

肿瘤标志物、甲基化检测试剂、试剂盒及其应用

技术领域

本发明涉及生物技术领域，特别涉及肿瘤标志物、甲基化检测试剂、试剂盒及其应用。

背景技术

结直肠癌，又称为大肠癌，是一种常见的消化道恶性肿瘤。其发病率在我国逐年升高，在我国部分沿海地区比如上海和广州，大肠癌发病率已跃居第二位，仅次于肺癌。目前认为肠癌的形成是遗传缺陷和表观遗传缺陷累积的结果。结直肠癌早期发病隐匿，常无明显症状，晚期可出现便血、腹痛、腹泻等症状。而当出现症状就诊时常常是晚期，这给病人带来极大的痛苦和昂贵的治疗费用。因此早发现、早诊断、早治疗是降低结直肠癌发病率和死亡率的一项重要措施。

筛查可以早期发现肠癌和癌前病变，并去除病灶，从而阻止肠癌的发生。目前大肠癌的筛查方法主要有隐血试验和肠镜检查。隐血试验存在易受食物影响或对腺瘤检出率不高的问题。肠镜虽是肠癌诊断金标准，但作为筛查手段使用时人群依从性不高。因此急需一种准确性高、依从性高的肠癌筛查方法。

粪便基因检测作为一种新的肠癌筛查方法，现在越来越受到重视。该方法（Cologuard®）于2016年纳入美国的肠癌筛查指南。该方法具有方便、无创、对肠癌和癌前病变腺瘤的检出率高等特点。要做成对肠癌检测高性能的粪便基因检测试剂盒，主要需要克服两大障碍：粪便DNA的提取和标志物选择。一方面，粪便中成分复杂，对下游反应的抑制物多，还有许多细菌DNA，要从这样的混合物中提取出人的目标基因，需要一套高敏的基因提取和纯化方法；另一方面，目前和肠癌相关的标志物很多，尤其是DNA甲基化标志物，因为研究表明，DNA甲基化是肿瘤形成的早期事件。但很多甲基化标志物在细胞、组织层面表现很好，当用于粪便、血液等筛查媒介时，其对肠癌的敏感性和特异性就显著降低，比如vimentin基因，其在组织中的敏感性有83%，在粪便标本中就降到了46%，类似的还有 SFRP1、SFRP2等基因，这样的标

标志物无法满足真正用于肠癌临床检测的需求。因此，挑选在粪便中对肠癌有极高检测敏感性和特异性的标志物是肠癌粪便基因检测的关键，并且这样的标志物有望真正用于肠癌的临床检测。

发明内容

有鉴于此，本发明提供了一种肿瘤标志物、捕获序列、引物对、探针、甲基化检测试剂、试剂盒及其应用。该肿瘤标志物在粪便中对肠癌的敏感性与组织中敏感性接近，甚至高于组织中的敏感性。

本发明的另一个目的在于提供一种无创检测肿瘤的标志物、捕获序列、引物对、探针、甲基化检测试剂、试剂盒及方法。

为了实现上述发明目的，本发明提供以下技术方案：

本发明提供了 COL4A1 基因在制备肿瘤标志物中的应用。

在本发明的一些具体实施方案中，所述 COL4A1 基因的序列与 Genbank Accession No. NC_000013.11 所示的序列具有至少 97.8% 的同一性。

在本发明的一些具体实施方案中，所述 COL4A1 基因的序列与 Genbank Accession No. NC_000013.11 所示的序列具有至少 98.9% 的同一性。

在本发明的一些具体实施方案中，所述的 COL4A1 基因的序列与 Genbank Accession No. NC_000013.11 所示的序列具有至少 99.9% 的同一性。

在本发明的一些具体实施方案中，所述的 COL4A1 基因的序列与 Genbank Accession No. NC_000013.11 所示的序列具有 100% 的同一性。

在本发明的一些具体实施方案中，所述肿瘤为结直肠癌或腺瘤。

在本发明的一些具体实施方案中，待测样本为组织、体液或排泄物。

在本发明的一些具体实施方案中，所述组织为肠组织。

在本发明的一些具体实施方案中，所述体液包括但不限于血液、血清、血浆、细胞外液、组织液、淋巴液、脑脊液或房水。

在本发明的一些具体实施方案中，所述排泄物为痰液、唾液、尿液或粪便。

本发明还提供了 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。

所述的 COL4A1 基因的甲基化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。每种检测方法均有其相对应的试剂，这些试剂均可以用本发明检测 COL4A1 基因的甲基化。

本发明还提供了一种捕获序列，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。

本发明还提供了一种引物对，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。

本发明还提供了一种探针，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。

本发明还提供了 COL4A1 基因的甲基化检测试剂，包括针对 COL4A1 基因甲基化检测的捕获序列、引物和/或探针。

在本发明的一些具体的实施方案中，包括针对 COL4A1 基因的 CpG 岛获得的捕获序列、引物和/或探针。

在本发明的一些具体的实施方案中，引物和/或探针通过甲基化特异性定量 PCR(quantitative Methylation-Specific PCR,qMSP)检测 COL4A1 基因的甲基化。

在本发明的一些具体的实施方案中，本发明提供的甲基化检测试剂通过检测 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。

肿瘤组织中存在的甲基化被认为是具有潜在临床价值的 DNA 表观修饰。基因体以、基因间区、启动子或其附近区域均存在甲基化，且这些区域的甲基化均可能与肿瘤相关。目前，在多种肿瘤中已经证实，抑癌基因启动子或其附近区域的 CpG 岛异常甲基化导致了转录失活。

在本发明的一些具体实施方案中，本发明提供的甲基化检测试剂包括针对 COL4A1 基因的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。

在本发明的一些具体实施方案中，本发明提供的甲基化检测试剂中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。

在本发明的一些具体实施方案中，本发明提供的甲基化检测试剂中，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。

在本发明的一些具体实施方案中，本发明提供的甲基化检测试剂中，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。

在本发明的一些具体实施方案中，本发明提供的甲基化检测试剂中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。

本发明还提供了一种检测肿瘤的试剂盒，包括所述的捕获序列、引物对、探针或甲基化检测试剂。

在本发明的一些具体实施方案中，本发明提供的试剂盒包括：划分成其内接收试剂的一个或多个容器。

在本发明的一些具体实施方案中，本发明提供的试剂盒包括：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。

在本发明的一些具体实施方案中，本发明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。所述的转化剂包括但不限于亚硫酸氢盐、重亚硫酸氢盐或胂盐等等。又如扩增 COL4A1 基因中常用的 DNA 聚合酶、dNTPs、 Mg^{2+} 离子和缓冲液等等。

本发明还提供了上述的捕获序列、引物对、探针、甲基化检测试剂、试剂盒在检测肿瘤中的应用。

本发明还提供了一种肿瘤的检测方法，通过检测 COL4A1 基因的甲基化水平，区分正常样本和肿瘤样本。

在本发明的一些具体实施方案中，其包含以下步骤：

(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所述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。

在本发明的一些具体实施方案中，本发明通过检测 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。

在本发明的一些具体实施方案中，本发明通过检测 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。

在本发明的一些具体实施方案中，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 (qMSP)，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。

在本发明的一些具体实施方案中，通过甲基化特异性定量 PCR (qMSP) 检测甲基化水平。

在本发明的一些具体实施方案中，甲基化水平采用所述的捕获序列、引物对、探针、甲基化检测试剂或所述的试剂盒检测。

在本发明的一些具体实施方案中，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(qMSP)检测。

在本发明的一些具体实施方案中，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。

在本发明的一些具体实施方案中，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，优选地，粪便标本中的 Ct 值的界值为 35.2，粪便标本的 Ct 值小于所述 Ct 值的界值则判断为肿瘤标本，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，优选地，组织标本中甲基化水平值的界值为 3.9，

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。该界值可根据实际情况进行调整。

本发明还提供了一种肿瘤的检测系统，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；

在本发明的一些具体实施方案中，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；

在本发明的一些具体实施方案中，所述的甲基化检测构件还含有所述的捕获序列、引物对、探针、甲基化检测试剂或试剂盒。

在本发明的一些具体实施方案中，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。

在本发明的一些具体实施方案中，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。

在本发明的一些具体实施方案中，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，优选地，粪便标本中的 Ct 值的界值为 35.2，粪便标本的 Ct 值小于所述 Ct 值的界值则判断为肿瘤标本，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，优选地，组织标本中甲基化水平值的界值为 3.9，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。该界值可根据实际情况进行调整。

在本发明的一些具体实施方案中，本发明所述肿瘤为结直肠肿瘤。

在本发明的一些具体实施方案中，本发明所述肿瘤为结直肠癌或腺瘤。

在本发明的一些具体实施方案中，本发明提供的待测样本或者样本类型为组织、体液或排泄物。

在本发明的一些具体实施方案中，所述组织为肠组织。

在本发明的一些具体实施方案中，所述体液包括血液、血清、血浆、细胞外液、组织液、淋巴液、脑脊液或房水。

在本发明的一些具体实施方案中，所述排泄物为痰液、尿液、唾液或粪便。

本发明通过研究发现：通过检测COL4A1基因启动子区的甲基化水平，可以很好的从正常人的粪便标本中区分出结直肠癌标本。本发明就是利用含有该基因的甲基化检测试剂来检测结直肠癌的，并且对肠癌的检测敏感性和特异性非常高。

与现有的检测肠癌的标志物相比，本发明提供的标志物和技术方案能够以很高的敏感性和特异度来检测出结直肠癌，并且在粪便中对结直肠癌的检出率高于组织标本，具体有以下几点：

1、在上述的一个技术方案中，COL4A1基因的甲基化检测试剂在粪便标本中能够在特异性为95.2%时，检测出83.8%的结直肠癌，显而易见地，对结直肠癌的检出率高于组织标本，可以简便地粪便做为检测样本，对结直肠癌进行可靠的诊断。粪便样品获得非常容易，取样无创简单，而且不会对病人造成任何的痛苦和不便。

2、在上述的一个技术方案中，COL4A1基因的甲基化检测试剂在组织标本中能够在特异性为95.2%时，检测出81.9%的结直肠癌。

3、上述的一个技术方案中含有COL4A1基因的甲基化检测试剂和提取检测方法能非常方便、准确地判断出结直肠癌和正常人，该基因的甲基化检测试剂有望用于粪便基因检测试剂盒，并服务于肠癌的临床检测。

4、上述的一个技术方案中的试剂/试剂盒是通过甲基化水平来检测和诊断癌症，越来越多的研究证实甲基化改变是肿瘤发生过程中的早期事件，检测甲基化异常更易发现早期病变。

附图说明

为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案，下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍。

图1示实施例1粪便实验中，COL4A1基因检测结直肠癌的ROC曲线；

图2示实施例1粪便实验中，COL4A1基因标准曲线扩增图谱；

图3示实施例2组织实验中，COL4A1基因检测结直肠癌的ROC曲线；

图4示对比例2的19对组织实验中，SFRP1基因检测结直肠癌的ROC曲线；

图5示对比例2的36例粪便实验中，SFRP1基因检测结直肠癌的ROC曲线。

具体实施方式

本发明公开了一种肿瘤标志物、甲基化检测试剂、试剂盒及其应用，本领域技术人员可以借鉴本文内容，适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是，所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的，它们都被视为包括在本发明。本发明的方法及应用已经通过较佳实施例进行了描述，相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的方法和应用进行改动或适当变更与组合，来实现和应用本发明技术。

本发明提供的肿瘤标志物、甲基化试剂、试剂盒及其应用中所用原料、辅料及试剂均可由市场购得或者合成。

只要有可检测差异性甲基化的 CpG 位点，COL4A1 基因的任何核酸片段可以用于本发明。CpG 岛是核酸序列中 CpG 富集区域。CpG 岛开始于启动子的上游，向下游延伸至转录区域。在启动子上的 CpG 岛的甲基化通常抑制基因的表达。启动子内的 CpG 岛为甲基化的一部分，基因体中的 CpG open sea 存在保守的 DNA 甲基化靶标。最近的研究揭示了非启动子区域（如基因体和 UTR）甲基化对基因表达的协同效应，基因体甲基化可能是癌症中潜在的治疗靶点。

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，本发明中的 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。

通常，含 CpG 的核酸是 DNA。然而，本发明可适用，例如，包含 DNA、或者 DNA 和含有 mRNA 的 RNA 的样品，其中 DNA 或者 RNA 可以是单链的或者双链的，或者 DNA-RNA 杂交链也可能包括在样品中。

本发明中的“引物”或“探针”是指一种寡核苷酸，其包含与靶核酸分子（例如靶基因）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，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 个连续或

不连续的分块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 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或 100% 互补。

本发明中的“检测”同诊断，除了结直肠肿瘤的早期诊断，还包括结直肠肿瘤中期和晚期的诊断，且也包括结直肠肿瘤筛选、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。

结直肠肿瘤标志物 COL4A1 的应用使得结直肠肿瘤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，结直肠癌可在早期通过在正常表象的细胞中的结直肠肿瘤特异性基因 COL4A1 的甲基化而诊断。

其中，早期诊断指的是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。

除了结直肠肿瘤的早期诊断，本发明的试剂/试剂盒还有希望用于结直肠肿瘤筛选、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，可通过在结直肠肿瘤在不同阶段或时期的进展可通过从样品中获取的 COL4A1 的甲基化程度的测量进行诊断。通过比较从结直肠癌的每个阶段的样品中分离出的核酸的 COL4A1 基因甲基化程度与从没有细胞增殖性异常的肠组织中的样品中分离出的一个或多个核酸的 COL4A1 基因甲基化程度，可检测样品中结直肠肿瘤的具体阶段。

下面结合实施例，进一步阐述本发明：

实施例 1

选取 163 例粪便标本（80 例结直肠癌，83 例正常，均经肠镜或病理确诊），进行研磨离心，加入 100ul 捕获磁珠（含有 COL4A1 基因的捕获序列），并按如下所述技术方案操作：

技术方案如下：

1) 收集有肠镜结果的正常人和结直肠肿瘤病人的粪便标本，按 1g 粪便：4mL 保护液混合研磨后 5000rpm 离心 10min，取上清弃沉淀；

2) 取出10mL上清再次离心, 取上清3.2mL加入2mL裂解液和100ul捕获磁珠M1, 92°C孵育10min, 然后室温放置1h;

3) 置于磁力架上弃部分上清后洗下磁珠转移至2mL离心管, 加入800ul洗液W1, 室温1300rpm孵育1min, 置于磁力架上吸去上清, 重复3次;

4) 加入55ul洗脱液, 92°C 1300rpm孵育10min, 置于磁力架上, 3min内转移50ul洗脱液至新的EP管中;

5) 用EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research) 对上一步骤中的DNA片段进行甲基化处理, 最后的洗脱液15ul用于qMSP检测。

最后得到Bisulfite转化后的DNA 15ul。然后进行qMSP检测COL4A2的甲基化水平。

qMSP反应体系: 25ul (无核酸酶水8.2ul, 5×Colorless GoTaq Flexi Buffer 5ul, MgCl₂ (25mM) 5ul, dNTPs (10mM) 1ul, GoTaq Hot Start polymerase 0.5ul, Forward primer (100uM) 0.125ul, Reverse primer (100uM) 0.125ul, Probe (100uM) 0.05ul, DNA 5ul)。反应程序: 95°C4min, (95°C20s, 56°C30s, 72°C30s) ×45Cycles, 37°C30s。

最后根据标准曲线计算基因在标本中的拷贝数。

COL4A1基因发生甲基化的位点相对恒定, 主要位于启动子区或附近的CpG岛上。针对这些区域设计了其中一组捕获序列、引物和探针, 并用于COL4A1基因甲基化检测试剂中。

试剂中含有的捕获序列、引物探针如下:

COL4A1的捕获序列 (SEQ ID NO:1):

5'-CTGCCCCGGCGTGC GGGGGCCGCGGCGGACAGCTAGCTCTC -3'

COL4A1的qMSP引物探针:

Forward Primer (SEQ ID NO:2): 5'-CGTTTGGAGTCGTCGTATTC -3'

Reverse Primer (SEQ ID NO:3): 5'-CGACGAACAACAACTCTCG -3'

Probe (SEQ ID NO:4): 5'-CGTAGCGTTGGAAGTTCGGTTTTT -3'

粪便实验中, COL4A1 基因检测结直肠癌的 ROC 曲线如图 1 所示:

对于结直肠癌, COL4A1基因的检测敏感性是83.8% (67/80), 特异性为95.2% (79/83), ROC曲线下面积是0.965 (95% CI: 0.941-0.989, $p < 0.0001$)。

粪便实验中, COL4A1基因标准曲线扩增图谱如图2所示:

结直肠癌	33	肠癌	正常	39	正常
结直肠癌	33	肠癌	正常	39	正常
结直肠癌	33	肠癌	正常	39	正常
结直肠癌	33	肠癌	正常	39	正常
结直肠癌	33	肠癌	正常	39	正常
结直肠癌	33	肠癌	正常	39	正常
结直肠癌	32	肠癌	正常	39	正常
结直肠癌	32	肠癌	正常	39	正常
结直肠癌	32	肠癌	正常	39	正常
结直肠癌	32	肠癌	正常	38	正常
结直肠癌	32	肠癌	正常	38	正常
结直肠癌	31	肠癌	正常	39	正常
结直肠癌	31	肠癌	正常	38	正常
结直肠癌	31	肠癌	正常	38	正常
结直肠癌	30	肠癌	正常	38	正常
结直肠癌	30	肠癌	正常	38	正常
结直肠癌	30	肠癌	正常	38	正常
结直肠癌	30	肠癌	正常	38	正常
结直肠癌	30	肠癌	正常	38	正常
结直肠癌	30	肠癌	正常	38	正常
结直肠癌	30	肠癌	正常	38	正常
结直肠癌	30	肠癌	正常	38	正常
结直肠癌	30	肠癌	正常	38	正常
结直肠癌	30	肠癌	正常	38	正常
结直肠癌	30	肠癌	正常	38	正常
结直肠癌	30	肠癌	正常	38	正常
结直肠癌	30	肠癌	正常	37	正常
结直肠癌	29	肠癌	正常	38	正常
结直肠癌	29	肠癌	正常	37	正常
结直肠癌	29	肠癌	正常	38	正常

结直肠癌	29	肠癌	正常	37	正常
结直肠癌	29	肠癌	正常	38	正常
结直肠癌	29	肠癌	正常	37	正常
结直肠癌	28	肠癌	正常	38	正常
结直肠癌	28	肠癌	正常	37	正常
结直肠癌	28	肠癌	正常	37	正常
结直肠癌	28	肠癌	正常	37	正常
结直肠癌	28	肠癌	正常	37	正常
结直肠癌	28	肠癌	正常	37	正常
结直肠癌	28	肠癌	正常	37	正常
结直肠癌	28	肠癌	正常	37	正常
结直肠癌	28	肠癌	正常	37	正常
结直肠癌	28	肠癌	正常	37	正常
结直肠癌	28	肠癌	正常	37	正常
结直肠癌	28	肠癌	正常	37	正常
结直肠癌	28	肠癌	正常	36	正常
结直肠癌	27	肠癌	正常	37	正常
结直肠癌	27	肠癌	正常	37	正常
结直肠癌	27	肠癌	正常	36	正常
结直肠癌	27	肠癌	正常	36	正常
结直肠癌	27	肠癌	正常	36	正常
结直肠癌	26	肠癌	正常	36	正常
结直肠癌	26	肠癌	正常	36	正常
结直肠癌	25	肠癌	正常	36	正常
结直肠癌	25	肠癌	正常	35	正常
结直肠癌	24	肠癌	正常	35	肠癌
			正常	35	肠癌
			正常	35	肠癌
			正常	35	肠癌

表 1 注：“无扩增”表示无扩增曲线，无 Ct 数据，属于大于界值的范围。

实施例 2

选取105对结直肠癌与癌旁正常组织标本（均经肠镜或病理确诊），根据 Protocol，分别用QIAamp DNA Kit (QIAGEN) 提取组织DNA，然后用EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research) 转化DNA。

然后进行qMSP检测COL4A1的甲基化水平。

qMSP反应体系和反应步骤同实施例1的粪便实验。最后根据标准曲线计算基因在标本中的甲基化值： $(\text{Target}/\text{ACTB}) \times 100$ 。所用的qMSP引物探针同实施例1。

组织实验中，COL4A1 基因检测结直肠癌的 ROC 曲线如图 3 所示：

对于结直肠癌，COL4A1 基因的检测敏感性是 81.9% (86/105)，特异性为 95.2%(100/105), ROC 曲线下面积是 0.884(95% CI:0.829-0.939, $p < 0.001$)。

表 2

105 对配对癌与癌旁正常组织					
样品分类	甲基化值	检测判读	样品分类	甲基化值	检测判读
结直肠癌	0.0	正常	正常	0.0	正常
结直肠癌	0.0	正常	正常	0.0	正常
结直肠癌	0.0	正常	正常	0.0	正常
结直肠癌	0.0	正常	正常	0.1	正常
结直肠癌	0.0	正常	正常	0.2	正常
结直肠癌	0.2	正常	正常	0.2	正常
结直肠癌	0.3	正常	正常	0.3	正常
结直肠癌	0.3	正常	正常	0.3	正常
结直肠癌	0.5	正常	正常	0.3	正常
结直肠癌	0.7	正常	正常	0.4	正常
结直肠癌	0.8	正常	正常	0.4	正常
结直肠癌	1.1	正常	正常	0.4	正常

结直肠癌	1.3	正常	正常	0.4	正常
结直肠癌	1.3	正常	正常	0.4	正常
结直肠癌	1.4	正常	正常	0.5	正常
结直肠癌	1.7	正常	正常	0.5	正常
结直肠癌	1.9	正常	正常	0.5	正常
结直肠癌	2.2	正常	正常	0.5	正常
结直肠癌	3.1	正常	正常	0.6	正常
结直肠癌	3.9	肠癌	正常	0.6	正常
结直肠癌	4.8	肠癌	正常	0.6	正常
结直肠癌	5.1	肠癌	正常	0.6	正常
结直肠癌	5.5	肠癌	正常	0.6	正常
结直肠癌	6.5	肠癌	正常	0.6	正常
结直肠癌	7.0	肠癌	正常	0.6	正常
结直肠癌	8.2	肠癌	正常	0.6	正常
结直肠癌	8.5	肠癌	正常	0.7	正常
结直肠癌	9.1	肠癌	正常	0.7	正常
结直肠癌	9.3	肠癌	正常	0.7	正常
结直肠癌	10.8	肠癌	正常	0.7	正常
结直肠癌	10.8	肠癌	正常	0.7	正常
结直肠癌	11.3	肠癌	正常	0.7	正常
结直肠癌	11.3	肠癌	正常	0.8	正常
结直肠癌	12.7	肠癌	正常	0.8	正常
结直肠癌	12.9	肠癌	正常	0.8	正常
结直肠癌	13.6	肠癌	正常	0.8	正常
结直肠癌	13.9	肠癌	正常	0.8	正常
结直肠癌	14.2	肠癌	正常	0.8	正常
结直肠癌	14.3	肠癌	正常	0.8	正常
结直肠癌	14.8	肠癌	正常	0.9	正常
结直肠癌	15.7	肠癌	正常	0.9	正常

结直肠癌	17.0	肠癌	正常	0.9	正常
结直肠癌	17.6	肠癌	正常	0.9	正常
结直肠癌	17.9	肠癌	正常	0.9	正常
结直肠癌	18.7	肠癌	正常	0.9	正常
结直肠癌	19.3	肠癌	正常	1.0	正常
结直肠癌	19.4	肠癌	正常	1.0	正常
结直肠癌	19.6	肠癌	正常	1.0	正常
结直肠癌	20.1	肠癌	正常	1.0	正常
结直肠癌	20.2	肠癌	正常	1.0	正常
结直肠癌	20.9	肠癌	正常	1.0	正常
结直肠癌	21.2	肠癌	正常	1.0	正常
结直肠癌	21.3	肠癌	正常	1.0	正常
结直肠癌	21.6	肠癌	正常	1.0	正常
结直肠癌	21.8	肠癌	正常	1.1	正常
结直肠癌	21.8	肠癌	正常	1.1	正常
结直肠癌	21.8	肠癌	正常	1.1	正常
结直肠癌	22.0	肠癌	正常	1.1	正常
结直肠癌	23.0	肠癌	正常	1.1	正常
结直肠癌	23.4	肠癌	正常	1.1	正常
结直肠癌	23.5	肠癌	正常	1.2	正常
结直肠癌	24.2	肠癌	正常	1.2	正常
结直肠癌	25.3	肠癌	正常	1.2	正常
结直肠癌	25.8	肠癌	正常	1.2	正常
结直肠癌	25.9	肠癌	正常	1.2	正常
结直肠癌	26.8	肠癌	正常	1.2	正常
结直肠癌	27.2	肠癌	正常	1.2	正常
结直肠癌	27.4	肠癌	正常	1.3	正常
结直肠癌	28.1	肠癌	正常	1.3	正常
结直肠癌	28.2	肠癌	正常	1.3	正常

结直肠癌	28.7	肠癌	正常	1.3	正常
结直肠癌	29.7	肠癌	正常	1.4	正常
结直肠癌	30.3	肠癌	正常	1.4	正常
结直肠癌	31.4	肠癌	正常	1.4	正常
结直肠癌	31.9	肠癌	正常	1.5	正常
结直肠癌	32.0	肠癌	正常	1.5	正常
结直肠癌	32.3	肠癌	正常	1.5	正常
结直肠癌	35.4	肠癌	正常	1.6	正常
结直肠癌	36.1	肠癌	正常	1.6	正常
结直肠癌	36.3	肠癌	正常	1.7	正常
结直肠癌	36.7	肠癌	正常	1.7	正常
结直肠癌	37.1	肠癌	正常	1.7	正常
结直肠癌	39.1	肠癌	正常	1.8	正常
结直肠癌	39.3	肠癌	正常	1.8	正常
结直肠癌	40.4	肠癌	正常	1.9	正常
结直肠癌	40.8	肠癌	正常	2.0	正常
结直肠癌	41.8	肠癌	正常	2.0	正常
结直肠癌	41.9	肠癌	正常	2.1	正常
结直肠癌	42.4	肠癌	正常	2.1	正常
结直肠癌	45.9	肠癌	正常	2.1	正常
结直肠癌	50.1	肠癌	正常	2.5	正常
结直肠癌	52.0	肠癌	正常	2.6	正常
结直肠癌	55.3	肠癌	正常	2.7	正常
结直肠癌	56.3	肠癌	正常	2.8	正常
结直肠癌	56.6	肠癌	正常	3.1	正常
结直肠癌	56.8	肠癌	正常	3.2	正常
结直肠癌	58.6	肠癌	正常	3.2	正常
结直肠癌	65.0	肠癌	正常	3.6	正常
结直肠癌	66.9	肠癌	正常	3.7	正常

结直肠癌	69.1	肠癌	正常	3.8	正常
结直肠癌	70.8	肠癌	正常	4.0	肠癌
结直肠癌	73.4	肠癌	正常	4.5	肠癌
结直肠癌	84.7	肠癌	正常	4.9	肠癌
结直肠癌	92.8	肠癌	正常	5.1	肠癌
结直肠癌	99.8	肠癌	正常	5.6	肠癌

对比例 1

目前有研究用QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN) 对粪便标本的DNA进行提取, 然后用甲基化特异性PCR (MSP) 或定量甲基化特异性PCR (qMSP) 来定性或定量检测标本中标志物的水平。其中通过MSP来检测结直肠癌因需要跑电泳, 操作更不方便, 且有产物污染风险; 通过QIAamp DNA Stool Mini Kit来提取粪便中的DNA为人和细菌的总DNA, 真正人的肿瘤DNA极少, 不利于后续PCR检测。

对比例 2

有研究表明 SFRP1 基因甲基化与肠癌有关, 在粪便中检测该基因的甲基化程度, 可以检出结直肠癌。在 53 例粪便标本 (29 例肠癌、7 例腺瘤、17 例正常) 实验中, 在特异性为 86% 时, 可检出 89% 的结直肠肿瘤。(Zhang W, Bauer M, Croner RS, Pelz JO, Lodygin D, Hermeking H, Sturzl M, Hohenberger W, Matzel KE. DNA stool test for colorectal cancer: Hypermethylation of the secreted frizzled-related protein-1 gene. DISEASES OF THE COLON & RECTUM 2007; 50(10): 1618-26; discussion 1626-7.)

在 19 对组织和 36 例粪便标本中同样检测了 SFRP1 基因的甲基化水平, 靶基因提取方法同实施例 1 和 2。19 对组织实验中, SFRP1 基因检测结直肠癌的 ROC 曲线如图 4 所示:

对于结直肠癌组织, SFRP1 基因的检测敏感性是 89%, 特异性为 95%, ROC 曲线下面积是 0.972 (95% CI: 0.929-1, $p < 0.001$)。

36 例粪便实验中, SFRP1 基因检测结直肠癌的 ROC 曲线如图 5 所示:

对于结直肠癌, SFRP1 基因的检测敏感性是 67%, 特异性为 94%, ROC 曲线下面积是 0.892 (95% CI: 0.790-0.994, $p < 0.0001$)。

由此可见，SFRP1基因对结直肠癌组织具有较高的检测敏感性和特异性，而在粪便标本中其敏感性就大幅降低了。

以上所述仅是本发明的优选实施方式，应当指出，对于本技术领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明原理的前提下，还可以做出若干改进和润饰，这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。