



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102119224 A

(43) 申请公布日 2011. 07. 06

(21) 申请号 200980129930. 4
 (22) 申请日 2009. 05. 29
 (30) 优先权数据
 61/129, 022 2008. 05. 30 US
 (85) PCT申请进入国家阶段日
 2011. 01. 28
 (86) PCT申请的申请数据
 PCT/CA2009/000744 2009. 05. 29
 (87) PCT申请的公布数据
 W02009/143624 EN 2009. 12. 03
 (71) 申请人 不列颠哥伦比亚大学
 地址 加拿大不列颠哥伦比亚省
 (72) 发明人 P·科欧文 A·斯彻尔 O·贡特尔
 R·巴尔肖 R·恩格 A·缪
 R·麦克马斯特 B·麦克马纽斯
 G·科亨弗里尤 A·梅里迪斯
 (74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所
 11256

代理人 陈文平 徐志明

(51) Int. Cl.
C12Q 1/68 (2006. 01)
C40B 30/00 (2006. 01)
G01N 33/483 (2006. 01)
G01N 33/53 (2006. 01)
G01N 33/543 (2006. 01)
G01N 33/68 (2006. 01)

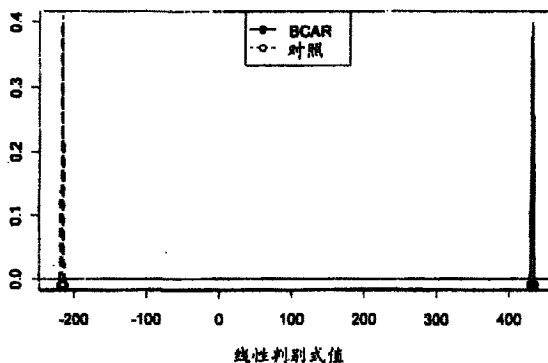
权利要求书 2 页 说明书 65 页 附图 28 页

(54) 发明名称

使用基因组或蛋白质组表达图谱诊断肾同种异体移植物的排斥的方法

(57) 摘要

测定受试者的急性同种异体移植物排斥状态的方法, 该方法包含下述步骤: 测定来自受试者的生物样品中一种或超过一种核酸标志物的核酸表达图谱, 或一种或超过一种蛋白质组标志物; 将一种或超过一种核酸标志物的表达图谱与对照图谱进行对比; 和确定一种或超过一种核酸标志物的表达水平是否相对于对照图谱升高, 其中一种或超过一种核酸标志物的升高是受试者的急性排斥状态的指示。



1. 测定受试者的急性同种异体移植物排斥状态的方法,该方法包含下述步骤:
 - a. 测定来自受试者的生物样品中一种或超过一种核酸标志物的核酸表达图谱,所述核酸标志物选自:TncRNA、FKSG49、ZNF438、1558448_a_at、CAMKK2、LMAN2、237442_at、FKSG49/LOC730444、JUNB、PRO1073 和 ITGAX;
 - b. 将一种或超过一种核酸标志物的表达图谱与对照图谱进行对比;和
 - c. 确定一种或超过一种核酸标志物的表达水平是否相对于对照图谱升高;其中一种或超过一种核酸标志物的升高是受试者的急性排斥状态的指示。
2. 权利要求 1 的方法,其中核酸标志物集合另外包含下述一种或超过一种:SFERS16、NFYC、NCOA3、PGS1、NEDD9、LIMK2、NASP、240057_at、LOC730399/LOC731974、FKBP1A、HLA-G、RBMS1 和 SLC6A6。
3. 权利要求 1 的方法,其中所述对照图谱获自无排斥的同种异体移植物受体受试者或非同种异体移植物受体受试者。
4. 权利要求 1 的方法,另外包括:得到一个或多个临床变量的值。
5. 权利要求 1 的方法,另外包括:在步骤 a) 中,测定选自表 2 的一种或超过一种核酸标志物的表达图谱。
6. 权利要求 1 的方法,其中通过检测与一种或超过一种标志物相对应的 RNA 序列来测定所述一种或超过一种核酸标志物的核酸表达图谱。
7. 权利要求 1 的方法,其中通过 PCR 测定所述一种或超过一种核酸标志物的核酸表达图谱。
8. 权利要求 1 的方法,其中通过杂交测定所述一种或超过一种核酸标志物的核酸表达图谱。
9. 权利要求 9 的方法,其中所述杂交是与寡核苷酸杂交。
10. 测定受试者的急性同种异体移植物排斥状态的方法,该方法包含下述步骤:
 - a. 测定来自受试者的生物样品中蛋白质组标志物的蛋白质组表达图谱,所述蛋白质组标志物包括由 KNG1、AFM、TTN、MSTP9/MST1、PI16、C2、MBL2、SERPINA10、F9 和 UBR4 编码的多肽;
 - b. 将蛋白质组标志物的表达图谱与对照图谱进行对比;和
 - c. 确定一种或超过一种蛋白质组标志物的表达水平是否相对于对照图谱升高或降低;其中 5 种或更多种蛋白质组标志物的升高或降低是受试者的急性排斥状态的指示。
11. 权利要求 10 的方法,其中由 KNG1 或 AFM 编码的多肽的水平相对于对照降低,且由 TTN、MSTP9/MST1、PI16、C2、MBL2、SERPINA10、F9 或 UBR4 编码的多肽的水平相对于对照图谱升高。
12. 权利要求 10 的方法,其中所述对照图谱获自无排斥的同种异体移植物受体受试者或非同种异体移植物受体受试者。
13. 权利要求 10 的方法,另外包括:得到一个或多个临床变量的值。
14. 权利要求 10 的方法,其中通过免疫测定法测定蛋白质组表达图谱。
15. 权利要求 10 的方法,其中通过 ELISA 测定蛋白质组表达图谱。
16. 权利要求 10 的方法,其中通过质谱法测定蛋白质组表达图谱。

17. 权利要求 10 的方法,其中通过同重元素或同位素标记方法测定蛋白质组表达图谱。

18. 权利要求 10 的方法,其中蛋白质组标志物另外包括由下述一种或超过一种编码的多肽 :LBP、VASN、ARNTL2、PI16、SERPINA5、CFD、USH1C、C9、LCAT、B2M、SHBG 和 C1S。

19. 权利要求 1 的方法,其中所述对照是自体对照。

20. 权利要求 10 的方法,其中所述对照是自体对照。

21. 权利要求 1 的方法,其中所述生物样品是血液或血浆。

22. 权利要求 10 的方法,其中所述生物样品是血液或血浆。

使用基因组或蛋白质组表达图谱诊断肾同种异体移植物的排斥的方法

[0001] 本申请要求 2008 年 5 月 30 日提交的美国临时申请 61/129,022 的优先权利益,它的内容通过引用并入本文。

技术领域

[0002] 本发明涉及使用基因组表达图谱或蛋白质组表达图谱诊断肾同种异体移植物的排斥的方法。

背景技术

[0003] 移植被视作具有末期生命器官衰竭的患者的主要疗法。尽管诸如环孢菌素和他罗利姆等免疫抑制剂的可用性已经提高了同种异体移植受体的存活和健康,但尽可能早地和尽可能精确地鉴别同种异体移植物的排斥和有效地监视和调节免疫抑制药物的剂量,对于同种异体移植受体的持续存活仍然非常重要。

[0004] 同种异体移植物的排斥源自受体对供体组织表达的非自身抗原的免疫应答,且可能发生在接受同种异体移植后数小时或数天内,或在数月至数年后。肾同种异体移植排斥的特征包括少尿、肾功能的快速衰退和轻度蛋白尿。肾同种异体移植排斥可以导致肾病变和肾衰竭。

[0005] 目前,侵入性活组织检查(例如心内膜心肌、肝核心和肾细针抽吸)被视作监督和诊断同种异体移植排斥的黄金标准,但是侵入性操作具有它们自身的风险(例如 Mehra MR, 等人 Curr. Opin. Cardiol. 2002 Mar ;17(2) :131-136.)。由于取样误差和观察人员之间的差异性,活组织检查结果也可能产生再现性和判读问题,尽管可利用国际指南例如 Banff 纲要(用于分级肾和肝同种异体移植排斥)(Solez 等人 2008 Am J Transplant 8 :753 ;表 1)。在移植后第一年,同种异体移植受体可以进行多次活组织检查操作。目前使用非侵入性的监视技术(血肌酸酐水平的升高),但是血清肌酸酐水平不能特异性地反映肾损伤。肾损伤可以来自排斥、感染或甚至原始病的复发,因而,该检验不是排斥特异性的。

[0006] 同种异体移植排斥的指标可以包括增强的和集中的免疫应答,这由下述的一种或多种指示:局部的或全身的炎症、组织损伤、免疫细胞的同种异体移植浸润、识别移植物上的供体特异性抗原的炎症细胞、同种特异性的抗体、细胞毒性的 T-细胞活化、组织-和血液-衍生的蛋白的改变的组成和浓度、同种异体移植组织的差别化氧合、水肿、感染、同种异体移植和/或周围组织的坏死等。

[0007] 同种异体移植排斥可以描述为“急性的”或“慢性的”。急性排斥(也称作急性抗体-介导的排斥、AMR 或主动排斥)通常视作在受试者接受同种异体移植物的约 6-12 个月内的组织或器官同种异体移植排斥。排斥或急性排斥的特征在于对供体组织的细胞和体液损伤,导致快速的移植功能障碍和组织或器官的衰竭。6-12 个月后的组织或器官同种异体移植物的排斥通常视作慢性排斥,且可能发生在接受同种异体移植后几年。这样的晚期或慢性排斥可能是亚临床的或未完全解决的急性排斥发作的结果。晚期发作或慢性

排斥的特征在于由同种免疫应答触发的渐进性组织再造,且可能导致在动脉内逐渐形成新生内膜,促成闭塞性血管病、实质纤维化,和最终的移植物衰竭和损失。根据排斥的性质和严重性,在正在发生或疑似发生同种异体移植物排斥(慢性的或急性的)的受试者中观察到的指示或临床变量可能存在重叠。

[0008] 科学和专利文献中报道了此类标志物或对于可以命名的每种医学病况的鉴别/诊断/预测/治疗具有重要意义的那些。甚至在同种异体移植物排斥的领域中,叙述了众多标志物(经常单个地),且可能呈现冲突的结果。文献中的这种冲突与基因组的复杂性(估计上限是30,000个转录单位)、人体中细胞类型(估计上限是200)、器官和组织表达的蛋白或多肽(估计上限是80,000)的复杂性一起,使可能用于诊断急性器官排斥的核酸序列、基因、蛋白、代谢物或其组合的数目是惊人的。个体之间的差异会产生额外的障碍,以及血浆中蛋白浓度的动态范围(介于 10^{-6} 至 $10^3 \mu\text{g/mL}$,许多潜在感兴趣的蛋白以非常低的浓度存在)和极大量的少数最丰富的血浆蛋白(占总蛋白质量的~99%)。

[0009] PCT公布WO 2006/125301公开了在移植的组织中差别表达的核酸,和用于检测肾组织排斥的方法和材料。

[0010] US 7235258公开了通过检测受试者中一个或多个基因的表达水平,诊断或监视受试者的移植物排斥(包括肾移植排斥)的方法。也描述了在这些方法中有用的寡核苷酸。

[0011] Flechner等人(Am J Transplant 2004;4(9)1475-1489)鉴别了几篇出版物,它们采用DNA或微阵列来鉴别接受肾移植的受试者中不同基因的差别化表达,并且也描述了微阵列分析和RT-PCR在检查来自肾移植受试者的外周血淋巴细胞和肾活组织检查样品的基因表达图谱中的应用,并鉴别出了超过60个差别表达的基因。

[0012] Alakulppi等人,2007(Transplantation 83:791-798)公开了使用8种核酸标志物的RT-PCT诊断急性肾同种异体移植物排斥。Alakulppi等人(2008, Transplantation 86:1222-8)的进一步研究没有鉴别出亚临床排斥的稳健的全血基因表达核酸标志物。

[0013] Sarwal等人2003(N. Engl. J. Med 349:125)报道称,在急性排斥期间,与细胞凋亡有关的基因在肾活组织检查中增加,且发现了指示淋巴细胞浸润和由NF- κ B和IFN γ 驱动的活化的转录物集合。

[0014] Mueller等人,2007. Am J. Transplant 7:2712 鉴别出了在人和小鼠中与细胞毒性的T-淋巴细胞、IFN γ 信号传递和上皮细胞损伤有关的肾组织中的转录物。

[0015] Mehra等人,2008提出,调节T-细胞体内稳态和皮质类固醇灵敏度的途径可能与心脏移植物的将来急性排斥有关,但是没有给出关于肾移植的评论。ITGAX的表达是提及的33个基因之一。

[0016] Fildes等人2008(Transplant Immunology 19:1-11)的综述讨论了细胞类型在肺移植后的免疫过程中的作用,并公开了AICL(CLEC2B)与NK细胞蛋白的相互作用可能在急性和慢性排斥中起作用。

[0017] 已经为不同癌症的诊断和监视提出多平台(蛋白质组学,基因组学)的整合,但是,在该领域鉴别出蛋白和mRNA表达之间的不一致性(Chen等人,2002. Mol Cell Proteomics 1:304-313;Nishizuka等人,2003 Cancer Research 63:5243-5250)。以前的研究已经报道了基因组和蛋白质组数据之间的低度相关(Gygi SP等人1999. Mol Cell Biol. 19:1720-1730;Huber等人,2004 Mol Cell Proteomics 3:43-55)。

[0018] 已经进行了几项着眼于肾移植受体尿蛋白组的研究（综述见 Schaub 等人，2008. *Contrib. Nephrol* 160 :65-75）。

[0019] Bottelli 等人，2008 (*J. Am Soc Nephrol* 19 :1904-18) 教导，在受损的小管细胞的再生过程中，巨噬细胞刺激蛋白 (MSP) 被上调，并提出，它可能有助于从急性肾损伤恢复。Gorgi 等人 (2009 *Transplantation Proceedings* 41 :660-662) 研究了急性肾移植排斥和 MBL 基因的多态性之间的关联，并得出结论：所述多态性可能参与研究的群体中对急性同种异体移植排斥的易感性。Fiene 等人，2005 (*Eur Heart J* 26 :1660-5) 公开了低 MBL 水平与心脏移植受体中急性排斥的发展有关。Fildes 2008 (*J. Heart Lung Transplant* 27 :1353-1356) 教导，具有 MBL 缺陷的心脏移植受体具有更少的排斥发作。Fiene 和 Fildes 都没有给出关于肾移植物的评论。

[0020] Berger 等人，2005 (*Am J. Transplant* 5 :1361-1366) 教导，更高的 MBL (结合甘露糖的凝集素) 可能与肾移植受体中的更严重的排斥形式有关，并提出，移植前 MBL 水平对于肾移植之前的风险分级可能是有用的。

[0021] 迫切需要侵入性更低的、可重复的且更稳健的（更不易产生取样和判读误差）评估或诊断同种异体移植排斥的方法。

发明内容

[0022] 本发明涉及使用从受试者得到的一个或多个生物样品的基因组表达图谱或蛋白质组表达图谱诊断肾同种异体移植排斥的方法。

[0023] 生物样品可以是血液或血浆样品；这样的样品在本文所述方法中的应用，提供了胜过基于活组织检查的评估和 / 或监视肾同种异体移植排斥（包括急性排斥）的优点，因为这样的样品可以以最低侵入的方式得到（例如外周血样品），不需要同种异体移植物的活组织检查。血液或血浆样品的使用提供了另一个优点，即它可以降低采样误差，且蛋白质组或核酸标志物的检测受判读的影响更低——标志物存在与否，或它相对于基线、对照等升高或降低，如本文所述。

[0024] 某些现有的采用取血样（例如血清肌酸水平）的监督技术可能不是排斥特异性的；当从血液或血浆样品得到时，本文所述的核酸或蛋白质组标志物是急性肾同种异体移植排斥特异性的，因而会提供另一个特异性的优点。

[0025] 急性肾同种异体移植排斥的复杂的病理生物学反映在本文鉴别出的标志物的异质性。本文鉴别出的标志物分布于广范围的生物学过程：免疫信号转导、细胞骨架改组、细胞凋亡、T- 细胞活化和增殖、细胞和体液免疫应答、急性期炎性途径等。

[0026] 根据本发明的另一个方面，提供了测定受试者的急性同种异体移植排斥状态的方法，该方法包含下述步骤：a) 测定来自受试者的生物样品中一种或超过一种核酸标志物的核酸表达图谱，所述核酸标志物选自：TncRNA、FKSG49、ZNF438、1558448_a_at、CAMKK2、LMAN2、237442_at、FKSG49/LOC730444、JUNB、PR01073 和 ITGAX；b) 将一种或超过一种核酸标志物的表达图谱与对照图谱进行对比；和 c) 确定一种或超过一种核酸标志物的表达水平是否相对于对照图谱升高；其中一种或超过一种核酸标志物的升高是受试者的急性排斥状态的指示。

[0027] 在某些方面，生物样品是血液或血浆。

[0028] 在某些方面,核酸标志物集合另外包含 SFRS16、NFYC、NCOA3、PGS1、NEDD9、LIMK2、NASP、240057_at、LOC730399/LOC731974、FKBP1A、HLA-G、RBMS1 和 SLC6A6 中的一种或超过一种。

[0029] 在某些方面,从无排斥的同种异体移植物受体受试者或非同种异体移植物受体受试者得到对照图谱。

[0030] 在某些方面,所述方法另外包含,得到一个或多个临床变量的值。

[0031] 在某些方面,所述方法另外包含,在步骤 a) 中,测定选自表 2 的一种或超过一种核酸标志物的表达图谱。

[0032] 在某些方面,通过检测与一种或超过一种标志物相对应的 RNA 序列,测定一种或超过一种核酸标志物的核酸表达图谱。

[0033] 在某些方面,通过 PCR 测定一种或超过一种核酸标志物的核酸表达图谱。

[0034] 在某些方面,通过杂交测定一种或超过一种核酸标志物的核酸表达图谱。所述杂交可以是与寡核苷酸杂交。

[0035] 在某些方面,所述对照是自体对照。

[0036] 根据本发明的另一个方面,提供了测定受试者的急性同种异体移植物排斥状态的方法,该方法包含下述步骤:a) 测定来自受试者的生物样品中蛋白质组标志物的蛋白质组表达图谱,所述蛋白质组标志物包括由下述一种或超过一种编码的多肽:KNG1、AFM、TTN、MSTP9/MST1、PI16、C2、MBL2、SERPINA10、F9 和 UBR4;b) 将蛋白质组标志物的表达图谱与对照图谱进行对比;和 c) 确定一种或超过一种蛋白质组标志物的表达水平是否相对于对照图谱升高或降低;其中 5 种或更多种蛋白质组标志物的升高或降低是受试者的急性排斥状态的指示。

[0037] 在某些方面,生物样品是血液或血浆。

[0038] 在某些方面,由 KNG1 和 AFM 中的一种或超过一种编码的多肽的水平相对于对照降低,且由 TTN、MSTP9、MST1、PI16、C2、MBL2、SERPINA10、F9 和 UBR4 中的一种或超过一种编码的多肽的水平相对于对照图谱升高。

[0039] 在某些方面,从无排斥的同种异体移植物受体受试者或非同种异体移植物受体受试者得到对照图谱。

[0040] 在某些方面,所述方法另外包含,得到一个或多个临床变量的值。

[0041] 在某些方面,通过免疫测定法测定蛋白质组表达图谱。

[0042] 在某些方面,通过 ELISA 测定蛋白质组表达图谱。

[0043] 在某些方面,通过质谱法测定蛋白质组表达图谱。

[0044] 在某些方面,通过同重元素或同位素标记方法测定蛋白质组表达图谱。

[0045] 在某些方面,蛋白质组标志物另外包括由下述一种或超过一种编码的多肽:LBP、VASN、ARNTL2、PI16、SERPINA5、CFD、USH1C、C9、LCAT、B2M、SHBG 和 C1S。

[0046] 在某些方面,所述对照是自体对照。

[0047] 根据本发明的另一个方面,提供了测定受试者的急性同种异体移植物排斥状态的方法,该方法包含下述步骤:a. 测定来自受试者的生物样品中蛋白质组标志物的蛋白质组表达图谱,所述蛋白质组标志物包括包含在蛋白组代码 (protein group code) 111、224、23、18、100、116、38、135、125 中的一个或超过一个中的多肽;b. 将蛋白质组标志物的表达

图谱与对照图谱进行对比;和 c. 确定一种或超过一种蛋白质组标志物的表达水平是否相对于对照图谱升高或降低;其中 5 种或更多种蛋白质组标志物的升高或降低是受试者的急性排斥状态的指示。

[0048] 在某些方面,蛋白组代码另外包括组 18、108、222、97、104、26、230、103、69 或 29 中的一个或超过一个。

[0049] 在某些方面,生物样品是血液或血浆。

[0050] 在某些方面,由 KNG1 和 AFM 中的一种或超过一种编码的多肽的水平相对于对照降低,且由 TTN、MSTP9、MST1、PI16、C2、MBL2、SERPINA10、F9 和 UBR4 中的一种或超过一种编码的多肽的水平相对于对照图谱升高。

[0051] 在某些方面,从无排斥的同种异体移植物受体受试者或非同种异体移植物受体受试者得到对照图谱。

[0052] 在某些方面,所述方法另外包含,得到一个或多个临床变量的值。

[0053] 在某些方面,通过免疫测定法测定蛋白质组表达图谱。

[0054] 在某些方面,通过 ELISA 测定蛋白质组表达图谱。

[0055] 在某些方面,通过质谱法测定蛋白质组表达图谱。

[0056] 在某些方面,通过同重元素或同位素标记方法测定蛋白质组表达图谱。

[0057] 在某些方面,蛋白质组标志物另外包括由下述一种或超过一种编码的多肽:LBP、VASN、ARNTL2、PI16、SERPINA5、CFD、USH1C、C9、LCAT、B2M、SHBG 和 C1S。

[0058] 在某些方面,所述对照是自体对照。

[0059] 根据本发明的另一个方面,提供了一种阵列,其包含核酸标志物 TncRNA、FKSG49、ZNF438、1558448_a_at、CAMKK2、LMAN2、237442_at、FKSG49/LOC730444、JUNB、PR01073、ITGAX 中的一种或超过一种的一个或多个探针集合。

[0060] 在某些方面,所述阵列另外包含核酸标志物 SFRS16、NFYC、NCOA3、PGS1、NEDD9、LIMK2、NASP、240057_at、LOC730399/LOC731974、FKBP1A、HLA-G、RBMS1 和 SLC6A6 中的一种或超过一种的一个或多个额外的探针集合。

[0061] 在某些方面,所述阵列另外包含表 2 的核酸标志物的一个或多个额外的探针集合。

[0062] 根据本发明的另一个方面,提供了一种阵列,其包含蛋白质组标志物 KNG1、AFM、TTN、MSTP9、MST1、PI16、C2、MBL2、SERPINA10、F9 和 UBR4 中的一种或超过一种的一种或多种检测试剂。

[0063] 在某些方面,所述阵列另外包含 LBP、VASN、ARNTL2、PI16、SERPINA5、CFD、USH1C、C9、LCAT、B2M、SHBG 和 C1S 中的一种或超过一种的一种或多种额外的检测试剂。

[0064] 根据本发明的另一个方面,提供了评估、监视或诊断受试者的肾同种异体移植物排斥的方法,该方法包含:a) 测定来自受试者的生物样品中至少一种或多种表 2 所示的核酸标志物的表达图谱;b) 将至少一种或多种标志物的表达图谱与无排斥者图谱进行对比;和 c) 确定至少一种或多种标志物的表达水平是否相对于对照图谱上调(升高)或下调(降低),其中至少一种或多种标志物的上调或下调是排斥状态的指示。

[0065] 在某些实施方案中,所述方法另外包含,得到一个或多个临床变量的值,并将一个或多个临床变量与对照进行对比。所述对照是无排斥的同种异体移植物受体受试者或非同

种异体移植受体受试者。在某些实施方案中,所述排斥是急性排斥。在某些实施方案中,所述一种或多种核酸标志物包括 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23 或 24 种核酸标志物,它们选自表 2 所示的那些。在某些实施方案中,所述核酸标志物可以包括一种或超过一种表 5 所示的核酸标志物。

[0066] 根据本发明的另一个方面,提供了一种试剂盒,其用于评估或诊断受试者的肾同种异体移植排斥,所述试剂盒包含用于特异性地和定量地检测至少一种或多种表 2 所示的标志物的试剂,以及关于使用这些试剂和分析得到的数据的方法的说明书。所述试剂盒可以另外包含一种或多种寡核苷酸,其用于选择性地杂交代表一种或多种标志物的一种或多种基因、转录物或序列单位。也可以在试剂盒中提供用于将试剂盒结果与其它测定法的结果进行组合、从而为受试者排斥状态的诊断提供无排斥截止指标或对照的说明书或其它信息。

[0067] 在某些实施方案中,所述试剂盒可以另外包含用于得到一个或多个临床变量的值并将一个或多个临床变量与对照进行对比的说明书或材料。所述对照是无排斥的同种异体移植受体受试者或非同种异体移植受体受试者。在某些实施方案中,所述排斥是急性排斥。在某些实施方案中,所述一种或多种核酸标志物包括 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23 或 24 种核酸标志物,它们选自表 2 所示的那些。在某些实施方案中,所述核酸标志物可以包括一种或超过一种表 5 所示的核酸标志物。

[0068] 本发明概要不一定描述了本发明的所有特征。本领域普通技术人员在阅读本发明的具体实施方案的以下描述后,会明白本发明的其它方面、特征和优点。

附图说明

[0069] 从下面的描述更容易明白本发明的这些和其它特征,在描述中参考了附图,其中:

[0070] 图 1 显示了使用一组 24 种核酸生物标志物(表 5 所示)进行受试者分类的结果。测得受试者具有:A) 24- 探针集合分类器;B) A) 的放大视图,以更清楚地显示高斯峰和下面的样品。对于 A 和 B,急性排斥- 实心圆形;无排斥- 空心圆形。C) 与 A 和 B 相同的数据集合,以与图 2 相同的格式显示数据。急性排斥(实心菱形)或无排斥(实心圆形)。

[0071] 图 2 显示了仅使用临床参数(血清肌酸酐、GFR、BUN)的受试者分类结果。测得受试者具有急性排斥(实心菱形)或无排斥(实心圆形)。

[0072] 图 3:通过微阵列分析检测具有和没有 BCAR 的受试者之间的探针集合的差别化表达。灰色的点指示通过单独的 LIMMA 鉴别出的探针集合,而黑色的点指示通过 LIMMA、稳健的 LIMMA 和 SAM 的交叉鉴别出的 183 探针集合。圆形指示在主要分类器中包括的 24 探针集合。

[0073] 图 4:显示相同受试者组的分离的主要组分分析,证实了所有组的形心(centroid)都明显分离。AR- 急性排斥者;NR- 无排斥者;N- 正常对照(20 位非受体受试者)。通过主要组分解的百分比差异显示在 X 轴(56%)和 Y 轴(12%)上。

[0074] 图 5. 在 BCAR 中差别表达的 183 探针集合的基因本体论和网络分析。x- 轴显示了 $-\log_{10}(p\text{- 值})$ 。A 通过递增的 p- 值分类的最显著富集的基因本体论分类(“生物学过程”)。B 通过递增的 p- 值分类的最显著富集的基因本体论分类(GeneGO MetaCore 生物学

分类)。

[0075] 图 6. 分类器的性能。(A) 增加的分类准确度,证实了 11 种普通的最高预测性的探针集合的逐步包含。Y-轴 - 分类准确度;X-轴,生物标志物。(B) 线性判别分析,显示了 11 探针集合分类器在区分具有(•,实线)和没有(°,虚线)BCAR(活组织检查-证实的急性排斥)的情况中的性能。(C) 与个体移植前(基线)值相比,移植后分类器评分的变化。仅在排斥时(第 1 周),队列之间的差异是显著的($p = 0.0001$)。Y 轴 - 从基线的变化(平均值 $\pm 2se$);X 轴 BL-基线;W1-W12,第 1 周 - 第 12 周。“START”指示逐步分析的开始,这时没有探针集合分类器。

[0076] 图 7:火山图(volcano plot),显示了在至少 2/3 的 BCAR 阳性样品和 2/3 的 BCAR 阴性样品中发现的所有 144 蛋白组代码。带有圆圈的点表示在具有或没有 BCAR 的受试者之间它们的血浆浓度存在显著差异($p < 0.05$)的 18 个蛋白组。

[0077] 图 8:线性判别分析,显示了基于血浆蛋白生物标志物分离具有或没有 BCAR 的患者。实线/“X”-BCAR 受试者;虚线/“|”-对照(无排斥者)受试者。

[0078] 图 9:估计的分类准确度,显示了通过正向选择逐步判别分析(SDA)选出的蛋白组的逐步包含。Y 轴 - 分类准确度;X 轴 -PGC 码。“START”与在图 6 中相同。

[0079] 图 10 显示了在表 2 中列出的可用于诊断急性肾同种异体移植排斥的核酸标志物的靶序列(SEQ ID NO:1-183)。

具体实施方式

[0080] 本发明提供了诊断已经接受组织或器官同种异体移植、尤其是肾同种异体移植物的受试者的排斥的方法。

[0081] 本发明提供了与受试者中同种异体移植排斥的评估、预测或诊断有关的基因组和蛋白质组表达图谱。尽管基因组或蛋白质组表达图谱中的几个元件可能单个地是现有技术已知的,但基因组、T-细胞、蛋白质组或代谢物标志物的特定集合的改变的表达水平(与对照相比升高或降低)的特定组合,包含可用于评估或诊断受试者的同种异体移植排斥的新颖组合。

[0082] 同种异体移植是在相同物种的两个遗传上不同的受试者之间移植的器官或组织。接受同种异体移植的受试者是“受体”,而提供同种异体移植的受试者是“供体”。组织或器官同种异体移植可以替代性地称作“移植(transplant)”、“移植(graft)”、“同种异体移植”、“供体组织”或“供体器官”或类似的术语。不同物种的两个受试者之间的移植是异种移植。

[0083] 受试者可能呈现文献中熟知的许多症状或临床变量,作为监视同种异体移植排斥的辅助。除了同种异体移植的活组织检查以外,众多临床变量可以用于评估具有或疑似具有同种异体移植排斥的受试者。然后,来自这些临床变量的信息由临床医师、医师、兽医或临床场合的其它从业人员用于临床场合中确定是否正在发生排斥和它的进展速度的尝试中,以允许修改受试者的免疫抑制药物疗法。在表 1 中显示了临床变量的实例。

[0084] 临床变量(任选地伴有活组织检查)尽管是目前临床医师在主流医疗实践中可利用的唯一实用工具,但是并非总能清楚地区分排斥的和无排斥的受试者,如图 2 所示。尽管极左和极右的受试者可以正确地被归类为排斥的和无排斥的,但大量的受试者落入中间范

围,且他们的状态不明。这没有否认临床变量在评估同种异体移植物排斥中的价值,但是相反地指出当在没有其它方法的情况下使用时它们的局限性。

[0085] 表 1 :可能用于评估同种异体移植物排斥的临床变量

[0086]

临床变量名称	肾/心脏/肝 /全部	变量解释
主要诊断	全部	导致移植的诊断
次要诊断	全部	导致移植的诊断
"移植操作- 活体相关, 活体非相关, 或尸体"		
血型	全部	血型
血液 Rh	全部	血液 Rh
身高(cm)	全部	身高(cm)
体重(kg)	全部	体重(kg)
BMI	全部	计算: 体重/(身高) ²
肝腹水	全部	
HLA A1	全部	
HLA A2	全部	
HLA B1	全部	
HLA B2	全部	
HLA DR1	全部	
HLA DR2	全部	
CMV	全部	病毒状态
CMV 日期	全部	病毒状态的日期
HIV	全部	病毒状态
HBV	全部	病毒状态
HBV 日期	全部	病毒状态的日期

[0087]

HbsAb	全部	病毒状态
HbcAb (总计)	全部	病毒状态
HBvDNA	全部	病毒状态
HCV	全部	病毒状态
HCV 基因型	全部	丙型肝炎基因型
HCV 基因型亚型	全部	"丙型肝炎基因型, 亚型"
EBV	全部	病毒状态
带状疱疹	全部	病毒状态
透析开始日期	全部	透析开始日期
透析类型	全部	透析类型
细胞毒性目前水平	全部	
细胞毒性目前日期	全部	
细胞毒性峰值水平	全部	
细胞毒性峰值日期	全部	
冲洗溶液	全部	在移植中使用的冲洗溶液类型
冷却时间 1	全部	
冷却时间 2	全部	
重新温热时间 1	全部	
重新温热时间 2	全部	
HTLV 1	全部	
HTLV 2	全部	
HCV RNA	全部	
24 小时尿	全部	24 小时尿排出量
收缩压	全部	血压读数
舒张压	全部	血压读数
24 小时尿	全部	24 小时尿
钠	全部	血检验
钾	全部	血检验
氯化物	全部	血检验
总 CO ₂	全部	血检验
白蛋白	全部	血检验
蛋白	全部	血检验
钙	全部	血检验
无机磷酸盐	全部	血检验

[0088]

镁	全部	血检验
尿酸	全部	血检验
葡萄糖	全部	血检验
血红蛋白 A1C	全部	血检验
CPK	全部	血检验
副甲状腺激素	全部	血检验
高半胱氨酸	全部	血检验
尿蛋白	全部	尿检验
肌酸酐	全部	血检验
BUN	全部	血检验
血红蛋白	全部	血检验
血小板计数	全部	血检验
白细胞计数	全部	血检验
凝血酶原时间	全部	血检验
部分凝血激酶时间	全部	血检验
INR	全部	血检验
γ GT	全部	血检验
AST	全部	血检验
碱性磷酸酶	全部	血检验
淀粉酶	全部	血检验
总胆红素	全部	血检验
直接胆红素	全部	血检验
LDH	全部	血检验
ALT	全部	血检验

甘油三酯	全部	血检验
胆固醇	全部	血检验
HDL 胆固醇	全部	血检验
LDL 胆固醇	全部	血检验
FEV1	全部	肺功能检查
FVC	全部	肺功能检查
总铁蛋白	全部	血检验
TIBC	全部	血检验
转铁蛋白饱和的	全部	血检验
铁蛋白	全部	血检验
血管造影术	心脏	心功能检验

[0089]

血管内超声	心脏	心功能检验
多巴酚丁胺负荷超声心动图	心脏	心功能检验
环孢菌素 WB	全部	免疫抑制水平
环孢菌素 2 hr	全部	免疫抑制水平
他罗利姆 WB	全部	免疫抑制水平
西罗莫司 WB	全部	免疫抑制每日总剂量
甲泼尼龙的水溶性酯	全部	免疫抑制每日总剂量
泼尼松	全部	免疫抑制每日总剂量
泼尼松 ALT	全部	免疫抑制每日总剂量
他罗利姆	全部	免疫抑制每日总剂量
环孢菌素	全部	免疫抑制每日总剂量
依木兰	全部	免疫抑制每日总剂量
麦考酚酸莫酯	全部	免疫抑制每日总剂量
西罗莫司	全部	免疫抑制每日总剂量
OKT3	全部	免疫抑制每日总剂量
ATG	全部	免疫抑制每日总剂量
ALG	全部	免疫抑制每日总剂量
巴利昔单抗	全部	免疫抑制每日总剂量
达珠单抗	全部	免疫抑制每日总剂量
更昔洛韦	全部	抗病毒每日总剂量
拉米夫定	全部	抗病毒每日总剂量
病毒唑	全部	抗病毒每日总剂量
干扰素	全部	抗病毒每日总剂量
丙肝病毒 RNA	全部	检验 HCV 值的存在 ()
CMV 抗原血症	全部	抗病毒和病毒
缬更昔洛韦	全部	抗病毒每日总剂量
中性粒细胞数	全部	血检验
C 肽	全部	血检验
Peg 干扰素	全部	抗病毒每日总剂量
GFR	全部	肾小球滤过率
并发症事件	全部	并发症类型
活组织检查评分	肾	边缘 1A, 1B, 2A, 2B, 3, 过急性
活组织检查评分	肝	肝门炎症, 胆管炎症损伤,

[0090]

		静脉内皮炎症,各自评分 1-2
供体血型	全部	供体血型
供体血液 Rh	全部	供体 Rh
供体 HLA A1	全部	供体 HLA A1
供体 HLA A2	全部	供体 HLA A2
供体 HLA B1	全部	供体 HLA B1
供体 HLA B2	全部	供体 HLA B2
供体 HLA DR1	全部	供体 HLA DR1
供体 HLA DR2	全部	供体 HLA DR2
供体 CMV	全部	供体 CMV
供体 HIV	全部	供体 HIV
供体 HBV	全部	供体 HBV
供体 HbsAb	全部	供体 HbsAb
供体 HbcAb(总)	全部	供体 HbcAb(总)
供体 Hbdna	全部	供体 Hbdna
供体 HCV	全部	供体 HCV
供体 EBV	全部	供体 EBV

[0091] 在本领域考虑到同种异体移植物排斥的预测、诊断和评估的多因素性质,排除了甚至满足同种异体移植物排斥的预测、诊断或评估需求之一的单一生物标志物的可能性。包含多个标志物的策略可以考虑该多因素性质。或者,可以与侵入性更低的临床变量(例如不需要活组织检查)组合地评估多个标志物,以适应受试者中同种异体移植物排斥的预测、诊断和/或评估。

[0092] 不管用于预测、诊断和评估同种异体移植物排斥的方法是什么,越早越好——从保持器官或组织功能和预防更多全身性有害效应的观点看。不能“治愈”同种异体移植物排斥,只能使受试者维持在适当地免疫抑制的状态,或在某些情况下,如果排斥已经过快发展或太严重而难以用免疫抑制药干预治疗进行矫正,则更换器官。

[0093] 将多个数学的和/或统计分析的方法应用于蛋白或多肽数据集、代谢物浓度数据集或核酸表达数据集,可以指示重要的标志物的不同子集,导致关于哪种方法是“最好”或

“更精确”的不确定性。不论数学,根本的生物学在数据集中是相同的。通过将多个数学的和/或统计的方法应用于微阵列数据集,并评估对于共同标志物各自的统计上显著的子集,可以减少不确定性,且可以鉴别标志物的临床上相关的核心组。

[0094] “标志物”、“生物学标志物”或“生物标志物”可以互换地使用,泛指生物样品中可检测的(和在某些情况下可定量的)分子或化合物。在移植同种异体移植物之后,受试者中的标志物可能下调(降低)、上调(升高)或实际上不变。标志物可以包括:核酸(DNA或RNA)、基因或转录物或转录物的一部分或片段,它们称作“基因组”标志物(或者称作“核酸标志物”);多肽、肽、蛋白、同种型或其片段或部分,它们称作“蛋白质组”标志物;或选定的分子、它们的前体、中间体或分解产物(例如脂肪酸、氨基酸、糖、激素或其片段或亚基)。在某些用法中,这些术语可以是指特定蛋白、肽、核酸或多核苷酸或代谢物的水平或数量(以绝对术语或相对于另一样品或标准值表示),或受试者的生物样品中两种蛋白、多核苷酸、肽或代谢物的水平之间的比例。可以将水平表示为:浓度,例如微克/毫升;在特定光波长的比色强度,例如0.0是透明,且1.0是不透明,其中实验样品相应地排列,并接受基于特定波长的光的透射或吸收的数字评分;或与用于定量标志物的其它方式有关,例如本领域已知的。在某些实例中,可以将比例表示为无单位的值。“标志物”也可以是指比例或减去基线值以后的净值。标志物也可以表示为“变化倍数”,有或没有方向性指示(升高或降低/上或下)。标志物的表达的升高或降低也可以称作“下调”或“上调”或响应于刺激、生理事件或受试者病况的升高或降低的类似指示。标志物可以存在于第一种生物样品中,且在第二种生物样品中不存在;或者,标志物可以存在于二者中,二者之间存在统计上显著的差异。生物样品中标志物的存在与否或相对水平的表示,可以取决于用于定量或评估该标志物的检测法的性质,并且这样的表示方式是本领域技术人员熟悉的。

[0095] 当排斥同种异体移植物的受试者中的表达水平显著不同于受试者或从无排斥受试者采取的样品的表达水平时,可以将标志物描述为差别表达的。与正常或对照样品的表达水平相比,差别表达的标志物可以过表达或低表达。

[0096] “图谱”是一种或多种标志物以及它们的存在与否、相对水平或丰度(相对于一种或多种对照)的集合。例如,代谢物图谱是代谢标志物的存在与否、相对水平或丰度的数据集。蛋白质组图谱是蛋白质组标志物的存在与否、相对水平或丰度的数据集。基因组或核酸图谱是表达的核酸(例如转录物、mRNA、EST等)的存在与否、相对水平或丰度的数据集。图谱可以替代性地称作表达图谱。

[0097] 通过本领域已知的几种测量基因产物或转录物或包含特定序列的核酸分子、多肽或蛋白、代谢物等的存在和/或相对丰度的方法中的任一种,可以测定生物样品中的标志物的升高或降低或定量。可以将标志物的水平测定为绝对值,或相对于基线值,和相对于截止指标(例如无排斥截止指标)的受试者标志物水平。或者,可以相对于对照,测定标志物的相对丰度。对照可以是临床上正常的受试者(例如尚未接受同种异体移植物的受试者),或可以是以前或现在没有表现出排斥的同种异体移植物受体。

[0098] 在某些实施方案中,对照可以是自体对照,例如在接受同种异体移植物移植之前从该受试者得到的样品或图谱。在某些实施方案中,可以将在一个时间点(移植之前、之后,或之前和之后)得到的图谱与以前从相同受试者得到的一种或超过一种图谱进行对比。通过随着时间从相同受试者重复采取相同的生物样品,可以提供组成图谱(composite

profile), 它会解释随着时间的标志物水平或表达。也可以从受试者得到连续的样品, 并得到各自的图谱, 以随着时间跟踪一种或多种标志物的升高或降低的进程, 例如, 可以在移植之前采取一种或多种起始样品, 每周、每 2 周、每月、每 2 个月或以其它合适的定期间隔采取后续样品, 并与以前采取的样品的图谱进行对比。也可以在施用药物 (例如免疫抑制药) 疗程之前、过程中和之后, 采取样品。

[0099] 可以用于检测和 / 或定量特定标志物或标志物集合的技术、方法、工具、算法、试剂和测定法的其它必要方面是各种各样的。重要的不是用于检测标志物或标志物集合的具体方法如此之多, 而是检测哪种标志物。如在文献中所反映的, 巨大的变动是可能的。一旦鉴别出要检测或定量的标志物或标志物集合, 只要提供适当的试剂, 几种技术中的任一种都可以很好地适用。当提供了要鉴别的标志物集合时, 本领域技术人员能选择适当的测定法 (例如, 基于 PCR 的或基于微阵列的测定法 (对于核酸标志物), ELISA、蛋白或抗体微阵列或类似的免疫测定法, 或在某些实例中, 使用基于 iTRAQ、iCAT 或 SELDI 蛋白质组质谱的方法) 来执行本文公开的方法。

[0100] 本发明提供了与受试者中同种异体移植物排斥的评估或诊断有关的核酸表达图谱和蛋白质组表达图谱。尽管基因组或 T- 细胞表达图谱或蛋白质组表达图谱中的几个元件可能单个地是现有技术已知的, 但基因组或蛋白质组标志物的特定集合的改变的表达水平 (与对照相比升高或降低) 的特定组合, 包含可用于评估或诊断受试者的同种异体移植物排斥的新颖组合。

[0101] 发现 183 探针集合特异性地检测 (通过标记的杂交和检测) 并允许对表达的核酸的表达水平进行定量。在该代表 183 个表达的转录物或核酸的 183 集合 (在表 2 中列出) 中, 检测、定量和发现了与无排斥的移植物 (NR) 相比, 24 探针集合的子集 (表 5) 在 AR 样品中表现出统计上显著的变化倍数。图 10 提供了通过表 2 和 5 列出的探针集合鉴别出的一部分核酸的核酸序列信息。图 10 中的序列 (SEQ ID NO :1-183) 可以用作与指明的基因特异性杂交 (例如在微阵列、印迹或其它基于杂交的测定中) 的探针, 或用于指明的基因的特异性扩增 (例如通过 PCR、RT-PCR 或其它基于扩增的测定) 的一种或多种引物的设计。

[0102] 使用多路 iTRAQ 方法, 发现 18 个重要的蛋白组代码在 AR 和 NR 受试者中具有差别化的相对水平 (相对于参照样品) (表 7)。这些蛋白组代码包括由 TTN、KNG1、LBP、VASN、ARNTL2、AFM、MSTP9、MST1、PI16、SERPINA5、CFD、USH1C、C2、MBL2、SERPINA10、C9、LCAT、B2M、SHBG、C1S、UBR4 和 F9 中的一种或超过一种编码的蛋白质组标志物。如下所述, 在本文中提供了登记号, 它们提供了编码这些多肽的核酸序列和这些多肽的氨基酸序列的具体索引。在表 7 中提供了所示的蛋白组代码的每个成员的唯一标识符 (国际蛋白索引登记号)。包含这些序列中的一种或多种的一部分的多肽可以用于制备特异性地检测一种或多种蛋白质组标志物的抗体, 或者, 通过将产生的肽片段与所述序列进行对比, 或与包含这些序列的数据库进行对比, 所述序列可以用于鉴别进行胰蛋白酶消化和质谱法分析的样品中的一种或多种蛋白质组标志物。

[0103] 通过许多方法或测定法中的任一种, 可以完成核酸的检测或测定, 和在某些情况下定量, 所述方法或测定法采用本领域已知的重组 DNA 技术, 包括但不限于, 序列特异性的杂交、聚合酶链式反应 (PCR)、RT-PCR、微阵列等。这样的测定法可以包括序列特异性的杂交、引物延伸或侵入切割。此外, 存在许多用于分析 / 检测每类反应的产物的方法 (例如,

荧光、发光、质量测量、电泳等)。此外,反应可以发生于溶液中或在固体载体(例如载玻片、芯片、珠子等)上。

[0104] 设计和选择用于微阵列或生物芯片中的探针的方法,或选择或设计用于基于 PCR 的测定中的引物的方法,是本领域已知的。一旦鉴别出一种或多种标志物,并测定了核酸的序列,例如,通过查询包含这样的序列的数据库,或通过具有提供的适当序列(例如,本文提供的序列列表),本领域技术人员能够使用这些信息来选择适当的探针或引物并执行选定的测定。

[0105] 阐述本领域技术人员已知的重组 DNA 技术的一般原理的标准参考文献包括,例如:Ausubel 等人, *Current Protocols In Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York(1998 和增刊至 2001); Sambrook 等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第 2 版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York(1989); Kaufman 等人编, *Handbook Of Molecular And Cellular Methods In Biology And Medicine*, CRC Press, Boca Raton(1995); McPherson 编, *Directed Mutagenesis: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford(1991)。

[0106] 通过本领域已知的多种方法,可以特异性地鉴别和/或定量蛋白、蛋白复合物或蛋白质组标志物,且可以单独地或组合地使用。基于免疫学的或抗体的技术包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)、蛋白印迹、免疫荧光、微阵列、一些色谱技术(即免疫亲和色谱法)、流式细胞术、免疫沉淀等。这些方法是基于一种或多种抗体对特定表位或表位组合的特异性,所述表位与目标蛋白或蛋白复合物有关。非免疫学方法包括基于蛋白或蛋白复合物自身的物理特征的方法。这些方法的实例包括电泳、一些色谱技术(例如高效液相色谱法(HPLC)、快速蛋白液相色谱法(FPLC)、亲和色谱法、离子交换色谱法、尺寸排阻色谱法等)、质谱法、测序、蛋白酶消化等。这些方法是基于质量、电荷、疏水性或亲水性,其源自蛋白或蛋白复合物的氨基酸补体和氨基酸的具体序列。示例性的方法包括,在例如 PCT 公开 WO 2004/019000、WO 2000/00208、US 6670194 中所述的那些。可以组合免疫学和非免疫学方法来鉴别或表征蛋白或蛋白复合物。此外,存在许多用于分析/检测每类反应的产物的方法(例如,荧光、发光、质量测量、电泳等)。此外,反应可以发生于溶液中或在固体载体(例如载玻片、芯片、珠子等)上。

[0107] 生产用于蛋白或抗体阵列或其它基于免疫学的测定法中的抗体的方法是本领域已知的。一旦鉴别出一种或多种标志物并鉴别了蛋白或多肽的氨基酸序列,无论是通过查询数据库,还是通过具有提供的适当序列(例如,本文提供的序列列表),本领域技术人员能够使用这些信息来制备一种或多种适当的抗体并执行选定的测定。

[0108] 关于针对生物标志物的单克隆抗体的制备,可以使用为生产抗体分子提供的任意技术。这样的技术包括但不限于,杂交瘤技术、三源杂交瘤(例如 Kohler 和 Milstein 1975, *Nature* 256:495-497; Gustafsson 等人, 1991, *Hum. Antibodies Hybridomas* 2:26-32)、人 B-细胞杂交瘤或 EBV 杂交瘤例如(Kozbor 等人, 1983, *Immunology Today* 4:72; Cole 等人, 1985, 见: *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., 77-96 页)。可以使用人或人源化的抗体,且可以通过使用人杂交瘤获得(Cote 等人, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:2026-2030)或通过用 EBV 病毒体外转化人 B 细胞来获得(Cole 等人, 1985, 见: *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., 77-96

页)。可以使用为生产“嵌合抗体”开发的技术 (Morrison 等人, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 :6851-6855 ;Neuberger 等人, 1984, Nature 312 :604-608 ;Takeda 等人, 1985, Nature 314 :452-454), 其中将对特定生物标志物特异性的小鼠抗体分子的编码序列与具有适当生物活性的人抗体分子的编码序列剪接到一起 ;这样的抗体是在本发明的范围内。可以改进关于单链抗体的生产所述的技术 (美国专利 4, 946, 778), 以生产生物标志物特异性的抗体。本发明的另一个实施方案利用关于 Fab 表达文库的构建所述的技术 (Huse 等人, 1989, Science 246 :1275-1281), 以允许快速且容易地鉴别对生物标志物蛋白具有希望的特异性的单克隆 Fab 片段。通过已知的方法 (例如, 美国专利号 5, 225, 539) 可以将非人抗体“人源化”。

[0109] 通过本领域已知的技术, 可以产生含有生物标志物的独特型的抗体片段。例如, 这样的片段包括但不限于, 可以通过胃蛋白酶消化抗体分子产生的 F(ab')₂ 片段 ;可以通过还原 F(ab')₂ 片段的二硫桥产生的 Fab' 片段 ;可以通过用木瓜蛋白酶和还原剂处理抗体分子产生的 Fab 片段 ;和 Fv 片段。合成的抗体, 例如, 通过化学合成产生的抗体, 也可用于本发明中。

[0110] 本文所述的和相关领域的技术人员已知的标准参考文献描述了免疫学和非免疫学技术、它们对于特定样品类型、抗体、蛋白或分析的适应性。阐述本领域技术人员已知的免疫学一般原理和采用免疫学方法的测定的标准参考文献包括, 例如 :Harlow 和 Lane, Antibodies :A Laboratory Manual, 第 2 版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1999) ;Harlow 和 Lane, Using Antibodies :A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York ;Coligan 等人编 .Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, New York, NY(1992-2006) ;和 Roitt 等人 ., Immunology, 第 3 版, Mosby-Year Book Europe Limited, London(1993)。阐述本领域技术人员已知的肽合成技术的一般原理和方法的标准参考文献包括, 例如 :Chan 等人, Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 2005 ;Peptide and Protein Drug Analysis, Reid, R. , Marcel Dekker 编, Inc. , 2000 ;Epitope Mapping, Westwood 等人编, Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 2000 ;Sambrook 等人, Molecular Cloning :A Laboratory Manual, 第 3 版, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY 2001 ;和 Ausubel 等人 ., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, NY, 1994)。

[0111] 受试者的排斥状态可以描述为“排斥者”(R 或“急性排斥者”或 AR) 或“无排斥者”(NR), 且可以通过将标志物的浓度与无排斥者截止指标的浓度进行对比来确定。“无排斥者截止指标”是数值或评分, 当超过它或在它之外时, 将受试者归类为具有排斥者状态。无排斥者截止指标可以替代性地称作“对照值”、“对照指标”或简称为“对照”。无排斥者截止指标可以是对照受试者群体中的单个标志物的浓度, 且可以为测量的每种标志物单独考虑 ;或者, 无排斥者截止指标可以是标志物浓度的组合, 并与为诊断提供的受试者样品中的标志物浓度的组合进行对比。对照受试者群体可以是正常的或健康的对照群体, 或可以是尚未或不会排斥同种异体移植物的同种异体移植物受体群体。对照或对照组可以是恒定的, 例如由静态值表示, 或可以是累积的, 因为用于获得它的样品群体可能随部位或时间不同而变化, 并结合额外的数据点。例如, 中央数据储存库, 例如集中的健康护理信息系统,

可以接收和储存在不同地方（医院，临床实验室等）得到的数据，并提供该累积数据集，在单个医院、社区诊所用于本发明的方法，由终端用户（即单个医学从业人员、医务所或中心等）获取。在某些实施方案中，截止指标可以进一步表征为基因组截止指标（对于受试者的基因组表达图谱）、蛋白质组截止指标（对于受试者的蛋白质组图谱）等。

[0112] “生物样品”泛指来自受试者的体液或组织或器官样品。例如，生物样品可以是体液，例如血液、血清、血浆、淋巴液、尿或唾液。可以消化、提取组织或器官样品（例如非液体组织样品），或另外转化成液体形式——这样的组织或器官的实例包括培养的细胞、血细胞、皮肤、肝、心脏、肾、胰腺、胰岛、骨髓、血液、血管、心脏瓣膜、肺、肠（intestine）、肠（bowel）、脾、膀胱、阴茎、脸、手、骨、肌肉、脂肪、角膜等。可以在任意一次收集多个生物样品。可以在任意时间从受试者采取一种或多种生物样品，包括在同种异体移植物移植之前，在移植时或在移植后的任意时间。生物样品可以包含单链或双链形式的“核酸”，诸如“脱氧核糖核酸”（也称作“DNA”）或“核糖核酸”（也称作“RNA”或“mRNA”）或其组合。核酸也可以称作“转录物”。

[0113] 在受试者接受同种异体移植物之前，或在接受同种异体移植物之后的任意时间，可以采用本文所述的方法来确定同种异体移植物是否被排斥。例如，可以评估在接受同种异体移植物之后的任意时间从受试者得到的样品中是否存在表 2 或 7 中列出的一种或超过一种核酸标志物或蛋白质组标志物的改变的水平（升高或降低）。在某些情况下，可以在接受同种异体移植物之后 1、2、3、4、5、6、7、8 或更多小时，从受试者得到样品。在某些情况下，可以在接受同种异体移植物之后一天或更多天（例如，2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40 或更多天），从受试者得到样品。在某些实施例中，可以在接受同种异体移植物之后 2-7 天（例如，5-7 天）得到样品，并评估在表 2 或 7 中列出的核酸标志物或蛋白质组标志物的存在。

[0114] 术语“受试者”或“患者”泛指哺乳动物和其它动物，包括人和其它灵长动物、宠物、动物园和耕作动物，包括，但不限于，猫、狗、啮齿动物、大鼠、小鼠、仓鼠、兔子、马、牛、绵羊、猪、山羊、家禽等。受试者包括要检验的受试者，或已经为同种异体移植物排斥的预测、评估或诊断检验过的受试者。受试者以前可能已经使用其它方法评估或诊断过，例如本文所述的方法或目前在临床实践中的方法，或可能被选择作为一般群体（对照受试者）的一部分。

[0115] 与对照相比，受试者中标志物的变化倍数可以是至少 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0 或更多，或其间的任意数量。变化倍数可以代表与对照值相比降低或升高。一个或超过一个包括 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 或更多。

[0116] “下调（down-regulation）”或“下调（down-regulated）”可以互换地使用，是指标志物（例如基因、核酸、代谢物、转录物、蛋白或多肽）的水平降低。“上调（up-regulation）”或“上调（up-regulated）”可以互换地使用，是指标志物（例如基因、核酸、代谢物、转录物、蛋白或多肽）的水平升高。另外，可以上调或下调诸如信号转导或代谢途径等途径。

[0117] 一旦通过任意方法（基因组或蛋白质组或其组合）将受试者鉴别为急性排斥者

或处于变成急性排斥者的风险中,可以应用治疗措施以改变受试者对同种异体移植物的免疫应答。受试者可以更频繁地接受临床值的其它监视,或使用更灵敏的监视方法。另外,可以给受试者施用免疫抑制药物以降低或增强受试者的免疫应答。尽管需要抑制受试者的免疫应答来预防同种异体移植物的排斥,也需要适当水平的免疫功能来保护免于机会性感染。可以施用给受试者的不同的药物是已知的;参见例如, Goodman 和 Gilman 的 *The Pharmacological Basis of Therapeutics* 第 11 版. 第 52 章, 1405-1431 页和其中的参考文献; LL Brunton, JS Lazo, KL Parker 编。阐述本领域技术人员已知的医学生理学和药理学的一般原理的标准参考文献包括: Fauci 等人编, *Harrison's Principles Of Internal Medicine*, 第 14 版, McGraw-Hill Companies, Inc. (1998)。其它预防性和治疗性策略综述在医学文献中——参见, 例如 Djamali 等人, 2006. *Clin J Am Soc Nephrol* 1:623-630。

[0118] 基因组核酸表达图谱

[0119] 如本发明提供的诊断受试者的急性同种异体移植排斥的方法包含: 1) 测定来自受试者的生物样品中的至少一种或多种标志物的表达图谱, 所述标志物选自在表 2 中显示的组; 2) 将至少一种或多种标志物的表达图谱与无排斥者图谱进行对比; 和 3) 确定至少一种或多种标志物的表达水平是否相对于对照图谱上调(升高)或下调(降低), 其中至少一种或多种标志物的上调或下调是排斥状态的指示。

[0120] 本发明也提供了如本发明提供的预测、评估或诊断受试者的肾同种异体移植排斥的方法, 该方法包含: 1) 测量选自在表 2 中显示的组的至少一种或多种标志物的升高或降低; 和 2) 测定受试者的“排斥状态”, 其中受试者的“排斥状态”的测定是基于受试者的标志物表达图谱与对照标志物表达图谱的对比。

[0121] 本文使用的短语“基因表达数据”、“基因表达图谱”或“标志物表达图谱”是指, 关于生物样品中的基因或基因集合的表达的相对或绝对水平的信息。基于从该基因编码的 RNA (例如 mRNA) 的水平, 可以测定基因的表达水平。或者, 基于从该基因编码的多肽或其片段的水平, 可以测定表达水平。

[0122] 本文使用的“多核苷酸”、“寡核苷酸”、“核酸”或“核苷酸聚合物”可以包括合成的或混合的核酸聚合物, 包括 RNA、DNA 或 RNA 和 DNA 二者, 正义和反义链二者, 且可以被化学地或生化地修饰, 或可以含有非天然的或衍生化的核苷酸碱基, 如本领域技术人员会容易地明白的。这样的修饰包括, 例如, 标记、甲基化、用类似物置换一个或多个天然存在的核苷酸、核苷酸间修饰例如不带电荷的连接(例如, 膦酸甲酯、膦酸三酯、氨基磷酸酯、氨甲酸酯等)、带电荷的连接(例如, 硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等)、悬垂部分(例如, 多肽)和修饰的连接(例如, α 异头的多核苷酸等)。还包括在通过氢键合和其它化学相互作用结合指定序列的能力方面模仿多核苷酸的合成分子。

[0123] 寡核苷酸包括不同长度的核酸, 它们可以用作探针、引物, 以及微阵列(阵列)的生产中, 用于检测和/或扩增特定的核酸。寡核苷酸可以包含 DNA、RNA、PNA 或在例如 US 5,948,902 中所述的其它多核苷酸部分。通过依次添加(5' -3' 或 3' -5') 激活的单体到生长链(其可以连接至不溶性载体)上, 可以合成这样的 DNA 或 RNA 链。本领域已知许多合成寡核苷酸的方法, 所述寡核苷酸用于随后的单独使用或作为不溶性载体的一部分, 例如用于阵列中 (Lashkari DA. 等人 *PNAS*(1995)92(17):7912-5; McGall G. 等人 *PNAS*(1996)93(24):13555-60; Albert TJ. 等人 *Nucleic Acid Res.* (2003)31(7):e35; Gao

X. 等人 *Biopolymers* (2004) 73(5) :579-96 ; 和 Moorcroft MJ. 等人 *Nucleic Acid Res.* (2005) 33(8) :e75 和其中的参考文献)。一般而言,取决于使用的方法,在多种条件下,通过逐步添加激活的和受保护的单体合成寡核苷酸。随后,可以去除特异性的保护基,以实现进一步延伸,且随后,一旦结束合成,可以去除所有保护基,如果需要,将寡核苷酸从它们的固体载体上取下,以纯化完整链。

[0124] “基因”是位于特定染色体上的特定位置的核苷酸的有序序列,其编码特定的功能产物,且可以包括在编码区附近(编码序列的 5' 和 3') 的不翻译和不转录序列以及外显子和 / 或内含子。这样的非编码序列可以含有序列的转录和翻译或内含子的剪接所需的调节序列,例如,或还可以具有除了发生目标突变之外的归因于它们的任意功能。基因也可以包括一个或多个启动子、增强子、转录因子结合位点、终止信号或其它调节元件。

[0125] 术语“微阵列”、“阵列”或“芯片”是指多个确定的核酸探针,它们在确定的位置偶联到基质表面上。所述基质可以是固体基质。本领域已经普遍地描述了微阵列,见例如,美国专利号 5, 143, 854 (Pirrung) ; Fodor 的 5, 424, 186、5, 445, 934、5, 744, 305 和 5, 800, 992, Winkler 的 5, 677, 195 和 6, 040, 193, 和 Fodor 等人 1991 (*Science*, 251 :767-777)。这些参考文献每篇通过引用整体并入本文。

[0126] “杂交”包括这样的反应,其中一种或多种多核苷酸和 / 或寡核苷酸以有序方式(序列特异性的)相互作用,形成通过氢键合(也称作“Watson-Crick”碱基配对)稳定化的复合物。通过非经典的氢键合,包括 Hoogsteen 碱基配对,也可能发生不同的碱基配对。在某些热力学的、离子的或 pH 条件下,可能产生三重螺旋,特别是与核糖核酸。这些和其它不同的氢键合或碱基配对是本领域已知的,且可以参见,例如, *Lehninger-Principles of Biochemistry*, 第 3 版 (Nelson 和 Cox 编. Worth Publishers, New York.), 通过引用并入本文。

[0127] 杂交反应可以在不同“严格性”的条件下进行。杂交反应的严格性可以决定任意两个核酸分子彼此杂交的容易性或难度。可以提高严格性,例如,通过升高进行杂交的温度,通过降低进行杂交的离子(盐)浓度,或其组合。在严格的条件下,彼此具有至少 60%、65%、70%、75% 或更高同一性的核酸分子保持彼此杂交,而具有低同一性百分比的分子通常不保持杂交。严格的杂交条件的一个实例是,在 6x 氯化钠 / 柠檬酸钠 (SSC) 中在约 44-45°C 杂交,然后在 50°C、55°C、60°C、65°C 或其间的温度、在 0. 2xSSC、0. 1% SDS 中洗涤一次或多次。

[0128] 两个核酸之间的杂交可以以反平行构型进行——这称作“退火”,且配对的核酸描述为互补的。如果在第一个多核苷酸的一条链和第二个多核苷酸的一条链之间可以发生杂交,则双链多核苷酸可能是“互补的”。一条多核苷酸与另一条多核苷酸的互补程度称作同源性,且根据普遍接受的碱基配对规则,在预期彼此氢键合的相对链中的碱基比例方面是可定量的。

[0129] 一般而言,序列特异性的杂交包含杂交探针,其能与确定的序列特异性地杂交。这样的探针可以设计为区分相差仅一个或几个核苷酸的序列,从而提供高度特异性。偶联检测和序列辨别的策略是使用“分子信标”,其中杂交探针(分子信标)具有 3' 和 / 或 5' 报道分子和猝灭剂分子和互补的 3' 和 5' 序列,使得不存在插入序列的适当结合靶物时,探针将形成发夹环。发夹环使报道分子和猝灭剂紧密靠近,导致荧光体(报道分子)的猝灭,

这会减少荧光发射。但是,当分子信标与靶物杂交时,荧光体和猝灭剂充分分开,以允许从荧光体发射荧光。

[0130] 在杂交中使用的探针可以包括双链 DNA、单链 DNA 和 RNA 寡核苷酸和肽核酸。在本领域描述了用于鉴别与特定探针杂交的标志物的杂交条件和方法——参见,例如, Brown, T. “Hybridization Analysis of DNA Blots” 见 *Current Protocols in Molecular Biology*. FM Ausubel 等人编. Wiley & Sons, 2003. doi :10. 1002/0471142727. mb0210s21。根据本发明使用的合适的杂交探针包括寡核苷酸、多核苷酸或修饰的核酸,其长度为约 10 至约 400 个核苷酸,或者约 20 至约 200 个核苷酸或约 30 至约 100 个核苷酸。

[0131] 通过与引物或探针杂交,并随后检测该杂交,可以鉴别特定序列。

[0132] “引物”包括短的多核苷酸,通常具有游离 3' -OH 基团,其通过与靶物杂交而结合目标样品中存在的靶物或“模板”,此后促进与靶物互补的多核苷酸的聚合。“聚合酶链式反应”(PCR) 是这样的反应,其中使用由“上游”和“下游”引物组成的“引物对”或“引物集合”、和聚合催化剂(例如 DNA 聚合酶和典型地热稳定的聚合酶),用目标多核苷酸制备复制拷贝。PCR 方法是本领域熟知的,且教导在,例如, Beverly, SM. *Enzymatic Amplification of RNA by PCR (RT-PCR)*, 见 *Current Protocols in Molecular Biology*. FM Ausubel 等人编. Wiley & Sons, 2003. doi :10. 1002/0471142727. mb1505s56。复制拷贝的合成可以包括,掺入具有标记或标签(例如,荧光分子、生物素或放射性分子)的核苷酸。使用常规方法,通过这些标签,可以随后检测复制拷贝。

[0133] 引物也可以用作杂交反应(例如 Southern 或 Northern 印迹分析)中的探针(参见,例如, Sambrook, J., Fritsh, E. F., 和 Maniatis, T. *Molecular Cloning :A Laboratory Manual*. 第 2 版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989)。

[0134] 本文使用的“探针集合”(或有时“引物集合”)是指一组寡核苷酸,其可以用于检测核酸分子(核酸标志物)在样品中的存在;检测可以是定量的或半定量的。检测可以例如,通过扩增(如在 PCR 和 RT-PCR 中),或通过杂交(如在微阵列上),或通过选择性破坏和保护(如在基于单链或双链核酸的选择性酶降解的测定中)。可以用一种或多种荧光的、放射性的或其它可检测的部分(包括酶)标记探针集合中的探针。探针可以是任意大小,只要探针足够大,能够选择性地检测目标基因——通常从约 15 个至约 25 个或至约 30 个核苷酸的大小是足够的大小。探针集合可以在溶液中,例如用于多路 PCR。或者,探针集合可以结合在固体表面,如在阵列或微阵列中。探针集合可以检测全长基因、全长基因的剪接变体、转录单位、或基因或转录单位的片段的表达水平。探针集合会鉴别在样品中存在的核酸标志物。

[0135] 在本发明的某些实施方案中,提供了探针集合,其用于检测由核酸标志物集合表达的核酸,所述核酸标志物集合包含 TncRNA、FKSG49、ZNF438、SFRS16、1558448_a_at、CAMKK2、NFYC、NCOA3、LMAN2、PGS1、NEDD9、237442_at、FKSG49/LOC730444、LIMK2、UNB、NASP、PR01073、240057_at、ITGAX、LOC730399/LOC731974、FKBP1A、HLA-G、RBMS1 和 SLC6A6 中的一个或多个。这样的探针集合可以用于测定受试者的排斥状态。探针集合可以包含一个或多个引物对,其用于特异性地扩增(例如 PCR 或 RT-PCR)与 TncRNA、FKSG49、ZNF438、SFRS16、1558448_a_at、CAMKK2、NFYC、NCOA3、LMAN2、PGS1、NEDD9、237442_at、FKSG49/LOC730444、

LIMK2、UNB、NASP、PR01073、240057_at、ITGAX、LOC730399/LOC731974、FKBP1A、HLA-G、RBMS1 和 SLC6A6 中的一个或多个相对应的核酸序列。在本发明的另一个实施方案中,探针集合是微阵列的一部分。在本发明的另一个实施方案中,核酸标志物包括 TncRNA、FKSG49、ZNF438、1558448_a_at、CAMKK2、LMAN2、237442_at、FKSG49/LOC730444、JUNB、PR01073 和 ITGAX 中的一个或多个。下面更详细地描述标志物。

[0136] 应当理解,许多用于序列辨别和检测的其它方法是本领域已知的,下面进一步详细描述了其中的一些。还应当理解,诸如阵列化的引物延伸微型测序、标签微阵列和序列特异性的延伸等反应,可以在微阵列上进行。一种这样的基于阵列的基因分型平台是基于微球的 Tag-it 高通量阵列 (Bortolin S. 等人 2004 *Clinical Chemistry* 50 :2028-36)。该方法通过 PCR,然后用一般标记的引物进行序列特异性的引物延伸来扩增基因组 DNA。然后在 Tag-It 阵列上分选产物,并使用 Luminex xMAP 系统检测。

[0137] 本领域技术人员会明白,序列内核苷酸的任意数字编号都与特定序列有关。同样,根据给序列编号的方式和选择的序列,可以给同一位置分配不同的数字编号。此外,序列突变(例如插入或缺失)可能改变相对位置,并从而改变在突变位点处和附近的特定核苷酸的数字编号。例如,由登记号例如 AC124566、AF211864、AI035495、AI326085、AK089167、AK131133、AK155816、AK170432、BC042840 和 BC057200 表示的序列都代表人 ITGAX 核苷酸序列,但是它们之间可能具有一些序列差异和编号差异。作为另一个实例,由登记号 NP_115925、NP_444509、P20702、NP_776169、NP_000878、NP_001706、NP_04223、AAA59180、AAA51620 表示的序列都代表人 ITGAX 多肽序列,但是它们之间可能具有一些序列差异和编号差异。其它核酸标志物可能具有变体,且在下面描述。

[0138] 当提供了目标基因的一个或多个核酸序列时,选择和 / 或设计用于特异性地检测任意目标基因(包括任意的上述基因)的表达的探针、引物或探针集合,属于相关领域的技术人员的能力之内。此外,几个探针、引物或探针集合中的任一个,或多个探针、引物或探针集合,可以用于检测目标基因,例如,一个阵列可以包括针对单个基因转录物的多个探针——本文所述的本发明的方面不限于例证的任何具体探针。

[0139] 使用核苷酸序列对比程序(对于 DNA 或 RNA 序列、或其片段或部分)或氨基酸序列对比程序(对于蛋白、多肽或肽序列、或其片段或部分),例如在 DNASIS 中提供的那些(例如,但不限于,使用下述参数:GAP 罚分 5,顶对角线的数目 5,固定的 GAP 罚分 10,k-元组 2,浮动缺口 10,和窗口大小 5),可以测定序列同一性或序列相似性。但是,用于对比的其它序列比对方法是本领域熟知的,例如 Smith & Waterman(1981, *Adv. Appl. Math.* 2 :482)、Needleman & Wunsch(*J. Mol. Biol.* 48 :443, 1970)、Pearson & Lipman(1988, *Proc. Nat' l. Acad. Sci. USA* 85 :2444)的算法,和通过这些算法的计算机化执行(例如 GAP、BESTFIT、FASTA 和 BLAST),或通过手工比对和目检。

[0140] 如果鉴别出了核酸或基因、多肽或目标序列且提供了该序列的一部分或片段(或基因、多肽等的序列),使用上面例证的程序,可以鉴别出类似的、或基本上类似的其它序列。例如,当构建微阵列或探针序列时,序列和位置是已知的,从而,如果微阵列实验鉴别出“击中”(在特定位置的探针与样品中的一种或多种核酸杂交),将知道探针的序列(通过微阵列的生产商或制作者,或通过由生产商提供的数据库——例如 Affymetrix(人类基因组 U133 Plus 2.0 阵列的生产商)的 NetAffx 数据库)。如果没有提供序列来源的特性,可以通

过在基于序列的一个或多个数据库搜索中使用探针序列进行测定。对于通过蛋白质组学测定（例如 iTRAQ）鉴别出的肽或肽片段，所述肽或片段的序列可以用于查询如上所述的氨基酸序列数据库。这样的数据库的实例包括由国家生物技术信息中心 (National Centre for Biotechnology Information) 维持的那些，或由瑞士生物信息学研究所 (Swiss Institute of Bioinformatics)、桑格中心 (the Sanger Centre) 或欧洲生物信息学研究所 (European Bioinformatics Institute) 维持的那些，例如国际蛋白索引 (IPI)。

[0141] 当它的序列可以与在相同种系发生的物种、属、科或目中发现的其它序列区分开时，可以认为特异性地鉴别出了蛋白或多肽、核酸或其片段或部分。通过序列对比可以鉴别出这样的分化。使用 BLAST 算法 (Altschul 等人 1990. *J. Mol Biol* 215 :403-410)，可以进行一个或多个序列的对比。BLAST 搜索允许将查询序列与特定序列或序列组进行对比，或与更大的序列文库或数据库（例如 GenBank 或 GenPept）进行对比，并且不仅鉴别表现出 100% 同一性的序列，而且鉴别具有更低程度同一性的那些。例如，关于具有多个同种型（源自例如分开的基因或来自基因的核酸转录物的变体剪接或翻译后加工）的蛋白，当通过特异性地检测在一种同种型中存在且在一种或多种其它同种型中不存在或不可检测的结构、序列或基序，将它与来自相同或不同物种的其它同种型区分开时，可以特异性地鉴别出同种型。

[0142] 本发明方法的使用，可以由例如执行单个标志物检验的临床实验室或其它检测机构提供给最终用户——将生物样品提供给所述机构，在那里进行单个检验和分析，并应用预测方法；或者，医学从业人员可以从临床实验室接收标志物值，并使用当地的仪器或基于因特网的仪器来使用本发明的预测方法。

[0143] 统计参数（例如多个中间值、标准误差、标准差等）的测定，以及本文所述的其它统计分析是已知的，且在相关领域的熟练人员的技能范围内。特定系数、值或指数的使用仅是示例性的，无意对本文公开的本发明的不同方面构成限制。

[0144] 从例如微阵列实验或复杂的 RT-PCR 实验得到的庞大基因表达数据的解释可能是一项艰难的任务，但是通过使用算法和统计工具（其设计为以突出系统特征的方式组织数据），可以得到极大的促进。可视化工具也具有显示差别表达的价值，例如，通过改变颜色的强度和色调 (Eisen 等人 1998. *Proc Natl Acad Sci* 95 :14863-14868)。随着阵列和得到的数据集的复杂性的增加，以及随着处理速度、计算机存储器的提高和它们的成本的相对降低，可利用的算法和统计工具的复杂度已经增加。

[0145] 核酸或蛋白表达图谱的数学和统计分析可以完成几件事情——在一条途径或生物系统的结构域中表现出协同调节的基因群体的鉴别、两个或更多个生物样品之间的相似性和差别的鉴别、区分受试者中的特定事件或过程的基因表达图谱特征的鉴别，等。这可以包括，评估治疗方案的效能或治疗方案中的变化、监视或检测特定病状的发展、区分两种临床上类似的（或几乎相同的）病状等。

[0146] 聚簇分析方法是已知的，且已经应用于微阵列数据集，例如，分级聚簇分析、自组织图谱、k-工具或确定性退火 (Eisen 等人, 1998 *Proc Natl Acad Sci USA* 95 : 14863-14868 ; Tamayo, P. 等人 1999. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 :2907-2912 ; Tavazoie, S. 等人 1999. *Nat Genet* 22 :281-285 ; Alon, U. 等人 1999. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 : 6745-6750)。这样的方法可以用于鉴别表现出协同调节的基因表达图谱中的基因群体，也可以用于鉴别功能未知的新基因，所述基因可能参与与表现出协同调节的其它基因相同的

途径或系统。

[0147] 生物样品中的核酸或蛋白表达的模式也可以提供它的功能状态和特性的特征性的和可获得的分子图像。具有相关的基因表达模式的两个不同样品可能彼此在生物学上和和功能上类似,反之,在核酸或蛋白质组表达模式中表现出显著差异的两个样品,不仅可以表现出表现的复杂表达模式来区分,而且可以指示基因产物或转录物的诊断子集,它们是特定病理状态或其它生理状况(例如同种异体移植物排斥)的指示。

[0148] 将多个数学和/或统计分析方法应用于微阵列数据集,可以指示重要标志物的不同子集,导致关于哪种方法“最好”或“更精确”的不确定性。无论数学,数据集中的根本生物学是相同的。通过将多个数学和/或统计方法应用于微阵列数据集,并评估各自的统计上显著的子集(对于共同标志物至所有),可以减少不确定性,并鉴别出临床上有关的标志物核心组。

[0149] 基因组表达图谱标志物

[0150] 本发明提供了核酸标志物的核心组,其可用于评估或诊断同种异体移植物排斥、包括急性肾同种异体移植物排斥,其包含一种或超过一种表 2 所示的核酸标志物,且可以包括 TncRNA、FKSG49、ZNF438、SFRS16、1558448_a_at、CAMKK2、NFYC、NCOA3、LMAN2、PGS1、NEDD9、237442_at、FKSG49/LOC730444、LIMK2、UNB、NASP、PR01073、240057_at、ITGAX、LOC730399/LOC731974、FKBP1A、HLA-G、RBMS1 和 SLC6A6 中的一种或超过一种。

[0151] 在应用的所有 3 个适度化的 t- 检验 (moderated t-test) 中比较排斥 (AR) 样品和无排斥移植 (NR) 对照,检测、定量和发现了 183 探针集合表现出统计上显著的差异,假发现率 (FDR) 低于 1%,且可以代表感兴趣的基因或转录物的升高/上调或降低/下调。这些探针集合会特异性地检测(通过标记的杂交和检测)并允许对表达的核酸的表达水平进行定量。在该代表 183 个单个表达的转录物或核酸的 183 集合(在表 2 中列出)中,在应用的所有 3 个适度化的 t- 检验中,检测、定量和发现了 24 探针集合的子集(表 5)与无排斥移植 (NR) 对照相比在 AR 样品中表现出统计上显著的变化倍数,且可以代表感兴趣的基因或转录物的升高/上调或降低/下调。在这些 24 探针集合中,至少 18 个检测出特定基因(已知的,或已知但是未描述)基因或转录物。图 10 提供了通过在表 2 和 5 中列出的探针集合鉴别出的一部分核酸的核酸序列信息。

[0152] 在某些实施方案中,本发明提供了评估、监视、预测或诊断同种异体移植物排斥(包括急性肾同种异体移植物排斥)的方法,其包含,测量选自表 2 所列的组且被所示的基因标识表示的至少一种或多种标志物或探针集合的表达水平。这些探针集合与基因标识指示的单个和独特基因或基因片段的表达水平有关,且可以特异性地测量所述表达水平。

[0153] 在表 2 或 5 中所示的基因或标志物可能在同种异体移植物排斥过程中具有生物学作用,且代表治疗靶标。

[0154] 在另一个实施方案中,本发明提供了一组核酸标志物,其可用于评估或诊断急性同种异体移植物排斥、包括肾同种异体移植物排斥,其包含 TncRNA、FKSG49、ZNF438、SFRS16、1558448_a_at、CAMKK2、NFYC、NCOA3、LMAN2、PGS1、NEDD9、237442_at、FKSG49/LOC730444、LIMK2、UNB、NASP、PR01073、240057_at、ITGAX、LOC730399/LOC731974、FKBP1A、HLA-G、RBMS1 和 SLC6A6 中的一种或超过一种。

[0155] 在另一个实施方案中,本发明提供了选自该组 24 种标志物的子集,其可以用于

评估、监视、预测或诊断同种异体移植物排斥、包括急性肾同种异体移植物排斥,其包含 TncRNA、FKSG49、ZNF438、1558448_a_at、CAMKK2、LMAN2、237442_at、FKSG49/LOC730444、JUNB、PR01073 和 ITGAX 中的一种或超过一种。

[0156] 在另一个实施方案中,本发明提供了选自该组 24 种标志物的子集,其可以用于评估、监视、预测或诊断同种异体移植物排斥、包括急性肾同种异体移植物排斥,其包含 TncRNA、FKSG49、ZNF438、1558448_a_at、CAMKK2、LMAN2、237442_at、FKSG49/LOC730444、JUNB、PR01073 和 ITGAX 和下述的一种或超过一种 :SFRS16、NFYC、NCOA3、PGS1、NEDD9、LIMK2、NASP、240057_at、LOC730399/LOC731974、FKBP1A、HLA-G、RBMS1 和 SLC6A6。一种或超过一种包括 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 或更多。

[0157] 实施例 1-3 的结果解释了上述实施方案——24 核酸分类器集合 (TncRNA、FKSG49、ZNF438、1558448_a_at、CAMKK2、LMAN2、237442_at、FKSG49/LOC730444、JUNB、PR01073、ITGAX ;SFRS16、NFYC、NCOA3、PGS1、NEDD9、LIMK2、NASP、240057_at、LOC730399/LOC731974、FKBP1A、HLA-G、RBMS1 和 SLC6A6) 可用于辨别急性排斥受试者和无排斥受试者。24 种的集合中的一种或超过一种的任意组合也可以用于辨别急性排斥受试者和无排斥受试者。11 种核酸标志物 (TncRNA、FKSG49、ZNF438、1558448_a_at、CAMKK2、LMAN2、237442_at、FKSG49/LOC730444、JUNB、PR01073 和 ITGAX) 的交叉集合也可以用于辨别急性排斥受试者和无排斥受试者。

[0158]

表 2: 差别表达的探针集合, 在 AR 和 NR 受试者之间表现出约 1.39 至 1.4-倍差异(或更大)。靶序列是从中选择探针序列的共有序列或示例序列的一部分 (Affymetrix™ NetAffx™ 注解数据库升级版 25, 2008 年 3 月)。共有序列或示例序列是在设计阵列时用于代表 GeneChip U133 2.0 探针集合测量的转录物的序列。共有序列源自碱基调用 (base-calling) 算法, 该算法比对序列数据并将它们合并成组。示例序列是每个基因的代表性的 cDNA 序列。

Affymetrix 探针集合 ID	基因标识	基因名称	RefSeq 登记号	log2(变化倍数)	变化倍数	方向 (AR 相对于 NR)	FDR 值	代表性序列 (SEQ ID NO:)
1552264_a_at	MAPK1	丝裂原-激活的蛋白激酶 1	NM_002745 NM_138957	0.73	1.66	上调	0.00749	1
1552542_s_at	TAGAP	T-细胞活化 GTP 酶激活蛋白	NM_054114 NM_138810 NM_152133	0.95	1.93	上调	0.00996	2
1553186_x_at	RASEF	含有 RAS 和 EF-手结构域的	NM_152573	1.12	2.18	上调	0.00760	3
1553297_a_at	CSF3R	集落刺激因子 3 受体 (粒细胞)	NM_000760 NM_156038 NM_156039 NM_172313	0.81	1.76	上调	0.00574	4
1554691_a_at	PACSIN2	神经元 2 中的蛋白激酶 C 和酪蛋白激酶底物	NM_007229	0.74	1.67	上调	0.00574	5
1555420_a_at	KLF7	Kruppel-样因子 7 (普遍存在的)	NM_003709	1.08	2.11	上调	0.00638	6
1555467_a_at	CUGBP1	CUG 三联体重复, RNA 结合蛋白 1	NM_001025596 NM_006560 NM_198700	0.79	1.73	上调	0.00363	7
1555797_a_at	ARPC5	肌动蛋白相关的蛋白 2/3 复合物, 亚基 5, 16kDa	NM_005717	0.76	1.70	上调	0.00711	8
1555852_at	1555852_at	---	--	0.90	1.87	上调	0.00721	9
1555950_a_at	CD55	CD55 分子, 补体的衰变加速因子 (Cromer 血型)	NM_000574	0.85	1.80	上调	0.00703	10

[0159]

1557924_s_at	ALPL	碱性磷酸酶, 肝/骨/肾	NM_000478	0.77	1.71	上调	0.00758	11
1558448_a_at	1558448_a_at	CDNA FLJ35687 fis, 克隆 SPLEN2019349	---	0.79	1.73	上调	0.00677	12
1563509_at	1563509_at	MRNA; cDNA DKFZp313O229 (来自克隆 DKFZp313O229)	---	0.84	1.79	上调	0.00219	13
1565484_x_at	EGFR	表皮生长因子受体 (成红细胞 白血病病毒的(v-erb-b)癌 基因同系物, 禽)	NM_005228 NM_201282 NM_201283 NM_201284	-1.23	2.35	下调	0.00562	14
1565599_at	1565599_at	克隆 23712 mRNA 序列	---	0.49	1.40	上调	0.00760	15
1565717_s_at	FUS	融合体(参与恶性脂肪肉瘤中 的t(12;16))	NM_001010850 NM_004960	1.04	2.06	上调	0.00375	16
1568609_s_at	FAM91A2 /FLJ39739 /LOC7278 20	具有序列相似性 91 的家族, 成员 A2 假定的 FLJ39739 假定的蛋白 LOC727820	NM_207400 XM_001125827 XM_934503	0.87	1.83	上调	0.00703	17
1569003_at	TMEM49	跨膜蛋白 49	NM_030938	0.95	1.94	上调	0.00769	18
200709_at	FKBP1A	FK506 结合蛋白 1A, 12kDa	NM_000801 NM_054014	0.59	1.50	上调	0.00775	19
200739_s_at	SUMO3	mif 2 个 3 同系物 3 的 SMT3 抑制基因 (酿酒酵母)	NM_006936	0.59	1.50	上调	0.00711	20
200796_s_at	MCL1	髓样细胞白血病病序列 1 (BCL2-有关的)	NM_021960 NM_182763	1.32	2.50	上调	0.00269	21
200797_s_at	MCL1	髓样细胞白血病病序列 1 (BCL2-有关的)	NM_021960 NM_182763	0.60	1.52	上调	0.00872	22
200805_at	LMAN2	凝集素, 结合甘露糖的 2	NM_006816	0.72	1.64	上调	0.00265	23

[0160]

200852_x_at	GNB2	鸟嘌呤核苷酸结合蛋白(G蛋白), β 多肽 2	NM_005273	0.53	1.44	上调	0.00872	24
200904_at	HLA-E	主要组织相容性复合物, I类, E	NM_005516	0.66	1.58	上调	0.00760	25
200959_at	FUS	融合体(参与恶性脂肪肉瘤中的 $\tau(12;16)$)	NM_001010850 NM_004960	0.74	1.67	上调	0.00254	26
201043_s_at	ANP32A	酸性(富含亮氨酸的)核磷蛋白 32 家族, 成员 A	NM_006305	0.81	1.75	上调	0.00087	27
201090_x_at	TUBA1B	微管蛋白, $\alpha 1b$	NM_006082	0.63	1.55	上调	0.00468	28
201440_at	DDX23	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) 盒多肽 23	NM_004818	0.54	1.46	上调	0.00826	29
201473_at	JUNB	jun B 原癌基因	NM_002229	0.76	1.69	上调	0.00638	30
201531_at	ZFP36	锌指蛋白 36, C3H 型, 同系物(小鼠)	NM_003407	0.86	1.81	上调	0.00265	31
201651_s_at	PACSIN2	神经元 2 中的蛋白激酶 C 和酪蛋白激酶底物	NM_007229	0.68	1.60	上调	0.00891	32
201729_s_at	KIAA0100	KIAA0100	NM_014680	0.59	1.51	上调	0.00711	33
201861_s_at	LRRFIP1	富含亮氨酸的重复(在 FLII 中)相互作用蛋白 1	NM_004735	1.11	2.16	上调	0.00222	34
201950_x_at	CAPZB	帽化蛋白(肌动蛋白丝) 肌肉 Z-线, β	NM_004930	0.70	1.62	上调	0.00872	35
201954_at	ARPC1B/ LOC6538 88	肌动蛋白相关的蛋白 2/3 复合物, 亚基 1B, 41kDa 类似于肌动蛋白-有关的蛋白 2/3 复合物亚基 1B (ARP2/3 复合物 41 kDa 亚基) (p41-ARC)	NM_005720 XM_936251	0.68	1.60	上调	0.00219	36

[0161]

201970_s_at	NASP	核自身抗原精子蛋白(组蛋白-结合的)	NM_002482 NM_152298 NM_172164	0.52	1.43	上调	0.00917	37
202150_s_at	NEDD9	神经前体细胞表达的, 发育下调的 9	NM_006403 NM_182966	0.49	1.40	上调	0.00879	38
202180_s_at	MVP	主要穹窿蛋白	NM_005115 NM_017458	0.82	1.77	上调	0.00703	39
202216_x_at	NFYC	核转录因子 Y, γ	NM_014223	0.55	1.46	上调	0.00775	40
202423_at	MYST3	MYST 组蛋白乙酰转移酶(单核细胞性白血病) 3	NM_001099412 NM_001099413 NM_006766	0.52	1.43	上调	0.00798	41
202510_s_at	TNFAIP2	肿瘤坏死因子, α -诱导的蛋白 2	NM_006291	0.86	1.81	上调	0.00465	42
202531_at	IRF1	干扰素调节因子 1	NM_002198	0.85	1.81	上调	0.00998	43
202897_at	SIRPA	信号调节蛋白 α	NM_001040022 NM_001040023 NM_080792	0.99	1.99	上调	0.00219	44
202910_s_at	CD97	CD97 分子	NM_001025160 NM_001784 NM_078481	0.93	1.90	上调	0.00760	45
202951_at	STK38	丝氨酸/苏氨酸激酶 38	NM_007271	0.78	1.71	上调	0.00879	46
203233_at	IL4R	白介素 4 受体	NM_000418 NM_001008699	0.92	1.90	上调	0.00912	47
203239_s_at	CNOT3	CCR4-NOT 转录复合物, 亚基 3	NM_014516	0.69	1.61	上调	0.00857	48
203254_s_at	TLN1	踝蛋白 1	NM_006289	0.83	1.78	上调	0.00434	49
203471_s_at	PLEK	普列克底物蛋白	NM_002664	0.80	1.74	上调	0.00879	50
203509_at	SORL1	分拣蛋白 - 有关的受体, L(DLR 类) A 重复-含有的	NM_003105	0.68	1.60	上调	0.00652	51

[0162]

203591_s_at	CSF3R	集落刺激因子 3 受体 (粒细胞)	NM_000760 NM_156038 NM_156039 NM_172313	0.88	1.85	上调	0.00638	52
203624_at	SFRS17A	剪接因子, 富含精氨酸/丝氨酸的 17A	NM_005088	0.72	1.65	上调	0.00972	53
203748_x_at	RBMS1	RNA 结合基序, 单链相互作用蛋白 1	NM_002897 NM_016836 NM_016839	0.80	1.74	上调	0.00219	54
204166_at	SBNO2	草莓刻痕同系物 2 (果蝇)	NM_001100122 NM_014963	0.80	1.74	上调	0.00314	55
204978_at	SFRS16	剪接因子, 富含精氨酸/丝氨酸的 16	NM_007056	0.76	1.70	上调	0.00552	56
205220_at	GPR109B	G 蛋白-偶联的受体 109B	NM_006018 XM_001134375	1.15	2.22	上调	0.00552	57
205285_s_at	FYB	FYN 结合蛋白(FYB-120/130)	NM_001465 NM_199335	0.62	1.53	上调	0.00872	58
205539_at	AVIL	advillin	NM_006576	0.92	1.89	上调	0.00087	59
205921_s_at	SLC6A6	溶质载体家族 6 (神经递质运载蛋白, 牛磺酸), 成员 6	NM_003043	0.65	1.57	上调	0.00756	60
206130_s_at	ASGR2	唾液酸糖蛋白受体 2	NM_001181 NM_080912 NM_080913 NM_080914	0.83	1.78	上调	0.00419	61
206323_x_at	OPHN1	oligophrenin 1	NM_002547	0.57	1.48	上调	0.00922	62
207127_s_at	HNRPH3	异质核内核糖核蛋白 H3 (2H9)	NM_012207 NM_021644	0.64	1.56	上调	0.00749	63
207266_x_at	RBMS1	RNA 结合基序, 单链相互作用蛋白 1	NM_002897 NM_016836 NM_016839	0.92	1.89	上调	0.00222	64

[0163]

207446_at	TLR6	toil-样受体 6	NM_006068	0.78	1.72	上调	0.00470	65
207643_s_at	TNFRSF1A	肿瘤坏死因子受体超家族, 成员 1A	NM_001065	0.77	1.71	上调	0.00288	66
207782_s_at	PSENI	早老素 1 (阿尔茨海默病 3)	NM_000021	0.70	1.63	上调	0.00971	67
208018_s_at	HCK	造血细胞激酶	NM_002110	0.87	1.83	上调	0.00930	68
208120_x_at	FKSG49/LOC730444	FKSG49 假定的蛋白	XM_001125803	0.56	1.47	上调	0.00356	69
208488_s_at	CR1	补体组分 (3b/4b) 受体 1 (Knops 血型)	NM_000573 NM_000651 XM_001126036	0.78	1.72	上调	0.00749	70
208702_x_at	APLP2	淀粉样蛋白 β (A4)前体-样蛋白 2	NM_001642	0.76	1.69	上调	0.00870	71
208772_at	ANKHD1/MASK-BP3	含有锚蛋白复制和 KH 结构域的 1 MASK-4E-BP3 交替读码框基因	NM_017747 NM_017978 NM_020690 NM_024668	0.85	1.81	上调	0.00775	72
208811_s_at	DNAJB6	DnaJ (Hsp40)同系物, 亚家族 B, 成员 6	NM_005494 NM_058246	0.82	1.77	上调	0.00777	73
208885_at	LCPI	淋巴细胞胞质的蛋白 1 (L-丝束蛋白)	NM_002298	0.77	1.70	上调	0.00912	74
208919_s_at	NADK	NAD 激酶	NM_023018	0.81	1.76	上调	0.00872	75
208922_s_at	NXF1	核 RNA 输出因子 1	NM_001081491 NM_006362	0.64	1.56	上调	0.00703	76
209060_x_at	NCOA3	核受体辅激活物 3	NM_006534 NM_181659	0.83	1.77	上调	0.00652	77
209083_at	CORO1A	冠蛋白, 肌动蛋白结合蛋白, 1A	NM_007074	0.82	1.77	上调	0.00760	78

[0164]

209286_at	CDC42EP 3	CDC42 效应蛋白(Rho GTP 酶 结合) 3	NM_006449	0.91	1.88	上调	0.00222	79
209868_s_at	RBMS1	RNA 结合基序, 单链相互作用 蛋白 1	NM_002897 NM_016836 NM_016839	0.88	1.84	上调	0.00337	80
210184_at	ITGAX	整联蛋白, α X (补体组分 3 受体 4 亚基)	NM_000887 XM_001127869	0.65	1.57	上调	0.00392	81
210190_at	STX11	突触融合蛋白 11	NM_003764	1.00	1.99	上调	0.00684	82
210191_s_at	PHTF1	假定的同源结构域转录因子 1	NM_006608	0.90	1.87	上调	0.00972	83
210483_at	MGC3195 7	假定的蛋白 MGC31957	---	0.59	1.51	上调	0.00652	84
210484_s_at	MGC3195 7/TNFRS F10C	肿瘤坏死因子受体超家族, 成员 10c, 没有胞内结构域 的铯 假定的蛋白 MGC31957	NM_003841	0.89	1.85	上调	0.00262	85
210514_x_at	HLA-G	HLA-G 组织相容性抗原, I 类, G	NM_002127	0.58	1.50	上调	0.00875	86
210563_x_at	CFLAR	CASP8 和 FADD-样细胞凋亡 调节剂	NM_003879	0.83	1.78	上调	0.00722	87
210569_s_at	SIGLEC9	唾液酸结合 Ig-样凝集素 9	NM_014441	0.67	1.59	上调	0.00087	88
210686_x_at	SLC25A1 6	溶质载体家族 25 (线粒体载 体; 格雷夫斯病自身抗原), 成员 16	NM_152707	0.74	1.67	上调	0.00179	89
210754_s_at	LYN	v-yes-1 Yamaguchi 肉瘤病毒 有关的癌基因同系物	NM_002350	0.71	1.64	上调	0.00758	90

[0165]

210787_s_at	CAMKK2	钙/钙调蛋白-依赖性的蛋白 激酶激酶 2, β	NM_006549 NM_153499 NM_153500 NM_172214 NM_172215 NM_172216 NM_172226	0.62	1.54	上调	0.00560	91
210992_x_at	FCGR2C	IgG 的 Fc 片段, 低亲和力和 IIc, (CD32)的受体	NM_001005410 NM_001005411 NM_001005412 NM_201563	0.83	1.77	上调	0.00522	92
211058_x_at	TUBA1B	微管蛋白, α 1b	NM_006082	0.57	1.48	上调	0.00761	93
211072_x_at	TUBA1B	微管蛋白, α 1b	NM_006082	0.60	1.51	上调	0.00409	94
211251_x_at	NFYC	核转录因子 Y, γ	NM_014223	0.49	1.40	上调	0.00888	95
211395_x_at	FCGR2C	IgG 的 Fc 片段, 低亲和力和 IIc, (CD32)的受体	NM_001005410 NM_001005411 NM_001005412 NM_201563	0.84	1.79	上调	0.00562	96
211454_x_at	FKSG49	FKSG49	---	0.75	1.69	上调	0.00087	97
211521_s_at	PSCD4	普列克底物蛋白同源性, Sec7 和卷曲螺旋结构域 4	NM_013385	0.69	1.61	上调	0.00219	98
211571_s_at	VCAN	多能聚糖	NM_004385	1.47	2.77	上调	0.00470	99
211750_x_at	TUBA1C	微管蛋白, α 1c	NM_032704	0.61	1.52	上调	0.00840	100
211787_s_at	EIF4A1	真核生物翻译起始因子 4A, 同 种型 I	NM_001416	0.58	1.50	上调	0.00715	101
211794_at	FYB	FYN 结合蛋白(FYB-120/130)	NM_001465 NM_199335	0.79	1.73	上调	0.00711	102
211795_s_at	FYB	FYN 结合蛋白(FYB-120/130)	NM_001465 NM_199335	1.02	2.03	上调	0.00756	103
211797_s_at	NFYC	核转录因子 Y, γ	NM_014223	0.81	1.76	上调	0.00760	104

[0166]

211823_s_at	PXN	桩蛋白	NM_002859 XM_001132665	0.65	1.57	上调	0.00356	105
211974_x_at	RBPJ	免疫球蛋白 κ J 区的重组信号结合蛋白	NM_005349 NM_015874 NM_203283 NM_203284	0.70	1.63	上调	0.00179	106
211996_s_at	DKFZp547E087/LOC23117/L OC44034 5/LOC440353/LOC613037/LOC728888	KIAA0220-样蛋白假定的基因 LOC283846假定的蛋白 LOC440345类似于蛋白 KIAA0220 的核孔复合物相互作用蛋白假基因	NR_002555 NR_002603 XM_496136 XM_931802 XM_931808 XM_931814 XM_931818 XM_931827 XM_931837 XM_931840 XM_933834 XM_933869 XR_015786 XR_015889	0.88	1.84	上调	0.00711	107
212036_s_at	PNN	pinnin, 桥粒有关的蛋白	NM_002687	1.34	2.53	上调	0.00688	108
212550_at	STAT5B	转录 5B 的信号转导物和激活剂	NM_012448	0.66	1.58	上调	0.00760	109
212639_x_at	TUBA1B	微管蛋白, α 1b	NM_006082	0.65	1.56	上调	0.00369	110
212680_x_at	PPP1R14B	蛋白磷酸酶 1, 调节(抑制剂)亚基 14B	NM_138689	0.77	1.71	上调	0.00519	111

[0167]

212708_at	MSL-1	雄性特异性的致命-1 同系物	NM_001012241 XM_932082 XM_932097 XM_932107 XM_943695 XM_943702	0.80	1.74	上调	0.00826	112
212974_at	DENND3	含有 DENN/MADD 结构域的 3	NM_014957	0.91	1.87	上调	0.00564	113
213505_s_at	SFRS14	剪接因子, 富含精氨酸/丝氨 酸的 14	NM_001017392 NM_014884	0.55	1.46	上调	0.00998	114
213596_at	CASP4	胱天蛋白酶 4, 细胞凋亡-有 关的半胱氨酸蛋白酶	NM_001225 NM_033306 NM_033307	1.00	2.00	上调	0.00996	115
213646_x_at	TUBA1B	微管蛋白, α 1b	NM_006082	0.63	1.55	上调	0.00468	116
214369_s_at	RASGRP 2	RAS 咪基释放蛋白 2 (钙和 DAG-调节的)	NM_001098670 NM_001098671 NM_005825 NM_153819	0.67	1.59	上调	0.00703	117
215210_s_at	DLST/DL STP	二氢硫辛酰胺 S-琥珀酰转移 酶(2-氧-戊二酸酯复合物的 E2 组分) 二氢硫辛酰胺 S- 琥珀酰转移酶假基因 (2-氧- 戊二酸酯复合物的 E2 组分)	NM_001933	0.48	1.39	上调	0.00826	118
215236_s_at	PICALM	磷脂酰肌醇结合网格蛋白菜 配蛋白	NM_001008660 NM_007166	1.21	2.31	上调	0.00869	119
215415_s_at	LYST	溶酶体运输调节剂	NM_000081 NM_001005736	0.74	1.67	上调	0.00369	120
215646_s_at	VCAN	多能聚糖	NM_004385	1.39	2.61	上调	0.00761	121
215760_s_at	SBNO2	草莓刻痕同系物 2 (果蝇)	NM_001100122 NM_014963	0.80	1.74	上调	0.00339	122

[0168]

215832_x_at	PICALM	磷脂酰肌醇结合网格蛋白装配蛋白	NM_001008660 NM_007166	0.71	1.63	上调	0.00879	123
215990_s_at	BCL6	B-细胞 CLL/淋巴瘤 6 (锌指蛋白 51)	NM_001706 NM_138931	1.64	3.13	上调	0.00439	124
216236_s_at	SLC2A14/ SLC2A3	溶质载体家族 2 (促进的葡萄糖运载体蛋白), 成员 3 溶质载体家族 2 (促进的葡萄糖运载体蛋白), 成员 14	NM_006931 NM_153449	0.90	1.86	上调	0.00959	125
216950_s_at	FCGR1A	IgG 的 Fc 片段, 高亲和力和受体 (CD64)	NM_000566	1.44	2.70	上调	0.00653	126
216985_s_at	STX3	突触融合蛋白 3	NM_004177	0.92	1.89	上调	0.00996	127
217436_x_at	LOC7303 99/LOC73 1974	假定的蛋白 LOC730399 假定的蛋白 LOC731974	XR_015561 XR_015670	0.60	1.51	上调	0.00777	128
217475_s_at	LIMK2	LIM 结构域激酶 2	NM_001031801 NM_005569 NM_016733	0.78	1.71	上调	0.00468	129
217507_at	SLC11A1	溶质载体家族 11 (质子-偶联的二价金属离子运载体蛋白), 成员 1	NM_000578	1.09	2.13	上调	0.00864	130
217728_at	S100A6	S100 钙结合蛋白 A6	NM_014624	0.84	1.79	上调	0.00745	131
217992_s_at	EFHD2	EF-手结构域家族, 成员 D2	NM_024329	0.77	1.70	上调	0.00879	132
218157_x_at	CDC42SE 1	CDC42 小效应物 1	NM_001038707 NM_020239	0.72	1.65	上调	0.00591	133
218380_at	NLRP1	NLR 家族, 含有 pyrin 结构域的 1	NM_001033053 NM_014922 NM_033004 NM_033006 NM_033007	0.75	1.68	上调	0.00333	134

[0169]

219100_at	OBFC1	含有寡核苷酸/寡糖-结合折叠的 1	NM_024928	0.69	1.62	上调	0.00998	135
219183_s_at	PSCD4	普列克底物蛋白同源性, Sec7 和卷曲螺旋结构域 4	NM_013385	0.80	1.74	上调	0.00574	136
219394_at	PGS1	磷脂酰甘油磷酸酯合酶 I	NM_024419	1.02	2.03	上调	0.00293	137
220046_s_at	CCNL1	细胞周期蛋白 L1	NM_020307	1.05	2.08	上调	0.00919	138
220305_at	MGC3260	假定的蛋白 MGC3260	NM_024030	0.97	1.96	上调	0.00219	139
220326_s_at	FLJ10357	假定的蛋白 FLJ10357	NM_018071	0.91	1.88	上调	0.00909	140
221432_s_at	SLC25A28	溶质载体家族 25, 成员 28	NM_031212	0.56	1.47	上调	0.00671	141
221695_s_at	MAP3K2	丝裂原-激活的蛋白激酶酶 2	NM_006609 XM_001128799	0.89	1.85	上调	0.00995	142
222244_s_at	TUG1	牛磺酸上调的基因 1	NR_002323	0.57	1.48	上调	0.00711	143
222435_s_at	UBE2J1	泛素-缀合酶 E2, J1 (UBC6 同系物, 酵母)	NM_016021	0.97	1.96	上调	0.00658	144
222955_s_at	FAM45A/ FAM45B/ LOC7318 32	具有序列相似性 45 的家族, 成员 B 具有序列相似性 45 的家族, 成员 A 类似于具有序列相似性 45 的家族, 成员 A	NM_018472 NM_207009 XM_001130983	0.66	1.58	上调	0.00814	145
223009_at	C11orf59	染色体 11 开放读码框 59	NM_017907	0.63	1.55	上调	0.00760	146
223578_x_at	PRO1073	PRO1073 蛋白	--	0.84	1.79	上调	0.00991	147
223591_at	RNF135	环指蛋白 135	NM_032322 NM_197939	0.72	1.64	上调	0.00879	148
224254_x_at	224254_x_at	--	--	0.88	1.84	上调	0.00499	149

[0170]

224566_at	TncRNA	滋养层-衍生的 不编码 RNA	NR_002802	1.33	2.52	上调	0.00536	150
224807_at	GRAMD1 A	含有 GRAM 结构域的 1A	NM_020895	0.74	1.67	上调	0.00219	151
224909_s_at	PREX1	磷脂酰肌醇 3,4,5-三磷酸酯- 依赖性的 RAC 交换剂 1	NM_020820	0.94	1.91	上调	0.00468	152
225673_at	MYADM	髓样-相关的分化标志物	NM_001020818 NM_001020819 NM_001020820 NM_001020821 NM_138373	0.88	1.84	上调	0.00749	153
226266_at	PGS1	磷脂酰甘油磷酸酯合酶 1	NM_024419	0.91	1.88	上调	0.00552	154
226334_s_at	AHSA2	AHA1, 热休克 90kDa 蛋白 ATP 酶同系物 2 的活化剂 (酵母)	NM_152392	1.01	2.01	上调	0.00468	155
226872_at	RFX2	调节因子 X, 2 (影响 HLA II 类表达)	NM_000635 NM_134433	0.81	1.76	上调	0.00879	156
227396_at	PTPRJ	蛋白酪氨酸磷酸酶, 受体型, J	NM_001098503 NM_002843	0.86	1.82	上调	0.00814	157
227490_at	WDFY2	含有 WD 重复序列和 FYVE 结构域的 2	NM_052950	0.51	1.43	上调	0.00342	158
227510_x_at	PRO1073	PRO1073 蛋白	---	1.16	2.24	上调	0.00265	159
227697_at	SOCS3	细胞因子信号传递 3 的抑制 剂	NM_003955	1.12	2.18	上调	0.00470	160
228216_at	228216_at	转录的基因座	---	0.91	1.88	上调	0.00982	161
228582_x_at	228582_x at	转录的基因座	---	1.20	2.30	上调	0.00591	162
228793_at	JMJD1C	含有 jumonji 结构域的 1C	NM_004241 NM_032776	1.31	2.48	上调	0.00870	163

[0171]

229120_s_at	CDC42SE 1	CDC42 小效应物 1	NM_001038707 NM_020239	0.92	1.89	上调	0.00362	164
230735_at	230735_at	转录的基因座	---	0.93	1.91	上调	0.00652	165
232555_at	232555_at	CDNA FLJ11431 fis, 克隆 HEMBA1001094	---	0.89	1.86	上调	0.00362	166
233303_at	233303_at	智人, 克隆 IMAGE:4295366, mRNA	---	1.20	2.30	上调	0.00872	167
234640_x_at	234640_x _at	CDNA: FLJ22614 fis, 克隆 HSI05089	---	1.86	3.64	上调	0.00425	168
235167_at	DKFZp54 7E087	假定的基因 LOC283846	XM_496136 XM_931802 XM_931808 XM_931814 XM_931818 XM_931827 XM_931837 XM_931840	1.56	2.94	上调	0.00326	169
236155_at	ZCCHC6	锌指, 含有 CCHC 结构域的 6 转录的基因座	NM_024617	1.07	2.10	上调	0.00823	170
236528_at	236528_at	转录的基因座	---	1.14	2.20	上调	0.00677	171
237442_at	237442_at	---	---	1.03	2.05	上调	0.00562	172
237544_at	237544_at	转录的基因座	---	1.07	2.10	上调	0.00711	173
238320_at	TncRNA	滋养层-衍生的 不编码 RNA	NR_002802	1.34	2.54	上调	0.00023	174
238712_at	238712_at	转录的基因座	---	0.78	1.71	上调	0.00917	175
239021_at	239021_at	转录的基因座, 中等类似于 XP_530714.1 假定的蛋白 XP_530714 [黑猩猩]	---	1.19	2.28	上调	0.00891	176
240057_at	240057_at	转录的基因座	---	0.52	1.43	上调	0.00703	177
241774_at	241774_at	转录的基因座	---	1.20	2.29	上调	0.00891	178

[0172]

242907_at	242907_at	---	---	1.16	2.23	上调	0.00494	179
244356_at	244356_at	---	---	1.17	2.25	上调	0.00254	180
244556_at	LCP2	转录的基因座 淋巴细胞胞质的蛋白 2 (含有 SH2 结构域的 76kDa 的白细 胞蛋白)	NM_005565	0.87	1.83	上调	0.00777	181
244752_at	ZNF438	锌指蛋白 438	NM_182755	0.67	1.59	上调	0.00468	182
37028_at	PPP1R15 A	蛋白磷酸酶 1, 调节(抑制剂) 亚基 15A	NM_014330	0.52	1.43	上调	0.00470	183

[0173] 在表 6 中指出的代表性序列是指相应的探针集合的靶序列。靶序列包含发现在 AR 和 NR 受试者样品中差别表达的一部分表达的核酸标志物。靶序列可以用于得到完整基因

或表达的核酸标志物的序列,例如,在合适的数据库(例如本文所述的那些)中使用 BLAST 搜索。

[0174] 与本发明的基因组生物标志物有关的生物学途径

[0175] 大规模基因表达分析方法(例如微阵列)已经显示,具有相互作用的基因群体(经常具有两个或更多的间隔程度)一起表达,且可能具有共同的调节元件。这样的协同调节的其它实例是本领域已知的,参见,例如,酵母的二峰生长(DiRisi 等人 1997 Science 278 :680-686 ;Eisen 等人 1998. Proc Natl Acad Sci 95 :14863-14868)。

[0176] 使用外周血样品的微阵列分析可以用于记录在移植物排斥过程中涉及的生物学过程;也已经在先前的实例中证实了 BCAR 的核酸标志物的鉴别。已经证实,这些标志物可以正确地分类样品,具有高交叉确认特异性。在排斥期间差别表达的基因(表 2)的生物功能包括与免疫信号转导、细胞骨架改组和细胞凋亡有关的 3 大类生物学过程,且突出了细胞因子-激活的 Jak-Stat 途径、干扰素信号传递和淋巴细胞激活、增殖、趋化性和粘附的参与。

[0177] 在排斥受试者中鉴别出了 4 种哺乳动物 Jak 家族激酶的上调,并在具有 BCAR 的患者中鉴别出了 STAT3、STAT5 和 STAT6 的上调——已知 Jak 酪氨酸激酶-Stat 转录因子途径参与免疫细胞发育、增殖和功能。急性排斥可以经典地归于细胞毒性 T 细胞介导的事件,但这些数据证实,Th2/STAT6 过程也是重要的。参与干扰素(IFN)信号传递的基因也在 BCAR 中上调,包括干扰素-诱导型鸟苷酸-结合蛋白(GBP)、干扰素-响应因子 1(IRF1) 和 STAT1。已知 2 个 MHC I 类基因 HLA-E 和 HLA-G 具有免疫调节功能,且在 AR 受试者中升高。

[0178] 已知 T 细胞活化和增殖参与肌动蛋白改造。在 MHC-肽/TCR 衔接上,肌动蛋白细胞骨架捆扎在衔接部位,且是形成免疫突触所必需的;已知该捆扎是由结构蛋白(如 SLP-76 和 ADAP、CDC42EP 和肌动蛋白捆扎蛋白 LCP-2) 介导。肌动蛋白细胞骨架被改造成,通过蛋白(如踝蛋白和桩蛋白)连接到整联蛋白-受体复合物上。编码这些蛋白的基因也在 AR 受试者中上调。AVIL(Advillin) 是最高差别化表达的基因之一,并编码已知的 Ca²⁺ 调节的肌动蛋白-结合蛋白和肌动蛋白调节蛋白的凝溶胶蛋白/绒毛蛋白家族的成员。

[0179] 凋亡细胞死亡(在该数据集合中检测出的另一个重要事件)由胱天蛋白酶 4、早老素 1、NACHT 亮氨酸富集的重叠序列和含有 PYD 的 1(NLRP1) 和肿瘤坏死因子受体 1(TNF-R1) 代表。ANP32A(酸性核磷蛋白 32 家族,成员 a) 是高度差别化表达的核酸标志物,且该基因编码已知具有促凋亡功能的蛋白,如在该数据集合中显示,它与 AR 受试者中的急性排斥有关。在 AR 受试者的外周血样品中检测出的细胞凋亡标记因而可以代表已经从该器官经过的细胞的 T 细胞活化(TNF-R1 是一种 T 细胞共同受体)和活化诱导的细胞死亡(AICD) 的组合。有趣的是,SIGLEC-9(结合唾液酸的 Ig-样凝集素 9)(另一个最高差别化表达的基因) 编码在白细胞上表达的细胞-粘附分子,其在炎症过程中上调,且已知通过细胞凋亡的诱导负调节 T 细胞和其它白细胞。

[0180] CAMKK2(钙/钙调蛋白-依赖性的蛋白激酶激酶 2,β) 基因的产物编码属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族的蛋白,并在钙-介导的信号传递中起作用。已经为该基因鉴别出了编码 6 个不同的同种型的 7 个转录物变体。CAMKK2β 普遍表达,且已知会调节转录因子 NfκB 的活化。已经描述了其它剪接变体,但是它们的全长性质尚未确定。鉴别出的同种型经历自身磷酸化,且也磷酸化其它激酶。人 CAMKK2 的核苷酸序列是已知的(例如 GenBank

登记号 AB018081、CH473973)。

[0181] FKBP1A(FK506 结合蛋白 1A,12kDa) 基因的产物编码的蛋白是亲免疫蛋白家族的成员,其在免疫调节和基础细胞过程(包括蛋白折叠和运输)中起作用。人 FKBP1A 的核苷酸序列是已知的(例如 AB241120、AB241121、AB241122、AF483488、AF483489、AI847849、AK002777、AK010693、AK019362、AK085599、AK141261、AK145400、AK145986、AK151047、AK154751、AK168333、AK169186、AK169242、AL928719、BC004671、BG074872、BY065108、CH466551、U65098、U65099、U65100、X60203)。

[0182] HLA-G(HLA-G 组织相容性抗原, I 类, G) 基因的产物编码的蛋白属于 HLA I 类重链旁系同源,且是由重链和轻链组成的异二聚体。人 HLA-G 的核苷酸序列是已知的(例如 AB088083、AB103589)。

[0183] ITGAX(整联蛋白, α X(补体组分 3 受体 4 亚基) 基因的产物编码由 α 链和 β 链组成的异二聚体完整膜蛋白。人 ITGAX 的核苷酸序列是已知的(例如 AC124566、AF211864、AI035495、AI326085、AK089167、AK131133、AK155816、AK170432、BC042840、BC057200)。

[0184] JUNB(jun B 原癌基因) 基因的产物编码。人 JUNB 的核苷酸序列是已知的(例如 BC053234、BX548032、EC268690)。

[0185] LIMK2(LIM 结构域激酶 2) 基因的产物编码的蛋白属于含有 LIM- 结构域的蛋白家族。LIMK2 参与肌动蛋白细胞骨架的调节。人 LIMK2 的核苷酸序列是已知的(例如 NC_000022.9、NT_011520.11)。

[0186] LMAN2(凝集素,结合甘露糖的 2) 基因的产物编码细胞内凝集素,已知其起陪伴分子(chaperone) 蛋白和内质网和高尔基体中的跨膜负荷受体的作用。人 LMAN2 的核苷酸序列是已知的(例如 X76392)。

[0187] NASP(核自身抗原精子蛋白(组蛋白-结合的)) 基因的产物编码的蛋白参与将组蛋白运输进分裂细胞的核中。该基因的转录物变体编码多种同种型。人 NASP 的核苷酸序列是已知的(例如 BC081913、CH474008)。

[0188] NCOA3(核受体辅激活物 3) 基因的产物编码核受体辅激活物,其与核激素受体相互作用,以增强它们的转录激活剂功能。人 NCOA3 的核苷酸序列是已知的(例如 AF322224、BC088343、CH474005)。

[0189] NEDD9(神经前体细胞表达的,发育下调的 9) 基因的产物编码停靠蛋白,其在与细胞粘附有关的基于酪氨酸激酶的信号传递中起中枢协调作用。人 NEDD9 的核苷酸序列是已知的(例如 AC167669、AF009366、AK030985、AK033729、AK046357、AK054179、AK083374、BB458177、BC004696、BC053713、CH466546、CT025639、D10919)。

[0190] NFYC(核转录因子 Y, γ) 基因的产物编码三聚体复合物的一个亚基,形成高度保守的转录因子,其高特异性地结合多个基因的启动子区中的 CCAAT 基序。人 NFYC 的核苷酸序列是已知的(例如 BC045364、BC065645、BC155102、CR388024、CT027763)。

[0191] PGS1(磷脂酰甘油磷酸酯合酶 1) 基因的产物编码的蛋白是磷脂酰转移酶,且参与代谢途径。人 PGS 1 的核苷酸序列是已知的(例如 AC061992、AK024529、AK225030、AL359590、BC008903、BC015570、BC025951、BC035662、BC108732、CH471099、CR594011、CR749720、DQ892813、DQ896059)。

[0192] RBMS1(RNA 结合基序,单链相互作用蛋白 1) 基因的产物编码的蛋白是结合单链

DNA/RNA 的小蛋白家族的成员。人 RBMS1 的核苷酸序列是已知的（例如 AB009975）。

[0193] SFRS16(剪接因子,富含精氨酸/丝氨酸的 16) 基因的产物编码的蛋白可能参与诸如 mRNA 加工或 RNA 剪接等过程。人 SFRS16 的核苷酸序列是已知的（例如 AC011489、AF042800、AF042802、AF042803、AF042804、AF042805、AF042806、AF042807、AF042808、AF042809、AF042810、AK074590、AK094681、AL080189、AY358944、BC013178、BC080554、BC131496、CH471126、CR604154）。

[0194] SLC6A6(溶质载体家族 8(神经递质运载蛋白,牛磺酸)成员 6) 基因的产物编码的蛋白可能在氨基酸运输或神经递质运输中起作用。人 SLC6A6 的核苷酸序列是已知的（例如 NC_006602、NW_876271）。

[0195] 命名为 TncRNA(滋养层-衍生的 ncRNA) 的短的非编码 RNA 源自 NEAT1 的 3'-引发末端(3-prime end),且在滋养层中专有地表达。已知 TncRNA 通过抑制 CIITA_{pIII} 活性来抑制小鼠中的 II 类 MHC 的表达,且可能是 TP53(p53) 的靶标,表明参与细胞凋亡或细胞周期控制。人 TncRNA 的核苷酸序列是已知的（例如 AF001892、AF001893、AF080092、AF508303、AK027191、AP000769、AP000944、CR611820、CR618687、U60873）。

[0196] ZNF438(锌指蛋白 438) 基因的产物编码的蛋白属于含有锌指基序的蛋白家族,且可能在免疫球蛋白的 DNA-依赖性转录的调节中起作用。人 ZNF438 的核苷酸序列是已知的（例如 AF428258、AF440405、AK057323、AK131357、AK292730、AL359532、AL591707、AL596113、AL833056、BC101622、BC104757、CH471072、DQ356011、DQ356012）。

[0197] PR01073 基因(MALAT1,转移有关的肺腺癌转录物 1) 的产物编码的蛋白可能参与细胞周期进展。人 PR01073 的核苷酸序列是已知的（例如 AE017126、NP_875465）。

[0198] 探针集合 1558448_a_at 在 Affymetrix™ NetAffx™ 注解数据库中未被注解,但是根据 NCBI Blast,靶序列是 IMAGE 克隆 5215251 的一部分。IMAGE 克隆 5215251 未被表征。IMAGE 克隆 5215251 的核苷酸序列是已知的（例如 GenBank 登记号 BC032451.1）。

[0199] 探针集合 208120_x_at 在 Affymetrix™ NetAffx™ 注解数据库中未被注解,但是根据 NCBI Blast,靶序列是基因 FKSG63 的一部分。FKSG63 未被表征。FKSG63 的核苷酸序列是已知的（例如 GenBank 登记号 AF338192）。

[0200] 探针集合 237442_ 在 Affymetrix™ NetAffx™ 注解数据库中未被注解,鉴别出了包括染色体 10 上的序列的核酸标志物,且可能是基因 APBB1IP(淀粉样蛋白 β(A4) 前体蛋白-结合家族 B 成员 1 相互作用蛋白) 的一部分。APBB1IP 的核苷酸序列是已知的（例如 GenBank 登记号 A160287.18）。

[0201] 探针集合 240057_at 在 Affymetrix™ NetAffx™ 注解数据库中未被注解,且根据 NCBI Blast,是 EST 的一部分。人 EST 的核苷酸序列是已知的（例如 GenBank 登记号 AP000763.5）。

[0202] 探针集合 217436_x_at 在 Affymetrix™ NetAffx™ 注解数据库中被注解为编码“假定的蛋白”,但是被发现是智人主要组织相容性复合物、I 类、G、mRNA(cDNA 克隆 IMAGE: 4694038) 的一部分,在 NCBI Blast 中的部分 cds。人 HLA-I、G 的核苷酸序列是已知的（例如 GenBank 登记号 BC020891.1）

[0203] FKSG49 在 Affymetrix™ NetAffx™ 注解数据库中未被注解。人 FKSG49 的核苷酸序列是已知的（例如 GenBank 登记号 AC113404.3）。

[0204] 尽管FKSG49、FKSG49/LOC730444和1558448_a_at的具体生物学作用尚不清楚,但它们在AR样品中的鉴别和上调,是它们作为急性排斥的核酸标志物的适合性的指示。

[0205] 用于诊断同种异体移植物排斥的蛋白质组图谱

[0206] 蛋白质组图谱也可以用于诊断同种异体移植物排斥。蛋白质组图谱可以单独使用,或与基因组表达图谱或代谢物图谱组合使用。

[0207] 在某些实施方案中,本发明提供了评估或诊断受试者的同种异体移植物排斥(包括急性肾同种异体移植物排斥)的方法,其包含:1)测定来自受试者的生物样品中一种或超过一种蛋白质组标志物的表达图谱,所述蛋白质组标志物选自由TTN、KNG1、LBP、VASN、ARNTL2、AFM、MSTP9、MST1、PI16、SERPINA5、CFD、USH1C、C2、MBL2、SERPINA10、C9、LCAT、B2M、SHBG、C1S、UBR4和F9编码的多肽;2)将一种或超过一种蛋白质组标志物的表达图谱与无排斥者图谱进行对比;和3)确定一种或超过一种蛋白质组标志物的表达水平是否相对于对照图谱升高或降低,其中一种或超过一种蛋白质组标志物的升高或降低是急性排斥状态的指示。这些标志物在下面更详细地描述。

[0208] 本发明也提供了如本发明提供的评估或诊断受试者的同种异体移植物排斥(包括急性肾同种异体移植物排斥)的方法,其包含:1)测量一种或超过一种蛋白质组标志物的升高或降低,所述蛋白质组标志物选自由TTN、KNG1、LBP、VASN、ARNTL2、AFM、MSTP9、MST1、PI16、SERPINA5、CFD、USH1C、C2、MBL2、SERPINA10、C9、LCAT、B2M、SHBG、C1S、UBR4和F9编码的多肽;和2)测定受试者的“排斥状态”,其中受试者“排斥状态”的测定是基于受试者的蛋白质组标志物表达图谱与对照蛋白质组标志物表达图谱的对比。

[0209] 在某些实施方案中,一种或超过一种蛋白质组标志物是KNG1、AFM、TTN、MSTP9/MST1、PI16、C2、MBL2、SERPINA10和UBR4。

[0210] 目前可利用多种蛋白鉴别和定量方法,例如糖肽捕获(Zhang等人,2005. Mol Cell Proteomics 4:144-155)、多维蛋白鉴别技术(Mud-PIT)Washburn等人,2001 Nature Biotechnology(19:242-247)和表面增强的激光解吸电离(SELDI-TOF)(Hutches等人,1993. Rapid Commun Mass Spec 7:576-580)。另外,几种允许定量多种蛋白样品的同位素标记方法,例如用于相对和绝对蛋白定量的同重元素标记(iTRAQ)(Ross等人,2004 Mol Cell Proteomics 3:1154-1169)、同位素编码的亲亲和标记(ICAT)(Gygi等人,1999 Nature Biotechnology 17:994-999)、同位素编码的蛋白标记(ICPL)(Schmidt等人,2004. Proteomics 5:4-15)和N-末端同位素标记(NIT)(Fedjaev等人,2007 Rapid Commun Mass Spectrom 21:2671-2679;Nam等人,2005. JChromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 826:91-107)会提供适合高通量性能的形式,即在生物标志物筛选/鉴别研究中特别有用的一项特征。

[0211] 多路iTRAQ方法被用于鉴别同种异体移植物受体中的血浆蛋白质组标志物。Ross等人,2004(Mol Cell Proteomics 3:1154-1169)首次描述了iTRAQ。简而言之,将受试者的血浆样品(对照和同种异体移植物受体)去除14种最丰富的蛋白,并通过iTRAQ-MALDI-TOF/TOF进行定量分析,导致在至少一个BCAR阳性和BCAR阴性样品中鉴别出460个蛋白组代码。在至少8/11的BCAR阳性样品和至少14/21的对照中检出144个蛋白组代码。表7显示了鉴别出的18个重要的蛋白组代码。

[0212] 因而,尽管单个候选生物标志物可能不能清楚地区分AR和NR受试者,但是包含

KNG1、AFM、TTN、MSTP9/MST1、PI16、C2、MBL2、SERPINA10 和 UBR4 的蛋白质组标志物集合在一起会实现满意的分类 (63% 灵敏度和 86% 特异性)。如在下面和在附随的实施例中所述, 鉴别为蛋白组代码成员的蛋白质组标志物的同种型的氨基酸序列是已知的, 且可以通过本文所述的登记号 (例如 GenBank、GenPept、IPI 等) 具体确定。

[0213] 尽管 iTRAQ 是用于检测肽的一种示例性方法, 但本文所述的其它方法, 例如基于免疫学的方法例如 ELISA, 也可能是有用的。或者, 可以产生针对一种或多种蛋白、同种型、前体、多肽、肽、或其部分或片段的特异性抗体, 并将所述特异性抗体用于检测一种或多种蛋白质组标志物在样品中的存在。选择合适的肽、免疫用于生产抗血清和 / 或生产和筛选杂交瘤 (用于生产单克隆抗体) 的动物 (例如小鼠、兔子等) 的方法, 是本领域已知的, 且描述在本文公开的参考文献中。

[0214] 蛋白质组表达图谱标志物 (“蛋白质组标志物”)

[0215] 一种或多种前体、剪接变体、同种型可以由单个基因编码。在表 7 中, 在各个蛋白组代码 (PGC) 下, 提供了基因和编码的同种型、前体和变体的实例。

[0216] 由 TTN (粗丝联接蛋白、肌联蛋白、TMD、CMH9、CMD1G、CMPD4、EOMFC、HMERF、LGMD2J、FLJ26020、FLJ26409、FLJ32040、FLJ34413、FLJ39564、FLJ43066、DKFZp451N061) 编码的多肽是在心肌和骨骼肌区域中表达的肌肉蛋白。编码 TTN 的核苷酸序列是已知的 (例如 GenBank 登记号 AC009948. 3、AF321609. 2、NM_133437. 2、NM_133432. 2、NM_003319. 3、NM_133378. 3、NM_133379. 2)。TTN 的氨基酸序列是已知的 (例如 GenPept 登记号 NP_597676. 2、NP_596870. 2、NP_597681. 2、NP_003310. 3、NP_596869. 3、Q4ZG20、Q8WZ50、Q6ZP81、Q8WZ42. 2)。

[0217] 由 KNG1 (激肽原 1、BDK) 编码的多肽可能在血浆激肽释放酶的装配中起作用, 且具有通过交替剪接产生的高和低分子量同种型。编码 KNG1 的核苷酸序列是已知的 (例如 GenBank 登记号 NM_000893. 2、NM001102416. 1、AC109780. 7、AI133186. 1、BC060039. 1)。KNG1 的氨基酸序列是已知的 (例如 GenPept 登记号 NP_000884. 1、NP_001095886. 1、AAH600396. 1、P01042. 2、Q05CF8)。

[0218] 由 LBP (脂多糖结合蛋白) 编码的多肽可能在针对细菌感染的急性期免疫应答中起作用。编码 LBP 的核苷酸序列是已知的 (例如 GenBank 登记号 NM_004139. 2、AF013512. 1、AF106067/1、M35533. 1、DQ891394. 2)。LBP 的氨基酸序列是已知的 (例如 GenPept 登记号 NP_004130. 2、AAC39547. 1、AAD21962. 1、AAA59493. 1、ABM85360. 1、P18428. 3、Q8TCF0)。

[0219] 由 VASN (vasorin) 编码的多肽是在血管平滑肌细胞中发现的 TGF- β 结合蛋白。编码 VASN 的核苷酸序列是已知的 (例如 GenBank 登记号 NM_138440. 2、CH471112. 2、AY166584. 1)。VASN 的氨基酸序列是已知的 (例如 GenPept 登记号 NP_612449. 2、EAW85311. 1、Q6EMK4. 1、AA027704. 1)。

[0220] 由 ARNTL2 (芳烃受体核转位分子 - 样 -2、BMAL2、MOP9) 编码的多肽是碱性螺旋 - 环 - 螺旋家族转录因子的成员, 其可能在不同的生理学过程 (包括昼夜节律) 中起作用。编码 ARNTL2 的核苷酸序列是已知的 (例如 GenBank 登记号 NM_020183. 3、AC068794. 25、AB03992. 1)。ARNTL2 的氨基酸序列是已知的 (例如 GenPept 登记号 NP_064568. 3、Q8WYA1. 2、BAB01485. 4)。

[0221] 由 AFM (afamin、ALB2、ALBA、ALF、MGC125338、MGC125339、AFM) 编码的多肽是白

蛋白基因家族的血清运输蛋白。编码 AFM 的核苷酸序列是已知的（例如 GenBank 登记号 NM_001133.2、AC108157.3、AK290556.1）。AFM 的氨基酸序列是已知的（例如 GenPept 登记号 NP_001124.1、BAF83245.1、P43652.1、Q4W5C5）。

[0222] 由 MSTP9 编码的多肽是假定的巨噬细胞 - 刺激蛋白（脑抢救因子 1）和肝细胞生长因子 - 样蛋白的同系物。编码 MSTP9 的核苷酸序列是已知的（例如 GenBank 登记号 AF083416.1、AF116647.1、AY192149.1、U28055.1）。MSTP9 的氨基酸序列是已知的（例如 GenPept 登记号 Q2TV78.2、AAP20103.12、AAC35412.1）。

[0223] 由 MST1（刺激巨噬细胞的 1、MSP、HGFL、NF15S2、D3F15S2）编码的多肽可能在炎性肠病中起作用。编码 MST1 的核苷酸序列是已知的（例如 GenBank 登记号 NM020998.3、AC099668.2、AK222893.1、M74178.1）。MST1 的氨基酸序列是已知的（例如 GenPept 登记号 NP_066278.3、P26928.2、Q13208、Q49A61、Q53GN8、BAD96613.1、AAA50165.1）。

[0224] 由 PI16（肽酶抑制剂 16、PSPBP、CRISP9、MSMBBP、MGC45378、DKFZp586B1817）编码的多肽是可以与前列腺分泌蛋白相互作用的血液蛋白。编码 PI16 的核苷酸序列是已知的（例如 GenBank 登记号 NM_153370.2、AL122034.29、AK075470.1、AK124589.1、AK302193.1、AK312785.1、BC022399.1）。PI16 的氨基酸序列是已知的（例如 GenPept 登记号 NP_699201.2、Q6UXB8.1、BAC11640.1、BAG35648.1、AAH22399.2）。

[0225] 由 SERPINA5（丝氨酸蛋白酶抑制剂、分化体 A 成员 5、PAI3、PCI、PROCI、蛋白 C 抑制剂）编码的多肽是激活的蛋白 C 的血浆蛋白抑制剂。编码 SERPINA5 的核苷酸序列是已知的（例如 GenBank 登记号 NM_000624.4、AF361796.1、AK096131.1、BC018915.2、U35464.1）。SERPINA5 的氨基酸序列是已知的（例如 GenPept 登记号 NP_000615.3、P05154.2AAB60386.1、AAH08915.1、BAG53218.1）。

[0226] 由 CFD（补体因子 D、脂肪细胞蛋白酶）编码的多肽是肽酶的胰蛋白酶因子成员。编码 CFD 的核苷酸序列是已知的（例如 GenBank 登记号 NM_001928.2、AC112706.2、AJ313463.1、BC034529.1、BC057807.1、M84526.1）。CFD 的氨基酸序列是已知的（例如 GenPept 登记号 NP_001919.2、P00746.5、Q6FHW3、AAA35527.1、AAH570807.1、CAC48304.1）。

[0227] 由 USH1C 编码的多肽是在 Usher 蛋白复合物的装配中起作用的支架蛋白。编码 USH1C 的核苷酸序列是已知的（例如 GenBank 登记号 NM_005709.3、NM_153676.3、kAC124799.5、AB006955.1、AF039699.1、AK000936.1、BK000147.1）。USH1C 的氨基酸序列是已知的（例如 GenPept 登记号 NP_005700.2、NP_710142.1、AAC18049.1、BAG62565.1、DAA00086.1、Q7RTU8、Q9H758、Q9Y6N9.3）。

[0228] 由 C2（补体组分 2、C02、DKFZp779M0311）编码的多肽是在经典补体途径中起作用的血清糖蛋白。编码 C2 的核苷酸序列是已知的（例如 GenBank 登记号 NM_000063.4、NM_001145903.1、AF019413.1、AK096258.1、BC029781.1、BX537504.1、M26301.1、X04481.1）。C2 的氨基酸序列是已知的（例如 GenPept 登记号 NP_000054.2、NP_001139375.1、AAA35604.1、CAA28169.1、CAD97767.1）。

[0229] 由 MBL2（结合甘露糖的凝集素 2、MBL、MBP、MBP1、COLEC1、HSMBPC、MGC116832、MGC116833）编码的多肽是在血清中发现的可溶的结合甘露糖的凝集素。编码 MBL2 的核苷酸序列是已知的（例如 GenBank 登记号 NM_000242.2、AB025350.1、AF360991.1、BC096181.2）。MBL2 的氨基酸序列是已知的（例如 GenPept 登记号 NP_000233.1、

BAB17020. 1、AAK52907. 1、AAH96182. 3、P11226. 2、Q5SQS3、Q9HCS8)。

[0230] 由 SERPINA10 (丝氨酸蛋白酶抑制剂分化体 A 成员 10、ZPI、PDI) 编码的多肽是丝氨酸蛋白酶抑制剂,其抑制激活的凝固因子 X 和 XI。编码 SERPINA10 的核苷酸序列是已知的 (例如 GenBank 登记号 NM_001100607. 1、NM_016186. 2、CH471061. 1、AF181467. 1、BC022261. 1、CR606434. 1)。SERPINA10 的氨基酸序列是已知的 (例如 GenPept 登记号 NP_001094077. 1、NP_057270. 1、EAW81564. 1、AAD53962. 1、CAD62339. 1、Q9UK55. 1)。

[0231] 由 LCAT (卵磷脂-胆固醇乙酰转移酶) 编码的多肽是胞外胆固醇酯化酶,其影响胆固醇运输。编码 LCAT 的核苷酸序列是已知的 (例如 GenBank 登记号 NM_000229. 1、AC040162. 5、BC014781. 1、X06537. 1)。LCAT 的氨基酸序列是已知的 (例如 GenPept 登记号 NP_000299. 1、P04180. 1、Q53XQ3、Q9Y5N3、AAH14781. 1、CAB56610. 1)。

[0232] 由 B2M (β -2-微球蛋白) 编码的多肽是发现与大部分有核细胞的表面上的主要组织相容性复合物 (MHC) 1 类重链有关的血清蛋白。编码 B2M 的核苷酸序列是已知的 (例如 GenBank 登记号 NM_004048、BU658737. 1、BC032589. 1 和 AI686916. 1)。B2M 的氨基酸序列是已知的 (例如 GenPept 登记号 P61769、AAA51811、CAA23830)。

[0233] 由 SHBG (结合性激素的球蛋白、雄激素结合蛋白、ABP、结合睾酮的 β -球蛋白、TEBG) 编码的多肽是结合性甾体的血浆糖蛋白。编码 SHBG 的核苷酸序列是已知的 (例如 GenBank 登记号 AK302603. 1、NM_001040. 2)。SHBG 的氨基酸序列是已知的 (例如 GenPept 登记号 P04728. 2、CAA34400. 1、NP001031. 2)。

[0234] 由 C1S (补体组分 1、S 亚组分) 编码的多肽是丝氨酸蛋白酶和人补体 C1 的组分。编码 C1S 的核苷酸序列是已知的 (例如 GenBank 登记号 NM_001734. 3、NM_201442. 2、AB009076. 1、AK025309. 1、J04080. 1、M18767. 1)。C1S 的氨基酸序列是已知的 (例如 GenPept 登记号 NP_001725. 1、NP_958850. 1、BAA86864. 1、AAA51852. 1、AAA51853. 1)。

[0235] 由 UBR4 (泛素蛋白连接酶 D3 组分 n-识别蛋白 4、p600 ;ZUBR1 ;RBAF600 ;FLJ41863 ;KIAA0462 ;KIAA1307 ;RP5-1126H10. 1) 编码的多肽可能在某些致瘤病毒有关的锚定非依赖的生长的调节中起作用。编码 UBR4 的核苷酸序列是已知的 (例如 GenBank 登记号 NM_020765. 2、AL137127. 7、AA748129. 1、AB007931. 1、BC096758. 1)。UBR4 的氨基酸序列是已知的 (例如 GenPept 登记号 NP_065816. 2、CAI19268. 1、BAA32307. 1、AAH96758. 1、QST4S7. 1、Q6ZUC7、Q96HY5)。

[0236] 由 F9 (凝固因子 XI) 编码的多肽是维生素 K-依赖性的凝固因子,在血液中发现是有活性的酶原。编码 F9 的核苷酸序列是已知的 (例如 GenBank 登记号 NM_000133. 3、A01819. 1、AB186358. 1、A13997. 1、M11390. 1)。F9 的氨基酸序列是已知的 (例如 GenPept 登记号 NP_1000124. 1、CAA00205. 1、BAD89383. 1、P00740. 2、Q14316、CAA01140. 1、AAA52023. 1)。

[0237] 表 7 和其中提供的 IPI 登记号进一步指示数据库记录,其中可以得到指明的蛋白组代码成员的具体同种型的氨基酸序列信息。

[0238] 解读从例如 iTRAQ 蛋白或蛋白质组实验得到的大量表达数据,但是通过利用设计成以突出系统特征的方式组织数据的算法和统计工具,可以得到极大促进。可视化工具也具有显示差别表达的价值,例如,通过改变颜色的强度和色调。随着阵列和得到的数据集的复杂性的增加,以及随着处理速度、计算机存储器的提高和它们的成本的相对降低,可利用

的算法和统计工具的复杂度已经增加。

[0239] 蛋白或多肽表达图谱的数学和统计分析可以完成几件事情——在一条途径或生物系统的结构域中表现出协同调节的基因群体的鉴别、两个或更多个生物样品之间的相似性和差别的鉴别、区分受试者中的特定事件或过程的基因表达图谱特征的鉴别,等。这可以包括,评估治疗方案的效能或治疗方案中的变化、监视或检测特定病状的发展、区分两种临床上类似的(或几乎相同的)病状等。

[0240] 本文提及或描述了选择和生产这样的抗体以及将它们包含在“芯片”或阵列或测定中的方法,和使用这样的芯片、阵列或测定的方法。

[0241] 其它实施方案

[0242] 核酸图谱也可以与代谢物(“代谢组学”)或蛋白质组图谱组合使用。受试者的基因组中的微小改变(例如单核苷酸变化或多态性)或基因组表达的微小改变(例如有差别的基因表达),可能导致受试者的小分子代谢物图谱的快速应答。小分子代谢物也可以对环境改变做出快速应答,在环境改变的几秒至几分钟内出现显著的代谢物变化——相反,蛋白或基因表达改变可能需要几小时或几天才能显现。临床变量的列表包括、例如,胆固醇、高半胱氨酸、葡萄糖、尿酸、丙二醛和酮体。在表 3 中列出了小分子代谢物的其它非限制性实例。

[0243] 表 3 :在从受试者群体得到的血清样品的 NMR 波谱中鉴别和定量的代谢物

[0244]

化合物名称	
葡萄糖	乳酸盐
谷氨酰胺	丙氨酸
甘氨酸	脯氨酸
甘油	缬氨酸
牛磺酸	赖氨酸
柠檬酸盐	丝氨酸
亮氨酸	鸟氨酸
肌酸酐	酪氨酸
苯丙氨酸	丙酮酸盐
组氨酸	肉碱
谷氨酸盐	醋酸盐
异亮氨酸	天冬酰胺

甜菜碱	3-羟基丁酸盐
肌酸	丙二醇
2-羟基丁酸盐	甲酸盐
蛋氨酸	胆碱
丙酮	

[0245] 多种技术和方法可以用于得到受试者的代谢物图谱。样品制备的细节可以随使用的方法以及目标代谢物而异——例如,为了得到样品中的氨基酸和小的、通常水溶性的分子的代谢物图谱,可以包含用 2-10kDa 的低分子量截止过滤样品,而为了得到脂类、脂肪酸和其它通常难溶于水的分子的代谢物图谱,可以包含一个或多个有机溶剂萃取和 / 或干燥和重新溶解残余物的步骤。尽管本文已经指出了一些示例性的检测和 / 或定量标志物的方法,但其它方法是本领域技术人员可获知的,且可容易地用于本申请所述的方法和用途中。

[0246] 可以用于(单独地或组合地)得到受试者的代谢物图谱的技术和方法的一些实例包括但不限于,核磁共振(NMR)、气相色谱法(GC)、气相色谱法与质谱法联用(GC-MS)、质谱法、傅里叶变换 MS(FT-MS)、高效液相色谱法等。用于得到代谢物图谱的样品制备和技术的示例性方法,可以参见,例如,人类代谢组计划(Human Metabolome Project)网站(Wishart DS 等人,2007.Nucleic Acids Research 35 :D521-6)。

[0247] 阐述本领域技术人员已知的可用于代谢物图谱中的这些方法的一般原理的标准参考文献包括,例如,Handbook of Pharmaceutical Biotechnology, (SC Gad 编) John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, (2007), Chromatographic Methods in Clinical Chemistry and Toxicology (R Bertholf 和 R. Winecker 编) John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, (2007), H., Friebolin 的 Basic One-and Two-Dimensional NMR Spectroscopy. Wiley-VCH 第 4 版 (2005)。

[0248] 本发明方法的使用,可以由例如执行单个标志物检验的临床实验室或其它检测机构提供给最终用户——将生物样品提供给所述机构,在那里进行单个检验和分析,并应用预测方法;或者,医学从业人员可以从临床实验室接收标志物值,并使用当地的仪器或基于因特网的仪器来使用本发明的预测方法。

[0249] 试剂盒

[0250] 本发明也提供了用于评估或诊断受试者的排斥状态的试剂盒。所述试剂盒可以包含用于特异性地和定量地检测一种或多种核酸标志物的试剂,所述核酸标志物选自 TncRNA、FKSG49、ZNF438、SFRS16、1558448_a_at、CAMKK2、NFYC、NCOA3、LMAN2、PGS1、NEDD9、237442_at、FKSG49/LOC730444、LIMK2、UNB、NASP、PRO1073、240057_at、ITGAX、LOC730399/LOC731974、FKBP1A、HLA-G、RBMS1 和 SLC6A6,以及关于使用这些试剂和分析得到的数据的方法的说明书。在某些实施方案中,核酸标志物是 TncRNA、FKSG49、ZNF438、1558448_a_at、CAMKK2、LMAN2、237442_at、FKSG49/LOC730444、JUNB、PRO1073 和 ITGAX。所述试剂盒可以单独地用于预测或诊断受试者的排斥状态,或它可以与测定临床变量的其它方法或认为适宜的其它测定法组合地使用。试剂盒可以包括,例如,能选择性地杂交标志物的标记的寡核

苷酸。试剂盒可以另外包括,例如,可操作地扩增(例如通过 PCR)标志物区域的寡核苷酸。也可以提供用于将试剂盒的结果与其它测定法的结果进行组合、从而为受试者排斥状态的预测或诊断提供无排斥截止指标的说明书或其它信息。

[0251] 本发明也提供了核酸阵列。所述阵列可以是二维阵列,且可以含有至少 10 种不同的核酸分子(例如,至少 20、至少 30、至少 50、至少 100、或至少 200 种不同的核酸分子)。每种核酸分子可以具有足以通过杂交特异性地鉴别核酸标志物的任意长度。例如,每种核酸分子的长度可以是 10 至 250 个核苷酸(例如,12 至 200、14 至 175、15 至 150、16 至 125、18 至 100、20 至 75 或 25 至 50 个核苷酸或其间的任意量)。例如,本文提供的阵列的核酸分子可以包含这样的序列,其与一种或超过一种表 2 所示的核酸标志物杂交并特异性地鉴别它们。这样的序列的实例包括 SEQ ID NO :1-183。

[0252] 本发明也提供了用于评估或诊断受试者的排斥状态的试剂盒。所述试剂盒可以包含用于特异性地和定量地检测一种或超过一种蛋白质组标志物的试剂,所述蛋白质组标志物选自 TTN、KNG1、LBP、VASN、ARNTL2、AFM、MSTP9、MST1、PI16、SERPINA5、CFD、USH1C、C2、MBL2、SERPINA10、C9、LCAT、B2M、SHBG、C1S、UBR4 和 F9,以及关于使用这些试剂和分析得到的数据的方法的说明书。在某些实施方案中,一种或超过一种蛋白质组标志物是 KNG1、AFM、TTN、MSTP9、MST1、PI16、C2、MBL2、SERPINA10、F9 和 UBR4。例如,试剂盒可以包含对蛋白质组标志物特异性的抗体或其片段(第一抗体),以及一种或多种可以掺入可检测标记的第二抗体;这样的抗体可以用于诸如 ELISA 等测定中。或者,抗体或其片段可以固定在固体表面(例如抗体阵列)上。所述试剂盒可以单独地用于预测或诊断受试者的排斥状态,或它可以与测定临床变量的其它方法或认为适宜的其它测定法组合地使用。也可以提供用于将试剂盒的结果与其它测定法的结果进行组合、从而为受试者排斥状态的预测或诊断提供无排斥截止指标的说明书或其它信息。

[0253] 本发明也提供了计算机可读的存储媒体,其配置了关于使可编程的处理器确定同种异体移植物是否被排斥的指令。本文描述了确定同种异体移植物是否被排斥(受试者的排斥状态)的方法,且所述处理器包含接收信号(例如光发射、荧光的强度或频率的变化等,它们代表了在样品中存在的核酸或蛋白质组标志物的相对量)和评估核酸或蛋白质组标志物相对于对照的水平和确定该水平是升高还是降低的指令。可以另外给处理器提供解释指定的核酸或蛋白质组标志物的升高和/或降低模式的指令,并将受试者排斥状态的信息提供给用户(例如医师)。也可以包括关于从检测的信号去除基线噪音或其它异常信号的指令和信息。可以将指令提供在计算机可读的存储媒体上,且可以以高水平程序的或面向对象的高级编程语言来执行,或与计算机系统交流。或者,这样的指令可以以汇编语言或机器语言来执行。所述语言另外可以是编译语言或解释语言。

[0254] 使用仪器(例如,芯片或阵列阅读器),可以得到核酸检测信号,且使用另外的处理器(例如,计算机),可以测定组织排斥。或者,具有可编程的处理器单个仪器可以组合这些和/或其它功能,得到检测信号并处理信号,以测定受试者的排斥状态。处理步骤可以与收集检测信号的步骤同时进行(例如,“实时”)。

[0255] 本文提及或描述了选择和生产这样的抗体的方法,以及它们在“芯片”或阵列上或在测定中的包含,和使用这样的芯片、阵列或测定的方法。

[0256] 方法

[0257] 受试者和样本

[0258] 该研究中的所有受试者在 2005 至 2007 年在加拿大英属哥伦比亚大学温哥华的圣保罗医院 (St. Paul's Hospital) 或温哥华综合医院 (Vancouver General Hospital) 接受肾移植, 并得到适当的同意。免疫抑制主要基于与他罗利姆和 / 或泼尼松龙相组合的麦考酚酸莫酯 (MMF)。受试者的年龄、性别、种族划分和原发病总结在下面的表 4 中。在移植前 (基线) 和移植后 0.5、1、2、3、4、8、12 和 26 周, 前 3 年中每隔 6 个月, 和疑似排斥时, 使用 PAXgene™ 试管抽取全血。得到相同时间点的尿样。使用移植患者的代表性的年龄和性别, 也从没有疾病的对照受试者队列采取 PAXgene™ 全血样品。在选择用于分析之前, 所有样品在 -80℃ 保藏。基因组标志物研究中包括 33 位受试者被, 蛋白质组标志物研究中这 33 位中的 32 位。

[0259] 表 4: 肾移植受试者统计数据

[0260]

	具有 AR 的受试者 (n=11)	没有 AR 的受试者 (n=22)
平均年龄(标准差)	41.85 (11.98)	48.97 (10.57)
性别(n, %男性)	8 (72.73%)	14 (63.64%)
种族划分 (n,%)		
高加索人	9 (81.82%)	15 (68.18%)
北美印第安人	1 (9.09%)	2 (9.09%)
亚洲人	0 (0%)	2 (9.09%)
印度次大陆	1 (9.09%)	2 (9.09%)
其它	0 (0%)	1 (4.55%)
原发病 (n, %)		
慢性肾衰竭, 病因不明	4 (36.36%)	2 (9.09%)
皮质或肾小管坏死	1 (9.09%)	1 (4.55%)
与 II 型有关的糖尿病肾病	1 (9.09%)	1 (4.55%)
病灶性肾小球硬化症 - 成年人	3 (27.27%)	4 (18.18%)
多囊肾, 成年型 (显性的)	0 (0%)	5 (22.73%)
IgA 肾病 (通过免疫荧光证实)	2 (18.18%)	1 (4.55%)
其它	0 (0%)	8 36.36%
供体		
存活	3 (27.3%)	8 (38.1%)
死亡	8 (72.7%)	13 (61-9%)

[0261] 评论了所有肾移植受试者的临床数据。样品选自没有明显并存病 (感染、疾病复发或其它共病事件) 的具有急性排斥、边缘排斥或无排斥的受试者。为了确保该分析的均一表型并使生物差异性最小化, 在下述情况下, 认为患者是合格的: 年龄小于 75 岁;

在移植之前不是正在接受免疫抑制；没有接受移植前免疫脱敏；已经接受来自死亡的或非-HLA-相同的活供体的肾移植物；具有阴性的 AHG-CDC 抗-供体 T-细胞交叉配对；没有接受使用 ATG 或 OKT3 的排除抗体诱导疗法；能接受口服给药，具有立即的移植物功能，且不具有感染、疾病复发和其它重要共病事件的临床或实验室证据。使用 Banff 标准 (Solez 等人 2008 Am J Transplant 8:753; 表 1) 诊断和记录活组织检查。该研究的队列由 11 位在第一周内的急性排斥 (AR) 受试者和 22 位在第一周内无排斥 (NR) 受试者 (活组织检查-证实的急性排斥, BCAR) 组成。对于所有 NR 受试者, 在第 1、2、3、4 周和基线 (BL) 可得到数据。1 位 AR 受试者不具有基线样品, 3 位受试者分别不具有第 1 周、第 2 周和第 4 周样品。几位受试者具有在第 8 和 12 周的额外时间点的数据。2 位 AR 患者在第 3 天具有他们的排斥。为了分析, 将这些排斥视作在第 1 周组。包括了来自 20 位健康个体的 20 份正常样品, 以计算相对于正常的结果。因而, 分析包括来自 53 位个体的样品, 其中 33 位是在移植后 3 个月阶段的不同时间点提供样品的患者。

[0262] 该研究采用封闭的队列病例-对照设计, 以对比在移植后前 3 个月期间具有或没有 BCAR 的受试者的差别化基因表达。在移植后前 12 周期间诊断出的具有 BCAR 的患者 (病例) 与在相同观察阶段中没有临床或 BCAR 证据的那些 (对照) 进行 1:2 匹配。通过常规的临床和实验室参数, 诊断所有排斥发作, 通过活组织检查确认, 并根据肾同种异体移植物病理学工作分类的 Banff 标准进行分级。Banff 分类 2 和 4 (抗体-介导的或急性/主动的细胞排斥) 视作显著的。单独分析具有边界变化的受试者 (类别 3)。在移植项目电子数据库中记录所有基线统计和随访数据, 且在研究期间没有随访缺失。

[0263] 免疫抑制: 免疫抑制包括在第 0 和 4 天, 静脉内施用 20mg 巴利昔单抗, 0.075mg/kg 的他罗利姆 1 天 2 次, 和 1000mg 的麦考酚酯 1 天 2 次。通过串联质谱法测量药物浓度; 调节他罗利姆剂量, 达到移植后第一个月 8-12ng/mL 的 12-小时波谷水平, 第二个月为 6-9ng/mL, 此后 4-8ng/mL。第一次移植且未敏化的受试者在移植当天静脉内接受 125mg 甲基泼尼松龙, 并在第 1 天口服 1mg/kg 的泼尼松, 在移植后第 3 天之前减量至零。对于第二次或后续移植的受体, 缓慢地且以逐步的方式减少泼尼松剂量, 以维持 3 个月后隔日 10mg 的剂量。每天用静脉内 500mg 甲基泼尼松龙治疗排斥发作, 持续 3-5 天。每天用静脉内 5mg OKT3 或静脉内 15mg/kg ALG 治疗类固醇抗性的排斥, 持续 7-10 天。

[0264] 血浆收集和耗竭: 将在计划的时间点和疑似排斥时从移植受体采取的全血样品, 以及来自正常无疾病对照 (可比较的年龄和性别) 的类似血样抽进 EDTA 试管, 在处理之前储存在冰上。分离血浆, 并在 -80°C 储存 2 小时以内, 然后转移至液氮, 直到选择用于分析。然后将血浆样品解冻至室温, 用 pH 7.6 的 10mM 磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 稀释 5 次, 用自旋-X 离心管过滤器过滤。通过 325 μ L 样品环将稀释的血浆注射到 5mL 鸟抗体亲和柱 (Genway Biotech; San Diego, CA) 上, 其能去除 14 种最丰富的血浆蛋白: HAS、IgG、纤维蛋白原、转铁蛋白、IgA、IgM、触珠蛋白、 α 2-巨球蛋白、 α 1-酸性糖蛋白、 α 1-抗胰蛋白酶、载脂蛋白-I、载脂蛋白-II、补体 C3 和低密度脂蛋白 (主要是载脂蛋白 B)。收集流穿级分, 并通过加入 TCA 至 10% 终浓度进行沉淀, 在 4°C 温育 16-18 小时。通过在 4°C 在 3200g 离心 1 小时回收蛋白沉淀, 用冰冷的丙酮 (EMD; Gibbstown, NJ) 洗涤 3 次, 并用 200-300 μ L iTRAQ 缓冲液重新水合, 所述 iTRAQ 缓冲液由 45:45:10 的饱和脲 (J.T. Baker; Phillipsburg, NJ)、0.05M TEAB 缓冲液 (Sigma-Aldrich; St Louis, MO) 和 0.2% SDS (Sigma-Aldrich; St

Louis, MO) 组成。然后在 -80°C 储存每个样品。

[0265] RNA 提取和微阵列分析

[0266] 使用 PAXgene™ 血液 RNA 试剂盒 [目录号 762134], 在解冻的样品上进行 RNA 提取以分离总 RNA。常规地从 2.5ml 全血分离出 4–10 μg RNA, 并使用 Agilent BioAnalyzer 证实 RNA 质量。在干冰上包装含有 1.5 μg RNA (RIN (RNA 完整性数字) > 5 , 且 A240/A280 > 1.9) 的样品, 并由快递 (overnight courier) 运送到 Microarray Core (MAC) Laboratory, Children's Hospital, Los Angeles, CA, 用于 Affymetrix 微阵列分析。在 CAP/CLIA 认可的 MAC 实验室, 由单个技术人员进行微阵列分析。初生态 RNA 用于双链 cDNA 合成。然后用 Affymetrix cDNA 合成试剂盒 (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA) 标记 cDNA, 片段化, 并与杂交混合液混合, 并在 GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 阵列上杂交。以每批 48 个, 用 Affymetrix 系统扫描阵列, 从合并的正常全血制备内部 RNA 对照。使用 Affymetrix 1.16.0 版和 affyPLM 1.14.0 版 BioConductor 包 (Bolstad, B., Low Level Analysis of High-density Oligonucleotide Array Data: Background, Normalization and Summarization. 2004, University of California, Berkeley; Irizarry 等人. 2003. Biostatistics 4(2): 249–64), 检查微阵列的质量问题。用来自相同时间点的不同 RNA 等分试样重复具有较低质量的阵列。Affymetrix™ NetAffx™ 注解数据库升级包 25 (2008 年 3 月) 用于鉴别和分析微阵列结果。

[0267] 基因表达分析

[0268] 微阵列分析利用 54,000 探针集合产生了每个样品的 1 个 Cel 文件 (Cel file), 所述探针集合分析来自超过 38,500 个确定证实的人基因的超过 47,000 个转录物和变体。在最终分析之前, 预处理所有 Cel 文件。预处理步骤是: (1) 基因芯片结果的质量控制, (2) 调节背景强度, (3) 将所有数据一起标准化, (4) 将探针-水平数据总结成探针集合强度值, 和 (5) 过滤探针集合成去除的探针集合 (removed probe-set), 后者不会在样品之间表现出足够高的强度。

[0269] 使用 Affy 1.16.0 版和 affyPLM 1.14.0 版 BioConductor 包, 进行质量控制。对具有低质量的样品重复。对 Cel 文件进行 RMA 标准化 (Bolstad, 等人 Bioinformatics, 2003. 19(2): 185–93 页), 并用 Affy BioConductor 包 1.16.0 版 (Bolstad, 2004, 同上) 进行 \log_2 -转化。在 416 个样品中的至少 3 个中, 粗表达过滤器剩下 21,771 探针集合, 信号强度为 $2^6 = 64$ 。然后使用过滤步骤, 以包括探针集合, 其在用于标准化的所有 416 个样品中的至少 3 个样品中, 具有至少等于 6 的 \log_2 -表达值。在预处理步骤中包括的总样品数是 416; 其中的 33 个来自移植受试者样品, 用于最终分析中。

[0270] 胰蛋白酶消化和 iTRAQ 标记: 使用双金鸡宁酸测定法 (BCA) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO USA) 测定总蛋白浓度, 并用于得到来自每个样品的 100 μg 总蛋白。然后通过加入 10 体积的在 -20°C 的 HPLC 级丙酮 (Sigma-Aldrich, Seelze, Germany) 并在 -20°C 温育 16–18 小时, 沉淀每个样品。通过在 16,110g 离心 10 分钟, 回收蛋白沉淀物, 并溶解在 50mM TEAB 缓冲液 (Sigma-Aldrich; St Louis, MO) 和 0.2% 电泳级 SDS (Fisher Scientific; Fair Lawn, NJ) 中。用 3.3mM 的 TCEP (Sigma-Aldrich; St Louis, MO) 还原每个样品中的蛋白, 并在 60°C 温育 60min。用终浓度为 6.7mM 的甲烷硫基磺酸甲酯封闭半胱氨酸, 并在室温温育 10min。

[0271] 然后用测序级改良的胰蛋白酶 (Promega ;Madison, WI) 消化还原的且封闭的样品,并在 37°C 温育 16-18 小时。然后在高速真空机 (speed vacuum) (Thermo Savant ; Holbrook, NY) 中干燥胰蛋白酶消化过的肽样品,并根据生产商的说明书 (Applied Biosystems ;Foster City, CA) 用 iTRAQ 试剂进行标记。合并标记过的样品,并用浓磷酸 (ACP Chemicals Inc ;Montreal, QC, Canada) 酸化至 pH 2.5-3.0。

[0272] 2D-LC 色谱法 :在 VISION 工作站 (Applied Biosystems ;Foster City, CA) 上,使用装填了 5 μ m 珠子 (具有 300 \AA 的孔) 的 4.6mm 内径 (ID) 和 100mm 长的 Polysulphoethyl A 柱 (PolyLC Inc., Columbia, MD USA),通过强阳离子交换色谱法 (SCX) 分离 iTRAQ 标记的肽。使用的流动相是 pH 为 2.7 的由 10mM 磷酸二氢钾 (Sigma-Aldrich ;St Louis, MO) 和 25% 乙腈 (EMD Chemicals ;Gibbstown, NJ) 组成的缓冲液 A,和除了加入 0.5M 氯化钾 (Sigma-Aldrich St Louis, MO, USA) 以外与 A 相同的缓冲液 B。在分成 2 个线性部分的 80 分钟梯度中,收集 500 μ L 级份 :1) 0-30 分钟,使用 5% 至 35% 的缓冲液 B,和 2) 30-80 分钟,使用 35% 至 100% 的缓冲液 B。选择 20-30 个具有最高肽水平 (通过 UV 示踪测得) 的级份,将它们的体积减小至 150 μ L,准备纳米反相色谱法。如下将肽脱盐 :将级份装载上 C18 PepMap 保护柱 (300 μ m ID x 5mm, 5 μ m, 100 \AA , LC Packings, Amsterdam),并在 50 μ L/分钟,使用由水 / 乙腈 / TFA 98 : 2 : 0.1 (v/v) 组成的流动相 A 洗涤 15 分钟。然后将捕获柱切换进 200nL/分钟的细流 (nano flow stream),其中将肽装载上 Magic C18 nano LC 柱 (15cm, 5 μ m 孔径, 100 \AA , Michrom Bioresources Inc., Auburn CA, USA),进行高分辨率色谱分析。通过下述梯度洗脱肽 :在 0-45 分钟使用 5% 至 15% B (乙腈 / 水 / TFA 98 : 2 : 0.1, v/v) ;在 45-100 分钟使用 15% 至 40% B,在 100-105 分钟使用 40% 至 75% B。使用 Probot 微级份收集器 (LC Packings, Amsterdam, 荷兰),将洗脱液直接印迹到 MALDI ABI4800 平板上。然后以 0.75 μ L/斑点加入基质溶液,基质溶液为 3mg/mL 的在 50% ACN、0.1% TFA 中的 α -氰基-4-羟基桂皮酸 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO USA)。

[0273] 蛋白质组方法 :使用 iTRAQ-MALDI-TOF/TOF 方法进行蛋白质组分析。iTRAQ 技术的多路能力允许每个实验运行同时处理 4 个样品。为了确保不同实验运行之间的可判读的结果,在所有 iTRAQ 运行中,与 3 个患者样品一起处理参照样品种。参照样品种由来自 16 位健康个体的血浆集合组成,且用 iTRAQ 试剂 114 一致地标记。在试剂 115、116 和 117 之间随机地标记患者样品。每个 iTRAQ 运行允许相对于参照样品种鉴别和定量 3 个患者样品的蛋白。

[0274] 质谱法和数据处理 :对于每个实验,将肽印迹在 MALDI 平板上,并使用由 4000 series Explorer 3.5 版软件控制的 4800MALDI TOF/TOF 分析仪 (Applied Biosystems ; Foster City, CA) 进行分析。质谱仪设定在阳离子模式,MS/MS 碰撞能量为 1keV。对于每次 MS/MS 运行,收集最大 1400 冲击 / 波谱,造成总质量时间范围是 35-40 小时。通过具有集成的 ParagonTM 搜索算法 (Applied Biosystems) 和 Pro GroupTM 算法的 ProteinPilotTM 软件 v2.0 (Applied Biosystems/MDS Sciex, Foster City, CA USA),进行肽的鉴别和定量。针对国际蛋白索引 (IPI HUMAN v3.39) (Kersey 等人,2004. Proteomics 4 :1985-8) 进行数据库搜索,以鉴别在样品中存在的多肽。前体耐受性设定为 150ppm, iTRAQ 片段耐受性设定为 0.2Da。为胰蛋白酶切割设定鉴别参数,通过 MMTS 进行半胱氨酸烷基化,特殊因子设定在脲变性, ID 聚焦于生物修饰。检测的蛋白阈值设定在 85% 置信区间。

[0275] Pro Group™ 算法 (Applied Biosystems) 将来自 Paragon™ 算法的肽证据组合为样品中的蛋白的综合总结。将从每个 iTRAQ 运行鉴别出的蛋白集合组成蛋白组,以避免冗余。基于每种蛋白的单个肽的 Log 比的加权平均值,通过 Protein Pilot,估计每个蛋白组的相对蛋白水平(标记 115、116 和 117 分别相对于 114 的水平)。每个 log 比的权重是误差因子 (Error Factor) 的倒数,所述误差因子是通过 Pro Group 算法计算出的定量中的误差估计。然后将这些加权平均值转换回线性空间,并使用 Pro Group 算法中的 Auto Bias 校正选项,校正实验偏差。从对应的平均蛋白比的计算中排除来自下述情况的肽比:共有的肽(即,相同肽序列由超过一种蛋白共有)、含有前体重叠的肽(即,产生鉴别出的肽的波谱也为具有不相关肽序列的不同蛋白所有)、具有低可靠度的肽(即,肽 ID 可靠度 < 1.0%)、不具有 iTRAQ 修饰的肽、含有鉴别出的试剂对的仅一个成员的肽、和其中所有峰对的信噪比的总和小于 9 的肽比。当所有(非空的)肽比是 0 或 9999 时(表示仅鉴别出了试剂对的一个成员),对应的蛋白的平均比显示为 0 或 9999。在 Protein Pilot 软件文档中,给出了关于指定给每种蛋白的这些和其它定量度量以及关于倚倚校正的其它信息。

[0276] 尽管 iTRAQ 实验中的每个蛋白组可以由超过一种鉴别出的蛋白组成,但基于鉴别出的肽的对应列表,为整个组分配 3 个 iTRAQ 比的单一集合。使用称作蛋白组代码算法 (PGCA) 自制算法,关联所有 iTRAQ 实验之间的蛋白组。PGCA 将识别码分配给每个 iTRAQ 运行中的所有蛋白组,并将共同码分配给运行之间的类似蛋白组。然后使用后一种代码(也称作蛋白组代码 (PGC)) 来匹配不同 iTRAQ 运行之间的蛋白。该方法确保所有实验运行之间有关的蛋白和蛋白家族的共同标识命名法。

[0277] 统计分析

[0278] 使用 SAS 9.1 版、R 2.6.1 版和 BioConductor 2.1 版 (Gentleman, R. 等人, Genome Biology, 2004. 5 :p. R80) 进行微阵列实验的统计分析。将稳健多阵列平均 (RMA) (Bolstad, 2003, 同上) 技术用于背景校正、标准化和总结,可在 Affy BioConductor 包中得到。然后进行噪音极小化;将在至少 3 个样品中具有始终低于 50 的表达值的探针集合视作噪音,并从进一步分析中排除。使用 3 种不同的适度化的 T- 检验分析剩余的探针集合。2 种方法可在微阵列数据的线性模型 (limma) BioConductor 包中得到——稳健拟合与 eBayes 相组合,且最小二乘拟合与 eBayes 相组合。第 3 种统计分析方法,微阵列统计分析 (SAM),可在相同的 BioConductor 包中得到。如果基因在所有 3 种方法中的假发现率 (FDR) < 0.01,则认为该基因是统计上显著的 (Smyth, G., Limma: linear models for microarray data, in Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor, R. Gentleman 等人编. 2005, Springer: New York)。在表 2 中显示了变化倍数和最大 FDR 值 [3 种方法的最高 FDR]。

[0279] 通过应用逐步判别分析 (SDA) 鉴别核酸标志物,在统计上显著的探针集合上正向选择。线性判别分析 (LDA) 用于训练和检验作为“分类器标志物”的生物标志物集合,以产生具有最佳诊断质量的最小的或小的标志物子集。使用分类器构建的整个过程的 11- 折叠交叉确认 (11-fold cross-validation),评价基于生物标志物集合的主要分类器的性能。将样品随机地分成 11 个不相交集,每个集合由来自具有 BCAR 的受试者的 1 份样品和来自没有 BCAR 的受试者的 2 份样品组成,它们反映了总研究队列中的 1-2 分布 (one-to-two distribution)。对于 11 个不相交集集合中的每一个,以与主要分类器相同的方式构建新的

分类器：基于 3 个适度化的 t- 检验，鉴别出一列差别表达的探针集合，随后正向选择判别分析。然后基于在每次折叠时删去的 3 个样品，确定 11 个分类器中的每一个的分类准确度（灵敏度和特异性）。通过平均 11- 折叠交叉确认样品之间的性能，估计主要分类器的灵敏度和特异性。

[0280] 蛋白质组的统计分析：使用稳健的适度化的 t- 检验（经验的 Bayes, eBayes；Smyth 等人, 2004 Stat Appl Genet Mol Biol 3:Article 3), 对已经使用 PGCA 分配的蛋白组代码在每个分析的组内的至少 2/3 中检测的蛋白集合进行一次一种蛋白 (one-protein at a time) 的差别相对水平评价。当研究的样本大小较小时使用该 eBayes 方案会减少人工低样品差异估计造成的假阳性的数目。另外，它的稳健版本将更少的分析权重分配给统计极端的蛋白水平。这使得该方法对偏离数据群体的观察的灵敏度比经典的非稳健的检验更低。在 BCAR 阳性和阴性之间具有显著差异（即，p- 值 < 0.05）的平均相对浓度（相对于合并的对照水平）的蛋白组代码被鉴别为潜在标志物。

[0281] 然后使用基于鉴别出的潜在标志物列表的正向选择逐步判别分析 (SDA), 测定蛋白质组生物标志物集合蛋白。SDA 算法一次掺入一个来自潜在标志物列表的蛋白组代码。在第一步中，它鉴别出基于去掉一个 (leave-one-out) 交叉确认对样品进行最佳分类的蛋白组代码。在第二步中，它鉴别出第二个蛋白组代码，其与以前鉴别出的代码一起，在去掉一个交叉确认中对样品进行最佳分类。重复该操作，直到所有蛋白组代码依次被掺入，或直到执行 (n-2) 步，其中 n 是可利用的样品的数目。通过经由 SDA 算法选择的第一个 k 蛋白组代码，定义蛋白质组生物标志物集合，其中 $k = k_0 + k_m$ ，是第一次达到最大交叉确认准确度的步骤 (k_0) 并维持 k_m 额外步骤。在每个交叉确认中，使用线性判别分析 (LDA) 进行样品分类，每个组的先验概率设定在 0.5。在 LDA 中，使用从每个组 (BCAR 阳性和阴性) 的剩余训练样品计算出的平均相对浓度，输入在患者样品和 / 或合并的对照中未检出的每种蛋白的相对浓度。

[0282] 内部确认（蛋白质组数据）：通过生物标志物集合选择的整个过程的去掉一个交叉确认，进行统计确认。更具体地，在去掉一个交叉确认的每一步中，为分类去掉一个样品（检验集合），将剩余的样品用于构建分类器（训练集合）。然后在训练集合（即来自通过 SDA 生物标志物集合选择在每个组的至少 2/3 样品中检测出的蛋白组代码的选择）上进行整个生物标志物选择过程。使用 LDA，构建基于得到的蛋白质组生物标志物集合的分类器，并在检验集合上检验（已经如上所述处理先前和缺失值）。重复该过程，直到将所有样品都用作检验集合一次。基于每次运行的分类准确度，估计总特异性和灵敏度。使用 R 2.7.0 版（用于统计计算的 R 项目），执行所有统计分析。

[0283] 技术确认：按照生产商的指导，使用可商业得到的试剂盒，从一组 9 种蛋白质组生物标志物选择 2 种蛋白，用于酶联免疫吸附测定 (ELISA) 验证：肝细胞生长因子 - 样蛋白同系物 (R&D DHG00) 和 E3 泛素 - 蛋白连接酶 UBR4 (DiaPharma-DPGR032A)。

[0284] 下面的实施例进一步解释了本发明。但是，应当理解，这些实施例仅用于解释目的，不应当用于以任何方式限制本发明的范围。

[0285] 实施例 1：生物标志物与临床诊断的对比

[0286] 在该研究中包括共 33 位受试者，包含 11 位在移植后第一周内具有急性排斥的患者，和 22 位在移植后至少 6 个月没有排斥的患者。33 位移植患者在肾移植后 3 个月是临床

上稳定的。发现代表 160 个基因的共 183 探针集合是统计上显著的,且在 AR 和 NR 受试者之间一贯地差别化表达(表 2)。在图 10 中显示了探针集合代表的序列。来自在移植后第一周内具有急性排斥的受试者的样品聚簇到一起,与来自无排斥患者的样品分开。

[0287] 使用在表 5 中列出的核酸标志物集合,将实验受试者分类,将受试者分成排斥者(AR)或无排斥者(NR)(图 1A-C)。

[0288] 作为对比,仅使用临床参数的一组受试者的独立分类尽管能够区分 AR 和 NR 受试者,但是,两组之间的边界不象图 1A-C 所示的受试者组所表现出来的那样清楚,因为观察到 AR 受试者和 NR 受试者的一些重叠(图 2)。

[0289] 表 5:与急性期排斥有关的主要分类器(24 种核酸标志物)

[0290]

Affymetrix 探针集合 ID	基因标识	基因名称	log2 (变化 倍数)	变化 倍数	方向 (AR 相 对于 NR)	SEQ ID NO:
238320_at	++TncRNA	滋养层-衍生的非 编码 RNA	1.34	2.54	上调	150
211454_x_at	++FKSG49	FKSG49	0.75	1.69	上调	69
244752_at	++ZNF438	锌指蛋白 438	0.67	1.59	上调	182
204978_at	SFRS16	剪接因子, 富含 精氨酸/丝氨酸的 16	0.76	1.70	上调	56
1558448_a_at	++1558448_a_a t	CDNA FLJ35687 fis, 克隆 SPLEN2019349	0.79	1.73	上调	12
210787_s_at	++CAMKK2	钙/钙调蛋白-依 赖性的蛋白激酶	0.62	1.54	上调	91

[0291]

		激酶 2, β				
211251_x_at	NFYC	核转录因子 Y, γ	0.49	1.40	上调	40
209060_x_at	NCOA3	核受体辅激活物 3	0.83	1.77	上调	77
200805_at	++LMAN2	凝集素, 结合甘露糖的 2	0.72	1.64	上调	23
226266_at	PGS1	磷脂酰甘油磷酸酯合酶 1	0.91	1.88	上调	137
202150_s_at	NEDD9	神经前体细胞表达的, 发育下调的 9	0.49	1.40	上调	38
237442_at	++237442_at	---	1.03	2.05	上调	172
208120_x_at	++FKSG49/LOC730444	FKSG49 假定的蛋白 LOC730444	0.56	1.47	上调	69
217475_s_at	LIMK2	LIM 结构域激酶 2	0.78	1.71	上调	129
201473_at	++JUNB	jun B 原癌基因	0.76	1.69	上调	30
201970_s_at	NASP	核自身抗原精子蛋白(组蛋白-结合的)	0.52	1.43	上调	37
227510_x_at	++PRO1073	PRO1073 蛋白	1.16	2.24	上调	147
240057_at	240057_at	转录的基因座	0.52	1.43	上调	177
210184_at	++ITGAX	整联蛋白, α X (补体组分 3 受体 4 亚基)	0.65	1.57	上调	81
217436_x_at	LOC730399/LOC731974	假定的蛋白 LOC730399 假定的蛋白 LOC731974	0.60	1.51	上调	128
200709_at	FKBP1A	FK506 结合蛋白 1A, 12kDa	0.59	1.50	上调	19
210514_x_at	HLA-G	HLA-G 组织相容性抗原, I 类, G	0.58	1.50	上调	86
203748_x_at	RBMS1	RNA 结合基序, 单链相互作用蛋白 1	0.80	1.74	上调	54
205921_s_at	SLC6A6	溶质载体家族 6 (神经递质运载蛋白, 牛磺酸), 成员 6	0.65	1.57	上调	60

[0292] ++ 在交叉确认过程中鉴别出的 11 探针集合的交点, 以估计去除样品 (out-of-sample) 性能

[0293] 实施例 2 :

[0294] 受试者 :在观察期间接受肾移植的 305 位受试者中,27 (8.9%) 位在移植后前 3 个月期间发生了 BCAR, Banff 等级 $\geq 1a$;而另外 24 (7.9%) 位仅具有边界变化。27 位在活组织检查 (范围 :3-10 天,平均 :6 天) 中等级 $\geq 1a$ 排斥的受试者中共有 11 位 (40.74%) 满足具有立即移植物功能的病例选择标准,且没有感染或其它混杂的共病事件,24 位在活组织检查 (范围 :5-7 天,平均 :6 天) 中具有边界变化的受试者中则有 5 位符合 (20.83%)。选择另外 22 位受试者作为匹配对照,他们具有立即移植物功能,在移植后至少 6 个月没有临床的或 BCAR,且没有混杂的临床共病事件,并将 20 位正常对照受试者用作比较组。统计细节如表 4 所示。在移植后第一周具有 BCAR 的病例中,移植物功能明显低劣 (27 ± 10 相对于 $42 \pm 13 \text{ml/min/1.73M}^2$, $P = 0.004$),但是在第 3 个月时,病例组和对照组是相当的 (48 ± 11 相对于 $51 \pm 8 \text{ml/min/1.73M}^2$, $P = 0.359$),并在 12 个月观察期中保持临床上稳定,具有良好的同种异体移植物功能 (在第 12 个月, 54 ± 13 相对于 $53 \pm 15 \text{ml/min/1.73M}^2$, $P = 0.859$)。

[0295] 微阵列表达 :外周血样品选自在急性排斥的活组织检查时具有 BCAR 的每个病例,和在与各个病例相同的时间点没有 BCAR 的各个对照,并与来自正常比较个体的样品相对比。在 $FDR < 0.01$ 的来自具有或没有 BCAR 的患者的样品的微阵列分析鉴别出了共 239 差别表达的探针集合 (使用 LIMMA)、575 探针集合 (使用稳健的 LIMMA) 和 2677 探针集合 (使用 SAM)。3 种方法的交叉发现了 183 探针集合的更受限集合,对于所有 3 种分析方法,它们在病例 (BCAR) 和对照 (没有 BCAR) 之间都差别表达。在 183 个显著差别表达的探针集合中,182 个在具有 BCAR 的受试者中过表达,而 1 个 (编码表皮 - 生长因子受体 EGFR 的 1565484_x_at) 表达不足 (图 3)。

[0296] 基于这些探针集合的无监督的双通道 (two-way) 分级聚簇和主要组分分析证实了正常受试者、具有 BCAR 的患者和没有 BCAR 的患者之间的离散分离。主要组分分析 (图 4) 说明了受试者组 (AR、NR 和 N) 的分离,表明所有组的形心都清楚地分离。当引入来自具有边界变化的受试者的样品时,它们在病例和具有和没有 BCAR 的对照之间不均匀地分布。在图 5 中显示了代表接近 160 个基因的 183 个差别表达的探针集合包括的生物学过程。探针集合共有的重叠网络的组合,鉴别出了 3 个主要的生物类别,它们暗示与免疫应答、信号转导和细胞骨架改组有关的过程的参与。基因 - 基因和蛋白 - 蛋白网络的分析 (Ekins 等人, 2007. *Methods Mol Biol* 356 :319-50) 揭示,细胞因子 - 激活的 Jak-Stat 途径、干扰素信号传递、淋巴细胞激活、增殖、趋化性和细胞凋亡在 183 个差别表达的探针集合中突出显示。

[0297] 分类器选择 :尽管许多基因与 BCAR 高度相关,但共线性暗示并非全部都是开发用于该事件的分类器所必需的。因此采用正向选择判别分析,以鉴别由更节俭的 (parsimonious) 分类器组成的线性判别功能,所述分类器来自最初记载的 183 个差别表达的探针集合。在表 5 中显示了在该分类器中鉴别出的主要的 24 探针集合和它们各自的基因。

[0298] 实施例 3 :核酸生物标志物的交叉确认

[0299] 使用相同的减少方法交叉确认整个基因集合,以增强该分类器的稳健性,并估计去除样品性能。通过该方法产生的 11 个核酸标志物集合列表含有平均 103 探针集合,且在每个列表中存在起始 183 探针集合的 6 个最显著差别表达的标志物 (TncRNA、FKSG49、AVIL、

SIGLEC9、ANP32A、SLC25A16)。正向选择判别分析鉴别出了一组 11 个分类器,具有 87 探针集合的联合。在表 5 中所示的 11 个这样的探针集合包括在起始 24 探针集合分类器中。对于具有或没有 BCAR 的样品的鉴别,交叉确认产生了 73% 的总平均灵敏度和 91% 的特异性。

[0300] 最终的 11 探针集合(核酸标志物)分类器的性能如图 6 所示。该组 11 种核酸标志物包括 TncRNA、FKSG49、ZNF438、1558448_a_at、CAMKK2、LMAN2、237442_at、FKSG49/LOC730444、JUNB、PRO1073 和 ITGAX。

[0301] 添加连续的探针集合后,诊断准确度快速提高(图 6A),且完整 11 探针集合分类器的线性判别式值表现出具有和没有 BCAR 的样品的清楚分离(图 6B)。最后,移植后前 3 个月的纵向监视表明在 BCAR 时分类器评分的显著增加($p = 0.001$),随后在排斥发作的治疗和消退后回归基线值。在没有经历 BCAR 的受试者中没有发生水平相当的增加,且在移植后的任何其它时间,这些曲线之间没有明显差异(图 6C)。

[0302] 11 交叉确认分析证实了下述平均预测准确度:对于 AR 是 72.7% (灵敏度),对于 NR 是 90.9% (特异性)(表 6),且是在表 5 中显示的列出的一组 24 种生物标志物的预测准确度的估计。表 5 中的“++”符号指示在交叉确认过程中鉴别出的 11 探针集合的交叉集中的核酸标志物,以估计去除样品性能。

[0303] 表 6:核酸标志物的交叉确认分析的灵敏度和特异性结果

[0304]

	灵敏度	特异性
折叠 1	100%	100%
折叠 2	0%	100%
折叠 3	100%	100%
折叠 4	100%	100%
折叠 5	100%	100%
折叠 6	100%	100%
折叠 7	100%	100%
折叠 8	100%	100%
折叠 9	0%	100%
折叠 10	100%	50%
折叠 11	0%	50%

[0305] 实施例 4:蛋白质组生物标志物鉴别和确认

[0306] 共 305 位受试者在观察期间接受肾移植,其中 27(8.8%) 位在移植后前 3 个月期间产生了 $BCAR \geq 1a$ 。它们中的 11 位满足立即移植物功能的病例选择标准,在移植后前 4

周（范围：3-10 天，平均：6 天）内 BCAR $\geq 1a$ ，且没有感染或其它混杂的共病事件。选择另外 21 位受试者作为对照，他们具有立即移植物功能，在移植后至少 6 个月没有临床的或 BCAR，且没有混杂的临床共病事件；总共是 32 位移植受试者。除了 BCAR 的发生以外，所有患者是临床上稳定的，在 12 个月观察期中具有良好的同种异体移植物功能。选择 6 个另外的 BCAR 阴性样品用于内部确认，各有一个来自在发现研究中包括的没有 BCAR 的 3 位患者，3 个来自新患者。

[0307] 通过免疫亲和色谱法 (Genway Biotech ;San Diego, CA) 除掉 14 种最丰富的蛋白（白蛋白、纤维蛋白原、转铁蛋白、IgG、IgA、IgM、触珠蛋白、 $\alpha 2$ - 巨球蛋白、 $\alpha 1$ - 酸性糖蛋白、 $\alpha 1$ - 抗胰蛋白酶、载脂蛋白 -I、载脂蛋白 -II、补体 C3 和载脂蛋白 B) 后，小于 5% 的总蛋白质量被保留。用测序级改良的胰蛋白酶 (Promega ;Madison, WI) 对剩余的蛋白进行胰蛋白酶消化，并根据生产商 (Applied Biosystems ;Foster City, CA) 的方法用 iTRAQ 试剂进行标记，并检查以鉴别肾急性排斥的血浆蛋白质组标志物。在至少一个 BCAR 阳性样品和一个 BCAR 阴性样品中，鉴别出共 460 蛋白组代码，其中 144 蛋白组代码在至少 8/11 的 BCAR 阳性样品中和在至少 14/21 的对照中检出，通过每组的 2/3 选择标准。用稳健的 eBayes 分析 144 蛋白组代码，鉴别出共 18 蛋白组代码，它们的浓度在 2 组之间明显不同 ($p < 0.05$) (图 7)。在表 7 中显示了来自 18 个重要蛋白组代码的结果。

[0308] 正向选择逐步判别分析 (SDA) 鉴别出了 9 蛋白组代码的子集，其构成蛋白质组生物标志物集合（表 7 中的蓝色粗体字体）。与没有 BCAR 的患者相比，在具有 BCAR 的患者中，7 种生物标志物集合 PGC 被上调 (TTN、MSTP9、PI16、C2、MBL2、SERPINA10、UBR4)，2 种被下调 (KNG1 和 AFM)。图 8 说明了在每步正向选择中通过蛋白组代码实现的边缘分类性能。x- 轴显示了在每步中选择的蛋白组代码，以与在前一步中选择的蛋白组代码连接。y- 轴显示了通过每个连续更大的组实现的分类准确度。随着蛋白组代码加入组中，预测准确度的边缘增加快速稳定化，甚至 3 种蛋白足以实现最大准确度（图 8）。

[0309] 表 7：在 p - 值 < 0.05 时具有差别相对浓度的血浆蛋白。在列“AR 相对于 NR”中鉴别出的蛋白组构成血浆蛋白质组生物标志物集合。列“PGC”含有由 PGCA 分配的代码。在其它列中，给出了每组中所有蛋白的登记号和蛋白名称、对应的基因、通过稳健 -eBayes 检验计算出的 p - 值、变化倍数和它们在 BCAR 阳性中相对于阴性的方向（上调或下调）。

[0310]

登记号	PGC	基因标识	蛋白名称	P-值	Adj. P-值	变化倍数	AR 相对于 NR
IPI00759754.1		TTN	粗丝联接蛋白的同种型 1				
IPI00749039.2		TTN	粗丝联接蛋白同种型 N2-A				
IPI00179357.2		TTN	粗丝联接蛋白的同种型 7				
IPI00023283.3		TTN	粗丝联接蛋白的同种型 2				
IPI00759542.1		TTN	粗丝联接蛋白的同种型 8				
IPI00759637.1	**111	TTN	粗丝联接蛋白的同种型 4	0.00003	0.0045	1.21	上调*
IPI00759613.1		TTN	粗丝联接蛋白的同种型 5				
IPI00375499.2		TTN	粗丝联接蛋白同种型 novex-2				
IPI00375498.2		TTN	粗丝联接蛋白同种型 novex-1				
IPI00455173.4		TTN	粗丝联接蛋白的同种型 3				
IPI00412307.8		TTN	2268 kDa 蛋白				
IPI00436021.3		TTN	粗丝联接蛋白 (片段)				
IPI00884109.1		-	细胞粗丝联接蛋白同种型 PEVK 变体 3 (片段)				
IPI00789376.1	**18	KNG1	KNG1 蛋白				
IPI00797833.3		KNG1	激肽原 1				
IPI00032328.2		KNG1	激肽原-1 前体的同种型高分子量	0.00149	0.1108	1.18	下调
IPI00215894.1		KNG1	激肽原-1 前体的同种型低分子量				
IPI00032311.4	108	LBP	脂多糖-结合蛋白前体	0.00641	0.2024	1.22	上调
IPI00395488.2	222	VASN	Vasorin 前体	0.00666	0.2024	1.14	上调
IPI00827866.1		ARNT L2	芳烃受体核转位分子-样蛋白 2 的同种型 7				
IPI00142781.3		ARNT L2	芳烃受体核转位分子-样蛋白 2 的同种型 1				
IPI00163662.3		ARNT L2	芳烃受体核转位分子-样蛋白 2 的同种型 2				
IPI00465306.3		ARNT L2	芳烃受体核转位分子-样蛋白 2 的同种型 5				

[0311]

IPI00788724.2		ARNT L2	芳烃受体核转位分子- 样蛋白 2 的同种型 6				
IPI00789255.2		ARNT L2	芳烃受体核转位分子- 样蛋白 2 的同种型 3				
IPI00795339.2		ARNT L2	芳烃受体核转位分子- 样蛋白 2 的同种型 4				
IPI00827897.1		ARNT L2	芳烃受体核转位分子- 样蛋白 2 的同种型 8				
IPI00019943.1	**23	AFM	Afamin 前体	0.00679	0.2024	1.29	下调
IPI00873854.1	**224	MSTP9	64 kDa 蛋白	0.00863	0.2143	1.09	上调
IPI00292218.4		MST1	肝细胞生长因子-样蛋 白前体				
IPI00384647.1		MST1	肝细胞生长因子-样蛋 白同系物				
IPI00718805.1		MSTP9	脑挽救因子-1				
IPI00816378.1		-	21 kDa 蛋白				
IPI00847702.2	MST1	14 kDa 蛋白					
IPI00301143.5	**135	PII6	肽酶抑制剂 16 前体 的同种型 1	0.01286	0.2738	1.25	上调
IPI00845506.1		PII6	肽酶抑制剂 16 前体 的同种型 2				
IPI00007221.1	97	SERPI NA5	血浆丝氨酸蛋白酶抑 制剂前体	0.01925	0.2870	1.22	下调
IPI00165972.3	104	CFD	补体因子 D 前蛋白原 Harmonin (乌斯赫尔 综合征-1C 型蛋白)(自 身免疫肠病有关的抗 原 AIE-75)(抗原 NY-CO-38/NY-CO-37) (PDZ-73 蛋白)(肾癌 抗原 NY-REN-3)。同 种型 3	0.02044	0.2870	1.43	上调
IPI00218195.3		USH1C	harmonin 同种型 b3				
IPI00412105.2		USH1C	Harmonin 的同种型 4				
IPI00478105.4		USH1C	Harmonin 的同种型 3				
IPI00478519.3		USH1C	29 kDa 蛋白				
IPI00790818.1		USH1C	60 kDa 蛋白				
IPI00872537.1	USH1C						
IPI00303963.1	**38	C2	补体 C2 前体(片段)	0.01939	0.2870	1.09	上调
IPI00643506.3		C2	补体组分 2				
IPI00004373.1	**116	MBL2	结合甘露糖的蛋白 C 前体	0.02119	0.2870	1.367 8	上调
IPI00007199.4	**125	SERPI NA10	蛋白 Z-依赖性的蛋白 酶抑制剂前体	0.02335	0.2899	1.231 7	上调
IPI00022395.1	26	C9	补体组分 C9 前体	0.02917	0.2962	1.132	上调

[0312]

IPI00022331.1	230	LCAT	磷脂酰胆碱-甾醇酰基转移酶前体	0.03031	0.2962	1.182 2	下调
IPI00868938.1 IPI00796379.1 IPI00004656.2	103	- B2M B2M	β -2-微球蛋白 B2M 蛋白 β -2-微球蛋白	0.03179	0.2962	1.273 5	上调
IPI00219583.1 IPI00023019.1	69	SHBG SHBG	结合性激素的球蛋白前体的同种型 2 结合性激素的球蛋白前体的同种型 1	0.03180	0.2962	1.192 4	下调
IPI00749179.2 IPI00017696.1 IPI00385294.2 IPI00791987.1 IPI00877989.1 IPI00878772.1	29	C1S C1S C1S C1S C1S	未表征的蛋白 C1S 补体 C1s 亚组分前体 假定的未表征的蛋白 DKFZp686M10257 17 kDa 蛋白 蛋白 19 kDa 蛋白	0.04030	0.3532	1.081 7	上调
IPI00843999.2 IPI00640981.3 IPI00296176.2 IPI00180305.7 IPI00646605.3 IPI00746934.2 IPI00816532.1	**100	UBR4 UBR4 F9 UBR4 UBR4 UBR4 F9	E3 泛素-蛋白连接酶 UBR4 的同种型 1 E3 泛素-蛋白连接酶 UBR4 的同种型 4 凝固因子 IX 前体 E3 泛素-蛋白连接酶 UBR4 的同种型 5 E3 泛素-蛋白连接酶 UBR4 的同种型 3 E3 泛素-蛋白连接酶 UBR4 的同种型 2 凝固因子 IX (片段)	0.04317	0.3574	1.094 3	上调

[0313] *关于“AR 相对于 NR”的“上调”是指，与 NR 受试者相比，指定的蛋白组代码中的一个或多个成员在 AR 受试者中增加。关于“AR 相对于 NR”的“下调”是指，与 NR 受试者相比，指定的蛋白组代码中的一个或多个成员在 AR 受试者中减少。

[0314] **表示通过 SDA 选择的蛋白组代码。与 NR 受试者相比，指定的蛋白组代码中的一个或多个成员在 AR 受试者中增加或减少（如在最右列中所指示的）。

[0315] 登记号是国际蛋白索引 (IPI) 登记号；如在方法部分中所指出的，对应的多肽的氨基酸序列可以从 IPI 数据库得到。

[0316] 在内部确认中，采用两个方案来估计蛋白质组生物标志物集合的分类新样品的能力。首先，使用 LDA，去掉一个交叉确认估计出了与所述的发现策略有关的 63% 的灵敏度和 86% 的特异性。其次，使用 LDA，构建了基于生物标志物集合中的 9 蛋白组代码的分类器，并在 6 个新的 NR 样品上测试。这 6 个样品中的 4 个被正确分类。

[0317] 全部引文通过引用并入本文，如同特别地且单独地指出每篇单个出版物通过引用并入本文，也如同在本文中予以完整阐述。本文的参考文献的引用不应当解释为或视作承认这些参考文献是本发明的现有技术。

[0318] 已经通过实施例描述了本发明的一个或多个目前优选的实施方案。本发明包括基本上如本文所述的和参考实施例和附图的所有的实施方案、改进和变化。本领域技术人员会明白, 可以做出许多变化和改进, 而不脱离权利要求书所界定的本发明的范围。这些改进的实例包括, 替换本发明的任意方面的已知等效方案以便以基本上相同的方式达到相同的结果。

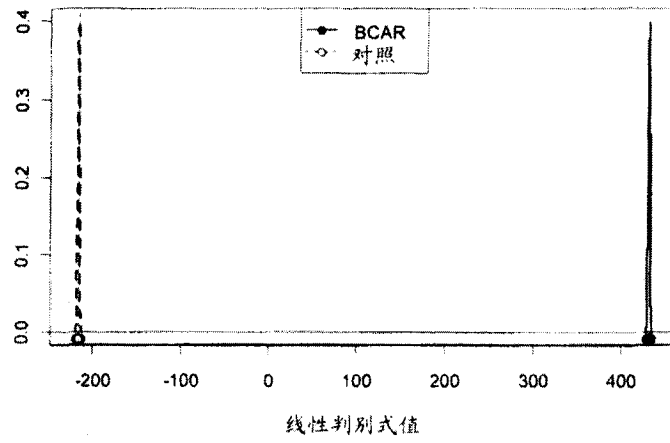


图 1A

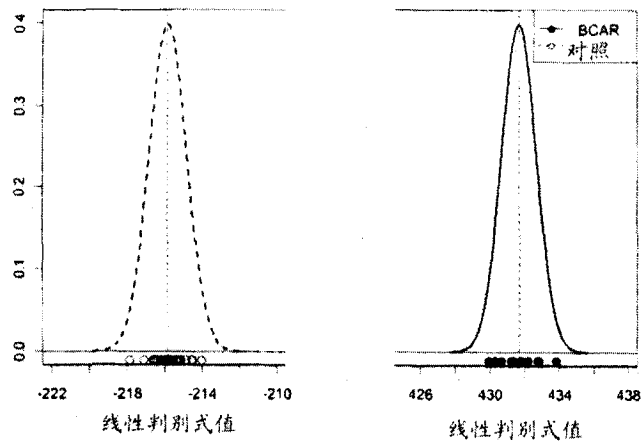


图 1B

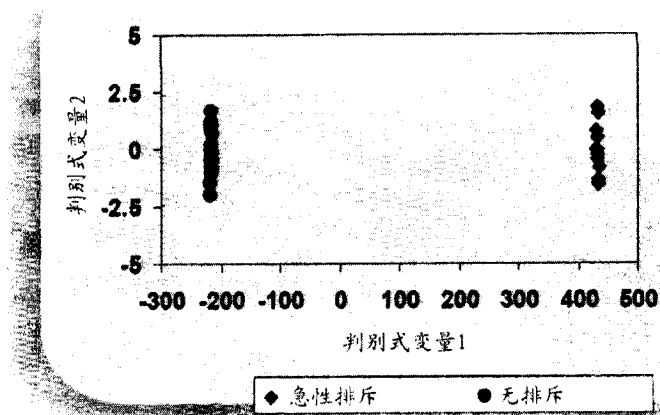


图 1C

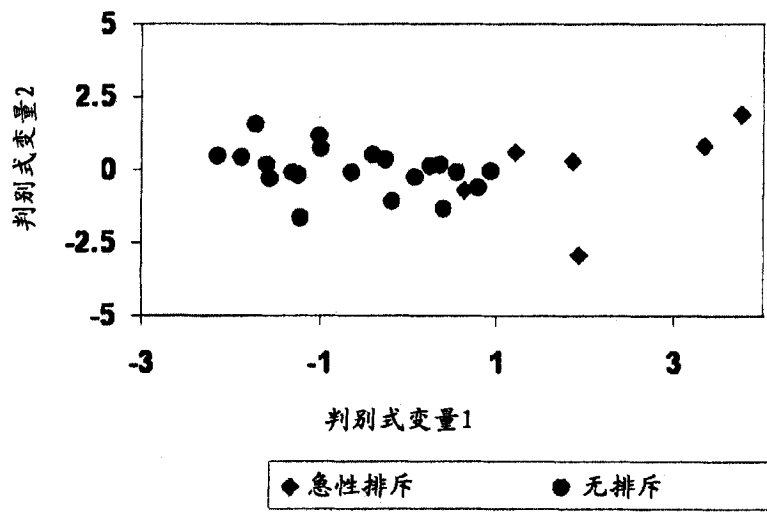


图 2

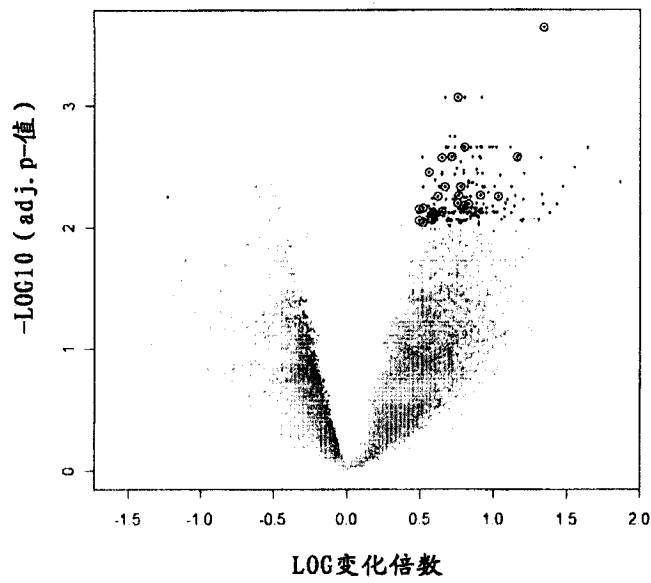


图 3

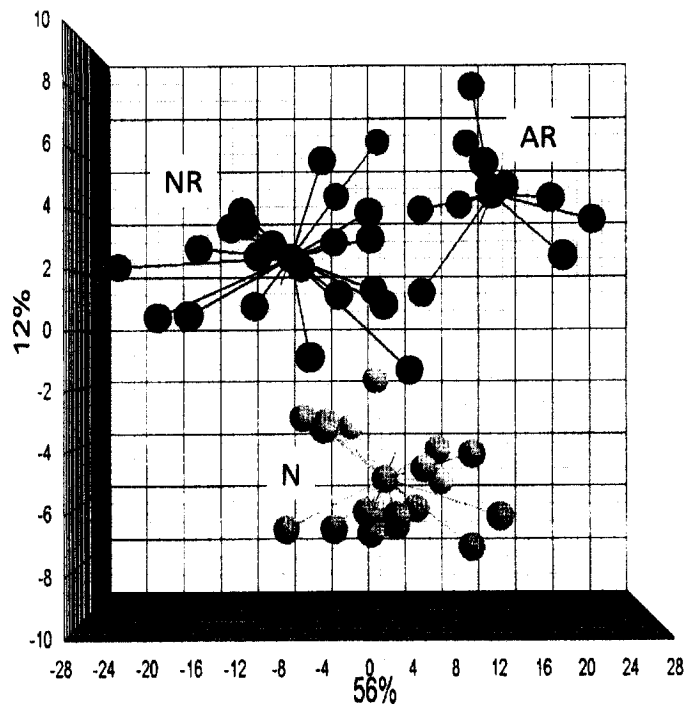


图 4

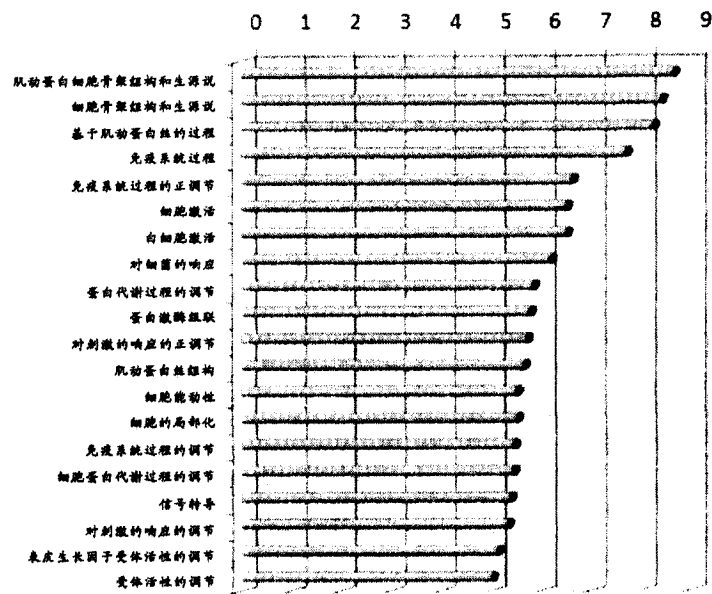


图 5A

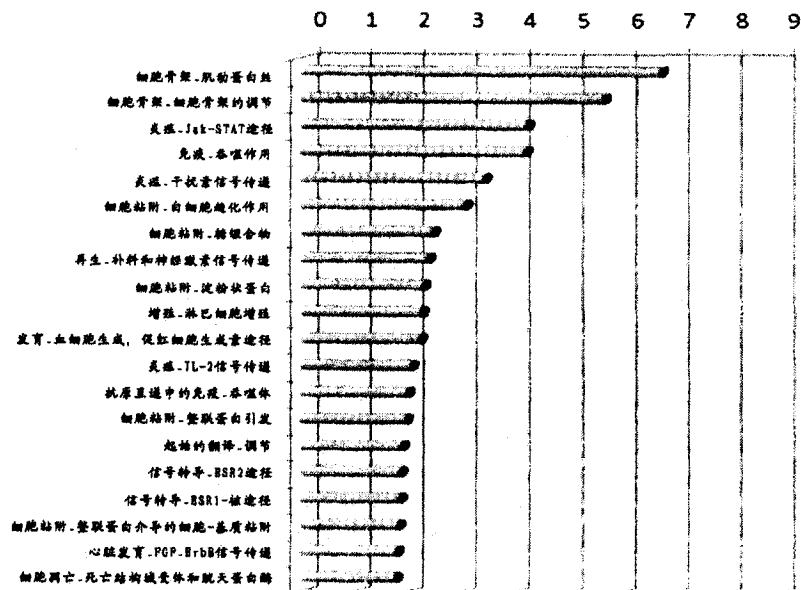


图 5B

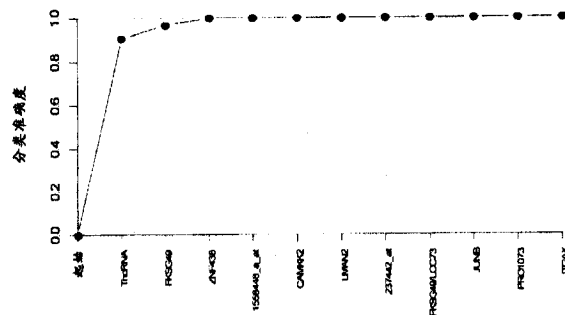


图 6A

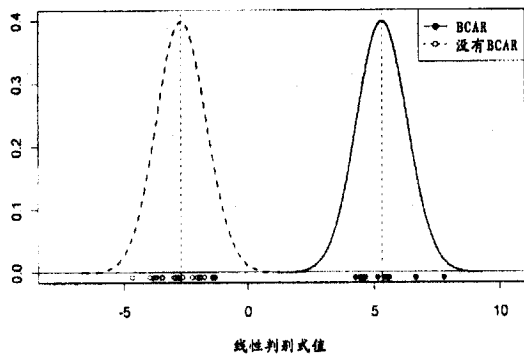


图 6B

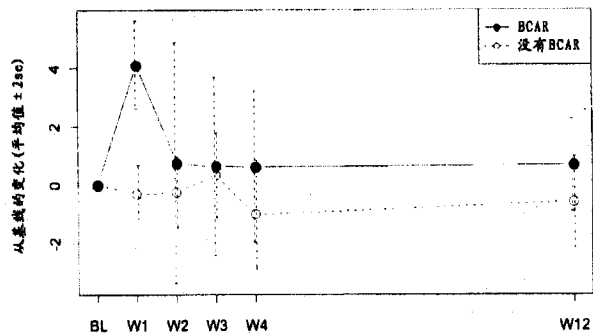


图 6C

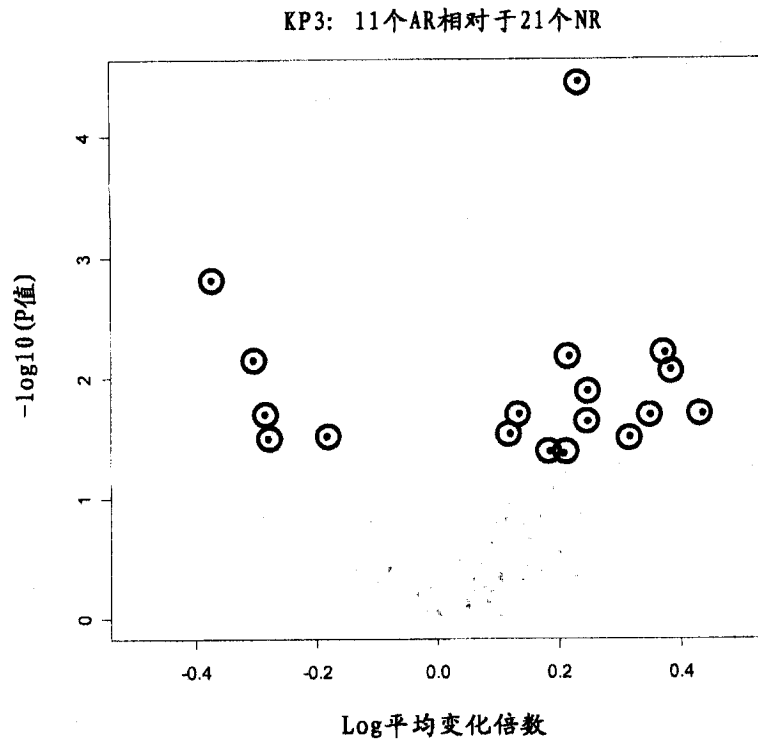


图 7

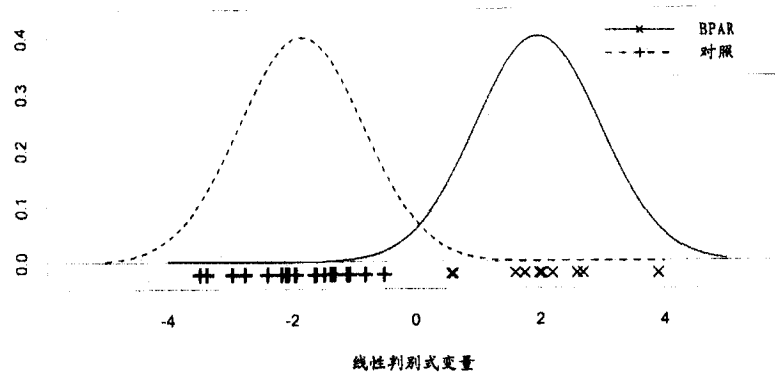


图 8

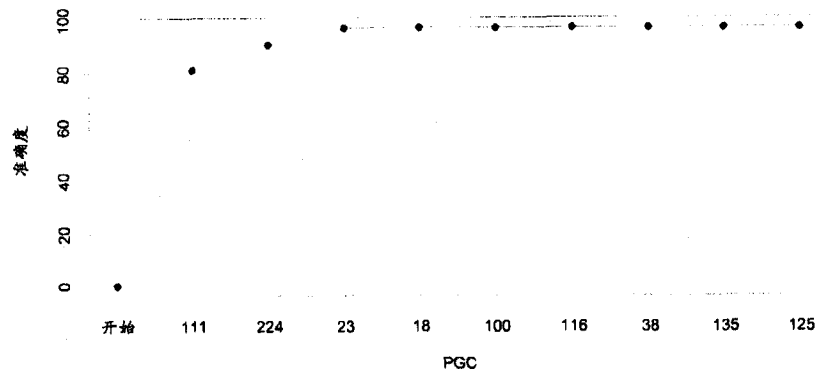


图 9

SEQ ID NO:	探针集合标识	靶序列
1	1552264_a_at	ttccagggaagcattatcttgaccagctgaaccacatttgggnlatcttggatccccatcacagaagacctgaat tgtataataaafitaaagctaggaactatttgcittcttccacacaaaaaagggtgccatggaacaggctgtfccc caaatctgactccaaagctctggacttattggacaaaatgtgacatcaaccacacaagaggattgaagtaga acaggctctggcccaccatactggagcagtaaacgcccagtgacgagcccatgccgaagaccattca agttcgacatggaatggatgacttgccctaaagaaaagcicaaagaactaattttgaaagagactgctgattccag ccaggat
2	1552542_s_at	ggaagctactttcaagcagctcttggagggtggatgggtgctctggagatgcaggacgaggaggacagaatc gaggccctgaaacaggtgcagataagctccccggcccaaccctctgclactcaagcacttggctatgtctgc acctcatcagcaagaactctgagggtgaacaggatggactccagcaatctggccatctgcaffggaccaacatgc tcacctggagaatgaccagcctctcatttgaagcccagaaggacctgaacaacaagggtttgtcttctactg atgagaaaatccccactatgatctaccatctgttgcgaatccaggcaataaaatgcttcagaatgtctccaact gactcagaatccagtgaaaalataaaaatgcaaaatgctttgtcatagttccactctctcagatatactgtat
3	1553186_x_at	aagaaacgggcaccacaagactatataccacacctggctcagagggtctacgcccacggaatctcgtgatt gctagcacagcagctctgagatcaaacctcaaggcggcaacgaggctggggaggggggcccgccatgccca ggcttcttaggtaaacaaagcagcctggaagctgaactgggtgggcccaccacagctcaaggaggcctgc ctgcccctgtaggctccacctctggggcaggggcacagacaaaacaaaagacagcagtaaacctctgcagacta agtgctccctgctgacagctttgaaagagcagtggttctccagcacgcagatggagatctggaacgggag actgctctcaagtggtccctgacctgacccccaaagcagcctaactgggaggcaccoccccaacagggg acctgacacctcacaggcgggtattccaacagacctacagctgagggtctctgtgttgaaggaaaactaa caaccagaaggacatctacaccgaaaaccctctgtat
4	1553297_a_at	aacagtacagctctaccctgatgacctgacccagaggggctggagctacacatcatctggccctgttccg ctctctgtgttctaccctgctctgaggaaactctggctctgttcagccccacaggaagaatccccttggcc aagtgtcccagaccagctcacagcagcctggctctctgggtgcccacaatcagggaggatgcttccagc tccccggcttggcagccaccatcaccagctcagctgctggaggaggatgaaaagaaagccgttccctg ggagtccealaacagctcagagacnnnnnnntcccactctggctcagacctatgtctccagggggacc agagcagtttccaccagcccccaatcccagctggcaccagcagctgggctcccccagggcagatctgata ctttaaggaccagatcatgctccatccagcccccaatggccttttggctgtttctataactcagta
5	1554691_a_at	caaggagcgttggacaacgggcaagttggcctataccggcaaatatgtggaggcagatccagtgatgagtc gggacagggccagcggggggacggagggcggcggccagggagcctcagccagccagctgggcatccactcc tttcttcaagagatgatgttccattgctcttggcttcatgggttcttggaaaggcagatgagctggatcttgcct gggactcggcacccttccgagtgagctggnaaggatcgaagcaggaagaccgagaacaacagaaaatagc cgcccccccccccactgtgctgtggcctatcatagatctclantgttcttacttngtctctcttccgagta atgggtgggnnnnncnnnnnngttccactgattactctctgacgagttccatccctgcaacttaaatg
6	1555420_a_at	ttcactgtctctcagtgcaacttgataggagaatccagcatcttaaagttgcatalgtgtagcactaatgttctttaa atagttgggggaaaatgacctaaacaaatggcagtttggtagccaaaatgaactcttggttatgttcttctgtg tgtgaaaagtcctactattccgtcagacttctcagaaactgttactgtgtttgttcttagtactattgagatc ttcgtctgatcccaacggccttagcggcggcagactggaataacaccttacaccttctggcctgcaattctgta gacttctctcaaggaggaggatttcttcttactgtttgacttttgcacaccatagcactaggagattctg
7	1555467_a_at	ctcaatgttggcttctggcaggaatggctgttfaaatggggcctggcagcagtgcccttccaatggcaccgg gagcaccatggaggccctcactcagccctactcgggtatccagcaatagctgctgctgctcctcccactctgtac aaccagaatctctgacacagcagatattggctgtctggaagccagaaggagggtccagagggaccaacct gttcatctaccactgccccaggatttggatcaggacctgctgcagatgttatgcccttgggaatgctgtgtct gccaaagtttcatagacaagcagacaacctgagcaagttgtttgtttgtaagtacgacaatctgcttccggcc caa
8	1555797_a_at	ggatgtcgaagaacacagtgctcggcccctccggaagggtggactggatgaaatagcagagaacaagttc gtggacgaagaagatggggcgcagcggccaggccggcccagcaggggcaggtggactcttgcctcctgcggc aaggaaacatgacagctgcccctacaggcagctctgaagaacccccatcaacacaaagagtcaggcagtgaa ggaccgggcaggcagcttcttgaagggtgctcactctttaaagctaatgatataagaaggcagttcaactct ggacaagaatgggtggatctctaatgaagtattataaaaggatttgagagcccgtcacaatagcagctgctat gttactcgaatggatgaaaaggcacttctgctggaggagtagggctccattgttctgtcttctgcaaga

图 10

SEQ ID NO:	探针集合标识	靶序列
9	1555852_at	ccattctgagcttctccgcaaacctttgttccattaaaggactgtttacatgaagggtgcaaaagtaggataaaaa tgagaacctagggtgaaacacgtagacaagaataaagactattgaatagctctctctaccatgacncttg gnattttatattgattttaaggaaataataactagtagtaaaagagatgagcattcaagtcaggcagacctgaattg ggtaaggctcggccactcaaaagctatagacctctatagagcagcttattcaaccttttaacctctcatttgc ctctgtagaagatgataaaatgctagctcagaaggattcc
10	1555950_a_at	taacttcaaggtccccaacacagttcagaaacctaccacagtaaatgttccaactacagaagtccccaacttct cagaaaaccaccacaaaaccaccaccaaagtctcaagcaaacggagctacacctgtttccaggacaacca agcattttcagaaacaacccaataaagggaagtggaaccactcaggtaactaccggtcttctcctc
11	1557924_s_at	caagtactggcagagcaagcgcaagagacactgaaatgtccctggagcttcagaagctcaacccaacgtag gctaaagatgctatgcttctggagatgggaggtgtctccacagtgacggctgcccgcacctcctcaagggtc agctccaccacaacctggggagagaccaggctggagatggacaagtcccttctggtgcccctcccaagac gtacaacccaatgccaggtccctgacagcggcggcaccgncaccgntacctgtgtggggtagggccaat cagggcaccgtggggtaagcgcancacactgancgttccgggtcaacaccaccanngggaacggaggtcac ctnctctcgcctgngggccaagcncnnggaaatctggtggcaltgtgaccaccagagatgaacctatg
12	1558448_a_at	ttggagccccttgaagaatcccctccacagcactgacagacagctggaagataggaaggtaccaggaagt cagagggctagctcaggaatctagcccctgataggagttcagaaaaagaaaaaggtgcccgggaccacaaggc ttgcaattccagggttaaaagtcaccagaaagtcgcccaagaatgaaattaccaaaccaaatgacatcct gtgaaattccaactctggattaacaagaagccctgaaagctccagagcaaacagatcacaataaacagctcac cagact
13	1563509_at	gaccactatcaaaaggcatggtgtcaggacaggctcgcgaagggttggaggccagaggggtttacattgc accttgagctggaagaaataaattggcagctccctcctcaaaaacagcaggatatttttaactcaggctcctgc ct
14	1565484_x_at	ctgcacctacgggtcctaataaatctcactgtctgactttagtctcccactaaaactgcatttcttacaattcaat ttctccctt
15	1565599_at	aatgttaactccatctgtgtgtggcgtgtgagcgcacctgtgctgtgcacagaagctggccttgggaaatct cttactagccaagatgtcctgggttcaacagttggcctgtgtttgtttaaaggcaatattgggaaatactgaaca caccggctttctctgattttttgtttccagtgacaagttagctatacaatcacccccacaattccattctgag ggctccaaacagctttgtaaacattctacaagaacacagttattttgattcacttaactttttacaacttttga gctttgtgagttttctgtgatttccagggcactaagtatctcattttttcaacctacaggaagctgatttaaat gaaacgcactgtgttcacagattctctgtaggtctttaaagaaataaaaaaacaaaacaaaacaaaacaaa aaaaaacactgaaagggtaaaagtcattttccatgacggacactgaataaggggcagggaaatgcttttacatga agtgctgcaca
16	1565717_s_at	gcagagcagtcagccctacggacagcagatitacagtggttatagccagtcaccggacactcagcctatggc
17	1568609_s_at	ggatgtttcaaggcagaccgaattcagaaggatatacagctctgctgacccaaggtccagagctgagga
18	1569003_at	ttcccagtagagcatacacagacgctcaacttctgtcaaggaaacttggcaaaccaacttacttatttgcctaaaa atgtgagtgagagctgtgaaatgtaattcagcccgaacttcccagaggggagaagaacccgattaaagctttac ctgtgtgtgtgccatttctgtttgtgtgaaagcttctgctgagcctccaggtactcctgaaatggcttctgcaga gafggacctatgccggggacagcactggaagcagggtacagtagcccaagaaagacacatttgggaaga aaagcaggaaaaactgtaaaagaaatgtacttaccctggactcaaaaggcagggattggataggaagagga ataaaataaaaaatcagagaactgctgaaattctgtgaccttttttagttnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn nnnnnnnctcctatcaaacacccttaaaaacaaaatctcccaccaactgtctgggagaaaccaagagctg taaatcagaaaccttccagcaa
19	200709_at	glagatcatgttcaactgcaatgctggacactacaggatctctgtccctggccagcagggacctctgaagcctttt gtggccttttttttctctctgtgttttcttaattgacattcaggaatttgaatcicataacttccagctccaccac ttcclaaacttaagaacttaattgacagtttcaattgaagggtctgtttgtgacttaacaccagtgaaagcccag ccatcatgacaatacttgaatgttcttaagaaaatgatgtgtctatcgcagcttcagcatcctgtttttttagt ttgg
20	200739_s_at	tgaagggtggccggcagggacggctccgtgtgagttcaagatcaagggcacacgocctgtagcaagctgat gaaggcctactcggagggcagggcttgtcaatgaggcagatcagattcaggttcgacggcagccaatcaatg aaactgacactccagcagagctggagaatggaggacgagaccatcagctgttccagcagcagagggg gggtgcccggagagcagcctggcagggcagatgttctagagggcccgtcccagcccggccttccatctc cattgtgtgaatggtgacacgtgacctgcccaccacaagggtgtctgaggaaactcagggacattcaccac gatgattttctc

图 10(续)

SEQ ID NO;	探针集合标识	靶序列
21	200796_s_at	g c g g c g a c i g g c a a g t t t g g c c t c a a a g a a a c g c g g l a a t e g g a c t c a a c c t c t a c t g t g g g g g g c c g g c t l g g g g c c g g c a g c g g c g g c c a c c c g c c c g g a g g g c g a c t t t t g g c t a c g g a g a a g g a g c c t c g g c c c g g c g a g a t a g g g g g a g g g
22	200797_s_at	c c c a c t t c c a a t t c a t t a g t a i g a c t g t g g a a l a c a g a c a a g a t c t a g t t g a t a t t t g g g c t l g g g g c a g l g a g g g c t t a g g a c a c c c a a g t g g t t t g g a a g g a g g a g g g a g t g g t g g g t t a t a g g g g a g g a g g a g g c a g g t g g t a a g i g c t g a c t g g c t a c g t a g t t c g g g c a a a t c c t c a a a a g g g a a a g g g a g g a t t t g c t f a g a a g g a l g g c t c c c a g t g a c t a c t t t t g a c t t g t t t g t c t a c g t c t c t c a g g g a a a a a t a t c a g t c t c t a g t g t t c a t g t a c a t t c t g t g g g g t g a a c a c c t t g g t c t g g t t a a a c a g c t g a c t t t t g a t a g c t g t c c c a g g a a g g g t t a g g a c c a a c a a t a a t g t t g g t t g c a a t g t a g t g t t t c c t a a c t t c t
23	200805_at	a c g g a g a g a g c a t c g a c t g g a c c a a g a t c g a g c c a g c g t c a a c t t c c a a g t c g c c c a a a g a c a a c g t g g a c g a c c c a c g g g a a c t t c c g c a g c g g g c c c t g a c g g g g t g g c g g g t g t t c t g c t g c t g c t c t c t c c l g g g c a l c g t t g t c t g c c g t g g t g g g g c c g t g g t t t c a g a a g c g g c a g g a g c g g a a c a a g o g t t c t a c t g a t g g c c t c c g g c g g g c c t g t c c t g g g c c c a g g a g c c a a t g t a a c t t t t t t a c c g g g a t a t a a a g a a c a a a g a t a c t t a t t c t t a a c t g t t c a a l a a a t g a t a a a g t a t t t c a l a c a t t t t c t t c t t c c c a g a g g g a c a g t g g c a g a c c g a g g c t a g g g t t a g c a c c c c c a c a g c t g g a g a c g g g a g c t c t c t g g g c t g g t g t c a g a g a c a g g g g t g t g t c a g a t g g g c t g t g g c c c t g c
24	200852_x_at	c a a c a t a c t g t g g c a t c a c c t o t g t t c c t t c t c g c g a g c g a c g g c t g c t g c t g c t g g o t a c a g a c t t c a a c t g c a a c a c t g g g a t c c a t g a a g g g c g a c c c t g c a g g a g t c t c g c t g g c c a c g a c a a c c g t g a g c t g c c t o g g g t c a c c g a c g a t g g c a t g g c t g t g c c a c g g g c t c t g g a c t c t t c t c a a g a t c t g a a c t a a t g g c c c c a c c c a c t g g g c c a g g c c a g g a g g g c c c t g c a t g c c c a c a t a c a g g c a g g g c t g c g g g c l g g c c a a t c c a g c c c c t t c c c g g c a c g g c c t t g g t c c c t g c c t c c a c c a g g t t g g t t c c t c c g g g g c c c c a c t g t g a g a l a a a g a g g g a t g g a a t g g g g a a g a g g a g a g c a g g a g c c c t a c t c t g c t g c c t g g g g t g g g c t c a c c c t c t g a g g c c g a c a g g a g g t g g a a c c c c a g g g g t g g c t
25	200904_at	l g t g c c t t a t c a t g g t t a a t g g a t a t g g t t a c a c a g a a l g g a c t g g t g g c t t a a g a a g a g g a a a g a g a a c t g a c t a g c a t g c c a g c c c a c a g a g a c c t c a c t a g a g t a t g t a a g t g g a a t g t g a g t g c a g c t g c c a c a g a g g c c c c a c a n g g a a t g t a g t g t c t a g t g a t c c a g g c c a c a g a g a g a g t g c c t g t g g a c c t g g a g a c a g a c t g a c a c c a c a g a c c c a g a a c t g t g a g t a g t g c a g a t a c a g a c c c c c t l g g g a a g c t t a g g c a c c a g c t g c a a c c a t t c g a g c a g c a c g t a g g c t g c a c c c a g a a g c c a c a g g c a c g g g c t a c t g a n g c c t t g g g g c c a a c c c t g c t c c a g t g t c c g t g a g g c a c a c a g a a g t c a a a g a g a t a t t c t t c c c a g a t a c c t t t t c t c c a t g a c c c t t a a c a g a t c t g c t a t t c c c t c a c c t c c c a g g c t g a c t g a g g t a a a
26	200959_at	a t c c a c c t g i g a g a a t a t g a a c t t c t t g g a g a a t g a a t g c a a c c a g t g t a a g c c c t a a a c a g a t g g c c a g g a g g g g a c a c a g t g g c t c a c a t g g g g g t a a c t a c g g g a l g a t c g t g t g g g c a g a g g g c t a t g a t c a g g c g g c t a c c g g g c c g c g g c g g g a c c t g g a g c t t c c a g g g g c c g g g t g g t g g g a c a g a g t g g c t t t g g c c t g g c a a g a t g a t t c c a g g g t g a g c a c a g a g a t c g a g g a g a g g c c t a
27	201043_s_at	g a a c t a a g c a t a a c a g a g t c t a g g g g c t g g a a g t a t t g g c a g a a a g t g c g a a c c t a c g a c t a t a a t t t a a g t g g c a a a a t t a a g a c c t a c a a a t a g a g o c a t g a a a a a g t t a g a a a c c t a a g a g c t a g a c c t t t c a a t g c g a g g t a a c a a c t g a a c g a c t a c c g a g a a a a t g t t c a a g c t c t c c c g a a c t a c a t a t c g a c g g c t a t a c c g g a c a a g a g g a g c c c t g a c t c g a t g c t g a g g g c t a c g t g g a g g c c t g g a t g a t g a g g a g a g a t g a g g a t g a g g a g a t a t a g a a g a t g c t a g g t a g t g a a g a c g a g g a g g a c g a g g a l g a g g a g a g a a g t g a a g a g g a g a c t g a g t g a g a g a g a g g a g g a t g a a g a a g t t a a c g a t g g a g a g t a g a t a c g a g g a a g a g a a g a g c t t g g t a a g a a a a g g g t c a g a a g c g a a a c g a g a a c t g a a g a
28	201090_x_at	a a t a c a t g g c t g c t g t t g l a c c t g g t g a c g t g g t t c c a a a g a t g a a t g c t g c c a t t g c c a c c a t c a a a a c c a a g c c a c g a t c c a g t t t g g a t t g g t c c c a c t g c t c a a g g t t g g c a t c a a c t a c a g c c t c c c a g t g g t c c t g g t g g a c c t g g c a a g g t a c a g a g a c t g t g t a t g t g a c a a c c a c a g c a t t g c t g a g g c c t g g g c t c c c t g a c c a a g t t t g a c t g a t g t a c a a g c g t g c t t t t a c t g t a c t g g g t g a g g g g a t g g a g a a g c g a t t t c a g a g c c c t g a a g a t a t g g c t g c c c t t g a g a g g a t t a g a g g t t g g t g t g g a t c t g t g a a g a g a g g t g a g g a a a g g a g a g a a t a c t a a t t a c c a t t c t t t t g c c c t g c a g c a t g t a t g t c c c a g a a t t c a g t c

图 10(续)

SEQ ID NO:	探针集合标识	靶序列
29	201440_at	aggacgacgctgctggaggcaggagagcaaatlaccacagctcttggcccaattcttcccttcttggcttgg attgcactggccatcagctcatgccaggctatggggcagccagttggcattgctccccagactgaacagaaa ctggccgccggatggacctcttggcacagactgactgtgtaactgcataaactgcagtagcaatcttggcc agatgccccagagagactggcaccatgaggatcacagacagtggaatttactgtc atctggacagctgtttcct gtttggatgtaaaaggaagttgagagcttttagacctgtgcacagccccgcaccaagggtgtcgtatgcttagg caccccccccaggggatttttaagtatgtagggggacacggggaactggctgtgtccatcttggc
30	201473_at	aggaggccagctcaaacagaaaggatgaccacgtcagcaacggctgtcagctgtctgtgggcaagg acacgcctctgaacgtccctgcccctttaccggacccccctcgttggcaggctggggcacacgcctcccactg gggtccaggagcagcggcggggcaccaccctgggacctaggggcggccgcaaacacactggacaccggc ccccctaccctggccagctccaccctcagctttacaagcccccttccactttttttatgttttttctgct ggaaacagactcgaatcattgaatataatatttggtaatttaacaggggagggaaggggggcagcgcggc ggagctggccccggcctgtactcaagcccggggacattgggaaggggaccccccccccctgcccctc cctctctgaccgtactgtggaaaagaacacgcacttagctctcaagagtttatttaagacgtgttttggttgtg
31	201531_at	atcaagtaatccctttccagaatgcattaacccactccctgacctcagcgtggggcaggctccccaaagtgtca agctcagattatcagtggtgggggagggagtgcttccgaggtcttgggggaaaaaaatgtagcatalttaag ggaggcaatgaacctctccccacctcttccctgcccacaatctgctctcagaatcttatgtctgtgtaataag ccttcaactgccccctcattttatagactgagggtccagtgctcctggaacggaaacctctctgagggggaat cctgtgtcctcaatcccccacaaagcaagtagccaaagccgttggccaaacccccacataaatgaggggcc tttatttatgacgacttatttctaatatgattttatgatttatataatgggtcgtctgcttccct
32	201651_s_at	ctggctccgtagcagaacactgtaaaagtcccgcgtctttgcagtagtgcagattcagctgctgttattctg cacaacagaagctgggtcttaccggcagcagagtgctcgggctggccggagtcgccggggagcagggtct gcagccagagttacggggggccacggcggccggcgggggtgggggaaacgtgggggaaactgttttccac tgactcagcagtgcccggccgctaccagctatgactcactccgttccagtgagacagatgtctgtgtaataag gtggacctgtctgtgtctctggaactaccagcagaatcctcaattctgtctacggg
33	201729_s_at	ggctagactttgccatggctgcaaaaaggacagccgcaaaagccctgggttggccaggtaatacaagagaagcta aggctgaagtctgcaacaggctctgaggctcgggggaaagctagaactaaatcggacctgaacatgcaacagc aggaagaggagagaaagcccggctcctcattgtttaaagtggtggcgacaagaacctggcaagaagctccat ctttggcagggcgaatgattggcgaattcagtggtgctgagtagcagatctgacttggctcaggctccaggga cttgggggggggggggctcccgttatccacgaggtttgggtgtagagccatagggatcactcttccagc acctgtctgttctgctgaggggcatggggacagtaagctgagttctgtctcactcaacactgacagct
34	201861_s_at	gcagttctcctcctgaaaacacagtagcaggttagtcaaatgaggctatgggtgcaccagatgacaggaccagaa ctccccctgagccatcaactgttggagtgacttagatggtgggaaccacacagagaatgtgggagagcagca gtgactcagggttgaagagcaggcagggcacagtgccctgtgtcctttaggccatagtgatgacacagttatcatg atgacaaatgtaggttagaggttccccagagtttagagacaagcaggggcatagtttagagaagaatcaccac accaggaagcagctgagcccaaggagggtccagcgcacagtagcagaagtaggtaggatcacaacgaagaag agggtgaagaacaggaataggagcagagaaccaatcaagacagaagttcctgtgttccagcaggaactga gggcaactgtcagggaagcgaagggtccaaagtagcagtagcactcaaaaagaaccttag
35	201950_x_at	acaagttgacctccacgggtgatgctgtggtcagaccacaacaaactggctctggcaccatgaacctggaggca gcctttaccagacagatggagaagatgaaactgtgagtgactgtctccccacacatagccaacatcgggctctg gtagaggacatggaaaataaaatcagaagtagctgtaaacgagatctactttggaaaaacaaggatcgtcaat gggctgaggtctgtcagacttttgcagacaatacaaaacaagaagctctgaagaatgacctgtgtgggctttg aagagaagcagcaatgcaaacctctgtttcagctaacacagacacggcgtgactctgttagatcttcttagaa aacctgtttctgtcttccctccttccctcccccagacagctcacataacagctgcatcatgaccgcacagc gccatctcctctgagaataaagccgatagccacctct
36	201954_at	cagacaacagcctggggcagcggggcagctgtctcccgggtgctgttccatgacggccggccggggat gctgagcttggcggggcggctggacttcttaagcagagctgcagcgtgcttggcggccggcggcctc cagaacctggacaagaagcggagctccgagggtggcagggctgcccggcggcggccttagactcgtgtcaca gaacagctcagccagatctgggtgctcagcggcggcaaggccaagtgtcgcagttctgaccactggcatg gatggcggcatgagtagtctgggatgtgaagagcttgagtcagccttgaaggaccctcaagatcaaatgacctg aggaatatgttcccttactcactaactgtggggaagcggggagagggtcagggaggtcaatgtgttctgtg aatgtttctggggtaacaaacaggttccataggggctgtctcctcaaaaaggaggagcagatggggagctt ttctacatt

图 10(续)

SEQ ID NO:	探针集合标识	靶序列
37	201970_s_at	gaggaaactaaaggaactgctaccgaaatfagagagaagatagaagatgcaaaaggagctcagcgtatggga atgtagctgaactggctctgaaagctactctggggagagttctactcaggttctactcctggggaggagctctt cagctcctcattgattgccagtagaaagccaacagacggctctcctcaaaatgtgtgactgataatccaccctgt cagaagaagaggaaccagagaagagagatccccgaaagatgatgcaaaagaaagccaacaagagccg gagggtaacggggagcagtggggatgcttcccagtggaatgaagtttcgaaaacatggaggagggagcct gagaatcagctgaaaccggagcagcagtgagggggacactggaggctggagctacagttgaaagc
38	202150_s_at	gacatctcgaagtggaaagccctctcagagccctaccaccacaacagtgccgtgagtgctcaggatcggcaggt gctgtgctctactatgaccaatgtgagaccatttcttccctctcaacgccattgacgcactctcagttgtgtca gctcagcccagccccggaaatctctggccacacagcaagttgtcctcctcagtcacacaaactgggttctatt ggagacacgctgacacggcaggtgactgcccaggacattcgaacaaagtcatagaactcagcaaacagcctct ggagcagctcaagactatgctatggcaaccaagatggcccccattaccagccaccagggccctcag gaaatgtgacccaagtgcagacccttctgaaatgccagctgttcaagcgtctttgtctg
39	202180_s_at	tgagcatggccgtggagagcaccgggagctgccaaggcggaggccgagctcccgtcggaggcagcccggatt gggggagaagggtccgtgctcagggccaagctaaagacacagccctggccattgaaacggaggctgagctc cagaagggtccagaaaggtccggagcctggaaactggctctatcccgggcccagctggagctggagggtgagcaag gctcagcagctgctgagggtgaggaagttcaagcagatgacagaggccatagggcccagccactca gggacctgtctggcctggcctgagatgacaggttaaaactgctccagctccctgggcccctgaaatcaacctcatca ccgatggctccactccatcaactctcaacacagccttgggctgctggggatggggcccggggctgagcctc ctggcagaagggtgcccagtgcccagccctgggggggatatccccagctctgctcagggcccctcaagct cctggagacaaccagctgtgcttactgctgctactcctgattaata
40	202216_x_at	gatccccgtgagctgaatgcccggccagctgcagtatatccgttagcccagcctglatcaggcactcaagttgtg caggagacagatccagacactgcccacatgctcaacagattacacagacagaggtccagcaaggacagcagc agttcagccagctcagatggacagcagctctaccagatccagcaagtcaccatgctcggggcaggacctc ggcccagccatgttcaicagtcagcaaccagccctccagcggcaggcccagggctgaccggcagctc gggctgagctgcaagggccaaggacaccaacaattttgccatacagcccagggcaatggggcagcagcctt cctcccagaggaccggccgacctcagcctctcagcctagggacactggtgcactacacc
41	202423_at	tgaaatcagccataacgcacacacagcccagccctctgttctagatgactttgaaatgtaactgagggct tgatgcttgagccctgactgataaaactaaalagcagctcccagtgattgctcttggcttctttaaatttgg tggatgactgtacatttgaattgaaaaataactgacaaccattgaaacagttatatttgggaagagatggc gcagatgtgtgtagaaggagatcacggtgtgatttctgtagctattaaatgatalacactcagttttgtatgic ttttgagatctgagttatccccgtgaaatcagatgcaaacacactcctctgtgagtgctlaatgagaagagg acagaccgaccacagcagataggcagatctggacagcagaatgtataacgaaagttcatgtgtgtctccca actc
42	202510_s_at	gtcgtctttctattttaggtcagctgattagccactagttccatctgcaactttagtcccactggctgtgtaacct acatagtcacaggtctggggactgctacgtggacatcttggggagccgttattctgcccaccgaccctccgt catccctgcccctgcccagcctcgtctaccccaggaatgtgagctgcttctgctcggcctgtgctccc ccaaaggctctgctcctcctgggctgaaagtctctcagcctgagagggggcccctctgactcagggatgac tcagcccggctgatgctctcagctgagctgagctgaggtttggggccggctctcttgggtctgctccttcccagg tactgcttcaaaagctgtggccaggaagtgccgggtataaaggatgcccaggctttgtacgtgtg
43	202531_at	acaggagtcagctgctgttctctgagccagctgctggagaggctcgcgtgactgctgctgctgctctag gggaacagaccagtgaccogaanaagcacaacccaatcccaggctggctctgcaactaagcgaatgtgca ctaaatgaatctgtccaagaactaccctttcagctgagccctggggactgtccaagccagtgatgtgaa ggaaactcccctcctggggcaatgctcctcagcctcagaggagctcaccctgctcctgcttggctgagg gcttgggaaaaaacttggcacttttctgtgtgatttgcacattctgatcagaggtgtacactaactttcccc gagctctggccttgcatttattatagctgcttctgctggggcccaccaccctcaagcccagcagcctca acaggcccaggagggaagtgtgagccttggatgactaa
44	202897_at	gcaggagctcagcatagaccagctctggggatgctaccctggtgattcaatgatggcatccaggaatag ctgagccaacagaccatgggacagcttggccagagctcccgtggcactggggagccacagtgaccagcc acctggctcagctagttccaattccaagaatggcttgaacacttctctcctcttttaccagagacagc acatacgtgtgacacgcacacacacattcagttttaaagaatgtttctgtggcttcttcttatttatt tttaattcttggaggggaaataagggaataaggccaaggaatgtatagctttagctttagcctgcaacctgg agaatccacatcctgtgtattgaaccccaggaagaagggtcgaaccaaccctgcccgaaggagcatggt ttcaggagtttttaagactgctgggaaggaaacagggcccatttggat

图 10(续)

SEQ ID NO:	探针集合标识	靶序列
45	202910_s_at	ctgtggccacagcagcttftgtacacgaagaccatccatccctcctcgtccaccactctactccctccacctccctccctcctgatccctgtgcccaccaggaggaggtggcagctatagctggcaccaaagctccaggacaccagtgagggtggagtcggagccactgctctgctgctggctcctctgctccaccctgtgaccagggtggggacaggggctggccccagggtgcaatgcagcatgttccctggccactgtggccagctactgggacagactaaaggcgtgtgccccatccctggaacttctctctcttctgctgagaactgaagagactaggcgtggggctcagcttcccttaagctaagactgatgcagaggccccatggcagggccccctggggccactgctgaggctcaccggtacagaggcctggcctggcggcaggagggttctc
46	202951_at	aaagcatcattgacactatgtgggaacttgcctgttgcacaagtattgtggccagctcagctgggagcctgcttctgcccagcttgagggttgaagatcagcttgaagaaggaaagtatgcttagcttagccattcagaagagaaaaatggaatatacagagttacagttgctcagtgaaactacttggatttaacctttagaggagaagaaaaagggttagggaggtgtcaactctggatgaagggtatgtttgctctcagcttcttcatatagcctgctagtgaagaggaaatgaatgagatcttttggtagcttggtagctcttggtagtaccataatagttgggggtgtgtagctctgtgttttgcagaagtgtggtatagcctggtaaaagagaaggaactcgggtgtgggagagcttgggtgtggggagtgccaggggatgtttgactgcccacaagcagatcaggccacgtgaggccaccctgctctgctcactgtaactagaagccgagcctagaaaactaacacagccatcagggaatgactggggcggccttgggaatcgtatgagaatgaaacttcaggggagggtgctcattgcccagaggtgctcattcattaaacagagcttcccttaggtttagctggaggcagaaacctggctgcaagggtgtcagtaagggggagcaacagaggacatgaaaaatgctatgactaaagcagggacaatttgcctcaaacacctatgccagctgtatggctgggggctcctgtagctatggaacccccagaataatatlgtcagccaccctgtggcggcggcaatccagacagcagcataaggcaccagttaccctgcatgtggccagacctaggtctagggaaggcgggaaccttgggtgagtaagtctgctgtgtgttt
47	203233_at	aggcactaaaggcagatctggcagcccaagccctaaagaagcagctatggcattccacccaagatcatgtgtgttccagaggccagggagcccaagaccatcactgacaggtttagcaggggcacctacatctactttagctacagagaagtgggccagcgggaagggcttcccttgggtaccg
48	203239_s_at	gaagatggttggcggcaltgcccagatcctgcagcagcaggaagaaatgcttgggaaggaaagagagctggaaaggcgggaagaaactggcccagatcggcagcagcagctacaagtcttccctcagagcttcagatgagcactaaagaagcctctctatattaaagcagaccctgaaacagatgtgtgtgaaagtataatttcaatccagattttaaattttaaagctccagaaagaaaggagatgagaacttttccctatttataaactcctcttgcctccctcaatccctgtaaacctcgaagctgttccactcccagatggtttatcaatagcctagaggtaagaagactgtcttttctgtatttataaattatcttataagaatagcacaagttttctactacagctgt
49	203254_s_at	gaatatacagcttaccctgggaatactactgacaatttttaaaatttccaaactgaaagatgggtcataattacagctcaccgtccaagcaagatgcttittggcaaccagatctggggagcctgccaatcctgctgtagcagctagggtgtctgctgagatgcatcgaacgcaggctgccagatcaggatgttgcctgtgtgtgcccattattctgatactgctgagcctgggggtgggtttgccatcctgtacacgaagcaccggaggctgcagagcagcttccaggccttcgccaacagccactacagctccaggctgggggtccgaatcttctctggggatgacctgggggagatgataagatgccctatgataactggattttagatgacgtcccattggtagcctgaaagagcttctcactagaacca
50	203471_s_at	aaggactcagagccacagaaacttctgagagggtgctttagcattgcccagcactctcagttccagtaaatgatlattgcttctgctcagctttaaagcacaagtagcagcagctcctgcttggagttcaggggcatatgcccctatgattaacagagtgatctaacctagactaaaattgggaacttattgcaattttgacctgaccactaactagtgattctctccaaaattgagaagcagcagcccatgaaacagatgtgtgtgaaagtataatttcaatccagattttaaattttaaagctccagaaagaaaggagatgagaacttttccctatttataaactcctcttgcctccctcaatccctgtaaacctcgaagctgttccactcccagatggtttatcaatagcctagaggtaagaagactgtcttttctgtatttataaattatcttataagaatagcacaagttttctactacagctgt
51	203509_at	gaatatacagcttaccctgggaatactactgacaatttttaaaatttccaaactgaaagatgggtcataattacagctcaccgtccaagcaagatgcttittggcaaccagatctggggagcctgccaatcctgctgtagcagctagggtgtctgctgagatgcatcgaacgcaggctgccagatcaggatgttgcctgtgtgtgcccattattctgatactgctgagcctgggggtgggtttgccatcctgtacacgaagcaccggaggctgcagagcagcttccaggccttcgccaacagccactacagctccaggctgggggtccgaatcttctctggggatgacctgggggagatgataagatgccctatgataactggattttagatgacgtcccattggtagcctgaaagagcttctcactagaacca
52	203591_s_at	ctatgtctccagggggacccaagagcagtttccaccaagcccaatcccagctggcaccagcagatcaggctctttagggcagctgctggcagccccacaagcccaggccaggcactatctccgctgtagctccactcagccccttggcggcctcacccccagccccagctctatgagaaccttgggtccaggccagccccttggggaccctggtaaccccagccccagccaggaggacgactgtgttggccactgctcaacttcccctctgcaagggtatcgggtccatgggatggagcgtggggagcttcttagggcttcccttggggcttcccttgggcttcaaggcctgagctagctggagaaggggggtccataaggccatgactaaaaactccccagccaggctctcaccatctccagctcaccagatctccctctcccaatctccatagctggggcctccaggcagctgatactttagggaccagatcatgctccat

图 10(续)

SEQ ID NO:	探针集合标识	靶序列
53	203624_at	ctaggaggtagcagggccaccatagtcacactggcactgaaaagaaagcgttgccttggtgattcttcccccc gtttgtaagttaactgatcaggaaagtcaggttggggggatgccaatcgtcgtgacattgagtcacaggatg aggaaggtacaaagctcttaagatcaaaactcaaacggccgttcttctaagggtgcggtatgtggggagtggtgta caaaatggtctgatgctcctcaaaaacattcactttttacaacgtcaaggaaatgaagcatalaaaaagattggttaaaa gctttggttctagtaaaaggttagtgggttttttaagaagctgtttgctaataattttacttggaaatgtttcaaa cagattcaggctgcaactgttttaataactgttcttccaa
54	203748_x_at	caagatcggggctctgctatacaagggtgcaaaagctctctggtgcaacctcaaccatataattctacagaccctg gtccgtgtaactccctcaatggagcaccatgtcactacagcccgtatcaatgacagccctctgcccagca gatgagtcactgtcactaggcagcaccggcaacatacatgcttcaacgtcagctatcaaggagcctactgtcc acagatgacacatagcagacgacagcgggtctgtgaggaggcaagtgtcaacagcaggtggtctgtgaga cgtctaatgaccattccatataccttcaacctaataagtaactgtgagatgtacagaaaggtgttcttcatgaa aagggtgtgaggctgcaaatcatggattttctgatcaattgtctttaggaaattatgacagtttgcacaggttc ttgaaaagcttattataatgaatacaactaaactattttgtctataagttctataagggtgcataaaacccttaaatcat ctagtagctgttcccc
55	204166_at	cctctgtacacgctttaggcgaaacatgccccaaagacacagggaccgttctccccctaggagcagcgggtgg gagcaggggcccaagctcctctgaccactgctcagaggagccctagcccctggcccgagcttctcagcggccc accggggcccccactgtctgacccctggcggggccactcagacagctggggccggcgtggcgtggcggg ccctctgtgctctcctcaagtagaaggggctccgggtgctctggactgggacccacaagggtc cagtgggcccaaaccttgaactcgtgaaccgggtgggtcccaagagctagaactcaggaacccccagggtg ctcaggggcccgcgtcggggctccgtggggcagaccctgctataatagcaa
56	204978_at	cgccatcaccgcgaaggagagaagctgaccaggccggccgctccccctgtgtgggcgagaagctgaaaaaga ccgaacctgcccgtgtaaaagacagaggctgccccaaaccaagctgacgctcaggagaagctgaaactga ggatgcagaaggcgtgaaacaggcagttcaaggcggataaagaagcggcacaagaaaagatgaccagcag gagcatgagggcagagcgggaagacgagctcagaccatggcccgaagatccgcatgaaaggagcggg aacgccgagagaaggagagagaagagtggaacgccagtacagccggcagagccgctcaccctccccg atcagctgagaatacagctcttctcgaaggcgtcaaggctcccgatcccgaagcccccattaccacattaggc agaaaggtgggggtggggagggcaaggggggtggglaaggggctcaagctgtgatgctgctgtttatctcta gtg
57	205220_at	gatctactgtgactgttggccttctccacatctgcctcagactgggggggctcagctcctcgggtgatata gcctgcttggagctctagcaggataaaggagctgagattggaggaaattgtgttctctggaggaaagccca ggcaltcattaacaagccagtaggtcactggtctccgtgggccaattctctcagacaagcttttagagaaaatgg actcagggaagagactacatgctttggttagtctgtgttccgggtgggtgtaalagggggattagccccagaagg gactgagctaaacagtgattatgggaaaggaaatggcattgcttcaaccagcactaatgcaatcattctct ctctgtttatgtaactaaagggtgagcagttaaacggcttcaggatagaagctgttcccacctgttctgtttac cattaaaagggaacgtgctctgccccacgggtagagggggtgcacgttccctctgttctctgctgtgtttct gtactacca
58	205285_s_at	ggccaaagattcggaaaccagccagcttgaccaccagagaccggcggaaagtgggatttctgaaacctgta ggccccaaagccatcaactgccccaaagaagattccaaacctacatttcccctggcctctggaacaagccatctc ttcacagtgaaccagaaccatgactaaagccactagggccgaactggcctctctccaacctcagaaaa tgaacagaagcaagcgtttcccaantgactgggttaaggggaaattatgtagcatcacaaagattgaaacc aagcccctctccccaaaccgcttggccagaagccgccctaaagtaccgagaactccatgaaagcagaag ccccatgaagaatgtgttcatcaaaagggtcccagctcccctgggagtcaggtccaaaagcggcctttaa accagcaagggaagactcagaaaataaagaacctcagggggagattcaagttgcccttctggagtggtttg a
59	205539_at	agcctgggaccctaacatttggagtgaggaaaacatatgaacaattaaagaagagctgggagatgctgctg ctatcatgcgaalctactgcatgagaatgcaacctctcccgaattctaatgacagtgagccaaaatattacc ctatagcagttctgtgaaaaaccagaatcaggagctgctgaggatgaaacctgccccaaaagagagaattacct ctctgaacaggacttgtctgtgttggcatcacaagaggccaattgacagctctgctgctggaacagctcc aaatgaagaaagaaaagggttttaaaagcaagaggcctatacctattgcaaggccacgaaaagagcaga tagtgccaaatcaggaataatttaccaccaatttctgctgacattcagctacttaatttagatataatgagctgc aaatcacggcatgttctccattttt

图 10(续)

SEQ ID NO:	探针集合标识	靶序列
68	208018_s_at	gctgatggagatcgtcacctacggccggatcccctaccagggatgtcaaacctgaagtgatccgagctctggagcgtggataccggatgcccgcgccagagaactgccagaggagcttacaacatcatgatcgctctggaaaaaccgtccggaggagcggccgaccttcaatacatccagagtgctggatgactctacacggccacagaggccagttaccacagcagccatgataggaggaccagggcagggcaggggggtcccagggtgggtgctcgaagtggtccagcaccatccgccaggggcccacccccttctactcccagacaccaccctcgttcagggccacagttcctcatctgctcagtggttaggtggactggaaaatctcttttgactcttgcaltccacaatctgacatctcaggaa gcccccaagttgataattctatt
69	208120_x_at	tgaaaagtciccattgctactcttctacacagacagcgcaaccatccgatttctcaacttttcccaccttcccccttttctattcccacaaaaccgccattgtcalcatggcccgttctcaatgagctgttgggtacacctcccagacgggggtgggtggccggcagaggggctcctcacttcccagtagggggcggccggcagagggcggccctcactctggacggggcgctggccgggggggggtgacccccctacctcctcccagacagggcggtggccaggcagaggggtcctcactcccagacggggcgggcgggcagagggcgctcccactcagacgatggggcggccggcagagacgctcctcactctagatggatggcggccggcagagacactcctcacttccagactgggcagccaggcagagggggctcctcactcccagacgatggcgggcagcagagacgctcctcactcccagacggggtagcggccggcagagggctgcaatctggcacttggggggcc
70	208488_s_at	gaggacacgtatctctatacttcttgggatgacaatcagctacatttgaacccggctacctgttagtgggaaaggcttctatttctgtacagaccgggaatctggagccaatggalcatattgcaaaagaagtaattgtacttcccactgtttatgaatcgaatcgaagggttagaaatgaaaaaagtatactatgagatattgtacttgaagtgtgaagatgggtatacttggaaaggcagtccttggagccagtgccagcggatgacagatgggacctccttggccaaatgtacctctgtgcacatgatctc atagtggcactttatctggtagatcttcttttactatcatcttctctcttggataattcaaaagcacagaaaaggcaataatgcacatgaaaacctaaagaagtggctacattacattctcaaggggcagcagcgttcaatcccgaactctgcaaaccaatgaaagaaatgacagggctccttcttga
71	208702_x_at	gtagcagtgctctcattggcctgtgntcctcagtgccattgcccaggtctcgtcactcagctgtgtagtctgtagaagaggcagtagggcaccatcagccagggatcgtggagggtgacccaatgctcaccocagaaagagcgtacctgaacaagatgagaaaccatggctatgagaaccccactcaaaatcggagcagatgcaattaggtggcagggagcggcagccctggcggaggatgcaggtggggcgggaagatcccagattccgactgccc aagcagcagccgctgccagggctgctgtgacatctgacctcctggactgtaggactatataaagtactactgtagaactgcaatttcttcttaaatgggtgaaaaatgtgataatacaatataatataaaaccttaaatgaaaaa aatgatctattgcagatattgatgtatttcttttaaatatcagaaccccacttccattgattgtctgacacatgctctcaat
72	208772_at	tcttccccctgtatggaagcagcttctggagggtatgcagaggttggaaagtcttcttgataaaaggagcagatg ttaatgtcccctgngccttccaaagatactgttaacnatagcagcagacaaaaggctcactcaaaatgttgtaacictgattcatatggggagncccacattgatgttcaacaaaagggaatacggcacttggctggcctcca atggaggtcattttagtggcagttgctagtgcaggaggtgctgtagtggatgcagcagataaccggaaaaatc acacctttagtgcagcatttccaaagggtcagta
73	208811_s_at	ggaccatttctcattgacttcttgaagaccctttgaggactcttgggaatcgaagggtccccaggaaagcag aagccgaggacggggctgtttctctgctcagtggaattccgtcttttggaaigtgatttcttcttttgatacag gatttacttattgggtcactaggctacggggccctcacttcttccacgtcatttgggtgtagtggcatggg caacttcaaatgatatacacttcaactaaatgggtaatggcagaaaaatcactacaagaagtgtcagagaacgg lcaagaa
74	208885_at	gaagtaagcctcatcagagccttctcctcaaaactggagtcctcaaatgtatcagggtttgtttttcagccacta agaaacccctctgttactctagaattggcctggaccagatcaaacatctgaaactctgccccttagagcctt agccttaatggaagggtggatccaagggtgtaatggaatcgaatcaagccactcggcagggatggagctat aactaagcactctagggtctcctcctccagcattagcctcacttagatctagttactgtgtatgctaaacc tgtcaacatttggaggcaatcctccttcttcttctagagcttagcatatctgattgttcagggccatattatcaat gtttactttttgtactataaaagcttctgccaccccctcaggggggcaaatatggtccaatcaatagcacc cctactacatacacacaccttagccagctgtcaagggc
75	208919_s_at	gagtaactgctctgagittgacacagaaagttcccctatctgctggagatcgaagaaggcacaagacgtt ctctctgcccgtgaggagcttcccgcagcccgctggcccagcctggggcagcttctccaggcatgtctccct gctcacctctgctggccacctcagcaltctggacttgaagctccaaaaacctgaggtgtattctggggcagccg gcctgcttgaagtcgccatgacctgggcacaggggaagcccagccgtggccttagggagagggaccag cgcccagccttagggctggaagacggcagtgctcagaattccagccgctcatctgaacacagaaggtgttaact gaccttcaaaagcagctgagatgggaatgaltgaaaaacttggattttgaaagtaaattttaatttctatattat tctgaaaatgtattaaatgtcatgaaagccttattacgcttttcagatccttcaat

图 10(续)

SEQ ID NO:	探针集合标识	靶序列
76	208922_s_at	agatccaagagccttgctatgcctgcaccacgccttccagcccgggtcccaccctctctccagagcagc aggaatgttgc aagcattctctaccagctgtggcatgaacctcga tgggccagaaagtgccctcaggacaaca ctgggactacaccagatctgccagccttactatctcaaggccaaggcggagatccaagaagtgccattcat gaagtgatcgtatgcctcagaagcagctccccctgtaaatagctctggatattaccctctggttctgctgt catctctctctgtctggcccaggcccccgtgactgtgaccgaggggaggggctgctgatccctctctc gcttccctctggaaagactcagaagattgagcctcactgtgtccaggaaagccaagcttacttctgtagaacctgac actaaactaccgaaaggacttaggtctttgtgacttaacccag
77	209060_x_at	gaaacacatcctggttttgcctacactacgtgttagacaagaacatgatgttttttaaagactgggtgacccctt tgccctalatgttagagcaataatgcttttaaaaataaacctctgaaaacccaaggccaggctactgcatctgaatca gaaatcgcagtggttctgtgaatgattttttgtaaatatgaccttaagatattglattatgtaaaatgtatatacctt ttttgtaggtcacaacaactattttacagagtttggagctaaatttaacattgttgattcagtaagctgtgtgt gaggctaccagtgaaagagacatccttgcattttgtggcctgggggaggggtagtctccacagctttctcc ccacccccagccttagatgctcctgctctttcaactcttaactaaatgcttttaagagattatttttagatgtag gcatttaatttttaaaaactctaccagaactaagcact
78	209083_at	tatctctccatgttcagttccaaggagtcaccagcggggcatgggclacatgcccaaacgtggcctggagtgaaac aagtgtgagatcggcagggttctacaagctgcacgagcggagggtgtagcccttgcctatgacagtgccctgaaa gtcggacctgttccaggaggacctgtaccaccaccagcaggcccaccctgcccacagctgaggagtg ctgggggtcgggatgctgggcccctctcctcaactcctcaaggatggctacgtacccccaaagagccggagctg gagggtcaaccgggctggacaccgggcagaggggcagcaccagagccagtgccactccagctcg gatgccctgtctggctggaggaggagatgaggaaagctccagccacgggtcagaggctcagaagcgttg gacaggctggaggagacagctccaggccaagtagagcccgcaggggctccagcagggtcagacattcacacc catc
79	209286_at	tgaacaccttctacagcaaaccttgcagtcagtttccctctgtaaggcaaatgctttttcacgcagaaagtcc atatagagcagataaaggcagctaaaacgaggcagtagagagcacttaccgacccccagggtccagagatg ccctgagatggtgtgtaaggaaacaggagcaggaatgtacacacagattcttcccttggccaactctcct cccccaaaagaaaaaaccttgcacacagtaactaccagctctctcctcaactgttattctctggaaatgtatct cagaatgacctctctcccaaccacttaacgaltcttctttgggttgggttctgcaagttatctcctcaaaaata cctttgactgcaggtaaaatgcaattaggcaactaaccaagtagacgaaacaaagttcccctaggca
80	209868_s_at	ggaaatgacattacttacgccaactacagctgtatatacagaacggattttatcttccaccatacagatgtctaca aacgaaatgatacctcaaaccttctattacaccctatattgcatctcctgtatctgcctaccagggtgcaagctctctg ggatgcaacctcaaccatalattctacagcaccctgggtgcccgtgtaactcctcaatggagcaccacctgacta cagcccgcatacaatgatcagccctctggcccagcagatgagtcactctgactaggcagcaccggaacatacatg cctgcaacgtcagctatgcaaggagcctactgtccacagtatg
81	210184_at	cagttctgaatatgtctcctcccacctgtcttcaacagctccccattaccctcaggacaatgtctgaactctcca gcttcgctgagaagtcctccctccatcccaggggtgggtctcaggggccacacagatgagagcctctgtgcccc catcaccctctgttccagtgaaatgtctctgctcagcagctcaggttctctctggtggctctcagttccgattc cccaggtgaaatgggagtgagatgctctgctggtgtctgacagctggcctcccgggttgggtcaacatt gctggcctggaaggaggagcgcctctagggaggacatggcccgggtgctgctgagctcaccagcccc aggggcagaaagagaccaacccttctatttttggagctatgaatatgtacctgaaaaaatgccaagcactag atttttttaaaaagctacttttaaatgtttgtttaaatacacttaaaacatcgcaaaaaagatgcatctaccgctt cc
82	210190_at	gcatttcgcccgcagctacaacgcctcaccctcaccctccagcgcgccatgcacgactacaaccaggccga gatgaagcagcgcgacaactgcaagatccgcatccagcggcagctggagatcatgggcaaggaaagctcggg cgaccagatcgaggacatgttcgagcagggttaagtgggacgtgtttccgagaactgctgcccagcgtgaagg gcgcggggcccccctcaacgagatcgagagccgccaccggaactgctgcccctggagagccgcatccgc gacgtacacgagctcttctgagatggcgtgctggggagaagcagggccgacacctgaacgtatcagact caactacaanaagagctgactacaccggccaggccaaggcaggtgctggaaaggcctgctgactacaggg agaagaacccttcccggaccctctgctctctgcttccctcctcaagtagcaggccggccc
83	210191_s_at	aaaactctcagccatattacttctgcccaggaagctaggaaatatgaatatcctcattcagacttaagaaggtgga gaatataaaatgtgttactgcttctctatcctaaagagacggggccacagcgttcagttgatgtggtgtatc ctgggttctactgacacttctgattgctttctttgtt

图 10(续)

SEQ ID NO:	探针集合标识	靶序列
99	211571_s_at	acaagcatcctgctcaccgaagaacaaagtgttgaatcgtgtggccatgattatcagtgataggcctcaatgacaagatgtttgagcatgacttccgttggactgatggcagcacactgcaatacagaatggagaccaaccagccagacagcttcttctgctggagaagactgtgttgaatcatttggcatgagaatggccagtggaatgatgttccctgcaattaccatctacccatacgtgcagaagaaggaacagtgcttggccagccccctgtgtgagaanaatgccaagaccttggaaagatgaaacctctgtatgaaataactccctgattagataccactgcaaaagatggttcattcaacgtcaccttccaactatccggctgctaggaaatggaagatgggtatatacctaaaattaccctgcatgaacccatctgcataccaaggactatfctatgaaatacttataaaatctctcatcagcaaaagacaatcaataaatacatcaaacatgatcatcgttggagccggagggtgg
100	211750_x_at	aaatgtaccctcgcctatgtaatacatggcttgcctcgttataccgtgtgacgttggctcccaagatgcaatgctgcccattgccaccatcaaaaccaagcgtaccatccagtttggatgggtgcccactggcttcaagggtggcattaattaccagcctccactgtgtgcttggcggagacctggccaaggtacagagagctgtgtgcatgctgagcaataccacagctgttggcggagcctgggctcgcctggaccacaagttgacctgatgtatgccaagcgtgcttggctactgtgtacgtgggtgagggatggggaagggcgagttttcagagggccgtgaggacatggctgccccttgagaaaggatfatgaggggttggagcagatagctgcagggagagatgaggggtgaaagatattaacctgtgtgctgtacttttactccttggcttggactgtc
101	211787_s_at	tgtactgtatgaaacctgaccatcaccaggcagtcacttctatcaaacaccgggagggaggactggctcaccgagaagatgcatgctcagatctacatgctatccgcctatgagatgacccaaagggaacgagagctgattatgagggagttcttcttggctctagcagagttttgattaccactgacctgctgggaaactatataccacagaatcggctcaggtggacggcttggccgtaaaaggttggcttataacatgggtgacagaagaaagacaaggagaccttccagacattgagaccttcaaacacctccattgagaaatgcccccaatgttgcctgacctatctgaggggctgtccggccaccagccccagggctcaactctggg
102	211794_at	atggctccactacaggttcaagagaagatatacctgtgctcctggggatgttgaagatgttaaagggaagaaagatgacagaagaaagatacagagagaacctaagctctgactcagacaataatgaagggttcatcttccctgcttccctgctcctcaacaattggacatggagatgaagttaacgatgatgtgatacctctgatttccctgtttcaicagcagagatgagtcaggaaactaattttggaagctaaagacagaagaaaggaccctaaagaactaaanaagcaggaaanaagaaagaaagacttcaggaanaaataaataatgatgttgaatagagctctatattcaactaaagttcaacttccataacttcaaaaagtggggaaccagagatctacaggtaaaacctggatcctctagaagtatacaaacacagatgacacaaaagtctctgcagaaatgaagaagggaataatggttatgctcttcggaggttacctagcggacaatgatggagagatctatgatattgctgatggctgcactatgacaatgact
103	211795_s_at	agccagtcagtaacttaccgctggctcagcaaccaccgctctccaagtcaggggcagcagaaggccagcagaccaccagctccaccagaccatccaggctgggagatcatcatcgcacagcctcagcaggggccagaccacacctgtgacaatgaggttggagagggctcagcaggtgagatgtccaggctcagccacagggctcaagcccaacaggccagagtgccactggacagaccatgaggtgatgcagcagatcatcactaacacaggagagatccagcagatcccgttcagctgaatgccggccaggtgagttatccgcttagccagcctgtatcaggcactcaagttgtcagggacagatccagacacttgcaccaatgctcaacagattacacagacagaggttcagcaagggacagcagcagttcagccagttcacagatggacagcagctcaccagatccagcaagtcac
104	211797_s_at	agccagtcagtaacttaccgctggctcagcaaccaccgctctccaagtcaggggcagcagaaggccagcagaccaccagctccaccagaccatccaggctgggagatcatcatcgcacagcctcagcaggggccagaccacacctgtgacaatgaggttggagagggctcagcaggtgagatgtccaggctcagccacagggctcaagcccaacaggccagagtgccactggacagaccatgaggtgatgcagcagatcatcactaacacaggagagatccagcagatcccgttcagctgaatgccggccaggtgagttatccgcttagccagcctgtatcaggcactcaagttgtcagggacagatccagacacttgcaccaatgctcaacagattacacagacagaggttcagcaagggacagcagcagttcagccagttcacagatggacagcagctcaccagatccagcaagtcac
105	211823_s_at	tcgagcgggatggacagccctactgtgaaaaggactaccacaacctcttccccgcgctgactactgcaacggccccatcctggataaagtgtgacagcccttgaccggagctggcaccctgaaacacttctctgacagatgtgtcaggccttcttggctcccgagggttccacgagaagagcggcaaggcctactctgcaaggactacttgcacatgttcgacccaagtgtggcgttgcggccgcccctctggagaactatctcagccctcaacacgctgtgtgctatcctgagtgcttggctggcggaaatgcttcacgccattcgtgaacggcagcttcttcagcagcagcggcagccctactgtgaggtgactaacacagagcggcggcgtcgtgttctgtgctgcagaaagcccatcaccggcctgctcaccggcatgccaagaagtccaccggagcacttgcctgtgcttctgcctcaagcagctcaacaaggccactcaaggagcagaacgacaagccttactgtcagaactgct
106	211974_x_at	gagagagatgctctgtctgccagacattctgcattccgagaaggttggagatgggtccgccaaacagtcaggttccagtaacttggctccgaaatgatggaatcatttattccaccagccttacccttaccacaccagaaccagggcccgccacattgcagtgacagcaggagcaatccttcagccaaatcaagccaggtgccccctaacgaaatcaacacaaacagcagggaaattacacaaacggcagcacaatcaaccagtgctacatcatctacagccacagtggtatcctaacctccttttcttagacttaactgacttggatgtggcaaaaagttaacaaaaggagaaaaatgaaacaatcgttgggttcttgggaaaactttcataccaggtgatactattcaaaaaccccgtgtctccctgcaatgctgatttg

图 10(续)

SEQ ID NO:	探针集合标识	靶序列
107	211996_s_at	aaaccacgcaaacccaagaggcagagggcgctgagatggaaccacctcccgaaccacaagagcggagggtcggtagcgtggaaccgtcacgcaaacccaagaggcggaggccgctgacgtggaaccatcatcaccgaaacccaagaggcggagggtcggtagtggtaaccgtcacgcaaacccaagaggcggaggccgctgacgtggaaccatcatcaccgaaaccgaagaggcggagggtcggtagcgtggaaccgtcacgcaaacccaagaggcggagggtcggtagcgtggaaccatcattaccgaaaccacaagaggcggagggtgagctgagaagaggccagctgacctaaggc
108	212036_s_at	gcagtagcagttctagtagcagttcaaccagtagcagcagtggaagtagttccagcagtggaagtagtagcagtcgcagtagttccagtagcagctccagtagcaagtaggagcagcagcagcagagatagtagcaggnnnnnntagcactagtagtagtagtagagtagaagtcggagtaggggcccgggnacataatagagatagaagcacagaagggagcgtggatcggaaagagaaggatactcaggactagaaagaagtcacaaatctcaaaaggtagtagtagtagtagatacaaaaggatcaaaaggataaagtccggtccgacagaagaagggtctatcatcagagtagtgcgtagcagcacaagatctcaagaagtagaaagagaccgaaaatcagacaggaagacaagaaggcgttaaatggaagaagccaggcttcttagccattcttgcagc
109	212550_at	agaggccacgtaactgagagcttacagtgccaatgcccgttggcttctgcccagagtggaagtcgcagccctgacccccagcgtgagattgtccctgggtaccaggaagctgttccggctgccacgtttctctgagccagcggatgcacagctccgtggcctctcaggcttattgatgatgcttttcaaatgtgaatcattggttctgttctaaaggtagatcttttttttctcctggcccccatttgacatacaaaatctctctgtgctattggccctgggctattcaaacccaggctcaccctattccccctctgttcacacctaattgtcttgaagagtaggtagcagcagtggtggctgaacctaggccagcttgcctagcgggtcaccctgctgtgaag
110	212639_x_at	gataccaatgcttgccttgcagcccaaccagatggtgaaatgtgacctcggccatggttaatacatgcttgcctgctgtttaccgtgtgtagcgtgttcccacaagatgcaatgctgccattgccaccatcaaaaccgaagccancatccagttgtgattgggtcccactggctcaaggttngcaalcaactaccancctcccactgtgtgctgctggggagacctggccaaggtacagagagcigtgtgcaigtgagcaacaccacancattgctgagcctgggcnncnnggaccacaantttgacctgatgtatnccaagcgtgccccttgcactggtagctgggtgaggggagtaggaggaaggcnmntnncagagccctgaaagatagcgtgccccttgagaaggatgatgagggttgggtgtagannctgtgaagagagagggtgaggaagagaggaactaataatccattcttggccct
111	212680_x_at	aggagtgatcctgtagcagctcacgcccctctacgactgccaggaagaggagatcccagaactgagatgacgtggatgagctcctggacatggagagtgacgatcccgggctgccagggtcaaggagctgctgtgtgactgtacaaaccacagagcccttattctgctcgtgacaaagatccggggcatgcaagaagctgagcacaccagaaagtaggggtcccgaaccaggaagcgggtgctcccagggacaatcgtgcccccacactcgtgacaaacagcaatccgggggaccctgcccagggcctgggtgccatgagcagggc
112	212708_at	gtgtcaatgatttgcctgttacaacactgggagatgtgttccagtaagtgtctcatcaagagaccagacttgggggttaactcccggcaacttgcatgcccctctgaaagaagggttttctgtctgtgaaatgcatagaactatacttggccatgcacgacttctcgaattgatattgttgaatctgggagggtggcttttgggtgttctcagggggccaaatgtaattttgggttggggagccagcttgggtggggaaatttaccctggccctccgctttaaactatataaacattatctgatactatgctccctgctggggggcaggaggaatctgccaagaccaacagcttactttatctatactatactcaaaagggttcaaaatgtgaaggttacttggattgcagtagccattgggtgtt
113	212974_at	gtaacgaaatgccatgacgcttccggagacaacctggaaacctgaaacataaaatcaaccctcggcggggggaggcgttcccacaagcgggtgacgtgctctctacactccagggtcatctgaccagccgaaaaagtgaagatgctcaccccaagttatgggtgtgctctgagcgaaggcaaggtgaccgtttcaatgcttctcatgaccatccacagcactcctttaaagtgggactgcaaaagtgaactgcatgggtgagccgaccagaaccaggtgtgggtggctcgggaagactccgtcatctacatcaacgtccacagcagctcctgcaacaagcagctcaccagccactgctccagtgcacggatttattgtgagggagggacagggagggcaccagcaactgtgactctgtgca
114	213505_s_at	gaaccagttcgaattgectatgacaggnnngnnngnccatgtccaaaagaagaaccacaaggacttggacttgcgccagcagaagctgaccgataagaacctgggcttcagatgctgcagaagatgggctggaaggaggccatggcctggctcccctggaaaaggcaacaggagccgggtcagcgtgggaaccctcggaaagggaagggttgggtgctgacgggcaggagcacaagaagacacattcgatgtgtccgacagaggtgatgtagatgtacagacacaagcggccaacaatagttncagggtcaccctggagggacaacaggtcctggaagtgtctctcggccactcgggttactgtctgcttggcttccatcactggaatacttagagaattgtagtttttggcttctgataaagcctagaag

图 10(续)

SEQ ID NO:	探针集合标识	靶序列
125	216236_s_at	agagaccgagtagaacctaccctcatttcaggaggatggccgcttggcacatgacaacttggccagctttctcccttgggttctgataattgccgactagaggatagggaggaaaaagtaaggtagcagttgccccaacctcagacttaccaggaagcagatatactatgagtgatggaagncnaggggngttatgtaagagcaccctctcacttccatacagctctacgcggcaaatfaacttgagttttatctnactctctggtttaftacataaatatttttaagtgtaatfttgc caaataaananancagnaaaggaaatlganantagaggagggtgtttaaaggagggttatagagtaaaagatttga tgcctggagagggttaaggtagcaataagaattcaggggagaatgttttcattatggagggttaaatgatgtggtgcct gaggctgtacattacccttaacaatttctgtcctca
126	216950_s_at	gaaacaaggtgctctgacagaggcctgtgttgcagctttacttctcttctacatgggcagcaagaccctgcgagg caggaaacacatcctgtaataccaactaactctgtagaagagaagactctgggttatactggctgaggctgcc acagaggatgaaatgtcttaagcgcagccctgagttggagcttaagtgctggccctcagttaccaactctgt tctgtttcatgctcttctatctgagcagtggaataatgttttagtgaacactgttctctgggtgacaatacgtaaag aactgaaaagaagaagaaagggtggtttgaaactctttggattctggaggccaagcacttgaagctccaactca gggctgcgcttaaggacattacatctctgaaalaccaataactaactctagaaagagaagactctgggttatactg tgcggaggctg
127	216985_s_at	tgcaccgatctcagagccaaaaccaaggatgacctagagcagctcacgactgagattaagaaaaggccaac aacgtccggaaacaactgaagagcatggagaagcatatgaaagaagatgaggctcaggtcatcggcagaccctcg gattcggaaatcccagcactctgcttctctggaaagtgtggagggtgatgaccaaaataaagagctcaagggg acttccgagaacgcagcaaaaggcgaatccagcggcagctcgaatattctggcaaaaagacaaccgatgagg agctggaggagatgtggagagtggaacccggccacttctcacttgggactgactcacaagattccaagca agccctcagtgagattgaggacgacacaaggacattgaggctggagagcagcatcaagggtctcacgac atgtttatgg
128	217436_x_at	tacctggaggccacctgcatggagtggtgccgagacacctggagaacgggaaggagacgtgagcggcgcg cggacccccnaagacacacgtgaccaccnccctnncctgaacatgaggcacaacgaggttctgggttctg ggcttctacctgaggatcaccattgacctggcagcgggatggggaggaccagaccagagcatggagctcg lggagaccaggccacaggggatgaaactccagaagtggcgggttggttagtgcctctggagaggaaaca gagatacacatgctgagcacaaggggcctgccaagccctcactctgagatggggagccctctccca gccaccatccccattgggtatcattgctggcctgttctctggagctgtggtcactgnnnnnnnnnnnnn nntgtgatgtggaggaaagagctcagatagaaaaggaggagctactctcaggtgcaagcagcacaagt gccagggctct
129	217475_s_at	gcccaacgtgaagctttctgggagaagttgttccacagattgccccggccttctcccgctggccgccatc tctgacagctggagcctgagagcagagcccccccggggccgcagggagaggccccggctgcccggatga tgagggccagtgaggcccaagggaaggtcaccatcaagtatgaccaccaaggagctacggaagcactcaaa cctagaggagtggttctctggagcagctcaccgctctacgactccaggaagaggagatcagaaactagag attgacgtggatgagctcctggacatggagagtgacgatgctgggcttccagggtcaaggagctgctggtgac tgttacaaccacagagacccttctctggcctgtggacaagatccgggccaatgagaagctgagacacac ccagaaagaaccagcattctgaaatggaggactcctttgaggccctctccctgtacctggggagctgggcat cccgctgctgagagctggaggagttggaccacactgtagcatgag
130	217507_at	gcagggaatgggaaccgggaaggccacgaagtctctaaagcatccagaagaccctacaccagggtctgtcc gctcctattcggcagccttctgttccgctgcaaccattttccagacagtaaaanaggcggcacttcttctc cgtcaggccaccaggctataaggaaaccaagagtc
131	217728_at	gggaccgctataaggccagctggactggacatagcccaccccctgaccgctcgcctgacttggccgctc cctaccgctccaagcccagccatgcccattggcatgcccctgggatcagccattggcctcctgtgcccattt ccacaagtactccggcagggggfacaagcacaccctgagcaagaaggagctgaaggagctgatccagaa gggagctcaccattggctcgaagctgcagg
132	217992_s_at	ttgcatgcccaggcgggtggcagcggggcctgtccagccctctcccgccatcttcccgaagtacgtccac tgcctgtaccagcagctgctgtctgcccaccccctgaggaaagcatggggaccctaacaccctgggtgccc tgcaccagacagggcgtggtcaggcccagccacggcgggtctgccaagcttcccagctgctgtgacat gcgtgtccctgtgtgggtctgtgtgtgtgtgtaaaccttgaccatcactcagtcacaacaagtgagttggccc tcgaggccacagttatgcaactttagtgtgtgtataaacgacgtcactgttttaactgataactttatttagt aaaaatgccaggagctctggaagctacgggacttgcagaggtttattttggccttagaactctgagaattag gaggcaccgagcccagcagcagcctcggaccggattgctgttgccttagcggat

图 10(续)

SEQ ID NO:	探针集合标识	靶序列
133	218157_x_at	ggggctcattagcttggcaacaggaaacatcctgtttattatggtagtggggctcaggaatgtaggaactggatcc atctgccaaatccaccattcagtttgcctatccctacagaacagtgactgaggctctttttttttttttttttttt aaatttccatgtatttttccatfttcagggtctaaagattggctacatacctccaaattactctcagttccagc gggtgctctgaaagtaaccagcttggctctaaaataaccctcagtagctgagtggtatatactagatctaaagggt aacaggatagggtggaaagggttagagactcctagaatctctggcaccgtgactctggcctcatictaaacctg ttcttggacagcttttcttggctctcttgcctttagctacccttcttaatat
134	218380_at	tcgagactggtaaccggaggagctgctcaccaggagaccagctcctggaagtgtccggactcgcggaccct gtggctgcagaccgccggccagcagggccagagctggcgactcctgaggatgagacttggggcccta gccgggttccacggggaggctgtccttggggacttaggatggctctgttctggccggctcactctggagctg tgagaccacaagcaaaaagggtgagggttctcattgacaagagttcgtcgggaaaaaccctgaccacct gggattgtcatttaagactcaaaaggcttaataccaggaacccttggcaagattttaccaccggccatctct gtttactatgaatgttaaatgttaaaacgcagcctcctaacctgcatatttacttgcagaatgtctgtaactg tgtatgctctgtagaataaattatcttttcagctcctctaaaaa
135	219100_at	gtgcagagctttaccagcaggagctggaaatgggtgagcttcttgcctccttcccaatcagcctgtgattcag tgctctccgaccaagtgaatttaagaaggacaccacttccaaaggcaattcatagatatttaagaatgtctataca actctgcaggaanaaggactgtttccagaaagatgagtttgataacctatactatgtaaccagagaagaca aagactctgcacagaagatccaccggatcattcagcaggactgccagaaccaaatcacaaggagaagggtg tcactctgcacacttggcctgtgctcgcctgagcctccggcctgagcagagctgtgctgcagcaaggt ctggagctcctggaggaccagagtgacattgacacacaatggagcactactacacagcgttctgagcagagac acgcagaccagctgaggggacaagaagggtggcattcaccaccagcctctgacttcagactcatgagg ggcaaggagcaggtggatccccagaaggaaaccgcagctcgcggaccctcctctgcccccccccc ccacttgcacacttccacagggctcaggtgagtagctgcttgcagggtggtagactctgtctctggagg ctgcaagcactgtatgtatgtcagcagacaaggcttgggtggcgtctgcaggaggagaccttggggac atctgagacatccgcagattctgtcagcctgtgaactaggccctcctctgacactcatgtccatgaaggag cagccaggggtggtgaaaggagcactgggtgagggtcaggggtcagagattctgctcctctgggatgca ctggctactcctctgactcctcctcctctctggtcctcagctcctcctcctcagggagatgggatcatggat ttctggcataaaggcttcttgggagctatcc
136	219183_s_at	ggcaaggagcaggtggatccccagaaggaaaccgcagctcgcggaccctcctctgcccccccccc ccacttgcacacttccacagggctcaggtgagtagctgcttgcagggtggtagactctgtctctggagg ctgcaagcactgtatgtatgtcagcagacaaggcttgggtggcgtctgcaggaggagaccttggggac atctgagacatccgcagattctgtcagcctgtgaactaggccctcctctgacactcatgtccatgaaggag cagccaggggtggtgaaaggagcactgggtgagggtcaggggtcagagattctgctcctctgggatgca ctggctactcctctgactcctcctcctcctggtcctcagctcctcctcctcagggagatgggatcatggat ttctggcataaaggcttcttgggagctatcc
137	219394_at	agatgacagcagatggccgggtcagcttcttccagccgcctcagcagatgactccagcttgggtgtccacoga gccccctgcagggacagatggctgagggtcaggtgtgctgccaagtagaggggggctggcagggaaagg tgggctctcacactccccgcccttgcagagctgggctctaccctcaccctcagggcctcagggcagctgcccacagctg gaagcagagccttctgagggtgagctgctgctgtaactaccctgcccctgggctcagggaaacagctcag ctaaagccctgggttccatccgtttaaactctggtcattttcagagcctcctctgacgcttaattgcaaggcag aagtcataactccagctaaaaaattacagagtaaaagttccctgattcttaattgttaattgtcctcctatggt gcaagctcgggacactcagatgacgccaagaacacagggcatgaaaggggacatcataggacagggctg aacgatctcctcttggaggtccccataaaagcaagcaccatggtggcagctcctcagggacatggcagggcac aggcctgacttctccttggagcctgcatcagttctgttttgcctatctaccagtgatgtagtagactcaatca aaaacatlaaacgaaaactgattagattgattcttgaaccctctaggctctagaacacigaggacagtttctt tgaaaagaactatgttaatttttgcacattaaaatgccctagcagatctaaataaaaaccatggcaggttcaattgt actttattatggtgtattgttattgctataagaactggagcgtgaaattctgaaaaatgatactttttatcagata aaattgcagacagcttcttaaaagttattttttaaagtagtgaactttcttaacactggtttgtctgca
138	220046_s_at	gcaagctcgggacactcagatgacgccaagaacacagggcatgaaaggggacatcataggacagggctg aacgatctcctcttggaggtccccataaaagcaagcaccatggtggcagctcctcagggacatggcagggcac aggcctgacttctccttggagcctgcatcagttctgttttgcctatctaccagtgatgtagtagactcaatca aaaacatlaaacgaaaactgattagattgattcttgaaccctctaggctctagaacacigaggacagtttctt tgaaaagaactatgttaatttttgcacattaaaatgccctagcagatctaaataaaaaccatggcaggttcaattgt actttattatggtgtattgttattgctataagaactggagcgtgaaattctgaaaaatgatactttttatcagata aaattgcagacagcttcttaaaagttattttttaaagtagtgaactttcttaacactggtttgtctgca
139	220305_at	gtcacagggtcgaatactactgcacagcaacgaatagaaatgaaatctgctatgacacagcaactggataaatt tcacagacatgaggtcaagcaaaagaggtcagatcctcctatcacaagagaagaattcatgtatgattcttcc caaaaagtacagaataaagcaaaactgatccatgggttagaagccaggggaaacagttaacaggggaggata ctggggaggggcactcctggagctgctgctacctcctctgggtgtgatttcacagatgattgcaattgttccaga ctccctgtggagatgtgaaataaaaaccacctaaacaagcagagagggccatttggctcaaaagtttcaaaagg agtcagccatgattgctgt
140	220326_s_at	atcccagacagatcctcagcagcctgagtgacccaccagcctctgtagcttggagaagatccagaactg cgtgcagcttctcctcagcacacttgggctgggagtgagcagtgaggcataatgggagccctggggcactcgtga atttctccctctcctcagcacagagggtctaacgaccagagattggcctgccaccactatctctagctc cctagcttgggtcctctcctcagggagtcagagcagccacttctgctcctcaccctggaggtggggaagtfa tccctctccggcttccatcctgggacctgtatccagacatcctccatgccacctcctggcagccc atgttctcctcttctcaccctgacttccctgagaagaatcactctgcccaggtcaactggagctcctggtgact ccattctgaggtgcacaagcaatgaaagctatgcaacaatagggggtgtgacaggggaaccgtagacttt

图 10(续)

SEQ ID NO:	探针集合标识	靶序列
141	221432_s_at	gcagatgtacaactcaccataccaccgggtgacagactgtgtacgggagtggtggcaaaatgaaggggcccggg gaccttaaccgagctacaccaccagcigaccatgaacgttcccaagccactcctatgatcaatgaatcc lgcaggagcacttaaccceccagagagcgtacaaccaagctcccactctcctctgagctgcaggagct gtagctccgcagccacaaccccaactggacgttggcaaaacactgctcaacccaggagctcttggcttggac tcacacattacaggacatacagggcatggctagtccttcaggacggtatatacaagtagggggggaccgct atttccgaggggtgcaggccagagtaattaccagatcccctccacagccatcgcatggctgtgtatgag
142	221695_s_at	gaatacaccctcagattctggagggtgccattttgacagtaaatgattgccaatagatacaaggcgc caaataccttcgagattcaacaggcaacgtcaaacataggagatttggggccagcaaacggcttcagaccatctg tcttcaggagacagaaatgaagtctgtcacgggcacaccatactggatgagccctgaagtcacatggtgacaag gctatggaaagaaaagcagacatcggaggttgcattaccgtggtagaaatgctaactgaaaagccgcttggg ctgaattgagcaatggctgccctttaaactgccactcagccaacaaaccgaaagctgccacctgatctca gactatactcgagatttcccaaacggattttgtagagcccaaacagagccctcagctgatgaactttaaaggc actgtttgcatcactagcagccagtaacctctc
143	222244_s_at	tccactcagcacagtctgtcagtagctgcaacatttgaatactgtgtgaaactgaaagtgcaga agcaggcatgcttggaccaggaatgatcatttctgaagatgggtgcaagtgaaactagataaacagccctcc actccagatggatccagtgatctagaatgggatagccagagaaactctatgcacctcactgcagaca ctcccctaagcaaacaccagatgctctactgtacttgaagtacatgacttgaagcttgcacctcaataactg aattatcagcaagggtttgaaagctggtcctcattgaggccatattagagcaactgtacattgacctctgtat cagccatgtacttactctgtgcaagagataactatgaaagccaaatcaatactgcaaacatttctaaagg ggctcaatattatcactctctcttcttccaaactacacatcactg
144	222435_s_at	gttggaaagatgtggctctgccatgaaggatgctctgttgcctttaaactggaaagcgaattcaagccagctgac caagaagccaaagactggcttaggcaataagctttaagggcagaagtcattcactctgaaagactatctctgagt cagacttaaacactcttttactaactgattacaagatgataactacaacattccagggtgtctacggccagtac atcgtacggagtcacgaaltccctcagcagcatcttcatcaacctcccaacctgtagctaaagaatccctcatga gcccctgacagcggccggccagcagagctcagagaaggttctactaccagatgtaaacagggcca ccagccaaagagacaaccactgatcgtggggcagctgtactgattgcatctgacttggcattggcagcctc ttatattccgacgaataatctggcaaacgaatacatattgactttagtllataataggtttgtgactttagagctgtg actcaactgttcattaaa
145	222955_s_at	gagtgaagaaaaggctcttcttagtaagattttagtcccgaagggcctacctgctgctcctcaagaca ttgatctcagtttgaatgggaaactgttatcttacacagcactgatgtaagaaaagaattgtgtgtatcacc ccaagatagaagcgggtccagggttaccaggactctgctgcccctgtgtgcaaccgacaggactgacatc cttactcttagctgcacctcaacgccgatgagctggaanctgcagatgtgcacagggtacgtcgtgatttga gacttggaggtgagcaacagaccagacctctatgatgttttgaatcggcagagatgagattaccattgctcc ccttgcaaaagagggccatg
146	223009_at	cagcctcactcggcctatacagttaccclaacctgctactaatacacagagaaaaatgtgaagaaggaggagaaga ggaaggctagaagcctgagcaagtgagggtagaaccttttgggactggccttgaagctctgcccagggatggg gtggggccaaaaggacagagcctgtgtatgtctcattagcattgagaatgtggagataaccagtttgggtgggg gtgatcaccaggggaccctaggagatccccctccaccctctctgttggcctcagagtcacctgcccctctcc ctgacttggctcactgcacctcactagggtttgaccagggtctgtagagcttgaattgaatgaattgagttt glatctagaacctgggttttacatgtttggctttttgttttgggttgcacctcgataaagga
147	223578_x_at	aagccaccctctaaagagacattcaagctgaactatcaaatcttaatacagttacaatttacaacaagataagttaa aataacaattacaatttttgaagcatalcctaacctctgttttgcagttaaacaatggaagattttctctaca ctaaaaaaaactgttacacacaactgaaaatagaalcttactgataatacaaaagctaccaicagaagaatc cctcaggatcattaaagccacttccctgtctgcagttctatagtagtttaaatattattaaactcctgaaaaaatt ccaaaagagaaccacactaccatataccaacaactttgcattccataattgtagttaatgtagccagtagg ccagaccaaccocccattcaatacttcttccccaaaagctctatacttgaaggaaaacagatcagatcaaat atgacacttcttccccaaatgaactggacaccagtgctcctattttaaacttcccc
148	223591_at	cacctggccaagaataaccactttgaagttatcccttttggtagacagagatgaacttgggatgtttgaacctggac attccaataaagaatagcccctgcttggctctgggagataaccttaagccattagaatcttgcctgataag agtgttttcttacttggccttggccatgcatcagctgacttgcagggtcaagctgaggagactaagt tagccatgtggcagtgaaagcatgccaatgtgatcaatccctagtaaaagccctggacacctaggcatg

图 10(续)

SEQ ID NO:	探针集合标识	靶序列
149	224254_x_at	acacaaaaaccatctgtatgtcaccatcaccgagaccagaagtagataaaaccacaagaatggggaaaaa cagagcagaaaaagctgaaaattataaaatcagagcgtctccccccaaggaccgagctcaccaccg aacggacaagaagctgacacagaatgacattgaggttgagagaagaaggctcagagaatcagactctccga gctaaaaggaggaaagttcgaaccatcgcagaagctaaaaacctgagaaaagattagacaaatggctaac gagtaaccagctgtagagaagctctaaatgacctgagggctgaaaaccatggcatgagaactcgtgacgaat gcacaagcttagtagctgattcaatcaac
150	224566_at	agacagcctgttccagaggggtgtttgttgggggtggtgttatcaagtgaattagtcacttgaagatggcgct agacttgatacagcagcagatcagcaccctcctgccccttagcaacttaggtggtgattgaaactgtgaagg gtgatttttcaggagctggaagcttagaaaaacctgtaaatgctctatattgtggctttaacgtattaaaggacc acttaagacgagattagatgggctctctggtattgtctctattgtcaccaggtgtctgtgattgaaatcagagcg aagtgaattgcatgattcaagggaatttagtatgaaatcgtccttagaaacacatctgttctttctgtgtttg gtcgatataaataatggcaaaattttgacctatcagtaictca
151	224807_at	ccccagacggccacagatgggcccagatcctggcgtgcagaagaatccacagcgtggaggtgcacaa gtggagcagatcctgggcccctcctggagctcctggatgagatgaagtctcgtggagaagcctgcaccaag gcatcacagctcagaccctcccttgacaccagccccggcccgatgacagcttttctgaggaaccggccac gcagctgttccccacatggacagatggacacacagagcctggcggccactgctggcacggtgtgagcgcca ggcatctcccacccgcccctccgacggcccaaccaggggctgtgacagagctggggaccacggaaaccgagat gcactttagaccaggagctggcccggcctctggcagggccccactaactattttgcccggctgaggtgtggtg ggggcgccctcctgggggtgcacgattcccagctcgggttaagtattatattttggggccagagtgccca ataaagggt
152	224909_s_at	gggtgctggagaccatagagctgatgggagcagctggtgctggccttcgntcctgctccccagaaccocaa gggaacgtcatggagccacatggggccacccggctccctgggatggctccgctgacatttgaaccoccg gtttctcaacntccacattccaggtgaccacagctgtctctctccctcatttagctccaggttaccctaaacct gtactaacctgcttgggtgacttggaaaagacttggctctgtcgggaaaggagagacggggcctccatcagcct gttaccagagatccccgagagccacaccagctmngacatcaccgcccctggaactggggccaccagcctg ggcagagattgctgacttatt
153	225673_at	gaggggacagcgtatggcccctgtgttaagaataacgtgtcctgctttggcagagagaagaaatagccactgc ccgcttcaaggaagatcaccctttctgtttgtttgtttttcttcttcttctgcccagaggacaaaataactgag tggcccttaagagggaagtgttttcagctgtctcttttggccctaggtgggaggggtggggtgctgctcctca gctagaggaaatggcttctgctgaatgtgtagtgcacacgacgggtttctgtgtgctagtgtcttctgctgct cctgctgtctgggactcacatacaatcgtmnnatataataataataataataataataataataataataata aalcttggagctctggttccatcagcttctgttgaatcgtaga
154	226266_at	actttgctctctagaagcagcttctcgccttccctcccgaggctggcagagtcactgctcagctaccctcatg gggtctgaaagggtgcatgggctcactgtcttagacaaggacagttgcanntccgaccaggcagacttgc agtttgagtggtgggtaggtggagcggcggcctggccacagtgcccggacagcagcacatcacatcagtt aacactgtttccctccaactagttattacgggtgtcctgtggacaatlagactggagagccaaaaggaaatgctcag gggactgggttctgtttggagagggctctcgglaaacagagttcgcattcctccagattctgtggcaccagagt aaatataatgcccacagccagcttaagcaatctatctgactgcccgtc
155	226334_s_at	gggtgtaaggattcccactgtgctcttccatgatggaactgtttgacacaactgtagagcagctgtatgactct cactgtaaggagttacaataaagaagatcagtaaatggagatgtgggaactggccagaagaactatgc catggtgactgaatttggcctactctagggcaaacagaattacaattgaaggagttcctatctactgtaaagaa gagaacatgaaatctgttggcagaagcagcattttgaaataaaaggttcactgacgtgacccccctaaatg gtgaaataaaattataagggcattacttttgaagcgggaaaagggtcacaattaccctctc
156	226872_at	caacagggtcagtgctcagccacaactcagaagcagccatcccggctgtcgtccaacagcagtgctcgtg tcccgtccacggagcttccagaacacctccccttgaactaatcccggagcaccaccaccggcaggtccca cctggaccttcaaaagtcaaaacttctctcgggacaacaatattcgggacttccaagccctgaactttaga caccagttgtctccatggaacacgtagccgctgacgtggacagctgctgctgagttctgtcccccaacca actgcagagaagaagacgagcctcggcccaggacgcgatttcaacgaaa
157	227396_at	attgactcactgattgtgctctgtgagtcagagcctccgggggttggggaicagggggcgggggctgact atgagcccatcacgtgtgttttcatctggatgaaaaagcctgttctctttgaaatgctgattgactattgagc taaacagcttggtagctgtgtgattggcclcaaaagttaagctcctgggtttcagactactgtgtagcagctgtg gttttaacatactgtacttttctccctgggggcacatacaataaggatgtgtatgtggacttaaacgttaattt cctgtaactatttggaaatgactatfttcaatgtttgtatctgtacagagatgctgttggctttt

图 10(续)

SEQ ID NO:	探针集合标识	靶序列
167	233303_at	cttacclattgacctglatattacttgctaaatTTTTTTTattggaaatccagaaaagtggalltagagaacaact aacctccacctaatactatgacagagatmnnnnanagagtanctgtgaaaaatgtgaaagtactgaaaaatgtaa ccttggcagcctgagcatagcaaccagaaaaactatcgaattaaaaaattggctcataggtactatttttggg ccataaggatttttcaactTTTTTnnaagtgattattatgctattccacgtaggtactgatacctgaagacttt tccaccttaaccttactcgttggaggactttg
168	234640_x_at	ctgtcttgggttctgctagggtatccagtttggcctgtgattttcatagtcgctgtagtcaacctgtcttgggttct gctagggtatccagtttggcctgtgattttcatagtcgctgtagtcaacctgtcttgggttctgctagggtatcca glttggcctgtgattttcatagtcgctgtagtcaacctgtcttgggttctgctagggtatccagtttggcctgt gattttcatagtcgctgtagtcaacctgtcttgggttctgctagggtatccagtttggcctgtgattttcatagtc cgtagtcaacctgtcttgggttctgctagggtatccagtttggcctgtgattttcatagtcgctgtagtcaacct gtcttgggttctgctagggtatccagtttggcctgtgattttcatagtcgctgtagtcaacctgtcttgggttct agggtatctggttggcctatgattttca
169	235167_at	gatagggttactactgagttgctatggctccagctgaaagaaagcccgtcagctcatatcacgtaaacatttgc ttatgctaaaaatattgggacctggcattaccagctattacaatctcctaagatgctcgggtagtatttagtactt ttcatactgctatgaaanaactggaaactgggtaattataaagaaaagggttaattgtagtaccagttccaca aggctggagagcctcagaatcattggggaagcgaagaggagcaaaaaggtagtctccatggcagcagg caagagagcacgtcagggaaactgcccttataaaaccatcagatttagtgagatgtagtaccatcacgagaac agtagggaaaaacctgccccatgattaccctaccgggtccctccacagacatggggattatggga actacaattcaagatgaaattgggtgggacgcagccaaccatafcgggtag
170	236155_at	gacactgagttgaaatccagcccaaccattactagttgtgtgacctatcaagttatgcaacctctctgtgctca gtttccttttggcaattgggtcaacacctcagcaggtattgtaaggattatgctatgataaagcacttaaca cagcatccgacacatctcatcactcaataaatacactgccccttttactgtggttaacaacctgtctgtaattct cttcttaactatagacaaaacataatggaattttaacataagtagtagagattgtgtaccacagtgataaa ctgattttatgcttaagtaactctgtttatgtagacaatttactagtagagaatcagaaaaactaatgttttt tctattcttaaccttacccttttttggtaaagaaaattaccgaaaaacaaaaaanaaaaaaacactctct gtctattttaccat
171	236528_at	gcactagctatagcaagtgcttaataatgatcgaataaagcaaaagagatttcaagttgattgcccagtt ggcaatcacaacagagaagtgtgcttctgtttttcaggtgacgtgacctttgtctatagaccagaatca gtccttcattcagagtagccctcttggtagtgcgatacctaaattttgtagtataattttctgctggaggttt gctgctaccacctcagacatattgtaataaataatatacatatttaccctagcacaccccagagtaggccc tacagataattgctaaatcagtttagcattcgggaagattgtagactctgtgcttataagcaactttctttta aaccttattccaactatgggtatgtagtatttatacagctctcatagattacactatgtagtattgaaatcagat gttttactcagattactcagttggttttttactctgatg
172	237442_at	gccagcagattccattcattcctcagctggagactaagagaacagnnangagaggcaagtttctgcccata atcagacagtgagaaagtgnnccatgatttagattagatgaattataatggcacacacaaagcacaagctgccc atcaacaagaagatggaaacagaagccgctctgatcagtgaggaaagaaaataatcagaagacaagtta tgtattgctctgattcagacactccgaatgtattgtctgtgtgcagaattataaagaaataacagacacgctca gcattaaagaataaccgcaatgtactcatgataatctacaacatgttttaagggatggaatcaaatctatctgc atacttggcctcaagattctgtgggctgtgacatctttgaattacaatgatgtatacagcttgtctacaagat tttggactagaacagaatcagactatgactttta
173	237544_at	atgagtgacctctgtagctactttacaggagcaltcctaaccatttctcagcattcatctcacactttcgttct tatgtaactgcagcaatctatatccacagctcttacaacaactttgtttttagcttttataatgtaggagtagact ttatgagatttttcaagagcagccagggaaacttccatattatcttcaagaaattggcttccaaggtacttt caagagaaccagaaaggtcatccatgcttagtagtagctaaactatccagaalagagcctacttcaaacct accttaaacacgtttaaagaagccatgaaaggatcaacaatactgattttcagtaacttaactgtcttctaacg aagccattcttaagggaactggcaaggtcagatctaaactcaatgtccaccagc
174	238320_at	aacgtttcaagccatcctgcacatgittgaactcaaaccttggggtgattcagttgcaacttcttcaacccca gctcctctccacagaggccaccgtcatggccagttgtgcancttcttccagagaacctgtgtagtataaagc tgtacaggcgtgggtacaccacagcctgtctgactgtggactgttgattactagtagtactagtagaaccc gcatactgtattcatgctgcttggctttcaacatctnctgnnagnngncttgaattaccntcccttttnggg nannnnccattannngtttncagcaattttactgtagataaggctataccgnatctgtgtmcatgggtttatg nacatgggcannnatctngagagagaannnctcagagnnaattctgggcacagcatgtgtaattcttaa afatgatggacaccccagcttccacctcaaggagggtgtccattga

图 10(续)

SEQ ID NO:	探针集合标识	靶序列
175	238712_at	actagtgtaggctgacaaccaataaggaagcaggagagatcaaacagaactgctgctgggtggtgctcagg agctgtacacggagaaccctggactatcgcataagcagcaaggctatagttcacttatgcgaaatggacn tgcagatgclaanctttgttgcgaagcgaagcctcacttggaaagaaactcagccccctctggcagcattg agttccittatggatgccgagtcgcgaaacaaagtanitttttaagtatctctttatgaggagaatgctaccaaaa atgtattaaggaatattaagtcgiccagagactgcttctaccaagaactgcaatggaaitcttttaaccaact agactcctacactagagttgataaacgttttctcacattgagtttagaagatcctgctgctcagggaagcc
176	239021_at	ctcgtgggatgagcaaatgactctgaaacggctccatgcccgaatgctcctggaatcttctgaaatcttcaaaa gccccagcaggggtggggcggggcggggctacagtccacgctgagctnccctctggccctctgctccc cgcccgagtgctngggcccgccggcgcccgacctggccgtggacacctcgggtgctgctgctcctccc catctgccactggaaagtctggggcgaccggctccaggtttagcaggacactgagaaaagggaatgctgct ctttcggaggctgggtgagccctctctgctcctaccctgcccccacagcggccctgcacctgctccacgg ggccattgccccggtagatgcggctttttggggctcaggcactctc
177	240057_at	tcagataaagcaaacctcctcaagaccgcagggaatgccattaggggcaggagcctgaattggctg taggaatttagagaatttgagggtctctcattcaaatttttctccaagtggtatatactttacataaatttcatata agccaaaagtctgacattagcctgaaggactgtgtgacattaaagttagtaaaataaactaactattctttcaaaa gagtaaatctttttatccaaagagtgaactgaggtctacactgcactcagcactgaggggagcggccaggttga agggaacacacgtgggtcacagtcaccgcacacaaggacttatggtctagctggggatgcaacacagccaca cgccaacaggaggtagaacaagacagcatgatacatagtaaaaatggttccagggttaaccaggaaaagagcaa gtgctgactgtcccttggctactatgcttttc
178	241774_at	ggcagtagcagtaagtggaccggtaataagagactctgagtgatgtaaatgtagtatttaataacaataga gccattggaattttctccacgtattgtagatgaaacctgatacactaccatacagacaggtgattgactaga ccctgtttagtagtctaatgtgaaacttagagttgtagtaagattacgattatccataacttttgaacttaaaaagctg gctacacacnaltttttggaactttttgtaataccaatgctacactctttgatctagagaatcacaataatlla gaaacatcactacnagnitaatgacttttttttttcttccaaactgttacaataatagtagtacttctttata laccgtataaactattcagggtttcttaannnggtttgaaatgttttttaactgctcttctcactttgataagg
179	242907_at	gtacacagatacaacactctctcattttttgctatttttcaatgttttaactttccactgttttctctgctatg cacttttataatctttaaagttattcttagttttancaatgatacttaagaagacttaatagcctatagaaataggatc tccctattcccaacctgggaacacataacatattagttcattttatgaaatctatctgtttacnccctcagtt agttatgctcttactttcaaacagttaattttgatactagttctgtaagcaaaaagcaactttattcttcttacaat tcccfttacttaactggaaactttctctggtttctcattagctactctc
180	244356_at	tagtgatggattgcttgaatactttgggancctgggtttmcanagtggtccctatnaagactaagtgaggactat aatgattgngttttcttaaatcagaatcnggatgcataaccagatgaagggaagacatagctgggagccatagttta ntactagattttgaaatttaggtgattactataggacaaaagtattgaaatgggattggcggaaactcagttg aaccagcagttgctaaagtaaatatatacaggacattagataatggatgaggaatgggttaaaagaagatga ggccctgtgagttgaaacaaaaaatacaaacctggaacactttccattttatgattatctcttcaataaaaa ttaatglatatgacaaaattttattgctctcctagttcaagtgatttactttttattccataaaaaatacttccaggata gggaaaaggtaacttgcattataagttgtattttctacggaagg
181	244556_at	ctctcaagtagcttttctcagacttaagtcctccatcgggtgacacggagggaagaacttcagaaccaactgttg gccctgaaaagacctcaagagggtgcaatcagttgattttacattgaaaggctcacagttccccctctgagagtn tgacggnittgacaanccccnccccggaanccctgatacacagtcancanccatgaagcagctcaggtt aagaactntattatggaccgtgccccatctgttctttacagatgaggcaactgagtcacaggagagcagaac gtgacntgctgtagaacacaaaagttagttagggcagactaggaccaggtaacca
182	244752_at	gacctcacagcttctcagggaagcacactttgaagcaagataactctagtaaacctctgctgttggcagtg aaaatttaagaacaagttgacttgcataaacatgaccaattatccaaccattctggcaatgcaagttcagttg atctctcagctcccaaaagggaactgccaatccccctactcaagaatgaagacaatggagtttcaaaaatca aatcagatgctaacattcagggttttcttaccaggacctaggccgactgtgataagataccctccaccacagaa ggcttfaatgacgccaccaaggtggcaagcaggctacctgttccacaaggtcaccagcagagtgccctgtaaaatg gccttt
183	37028_at	tgagactccccaaagccagaagggtgctcttccggagaaggctcactgtccattctggctgcttgggncag ggncggccccagccgccccaagggccccctgggagcagctgctcgggagcagcgncttgcagccgc atccccaggcccagggagctgagccccctgctcancncmnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnggcacg cctcaggaacccactttagccccatccctgccctcaccagacacttgccttctctctgctccctgctccccagt ccagaccagcccttgagccaaagctgtggccacacctcccgtctgctgctgctgacggcgtccctggacct cagtgaggagcgtggctgagaccaactggtttgcctata

图 10(续)

专利名称(译)	使用基因组或蛋白质组表达图谱诊断肾同种异体移植物的排斥的方法		
公开(公告)号	CN102119224A	公开(公告)日	2011-07-06
申请号	CN200980129930.4	申请日	2009-05-29
[标]申请(专利权)人(译)	英属哥伦比亚大学		
申请(专利权)人(译)	不列颠哥伦比亚大学		
当前申请(专利权)人(译)	不列颠哥伦比亚大学		
[标]发明人	P科欧文 A斯彻尔 O贡特尔 R巴尔肖 R恩格 A缪 R麦克马斯特 B麦克马纽斯 G科亨弗里尤 A梅里迪斯		
发明人	P· 科欧文 A· 斯彻尔 O· 贡特尔 R· 巴尔肖 R· 恩格 A· 缪 R· 麦克马斯特 B· 麦克马纽斯 G· 科亨弗里尤 A· 梅里迪斯		
IPC分类号	C12Q1/68 C40B30/00 G01N33/483 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/68		
CPC分类号	C12Q1/6883 C12Q2600/158 G01N2800/60 C12Q2600/112 G01N33/6842 G01N2800/245 C12Q2600/178 Y10T436/143333		
代理人(译)	陈文平 徐志明		
优先权	61/129022 2008-05-30 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

测定受试者的急性同种异体移植排斥状态的方法，该方法包含下述步骤：测定来自受试者的生物样品中一种或超过一种核酸标志物的核酸表达图谱，或一种或超过一种蛋白质组标志物；将一种或超过一种核酸标志物的表达图谱与对照图谱进行对比；和确定一种或超过一种核酸标志物的表达水平是否相对于对照图谱升高，其中一种或超过一种核酸标志物的升高是受试者的急性排斥状态的指示。

