

一种癌症筛检的检验组合物

技术领域

本发明涉及一种癌症的生物标记分子及筛检的检验套组，利用分析检体标的基因甲基化区域，设计数段对标的基因具特异性的寡核苷酸引子或探针，利用该具特异性寡核苷酸检测标的基因甲基化的有无，以判断癌症发生的可能性。

背景技术

根据 2008 世界卫生组织调查结果显示，癌症是目前世界上十大死亡原因之一，其中男性又以肺癌、肝癌、胃癌、大肠癌、口腔癌致死率较高；女性则为乳癌、肺癌、子宫颈癌、大肠癌致死率较高。因此各国研究者对于能提早预防性检测或是罹癌预后检测的方法都积极研究，且大多数早期癌症若能提早筛检出来，治愈的机率都提高许多。传统检验癌症的有无，例如 X 光、抹片、血液肿瘤标志、超音波等等，癌症筛检率约为 0.2~0.3%，若再加上消化道内视镜检查，筛检率提高约 0.5%，但是上述数据还不足以说服大众这些一般性健康检查能有效的早期诊断癌症。然而这些检验与判读往往耗工费时，方便性不足，且筛检率仍然偏低。

目前科学界普遍了解异常的表遗传（epigenetic）修饰，对于改变基因表达和诱导肿瘤的形成，发挥了至关重要的作用（Ting et al., 2006），其中 DNA 甲基化修饰就是其中一种。影响表现型（phenotype）的讯息，可能存于被修饰过的碱基 5-甲基胞嘧啶（5-methylcytosine）中，5-甲基胞嘧啶被发现存在于哺乳类动物细胞内的回文序列 5'-CpG-3'中，在哺乳类动物细胞内除了一些被称为“CpG 岛”（CpG islands, CGIs）的区域之外，大多数的 CpG 双核苷酸对都被甲基化，CpG 岛是指在大约 1000 个碱基对（1Kb）的区域内含有大量的 GC-以及 CpG-，通常位于基因的附近，且在广泛表现的基因之启动子附近。胞嘧啶的甲基化发生在 DNA 合成后，自一甲基捐赠

者 s-腺核昔甲硫胺酸 (S-adenosylmethionine, SAM) 将一甲基经酵素转移到胞嘧啶第 5 个碳的位置上, 该酵素反应系由 DNA 甲基转移酶 (DNA methyltransferase, DNMTs) 执行, DNMT1 是哺乳类动物主要的甲基转移酶, 系负责将半甲基化位置复制后修复 (post-replicative restoration) 为全甲基化, 被称为维持甲基化 (maintenance methylation); 反之, DNMT3A 及 DNMT3B 则被认为主要负责甲基化新的位置, 进行一种称为重新甲基化 (de novo methylation) 的步骤。CpG 双核苷酸对甲基化的遗失 (loss of methylation), 意即一般的低度甲基化, 是癌细胞内的第一个超遗传异常 (epigenetic abnormality); 然而, 在过去几年内的研究却显示, 特定位置 (例如: 一些肿瘤抑制基因) 的高度甲基化 (site-specific hypermethylation) 与其功能的丧失有关, 这可能会在癌症生成时提供选择优势 (selective advantages); 在启动子区域上 CpG 岛的高度甲基化, 可以通过组蛋白修饰 (histone modification) 伴随接续而来的基因默化现象 (gene silencing), 来引起染色质改造 (chromatin remodeling); 除了染色体缺失及基因突变之外, 经由启动子的高度甲基化所造成肿瘤抑制基因的超遗传默化现象 (epigenetic silencing) 也常见于人类癌症中 (Estelle et al., 1999; Herman et al., 2003)。

最近的流行病学研究显示, 血清叶酸盐 (serum folate) 的浓度 (一种甲基的主要来源) 与 HPV 的感染和清除有关联; 在甲基周期 (methyl cycle) 的代谢作用中, 酵素的基因多型性 (genetic polymorphisms) 也曾被报导与子宫颈上皮内病变的发展有关; 如同超基因演化的观念一般, DNA 甲基化与子宫颈癌间关联的研究也同样盛行, 子宫颈癌的 DNA 甲基化研究日与遽增, 显示使用甲基化作为子宫颈癌筛检的可能性; 由于遗传与环境交互作用的特性, 肿瘤抑制基因甲基化程度, 因不同的基因及不同的族群而异, 不同的疾病也会有不同的甲基化表现型 (methylator phenotypes); 然而, 子宫颈癌的甲基化表现型以及其与 HPV 基因型的关联仍未知, 而子宫颈癌中有何特定的基因会被甲基化, 以及需要多少基因

方可达到临床应用的需求，这些问题仍是未来需要被确认的议题。

国防赖鸿政博士先前已于台湾（TW Pat. Pub. No. 200831900、TW Pat. Pub. No. 201038739）、中国（CN Appl. No. 200810094659.2、CN Appl. No. 200910135501.X）、马来西亚（UI20085354）及美国（US Pat. Pub. No. 20080311570、US Pat. Pub. No. 20110045465）于所属技术领域提出相关发明及其不同的技术手段与方法，包括专利之申请（下称前案）。基因甲基化检测学理虽然发展时间不短，也为学术研究者广泛使用，然如欲应用于医疗检测等临床相关领域，则测试稳定度及具有重复性是非常重要的，而甲基化基因检测目前于医疗检测上尚未普遍应用，其部分原因除需大量研究来支持标定基因临床意义及相关验证外，如何提供稳定的测试方法也有相当的技术障碍。

本发明发明人深刻了解前案的不足与缺陷，加以改良创新，并经多年苦心孤诣潜心研究后，终于成功研发完成本发明可适用多种癌症筛检的方法及其检验套组，也使相关标的基因的甲基化检测具产业可利用性，例如定义标的基因相关序列及浓度范围，另外于癌症应用领域也提供更多信息予以验证支持，使标的基因检测得有重复性结果，并得以应用于医疗领域。本设计癌症筛检套组可更精确检验，并设计以试剂盒的形式，达到更快更方便与更有效率，提供检验上的一完善产品。

发明内容

本发明目的在于，提供一种检测套组，其用以测定一检测检体中标的基因 CpG 序列甲基化的存在，也即先由检体萃取出其 gDNA，此 gDNA 经过适当前处理及化学反应，即可使用本检测套组进行标的基因甲基化的存在测试，本检测套组包括：

（1）一浓度范围在 20 nM-1250 nM 标的基因引子混合液，其至少包含有一正向引子与一反向引子，该正向引子、反向引子的序列选自 SEQ ID No: 1-70 所示之核苷酸序列至少有 80% 的序列同一性或至少连续十个核苷酸相

同之序列之一或多种，最佳为序列完全相同；

(2) 一浓度范围在 20nM-1250nM 内部控制基因核酸分子侦测混合液，其至少包含有一正向引子及一反向引子；

(3) 一聚合酶连锁扩增反应主要混合液，其主要成分至少包含聚合酶、dNTPs 及镁盐。

可达成上述发明目的之一检验套组，该一内部控制基因核酸分子侦测混合液，其中正向引子、反向引子所包含的序列也选自由 SEQ ID No: 71-80 所示之核苷酸序列至少有 80% 的序列同一性或至少连续十个核苷酸相同之序列之一或多种，最佳为序列完全相同。其中标的基因与内部控制基因的引子可混和成为单管核酸分子侦测混合液。

可达成上述发明目的之一检验套组，该标的基因引子混合液更包含探针，其探针序列选自 SEQ ID No: 1-70 所示之核苷酸序列至少有 80% 的序列同一性或至少连续十个核苷酸相同之序列之一或多种或其互补序列，最佳为序列完全相同；该内部控制基因核酸分子侦测混合液，更包含可侦测内部控制基因扩增产物的探针。通过本发明进一步提供包含其中内部控制基因正向引子、反向引子所包含的序列系选自 SEQ ID No: 71-80 所示之核苷酸序列至少有 80% 的序列同一性或至少连续十个核苷酸相同之序列之一或多种，最佳为序列完全相同；探针序列系选自由 SEQ ID No: 71-80 所示之核苷酸序列至少有 80% 的序列同一性或至少连续十个核苷酸相同之序列之一或多种或互补序列，最佳为序列完全相同。其中标的基因与内部控制基因的引子可混和成为单管核酸分子侦测混合液。

可达成上述发明目的之一检验套组，其聚合酶连锁反应主要混合液，更包含可辨识连锁扩增反应产物的荧光物质或与选自可与 DNA 双股作用产生荧光进而被侦测到的物质，此物质包含 SYBR 系列物质如 SYBER Green, Syber Gold 等。

可达成上述发明目的之一检验套组，其中该检测检体中之内部控制基因选自于由以下至少一种或一种以上之基因：Col2A、-Globin、GAPDH

(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)、-actin 所组成的群组。

可达成上述发明目的之一种检验套组，其标的基因与内部控制组基因的探针具有荧光标记，此荧光标记系选自由于任一荧光：FAM、HEX、TET、TAMRA、Cy3、Cy5、Cy5.5、VIC、Red610、Yellow 555、Texas Red、Yakima Yellow, BHQ-1、BHQ-2 及 BHQ-3 所组成之群组。

可达成上述发明目的之一种检验套组，其中该检测检体中之基因选自由以下至少一种或一种以上之基因：PAX1、ZNF582、SOX1 及 NKX6-1 所组成的群组。

可达成上述发明目的之一种检验套组，其可更进一步用以检测不正常细胞增生现象。其中不正常细胞增生包含癌前病变检测、肿瘤检测、肿瘤复发检测或肿瘤用药预测或愈后效果检测。其中该恶性肿瘤系为下列群组之一：子宫颈癌、口腔癌、头颈癌、食道癌、大肠癌、肝癌、卵巢癌、乳腺癌、舌癌、肺腺癌以及皮肤癌。

可达成上述发明目的之检验套组，其中连锁扩增产物之鉴定方法可用荧光法、定序法 (sequencing)、微数组 (microarrays)、质谱仪分析 (mass spectrometer)、变性高效液相色谱 (denaturing high-performance liquid chromatography, DHPLC)、焦磷酸定序 (pyrosequencing) 或免疫分析法 (immunoassay)。

术语“检测检体”指离体之检测样本，该样本包括子宫颈抹片、腹水、血液、尿液、粪便、痰、口腔黏膜细胞、胃液、胆汁、子宫颈上皮细胞、或手术后的癌症组织等离体的检体样本。本发明的癌症筛检方法，用于检测该些离体样本中的目标基因甲基化的状态，以作为各类癌症的筛检指标。本发明所提供的癌症筛检方法及其筛检指标，可供检测研究人员于实验室中进行检测。

具体实施方式

为了更好地理解本发明的技术及其所能达到的效果，以下对本发明的较佳实施例进行详细说明。

本发明目的在于，提供一种检测套组，其系用以测定一检测检体中基因 CpG 序列甲基化的存在，也即先由检体萃取出其 gDNA，此 gDNA 经过适当前处理及化学反应，即可使用本检测套组进行基因甲基化的存在测试，本检测套组包括：

(1) 一浓度范围在 20nM-1250nM 标的基因引子混合液，其至少包含有一正向引子与一反向引子，该正向引子、反向引子的序列选自 SEQ ID No:

1-70 所示的核苷酸序列至少有 80% 的序列同一性或至少连续十个核苷酸相同之序列的一种或多种，最佳为序列完全相同；

(2) 一浓度范围在 20nM-1250nM 内部控制基因核酸分子侦测混合液，其至少包含有一正向引子及一反向引子；

(3) 一聚合酶连锁扩增反应主要混合液，其主要成分至少包含聚合酶、dNTPs 及镁盐。

可达成上述发明目的之一检验套组，该一内部控制基因核酸分子侦测混合液，其中正向引子、反向引子所包含的序列选自 SEQ ID No:

71-80 所示的核苷酸序列至少有 80% 的序列同一性或至少连续十个核苷酸相同之序列之一或多种，最佳为序列完全相同。其中标的基因与内部控制基因的引子可混和成为单管核酸分子侦测混合液。

可达成上述发明目的之一检验套组，该标的基因引子混合液更包含探针，其探针序列系选自 SEQ ID No: 1-70 所示之核苷酸序列至少有 80% 的序列同一性或至少连续十个核苷酸相同之序列之一或多种或其互补序列，最佳为序列完全相同；该内部控制基因核酸分子侦测混合液，更包含可侦测内部控制基因扩增产物的探针。通过本发明进一步提供包含其中内部控制基因正向引子、反向引子所包含的序列选自 SEQ ID No: 71-80 所示之核苷酸序列至少有 80% 的序列同一性或至少连续十个核苷酸相同之序列

之一种或多种，最佳为序列完全相同；探针序列选自 SEQ ID No: 71-80 所示之核苷酸序列至少有 80% 的序列同一性或至少连续十个核苷酸相同之序列之一种或多种或互补序列，最佳为序列完全相同。其中标的基因与内部控制基因的引子可混和成为单管核酸分子侦测混合液。

可达成上述发明目的之一种检验套组，其聚合酶连锁反应主要混合液，更包含可辨识连锁扩增反应产物的荧光物质或与选自可与 dna 双股键结产生荧光进而被侦测到的物质。此物质包含 SYBR 系列物质如 SYBER Green, Syber Gold 等。

可达成上述发明目的之一种检验套组，其中该检测检体中的内部控制基因选自于由以下至少一种或一种以上之基因：Col2A、-Globin、GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)、-actin 所组成的群组。

可达成上述发明目的之一种检验套组，其标的基因与内部控制组基因的探针具有荧光标记，此荧光标记系选自由于任一荧光：FAM、HEX、TET、TAMRA、Cy3、Cy5、Cy5.5、VIC、Red610、Yellow 555、Texas Red、Yakima Yellow, BHQ-1、BHQ-2 及 BHQ-3 所组成的群组。

可达成上述发明目的之一种检验套组，其中该检测检体中之基因选自于由以下至少一种或一种以上之基因：PAX1、ZNF582、SOX1 及 NKX6-1 所组成的群组。

可达成上述发明目的之一种检验套组，其可更进一步用以检测不正常细胞增生现象。其中不正常细胞增生包含癌前病变检测、肿瘤检测、肿瘤复发检测或肿瘤用药预测或愈后效果检测。其中该恶性肿瘤系为下列群组之一：子宫颈癌、口腔癌、头颈癌、食道癌、大肠癌、肝癌、卵巢癌、乳腺癌、舌癌、肺腺癌以及皮肤癌。

可达成上述发明目的之检验套组，其中连锁扩增产物之鉴定方法可用荧光法、定序法 (sequencing)、微数组 (microarrays)、质谱仪分析 (mass spectrometer)、变性高效液相色谱 (denaturing high-performance liquid chromatography, DHPLC)、焦磷酸定序 (pyrosequencing) 或免疫分

析法（immunoassay）。

以下为相关具体实施例的叙述，包括材料与检测方法等，以进一步阐述本发明的技术特征与效果；惟，可以理解的是，本发明具体实施例或方式不应作为限缩或被解释为实施本发明之限制或仅限于该些所述实施例或方式。

实施例一 材料与方法

检体样本，先抽取其 DNA，在经过重亚硫酸盐（bisulfite）的转换，并以表 1 至表 4 揭示可用于扩增含有 PAX1、ZNF582、SOX1、NKX6-1 以及内部控制组甲基化区域的引子对及探针组（如表 1 至五），来进行检测。试剂盒主要组成如下表 6：

表 1 用来扩增标的基因 PAX1 甲基化区域的引子对及探针组

ID No:	PAX1 引子对及探针组
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' gggcggtagcgcgttctgt 3'
SEQ ID No : 6	5' tagcgcggcggttaggtttgga 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' acaaacaacgaaaaatacgcg 3'
SEQ ID No : 11	5' acgacgaaaaaaacgacgacg 3'

SEQ ID No : 12	5' ttaaattgattttcgtacgttgtag 3'
SEQ ID No : 13	5' gcgaccccaaaccacaaaata 3'
SEQ ID No : 14	5' ctcccaaaacactctccac 3'
SEQ ID No : 15	5' agtagcggcggcggtagggtt 3'
SEQ ID No : 16	5' aacgaaacgcgtaccgccc 3'
SEQ ID No : 17	5' cgcgaccccaaaccacaaaata 3'
SEQ ID No : 18	5' aaaacactctccacgcccgcga 3'
SEQ ID No : 19	5' attgattttcgtacgtt 3'
SEQ ID No : 20	5' aacctaccgcccgcgtact 3'
SEQ ID No : 21	5' cctcccaaaacactctccacg 3'
SEQ ID No : 22	5' cccgaaaaccgaaaaccg 3'
SEQ ID No : 23	5' acgcccgaaaaccgaaaaccg 3'
SEQ ID No : 24	5' atgcccgccttaccata 3'
SEQ ID No : 25	5' cctacctatgcccgcctta 3'

表 2 用来扩增标的基因 ZNF582 甲基化区域的引子对及探针组

ID No:	ZNF582引子对及探针组
SEQ ID No : 26	5' acgatttacgcggagtagaag 3'
SEQ ID No : 27	5' tgacggtttttgtttatcggttattc 3'
SEQ ID No : 28	5' agtgacggtttttgtttatcggttattc 3'
SEQ ID No : 29	5' cggagggatattgcggcgctcggt 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' acccaaaaacgcgttcacca 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' acccgaccttaaaaccgaat 3'

表 3 用来扩增标的基因 SOX1 甲基化区域的引子对及探针组

ID No:	SOX1 引子对及探针组
SEQ ID No : 41	5' gcgttttttttttcgttattggc 3'
SEQ ID No : 42	5' tgcgttttttttttcgttattggcg 3'
SEQ ID No : 43	5' cgcggcgcgctcgttttgta 3'
SEQ ID No : 44	5' tggaggtcgttgaggatcg 3'
SEQ ID No : 45	5' cggcggtcggcgaggagata 3'
SEQ ID No : 46	5' gcgttttcgttcgagcgta 3'
SEQ ID No : 47	5' aggatcgagcgtaggaggaa 3'
SEQ ID No : 48	5' cgcgctatctccttctctctacg 3'
SEQ ID No : 49	5' gccgctacgcgctatctcc 3'
SEQ ID No : 50	5' gcaacccaaacgccctcgac 3'
SEQ ID No : 51	5' cgatacgctaaacccgacccg 3'
SEQ ID No : 52	5' cgcggcgcgctcgttttgta 3'
SEQ ID No : 53	5' cgatcctcaacgacctcca 3'

SEQ ID No : 54	5' cgatacgctaaacccgacccg 3'
SEQ ID No : 55	5' gctcgatcctcaacgacctc 3'
SEQ ID No : 56	5' acgatcgaaatcgccgtctt 3'

表 4 用来扩增标的基因 NKX6-1 甲基化区域的引子对及探针组

ID No:	NKX6-1 引子对及探针组
SEQ ID No : 57	5' tgtcgtttttcgctggagg 3'
SEQ ID No : 58	5' cgtggctgctgggatgttagc 3'
SEQ ID No : 59	5' tcggcgtggctgctgggatgttagc 3'
SEQ ID No : 60	5' acggttttcggcgtggctcgt 3'
SEQ ID No : 61	5' ttcgggcgcgctcgagtgtt 3'
SEQ ID No : 62	5' aacatcccacgaccacgccg 3'
SEQ ID No : 63	5' acgaccacgccgaaaaccgt 3'
SEQ ID No : 64	5' acaaacaacgaaaaatacgcg 3'
SEQ ID No : 65	5' gacaaacaacgaaaaatacgcg 3'
SEQ ID No : 66	5' acgacgaaaaaacgacgacg 3'
SEQ ID No : 67	5' cgctaccgaaaattactcg 3'
SEQ ID No : 68	5' cgaataccctccattacc 3'
SEQ ID No : 69	5' acaaacaacgaaaaatacgcg 3'
SEQ ID No : 70	5' aacactcgacgcgcccga 3'

表 5 用来扩增内部控制组基因甲基化区域的引子对及探针组

ID No:	内部控制组 引子对及探针组
SEQ ID No : 71	5' aggggtattttgaaaaggagatat 3'

SEQ ID No : 72	5' ttttaaggggaagatgggatagaag 3'
SEQ ID No : 73	5' agaggtggggataggtattgggt 3'
SEQ ID No : 74	5' cttctatcccatcttccc 3'
SEQ ID No : 75	5' ttcattctaaccaatacct 3'
SEQ ID No : 76	5' tggtagagtaaagtatagagt 3'
SEQ ID No : 77	5' aaccaatacctatccccacctc 3'
SEQ ID No : 78	5' aacaattataaactccaaccaccaaac 3'
SEQ ID No : 79	5' actccaaccaccaaaccttcattct 3'
SEQ ID No : 80	5' accgaccccactaatacccg 3'

表 6 试剂盒主要成分

试剂	内容物及功能
侦 测 混 合组	containing the mix of primers and probes of the target gene and internal control Gene 含有一个目标基因及内控组基因的引子对（一个正向引子及一个反向引子）及其探针混和物
主 要 混 合液	Master mix for PCR or Q-PCR reagent （Tag polymerase, dNDT etc.） 聚合酶连锁反应主要混合液
正 向 对 照组	Include the fragment of “Target gene” and the fragment of “Internal control gene” 一个目标基因及内部控制组基因

PCR 扩增反应如下：（i）在 95°C 下活化聚合酶 10 分钟，（ii）在 95°C 下变性 DNA 模板 10 秒及在 60°C 下键合/延长 DNA 链 40 秒，及（iii）进行变性/键合/延长循环 30 至 50 次。

PCR 扩增反应，其中一组混合物包括一个目标基因及内控组基因的引子对及其探针混和物，引子对为包含一个正向引子及一个反向引子，不同探针则以不同波长且互相干扰性低的荧光进行标记，于本实施例，目标基因探针用 FAM 标记，内控组探针用 VIC 标记。除荧光染料外，所有探针也会加上 quencher 基团，因此当探针序列和扩增序列能互补结合，则荧光染料会被释出荧光，进而被侦测到。目标基因甲基化基因的程度由 Cp 值（循环数值）及讯号强度来决定，而内控基因则可用以校正及侦错。以本实施例中的 PAX1 为例，如果 PAX1 的 Cp 值和内控基因 Cp 值差距不超过 12，则表示有 PAX1 有显著甲基化。其他目标基因依此类推。

实施例二 不同癌症细胞株目标基因的甲基化程度分析

本测试应用表 1 至表 4 所揭示可用于扩增含有 PAX1、ZNF582、SOX1 及 NKX6-1 甲基化区域之引子对及探针组，来进行不同癌症细胞株检测，其甲基化状态分析结果如表 7 所示。结果显示，于子宫颈癌相关的细胞株 Hela 中，PAX1、ZNF582、SOX1 及 NKX6-1 都侦测到有甲基化；子宫颈癌相关的细胞株 SiHa 中，PAX1、ZNF582 及 SOX1 侦测到有甲基化；子宫颈癌相关的细胞株 CaSki 中，PAX1、ZNF582、SOX1 及 NKX6-1 都侦测到有甲基化；子宫颈癌相关的细胞株 C-33 A 中，ZNF582、SOX1 及 NKX6-1 侦测到有甲基化。大肠癌相关的细胞株 COLO 205 中，PAX1、ZNF582、SOX1 及 NKX6-1 都侦测到有甲基化；大肠癌相关的细胞株 Caco-2 中，ZNF582、SOX1 及 NKX6-1 侦测到有甲基化；大肠癌相关的细胞株 HT-29 中，PAX1、ZNF582、SOX1 及 NKX6-1 都侦测到有甲基化。肝癌相关的细胞株 HuH-7 中，SOX1 及 NKX6-1 侦测到有甲基化；肝癌相关的细胞株 Mahlavu 中，ZNF582 及 SOX1 侦测到有甲基化。肺癌相关的细胞株 A549 中，PAX1、ZNF582、SOX1 及 NKX6-1 无侦测到甲基化。皮肤癌相关的细胞株 A-375 中，PAX1、ZNF582、SOX1 及 NKX6-1 无侦测到甲基化。卵巢癌相关的细胞株 A2780 中，ZNF582 及 SOX1 侦测到有甲基化。

乳癌相关的细胞株 T47D 中, PAX1 及 NKX6-1 侦测到有甲基化; 乳癌相关的细胞株 BT474 中, PAX1、ZNF582 及 SOX1 侦测到有甲基化; 乳癌相关的细胞株 MDA-MB-231 中, ZNF582、SOX1 及 NKX6-1 侦测到有甲基化; 乳癌相关的细胞株 ZR-75-1 中, ZNF582、SOX1 及 NKX6-1 侦测到有甲基化; 乳癌相关的细胞株 HCC1954 中, ZNF582 及 SOX1 侦测到有甲基化; 乳癌相关的细胞株 MCF-7 中, PAX1、ZNF582、SOX1 及 NKX6-1 侦测到有甲基化。舌癌相关的细胞株 SAS 中, PAX1、ZNF582、SOX1 及 NKX6-1 都侦测到有甲基化。口腔癌相关的细胞株 Ca9-22 中, PAX1、ZNF582、SOX1 及 NKX6-1 都侦测到有甲基化。

由此可知, 于子宫颈癌、大肠癌、肝癌、卵巢癌、乳癌、舌癌、口腔癌、肺癌、肺腺癌以及皮肤癌相关之细胞株中, 该四个基因至少其中之一侦测到甲基化现象。因此 PAX1、ZNF582、SOX1 及 NKX6-1 至少其中之一被甲基化确实可作为筛检癌症有无的筛检指标。

表 7 不同癌症细胞株目标基因有无甲基化分析

	PAX1	ZNF582	SOX1	NKX6-1	注释
Hela (CCL-2.2)	+	+	+	+	子宫颈腺癌 (adenocarcinoma; cervix) (HPV (18 (+)))
SiHa	+	+	+	-	子宫颈鳞状细胞癌 (epidermoid carcinoma; cervix) (HPV-16 (+))
CaSki	+	+	+	+	子宫颈鳞状细胞癌 (epidermoid carcinoma; cervix) (HPV-16 (+))
C-33A	-	+	+	+	子宫颈癌 (carcinoma; cervix) (HPV (-))
COLO 205	+	+	+	+	结直肠腺癌 (colorectal adenocarcinoma, metastatic site: ascites)
Caco-2	-	+	+	+	大肠癌 (colorectal adenocarcinoma)
HT-29	+	+	+	+	结直肠腺癌 (colorectal adenocarcinoma)
HuH-7	-	-	+	+	肝癌 (hepato cellular carcinoma)
Mahlavu	-	+	+	-	肝癌 (Mahlavu hepatocellular carcinoma)
A549	-	-	-	-	肺癌 (lung carcinoma)
A-375	-	-	-	-	皮肤癌 (skin; malignant melanoma)
A2780	-	+	+	-	卵巢癌 (ovarian carcinoma)

T47D	+	-	-	+	乳管癌 (breast ductal carcinoma)
BT474	+	+	+	-	乳管癌 (breast ductal carcinoma)
MDA-MB-231	-	+	+	+	乳癌 (breast adenocarcinoma)
ZR-75-1	-	+	+	+	乳管癌 (breast ductal carcinoma)
HCC1954	-	+	+	-	乳管癌 (breast ductal carcinoma)
MCF-7	+	+	+	+	乳癌 (breast adenocarcinoma)
SAS	+	+	+	+	舌鳞癌 (tongue, squamous carcinoma)
Ca9-22	+	+	+	+	口腔癌 (carcinoma; squamous cell carcinoma)

实施例三 子宫颈癌样本内目标基因的甲基化程度分析

本测试使用 279 位台湾已知诊断的正常与疾病的子宫颈抹片样本，如表 8 所示分别为正常 239 位 (85.7%)、轻度 (CIN1) 22 位 (7.9%)、中度 (CIN2) 2 位 (0.7%)、重度 (CIN3) /原位癌 (CIS) 12 位 (4.3%)、鳞状细胞癌 4 位 (1.4%)，并抽取其 DNA，在经过重亚硫酸盐 (bisulfite) 的转换，并以表 1 至表 4 揭示可用于扩增含有 PAX1、ZNF582、SOX1 及 NKX6-1 甲基化区域之引子对及探针组，来进行检测。如表 9 所示，相较于正常子宫颈抹片样本，分别以 PAX1、ZNF582、SOX1 及 NKX6-1 作为标的基因侦测重度以上子宫颈抹片样本有 85.45 倍 (95% 信赖区间 = 33.95~215.11)、289.17 倍 (95% 信赖区间 = 39.20~2133.14)、67.69 倍 (95% 信赖区间 = 20.55~223.01) 及 2.56 倍 (95% 信赖区间 = 1.36~4.82) 的危险会罹患重度子宫颈癌。如表 10 所示，当同时合并个别甲基化标的基因与子宫颈抹片检测疾病时，意即只要任一甲基化标的基因或子宫颈抹片检测结果为阳性，则认定该测试样本的子宫颈癌筛检结果为阳性。相较于正常子宫颈抹片样本，分别以 PAX1、ZNF582、SOX1 及 NKX6-1 作为标的基因侦测并搭配子宫颈抹片检测重度以上子宫颈抹片样本有 475.64 倍 (95% 信赖区间 = 63.94~3538.43)、543.31

倍（95% 信赖区间 =33.11~8914.18）、95.08 倍（95% 信赖区间 =20.55~223.01）及 14.25 倍（95% 信赖区间 =6.12~33.18）的危险会罹患重度子宫颈癌，且各项敏感度相对于没有搭配子宫颈抹片检测结果都有提升（PAX1: 75%提升至 94%、ZNF582: 87%提升至 94%、SOX1: 75%提升至 100%、NKX6-1: 50.00%提升至 84.78%）。

表 8 正常子宫颈样本与不同时期之子宫颈癌样本（切片结果）

样本数目	Normal 正常	CIN1 轻度	CIN2 中度	CIN3/CIS 重度/原位 癌	SCC 鳞状细胞 癌
279	239 (85.7%)	22 (7.9%)	2 (0.7%)	12 (4.3%)	4 (1.4%)

表 9

标的基因	敏感度	特异度	P-值	胜算比（95% 信赖区间） [*]
PAX1	75%	95%	<0.0001 ^a	85.45 (33.95~215.11)
ZNF582	87%	58%	<0.0001 ^a	289.17 (39.20~2133.14)
SOX1	75%	98%	<0.0001 ^a	67.69 (20.55~223.01)
NKX6-1	50.00%	73.05%	0.0015 ^a	2.56 (1.36~4.82)

表 10

标的基因	敏感度	特异度	P-值 ^a	胜算比（95% 信赖区间） [*]
PAX1 or Pap	94%	92%	<0.0001 ^a	475.64 (63.94~3538.43)
ZNF582 or Pap	94%	95%	<0.0001 ^a	543.31 (33.11~8914.18)
SOX1 or Pap	100%	56%	<0.0001 ^a	95.08 (22.66~398.96)
NKX6-1 or Pap	84.78%	70.13%	<0.0001 ^a	14.25 (6.12~33.18)

^a 依据卡方检验 ^b 依据费雪精确性检定

^{*} CIN3以上的胜算比（odds ratios, OR）（不含CIN1及CIN2）

CIN: 子宫颈上皮内赘瘤（Cervical intraepithelial neoplasia）

SCC: 鳞状细胞癌（squamous cell carcinoma）

Pap: 子宫颈抹片检测 (Papanicolaou test)

实施例四:

本测试使用 8 位已知诊断的正常与疾病的口腔抹片样本, 并抽取其 DNA, 在经过重亚硫酸盐 (bisulfite) 的转换, 并以表 1 至表 4 揭示可用于扩增含有 PAX1、ZNF582、SOX1 及 NKX6-1 甲基化区域之引子对及探针组, 来进行检测, 其甲基化状态分析结果如表 10 一所示。结果显示, 于口腔 1 中, PAX1、ZNF582、SOX1 及 NKX6-1 都无甲基化; 口腔 2 中, PAX1、ZNF582、SOX1 及 NKX6-1 都无甲基化; 口腔 3 中, PAX1 及 ZNF582 有甲基化; 口腔 4 中, PAX1、ZNF582、SOX1 及 NKX6-1 都甲基化; 口腔 5 中, PAX1 及 ZNF582 有甲基化。口腔 6 中, ZNF582 有甲基化; 口腔 7, ZNF582、SOX1 及 NKX6-1 有甲基化。口腔 8 中, PAX1 及 ZNF582 有甲基化。由此可知, 于口腔癌于不同时期不同症状中, 该四个基因至少其中之一大幅地被甲基化。因此 PAX1、ZNF582、SOX1 及 NKX6-1 至少其中之一甲基化程度确实可作为筛检口腔癌的筛检指标。

表 11 不同症状的口腔癌样本其目标基因甲基化程度分析

名称	口腔癌程度及特征	PAX1	ZNF582	SOX1	NKX6-1
口腔1	左边白斑、角化 (Leukoplakia)	-	-	-	-
口腔2	左边白斑、角化 (Leukoplakia)	-	-	-	-
口腔3	右边白斑、表面角化严重、疣状癌 (Verruciform leukoplakia)	+++	+++	-	-
口腔4	左边突起、突起周围白化、念珠菌感染、突起部经切片无癌细胞 (Erythroleukoplakia)	+++	+++	+++	+++
口腔5	左边红色突起、白点增生、口腔癌 (Erythroleukoplakia with Oral cancer history)	+++	+++	-	-
口腔6	口腔全面有点状白斑	-	+++	-	-

	(Leukoplakia)				
口腔7	口腔有白斑 (Leukoplakia)	-	+++	+++	+++
口腔8	口腔右边有红斑, 念珠菌感染、原位癌 (Erythroleukoplakia with Oral cancer)	+++	+++	-	-

权 利 要 求 书

IP120842

1、一种检测套组，其特征在于，用以测定一检测检体中基因 CpG 序列甲基化的存在，也即先由检体萃取出其 gDNA，此 gDNA 经过适当前处理及化学反应，即可使用本检测套组进行基因甲基化的存在测试，本检测套组包括：

(1) 一浓度范围在 20nM-1250nM 标的基因引子混合液，其至少包含有一正向引子与一反向引子，该正向引子、反向引子的序列选自 SEQ ID No: 1-70 所示的核苷酸序列至少有 80% 的序列同一性或至少连续十个核苷酸相同的序列的一种或多种；

(2) 一浓度范围在 20nM-1250nM 内部控制基因核酸分子侦测混合液，其至少包含有一正向引子及一反向引子；

(3) 一聚合酶连锁扩增反应主要混合液，其主要成分至少包含聚合酶、dNTPs 及镁盐。

2、根据权利要求 1 所述的检测套组，其特征在于，

(1) 该标的基因引子混合液更包含探针，其探针序列系选自 SEQ ID No: 1-70 所示的核苷酸序列至少有 80% 的序列同一性或至少连续十个核苷酸相同的序列的一种或多种或其互补序列；

(2) 该内部控制基因核酸分子侦测混合液，更包含可侦测内部控制基因扩增产物的探针。

3、根据权利要求 1 所述的检测套组，其特征在于，该一内部控制基因核酸分子侦测混合液，其中正向引子、反向引子所包含的序列系选自 SEQ ID No:

71-80 所示的核苷酸序列至少有 80% 的序列同一性或至少连续十个核苷酸相同的序列的一种或多种。

4、根据权利要求 2 所述的检测套组，其特征在于，该内部控制基因核酸分子侦测混合液，更包含探针，其中内部控制基因正向引子、反向引

子所包含的序列选自 SEQ ID No: 71-80 所示的核苷酸序列至少有 80% 的序列同一性或至少连续十个核苷酸相同的序列的一种或多种；探针序列选自 SEQ ID No: 71-80 所示的核苷酸序列至少有 80% 的序列同一性或至少连续十个核苷酸相同的序列的一种或多种或互补序列。

5、根据权利要求 1 所述的检测套组，其特征在于，其中标的基因正向引子与反向引子的序列选自 SEQ ID No: 1-70 所示的核苷酸序列的一种或多种。

6、根据权利要求 2 所述的标的基因，其特征在于，其正向引子与反向引子的序列选自 SEQ ID No: 1-70 所示的核苷酸序列的一种或多种；所述标的基因探针的序列选自 SEQ ID No: 71-80 所示的核苷酸序列的一种或多种或互补序列。

7、根据权利要求 4 所述内部控制组基因，其特征在于，其正向引子、反向引子所包含的序列选自 SEQ ID No: 71-80 所示的核苷酸序列的一种或多种；探针序列选自 SEQ ID No: 71-80 所示的核苷酸序列的一种或多种或互补序列。

8、根据权利要求 1 所述的检测套组，其特征在于，其聚合酶连锁反应主要混合液，更包含可辨识连锁扩增反应产物的荧光物质或与选自可与 DNA 双股作用产生荧光进而被检测到的物质。

9、根据权利要求 2 所述的检测套组，其特征在于，其标的基因与内部控制组基因的探针具有荧光标记，此荧光标记系选自由于任一荧光：FAM、HEX、TET、TAMRA、Cy3、Cy5、Cy5.5、VIC、Red610、Yellow 555、Texas Red、Yakima Yellow, BHQ-1、BHQ-2 及 BHQ-3 所组成的群组。

10、根据权利要求 1 所述的检测套组，其特征在于，其更进一步可用以检测不正常细胞增生现象。

11、根据权利要求 10 所述的检测套组，其特征在于，其中检测不正常细胞增生包含癌前病变检测、肿瘤检测、肿瘤复发检测或肿瘤用药预测

或愈后效果检测。

12、根据权利要求 11 所述的肿瘤，其特征在于，为下列群组之一：子宫颈癌、口腔癌、头颈癌、食道癌、大肠癌、肝癌、卵巢癌、乳癌、舌癌、肺癌、肺腺癌以及皮肤癌。

13、根据权利要求 2 所述的检测套组，其特征在于，其更进一步可用以检测不正常细胞增生现象。

14、根据权利要求 13 所述的检测套组，其特征在于，其中检测不正常细胞增生包含癌前病变检测、肿瘤检测、肿瘤复发检测或肿瘤用药预测或愈后效果检测。

15、根据权利要求 14 所述肿瘤，其特征在于，为下列群组之一：子宫颈癌、口腔癌、头颈癌、食道癌、大肠癌、肝癌、卵巢癌、乳癌、舌癌、肺癌、肺腺癌以及皮肤癌。

16、根据权利要求 1 所述的检测套组，其特征在于，其中标的基因与内部控制基因的引子可混和成为单管核酸分子侦测混合液。

17、根据权利要求 2 所述的检测套组，其特征在于，其中标的基因与内部控制基因的引子及探针可混和成为单管核酸分子侦测混合液。

18、根据权利要求 1 或 2 所述的检测套组，其特征在于，其中该检测检体中的标的基因选自于由以下至少一种或一种以上基因：PAX1、ZNF582、SOX1 及 NKX6-1 所组成的群组。

19、根据权利要求 1 或 2 所述的检测套组，其特征在于，其中该检测检体中的内部控制基因选自于由以下至少一种或一种以上的基因：Col2A、 α -Globin、GAPDH 及-actin 所组成的群组。

20、根据权利要求 1 或 2 所述的检测套组，其特征在于，其中连锁扩增产物的鉴定方法可用荧光法、定序法（sequencing）、微数组（microarrays）、质谱仪分析（mass spectrometer）、变性高效液相色谱（denaturing high-performance liquid chromatography, DHPLC）、焦磷酸定序（pyrosequencing）或免疫分析法（immunoassay）。