



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118957071 A

(43) 申请公布日 2024. 11. 15

(21) 申请号 202411152231.4

C12N 15/11 (2006.01)

(22) 申请日 2024.08.21

(71) 申请人 杭州翱锐基因科技有限公司

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

(72) 发明人 余韶华 郑文渊 徐博 张琼  
朱友杰

(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

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6886 (2018.01)

C12Q 1/6858 (2018.01)

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 21/76 (2006.01)

权利要求书2页 说明书25页

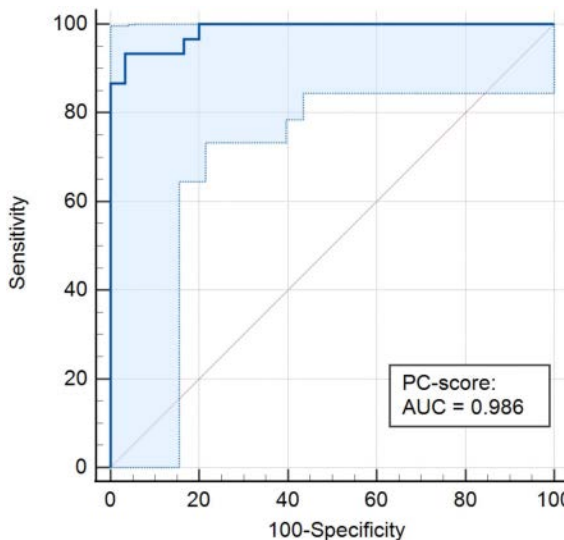
序列表(电子公布) 附图5页

(54) 发明名称

一种新型多靶点胰腺癌检测的标志物组合  
及其应用

(57) 摘要

本发明提供了一种新型多靶点胰腺癌检测的组合标志物及其应用, 通过从胰腺癌组织、癌旁组织、胰腺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、能高效区分胰腺癌、胰腺炎患者和健康人群的甲基化位点, 可用于胰腺癌的高效检测; 将该新型基因甲基化位点与其他胰腺癌检测标志物(如CA19-9)组合, 能进一步提高AUC值, 提高胰腺癌筛查的灵敏度和特异性。



1. 一种标志物用于制备胰腺癌检测试剂的用途,其特征在于,所述标志物为选自Seq ID NO.1~Seq ID NO.12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。

2. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述标志物为包含Seq ID NO.1、Seq ID NO.2、Seq ID NO.3、Seq ID NO.9、Seq ID NO.11、Seq ID NO.12任意一种或多种所示的核苷酸序列。

3. 如权利要求2所述的用途,其特征在于,所述标志物为包含Seq ID NO.1、Seq ID NO.2、Seq ID NO.3、Seq ID NO.9、Seq ID NO.11、Seq ID NO.12的任意2种、3种或6种核苷酸序列或其完全互补序列的组合。

4. 如权利要求3所述的用途,其特征在于,所述标志物为包括Seq ID NO.1和Seq ID NO.2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.12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.12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.2和Seq ID NO.12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.11和Seq ID NO.12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.11和Seq ID NO.12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.9和Seq ID NO.11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.9和Seq ID NO.12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.9、Seq ID NO.11和Seq ID NO.12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.2、Seq ID NO.3、Seq ID NO.9、Seq ID NO.11、Seq ID NO.12所示的核苷酸序列或其完全互补序列的组合。

5. 如权利要求4所述的用途,其特征在于,所述标志物为包括Seq ID NO.1、Seq ID NO.2和Seq ID NO.12所示的核苷酸序列或其完全互补序列的组合。

6. 如权利要求1~5任一项所述的用途,其特征在于,所述标志物还包括蛋白标志物,所述蛋白标志物为CA19-9组成。

7. 一种检测胰腺癌的引物组合,其特征在于,所述引物组合为选自如下表所示的12组引物、探针组合中的任意一组或多组:

组别	靶序列	正向引物	反向引物	探针
1	Seq ID NO.1	Seq ID NO.17	Seq ID NO.19	Seq ID NO.18
2	Seq ID NO.2	Seq ID NO.20	Seq ID NO.22	Seq ID NO.21
3	Seq ID NO.3	Seq ID NO.23	Seq ID NO.25	Seq ID NO.24

---

4	Seq ID NO.4	Seq ID NO.26	Seq ID NO.28	Seq ID NO.27
5	Seq ID NO.5	Seq ID NO.29	Seq ID NO.31	Seq ID NO.30
6	Seq ID NO.6	Seq ID NO.32	Seq ID NO.34	Seq ID NO.33
7	Seq ID NO.7	Seq ID NO.35	Seq ID NO.37	Seq ID NO.36
8	Seq ID NO.8	Seq ID NO.38	Seq ID NO.40	Seq ID NO.39
9	Seq ID NO.9	Seq ID NO.41	Seq ID NO.43	Seq ID NO.42
10	Seq ID NO.10	Seq ID NO.44	Seq ID NO.46	Seq ID NO.45
11	Seq ID NO.11	Seq ID NO.47	Seq ID NO.49	Seq ID NO.48
12	Seq ID NO.12	Seq ID NO.50	Seq ID NO.52	Seq ID NO.51

---

8. 一种用于检测胰腺癌的试剂盒,其特征在於,包括如权利要求7所述的引物和探针组合。

9. 一种用于检测胰腺癌的标记物组合,其特征在於,包括甲基化位点和蛋白标记物,所述甲基化位点为选自如序列表Seq ID NO.1~Seq ID NO.12中的任意一种或多种。

10. 如权利要求9所述的标记物组合,其特征在於,所述甲基化位点包括Seq ID NO.1、SeqID NO.2和Seq ID NO.12所示的核苷酸序列或其完全互补序列的组合。

## 一种新型多靶点胰腺癌检测的标志物组合及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及癌症筛查领域,具体而言,涉及一种新型多靶点胰腺癌检测的标志物组合及其应用。

### 背景技术

[0002] 胰腺癌(Pancreatic Cancer)是一个高度恶性的癌症,被称为“癌中之王”。包括中国在内的世界上大多数国家,胰腺癌的五年生存率均在10%以下,远远低于大肠癌,食管癌,肝癌等其他高发恶性肿瘤。胰腺癌超低生存率的原因之一是因为早期胰腺癌没有明显的临床症状,而现有临床上也缺乏高性能的筛查诊断早中期胰腺癌的标志物。临床上常用的例如CA 19-9,CEA等血液标志物,对于胰腺癌的筛查诊断灵敏度和特异性都很低,从而导致大部分的胰腺癌患者未能在早期得到明确诊断。胰腺癌一旦进展到中晚期,患者可以接受根治性手术切除治疗的可能性大大降低,而临床上其他有效的非手术治疗胰腺癌的手段非常缺乏(Diagnostics 2019;9:18)。因此,开发高性能的肿瘤标志物用以筛查胰腺癌,尤其是早期胰腺癌,是一个巨大的未被满足的临床需求,也是科学界和临床肿瘤学界致力于的一个重要方向。

[0003] cfDNA(cell free DNA)是血液中细胞成分之外的小片段DNA。理论上认为cfDNA是细胞凋亡或坏死后释放入血的,通常其长度约150到200个碱基对,半衰期约0.5-1小时(Nature Reviews Genetics 2019;20:71-88)。在正常人体中,cfDNA含量极微,而肿瘤患者的cfDNA含量明显升高。肿瘤患者中,外周血所测得的肿瘤所释放的DNA又称为循环肿瘤DNA(ctDNA,circulating tumor DNA),ctDNA是cfDNA的一部分。肿瘤患者中,ctDNA占cfDNA的比例差异巨大,少到低于0.01%,多到超过90%。对于健康的无症状人群,应用液体活检早期诊断肿瘤如获成功,则“管血验癌”将成为现实,无疑是液体活检最具吸引力之处。目前在这方面的应用探索正在进行(Annals of Oncology,2020,31(6):745-759;Science,2020,369(6499):eabb9601)。

[0004] ctDNA突变是肿瘤早筛早诊的一个可能的方向。在2018年一项联合ctDNA突变和蛋白质检测的CancerSEEK泛癌种筛查研究中,当把检测特异性设定在99%时,检测不同实体肿瘤的灵敏度在69-98%之间,以肺癌最低而结直肠癌(colorectal cancer,CRC)最高,其中,胰腺癌的灵敏度是87%(Science,2018,359(6378):926-930)。这个发现展示了通过ctDNA突变检测进行癌症早筛早诊的令人兴奋的前景。但是由于此项研究的某些限制,比如单癌种的样本数少,大多数纳入的肿瘤病例是中晚期而非早期,更重要的是,研究结果并未在独立样本中进行验证,所以其结果在真实世界里的有效性需要更多的探索。

[0005] 基因组中另外的重要的标志物包括拷贝数变异(copy number variation,CNV)和甲基化(methylation),此两者都是癌症发生发展的早期事件(Hallmarks)。研究者报道了将cfDNA甲基化标志物用于肝癌、肠癌、乳腺癌等恶性肿瘤的筛查(Nature materials 2017;16:1155-61;Clinical epigenetics 2018;10:1-10;Breast Cancer Research 2016;18:1-14)。2020年3月发表于Annals of Oncology的一篇文章采用了甲基化方案分析

了>50种肿瘤的筛查性能。当研究者把特异性定于99%时,不同癌种的平均检测灵敏度在I-III期肿瘤中是43.9%,而在I-IV期肿瘤中是54.9%。其中,对于胰腺癌,其灵敏度在I, II, III, IV期中分别是63%,83%,75%,和100%(Annals of Oncology,2020,31(6):745-759)。从中可以看到几点局限性。比如,对于III期病例的性能低于II期,这个很可能是由于样本数小导致的随机性造成。虽然对于IV期病例的性能是100%,但是对于I期病人的筛查性能只有63%。胰腺癌早筛应用于早期病例的临床意义远远高于晚期病例,因为只有在早期发现,病人才有可能接受根治性手术切除的机会。而对于晚期发现的病人,临床上并没有非常有效的手段大幅提高生存期。

[0006] 因此亟需找到能高效区分早期胰腺癌和胰腺炎的标志物组合,从而实现高灵敏度和高特异性的胰腺癌筛查,促进胰腺癌的早发现和早治疗,满足临床的迫切需求。

### 发明内容

[0007] 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胰腺癌检测的组合标志物和试剂盒及其在胰腺癌检测中的应用。通过从胰腺癌组织、癌旁组织、慢性胰腺炎血浆、胰腺癌血浆、正常血浆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、能高效区分胰腺癌和胰腺炎患者的甲基化位点,可用于胰腺癌的高效检测;将该新型基因甲基化位点与其他胰腺癌检测标志物(如CA 19-9,CEA等)组合,能进一步提高AUC值,提高胰腺癌筛查的灵敏度和特异性。

[0008] 本研究小组找到了在胰腺癌和慢性胰腺炎患者中甲基化程度具有显著差异的9个甲基化位点,并从中进一步精确筛选得到6个甲基化位点的组合,实现了在较少的标志物检测情况下对于胰腺癌的高效检出。

[0009] 一方面,本发明提供了一种标志物用于制备胰腺癌检测试剂的用途,所述标志物为选自如表1所示的Seq ID NO.1~Seq ID NO.12中的任意一种或多种核苷酸序列或其完全互补序列的组合。

[0010] 表1.胰腺癌检测位点

序号	靶序列	序号	靶序列
1	Seq ID NO.1	7	Seq ID NO.7
2	Seq ID NO.2	8	Seq ID NO.8
[0011] 3	Seq ID NO.3	9	Seq ID NO.9
4	Seq ID NO.4	10	Seq ID NO.10
5	Seq ID NO.5	11	Seq ID NO.11
6	Seq ID NO.6	12	Seq ID NO.12

[0012] 本发明通过对胰腺癌、慢性胰腺炎患者和正常人血浆游离DNA进行甲基化测序,筛选出区分胰腺癌和非胰腺癌的基于CpG的甲基化位点,然后进一步通过大量的胰腺癌和非胰腺癌血浆样本验证,最终发现并确定了在胰腺癌患者中发生甲基化异常的6个靶序列。经临床验证,本发明提供的6个新型靶序列,在胰腺癌和慢性胰腺炎患者中甲基化程度差异显

著。

[0013] 6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。

[0014] 在一些方式中,所述标志物为选自如序列表Seq ID NO.1~Seq ID NO.12中的1种、2种、3种、4种、5种或6种核苷酸序列或其完全互补序列的组合。

[0015] 进一步地,所述标志物为包含Seq ID NO.1、Seq ID NO.2、Seq ID NO.3、Seq ID NO.9、Seq ID NO.11、Seq ID NO.12任意一种或多种所示的核苷酸序列。

[0016] 进一步地,所述标志物为Seq ID NO.1、Seq ID NO.2、Seq ID NO.3、Seq ID NO.9、Seq ID NO.11、Seq ID NO.12的任意2种、3种或6种核苷酸序列或其完全互补序列的组合。

[0017] Seq ID NO.1、Seq ID NO.2和Seq ID NO.12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几个甲基化位点。

[0018] 进一步地,所述标志物为包括Seq ID NO.1和Seq ID NO.2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.12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.12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.2和Seq ID NO.12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.11和Seq ID NO.12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.11和Seq ID NO.12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.9和Seq ID NO.11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.9和Seq ID NO.12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.9、Seq ID NO.11和Seq ID NO.12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.2、Seq ID NO.3、Seq ID NO.9、Seq ID NO.11、Seq ID NO.12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、Seq ID NO.2和Seq ID NO.12所示的核苷酸序列或其完全互补序列的组合。

[0020] 经大量临床胰腺癌及胰腺炎样本验证,本发明从上述6个靶序列中,找到3个能够特别灵敏、特异地区分胰腺癌患者、胰腺炎患者、良性对照个体的高甲基化位点,分别具有如序列表Seq ID NO.1、Seq ID NO.2和Seq ID NO.12所示的序列。通过检测胰腺癌及胰腺炎临床血浆样本的数据显示,仅仅采用这3个甲基化位点进行胰腺癌检测,其AUC值就能达到0.942,灵敏度达到90%,特异性达到97%;研究证明,该3个甲基化位点的胰腺癌诊断性能并不低于甚至还略高于6个甲基化位点组合的情况,而且检测过程更简便高效,最具应用前景。

[0021] 进一步地,所述标志物还包括蛋白标志物,所述蛋白标志物为癌抗原19-9(CA19-9)。

[0022] 由于技术的局限性,单独通过甲基化位点检测癌症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,进一步提高胰腺癌检测的AUC值,提高检测灵敏度和特异性。

[0023] 本发明提供的蛋白标志物CA19-9在胰腺癌病人血清中的水平,与胰腺炎病人血清中蛋白标志物的水平比较有着较显著的差异。

[0024] 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CA19-9蛋白水平,能够更加灵敏、特异的区分胰腺癌患者和非癌个体。通过检测临床胰腺癌及胰腺炎样本的数据显示,本发明提供的组合可以非常有效地区分胰腺癌和非癌的患者,AUC值最高能达到0.986,灵敏度达到93%,特异性达到97%。

[0025] 另一方面,本发明提供了一种检测胰腺癌的引物组合,所述引物组合为选自如表2所示的12组引物、探针组合中的任意一组或多组。

[0026] 表2. 引物、探针组合

组别	靶序列	正向引物	反向引物	探针
	Seq ID NO.1	Seq ID NO.17	Seq ID NO.19	Seq ID NO.18
	Seq ID NO.2	Seq ID NO.20	Seq ID NO.22	Seq ID NO.21
	Seq ID NO.3	Seq ID NO.23	Seq ID NO.25	Seq ID NO.24
	Seq ID NO.4	Seq ID NO.26	Seq ID NO.28	Seq ID NO.27
	Seq ID NO.5	Seq ID NO.29	Seq ID NO.31	Seq ID NO.30
[0027]	Seq ID NO.6	Seq ID NO.32	Seq ID NO.34	Seq ID NO.33
	Seq ID NO.7	Seq ID NO.35	Seq ID NO.37	Seq ID NO.36
	Seq ID NO.8	Seq ID NO.38	Seq ID NO.40	Seq ID NO.39
	Seq ID NO.9	Seq ID NO.41	Seq ID NO.43	Seq ID NO.42
	Seq ID NO.10	Seq ID NO.44	Seq ID NO.46	Seq ID NO.45
	Seq ID NO.11	Seq ID NO.47	Seq ID NO.49	Seq ID NO.48
	Seq ID NO.12	Seq ID NO.50	Seq ID NO.52	Seq ID NO.51

[0028] 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、3种或6种。

[0029] 进一步地,所述引物组合为如表3所示的3组引物、探针组合。

[0030] 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
	Seq ID NO.1	Seq ID NO.17	Seq ID NO.19	Seq ID NO.18
	Seq ID NO.2	Seq ID NO.20	Seq ID NO.22	Seq ID NO.21
[0031]	Seq ID NO.12	Seq ID NO.50	Seq ID NO.52	Seq ID NO.51

[0032] 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.13所示的序列,其正向引物具有如序列表Seq ID NO.14所示的序列,反向引物具有如序列表Seq ID NO.16所示的序列,探针具有如序列表Seq ID NO.15所示的序列。

[0033] 再一方面,本发明提供了一种用于检测胰腺癌的试剂盒,所述试剂盒包括如上所述的任一种引物和探针组合。

[0034] 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,所述蛋白为CA19-9。

[0035] 再一方面,本发明提供了一种用于检测胰腺癌的标志物组合,所述标志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 N0.1~Seq ID N0.12中的任意一种或多种;所述蛋白标志物为CA19-9。

[0036] 在一些方式中,所述标志物组合中的甲基化位点为包含Seq ID N0.1、Seq ID N0.2、Seq ID N0.3、Seq ID N0.9、Seq ID N011、Seq ID N0.12的任意2种、3种或6种核苷酸序列或其完全互补序列的组合。

[0037] 在一些方式中,所述标志物为包括Seq ID N0.1和Seq ID N0.2所示的核苷酸序列或其完全互补序列的组合,或包括Seq ID N0.2、Seq ID N0.12所示的核苷酸序列或其完全互补序列的组合,或包括Seq ID N0.1、Seq ID N0.12所示的核苷酸序列或其完全互补序列的组合,或包括Seq ID N0.1、Seq ID N0.2和Seq ID N0.12所示的核苷酸序列或其完全互补序列的组合,或包括Seq ID N0.1、Seq ID N0.11和Seq ID N0.12所示的核苷酸序列或其完全互补序列的组合,或包括Seq ID N0.2、Seq ID N0.11和Seq ID N0.12所示的核苷酸序列或其完全互补序列的组合,或包括Seq ID N0.3、Seq ID N0.9和Seq ID N0.11所示的核苷酸序列或其完全互补序列的组合,或包括Seq ID N0.3、Seq ID N0.9和Seq ID N0.12所示的核苷酸序列或其完全互补序列的组合,或包括Seq ID N0.9、Seq ID N0.11和Seq ID N0.12所示的核苷酸序列或其完全互补序列的组合,或包括Seq ID N0.1、Seq ID N0.2、Seq ID N0.3、Seq ID N0.9、Seq ID N011、Seq ID N0.12所示的核苷酸序列或其完全互补序列的组合。

[0038] 在一些方式中,所述标志物组合中的甲基化位点为包括Seq ID N0.1、Seq ID N0.2和Seq ID N0.12所示的核苷酸序列或其完全互补序列的组合。

[0039] 再一方面,本发明提供了一种用于检测胰腺癌的标志物组合,所述标志物组合包括Seq ID N0.1、Seq ID N0.2和Seq ID N0.12所示的核苷酸序列或其完全互补序列的组合。

[0040] 通过本发明提供的甲基化位点进行体外检测胰腺癌的方法包括以下步骤:

[0041] 1) 分离待测生物样本中的基因组DNA或血浆游离DNA;

[0042] 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;

[0043] 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,并实现对胰腺癌的体外检测。

[0044] 通过本发明提供的甲基化位点和蛋白组合进行体外检测胰腺癌的方法包括以下步骤:

[0045] 1) 分离待测生物样本中的基因组DNA或血浆游离DNA和血清;

[0046] 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CA19-9蛋白水平;

[0047] 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,并实现对胰腺癌的体外检测。

[0048] 在一些方式中,所述方法还包括以下步骤:

[0049] 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;

[0050] 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；

[0051] 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；

[0052] 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；

[0053] 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；

[0054] 6) 采用磁微粒化学发光免疫分析夹心法, 测定人血清中CA19-9的浓度；

[0055] 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。

[0056] 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。

[0057] 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, 优选采用试剂为亚硫酸氢盐。

[0058] 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。由于和胞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, 对待检的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。

[0059] 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。

[0060] 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。

[0061] 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。

[0062] 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。

[0063] 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°C,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。

[0064] 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。

[0065] 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。

[0066] 在一些方式中,通过结合上述位点或者位点组合的甲基化以及蛋白标志物水平的状态来判断所检测生物样本是否呈阳性。

[0067] 再一方面,本发明提供了一种标志物用于区别胰腺癌和良性胰腺炎的用途,所述标志物组合包括甲基化位点,所述甲基化位点为选自如列表Seq ID NO.1~Seq ID NO.12中的任意一种或多种。

[0068] 在一些方式中,所述标志物组合中的甲基化位点为包括Seq ID NO.1、Seq ID NO.2和Seq ID NO.12所示的核苷酸序列或其完全互补序列的组合。

[0069] 进一步地,还包括蛋白标志物。

[0070] 进一步地,所述蛋白标志物为CA19-9。

[0071] 本发明提供的用于筛查胰腺癌的甲基化位点具有以下有益效果:

[0072] 1、提供了12个全新的差异甲基化位点,其在胰腺癌血浆游离DNA中的甲基化状态,与胰腺炎病人血浆游离DNA的甲基化状态有显著差异;

[0073] 2、从12个甲基化位点中,任选2种、3种或6种组合的甲基化位点,都能用于高灵敏度、高特异性地检测胰腺癌;

[0074] 3、从12个甲基化位点中,找到Seq ID NO.1、Seq ID NO.2、和Seq ID NO.12组成的三个甲基化位点的胰腺癌检测AUC值较高,灵敏度和特异性较好;

[0075] 4、找到3个甲基化位点(Seq ID NO.1、Seq ID NO.2、和Seq ID NO.12)与蛋白标志物CA19-9组合,用于胰腺癌的无创、快速体外检测,能够更有效地区分胰腺癌和其余胰腺病患者,AUC值最高能达到0.986,灵敏度达到93%,特异性达到97%;

[0076] 5、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

[0077] 图1为实施例1中的胰腺癌以及健康人组织样本WGBS测序数据热图,其中,tumor为胰腺癌组织样本;normal为健康人组织样本;

- [0078] 图2为实施例1中的12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；
- [0079] 图3为实施例2中的胰腺癌患者样本荧光定量PCR反应检测结果示意图；
- [0080] 图4为实施例2中的健康人样本荧光定量PCR反应检测结果示意图；
- [0081] 图5为实施例3中的3个甲基化位点检测归一化结果获得的ROC曲线；
- [0082] 图6为实施例3中的3个甲基化位点结合CA19-9蛋白检测归一化结果获得的ROC曲线。

### 具体实施方式

[0083] 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。

[0084] 实施例1基因甲基化位点的筛选

[0085] 本实施例从产品的实际临床应用出发,发现并确定了36个CpG位点作为qPCR候选靶标,并从中筛选出12个在胰腺癌患者中发生甲基化异常的靶序列。胰腺癌甲基化qPCR候选靶标的具体筛选过程如下:

[0086] 筛选过程包括两个阶段,第一阶段:从10对胰腺癌组织及其癌旁组织样本的WGBS数据、20例正常人cfDNA样本的WGBS数据(见图1)出发筛选在胰腺癌组织中表现出高甲基化而在癌旁组织中表现出去甲基化的区域(即胰腺癌panel区域),设计并合成相应的捕获探针;第二阶段:使用探针捕获并测序254例cfDNA样本(包括116例胰腺癌cfDNA样本、94例胰腺炎cfDNA样本,以及44例正常人cfDNA样本),通过分析这些数据,从胰腺癌panel区域筛选出最能区分胰腺癌cfDNA样本与非胰腺癌cfDNA样本、互补性好且连续的36个CpG位点作为qPCR候选靶标。

[0087] 根据区域设定,从NCBI数据库网站下载序列,并使用Methyl Primer Express v1.0软件将序列转化为甲基化转化后的序列,即保留“CG”序列中的“C”,并将所有其他的“C”转变为“T”。如下所示。为保证设计区域序列有较平衡的GC含量分布,在序列选择时同时考虑将反义链作为模板设计。根据通用引物设计原则,对36个高甲基化区域设计相应的检测引物和探针。使用以下浓度的模板对设计的引物进行筛选验证:

[0088] 1) 选择纯阳性模板MJ,该模板为经SSSI酶处理后纯化得到,所有CG位点均有甲基化修饰,是最佳的甲基化试验验证的阳性物质模板,选择100pg/ $\mu$ l及10pg/ $\mu$ l表征中浓度及低浓度水平。

[0089] 2) 选择纯阴性模板WBC,该模板取自健康人群的外周血白细胞gDNA,含有整套gDNA背景,经超声打断后,较好的模拟人cfDNA的状态。选择1ng/ $\mu$ l作为模拟真实高浓度样本。

[0090] 3) 低丰度混合模板MJ/WBC,该模板用于模拟真实样本中的混合状态,通常将5%作为模拟低丰度样本的状态。

[0091] 根据引物筛选的设计组合,每种组合分别配制甲基化检测体系进行比较,以100pg/ $\mu$ l及10pg/ $\mu$ l甲基化阳性模板、1ng/ $\mu$ l甲基化阴性模板及5%丰度甲基化混合模板做综合筛选,筛选标准如下表4所示。最终以特异性、检出率以及扩增效果Ct值为判定指标,对引物组合进行选择,筛选结果如表5所示。

[0092] 表4. 序列组合筛选标准

编号	模板类型	浓度	性能要求
1	WBC	1ng/μl	不检出
[0093] 2	MJ	100pg/μl	CT 值在 29-31 之间
3	MJ	10pg/μl	可检出
4	5% MJ/WBC	1ng/μl	可检出

[0094] 表5.筛选结果

编号	区域	WBC-1ng/μl	MJ-100pg/μl	MJ-10pg/μl	MJ-5% ( 1ng/μl )
1	区域 1	UD	30.92	35.32	33.46
2	区域 2	UD	30.06	37.7	35.24
3	区域 3	UD	29.55	37.08	34.79
4	区域 4	UD	30.74	40.16	34.96
5	<b>区域 5</b>	<b>35.17</b>	<b>30.65</b>	<b>35.37</b>	<b>33.65</b>
[0095] 6	<b>区域 6</b>	<b>UD</b>	<b>31.57</b>	<b>40.30</b>	<b>UD</b>
7	区域 7	UD	29.50	40.37	35.04
8	<b>区域 8</b>	<b>UD</b>	<b>30.88</b>	<b>UD</b>	<b>UD</b>
9	区域 9	UD	29.61	37.73	34.17
10	区域 10	UD	29.70	40.03	35.43
11	区域 11	UD	30.90	38.36	34.89
12	区域 12	UD	29.51	38.07	33.74

[0096] (UD表示未检出)

[0097] 经过筛选,其中区域5存在非特异性扩增问题,将该区域排除,区域6、8存在扩增灵敏度不足问题,同样将以上2个区域排除。剩余9个区域在检测性能上均达到较优水平。随后在临床样本上进行靶点的临床性能验证,使用样本包括胰腺癌样本120例,慢性胰腺炎样本120例。对检测结果进行单区域的ROC分析,将单区域AUC<0.75的区域进行排除,以排除临床性能较差的区域,缩小区域数量,以满足qPCR检测同时,保证后续区域组合验证时,保持较佳的临床性能。

[0098] 表6.筛选的12个区域的检测性能

编号	区域组合个数	AUC
1	区域 1	0.809
2	区域 2	0.837
3	区域 3	0.769
4	<b>区域 4</b>	<b>0.742</b>
[0099] 5	<b>区域 7</b>	<b>0.739</b>
6	区域 9	0.830
7	<b>区域 10</b>	<b>0.741</b>
8	区域 11	0.801
9	区域 12	0.848

[0100] 经过上述筛选,最终发现并确定了6个在胰腺癌患者中高甲基化的靶序列(具有如Seq ID N0.1、Seq ID N0.2、Seq ID N0.3、Seq ID N0.9、Seq ID N011、Seq ID N0.12所示的核苷酸序列,详见说明书中表1)。这6个异常甲基化位点在胰腺炎血浆、胰腺癌血浆和健康人血浆3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6个甲基化位点对于不同类型样本的甲基化水平差异明显,能够高效区分胰腺癌和其余胰腺病患者及正常人。

[0101] 实施例2采用2个甲基化位点(或结合蛋白标志物)检测胰腺癌

[0102] 本实施例从实施例1筛选的6个甲基化位点中选择其中2个用于胰腺癌的检测。并分别采用两种方式进行检测:一、采用2个甲基化位点检测胰腺癌;二、采用2个甲基化位点和蛋白标志物组合的方法检测胰腺癌。

[0103] 一、采用2个甲基化位点检测胰腺癌

[0104] 采用2个甲基化位点检测胰腺癌的具体方法包括如下步骤:

[0105] 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30例为胰腺癌患者,30例为健康人。

[0106] 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。

[0107] 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。

[0108] 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 $\mu$ M,探针投入浓度为0.167 $\mu$ M,实时荧光定量PCR反应体系为30 $\mu$ L,内参基

因序列的正反向引物投入浓度为0.083 $\mu$ M。

[0109] 第4步,设置荧光定量PCR反应检测程序如表7:

[0110] 表7.多重PCR反应程序

	温度	时间	循环数	备注
[0111]	95°C	10 min	1	/
	95°C	15 s	45	/
	57°C	35 s		采集荧光信号

[0112] 第5步,获得荧光定量PCR反应检测结果。

[0113] 本实施例分别选用如下几组包含3个甲基化位点的组合进行检测:

[0114] 1、Seq ID N0.1、Seq ID N0.2

[0115] 2、Seq ID N0.2、Seq ID N0.12

[0116] 3、Seq ID N0.1、Seq ID N0.12

[0117] 当选用第1组Seq ID N0.1和Seq ID N0.2所示的核苷酸序列对应的两个甲基化位点时,检测结果如图3、4所示,其中图3为胰腺癌患者样本结果,所有待检测甲基化位点的荧光信号都有检出,为阳性;图4为健康人样本,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。

[0118] 采用2个甲基化位点检测胰腺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。

[0119] 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。并通过综合两个目标甲基化位点的检测结果,对这60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。

[0120] 通过综合2个靶序列Seq ID N0.1和Seq ID N0.2甲基化的检测结果见表8,对这60个样本进行10乘交叉验证,并取平均值,获得分类ROC曲线。

[0121] 表8.2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.1	Seq ID NO.2	COL2A1
S1	健康人	45	45	合格的
S2	健康人	45	45	合格的
S3	健康人	45	45	合格的
S4	健康人	45	45	合格的
S5	健康人	45	39.9	合格的
S6	健康人	45	45	合格的
S7	健康人	45	39.57	合格的
S8	健康人	45	45	合格的
S9	健康人	43.37	43.27	合格的
S10	健康人	45	45	合格的
[0122] S11	健康人	45	45	合格的
S12	健康人	44.52	40.59	合格的
S13	健康人	45	45	合格的
S14	健康人	45	45	合格的
S15	健康人	37.96	45	合格的
S16	健康人	45	42.55	合格的
S17	健康人	45	45	合格的
S18	健康人	38.21	39.41	合格的
S19	健康人	45	45	合格的
S20	健康人	45	45	合格的
S21	健康人	37.99	45	合格的

	S22	健康人	45	45	合格的
	S23	健康人	45	43.72	合格的
	S24	健康人	45	45	合格的
	S25	健康人	38.19	45	合格的
	S26	健康人	40.96	45	合格的
	S27	健康人	45	45	合格的
	S28	健康人	38.99	45	合格的
	S29	健康人	39.51	45	合格的
	S30	健康人	45	45	合格的
	S31	胰腺癌	39.08	44.21	合格的
	S32	胰腺癌	34.68	37.03	合格的
	S33	胰腺癌	37.43	38.6	合格的
	S34	胰腺癌	37.18	45	合格的
	S35	胰腺癌	37.12	38.05	合格的
[0123]	S36	胰腺癌	45	45	合格的
	S37	胰腺癌	38.76	45	合格的
	S38	胰腺癌	36.85	38.32	合格的
	S39	胰腺癌	34.35	34.5	合格的
	S40	胰腺癌	36.14	37.98	合格的
	S41	胰腺癌	35.35	35.62	合格的
	S42	胰腺癌	45	37.1	合格的
	S43	胰腺癌	37.01	36.32	合格的
	S44	胰腺癌	42.83	37.69	合格的
	S45	胰腺癌	36.11	37.34	合格的
	S46	胰腺癌	35.86	36.24	合格的
	S47	胰腺癌	29.59	30.14	合格的
	S48	胰腺癌	40.19	39.43	合格的
	S49	胰腺癌	32.44	34.16	合格的
	S50	胰腺癌	41.79	36.07	合格的
	S51	胰腺癌	45	45	合格的



	S52	胰腺癌	36.36	41.57	合格的
	S53	胰腺癌	37.06	38.79	合格的
	S54	胰腺癌	36.37	38.48	合格的
	S55	胰腺癌	38.27	38.51	合格的
[0124]	S56	胰腺癌	35.37	36.24	合格的
	S57	胰腺癌	38.19	37.27	合格的
	S58	胰腺癌	45	36.83	合格的
	S59	胰腺癌	35.59	39.34	合格的
	S60	胰腺癌	32.87	38.7	合格的

[0125] 针对本次的样品检测结果,采用Seq ID N0.1和Seq ID N0.2的2个甲基化位点的组合的胰腺癌检测水平,其AUC=0.909,灵敏度为87%,特异性为95%,效果明显好于其他2组甲基化位点组合。第2和3组的检测分析结果详见后续实施例5及表11。

[0126] 二、采用2个甲基化位点和蛋白标志物组合的方法检测胰腺癌

[0127] 本实施例还分别采用1-6组的2个甲基化位点,再结合蛋白标志物的方法检测胰腺癌,其中,蛋白标志物为CA19-9。

[0128] 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CA19-9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。

[0129] 磁微粒化学发光免疫分析夹心法过程:将R1(分别采用CA19-9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CA19-9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9所示。

[0130] 分析判定方法:在结合上述的单独采用3个甲基化位点检测胰腺癌的结果分析判断方法,还需:

[0131] 1) 分别对每个样本的CA19-9检测值进行归一化处理: $P = \log_{10} P_{CA19-9}$ ;蛋白的P-score = sum a\*P,其中a=3.8618;

[0132] 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。

[0133] 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PC-score = M-score + P-score。在一些实施方案中,在PC-score值等于或大于设定阈值时,结果表明患者中胰腺癌和/或早期胰腺癌的阳性检测。在一些实施方案中,在GC-score值小于阈值时,结果表明患者中胰腺癌和/或早期胰腺癌的阴性检测。

[0134] 3) 通过综合2个目标甲基化位点,以及蛋白CA19-9检测结果的归一化结果,对这60个样本进行10乘交叉验证,并取平均值,获得分类ROC曲线。

[0135] 当选用第1组的Seq ID NO.1和Seq ID NO.2所示的核苷酸序列对应的2个甲基化位点时,结合蛋白CA19-9检测后的归一化结果,对这60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,其中蛋白CA19-9检测结果如表9所示。

[0136] 表9. 不同样本蛋白水平检测结果

样本编号	临床诊断	CA19-9 (U/ml)	样本编号	临床诊断	CA19-9 (U/ml)
S1	健康人	8.36	S31	胰腺癌	10.64
S2	健康人	5.02	S32	胰腺癌	9.63
S3	健康人	2.73	S33	胰腺癌	214.1
S4	健康人	12.56	S34	胰腺癌	15.9
S5	健康人	1.88	S35	胰腺癌	106.1
S6	健康人	4.63	S36	胰腺癌	19.32
S7	健康人	3.31	S37	胰腺癌	885.7
[0137] S8	健康人	7.2	S38	胰腺癌	23.83
S9	健康人	0.813	S39	胰腺癌	1000
S10	健康人	1.8	S40	胰腺癌	158.4
S11	健康人	1.72	S41	胰腺癌	36.56
S12	健康人	1	S42	胰腺癌	7.39
S13	健康人	4.71	S43	胰腺癌	1000
S14	健康人	5.76	S44	胰腺癌	12.21
S15	健康人	0.6	S45	胰腺癌	76.99
S16	健康人	15.43	S46	胰腺癌	130.7
S17	健康人	16.63	S47	胰腺癌	199824

	S18	健康人	4.06	S48	胰腺癌	4.48
	S19	健康人	3.08	S49	胰腺癌	1000
	S20	健康人	6.28	S50	胰腺癌	2859
	S21	健康人	4.05	S51	胰腺癌	1413
	S22	健康人	4.66	S52	胰腺癌	177.8
	S23	健康人	7.75	S53	胰腺癌	208.6
[0138]	S24	健康人	3.33	S54	胰腺癌	4.18
	S25	健康人	7.6	S55	胰腺癌	169.7
	S26	健康人	7.49	S56	胰腺癌	11998
	S27	健康人	70.15	S57	胰腺癌	14.37
	S28	健康人	4.57	S58	胰腺癌	2.18
	S29	健康人	19.78	S59	胰腺癌	3044
	S30	健康人	11.65	S60	胰腺癌	247.4

[0139] 当采用第1组的2个甲基化位点,并结合蛋白CA19-9检测后归一化结果,可以进一步提升胰腺癌检测效果,其AUC=0.949,灵敏度为90%,特异性为95%。

[0140] 第2和3组的2个甲基化位点,结合蛋白CA19-9检测后的归一化结果,详见后续实施例5。

[0141] 实施例3采用3个甲基化位点(或结合蛋白标志物)检测胰腺癌

[0142] 本实施例从实施例1筛选的6个甲基化位点中选择3个用于胰腺癌的检测。并分别采用两种方式进行检测:一、采用3个甲基化位点检测胰腺癌;二、采用3个甲基化位点和蛋白标志物组合的方法检测胰腺癌。

[0143] 一、采用3个甲基化位点检测胰腺癌

[0144] 本实施例分别选用如下几组包含3个甲基化位点的组合进行检测:

[0145] 4、Seq ID N0.1、Seq ID N0.11、Seq ID N0.12

[0146] 5、Seq ID N0.1、Seq ID N0.2、Seq ID N0.12

[0147] 6、Seq ID N0.2、Seq ID N0.11、Seq ID N0.12

[0148] 7、Seq ID N0.3、Seq ID N0.9、Seq ID N0.11

[0149] 8、Seq ID N0.3、Seq ID N0.9、Seq ID N0.12

[0150] 9、Seq ID N0.9、Seq ID N0.11、Seq ID N0.12

[0151] 采用3个甲基化位点检测胰腺癌的具体方法包括如下步骤:

[0152] 第一步,得到60名健康人及胰腺癌患者,其中健康人样本为30例,胰腺癌样本为30例。分离提取样本的血清和游离血浆DNA。

[0153] 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。

[0154] 第三步,指如表2所示的分别对应这3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。

[0155] 针对本次的样品检测结果,采用第5组的3个甲基化位点的效果明显好于其他组的

胰腺癌检测水平。根据ROC曲线可得,其AUC=0.942,灵敏度为90%,特异性为97%(图5)。

[0156] 第4、6-9组的3个甲基化位点的检测分析结果详见后续实施例5。

[0157] 二、采用3个甲基化位点和蛋白标志物组合的方法检测胰腺癌

[0158] 在上述检测采用3个甲基化位点检测胰腺癌的基础上,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CA19-9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3个甲基化位点的 $\Delta Ct$ (靶基因)结果以及蛋白标志物水平的检测结果,对这60个样本进行10重交叉验证,并取平均值,获得分类ROC曲线(图6)。

[0161] 第4、6-9组的3个甲基化位点,结合蛋白检测后的归一化结果详见后续实施例5。

[0162] 当采用第5组的3个甲基化位点,并结合CA19-9蛋白检测后的归一化结果,可以进一步提升胰腺癌检测效果,其AUC=0.986,灵敏度为93%,特异性为97%(图6)。

[0163] 实施例4采用6个甲基化位点(或结合蛋白标志物)检测胰腺癌

[0164] 本实施例从实施例1筛选的6个甲基化位点用于胰腺癌的检测。并分别采用两种方式进行检测:一、采用6个甲基化位点检测胰腺癌;二、采用6个甲基化位点和蛋白标志物组合的方法检测胰腺癌。

[0165] 一、采用6个甲基化位点检测胰腺癌

[0166] 采用6个甲基化位点检测胰腺癌的具体方法包括如下步骤:

[0167] 第一步,得到60名健康人及胰腺癌患者,其中健康人样本为30例,胰腺癌样本为30例。分离提取样本的血清和游离血浆DNA。

[0168] 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。

[0169] 第三步,指如表2所示的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。

[0170] 采用6个甲基化位点进行检测的AUC达到0.940,详见实施例5。

[0171] 二、采用6个甲基化位点和蛋白标志物组合的方法检测胰腺癌

[0172] 采用6个甲基化位点和蛋白标志物组合的方法检测胰腺癌的具体方法包括如下步骤:在上述检测采用6个甲基化位点检测胰腺癌的基础上,还需增加:

[0173] 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CA19-9蛋白标志物水平的检测,并对结果进行分析。

[0174] 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个靶基因的 $\Delta Ct$ (靶基因)结果以及蛋白标的检测结果,对这60个样本进行10重交叉验证,并取平均值,获得分类ROC曲线,其AUC-甲基化+蛋白=0.983,灵敏度达到93%,特异性达到96%,详见实施例5。

[0175] 实施例5采用不同甲基化位点组合的性能比较分析

[0176] 对实施例1中得到的60例胰腺癌和健康人样本的6个甲基化位点(Seq ID NO.1、Seq ID NO.2、Seq ID NO.3、Seq ID NO.9、Seq ID NO.11、Seq ID NO.12)的相对循环数 $\Delta CT$ 值进行不同位点组合的数学建模分析,以探讨6个甲基化位点和蛋白作为生物标记物组合对于检测胰腺癌的应用。

[0177] 首先,我们分别评估了上述6个甲基化位点中单个位点的模型对于诊断胰腺癌发生的性能,分别计算其AUC值,结果如表10所示。

[0178] 表10. 单个甲基化位点诊断胰腺癌的性能比较

	SEQ ID NO	AUC
	<b>1</b>	<b>0.874</b>
	<b>2</b>	<b>0.904</b>
[0179]	3	0.769
	9	0.826
	11	0.796
	<b>12</b>	<b>0.858</b>

[0180] 由表10可以看出,实施例1提供的6个甲基化位点用于诊断胰腺癌的AUC值都较高,都具有较好的诊断性能,尤其是其中的Seq ID NO.1、Seq ID NO.2和Seq ID NO.12所示的核苷酸序列对应的甲基化位点。

[0181] 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11所示。

[0182] 表11. 不同组合甲基化位点的模型对于诊断胰腺癌发生的比较

	组别	组合(SEQ ID NO)	AUC-甲基化	AUC-甲基化+蛋白
	1 (实施例 2)	1+2	0.909	0.949
	2 (实施例 2)	2+3	0.905	0.947
	3 (实施例 2)	2+9	0.907	0.941
	4 (实施例 3)	1+11+12	0.915	0.955
[0183]	<b>5 (实施例 3)</b>	<b>1+2+12</b>	<b>0.942</b>	<b>0.986</b>
	6 (实施例 3)	2+11+12	0.925	0.965
	7 (实施例 3)	3+9+11	0.910	0.930
	8 (实施例 3)	3+9+12	0.911	0.935
	9 (实施例 3)	9+11+12	0.913	0.945
	10 (实施例 4)	1+2+3+9+11+12	0.940	0.983

[0184] 由表10和11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3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。

[0185] 当选用2个甲基化位点组合作为诊断模型时,第1组的AUC-甲基化和AUC-甲基化+蛋白都是最高的,可见第1组采用Seq ID NO.1、Seq ID NO.2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。

[0186] 当选用3个甲基化位点组合作为诊断模型时,4-6组的3个甲基化位点组合的性能排名最靠前,其中第5组的AUC-甲基化和AUC-甲基化+蛋白都是最高的,可见第5组采用Seq ID NO.1、Seq ID NO.2、Seq ID NO.12所示的核苷酸序列对应的3个甲基化位点时,诊断性

能明显高于其他3个甲基化位点组合。

[0187] 当选用6个甲基化位点组合作为诊断模型时,其诊断性能与第5组的3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5组的3个甲基化位点组合。

[0188] 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12所示。

[0189] 表12. 优选的多个甲基化位点的模型对于诊断胰腺癌发生的比较

	组合(SEQ ID NO)	AUC	灵敏度	特异度	Youden 指数
[0190]	1+2+蛋白	0.949	90%	95%	0.85
	2+3+蛋白	0.947	89%	94%	0.83
	2+9+蛋白	0.941	88%	93%	0.81
	1+11+12+蛋白	0.955	91%	95%	0.86
	<b>1+2+12+蛋白</b>	<b>0.986</b>	<b>93%</b>	<b>97%</b>	<b>0.90</b>
[0191]	2+11+12+蛋白	0.965	92%	96%	0.88
	3+9+11+蛋白	0.930	86%	92%	0.78
	3+9+12+蛋白	0.935	87%	93%	0.80
	9+11+12+蛋白	0.945	89%	94%	0.83
	1+2+3+9+11+12+蛋白	0.983	93%	96%	0.89

[0192] 由表12可见,本实施例优选的几组甲基化位点+蛋白的组合都能够用于胰腺癌的高效检测,其中AUC最高能达到0.986,灵敏度达到93%,特异性达到97%,真正实现无创、全局、具有更高灵敏度和特异性的胰腺癌筛查,完全满足临床需求。

[0193] 实施例6独立验证集中不同的3个甲基化位点组合(或结合蛋白标志物)检测胰腺癌

[0194] 在独立验证集中对不同的3个甲基化位点组合以及联合蛋白进行性能验证,独立验证集包括100例胰腺癌样本与100例慢性胰腺炎样本、100例胰腺癌样本与150例健康人样本。

[0195] (一) 100例胰腺癌样本与100例慢性胰腺炎样本

[0196] 验证结果结果如下表13所示:

[0197] 表13. 胰腺癌样本与慢性胰腺炎样本中不同组合甲基化位点的组合诊断胰腺癌性能的比较

	组别	组合(SEQ ID NO)	AUC
	1	1+11+12	0.880
	2	1+2+12	0.894
	3	2+11+12	0.862
	4	3+9+11	0.835
[0198]	5	3+9+12	0.845
	6	9+11+12	0.855
	7	1+11+12+蛋白	0.913
	8	1+2+12+蛋白	0.929
	9	2+11+12+蛋白	0.896
	10	3+9+11+蛋白	0.881
	11	3+9+12+蛋白	0.893
[0199]	12	9+11+12+蛋白	0.890
	13	蛋白	0.801

[0200] (二) 100例胰腺癌样本与150例健康人样本

[0201] 验证结果结果如下表14所示:

[0202] 表14. 胰腺癌样本与健康人样本中不同组合甲基化位点的组合诊断胰腺癌性能的比较

组别	组合(SEQ ID NO)	AUC	
1	1+11+12	0.916	
2	1+2+12	0.943	
3	2+11+12	0.924	
4	3+9+11	0.911	
5	3+9+12	0.912	
6	9+11+12	0.914	
[0203]	7	1+11+12+蛋白	0.956
	8	1+2+12+蛋白	0.988
	9	2+11+12+蛋白	0.963
	10	3+9+11+蛋白	0.932
	11	3+9+12+蛋白	0.934
	12	9+11+12+蛋白	0.947
	13	蛋白	0.812

[0204] 根据表13和表14可知,通过甲基化联合CA19-9可以有效提高检测性能,1-3组甲基化标志物都能很好的区分胰腺癌和胰腺炎患者以及胰腺癌和健康人,其中组合1+2+12的性能最优。

[0205] 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。

[0206] 序列表

[0207] Seq ID NO.1

[0208] 甲基化位点1:

[0209] TAATTTATTTTTTTTGGATATTGGAGTTATTAATTGGCGTGTTTTTGTATTATTGGAGTATT

[0210] CGTATATTATTTAAATTAATAAATTATTAAGAGTTTTTTTCGCGTAGATTGTTGTTTTTTA

[0211] GTTGTTCGATTTTGTTCGTTTACGTTTGTTCGGTTAGAGTTTTTCGGCGTTTTTTTCGTTTT

[0212] AGCGGAGTTCGTTGGGGCGCGTTAGGGTTAGGTTTCGTCGGAGGAGCGCGTTTTTAGT

[0213] TTTTCGCGTATAGAGTCGTATTTTCGSeq ID NO.2

[0214] 甲基化位点2:

[0215] GTCGGTTGCGGTGGGGTCGGGTTGGAGGTCGCGGTGAGGTTTGTGGTTAATTTTCGC

[0216] GTTGTTCGAGTTTTATTTTTTCGAGTTTAGTTTGATTTTAGGTCGTTTTTAGGTCGGTG

[0217] TTTAGTTGAGGCGGAACGTTGTAGTTTGTTGAGCGTGATTTTTAGGTTTTGTGAGG

[0218] AAAAGTCGAGCGGTTATATCGAGGCGTTAGTCGTTTATTTTATTATAAGGTAAGAT

[0219] TTATGTTGTTTTAGTTATTTTAAAGTTGGGAGATATATTGTATTTTTTATTAGATTTTCGAA



- [0220] TGTTTTTAGTGTSeq ID NO.3
- [0221] 甲基化位点3:
- [0222] AGAGTGGGGCGTAGGGGCGGGTTAGGTTTTTGGGCGCGGCGGGTTCGGGGGA
- [0223] TTCGCGCGGTTGACGTTAGGTTATTTTTTAAATAGAGTCGGTAGCGGTTTCGTTCCGGT
- [0224] ATTTTTCGAAGAGTTAGATCGCGGTCGGCGTTAGCGTTATCGTTCCGGTTTATTCGTTAG
- [0225] TTCGTATAGTCGCGTCGTCGTCGAGCGTTTCGTGAGCGGCGTTTCGAGGATTAGGAAT
- [0226] GGGTTTTCGGGCGTTGGGCGGTTTTCGAATTCGGCGTACGTAAGAGTTTGGGAGCGT
- [0227] TCGAGTCGTTCCGGTTGTTCCGGAGTTTTATCGTTTAGGATCGGGAGATGTTGAAATGT
- [0228] AATCGTTTGTTCGAGGASeq ID NO.4
- [0229] 甲基化位点4:
- [0230] TCGAGTGTTGAAAAGGAGGGGCGTTTTTTTTGGACGTAGGGGATATTTTTCGAGGGTTT
- [0231] TTGTAGTTTTTTTTGTAAGGATTAGGCGGTTTAGTTATTTTTCGTTTTGTATTTCGTTTTCG
- [0232] GTCGCGCGTGTATTGAAGTTCGTTAGTGTTTCGTTTTTGTAGCGAAGGTTTTTATAGTT
- [0233] TAGTTTTATAATTCGGTAAAGGGGAGTATTTGTGTGGGTATGGTTTTATAGTTTCG
- [0234] TTTAGTATTAGTTTTAAATTTTTGTGSeq ID NO.5
- [0235] 甲基化位点5:
- [0236] ATAGTGGCGCGTTGGGGCGGGCGGAGGAAGTGGGGGAGTTAAGGAGATATTTTAGC
- [0237] GTTGGGATTCGTAAGTTTTTTTTTTGAGTGGTTAGGGGTTTCGTTTTTTTTTCGAT
- [0238] GTTTTTGTTTTTTTTGGGTTTTTCGAATTTAGTTTGTTTAATCGTTTTTCGTTGCGGG
- [0239] TAGCGTTGGTTACGCGGTTTTTCGTCGTCGGCGGTTTTTCGTGGTTAAGTATTTTTGGTT
- [0240] TTGGAGTTTAGGGTTGCGTTTTTTTTTGGGGTCGGGCGGGAGAGAGGATTTCCGGTG
- [0241] GTATTCGTTTCGTGCGTTGGGCGSeq ID NO.6
- [0242] 甲基化位点6:
- [0243] GTTGC CGGTTGATCGCGGGTTCGATATGATGGTTGGTGGGTAGCGGGTTCGCGCGGA
- [0244] GGGTAGCGGCGAGGAAGCGTTTTTCGGCGGGGTTCCGGTTTTGCGCGTTGGTTGGGGC
- [0245] GTCGCGTTTCGCGTTTTTGTAGTGTAGAGTTAGTCGTCGGAGGATTTTTAGTTTTTTT
- [0246] GGTTTAGTTGAATGAATGGGGGAGGAAGGCGGGCGTCGGTTTTTTTTTCGCGCGSeq ID NO.7
- [0247] 甲基化位点7:
- [0248] TGATTGCGGTTTTTTGGGGATTTTTGCGTTTAGTTCGAAAGTTGGTTTTGTAAAAAGA
- [0249] CGTACGGGTAGGAAGGGCGAAAAGGAAATTTTGTATTTTCGTCGCGTTGGGTTTTTCG
- [0250] AGTTCGTGCGTAAAGCGGTTTACGAGTTTTGGTTTTCGTATTTGTAGAGGATAAGAGTT
- [0251] AATGTTTTAAAAAGAATAGCGGAGGAATCGGTTGGCGCGTTAGTTGGAACGTTGGA
- [0252] TCGTAGTGCCTTAGGGAAGGTCGGGGCGTTCGTCGGTTTTAGTTTTTAGTGGTTTTT
- [0253] TTTTTACGTCGGTTTCGCGCGTGTTTTTGTTTATAAGATTTGGGGCGTTTTGGTTAGATT
- [0254] TGGATGGTAGGTTTTTTTCGTTATTTTCGGTTCGGTTTCGGGGCGTGGTTTGGCGCGG
- [0255] GGGCGGGTTAAGTTATCGCGGTGTTTATTATTTTATAGGTTTTTAAATTTTTTTTA
- [0256] GTCGTTTGGCGTTCGCGGTGCGTTTTAGAGTTTTAGGGTGGTACGCGGCGGCGTTTTT
- [0257] TTAGATTTAGAGCGTTTTTGTTCGATTTTTACGCGGTTTCGGGTTTTTTTTTTTTTAA
- [0258] ATTTTCGTTTTATTCGTTAAGTTTCGGTTTTTAGTTTTAGATATTCGTATCGGCGGTTTTT

- [0259] TTTCGTTTTTCGGAGTTTTTGGTTTTGGAGTTTTTATTATTTTTTTTTTTTTTTTTTCGTTTTTTTT
- [0260] TGATTTTTTTAGTTTTCGAGTTAAATGGATTTTAAAGAACGAAATAAAGGSeq ID NO.8
- [0261] 甲基化位点8:
- [0262] TTTTAGATTAGGGTGTTTAGGGGTGGTTATTTGGAGGAGGTGATATTTGAGACGTAA
- [0263] CGAGAACGAGTTAGTTTTAGTTTAGAGGAGTTTTAGGGGAAACGCGTTTTAGTTTTGA
- [0264] GATTATAAAGGGTATATTAGTGGTTACGAAGTTTTTTGGGGGAAAAATTCGGTAGGTC
- [0265] GTCGTCGTCGTTTTCGTTAGTAGTTATCGATTTTTCGTTTTGAGAGTTCGGAGTTGACGC
- [0266] GAAGGAGGGGTTTCGTTTTGGCGCGTTTTTTTTTTTCGCGTTATGTATTAGTTAGATGGG
- [0267] GAGTCGGGTGGTTAGGTTTTGGGTCCGGTAAGTTGGATTGTTCCGGTCGATTTGTTTT
- [0268] TATTTTTCGTTTTTTTTTTTTTCGGGCGGTCCAAGAGTATCGGGTTGATTTTTTTTTTAA
- [0269] GTGAAATTGSeq ID NO.9
- [0270] 甲基化位点9:
- [0271] GCGCGGTAGCGTGTACGGACGGGACGAGGGGATGGCGGGACGACGACGTGGGC
- [0272] GGTGGGAGTAGAGTGTTCGATTTTTCGGGGTAGGAAGGAGGGGCGGGATGGTTTTT
- [0273] CGCGTTCAAATTTACGGCGTGGCGGACGCGGAGGAGTTTCGAGTTTTATAATTAAGG
- [0274] GGTGGGAAGGAAAAGGATAGAGCGAGATAGAGCGTTTTTCGAGAAASeq ID NO.10
- [0275] 甲基化位点10:
- [0276] ATATTTGGTTTTAAGGTTATTATTTGATATAAAAATATAATGTTGGTTTTTTAAATAGGTA
- [0277] ATTTATATTGATATTTATATAGTTTTTATTTATATTTGCGATTATAAGGTAGTATTTTCGGG
- [0278] TTTTCGTCGTTACGATTCGTTTTTAGAGAGTATTCGCGTATAATTTTATTTTATTACGA
- [0279] TTTTGATTTTTTTTTTTTTTATTTTTTAATTTTATTCGGGACGAGATTATTAGTTTTATTT
- [0280] TTATTTTTATTTTTATSeq ID NO.11
- [0281] 甲基化位点11:
- [0282] GGGGAAAGGGTCGGGTAAGGTTCCGGATGGAGTAGTTTTCGGGAAGGTGCGGGTTTCG
- [0283] GCGATCGTTGGATGGTTGTCGTTTTTTTCGACGAGTGCCTTTTTTCGTAAATGTTTTTTGG
- [0284] GGTAAGGGTTTTTCGGTTATTGAGTTATGTATAGTAAGTTTAGATCGTAAAAAGATTCGC
- [0285] GAAGGGTAGAATATGTCGGTTTTTTTCGGTTCGTCGTCGTTTTTAGTTTAGGATGTTTTC
- [0286] GAATTTTGGAGTCAATAGGTTGGGTTTTTTTAGCGCGTTTTATCGCGGTTAGTTTTA
- [0287] TTATTTTCGCGCTTGTTCGTTTTTTTCGCGTTTTTGGATTCGTSeq ID NO.12
- [0288] 甲基化位点12:
- [0289] TTATTATCGCGAATTTTCAAAGCGTAGATTTGTTTTGAAGTTTTGAGCGATTTTTTCGT
- [0290] ATTAGGCGTTGGAAAGGTAATTTGCGGATTAGTAGTTTAGTCGATTTTTGATAGCGGCG
- [0291] AATTTTCGCGTAGAGTTACGGTGTCCGGACGGTAGCGATGAGGTTTTTTTACGTCGTCG
- [0292] GTGGTCGGCGCGTTTTTTTCGAGTCGTTTTAGTGGTTAGTTGTTTTCGCGGCGTTTTGTT
- [0293] ATCGGTG
- [0294] Seq ID NO.13
- [0295] COL2A1:
- [0296] TTTTTTGTAAAGGAGGATGTGGAGGGATAGAGGAGTAGTAGGTAAGGTTAGTAGGAG
- [0297] GTGATATAGGTAGGAGGATTAGGTTAAGGTTGGGAGGAGTTTATATTTGGTGTT Seq ID NO.14

- [0298] COL2A1的正向引物:  
[0299] ATGTGGAGGGATAGAGGAGTA Seq ID NO.15  
[0300] COL2A1的探针:  
[0301] CACCTCCTACTAACCTTACC Seq ID NO.16  
[0302] COL2A1的反向引物:  
[0303] CCTCCCAACCTTAACCTAAT Seq ID NO.17  
[0304] 甲基化位点1的正向引物:  
[0305] GTTGTTTTCGATTTTGTGTTTACG Seq ID NO.18  
[0306] 甲基化位点1的探针:  
[0307] CGCCGAAAACTCTAACCGA Seq ID NO.19  
[0308] 甲基化位点1的反向引物:  
[0309] CGCACTCCGCTAAAACG Seq ID NO.20  
[0310] 甲基化位点2的正向引物:  
[0311] TGATTTTTAGGTTTTGTGAGGAAA Seq ID NO.21  
[0312] 甲基化位点2的探针:  
[0313] CTCGATATAACGCGCTCGA Seq ID NO.22  
[0314] 甲基化位点2的反向引物:AATCTTTTACCTTATAATAAAAATAAACG Seq ID NO.23  
[0315] 甲基化位点3的正向引物:GTTTCGTTCCGGTATTTTTCGAA Seq ID NO.24  
[0316] 甲基化位点3的探针:TAACGCCGACCGCATCT Seq ID NO.25  
[0317] 甲基化位点3的反向引物:CGAATAAACCGAACGATAACG Seq ID NO.26  
[0318] 甲基化位点4的正向引物:GGATTAGCGGTTTAGTTATTTTTTC Seq ID NO.27  
[0319] 甲基化位点4的探针:CGTTTTCGGTCGCGGC Seq ID NO.28  
[0320] 甲基化位点4的反向引物:AACGAACACTAACGAACCTTCAATACA Seq ID NO.29  
[0321] 甲基化位点5的正向引物:CGTTGCGGGTAGCGTTG Seq ID NO.30  
[0322] 甲基化位点5的探针:TTTTCGTCGTCGCGGT Seq ID NO.31  
[0323] 甲基化位点5的反向引物:AACTCCAAAACCAAAAATACTTAACC Seq ID NO.32  
[0324] 甲基化位点6的正向引物:GGGGTTCCGGTTTTGC Seq ID NO.33  
[0325] 甲基化位点6的探针:CGTCGCGTTCGCGTTT Seq ID NO.34  
[0326] 甲基化位点6的反向引物:CCGACGACTAACTCTACTACTACAA Seq ID NO.35  
[0327] 甲基化位点7的正向引物:GTTTCGTCGTTTTAGTTTTTAGTG Seq ID NO.36  
[0328] 甲基化位点7的探针:CGCGCAACCGACGTA Seq ID NO.37  
[0329] 甲基化位点7的反向引物:CGCCCCAAATCTTATAAACAAAA Seq ID NO.38  
[0330] 甲基化位点8的正向引物:GGGGGAAAATTCGGTAGG Seq ID NO.39  
[0331] 甲基化位点8的探针:CTAACGAAACGACGACGACG Seq ID NO.40  
[0332] 甲基化位点8的反向引物:ACTCTCAAACGAAAATCGATAACT Seq ID NO.41  
[0333] 甲基化位点9的正向引物:ATGGTTTTTCGCGTTCGAA Seq ID NO.42  
[0334] 甲基化位点9的探针:TTTACGGCGTGGCGGAC Seq ID NO.43  
[0335] 甲基化位点9的反向引物:CCCCTTAATTATAAAAACCTCGAAACTC Seq ID NO.44  
[0336] 甲基化位点10的正向引物:TATATTTGCGATTATAAGGTAGTATTTTTC Seq ID NO.45

- [0337] 甲基化位点10的探针:TTTCGTCGGTTACGATTCGT Seq ID NO.46
- [0338] 甲基化位点10的反向引物:TAAAATTATACGCGAATACTCTCTAAA Seq ID NO.47
- [0339] 甲基化位点11的正向引物:ATTCGCGAAGGGTAGAATATGTC Seq ID NO.48
- [0340] 甲基化位点11的探针:TTCGGTTCGTCGTCGTTT Seq ID NO.49
- [0341] 甲基化位点11的反向引物:CAAAATTCGAAAACATCCTAAACTA Seq ID NO.50
- [0342] 甲基化位点12的正向引物:GCGGATTAGTAGTTTAGTCGATT Seq ID NO.51
- [0343] 甲基化位点12的探针:TACGCGAAATTCGCCGC Seq ID NO.52
- [0344] 甲基化位点12的反向引物:CGTCCCGACACCGTAA。

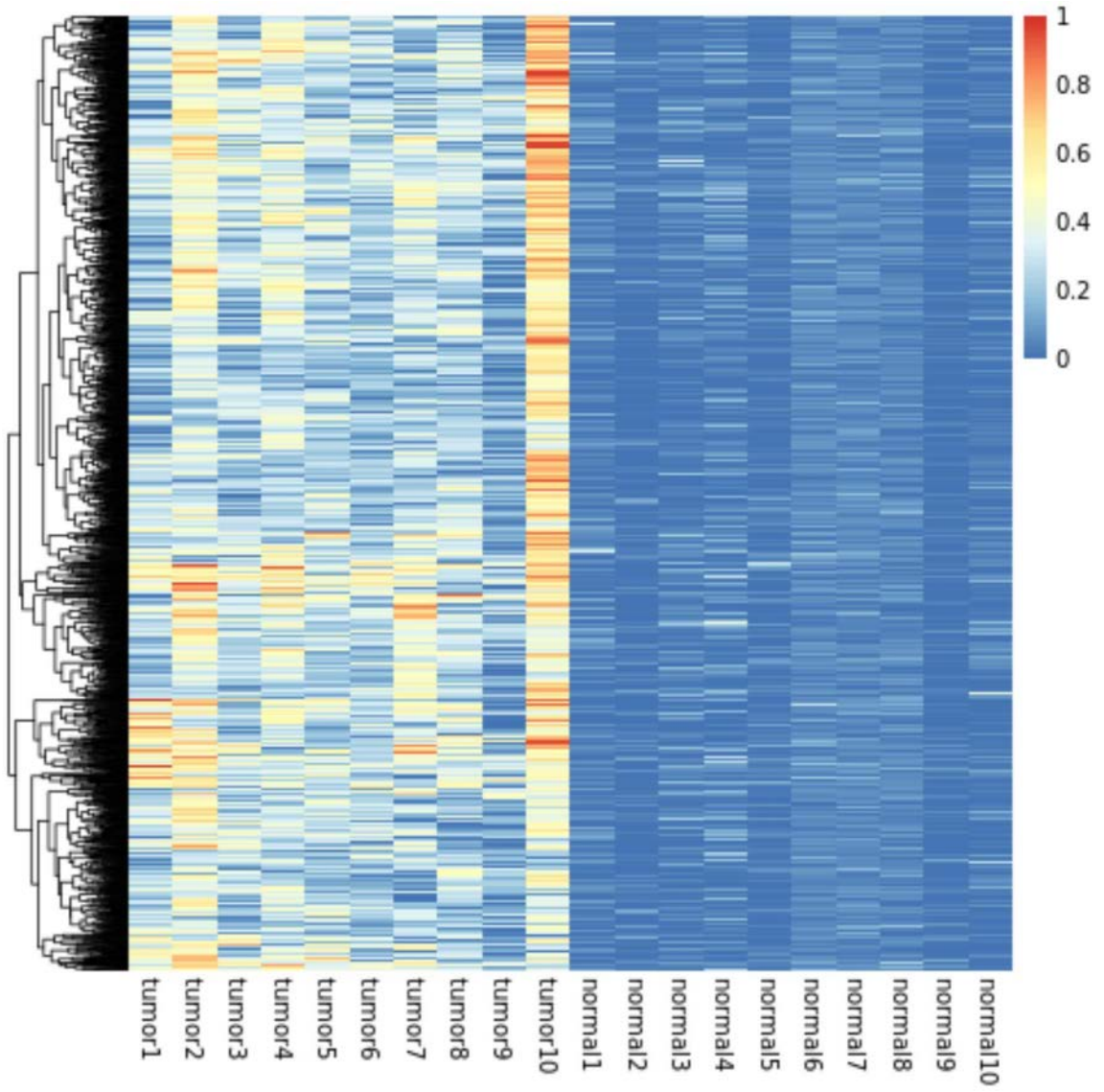
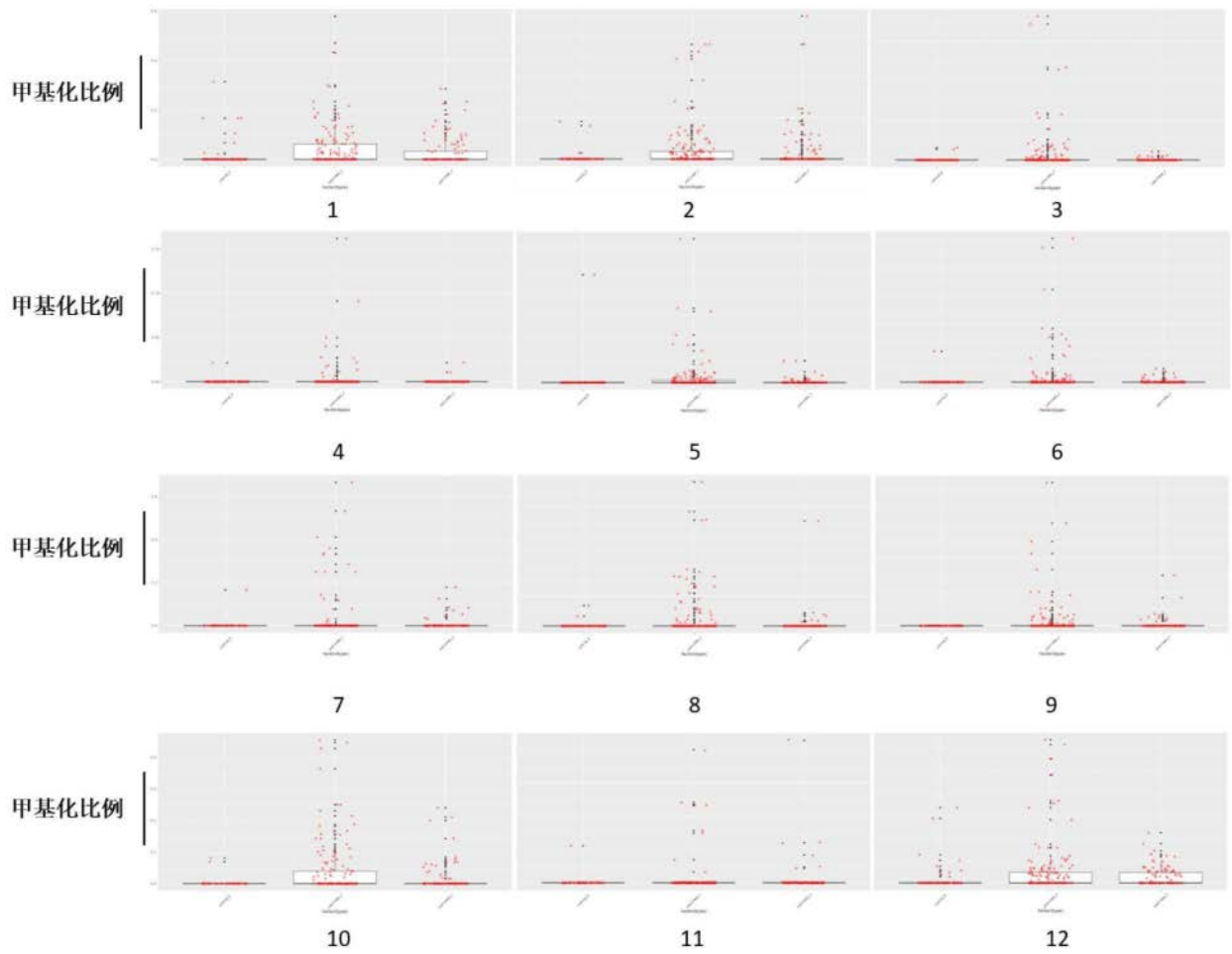


图1



(备注由左至右依次为：健康人血浆、胰腺癌患者血浆和胰腺炎患者血浆)

图2

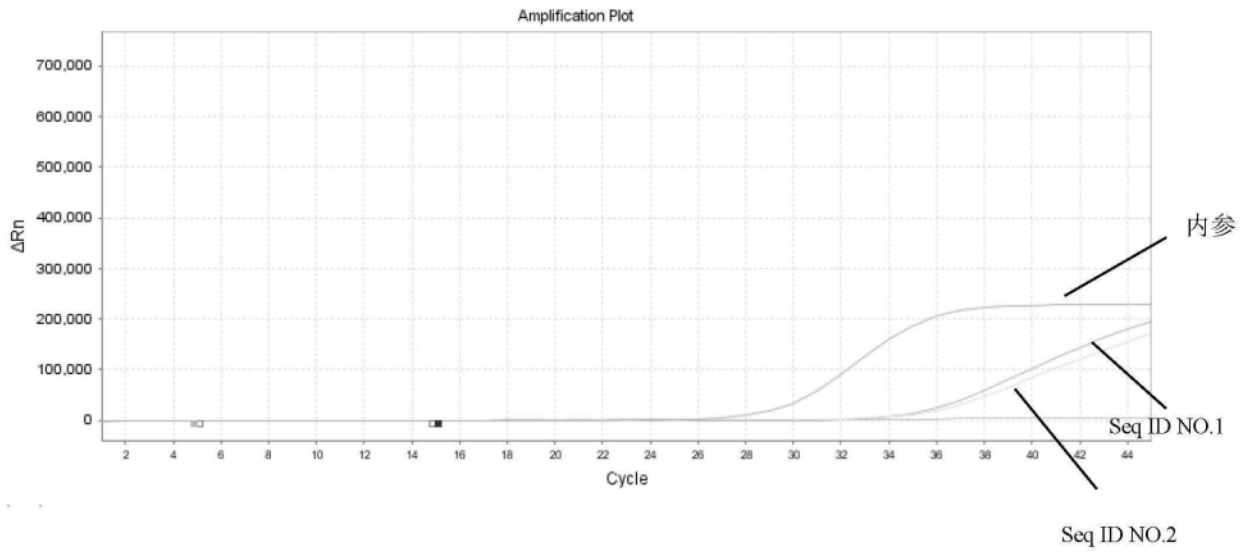


图3

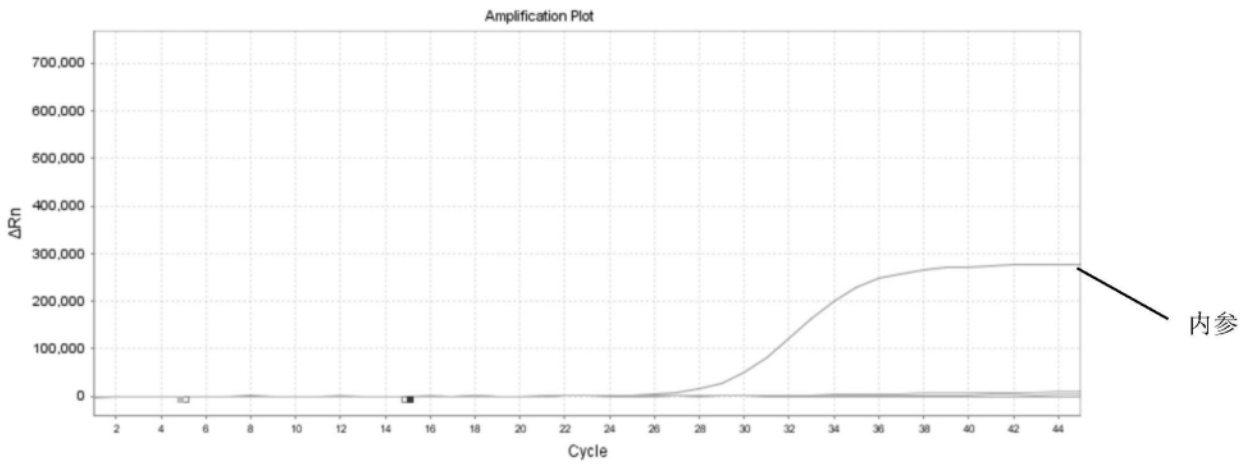


图4

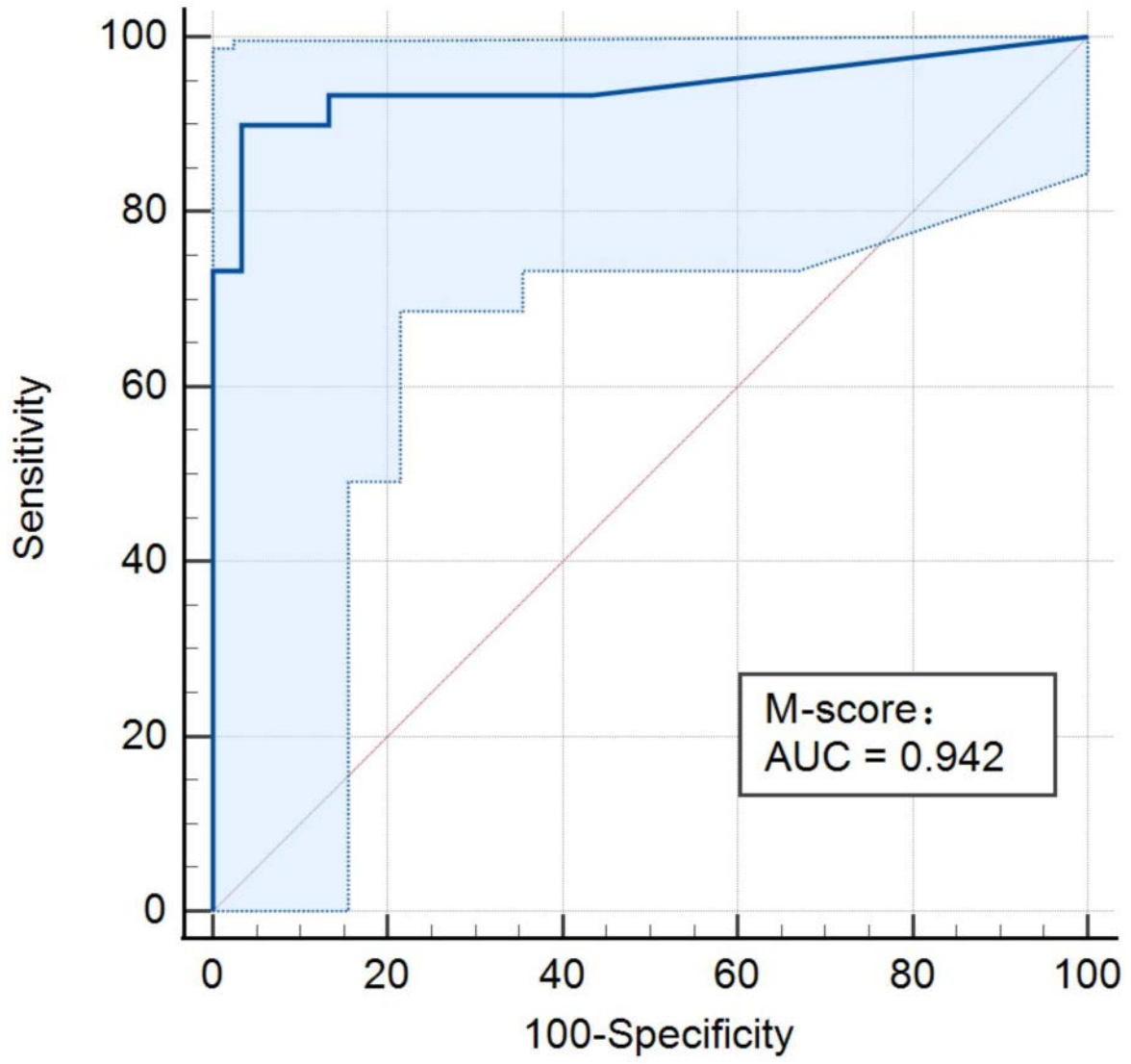


图5



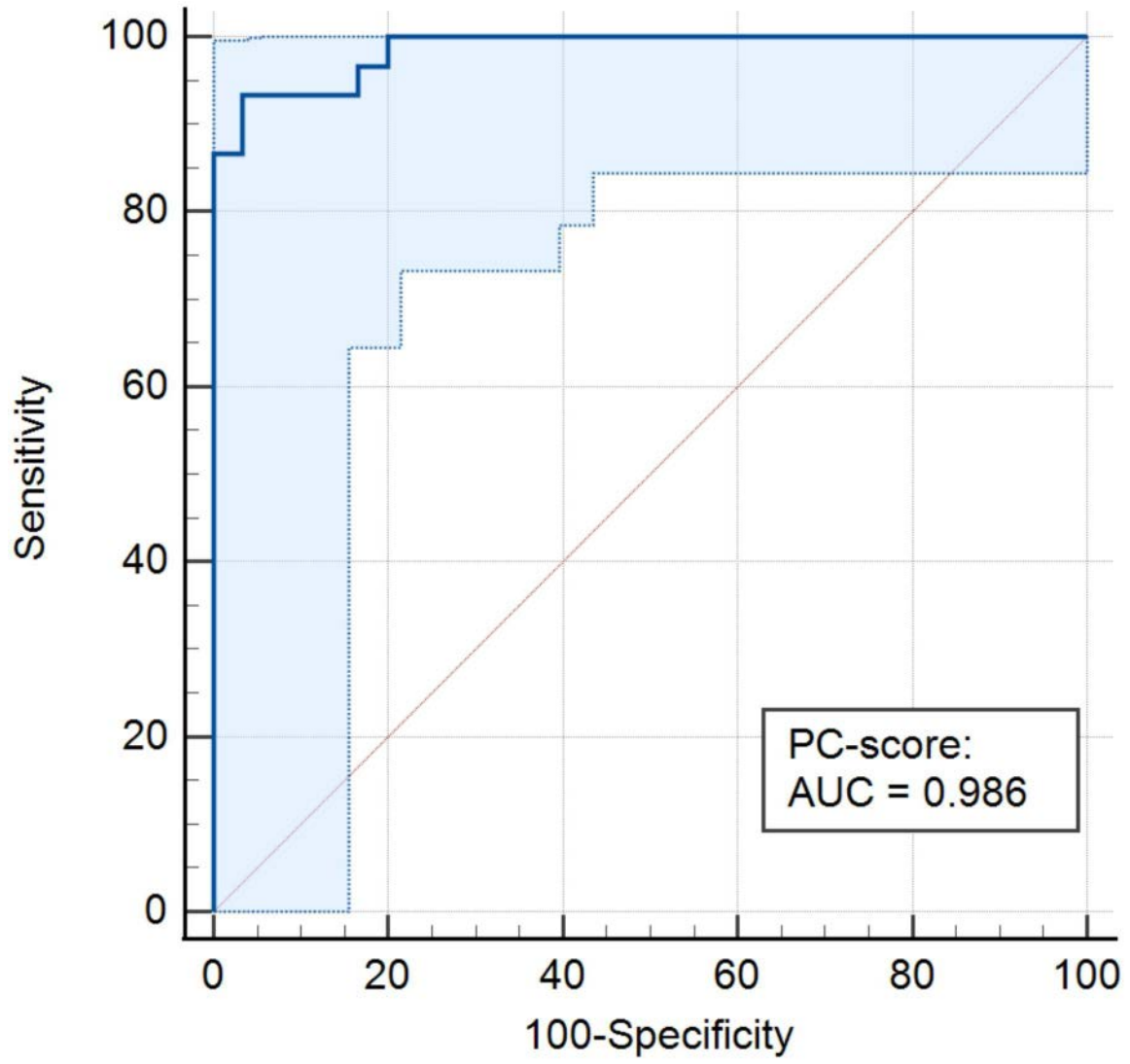


图6