(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2023 年 11 月 23 日 (23.11.2023)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2023/221306 A1

(51) 国际专利分类号:
C12Q 1/6883 (2018.01) *C12N 15/11* (2006.01)
C12Q 1/6858 (2018.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/110850

(22) 国际申请日: 2022 年 8 月 8 日 (08.08.2022)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202210546485.9 2022年5月19日 (19.05.2022) CN

(71) 申请人: 苏州大学 (**SOOCHOW UNIVERSITY**) [CN/CN]; 中国江苏省苏州市工业园区仁爱路199号, Jiangsu 215000 (CN)。

(72) 发明人: 彭浩 (**PENG, Hao**); 中国江苏省苏州市工业园区仁爱路199号, Jiangsu 215000 (CN)。卢莹 (**LU, Ying**); 中国江苏省苏州市工业园区仁爱路199号, Jiangsu 215000 (CN)。刘洋 (**LIU, Yang**); 中国江苏省苏州市工业园区仁爱路199号, Jiangsu 215000 (CN)。

(74) 代理人: 苏州市中南伟业知识产权代理事务所（普通合伙） (**CENTRAL SOUTH WELL INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE**); 中国江苏省苏州市吴中区石湖西路188号吴中万达广场A座苏州大学国家科技园2303, Jiangsu 215000 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

(54) **Title:** DNA HYDROXYMETHYLATION MARKER FOR NPPB GENE, PRIMER, AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种NPPB基因DNA羟甲基化标志物、引物及其应用

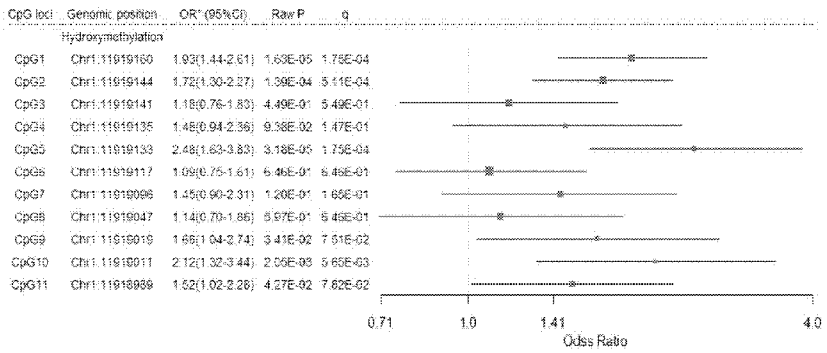


图 2

(57) **Abstract:** The present invention relates to a DNA hydroxymethylation marker for an NPPB gene, a primer, and use thereof. The DNA hydroxymethylation marker for the NPPB gene comprises at least one of DNA hydroxymethylation sites Chr1:11919160(CpG1), Chr1:11919144(CpG2), Chr1:11919133(CpG5), and Chr1:11919011(CpG10) in a promoter region of the NPPB gene, the hydroxymethylation degree of which indicates the onset risk of cerebral apoplexy. The DNA hydroxymethylation marker for the NPPB gene of the present invention can be used for predicting the onset risk of cerebral apoplexy, providing a new direction for preventing and treating cerebral apoplexy. Meanwhile, based on the above DNA hydroxymethylation sites, a combination of cerebral apoplexy-specific DNA hydroxymethylation markers is provided. By performing an assay based on a plurality of DNA hydroxymethylation sites, the problem of a low single DNA hydroxymethylation signal is solved, and the detection sensitivity, specificity, and accuracy are improved.

WO 2023/221306 A1

[见续页]

本国际公布:
— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
— 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(57) 摘要: 本发明涉及一种NPPB基因DNA羟甲基化标志物、引物及其应用，该NPPB基因DNA羟甲基化标志物包括NPPB基因启动子区的DNA羟甲基化位点Chr1:11919160(CpG1)、Chr1:11919144(CpG2)、Chr1:11919133(CpG5)和Chr1:11919011(CpG10)中的至少一个，其羟甲基化程度指示脑卒中发病风险。本发明提供的NPPB基因DNA羟甲基化标志物可用于预测脑卒中发病风险，为预防和治疗脑卒中提供了新的方向。同时，基于上述DNA羟甲基化位点提供了一种脑卒中特异性DNA羟甲基化标志物组合，进行基于多个DNA羟甲基化位点的检测克服了单个DNA羟甲基化信号低的问题，提高了检测灵敏度、特异性和准确率。

一种 *NPPB* 基因 DNA 羟甲基化标志物、引物及其应用

技术领域

本发明涉及生物医药技术领域，尤其涉及一种 *NPPB* 基因 DNA 羟甲基化标志物、引物及其应用。

背景技术

B 型利钠肽（B-type natriuretic peptide，BNP）是利尿钠肽家族的一员，由 32 个氨基酸残基组成的多肽。当心室负荷增加时，心室肌细胞合成并分泌 BNP 参与调节心血管稳态。许多基础研究发现，BNP 可通过舒张血管平滑肌—扩张血管、阻断交感神经系统—抑制肾上腺皮质激素释放、抑制肾素血管紧张素醛固酮系统—利尿排钠等过程参与调节心血管稳态以及心血管疾病及其危险因素的发生发展。在临床上，BNP 已成为心衰的生物标志物，用于心衰的筛查、诊断及鉴别诊断，也是心力衰竭患者未来结局的有用预测指标。根据 BNP 的生理特性合成的重组人 B 型利钠肽——奈西立肽，已在临床上对心衰患者展开应用，然而，值得注意的是，多项临床研究发现奈西立肽会导致剂量依赖性低血压，并且会增加慢性心衰合并急性肾功能衰竭患者的病死率。因此进一步探究 BNP 参与调节心血管疾病的分子机制，有助于新药研发、从而预防和控制心血管疾病。左心室功能障碍、心房颤动、心力衰竭、动脉粥样硬化等疾病是已知的血浆 BNP 水平升高的原因，而这些心血管疾病的高发病率最终导致了中风。大量流行病学研究表明，血浆 BNP 水平与中风有关，入院时的血浆 BNP 水平可以预测中风患者的院内死亡。脑卒中是一种急性脑血管疾病，是由于脑部血管突然破裂或因血管阻塞导致血液不能流入大脑而引起脑组织损伤的一组疾病，包括缺血性和出血性卒中。脑卒中发病率和死亡率居高不下，如何有效的防治脑卒中是我国公共卫生领域面临的重大挑战。

目前，脑卒中主要的诊断方法包括颅脑 CT、颅脑核磁共振、颈动脉彩超 CTA 和血管造影等，这些方法复杂繁琐，且影像学检查对于微小病灶的诊断能力有限，检测灵敏度和特异性低，且诊断结果具有一定的主观性。因此，临床急需新的诊断和治疗策略，探索更多的发病机制和治疗靶点将对人类健康作出重大贡献。目前尚未见关于 *NPPB* 基因 DNA 羟甲基化与脑卒中的研究报道，也没有报道一种合适的羟甲基化标志物可作为预防和控制脑卒中的干预靶点。

发明内容

为解决上述技术问题，本发明通过对 *NPPB* 基因 DNA 羟甲基化与脑卒中表型相关性的研究，提供了一种与脑卒中相关的 DNA 羟甲基化标志物，并进一步将其结合，提供了一种脑卒中特异性 DNA 羟甲基化标志物组合，进行基于多个 DNA 羟甲基化位点的检测克服了单个 DNA 羟甲基化信号低的问题，提高了检测灵敏度、特异性和准确率，

安全性也更高。

本发明的第一个目的是提供一种预测脑卒中发病风险的DNA羟甲基化标志物，该DNA羟甲基化标志物包括*NPPB*基因启动子区的DNA羟甲基化位点Chr1:11919160(CpG1)(CpG1)、Chr1:11919144(CpG2)(CpG2)、Chr1:11919133(CpG5)(CpG5)或Chr1:11919011(CpG10)。

进一步地，DNA羟甲基化标志物选自Chr1:11919160(CpG1)、Chr1:11919144(CpG2)、Chr1:11919133(CpG5)和Chr1:11919011(CpG10)中至少2个位点的组合。

优选地，DNA羟甲基化标志物为以下组合（1）-（10）中的任意一种：

（1）Chr1:11919160和Chr1:11919144，

（2）Chr1:11919160和Chr1:11919133，

（3）Chr1:11919160和Chr1:11919011，

（4）Chr1:11919144和Chr1:11919133，

（5）Chr1:11919144和Chr1:11919011，

（6）Chr1:11919133和Chr1:11919011，

（7）Chr1:11919160、Chr1:11919144和Chr1:11919133，

（8）Chr1:11919160、Chr1:11919144和Chr1:11919011，

（9）Chr1:11919160、Chr1:11919133和Chr1:11919011，

（10）Chr1:11919144、Chr1:11919133和Chr1:11919011，

（11）Chr1:11919160、Chr1:11919144、Chr1:11919133和Chr1:11919011。

进一步地，检测上述DNA羟甲基化标志物的羟甲基化水平包括以下步骤：

（1）提取DNA样本，用T4 β-葡糖基转移酶和APOBEC3A酶处理DNA样本；

（2）扩增步骤（1）处理后的样品，得到扩增产物；

（3）对步骤（2）的扩增产物进行转录和酶切，得到转录和酶切产物；

（4）对步骤（3）的转录和酶切产物进行检测，获取序列中Chr1:11919160(CpG1)、Chr1:11919144(CpG2)、Chr1:11919133(CpG5)或Chr1:11919011(CpG10)位点的羟甲基化水平。

进一步地，DNA样本为血液样本。

进一步地，扩增DNA羟甲基化标志物的上游引物如SEQ ID NO.1所示，下游引物如SEQ ID NO.2所示。

本发明的第二个目的是提供上述DNA羟甲基化标志物在制备预测脑卒中发病风险的试剂盒中的应用。

进一步地，试剂盒中还包括扩增*NPPB*基因启动子区的DNA羟甲基化位点

Chr1:11919160(CpG1)、Chr1:11919144(CpG2)、Chr1:11919133(CpG5)和Chr1:11919011(CpG10)中至少一个位点的引物。

进一步地，上游引物如SEQ ID NO.1所示，下游引物如SEQ ID NO.2所示。该引物对可同时扩增出这四个位点，再分别检测每个位点的羟甲基化水平，进而判断脑卒中发病风险。

本发明的第三个目的是提供扩增上述DNA羟甲基化标志物的引物在制备预测脑卒中发病风险的试剂盒中的应用，上游引物如SEQ ID NO.1所示，下游引物如SEQ ID NO.2所示，具体地，

F：GGTTTATTTTTATATAAGGTYGGTTTTGTT

R：ACRTCCRAATTTACTTCCCACCTAC，其中，R表示碱基A/G。

本发明的第四个目的是提供一种预测脑卒中发病风险的试剂盒，该试剂盒中包括：扩增*NPPB*基因启动子区的DNA羟甲基化位点Chr1:11919160(CpG1)、Chr1:11919144(CpG2)、Chr1:11919133(CpG5)和Chr1:11919011(CpG10)中至少一个位点的引物。

进一步地，试剂盒中还包含检测Chr1:11919160(CpG1)、Chr1:11919144(CpG2)、Chr1:11919133(CpG5)和Chr1:11919011(CpG10)中至少一个位点羟甲基化水平的试剂，该试剂与引物对应，试剂检测的位点至少覆盖引物扩增的位点。

进一步地，上游引物如SEQ ID NO.1所示，下游引物如SEQ ID NO.2所示。

借由上述方案，本发明至少具有以下优点：

本发明提供的*NPPB*基因DNA羟甲基化标志物可用于预测脑卒中的发病风险，为脑卒中高危人群的筛查提供依据，也可以作为预防和控制脑卒中的干预靶点。同时，进行基于多个DNA羟甲基化位点的检测克服了单个DNA羟甲基化信号低的问题，提高了检测灵敏度、特异性和准确率。

上述说明仅是本发明技术方案的概述，为了能够更清楚了解本发明的技术手段，并可依照说明书的内容予以实施，以下以本发明的较佳实施例并配合详细附图说明如后。

附图说明

为了使本发明的内容更容易被清楚的理解，下面根据本发明的具体实施例并结合附图，对本发明作进一步详细的说明。

图1为基于NGS的多目标CpG羟甲基化测序的目标序列和引物，以及预测的11个CpG位点；

图2为脑卒中患者组和健康对照组的11个CpG位点的DNA羟甲基化水平与脑卒中的关联程度；

图3-13为仅传统模型和各CpG位点联合传统模型的ROC曲线比较图；

图14-24为传统模型联合CpG位点各组合模型的ROC曲线比较图。

具体实施方式

下面结合附图和具体实施例对本发明作进一步说明，以使本领域的技术人员可以更好地理解本发明并能予以实施，但所举实施例不作为对本发明的限定。

实施例 1

在 CATIS（中国急性缺血性脑卒中抗高血压试验）人群中，纳入了 1771 人，包括脑卒中患者 853 人和健康对照 918 人。提取每一位研究对象的全血 DNA 标本，运用基于 NGS 的多目标 CpG 羟甲基化测序技术检测 *NPPB* 基因启动子区域各 CpG 位点羟甲基化水平，即利用 ENSEMBL 数据库查询人类 *NPPB* 基因的启动子区域，该区域为 Chr1: 11919190- 11918953（距 TSS: -168bp to 3 bp），在 NCBI 上截取该区域的核酸序列，将核酸序列导入 EMBOSS Cpgplot 软件预测 CpG 岛，然后运用 Epidesigner 程序对 CpG 岛及 CpG 密集区域序列进行引物设计，挑选合适的引物进行 DNA 羟甲基化检测（引物序列信息见表 1）。经过挑选，*NPPB* 羟甲基化共获得 11 个 CpG 位点的羟甲基化水平，11 个 CpG 位点如图 1 所示。

表 1 *NPPB* 基因启动子区域 DNA 羟甲基化检测引物序列

5’端引物序列	GGTTTATTTTTATATAAGGTYGGTTTTGTT（SEQ ID NO.1）
3’端引物序列	ACRTCCRAATTTACTTCCCACCTAC （SEQ ID NO.2）

DNA 羟甲基化的具体检测方法为：

首先用 DNA 羟甲基化试剂盒对 DNA 标本依次进行 T4 β-葡萄糖基转移酶和 APOBEC3A 酶处理，以葡萄糖基标记样本 DNA 中的羟甲基化胞嘧啶，被标记了的羟甲基化胞嘧啶不会被 APOBEC3A 酶脱去氨基，而其余的胞嘧啶和甲基化胞嘧啶则在 APOBEC3A 酶的作用下转化为胸腺嘧啶。接着用表 1 中的引物，以酶转化后的样品基因组为模板，进行多重 PCR 扩增。为区分不同样品，利用带有 Index 序列的引物，通过 PCR 扩增向文库末端引入和 illumina 平台兼容的特异性标签序列。最终，将所有样品 Index PCR 扩增产物等量混合，在 IlluminaHiseq/Miseq 平台，以 2x150bp/2x250bp 的双端测序模式进行高通量测序，获得 FastQ 数据。各 CpG 位点羟甲基化水平量化为该位点羟甲基化的 reads 数目(即检测到碱基 C 的 reads 数目)/该位点总的 reads 数目×100%。

研究结果如下：

1、研究对象的临床特征

表 2 表示研究对象的临床特征，共包含了 853 名缺血性脑卒中患者（平均年龄 62 岁，男性占 53%）和 918 名年龄性别匹配的健康对照（平均年龄 61 岁，男性占 55%）。缺血性脑卒中患者相比于健康对照有更多的代谢风险因素如：高血压、糖尿病、脂质、肥胖 (P<0.05)。

表 2 研究对象的临床特征

特征	健康对照	缺血性脑卒中	*P*
人数	918	853	-
年龄，岁	61.2±12.2	62.5±12.1	0.262
性别，男性(%)	503 (54.79)	453 (53.11)	0.507
教育程度，高中及以上(%)	580 (63.18)	732 (85.81)	<0.001
吸烟, n(%)	348 (37.91)	294 (34.47)	0.145
饮酒, n(%)	253 (27.56)	222 (26.03)	0.500
高血压, n(%)	325 (35.40)	670 (78.55)	<0.001
糖尿病, n(%)	27 (2.94)	165 (19.34)	<0.001
体质指数, kg/m^2	22.36±3.37	25.09±3.39	<0.001
收缩压, mmHg	134.60±20.70	168.1±16.8	<0.001
舒张压, mmHg	80.00±10.80	97.0±10.7	<0.001
空腹血糖, mmol/L	5.04±1.18	6.78±2.82	<0.001
总胆固醇, mmol/L	4.66±0.96	5.12±1.16	<0.001
甘油三酯, mmol/L	1.56±1.15	1.89±4.96	0.054
低密度脂蛋白胆固醇, mmol/L	3.01±0.82	2.94±0.98	<0.001
高密度脂蛋白胆固醇, mmol/L	1.34±0.33	1.30±0.41	0.032

2、NPPB 基因启动子区域 DNA 羟甲基化与缺血性脑卒中的关系

如表 3 所示，我们检测的 11 个 CpG 位点的 DNA 羟甲基化水平在脑卒中患者中均高于健康对照（q<0.05）。如图 2 所示，在调整了年龄、性别、教育水平、吸烟、饮酒、体质指数、低密度脂蛋白胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇、高血压以及糖尿病后，CpG1(Chr1:11919160) 、 CpG2(Chr1:11919144) 、 CpG5(Chr1:11919133) 、CpG9(Chr1:11919019)、CpG10(Chr1:11919011)、CpG11(Chr1:11918989)与缺血性脑卒中显著相关(P<0.05)，在进行多重校正后 CpG1(Chr1:11919160)、CpG2(Chr1:11919144)、CpG5(Chr1:11919133)、CpG10(Chr1:11919011)仍与脑卒中有关联(q<0.05)。

表 3 缺血性脑卒中患者和健康对照组的 *NPPB* 启动子羟甲基化的中位水平

CpG 位点	位置	距离 TSS，bp	健康对照	缺血性脑卒中	*P*	q
CpG1	Chr1:11919160	-168	0.33(0.23-0.62)	0.49(0.32-0.88)	1.42E-14	1.57E-13
CpG2	Chr1:11919144	-152	0.39(0.27-0.84)	0.59(0.36-1.20)	6.64E-11	3.65E-10
CpG3	Chr1:11919141	-149	0.39(0.30-0.57)	0.43(0.33-0.57)	6.42E-03	7.06E-03
CpG4	Chr1:11919135	-143	0.40(0.31-0.54)	0.43(0.33-0.58)	5.17E-03	6.32E-03
CpG5	Chr1:11919133	-141	0.30(0.22-0.43)	0.36(0.25-0.54)	3.27E-07	1.20E-06
CpG6	Chr1:11919117	-125	0.26(0.18-0.40)	0.29(0.20-0.44)	1.90E-02	1.90E-02
CpG7	Chr1:11919096	-104	0.32(0.24-0.45)	0.36(0.26-0.50)	7.38E-04	1.16E-03
CpG8	Chr1:11919047	-55	0.40(0.28-0.51)	0.43(0.32-0.57)	1.08E-03	1.49E-03
CpG9	Chr1:11919019	-27	0.34(0.24-0.48)	0.38(0.29-0.52)	3.10E-06	6.81E-06
CpG10	Chr1:11919011	-19	0.42(0.32-0.60)	0.50(0.37-0.64)	1.27E-06	3.49E-06

CpG11	Chr1:11918989	3	0.42(0.31-0.62)	0.50(0.36-0.70)	3.40E-05	6.24E-05

为了检验 CpG 位点的甲基化水平能否提升传统危险因素对脑卒中的预测能力，绘制了受试者工作特征曲线（receiver operating characteristic curve ROC）并比较了曲线下面积（Area Under Curve AUC），结果如图 3-13 所示，并联合传统危险因素模型对脑卒中的风险预测情况进行了测定，结果见表 4。如表 4 和图 3-13 所示，ROC 曲线下面积：AUC(传统危险因素+CpG1 羟甲基化水平)>AUC(传统危险因素+CpG2 羟甲基化水平)=AUC(传统危险因素+CpG5 羟甲基化水平)>AUC(传统危险因素+CpG10 羟甲基化水平)>AUC(传统危险因素+CpG9 羟甲基化水平)>AUC(传统危险因素+CpG 4 传统危险因素+CpG 4 羟甲基化水平)=AUC(传统危险因素+CpG7 羟甲基化水平)=AUC(传统危险因素+CpG11 羟甲基化水平)>AUC(传统危险因素+CpG3 羟甲基化水平)=AUC(传统危险因素+CpG6 羟甲基化水平)= AUC(传统危险因素+CpG8 羟甲基化水平)= AUC(仅传统危险因素)；结合图 2 的结果(CpG1、CpG2、CpG5、CpG10 在经过多重检验矫正后仍与脑卒中有关联(q<0.05))，筛选出四个位点：CpG1、CpG2、CpG5 和 CpG10。

表 4 传统模型联合各 CpG 位点对缺血性脑卒中的发病诊断

模型	AUC	灵敏度	特异度	准确度	截断值(P)	*P*-value
传统模型+CpG1	0.857	0.795	0.777	0.786	0.4859593	0.032
传统模型+CpG2	0.856	0.761	0.805	0.783	0.520059	0.047
传统模型+CpG3	0.851	0.732	0.821	0.776	0.5520311	0.988
传统模型+CpG4	0.852	0.731	0.834	0.782	0.5520028	0.469
传统模型+CpG5	0.856	0.778	0.796	0.787	0.516047	0.077
传统模型+CpG6	0.851	0.734	0.831	0.782	0.5526612	0.931
传统模型+CpG7	0.852	0.745	0.818	0.781	0.5443062	0.695
传统模型+CpG8	0.851	0.740	0.821	0.780	0.5430117	0.687
传统模型+CpG9	0.853	0.768	0.810	0.768	0.5253822	0.234
传统模型+CpG10	0.854	0.768	0.793	0.780	0.515397	0.149
传统模型+CpG11	0.852	0.745	0.821	0.783	0.5436925	0.391

传统模型包括年龄、性别、教育水平、吸烟、饮酒、体质指数、低密度脂蛋白胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇、高血压史以及糖尿病史。

如表 5 和图 14-24 所示，ROC 曲线下面积(AUC)最大的模型是：传统模型+

CpG1+CpG2+CpG5+CpG10，AUC 为 0.866，且 *P* 值小于 0.05。

表 5 传统模型联合 CpG 位点各组合模型对缺血性脑卒中的发病诊断

模型	AUC	灵敏度	特异度	准确度	截断值(P)	*P*-value
传统模型+CpG1+CpG2	0.859	0.765	0.813	0.789	0.5248799	0.011
传统模型+CpG1+CpG5	0.862	0.781	0.803	0.792	0.5199175	0.004
传统模型+CpG1+CpG10	0.860	0.797	0.778	0.788	0.4833371	0.01
传统模型+CpG2+CpG5	0.861	0.765	0.803	0.784	0.5162806	0.007
传统模型+CpG2+CpG10	0.858	0.779	0.791	0.785	0.4990622	0.02
传统模型+CpG5+CpG10	0.858	0.782	0.796	0.789	0.5099437	0.03
传统模型+CpG1+CpG2+CpG5	0.864	0.797	0.793	0.795	0.507641	0.001
传统模型+CpG1+CpG2+CpG10	0.862	0.753	0.826	0.789	0.5370989	0.002
传统模型+CpG1+CpG5+CpG10	0.863	0.797	0.793	0.795	0.5034375	0.002
传统模型+CpG2+CpG5+CpG10	0.863	0.771	0.806	0.789	0.5148221	0.002
传统模型+CpG1+CpG2+CpG5+CpG10	0.866	0.799	0.787	0.793	0.4935596	0.0004

传统模型包括年龄、性别、教育水平、吸烟、饮酒、体质指数、低密度脂蛋白胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇、高血压史以及糖尿病史。

表 6 显示了 CpG1 联合 CpG2、CpG5、CpG10 羟甲基化水平对缺血性卒中发生风险的预测价值。在传统模型的基础上，纳入 CpG1、CpG2、 CpG5、 CpG10 羟甲基化水平后，传统模型+CpG1+CpG2+CpG5+CpG10 模型对缺血性卒中发生风险的预测水平得到提升(NRI0.0475 %, P<0.05，IDI0.0326%)。

表 6 CpG1 联合 CpG2、CpG5、CpG10 羟甲基化水平对缺血性卒中发生风险的预测价值

	NRI		IDI	
	效应量(95%CI),%	P 值	效应量(95%CI),%	P 值
传统模型	参照组		参照组	

传统模型+CpG1+CpG2+CpG5+CpG10	0.4665 [0.3583-0.5748]	<0.001	0.0326 [0.0226-0.0427]	<0.001

NRI：净重分类改善指数；IDI：整体鉴别指数
传统模型包括年龄、性别、教育水平、吸烟、饮酒、体质指数、低密度脂蛋白胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇、高血压史以及糖尿病史。

如表 7 所示，得出的最佳脑卒中预测模型计算公式：Logit(P)= -12.509147+0.031318*年龄+0.558676*性别+2.022532*教育水平+0.399809*吸烟+0.082706*饮酒+0.260029*体质指数-0.356943*低密度脂蛋白胆固醇+0.353775*高密度脂蛋白胆固醇+1.600649*高血压史+1.767850*糖尿病史+0.542035* CpG1 羟甲基化水平+0.425184* CpG2 羟甲基化水平+0.847899* CpG5 羟甲基化水平+0.679995* CpG10 羟甲基化水平。此模型截断值：P=0.4935596。

表 7 缺血性脑卒中发生情况影响因素的 Logistic 回归分析

x_i		β_i	P value	AUC	灵敏度	特异度	准确度	截断值(P)
年龄	年	0.031318	6.18e-06					
性别	1=男性，0=女性	0.558676	0.005931					
教育水平	1=高中及以上，0=高中以下	2.022532	< 2e-16					
吸烟	1=是，0=否	0.399809	0.051840					
饮酒	1=是，0=否	0.082706	0.698886					
体质指数	kg/m^2	0.260029	< 2e-16	0.8661	0.7987	0.7865	0.7927	0.4935596
低密度脂蛋白胆固醇	mmol/L	-0.356943	1.46e-05					
高密度脂蛋白胆固醇	mmol/L	0.353775	0.097438					
高血压史	1=是，0=否	1.600649	< 2e-16					
糖尿病史	1=是，0=否	1.767850	2.10e-09					
CpG1 羟甲基化水平	%	0.542035	0.000437					
CpG2 羟甲基化水平	%	0.425184	0.004088					

CpG5 羟甲基化水平	%	0.847899	0.000131
CpG10 羟甲基化水平	%	0.679995	0.008104

Logit(P)= -12.509147+0.031318*年龄+0.558676*性别+2.022532*教育水平+0.399809*吸烟+0.082706*饮酒+0.260029*体质指数-0.356943*低密度脂蛋白胆固醇+0.353775*高密度脂蛋白胆固醇+1.600649*高血压史+1.767850*糖尿病史+0.542035* CpG1 羟甲基化水平+0.425184* CpG2 羟甲基化水平+0.847899* CpG5 羟甲基化水平+0.679995* CpG10 羟甲基化水平

实施例 2 构建羟甲基化检测试剂盒

基于以上研究，可以得知：位于启动子区域的 CpG1(Chr1:11919160)、CpG2(Chr1:11919144)、CpG5(Chr1:11919133)和 CpG10(Chr1:11919011)位点发生羟甲基化之后，可能促进 *NPPB* 基因表达进而参与脑卒中的发病，可以作为脑卒中发病风险的预测标志物和潜在药物靶点。因此，本发明构建了基于 CpG1(Chr1:11919160)、CpG2(Chr1:11919144)、 CpG5(Chr1:11919133)和 CpG10(Chr1:11919011)位点的羟甲基化检测试剂盒。

具体检测方法为：

①全血 DNA 提取并质检

a. 琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 完整性：电泳条带清晰可见，无明显降解，且无 RNA 污染。

b. Nanodrop 2000 检测基因组 DNA 质量：浓度≥20 ng/μL，总量≥1 μg，OD260/280 =1.7~2.0，OD260/230 ≥1.8。

②T4β-葡萄糖基转移酶和 APOBEC3A 酶处理

用 DNA 羟甲基化试剂盒对质检合格的 DNA 标本进行 T4β-葡萄糖基转移酶和 APOBEC3A 酶处理，将样本 DNA 中其余的胞嘧啶和甲基化胞嘧啶全部转化为胸腺嘧啶。

③多重 PCR 扩增

接着用设计好的引物（F：GGTTTATTTTTATATAAGGTYGGTTTTGTT；R：ACRTCCRAATTTACTTCCCACCTAC）对酶处理过的标本进行 DNA 扩增，得到带有 T7 RNA 聚合酶启动子序列的扩增产物。

④CpG 片段切割

然后运用 T7 RNA 聚合酶将扩增的 DNA 产物转录为 RNA 片段，用 RNase A 将所得的 RNA 片段切割成带有 CpG 的小片段。

⑤飞行质谱分析

最终，在每一个小的 RNA 片段内，未羟甲基化的 CpG 最终产物为 CpA，羟甲基化的 CpG 最终产物为 CpG，使用 Agena MassArray 飞行质谱分析系统检测这个最终产物的分子量。

⑥羟甲基化水平计算和脑卒中风险预测

该 CpG 位点羟甲基化水平量化为产物质量 CpG/(CpG+CpA)×100%，脑卒中风险预测模型，当数据带入脑卒中预测模型：Logit(P)= -12.509147+0.031318*年龄+0.558676*性别+2.022532*教育水平+0.399809*吸烟+0.082706*饮酒+0.260029*体质指数-0.356943*低密度脂蛋白胆固醇+0.353775*高密度脂蛋白胆固醇+1.600649*高血压史+1.767850*糖尿病史+0.542035* CpG1 羟甲基化水平+0.425184* CpG2 羟甲基化水平+0.847899* CpG5 羟甲基化水平+0.679995* CpG10 羟甲基化水平，计算出预测模型 P 值> 0.4935596 时，提示脑卒中发病风险较高，应密切关注并采取预防性治疗措施。

显然，上述实施例仅仅是为清楚地说明所作的举例，并非对实施方式的限定。对于所属领域的普通技术人员来说，在上述说明的基础上还可以做出其它不同形式变化或变动。这里无需也无法对所有的实施方式予以穷举。而由此所引申出的显而易见的变化或变动仍处于本发明创造的保护范围之中。

权 利 要 求 书

1．一种预测脑卒中发病风险的DNA羟甲基化标志物，其特征在于：所述DNA羟甲基化标志物包括*NPPB*基因启动子区的DNA羟甲基化位点Chr1:11919160、Chr1:11919144、Chr1:11919133和Chr1:11919011中的至少一个。

2．根据权利要求1所述的DNA羟甲基化标志物，其特征在于：所述DNA羟甲基化标志物包括*NPPB*基因启动子区的DNA甲基化位点的组合；所述DNA甲基化位点的组合为以下组合（1）-（10）中的任意一种：

（1）Chr1:11919160和Chr1:11919144，

（2）Chr1:11919160和Chr1:11919133，

（3）Chr1:11919160和Chr1:11919011，

（4）Chr1:11919144和Chr1:11919133，

（5）Chr1:11919144和Chr1:11919011，

（6）Chr1:11919133和Chr1:11919011，

（7）Chr1:11919160、Chr1:11919144和Chr1:11919133，

（8）Chr1:11919160、Chr1:11919144和Chr1:11919011，

（9）Chr1:11919160、Chr1:11919133和Chr1:11919011，

（10）Chr1:11919144、Chr1:11919133和Chr1:11919011，

（11）Chr1:11919160、Chr1:11919144、Chr1:11919133和Chr1:11919011。

3．根据权利要求1所述的DNA羟甲基化标志物，其特征在于，检测位点羟甲基化水平的方法包括以下步骤：

（1）提取DNA样本，用T4 β-葡糖基转移酶和APOBEC3A酶处理所述DNA样本；

（2）扩增步骤（1）处理后的样品，得到扩增产物；

（3）对步骤（2）的扩增产物进行转录和酶切，得到转录和酶切产物；

（4）对步骤（3）的转录和酶切产物进行检测，获取样品序列中位点Chr1:11919160、Chr1:11919144、Chr1:11919133或Chr1:11919011的羟甲基化水平。

4．根据权利要求1所述的DNA羟甲基化标志物，其特征在于：扩增所述DNA羟甲基化标志物的上游引物如SEQ ID NO.1所示，下游引物如SEQ ID NO.2所示。

5．权利要求1-4任一项所述的DNA羟甲基化标志物在制备预测脑卒中发病风险的试剂盒中的应用。

6．扩增权利要求1-4任一项所述的DNA羟甲基化标志物的引物在制备预测脑卒中发病风险的试剂盒中的应用。

7. 根据权利要求 6 所述的应用，其特征在于：扩增所述 DNA 羟甲基化标志物的上游引物如 SEQ ID NO.1 所示，下游引物如 SEQ ID NO.2 所示。

8. 一种预测脑卒中发病风险的试剂盒，其特征在于，所述试剂盒中包含：扩增 *NPPB* 基因启动子区的 DNA 羟甲基化位点 Chr1:11919160、Chr1:11919144、Chr1:11919133 和 Chr1:11919011 中至少一个位点的引物。

9. 根据权利要求 8 所述的试剂盒，其特征在于：所述试剂盒中还包含检测 Chr1:11919160、Chr1:11919144、Chr1:11919133 和 Chr1:11919011 中至少一个位点羟甲基化水平的试剂。

10. 根据权利要求 8 所述的试剂盒，其特征在于：上游引物如 SEQ ID NO.1 所示，下游引物如 SEQ ID NO.2 所示。


chromosome 1
TSS
NPPB
GGTTTATTTTTATATAAGGTYGGTTTTGTT
正向引物
Chr1:11919190
5'— GGCCCATTTCTATACAAGGTCGGCTCTGCCCGGTCTCCACCTCCCACG
1
2
TCGCAGGCGCGGAGGGGCTCATTCCCGGGCCCTGATCTCAGAGGCCCGG
3
4 5
6
7
AATGTGGCTGATAAATCAGAGATAACCCTGCATGGCAGGGCAGGCCCGAC
8
ACTCAGCTCCAGGATAAAAGGCCACGGTGTCCCGAGGAGCCAGGAGGAG
9
10
转录起始位点
CACCCCGCAGGCTGAGGGCAGGTGGGAAGCAAACCCGGACGC —3'
11
Chr1:11918953
反向引物
ACRTCCRAATTTACTTCCCACCTAC

图 1

CpG loci	Genomic position	OR* (95%CI)	Raw P	q
	Hydroxymethylation			
CpG1	Chr1:11919160	1.93(1.44-2.61)	1.63E-05	1.75E-04
CpG2	Chr1:11919144	1.72(1.30-2.27)	1.39E-04	5.11E-04
CpG3	Chr1:11919141	1.18(0.76-1.83)	4.49E-01	5.49E-01
CpG4	Chr1:11919135	1.48(0.94-2.36)	9.38E-02	1.47E-01
CpG5	Chr1:11919133	2.48(1.63-3.83)	3.18E-05	1.75E-04
CpG6	Chr1:11919117	1.09(0.75-1.61)	6.46E-01	6.46E-01
CpG7	Chr1:11919096	1.45(0.90-2.31)	1.20E-01	1.65E-01
CpG8	Chr1:11919047	1.14(0.70-1.86)	5.97E-01	6.46E-01
CpG9	Chr1:11919019	1.68(1.04-2.74)	3.41E-02	7.51E-02
CpG10	Chr1:11919011	2.12(1.32-3.44)	2.05E-03	5.65E-03
CpG11	Chr1:11918989	1.52(1.02-2.28)	4.27E-02	7.82E-02

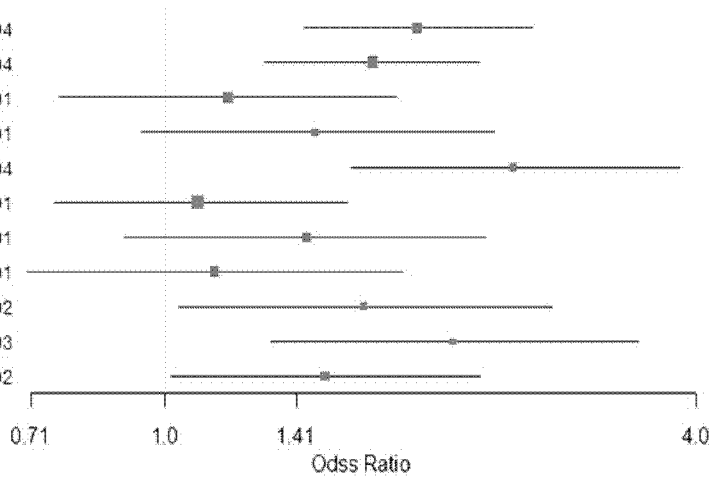


图 2

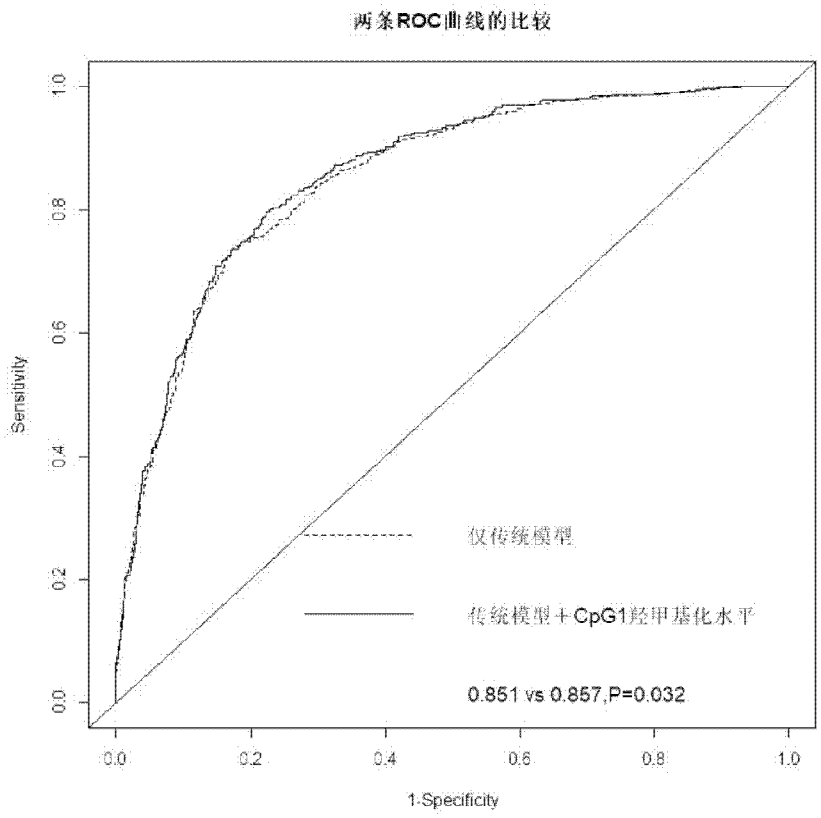

两条ROC曲线的比较
Sensitivity
1-Specificity
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
仅传统模型
传统模型+CpG1经甲基化水平
0.851 vs 0.857,P=0.032

图 3

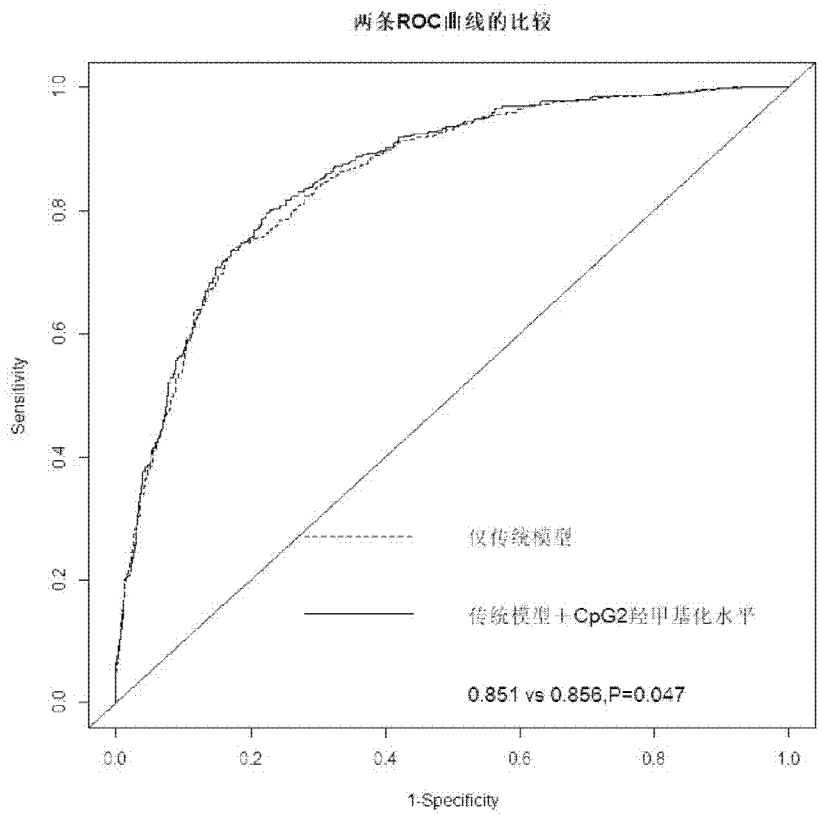

两条ROC曲线的比较
Sensitivity
1-Specificity
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
仅传统模型
传统模型+CpG2经甲基化水平
0.851 vs 0.856,P=0.047

图 4

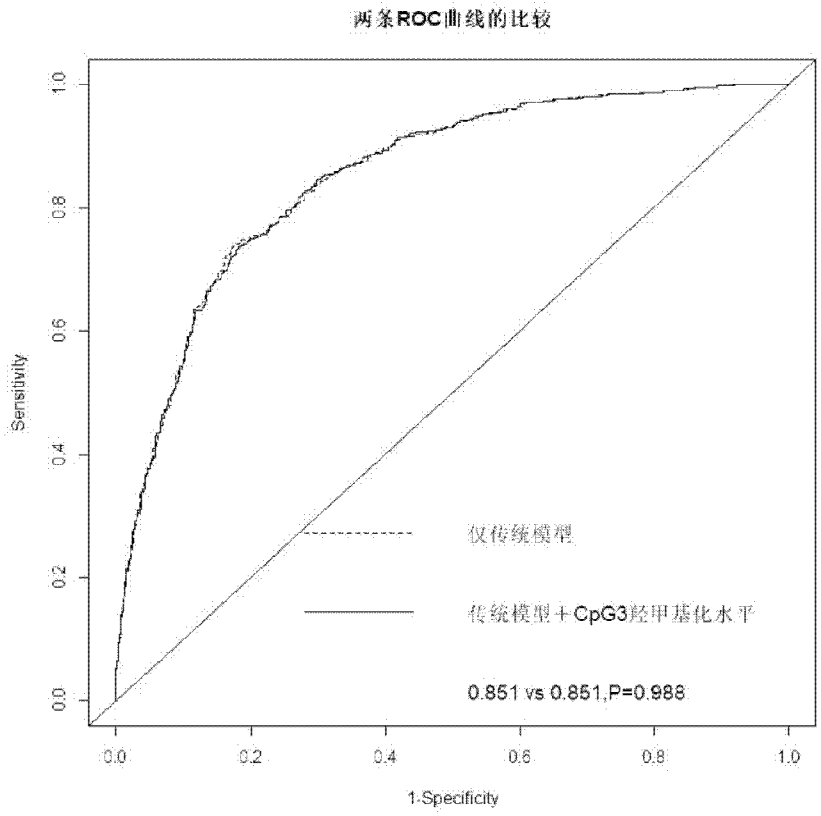

两条ROC曲线的比较
Sensitivity
1-Specificity
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
仅传统模型
传统模型＋CpG3经甲基化水平
0.851 vs 0.851,P=0.988

图 5

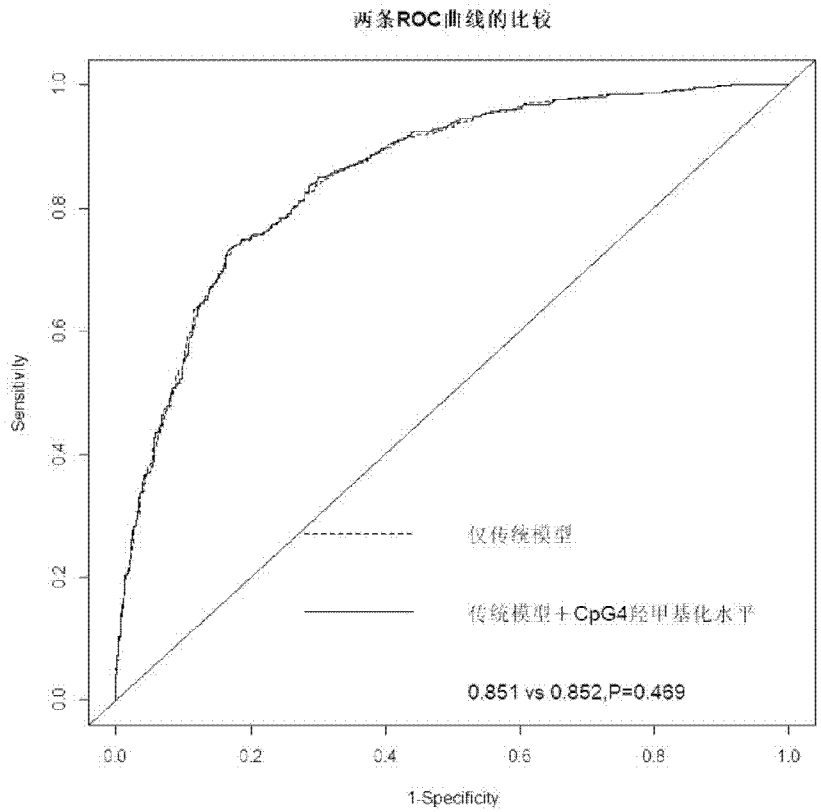

两条ROC曲线的比较
Sensitivity
1-Specificity
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
仅传统模型
传统模型＋CpG4经甲基化水平
0.851 vs 0.852,P=0.469

图 6

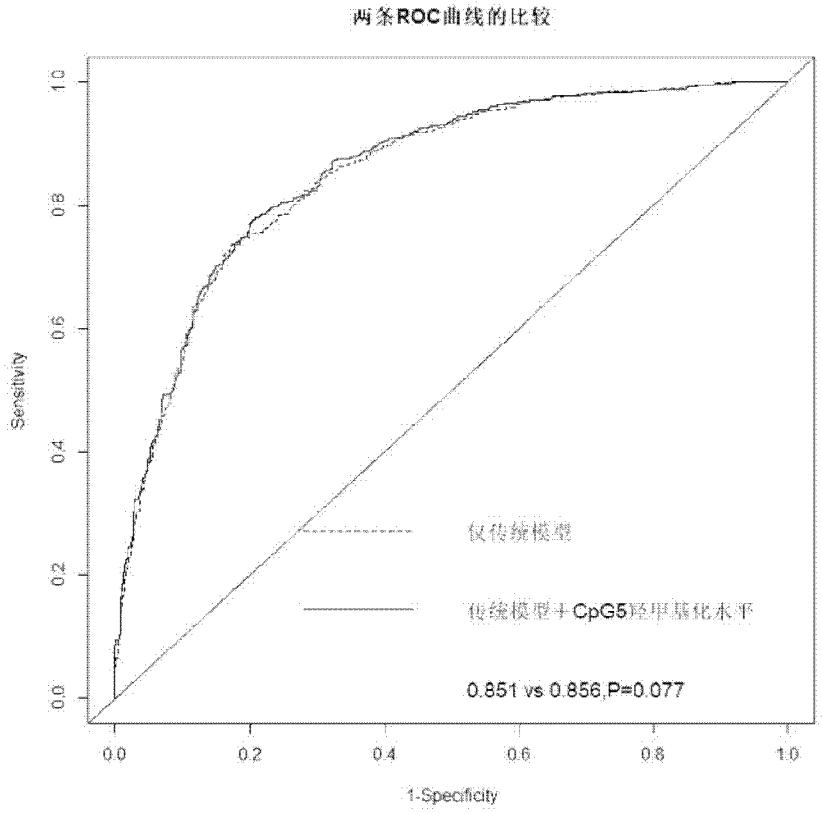

两条ROC曲线的比较
Sensitivity
1-Specificity
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
仅传统模型
传统模型+CpG5经甲基化水平
0.851 vs 0.856,P=0.077

图 7

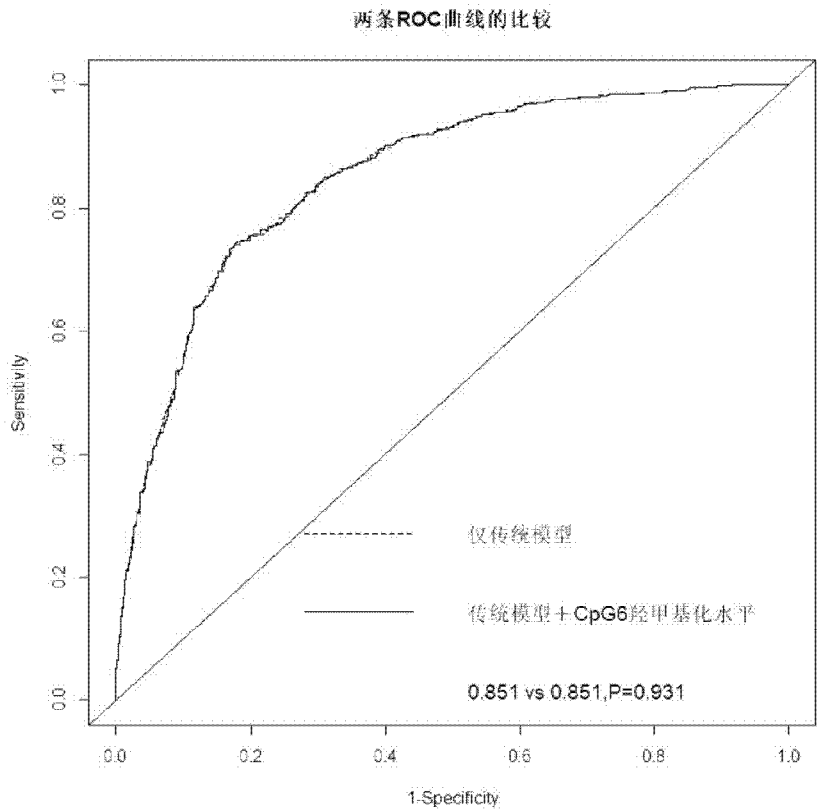

两条ROC曲线的比较
Sensitivity
1-Specificity
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
仅传统模型
传统模型+CpG6经甲基化水平
0.851 vs 0.851,P=0.931

图 8

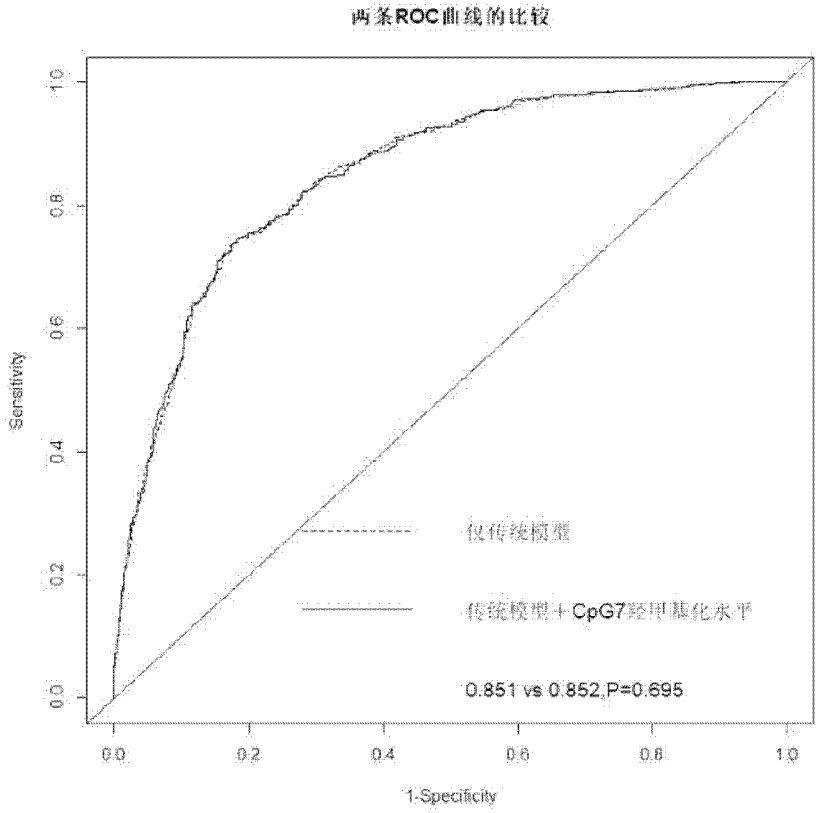

两条ROC曲线的比较
Sensitivity
1-Specificity
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
仅传统模型
传统模型+CpG7经甲基化水平
0.851 vs 0.852,P=0.695

图 9

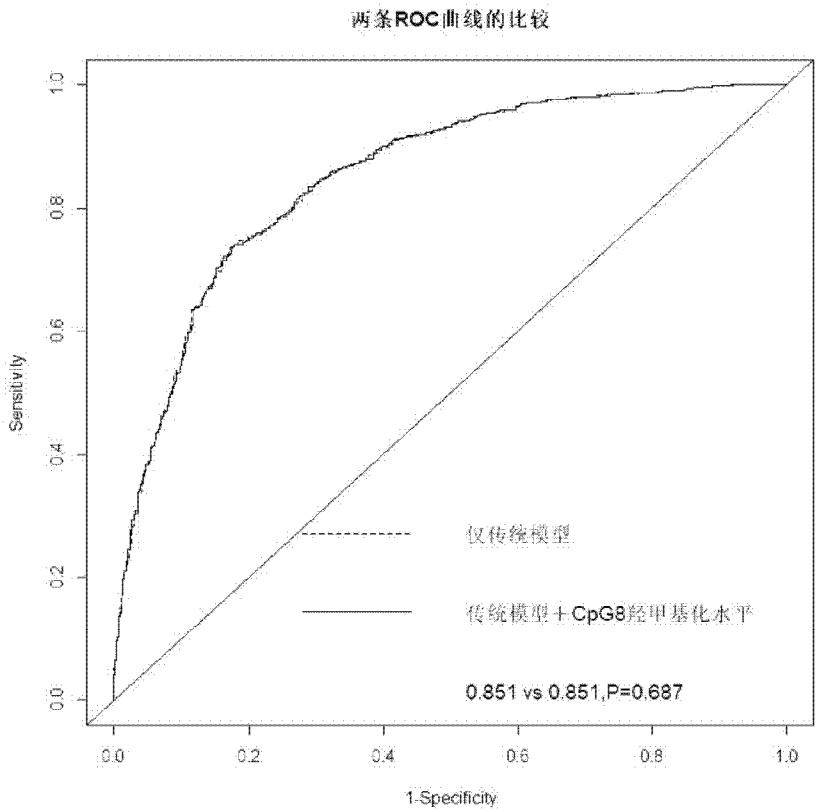

两条ROC曲线的比较
Sensitivity
1-Specificity
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
仅传统模型
传统模型+CpG8经甲基化水平
0.851 vs 0.851,P=0.687

图 10

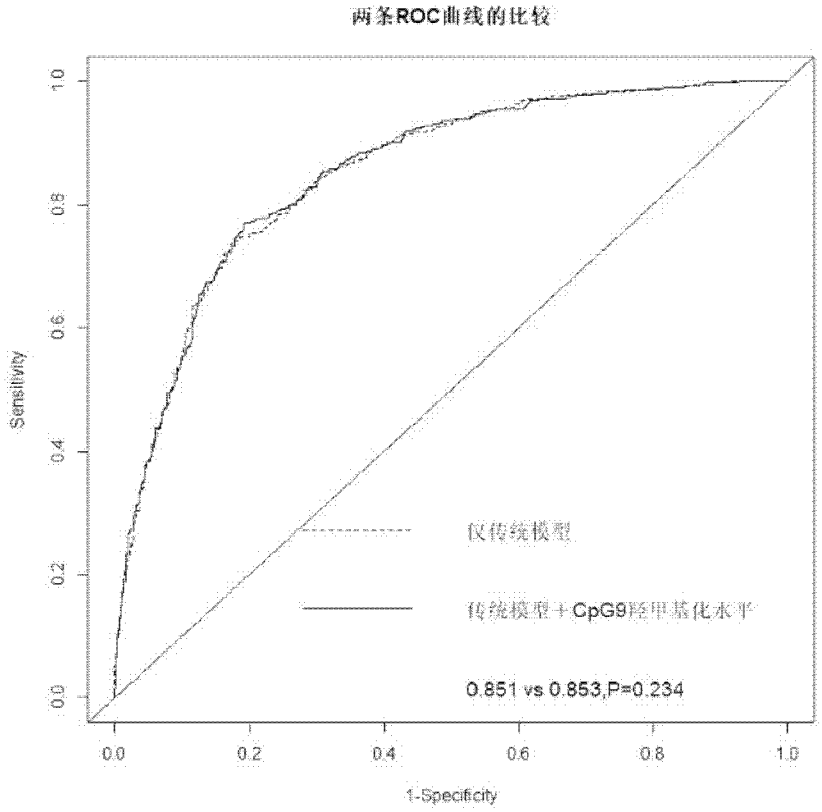

两条ROC曲线的比较
Sensitivity
1-Specificity
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
仅传统模型
传统模型+CpG9羟甲基化水平
0.851 vs 0.853,P=0.234

图 11

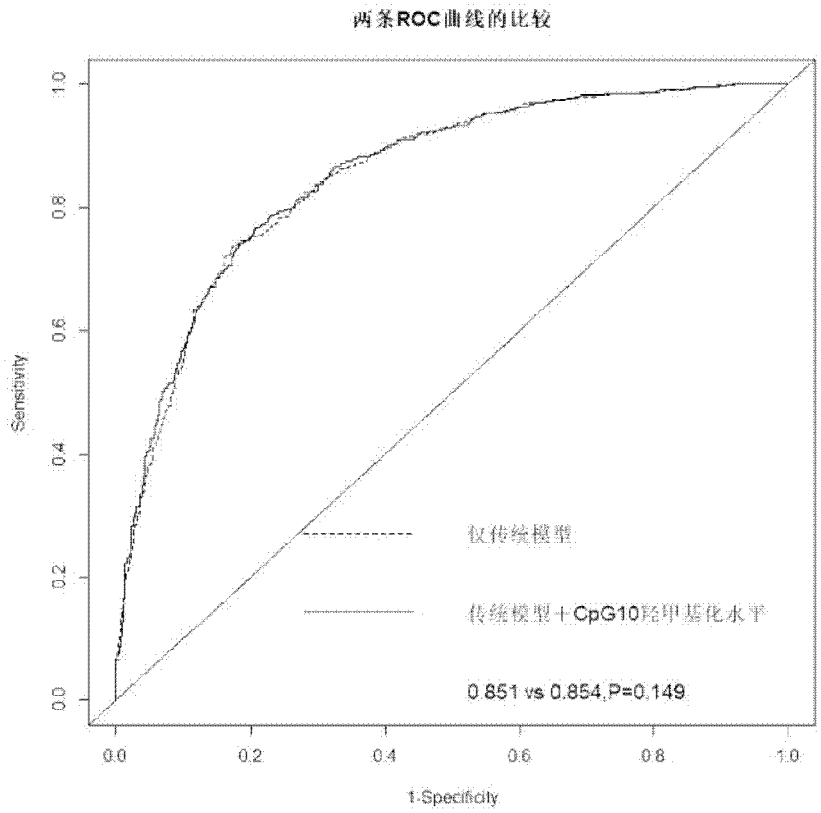

两条ROC曲线的比较
Sensitivity
1-Specificity
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
仅传统模型
传统模型+CpG10羟甲基化水平
0.851 vs 0.854,P=0.149

图 12

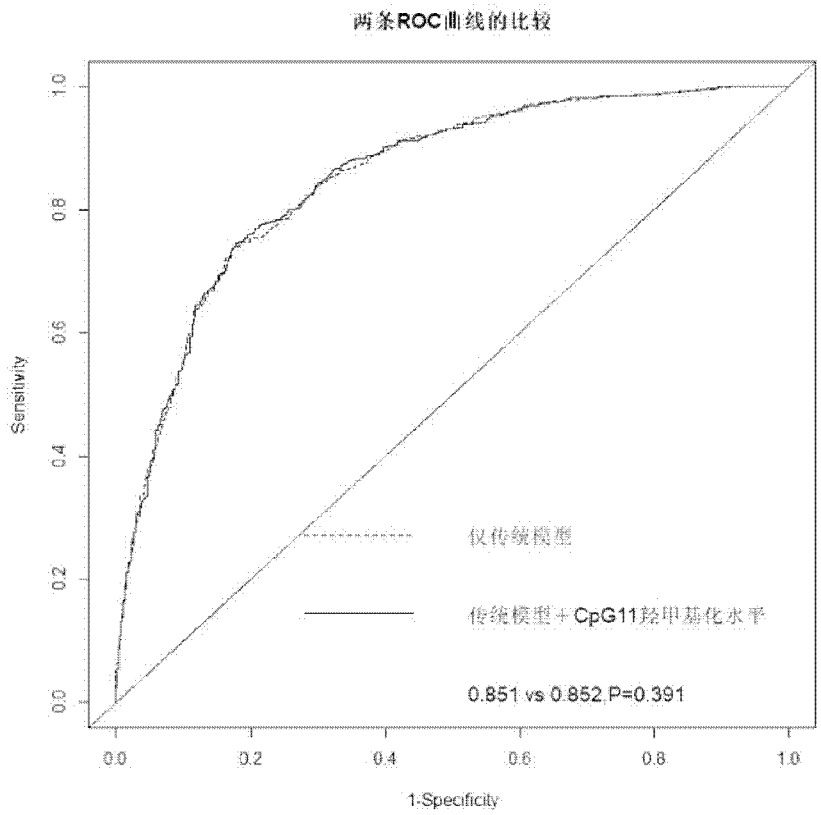

两条ROC曲线的比较
Sensitivity
1-Specificity
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
仅传统模型
传统模型＋CpG11羟甲基化水平
0.851 vs 0.852,P=0.391

图 13

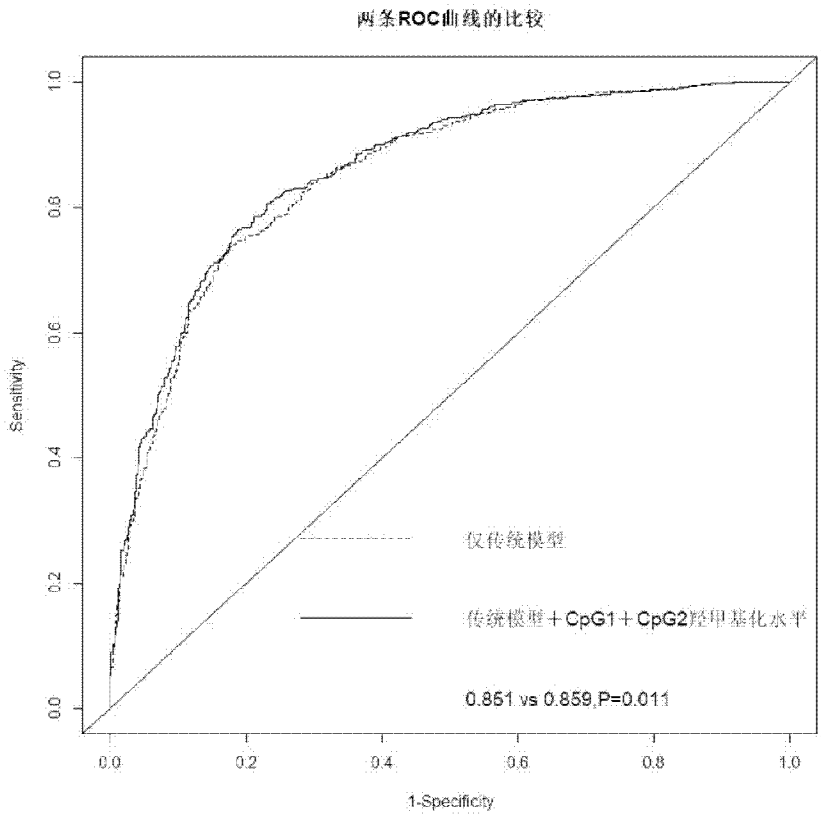

两条ROC曲线的比较
Sensitivity
1-Specificity
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
仅传统模型
传统模型＋CpG1＋CpG2羟甲基化水平
0.851 vs 0.859,P=0.011

图 14

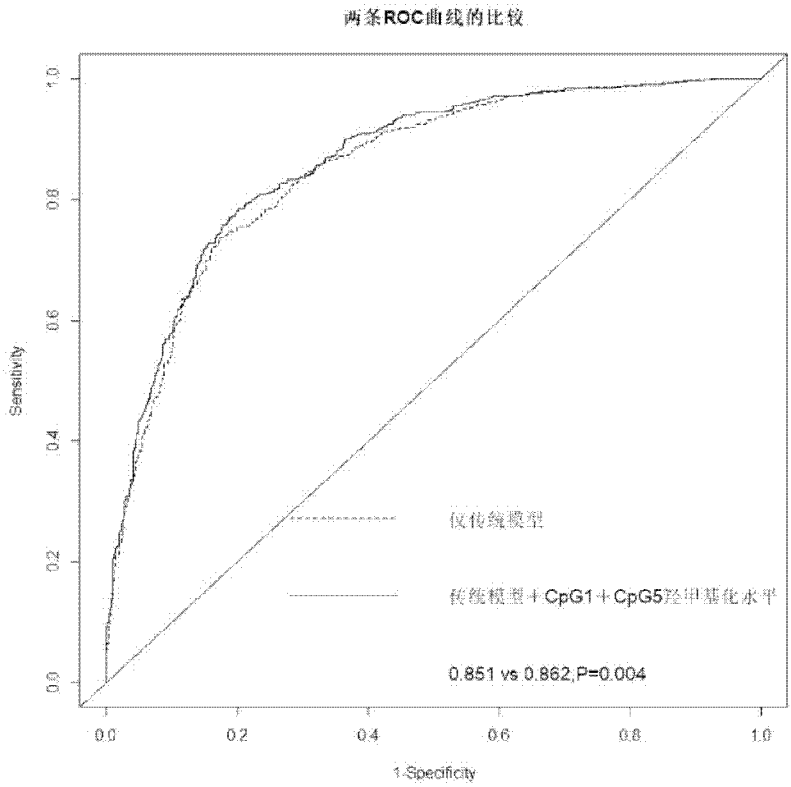

两条ROC曲线的比较
Sensitivity
1-Specificity
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
仅传统模型
传统模型＋CpG1＋CpG5羟甲基化水平
0.851 vs 0.862,P=0.004

图 15

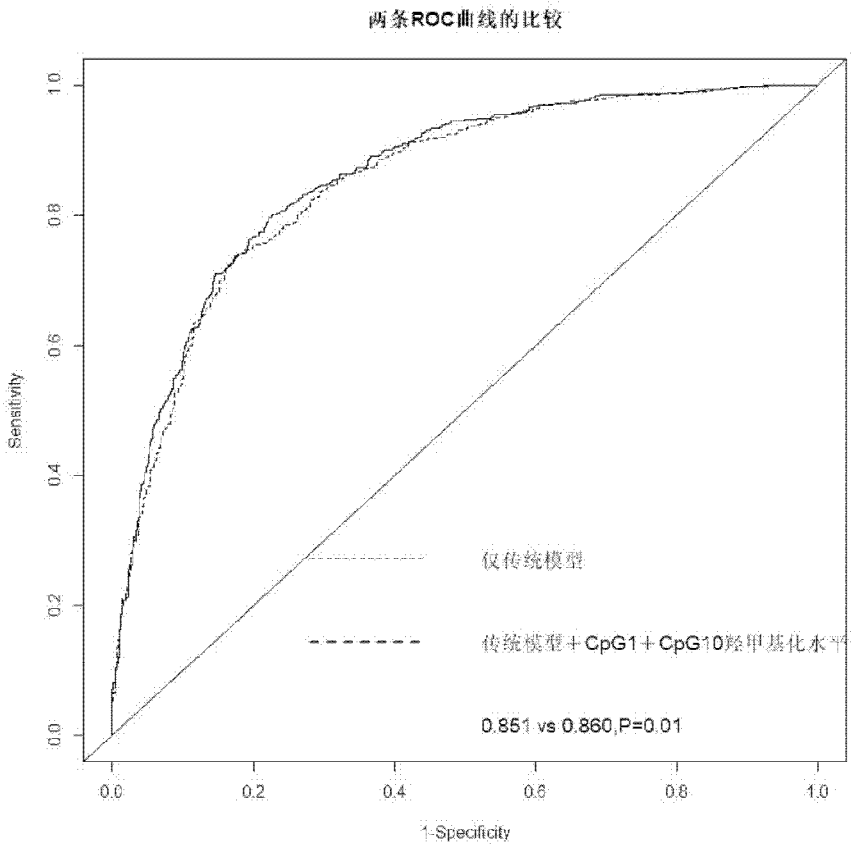

两条ROC曲线的比较
Sensitivity
1-Specificity
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
仅传统模型
传统模型＋CpG1＋CpG10羟甲基化水平
0.851 vs 0.860,P=0.01

图 16

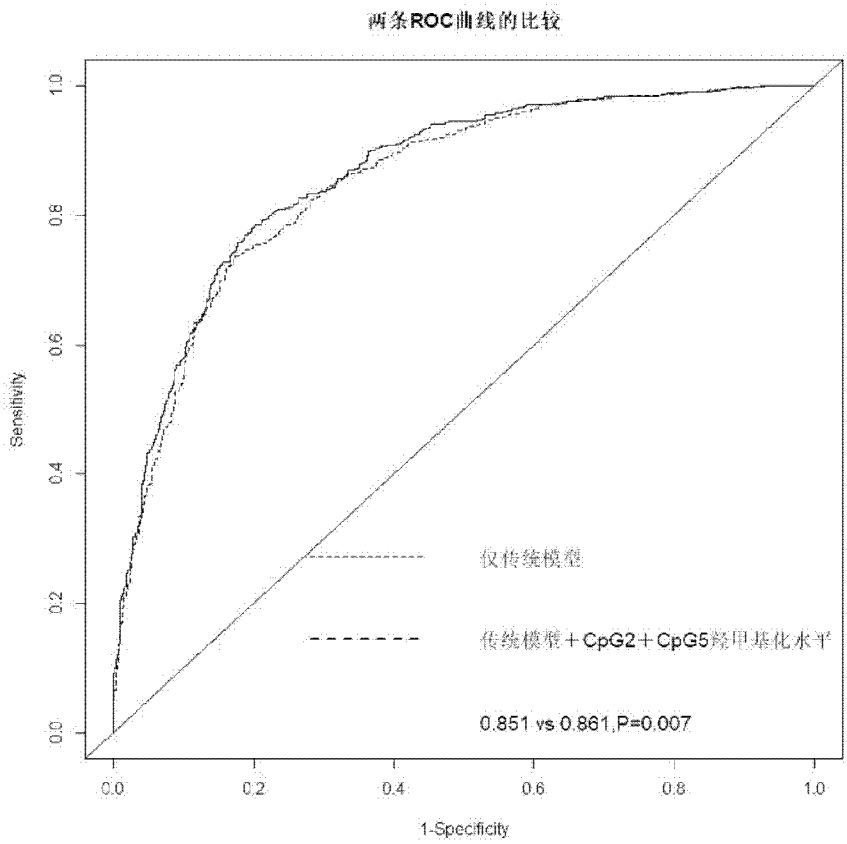

两条ROC曲线的比较
Sensitivity
1-Specificity
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
仅传统模型
传统模型＋CpG2＋CpG5羟甲基化水平
0.851 vs 0.861,P=0.007

图 17

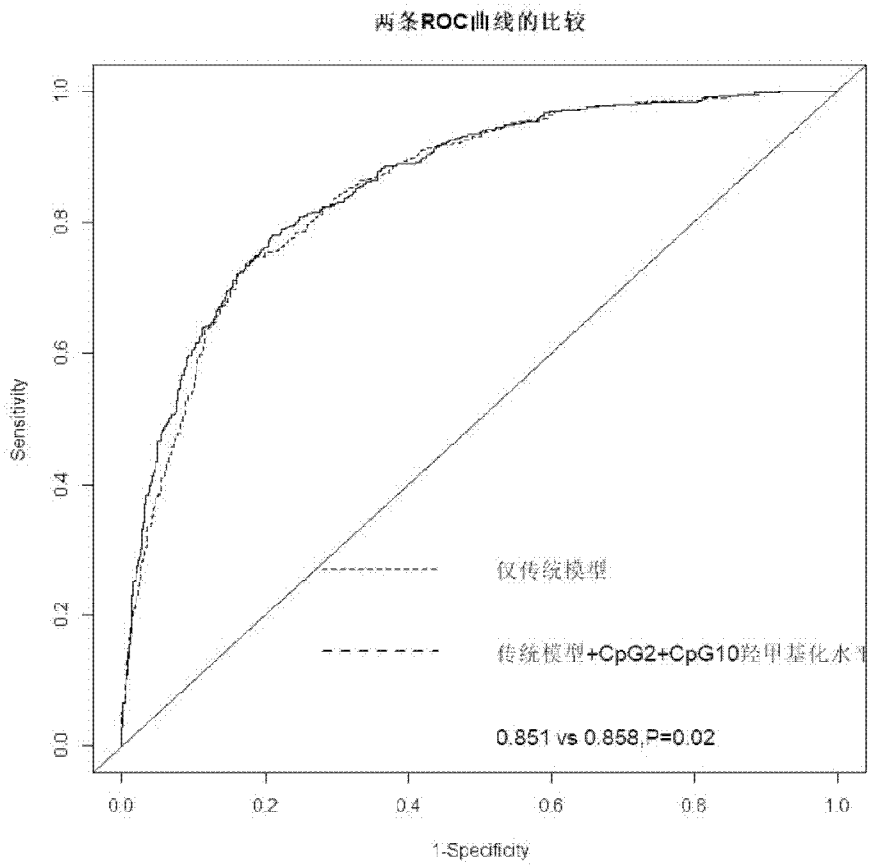

两条ROC曲线的比较
Sensitivity
1-Specificity
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
仅传统模型
传统模型+CpG2+CpG10羟甲基化水
0.851 vs 0.858,P=0.02

图 18

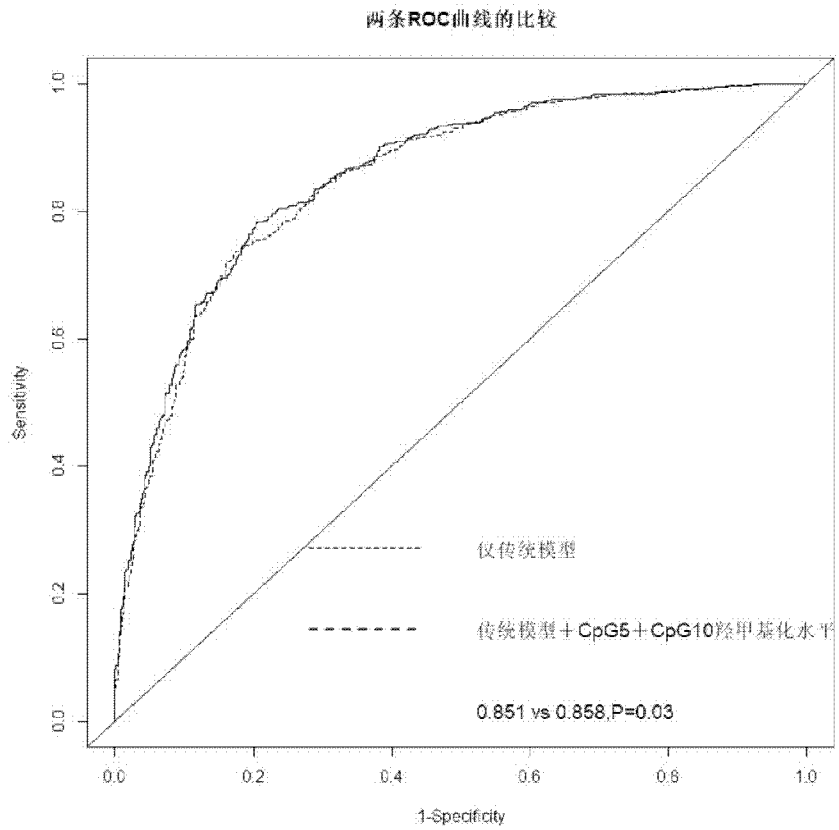

两条ROC曲线的比较
Sensitivity
1-Specificity
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
仅传统模型
传统模型＋CpG5＋CpG10羟甲基化水平
0.851 vs 0.858,P=0.03

图 19

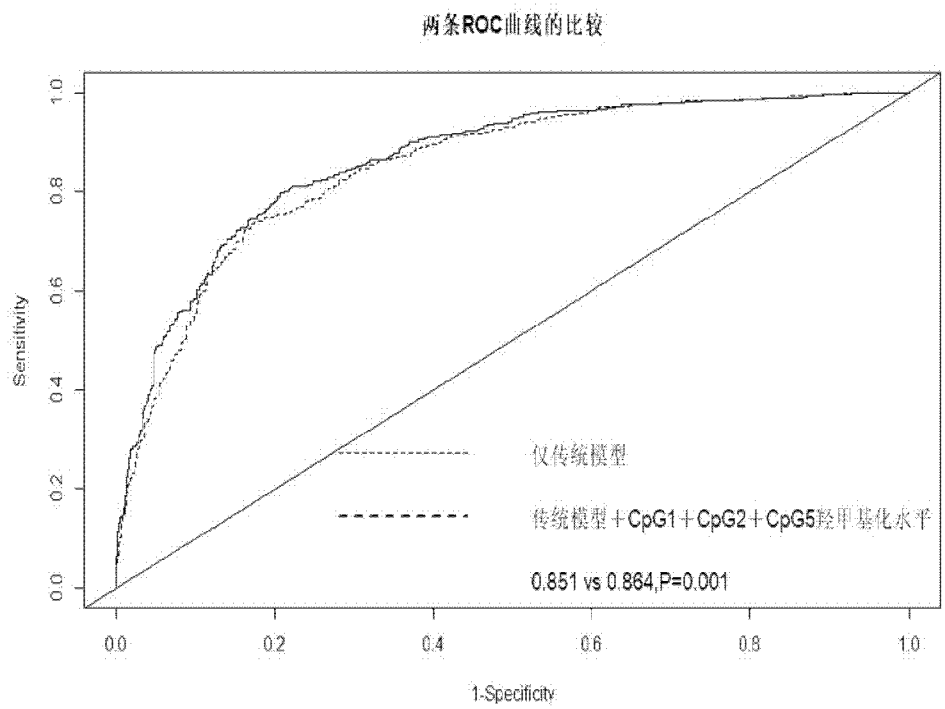

两条ROC曲线的比较
Sensitivity
1-Specificity
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
仅传统模型
传统模型＋CpG1＋CpG2＋CpG5羟甲基化水平
0.851 vs 0.864,P=0.001

图 20

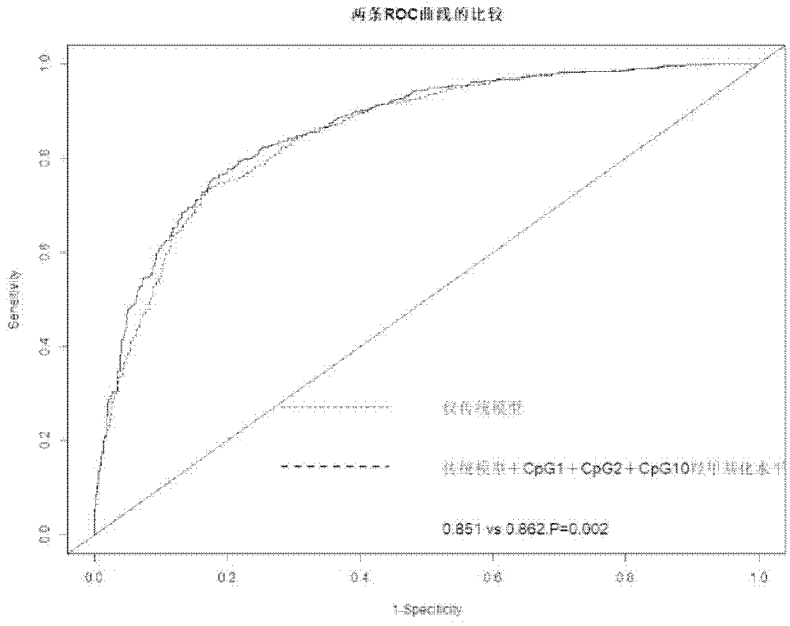

两条ROC曲线的比较
Sensitivity
1-Specificity
仅传统模型
传统模型+CpG1+CpG2+CpG10羟甲基化水平
0.851 vs 0.862,P=0.002

图 21

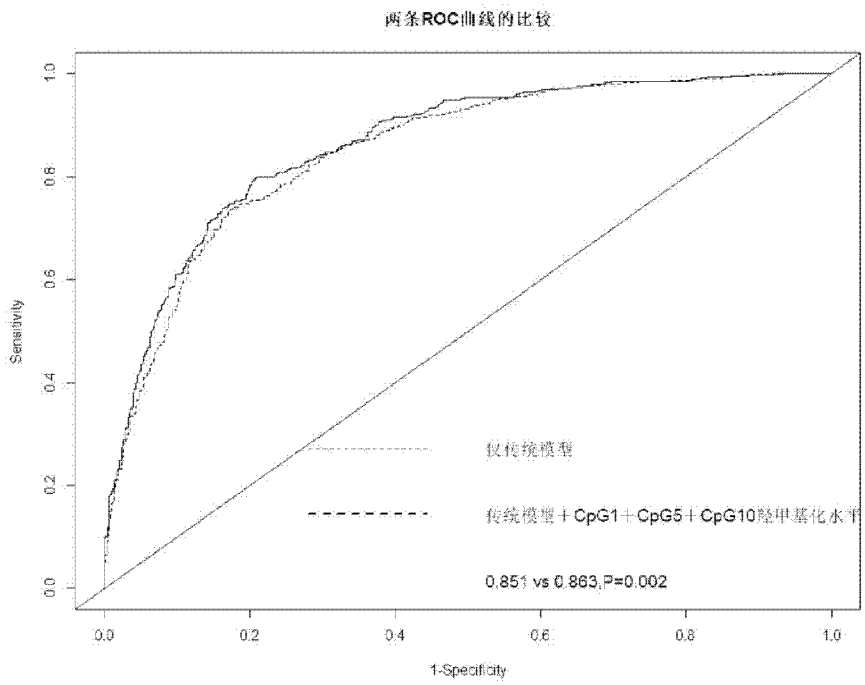

两条ROC曲线的比较
Sensitivity
1-Specificity
仅传统模型
传统模型+CpG1+CpG5+CpG10羟甲基化水平
0.851 vs 0.863,P=0.002

图 22

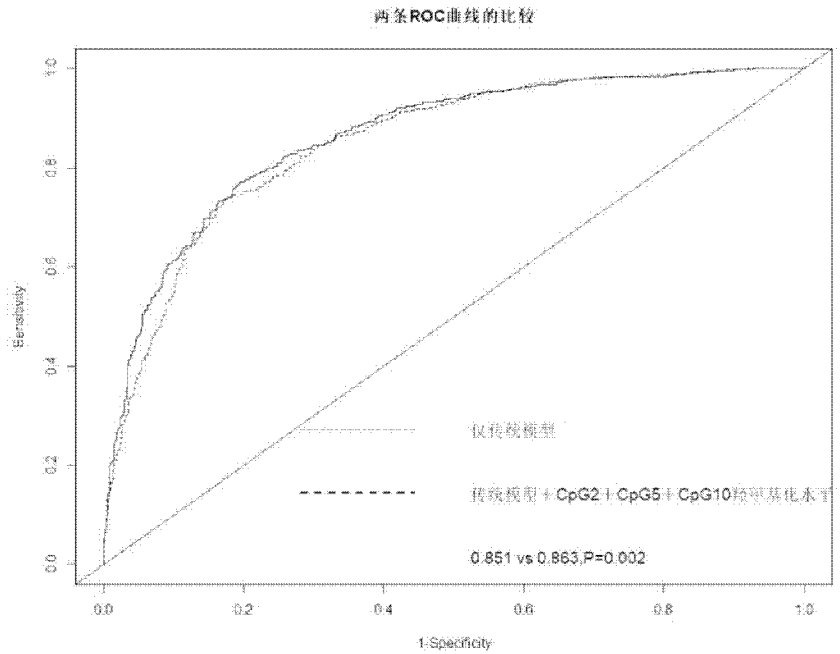

两条ROC曲线的比较
Sensitivity
1-Specificity
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
仅传统模型
传统模型+CpG2+CpG5+CpG10经甲基化水平
0.851 vs 0.863,P=0.002

图 23

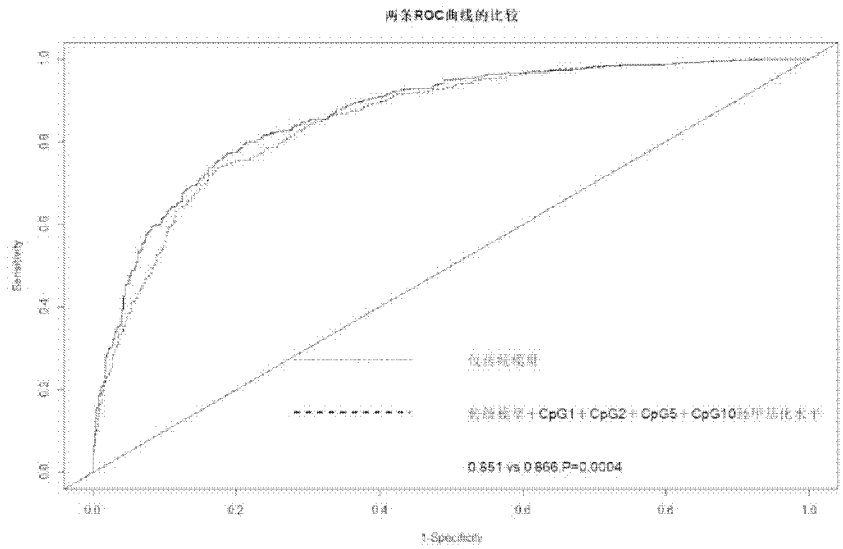

两条ROC曲线的比较
Sensitivity
1-Specificity
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
仅传统模型
传统模型+CpG1+CpG2+CpG5+CpG10经甲基化水平
0.851 vs 0.866,P=0.0004

图 24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2022/110850

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/6883(2018.01)i; C12Q 1/6858(2018.01)i; C12N 15/11(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q; C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, SIPOABS, DWPI, CNTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, JPTXT, KRTXT, CNKI, Web of Science, Elsevier Science, STN, GenBank, EBI, 中国专利生物序列检索系统, Chinese Patent Biological Sequence Retrieval System, 超星读秀, CHAOXING DUXIU: NPPB基因, BNP肽, B型利钠肽, 脑钠尿肽, 脑钠肽, 利尿钠肽, CpG, 甲基化, 脑卒中, 中风, 脑梗死, 脑出血, 急性脑血管病, NPPB gene, BNP peptide, B-type natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, natriuretic peptide, CpG, methylation, stroke, cerebral infarction, cerebral hemorrhage, acute cerebrovascular disease, 对SEQ ID NOs: 1-2进行序列检索, sequence search for SEQ ID NOs: 1-2

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WANG, Aili et al. "Associations of B-Type Natriuretic Peptide and Its Coding Gene Promoter Methylation With Functional Outcome of Acute Ischemic Stroke: A Mediation Analysis." *JOURNAL OF THE AMERICAN HEART ASSOCIATION*, Vol. 9, No. 18, 15 September 2020 (2020-09-15), pages 1-13, and see abstract, figure 2, and table 4	1, 3-10
X	PENG, Hao et al. "DNA Methylation of the Natriuretic Peptide System Genes and Ischemic Stroke: Gene-Based and Gene Set Analyses." *Neurol Genet.*, Vol. 8, No. 3, 11 May 2022 (2022-05-11), pages 1-10, and see abstract, and table 2	8-10,
A	CN 113373213 A (SOOCHOW UNIVERSITY) 10 September 2021 (2021-09-10) see claims 1-10	1-10
A	CN 114041058 A (FUNDACIO HOSPITAL UNIVERSITARI VALL D'HEBRON - INSTITUT DE RECERCA) 11 February 2022 (2022-02-11) see claims 1-4	1-10

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
12 January 2023	**20 January 2023**
Name and mailing address of the ISA/CN **China National Intellectual Property Administration (ISA/CN)** **No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088, China** Facsimile No. **(86-10)62019451**	Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 103998938 A (HOFFMANN LA ROCHE) 20 August 2014 (2014-08-20) see claims 1-5	1-10
A	US 2004209307 A1 (BIOSITE INC.) 21 October 2004 (2004-10-21) see embodiment 10	1-10
PX	CN 114807356 A (SOOCHOW UNIVERSITY) 29 July 2022 (2022-07-29) see claims 1-10	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2022/110850

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

   [1] The actually submitted sequence listing is an XML file in Standard ST.26.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2022/110850

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	113373213	A	10 September 2021	None			
CN	114041058	A	11 February 2022	EP	3969911	A2	23 March 2022
				WO	2020229691	A2	19 November 2020
				US	2022381794	A1	01 December 2022
				JP	2022532171	A	13 July 2022
				CA	3139901	A1	19 November 2020
CN	103998938	A	20 August 2014	US	2014220604	A1	07 August 2014
				KR	20160090913	A	01 August 2016
				EP	3088900	A1	02 November 2016
				HK	1196158	A1	05 December 2014
				ES	2824110	T3	11 May 2021
				AU	2012324967	A1	13 March 2014
				BR	112014007007	A2	11 April 2017
				CN	105785053	A	20 July 2016
				ES	2595028	T3	27 December 2016
				EP	2769227	A1	27 August 2014
				MX	2014003496	A	14 July 2014
				US	2018196066	A1	12 July 2018
				WO	2013057135	A1	25 April 2013
				US	2016011210	A1	14 January 2016
				KR	20140059864	A	16 May 2014
				US	2017023588	A1	26 January 2017
				JP	2014535047	A	25 December 2014
				CA	2846285	A1	25 April 2013
				BR	122021026652	B1	23 August 2022
				SG	2014014559	A	28 August 2014
				JP	2017049267	A	09 March 2017
US	2004209307	A1	21 October 2004	None			
CN	114807356	A	29 July 2022	None			

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2022/110850

A. 主题的分类

C12Q 1/6883(2018.01)i; C12Q 1/6858(2018.01)i; C12N 15/11(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12Q; C12N

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用））

CNABS, SIPOABS, DWPI, CNTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, JPTXT, KRTXT, CNKI, Web of Science, Elsevier Science, STN, GenBank, EBI,中国专利生物序列检索系统, 超星读秀：NPPB基因，BNP肽， B型利钠肽，脑钠尿肽，脑钠肽，利尿钠肽，CpG，甲基化，脑卒中，中风，脑梗死，脑出血，急性脑血管病，NPPB gene, BNP peptide, B-type natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, natriuretic peptide, CpG, methylation, stroke, cerebral infarction, cerebral hemorrhage, acute cerebrovascular disease, 对SEQ ID NOs:1-2进行序列检索

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X	WANG Aili等. "Associations of B-Type Natriuretic Peptide and Its Coding Gene Promoter Methylation With Functional Outcome of Acute Ischemic Stroke: A Mediation Analysis." JOURNAL OF THE AMERICAN HEART ASSOCIATION, 第9卷，第18期，2020年9月15日 (2020-09-15)， 第1-13页， 参见摘要，图2，表4	1，3-10
X	PENG Hao等. "DNA Methylation of the Natriuretic Peptide System Genes and Ischemic Stroke: Gene-Based and Gene Set Analyses." Neurol Genet., 第8卷，第3期，2022年5月11日 (2022-05-11)， 第1-10页， 参见摘要，表2	8-10
A	CN 113373213 A (苏州大学) 2021年9月10日 (2021-09-10) 参见权利要求1-10	1-10
A	CN 114041058 A (瓦尔德西布伦大学医院基金会研究所) 2022年2月11日 (2022-02-11) 参见权利要求1-4	1-10

☑ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

"X" 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

"Y" 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2023年1月12日	2023年1月20日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	受权官员 周洋 电话号码 01062089439

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2022/110850

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 103998938 A (霍夫曼-拉罗奇有限公司) 2014年8月20日 (2014 - 08 - 20) 参见权利要求1-5	1-10
A	US 2004209307 A1 (BIOSITE INC) 2004年10月21日 (2004 - 10 - 21) 参见实施例10	1-10
PX	CN 114807356 A (苏州大学) 2022年7月29日 (2022 - 07 - 29) 参见权利要求1-10	1-10

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2022/110850

第I栏　核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列表进行的：

a. ☑ 作为国际申请的一部分提交的：
   - ☑ 附件C/ST.25文本文件形式
   - ☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三.1(a)仅为国际检索目的以附件C/ST.25文本文件形式与国际申请同时提交的：

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的：
   - ☐ 附件C/ST.25文本文件形式（细则13之三.1(a)）
   - ☐ 纸件或图形文件形式（细则13之三.1(b)和行政规程第713段）

2. ☐ 另外，在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下，提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围（如适用）的所需声明。

3. 补充意见：

[1] 实际提交的序列表是ST.26标准的XML文件。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2022/110850

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	113373213	A	2021年9月10日	无			
CN	114041058	A	2022年2月11日	EP	3969911	A2	2022年3月23日
				WO	2020229691	A2	2020年11月19日
				US	2022381794	A1	2022年12月1日
				JP	2022532171	A	2022年7月13日
				CA	3139901	A1	2020年11月19日
CN	103998938	A	2014年8月20日	US	2014220604	A1	2014年8月7日
				KR	20160090913	A	2016年8月1日
				EP	3088900	A1	2016年11月2日
				HK	1196158	A1	2014年12月5日
				ES	2824110	T3	2021年5月11日
				AU	2012324967	A1	2014年3月13日
				BR	112014007007	A2	2017年4月11日
				CN	105785053	A	2016年7月20日
				ES	2595028	T3	2016年12月27日
				EP	2769227	A1	2014年8月27日
				MX	2014003496	A	2014年7月14日
				US	2018196066	A1	2018年7月12日
				WO	2013057135	A1	2013年4月25日
				US	2016011210	A1	2016年1月14日
				KR	20140059864	A	2014年5月16日
				US	2017023588	A1	2017年1月26日
				JP	2014535047	A	2014年12月25日
				CA	2846285	A1	2013年4月25日
				BR	122021026652	B1	2022年8月23日
				SG	2014014559	A	2014年8月28日
				JP	2017049267	A	2017年3月9日
US	2004209307	A1	2004年10月21日	无			
CN	114807356	A	2022年7月29日	无			