



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111187827 A

(43)申请公布日 2020.05.22

(21)申请号 202010065567.2

(22)申请日 2020.01.20

(71)申请人 厦门大学

地址 361000 福建省厦门市思明南路422号

(72)发明人 王翀 李娟

(74)专利代理机构 厦门创象知识产权代理有限公司 35232

代理人 王凤玲

(51)Int.Cl.

C12Q 1/6883(2018.01)

权利要求书1页 说明书6页  
序列表2页 附图2页

(54)发明名称

帕金森病生物标志物及其应用

(57)摘要

本发明涉及帕金森病生物标志物及其应用。本发明提出了一种用于帕金森病的生物标志物,所述生物标志物为环状RNA,所述环状RNA为circ-AMOTL1,所述circ-AMOTL1为含有SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列。本发明提出了用于早期诊断帕金森病或相关疾病的诊断以及预测患病风险的方法,可以解决现有帕金森病诊断方法不能做到早期预警、不能预测帕金森病等缺点。

1. 一种用于帕金森病的生物标志物,其特征在于,所述生物标志物为环状RNA,所述环状RNA为circ-AMOTL1,所述circ-AMOTL1为含有SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列。

2. 一种诊断对象是否患有帕金森病或相关疾病或者预测对象是否患有帕金森病或相关疾病的风险的方法,其特征在于,所述方法用于非疾病的诊断目的,包括:

(1) 从所述对象中收集外周血样本;

(2) 提取所述外周血样本的RNA、逆转录扩增所述RNA,然后荧光定量PCR检测circ-AMOTL1的表达量。

3. 一种试剂盒,其特征在于,包括用于检测权利要求1所述的生物标志物的试剂。

4. 权利要求1所述的生物标志物在制备试剂盒中的用途,其特征在于,所述试剂盒用于诊断对象是否患有帕金森病或相关疾病或者预测对象是否患有帕金森病或相关疾病的风险。

5. 如权利要求4所述的用途,其特征在于,所述诊断或预测包括以下步骤:

(1) 从所述对象中收集外周血样本;

(2) 提取所述外周血样本的RNA、逆转录扩增所述RNA,然后荧光定量PCR检测circ-AMOTL1的表达量。

## 帕金森病生物标志物及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药技术领域,具体涉及一种帕金森病生物标志物及其应用。

### 背景技术

[0002] 帕金森病(Parkinson's disease,PD)是一种常见的中枢神经系统变性疾病,其发病机制主要为黑质纹状体的多巴胺能神经元逐渐丢失,从而导致静止性震颤、运动迟缓、肌强直、姿势步态障碍等症状,严重影响患者健康和生活质量,给患者及其家庭、社会带来沉重的负担。目前PD临床诊断主要依靠病史、症状、体征、影像学的综合评估,但这些方法有主观性大、可靠性低、成本高等缺点。此外,早期干预能显著提高PD患者的生活质量和延长生存时间,而当患者已经表现出症状、体征时,多巴胺能神经元已经大部分丢失,错过了早期干预时机。

[0003] 因此,对于帕金森病的早期诊断以及发现仍有待改进。

### 发明内容

[0004] 本发明旨在至少在一定程度上解决相关技术中的技术问题之一。为此,本发明的一个目的在于提供一种用于帕金森病的生物标志物。该生物标志物的表达变化早于神经元丢失,可用于帕金森病的早期预测。

[0005] 为此,在本发明的第一个方面,本发明提出了一种用于帕金森病的生物标志物,所述生物标志物为环状RNA,所述环状RNA为circ-AMOTL1,所述circ-AMOTL1为含有SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列。

[0006] 根据本发明的一种用于帕金森病的生物标志物,通过检测环状RNA circ-AMOTL1可知,其在帕金森病患者血液中表达升高,在MPTP诱导的帕金森病动物模型中血液及中脑组织中表达也升高,并且其表达变化早于神经元丢失,可用于帕金森病的早期预测。具有客观、灵敏、简易、费用低等优点,且可以在早期提示帕金森病的风险。

[0007] 在本发明的第二方面,本发明提出了一种诊断对象是否患有帕金森病或相关疾病或者预测对象是否患有帕金森病或相关疾病的风险的方法,所述方法用于非疾病的诊断目的,包括:

[0008] (1)从所述对象中收集外周血样本;

[0009] (2)提取所述外周血样本的RNA、逆转录扩增所述RNA,然后荧光定量PCR检测circ-AMOTL1的表达量。

[0010] 根据本发明的方法,利用检测对象中的生物标志物的表达量来确定对象是否患有帕金森或相关疾病,或者预测其患有帕金森病或者相关疾病的风险。

[0011] 在本发明的第三方面,本发明提出了一种试剂盒,包括用于检测上述的生物标志物的试剂。

[0012] 在本发明的第四方面,本发明提出了上述生物标志物在制备试剂盒中的用途,所述试剂盒用于诊断对象是否患有帕金森病或相关疾病或者预测对象是否患有帕金森病或

相关疾病的风险。

[0013] 根据本发明的实施例,所述诊断或预测包括以下步骤:

[0014] (1) 从所述对象中收集外周血样本;

[0015] (2) 提取所述外周血样本的RNA、逆转录扩增所述RNA,然后荧光定量PCR检测circ-AMOTL1的表达量。

[0016] 利用检测对象中的生物标志物的表达量来确定对象是否患有帕金森或相关疾病,或者预测其患有帕金森病或者相关疾病的风险。

[0017] 本发明的附加方面和优点将在下面的描述中部分给出,部分将从下面的描述中变得明显,或通过本发明的实践了解到。

## 附图说明

[0018] 图1为本发明circ-AMOTL1在PD患者血液中的表达;

[0019] 图2为本发明circ-AMOTL1在PD小鼠血液中的表达;

[0020] 图3为本发明circ-AMOTL1在PD小鼠中脑组织中的表达;

[0021] 图4为本发明circ-AMOTL1在PD小鼠中脑TH阳性神经元数目。

## 具体实施方式

[0022] 以下通过特定的具体实例说明本发明的技术方案。应理解,本发明提到的一个或多个方法步骤并不排斥在所述组合步骤前后还存在其他方法步骤或在这些明确提到的步骤之间还可以插入其他方法步骤;还应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围。而且,除非另有说明,各方法步骤的编号仅为鉴别各方法步骤的便利工具,而非为限制各方法步骤的排列次序或限定本发明可实施的范围,其相对关系的改变或调整,在无实质变更技术内容的前提下,当亦视为本发明可实施的范畴。

[0023] 为了更好的理解上述技术方案,下面更详细地描述本发明的示例性实施例。虽然显示了本发明的示例性实施例,然而应当理解,可以以各种形式实现本发明而不应被这里阐述的实施例所限制。相反,提供这些实施例是为了能够更透彻地理解本发明,并且能够将本发明的范围完整的传达给本领域的技术人员。

[0024] 针对现有帕金森病诊断方法不能做到早期预警、不能预测帕金森病发病以及发展的趋势等缺点,本发明提出一种用于评估帕金森病风险或者早期诊断帕金森病的生物标志物,以及帕金森病的诊断和患病风险评估方法,能预测帕金森病发病以及发展的趋势,应用于疾病病理分型。

[0025] 生物标志物

[0026] 根据本发明的一个方面,本发明提出了一种生物标志物,所述生物标志物为环状RNA,所述环状RNA为circ-AMOTL1,所述circ-AMOTL1为含有如下所示的核苷酸序列:

TTGAAGATCCTCTTTGTAACCTCCACTCCCCAACTTCTGAGGATCTCAGAGGTG  
 GAAATGAGAGGTTCCGAGGATGCGGCAGCTGGAACAGTATTGCAGCGGCTGATCCAG  
 GAACAACCTGCGGTATGGCACCCCAACCGAGAACATGAACTTGCTGGCCATTCAGCAC  
 CAGGCCACAGGGAGTGCAGGACCAGCCATCCTACAAACAACCTTTTCTTCCACGGAA  
 AACCTCACTCAAGAAGACCCACAAATGGTCTACCAGTCAGCACGCCAAGAACCGCAG  
 GGTCAAGAACACCAGGTGGACAATACGGTGATGGAGAAACAGGTCCGGTCCACGCAG  
 CCTCAGCAGAACAACGAGGAACTGCCACTTACGAGGAGGCCAAAGCACAGTCGCA  
 GTTCTTCAGGGGGCAGCAGCAGCAACAGCAGCAGGGGGCGGTGGGCCATGGTTA  
 [0027] CTACATGGCAGGGGGCACCAGTCAGAAGTCCCGAACTGAGGGGAGGCCACTGTGAA  
 CCGTGCCAACAGTGGACAGGCGCATAAGGACGAGGCGCTGAAGGAACTGAAGCAGG  
 GCCACGTCCGCTCGCTCAGCGAGAGAATCATGCAGCTGTCCCTGGAGAGGAATGGGG  
 CCAAGCAACACCTTCCCGGCTCGGGGAATGGAAAGGGCTTCAAAGTAGGAGGGGGG  
 CCCTCCCCTGCCAGCCTGCAGGTAAAGTGCTGGACCCTCGGGGTCTCCACCTGAGT  
 ACCCCTTCAAGACCAAGCAAATGATGTCCCAGTCAGCAAGACCCAGGAGCACGGAC  
 TTTTTTATGGTGACCAGCACCCCGGATGCTCCACGAGATGGTCAAGCCCTACCCTGC  
 TCCTCAGCCTGTGAGAACAGATGTGGCCGTCTGCGGTACCAGCCACCCCTGAGTAT  
 GGGGTAACGAG。

[0028] 根据本发明的实施例,生物标志物质的水平通过其表达水平指示。其中,检测环状RNA circ-AMOTL1表达水平可以包括RT-PCR、荧光定量PCR、原位杂交或芯片等检测方法。

[0029] 下面参考具体实施例,对本发明进行描述,需要说明的是,这些实施例仅仅是描述性的,而不以任何方式限制本发明。

[0030] 实施例1人外周血circ-AMOTL1表达检测

[0031] 1、人血液样本收集

[0032] 收集PD(帕金森病)患者外周血样本10例,正常人外周血样本10例。

[0033] 血液样本RNA提取、逆转录和荧光定量PCR

[0034] (1) RNA提取:按照说明书步骤,利用TAKARA公司的血液RNA提取试剂盒提取血液样品RNA。从最后得到的RNA中取2 $\mu$ l进行定量。

[0035] (2) 逆转录:按照说明书步骤,利用MedChemExpress公司的逆转录试剂盒进行:

[0036] 反应体系:

[0037] 2 $\times$  Super RT Mix 10 $\mu$ L

[0038] Total RNA 1 $\mu$ g

[0039] RNase-Free H<sub>2</sub>O To 20 $\mu$ L

[0040] 反应条件:

[0041] 第一步:25 $^{\circ}$ C 10分钟;

[0042] 第二步:42 $^{\circ}$ C 45分钟;

[0043] 第三步:85 $^{\circ}$ C 2分钟。

[0044] (3) 荧光定量PCR:按照说明书步骤,利用Promega公司的SYBR Green法荧光定量

PCR试剂盒进行:

[0045] 反应体系:

2× GoTaq qPCR Master Mix 10 μL

Forward Primer 1 μL

Reverse Primer 1 μL

[0046] cDNA 2 μL

CXR Reference Dye 0.2 μL

RNase-Free H<sub>2</sub>O To 20 μL

[0047] Human circ-AMOTL1 Forward Primer:AGTATGGGGTAACGAGTTGAAGAT (SEQ ID NO: 2)。

[0048] Human circ-AMOTL1 Reverse Primer:AGTTGTTCTGGATCAGCCG (SEQ ID NO:3)。

[0049] 反应条件:

[0050] 第一步:95℃ 2分钟;

[0051] 第二步:95℃ 15秒,60℃ 1分钟,40个循环;

[0052] 第三步:60℃-95℃熔解曲线分析确定目的条带;

[0053] 第四步:Δ Δ CT法进行相对定量。

[0054] 3、结果

[0055] 如图1所示,与正常人血液相比,circ-AMOTL1在PD患者血液中的表达升高,差异具有统计学意义( $p < 0.05$ )。

[0056] 实施例2小鼠外周血Circ-AMOTL1表达检测及多巴胺能神经元计数

[0057] 1、模型建立

[0058] 本方案利用国际常用的PD小鼠模型:10周龄雄性C57BL小鼠32只,随机分为四组,PD 1天组、PD 7天组、对照1天组、对照7天组。PD 1天组和PD 7天组小鼠按30mg/kg剂量腹腔注射1-甲基-4-苯基-1,2,4,5-四氢吡啶(MPTP),连续注射5天,对照1天组和对照7天组注射等剂量生理盐水。

[0059] 2、小鼠样本收集

[0060] 在最后一次注射后的第1天,PD 1天组和对照1天组小鼠麻醉后取血液和中脑组织样本,或通过主动脉依次用生理盐水和4%多聚甲醛进行灌注和固定,打开颅骨,取全脑组织样本。

[0061] 3、血液及中脑组织样本RNA提取、逆转录和荧光定量PCR

[0062] (1) RNA提取:按照说明书步骤,利用TAKARA公司的RNA提取试剂盒提取血液及中脑组织样品RNA。从得到的RNA中取2μl进行定量。

[0063] (2) 逆转录:按照说明书步骤,利用MedChemExpress公司的逆转录试剂盒进行:

[0064] 反应体系:

[0065] 2× Super RT Mix 10μL

[0066] Total RNA/mRNA 1μg

[0067] RNase-Free H<sub>2</sub>O To 20μL

- [0068] 反应条件:
- [0069] 第一步:25℃ 10分钟;
- [0070] 第二步:42℃ 45分钟;
- [0071] 第三步:85℃ 2分钟。
- [0072] (3) 荧光定量PCR:按照说明书步骤,利用Promega公司的SYBR Green法荧光定量PCR试剂盒进行:
- [0073] 反应体系:
- |        |                             |          |
|--------|-----------------------------|----------|
| [0074] | 2× GoTaq qPCR Master Mix    | 10 μL    |
|        | Forward Primer              | 1 μL     |
|        | Reverse Primer              | 1 μL     |
| [0075] | cDNA                        | 2 μL     |
|        | CXR Reference Dye           | 0.2 μL   |
|        | RNase-Free H <sub>2</sub> O | To 20 μL |
- [0076] Mice circ-AMOTL1 Forward Primer:CGTCCTGAGGTATCAGCCAC (SEQ ID NO:4)。
- [0077] Mice circ-AMOTL1 Reverse Primer:AGTTGTTCTGGATCAGCCG (SEQ ID NO:5)。
- [0078] 反应条件:
- [0079] 第一步:95℃ 2分钟;
- [0080] 第二步:95℃ 15秒,60℃ 1分钟,40个循环;
- [0081] 第三步:60℃-95℃熔解曲线分析确定目的条带;
- [0082] 第四步:Δ Δ CT法进行相对定量。
- [0083] 4、全脑组织样本染色
- [0084] (1) 脑组织处理:将第2步获得的全脑组织于4%多聚甲醛中充分固定12小时,而后转移至30%蔗糖溶液中脱水48小时。
- [0085] (2) 切片:在冰冻切片机中对脑组织进行35μm厚度连续冠状切片,收集中脑黑质部分切片。
- [0086] (3) 免疫荧光:
- [0087] 1) 切片用PBS洗5分钟×3次。
- [0088] 2) 切片用山羊血清封闭1小时。
- [0089] 3) 切片加入酪氨酸羟化酶(TH)一抗,工作效价为1:1000,于4℃孵育过夜。
- [0090] 4) 切片加入羊抗兔荧光二抗,室温避光孵育1小时。
- [0091] 5) 将切片置于载玻片上,中性树脂封片,避光保存。
- [0092] (4) 计数:显微镜下观察黑质部位,拍照并统计荧光细胞数目。
- [0093] 5、结果
- [0094] (1) 如图2及图3所示,与对照组小鼠相比,circ-AMOTL1在PD 1天组和PD 7天组小鼠血液及中脑组织中的表达均升高,差异具有统计学意义(p<0.05)。
- [0095] (2) 如图4所示,与对照组小鼠相比,PD 7天组小鼠黑质切片的TH阳性神经元数目显著减少,差异具有统计学意义(p<0.05),但PD 1天组小鼠黑质切片的TH阳性神经元数目

无明显变化,而PD 1天组小鼠血液及中脑组织中circ-AMOTL1表达已经升高,说明血液及中脑组织中的circ-AMOTL1变化早于神经元丢失。

[0096] 综上,本发明通过检测环状RNA circ-AMOTL1可知,其在帕金森病患者血液中表达升高,在MPTP诱导的帕金森病动物模型中血液及中脑组织中表达也升高,并且其表达变化早于神经元丢失,可用于帕金森病的早期预测。具有客观、灵敏、简易、费用低等优点,且可以在早期提示帕金森病的风险。

[0097] 在本说明书的描述中,参考术语“一个实施例”、“一些实施例”、“示例”、“具体示例”、或“一些示例”等的描述意指结合该实施例或示例描述的具体特征、结构、材料或者特点包含于本发明的至少一个实施例或示例中。在本说明书中,对上述术语的示意性表述不应理解为必须针对的是相同的实施例或示例。而且,描述的具体特征、结构、材料或者特点可以在任何的一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。此外,本领域的技术人员可以将本说明书中描述的不同实施例或示例进行接合和组合。

[0098] 尽管上面已经示出和描述了本发明的实施例,可以理解的是,上述实施例是示例性的,不能理解为对本发明的限制,本领域的普通技术人员在本发明的范围内可以对上述实施例进行变化、修改、替换和变型。

## 序列表

<110> 厦门大学

<120> 帕金森病生物标志物及其应用

<160> 5

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 779

<212> RNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 1

```

gaagaccga acccaccacc aaaccagg accagaggg aaagagagg cgaggagcgg 60
cagcggaaca gagcagcggc gaccaggaac aacgcggagg caccccaacc gagaacagaa 120
cgcggccaca gcaccaggcc acagggaggc aggaccagcc caccacaaac aaccaccagg 180
aaaaccacc aagaagacc acaaaggcac cagcagcac ccaagaacc cagggcaaga 240
acaccagggg acaaacggga ggagaaacag gccggccac cagcccagca gaacaacgag 300
gaacgcccac acgaggaggc caaagcacag cgcagccagg gggcagcagc agcagcaaca 360
gcagcagggg gcgggggcca ggacacaggc agggggcacc agcagaagcc cgaacgaggg 420
gaggcccacg gaaccggcca acagggacag gcgcaaagga cgaggcgcga aggaacgaag 480
cagggccacg ccgccgccag cgagagaaca gcagcggccg gagaggaagg ggccaagcaa 540
cacccccggc cggggaagga aaggccaaa gaggaggggg gccccccgc ccagccgcag 600
gaaaggcggg ccccggggcc ccaccgagc cccaagacc aagcaaagag cccagcagc 660
aagaccagg agcacggaca gggaccagca cccgggagc ccacgagagg caagcccacc 720
cgccccagcc ggagaacaga gggccgccgc ggaccagcca ccccgagag gggaacgag 779

```

<210> 2

<211> 18

<212> RNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 2

```

agagggaac gaggaaga 18

```

<210> 3

<211> 14

<212> RNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 3

```

aggccggaca gccg 14

```

<210> 4

<211> 16

<212> RNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 4

cgccgaggac agccac 16

<210> 5

<211> 14

<212> RNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 5

aggccggaca gccg 14

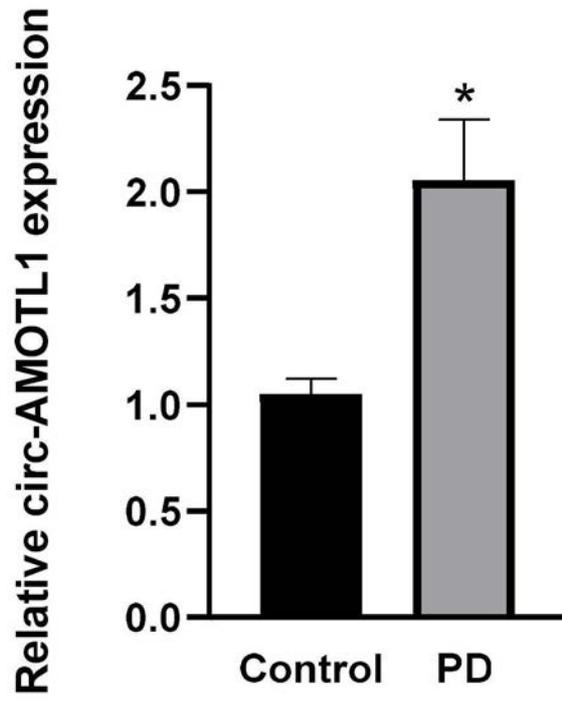


图1

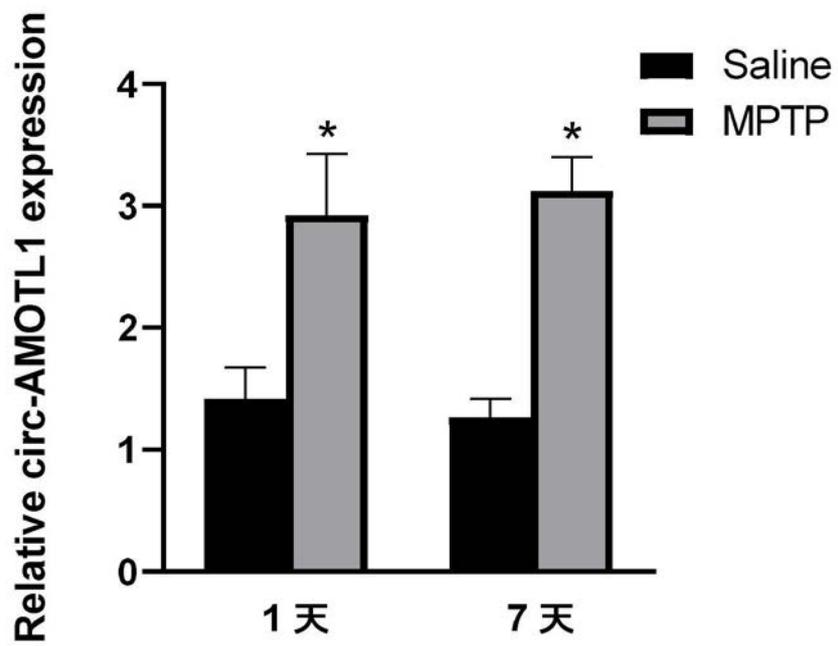


图2

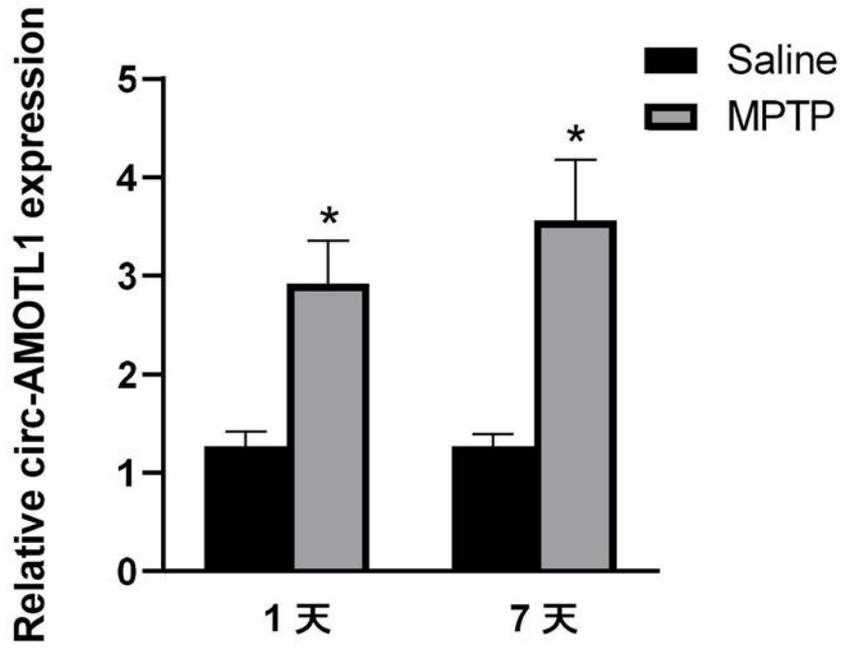


图3

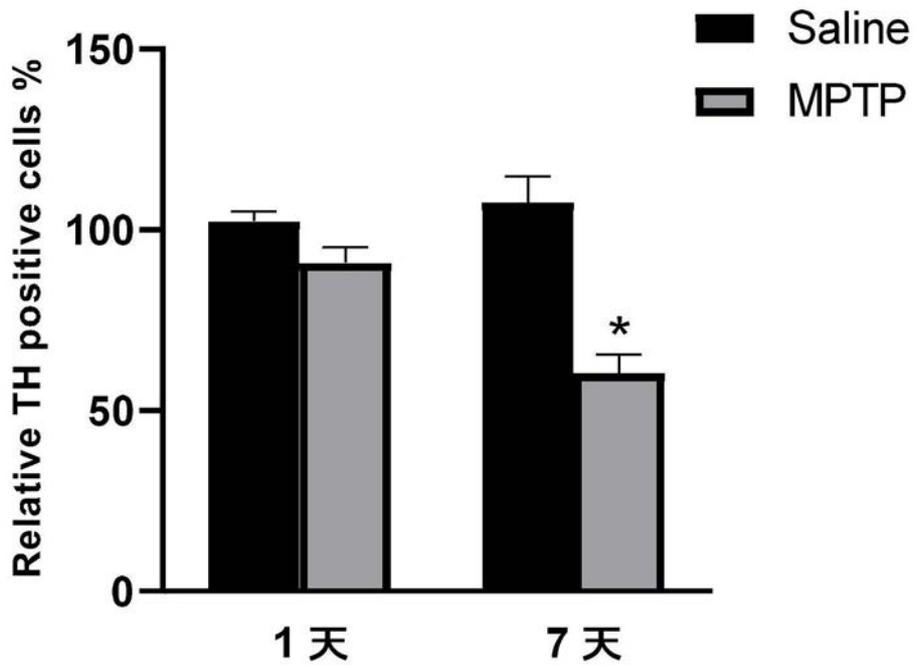


图4