

(19)中华人民共和国国家知识产权局



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106011139 A

(43)申请公布日 2016. 10. 12

(21)申请号 201610251587.2

(22)申请日 2016.04.21

(71)申请人 中国科学院生物物理研究所

地址 100101 北京市朝阳区大屯路15号

(72)发明人 李翀 王剑松 李书成 郝俊峰

田勇 韩玉刚 张勇 牛海涛

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任

公司 11021

代理人 吴小明

(51) Int. Cl.

C12N 15/113(2010.01)

C12Q 1/68(2006.01)

权利要求书1页 说明书10页

序列表2页 附图1页

(54)发明名称

一种用于膀胱癌筛查的环状RNA的检测及其
应用

(57)摘要

本发明涉及一种用于膀胱癌筛查的环状RNA的检测及其应用,具体是利用环状RNA芯片,通过差异分析,筛选到一条在人膀胱癌组织中显著高表达的circRNA,命名为cRNA-ZFR。与正常组织相比,cRNA-ZFR在人膀胱癌组织中显著高表达,并在大样本荧光定量PCR实验中进一步证实cRNA-ZFR在人膀胱癌组织中的表达量明显高于正常组织。这一新型的cRNA-ZFR将为进一步研究膀胱癌的发病机制提供新的思路,也为膀胱癌的早期筛查及预后监测提供了新的靶标。

1. 一种环状RNA, 名称为cRNA-ZFR, 其对应的cDNA序列如SEQ ID No.1或其互补序列所示。
2. 根据权利要求1所述的环状RNA, 其在膀胱癌组织中相对于癌旁正常组织高表达。
3. 权利要求1所述的环状RNA(cRNA-ZFR)用于制备诊断膀胱癌的诊断剂或试剂盒的用途。
4. 能够检测权利要求1所述的环状RNA(cRNA-ZFR)的表达的试剂在制备诊断膀胱癌的诊断剂或试剂盒中的用途。
5. 一种用于诊断膀胱癌的试剂盒, 其包括:
 - 1) 用于扩增权利要求1所述的环状RNA(cRNA-ZFR)的特异性引物对;
 - 2) 标准DNA模板; 和
 - 3) PCR反应液。
6. 根据权利要求5所述的试剂盒, 其中所述特异性引物对包括上游引物和下游引物, 其中上游引物序列为SEQ ID No.2, 下游引物序列为SEQ ID No.3。
7. 根据权利要求5所述的试剂盒, 其中所述试剂盒为荧光定量PCR检测试剂盒, 所述引物适用于SYBR Green、TaqMan探针和/或分子杂交探针的检测。
8. 根据权利要求5所述的试剂盒, 其中所述试剂盒中的PCR反应液为荧光定量PCR反应液, 并进一步包含荧光染料, 优选所述荧光定量PCR反应液包括dNTP、Mg²⁺、Taq酶及缓冲液, 所述荧光染料为SYBR Green II, 和/或Taq酶为热启动酶。
9. 一种检测环状RNA的方法, 所述方法包括以下步骤:
 - 1) 提取样品总RNA;
 - 2) 制备样品cDNA; 和
 - 3) 定量扩增cRNA-ZFR。
10. 权利要求1所述的环状RNA(cRNA-ZFR)用作膀胱癌药物的靶点的用途。

一种用于膀胱癌筛查的环状RNA的检测及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于肿瘤分子生物学领域,具体涉及一种环状RNA及其应用,具体而言,本发明涉及一种环状RNA在制备膀胱癌辅助诊断或者预后监测制剂中的应用。

背景技术

[0002] 膀胱癌为泌尿系最常见的恶性肿瘤,约95%来源于膀胱上皮。目前用于膀胱癌预防复发的药物疗效并不理想。高达40%-80%的患者会发生一次或多次复发,10%-15%的患者会发展为更高级别的肿瘤或发生转移。因此,发掘新型膀胱肿瘤标志物用于早期有效检测肿瘤的发生、发展及预后监测显得尤为重要。环状RNA(circRNA)是由多个外显子组成的封闭的环状非编码RNA分子。以往对于circRNA的认识主要来自于病毒,类病毒和拟病毒,但是近年来随着RNA测序和生物信息学技术的发展,使得大规模分析转录组数据成为可能,人类基因表达的circRNA也逐渐被了解。circRNA多数位于细胞质中,与线性RNA相比更稳定,且许多circRNA的表达水平不低于线性RNA的表达水平。一些circRNA拥有miRNA的应答原件(MRE),可以充当分子“海绵”,结合并封闭miRNA,从而抑制miRNA的活性;此外,circRNA很可能也是一种重要的新型转录后调控因子,具有调控其他RNA水平、与蛋白质直接结合调节蛋白质活性和作为蛋白质的模板,指导其合成等功能。

发明内容

[0003] 本发明利用环状表达谱芯片技术,通过差异分析,筛选到一条在人膀胱癌组织中显著高表达的circRNA,命名为cRNA-ZFR,其转录区域位于5号染色体,全长1561bp。与正常组织相比,cRNA-ZFR在人膀胱癌组织中显著高表达。在大样本荧光定量PCR实验中进一步证实cRNA-ZFR在人膀胱癌组织中的表达量明显高于正常组织。这一新型的cRNA-ZFR将为进一步研究膀胱癌的发病机制提供新的思路,也为膀胱癌的早期筛查及预后监测提供了新的靶标。

[0004] 发明人提供的3对膀胱癌和癌旁组织,采用上海康成生物工程有限公司代理的ArrayStar公司的circRNA芯片产品(Human CircRNA Microarray V3.0Service)进行检测,筛选出一条在膀胱癌组织中显著高表达的circRNA,命名为cRNA-ZFR,其核苷酸序列如SEQ ID No.1所示。通过35对人膀胱癌与癌旁组织样本的荧光定量PCR验证,发现有32对样本中的cRNA-ZFR在肿瘤组织中显著高表达。

[0005] 具体而言,本发明提供了一种在膀胱癌组织中高表达的circRNA,其名称为cRNA-ZFR,其对应的cDNA的核苷酸序列如SEQ ID No.1(5'→3'方向)或其互补序列所示。所述cRNA-ZFR可以是分离的和/或人工合成的。

[0006] 本发明提供了本发明第一个方面所述cRNA-ZFR用于制备诊断膀胱癌的药物或试剂盒的用途。还提供了能够检测权利要求1所述的环状RNA(cRNA-ZFR)的表达的试剂(如靶向其的特异性引物对)在制备诊断膀胱癌的诊断剂或试剂盒中的用途。

[0007] 在一个优选的实施方案中,所述cRNA-ZFR用于膀胱癌的辅助诊断。

[0008] 本发明的第三个方面提供一种用于诊断膀胱癌的试剂盒,其中包括:

[0009] 1)用于扩增cRNA-ZFR的特异性引物对;

[0010] 2)标准DNA模板;

[0011] 3)PCR反应液。

[0012] 在一个优选的实施方案中,所述特异性引物对包括上游引物和下游引物,上游引物序列为SEQ ID No.2,下游引物序列为SEQ ID No.3。

[0013] 在一个更优选的实施方案中,所述试剂盒为荧光定量PCR检测试剂盒,所述引物适用于SYBR Green、TaqMan探针、分子杂交探针的检测。

[0014] 在一个更优选的实施方案中,所述试剂盒中的PCR反应液为荧光定量PCR反应液,并包含荧光染料。

[0015] 在一个更优选的实施方案中,所述荧光定量PCR反应液包括dNTP、Mg²⁺、Taq酶及buffer缓冲液,所述荧光染料为SYBR Green II,Taq酶为热启动酶。

[0016] 本发明的荧光定量PCR试剂盒适合于目前存在市场上的所有类型荧光定量基因扩增仪,灵敏度高,特异性好,具有良好的应用前景。

[0017] 本发明提供了一种检测环状RNA的方法,所述方法包括以下步骤:

[0018] 1)提取样品总RNA;

[0019] 2)制备样品cDNA(例如来自膀胱癌组织的样品cDNA);

[0020] 3)扩增cRNA-ZFR。

[0021] 在一个优选的实施方案中,所述方法包括如下步骤:

[0022] 1)提取样品总RNA:按照SIGMA公司的TRIZOL试剂(货号T9424)所需试剂及步骤提取总RNA,再用7300实时PCR系统核算定量仪定量(Applied Biosystems AB)定量所提取的RNA的纯度和浓度。

[0023] 2)制备样品cDNA:采用北京康润诚业生物科技有限公司StarScript II One-step RT-PCR试剂盒(货号A215-01)对提取的总RNA反转录合成cDNA。

[0024] 第一步打开RNA二级结构,反应体系及条件如下:

[0025]

试剂	用量
Oligo dT	1ul
RNA	1-2ug
DEPC水	补齐至20ul

[0026] 第二步反转录反应,反应体系及条件如下:

[0027]

试剂	用量
2.5mM dNTP	2.5ul
5×RT buffer	6ul
HPR(RNase抑制剂)	0.6ul
MLV(逆转录酶)	0.4ul

[0028] 将上述组分混合均匀后42℃孵育1h,然后70度灭活10min,即得到cDNA。

[0029] 3)扩增cRNA-ZFR:采用北京康润诚业生物科技有限公司2×RealStar Power SYBR

Mixture UNG荧光定量试剂盒(货号A312),以反转录的cDNA为模板进行荧光定量PCR扩增。

[0030] 荧光定量PCR体系:

试剂	用量
2×MIX	10ul
50×ROX	2ul
[0031] 引物	各 1ul
DNA 模板	1ul
RNase Free ddH ₂ O	补齐至 20ul

[0032] 荧光定量PCR程序:95℃30s预变性,接40个循环:95℃30s,56℃30s。

[0033] 通过对阳性样品的检测,发现本发明定量试剂盒检测准确率为80%-85%,连续3次重复实验,实验结果稳定。

[0034] 本发明的第五个方面提供一种辅助检测膀胱癌的方法,所述方法包括以下步骤:

[0035] 1)提取样品总RNA;

[0036] 2)制备样品cDNA;

[0037] 3)定量扩增cRNA-ZFR,并根据相对定量结果进行判断。

[0038] 本发明还提供了本发明所述的cRNA-ZFR用作膀胱癌药物的新靶点的用途。

[0039] 本发明公开了一种检测膀胱癌的染料类荧光定量PCR试剂盒的使用方法,荧光定量PCR体系:

[0040] 上游引物;下游引物各1ul(10uM);DNA模板cDNA 1ul;50XROX 2ul;2×SYBR Green II 10uL,加离子水至5uL。荧光定量PCR程序:95℃30s预变性,接40个循环:95℃30s,56℃30s。

附图说明

[0041] 图1.CircRNA芯片聚类图,显示3对膀胱癌与癌旁组织差异表达的CircRNA芯片聚类。

[0042] 图2.针对cRNA-ZFR的序列设计的1对特异性引物PCR扩增后行琼脂糖凝胶电泳测试引物的效果。

[0043] 图3. 35例膀胱癌临床样本的cRNA-ZFR验证qRT-PCR检测结果。

具体实施方式

[0044] 实施例1:人膀胱癌与癌旁组织的circRNA芯片表达分析

[0045] 一、材料和方法

[0046] 1.材料

[0047] 组织样本来自于3对膀胱癌患者的住院病例手术切除样本(所有组织样本均来自昆明医科大学第二附属医院泌尿外科),每对包含膀胱癌组织和配对的癌旁组织。

[0048] 2.方法

[0049] (1)肿瘤组织和正常组织总RNA的提取:按Qiagen公司的RNA提取试剂盒(RNeasy Micro Kit,货号74004)说明书提取膀胱癌组织和癌旁组织的总RNA。

[0050] (2)对样品RNA进行Cy5荧光标记(委托上海康成生物工程有限公司进行“ArrayStar Human CircRNA Microarray V3.0Service”进行标记服务)

[0051] (3)反转录合成第一链cDNA:以Total RNA为起始,含有T7启动子序列的Oligo(dT) Primer(上海康成生物工程有限公司)为引物,使用CbcScript酶(上海康成生物工程有限公司)合成第一链cDNA。

[0052] (4)合成第二链cDNA:DNA聚合酶(上海康成生物工程有限公司)以RNA片段为引物,合成第二链cDNA,并纯化双链cDNA。

[0053] (5)体外转录合成cRNA:以cDNA为模板,利用T7Enzyme Mix(上海康成生物工程有限公司)合成cRNA。

[0054] (6)随机引物反转录:取1 μ g cRNA,用随机引物进行反转录。

[0055] (7)杂交与清洗:cDNA溶于杂交液(25%甲酰胺,5 \times SSC,0.1%SDS,0.5%BSA)中45 $^{\circ}$ C杂交过夜,用SSC(上海康成生物工程有限公司)的液体中洗5分钟,玻片甩干后即可用于扫描。

[0056] (8)芯片扫描,图像分析,差异基因筛选:芯片用Agilent Microarray Scanner (Agilent p/n G2565BA)进行扫描,并转化为数字信号。将原始数据输入到6eneSpring GX软件中,进行差异基因筛选。

[0057] 二、结果

[0058] 关于人膀胱癌的CircRNA芯片聚类分析见图1。芯片筛查发现多条表达上调和表达下调的circRNAs。其中cRNA-ZFR显示出在癌组织中表达显著上调,鉴于其可能在人膀胱癌的癌组织中存在特异性表达,本发明通过以下实施例采用大规模样本分批次进行指标的重复验证。

[0059] 实施例2:qRT-PCR初步验证cRNA-ZFR在膀胱癌的癌组织和癌旁组织中的差异表达

[0060] 一、实验材料

[0061] 选取35对(不同于芯片测试的样本)人膀胱癌的癌组织(由昆明医科大学第二附属医院提供)和配对癌旁组织,对cRNA-ZFR的表达差异进行qRT-PCR验证。

[0062] 二、实验方法和结果

[0063] 1.引物特异性鉴定

[0064] (1)特异性引物的设计:从Ensemble数据库提取cRNA-ZFR相关的转录本序列,并用根据转录本的序列通过NCBI的引物设计工具(Primer BLAST)设计引物;

[0065] 设计后的引物序列如下:

[0066] 上游引物:SEQ ID No.2

[0067] 下游引物:SEQ ID No.3

[0068] (2)将人膀胱癌组织与癌旁组织按照SIGMA公司的TRIZOL试剂(货号T9424)所需试剂及步骤提取总RNA,再用7300实时PCR系统核算定量仪定量(Applied Biosystems AB)定量所提取的RNA的纯度和浓度。

[0069] (3)采用北京康润诚业生物科技有限公司StarScript II One-step RT-PCR试剂

盒(货号A215-01)对提取的总RNA反转录合成cDNA。

[0070] 第一步打开RNA二级结构,反应体系及条件如下:

[0071]

试剂	用量
Oligo dT	1ul
RNA	1-2ug
DEPC水	补齐至20ul

[0072] 第二步反转录反应,反应体系及条件如下:

[0073]

试剂	用量
2.5mM dNTP	2.5ul
5*RT buffer	6ul
HPR(RNase抑制剂)	0.6ul
MLV(逆转录酶)	0.4ul

[0074] 将上述组分混合均匀后42度孵育1h,然后70度灭活10min,即得到cDNA。

[0075] (4)cRNA-ZFR的扩增:采用北京康润诚业生物科技有限公司2×RealStar Power SYBR Mixture UNG荧光定量试剂盒(货号A312),以反转录的cDNA为模板进行荧光定量PCR扩增。

[0076] 荧光定量PCR体系:

试剂	用量
2×MIX	10ul
50×ROX	2ul
引物	各 1ul
DNA 模板	1ul
RNase Free ddH ₂ O	补齐至 20ul

[0078] 荧光定量PCR程序:95℃30s预变性,接40个循环:95℃30s,56℃30s。

[0079] (5)电泳检测,选用DM2000DNA Marker(北京康为世纪生物科技有限公司,货号CW0632)。结果如图2所示:扩增片段大小与预期相同,扩增产物只有一条带。该引物对符合上述标准。上游的特异性引物,其序列见序列表SEQ ID No.2,下游的特异性引物,其序列见序列表SEQ ID No.3。

[0080] 2.样品总RNA的提取:

[0081] 采用液氮研磨法,按照SIGMA公司的TRIZOL试剂(货号T9424)所需试剂及步骤提取膀胱癌组织或肿瘤的Total RNA。主要操作步骤如下:

[0082] (1)新鲜组织样品迅速放入装有液氮的研钵中进行研磨,最终研磨成粉末状;

[0083] (2)每个研钵中加入1ml TRIZOL试剂,继续研磨3-5分钟,直至成匀浆状;

[0084] (3)把上述匀浆转移到1.5ml无菌无酶离心管中,每1份匀浆中加入0.2ml氯仿。混匀后12000g离心10分钟。RNA存在于上层水相中;

[0085] (4)吸取上层水相(约200-300ul)转移到1.5ml无菌无酶新管中,0.5ml异丙醇混匀,12000g离心10分钟;

[0086] (5)弃上清,用75%的乙醇洗涤RNA沉淀一次,用20ul无RNA酶的水吹打几次溶解RNA,保存于-80℃低温冰箱。

[0087] 3. 标准DNA模板的制备

[0088] 根据cRNA-ZFR碱基序列(其核苷酸序列如序列表SEQ ID No.1所示),委托上海生工合成。

[0089] 取样2ul合成产物,连接到pUC-T TA克隆载体(北京康为世纪生物科技有限公司,货号CW0801),随后转化到DH5a感受态细胞中。通过序列为SEQ ID No.2和SEQ ID No.3的特异性引物筛选阳性克隆,提取质粒DNA,质粒DNA用7300实时PCR系统核算定量仪定量,并做10倍系列稀释作为标准曲线(标准DNA模板浓度范围在 10^2 - 10^6 拷贝/ul)。

[0090] 4. 敏感性实验

[0091] 将标准DNA模板质粒按比例稀释为 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 拷贝/ul,进行荧光定量PCR,检测灵敏度。最低检出浓度为 10^2 拷贝/ul。

[0092] 5. 合成cDNA模板

[0093] 取上述30对膀胱癌组织和配对癌旁组织的总RNA,采用北京康润诚业生物科技有限公司StarScript II One-step RT-PCR试剂盒(货号A215-01)对提取的总RNA反转录合成cDNA。

[0094] 第一步打开RNA二级结构,反应体系及条件如下:

[0095]

试剂	用量
Oligo dT	1ul
RNA	1-2ug
DEPC水	补齐至20ul

[0096] 第二步反转录反应,反应体系及条件如下:

试剂	用量
2.5mM dNTP	2.5ul
5*RT buffer	6ul
HPR(RNase 抑制剂)	0.6ul
MLV(逆转录酶)	0.4ul

[0098] 将上述组分混合均匀后42度孵育1h,然后70度灭活10min,即得到cDNA。

[0099] 6. 荧光定量PCR检测cRNA-ZFR表达量

[0100] 采用北京康润诚业生物科技有限公司2X RealStar Power SYBR Mixture UNG荧光定量试剂盒(货号A312),以反转录的cDNA为模板进行荧光定量PCR扩增。

[0101] 荧光定量PCR体系:

试剂	用量
2*MIX	10ul
50*ROX	2ul
[0102] 引物	各 1ul
DNA 模板	1ul
RNase Free ddH ₂ O	补齐至 20ul

[0103] 荧光定量PCR程序:95℃30s预变性,接40个循环:95℃30s,56℃30s。

[0104] 根据qRT-PCR的相对定量公式: $2^{-\Delta Ct}$,分别计算出cRNA-ZFR在膀胱癌患者癌组织(T)和癌旁组织(N)中的表达水平,结果如图3所示:cRNA-ZFR在癌旁组织中的表达水平主要集中在0.32-3.76之间,而癌组织中的cRNA-ZFR的表达量主要集中在0.82-15.7之间,明显高于正常组织。以上结果说明,cRNA-ZFR在肿瘤组织中普遍高表达。本实验结果显示:cRNA-ZFR在35例膀胱癌与癌旁组织中,32例上调,阳性检出率=上调表达例数/总检测例数×100%=32/35=91.4%。CRNA-ZFR可以作为膀胱癌诊断的新肿瘤标志物,用于膀胱癌的筛查。

[0105] 实施例3:利用cRNA-ZFR的差异表达对膀胱癌组织进行筛查

[0106] 一、实验材料

[0107] 选取100份人膀胱癌组织和100份癌旁组织(由昆明医科大学第二附属医院提供),对cRNA-ZFR的表达差异进行qRT-PCR检测。

[0108] 二、实验方法和结果

[0109] 1. 引物特异性鉴定

[0110] (1)采用如下特异性引物序列:

[0111] 上游引物:SEQ ID No.2

[0112] 下游引物:SEQ ID No.3

[0113] (2)将人膀胱癌组织与癌旁组织按照SIGMA公司的TRIZOL试剂(货号T9424)所需试剂及步骤提取总RNA,再用7300实时PCR系统核酸定量仪定量(Applied Biosystems AB)定量所提取的RNA的纯度和浓度。

[0114] (3)采用北京康润诚业生物科技有限公司StarScript II One-step RT-PCR试剂盒(货号A215-01)对提取的总RNA反转录合成cDNA。

[0115] 第一步打开RNA二级结构,反应体系及条件如下:

[0116]

试剂	用量
Oligo dT	1ul
RNA	1-2ug
DEPC水	补齐至20ul

[0117] 第二步反转录反应,反应体系及条件如下:

[0118]

试剂	用量
2.5mM dNTP	2.5ul
5*RT buffer	6ul
HPR(RNase抑制剂)	0.6ul
MLV(逆转录酶)	0.4ul

[0119] 将上述组分混合均匀后42度孵育1h,然后70度灭活10min,即得到cDNA。

[0120] (4)cRNA-ZFR的扩增:采用北京康润诚业生物科技有限公司2×RealStar Power SYBR Mixture UNG荧光定量试剂盒(货号A312),以反转录的cDNA为模板进行荧光定量PCR扩增。

[0121] 荧光定量PCR体系:

[0122]

试剂	用量
2×MIX	10ul
50×ROX	2ul
引物	各1ul
DNA模板	1ul
RNase Free ddH ₂ O	补齐至20ul

[0123] 荧光定量PCR程序:95℃30s预变性,接40个循环:95℃30s,56℃30s。

[0124] 2.样品总RNA的提取:

[0125] 采用液氮研磨法,按照SIGMA公司的TRIZOL试剂(货号T9424)所需试剂及步骤提取膀胱癌组织或肿瘤的Total RNA。主要操作步骤如下:

[0126] (1)新鲜组织样品迅速放入装有液氮的研钵中进行研磨,最终研磨成粉末状;

[0127] (2)每个研钵中加入1ml TRIZOL试剂,继续研磨3-5分钟,直至成匀浆状;

[0128] (3)把上述匀浆转移到1.5ml无菌无酶离心管中,每1份匀浆中加入0.2ml氯仿。混匀后12000g离心10分钟。RNA在于上层水相中;

[0129] (4)吸取上层水相(约200-300ul)转移到1.5ml无菌无酶新管中,0.5ml异丙醇混匀,12000g离心10分钟;

[0130] (5)弃上清,用75%的乙醇洗涤RNA沉淀一次,用20ul无RNA酶的水吹打几次溶解RNA,保存于-80℃低温冰箱。

[0131] 3.合成cDNA模板

[0132] 取上述100例膀胱癌组织和100例癌旁组织的总RNA,采用北京康润诚业生物科技有限公司StarScript II One-step RT-PCR试剂盒(货号A215-01)对提取的总RNA反转录合成cDNA。

[0133] 第一步打开RNA二级结构,反应体系及条件如下:

[0134]

试剂	用量
Oligo dT	1ul

RNA	1-2ug
DEPC水	补齐至20ul

[0135] 第二步反转录反应,反应体系及条件如下:

[0136]

试剂	用量
2.5mM dNTP	2.5ul
5*RT buffer	6ul
HPR(RNase抑制剂)	0.6ul
MLV(逆转录酶)	0.4ul

[0137] 将上述组分混合均匀后42度孵育1h,然后70度灭活10min,即得到cDNA。

[0138] 4. 荧光定量PCR检测cRNA-ZFR表达量

[0139] 采用北京康润诚业生物科技有限公司2X RealStar Power SYBR Mixture UNG荧光定量试剂盒(货号A312),以反转录的cDNA为模板进行荧光定量PCR扩增。

[0140] 荧光定量PCR体系:

[0141]

试剂	用量
2*MIX	10ul
50*ROX	2ul
引物	各1ul
DNA模板	1ul
RNase Free ddH ₂ O	补齐至20ul

[0142] 荧光定量PCR程序:95℃30s预变性,接40个循环:95℃30s,56℃30s。

[0143] qRT-PCR检测膀胱癌组织样本中cRNA-ZFR的扩增曲线。产物扩增曲线在反应的早期就可能被监测到,起始点表示产物聚集的对数期开始,该期产物的荧光信号呈指数增长,检测仪将此点定义为Ct值。根据Ct值可以预测靶基因产物的起始浓度,即在PCR反应条件相同的情况下,靶基因起始浓度越大,则Ct值就越低。我们将癌旁对照组均值的95%可信区间的上界($\bar{X} \pm 1.83SD$)作为本诊断实验的Cut-off值,其值为4.673。在此分界值条件下,本诊断实验的灵敏度为93%,特异度为83%。

		实际样品		合计	
		+	-		
[0144]	检测结果	+	93	15	108
		-	7	85	92
合计			100	100	200

[0145] 临床灵敏度用来衡量某种试验检测出有病者的能力,灵敏度是将实际有病的人正确地判定为真阳性的比例。

[0146] 本实验灵敏度 = $93 / (93 + 7) \times \% = 93\%$ 。

[0147] 临床特异度是衡量试验正确地判定无病者的能力,特异度是将实际无病的人正确

地判定为真阴性的比例。

[0148] 本实验特异度 = $85 / (15 + 85) \times \% = 85\%$ 。

[0149] CircRNA作为全新的环状RNA,不仅能成为膀胱癌诊断的肿瘤标志物,而且有望成为膀胱癌治疗靶点,具有十分重要的科学意义和生理意义。

[0150] SEQ ID No.1

[0151] cRNA-ZFR序列:

[0152] GCTACTTGGGAGGCTGAGACAGGAGAATCGCTTGAACCCAGGAGGCCGAGGTTGCAGTGATCTGAGATC
GTGCACTCCAGCCTGGGGGACAGAGTGACACTCCGTCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAATGCCTGTTTTGG
GTTCTTCATTTTTTTCTATAACTGTAACATATTTGAGCATTCTATATTTATCATCAGTTCCTTTGTTATATTAGCTC
CAGAATAACTTACGACCATTTAGAGTACTGAACAACTCAGTAGTTTATTGTACATACTCATTAAGGTGGATTTTTG
TGTTCCCTCTTGTCTTGTGCTTTGTGCTAGTGCACTGTGTCCAGTAATCTTCCCTCGGATTTTCGTTTTGGTGGG
TAGGGTTTATATTTCCAGAAATTGTTTATTATTAATAAAGTTAACCTTTTGTTCCTCATATTGGATTA
TGTAATTTTATTGAAAATAACTCCGTGGATATATTAAGTGCCAACAAGCTCTCAAATGGCTCATGTGCACTGATG
CTACCTTAAGGAAGTGTCTTGCTCACCTGGTCAAACACCCATTCCTCACTGCATTTTGCCAATTCAATCCATTTTAG
ATGTAACCTCGGGTATGGTGAAAGACCCACCGACGCTTGGACAGGCAAAAATGCCTTGACGCTCTGGCTGCTCTA
CGCCACGCTAAGTGGTTCAGGTTCCGAACATCATTTTACTTTTTTCTGTAGCCTTATGAGAGAAGTAGTTCAGTA
CAACATGTTAACTGTGCTTAAACATTTCAAAGACTGCCAAGCAATACTATTTTAAATTAATATCAGAAAATAT
GTTAACATAGAAAGCTGGGTATGATGATCTGCATATTGCAGTTATTATTAATTTGACAATGAACTTAGGTTTGGGGA
GTGTTTTGTAGTTGGGGTTTTTTTATTTTTTATTTTTTAGTGGCTATATTTAAAGTTGACTTGTTTAGGAACATCACA
TGTTTGTGTATATATATTATATTCCATAAGGCTGCAGATTAACCTTGCTTTAAATAATGGAATATGTGTTAAAGCT
TTGTGTATAGTTTTAAGATTTTTTTCCCCCTCTTCTCTAAGTTAATAAGTGTAGGGAGTGAAAGGTGAGGAAGCAG
CTGTTTGGTTTGTGACTTTGCAGTCATGCAAAGGCACAGAAGGGAAACCAAACAGATTTCCCTAACCTTTCAGTCC
CTAGACAAACTTTTTAGCTCTTTACTTTTTCTTTTATTTCTAATGTAGGCAGACTTTTTTTTTTAAAGTTTACTGTT
TTAAATGAACACAGGTCAAGGTTACAGGGGATCAAGAAATATTATTCTGTATAATCTGTTTACTTTGACCTAAAT
ACCAGCTTTTAAATACTAACCTGGCATAAAATACTGCTGTAAATGGCAGCTCATTGAATCCAATTTTAAAGTGTGAT
TGTTTTTGTTTTTATCTGAGCTTCCATTGAACGGTGGTATTTTAACTTTTTTTCATCAAGGGATATATTCAGTATTT
CTAAGATTAATTCAATTGGTTTTTATGTT

[0153] SEQ ID No.2

[0154] 上游引物:5'-AATAAGTTAACCTTTTGT-3'

[0155] SEQ ID No.3

[0156] 下游引物:5'-TTAAATATCAGAAAATATG-3'。

序列表

<110> 中国科学院生物物理研究所

<120> 一种用于膀胱癌筛查的环状RNA的检测及其应用

<130> IB167483

<160> 3

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1561

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

[0001] gctacttggg aggetgagac aggagaatcg cttgaacceca ggaggccgag gtigcagtga 60
 tclgagatcg tgcactecag ccigggggac agagtgacac tccgletcaa aaaaaaaaaa 120
 aaaaaaaaaa gaaatgcctg ttttgggttc ttcatttttt tectataact gtaactatac 180
 ttagcattct atattatca tcagttcttt gttatattag ctccagaata acttaagacc 240
 atttagagta ctgaacaaac tcagtagtft attgtacata ctcaattaagg tggatttttg 300
 tgttccctct tgccttgttg tctttgtget agtgcactgt gtccagtaat etttcctteg 360
 gatttcgttt tgggtggtag ggtttatatt tccagaaatt gtttattata ttactaaatt 420
 aafaagttaa ccttttgttc ctcatattgg attatgtaaa tttattgaaa ataactccgt 480
 ggatatatta aagtgccaac aagetctcaa atggetcatg tgaaactgat gctacettaa 540
 ggaagtgtct tgcacactg gtaaacacc cattctctac tgcattttgc caattcaate 600
 cattttagat gtaacctcgg gtafggtgaa agaccacccg gacgtcttgg acaggcaaaa 660
 atgectigac gctctggetg ctctacgcca cgctaagtgg ttccagggtc ggaacatcat 720
 tttacttttt tctttagacc ttatgagaga agtagttcag tacaacatgt ttaactgtgc 780
 ttaaacattt caaaagactg cccaagcaat actattttaa attaaatac agaaaaatg 840
 ttaacataga aagetgggta tgaigatctg catattgcag ttattattaa ttigacaatg 900
 aacttaggtt tggggagtgt ttgtagttg gggttttttt atttttttat tttagtggct 960
 atatttaaag ttgacttgtt tagaacatc acatgtttgt gfatatatar tatattccat 1020
 aaggetgcag attaacittg cttaaaataa tggaatatgt gtttaaaaget ttgtgtatag 1080
 ttttaagatt ttttcccc tcttctcta agttaataag ttagggagt gaaaggtag 1140
 gaagcagctg tttggtttag tgactttgca gtcatgcaaa ggcaacagaag gaaaccaaaa 1200
 cagatttccct taaccttca gtccttagac aaacttttla gctctttact ttttcttla 1260

	ttctaatgt aggcagactt tttttttta agtttactgt tttaaataa cacaggtea	1320
	ggttcacagg ggatacaaaa atattattct tgtataatct gtttactttg acctaaatac	1380
	cagcttttaa atactaacce tggcataaaa tactgctgta aatggcagct cattgaatcc	1440
	aattttaagt gtgattggtt ttgtttttat ctgagcttcc attgaacggt ggtattttaa	1500
	cttttttca tcaagggata tatteagtat ttelaagatt aattcaattg gtttttatgt	1560
	t	1561
	<210> 2	
	<211> 19	
	<212> DNA	
[0002]	<213> 人工引物	
	<400> 2	
	aataagttaa ccttttggt	19
	<210> 3	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工引物	
	<400> 3	
	ttaaataatca gaaaatatg	19

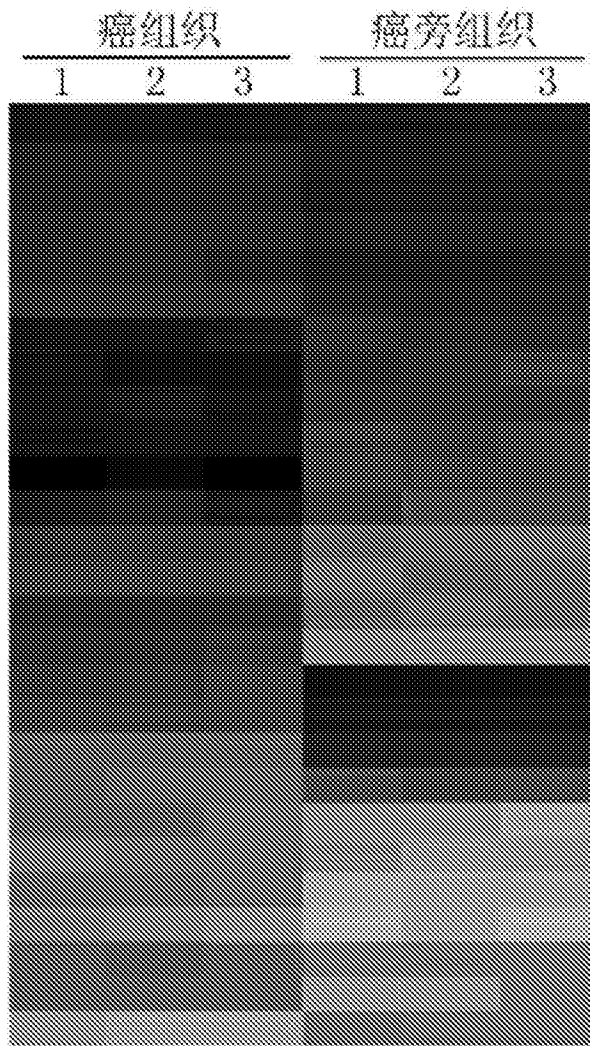


图1

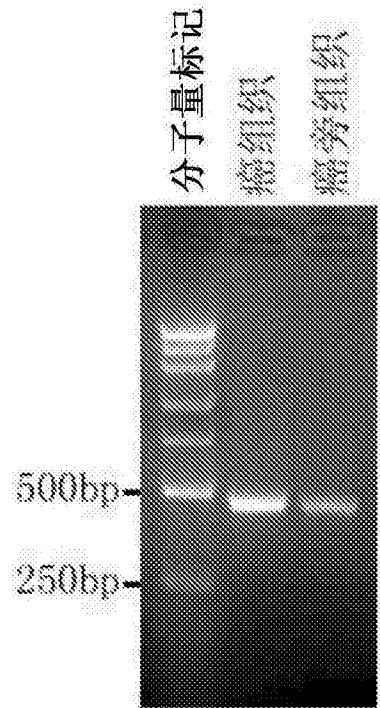


图2

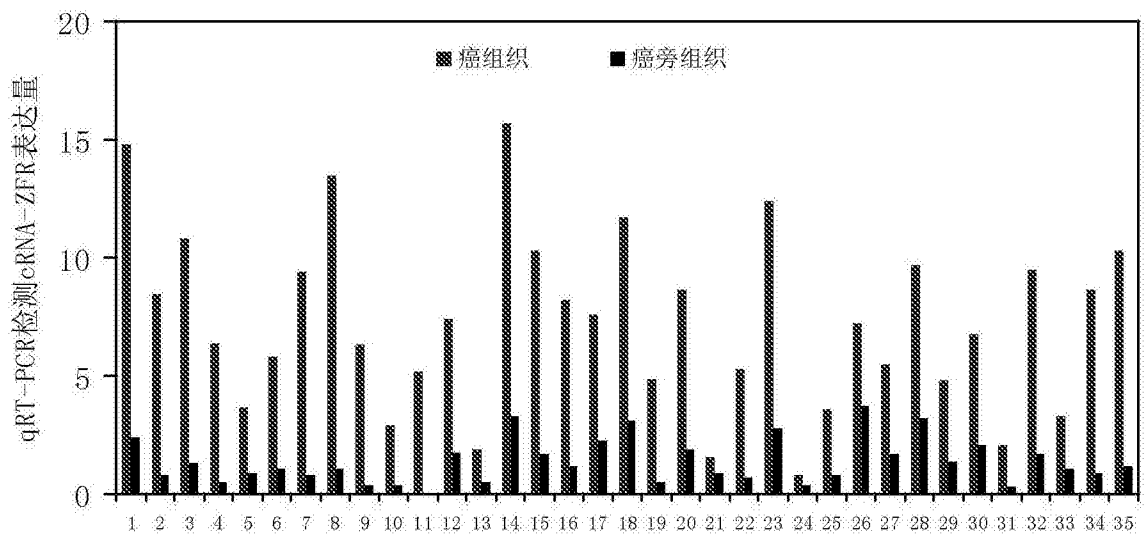


图3