

一种癌症筛检的方法

技术领域

本发明涉及一种癌症筛检的方法 III。

5

背景技术

子宫颈癌是全球及台湾女性主要的死因之一，根据 2002 年世界卫生组织(WHO)的统计，子宫颈癌为全球女性癌症死因的第二位，仅次于乳癌；定期接受子宫颈癌筛检是预防子宫颈癌的最佳方法，现有子宫颈癌筛检的方式主要有两种，一是最常见的子宫颈抹片检查(Pap smear)，另一则为人类乳突病毒检验(HPV testing)；子宫颈抹片检查是取出子宫颈部的分泌物，以显微镜观察其中脱落的上皮细胞中，是否有癌病变产生，以早期侦测子宫颈癌；而 HPV 检验则是以聚合酶连锁反应(polymerase chain reaction, RT-PCR)或 Hybrid Capture 的方式检查样本中是否存在有人类乳突病毒(human papilloma virus, HPV)的存在。

15 然而，由于子宫颈抹片检查(Pap smear)需要靠医师取样、检验师/病理医师判读抹片，除了容易产生高伪阴性率(High false negative rate)而延迟癌前病变的诊断与治疗之外，再者，所需的人力素质与成本太高，这对许多发展中的国家来说，有推广上的困难；另一方面，人类乳突病毒检验(HPV testing)虽具有高敏感度，但却容易造成高伪阳性率(High false positive rate)，不仅让病患白白担心，也会浪费许多医疗资源在伪阳性患者的追踪检查上；因此，如何提高子宫颈癌检验方法的准确性及方便性，是推广子宫颈癌检验的重要课题之一。

基因的缺失(genomic deletions)被认为是肿瘤形成的重要因素，长久以来，我们都习惯了基因组中的编码是仰赖 ATCG 四个碱基排列的观念，Knudson 早在 1975 年即提出双重受创理论(two-hit theory)，指出一些同源肿瘤抑制基因伴随的突变或缺失可能造成或易造成癌症的发生；然而，其它影响表现型(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的启动子附近被发现。胞嘧啶的甲基化发生在 DNA 合成后，自甲基捐赠者 s-腺核苷甲硫胺酸(S-adenosylmethionine, SAM)将甲基经酵素转移到胞嘧啶第 5 个碳的位置上，该酵素反应

30

是由 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, 是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。

5 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
10 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。

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
15 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
20 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。

由此可见, 上述现有子宫颈癌筛检方法仍有诸多缺失, 实非良善的设计, 而亟待加以改良。

本案发明人先前已于中国台湾(TW Pat. Pub. No. 200831900、TW Pat. Pub. No.
25 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)提出相关专利申请(下称前案), 本案一种癌症筛检的方法 III 是为前案的延伸, 本案发明人发现新颖的癌症筛检生物指标及其筛检的方法。

30 发明内容

本发明的目的即在于提供一种子宫颈癌筛检的方法, 以作为第一线子宫颈癌的筛检

(cancer screen)。

本发明的次一目的在于提供一种子宫颈癌筛检的方法，该方法除了可作为第一线子宫颈癌的筛检之外，亦可作为第二线子宫颈癌的筛检，辅助人类乳突病毒检验 (HPV testing) 或不确定的抹片结果，以达到更准确的子宫颈癌筛检效果。

- 5 本发明的另一目的在于提供一种癌症筛检的方法，该方法除可应用在子宫颈癌的检测上，亦可应用于其它癌症 (如：卵巢癌、肝癌、大肠癌、乳癌、口腔癌、子宫内膜癌及恶性肉瘤) 的检测，以辅助异常检体的判断。

可达成上述发明目的的一种癌症筛检的方法，是检测受测检体细胞中目标基因甲基化的状态，以作为癌症有无的筛检指标，该方法包含下列步骤：

- 10 步骤 1：提供受测检体；

步骤 2：检测该受测检体的基因组 DNA 中至少一个目标基因的 CpG 序列甲基化状态，该目标基因选自 ADRA1D、AJAP1、HS3ST2、MAGI2、POU4F2、POU4F3、PTGDR、SOX17 以及 SYT9 的至少一个；以及

- 步骤 3：根据该目标基因甲基化状态的有无，判断该检体是否具有癌症或癌前病变，
15 或作为治疗预后的指标。

其中该受测检体为子宫颈抹片、卵巢癌组织、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。

- 其中该目标基因的 CpG 序列甲基化状态检测方法包含但不限于甲基化特异性聚合酶连锁反应 (methylation-specific PCR, MSP)、定量甲基化特异性聚合酶连锁反应
20 (quantitative methylation-specific PCR, QMSP)、亚硫酸盐定序 (bisulfite sequencing, BS)、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) 等。

其中该目标基因 ADRA1D 具有如 SEQ ID No: 1 所示的核苷酸序列。

其中该目标基因 AJAP1 具有如 SEQ ID No: 2 所示的核苷酸序列。

- 25 其中该目标基因 HS3ST2 具有如 SEQ ID No: 3 所示的核苷酸序列。

其中该目标基因 MAGI2 具有如 SEQ ID No: 4 所示的核苷酸序列。

其中该目标基因 POU4F2 具有如 SEQ ID No: 5 所示的核苷酸序列。

其中该目标基因 POU4F3 具有如 SEQ ID No: 6 所示的核苷酸序列。

其中该目标基因 PTGDR 具有如 SEQ ID No: 7 所示的核苷酸序列。

- 30 其中该目标基因 SOX17 具有如 SEQ ID No: 8 所示的核苷酸序列。

其中该目标基因 SYT9 具有如 SEQ ID No: 9 所示的核苷酸序列。

其中该目标基因 ADRA1D 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 10-11 所示的核苷酸序列的引子对侦测的。

其中该目标基因 AJAP1 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 12-13 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的。

5 其中该目标基因 HS3ST2 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 14-15 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的。

其中该目标基因 MAGI2 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 16-17 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的。

10 其中该目标基因 POU4F2 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 18-19 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的。

其中该目标基因 POU4F3 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 20-21 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的。

其中该目标基因 PTGDR 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 22-23 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的。

15 其中该目标基因 SOX17 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 24-25 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的。

其中该目标基因 SYT9 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 26-27 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的。

20 其中该引子包含至少有 80% 的序列同一性、互补性或至少连续十个核苷酸相同的序列。此外, 前述筛检指标及筛检方法进一步可用于子宫颈癌、卵巢癌、肝癌、大肠癌、乳腺癌、口腔癌、子宫内膜癌或恶性肉瘤的筛检。

术语「受测检体」是指离体的受测样本, 该样本包括前述的子宫颈抹片、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是用于检测该些离体样本中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
25 研究人员于实验室中进行检测。

术语「指针基因」是指 CpG 序列甲基化的目标基因, 检测受测检体细胞中目标基因甲基化的状态以作为癌症有无的筛检指标。

本发明所提供的癌症筛检的方法, 与前述现有技术相互比较时, 更具有下列的优点:

30 1. 本发明所提供的癌症筛检的方法是以离体的检体中特定基因的甲基化程度作为癌症有无的筛检指标, 与现有子宫颈抹片及人类乳突病毒检验 (HPV testing) 方法比较, 本发

明的癌症筛检方法的敏感性及专一性均较前述两者高。

2. 本发明所提供的癌症筛检的方法除可应用在子宫颈癌的检测上, 亦可应用于其它癌症(如: 卵巢癌、肝癌、大肠癌、乳癌、口腔癌、子宫内膜癌及恶性肉瘤)的检测, 以辅助异常检体的判断。

5

附图说明

图 1 为本发明癌症筛检方法所使用的目标基因 ADRA1D, 在各类正常与罹癌的(A)子宫颈、(B)卵巢肿瘤、(C)肝、(D)大肠、(E)乳房以及(F)口腔组织样本中, 进行亚硫酸盐定序(BS)分析甲基化程度的结果。

10

图 2 为本发明癌症筛检方法所使用的目标基因 AJAP1, 在各类正常与罹癌的(A)子宫颈、(B)卵巢肿瘤、(C)大肠、(D)乳房、(E)口腔以及(F)子宫内膜组织样本中, 进行亚硫酸盐定序(BS)分析甲基化程度的结果。

图 3 为本发明癌症筛检方法所使用的目标基因 HS3ST2, 在各类正常与罹癌的(A)子宫颈、(B)卵巢肿瘤、(C)大肠、(D)乳房、(E)口腔以及(F)子宫内膜组织样本中, 进行亚硫酸盐定序(BS)分析甲基化程度的结果。

图 4 为本发明癌症筛检方法所使用的目标基因 MAGI2, 在各类正常与罹癌的(A)子宫颈、(B)卵巢肿瘤、(C)大肠、(D)乳房、(E)口腔、(F)子宫内膜以及(G)恶性肉瘤组织样本中, 进行亚硫酸盐定序(BS)分析甲基化程度的结果。

图 5 为本发明癌症筛检方法所使用的目标基因 POU4F2, 在各类正常与罹癌的(A)子宫颈、(B)卵巢肿瘤、(C)肝、(D)大肠、(E)乳房、(F)口腔以及(G)子宫内膜组织样本中, 进行亚硫酸盐定序(BS)分析甲基化程度的结果。

图 6 为本发明癌症筛检方法所使用的目标基因 POU4F3, 在各类正常与罹癌的(A)子宫颈、(B)卵巢肿瘤、(C)大肠、(D)乳房、(E)子宫内膜以及(F)恶性肉瘤组织样本中, 进行亚硫酸盐定序(BS)分析甲基化程度的结果。

图 7 为本发明癌症筛检方法所使用的目标基因 PTGDR, 在各类正常与罹癌的(A)子宫颈、(B)卵巢肿瘤、(C)肝、(D)乳房、(E)口腔以及(F)子宫内膜组织样本中, 进行亚硫酸盐定序(BS)分析甲基化程度的结果。

图 8 为本发明癌症筛检方法所使用的目标基因 SOX17, 在各类正常与罹癌的(A)子宫颈、(B)肝、(C)大肠以及(D)乳房组织样本中, 进行亚硫酸盐定序(BS)分析甲基化程度的结果。

图 9 为本发明癌症筛检方法所使用的目标基因 SYT9, 在各类正常与罹癌的(A)子宫颈、(B)肝、(C)大肠、(D)乳房、(E)口腔以及(F)子宫内膜组织样本中, 进行亚硫酸盐定序(BS)

30

分析甲基化程度的结果。

具体实施方式

本发明将就下列实施例作进一步说明，然该等实施例仅为例示说明之用，而不应被解释为
5 实施本发明的限制。

实施例 1 材料与方法

一、材料

试验材料包含一系列完整的子宫颈病变样本，包括：鳞状细胞癌(squamous cell carcinoma, SCC)、腺癌(adenocarcinoma, AC)，以及正常子宫颈样本。所有的子宫颈样
10 本(SCC + AC, n=20; normal, n=20)、卵巢样本(cancer of ovary, n=19; normal, n=14)、
大肠样本(Ca of colon, n=18; normal, n=18)、肝组织样本(HCC, n=18; normal, n=18)、
口腔样本(oral Ca, n=20; normal, n=19)、子宫内膜癌样本(endometrial Ca, n=20; normal,
n=20)、乳房组织样本(cancer of breast, n=17; normal, n=17)、恶性肉瘤样本(sarcoma,
n=18; normal, n=16)均取自台北三军总医院，各样本的基因组 DNA (genomic DNA)以 QIAamp
15 DNA 套组(QIAGEN)抽取，再以 Millipore 公司出产的 DNA 修饰套组(CpGenome™ DNA
Modification Kit, Millipore, Temecula, CA)进行亚硫酸盐修饰作用，并用以比对分析
全基因组中 DNA 甲基化的情形。

二、通过全基因组甲基化芯片(Illumina Infinium HumanMethylation27 BeadChip)
进行 DNA 甲基化分析

20 分别自癌组织样本与正常组织样本萃取 DNA，把萃取的 DNA 进行亚硫酸盐修饰作用
(Bisulfite modification)后并调整成同一浓度(ng/μl)，分别将浓度相同的癌组织样本
DNA 或正常组织细胞样本 DNA 各自混合成两组待测样品，于 Infinium HumanMethylation27
甲基化芯片(Illumina, San Diego, CA)分析全基因的甲基化程度，实验步骤依原厂操作
手册进行，以 Illumina 芯片扫描机(Bead Array reader)及 GenomeStudio 软件(Illumina)
25 分析芯片上各基因的甲基化程度。

Infinium HumanMethylation27 甲基化芯片含括 14,475 个基因，可检测这些基因共
27,578 个 CpG 位点的甲基化程度。CpG 位点甲基化程度的分析则是以「β 值」(β values)
的数值来呈现，每个 CpG 位点的 β 值介于 0 与 1 之间，0 代表无甲基化；而 1 则代表 100%
甲基化。

30 三、亚硫酸盐修饰作用(Bisulfite modification)、甲基化特异性定量聚合酶连锁反

应(quantitative methylation-specific PCR, qMSP)以及焦磷酸定序(pyrosequencing)使用 Millipore 公司出产的 DNA 修饰套组(CpGenome™ DNA Modification Kit, Millipore, Temecula, CA)进行亚硫酸盐修饰作用:取 1μg 样本的基因组 DNA (genomic DNA),以亚硫酸钠对基因组 DNA 进行化学修饰,在单链 DNA 中,所有非甲基化的胞嘧啶都会发生脱氨基作用而转变成尿嘧啶,而甲基化的胞嘧啶则不被修饰,仍保持 5-甲基胞嘧啶的状态;最后,将反应后的样本 DNA 溶于 70μl 55° C 的 TE 缓冲液(TE buffer)中,以进行甲基化特异性定量 PCR (qMSP)。

另取人类周围血(peripheral blood)的正常 DNA 进行亚硫酸盐修饰作用,以作为具有非甲基化启动子序列的对照组。

取 1μg 经过亚硫酸盐修饰作用后的样本基因组 DNA,以及对照组 DNA,以 qMSP 引子与探针进行甲基化特异性定量 PCR 分析,该 qMSP 引子和探针为可专一辨认甲基化基因序列,各目标基因的 qMSP 引子和探针序列如表 1 所示;甲基化特异性定量 PCR 反应物的总体积为 20μl,包含 1μl 已修饰过的模版 DNA、每一引子各 250 nM、荧光探针 225nM 以及 2X FastStart Universal Probe Master (Rox) (Roche);将混合好的反应物置于 ABI 7900HT Fast Real-Time PCR System 仪器,在 95°C 进行最初解离(denature)10 分钟,接着以 95°C 解离(denature)15 秒、60°C 黏合(annealing)与合成 1 分钟为循环,解离、黏合、合成步骤共重复 45 个循环,以 SDS 2.3 软件进行甲基化定量数据分析,设定软件 threshold = 0.128 与 baseline 介于 3 至 15 间。将内部对照基因 COL2A 与甲基化特异性基因的定量数据依甲基化索引(Methylation Index, Meth-Index)公式: $\left[\frac{100,00 \times 2^{-(\text{COL2A of Ct}) - (\text{Gene of Ct})}}{1} \right]$ 计算样品中目标基因的甲基化程度。

表 1 甲基化特异性 PCR (MSP)所使用的 MSP 引子的序列

基因名称	引子/探针种类	引子/探针序列
ADRA1D	M	正链(F') 5' ggtaggtagtttcggttttcgtagatgc 3' SEQ ID No: 10
		反链(R') 5' aaacacaaaacgaacgaccgaca 3' SEQ ID No: 11
AJAP1	M	正链(F') 5' tttaggtagagtttttcgattcggtagc 3' SEQ ID No: 12
		反链(R') 5' accgaaactccgcgcgcgataa 3' SEQ ID No: 13
HS3ST2	M	正链(F') 5' gtaagagtttgggagcggttcgagtc 3' SEQ ID No: 14
		反链(R') 5' caaaaaatcccgaacaacgac 3' SEQ ID No: 15

基因名称	引子/探针种类	引子/探针序列	
MAGI2	M	正链(F') 5' cgtagagttcgagatgtggtattaggc 3'	SEQ ID No: 16
		反链(R') 5' aaactcctatacgaaaaaacgcgcta 3'	SEQ ID No: 17
POU4F2	M	正链(F') 5' tactccccctcaaacttaaatectttc 3'	SEQ ID No: 18
		反链(R') 5' gcgggacgtttgcgaag 3'	SEQ ID No: 19
POU4F3	M	正链(F') 5' agcgcggggcgttgagtagc 3'	SEQ ID No: 20
		反链(R') 5' cgcgctcctaacaaaataacaacgaa 3'	SEQ ID No: 21
PTGDR	M	正链(F') 5' ttgtttcgcgttttttaagttagc 3'	SEQ ID No: 22
		反链(R') 5' aaaaaaactccgaaaacgacgaaat 3'	SEQ ID No: 23
SOX17*	M	正链(F') 5' ggagattcgcgtagttttcg 3'	SEQ ID No: 24
		反链(R') 5' aacccgaccatcaccgcg 3'	SEQ ID No: 25
SYT9	M	正链(F') 5' tggggtcgtcgttattttatatttc 3'	SEQ ID No: 26
		反链(R') 5' ccgcccgatccctccgtc 3'	SEQ ID No: 27

引子种类 M 代表可专一性辨认甲基化基因序列的 MSP 引子

使用焦磷酸定序分析目标基因片段的目的是精确定量目标基因 CpG 位点甲基化程度的百分比。进行焦磷酸定序之前，需先使用 PyroMark Assay Design 2.0 软件(QIAGEN)设计生物素(biotin)标记的引子，使用 PCR 反应扩增涵盖目标基因 CpG 位点的基因片段，再以焦磷酸定序检测目标基因 CpG 位点的甲基化百分比。首先将已经过亚硫酸盐修饰的子宫颈抹片细胞或组织样本 DNA 加入含有生物素(biotin)标记的引子对及 PyroMark PCR 套组(QIAGEN)的 PCR 反应溶液，经 PCR 反应扩增目标片段后，以 2.0%琼脂胶体确认 PCR 扩增片段是否正确，经 PyroMark Q24 Vacuum Workstation (QIAGEN)进行 DNA 样品的纯化与变性，加入定序引子后于 PyroMark Q24 System (QIAGEN)进行焦磷酸定序与甲基化分析。

10

实施例 2 甲基化目标基因的筛选

通过 Infinium HumanMethylation27K 甲基化芯片进行筛选 14,475 基因，

(1) 选择较高甲基化比率分数(β 值 >0.4 与 <0.4)、结合 Gene Expression 数据库(GEO7803)、以及基因丰富性分析(The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, DAVID) 筛选出 92 个基因；

15

(2) 癌细胞株(cancer cell line)经 5-AZC 与 TSA 处理样本, 以 QRT-PCR 分析这 92 个基因, 确认基因表现会受甲基化的影响, 剩下 61 个基因;

(3) 混合待测样本由 MSP 分析这 61 个基因中 DNA 甲基化, 剩下 26 个基因;

(4) 癌症试纸样本由 MSP 分析这 26 个基因中 DNA 甲基化, 剩下 21 个基因;

5 (5) 癌症组织由 MSP 分析这 21 个基因中 DNA 甲基化, 剩下 16 个基因;

(6) 癌症试纸样本由 Q-MSP 分析这 16 个基因中 DNA 甲基化, 剩下 14 个基因;

由焦磷酸定序来确认基因甲基化状态, 最后筛选出九个目标基因于癌细胞可能具有高度甲基化现象, 分别为 ADRA1D (SEQ ID No: 1)、AJAP1 (SEQ ID No: 2)、HS3ST2 (SEQ ID No: 3)、MAGI2 (SEQ ID No:4)、POU4F2 (SEQ ID No:5)、POU4F3 (SEQ ID No:6)、PTGDR (SEQ ID No:7)、SOX17 (SEQ ID No:8) 以及 SYT9 (SEQ ID No: 9), 其详细资料如表 3 所示; 由表 3 可知, 这九个基因除了 HS3ST2 已知与大肠癌、乳癌等可能有关, POU4F2 及 SOX17 已知乳癌及肝癌有关外, 目前很少有研究显示该些基因与子宫颈癌或其它癌症之间的关连。

15 表 3 以 Infinium HumanMethylation27K 甲基化芯片筛选出子宫颈癌或其它癌症中具甲基化的基因的详细资料

基因名称	UniGene 编号	染色体定位	基因全名	SEQ ID No
ADRA1D	NM_000678	20p13	alpha-1D-, receptor	SEQ ID No: 1
AJAP1	NM_018836	1p36.32	adherens junctions associated protein 1	SEQ ID No: 2
HS3ST2	NM_006043	16p12	heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 2	SEQ ID No: 3
MAGI2	NM_012301	7q21	membrane associated guanylate kinase, WW and PDZ domain containing 2	SEQ ID No: 4
POU4F2	NM_004575	4q31.2	POU class 4 homeobox 2	SEQ ID No: 5

基因名称	UniGene 编号	染色体定位	基因全名	SEQ ID No
POU4F3	NM_002700	5q32	POU class 4 homeobox 3	SEQ ID No: 6
PTGDR	NM_000953	14q22.1	prostaglandin D2 receptor	SEQ ID No: 7
SOX17	NM_022454	8q11.23	SRY (sex determining region Y)-box 17	SEQ ID No: 8
SYT9	NM_175733	11p15.4	synaptotagmin IX	SEQ ID No: 9

实施例3 子宫颈癌样本内目标基因的甲基化分析

以甲基化特异性 PCR (MSP) 分析该九个目标基因在子宫颈鳞状细胞癌样本中的甲基化状态, 结果显示, 于正常子宫颈样本 (SCC N) 中 ADRA1D、AJAP1、HS3ST2、MAGI2、POU4F2、POU4F3、PTGDR、SOX17 以及 SYT9 甲基化的程度 (中位数分别为 0.34、0.18、0.19、2.58、7.62、0.77、0.16、0.17 以及 0.31); 于子宫颈癌的样本 (SCC T) 中 ADRA1D、AJAP1、HS3ST2、MAGI2、POU4F2、POU4F3、PTGDR、SOX17 以及 SYT9 甲基化的程度 (中位数分别为 911.37、1558.97、1088.65、713.92、535.01、1552.71、305.84、248.29 以及 551.84)。这两组数据经过 Mann-Whitney test 分析后, 各组间都达到 $P < 0.0001$, 其差异在统计学上是具有显著差异的。以上如图 1(A)、图 2(A)、图 3(A)、图 4(A)、图 5(A)、图 6(A)、图 7(A)、图 8(A) 以及图 9(A) 所示。

实施例4 卵巢肿瘤样本内目标基因的甲基化分析

以甲基化特异性 PCR (MSP) 分析该七个目标基因在卵巢肿瘤样本中的甲基化状态, 结果显示, 于良性卵巢肿瘤样本 (ovary N) 中 ADRA1D、AJAP1、HS3ST2、MAGI2、POU4F2、POU4F3 以及 PTGDR 甲基化的程度 (中位数分别为 4.25、5.19、0.00、10.91、2.06、3.60 以及 1.57); 于恶性卵巢肿瘤的样本 (ovary T) 中 ADRA1D、AJAP1、HS3ST2、MAGI2、POU4F2、POU4F3 以及 PTGDR 甲基化的程度 (中位数分别为 13.62、10.76、114.38、33.08、4.28、21.97 以及 28.40)。这两组数据经过 Mann-Whitney test 分析后, 各组间都达到 $P < 0.05$, 其差异在统计学上是具有显著差异的。以上如图 1(B)、图 2(B)、图 3(B)、图 4(B)、图 5(B)、图

6(B) 以及图 7(B) 所示。

实施例 5 肝癌样本内目标基因的甲基化分析

以甲基化特异性 PCR (MSP) 分析该五个目标基因在肝癌样本中的甲基化状态, 结果显示, 于正常肝脏组织样本 (HCC N) 中 ADRA1D、POU4F2、PTGDR、SOX17 以及 SYT9 甲基化的程度 (中位数分别为 35.29、6.25、49.30、20.15 以及 19.70); 于肝癌的样本 (HCC T) 中 ADRA1D、POU4F2、PTGDR、SOX17 以及 SYT9 甲基化的程度 (中位数分别为 202.10、53.73、275.76、111.25 以及 154.65)。这两组数据经过 Mann-Whitney test 分析后, 各组间都达到 $P < 0.0001$, 其差异在统计学上是具有显著差异的。以上如图 1(C)、图 5(C)、图 7(C)、图 8(B) 以及图 9(B) 所示。

实施例 6 大肠癌样本内目标基因的甲基化分析

以甲基化特异性 PCR (MSP) 分析该八个目标基因在大肠癌样本中的甲基化状态, 结果显示, 于正常大肠组织样本 (colon N) 中 ADRA1D、AJAP1、HS3ST2、MAGI2、POU4F2、POU4F3、SOX17 以及 SYT9 甲基化的程度 (中位数分别为 59.21、228.97、292.95、123.44、591.64、249.72、80.12 以及 52.63); 于大肠癌的样本 (colon T) 中 ADRA1D、AJAP1、HS3ST2、MAGI2、POU4F2、POU4F3、SOX17 以及 SYT9 甲基化的程度 (中位数分别为 83.47、2312.91、2301.12、799.41、1615.48、1058.53、751.06 以及 601.65)。这两组数据经过 Mann-Whitney test 分析后, 各组间都达到 $P < 0.05$, 其差异在统计学上是具有显著差异的。以上如图 1(D)、图 2(C)、图 3(C)、图 4(C)、图 5(D)、图 6(C)、图 8(C) 以及图 9(C) 所示。

实施例 7 乳癌样本内目标基因的甲基化分析

以甲基化特异性 PCR (MSP) 分析该九个目标基因在乳癌样本中的甲基化状态, 结果显示, 于正常乳房组织样本 (breast Ca N) 中 ADRA1D、AJAP1、HS3ST2、MAGI2、POU4F2、POU4F3、PTGDR、SOX17 以及 SYT9 甲基化的程度 (中位数分别为 11.78、22.28、112.81、24.55、30.23、31.29、43.64、12.02 以及 5.53); 于乳癌的样本 (breast Ca T) 中 ADRA1D、AJAP1、HS3ST2、MAGI2、POU4F2、POU4F3、PTGDR、SOX17 以及 SYT9 甲基化的程度 (中位数分别为 57.19、260.96、281.64、193.70、77.06、310.34、341.97、77.05 以及 25.24)。这两组数据经过 Mann-Whitney test 分析后, 各组间都达到 $P < 0.01$, 其差异在统计学上是具有显著差异的。以上如图 1(E)、图 2(D)、图 3(D)、图 4(D)、图 5(E)、图 6(D)、图 7(D)、图 8(D)

以及图 9(D)所示。

实施例 8 口腔癌样本内目标基因的甲基化分析

以甲基化特异性 PCR (MSP)分析该七个目标基因在口腔癌样本中的甲基化状态，结果
5 显示，于正常口腔组织样本(oral Ca N)中 ADRA1D、AJAP1、HS3ST2、MAGI2、POU4F2、PTGDR
以及 SYT9 甲基化的程度(中位数分别为 10.25、0.0065、115.98、0.00、30.23、10.47 以
及 0.00)；于口腔癌的样本(oral Ca T)中 ADRA1D、AJAP1、HS3ST2、MAGI2、POU4F2、PTGDR
以及 SYT9 甲基化的程度(中位数分别为 26.44、0.0107、381.49、54.59、77.06、32.78
以及 10.85)。这两组数据经过 Mann-Whitney test 分析后，各组间都达到 $P < 0.05$ ，其差
10 异在统计学上是具有显著差异的。以上如图 1(F)、图 2(E)、图 3(E)、图 4(E)、图 5(F)、
图 7(E)以及图 9(E)所示。

实施例 9 子宫内膜癌样本内目标基因的甲基化分析

以甲基化特异性 PCR (MSP)分析该七个目标基因在子宫内膜癌样本中的甲基化状态，
15 结果显示，于正常子宫内膜组织样本(Em N)中 AJAP1、HS3ST2、MAGI2、POU4F2、POU4F3、
PTGDR 以及 SYT9 甲基化的程度(中位数分别为 0.00、0.00、0.00、16.42、0.31、0.00 以
及 0.63)；于子宫内膜癌的样本(Em T)中 AJAP1、HS3ST2、MAGI2、POU4F2、POU4F3、PTGDR
以及 SYT9 甲基化的程度(中位数分别为 535.78、1456.23、504.15、248.83、89.86、148.19
以及 0.43)。这两组数据经过 Mann-Whitney test 分析后，各组间都达到 $P < 0.05$ ，其差
20 异在统计学上是具有显著差异的。以上如图 2(F)、图 3(F)、图 4(F)、图 5(G)、图 6(E)、
图 7(F)以及图 9(F)所示。

实施例 10 恶性肉瘤样本内目标基因的甲基化分析

以甲基化特异性 PCR (MSP)分析该二个目标基因在恶性肉瘤样本中的甲基化状态，结
25 果显示，于良性肉瘤样本(sar N)中 MAGI2 以及 POU4F3 甲基化的程度(中位数分别为 0.00
以及 0.31)；于恶性肉瘤样本(sar T)中 MAGI2 以及 POU4F3 甲基化的程度(中位数分别为
5.20 以及 89.86)。这两组数据经过 Mann-Whitney test 分析后，各组间都达到 $P < 0.05$ ，
其差异在统计学上是具有显著差异的。以上如图 4(G)以及图 6(F)所示。

上列详细说明是针对本发明的可行实施例的具体说明，惟该实施例并非用以限制本发

明的专利范围，凡未脱离本发明所为的等效实施或变更，例如：受测者检体中各目标基因甲基化程度的判断方式等变化的等效性实施例，均应包含于本案的专利范围中。

权利要求书

1、一种癌症筛检的方法 III，是检测受测检体细胞中目标基因甲基化的状态，以作为癌症有无的筛检指标，其特征在于，该方法包含下列步骤：

步骤 1：提供受测检体；

步骤 2：检测该受测检体的基因组 DNA 中至少一个目标基因的 CpG 序列甲基化状态，该目标基因选自 ADRA1D、AJAP1、HS3ST2、MAGI2、POU4F2、POU4F3、PTGDR、SOX17 以及 SYT9 的至少一个；以及

步骤 3：根据该目标基因甲基化状态的有无，判断该检体是否具有癌症或癌前病变，或作为治疗预后的指标。

2、如权利要求 1 所述的癌症筛检的方法 III，其特征在于，所述受测检体为子宫颈抹片、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的离体样本。

3、如权利要求 1 所述的癌症筛检的方法 III，其特征在于，所述目标基因的 CpG 序列甲基化状态检测方法为甲基化特异性聚合酶连锁反应、定量甲基化特异性聚合酶连锁反应、亚硫酸盐定序、微数组、质谱仪分析、变性高效液相色谱、或焦磷酸定序。

4、如权利要求 1 所述的癌症筛检的方法 III，其特征在于，所述目标基因 ADRA1D 具有如 SEQ ID No：1 所示的核苷酸序列，所述目标基因 AJAP1 具有如 SEQ ID No：2 所示的核苷酸序列，所述目标基因 HS3ST2 具有如 SEQ ID No：3 所示的核苷酸序列，所述目标基因 MAGI2 具有如 SEQ ID No：4 所示的核苷酸序列，所述目标基因 POU4F2 具有如 SEQ ID No：5 所示的核苷酸序列，所述目标基因 POU4F3 具有如 SEQ ID No：6 所示的核苷酸序列，所述目标基因 PTGDR 具有如 SEQ ID No：7 所示的核苷酸序列，所述目标基因 SOX17 具有如 SEQ ID No：8 所示的核苷酸序列，所述目标基因 SYT9 具有如 SEQ ID No：9 所示的核苷酸序列。

5、如权利要求 1 所述的癌症筛检的方法 III，其特征在于，所述目标基因 ADRA1D 甲基化的状态是由 SEQ ID No：10-11 所示的核苷酸序列的引子对侦测的，所述目标基因 AJAP1 甲基化的状态是由 SEQ ID No：12-13 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的，所述目标基因 HS3ST2 甲基化的状态是由 SEQ ID No：14-15 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的，所述目标基因 MAGI2 甲基化的状态是由 SEQ ID No：16-17 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的，所述目标基因 POU4F2 甲基化的状态是由 SEQ ID No：18-19 所

示的核苷酸序列的引子对所侦测的,所述目标基因 POU4F3 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 20-21 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的,所述目标基因 PTGDR 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 22-23 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的,所述目标基因 SOX17 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 24-25 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的,所述目标基因 SYT9 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 26-27 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的;所述的引子包含至少有 80% 的序列同一性、互补性或至少连续十个核苷酸相同的序列。

6、一种子宫颈癌筛检的方法,检测受测检体细胞中目标基因甲基化的状态,以作为子宫颈癌有无的筛检指标,其特征在于,该方法包含下列步骤:

步骤 1: 提供受测检体;

步骤 2: 检测该受测检体的基因组 DNA 中至少一个目标基因的 CpG 序列甲基化状态,该目标基因选自 ADRA1D、AJAP1、HS3ST2、MAGI2、POU4F2、POU4F3、PTGDR、SOX17 以及 SYT9 的至少一个; 以及

步骤 3: 根据目标基因甲基化状态的有无,判断该检体是否具有子宫颈癌或子宫颈癌前病变,或作为治疗预后的指标。

7、如权利要求 6 所述的子宫颈癌筛检的方法,其特征在于,所述受测检体为子宫颈抹片、血液、尿液、子宫颈上皮细胞、或手术后的癌症组织的离体样本。

8、如权利要求 6 所述的子宫颈癌筛检的方法,其特征在于,所述受测检体为异常的子宫颈抹片。

9、如权利要求 6 所述的子宫颈癌筛检的方法,其特征在于,所述受测检体为人类乳突病毒检验呈阳性的子宫颈细胞检体。

10、如权利要求 6 所述的子宫颈癌筛检的方法,其特征在于,所述目标基因的 CpG 序列甲基化状态检测方法为甲基化特异性聚合酶连锁反应、定量甲基化特异性聚合酶连锁反应、亚硫酸盐定序、微数组、质谱仪分析、变性高效液相色谱、或焦磷酸定序。

11、如权利要求 6 所述的子宫颈癌筛检的方法,其特征在于,所述目标基因 ADRA1D 具有如 SEQ ID No: 1 所示的核苷酸序列,所述目标基因 AJAP1 具有如 SEQ ID No: 2 所示的核苷酸序列,所述目标基因 HS3ST2 具有如 SEQ ID No: 3 所示的核苷酸序列,所述目标基因 MAGI2 具有如 SEQ ID No: 4 所示的核苷酸序列,所述目标基因 POU4F2 具有如 SEQ ID No: 5 所示的核苷酸序列,所述目标基因 POU4F3 具有如 SEQ ID No: 6 所示的核苷酸序列,所述目标基因 PTGDR 具有如 SEQ ID No: 7 所示的核苷酸序列,所述

目标基因 SOX17 具有如 SEQ ID No: 8 所示的核苷酸序列, 所述目标基因 SYT9 具有如 SEQ ID No: 9 所示的核苷酸序列。

12、如权利要求 6 所述的癌症筛检的方法, 其特征在于, 所述目标基因 ADRA1D 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 10-11 所示的核苷酸序列的引子对侦测的, 所述目标基因 AJAP1 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 12-13 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的, 所述目标基因 HS3ST2 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 14-15 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的, 所述目标基因 MAGI2 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 16-17 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的, 所述目标基因 POU4F2 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 18-19 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的, 所述目标基因 POU4F3 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 20-21 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的, 所述目标基因 PTGDR 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 22-23 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的, 所述目标基因 SOX17 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 24-25 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的, 所述目标基因 SYT9 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 26-27 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的; 所述的引子包含至少有 80% 的序列同一性、互补性或至少连续十个核苷酸相同的序列。

13、一种卵巢癌筛检的方法, 是检测受测检体细胞中目标基因甲基化的状态, 以作为卵巢癌有无的筛检指标, 其特征在于, 该方法包含下列步骤:

步骤 1: 提供受测检体;

步骤 2: 检测该受测检体的基因组 DNA 中至少一个目标基因的 CpG 序列甲基化状态, 该目标基因选自 ADRA1D、AJAP1、HS3ST2、MAGI2、POU4F2、POU4F3、PTGDR、SOX17 以及 SYT9 的至少一个; 以及

步骤 3: 根据目标基因甲基化状态的有无, 判断该检体是否具有卵巢癌或作为治疗预后的指标。

14、如权利要求 13 所述的卵巢癌筛检的方法, 其特征在于, 所述受测检体为卵巢癌组织、腹水、血液、尿液、或手术后的癌症组织的离体样本。

15、如权利要求 13 所述的卵巢癌筛检的方法, 其特征在于, 所述目标基因的 CpG 序列甲基化状态检测方法为甲基化特异性聚合酶连锁反应、定量甲基化特异性聚合酶连锁反应、亚硫酸盐定序、微数组、质谱仪分析、变性高效液相色谱、或焦磷酸定序。

16、如权利要求 13 所述的卵巢癌筛检的方法, 其特征在于, 所述目标基因 ADRA1D 具有如 SEQ ID No: 1 所示的核苷酸序列, 所述目标基因 AJAP1 具有如 SEQ ID No: 2 所

示的核苷酸序列,所述目标基因 HS3ST2 具有如 SEQ ID No: 3 所示的核苷酸序列,所述目标基因 MAGI2 具有如 SEQ ID No: 4 所示的核苷酸序列,所述目标基因 POU4F2 具有如 SEQ ID No: 5 所示的核苷酸序列,所述目标基因 POU4F3 具有如 SEQ ID No: 6 所示的核苷酸序列,所述目标基因 PTGDR 具有如 SEQ ID No: 7 所示的核苷酸序列,所述目标基因 SOX17 具有如 SEQ ID No: 8 所示的核苷酸序列,所述目标基因 SYT9 具有如 SEQ ID No: 9 所示的核苷酸序列。

17、如权利要求 13 所述的癌症筛检的方法,其特征在于,所述目标基因 ADRA1D 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 10-11 所示的核苷酸序列的引子对侦测的,所述目标基因 AJAP1 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 12-13 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的,所述目标基因 HS3ST2 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 14-15 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的,所述目标基因 MAGI2 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 16-17 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的,所述目标基因 POU4F2 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 18-19 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的,所述目标基因 POU4F3 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 20-21 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的,所述目标基因 PTGDR 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 22-23 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的,所述目标基因 SOX17 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 24-25 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的,所述目标基因 SYT9 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 26-27 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的;所述的引子包含至少有 80% 的序列同一性、互补性或至少连续十个核苷酸相同的序列。

18、一种肝癌筛检的方法,是检测受测检体细胞中目标基因甲基化的状态,以作为肝癌有无的筛检指标,其特征在于,该方法包含下列步骤:

步骤 1: 提供受测检体;

步骤 2: 检测该受测检体的基因组 DNA 中至少一个目标基因的 CpG 序列甲基化状态,该目标基因选自 ADRA1D、AJAP1、HS3ST2、MAGI2、POU4F2、POU4F3、PTGDR、SOX17 以及 SYT9 的至少一个; 以及

步骤 3: 根据目标基因甲基化状态的有无,判断该检体是否具有肝癌或作为治疗预后的指标。

19、如权利要求 18 所述的肝癌筛检的方法,其特征在于,所述受测检体为肝组织、粪便、胃液、胆汁、腹水、血液、尿液、或手术后的癌症组织的离体样本。

20、如权利要求 18 所述的肝癌筛检的方法,其特征在于,所述目标基因的 CpG 序列甲

基化状态检测方法为甲基化特异性聚合酶连锁反应、定量甲基化特异性聚合酶连锁反应、亚硫酸盐定序、微数组、质谱仪分析、变性高效液相色谱、或焦磷酸定序。

21、如权利要求 18 所述的肝癌筛检的方法，其特征在于，所述目标基因 ADRA1D 具有如 SEQ ID No: 1 所示的核苷酸序列，所述目标基因 AJAP1 具有如 SEQ ID No: 2 所示的核苷酸序列，所述目标基因 HS3ST2 具有如 SEQ ID No: 3 所示的核苷酸序列，所述目标基因 MAGI2 具有如 SEQ ID No: 4 所示的核苷酸序列，所述目标基因 POU4F2 具有如 SEQ ID No: 5 所示的核苷酸序列，所述目标基因 POU4F3 具有如 SEQ ID No: 6 所示的核苷酸序列，所述目标基因 PTGDR 具有如 SEQ ID No: 7 所示的核苷酸序列，所述目标基因 SOX17 具有如 SEQ ID No: 8 所示的核苷酸序列，所述目标基因 SYT9 具有如 SEQ ID No: 9 所示的核苷酸序列。

22、如权利要求 18 所述的癌症筛检的方法，其特征在于，所述目标基因 ADRA1D 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 10-11 所示的核苷酸序列的引子对侦测的，所述目标基因 AJAP1 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 12-13 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的，所述目标基因 HS3ST2 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 14-15 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的，所述目标基因 MAGI2 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 16-17 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的，所述目标基因 POU4F2 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 18-19 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的，所述目标基因 POU4F3 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 20-21 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的，所述目标基因 PTGDR 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 22-23 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的，所述目标基因 SOX17 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 24-25 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的，所述目标基因 SYT9 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 26-27 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的；所述的引子包含至少有 80% 的序列同一性、互补性或至少连续十个核苷酸相同的序列。

23、一种大肠癌筛检的方法，是检测受测检体细胞中目标基因甲基化的状态，以作为大肠癌有无的筛检指标，其特征在于，该方法包含下列步骤：

步骤 1：提供受测检体；

步骤 2：检测该受测检体的基因组 DNA 中至少一个目标基因的 CpG 序列甲基化状态，该目标基因选自 ADRA1D、AJAP1、HS3ST2、MAGI2、POU4F2、POU4F3、PTGDR、SOX17 以及 SYT9 的至少一个；以及

步骤 3：根据目标基因甲基化状态的有无，判断该检体是否具有大肠癌或大肠癌前

病变，或作为治疗预后的指标。

24、如权利要求 23 所述的大肠癌筛检的方法，其特征在于，所述受测检体为大肠组织、腹水、血液、尿液、粪便、或手术后的癌症组织的离体样本。

25、如权利要求 23 所述的大肠癌筛检的方法，其特征在于，所述目标基因的 CpG 序列甲基化状态检测方法为甲基化特异性聚合酶连锁反应、定量甲基化特异性聚合酶连锁反应、亚硫酸盐定序、微数组、质谱仪分析、变性高效液相色谱、或焦磷酸定序。

26、如权利要求 23 所述的大肠癌筛检的方法，其特征在于，所述目标基因 ADRA1D 具有如 SEQ ID No: 1 所示的核苷酸序列，所述目标基因 AJAP1 具有如 SEQ ID No: 2 所示的核苷酸序列，所述目标基因 HS3ST2 具有如 SEQ ID No: 3 所示的核苷酸序列，所述目标基因 MAGI2 具有如 SEQ ID No: 4 所示的核苷酸序列，所述目标基因 POU4F2 具有如 SEQ ID No: 5 所示的核苷酸序列，所述目标基因 POU4F3 具有如 SEQ ID No: 6 所示的核苷酸序列，所述目标基因 PTGDR 具有如 SEQ ID No: 7 所示的核苷酸序列，所述目标基因 SOX17 具有如 SEQ ID No: 8 所示的核苷酸序列，所述目标基因 SYT9 具有如 SEQ ID No: 9 所示的核苷酸序列。

27、如权利要求 23 所述的癌症筛检的方法，其特征在于，所述目标基因 ADRA1D 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 10-11 所示的核苷酸序列的引子对侦测的，所述目标基因 AJAP1 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 12-13 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的，所述目标基因 HS3ST2 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 14-15 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的，所述目标基因 MAGI2 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 16-17 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的，所述目标基因 POU4F2 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 18-19 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的，所述目标基因 POU4F3 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 20-21 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的，所述目标基因 PTGDR 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 22-23 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的，所述目标基因 SOX17 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 24-25 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的，所述目标基因 SYT9 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 26-27 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的；所述的引子包含至少有 80% 的序列同一性、互补性或至少连续十个核苷酸相同的序列。

28、一种乳癌筛检的方法，是检测受测检体细胞中目标基因甲基化的状态，以作为乳癌有无的筛检指标，其特征在于，该方法包含下列步骤：

步骤 1：提供受测检体；

步骤 2: 检测该受测检体的基因组 DNA 中至少一个目标基因的 CpG 序列甲基化状态, 该目标基因选自 ADRA1D、AJAP1、HS3ST2、MAGI2、POU4F2、POU4F3、PTGDR、SOX17 以及 SYT9 的至少一个; 以及

步骤 3: 根据目标基因甲基化状态的有无, 判断该检体是否具有乳癌或作为治疗预后的指标。

29、如权利要求 28 所述的乳癌筛检的方法, 其特征在于, 所述受测检体为血液、尿液、乳汁、乳房分泌物、囊肿、穿刺及切片检体、或手术后的癌症组织的离体样本。

30、如权利要求 28 所述的乳癌筛检的方法, 其特征在于, 所述目标基因的 CpG 序列甲基化状态检测方法为甲基化特异性聚合酶连锁反应、定量甲基化特异性聚合酶连锁反应、亚硫酸盐定序、微数组、质谱仪分析、变性高效液相色谱、或焦磷酸定序。

31、如权利要求 28 所述的乳癌筛检的方法, 其特征在于, 所述目标基因 ADRA1D 具有如 SEQ ID No: 1 所示的核苷酸序列, 所述目标基因 AJAP1 具有如 SEQ ID No: 2 所示的核苷酸序列, 所述目标基因 HS3ST2 具有如 SEQ ID No: 3 所示的核苷酸序列, 所述目标基因 MAGI2 具有如 SEQ ID No: 4 所示的核苷酸序列, 所述目标基因 POU4F2 具有如 SEQ ID No: 5 所示的核苷酸序列, 所述目标基因 POU4F3 具有如 SEQ ID No: 6 所示的核苷酸序列, 所述目标基因 PTGDR 具有如 SEQ ID No: 7 所示的核苷酸序列, 所述目标基因 SOX17 具有如 SEQ ID No: 8 所示的核苷酸序列, 所述目标基因 SYT9 具有如 SEQ ID No: 9 所示的核苷酸序列。

32、如权利要求 28 所述的癌症筛检的方法, 其特征在于, 所述目标基因 ADRA1D 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 10-11 所示的核苷酸序列的引子对侦测的, 所述目标基因 AJAP1 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 12-13 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的, 所述目标基因 HS3ST2 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 14-15 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的, 所述目标基因 MAGI2 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 16-17 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的, 所述目标基因 POU4F2 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 18-19 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的, 所述目标基因 POU4F3 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 20-21 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的, 所述目标基因 PTGDR 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 22-23 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的, 所述目标基因 SOX17 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 24-25 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的, 所述目标基因 SYT9 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 26-27 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的; 所

述的引子包含至少有 80% 的序列同一性、互补性或至少连续十个核苷酸相同的序列。

33、一种口腔癌筛检的方法，是检测受测检体细胞中目标基因甲基化的状态，以作为口腔癌有无的筛检指标，其特征在于，该方法包含下列步骤：

步骤 1：提供受测检体；

步骤 2：检测该受测检体的基因组 DNA 中至少一个目标基因的 CpG 序列甲基化状态，该目标基因选自 ADRA1D、AJAP1、HS3ST2、MAGI2、POU4F2、POU4F3、PTGDR、SOX17 以及 SYT9 的至少一个；以及

步骤 3：根据目标基因甲基化状态的有无，判断该检体是否具有口腔癌或口腔癌前病变，或作为治疗预后的指标。

34、如权利要求 33 所述的口腔癌筛检的方法，其特征在于，所述受测检体为血液、口腔漱洗细胞、痰、口腔黏膜细胞、或手术后的癌症组织的离体样本。

35、如权利要求 33 所述的口腔癌筛检的方法，其特征在于，所述目标基因的 CpG 序列甲基化状态检测方法为甲基化特异性聚合酶连锁反应、定量甲基化特异性聚合酶连锁反应、亚硫酸盐定序、微数组、质谱仪分析、变性高效液相色谱、或焦磷酸定序。

36、如权利要求 33 所述的口腔癌筛检的方法，其特征在于，所述目标基因 ADRA1D 具有如 SEQ ID No: 1 所示的核苷酸序列，所述目标基因 AJAP1 具有如 SEQ ID No: 2 所示的核苷酸序列，所述目标基因 HS3ST2 具有如 SEQ ID No: 3 所示的核苷酸序列，所述目标基因 MAGI2 具有如 SEQ ID No: 4 所示的核苷酸序列，所述目标基因 POU4F2 具有如 SEQ ID No: 5 所示的核苷酸序列，所述目标基因 POU4F3 具有如 SEQ ID No: 6 所示的核苷酸序列，所述目标基因 PTGDR 具有如 SEQ ID No: 7 所示的核苷酸序列，所述目标基因 SOX17 具有如 SEQ ID No: 8 所示的核苷酸序列，所述目标基因 SYT9 具有如 SEQ ID No: 9 所示的核苷酸序列。

37、如权利要求 33 所述的癌症筛检的方法，其特征在于，所述目标基因 ADRA1D 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 10-11 所示的核苷酸序列的引子对侦测的，所述目标基因 AJAP1 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 12-13 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的，所述目标基因 HS3ST2 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 14-15 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的，所述目标基因 MAGI2 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 16-17 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的，所述目标基因 POU4F2 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 18-19 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的，所述目标基因 POU4F3 甲基化的状态是由 SEQ ID No:

20-21 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的, 所述目标基因 PTGDR 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 22-23 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的, 所述目标基因 SOX17 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 24-25 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的, 所述目标基因 SYT9 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 26-27 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的; 所述的引子包含至少有 80% 的序列同一性、互补性或至少连续十个核苷酸相同的序列。

38、一种子宫内膜癌筛检的方法, 是检测受测检体细胞中目标基因甲基化的状态, 以作为子宫内膜癌有无的筛检指标, 其特征在于, 该方法包含下列步骤:

步骤 1: 提供受测检体;

步骤 2: 检测该受测检体的基因组 DNA 中至少一个目标基因的 CpG 序列甲基化状态, 该目标基因选自 ADRA1D、AJAP1、HS3ST2、MAGI2、POU4F2、POU4F3、PTGDR、SOX17 以及 SYT9 的至少一个; 以及

步骤 3: 根据目标基因甲基化状态的有无, 判断该检体是否具有子宫内膜癌或作为治疗预后的指标。

39、如权利要求 38 所述的子宫内膜癌筛检的方法, 其特征在于, 所述受测检体为血液、尿液、阴道冲洗物、经血、内膜刮取组织、或手术后的癌症组织的离体样本。

40、如权利要求 38 所述的子宫内膜癌筛检的方法, 其特征在于, 所述目标基因的 CpG 序列甲基化状态检测方法为甲基化特异性聚合酶连锁反应、定量甲基化特异性聚合酶连锁反应、亚硫酸盐定序、微数组、质谱仪分析、变性高效液相色谱、或焦磷酸定序。

41、如权利要求 38 所述的子宫内膜癌筛检的方法, 其特征在于, 所述目标基因 ADRA1D 具有如 SEQ ID No: 1 所示的核苷酸序列, 所述目标基因 AJAP1 具有如 SEQ ID No: 2 所示的核苷酸序列, 所述目标基因 HS3ST2 具有如 SEQ ID No: 3 所示的核苷酸序列, 所述目标基因 MAGI2 具有如 SEQ ID No: 4 所示的核苷酸序列, 所述目标基因 POU4F2 具有如 SEQ ID No: 5 所示的核苷酸序列, 所述目标基因 POU4F3 具有如 SEQ ID No: 6 所示的核苷酸序列, 所述目标基因 PTGDR 具有如 SEQ ID No: 7 所示的核苷酸序列, 所述目标基因 SOX17 具有如 SEQ ID No: 8 所示的核苷酸序列, 所述目标基因 SYT9 具有如 SEQ ID No: 9 所示的核苷酸序列。

42、如权利要求 38 所述的癌症筛检的方法, 其特征在于, 所述目标基因 ADRA1D 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 10-11 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的, 所述目标基因 AJAP1 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 12-13 所示的核苷酸序列的引子对所侦测的, 所

述目标基因 HS3ST2 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 14-15 所示的核苷酸序列的引子对所检测的, 所述目标基因 MAGI2 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 16-17 所示的核苷酸序列的引子对所检测的, 所述目标基因 POU4F2 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 18-19 所示的核苷酸序列的引子对所检测的, 所述目标基因 POU4F3 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 20-21 所示的核苷酸序列的引子对所检测的, 所述目标基因 PTGDR 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 22-23 所示的核苷酸序列的引子对所检测的, 所述目标基因 SOX17 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 24-25 所示的核苷酸序列的引子对所检测的, 所述目标基因 SYT9 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 26-27 所示的核苷酸序列的引子对所检测的; 所述的引子包含至少有 80% 的序列同一性、互补性或至少连续十个核苷酸相同的序列。

43、一种恶性肉瘤筛检的方法, 是检测受测检体细胞中目标基因甲基化的状态, 以作为恶性肉瘤有无的筛检指标, 其特征在于, 该方法包含下列步骤:

步骤 1: 提供受测检体;

步骤 2: 检测该受测检体的基因组 DNA 中至少一个目标基因的 CpG 序列甲基化状态, 该目标基因选自 ADRA1D、AJAP1、HS3ST2、MAGI2、POU4F2、POU4F3、PTGDR、SOX17 以及 SYT9 的至少一个; 以及

步骤 3: 根据目标基因甲基化状态的有无, 判断该检体是否具有恶性肉瘤或作为治疗预后的指标。

44、如权利要求 43 所述的恶性肉瘤筛检的方法, 其特征在于, 所述受测检体为血液、尿液、或手术后的癌症组织的离体样本。

45、如权利要求 43 所述的恶性肉瘤筛检的方法, 其特征在于, 所述目标基因的 CpG 序列甲基化状态检测方法为甲基化特异性聚合酶连锁反应、定量甲基化特异性聚合酶连锁反应、亚硫酸盐定序、微数组、质谱仪分析、变性高效液相色谱、或焦磷酸定序。

46、如权利要求 43 所述的恶性肉瘤筛检的方法, 其特征在于, 所述目标基因 ADRA1D 具有如 SEQ ID No: 1 所示的核苷酸序列, 所述目标基因 AJAP1 具有如 SEQ ID No: 2 所示的核苷酸序列, 所述目标基因 HS3ST2 具有如 SEQ ID No: 3 所示的核苷酸序列, 所述目标基因 MAGI2 具有如 SEQ ID No: 4 所示的核苷酸序列, 所述目标基因 POU4F2 具有如 SEQ ID No: 5 所示的核苷酸序列, 所述目标基因 POU4F3 具有如 SEQ ID No: 6 所示的核苷酸序列, 所述目标基因 PTGDR 具有如 SEQ ID No: 7 所示的核苷酸序列, 所述目标基因 SOX17 具有如 SEQ ID No: 8 所示的核苷酸序列, 所述目标基因 SYT9 具有

如 SEQ ID No: 9 所示的核苷酸序列。

47、如权利要求 43 所述的癌症筛检的方法，其特征在于，所述目标基因 ADRA1D 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 10-11 所示的核苷酸序列的引子对所检测的，所述目标基因 AJAP1 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 12-13 所示的核苷酸序列的引子对所检测的，所述目标基因 HS3ST2 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 14-15 所示的核苷酸序列的引子对所检测的，所述目标基因 MAGI2 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 16-17 所示的核苷酸序列的引子对所检测的，所述目标基因 POU4F2 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 18-19 所示的核苷酸序列的引子对所检测的，所述目标基因 POU4F3 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 20-21 所示的核苷酸序列的引子对所检测的，所述目标基因 PTGDR 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 22-23 所示的核苷酸序列的引子对所检测的，所述目标基因 SOX17 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 24-25 所示的核苷酸序列的引子对所检测的，所述目标基因 SYT9 甲基化的状态是由 SEQ ID No: 26-27 所示的核苷酸序列的引子对所检测的；所述的引子包含至少有 80% 的序列同一性、互补性或至少连续十个核苷酸相同的序列。