



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105002172 A

(43) 申请公布日 2015. 10. 28

(21) 申请号 201510463528. 7

(22) 申请日 2015. 07. 31

(71) 申请人 北京泱深生物信息技术有限公司

地址 100080 北京市海淀区善缘街1号立方
庭大厦3103室

(72) 发明人 杨承刚 李曙光

(51) Int. Cl.

C12N 15/11(2006. 01)

C07K 16/18(2006. 01)

C12Q 1/68(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

C40B 40/08(2006. 01)

C40B 40/10(2006. 01)

A61K 48/00(2006. 01)

A61P 25/28(2006. 01)

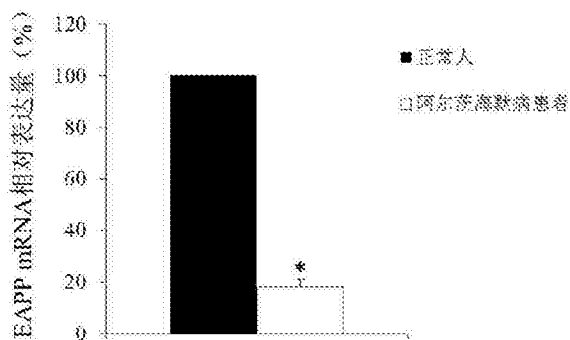
权利要求书1页 说明书8页
序列表5页 附图2页

(54) 发明名称

检测 EAPP 基因表达的试剂在诊治阿尔茨海默病中的应用

(57) 摘要

本发明公开了一种用于阿尔茨海默病早期诊断的分子标志物 -EAPP 基因。实验证明,在阿尔茨海默病患者血液中的 EAPP 基因的 mRNA 水平显著低于正常人群,因此通过测定受试者血液中 EAPP 基因的表达水平可以判断受试者是否存在患有阿尔茨海默病的风险,或者可以判断受试者是否已经患有阿尔茨海默病。EAPP 基因可以用于制备施用于阿尔茨海默病患者或者施用于患阿尔茨海默病风险高的人群,以用于治疗阿尔茨海默病或预防阿尔茨海默病的发生。本发明为临床上诊断阿尔茨海默病提供了新的诊断方法并且为治疗阿尔茨海默病提供了新的候选药物。



1. 人 EAPP 基因及其表达产物在制备诊断阿尔茨海默病的产品中的应用。
2. 根据权利要求 1 所述的应用,其特征在於,所述产品包括:通过 RT-PCR、实时定量 PCR、免疫检测、原位杂交或芯片检测 EAPP 基因及其表达产物的表达水平以诊断阿尔茨海默病的产品。
3. 根据权利要求 2 所述的应用,其特征在於,所述用 RT-PCR 诊断阿尔茨海默病的产品至少包括一对特异扩增 EAPP 基因的引物;所述用实时定量 PCR 诊断阿尔茨海默病的产品至少包括一对特异扩增 EAPP 基因的引物;所述用免疫检测诊断阿尔茨海默病的产品包括:与 EAPP 蛋白特异性结合的抗体;所述用原位杂交诊断阿尔茨海默病的产品包括:与 EAPP 基因的核酸序列杂交的探针;所述用芯片诊断阿尔茨海默病的产品包括:蛋白芯片和基因芯片;其中,蛋白芯片包括与 EAPP 蛋白特异性结合的抗体,基因芯片包括与 EAPP 基因的核酸序列杂交的探针。
4. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的应用,其特征在於,所述产品包括芯片、试剂盒。
5. 人 EAPP 基因在高通量测序平台中的应用,其特征在於,通过高通量测序能够获知 EAPP 基因的表达异常与阿尔茨海默病的发生和发展相关。
6. 人 EAPP 基因及其表达产物在制备治疗阿尔茨海默病的药物中的应用。
7. 根据权利要求 6 所述的应用,其特征在於,所述药物包括:含有人 EAPP 基因的药物、携带人 EAPP 基因的载体或宿主细胞所形成的药物、人 EAPP 蛋白质药物、或其他能够促进 EAPP 基因表达的药物。
8. 一种诊断阿尔茨海默病的芯片,其特征在於,所述芯片包括基因芯片、蛋白质芯片;所述基因芯片包括固相载体以及固定在固相载体的寡核苷酸探针,所述寡核苷酸探针包括用于检测 EAPP 基因转录水平的针对 EAPP 基因的寡核苷酸探针;所述蛋白质芯片包括固相载体以及固定在固相载体的 EAPP 蛋白的特异性抗体。
9. 一种诊断阿尔茨海默病的试剂盒,其特征在於,所述试剂盒包括基因检测试剂盒和蛋白免疫检测试剂盒;所述基因检测试剂盒包括用于检测 EAPP 基因转录水平的试剂;所述蛋白免疫检测试剂盒包括 EAPP 蛋白的特异性抗体。
10. 根据权利要求 9 所述的试剂盒,其特征在於,所述试剂包括针对 EAPP 基因的引物和 / 或探针。

检测 EAPP 基因表达的试剂在诊治阿尔茨海默病中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体地涉及人 EAPP 基因在阿尔茨海默病的诊断、治疗中的用途。

背景技术

[0002] 阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 又称老年痴呆症,是一种严重人类健康的神经退行性疾病。临床以进行性记忆力减退、认知功能障碍和行为异常为特征,以脑萎缩、脑内出现老年斑和神经原纤维缠结、神经元丢失为其病理特征。

[0003] 目前已知,各种类型的痴呆至少有 32 种,而其中 AD 就占了其发病率的 50 ~ 60% 之多。根据流行病学调查发现,目前全世界有 2500 万以上的 AD 患者。2008 年美国 AD 病人估计达到 520 万,65 岁及 65 岁以上 (13%) 人群 8 个中就有 1 个为 AD 患者,每 71 秒就有 1 个人染上 AD,到中世纪则每 33 秒就有 1 人成为 AD 患者,不包括护理费每年用于治疗 AD 的直接费用超过了 1480 亿美元。在我国通过严格统计学抽样方法抽取城乡不同生活环境的老年人群样本进行统计分析,结果表明,我国 AD 的患病率并不比西方国家低,属于 AD 重灾区。AD 患者通常被确诊后,平均可活 8 ~ 10 年,有的达 20 年,因此每年用于治疗 AD 以及康复护理的花费和给病人家属带来的精神负担使得 AD 已成为 21 世纪许多家庭不得不面对的灾难,由此带来的社会、经济、家庭和社会公共卫生问题也日益突出。

[0004] 由于 AD 的病因和发病机制尚不明确,目前没有特效方法逆转和阻止病情进展,因此目前主要通过早期进行对症治疗,而目前临床诊断的 AD 患者基本都处于中晚期,现有的治疗仅能改善症状,并不能组织或者逆转疾病的进展。因此,对其进行早期诊断和干预,能显著减少 AD 的危害,从而减轻社会和家庭的负担。

发明内容

[0005] 为了弥补现有技术的不足,本发明的目的在于提供一种可用于阿尔茨海默病早期诊断的分子标志物。相比传统的阿尔茨海默病的诊断方法,使用基因标志物来诊断阿尔茨海默病的具有及时性、特异性和灵敏性,从而使患者在疾病早期就能知晓疾病风险,针对风险高低,采取相应的预防和治疗措施。

[0006] 为了实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0007] 本发明提供了一种人 EAPP 基因及其表达产物在制备诊断阿尔茨海默病的产品中的应用。

[0008] 进一步,上面所提到的诊断产品包括:通过 RT-PCR、实时定量 PCR、免疫检测、原位杂交或芯片检测 EAPP 基因及其表达产物的表达水平以诊断阿尔茨海默病的产品。

[0009] 进一步,所述用 RT-PCR 诊断阿尔茨海默病的产品至少包括一对特异扩增 EAPP 基因的引物;所述用实时定量 PCR 诊断阿尔茨海默病的产品至少包括一对特异扩增 EAPP 基因的引物;所述用免疫检测诊断阿尔茨海默病的产品包括:与 EAPP 蛋白特异性结合的抗体;所述用原位杂交诊断阿尔茨海默病的产品包括:与 EAPP 基因的核酸序列杂交的探针;所述

用芯片诊断阿尔茨海默病的产品包括：蛋白芯片和基因芯片；其中，蛋白芯片包括与 EAPP 蛋白特异性结合的抗体，基因芯片包括与 EAPP 基因的核酸序列杂交的探针。

[0010] 优选地，所述产品包括芯片、试剂盒。

[0011] 本发明还提供了人 EAPP 基因在高通量测序平台中的应用。随着高通量测序技术的发展，对一个人的基因表达谱的构建将成为十分便捷的工作。通过对比疾病患者和正常人群的基因表达谱，容易分析出哪个基因的异常与疾病相关。因此，在高通量测序中获知人 EAPP 基因的异常与阿尔茨海默病相关也属于人 EAPP 基因的用途，同样在本发明的保护范围之内。

[0012] 本发明还提供了人 EAPP 基因及其表达产物在制备治疗阿尔茨海默病的药物中的应用。

[0013] 进一步，所述药物包括：含有人 EAPP 基因的药物、携带人 EAPP 基因的载体或宿主细胞所形成的药物、人 EAPP 蛋白质药物、或其他能够促进 EAPP 基因表达的药物。本发明的药物可以用于补充内源性的人 EAPP 蛋白的缺失或不足，通过提高人 EAPP 蛋白的表达，从而治疗因人 EAPP 蛋白缺乏导致的阿尔茨海默病。

[0014] 本发明所述携带基因的载体是本领域已知的各种载体，如市售的载体、包括质粒、粘粒、噬菌体、病毒等。

[0015] 在本发明中，术语“宿主细胞”包括原核细胞和真核细胞。常用的原核宿主细胞的例子包括大肠杆菌、枯草杆菌等。常用的真核宿主细胞包括酵母细胞、昆虫细胞和哺乳动物细胞。较佳地，该宿主细胞是真核细胞，如 CHO 细胞、COS 细胞等。

[0016] 进一步，本发明的药物还包括药学上可接受的载体，载体，这类载体包括（但不限于）：稀释剂、赋形剂如水等、填充剂如淀粉、蔗糖等；粘合剂如纤维素衍生物、藻酸盐、明胶和聚乙烯吡咯烷酮；湿润剂如甘油；崩解剂如琼脂、碳酸钙和碳酸氢钠；吸收促进剂季铵化合物；表面活性剂如十六烷醇；吸附载体如高岭土和皂粘土；润滑剂如滑石粉、硬脂酸钙和镁、聚乙二醇等。

[0017] 本发明的药物导入组织或者细胞的方式可以分为体外或者体内的方式。体外方式包括将含有人 EAPP 基因的药物或者含有人 EAPP 蛋白质的药物导入细胞中，再将细胞移植或回输到体内。体内方式包括直接将含有人 EAPP 基因的药物或者含有人 EAPP 蛋白质的药物注入体内组织中。

[0018] 本发明的药物还可与其他治疗阿尔茨海默病的药物联用，多种药物联合使用可以大大提到治疗的成功率。

[0019] 本发明还提供了一种诊断阿尔茨海默病的芯片，所述芯片包括基因芯片、蛋白质芯片；所述基因芯片包括固相载体以及固定在固相载体的寡核苷酸探针，所述寡核苷酸探针包括用于检测 EAPP 基因转录水平的针对 EAPP 基因的寡核苷酸探针；所述蛋白质芯片包括固相载体以及固定在固相载体的 EAPP 蛋白的特异性抗体。

[0020] 进一步，所述基因芯片可用于检测包括人 EAPP 基因在内的多个基因（例如，与阿尔茨海默病相关的多个基因）的表达水平。所述蛋白质芯片可用于检测包括人 EAPP 蛋白在内的多个蛋白质（例如与阿尔茨海默病相关的多个蛋白质）的表达水平。通过将多个与阿尔茨海默病的标志物同时检测，可大大提高阿尔茨海默病诊断的准确率。

[0021] 本发明提供了一种诊断阿尔茨海默病的试剂盒，所述试剂盒包括基因检测试剂盒

和蛋白免疫检测试剂盒；所述基因检测试剂盒包括用于检测 EAPP 基因转录水平的试剂；所述蛋白免疫检测试剂盒包括 EAPP 蛋白的特异性抗体。

[0022] 进一步，所述试剂包括使用 RT-PCR、实时定量 PCR、免疫检测、原位杂交或芯片方法检测 EAPP 基因表达水平过程中所需的试剂。优选地，所述试剂包括针对 EAPP 基因的引物和 / 或探针。根据 EAPP 基因的核苷酸序列容易设计出可以用于检测 EAPP 基因表达水平的引物和探针。

[0023] 与 EAPP 基因的核酸序列杂交的探针可以是 DNA、RNA、DNA-RNA 嵌合体、PNA 或其它衍生物。所述探针的长度没有限制，只要完成特异性杂交、与目的核苷酸序列特异性结合，任何长度都可以。所述探针的长度可短至 25、20、15、13 或 10 个碱基长度。同样，所述探针的长度可长至 60、80、100、150、300 个碱基对或更长，甚至整个基因。由于不同的探针长度对杂交效率、信号特异性有不同的影响，所述探针的长度通常至少是 14 个碱基对，最长一般不超过 30 个碱基对，与目的核苷酸序列互补的长度以 15-25 个碱基对最佳。所述探针自身互补序列最好少于 4 个碱基对，以免影响杂交效率。

[0024] 进一步，所述 EAPP 蛋白的特异性抗体包括单克隆抗体、多克隆抗体。所述 EAPP 蛋白的特异性抗体包括完整的抗体分子、抗体的任何片段或修饰（例如，嵌合抗体、scFv、Fab、F(ab')₂、Fv 等。只要所述片段能够保留与 EAPP 蛋白的结合能力即可。用于蛋白质水平的抗体的制备时本领域技术人员公知的，并且本发明可以使用任何方法来制备所述抗体。

[0025] 在本发明的上下文中，“EAPP 基因”包括人 EAPP 基因以及人 EAPP 基因的任何功能等同物的多核苷酸。EAPP 基因包括与目前国际公共核酸序列数据库 GeneBank 中 EAPP 基因 (NC_000014.9) DNA 序列具有 70% 以上同源性，且编码相同功能蛋白质的 DNA 序列；

[0026] 优选地，EAPP 基因的编码序列包括以下任一种 DNA 分子：

[0027] (1) 序列表中 SEQ ID NO. 1 所示的 DNA 序列；

[0028] (2) 在严格条件下与 1) 限定的 DNA 序列杂交且编码相同功能蛋白质的 DNA 序列；

[0029] (3) 与 (1) 或 (2) 限定的 DNA 序列具有 70%、优选地，90% 以上同源性，且编码相同功能蛋白质的 DNA 分子。

[0030] 在本发明的具体实施方案中，所述 EAPP 基因的编码序列是 SEQ ID NO. 1 所示的 DNA 序列。

[0031] 在本发明的上下文中，EAPP 基因表达产物包括人 EAPP 蛋白以及人 EAPP 蛋白的部分肽。所述 EAPP 蛋白的部分肽含有与阿尔茨海默病相关的功能域。

[0032] “EAPP 蛋白”包括人 EAPP 蛋白以及人 EAPP 蛋白的任何功能等同物。所述功能等同物包括人 EAPP 蛋白保守性变异蛋白质、或其活性片段，或其活性衍生物，等位变异体、天然突变体、诱导突变体、在高或低的严紧条件下能与入 EAPP 的 DNA 杂交的 DNA 所编码的蛋白质。

[0033] 优选地，EAPP 蛋白是具有下列氨基酸序列的蛋白质：

[0034] (1) 由序列表中 SEQ ID NO. 2 所示的氨基酸序列组成的蛋白质；

[0035] (2) 将 SEQ ID NO. 2 所示的氨基酸序列经过一个或几个氨基酸残基的取代和 / 或缺失和 / 或添加且与 SEQ ID NO. 2 所示的氨基酸序列具有相同功能的由 SEQ ID NO. 2 所示的氨基酸序列衍生的蛋白质。取代、缺失或者添加的氨基酸的个数通常为 1-50 个，较佳地

1-30 个,更佳地 1-20 个,最佳地 1-10 个。

[0036] (3) 与 SEQ ID NO. 2 所示的氨基酸序列具有至少 80% 同源性 (又称为序列同一性),更优选地,与 SEQ ID NO. 2 所示的氨基酸序列至少约 90% 至 95% 的同源性,常为 96%、97%、98%、99% 同源性的氨基酸序列构成的多肽。

[0037] 在本发明的具体实施方案中,所述 EAPP 蛋白是具有 SEQ ID NO. 2 所示的氨基酸序列的蛋白质。

[0038] 通常,已知的是,一个蛋白质中一个或多个氨基酸的修饰不会影响蛋白质的功能。本领域技术人员会认可改变单个氨基酸或小百分比的氨基酸或对氨基酸序列的个别添加、缺失、插入、替换是保守修饰,其中蛋白质的改变产生具有相似功能的蛋白质。提供功能相似的氨基酸的保守替换表是本领域公知的。

[0039] 通过添加一个氨基酸或多个氨基酸残基修饰的蛋白质的例子是 EAPP 蛋白的融合蛋白。对于与 EAPP 蛋白融合的肽或者蛋白质没有限制,只要所得的融合蛋白保留 EAPP 蛋白的生物学活性即可。

[0040] 本发明的 EAPP 蛋白也包括对 SEQ ID NO. 2 所示的氨基酸序列的非保守修饰,只要经过修饰的蛋白质仍然能够保留 EAPP 蛋白的生物学活性即可。在此类修饰蛋白质中突变的氨基酸数目通常是 10 个或者更少,例如 6 个或者更少,例如 3 个或者更少。

[0041] 在本发明的上下文中,“诊断阿尔茨海默病”既包括判断受试者是否已经患有阿尔茨海默病、也包括判断受试者是否存在患有阿尔茨海默病的风险。

[0042] 在本发明的上下文中,“治疗阿尔茨海默病”从疾病的状态变化来分,可以包括疾病的缓解、疾病的完全治愈。

[0043] 由于 Beta 淀粉样肽 (Amyloid-beta, 通常缩写为 A β) 被认为是 AD 的致病物质。A β 自身聚合能力强,形成比 A β 单体毒性更强的寡聚体和纤维。因此,判断一种基因或其表达产物是否具有治疗阿尔茨海默病的功能就可以通过检测基因或其表达产物是否具有抑制 A β 聚集的作用、具有清除脑内 A β 的作用以及具有阻断 A β 的神经毒性的作用来判断。

[0044] 在本发明的具体实施方式中,提取的是血清中的总 RNA 来进行 EAPP 基因差异表达的研究。本领域技术人员可知,原位肿瘤组织中的肿瘤细胞会脱落到血液中进行循环,因此血清中 EAPP 基因的表达情况就可以代表原位肿瘤组织中 EAPP 基因的表达情况。根据本发明的研究成果可知,通过提取肿瘤组织或者体液 (包括但不限于血液、尿液、组织液) 中的总 RNA 来检测 EAPP 基因的表达情况均可用于判断受试者是否患有阿尔茨海默病。

[0045] 本发明的优点和有益效果:

[0046] 本发明首次发现了 EAPP 基因表达与阿尔茨海默病相关,通过检测受试者血液中 EAPP 的表达,可以判断受试者是否患有阿尔茨海默病、或者判断受试者是否存在患有阿尔茨海默病的风险,从而指导临床医师给受试者提供预防方案或者治疗方案。

[0047] 本发明发现了一种新的分子标记物 -EAPP 基因,相比传统的检测手段,基因诊断更及时、更特异、更灵敏,能够实现阿尔茨海默病的早期诊断,从而降低阿尔茨海默病的死亡率。

附图说明

[0048] 图 1 显示利用 QPCR 检测 EAPP 基因在阿尔茨海默病血液中的表达情况；

[0049] 图 2 显示利用 QPCR 检测 EAPP 基因过表达的情况；

[0050] 图 3 显示 EAPP 基因表达对 A β 致神经细胞死亡的影响；

[0051] 图 4 显示 EAPP 基因表达对 A β 致神经突起变性的影响。

[0052] 具体的实施方式

[0053] 下面结合附图和实施例对本发明作进一步详细的说明。以下实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,例如 Sambrook 等人,分子克隆:实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。

[0054] 实施例 1 筛选与阿尔茨海默病相关的基因标志物

[0055] 1、外周血样本的收集

[0056] AD 患者来自北京 301 医院,共 60 例,年龄 53-84 岁,所有病例被诊断为 AD,其诊断标准参照美国精神疾病诊断统计手册第三版修订版。对照人群共 50 例,选自北京医院常规体检人群,所有入试者均排除血脂代谢等疾病,年龄 60-82 岁。所有研究对象均签署了对该检测项目的知情同意书,并且提供了外周血用于基因的检测。

[0057] 2、血液总 RNA 提取

[0058] 使用百泰克血液 RNA 提取试剂盒进行血液总 RNA 的提取

[0059] (1) 取全血 250 μ l (或 0.25g) 至 RNase-Free 过滤柱中,13000rpm 离心 2 分钟,收集下液,加入 0.75ml 裂解液 RLS。

[0060] (2) 将匀浆样品剧烈震荡混匀,在 15-30 $^{\circ}$ C 条件下孵育 5 分钟以使核蛋白体完全分解。

[0061] (3) 可选步骤:4 $^{\circ}$ C 的条件下 12,000rpm 离心 10 分钟,小心取上清转入一个新的无 RNA 酶的离心管中。

[0062] (4) 每 1ml RLS 加 0.2ml 氯仿。盖紧样品管盖,剧烈振荡 15 秒并将其在室温下孵育 3 分钟。

[0063] (5) 于 4 $^{\circ}$ C 12,000rpm 离心 10 分钟,样品会分成三层:下层有机相,中间层和上层无色的水相,RNA 存在于水相中。水相层的容量大约为所加 RLS 体积的 60%,把水相转移到新管中,进行下一步操作。

[0064] (6) 加入 1 倍体积 70%乙醇,颠倒混匀(此时可能会出现沉淀),得到的溶液和可能沉淀一起转入吸附柱 RA 中(吸附柱套在收集管内)。

[0065] (7) 10,000rpm 离心 45 秒,弃掉废液,将吸附柱重新套回收集管。

[0066] (8) 加 500 μ l 去蛋白液 RE,12,000rpm 离心 45 秒,弃掉废液。

[0067] (9) 加入 700 μ l 漂洗液 RW,12,000rpm 离心 60 秒,弃掉废液。

[0068] (10) 加入 500 μ l 漂洗液 RW,12,000rpm 离心 60 秒,弃掉废液。

[0069] (11) 将吸附柱 RA 放回空收集管中,12,000rpm 离心 2 分钟,尽量除去漂洗液,以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。

[0070] (12) 取出吸附柱 RA,放入一个无 RNA 酶的离心管中,根据预期 RNA 产量在吸附膜的中间部位加 50-80 μ l 无 RNA 酶的水,室温放置 2 分钟,12,000rpm 离心 1 分钟,收集洗脱液。

[0071] 3、QPCR 扩增

[0072] (1) 引物设计

[0073] 根据 Genbank 中 EAPP 基因和 GAPDH 基因的编码序列设计 QPCR 扩增引物,由上海生工生物工程技术有限公司合成。具体引物序列如下:

[0074] EAPP 基因:

[0075] 正向引物为 5' -CTCTGAGGATGAAGTGGAT-3' (SEQ ID NO. 3);

[0076] 反向引物为 5' -CGGTAAGACATTCTCTGATG-3' (SEQ ID NO. 4)。

[0077] GAPDH 基因:

[0078] 正向引物为 5' -TTTAACTCTGGTAAAGTGGATAT-3' (SEQ ID NO. 5);

[0079] 反向引物为 5' -GGTGAATCATATTGGAACA-3' (SEQ ID NO. 6)。

[0080] (2) 按照表 1 配制 PCR 反应体系:

[0081] 其中, SYBR Green 聚合酶链式反应体系购自 Invitrogen 公司。

[0082] 表 1 PCR 反应体系

[0083]

试剂	体积
正向引物	1 μ l
反向引物	1 μ l
SYBR Green 聚合酶链式反应体系	12.5 μ l
模板	2 μ l
去离子水	补足 25 μ l

[0084] (3) PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 10min, (95 $^{\circ}$ C 15s, 60 $^{\circ}$ C 60s)*45 个循环。以 SYBR Green 作为荧光标记物,在 Light Cycler 荧光定量 PCR 仪上进行 PCR 反应,通过融解曲线分析和电泳确定目的条带, $\Delta\Delta$ CT 法进行相对定量。

[0085] 4、统计学方法

[0086] 实验都是按照重复 3 次来完成的,结果数据都是以平均值 \pm 标准差的方式来表示,采用 SPSS13.0 统计软件来进行统计分析的,两者之间的差异采用 t 检验,认为当 P<0.05 时具有统计学意义。

[0087] 5、结果

[0088] 结果如图 1 所示,与正常人群相比,阿尔茨海默病人血清中含有的 EAPP 基因表达量显著降低,差异具有统计学意义 (P<0.05)。

[0089] 实施例 2 EAPP 基因表达质粒构建

[0090] 1、将人神经细胞株 SH-SY5Y,以含 10% 小牛血清的 DMEM (高糖) 培养基在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、相对湿度为 90% 的培养箱中培养。2-3 天换液 1 次,使用 0.25% 胰蛋白酶常规消化传代。

[0091] 2、EAPP 基因的过表达

[0092] 2.1 EAPP 基因表达载体的构建

[0093] 根据 EAPP 基因的编码序列（如 SEQ ID NO.1 所示）设计扩增引物，引物序列如下：正向引物为 5'-ATGAACCGGCTTCCGGAT-3' (SEQ ID NO.7)，反向引物为 5'-TTAGGAATGGCTTGCTAAAAC-3' (SEQ ID NO.8)。从成人胎脑的 cDNA 文库 (clontech 公司, 货号:638831) 中扩增全长的 EAPP 基因的编码序列，上述 cDNA 序列经限制性内切酶 BamHI 和 XhoI 双酶切后插入到经限制性内切酶 BamHI 和 XhoI 双酶切的真核细胞表达载体 pcDNA3.1 中，连接获得的重组载体 pcDNA3.1-EAPP 用于后续实验。

[0094] 2.2 转染

[0095] 将细胞分为两组，分别为对照组（转染 pcDNA3.1 空载体）、和 EAPP 过表达组（转染 pcDNA3.1-EAPP）。使用脂质体 2000 进行载体的转染，具体转染方法按照说明书的指示进行。pcDNA3.1 空载体和 pcDNA3.1-EAPP 的工作浓度均为 0.5 μg/ml。

[0096] 2.3 QPCR 检测

[0097] 具体步骤同实施例 1。

[0098] 3、统计学方法

[0099] 实验都是按照重复 3 次来完成的，结果数据都是以平均值 ± 标准差的方式来表示，采用 SPSS13.0 统计软件来进行统计分析的，两者之间的差异采用 t 检验，认为当 P<0.05 时具有统计学意义。

[0100] 4、结果

[0101] 如图 2 所示，与转染 pcDNA3.1 空载体的细胞相比，转染 pcDNA3.1-EAPP 的细胞中 EAPP 的 mRNA 水平显著上调，差异具有统计学意义 (P<0.05)。

[0102] 实施例 3 EAPP 基因表达对 Aβ 致神经细胞死亡的拮抗作用

[0103] 1、细胞转染：按照实施例 2 的方法对神经细胞株 R2L1 进行 pcDNA3.1-EAPP 和 pcDNA3.1 的转染。

[0104] 2、转染 24h 后，将神经细胞株 R2L1 于 96 孔板中培养，细胞密度为 0.5×10^4 细胞/孔。将细胞分为以下几组：

[0105] 未诱导组：转染 pcDNA3.1、不加入 20 μM Aβ 42；

[0106] 阴性对照组 (pcDNA3.1+Aβ 42)：转染 pcDNA3.1，同时培养基中加入 20 μM Aβ 42；

[0107] EAPP 基因过表达组 (pcDNA3.1-EAPP+Aβ 42)：转染 pcDNA3.1-EAPP，同时培养基中加入 20 μM Aβ 42；

[0108] 每组设置三复孔。在 37℃ 孵育 20h 后，然后加入 MTT，孵育 4h。在加入溶解液，37℃ 再孵育 12h，600nm 处读取光密度值。光密度值越高，表明细胞存活数越多。

[0109] 3、结果

[0110] 结果如图 3 所示，与未诱导组比较（为方便比较，将此组的光密度值设为 100%），阴性对照组 (pcDNA3.1+Aβ 42) 的光密度值为 35%，EAPP 基因过表达组 (pcDNA3.1-EAPP+Aβ 42) 的光密度值为 75%，差异具有统计学意义 (P<0.05)。上述实验表明，EAPP 基因过表达能够拮抗 Aβ 42 神经毒性的作用。

[0111] 实验例 4 EAPP 基因表达对 Aβ 致神经突起变性的拮抗作用

[0112] 1、构建稳定高表达 EAPP 基因的细胞株按照常规方法进行。

[0113] 2、将稳定转染的神经细胞株 SH-SY5Y 于 24 孔板中培养，细胞密度为

0.5×10^3 cells/孔, 在培养基 DMEM 中加入 $10 \mu\text{M}$ all-trans retinoic acid, 37°C 培养 7 天。之后将细胞分为三组:

[0114] 未诱导组: 稳定转染 pcDNA3.1、不加入 $1 \mu\text{M}$ A β 42;

[0115] 阴性对照组 (pcDNA3.1+A β 42): 稳定转染 pcDNA3.1, 同时培养基中加入 $1 \mu\text{M}$ A β 42;

[0116] EAPP 基因过表达组 (pcDNA3.1-EAPP+A β 42): 稳定转染 pcDNA3.1-EAPP, 同时培养基中加入 $1 \mu\text{M}$ A β 42;

[0117] 每组设置三复孔。在 37°C 孵育 5 天。去培养基, 然后加入 4% 多聚甲醛固定细胞。用抗 Beta-tubulin 抗体, 进行常规免疫组化染色。20 倍镜下拍照, 测量细胞突起长度。

[0118] 3、结果

[0119] 结果如图 4 所示, 与未诱导组比较 (为方便比较, 将未诱导组的细胞突起平均长度设为 100%), 阴性对照组 (pcDNA3.1+A β 42) 的细胞突起长度为 30%, EAPP 基因过表达组 (pcDNA3.1-EAPP+A β 42) 的细胞突起长度为 78%, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。上述实验结果表明 EAPP 基因过表达能够拮抗 A β 42 引起的神经突起变性作用。

[0120] 上述实施例的说明只是用于理解本发明的方法及其核心思想。应当指出, 对于本领域的普通技术人员来说, 在不脱离本发明原理的前提下, 还可以对本发明进行若干改进和修饰, 这些改进和修饰也将落入本发明权利要求的保护范围内。

[0001]

SEQUENCE LISTING

<110> 北京洪深生物信息技术有限公司

<120> 检测 EAPP 基因表达的试剂在诊治阿尔茨海默病中的应用

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 858

<212> DNA

<213> 人源

<400> 1

atgaaccggc ttccggatga ctacgacccc tacgcggttg aagagcctag cgacgaggag	60
ccggctttga gcagctctga ggatgaagtg gatgtgcttt tacatggaac tctgaccaa	120
aaacgaaaac tcatcagaga atgtcttacc ggagaaagtg aatcaictag tgaagatgaa	180
ttgaaaagg agatggaagc tgaattaaat tctaccatga aaacaatgga ggacaagtta	240
tctctctgg gaactggatc ttctcagga aatggaaaag ttgcaacagc tccgacaagg	300
tactacgatg atatatattt tgattctgat tccgaggatg aagacagagc agtacaggtg	360
accaagaaaa aaaagaagaa acaacacaag attccaaca atgacgaatt actglatgat	420
cctgaaaaag ataacagaga tcaggcctgg gttgatgcac agagaagggg ttaccatggt	480
ttgggaccac agagatcacg tcaacaacag cctgttccaa atagtgatgc tgtcttgaat	540
tgtctgect geatgaccac actttgccct gattgcaaaa ggcatgaatc atacaaaact	600
caatatagag caatgtttgt aatgaattgt tctattaaca aagaggaggt tetaagatat	660
aaagccctcag agaacaggaa gaaaaggcgg gtccataaga agatgaggtc taaccgggaa	720

[0002]

gatgctgccg agaaggcaga gacagatgtg gaagaaatct atcaccagct catgtgcact 780

gaatgtcca ctgaagtggc agtelacgac aaggatgaag tctttcattt ttcaatgtt 840

ttagcaagcc attectaa 858

<210> 2

<211> 285

<212> PRT

<213> 人源

<400> 2

Met Asn Arg Leu Pro Asp Asp Tyr Asp Pro Tyr Ala Val Glu Glu Pro

1 5 10 15

Ser Asp Glu Glu Pro Ala Leu Ser Ser Ser Glu Asp Glu Val Asp Val

20 25 30

Leu Leu His Gly Thr Pro Asp Gln Lys Arg Lys Leu Ile Arg Glu Cys

35 40 45

Leu Thr Gly Glu Ser Glu Ser Ser Ser Glu Asp Glu Phe Glu Lys Glu

50 55 60

Met Glu Ala Glu Leu Asn Ser Thr Met Lys Thr Met Glu Asp Lys Leu

65 70 75 80

Ser Ser Leu Gly Thr Gly Ser Ser Ser Gly Asn Gly Lys Val Ala Thr

85 90 95

Ala Pro Thr Arg Tyr Tyr Asp Asp Ile Tyr Phe Asp Ser Asp Ser Glu

100 105 110

Asp Glu Asp Arg Ala Val Gln Val Thr Lys Lys Lys Lys Lys Lys Gln

115 120 125

[0003]

His Lys Ile Pro Thr Asn Asp Glu Leu Leu Tyr Asp Pro Glu Lys Asp
 130 135 140
 Asn Arg Asp Gln Ala Trp Val Asp Ala Gln Arg Arg Gly Tyr His Gly
 145 150 155 160
 Leu Gly Pro Gln Arg Ser Arg Gln Gln Gln Pro Val Pro Asn Ser Asp
 165 170 175
 Ala Val Leu Asn Cys Pro Ala Cys Met Thr Thr Leu Cys Leu Asp Cys
 180 185 190
 Gln Arg His Glu Ser Tyr Lys Thr Gln Tyr Arg Ala Met Phe Val Met
 195 200 205
 Asn Cys Ser Ile Asn Lys Glu Glu Val Leu Arg Tyr Lys Ala Ser Glu
 210 215 220
 Asn Arg Lys Lys Arg Arg Val His Lys Lys Met Arg Ser Asn Arg Glu
 225 230 235 240
 Asp Ala Ala Glu Lys Ala Glu Thr Asp Val Glu Glu Ile Tyr His Pro
 245 250 255
 Val Met Cys Thr Glu Cys Ser Thr Glu Val Ala Val Tyr Asp Lys Asp
 260 265 270
 Glu Val Phe His Phe Phe Asn Val Leu Ala Ser His Ser
 275 280 285
 <210> 3
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 人工序列

[0004]

<400> 3	
ctctgaggat gaagtggat	19
<210> 4	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 4	
cggtaaagaca ttctctgatg	20
<210> 5	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 5	
tttaactctg gtaaagtgga tat	23
<210> 6	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 6	
ggtggaatca tattggaaca	20
<210> 7	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

[0005]

<400> 7

atgaaccggc tccggat

18

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 8

ttaggaatgg ctgctaaaa c

21

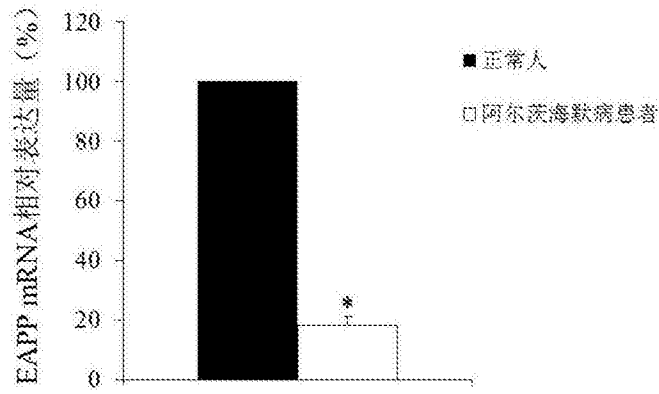


图 1

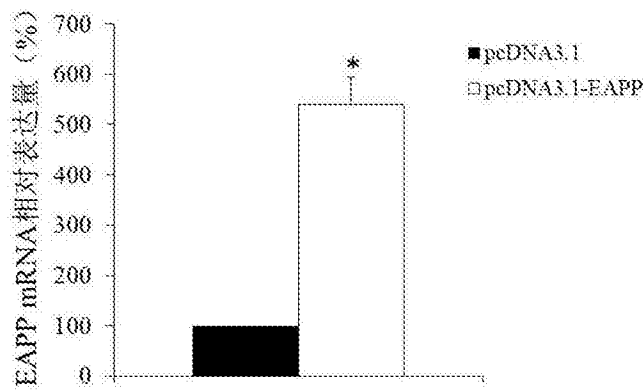


图 2

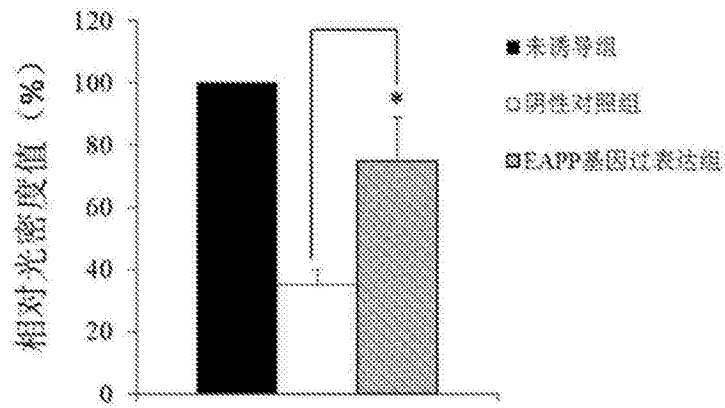


图 3

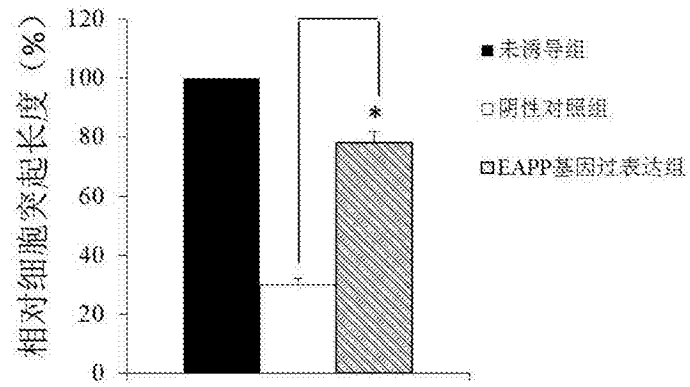


图 4

专利名称(译)	检测EAPP基因表达的试剂在诊治阿尔茨海默病中的应用		
公开(公告)号	CN105002172A	公开(公告)日	2015-10-28
申请号	CN201510463528.7	申请日	2015-07-31
[标]申请(专利权)人(译)	北京泱深生物信息技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京泱深生物信息技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京泱深生物信息技术有限公司		
[标]发明人	杨承刚 李曙光		
发明人	杨承刚 李曙光		
IPC分类号	C12N15/11 C07K16/18 C12Q1/68 G01N33/53 C40B40/08 C40B40/10 A61K48/00 A61P25/28		
其他公开文献	CN105002172B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种用于阿尔茨海默病早期诊断的分子标志物-EAPP基因。实验证明，在阿尔茨海默病患者血液中的EAPP基因的mRNA水平显著低于正常人群，因此通过测定受试者血液中EAPP基因的表达水平可以判断受试者是否存在患有阿尔茨海默病的风险，或者可以判断受试者是否已经患有阿尔茨海默病。EAPP基因可以用于制备施用于阿尔茨海默病患者或者施用于患阿尔茨海默病风险高的人群，以用于治疗阿尔茨海默病或预防阿尔茨海默病的发生。本发明为临床上诊断阿尔茨海默病提供了新的诊断方法并且为治疗阿尔茨海默病提供了新的候选药物。

