

# (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  
2020年1月9日 (09.01.2020)



(10) 国际公布号  
**WO 2020/007230 A1**

- (51) 国际专利分类号:  
*C12Q 1/68* (2018.01) **OTOLARYNGOLOGY** [CN/CN]; 中国北京市东城区后沟胡同17号, Beijing 100005 (CN)。
- (21) 国际申请号: PCT/CN2019/093299 (72) 发明人: 张罗 (ZHANG, Luo); 中国北京市东城区东交民巷1号, Beijing 100730 (CN)。王成硕 (WANG, Chengshuo); 中国北京市东城区东交民巷1号, Beijing 100730 (CN)。闫冰 (YAN, Bing); 中国北京市东城区东交民巷1号, Beijing 100730 (CN)。
- (22) 国际申请日: 2019年6月27日 (27.06.2019)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:  
201810717444.5 2018年7月3日 (03.07.2018) CN  
201810719334.2 2018年7月3日 (03.07.2018) CN  
201811437289.8 2018年11月28日 (28.11.2018) CN
- (74) 代理人: 北京超凡宏宇专利代理事务所 (特殊普通合伙) (CHOFN INTELLECTUAL PROPERTY); 中国北京市海淀区北四环西路68号左岸工社1215-1218室, Beijing 100080 (CN)。
- (71) 申请人: 首都医科大学附属北京同仁医院 (BEIJING TONGREN HOSPITAL, CAPITAL MEDICAL UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国北京市东城区东交民巷1号, Beijing 100730 (CN)。北京市耳鼻咽喉科研究所 (BEIJING INSTITUTE OF
- (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, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS,

(54) **Title:** METHOD AND KIT FOR DETECTING CHRONIC SINUSITIS WITH SUBTYPE OF NASAL POLYP AND APPLICATION OF CLC GENE OR PROTEIN AS BIOMARKER

(54) 发明名称: 检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型的方法和试剂盒及CLC基因或蛋白作为生物标志物的应用

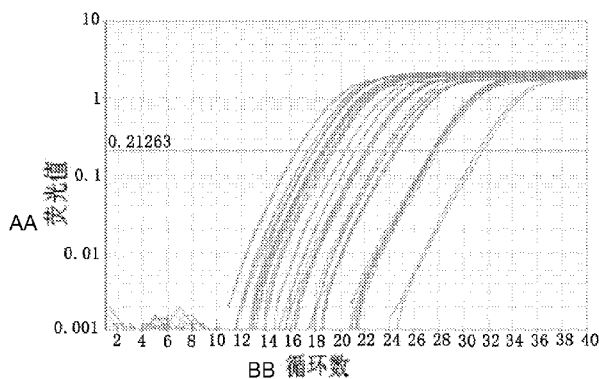


图1

AA Fluorescence value  
BB Number of cycles

(57) **Abstract:** The present invention provides a kit for detecting chronic sinusitis with a subtype of nasal polyp and an application of a CLC gene or protein as a biomarker, a method for detecting a CLC gene expression quantity in nasal cavity exfoliated cells and an application, and an ELISA kit for detecting chronic sinusitis with a subtype of nasal polyp and a preparation method thereof. The present invention further provides use of a CLC gene or protein as a biomarker for detecting chronic sinusitis with a subtype of nasal polyp. The method for detecting chronic sinusitis with a subtype of nasal polyp in the present invention comprises measuring a CLC gene expression quantity by using a PCR of a specific primer of the CLC gene, especially a real-time fluorescent quantitative PCR, or measuring a CLC protein expression quantity by using an anti-CLC antibody, especially ELISA of a mouse anti-human CLC monoclonal antibody.



WO 2020/007230 A1

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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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, 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)。

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:** 本公开提出用于检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型的试剂盒及CLC基因作为生物标志物的应用, 检测鼻腔脱落细胞中CLC基因表达量的方法及应用, 以及用于检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型的ELISA试剂盒及其制备方法。本公开还提供所述CLC基因或其蛋白质作为生物标志物用于检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型的用途。本公开的检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型的方法包括通过使用CLC基因特异性引物的PCR, 特别是实时荧光定量PCR测量CLC基因表达量, 或通过使用抗CLC抗体, 特别是小鼠抗人CLC单克隆抗体的ELISA测量CLC蛋白表达量。

## 检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型的方法和试剂盒及 CLC 基因或蛋白作为生物标志物的应用 相关申请的交叉引用

本公开要求于 2018 年 7 月 3 日提交中国国家知识产权局的申请号为 201810717444.5、名称为“用于检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型的试剂盒及 CLC 基因作为生物标志物的应用”的中国专利申请，于 2018 年 7 月 3 日提交中国国家知识产权局的申请号为 201810719334.2、名称为“检测鼻腔脱落细胞中 CLC 基因表达量的方法及应用”的中国专利申请，以及于 2018 年 11 月 28 日提交中国国家知识产权局的申请号为 201811437289.8、名称为“用于检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型的 ELISA 试剂盒及其制备方法”的中国专利申请的优先权，其全部内容通过引用结合在本公开中。

### 技术领域

本公开属于生物医药技术领域，尤其涉及一种用于检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型的试剂盒及 CLC 基因或蛋白作为生物标志物的应用，以及一种检测鼻腔脱落细胞中 CLC 基因或蛋白表达量的方法。

### 背景技术

慢性鼻窦炎伴鼻息肉 (Chronic rhinosinusitis with nasal polyps, CRSwNP) 是鼻窦黏膜的慢性炎症，查体可见鼻腔或中鼻道息肉形成。CRSwNP 常见症状为鼻塞、流涕或鼻涕倒流、嗅觉减退、面部闷胀感或压力感，持续时间超过 12 周。患病率约为 0.5-4%，CRSwNP 常伴有哮喘和过敏性鼻炎，有报道 7% 的哮喘患者患有 CRSwNP，而 26-48% 的 CRSwNP 患有哮喘。CRSwNP 发病机制目前还不确定，黏膜上皮细胞破坏、宿主免疫系统失衡和病原微生物入侵可能是其发病的主要原因。CRSwNP 主要的治疗方式是手术和药物治疗。但研究表明，即使通过规范的药物或手术治疗，慢性鼻窦炎伴鼻息肉的复发率仍高达 56%，严重影响患者生活质量，同时带来高额医疗支出，但临床却缺乏根治性治疗方法，因而成为鼻科学研究领域的重点。

依据嗜酸性粒细胞浸润的程度可以将 CRSwNP 分为嗜酸性粒细胞型 (Eosinophilic CRSwNP, ECRSwNP) 与非嗜酸性粒细胞型 (Noneosinophilic CRSwNP, nonECRSwNP)，二者的临床表现、用药和预后均不同，嗜酸性粒细胞型的临床症状较重，以鼻塞和嗅觉减退为主，多合并有哮喘，术后复发率较高。鼻息肉组织中嗜酸性粒细胞浸润程度与复发关系最为密切，当组织中该细胞百分比超过 27% 时，复发风险超过 90%。嗜酸性粒细胞型息肉对糖皮质激素类药物的敏感度显著高于非嗜酸性粒细胞型。非嗜酸性粒细胞型临床症状一般较轻，且合并哮喘的几率较小，气道炎症较轻，且术后复发率较嗜酸性粒细胞型低，对大环内酯类药物反应好。西方国家以嗜酸性粒细胞型为主，主要表现为 TH2 炎症反应，而我国的嗜酸性粒细胞型和非嗜酸性粒细胞型比例均约占一半，非嗜酸性粒细胞型主要表现为 TH1/TH17 炎症反应为主。综上所述，嗜酸性粒细胞型和非嗜酸性粒细胞型在免疫病理类型、临床症状、药物治疗反应和预后存在明显不同。不同慢性鼻窦炎伴鼻息肉的炎症/病理分型治疗策略不同。所以对慢性鼻窦炎伴鼻息肉的病理分型的鉴定显得尤为重要。

目前对两种亚型的判断主要依据鼻腔黏膜活检后组织病理标本染色，缺乏无创性生物学标志物用于鉴别诊断。患者在鼻内镜下获得息肉标本后，进行石蜡固定等病理标本的常规处理，然后进行苏木素伊红的染色，接下来通过高倍显微镜观察组织浸润的炎细胞（主要的炎细胞包括嗜酸性粒细胞，中性粒细胞，淋巴细胞，浆细胞）浸润个数，进行细胞分型。鼻腔黏膜病理活检的缺点如下：1. 为有创检查：增加了患者的感染风险，不适用于免疫力较低人群如儿童、老年人等；取材时鼻腔出血，往往引起患者恐惧和担忧。2. 难以获得疾病的实时动态变化信息：不能在术后对愈合期黏膜进行病理活检。但临床数据表明慢性鼻窦炎伴鼻息肉的病理分类会随药物治疗、手术治疗等转归，用治疗前的病理活检结果无法代表全部疾病时期的特征。3. 费时且增加就医成本，从获取组织样本到获取病理结果一般 3-4 个工作日。由于无法当日或次日获得结果，外地患者就医等产生额外的交通费、住宿费、挂号费，增加了就医成本。4. 存在一定的人为误差，不同的病理医生计数的炎细胞数量有可能不同，影响息肉分型的判断。5. 组织

病理切片较局限，只能反映切片位置的标本炎症状态，不能反映组织的全貌，可能会造成误诊。6.每张片子都需要病理科医生人工计数，难以批量操作。

由此可见，提供一种能够不依赖于鼻腔黏膜病理活检且能快速准确大批量检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型的方法成为本领域技术人员亟待解决的技术难题。

## 发明内容

本公开提供一种用于检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型的试剂盒，其中，所述试剂盒包括 CLC 基因的特异性引物。

本公开还提供了一种 CLC 基因作为生物标志物在制备用于检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型的产品中的应用。

本公开还提供一种 CLC 基因作为生物标志物用于检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型中的用途。

本公开还提供了本公开所述的试剂盒用于检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型中的用途。

本公开还提供了检测 CLC 的试剂用于检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型中的用途。

本公开还提供了一种检测鼻腔脱落细胞中 CLC 基因表达量的方法，包括以下步骤：从鼻腔脱落细胞中提取 RNA，将总 RNA 逆转录为 cDNA，采用定量聚合酶链反应将 cDNA 中的 CLC 基因和内参基因分别采用 CLC 基因的特异性引物和内参基因的特异性引物进行实时荧光定量 PCR 扩增，基于扩增产物的检测结果计算 CLC 基因表达量。

本公开还提供了一种上述检测鼻腔脱落细胞中 CLC 基因表达量的方法在制备用于检测伴有鼻息肉的慢性鼻窦炎亚型的试剂盒中的应用。

本公开还提供了一种检测伴有鼻息肉的慢性鼻窦炎亚型方法，包括通过本公开所述的方法检测鼻腔脱落细胞中 CLC 基因表达量。

本公开还提供了一种检测伴有鼻息肉的慢性鼻窦炎亚型方法，包括检测检测鼻腔脱落细胞中的 CLC 基因表达量，优选地使用本公开所述的试剂盒检测所述腔脱落细胞中的 CLC 基因表达量。

本公开还提出一种用于检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型的 ELISA 试剂盒及其制备方法。

一种用于检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型的 ELISA 试剂盒，包括包被有夏科雷登氏结晶蛋白 CLC 抗体的酶标板。

本公开还提出 CLC 蛋白作为生物标志物用于检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型中的用途。

本公开还提供了本公开所述的 ELISA 试剂盒用于检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型中的用途。

本公开还提供了一种检测伴有鼻息肉的慢性鼻窦炎亚型方法，包括使用本公开的 ELISA 试剂盒检测 CLC 蛋白表达量。

本公开还提供了 CLC 基因或 CLC 蛋白作为生物标志物在检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型中的用途。

本公开还提供了一种上述用于检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型的 ELISA 试剂盒的制备方法，包括以下步骤：

步骤一：制备包被有夏科雷登氏结晶蛋白 CLC 抗体：将小鼠抗人 CLC 单克隆抗体用磷酸缓冲盐溶液稀释；

步骤二：制备包被有夏科雷登氏结晶蛋白 CLC 抗体的酶标板：取酶标板，每孔加入稀释好的小鼠抗人 CLC 单克隆抗体，4℃过夜弃上清后加入洗涤液洗板，每孔加入封闭液，再次弃上清后加入洗涤液洗板；

步骤三：倍比稀释标准品：取标准品，向其加入标准品稀释液，制备得到浓度为 Xng/mL 的标准品，取浓度为 Xng/mL 的标准品进行倍比稀释，依次倍比稀释浓度为：Xng/mL，0.5Xng/mL，0.25Xng/mL，0.625Xng/mL，0.3125Xng/mL，0.15625Xng/mL，0.078125Xng/mL；

步骤四：样品稀释：取出样本至室温，并进行梯度稀释处理；

步骤五：装样：取步骤二制备的包被有夏科雷登氏结晶蛋白 CLC 抗体的酶标板，每孔分别依次加入步骤三的倍比稀释后的标准品和步骤四的稀释后的样品，同时设置添加有标准品稀释液的空白孔，孵育后加入洗涤液洗板；

步骤六：制备检测溶液 A 工作液：取生物素标记的人 CLC 抗体采用标准品稀释液稀释成 1~10  $\mu\text{g/mL}$  后加入至酶标板的每个孔内，覆膜并孵育后加入洗涤液洗板；

步骤七：制备检测溶液 B 工作液：采用标准品稀释液稀释成浓度 0.5~5  $\mu\text{g/mL}$  的抗生物素抗体结合的辣根过氧化物酶后加入至酶标板的每个孔内，覆膜并孵育后加入洗涤液洗板；

步骤八：显色：取 TMB 加入同等体积 0.75% 双氧水后制备得到 TBM 底物显色液并加入至酶标板的每个孔内，当观察添加有浓度为  $X\text{ng/mL}$  的标准品的孔变成棕黄色后，酶标板的每个孔加入的终止溶液，待添加有浓度为  $X\text{ng/mL}$  的标准品的孔由黄色变为蓝色时，采用酶标仪 450nm 检测波长检测，550nm-570nm 参考波长比色，制作标准曲线计算样品浓度值。

## 附图说明

- 图 1 为本公开实验例一部分 CLC 基因实时荧光定量 PCR 扩增曲线图；  
图 2 为本公开实验例一另一部分 CLC 基因实时荧光定量 PCR 扩增曲线图；  
图 3 为本公开实验例一再一部分 CLC 基因实时荧光定量 PCR 扩增曲线图；  
图 4 为本公开实验例一再一部分 CLC 基因实时荧光定量 PCR 扩增曲线图；  
图 5 为本公开实验例一部分 CLC 基因实时荧光定量 PCR 熔解曲线图；  
图 6 为本公开实验例一另一部分 CLC 基因实时荧光定量 PCR 熔解曲线图；  
图 7 为本公开实验例一再一部分 CLC 基因实时荧光定量 PCR 熔解曲线图；  
图 8 为本公开实验例一再一部分 CLC 基因实时荧光定量 PCR 熔解曲线图；  
图 9 为本公开实验例一的一种可选的进行慢性鼻窦炎伴鼻息肉分型检测的 ROC 曲线。  
图 10 为本公开实验例二部分 CLC 基因实时荧光定量 PCR 扩增曲线图；  
图 11 为本公开实验例二另一部分 CLC 基因实时荧光定量 PCR 扩增曲线图；  
图 12 为本公开实验例二部分 CLC 基因实时荧光定量 PCR 熔解曲线图；  
图 13 为本公开实验例二另一部分 CLC 基因实时荧光定量 PCR 熔解曲线图；  
图 14 为本公开实验例三 CLC 基因实时荧光定量 PCR 扩增曲线图；  
图 15 为本公开实验例三 CLC 基因实时荧光定量 PCR 熔解曲线图；  
图 16 为本公开实验例四 CLC 基因实时荧光定量 PCR 扩增曲线图；  
图 17 为本公开实验例四 CLC 基因实时荧光定量 PCR 熔解曲线图。  
图 18 为本发明实施例 13-15 效果检测试验结果的标准曲线图。

## 具体实施方式

下面将对本公开实施方式中的技术方案进行清楚、完整地描述，显然，所描述的实施方式仅仅是本公开一部分实施方式，而不是全部的实施方式。基于本公开中的实施方式，本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施方式，都属于本公开保护的范围。

如本文所用术语“引物”、“扩增引物”或“寡核苷酸引物”是指寡核苷酸，其能够与邻近靶序列的 RNA 或 DNA 区位点特异性地退火，并作为合适条件下 DNA 合成的起始引物。其通常为单链，其可以是天然发生的或合成的。“引物”或“寡核苷酸引物”通常包含约 5 至约 50 个核苷酸之间的序列，更优选为约 10 至约 30 个核苷酸，或更优选为约 15 至 25 个核苷酸。

相对于待扩增的核酸的区域，如本文所用术语“上游引物”一般与距离核酸分子 5' 末端较近的区域

域结合。另一方面,相对于待扩增的核酸上的区域,如本文所用术语“下游引物”一般与距离核酸分子3'末端较近的区域结合。如本文所用术语“内参基因”通常是指在各个组织和细胞中表达相对恒定的基因,例如鼻息肉组织或从鼻黏膜脱落细胞中的 GAPDH 基因,主要在检测基因表达水平时作为参照物使用。

如本文所用,“聚合酶链反应”或 PCR 是由以下项组成的核酸的扩增:分离双链核酸样本的链的初始变性步骤,随后重复(i)允许扩增引物对靶序列侧翼位置特异性退火的退火步骤;(ii)在 5'至 3'方向上延伸引物从而形成与靶序列互补的扩增子多核苷酸的延伸步骤,以及(iii)引起扩增子与靶序列分离的变性步骤。上述各步骤可以在不同的温度下进行,优选地使用自动热循环仪。

如本文所用,“荧光定量 PCR (Real-time quantitative PCR)”,也称为定量 PCR,简称为 QPCR,是指在 PCR 反应体系中加入荧光基团,利用荧光信号累积实时监测整个 PCR 进程,最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。

如本文所用术语“Ct (循环阈值)或“Ct 值”通常是指荧光定量 PCR 中荧光信号到达设定的阈值时所经历的循环数。

如本文所用,术语“包含”、“包括”、“涵盖”、“内含”、“含有”、“其特征在于”、“具有”或它们的任何其它变型旨在涵盖非排它性的包含之意。在一种或多种实施方式中,所述 CLC 基因的上游引物如 SEQ ID NO:2 所示,所述 CLC 基因的下游引物如 SEQ ID NO:3 所示。

在一种或多种实施方式中,所述试剂盒进一步还包括内参基因的特异性引物。

在一种或多种实施方式中,所述内参基因为 GAPDH,所述内参基因的上游引物如 SEQ ID NO:4 所示,所述 CLC 基因的下游引物如 SEQ ID NO:5 所示。

在一种或多种实施方式中,所述试剂盒进一步还包括:从鼻息肉组织或从鼻黏膜脱落细胞中提取 RNA 的试剂;将总 RNA 逆转录为 cDNA 的试剂;采用定量聚合酶链反应将 cDNA 中的 CLC 基因和内参基因进行实时荧光定量 PCR 反应的试剂。

在一种或多种实施方式中,所述将总 RNA 逆转录为 cDNA 的试剂包括:逆转录混合液和去 RNA 酶及去 DNA 酶的水;

在一种或多种实施方式中,将总 RNA 进行逆转录为 cDNA 的试剂包括:1  $\mu$ L~40  $\mu$ L 的逆转录混合液,以及 0  $\mu$ L~160  $\mu$ L 的去 RNA 酶及去 DNA 酶的水。进一步优选的,所述将总 RNA 逆转录为 cDNA 的试剂包括:2  $\mu$ L 的逆转录混合液,以及 0  $\mu$ L~8  $\mu$ L 的去 RNA 酶及去 DNA 酶的水。

在一种或多种实施方式中,采用定量聚合酶链反应将 cDNA 中的 CLC 基因和内参基因进行实时荧光定量 PCR 反应的试剂包括:PCR 预混合液、双蒸水、机器荧光补偿及矫正剂、CLC 基因的上游引物、CLC 基因的下游引物、内参基因的上游引物和内参基因的下游引物。

在一种或多种实施方式中,采用定量聚合酶链反应将 cDNA 中的 CLC 基因和内参基因进行实时荧光定量 PCR 反应的试剂包括:1  $\mu$ L~25  $\mu$ L 的 PCR 预混合液,0  $\mu$ L~50  $\mu$ L 的双蒸水,0  $\mu$ L~2  $\mu$ L 的机器荧光补偿及矫正剂,0.01~100  $\mu$ M 的 CLC 基因的上游引物,0.01~100  $\mu$ M 的 CLC 基因的下游引物,0.01~100  $\mu$ M 的内参基因的上游引物,0.01~100  $\mu$ M 的内参基因的下游引物;进一步优选的,采用定量聚合酶链反应将 cDNA 中的 CLC 基因和内参基因进行实时荧光定量 PCR 反应的试剂包括:5  $\mu$ L 的 PCR 预混合液,0  $\mu$ L~10  $\mu$ L 的双蒸水,根据总体积用水补齐至 10  $\mu$ L,0.2  $\mu$ L 的机器荧光补偿及矫正剂,1  $\mu$ M 的 CLC 基因的上游引物,1  $\mu$ M 的 CLC 基因的下游引物,1  $\mu$ M 的内参基因的上游引物,1  $\mu$ M 的内参基因的下游引物。

在一种或多种实施方式中,所述从鼻息肉组织中提取 RNA 的试剂可以选择以下两种试剂。

第一种包括:RNA 抽提液、氯仿、异丙醇、浓度为 65%~90%的乙醇、去 RNA 酶及去 DNA 酶的水;其中优选的,包括 0.1 mL~20 mL 的 RNA 抽提液 Trizol 或 RNAiso Blood 或 RNAiso Plus 或其它含

有苯酚、异硫氰酸胍、8-羟基喹啉、异硫氰酸胍或 $\beta$ -巯基乙醇的物质,所述 Trizol 或所述 RNAiso Blood 或所述 RNAiso Plus 或所述其它含有苯酚、异硫氰酸胍、8-羟基喹啉、异硫氰酸胍或 $\beta$ -巯基乙醇的物质的体积的 0.1~0.5 倍的氯仿,所述氯仿体积的 0.5~3 倍的异丙醇,所述异丙醇体积的 0.5~5 倍的 65% 至 90% 的乙醇,以及 0.01 mL 至 5 mL 的去 RNA 酶及去 DNA 酶的水;进一步优选的,针对从鼻息肉组织中提取 RNA 的试剂可选择以下两种试剂,第一种包括:1 mL 的 RNA 抽提液 Trizol 或 RNAiso Blood 或 RNAiso Plus 或其它含有苯酚、异硫氰酸胍、8-羟基喹啉、异硫氰酸胍或 $\beta$ -巯基乙醇的物质,200  $\mu$ L 的氯仿,200  $\mu$ L 的异丙醇,200  $\mu$ L 体积浓度为 65%至 90%的乙醇,以及 0.02 mL 的去 RNA 酶及去 DNA 酶的水;

另外一种包括:所述从鼻息肉组织中提取 RNA 的试剂包括:细胞裂解液、用于去除吸附有 RNA 的纯化柱的杂质的第一缓冲液、用于去除吸附有 RNA 的纯化柱的杂质和盐分的第二缓冲液和去 RNA 酶及去 DNA 酶的水;所述从鼻息肉组织中提取 RNA 的工具包括 RNA 纯化柱;其中所述从鼻息肉组织中提取 RNA 的试剂还包括 DNA 酶反应液或所述从鼻息肉组织中提取 RNA 的工具还包括基因组 DNA 吸附柱;所述 DNA 酶反应液包括 DNA 酶缓冲液、重组 DNA 酶和去 RNA 酶的双蒸水。

在一种或多种实施方式中,所述从鼻息肉组织中提取 RNA 的试剂包括 0.1 mL~2mL 的用于裂解细胞和抑制 RNA 降解的细胞裂解液、0.1 mL~0.7 mL 的洗涤用第一缓冲液、0.1 mL~0.7 mL 的洗涤用第二缓冲液、0.01 mL~1 mL 的去 RNA 酶及去 DNA 酶的水、0~10  $\mu$ L 的去基因组 DNA 的重组 DNA 酶、0~10  $\mu$ L 的去基因组 DNA 的 DNA 酶缓冲液、20~100  $\mu$ L 的去 RNA 酶的双蒸水,所述从鼻息肉组织中提取 RNA 的工具包括 RNA 纯化柱;或者包括 0.1 mL~2mL 的用于裂解细胞和抑制 RNA 降解的细胞裂解液、0.1 mL~0.7 mL 的洗涤用第一缓冲液、0.1 mL~0.7 mL 的洗涤用第二缓冲液、0.01 mL~1 mL 的去 RNA 酶及去 DNA 酶的水,所述从鼻息肉组织中提取 RNA 的工具包括基因组 DNA 吸附柱和 RNA 纯化柱。

在一种或多种实施方式中,所述从鼻息肉组织中提取 RNA 的试剂包括 300  $\mu$ L 的用于裂解细胞和抑制 RNA 降解的细胞裂解液、500  $\mu$ L 的洗涤用第一缓冲液、600  $\mu$ L 的洗涤用第二缓冲液、0.02 mL 的去 RNA 酶及去 DNA 酶的水、4  $\mu$ L 的去基因组 DNA 的重组 DNA 酶、5  $\mu$ L 10 $\times$  去除基因组 DNA 的 DNA 酶缓冲液、41  $\mu$ L 的去 RNA 酶的双蒸水,所述从鼻息肉组织中提取 RNA 的工具包括 RNA 纯化柱;或者包括 300  $\mu$ L 的用于裂解细胞和抑制 RNA 降解的细胞裂解液、500  $\mu$ L 的洗涤用第一缓冲液、600  $\mu$ L 的洗涤用第二缓冲液、0.02 mL 的去 RNA 酶及去 DNA 酶的水,所述从鼻息肉组织中提取 RNA 的工具包括基因组 DNA 吸附柱和 RNA 纯化柱。

在一种或多种实施方式中,所述鼻息肉组织为鼻腔病理活检获得的鼻息肉组织,或者所述鼻黏膜脱落细胞为刷取或粘取鼻息肉表面获取的鼻息肉细胞。

在一种或多种实施方式中,选用 $\Delta$ Ct(Ct(CLC)-Ct(GAPDH))分析法分析扩增产物的数据结果,且与所述 $\Delta$ Ct 进行比较的界定值为 4.85。

在一种或多种实施方式中,CLC 基因的上游引物如 SEQ ID NO:2 所示,CLC 基因的下游引物如 SEQ ID NO:3 所示。

在一种或多种实施方式中,所述内参基因为 GAPDH,所述内参基因的上游引物如 SEQ ID NO:4 所示,所述下游引物如 SEQ ID NO:5 所示。

在一种或多种实施方式中,所述鼻腔脱落细胞采用毛刷于鼻息肉表面获取,且将获取鼻腔脱落细胞后的毛刷置于细胞裂解液中于 4 $^{\circ}$ C 以下保存。

在一种或多种实施方式中,从鼻腔脱落细胞中提取 RNA 的方法,包括两种方法,其中第一种方法包括以下步骤:

步骤 1: 将所述鼻腔脱落细胞溶解于 100~2000  $\mu$ L 细胞裂解液中,并加入等体积的乙醇,混合均匀

后加入至 RNA 纯化柱中，离心处理后，除去收集管中的滤液，将所述 RNA 纯化柱置于收集管中；

步骤 2：向步骤 1 中获取的所述 RNA 纯化柱中加入 300  $\mu$ L ~700  $\mu$ L 的第一缓冲液，离心处理后，除去第一滤液；继续向所述 RNA 纯化柱加入 400  $\mu$ L~800  $\mu$ L 第二缓冲液，离心处理后，除去第二滤液，取 RNA 纯化柱经洗脱得到 RNA。

在一种或多种实施方式中，所述从鼻腔脱落细胞中提取 RNA 的方法，还包括以下步骤：向除去所述第二滤液后的 RNA 纯化柱中添加 10~100  $\mu$ L DNA 酶反应液，经静置处理后，加入 300  $\mu$ L~700  $\mu$ L 所述第二缓冲液，离心处理后，除去第三滤液，取 RNA 纯化柱经洗脱后采用分光光度计测量 RNA 纯度，得到 RNA。

在一种或多种实施方式中，所述 DNA 酶反应液的制备方法包括以下步骤：取 DNA 酶缓冲液、重组 DNA 酶，去 RNA 酶的双蒸水经混合得到 DNA 酶反应液。优选所述 DNA 酶反应液的制备方法包括以下步骤：取 5  $\mu$ L 10 $\times$  DNA 酶缓冲液、4  $\mu$ L 重组 DNA 酶，41  $\mu$ L 去 RNA 酶的双蒸水经混合得到 DNA 酶反应液。

在一种或多种实施方式中，当进行 RNA 提取时基因组含量较低或材料起始量较少时，所述从鼻腔脱落细胞中提取 RNA 的方法，还包括以下步骤：所述步骤 1 中，所述鼻腔脱落细胞溶解于细胞裂解液中后先加入至基因组 DNA 吸附柱中取滤液，再向所述滤液中加入等体积的乙醇。

在一种或多种实施方式中，为了获取更高浓度的 RNA，所述从鼻腔脱落细胞中提取 RNA 的方法，还包括以下步骤：取待洗脱的 RNA 纯化柱加入去 RNA 水解酶的蒸馏水或焦碳酸二乙酯处理水，室温静置后，经离心处理、洗脱所述 RNA 纯化柱，采用分光光度计测量 RNA 纯度，得到 RNA。

在一种或多种实施方式中，步骤 1 采用细胞裂解液能够迅速破碎鼻腔脱落细胞并抑制鼻腔脱落细胞释放出的核酸酶的物质；采用基因组 DNA 吸附柱用于去除基因组 DNA；步骤 2 中的 RNA 纯化柱用于富集 RNA；其中收集管用于收集去除基因组 DNA 后的溶液，用于去除吸附有 RNA 的纯化柱的杂质的第一缓冲液、用于去除 RNA 溶液中的杂质和盐分的第二缓冲液。

在一种或多种实施方式中，所述从鼻腔脱落细胞中提取 RNA 的第一种方法，包括以下步骤：

步骤 1：将所述鼻腔脱落细胞溶解于 300  $\mu$ L 细胞裂解液中，并加入等体积的 70%乙醇，使用移液枪将溶液混合均匀；立即将混合液加入至 RNA 纯化柱中，12000 转/分钟，离心 1min，除去滤液，将所述 RNA 纯化柱置于 2mL 收集管中；

步骤 2：向步骤 1 中获取的所述 RNA 纯化柱中加入 500  $\mu$ L 的第一缓冲液，12000 转/分钟，离心 30s，除去第一滤液；继续向所述 RNA 纯化柱加入 600  $\mu$ L 第二缓冲液，12000 转/分钟，离心 30s，除去第二滤液；

步骤 3：取 5  $\mu$ L 10 $\times$  DNA 酶缓冲液、4  $\mu$ L 重组 DNA 酶，41  $\mu$ L 去 RNA 酶的双蒸水经混合得到 DNA 酶反应液，向除去所述第二滤液后的 RNA 纯化柱中添加 50  $\mu$ L DNA 酶反应液，室温静置 15 分钟，加入 350  $\mu$ L 所述第二缓冲液，12000 转/分钟，离心 30s，除去第三滤液；

步骤 4：将步骤 3 中除去第三滤液的 RNA 纯化柱安置于 1.5mL 无 RNA 水解酶收集管，向 RNA 纯化柱加入 50  $\mu$ L 的去 RNA 水解酶的蒸馏水或 0.1%焦碳酸二乙酯处理水，室温静置 5 分钟，12000 转/分钟，离心 2min，洗脱 RNA 纯化柱，采用分光光度计测量 RNA 溶液的 OD260/OD280 比值为 1.7~2.1 时，得到 RNA。

在一种或多种实施方式中，所述从鼻腔脱落细胞中提取 RNA 的方法，包括以下步骤：

步骤 1：取基因组 DNA 吸附柱置于 2mL 收集管内，将所述鼻腔脱落细胞溶解于 100~2000  $\mu$ L 细胞裂解液中后加入至基因组 DNA 吸附柱中，取滤液，向所述滤液中加入等体积的 70%乙醇，混合均匀后加入至 RNA 纯化柱中，12000 转/分钟，离心 1min，除去滤液，将所述 RNA 纯化柱置于 2mL 收集管中；

步骤 2：向步骤 1 中获取的所述 RNA 纯化柱中加入 500  $\mu$ L 的第一缓冲液，12000 转/分钟，离心 30s，

除去第一滤液；继续向所述 RNA 纯化柱加入 600  $\mu$ L 第二缓冲液，12000 转/分钟，离心 30 s，除去第二滤液；

步骤 3：将步骤 2 中除去第二滤液的 RNA 纯化柱安置于 1.5mL 无 RNA 水解酶收集管，向 RNA 纯化柱加入 50  $\mu$ L 的去 RNA 水解酶的蒸馏水或 0.1% 焦碳酸二乙酯处理水，室温静置 5 分钟，12000 转/分钟，离心 2min，洗脱 RNA 纯化柱，采用分光光度计测量 RNA 溶液的 OD260/OD280 比值为 1.7~2.1 时，得到 RNA。

在一种或多种实施方式中，所述从鼻腔脱落细胞中提取 RNA 的第二种方法，包括以下步骤：向装有鼻腔脱落细胞的离心管中加入 0.1 mL~20 mL RNA 抽提液进行溶解、振荡后加入所述 RNA 抽提液体积的 0.1~0.5 倍的氯仿，震荡混匀，室温静置，将所述离心管离心，取上清液，加入所述氯仿体积的 0.5~3 倍的异丙醇，混匀后静置、离心，弃上清，保留第一沉淀，向所述第一沉淀中加入所述异丙醇体积的 0.5~5 倍的浓度 65%~90% 的乙醇，经洗涤后混匀、离心，弃上清，保留第二沉淀；盖紧所述离心管，再次离心，除去上清液，继续向所述离心管中加入 0.01~5mL 去 RNA 酶及去 DNA 酶的水溶解所述第二沉淀，采用分光光度计测量 RNA 纯度，得到 RNA。

在一种或多种实施方式中，所述 RNA 抽提液为 Trizol、RNAiso Blood、RNAiso Plus 或其它含有苯酚、异硫氰酸胍、8-羟基喹啉、异硫氰酸胍和  $\beta$ -巯基乙醇中的任一种或几种的试剂。

在一种或多种实施方式中，所述从鼻腔脱落细胞中提取 RNA 的第二种方法，包括以下步骤：向装有鼻腔脱落细胞的离心管中加入 0.1~20mL RNA 抽提液进行溶解、振荡后，室温静置 3~7min；加入 40  $\mu$ L~5mL 氯仿，震荡混匀，室温静置 3~7min，于 3 $^{\circ}$ C~5 $^{\circ}$ C，10000~14000r/min 离心 10~20min；取上清液 40  $\mu$ L~8mL，加入等体积的异丙醇，混匀后静置 8~12min，于 3 $^{\circ}$ C~5 $^{\circ}$ C，10000~14000r/min 离心 10~20min 弃上清，保留第一沉淀；向所述第一沉淀中加入与异丙醇等体积的浓度 65%~90% 的乙醇，于 3 $^{\circ}$ C~5 $^{\circ}$ C，7000~14000r/min 离心 10~20min，弃上清，保留第二沉淀；盖紧所述离心管，于 3 $^{\circ}$ C~5 $^{\circ}$ C，7000~14000r/min 离心 1~3min，除去上清液，静置 10~20min 后继续向所述离心管中加入 0.01~5mL 去 RNA 酶及去 DNA 酶的水溶解所述第二沉淀，采用分光光度计测量 RNA 纯度，得到 RNA。

在一种或多种实施方式中，所述从鼻腔脱落细胞中提取 RNA 的第二种方法，包括以下步骤：向装有鼻腔脱落细胞的离心管中加入 1mL RNA 抽提液进行溶解、振荡后，室温静置 5min；加入 200  $\mu$ L 氯仿，震荡混匀，室温静置 5min，于 4 $^{\circ}$ C，12000r/min 离心 15min；取上清液 200  $\mu$ L，加入 200  $\mu$ L 异丙醇，混匀后静置 10min，于 4 $^{\circ}$ C，12000r/min 离心 15min 弃上清，保留第一沉淀；向所述第一沉淀中加入与异丙醇等体积的浓度 75% 的乙醇，于 4 $^{\circ}$ C，7500r/min 离心 15min，弃上清，保留第二沉淀；盖紧所述离心管，于 4 $^{\circ}$ C，7500r/min 离心 2min，除去上清液，静置 15min 后继续向所述离心管中加入 50  $\mu$ L 去 RNA 酶及去 DNA 酶的水溶解所述第二沉淀，采用分光光度计测量 RNA 溶液 OD260/OD280 比值为 1.7~2.1，得到 RNA。

在一种或多种实施方式中，将总 RNA 逆转录为 cDNA 的方法包括以下步骤：取 1~3  $\mu$ L 的逆转录混合液、0~10  $\mu$ L 的去 RNA 水解酶蒸馏水和提取的 RNA 于 37 $^{\circ}$ C 温度条件下发生反转录反应 15min，后于 84 $^{\circ}$ C 温度条件下发生反转录酶的失活反应，得到逆转录产物 cDNA。

在一种或多种实施方式中，将总 RNA 逆转录为 cDNA 的方法包括以下步骤：取 2  $\mu$ L 的所述逆转录混合液，8  $\mu$ L 的所述去 RNA 水解酶蒸馏水，以及总量不超过 500ng 或体积不超过 8  $\mu$ L 的总 RNA，所述去 RNA 水解酶蒸馏水补齐至 10  $\mu$ L；轻柔混匀后进行逆转录反应，条件如下：在 37 $^{\circ}$ C 的条件下，进行 15 分钟的反转录反应；在 85 $^{\circ}$ C 的条件下，进行 5 秒的反转录酶的失活反应；产物 4 $^{\circ}$ C 放置。其中反应体系可按需求相应放大，10  $\mu$ L 反应体系可最大使用 500ng 的总 RNA，本领域技术人员可根据实际需要进行选择。

在一种或多种实施方式中，所述实时荧光定量 PCR 扩增包括以下步骤：

步骤 1: 制备实时荧光定量 PCR 反应液: 包括 1  $\mu$ L~25  $\mu$ L 的 PCR 预混合液, 0  $\mu$ L~10  $\mu$ L 的双蒸水补齐总体积用水至 10  $\mu$ L, 0  $\mu$ L~2  $\mu$ L 的机器荧光补偿及矫正剂, 0.01~100  $\mu$ M 的 CLC 基因的上游引物, 0.01~100  $\mu$ M 的 CLC 基因的下游引物, 0.01~100  $\mu$ M 的内参基因的上游引物, 0.01~100  $\mu$ M 的内参基因的下游引物, 0.01  $\mu$ L~5  $\mu$ L 的 cDNA;

步骤 2: 采用两步法 PCR 扩增标准程序或三步法 PCR 扩增标准程序进行实时荧光定量 PCR 检测;

步骤 3: 计算 CLC 基因表达量。

作为更优选的, 制备实时荧光定量 PCR 反应液: 包括 5  $\mu$ L 的 PCR 预混合液, 2.8  $\mu$ L 的双蒸水补齐总体积用水至 10  $\mu$ L, 0.2  $\mu$ L 的机器荧光补偿及矫正剂, 0.5  $\mu$ L 的 CLC 基因的上游引物, 0.5  $\mu$ L 的 CLC 基因的下游引物, 0.5  $\mu$ L 的内参基因的上游引物, 0.5  $\mu$ L 的内参基因的下游引物, 1ng/ $\mu$ L 的所述 cDNA 或 0.01  $\mu$ L 至 5  $\mu$ L 的所述 RNA。

在一种或多种实施方式中, 所述两步法 PCR 扩增标准程序的反应条件包括以下步骤: 第 1 阶段: 在 95 $^{\circ}$ C 的条件下预变性 30 秒; 第 2 阶段 PCR 反应: 在 95 $^{\circ}$ C 的条件下, 反应 15 秒, 在 60 $^{\circ}$ C 的条件下, 反应 60 秒, 退火延伸, 如此进行 40 个循环。

在一种或多种实施方式中, 所述三步法 PCR 扩增标准程序的反应条件包括以下步骤: 第 1 阶段: 在 95 $^{\circ}$ C 的条件下预变性 2 分钟; 第 2 阶段 PCR 反应: 在 95 $^{\circ}$ C 的条件下, 反应 1 分钟, 在 55 $^{\circ}$ C 的条件下, 反应 1 分钟, 在 72 $^{\circ}$ C 的条件下, 反应 1 分钟, 如此进行 40 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C, 7 分钟退火延伸。

在一种或多种实施方式中, 计算所述 CLC 基因表达量的方法为: 计算  $\Delta$ CT 或  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  来计算目的基因的表达量; 其中  $\Delta\text{CT} = (\text{CT}(\text{CLC}) - \text{CT}(\text{GAPDH}))$ ,  $-\Delta\Delta\text{CT} = -(\Delta\text{CT}(\text{处理标本 CT}(\text{CLC}) - \text{CT}(\text{GAPDH})) - \text{健康对照组平均}\Delta\text{CT})$ ; 健康对照组平均  $\Delta\text{CT} = \Sigma$  每个对照组  $\Delta\text{CT}(\text{CT}(\text{CLC}) - \text{CT}(\text{GAPDH})) / \text{对照组样本数}$ 。

在一种或多种实施方式中, 所述检测 CLC 的试剂包括 CLC 基因的特异性引物, 优选地所述 CLC 基因的特异性引物的上游引物如 SEQ ID NO:2 所示, 所述 CLC 基因的下游引物如 SEQ ID NO:3 所示。

在一种或多种实施方式中, 检测 CLC 的试剂选自自由针对 CLC 的引物、抗体、适配体、探针或其组合组成的组。

在一种或多种实施方式中, 通过荧光 PCR 法测定 CLC 基因水平来实现检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型。

在一种或多种实施方式中, 其中, 通过荧光 PCR 检测鼻腔脱落细胞中 CLC 基因表达量。

在一种或多种实施方式中, 根据  $\Delta\text{Ct}(\text{Ct}(\text{CLC}) - \text{Ct}(\text{GAPDH}))$  确定慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型,  $\text{Ct}(\text{CLC})$  为 CLC 基因的 Ct 值,  $\text{Ct}(\text{GAPDH})$  为内参基因 GAPDH 的 Ct 值。

在一种或多种实施方式中, 所述  $\Delta\text{Ct}$  大于或等于 4.85 代表非嗜酸性粒细胞型慢性鼻窦炎伴鼻息肉, 而  $\Delta\text{Ct}$  小于 4.85 代表嗜酸性粒细胞型慢性鼻窦炎伴鼻息肉。

在一种或多种实施方式中, 所述包被有夏科雷登氏结晶蛋白 CLC 抗体为小鼠抗人 CLC 单克隆抗体。

在一种或多种实施方式中, 所述酶标板的每个微孔内所述夏科雷登氏结晶蛋白 CLC 抗体的包被量为 0.1~1  $\mu$ g。

在一种或多种实施方式中, 所述 ELISA 试剂盒还包括夏科雷登氏结晶蛋白 CLC 标准品及其标准品稀释液、TMB 底物显色液、检测溶液 A 工作液、检测溶液 B 工作液、终止溶液和洗涤液。

在一种或多种实施方式中, 所述标准品为重组 CLC 蛋白;

所述标准稀释液包括吐温 20、牛血清白蛋白和磷酸缓冲盐溶液;

所述检测溶液 A 工作液包括采用标准品稀释液稀释成浓度 1~10  $\mu$ g/mL 的生物素标记的人 CLC 抗体;

所述检测溶液 B 工作液包括采用标准品稀释液稀释成浓度 0.5~5  $\mu$ g/mL 的抗生物素抗体结合的辣

根过氧化物酶；

所述终止溶液为硫酸；

所述洗涤液包括吐温 20 和磷酸缓冲盐溶液。

在一种或多种实施方式中，所述标准品为重组 CLC 蛋白，可直接外购获取得到，外购厂商为 Abcam；所述标准稀释液包括含有 1%吐温 20 和 10%牛血清白蛋白的磷酸缓冲盐溶液；

所述检测溶液 A 工作液包括采用标准品稀释液稀释成浓度 5  $\mu\text{g/mL}$  的生物素标记的人 CLC 抗体；

所述检测溶液 B 工作液包括采用标准品稀释液稀释成浓度 1.25/mL 的抗生物素抗体结合的辣根过氧化物酶；

所述终止溶液为 2N 硫酸；

所述洗涤液包括含有 0.05%吐温 20 的磷酸缓冲盐溶液。

在一种或多种实施方式中，包被有夏科雷登氏结晶蛋白 CLC 抗体的酶标板的制备方法，包括以下步骤：将小鼠抗人 CLC 单克隆抗体用磷酸缓冲盐溶液稀释，取酶标板，向其加入稀释好的小鼠抗人 CLC 单克隆抗体，4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜弃上清后洗板，每孔加入封闭液，再次弃上清后洗板。

本公开提供一种上述用于检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型的 ELISA 试剂盒的制备方法，包括以下步骤：

步骤一：制备包被有夏科雷登氏结晶蛋白 CLC 抗体：将小鼠抗人 CLC 单克隆抗体用磷酸缓冲盐溶液稀释；

步骤二：制备包被有夏科雷登氏结晶蛋白 CLC 抗体的酶标板：取酶标板，每孔加入稀释好的小鼠抗人 CLC 单克隆抗体，4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜弃上清后加入洗涤液洗板，每孔加入封闭液，再次弃上清后加入洗涤液洗板；

步骤三：倍比稀释标准品：取标准品，向其加入标准品稀释液，制备得到浓度为 Xng/mL 的标准品，取浓度为 Xng/mL 的标准品进行倍比稀释，依次倍比稀释浓度为：Xng/mL，0.5Xng/mL，0.25Xng/mL，0.625Xng/mL，0.3125Xng/mL，0.15625Xng/mL，0.078125Xng/mL；

步骤四：样品稀释：取出样本至室温，并进行梯度稀释处理；

步骤五：装样：取步骤二制备的包被有夏科雷登氏结晶蛋白 CLC 抗体的酶标板，每孔分别依次加入步骤三的倍比稀释后的标准品和步骤四的稀释后的样品，同时设置添加有标准品稀释液的空白孔，孵育后加入洗涤液洗板；

步骤六：制备检测溶液 A 工作液：取生物素标记的人 CLC 抗体采用标准品稀释液稀释成 1~10  $\mu\text{g/mL}$  后加入至酶标板的每个孔内，覆膜并孵育后加入洗涤液洗板；

步骤七：制备检测溶液 B 工作液：采用标准品稀释液稀释成浓度 0.5~5  $\mu\text{g/mL}$  的抗生物素抗体结合的辣根过氧化物酶后加入至酶标板的每个孔内，覆膜并孵育后加入洗涤液洗板；

步骤八：显色：取 TMB 加入同等体积 0.75%双氧水后制备得到 TBM 底物显色液并加入至酶标板的每个孔内，当观察添加有浓度为 Xng/mL 的标准品的孔变成棕黄色后，酶标板的每个孔加入的终止溶液，待添加有浓度为 Xng/mL 的标准品的孔由黄色变为蓝色时，采用酶标仪 450nm 检测波长检测，550nm-570nm 参考波长比色，制作标准曲线计算样品浓度值。

在一种或多种实施方式中，所述步骤二中，所述酶标板的每个孔中加入 100  $\mu\text{L}$  稀释好的小鼠抗人 CLC 单克隆抗体；每孔中加入清洗液的量为 300  $\mu\text{L}$ ；每孔加入封闭液的量为 250  $\mu\text{L}$ ；

在一种或多种实施方式中，所述步骤三中，取所述标准品，加入标准品稀释液制备得到浓度为 20ng/mL 的标准品，依此倍比稀释浓度为：20ng/mL、10ng/mL、5ng/mL、2.5ng/mL、1.25ng/mL、0.625ng/mL 和 0.312ng/mL 的倍比稀释标准品。

在一种或多种实施方式中，所述标准品稀释液包括含有 1%吐温 20 和 10%牛血清白蛋白的磷酸缓

冲盐溶液；所述封闭液包括含有 2%吐温 20 和 2%牛血清白蛋白的磷酸缓冲盐溶液。

在一种或多种实施方式中，所述步骤六中，取生物素标记的人 CLC 抗体采用标准品稀释液稀释成 5  $\mu\text{g/mL}$  后，取 100  $\mu\text{L}$  加入至酶标板的每个孔内，覆膜且于 37°C 孵育 1 小时，洗板 3 次；

在一种或多种实施方式中，所述步骤七中，采用标准品稀释液稀释成浓度 1.25  $\mu\text{g/mL}$  的抗生物素抗体结合的辣根过氧化物酶后，取 100  $\mu\text{L}$  加入至酶标板的每个孔内，覆膜且于 37°C 孵育 0.5 小时，洗板 5 次；

在一种或多种实施方式中，所述步骤八中，每孔加入 TBM 底物显色液的量为 90  $\mu\text{L}$ ；每孔加入终止溶液的量为 50  $\mu\text{L}$ 。

在一种或多种实施方式中，所述慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型为非嗜酸性粒细胞型慢性鼻窦炎伴鼻息肉或嗜酸性粒细胞型慢性鼻窦炎伴鼻息肉。

本公开的优点和积极效果包括但不限于以下中至少一种。

1、本公开提供一种用于检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型的试剂盒，通过蛋白质组学和转录组学方法筛选采用 CLC 基因作为生物标志物，将其应用到试剂盒中，以实现采用试剂盒进行检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型的方法，使最终获取的试剂盒包括 CLC 基因的特异性引物。在具有该特异性引物的基础上，本公开的试剂盒能够快速对鼻息肉亚型进行鉴别，且相比较传统的病理检测方法准确性更高，此试剂盒可以同时对待样品进行大批量、快速检测，节约了人力成本和就医成本。且系统化试剂盒鉴别准确率较高，可以全面的反应组织病理学特点。解决现有技术中人为误差的影响，避免了组织切片反应了组织局部特征造成误诊的弊端。通过试剂盒进行快速、准确、全面的鼻息肉亚型鉴别对临床诊疗至关重要，以尽早根据鼻息肉的炎症亚型进行针对性治疗，有效指导针对慢性鼻窦炎伴鼻息肉患者的药物治疗方式及手术方式的确定，准确预估药物治疗的反应、判断预后效果。

2、本公开所提供的试剂盒能够通过采用刷取或粘取的方式从鼻息肉的表面获取鼻息肉细胞来进行检测，从而确定患者的慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型，避免了对患者造成创面，提高了患者检查的安全性，且操作更便捷，节约了人力成本和就医成本。

3、本公开提供的检测鼻腔脱落细胞中 CLC 基因表达量的方法，以有效筛选的 CLC 基因作为生物标志物，提供对其基因表达量的检测方法，实现对鼻腔脱落细胞中 CLC 基因表达量的计算，能够有效获取 CLC 基因表达量，提供的方法简单快捷，敏感性高，重复性好，适宜广泛推广应用。

4、本公开提供的检测鼻腔脱落细胞中 CLC 基因表达量的方法，其中 CLC 基因是嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞中表达的溶血磷脂酶。它将溶血磷脂酰胆碱水解为甘油磷酸胆碱和游离脂肪酸。该蛋白可能具有碳水化合物或 IgE 结合活性。它在结构和功能上都与  $\beta$ -半乳糖苷结合蛋白的半乳糖凝集素家族有关。它与炎症和一些髓细胞白血病有关。与 CLC 相关的疾病包括自身炎症，脂肪代谢障碍和皮肤病综合症。其中公开提供的针对鼻腔脱落细胞中 CLC 基因表达量的方法可用于检测鼻腔脱落细胞中 CLC 表达情况。

5、本公开提供的检测鼻腔脱落细胞中 CLC 基因表达量的方法，根据实际需求采用  $\Delta\text{Ct}$  或  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法的相对定量法，选择了表达量相对恒定的内参基因，用内参基因的数量进行标准化，通过测定样品目的基因与内参基因的 Ct 值差异计算目的基因表达量，方法简便快速，检测精度高，可降低检测成本，节约检测时间。结果便于判读等优点。大大提升了实验效率。

6、本公开提供的检测鼻腔脱落细胞中 CLC 基因表达量的方法，为日后针对伴有鼻息肉的慢性鼻窦炎亚型的检测基因筛选技术提供了基础，为临床指导和药物治疗提供了可靠的基础。保证了用于检测伴有鼻息肉的慢性鼻窦炎亚型的试剂盒在临床应用的可行性。在一种或多种实施方式中，通过检测鼻窦炎伴鼻息肉的鼻腔病变组织中的 CLC 蛋白质水平来检测检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型。

7、本发明提供的检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型的 ELISA 试剂盒及其制备方法，采用小鼠抗人 CLC

单克隆抗体，其应用到 ELISA 试剂盒中，以实现检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型的目的，该试剂盒能够快速对鼻息肉亚型进行鉴别，且相比较传统的病理检测方法准确性更高，此 ELISA 试剂盒可以同时对待样品进行大批量、快速检测，节约了人力成本和就医成本。

8、本发明提供一种用于检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型的 ELISA 试剂盒。使用 CLC 蛋白作为标志物检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型具有独特的优势，这是由于蛋白水平能反映最终的表达量，且蛋白水平的检测为基于蛋白水平的药效评估提供了可能性。本发明提供一种用于检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型的 ELISA 试剂盒通过采用小鼠抗人 CLC 单克隆抗体，提高了检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型的准确性，且达到了快速检测的效果。

9、本发明提供一种用于检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型的 ELISA 试剂盒可以全面的反应组织病理学特点，解决现有技术中人为误差的影响，避免了组织切片反应了组织局部特征造成误诊的弊端。通过 ELISA 试剂盒进行快速、准确、全面的鼻息肉亚型鉴别对临床诊疗至关重要，以尽早根据鼻息肉的炎症亚型进行针对性治疗，有效指导针对慢性鼻窦炎伴鼻息肉患者的药物治疗方式及手术方式的确定，准确预估药物治疗的反应、判断预后效果。

在一种或多种实施方式中，通过例如鼻内镜切除获得慢性鼻窦炎伴鼻息肉的鼻腔病变组织样本，通过例如免疫组织化学法测定样本中 CLC 的蛋白质水平。优选地，使用抗 CLC 的抗体测定样本中 CLC 的蛋白质水平。

在一种或多种实施方式中，提供抗 CLC 的抗体用于检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型的用途。

本公开实施方式提供了一种用于检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型的试剂盒，所述试剂盒包括 CLC 基因的特异性引物。

本公开通过蛋白质组学和转录组学方法经大量的创造性实验筛选得到采用 CLC 基因作为生物标志物来制备用于检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型的试剂盒，目前现有的技术中尚未提供相应的任何报道。其中针对 CLC 基因为已知基因，基因 ID 为 1178，其 DNA 序列如 SEQ ID NO:1 所示，基因 NM 号为 001828.5。

在一可选实施方式中，所述 CLC 基因的上游引物如 SEQ ID NO:2 所示，所述 CLC 基因的下游引物如 SEQ ID NO:3 所示。针对本公开试剂盒中所确定的上游引物和下游引物，针对本公开的试剂盒在进行鼻息肉亚型鉴别时，准确性最高，且更加有效，使试剂盒适宜进行大批量、快速检测。

在一可选实施方式中，所述试剂盒进一步还包括内参基因。更为优选的，将所述内参基因为 GAPDH，所述内参基因的上游引物如 SEQ ID NO:4 所示，所述 CLC 基因的下游引物如 SEQ ID NO:5 所示。本公开试剂盒所确定的内参基因上游引物和下游引物，针对本公开的试剂盒在进行鼻息肉亚型鉴别时，能够有效通过显示 CLC 基因与 GAPDH 相比的表达，获取合适的  $\Delta CT$  值，以进行鼻息肉亚型鉴别。且具有较高的准确率。

在一可选实施方式中，所述试剂盒进一步还包括：从鼻息肉组织或从鼻黏膜脱落细胞中提取 RNA 的试剂；将总 RNA 逆转录为 cDNA 的试剂；采用定量聚合酶链反应将 cDNA 中的 CLC 基因和内参基因进行实时荧光定量 PCR 反应的试剂。

更为优选的，所述将总 RNA 逆转录为 cDNA 的试剂包括：逆转录混合液和去 RNA 酶及去 DNA 酶的水；采用定量聚合酶链反应将 cDNA 中的 CLC 基因和内参基因进行实时荧光定量 PCR 反应的试剂包括：PCR 预混合液、双蒸水、机器荧光补偿及矫正剂、CLC 基因的上游引物、CLC 基因的下游引物、内参基因的上游引物和内参基因的下游引物。

另外针对从鼻息肉组织中提取 RNA 的试剂可选择以下两种试剂，第一种包括：RNA 抽提液、氯仿、异丙醇、浓度为 65%~90%的乙醇、去 RNA 酶及去 DNA 酶的水；

另外一种包括：所述从鼻息肉组织中提取 RNA 的试剂包括：细胞裂解液、用于去除吸附有 RNA 的纯化柱的杂质的第一缓冲液、用于去除吸附有 RNA 的纯化柱的杂质和盐分的第二缓冲液和去 RNA 酶

及去 DNA 酶的水；所述从鼻息肉组织中提取 RNA 的工具包括 RNA 纯化柱；其中所述从鼻息肉组织中提取 RNA 的试剂还包括 DNA 酶反应液或所述从鼻息肉组织中提取 RNA 的工具还包括基因组 DNA 吸附柱；所述 DNA 酶反应液包括 DNA 酶缓冲液、重组 DNA 酶和去 RNA 酶的双蒸水。本领域技术人员可根据实际的制备需求进行选择。

具体的，所述将总 RNA 进行逆转录为 cDNA 的试剂包括：1  $\mu$ L~40  $\mu$ L 的逆转录混合液，以及 0  $\mu$ L~160  $\mu$ L 的去 RNA 酶及去 DNA 酶的水。

进一步优选的，所述将总 RNA 逆转录为 cDNA 的试剂包括：2  $\mu$ L 的逆转录混合液，以及 0  $\mu$ L~8  $\mu$ L 的去 RNA 酶及去 DNA 酶的水（根据 RNA 量用水补齐至 8  $\mu$ L）。针对上述限定的数值范围，均能够实现逆转录步骤，且对于本领域技术人员来说能够根据实际需要进行选择。

具体的，采用定量聚合酶链反应将 cDNA 中的 CLC 基因和内参基因进行实时荧光定量 PCR 反应的试剂包括：1  $\mu$ L~25  $\mu$ L 的 PCR 预混合液，0  $\mu$ L~50  $\mu$ L 的双蒸水，0  $\mu$ L~2  $\mu$ L 的机器荧光补偿及矫正剂，0.01~100  $\mu$ M 的 CLC 基因的上游引物，0.01~100  $\mu$ M 的 CLC 基因的下游引物，0.01~100  $\mu$ M 的内参基因的上游引物，0.01~100  $\mu$ M 的内参基因的下游引物；

进一步优选的，采用定量聚合酶链反应将 cDNA 中的 CLC 基因和内参基因进行实时荧光定量 PCR 反应的试剂包括：5  $\mu$ L 的 PCR 预混合液，0  $\mu$ L~10  $\mu$ L 的双蒸水（根据总体积用水补齐至 10  $\mu$ L），0.2  $\mu$ L 的机器荧光补偿及矫正剂，1  $\mu$ M 的 CLC 基因的上游引物，1  $\mu$ M 的 CLC 基因的下游引物，1  $\mu$ M 的内参基因的上游引物，1  $\mu$ M 的内参基因的下游引物。针对上述限定的数值范围，均能够实现定量聚合酶链反应将 cDNA 中的 CLC 基因和内参基因进行实时荧光定量 PCR 扩增的步骤，且对于本领域技术人员来说能够根据实际需要进行选择。

具体的，针对从鼻息肉组织中提取 RNA 的试剂可选择以下两种试剂，第一种包括：包括 0.1 mL~20 mL 的 RNA 抽提液 Trizol 或 RNAiso Blood 或 RNAiso Plus 或其它含有苯酚、异硫氰酸胍、8-羟基喹啉、异硫氰酸胍或  $\beta$ -巯基乙醇的物质，所述 Trizol 或所述 RNAiso Blood 或所述 RNAiso Plus 或所述其它含有苯酚、异硫氰酸胍、8-羟基喹啉、异硫氰酸胍或  $\beta$ -巯基乙醇的物质的体积的 0.1~0.5 倍的氯仿，所述氯仿体积的 0.5~3 倍的异丙醇，所述异丙醇体积的 0.5~5 倍的 65%至 90%的乙醇，以及 0.01 mL 至 5 mL 的去 RNA 酶及去 DNA 酶的水；

另外一种包括：包括 0.1 mL~2mL 的用于裂解细胞和抑制 RNA 降解的细胞裂解液、0.1 mL~0.7 mL 的洗涤用第一缓冲液、0.1 mL~0.7 mL 的洗涤用第二缓冲液、0.01 mL~1 mL 的去 RNA 酶及去 DNA 酶的水、0~10  $\mu$ L 的去基因组 DNA 的重组 DNA 酶、0~10  $\mu$ L 的去基因组 DNA 的 DNA 酶缓冲液、20~100  $\mu$ L 的去 RNA 酶的双蒸水，所述从鼻息肉组织中提取 RNA 的工具包括 RNA 纯化柱；或者包括 0.1 mL~2mL 的用于裂解细胞和抑制 RNA 降解的细胞裂解液、0.1 mL~0.7 mL 的洗涤用第一缓冲液、0.1 mL~0.7 mL 的洗涤用第二缓冲液、0.01 mL~1 mL 的去 RNA 酶及去 DNA 酶的水，所述从鼻息肉组织中提取 RNA 的工具包括基因组 DNA 吸附柱和 RNA 纯化柱。

进一步优选的，针对从鼻息肉组织中提取 RNA 的试剂可选择以下两种试剂，第一种包括：1 mL 的 RNA 抽提液 Trizol 或 RNAiso Blood 或 RNAiso Plus 或其它含有苯酚、异硫氰酸胍、8-羟基喹啉、异硫氰酸胍或  $\beta$ -巯基乙醇的物质，200 $\mu$ L 的氯仿，200 $\mu$ L 的异丙醇，200 $\mu$ L 体积浓度为 65%至 90%的乙醇，以及 0.02 mL 的去 RNA 酶及去 DNA 酶的水；其中 RNA 抽提液为 Trizol、RNAiso Blood 和 RNAiso Plus 的名称均为商品名。

另外一种包括：300 $\mu$ L 的用于裂解细胞和抑制 RNA 降解的细胞裂解液、500 $\mu$ L 的洗涤用第一缓冲液、600 $\mu$ L 的洗涤用第二缓冲液、0.02 mL 的去 RNA 酶及去 DNA 酶的水、4  $\mu$ L 的去基因组 DNA 的重组 DNA 酶、5  $\mu$ L 的去基因组 DNA 的 DNA 酶缓冲液、41  $\mu$ L 的去 RNA 酶的双蒸水，所述从鼻息肉组织中提取 RNA 的工具包括 RNA 纯化柱；或者包括 300  $\mu$ L 的用于裂解细胞和抑制 RNA 降解的细

胞裂解液、500  $\mu$ L 的洗涤用第一缓冲液、600  $\mu$ L 的洗涤用第二缓冲液、0.02 mL 的去 RNA 酶及去 DNA 酶的水，所述从鼻息肉组织中提取 RNA 的工具包括基因组 DNA 吸附柱和 RNA 纯化柱。针对上述限定的数值范围，均能够实现从鼻息肉组织中提取 RNA 的步骤，且对于本领域技术人员来说能够根据实际需要进行选择。

上述中的所述细胞裂解液用于迅速破碎细胞并抑制细胞释放出的核酸酶的物质，第一缓冲液用于去除吸附有 RNA 的纯化柱的杂质，第二缓冲液用于去除吸附有 RNA 的纯化柱的杂质和盐分，去 RNA 酶及去 DNA 酶的水用于溶解 RNA。

另外上述中的从鼻息肉组织中提取 RNA 的试剂；将总 RNA 逆转录为 cDNA 的试剂；采用定量聚合酶链反应将 cDNA 中的 CLC 基因和内参基因进行实时荧光定量 PCR 反应的试剂分别独立包装。

在一可选实施方式中，所述鼻息肉组织为鼻腔病理活检获得的鼻息肉组织，或者所述鼻黏膜脱落细胞为刷取或粘取鼻息肉表面获取的鼻息肉细胞。其中采用刷取或粘取方式，避免了对患者造成创面，提高了患者检查的安全性，且操作更便捷，节约了人力成本和就医成本。

在一可选实施方式中，选用  $\Delta$ Ct (Ct(CLC)-Ct(GAPDH)) 分析法分析扩增产物的数据结果，且与所述  $\Delta$ Ct 进行比较的界定值为 4.85。所限定该界定值，能够使本公开提供的试剂盒在检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型时的准确率达到 80% 以上。

本公开实施方式还提供一种 CLC 基因作为生物标志物在制备用于检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型的产品中的应用。其中的所述产品可以为检测试剂、芯片或试剂盒。虽上述实施方式仅说明了试剂盒的具体技术内容，但对于本领域技术人员来说，在公开本申请的技术方案的基础上，结合公知常识能够直接获取得到检测试剂和芯片产品的具体技术内容。

本公开实施方式提供了一种检测鼻腔脱落细胞中 CLC 基因表达量的方法，包括以下步骤：从鼻腔脱落细胞中提取 RNA，将总 RNA 逆转录为 cDNA，采用定量聚合酶链反应将 cDNA 中的 CLC 基因和内参基因分别采用 CLC 基因的特异性引物和内参基因的特异性引物进行实时荧光定量 PCR 扩增，基于扩增产物的检测结果计算 CLC 基因表达量。

本公开通过蛋白质组学和转录组学方法经大量的创造性实验筛选得到通过计算 CLC 基因表达量来检测伴有鼻息肉的慢性鼻窦炎亚型，且提供的针对 CLC 基因表达量的计算方法简便可靠，准确性高。目前现有的技术中尚未提供相应的任何报道。其中针对 CLC 基因为已知基因，基因 ID 为 1178，其 DNA 序列如 SEQ ID NO:1 所示，基因 NM 号为 001828.5。

在一可选实施方式中，CLC 基因的上游引物如 SEQ ID NO:2 所示，CLC 基因的下游引物如 SEQ ID NO:3 所示。针对 CLC 基因的上游引物和下游引物的设计，敏感性更高，在进行检测 CLC 基因表达量时，使结果更准确，重复性更好。

在一可选实施方式中，所述内参基因为 GAPDH，所述内参基因的上游引物如 SEQ ID NO:4 所示，所述下游引物如 SEQ ID NO:5 所示。针对该处特征的设计，结合上述 CLC 基因的上游引物和 CLC 基因的下游引物，获取合适的  $\Delta$ CT 值，以进行 CLC 基因表达量计算，且具有较高的准确率。

在一可选实施方式中，所述鼻腔脱落细胞采用毛刷于鼻息肉表面获取，且将获取鼻腔脱落细胞后的毛刷置于细胞裂解液中于 4 $^{\circ}$ C 以下保存。本公开的方法基于该种方式避免了对患者造成创面，提高了患者检查的安全性，且操作更便捷，节约了人力成本和就医成本。

在一可选实施方式中，从鼻腔脱落细胞中提取 RNA 的方法，包括两种方法，其中第一种方法包括以下步骤：

步骤 1：将所述鼻腔脱落细胞溶解于 100~2000  $\mu$ L 细胞裂解液中，并加入等体积的乙醇，混合均匀后加入至 RNA 纯化柱中，离心处理后，除去收集管中的滤液，将所述 RNA 纯化柱置于收集管中；

步骤 2：向步骤 1 中获取的所述 RNA 纯化柱中加入 300  $\mu$ L ~700  $\mu$ L 的第一缓冲液，离心处理后，

除去第一滤液；继续向所述 RNA 纯化柱加入 400  $\mu$ L~800  $\mu$ L 第二缓冲液，离心处理后，除去第二滤液，取 RNA 纯化柱经洗脱得到 RNA。

作为优选，所述从鼻腔脱落细胞中提取 RNA 的方法，还包括以下步骤：向除去所述第二滤液后的 RNA 纯化柱中添加 10~100  $\mu$ L DNA 酶反应液，经静置处理后，加入 300  $\mu$ L~700  $\mu$ L 所述第二缓冲液，离心处理后，除去第三滤液，取 RNA 纯化柱经洗脱后采用分光光度计测量 RNA 纯度，得到 RNA；

所述 DNA 酶反应液的制备方法包括以下步骤：取 DNA 酶缓冲液、重组 DNA 酶，去 RNA 酶的双蒸水经混合得到 DNA 酶反应液。优选所述 DNA 酶反应液的制备方法包括以下步骤：取 5  $\mu$ L 10 $\times$  DNA 酶缓冲液、4  $\mu$ L 重组 DNA 酶，41  $\mu$ L 去 RNA 酶的双蒸水经混合得到 DNA 酶反应液。

作为优选，当进行 RNA 提取时基因组含量较低或材料起始量较少时，所述从鼻腔脱落细胞中提取 RNA 的方法，还包括以下步骤：所述步骤 1 中，所述鼻腔脱落细胞溶解于细胞裂解液中后先加入至基因组 DNA 吸附柱中取滤液，再向所述滤液中加入等体积的乙醇。

作为优选，为了获取更高浓度的 RNA，所述从鼻腔脱落细胞中提取 RNA 的方法，还包括以下步骤：取待洗脱的 RNA 纯化柱加入去 RNA 水解酶的蒸馏水或焦碳酸二乙酯处理水，室温静置后，经离心处理、洗脱所述 RNA 纯化柱，采用分光光度计测量 RNA 纯度，得到 RNA。

其中步骤 1 采用细胞裂解液能够迅速破碎鼻腔脱落细胞并抑制鼻腔脱落细胞释放出的核酸酶的物质；采用基因组 DNA 吸附柱用于去除基因组 DNA；步骤 2 中的 RNA 纯化柱用于富集 RNA；其中收集管用于收集去除基因组 DNA 后的溶液，用于去除吸附有 RNA 的纯化柱的杂质的第一缓冲液、用于去除 RNA 溶液中的杂质和盐分的第二缓冲液。

具体的，所述从鼻腔脱落细胞中提取 RNA 的第一种方法，包括以下步骤：

步骤 1：将所述鼻腔脱落细胞溶解于 300  $\mu$ L 细胞裂解液中，并加入等体积的 70%乙醇，使用移液枪将溶液混合均匀；立即将混合液加入至 RNA 纯化柱中，12000 转/分钟，离心 1min，除去滤液，将所述 RNA 纯化柱置于 2mL 收集管中；

步骤 2：向步骤 1 中获取的所述 RNA 纯化柱中加入 500  $\mu$ L 的第一缓冲液，12000 转/分钟，离心 30s，除去第一滤液；继续向所述 RNA 纯化柱加入 600  $\mu$ L 第二缓冲液，12000 转/分钟，离心 30s，除去第二滤液；

步骤 3：取 5  $\mu$ L 10 $\times$  DNA 酶缓冲液、4  $\mu$ L 重组 DNA 酶，41  $\mu$ L 去 RNA 酶的双蒸水经混合得到 DNA 酶反应液，向除去所述第二滤液后的 RNA 纯化柱中添加 50  $\mu$ L DNA 酶反应液，室温静置 15 分钟，加入 350  $\mu$ L 所述第二缓冲液，12000 转/分钟，离心 30s，除去第三滤液；

步骤 4：将步骤 3 中除去第三滤液的 RNA 纯化柱安置于 1.5mL 无 RNA 水解酶收集管，向 RNA 纯化柱加入 50  $\mu$ L 的去 RNA 水解酶的蒸馏水或 0.1%焦碳酸二乙酯处理水，室温静置 5 分钟，12000 转/分钟，离心 2min，洗脱 RNA 纯化柱，采用分光光度计测量 RNA 溶液的 OD260/OD280 比值为 1.7~2.1 时，得到 RNA。

或者所述从鼻腔脱落细胞中提取 RNA 的方法，包括以下步骤：

步骤 1：取基因组 DNA 吸附柱置于 2mL 收集管内，将所述鼻腔脱落细胞溶解于 100~2000  $\mu$ L 细胞裂解液中后加入至基因组 DNA 吸附柱中，取滤液，向所述滤液中加入等体积的 70%乙醇，混合均匀后加入至 RNA 纯化柱中，12000 转/分钟，离心 1min，除去滤液，将所述 RNA 纯化柱置于 2mL 收集管中；

步骤 2：向步骤 1 中获取的所述 RNA 纯化柱中加入 500  $\mu$ L 的第一缓冲液，12000 转/分钟，离心 30s，除去第一滤液；继续向所述 RNA 纯化柱加入 600  $\mu$ L 第二缓冲液，12000 转/分钟，离心 30 s，除去第二滤液；

步骤 3：将步骤 2 中除去第二滤液的 RNA 纯化柱安置于 1.5mL 无 RNA 水解酶收集管，向 RNA 纯化柱加入 50  $\mu$ L 的去 RNA 水解酶的蒸馏水或 0.1%焦碳酸二乙酯处理水，室温静置 5 分钟，12000 转/

分钟，离心 2min，洗脱 RNA 纯化柱，采用分光光度计测量 RNA 溶液的 OD260/OD280 比值为 1.7~2.1 时，得到 RNA。

其中步骤 1 采用细胞裂解液能够迅速破碎鼻腔脱落细胞并抑制鼻腔脱落细胞释放出的核酸酶的物质；步骤 1 采用基因组 DNA 吸附柱用于去除基因组 DNA；步骤 2 中的 RNA 纯化柱用于富集 RNA；其中收集管用于收集去除基因组 DNA 后的溶液，用于去除吸附有 RNA 的纯化柱的杂质的第一缓冲液、用于去除 RNA 溶液中的杂质和盐分的第二缓冲液。

在一可选实施方式中，从鼻腔脱落细胞中提取 RNA 的第二种方法，包括以下步骤：向装有鼻腔脱落细胞的离心管中加入 0.1 mL ~20 mL RNA 抽提液进行溶解、振荡后加入所述 RNA 抽提液体积的 0.1~0.5 倍的氯仿，震荡混匀，室温静置，将所述离心管离心，取上清液，加入所述氯仿体积的 0.5~3 倍的异丙醇，混匀后静置、离心，弃上清，保留第一沉淀，向所述第一沉淀中加入所述异丙醇体积的 0.5~5 倍的浓度 65%~90%的乙醇，经洗涤后混匀、离心，弃上清，保留第二沉淀；盖紧所述离心管，再次离心，除去上清液，继续向所述离心管中加入 0.01 ~5mL 去 RNA 酶及去 DNA 酶的水溶解所述第二沉淀，采用分光光度计测量 RNA 纯度，得到 RNA。

优选所述 RNA 抽提液为 Trizol、RNAiso Blood、RNAiso Plus 或其它含有苯酚、异硫氰酸胍、8-羟基喹啉、异硫氰酸胍和  $\beta$ -巯基乙醇中的任一种或几种的试剂。

在一优选实施方式中，所述从鼻腔脱落细胞中提取 RNA 的第二种方法，包括以下步骤：向装有鼻腔脱落细胞的离心管中加入 0.1~20mL RNA 抽提液进行溶解、振荡后，室温静置 3~7min；加入 40  $\mu$ L~5mL 氯仿，震荡混匀，室温静置 3~7min，于 3 $^{\circ}$ C~5 $^{\circ}$ C，10000~14000r/min 离心 10~20min；取上清液 40  $\mu$ L~8mL，加入等体积的异丙醇，混匀后静置 8~12min，于 3 $^{\circ}$ C~5 $^{\circ}$ C，10000~14000r/min 离心 10~20min 弃上清，保留第一沉淀；向所述第一沉淀中加入与异丙醇等体积的浓度 65%~90%的乙醇，于 3 $^{\circ}$ C~5 $^{\circ}$ C，7000~14000r/min 离心 10~20min，弃上清，保留第二沉淀；盖紧所述离心管，于 3 $^{\circ}$ C~5 $^{\circ}$ C，7000~14000r/min 离心 1~3min，除去上清液，静置 10~20min 后继续向所述离心管中加入 0.01 ~5mL 去 RNA 酶及去 DNA 酶的水溶解所述第二沉淀，采用分光光度计测量 RNA 纯度，得到 RNA。

具体的，从鼻腔脱落细胞中提取 RNA 的第二种方法，包括以下步骤：向装有鼻腔脱落细胞的离心管中加入 1mL RNA 抽提液进行溶解、振荡后，室温静置 5min；加入 200  $\mu$ L 氯仿，震荡混匀，室温静置 5min，于 4 $^{\circ}$ C，12000r/min 离心 15min；取上清液 200  $\mu$ L，加入 200  $\mu$ L 异丙醇，混匀后静置 10min，于 4 $^{\circ}$ C，12000r/min 离心 15min 弃上清，保留第一沉淀；向所述第一沉淀中加入与异丙醇等体积的浓度 75%的乙醇，于 4 $^{\circ}$ C，7500r/min 离心 15min，弃上清，保留第二沉淀；盖紧所述离心管，于 4 $^{\circ}$ C，7500r/min 离心 2min，除去上清液，静置 15min 后继续向所述离心管中加入 50  $\mu$ L 去 RNA 酶及去 DNA 酶的水溶解所述第二沉淀，采用分光光度计测量 RNA 溶液 OD260/OD280 比值为 1.7~2.1，得到 RNA。

作为优选，将总 RNA 逆转录为 cDNA 的方法包括以下步骤：取 1~3  $\mu$ L 的逆转录混合液、0~10  $\mu$ L 的去 RNA 水解酶蒸馏水和提取的 RNA 于 37 $^{\circ}$ C 温度条件下发生反转录反应 15min，后于 84 $^{\circ}$ C 温度条件下发生反转录酶的失活反应，得到逆转录产物 cDNA。

在一可选实施方式中，将总 RNA 逆转录为 cDNA 的方法包括以下步骤：取 2  $\mu$ L 的所述逆转录混合液，8  $\mu$ L 的所述去 RNA 水解酶蒸馏水，以及总量不超过 500ng 或体积不超过 8  $\mu$ L 的总 RNA，所述去 RNA 水解酶蒸馏水补齐至 10  $\mu$ L；轻柔混匀后进行逆转录反应，条件如下：在 37 $^{\circ}$ C 的条件下，进行 15 分钟的反转录反应；在 85 $^{\circ}$ C 的条件下，进行 5 秒的反转录酶的失活反应；产物 4 $^{\circ}$ C 放置。

在一可选实施方式中，所述实时荧光定量 PCR 扩增包括以下步骤：

步骤 1：制备实时荧光定量 PCR 反应液：包括 1  $\mu$ L~25  $\mu$ L 的 PCR 预混合液，0  $\mu$ L~10  $\mu$ L 的双蒸水补齐总体积用水至 10  $\mu$ L，0  $\mu$ L~2  $\mu$ L 的机器荧光补偿及矫正剂，0.01~100  $\mu$ M 的 CLC 基因的上游引物，0.01~100  $\mu$ M 的 CLC 基因的下游引物，0.01~100  $\mu$ M 的内参基因的上游引物，0.01~100  $\mu$ M 的

内参基因的下游引物, 0.01  $\mu\text{L}$ ~5  $\mu\text{L}$  的 cDNA;

步骤 2: 采用两步法 PCR 扩增标准程序或三步法 PCR 扩增标准程序进行实时荧光定量 PCR 检测;

步骤 3: 计算 CLC 基因表达量。

具体的, 制备实时荧光定量 PCR 反应液: 包括 5  $\mu\text{L}$  的 PCR 预混合液, 2.8  $\mu\text{L}$  的双蒸水补齐总体积用水至 10  $\mu\text{L}$ , 0.2  $\mu\text{L}$  的机器荧光补偿及矫正剂, 0.5  $\mu\text{L}$  的 CLC 基因的上游引物, 0.5  $\mu\text{L}$  的 CLC 基因的下游引物, 0.5  $\mu\text{L}$  的内参基因的上游引物, 0.5  $\mu\text{L}$  的内参基因的下游引物, 1ng/ $\mu\text{L}$  的所述 cDNA。

在一可选实施方式中, 所述两步法 PCR 扩增标准程序的反应条件包括以下步骤: 第 1 阶段: 在 95 $^{\circ}\text{C}$  的条件下预变性 30 秒; 第 2 阶段 PCR 反应: 在 95 $^{\circ}\text{C}$  的条件下, 反应 15 秒, 在 60 $^{\circ}\text{C}$  的条件下, 反应 60 秒, 退火延伸, 如此进行 40 个循环;

所述三步法 PCR 扩增标准程序的反应条件包括以下步骤: 第 1 阶段: 在 95 $^{\circ}\text{C}$  的条件下预变性 2 分钟; 第 2 阶段 PCR 反应: 在 95 $^{\circ}\text{C}$  的条件下, 反应 1 分钟, 在 55 $^{\circ}\text{C}$  的条件下, 反应 1 分钟, 在 72 $^{\circ}\text{C}$  的条件下, 反应 1 分钟, 如此进行 40 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ , 7 分钟退火延伸;

计算所述 CLC 基因表达量的方法为: 计算  $\Delta\text{CT}$  或  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  来计算目的基因的表达量; 其中  $\Delta\text{CT} = (\text{CT}(\text{CLC}) - \text{CT}(\text{GAPDH}))$ ,  $-\Delta\Delta\text{CT} = -(\Delta\text{CT}(\text{处理标本 CT}(\text{CLC}) - \text{CT}(\text{GAPDH})) - \text{健康对照组平均}\Delta\text{CT})$ ; 健康对照组平均  $\Delta\text{CT} = \sum$  每个对照组  $\Delta\text{CT}(\text{CT}(\text{CLC}) - \text{CT}(\text{GAPDH})) / \text{对照组样本数}$ 。采用  $\Delta\text{CT}$  法或  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  法的相对定量法, 选择了表达量相对恒定的内参基因, 用内参基因的数量进行标准化, 通过测定样品目的基因与内参基因的 Ct 值差异计算目的基因表达量, 方法简便快速, 检测精度高, 可降低检测成本, 节约检测时间。结果便于判读等优点。大大提升了实验效率。

具体的针对同一受试者 CLC 与内参基因的表达量差异, 内参基因为体内表达较稳定的基因, 通常不会随疾病等变化, 因此与内参基因比较能够反映目标基因与内参基因的相对丰度, 则可采用  $\Delta\text{CT}$  法。针对不同受试者 CLC 与内参基因的表达量差异则可采用  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  法。

一种上述检测鼻腔脱落细胞中 CLC 基因表达量的方法在制备用于检测伴有鼻窦炎的慢性鼻窦炎亚型的试剂盒中的应用。

本发明实施方式提供了一种用于检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型的 ELISA 试剂盒, 包括包被有夏科雷登氏结晶蛋白 CLC 抗体的酶标板。

在一可选实施方式中, 所述包被有夏科雷登氏结晶蛋白 CLC 抗体为小鼠抗人 CLC 单克隆抗体。

在一可选实施方式中, 所述酶标板的每个微孔内所述夏科雷登氏结晶蛋白 CLC 抗体的包被量为 0.1~1  $\mu\text{g}$ 。其中为了进一步提高 ELISA 试剂盒的敏感性, 优选所述酶标板的每个微孔内所述夏科雷登氏结晶蛋白 CLC 抗体的包被量为 0.5  $\mu\text{g}$ 。

在一可选实施方式中, 进一步还包括夏科雷登氏结晶蛋白 CLC 标准品及其标准品稀释液、TMB 底物显色液、检测溶液 A 工作液、检测溶液 B 工作液、终止溶液和洗涤液。优选, 所述标准品为重组 CLC 蛋白, 其中重组 CLC 蛋白为直接实收购买得到, 购买厂商可为 Abcam; 所述标准稀释液包括吐温 20、牛血清白蛋白和磷酸缓冲盐溶液; 所述检测溶液 A 工作液包括采用标准品稀释液稀释成浓度 1~10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的生物素标记的人 CLC 抗体; 所述检测溶液 B 工作液包括采用标准品稀释液稀释成浓度 0.5~5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的抗生物素抗体结合的辣根过氧化物酶; 所述终止溶液为硫酸; 所述洗涤液包括吐温 20 和磷酸缓冲盐溶液。为了进一步使获取的 ELISA 试剂盒, 检测更加灵敏、高效, 检测结果更加准确, 更为优选的, 所述标准稀释液包括含有 1%吐温 20 和 10%牛血清白蛋白的磷酸缓冲盐溶液; 所述检测溶液 A 工作液包括采用标准品稀释液稀释成浓度 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的生物素标记的人 CLC 抗体; 所述检测溶液 B 工作液包括采用标准品稀释液稀释成浓度 1.25/ $\text{mL}$  的抗生物素抗体结合的辣根过氧化物酶; 所述终止溶液为 2N 硫酸; 所述洗涤液包括含有 0.05%吐温 20 的磷酸缓冲盐溶液。

在一可选实施方式中, 包被有夏科雷登氏结晶蛋白 CLC 抗体的酶标板的制备方法, 包括以下步骤:

将小鼠抗人 CLC 单克隆抗体用磷酸缓冲盐溶液稀释，取酶标板，向其加入稀释好的小鼠抗人 CLC 单克隆抗体，4℃过夜弃上清后洗板，每孔加入封闭液，再次弃上清后洗板。

一种上述用于检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型的 ELISA 试剂盒的制备方法，包括以下步骤：

步骤一：制备包被有夏科雷登氏结晶蛋白 CLC 抗体：将小鼠抗人 CLC 单克隆抗体用磷酸缓冲盐溶液稀释；

步骤二：制备包被有夏科雷登氏结晶蛋白 CLC 抗体的酶标板：取酶标板，每孔加入稀释好的小鼠抗人 CLC 单克隆抗体，4℃过夜弃上清后加入洗涤液洗板，每孔加入封闭液，再次弃上清后加入洗涤液洗板；

步骤三：倍比稀释标准品：取标准品，向其加入标准品稀释液，制备得到浓度为 Xng/mL 的标准品，取浓度为 Xng/mL 的标准品进行倍比稀释，依次倍比稀释浓度为：Xng/mL，0.5Xng/mL，0.25Xng/mL，0.625Xng/mL，0.3125Xng/mL，0.15625Xng/mL，0.078125Xng/mL；

步骤四：样品稀释：取出样本至室温，并进行梯度稀释处理；

步骤五：装样：取步骤二制备的包被有夏科雷登氏结晶蛋白 CLC 抗体的酶标板，每孔分别依次加入步骤三的倍比稀释后的标准品和步骤四的稀释后的样品，同时设置添加有标准品稀释液的空白孔，孵育后加入洗涤液洗板；

步骤六：制备检测溶液 A 工作液：取生物素标记的人 CLC 抗体采用标准品稀释液稀释成 1~10 μg/mL 后加入至酶标板的每个孔内，覆膜并孵育后加入洗涤液洗板；

步骤七：制备检测溶液 B 工作液：采用标准品稀释液稀释成浓度 0.5~5 μg/mL 的抗生物素抗体结合的辣根过氧化物酶后加入至酶标板的每个孔内，覆膜并孵育后加入洗涤液洗板；

步骤八：显色：取 TMB 加入同等体积 0.75%双氧水后制备得到 TMB 底物显色液并加入至酶标板的每个孔内，当观察添加有浓度为 Xng/mL 的标准品的孔变成棕黄色后，酶标板的每个孔加入的终止溶液，待添加有浓度为 Xng/mL 的标准品的孔由黄色变为蓝色时，采用酶标仪 450nm 检测波长检测，550nm-570nm 参考波长比色，制作标准曲线计算样品浓度值。

所述步骤二中，所述酶标板的每个孔中加入 100 μL 稀释好的小鼠抗人 CLC 单克隆抗体；每孔中加入清洗液的量为 300 μL；每孔加入封闭液的量为 250 μL；

所述步骤三中，取所述标准品，加入标准品稀释液制备得到浓度为 20ng/mL 的标准品，依此倍比稀释浓度为：20ng/mL、10ng/mL、5ng/mL、2.5ng/mL、1.25ng/mL、0.625ng/mL 和 0.312ng/mL 的倍比稀释标准品。

在一可选实施方式中，所述标准品稀释液包括含有 1%吐温 20 和 10%牛血清白蛋白的磷酸缓冲盐溶液；所述封闭液包括含有 2%吐温 20 和 2%牛血清白蛋白的磷酸缓冲盐溶液。

在一可选实施方式中，所述步骤六中，取生物素标记的人 CLC 抗体采用标准品稀释液稀释成 5 μg/mL 后，取 100 μL 加入至酶标板的每个孔内，覆膜且于 37℃孵育 1 小时，洗板 3 次；

所述步骤七中，采用标准品稀释液稀释成浓度 1.25 μg/mL 的抗生物素抗体结合的辣根过氧化物酶后，取 100 μL 加入至酶标板的每个孔内，覆膜且于 37℃孵育 0.5 小时，洗板 5 次；

所述步骤八中，每孔加入 TMB 底物显色液的量为 90 μL；每孔加入终止溶液的量为 50 μL。

为了更清楚详细地介绍本公开实施方式所提供的一种检测鼻腔脱落细胞中 CLC 基因表达量的方法及应用，以及本公开实施方式所提供的用于检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型的试剂盒及 CLC 基因或蛋白作为生物标志物的应用，下面将结合具体实施例进行描述。

## 实施例

### 实施例 1：

一种用于检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型的试剂盒，包括以下试剂：

从鼻息肉组织中提取 RNA 的试剂：20mL RNA 抽提液 Trizol 或 RNAiso Blood 或 RNAiso Plus 或其它含有苯酚、异硫氰酸胍，8-羟基喹啉、异硫氰酸胍、 $\beta$ -巯基乙醇等物质，能迅速破碎细胞并抑制细胞释放出的核酸酶的物质；2mL 的氯仿；20mL 的异丙醇；40mL 的 65~90%乙醇；5mL 去 RNA 酶及去 DNA 酶的水；

将提取的 RNA 逆转录为 cDNA 的试剂：40 $\mu$ L 的逆转录混合液（含有逆转录所需要的酶、RNA 酶抑制剂、随机的 6 核苷酸引物、多聚胸腺嘧啶、T 重复寡核苷酸、三磷酸脱氧核糖核苷酸混合物、缓冲液等），160 $\mu$ L 去 RNA 酶及去 DNA 酶的水；其中去 RNA 酶及去 DNA 酶的水用于补齐体系、溶解、稀释 RNA；

采用定量聚合酶链反应将 cDNA 中的 CLC 基因和内参基因进行实时荧光定量 PCR 反应的试剂：25 $\mu$ L 预混合液（含有 PCR 所需要的酶和缓冲液）、0~50 $\mu$ L 的双蒸水（根据总体积用水补齐至 50 $\mu$ L），0~2 $\mu$ L 的染料（用于进行机器的荧光补偿及矫正），100 $\mu$ M 的 CLC 基因的上游引物，100 $\mu$ M 的 CLC 基因的下游引物，100 $\mu$ M 的内参基因的上游引物，100 $\mu$ M 的内参基因的下游引物，10 $\mu$ g 阳性对照，10 $\mu$ g 阴性对照，阳性对照是含有 CLC 的质粒，阴性对照是空质粒(质粒载体)。

#### 实施例 2：

一种用于检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型的试剂盒，包括以下试剂：

从鼻息肉组织中提取 RNA 的试剂：1mL RNA 抽提液 Trizol 或 RNAiso Blood 或 RNAiso Plus 或其它含有苯酚、异硫氰酸胍，8-羟基喹啉、异硫氰酸胍、 $\beta$ -巯基乙醇等物质，能迅速破碎细胞并抑制细胞释放出的核酸酶的物质；0.2mL 的氯仿；0.2mL 的异丙醇；0.2mL 的 65~90%乙醇；0.05mL 去 RNA 酶及去 DNA 酶的水；

将提取的 RNA 逆转录为 cDNA 的试剂：2 $\mu$ L 的逆转录混合液（含有逆转录所需要的酶、RNA 酶抑制剂、随机的 6 核苷酸引物、多聚胸腺嘧啶、T 重复寡核苷酸、三磷酸脱氧核糖核苷酸混合物、缓冲液等），7 $\mu$ L 去 RNA 酶及去 DNA 酶的水；其中去 RNA 酶及去 DNA 酶的水用于补齐体系、溶解、稀释 RNA；

采用定量聚合酶链反应将 cDNA 中的 CLC 基因和内参基因进行实时荧光定量 PCR 反应的试剂：5 $\mu$ L 预混合液（含有 PCR 所需要的酶和缓冲液）、0~10 $\mu$ L 的双蒸水（根据总体积用水补齐至 10 $\mu$ L），0~2 $\mu$ L 的染料（用于进行机器的荧光补偿及矫正），50 $\mu$ M 的 CLC 基因的上游引物，50 $\mu$ M 的 CLC 基因的下游引物，50 $\mu$ M 的内参基因的上游引物，50 $\mu$ M 的内参基因的下游引物，5 $\mu$ g 阳性对照，5 $\mu$ g 阴性对照，阳性对照是含有 CLC 的质粒，阴性对照是空质粒(质粒载体)。

#### 实施例 3：

一种用于检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型的试剂盒，包括以下试剂：

从鼻息肉组织中提取 RNA 的试剂：0.1mL RNA 抽提液 Trizol 或 RNAiso Blood 或 RNAiso Plus 或其它含有苯酚、异硫氰酸胍，8-羟基喹啉、异硫氰酸胍、 $\beta$ -巯基乙醇等物质，能迅速破碎细胞并抑制细胞释放出的核酸酶的物质；0.05mL 的氯仿；0.015mL 的异丙醇；0.0075mL 的 65~90%乙醇；0.01mL 去 RNA 酶及去 DNA 酶的水；

将总 RNA 逆转录为 cDNA 的试剂：1 $\mu$ L 的逆转录混合液（含有逆转录所需要的酶、RNA 酶抑制剂、随机的 6 核苷酸引物、多聚胸腺嘧啶、T 重复寡核苷酸、三磷酸脱氧核糖核苷酸混合物、缓冲液等），0~10 $\mu$ L 去 RNA 酶及去 DNA 酶的水；其中去 RNA 酶及去 DNA 酶的水用于补齐体系、溶解、稀释 RNA；

采用定量聚合酶链反应将 cDNA 中的 CLC 基因和内参基因进行实时荧光定量 PCR 反应的试剂：1 $\mu$ L 预混合液（含有 PCR 所需要的酶和缓冲液）、0~10 $\mu$ L 的双蒸水（根据总体积用水补齐至 10 $\mu$ L），0~2 $\mu$ L 的染料（用于进行机器的荧光补偿及矫正），1 $\mu$ M 的 CLC 基因的上游引物，1 $\mu$ M 的 CLC 基因的下游引物，1 $\mu$ M 的内参基因的上游引物，1 $\mu$ M 的内参基因的下游引物，1 $\mu$ g 阳性对照，1 $\mu$ g 阴性对

照，阳性对照是含有 CLC 的质粒，阴性对照是空质粒(质粒载体)。

#### 实施例 4:

一种用于检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型的试剂盒，包括以下试剂和工具：

从鼻息肉组织中提取 RNA 的试剂：100  $\mu$  L 的细胞裂解液(RL 缓冲液加入 50 $\times$ 二硫苏糖醇(DTT))、用于去除基因组 DNA 的基因组 DNA 吸附柱、用于收集去除基因组 DNA 后溶液的收集管、用于富集 RNA 的 RNA 纯化柱、0.1mL 用于去除吸附有 RNA 的纯化柱的杂质的第一缓冲液、0.1mL 用于去除 RNA 溶液中的杂质和盐分的第二缓冲液、用于收集 RNA 的离心管、0.01mL 用于溶解 RNA 的去 RNA 酶及去 DNA 酶的水；

将总 RNA 逆转录为 cDNA 的试剂：1  $\mu$  L 的逆转录混合液（含有逆转录所需要的酶、RNA 酶抑制剂、随机的 6 核苷酸引物、多聚胸腺嘧啶、T 重复寡核苷酸、三磷酸脱氧核糖核苷酸混合物、缓冲液等），0~10  $\mu$  L 去 RNA 酶及去 DNA 酶的水；其中去 RNA 酶及去 DNA 酶的水用于补齐体系、溶解、稀释 RNA；

采用定量聚合酶链反应将 cDNA 中的 CLC 基因和内参基因进行实时荧光定量 PCR 反应的试剂：25  $\mu$  L 预混合液（含有 PCR 所需要的酶和缓冲液）、0~10  $\mu$  L 的双蒸水（根据总体积用水补齐至 10  $\mu$  L），0~2  $\mu$  L 的染料（用于进行机器的荧光补偿及矫正），0.01  $\mu$  M 的 CLC 基因的上游引物，0.01  $\mu$  M 的 CLC 基因的下游引物，0.01  $\mu$  M 的内参基因的上游引物，0.01  $\mu$  M 的内参基因的下游引物，1  $\mu$  g 阳性对照，1  $\mu$  g 阴性对照，阳性对照是含有 CLC 的质粒，阴性对照是空质粒(质粒载体)。

#### 实施例 5:

一种用于检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型的试剂盒，包括以下试剂和工具：

从鼻息肉组织中提取 RNA 的试剂：0.3mL 的细胞裂解液(RL 缓冲液加入 50 $\times$ 二硫苏糖醇(DTT))、用于富集 RNA 的 RNA 纯化柱、0.5mL 用于去除吸附有 RNA 的纯化柱的杂质的第一缓冲液、0.6mL 用于去除 RNA 溶液中的杂质和盐分的第二缓冲液、4  $\mu$  L 的去基因组 DNA 的重组 DNA 酶、5  $\mu$  L 的去基因组 DNA 的 DNA 酶缓冲液、用于收集 RNA 的离心管、0.05mL 用于溶解 RNA 的去 RNA 酶及去 DNA 酶的水；

将总 RNA 逆转录为 cDNA 的试剂：2  $\mu$  L 的逆转录混合液（含有逆转录所需要的酶、RNA 酶抑制剂、随机的 6 核苷酸引物、多聚胸腺嘧啶、T 重复寡核苷酸、三磷酸脱氧核糖核苷酸混合物、缓冲液等），0~10  $\mu$  L 去 RNA 酶及去 DNA 酶的水；其中去 RNA 酶及去 DNA 酶的水用于补齐体系、溶解、稀释 RNA；

采用定量聚合酶链反应将 cDNA 中的 CLC 基因和内参基因进行实时荧光定量 PCR 反应的试剂：5  $\mu$  L 预混合液（含有 PCR 所需要的酶和缓冲液）、0~10  $\mu$  L 的双蒸水（根据总体积用水补齐至 10  $\mu$  L），0~2  $\mu$  L 的染料（用于进行机器的荧光补偿及矫正），10  $\mu$  mol/L 的 CLC 基因的上游引物，10  $\mu$  mol/L 的 CLC 基因的下游引物，10  $\mu$  mol/L 的内参基因的上游引物，10  $\mu$  mol/L 的内参基因的下游引物，1  $\mu$  g 阳性对照，1  $\mu$  g 阴性对照，阳性对照是含有 CLC 的质粒，阴性对照是空质粒(质粒载体)。

#### 实施例 6:

一种用于检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型的试剂盒，包括以下试剂和工具：

从鼻息肉组织中提取 RNA 的试剂：2mL 的细胞裂解液（RL 缓冲液加入 50 $\times$ 二硫苏糖醇(DTT)）、用于去除基因组 DNA 的基因组 DNA 吸附柱、用于收集去除基因组 DNA 后溶液的收集管、用于富集 RNA 的 RNA 纯化柱、0.7mL 用于去除吸附有 RNA 的纯化柱的杂质的第一缓冲液、0.7mL 用于去除 RNA 溶液中的杂质和盐分的第二缓冲液、用于收集 RNA 的离心管、1mL 用于溶解 RNA 的去 RNA 酶及去 DNA 酶的水；

将总 RNA 逆转录为 cDNA 的试剂：2  $\mu$  L 的逆转录混合液（含有逆转录所需要的酶、RNA 酶抑制剂、随机的 6 核苷酸引物、多聚胸腺嘧啶、T 重复寡核苷酸、三磷酸脱氧核糖核苷酸混合物、缓冲液等），0~8  $\mu$  L 去 RNA 酶及去 DNA 酶的水（根据 RNA 量用水补齐至 8  $\mu$  L）；其中去 RNA 酶及去 DNA 酶的

水用于补齐体系、溶解、稀释 RNA;

采用定量聚合酶链反应将 cDNA 中的 CLC 基因和内参基因进行实时荧光定量 PCR 反应的试剂: 5  $\mu$ L 预混合液 (含有 PCR 所需要的酶和缓冲液)、0-10  $\mu$ L 的双蒸水 (根据总体积用水补齐至 10  $\mu$ L), 0~2  $\mu$ L 的染料 (用于进行机器的荧光补偿及矫正), 1  $\mu$ M 的 CLC 基因的上游引物, 1 $\mu$ M 的 CLC 基因的下游引物, 1 $\mu$ M 的内参基因的上游引物, 1 $\mu$ M 的内参基因的下游引物, 1 $\mu$ g 阳性对照, 1  $\mu$ g 阴性对照。

上述实施例 4~6 中, 所用的第一缓冲液 RWA buffer 的生产厂家为 Takara 公司, 货号 9767; 第二缓冲液 RWB buffer 的生产厂家为 Takara 公司, 货号 9767。

本公开实施例 1~6 提供的试剂盒均能够实现慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型的检测, 现提供如下用于检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型的试剂盒的具体效果检测实验:

#### 鼻息肉亚型检测效果实验:

实验例一:

##### 1、实验方法:

###### (1)、样本的收集与处理:

随机选取 78 名 CRSwNP 患者采用生理盐水冲洗鼻腔后, 在鼻内镜下取鼻息肉。将鼻息肉切割成直径约 0.5 厘米的组织, 浸泡于 RNA 稳定和储存溶液 (RNAlater) 中, 4 $^{\circ}$ C 短期保存, 后转移入低于 -20 $^{\circ}$ C 长期保存。

###### (2)、RNA 的提取:

步骤 1: 将浸泡于 RNA 稳定和储存溶液 (RNAlater) 中的组织称重, 称取约 0.01g 重量的组织放于加磁珠的离心管里, 置于液氮中, 匀浆机上进行研磨 (3000r, 5min) (或者手工研磨)。向装有组织细胞的试管中加入 1mL Trizol 进行溶解, 收集到离心管中, 充分振荡, 室温静置 5 分钟; 然后加入上述 RNA 提取试剂组的 200  $\mu$ L 氯仿 (三氯甲烷), 剧烈震荡混匀, 室温静置 5 分钟。

步骤 2: 12, 000 转/分钟, 4 $^{\circ}$ C, 离心 15 分钟。

步骤 3: 取上清液, 实际获得其体积约 200  $\mu$ L, 加入离心管, 加入上述 RNA 提取试剂组的等量 (约 200  $\mu$ L) 异丙醇。混匀后静置 10 分钟, 12000 转/分钟, 4 $^{\circ}$ C, 离心 15 分钟。弃上清, 保留沉淀。

步骤 4: 加入上述 RNA 提取试剂组的 (与异丙醇等量) 约 200  $\mu$ L 的 75%乙醇 (约 150  $\mu$ L 无水乙醇及 50  $\mu$ L 去 DNA 酶及 RNA 酶水的混合物) 清洗沉淀, 混匀。7500 转/分钟, 4 $^{\circ}$ C, 离心 15 分钟。弃上清, 保留沉淀。

步骤 5: 盖紧离心管, 7500 转/分钟, 4 $^{\circ}$ C, 离心 2 分钟。

步骤 6: 开盖, 弃上清, 静置于通风橱 15 分钟。

步骤 7: 加入上述 RNA 提取试剂组的 0.02mL 无 RNA 水解酶和无 DNA 水解酶 (RNase-free 和 DNase-free) 的水溶解沉淀。

步骤 8: 利用分光光度计测量 RNA 浓度, 且 OD260/OD280 比值在 1.7-2.1 之间。

(3)、逆转录制备 cDNA: 在冰上配制逆转录 (RT) 反应液, 具体包括以下试剂: 2  $\mu$ L 的逆转录混合液 (含有逆转录所需要的酶、RNA 酶抑制剂、随机的 6 核苷酸引物、多聚胸腺嘧啶、T 重复寡核苷酸、三磷酸脱氧核糖核苷酸混合物、缓冲液等), 不超过 500ng 或不超过 8  $\mu$ L 的总 RNA、0~8  $\mu$ L 去 RNA 酶及去 DNA 酶的水 (根据 RNA 量用水补齐至 8  $\mu$ L); 取提取的总 RNA 和上述的逆转录反应液加入反应体系中进行逆转录反应得到 cDNA 模板, 其中, 反应体系可按需求相应放大, 10  $\mu$ L 反应体系可最大使用 500ng 的总 RNA;

逆转录反应条件如下:

37 $^{\circ}$ C 15 分钟(反转录反应)

84°C 5 秒(反转录酶的失活反应)

产物 4°C 放置。

(4) 制备实时荧光定量 PCR 反应液: 包括 5  $\mu$ L 预混合液 (含有 PCR 所需要的酶和缓冲液)、0.2  $\mu$ L 的机器荧光补偿及矫正剂、1ng/ $\mu$ L cDNA 或阳性对照或阴性对照、0.5  $\mu$ L CLC 基因的上游引物、0.5  $\mu$ L CLC 基因的下游引物、0.5  $\mu$ L 内参基因的上游引物、0.5  $\mu$ L 内参基因的下游引物和 2.8  $\mu$ L 的双蒸水;

(5)、实时荧光定量 PCR 检测:

反应条件:

第 1 阶段: 预变性: 95°C, 30 秒。

第 2 阶段: PCR 反应: 95°C, 15 秒; 60°C, 1 分钟退火延伸, 共进行 40 个循环; 第 2 阶段中: 熔解曲线: 60°C 逐渐升温至 95°C, 速率为 0.1°C/秒, 采集荧光;

反应结束后确认实时荧光定量 PCR 的扩增曲线如图 1 至图 4 所示, 以及熔解曲线如图 5 至图 8 所示, 读取 CLC 及 GAPDH 的 Ct 值, 选用  $\Delta$ Ct 分析法 (CLC 的 Ct 值减 GAPDH 的 Ct 值) 进行分析, 采用 GAPDH 作为内参基因。

(6)、数据分析:

步骤 1: 实验质控的判断: 阳性对照 Ct 值 < 20 且阴性对照 Ct 值 > 38 视为实验有效, 否则实验无效;

步骤 2: 分型的判断: 目的基因的 Ct 值减内参基因的 Ct 值, 根据 ROC 曲线, CLC 的 Ct 值的最佳界值为 4.85, 若 CLC 的 Ct 值  $\geq$  4.85, 则为嗜酸性粒细胞型慢性鼻窦炎伴鼻息肉; 若 CLC 的 Ct 值 < 4.85, 则为典型的嗜酸性粒细胞型慢性鼻窦炎伴鼻息肉。

2、实验结果: 选取的 78 名患者基于上述提供的试剂盒的鼻息肉亚型检测结果如表 1 所示:

表 1 本公开提供的试剂盒及组织病理方式获取鼻息肉组织的鼻息肉亚型检测结果

受试者编号	$\Delta$ Ct 值	依据界值判断的结果	病理结果
1	11.796	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
2	9.424	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
3	8.938	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
4	12.657	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
5	7.716	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
6	5.984	非嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
7	5.304	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
8	6.250	非嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
9	9.183	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
10	10.656	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
11	5.709	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
12	3.240	嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
13	8.551	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
14	7.608	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
15	5.422	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
16	6.319	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
17	8.374	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
18	9.660	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
19	7.128	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型

20	6.338	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
21	10.267	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
22	8.870	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
23	4.366	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
24	12.984	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
25	6.303	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
26	5.594	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
27	11.126	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
28	2.013	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
29	-1.959	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
30	3.432	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
31	2.356	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
32	1.267	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
33	1.997	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
34	3.439	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
35	0.498	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
36	0.673	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
37	2.939	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
38	-2.961	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
39	6.250	非嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
40	3.145	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
41	-0.024	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
42	5.280	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
43	1.049	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
44	1.907	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
45	1.241	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
46	4.097	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
47	4.422	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
48	4.205	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
49	2.919	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
50	0.897	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
51	6.056	非嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
52	3.149	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
53	-3.759	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
54	3.273	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
55	-0.689	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
56	1.851	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
57	-0.636	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
58	1.596	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型

59	2.558	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
60	-1.691	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
61	3.743	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
62	2.657	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
63	2.355	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
64	5.921	非嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
65	10.016	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
66	3.572	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
67	0.935	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
68	10.461	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
69	-1.213	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
70	7.549	非嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
71	0.155	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
72	0.331	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
73	1.580	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
74	0.531	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
75	7.901	非嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
76	5.550	非嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
77	0.738	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
78	0.642	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型

上述 78 例样本的 ROC 曲线图如图 9 所示，采用本试剂盒对慢性鼻窦炎伴鼻息肉分型的预测，准确率为 88.5%。

#### 实验例二：

##### 1、实验方法：

###### (1)、样本的收集与处理：

随机选取 27 名 CRSwNP 患者用生理盐水冲洗鼻腔后，在鼻内镜下用毛刷（Copan 公司产）于鼻息肉表面按压 30s，旋转 3-4 圈，刷取息肉表面，将毛刷置于裂解液中，4℃短期保存（不超过 24 小时），或转移入低于-20℃长期保存。

###### (2)、RNA 的提取：

步骤 1：向装有脱落细胞的试管中加入 1mL Trizol 进行溶解，充分振荡，室温静置 5 分钟，然后加入 200  $\mu$ L 氯仿（三氯甲烷），剧烈震荡混匀，室温静置 5 分钟；

步骤 2：12,000 转/分钟，4℃，离心 15 分钟；

步骤 3：取上清液，实际获得其体积约 200  $\mu$ L，加入离心管，加入与氯仿等量（约 200  $\mu$ L）的异丙醇。混匀后静置 10 分钟，12000 转/分钟，4℃，离心 15 分钟。弃上清，保留沉淀；

步骤 4：加入上述 RNA 提取试剂组的等量（与异丙醇等量）约 200  $\mu$ L 的 75%乙醇（约 150  $\mu$ L 无水乙醇及 50  $\mu$ L 去 DNA 酶及 RNA 酶水的混合物）清洗沉淀，混匀，7500 转/分钟，4℃，离心 15 分钟，弃上清，保留沉淀；

步骤 5：盖紧离心管，7500 转/分钟，4℃，离心 2 分钟；

步骤 6：开盖，弃上清，静置于通风橱 15 分钟；

步骤 7：加入上述 RNA 提取试剂组的 0.02mL 无 RNA 水解酶和无 DNA 水解酶（RNase-free 和

DNase-free) 的水溶解沉淀;

步骤 8: 利用分光光度计测量 RNA 浓度, OD260/OD280 比值在 1.7~2.1 为好;

(3)、逆转录制备 cDNA: 同实验例一;

(4)、制备实时荧光定量 PCR 反应液: 同实验例一;

(5)、实时荧光定量 PCR 检测: 同实验例一; 反应结束后确认实时荧光定量 PCR 的扩增曲线如图 10 和图 11 所示, 以及熔解曲线如图 11 和图 12 所示;

(6)、数据分析: 目的基因的 Ct 值减内参基因的 Ct 值, 根据前期试验结果, CLC 的 Ct 值的最佳界值为 4.85, 若 CLC 的 Ct 值  $\geq 4.85$ , 则为非嗜酸性粒细胞型慢性鼻窦炎伴鼻息肉; 若 CLC 的 Ct 值  $< 4.85$ , 则为典型的嗜酸性粒细胞型慢性鼻窦炎伴鼻息肉。

2、实验结果: 计算结果如表 2 所示。

表 2 本公开提供的试剂盒采用刷取鼻息肉表面获取鼻黏膜脱落细胞的鼻息肉亚型检测结果

受试者编号	$\Delta Ct$ 值	依据界值判断的病理结果	病理结果
1	12.68	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
2	5.46	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
3	9.42	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
4	8.09	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
5	-4.64	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
6	3.41	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
7	6.48	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
8	9.9	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
9	7.11	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
10	4.28	嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
11	6.31	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
12	3.03	嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
13	7.6	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
14	5.57	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
15	1.69	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
16	5.06	非嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
17	6.39	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
18	0.48	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
19	3.5	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
20	3.84	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
21	5.86	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
22	4.86	非嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
23	7.06	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
24	1.66	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
25	3.31	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
26	6.2	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
27	5.53	非嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型

由表 2 提供的数据结果获取到, 本公开实验例二中的试剂盒对慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型检测的准确

率为 81.5%。

实验例三:

1、试验方法:

(1)、样本的收集与处理:

某患者用生理盐水冲洗鼻腔后,在鼻内镜下用毛刷(Copan 公司产)于鼻息肉表面按压 30s,旋转 3-4 圈,刷取息肉表面,将毛刷置于裂解液中,4℃短期保存(不超过 24 小时),或转移入低于-20℃长期保存。

(2) RNA 的提取:

步骤 1: 将基因组 DNA 吸附柱(基因组 DNA Eraser Spin Column)安放到 2mL 的收集管(Collection Tube)上;

步骤 2: 将含脱落细胞的裂解液(细胞裂解液)转移入到基因组 DNA 吸附柱中;

步骤 3: 12,000 转/分钟,离心 1 分钟;

步骤 4: 弃基因组 DNA 吸附柱,保留 2mL 收集管中的滤液;

步骤 5: 向上述步骤 4 中加入 300  $\mu$ L 的 70%乙醇(此时可能会出现沉淀),使用移液枪将溶液混合均匀;

步骤 6: 立即将混合液(含沉淀)全部转入到 RNA 纯化柱(RNA Spin Column)(含 2mL 收集管)中;

步骤 7: 12,000 转/分钟,离心 1 分钟,弃滤液。将 RNA 纯化柱放回到 2mL 收集管中;

步骤 8: 将 500  $\mu$ L 的第一缓冲液(Buffer RWA)加入至 RNA 纯化柱中,12,000 转/分钟,离心 30 秒钟,弃滤液;

步骤 9: 将 600 $\mu$ L 的第二缓冲液(Buffer RWB)加入至 RNA 纯化柱中,12,000 转/分钟,离心 30 秒钟,弃滤液。

步骤 10: 将 RNA 纯化柱安置于 1.5mL 的无 RNA 水解酶收集管(RNase Free Collection Tube)上,在 RNA 纯化柱膜中央处加入 50 $\mu$ L 的无 RNA 水解酶的蒸馏水(RNase Free dH<sub>2</sub>O)或 0.1%焦碳酸二乙酯(DEPC)处理水,室温静置 5 分钟;

步骤 11: 12,000 转/分钟离心,用去 RNA 酶及去 DNA 酶的水洗脱 RNA 2 分钟;

步骤 12: 利用分光光度计测量 RNA 浓度,OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 比值为 2.0。

(3)、逆转录制备 cDNA: 同实验例一;

(4)、制备实时荧光定量 PCR 反应液:

步骤 1: 配置 SYBR Green 1 预混合液 45  $\mu$ L; 和 ROX:1.8  $\mu$ L, 混匀后分为 3 份,分别为 A.11.7  $\mu$ L; B.11.7  $\mu$ L; C.23.4  $\mu$ L, 分别向 A 中加入 1ng/ $\mu$ L 阳性对照得到 A 溶液, B 中加入 1ng/ $\mu$ L 阴性对照得到 B 溶液, C 中加入 2ng 获得的 cDNA 得到 C 溶液(SYBR Green 1 预混合液和 ROX 均为 Takara 公司产品,货号 RR820A);

步骤 2: 配置 8 组平行孔;

第 1、2 平行孔: A 溶液、CLC 基因的特异性引物、3.8  $\mu$ L 灭菌双蒸水;

第 3、4 平行孔: B 溶液、CLC 基因的特异性引物、3.8  $\mu$ L 灭菌双蒸水;

第 5、6 平行孔: C 溶液、CLC 基因的特异性引物、3.8  $\mu$ L 灭菌双蒸水;

第 7、8 平行孔: C 溶液、GAPDH 基因的特异性引物、3.8  $\mu$ L 灭菌双蒸水;

步骤 3: 采用透明胶膜封板,离心,进行 PCR 操作。

步骤 4: 两步法 PCR 扩增标准程序:

(5)、实时荧光定量 PCR 检测:

反应条件:

第1阶段：预变性：95℃，30秒。

第2阶段：PCR反应：95℃，15秒；60℃，1分钟退火延伸，共进行40个循环。

反应结束后确认实时荧光定量PCR的扩增曲线如图14所示，以及熔解曲线如图15所示，读取CLC及GAPDH的Ct值，选用 $\Delta$ Ct分析法（CLC的Ct值减GAPDH的Ct值）进行分析，采用GAPDH作为内参基因。

（6）、数据分析：同实验例一；

2、实验结果：阳性对照孔平均Ct：16.2；阴性对照孔平均Ct：39.7；样品CLC平均Ct：21.8；样品GAPDH平均Ct：16.4；差异值：21.8-16.4为5.4，大于4.85，为非嗜酸性粒细胞型慢性鼻窦炎伴鼻息肉。

实验例四：

本公开实施例1~6提供的试剂盒均能够实现慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型的检测，现以实施例5为例进行如下用于检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型的试剂盒的效果检测实验：

（1）样本的收集与处理：

某患者用生理盐水冲洗鼻腔后，在鼻内镜下取息肉。将息肉切割成直径约0.5厘米的组织，浸泡于RNA稳定和储存溶液（RNAlater）中，4℃短期保存，后转移入低于-20℃长期保存。

（2）RNA的提取：

步骤1：将浸泡于RNA稳定和储存溶液（RNAlater）中的组织称重，称取约0.01g重量的组织放于加磁珠的离心管里，置于液氮中，匀浆机上进行研磨（3000r，5min）（或者手工研磨）；加入0.3mL细胞裂解液，12,000转/分钟，离心15分钟

步骤2：吸取上清，加入与上清液等体积的70%乙醇（70%无水乙醇及30%DEPC或去RNA酶及DNA酶的水），使用移液枪将溶液混合均匀；

步骤3：立即将混合液（含沉淀）全部转入到RNA纯化柱（含2mL收集管）中；

步骤4：12,000转/分钟，离心1分钟，弃滤液。将RNA纯化放回至2mL收集管中；

步骤5：将500 $\mu$ L的第一缓冲液（Buffer RWA）加入至RNA纯化柱中，12,000转/分钟，离心30秒钟，弃滤液；

步骤6：将600 $\mu$ L的第二缓冲液（Buffer RWB）加入至RNA纯化柱中，12,000转/分钟，离心30秒钟，弃滤液；

步骤7：DNA酶I（DNase I）反应液的配制：取5 $\mu$ L 10 $\times$ DNA酶I缓冲液，4 $\mu$ L重组DNA酶I（Recombinant DNase I，（无RNA酶，5U/ $\mu$ L），41 $\mu$ L无RNA酶的双蒸水到新的1.5mL管（无RNA酶）中，混合均匀；

步骤8：向RNA纯化柱膜中央加入50 $\mu$ L DNase I反应液，室温静置15分钟；

步骤9：向RNA纯化柱膜中央加入350 $\mu$ L的第二缓冲液，12,000转/分钟，离心30秒钟，弃滤液；

步骤10：重复步骤6；

步骤11：将RNA纯化柱重新安置于2mL收集管上，12,000转/分钟，离心2分钟；

步骤12：将RNA纯化柱安置于1.5mL的无RNA水解酶收集管（RNase Free Collection Tube）上，在RNA纯化柱膜中央处加入50 $\mu$ L的无RNA水解酶的蒸馏水（RNase Free dH<sub>2</sub>O）或0.1%焦碳酸二乙酯（DEPC）处理水，室温静置5分钟；

步骤13：12,000转/分钟离心，用去RNA酶及去DNA酶的水洗脱RNA 2分钟；

步骤14：利用分光光度计测量RNA浓度，OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>比值为2.0；

（3）逆转录制备cDNA：同实验例一；

(4) 制备实时荧光定量 PCR 反应液：同实验例三；

(5)、实时荧光定量 PCR 检测：

反应条件采用三步法 PCR 扩增标准程序：

第 1 阶段：预变性：95℃，2 分钟；

第 2 阶段：PCR 反应：95℃，1 分钟；55℃，1 分钟，72℃1 分钟，共进行 40 个循环，最后 72℃，7 分钟退火延伸；

反应结束后确认实时荧光定量 PCR 的扩增曲线如图 16 所示，以及熔解曲线如图 17 所示，读取 CLC 及 GAPDH 的 Ct 值，选用 $\Delta$ Ct 分析法（CLC 的 Ct 值减 GAPDH 的 Ct 值）进行分析，采用 GAPDH 作为内参基因。

(6) 数据分析：同实验例一；

2、实验结果：阳性对照孔平均 Ct：16.7；阴性对照孔平均 Ct：38.4；样品 CLC 平均 Ct：20.3；样品 GAPDH 平均 Ct：19.4；差异值：为 0.9，小于 4.85，为嗜酸性粒细胞型慢性鼻窦炎伴鼻息肉。

综上所述，本公开提供一种用于检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型的试剂盒，筛选采用 CLC 基因作为生物标志物，将其应用到试剂盒中，以实现采用试剂盒进行检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型的方法，通过试剂盒能够快速、准确、全面的针对患者鼻息肉亚型进行准确鉴别，以尽早根据鼻息肉的炎症亚型进行针对性治疗，有效指导针对慢性鼻窦炎伴鼻息肉患者的药物治疗方式及手术方式的确定，准确预估药物治疗的反应、判断预后效果。

#### 实施例 7：

样本的收集与处理：

某患者用生理盐水冲洗鼻腔后，在鼻内镜下用毛刷（Copan 公司产）于鼻息肉表面按压 30s，旋转 3~4 圈，刷取息肉表面，将毛刷置于由裂解液，4℃短期保存（不超过 24 小时），或转移入低于-20℃长期保存。

一种检测鼻腔脱落细胞中 CLC 基因表达量的方法，包括以下步骤：

步骤一：从鼻腔脱落细胞中提取 RNA：

步骤 1：取基因组 DNA 吸附柱置于 2mL 收集管内，将所述鼻腔脱落细胞溶解于 300  $\mu$ L 细胞裂解液中后加入至基因组 DNA 吸附柱中，取滤液，向所述滤液中加入等体积的 70%乙醇，混合均匀后加入至 RNA 纯化柱中，12000 转/分钟，离心 1min，除去滤液，将所述 RNA 纯化柱置于 2mL 收集管中；

步骤 2：向步骤 1 中获取的所述 RNA 纯化柱中加入 500  $\mu$ L 的第一缓冲液，12000 转/分钟，离心 30s，除去第一滤液；继续向所述 RNA 纯化柱加入 600  $\mu$ L 第二缓冲液，12000 转/分钟，离心 30 s，除去第二滤液；

步骤 3：将步骤 2 中除去第二滤液的 RNA 纯化柱安置于 1.5mL 无 RNA 水解酶收集管，向 RNA 纯化柱加入 50  $\mu$ L 的去 RNA 水解酶的蒸馏水或 0.1%焦碳酸二乙酯处理水，室温静置 5 分钟，12000 转/分钟，离心 2min，洗脱 RNA 纯化柱，采用分光光度计测量 RNA 溶液的 OD260/OD280 比值为 2.0，得到 RNA；

步骤二：逆转录制备 cDNA，包括以下步骤：取 2  $\mu$ L 的所述逆转录混合液，0~8  $\mu$ L 的所述去 RNA 水解酶蒸馏水（根据 RNA 量用水补齐至 8  $\mu$ L），以及总量不超过 500ng 或体积不超过 8  $\mu$ L 的总 RNA，所述去 RNA 水解酶蒸馏水补齐至 10  $\mu$ L；轻柔混匀后进行逆转录反应，条件如下：在 37℃的条件下，进行 15 分钟的反转录反应；在 85℃的条件下，进行 5 秒的反转录酶的失活反应；产物 4℃放置。

步骤三：实时荧光定量 PCR 扩增检测，包括以下步骤：

步骤 1：制备实时荧光定量 PCR 反应液：包括 1  $\mu$ L 的 PCR 预混合液，0-10  $\mu$ L 的双蒸水（根据总体积用水补齐至 10  $\mu$ L），0.2  $\mu$ L 的机器荧光补偿及矫正剂，1 $\mu$ M 的 CLC 基因的上游引物，1 $\mu$ M 的 CLC

基因的下游引物, 1 $\mu$ M 的内参基因的上游引物, 1 $\mu$ M 的内参基因的下游引物, 0.01 $\mu$ L 的所述 cDNA, 1  $\mu$ g 的阳性对照, 1  $\mu$ g 的阴性对照, 阳性对照是含有 CLC 的质粒, 阴性对照是空质粒(质粒载体);

步骤 2: 采用两步法 PCR 扩增标准程序: 所述两步法 PCR 扩增标准程序的反应条件包括以下步骤:

第 1 阶段: 在 95 $^{\circ}$ C 的条件下预变性 30 秒; 第 2 阶段 PCR 反应: 在 95 $^{\circ}$ C 的条件下, 反应 15 秒, 在 60 $^{\circ}$ C 的条件下, 反应 60 秒, 退火延伸, 如此进行 40 个循环。

步骤四: 计算所述 CLC 基因表达量:

反应结束后确认实时荧光定量 PCR 的扩增曲线和熔解曲线, 读取 CLC 及 GAPDH 的 Ct 值, 选用  $\Delta$ Ct 分析法 (CLC 的 Ct 值减 GAPDH 的 Ct 值) 进行分析, 采用 GAPDH 作为内参基因; 阳性对照 Ct 值 <20 且阴性对照 Ct 值 >38 视为实验有效, 否则实验无效;

本实施例采用  $\Delta$ CT 方法比较 CLC 与内参基因的表达量差异: 得 CLC 的平均 CT 值为 20.1, GAPDH 的平均 CT 值为 18.9,  $\Delta$ CT 值为 1.2。

### 实施例 8:

样本的收集与处理:

某患者用生理盐水冲洗鼻腔后, 在鼻内镜下用毛刷 (Copan 公司产) 于鼻息肉表面按压 30s, 旋转 3~4 圈, 刷取息肉表面, 将毛刷置于由裂解液, 4 $^{\circ}$ C 短期保存 (不超过 24 小时), 或转移入低于 -20 $^{\circ}$ C 长期保存。

一种检测鼻腔脱落细胞中 CLC 基因表达量的方法, 包括以下步骤:

步骤一: 从鼻腔脱落细胞中提取 RNA:

步骤 1: 取基因组 DNA 吸附柱置于 2mL 收集管内, 将所述鼻腔脱落细胞溶解于 100  $\mu$ L 细胞裂解液中后加入至基因组 DNA 吸附柱中, 于 12000 转/min 的条件下离心 60s, 取滤液, 向所述滤液中加入等体积的 70%乙醇, 混合均匀后加入至 RNA 纯化柱中, 12000 转/分钟, 离心 1min, 除去滤液, 将所述 RNA 纯化柱置于 2mL 收集管中;

步骤 2: 向步骤 1 中获取的所述 RNA 纯化柱中加入 300  $\mu$ L 的第一缓冲液, 12000 转/分钟, 离心 30s, 除去第一滤液; 继续向所述 RNA 纯化柱加入 400  $\mu$ L 第二缓冲液, 12000 转/分钟, 离心 30 s, 除去第二滤液;

步骤 3: 将步骤 2 中除去第二滤液的 RNA 纯化柱安置于 1.5mL 无 RNA 水解酶收集管, 向 RNA 纯化柱加入 50  $\mu$ L 的去 RNA 水解酶的蒸馏水或 0.1%焦碳酸二乙酯处理水, 室温静置 5 分钟, 12000 转/分钟, 离心 2min, 洗脱 RNA 纯化柱, 采用分光光度计测量 RNA 溶液的 OD260/OD280 比值为 2.0, 得到 RNA;

步骤二: 逆转录制备 cDNA, 包括以下步骤: 取 1  $\mu$ L 的所述逆转录混合液, 0~10  $\mu$ L 的所述去 RNA 水解酶蒸馏水, 以及总量不超过 500ng 或体积不超过 8  $\mu$ L 的总 RNA, 所述去 RNA 水解酶蒸馏水补齐至 10  $\mu$ L; 轻柔混匀后进行逆转录反应, 条件如下: 在 37 $^{\circ}$ C 的条件下, 进行 15 分钟的反转录反应; 在 85 $^{\circ}$ C 的条件下, 进行 5 秒的反转录酶的失活反应; 产物 4 $^{\circ}$ C 放置。

步骤三: 实时荧光定量 PCR 扩增检测, 包括以下步骤:

步骤 1: 制备实时荧光定量 PCR 反应液: 包括 25  $\mu$ L 的 PCR 预混合液, 0~10  $\mu$ L 的双蒸水 (根据总体积用水补齐至 10  $\mu$ L), 0~2  $\mu$ L 的染料 (用于进行仪器的荧光补偿及校正), 0.01  $\mu$ M 的 CLC 基因的上游引物, 0.01  $\mu$ M 的 CLC 基因的下游引物, 0.01  $\mu$ M 的内参基因的上游引物, 0.01  $\mu$ M 的内参基因的下游引物, 5 $\mu$ L 的 cDNA, 1  $\mu$ g 阳性对照, 1  $\mu$ g 阴性对照, 阳性对照是含有 CLC 的质粒, 阴性对照是空质粒(质粒载体);

步骤 2: 采用两步法 PCR 扩增标准程序: 所述两步法 PCR 扩增标准程序的反应条件包括以下步骤:

第 1 阶段: 在 95 $^{\circ}$ C 的条件下预变性 30 秒; 第 2 阶段 PCR 反应: 在 95 $^{\circ}$ C 的条件下, 反应 15 秒, 在 60 $^{\circ}$ C

的条件下,反应 60 秒,退火延伸,如此进行 40 个循环。

步骤四:计算所述 CLC 基因表达量:

反应结束后确认实时荧光定量 PCR 的扩增曲线和熔解曲线,读取 CLC 及 GAPDH 的 Ct 值,选用 $\Delta$ Ct 分析法 (CLC 的 Ct 值减 GAPDH 的 Ct 值) 进行分析,采用 GAPDH 作为内参基因;阳性对照 Ct 值 <20 且阴性对照 Ct 值 >38 视为实验有效,否则实验无效;

采用 $\Delta$ CT 方法比较 CLC 与内参基因的表达量差异:得 CLC 的平均 CT 值为 24.5, GAPDH 的平均 CT 值为 18.0,  $\Delta$ CT 值为 6.5。

#### 实施例 9:

样本的收集与处理:

某患者用生理盐水冲洗鼻腔后,在鼻内镜下用毛刷 (Copan 公司产) 于鼻息肉表面按压 30s,旋转 3~4 圈,刷取息肉表面,将毛刷置于由裂解液,4°C 短期保存 (不超过 24 小时),或转移入低于 -20°C 长期保存。

一种检测鼻腔脱落细胞中 CLC 基因表达量的方法,包括以下步骤:

步骤一:从鼻腔脱落细胞中提取 RNA:

步骤 1:取基因组 DNA 吸附柱置于 2mL 收集管内,将所述鼻腔脱落细胞溶解于 2000  $\mu$ L 细胞裂解液中后加入至基因组 DNA 吸附柱中,于 12000 转/min 的条件下离心 60s,取滤液,向所述滤液中加入等体积的 70%乙醇,混合均匀后加入至 RNA 纯化柱中,12000 转/分钟,离心 1min,除去滤液,将所述 RNA 纯化柱置于 2mL 收集管中;

步骤 2:向步骤 1 中获取的所述 RNA 纯化柱中加入 700  $\mu$ L 的第一缓冲液,12000 转/分钟,离心 30s,除去第一滤液;继续向所述 RNA 纯化柱加入 800  $\mu$ L 第二缓冲液,12000 转/分钟,离心 30 s,除去第二滤液;

步骤 3:将步骤 2 中除去第二滤液的 RNA 纯化柱安置于 1.5mL 无 RNA 水解酶收集管,向 RNA 纯化柱加入 50  $\mu$ L 的去 RNA 水解酶的蒸馏水或 0.1%焦碳酸二乙酯处理水,室温静置 5 分钟,12000 转/分钟,离心 2min,洗脱 RNA 纯化柱,采用分光光度计测量 RNA 溶液的 OD260/OD280 比值为 2.0,得到 RNA;

步骤二:逆转录制备 cDNA,包括以下步骤:取 3  $\mu$ L 的所述逆转录混合液,0~8  $\mu$ L 去 RNA 酶及去 DNA 酶的水(根据 RNA 量用水补齐至 8  $\mu$ L),以及总量不超过 500ng 或体积不超过 8  $\mu$ L 的总 RNA,所述去 RNA 水解酶蒸馏水补齐至 10  $\mu$ L;轻柔混匀后进行逆转录反应,条件如下:在 37°C 的条件下,进行 15 分钟的反转录反应;在 85°C 的条件下,进行 5 秒的反转录酶的失活反应;产物 4°C 放置。

步骤三:实时荧光定量 PCR 扩增检测,包括以下步骤:

步骤 1:制备实时荧光定量 PCR 反应液:包括 5  $\mu$ L 预混合液 (含有 PCR 所需要的酶和缓冲液)、0-10  $\mu$ L 的双蒸水(根据总体积用水补齐至 10  $\mu$ L),0~2  $\mu$ L 的染料(用于进行仪器的荧光补偿及校正),1  $\mu$ M 的 CLC 基因的上游引物,1  $\mu$ M 的 CLC 基因的下游引物,1  $\mu$ M 的内参基因的上游引物,1  $\mu$ M 的内参基因的下游引物,2 $\mu$ L 的 cDNA,1  $\mu$ g 阳性对照,1  $\mu$ g 阴性对照;

步骤 2:采用两步法 PCR 扩增标准程序:所述两步法 PCR 扩增标准程序的反应条件包括以下步骤:第 1 阶段:在 95°C 的条件下预变性 30 秒;第 2 阶段 PCR 反应:在 95°C 的条件下,反应 15 秒,在 60°C 的条件下,反应 60 秒,退火延伸,如此进行 40 个循环。

步骤四:计算所述 CLC 基因表达量:

反应结束后确认实时荧光定量 PCR 的扩增曲线和熔解曲线,读取 CLC 及 GAPDH 的 Ct 值,选用 $\Delta$ Ct 分析法 (CLC 的 Ct 值减 GAPDH 的 Ct 值) 进行分析,采用 GAPDH 作为内参基因;阳性对照 Ct 值 <20 且阴性对照 Ct 值 >38 视为实验有效,否则实验无效;

采用 $\Delta$ CT 方法比较 CLC 与内参基因的表达量差异：得 CLC 的平均 CT 值为 24.0，GAPDH 的平均 CT 值为 17.9， $\Delta$ CT 值为 6.1。

本公开上述实施例 7~9 中，优选的所用的第一缓冲液 RWA buffer 的生产厂家为 Takara 公司，货号 9767；第二缓冲液 RWB buffer 的生产厂家为 Takara 公司，货号 9767。但本申请保护范围并局限于上述的第一缓冲液和第二缓冲液。本领域技术人员可根据实际应用需要进行选择。

#### 实施例 10:

样本的收集与处理:

78 例受试者用生理盐水冲洗鼻腔后，在鼻内镜下用毛刷（Copan 公司产）于鼻息肉表面按压 30s，旋转 3-4 圈，刷取息肉表面，将毛刷置于后续所述裂解液中，4℃短期保存（不超过 24 小时），或转移入低于-20℃长期保存。

一种检测鼻腔脱落细胞中 CLC 基因表达量的方法，包括以下步骤:

步骤一：从鼻腔脱落细胞中提取 RNA：向装有鼻腔脱落细胞的离心管中加入 1mLRNA 抽提液进行溶解、振荡后，室温静置 5min；加入 200  $\mu$ L 氯仿，震荡混匀，室温静置 5min，于 4℃，12000r/min 离心 15min；取上清液 200  $\mu$ L，加入 200  $\mu$ L 异丙醇，混匀后静置 10min，于 4℃，12000r/min 离心 15min 弃上清，保留第一沉淀；向所述第一沉淀中加入与异丙醇等体积的浓度 75%的乙醇，于 4℃，7500r/min 离心 15min，弃上清，保留第二沉淀；盖紧所述离心管，于 4℃，7500r/min 离心 2min，除去上清液，静置 15min 后继续向所述离心管中加入 50  $\mu$ L 去 RNA 酶及去 DNA 酶的水溶解所述第二沉淀，采用分光光度计测量 RNA 溶液 OD260/OD280 比值为 1.8，得到 RNA；

步骤二：逆转录制备 cDNA 步骤同实施例 7。

步骤三：实时荧光定量 PCR 扩增检测步骤同实施例 7。

步骤四：计算所述 CLC 基因表达量：

反应结束后确认实时荧光定量 PCR 的扩增曲线和熔解曲线，读取 CLC 及 GAPDH 的 Ct 值，选用 $\Delta$ Ct 分析法（CLC 的 Ct 值减 GAPDH 的 Ct 值）进行分析，采用 GAPDH 作为内参基因；阳性对照 Ct 值 <20 且阴性对照 Ct 值 >38 视为实验有效，否则实验无效；

步骤 1：计算健康对照组平均 $\Delta$ CT：本例中受试者 1~10 为健康对照组，

计算方法如下：平均  $\Delta$ CT ( CT ( CLC ) -CT ( GAPDH ) ) = (5.304+6.364+6.733+4.366+5.709+6.338+5.894+6.25+6.319+5.649) /10=5.8926；

步骤 2：计算受试者相对表达量：

以 5.8926 为基准，求出每个受试者相对表达量（表示本基因在受试者中相对健康对照组平均值的表达高低，数值代表变化倍数，例如 1.5 相当于该受试者的表达量是健康对照组平均值的 1.5 倍），计算结果如表 3 所示。

计算公式为  $2^{-\Delta\Delta CT}$ ， $-\Delta\Delta CT = (\Delta CT (受试者 CT (CLC)) - CT (GAPDH)) - 平均\Delta CT (健康对照组平均\Delta CT)$ 。

表 3 实施例 8 提供的方法的 CLC 基因表达量计算结果

受试者编号	CLC CT 值	GAPDH CT 值	$\Delta$ CT	$-\Delta\Delta$ CT	相对表达量
1	20.375	15.071	5.304	0.5886	1.503787
2	23.814	17.45	6.364	-0.4714	0.721264
3	27.657	20.924	6.733	-0.8404	0.558489
4	21.302	16.936	4.366	1.5266	2.881061
5	26.077	20.368	5.709	0.1836	1.135714
6	26.012	19.675	6.338	-0.4454	0.734381

7	25.427	19.533	5.894	-0.0014	0.99903
8	21.78	15.53	6.25	-0.3574	0.78057
9	23.649	17.331	6.319	-0.4264	0.744116
10	24.379	18.73	5.649	0.2436	1.183943
11	25.604	23.591	2.013	3.8796	14.71892
12	20.439	18.432	2.007	3.8856	14.78026
13	22.36	21.136	1.224	4.6686	25.43248
14	19.517	17.14	2.377	3.5156	11.43671
15	27.462	24.904	2.558	3.3346	10.08822
16	18.775	15.336	3.439	2.4536	5.477813
17	22.414	21.104	1.31	4.5826	23.96073
18	16.848	14.416	2.432	3.4606	11.00891
19	23.833	20.894	2.939	2.9536	7.746797
20	24.432	20.999	3.432	2.4606	5.504456
21	31.152	24.025	7.128	-1.2354	0.424725
22	23.458	17.402	6.056	-0.1634	0.892918
23	29.099	18.832	10.267	-4.3744	0.048214
24	16.035	16.671	-0.636	6.5286	92.32184
25	18.597	19.809	-1.213	7.1056	137.7205
26	27.499	15.703	11.796	-5.9034	0.016707
27	23.573	18.756	4.817	1.0756	2.107598
28	16.562	18.253	-1.691	7.5836	191.8188
29	18.041	14.892	3.149	2.7436	6.697395
30	28.818	19.394	9.424	-3.5314	0.086485
31	17.442	17.213	0.229	5.6636	50.68897
32	20.952	17.679	3.273	2.6196	6.145797
33	36.793	25.744	11.049	-5.1564	0.028039
34	15.513	15.182	0.331	5.5616	47.22896
35	21.829	20.249	1.58	4.3126	19.8711
36	31.087	23.371	7.716	-1.8234	0.282554
37	31.97	21.954	10.016	-4.1234	0.057376
38	32.52	24.971	7.549	-1.6564	0.31723
39	19.499	16.58	2.919	2.9736	7.854939
40	22.037	18.892	3.145	2.7476	6.71599
41	24.859	16.958	7.901	-2.0084	0.248549
42	27.759	15.102	12.657	-6.7644	0.009198
43	17.936	24.94	-7.004	12.8966	7625.414
44	19.112	19.801	-0.689	6.5816	95.77651
45	19.14	17.544	1.596	4.2966	19.65194
46	25.007	20.585	4.422	1.4706	2.771371
47	26.583	22.84	3.743	2.1496	4.437048
48	22.163	17.992	4.171	1.7216	3.29802
49	29.809	24.259	5.55	0.3426	1.26804
50	23.029	18.932	4.097	1.7956	3.471598

51	18.636	17.993	0.643	5.2496	38.04408
52	21.546	18.306	3.24	2.6526	6.287995
53	19.581	19.083	0.498	5.3946	42.0665
54	20.854	19.957	0.898	4.9946	31.88045
55	24.395	20.823	3.572	2.3206	4.995399
56	27.212	19.604	7.608	-1.7154	0.304518
57	20.471	18.483	1.988	3.9046	14.9762
58	20.028	17.371	2.657	3.2356	9.41917
59	18.692	18.704	-0.012	5.9046	59.90481
60	17.932	17.418	0.514	5.3786	41.60255
61	19.107	17.256	1.851	4.0416	16.46807
62	24.549	26.508	-1.959	7.8516	230.9761
63	19.462	17.129	2.333	3.5596	11.79088
64	21.299	20.927	0.372	5.5206	45.90566
65	23.346	22.608	0.738	5.1546	35.61961
66	27.758	19.255	8.503	-2.6104	0.163754
67	31.182	17.487	13.695	-7.8024	0.00448
68	27.61	15.977	11.633	-5.7404	0.018705
69	22.797	17.517	5.28	0.6126	1.529012
70	15.721	18.682	-2.961	8.8536	462.5931
71	27.977	18.213	9.764	-3.8714	0.068327
72	20.641	18.285	2.356	3.5366	11.6044
73	27.168	21.746	5.422	0.4706	1.385686
74	19.402	18.619	0.783	5.1096	34.52573
75	27.649	18.604	9.045	-3.1524	0.112469
76	27.509	16.853	10.656	-4.7634	0.036819
77	19.249	18.401	0.848	5.0446	33.00471
78	18.686	17.984	0.702	5.1906	36.51962

**实施例 11:**

样本的收集与处理:

获取细胞前嘱患者用生理盐水冲洗鼻腔,在鼻内镜下用毛刷(Copan 公司产)于鼻息肉表面按压 30s,旋转 3-4 圈,刷取息肉表面,将毛刷置于裂解液中,4℃短期保存(不超过 24 小时),或转移入低于-20℃长期保存。

一种检测鼻腔脱落细胞中 CLC 基因表达量的方法,包括以下步骤:

步骤一:从鼻腔脱落细胞中提取 RNA 步骤:向装有鼻腔脱落细胞的离心管中加入 20mLRNA 抽提液进行溶解、振荡后,室温静置 7min;加入 10mL 氯仿,震荡混匀,室温静置 7min,于 5℃,14000r/min 离心 20min;取上清液 20mL,加入 20mL 的异丙醇,混匀后静置 12min,于 5℃,14000r/min 离心 20min 弃上清,保留第一沉淀;向所述第一沉淀中加入 40mL 的浓度 90%的乙醇,于 5℃,14000r/min 离心 3min,弃上清,保留第二沉淀;盖紧所述离心管,于 5℃,14000r/min 离心 3min,除去上清液,静置 20min 后继续向所述离心管中加入 5mL 去 RNA 酶及去 DNA 酶的水溶解所述第二沉淀,采用分光光度计测量 RNA 溶液 OD260/OD280 比值为 2.1,得到 RNA;

步骤二:逆转录制备 cDNA 步骤同实施例 7。

步骤三:实时荧光定量 PCR 扩增检测步骤中的制备实时荧光定量 PCR 反应液同实施例 7,针对 PCR

扩增标准程序采用三步法,所述三步法 PCR 扩增标准程序的反应条件包括以下步骤:第 1 阶段:在 95°C 的条件下预变性 2 分钟;第 2 阶段 PCR 反应:在 95°C 的条件下,反应 1 分钟,在 55°C 的条件下,反应 1 分钟,在 72°C 的条件下,反应 1 分钟,如此进行 40 个循环;最后 72°C,7 分钟退火延伸。

步骤四:计算所述 CLC 基因表达量:

反应结束后确认实时荧光定量 PCR 的扩增曲线和熔解曲线,读取 CLC 及 GAPDH 的 Ct 值,选用  $\Delta$  Ct 分析法 (CLC 的 Ct 值减 GAPDH 的 Ct 值) 进行分析,采用 GAPDH 作为内参基因;阳性对照 Ct 值 <20 且阴性对照 Ct 值 >38 视为实验有效,否则实验无效;

阳性对照孔平均 Ct: 16.9; 阴性对照孔平均 Ct: 39.7; 样品 CLC 平均 Ct: 18.8; 样品 GAPDH 平均 Ct: 16.4; 差异值: 18.8-16.4 为 2.4。表示该患者 CLC 表达为 GAPDH 的 0.19 倍 ( $1/2^{2.4}$ )。

### 实施例 12:

样本的收集与处理:

获取细胞前嘱患者用生理盐水冲洗鼻腔,在鼻内镜下用毛刷 (Copan 公司产) 于鼻息肉表面按压 30s, 旋转 3-4 圈,刷取息肉表面,将毛刷置于裂解液中,4°C 短期保存 (不超过 24 小时),或转移入低于 -20°C 长期保存。

一种检测鼻腔脱落细胞中 CLC 基因表达量的方法,包括以下步骤:

步骤一:从鼻腔脱落细胞中提取 RNA 步骤:向装有鼻腔脱落细胞的离心管中加入 0.1mL RNA 抽提液进行溶解、振荡后,室温静置 7min;加入 0.03mL 氯仿,震荡混匀,室温静置 7min,于 5°C, 14000r/min 离心 20min;取上清液 20mL,加入 0.015mL 的异丙醇,混匀后静置 12min,于 5°C, 14000r/min 离心 20min 弃上清,保留第一沉淀;向所述第一沉淀中加入 0.0075mL 的浓度 90% 的乙醇,于 5°C, 14000r/min 离心 3min,弃上清,保留第二沉淀;盖紧所述离心管,于 5°C, 14000r/min 离心 3min,除去上清液,静置 20min 后继续向所述离心管中加入 0.01mL 去 RNA 酶及去 DNA 酶的水溶解所述第二沉淀,采用分光光度计测量 RNA 溶液 OD260/OD280 比值为 2.1,得到 RNA;

步骤二:逆转录制备 cDNA 步骤同实施例 7。

步骤三:实时荧光定量 PCR 扩增检测步骤中的制备实时荧光定量 PCR 反应液同实施例 7,针对 PCR 扩增标准程序采用三步法,所述三步法 PCR 扩增标准程序的反应条件包括以下步骤:第 1 阶段:在 95°C 的条件下预变性 2 分钟;第 2 阶段 PCR 反应:在 95°C 的条件下,反应 1 分钟,在 55°C 的条件下,反应 1 分钟,在 72°C 的条件下,反应 1 分钟,如此进行 40 个循环;最后 72°C,7 分钟退火延伸。

步骤四:计算所述 CLC 基因表达量:

反应结束后确认实时荧光定量 PCR 的扩增曲线和熔解曲线,读取 CLC 及 GAPDH 的 Ct 值,选用  $\Delta$  Ct 分析法 (CLC 的 Ct 值减 GAPDH 的 Ct 值) 进行分析,采用 GAPDH 作为内参基因;阳性对照 Ct 值 <20 且阴性对照 Ct 值 >38 视为实验有效,否则实验无效;

阳性对照孔平均 Ct: 15.9; 阴性对照孔平均 Ct: 38.7; 样品 CLC 平均 Ct: 23.8; 样品 GAPDH 平均 Ct: 16.4; 差异值: 23.8-16.4 为 7.4。表示该患者 CLC 表达为 GAPDH 的 0.006 倍 ( $1/2^{7.4}$ )。

### 实施例 13:

一种用于检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型的 ELISA 试剂盒,包括以下组分:

包被有夏科雷登氏结晶蛋白 CLC 抗体的酶标板,所述包被有夏科雷登氏结晶蛋白 CLC 抗体为小鼠抗人 CLC 单克隆抗体,所述酶标板的每个微孔内所述夏科雷登氏结晶蛋白 CLC 抗体的包被量为 0.5  $\mu$ g;

标准稀释液:含有 1%吐温 20 和 10%牛血清白蛋白的磷酸缓冲盐溶液;

检测溶液 A 工作液:采用标准品稀释液稀释成浓度 5  $\mu$ g/mL 的生物素标记的人 CLC 抗体;

检测溶液 B 工作液:采用标准品稀释液稀释成浓度 1.25/mL 的抗生物素抗体结合的辣根过氧化物酶;

终止溶液:2N 硫酸;

洗涤液：含有 0.05%吐温 20 的磷酸缓冲盐溶液。

#### 实施例 14：

一种上述用于检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型的 ELISA 试剂盒的制备方法，包括以下步骤：

步骤一：制备包被有夏科雷登氏结晶蛋白 CLC 抗体：

步骤 1：动物免疫：取人重组 CLC 蛋白 1:1 加入福氏完全佐剂和福氏不完全佐剂，抗原和佐剂等体积混合在一起，研磨成油包水的乳糜状。

(1) 初次免疫，重组蛋白 50  $\mu$ g/只，加福氏完全佐剂皮下多点注射 1.5 mL，间隔 3 周。

(2) 第二次免疫，剂量途径同上，加福氏不完全佐剂，间隔 3 周。

(3) 第三次免疫，剂量同上，不加佐剂，腹腔注射，7 天后采血测其效价，检测免疫效果，间隔 3 周。

(4) 加强免疫，剂量 50  $\mu$ g，腹腔注射。

(5) 3 天后，取脾融合：

步骤 2：细胞融合：

(1) 饲养细胞的制备

在细胞融合后选择性培养过程中，由于大量骨髓瘤细胞和脾细胞相继死亡，此时单个或少数分散的杂交瘤细胞多半不易存活，通常必须加入其他活细胞使之繁殖，这种被加入的活细胞称为饲养细胞；

小鼠腹腔巨噬细胞的准备：

① 6-10 周龄的 BALB/c 小鼠；

② 浸泡于 75% 的酒精，消毒 3 min，向腹膜用吸管注入 6 mL 培养液，反复冲洗，吸出冲洗液；

③ 放入 10 mL 离心管，1200rpm 离心 5 min；

④ 用 20% 小牛血清的培养液混悬，调整细胞数为  $1 \times 10^5$ /mL. 加入 96 孔板，100  $\mu$ L/孔，放入 37 度孵箱培养；

(2) 骨髓瘤细胞的准备

① 于融合前 48-36 小时，将骨髓瘤细胞扩大培养

② 融合当天，用弯头滴管将细胞从瓶壁轻轻吹下，收集于 50 mL 离心管或融合管内。

③ 1000r/min 离心 5-10 分钟，弃去上清。

④ 加入 30 mL 不完全培养基，离心洗涤一次。然后将细胞重悬浮于 10 mL 不完全培养基，混匀。

⑤ 取骨髓瘤细胞悬液，加 0.4% 台盼蓝染液作活细胞计数后备用。

(3) 脾细胞的准备

取已经免疫的 BALB/c 小鼠，摘除眼球采血，并分离血清作为抗体检测时的阳性对照血清。同时将小鼠，浸泡于 75% 酒精中 5 分钟，于培养皿上取出脾脏置于已盛有 10 mL 不完全培养基的平皿中，洗涤并剥去周围结缔组织，置平皿中不锈钢筛网上，用注射器针芯研磨成细胞悬液后计数，使脾细胞进入平皿中的不完全培养基，用吸管吹打数次，制成单细胞悬液，每只小鼠  $1 \times 10^8$ - $2.5 \times 10^8$  个脾细胞；

(4) 细胞融合

① 将  $1 \times 10^8$  脾细胞与  $1 \times 10^7$  骨髓瘤细胞 SP2/0 混合于一支 50 mL 融合管中，补加不完全培养基至 30 mL，充分混匀；

② 1000r/min 离心 5-10 分钟，将上清尽量吸净；

③ 在手掌上轻击融合管底，使沉淀细胞松散均匀；

④ 用 1 mL 吸管在 30s 内加入预热的 50% PEG(聚乙二醇)1 mL，边加边轻轻搅拌；

⑤ 吸入吸管静置 1 min；

⑥ 加入预热的不完全培养液，终止 PEG 作用，连续每 2 min 内分别加入 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL,

5 mL, 10 mL;

⑦800rpm, 5 分钟; 弃去上清;

⑧加入 5 mL 完全培养基, 轻轻吹吸沉淀细胞, 使其悬浮并混匀, 然后补加完全培养基至 40-50 mL; 分装 96 孔细胞培养板, 每孔 100  $\mu$ L, 然后将培养板置 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养;

⑨ 6 h 后补加选择培养基, 每孔 50  $\mu$ L. 3 天后用选择培养基半换液;

⑩. 经常观察杂交瘤细胞生长情况, 待其长至孔底面积 1/10 以上时吸出上清供抗体检测;

#### (5) 杂交瘤细胞的选择

①抗原用包被液稀释至 10  $\mu$ g/mL;

②以 100  $\mu$ L/孔量加入酶标板孔中, 置 4 $^{\circ}$ C 过夜或 37 $^{\circ}$ C 吸附 2 小时;

③弃去孔内的液体, 同时用洗涤液洗 3 次, 每次 3 分钟, 拍干;

④每孔加 100  $\mu$ L 封闭液 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 小时;

⑤洗涤液洗 3 次;

⑥每孔加 100  $\mu$ L 待检杂交瘤细胞培养上清, 同时设立阳性、阴性对照和空白对照; 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时; 洗涤, 拍干。

⑦加酶标第二抗体, 每孔 100  $\mu$ L, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时, 洗涤, 拍干;

⑧加底物液, 每孔加新鲜配制的底物使用液 100  $\mu$ L, 37 $^{\circ}$ C 20 分钟;

⑨以 2mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应, 在酶联免疫阅读仪上读取 OD 值;

⑩结果判定: 以  $P/N \geq 2.1$ , 或  $P \geq N+3SD$  为阳性。若阴性对照孔无色或接近无色, 阳性对照孔明确显色, 则可直接用肉眼观察结果;

#### (6) 杂交瘤细胞的克隆化(有限稀释法)

①制备小鼠脾细胞为饲养细胞;

②制备待克隆的杂交瘤细胞悬液, 用含 20% 血清的 HT 培养基稀释至每毫升含 5、10 和 20 个细胞 3 种不同的稀释度;

③按每毫升加入  $5 \times 10^4$ - $1 \times 10^5$  细胞的比例, 在上述杂交瘤细胞悬液中分别加入腹腔巨噬细胞;

④每种杂交瘤细胞分装 96 孔板一块, 每孔量为 100  $\mu$ L;

⑤37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养 6 天, 出现肉眼可见的克隆即可检测抗体; 在倒置显微镜下观察, 标出只有单个克隆生长的孔, 取上清作抗体检测;

⑥取抗体检测阳性孔的细胞扩大培养, 并冻存;

步骤 3: 单克隆抗体的 Ig 类与亚类的鉴定:

①以 10  $\mu$ g/mL 浓度的抗原包被酶标板, 50  $\mu$ L/孔, 4 $^{\circ}$ C 过夜;

②洗涤后, 加入待检的单抗样品, 100  $\mu$ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 1 小时; 设阴性、阳性对照孔;

③洗涤后, 加入 HRP (辣根过氧化物酶) 标记的抗小鼠类及亚类 Ig 的抗体试剂, 100  $\mu$ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 避光显色 20 分钟; 用 2mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应后, 根据颜色判断抗体的亚型;

步骤 4: 单克隆抗体的生产及纯化

#### (1) 动物体内生产单抗

①成年 BALB/c 小鼠腹腔接种降植烷或液体石蜡, 每只小鼠 0.3-0.5 mL;

②7-10 天后腹腔接种用 PBS 或无血清培养基稀释的杂交瘤细胞, 每只小鼠  $5 \times 10^5/0.2$  mL;

③间隔 5 天后, 每天观察小鼠腹水产生情况, 如腹部明显膨大, 以手触摸时, 皮肤有紧张感, 即可采集腹水。通常每只小鼠可采 3 mL 腹水;

④将腹水离心 (2000r/min 5 分钟), 除去细胞成分和其他的沉淀物, 收集上清, 测定抗体效价, 分装, -70 $^{\circ}$ C 冻存备用;

## (2) 单克隆抗体的纯化(辛酸-硫酸铵沉淀法)

①腹水 4℃ 12000rpm 离心 15 min, 去除杂质;

②取 1 份腹水加 2 份 0.06mol/L PH5.0 醋酸缓冲液, 按每毫升稀释腹水加 33 μL 辛酸的比例, 室温搅拌下逐滴加入辛酸, 室温混合 30 min;

③ 4℃静置 2 小时, 取出 12000 g 离心 30 分钟, 弃沉淀;

④上清经尼龙筛过滤, 于 50 倍体积的 0.01M PH7.4 PBS 中 4℃透析 6 h;

⑤在透析后的上清中加入等体积饱和硫酸铵溶液;

⑥ 4℃静置 1 h 以上, 10000 g 离心 30 分钟, 弃上清;

⑦沉淀溶于适量 PBS (含 137 mmol/L NaCl, 2.6mol/L KCl, 0.2 mmol/L EDTA) 中, 于 50-100 倍体的 PBS 中透析过夜;

⑧取少量透析后样品适当稀释后, 以紫外分光光度计检测蛋白含量, SDS-PAGE, WB 检测抗体纯度;

步骤二: 制备样品: 血清或血浆 (EDTA 或者肝素抗凝): 1000g 4℃ 15 分钟离心, 取上清, 冻存入-80℃冰箱里, 备用; 其他体液 (组织匀浆, 痰, 鼻腔分泌物, 各种关节腔液等): 1000g 4℃ 15 分钟离心, 取上清, 冻存入-80℃冰箱里, 备用;

步骤三: 制备包被有夏科雷登氏结晶蛋白 CLC 抗体的酶标板: 取 96 孔酶标板, 每孔加入 100μL 稀释好的小鼠抗人 CLC 单克隆抗体, 4℃过夜; 用双蒸水将浓缩的洗液 30 倍稀释制备得到清洗液, 弃上清后每孔加入 300μL 洗涤静置 2 分钟后弃去, 并在吸水纸上排干, 如此再反复 2 次, 每孔加入 250μL 封闭液, 再次弃上清后重复上述洗板步骤; 所述封闭液包括含有 2%吐温 20 和 2%牛血清白蛋白的磷酸缓冲盐溶液;

步骤四: 制备标准品: 取标准品重组 CLC 蛋白干粉放置于室温 30min, 用标准品稀释液 1mL 溶解反复混匀后, 静置 10 分钟, 溶解后的标准品配置为浓度 20ng/mL 的标准品标记为标准品 1, 在分别取 6 个 EP 管标记标准品 2~7, 并均加入 500 μL 标准品稀释液, 然后从标准品 1 管中取出 500 μL 液体加入标准品 2 管中混匀, 再从标准品 2 管中取 500 μL 液体加入到标准品 3 管中, 依此操作至标准品 7 号管, 最终获得得到浓度依此为 20ng/mL、10ng/mL、5ng/mL、2.5ng/mL、1.25ng/mL、0.625ng/mL 和 0.312ng/mL 的倍比稀释标准品;

步骤五: 样品稀释: 取出样本至室温, 将血清或血浆样用标准品稀释液稀释 2 倍后检测;

步骤六: 装样: 取步骤三制备的包被有夏科雷登氏结晶蛋白 CLC 抗体的酶标板, 每孔分别依次加入 100μL 步骤四的倍比稀释后的标准品和步骤五的稀释后的样品, 同时设置添加有标准品稀释液的空白孔, 附上盖子, 37℃孵育 2 小时后重复洗板 3 次;

步骤七: 制备检测溶液 A 工作液: 取生物素标记的人 CLC 抗体采用标准品稀释液稀释成 5 μg/mL 后, 取 100 μL 加入至酶标板的每个孔内, 覆膜且于 37℃孵育 1 小时, 洗板 3 次;

步骤八: 制备检测溶液 B 工作液: 采用标准品稀释液稀释成浓度 1.25 μg/mL 的抗生物素抗体结合的辣根过氧化物酶后, 取 100 μL 加入至酶标板的每个孔内, 覆膜且于 37℃孵育 0.5 小时, 洗板 5 次;

步骤九: 显色: 取 TMB 溶液加入同等体积 0.75%双氧水后制备得到 TBM 底物显色液, 所述酶标板的每个孔内加入 90μLTBM 底物显色液, 室温避光孵育 15-30 分钟, 当观察添加有浓度为 Xng/mL 的标准品的孔变成棕黄色后, 酶标板的每个孔加入 50μL 的终止溶液 2N 硫酸, 待添加有浓度为 Xng/mL 的标准品的孔由黄色变为蓝色时, 采用酶标仪 450nm 检测波长检测, 550nm-570nm 参考波长比色, 用 4-pl 模式制作标准曲线, 计算样品浓度值。

**实施例 15:**

效果检测试验:

试验方法：酶联免疫吸附法（ELISA），每一单元格第一行为原始 OD 值(吸光度值)，第二行为减去空白对照后 OD 值(吸光度值)，第三行为 OD 值对应的实际浓度。如图 18 所示，第 1 列样本为不同浓度标准品，第 2-6 列样本为测试分泌物样本，基于数据能获得每个分泌物的实际样本浓度。

实验结论：如表 4 数据可知，本发明提供的 ELISA 试剂盒可用于检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型，样本 3B（3 为列 B 为行，下同），6B，3C，3D，4D，6D，3E，5E，3F，5F，6F，3G，4G，5G，6G，3H，4H，5H 中未检测到 CLC，考虑为无嗜酸性粒细胞浸润的鼻息肉，其它样本均有不同程度的嗜酸性粒细胞浸润，依据四分位数区间（25%，50%，75%的置信区间分别为 0，0.09，2.2），样本 2A，4A，6A，2B，2C，5C，6C，5D，4E 的浓度均高于 75%置信区间，为高嗜酸性粒细胞浸润的鼻息肉，其它样本为低嗜酸性粒细胞浸润的鼻息肉。

其中表 4 数据获取的标准曲线如图 18 所示，由图 18 可知本实验的可靠性， $R^2$  值大于 0.95 即为试验通过，该次结果为 0.998，结果表明 ELISA 试剂盒能通过 OD 值很准确反映稀释倍数。采用方法为酶联免疫吸附法（ELISA）。

表 4 效果检测实验结果

	1	2	3	4	5	6
A	OVRFLW	3.837	1.055	3.731	1.211	2.547
		3.716	0.933	3.609	1.089	2.426
		9.931	1.183	8.724	1.367	3.443
B	3.169	3.054	0.179	1.255	1.027	0.18
	3.047	2.932	0.057	1.133	0.905	0.058
	5.257	4.83	<0.000	1.42	1.149	<0.000
C	2.24	1.847	0.118	0.243	2.663	2.211
	2.119	1.726	-0.003	0.121	2.541	2.089
	2.835	2.201	<0.000	0.093	3.709	2.784
D	1.098	1.073	0.113	0.201	3.965	0.111
	0.976	0.951	-0.009	0.08	3.843	-0.011
	1.233	1.204	<0.000	<0.000	>10.492	<0.000
E	0.603	0.622	0.199	2.289	0.165	0.226
	0.481	0.5	0.077	2.167	0.043	0.104
	0.647	0.671	<0.000	2.924	<0.000	0.033
F	0.359	0.409	0.092	0.301	0.118	0.187
	0.237	0.287	-0.03	0.179	-0.004	0.066
	0.316	0.392	<0.000	0.218	<0.000	<0.000
G	0.229	0.241	0.117	0.138	0.127	0.158
	0.107	0.12	-0.005	0.016	0.005	0.036
	0.048	0.088	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000
H	0.118	0.125	0.117	0.108	0.135	0.301
	-0.003	0.004	-0.004	-0.014	0.013	0.179
	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	0.219

#### 工业实用性：

本公开提供一种用于检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型的试剂盒，通过蛋白质组学和转录组学方法筛选采用 CLC 基因作为生物标志物，将其应用到试剂盒中，以实现采用试剂盒进行检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型的方法，使最终获取的试剂盒包括 CLC 基因的特异性引物。在具有该特异性引物的基础上，本

公开的试剂盒能够快速对鼻息肉亚型进行鉴别，且相比较传统的病理检测方法准确性更高，此试剂盒可以同时样品进行大批量、快速检测，节约了人力成本和就医成本。且系统化试剂盒鉴别准确率较高，可以全面的反应组织病理学特点。解决现有技术中人为误差的影响，避免了组织切片反应了组织局部特征造成误诊的弊端。通过试剂盒进行快速、准确、全面的鼻息肉亚型鉴别对临床诊疗至关重要，以尽早根据鼻息肉的炎症亚型进行针对性治疗，有效指导针对慢性鼻窦炎伴鼻息肉患者的药物治疗方式及手术方式的确定，准确预估药物治疗的反应、判断预后效果。

本公开所提供的试剂盒能够通过采用刷取或粘取的方式从鼻息肉的表面获取鼻息肉细胞来进行检测，从而确定患者的慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型，避免了对患者造成创面，提高了患者检查的安全性，且操作更便捷，节约了人力成本和就医成本。

本公开提供的检测鼻腔脱落细胞中 CLC 基因表达量的方法，以有效筛选的 CLC 基因作为生物标志物，提供对其基因表达量的检测方法，实现对鼻腔脱落细胞中 CLC 基因表达量的计算，能够有效获取 CLC 基因表达量，提供的方法简单快捷，敏感性高，重复性好，适宜广泛推广应用。

本公开提供的检测鼻腔脱落细胞中 CLC 基因表达量的方法，其中 CLC 基因是嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞中表达的溶血磷脂酶。它将溶血磷脂酰胆碱水解为甘油磷酸胆碱和游离脂肪酸。该蛋白可能具有碳水化合物或 IgE 结合活性。它在结构和功能上都与  $\beta$ -半乳糖苷结合蛋白的半乳糖凝集素家族有关。它与炎症和一些髓细胞白血病有关。与 CLC 相关的疾病包括自身炎症，脂肪代谢障碍和皮肤病综合症。其中公开提供的针对鼻腔脱落细胞中 CLC 基因表达量的方法可用于检测鼻腔脱落细胞中 CLC 表达情况。

本公开提供的检测鼻腔脱落细胞中 CLC 基因表达量的方法，根据实际需求采用  $\Delta Ct$  或  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法的相对定量法，选择了表达量相对恒定的内参基因，用内参基因的数量进行标准化，通过测定样品目的基因与内参基因的 Ct 值差异计算目的基因表达量，方法简便快速，检测精度高，可降低检测成本，节约检测时间。结果便于判读等优点。大大提升了实验效率。

本公开提供的检测鼻腔脱落细胞中 CLC 基因表达量的方法，为日后针对伴有鼻息肉的慢性鼻窦炎亚型的检测基因筛选技术提供了基础，为临床指导和药物治疗提供了可靠的基础。保证了用于检测伴有鼻息肉的慢性鼻窦炎亚型的试剂盒在临床应用的可行性。

## 权利要求书

1. 一种用于检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型的试剂盒,其中,所述试剂盒包括 CLC 基因的特异性引物。
2. 根据权利要求 1 所述的用于检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型的试剂盒,其中,所述 CLC 基因的上游引物如 SEQ ID NO:2 所示,所述 CLC 基因的下游引物如 SEQ ID NO:3 所示。
3. 根据权利要求 1 或 2 任一项所述的用于检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型的试剂盒,其中,所述试剂盒进一步包括内参基因的特异性引物。
4. 根据权利要求 3 所述的用于检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型的试剂盒,其中,所述内参基因为 GAPDH,所述 GAPDH 的上游引物如 SEQ ID NO:4 所示,所述 GAPDH 的下游引物如 SEQ ID NO:5 所示。
5. 根据前述任一项权利要求所述的用于检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型的试剂盒,其中,所述试剂盒进一步还包括:从鼻息肉组织或从鼻黏膜脱落细胞中提取 RNA 的试剂;将总 RNA 逆转录为 cDNA 的试剂;采用定量聚合酶链反应将 cDNA 中的 CLC 基因和内参基因进行实时荧光定量 PCR 反应的试剂。
6. 根据权利要求 5 所述的用于检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型的试剂盒,其中,

所述将总 RNA 逆转录为 cDNA 的试剂包括:逆转录混合液和去 RNA 酶及去 DNA 酶的水;

采用定量聚合酶链反应将 cDNA 中的 CLC 基因和内参基因进行实时荧光定量 PCR 反应的试剂包括:PCR 预混合液、双蒸水、机器荧光补偿及矫正剂、CLC 基因的上游引物、CLC 基因的下游引物、内参基因的上游引物和内参基因的下游引物。
7. 一种检测鼻腔脱落细胞中 CLC 基因表达量的方法,包括以下步骤:从鼻腔脱落细胞中提取 RNA,将总 RNA 逆转录为 cDNA,采用定量聚合酶链反应将 cDNA 中的 CLC 基因和内参基因分别采用 CLC 基因的特异性引物和内参基因的特异性引物进行实时荧光定量 PCR 扩增,以及

基于扩增产物的检测结果计算 CLC 基因表达量。
8. 根据权利要求 7 所述的检测鼻腔脱落细胞中 CLC 基因表达量的方法,其中,CLC 基因的上游引物如 SEQ ID NO:2 所示,CLC 基因的下游引物如 SEQ ID NO:3 所示;

所述内参基因为 GAPDH,所述内参基因的上游引物如 SEQ ID NO:4 所示,所述下游引物如 SEQ ID NO:5 所示。
9. 一种用于检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型的 ELISA 试剂盒,其特征在于:包括包被有夏科雷登氏结晶蛋白 CLC 抗体的酶标板。
10. 根据权利要求 9 所述的用于检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型的 ELISA 试剂盒,其特征在于:所述包被有夏科雷登氏结晶蛋白 CLC 抗体为小鼠抗人 CLC 单克隆抗体。
11. 根据权利要求 1-6 中任一项所述的试剂盒或根据权利要求 10 或 11 所述的 ELISA 试剂盒用于检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型中的用途。

12. 检测 CLC 的试剂用于检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型的用途。
13. 根据权利要求 12 所述的用途，其中，所述检测 CLC 的试剂包括 CLC 基因的特异性引物，例如所述 CLC 基因的特异性引物的上游引物如 SEQ ID NO:2 所示，所述 CLC 基因的下游引物如 SEQ ID NO:3 所示。
14. 根据权利要求 12 所述的用途，其中，检测 CLC 的试剂选自由针对 CLC 的引物、抗体、适配体、探针或其组合组成的组。
15. CLC 基因或 CLC 蛋白作为生物标志物在检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型中的用途。
16. 一种检测伴有鼻息肉的慢性鼻窦炎亚型方法，包括检测检测鼻腔脱落细胞中的 CLC 基因表达量，例如使用权利要求 1-6 中任一项所述的试剂盒或根据权利要求 9 或 10 所述的 ELISA 试剂盒检测所述腔脱落细胞中的 CLC 基因表达量。
17. 根据权利要求 1-6 中任一项所述的试剂盒或权利要求 11-15 中任一项所述的用途，其中，通过荧光 PCR 检测鼻腔脱落细胞中 CLC 基因表达量。
18. 根据权利要求 17 所述的试剂盒或用途，其中，根据  $\Delta Ct$  ( $Ct (CLC) - Ct (GAPDH)$ ) 确定慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型， $Ct (CLC)$  为 CLC 基因的 Ct 值， $Ct (GAPDH)$  为内参基因 GAPDH 的 Ct 值。
19. 根据权利要求 18 所述的试剂盒或用途，其中，所述  $\Delta Ct$  大于或等于 4.85 代表非嗜酸性粒细胞型慢性鼻窦炎伴鼻息肉，而  $\Delta Ct$  小于 4.85 代表嗜酸性粒细胞型慢性鼻窦炎伴鼻息肉。
20. 根据权利要求 1-6 中任一项所述的试剂盒、根据权利要求 9 或 10 所述的 ELISA 试剂盒或根据权利要求 11-15 中任一项所述的用途，其中，所述慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型为非嗜酸性粒细胞型慢性鼻窦炎伴鼻息肉或嗜酸性粒细胞型慢性鼻窦炎伴鼻息肉。

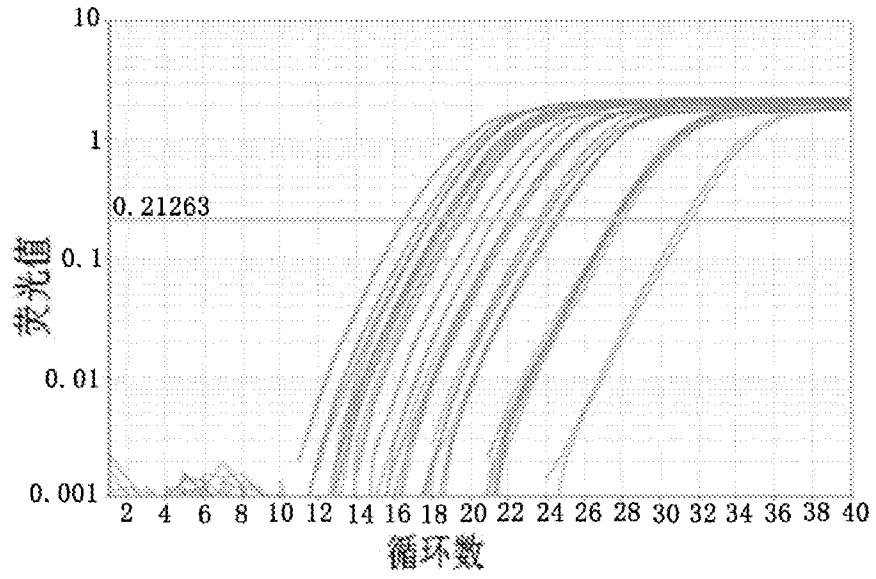


图 1

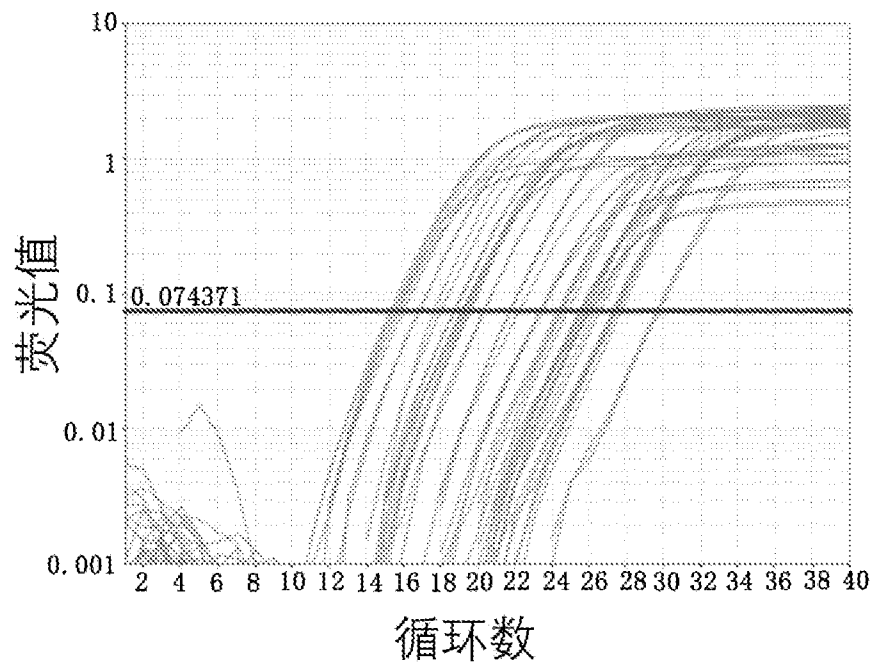


图 2

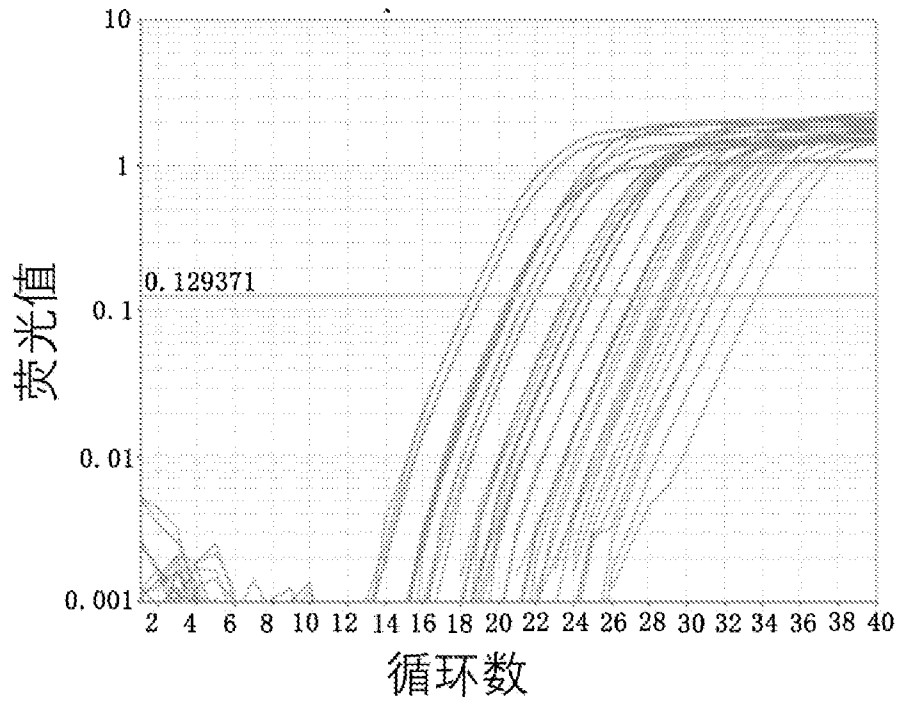


图 3

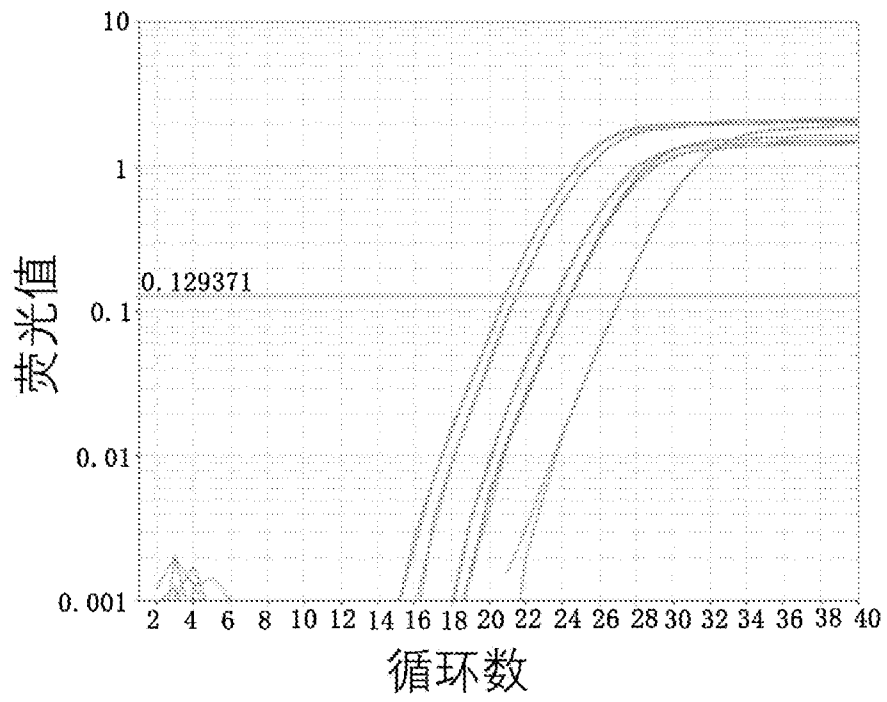


图 4

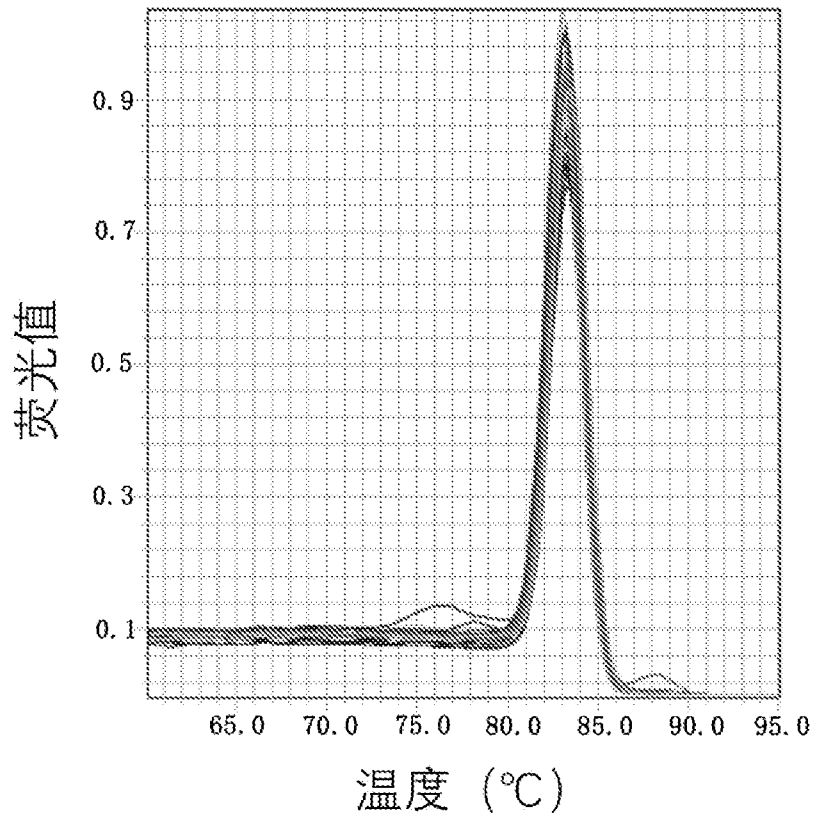


图 5

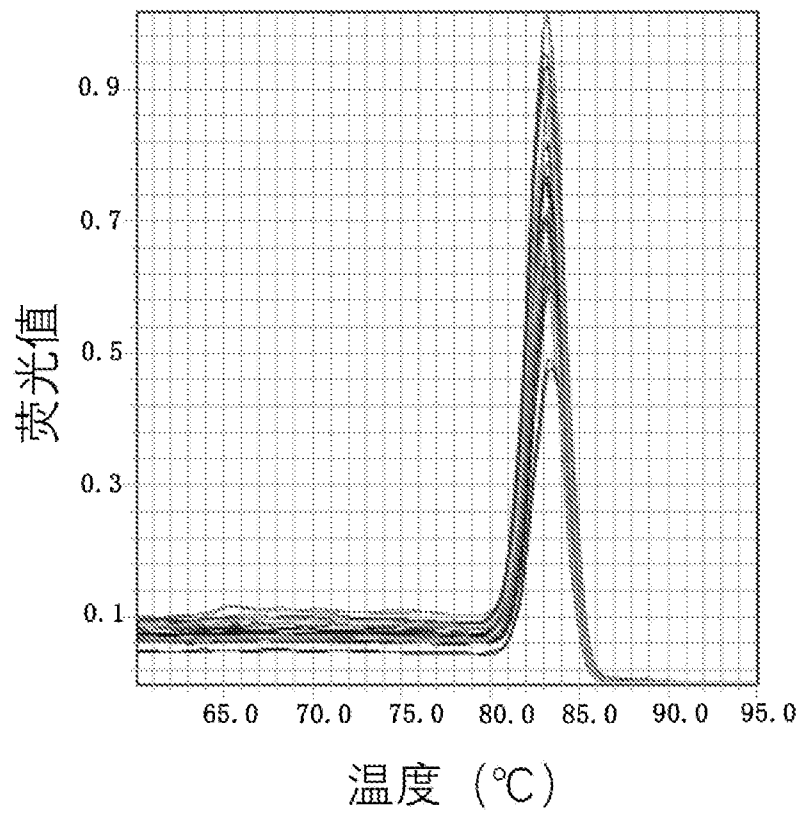


图 6

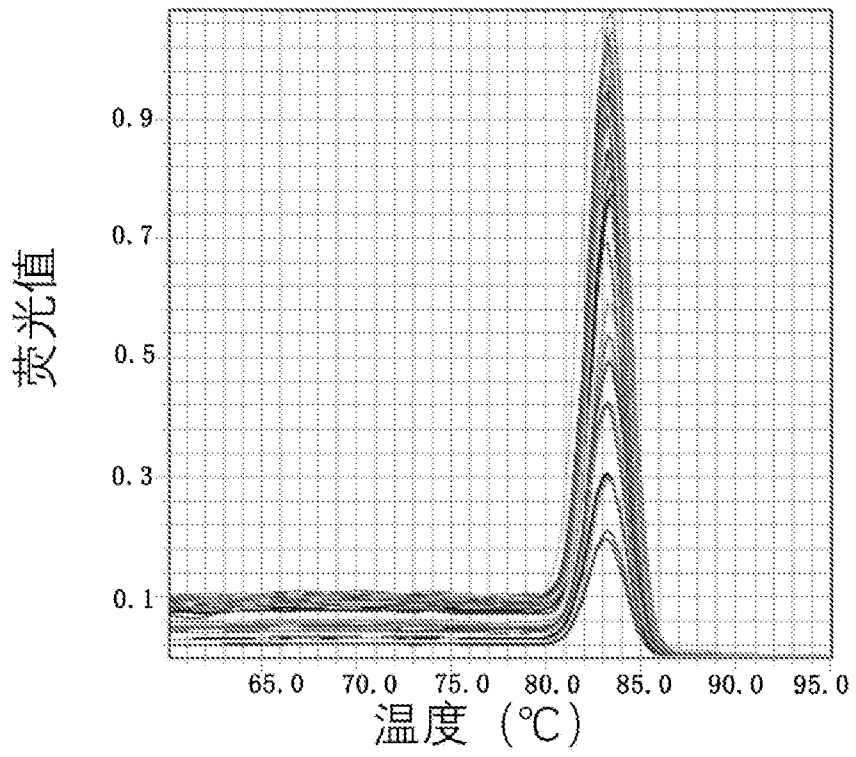


图 7

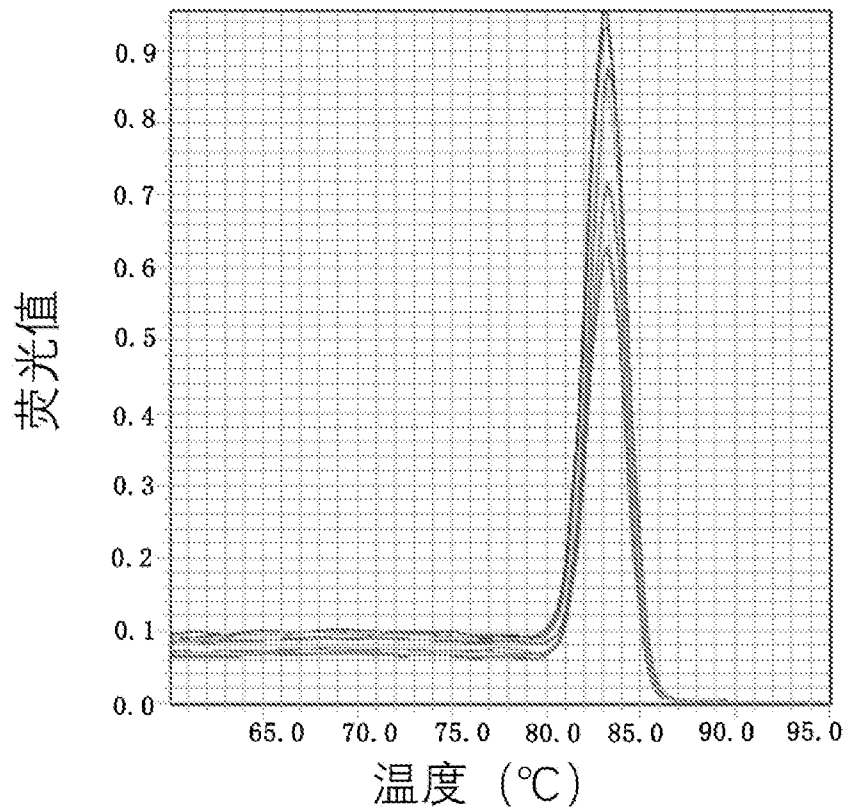


图 8

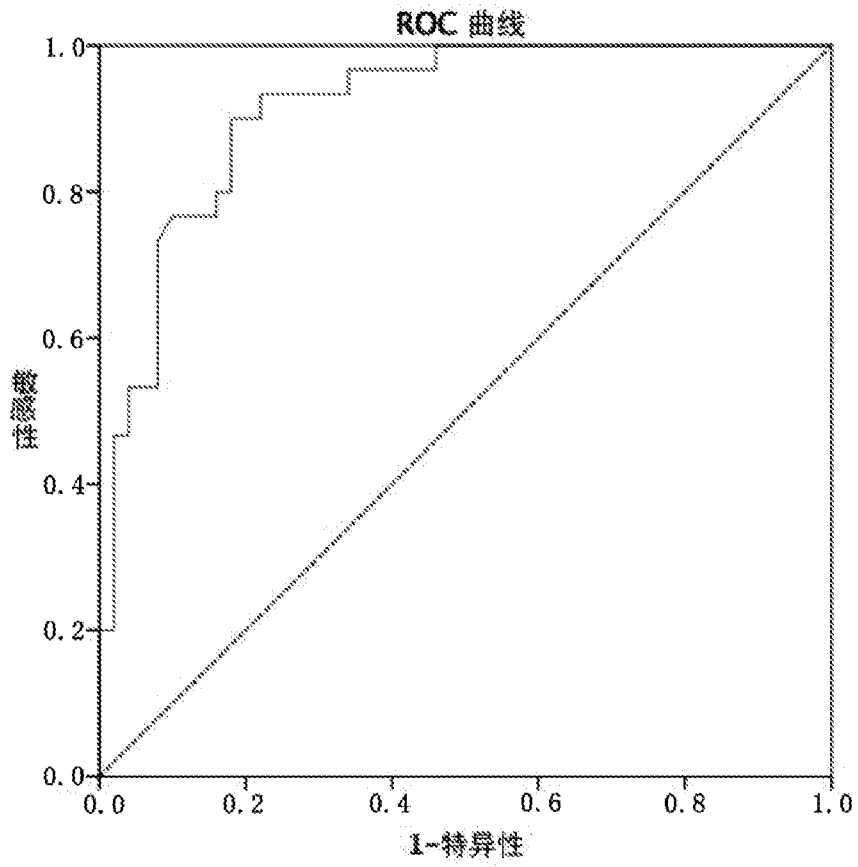


图 9

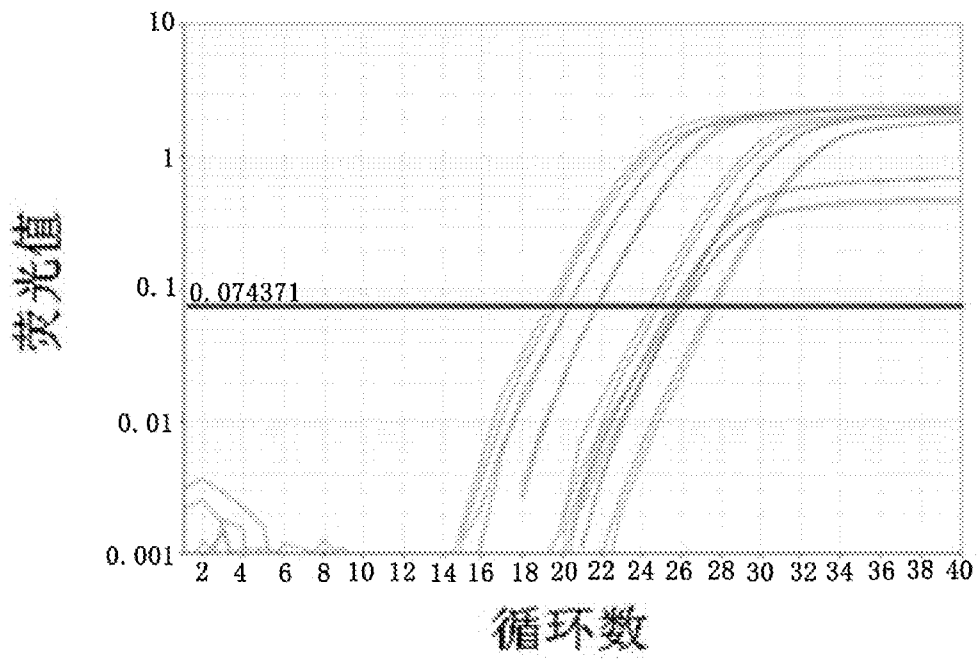


图 10

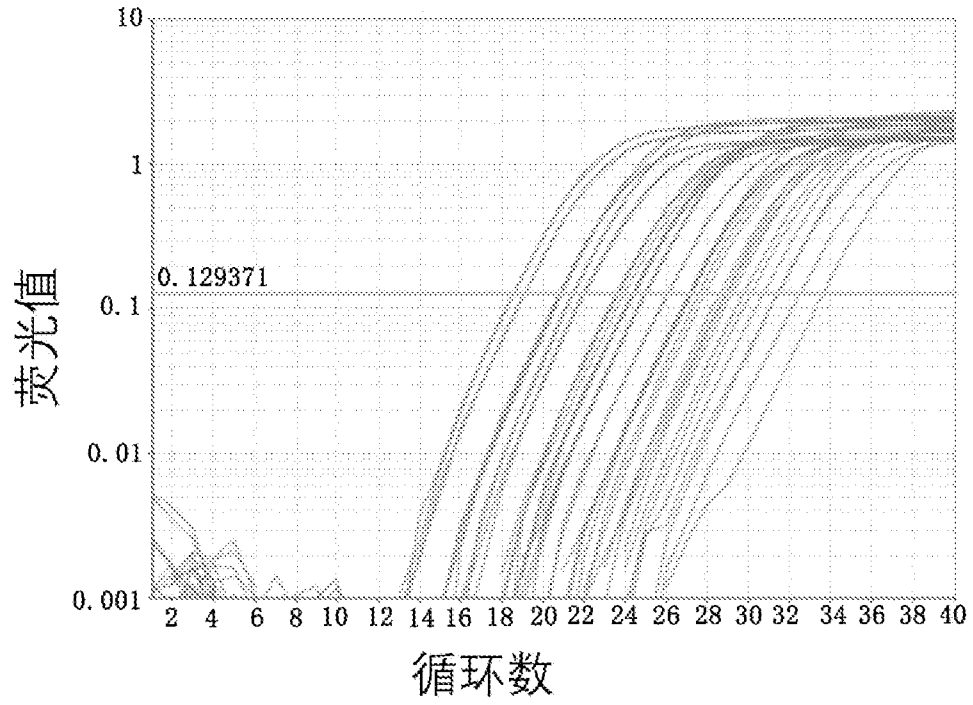


图 11

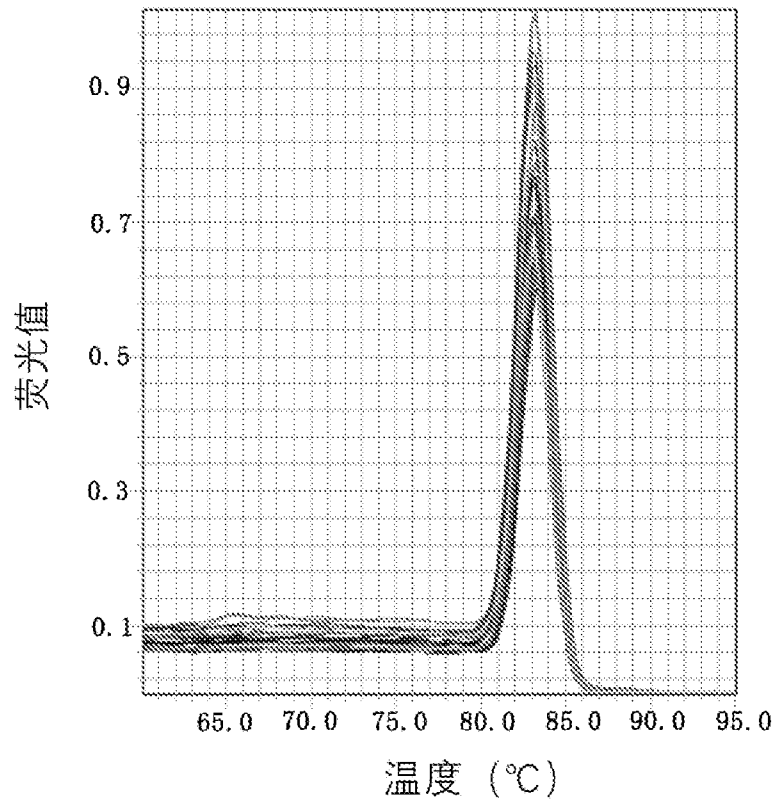


图 12

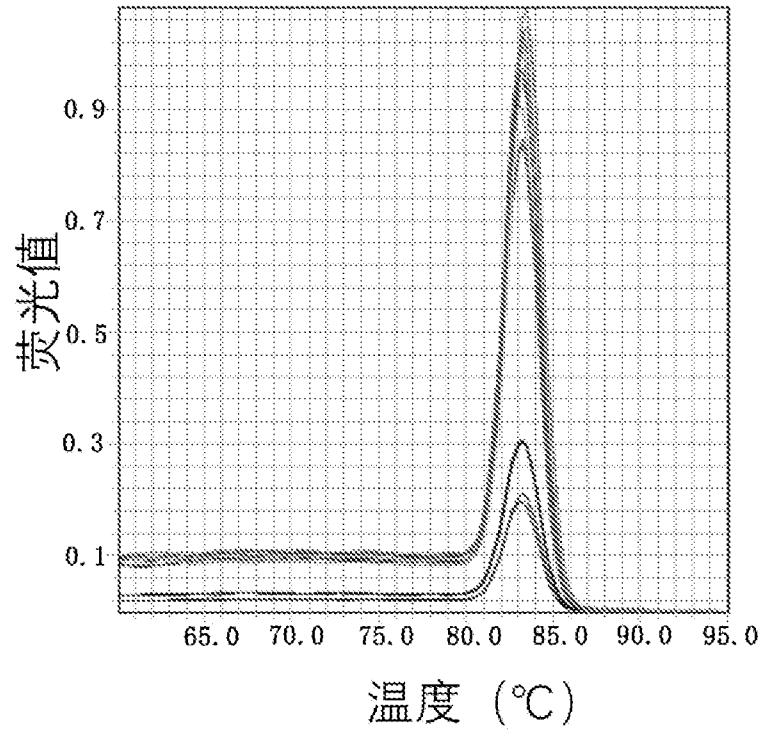


图 13

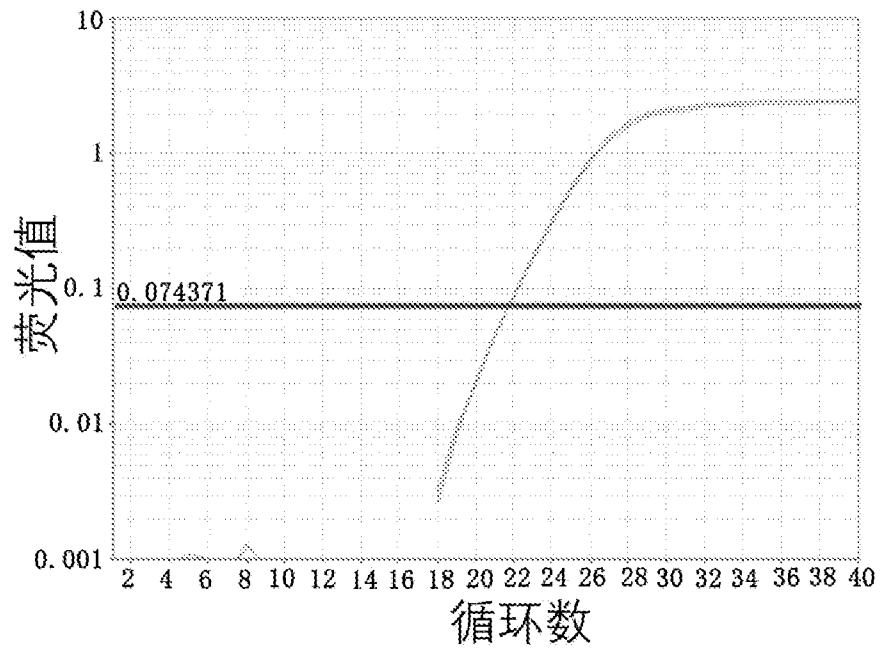


图 14

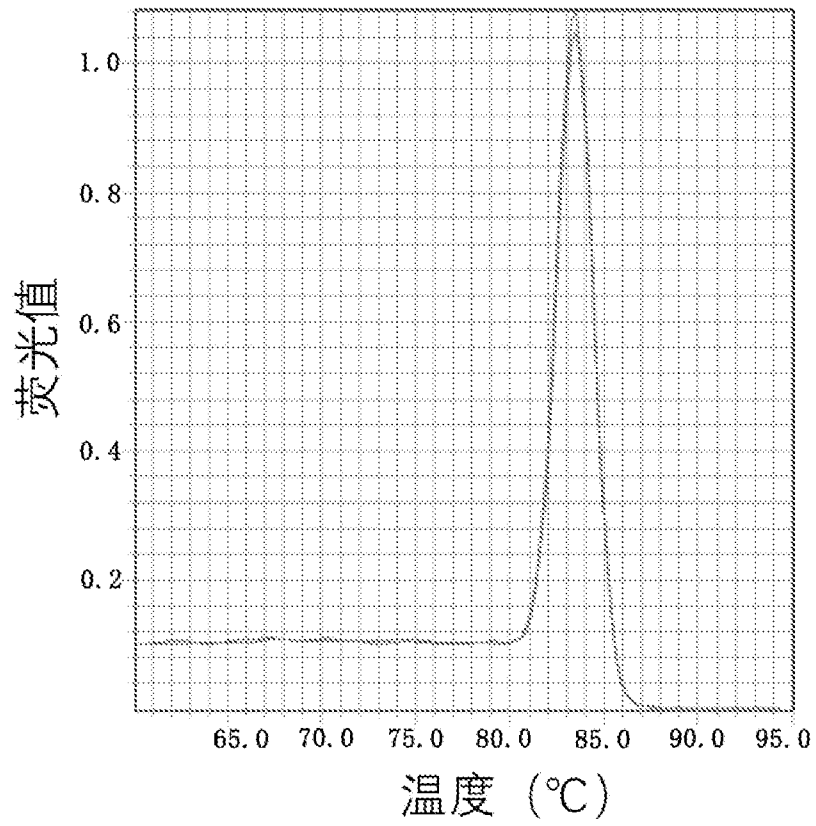


图 15

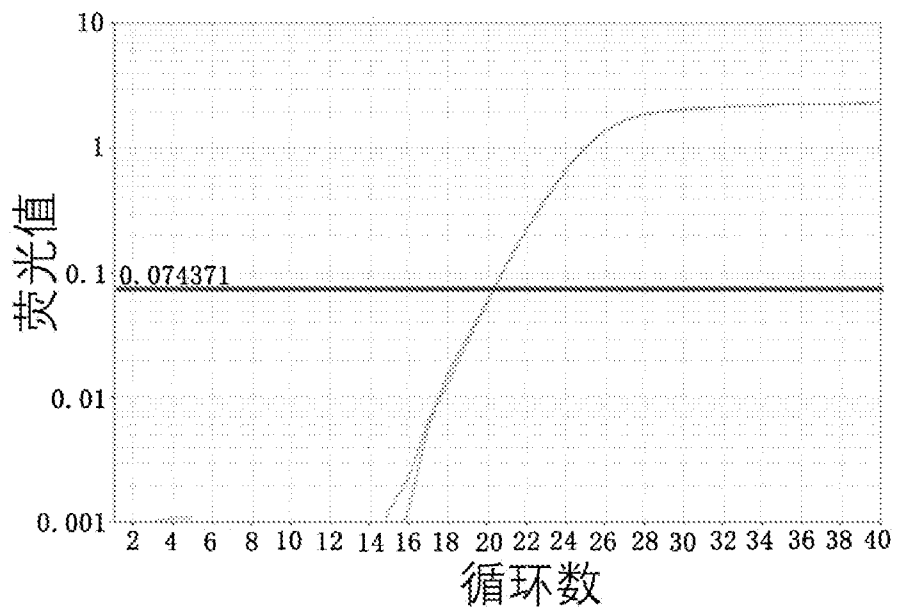


图 16

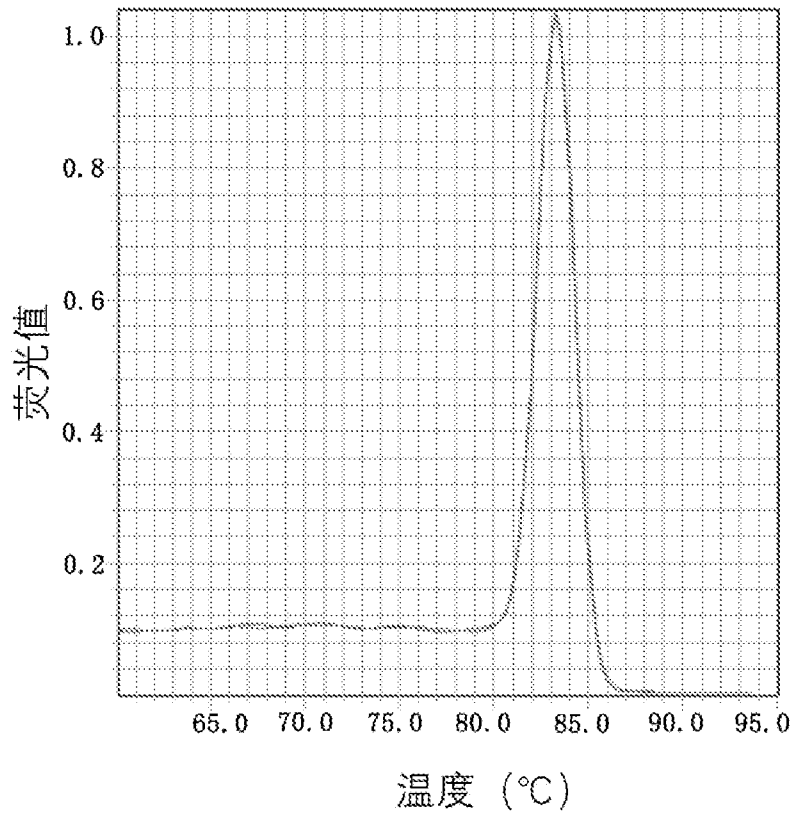


图 17

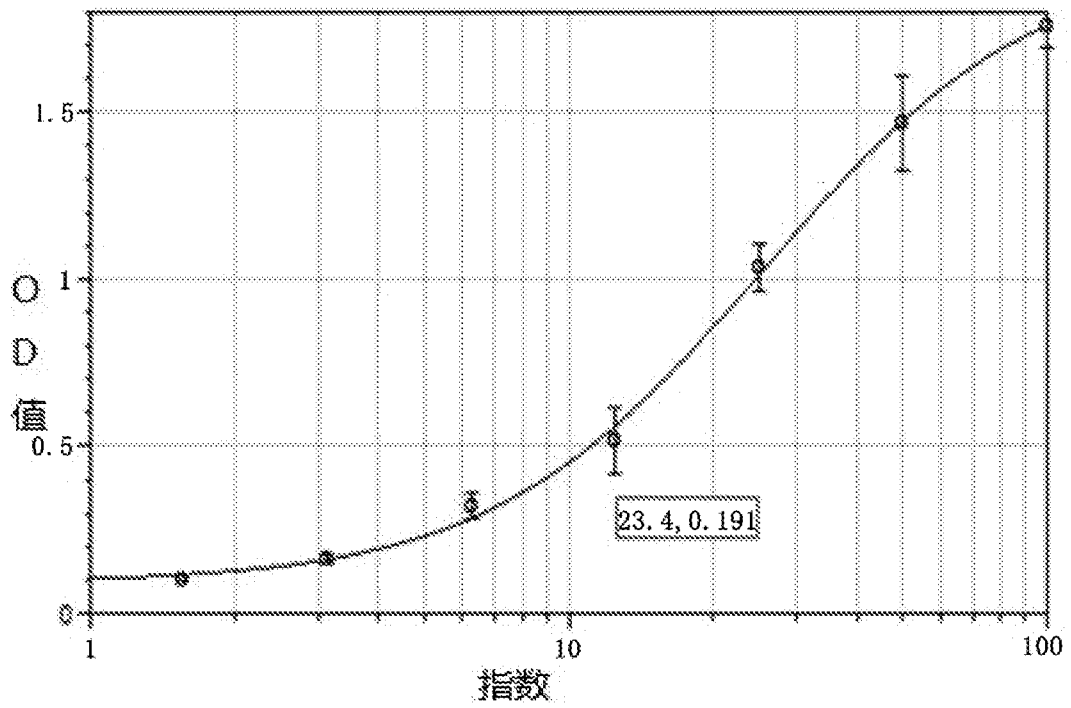


图 18

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/093299

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
C12Q 1/68(2018.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
C12Q		
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)		
CNMED, CNABS, CPEA, DWPI, SIPOABS, AUABS, TWMED, ILABS, TWABS, HKABS, MOABS, SGABS, CNKI, NCBI, EMBL, GoogleScholar: CLC, Charcot Leyden crystal protein, Exfoliated cells, 脱落细胞, nasal cavity, 鼻腔, express+, 表达, amplif+, 扩增, detect, 检测, chronic sinusitis subtype, 慢性鼻窦炎亚型, nasal polyps, 鼻息肉, chronic rhinosinusitis with nasal polyps, CRSwNP 中国专利生物序列检索系统: 基于SEQ ID NO: 2-5的序列检索, CRSwNP China Patents Biological Sequence Search System: sequence search based on SEQ ID NOs: 2-5		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LAVIN, J. et al. "Superior turbinate eosinophilia correlates with olfactory deficit in chronic rhinosinusitis patients" <i>Laryngoscope.</i> , Vol. 127, No. 10, 31 October 2017 (2017-10-31), abstract	1, 7, 9, 10, 12, 14-20
Y	LAVIN, J. et al. "Superior turbinate eosinophilia correlates with olfactory deficit in chronic rhinosinusitis patients" <i>Laryngoscope.</i> , Vol. 127, No. 10, 31 October 2017 (2017-10-31), abstract	2-6, 8, 11, 13
Y	WO 2017144894 A1 (UCL BUSINESS PLC) 31 August 2017 (2017-08-31) sequence 5	2-6, 8, 11, 13
A	CALAFAT, J. et al. "Ultrastructural localization of Charcot-Leyden crystal protein in human eosinophil and basophils" <i>Eur J Haematol</i> , Vol. 58, 31 December 1997 (1997-12-31), abstract	1-20
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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
04 September 2019		25 September 2019
Name and mailing address of the ISA/CN		Authorized officer
China National Intellectual Property Administration (ISA/ CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088 China		
Facsimile No. (86-10)62019451		Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2019/093299**

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2017144894 A1	31 August 2017	AU 2017222397 A1	06 September 2018
		CN 109072315 A	21 December 2018
		EP 3420101 A1	02 January 2019
		GB 201603367 D0	13 April 2016
		CA 3014268 A1	31 August 2017
		JP 2019512212 A	16 May 2019
		US 2019194725 A1	27 June 2019

---

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/093299

<p><b>A. 主题的分类</b> C12Q 1/68(2018.01)i</p> <p>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</p>																	
<p><b>B. 检索领域</b> 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C12Q</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>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)) CNMED, CNABS, CPEA, DWPI, SIPOABS, AUABS, TWMED, ILABS, TWABS, HKABS, MOABS, SGABS, CNKI, NCBI, EMBL, GoogleScholar:CLC, Charcot Leyden crystal protein, Exfoliated cells, 脱落细胞, nasal cavity, 鼻腔, exp-ress+, 表达, amplif+, 扩增, detect, 检测, chronic sinusitis subtype, 慢性鼻窦炎亚型, nasal polyps, 鼻息肉, chronic rhinosinusitis with nasal polyps, CRSwNP 中国专利生物序列检索系统: 基于SEQ ID NO: 2-5的序列检索</p>																	
<p><b>C. 相关文件</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>Jennifer Lavin等. "Superior turbinate eosinophilia correlates with olfactory deficit in chronic rhinosinusitis patients" Laryngoscope., 第127卷, 第10期, 2017年 10月 31日 (2017 - 10 - 31), 摘要</td> <td>1, 7, 9, 10, 12, 14-20</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>Jennifer Lavin等. "Superior turbinate eosinophilia correlates with olfactory deficit in chronic rhinosinusitis patients" Laryngoscope., 第127卷, 第10期, 2017年 10月 31日 (2017 - 10 - 31), 摘要</td> <td>2-6, 8, 11, 13</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2017144894 A1 (UCL BUSINESS PLC) 2017年 8月 31日 (2017 - 08 - 31) 序列5</td> <td>2-6, 8, 11, 13</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>Calafat J等. "Ultrastructural localization of Charcot -Leyden crystal protein in human eosinophil and basophils" Eur J Haematol, 第58卷, 1997年 12月 31日 (1997 - 12 - 31), 摘要</td> <td>1-20</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	Jennifer Lavin等. "Superior turbinate eosinophilia correlates with olfactory deficit in chronic rhinosinusitis patients" Laryngoscope., 第127卷, 第10期, 2017年 10月 31日 (2017 - 10 - 31), 摘要	1, 7, 9, 10, 12, 14-20	Y	Jennifer Lavin等. "Superior turbinate eosinophilia correlates with olfactory deficit in chronic rhinosinusitis patients" Laryngoscope., 第127卷, 第10期, 2017年 10月 31日 (2017 - 10 - 31), 摘要	2-6, 8, 11, 13	Y	WO 2017144894 A1 (UCL BUSINESS PLC) 2017年 8月 31日 (2017 - 08 - 31) 序列5	2-6, 8, 11, 13	A	Calafat J等. "Ultrastructural localization of Charcot -Leyden crystal protein in human eosinophil and basophils" Eur J Haematol, 第58卷, 1997年 12月 31日 (1997 - 12 - 31), 摘要	1-20
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求															
X	Jennifer Lavin等. "Superior turbinate eosinophilia correlates with olfactory deficit in chronic rhinosinusitis patients" Laryngoscope., 第127卷, 第10期, 2017年 10月 31日 (2017 - 10 - 31), 摘要	1, 7, 9, 10, 12, 14-20															
Y	Jennifer Lavin等. "Superior turbinate eosinophilia correlates with olfactory deficit in chronic rhinosinusitis patients" Laryngoscope., 第127卷, 第10期, 2017年 10月 31日 (2017 - 10 - 31), 摘要	2-6, 8, 11, 13															
Y	WO 2017144894 A1 (UCL BUSINESS PLC) 2017年 8月 31日 (2017 - 08 - 31) 序列5	2-6, 8, 11, 13															
A	Calafat J等. "Ultrastructural localization of Charcot -Leyden crystal protein in human eosinophil and basophils" Eur J Haematol, 第58卷, 1997年 12月 31日 (1997 - 12 - 31), 摘要	1-20															
<p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																	
<p>* 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</p> <p>“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 “&amp;” 同族专利的文件</p>																	
国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期																
2019年 9月 4日	2019年 9月 25日																
ISA/CN的名称和邮寄地址	受权官员																
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	张艳霞																
传真号 (86-10)62019451	电话号码 62089438																

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/093299

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)
WO	2017144894	A1	2017年 8月 31日	AU	2017222397	A1	2018年 9月 6日
				CN	109072315	A	2018年 12月 21日
				EP	3420101	A1	2019年 1月 2日
				GB	201603367	D0	2016年 4月 13日
				CA	3014268	A1	2017年 8月 31日
				JP	2019512212	A	2019年 5月 16日
				US	2019194725	A1	2019年 6月 27日