



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115058512 A

(43) 申请公布日 2022.09.16

(21) 申请号 202210912577.4 *G16B 25/20* (2019.01)

(22) 申请日 2022.07.30 *G16B 40/00* (2019.01)

(71) 申请人 山西省心血管病医院 (山西省心血管病研究所) *G16B 35/20* (2019.01)

地址 030024 山西省太原市漪汾街18号 *G16B 20/30* (2019.01)

(72) 发明人 王玉峰 蒯东

(74) 专利代理机构 北京预立生科知识产权代理有限公司 11736

专利代理师 朱萍

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6883 (2018.01)

G01N 33/68 (2006.01)

A61K 45/00 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

G16B 25/10 (2019.01)

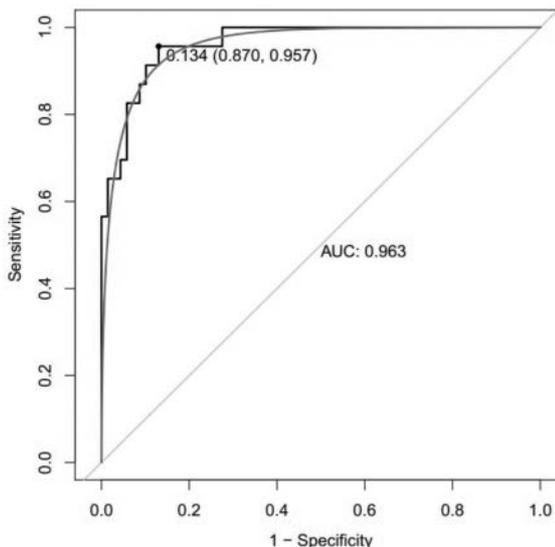
权利要求书1页 说明书11页 附图7页

(54) 发明名称

铁死亡相关基因在鉴定缺血性脑卒中的应用

(57) 摘要

本发明公开了铁死亡相关基因在鉴定缺血性脑卒中的应用,所述铁死亡相关基因为SLC40A1、SLC2A3、ACSL4,本发明经验证发现,所述SLC40A1、SLC2A3和ACSL4三者联合可用于缺血性脑卒中的早期诊断中,且具有较高的准确性、敏感性和特异性,本发明提供的用于缺血性脑卒中早期诊断的方法简便、客观、受人为主观影响小,相比于传统的诊断方法而言,具有更高的准确性、敏感性和特异性,可用于缺血性脑卒中早期准确有效的筛查和诊断中。



1. 检测铁死亡相关标志基因表达水平的试剂在制备用于早期诊断缺血性脑卒中的产品中的应用,其特征在于,所述铁死亡相关标志基因为SLC40A1、SLC2A3、ACSL4中的任意一种或多种;

优选地,所述铁死亡相关标志基因为SLC40A1、SLC2A3、ACSL4三者联合。

2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在於,所述试剂包括采用核酸杂交技术、核酸测序技术、数字成像技术、蛋白免疫技术、染料技术、色谱技术、质谱技术检测样本中所述铁死亡相关标志基因表达水平的试剂。

3. 根据权利要求2所述的应用,其特征在於,所述试剂包括与所述铁死亡相关标志基因的序列特异性结合的引物、与所述铁死亡相关标志基因的序列特异性互补的探针、对所述铁死亡相关标志基因的表位具有特异性的抗体、和/或对所述铁死亡相关标志基因具有特异性的染料。

4. 根据权利要求2所述的应用,其特征在於,所述样本为受试者来源的外周血样本。

5. 一种用于早期诊断缺血性脑卒中的产品,其特征在於,所述产品包括检测样本中铁死亡相关标志基因表达水平的试剂;

所述铁死亡相关标志基因为权利要求1中所述的铁死亡相关标志基因。

6. 根据权利要求5所述的产品,其特征在於,所述产品包括检测试剂盒、芯片、试纸。

7. 根据权利要求6所述的产品,其特征在於,所述检测试剂盒中包括检测所述铁死亡相关标志基因的引物和/或探针;

所述检测试剂盒还包括检测内参基因的试剂;

所述检测内参基因的试剂包括针对内参基因的引物和/或探针;

所述检测试剂盒还包括dNTPs、Mg²⁺离子、DNA聚合酶或包含dNTPs、Mg²⁺离子、DNA聚合酶的PCR体系;

所述检测试剂盒还包括亚硫酸氢盐或重亚硫酸氢盐或胍盐。

8. 一种用于早期诊断缺血性脑卒中的装置/系统,其特征在於,所述装置/系统包括检测模块和评估模块;

所述检测模块用于检测受试者样本中铁死亡相关标志基因的表达水平,所述铁死亡相关标志基因为权利要求1中所述的铁死亡相关标志基因;

所述评估模块用于将检测模块得到的受试者检测值与正常样本检测值或正常参考值进行比较,当SLC40A1、SLC2A3、ACSL4中的一种或多种的表达水平显著高于正常样本检测值或正常参考值时,判断受试者为缺血性脑卒中患者。

9. 检测铁死亡相关标志基因表达水平的试剂在制备用于早期诊断缺血性脑卒中的装置/系统中的应用,其特征在於,所述铁死亡相关标志基因为权利要求1中所述的铁死亡相关标志基因。

10. 一种用于治疗缺血性脑卒中的候选药物的体外筛选方法,其特征在於,所述方法包括如下步骤:

(1) 将待测药物加入到表达或含有SLC40A1、SLC2A3、ACSL4中的一种或多种的体系中;

(2) 检测所述体系中SLC40A1、SLC2A3、ACSL4中的一种或多种的表达水平;

(3) 选择可以显著降低SLC40A1、SLC2A3、ACSL4中的一种或多种表达水平的药物为候选药物。

铁死亡相关基因在鉴定缺血性脑卒中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药技术领域,具体涉及铁死亡相关基因在鉴定缺血性脑卒中的应用。

背景技术

[0002] 缺血性脑卒中(cerebral ischemic stroke,CIS)是指一种由于各种原因导致脑供血功能障碍、缺血、缺氧,进而导致脑组织坏死、软化,出现局灶性或完全性神经功能缺损症状的急性脑血管疾病。据统计,缺血性脑卒中的致死率在世界范围高达第三位,慢性致残率更是位居各类疾病之首(Bevan S,Markus H S.Genetic profiles in ischaemic stroke[J].Current Atherosclerosis Reports,2013,15(8):342.),是成年人死亡和残疾的主要原因,全球范围内约10%的死亡和5%的伤残调整寿命损失年是由缺血性脑卒中所导致的(GBD 2016DALYs and HALE Collaborators.Global,regional,and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 333diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 195countries and territories,1990-2016:a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016.Lancet.2017Sep 16;390(10100):1260-1344.)。近年来,缺血性脑卒中的发病率也在不断攀升,成为神经内科最常见的高发疾病之一,且逐渐呈现出年轻化的趋势,已经成为严重威胁人民生活质量与身心健康的重要杀手,同时也造成众多家庭乃至整个社会沉重的经济负担。

[0003] 关于缺血性脑卒中的病因,目前存在多种假说,涵盖了遗传、内分泌、系统代谢、先天发育等多方面的内容,但是目前为止尚没有一种假说能够完全阐释该病的发病机制及进展过程。传统危险因素包括高血压、冠心病、糖尿病、吸烟饮酒史、高血脂等,但这些并不能解释没有危险因素的缺血性脑卒中患者的病因,亦无法说明暴露在相同环境因素时发病与否的差异。近年来,基因学研究迅速发展,越来越多的研究者试图从分子水平探索缺血性脑卒中的遗传基础,通过利用先进的生物信息技术发掘与缺血性脑卒中相关的关键基因,可以让相关研究者从遗传学角度阐释缺血性脑卒中发病过程中潜在的分子机制。目前,识别引起缺血性脑卒中的原因是主要根据头颅CT扫描、核磁共振成像技术(MRI)和动脉造影。但CT、MRI扫描并不是完全可信的方法,因为在诊断早期CT对缺血性脑卒中只有16%的灵敏度,而对于出血性脑卒中却有89%的灵敏度。20%缺血性脑卒中并不能够被MRI扫描技术探测到。且影像诊断技术相关设备并不是在所有的诊疗中心中均存在,这些都阻碍了脑卒中的快速诊断和药物的及时应用。生物标志物是药物研发过程中的有效工具,它提供了药物性能及疾病进程的相关信息,反映了具体的药物治疗效果。糖尿病及免疫性疾病等多种疾病都已经根据生物标志物的指导进行相关的临床治疗。然而,在脑血管疾病中生物标志物仍相对缺乏。因此,探索缺血性脑卒中相关的生物标志物对于本领域而言具有重要的意义。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供铁死亡相关基因在鉴定缺血性脑卒中的应用,以弥补上述

现有技术中存在的不足。

[0005] 本发明的上述目的通过以下技术方案得以实现：

[0006] 本发明的第一方面提供了检测铁死亡相关标志基因表达水平的试剂在制备用于早期诊断缺血性脑卒中的产品中的应用。

[0007] 进一步,所述铁死亡相关标志基因为SLC40A1、SLC2A3、ACSL4中的任意一种或多种；

[0008] 优选地,所述铁死亡相关标志基因为SLC40A1、SLC2A3、ACSL4三者联合。

[0009] 在本发明具体实施方案中,所述铁死亡相关标志基因还包括SLC40A1、SLC2A3、ACSL4中的任意两种联合,即SLC40A1和SLC2A3两者联合、SLC40A1和ACSL4两者联合、SLC2A3和ACSL4两者联合。

[0010] 本发明首次发现并验证了SLC40A1和SLC2A3两者联合、SLC40A1和ACSL4两者联合、SLC2A3和ACSL4两者联合、SLC40A1、SLC2A3、ACSL4三者联合对缺血性脑卒中具有较高的诊断效能,其中,SLC40A1、SLC2A3、ACSL4三者联合的效果最佳。

[0011] 进一步,所述试剂包括采用核酸杂交技术、核酸测序技术、数字成像技术、蛋白免疫技术、染料技术、色谱技术、质谱技术检测样本中所述铁死亡相关标志基因表达水平的试剂。

[0012] 进一步,所述试剂包括与所述铁死亡相关标志基因的序列特异性结合的引物、与所述铁死亡相关标志基因的序列特异性互补的探针、对所述铁死亡相关标志基因的表位具有特异性的抗体、和/或对所述铁死亡相关标志基因具有特异性的染料。

[0013] 进一步,所述样本为受试者来源的外周血样本。

[0014] 进一步,所述受试者优选为人。

[0015] 本发明的第二方面提供了一种用于早期诊断缺血性脑卒中的产品。

[0016] 进一步,所述产品包括检测样本中铁死亡相关标志基因表达水平的试剂；

[0017] 所述铁死亡相关标志基因为本发明第一方面中所述的铁死亡相关标志基因。

[0018] 进一步,所述产品包括检测试剂盒、芯片、试纸。

[0019] 进一步,所述检测试剂盒中包括检测所述铁死亡相关标志基因的引物和/或探针；

[0020] 所述检测试剂盒还包括检测内参基因的试剂；

[0021] 所述检测内参基因的试剂包括针对内参基因的引物和/或探针；

[0022] 所述检测试剂盒还包括dNTPs、 Mg^{2+} 离子、DNA聚合酶或包含dNTPs、 Mg^{2+} 离子、DNA聚合酶的PCR体系；

[0023] 所述检测试剂盒还包括亚硫酸氢盐或重亚硫酸氢盐或胍盐。

[0024] 进一步,所述检测试剂盒包括qPCR检测试剂盒、免疫印迹检测试剂盒、免疫层析检测试剂盒、流式细胞分析检测试剂盒、免疫组化检测试剂盒、ELISA检测试剂盒和电化学发光检测试剂盒。

[0025] 进一步,所述芯片包括基因芯片、蛋白芯片,所述基因芯片包括用于检测所述铁死亡相关标志基因转录水平的针对所述铁死亡相关标志基因的寡核苷酸探针,所述蛋白芯片包括所述铁死亡相关标志基因编码的蛋白的特异性结合剂。

[0026] 进一步,所述试纸包括试纸载体和固定在试纸载体上的寡核苷酸,所述寡核苷酸能够检测所述铁死亡相关标志基因或其功能片段的表达水平。

- [0027] 本发明的第三方面提供了一种用于早期诊断缺血性脑卒中的装置/系统。
- [0028] 进一步,所述装置/系统包括检测模块和评估模块;
- [0029] 所述检测模块用于检测受试者样本中铁死亡相关标志基因的表达水平,所述铁死亡相关标志基因为本发明第一方面中所述的铁死亡相关标志基因;
- [0030] 所述评估模块用于将检测模块得到的受试者检测值与正常样本检测值或正常参考值进行比较,当SLC40A1、SLC2A3、ACSL4中的一种或多种的表达水平显著高于正常样本检测值或正常参考值时,判断受试者为缺血性脑卒中患者。
- [0031] 进一步,所述样本为受试者来源的外周血样本。
- [0032] 进一步,所述受试者优选为人。
- [0033] 进一步,所述评估模块包括存储器和数据处理器。
- [0034] 进一步,所述存储器用于存储正常样本中SLC40A1、SLC2A3、ACSL4中的一种或多种的检测值或正常SLC40A1、SLC2A3、ACSL4中的一种或多种的参考值。
- [0035] 进一步,所述数据处理器用于比较分析检测模块得到的受试者检测值与存储器中存储的正常样本检测值或正常参考值,由此诊断受试者是否患有缺血性脑卒中。
- [0036] 本发明的第四方面提供了检测铁死亡相关标志基因表达水平的试剂在制备用于早期诊断缺血性脑卒中的装置/系统中的应用。
- [0037] 进一步,所述铁死亡相关标志基因为本发明第一方面中所述的铁死亡相关标志基因。
- [0038] 本发明的第五方面提供了一种用于治疗缺血性脑卒中的候选药物的体外筛选方法。
- [0039] 进一步,所述方法包括如下步骤:
- [0040] (1) 将待测药物加入到表达或含有SLC40A1、SLC2A3、ACSL4中的一种或多种的体系中;
- [0041] (2) 检测所述体系中SLC40A1、SLC2A3、ACSL4中的一种或多种的表达水平;
- [0042] (3) 选择可以显著降低SLC40A1、SLC2A3、ACSL4中的一种或多种表达水平的药物为候选药物。
- [0043] 进一步,所述体系选自:细胞体系、亚细胞体系、溶液体系、组织体系、器官体系或动物体系。
- [0044] 进一步,所述待测药物包括但不限于:针对SLC40A1、SLC2A3、ACSL4中的一种或多种基因或其上游或下游基因设计的干扰分子、核酸抑制物、小分子化合物等。
- [0045] 此外,本发明还提供了检测SLC40A1、SLC2A3、ACSL4中的一种或多种表达水平的试剂在体外筛选用于治疗缺血性脑卒中的药物中的应用。
- [0046] 进一步,所述筛选方法为本发明第五方面所述的方法。
- [0047] 进一步,所述筛选方法通过检测待测药物对体系中的SLC40A1、SLC2A3、ACSL4中的一种或多种表达水平的影响,进而判断待测药物是否对缺血性脑卒中具有治疗效果。
- [0048] 此外,本发明还提供了抑制SLC40A1、SLC2A3、ACSL4中的一种或多种表达水平的试剂在制备用于治疗缺血性脑卒中的药物中的应用。
- [0049] 进一步,所述药物包含抑制SLC40A1、SLC2A3、ACSL4中的一种或多种表达水平的试剂,以及药学上可接受的载体和/或辅料。

[0050] 相对于现有技术,本发明具有的优点和有益效果如下:

[0051] 基于本发明提供的铁死亡相关标志基因SLC40A1、SLC2A3和ACSL4可以有效诊断区分缺血性脑卒中患者和非缺血性脑卒中者;本发明基于SLC40A1、SLC2A3和ACSL4三者联合在训练集中对缺血性脑卒中诊断预测的AUC值高达0.971,敏感性和特异性分别高达1.000和0.897,SLC40A1、SLC2A3和ACSL4三者联合在验证集中对缺血性脑卒中诊断预测的AUC值高达0.963,敏感性和特异性分别高达0.957和0.870,效果显著优于SLC40A1、SLC2A3或ACSL4单独使用。此外,本发明提供的用于缺血性脑卒中早期诊断的方法简便、客观、受人为主观影响小,相比于传统的诊断方法而言,具有更高的准确性、敏感性和特异性,可用于缺血性脑卒中早期准确有效的筛查和诊断中。

附图说明

[0052] 图1为在训练集中,铁死亡相关基因SLC40A1、SLC2A3、ACSL4在缺血性脑卒中患者和健康对照者之间差异表达的结果图,其中,A图:SLC40A1,B图:SLC2A3,C图:ACSL4;

[0053] 图2为在验证集中,铁死亡相关基因SLC40A1、SLC2A3、ACSL4在缺血性脑卒中患者和健康对照者之间差异表达的结果图,其中,A图:SLC40A1,B图:SLC2A3,C图:ACSL4;

[0054] 图3为在训练集中,铁死亡相关基因SLC40A1、SLC2A3、ACSL4在区分缺血性脑卒中患者和健康对照者的诊断效能的结果图,其中,A图:SLC40A1,B图:SLC2A3,C图:ACSL4;

[0055] 图4为在验证集中,铁死亡相关基因SLC40A1、SLC2A3、ACSL4在区分缺血性脑卒中患者和健康对照者的诊断效能的结果图,其中,A图:SLC40A1,B图:SLC2A3,C图:ACSL4;

[0056] 图5为在训练集中,铁死亡相关基因SLC40A1、SLC2A3、ACSL4中的任意两者联合在区分缺血性脑卒中患者和健康对照者的诊断效能的结果图,其中,A图:SLC40A1+SLC2A3,B图:SLC40A1+ACSL4,C图:SLC2A3+ACSL4;

[0057] 图6为在验证集中,铁死亡相关基因SLC40A1、SLC2A3、ACSL4中的任意两者联合在区分缺血性脑卒中患者和健康对照者的诊断效能的结果图,其中,A图:SLC40A1+SLC2A3,B图:SLC40A1+ACSL4,C图:SLC2A3+ACSL4;

[0058] 图7为在训练集中,铁死亡相关基因SLC40A1、SLC2A3、ACSL4三者联合在区分缺血性脑卒中患者和健康对照者的诊断效能的结果图;

[0059] 图8为在验证集中,铁死亡相关基因SLC40A1、SLC2A3、ACSL4三者联合在区分缺血性脑卒中患者和健康对照者的诊断效能的结果图。

具体实施方式

[0060] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明,实施例仅用于解释本发明,而不能理解为对本发明的限制。本领域的普通技术人员可以理解为:在不脱离本发明的原理和宗旨的情况下可以对这些实施例进行多种变化、修改、替换和变型,本发明的范围由权利要求及其等同物限定。下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法;下述实施例中所用的试剂、生物材料等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0061] 本发明通过广泛而深入的研究,基于铁死亡相关的关键基因,综合分析了155例缺血性脑卒中患者和健康对照者的基因表达数据,筛选出了与缺血性脑卒中早期诊断相关的铁死亡关键基因,并将其作为缺血性脑卒中的诊断标志物,基于所述标志物构建了用于早

期诊断缺血性脑卒中的方法,所述方法具有较高的准确性、敏感性和特异性。

[0062] 在本发明中使用的“和/或”应被视对在具有或不具有另一者的情况下两种指定特征或组分中的每一种的具体公开。例如,“A和/或B”将被视为(i) A、(ii) B、以及(iii) A和B中的每一种的具体公开,就像每一种在本发明中单独列出的一样。

[0063] 标志物

[0064] 本发明中使用的“标志物”,同“标志基因”、“生物标志物”,是指以可用于预测个体疾病状态的不同浓度存在于个体中的生物分子。所述标志物包括但不限于核酸、蛋白质及其变体和片段。标志物可以是包含编码该标志物的全部或部分核酸序列或这类序列的互补体的DNA。可用于本发明的标志物核酸被认为包括包含任何目的核酸序列的全部或部分序列的DNA和RNA。

[0065] 进一步,标志物以具有统计显著性(即p值小于0.05和/或q值小于0.10,如使用韦尔奇氏T检验(Welch's T-test)或Wilcoxon秩和检验(Wilcoxon's rank-sum Test)所确定)的水平差异地存在。

[0066] 在本发明的具体实施方式中,所述标志物包括铁死亡相关基因SLC40A1、SLC2A3和/或ACSL4。在另一实施方案中,所述标志物为SLC40A1、SLC2A3和/或ACSL4中的任意两种联合,在优选的实施方案中,所述标志物为SLC40A1、SLC2A3和ACSL4三者联合。

[0067] 铁死亡相关基因SLC40A1:solute carrier family 40member 1,以gene ID:30061在NCBI数据库中可以找到典型的智人mRNA和蛋白序列。

[0068] 铁死亡相关基因SLC2A3:solute carrier family 2member 3,以gene ID:2182在NCBI数据库中可以找到典型的智人mRNA和蛋白序列。

[0069] 铁死亡相关基因ACSL4:acyl-CoA synthetase long chain family member 4,以gene ID:6515在NCBI数据库中可以找到典型的智人mRNA和蛋白序列。

[0070] 如本发明所用,术语“标志物”、“标志基因”、“生物标志物”是可以互换使用的,并且是指与取自对照受试者,例如健康受试者的可比较样本相比,在取自缺血性脑卒中受试者的样本中差异存在的分子。因此,本发明的标志物提供有关缺血性脑卒中的可能病程的信息,并与缺血性脑卒中的早期诊断相关联。

[0071] 样本

[0072] 本发明中使用的“样本”可以是指生物学样本,通常是临床样本,并且包括例如血液和其他体液,包括但不限于外周血、血清、血浆、尿液和唾液;以及实体组织样本,例如活检标本。在某些实施方案中,外周血样本是要用于本发明中的优选的样本类型。通常,从受试者获得要分析的样本的过程不是本发明早期诊断方法的一部分。在本发明具体实施方案中的样本为外周血样本。

[0073] 表达水平

[0074] 本发明中使用的“表达水平”,同“标志基因表达水平”,是指受试者样本中本发明所述的标志基因的mRNA表达水平、和/或样本中本发明所述的标志基因编码的多肽和/或蛋白表达水平。

[0075] 本发明可以使用本领域普通技术人员已知的多种核酸以及蛋白技术对所述标志基因SLC40A1、SLC2A3和ACSL4的表达水平进行检测,这些技术包括但不限于:蛋白免疫技术、染料技术、核酸测序技术、核酸杂交技术、色谱技术、质谱技术。在此处详细列举如下几

种。

[0076] 本发明的蛋白免疫方法包括夹心免疫测定,例如夹心ELISA,其中使用识别生物标志物上不同表位的两种抗体进行该生物标志物的检测;放射免疫测定(RIA)、直接、间接或对比酶联免疫吸附测定(ELISA)、酶免疫测定(EIA)、荧光免疫测定(FIA)、蛋白质印迹法、免疫沉淀法和基于任何颗粒的免疫测定(如使用金颗粒、银颗粒或乳胶颗粒、磁性颗粒或量子点)。例如可在微量滴定板或条的形式中实施免疫法。

[0077] 本发明的核酸测序方法的示例性非限制性实例包括但不限于链终止子(Sanger)测序和染料终止子测序。本领域的普通技术人员将认识到,由于RNA在细胞中不太稳定并且在实验中更易受到核酸酶攻击,因此在测序前通常将RNA逆转录成DNA。

[0078] 本发明的核酸测序方法的另一示例性非限制性实例包括下一代测序(深度测序/高通量测序),高通量测序技术是一种基于单分子簇的边合成边测序技术,基于专有的可逆终止化学反应原理。测序时将基因组的DNA的随机片段附着到光学透明的玻璃表面,这些DNA片段经过延伸和桥式扩增后,在玻璃表面形成数以亿计的簇,每个簇是具有数千份相同模板的单分子簇,然后利用带荧光基团的四种特殊脱氧核糖核苷酸,通过可逆性的边合成边测序技术对待测的模板DNA进行测序。

[0079] 本发明中的核酸杂交方法包括但不限于原位杂交(ISH)、微阵列和Southern或Northern印迹。原位杂交(ISH)是一种使用标记的互补DNA或RNA链作为探针以定位组织一部分或切片(原位)或者如果组织足够小则为整个组织(全组织包埋ISH)中的特异性DNA或RNA序列的杂交。DNAISH可用于确定染色体的结构。RNAISH用于测量和定位组织切片或全组织包埋内的mRNA和其他转录本(例如,ncRNA)。通常对样本细胞和组织进行处理以原位固定靶转录本,并增加探针的进入。探针在高温下与靶序列杂交,然后将多余的探针洗掉。分别使用放射自显影、荧光显微术或免疫组织化学,对组织中用放射、荧光或抗原标记的碱基标记的探针进行定位和定量。ISH也可使用两种或更多种通过放射性或其他非放射性标记物标记的探针,以同时检测两种或更多种转录本。

[0080] 将Southern和Northern印迹分别用于检测特异性DNA或RNA序列。使从样本中提取的DNA或RNA断裂,在基质凝胶上通过电泳分离,然后转移到膜滤器上。使滤器结合的DNA或RNA与和所关注的序列互补的标记探针杂交。检测结合到滤器的杂交探针。该程序的一种变化形式是反向Northern印迹,其中固定到膜的底物核酸为分离的DNA片段的集合,而探针是从组织提取并进行了标记的RNA。

[0081] 在本发明中,“芯片”也称为“阵列”,指包含连接的核酸或肽探针的固体支持物。阵列通常包含按照不同的已知位置连接至基底表面的多种不同的核酸或肽探针。这些阵列,也称为“微阵列”,通常可以利用机械合成方法或光引导合成方法来产生这些阵列,所述光引导合成方法合并了光刻方法和固相合成方法的组合。阵列可以包含平坦的表面,或者可以是珠子、凝胶、聚合物表面、诸如光纤的纤维、玻璃或任何其它合适的基底上的核酸或肽。可以以一定的方式来包装阵列,从而允许进行全功能装置的诊断或其它方式的操纵。

[0082] 在本发明中,“引物”是指寡核苷酸,它与靶核酸中的序列(“引物结合位点”)杂交并且能够用作在适用于合成的条件下沿着核酸的互补链启动该合成的点。

[0083] 在本发明中,“探针”是指能与另一分子的特定序列或亚序列或其它部分结合分子。除非另有指出,术语“探针”通常指能通过互补碱基配对与另一多核苷酸(往往称为“靶

多核苷酸”)结合的多核苷酸探针。根据杂交条件的严格性,探针能和与该探针缺乏完全序列互补性的靶多核苷酸结合。探针可作直接或间接的标记。杂交方式,包括但不限于溶液相、固相、混合相或原位杂交测定法。

[0084] 在本发明中,“蛋白的结合剂”是指例如蛋白质的受体、结合蛋白质的凝集素、针对蛋白质的抗体、针对蛋白质的肽抗体(peptidebody)、双特异性双重结合剂或双特异性抗体形式。

[0085] 在本发明中,“受试者”是指动物受试者,特别是脊椎动物受试者,更特别是哺乳动物受试者。落在本发明的范围内的合适的脊椎动物包括但不限于脊索动物亚门的任何成员,包括灵长目动物、啮齿动物(例如,小鼠、大鼠、豚鼠)、兔形目动物(例如,家兔、野兔)、牛科动物(例如,牛)、绵羊类动物(例如,绵羊)、山羊类动物(例如,山羊)、猪类动物(例如,猪)、马科动物(例如,马)、犬科动物(例如,狗)、猫科动物(例如,猫)、鸟类动物(例如,鸡;鸭;鹅;陪伴鸟类,诸如金丝雀、虎皮鹦鹉等)、海洋哺乳动物(例如,海豚、鲸鱼)、爬行动物(例如,蛇、青蛙、蜥蜴等)和鱼。优选的受试者是灵长目动物(例如,人、猿、猴、黑猩猩)。如本发明所优选的受试者为人。

[0086] 实施例1缺血性脑卒中的关键基因(铁死亡相关基因)的识别与筛选1、样本数据收集和预处理

[0087] GEO是一个公共功能基因组数据存储库,其中选择了基因表达谱用于当前研究。本发明使用关键字“stroke”和“Homo sapiens”对基因表达谱数据进行过滤。然后使用以下标准筛选相应的数据集。纳入标准为:①样本不少于5例;②数据集中有正常对照。排除标准为:①细胞系或动物水平上的研究;②单样本的研究;③重复或重叠的研究。最终GSE16561、GSE58294纳入本发明的研究。GSE16561是由Barr TL等人提交包含39名CIS患者及24名健康对照者的外周血样本。GSE58294是由Stamova BB等人提交包含69名CIS患者及23名健康对照者的外周血样本,其中,GSE16561为训练集,GSE58294为验证集,详见表1,对于这两个数据集,本发明下载了其对应的基因表达矩阵文件以作分析。使用GPL平台注释文件对基因表达谱进行注释,将基因探针转换成gene symbol,其中多个探针对应同一个基因的取平均值。使用R包“sva”中的combatch函数移除批次效应。

[0088] 表1数据集相关信息

	GEO ID	Platforms	Contrast	CIS	Source	Author
[0089]	GSE16561	GPL6883	24	39	外周血	Barr TL
	GSE58294	GPL570	23	69	外周血	Stamova
	total		47	108		

[0090] 2、铁死亡相关基因的收集

[0091] 铁死亡相关基因(ferroptosis-related genes,FRGs)来自FerrDb及相关文献(PMID 32760210)。FerrDb数据库(<http://www.zhounan.org/ferrdb/index.html>)是世界上第一个关于铁死亡的数据库,提供了一个更新的关于铁死亡与疾病关联的调节剂和标记物数据库。本发明在FerrDb数据库共纳入了259个铁死亡相关基因,并纳入文献(PMID 32760210)中铁死亡基因作为补充。最终,本发明得到了267个FRGs。其中,有216个FRGs在上

述收集的GEO数据集中存在。

[0092] 3、差异表达基因分析

[0093] 在对上述两个数据集进行上述预处理之后,使用“limma”包进行差异表达分析,从而获取CIS的DEGs。DEGs的筛选标准设置为 $\text{adj.p.val} < 0.05$, $|\log_2\text{FC}| > 0.2$,并使用火山图进行可视化。筛选出其中差异的FRGs,并将结果用热图展示出来。

[0094] 4、实验结果

[0095] 本发明将处理好的数据读入R中,使用“limma”包以 $\text{adj.p.val} < 0.05$, $|\log_2\text{FC}| > 0.2$ 的标准进行差异表达分析。与对照组相比,在CIS患者组中鉴定出了27个铁死亡相关的差异表达基因,结果如表2和表3所示。其中,铁死亡相关基因SLC40A1、SLC2A3、ACSL4在训练集和验证集中的差异表达结果图如图1和图2所示,结果显示,SLC40A1、SLC2A3、ACSL4在缺血性脑卒中患者和健康对照者的外周血样本之间存在显著的差异性表达,且SLC40A1、SLC2A3、ACSL4在缺血性脑卒中患者的外周血样本中的表达趋势为显著上调。这一结果提示铁死亡相关基因SLC40A1、SLC2A3、ACSL4有望成为用于早期诊断缺血性脑卒中的生物标志物。

[0096] 表2在CIS患者组中鉴定出的29个铁死亡相关的差异表达基因 (GSE16561)

	铁死亡相关基因	$\log_2\text{FC}$	AveExpr	t	P.Value	adj.P.Val
	ACSL4	0.252634	0.039263	4.938716	5.43E-06	0.000172
	ALOX5	0.37977	-0.00925	4.000069	0.000159	0.002324
	ATG7	0.477765	0.017445	4.713978	1.25E-05	0.000334
	BID	0.248966	-0.03018	3.977929	0.000172	0.002449
[0097]	CBS	0.442854	-0.01949	3.156975	0.002381	0.019635
	CYBB	0.5114	0.112926	4.402783	3.89E-05	0.000773
	DDIT3	0.336072	0.051357	3.63856	0.000531	0.005906
	DUSP1	0.750485	0.090219	5.69819	2.87E-07	1.86E-05
	GABARAPL1	0.450424	0.004401	3.862735	0.000253	0.003312
	HIF1A	0.632317	0.117857	4.210157	7.70E-05	0.001314
	HMGCR	0.671736	-0.0202	8.089216	1.56E-11	2.22E-08

	IDH1	0.222136	-0.02337	3.105648	0.002773	0.022073
	LAMP2	0.841335	-0.06212	9.583617	3.16E-14	2.53E-10
	MAPK1	0.316546	0.011208	4.799194	9.15E-06	0.000262
	MAPK14	0.247507	-0.0237	3.071822	0.003063	0.023964
	NCOA4	0.403625	0.04188	3.693237	0.000444	0.005133
	NFE2L2	0.37575	0.065552	4.271729	6.20E-05	0.001112
	PGD	0.609125	0.00324	4.188587	8.31E-05	0.001395
[0098]	PRKAA1	0.220277	-0.00788	3.488653	0.000858	0.008717
	PTGS2	0.639418	0.119145	4.646534	1.61E-05	0.000401
	SLC2A3	0.739071	0.118949	6.654723	6.01E-09	1.34E-06
	SLC38A1	-0.28437	-0.02719	-4.68583	1.39E-05	0.000361
	SLC40A1	0.663288	0.018418	5.396879	9.38E-07	4.50E-05
	SP1	0.288738	0.045683	3.608669	0.000585	0.006371
	STAT3	0.567452	0.092587	5.712845	2.71E-07	1.78E-05
	TLR4	0.614035	0.0919	5.386637	9.76E-07	4.62E-05
	ULK1	0.355702	0.017241	3.649591	0.000512	0.005732

[0099] 表3在CIS患者组中鉴定出的29个铁死亡相关的差异表达基因 (GSE58294)

	铁死亡相关基因	log ₂ FC	AveExpr	t	P.Value	adj.P.Val
	ACSL4	0.763289	-0.22074	7.553999	2.61E-11	9.12E-10
	ALOX5	0.455493	1.901053	4.47823	2.10E-05	0.000149
	ATG7	0.491249	0.393079	7.312406	8.27E-11	2.51E-09
	BID	0.28161	2.543262	3.819593	0.000239	0.001246
[0100]	CBS	0.471213	-1.98455	3.39854	0.000992	0.004199
	CYBB	0.475308	1.046244	4.925708	3.55E-06	3.08E-05
	DDIT3	0.710816	0.586053	8.052598	2.35E-12	1.14E-10
	DUSP1	0.36466	0.734513	3.467528	0.000791	0.003457
	GABARAPL1	0.310252	1.579452	3.307044	0.001333	0.005414
	HIF1A	0.270673	3.748496	3.466338	0.000794	0.003469
	HMGCR	0.473202	1.743738	5.11379	1.64E-06	1.54E-05

	IDH1	0.477011	1.350127	7.07267	2.58E-10	6.83E-09
	LAMP2	0.794624	3.335284	10.66825	6.31E-18	2.10E-15
	MAPK1	0.656678	1.820155	8.634177	1.38E-13	9.41E-12
	MAPK14	0.991897	2.535116	9.676366	8.22E-16	1.19E-13
	NCOA4	0.222612	5.141446	2.754584	0.007045	0.021433
	NFE2L2	0.328414	-0.54911	5.40652	4.78E-07	5.24E-06
	PGD	0.304867	-1.44607	4.635352	1.14E-05	8.67E-05
[0101]	PRKAA1	0.427786	0.290069	6.500028	3.71E-09	7.06E-08
	PTGS2	0.801884	0.671657	5.35085	6.06E-07	6.43E-06
	SLC2A3	0.849812	3.492861	8.799168	6.14E-14	4.65E-12
	SLC38A1	-0.24278	0.131916	-3.00969	0.00335	0.011625
	SLC40A1	0.631124	1.904636	8.24305	9.31E-13	5.15E-11
	SP1	0.382149	0.084069	3.950859	0.00015	0.000827
	STAT3	0.662421	1.453244	7.011371	3.44E-10	8.79E-09
	TLR4	0.571994	1.95872	4.72716	7.90E-06	6.27E-05
	ULK1	0.408261	1.362361	3.849603	0.000215	0.001134

[0102] 实施例2铁死亡相关标志基因SLC40A1、SLC2A3、ACSL4在早期诊断缺血性脑卒中的应用

[0103] 1、实验方法

[0104] 为了进一步评估实施例1中经筛选得到的铁死亡相关标志基因SLC40A1、SLC2A3和ACSL4在区分CIS患者和健康者时的准确性,本实施例进行了诊断效能分析,采用ROC(受试者工作特征曲线,receiver operator characteristic curve,ROC曲线)分析了铁死亡相关标志基因SLC40A1、SLC2A3和ACSL4中的任意一种或多种联合用于缺血性脑卒中诊断时的诊断效能,其中,ROC曲线下面积(the area under the ROC curve,AUC),又称AUC值,AUC越接近1,证明诊断试验的真实性越好。AUC就是诊断试验正确区分患者与非患者的可能性,若AUC小于0.7,则表示诊断准确度较低,若AUC位于0.7-0.9之间,则表示诊断准确度中等,若AUC大于0.9,则表示诊断准确度高,能够非常好地有效准确区分患者与非患者。此外,本实施例通过计算灵敏度和特异性对分类效果进行了评价,其中,灵敏度=真阳性/(真阳性+假阴性),特异性=真阴性/(真阴性+假阳性)。

[0105] 2、实验结果

[0106] 结果表明,本发明实施例1中经筛选得到的铁死亡相关标志基因SLC40A1、SLC2A3和ACSL4的AUC值无论是在训练集中还是在验证集中均大于0.850,且表现出了较高的敏感性与特异性,如图3、图4、表4和表5所示。此外,SLC40A1、SLC2A3和ACSL4三者联合在训练集中的AUC值高达0.971,敏感性和特异性分别高达1.000和0.897,SLC40A1、SLC2A3和ACSL4三

者联合在验证集中的AUC值高达0.963,敏感性和特异性分别高达0.957和0.870,效果显著优于SLC40A1、SLC2A3或ACSL4单独使用,且显著优于SLC40A1、SLC2A3和ACSL4中的任意两个联合使用,如图5-图8、表4和表5所示。此外,相比于传统诊断方法而言,SLC40A1、SLC2A3和ACSL4三者联合对缺血性脑卒中的诊断具有更高的准确性、敏感性和特异性,可用于缺血性脑卒中早期准确有效的筛查和诊断中。

[0107] 表4铁死亡相关基因SLC40A1、SLC2A3或ACSL4单独使用或联合使用对缺血性脑卒中诊断效能的统计结果 (GSE16561)

	铁死亡相关基因	敏感性	特异性	AUC 值
	SLC40A1	0.958	0.641	0.851
	SLC2A3	0.958	0.744	0.908
[0108]	ACSL4	0.833	0.846	0.863
	SLC40A1+SLC2A3	0.875	0.846	0.937
	SLC40A1+ACSL4	0.958	0.769	0.908
	SLC2A3+ACSL4	1.000	0.897	0.964
	SLC40A1+SLC2A3+ACSL4	1.000	0.897	0.971

[0109] 表5铁死亡相关基因SLC40A1、SLC2A3或ACSL4单独使用或联合使用对缺血性脑卒中诊断效能的统计结果 (GSE58294)

	铁死亡相关基因	敏感性	特异性	AUC 值
[0110]	SLC40A1	0.870	0.928	0.939
	SLC2A3	0.783	0.942	0.921
	ACSL4	0.957	0.841	0.920
[0111]	SLC40A1+SLC2A3	0.957	0.899	0.958
	SLC40A1+ACSL4	0.957	0.899	0.955
	SLC2A3+ACSL4	0.957	0.826	0.948
	SLC40A1+SLC2A3+ACSL4	0.957	0.870	0.963

[0112] 以上的实施例是为了说明本发明公开的实施方案,并不能理解为对本发明的限制。此外,本文所列出的各种修改以及发明中方法、组合物的变化,在不脱离本发明的范围和精神的前提下对本领域内的技术人员来说是显而易见的。虽然已结合本发明的多种具体优选实施例对本发明进行了具体的描述,但应当理解,本发明不应仅限于这些具体实施例。事实上,各种如上所述的对本领域内的技术人员来说显而易见的修改来获取发明都应包括在本发明的范围内。

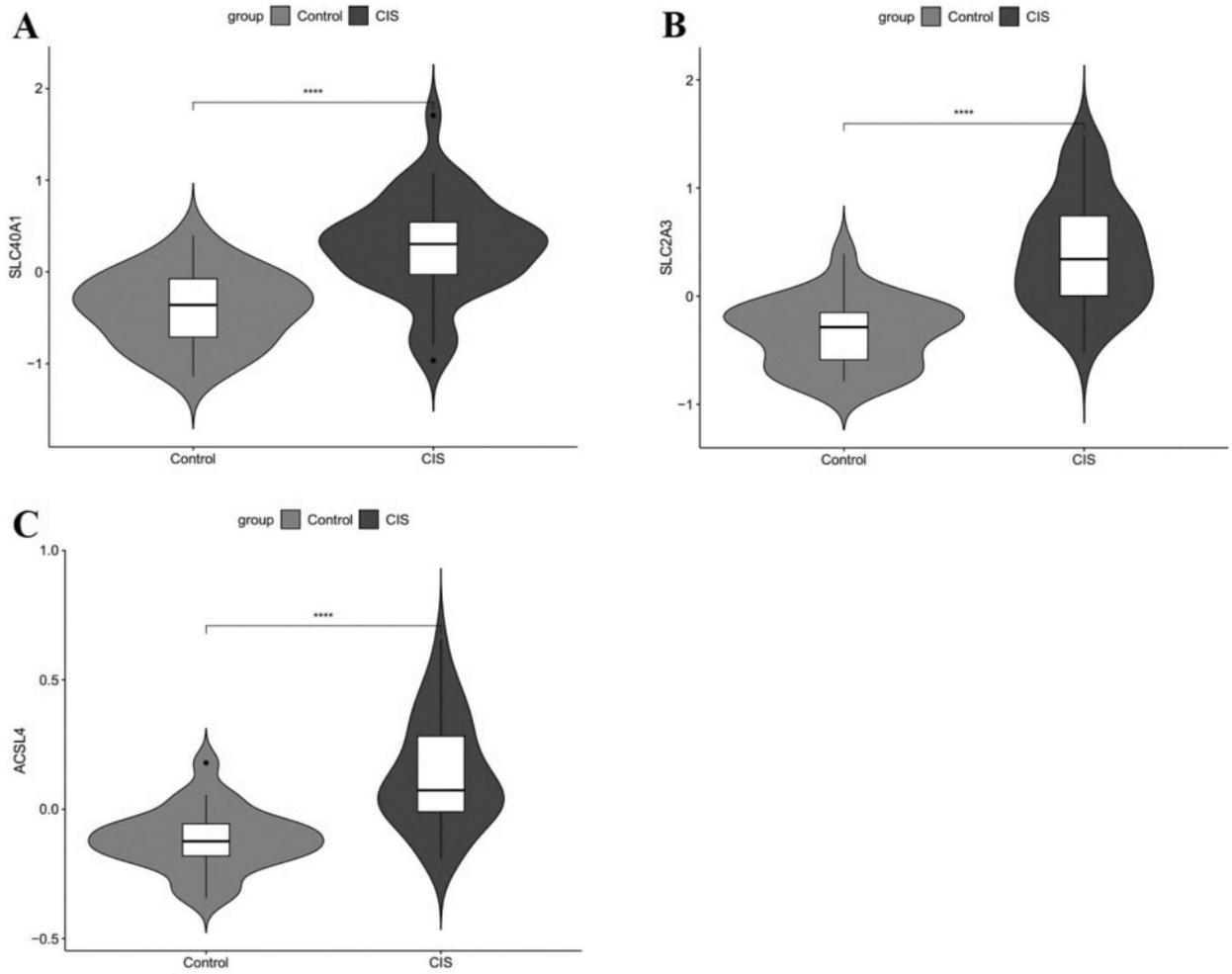


图1

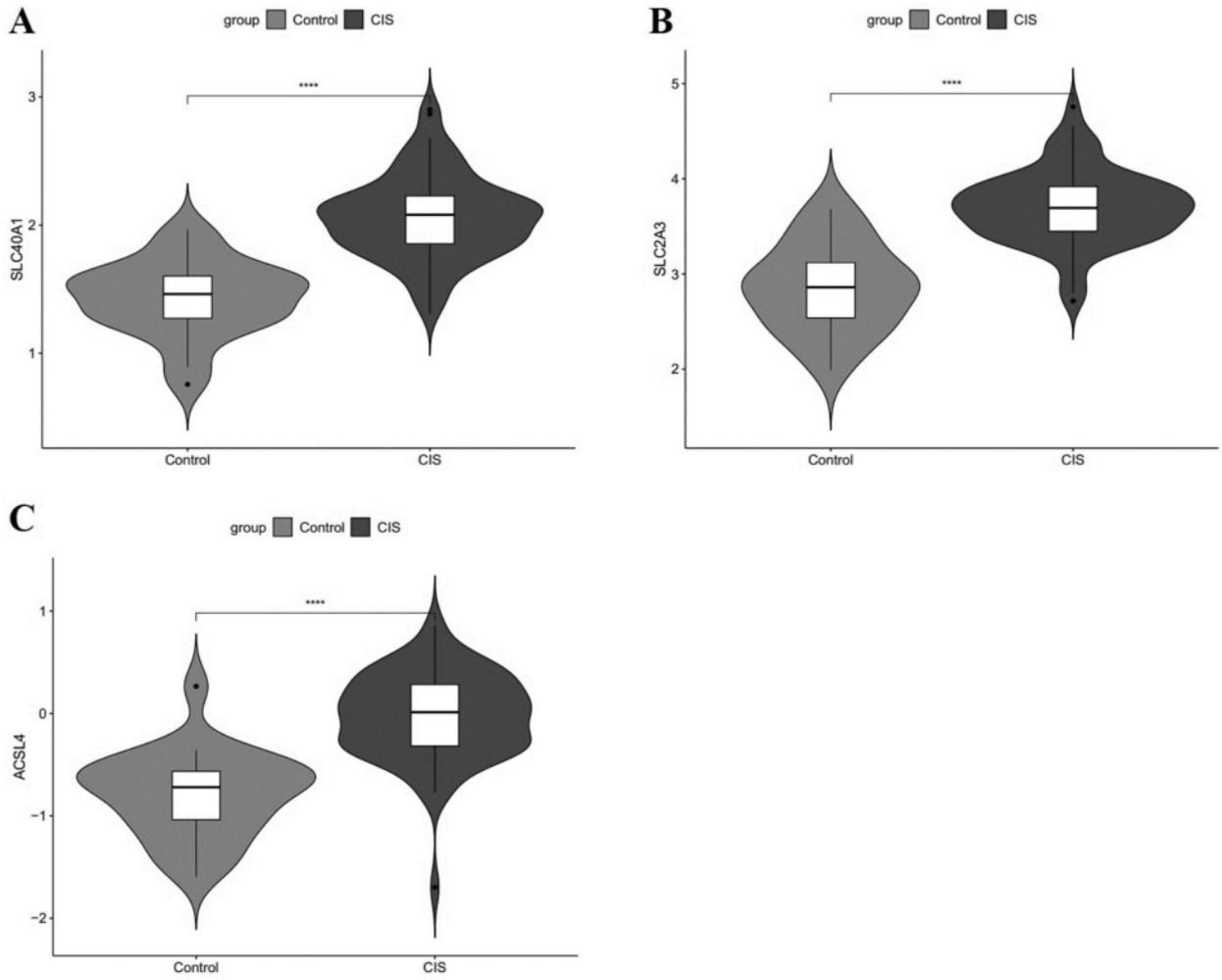


图2

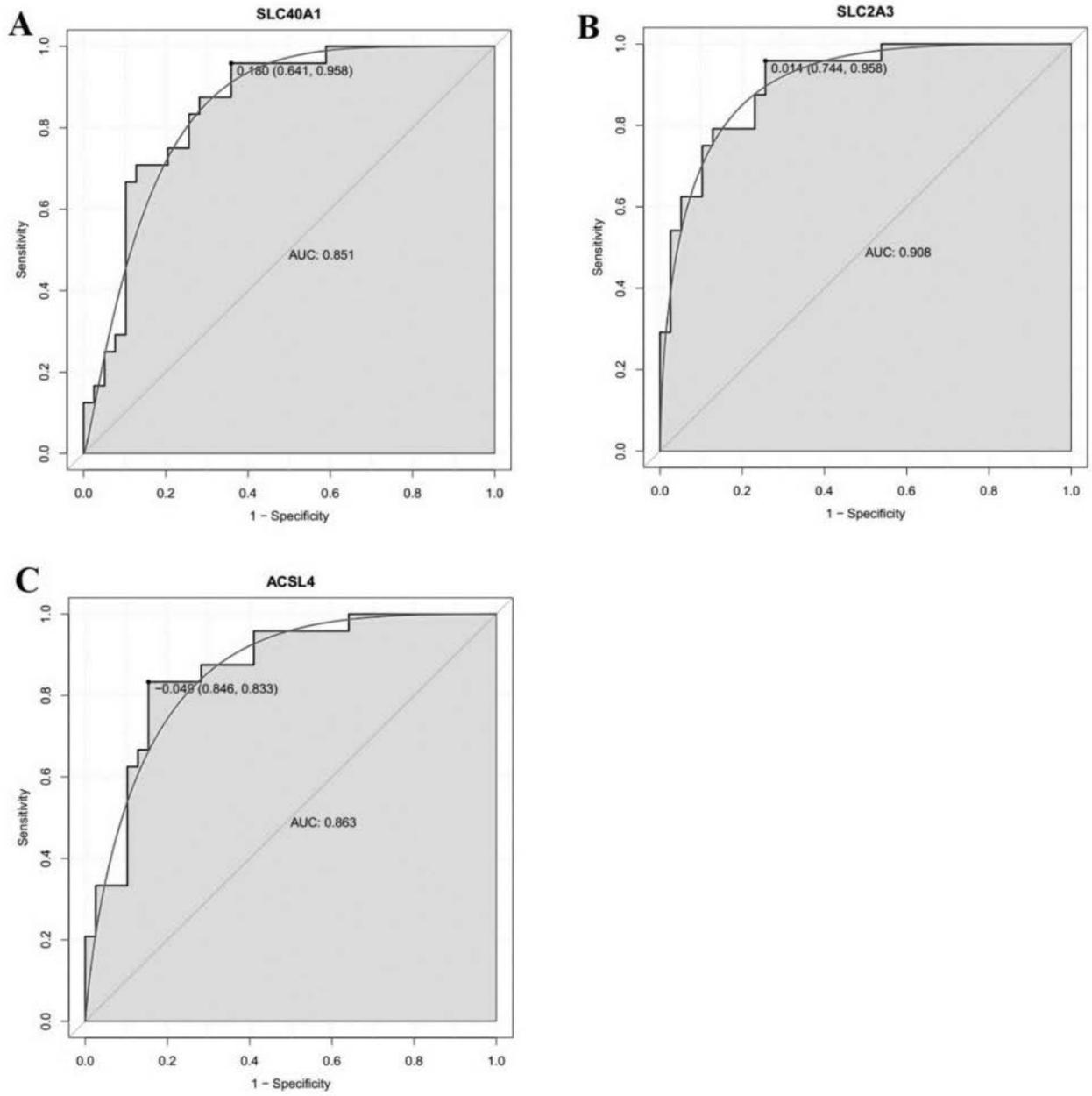


图3

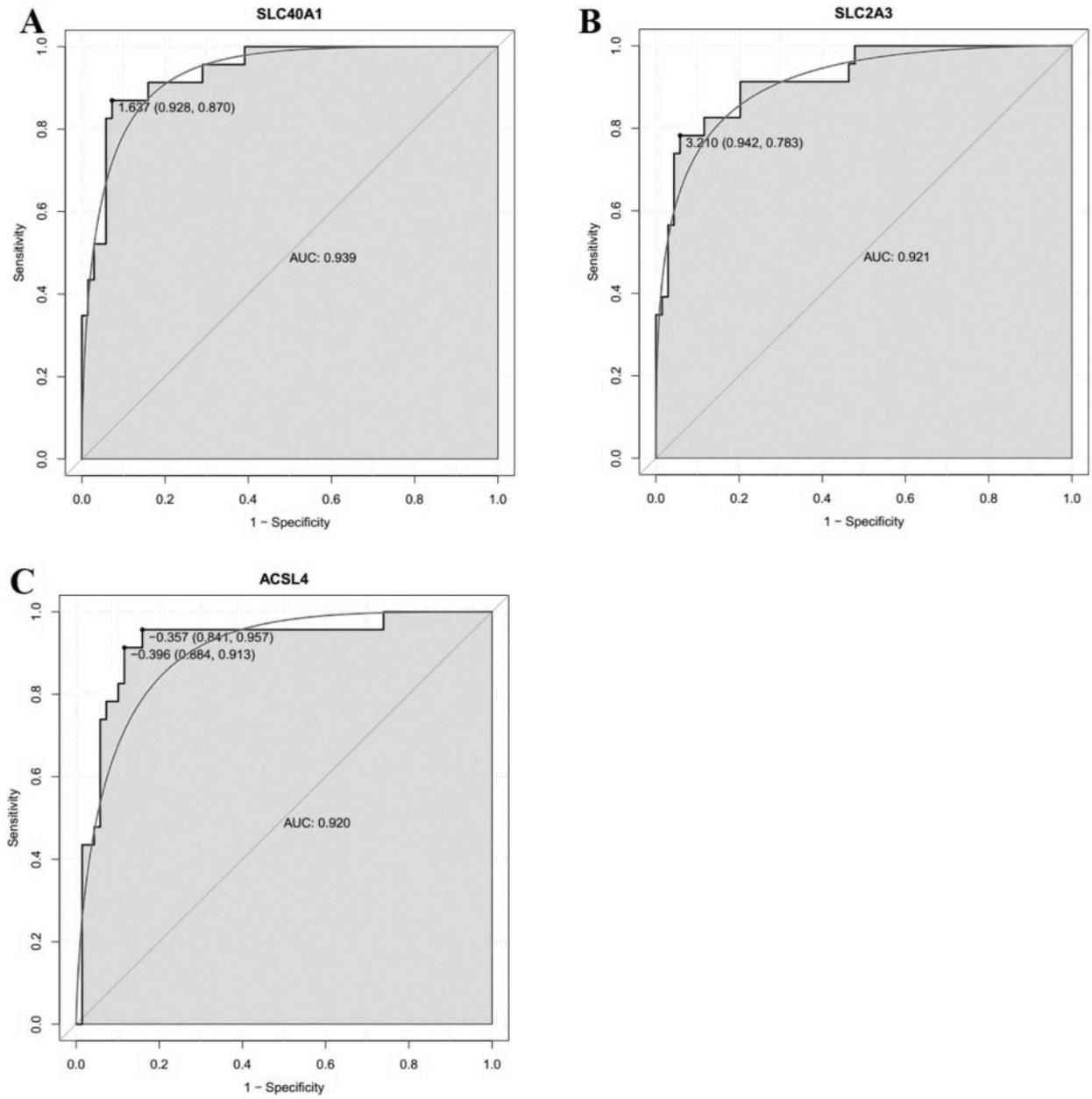


图4

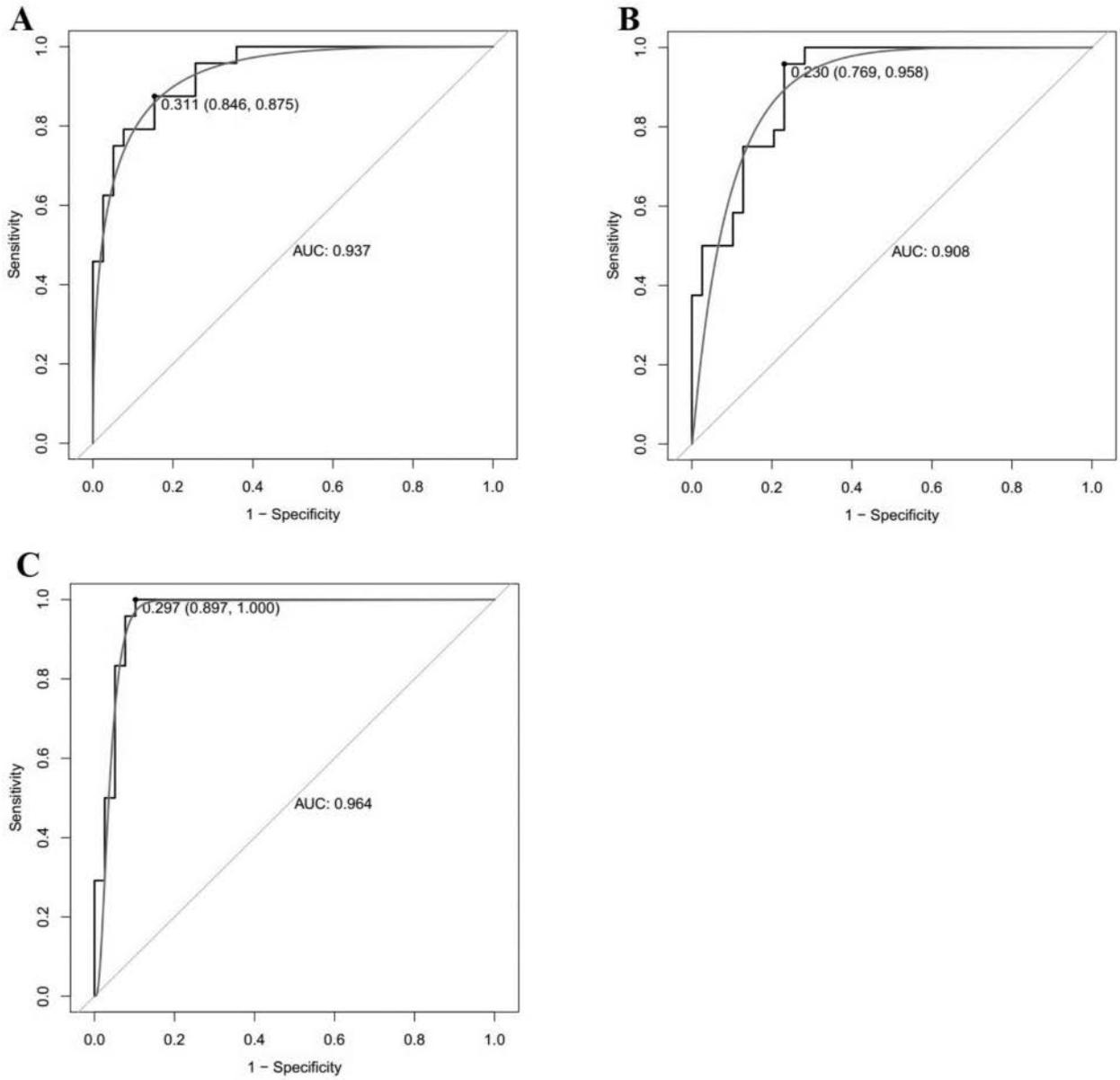


图5

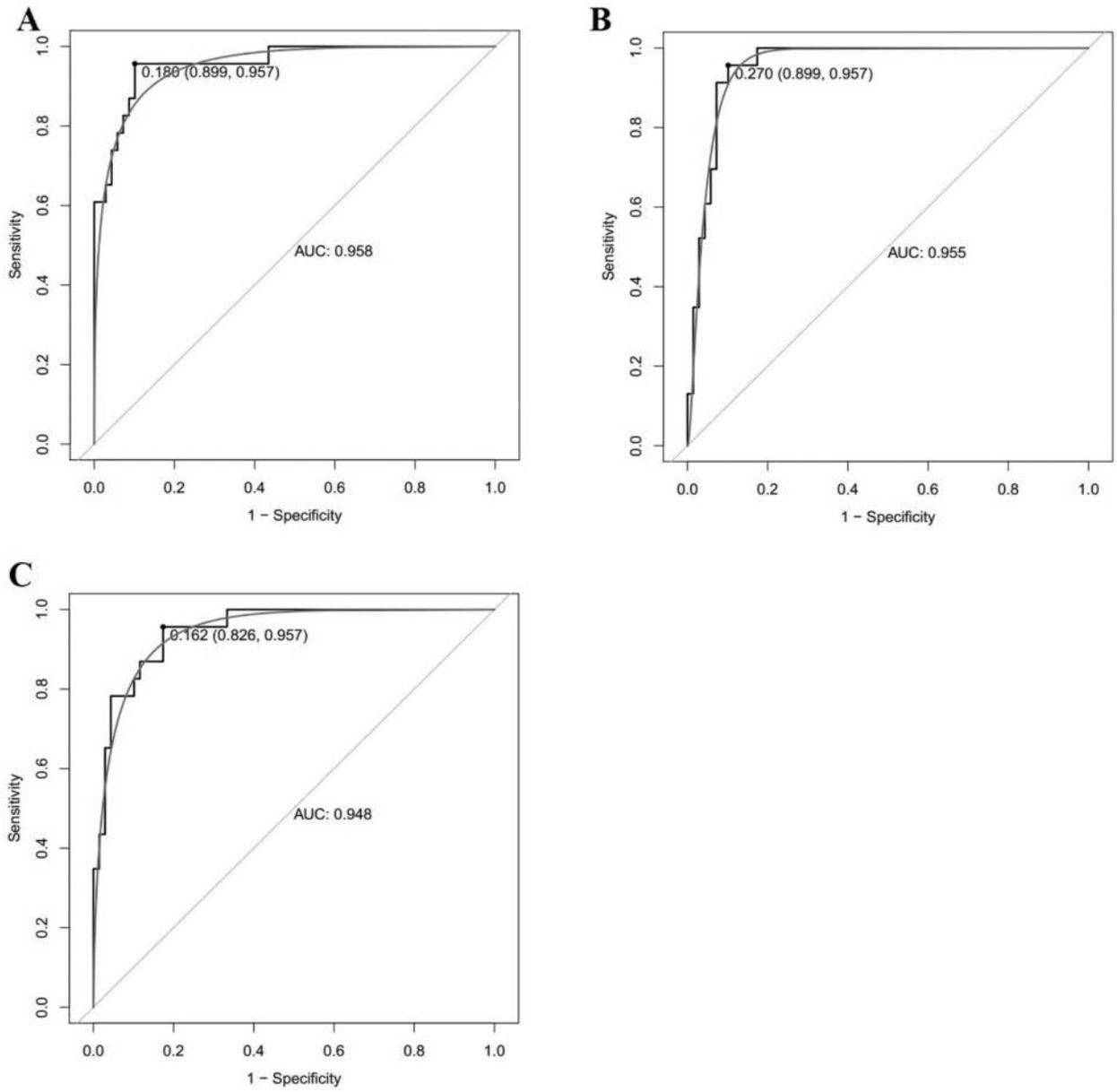


图6

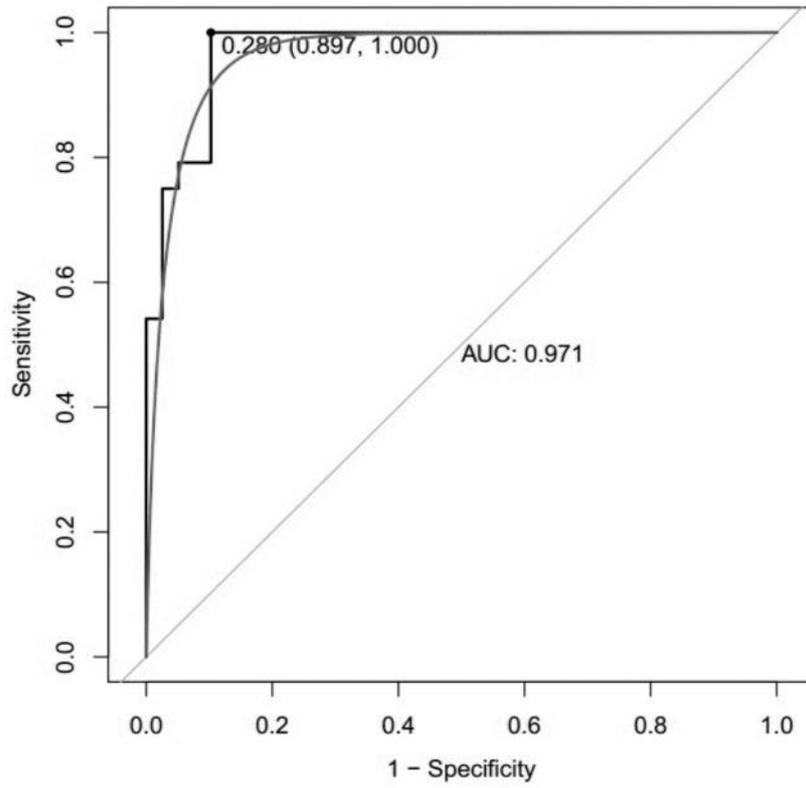


图7

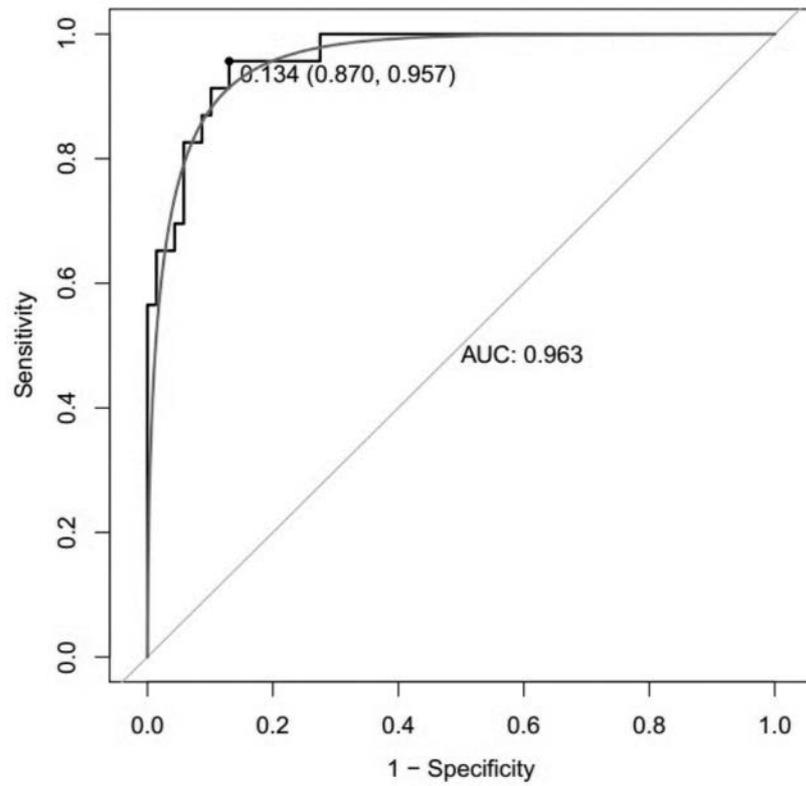


图8