

(19)中华人民共和国国家知识产权局



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109486935 A

(43)申请公布日 2019.03.19

(21)申请号 201811215486.5

A61P 19/10(2006.01)

(22)申请日 2018.10.18

(71)申请人 中国医学科学院北京协和医院

地址 100730 北京市东城区王府井帅府园1
号

(72)发明人 范彧 张保中 常晓

(74)专利代理机构 北京慧尚知识产权代理事务
所(特殊普通合伙) 11743

代理人 吉海莲 鲍晓芳

(51)Int.Cl.

C12Q 1/6883(2018.01)

C12N 15/11(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

A61K 45/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书8页

序列表2页 附图1页

(54)发明名称

作为骨质疏松症诊治靶标的AKNAD1基因

(57)摘要

本发明公开了用于骨质疏松症早期筛查的分子标记物AKNAD1基因及其应用。本发明通过转录组测序技术筛选到骨质疏松症相关标记物AKNAD1基因,进而探明了AKNAD1基因在骨质疏松症发生发展中的作用,以及其发挥的作用机制,AKNAD1基因作为骨质疏松症新型生物标志物,为指导其临床早期干预及靶向治疗提供了重要理论依据。

1. 检测AKNAD1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,其特征在于,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AKNAD1基因表达以诊断骨质疏松症的产品。
3. 根据权利要求2所述的应用,其特征在于,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AKNAD1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AKNAD1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AKNAD1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AKNAD1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AKNAD1蛋白特异性结合的抗体,基因芯片包括与AKNAD1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,其特征在于,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AKNAD1基因的引物如SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3所示。
5. 一种诊断骨质疏松症的工具,其特征在于,所述工具包括检测AKNAD1基因表达的试剂;所述试剂包括检测AKNAD1基因mRNA的引物和/或探针、检测AKNAD1蛋白的抗体。
6. 根据权利要求5所述的工具,其特征在于,所述检测AKNAD1基因mRNA的引物包括SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3所示的引物对。
7. AKNAD1基因和/或其表达产物的抑制剂在制备治疗骨质疏松症的药物中的应用。
8. 根据权利要求7所述的应用,其特征在于,所述抑制AKNAD1基因表达的试剂、降低AKNAD1基因表达产物稳定性的试剂、抑制AKNAD1基因表达产物活性的试剂、抑制AKNAD1基因表达产物功能的试剂。
9. 一种用于治疗骨质疏松症的药物组合物,其特征在于,所述药物组合物包括7或8中任一项所述的抑制剂。

作为骨质疏松症诊治靶标的AKNAD1基因

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术和医学检测技术领域,具体涉及AKNAD1基因及其表达产物在制备诊断骨质疏松症产品中的应用。

背景技术

[0002] 骨质疏松症(osteoporosis,OP)是一种以骨量低下、骨微结构破坏、导致骨脆性增加、易发生骨折为特征的全身性骨病(WHO)。2001年美国国立卫生研究院(NIH)提出骨质疏松症是以骨强度下降、骨折风险性增加为特征的骨骼系统疾病,骨强度反映了骨骼的两个主要方面,即骨矿密度和骨质量。

[0003] 目前骨质疏松症的治疗仍以健康教育和骨折处理为主,用于临床的多种药物多以抑制破骨细胞功能为主,但临床效果不满意,未来更看好以促进成骨的药物。但由于缺乏病因和致病机理的研究,还不能有效控制骨质疏松症的发生和发展。因此,深入研究骨质疏松症的病因和致病机理并探索新的治疗方法在我国有着非同寻常的意义。目前研究认为骨质疏松的发病与遗传因素密切相关,但骨质疏松的发病机制仍不明确,骨质疏松的早期诊断、治疗效果监测和预后评估对于骨质疏松的防治具有重要作用。近年来,随着生物技术的发展,遗传因素的研究成为骨质疏松诊治领域的热门课题,已有研究表明骨质疏松与体内基因的变化相关,如专利201510628024.6、201610271798.2、201710502537.1等报道了基因的差异表达与骨质疏松的发生发展相关,可见,利用基因进行骨质疏松的早期诊断成为未来发展的趋势。

发明内容

[0004] 为了实现骨质疏松症的早期发现,早期干预,本发明的目的在于提供一种新的骨质疏松症相关基因,以及该基因的表达蛋白及其片段、类似物和衍生物。

[0005] 本发明的另一目的是提供检测AKNAD1基因表达的产品在制备诊断骨质疏松症的工具中的应用。

[0006] 以上所述的应用,优选地,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AKNAD1基因表达以诊断骨质疏松症的产品。

[0007] 再优选地,所述产品包括芯片、试剂盒。

[0008] 以上所述的应用,优选地,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AKNAD1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AKNAD1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AKNAD1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AKNAD1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AKNAD1蛋白特异性结合的抗体,基因芯片包括与AKNAD1基因的核酸序列杂交的探针。

[0009] 以上所述的应用,优选地,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AKNAD1基因的引物如SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3所示。

[0010] 本发明还提供一种诊断骨质疏松症的工具,优选地,所述工具包括检测 AKNAD1基因表达的试剂;所述试剂包括检测AKNAD1基因mRNA的引物和/或探针、检测AKNAD1蛋白的抗体。

[0011] 以上所述的工具,优选地,所述检测AKNAD1基因mRNA的引物包括 SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3所示的引物对。

[0012] 本发明还提供了AKNAD1基因和/或其表达产物的抑制剂在制备治疗骨质疏松症的药物中的应用。

[0013] 根据权利要求7所述的应用,其特征在于,所述抑制AKNAD1基因表达的试剂、降低 AKNAD1基因表达产物稳定性的试剂、抑制AKNAD1基因表达产物活性的试剂、抑制AKNAD1基因表达产物功能的试剂。

[0014] 本发明还提供了一种用于治疗骨质疏松症的药物组合物,其特征在于,所述药物组合物包括以上任一项所述的抑制剂。

[0015] 进一步,本发明的药物组合物还包括药学上可接受的载体,载体,这类载体包括(但并不限于):稀释剂、赋形剂如水等、填充剂如淀粉、蔗糖等;粘合剂如纤维素衍生物、藻酸盐、明胶和聚乙烯吡咯烷酮;湿润剂如甘油;崩解剂如琼脂、碳酸钙和碳酸氢钠;吸收促进剂季铵化合物;表面活性剂如十六烷醇;吸附载体如高岭土和皂粘土;润滑剂如滑石粉、硬脂酸钙和镁、聚乙二醇等。

[0016] 本发明的药物组合物导入组织或者细胞的方式可以分为体外或者体内的方法。

[0017] 本发明的药物还可与其他治疗骨质疏松症的药物联用,多种药物联合使用可以大大提高到治疗的成功率。

[0018] 本发明的有益效果如下:

[0019] 本发明公开了一种与骨质疏松症相关的基因AKNAD1,并进一步证实该 AKNAD1基因或该基因的表达蛋白及其片段、类似物和衍生物在骨质疏松症患者生物学样本中表达上调。利用该基因在人群中进行骨质疏松症的普查,解决了现有技术中筛查与诊断措施敏感性和特异性差的问题,能够快速有效的做到骨质疏松症的早期筛查与诊断,而且为预测诊断骨质疏松症的发生发展,甚至是为今后在生物学水平治疗骨质疏松症提供了治疗靶点和重要依据。

附图说明

[0020] 图1本发明AKNAD1基因cDNA在各组中的表达;

[0021] 图2 WB分析各组中AKNAD1蛋白表达情况。

具体实施方式

[0022] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。若未特别指明,实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段。

[0023] 本发明中术语解释如下:

[0024] 本文使用的术语“引物”指存在于纯化的限制性消化物中或合成产生的寡核苷酸,置于诱导合成与核酸链互补的引物延伸产物的条件下时,即存在核苷酸和诱导剂(如DNA聚

合酶)以及适当的温度和pH时,所述寡核苷酸能作为合成的起始点。引物可以为单链或双链,并且必须具有足够的长度,以在诱导剂存在下引发所需延伸产物的合成。引物的确切长度会取决于许多因素,包括温度、引物来源和使用的方法。例如,就诊断应用而言,取决于靶序列的复杂性,寡核苷酸引物一般含有15-25或更多的核苷酸,尽管也可以含有更少的核苷酸。引物合适长度的确定中涉及的因素为本领域普通技术人员所公知。一般而言,根据本领域熟知的标准方法设计和选择本发明的引物,参阅Dieffenbach,C.W.,Lowe,T.M.J.,Dveksler,G.S.(1995)General Concepts for PCR Primer Design.《PCR Primer,A Laboratory Manual》(Dieffenbach,CW和Dveksler,G.S.编辑)Cold Spring Harbor Laboratory Press,New York, 133-155。

[0025] 本文中使用的术语“芯片”也称为“阵列”,指包含连接的核酸或肽探针的固体支持物。阵列通常包含按照不同的已知位置连接至基底表面的多种不同的核酸或肽探针。这些阵列,也称为“微阵列”,通常可以利用机械合成方法或光引导合成方法来产生这些阵列,所述光引导合成方法合并了光刻方法和固相合成方法的组合。阵列可以包含平坦的表面,或者可以是珠子、凝胶、聚合物表面、诸如光纤的纤维、玻璃或任何其它合适的基底上的核酸或肽。可以以一定的方式来包装阵列,从而允许进行全功能装置的诊断或其它方式的操纵。

[0026] 本文使用的“骨质疏松症”未做说明时,一般特指原发性骨质疏松症。

[0027] 本文使用的“对照”指未显示任何骨质疏松症症状(包括原发性骨质疏松症和继发性骨质疏松症)并且未诊断为骨质疏松症的个体或个体组。优选地,所述对照个体未使用影响骨质疏松症的药物。更优选地,对照个体具有与测试样本相比相似的性别、年龄和体重指标(BMI)。

[0028] 实施例1样品的收集和样品资料的整理

[0029] 选取2012年10月到2015年12月期间在北京协和医院骨科就诊的骨质疏松症患者,病例组共收集13例,所有患者均有典型的临床表现,经骨密度(双能X线)检查确诊。对照来源于同时期骨科住院的其他疾病患者,共收集15例。采集所有研究对象的骨组织样本,编号后置-80℃低温冰箱保存。本研究的所有临床样本,均对患者进行知情告知并经本医院伦理委员会通过。

[0030] 实施例2骨组织样本RNA的提取及检测

[0031] 1、骨组织样本RNA提取

[0032] 取所收集的骨组织样本,剥离干净肌肉,用液氮研磨骨组织,待研磨充分后,转移到1.5ml EP管,加入1ml TRIzol试剂(Invitrogen公司),震荡仪混匀。4℃,12000g离心20min,取上清,转移到新的1.5ml EP管。每1ml TRIzol 加入200μl的氯仿,用手上下震荡15s,室温放置2-3min。4℃,12000g离心15min,取上层水相转移到新的1.5ml EP管中,加入4℃预冷的异丙醇(500μl/1ml TRIzol),轻轻吹打混匀,-20℃冰箱静置30min,沉淀RNA。4℃, 12000g离心10min,移去上清,缓慢沿管壁加入1ml 75%乙醇,小心地吹打混匀。4℃, 7500g离心10min,移去上清,室温干燥沉淀10-20min,但不可完全干燥。加入20-50μl无RNase水溶解RNA(根据沉淀多少确定加水量)。

[0033] 2、提取的RNA完整性及纯度检测

[0034] 完整性:RNA可用普通琼脂糖凝胶电泳(电泳条件:1.2%胶;0.5×TBE 电泳缓冲液;150v,15min)检测完整性。RNA样本中最大rRNA亮度应为次大rRNA亮度的1.5-2.0倍,否

则表示RNA样品的降解。出现弥散片状或条带消失表明样品严重降解。

[0035] 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比值(10mM Tris,ph7.5)在2.0左右。OD260/OD280读数受测定所用溶液的pH值影响。同一个RNA样品,假定在10mM Tris,ph7.5溶液中测定出的OD260/OD280读数在1.8-2.1之间,在水溶液中所测定读数可能在1.5-1.9之间,但这并不代表RNA不纯。

[0036] 浓度:去一定量的RNA提取物,用RNase-free水稀释n倍,用RNase-free水将分光光度计调零,取稀释液进行OD260测定,按照以下公式进行RNA浓度的计算:终浓度(ng/uL)=OD260×n(稀释倍数)×40。

[0037] 实施例3骨组织RNA的RNA-seq测序文库构建与质检

[0038] 1、数据质量评估

[0039] cDNA文库的构建及测序,委托北京诺禾致源科技股份有限公司完成。28个样品的测序数据经过测序错误率检查、GC含量分布检查及原始数据过滤,获得后续分析使用的clean reads。通常认为RNA-seq数据进行不同文库间的基因差异表达分析,库总读段数至少为10M,数据整体GC含量保持在40%-60%,Q30在80%以上则为合理。本次测序所获数据中clean bases占7.2G以上,Q2碱基占95.18%以上,Q3碱基占89.15%以上,GC含量在样本间保持稳定,在54.29%-56.80%之间,说明整体测序质量良好,满足下游分析质量需求。

[0040] 2、比对结果分析

[0041] 将28个样品的clean reads用STAR软件比对到参考基因组序列,平均每个样品的比对率达到92.51%以上,Uniquely mapping rate是指比对到基因组单一位置的reads数占总clean reads数的百分比,只有Uniquely mapped reads才能用于表达量统计,本研究中参考基因组单一位点的平均比对率为76.956%。

[0042] 3、定量结果分析

[0043] 3.1定量结果说明

[0044] 本研究一共测了28个骨组织样本,每个样本平均产出6Gb数据。将测序reads比对到参考基因组并重构转录本之后,根据FPKM表达量计算得到28个样品中所有的基因的表达水平。随后,我们用bowtie将reads比对到基因上,每个样本平均检测到10102个基因。

[0045] 对每个样本分别进行基因水平或转录本水平定量,再合并得到所有样本的表达矩阵,第一列为基因或转录本ID,其余列为各样本的原始readcount值。

[0046] 3.2表达水平分布

[0047] RNA-seq的基因表达值通常用RPKM或FPKM表示。RPKM用于单端测序,FPKM用于双端测序,先对测序深度进行校正,再对基因或转录本的长度进行校正。

[0048] 3.3相关性分析

[0049] 我们要求生物学重复样品间R²至少要大于0.8,否则需要对样品做出合适的解释,或者重新进行实验。根据各样本所有基因的表达值(RPKM或FPKM),计算组内及组间样本的相关性系数,绘制成热图,可直观显示组间样本差异及组内样本重复情况。样本间相关性系数越高,其表达模式越为接近。

[0050] 4、差异结果分析

[0051] 基因差异分析的输入数据为基因定量中得到的原始readcount数据。本研究采用DESeq2软件对正常组及骨质疏松症组进行对比分析,筛选正常组与骨质疏松症组中基因表

达量padj值小于0.05的差异表达基因。最终共筛选出281个差异表达基因,包括79个表达上调的基因和202个表达下调的基因,经过聚类分析、GO功能富集和KEGG信号通路功能富集分析,发明人筛选到骨质疏松症相关标记物AKNAD1基因,该基因在骨质疏松症中为上调基因。

[0052] 实施例4骨质疏松症患者骨组织DNA中AKNAD1基因表达情况

[0053] 1. 实验材料

[0054] 获取自2012年10月到2015年12月于在北京协和医院骨科接受骨质疏松症所致椎体骨折需手术的25例患者的骨组织、28例正常的骨组织样本。所有患者术前均未接受骨质疏松症治疗,术前已取得患者的知情同意,并通过伦理委员会审核。

[0055] 2. 骨组织RNA的提取

[0056] 参照实施例2。

[0057] 3. 逆转录合成cDNA

[0058] 3.1 第一链cDNA合成试剂盒 (RevertAid Premium Reverse Transcriptase) (Thermo Scientific™ EP0733)

[0059] 3.2 cDNA第一链合成

[0060] (1) 在冰浴的nuclease-free PCR管中加入以下试剂:

total RNA 1.0 ul

Random Primer p(dN)₆ (100pmol) 1 μl

[0061] dNTP Mix (0.5 mM final concentration)) 1.0 μl

Rnase-free ddH₂O 定容至 14.5ul

[0062] (2) 轻轻混匀后离心3~5s,反应混合物在65℃温浴5min后,冰浴2min,然后离心3~5s。

[0063] (3) 将试管冰浴,再加入下列试剂:

[0064] 4.0μl 5*RT Buffer

[0065] 0.5μl Thermo Scientific RiboLock RNase Inhibitor (20U)

[0066] 1.0μl RevertAid Premium Reverse Transcriptase (200U)

[0067] (4) 轻轻混匀后离心3~5s

[0068] (5) 在PCR仪上按照下列条件进行反转录反应

[0069] ①25℃孵育10min

[0070] ②cDNA合成50℃ 30min

[0071] ③终止反应85℃ 5min,处理后,置于冰上放置

[0072] (6) 将上述溶液-20℃保存。

[0073] 4. Real-Time PCR

[0074] 引物设计

[0075] 采用在线引物设计软件,基因序列参照NCBI:AKNAD1 (NM_152763.4),内参选GAPDH,引物设计后由上海生工公司合成。具体引物序列如下:

[0076] 表1 Real-Time PCR引物序列

[0077]

基因	编号	序列
AKNAD1	SEQ ID NO:2	AGAGCCTGCAGGAAAGAACCC
	SEQ ID NO:3	CTGGTGTGGGCTCATGTTCA
GAPDH	SEQ ID NO:4	TGGGTGTGAACCATGAGAAGT
	SEQ ID NO:5	TGAGTCCTTCCACGATAACCAA

[0078] 操作过程如下：

[0079] (一) 反应体系:用Power SYBR® Green PCR Master Mix进行扩增,实验操作按产品说明书进行。扩增程序为:95℃3min预反应,进行45个循环 (95℃3s,60℃30s) 的扩增反应。

[0080] 表2 Real-Time PCR反应体系

[0081]

组分	加入量
2×mix	10μl
上游引物 (10μM)	0.4μl
下游引物 (10μM)	0.4μl
模板	2μl
加入灭菌蒸馏水	至20μl

[0082] (二) 样品Real-Time PCR检测

[0083] 将各样品cDNA 10倍稀释后取2μl作模板,分别用目的基因引物和内参基因引物进行扩增。同时在60–95℃进行溶解曲线分析。

[0084] 5. 实验结果

[0085] 实时定量PCR扩增曲线拐点清楚,扩增曲线整体平行性好,表明各反应管的扩增效率相近,极限平而无上扬现在,曲线指数期斜率较大,说明扩增效率较高。样本扩增产物溶解曲线都是单峰,说明扩增产物只有一条,为特异性扩增。根据qRT-PCR的相对定量公式,比较AKNAD1基因在骨质疏松症组和对照组中的表达水平。本实施例当中qRT-PCR扩增结果稳定,其 AKNAD1基因在骨质疏松症组中的表达水平为对照组织的约2.2倍(见图1),以上结果验证了高通量转录组表达数据的整合分析AKNAD1基因在骨质疏松症中高表达的结果。

[0086] 实施例5WB方法检测骨质疏松症中AKNAD1蛋白的表达水平

[0087] 1、实验材料

[0088] 收集28例行骨质疏松症所致椎体骨折需手术的骨质疏松症患者,术中获取骨质疏松症患者病变椎骨骨组织,取样来源于2012年10月到2015年 12月期间在北京协和医院骨科就诊的骨质疏松症患者,所有患者均有典型的临床表现,经骨密度(双能X线)检查确诊。对照来源于同时期住院的外伤致椎骨骨折患者,共收集20例,获取正常椎骨骨组织。采集所有研究对象的骨组织样本,编号后置-80℃低温冰箱保存。本研究的所有临床样本,均对患者进行知情告知并经本医院伦理委员会通过。

[0089] 2、利用BCA蛋白浓度测定试剂盒进行总蛋白定量

- [0090] 采用康为世纪微量BCA蛋白定量试剂盒(货号: CW2011), 具体步骤见其说明书。
- [0091] 3、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)
- [0092] (1) 蛋白质样品变性:
- [0093] a) 根据BCA蛋白质浓度测定结果, 每个凝胶加样孔中加入相同质量的总蛋白提取物。按照每1微升蛋白样品加入0.25微升蛋白上样缓冲液的比例, 混合蛋白样品和蛋白上样缓冲液(5x)。
- [0094] b) 100℃或沸水浴加热3-5分钟, 以充分变性蛋白。
- [0095] c) 冷却到室温后, 直接上样到SDS-PAGE胶加样孔内即可。
- [0096] (2) 胶板制备:
- [0097] 采用Bio-Rad公司的微型垂直板电泳装置制备0.75mm厚的凝胶, 照说明书安装好玻璃板后, 先在小烧杯中配制5mL 10%的分离胶, 配方如下:
- [0098] 表3分离胶配方
- [0099]

组分	用量
30%丙烯酰胺溶液	1.7mL
Tris-HCl (1.5M, pH8.8)	1.3mL
10%SDS	0.05mL
10%AP	0.05mL
TEMED	0.002mL
灭菌ddH ₂ O	补充至5mL

[0100] 混匀后立即灌胶, 然后加1mL蒸馏水覆盖, 室温下放置约30min待胶聚合后, 用蒸馏水洗2-3次, 再用滤纸吸干。然后制备2mL 5%的浓缩胶, 配方如下:

[0101] 表4浓缩胶配方

[0102]

组分	用量
30%丙烯酰胺溶液	0.33mL
Tris-HCl (1.0M, pH6.8)	0.25mL
10%SDS	0.02mL
10%AP	0.02mL
TEMED	0.002mL
灭菌ddH ₂ O	补充至2mL

[0103] 混匀后立即灌胶, 插入样品梳, 避免产生气泡, 待胶凝固后, 取出样品梳, 后用蒸馏水和1x蛋白电泳缓冲液先后冲洗样品孔。

[0104] 4、上样及电泳

[0105] 将凝胶板装在电泳装置上, 内槽中加满1x蛋白电泳缓冲液, 外槽中1x 蛋白电泳缓冲液应超过铂丝, 按顺序上样。在末端泳道中加入蛋白质质量标准蛋白梯度。电泳时蓝色染料到达胶的底端处附近即可停止电泳。

[0106] 5、蛋白质印迹

[0107] 5.1、按照上述方法先进行SDS-PAGE凝胶电泳分离蛋白。

[0108] 5.2、预先用转印缓冲液浸泡PVDF膜、滤纸、海棉垫。SDS-PAGE结束后取出凝胶，去除浓缩胶，打开电转印夹，每侧垫上一块专用的用转印缓冲液浸泡透的海棉垫，再各放一块转印液浸透的滤纸，滤纸与海棉垫大小相同或与PVDF膜，凝胶大小相同均可，将凝胶平放在阴极侧滤纸上，最后将 PVDF膜平放在凝胶上，去除气泡，夹好电转印夹。在电泳槽加满电转印液，插入电转印夹，将电泳槽放入冰箱内（电转印液之前要放入冰箱内预冷），连接好电极，接通电流，转印夹的PVDF膜应对电泳槽的正极。

[0109] 5.3、封闭：转印结束后将PVDF膜用1xTBS漂洗一次。加入含5%的脱脂奶粉TBS封闭缓冲液，摇床上室温孵育1h；

[0110] 5.4、一抗杂交：弃封闭液，加入用一抗稀释液稀释的一抗 (Rabbit Anti- AKNAD1- antibody (货号:HPA030272) 杂交溶液，置于4℃杂交过夜；

[0111] 5.5、回收一抗杂交液，用TBST洗膜3次；

[0112] 5.6、弃TBST，加入用封闭缓冲液稀释的二抗 (Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody (货号:#7074)) 杂交溶液，置于摇床上进行杂交；

[0113] 5.7、弃二抗溶液，用TBST洗膜3次；

[0114] 5.8、ECL化学发光及图像采集和分析：按照高灵敏度化学发光检测试剂盒(康为世纪货号CW0049B)，具体步骤参照说明书。

[0115] 5.9、以Transferrin作为内参进行数据标准化，以正常对照组-骨组织中 AKNAD1 作为参照样本，计算各组中AKNAD1蛋白的相对表达水平。

[0116] 6、实验结果

[0117] 骨质疏松症与正常对照组相比，AKNAD1蛋白表达明显升高 ($P<0.01$) 具体参见图2 所示。

[0118] 实施例6检测试剂盒的制作

[0119] 引物：特异扩增如SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列的在内的核苷酸序列的引物对如SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3所示；和特异扩增内参基因 (GAPDH) 的引物对如SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5所示；

[0120] 还包括SYBR Green聚合酶链式反应体系，如PCR缓冲液、SYBR Green 荧光染料、dNTPs。所述PCR缓冲液的成分为25mM KCL, 2.5mM MgCl₂, 200mM (NH₄)₂SO₄。

[0121] 为方便使用，该试剂盒还可包含对照：正常人骨组织样本cDNA序列。

[0122] 取受检者骨组织样本，使用常规方法(或使用特定的试剂盒)从骨组织样本提取RNA，使用试剂盒中试剂，按照最佳反应体系与条件进行PCR反应，使用试剂盒中正常骨组织的cDNA作为Real-Time PCR定量检测中的对照cDNA，检测受试者骨组织中如SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列相对表达量变化。

[0123] 此试剂盒通过最精简和特异的引物对检测基因的表达情况，不仅稳定，检测方便，且精确，大大提高诊断骨质疏松症的敏感性和特异性，因此将此试剂盒投入实践，可以帮助指导诊断和更有效的个体化治疗。

[0124] 虽然，上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述，但在本发明基础上，可以对之作一些修改或改进，这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此，在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进，均属于本发明要求保护的范围。

序列表

<110> 中国医学科学院北京协和医院

<120> 作为骨质疏松症诊治靶标的AKNAD1基因

<130> P18082

<160> 5

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 214

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

agagcctgca ggaaagaacc aactaaagaa tttcattata gataacaacac tccaggacag 60

aattactcaa atcatagcaa aagaggtgcc tttgtccagc cccattctt agatgaaagt 120

aaaaactctt caccctctt tttaaaaccc aaacggatct gttctcagag agtgaattca 180

aaatccttta aaggtaaca tgagccccaca ccag 214

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<400> 2

agagcctgca ggaaagaacc 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<400> 3

ctgggtgtggg ctcatgttca 20

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<400> 4

tgggtgtgaa ccatgagaag t 21

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<400> 5

tgagtccttc cacgatacc a 21

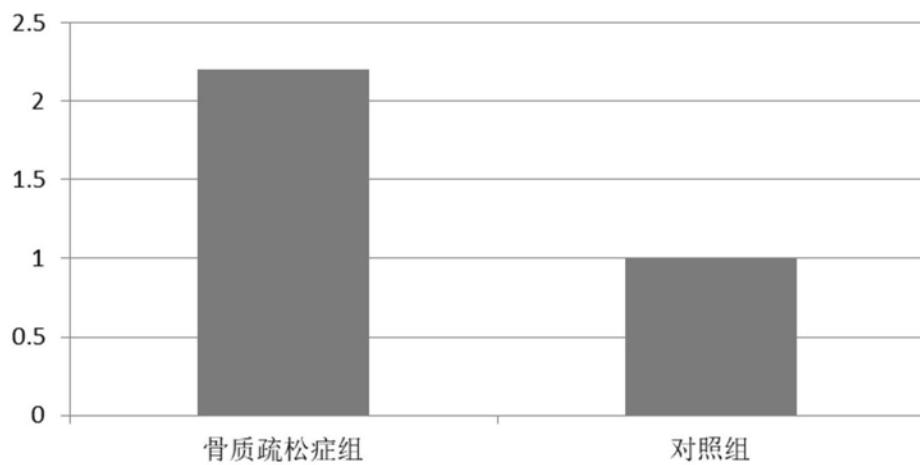
AKNAD1cDNA表达水平

图1

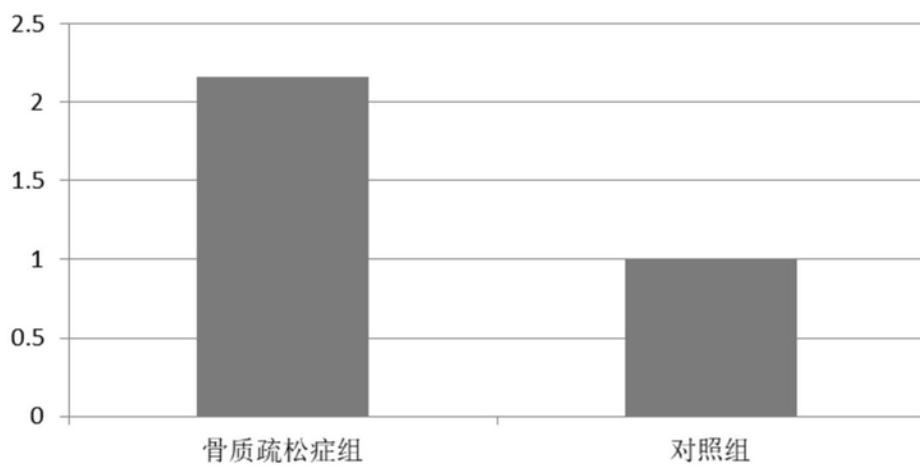
AKNAD1基因的蛋白表达水平

图2

专利名称(译)	作为骨质疏松症诊治靶标的AKNAD1基因		
公开(公告)号	CN109486935A	公开(公告)日	2019-03-19
申请号	CN201811215486.5	申请日	2018-10-18
[标]申请(专利权)人(译)	中国医学科学院北京协和医院		
申请(专利权)人(译)	中国医学科学院北京协和医院		
当前申请(专利权)人(译)	中国医学科学院北京协和医院		
[标]发明人	范彧 张保中 常晓		
发明人	范彧 张保中 常晓		
IPC分类号	C12Q1/6883 C12N15/11 G01N33/68 G01N33/53 A61K45/00 A61P19/10		
CPC分类号	C12Q1/6883 A61K45/00 A61P19/10 C12Q2600/158 G01N33/53 G01N33/6893		
代理人(译)	鲍晓芳		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明公开了用于骨质疏松症早期筛查的分子标记物AKNAD1基因及其应用。本发明通过转录组测序技术筛选到骨质疏松症相关标记物AKNAD1基因，进而探明了AKNAD1基因在骨质疏松症发生发展中的作用，以及其发挥的作用机制，AKNAD1基因作为骨质疏松症新型生物标志物，为指导其临床早期干预及靶向治疗提供了重要理论依据。