

一种新的卵巢癌细胞株TRP14-A2780及其构建方法和应用

申请号 CN201310132528. X

申请日 2013. 04. 16

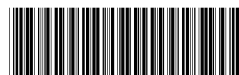
公开（公告）号 [CN103255107A](#)

公开（公告）日 2013. 08. 21

分类号 C12N5/10(2006. 01);C12N15/85(2006. 01);C12Q1/02
(2006. 01)

申请（专利权）人 谢幸;浙江大学医学院附属妇产科医院

www.innojoy.com



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103255107 A

(43) 申请公布日 2013.08.21

(21) 申请号 201310132528.X

C12Q 1/02 (2006.01)

(22) 申请日 2013.04.16

(83) 生物保藏信息

CCTCC NO:C201339 2013.04.10

(71) 申请人 谢幸

地址 310006 浙江省杭州市上城区学士路 1
号浙江大学医学院附属妇产科医院门
诊 16 楼

申请人 浙江大学医学院附属妇产科医院

(72) 发明人 谢幸 傅志勤 张松法 吕卫国
程晓东 王新宇

(74) 专利代理机构 杭州丰禾专利事务有限公
司 33214

代理人 张欢勇

(51) Int. Cl.

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

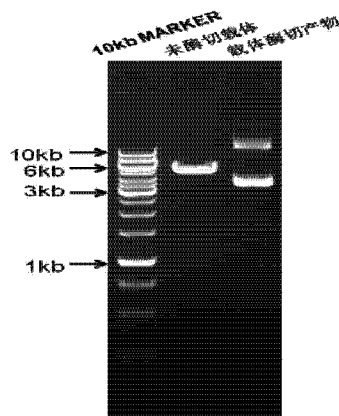
序列表1页 附图3页

(54) 发明名称

一种新的卵巢癌细胞株 TRP14-A2780 及其构
建方法和应用

(57) 摘要

本发明公开了一种新的卵巢癌细胞株,该卵巢癌细胞株 TRP14-A2780 保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏号为:CCTCC C201339。本发明的有益效果是:通过脂质体瞬转的方法,将 TRP14 高表达的质粒转导入卵巢癌 A2780 细胞中,经过 G418 抗生素稳转筛选以及单克隆的挑选及验证,从而建立了 TRP14 稳定高表达的细胞株 TRP14-A2780。本发明的细胞株可为研究卵巢癌紫杉醇化疗耐药机制的进一步深入研究搭建了一个良好的基础。



1. 一种新的卵巢癌细胞株 TRP14-A2780, 其特征在于 : 该卵巢癌细胞株 TRP14-A2780 保藏于中国典型培养物保藏中心, 保藏号为 : CCTCC C201339。

2. 一种如权利要求 1 所述的卵巢癌细胞株 TRP14-A2780 的建立方法, 其特征在于该方法包括以下步骤 :

1) 合成有效高表达 TRP14 的质粒 ;

2) 转染卵巢癌 A2780 细胞, 通过抗生素筛选获得稳转细胞。

3. 根据权利要求 2 所述的一种卵巢癌细胞株 TRP14-A2780 的建立方法, 其特征在于载体选用 GV141 载体。

4. 根据权利要求 2 或 3 所述的一种卵巢癌细胞株 TRP14-A2780 的建立方法, 其特征在于所述抗生素为 G418 抗生素。

5. 如权利要求 1 所述的卵巢癌细胞株 TRP14-A2780 用于作为卵巢癌紫杉醇化疗耐药机制的探讨及其相关信号通路的研究的细胞模型。

一种新的卵巢癌细胞株 TRP14-A2780 及其构建方法 and 应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种新的卵巢癌细胞株 TRP14-A2780, 通过脂质体的转导和稳筛, 在该细胞株中实现了对 TRP14 基因的稳定高表达。

背景技术

[0002] 卵巢癌仍然是迄今致死率最高的妇科恶性肿瘤, 根据美国国家健康统计中心 2012 年公布的数据, 美国卵巢癌总的 5 年生存率为 44%, 其中晚期病例仅为 27% (Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. CA Cancer J Clin. 2012Jan;62(1):10-29.). 目前卵巢癌的主要治疗方式为肿瘤细胞减灭术和以铂类、紫杉醇为一线药物的联合化疗。大多数患者在治疗后 2~3 年内复发, 几乎所有复发性卵巢癌对再次化疗耐药 (Agarwal R, Kaye SB. Ovarian cancer: strategies for overcoming resistance to chemotherapy. Nat Rev Cancer 2003;3:502-16.), 导致卵巢癌高致死率的主要原因是由于多数患者在首次就诊时已经处于肿瘤的晚期以及初次治疗后复发、耐药。因此研究卵巢癌化疗耐药的机制对改善卵巢癌患者的远期疗效具有重要意义。

[0003] 紫杉醇是一种促微管聚合和稳定, 抗有丝分裂的细胞周期特异性药物。研究表明, 与紫杉醇耐药相关的机制主要包括: P-糖蛋白等药物泵出蛋白表达增加, 微管动态变化和 tubulin 同型分子表达改变, 微管相关和细胞骨架调节相关蛋白阻碍紫杉醇和微管结合, 纺锤体检查点蛋白 BubR1 及凋亡相关分子改变等 (Kavallaris M. Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. Nat Rev Cancer. 2010Mar;10(3):194-204.). 但根据已有报道, 各种针对这些靶点的阻遏方法仅能部分逆转卵巢癌耐药, 事实上迄今尚没有一种基于上述机制建立的逆转耐药方法应用于临床。卵巢癌耐药的关键机制尚有待阐明。

[0004] 申请人在前期研究中, 通过药物浓度逐渐递增的紫杉醇的持续、长期作用, 成功建立了紫杉醇耐药的卵巢癌细胞亚系 SKOV3-TR30, 其耐药指数较亲代 SKOV3 细胞增加 27 倍 (Fu Y, Ye D, Chen H. et al. Weakened spindle checkpoint with reduced BubR1 expression in paclitaxel-resistant ovarian carcinoma cell line SKOV3-TR30. Gynecol Oncol. 2007Apr;105(1):66-73.). 研究显示紫杉醇耐药的细胞株与其亲代细胞相比, 除了耐药性增加之外, 其他多种表型也可发生改变。为了进一步研究耐药细胞和亲代细胞间差异表达的蛋白, 我们采用 LC-MS/MS-based label-free 定量蛋白质组学技术进行筛选, 共发现 356 个差异蛋白, 涉及细胞代谢、生化过程调控、物质运输、组织发生、细胞分化、死亡和信号转导等多个方面。其中部分差异蛋白可能参与了卵巢癌侵袭转移和细胞增殖、死亡等其他生物学行为的调控。进一步通过定量 RT-PCR 和 Western Blot 验证我们发现硫氧还蛋白相关蛋白 14 (TRP14) 在耐药细胞中表达显著上调。

[0005] TRP14 是一种广泛表达的可溶性的胞浆蛋白, 最早从 HeLa 细胞 cDNA 文库中成功克隆, 相对分子质量为 14KD, 属于 Trx 蛋白家族新发现的一种二硫还原酶。但目前对于 TRP14 的功能所知甚少。仅有的研究提示 TRP14 参与肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 信号途径

的调控。采用 RNA 干扰部分下调 TRP14 的表达,可导致 HeLa 细胞 TNF- α 诱导的核因子 κ B (NF- κ B)活化,丝裂原活化的蛋白激酶(MAPK)途径激活,和细胞凋亡增加(Jeong WJ, Chang TS, Boja ES, et al. Roles of TRP14, a thioredoxin-related protein in tumor necrosis factor- α signaling pathways. J Biol Chem, 2004, 279(5):3151-3159.)。虽然 TRP14 对 TNF- α 的效应具有调控作用,但 TRP14 是否可改变卵巢癌细胞的化疗耐药性,目前未有报道。但一般瞬时质粒转染的短效性,在研究中需要多次转染,这无疑增加了人力投入及研究成本。构建该稳转细胞株可以直接用于检测实验研究中的指标,可避免多次重复转染,简化实验操作,节约实验时间和成本。

发明内容

[0006] 本发明的第一个目的是提供一种新的卵巢癌细胞株,该卵巢癌细胞株可直接用于研究中各项相关指标的检测,省时省力。本发明的第二个目的是提供上述卵巢癌细胞株的建立方法。本发明的第三个目的是提供上述卵巢癌细胞株的应用。

[0007] 为了实现上述第一个目的,本发明采用了以下技术方案:

[0008] 一种新的卵巢癌细胞株,该卵巢癌细胞株 TRP14-A2780 保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏号为:CCTCC C201339。

[0009] 为了试验上述第二个目的,本发明采用以下的技术方案:

[0010] 一种如所述的卵巢癌细胞株的建立方法,该方法包括以下步骤:

[0011] 1) 合成可以有效高表达 TRP14 的质粒。

[0012] 2) 转染卵巢癌 A2780 细胞,通过抗生素筛选获得稳转细胞。

[0013] 载体选用 GV141 载体,即合成可以有效高表达 TRP14 的质粒的时候选用 GV141 载体。

[0014] 所述抗生素为 G418 抗生素。

[0015] 为了实现上述第三个目的,本发明采用了以下的技术方案:

[0016] 上述的卵巢癌细胞株 TRP14-A2780 用于作为卵巢癌紫杉醇耐药机制的探讨及相关信号通路的研究的细胞模型。

[0017] 本发明的有益效果是:通过脂质体瞬转的方法,将 TRP14 高表达的质粒转导入卵巢癌 A2780 细胞中,经过 G418 抗生素稳转筛选以及单克隆的挑选及验证,从而建立了 TRP14 稳定高表达的细胞株 TRP14-A2780。本发明的细胞株可为研究卵巢癌紫杉醇化疗耐药机制的进一步深入研究搭建了一个良好的基础。

附图说明

[0018] 图 1 为质粒抽提,质粒电泳图。

[0019] 图 2 为双酶切琼脂糖凝胶电泳鉴定图。

[0020] 图 3 为质粒测序图

[0021] 图 4 为实验组、阴性对照组提取 RNA,通过 Realtime PCR 方法检测 TRP14 基因 mRNA 水平的表达图。

[0022] 图 5 为实验组、阴性对照组提取蛋白质,通过 Western blot 方法检测 TRP14 基因蛋白水平的表达图。

[0023] 保藏说明

[0024] 卵巢癌细胞株 TRP14-A2780 保藏于中国典型培养物保藏中心,地址:中国武汉武汉大学,保藏号为:CCTCC C201339,保藏日为:2013年4月10日。

具体实施方式

[0025] 一、TRP14 过表达质粒构建

[0026] TRP14 过表达质粒是 GV141,插入的序列如 SEQ ID NO:1 所示。

[0027] 阳性克隆 PCR 鉴定。引物序列是:

	ID	Seq
[0028]	TRP14-P1	TCCGCTCGAGATGGCCCGCTATGAGGAG
	TRP14-P2	ATCGGGATCCACATCTTCAGAGAACAACATTTCC

[0029] TRP14 反应体系:

[0030]	试剂	体积 (μL)
	ddH ₂ O	12.4
	5×Taq buffer	4
	DNTPs (2.5Mm)	1.6
	Primer(+) (10Mm)	0.4
[0031]	Primer(-) (10Mm)	0.4
	Template	1
	Taq polymerase	0.2

[0032] PCR 反应条件是：

94°C 3 min

94°C 30 sec } 30 cycle

60°C 30 sec }

72°C 40 sec }

72°C 5 min

4°C forever

[0033] 即在 PCR 机器里面,反应物在 94°C 下孵育 3 分钟,然后进入 30 个循环,每个循环包括 94°C 下孵育 30 秒,60°C 下孵育 30 秒,72°C 下孵育 40 秒,30 个循环结束以后 72°C 下孵育 5 分钟,然后冷却到 4°C。

[0034] 抽提质粒,电泳结果如图 1 所示;电泳图说明如下:

[0035] 1 号泳道:阴性对照(ddH₂O)

[0036] 2 号泳道:阴性对照(空载自连对照组)

[0037] 3 号泳道:阳性对照(GAPDH)

[0038] 4 号泳道:Marker 自上而下依次为 5kb,3kb,2kb,1.5kb,1Kb,750bp,500bp,250bp,100bp

[0039] 5-12 号泳道:TXNDC171-8 号转化子

[0040] 双酶切琼脂糖凝胶电泳鉴定,如图 2 所示;测序结果如图 3 所示。

[0041] 二、具体实验步骤:

[0042] 1. 瞬时转染质粒:

[0043] TRP14 质粒及阴性对照序列按上述步骤合成

[0044] 实验分组:

[0045] 分为阳性组(TRP14 质粒 + 转染试剂),阴性对照组(阴性对照质粒 + 转染试剂),空白对照组(仅加转染试剂)

[0046] 细胞种板:将细胞以 1.5×10^5 /孔的密度种植于 12 孔板中,每孔含完全培养基 1ml,每组设 3 个重复。

[0047] 转染:细胞贴壁过夜,生长密度达到 80% 左右。将孔内培养基更换为新鲜完全血清培养基。将适量转染试剂与质粒分别逐滴加入到含无血清培养基的无核酸酶离心管中,轻轻震荡混匀后,室温孵育 5min,再将混好的转染试剂分别与 TRP14 质粒以及阴性对照质粒混合,轻弹管底混匀,室温孵育 20min,将转染复合物再悬空逐滴加入到孔中。前后轻摇细胞培养板,使转染复合物均匀溶于培养基中。培养箱中继续培养,6 小时更换新鲜完全培养基。

[0048] 继续培养 24 后进行后续操作。

[0049] 2. G418 对 A2780 细胞最低致死浓度摸索:

[0050] 模拟细胞稳筛时的细胞密度进行铺板,以一个六孔板细胞数为 5×10^4 铺八个孔,以备加入浓度梯度的药物用。

- [0051] 第二天,细胞换液,每孔加入 2ml 新鲜培养基。
- [0052] 加药:每孔加入不同量的 G418,使其在培养基的终浓度为(0,100,200,400,500,800,,1000) μ g/ml。
- [0053] 隔天换液,换成新鲜含药物的培养基。
- [0054] 每天观察,认真记录细胞死亡情况,连续培养两周。
- [0055] 取达到第 5 天细胞大部分死亡,两周内全部死亡效果的最小药物浓度为 G418 对 A2780 细胞最低致死浓度,即后续稳筛药物浓度。
- [0056] 3. A2780 转染质粒后的抗生素稳筛:
- [0057] 瞬时转染 24 小时后,取 1/20 细胞重新接种至新的 12 孔板,各组备三个复孔,37℃ 过夜。
- [0058] 等细胞贴壁后加入 400 μ g/ml G418。
- [0059] 之后每 3-4 日更换一次含 400 μ g/ml G418 浓度的新鲜培养基。
- [0060] 转导后第 14 日左右,同时严格设转染空载体及不转染组做对照,观察两周,观察细胞加药后的死亡情况。直至不转染组的细胞完全死亡,转染组出现单克隆。
- [0061] 4. 单克隆细胞的筛选步骤:
- [0062] 将稳筛的细胞用不含 EDTA 的胰酶消化,制备细胞悬液。
- [0063] 细胞计数,根据得出的数据,用含有 400 μ g/ml G418 的新鲜 1640 培养基倍比稀释细胞悬液。
- [0064] 在 96 孔板中,每孔中加入 100ul 细胞悬液,使各孔含有 0.5-1 个细胞。
- [0065] 隔日细胞贴壁后,观察单克隆孔的个数,并标记。
- [0066] 优势单克隆的选取:
- [0067] 经过 30 天的生长,各孔单克隆细胞数已长至 6 次方级,1:2 传代,一部分长满后冻存,另一部分提取 RNA 和蛋白,用 Realtime PCR 以及 Western blot 分别检测 TRP14 基因 mRNA 水平和蛋白水平的表达情况。

[0068]		TRP14mRNA	TRP14 蛋白
	实验组	0.25793	1.52477
	阴性对照组	0.06480	0.27361

- [0069] 上述实施序列及步骤用来解释说明本发明,而不是对本发明进行限制,在本发明的精神和权利要求的保护范围内,对本发明作出的任何修改和改变,都落入本发明的保护范围。

[0001]

序 列 表

<110>谢幸；浙江大学医学院附属妇产科医院

<120>一种新的卵巢癌细胞（TRP14-A2780）及其构建方法和应用

<160>1

<210>1

<211>372

<212>DNA

<213>人工合成

<400>1

ATGGCCCGCTATGAGGAGGTGAGCGTGTCCGGCTTCGAGGAGTTCCACCG
GGCCGTGGAACAGCACAAATGGCAAGACCAT
TTTCGCCTACTTTACGGGTTCTAAGGACGCCGGGGGGAAAAGCTGGTGCCC
CGACTGCGTGCAGGCTGAACCAGTCGTAC
GAGAGGGGCTGAAGCACATTAGTGAAGGATGTGTGTTTCATCTACTGCCAAG
TAGGAGAAAAGCCTTATTGGAAAGATCCA
AATAATGACTTCAGAAAAAACTTGAAAGTAACAGCAGTGCCTACACTACTT
AAGTATGGAACACCTCAAAAACCTGGTAGA
ATCTGAGTGTCTTCAGGCCAACCTGGTGGAAATGTTGTTCTCTGAAGATTAA
A 372

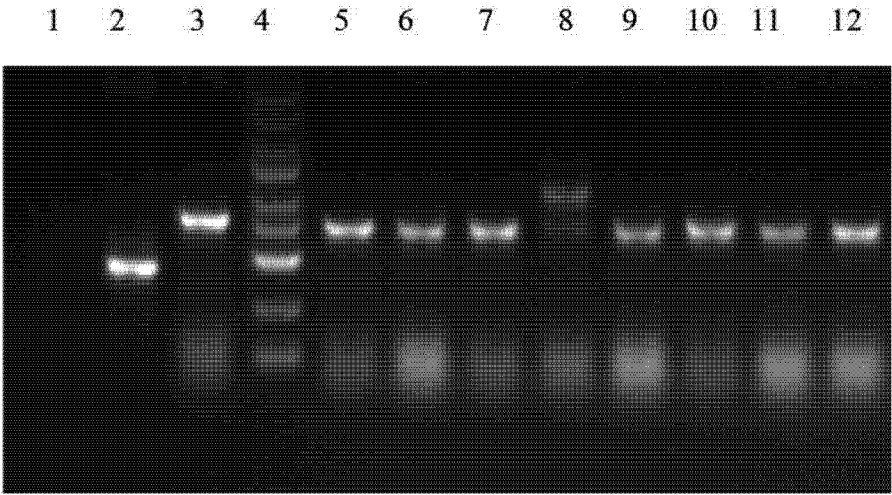


图 1

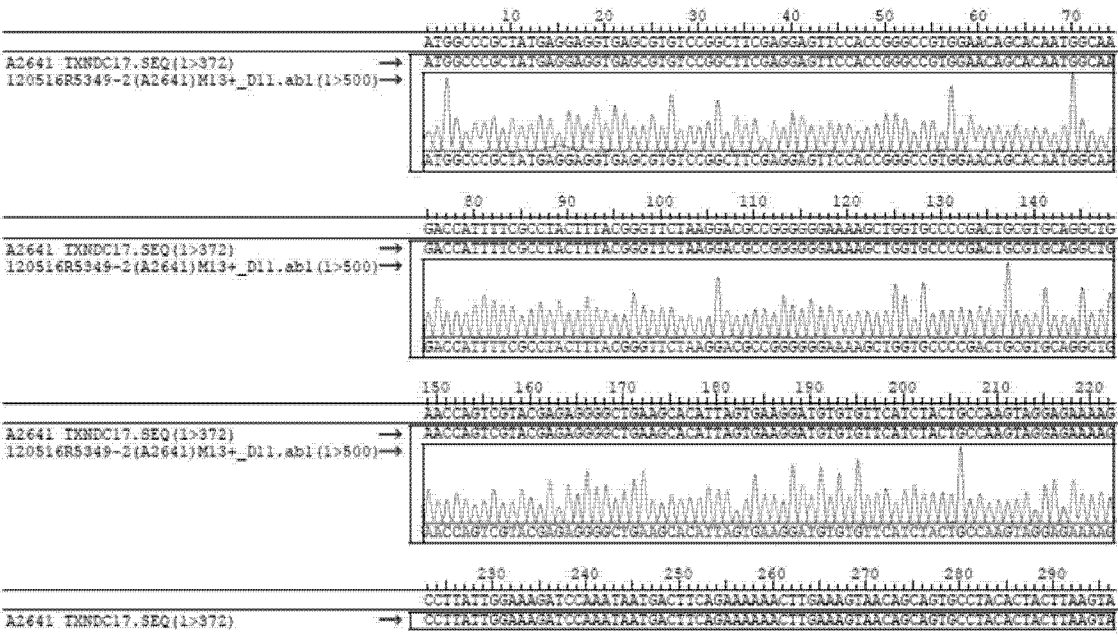


图 2

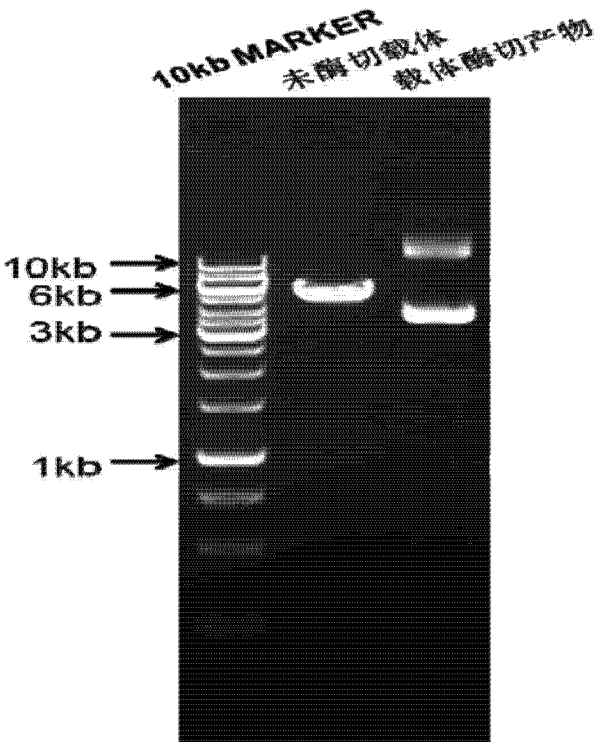


图 3

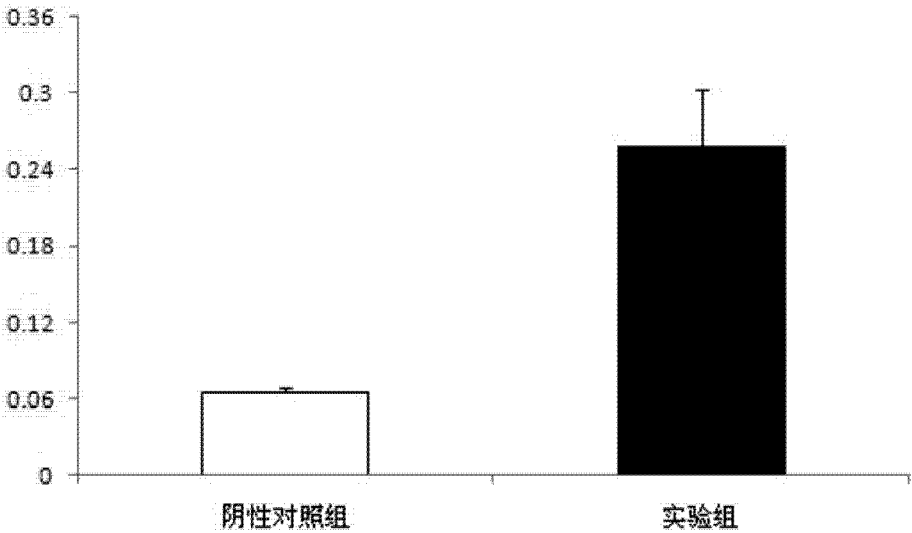


图 4

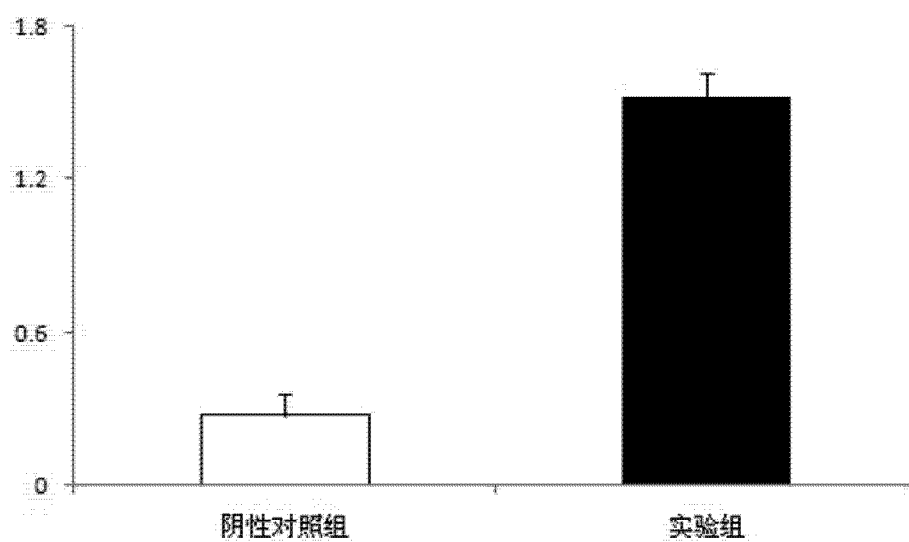


图 5