

# (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  
2018年12月13日 (13.12.2018)



(10) 国际公布号  
**WO 2018/223848 A1**

- (51) 国际专利分类号:  
*C12Q 1/6883* (2018.01) *C12N 15/113* (2010.01) SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (21) 国际申请号: PCT/CN2018/088324 (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)。
- (22) 国际申请日: 2018年5月25日 (25.05.2018)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:  
201710423197.3 2017年6月7日 (07.06.2017) CN  
201710424168.9 2017年6月7日 (07.06.2017) CN
- (71) 申请人: 中南大学湘雅二医院 (THE SECOND XIANGYA HOSPITAL OF CENTRAL SOUTH UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国湖南省长沙市人民中路139号, Hunan 410011 (CN)。
- (72) 发明人: 江冰 (JIANG, Bing); 中国湖南省长沙市人民中路139号, Hunan 410011 (CN)。 谢犁犁 (XIE, Lili); 中国湖南省长沙市人民中路139号, Hunan 410011 (CN)。 张璐丝 (ZHANG, Lusi); 中国湖南省长沙市人民中路139号, Hunan 410011 (CN)。 黄伟 (HUANG, Wei); 中国湖南省长沙市人民中路139号, Hunan 410011 (CN)。
- (74) 代理人: 长沙市融智专利事务所 (CHANGSHA RONG ZHI PATENT AGENCY); 中国湖南省长沙市人民中路308号袁靖, Hunan 410011 (CN)。
- (81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, 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, 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,

### 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))。

(54) Title: TWO MOLECULAR MARKERS FOR DIAGNOSIS OF GLAUCOMA, KIT, AND APPLICATION

(54) 发明名称: 两种用于青光眼诊断的分子标记物、试剂盒及应用

(57) Abstract: Disclosed are two molecular markers for diagnosis of glaucoma, a kit, and an application. Compared to people in a control group, lncRNAs:T267384 is up-regulated in both the aqueous humor and the serum of glaucoma patients, and lncRNAs:ENST00000564363 is up-regulated in the aqueous humor of the glaucoma patients. It is noted that both T267384 and ENST00000564363 are highly expressed lncRNAs in glaucoma, and are biomarkers that may assist in diagnosis of the glaucoma.

(57) 摘要: 本发明公开了两种用于青光眼诊断的分子标记物、试剂盒及应用。相对于对照组人群, lncRNAs:T267384在青光眼患者的房水和血清中均表达上调, lncRNAs:ENST00000564363在青光眼患者的房水中表达上调。提示T267384、ENST00000564363均是青光眼中的高表达lncRNAs, 是有助于青光眼诊断的生物标志物。



WO 2018/223848 A1

# 说明书

## 发明名称：两种用于青光眼诊断的分子标记物、试剂盒及应用 技术领域

[0001] 本发明涉及分子诊断技术领域，具体涉及有助于青光眼诊断的长链非编码RNA标志物、试剂盒及应用。

### 背景技术

[0002] 眼睛是人体十分重要的感觉器官，能够接受外部的光刺激，并将光冲动传送到大脑中枢而引起视觉。达芬奇曾说：“眼睛是心灵的窗户，通过眼睛，人们得以拥抱和欣赏世界的无限美妙，灵魂才得以安居于体内”。信息时代，人通过感觉器官从外界获得的信息中，大约90%是由眼睛来完成的。世界卫生组织的资料显示，眼科疾病已成为继肿瘤、心血管疾病之后的第三位危害及影响人们生存质量的疾病。在所有眼科疾病中，青光眼则是首位不可逆转的致盲性眼病，其影响视觉质量的原因是通过威胁和损害视神经及其通路而导致失明，从而严重威胁人类的视觉健康，给个人、家庭和社会造成难以估量的损失。

[0003] 青光眼造成的主要危害是影响视觉功能，即便是在发达国家中，也只有50%左右的青光眼患者能够得到及时的诊断和治疗，而且，青光眼的发病因素、遗传学规律等均不明了，因此我们要科学地掌握其发生发展规律，从而进行早期诊断和早期治疗，避免青光眼患者的失明。目前，青光眼的诊断主要是依靠病史、形态学和功能学方面的检查，如眼压测量、超声生物显微镜、眼底照相、光学相干断层扫描和视野检查等。虽然这些检查可以诊断青光眼，但研究表明，通过形态学和功能学手段诊断的青光眼，患者视觉功能的损害已经超过50%。而青光眼相关的生化检查、血清学筛查及检测标准仍处于相对空白状态，因此寻找一种高灵敏度和高特异性的标志物对青光眼诊断和监控尤为重要。

[0004] 基因组计划研究表明，在组成人类基因组的30亿个碱基对中，仅有1.5%的核苷酸序列用于蛋白质编码，其余98.5%的基因组为非蛋白编码序列。这些序列曾被认为是进化过程中累积的“垃圾序列”而未予以关注，在随后启动的人类基因组DNA元件百科全书（encyclopedia of DNA elements, ENCODE）计划中，研究表

明75%的基因序列能够被转录成RNA，其中近74%的转录产物为非编码RNA（non-coding RNAs, ncRNAs）。在ncRNA中，序列长度大于200个碱基的转录本为长链非编码RNAs (long noncoding RNA, lncRNAs), 它们由于功能的丰富性及作用机制的多样性而备受关注。lncRNAs能够在转录、转录后和翻译多个层面上调节蛋白编码基因的表达，从而广泛地参与包括细胞分化和机体发育在内的重要生命过程，其异常表达还与人类多种重大疾病的发生密切相关。

[0005] lncRNA具有高度保守性及组织特异性，在脑部含量非常丰富。lncRNA不仅参与了神经系统的生长发育和功能完善，使神经系统按照一定的时间顺序和在一定的空间内进行生长和发育，并且参与执行神经系统的功能。lncRNA通过多种机制参与到神经系统的发育及功能执行中，包括作为顺式作用元件及反式作用因子参与基因印记、染色质重塑、细胞周期调控、剪接调控、mRNA降解和翻译调控等过程。因此，利用检测lncRNAs的组成及表达水平的变化来反映神经系统的生理及病理状态是可行的手段。

[0006] 房水属于眼内容物，由睫状体产生，经过瞳孔、小梁网等最终进入血液，且处于动态循环之中，其成分构成与眼球局部生理及病理环境密切相关。外泌体作为机体至关重要的细胞间相互交流的中介物质，包含了lncRNAs、mRNAs、蛋白质及脂质等。外泌体内包含的物质由于特殊保护机制能长期保持稳定状态。因此，房水中的lncRNAs等分子可以外泌体的形式传递细胞间的相互交流信息，并可随房水的动态循环进入血液。因此青光眼相关的lncRNAs研究具有为青光眼相关生物标志物检测提供理论基础的潜能。

## 发明概述

## 技术问题

[0007] 本发明要解决的技术问题是提供两种用于青光眼诊断的分子标记物lncRNAsT2 67384, lncRNAsENST00000564363、试剂盒及应用。

## 问题的解决方案

## 技术解决方案

[0008] 发明内容

[0009] 本发明的目的之一是提供一种用于青光眼早期诊断的长链非编码RNA，对青光

眼的发病检测有重要意义。

[0010] 用于青光眼早期诊断的分子标记物lncRNAsT267384，其序列如SEQ ID NO:1所示。

[0011] 本发明的目的之二是提供上述分子标记物lncRNAsT267384的应用。检测lncRNAsT267384表达水平的产品在制备青光眼早期诊断工具中的应用。

[0012] 所述的检测lncRNAsT267384表达水平的产品包括：通过实时荧光定量PCR检测lncRNAsT267384表达水平的制剂。

[0013] 用实时荧光定量PCR

检测lncRNAsT267384表达水平的制剂包括特异性扩增lncRNAsT267384的引物。

[0014] 用实时荧光定量PCR

检测lncRNAsT267384表达水平的特异性扩增lncRNAsT267384的引物序列为：

[0015] F:5'-TCTGGGCATTGAAGAGTGAAG-3'，

[0016] R:5'-AGAGGGATGGGTACAAATAAGC-3'。

[0017] 本发明的目的之三是提供一种用于青光眼早期诊断的试剂盒，包含检测lncRNAsT267384表达水平的试剂。具体是包含通过实时荧光定量PCR检测lncRNAsT267384表达水平的试剂。

[0018] 所述的通过实时荧光定量PCR检测lncRNAsT267384表达水平的试剂包含通过实时荧光定量PCR特异性扩增lncRNAsT267384的引物。

[0019] 所述的通过实时荧光定量PCR检测lncRNAsT267384表达水平的试剂包含一对通过实时荧光定量PCR特异性扩增lncRNAsT267384的引物，其引物序列为：

[0020] F:5'-TCTGGGCATTGAAGAGTGAAG-3'，

[0021] R:5'-AGAGGGATGGGTACAAATAAGC-3'。

[0022] 我们运用qRT-PCR检测方法验证lncRNAs: T267384、ENST00000607393和T342877在房水、虹膜组织和血清中的表达水平并分析其在两类房水中表达量的差异。在三种组织中，房水具有最高的诊断意义，三种lncRNAs在房水中诊断青光眼的敏感性/特异性均大于90%。这种现象的可能原因是由于血-房水屏障的存在，显著限制了血源性免疫细胞和来自全身其他部位的信号分子进入房水。因此较血清而言，房水更能特异性的代表眼部的生理及病理状态。因此，在今后的

研究中房水可能较血清具有更大的青光眼诊断价值。

[0023] 本发明的目的之四是提供另一种用于青光眼早期诊断的长链非编码RNA，对青光眼的发病检测有重要意义。

[0024] 用于青光眼早期诊断的分子标记物lncRNAsENST00000564363，其序列如SEQ ID NO:4所示。

[0025] 本发明的目的之五是提供上述分子标记物lncRNAsENST00000564363的应用。检测lncRNAsENST00000564363表达水平的产品在制备青光眼早期诊断工具中的应用。

[0026] 所述的检测lncRNAs ENST00000564363表达水平的产品包括：通过实时荧光定量PCR检测lncRNAs ENST00000564363表达水平的制剂。

[0027] 所述的通过实时荧光定量PCR 检测lncRNAs ENST00000564363表达水平的制剂包括特异性扩增lncRNAs ENST00000564363的引物。

[0028] 用实时荧光定量PCR 检测lncRNAs ENST00000564363表达水平的特异性扩增lncRNAs ENST00000564363的引物序列为：

[0029] F:5' ACAAAAACATAAAGGCCGGG3'，

[0030] R:5'AGAGCACCCCAAGCCCT3'。

[0031] 本发明的目的之六是提供另一种用于青光眼早期诊断的试剂盒，包含检测lncRNAs ENST00000564363表达水平的试剂。具体是包含通过实时荧光定量PCR检测lncRNAs ENST00000564363表达水平的试剂。

[0032] 所述的通过实时荧光定量PCR检测lncRNAs ENST00000564363表达水平的试剂包含通过实时荧光定量PCR特异性扩增lncRNAs ENST00000564363的引物。

[0033] 所述的通过实时荧光定量PCR检测lncRNAs ENST00000564363表达水平的试剂包含一对通过实时荧光定量PCR特异性扩增lncRNAs ENST00000564363的引物，其引物序列为：

[0034] F:5' ACAAAAACATAAAGGCCGGG3'，

[0035] R:5'AGAGCACCCCAAGCCCT3'。

发明的有益效果

## 有益效果

[0036] 对于本申请而言，申请人发现相对于对照组人群，lncRNAs:T267384在青光眼患者的房水和血清中均表达上调。提示T267384是青光眼中的高表达lncRNAs，是有助于青光眼诊断的生物标志物。本发明为青光眼诊断提供了强有力的分子生物学基础，具有深远的临床意义和推广性。

[0037] 申请人发现相对于对照组人群，lncRNAs:ENST00000564363在青光眼患者的房水中表达上调。提示ENST00000564363是青光眼中的高表达lncRNAs，是有助于青光眼诊断的生物标志物。本发明为青光眼诊断提供了强有力的分子生物学基础，具有深远的临床意义和推广性。

## 对附图的简要说明

## 附图说明

[0038] 图1为青光眼患者房水中lncRNAs和mRNAs表达谱；

[0039] A：青光眼患者房水中lncRNAs表达谱分析聚类图；B：青光眼患者房水中mRNAs表达谱分析聚类图。

[0040] 图2为青光眼患者房水中差异表达的lncRNAs和mRNAs；

[0041] A：较年龄相关性白内障而言，青光眼患者房水中2倍差异表达的lncRNAs；B：较年龄相关性白内障而言，青光眼患者房水中2倍差异表达的mRNAs。

[0042] 图3为青光眼患者房水中lncRNAs和mRNAs表达的CNC分析图；

[0043] 红色点代表lncRNAs，蓝色点代表mRNAs，实线代表正相关，虚线代表负相关。

[0044] 图4为lncRNAs在青光眼及年龄相关性白内障患者房水中的表达量；

[0045] A-C：T267384、ENST00000607393和T342877在青光眼及年龄相关性白内障患者房水中表达的散点图；D-F：T267384、ENST00000607393和T342877在青光眼及年龄相关性白内障患者房水中表达的箱图。

[0046] 图5为lncRNAs在青光眼患者对照人群虹膜组织中的表达量；

[0047] A-C：T267384、ENST00000607393和T342877在青光眼患者及对照人群虹膜组织中表达的散点图；D-F：T267384、ENST00000607393和T342877在青光眼患者对照人群虹膜组织中表达的箱图。

- [0048] 图6为lncRNAs在青光眼患者及对照人群血清中的表达量；
- [0049] A-C: T267384、ENST00000607393和T342877在青光眼患者及对照人群血清中表达的散点图；D-F: T267384、ENST00000607393和T342877在青光眼患者对照人群血清中表达的箱图。
- [0050] 图7为利用lncRNAs在不同组织中诊断青光眼的ROC曲线；
- [0051] A: 利用T267384在房水中诊断青光眼的ROC曲线，曲线下面积为0.998；B: 利用ENST00000607393在房水中诊断青光眼的ROC曲线，曲线下面积为0.998；C: 利用T342877在房水中诊断青光眼的ROC曲线，曲线下面积为0.983；D: 利用ENST00000607393在虹膜组织中诊断青光眼的ROC曲线，曲线下面积为0.793；E: 利用T267384在血清中诊断青光眼的ROC曲线，曲线下面积为0.620；F: 利用ENST00000607393在血清中诊断青光眼的ROC曲线，曲线下面积为0.638。
- [0052] 图8为另一组lncRNAs在青光眼及年龄相关性白内障患者房水中的表达量；
- [0053] A-D为: lncRNA:ENST00000564363、NR\_026887、TCONS\_00025577和ENST00000508241在青光眼及年龄相关性白内障患者房水中表达的散点图。
- [0054] 图9为利用另一组lncRNAs在房水中诊断青光眼的ROC曲线；
- [0055] A-D为: lncRNA ENST00000564363、NR\_026887、TCONS\_00025577和ENST00000508241在房水样本中诊断青光眼的ROC曲线下面积分别为1.000、0.920、0.940和0.880。

## 发明实施例

### 本发明的实施方式

- [0056] 以下结合实施例旨在进一步说明本发明，而非限制本发明。
- [0057] 实施例1: 青光眼患者房水中lncRNAs及mRNAs的表达谱:
- [0058] 1.1 材料与试剂
- [0059] 1.1.1 主要仪器
- [0060] 常用离心机及低温离心机购自Eppendorf公司；高速离心机购自Beckman公司；Real-Time PCR仪器购自ABI公司；移液器和电动移液枪购自Eppendorf公司；Q5000购自Quawell Technology公司；制冰机购自Sanyan公司。

[0061] 1.1.2 材料与试剂

[0062] 不同型号的离心管及PCR管均购自Axygen公司；DEPC水购自鼎国昌盛公司；Trizol购自Invitrogen公司；TargetAmp™1-Round aRNA Amplification试剂盒购自epicentre公司；Transcriptor First Strand cDNA Synthesis试剂盒购自Roche公司；Quick Amp Labeling Kit, One-Color试剂盒购自Agilent Technologies公司；人lncRNAs microarray芯片购自Arraystar公司。

[0063] 1.1.3 试剂配置

[0064] 各种免疫印迹所用试剂根据《分子克隆（第三版）》中提供的方法配置。

[0065] 1.2 方法

[0066] 1.2.1 房水样本准备

[0067] 该研究已通过中南大学湘雅二医院伦理委员会审批。术前与所有研究对象签署知情同意书，在正式手术步骤开始前利用1ml的一次性无菌注射器于角膜缘抽取未稀释的房水标本0.1ml，立即注入高压灭菌的0.5mlEP管中，置于-80℃低温冰箱避光保存备用。所有入选患者为在我院住院需要进行手术治疗的青光眼患者和年龄相关性白内障患者。纳入标准：1. 原发性开角型青光眼：A. 眼压>21mmHg B. 青光眼性视盘损害和/RNFL缺损 C. 典型的青光眼性视野缺损 D. 前房角开放。具有以上四项或具有其中的A, D, B或C者。2. 正常眼压性青光眼：具有类似于POAG的视盘改变，RNFL及视野损害，24h眼压测量均≤21mmHg, 房角开放。3. 原发性闭角型青光眼：具有青光眼的视盘改变，RNFL及视野损害，眼压>21mmHg, 前房角变窄或关闭4. 年龄相关性白内障（对照组）：晶状体呈皮质性和/或核型浑浊和/或后囊下性混浊。排除标准：1. 伴发全身性疾病如高血压和糖尿病等。2. 继发性青光眼3. 可能影响视野、视神经或色觉的眼科或神经科疾病。4. 视野检测可靠性标准：固视丢失率、假阳性率和/或假阴性率>25%。5. 年龄相关性白内障：排除并发性、外伤性、先天性白内障并排除伴有其他眼内疾病者、排除过熟期病例。

[0068] 1.2.2 RNA提取

[0069] 取房水0.1ml加入0.5mlTrizol试剂，剧烈震荡后加入0.1毫升氯仿。而后经离心、沉淀及75%乙醇清洗后溶于10微升DPEC水，经Q5000仪器测量各管RNA浓度

- 。
- [0070] 1.2.3 RNA扩增
- [0071] 使用TargetAmp™1-Round aRNA Amplification Kit 103 (epicentre) 按生厂商说明书所示步骤对RNA进行扩增。大致步骤如下：首先根据RNA样本合成单链cDNA: RNA杂交产物，然后使用RNase H酶将上述杂交产物消化为小片段序列，这些小片段序列可协助双链cDNA的合成。最后由双链cDNA转录合成反义RNA。
- [0072] 1.2.4 cDNA合成和标记
- [0073] 使用Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) 按生厂商说明书所示步骤合成cDNA。使用Quick Amp Labeling Kit, One-Color (Agilent Technologies) 对合成的cDNA进行标记。
- [0074] 1.2.5 标记效率质量检测
- [0075] 取1.5微升已标记的cDNA样本，使用NanoDrop ND-1000检测荧光标记效率。
- [0076] 1.2.6 芯片杂交
- [0077] 在标准条件下将标记好的探针和高密度芯片 (Human lncRNA microarray V4.0, Arraystar公司) 进行杂交。该芯片共检测40173种lncRNAs及20730种mRNAs表达水平。
- [0078] 1.2.7 图像采集和数据分析
- [0079] 使用GenePix 4000B芯片扫描仪扫描芯片的荧光强度，并将实验结果转换成数字型数据保存。P值<0.05为差异有统计学意义。
- [0080] 1.3 结果
- [0081] 1.3.1 青光眼患者房水中lncRNAs及mRNAs的表达谱
- [0082] 在10份青光眼患者房水样本中平均检测到20653±569.9种lncRNAs和11265±268.3种mRNAs。其中，10份青光眼患者房水样本中均检测到的lncRNAs为11728种，均检测到的mRNAs为6686种。
- [0083] 1.3.2 青光眼患者房水中差异表达的lncRNAs及mRNAs

[0084] 较年龄相关性白内障而言，青光眼患者房水中2倍上调表达的lncRNAs为4372种，2倍下调表达的lncRNAs为2602种。较年龄相关性白内障而言，青光眼患者房水中2倍上调表达的mRNAs为2783种，2倍下调表达的mRNAs为1617种。

[0085] 1.4 结果

[0086] 由于其易取性、个体特异性及相对受机体其他器官影响较小的特点，房水是一种眼部疾病生物标志物相关研究的价值较大的研究对象。并且，尽管目前已有多种研究报道青光眼相关的流行病学及遗传学危险因素，但以房水为研究对象的相关研究相对较少。因此，我们认为房水具有应用于今后青光眼相关遗传学研究的潜能。由于取样的限制，人源性房水样本体积较小。为克服该问题，我们在进行芯片杂交前增加RNA扩增步骤，如此以保证后续步骤的顺利进行。通过使用lncRNAs芯片微阵列分析方法，11728种lncRNAs及6686种mRNAs在10份青光眼房水样本中均检测到，这与年龄相关性白内障患者房水中lncRNAs和mRNAs表达谱具有显著差异，因此房水中lncRNAs和mRNAs表达谱表现出个体特异性及疾病特异性。就我们所知，这是第一个青光眼房水相关lncRNAs和mRNAs表达谱研究。

[0087] 实施例2：通过CNC分析明确房水中特定lncRNAs与mRNAs的相关性

[0088] 为进一步探讨青光眼患者房水中表达的lncRNAs的可能功能，我们运用CNC (coding-noncoding gene co-expression) 分析明确与青光眼相关基因的mRNAs表达具有显著相关性的lncRNAs。CNC分析是一种通过lncRNA和mRNA共表达数据，将lncRNA与mRNA联系起来的分析方法。通过CNC分析可以发现与某个lncRNA具有相同表达模式的mRNA，通过这些mRNA的功能，可以将lncRNA与特定信号通路或疾病状况联系起来，从而便于预测lncRNA的功能，并揭示其作用机制。

[0089] 2.1 方法

[0090]

挑选房水中差异表达并且与青光眼发生发展具有相关性的mRNAs，将这些mRNAs在不同青光眼患者房水中的表达数据求平均值；求挑选出的mRNAs标准化之后的数据与青光眼患者房水中差异表达的lncRNAs相关数据之间的皮尔逊相关系

数 (Pearson Correlation Coefficient, PCC) 与错误发现率 (False Discovery Rate, FDR); 挑选出PCC $\geq$ 0.90并且FDR $\leq$ 0.05的记录; 使用相关记录, 利用Cytoscape 2.8.3工具绘图。

[0091] 2.2 结果

[0092] 较年龄相关性白内障而言, 在青光眼患者房水中差异表达且与青光眼发生发展具有相关性的mRNAs为如下十种: 骨形态生成蛋白2 (bone morphogenetic protein 2, BMP2)、室管膜相关基因1 (ependymin related 1, EPDR1)、转化生长因子 $\beta$ 1 (transforming growth factor beta 1, TGFB1)、叉头蛋白E3 (forkhead box E3, FOXE3)、生长激素促分泌素受体 (growth hormone secretagogue receptor, GHSR)、叉头蛋白C1 (forkhead box C1, FOXC1)、跨膜及卷曲螺旋结构域1 (transmembrane and coiled-coil domains 1, TMCO1)、PH结构域A7 (pleckstrin homology domain containing A7, PLEKHA7)、视神经蛋白 (optineurin, OPTN) 和整合素亚基 $\beta$ 5 (integrin subunit beta 5, ITGB5)。在青光眼患者房水中, 与这些mRNAs表达的皮尔逊相关系数大于0.9并且错误发现率小于0.05的lncRNAs有10种。

[0093] 实施例3

[0094] 我们利用qRT-PCR在青光眼及年龄相关白内障患者房水中验证实施例2中的10种lncRNAs中, 7种lncRNAs在两类房水中的差异表达量具有统计学差异, 3种lncRNAs在两类房水中的差异表达量无统计学差异。然后选取差异表达量最显著的3种T267384、ENST00000607393和T342877, 进行进一步验证。

[0095] 实施例4

[0096] 我们运用qRT-PCR检测方法验证实施例3中差异最显著的3种lncRNAs分子在房水、虹膜组织和血清中的表达水平, 并分析其在青光眼患者和正常人中表达量的差异。

[0097] 4.1 材料与试剂

[0098] 4.1.1 主要仪器

[0099] 常用离心机及低温离心机购自Eppendorf公司; 高速离心机购自Beckman公司; Real-Time

PCR仪器购自ABI公司；移液器和电动移液枪购自Eppendorf公司；Q5000购自Quawell Technology公司；制冰机购自Sanyan公司。

[0100] 4.1.2 材料与试剂

[0101] 不同型号的离心管及PCR管均购自Axygen公司；DEPC水购自鼎国昌盛公司；Trizol购自Invitrogen公司；逆转录试剂盒和荧光定量试剂盒均购自Roche公司。

[0102] 4.1.3 试剂配置

[0103] 各种免疫印迹所用试剂根据《分子克隆（第三版）》中提供的方法配置。

[0104] 4.2方法

[0105] 4.2.1 房水、血清及虹膜样本准备

[0106] 房水样本按1.2.1所述步骤准备。血清样本取自青光眼患者组及健康对照组人群，其中青光眼患者的纳入及排除标准同1.2.1所述，对照组血清取自与青光眼患者年龄与性别匹配的健康人群。虹膜样本取自青光眼患者组及对照组，其中青光眼患者的纳入及排除标准同1.2.1所述，对照组虹膜样本取自与青光眼患者年龄与性别匹配的湘雅二医院角膜捐赠自愿者的虹膜组织。

[0107] 4.2.2 RNA提取

[0108] 0.1毫升房水或虹膜组织加入0.5毫升Trizol试剂，剧烈震荡后加入0.1毫升氯仿。而后经离心、沉淀及75%乙醇清洗后溶于20微升DEPC水，经Q5000仪器测量各孔RNA浓度。外周静脉血静置30分钟后放入离心机中，在3200转/分钟条件下离心10分钟，使用灭菌的移液管取上层血清，然经由上述同样步骤提取RNA。

[0109] 4.2.3 qRT-PCR

[0110] 根据生厂商说明书首先依赖反转录酶将RNA反转录成cDNA，然后用PCR方法扩增cDNA，通过测定荧光强度信号实时检测定量扩增的产物量。

[0111] 4.2.2 数据分析

[0112] 采用SPSS19.0版统计学软件进行数据处理。计量资料以中位数±四分位数间距表示，青光眼/白内障代表两组中位数比值，比较进行Mann-whitney U检验。P值<0.05为差异有统计学意义。

[0113] 4.3 结果

[0114] 为进一步扩大房水样本量验证相关lncRNAs的表达水平并且探究特定lncRNAs

在青光眼患者血清及虹膜中的表达量，我们利用qRT-PCR检测60个房水样本（30个青光眼患者房水样本，30个年龄与性别匹配的年龄相关性白内障患者房水标本）、50个虹膜组织（40个青光眼患者虹膜组织样本，10个年龄与性别匹配的角膜捐赠自愿者的虹膜组织）和158个血清样本（103个青光眼患者血清样本，55个年龄与性别匹配的健康人群血清样本）中T267384、ENST00000607393和T342877表达水平。结果表明，在两类房水样本中，三种lncRNAs的表达量均有统计学差异，其在青光眼患者房水中表达量依次为在年龄相关性白内障患者房水中表达量的4.4036、2.1467和2.9692倍；在两类虹膜组织中ENST00000607393的表达量具有统计学差异，其在青光眼患者虹膜组织中表达量为在对照组虹膜组织中表达量的3.3436倍，而T267384和T342877的表达量无统计学差异；在两类血清样本中，T267384及ENST00000607393的表达量具有统计学差异，其在青光眼患者血清中表达量依次为在对照组血清中表达量的1.2878和1.5301倍，而T342877的表达量无统计学差异（表1,2,3）（图4,5,6）。为进一步了解这三种lncRNAs在不同种组织中诊断青光眼的有效性，我们利用所得数据绘制受试者工作特征（receiver operating characteristic, ROC）曲线（图7）。发现T267384、ENST00000607393和T342877在房水样本中诊断青光眼的ROC曲线下面积分别为0.998、0.998和0.983。ENST00000607393在虹膜组织中诊断青光眼的ROC曲线下面积为0.793；T267384和ENST00000607393在血清样本中诊断青光眼的ROC曲线下面积分别为0.620和0.638。当T267384、ENST00000607393和T342877在房水中的诊断值设为1.5437、1.1485和2.1052时，其诊断的敏感性/特异性依次为0.967/0.967、0.967/0.967和0.967/0.900；当ENST00000607393在虹膜组织中的诊断值设为0.2470时，其诊断的敏感性/特异性为0.700/0.700；当T267384和ENST00000607393在血清中的诊断值设为0.7191和0.8376时，其诊断的敏感性/特异性依次为0.612/0.600和0.680/0.600。

[0115] 表1 3种lncRNAs在房水中的表达量

[]

lncRNAs	青光眼组	白内障组	青光眼/白内障	P 值
T267384	3.4793 ± 1.2848	0.7901 ± 0.3129	4.4036	0.000
ENST00000607393	1.8700 ± 1.3398	0.8711 ± 0.1666	2.1457	0.000
T342877	3.6545 ± 1.4040	1.2308 ± 0.7356	2.9692	0.000

[0116] 表2 3种lncRNAs在虹膜组织中的表达量

□

lncRNAs	青光眼组	对照组	青光眼/白内障	P 值
T267384	0.2835 ± 0.5452	0.1875 ± 0.1097	1.5120	0.121
ENST00000607393	0.5537 ± 0.7749	0.1655 ± 0.2401	3.3436	0.006
T342877	0.2029 ± 0.3966	0.2269 ± 0.5187	0.6938	0.482

[0117] 表3 3种lncRNAs在血清中的表达量

□

lncRNAs	青光眼组	对照组	青光眼/白内障	P 值
T267384	0.8944 ± 1.6348	0.6945 ± 0.1908	1.2378	0.013
ENST00000607393	1.0905 ± 1.0336	0.7127 ± 0.7648	1.5301	0.004
T342877	0.8520 ± 0.6056	0.6503 ± 0.0527	1.0026	0.280

[0118] 表4 3种lncRNAs在不同组织中诊断的敏感性和特异性

□

Cut-off 值	敏感性	特异性
1.5437 (T267384 房水)	0.967	0.967
1.1485 (ENST00000607393 房水)	0.967	0.967
2.1052 (T342877 房水)	0.967	0.900
0.2470 (ENST00000607393 虹膜)	0.700	0.700
0.7191 (T267384 血清)	0.612	0.600
0.8376 (ENST00000607393 血清)	0.680	0.600

[0119] 实施例5

[0120] 我们利用qRT-PCR在青光眼及年龄相关白内障患者房水中验证实施例2中的10种lncRNAs中，7种lncRNAs在两类房水中的差异表达量具有统计学差异，3种lncRNAs在两类房水中的差异表达量无统计学差异。然后选取另一组具有统计学差异的lncRNA:ENST00000564363、NR\_026887、TCONS\_00025577和ENST00000508241进行进一步验证。

[0121] 实施例6

[0122] 我们运用qRT-PCR检测方法验证lncRNA:ENST00000564363、NR\_026887、TCONS\_00025577和ENST00000508241分子在房水中的表达水平，并分析其在青光眼患者和对照组人群中表达量的差异。

[0123] 6.1 材料与试剂

[0124] 6.1.1主要仪器

[0125] 常用离心机及低温离心机购自Eppendorf公司；高速离心机购自Beckman公司；

Real-Time

PCR仪器购自ABI公司；移液器和电动移液枪购自Eppendorf公司；Q5000购自Qu

awell Technology公司；制冰机购自Sanyan公司。

[0126] 6.1.2材料与试剂

[0127] 不同型号的离心管及PCR管均购自Axygen公司；DEPC水购自鼎国昌盛公司；Trizol购自Invitrogen公司；逆转录试剂盒和荧光定量试剂盒均购自Roche公司。

[0128] 6.1.3试剂配置

[0129] 各种免疫印迹所用试剂根据《分子克隆（第三版）》中提供的方法配置。

[0130] 6.2方法

[0131] 6.2.1房水样本准备

[0132] 房水样本按1.2.1所述步骤准备。

[0133] 6.2.2 RNA提取

[0134] 0.1毫升房水加入0.5毫升Trizol试剂，剧烈震荡后加入0.1毫升氯仿。而后经离心、沉淀及75%乙醇清洗后溶于20微升DEPC水，经Q5000仪器测量各孔RNA浓度。

[0135] 6.2.3 qRT-PCR

[0136] 根据生厂商说明书首先依赖反转录酶将RNA反转录成cDNA，然后用PCR方法扩增cDNA，通过测定荧光强度信号实时检测定量扩增的产物量。

[0137] 6.2.4数据分析

[0138] 采用SPSS19.0版统计学软件进行数据处理。计量资料以中位数±四分位数间距表示，青光眼/白内障代表两组中位数比值，比较进行Mann-whitney U检验。P值<0.05为差异有统计学意义。

[0139] 6.3 结果

[0140] 为进一步扩大房水样本量验证相关lncRNAs的表达水平并且探究特定lncRNAs在青光眼患者房水中的表达量，我们利用qRT-PCR检测20个房水样本（10个青光眼患者房水样本，10个年龄与性别匹配的年龄相关性白内障患者房水标本）中ENST00000564363、NR\_026887、TCONS\_00025577和ENST00000508241表达水平。结果表明，在两类房水样本中，ENST00000564363、NR\_026887、TCONS\_00025577和ENST00000508241的表达量均有统计学差异，其在青光眼患者房水中表达量依次为在年龄相关性白内障患者房水中表达量的1.6200、1.9500、1.9

302和1.8378倍（表5）（图8）。为进一步了解ENST00000564363、NR\_026887、TCONS\_00025577和ENST00000508241在房水中诊断青光眼的有效性，我们利用所得数据绘制受试者工作特征（receiver operating characteristic, ROC）曲线（图9）。发现ENST00000564363、NR\_026887、TCONS\_00025577和ENST00000508241在房水样本中诊断青光眼的ROC曲线下面积分别为1.000、0.920、0.940和0.880。当ENST00000564363、NR\_026887、TCONS\_00025577和ENST00000508241在房水中的诊断值设为0.0068、0.0056、0.0074和0.0048时，其诊断的敏感性/特异性依次为1.000/1.000、0.900/0.900、0.900/0.900和0.800/0.800（表6）。

[0141] 表5 lncRNAs在房水中的表达量

[0142]

[]

lncRNAs	青光眼组	白内障组	青光眼/白内障	P 值
ENST00000564363	0.0081±0.0020	0.0050±0.0013	1.6200	<b>0.001</b>
NR_026887	0.0078±0.0021	0.0040±0.0015	1.9500	<b>0.001</b>
TCONS_00025577	0.0083±0.0050	0.0043±0.0018	1.9302	<b>0.001</b>
ENST00000508241	0.0068±0.0027	0.0037±0.0017	1.8378	<b>0.004</b>

[0143] 表6 lncRNAs在房水中诊断青光眼的敏感性和特异性

[]

Cut-off 值	敏感性	特异性
0.0068 (ENST00000564363)	1.000	1.000
0.0056 (NR_026887)	0.900	0.900
0.0074 (TCONS_00025577)	0.900	0.900
0.0048 (ENST00000508241)	0.800	0.800

[0144]

序列表自由内容

- [0145] <110> 中南大学湘雅二医院
- [0146] <120> 两种用于青光眼诊断的分子标记物、试剂盒及应用
- [0147] <130> 无
- [0148] <160> 6
- [0149] <170> PatentIn version 3.3
- [0150]
- [0151] <210> 1
- [0152] <211> 6891
- [0153] <212> DNA
- [0154] <213> lncRNA: T267384的序列
- [0155]
- [0156] <400> 1
- [0157] tatttcatct tcgcattatt tcaactctg aaggtaaatt tagatctctc ttttttctt 60
- [0158] agtctggcta aaagcttctc aattttgctt aactttcaa aaaaccaact tttgtttca 120
- [0159] ttgattttg tattgtttac ttcatftaa tttcattfat ttctgttctg atctttatta 180
- [0160] ttcttctac taattttgga tttggtttgc tcttgttttc ctaattcttt aagatgcac 240
- [0161] attagattgt ttattfaatg taggcactat aagttccct ctttttgat gtaggcacta 300
- [0162] taacgataag ctccctctt agtactgctt ttgctgtatc ccatagattt tggatgttg 360
- [0163] tgctcccatt agcatttgtt ccaagaaatt tftaaatttc ttattaaaat gatecatcct 420
- [0164] tgagaatgat ccatatgctg aggaaaagca tgtgtattcc acagccattg gatgaaatgt 480
- [0165] tccgtaaffa tctactggat ccatttggtc tattgtgcag attaagtctg atgtttcttt 540
- [0166] attgattttt ctgectggaa gatecatcca gtgctgaaag tgggggtgctg aagtctccag 600
- [0167] ctattattgt attggggcct aactctctct ttagctcttt tttttgttt gttttgttt 660
- [0168] gagatggagc ctggctctgt tgcccagggt ggagtgcagt ggtatgatct tggtcactg 720
- [0169] caacctccgc ctcccagggt caagctattc tctgcctca gcctccaag tagctgggat 780
- [0170] tacagacatg tgccaccata cccggctaatt tttgtattt tagtagagat agggtttctc 840
- [0171] catcttggtc aagctggtct cgaactccca acctcaggtg atccacctgc cttggcctcc 900
- [0172] ccaaagtgct gggattatag gcatgagcca ctgcgctgg cctttttat tttttaagg 960

[0173] agggggggggg tctactaca ttgtctagc tagactcaa ctctgggct caagtgatec 1020  
[0174] ttctgcctcg acctctgaa atgctgatg tacaggcatg agccaccatg actggccctg 1080  
[0175] actgtgtatt tcaaatagc ctgtctcag gctactaat tcttctct gcttgatcaa 1140  
[0176] ttctgctact gaaagcctct aatgcattgt tcagtagcc aattgcattt ttactctgg 1200  
[0177] aatctcagtt tgattcttt tattttaate ttttggtaa atgtatctga tataatttg 1260  
[0178] aattcctct ctgtttatc ttgaattct tgatttct caacacagct atttgaatt 1320  
[0179] ctctgcctga aaggtcacac atctctgtt cccaggatt ggtccctggg ggctcattta 1380  
[0180] gttcattgg gaggtcatgt ttcctggat ggtgtgatg ttagtaaag ttctcagtg 1440  
[0181] tctgggcatt gaagagtga gtaattatg tagtctcac tgtctaggct tattgtacc 1500  
[0182] catcctctt agaaaggct tccagatatt tgaagtact tggatattgt gatgtaagct 1560  
[0183] gtatctgatt tagagagcac cccaatcca gtaactgt tttctgcag actcatggag 1620  
[0184] gtactacct gatggtctg gaaaagatcc agaagaatc tctgcattat caggcagaga 1680  
[0185] gactcctgt ccattctgt acttctctc aagcaaaaag agtctcact tcttctct 1740  
[0186] gagccacata aagccggcg ggagtgaca caagcatccc tgtggccacc accactatga 1800  
[0187] ctgcattggg tcagacctga agccagcaca gcagtggggc ttgccaaggc tggctgtaac 1860  
[0188] cacttctgg ctactgccta ttttctga aggcctggg gctctacaat tagctggtgg 1920  
[0189] caaagccggc caggcctgtg tcttccctt cagagccgtg aggtcccca ggccccaggt 1980  
[0190] gagtccagag gtgcctttg ggaatcaggg actagagtaa aaaacttg aagtctagct 2040  
[0191] ggtgtctat tgtactgtg ctgagctgt atcagacca ccagatgcag tcttccac 2100  
[0192] tcttcttc cttccaaa tgcagaggag cctcaccca tagccactgt caaccagc 2160  
[0193] cacgaggagt actgccagc tacctcaat atccctaa gcacgaggt atcttaagc 2220  
[0194] aagcttgtg tgaatgctc ctgcctggg actgcctt caggcgaatg ggtccctc 2280  
[0195] tggcctgggg caggtcaga aatggtgtcc aacagtcaag tctggaatc ggagacctca 2340  
[0196] agageccact tggctctta cccactgtg gctgtctgg tacctaaggt gcaagacaaa 2400  
[0197] gccctctta ctttcttc tcttctc aacagaagg agtttgcct tgttccacc 2460  
[0198] acagctagta atgtctgag tctacctga agccagcaag tctcagaggc tcaaccaagg 2520  
[0199] gccttgacat agtacctaaa tgaactgct ggtattcag ggtcctgcca acctcagtt 2580  
[0200] agcaggtgat gaatgctgc aggactgagt ccttcttc aaggtagtgg gtttctct 2640

[0201] gacctatggt gtgtctagaa atgtcatctg ggaactaggg cctggaatgg gggcctcagc 2700  
[0202] actcttccca gtcccctatt ctgccgcagc tgaactggta tccaagatgc aagatgaagt 2760  
[0203] cctccccact ctctttctc ctctccacaa gcagaaggaa agggctctct ttggagccac 2820  
[0204] gggctgtgca gcctggagtt aggggaagggg tgacgccagc acgccctgg ctgccttagc 2880  
[0205] tgggtctca gtatgcacc tgcctccca gttactgcc tctgggcta gttcagcact 2940  
[0206] agaactgcc tgagatctgc agtctcatg gcctgggctg ctttcaagt ttactggag 3000  
[0207] acccagactg tagccctcgg tggtagggt tgcaggaact caagtttaga cactgggat 3060  
[0208] cagtattcc cctctgggta gggctgttat taaatctcc ctccatggc aggcctcagc 3120  
[0209] tgagttgggt gtggtttcc ttctgccgt aacaggacag cactgagtc agtgcacac 3180  
[0210] agttgctgtg ttctccctc cgtgcacga gagatctct cagtaccaca acacagctgc 3240  
[0211] aggggcagag gggcctcagt gattcaggac tgttttctg atttctcgg tctctcttc 3300  
[0212] agcattataa agttaagagc aggtactatg agtgcctacc tgattttaa cacctatga 3360  
[0213] agttgttaa tgggtctct tgtggagggg gatgatagct gcagtctct attctccat 3420  
[0214] tttctctgt ctctcattt tttttttt tttttggag acggagtctt gctctgtcac 3480  
[0215] ccaggctgga gtcaatggc acgatctcgg ctactgcag cctccgcctc caggttcaag 3540  
[0216] cgattctct gcctcagact cctgagtagc tgggactaca ggtgtacca tgaacagcta 3600  
[0217] aatttaattt ttttaattat tatatattgt gggcgaagga ttacctaggt gccgaggcaa 3660  
[0218] gagactaaag gcacaaactg ttccagtata ataaagaaaa tagaataaga atagcataa 3720  
[0219] taciaaattag atatagagat gatcgtggac aattatcaat cattattata aacattatta 3780  
[0220] atcattagct ttaataatta ctctttgtg cattactaat ataacctagg aataaccage 3840  
[0221] gggatatagg tcaggtgctg aaagcacatt gtgacaagtt acctagaagg caagagctga 3900  
[0222] gccttctgtc acgcccgat aagggccgct tgaggctcc ttggtaagc ggtaatgcca 3960  
[0223] gtgtctggga agacaccac gacgtagcag accgcaaaag ggagtctct tctctgggtg 4020  
[0224] gagtcaggga acactctgt ccaccagctt cttgtgggag gctggatgtt atccaggcct 4080  
[0225] gcccacagtt atccggagc ctaaaccct cctgtgggtg ctgtgctca gtggtcacgc 4140  
[0226] tcttctcca ctctcatgt cctccagcac tctgggtcc ttttgaagt tctagtaga 4200  
[0227] taacggtaga agaaatagtg aaaggctta agtctttgac cttcttata agtgcataga 4260  
[0228] agaaaacgct gatgtatgcc acctctctc tgettcagct acctaaaagg gaagggeccc 4320

[0229] ctgtcctatg atcacatgac ttgcttcaac ttgcaatca cttagaagat tcacctcct 4380  
[0230] taccctgccc cctggtcttg tatgcaataa atalcagcgt gccagccat teggaccac 4440  
[0231] tacctgtctc cgtgtcttaa tggtagtggc ccctgggcc cagctgtttt ctctttatct 4500  
[0232] cttgtcctg tgtctttatt tattacaate tctcatctcc gtacatggcg agaacacctg 4560  
[0233] ctaagccccg taggcctcaa ctctacaata tttttttt atattgccca ggtagtccc 4620  
[0234] taactcctgg gtcaagtga tctcccacc tgcacctccc aaagtgctat aattacaggt 4680  
[0235] atgagccaca ccacaccgg ccaataatac acgtatcttt gcaagcataa acattcaggt 4740  
[0236] atcctaacaa cagtctcata agtataagag ttatgagtag atgaactgta tcataaaga 4800  
[0237] aataggccaa aaagtaaat gtattaacat atatgattgg taattgtgtg cactcaactt 4860  
[0238] tataactgtg gtcatctgaa ataccaagat ggacaatata agtcttttga caaatcaat 4920  
[0239] aaaaatccgc agtgagttac caccacacat gcagttgcc aaaagccaa gatctcaaaa 4980  
[0240] tttttatct tcacaaata tggatgtaca aaaagaagat atttattga ggaagttgca 5040  
[0241] atgtttttac atacatgcac aatgcttaca caaattcagc ttcgtgataa tgcactttca 5100  
[0242] tggagtcaaa tttgcaaaaa tgcataaaat gaattagaac tttctaaca tctttataca 5160  
[0243] atttatacct tcagtattaa aatggactg aggaggccgg gcacagtggc tcacacctgt 5220  
[0244] aatccctgac tttgagaggc tgaagtgggc ggatcacttg aggttaggag ttggagacct 5280  
[0245] gcctggccaa catagtgaaa ccctgtctgt agtaaaaata caaaaattaa cacttgagcc 5340  
[0246] caggaggcgg aggttggagt gagctgagat tgtaccactg cactccagcc tgggtgacaa 5400  
[0247] agtgagacc tgtctcaata aaaaataaaa ataaaaaag tatgttatta tttcctgttt 5460  
[0248] tattgtctaa aatggctat gaagtgtct gttgtgttt tatgtttctc aaatcctt 5520  
[0249] taaaaaatat aaataaagaa ttttaagaa ttttfaaat tttttgtca agaattatat 5580  
[0250] tttcaggatt ttaatcattt gggattggaa tttggggat tttggacttc agggattttg 5640  
[0251] atcttcagg attcatcat ttgggattat aacattcaag attgtgtctt ttgggattat 5700  
[0252] ggcccaaacc catgcaatgg gccagtctt tgaaggaat agtgttccat aactcacaca 5760  
[0253] aggagaaata gaaaattga ataggcctat acctgttaa ctaaatcaat gatttgccaa 5820  
[0254] agagtaata aggtttggac tacatttatg tcagcaaga ggagaggaca gattaattca 5880  
[0255] ttcaataagt gattgagtag atacctactg gtgtcaggca ttgttctagg cactgggaat 5940  
[0256] acagcagcaa acaaatgat tgagtagata cctactggtg tcaggcattg ttctaggcac 6000

- [0257] tgggaataca gcagcaaaca aaatagatca ccccttgggg ctttcaagtg gagtatcggt 6060
- [0258] gacagagtgg gtgtctgatt ggatcggg gaaaaggaga aaggtgcat gaggcaattc 6120
- [0259] aggggtcatt ggtacctgga ttttcacct tgaacaacta agtgatatca ttggacttgt 6180
- [0260] tgggtagaca aggtctaggg gacatccaga tggactcatt ttcacagcta gcaagagaga 6240
- [0261] cattctgaag atcaatagta agggagaaac tggagtaga gactttgggg tcctaagagg 6300
- [0262] cagttagaac catgggagta gatgattgta taagataaat agttttgcct cttacttccc 6360
- [0263] ccacccaac aaatgaaatg gaatcagaag ttaggagga gaactagggg aaattaggaa 6420
- [0264] gtgagatgtt catcaggga aaatgatct gacggatcaa atgggacaag aaatgtgaaa 6480
- [0265] aaaatcattt tacactttta tccatctatt gatggataaa atttaacaa aattgagtca 6540
- [0266] ctgaatttga tcattgatca aatttttctt actctgataa gattttcag aaaactctga 6600
- [0267] tcagagtttt cttactctga tatctcatat tcaaaaggga aagaaaatca acaacacaat 6660
- [0268] aaacaacctc ctgaggaatg cagtgtataa gcaaggcttg gtgtgttgtt tcgcaaaaaa 6720
- [0269] tcttgctttg tcagcattaa tactaacaga taacatgaga agaggcaaaa gtgttggtca 6780
- [0270] aatgtaccat aactgcctgg gaatagttat ctgtagtcta tttttttt ttctcatcta 6840
- [0271] aagttcttag atgaaagaga gctgggttac tgtgaaccaa aatctcctgc t 6891
- [0272]
- [0273] <210> 2
- [0274] <211> 21
- [0275] <212> DNA
- [0276] <213> 特异性扩增lncRNAsT267384的引物序列F
- [0277]
- [0278] <400> 2
- [0279] tctgggcatt gaagagtgaa g 21
- [0280]
- [0281] <210> 3
- [0282] <211> 22
- [0283] <212> DNA
- [0284] <213> 特异性扩增lncRNAsT267384的引物序列R

- [0285]
- [0286] <400> 3
- [0287] agagggatgg gtacaaataa gc 22
- [0288]
- [0289] <210> 4
- [0290] <211> 687
- [0291] <212> DNA
- [0292] <213> lncRNA ENST00000564363序列
- [0293]
- [0294] <400> 4
- [0295] ttccaactac atgtctattt ttattcaat atattaaata tattaatcag aaaagtcaca 60
- [0296] tactataaat ccaggaaaat acacaaatat aaatgacaga atctgtcatt tgtcttctc 120
- [0297] ctagagtgac agtttatgta catgtggaag gagggtagga agagagagcc agcaggaggc 180
- [0298] tggaaaggct gcccaggaag gcggggccca tcccttctc ccagccccgc tcccacctca 240
- [0299] agctctttct tctgtattt acagcagcac tgggcttatt tacagcacgg cgctatgtgt 300
- [0300] taaaaacggt ttatcttaca aaaaacataa aggccggggc caggctgggg gggataagac 360
- [0301] aaatcgtggg gtcaccccca tgaaggcacc cccctcccca agggcttggg ggtgctctgg 420
- [0302] gggctccgtg actaaaggca catgggggtg catatgagag tgcgcatgtg cacacgtgtt 480
- [0303] cccaggcagg ggtcagaagg gcagcgtgtc catgaagacc ttgtcaatga tgggtggagg 540
- [0304] gggcaccaag tctccagct tgaggtagaa gatgcgctgc aggcctggg tgcacagggt 600
- [0305] ccgcagctcg ggcagtttc ccaacagacg tgacaggcag ctggctggct ggggctcgcc 660
- [0306] cgccacagct gccacgtgct cttcag 687
- [0307]
- [0308]
- [0309] <210> 5
- [0310] <211> 21
- [0311] <212> DNA
- [0312] <213> 特异性扩增lncRNAs ENST00000564363的引物序列F

[0313]

[0314] <400> 5

[0315] acaaaaaaca taaaggccgg g 21

[0316]

[0317] <210> 6

[0318] <211> 18

[0319] <212> DNA

[0320] <213> 特异性扩增lncRNAs ENST00000564363的引物序列R

[0321]

[0322] <400> 6

[0323] agagcacccc caagccct 18

[0324]

## 权利要求书

- [权利要求 1] 用于青光眼诊断的分子标记物lncRNAsT267384，其序列如SEQ ID NO:1所示。
- [权利要求 2] 检测lncRNAsT267384表达水平的产品在制备青光眼诊断工具中的应用。
- [权利要求 3] 根据权利要求2所述的应用，其特征在于，所述的检测lncRNAsT267384表达水平的制剂包括：通过实时荧光定量PCR检测lncRNAsT267384表达水平的制剂。
- [权利要求 4] 根据权利要求3所述的应用，其特征在于，用实时荧光定量PCR检测lncRNAsT267384表达水平的制剂包括特异性扩增lncRNAsT267384的引物。
- [权利要求 5] 根据权利要求4所述的应用，其特征在于，用实时荧光定量PCR检测lncRNAsT267384表达水平的特异性扩增lncRNAsT267384的引物序列为：  
F:5'-TCTGGGCATTGAAGAGTGAAG-3'，  
R:5'-AGAGGGATGGGTACAAATAAGC-3'。
- [权利要求 6] 一种用于青光眼诊断的试剂盒，其特征在于，包含检测lncRNAsT267384表达水平的试剂。
- [权利要求 7] 根据权利要求6所述的用于青光眼诊断的试剂盒，其特征在于，包含通过实时荧光定量PCR检测lncRNAsT267384表达水平的试剂。
- [权利要求 8] 根据权利要求7所述的用于青光眼诊断的试剂盒，其特征在于，所述的通过实时荧光定量PCR检测lncRNAsT267384表达水平的试剂包含通过实时荧光定量PCR特异性扩增lncRNAsT267384的引物。
- [权利要求 9] 根据权利要求7或8所述的用于青光眼诊断的试剂盒，其特征在于，所述的通过实时荧光定量PCR检测lncRNAsT267384表达水平的试剂包含一对通过实时荧光定量PCR特异性扩增lncRNAsT267384的引物，其引物序列为：  
F:5'-TCTGGGCATTGAAGAGTGAAG-3'，

R:5'-AGAGGGATGGGTACAAATAAGC-3'。

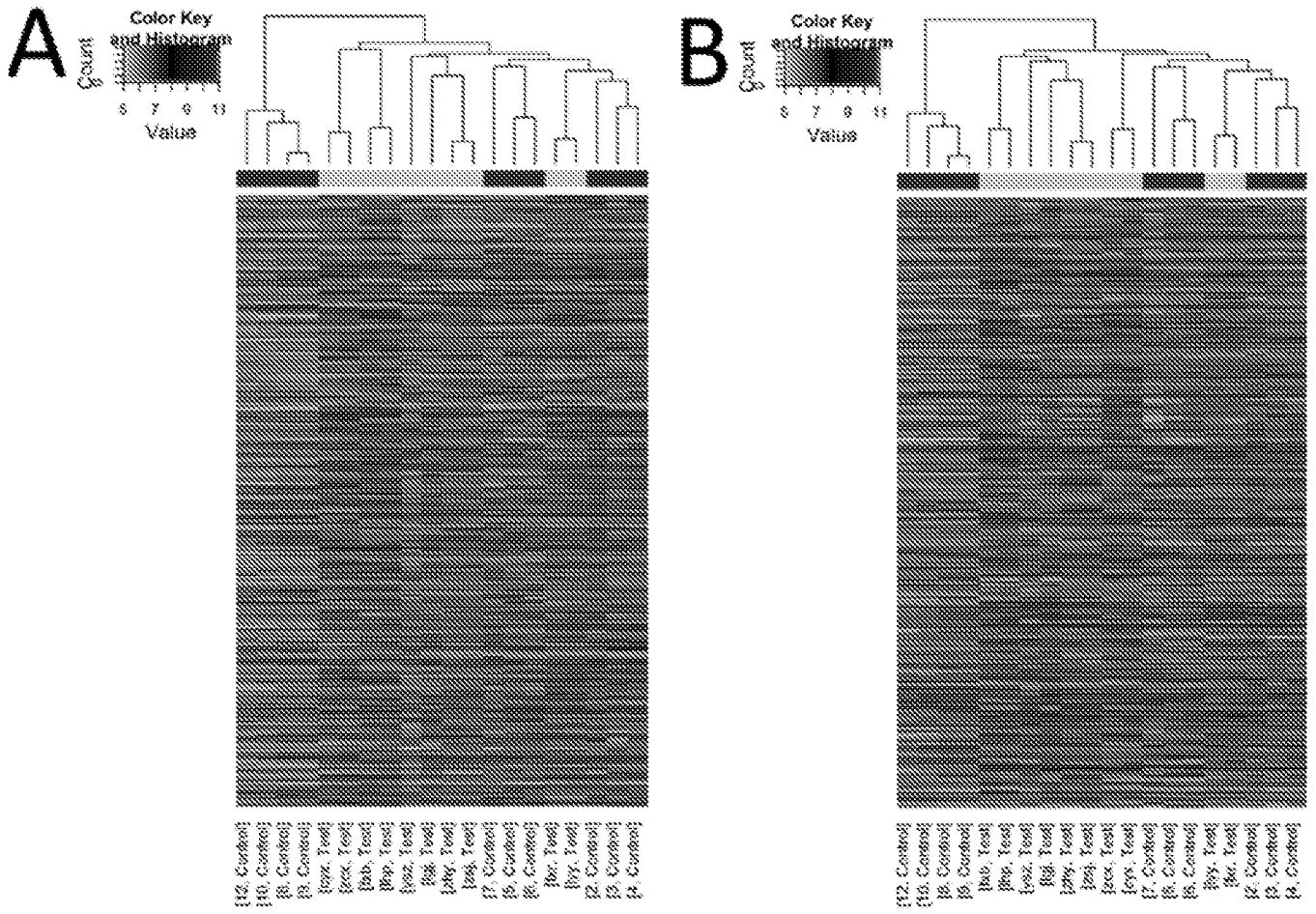
- [权利要求 10] 用于青光眼诊断的分子标记物lncRNAs  
ENST00000564363, 其序列如SEQ ID NO:4所示。
- [权利要求 11] 检测lncRNAs ENST00000564363表达水平的产品在制备青光眼诊断工具中的应用。
- [权利要求 12] 根据权利要求11所述的应用, 其特征在于, 所述的检测lncRNAs  
ENST00000564363表达水平的产品包括: 通过实时荧光定量PCR检测  
lncRNAs ENST00000564363表达水平的制剂。
- [权利要求 13] 根据权利要求12所述的应用, 其特征在于, 用实时荧光定量PCR 检  
测lncRNAs  
ENST00000564363表达水平的制剂包括特异性扩增lncRNAs  
ENST00000564363的引物。
- [权利要求 14] 根据权利要求13所述的应用, 其特征在于, 用实时荧光定量PCR 检  
测lncRNAs ENST00000564363表达水平的特异性扩增lncRNAs  
ENST00000564363的引物序列为:  
F:5' ACAAAAACATAAAGGCCGGG3',  
R:5' AGAGCACCCCAAGCCCT3'。
- [权利要求 15] 一种用于青光眼诊断的试剂盒, 其特征在于, 包含检测lncRNAs  
ENST00000564363表达水平的试剂。
- [权利要求 16] 根据权利要求15所述的用于青光眼诊断的试剂盒, 其特征在于, 包含  
通过实时荧光定量PCR检测lncRNAs ENST00000564363表达水平的试  
剂。
- [权利要求 17] 根据权利要求16所述的用于青光眼诊断的试剂盒, 其特征在于, 所述  
的通过实时荧光定量PCR检测lncRNAs ENST00000564363表达水平的  
试剂包含通过实时荧光定量PCR特异性扩增lncRNAs  
ENST00000564363的引物。
- [权利要求 18] 根据权利要求16或17所述的用于青光眼诊断的试剂盒, 其特征在于,  
所述的通过实时荧光定量PCR检测lncRNAs ENST00000564363表达水

平的试剂包含一对通过实时荧光定量PCR特异性扩增lncRNAs

ENST00000564363的引物，其引物序列为：

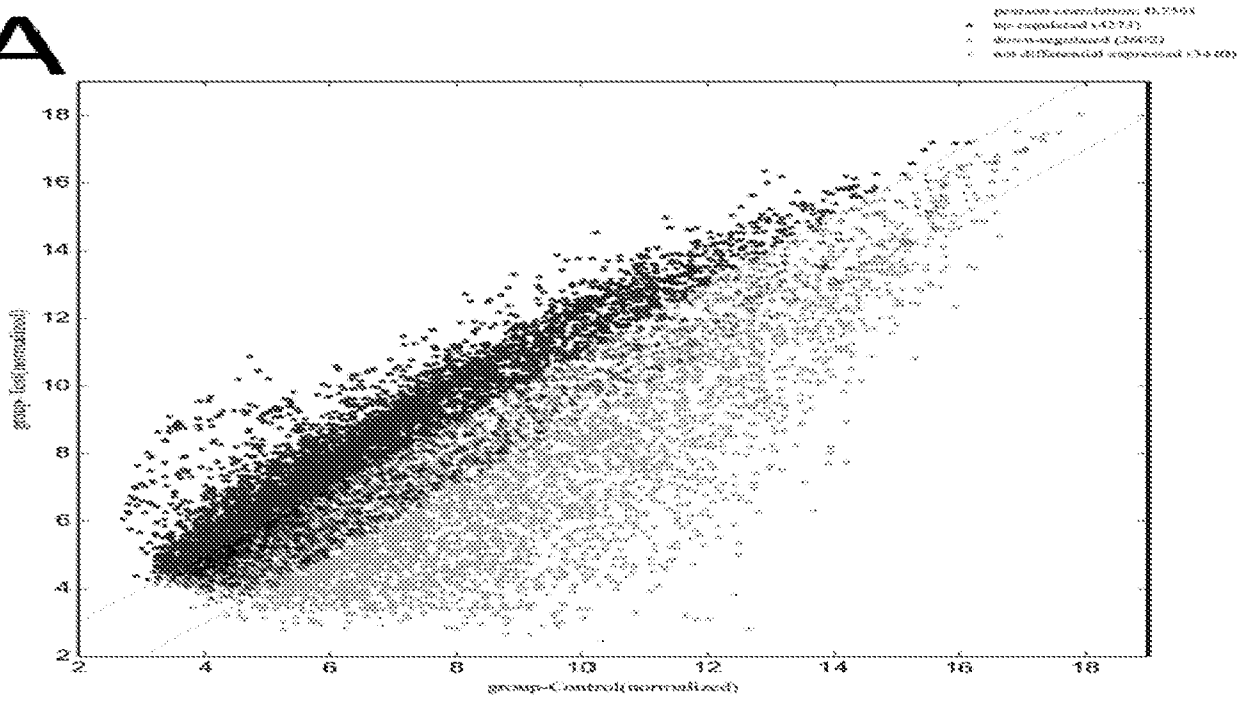
F:5' ACAAAAACATAAAGGCCGGG3'，

R:5' AGAGCACCCCAAGCCCT3'。



1

**A**



**B**

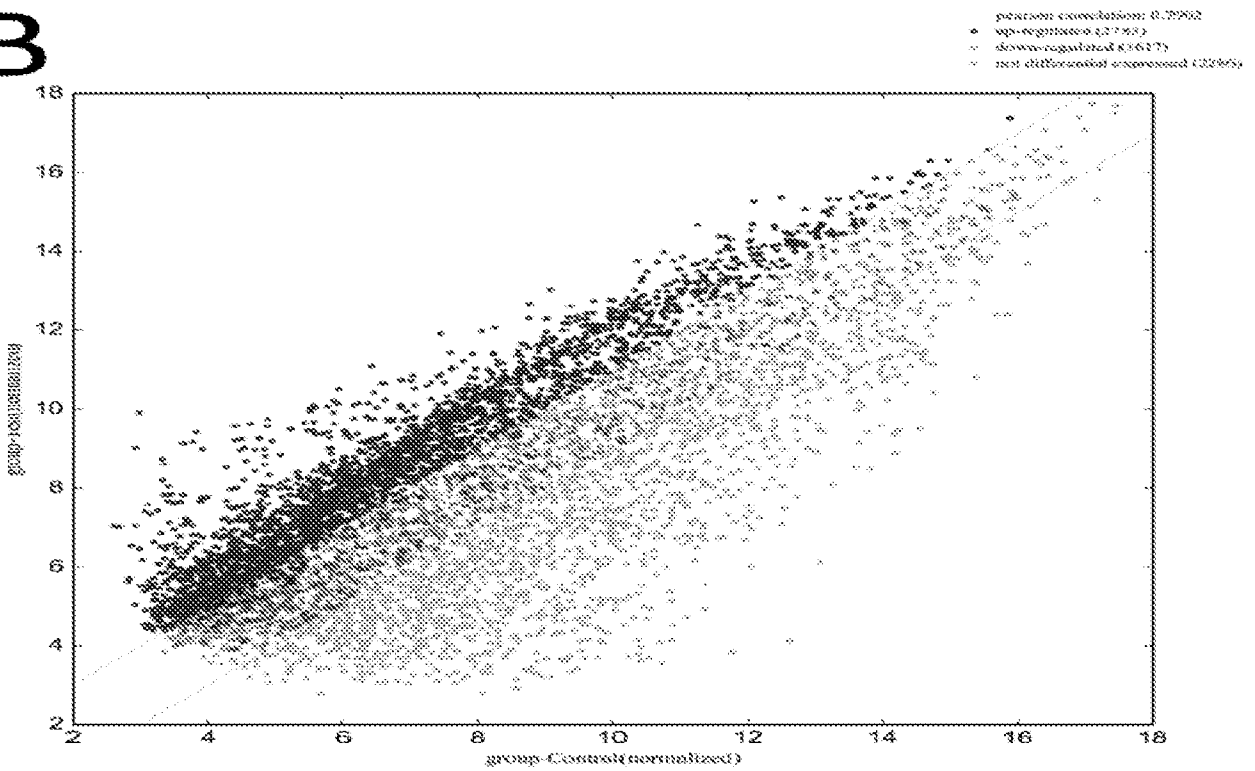


图 2

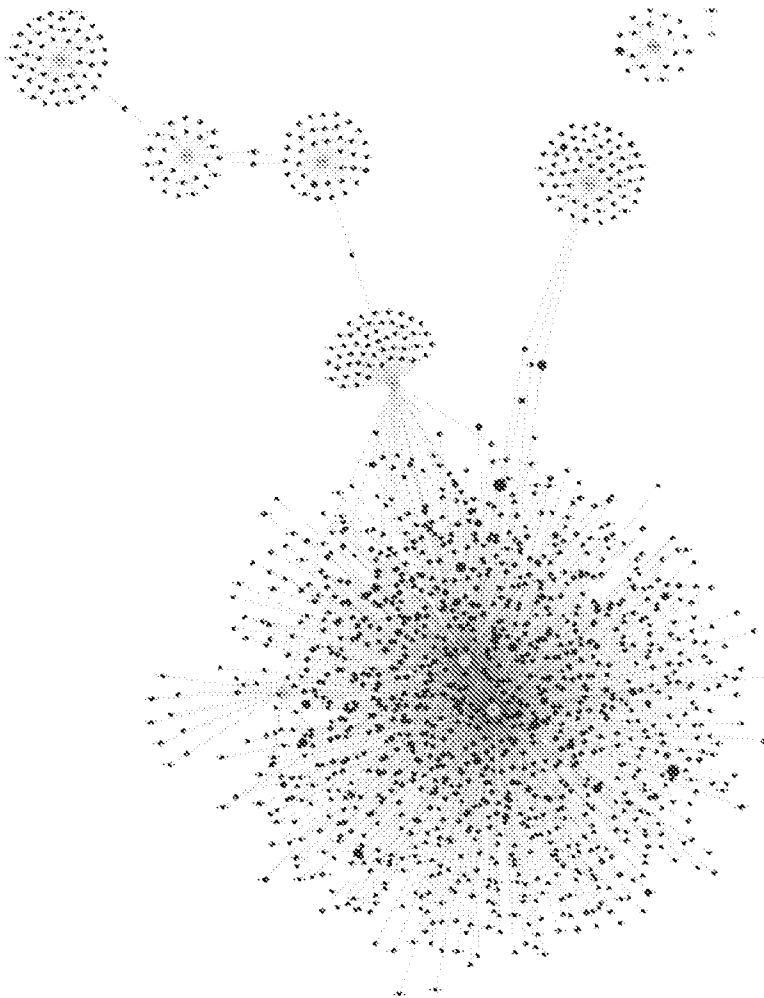


图 3

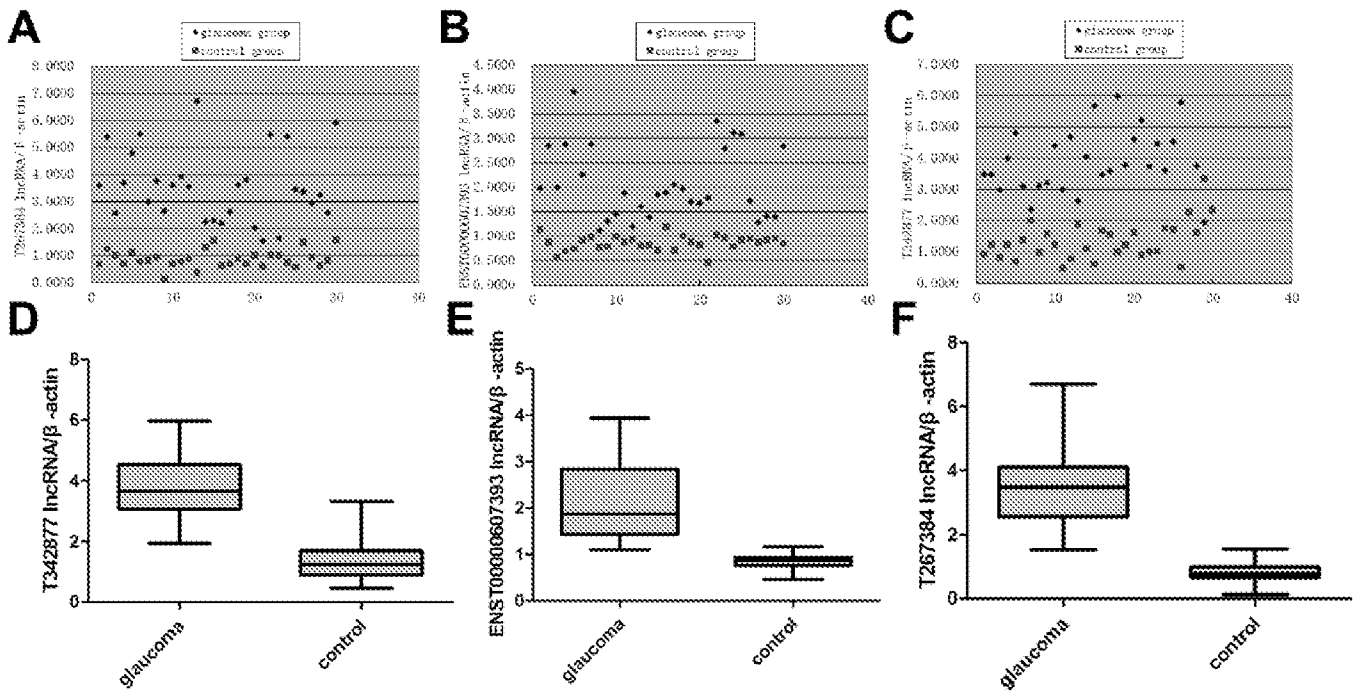


图 4

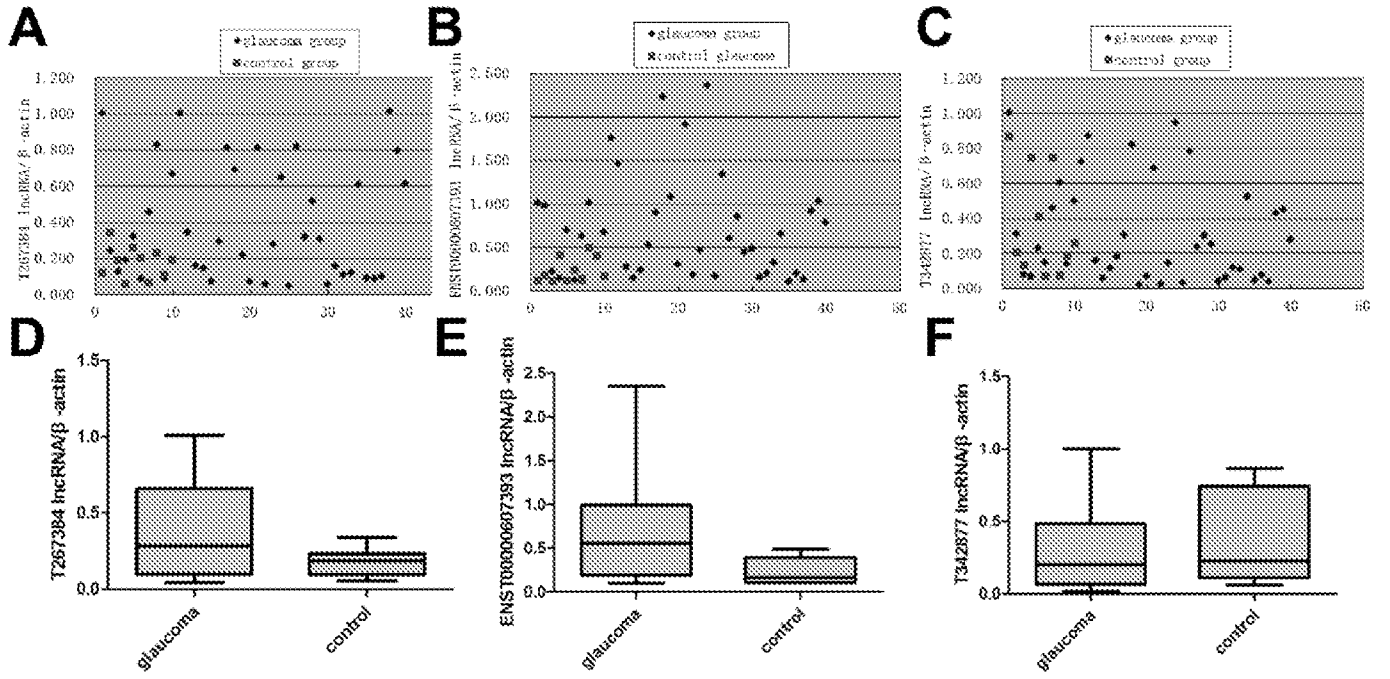


图 5

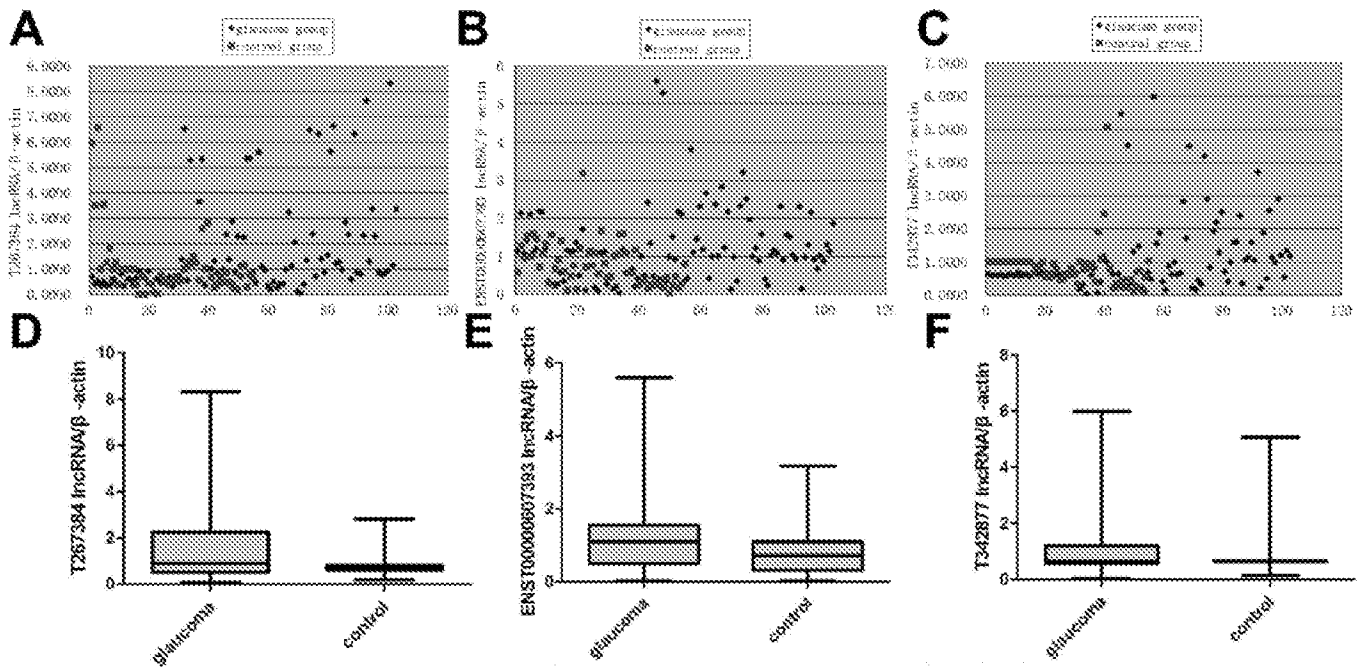


图 6

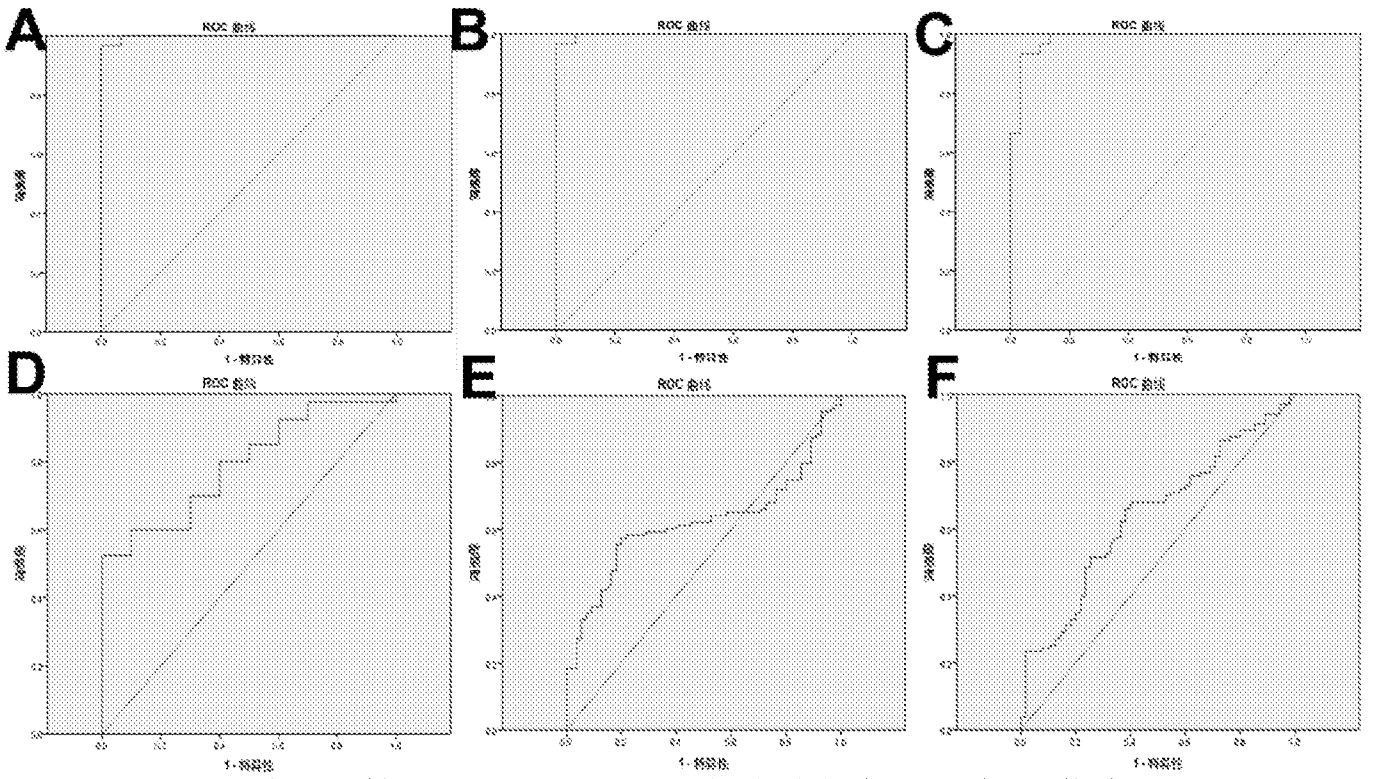


图 7

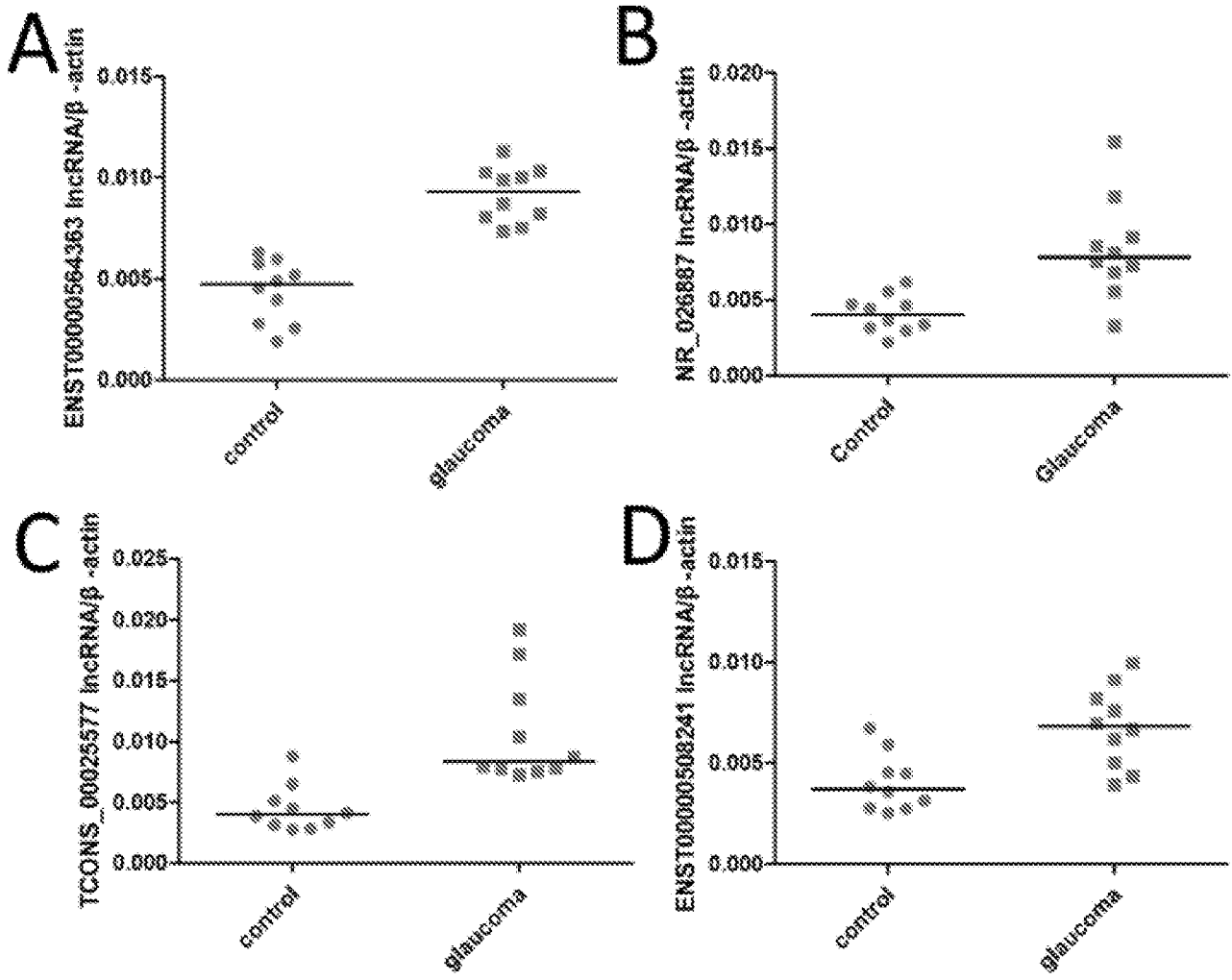


图 8

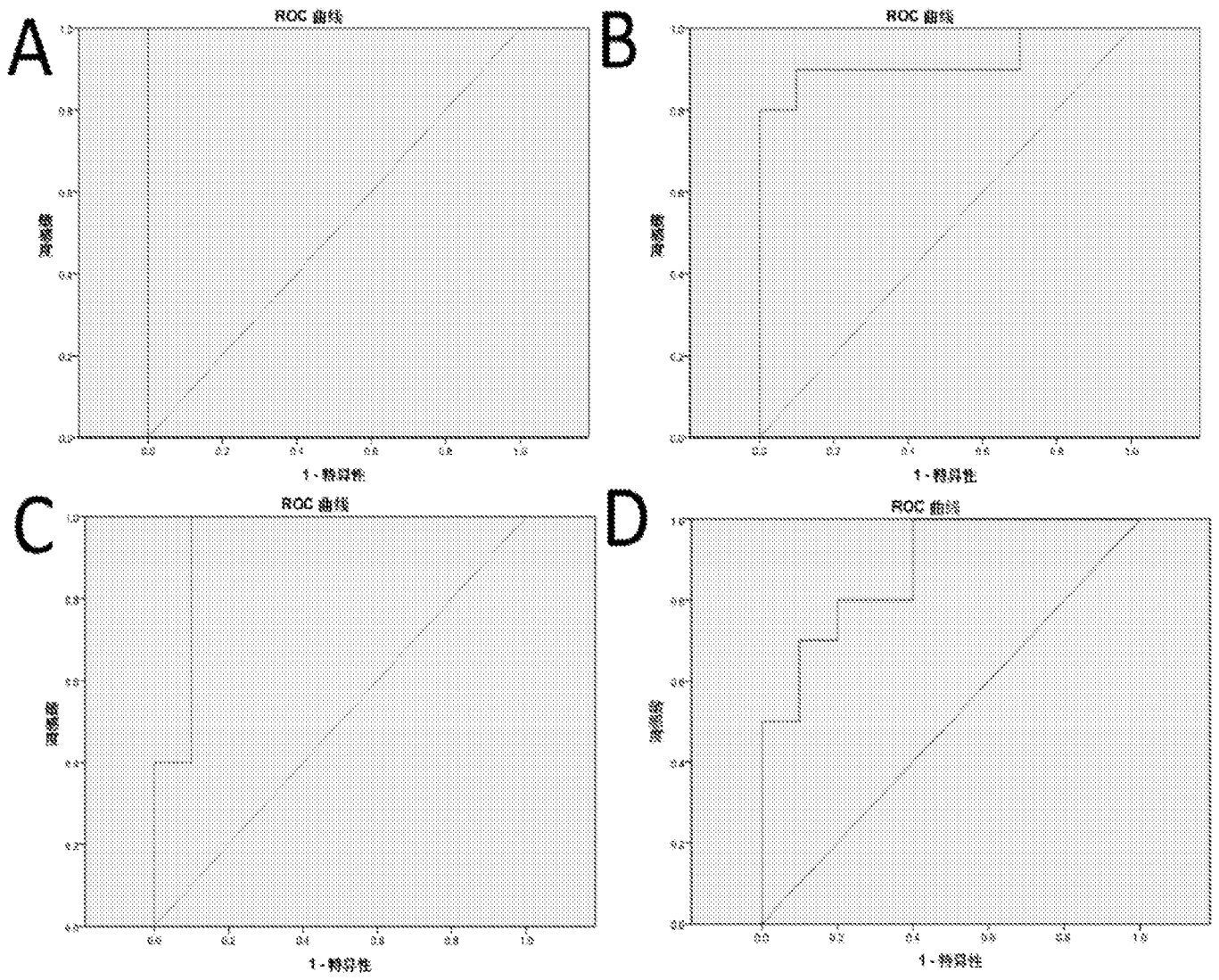


图 9

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/088324

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
C12Q 1/6883(2018.01)i; C12N 15/113(2010.01)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; C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
DWPI, SIPOABS, CPRSABS, CPEA, CNABS, JPABS, CNMED, KRABS, CNTXT, USTXT, WOTXT, EPTXT, JPTXT, KRTXT, CNKI, 万方, WANFANG, ISI Web of Science, 中国专利生物序列检索系统, NATIONAL BIO-SEQUENCE DATABASE OF CHINESE PATENT, REGISTRY: 青光眼, 绿内障, 绿风内障, 青风内障, 长链非编码, glaucoma, glaucomatous, cataracta, long noncoding, long non-coding, lncRNA, T267384, ENST00000564363, RP11-429O22, AC073840, NR4A1, Nur77, search for SEQ ID NO: 1-6		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 107142316 A (THE SECOND XIANGYA HOSPITAL OF CENTRAL SOUTH UNIVERSITY) 08 September 2017 (2017-09-08) see entire document	1-9
PX	CN 107034303 A (THE SECOND XIANGYA HOSPITAL OF CENTRAL SOUTH UNIVERSITY) 11 August 2017 (2017-08-11) see entire document	10-18
X	"ENST00000564363.1" <a href="http://lncrna.big.ac.cn/index.php/ENST00000564363.1#Annotated_Information">http://lncrna.big.ac.cn/index.php/ENST00000564363.1#Annotated_Information</a> , 16 October 2014 (2014-10-16),	10
X	SUN, Chuanzheng et al. "Genome-Wide Analysis of Long Noncoding RNA Expression Profiles in Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease" <i>International Union of Biochemistry and Molecular Biology</i> , Vol. 67, No. (11), 16 October 2015 (2015-10-16), pages 847-852, see abstract, table 3, and page 849, Real time-PCR Validation	15-18
<input checked="" 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
21 August 2018		31 August 2018
Name and mailing address of the ISA/CN		Authorized officer
State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088 China		
Facsimile No. (86-10)62019451		Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

**PCT/CN2018/088324**

<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 105002182 A (EYE HOSPITAL NANJING MEDICAL UNIVERSITY) 28 October 2015 (2015-10-28) see entire document	1-18
.....		

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
  - a.  forming part of the international application as filed:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
    - on paper or in the form of an image file.
  - b.  furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
  - c.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
    - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

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

International application No.

**PCT/CN2018/088324**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	107142316	A	08 September 2017	None			
CN	107034303	A	11 August 2017	None			
CN	105002182	A	28 October 2015	CN	105002182	B	23 March 2018

<p><b>A. 主题的分类</b></p> <p>C12Q 1/6883(2018.01)i; C12N 15/113(2010.01)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></p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C12Q; C12N</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))</p> <p>DWPI, SIPOABS, CPRSABS, CPEA, CNABS, JPABS, CNMED, KRABS, CNTXT, USTXT, WOTXT, EPTXT, JPTXT, KRTXT, CNKI, 万方, ISI Web of Science, 中国专利生物序列检索系统, REGISTRY: 青光眼, 绿内障, 绿风内障, 青风内障, 长链非编码, glaucoma, glaucomatous, cataracta, long noncoding, long non-coding, lncRNA, T267384, ENST00000564363, RP11-429022, AC073840, NR4A1, Nur77, SEQ ID NO: 1-6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>PX</td> <td>CN 107142316 A (中南大学湘雅二医院) 2017年 9月 8日 (2017 - 09 - 08) 参见全文</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>PX</td> <td>CN 107034303 A (中南大学湘雅二医院) 2017年 8月 11日 (2017 - 08 - 11) 参见全文</td> <td>10-18</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>"ENST00000564363.1" <a href="http://lncrna.big.ac.cn/index.php/ENST00000564363.1#Annotated_Information">http://lncrna.big.ac.cn/index.php/ENST00000564363.1#Annotated_Information</a>, 2014年 10月 16日 (2014 - 10 - 16),</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>Chuanzheng Sun等. "Genome-wide Analysis of Long Noncoding RNA Expression Profiles in Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease" International Union of Biochemistry and Molecular Biology, 第67卷, 第11期, 2015年 10月 16日 (2015 - 10 - 16), 第847-852页 参见摘要, 表3, 第849页 Real time-PCR Validation</td> <td>15-18</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 105002182 A (南京医科大学眼科医院) 2015年 10月 28日 (2015 - 10 - 28) 参见全文</td> <td>1-18</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	PX	CN 107142316 A (中南大学湘雅二医院) 2017年 9月 8日 (2017 - 09 - 08) 参见全文	1-9	PX	CN 107034303 A (中南大学湘雅二医院) 2017年 8月 11日 (2017 - 08 - 11) 参见全文	10-18	X	"ENST00000564363.1" <a href="http://lncrna.big.ac.cn/index.php/ENST00000564363.1#Annotated_Information">http://lncrna.big.ac.cn/index.php/ENST00000564363.1#Annotated_Information</a> , 2014年 10月 16日 (2014 - 10 - 16),	10	X	Chuanzheng Sun等. "Genome-wide Analysis of Long Noncoding RNA Expression Profiles in Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease" International Union of Biochemistry and Molecular Biology, 第67卷, 第11期, 2015年 10月 16日 (2015 - 10 - 16), 第847-852页 参见摘要, 表3, 第849页 Real time-PCR Validation	15-18	A	CN 105002182 A (南京医科大学眼科医院) 2015年 10月 28日 (2015 - 10 - 28) 参见全文	1-18
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
PX	CN 107142316 A (中南大学湘雅二医院) 2017年 9月 8日 (2017 - 09 - 08) 参见全文	1-9																		
PX	CN 107034303 A (中南大学湘雅二医院) 2017年 8月 11日 (2017 - 08 - 11) 参见全文	10-18																		
X	"ENST00000564363.1" <a href="http://lncrna.big.ac.cn/index.php/ENST00000564363.1#Annotated_Information">http://lncrna.big.ac.cn/index.php/ENST00000564363.1#Annotated_Information</a> , 2014年 10月 16日 (2014 - 10 - 16),	10																		
X	Chuanzheng Sun等. "Genome-wide Analysis of Long Noncoding RNA Expression Profiles in Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease" International Union of Biochemistry and Molecular Biology, 第67卷, 第11期, 2015年 10月 16日 (2015 - 10 - 16), 第847-852页 参见摘要, 表3, 第849页 Real time-PCR Validation	15-18																		
A	CN 105002182 A (南京医科大学眼科医院) 2015年 10月 28日 (2015 - 10 - 28) 参见全文	1-18																		
<p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																				
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>"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)</p> <p>"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&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																			
2018年 8月 21日	2018年 8月 31日																			
ISA/CN的名称和邮寄地址	受权官员																			
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	幸颖																			
传真号 (86-10)62019451	电话号码 62411044																			

## 第I栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列列表进行的:
- a.  作为国际申请的一部分提交的:
- 附件C/ST. 25文本文件形式
  - 纸件或图形文件形式
- b.  根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:
- c.  仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:
- 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))
  - 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)
2.  另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。
3. 补充意见:

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号 PCT/CN2018/088324
----------------------------

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	107142316	A	2017年 9月 8日	无	
CN	107034303	A	2017年 8月 11日	无	
CN	105002182	A	2015年 10月 28日	CN 105002182	B 2018年 3月 23日