



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105018484 A

(43) 申请公布日 2015. 11. 04

(21) 申请号 201510463469. 3

(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)

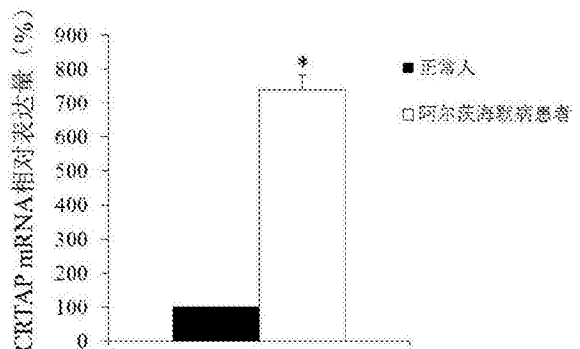
权利要求书1页 说明书9页  
序列表8页 附图2页

(54) 发明名称

CRTAP 基因及其表达产物作为阿尔茨海默病的  
诊治靶标

(57) 摘要

本发明公开了 CRTAP 基因及其表达产物可以  
作为阿尔茨海默病早期诊断的分子标志物,即  
可以通过检测受试者血液中的 CRTAP 基因表达水平  
来判断受试者是否患有阿尔茨海默病。根据本发  
明的研究成果,可以研发能够抑制 CRTAP 基因表  
达或者能够抑制 CRTAP 基因表达产物功能的药  
物,从而实现临床上对于阿尔茨海默病的预防和  
治疗。



1. 人 CRTAP 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 CRTAP 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. 人 CRTAP 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 CRTAP 基因的表达异常与阿尔茨海默病的发生和发展相关。
4. 人 CRTAP 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。
5. 一种诊断阿尔茨海默病的产品,其特征在於,所述产品能够通过检测胆管组织中 CRTAP 基因的表达来诊断阿尔茨海默病。
6. 根据权利要求 5 所述的产品,其特征在於,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 CRTAP 基因转录水平的针对 CRTAP 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 CRTAP 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 CRTAP 基因转录水平的试剂;所述蛋白免疫检测试剂盒包括 CRTAP 蛋白的特异性抗体。
7. 根据权利要求 6 所述的试剂盒,其特征在於,所述试剂包括针对 CRTAP 基因的引物和 / 或探针。
8. 一种用于治疗阿尔茨海默病的药物组合物,其特征在於,所述药物组合物包含 CRTAP 基因和 / 或其表达产物的抑制剂。
9. 根据权利要求 8 所述的药物组合物,其特征在於,所述抑制剂是针对 CRTAP 的 siRNA。
10. 权利要求 8 或 9 所述的抑制剂在制备治疗阿尔茨海默病的药物中的应用。

## CRTAP 基因及其表达产物作为阿尔茨海默病的诊治靶标

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体地涉及人 CRTAP 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 disease, AD),又叫老年性痴呆,是一种中枢神经系统变性病,起病隐袭,病程呈慢性进行性,是老年期痴呆最常见的一种类型。主要表现为渐进性记忆障碍、认知功能障碍、人格改变及语言障碍等神经精神症状,严重影响社交、职业与生活功能。AD 的病因及发病机制尚未阐明,特征性病理改变为  $\beta$  淀粉样蛋白沉积形成的细胞外老年斑和 tau 蛋白过度磷酸化形成的神经细胞内神经原纤维缠结,以及神经元丢失伴胶质细胞增生等。

[0003] 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

[0004] 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。

[0005] 为了实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0006] 本发明提供了一种人 CRTAP 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。

[0007] 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 CRTAP 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。

[0008] 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 CRTAP 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 CRTAP 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 CRTAP 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 CRTAP 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 CRTAP 蛋白特异性结合的抗体,基因芯片包括与 CRTAP 基因的核酸序列杂交的探针。

[0009] 优选地,所述产品包括芯片、试剂盒。

[0010] 本发明还提供了人 CRTAP 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

CRTAP 基因的异常与阿尔茨海默病相关也属于人 CRTAP 基因的用途,同样在本发明的保护范围之内。

[0011] 本发明还提供了人 CRTAP 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。

[0012] 本发明所述的“治疗阿尔茨海默病的药物”的主要活性成分包括抑制 CRTAP 基因表达的物质、抑制 CRTAP 基因表达产物稳定性的物质、和 / 或抑制 CRTAP 基因表达产物活性的物质。

[0013] 进一步,本发明所述的治疗阿尔茨海默病的药物包括:通过干扰 RNA 抑制 CRTAP 基因表达的双链核糖核酸,或基于 CRTAP 抗原蛋白的肿瘤疫苗、或用于抑制 CRTAP 蛋白活性的蛋白质。

[0014] 本发明还提供了一种用于治疗阿尔茨海默病的药物组合物,所述药物组合物包含 CRTAP 基因和 / 或其表达产物抑制剂。所述抑制剂包括抑制 CRTAP 基因表达的物质、抑制 CRTAP 基因表达产物稳定性的物质、和 / 或抑制 CRTAP 基因表达产物活性的物质。

[0015] 进一步,本发明所述抑制剂包括:通过干扰 RNA 抑制 CRTAP 基因表达的双链核糖核酸,或基于 CRTAP 抗原蛋白的肿瘤疫苗、或用于抑制 CRTAP 蛋白活性的蛋白质。

[0016] 本发明还提供了上述 CRTAP 基因和 / 或其表达产物抑制剂在制备治疗阿尔茨海默病药物中的应用。

[0017] 在本发明中,所述 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是指在进化过程中高度保守的、由双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 诱发的、同源 mRNA 高效特异性降解的现象。使用 RNAi 技术可以特异性剔除或关闭特定基因的表达,该技术已被广泛用于探索基因功能和传染性疾病及恶性肿瘤的基因治疗领域。以细胞为基础的 RNAi 筛选在功能基因学研究方面具有许多优势,主要表现在大多数细胞类型都能使用 RNAi 方法,并且相对较容易下调或沉默任何目的基因的表达。

[0018] 为了确保 CRTAP 基因能够被高效剔除或沉默,根据 CRTAP 基因的 mRNA 序列设计了 siRNA 特异性片段。siRNA 的设计根据已发表的通用设计原则 (Elbashir et.al 2001, Schwarz et.al 2003, Khvorova et.al 2003, Reynolds et.al 2004, Hsieh et.al 2004, Ui-Tei et.al 2004), 通过在线工具完成设计,该在线工具为:

[0019] siRNA Selection Program of Whitehead Institute (Bingbing Yuan et.al 2004, <http://jura.wi.mit.edu/bioc/siRNAext/>) 和 BLOCK-iTTM RNAi Designer of INVITROGEN (winner of the 2004 Frost & Sullivan Excellence in Research Award, <https://rnaidesigner.invitrogen.com/sirna/>)。为了进一步提高 siRNA 片断的有效性,综合两个在线设计工具的优点来设计用于筛选的 siRNA 片断。最后,通过同源性比对 (NCBI BLAST) 来过滤 siRNA 序列,以提高 siRNA 片断的特异性并减少 RNAi 干扰的脱靶效应。

[0020] 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 (但并不限于): 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。

[0021] 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。

[0022] 本发明还提供了一种诊断阿尔茨海默病的产品,所述产品包括但不限于芯片、试剂盒。

[0023] 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 CRTAP 基因转录水平的针对 CRTAP 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 CRTAP 蛋白的特异性抗体;所述基因芯片可用于检测包括人 CRTAP 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 CRTAP 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。

[0024] 其中,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 CRTAP 基因转录水平的试剂;所述蛋白免疫检测试剂盒包括 CRTAP 蛋白的特异性抗体。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 CRTAP 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 CRTAP 基因的引物和/或探针。根据 CRTAP 基因的核苷酸序列信息容易设计出可以用于检测 CRTAP 基因表达水平的引物和探针。

[0025] 与 CRTAP 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。

[0026] 进一步,所述 CRTAP 蛋白的特异性抗体包括单克隆抗体、多克隆抗体。所述 CRTAP 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')<sub>2</sub>、Fv 等。只要所述片段能够保留与 CRTAP 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。

[0027] 在本发明的上下文中,“CRTAP 基因”包括人 CRTAP 基因以及人 CRTAP 基因的任何功能等同物的多核苷酸。CRTAP 基因包括与目前国际公共核酸序列数据库 GeneBank 中 CRTAP 基因 (NC\_000003.12) 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;

[0028] 优选地,CRTAP 基因的编码序列包括以下任一种 DNA 分子:

[0029] (1) 序列表中 SEQ ID NO. 1 所示的 DNA 序列;

[0030] (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;

[0031] (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。

[0032] 在本发明的具体实施方案中,所述 CRTAP 基因的编码序列是 SEQ ID NO. 1 所示的 DNA 序列。

[0033] 在本发明的上下文中,CRTAP 基因表达产物包括人 CRTAP 蛋白以及人 CRTAP 蛋白

的部分肽。所述 CRTAP 蛋白的部分肽含有与阿尔茨海默病相关的功能域。

[0034] “CRTAP 蛋白”包括人 CRTAP 蛋白以及人 CRTAP 蛋白的任何功能等同物。所述功能等同物包括人 CRTAP 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 CRTAP 的 DNA 杂交的 DNA 所编码的蛋白质。

[0035] 优选地, CRTAP 蛋白是具有下列氨基酸序列的蛋白质:

[0036] (1) 由序列表中 SEQ ID NO. 2 所示的氨基酸序列组成的蛋白质;

[0037] (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, 更佳地 1-30 个, 更佳地 1-20 个, 最佳地 1-10 个。

[0038] (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。

[0039] 在本发明的具体实施方案中, 所述 CRTAP 蛋白是具有 SEQ ID NO. 2 所示的氨基酸序列的蛋白质。

[0040] 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。

[0041] 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 CRTAP 蛋白的融合蛋白。对于与 CRTAP 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 CRTAP 蛋白的生物学活性即可。

[0042] 本发明的 CRTAP 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 CRTAP 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。

[0043] 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。

[0044] 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。

[0045] 由于 Beta 淀粉样肽 (Amyloid-beta, 通常缩写为 A $\beta$ ) 被认为是 AD 的致病物质。A $\beta$  自身聚合能力强, 形成比 A $\beta$  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 $\beta$  聚集的作用、具有清除脑内 A $\beta$  的作用以及具有阻断 A $\beta$  的神经毒性的作用来判断。

[0046] 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 CRTAP 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 CRTAP 基因的表达情况就可以代表原位肿瘤组织中 CRTAP 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 CRTAP 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。

[0047] 本发明的优点和有益效果：

[0048] 本发明首次发现了 CRTAP 基因表达与阿尔茨海默病相关,通过检测受试者血液中 CRTAP 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。

[0049] 本发明发现了一种新的分子标记物 -CRTAP 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

[0050] 图 1 显示利用 QPCR 检测 CRTAP 基因在阿尔茨海默病血液中的表达情况；

[0051] 图 2 显示利用 QPCR 检测 siRNA 对 CRTAP 基因表达的影响；

[0052] 图 3 显示 CRTAP 基因对 A $\beta$  致神经细胞死亡的影响；

[0053] 图 4 显示 CRTAP 基因对 A $\beta$  致神经突起变性的影响。

[0054] 具体的实施方式

[0055] 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。

[0056] 实施例 1 筛选与阿尔茨海默病相关的基因标志物

[0057] 1、外周血样本的收集

[0058] 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。

[0059] 2、血液总 RNA 提取

[0060] 使用百泰克血液 RNA 提取试剂盒进行血液总 RNA 的提取。

[0061] (1) 取全血 250  $\mu$ 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。

[0062] (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。

[0063] (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。

[0064] (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。

[0065] (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。

[0066] (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）。

[0067] (7) 10,000rpm 离心 45 秒, 弃掉废液, 将吸附柱重新套回收集管。

[0068] (8) 加 500  $\mu$ l 去蛋白液 RE, 12,000rpm 离心 45 秒, 弃掉废液。

[0069] (9) 加入 700  $\mu$ l 漂洗液 RW, 12,000rpm 离心 60 秒, 弃掉废液。

[0070] (10) 加入 500  $\mu$ l 漂洗液 RW, 12,000rpm 离心 60 秒, 弃掉废液。

[0071] (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。

[0072] (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  $\mu$ 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。

[0073] 3、QPCR 扩增

[0074] (1) 引物设计

[0075] 根据 Genbank 中 CRTAP 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:

[0076] CRTAP 基因:

[0077] 正向引物为 5' -TCAAGGACTTCAAGGATT-3' (SEQ ID NO. 3);

[0078] 反向引物为 5' -ATTCTTCAGGTCGTTCAA-3' (SEQ ID NO. 4)。

[0079] GAPDH 基因:

[0080] 正向引物为 5' -TTTAACTCTGGTAAAGTGGATAT-3' (SEQ ID NO. 11);

[0081] 反向引物为 5' -GGTGGAATCATATTGGAACA-3' (SEQ ID NO. 12)。

[0082] (2) 按照表 1 配制 PCR 反应体系:

[0083] 其中, SYBR Green 聚合酶链式反应体系购自 Invitrogen 公司。

[0084] 表 1 PCR 反应体系

[0085]

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

[0086] (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。

[0087] 4、统计学方法

[0088] 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。

## [0089] 5、结果

[0090] 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 CRTAP 基因表达量显著增加,差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

## [0091] 实施例 2 干扰 CRTAP 基因的表达

### [0092] 1、siRNA 设计合成

[0093] 针对 CRTAP 的 siRNA 序列:

[0094] siRNA1-CRTAP:

[0095] 正义链为 5' -UUAUUUGCCUUGAAGUAAGCG-3' (SEQ ID NO. 5);

[0096] 反义链为 5' -CUUACUUC AAGGCAAAUAAUC-3' (SEQ ID NO. 6),

[0097] siRNA2-CRTAP:

[0098] 正义链为 5' -UAUGGAAAGGUAGAAAUCUU-3' (SEQ ID NO. 7);

[0099] 反义链为 5' -GGAUUUCUACCUUCCAUAGC-3' (SEQ ID NO. 8),

[0100] siRNA3-CRTAP:

[0101] 正义链为 5' -UCGUUCAACUUAAUAGGCA-3' (SEQ ID NO. 9);

[0102] 反义链为 5' -CCUAAUUAAGUUGAACGACC-3' (SEQ ID NO. 10)

[0103] 阴性对照 siRNA 序列 (siRNA-NC):

[0104] 正义链为 5' -CGUACGCGAAUACUUCGA-3' (SEQ ID NO. 13);

[0105] 反义链为 5' -UCGAAGUAUCCGCGUACG-3' (SEQ ID NO. 14)。

[0106] 将神经细胞株 R2L1 细胞按  $1 \times 10^4$ /孔接种到 24 孔细胞培养板中,在  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中细胞培养 24h,在无双抗、含 10% FBS 的 DMEM 培养基中,转染按照脂质体转染试剂 2000 (购自于 Invitrogen 公司) 的说明书转染,实验分为正常组、阴性对照组和实验组 (20nM),其中,正常组为不转染组,阴性对照组 siRNA 与 CRTAP 基因的序列无同源性,浓度为 20nM/孔,同时分别转染。

## [0107] 2、QPCR 检测 CRTAP 基因的转录水平

### [0108] 2.1 细胞总 RNA 的提取

[0109] 采用 TRIzol Reagent (Invitrogen Cat.No. 15596-018) 总 RNA 提取试剂,按说明书提供方法提取 QBC939 细胞的总 RNA。具体方法为:取细胞,用浓度为 0.01M 的 PBS 冲洗 3 次,加入适量 TRIzol 试剂,室温放置 5min 裂解细胞,吹打均匀后以 1mL/管分装至 1.5mL Eppendorf 管中。每管加入 0.2mL 氯仿,剧烈震荡 15s,室温放置 2-3min,  $4^\circ\text{C}$ 、12000r/min 离心 15min,将上层水相移至干净 Eppendorf 管中,加入 0.5mL 异丙醇,轻轻混匀,室温放置 10min,  $4^\circ\text{C}$ 、7500r/min 离心 10min。弃上清,75%乙醇洗涤 RNA 沉淀,7500r/min 离心 5min,室温干燥 RNA 沉淀,5-10min 后溶于适量 DEPC 水。质量分数为 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 样本的完整性,应用 Bio-Photometer 对提取的 RNA 进行定量测定。

[0110] 2.2 逆转录步骤同实施例 1。

[0111] 2.3 QPCR 扩增步骤同实施例 1。

### [0112] 3、统计学方法

[0113] 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,干扰 CRTAP 基因表达组与对照组之间的差异采用 t 检验,认为当  $P < 0.05$  时具有统计学意义。

#### [0114] 4、结果

[0115] 结果如图 2 显示,与 siRNA2-CRTAP、siRNA3-CRTAP 相比,siRNA1-CRTAP 能够更有效的抑制 CRTAP 基因的表达,差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),使用 siRNA1-CRTAP 进行后续的实验。

#### [0116] 实施例 3 CRTAP 基因对 A $\beta$ 致神经细胞死亡的拮抗作用

[0117] 1、细胞转染:按照实施例 2 的方法对神经细胞株 R2L1 进行 siRNA1-CRTAP 和 siRNA-NC 的转染。

[0118] 2、转染 24h 后,将神经细胞株 R2L1 于 96 孔板中培养,细胞密度为  $0.5 \times 10^4$  细胞/孔。将细胞分为以下几组:

[0119] 未诱导组:转染 siRNA-NC、不加入  $20 \mu\text{M}$  A $\beta$  42;

[0120] 阴性对照组 (siRNA-NC+A $\beta$  42):转染 siRNA-NC,同时培养基中加入  $20 \mu\text{M}$  A $\beta$  42;

[0121] CRTAP 基因干扰组 (siRNA-CRTAP+A $\beta$  42):转染 siRNA-CRTAP,同时培养基中加入  $20 \mu\text{M}$  A $\beta$  42;

[0122] 每组设置三复孔。在  $37^\circ\text{C}$  孵育 20h 后,然后加入 MTT,孵育 4h。在加入溶解液, $37^\circ\text{C}$  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。

#### [0123] 3、结果

[0124] 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 (siRNA-NC+A $\beta$  42) 的光密度值为 32%,CRTAP 基因干扰组 (siRNA-CRTAP+A $\beta$  42) 的光密度值为 91%,差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。上述实验表明,干扰 CRTAP 基因表达能够拮抗 A $\beta$  42 神经毒性的作用。

#### [0125] 实验例 4 CRTAP 基因对 A $\beta$ 致神经突起变性的拮抗作用

[0126] 1、构建稳定低表达 CRTAP 基因的细胞株

[0127] 选择 siRNA1-CRTAP 设计合成 shRNA,将其插入 shRNA 表达载体中,此工作由上海吉玛制药技术有限公司完成,从上海吉玛公司获取 CRTAP 基因 shRNA 表达载体后进行稳定低表达 CRTAP 基因的细胞株的构建,构建方法为本领域技术人员熟知。

[0128] 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  $0.5 \times 10^3$  cells/孔,在培养基 DMEM 中加入  $10 \mu\text{M}$  all-trans retinoic acid, $37^\circ\text{C}$  培养 7 天。之后将细胞分为三组:

[0129] 未诱导组:稳定转染 shRNA-NC 质粒、不加入  $1 \mu\text{M}$  A $\beta$  42;

[0130] 阴性对照组 (shRNA-NC 质粒+A $\beta$  42):稳定转染 shRNA-NC 质粒,同时培养基中加入  $1 \mu\text{M}$  A $\beta$  42;

[0131] CRTAP 基因干扰组 (shRNA-CRTAP 质粒+A $\beta$  42):稳定转染 shRNA-CRTAP 质粒,同时培养基中加入  $1 \mu\text{M}$  A $\beta$  42;

[0132] 每组设置三复孔。在  $37^\circ\text{C}$  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。

#### [0133] 3、结果

[0134] 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 (shRNA-NC 质粒 +A $\beta$  42) 的细胞突起长度为 31%, CRTAP 基因干扰组 (shRNA-CRTAP 质粒 +A $\beta$  42) 的细胞突起长度为 89%, 差异具有统计学意义 (P<0.05)。上述实验结果表明干扰 CRTAP 基因表达能够拮抗 A $\beta$  42 引起的神经突起变性作用。

[0135] 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

&lt;110&gt; 北京洪深生物信息技术有限公司

&lt;120&gt; CRTAP 基因及其表达产物作为阿尔茨海默病的诊治靶标

&lt;160&gt; 14

&lt;170&gt; PatentIn version 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 2412

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人源

&lt;400&gt; 1

```

atggagccgg ggcgcgggg ggccgcggcg ctctagcgc tctgtgcgt ggcctgcgcg      60
ctgcgcgccg ggcgcgcca atacgaacgc tacagcttc gcagctccc acgggacgag      120
ctgatgccgc tcgagtcggc ctaccggcac gcgctggaca agtacagcgg cgagcactgg      180
gccgagagcg tgggtacct ggagatcagc ctgcggctgc accgcttct gcgcgacagc      240
gaggecttct gccaccgcaa ctgcagcgc gcgcgcgagc ccgagcccgc cgccggcctc      300
gccagctatc ccgagctgcg cctctcggg ggctctctgc gccgcgcgca ctgectcaag      360
cgctgcaagc agggcctgcc agccttcgc cagtcaccagc ccagccgca ggtgctggcg      420
gacttcagc gccgcgagcc ctacaagtc ctgcagttc cttactcaa ggcaaataat      480
ctcccaaag ccacgcgcg tgctcacacc ttctactga agcactctga tgacgaaatg      540
atgaagagga acatggcata ttataagagc ctgcctggcg ccgaggacta catlaagac      600
ctggaaacca agtcatatga aagcctgttc atccgagcag tgcgggcata caacggtgag      660
aactggagaa catccatcac agacatggag ctggcccttc ccgacttctt caaagccttt      720

```

[0002]

tacgagtgtc tgcagcctg cgaggggtcc agggagaica aggacticaa ggatttctac	780
ctttccatag cagatcatta tgtagaagtt ctggaatgca aaatacagtg tgaagagaac	840
ctcaccacag ttataggagg ctatccggtt gagaaattg tggtaccat gtatcattac	900
ttgcagttg cctattataa gttgaacgac ctgaagaatg cagccccctg tgcagtcage	960
tatctgctct ttgatcagaa tgacaaggtc atgcagcaga acctggtgta ttaccagtac	1020
cacagggaca ctggggcct ctggatgag cacttccagc ccagacctga agcagttcag	1080
ttcttaatg tgaccacact ccagaaggag ctgtatgact ttgctaagga aaatataatg	1140
gatgatgatg agggagaagt tgtggaatat gtggatgacc tcttggaaact ggaggagacc	1200
agctagatgg agccggggcg ccggggggcc gcggcgctgc tagcgtctct gtgcgtggcc	1260
tgcgcgtgc gcgcggggcg cgccaatac gaacgtaca gttccgcag ctcccacgg	1320
gacgagctga tgcgctcga gtcggcctac cggcacgcgc tggacaagta cagcggcgag	1380
cactgggccg agagcgtggg ctacctggag atcagcctgc ggctgcaccg ctgtctgcgc	1440
gacagcgagg ccttctgcca ccgcaactgc agcgcgcgc cgcagcccga gcccgcgcg	1500
ggcctgcca gctatcccga gctgcgctc ttcgggggccc tgcctgcgcg cgcgcaactgc	1560
ctcaagcgtc gcaagcaggg cctgcagacc ttccgcccagt cccagcccag ccgcgaggtg	1620
ctggcggact tccagcgcg cgagccctac aagttcctgc agttcctta ctcaaggca	1680
aataatctc ccaaagccat cgcgctgct cacaccttc tactgaagca tctgatgac	1740
gaaatgatga agaggaacat ggcatattat aagagcctgc ctggtgccga ggactacatt	1800
aaagacctgg aaaccaagtc atatgaaagc ctgttcatec gagcagtgcg ggcatacaac	1860
ggtgagaact ggagaacatc catcacagac atggagctgg ccttcccga ctcttcaaa	1920
gccttttacg agtgtctgc agcctgcgag ggttccaggg agaicaagga ctcaaggat	1980
ttctacctt ccatagcaga tcattatgta gaagtctgg aatgcaaaa acagtgtaa	2040
gagaacctca ccccagttat aggaggctat ccggttgaga aattgtgce tacatgtat	2100
cattacttgc agtttgccia ttataagttg aacgacctga agaatgcage cccctgtgca	2160

[0003]

gtcagctatc tgctcttga tcagaatgac aaggctatgc agcagaacct ggtgtattac 2220  
 cagtaccaca gggacacttg gggccctcgc gatgagcaact tccageccag acctgaagea 2280  
 gttcagtctt ttaatgtgac cacactccag aaggagctgt atgactttgc taaggaaaat 2340  
 ataatggatg atgatgaggg agaagttgtg gaatatgigg atgacctctt ggaactggag 2400  
 gagaccagct ag 2412

<210> 2

<211> 401

<212> PRT

<213> 人源

<400> 2

Met Glu Pro Gly Arg Arg Gly Ala Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Cys

1 5 10 15

Val Ala Cys Ala Leu Arg Ala Gly Arg Ala Gln Tyr Glu Arg Tyr Ser

20 25 30

Phe Arg Ser Phe Pro Arg Asp Glu Leu Met Pro Leu Glu Ser Ala Tyr

35 40 45

Arg His Ala Leu Asp Lys Tyr Ser Gly Glu His Trp Ala Glu Ser Val

50 55 60

Gly Tyr Leu Glu Ile Ser Leu Arg Leu His Arg Leu Leu Arg Asp Ser

65 70 75 80

Glu Ala Phe Cys His Arg Asn Cys Ser Ala Ala Pro Gln Pro Glu Pro

85 90 95

Ala Ala Gly Leu Ala Ser Tyr Pro Glu Leu Arg Leu Phe Gly Gly Leu

100 105 110

[0004]

Leu Arg Arg Ala His Cys Leu Lys Arg Cys Lys Gln Gly Leu Pro Ala  
 115 120 125

Phe Arg Gln Ser Gln Pro Ser Arg Glu Val Leu Ala Asp Phe Gln Arg  
 130 135 140

Arg Glu Pro Tyr Lys Phe Leu Gln Phe Ala Tyr Phe Lys Ala Asn Asn  
 145 150 155 160

Leu Pro Lys Ala Ile Ala Ala Ala His Thr Phe Leu Leu Lys His Pro  
 165 170 175

Asp Asp Glu Met Met Lys Arg Asn Met Ala Tyr Tyr Lys Ser Leu Pro  
 180 185 190

Gly Ala Glu Asp Tyr Ile Lys Asp Leu Glu Thr Lys Ser Tyr Glu Ser  
 195 200 205

Leu Phe Ile Arg Ala Val Arg Ala Tyr Asn Gly Glu Asn Trp Arg Thr  
 210 215 220

Ser Ile Thr Asp Met Glu Leu Ala Leu Pro Asp Phe Phe Lys Ala Phe  
 225 230 235 240

Tyr Glu Cys Leu Ala Ala Cys Glu Gly Ser Arg Glu Ile Lys Asp Phe  
 245 250 255

Lys Asp Phe Tyr Leu Ser Ile Ala Asp His Tyr Val Glu Val Leu Glu  
 260 265 270

Cys Lys Ile Gln Cys Glu Glu Asn Leu Thr Pro Val Ile Gly Gly Tyr  
 275 280 285

Pro Val Glu Lys Phe Val Ala Thr Met Tyr His Tyr Leu Gln Phe Ala  
 290 295 300

[0005]



attcttcagg tcgttcaa	18
<210> 5	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工合成	
<400> 5	
uuauuugccu ugaaguaagc g	21
<210> 6	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工合成	
<400> 6	
cuuacuucaa ggcaauaau c	21
<210> 7	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工合成	
<400> 7	
uauggaaagg uagaaauccu u	21
<210> 8	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工合成	
<400> 8	

[0007]

ggauuuucuaac cuuuccauag c	21
<210> 9	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工合成	
<400> 9	
ucguucaacu uauaaauaggc a	21
<210> 10	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工合成	
<400> 10	
ccuauuuauaa guugaacgac c	21
<210> 11	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工合成	
<400> 11	
tttaactctggtaaagtgga tat	23
<210> 12	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工合成	
<400> 12	

[0008]

---

ggtggaatca tattggaaca	20
<210> 13	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> 人工合成	
<400> 13	
cguacgcgga auacuucga	19
<210> 14	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> 人工合成	
<400> 14	
ucgaaguauu ccgcuacg	19

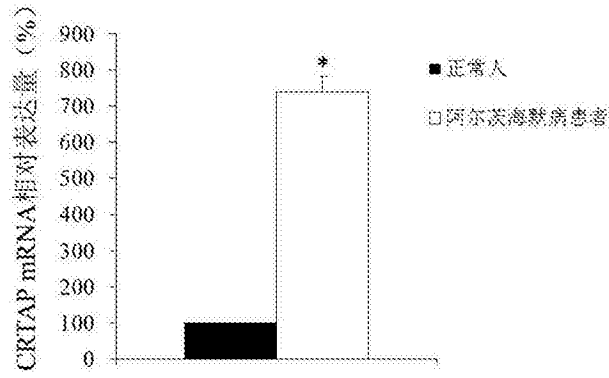


图 1

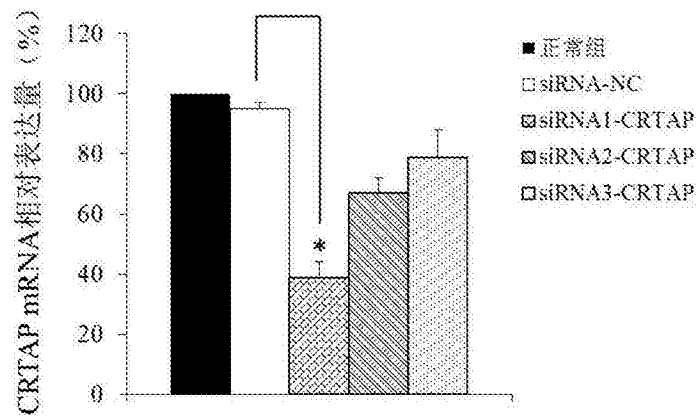


图 2

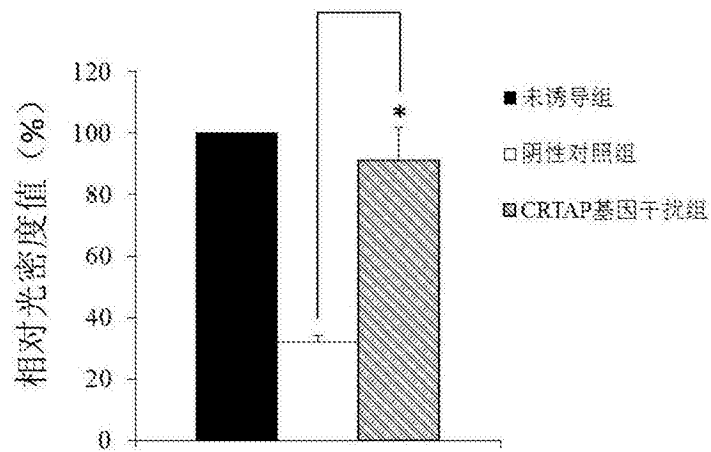


图 3

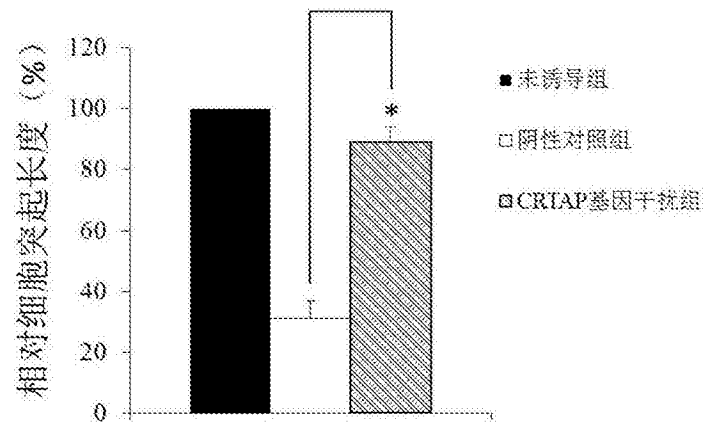


图 4

专利名称(译)	CRTAP基因及其表达产物作为阿尔茨海默病的诊治靶标		
公开(公告)号	<a href="#">CN105018484A</a>	公开(公告)日	2015-11-04
申请号	CN201510463469.3	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	CN105018484B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了CRTAP基因及其表达产物可以作为阿尔茨海默病早期诊断的分子标志物，即可以通过检测受试者血液中的CRTAP基因表达水平来判断受试者是否患有阿尔茨海默病。根据本发明的研究成果，可以研发能够抑制CRTAP基因表达或者能够抑制CRTAP基因表达产物功能的药物，从而实现临床上对于阿尔茨海默病的预防和治疗。

