



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105441578 B

(45)授权公告日 2018.08.31

(21)申请号 201610033419.6

(22)申请日 2016.01.19

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105441578 A

(43)申请公布日 2016.03.30

(73)专利权人 中南大学湘雅二医院

地址 410011 湖南省长沙市芙蓉区人民中路139号

(72)发明人 陆前进 刘莹 赵明

(74)专利代理机构 长沙市融智专利事务所

43114

代理人 袁靖

(51)Int.Cl.

C12Q 1/6883(2018.01)

(56)对比文件

CN 103237901 A,2013.08.07,

CN 103917869 A,2014.07.09,

S Marton. "Small RNAs analysis in CLL reveals a deregulation of miRNA

expression and novel miRNA candidates of putative relevance in CLL pathogenesis".

《Leukemia》.2008,第22卷第330-338页.

Javier Perez-Hernandez等. "Increased Urinary Exosomal MicroRNAs in Patients with Systemic Lupus Erythematosus".

《PLOS ONE》.2015,第10卷(第9期),第1-16页.

Konrad Huppi等. "The identification of

microRNAs in a genomically unstable region of human chromosome 8q24".

《Mol Cancer Res》.2008,第6卷(第2期),第212-221页.

审查员 贺巧巧

权利要求书1页 说明书7页

序列表2页 附图5页

(54)发明名称

尿液外泌体microRNA分子标志物的应用及制备的试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种尿液外泌体microRNA分子标志物的应用及制备的试剂盒。该尿液外泌体microRNA分子标志物为hsa-miR-1202和hsa-miR-1207-5p中任意一个或两个,该应用主要是指该分子标志物用于制备狼疮性肾炎活动性检测试剂盒,通过定量检测尿液外泌体microRNA分子标志物hsa-miR-1202和hsa-miR-1207-5p中的一种或两种来判断狼疮性肾炎的活动性。本发明试剂盒简单快速、经济实用且便于临床开展。

1. 尿液外泌体microRNA分子标志物在制备狼疮性肾炎活动性检测试剂盒中的应用,所述的尿液外泌体microRNA分子标志物是hsa-miR-1202和hsa-miR-1207-5p中的一种或两种;

所述hsa-miR-1202的序列是:GUGCCAGCUGCAGUGGGGGAG;

所述hsa-miR-1207-5p的序列是:UGGCAGGGAGGCUGGGAGGGG。

2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述的狼疮性肾炎活动性检测试剂盒为用于定量检测尿液外泌体microRNA分子标志物hsa-miR-1202和hsa-miR-1207-5p中的一种或两种的试剂盒。

3. 根据权利要求1或2所述的应用,其特征在于,所述的狼疮性肾炎活动性检测试剂盒为实时荧光定量PCR检测试剂盒。

4. 一种具有狼疮性肾炎活动性检测能力的试剂盒,其特征在于,包括尿液外泌体提取系统、外泌体总RNA提取系统、反转录系统、扩增系统和相对定量内参标准化系统;所述的试剂盒是通过定量检测尿液外泌体microRNA分子标志物hsa-miR-1202和hsa-miR-1207-5p中的一种或两种来判断狼疮性肾炎的活动性;所述hsa-miR-1202的序列是:GUGCCAGCUGCAGUGGGGGAG;所述hsa-miR-1207-5p的序列是:UGGCAGGGAGGCUGGGAGGGG。

5. 根据权利要求4所述的试剂盒,其特征在于,所述的相对定量内参标准化系统由hsa-miR-16组成。

尿液外泌体microRNA分子标志物的应用及制备的试剂盒

技术领域：

[0001] 本发明属于医学分子生物学技术领域，具体涉及一种尿液外泌体microRNA分子标志物在制备狼疮性肾炎活动性评估制剂方面的应用。

背景技术：

[0002] 红斑狼疮(LE)是一种经典的自身免疫性疾病。此病不仅可以累及皮肤，也可累及其他器官和系统。多器官、多系统受累的红斑狼疮称之为系统性红斑狼疮(SLE)。系统性红斑狼疮是一种严重危害人类健康的慢性复杂性疾病。狼疮性肾炎(LN)是SLE最常见和最严重的内脏损害，也是SLE预后不良的主要原因。在疾病初期，有尿检或者肾功能异常者占25%~50%，而肾活检显示几乎所有SLE患者均有不同程度的肾损害。LN是我国最常见的继发性肾小球疾病之一，常反复发作，约20%在10年内发展为尿毒症。红斑狼疮治疗的目的在于控制病情，减缓疾病进展，保持病情长期缓解与稳定，防治重要器官损害。特别强调早期诊断和早期治疗，以避免或延缓不可逆转的组织器官损害。

[0003] 外泌体(exosome)是一些小的、分泌的、由膜包裹的亚细胞结构，直径通常小于100nm，以30-50nm为主。自1987年在兔网织红细胞变成成熟的红细胞过程中发现外泌体的分泌以来，相继又在其他一些哺乳动物如猪、鼠、兔等的体内发现。外泌体可以由B淋巴细胞、树突状细胞、血小板、肿瘤细胞系、肥大细胞、肝细胞、上皮细胞、间充质干细胞等各种细胞分泌，并具有体内抗原递呈、抑制肿瘤细胞生长、传递成形素、诱导淋巴细胞凋亡、胞间膜交换、免疫治疗、免疫调控的作用。外泌体几乎存在于所有的体液中，如人的支气管肺泡灌洗液、恶性胸腔积液、血浆、尿液、乳汁、羊水、腹水、唾液、脑脊液、胆汁、精液等。近些年，基于外泌体寻找疾病的相关生物标志物引起了研究人员广泛的关注，特别是自2007年发现外泌体包含丰富的小RNA，尤其是microRNA之后，以外泌体microRNA为基础筛查疾病的相关生物标志物得到了长足的发展。microRNA是一些小的非编码RNA，长度通常为21个碱基，它们以其靶向针对信使RNA 3'非翻译区来抑制翻译和即使有大量核酶存在也依然稳定存在于各种体液中而被广泛用做生物标志物。本发明的目的即是首次发现了某些尿液外泌体microRNA可以作为筛查狼疮性肾炎活动性相关的生物标志物。

发明内容：

[0004] 本发明的目的是提供一种尿液外泌体microRNA分子标志物在制备狼疮性肾炎活动性检测试剂盒中的应用，以及制备的试剂盒。

[0005] 尿液外泌体microRNA分子标志物在制备狼疮性肾炎活动性检测试剂盒中的应用，所述的尿液外泌体microRNA分子标志物是hsa-miR-1202和hsa-miR-1207-5p中的一种或两种；

[0006] 所述hsa-miR-1202的序列是：GUGCCAGCUGCAGUGGGGGAG；

[0007] 所述hsa-miR-1207-5p的序列是：UGGCAGGGAGGCUGGGAGGGG。

[0008] 所述的狼疮性肾炎活动性检测试剂盒为用于定量检测尿液外泌体microRNA分子

标志物hsa-miR-1202和hsa-miR-1207-5p中的一种或两种的试剂盒。具体是为实时荧光定量PCR检测试剂盒。

[0009] 一种具有狼疮性肾炎活动性检测能力的试剂盒,包括尿液外泌体提取系统、外泌体总RNA提取系统、反转录系统、扩增系统和相对定量内参标准化系统;所述的试剂盒是通过定量检测尿液外泌体microRNA分子标志物hsa-miR-1202和hsa-miR-1207-5p中的一种或两种来判断狼疮性肾炎的活动性;所述hsa-miR-1202的序列是:GUGCCAGCUGCAGUGGGGAG;所述hsa-miR-1207-5p的序列是:UGGCAGGGAGGCUGGGAGGGG。所述的相对定量内参标准化系统由hsa-miR-16组成。

[0010] 所述尿液外泌体提取系统包括40%PEG6000(聚乙二醇6000);

[0011] 所述外泌体总RNA提取系统包括2×Denaturing Solution(2×变性液)、Acid-Phenol CHCl₃(酚氯仿)、miRNA Wash Solution 1(miRNA清洗液1)、Wash Solution 2/3(清洗液2/3)、RNase-free ddH₂O(无酶水);

[0012] 所述反转录系统包括5×RT primer(5×反转录引物)和dNTP Mix(dNTP混合物)、Reverse transcriptase(反转录酶)、10×RT Buffer(10×反转录缓冲液)、RNase Inhibiter(RNA酶抑制剂)、RNase-free ddH₂O(无酶水);

[0013] 所述扩增系统包括2×Master Mix(2×预混液)和20×TM probe(20×TM探针)、RNase-free ddH₂O。

[0014] 本发明的优点是:

[0015] 首先,本发明所提供的尿液外泌体microRNA分子标志物包括hsa-miR-1202和hsa-miR-1207-5p中任意一个或两个,这些分子标志物都能够单独或者结合起来用于检测狼疮性肾炎活动性。具体是用于制备狼疮性肾炎活动性检测试剂盒,该试剂盒通过定量检测尿液外泌体microRNA分子标志物hsa-miR-1202和hsa-miR-1207-5p中的一种或两种来筛查和判断狼疮性肾炎的活动性。其次,由于尿液具有取材方便,无创伤性,并可连续体外检测的优点,因此从尿液中寻找生物标志物可以将狼疮性肾炎活动性的早期筛查和诊断提高至一个新的水平;同时,通过实时荧光定量PCR技术对狼疮性肾炎尿液外泌体microRNA水平的检测,定量准确,相对于芯片技术、分子杂交技术或者高通量测序技术,该方法简单快速、经济实用且便于临床开展。

[0016] 以下结合附图说明和具体实施方式进一步详细的解释和说明本发明,而不会限制本发明的保护范围。

附图说明:

[0017] 图1是用透射电镜的方法鉴定所提取的尿液外泌体;

[0018] 图2是用Agilent 2100生物分析仪分析尿液外泌体所提取总RNA大小;

[0019] 图3是用Agilent microRNA芯片分析尿液外泌体所提取总RNA中microRNA种类,其中RA1、RA2、RA3为活动性狼疮性肾炎,non-RA1、non-RA2、non-RA3为非活动性狼疮性肾炎,HC1、HC2、HC3为健康对照;

[0020] 图4a是本发明所提供的hsa-miR-1202在活动性狼疮性肾炎、非活动性狼疮性肾炎、健康对照尿液外泌体样本中经RT-qPCR相对定量分析图;

[0021] 图4b是本发明所提供的hsa-miR-1207-5p在活动性狼疮性肾炎、非活动性狼疮性

肾炎、健康对照尿液外泌体样本中经RT-qPCR相对定量分析图；

[0022] 图4c是本发明所提供的相对定量内参标准化系统hsa-miR-16在活动性狼疮性肾炎、非活动性狼疮性肾炎、健康对照尿液外泌体样本中经RT-qPCR采用原始Ct值的分析图；

[0023] 图5a是本发明所提供的hsa-miR-1202在活动性狼疮性肾炎、非活动性狼疮性肾炎尿液外泌体样本中ROC诊断分析图；

[0024] 曲线下的面积

[0025] 检验结果变量:以miR16为内参的相对定量

[0026]	面积图	标准错误 ^a	渐近显著性水平 ^b	渐近 95% 置信区间	
[0027]				下限值	上限
	0.676	0.061	0.008	0.556	0.796

[0028] 检验结果变量以miR16为内参的相对定量至少有一个在正实际状态组和负实际状态组之间的结。统计数据可能有偏差。

[0029] a. 按非参数假设

[0030] b. 原假设:真实面积=0.5;

[0031] 图5b是本发明所提供的hsa-miR-1207-5p在活动性狼疮性肾炎、非活动性

[0032] 狼疮性肾炎尿液外泌体样本中ROC分析图；

[0033] 曲线下的面积

[0034] 检验结果变量:以miR16为内参的相对定量

[0035]				渐近 95% 置信区间	
	面积图	标准错误 ^a	渐近显著性水平 ^b	下限值	上限
	0.657	0.062	0.017	0.535	0.779

[0036] 检验结果变量以miR16为内参的相对定量至少有一个在正实际状态组和负实际状态组之间的结。统计数据可能有偏差。

[0037] a. 按非参数假设

[0038] b. 原假设:真实面积=0.5;

[0039] 图6a是本发明所提供的hsa-miR-1202和hsa-miR-1207-5p在活动性狼疮性肾炎、非活动性狼疮性肾炎、健康对照尿液外泌体样本中经RT-qPCR相对定量后的Spearman相关性分析图,由图可见,经内参标准化处理后的两个microRNA的表达量具有很强的相关性,相关系数高达0.976,P<0.001,统计学上显著;

[0040] 图6b是本发明所提供的hsa-miR-1202和hsa-miR-1207-5p在活动性狼疮性肾炎、非活动性狼疮性肾炎、健康对照尿液外泌体样本中经RT-qPCR采用原始Ct值的Spearman相

关性分析图,由图可见,未经过标准化处理的两个microRNA的表达量一样具有很强的相关性,相关系数高达0.971, $P < 0.001$,统计学上显著。

具体实施方式:

[0041] 实施例1:检测活动性狼疮性肾炎尿液外泌体样本、非活动性狼疮性肾炎尿液外泌体样本、健康对照尿液外泌体样本中microRNA的表达。

[0042] 实验材料及实验试剂:

[0043] 本发明中使用系统性红斑狼疮肾脏活跃病人晨尿样本41例、系统性红斑狼疮非肾脏活跃病人晨尿样本37例、健康对照晨尿样本45例。所有样本均为除了系统性红斑狼疮外无其他自身免疫性疾病、除了狼疮性肾炎外无其他肾脏疾病、无尿路感染以及近期无其他重大疾病。其中肾脏是否活跃以SLEDAI-2K评分系统中蛋白尿、血尿、白细胞尿、管型尿四项打分为评判标准。若蛋白尿 $> 0.5\text{g}/24\text{h}$,则仅此一项即可判断为肾脏活跃;若蛋白尿 $< 0.5\text{g}/24\text{h}$,则其他三项需满足两项或两项以上才可判断为肾脏活跃。

[0044] 实验试剂均为常用的分子生物学试剂,主要有PEG6000(聚乙二醇6000,Catalog#528877)购自Merck Millipore,mirVana PARIS mirVana Protein And RNA Isolation System(Catalog#AM1556,Ambion)试剂盒,无水乙醇为分析纯,Taqman microRNA assay、TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit(Catalog#4366596,Applied Biosystems)、Taqman Universal Master Mix II,no UNG(Catalog#4440040,Applied Biosystems)均购自Applied Biosystems公司。

[0045] 实验过程:

[0046] 1、尿液样本的处理

[0047] 取新鲜晨尿,2000g,室温离心20min,分离上清和沉淀,上清中加入0.5M EDTA使其终浓度为20mM以抑制各种蛋白酶活性,可直接提取外泌体或者冻存于 -80°C 直至外泌体提取时于 37°C 水浴彻底融化并再次2000g,室温离心10min以去除因冻融形成的蛋白沉淀。

[0048] 2、外泌体的提取

[0049] 于15mL离心管中吸入5mL尿液上清、5mL 40%PEG6000并彻底混匀, 4°C 放置过夜。然后将10mL尿液与PEG6000的混合物分装于6个1.5mL Ep管,10000g, 4°C 离心60min,弃上清,用200 μL PBS重悬外泌体并收集到一个1.5mL Ep管中。

[0050] 3、外泌体总RNA的提取

[0051] 所有尿液外泌体总RNA的提取均按照mirVana PARIS mirVana Protein And RNA Isolation System(Catalog#AM1556,Ambion)试剂盒所提供的操作步骤,并用Nanodrop定量,然后冻存于 -80°C 冰箱,直至检测。

[0052] 4、cDNA的合成

[0053] 取20ng RNA,其余操作均按照TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit(Catalog#4366596,Applied Biosystems)所提供的步骤进行。加入3 μL 5 \times RT primer,1.5 μL 10 \times Reverse Transcription Buffer,0.15 μL dNTPs(100mM),1 μL MultiScribe Reverse Transcriptase(50U/ μL),0.19 μL RNase Inhibitor(20U/ μL),然后用无酶水补至总体积15 μL ,混匀离心后,在PCR仪中进行反转录反应,反应参数设置为 16°C ,30min; 42°C ,30min; 85°C ,5min; 4°C ,stop。每一个microRNA都有一条特异的反转录引物,所以每一个

microRNA的反转录反应都是独立进行的。

[0054] 5、cDNA产物进行实时荧光定量PCR反应

[0055] 所有操作均按照Taqman Universal Master Mix II,no UNG (Catalog#4440040, Applied Biosystems)所提供的步骤进行。所有反应均做两个复孔,如两个Ct值差异较大(>0.5),则重复做一次。24 μ L Master Mix,18.4 μ L无酶水,2.4 μ L 20 \times TM probe,3.2 μ L反转录反应产物,混匀分装两个20 μ L体系。PCR反应条件为50 $^{\circ}$ C,2min;95 $^{\circ}$ C,10min;95 $^{\circ}$ C,15s,60 $^{\circ}$ C,60s,40个循环,终点采集荧光。通过该反应可得到各个microRNA在不同样本中的表达量,进而进行后续分析。

[0056] 6、数据分析

[0057] 荧光定量PCR定量检测microRNA的相对表达变化量时,相对表达量的计算用公式 $RQ=2^{-\Delta Ct}$, $\Delta Ct=Ct_{miR}-Ct_{miR-16}$ 。统计学分析采用SPSS22.0统计分析软件, $P<0.05$ 时,认为结果在统计学上有显著性差异。分析内容为microRNA在尿液外泌体中表达的个体差异性分析、ROC诊断分析以及Spearman相关性分析。该结果说明microRNA是否可作为活动性狼疮性肾炎的生物标志物。

[0058] 实验结果:

[0059] 本发明通过实验方法发现了2条microRNA可作为狼疮性肾炎活动性筛查与临床诊断的尿液生物标志物;具体序列如下:

[0060] hsa-miR-1202:GUGCCAGCUGCAGUGGGGGAG (SEQ ID NO:1)

[0061] hsa-miR-1207-5p:UGGCAGGGAGGCUGGGAGGGG (SEQ ID NO:2)

[0062] 1、所提取尿液外泌体的鉴定

[0063] 如图1所示,通过透射电镜分析表明,所提取尿液外泌体具有典型的大小(直径小于100nm,以30-50nm为主,图1)。

[0064] 2、所提取尿液外泌体总RNA的定性定量分析

[0065] 如图2所示,通过Agilent 2100生物分析仪分析表明,尿液外泌体总RNA中主要是小RNA,其中microRNA占35%左右。

[0066] 3、microRNA在尿液外泌体中的特异性表达

[0067] 如图3所示,通过Agilent microRNA芯片分析表明,在活动性狼疮性肾炎尿液外泌体总RNA,非活动性狼疮性肾炎尿液外泌体总RNA,健康人尿液外泌体总RNA中均检测到目标microRNA的特异性表达,说明hsa-miR-1202和hsa-miR-1207-5p在活动性狼疮性肾炎、非活动性狼疮性肾炎和健康对照尿液外泌体中均存在,为后续实验提供基础。

[0068] 4、临床狼疮性肾炎尿液样本的检测分析

[0069] 如图4a、4b、4c、5a、5b所示,经临床认定的活动性狼疮性肾炎尿液样本、非活动性狼疮性肾炎尿液样本和健康对照尿液样本共123例的RT-qPCR作图分析可得,hsa-miR-16(图4c)在各组样本之间表达恒定,可作为相对定量内参。hsa-miR-1202(图4a)和hsa-miR-1207-5p(图4b)在活动性狼疮性肾炎尿液外泌体样本中的表达显著高于非活动性狼疮性肾炎尿液外泌体样本和健康对照尿液外泌体样本。ROC诊断分析(图5a,5b)也提示,当 $hsa-miR-1202 \geq 52.8150$; $hsa-miR-1207-5p \geq 650.3800$ 时,狼疮性肾炎处于活动期。Spearman相关性分析(图6a,6b)也显示出两条microRNA在表达量上的强相关,提示二者在功能上可能具有紧密联系。也即该两条microRNA可特异性检测活动性狼疮性肾炎,是活动性狼疮性肾

炎发生的标志物。

[0070] 实施例2:利用本发明提供的试剂盒检测样本中microRNA的表达

[0071] 本发明的试剂盒由尿液外泌体提取系统、外泌体总RNA提取系统、反转录系统、扩增系统和相对定量内参标准化系统组成。该试剂盒是通过定量检测尿液外泌体microRNA分子标志物hsa-miR-1202和hsa-miR-1207-5p中的一种或两种来判断狼疮性肾炎的活动性。

[0072] 具体包括以下:

[0073] 尿液外泌体提取系统由40%PEG6000(聚乙二醇6000)组成;

[0074] 外泌体总RNA提取系统由2×Denaturing Solution(2×变性液)、Acid-Phenol CHCl₃(酚氯仿)、miRNA Wash Solution 1(miRNA清洗液1)、Wash Solution 2/3(清洗液2/3)、RNase-free ddH₂O(无酶水)组成;

[0075] 所述反转录系统由5×RT primer(5×反转录引物)和dNTP Mix(dNTP混合物)、Reverse transcriptase(反转录酶)、10×RT Buffer(10×反转录缓冲液)、RNase Inhibiter(RNA酶抑制剂)、RNase-free ddH₂O(无酶水)组成;

[0076] 所述扩增系统由2×Master Mix(2×预混液)和20×TM probe(20×TM探针)、RNase-free ddH₂O组成;

[0077] 所述相对定量内参标准化系统由hsa-miR-16组成。

[0078] 本发明的试剂盒的使用步骤如下;

[0079] 1)获取来源于被检测个体的尿液样本;

[0080] 2)提取尿液中的外泌体;

[0081] 3)提取外泌体总RNA;

[0082] 4)利用特异性的检测技术检测样本中生物标志物的表达;

[0083] 5)判断被检测个体狼疮性肾炎是否活跃。

[0084] 上述方法中生物标志物的检测是对分离的尿液外泌体纯化的总RNA样本进行检测。特异性检测技术为实时荧光定量PCR技术。

[0085] 该实施例中,分别以58个活动性狼疮性肾炎,53个非活动性狼疮性肾炎尿液外泌体为样本,分别用两个不同的microRNA生物标志物hsa-miR-1202和hsa-miR-1207-5p进行试验。具体如下:

[0086] 1、尿液样本的处理

[0087] 取新鲜晨尿,2000g,室温离心20min,分离上清和沉淀,上清中加入0.5M EDTA使其终浓度为20mM以抑制各种蛋白酶活性,可直接提取外泌体或者冻存于-80℃直至外泌体提取时于37℃水浴彻底融化并再次2000g,室温离心10min以去除因冻融形成的蛋白沉淀。

[0088] 2、外泌体的提取

[0089] 于15mL离心管中吸入5mL尿液上清、5mL 40%PEG6000并彻底混匀,4℃放置过夜。然后将10mL尿液与PEG6000的混合物分装于6个1.5mL Ep管,10000g,4℃离心60min,弃上清,用200μL PBS重悬外泌体并收集到一个1.5mL Ep管中。

[0090] 3、外泌体总RNA的提取

[0091] 所有尿液外泌体总RNA的提取均按照mirVana PARIS mirVana Protein And RNA Isolation System(Catalog#AM1556,Ambion)试剂盒所提供的操作步骤,并用Nanodrop定量,然后冻存于-80℃冰箱,直至检测。

[0092] 4、cDNA的合成

[0093] 取20ng RNA,其余操作均按照TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Catalog#4366596,Applied Biosystems)所提供的步骤进行。加入3 μ L 5 \times RT primer,1.5 μ L 10 \times Reverse Transcription Buffer,0.15 μ L dNTPs(100mM),1 μ L MultiScribe Reverse Transcriptase (50U/ μ L),0.19 μ L RNase Inhibitor (20U/ μ L),然后用无酶水补至总体积15 μ L,混匀离心后,在PCR仪中进行反转录反应参数设置为16 $^{\circ}$ C,30min;42 $^{\circ}$ C,30min;85 $^{\circ}$ C,5min;4 $^{\circ}$ C,stop。每一个microRNA都有一条特异的反转录引物,所以每一个microRNA的反转录反应都是独立进行的。

[0094] 5、cDNA产物进行实时荧光定量PCR反应

[0095] 所有操作均按照Taqman Universal Master Mix II,no UNG (Catalog#4440040,Applied Biosystems)所提供的步骤进行。所有反应均做两个复孔,如两个Ct值差异较大(>0.5),则重复做一次。24 μ L Master Mix,18.4 μ L无酶水,2.4 μ L 20 \times TM probe,3.2 μ L反转录反应产物,混匀分装两个20 μ L体系。PCR反应条件为50 $^{\circ}$ C,2min;95 $^{\circ}$ C,10min;95 $^{\circ}$ C,15s,60 $^{\circ}$ C,60s,40个循环,终点采集荧光。通过该反应可得到两个microRNA在不同样本中的表达量,进而进行后续分析。

[0096] 6、数据分析

[0097] 荧光定量PCR定量检测microRNA的相对表达变化量时,相对表达量的计算用公式 $RQ=2^{-\Delta Ct}$, $\Delta Ct=Ct_{miR}-Ct_{miR-16}$ 。统计学分析采用SPSS22.0统计分析软件, $P<0.05$ 时,认为结果在统计学上有显著性差异。如图5所示当检测样本中hsa-miR-1202 ≥ 52.8150 ;hsa-miR-1207-5p ≥ 650.3800 时,提示狼疮性肾炎处于活动期。

[0001]

<110> 中南大学湘雅二医院

<120> 尿液外泌体 microRNA 分子标志物的应用及制备的试剂盒

<130> 无

<160> 2

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 21

<212> RNA

<213> hsa-miR-1202 的序列

<400> 1

gugccagcug

caguggggga

g

21

<210> 2

[0002]

<211> 21

<212> RNA

<213> hsa-miR-1207-5p 的序列

<400> 2

uggcagggag

gcugggaggg

g

21

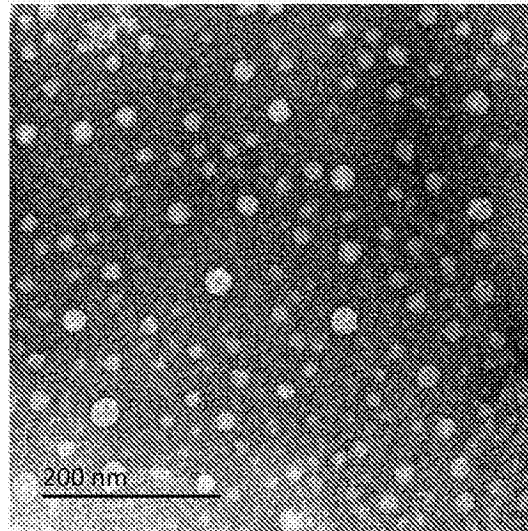
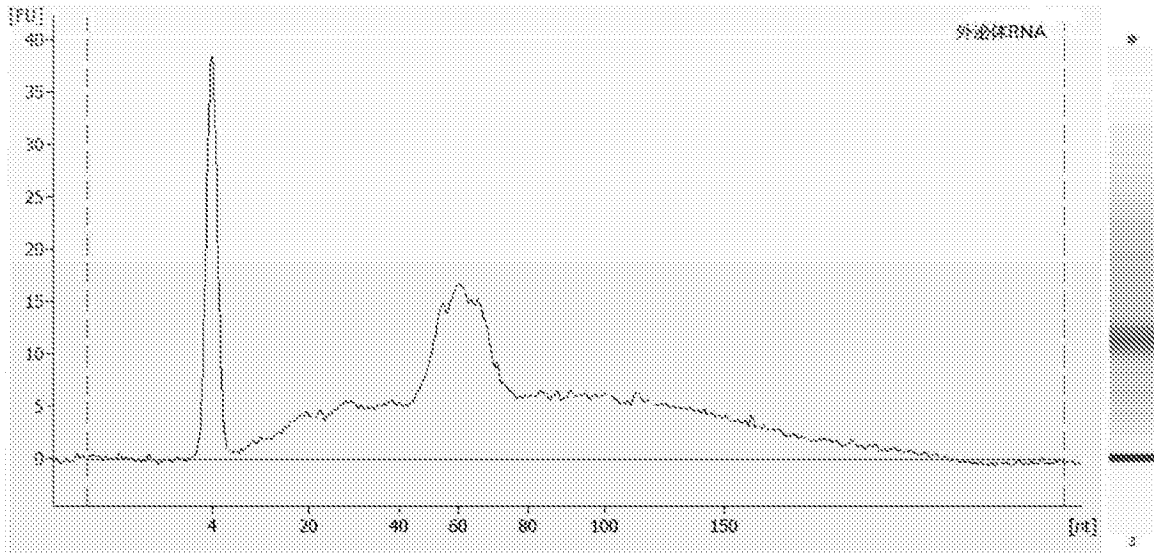


图1



样本 3 的总体结果:

小 RNA 浓度[pg/ul]: 2,378.9

miRNA 浓度[pg/ul]: 824.3

miRNA/小 RNA 比率[%]: 35

结果色标: 896021



结果标记: 35%miRNA; 浓度: 824.30 pg/ul

图2

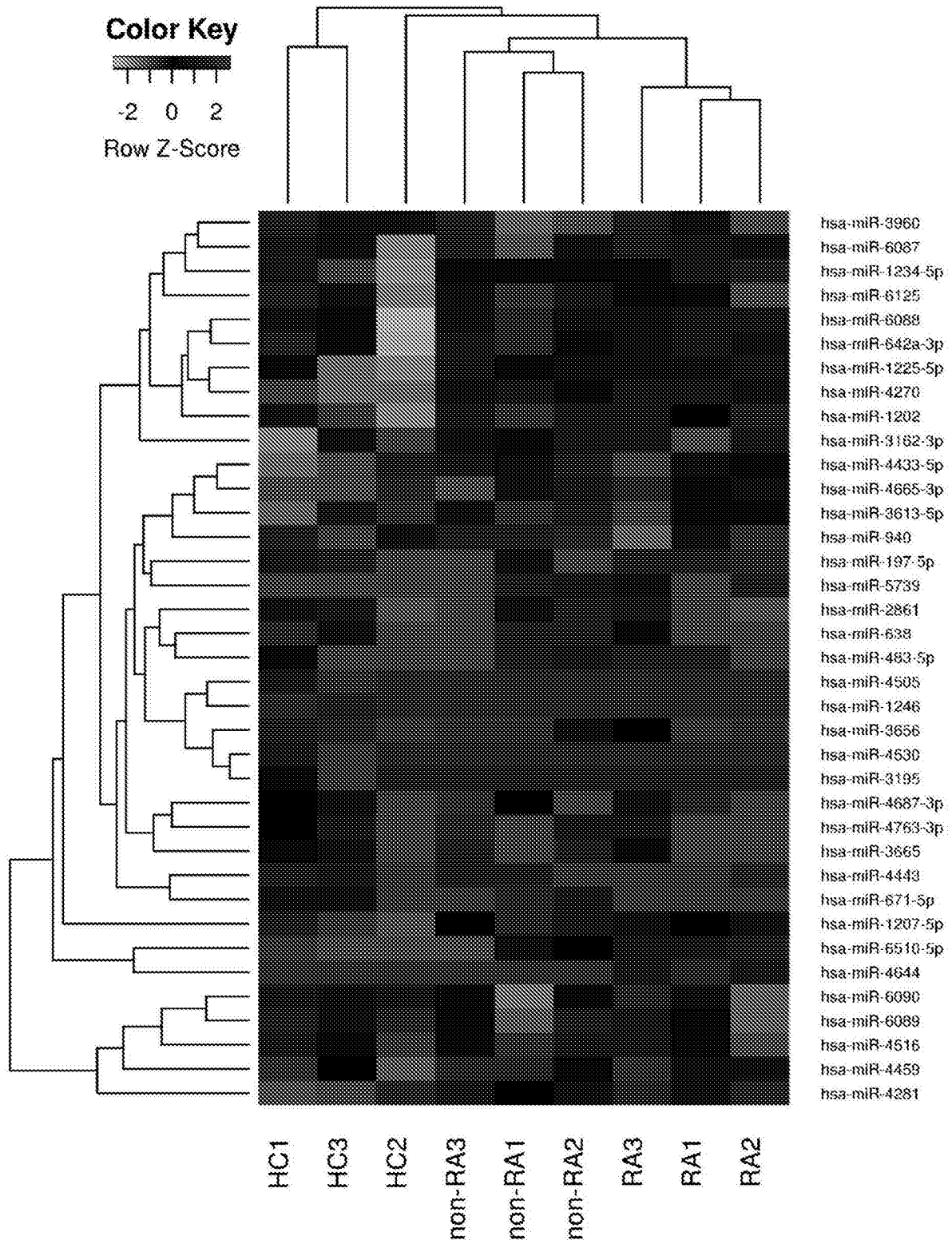


图3

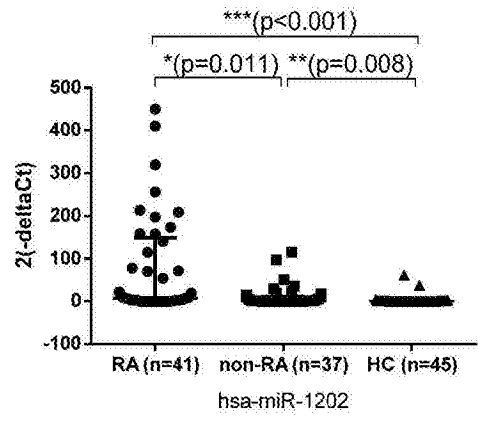


图4a

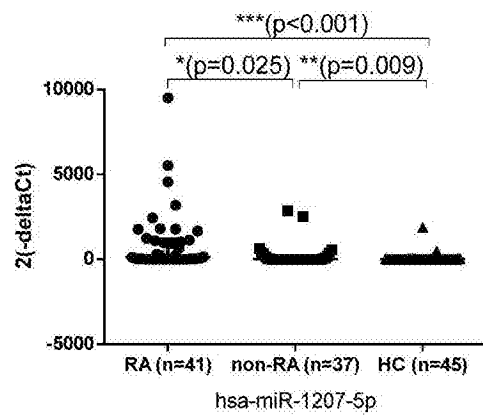


图4b

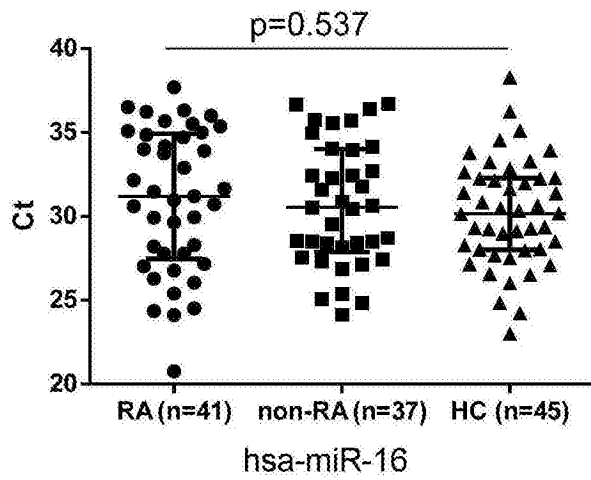


图4c

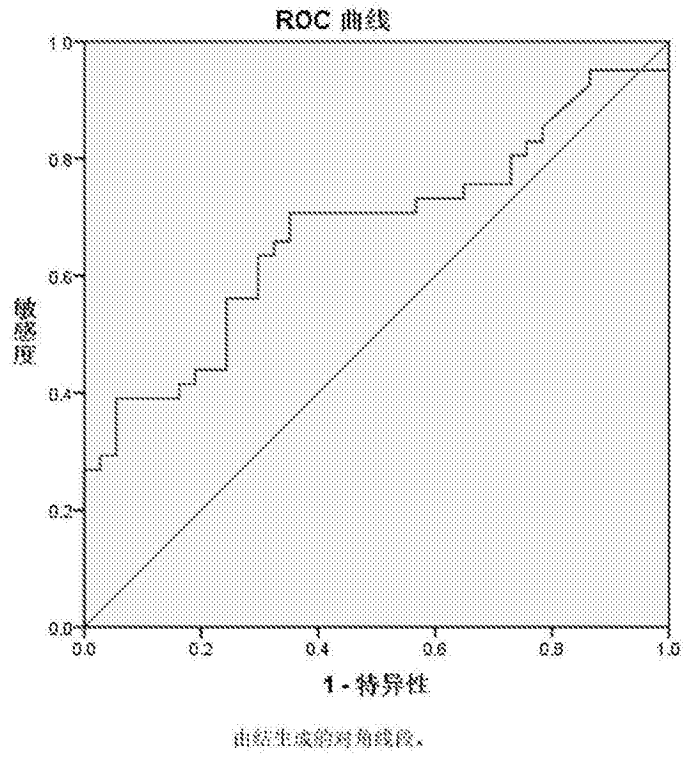


图5a

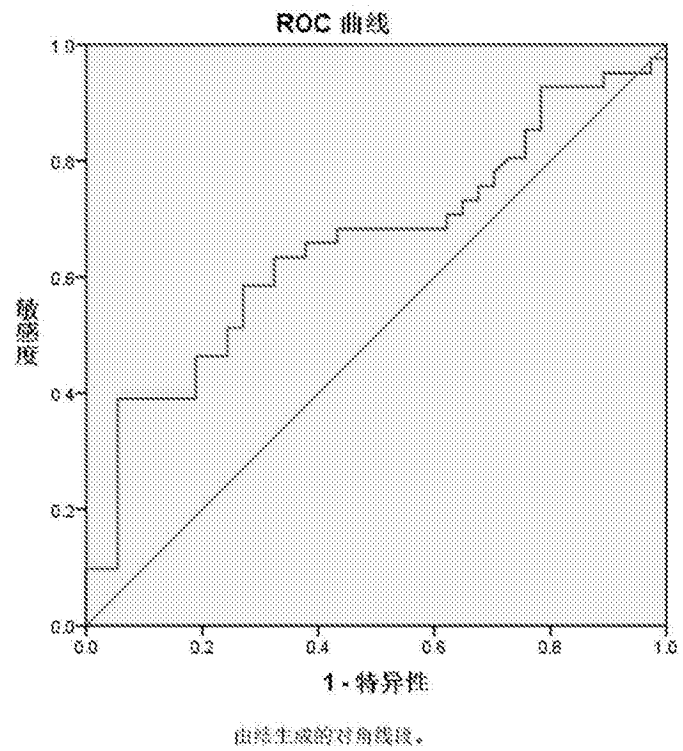


图5b

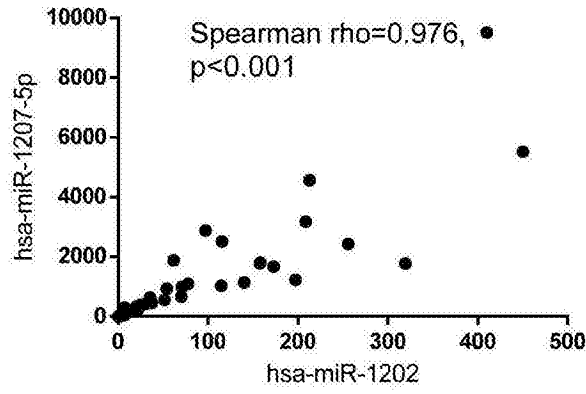


图6a

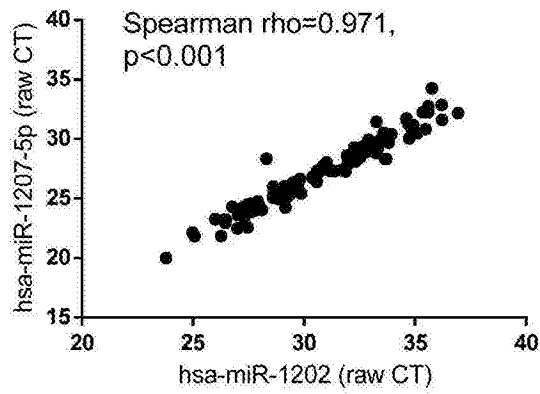


图6b