



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02813220.3

[43] 公开日 2004年8月18日

[11] 公开号 CN 1522304A

[22] 申请日 2002.6.28 [21] 申请号 02813220.3  
 [30] 优先权  
 [32] 2001.6.29 [33] EP [31] 01115946.4  
 [86] 国际申请 PCT/EP2002/007179 2002.6.28  
 [87] 国际公布 WO2003/002763 英 2003.1.9  
 [85] 进入国家阶段日期 2003.12.29  
 [71] 申请人 斯尔思实验室有限公司  
 地址 德国耶拿  
 [72] 发明人 彼得·弗朗茨·齐普费尔  
 汉斯彼得·萨卢齐  
 斯特凡·鲁斯武尔姆  
 康拉德·赖因哈特

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责  
 任公司  
 代理人 丁业平 王维玉

权利要求书1页 说明书11页

[54] 发明名称 脓毒症或脓毒相关综合症生物芯片  
在诊断上的应用

### [57] 摘要

本发明涉及含有探针核酸和/或探针蛋白的核酸和/或蛋白芯片的应用，所述探针核酸和/或探针蛋白为特异于细胞应激、炎性反应和免疫反应，与应激、炎性和免疫反应相关，在急性期反应过程中诱导的或它们的任一组合，并且所述探针核酸和/或探针蛋白固定在载体上用于脓毒症和脓毒相关综合症的诊断。

ISSN 1008-4274

5 1. 包含探针核酸和/或探针蛋白的核酸芯片和/或蛋白芯片的应用，所述探针核酸和/或探针蛋白为特异于细胞应激、炎性和免疫反应，与应激、炎性和免疫反应相关，在急性期反应过程中诱导的或它们的任一组合，并且所述探针核酸和/或探针蛋白固定在载体上用于脓毒症或脓毒相关综合症的诊断。

10 2. 根据权利要求 1 所述的应用，其中探针核酸为选自免疫介质，转录因子，急性期蛋白，补体成分，粘附分子，细胞特异性、细胞程序性死亡的标记，管家基因或者与机体对感染和脓毒症应答相关的分子中的基因，基因产物，所述基因的剪接变体和/或所述基因的片段。

15 3. 根据上述任一权利要求所述的应用，其中所述探针核酸进一步包括选自凝集系统分子和/或传染性介质中的至少一个基因，基因产物，所述基因的剪接变体和/或所述基因的片段。

20 4. 根据上述任一权利要求所述的应用，其中所述探针核酸和/或探针蛋白固定在载体的预定区域。

5. 根据权利要求 4 所述的应用，其中所述区域彼此分隔开。

25 6. 根据上述任一权利要求所述的应用，其中所述载体为载玻片，微滴定或者纳滴定板。

7. 根据上述任一权利要求的应用，其中将获自人或者动物的待检测的标记 mRNA，标记 cDNA 或者标记蛋白与芯片上的探针核酸和/或探针蛋白进行杂交，并且对杂交方式加以确定。

30 8. 根据权利要求 7 所述的应用，其中对所述杂交的标记 mRNA，cDNA 或者蛋白的浓度加以确定。

### 脓毒症或脓毒相关综合症生物芯片在诊断上的应用

5            本发明涉及核酸和/或蛋白芯片在诊断脓毒症或脓毒相关综合症上的应用。

脓毒症及其败血性休克后遗症以及多器官衰竭是术后重症监护室中最普遍的死亡原因。

10

脓毒症通常也称为败血症，是最具攻击性的感染形式。基本上，如果身体不能将感染限制在其起始位点，任何感染都会引起脓毒症。因而，细菌的成分以及内源性介质（*andogenous mediators*）都能损伤各种器官，甚至是远离感染部位的器官。在仅仅数小时之内就可能发展为多个器官衰竭危急生命的状况。在过去的几十年中，脓毒症 40% 到 60% 的致死率仍然没有变化。大约 5%-10% 的所有住院病人伴有感染。单单在德国，每年有 80.000 病人因这种感染导致脓毒症。

15

世界领先的研究者声称新治疗方法失败的主要原因是因为脓毒症诊断的延迟和非特异性。只有通过早期诊断和改善病人宿主应答的特征才可能进行较早的和更有效的治疗。

20

为了较早开始合适治疗，尤其需要进行脓毒症或脓毒相关综合症的迅速诊断，此外，在非常短时间内分析大量的病人样品也是必要的。

25

因此，本发明的根本技术问题就是以上述优点诊断脓毒症和脓毒相关综合症。

所述技术问题通过使用核酸和/或蛋白芯片（生物芯片）解决，其中芯片含有探针核酸和/或探针蛋白，所述探针核酸和/或探针蛋白

30

为特异于细胞应激、炎性和免疫反应，与应激、炎性和免疫反应相关，在急性期反应过程中诱导的或它们的任一组合，并且所述探针核酸和/或探针蛋白固定在载体上，尤其是以有序的网络模式固定，用于脓毒症或脓毒相关综合症的诊断。

5

根据本发明，术语“诊断”还包括病程的监控，严重性的检测以及每种脓毒症和脓毒相关综合症个体预测的确定。

根据本发明所用的术语“探针核酸和/或探针蛋白”是仅指核酸，  
10 仅指蛋白并且也指同时存在的核酸和蛋白。

根据本发明，术语“核酸”通常为任意种类和任意来源的 DNA 和 RNA。cDNA 也可用作 DNA 分子，可由细胞或分离的 mRNA 产生。

15

本发明涉及核酸芯片技术，是一个非常新的研究领域，其中核酸芯片可以使用高达几千个核酸点。为了达到这个目的，核酸以有序的网络模式固定在载体上。待检测的 DNA 或 RNA（靶核酸或样品）通常例如通过采用荧光染料进行标记并施加到芯片上。在靶核酸与结合到载体上并与待检测的 DNA 或 RNA 具有互补序列的探针核酸杂交的情况下，通过常用的方式，例如采用 CCD 摄像机或通过激光扫描仪对网格内相应位置的信号加以检测。

20

换句话说，上述的芯片技术是基于下列知识：一组分子的表达可通过 RNA 或 DNA 分子与以有序的网络模式固定在载体上的探针核酸杂交同时进行分析。

25

下面，参考核酸芯片本进行发明的详细描述，但应该理解其并不限于此。本发明也可被应用于蛋白芯片中，其中探针蛋白以有序网格形式固定在载体上。待检测样品中的蛋白可通过与探针蛋白的相互作用

30

用得以检测。可以通过常用的方式进行检测。本领域技术人员也知道制备蛋白芯片的化学药品，材料以及方法，并且应用它们，或者根据下面详细描述结合核酸芯片开发适合蛋白芯片的化学药品，材料以及方法。

5

在本发明的一个优选的实施方案中，探针核酸为选自免疫介质，转录因子，急性期蛋白，补体成分，粘附分子，细胞特异性、细胞程序性死亡的标记，管家基因，或与机体对感染应答相关的分子的基因，基因产物，所述基因的剪接变体和/或所述基因的片段。利用这些探针核酸，脓毒症和脓毒相关综合症的诊断可以有利的的方式根据上述需要来进行。

10

这里所用的术语“片段”是指比基因短的核酸序列，但仍然具有所述基因的特性使其编码的蛋白具有与野生蛋白基本相同的化学和/或物理特性，特别是功能特性。

15

为了诊断脓毒症和脓毒相关综合症，根据上述要求，尤其优选使用选自每种免疫介质，转录因子，急性期蛋白，补体成分，粘附分子，细胞特异性、细胞程序性死亡的标记，管家基因以及与机体对感染的应答和脓毒症相关的分子的基因，基因产物，所述基因的剪接变体和/或所述基因的片段。

20

在本发明的一个优选实施方案中，生物芯片进一步包含选自凝结系统分子和/或传染性介质分子中的至少一个基因，基因产物，所述基因的剪接变体和/或所述基因的片段。

25

免疫介质的例子为生长因子，诸如 PDGF- $\alpha$ ，- $\beta$ ，胰岛素样生长因子(ILGF)，促炎细胞因子和抗炎性细胞因子，例如白介素，例如 IL-1 到 IL-18，趋化因子样血小板因子-4 (PF-4)， $\gamma$ -干扰素诱导蛋白 10 (IP 10)，生长相关蛋白 Gro- $\alpha$ ，- $\beta$  以及- $\gamma$ ，噬酸细胞趋化因子，Mip-1 $\alpha$ ，

30

Mip-1 $\beta$ , RANTES, 生长因子受体, 细胞因子受体, 细胞因子诱导分子, 趋化因子受体和其它细胞生长相关抗原。

5 转录因子可以为 EGR-, NFAT-和 NF $\kappa$ B-蛋白, 以及 AP-1 和 CREB 蛋白家族成员以及转录调节因子。

其它急性期蛋白包括 C-反应蛋白和组织因子 1 以及细胞因子, 细胞因子受体, 细胞因子诱导分子, 趋化因子, 趋化因子受体, 激酶, 磷酸酶, 转录因子和转录调节因子。

10

补体成分的例子为因子 H, FHL-1 和 FHR 编码基因。

15 细胞特异性标记包括 CD 和粘附分子, T 细胞受体基因和与 T 细胞受体诸如 CD3, CD14, CD11e/CD18, CD28, CD143 蛋白相关的基因, 编码细胞特异性标记诸如, T 细胞亚型的 CD4 和 CD8, 巨噬细胞的 CD14, B 细胞的 IgM 的基因, 细胞周期的基因, 类花生酸信号途径和生长因子受体的基因。

20 管家基因的代表为葡萄糖-6-磷酸脱氢酶, 肌动蛋白和甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

25 其它与机体对感染和脓毒症的应答相关的分子包括细胞周期, 激酶 (Kinase), 磷酸酶和转录因子的基因, 例如人 Calc 基因的多种转录本, 编码降钙素原的代表性转录本, calcitonin N-末端肽, calcitonin 以及降钙素基因相关肽和它们的产物。

30 炎症通常由类似微生物的感染因子引起。为了直接针对炎症的起因, 例如微生物进行合适的治疗, 需要获得有关微生物尽可能多的信息。因此, 微生物的蛋白或者基因可以被固定在根据本发明所使用的生物芯片上以获得这些信息。

本发明的生物芯片可包括一种上述探针或者多达所有上述探针的任一组合。根据待检测的疾病的种类本领域技术人员可以很容易地进行探针选择。

5

上述的核酸芯片和蛋白芯片，尤其是带有上述特异性探针核酸的芯片在诊断脓毒症和脓毒相关综合症方面具有很多优点。其中一个优点就是以非常简单快速的方式就可以进行诊断，尤其是通过使用上述明确的探针核酸。可以准确的方式进行检测。另外，可以通过检测基因，基因片段和/或蛋白直接测定感染因子和/或由感染因子引起的机体反应。通过使用上述生物芯片，可以对脓毒症和脓毒相关综合症的诊断标准化。表达或者确定基因的方式不仅用于诊断，而且用于早期检查，以便在治疗中进行监控并且检测严重度。此外，本发明使用的生物芯片可以监测疾病的进展，脓毒症和脓毒相关综合症的进展，以及治疗的成功。

10

15

为了应用本发明生物芯片，待检测的 DNA 或者 RNA 可被，例如荧光染料进行标记，并且施加到芯片上。待检测 DNA 或者 RNA 与结合到具有互补序列载体上的探针分子杂交，可通过常用的方式，例如 CCD 摄像机或通过激光扫描仪在网格内的相应位置上加以检测。

20

根据本发明使用的生物芯片能够进行自动分析，并且可以定量测定待检测的样品量，这使得对脓毒症或脓毒相关综合症的病程，尤其是对治疗的成功提供更准确的信息成为可能。

25

如上所述，具有上述特异性的探针核酸和/或探针蛋白固定在载体上。这就意味着，仅仅核酸，仅仅蛋白或者核酸连同蛋白被结合到载体上。

30

根据本发明使用的生物芯片，探针尤其是以如上所述在芯片技术

中通常使用的有序网格形式固定在载体上。有序网格形式包括在载体上含有例如以点的形式存在的探针区域。通常，核酸和蛋白芯片在载体上提供了多个区域。在这种情况下，所有区域可以含有相同的探针或者区域具有不同的探针，即核酸探针和/或蛋白探针。

5

根据本发明所用生物芯片的一个优选实施方案中，探针核酸和/或探针蛋白固定在载体的预定区域。这也意味着探针应该固定的区域事先已知的。这还意味着特异性探针固定在载体上的位点在芯片使用之前是已知的，例如用待测定的样品处理过。这样就能有利地进行脓毒症和脓毒相关综合症的标准化和自动化诊断。另外，可以非常简单快速的方式进行测定。

10

根据本发明所用生物芯片的其它优选实施方案中，区域之间彼此分隔开。这样就能以非常有利的提供更好的和更准确的结果，另外，脓毒症和脓毒相关综合症诊断的标准化和自动化就可能实现。

15

优选地，探针的有序网格模式以区域间并排的方式进行排列。这种载体的例子为微滴定板，其中微孔代表探针区域，并且通常并排排列。根据所述实施方案，就能以有利的方式实现炎症测定的标准化和自动化。

20

在一个优选实施方案中，载体为载玻片。所述载玻片具有良好的光学特征，另外，具有固体和不发荧光的优点，根据这些特性，使其尤其适用于炎症的快速和准确的测定。

25

下面描述一种制备本发明所用生物芯片的方法。

为了制造生物芯片，探针，尤其是核酸可以溶解在点样液中，然后通过常规点样方法在载体上点样。柠檬酸钠盐（SSC）缓冲液被广泛用作点样液。也可补充有 50%的二甲基亚砷。

30

可以通过共价结合或者静电（离子）结合实现探针与载体的结合，例如核酸和/或蛋白与载体结合。

5           对核酸共价结合而言，例如提供醛基的化合物包埋在载体表面上。核酸含有的一级氨基可以和醛基反应形成希夫氏碱，即共价键。

          对于尤其是核酸的静电结合而言，应用是基于核酸通常为负电荷的事实。通过在载体表面提供正电荷，通过电荷的互动就可实现带负电荷核酸和带正电荷载体表面之间的彼此结合。为了这个目的，使用  
10           被带有正电荷的化合物包埋的，例如用聚-L-赖氨酸和/或氨基硅烷包埋的玻璃表面。这种活性载玻片是本领域公知的。

          如果需要，核酸和载体的交联可以通过 UV 照射实现。

15

          对于生物芯片在诊断脓毒症和脓毒相关综合症上的应用而言，来自待检测人或动物的标记 mRNA，cDNA 或者蛋白可以和生物芯片的探针核酸和/或探针蛋白杂交，并且可以如上所述确定杂交模式。待检测的样品可以分离自血液样品，尤其是静脉血，组织样品，器官或者  
20           生物体的外周血细胞。样品可以直接使用或者进一步加以纯化以获得血细胞亚群。血细胞可被溶解，以及可通过常规方式分离 RNA。通过标准程序可进一步纯化 mRNA，也可从 mRNA 中合成 cDNA。

          优选地，样品 cDNA 来自级分的细胞或者来自纯化的 mRNA。此外，样品核酸可来自 PCR 生成的片段。这些样品表现出的优点尤其是  
25           能够提供强信号。

          作为样品所用的 cDNA 或者 mRNA 可标记一个标记。任何在样品与生物芯片的探针杂交后可被检测的物质均可作为标记。这种标记  
30           的例子为荧光染料。标记的 cDNA 或者标记的 mRNA 可以常规的方式

和生物芯片的探针杂交。因此可以通过使用标准蛋白阵列技术进行蛋白分析。

5 下面，将参考核酸更详细描述本发明生物芯片的应用，但是应该理解本发明并不限于核酸，而是也可应用到蛋白。

10 来自待检测人或动物的细胞可以通过诸如 Ficoll Hypaque 离心，或者通过 Lymphoprep 的常规方法，分离自血液样品和外周血单核细胞。此外，可以使用组织，器官或者诸如分离自病人血浆和其它生物来源的感染介质的生物体。分离的细胞可被用于富集诸如单核细胞，T 细胞亚型或者 B 细胞亚型的特异性细胞亚型。

15 为了纯化细胞，可以通过诸如 FACS 筛拣，磁性筛拣或者通过裂解特异性细胞亚型的常规方法进一步进行富集。也可通过诸如酚/氯仿，RNAzol 或者 Trizol 的常规提取方式从细胞，组织或者生物体分离总 RNA 或者其部分。

20 分离的 RNA 可进一步纯化为 mRNA 以富集编码分子的数目。例如可以通过利用磁珠或者其它方法的寡-dT 选择进行上述操作过程。

cDNA 的合成也可通过标准方法进行。转化的 cDNA 可通过利用聚合酶链式反应采用基因特异性引物连同或者不存在寡-dT 引物对生物材料进行温度循环从而进一步加以富集。

25 为了制备 DNA 阵列，诸如 Borofloat-33 载玻片载体可包埋一层用于固定 DNA 的聚合物，诸如硅烷，所述聚合物含有固定 DNA 的反应基团。

30 标记的互补 RNA 或者标记的互补 cDNA 与固定在载体上核酸的杂交可通过标准方法进行。

待检测样品中所含的核酸和蛋白的标记可通过诸如掺入反应，例如利用 RTPCR 或者相关反应的方式掺入 Cy3-或者 Cy5-标记的脱氧核苷酸到 cDNA 中的常规方式进行。

5

通过扫描，例如利用 ScanArray 2000 进行信号检测。

基因的数据和定量表达模式或基因收集可通过例如利用合适的软件生物电子计算进一步加以研究和评价。为了这个目的，计算机程序可用于定义特定基因或者一组基因的表达量与通过评估试验参数或者血液动力学参数确定的炎症反应严重性之间的关系。这种程序可用于确定和预测病程的严重度或者疾病的进展。另外，可以跟踪治疗处理和介入的进展和效果。

因此可进行蛋白阵列分析。然而，为了捕获和观察，可以采用蛋白/蛋白互作。

根据本发明应用的优选实施方案，确定杂交标记 mRNA，cDNA 或者蛋白的浓度。换言之，这意味着样品中待检测核酸或者蛋白的水平被定量测定，反过来能够很容易地追踪脓毒症或者脓毒相关综合症的病程，例如确定治疗是否成功。如果成功了，样品中核酸或者蛋白的表示水平降低，因此检测信号减弱。

杂交核酸或者蛋白的检测可通过例如激光扫描仪或者 CCD 设备进行，并且可包括多阶乘生物信息分析以确定特定基因或者特定基因或者蛋白的表示水平与所述疾病严重度的关联。急性严重度和诸如脓毒症的炎性反应可例如通过诸如 APACHE II 记分的临床评估确定。

在一个优选实施方案中，根据本发明使用的生物芯片可用于有关急性或者慢性炎症，更优选地用于确定由脓毒症或者脓毒相关综合症

所引起的炎症。为了检测这些疾病，根据本发明的生物芯片是尤其有用的并且能够进行快速精确的测定。

尤其是，可通过评估众所周知的实验室和血液动力学参数评价疾病的病程，严重度或者进展从而确定特定组病人炎性反应的严重度。所述分析可例如通过诸如 APACHE II 记分的相关记分系统进行。

下面将参考实施例更详细描述本发明，但是应该理解实施例只是为了说明本发明而非限制本发明。

10

实施例 1:根据本发明生物芯片的应用。

通过静脉穿刺从根据 APACHE II 记分被归类为脓毒症的病人收集全血。另外从健康人志愿者收集血液。这些样品收集在市售真空采血管 (vacutaine) 中，根据标准程序所述采血管包括用于稳定 RNA 的溶液。根据供应商的说明书分离 RNA，根据标准方法分离 mRNA (<http://www.Microarrays.org/pdfs/YeastPolyAIsolation.pdf>)。通过利用逆转录酶掺入 Cy3 和 Cy5 标记的核苷酸标记 cDNA (<http://www.Microarrays.org/pdfs/HumanRNALabel.pdf>)。

根据脓毒症或者脓毒相关综合症的关联，大约 1000 个克隆从包括 75000 人克隆 (RZPD, Berlin) 的 cDNA 文库中挑选出来。来自这些 1000 个克隆的 PCR 产物通过使用 Omnigrad 点样器 (Genemachines) 点样在聚-L-赖氨酸包埋的载玻片 (Telechem) 上。

如 (<http://www.Microarrays.org/pdfs/Hybridization.pdf>) 所述，待检测的上述标记分子用于和固定在活化载体表面上的 cDNA 杂交。严格遵循说明进行冲洗 (<http://www.Microarrays.org/pdfs/ArrayWashing.pdf>)。根据说明书手册 Genepix 4000 (Axon) 扫描仪用于检测荧光标记的杂交分子。将获自脓毒症病人和健康人志愿者的材料之间的数据进行比较，AIDA Array Evaluation 软件 (raytest) 用于数据分析确定上调

30

---

或者下调基因。以下数据提炼处理的应用是为了确定不同基因表达和脓毒症或者脓毒相关综合症严重度的相互关系。通过利用上述生物芯片可以证实不同基因表达的分析能够建立脓毒症或者脓毒相关综合症的诊断，其严重度的定量分析并且测定对治疗的反应。

5

专利名称(译)	脓毒症或脓毒相关综合症生物芯片在诊断上的应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN1522304A</a>	公开(公告)日	2004-08-18
申请号	CN02813220.3	申请日	2002-06-28
[标]申请(专利权)人(译)	斯尔思实验室有限公司		
申请(专利权)人(译)	斯尔思实验室有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	斯尔思实验室有限公司		
[标]发明人	彼得弗朗茨齐普费尔 汉斯彼得萨卢齐 斯特凡鲁斯武尔姆 康拉德赖因哈特		
发明人	彼得·弗朗茨·齐普费尔 汉斯彼得·萨卢齐 斯特凡·鲁斯武尔姆 康拉德·赖因哈特		
IPC分类号	G01N33/53 C12M1/00 C12N15/09 C12Q1/68 C12Q1/6837 G01N33/566 G01N33/58		
CPC分类号	C12Q1/6837		
代理人(译)	丁业平 王维玉		
优先权	2001115946 2001-06-29 EP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及含有探针核酸和/或探针蛋白的核酸和/或蛋白芯片的应用，所述探针核酸和/或探针蛋白为特异于细胞应激、炎性反应和免疫反应，与应激、炎性和免疫反应相关，在急性期反应过程中诱导的或它们的任一组合，并且所述探针核酸和/或探针蛋白固定在载体上用于脓毒症和脓毒相关综合症的诊断。