



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105802964 A

(43)申请公布日 2016.07.27

(21)申请号 201610251595.7

(22)申请日 2016.04.21

(71)申请人 中国科学院生物物理研究所
地址 100101 北京市朝阳区大屯路15号

(72)发明人 李翀 郝俊峰 李书成 孟姝
田勇 韩玉刚 林开粟 朱虹

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

代理人 吴小明

(51)Int.Cl.

C12N 15/11(2006.01)

C12Q 1/68(2006.01)

权利要求书1页 说明书10页
序列表1页 附图2页

(54)发明名称

一种用于肝细胞癌筛查的cRNA-FUT8的检测
及其应用

(57)摘要

本发明主要关于一种可供肝细胞癌筛查的cRNA-FUT8的检测及其应用,具体方法是以基因芯片技术,通过进行癌及癌旁组织细胞cRNA-FUT8表达谱差异分析,筛选到一条在人肝细胞癌组织中明显高表达的环状RNA,cRNA-FUT8。相对于癌旁正常组织,该环状RNA在人肝细胞癌组织中显著高表达,并以实时定量PCR、Northern Blot实验进一步证实cRNA-FUT8在人肝细胞癌组织中的表达量明显高于正常组织。这一新近研究的cRNA-FUT8将为肝细胞癌复发及转移机制的研究提供新的视角,也为肝细胞癌的诊断、预后及治疗提供了新的评价指标和干预靶点。

1. 一种环状RNA, 名称为cRNA-FUT8, 其对应的cDNA序列如SEQ ID No.1或其互补序列所示。
2. 根据权利要求1所述的环状RNA, 其在肝细胞组织中、特别是在肝细胞癌组织中相对于癌旁正常组织高表达。
3. 权利要求1所述的环状RNA(cRNA-FUT8)用于制备诊断肝细胞癌的诊断剂或试剂盒的用途。
4. 能够检测权利要求1所述的环状RNA(cRNA-FUT8)的表达的试剂在制备诊断肝细胞癌的诊断剂或试剂盒中的用途。
5. 一种用于诊断肝细胞癌的试剂盒, 其包括:
 - 1) 用于扩增权利要求1所述的环状RNA(cRNA-FUT8)的特异性引物对;
 - 2) 标准DNA模板; 和
 - 3) PCR反应液。
6. 根据权利要求5所述的试剂盒, 其中所述特异性引物对包括上游引物和下游引物, 其中上游引物序列为SEQ ID No.2, 下游引物序列为SEQ ID No.3。
7. 根据权利要求5所述的试剂盒, 其中所述试剂盒为荧光定量PCR检测试剂盒, 所述引物适用于SYBR Green、TaqMan探针、分子信标、双杂交探针和/或复合探针的检测。
8. 根据权利要求5所述的试剂盒, 其中所述试剂盒中的PCR反应液为荧光定量PCR反应液, 并进一步包含荧光染料, 优选所述荧光定量PCR反应液包括dNTP、 Mg^{2+} 、Taq酶及缓冲液, 所述荧光染料为SYBR Green II, 和/或Taq酶为热启动酶。
9. 一种检测长链非编码RNA的方法, 所述方法包括以下步骤:
 - 1) 提取样品总RNA;
 - 2) 制备样品cDNA; 和
 - 3) 定量扩增cRNA-FUT8。
10. 权利要求1所述的环状RNA(cRNA-FUT8)用作肝细胞癌治疗药物的靶点的用途。

一种用于肝细胞癌筛查的cRNA-FUT8的检测及其应用

技术领域

[0001] 本发明归类于肿瘤分子生物学领域,主要用于一种环状RNA的检测及应用,具体来说,本发明关于一种环状RNA,即cRNA-FUT8在制备辅助诊断、预后评估甚至是治疗肝细胞癌的相关制剂中的应用。

背景技术

[0002] 肝细胞癌(Hepatocellular carcinoma,HCC)(简称肝癌)是全球最常见的恶性肿瘤之一,在男性的癌症死因中,肝癌位列第二,超过胃癌而仅次于肺癌,并且其发病率在稳定上升,而我国的肝癌患者发病人数占全球发病总数一半。肝癌具有“早期诊断困难”、“复发率高”、“预后差”的问题,其发病迅速隐匿,大部分肝癌患者的确诊是在晚期。这时候除了手术外,往往没有可选用的治疗方法,且手术疗效十分有限,其中位生存时间仅为数月。此外,HCC复发率高,术后两年内患者复发率可高达62%—82%。

[0003] 肝细胞癌早期有效诊断困难、肿瘤发展迅速隐匿、复发率高,手术等治疗效果有限,因此,发掘新型肿瘤标志物作为肝细胞癌诊断与治疗的靶点尤为重要。环状RNA(circularRNA,circRNA),又叫环形RNA,是近两年确认的一类特殊的非编码RNA(non-codingRNA,ncRNA)分子,两年来,circRNA迅速成为非编码RNA家族中的研究热点。circRNA是一类主要由2个及以上外显子构成的环形RNA分子,大量存在于真核细胞,具有一定的组织、时序和疾病特异性。早期circRNA被认为是错误可变剪接而形成的副产品,属于自然界中一种极罕见现象。随着RNA高通量测序等技术的快速发展,人们在大规模研究转录组数据时发现,circ RNA大量存在于真核细胞中。在真核生物中存在一种反向的可变剪接,使得基因的外显子序列反向首尾连接形成环形RNA。研究发现,circRNA可充当miRNA海绵,竞争性抑制miRNA的转录,从而参与转录后调控。此外,circRNA也可能与RNA结合蛋白结合或者与其他RNA通过碱基互补配对。circRNA与疾病关联的miRNA相互作用从而在疾病中发挥着调控作用。因此,环状的表达失控可能影响甚至决定肿瘤的进展及预后。基于这点,或可探究circRNA作为肿瘤临床诊断的标志物,甚至可发掘其成为肿瘤治疗的生物靶点。

发明内容

[0004] 本发明用基因表达谱芯片技术,对癌及癌旁组织细胞环状进行差异性表达谱的分析,筛选出在人肝细胞癌高表达的circRNA。circRNA转录区域位于14号染色体,全长431bp。与癌旁正常组织相比,circRNA在人肝细胞癌细胞中高表达,并以实时定量PCR、Northern Blot实验进一步证实circRNA在人肝细胞癌间质细胞中的表达量明显高于正常组织。这一新型的cRNA-FUT8将为肝细胞癌复发及转移机制的研究提供新的视角,也为肝细胞癌的诊断、预后及治疗提供了新的评价指标和干预靶点。

[0005] 发明人提供的3对肝细胞癌和癌旁组织,通过SIGMA公司的TRIZOL试剂(货号T9424)所需步骤提取总RNA后,采用上海康成生物工程有限公司代理的ArrayStar公司的cRNA-FUT8芯片产品(Human cRNA-FUT8Microarray V3.0 Service)进行检测,筛选出一条

在肝细胞癌组织中显著高表达的cRNA-FUT8,命名为cRNA-FUT8,其核苷酸序列如SEQ ID No.1所示。后期经过28对人肝细胞癌与癌旁组织样本荧光定量PCR验证,发现26对样本中,肿瘤组织的cRNA-FUT8显著高于癌旁组织。cRNA-FUT8作为肝细胞癌的新靶点,为肝细胞癌的临床治疗和药物开发提供理论基础。

[0006] 具体而言,本发明的第一个方面提供一种在肝细胞癌组织中高表达的cRNA-FUT8,其名称为cRNA-FUT8,其对应的cDNA的核苷酸序列如SEQ ID No.1(5'→3'方向)或其互补序列所示。所述cRNA-FUT8可以是分离的和/或人工合成的。

[0007] 本发明的第二个方面提供本发明第一个方面所述cRNA-FUT8用于制备诊断肝细胞癌的药物或试剂盒的用途。还提供了能够检测权利要求1所述的环状RNA(cRNA-FUT8)的表达的试剂(如靶向其的特异性引物对)在制备诊断肝细胞癌的诊断剂或试剂盒中的用途。

[0008] 在一个优选的实施方案中,所述cRNA-FUT8用于肝细胞癌的辅助诊断。

[0009] 本发明的第三个方面提供一种用于诊断肝细胞癌的试剂盒,其中包括:

[0010] 1)用于扩增cRNA-FUT8的特异性引物对;

[0011] 2)标准DNA模板(例如来自肝组织的样品cDNA);

[0012] 3)PCR反应液。

[0013] 在一个优选的实施方案中,所述特异性引物对包括上游引物和下游引物,上游引物序列为SEQ ID No.2,下游引物序列为SEQ ID No.3。

[0014] 在一个更优选的实施方案中,所述试剂盒为荧光定量PCR检测试剂盒,所述引物适用于SYBR Green、TaqMan探针、分子信标、双杂交探针、复合探针的检测。

[0015] 在一个更优选的实施方案中,所述试剂盒中的PCR反应液为荧光定量PCR反应液,并进一步包含荧光染料。

[0016] 在一个更优选的实施方案中,所述荧光定量PCR反应液包括dNTP、Mg²⁺、Taq酶及buffer缓冲液,所述荧光染料为SYBR Green II,Taq酶为热启动酶。

[0017] 本发明的荧光定量PCR试剂盒适合于目前存在市场上的所有类型荧光定量基因扩增仪,灵敏度高,特异性好,具有良好的应用前景。

[0018] 本发明的第四个方面提供一种检测长链非编码RNA的方法,所述方法包括以下步骤:

[0019] 1)提取样品总RNA;

[0020] 2)制备样品cDNA;

[0021] 3)扩增cRNA-FUT8。

[0022] 在一个优选的实施方案中,所述方法包括如下步骤:

[0023] 1)提取样品总RNA:按照SIGMA公司的TRIZOL试剂(货号T9424)所需试剂及步骤提取总RNA,再用7300实时PCR系统核算定量仪定量(Applied Biosystems AB)定量所提取的RNA的纯度和浓度。

[0024] 2)制备样品cDNA:采用北京康润诚业生物科技有限公司StarScript II One-step RT-PCR试剂盒(货号A215-01)对提取的总RNA反转录合成cDNA。

[0025] 第一步打开RNA二级结构,反应体系及条件如下:

[0026]

试剂	用量
----	----

Oligo dT	1ul
RNA	1-2ug
DEPC水	补齐至20ul

[0027] 将上述组分混合后70度反应5min然后冰浴10min

[0028] 第二步反转录反应,反应体系及条件如下:

[0029]

试剂	用量
2.5mM dNTP	2.5ul
5×RT buffer	6ul
HPR(RNase抑制剂)	0.6ul
MLV(逆转录酶)	0.4ul

[0030] 将上述组分混合均匀后42℃孵育1h,然后70度灭活10min,即得到cDNA。

[0031] 3)扩增cRNA-FUT8:采用北京康润诚业生物科技有限公司2×RealStar Power SYBR Mixture UNG荧光定量试剂盒(货号A312),以反转录的cDNA为模板进行荧光定量PCR扩增。

[0032] 荧光定量PCR体系:

[0033]

试剂	用量
2×MIX	10ul
50×ROX	2ul
引物	各1ul
DNA模板	1ul
RNase Free ddH ₂ O	补齐至20ul

[0034] 荧光定量PCR程序:95℃30s预变性,接40个循环:95℃30s,60℃30s。

[0035] 通过对阳性样品的检测,发现本发明定量试剂盒检测准确率为83%-87%,连续3次重复实验,实验结果稳定。

[0036] 本发明的第五个方面提供一种辅助检测肝细胞癌的方法,所述方法包括以下步骤:

[0037] 1)提取样品总RNA;

[0038] 2)制备样品cDNA;

[0039] 3)定量扩增cRNA-FUT8,并根据相对定量结果进行判断。

[0040] 本发明的第六个方面提供本发明第一个方面所述的cRNA-FUT8用作肝细胞癌药物的新靶点的用途。

[0041] 本发明还公开了一种检测肝细胞癌的染料类荧光定量PCR试剂盒的使用方法,荧光定量PCR体系:

[0042] 上游引物;下游引物各1ul(10uM);DNA模板cDNA 1ul;50XROX 2ul;2×SYBR Green II 10uL,加离子水至5uL。荧光定量PCR程序:95℃30s预变性,接40个循环:95℃30s,60℃30s。

附图说明

[0043] 图1.cRNA-FUT8芯片聚类图,显示6对肝细胞癌与癌旁组织差异表达的cRNA-FUT8芯片聚类。

[0044] 图2.针对cRNA-FUT8的序列设计的1对特异性引物PCR扩增后行琼脂糖凝胶电泳测试引物的效果。

[0045] 图3.28例肝细胞癌临床样本的cRNA-FUT8验证qRT-PCR检测结果。

具体实施方式

[0046] 实施例1:人肝细胞癌与癌旁组织的cRNA-FUT8芯片表达分析

[0047] 一、材料和方法

[0048] 1.材料

[0049] 组织样本来自于3对肝细胞癌患者的住院病例手术切除样本(所有组织样本均来自上海中山医院肝肿瘤外科),每对包含肝细胞癌组织和配对的癌旁正常组织。

[0050] 2.方法

[0051] (1)肿瘤组织和正常组织总RNA的提取:按Qiagen公司的RNA提取试剂盒(RNeasy Micro Kit,货号74004)说明书提取肝细胞癌组织和癌旁组织的总RNA。

[0052] (2)对样品RNA进行Cy5荧光标记(委托上海康成生物工程有限公司进行“ArrayStar Human cRNA-FUT8 Microarray V3.0 Service”进行标记服务)

[0053] (3)反转录合成第一链cDNA:以Total RNA为起始,含有T7启动子序列的Oligo(dT) Primer(上海康成生物工程有限公司)为引物,使用CbcScript酶(上海康成生物工程有限公司)合成第一链cDNA。

[0054] (4)合成第二链cDNA:DNA聚合酶(上海康成生物工程有限公司)以RNA片段为引物,合成第二链cDNA,并纯化双链cDNA。

[0055] (5)体外转录合成cRNA:以cDNA为模板,利用T7 Enzyme Mix(上海康成生物工程有限公司)合成cRNA。

[0056] (6)随机引物反转录:取1 μ g cRNA,用随机引物进行反转录。

[0057] (7)杂交与清洗:cDNA溶于杂交液(25%甲酰胺,5 \times SSC,0.1%SDS,0.5%BSA)中45 $^{\circ}$ C杂交过夜,用SSC(上海康成生物工程有限公司)的液体中洗5分钟,玻片甩干后即可用于扫描。

[0058] (8)芯片扫描,图像分析,差异基因筛选:芯片用Agilent Microarray Scanner (Agilent p/n G2565BA)进行扫描,并转化为数字信号。将原始数据输入到6geneSpring GX软件中,进行差异基因筛选。

[0059] 二、结果

[0060] 关于人肝细胞癌的环状RNA芯片聚类分析见图1。芯片筛查发现多条表达上调和表达下调的环状RNA。其中cRNA-FUT8显示出在癌组织中表达显著上调,鉴于其可能在人肝细胞癌的癌组织中存在特异性表达,本发明通过以下实施例采用大规模样本分批次进行指标的重复验证。

[0061] 实施例2:qRT-PCR初步验证cRNA-FUT8在肝细胞癌的癌组织和癌旁组织中的差异

表达

[0062] 一、实验材料

[0063] 选取28对(不同于芯片测试的样本)人肝细胞癌的癌组织(由上海中山医院肝肿瘤外科提供)和配对癌旁组织,对cRNA-FUT8的表达差异进行qRT-PCR验证。

[0064] 二、实验方法和结果

[0065] 1. 引物特异性鉴定

[0066] (1)特异性引物的设计:从Ensemble数据库提取cRNA-FUT8相关的转录本序列,并用根据转录本的序列通过NCBI的引物设计工具(Primer BLAST)设计引物;

[0067] 设计后的引物序列如下:

[0068] 上游引物:SEQ ID No.2

[0069] 下游引物:SEQ ID No.3

[0070] (2)将人肝细胞癌组织与癌旁组织按照SIGMA公司的TRIZOL试剂(货号T9424)所需试剂及步骤提取总RNA,再用7300 real time PCR system核算定量仪定量(Applied Biosystems AB)定量所提取的RNA的纯度和浓度。

[0071] (3)采用北京康润诚业生物科技有限公司StarScript II One-step RT-PCR试剂盒(货号A215-01)对提取的总RNA反转录合成cDNA。

[0072] 第一步打开RNA二级结构,反应体系及条件如下:

[0073]

试剂	用量
Oligo dT	1ul
RNA	1-2ug
DEPC水	补齐至20ul

[0074] 将上述组分混合后70度反应5min然后冰浴10min

[0075] 第二步反转录反应,反应体系及条件如下:

[0076]

试剂	用量
2.5mM dNTP	2.5ul
5×RT buffer	6ul
HPR(RNase抑制剂)	0.6ul
MLV(逆转录酶)	0.4ul

[0077] 将上述组分混合均匀后42度孵育1h,然后70度灭活10min,即得到cDNA。

[0078] (4)cRNA-FUT8的扩增:采用北京康润诚业生物科技有限公司2×RealStar Power SYBR Mixture UNG荧光定量试剂盒(货号A312),以反转录的cDNA为模板进行荧光定量PCR扩增。

[0079] 荧光定量PCR体系:

[0080]

试剂	用量
2×MIX	10ul
50×ROX	2ul

引物	各1ul
DNA模板	1ul
RNase Free ddH ₂ O	补齐至20ul

[0081] 荧光定量PCR程序:95℃30s预变性,接40个循环:95℃30s,60℃30s。

[0082] (5)电泳检测,选用DM2000 DNA Marker(北京康为世纪生物科技有限公司,货号CW0632)。结果如图2所示:扩增片段大小与预期相同,扩增产物只有一条带。该引物对符合上述标准。上游的特异性引物,其序列见序列列表SEQ ID No.2,下游的特异性引物,其序列见序列列表SEQ ID No.3。

[0083] 2. 样品总RNA的提取:

[0084] 采用液氮研磨法,按照SIGMA公司的TRIZOL试剂(货号T9424)所需试剂及步骤提取肝细胞癌组织或肿瘤的Total RNA。主要操作步骤如下:

[0085] (1)新鲜组织样品迅速放入装有液氮的研钵中进行研磨,最终研磨成粉末状;

[0086] (2)每个研钵中加入1ml TRIZOL试剂,继续研磨3-5分钟,直至成匀浆状;

[0087] (3)把上述匀浆转移到1.5ml无菌无酶离心管中,每1份匀浆中加入0.2ml氯仿。混匀后12000g离心10分钟。RNA存在于上层水相中;

[0088] (4)吸取上层水相(约200-300ul)转移到1.5ml无菌无酶新管中,0.5ml异丙醇混匀,12000g离心10分钟;

[0089] (5)弃上清,用75%的乙醇洗涤RNA沉淀一次,用20ul无RNA酶的水吹打几次溶解RNA,保存于-80℃低温冰箱。

[0090] 3. 标准DNA模板的制备

[0091] 根据cRNA-FUT8碱基序列(其核苷酸序列如序列列表SEQ ID No.1所示),委托上海生工合成。

[0092] 取样2ul合成产物,连接到pUC-T TA克隆载体(北京康为世纪生物科技有限公司,货号CW0801),随后转化到DH5a感受态细胞中。通过序列为SEQ ID No.2和SEQ ID No.3的特异性引物筛选阳性克隆,提取质粒DNA,质粒DNA用7300 real time PCR system核算定量仪定量,并做10倍系列稀释作为标准曲线(标准DNA模板浓度范围在 10^2 - 10^6 拷贝/ul)。

[0093] 4. 敏感性实验

[0094] 将标准DNA模板质粒按比例稀释为 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 拷贝/ul,进行荧光定量PCR,检测灵敏度。最低检出浓度为 10^2 拷贝/ul。

[0095] 5. 合成cDNA模板

[0096] 取上述28对肝细胞癌组织和配对癌旁组织的总RNA,采用北京康润诚业生物科技有限公司StarScript II One-step RT-PCR试剂盒(货号A215-01)对提取的总RNA反转录合成cDNA。

[0097] 第一步打开RNA二级结构,反应体系及条件如下:

[0098]

试剂	用量
Oligo dT	1ul
RNA	1-2ug
DEPC水	补齐至20ul

[0099] 将上述组分混合后70度反应5min然后冰浴10min

[0100] 第二步反转录反应,反应体系及条件如下:

[0101]

试剂	用量
2.5mM dNTP	2.5ul
5×RT buffer	6ul
HPR(RNase抑制剂)	0.6ul
MLV(逆转录酶)	0.4ul

[0102] 将上述组分混合均匀后42度孵育1h,然后70度灭活10min,即得到cDNA。

[0103] 6. 荧光定量PCR检测cRNA-FUT8表达量

[0104] 采用北京康润诚业生物科技有限公司2X RealStar Power SYBR Mixture UNG荧光定量试剂盒(货号A312),以反转录的cDNA为模板进行荧光定量PCR扩增。

[0105] 荧光定量PCR体系:

[0106]

试剂	用量
2×MIX	10ul
50×ROX	2ul
引物	各1ul
DNA模板	1ul
RNase Free d H2O	补齐至20ul

[0107] 荧光定量PCR程序:95℃30s预变性,接40个循环:95℃30s,60℃30s。

[0108] 根据qRT-PCR的相对定量公式: $2^{-\Delta Ct}$,分别计算出cRNA-FUT8在肝细胞癌患者癌组织(T)和癌旁组织(N)中的表达水平,结果如图3所示:cRNA-FUT8在癌旁组织中的表达水平主要集中在0.42-4.76之间,而癌组织中的cRNA-FUT8的表达量主要集中在1.28-12.7之间,明显高于正常组织。以上结果说明,cRNA-FUT8在肿瘤组织中普遍高表达。本实验结果显示:cRNA-FUT8在28对肝细胞癌与癌旁组织中,23例上调,阳性检出率=上调表达例数/总检测例数×100%=23/28=82.1%。cRNA-FUT8可以作为肝细胞癌一个新的肿瘤标志物,或可用于肝细胞癌的筛查和诊断。

[0109] 实施例3:利用cRNA-FUT8的差异表达对肝细胞癌组织进行筛查

[0110] 一、实验材料

[0111] 选取100份人肝细胞癌组织和100份癌旁组织(由上海仁济医院提供),对cRNA-FUT8的表达差异进行qRT-PCR检测。

[0112] 二、实验方法和结果

[0113] 1. 引物特异性鉴定

[0114] (1)采用如下特异性引物序列:

[0115] 上游引物:SEQ ID No.2

[0116] 下游引物:SEQ ID No.3

[0117] (2)将人肝细胞癌组织与癌旁组织按照SIGMA公司的TRIZOL试剂(货号T9424)所需试剂及步骤提取总RNA,再用7300 real time PCR system核酸定量仪定量(Applied

Biosystems AB)定量所提取的RNA的纯度和浓度。

[0118] (3)采用北京康润诚业生物科技有限公司StarScript II One-step RT-PCR试剂盒(货号A215-01)对提取的总RNA反转录合成cDNA。

[0119] 第一步打开RNA二级结构,反应体系及条件如下:

[0120]

试剂	用量
Oligo dT	1ul
RNA	1-2ug
DEPC水	补齐至20ul

[0121] 将上述组分混合后70度反应5min然后冰浴10min

[0122] 第二步反转录反应,反应体系及条件如下:

[0123]

试剂	用量
2.5mM dNTP	2.5ul
5×RT buffer	6ul
HPR(RNase抑制剂)	0.6ul
MLV(逆转录酶)	0.4ul

[0124] 将上述组分混合均匀后42度孵育1h,然后70度灭活10min,即得到cDNA。

[0125] (4)cRNA-FUT8的扩增:采用北京康润诚业生物科技有限公司2×RealStar Power SYBR Mixture UNG荧光定量试剂盒(货号A312),以反转录的cDNA为模板进行荧光定量PCR扩增。

[0126] 荧光定量PCR体系:

[0127]

试剂	用量
2×MIX	10ul
50×ROX	2ul
引物	各1ul
DNA模板	1ul
RNase Free ddH ₂ O	补齐至20ul

[0128] 荧光定量PCR程序:95℃30s预变性,接40个循环:95℃30s,60℃30s。

[0129] 2.样品总RNA的提取:

[0130] 采用液氮研磨法,按照SIGMA公司的TRIZOL试剂(货号T9424)所需试剂及步骤提取肝细胞癌组织或肿瘤的Total RNA。主要操作步骤如下:

[0131] (1)新鲜组织样品迅速放入装有液氮的研钵中进行研磨,最终研磨成粉末状;

[0132] (2)每个研钵中加入1ml TRIZOL试剂,继续研磨3-5分钟,直至成匀浆状;

[0133] (3)把上述匀浆转移到1.5ml无菌无酶离心管中,每1份匀浆中加入0.2ml氯仿。混匀后12000g离心10分钟。RNA在于上层水相中;

[0134] (4)吸取上层水相(约200-300ul)转移到1.5ml无菌无酶新管中,0.5ml异丙醇混匀,12000g离心10分钟;

[0135] (5)弃上清,用75%的乙醇洗涤RNA沉淀一次,用20ul无RNA酶的水吹打几次溶解RNA,保存于-80℃低温冰箱。

[0136] 3.合成cDNA模板

[0137] 取上述100例肝细胞癌组织和100例癌旁组织的总RNA,采用北京康润诚业生物科技有限公司StarScript II One-step RT-PCR试剂盒(货号A215-01)对提取的总RNA反转录合成cDNA。

[0138] 第一步打开RNA二级结构,反应体系及条件如下:

[0139]

试剂	用量
Oligo dT	1ul
RNA	1-2ug
DEPC水	补齐至20ul

[0140] 将上述组分混合后70度反应5min然后冰浴10min

[0141] 第二步反转录反应,反应体系及条件如下:

[0142]

试剂	用量
2.5mM dNTP	2.5ul
5×RT buffer	6ul
HPR(RNase抑制剂)	0.6ul
MLV(逆转录酶)	0.4ul

[0143] 将上述组分混合均匀后42度孵育1h,然后70度灭活10min,即得到cDNA。

[0144] 4.荧光定量PCR检测cRNA-FUT8表达量

[0145] 采用北京康润诚业生物科技有限公司2X RealStar Power SYBR Mixture UNG荧光定量试剂盒(货号A312),以反转录的cDNA为模板进行荧光定量PCR扩增。

[0146] 荧光定量PCR体系:

[0147]

试剂	用量
2×MIX	10ul
50×ROX	2ul
引物	各1ul
DNA模板	1ul
RNase Free d H2O	补齐至20ul

[0148] 荧光定量PCR程序:95℃30s预变性,接40个循环:95℃30s,60℃30s。

[0149] 检测结果:

		实际样品		合计	
		+	-		
[0150]	检测结果	+	90	15	105
		-	10	85	95
合计			100	100	200

[0151] 临床灵敏度用来衡量某种试验检测出有病者的能力,灵敏度是将实际有病的人正确地判定为真阳性的比例。

[0152] 本实验灵敏度= $90/(90+10) \times \% = 90\%$ 。

[0153] 临床特异度是衡量试验正确地判定无病者的能力,特异度是将实际无病的人正确地判定为真阴性的比例。

[0154] 本实验特异度= $85/(15+85) \times \% = 85\%$ 。

[0155] 值得注意的是,由于RNA在细胞外环境中很不稳定,因此,它若存在于组织中,则强烈提示该处存在肿瘤。环状RNA作为非编码RNA家族独特的成员,不单有可能成为肝细胞癌筛查与诊断的肿瘤标志物,而且有望成为肝细胞癌治疗靶点,具有重要的科学意义、生理意义和临床意义。

[0156] SEQ ID No.1

[0157] cRNA-FUT8序列:

[0158]

TTCCTACCCATGAGCATGGAATGTTCTTCCATTTGTTTGTATCCTCTTTTATTCATTGAGCAGTGGTTTGTAGTTC
TCCTTGAAGAGGTTCTTCATGTCCCTTGTAAGTTGGATTCCTAGGTATTTATTCTCTTTGAAGCAATTGTGAATGG
GAGTTCACACTCATGATTTGGCTCTCTGTTTGTCTGTTATTGGTGTATAAGAATGCTTGTGATTTTTGTACATTGATTT
TGTATCCTGAGACTTTGCTAAAGTTGCTTATCAGCTTAAGGAGATTTGGGCTGAGACAATGGGGTTTTCTAGATAT
ACAATCATGTCATCTGCAAACAGGGACAATTTGACTTCCTCTTTTCCTAAGTGAATACCCTTTATTTTCCTTCTCCTG
CCTAATTGCCCTGGCCAGAACTTCCAACACTATGTTGAATAGGAGT

[0159] SEQ ID No.2

[0160] 上游引物:5'-ATGGAATGTTCTTCCATTTG-3'

[0161] SEQ ID No.3

[0162] 下游引物:5'-CCAGAACTTCCAACACTATG-3'。

序列表

	<110>	中国科学院生物物理研究所	
	<120>	一种用于肝细胞癌筛查的cRNA-FUT8的检测及其应用	
	<130>	IB167474	
	<160>	3	
	<170>	PatentIn version 3.1	
	<210>	1	
	<211>	431	
	<212>	DNA	
	<213>	Homo sapiens	
[0001]	<400>	1	
		ttctacccca tgagcatgga atgttcttcc atttgtttgt atcctctttt atttcattga	60
		gcagtggttt gtagttctcc ttgaagaggt tcttcattgc cettgtaagt tggattccca	120
		ggtattttat tctctttgaa gcaattgtga atgggagttc acatcatgatt tggetctctg	180
		tttgcctgtt attggtgtat aagaatgctt gigatttttg tacattgatt ttgtaicctg	240
		agactttgct aaagttgctt atcagcttaa ggagattttg ggctgagaca atggggtttt	300
		ctagatatac aatcatgtca tctgcaaaca gggacaattt gacttcctct ttccctaagt	360
		gaataaccctt taittctctc tctgcccfaa ttgccctggc cagaacttcc aacactatgt	420
		tgaataggag t	431
	<210>	2	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工引物	
	<400>	2	
		atggaatggt cttccatttg	20
	<210>	3	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工引物	
[0002]	<400>	3	
		ccagaacttc caacactatg	20

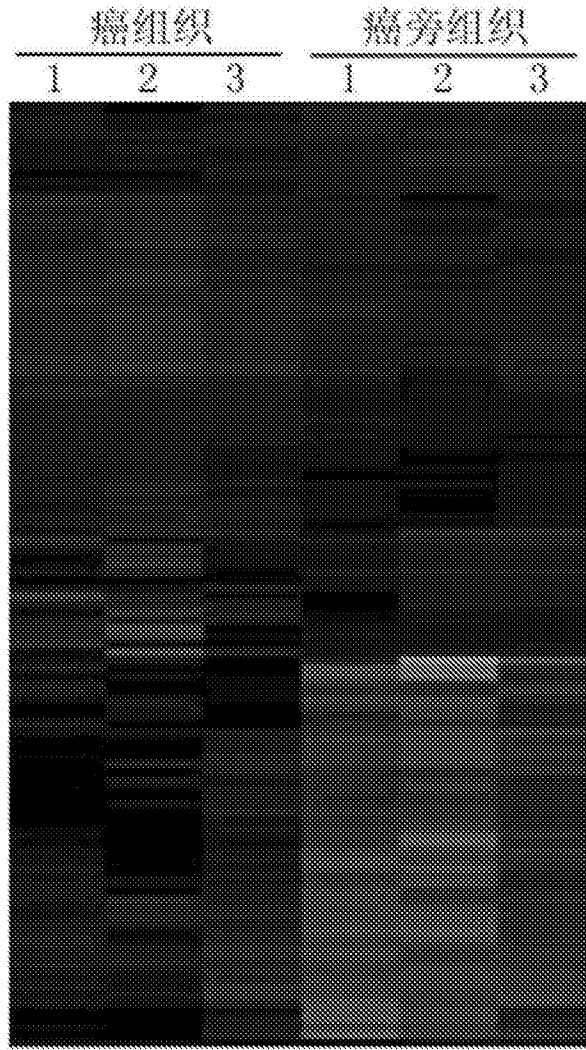


图1

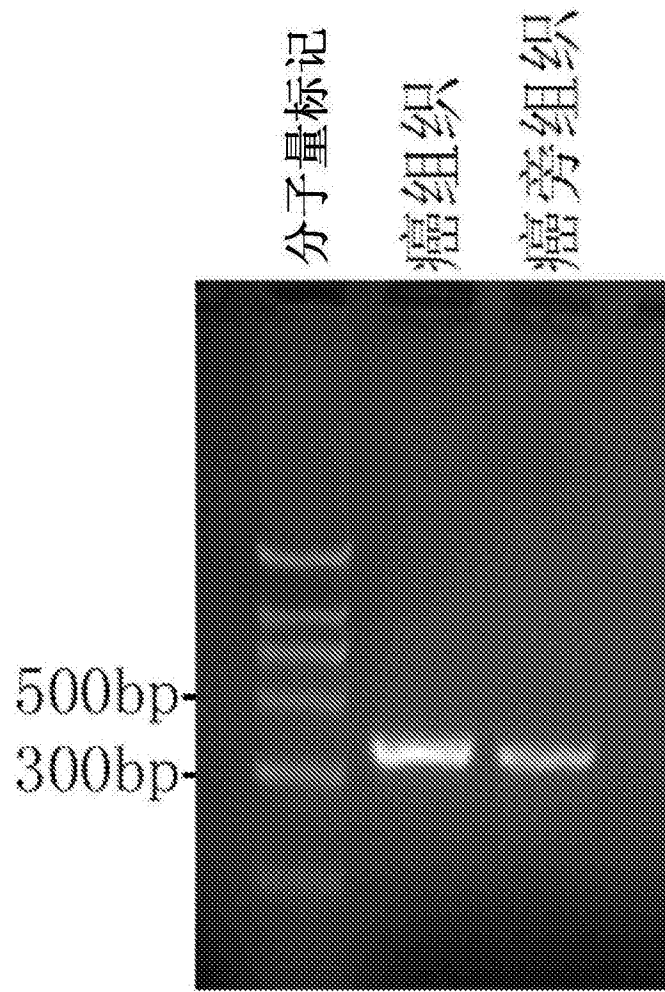


图2

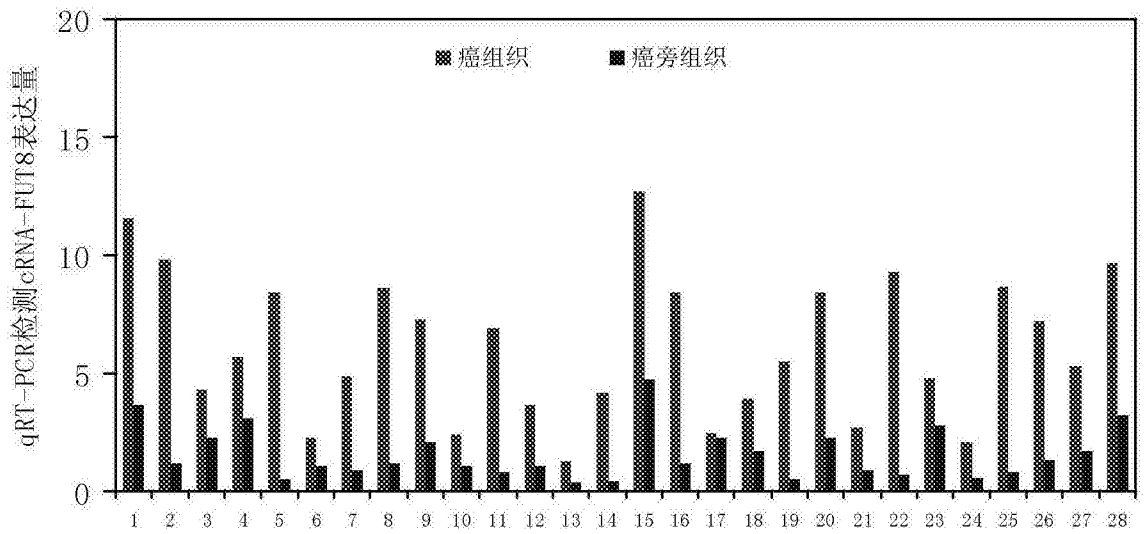


图3