

用于结直肠癌检测的组合物、试剂盒及应用

技术领域

本发明涉及生物技术领域，具体涉及一种用于结直肠癌检测的组合物、试剂盒及应用。

5

背景技术

发生在下消化道结肠、直肠部位的结直肠癌是一种常见的恶性肿瘤。据最新统计数字显示，全世界范围内结直肠癌的新发病例数在男性中排第三位、在女性中排第二位，死亡比例数在男性中排第四位、女性中排第三位（Bray 等，2018）。在我国，结直肠癌的防控形势也十分严峻，为恶性肿瘤新发病例的第三位（38.8 万人）、死亡病例的第五位（18.7 万人）（郑荣寿等，2019）。结直肠癌发展缓慢，一般会经历息肉、腺瘤、肠癌等过程，从腺瘤发展成为肠癌时间可长达 5-10 年。而如在结直肠癌发展早期进行干预，可显著降低死亡率。I 期结直肠癌患者的五年生存率可达 90%以上，而 IV 期结直肠癌患者的五年生存率低于 20%（Marzich Araghi 等，2020）。

传统的结直肠癌早筛技术主要有肠镜、大便潜血试验、肿瘤标志物 CEA 和 CA19-9 等，这些技术手段目前均存在一定的局限性。肠镜检查是肠癌诊断的金标准，通过从肛门插入镜头及光源，循腔经直肠、乙状结肠等部位可达回肠末端，图像可实时传输到显示器上，供操作医生观察。肠镜的图像直观、清晰，可观察到癌、息肉、溃疡、出血等多种病变，还可对息肉等进行镜下摘除等操作。但其为一种侵入性的检测技术，准备过程复杂，需控制饮食及进行肠道清洁，待检者的依从性低。且对设备和人员有要求，需要在医院专业人员和麻醉师操作，部分受检者会有不适感并且有产生并发症的风险（3-5 例/1000 人）。大便潜血试验是一种无创的方法，通过检测大便中的血液成分（血红蛋白）来判别有无消化道出血，以便医生判断肠癌风险。该方法快捷简便，待检者依从性较高。但该检测方法易受到饮食中的肝脏、血液制品、绿叶蔬菜等影响出现假阳性，同时对出血量较少的早期结直肠癌患者的灵敏度低，易出现漏诊。而 CEA 等作为广谱的肿瘤标志物，特异度低，易产生较多的假阳性，灵敏度亦有限。因此，需要建立一种准确、简便、经济的结直肠癌早期筛查方法。

DNA 甲基化是一种重要的基因表达调控机制，能够调节基因的表达和沉默，在肿瘤的发生发展中具有重大的影响。癌症相关基因的异常甲基化常出现于癌症发生的早期，因此 DNA 甲基化信号被认为是有潜力的肿瘤早期筛查标志物。人的粪便样本中混杂有肠道细胞 DNA，这些 DNA 携带有甲基化等信息，通过检测和分析这些信息，可推断受检者罹患肠癌的可能性。已有部分基因被证明了可以作为粪便中肠癌检测的甲基化标志物，例如 SFRP2，

SEPT9, NDRG4 和 SDC2 等 (Hannes M Müller 等, 2004; Jie Chen 等, 2019), 但它们的性能尚不能完全满足临床需求, 例如 SFRP2 对肠癌的灵敏度和特异性仅为 77% (Hannes M Müller 等, 2004)。

5 发明内容

本发明旨在至少在一定程度上解决相关技术中的技术问题之一, 提供了一种用于结直肠癌检测的组合物、试剂盒及应用。所提供的组合物可以用来检测结直肠癌, 其特异性和灵敏度均很高, 可以辅助临床检测, 丰富结直肠癌的诊断和检测。

具体而言, 本发明提供了如下技术方案:

10 在本发明的第一方面, 本发明提供了一种用于结直肠癌检测的组合物, 包含用于检测 *ADHFE1* 基因、*PPP2R5C* 基因和 *SDC2* 基因甲基化状态的试剂。

在本发明的第二方面, 本发明提供了一种用于结直肠癌诊断的试剂盒, 所述试剂盒包括上述第一方面用于结直肠癌检测的组合物。

在本发明的第三方面, 本发明提供了一种确定样品中基因甲基化状态的方法, 所述基
15 因包括 *SDC2* 基因、*ADHFE1* 和 *PPP2R5C* 基因, 所述方法包括:

(1) 获取基因组 DNA, 所述基因组 DNA 来自于所述样品;

(2) 对所述基因组 DNA 进行甲基化转化处理, 以便获得转化产物, 所述基因组 DNA 经过甲基化处理, 甲基化位点和非甲基化位点表现出差异;

(3) 利用引物组和探针对所述转化产物进行荧光定量 PCR 检测, 以便确定样品中基因
20 甲基化状态。

在本发明的第四方面, 本发明提供了一种分离的核酸序列, 所述分离的核酸序列包括引物组和探针, 所述引物组包括: (a) SEQ ID NO:3~SEQ ID NO:40 所示序列中的至少一对,

(b) SEQ ID NO:41~SEQ ID NO:60 所示序列中的至少一对; 以及

(c) SEQ ID NO:61~SEQ ID NO:98 所示序列中的至少一对;

25 所述探针包括:

SEQ ID NO:100~SEQ ID NO:112 所示序列中的至少一个,

SEQ ID NO:113~SEQ ID NO:127 所示序列中的至少一个,

SEQ ID NO:128~SEQ ID NO:142 所示序列中的至少一个。

在本发明的第五方面, 本发明提供了一种评估受试者结直肠癌患病状态的方法, 所述方
30 法包括: a) 提供受试者的样品, 所述样品含有所述受试者的靶标核酸, 所述靶标核酸包括 *ADHFE1* 基因、*PPP2R5C* 基因和 *SDC2* 基因; b) 评估所述靶标核酸的甲基化状态; 和 c)

基于所述靶标核酸的甲基化状态，评估所述受试者结直肠癌患病状态。

本发明的附加方面和优点将在下面的描述中部分给出，部分将从下面的描述中变得明显，或通过本发明的实践了解到。

5 附图说明

本发明的上述和/或附加的方面和优点从结合下面附图对实施例的描述中将变得明显和容易理解，其中：

图1是根据本发明的实施例提供的TCGA数据库中结直肠癌与非肠癌样本的甲基化水平示意图；

10 图2是本发明的实施例2中阳性标准品的荧光定量PCR扩增曲线图。

图3是本发明的实施例2中阴性标准品的荧光定量PCR扩增曲线图。

图4是本发明的实施例3所提供的用于结直肠癌诊断的试剂盒的检测流程图。

图5是本发明的实施例3中各基因检测结直肠癌样本的ROC曲线图。

15 具体实施方式

下面详细描述本发明的实施例，需要说明的是，所描述的实施例是示例性的，旨在用于解释本发明，而不能理解为对本发明的限制。在对本发明所提供的方案描述的过程中，对于文中有关的术语进行了解释和说明，这些解释和说明仅仅是为了方便对于方案的理解，并不能看做是对本发明保护方案的限制。

20 在本发明的一个方面，本发明提供了一种用于结直肠癌检测的组合物，包含用于检测 *ADHFE1* 基因、*PPP2R5C* 基因和 *SDC2* 基因的试剂。本文中所提到的组合物不要求必须两种或者以上的物质以混合接触的形式存在，所提到的组合物是指在使用时在同一环境下应用。例如，在检测结直肠癌时，同时检测 *ADHFE1* 基因、*PPP2R5C* 基因和 *SDC2* 基因的甲基化状态。

25 本文中所提及的 *ADHFE1* 基因、*PPP2R5C* 基因和 *SDC2* 基因的甲基化修饰与癌症的发生发展密切相关，在正常组织和患癌组织中表现出显著的差异。例如 *SDC2* 基因、*ADHFE1* 基因、*PPP2R5C* 基因在癌组织中呈现出高甲基化的水平。*ADHFE1* 基因编码一种转氢酶，由该基因的过甲基化引起的异常调控能缩短肠癌细胞周期并促进癌细胞增殖（Hu YH等，2019）。相对于大肠的正常组织，*ADHFE1* 基因在癌组织和进展期腺瘤组织均呈高甲基化水平（Tae CH等，2013），其甲基化水平在正常组织、肠癌组织及腺瘤组织中有显著性差异，是肠癌检测的理想标志物（Naumov VA等，2013.Fan, J等，2020）。*PPP2R5C* 基因编码PP2A磷酸酶的一个调节亚基，是细胞生长及增殖的负调控因子（Veerle JANSSENS等，2001），有证

30

据表明其编码蛋白可调节p53蛋白的去磷酸化以应对DNA损伤，从而抑制肠癌细胞的生长（Li HH等，2007）。PPP2R5C基因的过甲基化状态与肠癌的发生发展密切相关，可作为肠癌检测的潜在标志物（Galamb O等，2016）。SDC2基因编码一种细胞内在膜蛋白，在细胞分裂和迁移等过程中有着重要的生物学功能（Kim JH等，2018）。多个研究通过比较大肠癌患者的癌组织和癌旁组织的甲基化修饰状态，发现SDC2基因的甲基化水平在癌组织和癌旁组织存在显著差异，并在癌组织、腺瘤组织、息肉组织和正常组织的检出率存在明显递减趋势，可以作为肠癌检测的有效标志物（Oh TJ等，2017）。

目前 SDC2 基因已经成为结直肠癌诊断和检测的比较可靠的标准。本文将 SDC2 基因与 ADHFE1 基因和 PPP2R5C 基因组合，相较于单独的 SDC2 基因检测灵敏度更高、特异性更高。而且相较于其他基因来说，例如 NDRG4、BMP3 等基因，通过 SDC2 基因、ADHFE1 基因和 PPP2R5C 基因组合进行结直肠癌诊断，特异性和灵敏度更高。例如，灵敏度可以达到 85% 以上，特异性可以达到 90% 以上，再例如灵敏度可以达到 87% 以上，甚至是 90% 以上，特异性可以达到 90% 以上，甚至是 94% 以上。而且在结直肠癌样本和正常样本中更能表现出差异化。

在至少一些实施方案中，所述试剂包括引物组和探针。文中所提供到的“引物”是指具有游离 3' 羟基的短的核酸序列，所述核酸序列可与互补模板形成碱基对并充当模板链复制的起点。在适当的缓冲液和温度条件下，引物可在不同的核苷三磷酸和聚合试剂（如 DNA 聚合酶或者逆转录酶）存在的情况下启动 DNA 的合成。

术语“探针”是指多核苷酸的片段，例如 RNA 或者 DNA，能够特异性结合特定基因的 mRNA 或互补 DNA（cDNA），并且具有几个至数百个碱基对的长度。由于探针是标记的，因此探针可用于检查要结合的靶 mRNA 或者 cDNA 的存在与否或者表达水平。

在一些实施方案中，所述引物组包括：

（a-1）SEQ ID NO:3~SEQ ID NO:40 所示序列中的至少一条（例如为所示序列中的至少一对）；

（b-1）SEQ ID NO:41~SEQ ID NO:60 所示序列中的至少一条（例如为所示序列中的至少一对）；以及

（c-1）SEQ ID NO:61~SEQ ID NO:98 所示序列中的至少一条（例如为所示序列中的至少一对）；

所述探针包括：

（a-2）SEQ ID NO:100~SEQ ID NO:112 所示序列中的至少一个，

（b-2）SEQ ID NO:113~SEQ ID NO:127 所示序列中的至少一个，

（c-2）SEQ ID NO:128~SEQ ID NO:142 所示序列中的至少一个。

在至少一些实施方案中，所述引物组包括（a-1）SEQ ID NO:3~SEQ ID NO:40 所示序列中的至少一对，（b-1）SEQ ID NO:41~SEQ ID NO:60 所示序列中的至少一对，以及（c-1）SEQ ID NO:61~SEQ ID NO:98 所示序列中的至少一对；所述探针包括：（a-2）SEQ ID NO:100~SEQ ID NO:112 所示序列中的至少一个，（b-2）SEQ ID NO:113~SEQ ID NO:127 所示序列中的至少一个，（c-2）SEQ ID NO:128~SEQ ID NO:142 所示序列中的至少一个。

所提到的序列中的至少一对是指某一相同基因（即本文提到的 *ADHFE1* 基因、*PPP2R5C* 基因、或者 *SDC2* 基因）的任意正向引物和任意反向引物作为一对引物。需要说明的是，用于同一基因的引物和探针在组合使用时，可以将某一相同基因的任意正向引物和位于该正向引物后的反向引物，以及位于正、反向引物间的探针均可以组合使用，即可以实现结直肠癌相关基因的扩增和检测。本领域技术人员可以根据本文提供的序列，将序列比对到基因组上，选择引物和探针的组合进行使用。例如，编号为 SEQ ID NO:7、或者 SEQ ID NO:11 的正向引物可以分别和编号为 SEQ ID NO:8、或者 SEQ ID NO:24 的反向引物组合作为一对引物使用，并可以根据需要与编号为 SEQ ID NO:115、SEQ ID NO:114、SEQ ID NO:125、或者 SEQ ID NO:126 等探针配合使用。

在一些实施方案中，所述引物组进一步包括 SEQ ID NO:1~SEQ ID NO:2 所示序列，所述探针进一步包括 SEQ ID NO:99 所示序列。SEQ ID NO:1~SEQ ID NO:2 所示序列以及 SEQ ID NO:99 所示序列，可以用作内参基因 *GAPDH* 基因的 PCR 扩增以及检测。

其中各序列列在表1中。这些引物组和探针是针对相关基因 *ADHFE1*、*PPP2R5C*、*SDC2* 基因甲基化修饰后的序列进行设计，能够特异性地识别被甲基化修饰的序列；而以 *GAPDH* 基因作为内参，内参基因的扩增不会受到甲基化修饰的影响，因此能够对样本中的模板数进行定量；通过计算目的基因Ct值与内参基因Ct值的差值，能够实现对样本的甲基化程度进行判定，从而可以用于帮助检测结直肠癌。所提到的探针的5'端可以连接FAM、VIC、ROX、CY5荧光基团，3'端可以连接MGB等淬灭基团。所用到的荧光基团和淬灭基团可以为本领域常用的基团。

表1 引物组和探针序列表

序列号	序列	作用
SEQ ID NO : 1	TTTAGGAGTGAGTGGAAGATAGA	GAPDH 正向引物 1
SEQ ID NO : 2	AAACCACACCATCCTAATTACCT	GAPDH 反向引物 1
SEQ ID NO : 3	TCGTTGGGGTAGTTGGC	ADHFE1 正向引物 1
SEQ ID NO : 4	CCTATCTAAACCTCAAACCAATCG	ADHFE1 反向引物 1
SEQ ID NO : 5	GTTTTGGGTTTTTATCGCGC	ADHFE1 正向引物 2
SEQ ID NO : 6	GCCCTAAAAAACTACATCGCG	ADHFE1 反向引物 2
SEQ ID NO : 7	GATGGTGCGAGCGTC	ADHFE1 正向引物 3
SEQ ID NO : 8	CTATCTAAACCTCAAACCAATCG	ADHFE1 反向引物 3
SEQ ID NO : 9	GGTAATTTTAAGGGTGGATG	ADHFE1 正向引物 4

SEQ ID NO : 10	CTCAAAACCATTTTCCCAC	ADHFE1 反向引物 4
SEQ ID NO : 11	AAGTAAGGAGATTTAAGGTAG	ADHFE1 正向引物 5
SEQ ID NO : 12	CTCAAAACCATTTTCCCAC	ADHFE1 反向引物 5
SEQ ID NO : 13	GGGTTATTTGTTTAAAGTTTAAGT	ADHFE1 正向引物 6
SEQ ID NO : 14	CCCCAAATCCTCAACA	ADHFE1 反向引物 6
SEQ ID NO : 15	GTTGTAGTTGTTTGTAGTAAGT	ADHFE1 正向引物 7
SEQ ID NO : 16	TTAAAACTTAAACAAATAACCC	ADHFE1 反向引物 7
SEQ ID NO : 17	GATTGGTTTGAGGTTTAGA	ADHFE1 正向引物 8
SEQ ID NO : 18	AATCCTCTCCCTCCT	ADHFE1 反向引物 8
SEQ ID NO : 19	GATTGGTTTGAGGTTTAGA	ADHFE1 正向引物 9
SEQ ID NO : 20	TTACAATTACCTCAACAAATAC	ADHFE1 反向引物 9
SEQ ID NO : 21	GGTAATTTTAAGGGTGGATGGTG	ADHFE1 正向引物 10
SEQ ID NO : 22	TCACCTATCTAAACCTCAAACCA	ADHFE1 反向引物 10
SEQ ID NO : 23	AGGTTTAGATAGGTGATTCGC	ADHFE1 正向引物 11
SEQ ID NO : 24	AAACTACCCGCCTCCC	ADHFE1 反向引物 11
SEQ ID NO : 25	TTGGCGTTTTGGTTTTTATTC	ADHFE1 正向引物 12
SEQ ID NO : 26	CCTATCTAAACCTCAACCAATCG	ADHFE1 反向引物 12
SEQ ID NO : 27	GATTTAAGGTAGAATTCGAGGTTTAC	ADHFE1 正向引物 13
SEQ ID NO : 28	CACGAAATAAAAACCAAAACG	ADHFE1 反向引物 13
SEQ ID NO : 29	CGTAGTTTTTTGGGTGTGATTC	ADHFE1 正向引物 14
SEQ ID NO : 30	AAAACGATATCCAAATTCTCCG	ADHFE1 反向引物 14
SEQ ID NO : 31	CGTATTTTGTGATTCGTTGTTTC	ADHFE1 正向引物 15
SEQ ID NO : 32	AAAAATTCGAAAAATTTAAATACCG	ADHFE1 反向引物 15
SEQ ID NO : 33	CGTTTGTTTATTCGTTTCGC	ADHFE1 正向引物 16
SEQ ID NO : 34	CGCCGCTAAACAACCTAACG	ADHFE1 反向引物 16
SEQ ID NO : 35	CGTTTTGAGAGGTTGTATCGC	ADHFE1 正向引物 17
SEQ ID NO : 36	AAAAATTCGAAAAATTTAAATACCG	ADHFE1 反向引物 17
SEQ ID NO : 37	GTTTAGGGCGGTATTTAAATTTTC	ADHFE1 正向引物 18
SEQ ID NO : 38	ATATAACCCGCTCAAATCCTACG	ADHFE1 反向引物 18
SEQ ID NO : 39	TGTATCGCGTATTTTGTGATTC	ADHFE1 正向引物 19
SEQ ID NO : 40	CCGCTTACTTTCAAAAATTCG	ADHFE1 反向引物 19
SEQ ID NO : 41	GGTTTTCGTTGTTTCGTTTC	PPP2R5C 正向引物 1
SEQ ID NO : 42	CCAAATCGACGTCCTCCG	PPP2R5C 反向引物 1
SEQ ID NO : 43	GGTTTTAGGTCGGGGTTTC	PPP2R5C 正向引物 2
SEQ ID NO : 44	CCTCCTCCGAACCTCCG	PPP2R5C 反向引物 2
SEQ ID NO : 45	TTTCGGTATGGGTTTTAGGTC	PPP2R5C 正向引物 3
SEQ ID NO : 46	CCTCCTCCGAACCTCCG	PPP2R5C 反向引物 3
SEQ ID NO : 47	CGTTGTTTCGTTTCGGAGTTC	PPP2R5C 正向引物 4
SEQ ID NO : 48	CAAATCGACGTCCTCCG	PPP2R5C 反向引物 4
SEQ ID NO : 49	TGTTTCGGTTTTCGTTGTTTC	PPP2R5C 正向引物 5
SEQ ID NO : 50	CAAATCGACGTCCTCCG	PPP2R5C 反向引物 5
SEQ ID NO : 51	GGAAACGGGAGAGCGC	PPP2R5C 正向引物 6

SEQ ID NO : 52	CGCCGATCTAACCTCCTACG	PPP2R5C 反向引物 6
SEQ ID NO : 53	CGGGACGGAAAGGAAAC	PPP2R5C 正向引物 7
SEQ ID NO : 54	GCCGATCTAACCTCCTACG	PPP2R5C 反向引物 7
SEQ ID NO : 55	GGTTGGAGGATGAAGTT	PPP2R5C 正向引物 8
SEQ ID NO : 56	TCCAACCCTCTACTTAAC	PPP2R5C 反向引物 8
SEQ ID NO : 57	GGTATGGGTTTTAGGT	PPP2R5C 正向引物 9
SEQ ID NO : 58	ACTAAAAAATAAAACCCCC	PPP2R5C 反向引物 9
SEQ ID NO : 59	AAGTAGAGGGTTGGAG	PPP2R5C 正向引物 10
SEQ ID NO : 60	AAAACCCTTAACTCCC	PPP2R5C 反向引物 10
SEQ ID NO : 61	AGTGTAAGAAATTAATAAGTGAGAGGGC	SDC2 正向引物 1
SEQ ID NO : 62	TTCCTCCTCCTACGCCTACT	SDC2 反向引物 1
SEQ ID NO : 63	ATAAGTGAGAGGGCGTCGC	SDC2 正向引物 2
SEQ ID NO : 64	TTCCTCCTCCTACGCCTACT	SDC2 反向引物 2
SEQ ID NO : 65	CGTTGCGGTATTTTGTTTC	SDC2 正向引物 3
SEQ ID NO : 66	AACGAAACCTCCTACCCAA	SDC2 反向引物 3
SEQ ID NO : 67	AAATTAGAAATTGAATTTTCGGTACG	SDC2 正向引物 4
SEQ ID NO : 68	AACTACTCTCTAAACTCTTCTTACTCTAC T	SDC2 反向引物 4
SEQ ID NO : 69	GCGTTGGGTAGGAGGTTTC	SDC2 正向引物 5
SEQ ID NO : 70	ATATTCCCCAAAAACCGACTACT	SDC2 反向引物 5
SEQ ID NO : 71	TCGTTTAGGGTGTTTGAAGTTAC	SDC2 正向引物 6
SEQ ID NO : 72	CCAACGAATCTCCGATATATACTT	SDC2 反向引物 6
SEQ ID NO : 73	CGTGGTTTGGGAAGGAC	SDC2 正向引物 7
SEQ ID NO : 74	CGAAATAAAACCGTTCCCTC	SDC2 反向引物 7
SEQ ID NO : 75	GGAGTTTGGGTCGGGTTC	SDC2 正向引物 8
SEQ ID NO : 76	AAATTTCCAAATCATCCCTAATCTC	SDC2 反向引物 8
SEQ ID NO : 77	GGGAGGTAGAAATTAATAAGTGAGAGG	SDC2 正向引物 9
SEQ ID NO : 78	CTCCTACGCCTACTCCCCG	SDC2 反向引物 9
SEQ ID NO : 79	GAGTTCGAGTTTTTCGAGTTTGAGT	SDC2 正向引物 10
SEQ ID NO : 80	CTACCCAACGCTCGACG	SDC2 反向引物 10
SEQ ID NO : 81	GAGTTCGAGTTTTTCGAGTTTGAGT	SDC2 正向引物 11
SEQ ID NO : 82	CGAAACCTCCTACCCAACG	SDC2 反向引物 11
SEQ ID NO : 83	GAGTCGGTGAGTGGGTTAGG	SDC2 正向引物 12
SEQ ID NO : 84	GCTCCCCTATTCCCTACG	SDC2 反向引物 12
SEQ ID NO : 85	ATATTTTAAACGGCGCGC	SDC2 正向引物 13
SEQ ID NO : 86	TAAATCCTACTCACCTTAAACTTAATAACC T	SDC2 反向引物 13
SEQ ID NO : 87	TTGAGGAAGGGAAGAGGG	SDC2 正向引物 14
SEQ ID NO : 88	CAATCCCCAAATATACACCG	SDC2 反向引物 14
SEQ ID NO : 89	TTTAGGGATCGGTTGTTTTAGTC	SDC2 正向引物 15
SEQ ID NO : 90	GAATTCGTATACGCGAACTACG	SDC2 反向引物 15
SEQ ID NO : 91	AGTTTAAGGTGAGTAGGATTTACGC	SDC2 正向引物 16

SEQ ID NO : 92	TTTACCCTAATTACAAACAACGAC	SDC2 反向引物 16
SEQ ID NO : 93	GGTTTTTGCGGTTAGATTAAATC	SDC2 正向引物 17
SEQ ID NO : 94	AAAAAACGCTACTCGCTAACGT	SDC2 反向引物 17
SEQ ID NO : 95	GTAGGGAATAGGGGAG	SDC2 正向引物 18
SEQ ID NO : 96	AAATAACTTCAAAAACCTC	SDC2 反向引物 18
SEQ ID NO : 97	GAAGAAGTTGGGAGTGAT	SDC2 正向引物 19
SEQ ID NO : 98	CCTCTTCCCTTCCTCA	SDC2 反向引物 19
SEQ ID NO : 99	CCCAAAACACATTTCTTCCATTC	GAPDH 探针 1
SEQ ID NO : 100	AAACGAAGTTTTTTGTTTAGCGTT	SDC2 探针 1
SEQ ID NO : 101	GAAAAAACTTCGTTTTACCCTAATTAC	SDC2 探针 2
SEQ ID NO : 102	ACACCGAAAATTACGATTTAATCTAAC	SDC2 探针 3
SEQ ID NO : 103	ACACCAAAAATTACAATTTAATCTAAC	SDC2 探针 4
SEQ ID NO : 104	CTACTCGCTAACGTTACCC	SDC2 探针 5
SEQ ID NO : 105	CTACTCACTAACATTACCC	SDC2 探针 6
SEQ ID NO : 106	CCTCTTCCCTTCCTCA	SDC2 探针 7
SEQ ID NO : 107	TAACGCCAACGAACAACGCTTT	SDC2 探针 8
SEQ ID NO : 108	CTAAACCAAACCGCAATTCTCGATA	SDC2 探针 9
SEQ ID NO : 109	TAACACCAACAACAACACTTT	SDC2 探针 10
SEQ ID NO : 110	CTAAACCAAACCACAATTCTCAATA	SDC2 探针 11
SEQ ID NO : 111	ACCCGCGATCCGCGAAAATAAAA	SDC2 探针 12
SEQ ID NO : 112	CCCGCGATCCGCGAAAATAAAAACACCG	SDC2 探针 13
SEQ ID NO : 113	TCACCTATCTAAACCTCAAACCA	ADHFE1 探针 1
SEQ ID NO : 114	CCCAACGACGCTCGCAC	ADHFE1 探针 2
SEQ ID NO : 115	CAACGACGCTCGCACCAT	ADHFE1 探针 3
SEQ ID NO : 116	TAAATAATACGAACGCCGCTAAAAC	ADHFE1 探针 4
SEQ ID NO : 117	ATACGAACGCCGCTAAAACAATAAC	ADHFE1 探针 5
SEQ ID NO : 118	CCCAACAACACTCACAC	ADHFE1 探针 6
SEQ ID NO : 119	CAACAACACTCACACCAT	ADHFE1 探针 7
SEQ ID NO : 120	TAAATAATACAAACACCACTAAAAC	ADHFE1 探针 8
SEQ ID NO : 121	ATACAAACACCACTAAAACAATAAC	ADHFE1 探针 9
SEQ ID NO : 122	ACTCAAAACCATTTTCCCACGAAAT	ADHFE1 探针 10
SEQ ID NO : 123	AACGAAAAACGCCACTACCCGATACGA	ADHFE1 探针 11
SEQ ID NO : 124	AACGCCACTACCCGATACGAACCTACACC	ADHFE1 探针 12
SEQ ID NO : 125	AAAAACCAAAACGCCAACTACCCCA	ADHFE1 探针 13
SEQ ID NO : 126	CCCACGAAATAAAAACCAAAACGCCAAC	ADHFE1 探针 14
SEQ ID NO : 127	CAAAACGCCAACTACCCCAACGAC	ADHFE1 探针 15
SEQ ID NO : 128	CGAACCGCGCTCTCCC	PPP2R5C 探针 1
SEQ ID NO : 129	TTTCCTTTCCGTCCCGTCTCG	PPP2R5C 探针 2
SEQ ID NO : 130	AATTAAACGCGCAACGCAA	PPP2R5C 探针 3
SEQ ID NO : 131	CGATTGCGGAACGACC	PPP2R5C 探针 4
SEQ ID NO : 132	CTTTACCCCGACCTCCGCTA	PPP2R5C 探针 5
SEQ ID NO : 133	CAAACCACACTCTCCC	PPP2R5C 探针 6

SEQ ID NO : 134	TTTCCTTTCCATCCCATCTCA	PPP2R5C 探针 7
SEQ ID NO : 135	AATTAACACACACACACAA	PPP2R5C 探针 8
SEQ ID NO : 136	ACACAATTCACAAACAACCA	PPP2R5C 探针 9
SEQ ID NO : 137	CTTTACCCCAACCTCCACTA	PPP2R5C 探针 10
SEQ ID NO : 138	CCGCCCCGGAACCGCGCTC	PPP2R5C 探针 11
SEQ ID NO : 139	TACGCGCTCCAACCCTCTACTTAACCGC	PPP2R5C 探针 12
SEQ ID NO : 140	CAACCCTCTACTTAACCGCCCCGGA	PPP2R5C 探针 13
SEQ ID NO : 141	CGTTACGCGCTCCAACCCTCT	PPP2R5C 探针 14
SEQ ID NO : 142	TACGTTACGCGCTCCAACCCTCT	PPP2R5C 探针 15

在一些实施方案中，用于检测 *ADHFE1* 基因的试剂包括 SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8 和 SEQ ID NO:127 所示序列；用于检测 *PPP2R5C* 基因的试剂包括 SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54 和 SEQ ID NO:139 所示序列；用于检测 *SDC2* 基因的试剂包括 SEQ ID NO:89、SEQ ID NO:90 和 SEQ ID NO:101 所示序列；所述组合物还包括用于检测 *GAPDH* 基因的试剂，所述用于检测 *GAPDH* 基因的试剂包括 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:99 所示的序列。

所提到的引物或者探针可以人工合成，例如可以使用亚磷酰胺固相支持物合成或者其他本领域常用的方法化学合成。

在至少一些实施方案中，所述组合物包括选自下列中的至少一种：PCR 缓冲液、盐离子、dNTP、DNA 聚合酶或者靶标核酸。所提到的靶标核酸可以通过一些市售的试剂盒从样品中提取获得。所述靶标核酸为含有来自于 *ADHFE1*、*PPP2R5C*、*SDC2* 基因的核酸序列。

在至少一些实施方案中，所提到的荧光定量 PCR 检测条件包括 95 摄氏度 10 分钟，95 摄氏度 15 秒、55 摄氏度 30 秒，72 摄氏度 30 秒，共计 45 个循环。

在至少一些实施方案中，所述引物组和所述探针的质量比为 1: 1: 1: 1。由此可以得到理想的检测结果。

在本发明的另一方面，本发明提供了一种用于诊断结直肠癌的试剂盒，所述试剂盒上述所述的组合物。本发明所提供的试剂盒能够特异性地检测样品中 *ADHFE1*、*PPP2R5C*、*SDC2* 基因的甲基化修饰情况，从而评估受检者罹患结直肠癌的风险。本发明联合检测 *ADHFE1*、*PPP2R5C*、*SDC2* 三个基因的甲基化状态，与单一基因甲基化检测相比，能够有效提高检测性能。

在至少一些实施方案中，所述试剂盒进一步包括下列试剂中的至少一种：DNA 提取试剂、DNA 甲基化转化试剂、核酸纯化试剂。DNA 提取试剂可以用于获得样品中的 DNA。DNA 甲基化转化试剂可以使得 DNA 中的胞嘧啶转化为尿嘧啶。核酸纯化试剂可以用于获得纯化后的核酸，从而可以用于后续的反应过程。

所提到的试剂盒还可以用于下述相同的方法确定样品中基因甲基化状态，或者评估受试

者结直肠癌患病。为此，本发明还提供了试剂在制备试剂盒中的用途，所述试剂盒用于确定样品中基因甲基化状态。本发明还提供了试剂在制备试剂盒中的用途，所述试剂盒用于评估受试者结直肠癌患病状态。

在本发明的又一方面，本发明提供了一种确定样品中基因甲基化状态的方法，所述基因
5 包括 *ADHFE1* 基因、*PPP2R5C* 基因和 *SDC2* 基因，

所述方法包括：

- (1) 获取基因组 DNA，所述基因组 DNA 来自于所述样品；
- (2) 对所述基因组 DNA 进行甲基化转化处理，以便获得转化产物；
- (3) 利用引物组和探针对所述转化产物进行荧光定量 PCR 检测，以便确定样品中基因
10 甲基化状态。

甲基化状态通常指 DNA 序列中一个或者多个 CpG 二核苷酸存在或不存在 5-甲基胞嘧啶。本发明提供了一种确定样品中基因甲基化状态的方法，其可以用于准确、简便、经济的结直肠癌早期筛查手段，可提高结直肠癌高危人群及普通体检人群中结直肠癌-尤其是早期肠癌-的检出率，进而提高结直肠癌病人的生存率，并节约大量的医疗支出和降低医疗负担。
15 担。

所述样品不做特殊限制，可以为含有靶标核酸的生物样品，这些生物样品是离体的。包括但不限于组织样品、血液样品、唾液样品、分泌物或者排泄物中的至少一种。所提到的排泄物可以为尿液样品、汗液样品或者泪液样品。在一些优选实施方案中，所述排泄物为粪便样本。由于粪便样本含有肠道脱落细胞，且采用粪便样本进行检测具有无创性的特点，
20 可以以粪便样本作为首选的检测对象。

所提到的甲基化转化处理可以为一些化学试剂，例如亚硫酸氢钠。例如可以使用一些商用的试剂盒，进行甲基化转化处理，如使用 EZ DNA Methylation-Gold Kit 对 DNA 进行亚硫酸氢盐转化。所获得的产物可以采用商用的试剂盒进行柱纯化以及回溶处理，以获得纯化后的产物。

在本发明的另一方面，本发明提供了一种可分离的核酸序列，所述可分离的核酸序列包括引物组和探针，所述引物组包括：

- (a) SEQ ID NO:3~SEQ ID NO:40 所示序列中的至少一对，
- (b) SEQ ID NO:41~SEQ ID NO:60 所示序列中的至少一对，以及
- (c) SEQ ID NO:61~SEQ ID NO:98 所示序列中的至少一对；

30 所述探针包括：

SEQ ID NO:100~SEQ ID NO:112 所示序列中的至少一个，

SEQ ID NO:113~SEQ ID NO:127 所示序列中的至少一个，

SEQ ID NO:128~SEQ ID NO:142 所示序列中的至少一个。

本发明又提供了一种评估受试者结直肠癌患病状态的方法，所述方法包括：a) 提供受试者的样品，所述样品含有所述受试者的靶标核酸，所述靶标核酸包括来自于 *ADHFE1* 基因、*PPP2R5C* 基因和 *SDC2* 基因的核酸；b) 评估所述靶标核酸的甲基化状态；和 c) 基于所述靶标核酸的甲基化状态，评估所述受试者结直肠癌患病状态。用于评估所述靶标核酸的甲基化状态的试剂可以借助于化学试剂，例如亚硫酸盐或者亚硫酸氢盐、重亚硫酸盐，可以为亚硫酸氢钠。经过这些化学试剂处理后的靶标核酸中非甲基化的胞嘧啶会转换为尿嘧啶，甲基化胞嘧啶不发生这种转变。然后再借助于多种手段分析出转化后的序列的差异，例如测序、PCR、高分辨率熔解曲线分析等手段；尤其是荧光定量 PCR 的手段，可以快速方便进行区分。当然，用于评估所述靶标核酸的甲基化状态的试剂还可以借助于一些为生物试剂，例如多肽或者酶等，比如一些甲基化敏感的限制性酶。

本文中所提到的受试者为人类。例如可以是需要进行诊断的患者。来自受试者的生物样品的类型包括但不限于组织样品、血液样品、唾液样品等分泌物或者排泄物中的至少一种。所提到的排泄物可以为尿液样品、汗液样品或者泪液样品。而且由于粪便样本含有肠道脱落细胞，且采用粪便样本进行检测具有无创性的特点，粪便样本可以作为首选的检测对象。

在至少一些实施方案中，所述受试者为哺乳动物。在至少一些实施方案中，步骤 b) 中使用上述提到的引物组和探针评估所述靶标核酸的甲基化状态。

所述方法还包括从所述样品中分离所述靶标核酸。可以采用本领域一些商用的试剂盒从样品中分离所述靶标核酸。

所述方法还包括扩增所述靶标核酸。可以使用核酸扩增的一些常用的试剂。用于核酸扩增的试剂可以包含酶，例如可以在多核苷酸扩增反应中使用的酶，例如荧光定量聚合酶反应 (qPCR) 中使用的酶。

所述方法还包括评估所述靶标核酸的甲基化状态以便获得甲基化指标，将所述甲基化指标与参考值进行比较，以便确定所述样品的甲基化状态。在一些实施方案中，包括使用化学试剂评估所述靶标核酸的甲基化状态。根据本发明的优选实施方案，所述化学试剂包括亚硫酸氢盐或者亚硫酸盐。在一些优选实施方式中，所述参考值来自于内参基因 *GAPDH*，通过将 *ADHFE1*、*PPP2R5C*、*SDC2* 基因的扩增 Ct 值与内参 *GAPDH* 基因的扩增 Ct 值进行比较，并基于阈值判定样品基因甲基化状态。所提到的阈值可以根据已知病理信息的大量临床样本分析设定。当然，所提到的甲基化指标还可以是其他常见的一些甲基化指标，例如甲基化频率、甲基化单倍型负荷等等。

在至少一些实施方案中，所述方法进一步包括使用内参基因用于确定 DNA 含量是否满足检测，使用目标基因 Ct 值与内参基因 Ct 值的差值 (ΔCt) 判断甲基化状态。

在至少一些实施方案中，所述方法进一步包括利用 *GAPDH* 作为内参基因，通过荧光定量 PCR 的方法评估所述受试者结直肠癌患病状态；

5 当 *GAPDH* 的 Ct 值大于 37 时，判定为质控失败；

 当 *ADHFE1*、*PPP2R5C*、*SDC2* 基因大于 37 时，判定为阴性；

 当 *ADHFE1*、*PPP2R5C*、*SDC2* 基因 Ct 值 ≤ 37 时，计算 *ADHFE1*、*PPP2R5C*、*SDC2* 基因的扩增 Ct 值与内参 *GAPDH* 基因的扩增 Ct 值的差值 ΔCt ，并基于 *ADHFE1*、*PPP2R5C*、*SDC2* 基因 ΔCt 的 ROC 曲线结果和 AUC 结果，评估所述受试者结直肠癌患病状态。

10 所述方法进一步包括 ΔCt (*ADHFE1*) ≤ 8 、 ΔCt (*PPP2R5C*) ≤ 5 、 ΔCt (*SDC2*) ≤ 12 时，判定为阳性

 所述方法还包括基于所述受试者甲基化状态评估结直肠癌患病可能性，来实现辅助诊断和肿瘤筛查等目的，从而尽早地为受试者提供治疗。在至少一些实施方案中，所述治疗包括化学疗法、放射疗法、免疫疗法、细胞疗法、手术中的至少一种。

15 下面将结合实施例对本发明的方案进行解释。本领域技术人员将会理解，下面的实施例仅用于说明本发明，而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体技术或条件的，按照本领域内的文献所描述的技术或条件或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市购获得的常规产品。

20 **实施例 1**

 发明人按照下述方法和步骤确定了结直肠癌诊断的靶标核酸：

 首先，发明人对癌症基因组图谱 (The Cancer Genome Atlas, TCGA) 数据库中的不同基因在肿瘤/非瘤样本的甲基化水平所表现出来的显著性差异进行比较，从而筛选确定了甲基化检测的候选基因：*CDH4*、*ZNF132*、*PPP2R5C*、*LONRF2*、*ADHFE1*、*SDC2*、*NDRG4*、

25 *BMP3*；

 其次，针对上述候选基因，分别设计了特异性的引物以及探针。在设计引物和探针的过程中，发明人发现因为涉及到检测靶标核酸的甲基化，待测基因组序列在经过亚硫酸氢盐转化后，由于大部分 C 被转化为 U，基因组复杂度较低，在引物、探针设计时会遇到很多单一碱基连续出现的情况，且退火温度普遍偏低，可设计引物的区域相对较少。

30 接着，基于上述设计获得的引物和探针，利用少量肿瘤/非瘤样本对候选基因进行初步筛选，各基因的灵敏度/特异度结果如下：*CDH4* (61.5%/61.5%)、*ZNF132* (50%/100%)、

PPP2R5C (78.9%/100%)、*LONRF2* (77.8%/72%)、*ADHFE1* (100%/91.3%)、*SDC2* (88.9%/100%)、*NDRG4* (70%/95%)、*BMP3* (65%/90%)。其中，*BMP3*、*NDRG4*、*ADHFE1*、*PPP2R5C* 和 *SDC2* 的灵敏度/特异度较好。

进一步地，针对上述灵敏度/特异度较好的 5 个候选基因，比较其在 TCGA 数据库中的甲基化数据发现，相较于 *BMP3* 基因和 *NDRG4* 基因，*ADHFE1*、*PPP2R5C* 和 *SDC2* 基因均表现为在癌旁组织中的背景更低，在癌组织和癌旁组织也更能表现出更加明显的差异。如图 1 所示。

因而，发明人最终确定了 *ADHFE1*、*PPP2R5C*、*SDC2* 基因作为结直肠癌诊断的靶标核酸，并针对上述靶标基因进一步设计优化了特异性引物和探针序列，具体如表 1 所示。

实施例 2

发明人利用实施例 1 所获得的结直肠癌诊断的靶标核酸 (*ADHFE1*、*PPP2R5C*、*SDC2* 基因) 的各引物和探针，在阳性或阴性细胞系中的荧光定量 PCR 扩增，以验证引物和探针的效果。

步骤 1、样本收集：阳性标准品 DNA (CpGenome Human Methylated DNA Standard Set, Sigma-Aldrich, S8001M)、阴性标准品 DNA (CpGenome Human Non-Methylated DNA Standard Set, Sigma-Aldrich, S8001U)

步骤 2、DNA 修饰：取上述标准品 DNA 各 10ng，使用 EZ DNA Methylation-Gold Kit (ZYMO RESEARCH) 对 DNA 进行亚硫酸氢盐转化、柱纯化后，33ul NF 水回溶备用。

步骤 3、PCR 检测：

分别以表 1 中的引物和探针为例，按照下述 PCR 体系和 PCR 反应程序进行荧光定量 PCR 检测：其中 *ADHFE1* 的引物、探针选择 SEQ ID NO : 7、SEQ ID NO : 8 和 SEQ ID NO : 127；*PPP2R5C* 的引物、探针选择 SEQ ID NO : 53、SEQ ID NO : 54 和 SEQ ID NO : 139；*SDC2* 的引物、探针选择 SEQ ID NO : 89、SEQ ID NO : 90 和 SEQ ID NO : 101；内参 *GAPDH* 基因的引物、探针选择 SEQ ID NO : 1、SEQ ID NO : 2 和 SEQ ID NO : 99。

其中探针 SEQ ID NO : 127 的 5'端为 FAM，3'端为 BHQ1；
探针 SEQ ID NO : 139 的 5'端为 CY5，3'端为 BHQ3；
探针 SEQ ID NO : 101 的 5'端为 VIC，3'端为 BHQ1；
探针 SEQ ID NO : 99 的 5'端为 ROX，3'端为 MGB。

(1) PCR体系如表2所示：

表2 PCR体系

组分	终浓度
PCR Buffer	1x
镁离子	2~5mM
dNTP	0.2~0.8mM
引物	0.2~0.8 μ M
探针	50~200mM
Taq Polymerase	1~5U
模板	up to 30ul

(2) PCR反应程序如表3所示:

表3 PCR反应程序

温度	时间	循环数
95℃	10min	1
95℃	15s	45
55℃	30s	
72℃	30s	

5

步骤4、结果分析: 计算*ADHFE1*、*PPP2R5C*、*SDC2*基因的扩增Ct值与内参*GAPDH*基因的扩增Ct值的差值(ΔCt值), 根据已知病理信息的大量临床样本分析设定的判定阈值, 判定样本基因甲基化程度是否正常。

其中, 上述引物、探针扩增结果如图 2 和图 3 所示。

10

实施例 3

发明人设计开发了针对结直肠癌诊断的试剂盒, 包括特异性检测 *ADHFE1* 基因、*PPP2R5C* 基因和 *SDC2* 基因甲基化的特异性引物和探针, 其中不同试剂盒中所含有的特异性引物选自表 1 中所列出的引物, 探针选自表 1 中所列出的探针。每个试剂盒包括至少一种用于特异性检测 *ADHFE1* 基因的正反向引物、至少一种特异性检测 *PPP2R5C* 基因的正反向引物以及至少一种特异性检测 *SDC2* 基因的正反向引物; 还可以根据需要包括至少一种检测 *ADHFE1* 基因的探针、至少一种检测 *PPP2R5C* 基因的探针和至少一种检测 *SDC2* 基因的探针。

所开发的试剂盒还可以根据需要包括用于检测内参基因, 如 *GAPDH* 的正反向引物和探针。

探针上 5'端连接上荧光基团, 可以为 FAM、VIC、ROX 或者 CY5 等, 3'端可以连接淬灭基团, 如 MGB。

试剂盒中的引物和探针序列可以以粉末的形式提供。

另外，所提供的试剂盒还可以根据需要含有 PCR 反应缓冲液、聚合酶、DNA 甲基化转换试剂等，从而方便本领域技术人员按照本发明的方法进行结直肠癌的诊断。

实施例 4

5 发明人利用实施例 3 所示的用于结直肠癌诊断的试剂盒，通过下述方法对样本进行甲基化检测，步骤如图 4 所示，包括：

1、样本收集：

共收集了 201 例结直肠癌样本、184 例健康人对照、4 例腺瘤样本和 7 例息肉样本。

2、样本 DNA 提取：

10 采用商业粪便样本 DNA 提取试剂盒对收集到的样本进行 DNA 提取。

3、DNA 修饰：

使用 EZ DNA Methylation-Gold Kit(ZYMO RESEARCH)对 DNA 进行亚硫酸氢盐转化、柱纯化以及回溶备用。

4、PCR 检测：

15 在本实施例中，ADHFE1 的引物、探针选择 SEQ ID NO : 7、SEQ ID NO : 8 和 SEQ ID NO : 127；PPP2R5C 的引物、探针选择 SEQ ID NO : 53、SEQ ID NO : 54 和 SEQ ID NO : 139；SDC2 的引物、探针选择 SEQ ID NO : 89、SEQ ID NO : 90 和 SEQ ID NO : 101；内参 GAPDH 基因的引物、探针选择 SEQ ID NO : 1、SEQ ID NO : 2 和 SEQ ID NO : 99。按照上述实施例 2 的 PCR 体系及反应条件对收集的样本进行荧光定量 PCR 检测。

20 5、结果分析：

采用宏石 96S qPCR 仪进行检测，基线、阈值按照默认设置，各基因 Ct 值的阈值为 37。

其中，当 GAPDH 的 Ct 值大于 37 时，判定为质控失败；

当 ADHFE1、PPP2R5C、SDC2 基因大于 37 时，判定为阴性；

25 当 ADHFE1、PPP2R5C、SDC2 基因 Ct 值≤37 时，计算 ADHFE1、PPP2R5C、SDC2 基因的扩增 Ct 值与内参 GAPDH 基因的扩增 Ct 值的差值（ Δ Ct 值），并使用 SPSS 软件作三个待检测基因 Δ Ct 的 ROC 曲线，ROC 曲线如图 5 所示，各基因的性能及曲线下面积(AUC)如表 4 所示。

表 4 各基因的性能及曲线下面积（AUC）

基因	AUC	阈值	SEN	SPE
Δ Ct_ADHFE1	0.886	11.04	79.10%	88.60%
Δ Ct_PPP2R5C	0.883	12.66	83.60%	83.20%
Δ Ct_SDC2	0.902	11.15	81.10%	92.40%

为了进一步提高试剂盒性能，整合三个基因的 ΔCt 值进行分析，AUC 可达 0.945。最终确定 $\Delta Ct (ADHFE1) \leq 8$ 、 $\Delta Ct (PPP2R5C) \leq 5$ 、 $\Delta Ct (SDC2) \leq 12$ 时判定该基因检测阳性，当任意基因阳性时则判定该样本检测阳性，在此判定条件下，在特异性为 94.02% 时，灵敏性可达 87.56%。

- 5 其中，灵敏性用于表示通过检测，对最终临床病理诊断为结直肠癌的阳性样品或者患者诊断为结直肠癌的比率。

特异性是指通过检测，对最终临床病理诊断为正常的样品或者患者诊断为正常的比率。

以上结果表明，本发明通过多个基因联合检测，可以获得比单一基因检测更好的检测性能。

- 10 在本说明书的描述中，参考术语“一个实施例”、“一些实施例”、“示例”、“具体示例”、或“一些示例”等的描述意指结合该实施例或示例描述的具体特征、结构、材料或者特点包含于本发明的至少一个实施例或示例中。在本说明书中，对上述术语的示意性表述不必针对的是相同的实施例或示例。而且，描述的具体特征、结构、材料或者特点可以在任一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。此外，在不相互矛盾的情况下，
- 15 本领域的技术人员可以将本说明书中描述的不同实施例或示例以及不同实施例或示例的特征进行结合和组合。

尽管上面已经示出和描述了本发明的实施例，可以理解的是，上述实施例是示例性的，不能理解为对本发明的限制，本领域的普通技术人员在本发明的范围内可以对上述实施例进行变化、修改、替换和变型。

20

权利要求书

- 1、一种用于结直肠癌检测的组合物，其特征在于，包含用于检测 *ADHFEI* 基因、*PPP2R5C* 基因和 *SDC2* 基因甲基化状态的试剂。
- 5 2、根据权利要求 1 所述的组合物，其特征在于，所述试剂包括引物组和探针，所述引物组包括：
- (a-1) SEQ ID NO:3~SEQ ID NO:40 所示序列中的至少一条；
- (b-1) SEQ ID NO:41~SEQ ID NO:60 所示序列中的至少一条；以及
- (c-1) SEQ ID NO:61~SEQ ID NO:98 所示序列中的至少一条；
- 10 所述探针包括：
- (a-2) SEQ ID NO:100~SEQ ID NO:112 所示序列中的至少一个，
- (b-2) SEQ ID NO:113~SEQ ID NO:127 所示序列中的至少一个，
- (c-2) SEQ ID NO:128~SEQ ID NO:142 所示序列中的至少一个。
- 3、根据权利要求 2 所述的组合物，其特征在于，所述引物组进一步包括 SEQ ID
- 15 NO:1~SEQ ID NO:2 所示序列；
- 所述探针进一步包括 SEQ ID NO:99 所示序列。
- 4、根据权利要求 1 所述的组合物，其特征在于，用于检测 *ADHFEI* 基因的试剂包括 SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8 和 SEQ ID NO:127 所示序列；
- 用于检测 *PPP2R5C* 基因的试剂包括 SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54 和 SEQ ID NO:139
- 20 所示序列；
- 用于检测 *SDC2* 基因的试剂包括 SEQ ID NO:89、SEQ ID NO:90 和 SEQ ID NO:101 所示序列；
- 任选地，所述组合物还包括用于检测 *GAPDH* 基因的试剂，所述用于检测 *GAPDH* 基因的试剂包括 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:99 所示的序列。
- 25 5、根据权利要求 1 所述的组合物，其特征在于，所述组合物包括选自下列中的至少一种：
- PCR 缓冲液、盐离子、dNTP、DNA 聚合酶或者靶标核酸。
- 6、一种用于结直肠癌诊断的试剂盒，其特征在于，所述试剂盒包括权利要求 1~5 中任
- 一项所述的组合物。
- 30 7、根据权利要求 6 所述的试剂盒，其特征在于，进一步包括下列试剂中的至少一种：
- DNA 提取试剂、DNA 甲基化转化试剂、核酸纯化试剂。
- 8、一种确定样品中基因甲基化状态的方法，其特征在于，所述基因包括 *ADHFEI* 基因、

PPP2R5C 基因和 *SDC2* 基因,

所述方法包括:

(1) 获取基因组 DNA, 所述基因组 DNA 来自于所述样品;

(2) 对所述基因组 DNA 进行甲基化转化处理, 以便获得转化产物, 所述基因组 DNA 经过甲基化处理, 甲基化位点和非甲基化位点表现出差异;

(3) 利用引物组和探针对所述转化产物进行荧光定量 PCR 检测, 以便确定样品中基因甲基化状态。

9、根据权利要求 8 所述的方法, 其特征在于, 所述样品包括选自组织样品、血液样品、分泌物或者排泄物中的至少一种。

10、根据权利要求 9 所述的方法, 其特征在于, 所述排泄物包括粪便样本。

11、根据权利要求 8 所述的方法, 其特征在于, 所述引物组包括:

(a) SEQ ID NO:3~SEQ ID NO:40 所示序列中的至少一条,

(b) SEQ ID NO:41~SEQ ID NO:60 所示序列中的至少一条, 以及

(c) SEQ ID NO:61~SEQ ID NO:98 所示序列中的至少一条;

所述探针包括:

SEQ ID NO:100~SEQ ID NO:112 所示序列中的至少一个,

SEQ ID NO:113~SEQ ID NO:127 所示序列中的至少一个,

SEQ ID NO:128~SEQ ID NO:142 所示序列中的至少一个。

12、根据权利要求 8 所述的方法, 其特征在于, 所述荧光定量 PCR 检测条件包括 95 摄氏度 10 分钟, 95 摄氏度 15 秒、55 摄氏度 30 秒, 72 摄氏度 30 秒, 共计 45 个循环。

13、一种分离的核酸序列, 其特征在于, 所述分离的核酸序列包括引物组和探针, 所述引物组包括:

(a) SEQ ID NO:3~SEQ ID NO:40 所示序列中的至少一条,

(b) SEQ ID NO:41~SEQ ID NO:60 所示序列中的至少一条, 以及

(c) SEQ ID NO:61~SEQ ID NO:98 所示序列中的至少一条;

所述探针包括:

SEQ ID NO:100~SEQ ID NO:112 所示序列中的至少一个,

SEQ ID NO:113~SEQ ID NO:127 所示序列中的至少一个,

SEQ ID NO:128~SEQ ID NO:142 所示序列中的至少一个。

14、一种评估受试者结直肠癌患病状态的方法, 其特征在于, 所述方法包括:

a) 提供受试者的样品, 所述样品含有所述受试者的靶标核酸, 所述靶标核酸包括来自

- 于 *ADHFE1* 基因、*PPP2R5C* 基因和 *SDC2* 基因的核酸；
- b) 评估所述靶标核酸的甲基化状态；和
 - c) 基于所述靶标核酸的甲基化状态，评估所述受试者结直肠癌患病状态。
- 15、根据权利要求 14 所述的方法，其特征在于，所述受试者为哺乳动物。
- 5 16、根据权利要求 14 所述的方法，其特征在于，步骤 b) 中使用引物组和探针评估所述靶标核酸的甲基化状态，所述引物组包括：
- (a) SEQ ID NO:3~SEQ ID NO:40 所示序列中的至少一条，
 - (b) SEQ ID NO:41~SEQ ID NO:60 所示序列中的至少一条，以及
 - (c) SEQ ID NO:61~SEQ ID NO:98 所示序列中的至少一条；
- 10 所述探针包括：
- SEQ ID NO:100~SEQ ID NO:112 所示序列中的至少一个，
- SEQ ID NO:113~SEQ ID NO:127 所示序列中的至少一个，
- SEQ ID NO:128~SEQ ID NO:142 所示序列中的至少一个。
- 17、根据权利要求 14 所述的方法，其特征在于，所述方法还包括从所述样品中分离所
- 15 述靶标核酸。
- 18、根据权利要求 14 所述的方法，其特征在于，所述方法还包括扩增所述靶标核酸。
- 19、根据权利要求 14 所述的方法，其特征在于，进一步包括使用内参基因用于确定 DNA 含量是否满足检测，使用目标基因 Ct 值与内参基因 Ct 值的差值 (ΔCt) 判断甲基化状态。