



(21) 申请号 202311005202.0

(22) 申请日 2023.08.10

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 117106910 A

(43) 申请公布日 2023.11.24

(73) 专利权人 杭州师范大学

地址 311121 浙江省杭州市余杭区余杭塘路2318号

(72) 发明人 陈健翔 董衡 乔逸婷 张政果

倪梦洁 骆毅峰

(74) 专利代理机构 杭州君度专利代理事务所

(特殊普通合伙) 33240

专利代理师 朱亚冠

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6886 (2018.01)

(56) 对比文件

CN 113906149 A, 2022.01.07

US 2010131432 A1, 2010.05.27

注意:

申请人在申请日后补交了实验数据, 但该数据并未包含在本授权公告文档中。

审查员 王瑶

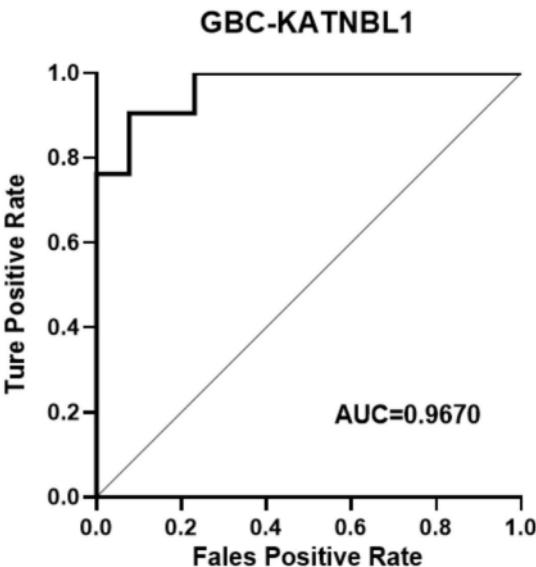
权利要求书1页 说明书4页 附图4页

(54) 发明名称

外周血白细胞RNA联合标志物在制备检测或诊断早期原发性胆囊癌试剂盒中的应用

(57) 摘要

本发明公开外周血白细胞RNA联合标志物在制备检测或诊断早期原发性胆囊癌试剂盒中的应用。本发明基于外周血白细胞RNA标志物进行检测, 所述标志物是一种液体活检生物标志物, 更为灵敏、稳定、无创, 且需要的样本量较少, 患者更容易接受, 其成功开发有助于胆囊癌的诊断。原发性胆囊癌的发病因素复杂, 本发明相较于单一的分子标志物, 本发明从异常高表达和低表达两个维度来评估受试样本的准确度, 可一定程度上减少因单一指标个体表达差异导致的误差, 使结果更加准确。



1. 外周血白细胞RNA组合物在制备诊断或检测早期原发性胆囊癌试剂盒中的应用,其特征在于,所述外周血白细胞RNA组合物由KATNBL1、PTTG2、ATP6V1B2、RESF1和CSRNP1组成。
2. 一种检测或诊断早期原发性胆囊癌的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括特异性检测人外周血白细胞RNA组合物的检测试剂;所述外周血白细胞RNA组合物由KATNBL1、PTTG2、ATP6V1B2、RESF1和CSRNP1组成。
3. 根据权利要求2所述的试剂盒,其特征在于,所述检测试剂包括特异性检测外周血白细胞RNA组合物的探针或引物。

外周血白细胞RNA联合标志物在制备检测或诊断早期原发性 胆囊癌试剂盒中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于分子生物学和医学诊断领域,具体涉及外周血白细胞RNA联合标志物在制备检测或诊断早期原发性胆囊癌试剂盒中的应用。

背景技术

[0002] 原发性胆囊癌(Gallbladder cancer,GBC)是一类起源于胆囊,具有高度异质性、侵袭性的恶性肿瘤,同时GBC也是常见的胆道系统恶性肿瘤,发病率居消化道恶性肿瘤第6位,其恶性程度高、预后差,5年生存率不足5%。因为胆囊解剖位置的特殊性和胆囊癌症状的模糊性及非特异性,GBC患者在首次诊断时通常已处于晚期,错过了最佳的治疗时机;而在早期便进行手术干预的GBC患者,患者5年内生存率高达90%;因此针对GBC的早期检测十分必要。目前GBC的检测主要还是依赖于影像学、血清CEA、CA19-9等,灵敏性、特异性有限。因此,临床上亟需开发一类新型、快捷的生物标志物用于早期胆囊癌检测。

[0003] 外周血白细胞(White blood cell,WBC)是一类无色的球形血细胞,参与机体免疫,通过吞噬和产生抗体等方式来消灭内源突变细胞以及外源病原微生物等。肿瘤的发生发展与体内免疫系统的改变有关,肿瘤细胞诱导免疫系统产生免疫耐受,从而打破肿瘤与免疫的平衡,使得肿瘤细胞摆脱了免疫控制,这也改变了肿瘤患者体内免疫细胞基因表达变化和功能。因此,基于检测外周血白细胞RNA水平变化来构建的早筛模型能够在肿瘤形成的初期便可以进行特异性的检测。

[0004] 本发明基于检测外周血白细胞联合标志物用于原发性胆囊癌早期筛查诊断试剂盒,具有特异性好、灵敏度高、成本低的显著优势。

发明内容

[0005] 本发明的第一个目的是针对现有技术的不足,提供外周血白细胞RNA组合物在作为原发性胆囊癌标志物上的应用,所述外周血白细胞RNA组合物包括KATNBL1、PTTG2、ATP6V1B2、RESF1和CSRNP1。

[0006] 作为优选,KATNBL1、PTTG2、ATP6V1B2和RESF1在原发性胆囊癌中高表达;

[0007] 作为优选,CSRNP1在原发性胆囊癌中低表达。

[0008] 本发明的第二个目的是提供外周血白细胞RNA联合标志物在制备早期原发性胆囊癌检测试剂盒中的应用,所述外周血白细胞RNA组合物包括KATNBL1、PTTG2、ATP6V1B2、RESF1和CSRNP1。

[0009] 本发明的第三个目的是提供检测或诊断原发性胆囊癌患者的GBC检测试剂盒,所述试剂盒包括特异性检测人外周血白细胞RNA组合物的检测试剂;所述外周血白细胞RNA组合物包括KATNBL1、PTTG2、ATP6V1B2、RESF1和CSRNP1。

[0010] 作为优选,所述检测试剂为特异性检测所述外周血白细胞RNA组合物的探针或引物。

[0011] 本发明的第四个目的是提供一种原发性胆囊癌诊断制剂,包括外周血白细胞联合标志物KATNBL1、PTTG2、ATP6V1B2、RESF1和CSRNP1。

[0012] 本发明的有益效果如下:

[0013] 1.本发明采用液体活检技术,提出特定外周血白细胞RNA组合物作为标记物对早期原发性胆囊癌进行检测或诊断,方法较为灵敏、稳定、无创,且需要的样本量较少,患者更容易接受,其成功开发有助于胆囊癌的诊断。

[0014] 2.本发明基于检测多个外周血白细胞联合标志物,相较于单一的分子标志物,从异常高表达和低表达两个维度来评估受试样本的准确度,可一定程度上减少因单一指标个体表达差异导致的误差,使结果更加准确,克服了因原发性胆囊癌发病因素复杂导致的难以检测或诊断的问题。

附图说明

[0015] 图1为ROC曲线分析采用外周血白细胞标志物KATNBL1鉴定原发性胆囊癌患者的检测结果。

[0016] 图2为ROC曲线分析采用外周血白细胞标志物PTTG2鉴定原发性胆囊癌患者的检测结果。

[0017] 图3为ROC曲线分析采用外周血白细胞标志物ATP6V1B2鉴定原发性胆囊癌患者的检测结果。

[0018] 图4为ROC曲线分析采用外周血白细胞标志物RESF1鉴定原发性胆囊癌患者的检测结果。

[0019] 图5为ROC曲线分析采用外周血白细胞标志物CSRNP1鉴定原发性胆囊癌患者的检测结果。

[0020] 图6为ROC曲线分析采用外周血白细胞联合标志物鉴定原发性胆囊癌患者的检测结果。

[0021] 图7为ROC曲线分析采用传统胆囊癌血清标志物糖类抗原19-9(CA19-9)鉴定原发性胆囊癌患者的检测结果。

具体实施方式

[0022] 下面结合具体实施例对本发明做进一步的分析。

[0023] 本发明实施例中采用的试剂盒型号如下:

[0024] 人外周血白细胞分离试剂盒:PGB2001,Beyotime,China;

[0025] 人外周血白细胞RNA提取试剂盒:PGB2002,Beyotime,China;

[0026] RNA反转录试剂盒:4368813,ABI,United States;

[0027] Q-PCR试剂盒:11202ES08,Yeasen,China。

[0028] 本发明实施例中检测人外周血白细胞联合标志物的仪器为Q-PCR仪。

[0029] 本发明KATNBL1、PTTG2、ATP6V1B2、RESF1、CSRNP1基因序列可通过<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>网站获知。

[0030] 本发明采用的用于检测外周血白细胞RNA联合标志物KATNBL1、PTTG2、ATP6V1B2、RESF1、CSRNP1分子检测引物以及内参引物,序列如下所示:

[0031] KATNBL1 F:5' -GATATTTCCACACTGGTTTCCC-3'

[0032] KATNBL1 R:5' -ACTCTTCCATGTATCATCCC-3'

[0033] PTTG2 F:5' -CCCTCTGCAAGTTTCAGG-3'

[0034] PTTG2 R:5' -TGTAGCATCTCAAATCCATCTG-3'

[0035] ATP6V1B2 F:5' -ACTTCGTAAAGTGATCTATCGCAG-3'

[0036] ATP6V1B2 R:5' -TCATGGTCCTGAGAAACCTC-3'

[0037] RESF1 F:5' -CGTTGCTGTGATTCTGTTGG-3'

[0038] RESF1 R:5' -GTAGGGAAGGAAACAAACAAGG-3'

[0039] CSRN1P1 F:5' -GAAAGACGAGGAGTACGAGC-3'

[0040] CSRN1P1 R:5' -CAAGTGGAGTGGAGTCTGC-3'

[0041] 内参引物序列:

[0042] HPRT1 F:5' -GCCATCACATTGTAGCCCTC-3'

[0043] HPRT1 R:5' -CGTCATTACAATAGCTCTTCAGTC-3'

[0044] 实施例1受试者及血液样本提取

[0045] 样本由杭州师范大学附属医院提供(伦理审批号:2022(E2)-KS-068)。其中原发性胆囊癌患者38例,健康对照13例。用一次性针筒采集受试者外周血5ml,迅速转入EDTA抗凝管,混匀。

[0046] 实施例2外周血白细胞的分离

[0047] 按照人外周血白细胞分离试剂盒(PGB2001,Beyotime,China)操作说明分离白细胞,具体步骤为:1)向15mL离心管中加入10mL试剂A备用,用1mL带滤芯的枪头吸取1mL抗凝血,沿着管壁缓缓注入15mL离心管中;2)盖好管盖,上下颠倒5次,静置5分钟,然后再上下颠倒5次,静置5分钟,室温,500g离心5分钟;3)去废液,加入10mL试剂B重悬,室温,500g离心5分钟;4)去废液,向离心管底部白色细胞沉淀中加入700μL试剂C,反复吹打10次至沉淀全部溶解;5)-80℃保存。

[0048] 实施例3外周血白细胞RNA的提取

[0049] 按照人外周血白细胞RNA提取试剂盒(PGB2002,Beyotime,China)的操作说明书提取人外周血RNA。具体步骤为:1)将实施例2中的白细胞样本从-80℃冰箱取出,于室温完全解冻;2)加入280μLDEPC水,漩涡混匀15秒,室温静置10分钟,12000g离心15分钟;3)离心后,吸取850μL上清液至新1.5mL离心管中,加入5μL的4-溴苯甲醚,漩涡混匀15秒,室温静置5分钟,12000g离心10分钟;4)离心后,转移700μL上清液至新1.5mL低吸附离心管,加入等体积的异丙醇并颠倒混匀20次,-80℃冰箱静置30分钟;5)取出待完全解冻后12000g离心30分钟;6)去除上清,加入1mL75%酒精洗涤1次,12000g离心4分钟;7)弃上清,通风橱晾干1分钟,加入20μLDEPC水吹打10-20次溶解RNA,立即置于冰上。提取的RNA经NanoDrop 2000Spectrophotometer(Thermo Fisher Scientific,Wilmington,DE)检测浓度。

[0050] 实施例4外周血白细胞联合标志物对于原发性胆囊癌的早筛预测

[0051] 提取的RNA采用RNA反转录试剂盒(4368813,ABI,United States)进行反转录。采用Q-PCR试剂盒(11202ES08,Yeasen,China)和特异引物,在38例胆囊癌样本和13例健康样本中对KATNBL1、PTTG2、ATP6V1B2、RESF1、CSRN1P1及内参基因HPRT1进行基因表达水平检测,并绘制ROC曲线。ROC曲线分析单独采用外周血白细胞标志物KATNBL1、PTTG2、ATP6V1B2、

RESF1和CSRNP1鉴定原发性胆囊癌患者的检测结果分别如图1-5所示;ROC曲线分析采用外周血白细胞联合标志物以及传统胆囊癌血清标志物糖类抗原19-9(CA19-9)鉴定原发性胆囊癌患者的检测结果分别如图6和图7所示。

[0052] 分析显示,以外周血白细胞中KATNBL1、PTTG2、ATP6V1B2、RESF1、CSRNP1作为检测联合标志物,在区分GBC组和健康对照组时,其AUC值为1.00(图6)。而以血清学标志物糖类抗原19-9(CA19-9)作为指标的区分GBC组和非GBC患者的AUC仅为0.77(图7)。

[0053] 上述实施例并非对于本发明的限制,本发明并非仅限于上述实施例,只要符合本发明要求,均属于本发明的保护范围。

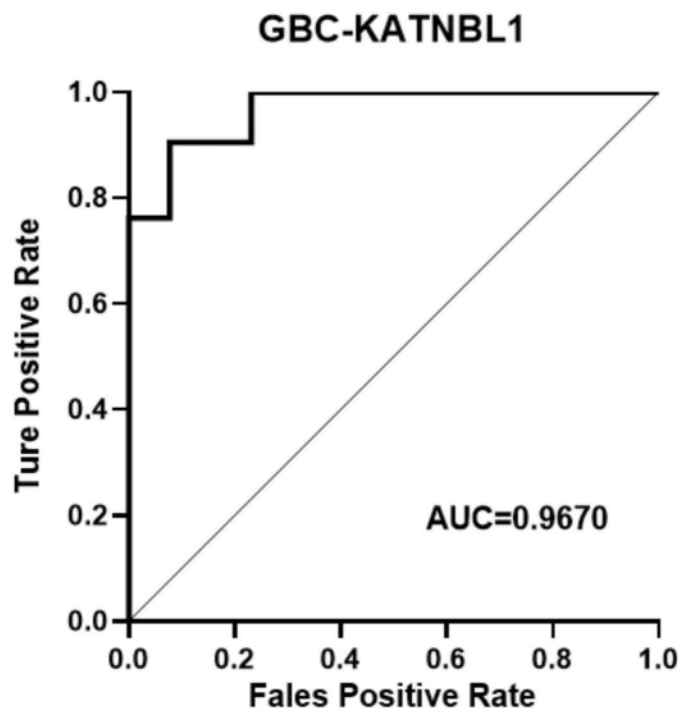


图1

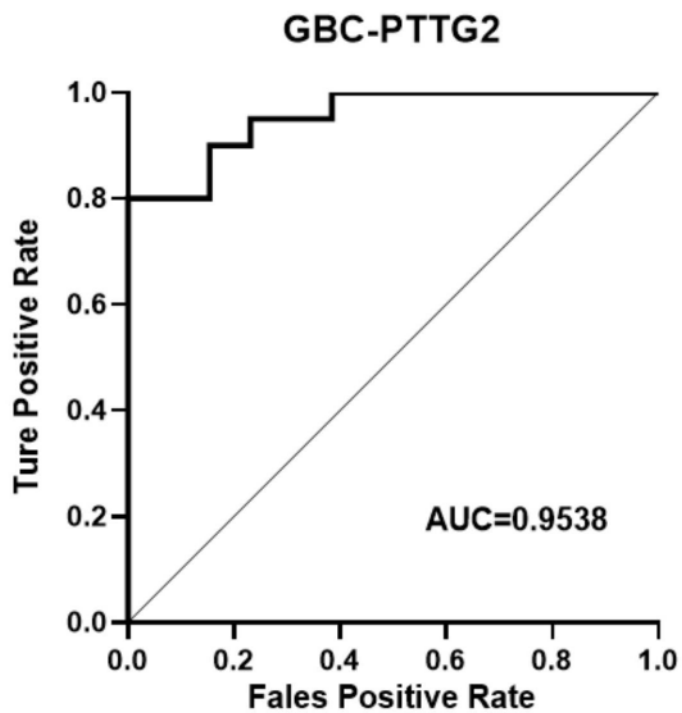


图2

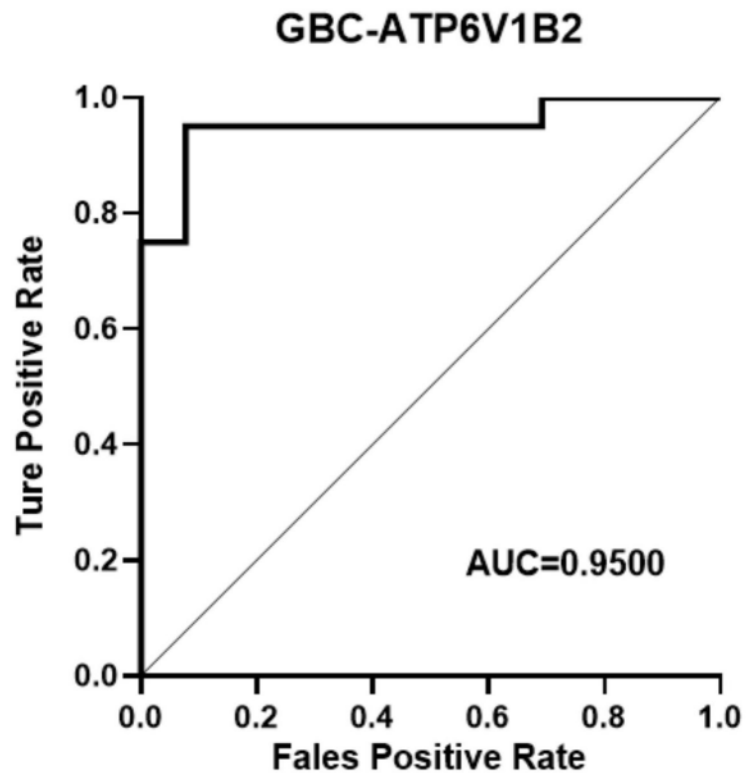


图3

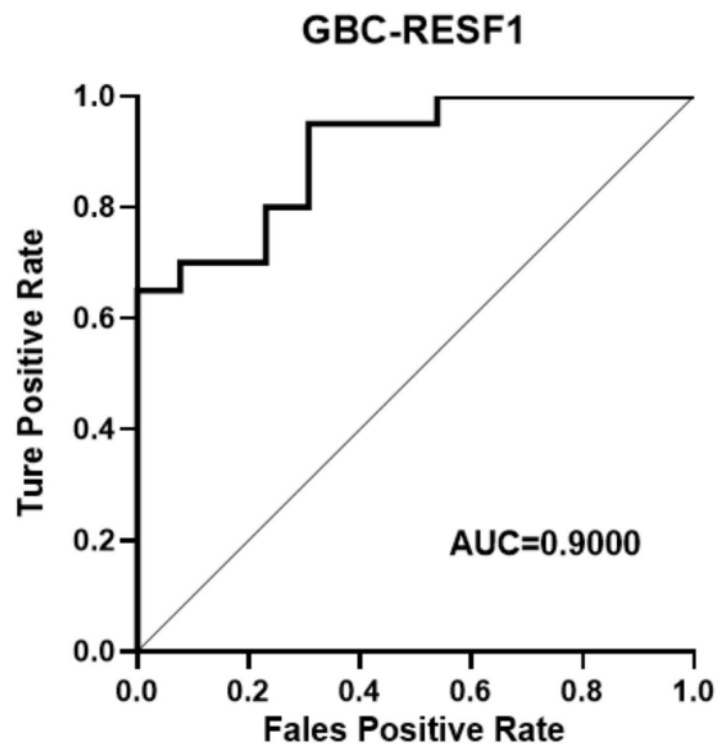


图4

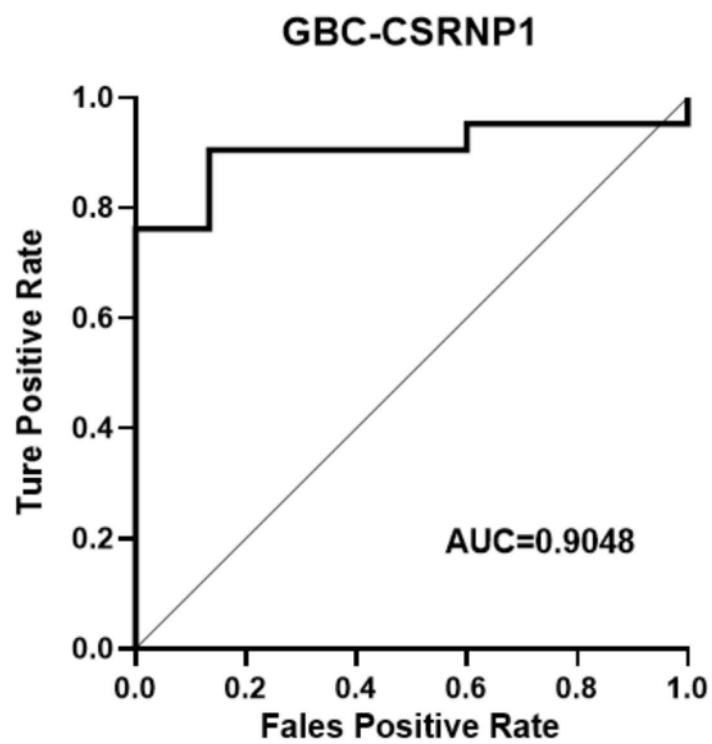


图5

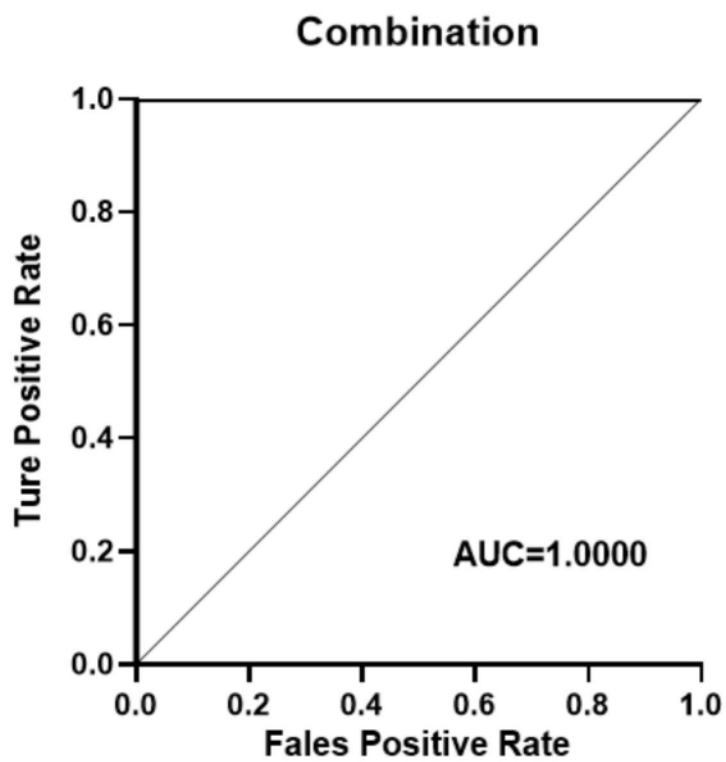


图6

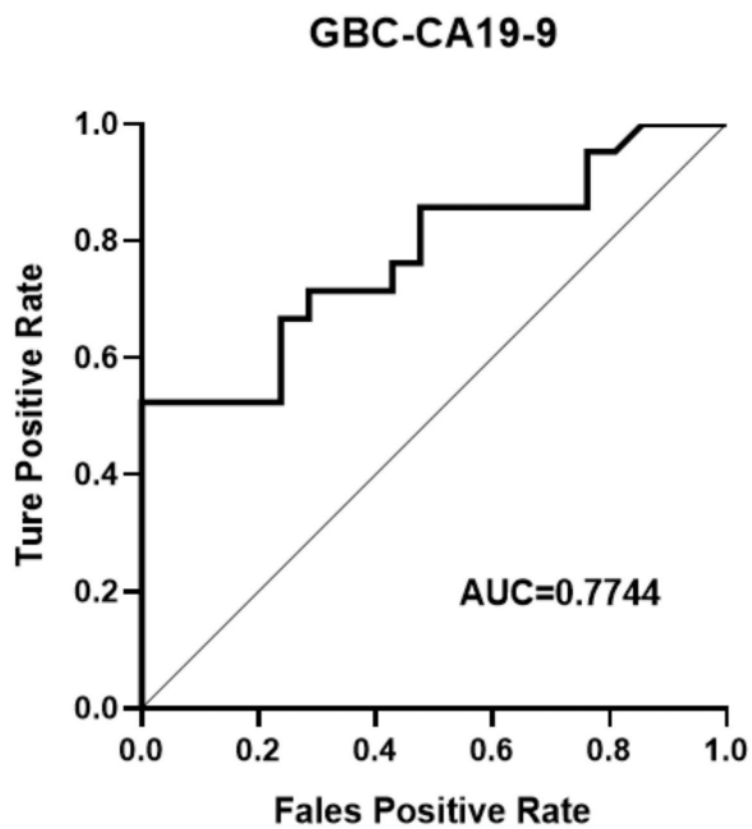


图7