



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105154445 B

(45)授权公告日 2018.07.27

(21)申请号 201410261573.X

(22)申请日 2014.06.12

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105154445 A

(43)申请公布日 2015.12.16

(73)专利权人 中国科学院上海生命科学研究院
地址 200031 上海市徐汇区岳阳路319号

(72)发明人 应浩 李俞莹

(74)专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司 31266
代理人 马莉华 崔佳佳

(51)Int.Cl.
C12N 15/113(2010.01)
C12N 15/11(2006.01)
C12N 15/63(2006.01)
C12Q 1/6883(2018.01)

(56)对比文件
CN 102356162 A,2012.02.15,
CN 101808649 A,2010.08.18,
KeisukeHitachi and
KunihiroTsuchida.RoleofmicroRNAsinskeleta

Imusclehypertrophy.
《FrontiersinPhysiology》.2014,第4卷
Laurence Jeanson-Leh et al..Serum
Profiling Identifies Novel Muscle miRNA
and Cardiomyopathy-Related miRNA
Biomarkers in Golden Retriever Muscular
Dystrophy Dogs and Duchenne Muscular
Dystrophy Patients.《The American Journal
of Pathology》.2014,第184卷(第11期),
Xihua Li et al..Circulating Muscle-
specific miRNAs in Duchenne Muscular
Dystrophy Patients.《Molecular Therapy—
Nucleic Acids》.2014,第3卷
肖楠,苏玉虹.杜氏肌营养不良症(DMD)及其
动物模型研究进展.《生命科学》.2007,第19卷
(第4期),
Isabelle G"uller and Aaron P.
Russell.MicroRNAs in skeletal muscle:
their role and regulation in development,
disease and function.《J Physiol》.2010,

审查员 郝佳

权利要求书1页 说明书19页
序列表2页 附图3页

(54)发明名称
新的肌营养不良肌病的血清miRNA标志物

(57)摘要
本发明提供了新的肌营养不良肌病的血清miRNA标志物。具体地,本发明提供了一种分离的miRNA或miRNA集合,所述的miRNA选自:序列如SEQ ID NO.:1所示的miRNA;序列如SEQ ID NO.:2所示的miRNA,和/或与其序列互补的miRNA。本发明还提供了包含上述序列的芯片和试剂盒。经检验证明,本发明的microRNA标志物可非常有效地区分肌营养不良患者组织样本和正常样本。而且使用本发明的microRNA可以有效的区分DMD和BMD肌营养不良肌病。

CN 105154445 B

1. 一种核酸序列集合在制备区分DMD样本、BMD样本和正常样本的芯片或试剂盒中的用途,其特征在于,所述的核酸序列集合为:

(i) 序列如SEQ ID NO:1所示的miRNA,或与SEQ ID NO:1所示miRNA序列互补的序列;
和

(ii) 序列如SEQ ID NO:2所示的miRNA,或与SEQ ID NO:2所示miRNA序列互补的序列。

2. 如权利要求1所述用途,其特征在于,所述的芯片为miRNA芯片,并且所述的miRNA芯片包括:

固相载体;以及

有序固定在所述固相载体上的寡核苷酸探针,所述的寡核苷酸探针特异性检测SEQ ID NO: 1和SEQ ID NO:2所示的序列。

3. 如权利要求2所述用途,其特征在于,所述的寡核苷酸探针含有:

互补结合区;和

与固相载体相连的连接区。

4. 一种miRNA芯片在制备区分DMD样本、BMD样本和正常样本的芯片或试剂盒中用途,其特征在于,所述的miRNA芯片包括:

固相载体;以及

有序固定在所述固相载体上的寡核苷酸探针,所述的寡核苷酸探针特异性检测SEQ ID NO: 1和SEQ ID NO:2所示的序列。

5. 如权利要求4所述用途,其特征在于,所述的寡核苷酸探针含有:

互补结合区;和

与固相载体相连的连接区。

新的肌营养不良肌病的血清miRNA标志物

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药领域,具体地说,本发明涉及两个新的肌营养不良肌病的血清miRNA标志物。

背景技术

[0002] 微小RNA (microRNA,简称miRNA)是近年来在线虫,果蝇和植物,哺乳动物等真核生物中发现的一种内源性的长度为22个核苷酸左右的非编码单链小RNA。它在表达上具有组织和时间的特异性,通过与靶mRNA的碱基互补配对而在转录后水平上对基因的表达进行负调控,导致mRNA的降解或翻译抑制,是调节其他功能基因表达的重要调控分子。越来越多的证据表明miRNA虽然微小,但它通过与靶mRNA形成完全或者不完全互不配对从而对生物体的各种生命过程有着至关重要的作用。一些miRNA已被证明在肌肉中特异性表达,并在肌肉发育过程中发挥十分重要的作用。在肌肉分化过程中特异性miRNA通过依赖成肌决定因子MyoD,Mef2以及Myogenin的功能来调节肌肉增殖与分化之间的平衡。miR-208b和miR-499位于慢肌肌球蛋白重链基因(Myh7和Myh7b)的内含子中,他们与肌纤维的分化的类型有着密切的关系。

[0003] 然而,最近的研究表明,不论是在动物或者人的循环系统中,也能够检测到miRNA的稳定存在,并且这些循环系统中的miRNA种类和数量的变化,与生物体的生理病理状况相关。由此揭示循环系统中的miRNAs具备疾病的无创诊断标志物的潜在可能性。通过血清miRNAs的发现与疾病的关系,以及对miRNAs靶向的进一步研究,进而对于一些疾病设计出新型的治疗方案。

[0004] 研究miRNA的方法很多,最常用的是使用高通量的芯片来筛选特异的、本发明人所感兴趣的miRNA,然后使用低通量的方法,比如real-time PCR、Northern blot、标记检测(荧光标记或者纳米粒子标记等)来对特定的miRNA表达进行验证,此外也可以通过原位杂交来检测特定miRNA表达的空间位置和时序性。在功能方面,可以通过knockdown或者过表达的方法来研究miRNA与靶基因的关系,从而阐明miRNA在生物体中的具体功能。

[0005] 肌营养不良肌病是一种致死的X-连锁隐性遗传性神经肌肉疾病。他的主要病理特征是骨骼肌进行性变形坏死,纤维化,脂肪浸润,随后逐步失去行走能力最终呼吸以及心脏衰竭死亡。发病率约为1/3500活产男婴。

[0006] 这种疾病是由于肌营养不良突变导致该蛋白表达缺乏引起。肌营养不良蛋白是一种细胞骨架蛋白,它将肌纤维通过细胞膜连接到周围的细胞外基质。当该蛋白缺乏时,初始损伤的肌纤维衰弱坏死,并伴随着一系列复杂的活动,包括吞噬作用,炎性细胞浸润和随后的纤维化和脂肪替代肌肉进而导致后续肌纤维的萎缩引起呼吸或心脏衰竭从而使患者过早死亡。

[0007] 肌营养不良蛋白基因的突变,如果导致可以表达出功能缺陷或者数量不足的dystrophin蛋白,且患者的临床表现比较温和则称之为贝克型肌营养不良症(BMD);如果基因突变导致dystrophin蛋白缺乏且临床表现严重的则为杜氏肌营养不良症(DMD)。

[0008] 由于目前没有针对DMD患者的有效治疗方法,因此早发现,早接触协助治疗,延长其离床活动的时间对于患者来说有着更加重要的意义。因此,本领域技术人员致力于开发一种能够准确、快速检测DMD并判断其临床发展阶段的技术。

发明内容

[0009] 本发明的目的就是提供一种新的、可用于区分肌营养不良肌病患者样本及正常样本的microRNA标志物及其用途。

[0010] 本发明的另一目的是提供检测所述疾病的芯片和试剂盒。

[0011] 在本发明的第一方面,提供了一种分离的miRNA或miRNA集合,所述的miRNA选自:

[0012] (i) 序列如SEQ ID NO.:1所示的miRNA;

[0013] (ii) 序列如SEQ ID NO.:2所示的miRNA,和/或

[0014] (iii) 与(i)或(ii)中所示miRNA序列互补的miRNA。

[0015] 在另一优选例中,所述的miRNA分离自人。

[0016] 本发明的第二方面,提供了一种分离的或人工构建的前体miRNA,所述的前体miRNA能在人细胞内剪切并表达成如本发明第一方面所述的miRNA或miRNA集合。

[0017] 本发明的第三方面,提供了一种分离的多核苷酸,所述的多核苷酸能被人细胞转录成前体miRNA,所述的前体miRNA能在人细胞内被剪切且表达成如权利要求1所述的miRNA或miRNA集合。

[0018] 在另一优选例中,所述的多核苷酸具有式I所示的结构:

[0019] Seq_{正向}-X-Seq_{反向} 式I

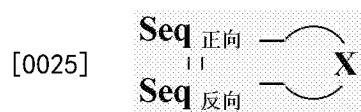
[0020] 式I中,

[0021] Seq_{正向}为能在人细胞中表达成所述的miRNA的核苷酸序列;

[0022] Seq_{反向}为与Seq_{正向}基本上互补或完全互补的核苷酸序列;

[0023] X为位于Seq_{正向}和Seq_{反向}之间的间隔序列,并且所述间隔序列与Seq_{正向}和Seq_{反向}不互补;

[0024] 并且式I所示的结构在转入人细胞后,形成式II所示的二级结构:



[0026] 式II,

[0027] 式II中,Seq_{正向}、Seq_{反向}和X的定义如上述,

[0028] ||表示在Seq_{正向}和Seq_{反向}之间形成的碱基互补配对关系。

[0029] 本发明的第四方面,提供了一种载体,所述载体含有如本发明第一方面所述的miRNA,或如本发明第三方面所述的多核苷酸。

[0030] 本发明的第五方面,提供了本发明第一方面所述的miRNA或miRNA集合的用途,所述的miRNA或miRNA集合用于制备区分DMD样本、BMD样本和正常样本的芯片或试剂盒。

[0031] 本发明的第六方面,提供了一种miRNA芯片,所述的miRNA芯片包括:

[0032] 固相载体;以及

[0033] 有序固定在所述固相载体上的寡核苷酸探针,所述的寡核苷酸探针特异性地对应

于SEQ ID NO.:1和/或SEQ ID NO.:2所示的序列。

[0034] 在另一优选例中,所述的寡核苷酸探针含有:

[0035] 互补结合区;和/或

[0036] 与固相载体相连的连接区。

[0037] 本发明的第七方面,提供了一种本发明第六方面所述的miRNA芯片的用途,所述miRNA芯片用于制备区分DMD样本、BMD样本和正常样本的试剂盒。

[0038] 本发明的第八方面,提供了一种试剂盒,所述的试剂盒中含有本发明第六方面所述的miRNA芯片;或

[0039] 本发明第一方面所述的miRNA或miRNA集合。

[0040] 本发明的第九方面,提供了一种筛选用于治疗肌营养不良肌病的候选药物的方法,包括步骤:

[0041] (a) 提供一测试组和一对照组,其中在所述测试组中将候选物质施用于测试组的细胞或动物,并测定施用后所述测试组中miR-499和/或miR-208b的表达水平,而所述的对照组采用与测试组相同的条件,但不将候选物质施用于对照组的细胞或动物;

[0042] (b) 将测试组的miR-499和/或miR-208b与对照组的miR-499和/或miR-208b的表达水平进行比较;

[0043] 其中,当测试组的miR-499和/或miR-208b的表达水平显著低于对照组的表达水平时,则表明该候选物质是用于治疗DMD的候选药物。

[0044] 本发明的第十方面,提供了一种诊断肌营养不良肌病的方法,包括步骤:

[0045] (a) 检测样本中miR-499和/或miR-208b的表达水平;

[0046] (b) 根据步骤(a)的检测结果,判断检测的样本是否来自肌营养不良肌病患者,判断方法为:

[0047] 如果miR-499表达水平高于正常样本中的表达水平,和/或

[0048] 如果miR-208b的表达水平高于正常样本中的表达水平,

[0049] 则判定该检测样本来自于DMD患者。

[0050] 在另一优选例中,如果所述miR-499表达水平高于正常样本的3倍,较佳地高于正常样本的4倍,更佳地高于正常样本的5倍,最佳地高于正常样本的6.5倍(特异性达到100%,灵敏性达到100%);和/或

[0051] 如果miR-208b的表达水平高于正常样本的2倍(特异性达到90%,灵敏性达到95%),更佳地高于正常样本的3倍,

[0052] 则判定该检测样本来自于肌营养不良肌病患者。

[0053] 本发明中所提及的miR-499和/或miR-208b在正常样本中的表达水平,为正常样本中miR-499和/或miR-208表达水平的平均值。

[0054] 本发明的第十一方面,提供了一种诊断区分DMD和BMD肌营养不良肌病的方法,包括步骤:

[0055] (a) 检测样本中miR-499和/或miR-208b的表达水平;

[0056] (b) 根据步骤(a)的检测结果,判断检测的样本是否来自DMD患者还是BMD患者,判断方法为:

[0057] 如果miR-499表达水平高于BMD样本中的表达水平,和/或

- [0058] 如果miR-208b的表达水平高于BMD样本中的表达水平，
- [0059] 则判定该检测样本来自于DMD患者。
- [0060] 在另一优选例中，所述miR-499表达水平高于正常平均值27倍(特异性达到92%，灵敏性达到43%)；和/或
- [0061] 如果miR-208b的表达水平高于正常平均值4.5倍(特异性达到83%，灵敏性达到62%)，
- [0062] 则判定该检测样本来自于DMD患者而不是BMD患者。
- [0063] 应理解，在本发明范围内中，本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合，从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅，在此不再一一累述。

附图说明

- [0064] 图1显示了miRNA在肌营养不良患者血清中的变化，图A显示了miR-499在肌营养不良患者血清中的变化；图B显示了miR-208b在肌营养不良患者血清中的变化。
- [0065] 图2显示了miRNA(图A:miR-499;图B:miR-208b)对于正常人、BMD和DMD患者的ROC曲线。
- [0066] 图3显示了miRNA与年龄的相关性。
- [0067] 图4显示了肌纤维与年龄的相关性。
- [0068] 图5显示了miRNA在快慢肌中的表达变化。
- [0069] 图6显示了DMD患儿中血清miRNA与IIc型肌纤维型的相关性。
- [0070] 图7显示了DMD患儿中血清miRNA与I型肌纤维型的相关性。

具体实施方式

- [0071] 本发明人经过长期而广泛的研究，通过检测肌营养不良患者样本血清和正常样本血清的microRNA表达谱水平，首次从中筛选出特异性的microRNA:miR-499和miR-208b。经检验证明，miR-499和miR-208b作为microRNA标志物可非常有效地区分肌营养不良患者组织样本和正常样本。而且使用本发明的microRNA可以有效的区分DMD和BMD肌营养不良肌病。在此基础上完成了本发明。
- [0072] 该microRNA可预测样本是来自DMD样本还是正常样本，其预测准确度达到80%以上。基于本发明的microRNA，可以开发成试剂盒，用于区分DMD样本和正常样本。
- [0073] miRNA及其前体
- [0074] 本发明提供了一类新的从人中发现的miRNA(microRNA)。如本文所用，所述的“miRNA”是指一种RNA分子，从可形成miRNA前体的转录物加工而来。成熟的miRNA通常具有18-26个核苷酸(nt)(更特别的约19-22nt)，也不排除具有其它数目核苷酸的miRNA分子。miRNA通常可被Northern印迹检测到。
- [0075] miRNA是一种内源性的小RNA，在转录后水平调控基因表达。越来越多的证据表明miRNAs在肌肉组织中发挥着重要的调控作用，包括肌肉的增殖、分化、发育以及一些相关的肌肉疾病的发生发展等。近年研究发现，除了组织和细胞中的miRNA，外周血miRNA的表达也与许多疾病具有显著的相关性、特异性和稳定性，符合疾病诊断标志物的要求。本发明人通

过比较正常小鼠与Duchenne肌营养不良小鼠模型mdx小鼠血清中miR-208b和miR-499的表达变化,两种肌营养不良肌病Duchenne氏肌营养不良(DMD)和Becker's氏肌营养不良(BMD)患者分别与正常患儿的血清中miRNA的表达变化,同时还分析这两个miRNA血清表达水平与患者不同的肌纤维比例的相关性,进而肯定miR-208b和miR-499可以很好的识别肌营养不良肌病的患者。并且,在一定的年龄阶段这两个miRNA可以反映患者的肌肉病理状况。

[0076] 本发明中提到的两种肌肉中富集的miRNA(miR-208b和miR-499)也可以作为DMD诊断的血清生物标志物。且miR-208b和miR-499在2到6岁的患者血清中的表达与他们的年龄以及肌纤维分型有着密切的相关性。由此提出肌肉中富集的这两个miRNA不仅可以作为DMD疾病的诊断标志物而且还可以用于推测该疾病的病理变化以及进程发展的一项有效的生物指标。

[0077] 在一优选例中,本发明所述的miR-208b核酸序列为:

[0078] UUAAGACUUGCAGUGAUGUUU (SEQ ID NO.:1)

[0079] 在另一优选例中,本发明所述的miR-499核酸序列为:

[0080] AUAAGACGAACAAAAGGUUUGU (SEQ ID NO.:2)

[0081] 人来源的miRNA可被从人细胞中分离。如本文所用,“分离的”是指物质从其原始环境中分离出来(如果是天然物质,原始环境即是天然环境)。如活体细胞内的天然状态下的多聚核苷酸和多肽是没有分离纯化的,但同样的多聚核苷酸或多肽如从天然状态中同存在的其他物质中分开,则为分离纯化的。

[0082] miRNA可从前体miRNA(Precursor miRNA,Pre-miRNA)加工而来,所述的前体miRNA可折叠成一种稳定的茎环(发夹)结构,所述的茎环结构长度一般在50-100bp之间。所述的前体miRNA可折叠成稳定的茎环结构,茎环结构的茎部两侧包含基本上互补的两条序列。所述的前体miRNA可以是天然的或是人工合成的。

[0083] 前体miRNA可被剪切生成miRNA,所述的miRNA可与编码基因的mRNA的至少一部分序列基本上互补。如本文所用,“基本上互补”是指核苷酸的序列是足够互补的,可以以一种可预见的方式发生相互作用,如形成二级结构(如茎环结构)。通常,两条“基本上互补”的核苷酸序列互相之间至少有70%的核苷酸是互补的;优选的,至少有80%的核苷酸是互补的;更优选的,至少有90%的核苷酸是互补的;进一步优选的,至少有95%的核苷酸是互补的;如98%、99%或100%。一般地,两条足够互补的分子之间可以具有最多40个不匹配的核苷酸;优选的,具有最多30个不匹配的核苷酸;更优选的,具有最多20个不匹配的核苷酸;进一步优选的,具有最多10个不匹配的核苷酸,如具有1、2、3、4、5、8、11个不匹配的核苷酸。

[0084] 如本文所用,“茎环”结构也被称作“发夹”结构,是指一种核苷酸分子,其可形成一种包括双链区域(茎部)的二级结构,所述的双链区域由该核苷酸分子的两个区域(位于同一分子上)形成,两个区域分列双链部分的两侧;其还包括至少一个“环”结构,包括非互补的核苷酸分子,即单链区域。即使该核苷酸分子的两个区域不是完全互补的,核苷酸的双链部分也可保持双链状态。例如,插入、缺失、取代等可导致一个小区域的不互补或该小区域自身形成茎环结构或其它形式的二级结构,然而,该两个区域仍可基本上互补,并在可预见的方式中发生相互作用,形成茎环结构的双链区域。茎环结构是本领域技术人员所熟知的,通常在获得了一条具有一级结构的核苷酸序列的核酸后,本领域技术人员能够确定该核酸是否能形成茎环结构。

[0085] 本发明所述的miRNA具有如SEQ ID NO.:1所示的序列。为了提高miRNA的稳定性或其它性质,还可在所述的miRNA的至少一端加上至少一个保护性碱基,如“TT”等。

[0086] 反义寡核苷酸

[0087] 根据本发明所提供的miRNA序列,可以设计出了其反义寡核苷酸,所述的反义寡核苷酸可在体内下调相应的miRNA的表达。如本文所用,“反义寡核苷酸(antisense-oligonucleotides,AS-Ons或ASO)”又称为“反义核苷酸”,是指长度约为18-26nt(更特别的约19-22nt)的DNA分子或RNA分子或其类似物。

[0088] 在本发明中,所述的“反义寡核苷酸”还包括采用如基于核酸锁或核酸链骨架修饰技术等手段获得的经修饰的反义核苷酸,所述的修饰基本不改变反义寡核苷酸的活性,更佳地,所述修饰可提高反义寡核苷酸的稳定性、活性或治疗效果。核酸锁(locked nucleic acid,LNA)通常是指通过一个亚甲基桥将核糖的2'氧原子和4'碳原子连接起来的修饰技术。LNA能延长miRNA的血清半衰期,提高对靶标亲和性,减少脱靶作用的范围和程度。基于核酸链骨架的修饰技术发展出的反义药物在可溶性,抗核酸酶降解等方面大有改善,且易于大量合成。寡核苷酸的骨架修饰方法有多种,包括硫代法,例如将脱氧核苷酸链硫代修饰为硫代脱氧核苷酸链。该方法是将DNA骨架上的磷酸键的氧原子用硫原子替代,可抵抗核酸酶降解。应理解,任何能够保持所述反义寡核苷酸的大部分或全部活性的修饰都包含在本发明中。

[0089] 作为本发明的优选方式,对反义寡核苷酸进行核酸锁修饰;更佳地还进行硫代修饰。

[0090] 将本发明所述的反义寡核苷酸转移到人体内后,它们能够明显下调相关miRNA的表达。

[0091] 多核苷酸构建物

[0092] 根据本发明所提供的miRNA序列,可设计出在被导入后可被加工成可影响相应的mRNA表达的miRNA的多核苷酸构建物,也即所述多核苷酸构建物能够在体内上调相应的miRNA的量。因此,本发明提供了一种分离的多核苷酸(构建物),所述的多核苷酸(构建物)可被人细胞转录成前体miRNA,所述的前体miRNA可被人细胞剪切且表达成所述的miRNA。

[0093] 作为本发明的一种优选方式,所述的多核苷酸构建物含有式I所示的结构:

[0094] Seq_{正向}-X-Seq_{反向}

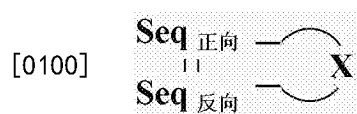
[0095] 式I

[0096] 式I中,

[0097] Seq_{正向}为可在细胞中表达成所述的miRNA的核苷酸序列,Seq_{反向}为与Seq_{正向}基本上互补的核苷酸序列;或者,Seq_{反向}为可在细胞中表达成所述的miRNA的核苷酸序列,Seq_{正向}为与Seq_{反向}基本上互补的核苷酸序列;

[0098] X为位于Seq_{正向}和Seq_{反向}之间的间隔序列,并且所述间隔序列与Seq_{正向}和Seq_{反向}不互补;

[0099] 式I所示的结构在转入细胞后,形成式II所示的二级结构:



[0101] 式II

[0102] 式II中,Seq_{正向}、Seq_{反向}和X的定义如上述;

[0103] ||表示在Seq_{正向}和Seq_{反向}之间形成的碱基互补配对关系。

[0104] 通常,所述的多核苷酸构建物位于表达载体上。因此,本发明还包括一种载体,它含有所述的miRNA,或所述的多核苷酸构建物。所述的表达载体通常还含有启动子、复制起点和/或标记基因等。本领域的技术人员熟知的方法能用于构建本发明所需的表达载体。这些方法包括体外重组DNA技术、DNA合成技术、体内重组技术等。所述的表达载体优选地包含一个或多个选择性标记基因,以提供用于选择转化的宿主细胞的表型性状,如卡拉霉素、庆大霉素、潮霉素、氨苄青霉素抗性。

[0105] 芯片

[0106] microRNA表达谱芯片通常含有多达几百个探针,涵盖多种microRNA,利用DNA双链同源互补的原理在全基因组水平上检测样本中所含各种microRNA的含量。因此,可在同一时间对待测样本中全基因组范围内的microRNA的转录水平进行检测。

[0107] 利用本发明所述的miRNA序列,还可以制备相应的miRNA芯片,进而研究其表达谱以及miRNAs的调节方式。

[0108] 在另一方面,本发明还提供一种用于分析miRNA表达谱的芯片,所述的芯片可用于区分DMD样本和正常样本。

[0109] 本发明的所述的miRNA芯片包括固相载体以及有序固定在所述固相载体上的寡核苷酸探针,所述的寡核苷酸探针包括SEQ ID NO.:1所示的序列。

[0110] 具体地,可根据本发明所述的miRNA,设计出适合的探针,固定在固相载体上,形成“寡核苷酸阵列”。所述的“寡核苷酸阵列”是指具有可寻址位置(即以区别性的,可访问的地址为特征的位置)的阵列,每个可寻址位置均含有一个与其相连的特征性寡核苷酸。根据需要,可将寡核苷酸阵列分成多个亚阵。

[0111] 所述固相载体可采用基因芯片领域的各种常用材料,例如但不限于尼龙膜,经活性基团(如醛基、氨基等)修饰的玻璃或硅片、未修饰的玻璃片、塑料片等。

[0112] 所述的miRNA芯片的制备可采用本领域已知的生物芯片的常规制造方法。例如,如果固相载体采用的是修饰玻璃片或硅片,探针的5'端含有氨基修饰的聚dT串,可将寡核苷酸探针配制成溶液,然后采用点样仪将其点在修饰玻璃片或硅片上,排列成预定的序列或阵列,然后通过放置过夜来固定,就可得到本发明的miRNA芯片。如果核酸不含氨基修饰,则其制备方法也可参照:王申五主编的《基因诊断技术-非放射性操作手册》;J.L.erisi, V.R.Iyer,P.O.BROWN.Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale.Science,1997;278:680和马立人,蒋中华主编.生物芯片.北京:化学工业出版社,2000,1-130。

[0113] 另一方面,本发明还提供了一种通过miRNA芯片检测人组织中miRNA表达谱的方法,包括步骤:

[0114] (1) 提供分离自人组织的RNA样品,在所述的RNA上设置标记物;

[0115] (2) 将(1)的RNA与所述的芯片接触,使所述的RNA与固相载体上的寡核苷酸探针发生杂交反应,从而在固相载体上形成“寡核苷酸探针-RNA”二元复合物;

[0116] (3) 检测(2)形成的二元复合物的标记物,从而确定人组织中相应的miRNA的表达

谱。

[0117] 从人组织中提取RNA的方法是本领域技术人员熟知的方法,包括Trizol法。

[0118] 更优选的,在步骤(1)中,在从人组织组织中分离出RNA样品后,对RNA样品进行适当处理,以富集具有一定长度的RNA,所述长度一般在10-100之间(小片段RNA)。在经过上述处理后,利用这些小片段RNA进行后续的杂交,这样可提高芯片捕获miRNA的准确性。本领域人员可方便地分离出具有一定片段长度的RNA,比如可采用凝胶电泳法来分离。

[0119] 对RNA进行标记也是本领域技术人员熟知的方法,其可通过在杂交时加入与RNA特异性结合的标记物的方法实现,所述标记物比如是标记基团。所述的标记基团包括但不限于:地高辛分子(DIG)、生物素分子(Bio)、荧光素及其衍生生物分子(FITC等)、其它荧光分子(如Cy3、Cy5等)、碱性磷酸酶(AP)、辣根过氧化物酶(HRP)等。这些标记及其标记方法都已本领域众所周知的常规技术。

[0120] 将上述的RNA与miRNA芯片进行杂交时,可以先将miRNA芯片与预杂交缓冲液进行预杂交。

[0121] 本发明所述的RNA与miRNA芯片之间的固相杂交按照本领域的经典方法进行,本领域一般人员依据经验容易确定有关缓冲液、探针和样本浓度、预杂交温度、杂交温度以及时间等的最适条件。或者也可以参照《分子克隆实验指南》中所述的。

[0122] 然后根据标记信号在miRNA芯片上的位置、强度等信息获取待测信息。若扩增产物用荧光基团标记,也可直接用荧光检测设备(如激光共聚焦扫描仪Scanarray3000等)获取待测信息。

[0123] 检测试剂盒

[0124] 本发明还提供了一种试剂盒,所述的试剂盒中含有本发明的芯片。所述的试剂盒可用于检测miRNA的表达谱;或用于区分DMD样本及正常样本,优选的,所述的试剂盒中还含有用于标记RNA样品的标记物,以及与所述标记物相对应的底物。

[0125] 此外,所述的试剂盒中还可包括用于提取RNA、PCR、杂交、显色等所需的各种试剂,包括但不限于:抽提液、扩增液、杂交液、酶、对照液、显色液、洗液、抗体等。

[0126] 此外,所述的试剂盒中还可包括使用说明书和/或芯片图像分析软件。

[0127] 诊断方法

[0128] 一方面,本发明提供的诊断肌营养不良肌病的方法,包括步骤:

[0129] (a) 检测样本中miR-499和/或miR-208b的表达水平;

[0130] (b) 根据步骤(a)的检测结果,判断检测的样本是否来自肌营养不良肌病患者,判断方法为:

[0131] 如果miR-499表达水平高于正常样本中的表达水平,和/或

[0132] 如果miR-208b的表达水平高于正常样本中的表达水平,

[0133] 则判定该检测样本来自于肌营养不良肌病患者。

[0134] 在另一优选例中,如果所述miR-499表达水平高于正常样本的3倍,较佳地高于正常样本的4倍,更佳地高于正常样本的5倍,最佳地高于正常样本的6.5倍(特异性达到100%,灵敏性达到100%);和/或

[0135] 如果miR-208b的表达水平高于正常样本的2倍(特异性达到90%,灵敏性达到95%),更佳地高于正常样本的3倍,

- [0136] 则判定该检测样本来自于肌营养不良肌病患者。
- [0137] 本发明中所提及的miR-499和/或miR-208b在正常样本中的表达水平,为正常样本中miR-499和/或miR-208表达水平的平均值。
- [0138] 另一方面,本发明提供了一种诊断区分DMD和BMD肌营养不良肌病的方法,包括步骤:
- [0139] (a) 检测样本中miR-499和/或miR-208b的表达水平;
- [0140] (b) 根据步骤(a)的检测结果,判断检测的样本是否来自DMD患者还是BMD患者,判断方法为:
- [0141] 如果miR-499表达水平高于BMD样本中的表达水平,和/或
- [0142] 如果miR-208b的表达水平高于BMD样本中的表达水平,
- [0143] 则判定该检测样本来自于DMD患者。
- [0144] 在另一优选例中,所述miR-499表达水平高于正常平均值27倍(特异性达到92%,灵敏性达到43%);和/或
- [0145] 如果miR-208b的表达水平高于正常平均值4.5倍(特异性达到83%,灵敏性达到62%),
- [0146] 则判定该检测样本来自于DMD患者而不是BMD患者。
- [0147] 本发明的主要优点
- [0148] (a) 本发明提供了一种可用于区分肌营养不良肌病样本和正常样本的microRNA标志物。
- [0149] (b) 由本发明microRNA标志物可非常有效地区分肌营养不良肌病样本及正常样本。
- [0150] (c) 本发明microRNA标志物还可以判定待检测样本来自于DMD患者还是BMD患者。
- [0151] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件如Sambrook等人,分子克隆:实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明,否则百分比和份数按重量计算。
- [0152] 实施例1实验材料与方法
- [0153] (1) 人血清样品收集与临床指标的检测
- [0154] 实验中所用的15例BMD和52例DMD病人以及对照组23例血清样本均采集自复旦大学附属儿科医院,此研究经过复旦大学儿科学临床药理学伦理委员会认可,并保有病人的知情同意书。血清保存于-80℃冰箱。同时ATP酶染色统计了患者不同类型的肌纤维比例,临床生化系统检测了患儿血清中肌酸激酶CK的水平。
- [0155] (2) RNA的抽提与实时定量PCR检测
- [0156] 血清miRNA通过天根公司的血清miRNA抽提试剂盒抽提。RNA反转录通过颈环结构的反转方法转录,最后通过实时定量PCR检测血清中miRNA的表达变化。
- [0157] (3) 统计方法
- [0158] 比较两组实验组的差异分析通过t-test分析,p值小于0.05的被认为具有显著变化。ROC曲线的作为诊断效果的评估。ROC曲线下方的区域面积被用来作为诊断标志物辨别

基本的准确性,相关性通过perarson检验分析。

[0159] 实施例2血清标志物筛选

[0160] (1) miRNA的选择

[0161] 从组织miRNA表达谱芯片筛选肌肉组织高表达的miRNA,分析已报道的文献,确定研究的miRNA为miR-208b和miR-499。

[0162] (2) 血清miRNA的抽提

[0163] 将收集的血浆4℃静置15分钟,然后4℃,3000×rpm离心30min取血清保留备用。

[0164] a. 样品处理:每管血清中加入等体积的裂解液MZ,振荡器震荡混匀30s。

[0165] b. 室温放置5min,使得核酸蛋白复合物完全分离。

[0166] c. 室温12,000rpm (~13,400×g) 离心10min,取上清,转入一个新的无RNase的EP管中。

[0167] d. 加入与血清等体积的氯仿,盖好管盖,剧烈振荡15s,室温放置5min。

[0168] e. 室温12,000rpm (~13,400×g) 离心15min,样品分三层,将上层的水相转移到新管中。

[0169] f. 量取转移液的体积,缓慢加入转移液体积1/3体积的无水乙醇,混匀(此时可能出现沉淀)。将得到的溶液和沉淀一起转入吸附柱miRspin,室温放置2min,室温12,000rpm (~13,400×g) 离心30s,离心后保留流出液以及吸附柱miRspin(吸附柱到最后所有的转移液离心完成之后弃掉)。

[0170] g. 量取流出液体积,缓慢加入流出液体积2/3体积的无水乙醇,混匀(此时可能出现沉淀)。将得到的溶液和沉淀一起转入吸附柱miRelute,室温放置2min,室温12,000rpm (~13,400×g) 离心30s,离心后弃掉流出液,保留吸附柱miRelute。

[0171] h. 向吸附柱miRelute中加入500μl的去蛋白液MRD(检查是否加入乙醇),室温静置2min,室温12,000rpm (~13,400×g) 离心30s,弃废液。

[0172] i. 向吸附柱miRelute中加入600μl的漂洗液RW(检查是否加入乙醇),室温静置2min,室温12,000rpm (~13,400×g) 离心30s,弃废液。

[0173] j. 重复步骤(9)。

[0174] k. 将吸附柱miRelute放入收集管中,室温12,000rpm (~13,400g) 离心1min,去除残余液体。(注:此步的目的是将吸附柱中残余漂洗液去除,如有漂洗液残留,可能会影响后续的RT等实验操作)同时将RNase-free的ddH₂O预热到50~60℃。

[0175] l. 将吸附柱miRelute转入一个新的1.5ml的EP管中,加入20μl的RNase-free的ddH₂O,室温放置两分钟,室温12,000rpm (~13,400g) 离心2min。

[0176] m. 重复步骤l),提高RNA的得率。-80℃保存备用。

[0177] (3) qRT-PCR检测

[0178] a. 反转

[0179] 本实验中micrRNA反转使用的是stem-loop反转体系

[0180] 从miRNA Database:<http://microrna.sanger.ac.uk/>中查找出序列如下:

[0181] miR-208b:AUAAGACGAACAAAAGGUUUGU

[0182] miR-499:UUAAGACUUGCAGUGAUGUUU

[0183] 然后设计这两个miRNA的正向引物和通用引物

- [0184] 逆转录引物(RT-Primer):
- [0185] miR-208b RT-primer:
- [0186] CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGACAAACCT
- [0187] miR-499RT-primer:
- [0188] CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGAAACATCA
- [0189] Real-time PCR引物:
- [0190] miR-208b primer:ACACTCCAGCTGGGATAAGACGAACAAAAG
- [0191] miR-499primer:ACACTCCAGCTGGGTAAAGACTTGCAGTGA
- [0192] 通用引物Universal primer:CTCAAGTGTCGTGGAGTCGGCAA
- [0193] 配制PCR反应体系

	试剂	每个反应试剂量
	Takara 5× PrimeScript buffer(含 dNTP)	2ul
[0194]	Takara PrimeScript RT enzyme Mix I	0.5ul
	RRI	0.5ul
	RT-Primer	0.25ul/each gene
	RNA	100ng
	DEPC水	Up to 10ul

- [0195] (2) RT-PCR反应程序

[0196]

1	42℃	15min
2	95℃	2min
3	16℃	0min

- [0197] 反转完成后,将cDNA稀释,混匀,保存在-20℃备用。

- [0198] b.Real-time PCR

- [0199] 相对定量中血清miRNA所使用的内参为miR-223。

- [0200] 反应体系及程序

Takara SYBR Green 使用体系		Fast 格式程序	
试剂	用量(ul)	95℃	5min
2×SYBR Green	5	95℃	30s
Primer1	0.2	60℃	30s
Primer2	0.2	72℃	30s
50×ROX	0.2	} 45 cycles	
cDNA	4.4		
Total	10		

- [0202] (4) 肌纤维分型ATP酶染色

- [0203] a. 将盛有异戊烷的烧杯放入液氮中,不要浸没,当异戊烷下面冻成固体上面呈液态时即可开始冷冻黄耆树胶固定好的肌肉组织。

- [0204] b. 小心将冷冻的组织包埋块拿出来,迅速放入预冷的容器中密封贮存或及时做冰

冻切片。或在-80℃以下长期保存。

[0205] c.冰冻切片8-10um,分别放入三种不同PH值的预孵育液内,室温下15分钟、5分钟、5分钟。PH值分别为10.5、4.6和4.2。

[0206] d.加入巴比妥钠液(PH9.4-9.7)30秒到1分钟轻轻清洗。

[0207] e.加入孵育液45分钟,37℃。

[0208] f.1%氯化钙洗3次每次3分钟。

[0209] g.2%氯化钴反应3分钟。

[0210] h.蒸馏水洗3次3分钟/次。

[0211] i.1%硫化胺(用时配制)1分钟。

[0212] j.流水冲洗。

[0213] k.各级酒精脱水、透明、封片。

[0214] l.显微镜下观察PH为10.5染成黑色的为II型肌纤维,白色的为I型肌纤维;PH为4.6染成黑色的为I型肌纤维,白色为IIa型肌纤维,鉴于二者之间的为IIb和IIc肌纤维;PH为4.2染成白色的为IIa或IIb肌纤维,鉴于二者之间的为IIc肌纤维。

[0215] m.预孵育液:

[0216] 巴比妥钠PH为10.5:20mM巴比妥钠,18mM的氯化钙;

[0217] 醋酸缓冲液PH为4.6:50mM醋酸钠,30mM的巴比妥钠,用盐酸调至pH值调为4.6。

[0218] 醋酸缓冲液PH为4.2:同上不过pH值调为4.2。

[0219] 实验结果

[0220] 1 miRNA在肌营养不良患者血清中的变化

[0221] 本发明人收集了年龄从1到14岁之间的23例健康儿童以及肌营养不良症的两类患儿即15例BMD和52例DMD患者的血清样本,有关患儿基因诊断等信息汇总在表1。图1显示了miRNA在肌营养不良患者血清中的变化。从图中可以看出,miR-208b和miR-499在BMD和DMD患者血清中表达均显著升高。进一步提示本发明人这些血清miRNA可以做为该种疾病的潜在的新的血清生物标志的可能性。

[0222] 表1 患者信息

[0223]

患者编号	疾病类型	年龄(月)	是否可以走动	激素治疗	肌肉活检	注释
BMD-01	BMD	11	是	否	是	MFT:N/A
BMD-02	BMD	24	是	否	是	MFT:N/A
BMD-03	BMD	36	是	否	是	MFT:N/A
BMD-04	BMD	36	是	否	是	
BMD-05	BMD	36	是	否	是	
BMD-06	BMD	40	是	否	是	MFT:N/A
BMD-07	BMD	48	是	否	是	
BMD-08	BMD	55	是	否	是	MFT:N/A
BMD-09	BMD	56	是	否	是	MFT:N/A
BMD-10	BMD	75	是	否	是	MFT:N/A
BMD-11	BMD	98	是	否	是	MFT:N/A

BMD-12	BMD	101	是	否	是	
BMD-13	BMD	110	是	否	是	
BMD-14	BMD	120	是	否	是	
BMD-15	BMD	165	是	否	是	MFT:N/A
DMD-01	DMD	7	是	否	是	

[0224]

DMD-02	DMD	8	是	否	是	
DMD-03	DMD	15	是	否	是	
DMD-04	DMD	17	是	否	是	
DMD-05	DMD	18	是	否	是	MFT:N/A
DMD-06	DMD	22	是	否	是	
DMD-07	DMD	24	是	否	是	
DMD-08	DMD	24	是	否	是	MFT:N/A
DMD-09	DMD	31	是	否	是	MFT:N/A
DMD-10	DMD	36	是	否	是	
DMD-11	DMD	36	是	否	是	
DMD-12	DMD	36	是	否	是	
DMD-13	DMD	40	是	否	是	MFT:N/A
DMD-14	DMD	43	是	否	是	
DMD-15	DMD	43	是	否	是	
DMD-16	DMD	46	是	否	是	
DMD-17	DMD	46	是	否	是	
DMD-18	DMD	48	是	否	是	
DMD-19	DMD	51	是	否	是	
DMD-20	DMD	52	是	否	是	MFT:N/A
DMD-21	DMD	55	是	否	是	
DMD-22	DMD	55	是	否	是	MFT:N/A
DMD-23	DMD	59	是	否	是	
DMD-24	DMD	62	是	否	是	MFT:N/A
DMD-25	DMD	65	是	否	是	
DMD-26	DMD	66	是	否	是	
DMD-27	DMD	67	是	否	是	MFT:N/A
DMD-28	DMD	68	是	否	是	
DMD-29	DMD	73	是	否	是	
DMD-30	DMD	77	是	否	是	
DMD-31	DMD	77	是	否	是	
DMD-32	DMD	79	是	否	是	
DMD-33	DMD	82	是	否	是	MFT:N/A
DMD-34	DMD	83	是	否	是	MFT:N/A
DMD-35	DMD	84	是	否	是	

DMD-36	DMD	90	是	否	是	
DMD-37	DMD	90	是	否	是	
DMD-38	DMD	90	是	否	是	MFT:N/A
DMD-39	DMD	92	是	否	是	MFT:N/A

[0225]

DMD-40	DMD	92	是	否	是	MFT:N/A
DMD-41	DMD	93	是	否	是	MFT:N/A
DMD-42	DMD	94	是	否	是	MFT:N/A
DMD-43	DMD	96	是	否	是	MFT:N/A
DMD-44	DMD	96	是	否	是	MFT:N/A
DMD-45	DMD	96	是	否	是	MFT:N/A
DMD-46	DMD	98	是	否	是	MFT:N/A
DMD-47	DMD	104	是	否	是	
DMD-48	DMD	104	是	否	是	MFT:N/A
DMD-49	DMD	125	是	否	是	
DMD-50	DMD	128	是	否	是	
DMD-51	DMD	138	否	否	是	MFT:N/A
DMD-52	DMD	144	是	否	是	
DMD-53	DMD	41	是	否	是	miRNAs:N/A
DMD-54	DMD	56	是	否	是	miRNAs:N/A
DMD-55	DMD	60	是	否	是	miRNAs:N/A
DMD-56	DMD	92	是	否	是	miRNAs:N/A
DMD-57	DMD	151	是	否	是	miRNAs:N/A

[0226] 注:N/A:无效;MFT:肌纤维型

[0227] 2 血清miRNA作为肌营养不良症的诊断标记物的评估

[0228] 通过受试者工作特征 (ROC) 曲线 (图2) 分析,miR-499和miR-208b能够很好的区分正常儿童与肌营养不良患者,尤其是DMD患儿 (AUC:0.9913和0.9130,P均<0.0001),同时他们也可以很好的区分BMD与DMD患者 (AUC:0.6987和0.7115,P=0.0198和P=0.0131)。

[0229] 图2显示了miRNA对于正常人、BMD和DMD患者的ROC曲线,如图所示,52例DMD患者15例BMD患者和23例正常儿童的ROC曲线,图中的数值表示的是曲线下的面积AUC。其中蓝色,红色和绿色曲线分别表示DMD与正常儿童,BMD与正常儿童以及BMD和DMD的ROC曲线。从图2A中可以看出血清miR-499水平高低可以很好的区分DMD与正常儿童 (AUC=0.99,p<0.0001),也可以很好的区分BMD与正常儿童 (AUC=0.9913,p<0.001),对于区分BMD和DMD也有一定的价值 (AUC=0.6987,p=0.0198);从图2B中可以看出血清miR-208b水平高低可以很好的区分DMD与正常儿童 (AUC=0.9323,p<0.001),也可以很好的区分BMD与正常儿童 (AUC=0.913,p<0.001),对于区分BMD和DMD相对于miR-499来讲价值稍高 (AUC=0.7115,p=0.0131)。这些结果表明,血清miR-499和miR-208b的水平不但可以区分正常儿童和DMD/BMD,而且对于区分DMD和BMD也有临床参考价值。

[0230] 3血清miRNA、肌纤维与年龄的相关性

[0231] DMD患者主要症状是渐进性的骨骼肌变性坏死,心肌逐渐被纤维组织替代,脂肪浸

润,最终通过呼吸或心脏衰竭死亡。为了进一步确认血清中miRNA的水平能与疾病的进程相关联,首先本发明人分析了年龄与血清miRNA之间的相关性。正如图3显示的血清中miR-499和miR-208b的表达水平在患儿早期诊断的时期(2-6岁)时正好与年龄呈正相关,而这段时间内患者的快肌纤维百分比(IIa型和IIb型)减少,这与临床上观测到在患者早期快肌纤维首先发生坏死相一致。同时本发明人发现具有再生纤维特性的IIc型肌纤维比例在此年龄段内逐渐增加(图4),由此说明血清中的这两个miRNA水平可能与肌肉损伤严重程度和肌肉再生的情况相关。

[0232] 图3显示了miRNA与年龄的相关性,从图中可以看出随着年龄的增加miR-499和miR-208b表达水平升高。

[0233] 图4显示了肌纤维与年龄的相关性,从图中可以看出随着年龄的增加快肌纤维百分比(IIa型和IIb型)减少而具有再生纤维特性的IIc型肌纤维比例增加。

[0234] 表2和表3分别显示了这两个血清miRNA的水平以及肌纤维类型与不同年龄段之间的相关性总结。从表中可以看出,CK在不同的年龄段内与年龄均不具有相关性,miR-499和miR-208b在DMD患者2-6岁期间与年龄有着正相关性,并且在此期间IIa+IIb型肌纤维比例与年龄呈负相关,而IIc型肌纤维与年龄呈正相关。

[0235] 表2 miRNA与年龄的相关性

[0236]

年龄	患者		miR-499	miR-208b	CK
≤2 岁	DMD (n=8)	r	0.0727	-0.4307	-0.3591
		P值	0.8642	0.2867	0.3824
	BMD(n=2)	r	/	/	/
		P值	/	/	/
2~6 岁	DMD (n=20)	r	0.5219	0.4664	-0.1446
		P值	0.0183	0.0382	0.543
	BMD (n=7)	r	-0.3289	0.1744	-0.1888
		P值	0.4713	0.7084	0.6852
>6 岁	DMD (n=24)	r	-0.1715	0.1560	-0.01889
		P值	0.4229	0.4668	0.9318
	BMD (n=6)	r	-0.5043	-0.6634	-0.6305
		P值	0.3076	0.1509	0.1795
0~14 岁	DMD (n=52)	r	-0.0558	-0.1162	-0.1050
		P值	0.6944	0.4121	0.4635
	BMD (n=15)	r	0.1383	0.0203	-0.0623
		P值	0.6231	0.9427	0.8254

[0237] 表3 肌纤维型与年龄的相关性

[0238]

年龄	患者		(IIa+IIb型)%	I型%	IIc型%
≤2 岁	DMD (n=6)	r	-0.3904	0.2411	0.2021
		P值	0.4442	0.6454	0.7010
	BMD (n=0)	r	/	/	/
		P值	/	/	/
2~6 岁	DMD (n=15)	r	-0.6598	0.0444	0.5928
		P值	0.0074	0.8752	0.0199
	BMD (n=3)	r	0.9496	-0.9997	-0.3646
		P值	0.2030	0.0164	0.7624
>6 岁	DMD (n=13)	r	-0.0451	0.2755	-0.5996
		P值	0.8838	0.3622	0.0303
	BMD (n=3)	r	0.8909	-0.8080	-0.9552
		P值	0.3001	0.4011	0.1912
0~14 岁	DMD (n=34)	r	-0.1342	0.2206	-0.1220
		P值	0.4492	0.2099	0.4918
	BMD (n=6)	r	-0.0777	0.1356	-0.0286
		P值	0.8838	0.7978	0.9572

[0239] 4 血清miRNA与肌纤维的相关性

[0240] 根据DMD的病理变化,患者初期肌肉坏死主要发生在快肌纤维中,进而本发明人推测这些miRNA是否与肌纤维类型相关。如图5所示,图5显示了miRNA在快慢肌中的表达变化,从图中可以看出miR-1和miR-133在以快肌纤维为主的胫骨前肌(TA)中表达较高,而miR-499、miR-208b和miR-206则在以慢肌纤维为主的比目鱼肌(SOL)中表达很高。心肌特异的miR-208a以及不是肌肉中特异表达的miR-21在两种肌纤维中表达无明显差异。这些数据表明血清中检测的miR-499和miR-208b的表达主要就是来自于慢肌。接下来本发明人分析了在DMD患者的不同年龄段内miR-499和miR-208b与不同的肌纤维型的相关性,结果发现在DMD早期(2至6岁)的患儿中,血清miR-499和miR-208b的水平与IIc型肌纤维正相关(图6)。而在年龄较大的患儿(大于6岁)血清中miR-499和miR-208b又与慢肌的肌纤维(I型)呈正相关(图7)。

[0241] 图6显示了DMD患儿中血清miRNA与IIc型肌纤维型的相关性,从图中可以看出随着IIc肌纤维比例的增加miR-499和miR-208b的表达量升高。

[0242] 图7显示了DMD患儿中血清miRNA与I型肌纤维型的相关性。从图中可以看出随着I型肌纤维比例的增加miR-499和miR-208b的表达量也明显升高。由此说明具有高比例的慢肌才能分泌出更多的慢肌中特异性表达的miRNAs。

[0243] DMD患者在不同年龄段内血清miRNA与肌纤维型的相关性总结在表4中。综合这些信息本发明人发现血清miRNA表达水平在不同的年龄段变化并不完全一致。从表格可以看出,慢肌中高表达的这两个miRNA(miR-499和miR-208b)在血清中的表达水平与患者的病理状况更加相关。在患者早期阶段(2至6岁)这两个miRNA与具有再生肌纤维特性的IIc型肌纤

维比例呈正相关,可以说明血清中这两个miRNA的表达水平越高,患者的肌肉再生能力越强,而在年龄较大的患者中(大于6岁)这两个miRNA的表达水平与IIa,IIb型肌纤维比例呈负相关,而与I型肌纤维呈正相关,说明在这个年龄段内血清中这两个miRNA的表达水平越高则代表患者肌肉主要以I型肌纤维为主。

[0244] 表4 DMD患儿中血清miRNA以及CK与肌纤维的相关性

[0245]

muscle type	≤2 岁 (n=6)		2~6 岁 (n=12)		>6 岁 (n=11)		0~14 岁 (n=29)	
	r	P值	r	P值	r	P值	r	P值
(IIa+IIb型)%								
miR-499	-0.0974	0.8544	-0.5610	0.0578	-0.6931	0.0180	-0.3771	0.0437 ¹⁰
miR-208b	0.7433	0.0904	-0.1409	0.6624	-0.6153	0.0439	0.3609	0.0544
CK	0.0805	0.8795	-0.3846	0.2170	-0.0801	0.8149	-0.1991	0.3006
I型%								
miR-499	0.0865	0.8706	0.0126	0.9690	0.7047	0.0155	0.1666	0.3877
miR-208b	-0.5348	0.2742	-0.3460	0.2706	0.6856	0.0199	-0.3480	0.0643 ¹⁵
CK	-0.1725	0.7438	0.2768	0.3837	0.1745	0.6078	0.2155	0.2614
IIc型%								
miR-499	-0.1305	0.8054	0.6122	0.0344	0.0874	0.7984	0.2639	0.1666
miR-208b	-0.5803	0.2273	0.6088	0.0356	-0.0518	0.8797	-0.0954	0.6224
CK	-0.0195	0.9707	0.0701	0.8286	-0.1916	0.5726	-0.0155	0.9366 ²⁰

[0246] 讨论

[0247] 本专利介绍了两个miRNA在血清中的表达水平可以作为肌营养不良症的生物标志物。在这项研究中本发明人发现在肌营养不良症的老鼠模型以及肌营养不良患者血清中这两个miRNA均显著升高。

[0248] 虽然血清中肌酸激酶CK的水平被常用做肌肉疾病的主要生物标志物,从而评价肌肉的损伤和坏死程度,但它并不总是可靠的,因为它经常受到外界因素的影响比如运动,而这时候它的变化就不一定是与疾病有关的。而血清miRNA的水平与CK水平相比是不太受外界因素对身体的压力的影响。

[0249] 本发明人进一步研究发现在从2至6岁的DMD患者中快肌纤维的百分比降低的同时,在慢肌纤维中富集的miRNA(miR-208b和miR-499)的血清表达水平与年龄和以及再生的IIc型肌纤维呈正相关。此外,以往的研究报告显示,TNF- α ,IL-6和GPX在DMD患者肌肉中的表达上调。综上所述,本发明人推测在DMD早期患儿血清中这些在慢肌纤维中富集的miRNA之所以升高,可能是来自于炎性细胞因子刺激的损伤程度较轻的慢肌纤维以及被激活的增殖的肌卫星细胞的分泌。因此,在患者早期慢肌纤维中富集的miRNA在血清中的表达可以反应出肌肉相应的炎症反应水平和肌肉再生水平。此外,本发明人还证明了在超过6岁的患儿血清中miR-499和miR-208b的表达水平与慢肌纤维比例呈正相关。由此推测此时血清中的这些miRNA表达水平则是表示剩余的肌肉质量的指标。

[0250] 这些结果使本发明人得出血清中的一些miRNA可以作为有价值的预后标志物从而监测DMD疾病进展。在分析数据的过程中本发明人已经发现一名早期患者(年龄在4岁左右)

的血清miRNA表达水平较同年龄段其他人以及年龄更小的患者的表达异常低下,推测其病情变化已经达到更晚期的阶段(大于6岁)通过随访调查发现该名患者目前(8岁左右)病情变化较其他同年龄段的患者更加严重。这一病例更加有力的说明血清miRNA可以用于监测DMD患者的病理变化。由于目前没有针对DMD患者的有效治疗方法,因此早发现,早接触协助治疗,延长其离床活动的时间对于患者来说有着更加重要的意义。

[0251] miR-499和miR-208b是骨骼肌慢肌特异的miRNA。血清miR-499和miR-208b的水平代表了骨骼肌慢肌的总量。在发病早期骨骼肌快肌先受损,导致快肌特异miRNA在血清中的含量迅速升高,在很快达到峰值后将维持不变,甚至会因快肌总量减少导致其血清水平下降,所以快肌特异miRNA不适用于判断病程发展。相反,骨骼肌慢肌受损慢,能较好的反应病程发展,血清miR-499和miR-208b水平越高,说明病情严重或发展快。在发病后期,骨骼肌总量减少,所有骨骼肌特异miRNA在血清中的含量下降,此时保留下来的骨骼肌多为慢肌,因此慢肌多意味着病程发展慢。血清miR-499和miR-208b水平如果相对高,说明病情发展慢。在临床上,可以根据特定时期不同患儿血清miR-499和miR-208b水平来判断其病程发展相对所有患儿来讲是快还是慢,也可以根据同一患儿在特定时期血清miR-499和miR-208b的水平来判断其病程是稳定了还是恶化了,以及药物治疗是否有效果。

[0252] 因此,本发明人提出的血清miRNA的生物标记物为肌营养不良症患者早期诊断不仅可以提出临床诊断意见,而且对于他们的治疗处理,也可以提出相应的建议或评估。

[0253] 实施例3制备miRNA芯片

[0254] 将本发明提供的miRNA序列(SEQ ID NO.:1)转换成互补序列,根据产生序列的GC比等特征在序列两端加上10-20nt的连接序列;核心序列不同,连接序列也不同。连接序列可以由程序随机产生,连接序列和核心序列形成的探针满足以下条件:

[0255] 1) 探针序列中,同一种核苷酸(A、C、G、T)的数量不能超过序列总数的50%;

[0256] 2) 任何连续的A、T或C、G的数量不能超过序列总数的25%;

[0257] 3) G、C含量占序列总数的40%-60%;

[0258] 4) 探针序列不能自杂交,即探针序列中互补片段的长度不能超过探针长度的30%。

[0259] 为使合成的探针稳定的结合在玻片上,采用常规的方法在合成后探针的5'端进行糖基修饰。

[0260] 芯片的点制:先将玻片的表面进行烷基化修饰,以提高结合能力。采用常规的芯片点样方法进行点样,为了检测杂交试验的可重复性,每个探针在玻片上点3-6个杂交点。

[0261] 实施例4

[0262] 试剂盒制备

[0263] 将实施例3中制备的芯片封装好,与使用说明书一起置于一盒中,构成试剂盒。

[0264] 实施例5

[0265] 芯片的检测验证

[0266] 对从医院获得的多个样本(包括30例肌营养不良肌病样本和30例正常样本,其中30例肌营养不良肌病样本中,15例为DMD样本,15例为BMD样本),按实施例1-2的方法制备和标记microRNA,按实施例3的方法制备的芯片,用双盲法进行检测。根据本发明所示的microRNA标志物的存在与否以及上调和下调情况来判断样本。其中,阳性对照和阴性对照

分别为已知的DMD样本和正常样本。

[0267] 结果表明,包括本发明的种特异性microRNA的芯片,其正确性为90%,可以有效区分DMD样本和正常样本。

[0268] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

序列表

<110>	中国科学院上海生命科学研究院	
<120>	新的肌营养不良肌病的血清miRNA标志物	
<130>	P2014-0669	
<160>	7	
<170>	PatentIn version 3.5	
<210>	1	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人	
<400>	1	
	uuaagacuug cagugauguu u	21
<210>	2	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	人	
<400>	2	
[0001]	auaagacgaa caaaagguuu gu	22
<210>	3	
<211>	44	
<212>	DNA	
<213>	引物	
<400>	3	
	ctcaactggg gtcgtggagt cggcaattca gttgagacaa acct	44
<210>	4	
<211>	44	
<212>	DNA	
<213>	引物	
<400>	4	
	ctcaactggg gtcgtggagt cggcaattca gttgagaaac atca	44
<210>	5	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	引物	

	<400> 5	
	acactccagc tgggataaga cgaacaaaag	30
	<210> 6	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> 引物	
[0002]	<400> 6	
	acactccagc tgggttaaga cttgcagtga	30
	<210> 7	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 引物	
	<400> 7	
	ctcaagtgtc gtggagtcgg eaa	23

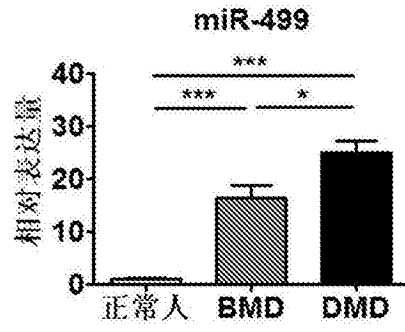


图1A

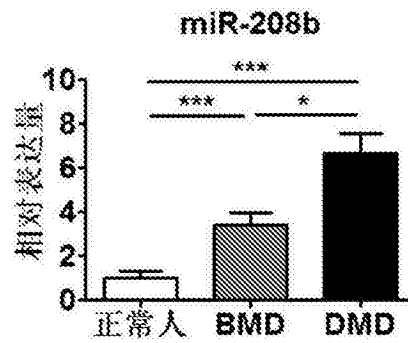


图1B

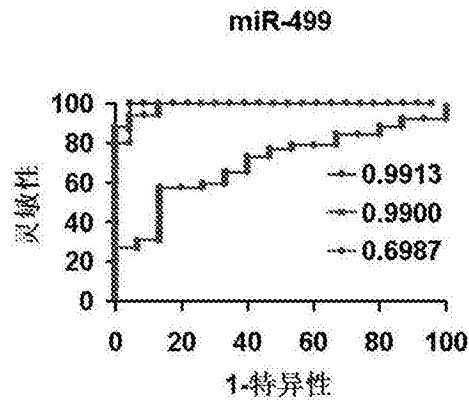


图2A

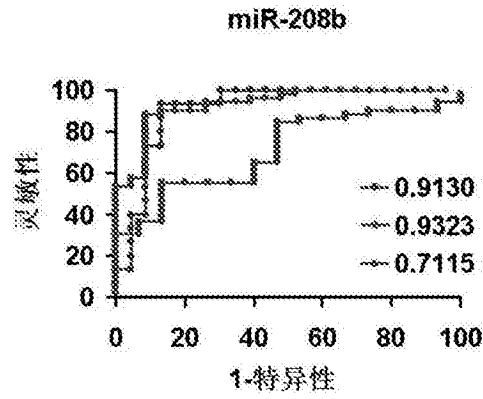


图2B

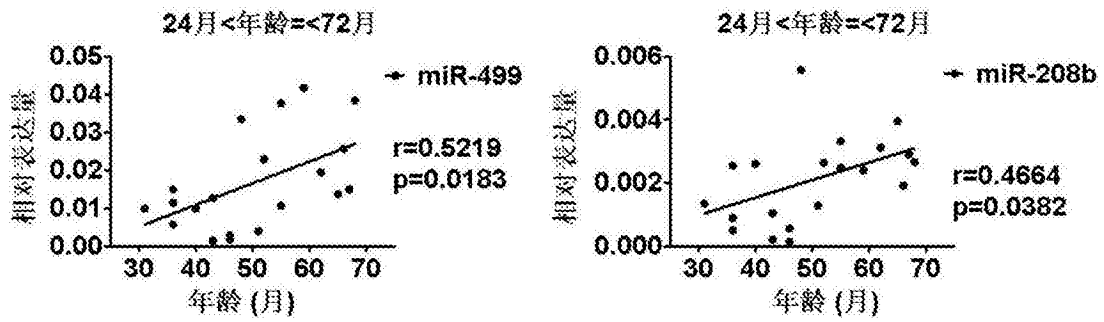


图3

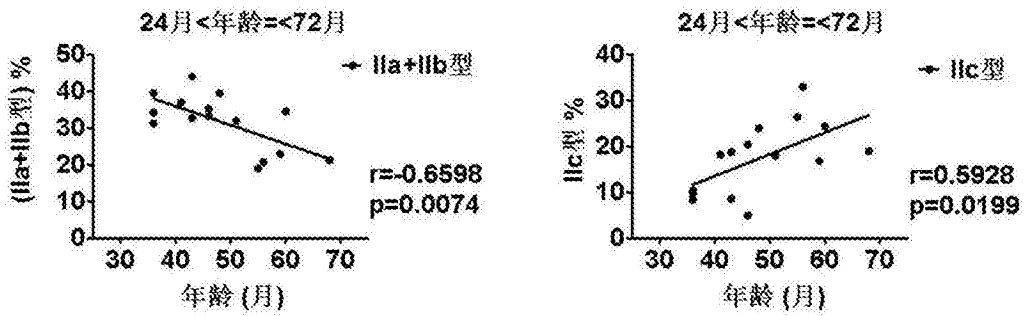


图4

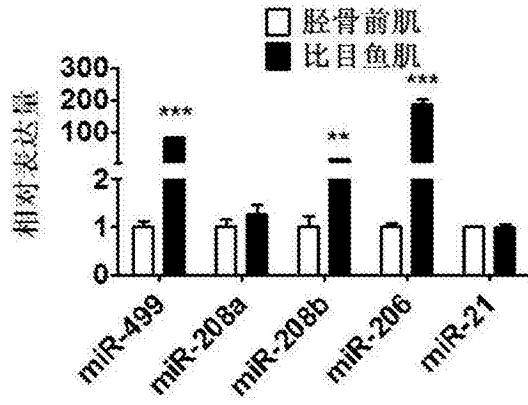


图5

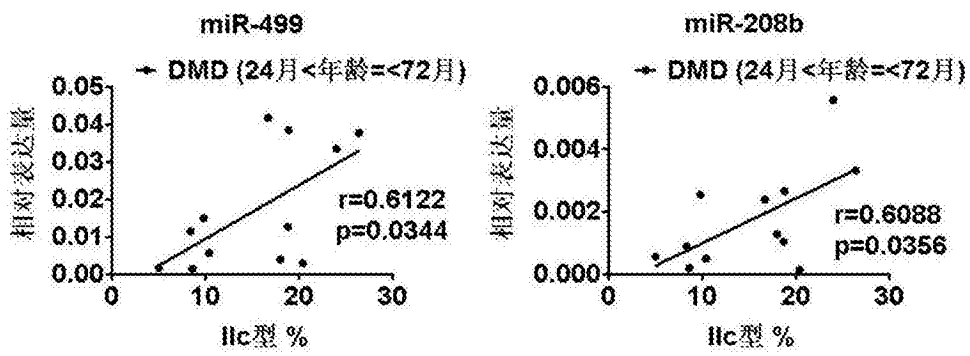


图6

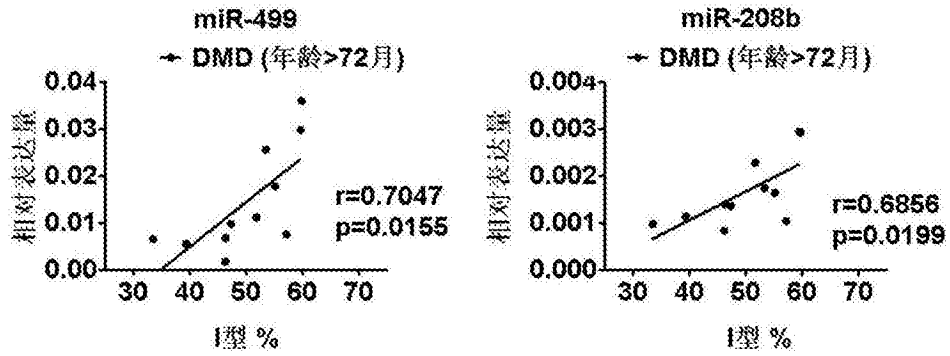


图7