

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104357443 A

(43) 申请公布日 2015. 02. 18

(21) 申请号 201410687379. 8

(22) 申请日 2014. 11. 25

(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 范祖森 李翀 杜颖 杨昭  
何璐云 王彦英 阎新龙 朱平平

(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 王旭

(51) Int. Cl.

*C12N 15/11* (2006. 01)

*C12Q 1/68* (2006. 01)

权利要求书1页 说明书11页  
序列表2页 附图2页

### (54) 发明名称

一种用于膀胱癌筛查的长链非编码 RNA 的检测及其应用

### (57) 摘要

本发明涉及一种用于膀胱癌筛查的长链非编码 RNA 的检测及其应用,具体是利用长链非编码表达谱芯片技术,通过差异分析,筛选到一条在人膀胱癌组织中显著高表达的 lncRNA,命名为 lncRNA-AC1。与正常组织相比, lncRNA-AC1 在人膀胱癌组织中显著高表达,并在大样本荧光定量 PCR 实验中进一步证实 lncRNA-AC1 在人膀胱癌组织中的表达量明显高于正常组织。这一新型的 lncRNA-AC1 将进一步丰富膀胱癌发病机制的研究,也为膀胱癌的早期诊断及预后监测提供了新的肿瘤标志物和治疗靶点。

1. 一种在膀胱癌组织中高表达的 lncRNA, 名称为 lncRNA-AC1, 其核酸序列如 SEQ ID No. 1 所示。
2. 权利要求 1 所述的 lncRNA-AC1 用于制备诊断膀胱癌的诊断剂或试剂盒的用途。
3. 一种用于诊断膀胱癌的试剂盒, 其中包括:
  - 1) 用于扩增权利要求 1 所述 lncRNA-AC1 的特异性引物对;
  - 2) 标准 DNA 模板;
  - 3) PCR 反应液。
4. 根据权利要求 3 所述的试剂盒, 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。
5. 根据权利要求 3 所述的试剂盒, 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。
6. 根据权利要求 3 所述的试剂盒, 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。
7. 根据权利要求 6 所述的试剂盒, 所述荧光定量 PCR 反应液包括 dNTP、Mg<sup>2+</sup>、Taq 酶及缓冲液, 所述荧光染料为 SYBR Green II, Taq 酶为热启动酶。
8. 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;
  - 3) 定量扩增 lncRNA-AC1。
9. 权利要求 1 所述的 lncRNA-AC1 用作膀胱癌药物的新靶点的用途。

## 一种用于膀胱癌筛查的长链非编码 RNA 的检测及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于肿瘤分子生物学领域,具体涉及一种长链非编码 RNA 及其应用,具体而言,本发明涉及一种长链非编码 RNA 在制备膀胱癌辅助诊断或者预后制剂中的应用。

### 背景技术

[0002] 膀胱癌为泌尿系最常见的恶性肿瘤,发病率在美国被列为男性恶性肿瘤的第四位,女性恶性肿瘤的第七位,仅次于前列腺癌。在我国发病率为第八位,居泌尿系肿瘤第一位。膀胱癌约 95% 来源于膀胱上皮,绝大多数为恶性,其中以移行细胞癌最常见,占 80% 以上。膀胱癌在肿瘤切除后的“预防复发”是临床的一个重要难题。目前用于膀胱灌注预防复发的药物,虽然在一定程度上能降低膀胱癌术后复发率,但是因特异性差、肿瘤多药耐药性 (MDR) 等问题的存在,总体疗效并不理想。高达 40%~80% 的患者要发生一次或多次复发,10%~15% 的患者发展为更高级别的肿瘤或发生转移。

[0003] 由于膀胱癌极易复发,早期有效检测肿瘤的发生、发展及提高抗癌药物的疗效显得尤为重要,发掘新型膀胱肿瘤标志物作为诊断与治疗的靶点一直是膀胱肿瘤研究的热点。长链非编码 RNA (lncRNA) 是指长度超过 200 个核苷酸、具有调控基因表达作用的非编码 RNA。lncRNA 原先被认为是基因组转录的“噪音”,是 RNA 聚合酶 II 转录的副产物,没有生物学功能,然而,近几年研究表明,lncRNA 参与了 X 染色体沉默、基因组印记、染色质修饰、转录激活或抑制等多种重要的细胞调控功能。目前已发现的 lncRNA 主要分布在细胞核中,少部分分布在细胞质中。细胞核中 lncRNA 主要通过介导染色质修饰分子 DNA 甲基转移酶 DNMT3、PRC2 复合物、H3K4 甲基转移酶 MLL1 复合物、H3K9 甲基转移酶等到特定的基因组区域而发挥功能。根据作用位点的不同,主要分为 cis(调控相邻基因的表达)和 trans(调控远端基因的表达)作用的 lncRNA。然而,对于这两类 lncRNA,靶向作用的机制还急需深入研究和分析,尤其是 cis 作用的 lncRNA 如何停留在它们靶基因的转录位点,以及 trans 作用的 lncRNA 如何找到它们的远距离靶点。近年的研究发现,lncRNA 参与了细胞内多种重要生命活动,具有多样的调控机制。

### 发明内容

[0004] 本发明利用长链非编码表达谱芯片技术,通过差异分析,筛选到一条在人膀胱癌组织中显著高表达的 lncRNA,命名为 lncRNA-AC1,其转录区域位于 2 号染色体,全长 849bp。与正常组织相比,lncRNA-AC1 在人膀胱癌组织中显著高表达,并在大样本荧光定量 PCR 实验中进一步证实 lncRNA-AC1 在人膀胱癌组织中的表达量明显高于正常组织。这一新型的 lncRNA-AC1 将进一步丰富膀胱癌发病机制的研究,也为膀胱癌的早期诊断及预后监测提供了新的肿瘤标志物和治疗靶点。

[0005] 发明人提供的 3 对膀胱癌和癌旁组织,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 lncRNA 芯片产品 (Human lncRNA Microarray V3.0Service) 进行检测,筛选出一条在膀胱

癌组织中显著高表达的 lncRNA, 命名为 lncRNA-AC1, 其核酸序列如 SEQ ID No. 1 所示。后期经过 30 对人膀胱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 lncRNA-AC1 显著高于癌旁组织。lncRNA-AC1 作为膀胱癌的新靶点, 为膀胱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膀胱癌组织中高表达的 lncRNA, 其名称为 lncRNA-AC1, 其核酸序列如 SEQ ID No. 1 所示。

[0007] 本发明的第二个方面提供本发明第一个方面所述 lncRNA-AC1 用于制备诊断膀胱癌的药物或试剂盒的用途。

[0008] 在一个优选的实施方案中, 所述 lncRNA-AC1 用于膀胱癌的辅助诊断。

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

[0010] 1) 用于扩增 lncRNA-AC1 的特异性引物对;

[0011] 2) 标准 DNA 模板;

[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、 $Mg^{2+}$ 、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 lncRNA-AC1。

[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 7300real 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。

[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 lncRNA-AC1: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 <sub>2</sub> 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膀胱癌的方法,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 lncRNA-AC1,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 lncRNA-AC1 用作膀胱癌药物的新靶点的用途。

[0041] 本发明还公开了一种检测膀胱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 1 $\mu$ l (10 $\mu$ M); DNA 模板 cDNA 1 $\mu$ l; 50XROX 2 $\mu$ l; 2 $\times$ SYBR Green II 10 $\mu$ L, 加离子水至 5 $\mu$ L。荧光定量 PCR 程序: 95 $^{\circ}$ C 30s 预变性, 接 40 个循环: 95 $^{\circ}$ C 30s, 60 $^{\circ}$ C 30s。

#### 附图说明

[0043] 图 1. LncRNA 芯片聚类图, 显示 6 对膀胱癌与癌旁组织差异表达的 LncRNA 芯片聚类。

[0044] 图 2. 针对 lncRNA-AC1 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. 30 例膀胱癌临床样本的 lncRNA-AC1 验证 qRT-PCR 检测结果。

[0046] 图 4. qRT-PCR 检测膀胱癌组织样本中 lncRNA-AC1 的扩增曲线。

#### 具体实施方式

[0047] 实施例 1: 人膀胱癌与癌旁组织的 lncRNA 芯片表达分析

[0048] 一、材料和方法

[0049] 1. 材料

[0050] 组织样本来自于 3 对膀胱癌患者的住院病例手术切除样本, 每对包含膀胱癌组织和配对的癌旁组织。

[0051] 2. 方法

[0052] (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) 说明书提取膀胱癌组织和癌旁组织的总 RNA。

[0053] (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 LncRNA Microarray V3.0Service” 进行标记服务)

[0054] (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。

[0055] (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。

[0056] (5) 体外转录合成 cRNA: 以 cDNA 为模板, 利用 T7Enzyme Mix (上海康成生物工程有限公司) 合成 cRNA。

[0057] (6) 随机引物反转录: 取 1 $\mu$ g cRNA, 用随机引物进行反转录。

[0058] (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。

[0059] (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 GeneSpring GX 软件中, 进行差异基因筛选。

## [0060] 二、结果

[0061] 关于人膀胱癌的 lncRNA 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 lncRNAs。其中 lncRNA-AC1 显示出在癌组织中表达显著上调, 鉴于其可能在人膀胱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。

[0062] 实施例 2 :qRT-PCR 初步验证 lncRNA-AC1 在膀胱癌的癌组织和癌旁组织中的差异表达

## [0063] 一、实验材料

[0064] 选取 30 对 (不同于芯片测试的样本) 人膀胱癌的癌组织 (由昆明医科大学第二附属医院提供) 和配对癌旁组织, 对 lncRNA-AC1 的表达差异进行 qRT-PCR 验证。

## [0065] 二、实验方法和结果

## [0066] 1. 引物特异性鉴定

[0067] (1) 特异性引物的设计: 从 Ensemble 数据库提取 lncRNA-AC1 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;

[0068] 设计后的引物序列如下:

[0069] 上游引物 :SEQ ID No. 2

[0070] 下游引物 :SEQ ID No. 3

[0071] (2) 将人膀胱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 7300real 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。

[0072] (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。

[0073] 第一步打开 RNA 二级结构, 反应体系及条件如下:

[0074]

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

[0075] 将上述组分混合后 70 度反应 5min 然后冰浴 10min

[0076] 第二步反转录反应, 反应体系及条件如下:

[0077]

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

[0078] 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。

[0079] (4) lncRNA-AC1 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。

[0080] 荧光定量 PCR 体系:

[0081]

试剂	用量
2×MIX	10ul
50×ROX	2ul
引物	各 1ul
DNA 模板	1ul

[0082]

RNase Free	补齐至 20ul
ddH <sub>2</sub> O	

[0083] 荧光定量 PCR 程序: 95℃ 30s 预变性, 接 40 个循环: 95℃ 30s, 60℃ 30s。

[0084] (5) 电泳检测, 选用 DM2000DNA 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, 其序列见序列表 SEQ ID No. 2, 下游的特异性引物, 其序列见序列表 SEQ ID No. 3。

[0085] 2. 样品总 RNA 的提取:

[0086] 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膀胱癌组织或肿瘤的 Total RNA。主要操作步骤如下:

[0087] (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;

[0088] (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;

[0089] (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;

[0090] (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;

[0091] (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。

[0092] 3. 标准 DNA 模板的制备

[0093] 根据 lncRNA-AC1 碱基序列 (其核酸序列如序列表 SEQ ID No. 1 所示), 委托上海



生工合成。

[0094] 取样 2u1 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 7300real 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 / u1)。

[0095] 4. 敏感性实验

[0096] 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 / u1, 进行荧光定量 PCR, 检测灵敏度。最低检出浓度为  $10^2$  拷贝 / u1。

[0097] 5. 合成 cDNA 模板

[0098] 取上述 30 对膀胱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。

[0099] 第一步打开 RNA 二级结构, 反应体系及条件如下:

[0100]

试剂	用量
Oligo dT	1u1
RNA	1-2ug
DEPC 水	补齐至 20u1

[0101] 将上述组分混合后 70 度反应 5min 然后冰浴 10min

[0102] 第二步反转录反应, 反应体系及条件如下:

[0103]

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

[0104] 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。

[0105] 6. 荧光定量 PCR 检测 lncRNA-AC1 表达量

[0106] 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。

[0107] 荧光定量 PCR 体系:

[0108]

试剂	用量
2*MIX	10ul
50*ROX	2ul

[0109]

引物	各 1ul
DNA 模板	1ul
RNase Free d	补齐至 20ul
H2O	

[0110] 荧光定量 PCR 程序 :95℃ 30s 预变性,接 40 个循环 :95℃ 30s,60℃ 30s。

[0111] 根据 qRT-PCR 的相对定量公式 : $2^{-\Delta Ct}$ , 分别计算出 lncRNA-AC1 在膀胱癌患者癌组织 (T) 和癌旁组织 (N) 中的表达水平, 结果如图 3 所示 :lncRNA-AC1 在癌旁组织中的表达水平主要集中在 0.27-3.16 之间, 而癌组织中的 lncRNA-AC1 的表达量主要集中在 0.86-14.5 之间, 明显高于正常组织。以上结果说明, lncRNA-AC1 在肿瘤组织中普遍高表达。本实验结果显示 :lncRNA-AC1 在 30 例膀胱癌与癌旁组织中, 26 例上调, 阳性检出率 = 上调表达例数 / 总检测例数  $\times 100\% = 26/30 = 86.7\%$ 。lncRNA-AC1 可以作为膀胱癌诊断的新肿瘤标志物, 用于膀胱癌的筛查。

[0112] 实施例 3 :利用 lncRNA-AC1 的差异表达对膀胱癌组织进行筛查

[0113] 一、实验材料

[0114] 选取 100 份人膀胱癌组织和 100 份癌旁组织 (由昆明医科大学第二附属医院提供), 对 lncRNA-AC1 的表达差异进行 qRT-PCR 检测。

[0115] 二、实验方法和结果

[0116] 1. 引物特异性鉴定

[0117] (1) 采用如下特异性引物序列 :

[0118] 上游引物 :SEQ ID No. 2

[0119] 下游引物 :SEQ ID No. 3

[0120] (2) 将人膀胱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 7300real 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。

[0121] (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。

[0122] 第一步打开 RNA 二级结构, 反应体系及条件如下 :

[0123]

试剂	用量

[0124]

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

[0125] 将上述组分混合后 70 度反应 5min 然后冰浴 10min

[0126] 第二步反转录反应,反应体系及条件如下:

[0127]

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

[0128] 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。

[0129] (4) lncRNA-AC1 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。

[0130] 荧光定量 PCR 体系:

[0131]

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

[0132] 荧光定量 PCR 程序: 95°C 30s 预变性, 接 40 个循环: 95°C 30s, 60°C 30s。

[0133] 2. 样品总 RNA 的提取:

[0134] 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膀胱癌组织或肿瘤的 Total RNA。主要操作步骤如下:

[0135] (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;

- [0136] (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;
- [0137] (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;
- [0138] (4) 吸取上层水相(约 200-300u1)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;
- [0139] (5) 弃上清,用 75%的乙醇洗涤 RNA 沉淀一次,用 20u1 无 RNA 酶的水吹打几次溶解 RNA,保存于 -80℃低温冰箱。
- [0140] 3. 合成 cDNA 模板
- [0141] 取上述 100 例膀胱癌组织和 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。
- [0142] 第一步打开 RNA 二级结构,反应体系及条件如下:

[0143]

试剂	用量
Oligo dT	1u1
RNA	1-2ug
DEPC 水	补齐至 20u1

[0144] 将上述组分混合后 70 度反应 5min 然后冰浴 10min

[0145] 第二步反转录反应,反应体系及条件如下:

[0146]

试剂	用量
2.5mM dNTP	2.5u1
5*RT buffer	6u1
HPR(RNase 抑制剂)	0.6u1
MLV(逆转录酶)	0.4u1

[0147] 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。

[0148] 4. 荧光定量 PCR 检测 lncRNA-AC1 表达量

[0149] 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。

[0150] 荧光定量 PCR 体系:

[0151]

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

[0152] 荧光定量 PCR 程序 :95℃ 30s 预变性,接 40 个循环 :95℃ 30s,60℃ 30s。

[0153] qRT-PCR 检测膀胱癌组织样本中 lncRNA-AC1 的扩增曲线如图 4 所示。产物扩增曲线在反应的早期就可能被监测到,起始点表示产物聚集的对数期开始,该期产物的荧光信号呈指数增长,检测仪将此点定义为 Ct 值。根据 Ct 值可以预测靶基因产物的起始浓度,即在 PCR 反应条件相同的情况下,靶基因起始浓度越大,则 Ct 值就越低。我们将癌旁对照组均值的 95%可信区间的上界 ( $X \pm 1.83SD$ ) 作为本诊断实验的 Cut-off 值,其值为 3.918。在此分界值条件下,本诊断实验的灵敏度为 92%,特异度为 83%。

[0154]

		实际样品		合计
		+	-	
检测结果	+	92	17	109
	-	8	83	91
合计		100	100	200

[0155] 临床灵敏度可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。

[0156] 本实验灵敏度 =  $92 / (92 + 8) \times \% = 92\%$ 。

[0157] 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。

[0158] 本实验特异度 =  $83 / (17 + 83) \times \% = 83\%$ 。

[0159] 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,则强烈提示肿瘤存在于此处。lncRNA 作为全新的长链非编码 RNA,不仅能成为膀胱癌诊断的肿瘤标志物,而且有望成为膀胱癌治疗靶点,具有十分重要的科学意义和生理意义。

[0001]

## 序 列 表

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; 中国科学院生物物理研究所

&lt;120&gt; 一种用于膀胱癌筛查的长链非编码 RNA 的检测及其应用

&lt;130&gt; IB148713

&lt;160&gt; 3

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 849

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 1

```

tgataattca cagcceggaa ggaacactac cttatttaga tgtgctgccc ccagaggagg      60
gggaaagaag gaggaggagg gggatttaga agcaggtaga gtaaaaggag aagatagaag      120
gcaccggtga ttctgagaat tcaaggacce tgctttagtag ctgtgtggac cccatactct      180
cttcctatcc caaaccttcc tattccacca ggggtgccctt ctacaagggc caggacctec      240
tccaggccac agcagtcacc tggatgatga gggctccagg aggcaccctc aacctggaa      300
ttctcttttt caaataagag atccagggtga gaaccgtgag gatgggcact tggacaggaa      360
gaggttgctt tggcccgagc agcaacaacg ttggtcactc aagccttcac caggttctgc      420
tccacacaga aggaaggaaa gcccatctca tcaggccttg ggcaccaaca acacaaatag      480
ttccttgeta gcaatacatt ttcgatatg tttttgette ttectetaac gttaacctt      540
gggtatattt caaaagaaac gcaagtctgc ttgcttctga ttcatactca ctgagatcat      600
caaaaccaga attatttggg aatagctgct gggtttactg gatgccctct gggatctgta      660

```

[0002]

aaateictat tccicagaaa caggaagtti caacaagagg aaggaggctg gtigcaaaaa	720
tcaaaatttg aatcttctcc acctattgga gagcccagcg ttcattggcac ticcctcagc	780
cagttaacaa atgtggattc ggigcctact gtgtgcagga actggggaca gagatgatti	840
tttaagggg	849

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

gatccaggtg agaaccgiga	20
-----------------------	----

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3

ccagctcct tccctctgtt g	21
------------------------	----

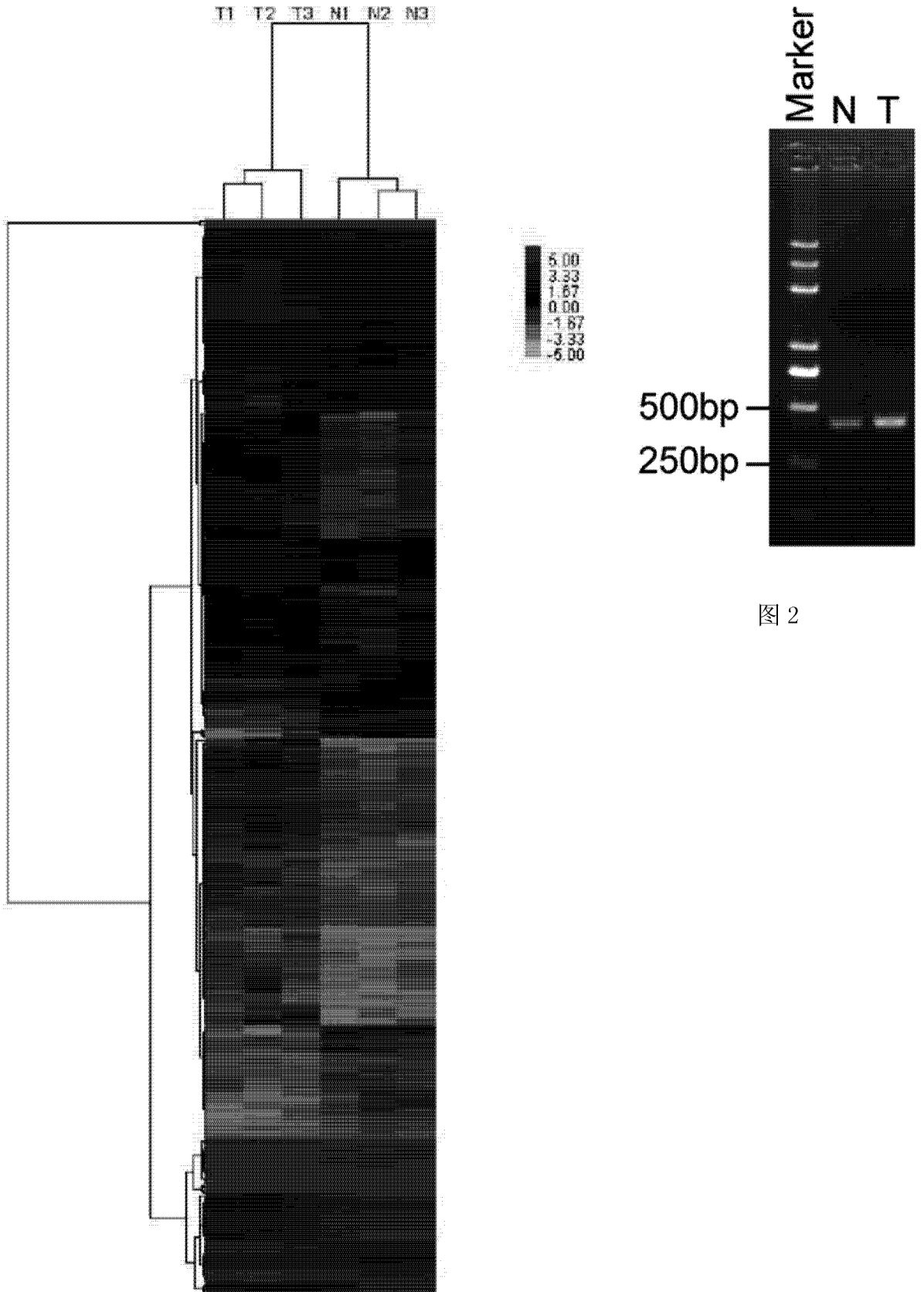


图 1

图 2



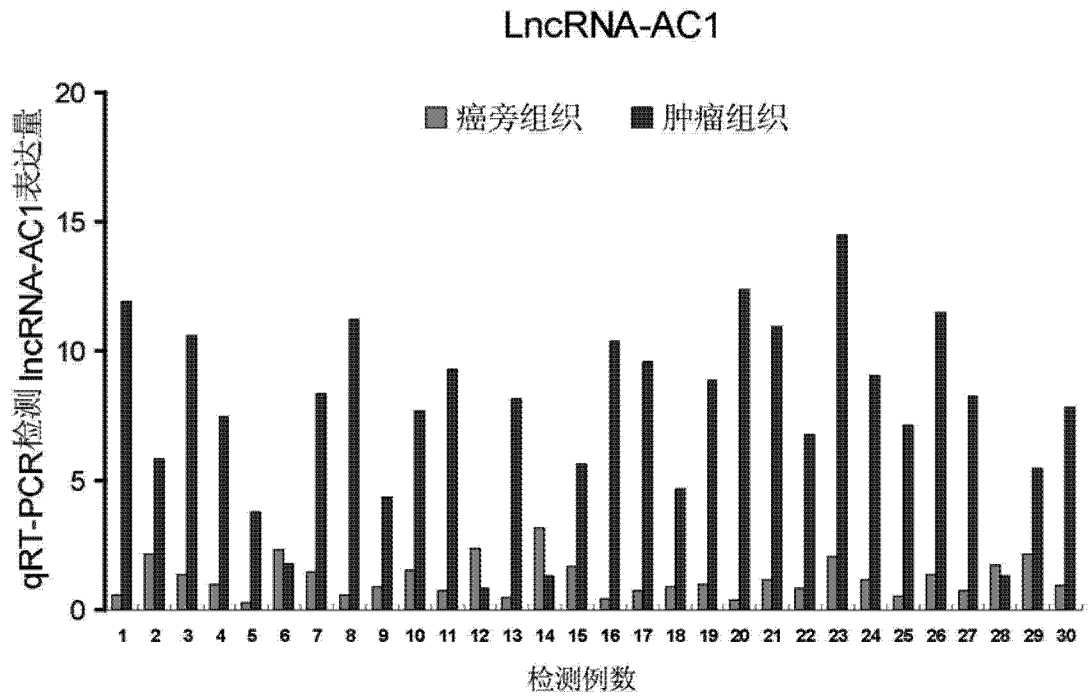
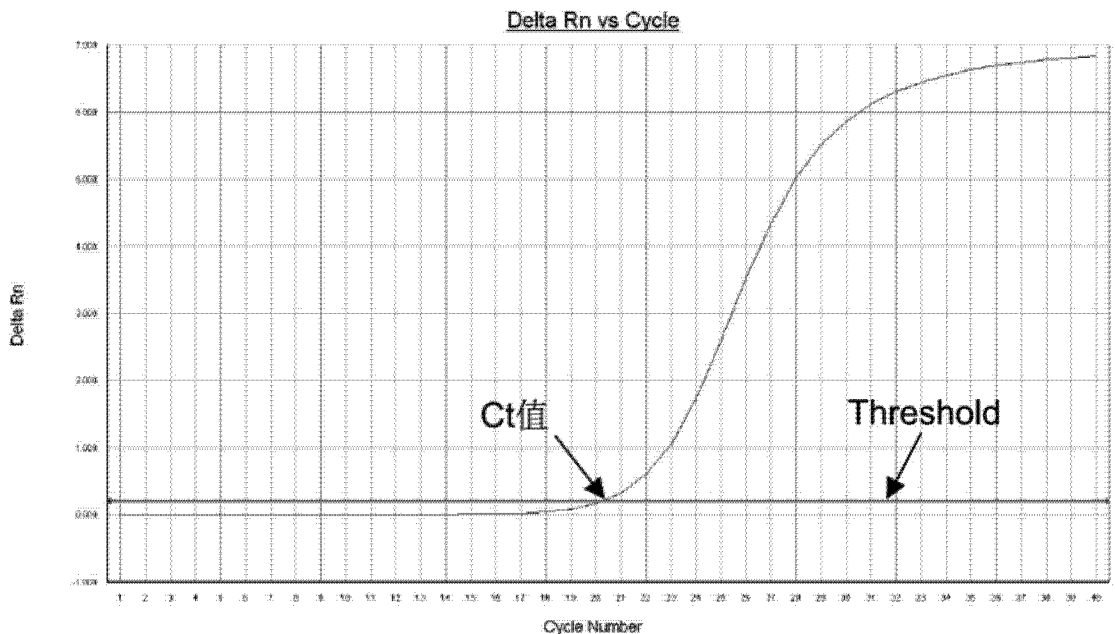


图 3



扩增曲线

图 4