

一种用于结直肠癌早期诊断的生物标志物组合物及应用

技术领域

本发明属于结直肠癌检测领域，具体涉及一种用于结直肠癌早期诊断的生物标志物组合物及应用。

背景技术

结直肠癌是临床常见肿瘤，具有高发病率及高死亡率，在中国新增癌症病例中结直肠癌发病率在男性中排第四，在女性中排第三，在全球范围排第二位。如果能在早期检测到结直肠癌病变并通过手术切除，则存活率超过 90%，而晚期则降低至 13%，因此，早筛是降低结直肠癌死亡率最有效的手段。发达国家已经建立了有效的早期筛查计划和诊断技术，成为选择治疗方法并预测结果的方法的重要组成部分，使得死亡风险和治疗质量都获得了很大的改善，这为我们提供了指导与借鉴。

目前对于筛查方法，结肠镜检查仍然是明确诊断的金标准。虽然它有效，但它也可能引起恐惧，尴尬，可能会导致严重的并发症，参与率低，不适合早期筛查。其它的侵入式筛查如气钡灌肠、核磁共振成像等，有技术难度大，费用高等缺点。而非侵入式的粪便隐血检查有：基于愈创木脂化学法（gFOBT）；免疫法等，均存在灵敏度低、易受饮食用药影响的问题。《结直肠癌早期筛查指南》推荐：高敏 gFOBT 每年检查一次，高敏免疫化学法每年检查一次，但这种方法具有较高的假阳性率，对早期息肉敏感性低。

粪便基因是另一种可靠的生物标志物，可以通过 DNA 检测来进行早期筛查。多靶点基因检测已被《结直肠癌早期筛查指南》推荐用于结直肠癌筛查，每三年一次，但是价格昂贵，对腺瘤诊断效果差，尚未在亚洲人群进行验证。FDA 批准的 Cologuard（大肠卫士）是一种有效的分子（基因突变，甲基化和潜血实验）筛查技术，是将粪便潜血检测与血液中肿瘤相关 DNA 标志物检测相结合，定量检测血液中与结直肠肿瘤相关的 DNA 标志物，及人类粪便中存在的潜血红蛋白，实现结直肠癌的早期诊断，但是其价格昂贵，且需要抽血检查，并且对腺瘤的诊断效果较差。因此，需要我们开发灵敏、无创、经济的无创筛查技术来改善现状。

研究表明肠道生物群在人类健康和许多疾病的过程中发挥着重要作用，可用

作诊断，预后和分层等生物标志物，并且可以通过患者粪便进行检测。例如，中国专利 CN106574294A，公开了一种通过定量 PCR 从人类粪便样本诊断结肠直肠癌的方法、引物及试剂盒，通过检测粪便中一种或多种 16SrDNA 细菌序列的量化水平，对人类对象的 CRC 和/或腺瘤性息肉进行早期检测、风险筛查和监控的方法，但是这种方法对结直肠癌的检测准确率和灵敏度较低。中国专利 CN110512015A，公开了一种肠癌生物标志物组合物及其应用，所述生物标志物组合物包括梭菌科、卟啉单胞菌属、消化链球菌属、具核梭杆菌和微单胞菌属。发明人采集大量结直肠癌和癌前病变（结直肠腺瘤和结直肠肿瘤性息肉）患者和健康个体的粪便样本，利用高通量测序、实时荧光定量 PCR、高分辨率熔解曲线法或生物芯片等方法，通过对粪便样本中微生物的丰度和相对含量差异进行对比分析和验证，确定了与结直肠癌和癌前病变相关的微生物，采用上述微生物的不同组合作为生物标志物组合物，通过检测生物标志物组合物在样本中的丰度，预测是否有结直肠癌发生。但是该方法检测特异性差。

本发明筛选了特定的肠道微生物作为用于结直肠癌早期诊断的生物标志物组合物，所述生物标志物组合物包括口炎消化链球菌 *Peptostreptococcus stomatis*，具核梭状杆菌 *Fusobacterium nucleatum*，微小微单胞菌 *Parvimonas micra*，双歧杆菌 *Bifidobacterium*；并通过上述微生物组合物的定量水平检测和粪便潜血实验结合，通过回归方程，用于结直肠癌的诊断结果，本发明利用基于高通量测序结果的特异性，并结合对结直肠癌进行早期诊断，灵敏度高和特异性强，能够避免肠镜侵入式检查导致的痛苦、不适及术后并发症，显著降低结直肠癌早期诊断的假阳性率，可以广泛用于结直肠癌的早期诊断。

发明内容

针对上述技术问题，本发明的目的在于提供一种结直肠癌生物标志物组合物，所述生物标志物组合物包括口炎消化链球菌 *Peptostreptococcus stomatis*，具核梭状杆菌 *Fusobacterium nucleatum*，微小微单胞菌 *Parvimonas micra*，双歧杆菌 *Bifidobacterium*。

本发明的另一目的在于提供一种检测结直肠癌的试剂盒，所述试剂盒包括生物标志物组合物的量化试剂，所述生物标志物组合物包括口炎消化链球菌

Peptostreptococcus stomatis, 具核梭状杆菌 *Fusobacterium nucleatum*, 微小微单胞菌 *Parvimonas micra*, 双歧杆菌 *Bifidobacterium*。

优选地, 所述量化试剂用于量化生物标志物组合物中的每一组分。

优选地, 所述量化试剂采用的原理为实时定量 PCR 法。

优选地, 所述量化试剂为实时定量 PCR 量化试剂。

优选地, 所述量化试剂包括用于生物标志物组合物的引物组。

优选地, 所述引物组包括用于扩增生物标志物组合物每一组分的引物对。

优选地, 所述引物组的核苷酸序列如 SEQ ID NO.1-8 所示。

优选地, 所述量化试剂还包括用于检测总菌的引物对。

优选地, 所述用于检测总菌的引物对的核苷酸序列如 SEQ ID NO.9-10 所示。

优选地, 所述量化试剂还包括实时定量 PCR 反应试剂。

优选地, 所述试剂盒还包括用于检测粪便中人血红蛋白的隐血检测试剂。

优选地, 所述隐血检测试剂包括稀释液和检测试纸。

本发明的另一目的在于提供一种上述试剂盒在结直肠癌早期诊断中的应用, 所述试剂盒用于检测结直肠癌时的步骤为: 检测权利要求 1 所述的生物标志物组合物中每一组分在样本中的丰度以及粪便隐血值, 再通过回归方程判断检测结果。以受试者粪便基因组 DNA 为模板, 采用试剂盒中的引物组检测生物标志物在样本中的丰度。

优选地, 所述试剂盒用于检测结直肠癌时, 包括以下步骤:

(1) 粪便隐血值测定: 采用粪便隐血检测试剂盒测定受试者粪便样品的隐血结果值 X_0 , 其中隐血结果为阳性时 $X_0=1$, 隐血结果为阴性时 $X_0=0$;

(2) 以受试者粪便基因组 DNA 为模板, 采用试剂盒中的引物组分别检测每个生物标志物的扩增值 $Ct_{\text{标志物}}$, 和总菌的扩增值 $Ct_{\text{总菌}}$;

(3) 根据回归方程计算出算 Y 值, 并将 Y 值带入公式 (II) 计算 P 值, 其中, e 为自然常数,

$$P = \frac{e^Y}{1+e^Y}$$

(II);

(5) 结果判定: 当 $P>0.5$, 结直肠癌诊断结果为阳性; 当 $P\leq 0.5$, 结直肠癌诊断结果为阴性。

优选地，所述步骤（4）中的回归方程为式（III）所示，

$$Y=A+\beta_0X_0+\beta_1X_1+\beta_2X_2+\beta_3X_3+\beta_4X_4$$

(III);

其中， X_0 为隐血结果值， X_1 为口炎消化链球菌 *Peptostreptococcus stomatis* 的 Ct 值， X_2 为具核梭状杆菌 *Fusobacterium nucleatum* 的 Ct 值， X_3 为微小微单胞菌 *Parvimonas micra* 的 Ct 值， X_4 为双歧杆菌 *Bifidobacterium* 的 Ct 值；A 和 β_0 - β_4 均为常数，A 和 β_0 - β_4 由临床实验数据获得。

优选地，所述步骤（4）中的回归方程包括式（IV）-式（VIII）中的任一种：

$$Y=-3.9583+3.1015X_0-0.6478X_1-0.3980X_2+0.2912X_3-0.5130X_4$$

(IV);

$$Y=-2.965+2.7005X_0-1.2309X_1-0.6054X_2+0.3328X_3-0.2359X_4$$

(V);

$$Y=-3.099+1.9907X_0-2.0011X_1-0.3290X_2+0.5476X_3-0.6620X_4$$

(VI);

$$Y=-3.771+4.0089X_0-0.9983X_1-0.4482X_2+0.1288X_3-0.4917X_4$$

(VII);

$$Y=-2.9043+2.8920X_0-0.5471X_1-0.1049X_2+0.2281X_3-0.6194X_4$$

(VIII)。

优选地，所述步骤（4）中的回归方程为：

$$Y=-2.965+2.7005X_0-1.2309X_1-0.6054X_2+0.3328X_3-0.2359X_4。$$

优选地，所述试剂盒还包括 DNA 提取试剂。

本发明的有益效果是：①本发明提供了一种用于结直肠癌早期诊断的生物标志物组合物，及用于定量检测所述生物标志物组合物的引物对和试剂盒；②本发明利用基于高通量测序结果的特异性，并结合粪便潜血实验对结直肠癌进行早期诊断，灵敏度高和特异性强，能够避免肠镜侵入式检查导致的痛苦、不适及术后并发症，显著降低结直肠癌早期诊断的假阳性率，实现了结直肠癌的无创诊断，还具有广泛的应用价值。

具体实施方式

以下的实施例便于更好地理解本发明，但并不限定本发明。下述实施例中的实验方法，如无特殊说明，均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料，如无特殊说明，均为市售。

术语“生物标志物”是指作为通常存在于身体样本中且可容易测定的物质的疾病标记物，所测量的量可以关联到潜在的疾病病理生理学，例如 CRC 的存在或不存在。

术语“量化”是指量化样本中的特定核酸序列的量的能力，用于测定目标核酸序列的量的分子生物学方法包括但不限于终点 PCR、竞争 PCR、逆转录酶 PCR (RT-PCR)、定量 PCR (qPCR)、PCR-ELISA、DNA 微阵列等。

术语“量化水平”可以是浓度（每单位体积的 DNA 量），每细胞数量的 DNA 量，循环阈值（Ct 值）。在以下一个优选的实施例中，所述细菌序列的量化通过 qPCR 进行；在以下一个更优选的实施例中，所述细菌序列的定量是通过 qPCR 进行，且量化等级是 Ct 值。Ct 值是指每个反应管内的荧光信号到达设定的域值时所经历的 qPCR 循环数。Ct 水平与样本中的目标核酸的量化成反比，即，Ct 水平越低，样本中目标核酸的量越大。

样本中目标核酸序列丰度的定量可以是绝对或相对的。相对定量是基于一个或多个内部参照基因，即来自参照菌株的 16S rRNA 基因，如使用通用引物测定总细菌数并将该目标核酸序列的丰度表达为细菌百分比；绝对定量通过与 DNA 标准比较得到目标分子的确切数目。

术语“引物”是指可在扩增方法例如聚合酶链式反应（PCR）中使用以扩增核苷酸序列的寡核苷酸。引物是基于特定目标序列的多核苷酸序列。

在一个具体实施例中，使用灵敏度、特异性、准确性及其他组合用来描述本发明所述检测方法的良好性和可靠性。与灵敏度、特异性、准确性的描述一起使用的若干术语包括：真阳性（TP）、真阴性（TN）、假阳性（FP）、假阴性（FN）；其中，如果证明患者患有疾病，且给定的筛查实验也表明该疾病的存在，则测试结果被认为是真阳性；如果证明患者未患有疾病，且给定的筛查实验也表明该疾病不存在，则测试结果被认为是真阴性；如果筛查实验的结果表明实际上未患有疾病的患者患有该疾病，则测试结果为假阳性；如果筛查实验的结果表明实际上患有疾病的患者未患有该疾病，则测试结果为假阴性。

灵敏度=TP/(TP+FN)=真阳性评估的数量/所有阳性评估的数量;

特异性=TN/(TN+FP)=真阴性评估的数量/所有阴性评估的数量;

准确度=(TN+TP)/(TN+TP+FN+FP)=正确评估数/所有评估的数量。

实施例 1 引物组的设计

分别针对口炎消化链球菌 *Peptostreptococcus stomatis*、具核梭状杆菌 *Fusobacterium nucleatum*、微小微单胞菌 *Parvimonas micra*、双歧杆菌 *Bifidobacterium* 以及总菌设计引物对如下 (1) - (5) 所示:

引物对 (1): 上游引物 5-AAGTGTTAGCGGTATAGGATG-3; 下游引物 5-CGTGTCTCAGTTCCAATGT-3;

引物对 (2): 上游引物 5-GGATTTATTGGGCGTAAAGC-3; 下游引物 5-GGCATTCCTACAAATATCTACGAA-3;

引物对 (3): 上游引物 5-GCGTAGATATTAGGAGGAATAC-3; 下游引物 5-GCGGAATGCTTAATGTGTT-3;

引物对 (4): 上游引物 5-CATCGCTTAACGGTGGAT-3-3; 下游引物 5-TTCGCCATTGGTGTCTT-3;

引物对 (5): 上游引物 5-GCAGGCCTAACACATGCAAGTC-3; 下游引物 5-CTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3。

实施例 2 试剂盒的制备和使用方法

2.1 试剂盒 1

一种检测结直肠癌的试剂盒,所述试剂盒包括生物标志物组合物口炎消化链球菌 *Peptostreptococcus stomatis*, 具核梭状杆菌 *Fusobacterium nucleatum*, 微小微单胞菌 *Parvimonas micra*, 双歧杆菌 *Bifidobacterium* 的量化试剂、反应缓冲体系、Mix、ROX 和 RNase-free ddH₂O, 所述量化试剂包括用于检测所述生物标志物组合物的引物组, 所述引物组如实施例 1 中的引物对 (1) - (4) 所示, 以及用于检测总菌 *Total bacteria* 的引物对, 所述引物对如实施例 1 中的引物对 (5) 所示。

使用方法: 提取受试者粪便基因组 DNA, 并以为粪便基因组 DNA 模板, 采用上述引物对 (1) - (5) 检测生物标志物在样本中的丰度; 根据生物标志物在样本中的丰度判断是否患有结直肠癌。

2.2 试剂盒 2

一种检测结直肠癌的试剂盒,所述试剂盒包括生物标志物组合物口炎消化链球菌 *Peptostreptococcus stomatis*, 具核梭状杆菌 *Fusobacterium nucleatum*, 微小微单胞菌 *Parvimonas micra*, 双歧杆菌 *Bifidobacterium* 的量化试剂和隐血检测试剂;所述量化试剂包括引物组、反应缓冲体系、Mix、ROX 和 RNase-free ddH₂O, 所述引物组如实施例 1 中的引物对(1)-(4)所示,以及用于检测总菌 Total bacteria 的引物对,所述引物对如实施例 1 中的引物对(5)所示;所述隐血检测试剂包括稀释液和检测试纸。

使用方法:

(1) 粪便隐血值测定:采用粪便隐血检测试剂盒测定受试者粪便样品的隐血结果值 X_0 , 其中隐血结果为阳性时 $X_0=1$, 隐血结果为阴性时 $X_0=0$;

(2) 以受试者粪便基因组 DNA 为模板,采用试剂盒中的引物组分别检测每个生物标志物的扩增值 $Ct_{\text{标志物}}$, 和总菌的扩增值 $Ct_{\text{总菌}}$;

(3) 根据回归方程 $Y=A+\beta_0X_0+\beta_1X_1+\beta_2X_2+\beta_3X_3+\beta_4X_4$ (III), 计算出 Y 值, 并将 Y 值带入公式 (II) 计算 P 值, 其中, e 为自然常数,

$$P = \frac{e^Y}{1+e^Y}$$

(II);

(4) 结果判定:当 $P>0.5$, 结直肠癌诊断结果为阳性;当 $P\leq 0.5$, 结直肠癌诊断结果为阴性。

其中回归方程 $Y=A+\beta_0X_0+\beta_1X_1+\beta_2X_2+\beta_3X_3+\beta_4X_4$ (III) 中, X_0 为隐血结果值, X_1 为口炎消化链球菌 *Peptostreptococcus stomatis* 的 Ct 值, X_2 为具核梭状杆菌 *Fusobacterium nucleatum* 的 Ct 值, X_3 为微小微单胞菌 *Parvimonas micra* 的 Ct 值, X_4 为双歧杆菌 *Bifidobacterium* 的 Ct 值; A 和 β_0 - β_4 均为常数并且由临床实验数据分析获得;

根据临床实验分析,所述回归方程可以为下式(IV)-式(VIII)中的任一种:

$$Y = -3.9583 + 3.1015X_0 - 0.6478X_1 - 0.3980X_2 + 0.2912X_3 - 0.5130X_4$$

(IV);

$$Y = -2.965 + 2.7005X_0 - 1.2309X_1 - 0.6054X_2 + 0.3328X_3 - 0.2359X_4$$

(V);

$$Y = -3.099 + 1.9907X_0 - 2.0011X_1 - 0.3290X_2 + 0.5476X_3 - 0.6620X_4$$

(VI);

$$Y = -3.771 + 4.0089X_0 - 0.9983X_1 - 0.4482X_2 + 0.1288X_3 - 0.4917X_4$$

(VII);

$$Y = -2.9043 + 2.8920X_0 - 0.5471X_1 - 0.1049X_2 + 0.2281X_3 - 0.6194X_4$$

(VIII)。

2.3 试剂盒 3

一种检测结直肠癌的试剂盒，所述试剂盒包括生物标志物组合物口炎消化链球菌 *Peptostreptococcus stomatis*，具核梭状杆菌 *Fusobacterium nucleatum*，微小微单胞菌 *Parvimonas micra*，双歧杆菌 *Bifidobacterium* 的量化试剂、隐血检测试剂和 DNA 提取试剂；所述量化试剂包括引物组、反应缓冲体系、Mix、ROX 和 RNase-free ddH₂O，所述引物组如实施例 1 中的引物对 (1) - (4) 所示，以及用于检测总菌的引物对，所述引物对如实施例 1 中的引物对 (5) 所示；所述试剂盒还包括；所述隐血检测试剂包括稀释液和检测试纸。

使用方法：

(1) 粪便隐血值测定：采用粪便隐血检测试剂盒测定受试者粪便样品的隐血结果值 X_0 ，其中隐血结果为阳性时 $X_0 = 1$ ，隐血结果为阴性时 $X_0 = 0$ ；

(2) 以受试者粪便基因组 DNA 为模板，采用试剂盒中的引物组分别检测每个生物标志物的扩增值 $Ct_{\text{标志物}}$ ，和总菌的扩增值 $Ct_{\text{总菌}}$ ；

(3) 根据回归方程 $Y = A + \beta_0 X_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4$ (III)，计算出 Y 值，并将 Y 值带入公式 (II) 计算 P 值，其中， e 为自然常数，

$$P = \frac{e^Y}{1 + e^Y}$$

(II)；

(4) 结果判定：当 $P > 0.5$ ，结直肠癌诊断结果为阳性；当 $P \leq 0.5$ ，结直肠癌诊断结果为阴性。

其中回归方程 $Y = A + \beta_0 X_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4$ (III) 中， X_0 为隐血结果值， X_1 为口炎消化链球菌 *Peptostreptococcus stomatis* 的 Ct 值， X_2 为具核梭状杆菌 *Fusobacterium nucleatum* 的 Ct 值， X_3 为微小微单胞菌 *Parvimonas micra* 的 Ct 值， X_4 为双歧杆菌 *Bifidobacterium* 的 Ct 值； A 和 $\beta_0 - \beta_4$ 均为常数并且由临床

实验数据分析获得：

根据临床实验分析，所述回归方程可以为下式（IV）-式（VIII）中的任一种：

$$Y=-3.9583+3.1015X_0-0.6478X_1-0.3980X_2+0.2912X_3-0.5130X_4$$

（IV）；

$$Y=-2.965+2.7005X_0-1.2309X_1-0.6054X_2+0.3328X_3-0.2359X_4$$

（V）；

$$Y=-3.099+1.9907X_0-2.0011X_1-0.3290X_2+0.5476X_3-0.6620X_4$$

（VI）；

$$Y=-3.771+4.0089X_0-0.9983X_1-0.4482X_2+0.1288X_3-0.4917X_4$$

（VII）；

$$Y=-2.9043+2.8920X_0-0.5471X_1-0.1049X_2+0.2281X_3-0.6194X_4$$

（VIII）。

实施例 3 结直肠癌诊断

选取患有结直肠癌和腺瘤息肉患者 40 例和健康人 18 例，使用本发明提供的试剂盒对上述病例进行筛查，并根据检测结果，判断本发明提供的试剂盒用于结直肠癌检测的灵敏度、特异性和准确度。

1. 粪便样品采集

准备两支采样管，标记为 a 管与 b 管，使用采样管采集受试患者的粪便 1 平勺，约 0.25ml，2g；

2. 粪便隐血检测

取上述 a 管，依照粪便隐血检测试（胶体金法）剂盒说明，在自动粪便处理分析系统上进行粪便隐血检测，其中质控线条带与检测线条带均为阳性，则为阳性结果，记为 $X_0=1$ ；质控线条带阳性，检测线条带阴性，则为阴性结果，记为 $X_0=0$ 。

3. 粪便生物标志物检测

3.1 粪便基因组 DNA 提取

（1）称取上述 b 管中的粪便样本 180-220mg 至 2ml 离心管中，根据基因组提取试剂及说明提取基因组 DNA：

(2) 称取粪便样本 180-220mg (如果是液态样本则转移 200 μ l 至离心管中) 至 2ml 离心管中, 并将管子置于冰上;

(3) 向样本中加入 500 μ l 葡萄糖及 EDTA 缓冲液, 100 μ l 裂解液, 15 μ l Proteinase K, 0.25g 的研磨珠, 间歇振荡 1min 至样本充分混匀; 95 $^{\circ}$ C 孵育 15min, 孵育期间震荡 2-3 次;

(4) 涡旋 15s, 12,000rpm 离心 3min, 转移上清液至新的离心管中, 加入 10 μ l 的 RNase A, 震荡混匀后室温放置 5min;

(5) 加入 200 μ l NaOH-SDS 缓冲液, 震荡混匀, 置冰上 5min; 12,000rpm 离心 3min, 将所得上清液转移至新的 1.5ml 离心管, 加入等体积醋酸钠溶液, 并加入到一个吸附柱 CR2 中 (吸附柱放入收集管中), 12,000rpm 离心 30s, 倒掉废液, 将吸附柱 CR2 放入收集管中;

(6) 向吸附柱 CR2 中加入 500 μ l 无水乙醇, 12,000rpm 离心 30s, 倒掉废液, 将吸附柱 CR2 放入收集管中; 向吸附柱 CR2 中加入 700 μ l 漂洗液, 12,000rpm 离心 30s, 倒掉废液, 吸附柱 CR2 放入收集管中, 重复操作;

(7) 将吸附柱 CR2 放回收集管中, 12,000rpm 离心 2min, 倒掉废液, 将吸附柱 CR2 置于室温放置数分钟, 以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液;

(8) 用紫外分光光度计检测浓度与纯度, 其中 OD260/OD280 比值应为 1.7-1.9, 确保提取的 DNA 无污染, 浓度 $\geq$ 50ng/ μ L 为最佳, 即获得粪便基因组 DNA。

3.2 实时 qPCR 检测

(1) Real Time PCR 反应液的配制: 冰上进行反应液的配制, 每 10 μ L 的反应体系含 5 μ L, 2 $\times$ Mix; 0.3 μ L, 上游引物; 0.3 μ L, 下游引物; 0.2 μ L, 50 $\times$ ROX; 3.2 μ L, RNase-free ddH₂O; 20ng, 基因组 DNA (构建标曲时分别添加 40、20、10、5 ng 基因组 DNA);

(2) 在 qPCR 仪上进行实验, 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C, 15 min; 45 个循环 (95 $^{\circ}$ C, 10 s; 58/60 $^{\circ}$ C, 60 s 或者 95 $^{\circ}$ C, 10 s; 58/60 $^{\circ}$ C 20s, 72 $^{\circ}$ C 30 s); 1.6 $^{\circ}$ C/s (95 $^{\circ}$ C, 15s; 60 $^{\circ}$ C, 60s)。其中, 所述引物对 (1) 56 $^{\circ}$ C 退火温度, 两步法; 所述引物对 (2) 58 $^{\circ}$ C 退火温度, 两步法; 所述引物对 (3) 56 $^{\circ}$ C 退火温度, 三步法; 所述引物对 (4) 60 $^{\circ}$ C 退火温度, 三步法; 所述引物对 (5) 60 $^{\circ}$ C 退火温度, 两步法。

(3) 绘制标准曲线, 按效率=10(-1/斜率)-1 计算扩增效率, 90%~110%合格;

(4) 根据上述步骤进行样本实验, 记录上述生物标志物相应的引物扩增值 $Ct_{\text{标志物}}$, 及总菌的引物扩增值 $Ct_{\text{总菌}}$, 计算每个生物标志物的循环值 Ct , 其中所述 $Ct = \lg(2^{(Ct_{\text{总菌}} - Ct_{\text{标志物}})})$ 。

4. 诊断结果判定

通过下述公式得到 P 值, 当 $P > 0.5$, 判定结果为阳性; 当 $P \leq 0.5$, 判定结果为阴性。

$$P = \frac{e^Y}{1 + e^Y}$$

其中 $Y = -3.9583 + 3.1015X_0 - 0.6478X_1 - 0.3980X_2 + 0.2912X_3 - 0.5130X_4$, X_0 为隐血结果值, X_1 为口炎消化链球菌 *Peptostreptococcus stomatis* 的 Ct 值, X_2 为具核梭状杆菌 *Fusobacterium nucleatum* 的 Ct 值, X_3 为微小微单胞菌 *Parvimonas micra* 的 Ct 值, X_4 为双歧杆菌 *Bifidobacterium* 的 Ct 值。

当 $P > 0.5$, 判定结果为阳性, 即确定患有结直肠癌; 当 $P \leq 0.5$, 判定结果为阴性, 即确定不患有结直肠癌。

5 结果分析

实验结果表明, 以发明所述的试剂盒用于结直肠癌诊断, 具有较高的准确率、特异性和灵敏度。

上述说明是针对本发明较佳可行实施例的详细说明, 但实施例并非用以限定本发明的专利申请范围, 凡本发明所提示的技术精神下所完成的同等变化或修饰变更, 均应属于本发明所涵盖专利范围。

权利要求书

1. 一种结直肠癌生物标志物组合物，其特征在于，所述生物标志物组合物包括口炎消化链球菌 *Peptostreptococcus stomatis*，具核梭状杆菌 *Fusobacterium nucleatum*，微小微单胞菌 *Parvimonas micra*，双歧杆菌 *Bifidobacterium*。
2. 一种检测结直肠癌的试剂盒，其特征在于，所述试剂盒包括权利要求 1 所述生物标志物组合物的量化试剂，所述量化试剂用于量化权利要求 1 所述的生物标志物组合物中的每一组分。
3. 如权利要求 2 所述的试剂盒，其特征在于，所述量化试剂采用的原理为实时定量 PCR 法。
4. 如权利要求 3 所述的试剂盒，其特征在于，所述量化试剂包括用于扩增权利要求 1 所述生物标志物组合物的引物组，所述引物组包括用于扩增权利要求 1 所述生物标志物组合物每一组分的引物对。
5. 如权利要求 4 所述的试剂盒，其特征在于，所述引物组的核苷酸序列如 SEQ ID NO.1-8 所示。
6. 如权利要求 5 所述的试剂盒，其特征在于，所述量化试剂还包括用于扩增总菌的引物对。
7. 如权利要求 6 所述的试剂盒，其特征在于，所述用于扩增总菌的引物对的核苷酸序列如 SEQ ID NO.9-10 所示。
8. 如权利要求 7 所述的试剂盒，其特征在于，所述量化试剂还包括实时定量 PCR 反应试剂。
9. 如权利要求 2-8 任一所述的试剂盒，其特征在于，所述试剂盒还包括用于检测粪便中人血红蛋白的隐血检测试剂。
10. 如权利要求 9 所述的试剂盒在结直肠癌早期诊断中的应用，其特征在于，所述试剂盒用于检测结直肠癌时的步骤为：检测权利要求 1 所述的生物标志物组合物中每一组分在样本中的丰度以及粪便隐血值，再通过回归方程判断检测结果。
11. 如权利要求 10 所述的试剂盒在结直肠癌早期诊断中的应用，其特征在于，所述试剂盒用于检测结直肠癌时，包括以下步骤：
 - (1) 粪便隐血值测定：采用粪便隐血检测试剂盒测定受试者粪便样品的隐血结果值 X_0 ，其中隐血结果为阳性时 $X_0=1$ ，隐血结果为阴性时 $X_0=0$ ；

(2) 以受试者粪便基因组 DNA 为模板, 采用试剂盒中的量化试剂分别检测每个生物标志物的扩增值 $Ct_{\text{标志物}}$, 和总菌的扩增值 $Ct_{\text{总菌}}$;

(3) 根据公式 (I) 分别确定样本中生物标志物组合物中每一组分在总菌中的相对含量 Ct 值,

$$Ct = \lg(2^{(Ct_{\text{标志物}} - Ct_{\text{总菌}})})$$

(I);

(4) 根据回归方程计算出 Y 值, 并将 Y 值带入公式 (II) 计算 P 值, 其中, e 为自然常数,

$$P = \frac{e^Y}{1 + e^Y}$$

(II);

(5) 结果判定: 当 $P > 0.5$, 结直肠癌诊断结果为阳性; 当 $P \leq 0.5$, 结直肠癌诊断结果为阴性。

12. 如权利要求 11 所述的应用, 其特征在于, 所述步骤 (4) 中的回归方程为式 (III) 所示,

$$Y = A + \beta_0 X_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4$$

(III);

其中, X_0 为隐血结果值, X_1 为口炎消化链球菌 *Peptostreptococcus stomatis* 的 Ct 值, X_2 为具核梭状杆菌 *Fusobacterium nucleatum* 的 Ct 值, X_3 为微小微单胞菌 *Parvimonas micra* 的 Ct 值, X_4 为双歧杆菌 *Bifidobacterium* 的 Ct 值; A 和 β_0 - β_4 均为常数, A 和 β_0 - β_4 由临床实验数据获得。

13. 如权利要求 12 所述的应用, 其特征在于, 所述步骤 (4) 中的回归方程包括式 (IV) - 式 (VIII) 中的任一种:

$$Y = -3.9583 + 3.1015X_0 - 0.6478X_1 - 0.3980X_2 + 0.2912X_3 - 0.5130X_4$$

(IV);

$$Y = -2.965 + 2.7005X_0 - 1.2309X_1 - 0.6054X_2 + 0.3328X_3 - 0.2359X_4$$

(V);

$$Y = -3.099 + 1.9907X_0 - 2.0011X_1 - 0.3290X_2 + 0.5476X_3 - 0.6620X_4$$

(VI);

$$Y = -3.771 + 4.0089X_0 - 0.9983X_1 - 0.4482X_2 + 0.1288X_3 - 0.4917X_4$$

(VII);

$$Y=-2.9043+2.8920X_0-0.5471X_1-0.1049X_2+0.2281X_3-0.6194X_4$$

(VIII)。