



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104745575 A

(43) 申请公布日 2015. 07. 01

(21) 申请号 201410389895. 2

(22) 申请日 2014. 08. 08

(71) 申请人 博尔诚研究公司

地址 美国加利福尼亚州

申请人 博尔诚(北京)科技有限公司

(72) 发明人 韩晓亮 陆彤 王建铭

(74) 专利代理机构 北京商专永信知识产权代理

事务所(普通合伙) 11400

代理人 郭玥 葛强

(51) Int. Cl.

C12N 15/11(2006. 01)

C12Q 1/68(2006. 01)

权利要求书3页 说明书33页

序列表6页 附图10页

(54) 发明名称

用于检测细胞增殖性异常或疾病程度分级的
基因组合物及其用途

(57) 摘要

本发明提供了一种组合物,试剂盒及其用途
和用于对个体中细胞增殖性异常进行检测或对个
体的疾病程度进行分级的方法,所述组合物包括
用于检测基因及其片段中至少一个靶区域内甲基
化程度的核酸。

1. 一种组合物,包括用于检测 RNF180 和 Septin9 基因及其片段中至少一个靶区域内甲基化程度的核酸。

2. 如权利要求 1 所述的组合物,所述核酸包括 RNF180 的至少 15 个寡核苷酸长片段,其中所述寡核苷酸包含至少一个 CpG 二核苷酸序列。

3. 如权利要求 2 所述的组合物,所述 RNF180 的核苷酸长片段包含等同于、互补于或在中等严谨或严谨条件下杂交于选自 SEQ ID No :10 至 SEQ ID No :12 的至少 15 个核苷酸及其互补序列。

4. 如权利要求 3 所述的组合物,所述 RNF180 的核苷酸长片段包含等同于、互补于或在中等严谨或严谨条件下杂交于选自 SEQ ID No :1 至 SEQ ID No :9 的序列及其互补序列。

5. 如权利要求 1 所述的组合物,还包括将基因的 5 位未甲基化的胞嘧啶碱基转化为尿嘧啶或在杂交性能方面可检测地不同于胞嘧啶的其他碱基的试剂。

6. 如权利要求 5 所述的组合物,所述试剂是亚硫酸氢盐。

7. 一种包含如 1 至 6 中任一项所述的组合物的试剂盒。

8. 如权利要求 7 所述的试剂盒,包括用于容纳患者生物样品的容器。

9. 如权利要求 7 所述的试剂盒,包括使用和解释试剂盒结果的说明。

10. 一种将如 1 至 6 中任一项所述的组合物在制备用于对个体中细胞增殖性异常进行检测的试剂盒中的用途。

11. 如权利要求 10 中任一项所述的用途,其中所述细胞增殖性异常是癌症。

12. 如权利要求 11 所述的用途,其中所述癌症是胃癌。

13. 一种对个体中细胞增殖性异常进行检测的方法,包括:

确定分离自所述个体的生物样品中 RNF180 和 Septin9 基因及其片段中至少一个靶区域内甲基化程度,通过综合 RNF180 和 Septin9 的甲基化检测结果来对个体中细胞增殖性异常进行检测。

14. 如权利要求 13 所述的方法,其还包括:

使用试剂以将基因的 5 位未甲基化的胞嘧啶碱基转化为尿嘧啶或在杂交性能方面可检测地不同于胞嘧啶的其他碱基;使所述经试剂处理的 Septin9 和 RNF180 基因或其片段与扩增酶和引物接触,使得所述经处理的基因或片段被扩增以产生扩增产物或不被扩增;

用探针检测扩增产物;以及

基于所述扩增物是否存在,确定 Septin9 和 RNF180 的基因 DNA 序列的至少一个 CpG 二核苷酸的甲基化程度。

15. 如权利要求 14 所述的方法,所述引物包括 RNF180 的核苷酸长片段,所述 RNF180 的核苷酸长片段包含等同于、互补于或在中等严谨或严谨条件下杂交于选自 SEQ ID No :10 至 SEQ ID No :12 的至少 15 个核苷酸及其互补序列。

16. 如权利要求 15 所述的方法,所述 RNF180 的核苷酸长片段包含等同于、互补于或在中等严谨或严谨条件下杂交于选自 SEQ ID No :1 至 SEQ ID No :9 的序列及其互补序列。

17. 如权利要求 14 所述的方法,其中用人造甲基化模板和非甲基化模板筛选所述引物和探针。

18. 如权利要求 14 所述的方法,其中用癌症和正常 DNA 做模板筛选所述引物和探针。

19. 如权利要求 13 所述的方法,其中所述个体的生物样品选自细胞系、组织学切片、组

织活检 / 石蜡包埋的组织、体液、粪便、结肠流出物、尿、血浆、血清、全血、分离的血细胞、从血液中分离的细胞,或其组合。

20. 如权利要求 19 所述的方法,其中所述个体的生物样品为血浆。

21. 如权利要求 14 所述的方法,其中所述 Septin9 和 RNF180 的基因 DNA 序列的至少一个 CpG 二核苷酸的甲基化状态是由聚合酶链式反应的循环阈值 Ct 值确定的。

22. 如权利要求 13 至 21 中任一项所述的方法,其中所述细胞增殖性异常是癌症。

23. 如权利要求 22 所述的方法,其中所述癌症是胃癌。

24. 一种组合物在制备用于对个体的疾病程度进行分级的试剂盒中的用途,所述组合物包括用于检测 RNF180 基因及其片段中至少一个靶区域内甲基化程度的核酸,通过 RNF180 的甲基化检测结果来对疾病程度进行分级。

25. 如权利要求 24 所述的用途,所述组合物进一步包括用于检测 Septin9 基因及其片段中至少一个靶区域内甲基化程度的核酸,通过综合 RNF180 和 Septin9 的甲基化检测结果来对疾病程度进行分级。

26. 如权利要求 24 所述的用途,所述核酸包括 RNF180 的至少 15 个寡核苷酸长片段,其中所述寡核苷酸包含至少一个 CpG 二核苷酸序列。

27. 如权利要求 26 所述的用途,所述 RNF180 的核苷酸长片段包含等同于、互补于或在中等严谨或严谨条件下杂交于选自 SEQ ID No :10 至 SEQ ID No :12 的至少 15 个核苷酸及其互补序列。

28. 如权利要求 27 所述的用途,所述 RNF180 的核苷酸长片段包含等同于、互补于或在中等严谨或严谨条件下杂交于选自 SEQ ID No :1 至 SEQ ID No :9 的序列及其互补序列。

29. 如权利要求 24 所述的用途,所述组合物还包括将基因的 5 位未甲基化的胞嘧啶碱基转化为尿嘧啶或在杂交性能方面可检测地不同于胞嘧啶的其他碱基的试剂。

30. 如权利要求 29 所述的用途,所述试剂是亚硫酸氢盐。

31. 如权利要求 24-30 中任一项所述的用途,其中所述疾病程度分为三级,第一级为正常,第二级为炎症,第三级为癌症。

32. 如权利要求 31 所述的用途,其中所述炎症为胃炎,并且所述癌症为胃癌。

33. 如权利要求 32 所述的用途,其中所述胃炎可进一步分级为不易癌变的胃炎和容易癌变的胃炎。

34. 如权利要求 33 所述的用途,其中所述不易癌变的胃炎是浅表胃炎。

35. 如权利要求 33 所述的用途,其中所述容易癌变的胃炎可进一步分级为萎缩性胃炎和有肠化生胃炎。

36. 如权利要求 32 所述的用途,其中所述胃癌可进一步分级为 I、II、III、IV 期胃癌。

37. 一种对个体的疾病程度进行分级的方法,包括:

确定分离自所述个体的生物样品中 RNF180 基因及其片段中至少一个靶区域内甲基化程度,通过 RNF180 的甲基化检测结果来对疾病程度进行分级。

38. 如权利要求 37 所述的方法,还包括

确定分离自所述个体的生物样品中 Septin9 基因及其片段中至少一个靶区域内的甲基化程度,通过综合 RNF180 和 Septin9 的甲基化检测结果来对疾病程度进行分级。

39. 如权利要求 38 所述的方法,其还包括:

使用试剂以将基因的 5 位未甲基化的胞嘧啶碱基转化为尿嘧啶或在杂交性能方面可检测地不同于胞嘧啶的其他碱基 ;使所述经试剂处理的 Septin9 和 RNF180 基因或其片段与扩增酶和引物接触,使得所述经处理的基因或片段被扩增以产生扩增产物或不被扩增 ;

用探针检测扩增产物 ;以及

基于所述扩增物是否存在,确定 Septin9 和 RNF180 的基因 DNA 序列的至少一个 CpG 二核苷酸的甲基化程度。

40. 如权利要求 39 所述的方法,所述引物包括 RNF180 的核苷酸长片段,所述 RNF180 的核苷酸长片段包含等同于、互补于或在中等严紧或严紧条件下杂交于选自 SEQ ID No :10 至 SEQ ID No :12 的至少 15 个核苷酸及其互补序列。

41. 如权利要求 40 所述的方法,所述 RNF180 的核苷酸长片段包含等同于、互补于或在中等严紧或严紧条件下杂交于选自 SEQ ID No :1 至 SEQ ID No :9 的序列及其互补序列。

42. 如权利要求 39 所述的方法,其中用人造甲基化模板和非甲基化模板筛选所述引物和探针。

43. 如权利要求 39 所述的方法,其中用癌症和正常 DNA 做模板筛选所述引物和探针。

44. 如权利要求 37 所述的方法,其中所述个体的生物样品选自细胞系、组织学切片、组织活检 / 石蜡包埋的组织、体液、粪便、结肠流出物、尿、血浆、血清、全血、分离的血细胞、从血液中分离的细胞,或其组合。

45. 如权利要求 44 所述的方法,其中所述个体的生物样品为血浆。

46. 如权利要求 39 所述的方法,其中所述 Septin9 和 RNF180 的基因 DNA 序列的至少一个 CpG 二核苷酸的甲基化状态是由聚合酶链式反应的循环阈值 Ct 值确定的。

47. 如权利要求 37 至 46 中任一项所述的方法,其中所述疾病程度分为三级,第一级为正常,第二级为炎症,第三级为癌症。

48. 一种核酸,所述核酸包括等同于、互补于或在中等严紧或严紧条件下杂交于选自 SEQ ID No :10 至 SEQ ID No :12 的至少 15 个核苷酸及其互补序列。

49. 如权利要求 48 所述的核酸,所述核酸包括等同于、互补于或在中等严紧或严紧条件下杂交于选自 SEQ ID No :1 至 SEQ ID No :9 的序列及其互补序列。

50. 如权利要求 48 或 49 所述的核酸,用作检测 RNF180 基因及其片段中至少一个靶区域内甲基化程度的引物和 / 或探针。

51. 一种组合物,包含如权利要求 48 或 49 所述的核酸,还包括将基因的 5 位未甲基化的胞嘧啶碱基转化为尿嘧啶或在杂交性能方面可检测地不同于胞嘧啶的其他碱基的试剂。

52. 如权利要求 51 所述的组合物,所述试剂是亚硫酸氢盐。

53. 一种包含如 51 至 52 中任一项所述的组合物的试剂盒。

54. 如权利要求 53 所述的试剂盒,包括用于容纳患者生物样品的容器。

55. 如权利要求 53 所述的试剂盒,包括使用和解释试剂盒结果的说明。

用于检测细胞增殖性异常或疾病程度分级的基因组合物及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及基因检测,尤其涉及一种基因组合物及其将该基因组合物用于检测个体中细胞增殖性异常或疾病程度的分级。

背景技术

[0002] 细胞增殖性异常性疾病,例如癌症是一个主要的公共健康难题,在美国,因癌症死亡的人数约占总死亡人数的25%。其中,胃癌是全世界排名第四个最普遍被诊断的癌症,而且在所有癌症中死亡率排名第二高,被视为全世界最大的健康克星之一。尤其在很多亚洲国家,包括在中国,胃癌在各种恶性肿瘤中居首位,其发病率和死亡率均很高。

[0003] 而胃炎是胃粘膜炎症的统称,其常见于成人,许多病因可刺激胃,如饮食不当,病毒和细菌感染、药物刺激等均可能引发,但比较容易纠正和治疗。

[0004] 但是胃炎症状和胃癌的症状一般容易混淆,使得日常生活中很多人常把胃炎误认为是胃癌,整天担惊受怕,即便是不严重的病疾,也会因心理作用,持续恶化;有些人则把胃癌误当成胃炎,不把它当一回事,以为不严重,错失了治疗的最佳时机。

[0005] 因此,急需一种灵敏度高和特性高的检测方法以便于区分正常、胃炎和胃癌,尤其急需一种灵敏度和特异性高,而且无痛的检测方法。

[0006] 而随着生物科技的不断发展,利用基因检测来诊断疾病的方法受到了广泛的瞩目。其中DNA甲基化是表观遗传学的重要组成部分,不仅在维持正常细胞功能,而且在癌症和炎症发生中也起着重要的作用,即甲基化状态的改变是引起癌症和炎症的一个重要因素,这种变化包括基因组整体甲基化程度降低和CpG岛局部甲基化程度的异常升高,从而导致基因组的不稳定和抗病基因的不表达。如果抗病基因中有活性的等位基因失活,则发生癌症以及炎症的机率提高。因此,甲基化的研究,为癌症和炎症的早期预测、分类、分级及预后评估提供了新的依据,是目前的研究热点之一。

发明内容

[0007] 因此,本发明提出了一种用于通过检测DNA甲基化程度来对个体中细胞增殖性异常进行检测或对疾病程度(例如胃癌和胃炎)进行分级的基因组合物、试剂盒及其用途,以及该基于该试剂盒来执行检测的方法。

[0008] 相应地,根据本发明的第一个方面,提供了一种组合物,包括用于检测RNF180和Septin9基因及其片段中至少一个靶区域内甲基化程度的核酸。

[0009] 典型地,所述核酸包括RNF180的至少15个寡核苷酸长片段,其中所述寡核苷酸包含至少一个CpG二核苷酸序列。

[0010] 根据某些优选实施方式,所述RNF180的核苷酸长片段包含等同于、互补于或在中等严谨或严谨条件下杂交于选自SEQ ID No:10至SEQ ID No:12的至少15个核苷酸及其互补序列。

[0011] 进一步优选的,所述 RNF180 的核苷酸长片段包含等同于、互补于或在中等严紧或严紧条件下杂交于选自 SEQ ID No :1 至 SEQ ID No :9 的序列及其互补序列。

[0012] 典型地,所述组合物还包括将基因的 5 位未甲基化的胞嘧啶碱基转化为尿嘧啶或在杂交性能方面可检测地不同于胞嘧啶的其他碱基的试剂。优选的,所述试剂是亚硫酸氢盐。

[0013] 根据本发明的第二个方面,还提供了包括上述组合物的试剂盒。

[0014] 典型地,所述的试剂盒包括用于容纳患者生物样品的容器。

[0015] 并且,所述的试剂盒也可包括使用和解释试剂盒结果的说明。

[0016] 根据本发明的第三个方面,还提供了所述组合物在制备用于检测个体中细胞增殖性异常的试剂盒中的用途。

[0017] 典型地,所述细胞增殖性异常是癌症。优选地,所述癌症是胃癌。

[0018] 根据本发明的第四个方面,还提供了一种对个体中细胞增殖性异常进行检测的方法,所述方法包括:确定分离自所述个体的生物样品中 RNF180 和 Septin9 基因及其片段中至少一个靶区域内甲基化程度,通过综合 RNF180 和 Septin9 的甲基化检测结果来对个体中细胞增殖性异常进行检测。

[0019] 典型地,所述方法还包括使用试剂以将基因的 5 位未甲基化的胞嘧啶碱基转化为尿嘧啶或在杂交性能方面可检测地不同于胞嘧啶的其他碱基;使所述经试剂处理的 Septin9 和 RNF180 基因或其片段与扩增酶和引物接触,使得所述经处理的基因或片段被扩增以产生扩增产物或不被扩增;用探针检测扩增产物;以及基于所述扩增物是否存在,确定 Septin9 和 RNF180 的基因 DNA 序列的至少一个 CpG 二核苷酸的甲基化程度。

[0020] 典型地,所述引物包括 RNF180 的核苷酸长片段,所述 RNF180 的核苷酸长片段包含等同于、互补于或在中等严紧或严紧条件下杂交于选自 SEQ ID No :10 至 SEQ ID No :12 的至少 15 个核苷酸及其互补序列。

[0021] 优选的,所述 RNF180 的核苷酸长片段包含等同于、互补于或在中等严紧或严紧条件下杂交于选自 SEQ ID No :1 至 SEQ ID No :9 的序列及其互补序列。

[0022] 其中,优选的,用人造甲基化模板和非甲基化模板筛选所述引物和探针;或者,用癌症和正常 DNA 做模板筛选所述引物和探针。

[0023] 典型地,所述个体的生物样品选自细胞系、组织学切片、组织活检/石蜡包埋的组织、体液、粪便、结肠流出物、尿、血浆、血清、全血、分离的血细胞、从血液中分离的细胞,或其组合。

[0024] 优选的,所述个体的生物样品为血浆。

[0025] 根据某些优选实施方式,所述 Septin9 和 RNF180 的基因 DNA 序列的至少一个 CpG 二核苷酸的甲基化状态是由聚合酶链式反应的循环阈值 Ct 值确定的。

[0026] 典型地,所述细胞增殖性异常是癌症。优选地,所述癌症是胃癌。

[0027] 相应地,根据本发明的另一个方面,提供了一种组合物在制备用于对个体的疾病程度进行分级的试剂盒中的用途,所述组合物包括用于检测 RNF180 基因及其片段中至少一个靶区域内甲基化程度的核酸,通过 RNF180 的甲基化检测结果来对疾病程度进行分级。

[0028] 根据本发明的某些优选实施方式,所述组合物进一步包括用于检测 Septin9 基因及其片段中至少一个靶区域内甲基化程度的核酸,通过综合 RNF180 和 Septin9 的甲基化检

测结果来对疾病程度进行分级。

[0029] 典型地,所述核酸包括 RNF180 的至少 15 个寡核苷酸长片段,其中所述寡核苷酸包含至少一个 CpG 二核苷酸序列。

[0030] 优选的,所述 RNF180 的核苷酸长片段包含等同于、互补于或在中等严紧或严紧条件下杂交于选自 SEQ ID No :10 至 SEQ ID No :12 的至少 15 个核苷酸及其互补序列。

[0031] 进一步优选的,所述 RNF180 的核苷酸长片段包含等同于、互补于或在中等严紧或严紧条件下杂交于选自 SEQ ID No :1 至 SEQ ID No :9 的序列及其互补序列。

[0032] 典型地,所述组合物还包括将基因的 5 位未甲基化的胞嘧啶碱基转化为尿嘧啶或在杂交性能方面可检测地不同于胞嘧啶的其他碱基的试剂。优选的,所述试剂是亚硫酸氢盐。

[0033] 典型地,所述疾病程度分为三级,第一级为正常,第二级为炎症,第三极为癌症。在某些优选实施方式中,所述炎症为胃炎,并且所述癌症为胃癌。优选地,所述胃炎可进一步分级为不易癌变的胃炎和容易癌变的胃炎。所述不易癌变的胃炎是浅表胃炎。进一步优选地,所述容易癌变的胃炎可进一步分级为萎缩性胃炎和有肠化生胃炎。进一步优选地,所述胃癌可进一步分级为 I、II、III、IV 期胃癌。

[0034] 根据本发明的另一方面,提供了一种对个体的疾病程度进行分级的方法,包括:确定分离自所述个体的生物样品中 RNF180 基因及其片段中至少一个靶区域内甲基化程度,通过 RNF180 的甲基化检测结果来对疾病程度进行分级。

[0035] 典型地,所述方法还包括:确定分离自所述个体的生物样品中 Septin9 基因及其片段中至少一个靶区域内的甲基化程度,通过综合 RNF180 和 Septin9 的甲基化检测结果来对疾病程度进行分级。

[0036] 根据某些优选实施方式,所述方法还包括:使用试剂以将基因的 5 位未甲基化的胞嘧啶碱基转化为尿嘧啶或在杂交性能方面可检测地不同于胞嘧啶的其他碱基;使所述经试剂处理的 Septin9 和 RNF180 基因或其片段与扩增酶和引物接触,使得所述经处理的基因或片段被扩增以产生扩增产物或不被扩增;用探针检测扩增产物;以及基于所述扩增物是否存在,确定 Septin9 和 RNF180 的基因 DNA 序列的至少一个 CpG 二核苷酸的甲基化程度。

[0037] 典型地,所述引物包括 RNF180 的核苷酸长片段,所述 RNF180 的核苷酸长片段包含等同于、互补于或在中等严紧或严紧条件下杂交于选自 SEQ ID No :10 至 SEQ ID No :12 的至少 15 个核苷酸及其互补序列。

[0038] 优选的,所述 RNF180 的核苷酸长片段包含等同于、互补于或在中等严紧或严紧条件下杂交于选自 SEQ ID No :1 至 SEQ ID No :9 的序列及其互补序列。

[0039] 其中,优选的,用人造甲基化模板和非甲基化模板筛选所述引物和探针;或者,用癌症和正常 DNA 做模板筛选所述引物和探针。

[0040] 典型地,所述个体的生物样品选自细胞系、组织学切片、组织活检/石蜡包埋的组织、体液、粪便、结肠流出物、尿、血浆、血清、全血、分离的血细胞、从血液中分离的细胞,或其组合。

[0041] 优选的,所述个体的生物样品为血浆。

[0042] 根据某些优选实施方式,所述 Septin9 和 RNF180 的基因 DNA 序列的至少一个 CpG 二核苷酸的甲基化状态是由聚合酶链式反应的循环阈值 Ct 值确定的。

[0043] 典型地,所述疾病程度分为三级,第一级为正常,第二级为炎症,第三级为癌症。

[0044] 根据本发明的另一方面,还提供了一种核酸,所述核酸包括等同于、互补于或在中等严紧或严紧条件下杂交于选自 SEQ ID No :10 至 SEQ ID No :12 的至少 15 个核苷酸及其互补序列。

[0045] 优选地,所述核酸包括等同于、互补于或在中等严紧或严紧条件下杂交于选自 SEQ ID No :1 至 SEQ ID No :9 的序列及其互补序列。

[0046] 在某些优选实施方式中,所述核酸用作检测 RNF180 基因及其片段中至少一个靶区域内甲基化程度的引物和 / 或探针。

[0047] 根据本发明的另一方面,还提供了一种组合物,包含所述核酸,还包括将基因的 5 位未甲基化的胞嘧啶碱基转化为尿嘧啶或在杂交性能方面可检测地不同于胞嘧啶的其他碱基的试剂。优选地,所述试剂是亚硫酸氢盐。

[0048] 根据本发明的另一方面,还提供了一种包含上述组合物的试剂盒。典型地,所述试剂盒包括用于容纳患者生物样品的容器。并且,所述试剂盒也可包括使用和解释试剂盒结果的说明。

[0049] 本申请中,通过实验发现胃炎和胃癌中的 RNF180 基因的甲基化程度存在一个较大的差异,RNF180 在正常人组、慢性浅表性胃炎组、慢性萎缩性胃炎(包括慢性胃炎并发肠化生)组、胃癌组 I 到 IV 期含量是逐渐增加的,Ct 值逐渐下降。阳性率也按同样顺序由正常人组到胃癌组逐渐上升,所以本申请提供了一种通过测试样本中的 RNF180 基因的甲基化程度来对胃癌和胃炎进行分级的方法,从而提供了一种无创的、快速的胃癌和胃炎筛选方法。

[0050] Septin9 和 RNF180 结合在一起检测胃癌,并和胃癌分期(I-IV)相关。RNF180 还能检测胃炎,分为正常组、胃炎组和胃癌组,三组之间均有显著的统计学差异。并且,RNF180 还能区别检测胃炎中有肠化生的胃炎和无肠化生的普通胃炎情况,有肠化生的 RNF180 是 100%阳性,普通胃炎约 27%阳性。

[0051] 申请人还发现:随着年龄的增长,外周血中甲基化的 RNF180 基因含量呈增高趋势,但由于年纪大的长者均多多少少会有一定程度的胃炎,难以区分是年龄的因素还是胃炎的因素导致外周血中甲基化的 RNF180 基因含量升高,从而对于胃炎和胃癌的检测的特异性和可靠性带来很大影响。因此,考虑到这一因素,在检测中同时加入 Septin9,因为 Septin9 基因受年龄和胃炎影响的因素可以忽略不计,从而可以用 Septin9 来确认胃癌的检测。具体而言,大约有 40%的胃癌是 Septin9 和 RNF180 同时阳性,用两者同时阳性做判断标准,可达到 90%的特异性。Septin9 的甲基化检测能够克服和弥补单独使用 RNF180 的甲基化检测时特异性欠佳的不足,更加如实的表明细胞增殖性异常的存在。并且,根据某些具体实施方式,一些胃癌的 RNF180 是阴性,而 Septin9 是阳性,用 Septin9 可以对这一部分的胃癌进行检测,可增加约 3%的灵敏度。Septin9 的甲基化检测能够克服和弥补单独使用 RNF180 的甲基化检测时灵敏度欠佳的不足,更加如实的表明细胞增殖性异常的存在。因此,通过联合利用 Septin9 和 RNF180 这两个生物标记物来对胃炎和胃癌进行分级,灵敏度和特异性均可以得到提高。

[0052] 最后,通过利用实时 PCR 分析血浆样本中的 DNA 的方法,能方便地实现针对 Septin9 和 RNF180 这两个生物标记物的同时间的双通道检测,并且能根据实时 PCR 的循环

阈值 (Ct) 值来快速、便捷地判断样本是否呈阳性,提供了一种无创性的快速的癌症和炎症的分级方法。

[0053] 除非另外定义,本说明书中有关技术的和科学的术语与本领域内的技术人员所通常理解的意思相同。虽然在实验或实际应用中可以应用与此间所述相似或相同的方法和材料,本文还是在下文中对材料和方法做了描述。在相冲突的情况下,以本说明书包括其中定义为准,另外,材料、方法和例子仅供说明,而不具限制性。

[0054] 本发明的其他特点和优势将由下面的具体说明和权利要求书作详细的描述。

附图说明

[0055] 本发明的上述及其他特征将通过下面结合附图及其详细描述作进一步说明。应当理解的是,这些附图仅示出了根据本发明的若干示例性的实施方式,因此不应被视为是对本发明保护范围的限制。除非特别说明,附图不必是成比例的,并且其中类似的标号表示类似的部件。

[0056] 图 1 显示在 Septin9 和 RNF180 的甲基化 DNA 多元检测中,RNF180 四组引物和探针均不影响 Septin9 的测定。

[0057] 图 2 显示 Septin9 和 RNF180 的甲基化 DNA 多元检测胃癌的阳性结果互补。

[0058] 图 3 显示 Septin9 和 RNF180 的甲基化 DNA 多元检测胃癌、胃炎和正常人的 Ct 平均值柱状图。

[0059] 图 4 显示 Septin9 和 RNF180 的甲基化 DNA 多元检测胃癌、胃炎和正常人的 Ct 值散点图。

[0060] 图 5 显示正常人、浅表、萎缩 / 肠化、胃癌 I 期、II 期、III 期、IV 期中 β -肌动蛋白的 Ct 值恒定。

[0061] 图 6 显示正常人、浅表、萎缩 / 肠化、胃癌 I 期、II 期、III 期、IV 期中 RNF180 的 dCt 值。

[0062] 图 7A-7C 分别显示正常人、浅表、萎缩 / 肠化、胃癌的 RS19 阳性率比较,胃癌 I 期、II 期、III 期、IV 期的 RS19 阳性率比较;以及正常人、胃炎、胃癌的 RS19 的 dCt 平均值柱状图。

[0063] 图 8A 显示 RNF180 甲基化含量与年龄的关系图;图 8B 显示 Septin9 和 RNF180 结合改善胃癌检测的特异性和灵敏度的示意图。

[0064] 图 9 显示 Septin9 和 RNF180 的甲基化 DNA 多元 (RS19) 检测正常、胃癌的灵敏度和特异性。

[0065] 图 10 显示 Septin9 和 RNF180 的甲基化 DNA 多元 (RS19) 检测正常、胃炎 (慢性、浅表性、溃疡性) 的灵敏度和特异性。

[0066] 图 11 显示 Septin9 和 RNF180 的甲基化 DNA 多元 (RS19) 检测正常、胃炎 (全部) 的灵敏度和特异性。

具体实施方式

[0067] 除非另有说明,本申请的实施将采用常规的分子生物学 (包括重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学和基因学技术,其均在本领域常规技术手段的范围内。在文

献中对此类技术进行了详细说明如 Molecular Cloning:A Laboratory Manual, 第二版 (Sambrook 等,1989);Oligonucleotide Synthesis(M. J.Gait,1984 版);Animal Cell Culture(R. I.Freshney,1987 版);Methods in Enzymology 丛书(美国学术出版社有限公司);Current Protocols in Molecular Biology(F. M.Ausubel 等,1987 版,和定期更新);PCR:The Polymerase Chain Reaction(Mullis 等,1994 版)。本申请中使用的引物、探针和试剂盒可以采用本领域公知的标准技术制备。

[0068] 除非另有定义,本申请所使用的技术和科学术语与本发明所属领域的普通技术人员的通常理解具有相同的含义。Singleton 等,Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 第二版,J.Wiley&Sons(New York,N.Y.1994),和 March,Advanced Organic Chemistry Reactions,Mechanisms and Structure, 第四版,John Wiley&Sons(New York,N.Y.1992),针对本申请中使用的多个术语为本领域技术人员提供了一般性的指导。

[0069] 定义

[0070] 本申请的“对疾病程度进行分级”表示根据检测结果来确定疾病的程度,从而进行分级。根据本申请,可以根据 DNA 甲基化的程度区分正常和癌症两个等级,即可以检测个体中的癌症。优选地,根据本申请,可以根据 DNA 甲基化的程度区分正常、炎症和癌症三个等级。例如,可以根据患者的样本所测的 DNA 甲基化的程度,来区分正常、胃炎和胃癌三个等级,并且对于胃炎还可以进一步区分浅表性胃炎和萎缩性胃炎。

[0071] 本申请的“癌症”表示并包括任何恶性肿瘤(malignancy)、或恶性细胞分裂或恶性肿瘤(malignant tumour),或具有不受控制的或不适当的细胞增殖的任何疾病状态,并且包括但不限于特征为不受控制的或不适当的细胞增殖的任何疾病。

[0072] 本申请的“胃癌(gastric cancer)”和“胃癌(stomach cancer)”具有相同含义,并且表示胃或胃细胞的癌症。这些癌症可以是发生于胃的内层(粘膜)并且可以发生于胃的幽门部、胃体部或贲门部(下部、体部和上部)的腺癌。

[0073] 本申请的“胃癌分期”是指可以根据胃癌的临床病理分期标准,将胃癌分为四期。其中胃癌分期涉及以下三个指标:原发肿瘤(T)、淋巴结转移情况(N)和远处转移情况(M,包括左锁骨上淋巴结转移、血行转移和腹腔种植)。“I 期”指无淋巴结转移的表浅型胃癌,或肿瘤虽已经侵及肌层但不超过一个分区 1/2;“II 期”指有第一站淋巴结转移的表浅癌、T2 癌(肿瘤侵及胃壁肌层,但大小不超过一个分区的 1/2)和 T3 癌(肿瘤侵及胃壁浆膜层,或者虽未侵及浆膜层,但病变已经超过一个分区的 1/2,但未超出一个分区),没有淋巴结转移的 T3 癌也属此期;“III 期”指有第二站淋巴结转移的各种大小肿瘤,或仅有第一站淋巴结转移甚或无淋巴结转移的肿瘤大小已经超过一个分区者;而“IV 期”指凡是伴有第三站淋巴结转移或者远处转移的,无论肿瘤大小,均属此期。

[0074] 本申请的“胃癌细胞”表示具有胃癌特征的细胞,并且包括癌症前期细胞。

[0075] 本申请的“癌症前期”表示处于转化为癌细胞的早期阶段或倾向于转化为癌细胞的细胞。这样的细胞可以表现出一种或多种具有癌细胞特征的表型性状。

[0076] 本申请的“胃炎”表示任何病因引起的胃黏膜炎症,常伴有上皮损伤和细胞再生。胃炎是最常见的消化系统疾病之一,一般按照临床发病的缓急分为急性胃炎和慢性胃炎。而慢性胃炎一般分为以下几个类型:炎症病变比较表浅,局限在胃粘膜表面一层(不超过

三分之)者,称作“浅表性胃炎”,而如果发展成胃部溃疡的话,就变成了“溃疡性胃炎”;而炎症病变波及胃粘膜的全层,并伴有胃腺体萎缩者,则为“萎缩性胃炎”。其中,在萎缩性胃炎患者中,病理活检发现胃黏膜有“结肠型不完全性肠上皮化生”和“不典型增生”这两种病变者,有可能发展成胃癌。所谓肠上皮化生(简称肠化),是指胃黏膜腺体中出现了正常时不应该有的小肠或结肠的腺体,即肠腺迁居胃内。肠化数量越多,萎缩程度也就越重。浅表性胃炎和溃疡性胃炎可以统称为“轻度胃炎”;而“萎缩性胃炎”和“肠化性胃炎”则可以统称为重度胃炎。

[0077] 本申请中的“生物标记物”指的是一种诸如基因的物质、与疾病相关的变量测定,可以作为那个疾病的指示因子或预测因子。疾病的存在或风险可以从生物标记物这个参数推断出来,不需要测定疾病本身。

[0078] 本申请中的“核酸”、“核酸序列”等等,指的是聚核苷酸,可以是 gDNA、cDNA 或 RNA,也可以是单链或双链的。术语也包括肽核酸(PNA),或任何化学的 DNA 类或 RNA 类物质。“cDNA”指的是从天然生成的 mRNA 复制的 DNA。“gDNA”指的是基因组 DNA。也可以使这些物质的组合(即部分是 gDNA 和部分是 cDNA 的重组核酸)。

[0079] 本申请中的“可操作地结合”、“可操作地连接”指的是功能上结合核酸序列。

[0080] 本申请中的“严紧杂交条件”和“高度严紧”指的是探针与其靶子序列杂交的条件,典型的在核酸复杂的混合物中。严紧的条件是依赖于序列的,并且在不同的环境下是不同的。较长的序列在较高的温度中特异性的杂交。关于核酸杂交的详细指导可以参考 Tijssen,生物化学和分子生物学技术-核酸探针杂交,“杂交原理和核酸试验策略的回顾”。通常,严紧条件是在限定的离子强度 pH 下低于特定核酸的熔点(T_m) 大约 5-10°C。在 T_m 的温度(在所限定的离子强度, pH 和核酸浓度)下,50%的和靶点互补的探针均衡地和靶点序列杂交。还可以通过增加去稳定剂来实现严紧条件。对于选择性或者特定的杂交,正信号为背景杂交的两倍,优选 10 倍。示例性的严紧杂交条件如下:在 50% 甲酰胺, 5x SSC 和 1% 的 SDS 的溶液在 42 摄氏度杂交,或者在 5x SSC 和 1% 的 SDS 的溶液在 65 摄氏度杂交,然后在 0.2xSSC 和 0.1% SDS 的溶液在 65 摄氏度洗涤。

[0081] 并且,如果核酸所编码的多肽是实质性相似的话,即使不能在严紧条件下杂交的核酸仍然是实质性相似的。这种情况下,典型地,核酸在中等严紧杂交条件下进行杂交。作为示例的,“中等严紧杂交条件”包括在 40% 甲酰胺, 1M 的氯化钠和 1% 的 SDS 的溶液在 37 摄氏度杂交,并且在 1xSSC 的溶液在 45 摄氏度洗涤。本领域的普通技术人员可以很显然地在现有技术中获得对于取得获得相同的严紧度的条件的指导。对于 PCR 而言, 36 摄氏度左右的温度典型地适用于低度严紧扩增,而基于引物的长度,退火温度的范围则在 32 摄氏度至 48 摄氏度之间。对于高度严紧的 PCR 扩增,一般是在 62 摄氏度,而基于引物的长度和特异性,高度严紧杂交的退火温度的范围则在 50 摄氏度至 65 摄氏度之间。对于高度严紧和低度严紧扩增的循环条件,典型的,包括:在 90-95 摄氏度下持续变性阶段 30 秒至 2 分钟,持续退火阶段 30 秒至 2 分钟,在约 72 摄氏度下持续扩展阶段 1 至 2 分钟。关于低度和高度严紧扩增反应的工具和指导可以在现有技术中获得。

[0082] 本申请中的“寡核苷酸”指由两个或者两个以上的核苷酸构成的分子,优选为由三个以上的核苷酸构成的分子,其精确大小可以依靠许多因素,这些因素反过来又是由寡核苷酸的最终功能和用途决定的。在某些具体实施方式中,寡核苷酸可以包括 10 个核苷酸至

100 个核苷酸的长度。在某些具体实施方式中,寡核苷酸可以包括 10 个核苷酸至 30 个核苷酸的长度,或者可以具有 20 和 25 个核苷酸的长度。在一些特定的具体实施方式中,短于这些长度的寡核苷酸也是合适的。

[0083] 本申请的“引物”表示当置于能诱发与核酸链互补的引物延伸产物的合成的条件下,即在核苷酸和诸如 DNA 或 RNA 聚合酶的诱发剂的存在下并且在合适的温度和 pH 下,能够作为合成起始点的寡核苷酸,无论它是纯化的限制性消化物中天然存在的或合成产生的。引物可以是单链或双链的,并且必须足够长而使其在诱发剂的存在下能引发所需延伸产物的合成。引物的确切长度取决于多种因素,包括温度、引物来源和所用的方法。例如,为了诊断和预后应用,根据靶序列的复杂性,寡核苷酸引物通常含有至少或多于约 10、或 15、或 20、或 25 或更多个核苷酸,但是其可以含有更少核苷酸或更多核苷酸。参与确定引物合适长度的因素是本领域技术人员熟知的。

[0084] 本申请的“引物对”表示与靶 DNA 分子相反链杂交或与侧翼连接待扩增的核苷酸序列的靶 DNA 区域杂交的引物对。

[0085] 本申请的“引物位点”表示引物杂交的靶 DNA 或其它核酸的区域。

[0086] 本申请的“探针”,当涉及核酸序列时,以其通常含义使用,表示在规定条件下能与靶序列杂交并且可以用于检测该靶序列的存在的选择的核酸序列。本领域技术人员应当理解,在某些情况下,探针也可以用作引物,并且引物也可以用作探针。

[0087] 本申请的“DNA 甲基化”是指甲基添加到胞嘧啶 (C) 的 5 位,这通常(但不必须)是在 CpG(胞嘧啶之后为鸟嘌呤)二核苷酸的情况下。本文所用的“增加的甲基化程度”或“显著的甲基化程度”是指 DNA 序列中至少存在一个甲基化的 C 核苷酸,其中正常对照样品(例如从非癌细胞或组织样品提取的 DNA 样品或对 DNA 残基的甲基化进行处理的 DNA 样品)中的对应 C 是非甲基化的,在某些实施方案中,至少 2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多个 C 可以是甲基化的,其中对照 DNA 样品中的这些位置的 C 是非甲基化的。

[0088] 在实施方案中,多种不同的方法可用于检测 DNA 甲基化改变。检测 DNA 甲基化的方法包括,例如,利用 southern 或聚合酶链反应 (PCR) 分析的甲基化敏感的限制性内切核酸酶 (MSRE) 测定、甲基化特异性或甲基化敏感的 PCR (MS-PCR)、甲基化敏感的单核苷酸引物延伸 (Ms-SnuPE)、高分辨率熔解 (HRM) 分析、重亚硫酸盐测序、焦磷酸测序、甲基化特异性单链构象分析 (MS-SSCA)、组合重亚硫酸盐限制分析 (COBRA)、甲基化特异性变性梯度凝胶电泳 (MS-DGGE)、甲基化特异性熔解曲线分析 (MS-MCA)、甲基化特异性变性高效液相色谱 (MS-DHPLC)、甲基化特异性微阵列 (MSO)。这些测定可以是 PCR 分析、利用荧光标记的定量分析或 southern 印记分析。

[0089] 本申请的“甲基化测定”指确定 DNA 序列内一个或多个 CpG 二核苷酸序列的甲基化状态的任何测定。

[0090] 本申请的“生物样品”或“样品”包括诸如活检和尸检样品的组织切片、和为了组织学目的而获取的冷冻切片、或任何这些样品的处理后形式。生物样品包括血液和血液组分或产物(例如血清、血浆、血小板、红细胞等),痰液或唾液,淋巴和舌组织,诸如原代培养物、外植体和转化的细胞的培养的细胞,粪便,尿液,胃活检组织等。生物样品通常获自真核生物,所述真核生物可以是哺乳动物,可以是灵长类并且可以是人类个体。

[0091] 本申请的“活检”是指为了诊断或预后评估取出组织样品的过程,并且也指组织样

本自身。本领域已知的任何活检技术可以用于本发明的诊断和预后方法。所用的活检技术取决于待评估的组织类型（例如舌、结肠、前列腺、肾、膀胱、淋巴结、肝、骨髓、血细胞、胃组织等）等因素。代表性的活检技术包括但不限于切除活检、切去活检、针吸活检、手术活检和骨髓活检，并且可以包括结肠镜检查。多种活检技术是本领域技术人员公知的，他们需要进行很少的实验便可以从这些技术中选择并使用。

[0092] 本申请的“分离的”核酸分子表示从通常与该分离的核酸分子相关联的其它核酸分子中分离出的核酸分子。因此，“分离的”核酸分子包括但不限于这样的核酸分子：不具有在分离的核酸来源于的生物体的基因组中天然地侧翼连接该核酸的一个或两个末端的序列（例如，通过 PCR 或限制性核酸内切酶消化而产生的 cDNA 或基因组 DNA 片段）。通常将这样的分离的核酸分子引入载体（例如，克隆载体或表达载体），以便于操控或产生融合核酸分子。此外，分离的核酸分子可以包括工程化的核酸分子，例如重组的或合成的核酸分子。存在于例如核酸文库（例如 cDNA 或基因组文库）或含有限制性消化的基因组 DNA 的凝胶（例如，琼脂糖或聚丙烯酰胺）的一部分中的数百至数百万其它核酸分子中的核酸分子不被认为是分离的核酸。

[0093] 本申请的“细胞”可以是分离的，可以被包含在细胞群体中，可以在培养物中，或被包含在活的个体中，并且可以是哺乳动物细胞，且可以是人的细胞。同样，“组织”可以包括任何数目的细胞，并且可以被包含在活的个体中或可以从其中被分离出。

[0094] 本申请的“纯化的”或“基本纯化的”，当用来指核酸或多肽时，表示从它们的天然环境中分离出的核酸或多肽，使得它们占给定样品中全部核酸或多肽或有机化学物的至少约 75%、80%、85%、90% 或 95%。本文中，可以通过 SDS-PAGE 和银染评估蛋白纯度。可以通过琼脂糖凝胶和 EtBr 染色评估核酸纯度。

[0095] 本申请的“检测”表示观察生物样品中的标志物或标志物改变（例如标志物甲基化状态的改变或核酸或蛋白序列的表达水平）的任何过程，无论实际上是否检测到标志物或标志物改变。换言之，探测样品的标志物或标志物改变的行为是“检测”，即使标志物被测定为不存在或低于灵敏度水平。检测可以是定量、半定量或非定量观察，并且可以基于与一个或多个对照样品的比较。应当理解，检测本文公开的结肠癌包括检测癌症前期细胞，所述癌症前期细胞开始发展为胃癌细胞或将要发展为胃癌细胞，或具有增加的发展为胃癌细胞的倾向。检测胃癌还可以包括检测可能的死亡概率或疾病条件的可能的预后。

[0096] 本申请的“同源性”、“同一性”和“相似性”表示 2 个核酸分子之间的序列相似性。可以比较每个序列中的位置来测定“同源性”、“同一性”或“相似性”，为了比较的目的可以将所述序列进行比对。当比较的序列中的等同位置被相同碱基占据时，所述分子在该位置是相同的；当等同位点被相同或相似氨基酸（例如，在空间性质或带电性质上相似）残基占据时，所述分子可以称为在该位置是同源的（相似的）。同源性 / 相似性或同一性百分比的表达是指比较的序列所共享的位置上相同或相似氨基酸的数量的函数。“无关的”或“非同源的”序列与本发明的序列共享小于 40% 同一性，优选小于 25% 同一性。在比较 2 个序列时，残基（氨基酸或核酸）的缺失或多余残基的存在也降低同一性和同源性 / 相似性。在具体实施方案中，对于两个或更多个序列或子序列，按照使用具有下文所述的默认参数的 BLAST 或 BLAST2.0 序列比较算法进行测定或通过例如国家生物技术信息中心（National Center for Biotechnology Information (NCBI)）在线提供的手动比对和肉眼检查进行测

定,当在比较窗或指定区域上为最大对应性进行比较和比对时,如果它们的序列在规定的区域上同一性为约 60%,或约 65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高,可以认为是基本或显著同源的、相似的或同一的。该定义也涉及或可以用于测试序列的互补物。因此,在本文背景允许的程度下,例如,如果核苷酸序列可以被预测为天然存在于 DNA 双链体中,或可以以互补链中的一条或两条的形式天然存在,则与规定靶序列或其变体互补的核苷酸序列自身被视为与靶序列是“相似的”,并且当涉及“相似的”核酸序列时,包括单链序列、其互补序列、双链的链复合物、能够编码相同或相似多肽产物的序列、以及上述任意一项的任何容许的变体。相似性必须限制为单一核酸链序列的分析的情况可以包括例如细胞中特定 RNA 序列或编码序列的表达的检测和定量。该定义还包括具有缺失和 / 或添加的序列,以及具有取代的序列。在实施方案中,同一性或相似性可以是在长度为至少约 10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25 或更多核苷酸的区域上,或在长度为多于约 10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95 或多于约 100 个核苷酸的区域上。

[0097] 本申请的“扩增”表示由核酸的一个具体基因座得到多个拷贝的过程,所述核酸例如基因组 DNA 或 cDNA。可以使用多种已知手段中的任何一种实现扩增,所述手段包括但不限于聚合酶链反应 (PCR)、基于转录的扩增和链置换扩增 (SDA)。

[0098] 本申请的“标准扩增条件”是指扩增反应混合物的基本组分和循环条件,所述循环条件包括模板核酸变性、寡核苷酸引物与模板核酸退火和通过聚合酶的引物延伸以产生扩增产物的多个循环。

[0099] 本申请的“聚合酶链反应”或“PCR”表示这样的技术:变性、与引物的退火和与 DNA 聚合酶的延伸的循环被用于将靶 DNA 序列的拷贝数扩增至约 10^6 倍或更多。用于扩增核酸的聚合酶链反应过程可参见美国专利第 4,683,195 号和第 4,683,202 号。

[0100] 本申请的“基于荧光的实时 PCR”表示这样的方法:在 PCR 反应体系中加入荧光基团,利用荧光信号积累实时监测整个 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。在该 PCR 技术中,有一个很重要的概念,循环阈值,也称为 Ct 值。C 代表 Cycle, t 代表 threshold(阈值,临界值),Ct 值的含义是:每个反应管内的荧光信号到达设定阈值时所经历的循环数。例如,荧光阈值(threshold)的设定方法如下:PCR 反应的前 15 个循环的荧光信号作为荧光本底信号,荧光阈值的缺省(默认)设置是 3-15 个循环的荧光信号的标准偏差的 10 倍。

[0101] 本申请的“实时 PCR 的 cut off 值”表示针对某一个生物标记物的判断样本阴阳性的一个临界 Ct 值。根据本申请的某些具体实时方式,“临界 Ct 值(Cut Off 值)是根据一定数量的样本数据,基于统计学处理而得到的”,该临界 Ct 值可以根据所需要的灵敏度或特异性的要求不同而不同。在概述中,将对于该临界 Ct 值做进一步的举例说明。

[0102] 本申请的“灵敏度”表示从一定癌症样本中检测出癌症的比例,其计算公式为:灵敏度 = (检测到的癌症 / 所有的癌症),而“特异性”表示一定正常人样本中检测出正常的比例,其计算公式为特异性 = (未检测到的阴性 / 总的阴性)。

[0103] 本申请的“标记”或“可检测的部分”是可通过分光镜、光化学、生物化学、免疫化学、化学或其它物理手段检测的组分。例如,有用的标记包括 ^{32}P 、荧光染料、电子致密试剂、酶(例如,ELISA 中常用的酶)、生物素、地高辛或半抗原和可以被制备为可检测的蛋白,例

如,通过将放射性标记并入肽或用于检测与肽特异性反应的抗体。

[0104] 可以使用多种不同方法检测核酸分子。核酸检测方法包括,例如,PCR 和核酸杂交(例如,Southern 印迹、Northern 印迹或原位杂交)。具体而言,能够扩增靶核酸的寡核苷酸(例如,寡核苷酸引物)可以用于 PCR 反应。PCR 方法通常包括以下步骤:获得样品、从所述样品分离核酸(例如,DNA、RNA 或两者)和使所述核酸与一种或多种寡核苷酸引物接触,所述引物在能使模板核酸扩增发生的条件下特异性地与模板核酸杂交。在模板核酸的存在下,产生扩增产物。核酸扩增和扩增产物检测的条件是本领域技术人员已知的。已开发出多种对于基础 PCR 技术的改进,包括但不限于,锚定 PCR、RACE PCR、RT-PCR 和连接酶链式反应(LCR)。扩增反应中的引物对必须与模板核酸的相对链退火,并且应该彼此保持合适的距离,使得聚合酶能有效地跨过区域进行聚合并使得可以例如使用电泳来容易地检测扩增产物。例如,可以使用诸如 OLIGO(Molecular Biology Insights Inc., Cascade, Colo.) 的计算机程序来设计寡核苷酸引物,以助于设计具有相似熔解温度的引物。通常,寡核苷酸引物长度为 10-30 或 40 或 50 个核苷酸(例如,长度为 10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49 或 50 个核苷酸),但是寡核苷酸引物可以更长或更短,只要使用合适的扩增条件。

[0105] 通常使用可检测的标记实现扩增产物或杂交复合物的检测。术语“标记”,当涉及核酸时,意图包括通过将可检测的物质偶联(即,物理连接)至核酸的核酸直接标记,以及通过与直接标记了可检测的物质的另一试剂进行反应的核酸间接标记。可检测的物质包括各种酶、辅基、荧光材料、冷光材料、生物冷光材料和放射性材料。合适的酶的实例包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;合适的辅基复合物的实例包括抗生物素蛋白链菌素/生物素和抗生物素蛋白/生物素;合适的荧光材料的实例包括伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯代三嗪基胺荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白;冷光材料的实例包括鲁米诺;生物冷光材料的实例包括荧光素酶、虫荧光素和水母蛋白。间接标记的实例包括用生物素将核酸进行末端标记,使得可以用荧光标记的抗生物素蛋白链菌素检测该核酸。

[0106] 概述

[0107] 本申请提供了一种通过联合使用 Septin9 和 RNF180 基因来对癌症进行检测的方法以及相应的组合物、试剂盒以及核酸序列,从而以非侵入性地方式、高效灵敏地诊断和检测癌症。通过具体实施方式可以发现在癌症中,尤其是胃癌中,Septin9 和 RNF180 的联合使用很大程度地提高了检测的灵敏度或特异性。

[0108] 本申请还提供了一种通过使用 RNF180 基因,优选的为,联合使用 Septin9 和 RNF180 基因来对疾病程度进行分级的方法以及相应的组合物、试剂盒以及核酸序列,从而以非侵入性地方式、高效灵敏地分级癌症和炎症,尤其是分级胃癌和胃炎。

[0109] 下述为本申请的组合物、试剂盒、核酸序列以及检测方法的实施例。可以理解,考虑到上文所提供的一般性描述,可以实施多种其他的实施方式。

[0110] 在第一组实施方案中,公开了对生物样品中的细胞增殖性异常进行诊断或检测的组合物,所述组合物包括用于检测 Septin9 和 RNF180 基因及其片段中至少一个靶区域内甲基化程度的核酸。具体而言,所述组合物不仅包括用于检测 Septin9 基因及其片段中至少

一个靶区域内甲基化程度的核酸序列,还包括用于检测 RNF180 基因及其片段中至少一个靶区域内甲基化程度的核酸序列。

[0111] 本申请还公开了用于对个体的疾病程度进行分级的组合物,包括用于检测 RNF180 基因及其片段中至少一个靶区域内甲基化程度的核酸,以通过 RNF180 的甲基化检测结果来对疾病程度进行分级。优选的,所述组合物不仅包括用于检测 RNF180 基因及其片段中至少一个靶区域内是否存在甲基化的核酸序列,还包括用于检测 Septin9 基因及其片段中至少一个靶区域内是否存在甲基化的核酸序列。

[0112] 以下,将首先介绍 Septin9 基因。人类 Septin9 基因(也称为 MLL septin 样融合蛋白、MLLseptin 样融合蛋白 MSF-A、Slpa、Eseptin、Msf、septin 样蛋白卵巢/乳腺 septin(Ov/Brseptin)以及 Septin D1)位于染色体 17q25 位于叠连群 AC068594.15.1.168501 内,为 Septin 基因家族的成员。例如,SEQ ID No :13 提供了 Septin9 的富含 CpG 的启动子区域的序列。

[0113] SEQ ID No :13 序列如下所示:

[0114] CGTTACCCGAGTTGTAAAGGGCGGCTCCCTGTGTCTGCCCCGCTGCACCGATACACCGA

[0115] GCTGCGCACGGTGCCAGCGCAGGGAGAACAATGATCATCTGTCCAACGCGCCCAT

[0116] TACAGGTGAGGAACTAAGGCTCCAACCTCAATCGACGCACTCTGCCCTTTTGATTACCA

[0117] GAAAAGTAGCAGGACAGGTGTCTGTCCCGCCCTACCCCGGCCACTAAGCCGGCACC

[0118] CCGGCTCCGACCCCGGCTGTGCCCGGCGCCGCGCGGTGCCCGGCGCCGCGCCTCG

[0119] CCGGCGGGGCGCCCGGAGCGCCCGCACCTCCGCCCGCTTCCACCTGGCCGGGCCCCG

[0120] CCGCGCCCGGACTCGGGACTGGGAAGTGCGGCGACTCCCGGAACCAGCCATTGGCGCC

[0121] AGCGCGGGGAGCTGGGGGTGCAGAGCTGCGGGCGGGCGGGCCACGCAGGCGGCCCC

[0122] CACCCCGGCTGGCCTGGTCTGGTCTGGTCTGCGCTGCCGCGGGGGCGCCCCCTCC

[0123] CAGGCCCGGCGCCCGCCAGCCCCGCTCCGCCAGGTGCAGCGCAGCGCAGGGGTGGGC

[0124] GGGGGTGGGGCTCGGCGCGCACGTTACGGGGCGGGAGGGGGCGGGTCAGGGGCGG

[0125] GACCACAGCCGGCTGGGCCGGGGTTCTATGCGCATCTCCGGGGAGGGGCGGGGCGGG

[0126] GCGGGGCGGGGCGGGGCCCCGGTCCGTGCACTCCAGACGGCGGGCCGCCCCCTCTTC

[0127] CCGCCTTCTACTACCGGCCAGGATTAGCGCCCTGGGAGCGCGCGCCCCGCTGCCTCG

[0128] CCGCCACACTTTCCTGGGAGCGGCGGCCACGGAGGCACCATGAAGAAGTCTTACTCAG

[0129] GTGGGCTTCGCGCCCGGGGTGGGGAGGGGTCCGTGTCCCGGGACCAGCGCTGCTCACC

[0130] TGAGTGCCTGCGGCCGGGAGTGGCGAGGCGCCCCGGAGCTGAGCGAGTCCCCGCGGC

[0131] GGGCACACTGCAGGTCGAGTTCCTCCAGGACAGGGCCGCTGTCCGGCCGCTTTCGAC

[0132] CTGAGCCGACCGTCCCCTGCGCTGTCTCCAGCCCTTGCTCGAGTGTCCGAGGGGCTGCC

[0133] CTGGGGGACGCTCCCTCTTCTCGCCCCTTGACCCCTCGCAGGAATCGCTGACTTTCCA

[0134] GGTCCGCCGGGTGCTTTGGGTCCCTGTGCGTCTGTGTGGGTGAATGGGGTCCGGGGCTA

[0135] GGTGGAGGGGTGTCTTGGGTTCAGCCTCTAGGGCTGGTGGTCCAGGCCGAGCATCC

[0136] TTTCTTCGGATTCTTTCGGTTTCTCTCTACTTAGTGGGGCACGGGACGGCCTCCAGAT

[0137] GGGACCGTCCAGCAGCGCCAAACTTGGCGACTCGGGTTCACGTTTTGCGCTCAGGAC

[0138] GCCGCCCGC

[0139] Septin 基因家族的成员与从膜泡运输到胞质分裂的多种细胞功能相关。破坏

Septin9 的作用将导致不完全的细胞分裂, Septin9 和其它的蛋白已显示为原癌基因 MLL 的融合伴侣分子 (fusion partner), 这表明了肿瘤发生中的作用。

[0140] 用于检测 Septin9 基因及其片段中至少一个靶区域内是否存在甲基化的核酸序列包括: 等同于或互补于或在中等严紧或严紧条件下杂交于选自 SEQ ID NO:13 的连续序列的至少 9 个碱基长片段。

[0141] 而根据一种具体实施方式, 用于检测 RNF180 基因及其片段中至少一个靶区域内是否存在甲基化的核酸序列可以包括: 等同于或互补于或在中等严紧或严紧条件下杂交于由如下所示的 RNF180 的启动子区域 SEQ ID No:10 的至少 15 个核苷酸及其互补序列, SEQ ID No:10 对应于 Genbank 接入号: NMi001113561chr5163497153-63497758。其中下划线标示“转录开始位点”。

[0142] 根据某些优选实施方式, 可以基于 SEQ ID No:10 的序列, 设计引物和探针。其中适用于作为 PCR 扩增的引物和探针的序列, 可以包括任何合适的长度, 例如可以包括至少 15 个的核苷酸, 或者可以包括至少 20, 25, 30, 35, 40, 45 个或者多于 50 个的核苷酸。在这些具体实施方式中, 核酸序列可以和 SEQ ID NO:10 的序列或者其互补序列具有约 95%, 96%, 97%, 98% 或 99% 的相似性。

[0143] SEQ ID No:10 (转录开始位点的 -234bp 至 +372bp)

[0144] GATAATTTCTGTGGCTCTGGTAAGGGGATGACAAGGGAGAAAACTTTCCCACGGTTCC

[0145] GTCTGGCCCCGCGCGCTTGTCTGCCTGCGCGGGTCAAAGCCC GCGCCGCCACGCG

[0146] CGGCTCGGGTGGGAACCCGAGACGTGGGGCGAGCAGGGCCGCTGGCTGTGGCGGGC

[0147] GAGCGCCGGGGCGCCACGTCCGAGGCCGCGGGGTCGGGGCTGCAGGCACAGCTCGAG

[0148] CGCTTTCCGCGGGGTTTGGCTCCTGTCGCTTCCCGTCTCGCCGAACCGGCATCGCCGCC

[0149] GCCGGAGCCGAGCGAGTCCTCAGAGCCTGGCTGCTGGCGGCCGGGAGCGCCGGGAC

[0150] GGGGCGGAAGCCGGAGGCTCCGGGACGTGGATACAGGTAAAGCCGGCGGGTTCGGA

[0151] GTCGGGCGGGGCGCGGCGGCGCCTCTCGGAGGGACCTGGCCTCGGCCGGGCCCTA

[0152] CCCAGCCGCGGTGGCCCCGGGCCCCACGTTGGCCCAGGCGGGGACGTGCCAAGGGGCT

[0153] GGGCTAGGGTTGCCGCTGGCCTGGCCGCTCTCGCCCGGGGGCCTCAGGTGACGCGG

[0154] CCGCGGCTTAACTTTTCGCACCTGAGGCT

[0155] 而优选的, 用于检测 RNF180 基因及其片段中至少一个靶区域内是否存在甲基化的核酸序列包括: 等同于或互补于或在中等严紧或严紧条件下杂交于由如下所示 SEQ ID No:11 的至少 15 个核苷酸及其互补序列。

[0156] SEQ ID No:11 (转录开始位点的 -167bp 至 +135bp)

[0157] CGCGGCGCTTGTCTGCCTGCGCGGGTCAAAGCCC GCGCCGCCACGCGCGGCTCGG

[0158] GTGGGAACCCGAGACGTGGGGCGAGCAGGGCCGCTGGCTGTGGCGGGCGAGCGCCG

[0159] GGGCGCCACGTCCGAGGCCGCGGGGTCGGGGCTGCAGGCACAGCTCGAGCGCTTTCCG

[0160] CGGGGTTTGGCTCCTGTCGCTTCCCGTCTCGCCGAACCGGCATCGCCCGCCGGAGCC

[0161] GCAGCGAGTCCTCAGAGCCTGGCTGCTGGCGGCCGGGAGCGCCGGGACGGGGCGCGA

[0162] AGCCGGAGGCTCC

[0163] 进一步优选的, 用于检测 RNF180 基因及其片段中至少一个靶区域内是否存在甲基化的核酸序列可以包括: 等同于或互补于或在中等严紧或严紧条件下杂交于由如下所示

SEQ ID No :12 的至少 15 个核苷酸及其互补序列。

[0164] SEQ ID No :12 (转录开始位点的 -43bp 至 +135bp)

[0165] GTCCGAGGCCGCGGGGTCGGGGCTGCAGGCACAGCTCGAGCGCTTTCCGCGGGGTTTG

[0166] GCTCCTGTCTGCTTCCCGTCTCGCCGAACCGGCATCGCCGCCCGGAGCCGACGAGT

[0167] CCTCAGAGCCTGGCTGCTGGCGGCCGGGAGCGCCGGGACGGGGCGGAAGCCGGAGG

[0168] CTCC

[0169] 因此,可以设计 TaqMan 探针和引物用于检测 RNF180 基因启动子区域 (转录开始位点的 -234bp 至 +372bp) 的 DNA 甲基化,优选检测的启动子区域是转录开始位点的 -167bp 至 +135bp,更优选检测的启动子区域是转录开始位点的 -43bp 至 +135bp,用于检测的扩增子大小范围是从 66bp 至 130bp。

[0170] 例如,在某些具体实施方式中,以 SEQ ID No :12 (转录开始位点的 -43bp 至 +135bp) 为靶点区域设计用于检测 RNF180 基因及其片段中至少一个靶区域内是否存在甲基化的引物和探针。所以,根据申请,可以设计很多套探针和引物的组合,而每一套探针和引物的组合的性能可能存在差别。所以,为了筛选高效的引物和探针,本申请通过以下步骤利用人造甲基化模板和非甲基化模板,以及癌症 (例如胃癌) 和正常 DNA 做模板,对所设计的多套探针和引物组合进行了筛选 :

[0171] 1. 设计 RNF180 基因启动子区域的引物和探针。

[0172] 2. 设计人造甲基化 DNA 和非甲基化 DNA。

[0173] 3. 利用人造甲基化 DNA 和非甲基化 DNA 筛选引物和探针,人造甲基化 DNA 有扩增,人造非甲基化没有显示扩增。

[0174] 4. 利用从正常白细胞 DNA 中提取的 DNA 筛选引物和探针。

[0175] 5. 如果在正常人白细胞 DNA 中没有扩增或扩增很少,那么利用从人胃癌组织中提取的 DNA 筛选引物和探针。

[0176] 6. 从临床研究阶段正常血浆中提取的 DNA 筛选引物和探针。

[0177] 7. 如果在临床研究阶段正常血浆中没有扩增或扩增很少,那么利用从胃癌病人中提取的 DNA 筛选引物和探针。

[0178] 通过上述筛选,构建了以下序列 SEQ ID NO:1-9 作为引物和探针 :

[0179] 引物 :SEQ ID No1 (180F7) 5' -GTTCGAGGTCGCGGGGTC-3'

[0180] 探针 :SEQ ID No2 (180P7) 5' -CAL Fluor Red-AACGCTCGAACTATACCTACAACCCC-BHQ2-3'

[0181] 引物 :SEQ ID No3 (180R7) 5' -ACAAAAACCAAACCCCGCG-3'

[0182] 引物 :SEQ ID No4 (180F24) 5' -GCGGGGTTTGGTTTTTTGT-3'

[0183] 探针 :SEQ ID No5 (180P2) 5' -CAL Fluor Red-CCGACGACGACGATACCG-BHQ2-3'

[0184] 引物 :SEQ ID No6 (180R2) 5' -ACAACCAAACCTCTAAAAACTCG-3'

[0185] 探针 :SEQ ID No7 (180P14) 5' -CAL Fluor Red-CGTCCGAGTCGTAGCGAGTTT-BHQ2-3'

[0186] 引物 :SEQ ID No8 (180R135) 5' -AAAACCTCCAACCTCACACCC-3'

[0187] 引物 :SEQ ID No9 (180R14) 5' -CGCCAACAACCAAACCTCTAA-3'

[0188] 进一步,申请人根据所筛选的上述引物和探针,设计了至少一个的引物和探针组

合,其中优选为以下四个组合:

[0189] A、引物和探针组合 1(扩增子 66bp,转录开始位点的 -43bp 至 +23b)

[0190] SEQ ID No1 (180F7)5'-GTTTCGAGGTCGCGGGGTC-3'

[0191] SEQ ID No2 (180P7)5'-CAL Fluor Red-AACGCTCGAACTATACCTACAACCCC-BHQ2-3'

[0192] SEQ ID No3 (180R7)5'-ACAAAAACCAAACCCCGCG-3'

[0193] B、引物和探针组合 2(扩增子 86bp,转录开始位点的 +5bp 至 +91bp)

[0194] SEQ ID No4 (180F24)5'-GCGGGGTTTGGTTTTTGT-3'

[0195] SEQ ID No5 (180P2)5'-CAL Fluor Red-CCGACGACGACGATACCG-BHQ2-3'

[0196] SEQ ID No6 (180R2)5'-ACAACCAAACCTCTAAAAACTCG-3'

[0197] C、引物和探针组合 3(扩增子 130bp,转录开始位点的 +5bp 至 +135bp)

[0198] SEQ ID No4 (180F24)5'-GCGGGGTTTGGTTTTTGT-3'

[0199] SEQ ID No7 (180P14)5'-CAL Fluor Red-CGTCCGAGTCGTAGCGAGTTT-BHQ2-3'

[0200] SEQ ID No8 (180R135)5'-AAAACCTCCAACCTCACACCC-3'

[0201] D、引物和探针组合 4(扩增子 91bp,转录开始位点的 +5bp 至 +96bp)

[0202] SEQ ID No4 (180F24)5'-GCGGGGTTTGGTTTTTGT-3'

[0203] SEQ ID No7 (180P14)5'-CAL Fluor Red-CGTCCGAGTCGTAGCGAGTTT-BHQ2-3'

[0204] SEQ ID No9 (180R14)5'-CGCCAACAACCAAACCTCTAA-3'

[0205] 以下进一步阐明了上述这些引物和探针组合与上述基因序列的结合位点(其中相同形状的下划线表示对应部分)。

[0206] A、引物和探针组合 1(扩增子 66bp,转录开始位点的 -43bp 至 +23bp)

[0207] GATAATTTCTGTGGCTCTGGTAAGGGGATGACAAGGGAGAAAACTTTCCACGGTTCCGTCTGGCCCCGGCGCTTGT

[0208] CTGCCTGCGCGGGTCAAAGCCCGGCGCCGCCACGCGCGGCTCGGGTGGGAACCCGCAGACGTGGGGCG

[0209] 结合位点示意:

[0210] SEQ ID No1(180F7)5'-GTTTCGAGGTCGCGGGGTC-3'

[0211] AGCAGGGCCGCTGGCTGTGGCGGGCGAGCGCCGGGGCGCCACGTCCGAGGCCGCGGGGTC GGGGCTGCAGGC

[0212] SEQ ID No2(180P7)5'-CAL Fluor Red-AACGCTCGAACT

[0213] ATACCTACAACCCC-BHQ2-3'

[0214] ACAGCTCGAGCGCTTTC CGCGGGGTTTGGCTCCTGT CGCTTCCCGTCTCGCCGAACCGGCATCGCCGCCCGGAG

[0215] 5'-ACAAAAACCAAACCCCGCG-3' SEQ ID No3(180R7)

[0216] CCGCAGCGAGTCCTCAGAGCCTGGCTGTGGCGGCCGGGAGCGCCGGGACGGGGCGGAAGCCGAGGCTCCGGGAC

[0217] GTGGATACAGGTAAGGCCGGCGGGTGGAGTCGGGCGGGGCGGGCGGGCGCCCTCTCGGAGGGACCTGGCCTCG

[0218] GCCGGGCCCTACCCAGCCGCGGTGGCCCGGGCCCCACGTTGGCCAGGCGGGACGTGCCAAGGGGCTGGGCTAGG

[0219] GTTGCCGCTGGCCTGGCCGCTCTGCCCGGGCGGCTCAGGTGACGCGCGGGCTTAACTTTCCGACCTGAGGCT

[0220] B、引物和探针组合 2(扩增子 86bp,转录开始位点的 +5bp 至 +91bp)

[0221] GATAATTTCTGTGGCTCTGGTAAGGGGATGACAAGGGAGAAAACTTTCCACGGTTCCGTCTGGCCCCGGCGCTTGT

[0222] CTGCCTGCGCGGGTCAAAGCCCGGCGCCGCCACGCGCGGCTCGGGTGGGAACCCGCAGACGTGGGGCG

[0223] AGCAGGGCCGCTGGCTGTGGCGGGCGAGCGCCGGGGCGCCACGTCCGAGGCCGCGGGTCCGGGCTGCAGGC

[0224] 结合位点示意:

[0225] BHQ2-3' SEQ ID No5(180P2)

- [0226] SEQ ID No4(180F24)5' -GCGGGGTTTGGTTTTTGT-3' 5' -CAL Fluor Red-CCGACGACGACGATACCG-
- [0227] ACAGCTCGAGCGCTTTC GCGGGGTTTGGCTCCTGT CGCTTCCCGTCTCGCCGAACCGGCATCGCCGCCCGGAG
- [0228] CCGCAG CGAGTCTCAGAGCCTGGCTGC TGGCGGCCGGGAGCGCCGGACGGGGCGGAAGCCGGAGGCTCCG
- [0229] 5' - ACAACCAAACCTCTAAAAACTCG -3' SEQ ID No6(180R2)
- [0230] GGACGTGGATACAGGTAAGGCCGGCGGGTTCGGAGTCGGGCGGGGCGCGCGGGCGGCGCTCTCGGAGGGACCTGGC
- [0231] CTCGGCCGGGCCCTACCCAGCCGCGGTGGCCCGGGCCCCACGTTGGCCCAGGCGGGGACGTGCCAAGGGGCTGGGC
- [0232] TAGGGTTGCCGCTGGCCTGGCCGCTCTCGCCCGGGGCGCTCAGGTGACGCGGCCGGCTTAACTTTCGCACCTGA
- [0233] GGCT
- [0234] C、引物和探针组合 3(扩增子 130bp,转录开始位点的 +5bp 至 +135bp)
- [0235] GATAATTTCTGTGGCTCTGGTAAGGGATGACAAGGGAGAAAACTTCCACGGTTCGTCTGGCCCGGGCGCTTGT
- [0236] CTGCCTGCGCGGGTCAAAGCCCGGCGCCCGCCACGCGCGGCTCGGGTGGGAACCCGCAGACGTGGGGCG
- [0237] AGCAGGGCCGCTGGCTGTGGCGGGGAGCGCCGGGGCGCCACGTCCGAGGCCGCGGGTTCGGGGCTGCAGGC
- [0238] 结合位点示意：
- [0239] SEQ ID No4(180F24)5' -GCGGGGTTTGGTTTTTGT-3' SEQ ID No7(180P14)5' - CGTCGGAG
- [0240] ACAGCTCGAGCGCTTTCGGGGGTTTGGCTCCTGTGCTTCCCGTCTCGCCGAACCGGCATCGCCG CGCCGGAG
- [0241] TCGTAGCGAGTTT -BHQ2-3'
- [0242] CCGCAGCGAGTCCTCAGAGCCTGGCTGCTGGCGCCGGGAGCGCCGGACG GGGCGCGAAGCCGGAGGCTCCG
- [0243] SEQ ID No8(180R135)5' - AAAACCTCCAACCTTCACACCC -3'
- [0244] GGACGTGGATACAGGTAAGGCCGGCGGGTTCGGAGTCGGGCGGGGCGCGCGGGCGGCGCTCTCGGAGGGACCTGGC
- [0245] CTCGGCCGGGCCCTACCCAGCCGCGGTGGCCCGGGCCCCACGTTGGCCCAGGCGGGGACGTGCCAAGGGGCTGGGC
- [0246] TAGGGTTGCCGCTGGCCTGGCCGCTCTCGCCCGGGGCGCTCAGGTGACGCGGCCGGCTTAACTTTCGCACCTGA
- [0247] GGCT
- [0248] D、引物和探针组合 4(扩增子 91,转录开始位点的 +5bp 至 +96bp)
- [0249] GATAATTTCTGTGGCTCTGGTAAGGGATGACAAGGGAGAAAACTTCCACGGTTCGTCTGGCCCGGGCGCTTGT
- [0250] CTGCCTGCGCGGGTCAAAGCCCGGCGCCCGCCACGCGCGGCTCGGGTGGGAACCCGCAGACGTGGGGCG
- [0251] AGCAGGGCCGCTGGCTGTGGCGGGGAGCGCCGGGGCGCCACGTCCGAGGCCGCGGGTTCGGGGCTGCAGGC
- [0252] 结合位点示意：
- [0253] SEQ ID No4(180F24)5' -GCGGGGTTTGGTTTTTGT-3' SEQ ID
- No7(180P14)5' - CGTCGGAG
- [0254] ACAGCTCGAGCGCTTTCGGGGGTTTGGCTCCTGTGCTTCCCGTCTCGCCGAACCGGCATCGCCG CGCCGGAG
- [0255] TCGTAGCGAGTTT -BHQ2-3'
- [0256] CCGCAGCGAGTCCTCAGAGCCTGGCTGCTGGCG GCCGGGAGCGCCGGACGGGGCGGAAGCCGGAGGCTCCG
- [0257] 5' - CGCCAACAACCAAACCTCTAA -3' SEQ ID No9(180R14)
- [0258] GGACGTGGATACAGGTAAGGCCGGCGGGTTCGGAGTCGGGCGGGGCGCGCGGGCGGCGCTCTCGGAGGGACCTGGC
- [0259] CTCGGCCGGGCCCTACCCAGCCGCGGTGGCCCGGGCCCCACGTTGGCCCAGGCGGGGACGTGCCAAGGGGCTGGGC
- [0260] TAGGGTTGCCGCTGGCCTGGCCGCTCTCGCCCGGGGCGCTCAGGTGACGCGGCCGGCTTAACTTTCGCACCTGA
- [0261] GGCT

[0262] 在某些具体实施方式中,所述组合物还包括将基因的 5 位未甲基化的胞嘧啶碱基转化为尿嘧啶或在杂交性能方面可检测地不同于胞嘧啶的其他碱基的试剂。例如,该试剂可以是亚硫酸氢盐。

[0263] 在某些具体实施方式中,所述细胞增殖性异常为癌症。例如,所述细胞增殖性异常为胃癌。

[0264] 在某些具体实施方式中,所述疾病程度分为三级,第一级为正常,第二级为炎症,第三级为癌症。优选地,所述炎症为胃炎,并且所述癌症为胃癌。

[0265] 进一步,对于在本申请上文描述的或建议的用途,在第二组实施方案中,公开了一种试剂盒,所述试剂盒包括在第一组实施方案中公开的对生物样品进行诊断或检测的组合物。对于该组合物的描述和第一组实施方案类似,在此不再重复。

[0266] 此类试剂盒可以包括被分隔成用于密封收纳一个或多个容器如小瓶、小管等的载体,每个容器均包括将在所述方法中使用的一个独立元件。例如,其中一个容器可以包括探针,其是或者可能是可检测标记的。

[0267] 典型地,本申请的试剂盒将包括用于容纳患者生物样品的容器和或使用和解释试剂盒结果的说明,具体而言,本申请的试剂盒包括从商业和用户的角度看所需的材料,包括用于容纳患者生物样品的容器、缓冲剂、稀释剂、过滤器、针头、注射器和插入包装中的使用说明书。可以在容器上使用标签,以便说明所述组分用于特定的治疗或非治疗应用,并且还可以说明是在体内或体外使用,如上文所述的那些。

[0268] 本申请的试剂盒具有多种实施方式。一个典型的实施方式是试剂盒,其包括容器、在所述容器上的标签和在所述容器内的组分;其中所述组分包括用于检测 Septin9 和 RNF180 基因及其片段中至少一个靶区域内甲基化程度的核酸,在所述容器上的标签表明可以使用所述组分评估样品的 DNA 的甲基化程度,并对如何使用本试剂盒进行说明。该试剂盒可以进一步包括一组说明和用于制备组织样品和将本申请的组合物应用于样品的材料。该试剂盒可以包括用于将基因的 5 位未甲基化的胞嘧啶碱基转化为尿嘧啶或在杂交性能方面可检测地不同于胞嘧啶的其他碱基的试剂,例如亚硫酸氢盐。

[0269] 在第三组实施方案中,公开了一种用于检测个体中细胞增殖性异常的方法,包括:确定分离自所述个体的生物样品中 RNF180 和 Septin9 基因及其片段中至少一个靶区域内甲基化程度,通过综合 RNF180 和 Septin9 的甲基化检测结果来对个体中细胞增殖性异常进行检测。

[0270] 本申请还公开了一种用于对个体的疾病程度进行分级的方法,包括:确定分离自所述个体的生物样品中 RNF180 基因及其片段中至少一个靶区域内甲基化程度,通过 RNF180 的甲基化检测结果来对疾病程度进行分级。优选的,所述方法还包括确定分离自所述个体的生物样品中 Septin9 基因及其片段中至少一个靶区域内的甲基化程度,通过综合 RNF180 和 Septin9 的甲基化检测结果来对疾病程度进行分级。

[0271] 典型地,根据本申请的方法还包括使用试剂以将基因的 5 位未甲基化的胞嘧啶碱基转化为尿嘧啶或在杂交性能方面可检测地不同于胞嘧啶的其他碱基的步骤。

[0272] DNA 的亚硫酸氢盐修饰为已知的用于评估 CpG 甲基化状态的工具。在真核细胞的 DNA 中,5-甲基胞嘧啶是最常见的共价碱基修饰。其例如在调节转录、遗传印迹以及肿瘤发生中起作用。因此确认 5-甲基胞嘧啶作为遗传信息组分有相当大的意义。但是,5-甲基胞

嘧啶不能通过测序来鉴定,因为 5-甲基胞嘧啶与胞嘧啶有相同的碱基配对行为。此外,例如在 PCR 扩增过程中,5-甲基胞嘧啶携带的表观遗传信息则完全丢失。

[0273] 最常用于分析 DNA 中 5-甲基胞嘧啶存在的方法是基于亚硫酸氢盐与胞嘧啶的特异反应,由此在随后的碱性水解后,胞嘧啶被转变为在配对行为上对应胸腺嘧啶的尿嘧啶。但重要的是,在这些条件下 5-甲基胞嘧啶保持不被修饰。结果,原始的 DNA 以此方式被转变,使得原来在其杂交行为上不能与胞嘧啶区分开的甲基胞嘧啶现在可作为仅剩的胞嘧啶被常规的已知分子生物学技术检测到,例如通过扩增和杂交。所有这些技术都基于不同的碱基配对特性,现在可被充分利用了。

[0274] 因此,典型地,本申请提供了亚硫酸氢盐技术与一种或多种甲基化测定的联合使用,用于确定 Septin9 和 RNF180 基因序列内的 CpG 二核苷酸序列的甲基化状态。基因组 CpG 二核苷酸可被甲基化或未被甲基化(或者分别称为上和下甲基化(up-and down-methylated))。但是,本发明的方法适于分析异质的生物样品,例如血液或粪便中的低浓度肿瘤细胞。因此,当分析这种样品中 CpG 位置的甲基化状态时,本领域技术人员可以使用定量测定法来确定特定 CpG 位置处的甲基化水平(例如百分比、份数、比率、比例或程度),而不是甲基化状态。相应地,术语甲基化状况或甲基化状态还应被认为是反映 CpG 位置处甲基化程度的值。除非有明确说明,术语“超甲基化”或“上甲基化”应被认为是指甲基化水平超过特定的临界值,其中所述的临界值可以是代表给定群体的平均或中值甲基化水平的值,或优选为优化的临界水平。在本文中“临界”也可指“阈值”。在本发明的上下文中,对于在选自以下序列的基因或基因组序列内的或与其有关的(例如在启动子或调节区内)所有 CpG 位置来说,术语“甲基化的”、“超甲基化的”或“上甲基化的”应被认为是包括甲基化水平高于临界值零(0)%(或其等同值)甲基化,所述序列为上述的 Septin9 和 RNF180 基因序列。

[0275] 在某些实施方式中,本申请的方法具体包括:使所述经试剂处理的 Septin9 和 RNF180 基因或其片段与扩增酶和引物接触,使得所述经处理的基因或片段被扩增以产生扩增产物或不被扩增;用探针检测扩增产物;以及基于所述扩增物是否存在,确定 Septin9 和 RNF180 的基因 DNA 序列的至少一个 CpG 二核苷酸的甲基化程度。

[0276] 并且,典型地,所述接触或扩增包括适用至少一种选自如下的方法:使用耐热 DNA 聚合酶作为所述扩增酶;使用缺乏 5'-3' 外切酶活性的聚合酶;使用聚合酶链式反应(PCR);产生带有可检测标记的扩增产物核酸分子。

[0277] 即,优选地用 PCR 方式来测定甲基化程度,诸如“基于荧光的实时 PCR 技术”(Eads 等人, *Cancer Res.* 59:2302-2306,1999)、Ms-SNuPE™(甲基化敏感的单核苷酸引物延伸)反应(Gonzalzo&Jones, *Nucleic Acids Res.* 25:2529-2531,1997)、甲基化特异性 PCR(“MSP”;Herman 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*93:9821-9826,1996;美国专利 5,786,146)以及甲基化的 CpG 岛扩增(“MCA”;Toyota 等人, *Cancer Res.* 59:2307-12,1999)等测定方法被用于测定 Septin9 和 RNF180 的基因 DNA 序列的至少一个 CpG 二核苷酸的甲基化程度。

[0278] 其中,“基于荧光的实时 PCR”测定为高通量定量甲基化测定,其使用基于荧光的实时 PCR(TaqMan₂)技术,在 PCR 步骤后不需要进一步的操作(Eads 等人, *Cancer Res.* 59:2302-2306,1999)。简言之,“基于荧光的实时 PCR”方法以基因组 DNA 的混合样品开始,该

混合样品根据标准操作（亚硫酸氢盐过程将未甲基化的胞嘧啶残基转变成尿嘧啶）在亚硫酸氢钠反应中被转变为甲基化依赖的序列差异的混合池。随后在“偏移的 (biased)”反应（采用重叠已知 CpG 二核苷酸的 PCR 引物）中进行基于荧光的 PCR。可在扩增过程水平以及在荧光检测过程水平上产生序列差别。

[0279] “基于荧光的实时 PCR”测定可以用作基因组 DNA 样品中甲基化模式的定量测试，其中序列区分发生在探针杂交水平上。在该定量方式中，在重叠特定的推定甲基化位点的荧光探针存在下，PCR 反应提供了甲基化特异的扩增。用于输入 DNA 量的无偏移对照由以下反应提供：其中引物和探针都不覆盖任何 CpG 二核苷酸。”基于荧光的实时 PCR”方法可与任何适合的探针一起使用，如“TaqMan_”、“Lightcycler_”等等。

[0280] TaqMan_ 探针为荧光“报道物”和“淬灭”分子双标记的，并被设计为特异于相对高 GC 含量区，以至于其在 PCR 循环中以比正向或反向引物高约 10°C 的温度熔解。这使得 TaqMan_ 探针在 PCR 退火 / 延伸步骤中保持充分杂交。当 Taq 聚合酶在 PCR 中酶合成新链时，其最终会遇到退火的 TaqMan_ 探针。Taq 聚合酶 5' 至 3' 内切酶活性随后将通过消化 TaqMan_ 探针而顶替它，从而释放荧光报道物分子用于采用实时荧光检测系统定量检测其现在未被淬灭的信号。

[0281] 用于“基于荧光的实时 PCR”分析的典型试剂（例如，可以在基于“基于荧光的实时 PCR”的试剂盒中找到的）可以包括，但不限于：用于特定基因（或亚硫酸氢盐处理的 DNA 序列或 CpG 岛）的 PCR 引物；TaqMan_ 或 Lightcycler_ 探针；优化的 PCR 缓冲液以及脱氧核苷酸；以及 Taq 聚合酶。

[0282] 并且，具体而言，在优选的实施方案中，所述方法包括以下步骤：

[0283] 在第一步中，获得待分析的组织样品。该来源可以是任何适合的来源，例如细胞系、组织学切片、活检组织、石蜡包埋的组织、体液、粪便、结肠流出物、尿、血浆、血清、全血、分离的血细胞、从血液分离的细胞及其所有可能的组合。优选地，DNA 的所述来源为粪便或体液，选自结肠流出物、尿、血浆、血清、全血、分离的血细胞、分离自血液的细胞。

[0284] 然后从所述样品分离基因组 DNA。可通过现有技术中的任何标准手段来分离，包括使用可商购的试剂盒。简言之，当目的 DNA 被包裹在细胞膜中时，该生物样品必须被破碎并通过酶、化学或机械手段被裂解。随后例如通过蛋白激酶 K 的消化而清除蛋白和其它的污染物。接着从溶液回收基因组 DNA。这可以通过各种方法来实现，包括盐析、有机提取或将 DNA 结合到固相支持物。对方法的选择会受到多种因素的影响，包括时间、费用和所需的 DNA 的量。

[0285] 当所述样品 DNA 未被包裹在细胞膜中时（例如来自血液样品的循环 DNA），可以使用现有技术中分离和 / 或纯化 DNA 的标准方法。这些方法包括使用蛋白降解试剂，例如离液盐，如盐酸胍或脲；或去污剂，如十二烷基磺酸钠 (SDS)、溴化氰。其它方法包括但不限于乙醇沉淀或丙醇沉淀、通过离心的真空浓缩等。本领域技术人员也可以利用装置，例如诸如超滤的滤器，硅表面或膜，磁性颗粒，聚苯乙烯颗粒，聚苯乙烯表面，带正电荷的表面以及带阳性电荷的膜，带电膜，带电表面，带电转换膜，带电转换表面。

[0286] 一旦核酸被提取，就将基因组双链 DNA 用于分析。

[0287] 在所述方法的第二步中，将所述基因组 DNA 样品处理以使得在 5' 位未甲基化的胞嘧啶碱基被转变为尿嘧啶、胸腺嘧啶或在杂交行为上不用于胞嘧啶的另一碱基。这应被理

解为本文所述的“预处理”或“处理”。

[0288] 这优选通过亚硫酸氢盐试剂处理来实现。术语“亚硫酸氢盐试剂”指包括亚硫酸氢盐、亚硫酸氢盐 (disulfite)、酸式亚硫酸盐或其组合的试剂,如这里所公开的可用于区分甲基化和未甲基化的 CpG 二核苷酸序列。所述处理在本领域中是已知的(例如 PCT/EP2004/011715,通过参考将其整体并入本文)。优选地,该亚硫酸氢盐处理在变性溶剂存在下进行,所述变性溶剂诸如但不限于正烷基二醇,尤其是二乙二醇二甲基醚 (DME),或者在二噁烷或二噁烷衍生物存在下进行。在优选的实施方案中,所述变性溶剂以 1% 至 35% (v/v) 的浓度使用。还优选该亚硫酸氢盐反应在清除剂存在下进行,例如但不限于色原烷衍生物,如 6-羟基-2,5,7,8,-四甲基色原烷 2-羧酸或三羟基苯甲酸及其衍生物,例如没食子酸(参见:PCT/EP2004/011715,将其整体通过参考并入本文)。该亚硫酸氢盐转变优选在 30°C 至 70°C 的反应温度下进行,其中在反应期间温度短时间地增加至超过 85°C (参见:PCT/EP2004/011715,将其整体通过参考并入本文)。经亚硫酸氢盐处理的 DNA 优选在定量之前进行纯化。这可通过任何现有技术中已知的方法来进行,例如但不限于超滤,优选通过 Microcon[®] (TM) 柱(由 Millipore[®] (TM) 生产)进行。

[0289] 在所述方法的第三步中,采用本发明的引物寡核苷酸以及扩增酶扩增经处理的 DNA 的片段。可在同一个反应容器中同时进行几种 DNA 片段的扩增。通常,该扩增反应采用聚合酶链式反应 (PCR) 进行。优选地,所述扩增产物的长度为 100 至 2,000 个碱基对。

[0290] 对于 Septin9 基因及其片段的甲基化的检测,利用针对 Septin9 的引物和探针,例如:

[0291] 引物:SEQ ID No14 GTAGTAGTTAGTTTAGTATTTATTTT

[0292] 引物:SEQ ID No15 CCCACCAACCATCATAT

[0293] 探针:SEQ ID No16 GAACCCCGCGATCAACGCG

[0294] 对于 RNF180 基因及其片段的甲基化的检测,利用针对 RNF180 的经上述筛选方法所筛选的引物和探针。例如,在一个优选实施方式中,可以利用上述的引物和探针组合 1、2、3、4 中的任何一种组合。

[0295] 通过扩增获得的片段可携带有可直接或间接地检测的标记物。优选的是,标记物为荧光标记物、放射性核素或可附着的分子片段的形式。

[0296] 在所述方法的第四步中,分析在所述方法的第三步中获得的扩增产物,以便确定处理之前 CpG 二核苷酸的甲基化状态。

[0297] 在第四步中,对扩增产物的检测是通过实时检测探针来进行。在本发明中,可以利用各种商业用实时 PCR 仪器设备上根据现有技术标准操作进行实时 PCR 的检测。根据某些具体实施方式,在 Life Technologies 仪器 (7500Fast) 上进行实时 PCR 的检测。PCR 反应混合物由经亚硫酸氢盐转化的 DNA 模板 25-40ng 和 300-600nM 引物、150-300nM 探针、1U Taq 聚合酶、50-400uM 的各个 dNTP、1 至 10mM 的 MgCl₂ 和 2X PCR 缓冲液至最终的 2u1 至 100u1 的体积。在 85 至 99°C 持续 3-60 分钟,以用预循环扩增样品,紧接着在 50 至 72°C 进行 1 至 30 秒的 35-55 个循环的退火,在 45 至 80°C 下退火 5 至 90 秒,在 85 至 99°C 下变性 5 至 90 秒。

[0298] 通过仅仅在甲基化的 RNF180 基因和 Septin9 基因片段上观测扩增,用与含 5-甲基胞嘧啶的 RNF180 和 Septin9 启动子区域的特异性的探针检测所述基因片段。并且,在某些具体实施方式中,以 β 肌动蛋白作为 PCR 的内参,通过使用与 β 肌动蛋白序列互补的引

物来创建 β 肌动蛋白扩增子,并且用特定的探针检测 β 肌动蛋白扩增子。每个样品进行至少一次的实时 PCR,在某些具体实施方式中,进行两次实时 PCR 检测。

[0299] 在所述方法的第五步中,分别体现所述 Septin9 和 RNF180 的基因 DNA 序列的至少一个 CpG 二核苷酸的甲基化状态是由聚合酶链式反应的循环阈值 Ct 值确定,然后进一步包括以下步骤:A) 比较所测样本的 Septin9 所对应的 PCR Ct 值与 Septin9 的预先设定的 cut 值(即临界 Ct 值),从而确定基于 Septin9 基因的分析结果是否为阳性;B) 比较所测样本的 RNF180 所对应的 PCR Ct 值与 RNF180 的预先设定的 cut 值,从而确定基于 RNF180 基因的分析结果是正常、胃炎还是胃癌(阳性);c) 综合所述 A) 和 B) 步骤的结果确定所述样本的最终分析结果是正常、胃炎还是胃癌(阳性)。

[0300] 根据本申请的具体实施方式,基于一定数量的胃癌样本和正常样本的 Septin9 和 RNF180 的平均 Ct 值,确定相对于 Septin9 和 RNF180 的胃癌、胃炎和正常的临界 Ct 值。在某些优选实施方式中,用于测量 Septin9 的基因 DNA 序列的至少一个 CpG 二核苷酸的甲基化状态的试剂盒购自 Epigenomics 公司(德国),所以可以根据 Epigenomics 说明书确定 Septin9 临界 Ct 值是 45Ct。而 RNF180 的临界 Ct 值是基于一定数量的胃癌样本、胃炎和正常样本的 RNF180 的平均 Ct 值,而确定的。而且 RNF180 的临界 Ct 值还和实际所需的灵敏度相关,灵敏度要求越高,所选的临界 Ct 值越大。

[0301] 并且,本申请还允许使用不同的方法学来分析 Ct 值。例如,使用 Δ Ct 或 dCt,肌动蛋白 Ct 作为 PCR 内部对照,Septin9Ct 减去肌动蛋白 Ct 得到 Septin9 的 dCt 值。相似地,RNF180Ct 减去肌动蛋白 Ct 得到 RNF180 的 dCt 值。相应地,如果采用 Δ Ct 或 dCt 作为检测标准,那么在所述方法的第五步中,分别体现所述 Septin9 和 RNF180 的基因 DNA 序列的至少一个 CpG 二核苷酸的甲基化状态是由聚合酶链式反应的循环阈值 Ct 值确定,然后进一步包括以下步骤:A) 比较所测样本的 Septin9 所对应的 PCR Δ Ct 值与 Septin9 的预先设定的 Δ cut 值(即临界 Ct 值),从而确定基于 Septin9 基因的分析结果是否为阳性;B) 比较所测样本的 RNF180 所对应的 PCR Δ Ct 值与 RNF180 的预先设定的 Δ cut 值,从而确定基于 RNF180 基因的分析结果是正常、胃炎还是胃癌(阳性);c) 综合所述 A) 和 B) 步骤的结果确定所述样本的最综合分析结果是正常、胃炎还是胃癌(阳性)。

[0302] 综上所述,本申请通过以上所述的组合物、核酸序列、试剂盒及其用途,以及上述检测方法,通过联合利用分别用于检测 Septin9 和 RNF180 基因及其片段的甲基化的核酸序列,使得癌症检测的灵敏度和特异性,尤其是胃癌检测的灵敏度和特异性得到了提高,从而保证了检测结果的正确性和可靠性;并且实现了联合利用 Septin9 和 RNF180 这两个生物标记物来对胃炎和胃癌进行分级,从而使得疾病分级的灵敏度和特异性均得到了提高。

[0303] 以下将详述具体的实施例。

[0304] 实施例

[0305] 实施例一:引物和探针的筛选

[0306] 因为根据某些具体实施方式,因为用于测量 Septin9 的基因 DNA 序列的至少一个 CpG 二核苷酸的甲基化状态的试剂盒购自 Epigenomics 公司(德国),所以直接就可以根据试剂盒的说明书获得针对 Septin9 的基因试验的引物和探针。而对于 RNF180 基因,可以设计很多套探针和引物的组合,而每一套探针和引物的组合的性能可能存在差别。所以在以下实施例中对于探针和引物进行了筛选。

[0307] 在本实施例中,先用人造甲基化模板和非甲基化模板对 RNF180 的引物和探针进行了筛选。本实施例包括以下步骤:

[0308] 首先,设计 RNF180 的各种引物和探针,只要其能等同于、互补于或在中等严谨或严谨条件下杂交于选自 SEQ ID No :10 至 SEQ ID No :12 的至少 15 个核苷酸及其互补序列。

[0309] 然后,用人造甲基化的寡核苷酸序列和人造非甲基化的寡核苷酸序列作为模板,使用不同的探针和引物组合进行 PCR 扩增。其中,本实施例中采取的 PCR 扩增条件为:在 Life Technologies 仪器 (7500Fast) 上进行实时 PCR。PCR 反应混合物由经亚硫酸氢盐转化的 DNA 模板 35ng 和 450nM 引物、225nM 探针、1UTaq 聚合酶、200um 的各个 dNTP、4.5mM 的 MgCl₂ 和 2XPCR 缓冲液组成至最终的 30u1 的体积。在 94℃ 保持 20 分钟用预循环扩增样品,紧接着在 62℃ 进行 5 秒的 45 个循环的退火,在 55.5℃ 下退火 35 秒,在 93℃ 下变性 30 秒。

[0310] 最后,通过 PCR 试验结果,筛选出以下 4 套合适的引物和探针:

[0311] 引物和探针组合 1 (扩增子 66bp, 转录开始位点的 -43bp 至 +23bp)

[0312] SEQ ID No1 (180F7)5' -GTTCGAGGTCGCGGGGTC-3'

[0313] SEQ ID No2 (180P7)5' -CAL Fluor Red-AACGCTCGAACTATACCTACAACCCC-BHQ2-3'

[0314] SEQ ID No3 (180R7)5' -ACAAAAACCAAACCCCGCG-3'

[0315] 引物和探针组合 2 (扩增子 86bp, 转录开始位点的 +5bp 至 +91bp)

[0316] SEQ ID No4 (180F24)5' -GCGGGGTTTGGTTTTTGT-3'

[0317] SEQ ID No5 (180P2)5' -CAL Fluor Red-CCGACGACGACGATACCG-BHQ2-3'

[0318] SEQ ID No6 (180R2)5' -ACAACCAAACTCTAAAAACTCG-3'

[0319] 引物和探针组合 3 (扩增子 130bp, 转录开始位点的 +5bp 至 +135bp)

[0320] SEQ ID No4 (180F24)5' -GCGGGGTTTGGTTTTTGT-3'

[0321] SEQ ID No7 (180P14)5' -CAL Fluor Red-CGTCGGAGTCGTAGCGAGTTT-BHQ2-3'

[0322] SEQ ID No8 (180R135)5' -AAAACCTCCAACCTCACACCC-3'

[0323] 引物和探针组合 4 (扩增子 91, 转录开始位点的 +5bp 至 +96bp)

[0324] SEQ ID No4 (180F24)5' -GCGGGGTTTGGTTTTTGT-3'

[0325] SEQ ID No7 (180P14)5' -CAL Fluor Red-CGTCGGAGTCGTAGCGAGTTT-BHQ2-3'

[0326] SEQ ID No9 (180R14)5' -CGCCAACAACCAAACTCTAA-3'

[0327] 结论:人造甲基化寡核苷酸模板有扩增,人造非甲基化寡核苷酸模板没有扩增,表明引物和探针的设计是正确的。四组引物和探针均能区别甲基化模板和非甲基化模板,都可以用作 RNF180 试验中的引物和探针。虽然不同的探针和引物的组合,效果是不同的,但是以上四组探针均适用于作为 RNF180 试验中的引物和探针。

[0328] 接着,用癌症和正常 DNA 做模板进一步筛选 RNF180 的引物和探针。

[0329] 得到 4 例胃癌 (S1-S4)、2 例肠癌 (C1-C2)、2 例肺癌 (L1-L2)、1 例血癌 (Jurkat) 和 1 例正常人 (WBC) 的样品。并提取 4 例胃癌、2 例肠癌、2 例肺癌、1 例血癌和 1 例正常人的基因组 DNA。Jurkat 细胞基因组 DNA 被用作阳性对照,正常 DNA 作为阴性对照。所有癌症样品来源于博尔诚公司。人正常样品来源于 BioReclamationIVT 公司。所述 DNA 的提取可以采用现有技术中的任何标准手段来进行,具体而言,在本实施例中,所有人样品 DNA 是通过使用 Epigenomics 公司的 EPI proColon Plasma Quick Kit 提取。

[0330] 然后,将所述基因组 DNA 样品预处理以使得在 5' 位未甲基化的胞嘧啶碱基被转变

为尿嘧啶、胸腺嘧啶或在杂交行为上不用于胞嘧啶的另一碱基。在本实施例中,通过亚硫酸氢盐试剂处理来实现该预处理。亚硫酸氢盐 DNA 的修饰是通过使用 Epi proColon Plasma Quick Kit 进行的。

[0331] 接着,上述经过预处理的 4 例胃癌、2 例肠癌、2 例肺癌、1 例血癌和 1 例正常人的基因组 DNA 样本中加入上述四组 RNF180 的引物和探针组,进行 4 组 RNF180PCR 试验,并且加入 Septin9 的引物和探针,多元地检测 RNF180PCR 试验和 Septin9PCR 试验。Septin9PCR 试剂购自 Epigenomics 公司。在经亚硫酸氢盐转化的 DNA 上进行实时 PCR。

[0332] 其中,本实验例中采取的 PCR 扩增条件为:在 Life Technologies 仪器 (7500Fast) 上进行实时 PCR。PCR 反应混合物由经亚硫酸氢盐转化的 DNA 模板 35ng 和 450nM 引物、225nM 探针、1UTaq 聚合酶、200um 的各个 dNTP、4.5mM 的 MgCl₂ 和 2XPCR 缓冲液组成至最终的 30u1 的体积。在 94℃ 保持 20 分钟用预循环扩增样品,紧接着在 62℃ 进行 5 秒的 45 个循环的退火,在 55.5℃ 下退火 35 秒,在 93℃ 下变性 30 秒。

[0333] 最后,分别测得 4 例胃癌、2 例肠癌、2 例肺癌、1 例血癌和 1 例正常人的基因组 DNA 样本对于 RNF180 基因的实时 PCR 的 Ct 值,以及 4 例胃癌、2 例肠癌、2 例肺癌、1 例血癌和 1 例正常人的基因组 DNA 样本对于 Septin9 基因的实时 PCR 的 Ct 值(如图 1 所示)。图 1 显示在 Septin9 和 RNF180 的甲基化 DNA 多元检测中,RNF180 四组引物和探针均不影响 Septin9 的测定,横坐标 SC_set1-4 表示引物和探针组 1-4,每组的柱状条从左到右依次代表 S1、S2、S3、S4、C1、C2、L1、L2、Jurkat 和 WBC,纵坐标是 Septin9 的 Ct 值,其中 S1-S4 表示 4 例胃癌,C1-C2 表示 2 例结肠癌,L1-L2 表示 2 例肺癌,Jurkat 表示 1 例血癌(阳性对照),WBC 表示 1 例正常人(阴性对照)。

[0334] 从 RNF180 基因的实时 PCR 的 Ct 值可以看出,RNF180 在癌症 DNA 有高度扩增,正常 DNA 有低度扩增。RNF180 引物和探针的特异性能区别癌症 DNA 和正常 DNA。RNF180 不同的引物和探针组合,效果是不同的。血癌 Jurkat 细胞的 DNA 有 RNF180 的极高度扩增。

[0335] 从 Septin9 基因的实时 PCR 的 Ct 值可以看出,如图 1 所示,RNF180 引物和探针在多元检测中,对 Septin9 的检测没有影响。Septin9 的引物和探针对能区别癌症 DNA 和正常 DNA,不受 RNF180 的影响。RNF180 不同的引物和探针组合,均不影响 Septin9 的测定。血癌 Jurkat 细胞的 DNA 有 RNF180 的极高度扩增,但没有 Septin9 的扩增。RNF180 和 Septin9 在不同癌症中甲基化有共性,但也有个性。

[0336] 根据上述实施例,本申请设计的 RNF180 的四组探针和引物均能区别癌症 DNA 和正常 DNA。而且在下面的实施例中,使用上述的探针和引物,进一步对正常人、胃炎患者以及胃癌患者生物样本中的 DNA 甲基化程度进行比较和分析。具体而言,为了能够利用实时 PCR 的结果对疾病程度进行分级,首先通过分析一定量的样本来确定根据不同灵敏度和特异性需要的作为对疾病程度进行分级的实时 PCR 的 Ct 的临界值,即 Cut 值。在以下实施例中,检测了反应胃癌患者、胃炎患者和正常人体的生物样本的 Septin9 和 RNF180 的甲基化 DNA 程度所对应的 Ct 值,从而为疾病程度分级(胃癌、胃炎和正常)提供判断临界值,即临界 Cut 值。

[0337] 实施例二:RNF180 和 Septin9 的甲基化 DNA 多元检测胃癌病人血浆的初步临床结果

[0338] 得到 10 例胃癌患者和 11 例健康人的样品。并提取 10 例胃癌患者和 11 例健康人

的基因组 DNA。所有癌症样品来源于博尔诚公司。人正常样品来源于 BioReclamationIVT 公司。所述 DNA 的提取可以采用现有技术中的任何标准手段来进行,具体而言,在本实施例中,所有的样品 DNA 是通过使用 Epigenomics 公司的 Epi proColon Plasma Quick Kit 提取。

[0339] 然后,将所述基因组 DNA 样品预处理以使得在 5' 位未甲基化的胞嘧啶碱基被转变为尿嘧啶、胸腺嘧啶或在杂交行为上不用于胞嘧啶的另一碱基。在本实施例中,通过亚硫酸氢盐试剂处理来实现该预处理。亚硫酸氢盐 DNA 的修饰是通过使用 Epi proColon Plasma Quick Kit 进行的。

[0340] 然后,上述经过预处理的 10 例胃癌患者和 11 例健康人的基因组 DNA 样本中加入上述第 2 组 RNF180 的引物和探针,进行 RNF180PCR 试验,并且加入 Septin9 的引物和探针,多元地检测 RNF180PCR 试验和 Septin9PCR 试验。Septin9PCR 试剂购自 Epigenomics 公司。在经亚硫酸氢盐转化的 DNA 上进行实时 PCR。

[0341] 其中,本实验例中采取的 PCR 扩增条件为:在 Life Technologies 仪器 (7500Fast) 上进行实时 PCR。PCR 反应混合物由经亚硫酸氢盐转化的 DNA 模板 35ng 和 450nM 引物、225nM 探针、1UTaq 聚合酶、200um 的各个 dNTP、4.5mM 的 MgCl₂ 和 2XPCR 缓冲液组成至最终的 30u1 的体积。在 94℃ 保持 20 分钟用预循环扩增样品,紧接着在 62℃ 进行 5 秒的 45 个循环的退火,在 55.5℃ 下退火 35 秒,在 93℃ 下变性 30 秒。

[0342] 最后,分别测得 10 例胃癌患者和 11 例健康人的基因组 DNA 样本对于 RNF180 基因的实时 PCR 的 Ct 值,以及 10 例胃癌患者和 11 例健康人的基因组 DNA 样本对于 Setptin9 基因的实时 PCR 的 Ct 值,如下表 1-3 所示。

[0343] 表 1 :Septin9 和 RNF180 的甲基化 DNA 多元检测 10 例胃癌患者

[0344]

癌症样本	Ct RNF180	Ct Septin9	关联	诊断
6/ 亚 / 男 /63 /	/	38.19	互补	阳性
35/ 亚 / 男 /58	37.62	/	互补	阳性
36/ 亚 / 女 /53	34.46	38.34		阳性
39/ 亚 / 女 /58	31.84	34.51		阳性
41/ 亚 / 男 /53	33.28	38.67		阳性
42/ 亚 / 女 /58	36.96	/	互补	阳性
43/ 亚 / 女 /56	32.90	36.03		阳性
59/ 亚 / 男 /57	34.56	38.00		阳性
61/ 亚 / 男 /69	34.71	/	互补	阳性

68/ 亚 / 女 / 49	35.15	No Ct	互补	阳性
阳性率	90%	70%		阳性

[0345] 表 2 :Septin9 和 RNF180 的甲基化 DNA 多元检测 6 例健康人

[0346]

健康人血浆	Ct RNF180	Ct Septin9
H1/ 亚 / 男 / 30	/	/
H2/ 亚 / 女 / 27	36.45	/
H3/ 亚 / 男 / 24	/	/
H4/ 亚 / 女 / 45	/	/
H5/ 亚 / 男 / 35	/	/
H6/ 亚 / 男女 / 32	/	/
特异性	83%	100%

[0347] 表 3 :Septin9 和 RNF180 的甲基化 DNA 多元检测 5 例健康人

[0348]

样品	RNF180		Septin9	
	Ct平均值	Ct SD	Ct平均值	Ct SD
#1: 西班牙/男/30	/	/	/	/
#2: 黑/男/34	/	/	/	/
#3: 黑/女/19	/	/	/	/
#4: 黑/女/31	/	/	/	/
#5: 黑/女/42	/	/	/	/
RC1	28.65	0.01	38.14	0.60
RC2	28.42	0.01	38.46	1.71
胃癌#3	29.93	0.03	29.86	0.15
水	/	/	/	/

[0349] RC1 和 RC2 都是参照。RNF180 和 Septin9 的 PCR 的 Ct 值均以 45 为临界值,超过 45 正常,低于 45 是癌症阳性。“/”表示 Ct 值超过 45。

[0350] 在 Septin9 和 RNF180 的甲基化 DNA 多元检测中, Ct 值低于 45 的是胃癌阳性,综合 Septin9 和 RNF180 的甲基化 DNA 检测的阳性结果,并使阳性结果互补。10 例胃癌患者的诊断结果均是阳性。胃癌的灵敏度达到 100%。在 11 例健康人阴性中,检测出 10 例阴性,特异性达到 91%。

[0351] 将表 1 中 10 例胃癌患者的 RNF180 和 Septin9 的 PCR 的 Ct 值用柱状图的形式表示,如图 2 所示。图 2 的横坐标是 10 例胃癌,纵坐标是 Septin9 和 RNF180 的 Ct 值。

[0352] 综合 Septin9 和 RNF180 的甲基化 DNA 检测的阳性结果,即将 Septin9 和 RNF180 的甲基化 DNA 检测的阳性结果互补,胃癌的灵敏度达到 100%。Septin9 和 RNF180 的阳性结果在诊断胃癌上是互补的。

[0353] 实施例三:RNF180 和 Septin9 的甲基化 DNA 多元检测,对胃癌、胃炎、正常人进行分级

[0354] 本实施例包括以下步骤:

[0355] 首先,得到 42 例胃癌患者、14 例胃炎患者和 11 例正常人的血浆。并且提取癌症、胃炎患者和正常人的基因组 DNA。所有癌症样品来源于博尔诚公司。人正常样品来源于 BioReclamationIVT 公司。所述 DNA 的提取可以采用现有技术中的任何标准手段来进行,具体而言,在本实施例中,所有的样品 DNA 是通过使用 Epigenomics 公司的 Epi proColon Plasma Quick Kit 提取的。

[0356] 然后,将所述基因组 DNA 样品预处理以使得在 5' 位未甲基化的胞嘧啶碱基被转变为尿嘧啶、胸腺嘧啶或在杂交行为上不用于胞嘧啶的另一碱基。在本实施例中,通过亚硫酸氢盐试剂处理来实现该预处理。亚硫酸氢盐 DNA 的修饰是通过使用 Epi proColon Plasma Quick Kit 进行的。

[0357] 然后,上述经过预处理的 42 例胃癌患者、14 例胃炎患者和 11 例正常人的基因组 DNA 样本中加入上述第 2 组 RNF180 的引物和探针,进行 RNF180PCR 试验,并且加入 Septin9 的引物和探针,多元地检测 RNF180PCR 试验和 Septin9PCR 试验。Septin9PCR 试剂购自 Epigenomics 公司。在经亚硫酸氢盐转化的 DNA 上进行实时 PCR。

[0358] 其中,本实验例中采取的 PCR 扩增条件为:在 Life Technologies 仪器 (7500Fast) 上进行实时 PCR。PCR 反应混合物由经亚硫酸氢盐转化的 DNA 模板 35ng 和 450nM 引物、225nM 探针、1UTaq 聚合酶、200um 的各个 dNTP、4.5mM 的 MgCl₂ 和 2XPCR 缓冲液组成至最终的 30u1 的体积。在 94℃ 保持 20 分钟用预循环扩增样品,紧接着在 62℃ 进行 5 秒的 45 个循环的退火,在 55.5℃ 下退火 35 秒,在 93℃ 下变性 30 秒。

[0359] 最后,分别测得 42 例胃癌患者、14 例胃炎患者和 11 例正常人的基因组 DNA 样本对于 RNF180 基因的实时 PCR 的 Ct 值,以及 42 例胃癌患者、14 例胃炎患者和 11 例正常人的基因组 DNA 样本对于 Septin9 基因的实时 PCR 的 Ct 值。然后根据所测得的 Ct 值进行统计学分析。其中附图 3 和图 4 分别为 Septin9 和 RNF180 的甲基化 DNA 多元检测胃癌、胃炎和正常人的 Ct 平均值柱状图和散点图。横坐标从左至右分别为代表 11 例正常人中的 RNF180 基因甲基化程度的 Ct 平均值、14 例胃炎患者中的 RNF180 基因甲基化程度的 Ct 平均值、42 例胃癌患者中的 RNF180 基因甲基化程度的 Ct 平均值、11 例正常人中的 Septin9 基因甲

甲基化程度的 Ct 平均值、14 例胃炎患者中的 Setptin9 基因甲基化程度的 Ct 平均值、42 例胃癌患者中的 Setptin9 基因甲基化程度的 Ct 平均值。* 表示显著差异，** 表示非常显著差异，*** 表示极其非常显著差异。

[0360] 从以上图可以看出，在 RNF180 检测中，胃癌和胃炎的 Ct 值之间具有非常显著差异，正常人和胃炎 Ct 之间有显著差异，正常人和胃癌的 Ct 之间有极其非常显著差异，从而为疾病程度分级（胃癌、胃炎和正常）提供判断临界值，即 Cut 值。这也表明了通过 RNF180 的甲基化检测结果可以对疾病程度进行分级，比如可以对胃癌、胃炎、正常人进行分级。在 Septin9 检测中，胃癌和胃炎的 Ct 值之间有显著差异，正常人和胃癌的 Ct 之间有显著差异。

[0361] 在该实施例中，当 Septin9 以 Ct 值 45 为临界值，RNF180 以 Ct 值 45 为临界值时，胃癌检测的灵敏度是 83.3%，胃炎检测的灵敏度是 64.3%，完全正常的特异性是 90.9%。当 Septin9 以 Ct 值 45 为临界值，RNF180 以 Ct 值 39 以下为胃癌、以 Ct 值 39-45 为胃炎时，胃癌的灵敏度是 78.6%，胃炎的灵敏度是 28.3%，完全正常的特异性是 90.9%。

[0362] 上述实验结果表明了通过本发明的 RNF180 和 Septin9 的甲基化 DNA 多元检测，可以对疾病程度进行分级，比如可以对胃癌、胃炎、正常人进行分级。

[0363] 实施例四：Septin9 和 RNF180 的甲基化 DNA 多元 (RS19) 检测对正常人、浅表、萎缩 / 肠化、胃癌 I 期、II 期、III 期、IV 期进行分级

[0364] 得到 15 例正常人、31 例浅表、6 例萎缩 / 肠化、19 例胃癌 I 期、20 例 II 期、22 例 III 期、10 例 IV 期的样品。提取各样品中基因组 DNA。所述 DNA 的提取可以采用现有技术中的任何标准手段来进行，具体而言，在本实施例中，所有的样品 DNA 是通过使用 Epigenomics 公司的 Epi proColon Plasma Quick Kit 提取。

[0365] 然后，将所述基因组 DNA 样品预处理以使得在 5' 位未甲基化的胞嘧啶碱基被转变为尿嘧啶、胸腺嘧啶或在杂交行为上不用于胞嘧啶的另一碱基。在本实施例中，通过亚硫酸氢盐试剂处理来实现该预处理。亚硫酸氢盐 DNA 的修饰是通过使用 Epi proColon Plasma Quick Kit 进行的。

[0366] 然后，上述经过预处理的 15 例正常人、31 例浅表、6 例萎缩 / 肠化、19 例胃癌 I 期、20 例 II 期、22 例 III 期、10 例 IV 期的基因组 DNA 样本中加入上述第 2 组 RNF180 的引物和探针，进行 RNF180PCR 试验，并且加入 Septin9、 β -肌动蛋白的引物和探针，多元地检测 RNF180PCR 试验、Septin9PCR 试验和 β -肌动蛋白 PCR 试验。Septin9PCR 试剂和 β -肌动蛋白 PCR 试剂购自 Epigenomics 公司。在经亚硫酸氢盐转化的 DNA 上进行实时 PCR。

[0367] 其中，本实验例中采取的 PCR 扩增条件为：在 Life Technologies 仪器 (7500Fast) 上进行实时 PCR。PCR 反应混合物由经亚硫酸氢盐转化的 DNA 模板 35ng 和 450nM 引物、225nM 探针、1Utaq 聚合酶、200um 的各个 dNTP、4.5mM 的 MgCl₂ 和 2XPCR 缓冲液组成至最终的 30u1 的体积。在 94℃ 保持 20 分钟用预循环扩增样品，紧接着在 62℃ 进行 5 秒的 45 个循环的退火，在 55.5℃ 下退火 35 秒，在 93℃ 下变性 30 秒。

[0368] 最后，测得 15 例正常人、31 例浅表、6 例萎缩 / 肠化、19 例胃癌 I 期、20 例 II 期、22 例 III 期、10 例 IV 期基因组 DNA 样本对于 Setptin9 基因的实时 PCR 的 Ct 值。并测得 15 例正常人、31 例浅表、6 例萎缩 / 肠化、19 例胃癌 I 期、20 例 II 期、22 例 III 期、10 例 IV 期基因组 DNA 样本对于 β -肌动蛋白的实时 PCR 的 Ct 值，如图 5 所示。从图 5 中可看出，随着正常人、浅表、萎缩 / 肠化、胃癌 I 期、II 期、III 期、IV 期病情的加重， β -肌动蛋白

(ACTB) 的 Ct 值的平均值很接近,因此 β -肌动蛋白的 Ct 值是恒定的。 β -肌动蛋白 Ct 可以作为 PCR 的内参,即内部对照。

[0369] 并且测得 15 例正常人、31 例浅表、6 例萎缩 / 肠化、19 例胃癌 I 期、20 例 II 期、22 例 III 期、10 例 IV 期基因组 DNA 样本对于 RNF180 基因的实时 PCR 的 Ct 值,如图 6 所示。并且由 RNF180Ct 减去 β -肌动蛋白 Ct 得到 RNF180 的 dCt 值。图 6 中,纵坐标是 RNF180 的 dCt 值或 Δ Ct 值。

[0370] 相似地,Septin9Ct 减去肌动蛋白 Ct 得到 Septin9 的 dCt 值。dCt 值越低,甲基化程度越高。

[0371] 从图 6 中可看出,随着正常人、浅表、萎缩 / 肠化、胃癌 I 期、II 期、III 期、IV 期病情的加重,RNF180 的 dCt 值越来越低,甲基化程度越来越高。

[0372] 上述实验结果进一步证明了不仅可以用 Ct 值或者 dCt 值来对正常人、胃炎和胃癌进行分级,而且还可以用 Ct 值或者 dCt 值来对于胃炎进行进一步分级,例如将胃炎分级为轻度胃炎(包括浅表性)和重度胃炎(包括肠化和萎缩),而且还可以用 Ct 值或者 dCt 值来对于胃癌进行进一步分级,例如将胃癌分级为胃癌 I 期、II 期、III 期、IV 期。

[0373] 实施例五:Septin9 和 RNF180 的甲基化 DNA 多元(RS19)检测正常、浅表、萎缩 / 肠化、胃癌以及胃癌 I 期、II 期、III 期、IV 期的阳性率。

[0374] 得到 15 例正常人、31 例浅表、6 例萎缩 / 肠化(包括 3 例萎缩和 3 例肠化)、74 例胃癌(包括 19 例胃癌 I 期、20 例 II 期、22 例 III 期、10 例 IV 期)的样品。提取各样品中基因组 DNA。所述 DNA 的提取可以采用现有技术中的任何标准手段来进行,具体而言,在本实施例中,所有的样品 DNA 是通过使用 Epigenomics 公司的 Epi proColon Plasma Quick Kit 提取。

[0375] 然后,将所述基因组 DNA 样品预处理以使得在 5' 位未甲基化的胞嘧啶碱基被转变为尿嘧啶、胸腺嘧啶或在杂交行为上不用于胞嘧啶的另一碱基。在本实施例中,通过亚硫酸氢盐试剂处理来实现该预处理。亚硫酸氢盐 DNA 的修饰是通过使用 Epi proColon Plasma Quick Kit 进行的。

[0376] 然后,上述经过预处理的 15 例正常人、31 例浅表、6 例萎缩 / 肠化、74 例胃癌(包括 19 例胃癌 I 期、20 例 II 期、22 例 III 期、10 例 IV 期)的基因组 DNA 样本中加入上述第 2 组 RNF180 的引物和探针,进行 RNF180PCR 试验,并且加入 Septin9、 β -肌动蛋白的引物和探针,多元地检测 RNF180PCR 试验、Septin9PCR 试验和 β -肌动蛋白 PCR 试验。Septin9PCR 试剂和 β -肌动蛋白 PCR 试剂购自 Epigenomics 公司。在经亚硫酸氢盐转化的 DNA 上进行实时 PCR。

[0377] 其中,本实验例中采取的 PCR 扩增条件为:在 Life Technologies 仪器(7500Fast)上进行实时 PCR。PCR 反应混合物由经亚硫酸氢盐转化的 DNA 模板 35ng 和 450nM 引物、225nM 探针、1UTaq 聚合酶、200um 的各个 dNTP、4.5mM 的 $MgCl_2$ 和 2XPCR 缓冲液组成至最终的 30u1 的体积。在 94℃ 保持 20 分钟用预循环扩增样品,紧接着在 62℃ 进行 5 秒的 45 个循环的退火,在 55.5℃ 下退火 35 秒,在 93℃ 下变性 30 秒。

[0378] 最后,测得 15 例正常人、31 例浅表、6 例萎缩 / 肠化、74 例胃癌(包括 19 例胃癌 I 期、20 例 II 期、22 例 III 期、10 例 IV 期)基因组 DNA 样本对于 Septin9 基因的实时 PCR 的 Ct 值。并测得 15 例正常人、31 例浅表、6 例萎缩 / 肠化、74 例胃癌以及 19 例胃癌 I 期、

20 例 II 期、22 例 III 期、10 例 IV 期基因组 DNA 样本对于 β -肌动蛋白的实时 PCR 的 Ct 值。并且测得 15 例正常人、31 例浅表、6 例萎缩 / 肠化、74 例胃癌（包括 19 例胃癌 I 期、20 例 II 期、22 例 III 期、10 例 IV 期）基因组 DNA 样本对于 RNF180 基因的实时 PCR 的 Ct 值。 β -肌动蛋白 Ct 作为内部对照。RNF180Ct 减去 β -肌动蛋白 Ct 得到 RNF180 的 dCt 值。如果 dCt<10, 就认定为疾病阳性。

[0379] 图 7A 显示了正常人、浅表、萎缩 / 肠化、胃癌的 RS19 阳性率比较。纵坐标是阳性率, 而横坐标从左到右分别为正常人、浅表、萎缩 / 肠化、胃癌。从图 7A 可以看出, 随着正常人、浅表、萎缩 / 肠化、胃癌病情的加重, 阳性率越来越高。

[0380] 图 7B 显示了胃癌 I 期、II 期、III 期、IV 期的 RS19 阳性率比较。纵坐标是阳性率, 而横坐标从左到右分别为胃癌 I 期、II 期、III 期、IV 期, 从图 7B 中可看出, 随着胃癌 I 期、II 期、III 期、IV 期病情的加重, 阳性率越来越高。

[0381] 而图 7C 显示了正常人、胃炎、胃癌的 RS19 的 dCt 平均值柱状图。图 7C 进一步验证了实施例二的结果, 在 RNF180 检测中, 胃癌和胃炎的 dCt 值之间具有非常显著差异, 正常人和胃炎 dCt 之间有显著差异, 正常人和胃癌的 dCt 之间有极其非常显著差异。该实验结果再次验证了通过 RNF180 的甲基化检测结果可以对疾病程度进行分级, 比如可以对胃癌、胃炎、正常人进行分级。

[0382] 并且, RNF180 甲基化在慢性胃炎并发肠化生中有重要的意义。一般认为慢性萎缩性胃炎和慢性胃炎并发肠化生更容易发生癌变, 在有病理活检确诊为慢性胃炎并发肠化生的 3 例样品中, 血液中 RNF180 含量均升高, Ct 值明显下降, 平均为 Ct7.9, 阳性率为 100% (3/3), 而慢性萎缩性胃炎的阳性率为 33% (1/3), 和普通慢性浅表性胃炎的阳性率 27% 接近, 参见表 4。估计在 RNF180 阳性的普通慢性浅表性胃炎患者中 (27%), 如果进行活检, 有肠化生的比例可能会升高。

[0383] 表 4 :3 例肠化生和 3 例慢性萎缩的 RNF180 的 dCT 值

[0384]

胃 炎	并发肠化 生例 1	并发肠化 生例 2	并发肠化生 例 3	慢性萎缩 性例 1	慢性萎缩性 例 2	慢性萎缩性 例 3
dCT	5.5	7.5	10.6	6.2	22.2	23.1

[0385] 因此, RNF180 还能区别检测胃炎中有肠化生的胃炎和无肠化生的普通胃炎情况, 有肠化生的 RNF180 是 100% 阳性, 普通胃炎约 27% 阳性。

[0386] 实施例六 :Septin9 和 RNF180 结合改善胃癌检测的特异性和灵敏度

[0387] 得到 15 例正常人、37 例胃炎和 74 例胃癌患者的样品。提取各样品中基因组 DNA。所述 DNA 的提取可以采用现有技术中的任何标准手段来进行, 具体而言, 在本实施例中, 所有的样品 DNA 是通过使用 Epigenomics 公司的 Epi proColon Plasma Quick Kit 提取。

[0388] 然后, 将所述基因组 DNA 样品预处理以使得在 5' 位未甲基化的胞嘧啶碱基被转变为尿嘧啶、胸腺嘧啶或在杂交行为上不用于胞嘧啶的另一碱基。在本实施例中, 通过亚硫酸氢盐试剂处理来实现该预处理。亚硫酸氢盐 DNA 的修饰是通过使用 Epi proColon Plasma Quick Kit 进行的。

[0389] 然后, 上述经过预处理的基因组 DNA 样本中加入上述第 2 组 RNF180 的引物和探针, 进行 RNF180PCR 试验, 并且加入 Septin9、 β -肌动蛋白的引物和探针, 多元地检测

RNF180PCR 试验、Septin9PCR 试验和 β -肌动蛋白 PCR 试验。Septin9PCR 试剂和 β -肌动蛋白 PCR 试剂购自 Epigenomics 公司。在经亚硫酸氢盐转化的 DNA 上进行实时 PCR。

[0390] 其中,本实验例中采取的PCR扩增条件为:在Life Technologies 仪器(7500Fast)上进行实时PCR。PCR反应混合物由经亚硫酸氢盐转化的DNA模板35ng和450nM引物、225nM探针、1UTaq聚合酶、200um的各个dNTP、4.5mM的MgCl₂和2XPCR缓冲液组成至最终的30ul的体积。在94℃保持20分钟用预循环扩增样品,紧接着在62℃进行5秒的45个循环的退火,在55.5℃下退火35秒,在93℃下变性30秒。

[0391] 最后,测得15例正常人、37例胃炎和74例胃癌患者基因组DNA样本对于Septin9基因的实时PCR的Ct值。并测得上述DNA样本对于 β -肌动蛋白的实时PCR的Ct值。并且测得上述DNA样本对于RNF180基因的实时PCR的Ct值。肌动蛋白Ct作为内部对照。RNF180Ct值减去 β -肌动蛋白Ct得到RNF180的dCT值,Septin9Ct值减去 β -肌动蛋白Ct值得到RNF180的dCT值。

[0392] 随着年龄的增长,外周血中甲基化的RNF180基因含量呈增高趋势,以年龄为横坐标,以RNF180的dCT值为纵坐标得到图8A。由于年纪大的长者均多多少少会有一些程度的胃炎,难以区分开是年龄的因素还是胃炎的因素导致外周血中甲基化的RNF180基因含量升高。这对胃癌检测的特异性和可靠性带来很大的影响。如图8A所示,在老年阶段,慢性胃炎(菱形)和胃癌(正方形)有部分交叉,影响胃癌的检测。

[0393] 以Septin9的dCT值为横坐标,以RNF180的dCT值为纵坐标得到图8B。如图8B所示,当选择Septin9的dCT的临界值为14,RNF180的dCT的临界值为10时,左边方框里的点代表Septin9的检测结果显示阳性,而且RNF180的检测结果显示也呈阳性。而右边方框表示Septin9的检测结果显示阴性,而且RNF180的检测结果显示呈阳性。对于本实施例,选择Septin9和RNF180同时阳性,提高了对部分胃癌的特异性,大约有39%(29/74)的胃癌达到了90%符合率(29/32),从而有效排除了胃炎和年龄对RNF180的负面影响。因此,联合Septin9和RNF180两个生物标识物可以减少RNF180非特异性高(年龄,胃炎)对胃癌诊断的负面影响,提高胃癌检测特异性,增加胃癌检测敏感性。

[0394] 并且,在灵敏度方面,有两例胃癌RNF180是阴性,但Septin9是阳性,Septin9可增加2.7%(2/74)的灵敏度。因此将Septin9和RNF180两个生物标记结合在一起进行检测的话,能够改善胃癌检测的特异性和灵敏度。

[0395] 综上所述,随着年龄的增长,外周血中甲基化的RNF180基因含量呈增高趋势,但由于年纪大的长者均多多少少会有一些程度的胃炎,难以区分开是年龄的因素还是胃炎的因素导致外周血中甲基化的RNF180基因含量升高。这对胃癌检测的特异性和可靠性带来很大的影响。Septin9基因受年龄和慢性胃炎影响的因素可以忽略不计,所以,可以用Septin9来确认RNF180对胃癌检测。

[0396] 实施例七:Septin9和RNF180的甲基化DNA多元(RS19)检测正常、胃癌的灵敏度和特异性。

[0397] 得到15例正常人和74例胃癌患者的样品。提取各样品中基因组DNA。所述DNA的提取可以采用现有技术中的任何标准手段来进行,具体而言,在本实施例中,所有的样品DNA是通过使用Epigenomics公司的Epi proColon Plasma Quick Kit提取。

[0398] 然后,将所述基因组DNA样品预处理以使得在5'位未甲基化的胞嘧啶碱基被转变

为尿嘧啶、胸腺嘧啶或在杂交行为上不用于胞嘧啶的另一碱基。在本实施例中,通过亚硫酸氢盐试剂处理来实现该预处理。亚硫酸氢盐 DNA 的修饰是通过使用 Epi proColon Plasma Quick Kit 进行的。

[0399] 然后,上述经过预处理的 15 例正常人和 74 例胃癌患者的基因组 DNA 样本中加入上述第 2 组 RNF180 的引物和探针,进行 RNF180PCR 试验,并且加入 Septin9、 β -肌动蛋白的引物和探针,多元地检测 RNF180PCR 试验、Septin9PCR 试验和 β -肌动蛋白 PCR 试验。Septin9PCR 试剂和 β -肌动蛋白 PCR 试剂购自 Epigenomics 公司。在经亚硫酸氢盐转化的 DNA 上进行实时 PCR。

[0400] 其中,本实验例中采取的 PCR 扩增条件为:在 Life Technologies 仪器 (7500Fast) 上进行实时 PCR。PCR 反应混合物由经亚硫酸氢盐转化的 DNA 模板 35ng 和 450nM 引物、225nM 探针、1UTaq 聚合酶、200um 的各个 dNTP、4.5mM 的 MgCl₂ 和 2XPCR 缓冲液组成至最终的 30ul 的体积。在 94℃ 保持 20 分钟用预循环扩增样品,紧接着在 62℃ 进行 5 秒的 45 个循环的退火,在 55.5℃ 下退火 35 秒,在 93℃ 下变性 30 秒。

[0401] 最后,测得 15 例正常人和 74 例胃癌患者基因组 DNA 样本对于 Septin9 基因的实时 PCR 的 Ct 值。并测得 15 例正常人和 74 例胃癌患者基因组 DNA 样本对于 β -肌动蛋白的实时 PCR 的 Ct 值。并且测得 15 例正常人和 74 例胃癌患者基因组 DNA 样本对于 RNF180 基因的实时 PCR 的 Ct 值。肌动蛋白 Ct 作为内部对照。RNF180Ct 减去 β -肌动蛋白 Ct 得到 RNF180 的 dCt 值,如图 9 所示。图 9 还显示了临界值分别是 10 和 15 时的检测胃癌的灵敏度和特异性,以及 ROC 曲线。

[0402] 所以,如图 9 的表格所示,当 dCut 值选为 10 时,灵敏度为 74%,而特异性为 87%,而当 dCut 值选为 15 时,灵敏度为 84%,而特异性为 73%。因此 dCut 值,或者说 Cut 值可以根据所选择的灵敏度和特异性进行变化。综合考虑灵敏度和特异性的实际需求,优选按照 dCut 值为 10。

[0403] 实施例八:Septin9 和 RNF180 的甲基化 DNA 多元 (RS19) 检测正常、胃炎 (慢性、浅表性、溃疡性) 的灵敏度和特异性。

[0404] 得到 15 例正常人和 33 例胃炎 (慢性、浅表性、溃疡性) 的样品。提取各样品中基因组 DNA。所述 DNA 的提取可以采用现有技术中的任何标准手段来进行,具体而言,在本实施例中,所有的样品 DNA 是通过使用 Epigenomics 公司的 Epi proColon Plasma Quick Kit 提取。

[0405] 然后,将所述基因组 DNA 样品预处理以使得在 5' 位未甲基化的胞嘧啶碱基被转变为尿嘧啶、胸腺嘧啶或在杂交行为上不用于胞嘧啶的另一碱基。在本实施例中,通过亚硫酸氢盐试剂处理来实现该预处理。亚硫酸氢盐 DNA 的修饰是通过使用 Epi proColon Plasma Quick Kit 进行的。

[0406] 然后,上述经过预处理的 15 例正常人和 33 例胃炎 (慢性、浅表性、溃疡性) 者的基因组 DNA 样本中加入上述第 2 组 RNF180 的引物和探针,进行 RNF180PCR 试验,并且加入 Septin9、 β -肌动蛋白的引物和探针,多元地检测 RNF180PCR 试验、Septin9PCR 试验和 β -肌动蛋白 PCR 试验。Septin9PCR 试剂和 β -肌动蛋白 PCR 试剂购自 Epigenomics 公司。在经亚硫酸氢盐转化的 DNA 上进行实时 PCR。

[0407] 其中,本实验例中采取的 PCR 扩增条件为:在 Life Technologies 仪器 (7500Fast)

上进行实时 PCR。PCR 反应混合物由经亚硫酸氢盐转化的 DNA 模板 35ng 和 450nM 引物、225nM 探针、1UTaq 聚合酶、200um 的各个 dNTP、4.5mM 的 MgCl₂ 和 2XPCR 缓冲液组成至最终的 30ul 的体积。在 94℃ 保持 20 分钟用预循环扩增样品,紧接着在 62℃ 进行 5 秒的 45 个循环的退火,在 55.5℃ 下退火 35 秒,在 93℃ 下变性 30 秒。

[0408] 最后,测得 15 例正常人和 33 例胃炎(慢性、浅表性、溃疡性)基因组 DNA 样本对于 Septin9 基因的实时 PCR 的 Ct 值。并测得 15 例正常人和 33 例胃炎(慢性、浅表性、溃疡性)基因组 DNA 样本对于 β-肌动蛋白的实时 PCR 的 Ct 值。并且测得 15 例正常人和 33 例胃炎(慢性、浅表性、溃疡性)基因组 DNA 样本对于 RNF180 基因的实时 PCR 的 Ct 值。β-肌动蛋白 Ct 作为内部对照。RNF180Ct 减去 β-肌动蛋白 Ct 得到 RNF180 的 dCT 值,如图 10 所示。图 10 还显示了临界值分别是 10、15、20 时的检测胃炎(慢性、浅表性、溃疡性)的灵敏度和特异性,以及 ROC 曲线。

[0409] 所以,如图 10 的表格所示,当 dCut 值选为 10 时,灵敏度为 30%,而特异性为 87%,而当 dCut 值选为 15 时,灵敏度为 64%,而特异性为 80%;而当 dCut 值选为 20 时,灵敏度为 73%,而特异性为 73%。因此 dCut 值,或者说 Cut 值可以根据所选择的灵敏度和特异性进行变化。综合考虑灵敏度和特异性的实际需求,优选按照 dCut 值为 15。

[0410] 实施例九:Septin9 和 RNF180 的甲基化 DNA 多元(RS19)检测正常、胃炎(全部)的灵敏度和特异性。

[0411] 得到 15 例正常人和 37 例胃炎(全部)的样品。提取各样品中基因组 DNA。所述 DNA 的提取可以采用现有技术中的任何标准手段来进行,具体而言,在本实施例中,所有的样品 DNA 是通过使用 Epigenomics 公司的 Epi proColon Plasma Quick Kit 提取。

[0412] 然后,将所述基因组 DNA 样品预处理以使得在 5' 位未甲基化的胞嘧啶碱基被转变为尿嘧啶、胸腺嘧啶或在杂交行为上不用于胞嘧啶的另一碱基。在本实施例中,通过亚硫酸氢盐试剂处理来实现该预处理。亚硫酸氢盐 DNA 的修饰是通过使用 Epi proColon Plasma Quick Kit 进行的。

[0413] 然后,上述经过预处理的 15 例正常人和 37 例胃炎(全部)的基因组 DNA 样本中加入上述第 2 组 RNF180 的引物和探针,进行 RNF180PCR 试验,并且加入 Septin9、β-肌动蛋白的引物和探针,多元地检测 RNF180PCR 试验、Septin9PCR 试验和 β-肌动蛋白 PCR 试验。Septin9PCR 试剂和 β-肌动蛋白 PCR 试剂购自 Epigenomics 公司。在经亚硫酸氢盐转化的 DNA 上进行实时 PCR。

[0414] 其中,本实验例中采取的 PCR 扩增条件为:在 Life Technologies 仪器(7500Fast)上进行实时 PCR。PCR 反应混合物由经亚硫酸氢盐转化的 DNA 模板 35ng 和 450nM 引物、225nM 探针、1UTaq 聚合酶、200um 的各个 dNTP、4.5mM 的 MgCl₂ 和 2XPCR 缓冲液组成至最终的 30ul 的体积。在 94℃ 保持 20 分钟用预循环扩增样品,紧接着在 62℃ 进行 5 秒的 45 个循环的退火,在 55.5℃ 下退火 35 秒,在 93℃ 下变性 30 秒。

[0415] 最后,测得 15 例正常人和 37 例胃炎(全部)基因组 DNA 样本对于 Septin9 基因的实时 PCR 的 Ct 值。并测得 15 例正常人和 37 例胃炎(全部)基因组 DNA 样本对于 β-肌动蛋白的实时 PCR 的 Ct 值。并且测得 15 例正常人和 37 例胃炎(全部)基因组 DNA 样本对于 RNF180 基因的实时 PCR 的 Ct 值。β-肌动蛋白 Ct 作为内部对照。RNF180Ct 减去 β-肌动蛋白 Ct 得到 RNF180 的 dCT 值,如图 11 所示。图 11 还显示了临界值分别是 10、15、20 时

的检测胃炎（全部）的灵敏度和特异性，以及 ROC 曲线。

[0416] 所以，如图 11 的表格所示，当 dCut 值选为 10 时，灵敏度为 32%，而特异性为 87%，而当 dCut 值选为 15 时，灵敏度为 62%，而特异性为 80%；而当 dCut 值选为 20 时，灵敏度为 70%，而特异性为 73%。因此 dCut 值，或者说 Cut 值可以根据所选择的灵敏度和特异性进行变化。综合考虑灵敏度和特异性的实际需求，优选按照 dCut 值为 15。

[0417] 综上所述，本申请中，通过实验发现胃炎和胃癌中的 RNF180 基因的甲基化程度存在一个较大的差异，RNF180 在正常人组，慢性浅表性胃炎（包括一般慢性胃炎和溃疡性胃炎）组，慢性萎缩性胃炎（包括慢性胃炎并发肠化生）组，胃癌组 I 到 IV 期含量是逐渐增加的，Ct 值逐渐下降。阳性率也按同样顺序由正常人组到胃癌组逐渐上升，所以本申请提供了一种通过测试样本中的 RNF180 基因的甲基化程度来对胃癌和胃炎进行分级的方法，从而提供了一种无创的、快速的胃癌和胃炎筛选方法。

[0418] 并且，因为随着年龄的增长，外周血中甲基化的 RNF180 基因含量呈增高趋势，但由于年纪大的长者均多多少少会有一些程度的胃炎，难以区分开是年龄的因素还是胃炎的因素导致外周血中甲基化的 RNF180 基因含量升高，从而对于胃炎和胃癌的检测的特异性 and 可靠性带来很大影响。因此，考虑到这一因素，在检测中同时加入 Septin9，因为 Septin9 基因受年龄和胃炎影响的因素可以忽略不计，从而可以用 Septin9 来确认胃癌的检测。具体而言，大约有 40% 的胃癌是 Septin9 和 RNF180 同时阳性，用两者同时阳性做判断标准，可达到 90% 的特异性。并且，根据某些具体实施方式，一些胃癌的 RNF180 是阴性，而 Septin9 是阳性，用 Septin9 可以对这一部分的胃癌进行检测，可增加约 3% 的灵敏度。因此，通过联合利用 Septin9 和 RNF180 这两个生物标记物来对胃炎和胃癌进行分级，灵敏度和特异性均可以得到提高。因此将 Septin9 和 RNF180 两个生物标记结合在一起进行检测的话，能够改善胃癌检测的特异性和灵敏度。

[0419] 最后，通过利用实时 PCR 分析血浆样本中的 DNA 的方法，能方便地实现针对 Septin9 和 RNF180 这两个生物标记物的同时间的双通道检测，并且能根据实时 PCR 的循环阈值 (Ct) 值来快速、便捷地判断样本是否呈阳性，提供了一种无创性的快速的癌症和炎症的分级方法。

[0420] 在说明书中提及的所有发表文献和专利申请表明与本发明相关领域内技术人员的水平。所有的发表文献和专利申请通过引用的方式结合到本文中，就如每个发表文献和专利申请被具体地、单个地注明通过引用的方式结合到本文中一样。仅仅对这些发表文献和专利申请的提及不能理解为承认它们相对于本申请是现有技术文献。

[0421] 尽管在此公开了本发明的各个方面和实施例，但其他方面和实施例对于本领域技术人员而言也是显而易见的。在此公开的各个方面和实施例仅用于说明目的，而非限制目的。本发明的保护范围和主旨仅通过后附的权利要求书来确定。

[0422] 除非另外明确指出，本文中所使用的术语和短语及其变体均应解释为开放式的，而不是限制性的。在一些实例中，诸如“一个或多个”、“至少”、“但不限于”这样的扩展性词汇和短语或者其他类似用语的出现不应理解为在可能没有这种扩展性用语的示例中意图或者需要表示缩窄的情况。

[0001]

062236-8002CN01序列表
序列表

- <110> 博尔诚研究公司；博尔诚(北京)科技有限公司
- <120> 用于检测细胞增殖性异常或疾病程度分级的基因组合物及其用途
- <130> 062236-8002CN01
- <160> 16
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 18
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 引物
- <400> 1
gttcgaggtc gcggggtc 18
- <210> 2
- <211> 26
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 探针
- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (1)..(1)
- <223> 连接CAL Fluor Red
- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (26)..(26)
- <223> 连接BHQ2
- <400> 2
aacgctcgaa ctatacctac aacccc 26
- <210> 3
- <211> 19
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 引物
- <400> 3

[0002]

acaaaaacca aacccccg	19
<210> 4	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 4	
gcggggtttg gtttttgt	18
<210> 5	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 探针	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1)..(1)	
<223> 连接CAL Fluor Red	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (18)..(18)	
<223> 连接BHQ2	
<400> 5	
ccgacgacga cgataccg	18
<210> 6	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 6	
acaaccaaac tctaaaaact cg	22
<210> 7	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	

[0003]

<223> 探针	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1)..(1)	
<223> 连接CAL Fluor Red	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (21)..(21)	
<223> 连接BHQ2	
<400> 7	
cgtcggagtc gtagcgagtt t	21
<210> 8	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 8	
aaaacctcca acttcacacc c	21
<210> 9	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 9	
cgccaacaac caaactctaa	20
<210> 10	
<211> 606	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> RNF180的启动子区域 (转录开始位点的-234bp至 +372bp)	
<400> 10	
gataatttct gtggtctctgg taaggggatg acaagggaga aaaactttcc cacggttccg	60
tctggcccgc ggcgcttgtc tgcttgcgcg ggggtcaaagc ccggcgccgc ccacgcgagg	120
ctcgggtggg aaccgcgaga cgtggggcga gcagggccgc tggctgtggc gggcgagcgc	180

[0004]

cggggcgcca cgtccgagge cgcggggtcg ggctgcagg cacagctega gcgtttccg	240
cggggtttgg ctctgtege tteccgtetc gccgaaccgg catcgcegc gccggagccg	300
cagcgagtc tccagagcctg gctgctggcg gccgggagcg ccgggacggg gcgcgaagcc	360
ggaggctccg ggacgtggat acaggtaaag gccggcgggt cggagtcggg cggggcgcgg	420
cggcggcgcc tctcggaggg acctggcctc ggccgggccc taccagecg cggtgggccc	480
ggccccacg ttggcccagg cggggacgtg ccaaggggct ggcttagggt tgccctggc	540
ctggccgct ctcgcccggc gggcctcagg tgacgcggcc gcggetaac tttcgacct	600
gagget	606

<210> 11
 <211> 302
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> RNF180的启动子区域 (转录开始位点的-167bp至 +135bp)

<400> 11	
cgcggcgctt gtctgcctgc gcgggggtcaa agcccggcgc cgcccacgc cggctcgggt	60
gggaaccgc agacgtgggg cgagcagggc cgtctggctgt ggccggcgag cgccggggcg	120
ccacgtccga ggccgcgggg tcgggctgc aggcacagct cgagcgttt ccgcccgggt	180
tgctctctgt cgtttccct ctcgccgaac cggcctcgc gcccccggag ccgcagcgag	240
tcctcagagc ctggctgctg gcggccggga gcgccgggac ggggcgcgaa gccggaggct	300
cc	302

<210> 12
 <211> 178
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> RNF180的启动子区域 (转录开始位点的-43bp至 +135bp)

<400> 12	
gtccgaggcc gcggggctcg ggctgcaggc acagctcgag cgctttccgc ggggtttgce	60
tcctgtegt tcccgtctcg ccgaaccggc atcgccgcg ccggagccgc agcgagtct	120
cagagcctgg ctgctggcgg ccgggagcgc cgggacgggg cgccaagccg gaggetcc	178

<210> 13

[0005]

<211>	1405	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Septin9的启动子序列	
<400>	13	
cgttaccega	gttgtaaagg geggetccct gtgtetgecc	cgctgeaccg atacaccgag 60
ctgcgcacgg	tgcccagcgc agggagaaca aatgatcate	tgtccaacgc gccatttac 120
aggtgaggaa	actaaggctc caactcaate gacgcactet	gcccttttga ttaccagaaa 180
agtagcagga	caggtgtcct gtcccgcctt accccggccc	actaagccgg caccocggct 240
ccgacccccg	gctgtgcccg gcgcccgcgc ggtgcccggc	gccgcccctt cgcccggcgg 300
ggccgcccgg	agcgcaccga cctccgcccg cttccacctg	gccgggcccg ccccgccggg 360
actcgggact	gggaagtgcg gegactcccg gaaccagcca	ttggcgccag cgcggggagc 420
tgggggtgca	gagctgcggg cgcggcgggc cacgcaggcg	gccccaccc cgggcctggc 480
ctggtctggt	ctggtctgcg ctgccgcgcg ggggcgcccc	ctcccaggcc eggcgcccgc 540
cagccccgct	cgcccagggt cagcgcagcg caggggtggg	cgggggtggg gctcggcgcg 600
cacgttcacg	ggcgggggag ggggcgggct aggggcggga	ccacagccgg ctgggcccggg 660
gttctatgeg	catctccggg gaggggcggg gcggggggcg	ggccggggcg gggcccggtc 720
ggtgcactec	agaagggcgg ccgccccctc ttcccgctt	cctactaccg gccagggatt 780
agcgccttgg	gagcgcgcgc cccgtgcct cgcgcceaca	ctttctggg agcggcggcc 840
acggaggcac	catgaagaag tcttactcag gtgggettgc	cgcccggggt ggggaggggt 900
cggtgtcccg	ggaaccagcgc tctcacctg agtgccctgc	gccgggagtg gcgaggcgcc 960
cccggagetg	agcgagtccc cgcggcgggc aactgeagg	tcgagttcct cccaggacag 1020
ggccgctgtc	gggecgcttt cgacctgagc cgaccgtccc	ctgcgctgtc tcagccctt 1080
gctcgagtgt	cggaggggct gccctggggg acgctccctc	ttctctgccc ctigcaccct 1140
cgcaggaatc	gctgactttc caggtcggcc gggtgctttg	ggteccctgt cgtctgtgtg 1200
ggtgaatggg	gtcggggcta ggtggagggg tgtccttggg	ttcagcctct agggctggtg 1260
gtccaggecg	cagcatcctt tcttcggatt ctcttcggtt	tctctctac ttagtggggc 1320
acgggacggc	ctccagatgg gaccgtccag cagcgcceaa	acttggegac tcgggttcac 1380
gttttgcgct	caggacgccg cccgc	1405

[0006]

<210> 14
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 14
gtagtagtta gtttagtatt tatttt

26

<210> 15
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 15
cccaccaacc atcatat

17

<210> 16
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 探针

<400> 16
gaaccccgcg atcaacgcg

19

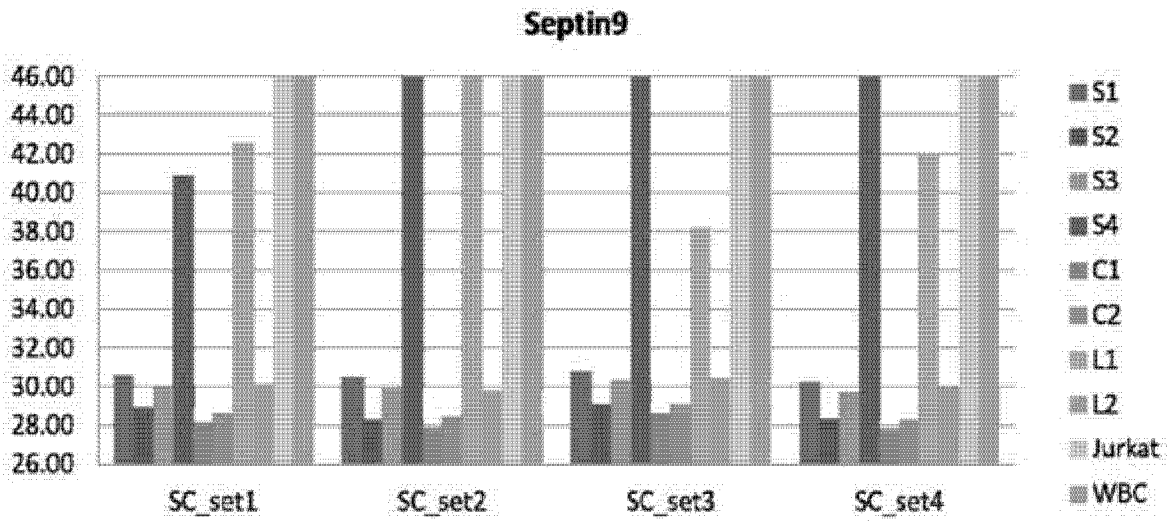


图 1

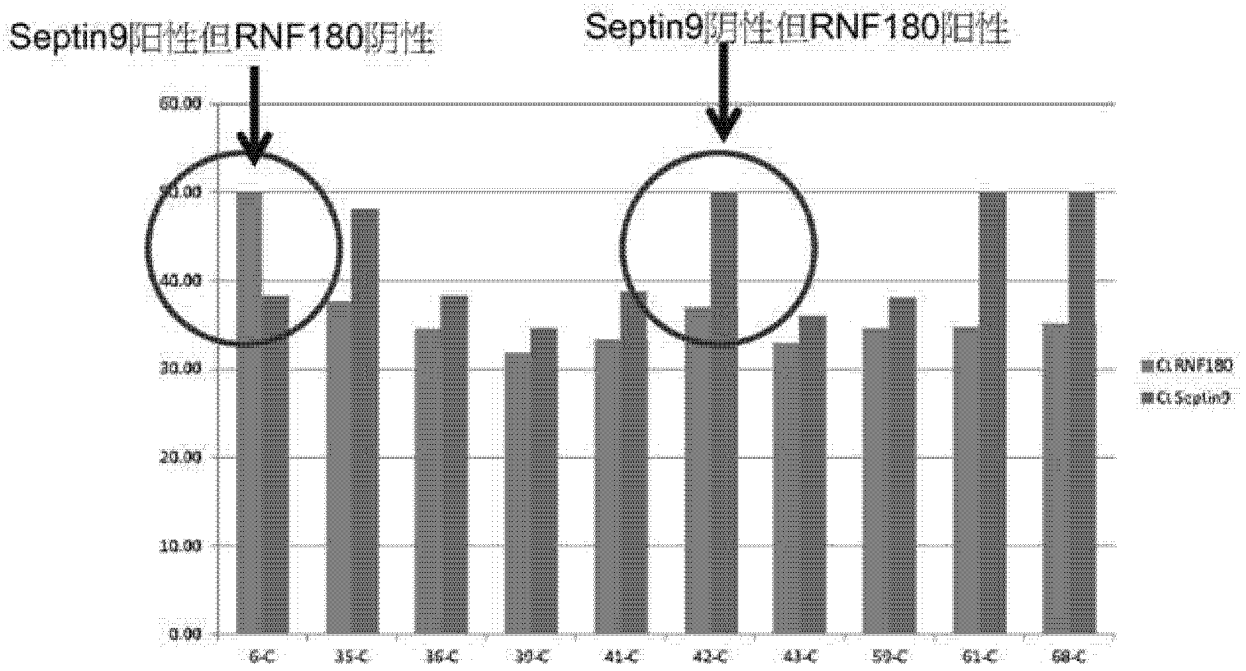


图 2

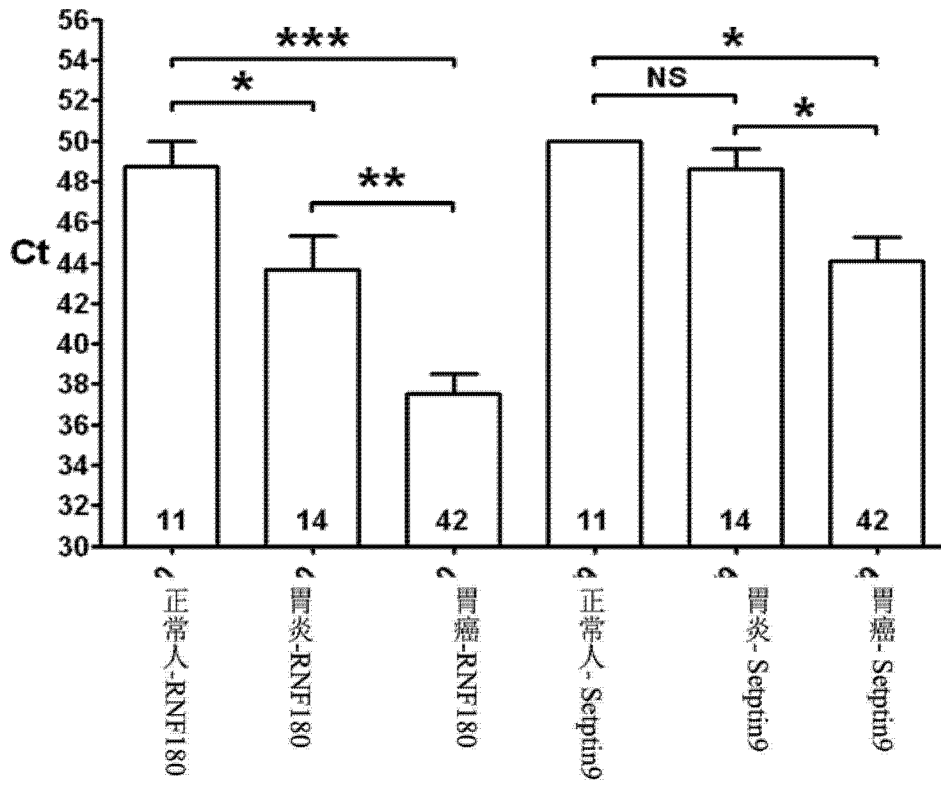


图 3

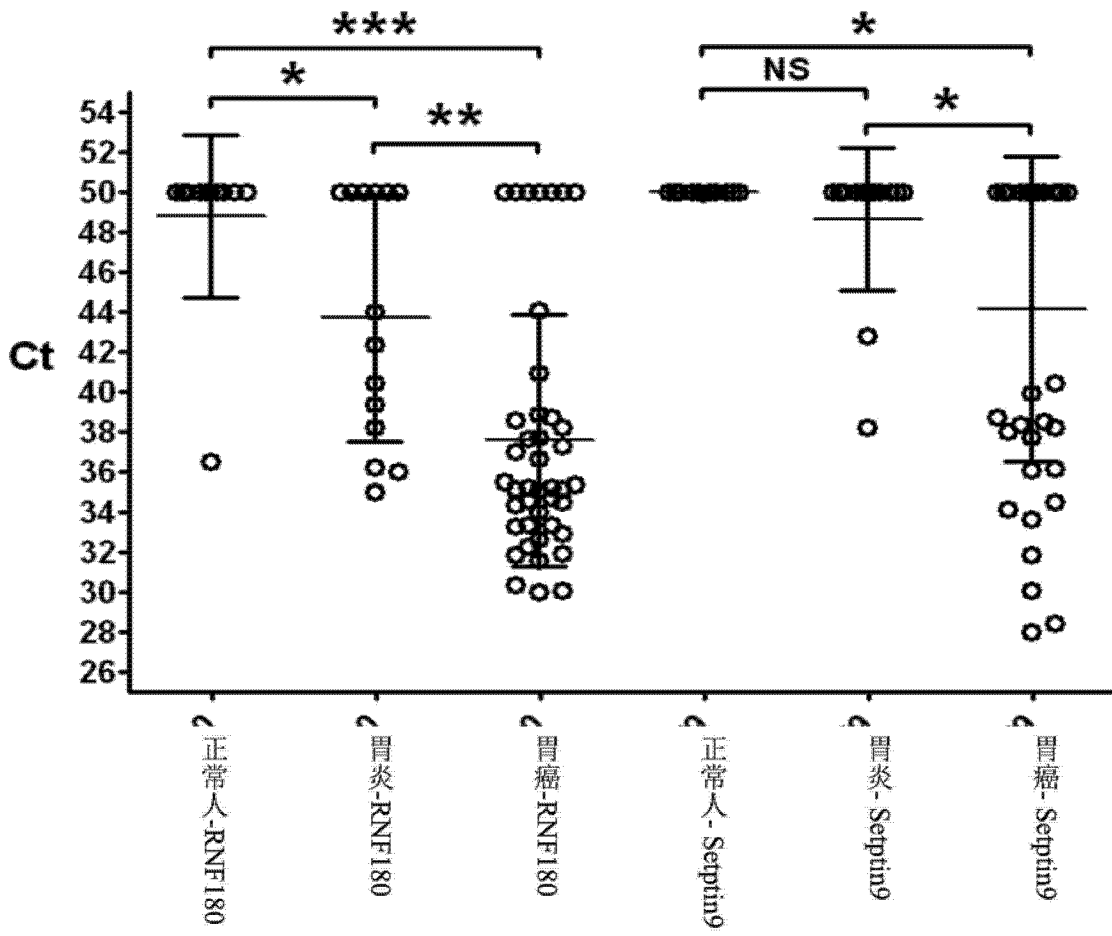
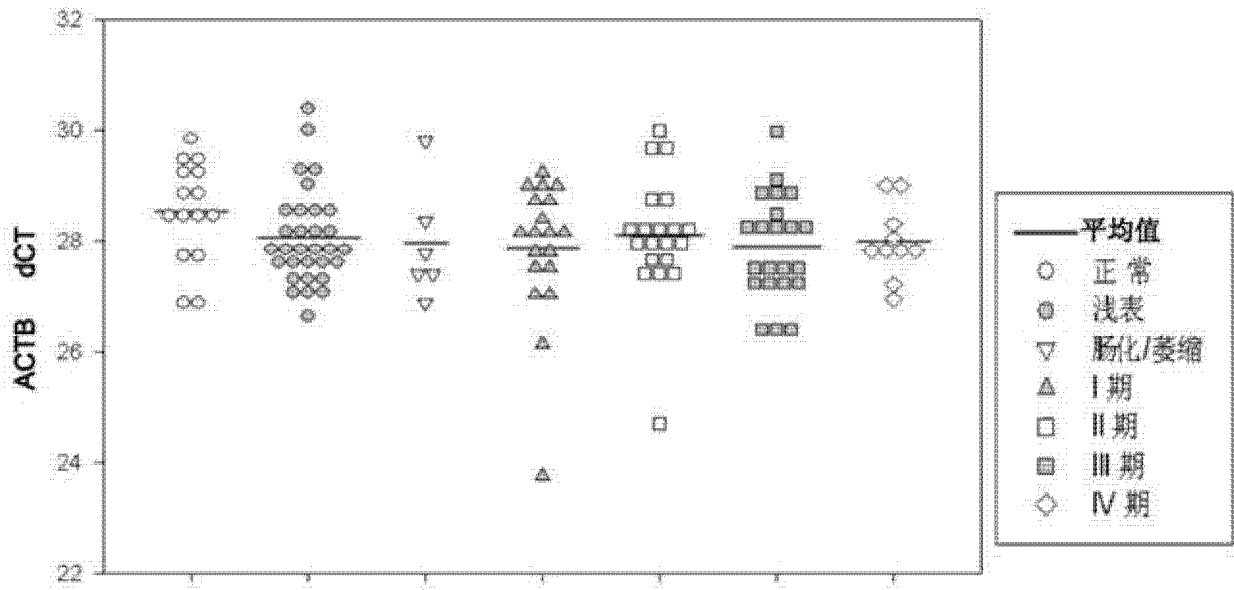
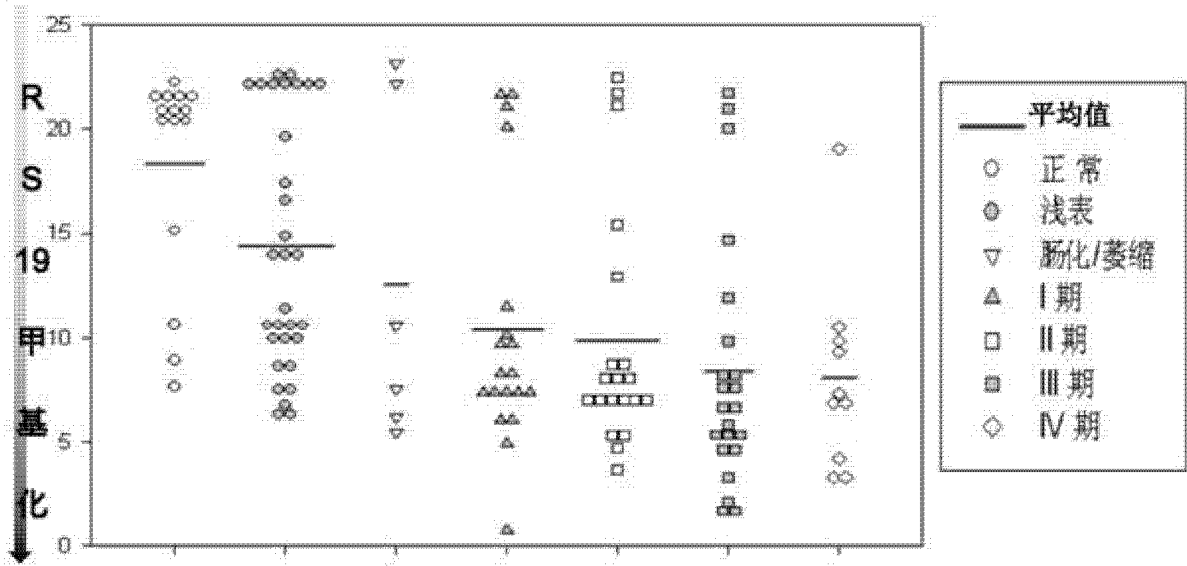


图 4



ACTB	正常	浅表	肠化/萎缩	I期	II期	III期	IV期
n	15	31	6	19	20	22	10
平均值	28.53	28.05	27.93	27.85	28.10	27.88	27.98
sd	0.91	0.86	1.04	1.28	1.10	0.94	0.66

图 5



RS19	正常	浅表	肠化/萎缩	I期	II期	III期	IV期
n	15	31	6	19	20	22	10
平均值	18.31	14.36	12.51	10.34	9.80	8.35	8.05
sd	5.10	5.97	8.07	6.15	5.80	5.99	4.67

图 6

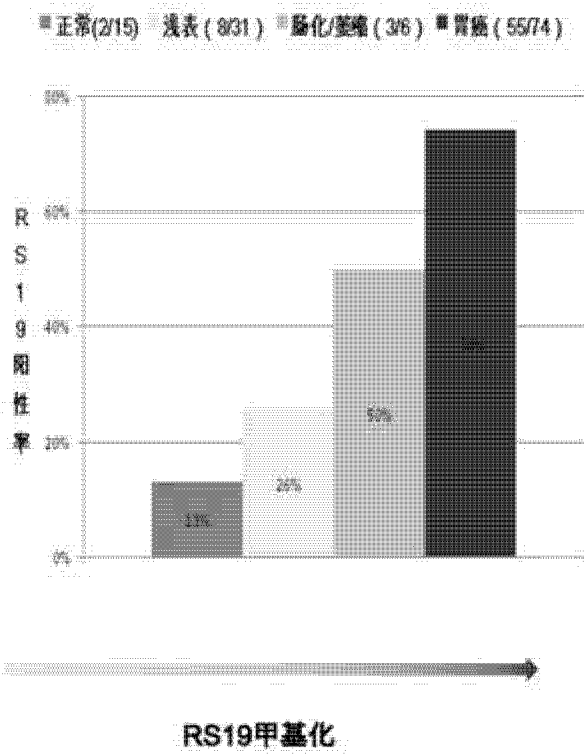


图 7A

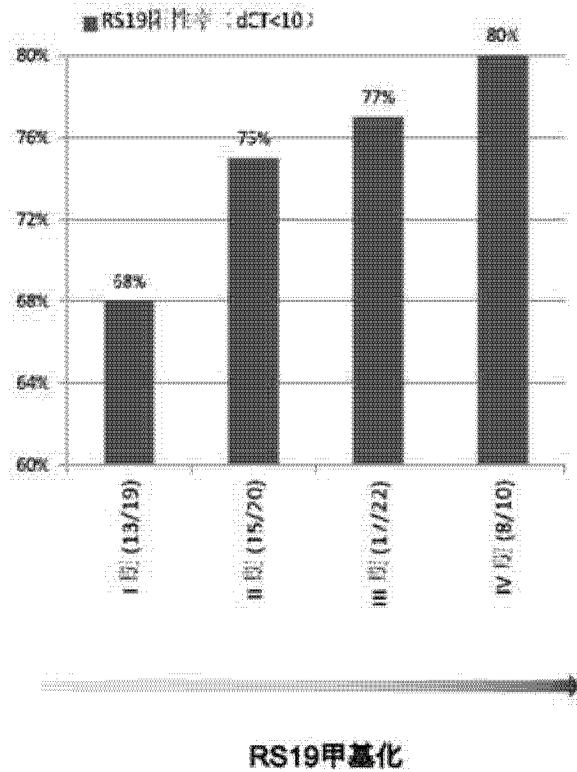


图 7B

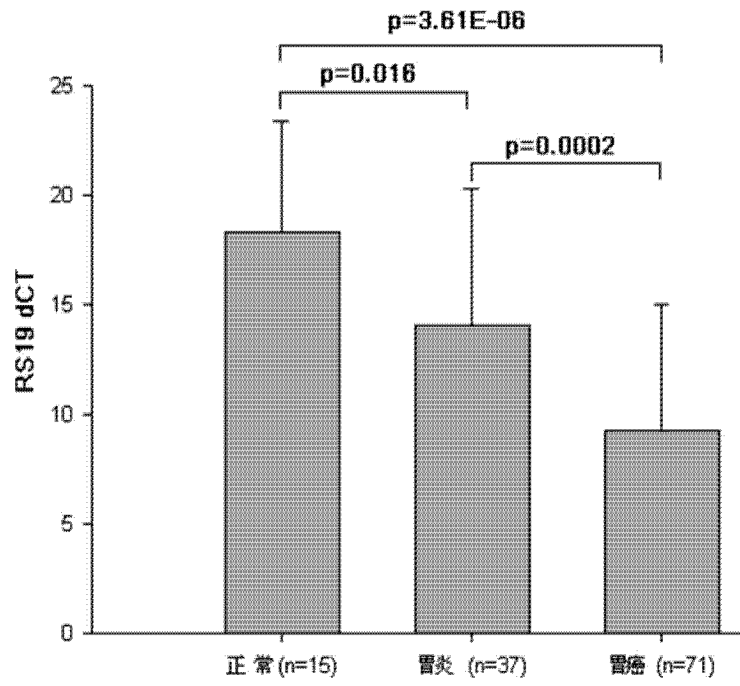


图 7C

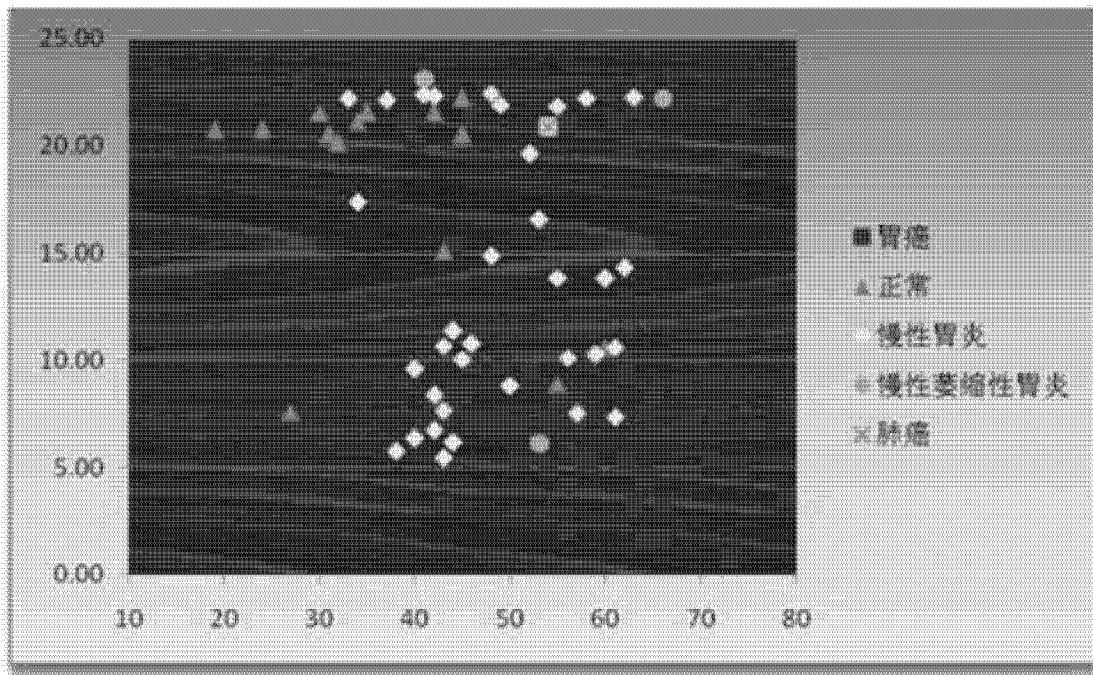


图 8A

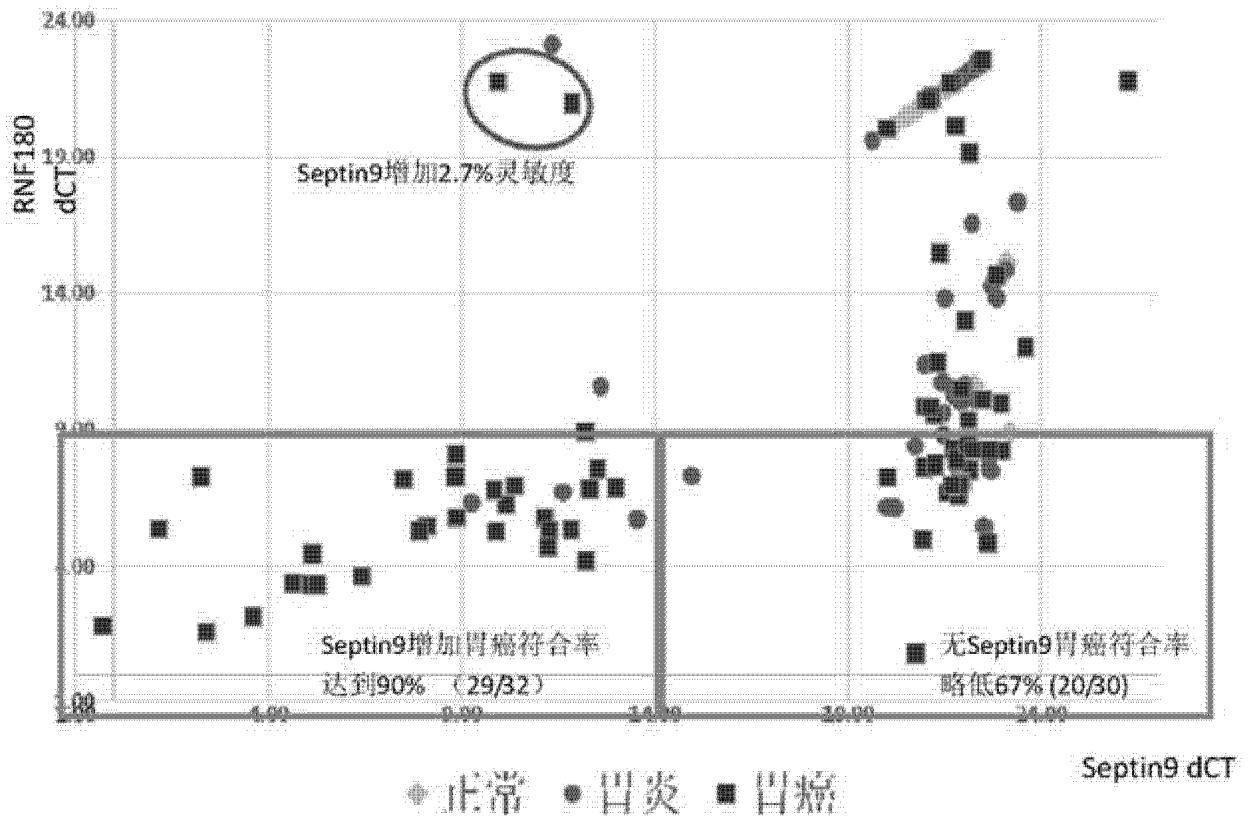
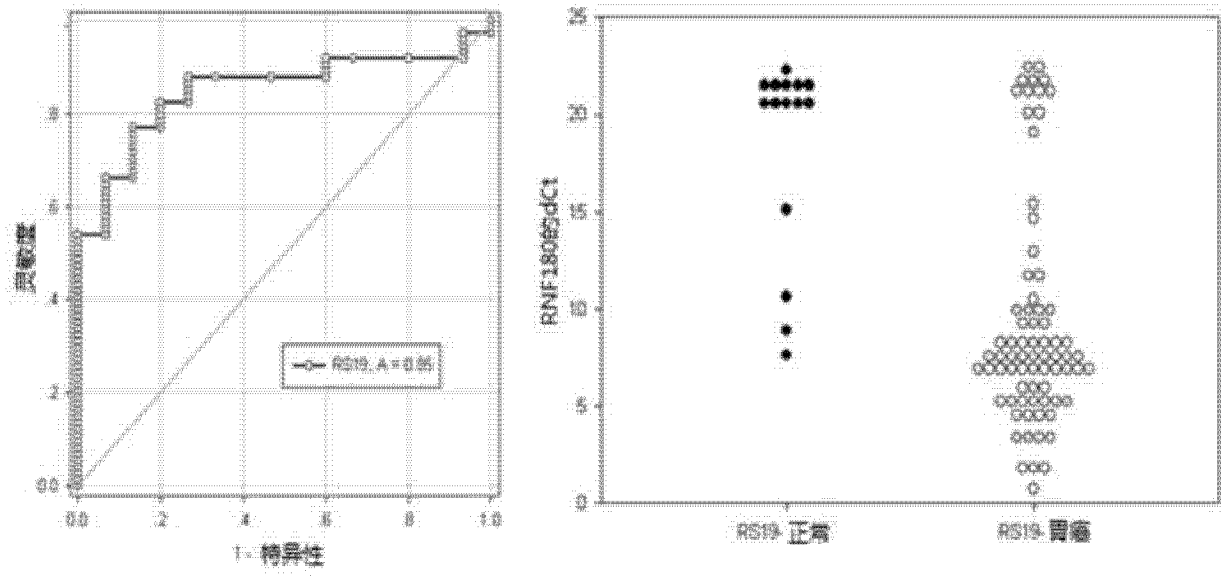


图 8B



临界值	灵敏度	特异性
10	74%	97%
15	82%	73%

正常: 15例
胃癌: 74例

曲线下面积: 0.85

图 9

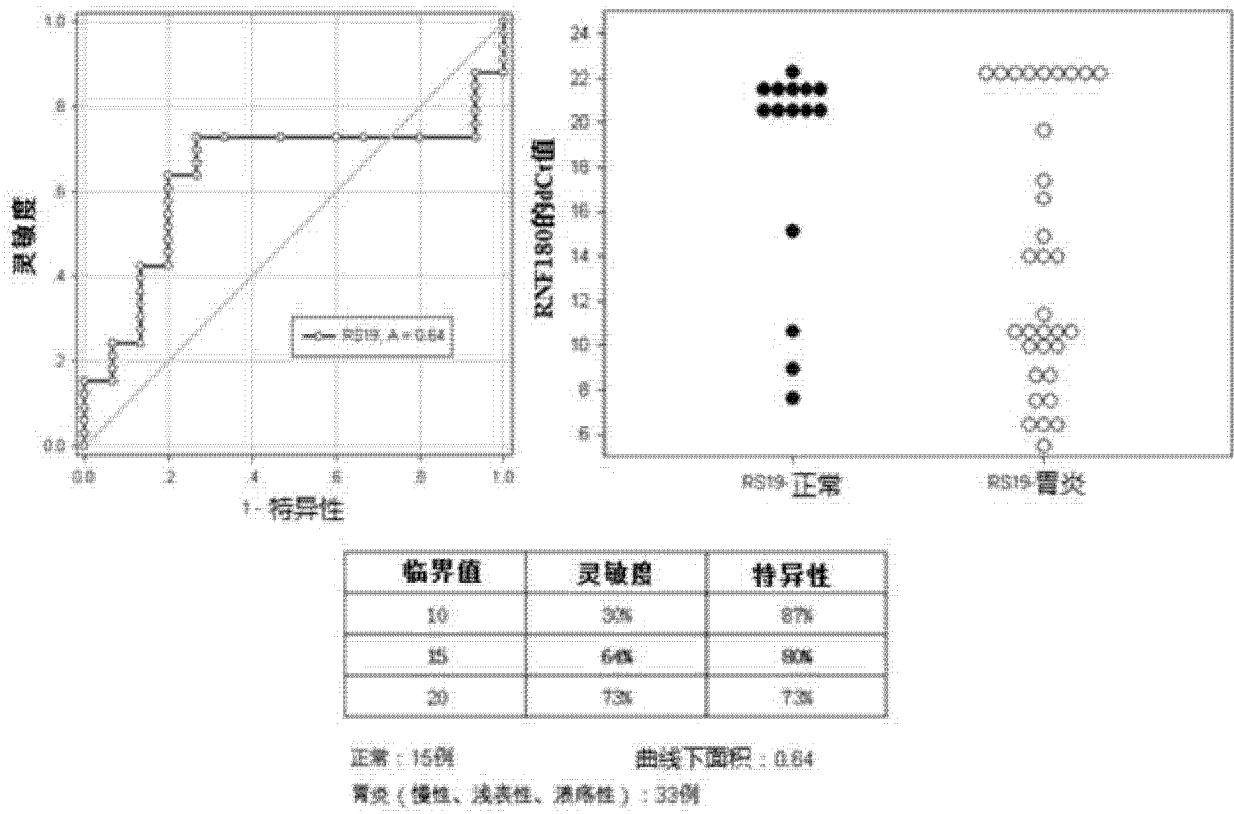


图 10

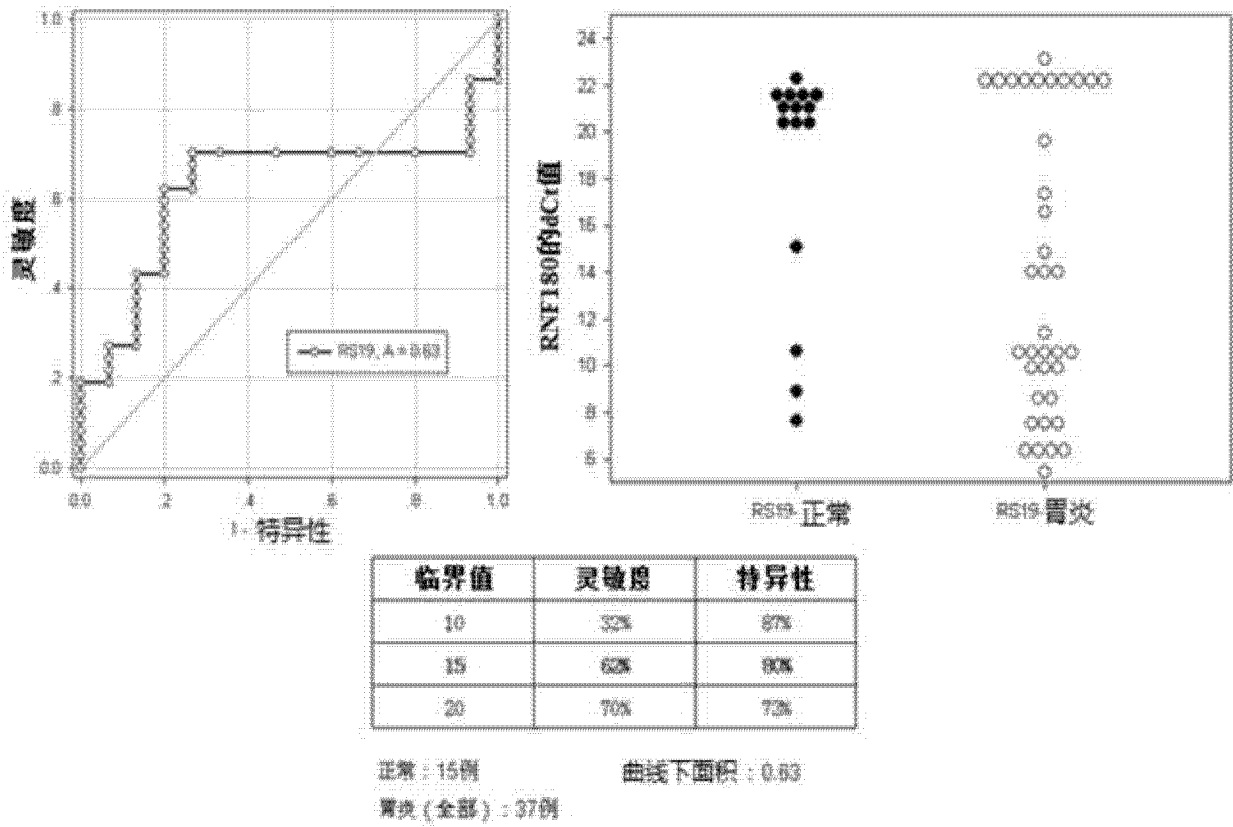


图 11