



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 115717167 B

(45) 授权公告日 2023. 09. 05

(21) 申请号 202210923439.6

C12N 15/11 (2006.01)

(22) 申请日 2022.08.02

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/573 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 115717167 A

(43) 申请公布日 2023.02.28

(66) 本国优先权数据

202111439557.1 2021.11.30 CN

(73) 专利权人 杭州翱锐基因科技有限公司

地址 310000 浙江省杭州市经济技术开发区6号大街260号18幢301室

(72) 发明人 张琼 朱友杰 郑文渊

(74) 专利代理机构 杭州天昊专利代理事务所

(特殊普通合伙) 33283

专利代理师 向庆宁 曹小燕

(56) 对比文件

CN 104073432 A, 2014.10.01

CN 107267626 A, 2017.10.20

CN 109423515 A, 2019.03.05

CN 102628087 A, 2012.08.08

CN 113249471 A, 2021.08.13

CN 113454219 A, 2021.09.28

CN 113621704 A, 2021.11.09

DE 602008006533 D1, 2011.06.09

KR 20170105184 A, 2017.09.19

谢婵等. 血液标志物用于临床肝细胞癌早期筛查的专家共识.《中国病毒病杂志》.2021, 第11卷(第5期), 334-340.

审查员 高又文

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6886 (2018.01)

C12Q 1/6827 (2018.01)

权利要求书1页 说明书17页

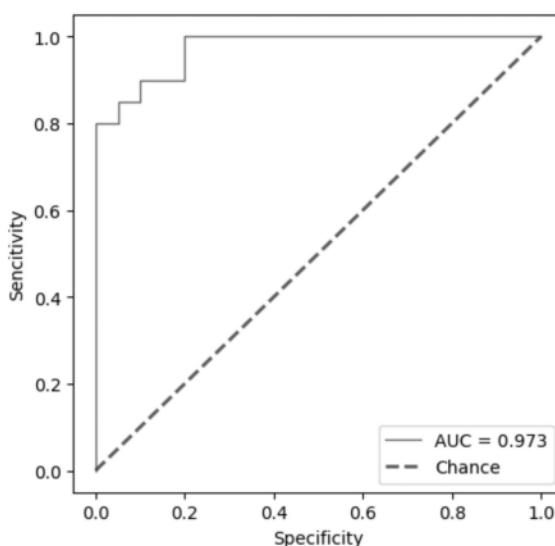
序列表(电子公布) 附图4页

(54) 发明名称

一种新型多靶点肝癌早期检测的标志物组合和试剂盒

(57) 摘要

本发明提供了一种新型多靶点肝癌早期检测的标志物组合和试剂盒, 通过从肝癌组织、癌旁组织、肝炎患者样本的高深度全基因组甲基化(WGBS)数据中找到了系列新型的、能高效区分肝癌和肝炎患者的甲基化位点, 可用于早期肝癌的高效检测; 将该新型基因甲基化位点与其他肝癌检测标志物(如AFP、AFP-L3和DCP)组合, 能进一步提高AUC值, 提高早期肝癌筛查的灵敏度和特异性。



1. 一种检测早期肝癌的引物组合,其特征在于,所述引物组合如下表所示:

组别	靶序列	正向引物	反向引物	探针
3	Seq ID NO.3	Seq ID NO.29	Seq ID NO.31	Seq ID NO.30
6	Seq ID NO.6	Seq ID NO.38	Seq ID NO.40	Seq ID NO.39
9	Seq ID NO.9	Seq ID NO.47	Seq ID NO.49	Seq ID NO.48
14	Seq ID NO.14	Seq ID NO.62	Seq ID NO.64	Seq ID NO.63
15	Seq ID NO.15	Seq ID NO.65	Seq ID NO.67	Seq ID NO.66
17	Seq ID NO.17	Seq ID NO.71	Seq ID NO.73	Seq ID NO.72

2. 如权利要求1所述的引物组合在制备早期肝癌检测试剂中的用途。

3. 如权利要求2所述的用途,其特征在于,所述试剂还包括蛋白标志物,所述蛋白标志物由AFP、DCP和AFP-L3组成。

4. 一种用于检测早期肝癌的试剂盒,其特征在于,包括如权利要求1所述的引物组合。

一种新型多靶点肝癌早期检测的标志物组合和试剂盒

[0001] 本申请主张中国在先申请,申请号:202111439557.1,申请日2021年11月30日的优先权;其所有的内容作为本发明的一部分。

技术领域

[0002] 本发明涉及癌症早期筛查领域,具体而言,涉及一种新型多靶点肝癌早期检测的标志物组合和试剂盒。

背景技术

[0003] 肝癌长期生存率低的主要原因,首先在于肝癌早期诊断率低,导致70%~80%的患者在诊断时已经是中晚期,如果能够早期发现和早期诊断,可以施行肝切除术和肝移植等根治性手段,可明显改善肝癌患者预后。

[0004] 目前而言,肝癌最主要的筛查手段是通过甲胎蛋白(AFP)进行检测,对于高风险人群再通过超声、核磁等影像学手段进一步检查。对于可疑病灶时,用于确诊的金标准手段是肝穿刺活检。然而上述三种检测手段都各有其局限性,根据文献报道,在检测特异性为95%时,甲胎蛋白(AFP)检测的灵敏度为45%。超声检测灵敏度有限,同时也不能用于确诊。作为诊断金标准的肝穿刺活检则不仅有很大的侵入性,且有引起肿瘤扩散的风险。不仅如此,由于肿瘤有普遍的肿瘤内异质性存在,导致很多时候肝穿刺活检并不能显示肿瘤的全貌。

[0005] 基于循环肿瘤DNA(circulating tumor DNA,ctDNA)检测的液体活检技术,由于其无创、实时、灵敏的特点,使之成为癌症早筛的主要检测方法,其中ctDNA的甲基化指标凭借组织溯源、增强信噪比、特征位点数量多等优势是癌症早筛的理想标志物。Kisiel等人(Hepatology,2019,69(3):1180-1192)一项针对95名肝细胞癌(HCC)患者和51名肝硬化对照的研究表明,甲基化DNA标记物组对小于2cm的孤立性HCC的诊断灵敏度为75%。Cai等人(Gut,2019,68(12):2195-2205)建立了一组由32个与HCC、HBV或肝纤维化有关的基因组成的甲基化panel,他们利用加权模型和上述甲基化panel能够有效地将HCC与慢性肝炎或肝硬化区分开来。在220名早期HCC与129名对照的验证队列研究中(Clinical Cancer Research,2019,25(17):5284-5294),诊断模型在区分早期HCC与HBV或肝硬化对照患者方面的灵敏度为83%,特异性为67%。但是现有的甲基化位点的检测早期肝癌的AUC值普遍偏低,灵敏度和特异性不高,并不能很好地区分肝癌和肝炎患者,依然还需要通过进一步地检查才能确诊。

[0006] 另一方面,由于技术的局限性,ctDNA甲基化检测性能也有一定的天花板,结合基因组学、表观遗传学、蛋白质组学等多组学指标已成为发展趋势。已有多个临床研究表明,多组学标志物检测的敏感性和特异性优于单一组学标志物。2020年4月,Thrive联合了约翰霍普金斯大学、格伊辛格卫生医疗系统,在Science杂志首次公布了Cancer SEEK的一项临床试验(DETECT-A)研究的结果(Science,2020.369(6499))。通过将血液筛查和PET-CT筛查并用,研究人员能够将检测出的癌症患者数目翻倍,且筛查阳性率能提高到99.6%。

2022年美国癌症早筛公司Exact Sciences在Clinical Gastroenterology and Hepatology杂志公布了其肝癌早筛产品的最新研究成果(Clinical Gastroenterology and Hepatology 20.1 (2022):173-182)。研究共计纳入540例患者的血液样本(136例病例+404例对照),检测包含3种甲基化标志物和1种蛋白标志物。结果显示整体检测灵敏度为88%,特异性为87%。

[0007] 因此亟需找到能高效区分肝癌和肝炎的标志物组合,从而实现高灵敏度和高特异性的肝癌早期筛查,促进肝癌的早发现和早治疗,满足临床的迫切需求。

发明内容

[0008] 针对现有技术中存在的问题,本发明提供了一种新型多靶点肝癌早期检测的组合标志物和试剂盒及其在肝癌早期检测中的应用。通过从肝癌组织、癌旁组织、肝炎患者样本的高深度全基因组甲基化(WGBS)数据中找到了系列新型的、能高效区分肝癌和肝炎患者的甲基化位点,可用于早期肝癌的高效检测;将该新型基因甲基化位点与其他肝癌检测标志物(如AFP、AFP-L3、DCP)组合,能进一步提高AUC值,提高早期肝癌筛查的灵敏度和特异性。

[0009] 本研究小组曾申请肝癌早期检测的组合标志物的相关发明专利CN114592066A,但由于该专利在检测时需要联合33个甲基化位点进行检测,检测过程较繁琐。为了优化甲基化标志物,本发明探索了相关基因的大量全新的甲基化位点,找到了在肝癌和其他肝病患者中甲基化程度具有显著差异的全新的18个甲基化位点,并从中找到了6个甲基化位点的组合,实现了在更少的标志物检测情况下对于早期肝癌的高效检出,并且检出性能更高,甚至高于过去的33个甲基化位点组合的检测灵敏度和特异性。

[0010] 一方面,本发明提供了一种标志物用于制备早期肝癌检测试剂的用途,所述标志物为选自如表1所示的序列表Seq ID NO.1~Seq ID NO.18中的任意一种或多种所示的核苷酸序列或其完全互补序列的组合:

[0011] 表1、早期肝癌检测位点

[0012]

序号	靶序列
1	Seq ID NO.1
2	Seq ID NO.2
3	Seq ID NO.3
4	Seq ID NO.4
5	Seq ID NO.5
6	Seq ID NO.6
7	Seq ID NO.7
8	Seq ID NO.8
9	Seq ID NO.9
10	Seq ID NO.10
11	Seq ID NO.11
12	Seq ID NO.12
13	Seq ID NO.13

14	Seq ID NO.14
15	Seq ID NO.15
16	Seq ID NO.16
17	Seq ID NO.17
18	Seq ID NO.18

[0013] 本发明通过对肝癌组织、配对的癌旁组织、肝炎患者血浆游离DNA进行高深度的全基因组甲基化测序,同时综合大量公共数据(>1,000例肝癌和癌旁的450K芯片数据),筛选出区分肝癌和非肝癌的基于CpG的甲基化位点,然后进一步通过大量的肝癌和非肝癌血浆样本验证,最终发现并确定了在早期肝癌患者中发生甲基化异常的9个基因以及18个靶序列。经临床验证,本发明提供的18个新型靶序列,在肝癌和其他肝病中甲基化程度差异显著。

[0014] 18个靶序列为双链DNA,存在互补序列,可以理解的是,本发明提供的甲基化位点靶序列可以是其正义链,也可以是其反义链。

[0015] 此外,虽然本发明所检测的基因与我司此前的发明专利CN 114592066 A中所检测的基因相同,但是对应基因检测的区域完全不同。另外对不同区域存在的甲基化个数差异,做了针对性的检测体系优化,提高了检测基因区域内的甲基化检测灵敏度。

[0016] 进一步地,所述标志物为包含如Seq ID NO.13或Seq ID NO.14所示的核苷酸序列或其完全互补序列的组合。

[0017] Seq ID NO.13或Seq ID NO.14对应的甲基化位点的AUC值、检测灵敏度和特异性都明显高于其他16个甲基化位点。

[0018] 进一步地,所述标志物为选自如序列Seq ID NO.1~Seq ID NO.18中的任意2种或6种所示的核苷酸序列或其完全互补序列的组合。

[0019] 进一步地,所述标志物为包括Seq ID NO.1和Seq ID NO.3所示的核苷酸序列或其完全互补序列的组合,或包括Seq ID NO.3和Seq ID NO.14所示的核苷酸序列或其完全互补序列的组合,或包括Seq ID NO.5和Seq ID NO.13所示的核苷酸序列或其完全互补序列的组合。

[0020] 进一步地,所述标志物为包括Seq ID NO.3和Seq ID NO.14所示的核苷酸序列或其完全互补序列的组合。

[0021] 进一步地,所述标志物为包括Seq ID NO.1、Seq ID NO.3、Seq ID NO.5、Seq ID NO.12、Seq ID NO.16和Seq ID NO.18所示的核苷酸序列或其完全互补序列的组合,或包括Seq ID NO.2、Seq ID NO.5、Seq ID NO.7、Seq ID NO.11、Seq ID NO.14和Seq ID NO.15所示的核苷酸序列或其完全互补序列的组合,或包括Seq ID NO.2、Seq ID NO.4、Seq ID NO.10、Seq ID NO.11、Seq ID NO.16和Seq ID NO.17所示的核苷酸序列或其完全互补序列的组合,或包括Seq ID NO.3、Seq ID NO.6、Seq ID NO.9、Seq ID NO.14、Seq ID NO.15和Seq ID NO.17所示的核苷酸序列或其完全互补序列的组合,或包括Seq ID NO.5、Seq ID NO.7、Seq ID NO.9、Seq ID NO.12、Seq ID NO.13和Seq ID NO.18所示的核苷酸序列或其完全互补序列的组合,或包括Seq ID NO.6、Seq ID NO.8、Seq ID NO.10、Seq ID NO.12、Seq ID NO.14和Seq ID NO.16所示的核苷酸序列或其完全互补序列的组合,或包括Seq ID NO.1、Seq ID NO.4、Seq ID NO.5、Seq ID NO.8、Seq ID NO.9和Seq ID NO.16所示的核苷

酸序列或其完全互补序列的组合,或包括Seq ID NO.1、Seq ID NO.5、Seq ID NO.7、Seq ID NO.10、Seq ID NO.13和Seq ID NO.15所示的核苷酸序列或其完全互补序列的组合。

[0022] 进一步地,所述标志物为包括Seq ID NO.3、Seq ID NO.6、Seq ID NO.9、Seq ID NO.14、Seq ID NO.15 和Seq ID NO.17所示的核苷酸序列或其完全互补序列的组合。

[0023] 经检测大量临床肝癌及肝炎样本验证,本发明从上述18个靶序列中,找到6个能够特别灵敏、特异地区分早期肝癌患者、肝炎患者、良性对照个体的全新的高甲基化位点,分别具有如列表Seq ID NO.3、Seq ID NO.6、Seq ID NO.9、Seq ID NO.14、Seq ID NO.15和Seq ID NO.17所示的序列。通过检测临床肝癌及肝炎样本的数据显示,仅仅采用这6个甲基化位点检测肝癌,其AUC值就能达到0.951,灵敏度达到88%,特异性达到89%。

[0024] 进一步地,所述标志物还包括蛋白标志物,所述蛋白标志物由甲胎蛋白(AFP)、甲胎蛋白异质体(AFP-L3)和脱- γ -羧基凝血酶原(DCP)组成。

[0025] 由于技术的局限性,单独通过甲基化位点检测肝癌的性能也有一定的天花板,结合基因组学、表观遗传学、蛋白质组学等多个类别的多组学已成为发展趋势。已有多个临床研究表明,多组学标志物检测的敏感性和特异性优于单一组学标志物。因此在本发明提供的甲基化位点的基础上,结合蛋白水平检测,进一步提高肝癌检测的AUC值,提高检测灵敏度和特异性。

[0026] 所述检测AFP-L3,是通过计算甲胎蛋白异质体比率(AFP-L3%)来进行肝癌的筛查,其中的AFP-L3%为AFP-L3占AFP含量的比值。

[0027] 本发明提供的蛋白标志物AFP、DCP和AFP-L3在肝癌病人血清中的水平,与肝炎病人血清中蛋白标志物的水平有着较显著的差异。

[0028] 研究证明,通过检测本发明提供的系列新型甲基化位点的甲基化水平,并结合血清样本中的AFP、DCP和AFP-L3蛋白水平,能够更加灵敏、特异的区分早期肝癌患者、肝炎患者、良性对照个体。通过检测临床肝癌及肝炎样本的数据显示,本发明提供的组合可以非常有效地区分肝癌和其余肝病患者,AUC值最高能达到0.973,灵敏度达到93%,特异性达到90%。

[0029] 另一方面,本发明提供了一种检测早期肝癌的引物组合,所述引物组合为选自如表2所示的18组引物、探针组合中的任意一组或多组:

[0030] 表2、引物、探针组合

[0031]

组别	靶序列	正向引物	反向引物	探针
1	Seq ID NO.1	Seq ID NO.23	Seq ID NO.25	Seq ID NO.24
2	Seq ID NO.2	Seq ID NO.26	Seq ID NO.28	Seq ID NO.27
3	Seq ID NO.3	Seq ID NO.29	Seq ID NO.31	Seq ID NO.30
4	Seq ID NO.4	Seq ID NO.32	Seq ID NO.34	Seq ID NO.33
5	Seq ID NO.5	Seq ID NO.35	Seq ID NO.37	Seq ID NO.36
6	Seq ID NO.6	Seq ID NO.38	Seq ID NO.40	Seq ID NO.39
7	Seq ID NO.7	Seq ID NO.41	Seq ID NO.43	Seq ID NO.42
8	Seq ID NO.8	Seq ID NO.44	Seq ID NO.46	Seq ID NO.45
9	Seq ID NO.9	Seq ID NO.47	Seq ID NO.49	Seq ID NO.48
10	Seq ID NO.10	Seq ID NO.50	Seq ID NO.52	Seq ID NO.51

11	Seq ID NO.11	Seq ID NO.53	Seq ID NO.55	Seq ID NO.54
12	Seq ID NO.12	Seq ID NO.56	Seq ID NO.58	Seq ID NO.57
13	Seq ID NO.13	Seq ID NO.59	Seq ID NO.61	Seq ID NO.60
14	Seq ID NO.14	Seq ID NO.62	Seq ID NO.64	Seq ID NO.63
15	Seq ID NO.15	Seq ID NO.65	Seq ID NO.67	Seq ID NO.66
16	Seq ID NO.16	Seq ID NO.68	Seq ID NO.70	Seq ID NO.69
17	Seq ID NO.17	Seq ID NO.71	Seq ID NO.73	Seq ID NO.72
18	Seq ID NO.18	Seq ID NO.74	Seq ID NO.76	Seq ID NO.75

[0032] 在一些方式中,所述引物组合为选自表2所示的引物、探针组合中的任意2种或6种。

[0033] 在一些方式中,所述的引物组合包括如表3所述的6组引物、探针组合:

[0034] 表3、6组引物、探针组合

组别	靶序列	正向引物	反向引物	探针
3	Seq ID NO.3	Seq ID NO.29	Seq ID NO.31	Seq ID NO.30
6	Seq ID NO.6	Seq ID NO.38	Seq ID NO.40	Seq ID NO.39
9	Seq ID NO.9	Seq ID NO.47	Seq ID NO.49	Seq ID NO.48
14	Seq ID NO.14	Seq ID NO.62	Seq ID NO.64	Seq ID NO.63
15	Seq ID NO.15	Seq ID NO.65	Seq ID NO.67	Seq ID NO.66
17	Seq ID NO.17	Seq ID NO.71	Seq ID NO.73	Seq ID NO.72

[0036] 进一步地,所述引物组合中还包含内参基因的引物和探针,所述内参基因COL2A1具有如序列表 Seq ID NO.19所示的序列,其正向引物具有如序列表Seq ID NO.20所示的序列,反向引物具有如序列 表Seq ID NO.22所示的序列,探针具有如序列表Seq ID NO.21所示的序列。

[0037] 再一方面,本发明提供了一种用于检测早期肝癌的试剂盒或芯片,所述试剂盒或芯片包括如上所述 的引物和探针组合。

[0038] 进一步地,所述试剂盒或芯片还包括用于检测蛋白的试剂或材料,所述蛋白包括AFP、DCP和 AFP-L3。

[0039] 再一方面,本发明提供了一种用于检测早期肝癌的标记物组合,所述标记物组合包括甲基化位点和 蛋白标志物,所述甲基化位点为选自如序列表Seq ID NO.1~Seq ID NO.18中的任意一种或多种;所述蛋 白标志物包括AFP、DCP和AFP-L3。

[0040] 在一些方式中,所述标记物组合中的甲基化位点为选自如序列表Seq ID NO.1~Seq ID NO.18中的任 意2种、6种所示的核苷酸序列或其完全互补序列的组合。

[0041] 在一些方式中,所述标记物组合中的甲基化位点为包括Seq ID NO.1和Seq ID NO.3所示的核苷酸 序列或其完全互补序列的组合,或包括Seq ID NO.3和Seq ID NO.14所示的核苷酸序列或其完全互补序 列的组合,或包括Seq ID NO.5和Seq ID NO.13所示的核苷酸序列或其完全互补序列的组合。

[0042] 在一些方式中,所述标记物组合中的甲基化位点为Seq ID NO.3和Seq ID NO.14所示的核苷酸序列 或其完全互补序列的组合。

[0043] 在一些方式中,所述标记物组合中的甲基化位点为包括Seq ID NO.1、Seq ID

NO.3、Seq ID NO.5、Seq ID NO.12、Seq ID NO.16和Seq ID NO.18所示的核苷酸序列或其完全互补序列的组合,或包括Seq ID NO.2、Seq ID NO.5、Seq ID NO.7、Seq ID NO.11、Seq ID NO.14和Seq ID NO.15所示的核苷酸序列或其完全互补序列的组合,或包括Seq ID NO.2、Seq ID NO.4、Seq ID NO.10、Seq ID NO.11、Seq ID NO.16 和Seq ID NO.17所示的核苷酸序列或其完全互补序列的组合,或包括Seq ID NO.3、Seq ID NO.6、Seq ID NO.9、Seq ID NO.14、Seq ID NO.15和Seq ID NO.17所示的核苷酸序列或其完全互补序列的组合,或包括Seq ID NO.5、Seq ID NO.7、Seq ID NO.9、Seq ID NO.12、Seq ID NO.13和Seq ID NO.18所示的核苷酸序列或其完全互补序列的组合,或包括Seq ID NO.6、Seq ID NO.8、Seq ID NO.10、Seq ID NO.12、Seq ID NO.14和Seq ID NO.16所示的核苷酸序列或其完全互补序列的组合,或包括Seq ID NO.1、Seq ID NO.4、Seq ID NO.5、Seq ID NO.8、Seq ID NO.9和Seq ID NO.16所示的核苷酸序列或其完全互补序列的组合,或包括Seq ID NO.1、Seq ID NO.5、Seq ID NO.7、Seq ID NO.10、Seq ID NO.13和Seq ID NO.15 所示的核苷酸序列或其完全互补序列的组合。

[0044] 在一些方式中,所述标记物组合中的甲基化位点为包括Seq ID NO.3、Seq ID NO.6、Seq ID NO.9、Seq ID NO.14、Seq ID NO.15和Seq ID NO.17所示的核苷酸序列或其完全互补序列的组合。

[0045] 再一方面,本发明提供了一种用于检测早期肝癌的标记物组合,所述标记物组合包括Seq ID NO.3、Seq ID NO.6、Seq ID NO.9、Seq ID NO.14、Seq ID NO.15和Seq ID NO.17所示的核苷酸序列或其完全互补序列的组合。

[0046] 通过本发明提供的甲基化位点进行体外检测早期肝癌的方法包括以下步骤:

[0047] 1) 分离待测生物样本中的基因组DNA或血浆游离DNA;

[0048] 2) 检测所述甲基化位点或者甲基化位点组合的甲基化状态;

[0049] 3) 通过所述目标基因甲基化位点状态,进行生物样品状态的判断,并实现对早期肝癌的体外检测。

[0050] 通过本发明提供的甲基化位点和蛋白组合进行体外检测早期肝癌的方法包括以下步骤:

[0051] 1) 分离待测生物样本中的基因组DNA或血浆游离DNA和血清;

[0052] 2) 检测所述甲基化位点或者甲基化位点组合的甲基化状态和血清AFP、AFP-L3和DCP蛋白水平;

[0053] 3) 通过所述目标基因甲基化位点状态以及蛋白标志物水平,进行生物样品状态的判断,并实现对早期肝癌的体外检测。

[0054] 在一些方式中,所述方法还包括以下步骤:

[0055] 1) 分离待测生物样本的血清和血浆,提取待测生物样本的血浆游离DNA;

[0056] 2) 使用试剂处理步骤1)得到的DNA样品,使5位未甲基化的胞嘧啶碱基转化为尿嘧啶,转化为尿嘧啶以后的碱基在杂交能力上不同于5位未甲基化的胞嘧啶,并且是可以检测的;

[0057] 3) 将步骤2)处理过的DNA样品与聚合酶链式反应体系组合,聚合酶链式反应体系包含以下一种 等几种组分:DNA聚合酶、所述目标靶序列的引物或者引物组合、相对应的探针或探针组合、聚合酶链式反应缓冲液,发生聚合酶链式反应后,产生扩增产物;

[0058] 4) 用被荧光标记的一种探针或几种探针的组合检测扩增产物,如果探针和扩增产物结合,则可以产生荧光信号;如果探针无法和扩增产物结合,则不能产生荧光信号;

[0059] 5) 基于是否产生荧光信号,确定所述目标基因靶序列的至少一个CpG的甲基化状态;

[0060] 6) 采用磁微粒化学发光免疫分析夹心法,测定人血清中AFP、AFP-L3和DCP的浓度,以及计算 AFP-L3%的比例;

[0061] 在一些方式中,所述的聚合酶链式反应体系中,DNA聚合酶包括耐热DNA聚合酶、热启动的DNA聚合酶、或缺乏5' -3' 外切酶活性的聚合酶。

[0062] 所述目标基因靶序列中至少一个CpG的甲基化状态是由PCR反应的循环阈值Ct值或靶基因的Ct值之间的差值进行确定。通过利用PCR反应分析生物样本中DNA的甲基化状态,能够方便地实现一个或多个目标基因靶序列的甲基化状态的检测。

[0063] 在一些方式中,所述将DNA的5位未甲基化的胞嘧啶转化为尿嘧啶,优选采用的试剂为亚硫酸氢盐。

[0064] 胞嘧啶5号位的甲基化修饰,是广泛存在于真核细胞生物中的一种DNA修饰方式,DNA上的甲基化修饰不仅在生物的生长发育中起到重要作用,在细胞的原癌化过程中也起着非常重要的作用。由于胞嘧啶和胸腺嘧啶具有一样的碱基互补配对性质,5-甲基胞嘧啶无法通过一代测序或高通量测序的方式来直接测定。目前最常用的检测5-甲基胞嘧啶的方法是将待测DNA通过亚硫酸氢盐转化,在碱性水解后,未甲基化的胞嘧啶被转化为尿嘧啶,而5-甲基胞嘧啶则不会发生转化。尿嘧啶在碱基互补配对的时候会与腺嘌呤互补配对,区别于胞嘧啶与鸟嘌呤的互补配对,因此通过对经过亚硫酸氢盐处理的DNA进行检测时,借助测序技术、聚合酶链式反应技术或者DNA分子杂交相关的技术,可以确定剩余的未发生转化的胞嘧啶,从而确定在原始DNA分子中,哪些胞嘧啶发生了甲基化。因此,本发明优选采用亚硫酸氢盐作为甲基化转化试剂,对待测的DNA样本进行处理后,通过测序、聚合酶链式反应或DNA分子杂交等相关技术,确定目标基因靶序列内的CpG二核苷酸序列的甲基化状态。

[0065] 在一些方式中,本发明的方法适用于分析混合状态的样本,例如血液、粪便或组织中存在的低浓度肿瘤细胞。因此,当分析这类样本中的CpG二核苷酸序列的甲基化状态时,本领域技术人员可以使用定量测定的方法来确定CpG二核苷酸序列的甲基化水平,如百分比、比率、分数或程度等,而不是单核苷酸分子的甲基化修饰状态。相应的,本发明中所述的甲基化状态应被认为是包括单核苷酸分子的甲基化修饰状态在内的,包含定量甲基化水平来反应的甲基化状态。

[0066] 在一些方式中,本发明采用实时荧光定量PCR方式来测定甲基化状态,诸如:使用Taqman探针的实时荧光定量PCR,使用荧光染料的实时荧光定量PCR,使用甲基化特异性PCR(MSP)等方法,用于测定目标基因靶序列的至少一个CpG二核苷酸的甲基化状态。由于不同甲基化状态的基因目标靶序列的碱基互补配对能力不同,因此可以通过实时荧光定量PCR进行基因组DNA样品中甲基化状态的定量测试,其中序列区分发生在探针杂交水平上。

[0067] 作为对照,本发明中使用COL2A1基因,通过设计引物探针均不覆盖任何CpG二核苷酸的位置,对于投入的经试剂处理后的基因组DNA进行检测。

[0068] 实时荧光定量PCR可以与任何适合的探针一起使用,如Taqman探针、MGB探针、蝎形

探针等。所述的荧光探针常规包含一个发光基团、一段核酸序列、一个猝灭基团,及有必要时所进行的一些化学修饰或者特殊核苷酸,如硫代核苷酸、锁核酸等。

[0069] 一般实时荧光定量PCR检测过程中,探针会被设计成熔解温度超过正向和反向引物10℃,这使得探针在退火及延伸过程中会完全结合在PCR产物上。典型的,例如Taqman探针,会在具有5' -3' 外切酶活性的DNA聚合酶的作用下,在延伸过程中发生探针的水解,使得探针中的荧光基团和猝灭基团远离,从而破坏荧光基团和猝灭基团间的共振能量传递,使得荧光基团发出的荧光可以被仪器检测到,同时随着PCR产物的逐渐增多,荧光信号会在一定时间内呈现指数级别的上升,最后在荧光定量PCR仪上呈现“S”型的扩增曲线。

[0070] 用于实时荧光定量PCR的反应试剂包括但不限于:目标基因靶序列的正反向引物、Taqman荧光探针、优化的PCR缓冲液、三磷酸脱氧核苷酸以及具有5' -3' 外切酶活性的DNA聚合酶等。

[0071] 本发明检测目标蛋白水平采用但不限于磁微粒化学发光免疫分析夹心法,其他常用的检测方法例如流式荧光发光法、酶联免疫吸附法等。

[0072] 在一些方式中,通过结合上述甲基化位点或者位点组合的甲基化以及蛋白水平的状态来判断所检测生物样本是否呈阳性。

[0073] 本发明提供的用于筛查早期肝癌的甲基化位点具有以下有益效果:

[0074] 1、提供了9个新型差异甲基化基因以及18个新型差异甲基化位点,其在肝癌血浆游离DNA中的甲基化状态,与肝炎病人血浆游离DNA的甲基化状态有显著差异;

[0075] 2、从9个新型差异甲基化基因的18个甲基化位点中,任选2、6种组合的甲基化位点,都能用于高灵敏度、高特异性地检测早期肝癌;

[0076] 3、采用本发明提供的6个甲基化位点与蛋白标志物AFP、DCP、AFP-L3组合,用于早期肝癌的无创、快速体外检测,能够更有效地区分肝癌和其余肝病患者,AUC值最高能达到0.973,灵敏度达到93%,特异性达到90%;

[0077] 4、方便、快捷、检测结果与临床金标准检测结果高度一致。

附图说明

[0078] 图1为实施例1中的肝癌、癌旁组织WGBS测序数据热图;

[0079] 图2为实施例1中的18个甲基化位点在不同类型样本中甲基化水平对比的箱线图;

[0080] 图3为实施例2中的肝癌患者样本荧光定量PCR反应检测结果示意图;

[0081] 图4为实施例2中的肝炎患者样本荧光定量PCR反应检测结果示意图;

[0082] 图5为实施例2中的2个甲基化位点结合AFP、AFP-L3%和DCP蛋白检测归一化结果获得的ROC曲线;

[0083] 图6为实施例3中的6个甲基化位点结合AFP、AFP-L3%和DCP蛋白检测归一化结果获得的ROC曲线。

具体实施方式

[0084] 下面结合附图和实施例对本发明作进一步详细描述,需要指出的是,以下所述实施例旨在便于对本发明的理解,而对其不起任何限定作用。本实施例中使用的试剂均为已知产品,通过购买市售产品获得。

[0085] 实施例1基因甲基化位点的筛选

[0086] 我司此前的发明专利CN 114592066 A确定了在早期肝癌患者中发生甲基化异常的33个基因,在保证癌症早筛产品需满足简便易行、经济有效的条件下,本实施例从产品的实际临床应用出发,在发明专利CN 114592066 A的基础上从中挑选了9个基因,优化了9个基因的检测位点和方法。虽然本发明所检测的基因与我司此前的发明专利CN 114592066 A中所检测的基因相同,但是对应基因检测的区域完全不同。另外对不同区域存在的甲基化个数差异,做了针对性的检测体系优化,提高了检测基因区域内的甲基化检测灵敏度。最终发现并确定了9个基因中18个在早期肝癌患者中发生甲基化异常的靶序列。这18个异常甲基化位点在肝癌组织、癌旁组织、肝炎血浆、肝癌血浆、正常血浆5种不同类型样本中甲基化水平对比的箱线图如图2所示,可见本发明筛选获得的18个甲基化位点对于不同类型样本的甲基化水平差异明显,能够高效区分肝癌和其余肝病及正常人。

[0087] 实施例2采用2个甲基化位点(或结合蛋白标志物)筛查早期肝癌

[0088] 本实施例从实施例1筛选的18个甲基化位点中选择2个用于早期肝癌的检测。并分别采用两种方式进行检测:一、采用2个甲基化位点检测早期肝癌;二、采用2个甲基化位点和蛋白标志物组合的方法检测早期肝癌。

[0089] 一、采用2个甲基化位点检测早期肝癌

[0090] 采用2个甲基化位点检测早期肝癌的具体方法包括如下步骤:

[0091] 第1步,分离血液样本的血清和血浆,使用磁珠法提取试剂,提取待测生物样本的血浆游离DNA,其中20例为肝癌患者,20例为肝炎患者。

[0092] 第2步,使用亚硫酸氢盐为主要成分的甲基化转化试剂,对步骤1中提取的血浆游离DNA样本进行甲基化转化处理,投入5ng血浆游离DNA,将未发生甲基化的胞嘧啶转变为尿嘧啶。

[0093] 第3步,将转化后的血浆游离DNA投入到含有检测基因靶序列的实时荧光定量PCR的反应体系中。其中用于检测2个靶序列的荧光探针分别使用FAM和ROX荧光染料标记、用于检测内参基因COL2A1的荧光探针使用VIC荧光染料标记。其中,上游引物、下游引物和探针是指如表2所示的,分别对应这2个靶序列的上游引物、下游引物和探针。

[0094] 荧光定量PCR检测时的体系是多个目的基因和内参COL2A1的引物探针混合,形成一个多重PCR体系,多个目的基因都与内参COL2A1同时检测。单管最多4个靶基因与内参同时检测,检测靶基因数量更多时则分多管进行检测。反应体系中,靶基因序列的正反向引物投入浓度为0.167 μ M,探针投入浓度为0.167 μ M,实时荧光定量PCR反应体系为30 μ L,内参基因序列的正反向引物投入浓度为0.083 μ M。

[0095] 第4步,设置荧光定量PCR反应检测程序如表4:

[0096] 表4、多重PCR反应程序

温度	时间	循环数	备注
95 $^{\circ}$ C	10 min	1	
95 $^{\circ}$ C	15 s	45	采集荧光信号
57 $^{\circ}$ C	35 s		

[0098] 第5步,获得荧光定量PCR反应检测结果。

[0099] 本实施例分别选用如下几组包含2个甲基化位点的组合进行检测:

[0100] 1、Seq ID NO.1、Seq ID NO.3

[0101] 2、Seq ID NO.3、Seq ID NO.14

[0102] 3、Seq ID NO.5、Seq ID NO.13

[0103] 当选用第2组的2个甲基化位点,分别为如序列表Seq ID NO.3、Seq ID NO.14所示的核苷酸序列 对应的2个甲基化位点时,检测结果如图3、4所示,其中图3为肝癌患者样本结果,所有待检测甲基化位点的荧光信号都有检出,为阳性;图4为肝炎患者样本,仅有对照基因COL2A1的荧光信号被检出,其余待检测位点荧光信号未检出,为阴性。

[0104] 采用2个甲基化位点检测早期肝癌的结果分析判定方法:1) 记录软件自动输出的各甲基化位点Ct 值;2) 分别计算样本中每个位点与内参COL2A1的Ct值,而后对Ct进行归一化处理: $\Delta Ct(\text{靶序列}) = |Ct(\text{COL2A1}) - Ct(\text{靶序列})|$;3) M个甲基化位点,第i个甲基化位点的score为 M_i 。 M_i 的取值分别为0 或1,根据 $\Delta Ct(\text{靶序列})$ 值以及对应的Youden's index来判别 M_i 。如果 $\Delta Ct(\text{靶序列}) > \text{Youden's index}$ 设 $M_i = 1$,如果 $\Delta Ct(\text{靶序列}) < \text{Youden's index}$ 设 $M_i = 0$ 。甲基化的M-score = $\sum_i^m (M_i)$ 。检测结果如表5 所示。

[0105] 根据logistic regression分析对使用所述试剂盒检测获得的结果进行校正和分析计算。M-score的阈值设定根据ROC曲线来设定。并通过综合2个目标甲基化位点的检测结果,对这40个样本进行10乘交叉验证,并取平均值,获得分类ROC曲线,计算AUC值、检测灵敏度和特异性。

[0106] 通过综合2个靶序列SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.14甲基化的检测结果见表5,对这40个样本进行 10乘交叉验证,并取平均值,获得分类ROC曲线。

[0107] 表5、2个甲基化位点甲基化水平检测结果

样本编号	临床诊断	Seq ID NO.14	Seq ID NO.3	COL2A1
S1	乙肝	45	45	合格的
S2	乙肝	45	45	合格的
S3	乙肝	45	45	合格的
S4	乙肝	45	45	合格的
S5	乙肝	45	45	合格的
S6	乙肝	45	45	合格的
S7	乙肝	45	40.82	合格的
S8	乙肝	45	45	合格的
S9	乙肝	45	45	合格的
S10	乙肝	45	45	合格的
S11	肝硬化	43.35	44.09	合格的
S12	肝硬化	45	42.95	合格的
S13	肝硬化	45	45	合格的
S14	肝硬化	45	42.46	合格的
S15	肝硬化	45	43.66	合格的
S16	肝硬化	45	45	合格的
[0108] S17	肝硬化	45	45	合格的
S18	肝硬化	45	45	合格的
S19	肝硬化	39.69	40.06	合格的
S20	肝硬化	45	45	合格的
S21	肝癌	26.45	26.18	合格的
S22	肝癌	45	42.54	合格的
S23	肝癌	38.71	37.76	合格的
S24	肝癌	37.42	37.9	合格的
S25	肝癌	25.99	26.39	合格的
S26	肝癌	45	45	合格的
S27	肝癌	42.59	34.59	合格的
S28	肝癌	45	30.63	合格的
S29	肝癌	31.16	29.72	合格的
S30	肝癌	45	45	合格的
S31	肝癌	31.52	32.51	合格的
S32	肝癌	37.14	36.23	合格的
S33	肝癌	28.97	30.14	合格的
S34	肝癌	42.18	36.95	合格的
S35	肝癌	40.79	45	合格的
S36	肝癌	41.98	45	合格的
[0109] S37	肝癌	40.66	40.32	合格的
S38	肝癌	30.74	31.14	合格的
S39	肝癌	37.16	37.36	合格的
S40	肝癌	37.76	39.4	合格的

[0110] 由表5可以计算出,针对本次的样品检测结果,采用第2组的两个甲基化位点的效果明显好于现有的2个甲基化位点组合的肝癌检测水平。根据ROC曲线可得,其AUC=0.922,灵敏度为75%,特异性为91%,效果明显好于现有的2个甲基化位点组合的肝癌检测水平。第1、2、3组的检测分析结果详见后续实施例5。

[0111] 二、采用2个甲基化位点和蛋白标志物组合的方法检测早期肝癌

[0112] 本实施例还分别采用1、2、3组的三个甲基化位点,再结合蛋白标志物的方法检测

早期肝癌,其中,蛋白标志物包括AFP、DCP、AFP-L3,并计算出AFP-L3%。

[0113] 其中2个甲基化位点的检测方法参照上述的第1步~第5步,蛋白标志物AFP、DCP和AFP-L3的检测还需增加第6步:取第1步分离的血清样本,采用磁微粒化学发光免疫分析夹心法,测定人血清中蛋白标志物的浓度。

[0114] 磁微粒化学发光免疫分析夹心法过程:将R1(分别采用AFP、DCP和AFP-L3相对应的抗体)、待测样本、M磁微粒混合孵育。样本中蛋白标志物的不同位点与磁珠上偶联的抗体结合,形成固相抗体-抗原复合物;通过清洗,后加入R2试剂(分别采用AFP、DCP和AFP-L3相对应的二抗)混合孵育,上述复合物和经标记的肿瘤标志物抗体结合,形成固相抗体-抗原-抗体夹心复合物;通过洗涤,未被结合的抗体以及其它物质被去除。在反应复合物中加入化学发光底物1和化学发光底物2,通过相对发光强度测定化学发光反应,所产生的发光强度与样本中肿瘤标志物的浓度成正比。对所述样品中的蛋白标志物进行磁微粒化学发光免疫分析夹心法测试并将得分确定为P值。检测结果如表7所示。

[0115] 分析判定方法:在结合上述的单独采用2个甲基化位点检测早期肝癌的结果分析判断方法,还需:

[0116] 1) 分别对每个样本的AFP、DCP和AFP-L3%检测值进行归一化处理: $P1 = \log_{10}PA_{AFP}$, $P2 = \log_{10}PD_{DCP}$, $P3 = AFP-L3\% * 100$;蛋白的P-score = $\sum(a * P1 + b * P2 + c * P3)$, 其中 $a = 0.75$, $b = 1.25$, $c = 0.11$;

[0117] 2) 根据logistic regression分析对使用所述试剂盒检测获得的结果进行校正和分析计算。M-score和P-score的阈值设定根据ROC曲线来设定。

[0118] 通过整合甲基化和蛋白标志物两个互补的维度来提高检测性能。整合后的模型为 $HCC-score = M-score + P-score$ 。在一些实施方案中,在HCC-score值等于或大于设定阈值时,结果表明患者中肝癌和/或早期肝癌的阳性检测。在一些实施方案中,在HCC-score值小于阈值时,结果表明患者中肝癌和/或早期肝癌的阴性检测。

[0119] 3) 通过综合2个靶甲基化位点的检测结果,以及AFP、AFP-L3%和DCP蛋白检测结果的归一化结果,对这40个样本进行10乘交叉验证,并取平均值,获得分类ROC曲线。

[0120] 当选用第2组的2个甲基化位点,分别为如序列表Seq ID N0.3、Seq ID N0.14所示的核苷酸序列对应的2个甲基化位点时,结合AFP、AFP-L3%和DCP蛋白检测结果的归一化结果,对这40个样本进行10乘交叉验证,并取平均值,获得分类ROC曲线如图5所示,其中AFP、AFP-L3%和DCP蛋白检测结果如表6所示。

[0121] 表6、不同样本蛋白水平检测结果

[0122]

样本编号	临床诊断	AFP (ng/mL)	DCP (ng/mL)	AFP-L3 (ng/mL)	AFP-L3%
S1	乙肝	4.08	5.36	0.6	0.05
S2	乙肝	4.4	7.24	0.6	0.05
S3	乙肝	2.76	11.49	0.6	0.05
S4	乙肝	5.48	3.43	0.6	0.05
S5	乙肝	3.98	7.63	0.6	0.05
S6	乙肝	3.49	7.04	0.6	0.05
S7	乙肝	5.02	7.65	0.6	0.05
S8	乙肝	3.09	2.44	0.6	0.05

S9	乙肝	3.65	5.92	0.6	0.05
S10	乙肝	2.78	9.59	0.6	0.05
S11	肝硬化	13.63	2.92	2.29	0.1677
S12	肝硬化	6.55	82.39	0.6	0.05
S13	肝硬化	56.58	6.39	8.05	0.1422
S14	肝硬化	5.85	4.1	0.6	0.05
S15	肝硬化	409.8	6.42	52.42	0.1279
S16	肝硬化	3.8	4.99	0.6	0.05
S17	肝硬化	3.03	6.67	0.6	0.05
S18	肝硬化	2.35	3.18	0.6	0.05
S19	肝硬化	3.99	3.46	0.6	0.05
S20	肝硬化	4.64	67.72	0.6	0.05
S21	肝癌	26.51	46.19	4.82	0.182
S22	肝癌	710.4	12.44	152.7	0.215
S23	肝癌	205.5	68.96	28.2	0.1373
S24	肝癌	57.41	613.7	9.35	0.1629
S25	肝癌	1200	18017	1200	0.1
S26	肝癌	294.3	61.73	39.21	0.1332
S27	肝癌	2.3	3.55	0.6	0.05
S28	肝癌	2.03	5.62	0.6	0.05
S29	肝癌	500.7	10993	96.04	0.1918
S30	肝癌	2.56	4.17	0.6	0.05
S31	肝癌	966.4	14187	285.9	0.2958
S32	肝癌	3.46	1857	0.6	0.05
S33	肝癌	800.8	473.8	181.3	0.2264
S34	肝癌	439.7	878.6	56.69	0.1289
S35	肝癌	3.28	157.1	0.6	0.05
S36	肝癌	84.83	25.87	11.61	0.1369
S37	肝癌	308.2	354.8	57.08	0.1852
S38	肝癌	10.1	22.22	2.19	0.2165
S39	肝癌	2.23	20000	0.6	0.05
S40	肝癌	783.7	65.3	137.5	0.1755

[0123] 由表6可见,当采用第2组的2个甲基化位点,并结合AFP、AFP-L3%和DCP蛋白的归一化检测结果,可以进一步提升肝癌检测效果,其AUC=0.932,灵敏度为77%,特异性为95%。

[0124] 第1、2、3组的2个甲基化位点,结合AFP、AFP-L3%和DCP蛋白的归一化检测结果,检测分析结果详见后续实施例5。

[0125] 实施例3采用6个甲基化位点(或结合蛋白标志物)筛查早期肝癌

[0126] 本实施例从实施例1筛选的18个甲基化位点中选择6个用于早期肝癌的检测。并分

别采用两种方式进行检测：一、采用6个甲基化位点检测早期肝癌；二、采用6个甲基化位点和蛋白标志物组合的方法检测早期肝癌。

[0127] 一、采用6个甲基化位点检测早期肝癌

[0128] 本实施例分别选用如下几组包含6个甲基化位点的组合进行检测：

[0129] 4、Seq ID NO.1、Seq ID NO.3、Seq ID NO.5、Seq ID NO.12、Seq ID NO.16、Seq ID NO.18

[0130] 5、Seq ID NO.2、Seq ID NO.5、Seq ID NO.7、Seq ID NO.11、Seq ID NO.14、Seq ID NO.15

[0131] 6、Seq ID NO.2、Seq ID NO.4、Seq ID NO.10、Seq ID NO.11、Seq ID NO.16、Seq ID NO.17

[0132] 7、Seq ID NO.3、Seq ID NO.6、Seq ID NO.9、Seq ID NO.14、Seq ID NO.15、Seq ID NO.17

[0133] 8、Seq ID NO.5、Seq ID NO.7、Seq ID NO.9、Seq ID NO.12、Seq ID NO.13、Seq ID NO.18

[0134] 9、Seq ID NO.6、Seq ID NO.8、Seq ID NO.10、Seq ID NO.12、Seq ID NO.14、Seq ID NO.16

[0135] 10、Seq ID NO.1、Seq ID NO.4、Seq ID NO.5、Seq ID NO.8、Seq ID NO.9、Seq ID NO.16

[0136] 11、Seq ID NO.1、Seq ID NO.5、Seq ID NO.7、Seq ID NO.10、Seq ID NO.13、Seq ID NO.15

[0137] 采用6个甲基化位点检测早期肝癌的具体方法包括如下步骤：

[0138] 第一步，得到40名肝炎及肝癌患者，其中肝炎样本为20例，肝癌样本为20例。分离提取样本的血清和游离血浆DNA。

[0139] 第二步，使用亚硫酸氢盐为主要成分的甲基化转化试剂，对血浆游离DNA样本进行甲基化转化处理，投入血浆游离DNA，将未发生甲基化的胞嘧啶转变为尿嘧啶。

[0140] 第三步，指如表2所示的分别对应这6个靶序列的上游引物、下游引物和探针，按照实施例2的方法进行实时荧光定量PCR检测。

[0141] 针对本次的样品检测结果，采用第7组的6个甲基化位点的效果明显好于其他组的6个甲基化位点组合的肝癌检测水平。根据ROC曲线可得，其AUC=0.951，灵敏度为88%，特异性为89%，效果明显好于现有的甲基化位点组合的肝癌检测水平。

[0142] 第4-11组的6个甲基化位点的检测分析结果详见后续实施例5。

[0143] 二、采用6个甲基化位点和蛋白标志物组合的方法检测早期肝癌

[0144] 在上述检测采用6个甲基化位点检测早期肝癌的基础上，还需增加：

[0145] 第四步，取第一步分离的血清样本，采用磁微粒化学发光免疫分析夹心法，测定人血清中AFP、AFP-L3%和DCP蛋白标志物水平的检测，并对结果进行分析。

[0146] 第五步，将所检测到的结果中各基因甲基化和蛋白的值进行归一化，通过综合6个甲基化位点的 ΔCt （靶基因）结果以及三个蛋白标志物水平的检测结果，对这40个样本进行10乘交叉验证，并取平均值，获得分类ROC曲线（图6）。

[0147] 第4-11组的6个甲基化位点，结合AFP、AFP-L3%和DCP蛋白的归一化检测结果，检

测分析结果 详见后续实施例5。

[0148] 当采用第7组的6个甲基化位点,并结合AFP、AFP-L3%和DCP蛋白的归一化检测结果,可以进一步提升肝癌检测效果,其AUC=0.973,灵敏度为93%,特异性为90%。

[0149] 实施例4采用18个甲基化位点(或结合蛋白标志物)筛查早期肝癌

[0150] 本实施例采用实施例1筛选的18个基因甲基化位点进行早期肝癌的检测。并分别采用两种方式进行检测:一、采用18个甲基化位点检测早期肝癌;二、采用18个甲基化位点和蛋白标志物组合的方法 检测早期肝癌。

[0151] 一、采用18个甲基化位点检测早期肝癌

[0152] 采用18个甲基化位点检测早期肝癌的具体方法包括如下步骤:

[0153] 第一步,得到40名肝炎及肝癌患者,其中肝炎样本为20例,肝癌样本为20例。分离提取样本的 血清和游离血浆DNA。

[0154] 第二步,使用亚硫酸氢盐为主要成分的甲基化转化试剂,对血浆游离DNA样本进行甲基化转化处 理,投入血浆游离DNA,将未发生甲基化的胞嘧啶转变为尿嘧啶。

[0155] 第三步,指如表2所示的18个靶序列的上游引物、下游引物和探针,按照实施例2的方法进行实 时荧光定量PCR检测。

[0156] 采用18个甲基化位点进行检测的AUC达到0.949,详见实施例5。

[0157] 二、采用18个甲基化位点和蛋白标志物组合的方法检测早期肝癌

[0158] 采用18个甲基化位点和蛋白标志物组合的方法检测早期肝癌的具体方法包括如下步骤:在上述检 测采用18个甲基化位点检测早期肝癌的基础上,还需增加:

[0159] 第四步,取第一步分离的血清样本,采用磁微粒化学发光免疫分析夹心法,测定人血清中AFP、AFP-L3%和DCP蛋白标志物水平的检测,并对结果进行分析。

[0160] 第五步,将所检测到的结果中各基因甲基化和蛋白的值进行归一化,通过综合18个靶基因的 ΔCt (靶基因)结果以及三个蛋白标志物水平的检测结果,对这40个样本进行10乘交叉验证,并取平均值, 获得分类ROC曲线,其AUC-甲基化+蛋白=0.970,灵敏度达到91%,特异性达到90%,详见实施例5。

[0161] 实施例5采用不同甲基化位点组合的性能比较分析

[0162] 对实施例1中得到的40例肝癌和肝炎患者样本的18个甲基化位点(SEQ ID NO.1~18)的相对循环数 ΔCt 值进行不同位点组合的数学建模分析,以探讨18个甲基化位点和蛋白作为生物标记物组合对于检 测早期肝癌的应用。

[0163] 首先,我们分别评估了上述18个甲基化位点中单个位点的模型对于诊断早期肝癌发生的性能,分 别计算其AUC值,结果如表7所示。

[0164] 表7、单个甲基化位点的模型对于诊断早期肝癌发生的比较

[0165]

SEQ ID NO	AUC
-----------	-----

[0166]

1	0.832
2	0.822
3	0.860
4	0.678
5	0.827
6	0.812
7	0.823
8	0.821
9	0.802
10	0.825
11	0.823
12	0.789
13	0.867
14	0.880
15	0.834
16	0.847
17	0.667
18	0.836

[0167] 由表7可以看出,实施例1提供的18个甲基化位点用于诊断早期肝癌的AUC值都较高,都具有较好的诊断性能,尤其是其中的Seq ID NO.13和Seq ID NO.14所示的核苷酸序列对应的甲基化位点,是全新发现的可用于高效区分肝癌与其他肝病的高甲基化位点。

[0168] 其次,对比实施例2~4列举的不同组合甲基化位点,或结合蛋白标志物组合的诊断效能,结果如表8所示。

[0169] 表8、不同组合甲基化位点的模型对于诊断早期肝癌发生的比较

[0170]

组别	组合 (SEQ ID NO)	AUC-甲基化	AUC-甲基化+蛋白
1(实施例2)	1+3	0.870	0.923
2(实施例2)	3+14	0.922	0.932
3(实施例2)	5+13	0.897	0.929
4(实施例3)	1+3+5+12+16+18	0.937	0.951
5(实施例3)	2+5+7+11+14+15	0.939	0.955
6(实施例3)	2+4+10+11+16+17	0.932	0.942
7(实施例3)	3+6+9+14+15+17	0.951	0.973
8(实施例3)	5+7+9+12+13+18	0.942	0.963
9(实施例3)	6+8+10+12+14+16	0.940	0.958
10(实施例3)	1+4+5+8+9+16	0.930	0.941
11(实施例3)	1+5+7+10+13+15	0.929	0.940
12(实施例4)	1~18	0.951	0.970

[0171] 由表7和8可以看出,使用单个甲基化位点作为诊断模型的对比多个甲基化位点组

合模型诊断性能较低,使用2个甲基化位点组合作为诊断模型比6个甲基化位点组合模型诊断性能要低,甲基化结合蛋白标志物的多组学模型的诊断性能要显著优于单一组学标志物。

[0172] 当选用2个甲基化位点组合作为诊断模型时,第2组的AUC-甲基化和AUC-甲基化+蛋白都是最高的,可见第2组采用Seq ID NO.3、Seq ID NO.14所示的核苷酸序列对应的2个甲基化位点时,诊断性能明显高于其他2个甲基化位点组合。

[0173] 当选用6个甲基化位点组合作为诊断模型时,第7组的AUC-甲基化和AUC-甲基化+蛋白都是最高的,可见第7组采用Seq ID NO.3、Seq ID NO.6、Seq ID NO.9、Seq ID NO.14、Seq ID NO.15、Seq ID NO.17所示的核苷酸序列对应的6个甲基化位点时,诊断性能明显高于其他6个甲基化位点组合。

[0174] 当选用18个甲基化位点组合作为诊断模型时,其诊断性能与第7组的6个甲基化位点组合的诊断性能非常接近,因此最优选采用第7组的6个甲基化位点组合。

[0175] 本实施例进一步对从中优选的不同的甲基化位点组合的诊断性能分别进行分析,结果如表9所示。

[0176] 表9、优选的多个甲基化位点的模型对于诊断早期肝癌发生的比较

[0177]

组合 (SEQ ID NO)	AUC	灵敏度	特异度	Youden指数
3+蛋白	0.890	71%	94%	0.65
14+蛋白	0.895	75%	92%	0.67
3+14+蛋白	0.932	77%	95%	0.72
1+3+5+12+16+18+蛋白	0.951	87%	90%	0.77
2+5+7+11+14+15+蛋白	0.955	90%	88%	0.78
2+4+10+11+16+17+蛋白	0.942	87%	89%	0.76
3+6+9+14+15+17+蛋白	0.973	93%	90%	0.83
5+7+9+12+13+18+蛋白	0.963	91%	89%	0.80
6+8+10+12+14+16+蛋白	0.958	90%	89%	0.79
1+4+5+8+9+16+蛋白	0.941	86%	90%	0.76
1+5+7+10+13+15+蛋白	0.940	85%	90%	0.75
1~18+蛋白	0.970	91%	90%	0.81

[0178] 由表9可见,本实施例优选的几组甲基化位点+蛋白的组合用于早期肝癌诊断时,都能够用于早期肝癌的高效检测,其中AUC最高能达到0.973,灵敏度达到93%,特异性达到90%,真正实现无创、全局、具有更高灵敏度和特异性的肝癌早期筛查,完全满足临床需求。

[0179] 虽然本发明披露如上,但本发明并非限于此。任何本领域技术人员,在不脱离本发明的精神和范围内,均可作各种更动与修改,因此本发明的保护范围应当以权利要求所限定的范围为准。

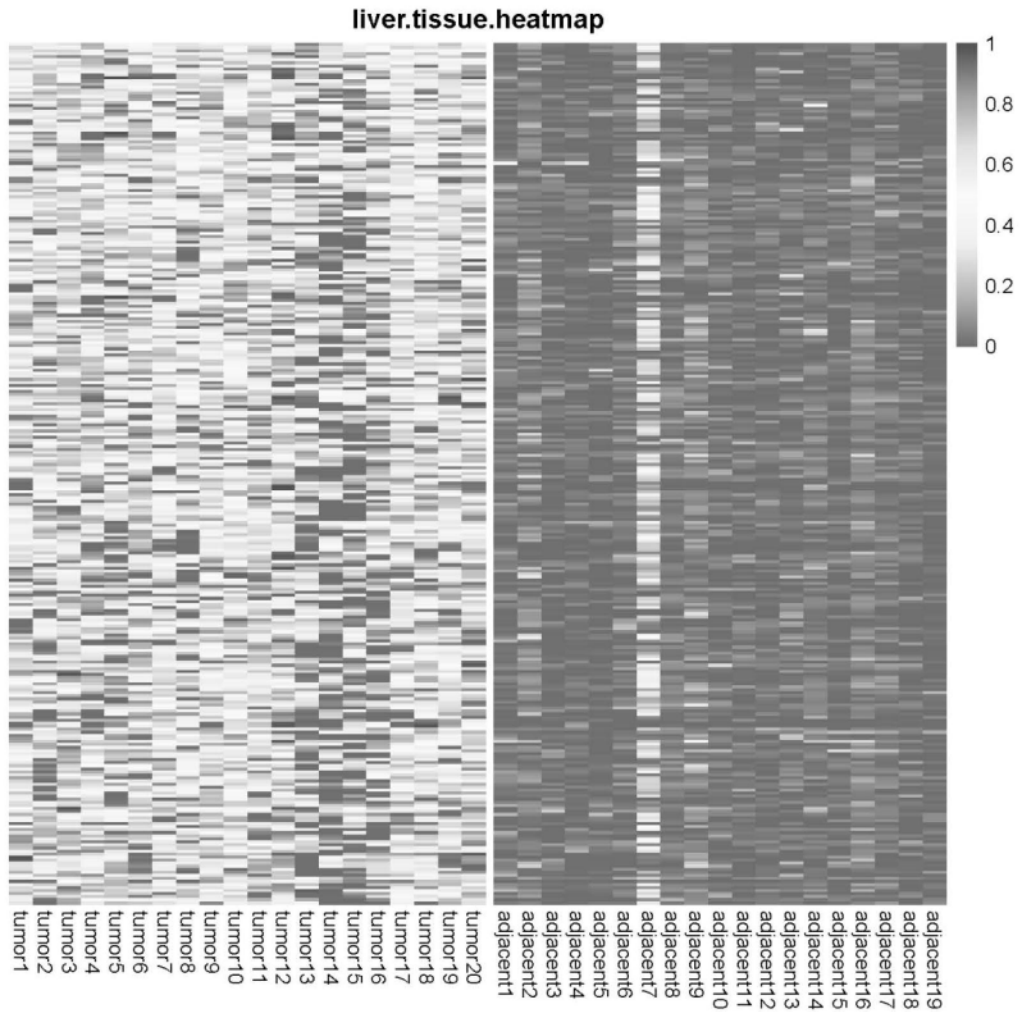


图1

(由左至右依次为) 癌旁组织样本 肝炎患者血浆样本 肝癌患者血浆样本 正常人血浆样本 肝癌组织样本

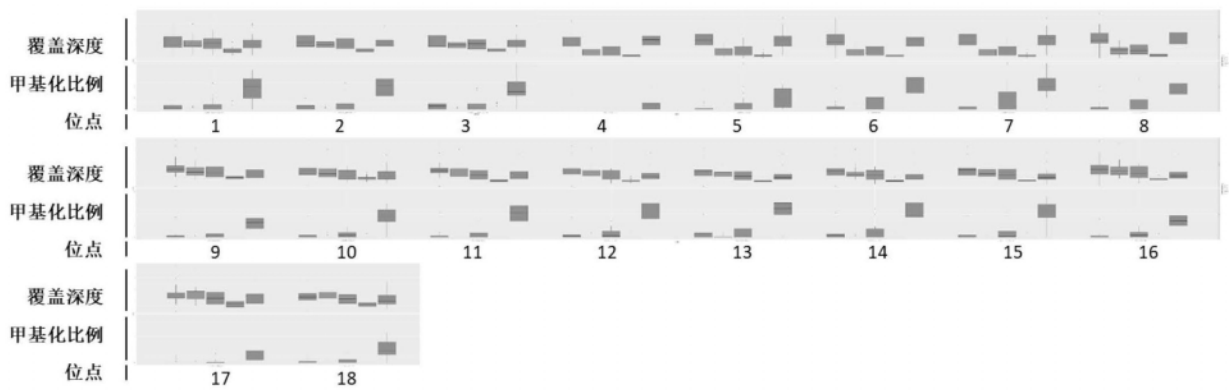


图2

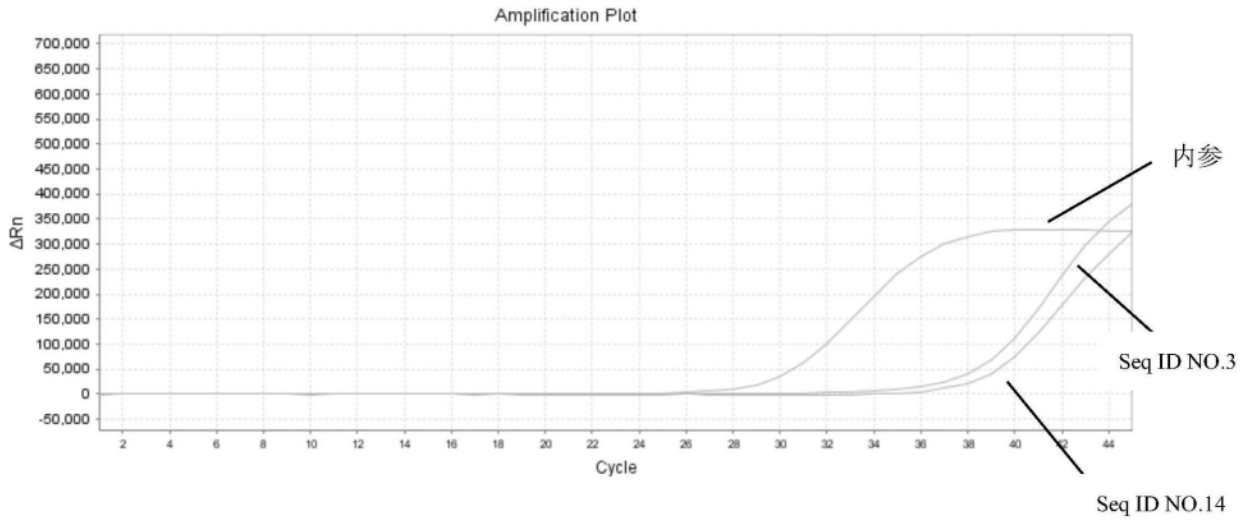


图3

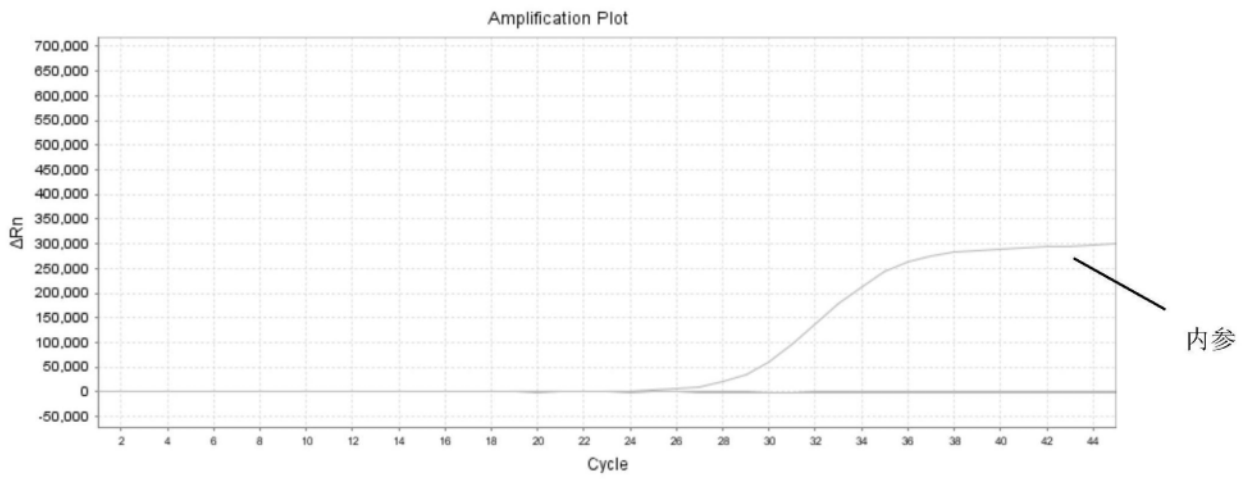


图4

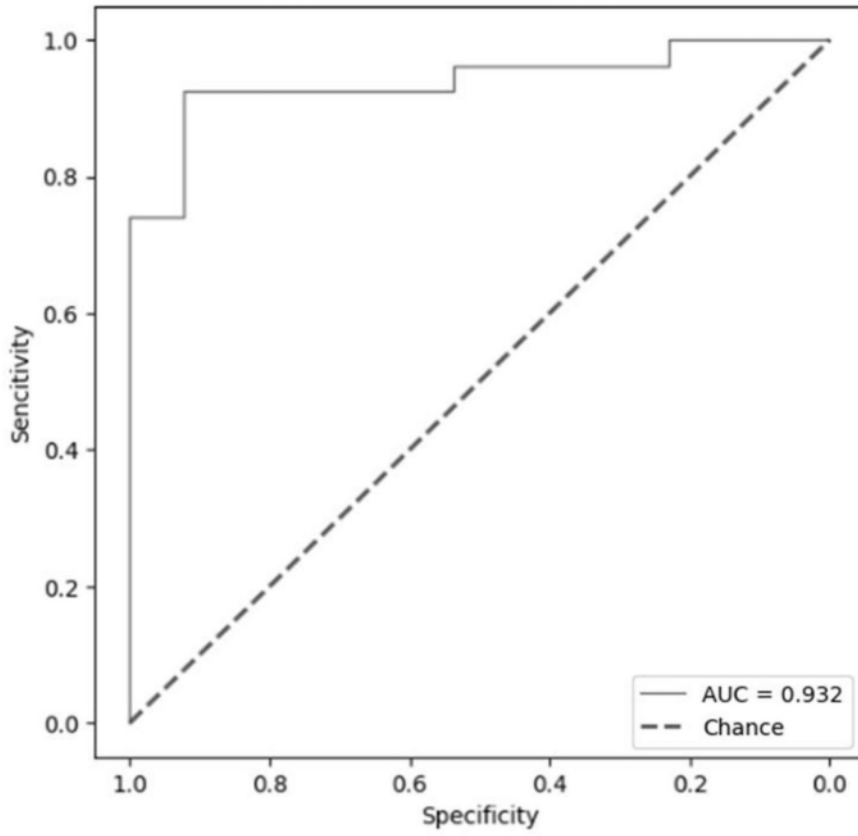


图5

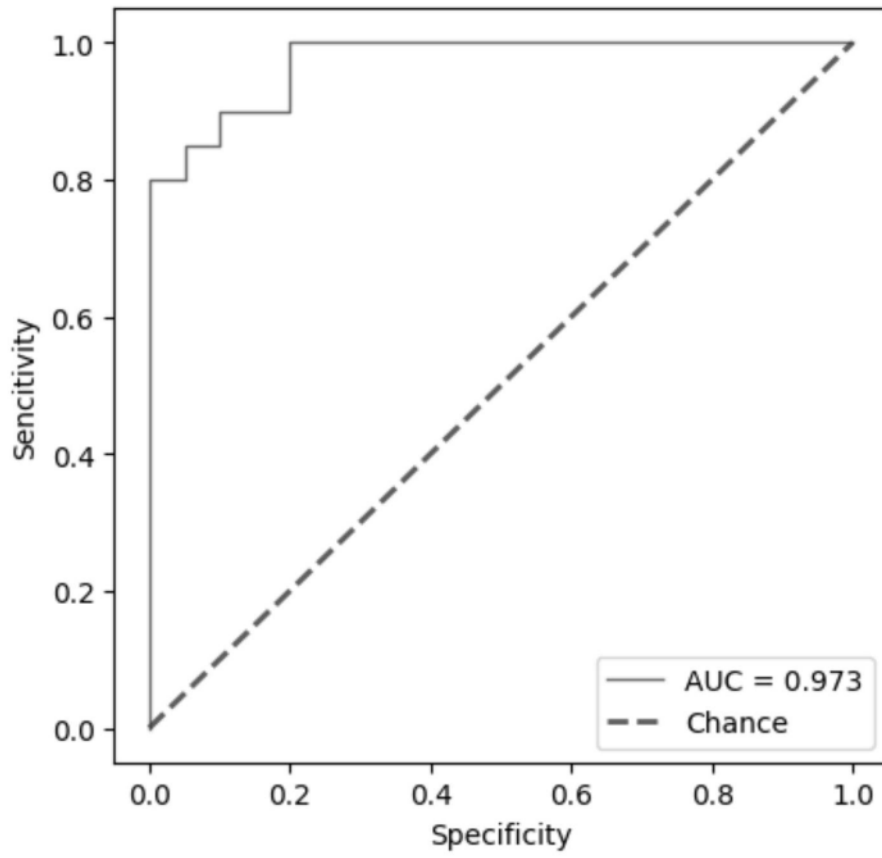


图6