



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112816711 A

(43) 申请公布日 2021.05.18

(21) 申请号 202110285096.0

(22) 申请日 2021.03.17

(71) 申请人 中国医科大学附属盛京医院
地址 110004 辽宁省沈阳市和平区三好街36号

(72) 发明人 袁正伟 王衍夫 马玲 王勤博

(74) 专利代理机构 沈阳亚泰专利商标代理有限公司 21107

代理人 马维骏

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

C12Q 1/6883 (2018.01)

C12N 15/11 (2006.01)

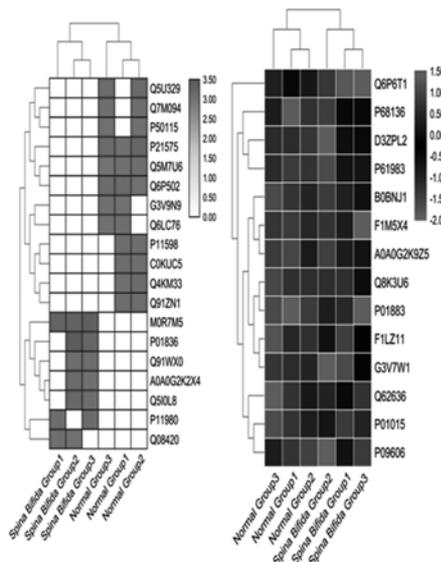
权利要求书1页 说明书7页 附图9页

(54) 发明名称

用于神经管畸形、先天性心脏病和唇腭裂胎儿产前无创诊断的分子标志物及其应用

(57) 摘要

本发明属于生物医药技术领域,具体涉及用于神经管畸形、先天性心脏病和唇腭裂胎儿产前无创诊断的分子标志物及其应用。用于神经管畸形、先天性心脏病和唇腭裂胎儿产前无创诊断的分子标志物,包括COR01A、DNM2和ACTR2蛋白中的一种或多种组成。所述的产前无创诊断的分子标志物在制备用于神经管畸形、先天性心脏病和唇腭裂胎儿产前筛查、预警、临床诊断和生化检验产品中的应用。本发明首次发现并证实在孕妇血中蛋白质(包括COR01A、DNM2和ACTR2)的表达异常与神经管畸形、先天性心脏病和唇腭裂胎儿的发生具有密切相关性,验证的样本量多,结果准确,为神经管畸形、先天性心脏病和唇腭裂胎儿产前筛查、预警和诊断提供了新的途径。



1. 用于神经管畸形、先天性心脏病和唇腭裂胎儿产前无创诊断的分子标志物,其特征在于,是由COR01A、DNM2和ACTR2蛋白中的一种或多种组成。

2. 如权利要求1所述的产前无创诊断的分子标志物在制备用于神经管畸形、先天性心脏病和唇腭裂胎儿产前筛查、预警、临床诊断和生化检验产品中的应用。

3. 如权利要求2所述的应用,其特征在於,所述产品包括试剂、试剂盒、芯片、试纸,高通量测序平台,通过质谱技术、PCR、原位杂交、荧光原位杂交、免疫透射比浊法、放射免疫法等相关方法对与神经管畸形、先天性心脏病和唇腭裂胎儿产前无创诊断相关的蛋白质分子标志物进行检测。

4. 如权利要求2所述的应用,其特征在於,所述神经管畸形、先天性心脏病和唇腭裂胎儿产前筛查、预警、临床诊断和生化检验的标本包括孕妇血液及其外泌体、尿液其外泌体、羊水及其外泌体和胎儿标本。

5. 一种检测如权利要求1所述的用于神经管畸形、先天性心脏病和唇腭裂胎儿产前无创诊断的分子标志物的试剂在制备胎儿产前无创诊断工具中的应用。

6. 如权利要求5所述的应用,其特征在於,所述检测用于神经管畸形、先天性心脏病和唇腭裂胎儿产前无创诊断分子标志物的试剂包括能够定量权利要求1所述的用于神经管畸形、先天性心脏病和唇腭裂胎儿产前无创诊断的分子标志物的试剂。

7. 如权利要求6所述的应用,其特征在於,所述能够定量权利要求1所述的用于神经管畸形、先天性心脏病和唇腭裂胎儿产前无创诊断的分子标志物的试剂是基因或转录本的特异性引物,或是特异性识别探针,或同时包括引物和探针。

8. 一种用于用于神经管畸形、先天性心脏病和唇腭裂胎儿产前筛查、预警和诊断的工具,其特征在於,所述工具能够检测权利要求1所述的用于神经管畸形、先天性心脏病和唇腭裂胎儿产前无创诊断的分子标志物的分子表达量。

9. 如权利要求8所述的工具,其特征在於,包括能够定量权利要求1所述的用于神经管畸形、先天性心脏病和唇腭裂胎儿产前无创诊断的分子标志物,所述的工具包括芯片、试剂盒、试纸和高通量测序平台。

用于神经管畸形、先天性心脏病和唇腭裂胎儿产前无创诊断的分子标志物及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于医药生物技术领域,具体涉及用于神经管畸形、先天性心脏病和唇腭裂胎儿产前无创诊断的分子标志物(COR01A、DNM2和ACTR2蛋白)及其应用。

背景技术

[0002] 神经管畸形、先天性心脏病和唇腭裂等是我国常见重大胎儿发育畸形,严重危害出生人口生活质量的提高。因此,研究这些先天畸形的胚胎早期无创诊断的方法,使其能够在严重结构异常或不可逆损伤之前获得诊断,制定相应的胚胎早期治疗和预防新策略,对于减少畸形的致残率、提高人口素质具有极其重要意义。

[0003] 建立无创的先天畸形早期筛查方法,一直是人们不断追求的理想目标。虽然目前影像学技术(超声和MRI)的发展非常迅速,使一些先天畸形的诊断时间获得提前,但仍无法达到早期筛查和诊断的要求。母体血清学检查是一种无创性产前诊断方法,孕妇易接受,适用于大范围产前筛查。因此,国内外许多学者都在致力于发现新的诊断特异性标志物的研究,但目前为止除了神经管畸形和Down综合症可以利用血清甲胎蛋白进行筛查外,其它出生缺陷尚没有在临床获得应用的诊断分子标志物。

[0004] 近年来随着各种组学技术突飞猛进的发展,一系列新技术融入到高通量的组学研究中,使疾病诊断分子标志物筛查工作有了新的突破,也为目前大家非常重视的转化医学研究提供了极其重要的手段。利用高通量的组学技术可以充分考虑母体与胎儿两方面因素,从众多复杂的蛋白质中筛选出一组改变明显的关键性分子,综合分析其变化规律,将有利于确定疾病早期诊断和预后判定的分子标志物,也是未来将复杂的分子标志物转化为临床应用的趋势所在。

发明内容

[0005] 鉴于现有技术存在的问题,本发明的目的在于提供用于神经管畸形、先天性心脏病和唇腭裂胎儿产前无创诊断的分子标志物及其应用,所述分子标志物为COR01A、DNM2和ACTR2蛋白,可单独或联合用于先天畸形产前筛查,为神经管畸形、先天性心脏病和唇腭裂治疗提供新的靶点。

[0006] 为实现上述目的,本发明采用以下技术方案。

[0007] 用于神经管畸形、先天性心脏病和唇腭裂胎儿产前无创诊断的分子标志物,是由COR01A、DNM2和ACTR2蛋白一种或多种组成。

[0008] 所述的分子标志物在制备用于神经管畸形、先天性心脏病和唇腭裂胎儿产前筛查、预警、临床诊断和生化检验产品中的应用。

[0009] 进一步地,所述产品包括试剂、试剂盒、芯片、试纸,高通量测序平台,通过质谱技术、PCR、原位杂交、荧光原位杂交、免疫透射比浊法、放射免疫法等相关方法对与神经管畸形、先天性心脏病和唇腭裂胎儿产前无创诊断相关的蛋白分子标志物进行检测。

[0010] 进一步地,所述神经管畸形、先天性心脏病和唇腭裂胎儿产前筛查、预警、临床诊断和生化检验的标本包括孕妇血液(及其外泌体)、尿液(及其外泌体)、羊水(及其外泌体)和胎儿标本等。

[0011] 一种检测用于神经管畸形、先天性心脏病和唇腭裂胎儿产前无创诊断的分子标志物的试剂在制备胎儿产前无创诊断工具中的应用。

[0012] 进一步地,所述检测神经管畸形、先天性心脏病和唇腭裂胎儿产前无创诊断分子标志物的试剂包括能够定量上述蛋白的试剂。

[0013] 进一步地,所述能够定量上述蛋白的试剂可以是基因或转录本的特异性引物,也可以是特异性识别探针,或同时包括引物和探针。

[0014] 一种用于用于神经管畸形、先天性心脏病和唇腭裂胎儿产前筛查、预警和诊断的工具,所述工具能够检测上述分子表达量。

[0015] 进一步,所述工具包括能够定量与神经管畸形、先天性心脏病和唇腭裂胎儿产前无创诊断蛋白分子标志物包括CORO1A、DNM2和ACTR2。

[0016] 进一步,所述用于神经管畸形、先天性心脏病和唇腭裂胎儿产前筛查、预警和诊断的工具包括芯片、试剂盒、试纸和高通量测序平台。

[0017] 一种神经管畸形、先天性心脏病和唇腭裂产前筛查、预警和诊断的方法,所述方法包括如下步骤。

[0018] (1) 获取受试者的样品。

[0019] (2) 检测受试者样品中上述分子表达水平。

[0020] (3) 将测得的上述分子表达水平变化趋势与受试者的疾病相关性关联起来。

[0021] (4) 与正常对照相比,上述分子表达异常,表明受试者怀有神经管畸形、先天性心脏病和唇腭裂胎儿的风险高。

[0022] 本发明的定量蛋白质的试剂可基于非抗体的已知方法来发挥其功能:例如质谱技术,包括MRM和PRM等。

[0023] 本发明的定量蛋白质的试剂可基于使用抗体的已知方法来发挥其功能:例如,可以包括芯片(蛋白质芯片和微流控芯片等)、数字式单分子免疫阵列、ELISA、放射免疫测定法、免疫透射比浊法、免疫组织化学法、Western印迹等。

[0024] 本发明的定量蛋白的试剂包括特异性结合蛋白的抗体或其片段。可以使用任何结构、尺寸、免疫球蛋白类别、起源等的抗体或其片段,只要它结合靶蛋白质即可。本发明的检测产品中包括的抗体或其片段可以是单克隆的或多克隆的。抗体片段指保留抗体对抗原的结合活性的抗体一部分(部分片段)或含有抗体一部分的肽。抗体片段可以包括F(ab')₂、Fab'、Fab、单链Fv(scFv)、二硫化物键合的Fv(dsFv)或其聚合物、二聚化V区(双抗体)、或含有CDR的肽。本发明的定量蛋白的试剂可以包括编码抗体或编码抗体片段的氨基酸序列的分离的核酸,包含该核酸的载体,和携带该载体的细胞。

[0025] 抗体可以通过本领域技术人员公知的方法来获得。例如,制备保留整个或部分靶蛋白质的多肽或整合编码它们的多核苷酸的哺乳动物细胞表达载体作为抗原。使用抗原免疫动物后,从经过免疫的动物获得免疫细胞并融合骨髓瘤细胞以获得杂交瘤。然后从杂交瘤培养物收集抗体。最后可以通过使用被用作抗原的蛋白或其部分对获得的抗体实施抗原特异性纯化来获得针对本发明所述蛋白的单克隆抗体。可以如下制备多克隆抗体:用与上

文相同的抗原免疫动物,从经过免疫的动物收集血液样品,从血液中分离出血清,然后使用上述抗原对血清实施抗原特异性纯化。可以通过用酶处理获得的抗体或通过使用获得的抗体的序列信息来获得抗体片段。

[0026] 标记物与抗体或其片段的结合可以通过本领域普遍知道的方法来实现。例如,可以如下荧光标记蛋白质或肽:用磷酸盐缓冲液清洗蛋白质或肽,添加用DMSO、缓冲剂等,然后混合溶液,再于室温放置10分钟。另外,标记可使用商品化的标记试剂盒,诸如生物素标记试剂盒,如生物素标记试剂盒-NH₂、生物素标记试剂盒-SH(Dojindo Laboratories);碱性磷酸酶标记试剂盒诸如碱性磷酸酶标记试剂盒-NH₂、碱性磷酸酶标记试剂盒-SH(Dojindo Laboratories);过氧化物酶标记试剂盒诸如过氧化物酶标记试剂盒-NH₂、过氧化物酶标记试剂盒-NH₂(Dojindo Laboratories);藻胆蛋白标记试剂盒诸如藻胆蛋白标记试剂盒-NH₂、藻胆蛋白标记试剂盒-SH、B-藻红蛋白标记试剂盒-NH₂、B-藻红蛋白标记试剂盒-SH、R-藻红蛋白标记试剂盒-NH₂、R-藻红蛋白标记试剂盒SH(Dojindo Laboratories);荧光标记试剂盒诸如荧光素标记试剂盒-NH₂、HiLyte Fluor(TM) 555标记试剂盒-NH₂、HiLyte Fluor(TM) 647标记试剂盒-NH₂(Dojindo Laboratories);及DyLight 547和DyLight647(Techno Chemical Corp.)、Zenon(TM)、Alexa Fluor(TM)抗体标记试剂盒、Qdot(TM)抗体标记试剂盒(Invitrogen Corporation)和EZ-标记物蛋白质标记试剂盒(Funakoshi Corporation)。为了正确标记,可以使用适宜的仪器来检测经过标记的抗体或其片段。

[0027] 本发明的用于检测上述分子表达量的样品的获得是本领域的常规技术,优选可选择非侵入性或具有最低程度侵入性的方法获得。

[0028] 本发明样品可以是(但不限于):孕妇血液、尿液、羊水和畸形胎儿或患儿标本。在本发明的具体实施方案中,所述样品来自受试者的组织。

[0029] 高通量蛋白质组学检测平台是一种特殊工具,通过对比疾病患者和正常人群的蛋白质表达差异,容易分析出哪个蛋白质表达的异常与疾病相关。因此,在高通量蛋白质组学检测中获知上述分子表达异常与神经管畸形、先天性心脏病和唇腭裂相关也属于使用了本发明的新用途,同样在本发明的保护范围之内。

[0030] 本发明所述的试剂盒可包含适于实用(如针对于不同的检测方法)的多种不同的试剂,并不限于目前所列举的试剂,只要是基于上述分子检测来判断神经管畸形、先天性心脏病和唇腭裂的试剂均包含在本发明范围内。

[0031] 在本发明的上下文中,“神经管畸形、先天性心脏病和唇腭裂胎儿产前筛查、预警和诊断”包括判断受试者胎儿是否已经发生神经管畸形、先天性心脏病和唇腭裂,判断受试者胎儿是否存在患有神经管畸形、先天性心脏病和唇腭裂的风险。

[0032] 与现有技术比,本发明的有益效果如下。

[0033] 本发明首次发现并证实在孕妇血中蛋白质(包括COR01A、DNM2和ACTR2)的表达异常与神经管畸形、先天性心脏病和唇腭裂胎儿的发生具有密切相关性,验证的样本量多,结果准确。

[0034] 本发明提供的用于神经管畸形、先天性心脏病和唇腭裂胎儿产前无创诊断相关的蛋白标志物,提供神经管畸形、先天性心脏病和唇腭裂胎儿产前诊断或风险监控的服务,协作或独立地向医院和诊所销售诊断和预后的咨询服务。

[0035] 本发明提供的用于神经管畸形、先天性心脏病和唇腭裂胎儿产前无创诊断相关的蛋白标志物为神经管畸形、先天性心脏病和唇腭裂胎儿产前筛查、预警和诊断提供了新的途径。

附图说明

[0036] 图1至图3是利用蛋白质组学技术在神经管畸形外周血中筛选出33个差异表达蛋白质,进行生物信息学分析发现三个存在相互作用的差异蛋白质(COR01A、DNM2和ACTR2)。

[0037] 图4-1至图4-4是利用Western-blot方法在胚胎E12天、E14天和E18天的神经管畸形孕鼠外周血中对COR01A、DNM2和ACTR2三个差异表达蛋白质进行定量检测验证,证实COR01A、DNM2和ACTR2在神经管畸形孕鼠外周血中明显低表达。

[0038] 图5-1至图5-4是利用Western-blot方法在胚胎E12天和E18天的神经管畸形脊髓组织中,以及胚胎E18天孕鼠外周血胚胎神经组织来源的外泌体中对COR01A、DNM2和ACTR2三个差异表达蛋白质进行定量检测验证,同时利用免疫组化方法在神经管畸形脊髓组织中COR01A、DNM2和ACTR2表达情况进行检测分析,证实COR01A、DNM2和ACTR2在神经管畸形中明显低表达。

[0039] 图6-1至图6-3是利用ELISA方法在神经管畸形孕妇外周血中对COR01A和DNM2进行定量检测验证,证实COR01A和DNM2在神经管畸形孕妇外周血中明显低表达,而且在孕早期改变更加明显。

[0040] 图7-1至图7-3是ROC曲线分析显示COR01A和DNM2对神经管畸形胎儿的孕妇的诊断准确性、敏感性和特异性分析的结果,显示COR01A和DNM2对孕早期神经管畸形诊断效果更好。

具体的实施方式

[0041] 下面结合附图和实施例对本发明作进一步详细的说明。以下实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,或按照制造厂商所建议的条件。实施例中使用动物模型来源于盛京医院动物中心,所用孕妇外周血标本来源于盛京出生队列样本库,并获得中国医科大学附属盛京医院伦理委员会批准(批准号:2017PS264K)。

[0042] 实施例1利用蛋白质组学技术在神经管畸形孕鼠外周血中筛选差异表达蛋白质及生物信息学分析。

[0043] 采用超高速离心的方法分离神经管畸形孕鼠血浆外泌体,并完成外泌体相关鉴定工作。用非标记定量技术(label-free)进行蛋白质组学筛选,并结合生物信息学分析,初步筛选可能的蛋白质标志物,如图1-3所示。

[0044] 1、分离血浆。

[0045] 采集全血样品,于EDTA抗凝管中,轻柔颠倒混匀后,使用4℃低温离心机,1600×g离心10min,离心后收集上清(血浆)至新的EP管中,16000×g离心10min去除细胞碎片,将血浆分装到多个离心管中。

[0046] 2、外泌体的分离和鉴定。

[0047] 采用超高速离心的方法分离血浆外泌体。分离方法如下:10000×g离心1h,4℃,上清液移至新的超高速离心管后,按照100000×g离心4h,4℃。弃上清,用100μl冷的PBS重悬

外泌体。采用三种标准方法(透射电镜、粒径分析和外泌体表面标志蛋白)鉴定分离得到的外泌体颗粒。

[0048] 3、蛋白质组学检测和生物信息学分析。

[0049] 对3例神经管畸形孕鼠和3例正常孕鼠进行非标记定量技术(label-free)的蛋白质组学检测,将组学数据输入TBtools软件制作热图,生物信息学分析在webgestalt网站上进行基因GO生物学过程的富集分析,之后对这些差异蛋白于String网站进行蛋白互作网络。

[0050] 4、外泌体鉴定与蛋白质组检测结果。

[0051] (1) 外泌体鉴定:透射电镜和粒子直径检测证明外泌体在100nm直径处发现了波峰,说明用超速离心法提取的外泌体纯度良好。之后,使用不同浓度的外泌体对Alix、CD63和CD9进行Western blot检测以鉴定外泌体标志物表达情况,结果显示Alix、CD63和CD9条带随着浓度梯度的增加呈现正确的变化趋势。

[0052] (2) 蛋白质组学结果:总共3只E18正常鼠的血清样本与3只神经管畸形的血清外泌体样本用于蛋白质组学检测,总共发现了63个富集蛋白质,且有33个蛋白质在正常组与畸形组之间存在差异。有7个蛋白质在NTDs中特异性表达,有12个蛋白质在正常组中特异性表达,有2个未知蛋白质。此外,还有14个蛋白质在NTDs组和正常组中均有表达,其中1个蛋白质在神经管畸形高表达,有13个蛋白质低表达。GO分析发现了4个生物学过程的富集,分别为:调节actin聚合(解聚),调节解剖学形态结构发生,对含氧物质的反应和细胞结构组装。其中ACTR2、CORO1A、DNM2、AGT、GLUL、LIMS1、PDCD6和PKM参与了2种及以上的生物学过程,其中ACTR2、CORO1A、GLUL和DNM2与神经发育相关,且未在神经管畸形中报道过。这4个蛋白质又在String网站上进行了蛋白质互作分析,结果显示ACTR2、CORO1A和DNM2可以聚到同一个互作网络簇之中。

[0053] 实施例2在神经管畸形血清外泌体中验证ACTR2、CORO1A和DNM2的表达情况。

[0054] 1、在胚胎E18天血清外泌体中验证ACTR2、CORO1A和DNM2的表达情况。

[0055] 选取组学检测以外的19对胚胎E18天的样本进行Western-blot的扩大样本量验证。该验证用Alix作为内参,检测在45kDa的ACTR2、在57kDa的CORO1A以及在98kDa的DNM2。对总共19对来源于孕鼠血清外泌体的样本(19个正常,19个神经管畸形)进行了检测,并发现他们与组学结果的趋势一致,均在畸形组低表达。统计结果也显示ACTR2、CORO1A及DNM2在神经管畸形组的低表达存在统计学差异。利用ELISA对CORO1A的检测同样也证实了Western-blot结果的一致性。

[0056] 2、在胚胎E12、E14和E16天血清外泌体中ACTR2、CORO1A和DNM2的表达情况。

[0057] 为了验证ACTR2、CORO1A和DNM2是否在孕早期也发生了改变,对E12、E14、E16天的血清外泌体利用Western-blot方法进行了验证。结果发现其条带表达情况以及非配对T检验统计结果均显示在神经管畸形组显著下调。这部分结果明确了孕早期这些蛋白的表达趋势与E18天一致。此外,利用ELISA对E12的CORO1A检测结果显示显著下调趋势,也证实Western-blot结果的一致性。这部分结果明确了ACTR2、CORO1A和DNM2在E12至E16期间也存在显著下调趋势,提示它们可以作为孕早期神经管畸形的诊断指标。

[0058] 对上述蛋白质组学结果发现的ACTR2、CORO1A和DNM2,利用Western-blot方法在神经管畸形血清外泌体中进行验证,如图4-1至图4-4所示。

[0059] 实施例3ACTR2、CORO1A和DNM2在脊髓组织和胚胎神经源性外泌体中表达情况。

[0060] 1、ACTR2、CORO1A和DNM2在脊髓组织中表达情况。

[0061] 为了探讨ACTR2、CORO1A和DNM2与神经管畸形发生的关系,明确其在脊髓组织的表达情况,利用Western-blot对胚胎E18和E12天脊髓组织中表达情况进行了检测,并以 β -actin作为组织检测的内参。结果显示与血清外泌体趋势一致ACTR2、CORO1A和DNM2在神经管畸形的脊髓组织中均表现为具有统计学意义的下调趋势。免疫组化染色显示了E18天神经管畸形脊髓组织中ACTR2、CORO1A和DNM2表达情况,明确这些蛋白质是否在神经管组织内存在特异性表达。ACTR2在神经细胞、神经上皮以及神经嵴侧有表达,并且在神经管畸形组织中明显下调;CORO1A在神经纤维、神经细胞上表达较为明显,并且在神经管畸形组织中均有下调表现;DNM2在神经纤维、神经上皮、神经细胞以及神经嵴上均有表达,并且在神经管畸形组织中均表现出了下调趋势。提示血清外泌体中这3个指标的改变很可能来源于脊髓组织的改变。

[0062] 2、ACTR2、CORO1A和DNM2在胚胎神经源性外泌体中表达情况。

[0063] 为了验证ACTR2、CORO1A和DNM2在神经管畸形孕鼠血清外泌体中低表达是否由于胚胎神经源性外泌体中低表达所致,对孕鼠血清外泌体进行进一步分离,利用特异性抗体结合的分选试剂盒分离出胚胎神经源性外泌体,并利用Western-blot方法进行ACTR2、CORO1A和DNM2定量检测,结果显示CORO1A和DNM2表达在神经管畸形组明显降低,ACTR2表达量在神经管畸形组和正常对照组之间没有统计学差异。结果提示在孕鼠血清外泌体中CORO1A和DNM2表达降低是由于胚胎脊髓组织产生的外泌体中表达降低所致。

[0064] 对上述在孕鼠血清外泌体中验证的ACTR2、CORO1A和DNM2,利用Western-blot和免疫组化方法在神经管畸形脊髓组织和胚胎神经源性外泌体中进行验证,如图5-1至图5-4所示。

[0065] 实施例4在神经管畸形、先天性心脏病和唇腭裂胎儿母亲外周血外泌体中验证CORO1A和DNM2作为分子标志物的诊断效能。

[0066] 1、纳入研究样本。

[0067] 从盛京出生队列中收集19例神经管畸形胎儿母亲外周血,100例先天性心脏病胎儿母亲外周血,40例唇腭裂胎儿母亲外周血,取孕妇年龄和胎龄相近的正常孕妇159例作为正常对照。

[0068] 2、外泌体的分离。

[0069] 采用超高速离心的方法分离血浆外泌体。分离方法如下:10000 \times g离心1h,4 $^{\circ}$ C,上清液移至新的超高速离心管后,按照100000 \times g离心4h,4 $^{\circ}$ C。弃上清,用100 μ l冷的PBS重悬外泌体。

[0070] 3、ELISA检测CORO1A和DNM2表达量。

[0071] 取50微升血清外泌体在PBS液中稀释为100微升,然后利用人CORO1A ELISA试剂盒和人DNM2 ELISA试剂盒,按照说明书的步骤进行操作,加入反应终止液后,利用多功能酶标仪在450纳米进行检测,根据标准曲线计算CORO1A和DNM2表达量。

[0072] 4、CORO1A和DNM2作为分子标志物在神经管畸形、先天性心脏病和唇腭裂胎儿母亲外周血外泌体中的诊断效能。

[0073] DNM2检测结果显示,在神经管畸形胎儿母亲外周血外泌体的表达量明显降低,与

正常孕妇组相比存在统计学差异。ROC曲线分析DNM2诊断神经管畸形的敏感性为73.68%、特异性为78.95%。进一步对神经管畸形胎儿母亲的孕周进行分析,发现DNM2对孕早期(孕12周-18周)诊断效能更好,敏感性和特异性均达到100%。对于孕晚期诊断效能较差,敏感性为68.42%、特异性为89.47%。在先天性心脏病胎儿母亲外周血外泌体的表达量明显降低,与正常孕妇组相比存在统计学差异。ROC曲线分析DNM2诊断先天性心脏病的敏感性为78.68%、特异性为80.65%。在唇腭裂胎儿母亲外周血外泌体的表达量也明显降低,与正常孕妇组相比存在统计学差异。ROC曲线分析DNM2诊断神经管畸形的敏感性为70.38%、特异性为75.55%。

[0074] CORO1A检测结果显示,在神经管畸形胎儿母亲外周血外泌体的表达量也明显降低,与正常孕妇组相比存在统计学差异。ROC曲线分析CORO1A诊断神经管畸形的敏感性为73.68%、特异性为78.95%。进一步对神经管畸形胎儿母亲的孕周进行分析,发现CORO1A对孕早期(孕12周-18周)诊断效能也是更好,敏感性为85.71%、特异性为85.71%。对于孕晚期诊断效能较差,敏感性为75.00%、特异性为83.33%。在先天性心脏病胎儿母亲外周血外泌体的表达量明显降低,与正常孕妇组相比存在统计学差异。ROC曲线分析CORO1A诊断先天性心脏病的敏感性为80.11%、特异性为79.28%。在唇腭裂胎儿母亲外周血外泌体的表达量也明显降低,与正常孕妇组相比存在统计学差异。ROC曲线分析CORO1A诊断神经管畸形的敏感性为71.22%、特异性为77.78%。

[0075] 对于上述动物模型中筛选出的分子标志物(CORO1A和DNM2),利用ELISA方法在神经管畸形、先天性心脏病和唇腭裂胎儿母亲外周血外泌体中验证,如图6-1至6-3和图7-1至7-3所示。

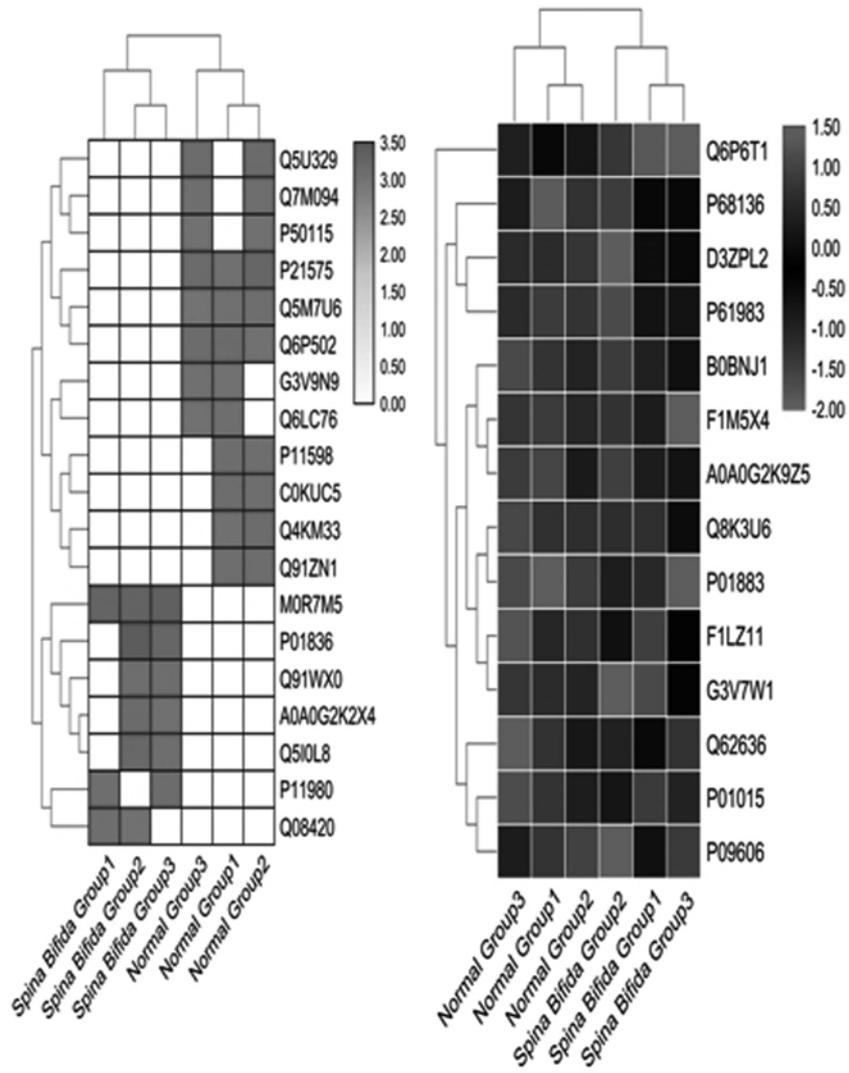


图1

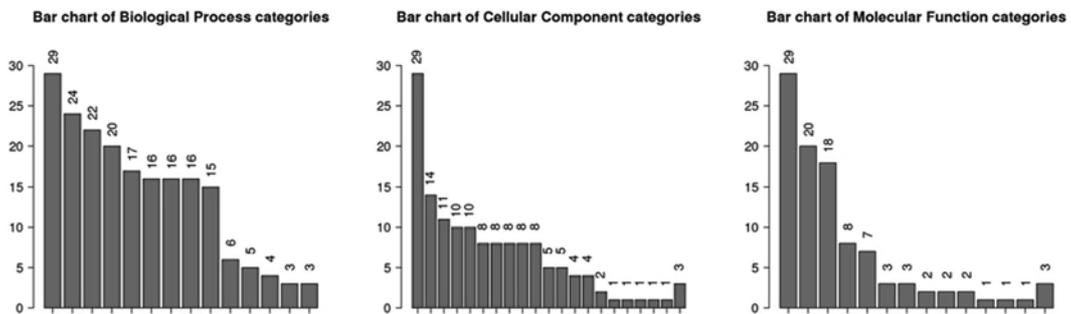


图2

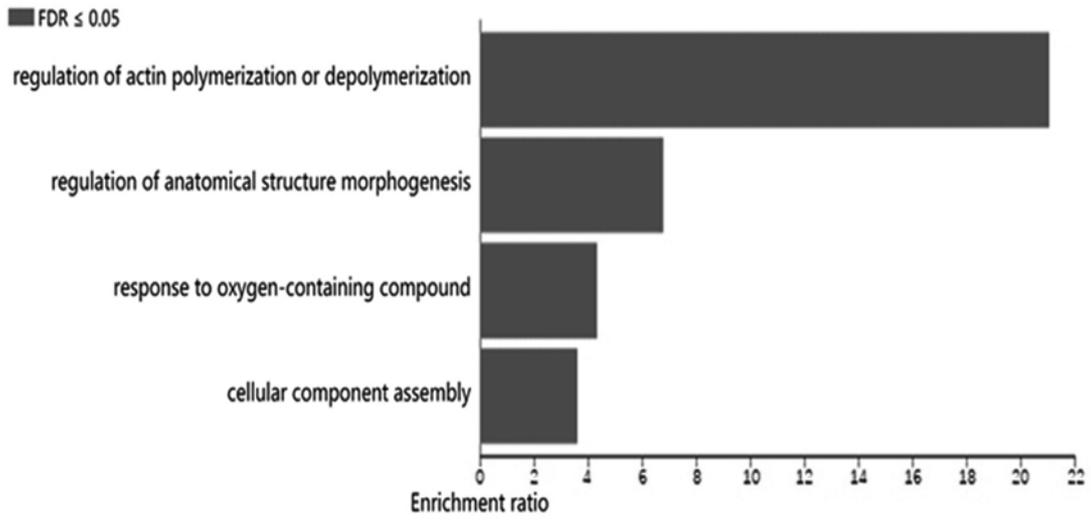


图3

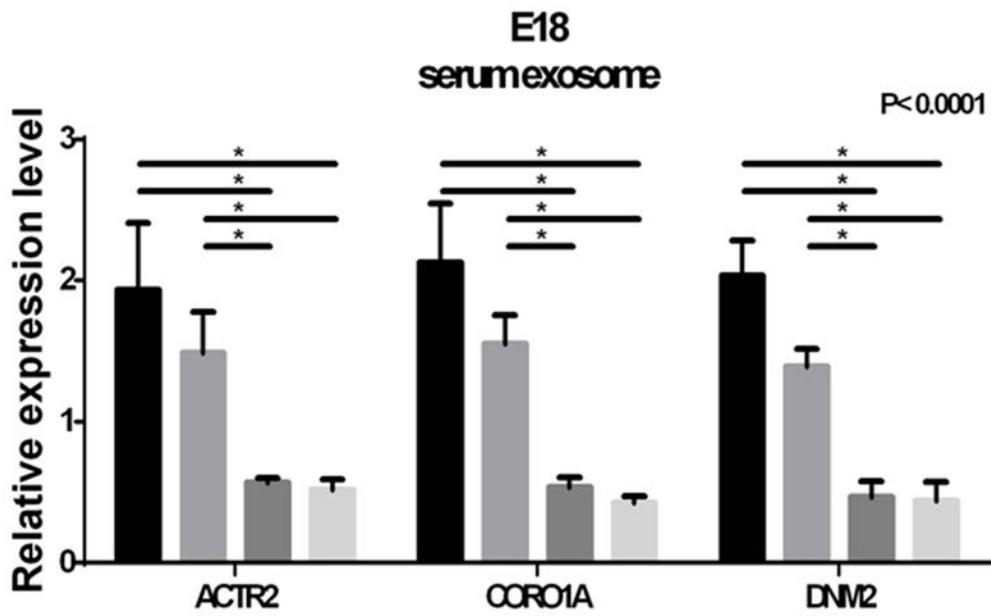


图4-1

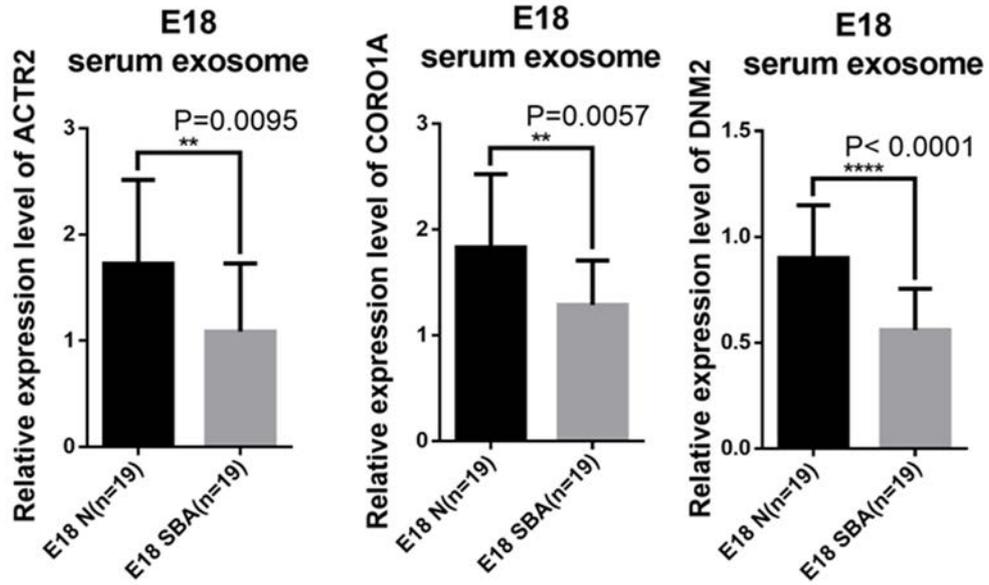


图4-2

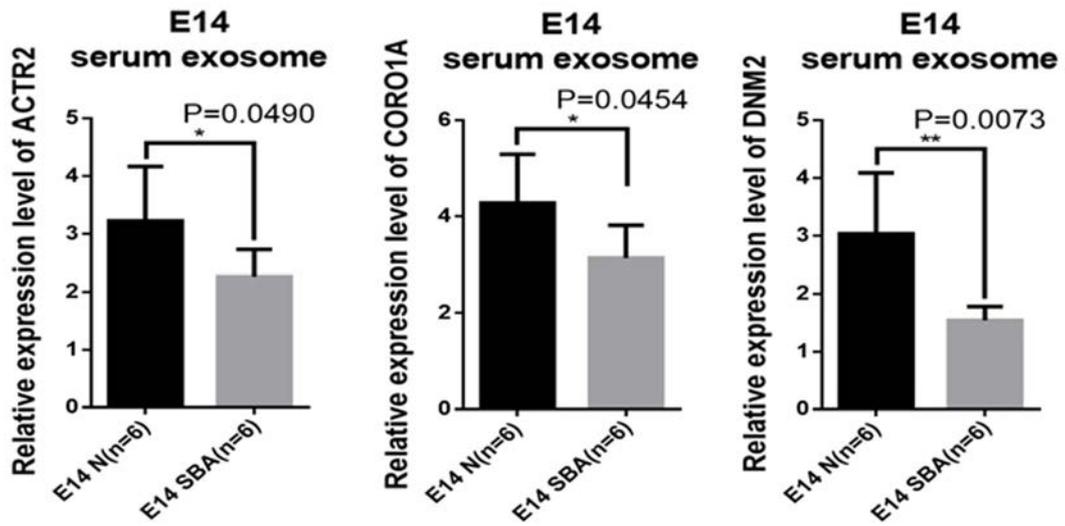


图4-3

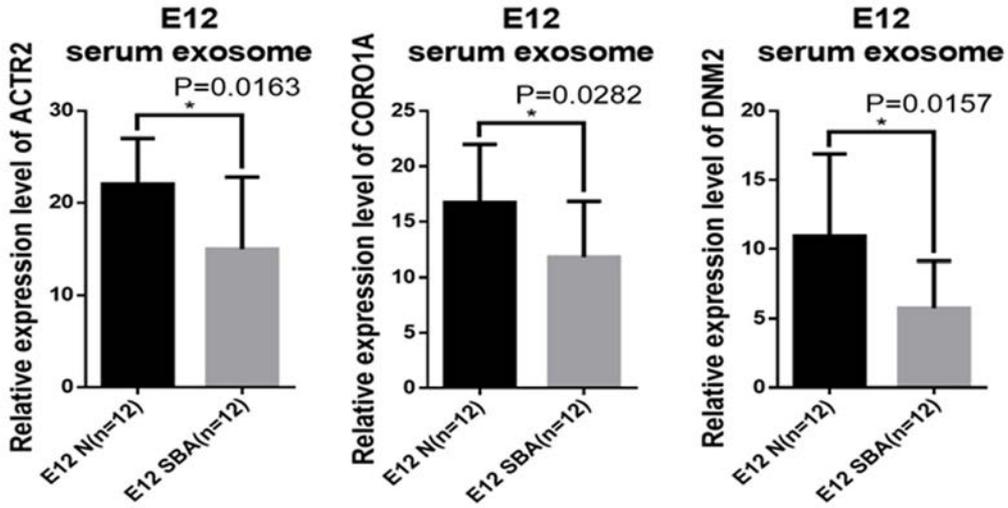


图4-4

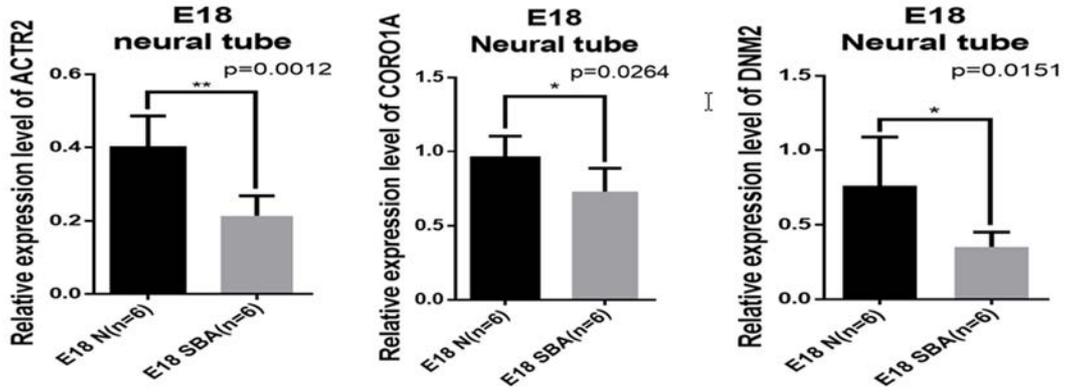


图5-1

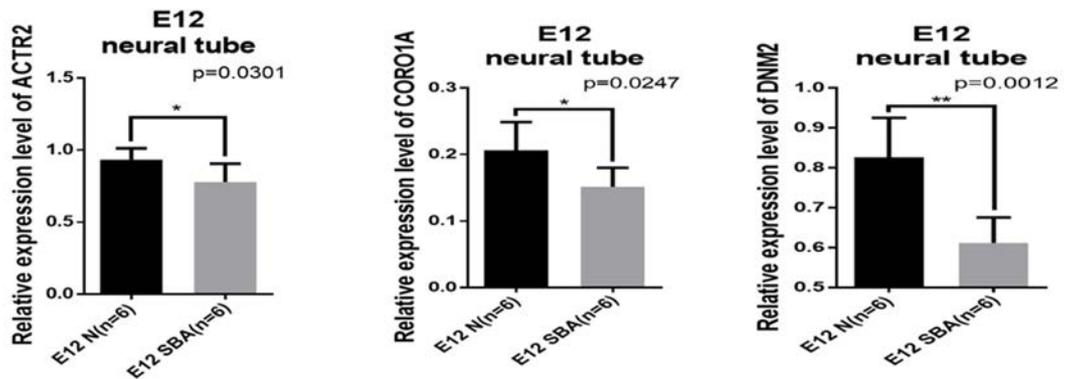


图5-2

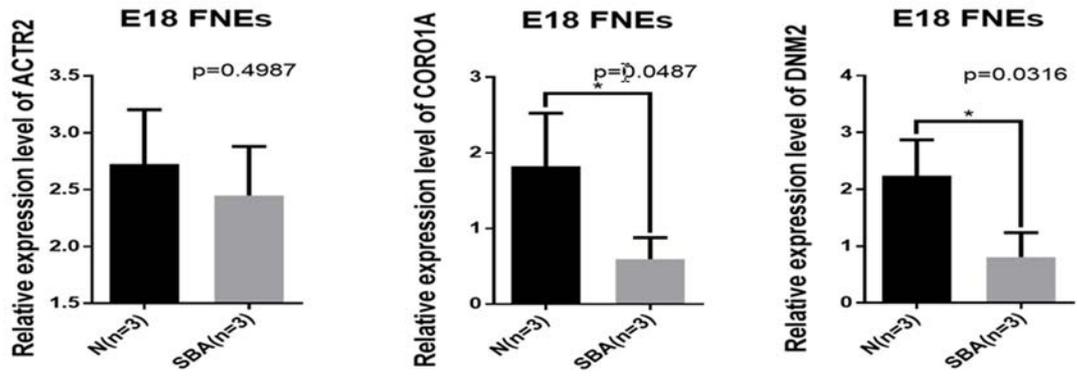


图5-3

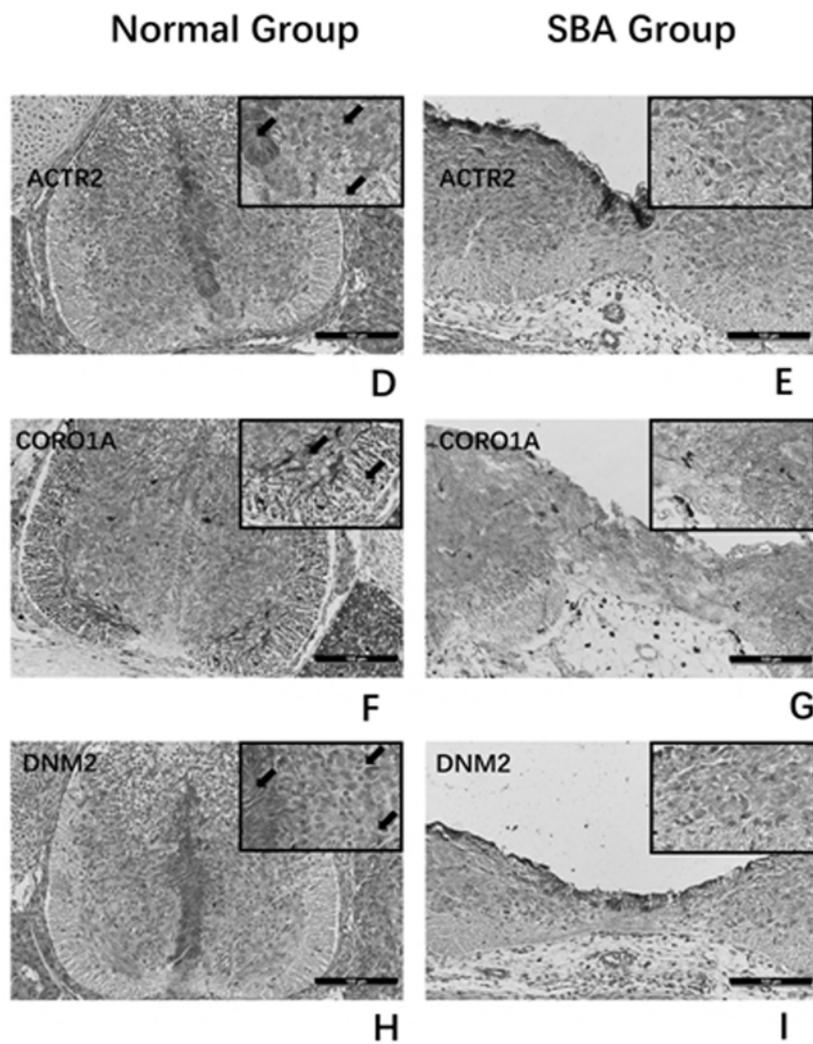


图5-4



图6-1



图6-2



图6-3

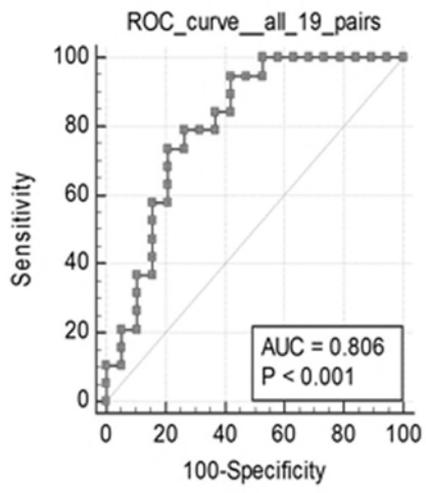
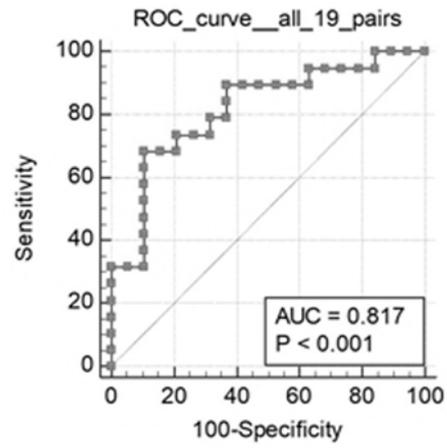


图7-1

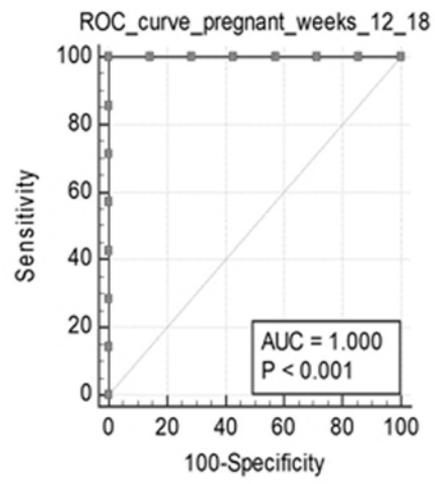
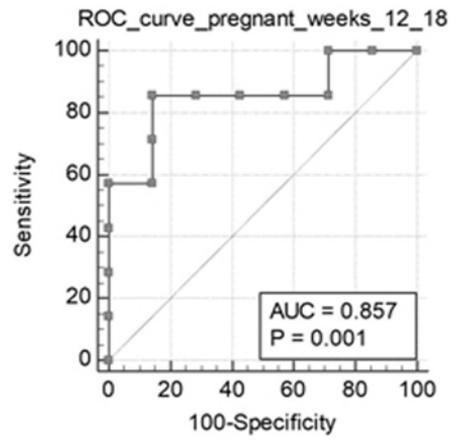


图7-2

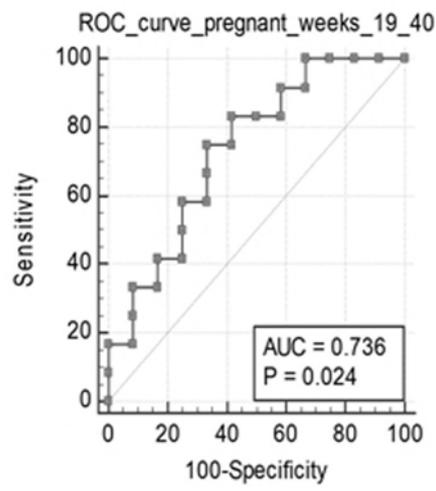
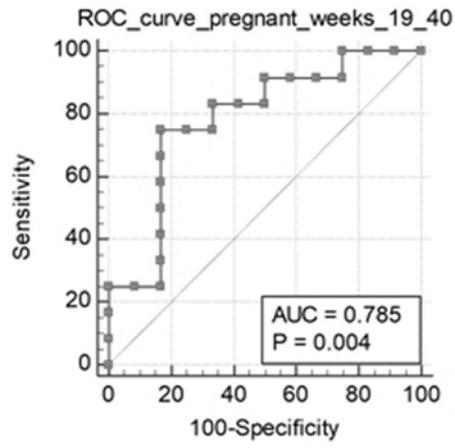


图7-3