



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107604068 A

(43)申请公布日 2018.01.19

(21)申请号 201711002908.6

(22)申请日 2017.10.24

(71)申请人 李翀

地址 100101 北京市朝阳区大屯路15号中国科学院生物物理研究所

(72)发明人 李翀 李书成

(74)专利代理机构 北京创遇知识产权代理有限公司 11577

代理人 武媛 吕学文

(51)Int.Cl.

C12Q 1/6886(2018.01)

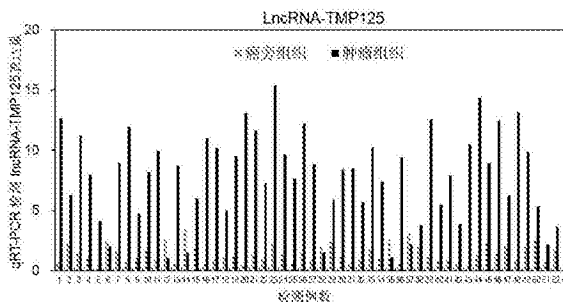
权利要求书1页 说明书10页
序列表2页 附图2页

(54)发明名称

一种利用长链非编码RNA检测膀胱癌的试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种利用长链非编码RNA检测膀胱癌的试剂盒,所述试剂盒包括:如SEQ ID No.2所述的上游引物和SEQ ID No.3所述的下游引物;探针;包含SEQ ID No.1所述核酸序列的标准DNA模板;PCR反应液。本发明的利用长链非编码RNA检测膀胱癌的试剂盒,选择长链非编码RNA lncRNA-TMP125对膀胱癌组织的检测,对膀胱癌的检测效果好,具有较高的灵敏度和特异性。



1. 一种利用长链非编码RNA检测膀胱癌的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括:
如SEQ ID No.2所述的上游引物和SEQ ID No.3所述的下游引物;
荧光标记物;
包含SEQ ID No.1所述核酸序列的标准DNA模板;
PCR反应液。
2. 根据权利要求1所述的利用长链非编码RNA检测膀胱癌的试剂盒,其特征在于,所述PCR反应液包括2×Super TaqMan Onestep Buffer, Super Onestep Enzyme, 探针, RNase-Free Water。
3. 根据权利要求2所述的利用长链非编码RNA检测膀胱癌的试剂盒,其特征在于, PCR反应体系为25ul反应体系,其中, 2xSuper TaqMan Onestep Buffer 12.5ul; 上游引物, 10uM, 0.5ul; 下游引物, 10uM, 0.5ul; 探针, 10pM, 0.5ul; Super Onestep Enzyme, 1.0ul; RNA Template, 10pg-100ng。
4. 根据权利要求1所述的利用长链非编码RNA检测膀胱癌的试剂盒,其特征在于, 所述标准模板DNA转化到DH5α感受态细胞中, 为提取的含有SEQ ID No.1所示序列的质粒。
5. 根据权利要求1所述的利用长链非编码RNA检测膀胱癌的试剂盒,其特征在于, 所述荧光标记物为SYBR Green、TaqMan探针、分子信标、双杂交探针或复合探针。
6. 根据权利要求5所述的利用长链非编码RNA检测膀胱癌的试剂盒,其特征在于, 所述TaqMan探针序列如SEQ ID No.4所示。
7. 根据权利要求1所述的利用长链非编码RNA检测膀胱癌的试剂盒,其特征在于, 所述试剂盒还包括RNA的提取试剂, 所述RNA的提取试剂为Thermo Fisher Scientific公司的TRIzol试剂。
8. 根据权利要求1所述的利用长链非编码RNA检测膀胱癌的试剂盒,其特征在于, 所述试剂盒还包括核酸定量仪。
9. 根据权利要求1所述的利用长链非编码RNA检测膀胱癌的试剂盒,其特征在于, 所述试剂盒还包括荧光定量扩增仪。

一种利用长链非编码RNA检测膀胱癌的试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及检测试剂盒技术领域,具体涉及一种膀胱癌基因检测试剂盒。

背景技术

[0002] 膀胱癌为泌尿系最常见的恶性肿瘤,在我国发病率居泌尿系统肿瘤的第一位。膀胱癌极易复发,发掘一种能用于早期筛查和预后监测的新型膀胱癌标志物,显得尤为重要。长链非编码RNA(lncRNA)是指长度超过200个核苷酸、具有调控基因表达作用的非编码RNA。研究发现,lncRNA参与了细胞内多种重要生命活动,虽无蛋白质编码功能,但可通过表观遗传修饰调控基因表达,与肿瘤的发生、发展密不可分。近年来,lncRNA与膀胱癌的关系也逐渐受到关注,一些具有极为重要的lncRNA有望成为膀胱癌诊断的生物标志物及治疗的分子靶点。

[0003] 传统的膀胱癌的检测中,极少用到lncRNA作为检测的标志物,虽然经过大量的研究,但是仍为发现有效的以lncRNA作为检测的标志物,亟待进一步研发一种以lncRNA作为检测标志物的检测试剂盒。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种利用长链非编码RNA检测膀胱癌的试剂盒,用以解决现有技术中存在的对膀胱癌检测的特异性及灵敏度较差的缺陷。

[0005] 为解决上述技术问题,本发明提供一种利用长链非编码RNA检测膀胱癌的试剂盒,

[0006] 所述试剂盒包括:

[0007] 如SEQ ID No.2所述的上游引物和SEQ ID No.3所述的下游引物;

[0008] 荧光标记物;

[0009] 包含SEQ ID No.1所述核酸序列的标准DNA模板;

[0010] PCR反应液。

[0011] 优选的,所述PCR反应液包括2×Super TaqMan Onestep Buffer,Super Onestep Enzyme,探针,RNase-Free Water。

[0012] 优选的,PCR反应体系为25u1反应体系,其中,2xSuper TaqMan Onestep Buffer 12.5u1;上游引物,10uM,0.5u1;下游引物,10uM,0.5u1;探针,10pM,0.5u1;Super Onestep Enzyme,1.0u1;RNA Template,10pg-100ng。

[0013] 优选的,所述标准模板DNA转化到DH5α感受态细胞中,为提取的含有SEQ ID No.1所示序列的质粒。

[0014] 优选的,所述荧光标记物为SYBR Green、TaqMan探针、分子信标、双杂交探针或复合探针。

[0015] 优选的,所述TaqMan探针序列如SEQ ID No.4所示。

[0016] 优选的,所述试剂盒还包括RNA的提取试剂,所述RNA的提取试剂为Thermo Fisher Scientific公司的TRIzol试剂。

[0017] 优选的,所述试剂盒还包括核酸定量仪。

[0018] 优选的,所述试剂盒还包括荧光定量扩增仪。

[0019] 本发明具有如下优点:

[0020] 本发明利用长链非编码表达谱芯片技术,通过差异分析,筛选到在人膀胱癌组织中显著表达的长链非编码RNA,命名为lncRNA。该长链非编码RNA在癌组织中的表达量与正常组织中的表达量相比,lncRNA-TMP125在人膀胱癌组织中显著高表达,本发明的利用长链非编码RNA检测膀胱癌的试剂盒,选择长链非编码RNA lncRNA-TMP125对膀胱癌组织的检测,对膀胱癌的检测效果好,具有较高的灵敏度和特异性。

附图说明

[0021] 图1为本发明的LncRNA芯片检测结果,显示膀胱癌组织里高表达的前十位的LncRNA信息。

[0022] 图2为本发明的针对lncRNA-TMP125的序列设计的引物PCR扩增后进行琼脂糖凝胶电泳结果图。

[0023] 图3为本发明的53例膀胱癌临床样本的lncRNA-TMP125验证qRT-PCR检测结果。

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。

[0025] 实施例1人膀胱癌与癌旁组织的lncRNA芯片表达分析,筛选癌组织中显著高表达的lncRNA

[0026] 一、材料和方法

[0027] 1.材料

[0028] 组织样本来自于3对膀胱癌患者的手术切除样本,每对包含膀胱癌组织和配对的癌旁组织。

[0029] 2.方法

[0030] (1)按Thermo Fisher Scientific公司的TRIzol试剂(货号15596026)提取膀胱癌组织和癌旁组织的总RNA。

[0031] (2)对样品RNA进行Cy5荧光标记(委托上海康成生物工程有限公司进行“ArrayStar Human LncRNA Microarray V4.0Service”进行标记服务)

[0032] (3)反转录合成第一链cDNA:以Total RNA为起始,含有T7启动子序列的Oligo(dT)Primer(上海康成生物工程有限公司)为引物,使用CbcScript酶合成第一链cDNA。

[0033] (4)合成第二链cDNA:DNA聚合酶(上海康成生物工程有限公司)以RNA片段为引物,合成第二链cDNA,并纯化双链cDNA。

[0034] (5)体外转录合成cRNA:以cDNA为模板,利用T7Enzyme Mix(上海康成生物工程有限公司)合成cRNA。

[0035] (6)随机引物反转录:取1 μ g cRNA,用随机引物进行反转录。

[0036] (7)杂交与清洗:cDNA溶于杂交液(25%甲酰胺,5 \times SSC,0.1%SDS,0.5%BSA)中45 $^{\circ}$ C杂交过夜,用SSC(上海康成生物工程有限公司)缓冲液中洗5分钟,玻片甩干后即可用于扫描。

[0037] (8) 芯片扫描, 图像分析, 差异基因筛选, 芯片用Agilent Microarray Scanner (Agilent p/n G2565BA) 进行扫描, 并转化为数字信号, 将原始数据输入到GeneSpring GX 软件中, 进行差异基因筛选。

[0038] 二、结果

[0039] 如图1所示, 本发明中关于人膀胱癌的lncRNA芯片聚类分析, 芯片筛查发现多条表达上调和表达下调的lncRNAs。其中lncRNA-TMP125显示出在癌组织中表达显著上调。

[0040] 实施例2qRT-PCR初步验证lncRNA-TMP125在膀胱癌的癌组织和癌旁组织中的差异表达

[0041] 一、实验材料

[0042] 选取53对人膀胱癌的癌组织和配对癌旁组织, 对lncRNA-TMP125的表达差异进行qRT-PCR验证。

[0043] 二、实验方法和结果

[0044] 1. 引物特异性鉴定

[0045] (1) 从Ensemble数据库提取lncRNA-TMP125相关的转录本序列, 并根据转录本的序列通过NCBI的引物设计工具(Primer BLAST)设计引物, 上游引物序列如SEQ ID No.2所示, 以及下游引物如SEQ ID No.3所示。

[0046] (2) 将人膀胱癌组织与癌旁组织用Thermo Fisher Scientific公司的TRIzol试剂(货号15596026)提取总RNA后, 再用7300real time PCR system核酸定量仪(Applied Biosystems AB)定量所提取的RNA的纯度和浓度。

[0047] (3) 采用北京康为世纪生物科技有限公司Super TaqMan OneStep RT-qPCR Kit试剂盒(货号CW2695), 以RNA为模板进行荧光定量PCR扩增。

[0048] 荧光定量PCR体系:

[0049]

试剂	25ul反应体系	终浓度
2xSuper TaqMan Onestep Buffer	12.5ul	1x
Forward Primer, 10uM	0.5ul	0.2uM
Reverse Primer, 10uM	0.5ul	0.2uM
Probe, 10pM	0.5ul	0.2uM
Super Onestep Enzyme	1.0ul	
RNA Template	X ul	10pg-100ng
RNase-Free Water	Up to 25ul	

[0050] 荧光定量PCR程序如下: 逆转录45℃, 20min; PCR预变性95℃, 2-5min; 变性95℃, 15s, 退火/延伸60℃, 30-45s, 共30-40个循环。

[0051] (4) 电泳检测, 选用DM2000DNA Marker(北京康为世纪生物科技有限公司, 货号CW0632)。如图2所示, 电泳结果为扩增片段大小与预期相同, 扩增产物只有一条带。

[0052] 2. 采用液氮研磨法, 按照Thermo Fisher Scientific公司的TRIzol试剂(货号15596026)所需试剂及步骤提取膀胱癌组织或肿瘤的总RNA。主要操作步骤如下:

[0053] (1) 新鲜组织样品迅速放入装有液氮的研钵中进行研磨, 最终研磨成粉末状;

[0054] (2) 每个研钵中加入1ml TRIzol试剂, 继续研磨5分钟, 直至形成匀浆状;

[0055] (3) 把上述匀浆转移到1.5ml无菌无酶离心管中,每1份匀浆中加入0.2ml氯仿,混匀后12000g离心20分钟,RNA存在于上层水相中;

[0056] (4) 吸取上层水相(约200-300u1)转移到1.5ml无菌无酶新管中,0.5ml异丙醇混匀,12000g离心10分钟;

[0057] (5) 弃上清,用75%的乙醇洗涤RNA沉淀一次,用20u1无RNA酶的水吹打几次溶解RNA,保存于-80℃低温冰箱。

[0058] 3. 标准DNA模板的制备

[0059] 根据SEQ ID No.1所示lncRNA-TMP125碱基序列,委托上海生工合成DNA。

[0060] 取样2u1合成产物,连接到pUC-TTA Cloning Kit(北京康为世纪生物科技有限公司,货号CW2591),随后转化到DH5 α 感受态细胞中。通过如SEQ ID No.2所示的引物和如SEQ ID No.3所示的引物筛选阳性克隆,提取质粒DNA,质粒DNA用7300real time PCR system核酸定量仪定量,并做10倍系列稀释作为标准曲线(标准DNA模板浓度范围在 10^2 - 10^6 拷贝/u1)。

[0061] 4. 敏感性实验

[0062] 将标准DNA模板质粒按比例稀释为102、103、104、105、106拷贝/u1,进行荧光定量PCR,以检测为阳性的最低浓度为该方法的检测灵敏度。本研究建立的方法,其检测范围为102-106拷贝/u1。最低检出浓度为102拷贝/u1。

[0063] 5. 荧光定量PCR检测lncRNA-TMP125表达量

[0064] 以RNA为模板进行荧光定量PCR扩增,荧光定量PCR体系:

[0065]

试剂	25u1反应体系	终浓度
2xSuper TaqMan Onestep Buffer	12.5u1	1x
Forward Primer,10uM	0.5u1	0.2uM
Reverse Primer,10uM	0.5u1	0.2uM
Probe,10pM	0.5u1	0.2uM
Super Onestep Enzyme	1.0u1	
RNA Template	X u1	10pg-100ng
RNase-Free Water	Up to 25u1	

[0066] 荧光定量PCR程序如下:逆转录45℃,20min;PCR预变性95℃,2-5min;变性95℃,15s,退火/延伸60℃,30-45s,共30-40个循环。

[0067] 根据qRT-PCR的相对定量公式: $2^{-\Delta Ct}$,分别计算出lncRNA-TMP125在膀胱癌患者癌组织(T)和癌旁组织(N)中的表达水平。如图3所示,lncRNA-TMP125在癌旁组织中的表达水平主要集中在0.37-3.28之间,而癌组织中的lncRNA-TMP125的表达量主要集中在1.053-15.375之间,明显高于正常组织。进一步确认lncRNA-TMP125在肿瘤组织中普遍高表达。本实施例的数据表明:lncRNA-TMP125在53例膀胱癌与癌旁组织中,47例上调,阳性检出率=上调表达例数/总检测例数 \times 100%=47/53=88.7%,lncRNA-TMP125可以作为膀胱癌诊断的新的肿瘤标志物。

[0068] 根据上述实施例1和实施例2的检测结果,利用lncRNA-TMP125长链非编码RNA在膀胱癌组织中高表达的特性,其核酸序列如SEQ ID No.1所示,其转录区域位于6号染色体,全

长1122bp。与正常组织相比,1ncRNA-TMP125在人膀胱癌组织中显著高表达。本发明提供一种利用长链非编码RNA检测膀胱癌的试剂盒,其包括如SEQ ID No.1的上游引物和如SEQ ID No.2的下游引物;TaqMan探针序列如SEQ ID No.4;包含SEQ ID No.1核酸序列的标准DNA模板;PCR反应液。

[0069] 其中,PCR反应液包括2xSuper TaqMan Onestep Buffer,Super Onestep Enzyme,RNase-Free Water,dNTP,Mg²⁺,Taq酶及buffer缓冲液,上游引物以及下游引物。荧光标记物为SYBR Green II、TaqMan探针、分子信标、双杂交探针或复合探针,Taq酶为热启动酶。检测试剂盒为荧光定量PCR检测试剂盒,引物适用于SYBR Green、TaqMan探针、分子信标、双杂交探针、复合探针的检测。

[0070] 本发明利用长链非编码RNA检测膀胱癌的试剂盒检测步骤如下:

[0071] 步骤A:按照Thermo Fisher Scientific公司的TRIzol试剂所需试剂及步骤提取总RNA提取样品总RNA,再用7300real time PCR system核酸定量仪(Applied Biosystems AB)定量所提取的的纯度和浓度。

[0072] 步骤B:以反转录的总RNA为模板进行荧光定量PCR扩增1ncRNA-TMP125。

[0073] 具体的,本发明的检测膀胱癌1ncRNA-TMP125的染料类荧光定量PCR试剂盒的使用方法,荧光定量PCR反应体系如下:

[0074]

试剂	25ul反应体系	终浓度
2xSuper TaqMan Onestep Buffer	12.5ul	1x
Forward Primer,10uM	0.5ul	0.2uM
Reverse Primer,10uM	0.5ul	0.2uM
Probe,10pM	0.5ul	0.2uM
Super Onestep Enzyme	1.0ul	
RNA Template	X ul	10pg-100ng
RNase-Free Water	Up to 25ul	

[0075] 荧光定量PCR程序如下:逆转录45℃,20min;PCR预变性95℃,2-5min;变性95℃,15s,退火/延伸60℃,30-45s,共30-40个循环。通过对阳性样品的检测,本发明定量试剂盒检测准确率为85.7%-91.6%,连续3次重复实验,实验结果稳定。

[0076] 本发明的荧光定量PCR检测试剂盒适合于目前存在市场上的所有类型荧光定量基因扩增仪,灵敏度高,特异性好,具有良好的应用前景。

[0077] 实施例3利用本发明的检测试剂盒对1ncRNA-TMP125在膀胱癌组织以及癌旁组织的差异表达进行检测

[0078] 一、实验材料

[0079] 选取100份人膀胱癌组织和100份癌旁组织(由北京大学第三医院提供),对1ncRNA-TMP125的表达差异进行qRT-PCR检测。

[0080] 二、实验方法和结果

[0081] 1.样品总RNA的提取:

[0082] 采用液氮研磨法,用Thermo Fisher Scientific公司的TRIzol试剂(货号15596026)提取膀胱癌组织或肿瘤的总RNA。主要操作步骤如下:

- [0083] (1) 新鲜组织样品迅速放入装有液氮的研钵中进行研磨,最终研磨成粉末状;
- [0084] (2) 每个研钵中加入1ml TRIZOL试剂,继续研磨3-5分钟,直至成匀浆状;
- [0085] (3) 把上述匀浆转移到1.5ml无菌无酶离心管中,每1份匀浆中加入0.2ml氯仿,混匀后12000g离心10分钟,RNA在上层水相中;
- [0086] (4) 吸取上层水相(约200-300ul)转移到1.5ml无菌无酶新管中,0.5ml异丙醇混匀,12000g离心10分钟;
- [0087] (5) 弃上清,用75%的乙醇洗涤RNA沉淀一次,用20ul无RNA酶的水吹打几次溶解RNA,保存于-80℃低温冰箱。

[0088] 2. 荧光定量PCR扩增

- [0089] (1) 采用如SEQ ID No.2所示的上游引物以及如SEQ ID No.3所示的下游引物。
- [0090] (2) 将人膀胱癌组织与癌旁组织按照Thermo Fisher Scientific公司的TRIzol试剂(货号15596026)提取总RNA后,再用7300real time PCR system核酸定量仪(Applied Biosystems AB)定量所提取的RNA的纯度和浓度。
- [0091] (3) 以总RNA为模板进行荧光定量PCR扩增。

[0092] 荧光定量PCR反应体系:

[0093]

试剂	25ul反应体系	终浓度
2xSuper TaqMan Onestep Buffer	12.5ul	1x
Forward Primer,10uM	0.5ul	0.2uM
Reverse Primer,10uM	0.5ul	0.2uM
Probe,10pM	0.5ul	0.2uM
Super Onestep Enzyme	1.0ul	
RNA Template	X ul	10pg-100ng
RNase-Free Water	Up to 25ul	

[0094] 荧光定量PCR的程序如下:逆转录45℃,20min;PCR预变性95℃,2-5min;变性95℃,15s,退火/延伸60℃,30-45s,共30-40个循环。

[0095] qRT-PCR检测膀胱癌组织样本中的lncRNA-TMP125,起始点表示产物聚集的对数期开始,该产物的荧光信号呈指数增长,即为Ct值。根据Ct值可以预测靶基因产物的起始浓度,即在PCR反应条件相同的情况下,靶基因起始浓度越大,则Ct值就越低。

[0096] 将癌旁对照组均值的95%可信区间的上界($X \pm 2.79SD$)作为本诊断实验的Cut-off值,其值为4.206。在此分界值条件下,本诊断实验的灵敏度为92%,特异度为83%。具体如下:

		实际样品		合计
		+	-	
[0097] 检测结果	+	89	13	102
	-	11	87	98
合计		100	100	200

[0098] 临床灵敏度可用来衡量某种试验检测出有病者的能力,灵敏度是将实际有病的人正确地判定为真阳性的比例,本实验灵敏度 $=89/(89+11) \times \% = 89\%$ 。

[0099] 临床特异度是衡量试验正确地判定无病者的能力,特异度是将实际无病的人正确地判定为真阴性的比例。本实验特异度 $=87/(13+87) \times \% = 87\%$ 。本发明的检测试剂盒用于膀胱癌组织的检测,具有较高的灵敏度和特异性。

[0100] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施例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。

[0101]

序列表

<120> 一种利用长链非编码 RNA 检测膀胱癌的试剂盒

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1122

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

tgcttttccct tctactgcac actgagctcc tgaaggcaact ggggcttget cccatttgta	60
ccctggageca cacagtaggt gttactaag tgactgtgga gcagaacttc taatattttt	120
gaaacacaga ttiggaaca ttttccaga aaacagacta caacaaatca tttccctggt	180
atgaaggaat gaagtttttt gtttcttca tagtcetaaa aaaatecccc aagagctcac	240
cagcatgaaa gcactagctc tgaatatgat atggaggaac aatgatttga agacctega	300
aaggcaagca acttgacacg gggcatcttt ctagatcatt gtttgaaga gaaccatcag	360
gaecatccca ggggtcctgt gaaacgtgt tggcctgggc aaggaggga ctggtgetca	420
tcactggccc tttcagaaa caatctgctc cgtccaagtg caatatgagt atttccagct	480
gaccatgggg aaacttgitt tctagtttat ccagctaca ttatcaagaa aatagtcaat	540
ggagtcaaca aatgcaaacc tctggaaaac atttcagaga ctggcttggt gctacaacaa	600
gaacggtgat atcataatca ccattgtgga gcagatgcca ggtagcattg ctaacctett	660
cagaataatt gacatttttc taacatgcag agtggccata acaaccactt cagctacaca	720
atagcctcca ccgtaacact tccttagcaa cccgcttaac accgtgaett tgaatcacc	780

[0102]

cgctatTTTtg gcagcaggat gaatgTTTgc TgTcTgTgaa cTTTTcaaag gTcAtcagct 840
 ggaaacaagc ctgcccactt cTTTgCcta ccccgccact gCctgTegTa cccatccatc 900
 acaggacata atgCtTaagc actTgaggaa aagataatgc accgCtTaca tTTTctagT 960
 ggaacaataa atTTTattTc ggggatgTtg ggggaaaaaa gTcgtagTgt tactgacca 1020
 TgTTTatta acctgTctcc aattaacaga aaggatgaca cTaattgGaa acacaccatt 1080
 ttgCtTaagc aattaatctt tTTTgTtTa tTTTTaaag cc 1122

<170> PatentIn version 3.5

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

caccagcatgaaagcactag 20

<170> PatentIn version 3.5

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3

[0103]

aaataactcatattgcacttg

20

<170> PatentIn version 3.5

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 4

caggacgac ccaggggtcc tgtgaaacgc

30

序列表

<110> 李翀

<120> 一种利用长链非编码RNA检测膀胱癌的试剂盒

<130> 201710

<160> 4

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 1122

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

```

tgtctttcct tctactgcac actgagctcc tgaaggcact ggggcttgct cccatttgta 60
ccctggagca cacagtaggt gettaactaag tgactgtgga gcagaacttc taatattttt 120
gaaacacaga tttggaaaca tcttcccaga aaacagacta caacaaatca tttccctggt 180
atgaaggaaat gaagtttttt gtttctttca tagtctctaaa aaaatceccc aagagctcac 240
cagcatgaaa gcactagctc tgaatatgat atggaggaac aatgatttga agaccttcga 300
aaggcaagca acttgacacg gggcatcttt ctagatcatt gtttggaga gaaccatcag 360
gacgatccca ggggtcctgt gaaacgctgt tggcctgggc aaggaggaa ctggtgctca 420
tactggccc tcttcagaaa caatctgctc cgtccaagtg caatatgagt atttcagct 480
gaccatgggg aaacttgttt tctagtttat cccagctaca ttatcaagaa aatagtcaat 540
ggagtcaaca aatgcaaacc tctggaaaac atttcagaga ctggcttggt gctacaacaa 600
gaacggtgat atcataatca ccattgtgga gcagatgcca ggtagcattg ctaacctctt 660
cagaataatt gacatttttc taacatgcag agtggccata acaaccactt cagctacaca 720
atagcctcca ccgtaacact tccttagcaa cccgettaac accgtgactt tgaatcatc 780
cgctattttg gcagcaggat gaatgtttgc tggctgtgaa cttttcaaag gtcatcagct 840
ggaaacaagc ctgcccactt ctttgctta cccgccact gcctgtcgta cccatccatc 900
acaggacata atgcttaagc acttgaggaa aagataatgc accgcttaca ttttcctagt 960
ggaacaataa attttatttc ggggatgttg ggggaaaaaa gtcgtagtgt tactgacca 1020
tgttttatta acctgtctcc aattaacaga aaggatgaca ctaattggaa acacaccatt 1080
ttgcttaagc aattaatctt ttttggttta tttttaaag cc 1122

```

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

caccagcatg aaagcactag 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 3

aaatactcat attgcacttg 20

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 4

caggacgate ccaggggtcc tgtgaaacgc 30

No.	Seqname	P-value	Fold change	Regulation	Type	Source	RNA length	Chrom
1	ENST00000435810	0.03394	5.2973	Up	Noncoding	Ensembl	1122	Chr6
2	ENST00000513573	0.01366	5.0717	Up	Noncoding	Ensembl	424	Chr5
3	AC104695.4	0.03738	4.7113	Up	Noncoding	Ensembl	849	Chr2
4	ENST00000443228	0.01578	4.4804	Up	Noncoding	Ensembl	210	Chr13
5	BO221934	0.02604	4.3553	Up	Noncoding	lincRNA	803	Chr21
6	ENST00000507428	0.00910	4.2019	Up	Noncoding	Ensembl	566	Chr5
7	ENST00000412311	0.02051	4.1506	Up	Noncoding	Ensembl	497	Chr1
8	Uc001mj.1	0.01559	3.9646	Up	Noncoding	Ensembl	4587	Chr12
9	Chr3:33273197	0.02571	3.8583	Up	Noncoding	LincRNA	2405	Chr3
10	AK056127	0.00611	3.5019	Up	Noncoding	Misc_RNA	1859	Chr12

图1

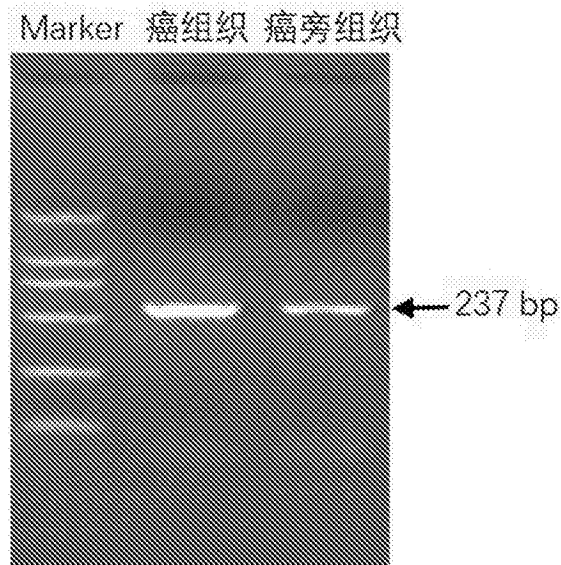


图2

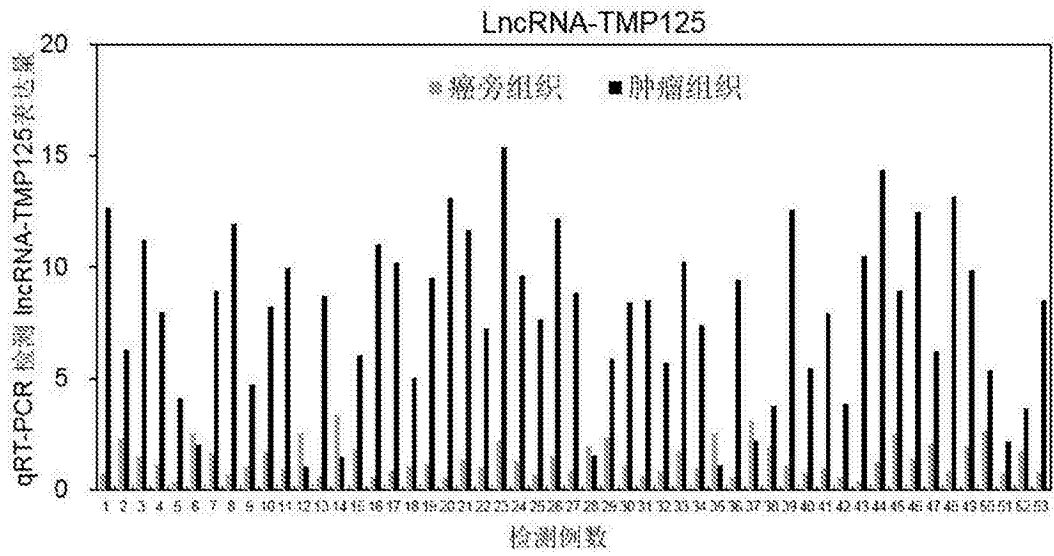


图3