



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107287326 B

(45)授权公告日 2018.02.16

(21)申请号 201710619782.0

(22)申请日 2017.07.26

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 107287326 A

(43)申请公布日 2017.10.24

(73)专利权人 中国人民解放军南京军区南京总医院

地址 210002 江苏省南京市中山东路305号

(72)发明人 饶秋 夏秋媛 方茹 叶胜兵  
李芳秋 周晓军

(74)专利代理机构 南京天华专利代理有限责任  
公司 32218

代理人 傅婷婷 夏平

(51)Int.Cl.

C12Q 1/6886(2018.01)

C12N 15/11(2006.01)

(56)对比文件

CN 102424848 A,2012.04.25,全文.

CN 104212889 A,2014.12.17,全文.

Kuroda等.Review of renal carcinoma

associated with Xp11.2 translocations/  
TFE3 gene fusions with focus on  
pathobiological aspect.《Histology &  
Histopathology》.2012,第27卷(第2期),第133-  
40页.

Rao Q等.Renal cell carcinomas with t  
(6;11)(p21;q12) presenting with  
tubulocystic renal cell carcinoma-like  
features.《INTERNATIONAL JOURNAL OF  
CLINICAL AND EXPERIMENTAL PATHOLOGY》  
.2013,第6卷(第7期),第1452-1457页.

陈显成等.Xp11.2易位/TFE3基因融合相关  
性肾癌:一种需要更多认识的肾癌亚型.《中华临  
床医师杂志(电子版)》.2014,第8卷(第21期),第  
3749-3752页.

Henry等.Xp11.2 translocation renal  
cell carcinoma occurring during.  
《Diagnostic Pathology》.2009,第4卷(第15  
期),第1-11页.

审查员 祝春燕

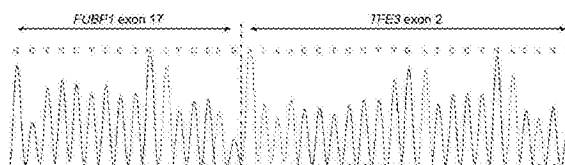
权利要求书1页 说明书4页  
序列表1页 附图1页

(54)发明名称

一种Xp11.2的新易位伴侣FUBP1及其检测引  
物和应用

(57)摘要

本发明公开了一种Xp11.2的新易位伴侣  
FUBP1及其检测引物和应用。Xp11.2的新易位伴  
侣为FUBP1-TFE3基因易位,FUBP1基因位于  
1p31.1,共22个外显子;基因融合发生于FUBP1的  
17号外显子与TFE3基因2号外显子之间;优选包  
含SEQ ID NO.3所示的核苷酸序列。一种检测  
FUBP1-TFE3易位性肿瘤的PCR引物,上游引物  
FUBP1-E17-F序列如SEQ ID NO.1所示;下游引物  
TFE3-E2-R序列如SEQ ID NO.2所示。本发明针对  
高通量测序发现的新融合位点设计了特异性的  
PCR引物,扩大了原引物组合的检测范围,应用于  
临床,可提高诊断该类肿瘤的检出率和准确率。



CN 107287326 B

1. 一种融合基因,其特征在于为FUBP1-TFE3基因易位,FUBP1基因位于1号染色体,位置77944055-77979494,序列来自GeneBank,序列版本号GRCh38.p7,共22个外显子;基因融合发生于FUBP1的17号外显子与TFE3基因2号外显子之间;所述的融合基因包含SEQ ID NO.3所示的核苷酸序列。

2. 权利要求1所述的融合基因在制备FUBP1-TFE3易位性肿瘤诊断试剂中的应用。

3. 一种检测FUBP1-TFE3易位性肿瘤的PCR引物,其特征在于所述的PCR引物为检测权利要求1所述的融合基因的PCR引物。

4. 根据权利要求3所述的PCR引物,其特征在于所述的PCR引物的上游引物FUBP1-E17-F序列如SEQ ID NO.1所示;下游引物TFE3-E2-R序列如SEQ ID NO.2所示。

5. 权利要求3或4所述的PCR引物在制备FUBP1-TFE3易位性肿瘤诊断试剂中的应用。

6. 一种FUBP1-TFE3易位性肿瘤诊断试剂盒,其特征在于所述的试剂盒包括权利要求3或4所述的PCR引物。

## 一种Xp11.2的新易位伴侣FUBP1及其检测引物和应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于医学检验领域,涉及一种Xp11.2的新易位伴侣FUBP1及其检测引物和应用。

### 背景技术

[0002] 2004年WHO对1997年肾细胞癌病理组织学分类进行了修改,新增了Xp11.2易位/TFE3基因融合相关性肾癌(Xp11.2易位性肾癌)。TFE3基因位于XP11.2,是Xp11.2易位性肾癌的唯一驱动基因,其致病机理清晰明确:这类肿瘤均涉及位于Xp11.2的TFE3基因同其它染色体易位及其所致形成融合基因,通过启动子变换从而高表达TFE3融合蛋白,而TFE3作为一个转录因子,通过与特异的DNA结构相结合,转录调控体内多种基因表达最终致病。目前至少有10种不同的易位伴侣和融合基因被报道,包括ASPL-TFE3、PRCC-TFE3、SFPQ-TFE3、NONO-TFE3、CLTC-TFE3、LUC7L3-TFE3、KHSRP-TFE3、PARP14-TFE3、DVL2-TFE3和RBM10-TFE3等,每例肿瘤内仅存在单一的易位形式。除肾细胞癌外,一些软组织间叶肿瘤同样存在TFE3基因致病性的基因易位,包括腺泡状软组织肉瘤、部分上皮样血管周细胞肿瘤等,这些间叶肿瘤和Xp11.2易位性肾癌一起统称为Xp11.2易位性肿瘤。

[0003] Xp11.2易位性肿瘤是一罕见类型肿瘤,虽然其总体发病率很低,但在儿童肾癌患者中约1/3为此类肾癌,并且回顾性研究表明此类肿瘤在我国并不罕见。该疾病以发病年龄轻为突出特征,因此造成极其沉重的家庭及社会负担。且研究已证实,Xp11.2易位性肾癌预后要比非Xp11.2易位性肾癌预后差,并且不同基因类型Xp11.2易位性肾癌的预后有所区别。此外,有明确证据表明Xp11.2易位性肿瘤的患者对血管内皮生长因子受体(vascular endothelial growth factor receptor,VEGFR)或哺乳动物雷帕霉素(mammalian target of rapamycin,mTOR)分子靶向治疗敏感。另有研究表明,MET酪氨酸激酶为ASPL-TFE3融合基因的靶基因,并有望成为Xp11.2易位性肿瘤的治疗靶点。因此,根据基因型来精确诊断此类肿瘤显得十分重要。

[0004] 目前常用的诊断Xp11.2易位性肿瘤的检测方法主要包括免疫组织化学和荧光原位杂交。免疫组织化学检测细胞核TFE3融合蛋白直观、快捷、价格低,但其缺点是该方法容易受到多种因素影响,如组织固定时间、组织修复方式、抗体克隆号以及人为的判读因素等等,使得结果可能出现假阳性或假阴性。染色体荧光原位杂交(FISH)始于传统的细胞遗传学和DNA技术的结合,快速灵敏、特异性好,可以检测隐匿或微小的染色体畸变以及复杂核型;还可以使用多种荧光标记,显示DNA片段及基因之间的相对位置与方向,空间定位精确。但这两种检测方法只能提示存在TFE3蛋白的高表达或TFE3基因的易位,均不能明确肿瘤中发生的具体易位改变。精确检测Xp11.2易位性肿瘤的易位伴侣和融合基因位点,不仅是患者预后预测的依据,也是未来靶向治疗的指导,因此,明确Xp11.2易位性肿瘤的基因易位位点,具有重要的临床意义。

[0005] Xp11.2易位性肿瘤是一种每个个体间异质性较大的肿瘤类型,目前已知的融合基因形式就包括ASPL-TFE3、PRCC-TFE3、SFPQ-TFE3、NONO-TFE3、CLTC-TFE3、LUC7L3-TFE3、

KHSRP-TFE3、PARP14-TFE3、DVL2-TFE3和RBM10-TFE3等十余种。

[0006] 目前高通量测序是唯一可以明确未知易位位点的检测手段,然而高通量测序费用高昂,检测周期长,检测平台稀缺,对样品质量要求高,不利于普及推广,对于大多数患者来说也不是首选检测手段。依赖以往经验,针对已知的融合位点设计特异性的PCR引物组合,对肿瘤组织中提取出的RNA逆转录之后进行PCR扩增并测序,检测融合基因具体易位位点,是最准确、便捷、经济的方法。因此,发现新的致病融合位点,进而设计PCR引物将有利于Xp11.2易位性肿瘤检测准确度的进一步提高。

## 发明内容

[0007] 本发明的目的是针对现有技术的上述不足,提供一种Xp11.2的新易位伴侣。

[0008] 本发明的另一目的是提供该新易位伴侣的检测引物。

[0009] 本发明的又一目的是提供引物的应用。

[0010] 本发明的目的可通过以下技术方案实现:

[0011] 一种Xp11.2的新易位伴侣,为FUBP1-TFE3基因易位,FUBP1基因位于1p31.1(1号染色体,位置77944055-77979494,序列来自GeneBank,序列版本号GRCh38.p7),共22个外显子;基因融合发生于FUBP1的17号外显子与TFE3基因2号外显子之间。我们通过高通量测序方法检测未知融合对象的Xp11.2肿瘤患者的标本,发现所述的Xp11.2的新易位伴侣:FUBP1-TFE3基因易位,这一位点国内外文献均未报道过,原有TFE3融合基因扩增引物也无法检测出这一融合基因,因此会导致漏诊。

[0012] 所述的Xp11.2的新易位伴侣优选包含SEQ ID NO.3所示的核苷酸序列。

[0013] 本发明所述的Xp11.2的新易位伴侣在制备FUBP1-TFE3易位性肿瘤诊断试剂中的应用。

[0014] 一种检测FUBP1-TFE3易位性肿瘤的PCR引物,为检测本发明所述的FUBP1-TFE3基因易位的PCR引物。所有能够检测本发明所述FUBP1-TFE3基因易位的引物均在本发明的保护范围内。

[0015] 针对本发明找到的新的新易位伴侣,我们在FUBP1的17号外显子和TFE3的2号外显子内分别设计引物。遵循引物设计原则,引物最好在模板cDNA的保守区内设计,引物长度在15bp-30bp之间,引物GC含量在40%~60%之间,退火温度最好接近72℃,引物自身及引物之间不应存在互补序列,扩增条带单一特异。由于工作中经常需要在石蜡固定标本中开展工作,石蜡标本RNA碎裂严重,因此扩增产物不宜过长,需要控制在300bp以下。

[0016] 经过多次调试和验证,最终设计的引物序列为:FUBP1-E17-F:GAACCTCCAATGGGACCATAC(SEQ ID NO.1);TFE3-E2-R:GGTAAGGGTTGGCTTTTGAG(SEQ ID NO.2),理论扩增产物长197bp,扩增产物(融合基因)的全部序列如下:GAACCTCCAATGGGACCATACAACCCTGCACCTTATAATCCTGGACCACCAGGCCCGCTCCTCATGGTCCCTCCAGCCCCATATGCTCCCAGGGATGGGAAATGCATATCCACACTGGCAGCAGCAGGCTCCTCCTGATCCAGGAAAACGTCTTGTATCCTGACAGCTTCTACGAGCTCAAAAAGCCAACCCTTACC(SEQ ID NO.3)。经实验验证,引物可成功扩增出目的条带,条带单一、特异。

[0017] 本发明所述的PCR引物在制备FUBP1-TFE3易位性肿瘤诊断试剂中的应用。

[0018] 一种FUBP1-TFE3易位性肿瘤诊断试剂盒,包括本发明所述的PCR引物。

[0019] 有益效果:

[0020] 本发明针对高通量测序发现的新融合位点设计了特异性的PCR引物,扩大了原引物组合的检测范围,应用于临床,可提高诊断该类肿瘤的检出率和准确率。为诊断分型及分子靶向治疗提供依据。根据我们的实验结果,该引物组合诊断的特异性和敏感性均达到了100%,且操作对象只需要在石蜡包埋组织切片上进行,时间仅为三个工作日。采用本发明提供的探针组合进行检测FUBP1-TFE3易位性肿瘤,不但方便、快速、可靠而且检出率高,可用于制备FUBP1-TFE3易位性肿瘤诊断试剂盒,为FUBP1-TFE3易位性肿瘤的快速准确的诊断提供了新的工具。

### 附图说明

[0021] 图1:在已知FUBP1-TFE3融合型肿瘤中应用本发明引物组合(FUBP1-E17-F;TFE3-E2-R)进行验证,成功检出的FUBP1-TFE3融合基因测序图。

### 具体实施方式

[0022] 以下通过实施例对本发明作进一步的阐述。

[0023] 实施例1针对明确诊断的病例进行验证:

[0024] 对于高通量测序RNA-seq检测出FUBP1 exon17-TFE3 exon2新融合位点的病例,使用我们设计的引物进行验证。

[0025] 一、RNA的提取:

[0026] 严格按照RNeasy FFPE Kit操作说明进行提取。①脱蜡:将收集好的玻片进行二甲苯脱蜡,再用无水乙醇漂洗,风干后用手术刀片刮下来装入1.5ml EP管中;②酶解:加入150 $\mu$ l消化液,再加入10 $\mu$ l蛋白酶K,混匀,56 $^{\circ}$ C酶解15min,80 $^{\circ}$ C 15min,冰上冷却;③加入16 $\mu$ l DNDNA酶缓冲液,再加入10 $\mu$ l DNase I,混匀,室温静置15min,12000rpm离心15min,取上清;④加入320 $\mu$ l结合液液再加入720 $\mu$ l无水乙醇,混匀,分2次转移至吸附柱中,8000rpm离心1min,,弃废液;⑤洗涤:加入500 $\mu$ l洗涤液,8000rpm离心1min;重复洗涤一次,弃废液,将吸附柱转移到一个新的2ml收集管中,12000rpm离心5min;⑥洗脱:将吸附柱转移到1.5ml的EP管中,加入100 $\mu$ l的洗脱液,室温静置1min,12000rpm离心1min,将收集好的洗脱液(即DNA提取液)进行浓度和纯度测定,-80 $^{\circ}$ C保存存待用。

[0027] 二、逆转录PCR RT-PCR

[0028] 采用试剂盒(K1622,RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit,MBI)对RNA进行逆转录,方法详见试剂盒说明。PCR扩增引物为本专利FUBP1-TFE3融合基因引物组合FUBP1-E17-F/TFE3-E2-R。反应体系包括:0.125 $\mu$ l TaKaRa Ex Taq<sup>TM</sup>HS液,2.5 $\mu$ l 10 $\times$ Taq Buffer (Mg<sup>2+</sup> plus),2 $\mu$ l dNTP(均购自日本Takara公司),引物浓度为20 $\mu$ mol/l,cDNA模版为100ng,无菌去离子水加至25 $\mu$ l。PCR扩增条件为94 $^{\circ}$ C变性3min后,94 $^{\circ}$ C 30s、60 $^{\circ}$ C 30s、72 $^{\circ}$ C 1min,共35次循环,最后72 $^{\circ}$ C延伸5min。PCR产物用3%琼脂糖,电压100V,电泳,溴化乙啶染色后于紫外光下观察结果,并送测序。

[0029] 结果:分别用本发明引物(FUBP1-E17-F/TFE3-E2-R)PCR后可见单一特异的电泳条带,对扩增产物进行测序,得到FUBP1 exon17-TFE3 exon2融合基因序列(图1),证明本发明设计的引物组合可靠且敏感。

[0030] 实施例2针对对照组病例进行检测

[0031] 我们对30例诊断明确的对照组病例(包括10例透明细胞性肾细胞癌,5例乳头状肾细胞癌,5例嫌色细胞性肾细胞癌,5例已知融合伴侣的TFE3易位相关性肾细胞癌和5例TFEB易位相关性肾癌,理论上均不存在FUBP1-TFE3基因融合)使用本发明的引物组合进行检测, RNA提取、逆转录PCR和测序方法同上。

[0032] 结果:使用本发明设计引物组合检测,未检测出FUBP1-TFE3融合基因,证明本项目设计的引物特异性高。

[0033] 评价:本发明引物组合是对原有Xp11.2/TFE3易位性肾细胞癌融合基因引物的补充,扩展了Xp11.2/TFE3易位性肾细胞癌融合基因的类型,增加了RT-PCR方法诊断该肿瘤的检出率。

- [0001] <110> 中国人民解放军南京军区南京总医院
- [0002] <120> 一种Xp11.2的新易位伴侣FUBP1及其检测引物和应用
- [0003] <160> 3
- [0004] <210> 1
- [0005] <211> 20
- [0006] <212> DNA
- [0007] <213> 人工序列
- [0008] <220>
- [0009] <223> 引物FUBP1-E17-F
- [0010] <400> 1
- [0011] gaactccaat gggaccatac 20
- [0012] <210> 2
- [0013] <211> 20
- [0014] <212> DNA
- [0015] <213> 人工序列
- [0016] <220>
- [0017] <223> 引物TFE3-E2-R
- [0018] <400> 2
- [0019] ggtaagggtt ggcttttgag 20
- [0020] <210> 3
- [0021] <211> 197
- [0022] <212> DNA
- [0023] <213> 人类
- [0024] <220>
- [0025] <223> FUBP1-TFE3基因易位片段
- [0026] <400> 3
- [0027] gaactccaat gggaccatac aacctgcac cttataatcc tggaccacca ggcccggctc 60
- [0028] ctcatggtcc tccagcccca tatgctcccc agggatgggg aatgcatat ccacactggc 120
- [0029] agcagcagge tcctcctgat ccaggaaaac gtccttgatc ctgacagctt ctacgagctc 180
- [0030] aaaagccaac ccttacc 197

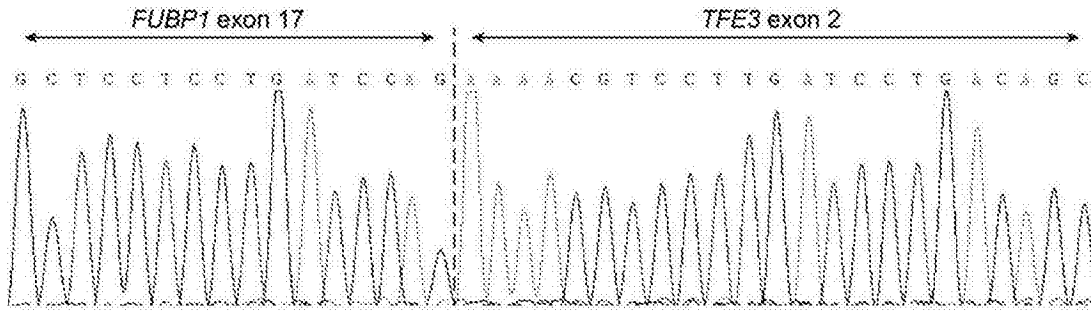


图1