

(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 2020/007227 A1

(51) 国际专利分类号:
C12Q 1/6883 (2018.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/093281

(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:
201810717413.X 2018 年 7 月 3 日 (03.07.2018) CN
201810720285.4 2018 年 7 月 3 日 (03.07.2018) 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

OTOLARYNGOLOGY) [CN/CN]; 中国北京市东城区后沟胡同 17 号, Beijing 100005 (CN)。

(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)。

(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)。

(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,

(54) Title: METHOD AND KIT FOR DETECTING CHRONIC RHINOSINUSITIS WITH NASAL POLYPS SUBTYPE AND USE OF ALOX15 GENE 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 ALOX15 基因作为生物标志物的应用

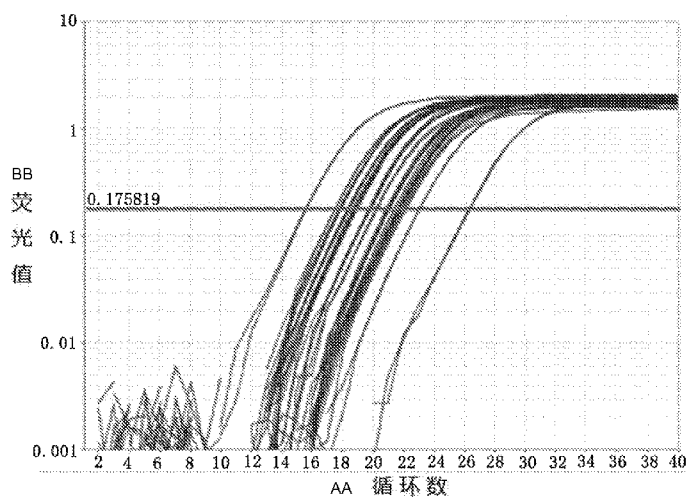


图 1

AA CYCLE NUMBER
BB FLUORESCENCE VALUE

(57) Abstract: Disclosed are a kit for detecting chronic rhinosinusitis with nasal polyps subtype and the use of an ALOX15 gene as a biomarker, and the method for and the use of detecting the expression amount of the ALOX15 gene in cast-off cells in a nasal cavity. The kit comprises specific primers of the ALOX15 gene. The ALOX15 gene, as a biomarker, can be made into a product for detecting chronic rhinosinusitis with nasal polyps subtype. The detection method of the present disclosure comprises the following steps: extracting RNAs from cast-off cells in the nasal cavity, reverse transcribing the total RNA into cDNA, carrying out real-time fluorescence quantitative PCR amplification of the ALOX15 gene and a reference gene of the cDNA respectively with the specific primers of the ALOX15 gene and specific primers of the reference gene by using a quantitative polymerase chain reaction, and calculating the expression amount of

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, 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))。

the ALOX15 gene based on a detection result of an amplification product.

(57) 摘要: 本公开提出一种用于检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型的试剂盒及ALOX15基因作为生物标志物的应用, 以及检测鼻腔脱落细胞中ALOX15基因表达量的方法及应用。其中所述试剂盒包括ALOX15基因的特异性引物。所述ALOX15基因作为生物标志物能够制备用于检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型的产品。本公开的检测方法包括以下步骤: 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ALOX15基因和内参基因分别采用ALOX15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ALOX15基因表达量。

检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型的方法和试剂盒及 ALOX15 基因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 201810717413.X、名称为“用于检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型的试剂盒及 ALOX15 基因作为生物标志物的应用”的中国专利申请，和于 2018 年 7 月 3 日提交中国国家知识产权局的申请号为 201810720285.4、名称为“检测鼻腔脱落细胞中 ALOX15 基因表达量的方法及应用”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 ALOX15 基因作为生物标志物的应用，以及一种检测鼻腔脱落细胞中 ALOX15 基因表达量的方法。

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，对大环内酯类药物治疗反应好。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. 每张图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。

近年兴起的实时荧光定量 PCR 弥补了上述技术的不足。该方法是在 PCR 反应体系中加入荧光基团,利用荧光信号的积累实时监测整个 PCR 过程,最后根据荧光信号对所测 DNA 样品进行定量分析,该方法操作简便,敏感性高,重复性好且结果准确性高。然而现有技术中尚未公开有效提供检测鼻腔脱落细胞中 ALOX15 基因表达量的方法,以更好的获取到鼻腔脱落细胞内 ALOX15 基因含量情况。

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 ALOX15 基因的特异性引物。

本公开还提供了一种 ALOX15 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 ALOX15 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 ALOX15 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 ALOX15 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 ALOX15 基因和内参基因分别采用 ALOX15 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 ALOX15 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 ALOX15 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 ALOX15 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 ALOX15 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 ALOX15 基因表达量。

附图说明

图 1 为本公开实验例一部分 ALOX15 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 ALOX15 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 ALOX15 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 ALOX15 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 ALOX15 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 ALOX15 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 ALOX15 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 ALOX15 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 ALOX15 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 ALOX15 基因实时荧光定量 PCR 扩增曲线图;

图 12 为本公开实验例二再一部分 ALOX15 基因实时荧光定量 PCR 扩增曲线图;

图 13 为本公开实验例二部分 ALOX15 基因实时荧光定量 PCR 熔解曲线图;

图 14 为本公开实验例二另一部分 ALOX15 基因实时荧光定量 PCR 熔解曲线图;

图 15 为本公开实验例二再一部分 ALOX15 基因实时荧光定量 PCR 熔解曲线图;

图 16 为本公开实验例三 ALOX15 基因实时荧光定量 PCR 扩增曲线图;

图 17 为本公开实验例三 ALOX15 基因实时荧光定量 PCR 熔解曲线图；

图 18 为本公开实验例四 ALOX15 基因实时荧光定量 PCR 扩增曲线图；

图 19 为本公开实验例四 ALOX15 基因实时荧光定量 PCR 熔解曲线图。

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 ALOX15 基因的上游引物如 SEQ ID NO:2 所示，所述 ALOX15 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 ALOX15 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 ALOX15 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 μ L~40 μ L 的逆转录混合液，以及 0 μ L~160 μ 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 μ L 的逆转录混合液，以及 0 μ L~8 μ 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 ALOX15 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、ALOX15 基因的上游引物、ALOX15 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 ALOX15 基因和内参基因进行实时荧光定量 PCR 反应的试剂包括：1 μ L~25 μ L 的 PCR 预混合液，0 μ L~50 μ L 的双蒸水，0 μ L~2 μ L 的机器荧光补偿及矫正剂，0.01~100 μ M 的 ALOX15 基因的上游引物，0.01~100 μ M 的 ALOX15 基因的下游引物，0.01~100 μ M 的内参基因的上游引物，0.01~100 μ 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 ALOX15 基因和内参基因进行实时荧光定量 PCR 反应的试剂包括：5 μ L 的 PCR 预混合液，0 μ L~10 μ L 的双蒸水，根据总体积用水补齐至 10 μ L，0.2 μ L 的机器荧光补偿及矫正剂，1 μ M 的 ALOX15 基因的上游引物，1 μ M 的 ALOX15 基因的下游引物，1 μ M 的内参基因的上游引物，1 μ 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 β -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 β -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 β -巯基乙醇的物质，200 μ L 的氯仿，200 μ L 的异丙醇，200 μ 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~2 mL 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 μ L 的去基因组 DNA 的重组 DNA 酶、0~10 μ L 的去基因组 DNA 的 DNA 酶缓冲液、20~100 μ 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~2 mL 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 μ L 的用于裂解细胞和抑制 RNA 降解的细胞裂解液、500 μ L 的洗涤用第一缓冲液、600 μ L 的洗涤用第二缓冲液、0.02 mL 的去 RNA 酶及去 DNA 酶的水、4 μ L 的去基因组 DNA 的重组 DNA 酶、5 μ L 10 $\times$ 去除基因组 DNA 的 DNA 酶缓冲液、41 μ 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 μ L 的用于裂解细胞和抑制 RNA 降解的细胞裂解液、500 μ L 的洗涤用第一缓冲液、600 μ 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 $\Delta Ct(Ct(AlOX15)-Ct(GAPDH))$ 分析法分析扩增产物的数据结果,且与所述 ΔCt 进行比较的界定值为 1.675。

在一种或多种实施方式中,ALOX15 基因的上游引物如 SEQ ID NO:2 所示,ALOX15 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℃ 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 μ 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 μ L ~700 μ 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 μ L~800 μ 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 μ L DNA 酶反应液,经静置处理后,加入 300 μ L~700 μ 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 μ L 10 $\times$ DNA 酶缓冲液、4 μ L 重组 DNA 酶,41 μ 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。

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。

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 μ 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 μ 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 μ L 第二缓冲液,12000 转/分钟,离心 30s,除去第二滤液;

步骤3: 取 5 μ L 10 $\times$ DNA 酶缓冲液、4 μ L 重组 DNA 酶, 41 μ 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 μ L DNA 酶反应液, 室温静置 15 分钟, 加入 350 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 β -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 μ 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 μ 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 μ 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 μ L, 加入 200 μ 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

μL 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 μL 的逆转录混合液、0~10 μL 的去 RNA 水解酶蒸馏水和提取的 RNA 于 37°C 温度条件下发生反转录反应 15min, 后于 84°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 μL 的所述逆转录混合液, 8 μL 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 μL 的总 RNA, 所述去 RNA 水解酶蒸馏水补齐至 10 μL ; 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。其中反应体系可按需求相应放大, 10 μL 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 μL ~25 μL 的 PCR 预混合液, 0 μL ~10 μL 的双蒸水补齐总体积用水至 10 μL , 0 μL ~2 μL 的机器荧光补偿及矫正剂, 0.01~100 μM 的 ALOX15 基因的上游引物, 0.01~100 μM 的 ALOX15 基因的下游引物, 0.01~100 μM 的内参基因的上游引物, 0.01~100 μM 的内参基因的下游引物, 0.01 μL ~5 μL 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 ALOX15 基因表达量。

在一种或多种实施方式中, 制备实时荧光定量 PCR 反应液: 包括 5 μL 的 PCR 预混合液, 2.8 μL 的双蒸水补齐总体积用水至 10 μL , 0.2 μL 的机器荧光补偿及矫正剂, 0.5 μL 的 ALOX15 基因的上游引物, 0.5 μL 的 ALOX15 基因的下游引物, 0.5 μL 的内参基因的上游引物, 0.5 μL 的内参基因的下游引物, 1ng/ μL 的所述 cDNA 或 0.01 μL 至 5 μL 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°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。

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°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。

在一种或多种实施方式中, 计算所述 ALOX15 基因表达量的方法为: 计算 ΔCT 或 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 来计算目的基因的表达量; 其中 $\Delta\text{CT} = (\text{CT}(\text{ALOX15}) - \text{CT}(\text{GAPDH}))$, $-\Delta\Delta\text{CT} = -(\Delta\text{CT}(\text{处理标本 CT}(\text{ALOX15}) - \text{CT}(\text{GAPDH})) - \text{健康对照组平均}\Delta\text{CT})$; 健康对照组平均 $\Delta\text{CT} = \sum \text{每个对照组}\Delta\text{CT}(\text{CT}(\text{ALOX15}) - \text{CT}(\text{GAPDH})) / \text{对照组样本数}$ 。

在一种或多种实施方式中, 所述检测 ALOX15 的试剂包括 ALOX15 基因的特异性引物, 优选地所述 ALOX15 基因的特异性引物的上游引物如 SEQ ID NO:2 所示, 所述 ALOX15 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 ALOX15 的试剂选自针对 ALOX15 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 ALOX15 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 ALOX15 基因表达量。

在一种或多种实施方式中, 根据 $\Delta\text{Ct}(\text{Ct}(\text{ALOX15}) - \text{Ct}(\text{GAPDH}))$ 确定慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚

型, Ct (ALOX15) 为 ALOX15 基因的 Ct 值, Ct (GAPDH) 为内参基因 GAPDH 的 Ct 值。

在一种或多种实施方式中, 所述 Δ Ct 大于或等于 1.675 代表非嗜酸性粒细胞型慢性鼻窦炎伴鼻息肉, 而 Δ Ct 小于 1.675 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 ALOX15 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 ALOX15 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化治疗, 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 ALOX15 基因表达量的方法, 以有效筛选的 ALOX15 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 ALOX15 基因表达量的计算, 能够有效获取 ALOX15 基因表达量, 提供的方法简单快捷, 敏感性高, 重复性好, 适宜推广应用。

4、本公开提供的检测鼻腔脱落细胞中 ALOX15 基因表达量的方法, 其中 ALOX15 基因能编码脂氧合酶蛋白质, 编码的酶作用于各种多不饱和脂肪酸底物以产生各种生物活性脂质介质, 例如类花生酸, 肝素, 脂氧素等。将花生四烯酸转化为 12-氢过氧化二十碳四烯酸/ 12-HPETE 和 15-氢过氧化二十碳四烯酸/ 15-HPETE。还将亚油酸转化为 13-氢过氧十八碳二烯酸。也可以作用于 (12S) - 过氧化氢二十碳四烯酸/ (12S) -HPETE 以产生肝毒素 A3。编码的酶及其反应产物能够调节炎症和免疫反应, 与 ALOX15 相关的疾病包括脑室周围白质软化等。其通过氧化巨噬细胞中膜结合的磷脂酰乙醇胺帮助清除炎症期间的凋亡细胞, 并且抑制与炎性单核细胞清除凋亡细胞相关的自身免疫应答。目前现有技术中尚未公开有 ALOX15 基因, 更未发现该基因的用途。其中公开提供的针对鼻腔脱落细胞中 ALOX15 基因表达量的方法可用于检测鼻腔脱落细胞中 ALOX15 表达情况, 可用于进一步为鼻腔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。

5、本公开提供的检测鼻腔脱落细胞中 ALOX15 基因表达量的方法, 根据实际需求采用 Δ 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。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 ALOX15 蛋白质水平来检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型。

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 ALOX15 的蛋白质水平。优选地, 使用抗 ALOX15 的抗体测定样本中 ALOX15 的蛋白质水平。

在一种或多种实施方式中, 提供抗 ALOX15 的抗体用于检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型的用途。

本公开实施例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 ALOX15 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 ALOX15 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 ALOX15 基因为已知基因，基因 ID 为 246，其 DNA 序列如 SEQ ID NO:1 所示，基因 NM 号为 001140.4。

在一可选实施方式中，所述 ALOX15 基因的上游引物如 SEQ ID NO:2 所示，所述 ALOX15 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 ALOX15 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 ALOX15 基因与 GAPDH 相比的表达，获取合适的 ΔCT 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 ALOX15 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 ALOX15 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、ALOX15 基因的上游引物、ALOX15 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 μ L~40 μ L 的逆转录混合液，以及 0 μ L~160 μ 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 μ L 的逆转录混合液，以及 0 μ L~8 μ L 的去 RNA 酶及去 DNA 酶的水（根据 RNA 量用水补齐至 8 μ 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 ALOX15 基因和内参基因进行实时荧光定量 PCR 反应的试剂包括：1 μ L~25 μ L 的 PCR 预混合液，0 μ L~50 μ L 的双蒸水，0 μ L~2 μ L 的机器荧光补偿及矫正剂，0.01~100 μ M 的 ALOX15 基因的上游引物，0.01~100 μ M 的 ALOX15 基因的下游引物，0.01~100 μ M 的内参基因的上游引物，0.01~100 μ 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 ALOX15 基因和内参基因进行实时荧光定量 PCR 反应的试剂包括：5 μ L 的 PCR 预混合液，0 μ L~10 μ L 的双蒸水（根据总体积用水补齐至 10 μ L），0.2 μ L 的机器荧光补偿及矫正剂，1 μ M 的 ALOX15 基因的上游引物，1 μ M 的 ALOX15 基因的下游引物，1 μ M 的内参基因的上游引物，1 μ 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

ALOX15 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 β -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 β -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 μ L 的去基因组 DNA 的重组 DNA 酶、0~10 μ L 的去基因组 DNA 的 DNA 酶缓冲液、20~100 μ 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 β -巯基乙醇的物质, 200 μ L 的氯仿, 200 μ L 的异丙醇, 200 μ 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: 包括 300 μ L 的用于裂解细胞和抑制 RNA 降解的细胞裂解液、500 μ L 的洗涤用第一缓冲液、600 μ L 的洗涤用第二缓冲液、0.02 mL 的去 RNA 酶及去 DNA 酶的水、4 μ L 的去基因组 DNA 的重组 DNA 酶、5 μ L 10 $\times$ 去除基因组 DNA 的 DNA 酶缓冲液、41 μ 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 μ L 的用于裂解细胞和抑制 RNA 降解的细胞裂解液、500 μ L 的洗涤用第一缓冲液、600 μ 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 ALOX15 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 Δ Ct (Ct(ALOX15)-Ct(GAPDH)) 分析法分析扩增产物的数据结果, 且与所述 Δ Ct 进行比较的界定值为 1.675。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 75%以上。

本公开实施方式还提供一种 ALOX15 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 ALOX15 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 ALOX15 基因和内参基因分别采用 ALOX15 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 ALOX15 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 ALOX15 基因表达量来检测伴有鼻窦炎的慢性鼻窦炎亚型,且提供的针对 ALOX15 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 ALOX15 基因为已知基因,基因 ID 为 246,其 DNA 序列如 SEQ ID NO:1 所示,基因 NM 号为 001140.4。

在一可选实施方式中, ALOX15 基因的上游引物如 SEQ ID NO:2 所示, ALOX15 基因的下游引物如 SEQ ID NO:3 所示。针对 ALOX15 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 ALOX15 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 ALOX15 基因的上游引物和 ALOX15 基因的下游引物,获取合适的 ΔCT 值,以进行 ALOX15 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℃ 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 μ 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 μ L ~700 μ 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 μ L~800 μ 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 μ L DNA 酶反应液,经静置处理后,加入 300 μ L~700 μ 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 μ L 10×DNA 酶缓冲液、4 μ L 重组 DNA 酶,41 μ 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 μ 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 μ 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 μ L 第二缓冲液，12000 转/分钟，离心 30s，除去第二滤液；

步骤 3：取 5 μ L 10 $\times$ DNA 酶缓冲液、4 μ L 重组 DNA 酶，41 μ 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 μ L DNA 酶反应液，室温静置 15 分钟，加入 350 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 β -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 0.1~20mLRNA 抽提液进行溶解、振荡后,室温静置 3~7min;加入 40 μ L~5mL 氯仿,震荡混匀,室温静置 3~7min,于 3℃~5℃,10000~14000r/min 离心 10~20min;取上清液 40 μ L~8mL,加入等体积的异丙醇,混匀后静置 8~12min,于 3℃~5℃,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℃~5℃,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℃~5℃,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 1mLRNA 抽提液进行溶解、振荡后,室温静置 5min;加入 200 μ L 氯仿,震荡混匀,室温静置 5min,于 4℃,12000r/min 离心 15min;取上清液 200 μ L,加入 200 μ 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 μ 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 μ L 的逆转录混合液、0~10 μ L 的去 RNA 水解酶蒸馏水和提取的 RNA 于 37℃温度条件下发生反转录反应 15min,后于 84℃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 μ L 的所述逆转录混合液,8 μ 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 μ L 的总 RNA,所述去 RNA 水解酶蒸馏水补齐至 10 μ 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。

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 μ L~25 μ L 的 PCR 预混合液,0 μ L~10 μ L 的双蒸水补齐总体积用水至 10 μ L,0 μ L~2 μ L 的机器荧光补偿及矫正剂,0.01~100 μ M 的 ALOX15 基因的上游引物,0.01~100 μ M 的 ALOX15 基因的下游引物,0.01~100 μ M 的内参基因的上游引物,0.01~100 μ M 的内参基因的下游引物,0.01 μ L~5 μ 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 ALOX15 基因表达量。

具体的,制备实时荧光定量 PCR 反应液:包括 5 μ L 的 PCR 预混合液,2.8 μ L 的双蒸水补齐总体积用水至 10 μ L,0.2 μ L 的机器荧光补偿及矫正剂,0.5 μ L 的 ALOX15 基因的上游引物,0.5 μ L 的 ALOX15 基因的下游引物,0.5 μ L 的内参基因的上游引物,0.5 μ L 的内参基因的下游引物,1ng/ μ 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℃的条件下预变性 30 秒;第 2 阶段 PCR 反应:在 95℃的条件下,反应 15 秒,在 60℃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℃的条件下预变性 2 分钟;第 2 阶段 PCR 反应:在 95℃的条件下,反应 1 分钟,在 55℃的条件下,反应 1 分钟,在 72℃的条件下,反应 1 分钟,如此进行 40 个循环;最后 72℃,7 分钟退火延伸;

计算所述 ALOX15 基因表达量的方法为:计算 Δ CT 或 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 来计算目的基因的表达量;其中 Δ CT= (CT (ALOX15) -CT (GAPDH)), $-\Delta\Delta CT=-(\Delta$ CT (处理标本 CT (ALOX15) -CT (GAPDH)) -健康对照组平均 Δ CT);健康对照组平均 Δ CT= Σ 每个对照组 Δ CT (CT (ALOX15) -CT (GAPDH)) / 对照组

样本数。采用 ΔCT 法或 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 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。

具体的针对同一受试者 ALOX15 与内参基因的表达量差异,内参基因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 ΔCT 法。针对不同受试者 ALOX15 与内参基因的表达量差异则可采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法。

一种上述检测鼻腔脱落细胞中 ALOX15 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。

为了更清楚详细地介绍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 ALOX15 基因作为生物标志物的应用,以及本发明实施方式所提供的一种检测鼻腔脱落细胞中 ALOX15 基因表达量的方法及应用,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、 β -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 μ 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 μ 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 ALOX15 基因和内参基因进行实时荧光定量 PCR 反应的试剂: 25 μ L 预混合液(含有 PCR 所需要的酶和缓冲液)、0~50 μ L 的双蒸水(根据总体积用水补齐至 50 μ L), 0~2 μ L 的染料(用于进行机器的荧光补偿及校正), 100 μ M 的 ALOX15 基因的上游引物, 100 μ M 的 ALOX15 基因的下游引物, 100 μ M 的内参基因的上游引物, 100 μ M 的内参基因的下游引物, 10 μ g 阳性对照, 10 μ g 阴性对照, 阳性对照是含有 ALOX15 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、 β -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 μ 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 μ 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 ALOX15 基因和内参基因进行实时荧光定量 PCR 反应的试剂: 5 μ L 预混合液(含有 PCR 所需要的酶和缓冲液)、0~10 μ L 的双蒸水(根据总体积用水补齐至 10 μ L), 0~2 μ L 的染料(用于进行机器的荧光补偿及校正), 50 μ M 的 ALOX15 基因的上游引物, 50 μ M 的 ALOX15 基因的下游引物, 50 μ M 的内参基因的上游引物, 50 μ M 的内参基因的下游引物, 5 μ g

阳性对照, 5 μ g 阴性对照, 阳性对照是含有 ALOX15 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、 β -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; 0.05 mL 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 μ 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 μ 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 ALOX15 基因和内参基因进行实时荧光定量 PCR 反应的试剂: 1 μ L 预混合液(含有 PCR 所需要的酶和缓冲液)、0~10 μ L 的双蒸水(根据总体积用水补齐至 10 μ L), 0~2 μ L 的染料(用于进行机器的荧光补偿及校正), 1 μ M 的 ALOX15 基因的上游引物, 1 μ M 的 ALOX15 基因的下游引物, 1 μ M 的内参基因的上游引物, 1 μ M 的内参基因的下游引物, 1 μ g 阳性对照, 1 μ g 阴性对照, 阳性对照是含有 ALOX15 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 μ 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 μ 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 μ 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 ALOX15 基因和内参基因进行实时荧光定量 PCR 反应的试剂: 25 μ L 预混合液(含有 PCR 所需要的酶和缓冲液)、0~10 μ L 的双蒸水(根据总体积用水补齐至 10 μ L), 0~2 μ L 的染料(用于进行机器的荧光补偿及校正), 0.01 μ M 的 ALOX15 基因的上游引物, 0.01 μ M 的 ALOX15 基因的下游引物, 0.01 μ M 的内参基因的上游引物, 0.01 μ M 的内参基因的下游引物, 1 μ g 阳性对照, 1 μ g 阴性对照, 阳性对照是含有 ALOX15 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 μ L 的去基因组 DNA 的重组 DNA 酶、5 μ L 的去基因组 DNA 的 DNA 酶缓冲液、41 μ L 去 RNA 酶的双蒸水、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 μ 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 μ 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 ALOX15 基因和内参基因进行实时荧光定量 PCR 反应的试

剂: 5 μ L 预混合液(含有 PCR 所需要的酶和缓冲液)、0~10 μ L 的双蒸水(根据总体积用水补齐至 10 μ L), 0~2 μ L 的染料(用于进行机器的荧光补偿及矫正), 10 μ mol/L 的 ALOX15 基因的上游引物, 10 μ mol/L 的 ALOX15 基因的下游引物, 10 μ mol/L 的内参基因的上游引物, 10 μ mol/L 的内参基因的下游引物, 1 μ g 阳性对照, 1 μ g 阴性对照, 阳性对照是含有 ALOX15 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 μ 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 μ L 去 RNA 酶及去 DNA 酶的水(根据 RNA 量用水补齐至 8 μ 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 ALOX15 基因和内参基因进行实时荧光定量 PCR 反应的试剂: 5 μ L 预混合液(含有 PCR 所需要的酶和缓冲液)、0~10 μ L 的双蒸水(根据总体积用水补齐至 10 μ L), 0~2 μ L 的染料(用于进行机器的荧光补偿及矫正), 1 μ M 的 ALOX15 基因的上游引物, 1 μ M 的 ALOX15 基因的下游引物, 1 μ M 的内参基因的上游引物, 1 μ M 的内参基因的下游引物, 1 μ g 阳性对照, 1 μ 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 μ 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 μ L, 加入离心管, 加入上述 RNA 提取试剂组的等量(约 200 μ 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 μ L 的 75%乙醇(约 150 μ L 无水乙

醇及 50 μ 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 μ 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 μ L 的总 RNA、0~8 μ L 去 RNA 酶及去 DNA 酶的水(根据 RNA 量用水补齐至 8 μ 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 μ 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 $^{\circ}$ C 5 秒(反转录酶的失活反应)

产物 4 $^{\circ}$ C 放置。

(4) 制备实时荧光定量 PCR 反应液: 包括 5 μ L 预混合液(含有 PCR 所需要的酶和缓冲液)、0.2 μ L 的机器荧光补偿及矫正剂、1ng/ μ L cDNA 或阳性对照或阴性对照、0.5 μ L ALOX15 基因的上游引物、0.5 μ L ALOX15 基因的下游引物、0.5 μ L 内参基因的上游引物、0.5 μ L 内参基因的下游引物和 2.8 μ 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 $^{\circ}$ C, 30 秒。

第 2 阶段: PCR 反应: 95 $^{\circ}$ C, 15 秒; 60 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C 逐渐升温至 95 $^{\circ}$ C,速率为 0.1 $^{\circ}$ 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 ALOX15 及 GAPDH 的 Ct 值,选用 Δ Ct 分析法(ALOX15 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,ALOX15 的 Ct 值的最佳界值为 1.675,若 ALOX15 的 Ct 值 $\geq$ 1.675,则为非嗜酸性粒细胞型慢性鼻窦炎伴鼻息肉;若 ALOX15 的 Ct 值<1.675,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	Δ Ct 值	依据界值判断的结果	病理结果
1	3.029	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
2	2.616	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
3	3.188	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型

4	6.052	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
5	1.695	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
6	1.313	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
7	5.437	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
8	1.475	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
9	7.778	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
10	4.292	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
11	2.284	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
12	4.198	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
13	3.383	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
14	3.684	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
15	3.302	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
16	4.144	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
17	3.714	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
18	3.556	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
19	4.136	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
20	2.186	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
21	4.062	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
22	4.420	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
23	0.313	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
24	2.999	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
25	2.892	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
26	3.048	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
27	2.152	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
28	0.387	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
29	1.547	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
30	2.401	非嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
31	1.655	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
32	0.547	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
33	0.282	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
34	1.829	非嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
35	-0.895	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
36	2.152	非嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
37	3.272	非嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
38	2.537	非嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
39	3.968	非嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
40	3.158	非嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
41	0.183	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
42	-0.933	嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型

43	-0.021	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
44	0.296	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
45	-1.137	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
46	3.202	非嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
47	0.442	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
48	0.765	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
49	2.253	非嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
50	0.769	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
51	2.422	非嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
52	0.749	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
53	-3.834	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
54	1.930	非嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
55	0.767	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
56	0.778	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
57	0.061	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
58	4.640	非嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
59	-0.547	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
60	0.019	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
61	0.355	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
62	0.251	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
63	0.589	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
64	3.664	非嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
65	2.454	非嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
66	0.224	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
67	3.117	非嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
68	1.637	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
69	1.489	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
70	2.073	非嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
71	1.317	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
72	0.206	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
73	-1.086	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
74	-0.012	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
75	1.609	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
76	-3.187	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
77	0.732	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
78	1.152	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 78.2%。

实验例二:

1、实验方法:

(1)、样本的收集与处理:

随机选取 47 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 μ 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 μ L, 加入离心管, 加入与氯仿等量 (约 200 μ 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 μ L 的 75%乙醇 (约 150 μ L 无水乙醇及 50 μ 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 至图 12 所示, 以及溶解曲线如图 13 至图 15 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, ALOX15 的 Ct 值的最佳界值为 1.675, 若 ALOX15 的 Ct 值 $\geq$ 1.675, 则为非嗜酸性粒细胞型慢性鼻窦炎伴鼻息肉; 若 ALOX15 的 Ct 值 $<$ 1.675, 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	Δ Ct 值	依据界值判断的病理结果	病理结果
1	3.413	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
2	0.491	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
3	2.77	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
4	0.711	嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
5	7.17	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
6	1.818	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
7	2.952	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
8	0.167	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
9	2.014	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
10	1.83	非嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
11	2.015	非嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
12	3.665	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型

13	1.757	非嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
14	0.218	嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
15	2.329	非嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
16	1.107	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
17	0.321	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
18	0.898	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
19	0.394	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
20	0.483	嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
21	0.619	嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
22	0.869	嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
23	1.55	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
24	1.02	嗜酸性粒细胞型	非嗜酸性粒细胞型
25	-0.121	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
26	-0.709	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
27	-0.303	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
28	-0.196	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
29	-1.375	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
30	-2.017	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
31	-0.42	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
32	-2.01	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
33	-1.25	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
34	-1.26	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
35	-0.26	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
36	-2.312	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
37	-1.309	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
38	-0.786	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
39	-1.363	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
40	-0.375	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
41	-0.072	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
42	-0.088	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
43	-0.789	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
44	-0.891	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
45	-0.581	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
46	-1.423	嗜酸性粒细胞型	嗜酸性粒细胞型
47	-1.128	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 80.9%。

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 μ 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 μ 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 μ 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 μ L 的无 RNA 水解酶的蒸馏水（RNase Free dH₂O）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，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，OD₂₆₀/OD₂₈₀ 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 μ L；和 ROX:1.8 μ L，混匀后分为 3 份，分别为 A.11.7 μ L；B.11.7 μ L；C.23.4 μ L，分别向 A 中加入 1ng/ μ L 阳性对照得到 A 溶液，B 中加入 1ng/ μ 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、 ALOX15 基因的特异性引物、3.8 μ L 灭菌双蒸水；

第 3、4 平行孔：B 溶液、 ALOX15 基因的特异性引物、3.8 μ L 灭菌双蒸水；

第 5、6 平行孔：C 溶液、 ALOX15 基因的特异性引物、3.8 μ 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 μ 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 16 所示，以及熔解曲线如图 17 所示，读取 ALOX15 及 GAPDH 的 Ct 值，选用 Δ Ct 分析法（ALOX15 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 ALOX15 平均 Ct: 19.4; 样品 GAPDH 平均 Ct: 16.4; 差异值: 19.4-16.4 为 3, 大于 1.675, 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 0.3 mL 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 纯化放回到 2 mL 收集管中;

步骤 5: 将 500 μ 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 μ 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 μ L 10 $\times$ DNA 酶 I 缓冲液, 4 μ L 重组 DNA 酶 I (Recombinant DNase I, (无 RNA 酶, 5U/ μ L), 41 μ 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 μ 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 μ 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 μ L 的无 RNA 水解酶的蒸馏水 (RNase Free dH₂O) 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, 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, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 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18所示, 以及熔解曲线如图19所示, 读取ALOX15及GAPDH的Ct值, 选用 Δ Ct分析法(ALOX15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ALOX15平均Ct: 19.2; 样品GAPDH平均Ct: 16.4; 差异值: 为2.8, 大于1.675, 为非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ALOX15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化治疗, 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ALOX15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 μ 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 μ 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 μ L第二缓冲液, 12000转/分钟, 离心30s, 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 μ 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 μ L的所述逆转录混合液, 0~8 μ L的所述去RNA水解酶蒸馏水(根据RNA量用水补齐至8 μ L), 以及总量不超过500ng或体积不超过8 μ L的总RNA, 所述去RNA水解酶蒸馏水补齐至10 μ 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 μ L的PCR预混合液, 0~10 μ L的双蒸水(根据总体积用水补齐至10 μ L), 0.2 μ L的机器荧光补偿及矫正剂, 1 μ M的ALOX15基因的上游引物, 1 μ M的ALOX15基因的下游引物, 1 μ M的内参基因的上游引物, 1 μ M的内参基因的下游引物, 0.01 μ L的所述cDNA, 1 μ g的阳性对照, 1 μ g的阴性对照, 阳性对照是含有ALOX15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℃的条件下预变性30秒；第2阶段PCR反应：在95℃的条件下，反应15秒，在60℃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ALOX15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ALOX15及GAPDH的Ct值，选用 ΔCt 分析法（ALOX15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 ΔCT 方法比较ALOX15与内参基因的表达量差异：得ALOX15的平均CT值为20.9，GAPDH的平均CT值为18.9， ΔCT 值为2.0。

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℃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ALOX15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 μ 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 μ 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 μ L第二缓冲液，12000转/分钟，离心30s，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 μ 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 μ L的所述逆转录混合液，0~10 μ 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 μ L的总RNA，所述去RNA水解酶蒸馏水补齐至10 μ 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25 μ L的PCR预混合液，0~10 μ L的双蒸水（根据总体积用水补齐至10 μ L），0~2 μ L的染料（用于进行机器的荧光补偿及矫正），0.01 μ M的ALOX15基因的上游引物，0.01 μ M的ALOX15基因的下游引物，0.01 μ M的内参基因的上游引物，0.01 μ M的内参基因的下游引物，5 μ L的cDNA，1 μ g阳性对照，1 μ g阴性对照，阳性对照是含有ALOX15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℃的条件下预变性30秒；第2阶段PCR反应：在95℃的条件下，反应15秒，在60℃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ALOX15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ALOX15及GAPDH的Ct值，选

用 ΔCt 分析法(ALOX15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 ΔCT 方法比较ALOX15与内参基因的表达量差异:得ALOX15的平均CT值为19.5,GAPDH的平均CT值为18.0, ΔCT 值为1.5。

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℃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ALOX15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 μ 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 μ 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 μ L第二缓冲液,12000转/分钟,离心30s,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 μ 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 μ L的所述逆转录混合液,0~8 μ L去RNA酶及去DNA酶的水(根据RNA量用水补齐至8 μ L),以及总量不超过500ng或体积不超过8 μ L的总RNA,所述去RNA水解酶蒸馏水补齐至10 μ 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5 μ L预混合液(含有PCR所需要的酶和缓冲液)、0~10 μ L的双蒸水(根据总体积用水补齐至10 μ L)、0~2 μ L的染料(用于进行机器的荧光补偿及矫正),1 μ M的ALOX15基因的上游引物,1 μ M的ALOX15基因的下游引物,1 μ M的内参基因的上游引物,1 μ M的内参基因的下游引物,2 μ L的cDNA,1 μ g阳性对照,1 μ 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℃的条件下预变性30秒;第2阶段PCR反应:在95℃的条件下,反应15秒,在60℃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ALOX15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ALOX15及GAPDH的Ct值,选用 ΔCt 分析法(ALOX15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 ΔCT 方法比较ALOX15与内参基因的表达量差异:得ALOX15的平均CT值为20.1,GAPDH的平均CT值为17.9, ΔCT 值为2.2。

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 ALOX15 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 μL 氯仿, 震荡混匀, 室温静置 5min, 于 4℃, 12000r/min 离心 15min; 取上清液 200 μL, 加入 200 μL 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 μL 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 ALOX15 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 ALOX15 及 GAPDH 的 Ct 值, 选用 ΔCt 分析法 (ALOX15 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 ΔCt : 本例中受试者 1~10 为健康对照组, 计算方法如下: 平均 ΔCt ($Ct_{ALOX15} - Ct_{GAPDH}$) = (1.754+1.655+1.829+2.2+1.308+1.449+1.234+1.343+1.49+1.695)/10=1.5975;

步骤 2: 计算受试者相对表达量:

以 1.5975 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 $2^{-\Delta\Delta Ct}$, $-\Delta\Delta Ct = -(Ct_{ALOX15} - Ct_{GAPDH}) - \text{平均}\Delta Ct$ (健康对照组平均 ΔCt)。

表 3 实施例 8 提供的方法的 ALOX15 基因表达量计算结果

受试者编号	ALOX15 CT 值	GAPDH CT 值	ΔCt	$-\Delta\Delta Ct$	相对表达量
1	28.262	26.508	1.754	-0.1565	0.897199
2	19.94	18.285	1.655	-0.0575	0.960928
3	17.165	15.336	1.829	-0.2315	0.851749
4	20.184	17.984	2.2	-0.6025	0.658612
5	19.709	18.401	1.308	0.2895	1.222217
6	15.865	14.416	1.449	0.1485	1.108416
7	20.767	19.533	1.234	0.3635	1.286543
8	18.556	17.213	1.343	0.2545	1.192922

9	21.299	19.809	1.49	0.1075	1.07736
10	25.066	23.371	1.695	-0.0975	0.934651
11	24.357	24.904	-0.547	2.1445	4.42139
12	28.16	24.025	4.135	-2.5375	0.172241
13	19.768	17.402	2.366	-0.7685	0.587028
14	22.894	18.832	4.062	-2.4645	0.181181
15	16.732	16.671	0.061	1.5365	2.900899
16	18.732	15.703	3.029	-1.4315	0.370745
17	21.003	18.756	2.247	-0.6495	0.637501
18	18.252	18.253	-0.001	1.5985	3.028283
19	15.641	14.892	0.749	0.8485	1.800628
20	22.009	19.394	2.615	-1.0175	0.493972
21	19.609	17.679	1.93	-0.3325	0.794159
22	27.896	25.744	2.152	-0.5545	0.680893
23	15.388	15.182	0.206	1.3915	2.623513
24	19.163	20.249	-1.086	2.6835	6.424125
25	24.408	21.954	2.454	-0.8565	0.552291
26	27.043	24.971	2.072	-0.4745	0.719716
27	18.917	16.58	2.337	-0.7395	0.598947
28	22.05	18.892	3.158	-1.5605	0.339034
29	18.567	16.958	1.609	-0.0115	0.99206
30	21.153	15.102	6.051	-4.4535	0.045642
31	17.804	24.94	-7.136	8.7335	425.643
32	20.568	19.801	0.767	0.8305	1.778302
33	22.229	17.544	4.685	-3.0875	0.117644
34	21.028	20.585	0.443	1.1545	2.226072
35	22.966	22.84	0.126	1.4715	2.773101
36	18.688	17.992	0.696	0.9015	1.868007
37	21.072	24.259	-3.187	4.7845	27.55992
38	22.134	18.932	3.202	-1.6045	0.32885
39	18.122	15.53	2.592	-0.9945	0.50191
40	21.474	17.331	4.143	-2.5455	0.171288
41	21.003	18.73	2.273	-0.6755	0.626115
42	20.097	17.993	2.104	-0.5065	0.703928
43	22.503	18.306	4.197	-2.5995	0.164996
44	21.86	19.675	2.185	-0.5875	0.665495
45	18.188	19.083	-0.895	2.4925	5.627523
46	20.726	19.957	0.769	0.8285	1.775838
47	21.047	20.823	0.224	1.3735	2.590984
48	23.288	19.604	3.684	-2.0865	0.235451
49	18.736	18.483	0.253	1.3445	2.539422
50	17.622	17.371	0.251	1.3465	2.542945
51	18.878	18.704	0.174	1.4235	2.682355
52	15.54	17.418	-1.878	3.4755	11.1232

53	17.249	16.936	0.313	1.2845	2.435976
54	18.034	17.256	0.778	0.8195	1.764794
55	22.652	20.368	2.284	-0.6865	0.621359
56	17.711	17.129	0.582	1.0155	2.021603
57	19.629	20.927	-1.298	2.8955	7.441018
58	22.978	19.255	3.723	-2.1255	0.229172
59	21.379	17.487	3.892	-2.2945	0.203839
60	26.274	15.977	10.297	-8.6995	0.002405
61	16.584	17.517	-0.933	2.5305	5.777719
62	21.219	18.682	2.537	-0.9395	0.521414
63	21.606	18.213	3.393	-1.7955	0.288072
64	25.048	21.746	3.302	-1.7045	0.306828
65	24.166	20.894	3.272	-1.6745	0.313275
66	21.738	18.619	3.119	-1.5215	0.348324
67	23.4	20.999	2.401	-0.8035	0.572957
68	21.742	18.604	3.138	-1.5405	0.343766
69	21.672	21.104	0.568	1.0295	2.041317
70	21.145	16.853	4.292	-2.6945	0.154481
71	20.508	15.071	5.437	-3.8395	0.069855
72	21.548	17.45	4.098	-2.5005	0.176715
73	26.183	20.924	5.259	-3.6615	0.079028
74	23.889	23.591	0.298	1.2995	2.461436
75	18.743	18.432	0.311	1.2865	2.439355
76	21.662	21.136	0.526	1.0715	2.101617
77	17.735	17.14	0.595	1.0025	2.003469
78	23.431	22.608	0.823	0.7745	1.710597

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 ALOX15 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 20mL RNA 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℃的条件下预变性 2 分钟; 第 2 阶段 PCR 反应: 在 95℃的条件下, 反应 1 分钟, 在 55℃的条件

下,反应1分钟,在72℃的条件下,反应1分钟,如此进行40个循环;最后72℃,7分钟退火延伸。

步骤四:计算所述 ALOX15 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 ALOX15 及 GAPDH 的 Ct 值,选用 ΔCt 分析法 (ALOX15 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: 16.7; 阴性对照孔平均 Ct: 38.4; 样品 ALOX15 平均 Ct: 21.5; 样品 GAPDH 平均 Ct: 19.4; 差异值: 为 2.1。表示该患者 ALOX15 表达为 GAPDH 的 0.23 倍 ($1/2^{2.1}$)。

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℃ 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 ALOX15 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℃, 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℃, 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℃, 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 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℃ 的条件下预变性 2 分钟; 第 2 阶段 PCR 反应: 在 95℃ 的条件下, 反应 1 分钟, 在 55℃ 的条件下, 反应 1 分钟, 在 72℃ 的条件下, 反应 1 分钟, 如此进行 40 个循环; 最后 72℃, 7 分钟退火延伸。

步骤四: 计算所述 ALOX15 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 ALOX15 及 GAPDH 的 Ct 值, 选用 ΔCt 分析法 (ALOX15 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 ALOX15 平均 Ct: 17.8; 样品 GAPDH 平均 Ct: 16.4; 差异值: 17.8-16.4 为 1.4。表示该患者 ALOX15 表达为 GAPDH 的 0.51 倍 ($1/2^{1.4}$)。

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 ALOX15 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 ALOX15 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 ALOX15 基因表达量的方法，以有效筛选的 ALOX15 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 ALOX15 基因表达量的计算，能够有效获取 ALOX15 基因表达量，提供的方法简单快捷，敏感性高，重复性好，适宜广泛应用。

本公开提供的检测鼻腔脱落细胞中 ALOX15 基因表达量的方法，其中 ALOX15 基因能编码脂氧合酶蛋白质，编码的酶作用于各种多不饱和脂肪酸底物以产生各种生物活性脂质介质，例如类花生酸，肝素，脂氧素等。将花生四烯酸转化为 12-氢过氧化二十碳四烯酸/ 12-HPETE 和 15-氢过氧化二十碳四烯酸/ 15-HPETE。还将亚油酸转化为 13-氢过氧十八碳二烯酸。也可以作用于 (12S) - 过氧化氢二十一碳四烯酸/ (12S) -HPETE 以产生肝霉素 A3。编码的酶及其反应产物能够调节炎症和免疫反应，与 ALOX15 相关的疾病包括脑室周围白质软化等。其通过氧化巨噬细胞中膜结合的磷脂酰乙醇胺帮助清除炎症期间的凋亡细胞，并且抑制与炎性单核细胞清除凋亡细胞相关的自身免疫应答。目前现有技术中尚未公开有 ALOX15 基因，更未发现该基因的用途。其中公开提供的针对鼻腔脱落细胞中 ALOX15 基因表达量的方法可用于检测鼻腔脱落细胞中 ALOX15 表达情况，可用于进一步为鼻腔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。

本公开提供的检测鼻腔脱落细胞中 ALOX15 基因表达量的方法，根据实际需求采用 ΔCt 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。

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 ALOX15 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 ALOX15 基因的上游引物如 SEQ ID NO:2 所示, 所述 ALOX15 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, 所述试剂盒进一步还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. 根据前述权利要求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 ALOX15 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 ALOX15 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、ALOX15 基因的上游引物、ALOX15 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. ALOX15 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。
8. 根据权利要求 1-6 中任一项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。
9. 检测 ALOX15 的试剂用于检测慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型的用途。
10. 根据权利要求 9 所述的用途, 其中, 所述检测 ALOX15 的试剂包括 ALOX15 基因的特异性引物, 例如所述 ALOX15 基因的特异性引物的上游引物如 SEQ ID NO:2 所示, 所述 ALOX15 基因的下游引物如 SEQ ID NO:3 所示。
11. 根据权利要求 9 所述的用途, 其中, 检测 ALOX15 的试剂选自针对 ALOX15 的引物、抗体、适配体、探针或其组合组成的组。
12. 一种检测鼻腔脱落细胞中 ALOX15 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 ALOX15 基因和内参基因分别采用 ALOX15 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 ALOX15 基因表达量。

13. 根据权利要求 12 所述的检测鼻腔脱落细胞中 ALOX15 基因表达量的方法，其中，

ALOX15 基因的上游引物如 SEQ ID NO:2 所示，ALOX15 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。

14. 根据权利要求 12 或 13 所述的检测鼻腔脱落细胞中 ALOX15 基因表达量的方法，其中，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℃ 以下保存。
15. 一种检测伴有鼻息肉的慢性鼻窦炎亚型方法，包括通过根据权利要求 12-14 中任一项所述的方法检测鼻腔脱落细胞中 ALOX15 基因表达量。
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 ALOX15 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检测所述腔脱落细胞中的 ALOX15 基因表达量。
17. 根据权利要求 1-6 中任一项所述的试剂盒、权利要求 7 所述的用途、权利要求 8 所述用途、权利要求 9-11 中任一项所述的用途、权利要求 15 所述的方法或权利要求 16 所述的方法，其中，通过荧光 PCR 检测鼻腔脱落细胞中 ALOX15 基因表达量。
18. 根据权利要求 17 所述的试剂盒、用途或方法，其中，根据 ΔCt (Ct (ALOX15) - Ct (GAPDH)) 确定慢性鼻窦炎伴鼻息肉亚型， Ct (ALOX15) 为 ALOX15 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、用途或方法，其中，所述 ΔCt 大于或等于 1.675 代表非嗜酸性粒细胞型慢性鼻窦炎伴鼻息肉，而 ΔCt 小于 1.675 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、权利要求 7 所述的用途、权利要求 8 所述用途、权利要求 9-11 中任一项所述的用途、权利要求 15 所述的方法或权利要求 16 所述的方法，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。

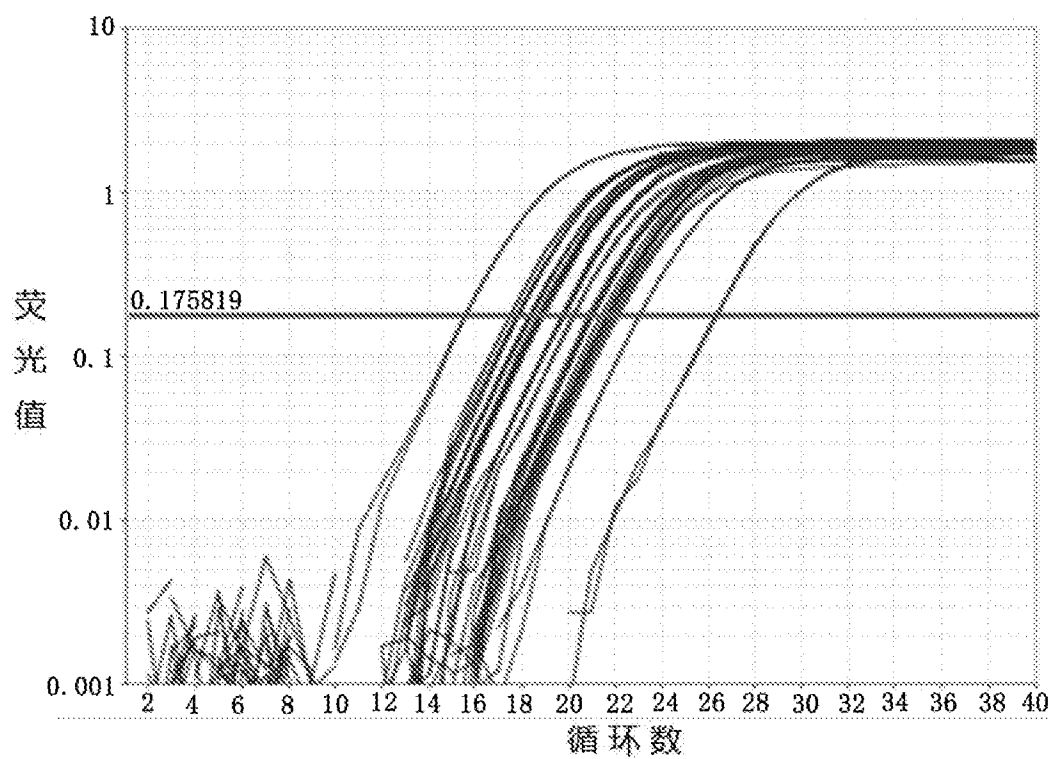


图 1

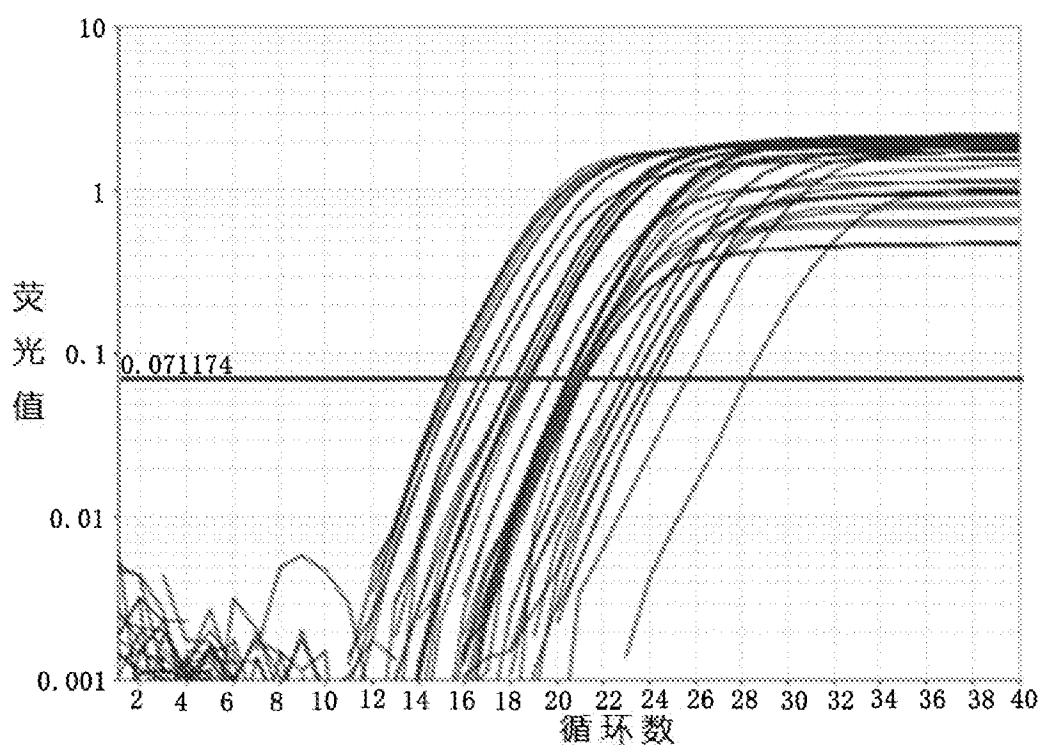


图 2

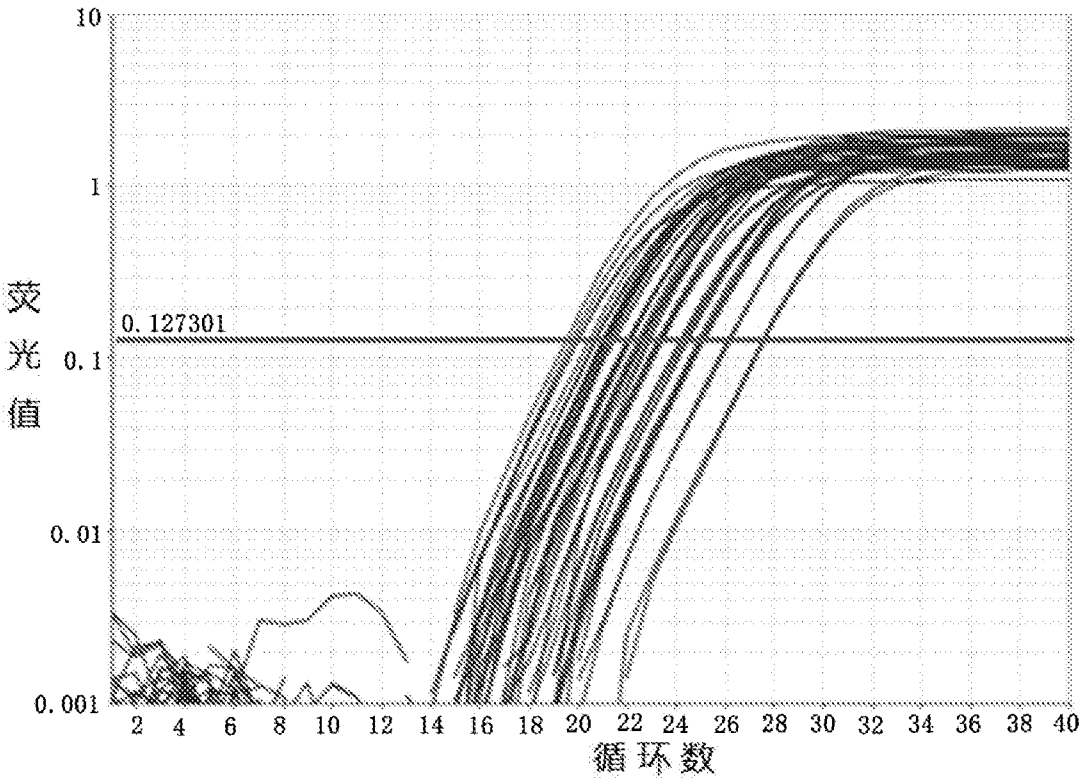


图 3

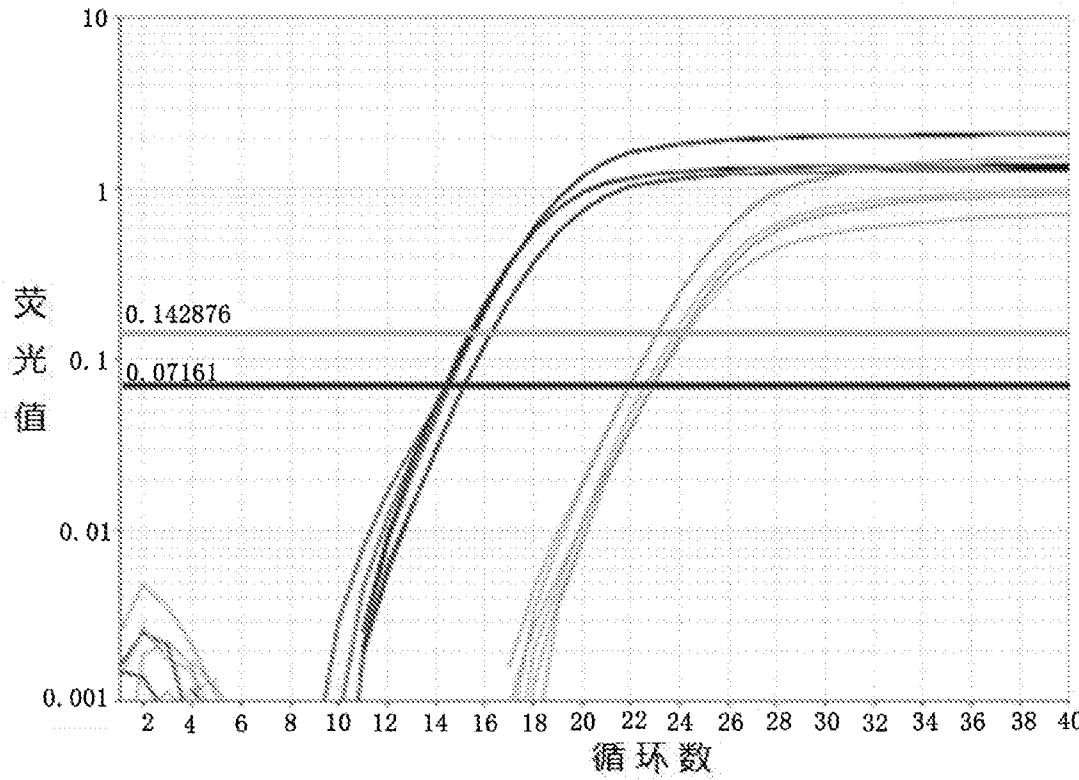


图 4

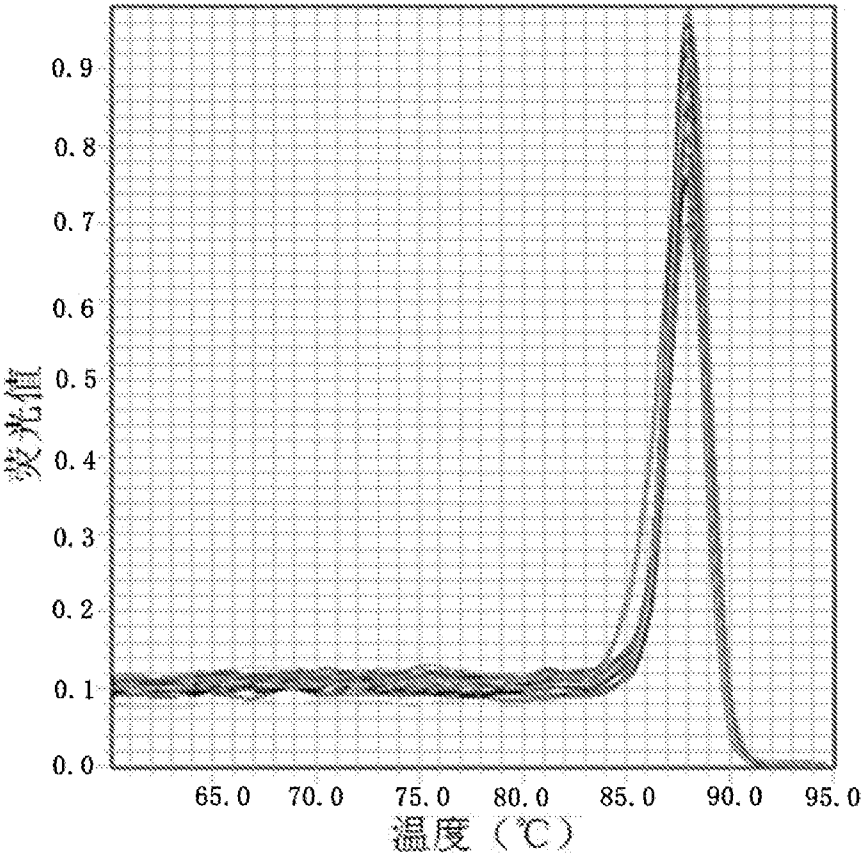


图 5

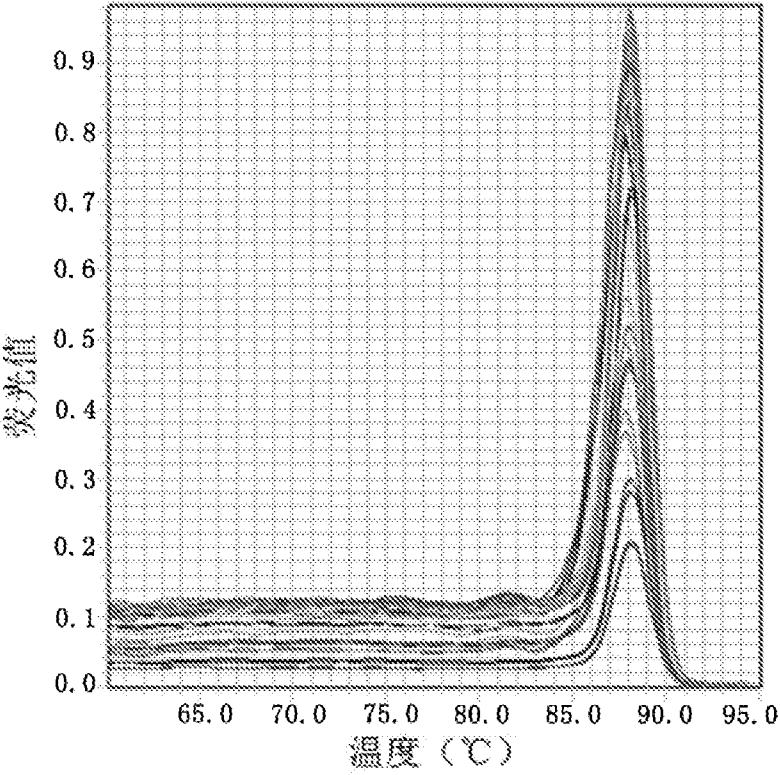


图 6

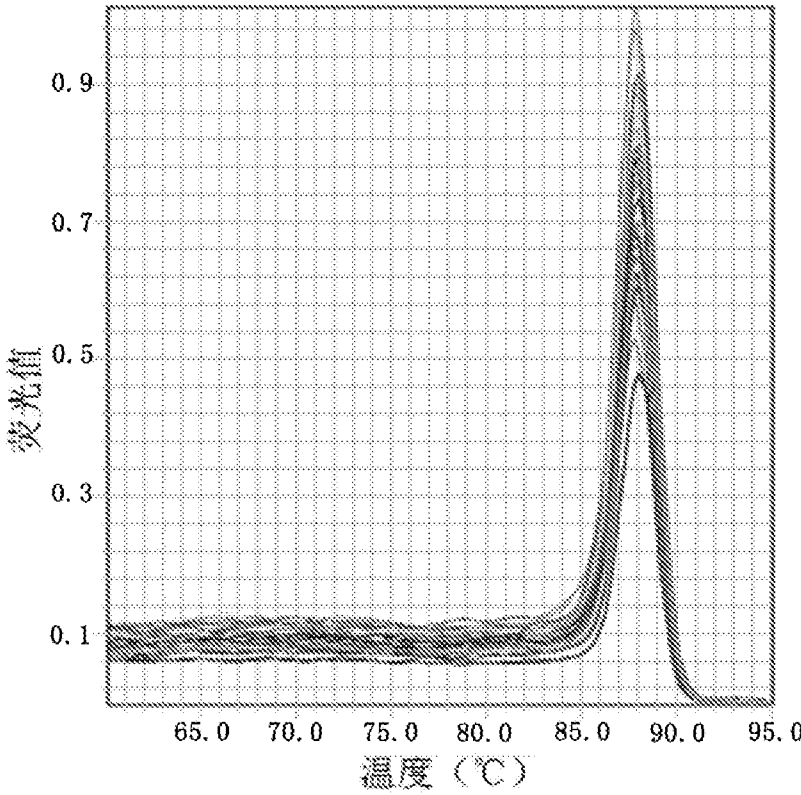


图 7

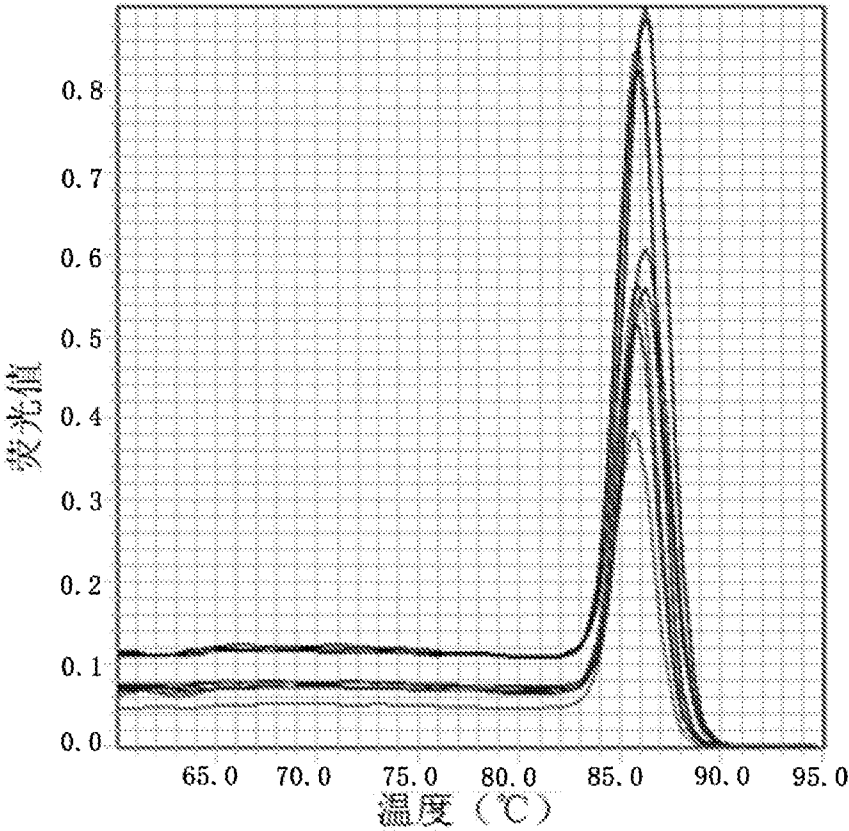


图 8

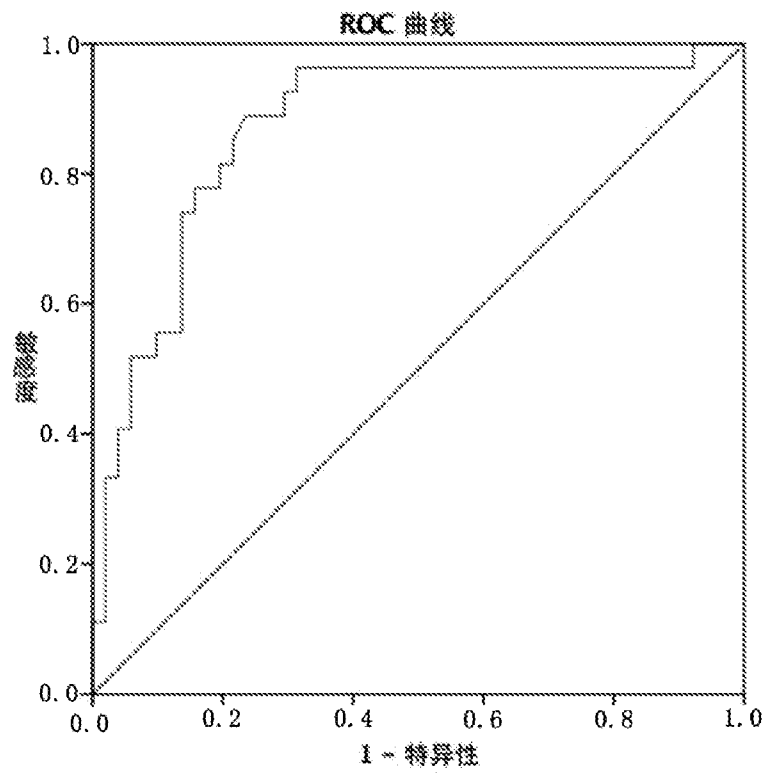


图 9

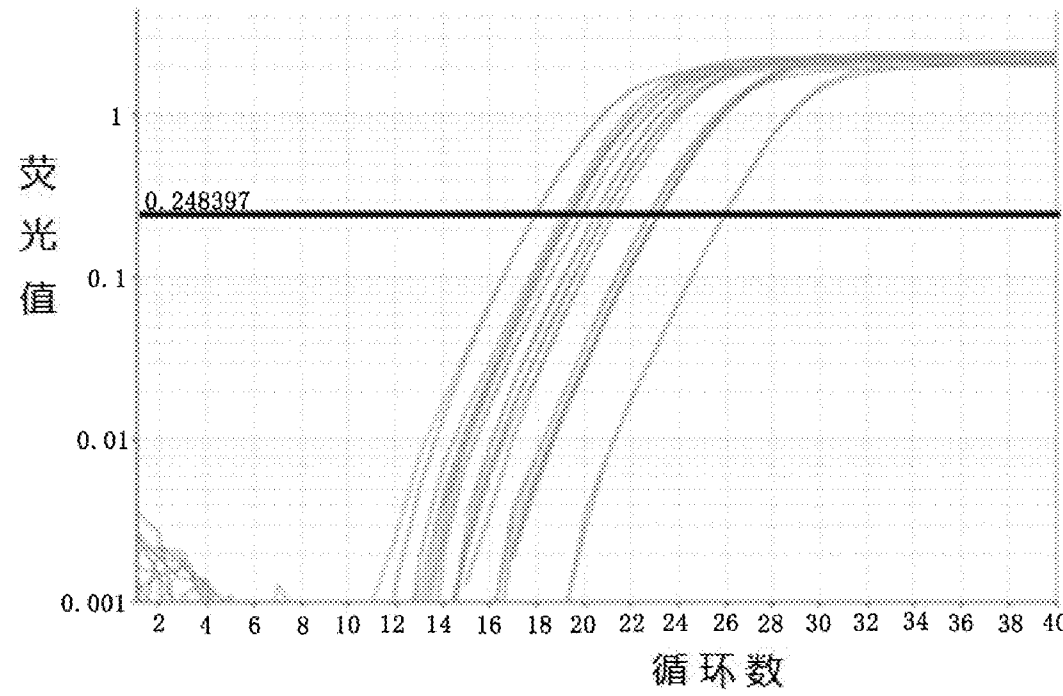


图 10

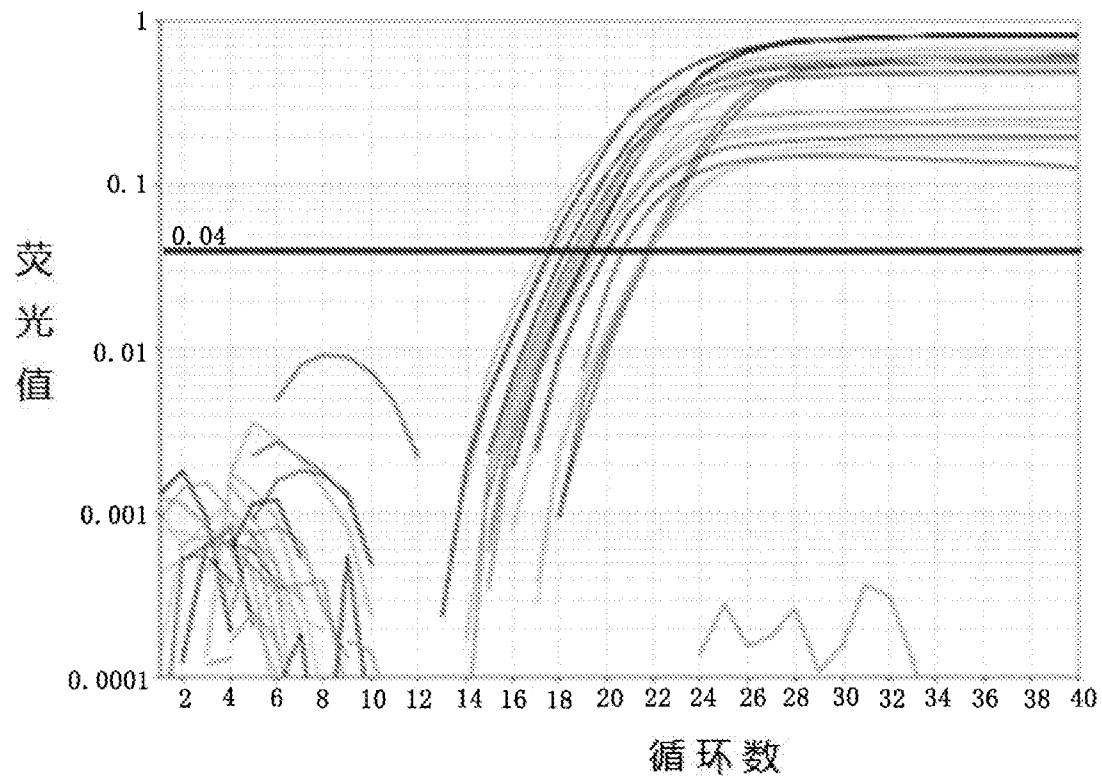


图 11

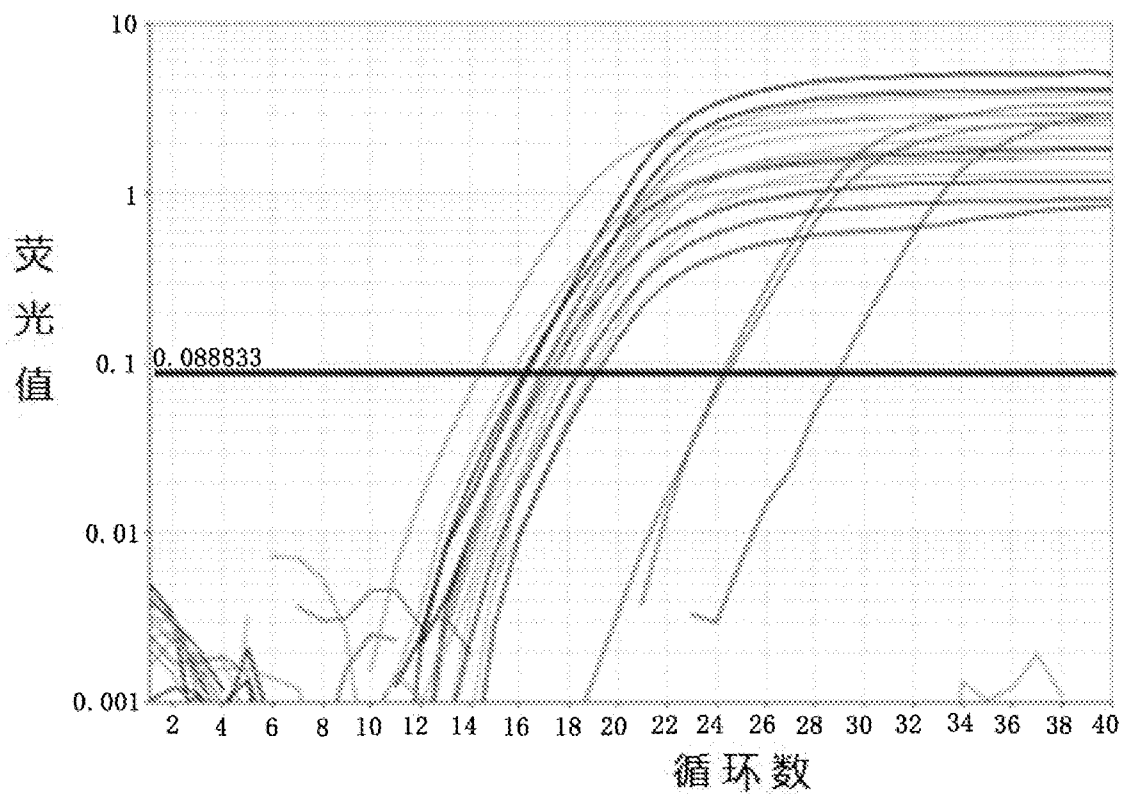


图 12

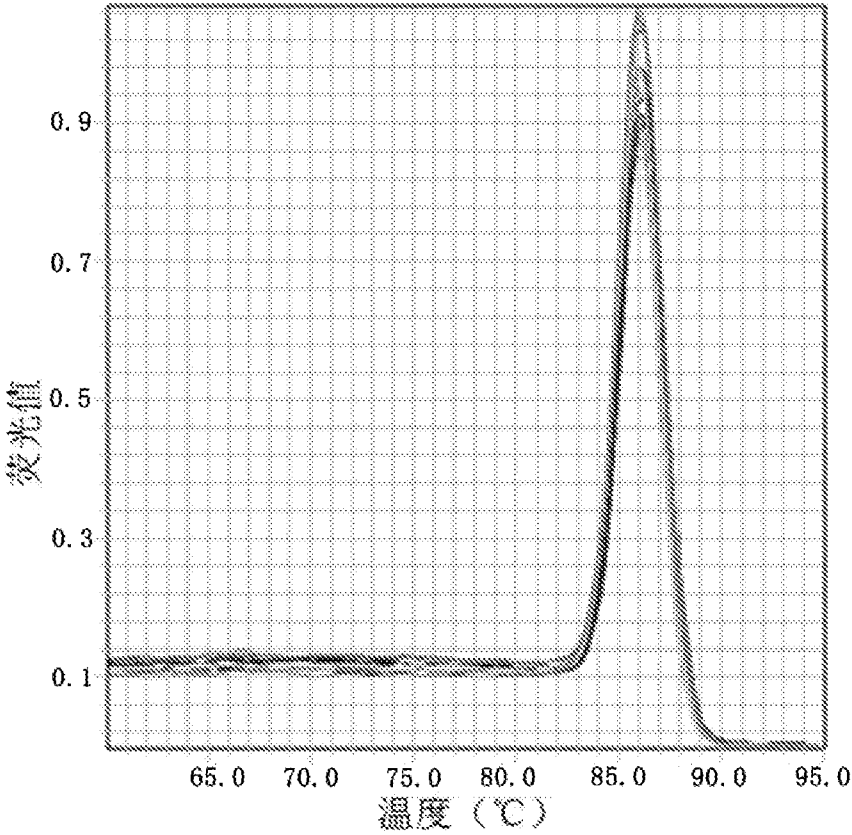


图 13

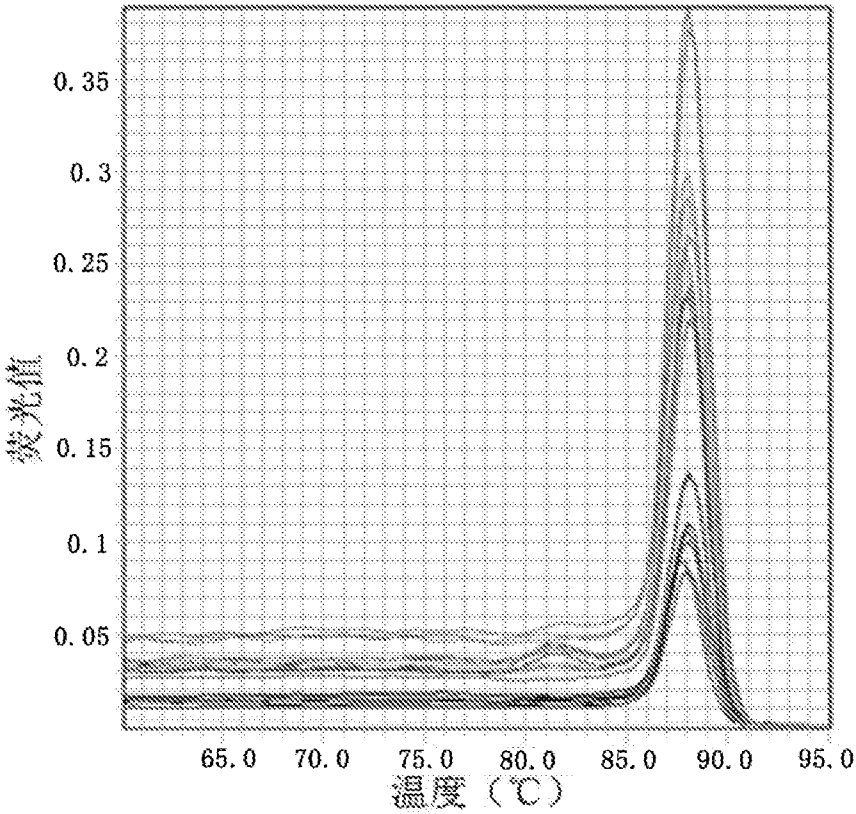


图 14

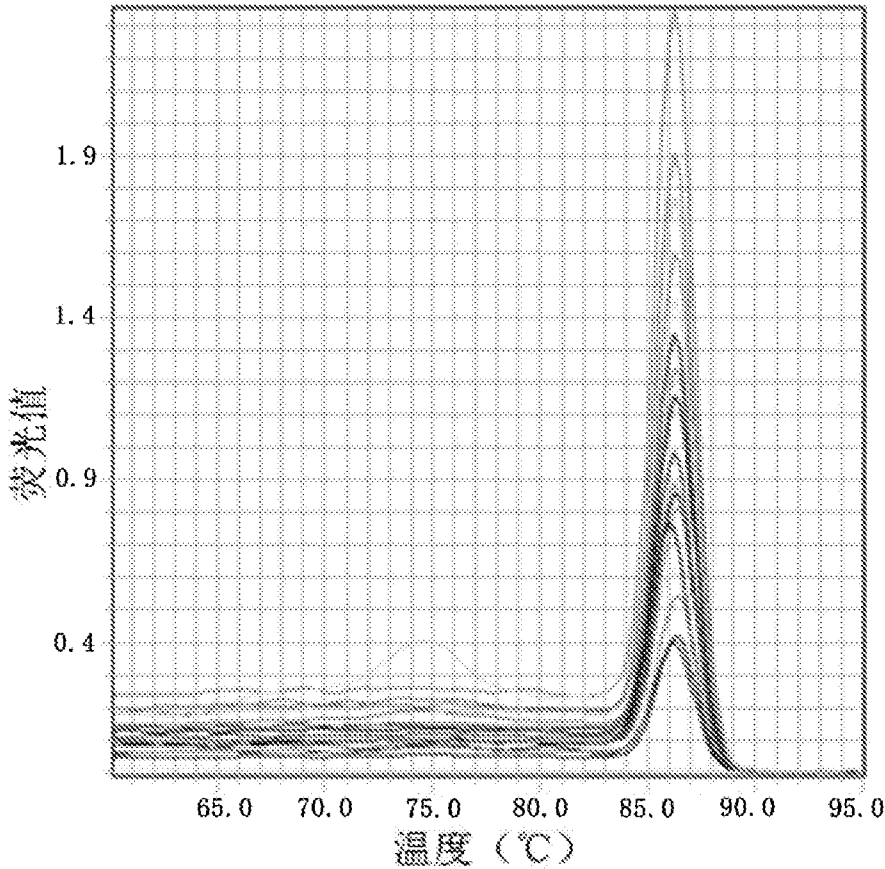


图 15

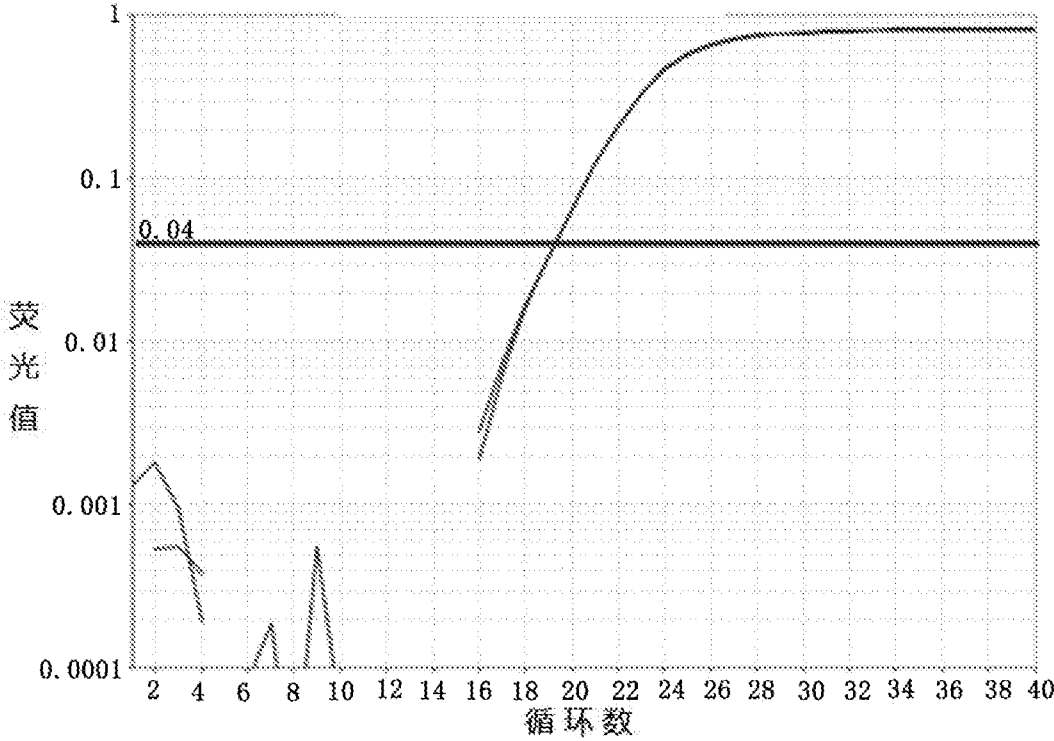


图 16

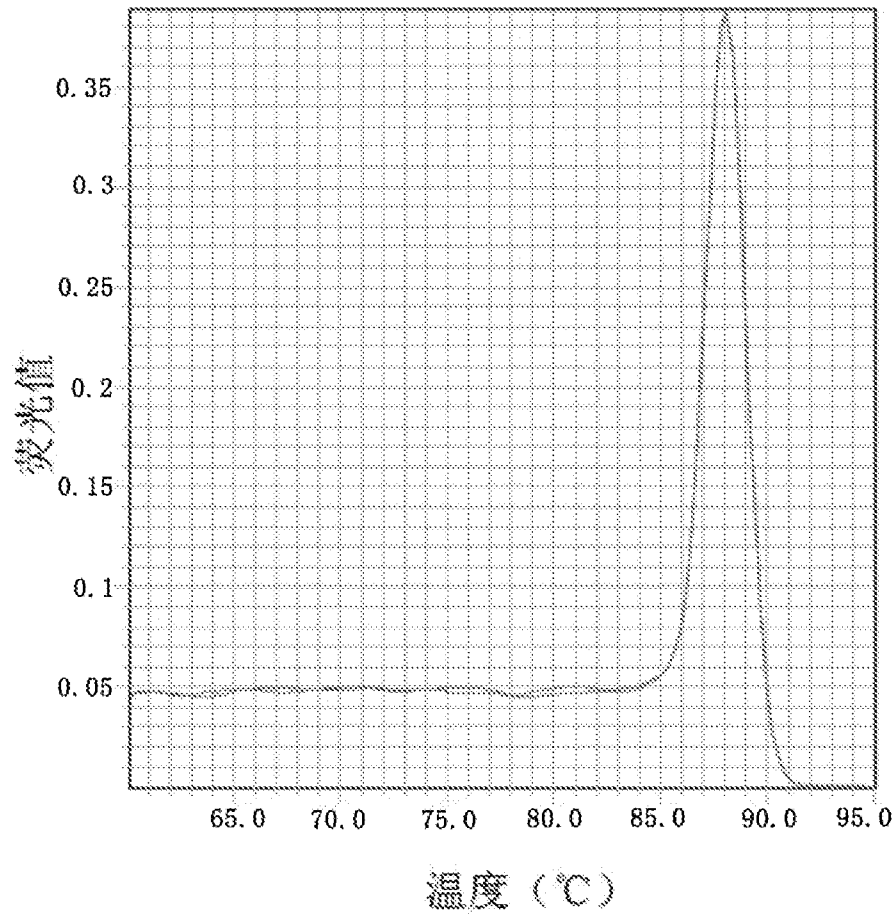


图 17

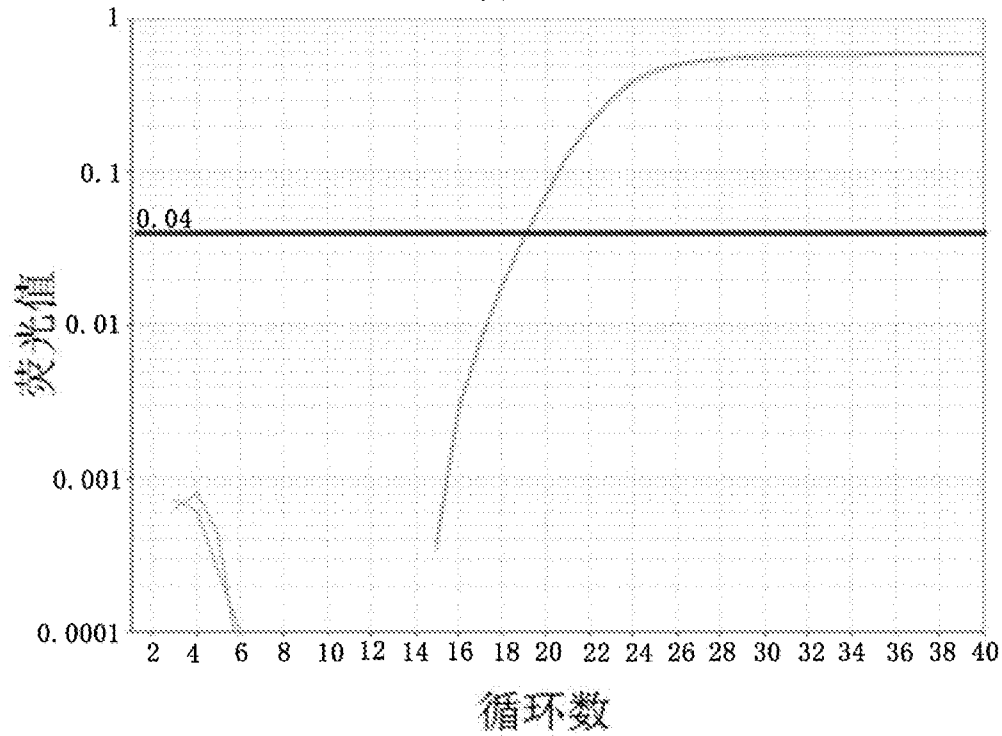


图 18

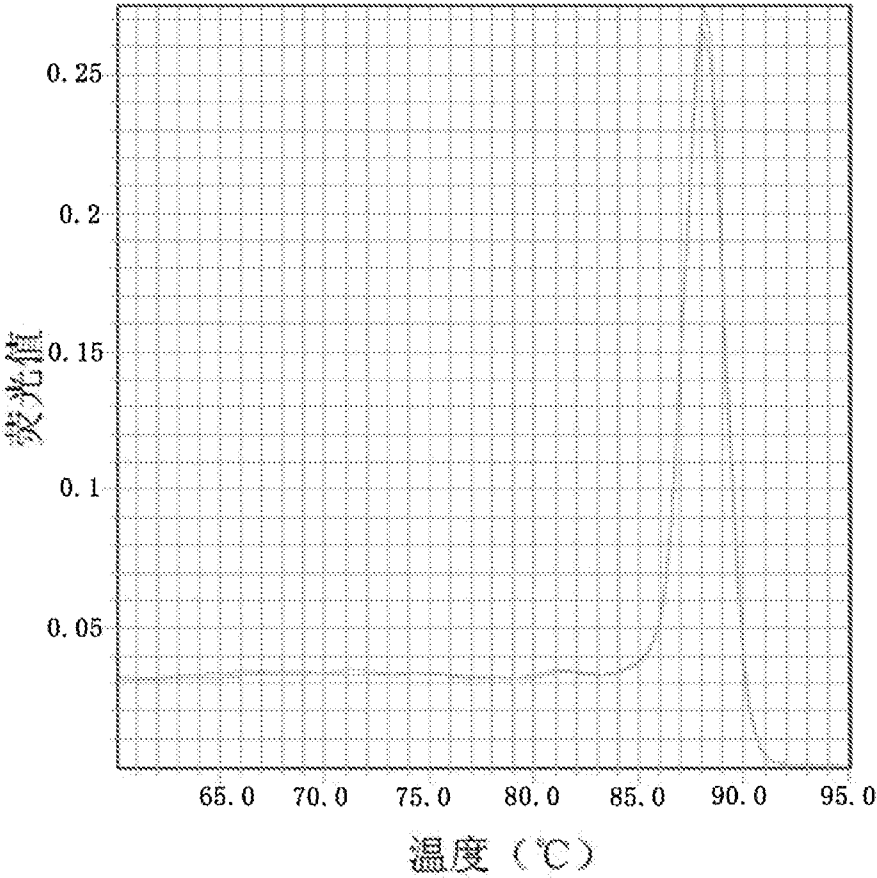


图 19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/093281

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/6883(2018.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q

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

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

CNABS, CPRSABS, DWPI, SIPOABS, CNKI, ISI web of Science, 百度学术, BAIDU, Genbank: RNA酶, 鼻息肉, ALOX15, 鼻窦炎, 慢性鼻窦炎伴鼻息肉, 花生四烯酸酯15-脂氧合酶, ECRSwNP, 引物, 扩增, 检测, GAPDH, 内参, nonECRSwNP, expression, primer, detect+, amplif+

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 108913764 A (ZHANG, LUO; WANG, CHENGSHUO; YAN, BING; BEIJING INSTITUTE OF OTORHINOLARYNGOLOGY; BEIJING TONGREN HOSPITAL, CAPITAL MEDICAL UNIVERSITY) 30 November 2018 (2018-11-30) claims 1-11	12-17
PX	CN 108949954 A (BEIJING INSTITUTE OF OTORHINOLARYNGOLOGY ET AL.) 07 December 2018 (2018-12-07) claims 1-10, and description, paragraph 22	1-11, 17-20
X	闫冰等 (YAN, Bing et al.). "ALOX15在慢性鼻窦炎伴鼻息肉中表达及糖皮质激素对其作用研究 (Expression and Corticosteroid Inhibition of Arachidonate 15-lipoxygenase in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps)" <i>首都医科大学学报 (Journal of Capital Medical University)</i> , Vol. 38, No. 5, 31 October 2017 (2017-10-31), abstract, a part of materials and methods	1-20
X	CN 105849280 A (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG) 10 August 2016 (2016-08-10) embodiment 1	1, 17-20



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 September 2019

Date of mailing of the international search report

30 September 2019

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/093281

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 102232113 A (GENENTECH, INC.; UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 02 November 2011 (2011-11-02) description, table 1	1, 17-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/093281

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	108913764	A	30 November 2018	None			
CN	108949954	A	07 December 2018	None			
CN	105849280	A	10 August 2016	EP	3060685	B1	01 May 2019
				MX	2016005159	A	05 July 2016
				SG	11201603127W	A	30 May 2016
				AR	098155	A1	04 May 2016
				EP	3060685	A4	18 October 2017
				RU	2016119425	A3	30 May 2018
				US	2017067108	A1	09 March 2017
				AU	2014340129	A1	26 May 2016
				EP	3060685	A1	31 August 2016
				RU	2016119425	A	28 November 2017
				US	2019024178	A1	24 January 2019
				WO	2015061441	A1	30 April 2015
				KR	20160068802	A	15 June 2016
				IL	244709	D0	21 April 2016
				JP	2017501680	A	19 January 2017
				CA	2924873	A1	30 April 2015
CN	102232113	A	02 November 2011	NZ	588853	A	26 July 2013
				IL	208366	D0	30 December 2010
				JP	6161233	B2	12 July 2017
				AU	2009231733	B2	24 December 2015
				BR	PI0906261	A2	07 July 2015
				EP	2271770	A1	12 January 2011
				WO	2009124090	A1	08 October 2009
				RU	2607569	C2	10 January 2017
				MX	2010010746	A	15 October 2010
				CA	2718120	A1	08 October 2009
				SG	2014014138	A	30 July 2014
				JP	6037515	B2	07 December 2016
				RU	2014110413	A	27 September 2015
				JP	2015166738	A	24 September 2015
				KR	20170063996	A	08 June 2017
				MX	348362	B	07 June 2017
				JP	2011523350	A	11 August 2011
				KR	20100131003	A	14 December 2010
				US	2011123530	A1	26 May 2011
				NZ	601815	A	31 October 2014
				EP	2631302	A2	28 August 2013
				EP	2271770	B1	22 August 2018
				JP	2014204725	A	30 October 2014
				EP	2631302	A3	08 January 2014
				AU	2009231733	A1	08 October 2009
				RU	2010144502	A	10 May 2012

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/093281

A. 主题的分类

C12Q 1/6883(2018.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12Q

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNABS, CPRSABS, DWPI, SIPOABS, CNKI, ISI web of Science, 百度学术, Genbank:RNA酶, 鼻息肉, ALOX15, 鼻窦炎, 慢性鼻窦炎伴鼻息肉, 花生四烯酸酯15-脂氧合酶, ECRSwNP, 引物, 扩增, 检测, GAPDH, 内参, nonECRSwNP, expression, primer, detect+, amplif+

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 108913764 A (张罗 王成硕 闫冰 北京市耳鼻咽喉科研究所 首都医科大学附属北京同仁医院) 2018年 11月 30日 (2018 - 11 - 30) 权利要求1-11	12-17
PX	CN 108949954 A (北京市耳鼻咽喉科研究所等) 2018年 12月 7日 (2018 - 12 - 07) 权利要求1-10, 说明书第22段	1-11, 17-20
X	闫冰等. "ALOX15在慢性鼻窦炎伴鼻息肉中表达及糖皮质激素对其作用研究" 首都医科大学学报, 第38卷, 第5期, 2017年 10月 31日 (2017 - 10 - 31), 摘要, 材料与方法部分	1-20
X	CN 105849280 A (豪夫迈 罗氏有限公司) 2016年 8月 10日 (2016 - 08 - 10) 实施例1	1, 17-20
X	CN 102232113 A (健泰科生物技术公司 加利福尼亚大学董事会) 2011年 11月 2日 (2011 - 11 - 02) 说明书表1	1, 17-20

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

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

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

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

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

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

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2019年 9月 12日

国际检索报告邮寄日期

2019年 9月 30日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局 (ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

授权官员

吴立

电话号码 62411046

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/093281

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	108913764	A	2018年 11月 30日	无			
CN	108949954	A	2018年 12月 7日	无			
CN	105849280	A	2016年 8月 10日	EP	3060685	B1	2019年 5月 1日
				MX	2016005159	A	2016年 7月 5日
				SG	11201603127W	A	2016年 5月 30日
				AR	098155	A1	2016年 5月 4日
				EP	3060685	A4	2017年 10月 18日
				RU	2016119425	A3	2018年 5月 30日
				US	2017067108	A1	2017年 3月 9日
				AU	2014340129	A1	2016年 5月 26日
				EP	3060685	A1	2016年 8月 31日
				RU	2016119425	A	2017年 11月 28日
				US	2019024178	A1	2019年 1月 24日
				WO	2015061441	A1	2015年 4月 30日
				KR	20160068802	A	2016年 6月 15日
				IL	244709	D0	2016年 4月 21日
				JP	2017501680	A	2017年 1月 19日
				CA	2924873	A1	2015年 4月 30日
CN	102232113	A	2011年 11月 2日	NZ	588853	A	2013年 7月 26日
				IL	208366	D0	2010年 12月 30日
				JP	6161233	B2	2017年 7月 12日
				AU	2009231733	B2	2015年 12月 24日
				BR	PI0906261	A2	2015年 7月 7日
				EP	2271770	A1	2011年 1月 12日
				WO	2009124090	A1	2009年 10月 8日
				RU	2607569	C2	2017年 1月 10日
				MX	2010010746	A	2010年 10月 15日
				CA	2718120	A1	2009年 10月 8日
				SG	2014014138	A	2014年 7月 30日
				JP	6037515	B2	2016年 12月 7日
				RU	2014110413	A	2015年 9月 27日
				JP	2015166738	A	2015年 9月 24日
				KR	20170063996	A	2017年 6月 8日
				MX	348362	B	2017年 6月 7日
				JP	2011523350	A	2011年 8月 11日
				KR	20100131003	A	2010年 12月 14日
				US	2011123530	A1	2011年 5月 26日
				NZ	601815	A	2014年 10月 31日
				EP	2631302	A2	2013年 8月 28日
				EP	2271770	B1	2018年 8月 22日
				JP	2014204725	A	2014年 10月 30日
				EP	2631302	A3	2014年 1月 8日
				AU	2009231733	A1	2009年 10月 8日
				RU	2010144502	A	2012年 5月 10日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)