

权 利 要 求 书

1、COL4A1 基因在制备肿瘤标志物中的应用；

优选地，所述 COL4A1 基因的序列与 Genebank Accession No. NC_000013.11 所示的序列具有至少 97.8%，至少 98.9%，至少 99.9%或 100% 的同一性；

优选地，所述肿瘤为结直肠肿瘤；

优选地，所述肿瘤为结直肠癌或腺瘤；

优选地，所述标志物所针对的待测样本为组织、体液或排泄物；

优选地，所述组织为肠组织；

优选地，所述体液为血液、血清、血浆、细胞外液、组织液、淋巴液、脑脊液或房水；

优选地，所述排泄物为痰液、唾液、尿液或粪便。

2、COL4A1 基因的甲基化检测试剂在制备肿瘤检测试剂或者试剂盒中的应用；

优选地，所述 COL4A1 基因的序列至少与 Genebank Accession No. NC_000013.11 所示的序列具有至少 97.8%，至少 98.9%，至少 99.9%或 100% 的同一性；

优选地，所述肿瘤为结直肠肿瘤；

优选地，所述肿瘤为结直肠癌或腺瘤；

优选地，检测试剂所针对的待测样本为组织、体液或排泄物；

优选地，所述组织为肠组织；

优选地，所述体液为血液、血清、血浆、细胞外液、组织液、淋巴液、脑脊液或房水；

优选地，所述排泄物为痰液、尿液、唾液或粪便。

3、一种捕获序列，其特征在于，所述捕获序列具有如下所示的核苷酸序列中的任意一项：

I、具有 SEQ ID NO:1 所示的核苷酸序列；

II、具有 SEQ ID NO:1 所示的核苷酸序列经修饰、取代、缺失或添加一个或多个碱基获得的核苷酸序列或具有 SEQ ID NO:1 所示的核苷酸序列的 CpG 岛获得的功能相近的核苷酸序列；

III、与 SEQ ID NO:1 所示的核苷酸序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%或至少 99%同一性的序列或具有 SEQ ID NO:1 所示的核苷酸序列的 CpG 岛获得的功能相近的核苷酸序列；

IV、如 I、II 或 III 所示序列的互补序列。

4、一种引物对，其特征在于，上游引物具有如下所示的核苷酸序列中的任意一项：

V、具有 SEQ ID NO:2 所示的核苷酸序列；

VI、具有 SEQ ID NO:2 所示的核苷酸序列经修饰、取代、缺失或添加一个或多个碱基获得的核苷酸序列；

VII、与 SEQ ID NO:2 所示的核苷酸序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%或至少 99%同一性的序列或具有 SEQ ID NO:2 所示的核苷酸序列的 CpG 岛获得的功能相近的核苷酸序列；

VIII、如 V、VI 或 VII 所示序列的互补序列；

下游引物具有如下所示的核苷酸序列中的任意一项：

IX、具有 SEQ ID NO:3 所示的核苷酸序列；

X、具有 SEQ ID NO:3 所示的核苷酸序列经修饰、取代、缺失或添加一个或多个碱基获得的核苷酸序列；

XI、与 SEQ ID NO:3 所示的核苷酸序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%或至少 99%同一性的序列或具有 SEQ ID NO:3 所示的核苷酸序列的 CpG 岛获得的功能相近的核苷酸序列；

XII、如 IX、X 或 XI 所示序列的互补序列。

5、一种探针，其特征在于，所述探针具有如下所示的核苷酸序列中的任意一项：

XIII、具有 SEQ ID NO:4 所示的核苷酸序列；

XIV、具有 SEQ ID NO:4 所示的核苷酸序列经修饰、取代、缺失或添加一个或多个碱基获得的核苷酸序列；

XV、与 SEQ ID NO:4 所示的核苷酸序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%或至少 99%同一性的序列或具有 SEQ ID NO:4 所示的核苷酸序列的 CpG 岛获得的功能相近的核苷酸序列；

XVI、如 XIII、XIV 或 XV 所示序列的互补序列。

6、COL4A1 基因的甲基化检测试剂，其特征在于，包括 COL4A1 基因甲基化检测的捕获序列、引物和/或探针；

优选地，包括针对 COL4A1 基因的 CpG 岛获得的捕获序列、引物和/或探针；

优选地，包括针对 COL4A1 基因的基因体、基因间区、启动子区或所述启动子区附近区域的 CpG 岛获得的捕获序列、引物和/或探针；

优选地，所述捕获序列具有如下所示的核苷酸序列中的任意一项：

I、具有 SEQ ID NO:1 所示的核苷酸序列；

II、具有 SEQ ID NO:1 所示的核苷酸序列经修饰、取代、缺失或添加一个或多个碱基获得的核苷酸序列或具有 SEQ ID NO:1 所示的核苷酸序列的 CpG 岛获得的功能相近的核苷酸序列；

III、与 SEQ ID NO:1 所示的核苷酸序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%或至少 99%同一性的序列或具有 SEQ ID NO:1 所示的核苷酸序列的 CpG 岛获得的功能相近的核苷酸序列；

IV、如 I、II 或 III 所示序列的互补序列；

优选地，所述引物中的上游引物具有如下所示的核苷酸序列中的任意一项：

V、具有 SEQ ID NO:2 所示的核苷酸序列；

VI、具有 SEQ ID NO:2 所示的核苷酸序列经修饰、取代、缺失或添加一个或多个碱基获得的核苷酸序列；

VII、与 SEQ ID NO:2 所示的核苷酸序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%或至少 99%同一性的序列或具有 SEQ ID NO:2 所示的核苷酸序列的 CpG 岛获得的功能相近的核苷酸序列；

VIII、如 V、VI 或 VII 所示序列的互补序列；

所述引物中的下游引物具有如下所示的核苷酸序列中的任意一项：

IX、具有 SEQ ID NO:3 所示的核苷酸序列；

X、具有 SEQ ID NO:3 所示的核苷酸序列经修饰、取代、缺失或添加一个或多个碱基获得的核苷酸序列；

XI、与 SEQ ID NO:3 所示的核苷酸序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%或至少 99%同一性的序列或具有 SEQ ID NO:3 所示的核苷酸序列的 CpG 岛获得的功能相近的核苷酸序列；

XII、如 IX、X 或 XI 所示序列的互补序列；

优选地，所述探针具有如下所示的核苷酸序列中的任意一项：

XIII、具有 SEQ ID NO:4 所示的核苷酸序列；

XIV、具有 SEQ ID NO:4 所示的核苷酸序列经修饰、取代、缺失或添加一个或多个碱基获得的核苷酸序列；

XV、与 SEQ ID NO:4 所示的核苷酸序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%或至少 99%同一性的序列或具有 SEQ ID NO:4 所示的核苷酸序列的 CpG 岛获得的功能相近的核苷酸序列；

XVI、如 XIII、XIV 或 XV 所示序列的互补序列。

7、一种试剂盒，其特征在于，包括如权利要求 3 所述的捕获序列，或者权利要求 4 所述的引物对，或者权利要求 5 所述的探针，或者如权利要求 6 所述的甲基化检测试剂；

优选地，所述的试剂盒包括：第一容器，其包含捕获序列；第二容器，其包含用于扩增的引物对；第三容器，其包含探针。

8、如权利要求 3 所述的捕获序列，或者权利要求 4 所述的引物对，或者权利要求 5 所述的探针，或者权利要求 6 所述的甲基化检测试剂，在制备检测肿瘤的试剂盒中的应用；

优选地，所述肿瘤为结直肠肿瘤

优选地，所述肿瘤为结直肠癌或腺瘤；

优选地，检测所针对的待测样本为组织、体液或排泄物；

优选地，所述组织为肠组织；

优选地，所述体液为血液、血清、血浆、细胞外液、组织液、淋巴液、脑脊液或房水；

优选地，所述排泄物为痰液、尿液、唾液或粪便。

9、权利要求 3 所述的捕获序列，或者权利要求 4 所述的引物对，或者权利要求 5 所述的探针，或者权利要求 6 所述的甲基化检测试剂，或者权利要求 7 所述的试剂盒在检测肿瘤中的应用；

优选地，所述肿瘤为结直肠肿瘤；

优选地，所述肿瘤为结直肠癌或腺瘤；

优选地，检测所针对的样本为组织、体液或排泄物；

优选地，所述组织为肠组织；

优选地，所述体液为血液、血清、血浆、细胞外液、组织液、淋巴液、脑脊液或房水；

优选地，所述排泄物为痰液、尿液、唾液或粪便。

10、一种肿瘤的检测方法，其特征在于，所述的方法包括，

(1) 检测受试者 COL4A1 基因的甲基化水平；

(2) 将受试者 COL4A1 基因的甲基化水平与正常对照样本的甲基化水平相比较；

(3) 根据所述受试者 COL4A1 基因的甲基化水平与正常对照样本的甲基化水平相比的升高，指示所述受试者患有或者有风险患上肿瘤，以区分正常样本和肿瘤样本；

优选地，通过检测 COL4A1 基因的基因体、基因间区或启动子区及启动子区附近区域的甲基化水平；

优选地，通过检测 COL4A1 基因启动子区及启动子区附近区域的甲基化水平，区分正常样本和肿瘤样本；

优选地，所述甲基化水平通过甲基化特异性 PCR，或者甲基化特异性定量 PCR，或者甲基化 DNA 特异性结合蛋白的 PCR、定量 PCR、以及 DNA 芯片，或者甲基化敏感的限制性内切酶，或者重亚硫酸盐测序法，或者焦磷酸测序检测；

优选地，所述的甲基化水平通过甲基化特异性定量 PCR 检测；

优选地，所述的甲基化水平采用如权利要求 3 所述的捕获序列，或者权利要求 4 所述的引物对，或者权利要求 5 所述的探针，或者如权利要求 6 所述的甲基化检测试剂，或者如权利要求 7 所述的试剂盒检测；

优选地，步骤 (1) 中，检测受试者 COL4A1 基因的甲基化水平包含以下步骤：

a) 采用磁珠捕获法提取待测样品的 DNA；

b) 待测样品的 DNA 采用亚硫酸氢盐、重亚硫酸氢盐或胍盐进行转化；

c) 甲基化特异性定量 PCR 检测;

优选地, 步骤 a) 中, 采用磁珠捕获法提取待测样品的 DNA 包括以下步骤;

取待测样本在保护液中混合研磨、离心、取上清;

上清再离心, 取上清, 加入裂解液和带有特定互补寡核苷酸捕获序列的磁珠至上清液中孵育;

弃部分上清后洗下磁珠转移至干净离心管, 加入洗液, 室温 100-2000rpm 孵育 0.5-5min, 置于磁力架上吸去上清, 重复 3 次;

用缓冲液将目标基因 DNA 洗脱。

11、如权利要求 10 所述的方法, 其特征在于, 其检测标准为: 根据界值判断肿瘤标本和正常标本, 粪便标本中的 Ct 值的界值为 32~42, 所述粪便标本的 Ct 值小于所述 Ct 值的界值则判断为肿瘤标本, 所述粪便标本的 Ct 值大于等于所述 Ct 值的界值则判断为正常标本;

组织标本中甲基化水平值的界值为 1~10, 所述组织标本的甲基化水平值大于所述甲基化水平值的界值则判断为肿瘤标本, 所述组织标本的甲基化水平值小于等于所述甲基化水平值的界值则判断为正常标本。

12、一种肿瘤的检测系统, 其特征在于, 所述的系统包含有以下构件;

(1) COL4A1 基因的甲基化检测构件;

(2) 数据处理构件;

(3) 结果输出构件;

优选地, 所述的甲基化检测构件含有荧光定量 PCR 仪、PCR 仪、测序仪中的一种或多种;

优选地, 所述的甲基化检测构件还含有如权利要求 3 所述的捕获序列, 或者权利要求 4 所述的引物对, 或者权利要求 5 所述的探针, 或者如权利要求 6 所述的甲基化检测试剂, 或者如权利要求 7 所述的试剂盒;

优选地, 所述的数据处理构件被配置于 a. 接收待测样本以及正常对照样本的测试数据; b. 储存待测样本以及正常对照样本的测试数据; c. 比对同种类型的待测样本以及正常对照样本的测试数据; d. 根据比对结果, 响应于测试者罹患肿瘤的概率或者可能性;

优选地, 所述的结果输出构件用于输出测试者罹患肿瘤的概率或者可能性;

优选地，数据处理构件的判断标准为：根据界值判断肿瘤标本和正常标本；

粪便标本中的 Ct 值的界值为 32~42，所述粪便标本的 Ct 值小于所述 Ct 值的界值则判断为肿瘤标本，所述粪便标本的 Ct 值大于等于所述 Ct 值的界值则判断为正常标本；

组织标本中甲基化水平值的界值为 1~10，所述组织标本的甲基化水平值大于所述甲基化水平值的界值则判断为肿瘤标本，所述组织标本的甲基化水平值小于等于所述甲基化水平值的界值则判断为正常标本。

13、如权利要求 10-11 任一所述的方法，或者权利要求 12 所述的系统，其特征在于，所述肿瘤为结直肠肿瘤；

优选地，所述肿瘤为结直肠癌或腺瘤。

14、如权利要求 10-11 任一所述的方法，或者权利要求 12 所述的系统，其特征在于，所述的系统或者方法检测样本类型为组织、体液或排泄物；

优选地，所述组织为肠组织；

优选地，所述体液为血液、血清、血浆、细胞外液、组织液、淋巴液、脑脊液或房水；

优选地，所述排泄物为痰液、尿液、唾液或粪便。