



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105256039 A

(43) 申请公布日 2016. 01. 20

(21) 申请号 201510725408. X

(22) 申请日 2015. 10. 29

(71) 申请人 北京泱深生物信息技术有限公司

地址 100080 北京市海淀区善缘街1号立方
庭大厦3103室

(72) 发明人 宋宏涛 任静 杨承刚

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006. 01)

C12N 15/11(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

C40B 40/08(2006. 01)

C40B 40/10(2006. 01)

权利要求书1页 说明书7页

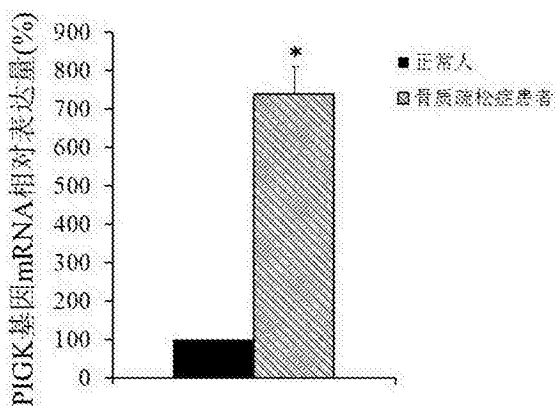
序列表5页 附图1页

(54) 发明名称

骨质疏松症诊断标志物

(57) 摘要

本发明公开了 PIGK 基因可以作为骨质疏松症早期诊断的分子标志物。本发明利用基因芯片和 QPCR 的方法发现 PIGK 基因在正常人和骨质疏松症患者的血液中的表达存在显著差异,即可以通过检测血液中 PIGK 基因表达情况来判断受试者是否患有骨质疏松症。根据两者的相关性,本发明开发了一种诊断骨质疏松的试剂盒,该试剂盒通过检测 PIGK 基因的表达从而进行骨质疏松的诊断。本发明的诊断试剂盒可用于疾病的早期诊断,在临床上具有广泛的应用前景。



1. 检测 PIGK 基因表达的产品在制备诊断骨质疏松症的工具中的应用。
2. 根据权利要求 1 所述的应用,其特征在於,所述产品包括:通过 RT-PCR、实时定量 PCR、免疫检测、原位杂交、芯片或高通量测序平台检测 PIGK 基因表达水平以诊断骨质疏松症的产品。
3. 根据权利要求 2 所述的应用,其特征在於,所述用 RT-PCR 诊断骨质疏松症的产品至少包括一对特异扩增 PIGK 基因的引物;所述用实时定量 PCR 诊断骨质疏松症的产品至少包括一对特异扩增 PIGK 基因的引物;所述用免疫检测诊断骨质疏松症的产品包括:与 PIGK 蛋白特异性结合的抗体;所述用原位杂交诊断骨质疏松症的产品包括:与 PIGK 基因的核酸序列杂交的探针;所述用芯片诊断骨质疏松症的产品包括:蛋白芯片和基因芯片;其中,蛋白芯片包括与 PIGK 蛋白特异性结合的抗体,基因芯片包括与 PIGK 基因的核酸序列杂交的探针。
4. 根据权利要求 3 所述的应用,其特征在於,所述用实时定量 PCR 诊断骨质疏松症的产品至少包括的一对特异扩增 PIGK 基因的引物如 SEQ ID NO. 3 和 SEQ ID NO. 4 所示。
5. 一种用于诊断骨质疏松症的工具,其特征在於,所述工具能够通过检测样本中 PIGK 基因的表达来诊断骨质疏松症。
6. 根据权利要求 5 所述的工具,其特征在於,所述工具包括芯片、试剂盒、试纸或高通量测序平台。
7. 根据权利要求 6 所述的工具,其特征在於,所述芯片包括基因芯片、蛋白质芯片;所述基因芯片包括固相载体以及固定在固相载体的寡核苷酸探针,所述寡核苷酸探针包括用于检测 PIGK 基因转录水平的针对 PIGK 基因的寡核苷酸探针;所述蛋白质芯片包括固相载体以及固定在固相载体的 PIGK 蛋白的特异性抗体;所述试剂盒包括基因检测试剂盒和蛋白免疫检测试剂盒;所述基因检测试剂盒包括用于检测 PIGK 基因转录水平的试剂;所述蛋白免疫检测试剂盒包括 PIGK 蛋白的特异性抗体;所述试纸包括用于检测 PIGK 基因转录水平的试剂;所述高通量测序平台包括用于检测 PIGK 基因转录水平的试剂。
8. 根据权利要求 7 所述的工具,其特征在於,所述检测 PIGK 基因转录水平的试剂包括针对 PIGK 基因的引物和 / 或探针。
9. 根据权利要求 8 所述的工具,其特征在於,所述针对 PIGK 基因的引物序列如下:正向引物序列如 SEQ ID NO. 3 所示,反向引物如 SEQ ID NO. 4 所示。
10. 根据权利要求 5-9 中任一项所述的工具,其特征在於,所述样本是血液。

骨质疏松症诊断标志物

技术领域

[0001] 本发明属于分子诊断领域,涉及一种用于骨质疏松症诊断的分子标志物,具体涉及血液中的分子标志物 -PIGK 基因在制备诊断骨质疏松症的产品中的应用。

背景技术

[0002] 骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 是多种原因引起的一组骨病,骨组织有正常的钙化,钙盐与基质呈正常比例,以单位体积内骨组织量减少为特点的代谢性骨病变。在多数骨质疏松中,骨组织的减少主要由于骨质吸收增多所致。以骨骼疼痛、易于骨折为特征。

[0003] 世界卫生组织已将骨质疏松列为仅次于心血管疾病的第二大危害人类健康的疾病。据中国健康促进基金会最新发布的《2013 中国骨质疏松骨折防治蓝皮书》显示,骨质疏松骨折是一种脆性骨折,即在受到轻微创伤或日常活动中遭受低能量外伤即可发生的骨折。骨质疏松骨折的常见部位是脊椎、髌骨和前臂远端。我国 50 岁以上人群约 6944 万人患有骨质疏松症,约 2.1 亿人骨量偏低。北京等地区流行病学调查显示,50 岁以上女性脊椎骨折的患病率为 15%,相当于每 7 个 50 岁以上的女性中就有一个发生过脊椎骨折。

[0004] 骨质疏松症的检测包括实验室检查指标的检测和辅助检测。

[0005] 实验室检查指标:

[0006] 骨质疏松症患者部分血清学生化指标可以反应骨转换(包括骨形成和骨吸收)状态,在骨的高转换状态(例如 I 型骨质疏松症)下,这些指标可以升高,也可用于监测治疗的早期反应。但其在骨质疏松症中的临床意义仍有待于进一步研究。这些生化测量指标包括:骨特异的碱性磷酸酶 (Bone-specific alkaline phosphatase, 反应骨形成)、抗酒石酸酸性磷酸酶 (tartrated resistant acid phosphatase, 反应骨吸收)、骨钙素 (Osteocalcin, 反应骨形成)、I 型原胶原肽 (Type I procollagenpeptidase, 反应骨形成)、尿吡啶啉 (Urinary pyridinoline) 和脱氧吡啶啉 (Urinary deoxypyridinoline, 反应骨吸收)、I 型胶原的 N-C- 末端交联肽 (cross-linked N-and C-telopeptide of type I collagen, 反应骨吸收)。正如前面所提到的,使用生化指标检测骨质疏松症的精确度不够。

[0007] 辅助检查:包括骨影像学检查和骨密度检测。辅助检查的对象一般都是骨质疏松症的晚期患者,不能用于早期骨质疏松症患者的筛查。

[0008] 基于现有技术中检测骨质疏松症的手段的局限性,寻找一种有效的能够在早期即可诊断骨质疏松症发生的方法是亟待解决的问题。

发明内容

[0009] 为了弥补现有技术的不足,本发明的目的在于提供一种可用于骨质疏松症 (Osterarthritis, OA) 早期诊断的分子标志物。相比传统的骨质疏松症的诊断方法,使用基因标志物来诊断骨质疏松症的具有及时性、特异性和灵敏性,从而使患者在疾病早期就能知晓疾病风险,针对风险高低,采取相应的预防和治疗措施。

[0010] 为了实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0011] 本发明提供了检测 PIGK 基因表达的产品在制备诊断骨质疏松症的工具中的应用。

[0012] 进一步,上面所提到的检测 PIGK 基因表达的产品包括:通过 RT-PCR、实时定量 PCR、免疫检测、原位杂交、芯片或高通量测序平台检测 PIGK 基因表达水平以诊断骨质疏松症的产品。

[0013] 进一步,所述用 RT-PCR 诊断骨质疏松症的产品至少包括一对特异扩增 PIGK 基因的引物;所述用实时定量 PCR 诊断骨质疏松症的产品至少包括一对特异扩增 PIGK 基因的引物;所述用免疫检测诊断骨质疏松症的产品包括:与 PIGK 蛋白特异性结合的抗体;所述用原位杂交诊断骨质疏松症的产品包括:与 PIGK 基因的核酸序列杂交的探针;所述用芯片诊断骨质疏松症的产品包括:蛋白芯片和基因芯片;其中,蛋白芯片包括与 PIGK 蛋白特异性结合的抗体,基因芯片包括与 PIGK 基因的核酸序列杂交的探针。

[0014] 在本发明的具体实施方案中,所述用实时定量 PCR 诊断骨质疏松症的产品至少包括一对特异扩增 PIGK 基因的引物的序列如 SEQ ID NO. 3 和 SEQ ID NO. 4 所示。

[0015] 优选地,所述诊断工具包括芯片、试剂盒、试纸或高通量测序平台。其中,高通量测序平台是一种特殊的诊断工具,检测 PIGK 基因表达的产品可以应用于该平台实现对 PIGK 基因的表达情况的检测。随着高通量测序技术的发展,对一个人的基因表达谱的构建将成为十分便捷的工作。通过对比疾病患者和正常人群的基因表达谱,容易分析出哪个基因的异常与疾病相关。因此,在高通量测序中获知 PIGK 基因的异常与骨质疏松症相关也属于 PIGK 基因的用途,同样在本发明的保护范围之内。

[0016] 本发明还提供了一种诊断骨质疏松症的工具,所述诊断工具包括芯片、试剂盒、试纸、或高通量测序平台。

[0017] 其中,所述芯片包括基因芯片、蛋白质芯片;所述基因芯片包括固相载体以及固定在固相载体的寡核苷酸探针,所述寡核苷酸探针包括用于检测 PIGK 基因转录水平的针对 PIGK 基因的寡核苷酸探针;所述蛋白质芯片包括固相载体以及固定在固相载体的 PIGK 蛋白的特异性抗体;所述基因芯片可用于检测包括 PIGK 基因在内的多个基因(例如,与骨质疏松症相关的多个基因)的表达水平。所述蛋白质芯片可用于检测包括 PIGK 蛋白在内的多个蛋白质(例如与骨质疏松症相关的多个蛋白质)的表达水平。通过将多个与骨质疏松症的标志物同时检测,可大大提高骨质疏松症诊断的准确率。

[0018] 其中,所述试剂盒包括基因检测试剂盒和蛋白免疫检测试剂盒;所述基因检测试剂盒包括用于检测 PIGK 基因转录水平的试剂;所述蛋白免疫检测试剂盒包括 PIGK 蛋白的特异性抗体。进一步,所述试剂包括使用 RT-PCR、实时定量 PCR、免疫检测、原位杂交或芯片方法检测 PIGK 基因表达水平过程中所需的试剂。优选度,所述试剂包括针对 PIGK 基因的引物和/或探针。根据 PIGK 基因的核苷酸序列信息容易设计出可以用于检测 PIGK 基因表达水平的引物和探针。

[0019] 与 PIGK 基因的核酸序列杂交的探针可以是 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。

[0020] 所述高通量测序平台包括检测 PIGK 基因表达水平的试剂。

[0021] 所述试纸包括试纸载体和固定在试纸载体上的寡核苷酸,所述寡核苷酸能够检测 PIGK 基因的转录水平。

[0022] 进一步,所述 PIGK 蛋白的特异性抗体包括单克隆抗体、多克隆抗体。所述 PIGK 蛋白的特异性抗体包括完整的抗体分子、抗体的任何片段或修饰(例如,嵌合抗体、scFv、Fab、F(ab')₂、Fv 等。只要所述片段能够保留与 PIGK 蛋白的结合能力即可。用于蛋白质水平的抗体的制备时本领域技术人员公知的,并且本发明可以使用任何方法来制备所述抗体。

[0023] 在本发明的具体实施方案中,所述针对 PIGK 基因的引物序列如下:正向引物序列如 SEQ ID NO. 3 所示,反向引物如 SEQ ID NO. 4 所示。

[0024] 用于诊断骨质疏松症的 PIGK 基因及其表达产物的来源包括但不限于血液、组织液、尿液、唾液、脊髓液等可以获得基因组 DNA 的体液。在本发明的具体实施方案中,用于诊断骨质疏松症的 PIGK 基因及其表达产物的来源是血液。

[0025] 在本发明的上下文中,“PIGK 基因”包括 PIGK 基因以及 PIGK 基因的任何功能等同物的多核苷酸。PIGK 基因包括与目前国际公共核酸序列数据库 GeneBank 中 PIGK 基因(NC_000001.11)DNA 序列具有 70% 以上同源性,且编码相同功能蛋白质的 DNA 序列;

[0026] 优选地,PIGK 基因的编码序列包括以下任一种 DNA 分子:

[0027] (1) 序列表中 SEQ ID NO. 1 所示的 DNA 序列;

[0028] (2) 在严格条件下与 1) 限定的 DNA 序列杂交且编码相同功能蛋白质的 DNA 序列;

[0029] (3) 与 (1) 或 (2) 限定的 DNA 序列具有 70%、优选地,90% 以上同源性,且编码相同功能蛋白质的 DNA 分子。

[0030] 在本发明的具体实施方案中,所述 PIGK 基因的编码序列是 SEQ ID NO. 1 所示的 DNA 序列。

[0031] 在本发明的上下文中,PIGK 基因表达产物包括 PIGK 蛋白以及 PIGK 蛋白的部分肽。所述 PIGK 蛋白的部分肽含有与骨质疏松症相关的功能域。

[0032] “PIGK 蛋白”包括 PIGK 蛋白以及 PIGK 蛋白的任何功能等同物。所述功能等同物包括 PIGK 蛋白保守性变异蛋白质、或其活性片段,或其活性衍生物,等位变异体、天然突变体、诱导突变体、在高或低的严谨条件下能与 PIGK 的 DNA 杂交的 DNA 所编码的蛋白质。

[0033] 优选地,PIGK 蛋白是具有下列氨基酸序列的蛋白质:

[0034] (1) 由序列表中 SEQ ID NO. 2 所示的氨基酸序列组成的蛋白质;

[0035] (2) 将 SEQ ID NO. 2 所示的氨基酸序列经过一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加且与 SEQ ID NO. 2 所示的氨基酸序列具有相同功能的由 SEQ ID NO. 2 所示的氨基酸序列衍生的蛋白质。取代、缺失或者添加的氨基酸的个数通常为 1-50 个,更佳地 1-30 个,更佳地 1-20 个,最佳地 1-10 个。

[0036] (3) 与 SEQ ID NO. 2 所示的氨基酸序列具有至少 80% 同源性(又称为序列同一性),更优选地,与 SEQ ID NO. 2 所示的氨基酸序列至少约 90% 至 95% 的同源性,常为 96%、

97%、98%、99%同源性的氨基酸序列构成的多肽。

[0037] 在本发明的具体实施方案中,所述PIGK蛋白是具有SEQ ID NO. 2所示的氨基酸序列的蛋白质。

[0038] 通常,已知的是,一个蛋白质中一个或多个氨基酸的修饰不会影响蛋白质的功能。本领域技术人员会认可改变单个氨基酸或小百分比的氨基酸或对氨基酸序列的个别添加、缺失、插入、替换是保守修饰,其中蛋白质的改变产生具有相似功能的蛋白质。提供功能相似的氨基酸的保守替换表是本领域公知的。

[0039] 通过添加一个氨基酸或多个氨基酸残基修饰的蛋白质的例子是PIGK蛋白的融合蛋白。对于与PIGK蛋白融合的肽或者蛋白质没有限制,只要所得的融合蛋白保留PIGK蛋白的生物学活性即可。

[0040] 本发明的PIGK蛋白也包括对SEQ ID NO. 2所示的氨基酸序列的非保守修饰,只要经过修饰的蛋白质仍然能够保留PIGK蛋白的生物学活性即可。在此类修饰蛋白质中突变的氨基酸数目通常是10个或者更少,例如6个或者更少,例如3个或者更少。

[0041] 在本发明的上下文中,“诊断骨质疏松症”既包括判断受试者是否已经患有骨质疏松症、也包括判断受试者是否存在患有骨质疏松症的风险。

[0042] 本发明的优点和有益效果:

[0043] 本发明首次发现了PIGK基因表达与骨质疏松症相关,通过检测受试者中PIGK的表达,可以判断受试者是否患有骨质疏松症、或者判断受试者是否存在患有骨质疏松症的风险,从而指导临床医师给受试者提供预防方案或者治疗方案。

[0044] 本发明发现了一种新的分子标记物-PIGK基因,相比传统的检测手段,基因诊断更及时、更特异、更灵敏,能够实现骨质疏松症的早期诊断,从而降低骨质疏松症的死亡率。

附图说明

[0045] 图1显示利用基因芯片检测PIGK基因在骨质疏松症患者和正常人中的表达差异;

[0046] 图2显示利用QPCR检测PIGK基因在骨质疏松症患者和正常人中的表达差异。

[0047] 具体的实施方式

[0048] 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。

[0049] 实施例1 筛选骨质疏松症患者和正常人中差异表达的基因

[0050] 1、研究对象:

[0051] 骨质疏松组:随机抽取医院骨科收治的10例原发性骨质疏松症患者,男、女各5例,年龄最小50岁,最大75岁。纳入标准:符合《中国人骨质疏松症建议诊断标准》(第二稿)。无明显心、肝、肾、肺功能不全、无引起继发性骨质疏松症的各种内分泌疾病、排除肿瘤、糖尿病等其他严重疾病干扰骨代谢者。

[0052] 正常组:选取年龄50-75岁的健康志愿者10例,男女各5例。

[0053] 两组之间年龄、性别差异无统计学意义($P>0.10$),具有可比性。

[0054] 所有研究对象对本研究均知情并签署了知情同意书。

[0055] 2、血液中总 RNA 的提取

[0056] (1) 匀浆处理 (Homogenization)

[0057] 直接取新鲜的血液, 加入 3 倍体积红细胞裂解液, 混匀后室温放置 10 分钟, 10,000rpm 离心 1 分钟。彻底吸弃上清, 收集白细胞沉淀。每 100-200 μ l 血液收集的白细胞沉淀加入 1ml TRIzol。

[0058] (2) 分层 (Phase Separation)

[0059] a. 样品加入 TRIzol 后, 室温放置 5min, 使样品充分裂解。

[0060] b. 每 1ml TRIzol 加入 200 μ l 氯仿, 剧烈振荡混匀后室温放置 3-5min 使其自然分相。

[0061] (3) RNA 沉淀 (RNA Precipitation)

[0062] a. 4 $^{\circ}$ C 12,000rpm 离心 10-15min。样品会分成三层: 黄色的有机相, 中间层和无色的水相, RNA 主要在水相中, 把水相 (通常可吸取 550 μ l) 转移到新管中。

[0063] b. 在上清中加入等体积冰冷的异丙醇, 室温放置 10-20min。4 $^{\circ}$ C 12,000rpm 离心 10min, 弃上清, RNA 沉淀于管底。

[0064] (4) RNA 漂洗 (RNA Wash)

[0065] a. RNA 沉淀中加入 1ml 75%乙醇 (用 RNase-free 水配制), 温和振荡离心管, 悬浮沉淀。每 1ml TRIzol 加入 1ml 75%乙醇。

[0066] b. 4 $^{\circ}$ C 5,000-8,000rpm 离心 1-2min, 弃上清; 短暂快速离心, 用移液器小心吸弃上清, 室温放置 1-2 分钟晾干沉淀。

[0067] (5) 溶解 RNA (Redissolving the RNA)

[0068] 沉淀中加入 50-100 μ l RNase-free 水, 轻弹管壁, 以充分溶解 RNA, -70 $^{\circ}$ C 保存。

[0069] 3、RNA 质量和纯度检测

[0070] RNA 质量: 通过 RNA 完整性来表示, 可用普通琼脂糖凝胶电泳 (电泳条件: 1.2% 胶; 0.5 \times TBE 电泳缓冲液; 150v, 15 分钟) 检测完整性。

[0071] RNA 纯度: OD260/OD280 比值是衡量 RNA 样品中蛋白质污染程度的指标。高质量的 RNA 样品, OD260/OD280 值 (10mM Tris, pH7.5) 在 2.0 左右。

[0072] 4、基因芯片杂交及扫描

[0073] 总 RNA 经线性化扩增后, cy3-UTP 标记, 荧光标记后的 cRNAs 采用 RNEASY Mini Kit 纯化, 用 Amhion 的 RNA Fragmentation Reagents 对标记好的 cRNAs 进行片段化处理。采用美国 Agilent 公司的人全基因表达谱芯片 (4x 44K 基因), 在芯片杂交炉中 65 $^{\circ}$ C 杂交 17h, 然后洗脱、染色, 最后用 Agilent DNA MicroarrayScanner 扫描仪扫描。

[0074] 5、芯片数据处理与分析

[0075] 杂交后的芯片经芯片扫描仪读取数据点后, 将数据导入分析软件, 对于两组比值的自然对数绝对值大于 2.0 或小于 0.5 的基因作为差异表达基因。

[0076] 6、统计学处理

[0077] 采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据分析, 组间差异比较采用单因素方差分析法, $P < 0.05$ 差异有显著性意义。

[0078] 7、结果

[0079] 结果显示(如图1所示),与正常人相比,骨质疏松症患者血液中PIGK基因的mRNA水平显著升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

[0080] 实施例2 QPCR实验验证骨质疏松症患者和正常人中差异表达的基因

[0081] 1、研究对象:

[0082] 骨质疏松组:随机抽取医院骨科收治的50例原发性骨质疏松症患者,男、女各25例,年龄最小50岁,最大75岁。纳入标准:符合《中国人骨质疏松症建议诊断标准》(第二稿)。无明显心、肝、肾、肺功能不全、无引起继发性骨质疏松症的各种内分泌疾病、排除肿瘤、糖尿病等其他严重疾病干扰骨代谢者。

[0083] 正常组:选取年龄50-75岁的健康志愿者46例,男女各23例。

[0084] 两组之间年龄、性别差异无统计学意义($P > 0.10$),具有可比性。

[0085] 所有研究对象对本研究均知情并签署了知情同意书。

[0086] 2、血液中总RNA的提取

[0087] 步骤同实施例1。

[0088] 3、逆转录

[0089] 用逆转录缓冲液对 $1 \mu\text{g}$ 总RNA进行逆转录合成cDNA。采用 $25 \mu\text{l}$ 反应体系,每个样品取 $1 \mu\text{g}$ 总RNA作为模板RNA,在PCR管中分别加入以下组分:DEPC水, $5 \times$ 逆转录缓冲液, 10mmol/L dNTP, 0.1mmol/L DTT, $30 \mu\text{mol/L}$ Oligo dT, $200 \text{U}/\mu\text{l}$ M-MLV,模板RNA。 42°C 孵育1h, 72°C 10min,短暂离心。

[0090] 4、QPCR

[0091] (1) 引物设计

[0092] 根据Genbank中PIGK基因和GAPDH基因的编码序列设计QPCR扩增引物,由上海生工生物工程技术有限公司合成。具体引物序列如下:

[0093] PIGK基因:

[0094] 正向引物为 $5' - \text{CAGTCACATTGTCCTAAT} - 3'$ (SEQ ID NO. 3);

[0095] 反向引物为 $5' - \text{CTCGTAACTTCTATAATCCA} - 3'$ (SEQ ID NO. 4),

[0096] GAPDH基因:

[0097] 正向引物为 $5' - \text{TTTAACTCTGGTAAAGTGGATAT} - 3'$ (SEQ ID NO. 5);

[0098] 反向引物为 $5' - \text{GGTGAATCATATTGGAACA} - 3'$ (SEQ ID NO. 6)。

[0099] (2) 按照表1配制PCR反应体系:

[0100] 其中,SYBR Green聚合酶链式反应体系购自Invitrogen公司。

[0101] 表1 PCR反应体系

[0102]

试剂	体积
正向引物	$1 \mu\text{l}$
反向引物	$1 \mu\text{l}$

[0103]

SYBR Green 聚合酶链式反应体系	12.5 μ l
模板	2 μ l
去离子水	补足 25 μ l

[0104] (3)PCR 反应条件 :95 $^{\circ}$ C 10min, (95 $^{\circ}$ C 10s,60 $^{\circ}$ C 40s)*42 个循环。以 SYBR Green 作为荧光标记物,在 Light Cycler 荧光定量 PCR 仪上进行 PCR 反应,通过融解曲线分析和电泳确定目的条带, $\Delta \Delta CT$ 法进行相对定量。

[0105] 5、统计学方法

[0106] 结果数据都是以平均值 \pm 标准差的方式来表示,采用 SPSS13.0 统计软件来进行统计分析的,两者之间的差异采用 t 检验,认为当 $P < 0.05$ 时具有统计学意义。

[0107] 6、结果

[0108] 结果如图 2 所示,与正常人相比,骨质疏松症患者血液中 PIGK 基因的 mRNA 水平显著增加,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),结果同基因芯片实验。

[0109] 上述实施例的说明只是用于理解本发明的方法及其核心思想。应当指出,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以对本发明进行若干改进和修饰,这些改进和修饰也将落入本发明权利要求的保护范围内。

[0001]

SEQUENCE LISTING

<110> 北京泱深生物信息技术有限公司

<120> 骨质疏松症诊断标志物

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1188

<212> DNA

<213> 人源

<400> 1

```

atggccgtea cgcacagcct cagccgggct ggcactgtct tggcaactgt gttgctctg      60
tccfcggca gcgtggccgc tagtcalatc gaggatcaag cagaacaatt cttlagaagt      120
ggccatacaa acaactgggc tgttctggig tgtacatccc gattctggit taaitatga      180
catgttgcaa atacccttfc tgtttataga agtgtcaaga ggetaggtat tctgacagt      240
cacattgtcc taatgcttgc agatgatatg gcctgtaate ctagaaatcc caaacagct      300
acagtgttta gtcacaagaa tatggaacta aatgtgtatg gagatgatgt ggaagtggat      360
tatagaagtt acgaggtaac tgtggagaat ttttacggg tattaactgg gaggatccca      420
cctagtactc cfcggcmeta acgtcttctt tctgatgaca gaagcaatat tctaatttat      480
atgacagggc atggcggaaa tggcttctta aaattcaag attctgaaga aattaccaac      540
atagaacteg cggatgcttt tgaacaaatg tggcagaaaa gacgctacaa tgagctactg      600
tttattattg atactfgcca aggagcatcc atgtatgaac gattttatfc tctaacata      660

```

[0002]

atggctctag ctagtgtca agtgggagaa gattcactct cgcatacaacc tgatcctgca 720
 attggagtcc atcttatgga tagatacaca ttttatgtct tggaaftttt ggaagaaatt 780
 aaccagcta gceaaactaa tatgaatgac cttttcagg tatgtcccaa aagtctgtgt 840
 gtgtctactc ctggacatcg cactgatctt ttcagaggg atcctaaaaa tgtactgata 900
 actgatttct ttggaagtgt acggaaagtg gaaattacaa cagagactat taaattgcaa 960
 caggattcag aaatcatgga aagcagctat aaggaagacc agatggatga gaaactaatg 1020
 gaacctctga aatatgctga acaacttctt gtagctcaga taatacacca gaaaccgaag 1080
 ctgaaagact ggcatactcc tgggggcttt attctgggat tatgggcact tattatcatg 1140
 gttttctca aaacttatgg aattaagcat atgaagtca ttttttag 1188

<210> 2

<211> 395

<212> PRT

<213> 人源

<400> 2

Met Ala Val Thr Asp Ser Leu Ser Arg Ala Ala Thr Val Leu Ala Thr

1 5 10 15

Val Leu Leu Leu Ser Phe Gly Ser Val Ala Ala Ser His Ile Glu Asp

20 25 30

Gln Ala Glu Gln Phe Phe Arg Ser Gly His Thr Asn Asn Trp Ala Val

35 40 45

Leu Val Cys Thr Ser Arg Phe Trp Phe Asn Tyr Arg His Val Ala Asn

50 55 60

Thr Leu Ser Val Tyr Arg Ser Val Lys Arg Leu Gly Ile Pro Asp Ser

65 70 75 80

[0003]

His Ile Val Leu Met Leu Ala Asp Asp Met Ala Cys Asn Pro Arg Asn

85

90

95

Pro Lys Pro Ala Thr Val Phe Ser His Lys Asn Met Glu Leu Asn Val

100

105

110

Tyr Gly Asp Asp Val Glu Val Asp Tyr Arg Ser Tyr Glu Val Thr Val

115

120

125

Glu Asn Phe Leu Arg Val Leu Thr Gly Arg Ile Pro Pro Ser Thr Pro

130

135

140

Arg Ser Lys Arg Leu Leu Ser Asp Asp Arg Ser Asn Ile Leu Ile Tyr

145

150

155

160

Met Thr Gly His Gly Gly Asn Gly Phe Leu Lys Phe Gln Asp Ser Glu

165

170

175

Glu Ile Thr Asn Ile Glu Leu Ala Asp Ala Phe Glu Gln Met Trp Gln

180

185

190

Lys Arg Arg Tyr Asn Glu Leu Leu Phe Ile Ile Asp Thr Cys Gln Gly

195

200

205

Ala Ser Met Tyr Glu Arg Phe Tyr Ser Pro Asn Ile Met Ala Leu Ala

210

215

220

Ser Ser Gln Val Gly Glu Asp Ser Leu Ser His Gln Pro Asp Pro Ala

225

230

235

240

Ile Gly Val His Leu Met Asp Arg Tyr Thr Phe Tyr Val Leu Glu Phe

245

250

255

Leu Glu Glu Ile Asn Pro Ala Ser Gln Thr Asn Met Asn Asp Leu Phe

260

265

270

[0004]

Gln Val Cys Pro Lys Ser Leu Cys Val Ser Thr Pro Gly His Arg Thr

275

280

285

Asp Leu Phe Gln Arg Asp Pro Lys Asn Val Leu Ile Thr Asp Phe Phe

290

295

300

Gly Ser Val Arg Lys Val Glu Ile Thr Thr Glu Thr Ile Lys Leu Gln

305

310

315

320

Gln Asp Ser Glu Ile Met Glu Ser Ser Tyr Lys Glu Asp Gln Met Asp

325

330

335

Glu Lys Leu Met Glu Pro Leu Lys Tyr Ala Glu Gln Leu Pro Val Ala

340

345

350

Gln Ile Ile His Gln Lys Pro Lys Leu Lys Asp Trp His Pro Pro Gly

355

360

365

Gly Phe Ile Leu Gly Leu Trp Ala Leu Ile Ile Met Val Phe Phe Lys

370

375

380

Thr Tyr Gly Ile Lys His Met Lys Phe Ile Phe

385

390

395

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 3

cagtcacatt gtctaat

18

<210> 4

<211> 20

[0005]

<212> DNA	
<213> 人工合成	
<400> 4	
ctcgtaacct ctataatcca	20
<210> 5	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工合成	
<400> 5	
tttaactctggtaaagtgga tat	23
<210> 6	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工合成	
<400> 6	
ggf ggaatca tattggaaca	20

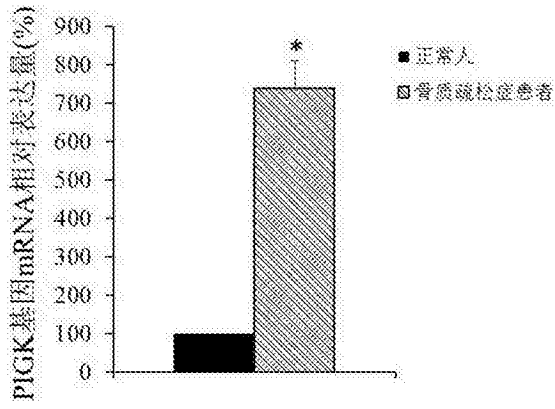


图 1

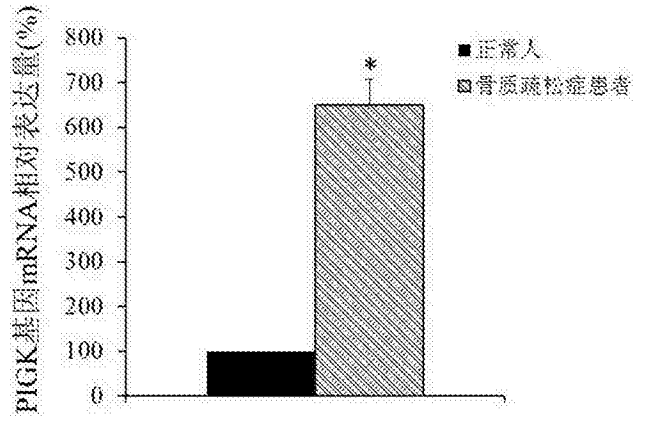


图 2

专利名称(译)	骨质疏松症诊断标志物		
公开(公告)号	CN105256039A	公开(公告)日	2016-01-20
申请号	CN201510725408.X	申请日	2015-10-29
[标]申请(专利权)人(译)	北京泱深生物信息技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京泱深生物信息技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京泱深生物信息技术有限公司		
[标]发明人	宋宏涛 任静 杨承刚		
发明人	宋宏涛 任静 杨承刚		
IPC分类号	C12Q1/68 C12N15/11 G01N33/53 C40B40/08 C40B40/10		
CPC分类号	C12Q1/686 C12Q1/6837 C12Q1/6841 C12Q1/6869 C40B40/08 C40B40/10 G01N33/53 C12Q2561/113 C12Q2545/114		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了PIGK基因可以作为骨质疏松症早期诊断的分子标志物。本发明利用基因芯片和QPCR的方法发现PIGK基因在正常人和骨质疏松症患者的血液中的表达存在显著差异，即可以通过检测血液中PIGK基因表达情况来判断受试者是否患有骨质疏松症。根据两者的相关性，本发明开发了一种诊断骨质疏松的试剂盒，该试剂盒通过检测PIGK基因的表达从而进行骨质疏松的诊断。本发明的诊断试剂盒可用于疾病的早期诊断，在临床上具有广泛的应用前景。

