



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105018484 B

(45)授权公告日 2017.10.13

(21)申请号 201510463469.3

C40B 40/10(2006.01)

(22)申请日 2015.07.31

A61K 48/00(2006.01)

A61P 25/28(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105018484 A

(56)对比文件

CN 101454335 A, 2009.06.10, 说明书和权

利要求书.

(43)申请公布日 2015.11.04

(73)专利权人 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

审查员 贵书琳

(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)

权利要求书1页 说明书8页

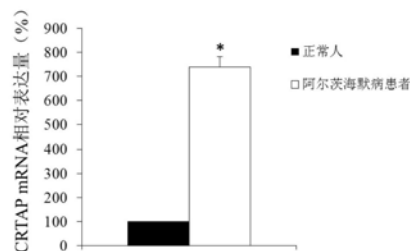
序列表8页 附图2页

(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;其特征在于,人CRTAP基因的编码序列如SEQ ID NO.1所示。
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基因及其表达产物在制备治疗阿尔茨海默病的药物中的应用,其特征在于,人CRTAP基因的编码序列如SEQ ID NO.1所示。
4. 一种诊断阿尔茨海默病的产品,其特征在于,所述产品能够通过检测血液中CRTAP基因的表达来诊断阿尔茨海默病,CRTAP基因的编码序列如SEQ IDNO.1所示。
5. 根据权利要求4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或蛋白质芯片;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。
6. 根据权利要求5所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂包括针对CRTAP基因的引物和/或探针。
7. 一种用于治疗阿尔茨海默病的药物组合物,其特征在于,所述药物组合物包含CRTAP基因的抑制剂和/或CRTAP基因表达产物的抑制剂,CRTAP基因的编码序列如SEQ ID NO.1所示。
8. 根据权利要求7所述的药物组合物,其特征在于,所述抑制剂是针对CRTAP基因的siRNA。
9. 权利要求7或8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 β 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')₂、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,较佳地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 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。

[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 β 致神经细胞死亡的影响;

[0053] 图4显示CRTAP基因对A β 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并不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 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。

[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 μ l 去蛋白液RE, 12,000rpm离心45秒, 弃掉废液。
 [0069] (9) 加入700 μ l 漂洗液RW, 12,000rpm离心60秒, 弃掉废液。
 [0070] (10) 加入500 μ 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 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。

[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 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

[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'-CUUACUUCAAGGCAAAUAAUC-3' (SEQ ID NO.6),

[0097] siRNA2-CRTAP:

[0098] 正义链为5'-UAUGGAAAGGUAGAAAUCCUU-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'-UCGUUCAACUUAUAAUAGGCA-3' (SEQ ID NO.9);

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

[0103] 阴性对照siRNA序列 (siRNA-NC):

[0104] 正义链为5'-CGUACGCGGAUACUUCGA-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 1×10^4 /孔接种到24孔细胞培养板中,在37℃、5%CO₂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℃、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℃、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±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Aβ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 0.5×10^4 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 β 42；

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

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

[0122] 每组设置三复孔。在 37°C 孵育20h后，然后加入MTT，孵育4h。在加入溶解液， 37°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 β 42) 的光密度值为32%，CRTAP基因干扰组 (siRNA-CRTAP+A β 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 β 42神经毒性的作用。

[0125] 实验例4 CRTAP基因对A β 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 0.5×10^3 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：

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

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

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

[0132] 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。

[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 β 42) 的细胞突起长度为31%，CRTAP基因干扰组 (shRNA-CRTAP质粒+A β 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 β 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。

SEQUENCE LISTING

<110> 北京泱深生物信息技术有限公司

<120> CRTAP 基因及其表达产物作为阿尔茨海默病的诊治靶标

<160> 14

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2412

<212> DNA

<213> 人源

<400> 1

[0001]

atggagccgg ggcgccgggg ggccgcggcg ctgctagcgc tgctgtgctt ggctgcgcg	60
ctgcgcgccg ggcgcgcca atacgaacgc tacagcttcc gcagcttccc acgggacgag	120
ctgatgccgc tcgagtcggc ctaccggcac gcgctggaca agtacagcgg cgagcactgg	180
gccgagagcg tgggttacct ggagatcage ctgcggctgc accgcttgct gcgcgacagc	240
gaggccttct gccaccgcaa ctgcagcgcc gcgcgcgagc ccgagcccgcc cgccggcctc	300
gccagctatc ccgagctgcg cctcttcggg ggctgtctgc gccgcgcgca ctgcctcaag	360
cgctgcaagc agggcctgcc agccttcgc cagtccagc ccagccgca ggtgtggtgcg	420
gacttcagc gccgcgagcc ctacaagttc ctgcagttcg ctacttcaa ggcaaataat	480
ctcccaaag ccatcgccgc tgctcacacc ttctactga agcatcctga tgacgaaatg	540
atgaagagga acatggcata ttataagagc ctgcctggtg ccgaggacta cattaaagac	600
ctggaaacca agtcatatga aagcctgttc atccgagcag tgcgggcata caacggtgag	660
aactggagaa catccatcac agacatggag ctggcccttc ccgacttctt caaagccttt	720

	tacgagtgtc tcgcagcctg cgaggggtcc agggagatca aggacttcaa ggatttctac	780
	ctttccatag cagatcatta tglagaagtt ctggaatgca aaatacagtg tgaagagaac	840
	ctcaccacag ttataggagg ctatccgggt gagaaatttg tggctacat gtatcattac	900
	ttgcagtttg cctattataa gttgaacgac ctgaagaatg cagccccctg tgcagtcagc	960
	tatctgctct ttgatcagaa tgacaaggtc atgcagcaga acctggtgta ttaccagtac	1020
	cacaggga cttggggcct ctcgatgag cacttccagc ccagacctga agcagttcag	1080
	ttctttaatg tgaccacact ccagaaggag ctgtatgact ttgctaagga aaatataatg	1140
	gatgatgatg agggagaagt tgtggaatat gtggatgacc tcttggaaact ggaggagacc	1200
	agctagatgg agccggggcg ccggggggcc gcggcgctgc tagcgctgct gtgcgtggcc	1260
	tgcgcgctgc gcggggcg cgccaatac gaacgtaca gcttccgag ctcccacgg	1320
	gacgagctga tgccgctga gtcggcctac cggcacgcgc tggacaagta cagcggcgag	1380
	cactgggccc agagcgtggg ctacctggag atcagcctgc ggctgcaccg ctgtctgcgc	1440
[0002]	gacagcgagg cttctgcca ccgcaactgc agcgccgcgc cgcagcccga gcccgcgcc	1500
	ggcctcgcca gctatcccga gctgcgcctc ttggggggcc tgctgcgccg cgcgcactgc	1560
	ctcaagcgct gcaagcaggg cctgccagcc ttccgccagt cccagcccag ccgcgaggtg	1620
	ctggcggact tccagcgccg cgagccctac aagttcctgc agttcgctta cttaaggca	1680
	aaataatccc ccaaagccat cgccgctgct cacaccttct tactgaagca tcctgatgac	1740
	gaaatgatga agaggaacat ggcatattat aagagcctgc ctggtgccga ggactacatt	1800
	aaagacctgg aaaccaagtc atatgaaagc ctgttcatcc gagcagtgcg ggcatacaac	1860
	ggtgagaact ggagaacatc catcacagac atggagctgg ccttcccga ctcttcaaa	1920
	gccttttacg agtgtctgc agcctgcgag ggttccaggg agatcaagga cttaaggat	1980
	ttctaccttt ccatagcaga tcattatgta gaagttctgg aatgcaaaat acagtgtgaa	2040
	gagaacctca cccagttat agggaggctat ccggttgaga aatttgtggc taccatgtat	2100
	cattactgc agtttgccta ttataagttg aacgacctga agaatgcagc ccctgtgca	2160

gtcagctatc tgctctttga tcagaatgac aaggatcatgc agcagaacct ggtgtattac 2220
 cagtaccaca gggacacttg gggcctctcg gatgagcact tccagcccag acctgaagca 2280
 gttcagttct ttaatgtgac cacactccag aaggagctgt atgactttgc taaggaaaat 2340
 ataatggatg atgatgaggg agaagttgtg gaatatgtgg 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

[0003]

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			
	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			
	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			

Tyr Tyr Lys Leu Asn Asp Leu Lys Asn Ala Ala Pro Cys Ala Val Ser

305 310 315 320

Tyr Leu Leu Phe Asp Gln Asn Asp Lys Val Met Gln Gln Asn Leu Val

325 330 335

Tyr Tyr Gln Tyr His Arg Asp Thr Trp Gly Leu Ser Asp Glu His Phe

340 345 350

Gln Pro Arg Pro Glu Ala Val Gln Phe Phe Asn Val Thr Thr Leu Gln

355 360 365

Lys Glu Leu Tyr Asp Phe Ala Lys Glu Asn Ile Met Asp Asp Asp Glu

370 375 380

Gly Glu Val Val Glu Tyr Val Asp Asp Leu Leu Glu Leu Glu Glu Thr

385 390 395 400

[0005]

Ser

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 3

tcaaggactt caaggatt

18

<210> 4

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 4

	attcttcagg tcgtcaa	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	
[0006]	cuuacuucaa ggcaaaauau 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	

	ggauuucuac 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	
[0007]	ccuauuauaa guugaacgac c	21
	<210> 11	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工合成	
	<400> 11	
	tttaactctggtaaagtga tat	23
	<210> 12	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工合成	
	<400> 12	

	ggtggaatca tattggaaca	20
	<210> 13	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工合成	
	<400> 13	
[0008]	cguacgcgga auacuucga	19
	<210> 14	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工合成	
	<400> 14	
	ucgaaguaau ccgcguacg	19

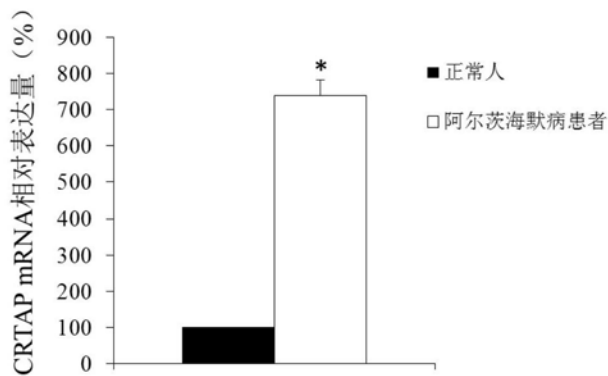


图1

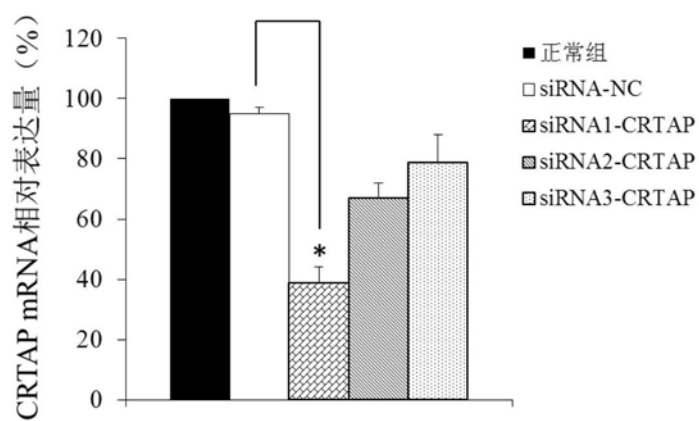


图2

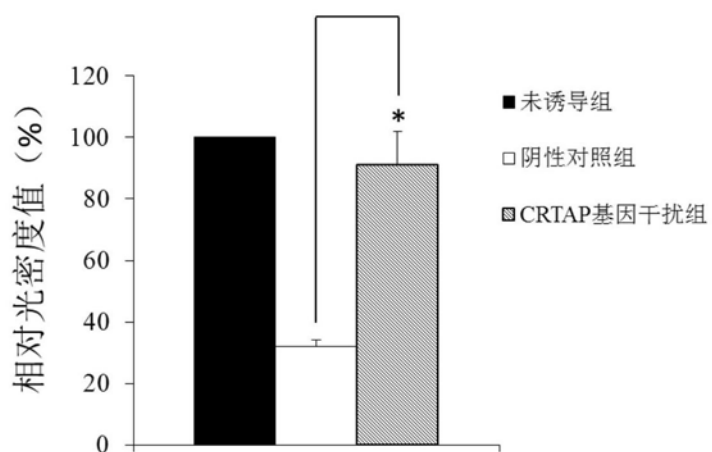


图3

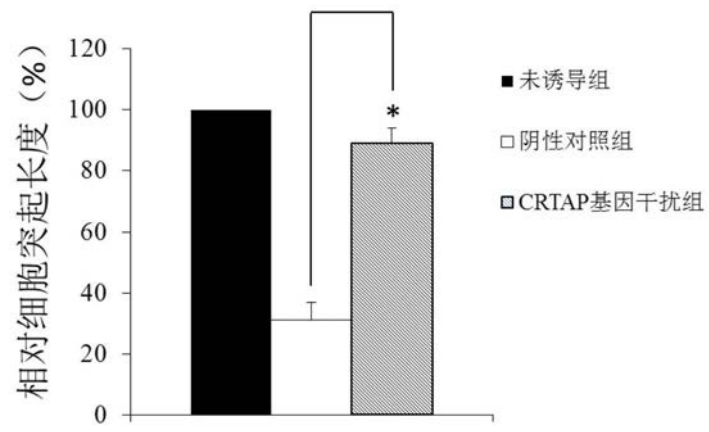


图4

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	CN105018484B	公开(公告)日	2017-10-13
申请号	CN201510463469.3	申请日	2015-07-31
[标]申请(专利权)人(译)	北京决深生物信息技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京决深生物信息技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京决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	CN105018484A		
外部链接	Espacenet SIPO		

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。

