

一种基因标志物组合及其应用

技术领域

5 本公开属于生物医药领域，特别涉及一种基因标志物组合及其应用。

发明背景

肺癌是起源于支气管粘膜、腺体或肺泡上皮的肺部恶性肿瘤。按照病理类型可以分为：1) 小细胞肺癌 (small cell lung cancer, SCLC)：一种特殊病理学类型的肺癌，有明显的远处转移倾向，预后较差，但多数病人对放化疗敏感；2) 非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC)：除小细胞肺癌以外其他病理学
10 类型的肺癌，包括鳞状细胞癌、腺癌、大细胞癌等。在生物学行为和临床病程方面具有一定差异。按照发生位置又可以分为：1) 中心型肺癌 (central lung cancer)：生长在肺段支气管开口及以上的肺癌；2) 周围型肺癌 (peripheral lung cancer)：生长在肺段支气管开口以远的肺癌。

近年来，人口老龄化、大气污染及吸烟等因素的影响，致使中国肺癌的发病率和死亡率逐年递增，根据国家癌症中心发布的《2017 中国肿瘤登记年报》显示，全国每分钟约 7 人确诊患癌，其中肺癌发病率与死亡率均为第一位。中国已成为世界上肺癌人数最多的国家，专家预测到 2025 年中国肺癌的人数将达到 100 万。而根据流行病学研究显示：吸烟是引起肺癌的重要因素。世界上约 80%-90% 的肺癌可归因于吸烟。与非吸烟者相比，45-64 岁每日吸香烟 1-19 支和 20 支以上者患肺癌的相对危险度分别为 4.27 和 8.61，与从不吸烟者比较，长期每日吸烟 1-19 支和 20 支以上者死于肺癌的相对危险度分别为 6.14 和 10.73。虽然肺癌的治疗技术日新月异，但 5 年生存率从 4% 仅上升至 12% 左右，现有的抗肿瘤药物仍只能起到缓解病情作用，患者无进展生存期平均仅延长 3 个月~5 个月，但对于 I 期肺癌患者，手术后 5 年生存率高达约 60%~70%。因此肺癌的早期诊断与早期手术是提高肺癌 5 年生存率、降低死亡率最有效的方法之一。

肺癌目前的临床辅助诊断主要有以下几种，但是他们都不能完全做到早发现，早诊断：

(1) 血液生化检查：对于原发性肺癌，目前无特异性血液生化检查。肺癌病人血液碱性磷酸酶或血钙升高考虑骨转移的可能，血液碱性磷酸酶、谷草转氨酶、乳酸脱氢酶或胆红素升高考虑肝转移的可能。

25 (2) 肿瘤标志物检查：1) CEA：30%~70% 肺癌患者血清中有异常高水平的 CEA，但主要见于较晚期肺癌患者。目前血清中 CEA 的检查主要用于估计肺癌预后以及对治疗过程的监控。2) NSE：是小细胞肺癌首选标志物，用于小细胞肺癌的诊断和监测治疗反应，根据检测方法和试剂的不同，参考值不同。3) CYFRA21-1：是非小细胞肺癌的首选标记物，对肺鳞癌诊断的敏感性可达 60%，根据检测方法和试剂的不同，参考值不同。

30 (3) 影像学检查：1) 胸部 X 线检查：应包括胸部正位和侧位片。在基层医院，胸部正侧位片仍是肺癌初诊时最基本和首选的影像诊断方法。一旦诊断或疑诊肺癌，即行胸部 CT 检查。2) CT 检查：胸部 CT 是肺癌的最常用和最重要的检查方法，用于肺癌的诊断与鉴别诊断、分期及治疗后随访。CT 引导下肺穿刺活检是肺癌的重要诊断技术，有条件的医院可将其用于难以定性的肺内病变的诊断，以及临床诊断肺癌需经细胞学、组织学证实而其它方法又难以取材的病例。近年来，多层螺旋 CT 和低剂量 CT (LDCT) 是发现早期肺癌和降低死亡率的有效筛查工具，全国家肺癌筛查研究 (NLST) 已经表明 LDCT 相比胸部 X 线筛查可降低 20% 肺癌的死亡率。低剂量螺旋 CT 被推荐为早期肺癌筛查的重要手段，但是人为影响因素较多，假阳性率非常高。3) 超声检查：主要用于发现腹部重要器官及腹腔、腹膜后淋巴结有无转移，也用于颈部淋巴结的检查。对于贴邻胸壁的肺内病变或胸壁病变，可鉴别其囊实性及进行超声引导下穿刺活检；超声还常用于胸水抽取定位。4) 骨扫描：对肺癌骨转移检出的敏感性较高，但有一定的假阳性率。可用于以下情况：
35 肺癌的术前检查；伴有局部症状的病人。

(4) 其它检查：1) 痰细胞学检查：目前肺癌简单方便的无创诊断方法，连续涂片检查可提高阳性率约达 60%，是可疑肺癌病例的常规诊断方法。2) 纤维支气管镜检查：肺癌诊断中最重要的手段之一，对于

肺癌的定性定位诊断和手术方案的选择有重要的作用。对拟行手术治疗的患者为必需的常规检查项目。而经支气管镜穿刺活检检查（TBNA），虽利于治疗前分期，但因技术难度和风险较大，有需要者应转上级医院进一步检查。3）其他：如经皮肺穿刺活检、胸腔镜活检、纵隔镜活检、胸水细胞学检查等，在有适应证的情况下，可根据现有条件分别采用以协助诊断。

5 影像学检查中的多层螺旋 CT 和低剂量 CT（LDCT）是发现早期肺癌和降低死亡率的有效筛查工具，全国家肺癌筛查研究（NLST）已经表明 LDCT 相比胸部 X 线筛查可降低 20% 肺癌的死亡率。在临床实践中证明，任何肺癌筛查项目的成败取决于高危人群的识别，融合多重高危因素的风险预测模型已被世界公认为是识别肺癌高危人群的方法之一。风险模型通过协助临床医生改进干预措施或治疗手段，从而进一步改善肺癌患者的疗效。虽然世界已经认同针对高危人群的筛查能够降低肺癌目前较高的死亡率，但高危人群界定仍然是难以解决的问题。为了使肺癌筛查的效益-伤害比达到最大化，关键的问题第一是如何界定高危患病风险的人群；第二是用什么方法对该人群进行筛查，包括高危因素的界定，总体风险的量化汇总以及筛查效益界值的选择。

10 随着技术的飞速发展，肿瘤标志物检测成为继影像学诊断，病理诊断之后的肿瘤诊断治疗新领域，能够对肿瘤的诊断，检测，治疗产生重大的影响。肿瘤标志物可以在体液或者是组织中检测到，能够反映肿瘤的存在，分化程度，预后估计和个性化用药以及治疗效果等。早期肺癌患者没有明显的症状，难以被医生和患者察觉，再加之其在血液或生化项目上没有明显的特异性的标识物，因此难以通过常规的诊断方法进行早期发现和早期诊断，因此对肺癌早期诊断，尤其是大规模应用人群筛查上较为困难。

越来越多的研究表明，在肿瘤形成过程中包含两大类机制。一个是通过 DNA 核苷酸序列改变而形成突变，即遗传学机制。肿瘤作为一种遗传学疾病在分子生物学领域已经得到证实。另外一个就是表观遗传学（epigenetics）机制，即不依赖 DNA 序列改变导致基因表达水平的变化，它在肿瘤形成过程中的作用越来越受到重视。遗传学与表观遗传学两种机制相互交叉存在，共同促进了肿瘤的形成。基因的异常甲基化在肿瘤发生的早期就可出现，并且在肿瘤逐步发展的过程中，基因异常甲基化的程度增加。对常见的 98 种人类原发肿瘤的基因组进行分析，发现每种肿瘤至少有 600 个异常甲基化的 CpG 岛。

20 许多研究显示启动子异常甲基化在许多肿瘤的发生过程中是一个频发的早期事件，因此肿瘤相关基因的甲基化状态是肿瘤发生的一个早期敏感指标，被认为是一种有前景的肿瘤分子生物标志物（biomarker）。更为重要的是，癌变细胞可以释放 DNA 到外周血中。正常人外周血中都存在纳克级的游离 DNA。研究发现外周血血浆/血清、肿瘤累及器官相关的体液（如唾液、痰等）中同样可以检测到肿瘤组织中存在的肿瘤相关基因的启动子异常甲基化。这些生物样品比较容易获得，并且通过 PCR 技术将其中的 DNA 进行大量的扩增后能够很灵敏的检测到，因此检测其中某些肿瘤相关基因的启动子区甲基化状态，可以为肿瘤的早期诊断提供非常有价值的信息。与其它类型的肿瘤分子标记物相比，检测启动子异常甲基化有更多的优点。某一基因在不同类型肿瘤中，其启动子异常甲基化的区域是相同的，检测比较方便；另外与等位基因缺失这样的标志物相比，异常甲基化是一个阳性信号，很容易与正常组织中的阴性背景区分。Esteller 等检测了 22 例非小细胞肺癌（NSCLC）的肿瘤组织和血清中 p16、DAPIK、GSTP1 及 MGM T 等基因的启动子区异常甲基化状态，发现 68%（15/22）的肿瘤组织中存在至少一种基因的启动子甲基化；而在 15 例组织阳性病例中，有 11 例同时在血清中也检测到了启动子异常甲基化的存在。另有许多研究者也分别从肝癌、头颈部癌、食管癌及结肠癌患者的肿瘤组织和血清中同时检测出了某些肿瘤相关基因的启动子甲基化。

35 现有的肺癌检测技术中主要存在灵敏度低、假阳性高，有创，并且，目前常规检测技术难以检出早期肺癌。

而肺癌的无创检测，例如，痰液检测，难度则更大。尽管也有研究者研究肺癌患者痰液中的肿瘤标志物，然而，对比起其他肿瘤患者血液样本的肿瘤标志物检测及评估，痰液样本的成功率却很低。这主要由于以下原因：①痰液的成分比较复杂，不同的人群在不同的疾病或者环境下痰液的成分和粘度等差异比较大；②痰液中含有较多的气管上皮细胞和细菌，口腔黏膜细胞等非肺癌细胞的成分，一般的样本处理方法无法有

效的富集到数目充足的肺癌来源的 DNA; ③有很多的吸烟患者并不表现出咳痰。A J Hubers 等人在《Molecular sputum analysis for the diagnosis of lung cancer》中对过去 10 篇文献研究显示, 肺癌组织中标志物的中位数的甲基化程度为 48%, 而痰液的中位数的甲基化程度为 38%, 结果显示甲基化标志物在组织中的检出率明显高于痰液。同时, Rosalia Cirincione (Methylation profile in tumor and sputum samples of lung cancer patients detected by spiral computed tomography: A nested case - contro) 报道了 RARbeta2、P16、RASSF1A 在肺癌组织中检出率分别达到 65.5%、41.4%、51.7%, 而在痰液中分别只有 44.4%、5%、5%。

发明内容

本公开的目的之一在于提供一种基因标志物组合, 以及检测该基因标志物组合的检测/诊断试剂及其应用。

一方面, 本公开提供了一种基因标志物组合, 所述基因标志物包括 HOXB4 和 SCRIN1。

本公开的基因标志物组合, 还包括了各基因标志物中的任意长度的片段, 也就是说, 来自 HOXB4、SCRIN1 各自任意一个片段 (该片段可以为任意长度) 组合, 均落入本公开的保护范围内。

HOXB4 基因是 Antp 同源盒基因家族的一员, 属于染色体 17 上的同源盒 B 簇基因。编码带有同源盒 DNA 结合结构域的核蛋白, 编码的蛋白作为参与发育的特异性序列转录因子。该蛋白的细胞内或异位表达可在体内和体外扩增造血干细胞和祖细胞, 使其成为治疗性干细胞扩增的潜在候选者。

SRCIN1 (SRC kinase signaling inhibitor 1) 全称为 SRC 激酶信号传导抑制基因 1。SRCIN1 基因和蛋白质作为 SRC 的负调控因子, 通过激活 CSK 抑制 SRC 活性和下游信号传导, 导致细胞扩散和迁移受损。调节树突棘的形态。参与钙依赖性的胞吐作用。

本公开还提供了多基因的甲基化联合检测试剂在制备肺癌检测试剂或者试剂盒中的应用, 所述基因包括 HOXB4 和 SCRIN1。

目前肺癌的漏检率较高。特别是, 对于腺癌这种类型, 痰液无创检测更加是难上加难, 检出率极其低。这是因为, 多数腺癌起源于较小的支气管, 为周围型肺癌, 肺深部的脱落细胞更加难以通过痰液咳出。因此, 目前腺癌的痰液检测手段几乎为零。

降低漏检率在肿瘤早期筛查中是尤其重要的。如果一个肿瘤早期筛查产品无法将所有或绝大部分的病患筛查出来的话, 那么漏检的那些将无法得到足够的风险提示, 从而延误的治疗时机, 这对患者来说是一个巨大的损失。

尽管现有技术中已经发现了一些肺癌相关的肿瘤标志物, 但是, 受限于此针对这些肿瘤标志物的检测试剂或者检测手段, 导致这些肿瘤标志物的灵敏度和特异性不能满足需求, 因此, 目前本领域中仍然需要进一步研究能够切实地应用于肺癌的筛查手段。然而, 虽然无创式的筛查具有取样方面独到的优势, 然而, 其也具有其他方面的一些局限, 例如, 肺癌中的腺癌这种类型, 由于其肺深部的脱落细胞难以通过痰液咳出, 通常说来, 本领域技术人员会认为该种类型的肺癌不适宜采用无创筛查。另一方面, 即使是其他类型的肺癌, 目前已报道的无创筛查方法也很难达到临床使用的要求。尽管相关研究已进展多年, 但至今仍未有可以推向临床的肺癌无创筛查方法。

本公开还提供了一种多基因甲基化联合检测试剂或试剂盒, 包括 HOXB4 和 SRCIN1 基因的甲基化检测的试剂。

“甲基化检测试剂”, 包括以下内容: 针对所述基因或基因内容的更小/短的任意序列进行检测的试剂。也就是说, 任意针对所述基因中的任意位点 (例如, 一段更小的片段) 进行的检测及检测试剂, 均落入本公开的保护范围内。

本公开中的基因标志物 HOXB4 和 SCRIN1 是联合检测的, 也就是说, 本公开中的几个基因标志物是同时被检测的。

本公开中的“检测”同诊断, 除了肺癌的早期诊断, 还包括肺癌中期和晚期的诊断, 且也包括肺癌筛选、风险评估、预后、疾病识别、病症阶段的诊断和治疗性靶标的选择。

肺癌标志物组合 HOXB4 和 SCRIN1 的应用使得肺癌的早期诊断成为可能。当确定在癌症细胞中甲基化的基因在临床上或形态学上正常表象的细胞中甲基化时,这就表明该正常表象的细胞向癌症发展。这样,肺癌可在早期通过在正常表象的细胞中的肺癌特异性 HOXB4 和 SCRIN1 基因组合的甲基化而诊断。

其中,早期诊断包括在转移之前发现癌症的可能性,优选在可观察到组织或者细胞的形态学变化之前。

5 除了肺癌的早期诊断,本公开的试剂/试剂盒还有希望用于肺癌筛选、风险评估、预后诊断、疾病识别、病症阶段的诊断和治疗性靶标的选择。

作为病症阶段可选的实施方式,可通过在肺癌在不同阶段或时期的进展可通过从样品中获取的 HOXB4 和 SCRIN1 基因组合的甲基化程度的测量进行诊断。通过比较从肺癌的每个阶段的样品中分离出的核酸的 HOXB4 和 SCRIN1 基因组合甲基化程度与从没有细胞增殖性异常的组织中的样品中分离出的一个或多个核
10 酸的 HOXB4 和 SCRIN1 基因组合甲基化程度,可检测样品中肺癌的具体阶段。

通常来说,CpG 岛是指富含 CpG 二核苷酸的一些区域,通常位于启动子及其附近的区域,本公开中的 CpG 岛,不仅指启动子及其附近的区域富含 CpG 二核苷酸,也包括杂合甲基化的 CpG 位点,或者是孤立的 CpG 位点。

所述的 HOXB4 和 SCRIN1 基因组合的甲基化联合检测试剂可以是现有技术中的甲基化检测试剂。现有技术中,已经有多种方法可以检测目的基因的甲基化,如甲基化特异性 PCR (MSP)、甲基化特异性定量 PCR (qMSP)、甲基化 DNA 特异性结合蛋白的 PCR,定量 PCR 以及 DNA 芯片、甲基化敏感的限制性内切酶、重亚硫酸盐测序法或者焦磷酸测序等等。除此之外,其他的甲基化检测方法可以通过专利 US62007687 引入。每种检测方法均有其相对应的试剂,这些试剂均可以用于本公开检测 HOXB4 和 SCRIN1 基因组合的甲基化。

本公开还提供了 HOXB4 和 SCRIN1 基因组合的甲基化联合检测试剂,包括针对 HOXB4 和 SCRIN1 基因组合中每个基因的引物和/或探针。
20

在本公开的一些具体的实施方案中,包括针对 HOXB4 和 SCRIN1 基因组合中每个基因的 CpG 岛获得的引物和/或探针。

在本公开的一些具体的实施方案中,引物和/或探针通过 quantitative Methylation-Specific PCR (qMSP)检测 HOXB4 和 SCRIN1 基因组合中的每个基因的甲基化。

25 在本公开的一些具体的实施方案中,本公开提供的甲基化检测试剂通过检测 HOXB4 和 SCRIN1 基因组合中的每个基因的基因体、基因间区或启动子区及启动子区附近区域的甲基化水平。

在一些实施方案中,本公开提供的甲基化检测试剂包括针对 HOXB4 和 SCRIN1 基因组合中的每个基因的启动子区或所述启动子区附近区域的 CpG 岛获得的引物和/或探针。

在一些实施方案中,本公开提供的甲基化检测试剂中所述 HOXB4 基因的甲基化检测的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:
30

I、与如 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO: 16 和 SEQ ID NO: 19 所示的核苷酸序列具有至少 85%或至少 90%或至少 91%或至少 92%或至少 93%或至少 94%或至少 95%或至少 96%或至少 97%或至少 98%或至少 99%,或 100%同一性的核苷酸序列;及

II、如 I 所示序列的互补序列;和/或

35 所述 HOXB4 基因的甲基化检测的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:

III、与如 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO: 17 和 SEQ ID NO: 20 所示的核苷酸序列具有至少 85%或至少 90%或至少 91%或至少 92%或至少 93%或至少 94%或至少 95%或至少 96%或至少 97%或至少 98%或至少 99%,或 100%同一性的核苷酸序列;

IV、如 III 所示序列的互补序列;和/或

40 所述 SRCIN1 基因的甲基化检测的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、与如 SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:22 所示的核苷酸序列具有至少 85%或至少 90%或至少 91%或至少 92%或至少 93%或至少 94%或至少 95%或至少 96%或至少 97%或至少 98%或至少 99%,或 100%同一性的核

核苷酸序列；及

VI、如 V 所示序列的互补序列；和/或

所述 SRCIN1 基因的甲基化检测的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：

VII、与如 SEQ ID NO:5 所示的核苷酸序列具有至少 85%或至少 90%或至少 91%或至少 92%或至少 93%
5 或至少 94%或至少 95%或至少 96%或至少 97%或至少 98%或至少 99%，或 100%同一性的核苷酸序列；及
VIII、如 VII 所示序列的互补序列；

在一些实施方案中，所述 HOXB4 基因的甲基化检测的引物对如 SEQ ID NO.:1 和 SEQ ID NO.:2 所示。

在一些实施方案中，所述 HOXB4 基因的甲基化检测的引物对如 SEQ ID NO.:16 和 SEQ ID NO.:17 所示。

所述 HOXB4 基因的甲基化检测的引物对如 SEQ ID NO.:19 和 SEQ ID NO.:20 所示。

10 在一些实施方案中，所述 SRCIN1 基因的甲基化检测的引物对如 SEQ ID NO.:4 和 SEQ ID NO.:5 所示。

在一些实施方案中，所述 SRCIN1 基因的甲基化检测的引物对如 SEQ ID NO.:22 和 SEQ ID NO.:5 所示。

在一些实施方案中，所述 HOXB4 基因的甲基化检测的探针具有如下所示的核苷酸序列中的任意一项：

IX、与如 SEQ ID NO.:3、SEQ ID NO.:18 和 SEQ ID NO.:21 所示的核苷酸序列具有至少 85%或至少 90%
或至少 91%或至少 92%或至少 93%或至少 94%或至少 95%或至少 96%或至少 97%或至少 98%或至少 99%，
15 或 100%同一性的核苷酸序列；及

X、如 IX 所示序列的互补序列；和/或

所述 SRCIN1 基因的甲基化检测的探针具有如下所示的核苷酸序列中的任意一项：

XI、与如 SEQ ID NO.:6 所示的核苷酸序列具有至少 85%或至少 90%或至少 91%或至少 92%或至少 93%
或至少 94%或至少 95%或至少 96%或至少 97%或至少 98%或至少 99%，或 100%同一性的核苷酸序列；及
20 XII、如 XI 所示序列的互补序列。

在一些实施方案中，所述肺癌选自小细胞肺癌和非小细胞肺癌。

在一些实施方案中，所述的非小细胞肺癌选自鳞状细胞癌、腺癌。

本公开还提供了一种检测肺癌的试剂盒，包括所述的甲基化联合检测试剂。

25 在一些实施方案中，本公开提供的试剂盒还包括试剂盒中的常用试剂，如 qMSP 中常用转化剂，用于将非甲基化的胞嘧啶碱基都转化为尿嘧啶，而甲基化的胞嘧啶碱基保持不变。所述的转化剂无特别限制，现有技术中报道的可实现胞嘧啶到尿嘧啶转化的试剂均可以，如胍盐、重亚硫酸氢盐和亚硫酸氢盐（例如偏亚硫酸氢钠、亚硫酸氢钾、亚硫酸氢铯、亚硫酸氢铵等）中的一种或几种。又如扩增基因中常用的 DNA 聚合酶、dNTPs、Mg²⁺离子和缓冲液等等。

在一些实施方案中，所述的试剂或试剂盒还包括内参基因的检测试剂。

30 在一些实施方案中，所述的内参基因为 β -actin。

在一些实施方案中，所述的内参基因的检测试剂为针对内参基因的引物和探针。

在一些实施方案中，所述的内参基因的检测试剂为 SEQ ID NO: 13 和 SEQ ID NO: 14 所示的引物对和
SEQ ID NO: 15 所示的探针。

本公开提供了 HOXB4 和 SRCIN1 基因的甲基化联合检测试剂在制备肺癌检测试剂或者试剂盒中的应用。

35 本公开提供了一种引物，所述引物选自与如 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 22 所示序列具有至少 85%或至少 90%或至少 91%或至少 92%或至少 93%或至少 94%或至少 95%或至少 96%或至少 97%或至少 98%或至少 99%，或 100%同一性的核苷酸序列，或它们互补序列中的至少任意一条。

40 本公开提供了一种引物，所述引物选自与如 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5 所示序列具有至少 85%或至少 90%或至少 91%或至少 92%或至少 93%或至少 94%或至少 95%或至少 96%或至少 97%或至少 98%或至少 99%，或 100%同一性的核苷酸序列，或它们互补序列中的至少任意一条。

在一些实施方案中，所述引物选自 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4 和 SEQ ID NO: 5

所示的至少一对引物对

在一些实施方案, 所述引物选自 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4 和 SEQ ID NO: 5 所示的引物对。

所述的引物用于扩增所述核酸片段。本领域公知, 引物的成功设计对于 PCR 是至关重要。相对于一般的 PCR, 在甲基化检测中, 引物的设计影响更为关键, 这是由于甲硫反应促使 DNA 链中的“C”转化为“U”, 导致 GC 含量降低, 使 PCR 反应后在序列中出现长的连续“T”, 容易引起 DNA 链的断裂, 导致很难选择具有合适的 T_m 值及稳定的引物; 另一方面, 为了区别硫化处理和没有硫化处理以及未完全处理的 DNA, 需要引物有足够数量的“C”, 这些都增加了选择稳定引物的困难。因此, DNA 甲基化检测中, 引物所针对的扩增片段的选择, 如扩增片段长短和位置, 以及引物的选择等等都对检测的灵敏度和特异性产生影响。发明人经实验也发现, 不同的扩增目的片段和引物对检测效果有所区别。很多时候, 发现了某些基因或核酸片段在肿瘤和非肿瘤中具有表达差异, 然而其距离转化为肿瘤的标志物, 应用到临床中, 仍存在很长的距离。其中最主要的原因是因为检测试剂的限制, 导致该潜在肿瘤标志物的检测灵敏度和特异性难以满足检测需求, 或者检测方法操作复杂、成本高, 难以在临床中大规模应用。

另一方面, 本公开还提供了一种核酸探针, 所述核酸探针选自与如 SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 21 所示序列具有至少 85%或至少 90%或至少 91%或至少 92%或至少 93%或至少 94%或至少 95%或至少 96%或至少 97%或至少 98%或至少 99%, 或 100%同一性的核苷酸序列, 或它们互补序列中的至少任意一条。

作为本公开优选的实施方式, 所述核酸探针选自 SEQ ID NO: 3 和 SEQ ID NO: 6 所示的序列。

在一些实施方案中, 本公开提供的试剂盒包括: 第一容器, 其包含用于扩增的引物对; 第二容器, 其包含探针。

在一些实施方案中, 所述试剂盒还包含说明书。

在一些实施方案中, 所述试剂盒还包含核酸提取试剂。

在一些实施方案中, 所述试剂盒还包含取样装置。

本公开还提供了上述的甲基化检测试剂、试剂盒、引物、探针在制备甲基化检测的试剂或试剂盒, 或者制备检测肺癌的试剂或试剂盒中的应用。

本公开还提供了上述的甲基化检测试剂、试剂盒、引物、探针在甲基化检测中的应用, 或者在检测肺癌中的应用。

本公开还提供了一种肺癌的检测系统, 所述的系统包含有以下构件:

- (1) HOXB4 和 SRCIN1 基因的甲基化联合检测构件;
- (2) 数据处理构件;
- (3) 结果输出构件。

在一些实施方案中, 所述的甲基化检测构件含有甲基化检测仪器。

在一些实施方案中, 所述的甲基化检测构件还含有所述的甲基化联合检测试剂、试剂盒、引物、探针。

在一些实施方案中, 所述的甲基化检测仪器包含荧光定量 PCR 仪、PCR 仪、测序仪中的一种或多种。

在一些实施方案中, 所述的数据处理构件含有数据处理机器。

所述的数据处理机器包括本领域技术人员可使用的任何可以进行数据处理的设备或仪器或装置。

在一些实施方案中, 所述的数据处理机器包含计算器、计算机中的一种或多种。

所述的计算机中附载有本领域技术人员可使用的任何可以进行数据处理或统计分析的软件或程序。

在一些实施方案中, 所述的计算机包含附载有 SPSS、SAS、Excel 中一种或多种软件的计算机。

在一些实施方案中, 所述的结果输出构件含有结果输出器。

所述的输出器包含任何可以将数据处理结果显示为可阅读的内容的设备或仪器或装置。

在一些实施方案中, 所述的甲基化检测构件还含有所述的多基因的甲基化联合检测试剂。

在一些实施方案中，所述的结果输出器包含屏幕、纸质报告中的一种或多种。

在一些实施方案中，所述的数据处理器被配置于 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，响应于测试者罹患肺癌的概率或者可能性。

5 在一些实施方案中，所述的结果输出构件用于输出测试者罹患肺癌的概率或者可能性。

在一些实施方案中，数据处理构件的判断标准为：根据界值判断肺癌标本和正常标本。

在一些实施方案中，本公开的 HOXB4 与 SRCIN1 联合检测，还可以通过多重 PCR 的方式实现。

在一些实施方案中，根据目标基因即 HOXB4、SRCIN1 的 Cp 值和/或 ΔCp 值 (ΔCp 值 = Cp_{靶向基因} - Cp_{内参基因}) 来判断标本的甲基化水平。

10 在一些实施方案中，只要其中一个基因在所述组织标本中的 ΔCp 值小于所述 ΔCp 值的界值则判断为肺癌标本，只有两个基因在所述组织标本的 ΔCp 值同时大于等于所述 ΔCp 值的界值则判断为正常标本。

在一些实施方案中，标本中的 Cp 值的界值取值范围为 35~39， ΔCp 值的界值取值范围为 4~12。

在一些实施方案中，HOXB4 与 SRCIN1 联合检测，在组织标本中，HOXB4 的 ΔCp 值的界值为 5.4，SRCIN1 的 ΔCp 值的界值 6.5。

15 在一些实施方案中，HOXB4 与 SRCIN1 联合检测，在痰液标本中，HOXB4 与 SRCIN1 的阈值线 Cp 值分别为：36.9 和 37.0。当单个基因检测结果中的一项小于前述阈值，则可判定为阳性（即肺癌标本），若检测结果中 2 项结果均大于或等于相对应的阈值，则可判定为阴性（即正常标本）。

在一些实施方案中，HOXB4 与 SRCIN1 多重 PCR 检测，在痰液标本中的 Cp 值的界值为 36.7，在灌洗液标本中的 Cp 值的界值为 37.2 和 ΔCp 值的界值为 9。

20 在一些实施方案中，HOXB4 与 SRCIN1 多重 PCR 检测，在所述痰液标本的 Cp 值小于所述 Cp 值的界值则判断为肺癌标本，所述痰液标本的 Cp 值大于等于所述 Cp 值的界值则判断为正常标本。

在一些实施方案中，HOXB4 与 SRCIN1 多重 PCR 检测，在所述灌洗液标本的 Cp 值和 ΔCp 值任何一个数值小于所述 Cp 值和 ΔCp 的界值则判断为肺癌标本，所述灌洗液标本的 Cp 值和 ΔCp 值均大于等于所述 Cp 值和 ΔCp 值的界值则判断为正常标本。

25 在一些实施方案中，所述肿瘤为肺癌。

在一些实施方案中，所述肿瘤为小细胞肺癌和非小细胞肺癌。

在一些实施方案中，所述非小细胞肺癌选自鳞状细胞癌、腺癌。

在一些实施方案中，所述针对的待测样本或者样本类型选自肺泡灌洗液、组织、胸水、痰液、血液、血清、血浆、尿液、前列腺液或粪便中的至少一种。

30 在一些实施方案中，本公开所述的样本选自肺泡灌洗液、组织、痰液中的至少一种。

在一些实施方案中，本公开所述的样本选自肺泡灌洗液或痰液中的至少一种。

本公开还提供了一种肺癌的诊断方法，所述方法包括以下步骤：

- 35 (1) 检测来源于受试者的待测样本 HOXB4 和 SRCIN1 基因的甲基化水平；
(2) 将待测样本与正常对照样本的 HOXB4 和 SRCIN1 基因甲基化水平比较；及
(3) 基于待测样本与正常对照样本的甲基化水平的偏离，诊断肺癌。

在一些实施方案中，本公开提供了一种肺癌的诊断方法，所述方法包括以下步骤：(1) 检测来源于受试者的待测样本 HOXB4 和 SRCIN1 基因的甲基化水平；所述检测包括将受试者待测样本与检测 HOXB4 和 SRCIN1 基因的甲基化水平的检测试剂接触；(2) 将待测样本与正常对照样本的 HOXB4 和 SRCIN1 基因甲基化水平比较；及 (3) 基于待测样本与正常对照样本的甲基化水平的偏离，诊断肺癌。

40 在一些实施方案中，本公开提供了一种肺癌的诊断方法，所述方法包括以下步骤：将基因的甲基化检测试剂加入来自受试者的待测样本中，检测该待测样本中 HOXB4 和 SRCIN1 基因的甲基化水平；将待测样本与正常对照样本的 HOXB4 和 SRCIN1 基因甲基化水平比较；及基于待测样本与正常对照样本的甲基化水平

的偏离，诊断肺癌。

在一些实施方案中，所述步骤（3）中所述的偏离，是指 HOXB4 和 SRCIN1 这 2 个基因中任意一个的甲基化水平的偏离。

5 在一些实施方案中，所述步骤（1）中，所述检测包括将受试者的待测样本与 HOXB4 和 SRCIN1 基因的甲基化水平的检测试剂接触。

在一些实施方案中，采用甲基化特异性定量 PCR（qMSP）检测 HOXB4 和 SRCIN1 基因的甲基化水平。

在一些实施方案中，通过结果比较待测样本与正常样本的甲基化结果，当待测样本与正常样本的甲基化具有显著差异或极显著差异时，结果判断待测样本患病风险高。

10 本公开的诊断方法可以在肺癌治疗前后使用或者与肺癌治疗联合使用，治疗后使用如评价治疗的成功或者监测治疗后肺癌的缓解、复发和/或进展(包括转移)。

一方面，还提供了一种肺癌的治疗方法，所述方法包括以下步骤：

- （1）检测来源于受试者的待测样本 HOXB4 和 SRCIN1 基因的甲基化水平；
- （2）将待测样本与正常对照样本的 HOXB4 和 SRCIN1 基因甲基化水平比较；及
- （3）基于待测样本与正常对照样本的甲基化水平的偏离，诊断肺癌；
- 15 （4）向被诊断为肺癌的受试者施用抗肺癌的药物。

本公开另一方面提供了一种肺癌的治疗方法，所述方法包括对经上述诊断方法诊断为肺癌的患者，施用手术、化疗、放疗、放化疗、免疫疗法、溶瘤病毒疗法、或其他本领域所用的任何其他类型肺癌治疗方法以及这些治疗方法的组合。

20 本公开通过研究发现：在一些具体的实施方案中，通过检测 HOXB4 和 SRCIN1 基因组合，可以很好的从样本中区分出肺癌样本。对肺癌的检测敏感性和特异性极高。

附图说明

图 1 为不同标志物组合在组织样本中检测的 ROC 曲线；

图 2 为不同标志物组合在痰液样本中检测的 ROC 曲线；

25 图 3 为 HOXB4 与 SRCIN1 联合检测灌洗液标本中检测的扩增曲线。

具体实施方式

以下通过具体的实施例进一步说明本公开的技术方案，具体实施例不代表对本公开保护范围的限制。其他人根据本公开理念所做出的一些非本质的修改和调整仍属于本公开的保护范围。

30 本公开中的“引物”或“探针”是指一种寡核苷酸，其包含与靶分子（例如靶核酸片段）的至少 6 个连续核苷酸的序列互补的区域。在一些实施方案中，所述引物或探针至少一部分序列与扩增的序列不互补。在一些实施方案中，引物或探针包含与靶分子的至少 9、至少 10、至少 11、至少 12、至少 13、至少 14、至少 15、至少 16、至少 17、至少 18、至少 19 或至少 20 连续核苷酸的序列互补的区域。当引物或探针包含“与靶分子的至少 x 个连续核苷酸互补”的区域时，所述引物或探针与靶分子的至少 x 个连续或不连续的分块核苷酸至少 95% 互补。在一些实施方案中，引物或探针与靶分子至少 80%、至少 81%、至少 82%、至少 83%、至少 84%、至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或 100% 互补。

本公开中，“正常”样本指分离自己知无所述癌症或肿瘤的个体的相同类型的样本。

本公开甲基化检测的样本包括但不限于 DNA，或 RNA，或含 mRNA 的 DNA 和 RNA 样品、或 DNA-RNA 杂交体。其中 DNA 或者 RNA 可为单链或双链。

40 本公开中，所述“受试者”是哺乳动物，例如是人。

本公开中，“甲基化水平”同“甲基化程度”，通常可以表示为甲基化胞嘧啶的百分比，其为甲基化的胞嘧啶数量除以甲基化胞嘧啶的数量与未甲基化胞嘧啶数量的总和；以及目前普遍采用甲基化靶向基因数量除

以内参基因数量的方法来表示甲基化水平；以及其他现有技术中甲基化水平表示方法。

本公开中“样本”同“标本”。

如本公开所使用的术语“和/或”是指并且涵盖一个或多个相关联的所列项目的任何和所有可能的组合。当在两个或多个项目的列表中使用时，术语“和/或”表示所列出的项目中的任何一个可以单独使用，或者可以使用两个或多个所列出的项目的任何组合。例如，如果组合物，组合，构造等被描述为包括（或包含）组分 A，B，C 和/或 D，则该组合物可以单独包含 A；单独包含 B；单独包含 C；单独包含 D；包含 A 和 B 的组合；包含 A 和 C 的组合；包含 A 和 D 的组合；包含 B 和 C 的组合；包含 B 和 D 的组合；包含 C 和 D 的组合；包含 A，B 和 C 的组合；包含 A，B 和 D 组合；包含 A，C 和 D 的组合；包含 B，C 和 D 组合；或 A，B，C 和 D 组合使用。

10 实施例 1

发明人筛选了数百个基因，在组织样本中进行筛选，以 β -actin 基因作为内参基因，比较 HOXB4、SRCIN1、PCDHGA12、HOXD8 基因的两两联合检测结果，各基因检测引物探针如下：

HOXB4 的检测引物和探针为：

SEQ ID NO: 1 HOXB4-F1 引物 F: TTCGTCGTTTTCGTTATCATTC

15 SEQ ID NO: 2 HOXB4-R1 引物 R: TACTAACCGCCTCGCTAC

SEQ ID NO: 3 HOXB4-P1 探针 P: FAM-CGGGTTTTCGTCGTTATTCGTC -BQ1

SRCIN1 的检测引物和探针为：

SEQ ID NO: 4 SRCIN1 引物 F: TCGTGTGTCGTCGTTTCAGAC

20 SEQ ID NO: 5 SRCIN1 引物 R: GAAATACCCGCGAAAATACTG

SEQ ID NO: 6 SRCIN1 探针 P:

FAM- AGTTTTACGTTGGAGAAGCGTCGG -BQ1

PCDHGA12 的检测引物和探针为：

25 SEQ ID NO: 7 PCDHGA12 引物 F: TTGGTTTTCACGGTTTTCGAC

SEQ ID NO: 8 PCDHGA12 引物 R: AAATTCTCCGAAACGCTCG

SEQ ID NO: 9 PCDHGA12 探针 P:

FAM-ATTCGGTGCGTATAGGTATCGCGC -BQ1

30 HOXD8 的检测引物和探针为：

SEQ ID NO: 10 HOXD8 引物 F: TTAGTTTCGGCGCGTAGC

SEQ ID NO: 11 HOXD8 引物 R: CCTAAAACCGACGCGATCTA

SEQ ID NO: 12 HOXD8 探针 P: FAM-AAAACTTACGATCGTCTACCCTCCG -BQ1

35 β -actin 的检测引物和探针为：

SEQ ID NO: 13 β -actin 引物 F: GGAGGTTTAGTAAGTTTTTGGATT

SEQ ID NO: 14 β -actin 引物 R: CAATAAAACCTACTCCTCCCTTA

SEQ ID NO: 15 β -actin 探针 P: FAM- TTGTGTGTTGGGTGGTGGTT-BQ1

实验过程：

40 1、提取 DNA

收集确诊肺癌患者的标本和非肺癌患者的标本，分别包括石蜡组织标本、痰液标本、灌洗液标本。样品经过预处理及分离细胞后，按美基生物公司试剂盒 HiPure FFPE DNA Kit(D3126-03)说明书进行 DNA 提取。

2、DNA 修饰

以 ZYMO RESEARCH 生物公司试剂盒 EZ DNA Methylation™ KIT (D5002) 说明进行重亚硫酸氢盐修饰。

3、扩增与检测

5

表 1 配液体系

	HOXB4	SRCIN1	PCDHGA12	HOXD8	β-actin
反应组份	加入量 (μl)	加入量 (μl)	加入量 (μl)	加入量 (μl)	加入量 (μl)
上游引物 (100 μM)	0.125	0.125	0.125	0.05	0.125
下游引物 (100 μM)	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125
探针 (100 μM)	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
镁离子 (25 mM)	6	6	6	6	6
dNTPs (10 mM)	1	1	1	1	1
Taq 聚合酶 (5 unit/μl)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
5X 缓冲液	6	6	6	6	6
灭菌水	11.2	11.2	11.2	11.275	11.2
模板 DNA	5	5	5	5	5
总体积	30	30	30	30	30

扩增体系：各检测基因的扩增体系见表 2、表 3。

表 2 HOXB4、SRCIN1 和 β-actin 扩增体系

步骤	温度和时间	循环数目
预变性	95°C 5 分钟	1
扩增	95°C 15 秒	48
	58°C 30 秒	
	72°C 30 秒	
冷却	40°C 30 秒	1

表 3 PCDHGA12 和 HOXD8 的扩增体系

步骤	温度和时间	循环数目
预变性	95°C 5 分钟	1
扩增 1	95°C 20 秒	10
	60°C 30 秒	
	70°C 30 秒	
扩增 2	95°C 20 秒	45
	55°C 60 秒	
	72°C 30 秒	
冷却	40°C 30 秒	1

10

4、检测结果

样本信息：肺组织样本共计 169 例，其中正常组织样本 91 例，癌组织样本 78 例，78 例癌症组样本中有鳞癌 27 例，腺癌 38 例，小细胞癌 3 例，大细胞癌 4 例，复合型癌 1 例，未明确分类的肺癌 5 例，其中癌和癌旁对照样本 77 对。

以 ACTB 作为内参基因，根据靶向基因即 HOXB4、SRCIN1 的 ΔC_p 值（ $\Delta C_p \text{ 值} = C_{p \text{ 靶向基因}} - C_{p \text{ ACTB}}$ ）来判断标本的甲基化水平，HOXB4 与 SRCIN1 的阈值线分别为： $\Delta C_p \text{ 值} = 5.4$ ， $\Delta C_p \text{ 值} = 6.5$ 。当检测结果中的一项小于以上阈值，则可判定为阳性，若检测结果中 2 项结果均大于或等于相对应的阈值，则可判定为阴性。

PCDHGA12 的阈值线为 $C_p \text{ 值} = 25.9$ ，HOXD8 的阈值线为 $C_p \text{ 值} = 27.4$ ，当各标志物检测结果大于或等于对应的阈值线时则可判定为阴性；若标志物检测结果小于对应的阈值线则可判定为阳性。

HOXB4 与 SRCIN1 联合、HOXB4 与 PCDHGA12 联合、HOXB4 与 HOXD8 联合在所有组织标本中检测的 ROC 曲线图 1 所示。各基因在组织中检测的统计结果表 3 所示。

表 3 组织中的检测结果

分析组别	指标	HOXB4	SRCIN1	PCDHGA12	HOXD8
正常组和全部癌症组比较	特异性	100%	97.8%	97.8%	97.8%
	灵敏度	73.1%	71.8%	50.0%	53.8%
正常组和鳞癌组比较	特异性	100%	97.8%	97.8%	97.8%
	灵敏度	74.1%	51.9%	44.4%	81.5%
正常组和腺癌组比较	特异性	100%	97.8%	97.8%	97.8%
	灵敏度	78.9%	89.5%	50.0%	50%
正常组和小细胞癌组比较	特异性	100%	97.8%	97.8%	97.8%
	灵敏度	0%	33.3%	66.7%	33.3%
正常组和大细胞癌组比较	特异性	100%	97.8%	97.8%	97.8%
	灵敏度	50.0%	75.0%	50.0%	0%

表 3（续）

分析组别	指标	HOXB4 与 SRCIN1 联合	HOXB4 与 PCDHGA12 联合	HOXB4 与 HOXD8 联合
正常组和全部癌症组比较	特异性	97.8%	97.8%	97.8%
	灵敏度	89.7%	75.6%	78.2%
正常组和鳞癌组比较	特异性	97.8%	97.8%	97.8%
	灵敏度	81.5%	74.1%	81.5%
正常组和腺癌组比较	特异性	97.8%	97.8%	97.8%
	灵敏度	100%	78.9%	81.6%
正常组和小细胞癌组比较	特异性	97.8%	97.8%	97.8%
	灵敏度	33.3%	66.7%	33.3%
正常组和大细胞癌组比较	特异性	97.8%	97.8%	97.8%
	灵敏度	75.0%	50.0%	50.0%

从以上结果可以看出，在组织样本中 HOXB4 与 SRCIN1 联合检测，正常组和全部癌症组比较，特异性为 97.8%，灵敏度 89.7%，与另外两组联合检测相比，HOXB4 与 SRCIN1 联合检测在特异性一致的情况下有更高的灵敏度。此外，HOXB4 与 SRCIN1 联合检测相较于 HOXB4、SRCIN1 单独检测，非显而易见地，显著提升了灵敏度。

根据以上结果，HOXB4 和 SRCIN1 在组织样本中，在高特异性下，仍然具有较高的灵敏度。特别是通过联合检测，在基本不影响特异性的情况下，灵敏度有非常大的提升。痰液作为无创性的检测样本，在肺癌诊断上更具重要意义，为此，发明人对 HOXB4 和 SRCIN1 这 2 个标志物在痰液中进行检测。

实施例 2：HOXB4 和 SRCIN1 基因在痰液中的检测

样本信息：测试痰液样本共计 107 例，其中正常对照组样本 51 例，癌症组样本 56 例，56 例癌症组样本中有鳞癌 20 例，小细胞癌 8 例，腺癌 20 例，大细胞癌 1 例，巨细胞癌 1 例，未明确分类的肺癌 6 例。

试验过程：

- a. 收集确诊为肺癌患者和非肺癌患者的痰液标本，使用 NaOH 解稠后，离心取沉淀分离细胞，使用 PBS 洗涤 2 遍，然后使用美基生物（Magen）公司的 DNA 提取试剂盒（HiPure FFPE DNA Kit，D3126-03）提取 DNA。
- b. 使用 ZYMO RESEARCH 生物公司的 DNA 转化试剂盒（EZ DNA Methylation Kit，D5002）进行 DNA 的重亚硫酸氢盐修饰。
- c. 各基因标志物的引物探针序列、配液体系及扩增体系与实施例 1 相同。
- 10d. 根据靶向基因即 HOXB4、SRCIN1 的 Cp 值来判断标本的甲基化水平，HOXB4 与 SRCIN1 的阈值线 Cp 值分别为：36.9 和 37.0。当单个基因检测结果中的一项小于前述阈值，则可判定为阳性，若检测结果中 2 项结果均大于或等于相对应的阈值，则可判定为阴性。
- PCDHGA12、HOXD8：PCDHGA12 的阈值线为 Cp 值=23.48，HOXD8 的阈值线为 Cp 值=26.4，当各标志物检测结果大于或等于对应的阈值线时则可判定为阴性；若标志物检测结果小于对应的阈值线则可判定为
- 15阳性。
- e. 检测结果如下：

表 4 痰液中的检测结果

分析组别	指标	HOXB4	SRCIN1	PCDHGA12	HOXD8
正常组和全部癌症组比较	特异性	96.1%	96.1%	96.1%	96.1%
	灵敏度	64.3%	48.2%	16.1%	23.2%
正常组和鳞癌组比较	特异性	96.1%	96.1%	96.1%	96.1%
	灵敏度	80.0%	35.0%	25.0%	50.0%
正常组和腺癌组比较	特异性	96.1%	96.1%	96.1%	96.1%
	灵敏度	50.0%	40.0%	10.0%	5.0%
正常组和小细胞癌组比较	特异性	96.1%	96.1%	96.1%	96.1%
	灵敏度	50.0%	100%	12.5%	12.5%

表 4（续）

分析组别	指标	HOXB4 与 SRCIN1 联合	HOXB4 与 PCDHGA12 联合	HOXB4 与 HOXD8 联合
正常组和全部癌症组比较	特异性	92.2%	92.2%	94.1%
	灵敏度	76.8%	64.3%	66.1%
正常组和全部鳞癌组比较	特异性	92.2%	92.2%	94.1%
	灵敏度	85.0%	80.0%	85.0%
正常组和全部腺癌组比较	特异性	92.2%	92.2%	94.1%
	灵敏度	55.0%	50.0%	50.0%
正常组和全部小细胞癌组比较	特异性	92.2%	92.2%	94.1%
	灵敏度	100%	50.0%	50.0%

20 HOXB4 和 SRCIN1 在痰液标本中检测的 ROC 曲线见图 2，统计结果见表 4，从以上结果可以看出，在痰液样本中，HOXB4 和 SRCIN1 联合检测时，正常组和全部癌症组比较，对肺癌的灵敏度提达到 76.8%；正常组和全部小细胞癌组比较，灵敏度能达到 100%。相对于单个基因标志物，HOXB4 的检出率为 64.3%，SRCIN1 的检出率为 48.2%，二者联合检测时，对肺癌的灵敏度提升到 76.8%，二者具有协同性。

实施例 3: HOXB4 和 SRCIN1 基因多重 PCR 体系优化

基于以上结果显示 HOXB4 和 SRCIN1 基因的联合检测可明显提高肺癌的检出率, 本发明人通过多重 PCR 方式对 PCR 体系进行优化, 从而简化检测流程, 并在实施例 2 的样本基础上进行验证。各基因检测引物探针如下:

- 5 HOXB4、SRCIN1 和 β -actin 的检测引物和探针序列与实施例 1 相同。
- a. 痰液样本处理同实施例 2;
 - b. 配液体系如下:

表 5 配液体系

反应组份	加入量 (μ l)
HOXB4-F1 (100 μ M)	0.125
HOXB4-R1 (100 μ M)	0.125
HOXB4-P1 (100 μ M)	0.05
SRCIN1-F1 (100 μ M)	0.125
SRCIN1-R1 (100 μ M)	0.125
SRCIN1-P1 (100 μ M)	0.05
β -actin -F1 (100 μ M)	0.125
β -actin -R1 (100 μ M)	0.125
β -actin -P2 (100 μ M)	0.05
镁离子(25 mM)	6
dNTPs(10 mM)	1
Taq 聚合酶(5 unit/ μ l)	0.5
5X 缓冲液	6
灭菌水	10.6
模板 DNA	5
总体积	30

- c. 扩增体系与实施例 1 表 2 的扩增体系相同;
- 10 d. 根据靶向基因即 HOXB4、SRCIN1 多重 PCR 的 Cp 值来判断标本的甲基化水平, HOXB4 与 SRCIN1 多重 PCR 检测的阈值线 Cp 值为: 36.7。当单个基因检测结果中的一项小于前述阈值, 则可判定为阳性, 若检测结果大于或等于阈值, 则可判定为阴性。
- e. 检测结果如下表 6:

表 6 检测结果

分析组别	指标	HOXB4 与 SRCIN1 联合检测
正常组和全部癌症组比较	特异性	94.1%
	灵敏度	78.6%
正常组和全部鳞癌组比较	特异性	94.1%
	灵敏度	85.0%
正常组和全部腺癌组比较	特异性	94.1%
	灵敏度	60.0%
正常组和全部小细胞癌组比较	特异性	94.1%
	灵敏度	100%

结果显示 HOXB4 与 SRCIN1 多重 PCR 体系的检测结果与实施例 2 中的检测结果基本保持一致。表明该多重 PCR 体系检测结果可作为 HOXB4 与 SRCIN1 基因联合检测肺癌的结果判定。

实施例 4：HOXB4 和 SRCIN1 基因在灌洗液液中的检测

样本信息：测试肺泡灌洗液样本共计 387 例，其中正常对照组样本 303 例，癌症组对照样本 84 例，84 例癌症组样本中有鳞癌 21 例，腺癌 40 例，小细胞癌 10 例，未明确肺癌类型 13 例。

HOXB4、SRCIN1 和 β-actin 的检测引物和探针序列与实施例 1 相同。

试验过程：

- a. 收集确诊为肺癌患者和非肺癌患者的肺泡灌洗液标本，离心分离细胞，然后使用美基生物公司的 DNA 提取试剂盒（HiPure FFPE DNA Kit，D3126-03）提取 DNA。
- b. 使用 ZYMO RESEARCH 生物公司的 DNA 转化试剂盒（EZ DNA Methylation Kit，D5002）进行 DNA 的重亚硫酸氢盐修饰。
- c. 配液体系和扩增体系与实施例 3 相同。
- d. 检测结果如下：

以 ACTB 作为内参基因，根据靶向基因即 HOXB4、SRCIN1 的 Cp 值和 ΔCp 值（ $\Delta Cp \text{ 值} = Cp_{\text{靶向基因}} - Cp_{\text{ACTB}}$ ）来判断标本的甲基化水平，HOXB4 与 SRCIN1 的阈值线为：Cp 值=37.2，ΔCp 值=9。当检测结果中的一项小于以上阈值，则可判定为阳性，若检测结果中 2 项结果均大于或等于阈值，则可判定为阴性。387 例灌洗液标本的检测检测结果如下：

表 7 检测结果

分析组别	指标	HOXB4 与 SRCIN1 联合
正常组和全部癌症组比较	特异性	96.0%
	灵敏度	77.4%
正常组和全部鳞癌组比较	特异性	96.0%
	灵敏度	71.4%
正常组和全部腺癌组比较	特异性	96.0%
	灵敏度	75.0%
正常组和全部小细胞癌组比较	特异性	96.0%
	灵敏度	90.0%

HOXB4 与 SRCIN1 联合检测在所有灌洗液标本中检测的扩增曲线见图 3，统计结果见表 7。从以上结果可以看出，HOXB4 与 SRCIN1 联合检测在 96.0% 的高特异性下，灵敏度达到 77.4%；按照肺癌的亚型进行比较分析，鳞癌组 HOXB4 与 SRCIN1 联合检测的检出率为 71.4%。特别是对腺癌的检测效果，HOXB4 与 SRCIN1 联合检测的灵敏性高达 75.0%，这一突破对腺癌的检测具有重大的意义。因为腺癌一般为周围型，由于支气管的树状生理结构，肺泡灌洗液不容易接触到肺深部的肺泡或者癌组织。

实施例 5 不同标志物组合在痰液样本的检测检测结果

发明人同时比较了不同标志物组合在痰液样本中的检测情况，对比的组别如下：

- 组合 1：HOXB4+ SRCIN1
- 组合 2：HOXB4+PCDHGA12
- 组合 3：SRCIN1+ PCDHGA12
- 组合 4：HOXB4+HOXD8
- 组合 5：SRCIN1+HOXD8
- 组合 6：SRCIN1+ PCDHGA12+ HOXD8
- 组合 7：SRCIN1+HOXB4+ HOXD8

具体实验条件及操作同实施例 2。

在 107 例痰液样本对不同标志物组合进行检测，其中正常对照组样本 51 例，癌症组样本 56 例，各组合的检测结果如表 8：

表 8（正常组 vs.全部癌症组）

	组合 1	组合 2	组合 3	组合 4	组合 5	组合 6	组合 7
灵敏度	76.8%	64.3%	46.4%	66.1%	53.6%	53.6%	76.8%
特异性	92.2%	92.2%	92.2%	94.1%	94.1%	90.2%	92.2%
AUC	0.870	0.810	0.848	0.833	0.883	0.832	0.892

表 8 的结果表明不同标志物组合对痰液样本肺癌检出率有较大的影响。分析组合 1、组合 2、组合 3、组合 4 和组合 5 的结果显示，不同标志物两两组合的检测结果显示差异较大，而组合 1 中通过 HOXB4 与 SRCIN1 联合检测其特异性为 92.2%，灵敏度为 76.8%，综合检测性能远远高于其他 4 个组合。分析组合 3、组合 5、组合 6 或组合 1、组合 7，结果显示额外增加标志物并不一定能提高检出率，反而有可能降低其特异性。结果表明，并非任意的基因标志物组合能够如本公开的组合 1 一样，在灵敏度、特异性及 AUC 这 3 个指标上有综合最佳的效果。非显而易见地，增加目标基因标志物的数量进行联合检测（如组合 6，7），也并未相应地提升特异性和灵敏度。

实施例 6 引物探针组合的选择

引物和探针也对肿瘤标志物的检测效果有极大的影响，发明人在研究过程中，设计了多对引物及其对应的探针，以寻找到尽可能提高检测灵敏度和特异性的探针和引物，以使本发明的检测试剂能够实际应用到临床检测中。

在 40 例痰液样本对不同引物探针组合进行检测，其中正常对照组样本 15 例，癌症组对照样本 25 例。

表 9 引物和探针

名称	序列编号	序列	作用
HOXB4-F1	SEQ ID NO: 1	TCGTCGTTTTTCGTTATCATTC	HOXB4 上游引物
HOXB4-R1	SEQ ID NO: 2	TACTAACCGCTCGCTAC	HOXB4 下游引物
HOXB4-P1	SEQ ID NO: 3	FAM-CGGGTTTTTGCCTCGTTATTCGTC -BQ1	HOXB4 检测探针
HOXB4-F2	SEQ ID NO: 16	ATTCGTTCCGGGTATTACGTC	HOXB4 上游引物
HOXB4-R2	SEQ ID NO: 17	CCAAATCCCGACAAACCG	HOXB4 下游引物
HOXB4-P2	SEQ ID NO: 18	FAM-CGGTTAGAGGCGAGAGAGTAGTTT-BQ1	HOXB4 检测探针
HOXB4-F3	SEQ ID NO: 19	CGGGTTTCGGGCGGCGCGC	HOXB4 上游引物
HOXB4-R3	SEQ ID NO: 20	CGAACGATAACGAAACGACG	HOXB4 下游引物
HOXB4-P3	SEQ ID NO: 21	FAM-CGTGTATCGTGTAGCGTTACGCGG-BQ1	HOXB4 检测探针
SRCIN1-F1	SEQ ID NO: 4	TCGTGTGTCGTCGTTACAGAC	SRCIN1 上游引物
SRCIN1-R1	SEQ ID NO: 5	GAAATACCCGCGAAATACTG	SRCIN1 下游引物
SRCIN1-P1	SEQ ID NO: 6	AGTTTTACGTTGGAGAAGCGTCGG	SRCIN1 检测探针
SRCIN1-F2	SEQ ID NO: 22	TATCGTGTATCGTCGTTCCGAC	SRCIN1 上游引物
SRCIN1-R1	SEQ ID NO: 5	GAAATACCCGCGAAATACTG	SRCIN1 下游引物
SRCIN1-P1	SEQ ID NO: 6	AGTTTTACGTTGGAGAAGCGTCGG	SRCIN1 检测探针
A3-TqMF	SEQ ID NO: 13	GGAGGTTTAGTAAGTTTTTGGATT	β -actin 基因上游引物
A3-TqMR	SEQ ID NO: 14	CAATAAACCTACTCCTCCCTTA	β -actin 基因下游引物
A3-TqP	SEQ ID NO: 15	FAM-TTGTGTGTTGGGTGGTGGTT -BQ1	β -actin 基因检测探针

各配液体系均一致，配液体系、各扩增程序均一致，扩增程序同实施例 2。
检测结果如表 10、11 所示。

表 10 HOXB4 在痰液样本中的检测结果（正常组 vs.全部癌症组）

组别	特异性	灵敏性
F1, R1, P1	93.3%	72.0%
F2, R2, P2	93.3%	44.0%
F3, R3, P3	93.3%	68.0%

表 11 SRCIN1 在痰液样本中的检测结果（正常组 vs.全部癌症组）

组别	特异性	灵敏性
F1, R1, P1	93.3%	56.0%
F2, R1, P1	93.3%	52.0%

结果表明针对同一区域的不同引物对，对检测结果会产生影响。在特异性一致的情况下，HOXB-F1，HOXB-R1，HOXB-P1 和 SRCIN1-F1，SRCIN1-R1，SRCIN1-P1 的引物和探针组合有更高的灵敏性。