



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105925714 A

(43)申请公布日 2016.09.07

(21)申请号 201610512820.8

(22)申请日 2016.07.01

(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 李曙光 杨承刚

(51)Int. Cl.

C12Q 1/68(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

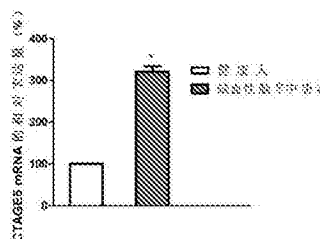
权利要求书1页 说明书7页
序列表7页 附图1页

(54)发明名称

一种诊断缺血性脑卒中的分子标志物

(57)摘要

本发明公开了一种诊断缺血性脑卒中的分子标志物,该标志物为CTAGE5基因,通过检测CTAGE5基因的表达水平可以为缺血性脑卒中患者提供早期诊断,从而实现早发现早治疗,降低缺血性脑卒中患者的死亡率。本发明提供了一种诊断缺血性脑卒中的产品,所述产品包括检测CTAGE5基因的表达水平的试剂,该产品能够实现缺血性脑卒中的早期诊断。



1. 分子标志物在制备诊断缺血性脑卒中产品中的应用,其特征在于,所述分子标志物为CTAGE5。
2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述分子标志物在缺血性脑卒中患者中表达上调。
3. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述产品包括:通过RT-PCR、实时定量PCR、免疫检测、原位杂交或微阵列芯片检测CTAGE5基因的表达水平以诊断缺血性脑卒中的产品。
4. 根据权利要求1-3任一项所述的应用,其特征在于,所述产品包括芯片和/或试剂盒;其中所述芯片包括基因芯片、蛋白质芯片;所述试剂盒包括基因检测试剂盒和蛋白免疫检测试剂盒。
5. 根据权利要求4所述的应用,其特征在于,所述基因检测试剂盒至少包括一对特异性扩增CTAGE5的引物。
6. 根据权利要求5所述的应用,其特征在于,所述特异性扩增CTAGE5的引物序列如SEQ ID NO.3和SEQ ID NO.4所示。
7. 一种诊断缺血性脑卒中的产品,其特征在于,所述的产品能够通过检测样本中CTAGE5基因的表达水平来诊断缺血性脑卒中。
8. 根据权利要求7所述的产品,其特征在于,所述产品包括芯片、或试剂盒;其中,所述芯片包括基因芯片、蛋白质芯片;所述试剂盒包括基因检测试剂盒和蛋白免疫检测试剂盒。
9. 根据权利要求8所述的产品,其特征在于,所述基因检测试剂盒包括针对CTAGE5基因的引物和/或探针。
10. 根据权利要求7-9任一项所述的产品,其特征在于,所述样本为血液。

一种诊断缺血性脑卒中的分子标志物

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,涉及一种一种诊断缺血性脑卒中的分子标志物,具体的该分子标志物为CTAGE5。

背景技术

[0002] 脑卒中是严重危害人类生命安全的难治性疾病,具有高发病率、高致残率和高死亡率的特点。在2008年我国卫生部公布的死因顺位中,脑卒中在城市中为第三位的致死原因,在农村中为第二位的致死原因。流行病学调查显示近年来青年脑卒中的发病率越来越高,其中45岁以下成人发生的脑卒中,在西方国家及国内报道的比例分别为5%和13.44%。脑卒中按其性质分为缺血性脑卒中和出血性脑卒中,其中缺血性脑卒中占卒中病人总数的75%~85%。缺血性脑卒中又名脑梗塞/死,是指由于脑部血液供应障碍,缺血、缺氧引起的局限性脑组织的缺血性坏死或脑软化。

[0003] 目前认为,脑卒中是一种受环境因素、遗传因素等共同作用的复杂疾病,虽然脑卒中的发病机制还没有完全搞清楚,但高血压,糖尿病,血脂异常,肥胖,吸烟和过量饮酒等已被公认为脑卒中发病的主要独立危险因素,且这些危险因素的聚集将也会进一步增加脑卒中发病的风险。

[0004] 随着分子遗传学的发展,遗传因素对疾病的影响受到广泛重视,寻找与疾病相关的基因成为当前研究的热点。越来越多的研究证实,基因在缺血性脑卒中的发生发展过程中起着重要的调控作用,寻找缺血性脑卒中的生物标志物对于其早期诊断具有重要的意义。

[0005] 随着我国生活水平的提高,人口老龄化及生活方式的改变,现阶段需要加强预防保健的重要疾病之一就是缺血性脑卒中。尽早改善已经狭窄或者闭塞的血管,保护脑细胞,恢复脑组织的血液供应是目前治疗缺血性脑卒中的最主要原则。因此,实现缺血性脑卒中的早期诊断,并对其进行评估干预,指导临床选择及时有效的治疗对于缺血性脑卒中患者的生存时间和生存质量具有重大的意义。

发明内容

[0006] 为了弥补现有技术的不足,本发明的目的之一,提供一种缺血性脑卒中的诊断标志物;

[0007] 本发明的目的之二,提供一种诊断缺血性脑卒中的产品,实现缺血性脑卒中的早期诊断。

[0008] 为了实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0009] 本发明提供了一种分子标志物在制备诊断缺血性脑卒中产品中的应用,所述分子标志物为CTAGE5。

[0010] 进一步,分子标志物CTAGE5在缺血性脑卒中患者中表达上调。

[0011] 进一步,上面所述产品包括:通过RT-PCR、实时定量PCR、免疫检测、原位杂交或微

阵列芯片检测CTAGE5基因的表达水平以诊断缺血性脑卒中的产品。

[0012] 进一步,所述用RT-PCR诊断缺血性脑卒中的产品至少包括一对特异扩增CTAGE5基因的引物;所述用实时定量PCR诊断缺血性脑卒中的产品至少包括一对特异扩增CTAGE5基因的引物;所述用免疫检测诊断缺血性脑卒中的产品包括:与CTAGE5蛋白特异性结合的抗体;所述用原位杂交诊断缺血性脑卒中的产品包括:与CTAGE5基因的核酸序列杂交的探针;所述用微阵列芯片诊断缺血性脑卒中的产品包括:蛋白芯片和基因芯片;其中,蛋白芯片包括与CTAGE5蛋白特异性结合的抗体,基因芯片包括与CTAGE5基因的核酸序列杂交的探针。

[0013] 进一步,所述诊断产品包括芯片和/或试剂盒;其中所述芯片包括基因芯片、蛋白质芯片;所述试剂盒包括基因检测试剂盒和蛋白免疫检测试剂盒。

[0014] 进一步,所述基因检测试剂盒至少包括一对特异性扩增CTAGE5的引物。

[0015] 进一步,所述特异性扩增CTAGE5的引物序列如SEQ ID NO.3和SEQ ID NO.4所示。

[0016] 进一步,所述基因检测试剂盒还包括SYBR Green聚合酶链式反应体系、用于扩增管家基因的引物对;所述SYBR Green聚合酶链式反应体系包含:PCR缓冲液、dNTPs、SYBR Green荧光染料。

[0017] 本发明提供了一种诊断缺血性脑卒中的产品,所述产品能够通过检测CTAGE5基因的表达水平来诊断缺血性脑卒中。

[0018] 进一步,上面所述的产品包括芯片、或试剂盒。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上的寡核苷酸探针,所述寡核苷酸探针包括用于检测CTAGE5基因转录水平的针对CTAGE5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上的CTAGE5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CTAGE5基因转录水平的试剂;所述蛋白免疫检测试剂盒包括CTAGE5蛋白的特异性抗体。其中,所述基因芯片可用于检测包括CTAGE5基因在内的多个基因(例如,与缺血性脑卒中相关的多个基因)的表达水平。所述蛋白质芯片可用于检测包括CTAGE5蛋白在内的多个蛋白质(例如与缺血性脑卒中相关的多个蛋白质)的表达水平。通过将多个与缺血性脑卒中的标志物同时检测,可大大提高缺血性脑卒中诊断的准确率。

[0019] 进一步,所述基因检测试剂盒包括针对CTAGE5基因的引物和/或探针。

[0020] 进一步,所述针对CTAGE5的引物序列如SEQ ID NO.3和SEQ ID NO.4所示。

[0021] 本发明中的基因检测试剂盒还可用于检测包括CTAGE5基因在内的多个基因(例如,与缺血性脑卒中相关的多个基因)的表达水平。

[0022] 进一步,检测CTAGE5表达水平的样本为从目标患者得到的组合物,优选的所述样本为血液。

[0023] 在本发明中,“抗体”包括单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)、及抗体片段、组合抗体等,只要它们展现出期望的生物学活性即可。“单克隆抗体”指从一群基本上同质的抗体获得的抗体,即构成群体的各个抗体相同和/或结合相同表位,除了生产单克隆抗体的过程中可能产生的可能变体外,此类变体一般以极少量存在。此类单克隆抗体典型的包括包含结合靶物的多肽序列的抗体,其中靶物结合多肽序列是通过包括从众多多肽序列中选择单一靶物结合多肽序列在内的过程得到的。

[0024] 单克隆抗体还包括“嵌合”抗体,其中重链和/或轻链的一部分与衍生自特定物种

或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,而链的剩余部分与衍生自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,以及此类抗体的片段,只要它们展现出期望的生物学活性即可。

[0025] “抗体或抗体片段”指无论自天然生成抗体的任何物种衍生,还是通过重组DNA技术创建;无论自血清、B细胞、杂交瘤、转染瘤、酵母或细菌分离的抗体(例如IgG、IgM、IgA、IgD或IgE)或片段(诸如Fab、F(ab')²、Fv、二硫化物连接的Fv、scFv、闭合构象多特异性抗体、二硫化物连接的scFv、双抗体)。

[0026] 在本发明中,术语“探针”指能与另一分子的特定序列或亚序列或其它部分结合的分子。除非另有指出,术语“探针”通常指能通过互补碱基配对与另一多核苷酸(往往称为“靶多核苷酸”)结合的多核苷酸探针。根据杂交条件的严谨性,探针能和与该探针缺乏完全序列互补性的靶多核苷酸结合。探针可作直接或间接的标记,其范围包括引物。杂交方式,包括但不限于:溶液相、固相、混合相或原位杂交测定法。

[0027] 在本发明中,术语“微阵列”是杂交阵列原件有序排列在基质上,所述杂交阵列原件诸如聚核苷酸探针(例如寡核苷酸)或结合剂(例如抗体)。所述基质可以是固体基质,例如,玻璃或二氧化硅玻片、珠、纤维光学粘结剂或半固态基质,例如硝酸纤维素膜。核苷酸序列可以是DNA、RNA或其中的任何排列。

[0028] 各种探针阵列已经描述在文献中并且可以用于本发明上下文中检测可能与本文所述表型相关的标志物。例如,DNA探针阵列芯片或较大的DNA探针阵列晶片(否则,可以通过打断晶片而获得各个体芯片)用于本发明的一个实施方案。DNA探针阵列晶片一般包含玻璃晶片,其上放置了高密度DNA探针(短DNA片段)阵列。这些晶片各自可以保持例如约6000万个用于识别较长样品DNA序列(例如,来自个体或群体,例如,包含所关注的标志物)的DNA探针。用玻璃晶片上的DNA探针组识别样品DNA通过DNA杂交进行。当DNA样品与DNA探针阵列杂交时,样品结合于样品DNA序列互补的那些探针。通过评价个体样品DNA与那些探针更稳固地杂交,有可能确定已知的核酸序列是否存在于样品中,由此确定核酸中发现的标志物是否存在。还可以使用这一手段通过控制杂交条件以允许区别单一核苷酸,例如,用于SNP鉴定和一种或多种SNP的样品基因分型来进行ASH。阵列提供了一种同时(或串连)检测多个多态性标志物的便利性实施方案。

[0029] 上述探针具有与靶点基因的特定的碱基序列互补的碱基序列。这里,所谓“互补”,只要是杂交即可,可以不是完全互补。这些多核苷酸通常相对于该特定的碱基序列具有80%以上、优选90%以上、更优选95%以上、特别优选100%的同源性。这些探针可以是DNA,也可以是RNA,另外,可以为在其一部分或全部中核苷酸通过PNA、LNA、ENA、GNA、TNA等人工核酸置换得到的多核苷酸。

[0030] 在本发明的上下文中,“CTAGE5基因”包括人CTAGE5基因以及人CTAGE5基因的任何功能等同物的多核苷酸。CTAGE5基因包括与目前国际公共核酸序列数据库GeneBank中CTAGE5基因(NC_000014.9)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;在本发明的具体实施方案中,所述CTAGE5基因的编码序列是SEQ ID NO.1所示的DNA序列。

[0031] 本发明的CTAGE5基因可以是天然的或是人工合成的,或者使用可以表达CTAGE5的DNA片段的载体转染细胞获得。所述载体所述载体包括病毒载体、真核表达载体。

[0032] 病毒载体可以是任何适当的载体,包括但不限于逆转录病毒载体、腺病毒载体、腺病毒相关病毒载体、疱疹病毒(例如单纯疱疹病毒、痘苗病毒及EB病毒)载体、甲病毒载体。真核表达载体可以是任何适当的表达载体,包括但不限于pCMV-Myc表达载体、pcDNA3.0表达载体、pcDNA3.1表达载体、pEGFP表达载体、pEF Bos表达载体、pTet表达载体、pTRE表达载体、或者在公知表达载体的基础上经改造的载体,比如pBin438、pCAMBIA1301等。

[0033] 在本发明的上下文中,CTAGE5基因表达产物包括人CTAGE5蛋白以及人CTAGE5蛋白的部分肽。所述CTAGE5蛋白的部分肽含有与缺血性脑卒中相关的功能域。

[0034] “CTAGE5蛋白”包括CTAGE5蛋白以及CTAGE5蛋白的任何功能等同物。所述功能等同物包括CTAGE5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、在高或低的严格条件下能与CTAGE5的DNA杂交的DNA所编码的蛋白质。在本发明的具体实施方式中,所述CTAGE5蛋白是由序列表中SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列组成的蛋白质。

[0035] 术语“在严格条件下杂交”意图描述彼此至少50%同源的编码受体的核苷酸序列通常仍彼此杂交的杂交和清洗条件。该条件可以使得彼此至少约65%、至少约70%、或至少约75%或更多同源的序列通常仍彼此杂交。杂交反应的“严格性”容易为本领域普通技术人员所确定,并且通常取决于探针长度、洗涤温度和盐浓度凭经验计算。一般而言,较长的探针需要较高的温度用于正确的退火,而较短的探针则需要较低的温度。当互补链存在于低于它们解链温度的环境中时,杂交通常取决于变性DNA重新退火的能力。探针和能杂交的序列之间的期望同源性程度越高,就可使用越高的相对温度。作为结果,更高的相对温度趋向于使反应条件更加严格,而更低的温度则更不严格。

[0036] 在本发明中,术语“样本”是指从目标患者得到的组合物,其包含细胞和/或其他分子体—将其进行特征化和/或识别,例如,根据物理、生化、化学和/或生理特征。例如,短语“临床样本”或“疾病样本”及其变体,是指从目标患者获得的任何样本,将预期或已知所述样本中能够获得细胞和/或分子体,例如将被特征化的生物标志物。

[0037] 本发明的优点和有益效果:

[0038] 本发明首次发现了缺血性脑卒中的分子标志物—CTAGE5基因,该标志物在缺血性脑卒中患者中表达上调,通过检测CTAGE5基因的表达水平,可以判断受试者是否患有缺血性脑卒中及患缺血性脑卒中的风险。

[0039] 本发明发现了一种缺血性脑卒中的早期诊断产品,该产品能够实现缺血性脑卒中的早期诊断或风险预测,从而对患者进行防治。

附图说明

[0040] 图1显示利用QPCR检测CTAGE5基因在缺血性脑卒中患者中的表达情况。

[0041] 具体的实施方式

[0042] 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。

[0043] 实施例1筛选与缺血性脑卒中相关的基因标志物

[0044] 1、样品收集

[0045] 各收集10例正常人血液和缺血性脑卒中患者血液样本,上述所有标本的取得均通过伦理委员会的同意。

[0046] 2、样本总RNA的提取及质量分析

[0047] 2.1样本RNA的提取

[0048] 使用U-gene公司的BLOOD RNA提取试剂盒提取总RNA。具体步骤如下:

[0049] 1)每体积新鲜血液(最大1mI)加入5倍体积的1×XR-I缓冲液,例如:每1mI血液中加入5mI的XR-I缓冲液,漩涡振荡混匀;

[0050] 2)冰浴15min,在漩涡振荡器上迅速混匀两次,溶液变清表明红血细胞已裂解。如果个别样品的血细胞计容或ECR升高时,延长冰浴时间至20min;

[0051] 3)4℃下450g离心10min沉淀白细胞,完全弃去含有裂解红细胞的上清液;

[0052] 4)用2倍体积的XR-I缓冲液洗涤在步骤1中用到的每体积的全血,漩涡振荡以完全悬浮细胞;

[0053] 5)4℃下450g离心10min,并再次去掉上清;

[0054] 6)往成团的白细胞中加入XR-II溶解缓冲液/2-巯基乙醇,漩涡振荡充分混匀。500μI以下的全血就加入400μI XR-II溶解缓冲液,如果在步骤1中用到的是0.5~1.0mI的血液,则加650μI XR-II溶解缓冲液。在加入XR-II溶解缓冲液之后,样品应保存于-70℃的条件下;

[0055] 7)加入等体积的70%乙醇,漩涡振荡混匀;

[0056] 8)把所有的样品(包括所有的沉淀)加到一个固定在一个2mI收集试管上的Mu-Pu RNA分离柱上。10,000g离心的15s,弃去流出液体;

[0057] 9)重复步骤7、8;

[0058] 10)用移液枪吸750μI RNA洗涤缓冲液I直接加到自旋柱上洗涤柱子。如上方法离心并弃去2mI收集管;

[0059] 11)把柱子装到提供的一干净的新2mI收集试管上,加入500μI用乙醇稀释的RNA洗涤缓冲液II,离心,弃去流出液,重复使用该收集试管;

[0060] 12)加入400μI Wash solution,14000g离心2min;

[0061] 13)再用500μI的RNA洗涤缓冲液II洗涤柱子,离心并弃去流出液。然后用一个空的收集试管,极速离心空柱子1min以甩干Mu-Pu柱基质;

[0062] 14)洗脱RNA。把柱子转移到一干净的1.5mI离心管(试剂盒无提供)并用50~100μI的DEPC-水(由试剂盒提供)洗脱RNA。确保加入的DEPC-水是直接加在柱基质上,极速离心1min;

[0063] 15)加入100μI Enzyme Incubation Buffer和15μI DNase I,14000g离心1min;

[0064] 16)将收集管中的溶液重新移入柱,室温放置15min;

[0065] 17)将收集到的RNA保存在-70℃冰箱中,待用。

[0066] 2.2 RNA样品的质量分析(NanoDrop1000分光光度计)

[0067] NanoDrop1000分光光度计检测RNA样品,RNA-seq测序的样品要求:OD260/OD280为1.8-2.2。

[0068] 2.3 RNA样品的质量分析(Agilent Technologies 2100Bioanalyzer)

[0069] 将上述提取的RNA进行琼脂糖凝胶电泳,Agilent Technologies 2100Bioanalyzer检测RNA样品质量,观察28S rRNA和18S rRNA主带明显、无降解、RNA完整性指数合格、浓度达到要求的符合RNA-seq测序cDNA文库构建的要求,可以用于文库构建及测序。

[0070] 3、高通量转录组测序

[0071] 3.1 RNA-seq读段定位

[0072] 首先将低质量的读段去除得到清洁读段,然后利用TopHat v1.3.1将清洁片段与UCSC H.sapiens参考基因组(hg19)进行匹配,H.sapiens UCSC hg19版的预先构建的索引从TopHat主页下载,并作为参考基因组,利用TopHat与基因组匹配时,允许每个读段(默认到20)有多个匹配位点,最多2次错配。TopHat根据外显子区域和GT-AG剪切信号建立可能的剪切位点库,根据这些剪切位点库将没有定位到基因组的读段定位到基因组上。我们使用TopHat方法的系统默认参数。

[0073] 3.2转录丰度评估

[0074] 匹配上的读段文件通过Cufflinks v1.0.3处理,Cufflinks v1.0.3将RNA-seq片段数目进行标准化计算转录本的相对丰度。FPKM值指的是每一百万测序片段中匹配到特定基因1kb长的外显子区域的片段数目。通过贝叶斯推理方法计算FPKM估计值的置信区间。Cufflinks使用的参考的GTF注释文件从Ensembl数据库下载(Homo_sapiens.GRCh37.63.gtf)。

[0075] 3.3差异表达基因的检测

[0076] 将下载的Ensembl GTF文件和通过TopHat匹配的原始文件传输到Cuffdiff,Cuffdiff使用原始的匹配文件重新估算GTF文件中列出的转录本的表达丰度,检测差异表达。在Cuffdiff输出中只有q值<0.01,测试显示成功的比较才被认为是差异表达。

[0077] 4、结果

[0078] RNA-seq结果显示,CTAGE5基因在缺血性脑卒中患者血液中的表达量显著高于正常人的表达量。

[0079] 实施例2 QPCR测序验证CTAGE5基因的差异表达

[0080] 1、根据高通量测序的检测结果显示选择CTAGE5基因进行大样本QPCR验证。按照实施例1中的样本收集方式选择缺血性脑卒中患者血液和正常人血液各80例。

[0081] 2、RNA提取步骤同实施例1。

[0082] 3、逆转录:使用TAKARA公司的反转录试剂盒进行操作。具体步骤如下:

[0083] (1)取总RNA 2 μ g进行逆转录,加入Oligo(dT)2 μ l,充分混匀;70 $^{\circ}$ C水浴;5min后立即冰浴2-3min;

[0084] (2)构建25 μ l反应体系,其中包括5 \times 逆转录缓冲液5 μ l,dNTP(2.5mM)5 μ l,RNasin 40U/ μ l,M-MLV 200U/ μ l,补无核酶水至25 μ l;

[0085] (3)42 $^{\circ}$ C水浴60min后,95 $^{\circ}$ C水浴5min以灭活M-MLV,-20 $^{\circ}$ C储存备用。

[0086] 4、QPCR扩增

[0087] (1)引物设计

[0088] 根据Genbank中CTAGE5基因和管家基因GAPDH基因的编码序列设计QPCR扩增引物,北京赛诺基因组研究中心有限公司合成。

[0089] CTAGE5基因的引物对序列如下:

[0090] 正向引物序列:5'-TCTGAAGGTAGAAGTGAGTT-3'(SEQ ID NO.3);

[0091] 反向引物序列为5'-CTGTGGTTCTGGATGTTC-3'(SEQ ID NO.4)。

[0092] GAPDH基因的引物序列对如下:

[0093] 正向引物序列为5'-CTCTGGTAAAGTGGATATTGT-3'(SEQ ID NO.5);

[0094] 反向引物序列为5'-GGTGAATCATATTGGAACA-3'(SEQ ID NO.6)。

[0095] (2)PCR反应体系:正向引物和反向引物各1 μ I,SYBR Green聚合酶链式反应体系12.5 μ I,模板2 μ I,加去离子水补足至25 μ I。

[0096] 其中,SYBR Green聚合酶链式反应体系购自Invitrogen公司。

[0097] (3)PCR反应条件:95 $^{\circ}$ C10min,(95 $^{\circ}$ C15s,60 $^{\circ}$ C60s) \times 30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。

[0098] 5、统计学方法

[0099] 实验采用3次重复实验,结果数据都是以平均值 \pm 标准差的方式来表示,使用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。

[0100] 6、结果

[0101] 结果如图1所示,与正常人血液相比,CTAGE5基因在缺血性脑卒中患者血液中的表达上调,差异具有统计学意义($P<0.05$),同RNA-seq结果一致。

[0102] 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。

SEQUENCE LISTING

<110> 北京洪深生物信息技术有限公司

<120> 一种诊断缺血性脑卒中的分子标志物

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2199

<212> DNA

<213> 人源

<400> 1

	atgagaccag attctaactc ttatggtttt ccatgggaat tggatgatg tgcagctgtt	60
[0001]	gttggaattt ttgctgttct ctttttttg tggagaagtt ttgatcggg taggagtcgg	120
	ctttatgtgg gacgagagaa aaagcttgct ctaatgcttt ctggactaat tgaagaaaa	180
	agtaaaactac ttgaaaaatt tagccttgtt caaaaagagt atgaaggcta tgaagtagag	240
	tcactcttaa aggatgccag ctttgagaag gaggcaacag aagcacaag tttggaggca	300
	acctgtgaaa agctgaacag gtccaattct gaacttgagg atgaaatact ctgtctagaa	360
	aaagagttaa aagaagagaa atccaaacat tctgaacaag atgaattgat ggcggatatt	420
	tcaaaaagga tacagtctct agaagatgag tcaaaatccc tcaaatcaca agtagctgaa	480
	gccaaaatga cctcaagat atttcaaatg aatgaagaac gactgaagat agcaataaaa	540
	gatgctttga atgaaaattc tcaacttcag gaaagccaga aacagctttt gcaagaagct	600
	gaagtatgga aagaacaagt gagtgaactt aataaacaga aagtaacatt tgaagactcc	660
	aaagtaacatg cagaacaagt tctaaatgat aaagaaagtc acatcaagac tctgactgaa	720
	cgcttgtaa agatgaaaga ttgggctgct atgcttgag aagacataac ggatgatgat	780

aacttgaat tagaaatgaa cagtgaatcg gaaaatggtg ctactlaga taatcctcca	840
aaaggagctt tgaagaaact gattcatgct gctaagttaa atgctctttt aaaaacctta	900
gaaggagaaa gaaaccaaatt ttatattcag ttgtctgaag ttgataaaac aaaggaagag	960
cttacagagc atattaaaaa tcttcagaact gaacaagcat ctttgcagtc agaaaacaca	1020
cattttgaaa atgagaatca gaagettcaa cagaaactta aagtaatgac tgaattatat	1080
caagaaaatg aaatgaaact ccacaggaaa ttaacagtag aggaaaatta tccggttagag	1140
aaagaagaga aactttctaa agtagatgaa aagatcagcc atgccactga agagctggag	1200
acctatagaa agcgagccaa agatcttgaa gaagaattgg agagaactat tcattcttat	1260
caagggcaga ttatttccca tgagaaaaaa gcacatgata atfggttggc agctcggaat	1320
gctgaaagaa acctcaatga ttaagggaaa gaaaatgctc acaacagaca aaaatfaact	1380
gaaacagagc ttaaattga acttttagaa aaagatcctt atgcactcga tgttccaaat	1440
acagcatttg gcagaggctc acgaggccca gggaatcctc tggaccatca gattaccaat	1500
[0002] gaaagaggag aatcaagctg tgataggtta accgatcctc atagggctcc ctctgacact	1560
gggtctctgt cacctccatg ggaccaggac cgtaggatga tgttctctcc gccaggacaa	1620
tcatatcctg atcagccct tcttccacaa aggeaagaca gattttgttc taattctggt	1680
agaactgtctg gaccagcaga actcagaagt ttaatatgc ctcttttggg taaaatggat	1740
gggtcaatgc ctccagaaat ggaatccagt agaaatgata ccaaagatga tcttggtaat	1800
ttaaatgtgc ctgattcacc tctccctgct gaaaatgaag ccaactggccc tggctttgtt	1860
cttccacctc ttgetccaat cagaggtcca ttgtttccag tggatgcaag aggcccatc	1920
ttgagaagag gacctcttt ccccccaact ctccaggag ccatgtttgg agcttctga	1980
gattatttcc caccagggga ttcccagggt ccaccacctg ctccatttgc aatgagaaat	2040
gtctalccac cgaggggttt tcttcttac ctcccccaa gacctggatt ttccccca	2100
ccccacatt ctgaaggtag aagtgagttc cctcagggt ttgattccacc ttcaaatgag	2160
cctgctactg aacatccaga accacagcaa gaaacctga	2199

<210> 2

<211> 732

<212> PRT

<213> 人源

<400> 2

Met Arg Pro Asp Ser Asn Leu Tyr Gly Phe Pro Trp Glu Leu Val Ile

1 5 10 15

Cys Ala Ala Val Val Gly Phe Phe Ala Val Leu Phe Phe Leu Trp Arg

20 25 30

Ser Phe Arg Ser Val Arg Ser Arg Leu Tyr Val Gly Arg Glu Lys Lys

35 40 45

Leu Ala Leu Met Leu Ser Gly Leu Ile Glu Glu Lys Ser Lys Leu Leu

[0003]

50 55 60

Glu Lys Phe Ser Leu Val Gln Lys Glu Tyr Glu Gly Tyr Glu Val Glu

65 70 75 80

Ser Ser Leu Lys Asp Ala Ser Phe Glu Lys Glu Ala Thr Glu Ala Gln

85 90 95

Ser Leu Glu Ala Thr Cys Glu Lys Leu Asn Arg Ser Asn Ser Glu Leu

100 105 110

Glu Asp Glu Ile Leu Cys Leu Glu Lys Glu Leu Lys Glu Glu Lys Ser

115 120 125

Lys His Ser Glu Gln Asp Glu Leu Met Ala Asp Ile Ser Lys Arg Ile

130 135 140

Gln Ser Leu Glu Asp Glu Ser Lys Ser Leu Lys Ser Gln Val Ala Glu

145 150 155 160
 Ala Lys Met Thr Phe Lys Ile Phe Gln Met Asn Glu Glu Arg Leu Lys
 165 170 175
 Ile Ala Ile Lys Asp Ala Leu Asn Glu Asn Ser Gln Leu Gln Glu Ser
 180 185 190
 Gln Lys Gln Leu Leu Gln Glu Ala Glu Val Trp Lys Glu Gln Val Ser
 195 200 205
 Glu Leu Asn Lys Gln Lys Val Thr Phe Glu Asp Ser Lys Val His Ala
 210 215 220
 Glu Gln Val Leu Asn Asp Lys Glu Ser His Ile Lys Thr Leu Thr Glu
 225 230 235 240
 Arg Leu Leu Lys Met Lys Asp Trp Ala Ala Met Leu Gly Glu Asp Ile
 [0004] 245 250 255
 Thr Asp Asp Asp Asn Leu Glu Leu Glu Met Asn Ser Glu Ser Glu Asn
 260 265 270
 Gly Ala Tyr Leu Asp Asn Pro Pro Lys Gly Ala Leu Lys Lys Leu Ile
 275 280 285
 His Ala Ala Lys Leu Asn Ala Ser Leu Lys Thr Leu Glu Gly Glu Arg
 290 295 300
 Asn Gln Ile Tyr Ile Gln Leu Ser Glu Val Asp Lys Thr Lys Glu Glu
 305 310 315 320
 Leu Thr Glu His Ile Lys Asn Leu Gln Thr Glu Gln Ala Ser Leu Gln
 325 330 335
 Ser Glu Asn Thr His Phe Glu Asn Glu Asn Gln Lys Leu Gln Gln Lys

	340	345	350
	Leu Lys Val Met Thr Glu Leu Tyr Gln Glu Asn Glu Met Lys Leu His		
	355	360	365
	Arg Lys Leu Thr Val Glu Glu Asn Tyr Arg Leu Glu Lys Glu Glu Lys		
	370	375	380
	Leu Ser Lys Val Asp Glu Lys Ile Ser His Ala Thr Glu Glu Leu Glu		
	385	390	395
	Thr Tyr Arg Lys Arg Ala Lys Asp Leu Glu Glu Glu Leu Glu Arg Thr		
	405	410	415
	Ile His Ser Tyr Gln Gly Gln Ile Ile Ser His Glu Lys Lys Ala His		
	420	425	430
[0005]	Asp Asn Trp Leu Ala Ala Arg Asn Ala Glu Arg Asn Leu Asn Asp Leu		
	435	440	445
	Arg Lys Glu Asn Ala His Asn Arg Gln Lys Leu Thr Glu Thr Glu Leu		
	450	455	460
	Lys Phe Glu Leu Leu Glu Lys Asp Pro Tyr Ala Leu Asp Val Pro Asn		
	465	470	475
	Thr Ala Phe Gly Arg Gly Ser Arg Gly Pro Gly Asn Pro Leu Asp His		
	485	490	495
	Gln Ile Thr Asn Glu Arg Gly Glu Ser Ser Cys Asp Arg Leu Thr Asp		
	500	505	510
	Pro His Arg Ala Pro Ser Asp Thr Gly Ser Leu Ser Pro Pro Trp Asp		
	515	520	525
	Gln Asp Arg Arg Met Met Phe Pro Pro Pro Gly Gln Ser Tyr Pro Asp		

530 535 540
 Ser Ala Leu Pro Pro Gln Arg Gln Asp Arg Phe Cys Ser Asn Ser Gly
 545 550 555 560
 Arg Leu Ser Gly Pro Ala Glu Leu Arg Ser Phe Asn Met Pro Ser Leu
 565 570 575
 Asp Lys Met Asp Gly Ser Met Pro Ser Glu Met Glu Ser Ser Arg Asn
 580 585 590
 Asp Thr Lys Asp Asp Leu Gly Asn Leu Asn Val Pro Asp Ser Ser Leu
 595 600 605
 Pro Ala Glu Asn Glu Ala Thr Gly Pro Gly Phe Val Pro Pro Pro Leu
 610 615 620
 Ala Pro Ile Arg Gly Pro Leu Phe Pro Val Asp Ala Arg Gly Pro Phe
 [0006] 625 630 635 640
 Leu Arg Arg Gly Pro Pro Phe Pro Pro Pro Pro Pro Gly Ala Met Phe
 645 650 655
 Gly Ala Ser Arg Asp Tyr Phe Pro Pro Gly Asp Phe Pro Gly Pro Pro
 660 665 670
 Pro Ala Pro Phe Ala Met Arg Asn Val Tyr Pro Pro Arg Gly Phe Pro
 675 680 685
 Pro Tyr Leu Pro Pro Arg Pro Gly Phe Phe Pro Pro Pro Pro His Ser
 690 695 700
 Glu Gly Arg Ser Glu Phe Pro Ser Gly Leu Ile Pro Pro Ser Asn Glu
 705 710 715 720
 Pro Ala Thr Glu His Pro Glu Pro Gln Gln Glu Thr

	725	730	
	<210>	3	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<400>	3	
	tctgaaggta gaagtgagtt		20
	<210>	4	
	<211>	18	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<400>	4	
[0007]	ctgtggttct ggatgttc		18
	<210>	5	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<400>	5	
	ctctggtaaa gtggatattg t		21
	<210>	6	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<400>	6	
[0008]	ggtggaatca tattggaaca		20

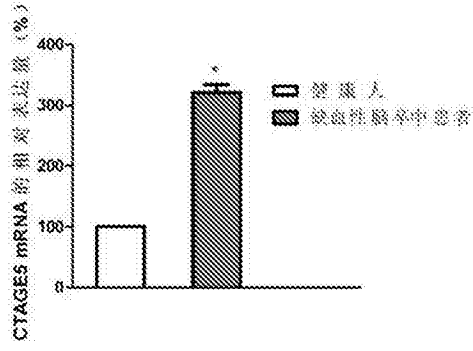


图1

专利名称(译)	一种诊断缺血性脑卒中的分子标志物		
公开(公告)号	CN105925714A	公开(公告)日	2016-09-07
申请号	CN201610512820.8	申请日	2016-07-01
[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 李曙光 杨承刚		
发明人	宋宏涛 李曙光 杨承刚		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/68 G01N33/53		
CPC分类号	C12Q1/6883 C12Q2600/158 G01N33/53 G01N33/6893 G01N2333/47 G01N2800/2871		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种诊断缺血性脑卒中的分子标志物，该标志物为CTAGE5基因，通过检测CTAGE5基因的表达水平可以为缺血性脑卒中患者提供早期诊断，从而实现早发现早治疗，降低缺血性脑卒中患者的死亡率。本发明提供了一种诊断缺血性脑卒中的产品，所述产品包括检测CTAGE5基因的表达水平的试剂，该产品能够实现缺血性脑卒中的早期诊断。

