



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107419008 B

(45) 授权公告日 2021.07.13

(21) 申请号 201710494171.8

(22) 申请日 2017.06.26

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 107419008 A

(43) 申请公布日 2017.12.01

(73) 专利权人 上海惠皓医疗科技有限公司  
地址 200241 上海市闵行区东川路555号丙  
楼1168室

(72) 发明人 江海松 李宾 富磊 江城松

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公  
司 31100

代理人 陈静

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6883 (2018.01)

C12Q 1/6851 (2018.01)

C12N 15/11 (2006.01)

(56) 对比文件

US 2014045921 A1, 2014.02.13

US 2014378536 A1, 2014.12.25

US 2012122958 A1, 2012.05.17

WO 2012169893 A1, 2012.12.13

WO 2012067970 A2, 2012.05.24

Joo-Ho Shin等.PARIS (ZNF746)

Repression of PGC-1 $\alpha$  Contributes to  
Neurodegeneration in Parkinson's Disease.  
《Cell》.2011,第144卷(第5期),第689-702页.

BONGLEE KIM等.Inhibition of ZNF746  
suppresses invasion and epithelial to  
mesenchymal transition in H460 non-small  
cell lung cancer cells.《ONCOLOGY  
REPORTS》.2013,第31卷(第1期),第73-78页.

审查员 马琪

权利要求书1页 说明书8页  
序列表2页 附图2页

(54) 发明名称

一种早期精确诊断帕金森病的方法和试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及一种早期精确诊断帕金森病的方法和试剂盒。更具体地,本发明提供了一种通过定量PCR的方法在外周血检测锌指转录因子蛋白PARIS (ZNF746) mRNA的水平来早期检测帕金森病的方法。本发明还提供了实施所述的方法的检测试剂盒。本发明的方法及试剂盒成本低、程序简单、耗时少。

1. 特异性扩增锌指转录因子PARIS上的靶序列片段1的引物对以及特异性针对所述的靶序列片段1的探针的用途,用于制备早期诊断帕金森疾病的试剂盒;其中,所述的靶序列片段1为:以SEQ ID NO: 1和SEQ ID NO: 2所示序列的引物扩增锌指转录因子PARIS所获得的序列片段;

其中,所述早期诊断帕金森疾病为根据Hoehn-Yahr分期,诊断处于Hoehn-Yahr2期前的病程阶段的帕金森疾病;所述早期诊断是针对血液样品的早期诊断;

所述引物对为SEQ ID NO: 1和SEQ ID NO: 2所示序列的引物对;所述探针为SEQ ID NO: 3所示序列的探针。

2. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述的早期是根据帕金森疾病的Hoehn-Yahr分期,处于Hoehn-Yahr1.5期前的病程阶段。

3. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述的早期是根据帕金森疾病的Hoehn-Yahr分期,处于Hoehn-Yahr1期前的病程阶段。

4. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述的探针是荧光探针。

5. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述试剂盒中还含有:锌指转录因子PARIS标准品,其为 SEQ ID NO: 7所示序列。

6. 如权利要求 1所述的用途,其特征在于,所述试剂盒中还含有:阴性对照和阳性对照。

7. 如权利要求6所述的用途,其特征在于,所述的阴性对照为无PARIS mRNA的RNA样品;所述的阳性对照为含有PARIS mRNA的RNA样品。

8. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述试剂盒中还含有:

逆转录酶;

逆转录RT反应液;

RNA酶抑制剂;

聚合酶链PCR反应液;

DNA聚合酶;和/或

说明诊断帕金森疾病的方法的使用说明书。

9. 如权利要求8所述的用途,其特征在于,所述逆转录酶为莫洛尼氏鼠白血病病毒M-MLV逆转录酶。

10. 如权利要求8所述的用途,其特征在于,所述DNA聚合酶为耐热DNA聚合酶Taq。

## 一种早期精确诊断帕金森病的方法和试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明属于疾病诊断领域,更具体地,本发明涉及一种早期精确检测帕金森病的方法和试剂盒。

### 背景技术

[0002] 中国是世界上人口第一大国,伴随着改革开放以来生活水平的提高和寿命的延长。目前中国已经进入人口老龄化快速发展阶段。2020年中国60周岁以上老年人口将达到2.43亿。如何让老年人群更健康地生活将是未来几十年一个重大的机遇和挑战。伴随老龄化发生的神经功能退化性疾病逐渐成为困扰老年人及其家庭的重要病症。

[0003] 帕金森疾病(parkinson disease,PD)是一种常见的神经系统退行性疾病,其特征性的病理改变是中脑黑质多巴胺(dopamine,DA)能神经元的进行性缺失,进而导致投射至纹状体多巴胺神经递质的减少。临床上帕金森症病人主要表现为麻痹、震颤、运动障碍等。遗传因素、环境因素、年龄老化、氧化应激以及炎症等均参与帕金森氏病多巴胺能神经元的变性死亡过程。5-10%帕金森症病人有家族史。其中,氧化应激在各种神经变性机制中处于主导地位,对多巴胺神经元死亡起重要作用。

[0004] 多年的研究表明,在患者出现典型的帕金森疾病的症状时,多巴胺细胞已出现大量的死亡,在这时再进行干预和治疗已无法挽回脑功能的进一步退化。无法做到早期诊断并进行早期干预是造成国际上各大药厂在帕金森病的临床试验中屡受挫折的一个主要原因。目前,本领域尚无可以稳定、有效地在帕金森疾病早期进行诊断的试剂。

[0005] 因此,早期诊断帕金森疾病的方法以及试剂的开发是本领域的当务之急。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种早期精确检测帕金森病的方法和试剂盒。

[0007] 在本发明的第一方面,提供一种用于早期诊断帕金森疾病的试剂盒,所述的试剂盒中包括:特异性扩增锌指转录因子PARIS上的靶序列片段1的引物对;所述的靶序列片段1为:以SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2所示序列的引物扩增锌指转录因子PARIS所获得的序列片段,或包含锌指转录因子PARIS上的该序列片段及其上游和/或下游1~20个,如20个,15个,10个,5个碱基的序列片段;

[0008] 在一个优选例中,所述的用于早期诊断帕金森疾病的试剂盒中还包括:特异性针对所述的靶序列片段1的探针;较佳地,所述的探针是荧光探针。

[0009] 在另一优选例中,所述的用于早期诊断帕金森疾病的试剂盒,所述的引物对选自:SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2所示序列的引物对。

[0010] 在另一优选例中,所述的用于早期诊断帕金森疾病的试剂盒,中还含有:锌指转录因子PARIS标准品,其为SEQ ID NO:7所示序列,或为锌指转录因子PARIS的基因序列上包含该SEQ ID NO:7所示序列及其上下游序列的长度为200bp以内的序列片段。

[0011] 在另一优选例中,所述的标准品是质粒。

[0012] 在另一优选例中,所述的用于早期诊断帕金森疾病的试剂盒中还含有:阴性对照和阳性对照;较佳地,所述的阴性对照为无PARIS mRNA的RNA样品;所述的阳性对照为含有PARIS mRNA的RNA样品。

[0013] 在另一优选例中,所述的用于早期诊断帕金森疾病的试剂盒中还含有:

[0014] 逆转录酶,较佳地为莫洛尼氏鼠白血病病毒M-MLV逆转录酶;

[0015] 逆转录RT反应液;

[0016] RNA酶抑制剂;

[0017] 聚合酶链PCR反应液;

[0018] DNA聚合酶,较佳地为耐热DNA聚合酶Taq;和/或

[0019] 说明诊断帕金森疾病的方法的使用说明书。

[0020] 在本发明的另一方面,提供特异性扩增锌指转录因子PARIS上的靶序列片段1的引物对,以及特异性针对所述的靶序列片段1的探针的用途,用于制备早期诊断帕金森疾病的试剂盒;其中,所述的靶序列片段1为:以SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2所示序列的引物扩增锌指转录因子PARIS所获得的序列片段,或包含锌指转录因子PARIS上的该序列片段及其上游和/或下游1~20个,如20个,15个,10个,5个碱基的序列片段。

[0021] 在另一优选例中,,所述的早期是根据帕金森疾病的Hoehn-Yahr分期,处于Hoehn-Yahr2期前的病程阶段,较佳地处于Hoehn-Yahr1.5期前的病程阶段,更佳地处于Hoehn-Yahr1期前的病程阶段。

[0022] 在本发明的另一方面,提供一种测定锌指转录因子PARIS mRNA的量的方法,所述方法包括:

[0023] (1)以待测样品的RNA为模板,以前面任一所述的用于早期诊断帕金森疾病的试剂盒进行PCR扩增,获得扩增产物;

[0024] (2)对(1)获得的扩增产物进行分析,确定PARIS mRNA的量。

[0025] 在一个优选例中,步骤(2)中,通过标准曲线法确定PARIS mRNA的量。

[0026] 在另一优选例中,若PARIS mRNA的量(拷贝数)为高于 $1.2E+05$ 拷贝数/ml,较佳地高于 $1.5E+05$ 拷贝数/ml,更佳地高于 $1.7E+05$ 拷贝数/ml,则受试者为早期帕金森疾病高危者。

[0027] 在另一优选例中,所述的方法为非诊断性方法。

[0028] 在另一优选例中,所述的待测样品为体液样品,较佳地为外周血或血清样品。

[0029] 本发明的其它方面由于本文的公开内容,对本领域的技术人员而言是显而易见的。

#### 附图说明

[0030] 图1、外周血的全RNA电泳图。其中样品1为正常人的全RNA电泳图,样品2为帕金森病人的全RNA电泳图。

[0031] 图2、质粒酶切图谱。质粒1和质粒2是含有PARIS标准品1序列的重组质粒。

[0032] 图3、荧光PCR的反应扩增线。

[0033] 图4、荧光PCR的标准曲线。

## 具体实施方式

[0034] 本发明经过广泛而深入的研究,揭示了一种荧光定量PCR检测PARIS的mRNA的量的方法,其可实现早期检测帕金森疾病。本发明还提供了实施所述的方法的检测试剂盒。本发明的方法及试剂盒成本低、程序简单、耗时少。

[0035] 目前开发帕金森早期检测试剂的难点在于难以找到可实现准确地、高灵敏度地检测的试剂。即使目前已有一些在帕金森病程中表达异常的基因已经被鉴定,然而,本领域中仍然没有获得符合标准的、检测准确性高、灵敏度高、实用性强的检测试剂。为此,本发明人经过深入的研究和大量的筛选,排除了一系列不合适的检测靶标或检测方法,确定了合适的检测靶标,找到了合适的检测试剂,基于此开发了实时荧光PCR早期检测帕金森疾病的方法。

[0036] PARIS是一个锌指转录因子,其具有644个氨基酸,其分子量69,136Da,其基因长度为1935bp,具有7个外显子和6个内含子;其GenBank登录号为155061。在帕金森病人的多巴胺神经元中,PARIS蛋白大量聚集,从而下调线粒体的重要管家基因PGC-1 $\alpha$ ,导致多巴胺神经的能量提供的紊乱,最终导致死亡。

[0037] 本发明人通过对检测靶向序列区段及引物的筛选,获得一种可特异性鉴定锌指转录因子PARIS的引物,其对于锌指转录因子PARIS发生特异性扩增,而对没有锌指转录因子PARIS成分的DNA不发生特异性扩增。

[0038] 本发明提供一种引物,其特异性扩增锌指转录因子PARIS上的靶序列片段1;所述的靶序列片段1为:以SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2所示序列的引物扩增锌指转录因子PARIS所获得的序列片段,或包含锌指转录因子PARIS上的该序列片段及其上游和/或下游1~20个(如20个,15个,10个,5个)碱基的序列片段。作为本发明的优选方式,所述的引物具SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2所示的核苷酸序列。

[0039] 本发明的这些引物还可以用放射性同位素、生物素、酶、荧光素或其他化学发光物质进行标记。

[0040] 本发明还提供一种探针,所述的探针是特异性针对所述的靶序列片段1的探针;较佳地,所述的探针是荧光探针;更佳地,所述的探针是Taqman探针,从而便于实时荧光检测。

[0041] 利用本发明的引物及探针,只需进行PCR反应、结合标准曲线法,就可以准确、快速地判断待测样品是否含有PARIS以及PARIS的量,而且所需的样品量很少。

[0042] 基于本发明所提供的适用于鉴定特异性扩增锌指转录因子PARIS的特异性引物及探针,本发明还提供了一种鉴定PARIS的方法,所述方法包括:以待测样品的DNA为模板,以SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2所示序列的引物对进行PCR扩增,若发生特异性扩增,则表明待测样品中包含PARIS。

[0043] 进一步地,通过以PARIS标准品制作标准曲线,可以对PARIS实现定量。较佳地,所述的定量是确定PARIS mRNA的量。

[0044] 聚合酶链反应(PCR)技术是本领域技术人员熟知的技术,其基本原理是体外酶促合成特异DNA片段的方法。

[0045] 作为本发明的优选方式,利用所述引物,采用Taqman实时荧光PCR方法来进行PARIS的鉴定。TaqMan探针法是特异的定量PCR技术,其核心是利用Taq酶的3'→5'外切核酸酶活性,切断探针,产生荧光信号。由于探针与模板是特异性结合,所以荧光信号的强弱就

代表了模板的数量。

[0046] 获取待测样品的DNA或RNA的方法是本领域技术人员所熟知的技术,例如可采取传统的酚/氯仿/异戊醇法,或者可采用一些商购的DNA提取试剂盒,这类试剂盒是本领域技术人员熟知的。

[0047] 本发明还涉及一种用于鉴定PARIS,进而用于早期诊断帕金森疾病的试剂盒,所述试剂盒中含有前面所述的引物;更佳地,所述的试剂盒中还含有前面所述的探针。

[0048] 此外,所述的试剂盒还可含有其它鉴定PARIS的试剂,例如包括(但不限于):

[0049] 逆转录酶,较佳地为莫洛尼氏鼠白血病病毒M-MLV逆转录酶;

[0050] 逆转录RT反应液;

[0051] RNA酶抑制剂;

[0052] 聚合酶链PCR反应液;

[0053] DNA聚合酶,较佳地为耐热DNA聚合酶Taq。

[0054] 此外,所述的试剂盒中还可含有鉴定PARIS的使用说明书和/或标准操作程序。本发明所述的试剂盒可实现快速检测、批量检测PARIS的目的。

[0055] 本发明的有益效果是:

[0056] 建立了利用Taqman技术检测PARIS mRNA的方法。由于本发明的优化,使得检测PARIS mRNA的敏感性大大提高,能保证在极少的标本中获得足够的信息。由于荧光探针的应用,使得检测的特异性大大提高,能有效降低常规PCR扩增的假阳性率。本发明的方法所设计的引物、探针以及检查结果,可以为荧光定量PCR检测试剂盒的开发提供可靠的依据。

[0057] 利用本发明的试剂盒以及检测方法进行荧光定量PCR的鉴定,成本低,具有准确的定性和定量的分析。

[0058] 本发明的试剂盒以及检测方法,可以实现早期确定,所述的早期是根据帕金森疾病的Hoehn-Yahr分期,处于Hoehn-Yahr2期前的病程阶段,较佳地处于Hoehn-Yahr1.5期前的病程阶段,更佳地处于Hoehn-Yahr1期前的病程阶段。因此,令人意外地,本发明的试剂盒与现有的诊断技术相比,可以提前约11年确诊帕金森疾病。

[0059] 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并不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J. 萨姆布鲁克等编著,分子克隆实验指南,第三版,科学出版社,2002中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。

[0060] 实施例1、样本收集及RNA获取

[0061] 样本收集:早上,在用餐之前,收取检测人的外周血,储存在4℃,在2个小时内,提取全RNA;或者放在冻存管里,-80℃保存备于后续提取全RNA。

[0062] 提取:使用Human RNA whole Blood mini kit提取RNA。RNA的质量通过RNA Gel的电泳来决定。如图1,获自正常人和帕金森病人样品的代表性的全RNA图。

[0063] 实施例2、用于PARIS定量PCR的引物及试剂盒制备

[0064] 1、引物

[0065] 本发明人进行了大量的研究、分析,包括序列特异性比较、扩增效率比较、定量准确性比较等。经过比对和实验验证,找到了具有特异性且定量效果理想的引物对及探针组合。所述的引物及探针序列如下。

[0066] 引物探针组合1:

[0067] 正向引物:5' -CCTGGCCCCAAGATTCCAG-3' (SEQ ID NO:1);

[0068] 反向引物:5' -CTGCTTGATCTGCATCAAGAGGTC-3' (SEQ ID NO:2);

[0069] 探针:5' -Fam-ACCCCAGTCCAGGCTCGG-Rox-3' (SEQ ID NO:3)。

[0070] 引物探针组合2:

[0071] 正向引物:5' -AAGCTCAACACAGCAGCCTC-3' (SEQ ID NO:4);

[0072] 反向引物:5' -GGGTGTGGCCACCACCTCCT-3' (SEQ ID NO:5);

[0073] 探针:5' -Fam-AAATTGTAATAAAAAACAGAAGTC-Rox-3' (SEQ ID NO:6)。

[0074] 2、PARIS标准品(质粒)的制备

[0075] 其中,PARIS标准品如下:

[0076] 标准品1序列:

[0077] CCTGGCCCCAAGATTCCAGATGTTCTGTGGACCCCAGTCCAGGCTCGGGGCCCCCAGTCCCGCCCC  
AGACCTCTTGATGCAGATCAAGCAG (SEQ ID NO:7)

[0078] 采用常规的连接方法,将PARIS标准品1与PCR2.1TOPO载体(购自Thermo scientific)在室温连接15min。将连接产物转化大肠杆菌TOP10感受态细胞,涂LB平板(含氨苄青霉素),37℃倒置培养过夜。

[0079] 挑取平板中单克隆菌落放入5ml LB培养基中,摇菌10小时;使用Qiagen小量质粒提取试剂盒进行质粒小量提取,操作步骤按说明书进行,获得重组质粒DNA,-20℃保存。

[0080] 质粒鉴定:取2ul质粒,用2单位(U)E.coli酶,37℃1小时;PCR产物行1.5%的琼脂糖凝胶电泳,观察目的条带,可见与目的片段大小一致的约93bp的电泳条带,见图2。

[0081] 电泳正确的进行测序验证,测序结果证明基因序列完全正确,证明序列克隆正确。说明目的基因已被克隆入PCR2.1TOPO载体中,该重组质粒可用作荧光定量PCR的阳性定量标准模板。

[0082] 3、试剂盒

[0083] 将上述的引物探针组合1或引物探针组合2置于试剂盒中。并且,还在试剂盒中装入以下试剂:

[0084] 逆转录RT反应液;其中含有olig-dT(15\_18)、dNTPs、DEPC-H<sub>2</sub>O;

[0085] 莫洛尼氏鼠白血病毒M-MLV逆转录酶;

[0086] RNA酶抑制剂foiasin;

[0087] 聚合酶链PCR反应液;其中含有:PCR缓冲液、MgCl<sub>2</sub>、dNTPs、扩增用荧光引物的mix;

[0088] 耐热DNA聚合酶;

[0089] PARIS标准品1质粒1和/或PARIS标准品1质粒2;

[0090] 对照品。

[0091] 其中,对照品分为阴性对照和阳性对照,如下:

[0092] 阴性对照,为无PARIS mRNA的RNA样品(正常人全血RNA);

[0093] 阳性对照,为含有PARIS mRNA的RNA样品10<sup>6</sup>拷贝数/ml(在上海生工生物有限公司合成)。

[0094] 本试剂盒应保存于-20℃,尽量减少反复冻融。

[0095] 实施例3、荧光定量PCR

[0096] 以实施例1制备的样品的RNA为模板,采用实施例2中所述的TaqMan荧光引物探针组合1,在定量荧光PCR仪进行二步法实时荧光定量PCR检测,PCR扩增产物的大小是93bp。

[0097] 以实施例1制备的样品的RNA为模板,采用实施例2中所述的TaqMan荧光引物探针组合2,在定量荧光PCR仪进行二步法实时荧光定量PCR检测,得不到特异性的产物。

[0098] 因此,相比引物探针组合1,引物探针组合2以及其它多个本发明人在前期验证过的序列在特异性和扩增效率方面都不够理想,扩增产物不特异。所以引物组合1是最理想的引物。

[0099] 1、PARIS mRNA荧光定量PCR检测标准曲线的建立(引物探针组合1)

[0100] 为了得到PARIS mRNA绝对定量值,本发明中实时荧光定量PCR检测采用外标准曲线定量的方法,将克隆的标准品1按 $10^9$ 拷贝数/ml, $10^8$ 拷贝数/ml, $10^7$ 拷贝数/ml, $10^6$ 拷贝数/ml, $10^5$ 拷贝数/ml, $10^4$ 拷贝数/ml, $10^3$ 拷贝数/ml, $10^2$ 拷贝数/ml, $10^1$ 拷贝数/ml, $10^0$ 拷贝数/ml梯度稀释,加于不同的反应管中。

[0101] 反应体系如下:

[0102] 荧光PCR Master Mix:10 $\mu$ l;

[0103] QPCR Array Mix(含引物和探针)(10uM):1ul;

[0104] 不同稀释度的标准品1(质粒):9ul;

[0105] 总体积20 $\mu$ l。

[0106] 反应条件如下:

[0107] 95 $^{\circ}$ C,10min;

[0108] 95 $^{\circ}$ C,15sec;60 $^{\circ}$ C,30s;72 $^{\circ}$ C,20sec;该步骤一共40个循环。

[0109] 反应结束后,通过软件分析得到定量PCR扩增动力曲线,见图3;并且,获得定量标准曲线,见图4。由图可见,标准曲线的提示误差较小,可信度高。

[0110] 2、帕金森疾病的Hoehn-Yahr分期

[0111] 根据Hoehn-Yahr分期,帕金森疾病包括5个期:

[0112] 早期含:

[0113] 1期:表现单侧受累;

[0114] 1.5期:表现单侧加躯干受累;

[0115] 2期:包括轻微双侧受累,无平衡障碍;

[0116] 2.5期:包括轻微双侧受累,后拉实验可恢复;

[0117] 中期含:

[0118] 3期:包括轻中度双侧受累,某种姿势不稳,可独立生活;

[0119] 晚期含:

[0120] 4期:包括严重残疾,能独立行走或站立;

[0121] 5期:表现为无帮助时只能坐轮椅或者卧床。

[0122] Hoehn-Yahr分期的平均病程:1期3年,2期6年,3期7年,4期9年,5期14年。

[0123] 3、受试者外周血PARIS mRNA定量检测(引物探针组合1搭配标准品1)

[0124] 本发明人从医院获得志愿者的样品。抽取10个年龄相仿的正常人,14个Hoehn-Yahr1-1.5期病人的全血,参照前述的荧光定量PCR检测体系以及检测方法检测PARIS mRNA的量。



[0125] 反应条件如下:

[0126] 50°C,45min;

[0127] 95°C,10min;

[0128] 95°C,15sec,60°C,30s,72°C,20sec,一共40个循环。

[0129] 反应结束后,根据标准曲线进行相应的分析,得出待测样品的起始PARIS mRNA的量。结果,10例正常人和13例帕金森病人PARIS mRNA拷贝数/ml检测结果如表1所示(用T-test的方法统计差异)。

[0130] 表1

[0131]

样品 编号	性 别	年 龄	类型	PARIS mRNA 量	平均值	差异	STD	T-test
1	男	60	正常	6.23E+04	7.64E+04	1	1.56E+04	1.52E-12
2	男	55	正常	1.03E+05				
3	男	70	正常	8.42E+04				
4	女	65	正常	6.46E+04				
5	女	66	正常	9.56E+04				
6	男	64	正常	5.34E+04				
7	男	56	正常	7.21E+04				
8	男	67	正常	8.42E+04				
9	女	68	正常	6.63E+04				
10	男	69	正常	7.84E+04				
11	男	58	Hoehn-Yahr 1 期	1.44E+05	1.79E+05	2.34	1.94E+04	
12	男	59	Hoehn-Yahr 1 期	1.58E+05				
13	男	62	Hoehn-Yahr 1 期	1.65E+05				
14	女	65	Hoehn-Yahr 1 期	1.93E+05				
15	女	67	Hoehn-Yahr 1 期	1.78E+05				

[0132]	16	男	68	Hoehn-Yahr 1 期	1.54E+05				
	17	男	70	Hoehn-Yahr 1 期	1.78E+05				
	18	男	72	Hoehn-Yahr 1 期	1.70E+05				
	19	男	65	Hoehn-Yahr 1 期	1.87E+05				
	20	男	62	Hoehn-Yahr 1 期	1.93E+05				
	21	男	65	Hoehn-Yahr 1.5 期	1.95E+05				
	22	男	64	Hoehn-Yahr 1.5 期	2.04E+05				
	23	男	65	Hoehn-Yahr 1.5 期	2.03E+05				

[0133] 表1的结果表明,本发明的方法可在正常和帕金森早期病人的外周血中对PARIS mRNA的表达进行非常准确的定性及定量分析。本发明的试剂盒产品能精准检测出Hoehn-Yahr1期病人的PARIS mRNA显著差异,可应用于对帕金森疾病进行早期诊断。

[0134] 本发明的上述方法,可以实现在Hoehn-Yahr1-1.5期之前确诊帕金森疾病,比目前现有技术的一般确诊方法相比,对于帕金森疾病确诊时间提前了11年。

[0135] 实施例4、检测试剂盒的临床应用

[0136] 获得8位临床受试者的外周血,如前述的方法提取全RNA,应用所述的引物组合1作为引物对进行PCR扩增,通过标准曲线法来获得PARIS mRNA的量。

[0137] 结果如下:

[0138] 7位受试者PARIS mRNA的量(拷贝数)低于1E+05拷贝数/ml,预后为非帕金森疾病高危者,可以定期检测即可。

[0139] 1位受试者PARIS mRNA的量(拷贝数)高于1.3E+05拷贝数/ml,预后为帕金森疾病高危者或患者,建议后续进行积极检查,在必要的情况下进行治疗。

[0140] 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。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 上海惠皓医疗科技有限公司
- [0003] <120> 一种早期精确诊断帕金森病的方法和试剂盒
- [0004] <130> 174342
- [0005] <160> 7
- [0006] <170> PatentIn version 3.3
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 19
- [0009] <212> DNA
- [0010] <213> 人工序列
- [0011] <220>
- [0012] <221> misc\_feature
- [0013] <223> 引物
- [0014] <400> 1
- [0015] cctggcccca agattccag 19
- [0016] <210> 2
- [0017] <211> 24
- [0018] <212> DNA
- [0019] <213> 人工序列
- [0020] <220>
- [0021] <221> misc\_feature
- [0022] <223> 引物
- [0023] <400> 2
- [0024] ctgcttgatc tgcataaaga ggctc 24
- [0025] <210> 3
- [0026] <211> 18
- [0027] <212> DNA
- [0028] <213> 人工序列
- [0029] <220>
- [0030] <221> misc\_feature
- [0031] <223> 探针
- [0032] <400> 3
- [0033] accccagtcc aggctcgg 18
- [0034] <210> 4
- [0035] <211> 20
- [0036] <212> DNA
- [0037] <213> 人工序列
- [0038] <220>

[0039] <221> misc\_feature  
[0040] <223> 引物  
[0041] <400> 4  
[0042] aagctcaaca cagcagcctc 20  
[0043] <210> 5  
[0044] <211> 20  
[0045] <212> DNA  
[0046] <213> 人工序列  
[0047] <220>  
[0048] <221> misc\_feature  
[0049] <223> 引物  
[0050] <400> 5  
[0051] ggggtgtggcc accacctcct 20  
[0052] <210> 6  
[0053] <211> 23  
[0054] <212> DNA  
[0055] <213> 人工序列  
[0056] <220>  
[0057] <221> misc\_feature  
[0058] <223> 探针  
[0059] <400> 6  
[0060] aaattgtaat aaaaacagaa gtc 23  
[0061] <210> 7  
[0062] <211> 93  
[0063] <212> DNA  
[0064] <213> 人工序列  
[0065] <220>  
[0066] <221> misc\_feature  
[0067] <223> 标准品  
[0068] <400> 7  
[0069] cctggcccca agattccaga tgttctctgtg gaccccagtc caggctcggg gcccccagtt 60  
[0070] cccgccccag acctcttgat gcagatcaag cag 93

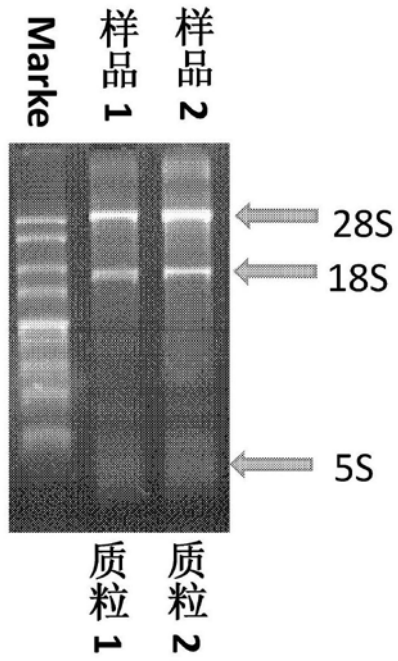


图1

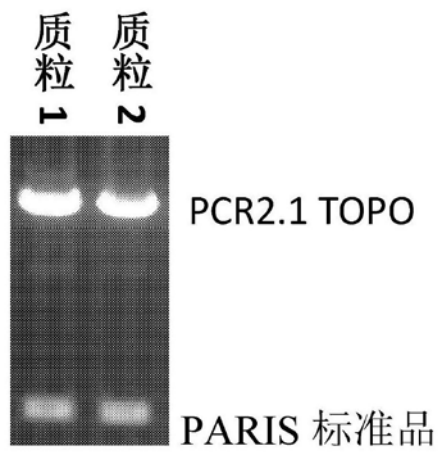


图2

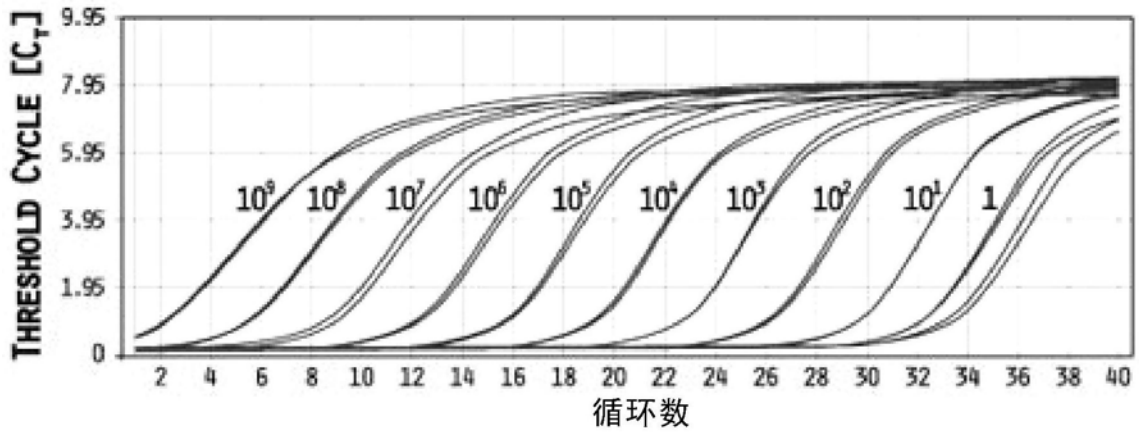


图3

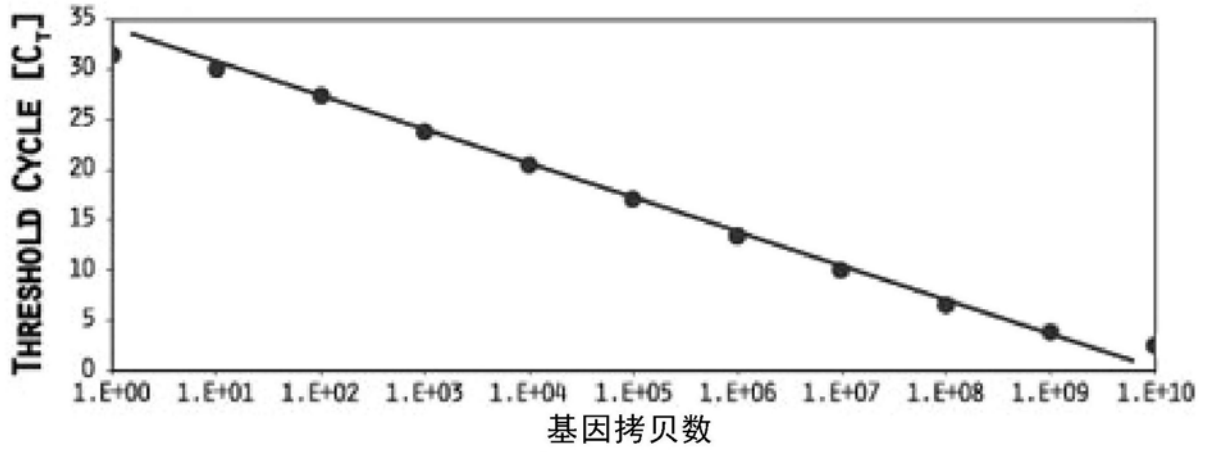


图4