



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110373457 B

(45) 授权公告日 2023.03.14

(21) 申请号 201910536229.X

(22) 申请日 2019.06.20

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110373457 A

(43) 申请公布日 2019.10.25

(73) 专利权人 镇江市第一人民医院
地址 212002 江苏省镇江市电力路8号

(72) 发明人 石岩 许亚平 姚俊

(74) 专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限公司 32200

专利代理师 黄欣

(51) Int. Cl.

G12Q 1/6883 (2018.01)

G12N 1/11 (2006.01)

(56) 对比文件

US 2013225439 A1, 2013.08.29

JP 2018085989 A, 2018.06.07

CN 108165624 A, 2018.06.15

WO 2008147938 A2, 2008.12.04

CN 108796066 A, 2018.11.13

CA 2966772 A1, 2016.05.19

Pan Y等.NCBI Reference Sequence: NM_004454.3.《NCBI》.2018,

陈斌等.miR-155 下调 Ets-1 参与溃疡性结肠炎的发病机制.《中药新药与临床药理》.2015, 第26卷(第3期),

审查员 田晓蓉

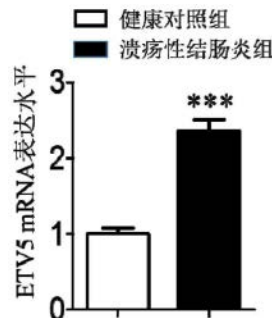
权利要求书1页 说明书4页
序列表3页 附图1页

(54) 发明名称

一种用于溃疡性结肠炎诊断的mRNA标志物及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种用于溃疡性结肠炎诊断的mRNA标志物及其应用,所述标志物为SEQ ID No:1所示的ETV5。本发明提供的mRNA标志物ETV5对于诊断UC具有很高的特异性及灵敏度,可以作为新型的生物标志物用于UC的临床诊断。



1. 用于检测mRNA标志物的引物对在制备检测溃疡性结肠炎诊断试剂盒中的应用,该标志物为SEQ ID No:1 所示的ETV5;所述引物对包括如SEQ ID No:2所示的上游引物和如SEQ ID No:3所示的下游引物,所述试剂盒包括mRNA逆转录试剂和mRNA qRT-PCR反应试剂。

一种用于溃疡性结肠炎诊断的mRNA标志物及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于医学分子生物学技术领域,具体涉及一种用于溃疡性结肠炎诊断的mRNA标志物及其应用。

背景技术

[0002] 溃疡性结肠炎(ulcerative colitis,UC)是一种主要累及结肠的慢性、非特异性的炎症性疾病,临床表现主要包括腹痛、腹泻及粘液脓血便等。虽然目前UC的发病机制仍不清楚,但是越来越多的研究表明,CD4⁺T细胞免疫调节功能紊乱诱导的炎症反应在UC发生发展过程中发挥关键作用。随着环境和饮食习惯改变,UC发病率在我国呈逐年上升趋势。该病易复发,常迁延不愈,有致残、癌变等风险,给患者身心造成沉重打击。

[0003] 随着科技进步,UC的诊断和治疗不断发展。目前用于UC临床诊断的方法主要为内镜、组织病理学和血液检查。但是许多患者因病情严重导致肠腔狭窄、虚弱等情况,难以耐受内镜检查,使得临床诊断和病情严重程度评估受到巨大限制。血液检查包括血沉、C-反应蛋白、内毒素等指标,但是由于上述指标缺乏特异性,导致UC难以与其他消化道疾病(如:淋巴瘤、肠结核、缺血性肠炎等)相鉴别,易引起误诊,延误治疗。此外,由于发病机制尚不明确,目前UC的临床治疗亦面临巨大挑战。因此,探索UC的发病机制,寻找特异性的UC诊断标志物和治疗靶点,对我国UC的临床诊治极其重要。

[0004] 人类ETS variant 5 (ETV5)基因位于3号染色体上。有研究表明,ETV5在多种肿瘤性疾病及自身免疫性疾病的发生发展过程中发挥重要作用。但是ETV5基因在UC患者外周血CD4⁺T细胞中的表达水平及其对CD4⁺T细胞的免疫调节作用未见相关报道。

发明内容

[0005] 针对上述现有技术的不足,本发明提供了一种用于溃疡性结肠炎诊断的mRNA标志物及其应用,该mRNA标志物为ETV5,该mRNA标志物对于诊断UC具有很高的特异性及灵敏度,可以作为新型的生物标志物用于UC的临床诊断。

[0006] 为实现上述目的,本发明采用以下技术方案:

[0007] 一种用于溃疡性结肠炎诊断的mRNA标志物,所述标志物为SEQ ID No:1所示的ETV5。

[0008] 针对上述mRNA标志物的引物组合,包括如SEQ ID No:2所示的上游引物和如SEQ ID No:3所示的下游引物。

[0009] 上述mRNA标志物在制备诊断溃疡性结肠炎的产品中的应用。

[0010] 上述引物组合在制备诊断溃疡性结肠炎的产品中的应用。

[0011] 一种溃疡性结肠炎检测试剂盒,包括上述的引物组合。

[0012] 进一步地,上述检测试剂盒还包括mRNA逆转录试剂和mRNA qRT-PCR反应试剂。

[0013] 有益效果:

[0014] 1、采用qRT-PCR技术检测UC患者和健康对照者外周血CD4⁺T细胞中ETV5 mRNA表达

水,为UC的临床诊治提供新的生物标志物和治疗靶点。

[0015] 2、ETV5作为生物标志物用于UC诊断的敏感性高,特异性强,操作简单,结果稳定,具有广泛的临床应用前景。ETV5作为诊断标志物的特异度和灵敏度都达到90%以上,是诊断UC的比较可靠的特异性标志物。

附图说明

[0016] 图1为实施例1中UC患者和健康对照者的ETV5表达差异分析;

[0017] 图2为实施例1中ETV5表达水平对UC诊断的ROC曲线分析。

具体实施方式

[0018] 下面结合具体实施例对本发明的技术方案作进一步说明。

[0019] 实施例1

[0020] 1. 化合物:ETV5 qRT-PCR引物和GAPDH qRT-PCR引物。

[0021] ETV5上游引物	ACGACACTTGTGTTGTGCCTGAG (SEQ ID No:2)
ETV5下游引物	GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG (SEQ ID No:3)
GAPDH上游引物	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT (SEQ ID No:4)
GAPDH下游引物	CTTGAACTCCATGCCTCGACCTG (SEQ ID No:5)

[0022] 2. 组合物:

[0023] (1) mRNA逆转录试剂:5×PrimerScript RT Master Mix,RNase-free H₂O。(Takara生物公司提供)。

[0024] (2) mRNA qRT-PCR反应试剂:TB Green Premix Ex Taq (TaKaRa Ex Taq HS,dNTP Mixture,Mg²⁺,Tli RNaseH,TB Green);ROX Reference Dye II;ETV5 qRT-PCR上游引物和下游引物。该方法以cDNA作为模板进行PCR反应时,可以很好地抑制由于cDNA中残存mRNA对PCR反应造成的阻害作用,对靶基因进行准确定量、检测,重复性好,可信度高。(Takara生物公司提供)。

[0025] 3. 方法:

[0026] (1) 分离提取外周血CD4⁺T细胞:使用肝素抗凝试管收集UC患者和健康对照者外周静脉血10mL。将收集的外周血与等体积的磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)混匀,缓慢加入淋巴细胞分离液上层,室温下2000rpm梯度离心20分钟。离心结束后用吸管缓慢吸取中间云雾层细胞置于50mL离心管中,用PBS清洗,1800rpm离心8分钟后弃上清可得到单个核细胞。将上述单个核细胞转移至流式管中,加入200微升CD4⁺T细胞分选磁珠(购自BD Biosciences),冰上孵育30分钟。孵育结束后将试管置于磁柱上提取CD4⁺T细胞,重复该步骤三次纯化CD4⁺T细胞并转移至无菌无酶EP管中,即为所需外周血CD4⁺T细胞样本。加入1mL Trizol室温放置5分钟后保存于-80℃冰箱中备用。

[0027] (2) RNA提取:将预先准备好的UC患者和健康对照者CD4⁺T细胞标本置于室温溶解,加入200微升氯仿,充分混匀并剧烈震荡15s后置于室温下5min。将上述标本在4℃、12000rpm条件下离心15min。离心结束后缓慢吸取上层清液400微升至另一EP管中,然后加入500微升异丙醇。缓慢混匀后室温静置10分钟,然后在4℃、12000rpm离心条件下离心10min可见RNA沉于EP管底部。弃去全部液体,加入75%乙醇静置5分钟在4℃,7500rpm条件

下离心5min。离心结束后吸弃乙醇,置于室温下迅速烘干,可得到纯化后的RNA。加入适量DEPC水溶解RNA,使用Experion Automated Electrophoresis System(美国Bio-Rad Laboratories)检测RNA纯度及浓度,A260/280介于1.8-2.0的RNA样本可用于后续PCR实验。

[0028] (3) mRNA逆转录:

[0029] 使用Takara公司mRNA逆转录试剂盒对ETV5 mRNA进行逆转录获得模板cDNA,该试剂盒包含了:5×PrimerScript RT Master Mix,RNase-free H₂O。

[0030] 具体方法及步骤如下:将上述试剂取出后分别放置在冰上进行缓慢融解,待溶解完全后混匀,按照如下表格所示体积配制所需的反应溶液。

试剂组分	体积
RNA (400ng/μL)	1μL
5×PrimerScript RT Master Mix	2μL
RNase-free H ₂ O	7μL

[0032] 以上溶液混匀后,置于逆转录PCR仪中,使用逆转录反应程序为:37℃15分钟,85℃5秒。逆转录反应结束后,将所得cDNA样本迅速转移至冰上冷却,用于以下qRT-PCR实验。

[0033] (4) qRT-PCR实验

[0034] ETV5 qRT-PCR检测使用Takara公司mRNA检测试剂盒,ETV5前引物、后引物,内参基因GAPDH前引物、后引物。qRT-PCR反应过程中ETV5和GAPDH cDNA扩增信号及CT值使用ABI公司的7500型实时PCR仪进行收集。

[0035] 具体过程如下:将上述试剂取出后放置于冰上缓慢融解,待溶解完全后混匀,按照如下表格所示体积配制所需的反应溶液。

试剂组分	体积
cDNA模板	2μL
TB Green Premix Ex Taq	10μL
ROX Reference Dye II	0.4μL
ETV5/GAPDH前引物	0.4μL
ETV5/GAPDH后引物	0.4μL
灭菌水	6.8μL

[0037] 按照上述溶液组分和体积配置反应液,加入96孔PCR板中,每个样本重复三次。反应条件为95℃30秒;95℃5秒,60℃34秒,40个循环。反应结束后,将每个样本的ETV5及内参基因GAPDH的CT值取平均值,拷贝后置于Excel表中进行分析。

[0038] 计算公式如下:

[0039] $\Delta CT = \text{ETV5基因CT值} - \text{内参基因GAPDH CT值}$;

[0040] $\Delta \Delta CT = \text{UC患者ETV5基因} \Delta CT \text{值} - \text{健康对照组ETV5基因} \Delta CT \text{值}$;

[0041] $\text{相对值} = 2^{-\Delta \Delta CT}$;

[0042] 按照上述公式处理实验结果,分析ETV5在UC和健康对照者外周血CD4⁺T细胞中表达水平差异。

[0043] (5) 统计学分析:

[0044] 1) 应用prism5统计软件,采用非配对样本t检验的方法分析ETV5在UC和健康对照者外周血CD4⁺T细胞中表达水平差异,以P<0.05为差异有统计学意义。

[0045] 2) ETV5诊断价值评价应用prism5统计软件对数据进行受试者工作特征(receiver operating characteristic,ROC)曲线分析,通过绘制ROC曲线并计算曲线下面积AUC评价ETV5诊断UC的敏感性和特异性。AUC<0.5时,表示诊断无意义;AUC=0.5-0.7时,表示诊断准确性较低;AUC=0.7-0.9时,表示诊断准确性中等;AUC>0.9时,表示诊断准确性高。

[0046] 4.结果分析:

[0047] (1)如图1所示,UC患者外周血CD4⁺T细胞中ETV5表达比健康对照者ETV5表达水平显著上升,差异有统计学意义(p<0.05)。

[0048] (2)ETV5对UC的诊断价值:

[0049] 利用ROC曲线分析ETV5在CD4⁺T细胞中的表达水平对UC诊断的检验效能,如图2所示:ETV5的ROC曲线下面积(area undercurve,AUC)为0.9297,灵敏度为82.76,特异度为84.62,提示ETV5作为UC诊断标志物的准确性、特异性及灵敏度均较高。

[0050] 综上所述,UC患者CD4⁺T细胞中ETV5表达水平显著升高,ROC曲线分析结果显示AUC为0.9297,灵敏度为82.76,特异度为84.62。表明ETV5对UC有一定的诊断价值,是诊断UC的比较可靠的特异性生物标志物。

[0051] 本发明利用RNA提取试剂提取健康对照者和UC患者外周血CD4⁺T细胞中总RNA分子,利用逆转录试剂制备ETV5模板cDNA。利用上述cDNA分子与ETV5 qRT-PCR引物、qRT-PCR试剂进行反应,检测ETV5在各样本中的CT值(CT值表示每个样本荧光强度达到阈值时所用的PCR循环数),利用相对值= $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算方法和非配对t检验方法比较ETV5在UC患者和健康对照者外周血CD4⁺T细胞表达差异。绘制ROC曲线并计算曲线下面积AUC,用于评价ETV5分子对UC诊断的特异性和敏感性。AUC<0.5时,表示无诊断意义;AUC=0.5-0.7时,表示诊断准确性较低;AUC=0.7-0.9时,表示诊断准确性中等;AUC>0.9时,表示诊断准确性较高。

[0052] 通常由于UC胃肠道病变内镜下及组织病理学表现难以与其他消化道疾病相鉴别,使得UC的临床诊断面临许多难点。本发明利用qRT-PCR等方法检测ETV5在UC患者外周血CD4⁺T细胞中的表达水平,可作为生物标志物用于UC临床诊断,其特异度、灵敏度及准确性均较高。相对于现在所用的内镜检查及组织病理学检测方法,该检测方法更加快捷、方便,同时避免了肠镜检查存在的局限性,受试范围更加广泛。本发明中所用的qRT-PCR等方法操作简便,所用试剂及引物针对性强,可重复性强,结果稳定,有利于推广。

[0001]	序列表	
[0002]	<110>	镇江市第一人民医院
[0003]	<120>	一种用于溃疡性结肠炎诊断的mRNA标志物及其应用
[0004]	<130>	20190620
[0005]	<160>	5
[0006]	<170>	SIP0SequenceListing 1.0
[0007]	<210>	1
[0008]	<211>	4082
[0009]	<212>	DNA
[0010]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0011]	<400>	1
[0012]	agagtccagc	cgctggtgcg cggagcggtt caccgtcttc ggagcggttc ggcccagcct 60
[0013]	ttcgcccagg	cgcccaggcc cgctgcgcgc gtgcgtgagc gcgcctgcgc cgccggggcc 120
[0014]	gctgcaaggg	gaggagagag gccgcctcag gaggatccct tttccccag aaattactca 180
[0015]	atgctgaaac	ctctcaaagt ggtattagag acgctgaaag caccatggac gggttttatg 240
[0016]	atcagcaagt	cccttttatg gtcccagga aatctcgatc tgaggaatgc agaggcggc 300
[0017]	ctgtgattga	cagaaagagg aagtttttg acacagatct ggctcacgat tctgaagagc 360
[0018]	tatttcagga	tctcagtaa cttcaagagg cttggttagc tgaagcaca gttcctgatg 420
[0019]	atgaacagtt	tgtcccagat tttcagctg ataacctggt gttcatgcc ccacctcaa 480
[0020]	ccaagatcaa	acgggagctg cacagcccct cctctgagct gtcgtcttgt agccatgagc 540
[0021]	aggetcttgg	tgctaactat ggagaaaagt gcctctaca ctattgtgcc tatgatagga 600
[0022]	agcctccctc	tgggttcaag ccattaacc ctctacaac cccctctca cccacctc 660
[0023]	agaatcccct	atttccccca cctcaggcaa ctctgccac ctcaggcat gccctgcag 720
[0024]	ctggcccagt	tcaaggtgtg ggccccgcc cgcccccca ttcgcttcca gacccctggac 780
[0025]	cacagcagca	aacatttgcg gtccccgac caccacatca gccctgcag atgccaaaga 840
[0026]	tgatgcctga	aaaccagtat ccatcagaac agagatttca gagacaactg tctgaacct 900
[0027]	gccaccctt	ccctcctcag ccaggagttc ctggagataa tcgccccagt taccatcggc 960
[0028]	aaatgtcaga	acctattgtc cctgcagctc ccccgcccc tcagggattc aaacaagaat 1020
[0029]	acctgacct	actctatgaa catgggttcc cgggatgcc agggccccca gcacacgggt 1080
[0030]	tccagtcacc	aatgggaatc aagcaggagc ctcgggatta ctgcgtcgat tcagaagtgc 1140
[0031]	ctaactgcca	gtatcctac atgagagggg gttatttctc cagcagccat gaaggttttt 1200
[0032]	catatgaaaa	agatccccga ttatacttg acgacactg tgttgtgcct gagagactgg 1260
[0033]	aaggcaaagt	caaacaggag cctaccatgt atcgagaggg gccccctac cagaggcgag 1320
[0034]	gttcccttca	gctgtggcag ttctgtgtca cccttcttga tgaccagcc aatgcccact 1380
[0035]	tcattgcctg	gacaggtcga ggcatggagt tcaagctgat agaaccggaa gaggttgctc 1440
[0036]	ggcgtgggg	catccagaag aaccggccag ccatgaaacta tgacaagctg agccgctctc 1500
[0037]	tccgctatta	ctatgaaaag ggcatcatgc agaaggtggc tggagagcga tacgtctaca 1560
[0038]	aatttgtctg	tgaccagat gccctcttct ccatggcttt cccggataac cagcgtccgt 1620
[0039]	tctgaaggc	agagtccgag tgccacctca gcgaggagga caccctgcc ctgaccact 1680
[0040]	ttgaagacag	ccccgttac ctctggaca tggaccgctg cagcagcctc ccctatgccg 1740
[0041]	aaggctttgc	ttactaagtt tctgagtggc ggagtggcca aaccctagag ctagcagttc 1800

[0042]	ccattcaggc aaacaagggc agtggttttg tttgtgtttt tggttgttcc taaagcttgc	1860
[0043]	cctttgagta ttatctggag aaccaagct gtctctggat tggcacctt aaagacagat	1920
[0044]	acattggctg gggagtggga acagggaggg gcagaaaacc accaaaaggc cagtgcctca	1980
[0045]	actcttgatt ctgatgaggt ttctgggaag agatcaaaat ggagtctcct taccatggac	2040
[0046]	aatacatgca aagcaatc tttgtcaggt tagtaccgc aaaacgggac atagtatgtg	2100
[0047]	acaatctgca tcgatcatgg actactaaat gcctttacat agaagggtc tgatttgac	2160
[0048]	aatttggtga aaaatcacia acccatagaa aagtaagtag gctaagttgg ggaggctcaa	2220
[0049]	accattaagg gttaaaaata catcttaaac attggaaagc tcttctagct gaatctgaaa	2280
[0050]	tattaccct tgtctagaaa aaggggggca gtcagaacag ctgttcccca ctccgtggt	2340
[0051]	ctcaaatca taaccatgg ctactcttg gaaccaccg gccatgtggt cgccaagtag	2400
[0052]	agcaagcccc ctttctctt ccaatcacgt ggctgagtgt ggatgactt tatttttagga	2460
[0053]	gaaggggat taacactttt gacagtattt tgttttgccc tgatttggg gattgtttt	2520
[0054]	ttttggtggt tgttttgaa aaacagtta taaactgatt tttgtagtt tggattttaa	2580
[0055]	agcaaaaaa cgaaaaaaa aaaacaaaa caaaccttt ggtaactgt cactgtgtcc	2640
[0056]	tttagccagg gccgtccaa cttatgaaga cactgcagct tgagagggc tttgctgagg	2700
[0057]	cttcccctg gccatgtgaa agcccgcct gttgectget ttgtgcttc tgcaccagac	2760
[0058]	aacctgatg aacatttga cctgagttg acatttttga agtgtgcagg gcagcctgga	2820
[0059]	cacaagctta gattctctat gtatagtcc ccgtgtcac taacatgcc tctctgaaa	2880
[0060]	gcatatgtat ataacatgtg tcatgtcct tggaaacctg gtcacctggt gaaaacctt	2940
[0061]	gggattctt cctgggcatg actgatgaca atttccatt catcagttg tttgttttc	3000
[0062]	cttttcttt aaatcttga ctttaaaccc tacctgtgtg attcagtagg gtttgagact	3060
[0063]	tacgtgtgat actgacaggt aagcaacagt gctagcatt tagattcctg cttttttta	3120
[0064]	aaaagaatt attctcatt ctgtattata ttggaaaagt tttaaacaac caagctaaag	3180
[0065]	ctatgtgaaa gttgagctca aagtagagga aaagttactg gtggtacct gctgectgt	3240
[0066]	ctgctgtag aattctgtgc tccccgtgac acttagtaca ttaagaatga ctacactgtt	3300
[0067]	cctcgtatgt gaaggagca gtgctgactc cgtgagtgt agacacgtc tttgaactgc	3360
[0068]	tttctattc atggagcact ccatagtctc aaactgtccc cttatgacc aacagcacat	3420
[0069]	ttgtgaagag gttcgcaggg ataaggggtg cactttatag ctatggaaac atgagattct	3480
[0070]	cctctattg aagctaatta gccacaaaag gtggtaaacc thtagattgg gccttaatta	3540
[0071]	gcattgtact ctaatcaaag gactcttct aaacctatt tatagcttc ttaacctaca	3600
[0072]	catagtctat acatagatgc atattttacc cccagctgc tagagattta tttgttgtaa	3660
[0073]	atgctgtata gatttggtt tccttcttt acttaccctg gtttgattt tttttttt	3720
[0074]	tctttgaaat ggatttatgc tgtcttagca atatgacaat aatcctctgt agcttgagct	3780
[0075]	accctcccc tgctgtaact tacgtgacct gtgctgtcac tgggcatagg acagcggcat	3840
[0076]	cacggtgca ttccattgg actcatgcac ctcccgatg gttttgttt ttttcgggg	3900
[0077]	ttcttgggg tttgttggt tgcttcttt ccagagtgtg gaaagtctac agtgcagaaa	3960
[0078]	ggcttgaacc tgccagctga tttgaaatac tttcccctgc gcaggccct atgcatcctg	4020
[0079]	ccaagctgag ttatattctg tactgtgtac aataaagaag tttgctttc gtttaccag	4080
[0080]	ca	4082
[0081]	<210> 2	
[0082]	<211> 23	
[0083]	<212> DNA	

[0084]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
[0085]	<400> 2	
[0086]	acgacacttg tgttgtgcct gag	23
[0087]	<210> 3	
[0088]	<211> 23	
[0089]	<212> DNA	
[0090]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
[0091]	<400> 3	
[0092]	ggctgttgtc atacttctca tgg	23
[0093]	<210> 4	
[0094]	<211> 21	
[0095]	<212> DNA	
[0096]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
[0097]	<400> 4	
[0098]	ggagcgagat ccctcaaaa t	21
[0099]	<210> 5	
[0100]	<211> 23	
[0101]	<212> DNA	
[0102]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
[0103]	<400> 5	
[0104]	cttgaactcc atgcctcgac ctg	23

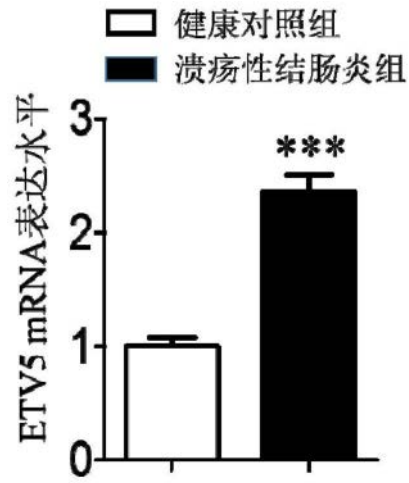


图1

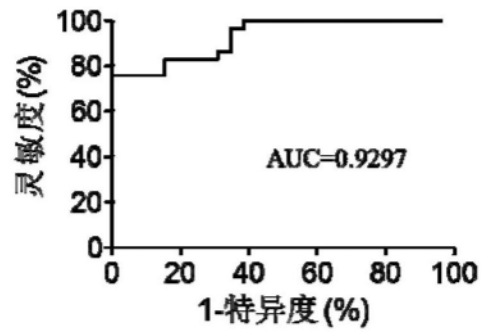


图2