



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109182521 B

(45) 授权公告日 2021.06.08

(21) 申请号 201811102016.8

C12N 15/113 (2010.01)

(22) 申请日 2018.09.20

审查员 陶然

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 109182521 A

(43) 申请公布日 2019.01.11

(73) 专利权人 中国医学科学院北京协和医院

地址 100730 北京市东城区王府井帅府园1号

(72) 发明人 郭丹 孙健 龙波 谢秋 赵晓晓 王安琪

(74) 专利代理机构 北京慧尚知识产权代理事务所(特殊普通合伙) 11743

代理人 吉海莲

(51) Int. Cl.

权利要求书1页 说明书10页
序列表4页 附图2页

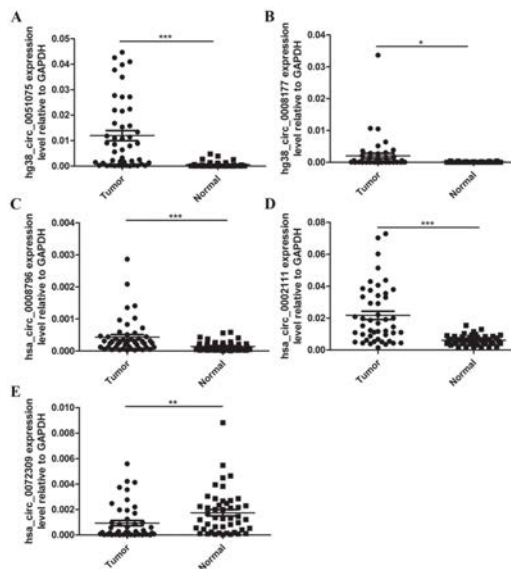
C12Q 1/6886 (2018.01)

(54) 发明名称

circRNA作为甲状腺乳头状癌标志物的应用

(57) 摘要

本发明公开了甲状腺乳头状癌标志物,所述标志物为hg38_circ_0051075、hg38_circ_0008177、hsa_circ_0008796、hsa_circ_0002111和hsa_circ_0072309,并进一步公开了所述标志物在制备甲状腺乳头状癌的诊断、预后、预防或治疗产品中的应用。还公开了用于甲状腺乳头状癌诊断或预后的试剂盒,以及预防和/或治疗甲状腺乳头状癌的药物组合物。利用本发明所述的标志物能够快速有效地对甲状腺乳头状癌进行早期检测,还能为基因治疗、药物治疗等临床应用提供治疗靶点和重要依据。



1. 甲状腺乳头状癌标志物在制备甲状腺乳头状癌的诊断产品中的应用, 其特征在于, 所述甲状腺乳头状癌标志物为hsa_circ_0008796。

2. 检测甲状腺乳头状癌标志物hsa_circ_0008796表达水平的试剂在用于制备甲状腺乳头状癌诊断的试剂盒中的应用, 其特征在于, 所述试剂盒包含特异性扩增hsa_circ_0008796的引物和说明书。

3. 如权利要求2所述的应用, 其特征在于, 所述特异性扩增hsa_circ_0008796基因的引物对为SEQ ID NO:5所示序列的正向引物和SEQ ID NO:6所示序列的反向引物。

circRNA作为甲状腺乳头状癌标志物的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体涉及circRNA作为甲状腺乳头状癌标志物的应用。

背景技术

[0002] 甲状腺乳头状癌(papillary thyroid cancer,PTC)最常见、恶性度也最低,约占甲状腺癌的85%。任何年龄均可发病,多见于儿童或年轻(40岁前)女性。其肿瘤生长缓慢,可在甲状腺内局限数年,病灶可经腺内淋巴管自原发部位扩散至腺体的其他部位和颈部淋巴结,也可局限数年,故易忽视其性质。目前甲状腺乳头状癌的发病率呈逐年增加趋势。虽然PTC与其他恶性肿瘤相比死亡率比较低,但是PTC转移率很高,淋巴结转移率高达30%-50%。如果PTC转移和复发,病人没能及时诊断则丧失最佳手术时机,死亡率会显著升高,是预后不良的重要指标。

[0003] 环状RNA(circRNA)是由线性mRNA前体通过非经典剪接形成的既无5'帽也无3'尾的共价闭环结构。circRNA在进化上保守,在秀丽线虫(*C.elegans*)、斑马鱼、果蝇、小鼠以及人类中circRNA结构稳定且丰度高。circRNA广泛存在于人体细胞中,有时甚至超过其线性异构体的10倍之多。circRNA被确定是主要由外显子或内含子产生的稳定结构,外显子circRNA和内含子circRNA在调控基因表达中皆起作用。最近的研究表明,circRNA可能通过以下几种方式发挥其生物学功能:积极参与pre-mRNA剪接、通过与蛋白结合影响基因表达、参与蛋白翻译等,还有部分circRNA分子因含miRNA应答元件可充当竞争性内源RNA而与miRNA结合,在细胞中起到miRNA海绵的作用,进而解除miRNA对其靶基因的抑制作用,上调靶基因的表达水平。

[0004] 最近几年,circRNA在癌症中所起的作用和功能成为癌症研究领域的新焦点。circRNA的独特特征不断地被揭示和发现,将扩展对癌症的认识,尤其癌症发生和恶性发展方面。文献报道,circRNA的总体特征是种类繁多且数量庞大、分布广泛、较强的进化保守性、组织特异性、极高的稳定性和高丰度表达。circRNA这种独特的优势,使之成为可用于疾病诊断、预后和预测治疗反应的新标志物。

[0005] 研究发现circRNA与肿瘤TNM分型密切相关;除此之外,circRNA能够在外泌体与体液中检测到,即能通过外周血检测circRNA;另外,circRNA的RT-PCR以及原位杂交比蛋白质更敏感和特异。这些都说明了circRNA作为肿瘤的生物标志物很有前景。

[0006] 同时,circRNA通过调控大量信号通路与肿瘤细胞的增殖、凋亡以及转移密切相关,另外还能通过细胞外囊泡(例如外泌体、纳米微粒)进行转运,同时circRNA具有低分子量、较好的稳定性与保守性的特点,因此,circRNA还具有作为治疗肿瘤的药物靶点或载体的潜能。

[0007] 综上所述,通过检测circRNA的甲状腺乳头状癌标志物来尽早诊断和/或治疗甲状腺乳头状,能够解决甲状腺乳头状癌及时诊断和有效治疗方面的问题。

发明内容

[0008] 为了实现甲状腺乳头状癌的早期诊断和干预,本发明的目的在于提供甲状腺乳头状癌标志物在制备甲状腺乳头状癌的诊断、预后、预防或治疗产品中的应用。本发明的研究工作受到中国医学科学院医学与健康科技创新工程的“内分泌肿瘤基础与临床研究”(2017-I2M-1-001)和“疑难性罕见病样本库的深度挖掘与利用”(2017-I2M-2-001)项目经费的支持。

[0009] 在本发明的实施方案中,所述甲状腺乳头状癌标志物为hg38_circ_0051075、hg38_circ_0008177、hsa_circ_0008796、hsa_circ_0002111和hsa_circ_0072309中的一个或多个,其中标志物hg38_circ_0051075、hg38_circ_0008177、hsa_circ_0008796和hsa_circ_0002111在甲状腺乳头状癌患者的甲状腺癌组织或血液中表达上调,以及标志物hsa_circ_0072309在甲状腺乳头状癌患者的甲状腺癌组织或血液中表达下调。

[0010] 本文所用术语“表达上调”指对于特定circRNA序列,其序列量的测量表明,与正常个体相比,在从甲状腺乳头状癌患者或具有患甲状腺乳头状癌风险的个体分离的生物样品如癌组织或血液中,该基因的表达水平增加。反之,“表达下调”指对于特定circRNA序列,其序列量的测量表明,与正常个体相比,在从甲状腺乳头状癌患者或具有患甲状腺乳头状癌风险的个体分离的生物样品如癌组织或血液中,该基因的表达水平降低。

[0011] 为实现上述目的,本发明首先提供用于甲状腺乳头状癌诊断或预后的试剂盒,其包含特异性扩增所述甲状腺乳头状癌标志物hg38_circ_0051075、hg38_circ_0008177、hsa_circ_0008796、hsa_circ_0002111和hsa_circ_0072309中一个或多个的引物和说明书。

[0012] 在本发明中,“预后”是指癌症患者在通过手术、化疗、药物治疗或其组合处理等抑制或缓解肿瘤生长后的过程或结果。预后可以通过手术、化疗、药物治疗或其组合处理抑制或缓解甲状腺乳头状癌生长后1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20年或更久时的生机状态。预后可以通过检测标志物来评估,所述标志物为一个或多个基因。预后评估可以这样进行:根据标志物的有或无,或者升高或降低,确定患者的预后是否良好,或者确定良好预后或不良预后的概率。

[0013] 进一步地,所述特异性扩增hg38_circ_0051075基因的引物对为SEQ ID NO:1所示序列的正向引物和SEQ ID NO:2所示序列的反向引物;所述特异性扩增hg38_circ_0008177基因的引物对为SEQ ID NO:3所示序列的正向引物和SEQ ID NO:4所示序列的反向引物;所述特异性扩增hsa_circ_0008796基因的引物对为SEQ ID NO:5所示序列的正向引物和SEQ ID NO:6所示序列的反向引物;所述特异性扩增hsa_circ_0002111基因的引物对为SEQ ID NO:7所示序列的正向引物和SEQ ID NO:8所示序列的反向引物;所述特异性扩增hsa_circ_0072309基因的引物对为SEQ ID NO:9所示序列的正向引物和SEQ ID NO:10所示序列的反向引物;其中,扩增内参GAPDH的引物对为SEQ ID NO:11所示序列的正向引物和SEQ ID NO:12所示序列的反向引物。

[0014] 所述试剂盒还可以包括PCR反应常用试剂,如逆转录酶、缓冲液、dNTPs、MgCl₂、DEPC水和Taq酶等;还可以含有标准品和/或对照品。

[0015] 本发明一个方面提供了hg38_circ_0051075、hg38_circ_0008177、hsa_circ_0008796和/或hsa_circ_0002111的抑制剂在制备预防和/或治疗甲状腺乳头状癌的药物组

合物中的应用。

[0016] 本发明另一个方面提供了hsa_circ_0072309或其类似物在制备预防和/或治疗甲状腺乳头状癌的药物组合物中的应用。

[0017] 本发明一个方面提供了预防和/或治疗甲状腺乳头状癌的药物组合物,其中所述药物组合物包含hg38_circ_0051075、hg38_circ_0008177、hsa_circ_0008796和/或hsa_circ_0002111的抑制剂,以及药学上可接受的载体。所述circRNA抑制剂为能够分别对应地抑制上述四种circRNA表达的物质,如相应的化学抑制剂或siRNA等。

[0018] 本发明又一个方面提供了预防和/或治疗甲状腺乳头状癌的药物组合物,其中所述药物组合物包含hsa_circ_0072309或具有其生物活性的类似物,以及药学上可接受的载体。

[0019] 在本发明的上述方面中,所述药物组合物还可以包含抑制或治疗甲状腺乳头状癌的其他药剂。

[0020] 有益效果:

[0021] 本发明的circRNA在患者的甲状腺乳头状癌组织和癌旁组织中存在表达差异,因此可以用作甲状腺乳头状癌诊断和预后的标志物。本发明提供的用于检测甲状腺乳头状癌的诊断试剂盒,可用于circRNA相关的甲状腺乳头状癌的诊断和预后,从而为有针对性地预防和/或治疗该疾病提供依据。由于circRNA具有结构稳定、丰度高和组织特异性表达等特征,本发明的circRNA不仅能够用来快速有效地对甲状腺乳头状癌进行早期检测,而且为基因治疗、药物治疗等临床应用提供了治疗靶点和重要依据。

附图说明

[0022] 图1所示为5对甲状腺乳头状癌及癌旁组织样本的高通量测序结果;其中A为差异表达的circRNA的聚类分析图,B为53个差异表达的circRNA在乳癌样本中的整体表达情况,C为差异表达的circRNA在23对染色体上的分布和数量。

[0023] 图2所示为circRNA在47对甲状腺乳头状癌及癌旁组织样本中的qPCR验证;其中A为hg38_circ_0051075的qPCR验证结果;B为hg38_circ_0008177的qPCR验证结果;C为hsa_circ_0008796的qPCR验证结果;D为hsa_circ_0002111的qPCR验证结果;E为hsa_circ_0072309的qPCR验证结果。

具体实施方式

[0024] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。若未特别指明,实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段。

[0025] 实施例

[0026] 实施例1

[0027] 通过高通量测序来筛选在甲状腺乳头状癌组织和癌旁组织中差异表达的circRNA

[0028] 1、取样

[0029] 取自北京协和医院甲状腺切除手术中获得的甲状腺组织标本52对(17位男性,35位女性;平均年龄42岁,年龄范围17-78岁;其中5对样本用于测序,47对样本用于后续的验证),所有标本均经病理学检查证实,诊断为甲状腺乳头状癌。获得的组织均置于盛有

RNAlater溶液的冻存管中并保存于-80℃冰箱。本研究中所用的临床样本,均对患者进行知情告知并经本院伦理委员会通过。

[0030] 2、样本总RNA提取

[0031] 采用 **TRIzol®** Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 进行样本RNA提取, 实验操作按产品说明书进行, 具体操作如下:

[0032] 收集样本后冻存于-80℃冰箱, 待RNAlater解冻后取出组织并分割成绿豆大小状, 取大约30mg置于预先盛有1ml TRIzol的EP管中, 利用IKA组织研磨仪研磨(全程无菌、低温操作), 待组织样本研磨至不见颗粒状后, 按以下步骤操作:

[0033] ①室温静置10分钟;

[0034] ②加氯仿0.2mL, 用力振荡离心管, 充分混匀, 室温静置3分钟;

[0035] ③4℃、12000rpm离心15分钟后, 吸取上层水相到另一新的离心管中, 注意不要吸到两层水相之间的蛋白物质。移入新管, 加入等体积的异丙醇, 充分颠倒混匀, 室温静置10分钟;

[0036] ④4℃、12000rpm离心15分钟后小心弃掉上清液, 加入1ml 75%乙醇洗涤沉淀, 振荡混合后于4℃下7500g离心5分钟;

[0037] ⑤弃去乙醇液体, 室温下放置10分钟以充分晾干沉淀, 加入DEPC水溶解沉淀;

[0038] ⑥用NanoDrop One分光光度计测量RNA浓度及纯度, 冻存于-80℃。RNA-seq测序的样品要求: OD260/OD280为1.8-2.2。

[0039] 3、高通量测序

[0040] 每个RNA样品输入5μg。首先利用Epicentre Ribo-zero™ rRNA Removal试剂盒 (Epicentre, USA) 将以上步骤提取的总RNA去除rRNA, 再利用RNAase R (Epicentre, USA) 进行消化, 随后利用 **NEBNext® Ultra™** Directional RNA Library Prep试剂盒 (NEB, USA) 按照说明书的指导来制备测序文库, 并在每个样品的属性序列中加入索引编码。将测序文库在NEBNext的第一链合成反应缓冲液 (First Strand Synthesis Reaction Buffer, 5×) 中利用二价阳离子进行高温下裂解。利用随机引物 (random hexamer primer) 和M-MuLV反转录酶合成第一链cDNA。随后用DNA聚合酶I和RNase H进行第二链cDNA合成, 反应缓冲液用dUTP代替dNTPS中的dTTP。再用聚合酶和外切核酸酶把cDNA片段转换成平末端。将DNA片段3'端磷酸化之后, 与带有发夹结构的NEBNext Adaptor连接以备杂交。为了选择长度约为150~200bp的cDNA片段, 用ApHealthXP系统 (Beckman Coulter, Beverly, USA) 对文库片段进行纯化。然后用3μL的USER Enzyme (NEB, USA) 进行大小选择, 在37℃下连接cDNA进行15分钟, 再在95℃下进行5分钟。使用Phusion高保真DNA聚合酶进行PCR。最后, 利用AMPure XP系统进行文库纯化, 再用Agilent Bioanalyzer 2100系统进行质量评估。根据说明书指导, 在cBot Cluster Generation系统上使用HiSeq PE Cluster Kit v4-cBot试剂盒 (Illumina) 进行索引编码样本的聚类, 再通过Illumina HiSeq 2500平台进行高通量测序, 获得125bp双端测序读取 (reads) 之后, 在参考有关物种的参考序列或基因组的情况下, 进行生物信息分析。

[0041] 4、检测数据分析

[0042] 4.1对读取 (reads) 的质量控制

[0043] 将以上步骤中获得的Fastq形式的数据, 首先通过原始数据 (raw data) 内部脚本

编程,去掉带接头的读取、包含多聚N的读取以及低质量的读取,得到干净数据(clean data)。同时,计算干净数据的Q20、Q30和GC含量。所有的后续分析都基于高质量的干净数据。

[0044] 4.2将读取(reads)与参考基因进行比对

[0045] 基因组和基因组模型注释文件直接从基因组站点下载。参考基因组索引通过Bowtie v2.0.6进行构建,双端的干净读取(clean reads)通过TopHat v2.0.9与参考基因组匹配。

[0046] 4.3circRNA的鉴定

[0047] 使用find_circ(Memczak et al.,2013)鉴定circRNA。find_circ的基本原理是,从没有比对到参考序列的读取的两端各提取20nt的锚定(anchor)序列,将每一对锚定序列再次与参考序列进行比对,如果锚定序列的5'端比对到参考序列(起始与终止位点分别记为A3、A4),同时该锚定序列的3'端比对到此位点的上游(起始与终止位点分别记为A1、A2),并且在参考序列的A2到A3之间存在剪接位点(GU/AG),则将此读取作为候选circRNA。最后将读取数(read count)大于等于2的候选circRNA作为鉴定的circRNA。

[0048] 4.4miRNA结合位点的预测

[0049] 在植物和动物样本中,分别利用psRobot_tar(Wu et al,2012)和miRanda(Enright et al,2013)预测circRNA与miRNA的结合位点。

[0050] 4.5circRNA表达水平的分析

[0051] 对各样本中已知和新的circRNA进行表达量的统计,并用TPM(Zhou et al.,2010)进行表达量归一化处理,获得样本的读取数。均一化表达=(比对的读取)/(总的读取)*1000000。

[0052] 4.6circRNA差异表达分析和判断

[0053] circRNA差异表达的输入数据为circRNA表达水平分析中得到的读取数(readcount)数据。对于有生物学重复的样品,我们采用基于负二项分布的DESeq2(version 1.6.3)(Love et al.,2014)进行分析,P值通过Benjamini&Hochberg方法进行调整,差异表达的P值阈值为0.05;对于无生物学重复的样品,先采用TMM对readcount数据进行标准化处理,之后用DEGseq(version 1.20.0)(Wang et al.,2010)进行差异分析,P值经过q值(Storey et al,2003)矫正,q值<0.01并且 $|\log_2(\text{foldchange})|>1$ 则认为是有差异的。

[0054] 4.7差异表达circRNA的进一步分析和筛选

[0055] 为了更好的理解差异表达基因的功能,我们利用G0seq(version 1.18.0)和KOBAS(Mao et al.,2005)对差异表达基因进行了基因本体论(Gene Ontology,GO)分析、信号通路(KEGG)分析,并对差异表达基因进行功能注释。具体分析如图1所示,其中A为差异表达的circRNA的聚类分析图,B为53个差异表达的circRNA在乳癌样本中的整体表达情况,C为差异表达的circRNA在23对染色体上的分布和数量。

[0056] 鉴于以上数据分析的结果,并结合文献我们筛选了差异表达的hg38_circ_0051075、hg38_circ_0008177、hsa_circ_0008796、hsa_circ_0002111和hsa_circ_0072309用于本申请的研究。其中,前4个circRNA在甲状腺乳头状癌患者的甲状腺癌组织样本中表达上调,最后一个circRNA在甲状腺乳头状癌患者的甲状腺癌组织样本中表达下调。

[0057] 实施例2

[0058] 通过RT-PCR来验证hg38_circ_0051075、hg38_circ_0008177、hsa_circ_0008796、hsa_circ_0002111和hsa_circ_0072309的表达情况

[0059] 1、逆转录合成cDNA

[0060] 采用M-MLV逆转录酶 (promega, 货号1701)、dNTP混合物 (dNTPmix) (promega, 货号U1511)、随机引物 (promega, 货号C1181)、RNA酶抑制剂 (promega, 货号N251B) 进行cDNA反转录, 实验操作按产品说明书进行, 具体操作如下:

[0061] 先将1 μ g实施例1中所提取的总RNA与1 μ L随机引物混合, 70 $^{\circ}$ C、10min; 随后将逆转录缓冲液、dNTP、逆转录酶抑制剂、M-MLV加入至25 μ L反应体系, 进行逆转录合成cDNA, 将获得的cDNA样品稀释4倍, 然后保存在-20 $^{\circ}$ C冰箱备用。

[0062] 2、Real-Time PCR

[0063] 2.1仪器及分析方法

[0064] 用ABI 7500型荧光定量PCR仪, 采用2- $\Delta\Delta$ Ct法进行数据相对定量分析。

[0065] 2.2引物设计

[0066] 采用在线引物设计软件, 基因序列参照北京诺禾致源科技股份有限公司给出的序列: hg38_circ_0051075、hg38_circ_0008177、hsa_circ_0008796、hsa_circ_0002111、hsa_circ_0072309, 内参选GAPDH, 引物设计后由invitrogen公司合成。具体引物序列如下:

[0067] 表1引物序列

基因	编号	序列	扩增长度
hg38_circ_0051075	正向引物	CACAATCAACACCCACCTCC (SEQ ID NO:1)	268bp (SEQ ID NO:13)
	反向引物	TATCATCGCCACGCCAGTA (SEQ ID NO:2)	
hg38_circ_0008177	正向引物	CCAAAGACCGTGAGGAAAG (SEQ ID NO:3)	145bp (SEQ ID NO:14)
	反向引物	GAGGTAGGTGGCAGCAAG (SEQ ID NO:4)	
hsa_circ_0008796	正向引物	TCAGTAGAGGAAGTGGCAGGA (SEQ ID NO:5)	142bp (SEQ ID NO:15)
	反向引物	GCTGTTGAATCAGAATGAGGCT TA (SEQ ID NO:6)	

[0069]	hsa_circ_0002111	正向引物	CTGTCAGGAGTTCATTGCAAAT C (SEQ ID NO:7)	177bp (SEQ ID NO:16)
		反向引物	TGCTGCTGGTACCATTACTGAG (SEQ ID NO:8)	
[0069]	hsa_circ_0072309	正向引物	CTGCTGATTTCTCAACCTC (SEQ ID NO:9)	203bp (SEQ ID NO:17)
		反向引物	CTTTTATTGTCCACCATCC (SEQ ID NO:10)	
[0069]	GAPDH	正向引物	AACGTGTCAGTGGTGGACCTG (SEQ ID NO:11)	135bp
		反向引物	GAGACCACCTGGTGCTCAGTG (SEQ ID NO:12)	

[0070] 操作过程如下:

[0071] 表2Real-Time PCR反应体系

组分	加入量
2×mix	5μL
上游引物 (1.67μM)	1μL
下游引物 (1.67μM)	1μL
模板	2μL
加入灭菌蒸馏水	至10μL

[0073] 用 **Fast SYBR®** Green Master Mix (ThermoFisher, 货号4385612) 分别对目的基因引物和内参基因引物进行扩增。实验操作按产品说明书进行。扩增程序为:95°C 5min, (95°C 15sec, 60°C 30sec, 72°C 35sec) × 40个循环。同时在60-95°C进行溶解曲线分析。反应结束后,取5μl的PCR产物进行2%琼脂糖电泳,将符合目的片段大小条带的circRNA再次扩增并测序,结果用blast软件进行序列比对。

[0074] 3、实验结果

[0075] 实时定量PCR (qRT-PCR) 扩增曲线拐点清楚,扩增曲线整体平行性好,表明各反应管的扩增效率相近;基线平而无上扬现象,曲线指数期斜率较大,说明扩增效率较高;样本扩增产物溶解曲线都是单峰,说明扩增产物只有一条,为特异性扩增;根据qRT-PCR的相对定量公式: $2^{-\Delta\Delta Ct} \times 100\%$,比较hg38_circ_0051075、hg38_circ_0008177、hsa_circ_0008796、hsa_circ_0002111和hsa_circ_0072309在甲状腺乳头状癌组织和癌旁组织中的表达水平,前四个circRNA在甲状腺乳头状癌组织中表达升高,最后一个circRNA在甲状腺乳头状癌组织中表达降低,分别如图2中A至E所示,与实施例1中的高通量测序结果一致。

[0076] RT-PCR产物经回收后,在ABI3730全自动测序仪上测序,在以上表1所列的扩增片段中,268bp片段的核苷酸序列如SEQ ID NO.13所示,145bp片段的核苷酸序列如SEQ ID

NO.14所示,142bp片段的核苷酸序列如SEQID NO.15所示,177bp片段的核苷酸序列如SEQ ID NO.16所示,203bp片段的核苷酸序列如SEQ ID NO.17所示。用Vector NTI advance 10软件(Invitrogen公司)将以上序列SEQ ID NOs.13-17分别与相应的hg38_circ_0051075、hg38_circ_0008177、hsa_circ_0008796、hsa_circ_0002111和hsa_circ_0072309基因的整个DNA序列进行比对,比对结果显示,如SEQID NOs.13-17所示的核苷酸序列分别为其对应的完整circRNA基因序列的一部分,符合率为100%。

[0077] 实施例3

[0078] 基于上述实施例2的表1中所列用于RT-PCR的引物序列,分别组装用于检测甲状腺乳头状癌的试剂盒,该试剂盒包括以下5组引物对中的一组或多组:

[0079] a.特异性扩增hg38_circ_0051075基因的引物对:SEQ ID NO:1所示序列的正向引物和SEQ ID NO:2所示序列的反向引物;

[0080] b.特异性扩增hg38_circ_0008177基因的引物对:SEQ ID NO:3所示序列的正向引物和SEQ ID NO:4所示序列的反向引物;

[0081] c.特异性扩增hsa_circ_0008796基因的引物对:SEQ ID NO:5所示序列的正向引物和SEQ ID NO:6所示序列的反向引物;

[0082] d.特异性扩增hsa_circ_0002111基因的引物对:SEQ ID NO:7所示序列的正向引物和SEQ ID NO:8所示序列的反向引物;

[0083] e.特异性扩增hsa_circ_0072309基因的引物对:SEQ ID NO:9所示序列的正向引物和SEQ ID NO:10所示序列的反向引物。

[0084] 具体地,例如以下试剂盒:

[0085] 1、试剂盒一包括特异性扩增hg38_circ_0051075基因的引物对:SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2;

[0086] 2、试剂盒二包括特异性扩增hg38_circ_0008177基因的引物对:SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4;

[0087] 3、试剂盒三包括特异性扩增hsa_circ_0008796基因的引物对:SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6;

[0088] 4、试剂盒四包括特异性扩增hsa_circ_0002111基因的引物对:SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8;

[0089] 5、试剂盒五包括特异性扩增hsa_circ_0072309基因的引物对:SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10。

[0090] 6、试剂盒六包括特异性扩增hg38_circ_0051075基因的引物对:SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2,以及特异性扩增hg38_circ_0008177基因的引物对:SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4

[0091] 7、试剂盒七包括特异性扩增hg38_circ_0008177基因的引物对:SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4,以及特异性扩增hsa_circ_0008796基因的引物对:SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6;

[0092] 8、试剂盒八包括hg38_circ_0051075基因的引物对:SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2,以及特异性扩增hsa_circ_0008796基因的引物对:SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6;

[0093] 9、试剂盒九包括特异性扩增hsa_circ_0008796基因的引物对:SEQ ID NO:5和SEQ

ID NO:6,以及特异性扩增hsa_circ_0002111基因的引物对:SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8;

[0094] 10、试剂盒十包括特异性扩增hsa_circ_0002111基因的引物对:SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8,以及特异性扩增hsa_circ_0072309基因的引物对:SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10。

[0095] 11、试剂盒十一包括特异性扩增hg38_circ_0051075基因的引物对:SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2,特异性扩增hg38_circ_0008177基因的引物对:SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4,以及特异性扩增hsa_circ_0008796基因的引物对:SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6;

[0096] 12、试剂盒十二包括特异性扩增hg38_circ_0008177基因的引物对:SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4,hsa_circ_0008796基因的引物对:SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6以及hsa_circ_0002111基因的引物对:SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8;

[0097] 13、试剂盒十三包括特异性扩增hg38_circ_0051075基因的引物对:SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2,特异性扩增hsa_circ_0008796基因的引物对:SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6,以及特异性扩增hsa_circ_0002111基因的引物对:SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8;

[0098] 14、试剂盒十四包括特异性扩增hg38_circ_0051075基因的引物对:SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2,特异性扩增hg38_circ_0008177基因的引物对:SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4,特异性扩增hsa_circ_0008796基因的引物对:SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6,以及特异性扩增hsa_circ_0002111基因的引物对:SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8;

[0099] 15、试剂盒十五包括特异性扩增hg38_circ_0051075基因的引物对:SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2,特异性扩增hg38_circ_0008177基因的引物对:SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4,特异性扩增hsa_circ_0008796基因的引物对:SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6,以及特异性扩增hsa_circ_0002111基因的引物对:SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8,特异性扩增hg38_circ_0051075基因的引物对:SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2,特异性扩增hg38_circ_0008177基因的引物对:SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4,特异性扩增hsa_circ_0008796基因的引物对:SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6,特异性扩增hsa_circ_0002111基因的引物对:SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8,以及特异性扩增hsa_circ_0072309基因的引物对:SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10。

[0100] 另外,该试剂盒还包括特异扩增内参基因(GAPDH)的引物对:SEQ ID NO:11所示序列的正向引物和SEQ ID NO:12所示序列的反向引物;以及SYBR Green聚合酶链式反应体系,如PCR缓冲液、SYBR Green荧光染料、dNTPs。所述PCR缓冲液的成分为25mM KCl,2.5mM MgCl₂,200mM (NH₄)₂SO₄。通过对引物浓度和退火温度的优化,最终确定反应体系如表3所示:

[0101] 表3PCR反应体系

[0102]

组分	加入量
SYBR Green聚合酶链式反应体系	12.5μL
正向引物(10μM)	0.5μL
反向引物(10μM)	0.5μL
模板cDNA	2.0μL
加入灭菌蒸馏水	至25μL

[0103] 最佳反应条件为:95℃预变性5min,(95℃变性15sec,60℃退火45sec,72℃延伸35sec)×40个循环,72℃延伸15min。

[0104] 为方便使用,试剂盒还可包含对照:上述5种circRNA基因中一种或多种的正常

cDNA样本。

[0105] 取受检者生物学样本,使用常规方法(或使用特定的试剂盒)从生物学样本中提取RNA,使用所述试剂盒中试剂,按照最佳反应体系与条件进行PCR反应,使用试剂盒中正常cDNA作为Real-Time PCR定量检测中的对照cDNA,测量受检者生物学样本中hg38_circ_0051075、hg38_circ_0008177、hsa_circ_0008796、hsa_circ_0002111和/或hsa_circ_0072309基因的表达量相对正常cDNA的表达量变化。

[0106] 受检者可以为未经甲状腺乳头状癌诊断的个体,检测结果可以用于对该个体进行患甲状腺乳头状癌可能性的风险评估或疾病诊断和自然预后。

[0107] 受检者可以为经甲状腺乳头状癌治疗的个体,检测结果可以用于对该个体进行甲状腺乳头状癌治疗的疗效评估和治疗预后。

[0108] 本发明的试剂盒通过最精简和具有特异性的引物对来检测circRNA基因的表达情况,稳定而且精确,检测也方便,大大提高了诊断甲状腺乳头状癌的敏感性和特异性,因此将此试剂盒投入实践,可以帮助指导早期诊断和更有效的个体化治疗。

[0109] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 中国医学科学院北京协和医院
- [0003] <120> circRNA作为甲状腺乳头状癌标志物的应用
- [0004] <130> P18077
- [0005] <160> 17
- [0006] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 20
- [0009] <212> DNA
- [0010] <213> 人工序列(Artificial sequence)
- [0011] <400> 1
- [0012] cacaatcaac acccacctcc 20
- [0013] <210> 2
- [0014] <211> 19
- [0015] <212> DNA
- [0016] <213> 人工序列(Artificial sequence)
- [0017] <400> 2
- [0018] tatcatcgcc acgccagta 19
- [0019] <210> 3
- [0020] <211> 19
- [0021] <212> DNA
- [0022] <213> 人工序列(Artificial sequence)
- [0023] <400> 3
- [0024] ccaaagaccg tgaggaaag 19
- [0025] <210> 4
- [0026] <211> 19
- [0027] <212> DNA
- [0028] <213> 人工序列(Artificial sequence)
- [0029] <400> 4
- [0030] gaggtaggtg ggcagcaag 19
- [0031] <210> 5
- [0032] <211> 21
- [0033] <212> DNA
- [0034] <213> 人工序列(Artificial sequence)
- [0035] <400> 5
- [0036] tcagtagagg aagtggcagg a 21
- [0037] <210> 6
- [0038] <211> 24

- [0039] <212> DNA
[0040] <213> 人工序列(Artificial sequence)
[0041] <400> 6
[0042] gctgttgaat cagaatgagg ctta 24
[0043] <210> 7
[0044] <211> 23
[0045] <212> DNA
[0046] <213> 人工序列(Artificial sequence)
[0047] <400> 7
[0048] ctgtcaggag ttcattgcaa atc 23
[0049] <210> 8
[0050] <211> 22
[0051] <212> DNA
[0052] <213> 人工序列(Artificial sequence)
[0053] <400> 8
[0054] tgctgctggt accattactg ag 22
[0055] <210> 9
[0056] <211> 19
[0057] <212> DNA
[0058] <213> 人工序列(Artificial sequence)
[0059] <400> 9
[0060] ctgctgattt ctcaacctc 19
[0061] <210> 10
[0062] <211> 19
[0063] <212> DNA
[0064] <213> 人工序列(Artificial sequence)
[0065] <400> 10
[0066] cttttattgt ccaccatcc 19
[0067] <210> 11
[0068] <211> 21
[0069] <212> DNA
[0070] <213> 人工序列(Artificial sequence)
[0071] <400> 11
[0072] aacgtgtcag tgggtggacct g 21
[0073] <210> 12
[0074] <211> 21
[0075] <212> DNA
[0076] <213> 人工序列(Artificial sequence)
[0077] <400> 12

[0078] gagaccacct ggtgctcagt g 21
[0079] <210> 13
[0080] <211> 268
[0081] <212> DNA
[0082] <213> 智人(Homo sapiens)
[0083] <400> 13
[0084] cacaatcaac acccacctcc gggaaactct ccctaaaatc ccctatgtga aggccattga 60
[0085] catgtacctg atggggtgct ttgtcttcgt tttcatggcc cttctggaat atgccctagt 120
[0086] caactacatc ttctttggga gggggcccca acgccaaaag aaagcagctg agaaggctgc 180
[0087] cagtgccaac aatgagaaga tgcgcctgga tgtcaacaag atggatacac aactgatgac 240
[0088] attgagtttt actggcgtgg cgatgata 268
[0089] <210> 14
[0090] <211> 145
[0091] <212> DNA
[0092] <213> 智人(Homo sapiens)
[0093] <400> 14
[0094] ccaaagaccg tgaggaaagg agacgtgctg acttttctctg tttccatctc cagaaattcc 60
[0095] actgaagatc gcttcacgtt gaggtagcga aggtcgaggg atccttgaga gcatccagag 120
[0096] gttttccttg ctgcccacct acctc 145
[0097] <210> 15
[0098] <211> 142
[0099] <212> DNA
[0100] <213> 智人(Homo sapiens)
[0101] <400> 15
[0102] tcagtagagg aagtggcagg aatttgggaa tgaggagcac agtgattaaa ctggggccat 60
[0103] tcatatgaga gtttaagaac tcagaccagt gacttagtgt cccttttgat gagaagaata 120
[0104] agcctcattc tgattcaaca gc 142
[0105] <210> 16
[0106] <211> 177
[0107] <212> DNA
[0108] <213> 智人(Homo sapiens)
[0109] <400> 16
[0110] ctgtcaggag ttcattgcaa atctgcaagg ggtaaagag ggtgttgatt tctccaagga 60
[0111] tctgctgaaa caatgctggg gtgaaaacaa cacggctaga agctcattct gaaatgggga 120
[0112] gcaactgaaat tttggaaaag gagaccccag aaaatctcag taatggtacc agcagca 177
[0113] <210> 17
[0114] <211> 203
[0115] <212> DNA
[0116] <213> 智人(Homo sapiens)

[0117] <400> 17
[0118] ctgctgattt ctcaacctct acattatacc taaagtggaa cgacaggggt tcagtttttc 60
[0119] cacaccgctc aaatggtatc tgggaaatta aagttctacg taaagagagt atggagctcg 120
[0120] taaaattaga ctgactgcat tgcacagatg atggatattt acgtatgttt gaaacgacca 180
[0121] tcctggatgg tggacaataa aag 203

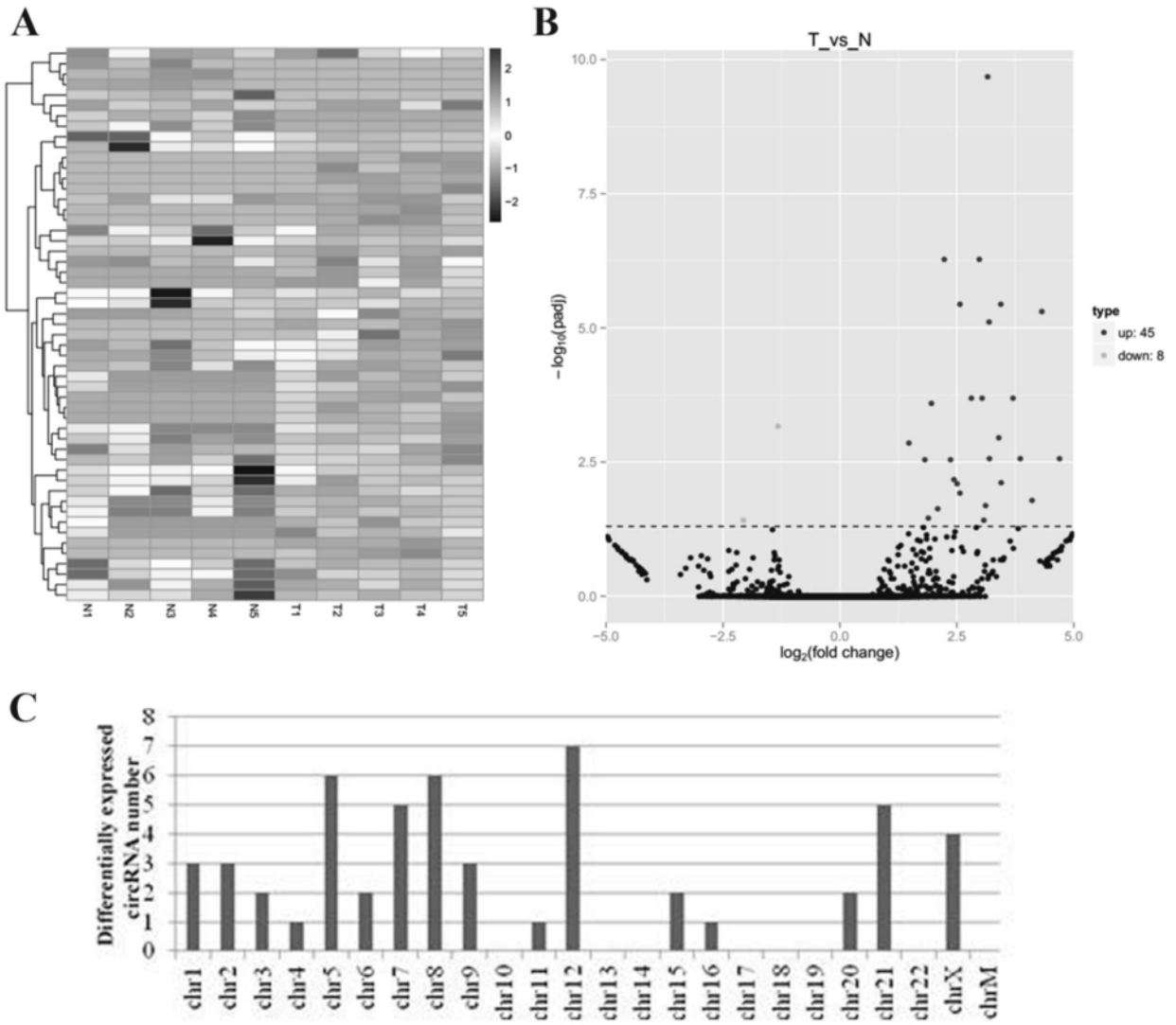


图1

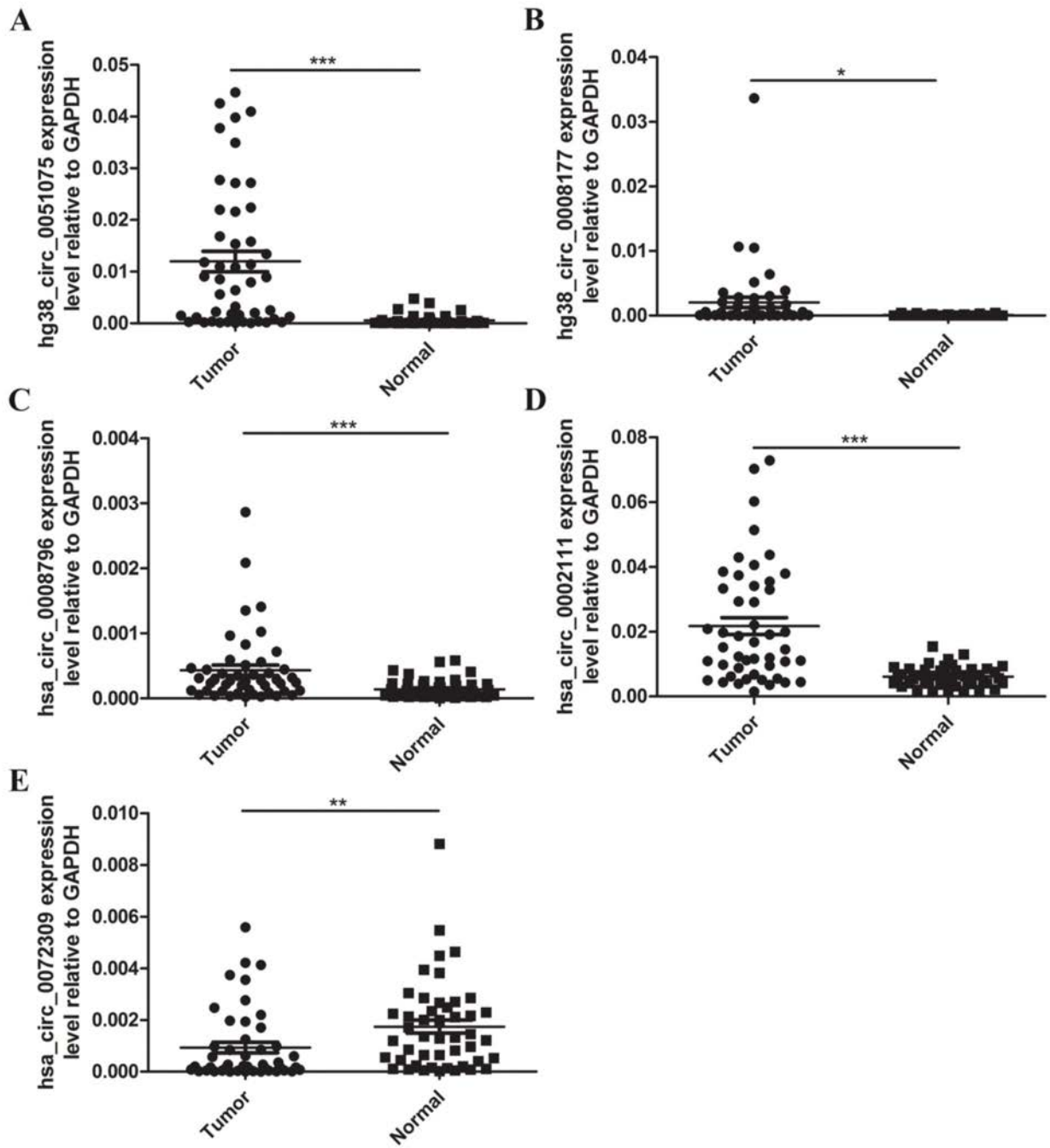


图2