



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105907881 A

(43)申请公布日 2016.08.31

(21)申请号 201610509639.1

(22)申请日 2016.07.01

(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 宋宏涛 肖枫 杨承刚

(51)Int. Cl.

C12Q 1/68(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

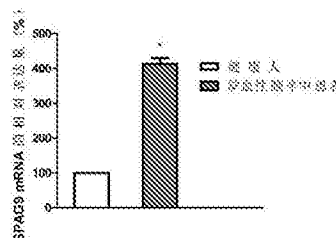
权利要求书1页 说明书7页  
序列表12页 附图1页

(54)发明名称

基因标志物在制备诊断缺血性脑卒中的产品中的用途

(57)摘要

本发明公开了基因标志物在制备诊断缺血性脑卒中的产品中的用途,所述标志物为SPAG9基因,SPAG9基因在缺血性脑卒中表达上调,通过检测SPAG9基因的表达水平可以为缺血性脑卒中患者提供早期诊断,以期实现早治疗,降低缺血性脑卒中患者的死亡率和致残率。



1. 检测SPAG9基因的试剂在制备诊断缺血性脑卒中产品中的应用。
2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述产品包括:通过RT-PCR、实时定量PCR、免疫检测、原位杂交或微阵列芯片检测SPAG9基因的表达水平以诊断缺血性脑卒中的产品。
3. 根据权利要求2所述的应用,其特征在于,所述用RT-PCR诊断缺血性脑卒中的产品至少包括一对特异扩增SPAG9基因的引物;所述用实时定量PCR诊断缺血性脑卒中的产品至少包括一对特异扩增SPAG9基因的引物;所述用免疫检测诊断缺血性脑卒中的产品包括:与SPAG9蛋白特异性结合的抗体;所述用原位杂交诊断缺血性脑卒中的产品包括:与SPAG9基因的核酸序列杂交的探针;所述用微阵列芯片诊断缺血性脑卒中的产品包括:蛋白芯片和基因芯片;其中,蛋白芯片包括与SPAG9蛋白特异性结合的抗体,基因芯片包括与SPAG9基因的核酸序列杂交的探针。
4. 根据权利要求1-3任一项所述的应用,其特征在于,所述产品包括芯片和/或试剂盒;其中所述芯片包括基因芯片、蛋白质芯片;所述试剂盒包括基因检测试剂盒和蛋白免疫检测试剂盒。
5. 根据权利要求4所述的应用,其特征在于,所述基因检测试剂盒特异性扩增SPAG9基因的引物对。
6. 根据权利要求5所述的应用,其特征在于,所述特异性扩增SPAG9基因的引物对序列如SEQ ID NO.3和SEQ ID NO.4所示。
7. 一种诊断缺血性脑卒中的产品,其特征在于,所述的产品能够通过检测样本中SPAG9基因的表达水平来诊断缺血性脑卒中。
8. 根据权利要求7所述的产品,其特征在于,所述产品包括芯片、或试剂盒;其中,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SPAG9基因转录水平的针对SPAG9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SPAG9蛋白的特异性抗体;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SPAG9基因转录水平的试剂;所述蛋白免疫检测试剂盒包括SPAG9蛋白的特异性抗体。
9. 根据权利要求8所述的产品,其特征在于,所述检测SPAG9基因转录水平的试剂包括针对SPAG9基因的引物和/或探针。
10. 根据权利要求9所述的产品,其特征在于,所述针对对SPAG9基因的引物序列如SEQ ID NO.3和SEQ ID NO.4所示。

## 基因标志物在制备诊断缺血性脑卒中的产品中的用途

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,涉及基因标志物在制备诊断缺血性脑卒中的产品中的用途,具体地该基因标志物为SPAG9。

### 背景技术

[0002] 脑卒中(stroke),又称为中风或脑血管意外,是一组突然起病,由于脑局部血液循环障碍导致的、以局灶性神经功能缺损为共同特征的急性脑血管疾病。其因高发病率、高死亡率、高致残率、高复发率成为世界范围内三大死亡疾病之一,在我国已跃升为城市居民死因首位、农村居民死因第二位,也是成年人首位致残疾病。近20年来,随着自然人口增加和老龄化的冲击,我国的脑卒中发病率、死亡率总体呈上升趋势,据统计,我国每年新发脑卒中超过200万,每年死于脑卒中者超过100万,而且存活着中50-70%病人遗留瘫痪、失语等严重残疾,给个人和社会构成巨大的负担,成为严重危害人类健康及社会发展的主要公共卫生问题之一。

[0003] 缺血性脑卒中又称为脑梗死,它是由各种原因所致的局部脑组织区域血液供应障碍,导致脑组织缺血缺氧性病变坏死,进而产生临床上对应的神经功能缺失表现。缺血性卒中是卒中的主要类型,约占卒中总发病的60%~80%。许多流行病学研究已从不同方面表明,缺血性脑卒中是一种受环境和遗传因素共同作用的复杂性疾病。众所周知,高龄、吸烟、饮酒、高血压、高血脂、高血糖、心脏病、纤维蛋白原水平异常和凝血机制障碍等是心脑血管疾病的传统危险因素,但这仅能解释约50-60%脑卒中的发生。许多人即使具备上述危险因素未发生脑卒中,而一些不具备上述危险因素的人却发生了脑卒中,提示脑卒中的发病还与其它因素有关。多数关于家族中一级亲属脑血管病发病情况的研究均发现,有卒中或心脏病阳性家族史者较同龄、同性别的阴性家族史者更易患脑卒中,提示家族史是脑血管病的一项独立危险因素;对丹麦孪生子的长期随访也表明,同卵双生子均患脑梗死的危险性是双卵双生子的2倍,说明缺血性脑卒中发病与遗传因素密切相关。近年来,由于人类基因组计划的完成,对缺血性脑卒中的研究从分子遗传学角度有了新的突破。

[0004] 目前,脑卒中的诊断主要依靠临床检查和各种神经成像技术,尽管相比以往来说,医学技术已高度发达,但是尚无可靠的生物标志物可以对缺血性脑卒中中进行风险预测和早期诊断,而目前防治缺血性脑卒中的关键是早期发现病变血管,并对其进行评估干预,指导临床选择及时有效的治疗措施。

### 发明内容

[0005] 为了弥补现有技术的不足,本发明的目的之一,提供一种缺血性脑卒中的诊断标志物;

[0006] 本发明的目的之二,提供一种诊断缺血性脑卒中的产品,实现缺血性脑卒中的早期诊断。

[0007] 为了实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0008] 本发明提供了检测SPAG9基因的试剂在制备诊断缺血性脑卒中产品中的应用。

[0009] 进一步,上面所述诊断产品包括:通过RT-PCR、实时定量PCR、免疫检测、原位杂交或芯片检测SPAG9基因的表达水平以诊断缺血性脑卒中的产品。

[0010] 进一步,所述用RT-PCR诊断缺血性脑卒中的产品至少包括一对特异扩增SPAG9基因的引物;所述用实时定量PCR诊断缺血性脑卒中的产品至少包括一对特异扩增SPAG9基因的引物;所述用免疫检测诊断缺血性脑卒中的产品包括:与SPAG9蛋白特异性结合的抗体;所述用原位杂交诊断缺血性脑卒中的产品包括:与SPAG9基因的核酸序列杂交的探针;所述用微阵列芯片诊断缺血性脑卒中的产品包括:蛋白芯片和基因芯片;其中,蛋白芯片包括与SPAG9蛋白特异性结合的抗体,基因芯片包括与SPAG9基因的核酸序列杂交的探针。

[0011] 进一步,所述产品包括芯片和/或试剂盒;其中所述芯片包括基因芯片、蛋白质芯片;所述试剂盒包括基因检测试剂盒和蛋白免疫检测试剂盒。

[0012] 进一步,所述基因检测试剂盒特异性扩增SPAG9基因的引物对。

[0013] 在本发明的具体实施方式中,所述特异性扩增SPAG9基因的引物对序列如SEQ ID NO.3和SEQ ID NO.4所示。

[0014] 本发明提供了一种诊断缺血性脑卒中的产品,所述产品能够通过检测样本中SPAG9基因的表达水平来诊断缺血性脑卒中。

[0015] 进一步,上面所述的产品包括芯片、或试剂盒。其中,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上的寡核苷酸探针,所述寡核苷酸探针包括用于检测SPAG9基因转录水平的针对SPAG9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上的SPAG9蛋白的特异性抗体;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SPAG9基因转录水平的试剂;所述蛋白免疫检测试剂盒包括SPAG9蛋白的特异性抗体。其中,所述基因芯片可用于检测包括SPAG9基因在内的多个基因(例如,与缺血性脑卒中相关的多个基因)的表达水平。所述蛋白质芯片可用于检测包括SPAG9蛋白在内的多个蛋白质(例如与缺血性脑卒中相关的多个蛋白质)的表达水平。通过将多个与缺血性脑卒中的标志物同时检测,可大大提高缺血性脑卒中诊断的准确率。

[0016] 进一步,所述检测SPAG9基因转录水平的试剂包括针对SPAG9基因的引物和/或探针。

[0017] 进一步,所述针对对SPAG9基因的引物序列如SEQ ID NO.3和SEQ ID NO.4所示。

[0018] 在本发明中,“抗体”覆盖单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)、及抗体片段、组合抗体等,只要它们展现出期望的生物学活性即可。“单克隆抗体”指从一群基本上同质的抗体获得的抗体,即构成群体的各个抗体相同和/或结合相同表位,除了生产单克隆抗体的过程中可能产生的可能变体外,此类变体一般以极少量存在。此类单克隆抗体典型的包括包含结合靶物的多肽序列的抗体,其中靶物结合多肽序列是通过包括从众多多肽序列中选择单一靶物结合多肽序列在内的过程得到的。

[0019] 单克隆抗体还包括“嵌合”抗体,其中重链和/或轻链的一部分与衍生自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,而链的剩余部分与衍生自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,以及此类抗体的片段,只要它们展现出期望的生物学活性即可。

[0020] “抗体或抗体片段”指无论自天然生成抗体的任何物种衍生,还是通过重组DNA技术创建;无论自血清、B细胞、杂交瘤、转染瘤、酵母或细菌分离的抗体(例如IgG、IgM、IgA、IgD或IgE)或片段(诸如Fab、F(ab')<sup>2</sup>、Fv、二硫化物连接的Fv、scFv、闭合构象多特异性抗体、二硫化物连接的scFv、双抗体)。

[0021] 在本发明中,术语“探针”指能与另一分子的特定序列或亚序列或其它部分结合的分子。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。根据杂交条件的严谨性,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,其范围包括引物。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。

[0022] 在本发明中,术语“微阵列”是杂交阵列原件有序排列在基质上,所述杂交阵列原件诸如聚核苷酸探针(例如寡核苷酸)或结合剂(例如抗体)。所述基质可以是固体基质,例如,玻璃或二氧化硅玻片、珠、纤维光学粘结剂或半固态基质,例如硝酸纤维素膜。核苷酸序列可以是DNA、RNA或其中的任何排列。

[0023] 各种探针阵列已经描述在文献中并且可以用于本发明上下文中检测可能与本文所述表型相关的标志物。例如,DNA探针阵列芯片或较大的DNA探针阵列晶片(否则,可以通过打断晶片而获得各个体芯片)用于本发明的一个实施方案。DNA探针阵列晶片一般包含玻璃晶片,其上放置了高密度DNA探针(短DNA片段)阵列。这些晶片各自可以保持例如约6000万个用于识别较长样品DNA序列(例如,来自个体或群体,例如,包含所关注的标志物)的DNA探针。用玻璃晶片上的DNA探针组识别样品DNA通过DNA杂交进行。当DNA样品与DNA探针阵列杂交时,样品结合于样品DNA序列互补的那些探针。通过评价个体样品DNA与那些探针更稳固地杂交,有可能确定已知的核酸序列是否存在于样品中,由此确定核酸中发现的标志物是否存在。还可以使用这一手段通过控制杂交条件以允许区别单一核苷酸,例如,用于SNP鉴定和一种或多种SNP的样品基因分型来进行ASH。阵列提供了一种同时(或串连)检测多个多态性标志物的便利性实施方案。

[0024] 上述探针具有与靶点基因的特定的碱基序列互补的碱基序列。这里,所谓“互补”,只要是杂交即可,可以不是完全互补。这些多核苷酸通常相对于该特定的碱基序列具有80%以上、优选90%以上、更优选95%以上、特别优选100%的同源性。这些探针可以是DNA,也可以是RNA,另外,可以为在其一部分或全部中核苷酸通过PNA、LNA、ENA、GNA、TNA等人工核酸置换得到的多核苷酸。

[0025] 在本发明的上下文中,“SPAG9基因”包括人SPAG9基因以及人SPAG9基因的任何功能等同物的多核苷酸。SPAG9基因包括与目前国际公共核酸序列数据库GeneBank中SPAG9基因(NC\_000017.11)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;在本发明的具体实施方案中,所述SPAG9基因的编码序列是SEQ ID NO.1所示的DNA序列。

[0026] 本发明的SPAG9基因可以是天然的或是人工合成的,或者使用可以表达SPAG9的DNA片段的载体转染细胞获得。所述载体所述载体包括病毒载体、真核表达载体。

[0027] 病毒载体可以是任何适当的载体,包括但不限于逆转录病毒载体、腺病毒载体、腺病毒相关病毒载体、疱疹病毒(例如单纯疱疹病毒、痘苗病毒及EB病毒)载体、甲病毒载体。真核表达载体可以是任何适当的表达载体,包括但不限于pCMV-Myc表达载体、pcDNA3.0表达载体、pcDNA3.1表达载体、pEGFP表达载体、pEF Bos表达载体、pTet表达载体、pTRE表达载

体、或者在公知表达载体的基础上经改造的载体,比如pBin438、pCambia1301等。

[0028] 在本发明的上下文中,SPAG9基因表达产物包括人SPAG9蛋白以及人SPAG9蛋白的部分肽。所述SPAG9蛋白的部分肽含有与缺血性脑卒中相关的功能域。

[0029] “SPAG9蛋白”包括SPAG9蛋白以及SPAG9蛋白的任何功能等同物。所述功能等同物包括SPAG9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SPAG9的DNA杂交的DNA所编码的蛋白质。在本发明的具体实施方式中,所述SPAG9蛋白是由序列表中SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列组成的蛋白质。

[0030] 在本发明中,术语“样本”是指从目标患者得到的组合物,其包含细胞和/或其他分子体—将其进行特征化和/或识别,例如,根据物理、生化、化学和/或生理特征。例如,短语“临床样本”或“疾病样本”及其变体,是指从目标患者获得的任何样本,将预期或已知所述样本中能够获得细胞和/或分子体,例如将被特征化的生物标志物。

[0031] 在本发明的具体实施方式中,所述“样本”为受试者的血液。

[0032] 在本发明的上下文中,“诊断缺血性脑卒中”既包括判断受试者是否已经患有缺血性脑卒中、也包括判断受试者是否存在患有缺血性脑卒中的风险。

[0033] 本发明的优点和有益效果:

[0034] 本发明首次发现了SPAG9基因表达与缺血性脑卒中相关,通过检测受试者血液中SPAG9的表达,可以判断受试者是否患有缺血性脑卒中、或者判断受试者是否存在患有缺血性脑卒中的风险,从而指导临床医师给受试者提供预防方案或者治疗方案。

[0035] 本发明发现了一种缺血性脑卒中的新的分子标记物—SPAG9基因,相比传统的检测手段,基因诊断更及时、更特异、更灵敏,能够实现缺血性脑卒中的早期诊断,从而降低缺血性脑卒中的死亡率。

## 附图说明

[0036] 图1显示利用QPCR检测SPAG9基因在缺血性脑卒中患者中的表达情况。

[0037] 具体的实施方式

[0038] 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。

[0039] 实施例1筛选与缺血性脑卒中相关的基因标志物

[0040] 1、样品收集

[0041] 各收集10例正常人血液和缺血性脑卒中患者血液样本,上述所有标本的取得均通过伦理委员会的同意,并获得受试者的知情同意。

[0042] 2、RNA样品的制备及质量分析

[0043] 2.1 RNA样品的制备

[0044] (1)匀浆处理

[0045] 直接取血液,加入3倍体积红细胞裂解液,混匀后室温放置10min,10,000rpm离心1min。彻底吸弃上清,收集白细胞沉淀。每100-200 $\mu$ l血液收集的白细胞沉淀加入1ml

Trizol。

[0046] (2)分层

[0047] a. 样品加入Trizol后,室温放置5min,使样品充分裂解。4℃12,000rpm离心10min,取上清;

[0048] b. 每1ml Trizol加入200μl氯仿,剧烈振荡混匀后室温放置3-5min使其自然分相。

[0049] (3)RNA沉淀

[0050] a. 4℃12,000rpm离心10-15min。样品会分成三层:黄色的有机相,中间层和无色的水相,RNA主要在水相中,把水相小心的转移到新管中。

[0051] b. 在上清中加入等体积冰冷的异丙醇,室温放置10-20min。4℃12,000rpm离心10min,弃上清,RNA沉淀于管底。

[0052] (4)RNA漂洗

[0053] a. RNA沉淀中加入1ml 75%乙醇(用RNase-free水配制),温和振荡离心管,悬浮沉淀。每1ml Trizol加入1ml 75%乙醇。

[0054] b. 4℃5,000-8,000rpm离心1-2min,弃上清;短暂快速离心,用移液器小心吸弃上清,注意不要吸弃沉淀。室温放置1-2min晾干沉淀。

[0055] (5)溶解RNA

[0056] 沉淀中加入50-100μl RNase-free水,轻弹管壁,以充分溶解RNA,-70℃保存。

[0057] 2.2 RNA样品的质量分析(NanoDrop1000分光光度计)

[0058] NanoDrop1000分光光度计检测RNA样品,RNA-seq测序的样品要求:OD260/OD280为1.8-2.2。

[0059] 2.3 RNA样品的质量分析(Agilent Technologies 2100Bioanalyzer)

[0060] 将上述提取的RNA进行琼脂糖凝胶电泳,Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer检测RNA样品质量,观察28S rRNA和18S rRNA主带明显、无降解、RNA完整性指数合格、浓度达到要求的符合RNA-seq测序cDNA文库构建的要求,可以用于文库构建及测序。

[0061] 3、高通量转录组测序

[0062] 3.1 RNA-seq读段定位

[0063] 首先将低质量的读段去除得到清洁读段,然后利用TopHat v1.3.1将清洁片段与UCSC H.sapiens参考基因组(hg19)进行匹配,H.sapiens UCSC hg19版的预先构建的索引从TopHat主页下载,并作为参考基因组,利用TopHat与基因组匹配时,允许每个读段(默认到20)有多个匹配位点,最多2次错配。TopHat根据外显子区域和GT-AG剪切信号建立可能的剪切位点库,根据这些剪切位点库将没有定位到基因组的读段定位到基因组上。我们使用TopHat方法的系统默认参数。

[0064] 3.2转录丰度评估

[0065] 匹配上的读段文件通过Cufflinks v1.0.3处理,Cufflinks v1.0.3将RNA-seq片段数目进行标准化计算转录本的相对丰度。FPKM值指的是每一百万测序片段中匹配到特定基因1kb长的外显子区域的片段数目。通过贝叶斯推理方法计算FPKM估计值的置信区间。Cufflinks使用的参考的GTF注释文件从Ensembl数据库下载(Homo\_sapiens.GRCh37.63.gtf)。

[0066] 3.3差异表达基因的检测

[0067] 将下载的Ensembl GTF文件和通过TopHat匹配的原始文件传输到Cuffdiff, Cuffdiff使用原始的匹配文件重新估算GTF文件中列出的转录本的表达丰度,检测差异表达。在Cuffdiff输出中只有q值<0.01,测试显示成功的比较才被认为是差异表达。

[0068] 4、结果

[0069] RNA-seq结果显示,SPAG9基因在缺血性脑卒中患者血液中的表达水平显著高于正常人的表达水平。

[0070] 实施例2 QPCR测序验证SPAG9基因的差异表达

[0071] 1、根据高通量测序的检测选择SPAG9基因进行大样本QPCR验证。按照实施例1中的样本收集方式选择缺血性脑卒中患者血液和正常人血液各80例。

[0072] 2、RNA提取步骤同实施例1。

[0073] 3、逆转录:使用TAKARA公司的反转录试剂盒进行操作。具体步骤如下:

[0074] (1)取总RNA 2 $\mu$ g进行逆转录,加入Oligo(dT)2 $\mu$ I,充分混匀;70 $^{\circ}$ C水浴;5min后立即冰浴2-3min;

[0075] (2)构建25 $\mu$ I反应体系,其中包括5 $\times$ 逆转录缓冲液5 $\mu$ I,dNTP(2.5mM)5 $\mu$ I,RNasin 40U/ $\mu$ I,M-MLV 200U/ $\mu$ I,补无核酶水至25 $\mu$ I;

[0076] (3)42 $^{\circ}$ C水浴60min后,95 $^{\circ}$ C水浴5min以灭活M-MLV,-20 $^{\circ}$ C储存备用。

[0077] 4、QPCR扩增

[0078] (1)引物设计

[0079] 根据Genebank中SPAG9基因和管家基因GAPDH基因的编码序列设计QPCR扩增引物,北京赛诺基因组研究中心有限公司合成。其中SPAG9基因的引物对序列如下:正向引物序列为5'-AGAGAATTGGAGGAAGAG-3'(SEQ ID NO.3);反向引物序列为5'-ATCACTATCATCGTCATCT-3'(SEQ ID NO.4)。GAPDH基因的引物序列对如下:正向引物序列为5'-CTCTGGTAAAGTGGATATTGT-3'(SEQ ID NO.5);反向引物序列为5'-GGTGAATCATATTGGAACA-3'(SEQ ID NO.6)。

[0080] (2)PCR反应体系:正向引物和反向引物各1 $\mu$ I,SYBR Green聚合酶链式反应体系12.5 $\mu$ I,模板2 $\mu$ I,加去离子水补足至25 $\mu$ I。

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

[0082] (3)PCR反应条件:95 $^{\circ}$ C10min,(95 $^{\circ}$ C15s,60 $^{\circ}$ C60s) $\times$ 30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。

[0083] 5、统计学方法

[0084] 实验采用3次重复实验,结果数据都是以平均值 $\pm$ 标准差的方式来表示,使用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。

[0085] 6、结果

[0086] 结果如图1所示,与正常人血液相比,SPAG9基因在缺血性脑卒中患者血液中的表达上调,差异具有统计学意义(P<0.05),同RNA-seq结果一致。

[0087] 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。

## SEQUENCE LISTING

<110> 北京洪深生物信息技术有限公司

<120> 基因标志物在制备诊断缺血性脑卒中的产品中的用途

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 3936

<212> DNA

<213> 人源

<400> 1

	atggagctgg aggacggtgt ggtgtatcag gaggagcccc gcggctccgg ggccgtgatg	60
[0001]	tcggagcggg tgtccggcct ggccggctcc atctaccgcg agtfcgagcg gcttatcggg	120
	cgctatgacg aggaggtggt caaagagctg atgccgctgg tggaggctgt gctggagaac	180
	ctggactcgg tgttcgcgca ggaccaggag caccaggtgg agctggagct gctgcgggac	240
	gacaacgagc agtctatcac ccagtacgag cgggagaagg cgctgcgcaa gcacgctgag	300
	gagaaattca ttgaattga agactctcaa gaacaggaaa aaaaggactt acagaccgca	360
	gtggaatctt tagaatctca aacaagacaa cttgagctga aagegaaaa ctatgctgac	420
	cagattagca gacttgaaga aagagaagca gaactgaaga aggaatataa tgcattacat	480
	caaagacaca ctgagatgat ccataattat atggaacatt tagaaagaac aaaacttcat	540
	cagctctcag ggagtgatca actagaatcc acagctcata gtagaattag aaaagaacgc	600
	cctataatcat taggaatttt ccattacct gctggagatg gattgcttac acctgatgct	660
	cagaaaggag gagagacccc tggatctgag caatggaaat ttcaggaatt aagtcaacca	720
	cgttctcata ccagcctgaa ggatgagctt tctgatgtta gccaaaggcg atctaaagct	780

	accactccag catcaacagc taattcagat gtggcaacaa ttctactga tactccctta	840
	aaggaagaaa acgaaggatt tgtgaaggtt acagatgcgc caaataaatc agagataagc	900
	aaacacattg aagtacaggt agcccaggaa actagaaatg tatctactgg ctctgctgaa	960
	aatgaagaaa agtcagaagt tcaagcaatc atcgaatcta ctctgagct ggatatggac	1020
	aaagatctca gtggatataa aggttcaagc actcccacca aaggcataga gaacaaaget	1080
	ttgatcgc atacagaatc tctctttaa gaactgtctt cagctggctc agcctaata	1140
	ggagatgtgg atgaaggagc agatttacta ggaatgggtc ggaagtga gaacttata	1200
	ttagaaaata cacaactgtt ggaaaccaaa aatgcttga acatagtga gaatgattg	1260
	atagcaaaag tggatgaact gacctgtgag aaagatgtgc tgaaggga atggaggct	1320
	gtgaagcaag ccaaactgaa actagaggaa aagaacagag aattggagga agagcttagg	1380
	aaagctcggg cagaagctga agatgcaagg caaaaagca aagatgacga tgalatgat	1440
[0002]	attcccacag cccagaggaa acggttact agagtagaaa tggcccgtgt tctcatggag	1500
	cgaaccagt ataaagagag atgatggag ctccaggaag ctgtcgaag gacagagatg	1560
	atcgggcat cacgagaaaa tccagccatg caggaaaaaa aaaggtcaag catttggcag	1620
	ttgtgcaa ctctttcag ccgactttc agctctcaa gtaacacgac taagaagcct	1680
	gaaccactg ttaatctgaa gtacaatgca cccacgtctc atgttactcc gtccgcaag	1740
	aaaagaagca gcacctatc tcagctcctt ggggataagt ccaaagcctt tgatttctt	1800
	agtgaagaaa ctgaagctag tttagcctca cgcagagaac aaaagagaga gcagtaicgt	1860
	caggtaaaag cacatgttca gaaggaagac ggtagagtc aggcttttgg ctggagtctg	1920
	ctcagaagt acaaacaggt aaccaatggt caaggtgaaa ataagatgaa aaattacct	1980
	gtgccigtct atctcagacc tetggatgaa aaagatacat caatgaagct gtggigtgct	2040
	gttggagtca atttacttgg ttggaagacc agagatgggt gtctgtgtg ttgagcaagt	2100
	gtatttaca aggatgttc tggtttggat acagaaggca gtaaacagcg aagtgcctct	2160
	cagagtagtt tagataagtt agatcaggaa ctttaggaac agcagaagga gtaaaaaat	2220

	caagaagaat tatccagtct agtttgatc tgtaccagca ctcatcggc tacaaaagt	2280
	ctfattatg atgctgtca acctggaac atcctagaca gtttactgt ttgcaactct	2340
	catgttctgt gcattgcaag tgtgccaggt gcacgagaaa cagactacc tgcaggagaa	2400
	gatcttcag aatctggta ggtagacaaa gcatcttat gtggaagtat gacaagcaac	2460
	agctcagcag agacagacag cctgttagga ggcatcacag tggttggtg ttctgcagaa	2520
	ggtgtgacgg gagctgccac tcccctagt acaaatggg cttctccagt gatggataa	2580
	ccaccagaaa tgggaagcaga aatagtggag gttgatgaaa atgltccaac agcagaagaa	2640
	gcaactgaag ctacagaagg gaatgcgggg teagetgaag acacagtga catctccaa	2700
	actggcgtct acacagagca tctcttaca gatccttgg gagttcagat ccagaagac	2760
	ctctccccag tgfatcagc gagcaatgac teagatgcat ataaagatca aatatcagta	2820
	ctgccaatg aacaagactl ggtgagagaa gaagcccaga aatgagtag tctttacca	2880
[0003]	actatgtggc ttggagctca aatggctgt ttgtatgtcc atctatctgt agcccagtgg	2940
	aggaaatgtc tccatccat taaactaaa gattegatc teagtattgt acacgtgaag	3000
	ggaatcgtgt tagtagcct ggctgacggc acccttgca tcttcacag aggagtggat	3060
	gggcagtggg atttgtcaaa ctatcacctc ttgaccttg gacggcctca tcatccatc	3120
	cgttgcata ctgtggtaca tgacaaagtc tgggtgtggt ataggaacaa aatctatgt	3180
	gtgcagccaa aggccatgaa aatagagaaa tctttgatg cacatcccag gaaggagagc	3240
	caagtgcgac agcttgcgtg ggtgggggat ggcgtgtggg tctccatcg cttggattct	3300
	acgtccgctc tctatcatgc acacactat caacatctac aggatgtgga cattgagcct	3360
	tatgtaagca aatgttagg tactggaaaa ctggcttct ctttgtgag aattacagct	3420
	cttatggtgt ctgtaatcg tttgtgggtg gggacaggaa atggtgcat tatctccatc	3480
	ccattgacag aaacaataa aacctcaggi gtaccaggaa atcgtcctgg aagtglaatc	3540
	cgtgtatatg gtgatgaaaa cagtataaa gtgactccag ggacattat accctattgt	3600
	tcaatggcac atgcacagct ttgcttccat gggcaccggg atgctgtgaa attcttgtg	3660

gcagtcccag gtcaagtcac cagcccacaa agtagcagta gtggcacgga tctgacgggt 3720  
gacaaagcag ggccatctgc acaggagcct ggtagtcaga cgcccttga gctctatgctt 3780  
gtcatcagtg gaggagaggg ctacatcgac ttccgaatgg gtgatgaagg tggagaatca 3840  
gaacttcttg gagaggatct tccacttga ccttctgtca ccaaagcaga aaggagtcac 3900  
ttgatagtgt ggcaagtgat gtatggcaat gagtga 3936

<210> 2

<211> 1311

<212> PRT

<213> 人源

<400> 2

Met Glu Leu Glu Asp Gly Val Val Tyr Gln Glu Glu Pro Gly Gly Ser

1	5	10	15
---	---	----	----

[0004]

Gly Ala Val Met Ser Glu Arg Val Ser Gly Leu Ala Gly Ser Ile Tyr

20	25	30
----	----	----

Arg Glu Phe Glu Arg Leu Ile Gly Arg Tyr Asp Glu Glu Val Val Lys

35	40	45
----	----	----

Glu Leu Met Pro Leu Val Val Ala Val Leu Glu Asn Leu Asp Ser Val

50	55	60
----	----	----

Phe Ala Gln Asp Gln Glu His Gln Val Glu Leu Glu Leu Leu Arg Asp

65	70	75	80
----	----	----	----

Asp Asn Glu Gln Leu Ile Thr Gln Tyr Glu Arg Glu Lys Ala Leu Arg

85	90	95
----	----	----

Lys His Ala Glu Glu Lys Phe Ile Glu Phe Glu Asp Ser Gln Glu Gln

100	105	110
-----	-----	-----

Glu Lys Lys Asp Leu Gln Thr Arg Val Glu Ser Leu Glu Ser Gln Thr  
 115 120 125  
 Arg Gln Leu Glu Leu Lys Ala Lys Asn Tyr Ala Asp Gln Ile Ser Arg  
 130 135 140  
 Leu Glu Glu Arg Glu Ala Glu Leu Lys Lys Glu Tyr Asn Ala Leu His  
 145 150 155 160  
 Gln Arg His Thr Glu Met Ile His Asn Tyr Met Glu His Leu Glu Arg  
 165 170 175  
 Thr Lys Leu His Gln Leu Ser Gly Ser Asp Gln Leu Glu Ser Thr Ala  
 180 185 190  
 His Ser Arg Ile Arg Lys Glu Arg Pro Ile Ser Leu Gly Ile Phe Pro  
 195 200 205  
 [0005] Leu Pro Ala Gly Asp Gly Leu Leu Thr Pro Asp Ala Gln Lys Gly Gly  
 210 215 220  
 Glu Thr Pro Gly Ser Glu Gln Trp Lys Phe Gln Glu Leu Ser Gln Pro  
 225 230 235 240  
 Arg Ser His Thr Ser Leu Lys Asp Glu Leu Ser Asp Val Ser Gln Gly  
 245 250 255  
 Gly Ser Lys Ala Thr Thr Pro Ala Ser Thr Ala Asn Ser Asp Val Ala  
 260 265 270  
 Thr Ile Pro Thr Asp Thr Pro Leu Lys Glu Glu Asn Glu Gly Phe Val  
 275 280 285  
 Lys Val Thr Asp Ala Pro Asn Lys Ser Glu Ile Ser Lys His Ile Glu  
 290 295 300

Val Gln Val Ala Gln Glu Thr Arg Asn Val Ser Thr Gly Ser Ala Glu  
 305                      310                      315                      320  
 Asn Glu Glu Lys Ser Glu Val Gln Ala Ile Ile Glu Ser Thr Pro Glu  
                                  325                      330                      335  
 Leu Asp Met Asp Lys Asp Leu Ser Gly Tyr Lys Gly Ser Ser Thr Pro  
                                  340                      345                      350  
 Thr Lys Gly Ile Glu Asn Lys Ala Phe Asp Arg Asn Thr Glu Ser Leu  
                                  355                      360                      365  
 Phe Glu Glu Leu Ser Ser Ala Gly Ser Gly Leu Ile Gly Asp Val Asp  
                                  370                      375                      380  
 Glu Gly Ala Asp Leu Leu Gly Met Gly Arg Glu Val Glu Asn Leu Ile  
 385                      390                      395                      400  
 [0006] Leu Glu Asn Thr Gln Leu Leu Glu Thr Lys Asn Ala Leu Asn Ile Val  
                                  405                      410                      415  
 Lys Asn Asp Leu Ile Ala Lys Val Asp Glu Leu Thr Cys Glu Lys Asp  
                                  420                      425                      430  
 Val Leu Gln Gly Glu Leu Glu Ala Val Lys Gln Ala Lys Leu Lys Leu  
                                  435                      440                      445  
 Glu Glu Lys Asn Arg Glu Leu Glu Glu Glu Leu Arg Lys Ala Arg Ala  
                                  450                      455                      460  
 Glu Ala Glu Asp Ala Arg Gln Lys Ala Lys Asp Asp Asp Asp Ser Asp  
 465                      470                      475                      480  
 Ile Pro Thr Ala Gln Arg Lys Arg Phe Thr Arg Val Glu Met Ala Arg  
                                  485                      490                      495

Val Leu Met Glu Arg Asn Gln Tyr Lys Glu Arg Leu Met Glu Leu Gln  
500 505 510

Glu Ala Val Arg Trp Thr Glu Met Ile Arg Ala Ser Arg Glu Asn Pro  
515 520 525

Ala Met Gln Glu Lys Lys Arg Ser Ser Ile Trp Gln Phe Val Pro Thr  
530 535 540

Arg Phe Ser Arg Leu Phe Ser Ser Ser Ser Asn Thr Thr Lys Lys Pro  
545 550 555 560

Glu Pro Pro Val Asn Leu Lys Tyr Asn Ala Pro Thr Ser His Val Thr  
565 570 575

Pro Ser Val Lys Lys Arg Ser Ser Thr Leu Ser Gln Leu Pro Gly Asp  
580 585 590

[0007] Lys Ser Lys Ala Phe Asp Phe Leu Ser Glu Glu Thr Glu Ala Ser Leu  
595 600 605

Ala Ser Arg Arg Glu Gln Lys Arg Glu Gln Tyr Arg Gln Val Lys Ala  
610 615 620

His Val Gln Lys Glu Asp Gly Arg Val Gln Ala Phe Gly Trp Ser Leu  
625 630 635 640

Pro Gln Lys Tyr Lys Gln Val Thr Asn Gly Gln Gly Glu Asn Lys Met  
645 650 655

Lys Asn Leu Pro Val Pro Val Tyr Leu Arg Pro Leu Asp Glu Lys Asp  
660 665 670

Thr Ser Met Lys Leu Trp Cys Ala Val Gly Val Asn Leu Ser Gly Gly  
675 680 685

Lys Thr Arg Asp Gly Gly Ser Val Val Gly Ala Ser Val Phe Tyr Lys  
 690                      695                      700

Asp Val Ala Gly Leu Asp Thr Glu Gly Ser Lys Gln Arg Ser Ala Ser  
 705                      710                      715                      720

Gln Ser Ser Leu Asp Lys Leu Asp Gln Glu Leu Lys Glu Gln Gln Lys  
 725                      730                      735

Glu Leu Lys Asn Gln Glu Glu Leu Ser Ser Leu Val Trp Ile Cys Thr  
 740                      745                      750

Ser Thr His Ser Ala Thr Lys Val Leu Ile Ile Asp Ala Val Gln Pro  
 755                      760                      765

Gly Asn Ile Leu Asp Ser Phe Thr Val Cys Asn Ser His Val Leu Cys  
 770                      775                      780

[0008]

Ile Ala Ser Val Pro Gly Ala Arg Glu Thr Asp Tyr Pro Ala Gly Glu  
 785                      790                      795                      800

Asp Leu Ser Glu Ser Gly Gln Val Asp Lys Ala Ser Leu Cys Gly Ser  
 805                      810                      815

Met Thr Ser Asn Ser Ser Ala Glu Thr Asp Ser Leu Leu Gly Gly Ile  
 820                      825                      830

Thr Val Val Gly Cys Ser Ala Glu Gly Val Thr Gly Ala Ala Thr Ser  
 835                      840                      845

Pro Ser Thr Asn Gly Ala Ser Pro Val Met Asp Lys Pro Pro Glu Met  
 850                      855                      860

Glu Ala Glu Asn Ser Glu Val Asp Glu Asn Val Pro Thr Ala Glu Glu  
 865                      870                      875                      880

Ala Thr Glu Ala Thr Glu Gly Asn Ala Gly Ser Ala Glu Asp Thr Val			
	885	890	895
Asp Ile Ser Gln Thr Gly Val Tyr Thr Glu His Val Phe Thr Asp Pro			
	900	905	910
Leu Gly Val Gln Ile Pro Glu Asp Leu Ser Pro Val Tyr Gln Ser Ser			
	915	920	925
Asn Asp Ser Asp Ala Tyr Lys Asp Gln Ile Ser Val Leu Pro Asn Glu			
	930	935	940
Gln Asp Leu Val Arg Glu Glu Ala Gln Lys Met Ser Ser Leu Leu Pro			
945	950	955	960
Thr Met Trp Leu Gly Ala Gln Asn Gly Cys Leu Tyr Val His Ser Ser			
	965	970	975
[0009] Val Ala Gln Trp Arg Lys Cys Leu His Ser Ile Lys Leu Lys Asp Ser			
	980	985	990
Ile Leu Ser Ile Val His Val Lys Gly Ile Val Leu Val Ala Leu Ala			
	995	1000	1005
Asp Gly Thr Leu Ala Ile Phe His Arg Gly Val Asp Gly Gln Trp			
	1010	1015	1020
Asp Leu Ser Asn Tyr His Leu Leu Asp Leu Gly Arg Pro His His			
	1025	1030	1035
Ser Ile Arg Cys Met Thr Val Val His Asp Lys Val Trp Cys Gly			
	1040	1045	1050
Tyr Arg Asn Lys Ile Tyr Val Val Gln Pro Lys Ala Met Lys Ile			
	1055	1060	1065

Glu Lys	Ser Phe Asp Ala His	Pro Arg Lys Glu Ser	Gln Val Arg
1070	1075	1080	
Gln Leu	Ala Trp Val Gly Asp	Gly Val Trp Val Ser	Ile Arg Leu
1085	1090	1095	
Asp Ser	Thr Leu Arg Leu Tyr	His Ala His Thr Tyr	Gln His Leu
1100	1105	1110	
Gln Asp	Val Asp Ile Glu Pro	Tyr Val Ser Lys Met	Leu Gly Thr
1115	1120	1125	
Gly Lys	Leu Gly Phe Ser Phe	Val Arg Ile Thr Ala	Leu Met Val
1130	1135	1140	
Ser Cys	Asn Arg Leu Trp Val	Gly Thr Gly Asn Gly	Val Ile Ile
1145	1150	1155	
[0010]			
Ser Ile	Pro Leu Thr Glu Thr	Asn Lys Thr Ser Gly	Val Pro Gly
1160	1165	1170	
Asn Arg	Pro Gly Ser Val Ile	Arg Val Tyr Gly Asp	Glu Asn Ser
1175	1180	1185	
Asp Lys	Val Thr Pro Gly Thr	Phe Ile Pro Tyr Cys	Ser Met Ala
1190	1195	1200	
His Ala	Gln Leu Cys Phe His	Gly His Arg Asp Ala	Val Lys Phe
1205	1210	1215	
Phe Val	Ala Val Pro Gly Gln	Val Ile Ser Pro Gln	Ser Ser Ser
1220	1225	1230	
Ser Gly	Thr Asp Leu Thr Gly	Asp Lys Ala Gly Pro	Ser Ala Gln
1235	1240	1245	

Glu Pro Gly Ser Gln Thr Pro Leu Lys Ser Met Leu Val Ile Ser  
 1250 1255 1260  
 Gly Gly Glu Gly Tyr Ile Asp Phe Arg Met Gly Asp Glu Gly Gly  
 1265 1270 1275  
 Glu Ser Glu Leu Leu Gly Glu Asp Leu Pro Leu Glu Pro Ser Val  
 1280 1285 1290  
 Thr Lys Ala Glu Arg Ser His Leu Ile Val Trp Gln Val Met Tyr  
 1295 1300 1305

Gly Asn Glu

1310

<210> 3

<211> 18

[0011]

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3

agagaattgg aggaagag

18

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 4

atcactatca tcgcatct

19

<210> 5

<211> 21

---

	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<400> 5	
	ctctggtaaa gtggatattg t	21
[0012]	<210> 6	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<400> 6	
	ggtggaatca tattgaaca	20

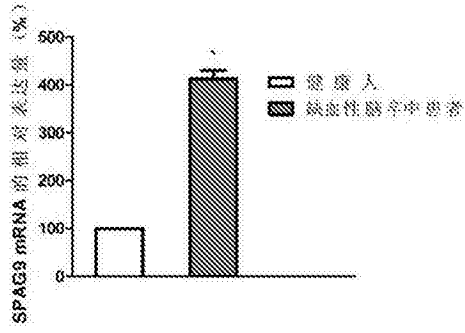


图1

专利名称(译)	基因标志物在制备诊断缺血性脑卒中的产品中的用途		
公开(公告)号	<a href="#">CN105907881A</a>	公开(公告)日	2016-08-31
申请号	CN201610509639.1	申请日	2016-07-01
[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	宋宏涛 肖枫 杨承刚		
发明人	宋宏涛 肖枫 杨承刚		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/68 G01N33/53		
CPC分类号	C12Q1/6883 C12Q2600/158 G01N33/53 G01N33/6893 G01N2333/47 G01N2800/2871		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了基因标志物在制备诊断缺血性脑卒中的产品中的用途，所述标志物为SPAG9基因，SPAG9基因在缺血性脑卒中表达上调，通过检测SPAG9基因的表达水平可以为缺血性脑卒中患者提供早期诊断，以期实现早治疗，降低缺血性脑卒中患者的死亡率和致残率。

