

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810043048.5

[51] Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 7 月 29 日

[11] 公开号 CN 101492715A

[51] Int. Cl. (续)

A61P 35/00 (2006.01)

[22] 申请日 2008.1.21

[21] 申请号 200810043048.5

[71] 申请人 上海人类基因组研究中心

地址 201203 上海市浦东新区张江高科技园区碧波路 250 号 1 号楼

[72] 发明人 黄 健 邓 庆 韩泽广

[74] 专利代理机构 上海浦一知识产权代理有限公司
代理人 陈履忠

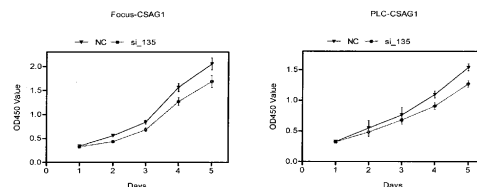
权利要求书 1 页 说明书 15 页 附图 4 页

[54] 发明名称

CSAG1 基因的应用

[57] 摘要

本发明公开了一种 CSAG1 基因的应用，用于制备诊断肝癌的产品和制备治疗肝癌的药物。本发明的 CSAG1 基因，可作为诊断肝癌的特异标志基因，使肝癌诊断更加准确、快速，且为防治肝癌提供了新的治疗靶点和有效新药。



1. 一种 CSAG1 基因的应用，其特征在于，所述 CSAG1 基因在制备诊断肝癌的产品中的应用。

2. 如权利要求 1 所述的应用，其特征在于，所述诊断肝癌的产品包括：用 RT-PCR、实时定量 PCR、免疫检测、原位杂交或基因芯片诊断肝癌的产品。

3. 如权利要求 2 所述的应用，其特征在于，所述用 RT-PCR 诊断肝癌的产品至少包括一对特异扩增 CSAG1 基因的引物。

4. 如权利要求 2 所述的应用，其特征在于，所述用实时定量 PCR 诊断肝癌的产品至少包括一对特异扩增 CSAG1 基因的引物。

5. 如权利要求 2 所述的应用，其特征在于，所述用免疫检测诊断肝癌的产品包括：与 CSAG1 蛋白特异性结合的抗体。

6. 如权利要求 2 所述的应用，其特征在于，所述用原位杂交诊断肝癌的产品包括：与 CSAG1 基因的核酸序列杂交的探针。

7. 如权利要求 2 所述的应用，其特征在于，所述用基因芯片诊断肝癌的产品包括：与 CSAG1 基因的核酸序列杂交的探针。

8. 一种 CSAG1 基因的应用，其特征在于，所述 CSAG1 基因在制备治疗肝癌的药物中的应用。

9. 如权利要求 1 所述的应用，其特征在于，所述治疗肝癌的药物包括：通过 RNA 干扰抑制 CSAG1 基因表达的双链核糖核酸，或基于 CSAG1 抗原蛋白的肿瘤疫苗，或用于抑制 CSAG1 蛋白活性的蛋白质。

CSAG1 基因的应用

技术领域

本发明涉及一种基因，尤其涉及一种 CSAG1 基因的应用。

背景技术

肝癌是我国常见的恶性肿瘤之一，是我国位居第二的癌症“杀手”，常见于中年男性。因其恶性度高、病情进展快，病人早期一般没有什么不适，一旦出现症状就诊，往往已属中晚期。故治疗难度大、疗效差，一般发病后生存时间仅为 6 个月，人称“癌中之王”。因此，提高肝癌早期诊断水平、选择科学合理的治疗方法和采取有效的预防复发转移措施将是改变这种局面的三个关键环节。

目前诊断原发性肝癌最重要的肿瘤标志物是甲胎球蛋白（AFP），但在我国原发性肝癌患者中，血清 AFP 水平高于正常值者只占 60%~70%；其中只有约 32% 的患者血清 AFP 水平能达到诊断标准（ $>400 \mu\text{g/L}$ ），其余均为低浓度阳性。此外，部分肝炎、肝硬化等非肝癌患者的血清 AFP 水平也可异常升高。这些都影响了 AFP 这一指标的诊断特异性。因此，有待开发新的特异性肿瘤标记物，以提高原发性肝癌的诊断水平。

此外，由于我国肝癌患者多合并严重的肝硬化，且易肝内播散和远处转移，使手术切除受到很大限制，而且放化疗在杀伤肿瘤细胞的同时，对正常细胞和免疫系统也有破坏和抑制作用。因此，治疗肝癌除了传统的手术、放疗、化疗方式外，还需要肿瘤治疗疫苗的辅助治疗。

CT（Cancer-testis，肿瘤—睾丸）抗原，又称肿瘤共享抗原，一般在正常组织中不表达，但在人生殖细胞系正常表达，在多种不同类型的肿瘤中也均有表达，包括黑色素瘤，膀胱癌，肺癌，肝癌等，这些具有免疫原性的蛋白正在被积极发展为肿瘤治疗疫苗的靶点。目前为止已有多达 80 多个 CT 抗原家族被鉴定。CT 抗原在肿瘤形成中的作用也正在受到进一步评估，精子发生过程中的部分基因表达程序在肿瘤发生时重新开放，可能有助于恶性肿瘤的表型特征—永生性，侵袭性，免疫逃逸，基因组低甲基化和转移能力。

CT 抗原根据编码它们基因的染色体定位可分为 X 染色体连锁 CT 抗原（X-CT）和

常染色体 (non-X CT) 即非 X 染色体连锁抗原。在正常睾丸中 X 染色体连锁的 CT 抗原通常在精原细胞中表达, 而精原细胞是在睾丸中保持不断增殖的一类生殖干细胞。由于生殖干细胞、发生于胚胎滋养层的细胞和肿瘤细胞有着许多共有的特征, 在已知癌基因和抑癌基因无突变的情况下, 原本已沉默的生殖细胞系特异性表达基因在肿瘤干细胞中被激活后可以调节肿瘤的恶性表型。值得强调的是, 据估计 X 染色体上约有 10% 的基因属于 X 染色体连锁 CT 基因。因此, 选取 X 染色体连锁的 CT 基因为对象研究其在肝癌发生发展中的作用机制。

人 CSAG1 基因 (Genbank No. NM_153478.1, NM_153479.1) 是 CT 抗原家族的成员之一。关于 CSAG1 基因与肝癌发生的关系尚不清楚, 有待进一步研究。

发明内容

本发明要解决的技术问题之一是提供一种 CSAG1 基因的应用, 该 CSAG1 基因可作为肝癌诊断的标记分子, 提高了肝癌诊断的准确性。

本发明要解决的技术问题之二是提供一种 CSAG1 基因在制备治疗肝癌的药物中的应用, 使肿瘤的复发和转移得到有效控制。

为了解决上述技术问题, 本发明通过如下技术方案实现:

在本发明的一个方面, 提供了一种 CSAG1 基因在制备诊断肝癌的产品中的应用。

所述诊断肝癌的产品包括: 用 RT-PCR、实时定量 PCR、免疫检测、原位杂交或基因芯片诊断肝癌的产品。

在本发明中, 所述用 RT-PCR 诊断肝癌的产品至少包括一对特异扩增 CSAG1 基因的引物。

所述用实时定量 PCR 诊断肝癌的产品至少包括一对特异扩增 CSAG1 基因的引物。

所述用免疫检测诊断肝癌的产品包括: 与 CSAG1 蛋白特异性结合的抗体, 包括多克隆抗体和单克隆抗体。

所述用原位杂交诊断肝癌的产品包括: 与 CSAG1 基因的核酸序列杂交的探针。

所述用基因芯片诊断肝癌的产品包括: 与 CSAG1 基因的核酸序列杂交的探针。

在本发明中, 可以使用一系列本领域已知的方法来制备针对 CSAG1 蛋白特异的抗体。例如, 将提纯的人 CSAG1 基因产物或它的抗原片段注射入动物体内以产生多克隆抗体。同样, 表达人 CSAG1 蛋白或它的抗原片段的细胞也可以用来对动物致免疫而产生抗体。根据本发明制备的抗体也可以是单克隆抗体, 这些单克隆抗体可用杂交瘤

技术制备(例如, Kohler et al., Nature 256: 495, 1975; Kohler et al., Eur. J. Immunol. 6: 511, 1976; Kohler et al., Eur. J. Immunol. 6: 292, 1976)。本发明的抗体包括可以阻抑 CSAG1 功能的抗体,也可以是不影响人 CSAG1 功能的抗体。每一类抗体都可以通过对人 CSAG1 基因产物的片段或功能域致免疫而产生,而人 CSAG1 基因产物及其片段可以用重组方法产生或用多肽合成仪进行合成。与非修饰形式的 CSAG1 基因产物结合的抗体,可以利用在原核细胞例如 *E. coli* 中产生的基因产物来免疫动物而得到。与翻译后修饰形式如糖基化或磷酸化 CSAG1 蛋白或多肽结合的抗体,可以利用在真核细胞如酵母或昆虫细胞中产生的基因产物来免疫动物而得到。

在本发明中,所述探针可以是 DNA、RNA、DNA-RNA 嵌合体、PNA 或其它衍生物。所述探针的长度没有限制,只要完成特异性杂交、与目的核苷酸序列特异性结合,任何长度都可以。所述探针的长度可短至 25、20、15、13 或 10 个碱基长度。同样,所述探针的长度可长至 60、80、100、150、300 个碱基对或更长,甚至整个基因。由于不同的探针长度对杂交效率、信号特异性有不同的影响,所述探针的长度通常至少是 14 个碱基对,最长一般不超过 30 个碱基对,与目的核苷酸序列互补的长度以 15-25 个碱基对最佳。所述探针自身互补序列最好少于 4 个碱基对,以免影响杂交效率。

在本发明的另一方面,提供了一种 CSAG1 基因在制备治疗肝癌的药物中的应用。

所述治疗肝癌的药物包括:通过 RNA 干扰抑制 CSAG1 基因表达的双链核糖核酸,或基于 CSAG1 抗原蛋白的肿瘤疫苗,或用于抑制 CSAG1 蛋白活性的蛋白质。

在本发明中,所述 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是指在进化过程中高度保守的、由双链 RNA(double-stranded RNA, dsRNA)诱发的、同源 mRNA 高效特异性降解的现象。使用 RNAi 技术可以特异性剔除或关闭特定基因的表达,该技术已被广泛用于探索基因功能和传染性疾病及恶性肿瘤的基因治疗领域。以细胞为基础的 RNAi 筛选在功能基因学研究方面具有许多优势,主要表现在大多数细胞类型都能使用 RNAi 方法,并且相对较容易下调或沉默任何目的基因的表达。

在本发明中,所述肿瘤疫苗是指用肿瘤组织中的特殊物质来激发患者体内的免疫功能,使患者的免疫功能能够杀伤肿瘤细胞。肿瘤疫苗主要指治疗性疫苗,是在病人得病后再用疫苗的方法进行治疗,以控制肿瘤的复发和转移。肿瘤疫苗具有个体性,因为每一个病人所得的肿瘤类型、分期都不一样,肿瘤细胞所表达的物质也不同,而肿瘤疫苗又是由病人本身的肿瘤制成,因此针对患者具体的肿瘤制备的肿瘤疫苗具有

个体化特征，其副作用小，针对性强。

所述肿瘤疫苗制备时，用手术方法切取肿瘤患者的肿瘤组织并无菌冷冻保存，以提取肿瘤抗原。本发明的 CSAG1 抗原蛋白可作为肿瘤抗原被提取。获得肿瘤抗原是第一步，接着要获得树突状细胞，即从病人血液的单个核细胞中获得。采出单个核细胞后再进行筛选和体外培养，然后用肿瘤抗原 CSAG1 在体外刺激树突状细胞，使该树突状细胞能够传递免疫信息，最后将训练好的树突状细胞回输到体内，使体内产生针对肿瘤抗原 CSAG1 的免疫应答。

本发明治疗肝癌的药物施用方式可以是口服、全身施用（例如，透过皮肤、鼻吸入或者用栓剂）或肠胃外施用（例如，肌肉内、静脉内或皮下）。

本发明的药物也可被制成针剂形式，例如用生理盐水或含有葡萄糖和其他辅剂的水溶液通过常规方法进行制备。诸如片剂和胶囊之类的药物，可通过常规方法进行制备。针剂、溶液、片剂和胶囊宜在无菌条件下制造。

本发明实验证明 CSAG1 基因在肝癌组织中的表达明显高于癌旁组织，因此 CSAG1 基因可作为诊断肝癌的特异标志基因，使肝癌诊断更加准确、快速。本发明 CSAG1 基因为防治肝癌提供了新的治疗靶点和有效新药。

附图说明

图 1 是本发明实施例 1 通过 RT-PCR 验证 CSAG1 基因在人肝癌组织和癌旁组织中的差异表达图；

图 2 是本发明实施例 6 通过 RT-PCR 分析 X 染色体连锁 CT 基因在肝癌细胞中的表达图；

图 3 是本发明实施例 7 对 CSAG1 基因进行 siRNA 实验的流程图；

图 4 是本发明针对 CSAG1 基因的 siRNA 抑制肝癌细胞生长的曲线图。

具体实施方式

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不适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。

实施例 1

RT-PCR 实验检测 CSAG1 基因在肝癌组织中的表达情况。

1. 组织分离(Tissue isolation)

实验用组织来源于 72 例 HBV 阳性并表达甲胎蛋白的原发性肝癌的手术病人(RT-PCR 证实 AFP 在肝癌均为阳性而癌旁为阴性)。手术切除的肝脏一经离体,迅速切取病灶及周围 5 公分外癌旁组织,放入液氮中(−80℃)保存。癌和癌旁的诊断均以病理诊断为最终依据。

2. 总 RNA 的抽提试剂盒

抽提 RNA 试剂采用 TRIzol reagent(GIBCO/BRL),该试剂是基于酸性酚一步抽提法生产的。用于抽提 RNA 所用的器皿和水均要进行无 RNA 酶处理,以保证实验中无 RNA 酶的环境。

3. RNA 的抽提步骤

将碾杵和匀浆器等器皿在 200℃干烤 4 h,去除 RNA 酶,冷却;加入液氮中预冷,将组织从液氮中迅速取出,碾成粉末;用刮匙将组织放入预先加入 TRIzol 试剂的匀浆器中,匀浆数分钟;将匀浆后的液体转入无 RNA 酶的离心管中,加入氯仿后,4℃离心分层;将上层水相转入一无 RNA 酶的离心管中,加入氯仿后,4℃离心分层;将上层水相转入一无 RNA 酶的离心管中,加异丙醇,4℃离心沉淀 RNA;用 75%乙醇洗涤沉淀 2 次;用无 RNA 酶的去离子水溶解沉淀。抽提的 RNA 质量鉴定:紫外分光光度计测定 260/280 比值(比值均在 1.7~2.0);并在 MOPS 甲醛变性胶中观察有无降解。

4. cDNA 的合成

取总 RNA 2μg, OligodT16 1μL, 70℃保温 3min,立即冰上变性 5min。加入 5×buffer, DTT 和 50mg/L 的 dNTP 各 2μL 及 1μL 的逆转录酶,充分混匀后,42℃2h。模板使用终浓度通常为 1 μg/100μL。

5. RT-PCR 扩增

CSAG1 (F): 上游引物为 5' - TTCCCAAGACAACCCAAAAG -3' (SEQ ID NO:1);

CSAG1 (R): 下游引物为 5' - CAAGGAAGCACTGGAGAAGG -3' (SEQ ID NO:2);

β-actin(F): 5' - CATCCTGCGTCTGGACCT -3' (SEQ ID NO:3);

β-actin(R): 5' - GTACTTGCGCTCAGGAGGAG -3' (SEQ ID NO:4)。

以 β-actin 作内对照,反应混合物中各成分为: β-actin(F)、β-actin(R)、CSAG1 (F)、CSAG1 (R)、10×Buffer、MgCl₂、dNTP、Taq DNA 聚合酶、cDNA 模板分别为 0.2、

0.2、0.4、0.4、1.0、1.0、0.2、0.1 和 5 μ L，最后补充 ddH₂O 使反应体系为 10 μ L。PCR 的反应条件如下：94℃，5 分钟预变性；94℃，30 秒变性；55℃，30 秒退火；72℃，30 秒延伸；35 个循环，电泳检测 PCR 扩增产物。

6. 实验结果显示，CSAG1 基因在肝癌组织中的表达水平明显高于癌旁组织中 CSAG1 基因的表达水平（见图 1），差异率达 75%，CSAG1 特异扩增片断大小为 216bp，内参 β -actin 的产物片断大小为 490 bp，在图 1 中，“N”指癌旁组织，“C”指肝癌组织。

7. 根据上述实验结果，可通过 RT-PCR 诊断肝癌：设计 CSAG1 基因的 PCR 引物，检测肿瘤组织中 CSAG1 基因 RNA 的含量，RNA 含量高则说明患肝癌的可能性高，反之则低。

实施例 2 实时定量 PCR 实验

采用相对定量法检测 CSAG1 基因在肝癌样本中的表达差异 (Thermal Cycler Dice™ Real Time System TP800, Takara; SYBR® Premix Ex Taq™, Takara)。实时定量 PCR 检测表明，CSAG1 基因在肝癌组织中的表达水平明显高于癌旁组织中的表达水平，经 t 检验， $P < 0.01$ 。该实验结果表明，可通过实时定量 PCR 诊断肝癌：设计 CSAG1 基因的 PCR 引物，检测肿瘤组织中 CSAG1 基因 RNA 的含量，RNA 含量高则说明患肝癌的可能性高，反之则低。

实施例 3 原位杂交

用 CSAG1 基因探针，与肿瘤切片进行原位杂交，阳性杂交信号越强，患肝癌的可能性越高。实验步骤为：将肝脏肿瘤组织取材后 OCT 包埋、液氮速冻，恒冷箱冰冻切片，该冰冻切片进一步用于原位杂交。

实施例 4 免疫检测

1. 抗原蛋白获得

(1) 利用基因工程表达：可从 Genbank 数据库中获得人 CSAG1 基因的 cDNA 序列，通过 PCR 扩增获得编码框，插入原核生物或真核生物表达载体中，表达 CSAG1 蛋白，并按基因工程表达产物的纯化体系纯化蛋白质。

(2) 通过培养高表达 CSAG1 基因的人体来源细胞或组织，再分离纯化 CSAG1 蛋白。

2. 抗体制备

可采用以下几种方法制备抗体：

(1) 细胞融合法：用上述制备的 CSAG1 蛋白免疫动物（包括兔子、山羊等），获得脾脏细胞，再与骨髓瘤细胞融合，并按常规单克隆抗体制备技术制备单克隆抗体。

(2) 利用噬菌体表面展示库，克隆免疫动物的脾脏 IgG 可变区并表达成基因工程单克隆抗体。

(3) 利用纯化的蛋白质免疫动物，制备多抗血清。

3. 检测

(1) 用制备的抗体（多抗或单抗），用组织化学方法进行肝癌的病理检测，阳性信号为肝癌。

(2) 取患者血清，用 ELISA 方法检测，阳性反应为肝癌可疑病人。

(3) 将 CSAG1 抗体作为蛋白质芯片的探针之一，用于多种肿瘤诊断。

实施例 5

用去甲基化药物 DAC（终浓度为 2000nM），处理 15 株肝癌细胞株后，使用基因芯片检测处理前后基因表达水平的差异，发现在 8 株细胞株中，CSAG1 基因表达差异明显。其中，基因芯片实验主要包括如下四个步骤：芯片制备、样品制备、杂交反应和信号检测以及结果分析。

1. 芯片制备 目前制备芯片主要以玻璃片或硅片为载体。通过点样法将靶基因作为探针按顺序排列在载体上，靶基因可分为基因组 DNA、cDNA（或人工合成 DNA）。

2. 样品制备 待测样品中总 RNA 的抽提步骤如下：分别取用去甲基化药物 DAC 处理的 15 株肝癌细胞株和 15 株未经去甲基化处理的肝癌细胞株，再用 TRIzol 法抽提总 RNA。

提取的总 RNA 可进一步用于样品 cDNA 探针制备，其过程包括荧光探针的制备（cDNA 第一链标记）、纯化和定量。定量后的探针吸回至 1.5 ml 离心管中，加热抽干，保存于 -20℃，待杂交。

3. 芯片杂交

取出经定量的 Cy3 和 Cy5 标记的探针，各用 9~15 μ l ddH₂O 充分溶解混合于 1.5ml 离心管内，然后配制杂交液，Cy3/Cy5 荧光标记探针的杂交液由 20× SSPE 缓冲液、50× Denhardt's 缓冲液和溶解有探针的 ddH₂O 组成，接着，取杂交液滴加在芯片上，并盖上盖玻片。最后，将该杂交芯片放入加有 PBS 的杂交盒，置于 42℃ 杂交箱中杂交 12~20 小时。

4. 洗涤、扫描和数据分析 芯片杂交反应结束后, 需进行芯片洗涤。再通过特定的扫描仪比如激光共聚焦扫描仪进行扫描, 扫描后将图像转化为基于荧光强度的数字信号, 随后进行数据分析和处理。由于样本差异、荧光标记效率和检出率的不平衡, 需对原始提取信号进行均衡和修正才能进一步分析实验数据。经分析, 由基因芯片检测肝癌及癌旁组织中 CSAG1 基因的表达差异, 结果显示 CSAG1 基因在肝癌组织中表达显著上调。

实施例6 肝癌细胞株模型的选择

利用 RT-PCR 分析了约 40 个 X 染色体连锁 CT 基因在 17 株肝癌细胞中的表达情况 (见图 2), 发现它们在其中两细胞株 (PLC, Focus) 中均有表达, 因此选择这两株细胞系作为筛选模型。

肝癌细胞株 Focus、PLC 由本实验室保种, 复苏后在含 10%胎牛血清、200 单位/毫升青霉素、200 皮克/毫升链霉素的 DMEM(GIBCO) 培液中, 5% CO₂、37℃ 条件下培养, 以用于 siRNA 转染。

实施例7 基于肝癌细胞株 PLC、Focus 对 X 染色体连锁 CT 基因进行 siRNA 筛选

1. 特异性针对候选基因 siRNA 的产生

为确保候选基因能够在筛选体系中被高效剔除或沉默, 针对每个候选基因的 mRNA 序列 (Refseq, NCBI GenBank) 设计 2~3 siRNA 特异性片段。针对 X 染色体连锁的 CT 基因共设计了 177 条 siRNAs。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: siRNA Selection Program of Whitehead Institute (BingbingYuan et.al 2004, <http://jura.wi.mit.edu/bioc/siRNAext/>) 和 BLOCK-iT™ 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 片段的有效性, 综合两个在线设计工具的优点来设计用于筛选的 siRNA 片段。最后, 通过同源性比对 (NCBI BLAST) 来过滤 siRNA 序列, 以提高 siRNA 片段的特异性并减少 RNAi 干扰的脱靶效应。SiRNA 寡核苷酸由上海吉玛制药技术有限公司化学合成, 由 DEPC 处理过的 RNase-free 的双蒸水溶解, 浓度为 20 μM。两条 siRNA 片段作为阴性对照, 序列如下:

S:5' CGUACGCGAAUACUUCGAdTdT3' (SEQ ID NO:5),
 AS:5' UCGAAGUAUCCGCGUACGdTdT3' (SEQ ID NO:6);
 S:5' UUCUCCGAACGUGUCACGUdTdT 3' (SEQ ID NO:7),
 AS:5' ACGUGACACGUUCGGAGAAdTdT 3' (SEQ ID NO:8)。

2. siRNA 转染和细胞增殖分析

如图 3 所示, 在 96 孔板中接种合适密度的肝癌细胞。转染前换成无血清的 DMEM 培液, 并且细胞密度不高于 40%。转染试剂选用 Lipofectamine™ 2000 (Invotrogen), 用 Opti-MEM® I 低血清培养基 (Invotrogen) 配置 siRNA oligomer-Lipofectamine™ 2000 复合物 (转染条件已优化), 室温放置 30 分钟后加入细胞中, 混匀, 37℃ 培养 4~6 小时后换成含 10% 胎牛血清的 DMEM 培液。每条 siRNA 片断转染三复孔细胞, 转染实验独立重复两次。

转染后细胞经过 3 天培养, 采用 CCK-8 (cell counting kit-8, 细胞计数试剂盒, Dojindo) 法分析细胞增殖状态。加 10 μl CCK-8 溶液/孔于 96 孔板后, 37℃, 5% CO₂ 培养 2 小时, 通过溶液比色度分析来反映每孔活性细胞数; 酶标仪 (Bio-Tek, MQX200) 在波长段 450nm 测定溶液的比色度, 重复两次读数。

3. 数据分析

鉴于细胞 RNAi 干扰实验的变异和大规模实验时的操作误差, 采用必要的统计学方法分析数据可提高筛选体系的可信度, 降低筛选体系得出的假阳性率, 因此在数据分析时引入 Z 值 (筛选系数) 和 P 值 (T 检验可信度)。Z 值是一个简明的无自由度限制的统计学参数, 用于评估和调整任何筛选体系。 $Z = 1 - (3\delta_s + 3\delta_c) / |\mu_s - \mu_c|$ (Journal of Biomolecular Screening, 1999), δ_s : 实验组 siRNA 标准差; δ_c : 对照组 siRNA 标准差; μ_s : 实验组 siRNA 均数; μ_c : 对照组 siRNA 均数; 实验组 siRNA 和对照 siRNA 标准化数据进行单侧 t 检验, 求出 P 值。

将数据处理后, 按上述方式算出统计学参数 Z 值和 P 值, 认为 $P < 0.05$, $Z > 1$ 的 siRNA 导致的表型有意义, 并由此划定阳性 siRNA 片断。

针对 CSAG1 基因 (Genbank No. NM_153478.1, NM_153479.1) 设计的 siRNA, 算出的 $P < 0.05$, $Z > 1$, 对表型有意义。CSAG1 基因的阳性 siRNA 片断是针对靶序列 CAGGTGGACTGGAGTAGACTGTACA (389-413) 设计的 siRNA, 名称为 SI_135, 其序列如下:
 S:5' CAGGUGGACUGGAGUAGACUGUACAdTdT3' (SEQ ID NO:9), AS:5' UGUACAGUCUACUCCA

GUCCACCUGdTdT 3' (SEQ ID NO:10)。

4. 验证 CSAG1 基因的阳性 siRNA 片断对肝癌细胞生长效应的影响

将 CSAG1 基因的阳性 siRNA 片断单独进行转染实验后,用 CCK-8 法计量活细胞生长数,以天为间隔,连续测量五天,做出细胞的生长曲线。

结果显示,针对 CSAG1 基因的 siRNA,能使 Focus、PLC 肝癌细胞的存活率明显低于对照组的细胞(见图 4),说明人 CSAG1 基因的表达下调能在一定程度上抑制肝癌细胞生长。

实施例 8 CSAG1 抗原蛋白作为肿瘤疫苗的应用

1. 原发性肝癌组织标本在术中取材,术后均经病理诊断确证。采用美国 PEL-FREEZA-SSP UNITRAY 试剂盒对肝癌组织 DNA 进行 PCR 扩增,PCR 产物在 2%的琼脂糖凝胶中电泳,根据电泳结果对细胞株 HLA-A 位点分型。

2. 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成:利用 Trizol 试剂(Gibco BRL 公司)提取肝癌组织总 RNA,溶于适量焦碳酸二乙酯(DEPC)处理的超纯水中并定量。取 5 μ g RNA 标本,用逆转录酶 Superscript II 合成 cDNA。

3. 抗原基因 cDNA 的 PCR 扩增:总反应体积为 50 μ l。其中含 2 μ l cDNA、25pmol CT 抗原基因 CSAG1 的引物。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定。

4. PCR 产物的纯化、克隆和测序:参照《分子克隆》(第 3 版)的方法。

5. DC(树突状细胞)的体外分离和培养:患者外周静脉血经淋巴细胞分层液 Ficoll 梯度离心后分离界面单个核细胞。细胞经洗涤 2 次后,用无血清培养基 AIM-V 培养液(Gibco BRL 公司)悬浮,调整细胞浓度到 3×10^6 个/ml,接种入 6 孔培养板。在 37℃、5%CO₂ 孵箱中培养过夜后,轻轻吹打悬浮细胞并回收冻存,用以制备效应细胞。在贴壁细胞培养液中加入含 1000U/ml 粒单集落刺激因子和 500U/ml 白细胞介素的 AIM-V。培养至第 7 天时,收获悬浮的 DC。

6. 多肽合成:CSAG1 抗原多肽由多肽合成仪合成。T2 细胞或 HLA-A2 的 EBV (Epstein Barr Virus,非洲淋巴细胞瘤病毒)转染的人 B 淋巴细胞与终浓度为 20ug/ml 的 CSAG1 抗原多肽共孵育 4 小时,洗涤后作为靶细胞。

7. 通过以下方式鉴定本发明治疗肝癌的肿瘤 CT 抗原疫苗,通过 DC 递呈 CSAG1 抗原肽活化效应 T 细胞,产生特异性针对 CSAG1 抗原表位的免疫应答:

(1) DC 膜标志的鉴定:用荧光标记抗体,HLA-DR(购自 Pharmingen 公司)检测,

通过流式细胞仪检测细胞表型。

(2) DC 细胞的处理：DC 经离心后重悬浮在 2ml AIM-V 中，并加入 CSAG1 抗原肽至该多肽终浓度为 40ug/ml。37℃、5% CO₂ 培养 18 小时，经 3000rad 放射线照射后，洗涤待用。

(3) 效应细胞的制备：非贴壁细胞复苏后，与照射后的 DC 细胞以 20:1 混合共孵育 6-7 天，再按照相同比例加入 DC，6-7 天后，再次重复刺激一次，作为效应 T 细胞。于 0、7、10、14、19 天，分别留取培养上清，用于细胞因子检测。

(4) 细胞因子检测：采用细胞因子检测试剂盒（购自美国 Endogen 公司）检测培养上清中分泌的细胞因子。

8. 实验结果表明，经本发明 CSAG1 抗原肽刺激的 DC 所活化的效应 T 细胞，能产生特异性针对 CSAG1 抗原表位的免疫应答，从而特异性杀伤结合有该相同 CSAG1 抗原肽的靶细胞，说明本发明 CSAG1 抗原蛋白可以作为潜在的肝癌治疗性疫苗。

实施例 9 以 CSAG1 基因表达产物为靶分子设计的基因治疗

以 CSAG1 基因表达产物为靶分子，设计一种携带某基因的表达载体，导入该载体，其产物对 CSAG1 基因的表达有抑制作用，或对 CSAG1 蛋白活性有抑制作用。

序列表

<110> 上海人类基因组研究中心
<120> CSAG1 基因的应用
<130> NP-08-12164
<160> 10
<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> 引物

<400> 1
ttccaagac aacccaaaag

20

<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> 引物

<400> 2
caaggaagca ctggagaagg

20

<210> 3
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(18)
<223> 引物

<400> 3	
catcctgcgt ctggacct	18
<210> 4	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1)..(20)	
<223> 引物	
<400> 4	
gtacttgccg tcaggaggag	20
<210> 5	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> misc_RNA	
<222> (1)..(21)	
<223> siRNA	
<400> 5	
cguacgcgga auacuucgat t	21
<210> 6	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> misc_RNA	
<222> (1)..(21)	
<223> siRNA	
<400> 6	
ucgaaguauu ccgcguacgt t	21
<210> 7	
<211> 21	

<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> misc_RNA
<222> (1)..(21)
<223> siRNA

<400> 7
uucuccgaac gugucacgut t

21

<210> 8
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> misc_RNA
<222> (1)..(21)
<223> siRNA

<400> 8
acgugacacg uucggagaat t

21

<210> 9
<211> 27
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> misc_RNA
<222> (1)..(27)
<223> siRNA

<400> 9
cagguggacu ggaguagacu guacatt

27

<210> 10
<211> 27
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> misc_RNA

<222> (1)..(27)

<223> siRNA

<400> 10

uguacagucu acuccagucc accugtt

27



图 1

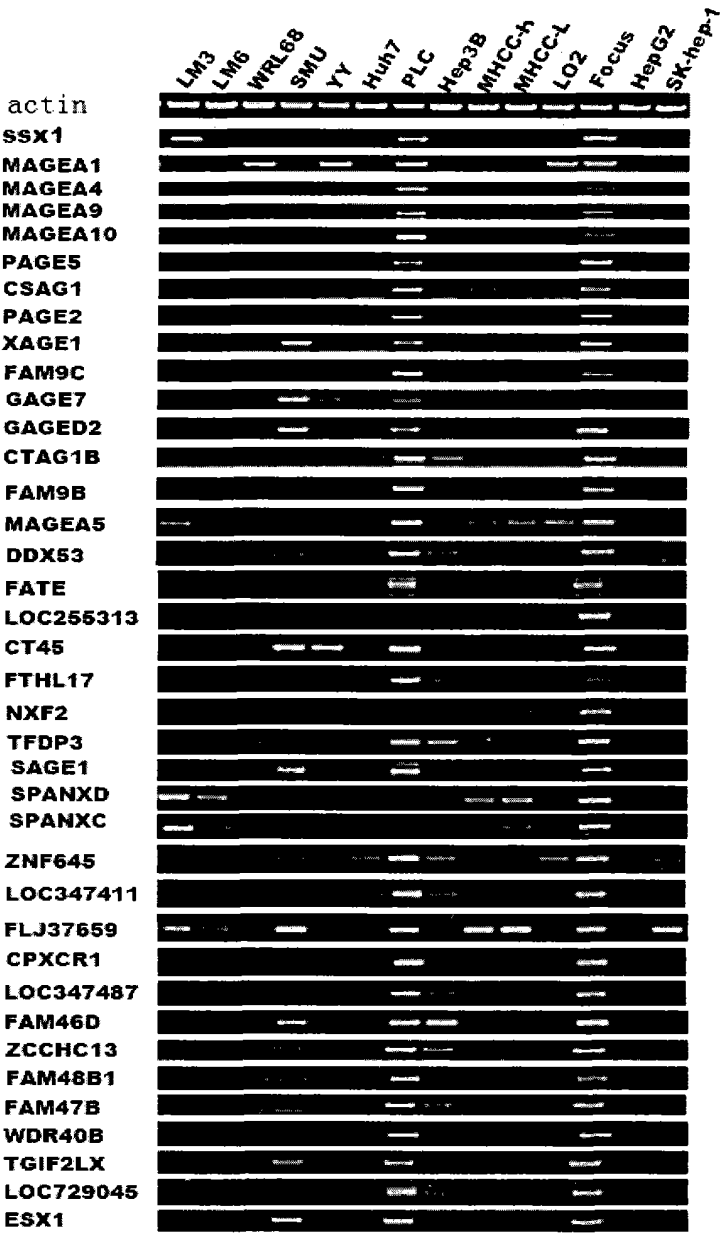


图 2

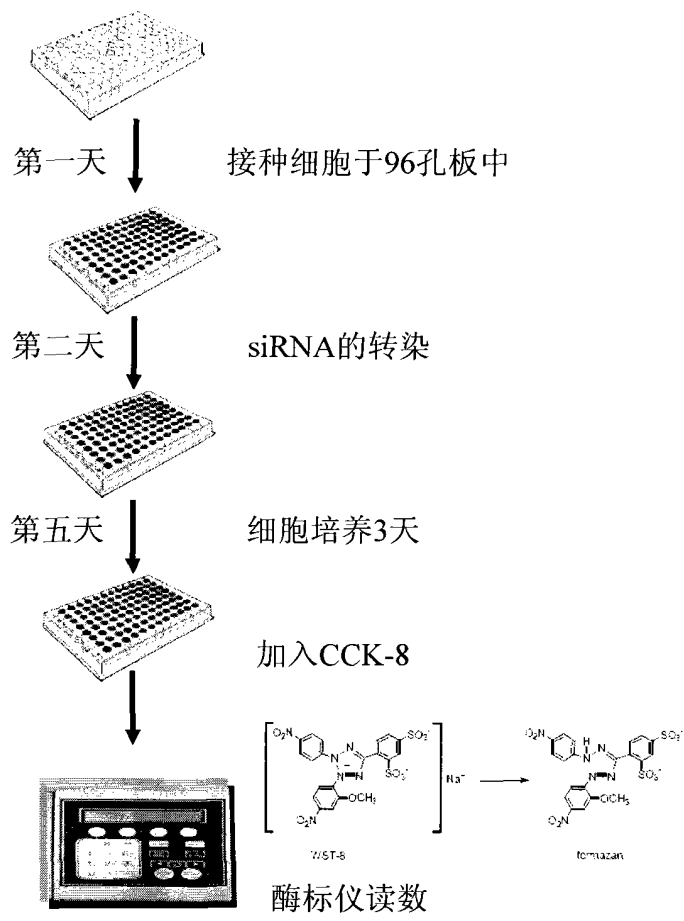


图 3

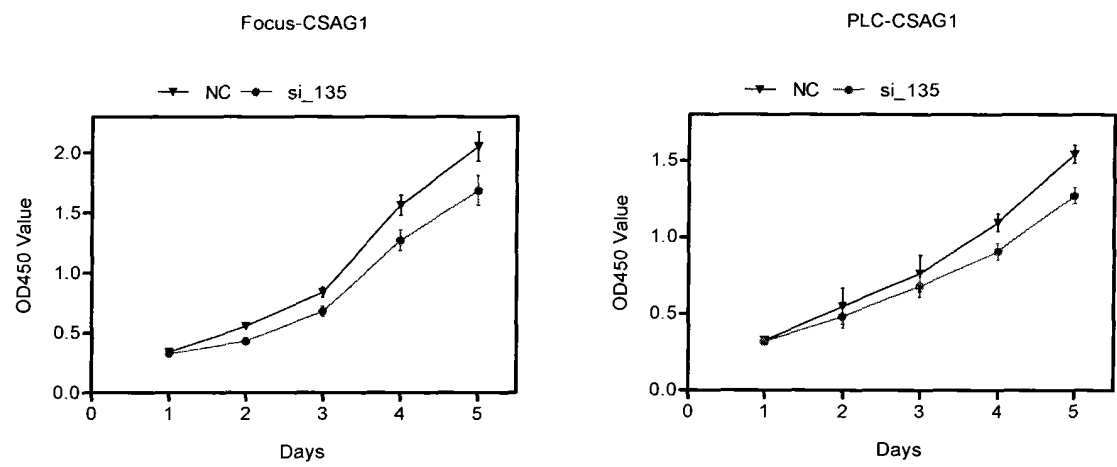


图 4