



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公告本

(11) 證書號數：TW I640635 B

(45) 公告日：中華民國 107 (2018) 年 11 月 11 日

(21) 申請案號：105110619

(22) 申請日：中華民國 105 (2016) 年 04 月 01 日

(51) Int. Cl. : C12Q1/68 (2018.01)

G01N33/574 (2006.01)

(71) 申請人：日祥生命科學股份有限公司 (中華民國) ISTAT BIOMEDICAL CO. LTD. (TW)

新北市汐止區新台五路 1 段 96 號 18 樓

(72) 發明人：張綺芬 CHANG, CHI FENG (TW)；王惠貞 WANG, HUEI JEN (TW)

(74) 代理人：鄭志玲

(56) 參考文獻：

TW 201408777A

TW 201514308A

審查人員：莊智惠

申請專利範圍項數：9 項 圖式數：6 共 36 頁

(54) 名稱

膀胱癌檢測方法及套組

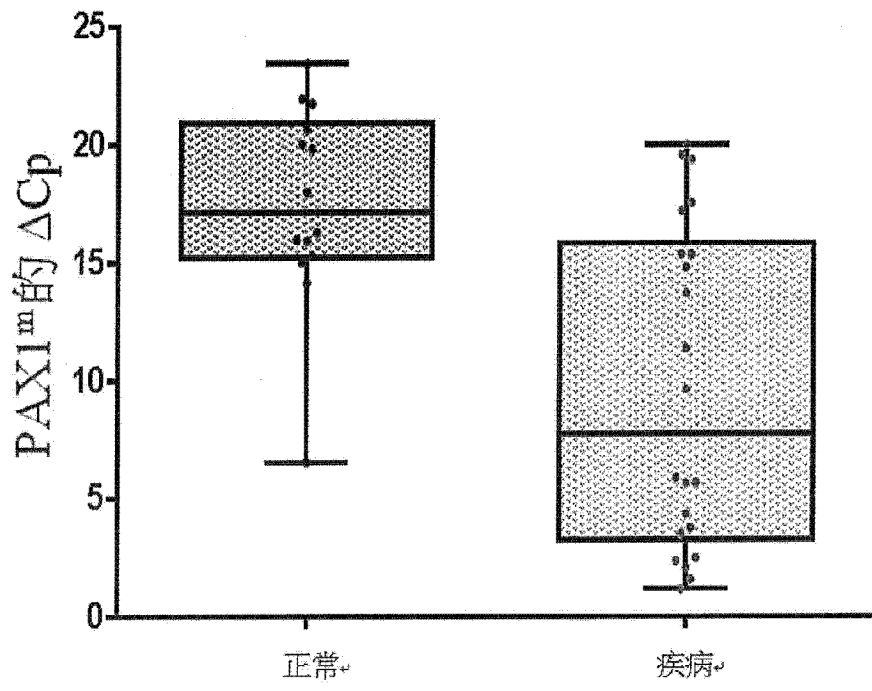
METHOD AND KITS FOR DETECTION OF BLADDER CANCER

(57) 摘要

本發明係關於診斷膀胱癌或泌尿系統癌症之方法及套組，係利用分析個體之檢體中一或多個目標基因甲基化狀態判斷膀胱或泌尿系統發生癌變的可能性，其中該目標基因係選自由 PAX1、SOX1、ZNF582、NKX6-1 及 PTPRR 組成之群。

The invention is related to a method and a kit for diagnosis of bladder or urinary system cancer through analysis of the DNA methylation status in one or more target genes in a sample from a subject in need thereof to detect the possibility of carcinogenesis in bladder or urinary system, wherein the target gene is selected from the group consisting of PAX1, SOX1, ZNF582, NKX6-1 and PTPRR.

指定代表圖：



【圖1】

**【發明說明書】**

**【中文發明名稱】** 膀胱癌檢測方法及套組

**【英文發明名稱】** METHOD AND KITS FOR DETECTION OF BLADDER  
CANCER

**【技術領域】**

**【0001】** 本發明係關於利用生物標記分子篩檢膀胱癌或泌尿系統癌症之檢測方法及套組。

**【先前技術】**

**【0002】** 癌症是目前世界上十大死亡原因之一，各國積極研究提早預防性檢測或是罹癌預後檢測的方法，期能在早期癌症時提早篩檢，提高治癒機率。傳統檢驗癌症的有無，例如X光、抹片、血液腫瘤標誌、超音波等等，癌症篩檢率約為0.2~0.3%，但這些檢驗與判讀往往耗工費時，方便性不足，且篩檢率偏低，迄今仍無法說服大眾這些一般性健康檢查能有效的早期診斷癌症。

**【0003】** 過去的研究顯示，在特定基因的高度甲基化(site-specific hypermethylation)與其功能的喪失有關，從而被利用在癌症診斷，例如，台灣專利第I-329743號(亦即美國專利US 7820386 B2)，是關於一種子宮頸癌高危險性篩檢的方法，利用檢測一子宮頸樣本檢體中目標基因的CpG序列甲基化狀態判斷子宮頸癌之可能性，該目標基因係由SOX1、PAX1、LMX1A、NKX6-1、WT1及ONECUT1所組成。另一件台灣專利第I-385252號(亦即美國專利US 8048634 B2)，也是利用檢測受測檢體細胞中目標基因甲基化的狀態以篩檢癌症的方法，

該目標基因係由PTPRR, ZNF582, PDE8B 及DBC1所組成。基因甲基化檢測學理雖發展已有相當時日，亦為學術研究者廣泛使用，然如欲應用於醫療檢測等臨床相關領域，則測試穩定度及具有重複性是非常重要的，針對不同目標基因於不同癌症醫療檢測之應用尚需進一步開發及驗證。

【0004】在美國癌症患者排名中，膀胱癌在男性名列前四名，女性則位居第九。每年有超過 47,000 位男性和 16,000 女性被診斷出膀胱癌。而一般膀胱癌或泌尿系統癌的診斷不外乎身體檢查、尿液培養、膀胱鏡、靜脈注射腎盂攝影術等，但尚無一可用於早期診斷之方法。

【0005】2011年Chung 等教示六種特定基因的甲基化與膀胱癌有關，包括 MYO3A、CA10、SOX11、NKX6-2、PENK及DBC1，可使用於尿液檢體臨床上之檢查。(Chung 等，Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 20(7):1483-1491, 2011)。另有一文獻提及BRCA1, RARB及WT1可供檢測膀胱癌，於尿液檢體中抑制甲基化的標識基因，利用包含多個抑制甲基化的標識基因之專一於甲基化的多叢連結依賴探針( methylation-specific multiplex ligation-dependent probe, MS-MLDP) 檢測尿液檢體(Cabello等，J. Mol. Diagn. 13:29-40, 2011)。但其他目標基因尚無建立與膀胱癌在臨床上的意義及相關驗證。

#### 【發明內容】

【0006】本發明之目的，即在提供針對膀胱癌或泌尿系統癌症檢測，有別於已知標識基因之具高特異性及靈敏度的標識基因，檢測檢體中該等基因甲基化的有無，進而判斷癌變發生的可能性，尤其可利用在早期診斷上。又因為方

法快速且簡便，且可用於尿液等檢體之檢測，成本低且對受檢個體不會造成壓力，可開發為一般消費者使用或大量篩檢的檢測套組。

【0007】因此，本發明一方面提供一種檢測膀胱癌或泌尿系統癌症之方法，包含：分析待檢測個體之檢體中一或多個目標基因甲基化狀態判斷膀胱或泌尿系統發生癌變的可能性，其中該目標基因係選自由PAX1、SOX1、ZNF582、NKX6-1及PTPRR組成之群，如一個體之檢體經檢測判定該目標基因有甲基化，判定膀胱或泌尿系統有發生癌變之可能性。

【0008】根據本發明之實施例，可用於尿液、血液、粘液、泌尿系統上皮細胞、黏膜脫落細胞或手術後之癌症組織等離體之檢體之檢測，泌尿系統尤佳為尿液。

【0009】根據本發明之實施例，本發明方法可用於早期診斷及術後或治療後追蹤。

【0010】根據本發明之實施例所述之癌症包含膀胱癌及泌尿道細胞癌。

【0011】另一方面，本發明提供用於一種檢測套組以供實施本發明方法。

#### 【圖式簡單說明】

【0012】圖1提供疾病組與正常組針對目標基因PAX1甲基化狀態之甲基化狀態分布。

【0013】圖2提供疾病組與正常組針對目標基因SOX1甲基化狀態之甲基化狀態分布。

【0014】圖3提供疾病組與正常組針對目標基因ZNF582甲基化狀態之甲基化狀態分布。

【0015】 圖4提供疾病組與正常組針對目標基因PAX1甲基化狀態檢測診斷膀胱癌發生可能性之ROC曲線及AUC。

【0016】 圖5提供疾病組與正常組針對目標基因SOX1甲基化狀態檢測診斷膀胱癌發生可能性之ROC曲線及AUC。

【0017】 圖6提供疾病組與正常組針對目標基因ZNF582甲基化狀態甲基化狀態檢測診斷膀胱癌發生可能性之ROC曲線及AUC。

### 【實施方式】

【0018】 本發明提供一種檢測膀胱癌或泌尿系統癌之方法，包含：分析待檢測個體之檢體中一或多個目標基因甲基化狀態判斷膀胱癌或泌尿系統發生癌變的可能性，其中該目標基因係選自由PAX1、SOX1、ZNF582、NKX6-1及PTPRR組成之群，如一個體檢體經檢測判定目標基因有甲基化，判定膀胱或泌尿系統有發生癌變之可能性。

【0019】 根據本發明，本發明方法可用以檢測泌尿系統不正常細胞增生現象，包括但不限於癌前病變檢測、腫瘤檢測、腫瘤復發檢測或腫瘤用藥預測或癒後效果檢測。

【0020】 本文中使用的術語「泌尿系統」，係指負責尿液的產生、運送、儲存與排泄之系統。人類的泌尿系統包括左右兩顆腎臟、左右兩條輸尿管、膀胱、內外兩道括約肌，以及尿道。

【0021】本文中使用的術語「檢體」，係指來自待測個體之體液或組織，包含但不限於尿液、血液、泌尿系統上皮細胞或手術後之癌症組織等離體之檢體。

【0022】為進行本發明目標基因及內部控制基因檢測，可以連鎖擴增產物之鑑定方法進行，包括但不限於螢光法、定序法(sequencing)、微陣列(microarrays)、質譜儀分析(mass spectrometer)、變性高效液相色譜(denaturing high-performance liquid chromatography, DHPLC)、焦磷酸定序(pyrosequencing)或免疫分析法(immunoassay)。

【0023】為實施本發明方法，本發明亦提供一種檢測套組，其包含：

- (1)含偵測目標基因之混合液，其至少包含有針對一或多個目標基因甲基化區域之正向引子、反向引子對或探針；其中該目標基因係選自由PAX1、SOX1、ZNF582、NKX6-1及PTPRR組成之群；
- (2)含偵測內部控制基因之混合液，其至少包含可偵測內部控制基因之正向引子、反向引子對或探針；
- (3)一聚合酶連鎖擴增反應主要混合液。

【0024】可參考台灣專利第I-513822號所述方法，將該待測個體檢體萃取出其gDNA，經適當前處理及化學反應，檢測檢體中基因CpG序列甲基化的存在與否。

【0025】根據本發明，該針對目標基因PTPRR甲基化區域之正向引子、反向引子或探針的序列係選自SEQ ID No：69-84所示之核苷酸序列，其具有至少80%或至少90%同一性之序列，與其任一序列中至少連續十個核苷酸相同之序列，及其互補序列組成之群。

【0026】 根據本發明，可利用該目標基因引子對及/或探針進行偵測。其目標基因引子對及/或探針序列係選自SEQ ID No：1-84所示之核苷酸序列，其具有至少有80%或90%同一性之序列，與其任一序列中至少連續十個核苷酸相同之序列，及其互補序列組成之群。

【0027】 根據本發明，其中該內部控制基因係選自於由以下至少一種或一種以上之基因：Col2A、 $\beta$ -Globin、GAPDH(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)、 $\beta$ -actin 所組成的群。

【0028】 根據本發明實施例，該可偵測內部控制基因擴增產物的正向引子、反向引子探針對及/或探針序列係選自SEQ ID No：85-94所示之核苷酸序列所示之核苷酸序列，其具有至少80%或至少90%同一性之序列，與其任一序列中連續至少十個核苷酸相同之序列，及其互補序列組成之群。

【0029】 根據本發明實施例，該聚合酶連鎖擴增反應主要混合液之主要成分至少包含聚合酶、dNTPs 及鎂鹽。

【0030】 根據本發明實施例，其中該偵測目標基因之混合液與偵測內部控制基因的混合液可混合成為單管核酸分子偵測混合液。

【0031】 以下提供實施本發明方法之具體實施例，用以闡述本發明之技術特徵與功效；但不應作為限縮或被解釋為實施本發明之限制。

【0032】 實施例

【0033】 實施例1 檢驗方法的建立及套組的製備

【0034】 參考台灣專利第I-513822號所述方法，於檢體中抽取其DNA，經重亞硫酸鹽（bisulfite）的轉換，並以表1至表6所示用於擴增目標基因PAX1、



SOX1、ZNF582、NKX6-1、PTPRR 甲基化區域及內部控制基因之引子及探針組  
進行甲基化檢測。

表 1 用來擴增目標基因 PAX1 甲基化區域之引子對及探針組

序列編號	PAX1 引子及探針組
SEQ ID No : 1	5' attcgcgcgttttcggcgtga 3'
SEQ ID No : 2	5' gttaaattgatttcgtacgtttag 3'
SEQ ID No : 3	5' tattttgggtttggggtcgc 3'
SEQ ID No : 4	5' ttattttgggtttggggtcgcg 3'
SEQ ID No : 5	5' gggcggtagcgcgtttcgtt 3'
SEQ ID No : 6	5' tagcggcgggcggtaggttttga 3'
SEQ ID No : 7	5' gtagtgacgggaattaatgagt 3'
SEQ ID No : 8	5' aacatcccacgaccacgccg 3'
SEQ ID No : 9	5' acgaccacgccgaaaaccgt 3'
SEQ ID No : 10	5' acaacaacgaaaaatacgcg 3'
SEQ ID No : 11	5' acgacgaaaaaacgacgacg 3'
SEQ ID No : 12	5' ttaaattgatttcgtacgtttag 3'
SEQ ID No : 13	5' gcgaccccaaaccctaaata 3'
SEQ ID No : 14	5' ctcccacaaactctccac 3'
SEQ ID No : 15	5' agtagcggcgggcggtaggtt 3'
SEQ ID No : 16	5' aacgaaacgcgtaccgcc 3'
SEQ ID No : 17	5' cgcgaccccaaaccctaaata 3'
SEQ ID No : 18	5' aaaacactctccacgcccgca 3'
SEQ ID No : 19	5' attgatttcgtacgtt 3'
SEQ ID No : 20	5' aacctaccgcccgctact 3'
SEQ ID No : 21	5' cctcccacaaactctccacg 3'

SEQ ID No : 22	5' cccgaaaaccgaaaaccg 3'
SEQ ID No : 23	5' acgccccgaaaaccgaaaaccg 3'
SEQ ID No : 24	5' atgccccgcccccttaccata 3'
SEQ ID No : 25	5' cctacctatgccccgccctta 3'

表 2 用來擴增目標基因 ZNF582 甲基化區域之引子對及探針組

序列編號	ZNF582 引子及探針組
SEQ ID No : 26	5' acgatttacgcggagtagaag 3'
SEQ ID No : 27	5' tgacggtttttgtttattcggttattc 3'
SEQ ID No : 28	5' agtgacggtttttgtttattcggttattc 3'
SEQ ID No : 29	5' cggagggatattgcggcgctcgggt 3'
SEQ ID No : 30	5' atgggaacgtaacggatga 3'
SEQ ID No : 31	5' atttaacgatttacgcggag 3'
SEQ ID No : 32	5' aaacgtacctacgcaatacgcga 3'
SEQ ID No : 33	5' cgaacgcaaacgtacctacgc 3'
SEQ ID No : 34	5' accgaacgcaaacgtacctacgca 3'
SEQ ID No : 35	5' acccaaacgcgcttcacca 3'
SEQ ID No : 36	5' cgaataaccgaataaac 3'
SEQ ID No : 37	5' tacgcgaaaaaatac 3'
SEQ ID No : 38	5' cgccgtacgcaaccga 3'
SEQ ID No : 39	5' atttcaaaataaaaccgaacgc 3'
SEQ ID No : 40	5' acccgaccttaaaccgaat 3'

表 3 用來擴增目標基因 SOX1 甲基化區域之引子對及探針組

序列編號	SOX1 引子及探針組
------	-------------

SEQ ID No : 41	5' gcgtttttttttcgttattggc 3'
SEQ ID No : 42	5' tgcgtttttttttcgttattggcg 3'
SEQ ID No : 43	5' cgcggcgcgctgttttgta 3'
SEQ ID No : 44	5' tggaggtcgttgaggatcg 3'
SEQ ID No : 45	5' cggcggtcggcgaggagata 3'
SEQ ID No : 46	5' gcgtttcgtttcgagcgta 3'
SEQ ID No : 47	5' aggatcgagcgtaggaggaa 3'
SEQ ID No : 48	5' cgcgctatctcctcctcctacg 3'
SEQ ID No : 49	5' gccgctacgcgctatctec 3'
SEQ ID No : 50	5' gcaacccaaacgccctcgac 3'
SEQ ID No : 51	5' cgatacgtaaacccgaccg 3'
SEQ ID No : 52	5' cgcggcgcgctgttttgta 3'
SEQ ID No : 53	5' cgatcctcaacgacctcca 3'
SEQ ID No : 54	5' cgatacgtaaacccgaccg 3'
SEQ ID No : 55	5' gctcgatcctcaacgacctc 3'
SEQ ID No : 56	5' acgatcgaaatcgccgtctt 3'

表 4 用來擴增目標基因 NKX6-1 甲基化區域之引子對及探針組

序列編號	NKX6-1 引子及探針組
SEQ ID No : 57	5' tgtcgtttttcgctggaggg 3'
SEQ ID No : 58	5' cgtggtcgtgggatgtagc 3'
SEQ ID No : 59	5' acggttttcggcgtggtcgt3'
SEQ ID No : 60	5' ttcgggcgcgctcgagtgtt 3'
SEQ ID No : 61	5' cgctaccgaaaattactcg 3'
SEQ ID No : 62	5' cgaataccctccattacc3'

SEQ ID No : 63	5' acaaacaacgaaaaatacgcg3'
SEQ ID No : 64	5' aacactcgacgcgccccgaa 3'
SEQ ID No : 65	5' aacatcccacgaccacgccg 3'
SEQ ID No : 66	5' acgaccacgccgaaaaccgt 3'
SEQ ID No : 67	5' acaaacaacgaaaaatacgcg 3'
SEQ ID No : 68	5' acgacgaaaaaaaaacgacgacg3'

表 5 用來擴增目標基因 PTPRR 甲基化區域之引子對及探針組

序列編號	PTPRR 引子及探針組
SEQ ID No : 69	5' gcggtgtgtgggtgtt3'
SEQ ID No : 70	5' aagtcgctgtaagattcggagaagcgg3'
SEQ ID No : 71	5' cggcgttgggtatgtagtagtc3'
SEQ ID No : 72	5' agtcgcgcggttgtgttg 3'
SEQ ID No : 73	5' tgggtatgtagtagtcgccc 3'
SEQ ID No : 74	5' agattcggagaagcgggaattt3'
SEQ ID No : 75	5' gttggcgcgagtttattt 3'
SEQ ID No : 76	5' tacctaaccttctaaacgcccc 3'
SEQ ID No : 77	5' actaaacatacccaacgccgacc 3'
SEQ ID No : 78	5' acgacaaatacctaaccttctaaacgccc3'
SEQ ID No : 79	5' acgacaaatacctaacctt 3'
SEQ ID No : 80	5' tccgaaattcaaatcctcgacta 3'
SEQ ID No : 81	5' aattacgaataaaaaaaaaacaaaaacgctc3'
SEQ ID No : 82	5' accgcaaaaaatcttctaatctccgaa 3'
SEQ ID No : 83	5' ttgtcggcggttagattgattgtt3'
SEQ ID No : 84	5' caatcaatctataacgccgacaaa3'

表 6 用來擴增內部控制組基因甲基化區域之引子對及探針組

序列編號	內部基因控制組引子及探針組
SEQ ID No : 85	5' agggttatTTTgaaaaggagatat 3'
SEQ ID No : 86	5' tTTTaagggaagatggatagaag 3'
SEQ ID No : 87	5' agaggtggggataggtattgggt 3'
SEQ ID No : 88	5' cttctatcccatcttccc 3'
SEQ ID No : 89	5' ttcattctaaccaatacct 3'
SEQ ID No : 90	5' tgtagagtaaagtatagagt 3'
SEQ ID No : 91	5' aaccaatacctatccccacctc 3'
SEQ ID No : 92	5' aacaattataaactccaaccaccaaac 3'
SEQ ID No : 93	5' actccaaccaccaaacttcattct 3'
SEQ ID No : 94	5' accgaccccaactaatacccg 3'

【0035】 聚合酶連鎖反應PCR擴增反應方法步驟如下：(i)在95°C下活化聚合酶10分鐘，(ii)在95°C下變性DNA模板10秒及在60°C下鍵合/延長DNA鏈40秒，及(iii)進行變性/鍵合/延長循環30至50次。

【0036】 同時針對不同目標基因或其基因組合可製成診斷套組，供市售或方便使用，其包含：

- 含目標基因引子及/或探針之混合液，其至少包含針對一或多個目標基因甲基化區域之正向引子、反向引子對及/或探針；
- 含內部控制基因之混合液，其至少包含針對內部控制基因之正向引子、反向引子對及/或探針；

-聚合酶連鎖擴增反應主要混合液；及

- 正對照組：一個目標基因及內部控制組基因。

【0037】 實施例2 不同目標基因的甲基化分析

【0038】 本實施例採6個與泌尿系統相關癌症細胞株或上皮細胞相關的癌症細胞株進行測試，利用表1至表6所揭示用來擴增目標基因PAX1、ZNF582、SOX1、NKX6-1、PTPRR及內部控制組基因甲基化區域之引子對及探針組，來進行不同目標基因的甲基化程度之分布分析，甲基化程度以目標基因與內控基因之Cp值(循環數值)差異計算： $\Delta Cp = Cp_{\text{目標基因}} - Cp_{\text{內部控制組}}$ 。PAX1、SOX1、ZNF582、NKX6-1及PTPRR之甲基化狀態分析結果與已知標識基因WT1、DBC1比較如表7所示。

表7 不同目標基因甲基化檢測泌尿系統癌症細胞株的結果

癌細胞株	組織來源	目標基因						
		PAX1	ZNF582	SOX1	NKX6.1	PTPRR	WT1	DBC1
HT 1376	膀胱	+	+	+	+	-	-	-
HT 1197	膀胱	+	-	+	-	-	-	+
T24	膀胱	+	+	+	+	+	+	+
BFTC 905	膀胱	+	-	+	+	+	+	+
BFTC 909	腎臟/ 腎盂	+	+	+	-	+	+	+
RT4	膀胱	+	+	+	+	+	+	+

--	--	--	--	--	--	--	--	--

【0039】 實施例3 不同目標基因的甲基化分析

【0040】 本實施例採6個癌症組織，利用表1至表6所揭示用來擴增目標基因PAX1、ZNF582、SOX1、NKX6-1、PTPRR及內部控制組基因甲基化區域之引子對及探針組，來進行不同目標基因的甲基化程度之分布分析，甲基化程度以目標基因與內控基因之Cp值(循環數值)差異計算： $\Delta Cp = Cp_{\text{目標基因}} - Cp_{\text{內部控制組}}$ 。PAX1、SOX1、ZNF582、NKX6-1及PTPRR之甲基化狀態分析檢測膀胱癌與肺癌結果如表8所示，顯示該等目標基因相對於肺癌細胞，特別專一於膀胱癌之檢測。

表 8 不同目標基因於膀胱癌與肺癌細胞之甲基化表現

樣品編號	癌細胞種類	癌症階段	PAX1	SOX1	ZNF582	NKX6.1	PTPRR
CM1	膀胱癌	I	-	++	-	++	-
CM2	膀胱癌	I	++	++	+	++	-
CM3	膀胱癌	II	-	++	++	+	++
CM4	膀胱癌	II	++	++	++	-	+
CM5	膀胱癌	I	++	++	-	+	++
13440	肺癌		-	+	-	-	-
3038A3	肺癌		-	-	-	-	-
12809A4	肺癌		-	+	-	+	-
20349B2	肺癌		-	+	-	-	-
12976B3	肺癌		-	-	-	-	-
15179	肺癌		-	+	-	-	-
14821	肺癌		-	+	-	-	-

10477	肺癌		-	-	-	-	-
2887	肺癌		+	-	-	-	-
16057	肺癌		-	-	-	-	-
9827A1	肺癌		-	-	-	-	-
2649	肺癌		-	-	-	-	-
13585	肺癌		-	+	-	+	-

**【0041】 實施例4 不同目標基因的甲基化程度分析**

**【0042】** 本實施例採14個正常尿液檢體（正常組）及22個確診為膀胱癌個體的尿液檢體（疾病組），利用表1至表6所揭示用來擴增目標基因PAX1、ZNF582、SOX1及內部控制組基因甲基化區域之引子對及探針組，來進行不同目標基因的甲基化程度之分布分析，甲基化程度以目標基因與內控基因之Cp值(循環數值)差異計算： $\Delta Cp = Cp_{\text{目標基因}} - Cp_{\text{內部控制組}}$ 。PAX1、SOX1及ZNF582之甲基化狀態分析結果如圖1、2及3所示。

**【0043】** 如圖1、2及3所示，疾病組針對不同目標基因PAX1、SOX1及ZNF582之甲基化狀態分布及其平均值相對於正常組，均有一顯著的差異，足以區分為癌變檢體與正常檢體，證實確可作為篩檢膀胱癌有無的篩檢指標。

**【0044】 實施例5 尿液檢體檢測方法敏感度及特異性之計算**

**【0045】** 本實施例使用已確診為正常（正常組）與膀胱癌（疾病組）的尿液檢體共36個，包括正常組14個及疾病組22個，經抽取DNA，重亞硫酸鹽（bisulfite）轉換，並以表1至表3揭示用於擴增PAX1、SOX1及ZNF582甲基化區域之引子對及探針組檢測其甲基化狀態，分別針對目標基因PAX1、SOX1及ZNF582甲基化區域及其不同組合進行分析，並計算使用該等目標基因或目標基



因組合檢驗方法之敏感度(sensitivity)及特異性(specificity)，其結果見表9。進一步分析其接收者操作特徵曲線 (Receiver Operating Characteristic Curve, ROC曲線) 並計算曲線下面積 (Area under the Curve, AUC)，針對不同目標基因PAX1、SOX1及ZNF582甲基化狀態檢測診斷膀胱癌發生可能性之ROC曲線及AUC如圖4、5及6所示。

【0046】如表9所示，不同目標基因於正常組呈現甲基化之檢體數，以單一基因分析分別為PAX1有1位，SOX1有2位及ZNF582有1位，以其組合分析分別為PAX1/ ZNF582有1位，PAX1/SOX1有2位，SOX1/ZNF582有2位，以及PAX1/SOX1/ZNF582有2位；而於疾病組呈現甲基化之檢體數，以單一基因分析分別為PAX1有17位，SOX1有18位及ZNF582有13位，以其組合分析分別為PAX1/ZNF582有18位，PAX1/SOX1有18位，SOX1/ZNF582有19位，以及PAX1/SOX1/ZNF582有19位，計算其膀胱癌診斷之敏感度均在50%以上，甚至高達86%以上(SOX1/ZNF582)，其特異性則高於85%，更高達92%以上(PAX1及ZNF582)，足以證實該等基因及其任一組合可作為膀胱癌的篩檢指標。

【0047】綜上，無論是檢測單獨的PAX1、SOX1、ZNF582之甲基化狀態，或其任一組合，均可有效於尿液、組織檢體中診斷膀胱或泌尿系統發生癌變的可能性。

表 9 不同目標基因甲基化檢測診斷膀胱癌結果以及敏感度與特異性

目標基因	正常組 (n=14)	疾病組 (n=22)	敏感度	特異性
PAX1	1	17	77.27%	92.86%
SOX1	2	18	81.82%	85.71%

ZNF582	1	13	59.09%	92.86%
PAX1/ZNF582	1	18	81.82%	92.86%
PAX1/SOX1	2	18	81.82%	85.71%
SOX1/ZNF582	2	19	86.36%	85.71%
PAX1/SOX1/ZNF582	2	19	86.36%	85.71%

**【符號說明】**

無

**【生物材料寄存】**

無

## 序列表

<110> 日祥生命科學股份有限公司

<120> 膀胱癌檢測方法及套組

<160> 80

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子或探針

<400> 1

attcgcgcgt tttcggcgtg a

21

<210> 2

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子或探針

<400> 2

gttaaattga ttttcgtacg ttgtag

26

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子或探針

<400> 3

tattttgggt ttggggtcgc

20

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子或探針

<400> 4

ttattttggg tttggggtcg cg

22

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子或探針

<400> 5  
gggcggtagc gcgtttcgtt 20

<210> 6  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 引子或探針

<400> 6  
tagcggcggc gtaggtttt gga 23

<210> 7  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 引子或探針

<400> 7  
gtagtgacgg gaattaatga gt 22

<210> 8  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 引子或探針

<400> 8  
aacatcccac gaccacgccg 20

<210> 9  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 引子或探針

<400> 9  
acgaccacgc cgaaaaccgt 20

<210> 10  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 引子或探針

<400> 10  
 acaaacaacg aaaaatacgc g 21

<210> 11  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 引子或探針

<400> 11  
 acgacgaaaa aaacgacgac g 21

<210> 12  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 引子或探針

<400> 12  
 ttaaattgat tttcgtacgt tgtag 25

<210> 13  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 引子或探針

<400> 13  
 gcgaccccaa acccaaaata 20

<210> 14  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 引子或探針

<400> 14  
 ctccaaaac actctccac 19

<210> 15  
 <211> 2  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 引子或探針

<400> 15  
 agtagcggcg gcggtaggtt 20

<210> 16  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 引子或探針

<400> 16  
 aacgaaacgc gctaccgccc 20

<210> 17  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 引子或探針

<400> 17  
 cgcgacccca aaccctaaaat a 21

<210> 18  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 引子或探針

<400> 18  
 aaaacactct ccacgcccgc ga 22

<210> 19  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 引子或探針

<400> 19  
 attgattttc gtacggtt 17

<210> 20  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 引子或探針

<400> 20  
 aacctaccgc cgccgctact 20

<210> 21  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 引子或探針  
  
 <400> 21  
 cctcccaaaa cactctccac g 21

<210> 22  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 引子或探針  
  
 <400> 22  
 cccgaaaacc gaaaaccg 22

<210> 23  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 引子或探針  
  
 <400> 23  
 acgcccgaaa accgaaaacc g 21

<210> 24  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 引子或探針  
  
 <400> 24  
 atcgcccgcc ccttaccat a 21

<210> 25  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 引子或探針  
  
 <400> 25  
 cctacctatc gcccgcccct ta 22

<210> 26  
 <211> 22

<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 引子或探針		
<400> 26		22
acgatttacg cggagttaga ag		
<210> 27		
<211> 28		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 引子或探針		
<400> 27		28
tgacggtttt ttgtttattc ggttattc		
<210> 28		
<211> 30		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 引子或探針		
<400> 28		30
agtgacgggt tttgtttat tcggttattc		
<210> 29		
<211> 23		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 引子或探針		
<400> 29		23
cggagggata ttgcggcgtc ggt		
<210> 30		
<211> 19		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 引子或探針		
<400> 30		19
atgggaacgt aacggatga		
<210> 31		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> 人工序列		



&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 引子或探針

&lt;400&gt; 31

atttaacgat ttacgaggag

20

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 引子或探針

&lt;400&gt; 32

aaacgtacct acgcaatacg cga

23

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 引子或探針

&lt;400&gt; 33

cgaacgcaaa cgtacctacg c

21

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 引子或探針

&lt;400&gt; 34

accgaacgca aacgtaccta cgca

24

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 引子或探針

&lt;400&gt; 35

acccaaaacg cgcctccacc a

21

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 引子或探針

<400> 36  
cgaataaccg aataaac

17

<210> 37  
<211> 15  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 引子或探針

<400> 37  
tacgcgaaaa aatac

15

<210> 38  
<211> 16  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 引子或探針

<400> 38  
cgccgtacgc aaccga

16

<210> 39  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 引子或探針

<400> 39  
atttcaaaat aaaaccgaac gc

22

<210> 40  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 引子或探針

<400> 40  
accgcacctt aaaaccgaat

20

<210> 41  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 引子或探針

<400> 41

gcgttttttt tttttcgta ttggc

25

<210> 42  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 引子或探針

<400> 42  
 tgcgtttttt tttttcgtt attggcg

27

<210> 43  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 引子或探針

<400> 43  
 cgcggcgcgt cgttttgta

20

<210> 44  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 引子或探針

<400> 44  
 tggaggtcgt tgaggatcg

19

<210> 45  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 引子或探針

<400> 45  
 cggcggtcgg cgaggagata

20

<210> 46  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 引子或探針

<400> 46  
 gcgttttcgt ttcgagcgta

20

<210> 47  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 引子或探針

<400> 47  
 aggatcgagc gtaggaggaa 20

<210> 48  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 引子或探針

<400> 48  
 cgcgctatct ccttctcct acg 23

<210> 49  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 引子或探針

<400> 49  
 gccgctacgc gctatctcc 19

<210> 50  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 引子或探針

<400> 50  
 gcaaccctaaa cgccctcgac 20

<210> 51  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 引子或探針

<400> 51  
 cgatagccta aaccgaccc g 21

<210> 52

<211> 20  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 引子或探針

<400> 52  
 cgcggcgcgt cgttttgta

20

<210> 53  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 引子或探針

<400> 53  
 cgatcctcaa cgacctcca

19

<210> 54  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 引子或探針

<400> 54  
 cgatagcta aacccgaccc g

21

<210> 55  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 引子或探針

<400> 55  
 gctcgatcct caacgacctc

20

<210> 56  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 引子或探針

<400> 56  
 acgatcgaat tcgccgtctt

20

<210> 57  
 <211> 25  
 <212> DNA

<213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 引子或探針

<400> 57  
 agggttatatt tgaaaaggga gatat 25

<210> 58  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 引子或探針

<400> 58  
 ttttaagggg aagatgggat agaag 25

<210> 59  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 引子或探針

<400> 59  
 agaggtgggg ataggtattg ggt 23

<210> 60  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 引子或探針

<400> 60  
 cttctatccc atcttccc 18

<210> 61  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 引子或探針

<400> 61  
 ttcattctaa cccaatacct 20

<210> 62  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>

<223> 引子或探針

<400> 62  
tgtagagta aagtatagag t 21

<210> 63

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子或探針

<400> 63  
aacccaatac ctatccccac etc 23

<210> 64

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子或探針

<400> 64  
aacaattata aactccaacc accaaac 27

<210> 65

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子或探針

<400> 65  
actccaacca ccaaacccttc attct 25

<210> 66

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子或探針

<400> 66  
accgacccca ctaataccg 20

申請案號：105110619

公告本

申請日：105.4.1

IPC分類：

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/54 (2006.01)

I640635

【發明摘要】

【中文發明名稱】膀胱癌檢測方法及套組

【英文發明名稱】METHOD AND KITS FOR DETECTION OF BLADDER  
CANCER

【中文】

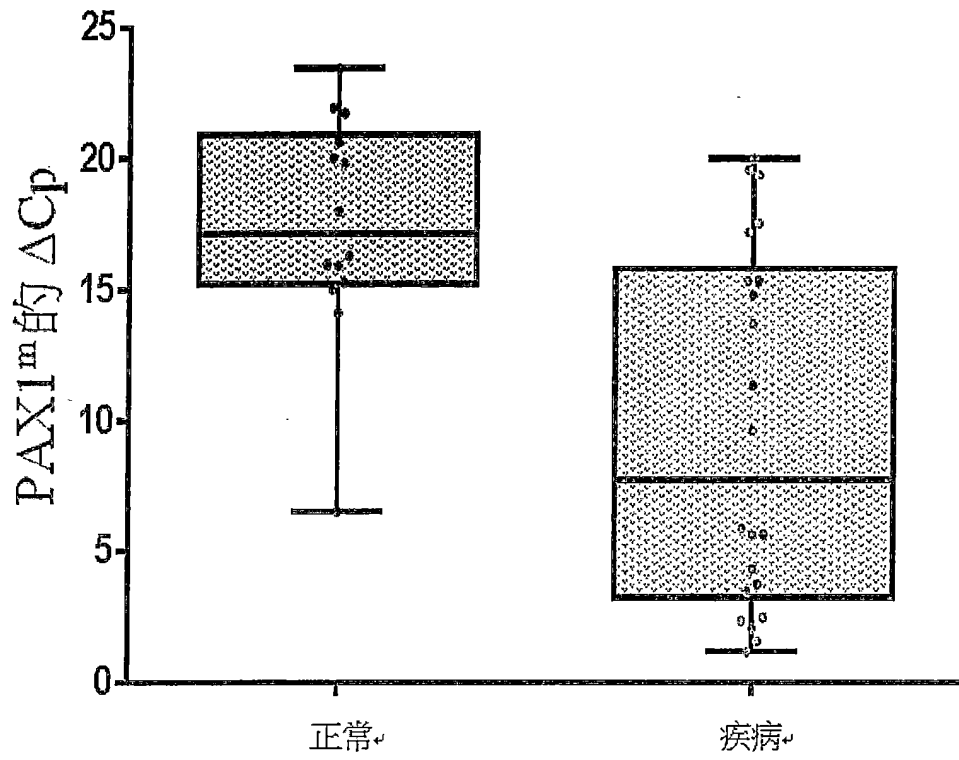
本發明係關於診斷膀胱癌或泌尿系統癌症之方法及套組，係利用分析個體之檢體中一或多個目標基因甲基化狀態判斷膀胱或泌尿系統發生癌變的可能性，其中該目標基因係選自由PAX1、SOX1、ZNF582、NKX6-1及PTPRR組成之群。

【英文】

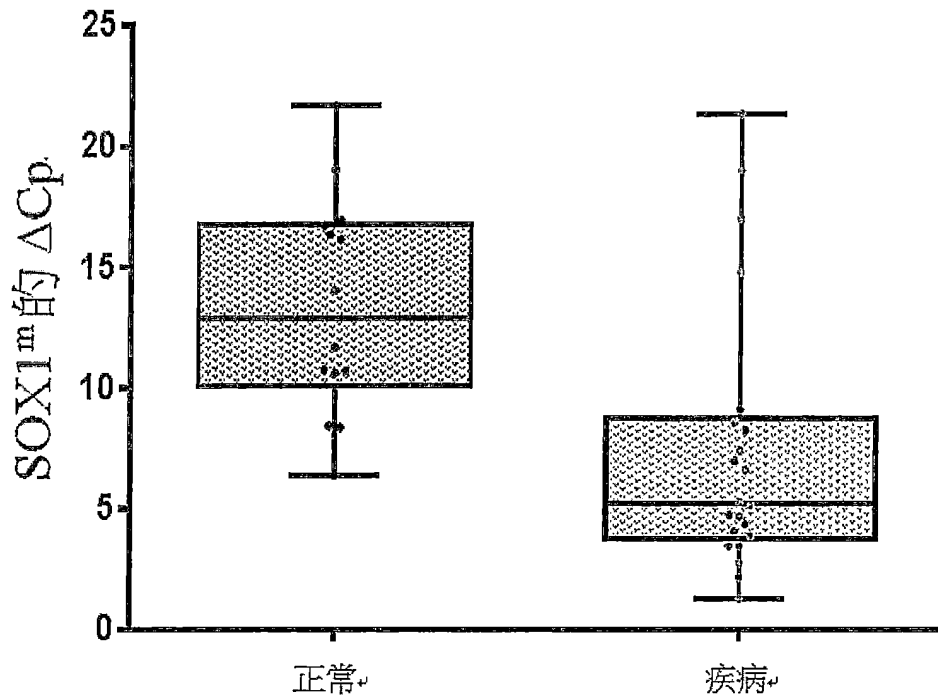
The invention is related to a method and a kit for diagnosis of bladder or urinary system cancer through analysis of the DNA methylation status in one or more target genes in a sample from a subject in need thereof to detect the possibility of carcinogenesis in bladder or urinary system, wherein the target gene is selected from the group consisting of PAX1, SOX1, ZNF582, NKX6-1 and PTPRR.



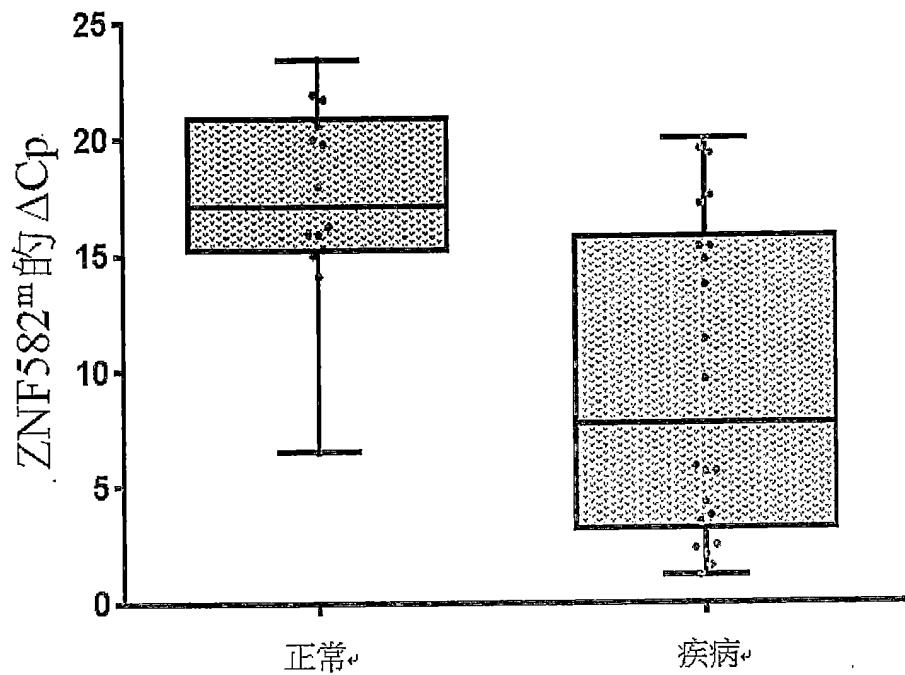
【發明圖式】



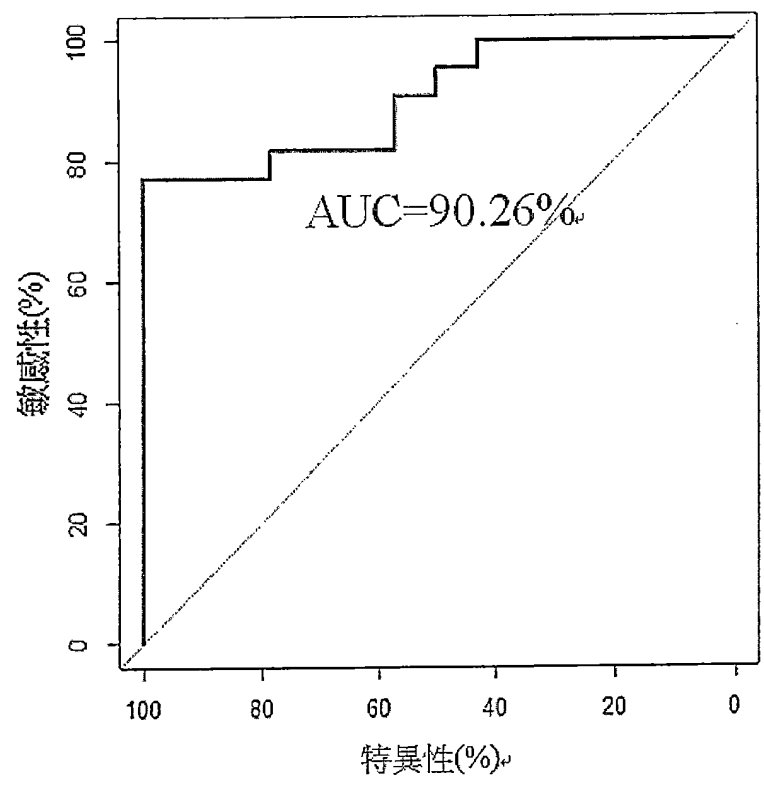
【圖1】



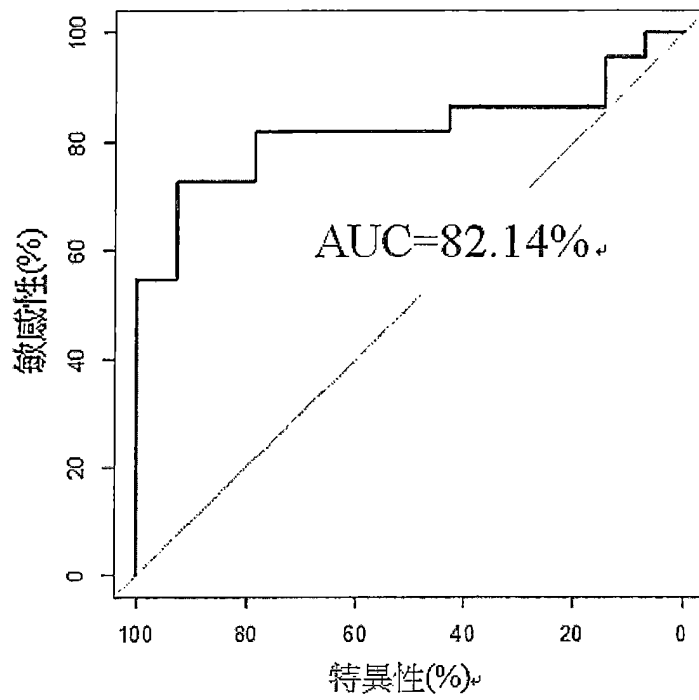
【圖2】



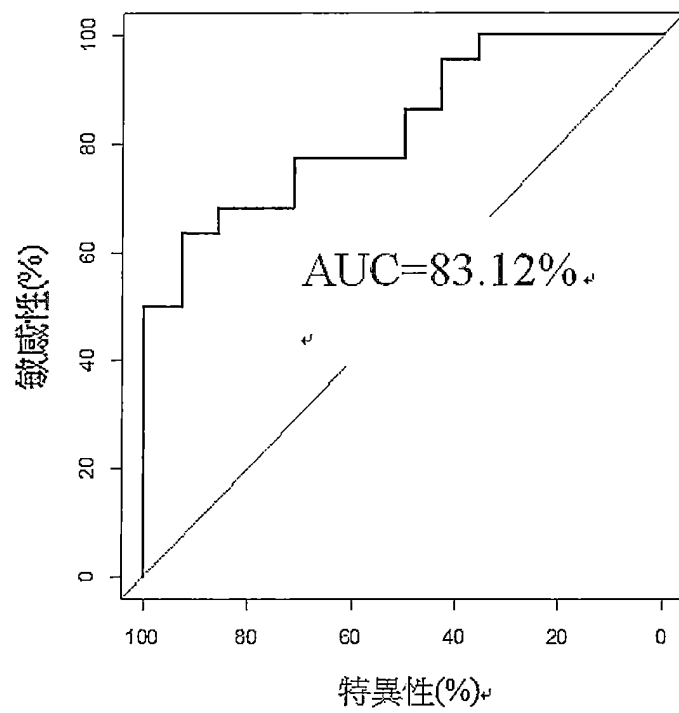
【圖3】



【圖4】



【圖5】



【圖6】

【指定代表圖】圖1

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

**【發明申請專利範圍】**

【第1項】一種檢測膀胱癌或泌尿系統癌症之方法，包含：分析待檢測個體之檢體中PAX1與SOX1為目標基因組合之甲基化、PAX1與ZNF582為目標基因組合之甲基化、或PAX1與SOX1與ZNF582為目標基因組合之甲基化狀態判斷膀胱或泌尿系統發生癌變的可能性，如一個體檢體經檢測判定目標基因有甲基化，判定膀胱或泌尿系統組織有發生癌變之可能性。

【第2項】根據請求項1所述之方法，其用以檢測泌尿系統不正常細胞增生現象。

【第3項】根據請求項2所述之方法，其中待檢測之不正常細胞增生包含癌前病變檢測、腫瘤檢測、腫瘤復發檢測或腫瘤用藥預測或癒後效果檢測。

【第4項】根據請求項1所述之方法，其中該檢體為尿液、血液、粘液、黏膜脫落細胞、泌尿系統上皮細胞或手術後之癌症組織等離體之檢體。

【第5項】根據請求項1所述之方法，其中該檢體為尿液。

【第6項】根據請求項1所述之方法，其係用於早期診斷或治療追蹤。

【第7項】根據請求項1所述之方法，其中該泌尿系統癌症為泌尿道細胞癌。

【第8項】根據請求項1所述之方法，其包含由該待測個體檢體萃取出其gDNA，經適當前處理及化學反應，檢測檢體中基因CpG序列甲基化的存在與否，判定該待測個體有發生癌變之可能性。

【第9項】根據請求項1所述之方法，其中該目標基因甲基化狀態係以連鎖擴增產物後以螢光法、定序法(sequencing)、微陣列(microarrays)、質譜儀分析(mass

spectrometer) 、變性高效液相色譜 (denaturing high-performance liquid chromatography, DHPLC) 、焦磷酸定序 (pyrosequencing) 或免疫分析法 (immunoassay) 分析。