



上海伯豪生物技术有限公司
SHANGHAI BIOTECHNOLOGY CORPORATION

基因编辑与基因功能研究

——一站式解决方案

服务科技创新 护航人类健康



产品列表

基因缺失/获得功能研究

CRISPR/Cas9基因删除服务
CRISPRi服务
RNAi服务
基因过表达服务

细胞表型检测服务

周期
增殖
凋亡
侵袭
迁移
克隆形成
自噬
EMT
血管生成

基因功能及机制研究工具

高级分析共表达&IPA
基因芯片
PCR-array
蛋白芯片/磷酸化因子检测
Pulldown
Co-IP
ChIP
RIP
双荧光素酶报告系统服务
RNA-FISH

动物实验服务

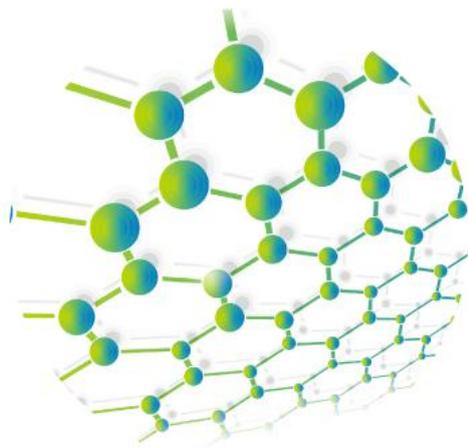
动物给药实验
动物疾病模型
移植瘤
基因敲除动物模型

配套服务

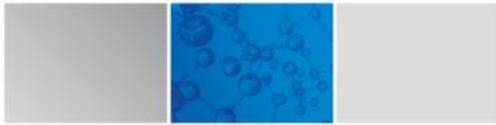
慢病毒包装/感染服务
细胞库
支原体检测&清除试剂盒
细胞系STR鉴定
上游相关服务

目录

CONTENTS



- P01 公司介绍
- P03 前言
- P06 CRISPR/Cas9基因编辑服务
- P10 RNAi服务
- P12 基因过表达服务
- P14 细胞表型检测服务
- P15 基因功能预测和信号通路研究工具
- P18 相互作用的研究和验证服务
- P20 动物实验服务
- P21 慢病毒包装/感染服务
- P23 伯豪细胞库
- P23 支原体检测&清除试剂盒
- P25 细胞系STR鉴定
- P25 上游相关服务
- P26 精选文献分析
- P28 经典研究策略图例



www.shbio.com

公司介绍

上海伯豪生物技术有限公司(以下简称“伯豪生物”)2008年12月成立,是一家以科技服务、疾病与健康检测、分子检测产品的开发和生产为主营业务的高新技术企业。公司形成了面向科研和临床的系统技术服务平台,提供全基因组测序、生物信息分析、标志物筛选和分子检测验证、基因功能验证科研一站式服务,同时提供试剂盒开发、生产以及检测应用的转化医学的临床一站式服务。伯豪生物携手各参控股子公司重庆伯豪医学检验所(临床医学检测专业子公司)、伯豪医药(医疗器械经营专业子公司)和迅伯生物(产品研发和GMP生产专业子公司)共同开启“专业服务成就科学发现,产业布局构筑精准医学”的新篇章。



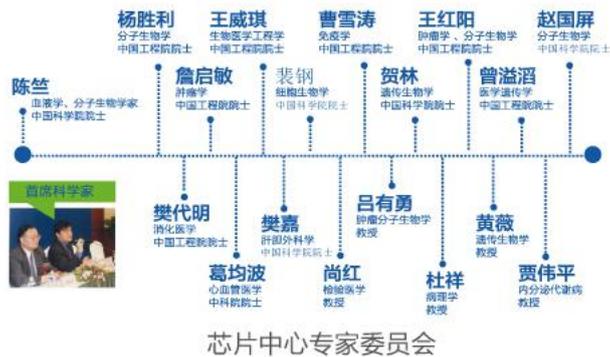
高新技术企业



国家基因检测技术应用示范中心



浦东新区企业研发机构



芯片中心专家委员会

1 伯豪生物多样灵活的服务平台, 系统的生物学研究解决方案, 全力加速您组学研究的进程!

伯豪生物建立了规范化的质量控制体系, 通过了ISO9001:2015质量管理体系的认证, 并参照GLP-L的标准, 通过156个SOP文件对项目、样品、实验过程、生物信息分析过程、数据信息管理、保密等进行严格质控。



2 多样化的服务平台

伯豪生物多样灵活的服务平台, 系统的生物学研究解决方案, 全力加速您组学研究的进程!

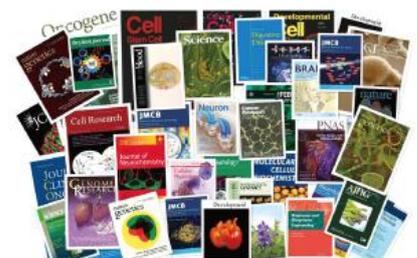


3 丰富的项目经验

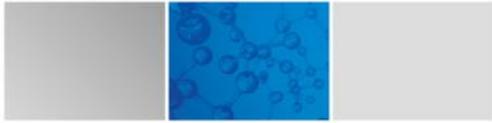
伯豪生物从事技术服务15年, 承接项目数超过10000个, 用户单位3000家以上, 协助客户发表SCI论文1300余篇 (影响因子共计6000多分), 全面推动中国基因组学服务产业的发展。



客户分布网络图

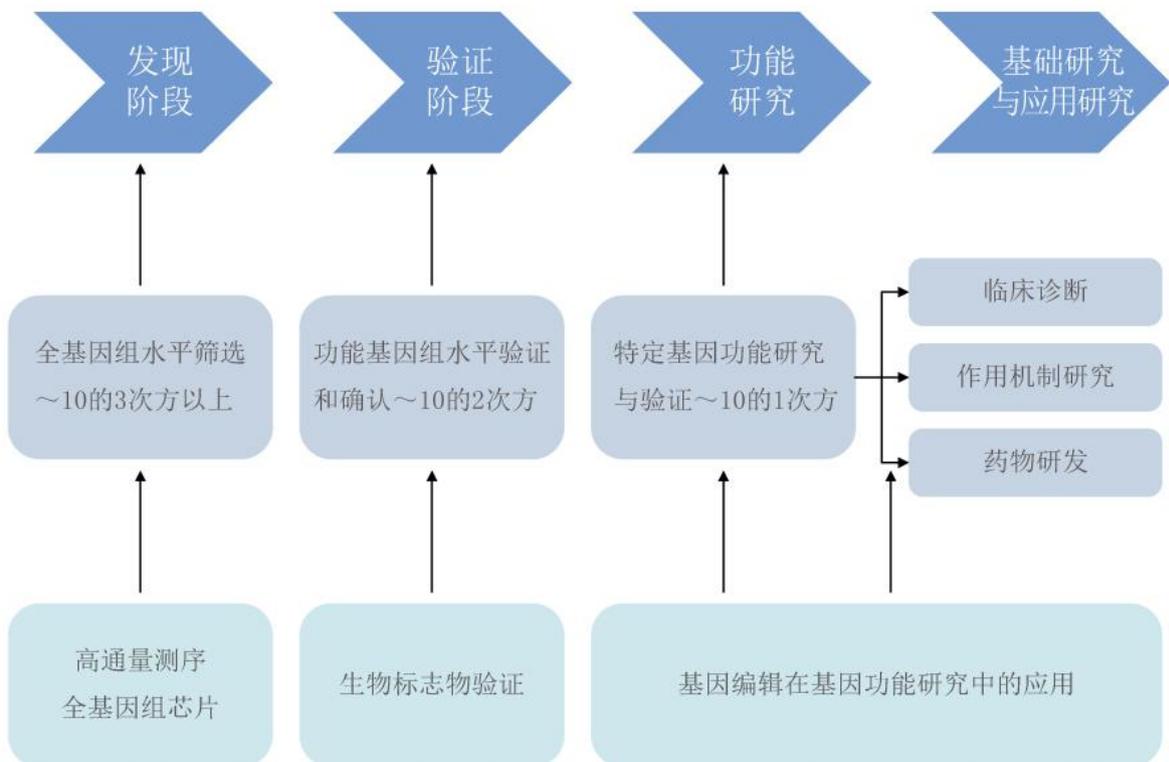


伯豪生物协助客户发表相关文章

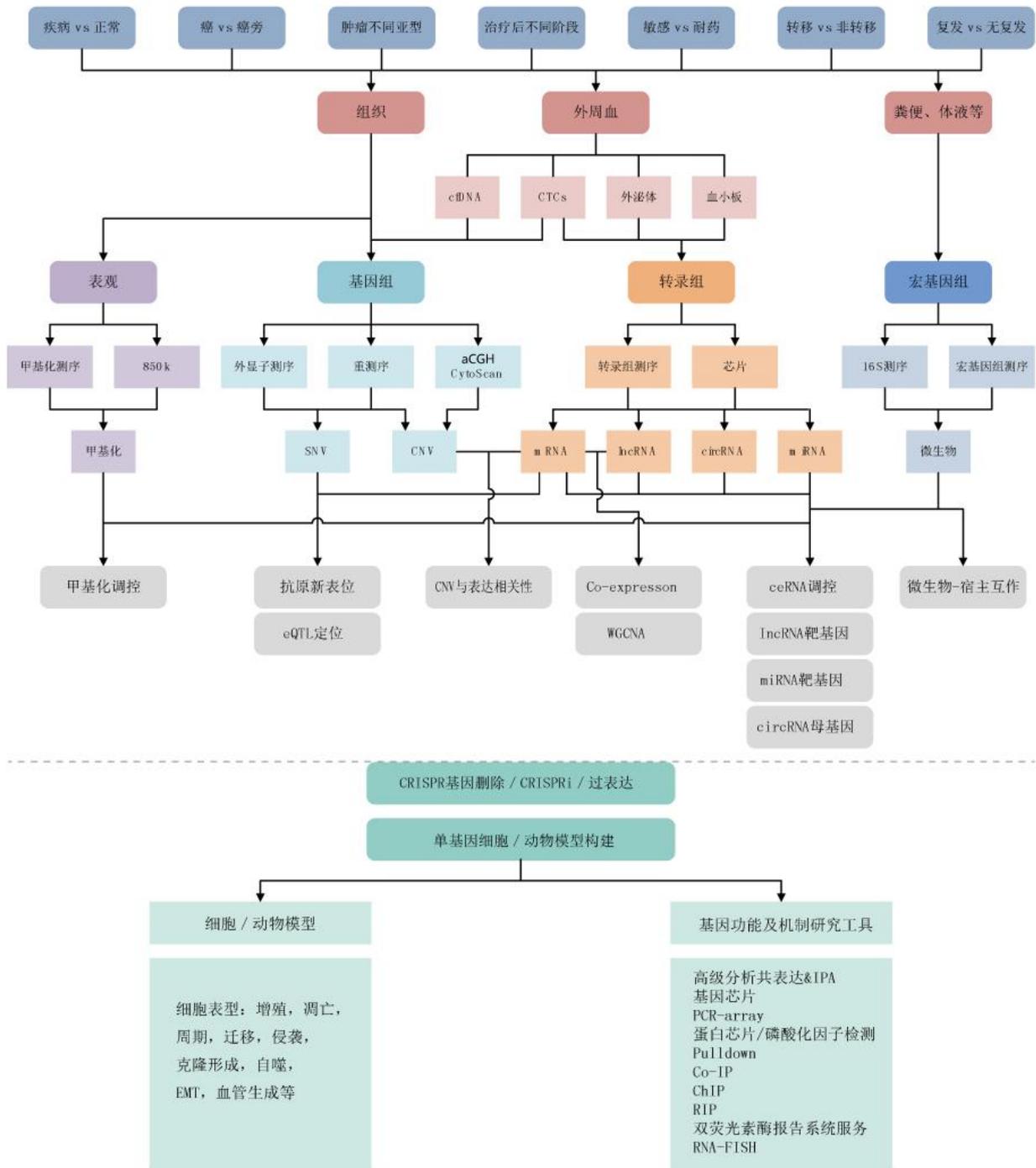


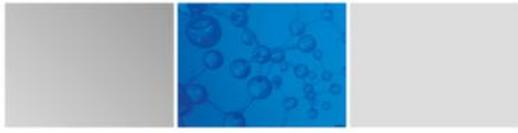
前言

生物科学研究,可以分为“发现阶段”、“验证阶段”、“功能研究”及“基础研究与应用研究”。筛选出好的 biomarker 并验证之后,已经能够发文章了。当然,还可以在此基础上进行更深入的工作,发掘更多的信息。这就需要针对此 biomarker 的基因进行“功能研究”,即研究此基因在细胞水平或动物水平上,如何行使其功能,如何与其它分子相互作用,更多基因如何形成相互作用的网络等。

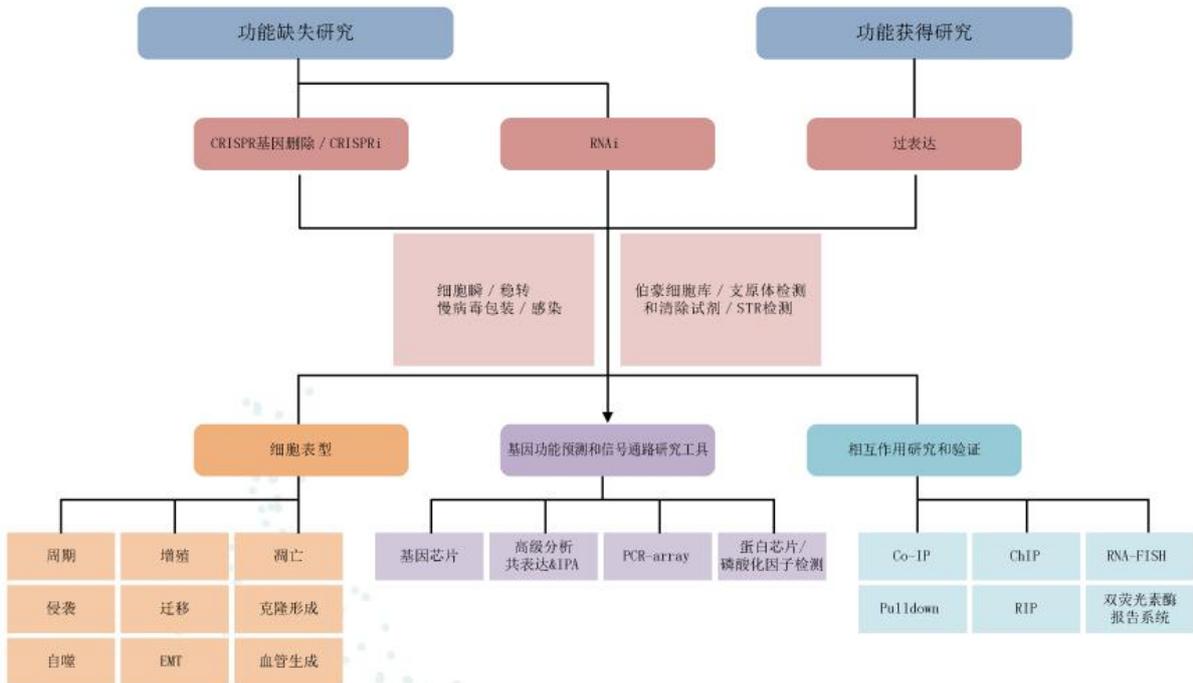


伯豪生物提供上下游一体一站式服务，只需样本，可提供从高通量技术出发到基因功能研究的全套解决方案，为临床诊断、个体化治疗、药物研发、研究论文发表等多方面提供帮助。





功能研究通常可分为以下两大类研究策略:基因功能缺失 Loss of function和基因功能获得 Gain of function:将基因导入到一个细胞或个体中, 或者从细胞或个体中将基因失活,通过观察细胞生物学行为或个体表型遗传性状的变化,从而鉴定基因的功能。一般情况下,大家会先在细胞中进行实验,如需更进一步,再在动物体内进行。下图展示了在细胞中的研究思路:





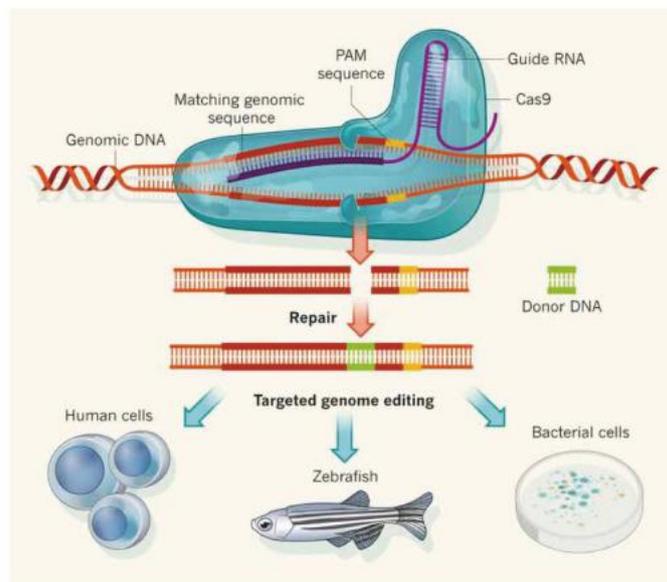
CRISPR/Cas9基因编辑服务



CRISPR/Cas(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats),是细菌和古细菌为应对病毒和质粒不断攻击而演化来的获得性免疫防御机制,其主要功能是对抗入侵的病毒及外源DNA。科学家利用CRISPR/Cas系统可以对多种细胞的特定的基因组位点上进行切割,以便插入新的遗传物质。在需要对目的基因的功能进行破坏,或者要进行目的基因替换时都可以使用CRISPR/Cas系统,可以像编辑文字一样编辑基因,因此被称为基因编辑技术。

本技术具有简便、快捷、精准等优点,于2016年获得被喻为“豪华诺贝尔奖”的生命科学突破奖。CRISPR/Cas的开发为构建更高效的基因定点修饰技术提供了全新平台。

sgRNA与靶DNA结合,招募Cas9内切酶形成复合物,Cas9内切酶则切割,断裂DNA双链,体内启动DNA修复。在无外源模板的情况下,修复导致DNA移码突变,蛋白质无法翻译或者失去功能,达到了基因敲除(Knock-out)的目的。在有外源模板(双链断裂DNA同源的DNA片段)的情况下,可以通过人为的添加同源的DNA序列达到基因定点敲入(Knock-in)的目的。

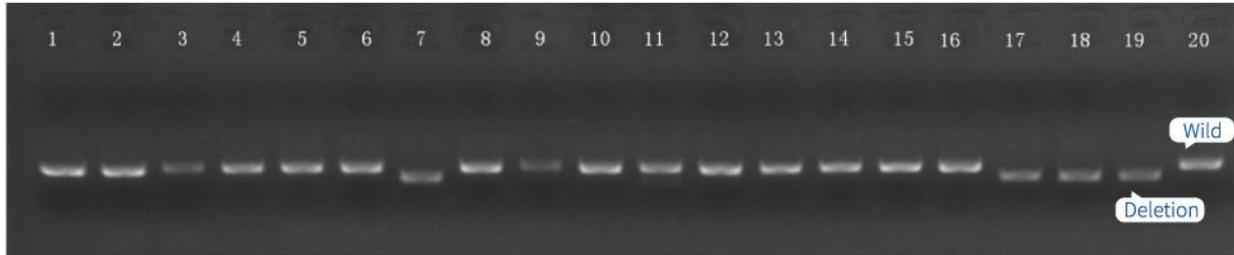


CRISPR / Cas9基因编辑原理





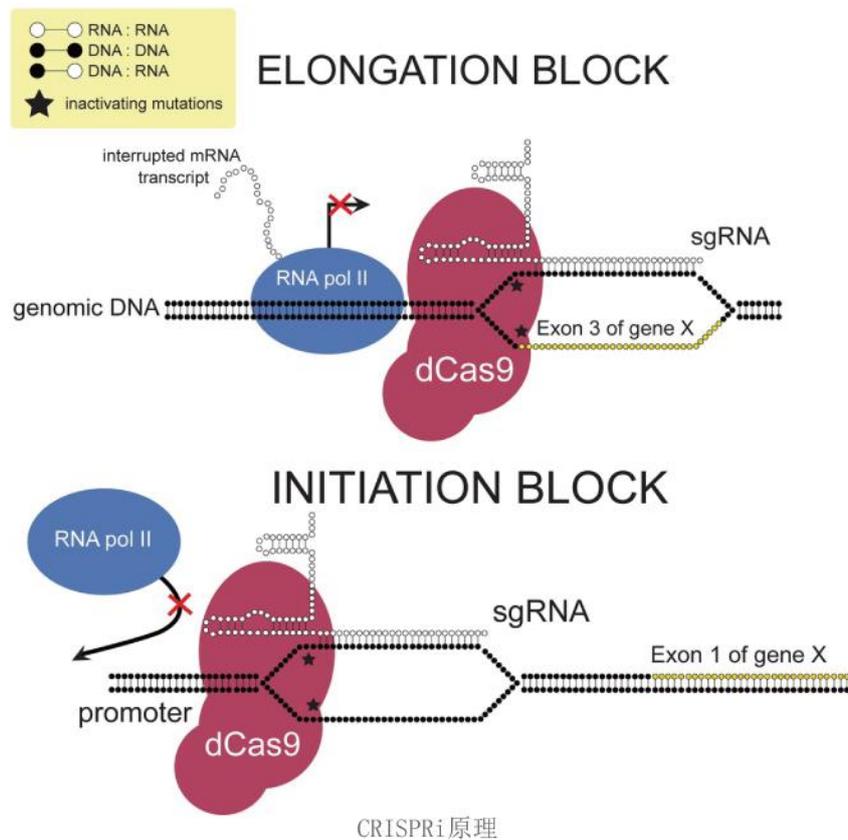
www.shbio.com

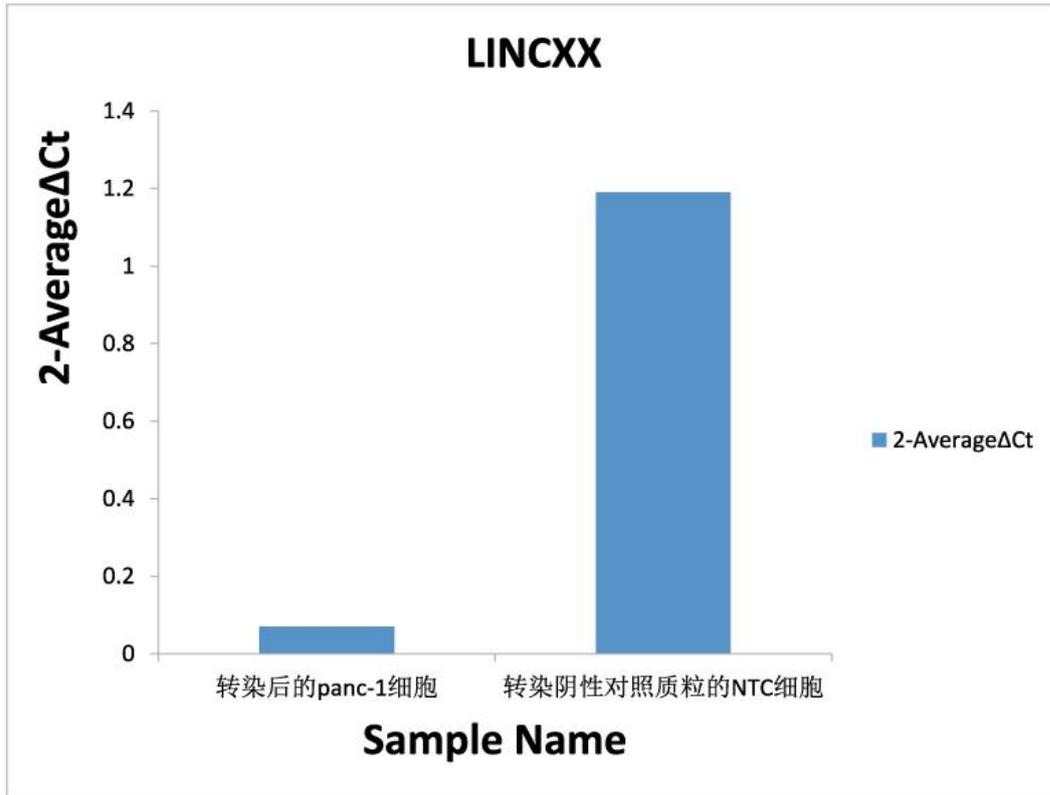


应用CRISPR技术建立miRNA-126的敲除细胞系。上图为sgRNA设计示意，下图为筛选阳性克隆电泳图。由伯豪生物实验室完成。

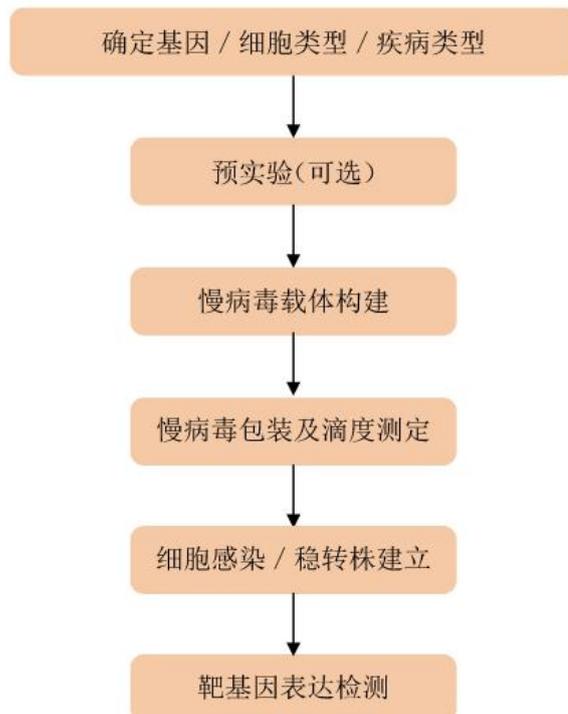


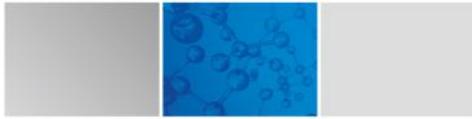
将体系里的Cas9突变成dCas9(dead Cas9)，它没有切割DNA活性。在目标基因启动子区域或者增强子区设计sgRNA，引导dCas9蛋白靶向结合该基因的启动子区域的DNA。则该位置被dCas9“占据”，基因转录被抑制。还可将转录抑制肽KRAB repressor融合在dCas9蛋白的C端，使转录抑制更强化。





CRISPRi 高效敲降(效率为90%以上)。由伯豪生物实验室完成。





www.shbio.com



客户提供基因信息, 疾病信息, 活细胞或细胞类型、培养条件信息。
公司提供细胞稳定株, 及实验报告(材料、试剂、仪器、方法、实验结果)。



Xing YH, Yao RW, Zhang Y, Guo CJ, Jiang S, Xu G, Dong R, Yang L, Chen LL. SLERT Regulates DDX21 Rings Associated with Pol I Transcription. Cell. 2017 May 4;169(4):664-678. e16.

Yi Zheng et al. CRISPR interference-based specific and efficient gene inactivation in the brain. Nature Neuroscience. 2018



快速高效

操作简便, 只需设计sgRNA, 整个实验周期一般需45—60个工作日(以293T细胞为参照)。

定向精准

由RNA指导的Cas9核酸酶进行靶向剪切, 大大降低基因编辑中脱靶发生率。

应用广泛

可构建mRNA和非编码RNA(lncRNA, miRNA, ceRNA)的删除、低表达或高表达细胞模型。

灵活多变

拥有上下游配套研究工具, 如高通量测序、芯片、qPCR、基因功能预测等。通过与CRISPR技术进行不同组合, 帮助研究者实现多样研究目的。

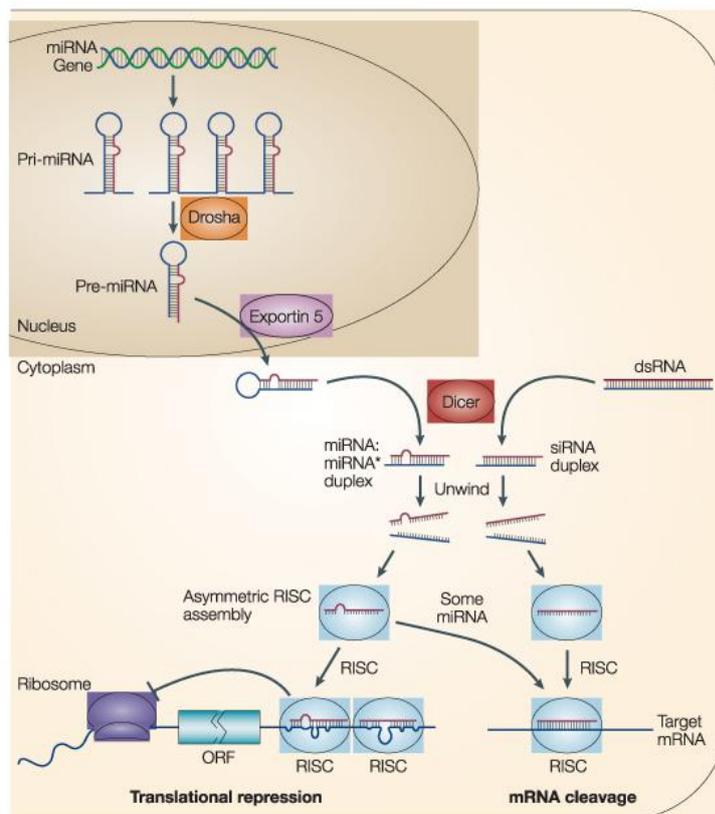
全程一站

只需提供样本, 可提供从高通量技术出发到基因功能研究的全套技术研究方案。

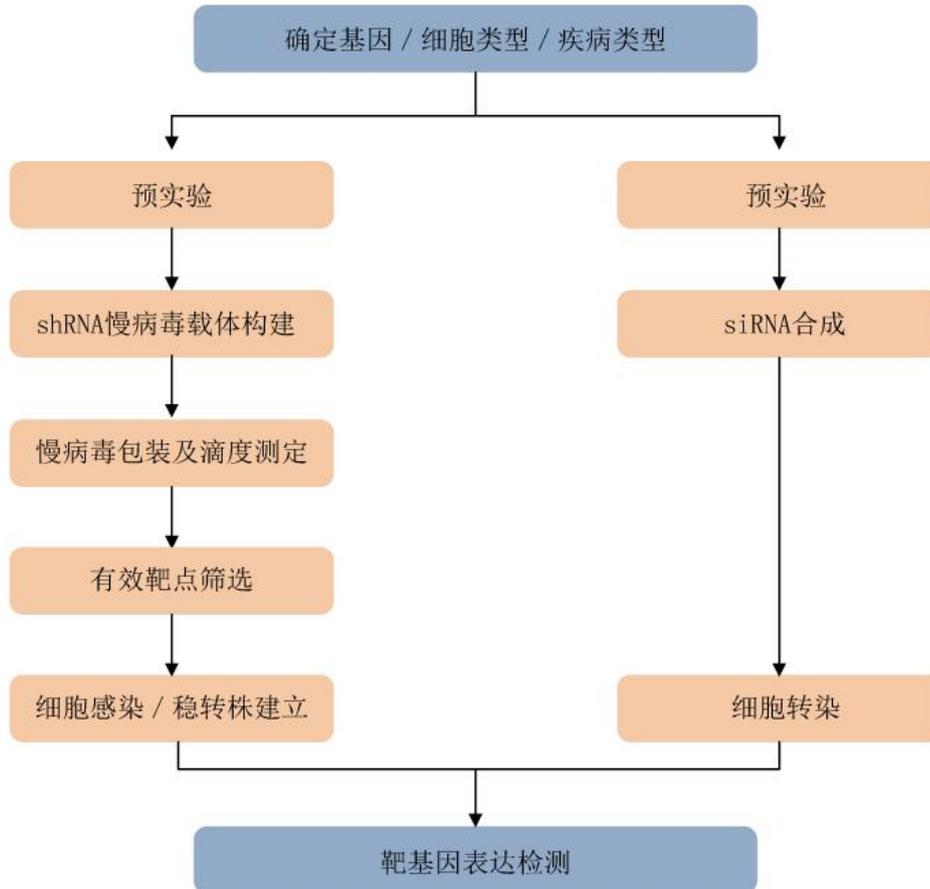
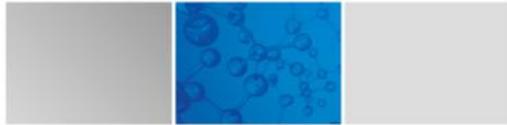


RNAi (RNA干扰)是指双链RNA(dsRNA)分子,使基因表达沉寂的现象,科学家们在线虫中发现这一现象,并在1998年的一篇Nature论文中公诸于众。RNAi几乎适用于所有真核生物体内,是研究“loss of function”的特异、有效且非常成功的方法。

siRNA在细胞内RNA解旋酶的作用下解链,由反义siRNA再与体内一些酶(包括内切酶、外切酶、解旋酶等)结合形成RNA诱导的沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)。RISC具有核酸酶的功能,与mRNA进行特异性结合并切割mRNA。shRNA(short hairpin RNA,短发夹RNA)可被加工为siRNA。可用于基因敲降(knock-down)。



RNAi 原理



客户提供基因信息, 疾病信息, 活细胞或细胞类型、培养条件信息。
公司提供细胞稳定株, 及实验报告(材料、试剂、仪器、方法、实验结果)。



Pearson MJ. Endogenous Galectin-9 Suppresses Apoptosis in Human Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts. Sci Rep. 2018 Aug 27;8(1):12887.

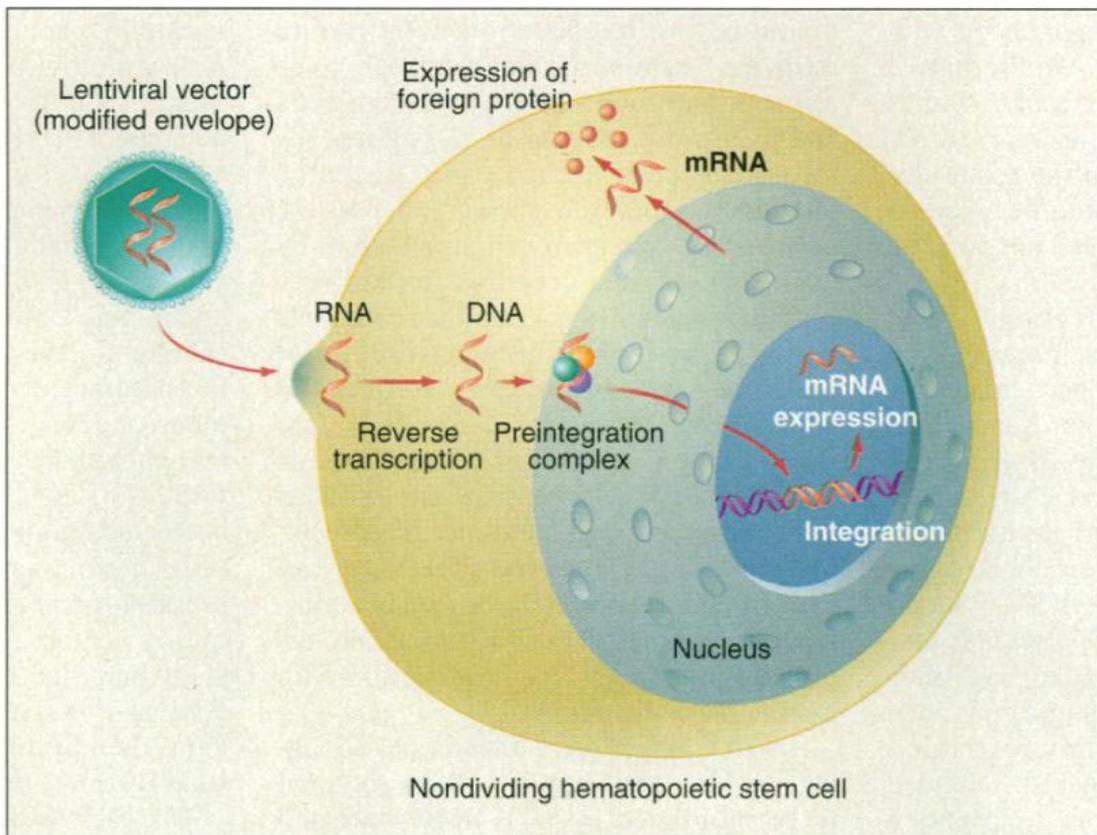


基因过表达服务

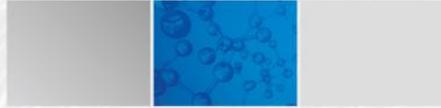


在细胞水平上进行基因功能获得 (Gain of function) 研究, 可以使用基因过表达技术。常规技术是将目的基因转入细胞内, 增加目的基因的拷贝数。也可在目的基因上游加入调控元件, 使基因的表达可以在人为控制的条件下进行。

可以得到目的基因的过表达细胞株, 通过下游的实验研究其在细胞内的功能。可检测蛋白定位、细胞表型, 可用于信号通路研究等。也可以将过表达的蛋白纯化, 在体外研究其功能, 可用于酶活检测等。



基因过表达



www.shbio.com



客户提供基因信息, 疾病信息, 活细胞或细胞类型、培养条件信息。
公司提供细胞稳定株, 及实验报告(材料、试剂、仪器、方法、实验结果)。



Prelich G. Gene overexpression: uses, mechanisms, and interpretation. Genetics. 2012 Mar;190(3):841-54.

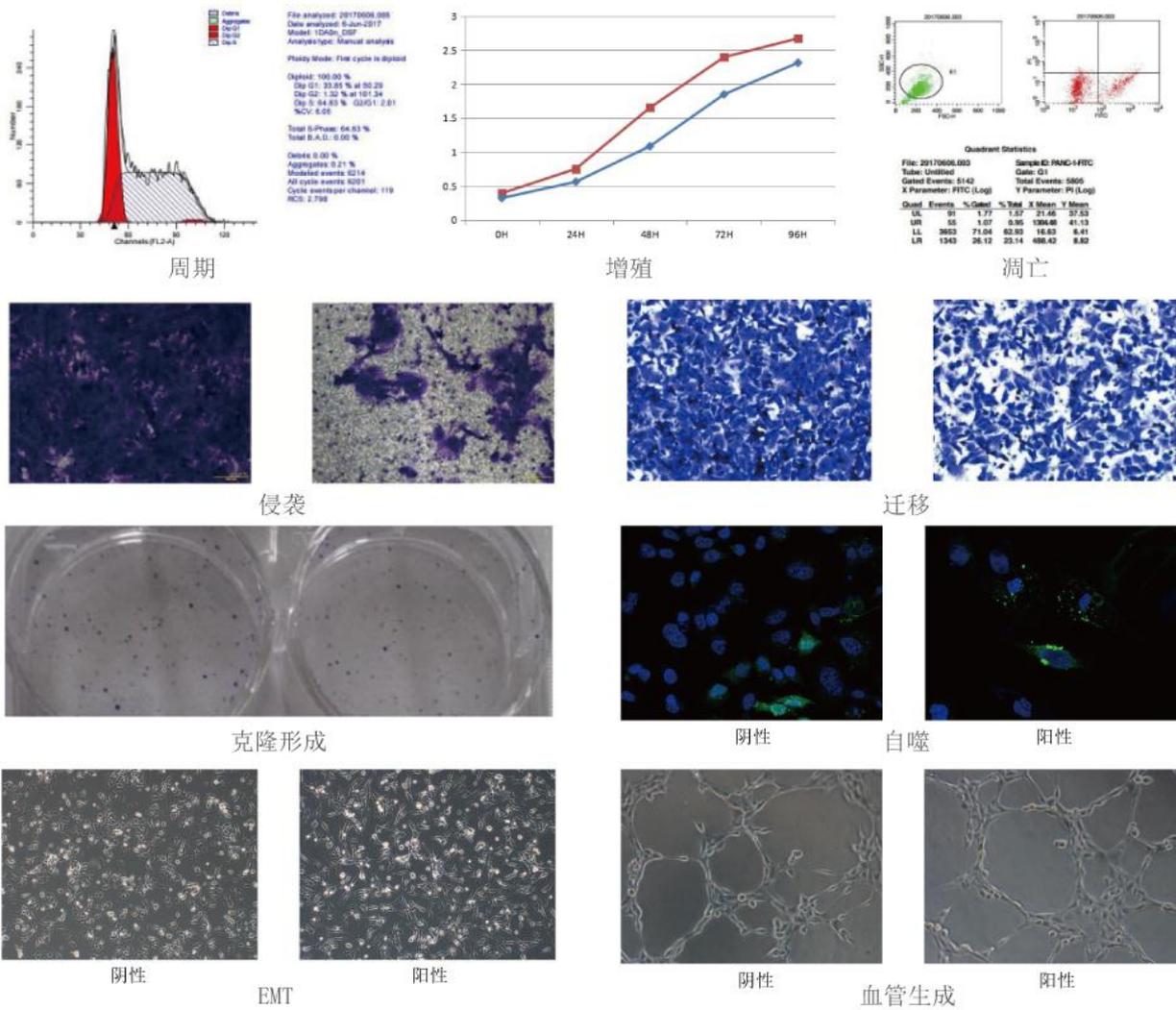


细胞表型检测服务

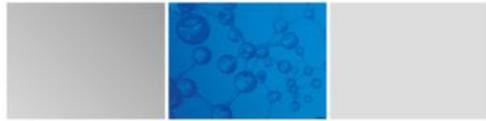


细胞表型是涉及基因和蛋白表达的多个细胞过程的集合体，这些过程导致细胞特定的形态和功能。细胞表型检测，检测的是如下若干表型：周期、增殖、凋亡、侵袭、迁移、克隆形成、自噬、EMT、血管生成。

在细胞内，将某目的基因敲除、敲降、过表达，建立稳转株后，与野生型细胞一起，检测细胞表型，观察每项表型的变化，并推断该目的基因的功能。



细胞表型检测



www.shbio.com



稳转株或客户提供细胞



检测细胞增殖 / 凋亡 / 周期 / 迁移 / 侵袭 / 克隆形成等



客户提供基因信息, 疾病信息, 活细胞或细胞类型、培养条件信息。
公司提供细胞表型实验报告(材料、试剂、仪器、方法、实验结果)。



Renjie Wang, Sai Zhang, Xuyi Chen, Nan Li, Jianwei Li, Ruichao Jia, Yuanqing Pan, and Haiqian Liang, CircNT5E acts as a sponge of microRNA-422a to promote glioblastoma tumorigenesis. Cancer Res. 2018.



基因功能预测和信号通路研究工具



基因功能预测工具

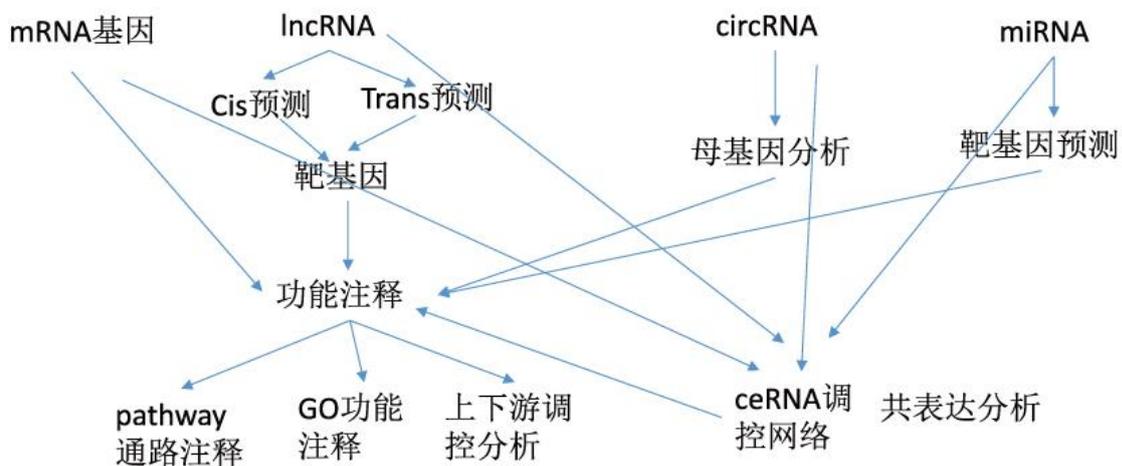
在筛选出有意义的基因并对其进行验证之后, 可以对这些基因进行功能预测, 以使后续的功能研究实验更有的放矢。伯豪自主开发的基因功能预测工具, 可对非编码RNA与miRNA、非编码RNA与蛋白/转录因子、ceRNA、下游靶基因/相互作用基因等, 进行功能预测。

信号通路研究工具

一般情况下，信号通路的变化会通过转录水平和蛋白磷酸化水平体现出来，那么这种变化可以用基因芯片、PCR-array、蛋白芯片/磷酸化因子检测，然后用高级分析共表达&IPA，生物信息学的方法进行分析。

IPA (Ingenuity Pathway Analysis) 是一个一体化的在线整合分析软件，其背后的数据库包含 500 多万条生物学知识。数据经由 500 多名专家多轮质控，收集自 300 多种顶尖杂志的全文、3000 多种生物学杂志摘要和 30 多个公共数据库，包含人、小鼠、大鼠等物种的基因表达数据、microRNA 数据和小规模实验数据，并且每周更新最新文献，每季度更新分析功能。IPA的分析内容包括：功能疾病相关性分析，生物学下游效应分析，经典通路相关性分析，通路活性效应预测，转录调控分析，转录因子互作分析，相互作用网络分析，生物标志物筛选，功能、疾病背景分子查询，相应文献调研及对应通路绘制等。

伯豪生物可进行一系列的IPA分析。



差异基因功能注释流程图



Results: 1 to 20 of 1751
NEXTBIO

Gene Ontology

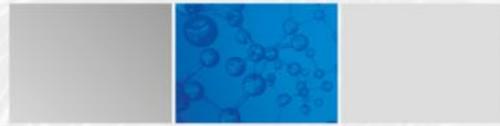
BIODASE
BIOLOGICAL DATABASES



STRING



INGENUITY
PATHWAY ANALYSIS



确定基因 / 细胞类型 / 疾病类型

建立好的细胞模型

表达谱芯片/ceRNA芯片/PCR-array / 蛋白芯片

共表达&IPA分析



仅生信分析:

客户提供每组数据3个或3个以上生物学重复并且为差异基因或者关注的部分基因。

公司提供图片文件(Network图), 包括png、PDF格式; Cytoscape文件: 可以cytoscape打开进行细节调整; 文本文件。

实验+生信分析:

客户提供基因信息, 疾病信息, 活细胞或细胞类型、培养条件信息, 及需要进行实验类型。

公司提供实验报告(材料、试剂、仪器、方法、实验结果)和生信分析结果。



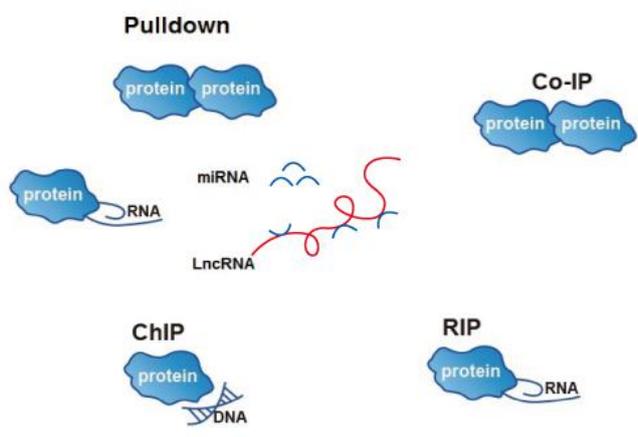
Shan-Shan Lai et al., PP2Ac α positively regulates the termination of liver regeneration in mice through the AKT/GSK3 β /Cyclin D1 pathway. Journal of Hepatology.



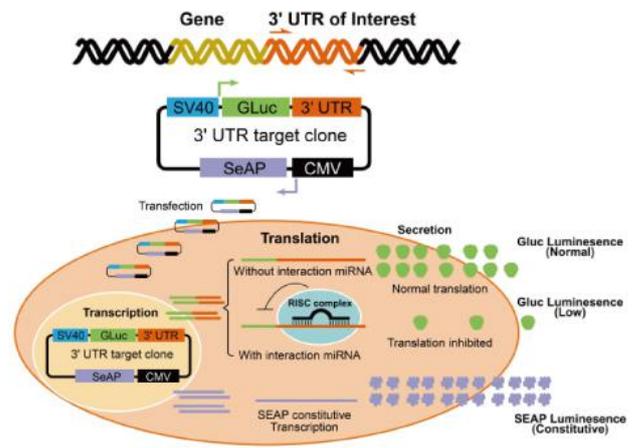
相互作用的研究和验证服务



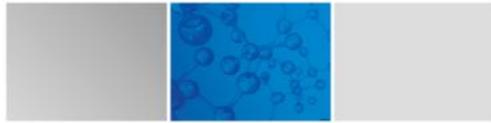
在细胞的复杂环境下,存在着大量的相互作用。有核酸与蛋白之间的,如转录因子与DNA的结合,RNP(Ribonucleoprotein)复合物中的蛋白与RNA的结合。有蛋白与蛋白之间的,如信号通路中的各个蛋白的相互作用。还有核酸与核酸之间的,如lncRNA对miRNA的sponge(海绵吸附)结合,miRNA对mRNA靶点的攻击。阐述某基因的功能机制,则必须说明其DNA,或转录的RNA,或翻译的蛋白,与别的分子如何相互作用。此时,需要用到相互作用的研究方法,包括:Pulldown, Co-IP(Co-Immunoprecipitation,免疫共沉淀), RIP(RNP-Immunoprecipitation), ChIP(Chromatin Immunoprecipitation), 双荧光素酶报告系统实验。



Pulldown, Co-IP, CHIP, 和RIP

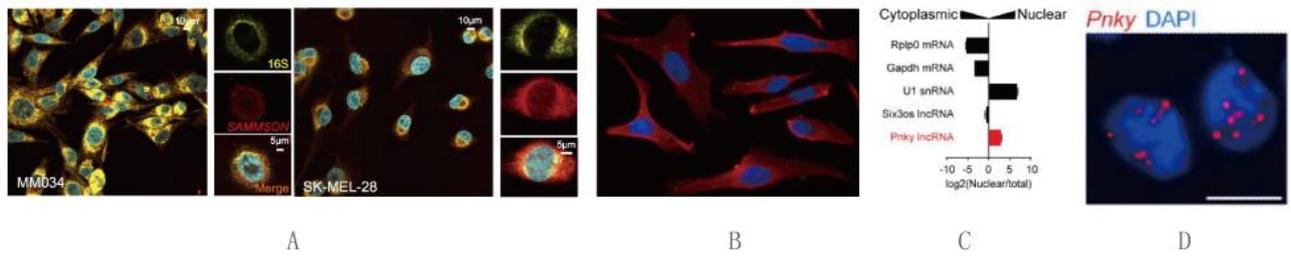


双荧光素酶报告系统

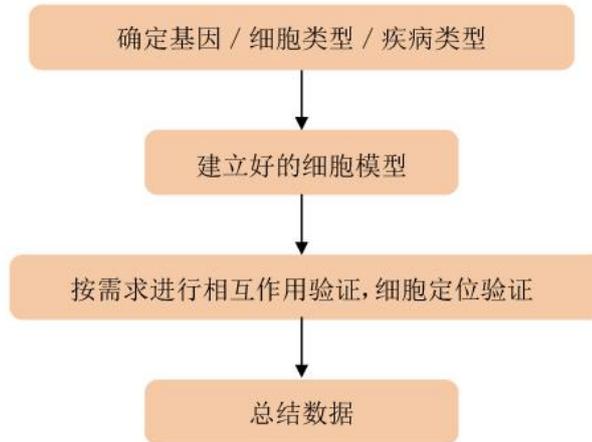


www.shbio.com

有时,基因转录的RNA,或翻译的蛋白,其细胞定位也是很重要的信息,可预判其功能。此时,可采用FISH(Fluorescence In Situ Hybridization, 荧光原位杂交)来定位蛋白,RNA-FISH(RNA荧光原位杂交)来定位RNA。



RNA-FISH A, RNA定位在线粒体中;B, RNA定位在细胞质中;C, RNA定位在细胞核中



客户提供基因信息, 疾病信息, 活细胞或细胞类型、培养条件信息, 及需要做的实验类型。公司提供实验报告(材料、试剂、仪器、方法、实验结果、数据分析)。



Leucci E et al., Melanoma addiction to the long non-coding RNA SAMMSON. Nature. 2016 Mar 24;531(7595):518-22.



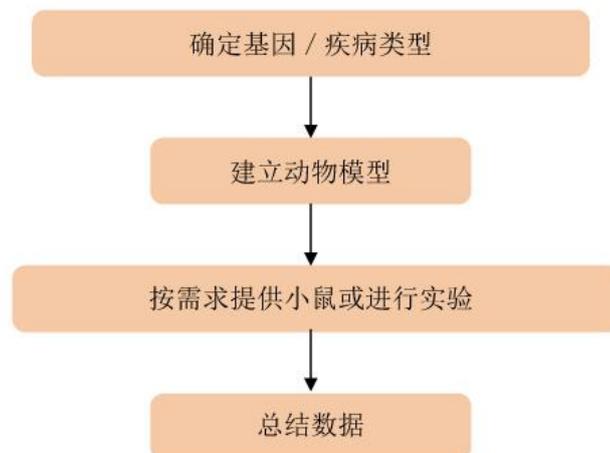
动物实验服务



比细胞更复杂的研究对象是动物。因此，可以采用动物研究，寻找影响动物行为和生物系统的变量。在基因功能研究中，动物水平的研究可以在更多的维度、时间和空间上提供特定基因的信息。动物水平的研究，可在多种动物中进行，而小鼠的体型适合，成本较低，操作方便，繁殖迅速，是最常使用的脊椎动物。

在动物中，同样也有基因功能缺失研究和基因功能获得研究。基因敲除(knock-out)是最为经典和常用的基因功能缺失研究手段之一。其原理与细胞水平研究中的基因敲除一样。基因敲除又可以分为全身性基因敲除和条件性基因敲除。动物中的基因功能获得研究，是将目的基因导入个体中，使其获得新的或更高水平的表达，通过个体生物性状的变化来研究基因的功能。其方法有基因敲入(knock-in)，基因的定点过表达等。

还可用动物进行给药实验，进行药物的临床前研究。或建立疾病动物模型，可代替人体作用研究疾病的样本，收获大量的体液或者组织，方便实验。



客户提供基因信息、疾病信息，需要做的实验类型。
 公司提供实验报告(材料、试剂、仪器、方法、实验结果)，和相应的动物模型。



Enga RM et al. Initial characterization of behavior and ketamine response in a mouse knockout of the post-synaptic effector gene Anks1b. *Neurosci Lett.* 2017 Feb 22;641:26-32.

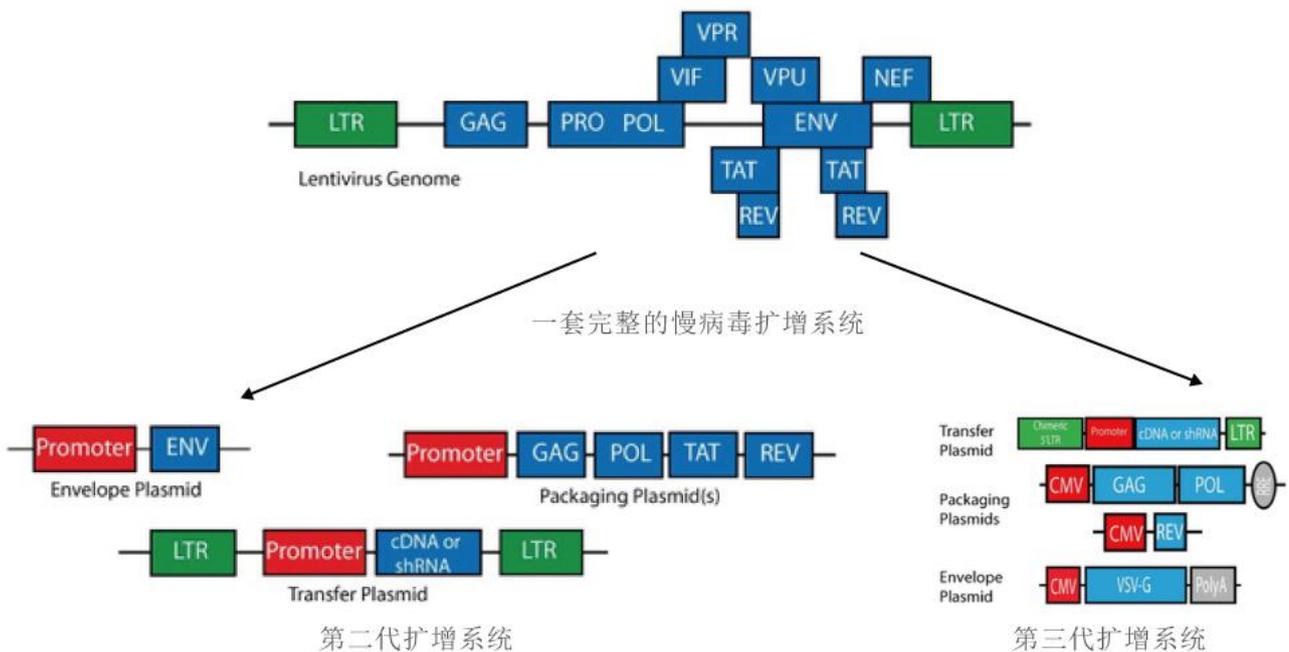


慢病毒包装 / 感染服务

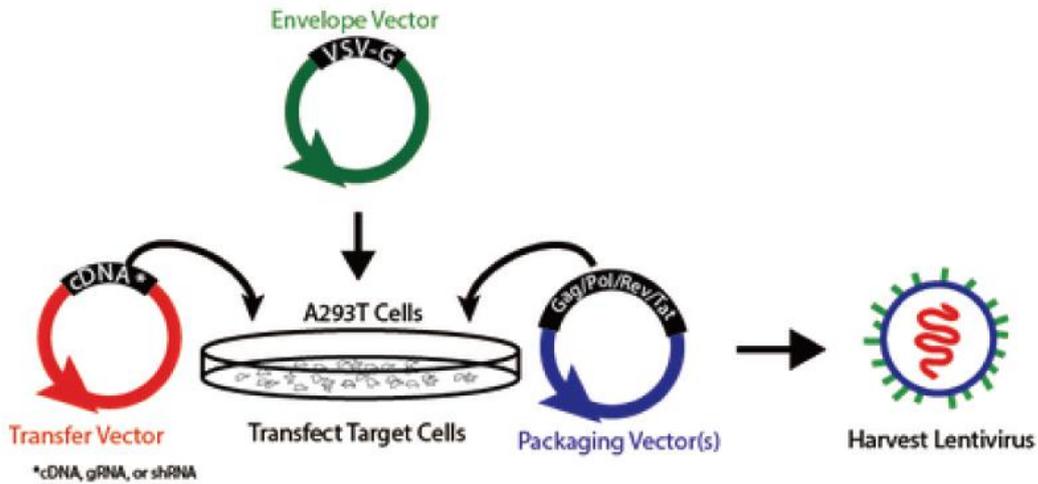


慢病毒 (lentivirus, lente-前缀在拉丁文中是“慢”的意思), 是反转录病毒科下的一个属。慢病毒可以整合相当一部分的病毒RNA到宿主细胞的DNA中, 并且可高效地感染非分裂细胞, 因此慢病毒是一种非常高效的基因传递方法。利用慢病毒可传递基因到宿主细胞的特点, 科研人员设计了一套慢病毒系统, 可以将目的基因转入, 并稳定地整合进目的细胞的基因组中, 在细胞传代的过程中目的基因也不丢失。

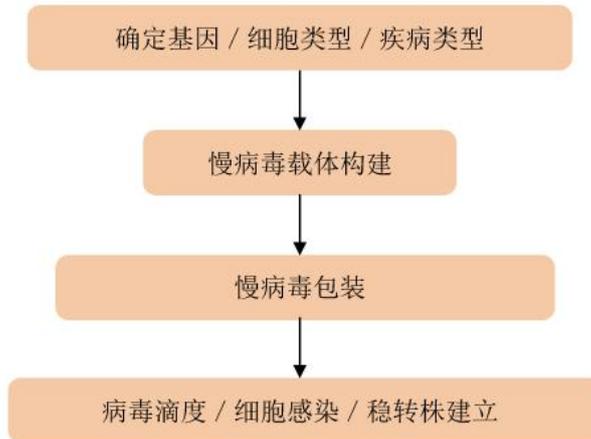
由于慢病毒是可以感染人类的, 所以为增加安全性, 病毒扩增所必需的元件被分到若干个质粒里 (第二代扩增系统3个质粒, 第三代扩增系统4个质粒)。



将扩增系统中的所有质粒一起共转 A293T 细胞，换液，短暂培养一段时间，则可以从上清中获得包装好的慢病毒颗粒，可用于感染细胞，将外源基因传递到目的细胞中，慢病毒的整合效率很高，很适合建立稳定株。

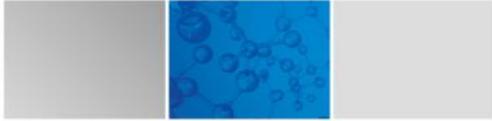


慢病毒包装示意图



客户提供基因信息，疾病信息，活细胞或细胞类型、培养条件信息。

公司提供慢病毒/细胞稳定株(慢病毒包装服务提供前者，感染服务提供后者)，及实验报告(材料、试剂、仪器、方法、实验结果)。



www.shbio.com



伯豪细胞库



伯豪生物在2010年开始建立。到目前为止，有近四百种细胞现货。细胞种类多，涉及研究领域广。有近三百株肿瘤细胞系，来自人体各个器官组织及血液，如Cecum、Prostate、Lung、Kidney、Liver、B-Lymphocytes、Blood Peripheral B lymphoblast等；也有来自实验动物的正常二倍体细胞和肿瘤细胞系。这些细胞都已建立成熟的细胞系，可以避免体外细胞毒性的实验，减少重复原代培养的麻烦，确保实验的重复性和可比性。有这么多细胞系，可以随性地选择，进行细胞水平的实验了！绝大多数方向的研究，我们伯豪都可以找到合适的细胞系进行实验。伯豪还可提供细胞系出售，售前由实验室进行扩增、冻存，均经严格质检，无细菌、真菌、支原体污染，出售后一个月内可对此负责。



可向客户提供所需细胞，以冻存管或培养瓶形式。

支原体检测 & 清除试剂盒



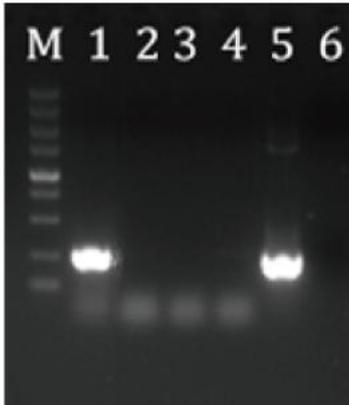
支原体，是一种大小介于细菌和病毒之间（最小直径 $0.2\ \mu\text{m}$ ）并独立生活的微生物。它没有细胞壁，且形态呈高度多形性，大多呈不规则球状或丝状。这样一种微小的且形状灵活的原核生物，传播性非常强。根据资料统计，全球范围内有15-35%的细胞系都感染了支原体。（国内不明来源的细胞支原体污染就更加不可描述，有些实验室来源的细胞，支原体污染比例能到50%，甚至80%）

支原体污染会造成严重的危害。它造成细胞生长缓慢，影响代谢、免疫或生长特性、生长状况以及细胞存活等，同时支原体能消耗营养物，促进代谢积累，导致pH改变，诱导或抑制细胞因子表达，并改变培养细胞的代谢、增殖特征及形态。支原体污染直接地带来核酸的污染，影响诸如二代测序的数据。还会改变细胞的DNA、RNA及蛋白表达，改变细胞，篡改数据，造成实验数据不准确、不稳定或每次实验都得出不同结论或相反的结论。

支原体污染不除，实验结果势必或多或少产生偏差。故进行实验前，确定细胞无支原体污染至关重要，实验结果之数据才有意义。

伯豪支原体检测试剂盒：

本试剂盒只需一点细胞培养上清液，通过简单的PCR方法，即可检测中20拷贝/ μ l以上的支原体，使用非常方便。而且特异性引物是针对高度保守的支原体16S rRNA序列设计的，可用于检测非常广泛的支原体种类，涵盖了所有常见的支原体污染种类，不受真核细胞或细菌DNA干扰。另附有阳性对照组分，可帮助判断假阴性现象。



实验实例

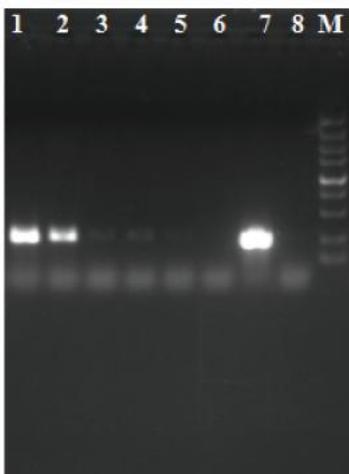
M: DL5000

- 1: 支原体污染细胞；
- 2, 4: 弱阳性, 轻微支原体污染细胞；
- 3: 无支原体污染细胞；
- 5: 阳性对照；
- 6: 阴性对照；

伯豪支原体清除试剂：

产品包含几组成分：一组主要去除支原体的功能单位，抑制肽链的增长和影响蛋白质合成；另一组成分通过抑制支原体的“元神”DNA回旋酶及拓扑异构酶IV活性从而达到抗菌效果，特异性地杀灭原核类生物。本产品对真核类的细胞低毒性，可放心使用。

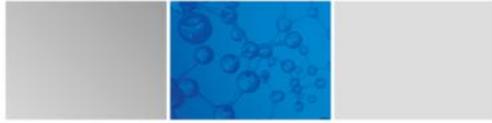
只需将本产品加入培养基中，即可预防细胞培养过程中支原体污染以及常见革兰氏阳性菌阴性菌污染。对于已感染支原体的细胞，一般情况下，连续给药5-7天，即可除支原体，非常高效。



实验实例

M: DL5000

- 1: 支原体污染细胞加药第1天取样检测支原体
- 2: 支原体污染细胞加药第2天取样检测支原体
- 3: 支原体污染细胞加药第3天取样检测支原体
- 4: 支原体污染细胞加药第4天取样检测支原体
- 5: 支原体污染细胞加药第5天取样检测支原体
- 6: 支原体污染细胞加药第6天取样检测支原体
- 7: 支原体检测阳性对照
- 8: 支原体检测阴性对照



细胞系STR鉴定



细胞系被广泛应用于科学研究和药物开发,然而很大一部分细胞系被错误标记或被其它个体、组织、种系来源的细胞所替代。细胞系错误问题已有50年历史,基于国际细胞库的分析数据显示:1984年细胞错误鉴定率为35%,1999年为18%。细胞系错误鉴定会造成恶劣的后果:细胞系、时间、金钱的损失,在文献、专利中提供错误的信息,造成实验结果不一致或不可重复,等等。

STR(Short Tandem Repeat短串联重复序列)基因位点由长度为3-7个碱基对的短串联重复序列组成。这些重复序列广泛存在于人类基因组中,可作为高度多态性标记,被称为细胞的DNA指纹。基因分型已被ICLAC、ATCC等权威机构作为金标准应用于细胞鉴定。STR基因座上的等位基因可通过扩增区域内重复序列的拷贝数不同来区分,在毛细管电泳分离之后可通过荧光检测来识别。随后通过一定的计算方法,即可根据所得的STR分型结果与STR数据库比对,从而推算出样本所属的细胞系或可能的交叉污染细胞系名称。



伯豪生物提供共20个STR位点鉴定

TH01	AMEL	TPOX	D3S1358
D12S391	D5S818	VWA	D13S317
D7S820	D2S1338	D8S1179	D6S1043
CSFIPO	D21S11	D19S433	D16S539
FGA	D18S51	PENTAD	PENTAE

上游相关服务

见《基于组学大数据和机器学习的Biomarker——研究解决方案》分册。



精选文献分析

中山大学孙逸仙纪念医院的林天歆教授, Long noncoding RNA BLACAT2 promotes bladder cancer-associated lymphangiogenesis and lymphatic metastasis, 发表于2018年1月的J Clin Invest, 影响因子12.575分。

研究背景

长链非编码RNAs(long non-coding RNAs, lncRNAs), 在人癌症的进展中有众多的作用。例如, HOTAIR, SChLAP1, and BLACAT1 促进细胞迁移和入侵, 因而参与了肿瘤转移。lncRNA-ATB和LINC01186诱导了上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT), 也促进了肿瘤转移。而lncRNAs参与淋巴管生成的详细机制还未知。

研究思路 and 结果

一、先进行筛选:

样本是来自高级别MIBC患者的癌组织和相应的癌旁边组织。对样本进行lncRNAs 微阵列分析(microarray analysis)。发现一个lncRNA, 较相应的癌旁边组织, 在癌组织中显著高表达。他们将此lncRNA命名为BLACAT2(bladder cancer-associated transcript 2)。

二、然后再进行验证:

140例新鲜样本, 来自淋巴转移(LN+)和未淋巴转移(LN-)的膀胱癌患者。

1, 用高通量的技术qPCR, 验证了这两组样本中的BLACAT2表达。结果确实显示, LN+的BLACAT2表达显著高于LN-。检索The Cancer Genome Atlas (TCGA) 数据库, 也可证实此类结果。

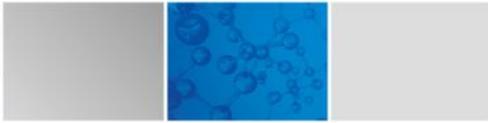
2, 比较两组患者的存活率。结果显示, BLACAT2表达高的组, 患者存活率低。

3, 用原位杂交(ISH)的方法, 比较两组患者癌内和癌周组织的BLACAT2表达, 并与微淋巴管密度共定位(microlymphatic vessel density, MVD)。结果显示, BLACAT2表达与MVD显著相关。MVD与淋巴转移相关。

以上, 已经初步揭示, BLACAT2可能在膀胱癌的淋巴管生存中起重要作用。筛选和验证的结果总结成Figure 1。

三、进行基因功能缺失(Loss of function)和基因功能获得(Gain of function)研究:

选择UM-UC-3 / luc和HT-1376/luc两种人膀胱癌细胞系, 构建BLACAT2过表达及shRNA(RNAi)稳转株, 并将稳转株移植裸鼠。观察表型。



1, 裸鼠表型包括: 淋巴结体积; 腭窝淋巴结的HE染色及与luciferase共定位; 癌内和癌周组织的BLACAT2表达, 并与微淋巴管密度共定位 (microlymphatic vessel density, MVD); HE染色及与luciferase、BLACAT2 共定位, 显示人脐癌细胞系入侵周围的组织; 尾静脉注射人脐癌细胞在肺的定植及肺组织的HE染色。

2, 细胞表型包括: 体外血管生成实验; 划痕实验; 细胞迁移、侵袭实验。

以上揭示了BLACAT2在细胞及裸鼠中的作用, 结果总结成Figure 2、3、4。

四、进行信号通路和相互作用研究:

仍然使用UM-UC-3 / luc1的BLACAT2过表达及shRNA(RNAi)稳转株

1, 进行二代测序, 发现VEGF-C、SNAI2、及MMP9在BLACAT2沉默细胞中显著下调;

2, 用qPCR、western、免疫组化 (immunocytochemistry, IHC), 验证VEGF-C、SNAI2、及MMP9在BLACAT2过表达细胞中显著上调, 在BLACAT2沉默细胞中显著下调;

3, 用ChIRP (chromatin isolation by RNA purification) 发现, BLACAT2直接与VEGF-C的启动子区域结合。圆二色谱 (Circular dichroism (CD) spectroscopy) 更进一步说明, 在体外, BLACAT2与VEGF-C启动子的两个部位形成三聚体。

4, 将BLACAT2的33-66nt处进行突变, 并照之前的方法在细胞中过表达。结果表明, VEGF-C表达无上调, 且无法促进血管生成及迁移。

使用UM-UC-3和5637人脐癌细胞系

1, 用biotin-labeled BLACAT2进行RNA pull-down, 发现与BLACAT2相互作用的蛋白, 质谱结果是WDR5。用WDR5的抗体做western验证之; 用WDR5的抗体做RNA免疫共沉淀 (RNA immunoprecipitation, RIP), 验证沉淀下的片段为BLACAT2。

2, BLACAT2的各个片段进行RNA pull-down, 找出与WDR5结合的核心区域为100-130nt。

3, 将BLACAT2突变 (缺失100-130nt), 在细胞中过表达, 结果表明, VEGF-C表达无上调, 且无法促进血管生成及迁移。

4, WDR5是人H3K4甲基转移酶复合物的核心部分, 那么BLACAT2是否通过甲基化来调控VEGF-C?

转入shRNA将BLACAT2表达沉默, 又转入 Δ BLACAT2 (1-200nt), 使细胞中仅有部分缺失的 Δ BLACAT2。检测细胞表型。结果表明, VEGF-C表达上调, 且促进血管生成及迁移。

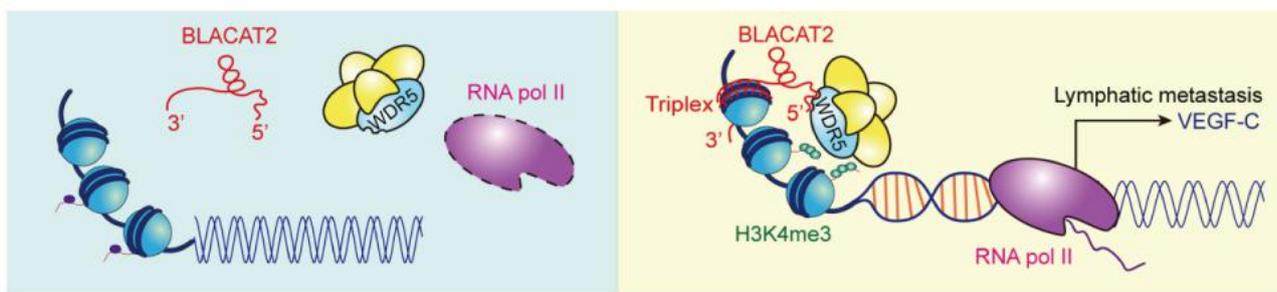
用WDR5和H3K4me3抗体, 和BLACAT2过表达及shRNA的细胞系, 进行ChIP-qPCR实验。结果表明, BLACAT2过表达, 促进WDR5表达, 及H3K4me3对VEGF-C启动子区的甲基化。

使用裸鼠模型 (先构建细胞系, 再移植裸鼠)

1, 用shRNA将VEGF-C沉默, 植入裸鼠体内。观察淋巴结体积、状态。结果表明, VEGF-C缺失阻断了BLACAT2介导的淋巴转移。

2, 将shRNA沉默VEGF-C, 换为VEGF-C抗体使VEGF-C失活。重复上述实验, 得到同样的结论。

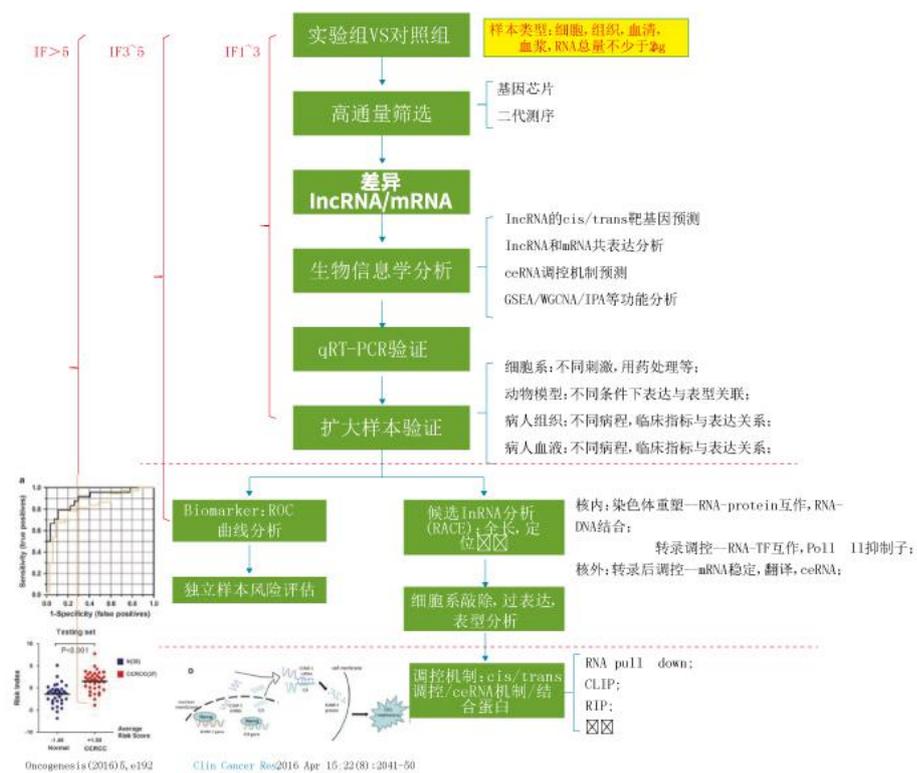
五, 最后得到模拟的机理图: 膀胱癌中, BLACAT2在淋巴转移中的作用



以上揭示了BLACAT2在细胞及动物中的作用机制, 它怎样与其它分子相互相互作用, 促成了其在细胞裸鼠中的功能, 结果总结成Figure5-10。

He W, Zhong G, Jiang N, Wang B, Fan X, Chen C, Chen X, Huang J, Lin T. Long noncoding RNA BLACAT2 promotes bladder cancer-associated lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *J Clin Invest.* 2018 Feb 1;128(2):861-875.

经典研究策略图例





上海伯豪生物技术有限公司
SHANGHAI BIOTECHNOLOGY CORPORATION



服务科技创新，护航人类健康！

技术服务热线：800-820-5086/400-800-5086

地址：上海张江高科技园李冰路151号

电话：+86-21-51320288-8136

网址：<http://www.shbio.com>