诊断试剂盒中的应用。

[0008] USH1G基因在制备用于治疗胃癌的药物中的应用。

[0009] 所述药物以USH1G基因为靶点设计而成。

[0010] 所述药物包括以下三条siRNA序列:

[0011] USH1G#1:5'-CTGGGATGAGCTCGATTTA-3';

[0012] USH1G#2:5'-ATGGTGTTCCGCAGAAATT-3';

[0013] USH1G#3:5'-ACATGGAATGCGTGCGCTA-3' ;

[0014] 本申请回顾性收集701例胃病患者(包括慢性胃炎、肠化生、上皮内瘤样病变和胃癌)病理切片,发现USH1G蛋白在胃癌中表达明显高于非癌症组。统计其中具有完整临床与预后信息的520例胃癌病理组织芯片中USH1G的蛋白表达差异,并建立Cox比例风险回归模型。发现USH1G与胃癌TNM分期晚,预后差密切相关。同时在临床胃癌组织样本中发现USH1G在胃癌组织中的表达水平明显高于癌旁组织;此外体外实验干扰USH1G表达可抑制胃癌细胞的侵袭、迁移和黏附能力。这些临床数据和实验结果均表明,USH1G可成为胃癌精准诊疗提供有价值的新靶点。

[0015] 有益效果:与现有的技术相比,本发明采用组织芯片和免疫组化技术检测胃癌中USH1G的表达情况,发现USH1G蛋白的表达在胃癌组织中明显升高,且USH1G高表达组患者预后较差。同时获取临床胃癌组织样本,发现USH1G在胃癌组织中的表达水平明显高于癌旁组织;此外通过Western blot、划痕实验、Transwell小室、细胞黏附等技术,在体外试验中研究USH1G基因对胃癌细胞生物学行为的影响。结果发现特异性的siRNA序列可以有效抑制人胃癌细胞中USH1G蛋白的表达。RNA干扰抑制USH1G表达后,胃癌细胞侵袭迁移和黏附能力下降。USH1G是胃癌基因诊疗的一个靶点,在用于制备胃癌转移诊断试剂盒和治疗药物中将具有广泛的应用。

附图说明

[0016] 图1是IHC观察USH1G在胃癌及癌旁组织中的表达结果图;图中,A为中低度分化胃癌组织,B为高度分化胃癌组织,C为高级上皮内瘤变,D低级上皮内瘤变,E为正常胃粘膜上皮组织;

[0017] 图2是USH1G的表达与胃癌患者预后的关系图;

[0018] 图3是比较12对胃癌及癌旁组织中USH1G的表达水平结果图;图中,A利用Western blot法检测胃癌及其癌旁组织中USH1G的蛋白水平,Histone H3为内参,B是A的量化柱形图;

[0019] 图4是siRNA干扰胃癌细胞后,USH1G的表达情况结果图;图中,A是将siRNA NC(Negative Control)和USH1G siRNA干扰片段转染至胃癌细胞HGC27,B指转至AGS,48h后检测细胞中USH1G的蛋白表达水平;

[0020] 图5是Transwell小室实验观察USH1G对胃癌细胞侵袭能力的影响结果图;

[0021] 图6是划痕实验观察USH1G对胃癌细胞迁移能力的影响结果图;

[0022] 图7是细胞基质黏附实验观察USH1G对胃癌细胞侵袭能力的影响结果图。

具体实施方式

[0023] 下面结合具体实施例对本发明做进一步的说明。

[0024] 以下实施例中使用的主要试剂为:

[0025] (1) 二步法免疫组化检测试剂盒:基因科技上海有限公司;兔抗人USH1G多克隆抗体(免疫组化试验用):abcam公司;辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗(免疫组化试验用):美国CST公司;0.01mol/L柠檬酸缓冲液(pH6.0):北京中山生物技术有限公司;DAB:美国Sigma公司;二甲苯、中性树胶等由病理科提供。DAB工作液:DAB粉剂20mg溶解于

50mL 0.01mol/L PBS 中,再用定性滤纸过滤,保存在棕色瓶中(使用前配制);根据需要加入由 0.01mol/L PBS 液配制的 3% H_2O_2 数滴帮助显色。

[0026] (2) 细胞培养及转染所需试剂:DMEM 高糖、1640 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶:美国 HyClone 公司;LipofectamineTM2000:美国 Invitrogen 公司;RPMI-1640 完全培养液:分别加入 RPMI-1640 与胎牛血清混匀,使其终浓度分别为 90%,10%, $1\times$,4℃ 保存。细胞冻存液:将 RPMI-1640 完全培养液、胎牛血清和 DMSO 按 5:4:1 比例配制,4℃ 保存。

[0027] (3) Western blot 实验试剂: $1\times$ TBST:取 Tris 2.42g、NaCl 8.0g、Tween-20 0.5mL,混合溶解,定容至 1L,常温保存。 $1\times$ 转膜 Buffer:甘氨酸 14.4g、Tris 3.03g,加适量双蒸水搅拌溶解,再加 200mL 无水甲醇,定容至 1L,混合均匀(用时配制)。封闭液 100mL:取脱脂奶粉 5g,加入 100mL $1\times$ TBST,混合溶解即可(需用时配制)。BCA 蛋白测定试剂盒:BioSharp;兔抗人 USH1G 多克隆抗体(Western blot 试验用):abcam 公司;辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗(Western blot 试验用):美国 CST 公司;ECL 发光试剂盒:美国 ThermoFisher 公司。

[0028] 以下实施例中使用的主要仪器如下:

[0029] 组织芯片制作仪:美国 Beecher Instruments 公司;自动免疫组化染色仪(2D):美国 LABVISION 公司。倒置相差显微镜:德国 Leica 公司;凝胶成像系统:美国 BIO-RAD 公司;多功能酶标仪:美国 Thermo 公司;正置、倒置荧光显微镜:日本 Olympus 公司。样品快速制备系统:美国 Millipore 公司。

[0030] 实施例 1 USH1G 在胃癌组织中的表达研究

[0031] 1、免疫组织化学法标本:

[0032] 520 例胃癌组织切片标本、相应 59 例癌旁组织及 121 例慢性胃炎组织切片标本,所有切片组织均取自南通大学附属医院病理科档案库。这些组织切片来自于 2004 年 1 月~2010 年 12 月在南通大学附属医院进行住院手术治疗的患者。所有患者术前均未经过放、化疗,临床数据(包括年龄、分期、肿瘤大小、分化、淋巴结转移、远处转移和 TNM 分期)均有书面记录。所有组织标本均常规 10% 中性福尔马林固定,石蜡包埋,蜡块经筛选无明显缺陷,制作成厚度为 4mm 厚的组织芯片共五张,置于冰箱 4℃ 冷藏室储存备用。

[0033] 1) 组织芯片的制作

[0034] 所有标本均用 10% 甲醛固定,石蜡包埋,蜡块经过筛选无明显缺陷。制作成组织芯片。主要流程为:

[0035] (1) 根据 HE 染色切片的镜检结果,在蜡块上有代表性的癌巢区域作标记。

[0036] (2) 1:1 混合石蜡与蜂蜡,制作空白受体蜡块。在蜡块上设计 10×7 孔的组织阵列,然后用组织芯片仪制成 TMA 空白蜡块。

[0037] (3) 将供体蜡块在标记的点上选取最有代表性的癌巢区域,取直径 2mm 的组织块,每例各取 1 个芯。

[0038] (4) 将取好的组织芯转移到受体蜡块的孔中,并取相应癌旁组织做对照。

[0039] (5) 组织阵列块在 55℃ 的恒温烤箱中加热融合 10min,在快融化之前放至室温冷却,使受体蜡块与供体组织融为一体。

[0040] (6) 将组织芯片置于 4℃ 条件下冷冻 4h 左右,随后用全自动组织切片机对组织阵列块进行修正,速度为 20mm/转,等修到所有组织芯完全暴露。

[0041] (7) 切片机对组织阵列块进行切片,将连续切片分别漂在凉水中,使其自然展开,

再将切片转移至45℃温水中展片2min左右,待展开后将其贴在经过防脱片处理的载玻片上晾干。

[0042] (8) 将切片置于60℃的环境下烤片3min,58℃继续烤片16h。

[0043] (9) 将做好的组织芯片保存于切片盒,置于冰箱4℃冷藏室备用。

[0044] 2) 免疫组化染色(EnVision两步法)

[0045] (1) 常规脱蜡水化:脱蜡前,将组织芯片放在60℃的恒温箱中,烘烤约20min。将已干燥的组织芯片浸于二甲苯中10min 2次。取出后进行梯度酒精脱水,100%乙醇10min,95%乙醇10min,80%乙醇10min,70%乙醇10min,流水冲洗组织芯片。

[0046] (2) 将组织芯片置于耐高温切片架上,置于pH为6.0的柠檬酸盐缓冲液,高温抗原修复5min,自然冷却至室温后用PBS冲洗3次,每次5min。

[0047] (3) 取出蒸馏水中的芯片,滴加30% H_2O_2 避光孵育20min,以消除内源性过氧化物酶的活性。蒸馏水冲洗,再将芯片置入PBS缓冲液中浸泡5min,总共3次,然后取出甩干。

[0048] (4) 滴加200 μ L的兔抗人USH1G多克隆抗体工作液(稀释比例为1:50)于组织芯片上,在4℃条件下过夜。

[0049] (5) 第二天,取出组织芯片,复温1h,后置入PBS缓冲液中浸泡5min,一共3次,之后取出甩干。

[0050] (6) 在组织芯片上滴加200 μ L的二抗工作液,于室温孵育30min,将组织芯片置于PBS缓冲液中浸泡5min,一共3次,之后取出甩干。

[0051] (7) 滴加准备好的显色剂DAB工作液,光镜下控制显色程度,显色完全后,立即用蒸馏水冲洗,终止显色。

[0052] (8) 室温下用苏木素复染2min,用蒸馏水流水震洗后甩干。

[0053] (9) 芯片脱水,透明,封片。

[0054] (10) 光镜下观察免疫组化染色结果,细胞相应部位出现棕黄色作为阳性表现。

[0055] 3) 结果判断:

[0056] 免疫组化结果判断采用双盲法,由两位经验丰富的病理科医师对组织芯片上的染色结果进行独立评价。在400倍视野下,观测每张切片中具有代表性的区域,随机选取5个视野,计数500~1000个细胞,统计计算细胞的阳性率根据染色阳性的肿瘤细胞数目所占百分比计为0~100%,染色强度按肿瘤细胞着色的深浅计分:无着色为0分,黄色计1分,浅棕色计2分,棕褐色计3分。USH1G的最终染色得分为染色强度与阳性细胞染色面积的乘积。

[0057] 免疫组化染色结果如图1所示(A1-E1 $\times$ 40倍镜下;A2-E2 $\times$ 400倍镜下),图1A为中低度分化胃癌组织,图1B为高度分化胃癌组织,图1C为高级上皮内瘤变,图1D低级上皮内瘤变,图1E为正常胃粘膜上皮组织;图1A、图1B中,USH1G在胃癌组织的胞膜和胞质中的呈强阳性染色(红色箭头);图1C,图1D中,USH1G在上皮内瘤变的胞膜和胞质中的呈弱阳性染色(红色箭头);图1E中,USH1G在正常组织样本中呈阴性染色(绿色箭头)。可见,USH1G蛋白阳性主表达于腺癌组织的细胞质中,呈棕黄色。而癌旁组织和良性组织中USH1G低表达或无表达。胃癌组织USH1G蛋白表达阳性率为63.08%(328/520),癌旁组织表达阳性率15.25%(9/59)。良性组织中,慢性胃炎阳性率为0%(0/22),肠上皮化生为63.57%(25/43),低级上皮内瘤变27.27%(9/33),高级上皮内瘤变50.00%(12/24)。相关性统计学分析结果显示, $\chi^2=80.63$, $P<0.000$ (表1)。Kaplan-Meier生存曲线如图2所示,显示USH1G高表达组比USH1G

低表达组总体生存率低,*** $P < 0.001$ 。

[0058] 表1胃良性组织,胃癌和癌旁组织中USH1G IHC染色情况

[0059]	临床参数	例数	低表达 (%)	高表达 (%)	Pearson χ^2	P 值
	慢性胃炎	22	22 (100.00%)	0 (0.00%)		
	肠上皮化生	43	18 (32.43%)	25 (63.57%)		
	低级上皮内瘤变	33	24 (72.73%)	9 (27.27%)		
	高级上皮内瘤变	24	12 (50.00%)	12 (50.00%)		
	癌旁组织	59	50 (84.75%)	9 (15.25%)		
[0060]	胃癌	520	192 (36.92%)	328 (63.08%)		
	总数				80.63	< 0.000

[0061] USH1G表达与胃癌患者的预后关系分析用Kaplan-Meier生存分析(图2),所有检验结果 $P < 0.001$,为差异有统计学意义。由此可见,胃癌组织中USH1G蛋白的表达高于良性组织。USH1G高表达的胃癌患者预后比低表达的患者预后差。

[0062] 根据对520例胃癌患者生存率的随访资料,建立Cox生存回归模型。如表2所示,单因素分析结果显示USH1G ($P < 0.001$)、年龄 ($P = 0.040$)、胃癌分化程度 ($P = 0.003$)、TNM分期 ($P < 0.001$)均能影响患者的生存率。但多因素分析结果显示USH1G ($P < 0.001$)与TNM分期 ($P < 0.001$)起主要作用。

[0063] 表2胃癌患者5年生存率的单因素和多因素Cox分析

[0064]

	Univariate analysis				Multivariate analysis			
	HR	$P > z $	95% CI		HR	$P > z $	95% CI	
USH1G	3.609	<0.001*	2.680	4.859	2.	<0.001*	1.756	4.228
Age (years)	1.295	0.040*	1.012	1.657				
Gender	0.998	0.986	0.768	1.296				
Differentiation	1.306	0.003*	1.097	1.554			0.718	1.499
TNM stage	1.507	<0.001*	1.415	1.605	1.549	<0.001*	1.404	1.710
T	1.995	<0.001*	1.686	2.362				
N	1.709	<0.001*	1.544	1.891				
M	3.594	<0.001*	2.491	5.186				
Cea level	1.790	<0.001*	1.300	2.463	1.324	0.147	0.906	1.934
Ca199 level	2.449	<0.001*	1.690	3.548	1.		1.049	2.58

[0065] 2、蛋白免疫印迹法标本

[0066] 12对新鲜胃癌组织及其对应的癌旁组织由南通大学附属肿瘤医院提供。上述组织手术离体后立即去除坏死组织,用生理盐水冲洗血污,在30min内给以液氮冷冻处理,之后置于-80℃冰箱保存。

[0067] 1) 组织蛋白提取:

[0068] (1) 配置含抑制剂的蛋白质抽提试剂(1mL抽提试剂中加入5μL蛋白酶抑制剂混合液,5μLPMSF和5μL磷酸酶混合液)。

[0069] (2) 将组织从液氮或者-80℃冰箱中取出,称重,切小块放入管中。

[0070] (3) 加入预冷的含抑制剂的蛋白质抽提试剂(250mg组织中加入1mL抽提试剂)。

[0071] (4) 每管加入2粒钢珠,使用样品快速制备系统匀浆20s至组织完全裂解。

[0072] (5) 裂解液在预冷的离心机中14000g离心15min。上清液立刻转移入新的离心管中保存待用。

[0073] (6) BCA法测蛋白质浓度。

[0074] (7) 将提取的蛋白质保存于-80℃,或按4:1的比例将提取的蛋白质与5×SDS page loading buffer混合,迅速混匀,100℃煮沸5min,保存于-20℃。

[0075] 2) 凝胶电泳

[0076] (1) 将蛋白样品从-20℃取出,室温溶解,沸水煮5min,冷凝后离心备用。

[0077] (2) 用纯水冲洗从低温冰箱取出的凝胶,洗干净后放在电泳槽中。加入电泳缓冲液后,缓慢得垂直向上拔走凝胶的梳子。

[0078] (3) 清洗上样孔,将样品和Marker缓慢加入凝胶的上样孔。

[0079] (4) 开始电泳,先设置浓缩胶电压85V大概45min,Marker会分离开来,再设置分离胶电压为115V,根据需要停止电泳。

[0080] (5) 切胶,记住自己的上样顺序,将胶浸入转膜缓冲液中备用。

[0081] 3) 转膜

[0082] (1) 按上一步胶的尺寸剪下适当大小的PVDF膜,放于甲醇中,浸泡10s左右,浸泡时间不宜过长,然后将膜转移到转膜缓冲液中。

[0083] (2) 将PVDF膜和双层滤纸放在转膜缓冲液中平衡。按照黑-胶-膜的顺序夹好,中间避免产生气泡,然后向电泳槽内加入预冷的转膜缓冲液,电泳槽外侧用冰盒保证低温环境,根据目的蛋白分子量的不同,恒流350mA转膜,时间大概需要1-2h。

[0084] (3) 转膜结束后,小心取出PVDF膜,剪角来标记电泳方向及膜的正反面,有蛋白的一面为正面。

[0085] 4) 抗原抗体反应

[0086] (1) 将上一步中取出的PVDF膜放入5%脱脂牛奶中,室温摇床上封闭1-2h,时间不宜过长。

[0087] (2) 封闭结束,用1×TBS溶液漂洗PVDF膜,目的是为了去除PVDF膜上残留的牛奶。

[0088] (3) 封闭后将PVDF膜放于抗体孵育盒中,加入一抗稀释液稀释后的一抗,4℃摇床上过夜。

[0089] (4) 从冰箱中取出孵育盒和PVDF膜,用TBST溶液漂洗膜3遍,每遍5min。

[0090] (5) 将漂洗过的PVDF膜重新放于抗体孵育盒中,加入用5%脱脂奶粉稀释的荧光二抗(1:5000稀释),室温避光摇床上孵育1h。

[0091] (6) 从孵育盒中取出PVDF膜,TBST溶液漂洗膜3遍,每遍5min。

[0092] (7) 使用吸水纸将膜上的多余液体吸干,显影。

[0093] (8) 使用Image J图像处理软件对图像进行灰度统计分析。

[0094] 通过Western blot法,检测12对胃癌和其癌旁组织中USH1G的蛋白质表达水平。图3是比较12对胃癌及癌旁组织中USH1G的表达水平;图3A利用Western blot法检测胃癌及其癌旁组织中USH1G的蛋白水平,Histone H3为内参;图3B是图3A的量化柱形图;结果发现USH1G在胃癌组织中表达明显高于对应的癌旁组织。

[0095] 实施例2USH1G在胃癌细胞中的功能研究

[0096] 1、siRNA设计

[0097] 针对人USH1G的三段不同的siRNA序列及阴性对照siRNA(negative control,NC),由吉凯(genechem)公司设计并完成,序列如下:

[0098] USH1G#1:5'-CTGGGATGAGCTCGATTTA-3';

[0099] USH1G#2:5'-ATGGTGTTCGCAGAAATT-3';

[0100] USH1G#3:5'-ACATGGAATGCGTGCGCTA-3';

[0101] NC:5'-TTCTCCGAACGTGTCACGT-3'。

[0102] 2. 胃癌细胞株HGC27、AGS的培养

[0103] 1) 细胞复苏

[0104] (1) 从-80℃低温冰箱或者液氮罐中取出冻存的细胞,迅速放入37℃水浴锅中快速晃动,1min内使管中液体完全溶解。

[0105] (2) 将冻存管中的液体移至无菌的EP管中,加入4mL完培,充分混匀,室温1000rpm离心5min。

[0106] (3) 弃去管中上清液体,加入2mL完培重悬底部沉淀,将混悬液加入新的培养皿中,补充足量的完培。

[0107] (4) 放入细胞培养箱中培养,24h后显微镜下观察细胞状态,细胞完全贴壁后弃去原有培养基,换上新鲜的完全培养基。

[0108] 2) 细胞传代

[0109] (1) 待细胞生长至密度达到80%~90%时开始准备传代。

[0110] (2) 弃去原有培养液,无菌的PBS小心清洗细胞3次。

[0111] (3) 加入适量胰酶,消化细胞,在显微镜下观察,等到细胞突触收回,整体变圆时加入PBS稀释过的小牛血清终止消化。

[0112] (4) 用枪头小心吹打培养瓶或培养皿中的贴壁细胞,将细胞悬液吸取至无菌的EP管中,室温1000rpm离心5min。

[0113] (5) 离心结束后,弃去上清,可根据需要重复洗2到3次,加入完培重悬沉淀。

[0114] (6) 将细胞混悬液转至新的培养瓶或培养皿中,补足培养液。

[0115] 3) 细胞冻存

[0116] (1) 弃去细胞原有培养基,加入无菌PBS小心洗细胞3次。

[0117] (2) 加入胰酶消化,小牛血清终止消化后收集细胞。

[0118] (3) 室温1000rpm离心5min。

[0119] (4) 离心结束后,弃去上清,可根据需要重复洗2到3次,加入提前配好的细胞冻存液(含90%胎牛血清,10%DMSO)将细胞重悬。

[0120] (5) 分装进细胞冻存管,每管1mL,先4℃放置45min,再-20℃放置60min(待液体凝固),最后将细胞转移至-80℃过夜,最后移至液氮保存。

[0121] 3. 细胞转染siRNA片段(以35mm培养皿为例)

[0122] (1) 将状态良好的指数增长期的细胞接种到培养皿中,密度在30%~50%为佳。

[0123] (2) 为了获得最佳的基因干扰效果,在正式试验之前,每种细胞转染siRNA的量都经过预实验的确定。前期的实验确定siRNA使用量为20μM 10μL/小皿。

[0124] (3) 稀释转染试剂:50μL Opti-MEMI培养基加入5μL Lipofectamine™2000转染试剂,轻柔混匀。

[0125] (4) 稀释干扰片段:50μL Opti-MEMI培养基加入20μM siRNA 10μL,轻柔混匀。

[0126] (5) 制备转染复合物:轻柔混匀(2)和(3),室温静置5-10min。

[0127] (6) 弃去小皿中原有培养基,PBS清洗细胞2次,每小皿加入1.9mL不含双抗的新鲜培养基。

[0128] (7) 将上一步制备的转染复合物逐滴加入到细胞培养皿中,轻柔混匀后放入细胞培养箱中孵育48-96h。

[0129] 4. Transwell小室观察细胞侵袭能力

[0130] (1) 实验分四组:siRNA-NC,USH1G siRNA#1,USH1G siRNA#2和USH1G siRNA#3,每组设3个复孔。

[0131] (2) 取培养至对数生长期细胞,常规消化,重悬细胞,以 2.5×10^5 /孔接种于六孔板

上,待细胞融合达70%~90%时使用Lipofectamine™2000试剂转染(转染步骤同上)。

[0132] (3) 取Transwell小室,上室面覆以Matrigel胶(Matrigel胶:RPMI-1640培养基=1:4) 50μl/孔,将小室放入24孔板,使用前37℃孵育1h。

[0133] (4) 转染48h后,常规消化,重悬各组细胞,以200μl/孔接种于覆盖Matrigel胶的小室内,下室为含20%胎牛血清的RPMI-1640培养液600μl,37℃、5%CO₂培养箱中孵育24h。

[0134] (5) 孵育结束后,取出小室,PBS洗两遍,用棉签轻轻拭去上室滤膜内侧面贴壁细胞,PBS洗两遍。

[0135] (6) 将滤膜用甲醇固定10min,吸去固定液,将膜风干,每孔加入500μl结晶紫染液,室温置放15min,除去染色液。PBS洗两遍,将上室取出,自然干燥。

[0136] (7) 正置荧光显微镜下计数膜背面迁移的细胞数,计数每张膜的中央部分和周围部分随机3个视野,实验重复三次,计算平均值。

[0137] 5. 细胞划痕实验

[0138] (1) 培养板接种细胞之前先用marker笔在12孔板背面画横线标记(方便拍照时定位同一个视野)。

[0139] (2) 细胞消化后接入12孔板,数量以贴壁后铺满板底为宜(数量少时可培养一段时间至铺满板底)。

[0140] (3) 用200μL枪头垂直于孔板制造细胞划痕,尽量保证各个划痕宽度一致。

[0141] (4) 吸去细胞培养液,用PBS冲洗孔板三次,洗去划痕产生的细胞碎片。

[0142] (5) 加入无血清培养基,拍照记录。

[0143] (6) 将培养板放入培养箱培养,每隔12h取出拍照。根据收集图片数据分析实验结果。

[0144] 6. 细胞基质黏附实验

[0145] (1) 无血清培养基RPMI-1640将Matrigel(人工基底膜胶)配制成0.04μg/μL的人工基底膜胶备用。

[0146] (2) 96孔板每孔中铺Matrigel 2μg,放于超净台中风干过夜。

[0147] (3) 每孔加入适量无血清RPMI-1640细胞培养液,放置60~90min,洗去多余的胶。

[0148] (4) 取培养的肿瘤细胞以40000/孔接种在铺胶的96孔板中,设3个重复孔。

[0149] (5) 放入37℃、5%CO₂培养箱中培养2h。

[0150] (6) 吸去培养液,PBS洗三遍将未黏附的细胞除去。

[0151] (7) 用甲醇固定15min后,吸去固定液。

[0152] (8) 每孔加入适量结晶紫染液,室温置放30min。除去染色液,PBS洗两遍,拍照分析。

[0153] 本实施例在胃癌细胞HGC27和AGS中转染USH1G siRNA的干扰片段,共计3个。Westernblot结果如图4所示,将siRNANC(Negative Control)和USH1G siRNA干扰片段转染至胃癌细胞HGC27(图4A)和AGS(图4B),48h后检测细胞中USH1G的蛋白表达水平;结果显示,转染USH1G siRNA#1-3之后,HGC27和AGS细胞中USH1G的蛋白表达明显低于对照组siRNANC,说明设计的3组针对USH1G基因的siRNA干扰片段均能下调USH1G的表达。通过Transwell、划痕和黏附系列实验,结果如图5-7所示,图5是Transwell小室实验观察USH1G对胃癌细胞侵袭能力的影响结果,图6是划痕实验观察USH1G对胃癌细胞迁移能力的影响结果,图7是细胞基

质黏附实验观察USH1G对胃癌细胞侵袭能力的影响结果,表明转染USH1G-siRNA的胃癌细胞与siRNA-NC相比,细胞的侵袭、迁移和黏附能力均受到明显抑制。

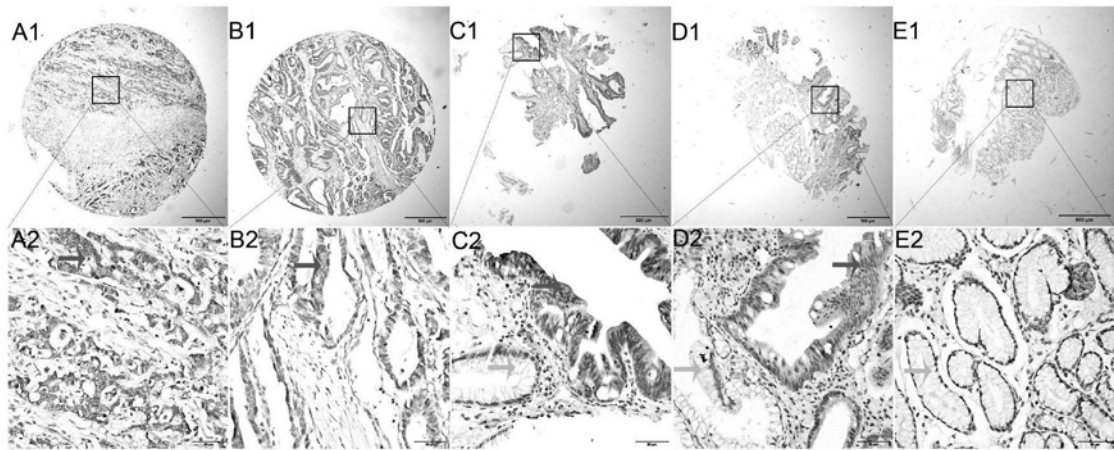


图1

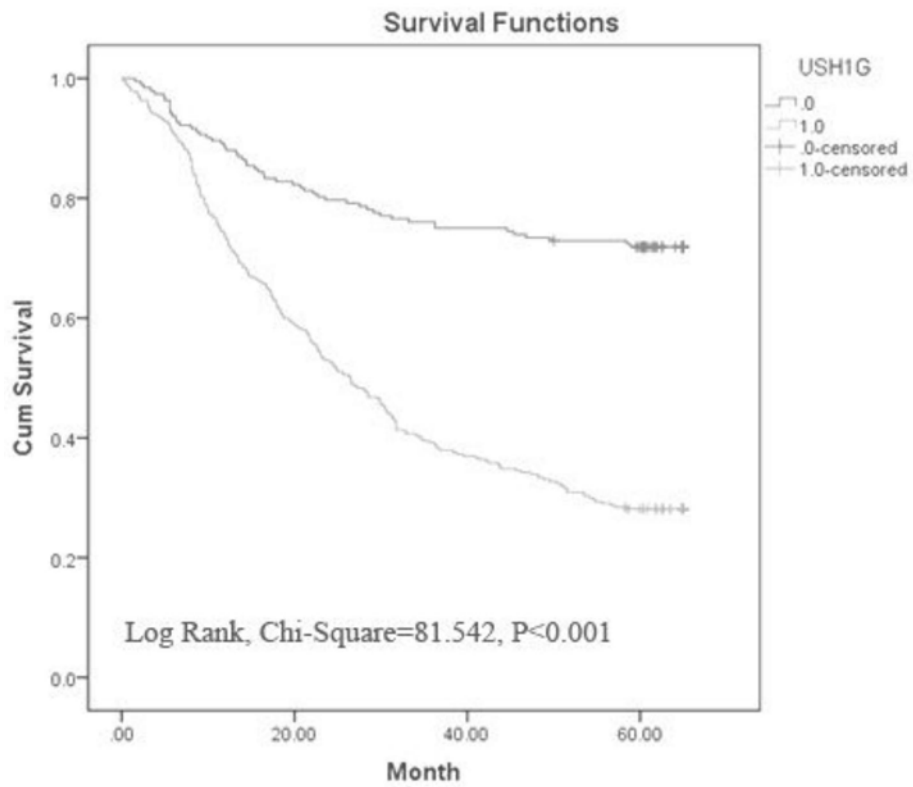


图2

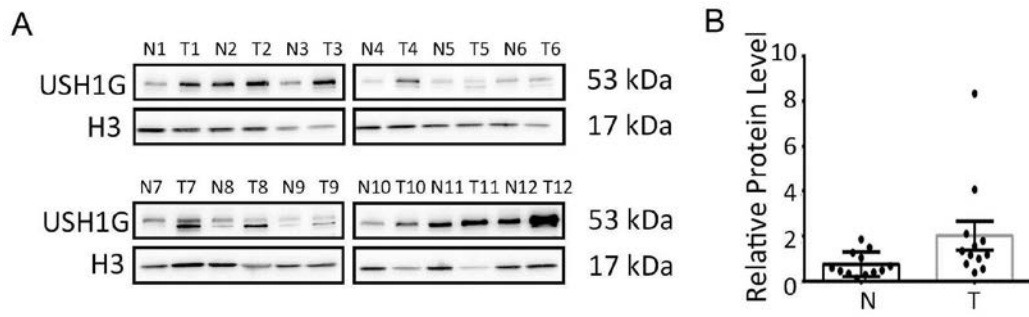


图3

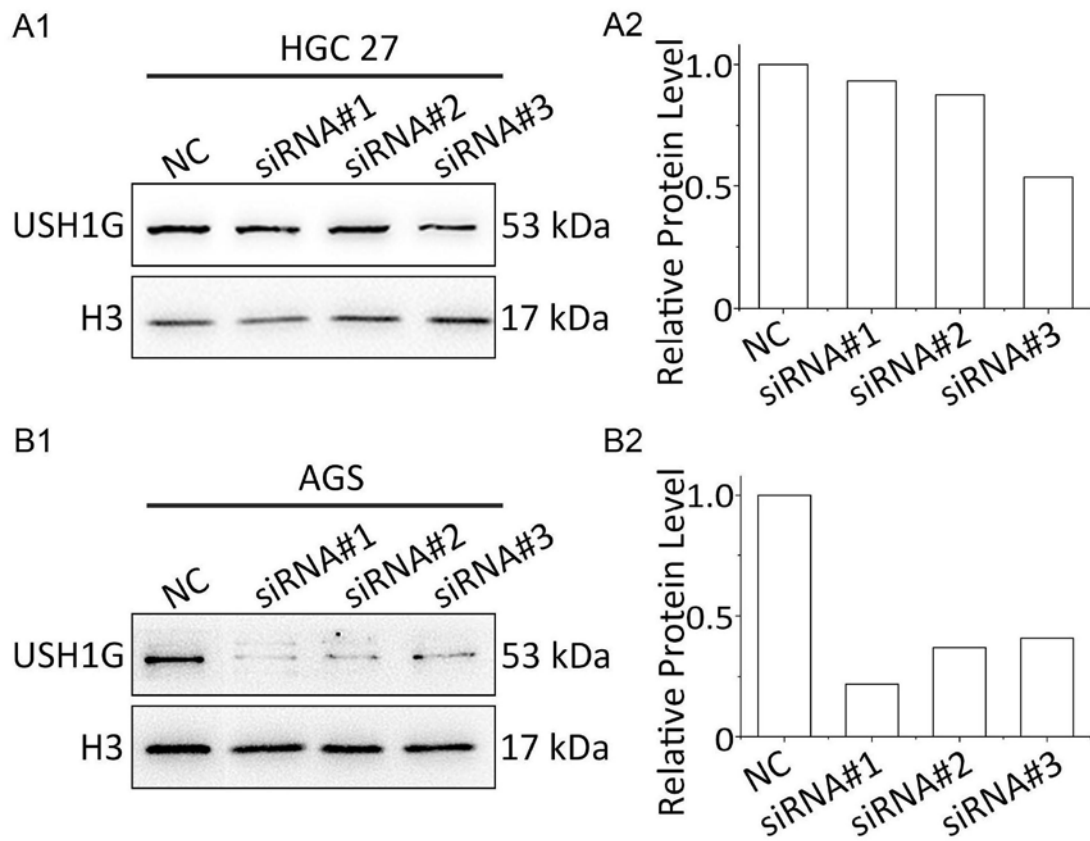


图4

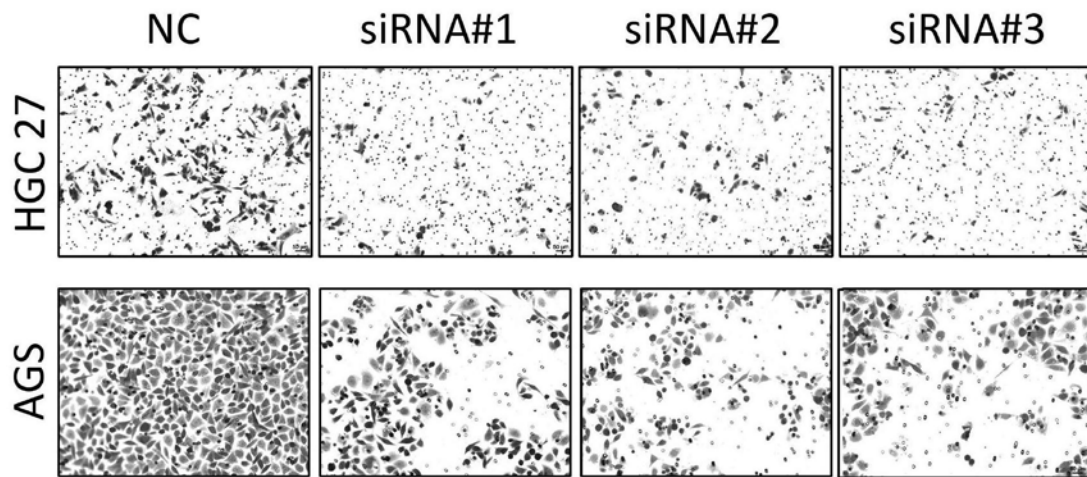


图5

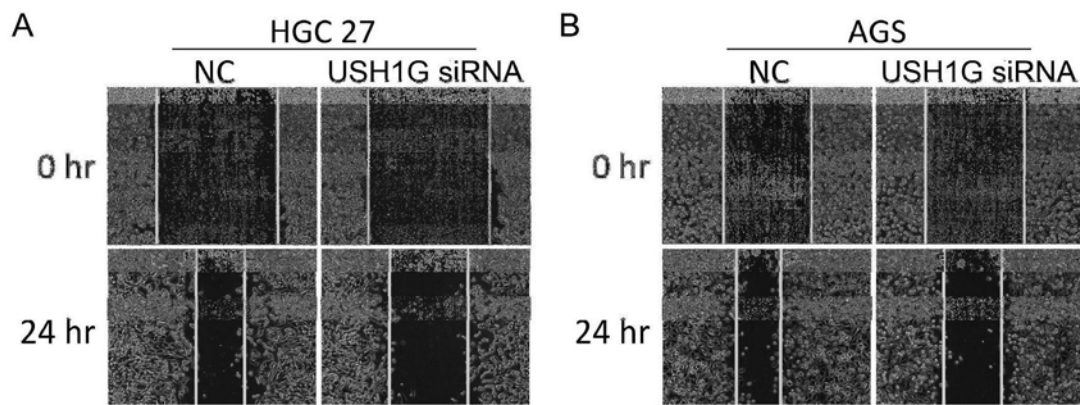


图6

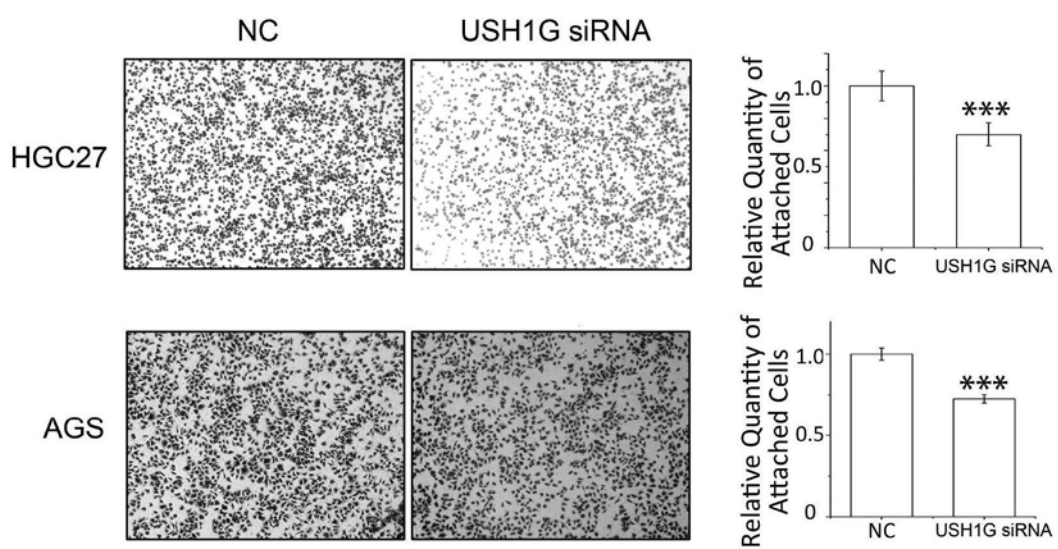


图7