

## 一种肿瘤检测试剂及试剂盒

### 技术领域

本公开属于基因检测领域，更具体地，本公开涉及一种肿瘤检测试剂及试剂盒。

### 背景技术

随着社会经济的发展，罹患肿瘤的人群越来越多，越来越年轻化。对肿瘤实现早期、无痛、快速准确的检测成为了人们越来越迫切的需求。

目前肿瘤的传统诊断和随诊方法主要包括体外成像、在体镜检、组织活检及脱落细胞或排泄物细胞学检查，体外成像技术主要包括计算机断层扫描成像、核磁共振成像和经腹超声等，但该技术对癌症早期诊断中往往出现较高的假阳性率。在体镜检查作为一些肿瘤诊断的金标准，近年来虽然已经被改进并采用软性材料，但是仍然具有较大的侵入性，给病人带来极大的痛苦，病人在检测之后的几天内会出现疼痛出血等问题，并且该检查对于一些肿瘤早期诊断的特异性和灵敏度较低。组织活检检测对象为疑似病变组织，主要是对肿瘤细胞形态和生物标志物进行检测，具有较高的特异性和灵敏度，但在取样过程中对病人有一定的侵入性，还存在样品前处理时间较长和步骤复杂等缺点。脱落细胞或排泄物细胞学检测是一种非侵入性操作，因此被广泛用于多种肿瘤的诊断，但一些脱落细胞或排泄物细胞学检测不能排除低级别别肿瘤的存在而导致灵敏性低。核基质蛋白-22、肿瘤相关抗原、Immuno Cyt 测定和 Uro Vysion 测定等检测方法由于相对低的灵敏度和或特异性，这些方法没有用于常规临床测试。

表观遗传学是癌症生物学中的快速发展领域，并且在临床和转化医学研究方面具有巨大的潜力。研究发现对于肿瘤发生至关重要的生物化学途径部分由表观遗传学现象调节，例如肿瘤细胞中 DNA 甲基化的改变，组蛋白修饰的异常，miRNA 介导的各种靶向基因的沉默，核小体的错构重建。异常 DNA 甲基化是所有类型的人类癌症相关的最广泛研究的表观遗传变化。高甲基化沉默转录因子如 RUNX3、GATA-4、GATA-5 导致其参与各种细胞过程的下游靶标的失活。RUNX3 是一种转录因子家族重要组成部分，研究表明在肺癌细胞系和原发性肺癌标本中，RUNX3 被异常 DNA 超甲基化失活。类似地，转录因子的 GATA 家族与胃肠道的发病相关，并且已观察到在结肠直肠癌启动子中，导致 GATA-4 和 GATA-5 基因的启动子区出现频繁的甲基化。在膀胱癌中也显示一些基因的启动子甲基化程度较高，DNA 甲基化频率在 48%-96%之间，包括 A2BP1、NPTX2、POU4F2、HOXA9、MEIS1、GDF15、TMEHF2、VIM、STK11、MSH6、BRCA1、TBX2、TBX3、GATA2、ZIC4、PAX5A、MGMT 和 IGSF4 等基因<sup>[1]</sup>。

近年来，通过检查血液、痰、唾液、粪便、尿液样本中肿瘤相关基因特定区域甲基化广泛应用于癌症的诊断和早期诊断、癌症发展的预测、癌症的预后预测、治疗后监测以及对抗癌治疗响应的预测等方面。

### 发明内容

在一些实施方案中，本公开提供了与 SEQ ID NO: 4 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（下称“核苷酸序列”或“核酸片段”）在制备肿瘤检测试剂或试剂盒中的应用。

在一些实施方案中，本公开提供了针对与 SEQ ID NO: 4 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的甲基化水平检测试剂，在制备肿瘤检测试剂或试剂盒中的应用。

在一些实施方案中，本公开还提供了一种引物，所述的引物包括与 SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 34、SEQ ID NO: 35、SEQ ID NO: 37、SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 43、SEQ ID NO: 44、SEQ ID NO: 46 或 SEQ ID NO: 47 所示序列或其互补序列中的任一所示的序列，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。

在一些实施方案中，所述引物包括与 SEQ ID NO: 31 和 SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 34 和 SEQ ID NO: 35、SEQ

ID NO: 37 和 SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 40 和 SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 43 和 SEQ ID NO: 44 或 SEQ ID NO: 46 和 SEQ ID NO: 47 所示任意一对引物对的各个引物，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，多个核苷酸序列。

在一些实施方案中，所述引物包括与 SEQ ID NO: 34 和 SEQ ID NO: 35、SEQ ID NO: 43 和 SEQ ID NO: 44 或 SEQ ID NO: 46 和 SEQ ID NO: 47 所示任意一对引物对的各个引物，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，多个核苷酸序列。

在一些实施方案中，所述引物包括与 SEQ ID NO: 43 和 SEQ ID NO: 44 所示的引物对的各个引物，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，多个核苷酸序列。

在一些实施方案中，本公开还提供了一种探针，所述的探针包括与 SEQ ID NO: 33、SEQ ID NO: 36、SEQ ID NO: 39、SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO: 45 或 SEQ ID NO: 48 所示序列或其互补序列中的任一所示的序列，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。

在一些实施方案中，所述探针包括与 SEQ ID NO: 36、SEQ ID NO: 45 或 SEQ ID NO: 48 所示的序列或其互补序列中的任一所示的序列，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。

在一些实施方案中，所述探针包括与 SEQ ID NO: 45 所示的序列，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。

在一些实施方案中，所述的引物或探针为分离的引物或探针。

在一些实施方案中，本公开还提供了上述的引物和 / 或者探针在制备肿瘤检测试剂或试剂盒中的应用。

本公开中的“检测”同诊断，除了肿瘤的早期诊断，还包括结肿瘤中期和晚期的诊断，且也包括肿瘤筛选、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。

作为病症阶段可选的实施方案，可通过在肿瘤在不同阶段或时期的进展可通过从样品中获取的所述核苷酸序列的甲基化程度的测量进行诊断。通过比较从肿瘤的每个阶段的样品中分离出的所述核苷酸序列甲基化程度与从没有细胞增殖性异常的样品中分离出的一个或多个核酸中的所述核苷酸序列的甲基化程度，可检测样品中肿瘤的具体阶段。

在一些实施方案中，本公开提供了一种肿瘤检测试剂，该试剂含有与 SEQ ID NO: 4 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的甲基化水平检测试剂。

甲基化的发生是胞嘧啶上多了一个甲基，经过经亚硫酸氢盐或重亚硫酸氢盐或胍盐处理后，胞嘧啶会变成尿嘧啶，因为在进行 PCR 扩增时尿嘧啶与胸腺嘧啶相似而会被识别为胸腺嘧啶，体现在 PCR 扩增序列上就是没有发生甲基化的胞嘧啶变成了胸腺嘧啶（C 变成 T），甲基化的胞嘧啶（C）则不会发生变化。PCR 检测甲基化基因的技术通常为 MSP，针对处理后的甲基化片段（即片段中未改变的 C）设计引物，进行 PCR 扩增，如果有扩增则说明发生了甲基化，无扩增则没有甲基化。

在一些实施方案中，所述的甲基化水平检测试剂检测的是所述核苷酸序列经亚硫酸氢盐或重亚硫酸氢盐或胍盐修饰后的序列。

在一些实施方案中，检测的是所述核苷酸序列经重亚硫酸氢盐修饰后的序列。

在一些实施方案中，所述甲基化水平检测试剂包括针对与 SEQ ID NO: 4 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的甲基化水平检测的引物和 / 或探针。

在一些实施方案中,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:

I、与 SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:43 或 SEQ ID NO:46 任一所示的核苷酸序列,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;

II、如 I 所示序列的互补序列。

在一些实施方案中,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:

III、与 SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:44 或 SEQ ID NO:47 任一所示的核苷酸序列,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。

所述的引物用于扩增所述核苷酸序列。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,在甲基化水平检测中,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<sub>m</sub> 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 甲基化水平检测中,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苷酸序列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。

在一些实施方案中,所述探针具有如下所示的核苷酸序列中的任意一项:

V、与 SEQ ID NO: 33、SEQ ID NO: 36、SEQ ID NO: 39、SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO: 45 或 SEQ ID NO: 48 任一所示的核苷酸序列,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;

VI、如 V 所示序列的互补序列。

在一些实施方案中,所述的试剂含包括内参基因的检测试剂。

在一些实施方案中,所述的内参基因为  $\beta$ -actin (ACTB)。

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,所述的试剂还包括亚硫酸氢盐、重亚硫酸氢盐或胍盐中的至少一种,以对所述核苷酸序列进行修饰,当然可以不包括。

在一些实施方案中,所述的试剂含包括 DNA 聚合酶、dNTPs、Mg<sup>2+</sup>离子、缓冲液中的一种或几种,可选包括 DNA 聚合酶、dNTPs、Mg<sup>2+</sup>离子和缓冲液的 PCR 反应体系,用于对经修饰后的核苷酸序列的扩增。

本公开的检测/诊断试剂所检测的样品可以选自组织、体液或排泄物中的至少一种。

可选地,所述组织为膀胱组织。

可选地,所述体液为血液、血清、血浆、细胞外液、组织液、淋巴液、脑脊液或房水中的至少一种。

可选地,所述排泄物选自痰液、尿液、唾液或粪便中的至少一种。

可选地,所述排泄物选自尿液。

在一些实施方案中,本公开还提供了包含上述肿瘤检测试剂的试剂盒。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。

在一些实施方案中,本公开的检测试剂针对的组织选自肿瘤组织和肿瘤旁正常组织(或者良性肿瘤疾病组织)。

在一些实施方案中，本公开还提供了一种样品中所述核苷酸序列甲基化水平的检测方法，其特征在于，包括以下步骤：（1）将待测样品进行亚硫酸氢盐或重亚硫酸氢盐或肼盐处理，获得经修饰的待测样品；（2）进行所述核苷酸序列的甲基化水平检测，例如是利用上述试剂或试剂盒对步骤（1）的经修饰的待测样品进行所述核苷酸序列的甲基化检测；作为可选的实施方式，步骤（2）中，采用实时荧光定量甲基化特异性聚合酶链反应进行检测。

在一些实施方案中，本公开还提供了一种肿瘤检测方法，包括：检测待测样品中核苷酸序列的甲基化水平，可选地是进行上述的检测核苷酸序列甲基化水平的方法；以及根据检测得到，可选地上述的检测核苷酸序列甲基化水平的方法方法得到的甲基化水平，与正常对照样品的对应的甲基化水平的偏离，可选地甲基化水平的偏离，指示受试者患有或有风险患有所述肿瘤。上述步骤中所述的“偏离”，是指与SEQ ID NO: 4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中的任意一个的甲基化水平的偏离。

在一些实施方案中，本公开还提供了一种受试者的肿瘤的治疗方法，包括：进行受试者的肿瘤的检测，包括进行受试者的检测样品的与SEQ ID NO: 4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的甲基化水平检测，且当受试者的肿瘤的检测指示受试者患有或有风险患有肿瘤时，给予所述肿瘤的治疗。可选地，甲基化水平检测是以上述的核苷酸序列甲基化水平的检测方法进行检测；可选地，受试者的肿瘤的检测是以上述的肿瘤检测方法进行检测；可选地，所述治疗是施用手术、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肿瘤治疗方法以及这些治疗方法的组合。

在一些实施方案中，本公开还提供了一种设计引物的方法，所述方法包括针对与SEQ ID NO: 4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设计引物的步骤。

在一些实施方案中，本公开还提供了一种设计引物的系统，所述的系统含有：

1) 输入构件；2) 处理构件；3) 输出构件；可选地，所述输入构件用于读取与SEQ ID NO: 4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；可选地，所述处理构件装载基于输入构件读取的信息进行引物设计的程序；可选地，所述输出构件用于输出处理构件的设计出的引物序列。

在一些实施方案中，本公开还提供了一种肿瘤的检测系统。所述的系统含有：（1）与SEQ ID NO: 4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的甲基化水平检测构件，以及（2）结果判断系统。

在一些实施方案中，所述的甲基化水平检测构件含有上述检测试剂或试剂盒。

在一些实施方案中，所述的结果判断构件用于根据检测系统检测的与SEQ ID NO: 4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的甲基化结果，输出肿瘤的患病风险和/或肿瘤类型。

在一些实施方案中，所述的患病风险是根据通过结果判断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。

在一些实施方案中，若所述核苷酸序列甲基化阳性，则表明待测样品的提供者肿瘤高危或肿瘤患者。作为一种可选的实施方式，所述的阳性是指将所获得检测结果与正常样本的检测比较，当待测样本与正常样本的扩增结果具有显著或极显著的差异时，所述待测样本的供体呈阳性。

在一些实施方案中，所述判断系统的判断标准包括：根据界值判断肿瘤标本和正常标本。

在一些实施方案中，所述肿瘤选自尿路上皮肿瘤；可选地，所述肿瘤选自膀胱癌、输尿管癌、肾盂癌、尿道癌；可选地，所述肿瘤选自膀胱癌。

本申请的检测方法可以在肿瘤治疗前后使用或者与肿瘤治疗联合使用，治疗后使用如评价治疗的成功或者监测治疗后肿瘤的缓解、复发和/或进展(包括转移)。

### 附图说明

图 1A-1F 依次为核酸片段 1-6 分别在 108 个临床组织标本（66 个膀胱癌组织和 42 个膀胱癌旁组织标本）中检测的 ROC 曲线图；

图 2 为核酸片段 4 和 MEIS1 在 97 例尿液样品（膀胱癌 45 例，对照样本 52 例）中检测的 ROC 曲线；

图 3 为在 299 例尿液样品（低度恶性潜能的内翻性尿路上皮肿瘤 1 例，低度恶性潜能的乳头状尿路上皮肿瘤 16 例，膀胱癌 105 例，前列腺癌 31 例，肾盂癌 17 例，输尿管癌 10 例，对照样本 119 例）中使用核酸片段 4 对不同肿瘤类型的样品的检测统计结果；其中，图 3A 为对照组和“膀胱癌&输尿管癌&肾盂癌”作为一个整体组比较的 ROC 曲线；图 3B 为对照组和输尿管癌组比较的 ROC 曲线；图 3C 为对照组和肾盂癌组比较的 ROC 曲线；图 3D 为对照组和膀胱癌组比较的 ROC 曲线；图 3E 为对照组和“低度恶性潜能的内翻性尿路上皮肿瘤&低度恶性潜能的乳头状尿路上皮肿瘤”作为一个整体组比较的 ROC 曲线；图 3F 为对照组和前列腺癌组比较的 ROC 曲线。

图 4 为各不同引物探针组别的扩增曲线和熔解曲线；

图 5 为 CG441 组别的引物探针组合在 193 例尿液样品中检测的 ROC 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。

本申请中的“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%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或 100% 互补。

本申请中，“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。

本申请甲基化水平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。

本申请中，所述“受试者”是哺乳动物，例如是人。

本申请中，“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。

本申请中“样本”同“标本”。

如本申请所使用的术语“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。

### 实施例 1:

发明人筛选了数百个基因标志物及核酸片段，研究基因甲基化位点分布情况。

此处列出发明人筛选的 6 个核酸片段及筛选结果。

核酸片段 1-6 的序列分别如 SEQ ID NO: 1-6 所示；

实验过程：

UM-UC-3、J82、SW780、T24、RT4、5637、SCaBER、UM-UC-3、J82 等细胞株来自国家细胞资源共享服务平台，其余细胞采购至 ATCC，采用推荐培养基复苏培养。所有细胞经过支原体检测为阴性，其细胞形态正常。经扩大培养后，收集细胞按 5×10<sup>6</sup> 分装保存于 -80℃ 低温冰箱，用于 DNA 提取。

1) DNA 提取

使用 QIAGEN 公司的 DNA 提取试剂盒（QIAGEN DNA Mini Kit，#51306）对 17 株膀胱癌细胞进行 DNA 提取。

2) DNA 修饰

使用 ZYMO RESEARCH 生物公司的 DNA 转化试剂盒（EZ DNA Methylation Kit，D5002）进行 DNA 的亚硫酸盐修饰。

修饰后的序列如表 1 所示：

表 1

| 原片段                   | 修饰后           |
|-----------------------|---------------|
| 核酸片段 1 (SEQ ID NO: 1) | SEQ ID NO: 25 |
| 核酸片段 2 (SEQ ID NO: 2) | SEQ ID NO: 26 |
| 核酸片段 3 (SEQ ID NO: 3) | SEQ ID NO: 27 |
| 核酸片段 4 (SEQ ID NO: 4) | SEQ ID NO: 28 |
| 核酸片段 5 (SEQ ID NO: 5) | SEQ ID NO: 29 |
| 核酸片段 6 (SEQ ID NO: 6) | SEQ ID NO: 30 |

3) 扩增与检测

针对每一个核酸片段是否发生甲基化的引物探针如表 2 所示。

表 2 针对各个核酸片段的引物探针序列

| 核酸片段           | 引物探针序列                                                                                                                               |
|----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ACTB<br>(内参基因) | F: TTTTGGATTGTGAATTTGTG (SEQ ID No: 49)<br>R: AAACCTACTCCTCCCTTAA (SEQ ID No: 50)<br>P: TTGTGTGTTGGGTGGTGGTT (SEQ ID No: 51)         |
| 核酸片段 1         | F: CGAGAGGTTATATAAGTTTACG (SEQ ID No: 7)<br>R: AATTTCTTAACAAATAATTTCCG (SEQ ID No: 8)<br>P: CGCCCGAAAACGTATAAATTACTCC (SEQ ID No: 9) |
| 核酸片段 2         | F: TTTAAGGATTAATAATAGAGCG (SEQ ID No: 10)<br>R: GAACCGCGTAATTAAAAC (SEQ ID No: 11)<br>P: CTAACCTCTGCCGTACCGAATC (SEQ ID No: 12)      |
| 核酸片段 3         | F: GGACGGAGATATAAGGAT (SEQ ID No: 13)<br>R: ATAAACGAACACCAAAATC (SEQ ID No: 14)<br>P: CGCAACCCCATAAACCCAA (SEQ ID No: 15)            |
| 核酸片段 4         | F: GTAGTCGAGAAGTATTCG (SEQ ID No: 16)<br>R: GATAAACGTACACTTAACG (SEQ ID No: 17)<br>P: ATCCTTCCAACGACAATAACG (SEQ ID No: 18)          |
| 核酸片段 5         | F: TTCGTTTATTTATGGATTACG (SEQ ID No: 19)<br>R: CGTAAATCGACTCCTTATAC (SEQ ID No: 20)<br>P: AACACGACGACCGAACGAT (SEQ ID No: 21)        |
| 核酸片段 6         | F: GAAAATAATGTCGAATTTTCGT (SEQ ID No: 22)<br>R: AAAATCGAAAATCCCACG (SEQ ID No: 23)<br>P: CTCGAACAAACGTCTCCTTAAC (SEQ ID No: 24)      |

反应体系如表 3 所示：

表 3

| 反应组分                                    | 加入量 (μl) |
|-----------------------------------------|----------|
| iTaq Universal SYBR Green supermix (2x) | 10       |

|                     |     |
|---------------------|-----|
| 引物 (F+R, 12.5uM)    | 0.2 |
| Nuclease-free Water | 8.8 |
| 模板 DNA              | 1   |
| 总体积                 | 20  |

扩增程序如表 4 所示:

表 4

| 步骤   | 温度和时间                    | 循环数目 |
|------|--------------------------|------|
| 预变性  | 95 °C 10 分钟              | 1    |
| 扩增   | 95 °C 30 秒               | 45   |
|      | 55 °C 30 秒               |      |
|      | 72 °C 30 秒 采集荧光          |      |
| 熔解曲线 | 95 °C 5 秒                | 1    |
|      | 65 °C 60 秒连续采集荧光直至 97 °C |      |
| 冷却   | 40 °C 3 分钟               | 1    |

检测结束后利用标准曲线定量计算各核酸片段定量体系在各细胞株拷贝数, 采用“核酸片段拷贝数÷ACTB 内参基因拷贝数×100”来表示各核酸片段在 17 株膀胱癌细胞株中的甲基化程度。

在 17 株膀胱癌细胞株中检测 6 个核酸片段的甲基化结果, 检测结果如表 5 所示。

表 5 17 株膀胱癌细胞株中核酸片段的甲基化水平检测结果

| 细胞株       | 核酸片段 1 | 核酸片段 2 | 核酸片段 3 | 核酸片段 4 | 核酸片段 5 | 核酸片段 6 |
|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| BFTC-905  | 14%    | 34%    | 56%    | 58%    | 73%    | 55%    |
| CAL-29    | 57%    | 59%    | 81%    | 51%    | 39%    | 50%    |
| SCABER    | 10%    | 8%     | 3%     | 90%    | 83%    | 95%    |
| VM-CUB-1  | 88%    | 87%    | 87%    | 87%    | 56%    | 97%    |
| RT-112    | 78%    | 71%    | 83%    | 76%    | 66%    | 84%    |
| SW780     | 44%    | 51%    | 62%    | 72%    | 75%    | 80%    |
| DSH1      | 89%    | 85%    | 78%    | 92%    | 54%    | 95%    |
| RT4       | 90%    | 83%    | 86%    | 74%    | 80%    | 92%    |
| SW1710    | 86%    | 67%    | 81%    | 70%    | 58%    | 77%    |
| 639-V     | 35%    | 62%    | 91%    | 85%    | 76%    | 95%    |
| UM-UC-3   | 92%    | 83%    | 85%    | 89%    | 88%    | 84%    |
| LB831-BLC | 78%    | 81%    | 89%    | 82%    | 71%    | 72%    |
| KU-19-19  | 56%    | 68%    | 84%    | 60%    | 63%    | 34%    |
| 647-V     | 13%    | 50%    | 83%    | 83%    | 60%    | 85%    |
| 5637      | 1%     | 5%     | 36%    | 84%    | 86%    | 98%    |
| J82       | 79%    | 80%    | 76%    | 74%    | 35%    | 80%    |
| T-24      | 62%    | 83%    | 87%    | 76%    | 55%    | 83%    |

由表 5 可以看出, 在 17 株膀胱癌细胞株中, 6 条核酸片段均有不同程度的甲基化, 其中, 核酸片段 3、4、6 相较于其它片段, 可以在更多细胞株中检出他们的甲基化。

实施例 2

在 108 个临床组织标本 (66 个膀胱癌组织和 42 个膀胱癌癌旁组织标本) 中检测实施例 1 中各核酸片段的灵敏度和特异性。

实验过程:

1) DNA 提取

组织切片标本使用 Magen 的 DNA 提取试剂盒 (HiPure FFPE DNA Kit, D3126-03) 来提取 DNA。

2) DNA 修饰、扩增与检测、各片段的引物探针序列与实施例 1 相同。

3) 计算方法

检测结束后利用标准曲线定量计算各核酸片段定量体系在各细胞株拷贝数, 采用“核酸片段拷贝数÷ACTB 内参基因拷贝数×100”来表示各核酸片段在各组织标本中的甲基化程度。最后选取一个阈值作为判断癌症组和对照组的标准, 换算后的比值大于设定阈值可判断为阳性, 等于或小于设定阈值可判断为阴性。根据此标准, 6 个核酸片段在 108 个临床组织样本中的检测统计结果如表 6 所示, ROC 曲线如图 1A-1F 所示。

表 6 6 个核酸片段在临床组织样本中的检测结果

| 片段     | 灵敏度         | 特异性         | AUC (P<0.001) |
|--------|-------------|-------------|---------------|
| 核酸片段 1 | 65.2        | 80.5        | 0.783         |
| 核酸片段 2 | 77.3        | 83.3        | 0.854         |
| 核酸片段 3 | <b>81.8</b> | <b>90.5</b> | <b>0.915</b>  |
| 核酸片段 4 | <b>84.8</b> | <b>92.2</b> | <b>0.925</b>  |
| 核酸片段 5 | 63.6        | 91.1        | 0.773         |
| 核酸片段 6 | 78.8        | 92.9        | 0.896         |

结果显示，在组织样本中，不同片段的灵敏度和特异性也有差别。其中，核酸片段 3、4 的灵敏度及特异性优于其它片段。

### 实施例 3

将本公开的核酸片段 4 与文献经常报道的膀胱癌基因甲基化标志物 MEIS1、NKX6-2、OTX1、SIM2、SOX1、BARHL2、ZNF154、RUNX3 比较，

取膀胱石蜡组织样品 20 例，包括膀胱癌 10 例，腺性膀胱炎对照 10 例。

实验过程：

1) DNA 提取

组织切片使用 Magen 的 DNA 提取试剂盒 (HiPure FFPE DNA Kit, D3126-03) 来提取 DNA。

2) DNA 修饰

使用 ZYMO RESEARCH 生物公司的 DNA 转化试剂盒 (EZ DNA Methylation Kit, D5002) 进行 DNA 的亚硫酸盐修饰。

3) 扩增与检测

反应体系和扩增程序与实施例 1 相同。

引物序列如表 7 所示。

表 7

| 名称          | 序列                                                                                                   |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ACTB (内参基因) | 正向引物: TGGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGT (SEQ ID No: 52)<br>反向引物: AACCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAA (SEQ ID No: 53) |
| 核酸片段 4      | 正向引物: GCGTTCGGAGTTGTTTAGC (SEQ ID No: 54)<br>反向引物: CACCGACGCCACAAACG (SEQ ID No: 55)                 |
| MEIS1       | 正向引物: GTTCGGGATAAGATTTCGGGG (SEQ ID No: 56)<br>反向引物: TAATTAAACTACGCAACCCGACT (SEQ ID No: 57)         |
| NKX6-2      | 正向引物: AGAAGAAGTATTCGCGTTCGAT (SEQ ID No: 58)<br>反向引物: GATCATACCCACGAATAAACG (SEQ ID No: 59)          |
| OTX1        | 正向引物: GTTAGTAGTAGTAGAGCGGGAGC (SEQ ID No: 60)<br>反向引物: GACGTAAATTAACCACTACTTTTCG (SEQ ID No: 61)     |
| SIM2        | 正向引物: GTAGGCGTAGAGGGGATAATTTCG (SEQ ID No: 62)<br>反向引物: ACCCGCGCTAAATCTACAAC (SEQ ID No: 63)         |
| SOX1        | 正向引物: TAATTAGGATCGGGTTAAACGGT (SEQ ID No: 64)<br>反向引物: AAACGCTTACTAATCTCCGAAT (SEQ ID No: 65)        |
| BARHL2      | 正向引物: CGTTAGTAGTCGGATTATAAGCGAAC (SEQ ID No: 66)<br>反向引物: AAAAATTACGAAACAAACACGACCG (SEQ ID No: 67)  |
| ZNF154      | 正向引物: GTTAGGTTTGGGATAGGGATCG (SEQ ID No: 68)<br>反向引物: CGCTACCATCAAACCTCTACG (SEQ ID No: 69)          |
| RUNX3       | 正向引物: GAGGTTTAGTACGCGTTTCG (SEQ ID No: 70)<br>反向引物: CCCGCTCCTAAATCTATCG (SEQ ID No: 71)              |

4) 计算方法与实施例 2 相同。

在 20 例组织样本中，检测结果如表 8 所示，结果统计分析如表 9 所示。

表 8 9 个基因在膀胱组织标本中甲基化水平检测结果

| 样本编号 | 样本类型 | MEIS1         | NKX6-2 | OTX1   | SIM2  | SOX1  | BARHL2 | 核酸片段 4      | ZNF154 | RUNX3  |
|------|------|---------------|--------|--------|-------|-------|--------|-------------|--------|--------|
| BA01 | 膀胱癌  | 54.1%         | 0.0%   | 3.7%   | 39.8% | 0.0%  | 0.0%   | 21.6%       | 0.0%   | 0.0%   |
| BA02 | 膀胱癌  | <b>133.0%</b> | 0.0%   | 0.9%   | 68.5% | 9.7%  | 1.3%   | <b>1.7%</b> | 0.0%   | 11.0%  |
| BA03 | 膀胱癌  | 87.5%         | 0.0%   | 50.6%  | 2.6%  | 19.4% | 34.8%  | 46.8%       | 75.8%  | 23.0%  |
| BA04 | 膀胱癌  | 8.6%          | 36.4%  | 46.5%  | 48.6% | 66.7% | 36.7%  | 46.1%       | 79.9%  | 37.8%  |
| BA05 | 膀胱癌  | <b>98.6%</b>  | 0.0%   | 0.6%   | 28.8% | 6.0%  | 0.0%   | <b>0.0%</b> | 7.7%   | 8.1%   |
| BA06 | 膀胱癌  | 52.5%         | 21.5%  | 53.2%  | 60.4% | 8.1%  | 20.3%  | 45.7%       | 87.9%  | 3.2%   |
| BA07 | 膀胱癌  | 0.0%          | 17.7%  | 119.5% | 57.5% | 25.8% | 70.8%  | 12.7%       | 161.5% | 23.4%  |
| BA08 | 膀胱癌  | 53.8%         | 57.7%  | 48.5%  | 64.7% | 14.1% | 54.8%  | 29.0%       | 94.0%  | 43.4%  |
| BA09 | 膀胱癌  | 54.1%         | 21.1%  | 47.5%  | 28.4% | 8.9%  | 23.8%  | 43.6%       | 55.9%  | 55.9%  |
| BA10 | 膀胱癌  | 74.1%         | 2.3%   | 63.9%  | 59.0% | 52.8% | 67.1%  | 42.8%       | 76.8%  | 85.8%  |
| BB01 | 对照   | 3.4%          | 0.0%   | 1.2%   | 26.4% | 11.4% | 0.0%   | 1.4%        | 11.5%  | 42.3%  |
| BB02 | 对照   | 5.3%          | 2.4%   | 1.1%   | 11.1% | 6.7%  | 8.9%   | 0.7%        | 7.0%   | 54.3%  |
| BB03 | 对照   | 0.4%          | 0.0%   | 2.2%   | 7.3%  | 3.7%  | 0.6%   | 0.0%        | 3.9%   | 37.7%  |
| BB04 | 对照   | 0.9%          | 0.0%   | 7.1%   | 2.1%  | 12.8% | 0.0%   | 0.0%        | 23.3%  | 19.6%  |
| BB05 | 对照   | 0.7%          | 0.0%   | 0.6%   | 4.7%  | 10.0% | 0.9%   | 1.2%        | 18.0%  | 14.2%  |
| BB06 | 对照   | 3.2%          | 1.4%   | 2.0%   | 11.3% | 5.1%  | 0.9%   | 1.0%        | 9.8%   | 43.2%  |
| BB07 | 对照   | 5.3%          | 0.0%   | 4.4%   | 1.8%  | 9.9%  | 0.0%   | 1.0%        | 6.8%   | 17.2%  |
| BB08 | 对照   | 2.1%          | 0.0%   | 33.7%  | 18.7% | 3.9%  | 0.0%   | 0.0%        | 8.2%   | 15.9%  |
| BB09 | 对照   | 0.9%          | 0.0%   | 1.4%   | 3.1%  | 0.0%  | 0.0%   | 0.0%        | 15.4%  | 1.2%   |
| BB10 | 对照   | 3.5%          | 0.0%   | 0.9%   | 25.9% | 40.3% | 24.0%  | 7.8%        | 3.8%   | 124.0% |

表格中，甲基化百分比=靶基因定量浓度/内参基因定量浓度\*100%。

表 9 统计结果

|     | MEIS1        | NKX6-2 | OTX1  | SIM2         | SOX1  | BARHL2 | 核酸片段 4       | ZNF154 | RUNX3 |
|-----|--------------|--------|-------|--------------|-------|--------|--------------|--------|-------|
| 灵敏度 | <b>90.0%</b> | 60.0%  | 70.0% | <b>90.0%</b> | 50.0% | 70.0%  | <b>90.0%</b> | 70.0%  | 20.0% |
| 特异性 | <b>90.0%</b> | 90.0%  | 90.0% | <b>90.0%</b> | 90.0% | 90.0%  | <b>90.0%</b> | 90.0%  | 90.0% |

结果显示 MEIS1、SIM2、及本公开的核酸片段 4 可以很好识别膀胱癌患者癌组织和非膀胱癌患者膀胱组织，其对组织标本膀胱癌检测的灵敏度、特异性均为 90%。

#### 实施例 4

样本信息：尿液样本 97 例，包括膀胱癌 45 例，对照样本 52 例。

本实施例中，DNA 提取、转化同实施例 3。

引物探针序列如表 10 所示。

表 10

| 名称             | 序列                                                                                                                                        |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ACTB<br>(内参基因) | 正向引物: TTTTGGATTGTGAATTGTG (SEQ ID NO: 49)<br>反向引物: AAACCTACTCCTCCCTTAA (SEQ ID NO: 50)<br>探针: TTGTGTGTTGGGTGGTGGTT (SEQ ID NO: 51)        |
| 核酸片段 4         | 正向引物: GCGTTCGGAGTTGTTAGCG (SEQ ID NO: 72)<br>反向引物: CACCGACGCCACAAACGA (SEQ ID NO: 73)<br>探针: CTATTACCGCCGCCGCGTCG (SEQ ID NO: 74)         |
| MEIS1          | 正向引物: GTTCGGGATAAGATTTCGGGG (SEQ ID NO: 75)<br>反向引物: TAATTAAACTACGCAACCCGACT (SEQ ID NO: 76)<br>探针: CGAGAGGGGTCGGCGAGTTAG (SEQ ID NO: 77) |

本实施例的扩增体系如表 11 所示：

表 11

| 反应组分       | 加入量 (μl) |
|------------|----------|
| 5X 缓冲液     | 4        |
| 镁离子(25 mM) | 4        |

|                   |     |
|-------------------|-----|
| dNTPs(10 mM)      | 0.8 |
| 上游引物 F(25 μM)     | 0.4 |
| 下游引物 R(25 μM)     | 0.4 |
| 探针 P(10 μM)       | 0.4 |
| Taq 聚合酶(5unit/μl) | 0.4 |
| H <sub>2</sub> O  | 7.6 |
| 模板 DNA            | 2   |
| 总体积               | 20  |

本实施例的扩增程序表如 12 所示:

表 12

| 步骤  | 温度和时间      | 循环数目 |
|-----|------------|------|
| 预变性 | 95 °C 5 分钟 | 1    |
| 扩增  | 95 °C 20 秒 | 45   |
|     | 65 °C 20 秒 |      |
|     | 62 °C 40 秒 |      |
| 冷却  | 40 °C 3 分钟 | 1    |

在 97 例尿液样品中, 甲基化水平检测 CT 值大于 cut-off 值为阴性, 反之为阳性。核酸片段 4 的检测 cut-off 值为 34.65, MEIS1 的检测 cut-off 值为 33.82。检测结果如表 13 所示。

表 13 97 例尿液样品检测结果

| 样本编号  | 样本类型 | 核酸片段 4 |      | MEIS1 |      | 样本编号  | 样本类型 | 核酸片段 4 |      | MEIS1 |      | 样本编号  | 样本类型 | 核酸片段 4 |      | MEIS1 |      |
|-------|------|--------|------|-------|------|-------|------|--------|------|-------|------|-------|------|--------|------|-------|------|
|       |      | CT 值   | 检测结果 | CT 值  | 检测结果 |       |      | CT 值   | 检测结果 | CT 值  | 检测结果 |       |      | CT 值   | 检测结果 | CT 值  | 检测结果 |
| UF001 | 对照   | 35.21  | 阴性   | 34.82 | 阴性   | UA042 | 对照   | 36.98  | 阴性   | 35.32 | 阴性   | UD063 | 膀胱癌  | 28.89  | 阳性   | 33.08 | 阳性   |
| UF002 | 对照   | 35.59  | 阴性   | 35.67 | 阴性   | UA046 | 对照   | 45     | 阴性   | 34.91 | 阴性   | UD065 | 膀胱癌  | 30.45  | 阳性   | 33.72 | 阳性   |
| UF003 | 对照   | 45     | 阴性   | 36.27 | 阴性   | UA049 | 对照   | 36.78  | 阴性   | 34.18 | 阴性   | UD068 | 膀胱癌  | 31.03  | 阳性   | 33.82 | 阴性   |
| UF004 | 对照   | 45     | 阴性   | 38.84 | 阴性   | UE001 | 对照   | 36.62  | 阴性   | 34.69 | 阴性   | UD070 | 膀胱癌  | 30.46  | 阳性   | 33.93 | 阴性   |
| UF005 | 对照   | 37.64  | 阴性   | 36.16 | 阴性   | UE002 | 对照   | 40.11  | 阴性   | 33.89 | 阴性   | UD072 | 膀胱癌  | 34.65  | 阴性   | 34.76 | 阴性   |
| UF006 | 对照   | 35.74  | 阴性   | 33.77 | 阳性   | UE003 | 对照   | 38.04  | 阴性   | 32.22 | 阳性   | UD076 | 膀胱癌  | 27.43  | 阳性   | 31.16 | 阳性   |
| UF007 | 对照   | 35.29  | 阴性   | 36.04 | 阴性   | UE004 | 对照   | 35.21  | 阴性   | 32.48 | 阳性   | UD084 | 膀胱癌  | 31.18  | 阳性   | 38.69 | 阴性   |
| UF008 | 对照   | 35.78  | 阴性   | 35.24 | 阴性   | UE005 | 对照   | 35.85  | 阴性   | 33.81 | 阳性   | UD089 | 膀胱癌  | 35.94  | 阴性   | 31.28 | 阳性   |
| UF009 | 对照   | 38.69  | 阴性   | 33.45 | 阳性   | UE006 | 对照   | 34.83  | 阴性   | 35.28 | 阴性   | UA001 | 膀胱癌  | 39.38  | 阴性   | 37.19 | 阴性   |
| UF010 | 对照   | 36.29  | 阴性   | 35.19 | 阴性   | UE008 | 对照   | 34.7   | 阴性   | 33.87 | 阴性   | UA002 | 膀胱癌  | 34.58  | 阳性   | 33.91 | 阴性   |
| UF011 | 对照   | 45     | 阴性   | 37.9  | 阴性   | UE009 | 对照   | 45     | 阴性   | 35.98 | 阴性   | UA003 | 膀胱癌  | 30.83  | 阳性   | 29.99 | 阳性   |
| UF012 | 对照   | 45     | 阴性   | 38.24 | 阴性   | UE010 | 对照   | 36.34  | 阴性   | 35    | 阴性   | UA004 | 膀胱癌  | 27.54  | 阳性   | 30.54 | 阳性   |
| UF013 | 对照   | 35.66  | 阴性   | 34.53 | 阴性   | UE013 | 对照   | 45     | 阴性   | 35.5  | 阴性   | UA063 | 膀胱癌  | 27.48  | 阳性   | 29.67 | 阳性   |
| UF014 | 对照   | 36.01  | 阴性   | 33.99 | 阴性   | UE014 | 对照   | 36.1   | 阴性   | 32.03 | 阳性   | UA066 | 膀胱癌  | 27.38  | 阳性   | 30.61 | 阳性   |
| UF015 | 对照   | 45     | 阴性   | 37.7  | 阴性   | UE016 | 对照   | 37.54  | 阴性   | 34.6  | 阴性   | UA067 | 膀胱癌  | 33.04  | 阳性   | 35.16 | 阴性   |
| UF016 | 对照   | 35.51  | 阴性   | 43    | 阴性   | UE017 | 对照   | 37.84  | 阴性   | 31.55 | 阳性   | UA068 | 膀胱癌  | 31.82  | 阳性   | 33.7  | 阳性   |
| UF017 | 对照   | 38.13  | 阴性   | 37.21 | 阴性   | UE018 | 对照   | 38.09  | 阴性   | 33.71 | 阳性   | UA069 | 膀胱癌  | 34.33  | 阳性   | 38.53 | 阴性   |
| UF018 | 对照   | 36.81  | 阴性   | 36.47 | 阴性   | UE019 | 对照   | 39.16  | 阴性   | 35.08 | 阴性   | UA070 | 膀胱癌  | 29.89  | 阳性   | 32.33 | 阳性   |
| UF019 | 对照   | 35.47  | 阴性   | 38.45 | 阴性   | UE020 | 对照   | 36.56  | 阴性   | 36.16 | 阴性   | UA071 | 膀胱癌  | 25.65  | 阳性   | 28.54 | 阳性   |
| UF020 | 对照   | 38.94  | 阴性   | 36.76 | 阴性   | UC107 | 膀胱癌  | 26.19  | 阳性   | 30.05 | 阳性   | UA072 | 膀胱癌  | 36.09  | 阴性   | 27.93 | 阳性   |
| UA009 | 对照   | 37.26  | 阴性   | 34.56 | 阴性   | UC108 | 膀胱癌  | 27.43  | 阳性   | 31.65 | 阳性   | UC018 | 膀胱癌  | 30.49  | 阳性   | 34.31 | 阴性   |
| UA011 | 对照   | 35.81  | 阴性   | 35.53 | 阴性   | UD043 | 膀胱癌  | 34.26  | 阳性   | 38.77 | 阴性   | UC035 | 膀胱癌  | 25.15  | 阳性   | 27.93 | 阳性   |
| UA013 | 对照   | 39.42  | 阴性   | 38.74 | 阴性   | UD044 | 膀胱癌  | 28.51  | 阳性   | 31.87 | 阳性   | UC045 | 膀胱癌  | 34.14  | 阳性   | 38.61 | 阴性   |
| UA018 | 对照   | 37.11  | 阴性   | 35.1  | 阴性   | UD046 | 膀胱癌  | 31.21  | 阳性   | 33.72 | 阳性   | UC062 | 膀胱癌  | 34.52  | 阳性   | 31.73 | 阳性   |
| UA022 | 对照   | 37     | 阴性   | 35.63 | 阴性   | UD047 | 膀胱癌  | 28.08  | 阳性   | 32    | 阳性   | UC068 | 膀胱癌  | 33.77  | 阳性   | 33.31 | 阳性   |
| UA023 | 对照   | 34.74  | 阴性   | 36.69 | 阴性   | UD049 | 膀胱癌  | 34.4   | 阳性   | 35.46 | 阴性   | UC070 | 膀胱癌  | 26.54  | 阳性   | 29.28 | 阳性   |
| UA027 | 对照   | 45     | 阴性   | 35.29 | 阴性   | UD051 | 膀胱癌  | 27.47  | 阳性   | 31.34 | 阳性   | UC080 | 膀胱癌  | 26.07  | 阳性   | 30.74 | 阳性   |
| UA028 | 对照   | 36.54  | 阴性   | 33.88 | 阴性   | UD054 | 膀胱癌  | 28.2   | 阳性   | 31.28 | 阳性   | UC082 | 膀胱癌  | 38.23  | 阴性   | 37.59 | 阴性   |

WO 2021/218031

PCT/CN2020/118994

|       |    |       |    |       |    |       |     |       |    |       |    |       |     |       |    |       |    |
|-------|----|-------|----|-------|----|-------|-----|-------|----|-------|----|-------|-----|-------|----|-------|----|
| UA029 | 对照 | 38.01 | 阴性 | 34.08 | 阴性 | UD056 | 膀胱癌 | 27.87 | 阳性 | 31.01 | 阳性 | UC083 | 膀胱癌 | 32.52 | 阳性 | 33.67 | 阳性 |
| UA030 | 对照 | 37.43 | 阴性 | 35.35 | 阴性 | UD057 | 膀胱癌 | 26.69 | 阳性 | 30.22 | 阳性 | UC087 | 膀胱癌 | 29.51 | 阳性 | 32.2  | 阳性 |
| UA032 | 对照 | 37.35 | 阴性 | 35.88 | 阴性 | UD059 | 膀胱癌 | 31.27 | 阳性 | 33.76 | 阳性 | UC092 | 膀胱癌 | 29.64 | 阳性 | 31.9  | 阳性 |
| UA037 | 对照 | 45    | 阴性 | 36.94 | 阴性 | UD060 | 膀胱癌 | 28.24 | 阳性 | 37.69 | 阴性 | UC095 | 膀胱癌 | 26.63 | 阳性 | 31.88 | 阳性 |
| UA040 | 对照 | 39.99 | 阴性 | 35.97 | 阴性 |       |     |       |    |       |    |       |     |       |    |       |    |

上述检测结果的统计分析结果如表 14 所示，ROC 曲线如图 2 所示。

表 14

|         | 核酸片段 4 | MEIS1 |
|---------|--------|-------|
| Cut-Off | 34.65  | 33.82 |
| 灵敏度     | 91.1   | 71.1  |
| 特异性     | 100.0  | 84.6  |
| AUC     | 0.956  | 0.790 |

结果显示，核酸片段 4 甲基化水平检测尿液样本中的膀胱癌，检测的特异性高达 100%，灵敏度达到 91.1%。

MEIS1 基因甲基化水平检测尿液样本中的膀胱癌，检测的特异性只有 84.6%，灵敏度只有 71.1%。

### 实施例 5

样本信息：尿液样本 299 例，包括低度恶性潜能的内翻性尿路上皮肿瘤 1 例，低度恶性潜能的乳头状尿路上皮肿瘤 16 例，膀胱癌 105 例，前列腺癌 31 例，肾盂癌 17 例，输尿管癌 10 例，对照样本 119 例。

本实施例中，DNA 提取、转化、核酸片段 4 的引物探针序列、扩增体系、扩增程序同实施例 4。

不同肿瘤类型样品的检测结果如表 15 所示：

表 15 核酸片段 4 对于尿液样品中不同肿瘤类型的检测结果

|       | 样本类型             | 核酸片<br>段 4 CT<br>值 | 核酸片<br>段 4 检<br>测结果 |       | 样本类<br>型 | 核酸片<br>段 4 CT<br>值 | 核酸片<br>段 4 检<br>测结果 |       | 样本类型 | 核酸片<br>段 4 CT<br>值 | 核酸片<br>段 4 检<br>测结果 |
|-------|------------------|--------------------|---------------------|-------|----------|--------------------|---------------------|-------|------|--------------------|---------------------|
| UA126 | 低度恶性潜能的内翻性尿路上皮肿瘤 | 37.89              | 阴性                  | UD236 | 对照组      | 45                 | 阴性                  | UD134 | 膀胱癌  | 33.59              | 阳性                  |
| UD007 | 低度恶性潜能的乳头状尿路上皮肿瘤 | 45                 | 阴性                  | UD238 | 对照组      | 37.68              | 阴性                  | UD135 | 膀胱癌  | 33.21              | 阳性                  |
| UD035 | 低度恶性潜能的乳头状尿路上皮肿瘤 | 39.18              | 阴性                  | UD242 | 对照组      | 37.06              | 阴性                  | UD136 | 膀胱癌  | 28.59              | 阳性                  |
| UD055 | 低度恶性潜能的乳头状尿路上皮肿瘤 | 36.92              | 阴性                  | UD259 | 对照组      | 34.49              | 阳性                  | UD137 | 膀胱癌  | 35.82              | 阳性                  |
| UD058 | 低度恶性潜能的乳头状尿路上皮肿瘤 | 36.77              | 阴性                  | UD263 | 对照组      | 45                 | 阴性                  | UD141 | 膀胱癌  | 34.57              | 阳性                  |
| UD061 | 低度恶性潜能的乳头状尿路上皮肿瘤 | 31.52              | 阳性                  | UD265 | 对照组      | 45                 | 阴性                  | UD142 | 膀胱癌  | 34.63              | 阳性                  |
| UD091 | 低度恶性潜能的乳头状尿路上皮肿瘤 | 40.48              | 阴性                  | UD266 | 对照组      | 38.52              | 阴性                  | UD145 | 膀胱癌  | 29.86              | 阳性                  |
| UD106 | 低度恶性潜能的乳头状尿路上皮肿瘤 | 33.11              | 阳性                  | UD269 | 对照组      | 37.42              | 阴性                  | UD150 | 膀胱癌  | 34.84              | 阳性                  |
| UD123 | 低度恶性潜能的乳头状尿路上皮肿瘤 | 37.45              | 阴性                  | UD270 | 对照组      | 36.66              | 阴性                  | UD161 | 膀胱癌  | 30.01              | 阳性                  |
| UD159 | 低度恶性潜能的乳头状尿路上皮肿瘤 | 34.93              | 阳性                  | UD274 | 对照组      | 38.54              | 阴性                  | UD162 | 膀胱癌  | 35.01              | 阳性                  |
| UD160 | 低度恶性潜能的乳头状尿路上皮肿瘤 | 35.19              | 阳性                  | UD276 | 对照组      | 45                 | 阴性                  | UD174 | 膀胱癌  | 34.83              | 阳性                  |
| UD181 | 低度恶性潜能的乳头状尿路上皮肿瘤 | 38.92              | 阴性                  | UD277 | 对照组      | 38.73              | 阴性                  | UD175 | 膀胱癌  | 32.68              | 阳性                  |
| UD230 | 低度恶性潜能的乳头状尿路上皮肿瘤 | 37.64              | 阴性                  | UD281 | 对照组      | 39.23              | 阴性                  | UD205 | 膀胱癌  | 30.64              | 阳性                  |
| UD232 | 低度恶性潜能的乳头状尿路上皮肿瘤 | 45                 | 阴性                  | UD301 | 对照组      | 38.06              | 阴性                  | UD210 | 膀胱癌  | 34.01              | 阳性                  |
| UD319 | 低度恶性潜能的乳头状尿路上皮肿瘤 | 38.82              | 阴性                  | UD304 | 对照组      | 45                 | 阴性                  | UD220 | 膀胱癌  | 29.11              | 阳性                  |
| UG043 | 低度恶性潜能的乳头状尿路上皮肿瘤 | 36.51              | 阴性                  | UD306 | 对照组      | 36.66              | 阴性                  | UD221 | 膀胱癌  | 29.06              | 阳性                  |
| UC071 | 低度恶性潜能的乳头状尿路上皮肿瘤 | 28.56              | 阳性                  | UD316 | 对照组      | 38.57              | 阴性                  | UD225 | 膀胱癌  | 37.17              | 阴性                  |
| UA010 | 对照组              | 37.29              | 阴性                  | UD318 | 对照组      | 36.85              | 阴性                  | UD237 | 膀胱癌  | 33.03              | 阳性                  |
| UA012 | 对照组              | 45                 | 阴性                  | UD323 | 对照组      | 39.11              | 阴性                  | UD243 | 膀胱癌  | 36.29              | 阳性                  |
| UA014 | 对照组              | 45                 | 阴性                  | UD325 | 对照组      | 38.66              | 阴性                  | UD244 | 膀胱癌  | 30.27              | 阳性                  |
| UA015 | 对照组              | 45                 | 阴性                  | UD326 | 对照组      | 38.6               | 阴性                  | UD257 | 膀胱癌  | 29.87              | 阳性                  |
| UA016 | 对照组              | 36.49              | 阴性                  | UD328 | 对照组      | 40.71              | 阴性                  | UD268 | 膀胱癌  | 29.51              | 阳性                  |
| UA017 | 对照组              | 37.42              | 阴性                  | UD331 | 对照组      | 37.89              | 阴性                  | UD293 | 膀胱癌  | 32.53              | 阳性                  |
| UA020 | 对照组              | 36.91              | 阴性                  | UD336 | 对照组      | 32.95              | 阳性                  | UD298 | 膀胱癌  | 30.48              | 阳性                  |
| UA021 | 对照组              | 45                 | 阴性                  | UG004 | 对照组      | 37.95              | 阴性                  | UD303 | 膀胱癌  | 32.98              | 阳性                  |

WO 2021/218031

PCT/CN2020/118994

|       |     |       |    |         |     |       |    |       |      |       |    |
|-------|-----|-------|----|---------|-----|-------|----|-------|------|-------|----|
| UA024 | 对照组 | 45    | 阴性 | UG009   | 对照组 | 45    | 阴性 | UD308 | 膀胱癌  | 34.96 | 阳性 |
| UA025 | 对照组 | 36.85 | 阴性 | UG021   | 对照组 | 45    | 阴性 | UD312 | 膀胱癌  | 35.02 | 阳性 |
| UA026 | 对照组 | 45    | 阴性 | UG036   | 对照组 | 38.4  | 阴性 | UD314 | 膀胱癌  | 31.95 | 阳性 |
| UA031 | 对照组 | 45    | 阴性 | UG039   | 对照组 | 45    | 阴性 | UD330 | 膀胱癌  | 30.06 | 阳性 |
| UA033 | 对照组 | 45    | 阴性 | UG066   | 对照组 | 38.08 | 阴性 | UD349 | 膀胱癌  | 32.5  | 阳性 |
| UA034 | 对照组 | 35.75 | 阳性 | UG093   | 对照组 | 45    | 阴性 | UD355 | 膀胱癌  | 30.59 | 阳性 |
| UA035 | 对照组 | 38.62 | 阴性 | UD164   | 对照组 | 36.5  | 阴性 | UD361 | 膀胱癌  | 33.99 | 阳性 |
| UA036 | 对照组 | 45    | 阴性 | UG035   | 对照组 | 38.61 | 阴性 | UD366 | 膀胱癌  | 31.61 | 阳性 |
| UA039 | 对照组 | 45    | 阴性 | UD346   | 对照组 | 37.55 | 阴性 | UD367 | 膀胱癌  | 31.71 | 阳性 |
| UA041 | 对照组 | 34.56 | 阳性 | UD357   | 对照组 | 37.33 | 阴性 | UG003 | 膀胱癌  | 32.28 | 阳性 |
| UA043 | 对照组 | 45    | 阴性 | UD364   | 对照组 | 45    | 阴性 | UG025 | 膀胱癌  | 35.58 | 阳性 |
| UA044 | 对照组 | 37.17 | 阴性 | UA002-2 | 膀胱癌 | 35.86 | 阳性 | UG046 | 膀胱癌  | 34.94 | 阳性 |
| UA045 | 对照组 | 37.63 | 阴性 | UA006   | 膀胱癌 | 33.2  | 阳性 | UG053 | 膀胱癌  | 33.5  | 阳性 |
| UA047 | 对照组 | 33.25 | 阳性 | UA008   | 膀胱癌 | 29.04 | 阳性 | UG059 | 膀胱癌  | 30.67 | 阳性 |
| UA048 | 对照组 | 37.92 | 阴性 | UA053   | 膀胱癌 | 30.97 | 阳性 | UG064 | 膀胱癌  | 32.83 | 阳性 |
| UA050 | 对照组 | 45    | 阴性 | UA055   | 膀胱癌 | 29.19 | 阳性 | UG080 | 膀胱癌  | 32    | 阳性 |
| UA051 | 对照组 | 37.24 | 阴性 | UA056   | 膀胱癌 | 28.83 | 阳性 | UA088 | 前列腺癌 | 35.19 | 阳性 |
| UA052 | 对照组 | 38.46 | 阴性 | UA057   | 膀胱癌 | 37.26 | 阴性 | UA089 | 前列腺癌 | 34.53 | 阳性 |
| UA108 | 对照组 | 36.84 | 阴性 | UA060   | 膀胱癌 | 32.61 | 阳性 | UA093 | 前列腺癌 | 36.14 | 阳性 |
| UA109 | 对照组 | 40.73 | 阴性 | UA061   | 膀胱癌 | 37.8  | 阴性 | UA105 | 前列腺癌 | 36.46 | 阴性 |
| UA114 | 对照组 | 37.47 | 阴性 | UA062   | 膀胱癌 | 29.53 | 阳性 | UD064 | 前列腺癌 | 34.91 | 阳性 |
| UA117 | 对照组 | 38.63 | 阴性 | UA073   | 膀胱癌 | 29.92 | 阳性 | UD102 | 前列腺癌 | 45    | 阴性 |
| UA118 | 对照组 | 39.81 | 阴性 | UA074   | 膀胱癌 | 34.94 | 阳性 | UD127 | 前列腺癌 | 36.5  | 阴性 |
| UA128 | 对照组 | 42.86 | 阴性 | UA077   | 膀胱癌 | 32.69 | 阳性 | UD138 | 前列腺癌 | 37.08 | 阴性 |
| UC001 | 对照组 | 34.94 | 阳性 | UA078   | 膀胱癌 | 29.86 | 阳性 | UD151 | 前列腺癌 | 36.07 | 阳性 |
| UC002 | 对照组 | 36.77 | 阴性 | UA079   | 膀胱癌 | 35.04 | 阳性 | UD154 | 前列腺癌 | 36.95 | 阴性 |
| UC005 | 对照组 | 37.97 | 阴性 | UA090   | 膀胱癌 | 36.6  | 阴性 | UD165 | 前列腺癌 | 37.88 | 阴性 |
| UC006 | 对照组 | 45    | 阴性 | UA091   | 膀胱癌 | 29.57 | 阳性 | UD179 | 前列腺癌 | 35.7  | 阳性 |
| UC007 | 对照组 | 37.7  | 阴性 | UA092   | 膀胱癌 | 30.71 | 阳性 | UD206 | 前列腺癌 | 39.03 | 阴性 |
| UC009 | 对照组 | 38.15 | 阴性 | UA094   | 膀胱癌 | 31.85 | 阳性 | UD233 | 前列腺癌 | 35.56 | 阳性 |
| UC011 | 对照组 | 38.43 | 阴性 | UA097   | 膀胱癌 | 29.41 | 阳性 | UD240 | 前列腺癌 | 34.29 | 阳性 |
| UC012 | 对照组 | 38.92 | 阴性 | UA100   | 膀胱癌 | 36.99 | 阴性 | UD254 | 前列腺癌 | 37.11 | 阴性 |
| UC013 | 对照组 | 37.17 | 阴性 | UA104   | 膀胱癌 | 37.5  | 阴性 | UD255 | 前列腺癌 | 45    | 阴性 |
| UC017 | 对照组 | 37.49 | 阴性 | UA111   | 膀胱癌 | 31.03 | 阳性 | UD294 | 前列腺癌 | 45    | 阴性 |
| UC019 | 对照组 | 37.67 | 阴性 | UA115   | 膀胱癌 | 34.47 | 阳性 | UD310 | 前列腺癌 | 37.97 | 阴性 |
| UC020 | 对照组 | 37.79 | 阴性 | UA116   | 膀胱癌 | 31.71 | 阳性 | UD338 | 前列腺癌 | 37.18 | 阴性 |
| UC022 | 对照组 | 37.67 | 阴性 | UA119   | 膀胱癌 | 33.26 | 阳性 | UD341 | 前列腺癌 | 38.13 | 阴性 |
| UC023 | 对照组 | 38.4  | 阴性 | UA121   | 膀胱癌 | 31.05 | 阳性 | UD351 | 前列腺癌 | 38.71 | 阴性 |
| UC024 | 对照组 | 39.64 | 阴性 | UA122   | 膀胱癌 | 30.28 | 阳性 | UG007 | 前列腺癌 | 34.69 | 阳性 |
| UC026 | 对照组 | 37.81 | 阴性 | UA124   | 膀胱癌 | 29.37 | 阳性 | UG011 | 前列腺癌 | 37.87 | 阴性 |
| UC027 | 对照组 | 45    | 阴性 | UA134   | 膀胱癌 | 29.32 | 阳性 | UG037 | 前列腺癌 | 38.11 | 阴性 |
| UC030 | 对照组 | 37.23 | 阴性 | UA135   | 膀胱癌 | 36.85 | 阴性 | UG038 | 前列腺癌 | 45    | 阴性 |
| UC031 | 对照组 | 45    | 阴性 | UA137   | 膀胱癌 | 31.16 | 阳性 | UG044 | 前列腺癌 | 33.04 | 阳性 |
| UC032 | 对照组 | 36.74 | 阴性 | UA138   | 膀胱癌 | 30.48 | 阳性 | UG054 | 前列腺癌 | 36.13 | 阳性 |
| UC033 | 对照组 | 38.47 | 阴性 | UA139   | 膀胱癌 | 28.75 | 阳性 | UG061 | 前列腺癌 | 36.66 | 阴性 |
| UC039 | 对照组 | 37.73 | 阴性 | UA141   | 膀胱癌 | 28.14 | 阳性 | UA110 | 前列腺癌 | 45    | 阴性 |
| UC040 | 对照组 | 38.62 | 阴性 | UA147   | 膀胱癌 | 45    | 阴性 | UD292 | 前列腺癌 | 45    | 阴性 |
| UC041 | 对照组 | 37.8  | 阴性 | UA149   | 膀胱癌 | 29.24 | 阳性 | UA080 | 肾盂癌  | 30.98 | 阳性 |
| UC044 | 对照组 | 38.03 | 阴性 | UA154   | 膀胱癌 | 31.17 | 阳性 | UA085 | 肾盂癌  | 34.92 | 阳性 |
| UC046 | 对照组 | 34.15 | 阳性 | UB001   | 膀胱癌 | 31.57 | 阳性 | UA086 | 肾盂癌  | 35.11 | 阳性 |
| UC047 | 对照组 | 37.57 | 阴性 | UB003   | 膀胱癌 | 29.23 | 阳性 | UA106 | 肾盂癌  | 33.1  | 阳性 |
| UC048 | 对照组 | 36.51 | 阴性 | UB005   | 膀胱癌 | 28.74 | 阳性 | UA142 | 肾盂癌  | 37.85 | 阴性 |

|       |     |       |    |       |     |       |    |       |      |       |    |
|-------|-----|-------|----|-------|-----|-------|----|-------|------|-------|----|
| UC051 | 对照组 | 45    | 阴性 | UB006 | 膀胱癌 | 31.12 | 阳性 | UD013 | 肾盂癌  | 35.76 | 阳性 |
| UC052 | 对照组 | 37.56 | 阴性 | UB008 | 膀胱癌 | 32.25 | 阳性 | UD023 | 肾盂癌  | 30.23 | 阳性 |
| UC055 | 对照组 | 45    | 阴性 | UC096 | 膀胱癌 | 36.11 | 阳性 | UD042 | 肾盂癌  | 33.77 | 阳性 |
| UC056 | 对照组 | 45    | 阴性 | UC101 | 膀胱癌 | 30.2  | 阳性 | UD062 | 肾盂癌  | 35.71 | 阳性 |
| UC059 | 对照组 | 45    | 阴性 | UD003 | 膀胱癌 | 35.16 | 阳性 | UD067 | 肾盂癌  | 38.29 | 阴性 |
| UC060 | 对照组 | 39.64 | 阴性 | UD004 | 膀胱癌 | 29.16 | 阳性 | UD079 | 肾盂癌  | 31.58 | 阳性 |
| UC061 | 对照组 | 45    | 阴性 | UD009 | 膀胱癌 | 29.79 | 阳性 | UD113 | 肾盂癌  | 28.25 | 阳性 |
| UC063 | 对照组 | 37.51 | 阴性 | UD011 | 膀胱癌 | 28.87 | 阳性 | UD125 | 肾盂癌  | 30.63 | 阳性 |
| UC064 | 对照组 | 38.07 | 阴性 | UD014 | 膀胱癌 | 32.92 | 阳性 | UD251 | 肾盂癌  | 31.07 | 阳性 |
| UC081 | 对照组 | 36.53 | 阴性 | UD015 | 膀胱癌 | 34.54 | 阳性 | UD290 | 肾盂癌  | 36.56 | 阴性 |
| UC097 | 对照组 | 37.37 | 阴性 | UD016 | 膀胱癌 | 30.08 | 阳性 | UD291 | 肾盂癌  | 31.54 | 阳性 |
| UC098 | 对照组 | 37.81 | 阴性 | UD018 | 膀胱癌 | 32.11 | 阳性 | UD053 | 肾盂癌  | 31    | 阳性 |
| UD008 | 对照组 | 45    | 阴性 | UD028 | 膀胱癌 | 34.16 | 阳性 | UD167 | 输尿管癌 | 29.78 | 阳性 |
| UD040 | 对照组 | 39.98 | 阴性 | UD030 | 膀胱癌 | 28.73 | 阳性 | UD094 | 输尿管癌 | 33.57 | 阳性 |
| UD041 | 对照组 | 35.93 | 阳性 | UD038 | 膀胱癌 | 29.54 | 阳性 | UD156 | 输尿管癌 | 36.74 | 阴性 |
| UD045 | 对照组 | 37.53 | 阴性 | UD039 | 膀胱癌 | 36.31 | 阴性 | UD176 | 输尿管癌 | 29.94 | 阳性 |
| UD050 | 对照组 | 38.19 | 阴性 | UD078 | 膀胱癌 | 33.22 | 阳性 | UD177 | 输尿管癌 | 31.76 | 阳性 |
| UD071 | 对照组 | 38.29 | 阴性 | UD080 | 膀胱癌 | 28.36 | 阳性 | UD246 | 输尿管癌 | 31.02 | 阳性 |
| UD073 | 对照组 | 37.69 | 阴性 | UD095 | 膀胱癌 | 31.15 | 阳性 | UD253 | 输尿管癌 | 34.98 | 阳性 |
| UD108 | 对照组 | 37.99 | 阴性 | UD099 | 膀胱癌 | 35.08 | 阳性 | UD350 | 输尿管癌 | 31.66 | 阳性 |
| UD124 | 对照组 | 39.18 | 阴性 | UD109 | 膀胱癌 | 30.96 | 阳性 | UG078 | 输尿管癌 | 34.14 | 阳性 |
| UD126 | 对照组 | 37.49 | 阴性 | UD110 | 膀胱癌 | 36.1  | 阳性 | UG085 | 输尿管癌 | 30.01 | 阳性 |
| UD200 | 对照组 | 42.77 | 阴性 | UD111 | 膀胱癌 | 32.91 | 阳性 |       |      |       |    |

在本次检测中，ACTB 小于 32 表示样本取样合格或者操作正确；当核酸片段 4 甲基化水平检测 CT 值小于 36.3 时，表示检测结果为阳性，反之检测结果为阴性。

上述检测结果的统计分析结果如表 16 所示，ROC 曲线如图 3 所示。

表 16

| 分析组别                                             | 指标  | 核酸片段 4          |
|--------------------------------------------------|-----|-----------------|
| 对照组和膀胱癌&输尿管癌&肾盂癌组比较                              | 特异性 | 93.3%           |
|                                                  | 灵敏度 | 90.9%           |
|                                                  | AUC | 0.962 (P<0.001) |
| 对照组和输尿管癌组比较                                      | 特异性 | 92.4%           |
|                                                  | 灵敏度 | 90.0%           |
|                                                  | AUC | 0.979 (P<0.001) |
| 对照组和肾盂癌组比较                                       | 特异性 | 92.4%           |
|                                                  | 灵敏度 | 82.4%           |
|                                                  | AUC | 0.927 (P<0.001) |
| 对照组和膀胱癌组比较                                       | 特异性 | 93.3%           |
|                                                  | 灵敏度 | 90.4%           |
|                                                  | AUC | 0.966 (P<0.001) |
| 对照组和<br>低度恶性潜能的内翻性尿路上皮肿瘤&低度恶性潜<br>能的乳头状尿路上皮肿瘤组比较 | 特异性 | 92.4            |
|                                                  | 灵敏度 | 83.6            |
|                                                  | AUC | 0.923 (P<0.001) |
| 对照组和前列腺癌组比较                                      | 特异性 | 80.7            |
|                                                  | 灵敏度 | 58.1            |
|                                                  | AUC | 0.671 (P=0.006) |

从上表结果来看，核酸片段 4 对尿液样品中各种肿瘤类型的检测效果均有良好的灵敏性和特异性。

#### 实施例 6

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，以使本公开的检测试剂能够实际应用临床检测中。

部分引物和探针（6组）如下表 17 所示，检测结果如表 18 所示。所有的引物和探针使用经亚硫酸盐转化获得核酸片段 4 甲基化序列作为模板，由发明人设计获得。交由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。

表 17 引物和探针

| 名称      | 序列编号       | 序列                           | 名称   | 序列编号          | 序列                      |
|---------|------------|------------------------------|------|---------------|-------------------------|
| CG443-F | SEQ NO.:31 | IDAGGTTCGTTTACGAGGTTTTC      | A1-F | SEQ ID NO.:78 | TTGGATTGTGAATTTGTGTTTGT |
| CG443-R | SEQ NO.:32 | IDCCTACGCCAACTACTCCG         | A1-R | SEQ ID NO.:79 | CAATAAAACCTACTCCTCCCTTA |
| CG443-P | SEQ NO.:33 | IDCGAACGCTCCCCTCCAAA         | A1-P | SEQ ID NO.:51 | TTGTGTGTTGGGTGGTGGTT    |
| CG447-F | SEQ NO.:34 | IDTGCCTTAAGTGTACGTTTATC      | A2-F | SEQ ID NO.:80 | GATGGAGGAGGTTTAGTAAGTT  |
| CG447-R | SEQ NO.:35 | IDCGTAAACAACATACTCGCG        | A2-R | SEQ ID NO.:81 | CAATAAAACCTACTCCTCCCTTA |
| CG447-P | SEQ NO.:36 | IDTTCTCCTCCTACGCCTACTACCTA   | A2-P | SEQ ID NO.:51 | TTGTGTGTTGGGTGGTGGTT    |
| CG190-F | SEQ NO.:37 | IDGCGTTGCGTAGGTAGTAGGC       | A3-F | SEQ ID NO.:82 | GGAGGTTTAGTAAGTTTGGATT  |
| CG190-R | SEQ NO.:38 | IDGAACCTCGAAAAATAATACCGTT    | A3-R | SEQ ID NO.:83 | CAATAAAACCTACTCCTCCCTTA |
| CG190-P | SEQ NO.:39 | IDAGGAGAACGAGCGCGCGA         | A3-P | SEQ ID NO.:51 | TTGTGTGTTGGGTGGTGGTT    |
| CG437-F | SEQ NO.:40 | IDGCGTTCGGAGTTGTTTAGCG       |      |               |                         |
| CG437-R | SEQ NO.:41 | IDCACCGACGCCACAAACGA         |      |               |                         |
| CG437-P | SEQ NO.:42 | IDCTATTACCGCCGCGCGCTCG       |      |               |                         |
| CG441-F | SEQ NO.:43 | IDGCGGTCGTTGTATCGTTATC       |      |               |                         |
| CG441-R | SEQ NO.:44 | IDGAATACTTCTCGACTACCCG       |      |               |                         |
| CG441-P | SEQ NO.:45 | IDTAACGACCCCGCAACAAACCG      |      |               |                         |
| CG446-F | SEQ NO.:46 | IDCGTTGTATCGTTATCGGTGAGC     |      |               |                         |
| CG446-R | SEQ NO.:47 | IDGCGCACTTAAAAATCCGCG        |      |               |                         |
| CG446-P | SEQ NO.:48 | IDCTTCTCGACTACCCGCAACAATAACG |      |               |                         |

各引物探针组的筛选在 5637 膀胱癌细胞株（阳性）和 SK-N-BE 细胞株（阴性）中进行。细胞经支原体检测和细胞形态分析确定正常，经过扩大培养后收集细胞，采用 QIAGEN 公司的 DNA 提取试剂盒（QIAGEN DNA Mini Kit, #51306）进行 DNA 提取。提取获得的 DNA 经紫外分光光度计定量后使用 ZYMO RESEARCH 生物公司的 DNA 转化试剂盒（EZ DNA Methylation Kit, D5002）进行 DNA 的亚硫酸盐修饰。最终采用 1×TE Buffer 将 DNA 稀释到 6000 copies/μl。分别获得阳性参考品 P0（阳性 DNA 占比 100%，即核酸片段 4 甲基化程度为 100%）和阴性参考品 N0（阴性 DNA 占比 100%，即核酸片段 4 甲基化程度为 0）。P1 采用阳性 DNA 与阴性 DNA 按 1:9 的比率混合，P2 采用阳性 DNA 与阴性 DNA 按 1:99 的比率混合，P3 采用阳性 DNA 与阴性 DNA 按 1:999 的比率混合获得。

按照实施例 1 的体系和扩增程序进行获得引物熔解曲线结果，进一步按照实施例 4 的检测体系与扩增程序获得引物探针组的扩增结果。各组引物探针的扩增曲线和熔解曲线如图 4 所示。

表 18 为各引物探针组在不同参考品中的检测结果数据。

表 18 各引物探针组在不同参考品中的检测的 Ct 值

| 检测 DNA        | CG190  | CG437  | CG441  | CG443  | CG446  | CG447  | A1 (内参) | A2 (内参) | A3 (内参) |
|---------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|---------|
| P0 (检测限 100%) | 24.973 | 25.809 | 24.934 | 25.090 | 25.238 | 25.355 | 24.582  | 24.363  | 24.371  |
| P1 (检测限 10%)  | 28.340 | 29.020 | 28.035 | 28.285 | 28.637 | 28.949 | 24.691  | 24.270  | 24.715  |

## WO 2021/218031

## PCT/CN2020/118994

|               |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
|---------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| P2 (检测限 1%)   | 31.520 | 32.309 | 31.090 | 31.145 | 32.637 | 31.902 | 24.504 | 24.285 | 24.559 |
| P3 (检测限 0.1%) | 35.293 | 33.738 | 35.012 | 34.949 | 34.738 | 34.824 | 24.449 | 24.230 | 24.566 |
| N0 (阴性)       | 37.176 | 34.520 | 无扩增    | 35.754 | 40.895 | 无扩增    | 24.793 | 24.449 | 24.840 |

结果判断 Cutoff 值为 38, Ct 值小于等于 38 为阳性, Ct 值大于 38 为阴性。

如表 18 所示, 6 组引物探针组合均能在 0.1% 的检测限水平上检测出 5637 阳性膀胱癌细胞株, 但仅有 CG441、CG446、CG447 引物探针组在阴性细胞株 SK-N-BE 上不会发生非特异性扩增或误判为阳性。为了能实际应用于临床, 发明人设计挑选出了三组内参基因 ACTB 检测引物探针序列, 参考品检测评估结果显示 A1、A2 和 A3 等 3 组引物探针检测体系检测结果一致。

图 4 显示 CG190、CG437、CG443 检测体系溶解曲线有双峰, 其中 P0、P1、P2 参考品检测结果溶解峰位置一致, 部分检测体系 P3 与 N0 参考品检测结果溶解峰位置与 P0 相差较大, 结合扩增曲线定量结果 ct 值提示检测体系不能很好区分阴性质控品和 P3 参考品, 其检测限不能达到千分之一。CG446 检测体系溶解曲线也有双峰, N0 溶解峰位置与 P0 相差较大, 但其扩增曲线定量结果 ct 值提示检测体系可以很好区分阴性质控品和 P3 参考品, 其检测限能达到千分之一。CG441、CG447 检测体系溶解曲线峰图单一, N0 没有扩增曲线, 无产物溶解峰, 其扩增曲线定量结果 ct 值提示检测体系可以很好区分阴性质控品和 P3 参考品, 该体系其检测限达到千分之一。其中 CG447 平台期荧光信号强度显著低于 CG441、CG446。

## 实施例 7

用引物探针组 CG441 在 193 例尿液标本中 (膀胱癌 89 例, 对照组 104 例) 进行检测, 扩增体系及扩增程序按照实施例 4。检测结果如表 19 所示。

表 19 引物探针组 CG441 在 193 例尿液样品检测结果

| 样本编号  | 样本类型 | ACTB (内参基因) | CG441 | 检测结果 | 样本编号    | 样本类型 | ACTB (内参基因) | CG441 | 检测结果 | 样本编号  | 样本类型 | ACTB (内参基因) | CG441 | 检测结果 |
|-------|------|-------------|-------|------|---------|------|-------------|-------|------|-------|------|-------------|-------|------|
| UA141 | 膀胱癌  | 25.77       | 28.79 | 阳性   | UC046   | 对照组  | 28.98       | 35.98 | 阴性   | UD073 | 对照组  | 28.31       | 40.61 | 阴性   |
| UD080 | 膀胱癌  | 27.98       | 28.55 | 阳性   | UD028   | 膀胱癌  | 28.32       | 34.14 | 阳性   | UC007 | 对照组  | 28.61       | 44    | 阴性   |
| UD136 | 膀胱癌  | 28.61       | 28.55 | 阳性   | UA115   | 膀胱癌  | 30.82       | 35.14 | 阳性   | UC039 | 对照组  | 28.04       | 41.53 | 阴性   |
| UD030 | 膀胱癌  | 28.62       | 28.97 | 阳性   | UD259   | 对照组  | 28.64       | 37.1  | 阴性   | UC020 | 对照组  | 28.66       | 44    | 阴性   |
| UB005 | 膀胱癌  | 28.09       | 29.01 | 阳性   | UD015   | 膀胱癌  | 28.21       | 36.08 | 阳性   | UC041 | 对照组  | 28.16       | 44    | 阴性   |
| UA139 | 膀胱癌  | 27.84       | 29.53 | 阳性   | UA041   | 对照组  | 28.9        | 38.6  | 阴性   | UA061 | 膀胱癌  | 28.57       | 39.92 | 阴性   |
| UA056 | 膀胱癌  | 27.94       | 30.66 | 阳性   | UD141   | 膀胱癌  | 29.8        | 34.97 | 阳性   | UC026 | 对照组  | 29.23       | 39.74 | 阴性   |
| UD011 | 膀胱癌  | 27.88       | 28.89 | 阳性   | UD142   | 膀胱癌  | 29.92       | 35.47 | 阳性   | UC098 | 对照组  | 28.68       | 43    | 阴性   |
| UA008 | 膀胱癌  | 28.02       | 31.41 | 阳性   | UD174   | 膀胱癌  | 29.03       | 36.32 | 阳性   | UA048 | 对照组  | 29.52       | 44    | 阴性   |
| UD221 | 膀胱癌  | 27.97       | 29.18 | 阳性   | UD150   | 膀胱癌  | 29.44       | 36.45 | 阳性   | UC005 | 对照组  | 29.43       | 40.93 | 阴性   |
| UD220 | 膀胱癌  | 28.07       | 29.25 | 阳性   | UA074   | 膀胱癌  | 32.62       | 36.47 | 阳性   | UD108 | 对照组  | 28.36       | 44    | 阴性   |
| UD004 | 膀胱癌  | 28.18       | 29.54 | 阳性   | UC001   | 对照组  | 28.89       | 36.78 | 阴性   | UC044 | 对照组  | 28.83       | 39.09 | 阴性   |
| UA055 | 膀胱癌  | 28.58       | 31.55 | 阳性   | UD308   | 膀胱癌  | 28.52       | 35.41 | 阳性   | UC064 | 对照组  | 28.87       | 39.75 | 阴性   |
| UB003 | 膀胱癌  | 28.53       | 29.88 | 阳性   | UA079   | 膀胱癌  | 29.33       | 40.29 | 阴性   | UC009 | 对照组  | 28          | 44    | 阴性   |
| UA149 | 膀胱癌  | 27.98       | 29.49 | 阳性   | UD099   | 膀胱癌  | 28.14       | 36.62 | 阳性   | UD050 | 对照组  | 28.79       | 44    | 阴性   |
| UA134 | 膀胱癌  | 28.73       | 32.23 | 阳性   | UD003   | 膀胱癌  | 28.46       | 40.21 | 阴性   | UD071 | 对照组  | 29.67       | 44    | 阴性   |
| UA124 | 膀胱癌  | 27.25       | 32.72 | 阳性   | UA034   | 对照组  | 28.95       | 39.11 | 阴性   | UC023 | 对照组  | 29.51       | 44    | 阴性   |
| UA097 | 膀胱癌  | 28.43       | 30.24 | 阳性   | UD137   | 膀胱癌  | 30.71       | 39.03 | 阴性   | UC011 | 对照组  | 28.65       | 44    | 阴性   |
| UD268 | 膀胱癌  | 28.16       | 29.72 | 阳性   | UA002-2 | 膀胱癌  | 29.72       | 37.66 | 阳性   | UA052 | 对照组  | 29.08       | 39.13 | 阴性   |
| UA062 | 膀胱癌  | 27.8        | 30.46 | 阳性   | UD041   | 对照组  | 28.7        | 38.65 | 阴性   | UC033 | 对照组  | 28.84       | 44    | 阴性   |
| UD038 | 膀胱癌  | 28.16       | 30.23 | 阳性   | UD110   | 膀胱癌  | 28.6        | 37.43 | 阳性   | UD266 | 对照组  | 29.92       | 39.91 | 阴性   |
| UA091 | 膀胱癌  | 29.07       | 33.89 | 阳性   | UC096   | 膀胱癌  | 30.93       | 44    | 阴性   | UD274 | 对照组  | 28.81       | 44    | 阴性   |
| UD009 | 膀胱癌  | 28.09       | 30.74 | 阳性   | UD243   | 膀胱癌  | 31.46       | 36.57 | 阳性   | UC040 | 对照组  | 29.21       | 40.05 | 阴性   |
| UD145 | 膀胱癌  | 28.26       | 29.84 | 阳性   | UD039   | 膀胱癌  | 28.43       | 39.76 | 阴性   | UA035 | 对照组  | 31.25       | 44    | 阴性   |
| UA078 | 膀胱癌  | 27.87       | 31.69 | 阳性   | UA016   | 对照组  | 28.94       | 43    | 阴性   | UA117 | 对照组  | 29.24       | 44    | 阴性   |
| UD257 | 膀胱癌  | 28.27       | 30.65 | 阳性   | UD164   | 对照组  | 28.73       | 40.47 | 阴性   | UD277 | 对照组  | 28.64       | 44    | 阴性   |

| WO 2021/218031 |     |       |       |    |       |     |       |       | PCT/CN2020/118994 |       |     |       |       |    |
|----------------|-----|-------|-------|----|-------|-----|-------|-------|-------------------|-------|-----|-------|-------|----|
| UA073          | 膀胱癌 | 28.04 | 31.23 | 阳性 | UC048 | 对照组 | 28.21 | 44    | 阴性                | UC012 | 对照组 | 28.89 | 44    | 阴性 |
| UD161          | 膀胱癌 | 28.58 | 30.16 | 阳性 | UC081 | 对照组 | 27.9  | 40.39 | 阴性                | UD124 | 对照组 | 30.65 | 39.12 | 阴性 |
| UD016          | 膀胱癌 | 29.27 | 30.28 | 阳性 | UA090 | 膀胱癌 | 28.71 | 40.83 | 阴性                | UD281 | 对照组 | 28.62 | 44    | 阴性 |
| UC101          | 膀胱癌 | 28.5  | 30.95 | 阳性 | UD270 | 对照组 | 29.85 | 37.27 | 阳性                | UC024 | 对照组 | 29.61 | 44    | 阴性 |
| UD244          | 膀胱癌 | 27.84 | 30.99 | 阳性 | UD306 | 对照组 | 28.91 | 44    | 阴性                | UC060 | 对照组 | 31.53 | 44    | 阴性 |
| UA122          | 膀胱癌 | 28.31 | 31.12 | 阳性 | UC032 | 对照组 | 28.93 | 38.9  | 阴性                | UA118 | 对照组 | 33.15 | 44    | 阴性 |
| UD298          | 膀胱癌 | 28.52 | 30.43 | 阳性 | UC002 | 对照组 | 28.58 | 37.82 | 阳性                | UD040 | 对照组 | 28.75 | 44    | 阴性 |
| UA138          | 膀胱癌 | 28.26 | 31.49 | 阳性 | UA108 | 对照组 | 28.66 | 38.81 | 阴性                | UA109 | 对照组 | 31.61 | 44    | 阴性 |
| UD205          | 膀胱癌 | 28.63 | 31.62 | 阳性 | UD318 | 对照组 | 29.83 | 39.14 | 阴性                | UD200 | 对照组 | 32.69 | 44    | 阴性 |
| UA092          | 膀胱癌 | 28.84 | 31.46 | 阳性 | UA025 | 对照组 | 28.91 | 43    | 阴性                | UA128 | 对照组 | 31.09 | 44    | 阴性 |
| UD109          | 膀胱癌 | 28.69 | 31.26 | 阳性 | UA135 | 膀胱癌 | 28.79 | 39.61 | 阴性                | UA147 | 膀胱癌 | 30.53 | 44    | 阴性 |
| UA053          | 膀胱癌 | 27.98 | 32.22 | 阳性 | UA020 | 对照组 | 28.82 | 43    | 阴性                | UA021 | 对照组 | 28.93 | 39.63 | 阴性 |
| UA111          | 膀胱癌 | 28.61 | 31.82 | 阳性 | UA100 | 膀胱癌 | 28.14 | 44    | 阴性                | UD364 | 对照组 | 30.84 | 39.72 | 阴性 |
| UA121          | 膀胱癌 | 28.76 | 31.62 | 阳性 | UD242 | 对照组 | 29.58 | 44    | 阴性                | UC061 | 对照组 | 31.94 | 40.68 | 阴性 |
| UB006          | 膀胱癌 | 28.5  | 31.92 | 阳性 | UA044 | 对照组 | 29.17 | 44    | 阴性                | UA050 | 对照组 | 28.88 | 43    | 阴性 |
| UD095          | 膀胱癌 | 28.02 | 31.17 | 阳性 | UC013 | 对照组 | 28.33 | 44    | 阴性                | UC059 | 对照组 | 30.63 | 43    | 阴性 |
| UA137          | 膀胱癌 | 31.55 | 31.86 | 阳性 | UD225 | 膀胱癌 | 30.63 | 39.58 | 阴性                | UD263 | 对照组 | 30.59 | 43    | 阴性 |
| UA154          | 膀胱癌 | 28.33 | 33.49 | 阳性 | UC030 | 对照组 | 29.2  | 44    | 阴性                | UD008 | 对照组 | 30.29 | 44    | 阴性 |
| UB001          | 膀胱癌 | 28.79 | 31.74 | 阳性 | UA051 | 对照组 | 28.72 | 39.49 | 阴性                | UC056 | 对照组 | 32.65 | 44    | 阴性 |
| UA116          | 膀胱癌 | 28.36 | 32.16 | 阳性 | UA057 | 膀胱癌 | 30.11 | 44    | 阴性                | UC055 | 对照组 | 28.32 | 44    | 阴性 |
| UA094          | 膀胱癌 | 30.78 | 33.13 | 阳性 | UA010 | 对照组 | 28.93 | 39.99 | 阴性                | UC027 | 对照组 | 32.18 | 44    | 阴性 |
| UD018          | 膀胱癌 | 30.32 | 33.01 | 阳性 | UD357 | 对照组 | 27.73 | 44    | 阴性                | UD265 | 对照组 | 30.04 | 44    | 阴性 |
| UB008          | 膀胱癌 | 28.58 | 32.81 | 阳性 | UC097 | 对照组 | 28.88 | 44    | 阴性                | UD236 | 对照组 | 28.35 | 44    | 阴性 |
| UD293          | 膀胱癌 | 28.53 | 32.7  | 阳性 | UD269 | 对照组 | 30.34 | 40.72 | 阴性                | UA015 | 对照组 | 29.47 | 44    | 阴性 |
| UA060          | 膀胱癌 | 28.7  | 36.1  | 阳性 | UA017 | 对照组 | 29.56 | 44    | 阴性                | UG093 | 对照组 | 29.74 | 44    | 阴性 |
| UD175          | 膀胱癌 | 28.82 | 33.06 | 阳性 | UA114 | 对照组 | 28.04 | 43    | 阴性                | UA014 | 对照组 | 31.76 | 44    | 阴性 |
| UA077          | 膀胱癌 | 28.14 | 33.82 | 阳性 | UD126 | 对照组 | 28.81 | 38.62 | 阴性                | UA012 | 对照组 | 31.47 | 44    | 阴性 |
| UD111          | 膀胱癌 | 32.89 | 33.47 | 阳性 | UC017 | 对照组 | 28.92 | 44    | 阴性                | UA024 | 对照组 | 32.56 | 44    | 阴性 |
| UD014          | 膀胱癌 | 28.35 | 32.94 | 阳性 | UA104 | 膀胱癌 | 28.79 | 44    | 阴性                | UA036 | 对照组 | 30.78 | 44    | 阴性 |
| UD336          | 对照组 | 29.06 | 39.21 | 阴性 | UC063 | 对照组 | 28.27 | 44    | 阴性                | UA043 | 对照组 | 30.74 | 44    | 阴性 |
| UD303          | 膀胱癌 | 28.76 | 36.95 | 阳性 | UD045 | 对照组 | 28.29 | 44    | 阴性                | UA033 | 对照组 | 29.55 | 44    | 阴性 |
| UD237          | 膀胱癌 | 30.92 | 34.63 | 阳性 | UD346 | 对照组 | 29.17 | 44    | 阴性                | UA031 | 对照组 | 29.48 | 44    | 阴性 |
| UA006          | 膀胱癌 | 28.13 | 40.73 | 阴性 | UC052 | 对照组 | 28.07 | 44    | 阴性                | UA026 | 对照组 | 28.84 | 44    | 阴性 |
| UD135          | 膀胱癌 | 28.59 | 33.82 | 阳性 | UC047 | 对照组 | 29.03 | 44    | 阴性                | UA039 | 对照组 | 33    | 44    | 阴性 |
| UD078          | 膀胱癌 | 28.63 | 33.74 | 阳性 | UA045 | 对照组 | 28.45 | 44    | 阴性                | UC006 | 对照组 | 31.89 | 44    | 阴性 |
| UA047          | 对照组 | 28.44 | 33.44 | 阴性 | UC022 | 对照组 | 28.93 | 38.73 | 阴性                | UC031 | 对照组 | 30.49 | 44    | 阴性 |
| UA119          | 膀胱癌 | 28.85 | 34.58 | 阳性 | UC019 | 对照组 | 28.94 | 39.08 | 阴性                | UC051 | 对照组 | 31.51 | 44    | 阴性 |
| UD134          | 膀胱癌 | 28.85 | 34.18 | 阳性 | UD238 | 对照组 | 28.2  | 39.73 | 阴性                | UD276 | 对照组 | 32.49 | 44    | 阴性 |
| UD210          | 膀胱癌 |       | 34.47 | 阳性 |       |     |       |       |                   |       |     |       |       |    |

结果判断 Cutoff 值设为 38.6，Ct 值小于等于 38.6 判为阳性，Ct 值大于 38.6 大于阴性。获得核酸片段 4 对该 193 例尿液样品中膀胱癌的检测特异性为 93.3%，灵敏度为 84.3%，ROC 曲线下面积 0.931（P<0.001）。ROC 曲线如图 5 所示。

参考文献：

1.Mbeutcha, A., Lucca, I., Mathieu, R., Lotan, Y. & Shariat, S. F. Current Status of Urinary Biomarkers for Detection and Surveillance of Bladder Cancer. Urologic Clinics of North America 43, 47–62 (2016).