

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2022年1月6日 (06.01.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/001948 A1

(51) 国际专利分类号:
C12Q 1/6809 (2018.01) C12Q 1/6876 (2018.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/102727

(22) 国际申请日: 2021年6月28日 (28.06.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202010609179.6 2020年6月29日 (29.06.2020) CN
202110642369.2 2021年6月9日 (09.06.2021) CN

(71) 申请人: 广州市基准医疗有限责任公司(ANCHORDX MEDICAL CO., LTD.) [CN/CN];
中国广东省广州市国际生物岛螺旋三路8号502单元, Guangdong 510300 (CN)。

(72) 发明人: 陈志伟(CHEN, Zhiwei); 中国广东省广州市国际生物岛螺旋三路8号502单元, Guangdong

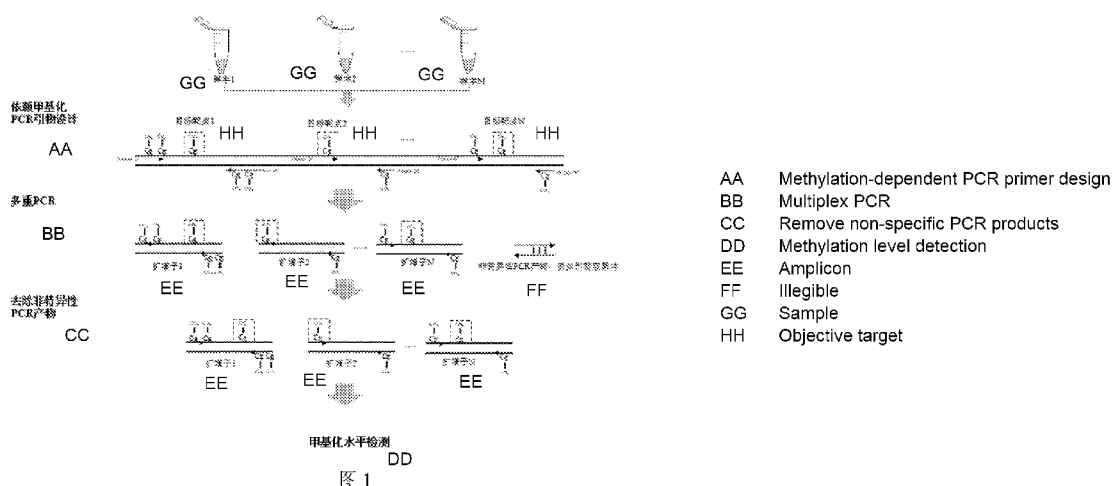
510300 (CN)。 许林浩(XU, Linhao); 中国广东省广州市国际生物岛螺旋三路8号502单元, Guangdong 510300 (CN)。 王军(WANG, Jun); 中国广东省广州市国际生物岛螺旋三路8号502单元, Guangdong 510300 (CN)。 刘鑫(LIU, Xin); 中国广东省广州市国际生物岛螺旋三路8号502单元, Guangdong 510300 (CN)。 叶竹佳(YE, Zhujia); 中国广东省广州市国际生物岛螺旋三路8号502单元, Guangdong 510300 (CN)。 范建兵(FAN, Jianbing); 中国广东省广州市国际生物岛螺旋三路8号502单元, Guangdong 510300 (CN)。

(74) 代理人: 广州广典知识产权代理事务所(普通合伙)(GUANGZHOU PRIME IP LAW OFFICE); 中国广东省广州市天河区天源路5号天河新天地C座1010室, Guangdong 510000 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,

(54) Title: METHYLATION DETECTION METHOD AND KIT FOR BIOLOGICAL SAMPLE GENOMIC DNA OR FREE DNA MOLECULES

(54) 发明名称: 一种生物样本基因组DNA或游离DNA分子的甲基化检测方法和试剂盒



(57) Abstract: The present invention provides a methylation detection method and a kit for biological sample genomic DNA or free DNA molecules. The method comprises: obtaining transformed DNA molecules by means of a chemical reaction; performing, by using the transformed DNA molecules as a substrate, performing methylation-specific multiplex PCR reaction for one or more methylation regions of one or more genes by means of multiple pairs of methylation-specific primers, so as to obtain a PCR amplified product; and detecting methylation levels of different fragments in the amplified product.

(57) 摘要: 本发明提供了一种生物样本基因组DNA或游离DNA分子的甲基化检测方法和试剂盒, 该方法通过化学反应得到转化的DNA分子; 用转化的DNA分子作为底物, 通过多对甲基化特异性的引物针对一个或多个基因的一个或多个甲基化区域进行甲基化特异性的多重PCR反应, 从而得到PCR扩增产物; 检测扩增产物中不同片段的甲基化水平。



WO 2022/001948 A1

BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则4.17的声明:

- 关于发明人身份(细则4.17(i))
- 关于申请人有权申请并被授予专利(细则4.17(ii))

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

一种生物样本基因组 DNA 或游离 DNA 分子的甲基化检测方法和试剂盒

技术领域

本发明属于基因检测技术领域，具体涉及一种生物样本基因组 DNA 或游离 DNA 分子的甲基化检测方法和试剂盒。

5 背景技术

DNA 甲基化可以调控基因表达，因此检测 DNA 甲基化至少可以为解释基因表达的调控提供一些线索。其次，DNA 甲基化已证实参与一系列重要生物学过程，包括早期胚胎发育、基因组印记、X 染色体失活、重复序列的沉默以及癌症的发生发展转移。此外，研究表明，DNA 甲基化一个非常重要的应用，是可以作为肿瘤的早期筛查和预后的生物标志物。

10 人类大约有 30 亿个碱基对，DNA 甲基化主要发生在 CpG 二核苷酸上。基因组中大约有 2800 万个 CpG 位点，这些 CpG 位点中，大约 60~80% 被甲基化，而在一些特定的区域，比如启动子，存在 CpG 位点富集的序列（CpG 岛），CpG 岛通常未被甲基化。但是在肿瘤细胞中，整体甲基化水平降低至 20~50%，与正常细胞相比，即可能有 10~60% 的 CpG 位点的甲基化状态发生了改变，特别是抑癌基因上，也就是大约 280~1680 万个 CpG 位点。

15 现有的 DNA 甲基化检测方法主要包括全基因组的 DNA 甲基化检测和特异性位点甲基化检测。全基因组的 DNA 甲基化检测主要用于研究层面、寻找差异化甲基化位点等，又可分为基于高通量测序和基于芯片的全基因组 DNA 甲基化检测方法。特异性位点甲基化检测主要用于转化医学层面，包括甲基化特异性 PCR（MSP）、重亚硫酸盐测序 PCR（BSP）、焦磷酸测序和质谱检测。

20 在实际临床应用和操作过程中，检测基质中的 DNA 含量一般较少，例如在癌症早筛检测中，血浆中的 ctDNA（circulating tumor DNA）含量，在游离 DNA（cfDNA）的占比较低（可低至 0.01%）。cfDNA 的浓度在健康个体血浆中，每毫升约含有 0 至 100 ng，平均浓度大约为 30 ng/mL。而且 ctDNA 片段长度，一般约为 166 bp（死亡细胞裂解）或者 150-250 bp（癌细胞外囊泡分泌）。在此种条件下，传统的通过杂交的方式捕获 DNA 后再进行高通量测序的方法灵敏性和特异性差。且基于全基因组的甲基化测序方式，流程复杂、后续分析复杂、捕获成本较高。其他通过 PCR 的方法，比如 BSP 的方法，因为引物不包含 CpG 位点，虽然可以测到甲基化，但有两点问题，一是由于不能包含 CpG 位点，一般的 C 经过 BS 转化变成 T，所以在实际操作中，特别是 CpG 岛里面设计引物较困难，存在 GC 含量低，PCR 实际效率差，

25

非特异性产物过多的情况；二是针对于痕量的甲基化片段，因为 PCR 没有选择性，非甲基化的信号往往会将这部分信号湮没，比如一段序列可能正常细胞分泌了 99%但都没有甲基化，而癌细胞就分泌了 1%发生甲基化了，所以如果用 BSP 可能 99%因为无法区分噪音还是真实信号，1%这部分信息就会丢失掉。使用 MSP，或芯片，仅能覆盖有限的 CpG 位点（一般目标只有 1 个位点），灵活度低。一般 CpG 岛区域有较多位点会被甲基化，传统方法不能够知道一段序列内的多个位点的 CpG 情况。

发明内容

本发明的一个方面是提供一种生物样本基因组 DNA 或游离 DNA 分子的甲基化检测方法。实现上述目的技术方案包括：

10 一种生物样本基因组 DNA 或游离 DNA 分子的甲基化检测方法，包括以下：

通过化学反应得到转化的 DNA 分子；

用转化的 DNA 分子作为底物，通过多对甲基化特异性的引物针对一个或多个基因的一个或多个甲基化区域进行甲基化特异性的多重 PCR 反应，从而得到 PCR 扩增产物；

检测扩增产物中不同片段的甲基化水平。

15 本发明所述检测方法可以同时多样本多基因的 DNA 甲基化进行检测，整个检测流程和后续的数据分析步骤简单科学，对起始 DNA 量要求低，非常适用于低拷贝数的甲基化片段检测，且具有灵敏度高、特异性好、检测限低以及检测成本低等优点。

本发明的另一个方面还提供了一种生物样本基因组 DNA 或游离 DNA 分子的甲基化试剂盒。

20 一种 DNA 甲基化检测试剂盒，所述试剂盒包括针对 SEQ ID NO.1~ SEQ ID NO.8 所示序列中的至少一种序列的特异性 PCR 引物，所述引物为：

针对 SEQ ID NO.1 的特异性 PCR 引物为 SEQ ID NO.9 所示的上游引物和 SEQ ID NO.10 所示的下游引物；

25 和/或，针对 SEQ ID NO.2 的特异性 PCR 引物为 SEQ ID NO.11 所示的上游引物和 SEQ ID NO.12 所示的下游引物；

和/或，针对 SEQ ID NO.3 的特异性 PCR 引物为 SEQ ID NO.13 所示的上游引物和 SEQ ID NO.14 所示的下游引物；

和/或，针对 SEQ ID NO.4 的特异性 PCR 引物为 SEQ ID NO.15 所示的上游引物和 SEQ ID NO.16 所示的下游引物；

和/或,针对 SEQ ID NO.5 的特异性 PCR 引物为 SEQ ID NO.17 所示的上游引物和 SEQ ID NO.18 所示的下游引物;

和/或,针对 SEQ ID NO.6 的特异性 PCR 引物为 SEQ ID NO.19 所示的上游引物和 SEQ ID NO.20 所示的下游引物;

5 和/或,针对 SEQ ID NO.7 的特异性 PCR 引物为 SEQ ID NO.21 所示的上游引物和 SEQ ID NO.22 所示的下游引物;

和/或,针对 SEQ ID NO.8 的特异性 PCR 引物为 SEQ ID NO.23 所示的上游引物和 SEQ ID NO.24 所示的下游引物。

10 本发明所述检测方法引入依赖甲基化多重 PCR 技术,能快速对感兴趣的甲基化区域进行特异性扩增富集,并且还依赖甲基化多重 PCR 技术进行了优化:先使用高保真聚合酶进行依赖甲基化多重 PCR 扩增,再进一步利用核酸内切酶或 DNA 片段分选磁珠处理多重 PCR 产物,然后进行纯化。发明人发现,通过上述优化能有效去除依赖甲基化多重 PCR 扩增产物中的非特异性产物,避免非特异性产物对后续检测的影响,例如避免非特异性产物在测序过程中产生杂信号和占据测序深度,有效提高后续检测结果的准确性,降低检测限。尤其是当使用 Phusion U DNA 聚合酶进行依赖甲基化多重 PCR 时,可以更好地提高本发明依赖甲基化多重 PCR 反应的特异性。此外,本发明检测方法还使用了合适的参考序列,通过参考序列来对不同甲基化比例的样本的检测结果进行标准化,能平行比较出甲基化的差别,进一步提高检测结果的准确性和可靠性。

20 本发明通过引入依赖甲基化多重 PCR 技术并对依赖甲基化多重 PCR 扩增方法和产物处理方法进行优化,克服了现有甲基化检测方法对起始 DNA 含量要求高,以及现有多重 PCR 扩增产物不适用于直接进行后续高通量检测的缺陷,具有灵敏度高、特异性好、准确性高、检测限低和检测成本低的优点,可以检测出 0.05% 甲基化水平,且检测流程 and 数据分析步骤更简单更科学,尤其适用于对低拷贝数的甲基化片段进行检测。

附图说明

25 图 1 本发明检测方法的流程示意图。

图 2 为实施例 3 中 SEQ ID NO.5 所示序列的两个 CpG site 的信息。

图 3 为实施例 3 中本发明检测方法对 SEQ ID NO.5 所示序列的两个 CpG site 的 LOQ 检测结果图。

30 图 4 为实施例 3 中重亚硫酸盐修饰后测序法对 SEQ ID NO.5 所示序列的两个 CpG site 的 LOQ 检测结果图。

图 5 为实施例 4 中本发明检测方法和重亚硫酸盐修饰后测序法对样本 CpG 位点 1 ch5_40681550 的检测结果图。

图 6 为实施例 4 中本发明检测方法和重亚硫酸盐修饰后测序法对样本 CpG 位点 2 ch5_40681569 的检测结果图。

5 图 7 为使用 Q5U 酶和 Phusion U 酶进行依赖甲基化多重 PCR 扩增获得的产物中二聚体比例检测结果图。

图 8 为使用传统 PCR 法和 Touchdown PCR 法进行依赖甲基化多重 PCR 扩增获得的产物中二聚体比例和目标测序量比例检测结果图。

10 图 9 为使用 XP beads 和 Smart Beads 纯化依赖甲基化多重 PCR 扩增产物后纯化产物中二聚体比例检测结果图。

图 10 为使用 XP beads 和 Column 纯化依赖甲基化多重 PCR 扩增产物后纯化产物中二聚体比例和目标测序量比例检测结果图。

图 11 为使用不同多重 PCR 扩增循环数进行依赖甲基化多重 PCR 扩增的检测效果对比图。

15 图 12 为实施例 5 中 17 个靶点在内的不同甲基化浓度的标品上的信号进行很好的线性拟合结果示意图。

图 13 为实施例 6 中的 ROC Curve 结果示意图。

图 14 为实施例 7 中的 ROC Curve 结果示意图。

具体实施方式

20 本发明下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，例如 Sambrook 等人，分子克隆：实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。实施例中所用到的各种常用化学试剂，均为市售产品。

除非另有定义，本发明所使用的所有的技术和科学术语与属于本发明的技术领域的技术人员通常理解的含义相同。本发明的说明书中所使用的术语只是为了描述具体的实施例的目的，不用于限制本发明。

25 本发明的术语“包括”和“具有”以及它们任何变形，意图在于覆盖不排他的包含。例如包含了一系列步骤的过程、方法、装置、产品或设备没有限定于已列出的步骤或模块，而是可选地还包括没有列出的步骤，或可选地还包括对于这些过程、方法、产品或设备固有的其它步骤。

在本发明中提及的“多个”是指两个或两个以上。“和/或”，描述关联对象的关联关系，表示可以存在三种关系，例如，A 和/或 B，可以表示：单独存在 A，同时存在 A 和 B，单独存在 B 这三种情况。字符“/”一般表示前后关联对象是一种“或”的关系。

本发明所述“转化的 DNA 分子”是指，1) 通过脱氨基反应将 DNA 分子中的胞嘧啶（无甲基化）转化为尿嘧啶，而 DNA 分子中 5'-甲基化胞嘧啶仍然得到保留，从而得到的 DNA 分子，在一些实施例中，使用转化试剂可以是重亚硫酸钠（sodium bisulfite），或 TET 酶加 APOBEC 酶（酶法）。2) 通过化学/酶混合法将 DNA 分子中的 5'-甲基化胞嘧啶转化为二氢尿嘧啶，而 DNA 分子中的无甲基化胞嘧啶仍然得到保留，从而得到转化的 DNA 分子，在一些实施例中，使用转化试剂可以是 TET 酶加吡啶硼烷（Pyridine borane）。

10 本发明所述“甲基化特异性引物”，是指针对甲基化区域所设计的 PCR 引物，这些引物能够特异地结合到转化的 DNA 分子中的甲基化区域。

本发明所述“甲基化区域”，是指包含 CpG 位点的特定基因组区域。

本发明所述“甲基化特异性多重 PCR 反应”，又称为“甲基化依赖的多重 PCR 反应”，是指在同一个 PCR 扩增体系中，同时针对多个目标甲基化位点及其附近 40-10000 bp 区域使用甲基化特异性引物进行的 PCR 扩增，其中目标甲基化位点可位于引物上或扩增子内部。

本发明所述“甲基化水平”是指，1) 特定 CpG 位点的甲基化率大小；2) 一段区域内多个 CpG 位点甲基化率的平均水平；3) 甲基化扩增片段经过标准化(normalization)的读数(reads)。

本发明所述“片段”，是指在 40-10000bp 大小范围内的片段。

20 本发明所述测序，包括二代测序技术与三代测序技术。二代测序技术原理为大规模平行测序（massive parallel sequencing, MPS），在其中一些实施例中，二代测序技术可以是：1. 基于 DNA 聚合酶合成测序技术（Sequencing by synthesis technology, SBS）：代表公司为 Illumina（可逆终止测序，reversible terminator sequencing）、Thermo Fisher/Life Technologies (Ion Torrent), GenapSys, 罗氏诊断（454 焦磷酸测序）；2. 基于 DNA 连接酶连接测序技术（Sequencing by ligation technology, SBL），代表公司为华大基因/Complete Genomics（复合探针-锚定分子连接，cPAL）、Thermo Fisher/Applied Biosystems (Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection, SOLiD)。三代测序技术为单分子测序技术，在其中一些实施例中，三代测序技术可以是：单分子实时荧光测序技术（SMRT, Pacific Biosciences）、纳米孔测序技术 [Oxford Nanopore Technologies (ONT), Genia Technologies and Stratos Genomics (罗氏诊断)]、纳米门测序技术（Nanogate, Quantum Biosystems）、基于 DNA 水解测序技术（Sequencing by de-synthesis, pyrophosphorolysis, Base4）。

本发明所述通用阵列(universal array)是指将已知的目标 DNA 片段(可以是甲基化片段)和未知的核酸序列之间的一方以有序的阵列固定到特定载体上,通过序列互补杂交原理,并将杂交的结果以荧光技术和模式识别分析来检测的技术。在其中一些实施例中,通用阵列可以是: 1.微阵列技术(microarray),代表公司为 Affymetrix (Thermo Fisher)/Agilent 等; 2.珠阵列技术(bead array),代表公司为 Illumina 等; 3. xMAP (Multi-Analyte Profiling) 技术,代表公司为 Luminex 等; 4. nCounter 技术,代表公司为 NanoString 等。

本发明一些实施例中,涉及一种生物样本基因组 DNA 或游离 DNA 分子的甲基化检测方法,包括以下步骤:

通过化学反应得到转化的 DNA 分子;

10 用转化的 DNA 分子作为底物,通过多对甲基化特异性的引物针对一个或多个基因的一个或多个甲基化区域进行甲基化特异性的多重 PCR 反应,从而得到 PCR 扩增产物;检测扩增产物中不同片段的甲基化水平。

在其中一些实施例中,包括以下步骤:

S1、提取生物样本基因组 DNA 或游离 DNA,对提取的 DNA 使用化学反应进行处理, 15 然后对得到的转化的 DNA 分子使用甲基化特异性引物进行甲基化特异性的多重 PCR;其中针对不同基因或不同甲基化位点使用不同的甲基化特异性 PCR 引物;

S2、多重 PCR 产物处理和纯化:对步骤 S1 获得的多重 PCR 产物用核酸内切酶或者 DNA 片段分选磁珠进行处理,然后进行纯化;

S3、对步骤 S2 获得的纯化产物的甲基化水平进行检测。

20 在其中一些实施例中,所述生物样本包括生物组织样品、细胞样品或流体样品,优选为血液、血清、血浆、玻璃体、痰、尿、眼泪、汗液、唾液。

在其中一些实施例中,提取生物样本基因组 DNA 或游离 DNA 用于化学转化。

在其中一些实施例中,转化 DNA 的化学反应包括化学法(重亚硫酸盐)或酶法(TET 酶/APOBEC 酶)或化学/酶混合法(TET 酶/吡啶硼烷)。

25 在其中一些实施例中,化学法或酶法将 DNA 分子中的无甲基化的胞嘧啶转化为尿嘧啶,而 DNA 分子中 5'-甲基化胞嘧啶仍然得到保留,从而得到转化的 DNA 分子。

在其中一些实施例中,化学/酶混合法将 DNA 分子中的 5'-甲基化胞嘧啶转化为二氢尿嘧啶,而 DNA 分子中的无甲基化胞嘧啶仍然得到保留,从而得到转化的 DNA 分子。

30 在其中一些实施例中,还包括对多重 PCR 产物处理和纯化:对获得的多重 PCR 产物用核酸内切酶或者 DNA 片段分选磁珠进行处理,然后进行纯化。

在其中一些实施例中，S1、提取样本基因组 DNA 或游离 DNA (cell-free DNA)，对提取的 DNA 使用重亚硫酸盐进行处理，然后使用特异性引物对处理好的 DNA 进行依赖甲基化多重 PCR (Methylation Dependent Multiplex PCR)；其中针对不同基因或不同甲基化位点使用不同的特异性 PCR 引物；

5 S2、多重 PCR 产物处理和纯化：对步骤 S1 获得的多重 PCR 产物用核酸内切酶或者 DNA 片段分选磁珠进行处理，然后进行纯化；

S3、对步骤 S2 获得的纯化产物的甲基化水平进行检测。

本发明所述依赖甲基化多重 PCR 扩增 (Methylation Dependent Multiplex PCR) 是指在一个 PCR 扩增体系中同时针对多个感兴趣甲基化位点及其附近 50-300 bp 区域进行的 PCR 扩
10 增，其中感兴趣甲基化位点可位于引物上或扩增子内部。

本发明所述特异性 PCR 引物是指针对感兴趣的甲基化位点，或其旁边的 CpG 位点进行设计的引物；所述特异性 PCR 引物包含重亚硫酸钠处理后成功转化的甲基化的 CpG 位点，以保证对甲基化 DNA 进行特异性扩增。

本发明检测方法可以同时多样本多基因的 DNA 甲基化水平进行检测，针对不同基因
15 或不同甲基化位点使用不同的特异性 PCR 引物，针对不同的样本在检测时使用特异的标签序列来进行区别。

在其中一些实施例中，步骤 S1 所述依赖甲基化多重 PCR 的反应条件为：98°C 30 s-5 min；10-25 个循环 (98°C 15 s, 60±10°C 15 s-10 min, 68°C -72°C 15 s-5 min)；68°C -72°C 0-15 min。

在其中一些实施例中，步骤 S1 所述依赖甲基化多重 PCR 的反应优化条件为：98°C 30 s-5
20 min；10-25 个循环 (98°C 15 s, 60±5°C 15 s-10 min, 72°C 15 s-5 min)；72°C 0-15 min。

在其中一些实施例中，步骤 S1 所述依赖甲基化多重 PCR 的反应优化条件为：98°C 30 s-5 min；10-25 个循环 (98°C 15 s, 60±5°C 15 s-5 min, 72°C 15 s-5 min)；72°C 0-15 min。

在其中一些实施例中，步骤 S1 所述依赖甲基化多重 PCR 的扩增方法为降落 PCR 法。发明人经过研究法发现，在本发明检测体系中使用降落 PCR 法进行依赖甲基化多重 PCR，能有
25 效提高依赖甲基化多重 PCR 反应的特异性，降低非特异性扩增产物。

在其中一些实施例中，步骤 S1 所述依赖甲基化多重 PCR 的反应条件为：98°C 30 s；5-10 个循环 (98°C 15 s, 65±3°C (每个循环下降 0.2-0.8°C) 15 s, 72°C 15 s)；10-25 个循环 (98°C 15 s, 60±10°C 15 s-10 min, 68°C -72°C 15 s-5 min)；72°C 0 min -15 min。

在其中一些实施例中，步骤 S1 所述依赖甲基化多重 PCR 的反应条件为：98°C 30 s；5-10
30 个循环 (98°C 15 s, 65±3°C (每个循环后下降 0.2-0.8°C) 15 s, 72°C 15 s)；10-25 个循环 (98°C 15 s, 60±5°C 15 s-10 min, 68-72°C 15 s-5 min)；72°C 0 min -15 min。

在其中一些实施例中，步骤 S1 所述依赖甲基化多重 PCR 的反应条件为：98°C 30 s；5-10 个循环（98°C 15 s，65±3°C（每个循环后下降 0.2-0.8°C）15 s，72°C 15 s）；10-25 个循环（98°C 15 s，60±5°C 15 s-5 min，68-72°C 15 s-5 min）；72°C 0 min -15 min。

在其中一些实施例中，优选步骤 S1 所述依赖甲基化多重 PCR 的反应条件为：98°C 30 s；
5 5-10 个循环（98°C 15 s，65±3°C（每个循环后下降 0.2°C -0.8°C）15 s，72°C 15 s）；15-20 个循环（98°C 15 s，60±3°C 15 s，72°C 15 s）；72°C 15 min。

在其中一些实施例中，更优选地，步骤 S1 所述依赖甲基化多重 PCR 的反应条件为：98°C 30 s；10 个循环（98°C 15 s，65±3°C（每个循环下降 0.5°C）15 s，72°C 15 s）；15 个循环（98°C 15 s，60±3°C 15 s，72°C 15 s）；72°C 15 min。发明人经过研究发现，此多重 PCR 扩增反应
10 条件下能成功检测到目标基因的数目最多。

在其中一些实施例中，步骤 S1 所述依赖甲基化多重 PCR 的反应酶为 Phusion DNA 聚合酶、Q5 酶、Hieff 酶、KAPA DNA 聚合酶、Pfu 酶、SuperFi 酶、相应可兼容尿嘧啶的聚合酶、优选为 PhusionU 酶、KAPAU 酶、Q5U 酶、HieffU 酶。

在其中一些实施例中，优选步骤 S1 所述依赖甲基化多重 PCR 的反应酶为 Phusion DNA
15 聚合酶。

在其中一些实施例中，更优选地，所述依赖甲基化多重 PCR 的反应酶为 Phusion U Hot Start DNA 聚合酶。使用 Phusion U Hot Start DNA 聚合酶能更好地提高本发明检测方法依赖甲基化多重 PCR 反应的特异性，降低非特异性扩增产物。

在其中一些实施例中，所述降落 PCR 法为巢式 PCR 法。

20 在其中一些实施例中，所述步骤 S1 中同时对不同基因和参考序列进行依赖甲基化多重 PCR。

在其中一些实施例中，所述参考序列选自参考序列 1~4 中的至少一种：

参考序列 1：以 SEQ ID NO.25 和 SEQ ID NO.26 为特异性 PCR 引物进行 PCR 扩增的片段在 EPHA3 基因中所对应的序列；

25 参考序列 2：以 SEQ ID NO.27 和 SEQ ID NO.28 为特异性 PCR 引物进行 PCR 扩增的片段在 KBTBD4 基因中所对应的序列；

参考序列 3：以 SEQ ID NO.29 和 SEQ ID NO.30 为特异性 PCR 引物进行 PCR 扩增的片段在 PLEKHF1 基因中所对应的序列；

30 参考序列 4：以 SEQ ID NO.31 和 SEQ ID NO.32 为特异性 PCR 引物进行 PCR 扩增的片段在 SYT10 基因中所对应的序列。

在其中一些实施例中，所述参考序列选自参考序列 1~4 中的至少两种。使用至少两种所述参考序列可以使检测结果更稳定，使不同样本之间的检测结果比较更准确。

在其中一些实施例中，所述不同基因的序列选自 SEQ ID NO.1~ SEQ ID NO.8 所示序列中的至少一种。

5 在其中一些实施例中，针对 SEQ ID NO.1~ SEQ ID NO.8 所示序列中的至少一种的依赖甲基化多重 PCR 扩增的反应条件为：98°C 30 s；10 个循环（98°C 15 s，65±3°C（每个循环下降 0.2~0.8°C）15 s，72°C 15 s）；15~20 个循环（98°C 15 s，60±3°C 15 s，72°C 15 s）；72°C 15 min。

10 在其中一些实施例中，优选针对 SEQ ID NO.1~ SEQ ID NO.8 所示序列中的至少一种的依赖甲基化多重 PCR 扩增的反应条件为：98°C 30 s；10 个循环（98°C 15 s，65±3°C（每个循环下降 0.5°C）15 s，72°C 15 s）；15 个循环（98°C 15 s，60±3°C 15 s，72°C 15 s）；72°C 15 min。

在其中一些实施例中，步骤 S2 所述核酸内切酶处理条件为：37±1°C 处理 10 min -15 min，处理体系中核酸内切酶的终浓度为 1 U/uL -10 U/uL。

15 在其中一些实施例中，步骤 S2 所述核酸内切酶处理条件为：37±1°C 处理 10 min -15 min，处理体系中核酸内切酶的终浓度为 3.5 U/uL -4.5 U/uL。

在其中一些实施例中，优选步骤 S2 所述核酸内切酶处理条件为：37±1°C 处理 10 min，处理体系中核酸内切酶的终浓度为 4 U/uL。

在其中一些实施例中，所述核酸内切酶为 T4 核酸内切酶。

20 在其中一些实施例中，步骤 S2 所述 DNA 片段分选磁珠为 XP 磁珠。

在其中一些实施例中，步骤 S2 所述纯化为使用磁珠法进行纯化。

在其中一些实施例中，所述磁珠法进行纯化使用的磁珠为 XP 磁珠。发明人经过研究发现，在本发明检测方法中，使用 XP 磁珠可获得更好的纯化效果。

25 在其中一些实施例中，步骤 S3 利用测序法对步骤 S2 获得的纯化产物的甲基化水平进行检测。

在其中一些实施例中，所述测序法包括二代测序技术与三代测序技术。二代测序技术原理为大规模平行测序（massive parallel sequencing, MPS），例如 DNA 聚合酶合成测序技术（Sequencing by synthesis technology, SBS）、基于 DNA 连接酶连接测序技术（Sequencing by ligation technology, SBL）。三代测序技术为单分子测序技术。

30 例如 单分子实时荧光测序技术、纳米孔测序技术、纳米门测序技术、基于 DNA 水解测序技术。

在其中一些实施例中，步骤 S3 所述测序法包括以下步骤：（1）将步骤 S2 获得的纯化产物同时进行 3'末端修复和 3'末端添加碱基 A；（2）将步骤（1）获得的产物与测序接头连接；（3）使用接头引物对步骤（2）获得的连接产物进行 PCR 扩增，得到测序文库；（4）将不同样本制备所得文库按照相同的摩尔数混合，测序。

5 在其中一些实施例中，所述步骤（3）中 PCR 扩增的循环数为 3-7。优选地，所述步骤（3）中 PCR 扩增的循环数为 7。

在其中一些实施例中，所述步骤（3）中还包括对测序文库进行纯化和质检。

在其中一些实施例中，使用 XP 磁珠对测序文库进行纯化。

在其中一些实施例中，所述测序法包括二代测序技术与三代测序技术。二代测序技术原理为大规模平行测序（massive parallel sequencing, MPS），三代测序技术为单分子测序技术。

在其中一些实施例中，所述二代测序技术可以是基于 DNA 聚合酶合成测序技术（Sequencing by synthesis technology, SBS）、基于 DNA 连接酶连接测序技术（Sequencing by ligation technology, SBL）。

在其中一些实施例中，所述三代测序技术可以是单分子实时荧光测序技术、纳米孔测序技术、纳米门测序技术、基于 DNA 水解测序技术。

本发明将上述步骤 S3 通过测序法对步骤 S2 获得的纯化产物的甲基化水平进行检测的多样本多片段 DNA 甲基化检测方法命名为依赖甲基化的扩增和测序法（Methylation-Dependent Amplification and Sequencing, MeDAS）。

在其中一些实施例中，步骤 S3 利用通用阵列法对步骤 S2 获得的纯化产物的甲基化水平进行检测。所述通用阵列（universal array）是指将已知的目标 DNA 片段（可以是甲基化片段）和未知的核酸序列之间的一方以有序的阵列固定到特定载体上，通过序列互补杂交原理，并将杂交的结果以荧光技术和模式识别分析来检测的技术。检测时不同样本使用特异的标签序列进行区别。

在其中一些实施例中，所述通用阵列可以是微阵列技术（microarray）、珠阵列技术（bead array）、xMAP（Multi-Analyte Profiling）技术、nCounter 技术。

在其中一些实施例中，所述样本为生物体液、细胞或组织。

在其中一些实施例中，所述生物体液为人体在正常或病理状态下各个器官和组织分泌的液体。

在其中一些实施例中，所述生物体液为血液、尿液、唾液、汗液、脑脊液、胸腔积水、腹积水。

在其中一些实施例中，所述生物体液优选为血清、血浆、玻璃体、痰、尿、眼泪、汗液、唾液等。

本发明另一实施例提供了一种 DNA 甲基化检测试剂盒，所述试剂盒包括针对 SEQ ID NO.1~ SEQ ID NO.8 所示序列中的至少一种序列的特异性 PCR 引物，所述引物为：

5 针对 SEQ ID NO.1 的特异性 PCR 引物为 SEQ ID NO.9 所示的上游引物和 SEQ ID NO.10 所示的下游引物；

和/或，针对 SEQ ID NO.2 的特异性 PCR 引物为 SEQ ID NO.11 所示的上游引物和 SEQ ID NO.12 所示的下游引物；

10 和/或，针对 SEQ ID NO.3 的特异性 PCR 引物为 SEQ ID NO.13 所示的上游引物和 SEQ ID NO.14 所示的下游引物；

和/或，针对 SEQ ID NO.4 的特异性 PCR 引物为 SEQ ID NO.15 所示的上游引物和 SEQ ID NO.16 所示的下游引物；

和/或，针对 SEQ ID NO.5 的特异性 PCR 引物为 SEQ ID NO.17 所示的上游引物和 SEQ ID NO.18 所示的下游引物；

15 和/或，针对 SEQ ID NO.6 的特异性 PCR 引物为 SEQ ID NO.19 所示的上游引物和 SEQ ID NO.20 所示的下游引物；

和/或，针对 SEQ ID NO.7 的特异性 PCR 引物为 SEQ ID NO.21 所示的上游引物和 SEQ ID NO.22 所示的下游引物；

20 和/或，针对 SEQ ID NO.8 的特异性 PCR 引物为 SEQ ID NO.23 所示的上游引物和 SEQ ID NO.24 所示的下游引物。

在其中一些实施例中，所述试剂盒还包括以下特异性 PCR 引物中的至少一种：

由 SEQ ID NO.25 所示的上游引物和 SEQ ID NO.26 所示的下游引物组成的特异性 PCR 引物；

25 和/或，由 SEQ ID NO.27 所示的上游引物和 SEQ ID NO.28 所示的下游引物组成的特异性 PCR 引物；

和/或，由 SEQ ID NO.29 所示的上游引物和 SEQ ID NO.30 所示的下游引物组成的特异性 PCR 引物；

和/或，由 SEQ ID NO.31 所示的上游引物和 SEQ ID NO.32 所示的下游引物组成的特异性 PCR 引物。

30 在其中一些实施例中，所述试剂盒包括上述特异性 PCR 引物中的至少两种。

在其中一些实施例中，所述试剂盒包括上述四种特异性 PCR 引物。

在其中一些实施例中，所述试剂盒还包括 Phusion DNA 聚合酶、T4 核酸内切酶、DNA 纯化磁珠。

在其中一些实施例中，优选所述 Phusion DNA 聚合酶为 Phusion U Hot Start DNA 聚合酶。

在其中一些实施例中，优选所述 DNA 纯化磁珠为 XP 磁珠。

5 在其中一些实施例中，所述试剂盒还包括测序文库构建试剂。

本发明提供的检测方法的检测流程图如图 1 所示。

实施例 1

本实施例一种多样本多片段 DNA 甲基化检测方法，包括以下步骤：

S1、提取样本基因组 DNA 或游离 DNA，对提取的 DNA 使用采用 EZDNA

10 Methylation-Gold (ZYMO) 试剂盒进行处理，然后使用特异性引物对处理好的 DNA 进行依赖甲基化多重 PCR (Methylation Dependent Multiplex PCR)；PCR 反应使用的酶为高保真酶，可选用 Phusion DNA 聚合酶（例如 Phusion Hot Start II DNA Polymerase，Phusion U Hot Start DNA Polymerase）、Q5 酶（例如 Q5[®] Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase, Q5U[®] Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase）、Hieff 酶（例如 Hieff NGS[®] HG 热启动多重 PCR 酶）、KAPA
15 DNA 聚合酶（例如 KAPA HiFi Uracil+ Kit, KAPA2G 快速热启动 DNA 聚合酶）、Pfu 酶或 SuperFi 酶，本实施例优选 Phusion U Hot Start DNA Polymerase；PCR 反应扩增方法为降落 PCR 法；其中针对不同基因或不同甲基化位点使用不同的特异性 PCR 引物；

S2、多重 PCR 产物处理和纯化：可选方法 1：对步骤 S1 获得的多重 PCR 产物用 T4 核酸内切酶进行处理，处理条件为：37±1° C 处理 10-15 min，处理体系中酶的终浓度为 1~10 U/uL
20 （优选处理条件为：37±1° C 处理 10 min，处理体系中酶的终浓度为 4 U/ uL）；将酶处理后的 PCR 产物进行纯化，所述纯化方法为 XP 磁珠纯化法；可选方法 2：直接使用 DNA 片段分选磁珠进行处理和纯化，其中磁珠为 XP 磁珠。

S3、利用测序法对步骤 S2 获得的纯化产物的甲基化水平进行检测：（1）将步骤 S2 获得的纯化产物同时进行 3'末端修复和 3'末端添加碱基 A；（2）将步骤（1）获得的产物与测
25 序接头连接；（3）使用接头引物对步骤（2）获得的连接产物进行 PCR 扩增，PCR 循环数为 3-7 轮（优选为 7 轮），对扩增产物进行纯化，获得测序文库，对测序文库进行质检和定量；（4）将不同样本制备所得文库按照相同的摩尔数混合，利用 Illumina MiSeq/MiSeqDx/NextSeq/NextSeqDx 平台对文库进行测序。

本实施例提供的检测方法命名为依赖甲基化的扩增和测序法（Methylation-Dependent Amplification and Sequencing, MeDAS），能同时对多样本多基因的 DNA 甲基化进行检测，
30 整个检测流程和后续的数据分析步骤简单科学，对起始 DNA 量要求低，非常适用于低拷贝

数的甲基化片段检测，且具有灵敏度高、特异性好、检测限低以及检测成本低等优点。表 1 为本发明 MeDAS 法与现有的甲基化检测方法的特征比较：

表 1 本发明 MeDAS 法与现有的甲基化检测方法的比较

特征	MeDAS	MSP	MethyLight	BSP
检测目标区域 (扩增子)	中等-高-非常高 (几十到上千个目标区域)，范围灵活	低 (<10 个目标区域)	低 (<10 个目标区域)	低-中等-高 (几个到上百个目标区域)
样品通量	低-中-高 (几个到几百个，甚至上千个)，范围灵活	低 (1-30 个)	低 (1-30 个)	低-中等 (几个到几十个)
检测设备	NGS	DNA 凝胶电泳	qPCR	Sanger sequencing 或 NGS
测序深度	低-中等 (几百-上千倍的覆盖度)	无	无	高 (几千-上万倍的覆盖度)
检测信号	扩增子的读数和目标区域的序列信息	DNA 条带	荧光信号	扩增子 (甲基化和非甲基化) 的读数
内参序列 (参考序列)	有或无 (取决于标准化方法)	无	有	无
判别	1) 目标区域的相对甲基化比例; 2) 目标区域的甲基化单倍体信息	目标区域是否有甲基化	目标区域的相对甲基化比例	目标区域的甲基化比例
检测性质	半定量	定性	半定量	定量
费用 (仅包括试剂和测序费用, 不包括前期样品的收集和处理的)	低-中等 (几十-上百人民币/每个样品), 与目标区域数量和样品通量有关	低 (几十人民币/每个样品)	低 (几十人民币/每个样品)	高 (几百百人民币/每个样品)

表中，MeDAS 代表 Methylation-Dependent Amplification and Sequencing; MSP 代表

5 Methylation Specific PCR; BSP 代表 Bisulfite Sequencing PCR。

从表 1 可知，与现有技术相比，本发明提供的 MeDAS 技术具有通量高、灵敏度高、特异性好、检测限低以及检测成本低等优点。

实施例 2

本实施例一种 DNA 甲基化检测试剂盒，包括针对 SEQ ID NO.1~ SEQ ID NO.8 所示序列
10 的甲基化水平检测试剂，所述 SEQ ID NO.1~ SEQ ID NO.8 所示序列如表 2 所示：

表 2 SEQ ID NO.1~ SEQ ID NO.8 所示序列

SEQ ID NO.	编号	基因组位置 (hg19 reference genome)	序列 (5'-3')
1	ZY-104	Chr7_ 50347009-50347085(-)	TGCCGCTAGAAGCAGGCGTCACAGTGCCC CCAGAGTGCTTGTCACTTAGAAACAGAG GCATCGGAAGACAAGCGT
2	ZY-131	Chr2_ 177029539-177029622(+)	GCTAGTCACAGCCTGGCGCCTGGTGTCCCC TCCCTTCCCAAGCCCCCTCAGCTTTTCCACT GCCACCGGCGTACAAGCAAGTGC
3	ZY-137	Chr20_ 4850587-4850664(-)	GTCATCGGCATGCTCAGTGCCGTGGTCGCC AGCATCATCGAGTCTATTGGTGACTACTAC GCCTGTGCACGGCTGTCC
4	ZY-148	Chr1_ 157948715-157948832(+)	TTGCAGCGGCCTCAGCTGGCGGGCCTCCT CCCCTGCTTTCGCCACCCGGCGCCTCGCCC CTCGACCCCGCGGCAGCTGGGCCCGGGCG CTCTGCTTCCCTCGGCCCTTTGTGGCTCT
5	ZY-154	Chr5_ 40681506-40681575(+)	CCTCACGCTCTTTGCAGTCTATGCGTCCAA CGTGCTCTTTTGCAGCTGCCAACATGGG TCTCGGTAGC
6	ZY-62	Chr5_ 90653216-90653288(+)	AGCACTGCGCTGCGACCTAGTTTTCCCTTT GGAATCAGGTCTCTCTCCTGCGTTTACAT TGGCCTCTCCAC
7	ZY-7	Chr1_ 63795438-63795505(-)	CCACATCACGAGGCAAGAAGGAAATGGGG CCGTCGGTCCCCGCAGAACCCTCATCGCC GGGCTAGAG
8	ZY-8	Chr12_ 133000021-133000089(-)	CCAGTGTAACACCAGCGCTGCTGATTGGC TCCCGTCTCGGCTCTGGGTGCCTGGACAC CGTGATTGG

上述试剂盒包含以下组分：

- (1) 针对 SEQ ID NO.1~ SEQ ID NO.8 所示序列的特异性 PCR 引物，所述特异性 PCR 引物具体如表 3 所示：

表 3 针对 SEQ ID NO.1~ SEQ ID NO.8 所示序列的特异性 PCR 引物

检测的 SEQ ID NO.	上游引物 (5'-3')	SEQ ID NO.	下游引物 (5'-3')	SEQ ID NO.
1	ACGCTTATCTTCCGATAACC TCTATT	9	TGTCGTTAGAAGTAGGCGT TATAGTG	10
2	GCTAATCACAACTAACGC	11	GTATTTGTTTGTACGTCGG	12

	CTAAT		TGGTAGT	
3	GGATAGTCGTGTATAGGCG TAGTAGTT	13	ATCATCGACATACTCAATA CCGTAATC	14
4	TTACAACGACCTCAACTAA CGAAAC	15	AGAGTTATAAAGGGTCTGA GGGAAGTA	16
5	CCTCACGCTCTTTACAATC TATACG	17	GTTATCGAGATTTATGTTG GGTAGC	18
6	AACACTACGCTACGACCTA ATTTTC	19	GTGGGAGAGGTTAATGTA AACGTAG	20
7	CTCTAACCCGACGATAAAT AATTCTAC	21	TTATATTACGAGGTAAGAA GGAAATGG	22
8	TTAATTACGGTGTTTAGGC GATTA	23	CCAATATAACACCCAACGC TACTAA	24

(2) 针对参考序列 1-4 (Ref1-4) 的特异性 PCR 引物:

参考序列 1: 以 SEQ ID NO.25 和 SEQ ID NO.26 为特异性 PCR 引物进行 PCR 扩增的片段在 EPHA3 基因中所对应的序列;

5 参考序列 2: 以 SEQ ID NO.27 和 SEQ ID NO.28 为特异性 PCR 引物进行 PCR 扩增的片段在 KBTBD4 基因中所对应的序列;

参考序列 3: 以 SEQ ID NO.29 和 SEQ ID NO.30 为特异性 PCR 引物进行 PCR 扩增的片段在 PLEKHF1 基因中所对应的序列;

10 参考序列 4: 以 SEQ ID NO.31 和 SEQ ID NO.32 为特异性 PCR 引物进行 PCR 扩增的片段在 SYT10 基因中所对应的序列。

具体如表 4 所示:

表 4 参考序列 1-4 具体的特异性 PCR 引物信息

参考序列	对应的基因名称	基因代号	上游引物 (5'-3')	SEQ ID NO.	下游引物 (5'-3')	SEQ ID NO.
Ref1	EPHA3	NM_005233	GGATTTATTAGG TGTGTAATGTTAT GGATT	25	ACTCCACATAAAA TCTTCTAAACTA AATTCCT	26
Ref2	KBTBD4	NM_001318 724	TTTGTATGTGGTG GGAGGGTTT	27	ACAAAAAACA CACCCTCCCAA	28

Ref3	PLEKHF1	NM_024310	GTAGTTTTAGAT GGTTTTTTGAGTT GGA	29	CACTCCCATCCT ATCTTCCCTCTA TA	30
Ref4	SYT10	NM_198992	GAGGTAAATGTA GGTTTTTAGTGTT GATTTT	31	CTTTATCCTCCC AATACTAATTAT TATTTCTCC	32

(3) Phusion U Hot Start DNA Polymerase、T4 核酸内切酶、Agencourt AMPure XP beads。

上述试剂盒提供的针对 SEQ ID NO.1~ SEQ ID NO.8 所示序列的特异性 PCR 引物是发明人经过大量研究和分析后设计得到的，所述检测引物既能保证依赖甲基化多重 PCR 扩增的灵敏度和特异性，又不会影响后续测序的深度，在 2 个拷贝~ 0.05%甲基化检测限上检测到甲基化片段需要的测序深度约小于现有方法（重亚硫酸盐修饰后测序法）2-3 个数量级。

上述试剂盒提供的参考序列 1-4 (Ref1-4) 是发明人经过优化后得出的，在不同样本中表达稳定且不受甲基化水平的影响，非常适合用于对测序数据进行标准化处理，使不同样本间 DNA 的甲基化水平具有可比性，提高比较结果的准确性和可靠性。

实施例 3

本实施例对本发明 DNA 甲基化检测方法 (MeDAS) 和重亚硫酸盐修饰后测序法 (BSP) 的检测效果进行比较。分别利用本发明 DNA 甲基化检测方法和重亚硫酸盐修饰后测序法 (BSP) 对实施例 2 所述 SEQ ID NO.1~ SEQ ID NO.8 所示序列的甲基化情况进行检测。本发明 DNA 甲基化检测方法使用实施例 2 所述试剂盒，具体步骤如下：

S1、获得 DNA 标准品，对 DNA 标准品使用重亚硫酸盐进行处理，然后对处理好的 DNA 标准品进行依赖甲基化多重 PCR 扩增

(1) 制备 cfDNA mock 标准品

1) genomic DNA 定量--Qubit HS

a) Qubit 溶液配制：

表 5 Qubit 溶液配方

配方	体积 μL
Qubit dsDNA HS Buffer (QB)	199
Qubit dsDNA HS Reagent (QA)	1
总体积	200

b) genomic DNA 样品的稀释：取 1 μL DNA 样品+9 μL EB，将 DNA 样品稀释 10 倍，再取 1 μL 稀释后的 DNA 进行定量。

2) genomic DNA 打断

将 genomic DNA 用 EB 稀释为约 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 后，取 300 μL ，分别向 3 支配套打断管（规格为 130 μL ）中各加入 50 μL （重复两次），用以下程序进行打断：

表 6 cfDNA 打断程序

Peak incident power (w)	Duty factor	Treatment time(s)	Cycles per burst	Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	Sample volume (μL)
50	40%	240	200	20	50

取 3 μL 打断后 DNA 放 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存，待进行浓度测定和 2100 Bioanalyzer 质检。

3) 打断后 DNA 纯化与保存

a) 80%乙醇制备

b)纯化步骤:原倍 AMPure 磁珠室温平衡 30 min→取 240 μL 与打断后的所有 genomic DNA 于 1.5 mL 的 LoBind 管充分涡旋混匀，简单离心→室温孵育 5 min→上磁力架 3-4 min 至溶液澄清→将上清转移至新的 1.5 mL LoBind 管→重新加入 240 μl 原倍 AMPure 磁珠→充分涡旋混匀，简单离心→室温孵育 5 min→上磁力架 4 min 至溶液澄清，吸弃上清→加入 1.5 mL 80%乙醇洗涤 30 s，弃上清→加入 1.5 mL 80%乙醇洗涤 30 s，弃上清→离心 1 min，上架至液体澄清，吸余液→开盖晾干至磁珠表面无反光→加 100 μL EB 洗脱，混匀，简单离心，室温孵育 2 min→上磁力架吸附 2 min 至液体澄清，收集上清至新的 1.5 mL LoBind 管；重复一次洗脱步骤，DNA 样品终体积为 200 μL 。

c) 保存：-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

4) 纯化后 DNA 定量和质检

质检：取 1 μL 纯化后的 cfDNA mock 样品进行 2100 Bioanalyzer 质检；定量：取 1 μL 进行 Qubit HS 定量。

(2) 混合制备梯度浓度的 DNA 标准品底物

1) 重亚硫酸盐处理基因组 DNA 制备 100% methylation control

采用 EZDNA Methylation-Gold (ZYMO) 试剂盒处理 HG DNA 以及 cfDNA mock，具体步骤如下：

a)相关 Buffer 制备：

a. CT Conversion Reagent 的制备: 添加 900 uL 水, 50 uL 的 M-Dissolving Buffer, 和 300 uL 的 M-Dilution Buffer 到一管 CT Conversion Reagent 中, 在室温下溶解并且在摇床上摇动 10min ;

5 b. M-WASH BUFFER 的制备: 加入 24 mL 无水乙醇至 M-WASH BUFFER 瓶中, 并在瓶盖上做好标记;

b)在 PCR 管中添加:

a. DNA 量 500 ng, 根据浓度算好体积, 用水来补至 20 μ L;

b. 130 uL 的 CT Conversion Reagent: 轻弹试管或移液器操作来混合样品;

c)将样品管放到循环变温器并按以下步骤操作: 98^o C 放置 10 min, 64^o C 放置 14 h;

10 d)将柱子放入 Collection Tube 中, 并加入 600 uL 的 M-Binding Buffer, 并将步骤 2 的样品加入到柱子中, 盖上盖子将柱颠倒数次来混合样品;

e)全速 (>10,000x g)离心 30 s, 弃废液;

f)添加 200 uL 的 M-Wash Buffer 到柱中, 全速离心 30 s;

g)添加 200 uL 的 M-Desphonation Buffer 到柱中并且在室温 (20-30^o C)下放置 15-20 min;

15 h)全速离心 30 s, 弃废液;

i)加 200 uL 的 M-Wash Buffer 到柱中, 全速离心 30 s;

j)再添加 200 uL 的 M-Wash Buffer, 并且离心 30 s;

h)直接添加 25 uL 的 M-Elution Buffer 到柱基质中, 将柱放置在 1.5 mL 的管中, 全速离心来洗脱 DNA, 得到最终转化产物 (-20^o C 暂时储存, 可保存 1 周);

20 i)通过测序分析, 通过 7-10 个 CpG、CHG、CHH 位点判断标准品中甲基化转化程度。

2)通过 0 % methylation control 和 100 % methylation control 混合制备梯度标准品: 0 %、0.05 %、0.1 %、0.25 %、0.5 %、1 %、100 %。

(3) 针对实施例 2 所述 SEQ ID NO.1~ SEQ ID NO.8 所示序列和参考序列 1-4 分别进行本发明依赖甲基化多重 PCR 和 Multiplex Bisulfide-specific PCR (多重 BSP)。其中, 本发明
25 针对 SEQ ID NO.1~ SEQ ID NO.8 所示序列的依赖甲基化多重 PCR 引物如实施例 2 所示, 针对 SEQ ID NO.1~ SEQ ID NO.8 所示序列的多重 BSP 引物如表 7 所示, 针对参考序列 1-4 的引物如实施例 2 所示。

表 7 多重 BSP 引物

检测的 SEQ ID NO.	上游引物 (5'-3')	SEQ ID NO.	下游引物 (5'-3')	SEQ ID NO.

1	GAGTGTGGTTAGTTTT AGAAATAGAGG	33	GGTAACTCCACTCCAA CTTACA	34
2	TTGGGAAGGGAGGGGA TATTAGG	35	CCCCCTCTCTTCAACT TAAATAAAC	36
3	GGGGTGGGGTATAGGA TAGT	37	TCCCACAATTCAATAA AACTACC	38
4	AATTGGAAAATAAATT AGAGTTATAAAGGG	39	AAACCTCCTCCCCTACT TTC	40
5	GGTAGGTGTTGGGTAT TGTA	41	GGATACCTATTTCTACA ACCACTAC	42
6	GAGAGAGGATTTGATT TTAAAGGGA	43	TCCAATACATTCACTA AAACATTTCCAA	44
7	AGGTAAGAAGGAAATG GGGT	45	AACTATAAACCTAAAC CCTAAAACCTCCC	46
8	GGTTTTTATTGGGTTAG TTTGG	47	TAACCACCCAAACCCT ACC	48

本发明依赖甲基化多重 PCR 扩增体系如表 8 所示，扩增程序如表 9 所示：

表 8 本发明依赖甲基化多重 PCR 扩增体系

试剂	1 RXN	终含量
	体积 (uL)	
5X GC buffer	10	1X
10 mM dNTP Mix	2	400 uM
Primer Set	-	200 nM each
MgCl ₂	3	1.5 mM
Phusion U Hot Start DNA Polymerase	0.75	0.03 U/uL
DNA	-	10 ng cfDNA
H ₂ O		
Final Volume	50	-

表 9 本发明依赖甲基化多重 PCR 扩增程序 (Touchdown 法)

温度	时间	循环数
98° C	30 s	1
98° C	15 s	10
65° C (每个循环后降 0.5° C)	15 s	
72° C	15 s	
98° C	15 s	15
60° C	15 s	
72° C	15 s	
72° C	5 min	1
4° C	保持	-

BSP 检测体系如表 10 所示, 检测程序如表 11 所示:

表 10 多重 BSP 检测体系

试剂	1 RXN	终含量
	体积 (uL)	
5X GC buffer	10	1X
10 mM dNTP Mix	2	400 uM
Primer Set	-	200 nM each
MgCl ₂	3	1.5 mM
Phusion U Hot Start DNA Polymerase	0.75	0.03 U/uL
DNA	-	10 ng cfDNA
H ₂ O		
Final Volume	50	-

表 11 多重 BSP 检测程序

温度	时间	循环数
98° C	30 s	1
98° C	15 s	3
50° C	15 s	

72° C	15 s	
98° C	15 s	27
57° C	15 s	
72° C	15 s	
72° C	5 min	1
4° C	保持	-

S2、PCR产物处理和纯化

(1) 对上述的依赖甲基化多重 PCR 产物用 T4 核酸内切酶进行处理，处理条件为：
37±1° C 处理 10 min，处理体系终 T4 核酸内切酶的终浓度为 4 U/ uL；

(2) 将 T4 核酸内切酶处理后的不同样本的 PCR 产物分别使用 Agencourt AMPure XP
5 beads 纯化，具体步骤如下：

- a) 将 AMPure XP beads 置于室温下平衡至少 30 min；
- b) 向 1.5 mL 离心管中加入 50 ng 待建库的 DNA，再加入 90 uL (1.8X) AMPure XP beads，
在 Vortex 上混匀并室温放置 5 min；
- c) 将离心管放在磁力架上直至溶液澄清（大约 3-5 min）；
- 10 d) 保持离心管在磁力架上，小心弃掉离心管中的上清；
- e) 继续保持离心管在磁力架上，加入 200 μL 的 80%乙醇；
- f) 将管子放置 1 min，使所有 beads 沉淀，弃掉乙醇，重复 e) + f) 一次；
- g) 简单离心，上架至液体澄清，吸余液，在 37° C 加热模块中干燥样品 5 min 或直到
残余的乙醇完全消失；
- 15 h) 加 55 uL EB 洗脱，混匀，室温孵育 5 min；
- j) 简单离心，上架吸附 3-5 min 至液体澄清，收集上清（共 50 uL，挑选个别样本 2 uL
测 Qubit 后再补齐 50 uL）。

S3、利用测序法对步骤 S2 获得的纯化产物的甲基化水平进行检测

使用 NEB 文库制备试剂盒 Z1901S/L 进行文库构建，不同样本使用特异的标签序列进行
20 区别，具体步骤如下：

(1) 将步骤 S2 获得的纯化产物同时进行 3'末端修复和 3'末端添加碱基 A。

将上一步得到的 DNA 纯化产物按下表在 1.5 mL 离心管中配制末端修复和加 A 反应体系：

表 12 末端修复和加 A 反应体系

反应体系	单个用量 μL	mix 个数	总量 μL
上一步产物	50	单加	

NEBNext ultra II End Prep Enzyme Mix	3	101	303
NEBNext ultra II End Prep Reaction Buffer	7		707
总体积	10		1010

反应程序如下：20° C, 30 min→65° C, 30 min→4° C, hold, 热盖：85° C, 体积 60 μL。

(2) 将 3'末端添加碱基 A 的产物连接测序接头，以便获得测序接头连接产物。

将上一步得到的产物直接按下表在 1.5 mL 离心管中配制连接反应体系：

表 13 测序接头连接反应体系

反应体系	单个用量 μL	mix 个数	总量 μL
上一步产物	60	单加	
NEBNext Adaptor for Illumina	2.5	单加	
NEBNext Ligation Enhancer	1	100.5	100.5
NEBNext ultra II Ligation Master Mix	30		3015
总体积	31		3115.5

备注：input DNA > 100 ng 时使用原倍 Adaptor；5 ng ≤ Input DNA ≤ 100 ng 时 1:10 稀释 Adaptor；input DNA < 5 ng 时 1:25 稀释 Adaptor。

5 反应程序如下：20° C, 15min→4° C, hold, 关闭热盖，体积 100 μL。

反应完后使用 Agencourt AMPure XP beads 纯化，最后用 20 uL EB 洗脱 DNA 并收集上清液（15 uL）。

(3) 将测序接头连接产物进行 PCR 扩增，其中 PCR 循环数为 7 轮，获得测序文库，反应体系如下：

10

表 14 Indexing PCR 反应体系

反应体系	单个用量 μL	mix 个数
上一步产物	15	单加
NEBNext ultra II Q5 Master Mix	25	单加
i5 index Primer	5	单加
i7 index Primer	5	单加

总体积	50	
-----	----	--

反应程序如下：98° C, 30 s → 7 个循环【98° C, 10 s → 65° C, 75 s】 → 65° C, 5 min → 4° C, hold, 热盖 105° C, 体积 50 μL。

反应完后使用 Agencourt AMPure XP beads 纯化，最后用 35 uL EB 洗脱 DNA 并收集上清液（30 uL）。

5 定量：制备得到的文库用 Qubit® 2.0 (Invitrogen)进行定量，-20° C 保存。

2100 质检：用于 2100 检测的文库浓度范围：100 pg/uL - 10 ng/uL，按说明书《5.2100_HighSensitivityDNA_QSG》进行操作。

(4) 二代高通量测序

将不同样本制备所得文库按照相同的摩尔数混合，然后进行二代高通量测序，包括以下

10 步骤：

1) 样品 Pooling

用 Qubit 测量文库的质量浓度 (ng/uL)，通过 2100 确定文库的平均长度 (bp)，根据以下公式进行质量浓度和摩尔浓度的换算。混合文库上机，现将文库按照上机数据量比例混合，即 pooling，再计算混合文库的理论摩尔浓度。

$$\text{文库的摩尔浓度 (nM)} = \frac{\text{文库质量浓度 (ng/ul)}}{(660\text{g/mol} \times \text{文库平均长度bp}) \times 1000} \times 10^6$$

注：YG001-047 文库平均长度为 350 bp。

20 2) 将样品使用 Illumina MiSeq PE-300 程序进行单末端测序；MiSeq 产出的测序结果是 fastq 形式的 DNA 序列，通过测序文库标签 (Index)、样本标签序列 (barcode)将测序序列对应到每个样本，然后计算每个样本所测片段每个 CG 位点的甲基化状态。

检测结果如下：

(1) 本发明检测方法比重亚硫酸盐修饰后测序法具有更低的 LOQ-Hypothesis: 本发明检测方法可以检测到 0.05% 甲基化 (平均测序深度仅需 100-200X, 随浓度上升检测信号呈线性趋势)，而重亚硫酸盐修饰后测序法检测限在 0.5% 甲基化之上 (测序深度虽然上万 X, 但仍难以有线性关系出现)。以 SEQ ID NO.5 所示序列的两个 CpG site 的检测结果为例，示例位点信息如图 2 所示，本发明方法检测两个 CpG site 的 LOQ 情况如图 3 所示，测序深度平均每

个梯度在 100-200X；重亚硫酸盐修饰后测序法检测相同两个 CpG site 的 LOQ 情况如图 4 所示，测序深度平均每个梯度大于 9500X。

(2) 本发明检测方法与重亚硫酸盐修饰后测序法相比具有更低的 LOD-Hypothesis：以 SEQ ID NO.7 所示序列的 chr1_63795447(-)和 chr1_6379497(-)两个 CpG 位点为例，在 2 copies 这个 LOD 梯度，本发明检测方法在上千 X 测序深度可以稳定检出两个位点的甲基化情况，但是重亚硫酸盐修饰后测序法即使是在~40000X 的深度，仍然无法检出（检测出的 C 在测序噪音的区间），具体如表 15 所示：

表 15 本发明检测方法与 BSP 的 LOD-Hypothesis

2 copies						
	BSP 方法			本发明检测方法		
	测序深度	位点 1 测序量 Chr1_63795447(-)	位点 2 测序量 Chr1_63795497(-)	测序深度	位点 1 C% Chr1_63795447(-)	位点 2 C% Chr1_63795497(-)
重复 1	38969	4	8	2002	100%	99.92%
重复 2	47643	1	2	4131	99.95%	100%

10 实施例 4

本实施例分别利用本发明所述检测方法和重亚硫酸盐修饰后测序法对 3 例临床肺癌组织样本及 3 例对照组织样本的 SEQ ID NO.1~ SEQ ID NO.8 所示 8 个序列的甲基化水平进行检测，具体检测步骤如下：

S1、提取临床肺癌组织样本及对照组织样本基因组 DNA，对提取的 DNA 使用重亚硫酸盐进行处理，然后对处理好的 DNA 进行依赖甲基化多重 PCR 扩增：

利用 Qiagen-QIAamp-DNA-FFPE 组织试剂盒(Qiagen, Cat#56404)提取样本基因组 DNA，提取步骤根据试剂盒说明书进行。提取得到的 DNA 按实施例 3 所述方法进行重亚硫酸盐处理以及依赖甲基化多重 PCR 扩增。

步骤 S2 和 S3 同实施例 3 所述。

20 检测结果表明，本发明检测方法可以在上千 X 的测序深度检测到肺癌与正常标本中的甲基化显著差异，而重亚硫酸盐修饰后测序法则不可以。以 SEQ ID NO.5 所示序列的两个 CpG site（CpG 位点 1 ch5_40681550、CpG 位点 2 ch5_40681569）的检测结果为例（所述两个 CpG 已知在肺癌组织中甲基化上调），CpG 位点 1 ch5_40681550 的检测结果如图 5 所示，CpG 位点 2 ch5_40681569 的检测结果如图 6 所示。由图 5 和图 6 可知，使用本发明方法，在 2000 X 的测序深度，即可发现检测位点在肺癌组织标本中有明显的差别，而使用 BSP 的方法，在 10 倍的测序深度，即 20000X 深度，也无法有效检测到正常标本与肺癌标本的差别。

对比例 1

本对比例一种 DNA 甲基化检测方法,除了步骤 S1 中使用 Q5 酶进行依赖甲基化多重 PCR 扩增外,其他与实施例 3 中本发明 DNA 甲基化检测方法相同,其中,Q5 酶的用量与 Phusion DNA 聚合酶的用量相同。本发明检测方法在依赖甲基化多重 PCR 扩增时使用高保真酶 Phusion DNA 聚合酶(例如 Phusion Hot Start II DNA Polymerase, Phusion U Hot Start DNA Polymerase)、Q5 酶(例如 Q5[®] Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase, Q5U[®] Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase)、Hieff 酶(例如 Hieff NGS[®] HG 热启动多重 PCR 酶)、KAPA DNA 聚合酶(例如 KAPA HiFi Uracil+ Kit, KAPA2G 快速热启动 DNA 聚合酶)、Pfu 酶或 SuperFi 酶,均能取得较好的多重扩增效果;其中,Phusion DNA 聚合酶的多重扩增效果最好,本对比例以 Phusion DNA 聚合酶(优选 Phusion U Hot Start DNA Polymerase)和 Q5 酶(优选 Q5[®] Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase)为例进行多重扩增效果的比较。

分别利用本对比例 DNA 甲基化检测方法和实施例 3 本发明 DNA 甲基化检测方法中的依赖甲基化多重 PCR 法对 10%甲基化 cfDNA mock 标准品中 50 个不同的基因进行依赖甲基化多重 PCR 扩增,PCR 测试统一条件为: 98[°] C 30s; 18 个循环(98[°] C 15 s, 60[°] C 2 min, 72[°] C 1 min); 72[°] C 15 min。

通过 2100 分析,根据片段的长度范围来计算二聚体的比例,并比较两种扩增方法获得的扩增产物中二聚体的比例。

结果如图 7 所示,结果表明,与使用 Q5 酶进行依赖甲基化多重 PCR 扩增相比,使用 Phusion DNA 聚合酶(实施例 3 所述本发明检测方法中的依赖甲基化多重 PCR 法)进行依赖甲基化多重 PCR 扩增能有效降低扩增产物中二聚体的比例,使多重 PCR 扩增产物更利于后续的检测。

对比例 2

本对比例一种 DNA 甲基化检测方法,除了步骤 S1 中使用传统 PCR 法进行多重 PCR 扩增外,其他与实施例 3 中本发明 DNA 甲基化检测方法相同,所述传统 PCR 法的反应程序如表 16 所示:

表 16 传统 PCR 法反应程序

温度	时间	循环数
98 [°] C	30 s	1
98 [°] C	15 s	30

60° C	15 s	
72° C	15 s	
72° C	5 min	1
4° C	保持	-

5 分别利用本对比例 DNA 甲基化检测方法和实施例 3 本发明 DNA 甲基化检测方法中的依赖甲基化多重 PCR 法对 100% 甲基化 cfDNA mock 标准品中 50 个不同的基因进行依赖甲基化多重 PCR 扩增，比较两种扩增方法获得的扩增产物中引物二聚体的比例以及目标测序量的比例。

10 结果如图 8（图中 Normal PCR 代表传统 PCR 法，Touchdown PCR 代表降落 PCR 法）所示，结果表明，与使用传统 PCR 法进行依赖甲基化多重 PCR 扩增相比，使用降落 PCR 法（本发明检测方法的依赖甲基化多重 PCR 法）进行依赖甲基化多重 PCR 扩增能有效降低扩增产物中二聚体的比例（可降低高达 50% 的二聚体比例含量），使多重 PCR 扩增产物更利于后续的测序检测，提高目标基因测序量的比例（目标基因测序量可提升约 40%）。

对比例 3

15 本对比例一种 DNA 甲基化检测方法，除了步骤 S2 中使用 Smart Beads 纯化 T4 核酸内切酶处理后的依赖甲基化多重 PCR 扩增产物外，其他与实施例 3 中本发明 DNA 甲基化检测方法相同。所述使用 Smart Beads 纯化多重 PCR 扩增产物的步骤如下：取 50 uL DEPC 加入至 50 uL PCR 产物 → Smarter 磁珠室温平衡 30 min → 混匀后取 220 uL (2.2X) 与样品 Vortex 混匀 → 室温孵育 5 min → 简单离心，上磁力架吸附 5 min 至液体澄清，吸弃上清 → 200 uL 80% 乙醇漂洗 30 s，弃上清 → 200 μL 80% 乙醇漂洗 30 s，弃上清 → 简单离心，上架至液体澄清，吸余液 → 开盖晾干至磁珠表面无反光 → 加 55 uL EB 洗脱，混匀，室温孵育 5 min
20 → 简单离心，上架吸附 3-5 min 至液体澄清，收集上清（共 50 uL，挑选个别样本 2 uL 测 Qubit 后再补齐 50 uL）。

25 分别利用本对比例 DNA 甲基化检测方法和实施例 3 本发明 DNA 甲基化检测方法中的纯化方法对 10% 甲基化 cfDNA mock 标准品中 50 个不同的基因的依赖甲基化多重 PCR 扩增产物进行纯化，比较两种纯化方法获得的扩增产物中二聚体的比例。

结果如图 9 所示，结果表明，与使用 Smart Beads 进行依赖甲基化多重 PCR 扩增产物的纯化相比，使用 XP Beads（本发明检测方法中的纯化方法）进行依赖甲基化多重 PCR 扩增产

物的纯化能有效降低扩增产物中二聚体的比例，使纯化后的多重 PCR 扩增产物更利于后续的检测。

对比例 4

- 5 本对比例一种 DNA 甲基化检测方法，除了步骤 S2 中使用纯化柱纯化 T4 核酸内切酶处理后的依赖甲基化多重 PCR 扩增产物外，其他与实施例 3 中本发明 DNA 甲基化检测方法相同。所述使用纯化柱（QIAGEN 公司）纯化多重 PCR 扩增产物的步骤如下：五倍体积 binding solution 加入 PCR 反应产物并颠倒均匀 → 转移到 DNA recovery column，室温放置 2 min，8,000 rpm 离心 1min → 倒掉收集管中废液 → 重复一次 → 加入 wash solution 洗脱一次，
- 10 12,000 rpm 离心 1 min → 加入 50 uL 的 elution buffer，放置 2 min 后 12,000 rpm 离心 1 min。

分别利用本对比例 DNA 甲基化检测方法和实施例 3 本发明 DNA 甲基化检测方法中的纯化方法对 10%甲基化 cfDNA mock 标准品中 50 个不同的基因的依赖甲基化多重 PCR 扩增产物进行纯化，比较两种纯化方法获得的扩增产物中二聚体的比例以及目标测序量的比例。

- 15 结果如图 10（图中 Column 代表纯化柱纯化组）所示，结果表明，与使用纯化柱进行依赖甲基化多重 PCR 扩增产物的纯化相比，使用 XP Beads（本发明检测方法中的纯化方法）进行依赖甲基化多重 PCR 扩增产物的纯化能有效降低扩增产物中二聚体的比例，使纯化后的多重 PCR 扩增产物更利于后续的测序检测，提高目标测序量的比例。

对比例 5

- 20 本对比例一种 DNA 甲基化检测方法，除了步骤 S1 中依赖甲基化多重 PCR 扩增的循环数不同外，其他与实施例 3 中本发明 DNA 甲基化检测方法相同，本对比例进行了 2 种不同条件的多重 PCR 扩增，分别为：（1）98⁰ C 30 s；10 个循环（98⁰ C 15 s，65⁰ C（每个循环下降 0.5⁰ C）15 s，72⁰ C 15 s）；17 个循环（98⁰ C 15 s，60⁰ C 15 s，72⁰ C 15 s）；72⁰ C 15 min；
- 25 （2）98⁰ C 30 s；10 个循环（98⁰ C 15 s，65⁰ C（每个循环下降 0.5⁰ C）15 s，72⁰ C 15 s）；20 个循环（98⁰ C 15 s，60⁰ C 15 s，72⁰ C 15 s）；72⁰ C 15 min。本发明检测方法在依赖甲基化多重 PCR 扩增时扩增循环数为 15~20 时均能实现检测，尤其是当扩增循环数为 15 时能成功检测到目标基因数目是最多。

- 30 分别利用本对比例 2 种 DNA 甲基化检测方法和实施例 3 中本发明 DNA 甲基化检测方法中的依赖甲基化多重 PCR 法对不同甲基化 cfDNA mock 标准品（0.5 %、1 %、5 %和 10 %）中的 153 个不同基因进行依赖甲基化多重 PCR 及后续测序分析比较，结果如图 11 所示，15

个循环数在 0.5 %、1 %、5 %和 10 %的甲基化浓度条件下，能成功检测到目标基因数目明显多余 17 和 20 个循环数，其没检测到的目标基因数目是最少的。

实施例 5

5 本实施例对本发明所述 DNA 甲基化检测方法 (MeDAS) 在不同甲基化程度的人类细胞系基因组 DNA (genomic DNA)的检测效果进行评估，具体实施步骤如下：

(1) 制备不同甲基化梯度的基因组 DNA 标品：0%和 100%的人类基因组 DNA 标品从 Zymo 公司购买 (Cat# D5014)，其中 0%的标品源为 HCT116 [DNMT1 (-/-)DNMT3b (-/-)] 细胞系；100%的标品源为 0%的标品进行相关甲基化酶处理获得且经过相关测序验证。25% 和 50% 的标品由 0%与 100%的标品按比例混合而成；

10

(2) 本实施例针对基因组上 32 个随机挑选 CpG 位点进行依赖甲基化多重 PCR 引物设计，详见下表：

CpG 位点	引物设计		SEQ ID NO.
cg16673106	MF1	GAGTAGGTAGAGTCGGGGAC	49
	MR1	ACTTCTACAATAAATTCGAAAACGTC	50
cg14477452	MF1	TTTTGGGCGTAGAGTAGCGGTT	51
	MR1	CTCTAAATCTCGATAAACTCGCAT	52
cg12622139	MF1	ACGCGCGTCGGAGGATTC	53
	MR1	AATCGCCACCCGAACGAACG	54
cg25497529	MF1	TTGTAGGTTAGGGAGATTACGTTT	55
	MR1	CTATCTCTATATCTCTATCTCCCG	56
cg06080005	MF1	GCGGTTTAGTATCGGTGGGAGATCGT	57
	MR1	TAAACCAAATCGAAAATCGCGACC	58
cg14242042	MF1	TTACGTCGGAGGAGGTATTAACGAGA	59
	MR1	CTTAAAAATCTACCCACAACAACATCGAAACG	60
cg21715963	MF1	TTTTTTTAGATACGTGCGGT	61
	MR1	CCTCTCTACTAACTAAACCCCTTTATACTA	62
cg07959338	MF1	TCGGTTAATTAATTTGGGAGGCGAAA	63
	MR1	GACGCGATACGACTCACTCCGCTA	64
cg22101924	MF1	GTAGTTTCGGTAGAGGCGTTT	65
	MR1	CTACTAAATTACTAAACGAATCGAAA	66
cg21542248	MF1	GGTTTAAAATTCGAGAAAATAACG	67
	MR1	ACGCCTCAAAAACCTCCGAAA	68
cg25381667	MF1	GAGTTATAGTGAGTCGGTTACGTAAATAGCGA	69
	MR1	ATTACTTATCAACGCCGACAACTACCGCT	70
cg25999722	MF1	TTACGTTATTGGTTGGAGGGTGCG	71
	MR1	CTAACTAAACCGCGCGAACG	72

cg14589148	MF1	AGAGTTATAGTGAGTCGGTTACGTAAATAGCG	73
	MR1	CTTATTACTTATCAACGCCGACAACTACCGC	74
cg24496978	MF1	GTAGTTGAGTTGTAGGATGTAAGCG	75
	MR1	CCAAACCCTACTAAAACCCG	76
cg24016939	MF1	TTTAAGGTAGGGGATTTTCGG	77
	MR1	AAAATCCTATCAACCCTTTAAAACCTCGAA	78
cg11679177	MF1	CGTAGGTAGGTGAAAGTAGGC	79
	MR1	GAACCTCCTCTCTATTCCCCC	80
cg03556653	MF1	TTATAGAAATTAGGAGGCGCGTA	81
	MR1	GCAACTCCTCTAAACCGAAC	82
cg02596331	MF1	AGATATTTTTTAAAAGGTAGCGAAA	83
	MR1	ACACTACCTCTCCAACATAAAAACG	84
cg13119884	MF1	AGTTATAACGTATTGAAGTTGCG	85
	MR1	TTATTATAAACGCTCAAATRGAAAAA	86
cg23516634	MF1	GTAGGGGTAGGGATTACGGT	87
	MR1	TTAATCTCCTAAACAACAATATATAACCGA	88
cg07696033	MF1	GTTTTGAGTCGTACGCGTTG	89
	MR1	CTTAAAAACCAAATCCTCCGA	90
cg13552710	MF1	TAGTAGCGCGGAGTTGGTTT	91
	MR1	ACTACTACCACCGCTACCGC	92
cg24876786	MF1	TAAAGGGAATGTGGGGTTTC	93
	MR1	CGCTTCCTTCTCTTAAACTAAAAA	94
cg15811719	MF1	AGAATTCGTTTAGGGTAGGGC	95
	MR1	GATACGAATTTCTAATACGCTAACC	96
cg06123396	MF1	ATTTAGATTGTTAGTAGCGGG	97
	MR1	AAAACACAAACCGAAACAAAAC	98
cg00901765	MF1	TATAATAAGGTGATGTGTTAGGAAGC	99
	MR1	AAAACAAACAAAACAAACGTA	100
cg12180984	MF1	AAAGAGGGGAGAGAGTTTCGC	101
	MR1	CTATATCCTCGACCCCGATT	102
cg23753247	MF1	AGTAATCGTAGGGTAGTGGACGGGG	103
	MR1	CTCTAAAACGAACTACCCTTAAACGCGCC	104
cg07944863	MF1	AGGTACGTGATGAAATTTTGGT	105
	MR1	GAAATTTAACGCCCAATATAAACC	106
cg04234680	MF1	TCGTGGAAGGAAGTACGTTT	107
	MR1	CGACATAAAATTCAACTAAATAACCG	108
cg16712637	MF1	GAATTAGAGCGATTTCGGGAC	109
	MR1	GTCAAAACTCCCGCTTCATATT	110
cg14603466	MF1	TAGTGAGTAGAGAAAGACGTACGAAA	111
	MR1	GCCTATCTACACCCTATCGCC	112

(3) 之后, 对 0% 25% 50%和 100%的标品按实施例 3 所述方法进行重亚硫酸盐处理以及依赖甲基化多重 PCR 扩增, 步骤 S2 和 S3 同实施例 3 所述。

检测结果表明,本发明检测方法对包含 cg16673106, cg25381667, cg24016939, cg22101924, cg21715963, cg16712637, cg15811719, cg14603466, cg14589148, cg13119884, cg12622139, cg12180984, cg07696033, cg06080005, cg04234680, cg03556653, cg02596331 17 个靶点在内的不同甲基化浓度的标品上的信号进行很好的线性拟合($R^2 > 0.8$), 如图 12 所示。该结果显示, 本发明所述检测方法可以在细胞系基因组 DNA 上进行相关靶点甲基化程度的高通量、有效检测。

实施例 6

本实施例对本发明所述 DNA 甲基化检测方法 (MeDAS) 在胃癌患者的血液标本中标志物进行检测评估, 用于胃癌的早筛早诊检测, 具体实施步骤如下:

1. 全血处理: 本实施例共对 152 例胃镜无胃癌的正常人以及 109 例胃癌病人的血浆样本进行检测

1.1 利用 EDTAK2 抗凝真空采血管 (BD, Cat#367525) 采集 10mL 全血, 充分混匀, 避免出现溶血, 并在 4-6 小时内对全血进行血浆分离处理。

1.2 全血于低速离心机进行 4 °C, 1600 g, 15 min 离心处理, 小心吸取上层血浆, 避免吸取中间的白膜层, 所得血浆再次于高速离心机进行 4 °C, 16000 g, 10min 离心处理, 获得所需样品血浆。

2. 对血浆进行 cfDNA 的提取

具体方法: 血浆 DNA 提取具体操作步骤按照 Thermo Fisher 公司的 MagMAX™ Cell-Free DNA Isolation Kit 说明书进行。

3. 对提取的 cfDNA 进行亚硫酸盐转化

将提取的 DNA 进行重亚硫酸盐转化, 使 DNA 中未发生甲基化的胞嘧啶脱氨基转变成尿嘧啶, 而甲基化的胞嘧啶保持不变, 得到重亚硫酸盐转化后的 DNA, 转化具体操作按照 Zymo DNA Methylation-Direct MagPrep 的 protocol 进行, 其中, 投入的 cfDNA 范围在 5-20 ng, 本实施例优选在 10ng。重亚硫酸盐转化的产物全部用于进行多重甲基化扩增。

4. 对转化后的 cfDNA 进行特定多个标志物的多重甲基化扩增

转化后的产物全部进行多重甲基化扩增, 其中的反应组分为通过组织筛选到的胃癌差异性 103 种标志物的引物组合, 其中浓度在 50-200 nM, 镁离子的浓度在 2-5 mM, 本实施例优选在 3 mM, dNTP mix 浓度在 100-600 uM, 本实施例优选在 200 uM, 采用的酶为 KAPA2G Fast Multiplex PCR Kit (Roche, Cat# KK5802)。具体的反应条件为: 预变性, 95 °C 5 min,

15-30 个循环（变性，95 °C 15s，退火，58-66 °C，本实施例优选 63 °C，4 min。），优选 20 个循环。

多重反应体系配制如下：

组分	体积 (ul)	终浓度
2×Kapa 2G fast multiple Mix	25	1X
primer mix (500 nM each)	5	50 nM each
Template	20	

5. 对多重甲基化扩增产物进行文库构建

5 利用 NEB NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit for Illumina® 与 NEBNext® Multiplex Oligos for Illumina® (Dual Index Primers Set 1) 对多重产物文库构建。相关操作见试剂盒说明书。

6. 按照等量的原则，对样本进行 pooling 处理，并上测序仪测序、进行相关统计分析。

10 实验结果：选取全部的 103 个标志物利用随机森林模型进行建模分析，按照 7: 3 的切分，进行 100 次重复，在 99% 的特异性下，测试集的 1 期的检测灵敏度为 87.5%，2 期的检测灵敏度为 92.9%，3 期的检测灵敏度为 77.8%，4 期的检测灵敏度为 86.7%，对于所有的结直肠癌样本，检测的整体灵敏度为 85.3%。整体的 AUC 为 0.974。表明了这些标志物在该方法下可用于胃癌的早期筛查。具体的 ROC Curve 请见图 13。

实施例 7

15 本实施例对本发明所述 DNA 甲基化检测方法（MeDAS）在乳腺癌患者的血液标本中标志物进行检测评估，用于乳腺癌的早筛早诊检测，具体实施步骤参照补充本发明实施例 2，对 30 例正常人以及 30 例乳腺癌病人的血浆样本进行检测。通过组织中筛选到全部的 54 个甲基化标志物利用随机森林模型进行建模分析，按照 7: 3 的切分，进行 100 次重复，在 99% 的特异性下，测试集的 11 个 1 期样本的检测灵敏度为 54.5%，15 个 2 期样本的检测灵敏度为 26.7%，4 个 3 期样本的检测灵敏度为 25%。对于所有的乳腺癌样本，检测的整体灵敏度为 36.7%。整体的 AUC 为 0.948。表明了这些标志物在该方法下可用于乳腺癌的早期筛查。具体的 ROC Curve 请见图 14。

25 以上所述实施例的各技术特征可以进行任意的组合，为使描述简洁，未对以上实施例中的各个技术特征所有可能的组合都进行描述，然而，只要这些技术特征的组合不存在矛盾，都应当认为是本说明书记载的范围。

以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式，其描述较为具体和详细，但并不能因此而理解为对本发明专利范围的限制。应当指出的是，对于本领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明构思的前提下，还可以做出若干变形和改进，这些都属于本发明的保护范围。因此，本发明专利的保护范围应以所附权利要求为准。

权利要求书

1. 一种生物样本基因组 DNA 或游离 DNA 分子的甲基化检测方法，其特征在于：
通过化学反应得到转化的 DNA 分子；

用转化的 DNA 分子作为底物，通过多对甲基化特异性的引物针对一个或多个基因的一个或多个甲基化区域进行甲基化特异性的多重 PCR 反应，从而得到 PCR 扩增产物；

5 检测扩增产物中不同片段的甲基化水平。

2. 根据权利要求 1 所述的甲基化检测方法，其特征在于：包括以下步骤：

S1、提取生物样本基因组 DNA 或游离 DNA，对提取的 DNA 使用化学反应进行处理，然后对得到的转化的 DNA 分子使用甲基化特异性引物进行甲基化特异性的多重 PCR；其中针对不同基因或不同甲基化位点使用不同的甲基化特异性 PCR 引物；

10 S2、多重 PCR 产物处理和纯化：对步骤 S1 获得的多重 PCR 产物用核酸内切酶或者 DNA 片段分选磁珠进行处理，然后进行纯化；

S3、对步骤 S2 获得的纯化产物的甲基化水平进行检测。

3. 根据权利要求 2 所述的甲基化检测方法，其特征在于，所述生物样本包括生物组织样品、细胞样品或流体样品，优选为血液、血清、血浆、玻璃体、痰、尿、眼泪、汗液、唾液。

15 4. 根据权利要求 2 所述的检测方法，其特征在于，提取生物样本基因组 DNA 或游离 DNA 用于化学转化。

5. 根据权利要求 1 或 2 所述的甲基化检测方法，其特征在于，转化 DNA 的化学反应包括化学法（例如重亚硫酸盐法）或酶法（TET 酶/APOBEC 酶）或化学/酶混合法（TET 酶/吡啶硼烷）。

20 6. 根据权利要求 5 所述的甲基化检测方法，其特征在于：化学法或酶法将 DNA 分子中的无甲基化的胞嘧啶转化为尿嘧啶，而 DNA 分子中 5'-甲基化胞嘧啶仍然得到保留，从而得到转化的 DNA 分子。

7. 根据权利要求 5 所述的甲基化检测方法，其特征在于：化学/酶混合法将 DNA 分子中的 5'-甲基化胞嘧啶转化为二氢尿嘧啶，而 DNA 分子中的无甲基化胞嘧啶仍然得到保留，从而得到转化的 DNA 分子。

8. 根据权利要求 1 或 2 所述的甲基化检测方法，其特征在于：还包括对多重 PCR 产物处理和纯化：对获得的多重 PCR 产物用核酸内切酶或者 DNA 片段分选磁珠进行处理，然后进行纯化。

9. 根据权利要求 2 所述的甲基化检测方法，其特征在于，步骤 S1 所述依赖甲基化多重
30 PCR 的反应条件为：98°C 30 s-5 min；10-25 个循环，每个循环优选为：98°C 15 s，60±10°C 15 s-10 min，68-72°C 15 s-5 min；68-72°C 0 min -15 min。

10. 根据权利要求 9 所述的甲基化检测方法, 其特征在于, 步骤 S1 所述依赖甲基化多重 PCR 的反应条件为: 98°C 30 s; 5-10 个循环, 每个循环优选为: 98°C 15 s, 65±3°C, 且每一个循环后下降 0.2°C -0.8°C, 15 s, 72°C 15 s; 10-25 个循环, 每个循环优选为: 98°C 15 s, 60±10°C 15 s-10 min, 68°C -72°C 15 s-5 min; 72°C 0 min -15 min。

5 11. 根据权利要求 2 所述的甲基化检测方法, 其特征在于, 步骤 S1 所述依赖甲基化多重 PCR 的反应酶为 Phusion DNA 聚合酶、Q5 酶、Hieff 酶、KAPA DNA 聚合酶、Pfu 酶、SuperFi 酶、相应可兼容尿嘧啶的聚合酶、优选为 PhusionU 酶、KAPAU 酶、Q5U 酶、HieffU 酶。

12. 根据权利要求 11 所述的甲基化检测方法, 其特征在于, 所述反应酶为 Phusion DNA 聚合酶。

10 13. 根据权利要求 1~11 任一项所述的甲基化检测方法, 其特征在于, 所述步骤 S1 中同时对不同基因和/或参考序列进行依赖甲基化多重 PCR。

14. 根据权利要求 13 所述的甲基化检测方法, 其特征在于, 所述参考序列选自参考序列 1~4 中的至少一种:

15 参考序列 1: 以 SEQ ID NO.25 和 SEQ ID NO.26 为特异性 PCR 引物进行 PCR 扩增的片段在 EPHA3 基因中所对应的序列;

参考序列 2: 以 SEQ ID NO.27 和 SEQ ID NO.28 为特异性 PCR 引物进行 PCR 扩增的片段在 KBTBD4 基因中所对应的序列;

参考序列 3: 以 SEQ ID NO.29 和 SEQ ID NO.30 为特异性 PCR 引物进行 PCR 扩增的片段在 PLEKHF1 基因中所对应的序列;

20 参考序列 4: 以 SEQ ID NO.31 和 SEQ ID NO.32 为特异性 PCR 引物进行 PCR 扩增的片段在 SYT10 基因中所对应的序列。

15. 根据权利要求 13 所述的甲基化检测方法, 其特征在于, 所述参考序列选自参考序列 1~4 中的至少两种。

25 16. 根据权利要求 8 所述的甲基化检测方法, 其特征在于, 所述不同基因的序列选自 SEQ ID NO.1~ SEQ ID NO.8 所示序列中的至少一种。

17. 根据权利要求 13 所述的甲基化检测方法, 其特征在于, 针对 SEQ ID NO.1~ SEQ ID NO.8 所示序列中的至少一种的依赖甲基化多重 PCR 扩增的反应条件为: 98°C 30 s; 10 个循环, 98°C 15 s, 65±3°C, 且每个循环后下降 0.2°C ~0.8°C, 15 s, 72°C 15 s; 15-20 个循环, 每个循环 98°C 15 s, 60±3°C 15 s, 72°C 15 s; 72°C 15 min。

30 18. 根据权利要求 2 所述的甲基化检测方法, 其特征在于, 步骤 S2 所述核酸内切酶处理条件为: 37±1°C 处理 10~15 min, 处理体系中核酸内切酶的终浓度为 1-10 U/uL。

19.根据权利要求 18 所述的甲基化检测方法,其特征在于,所述核酸内切酶为 T4 核酸内切酶。

20.根据权利要求 2 所述的甲基化检测方法,其特征在于,步骤 S2 所述 DNA 片段分选磁珠为 XP 磁珠。

5 21.根据权利要求 2 所述的甲基化检测方法,其特征在于,步骤 S2 所述纯化为使用磁珠法进行纯化。

22.根据权利要求 21 所述的甲基化检测方法,其特征在于,所述磁珠为 XP 磁珠。

23.根据权利要求 2 所述的甲基化检测方法,其特征在于,步骤 S3 利用测序法或通用阵列法对步骤 S2 获得的纯化产物的甲基化水平进行检测。

10 24. 根据权利要求 2 所述的甲基化检测方法,其特征在于,所述测序法包括二代测序技术与三代测序技术。

25.根据权利要求 23 所述的甲基化检测方法,其特征在于,步骤 S3 所述测序法包括以下步骤:(1)将步骤 S2 获得的纯化产物同时进行 3'末端修复和 3'末端添加碱基 A;(2)将步骤(1)获得的产物与测序接头连接;(3)使用接头引物对步骤(2)获得的连接产物进行
15 PCR 扩增,得到测序文库;(4)将不同样本制备所得文库按照相同的摩尔数混合,测序。

26.一种生物样本基因组 DNA 或游离 DNA 分子的甲基化检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括针对 SEQ ID NO.1~ SEQ ID NO.8 所示序列中的至少一种序列的特异性 PCR 引物,所述引物为:

针对 SEQ ID NO.1 的特异性 PCR 引物为 SEQ ID NO.9 所示的上游引物和 SEQ ID NO.10
20 所示的下游引物;

和/或,针对 SEQ ID NO.2 的特异性 PCR 引物为 SEQ ID NO.11 所示的上游引物和 SEQ ID NO.12 所示的下游引物;

和/或,针对 SEQ ID NO.3 的特异性 PCR 引物为 SEQ ID NO.13 所示的上游引物和 SEQ ID NO.14 所示的下游引物;

25 和/或,针对 SEQ ID NO.4 的特异性 PCR 引物为 SEQ ID NO.15 所示的上游引物和 SEQ ID NO.16 所示的下游引物;

和/或,针对 SEQ ID NO.5 的特异性 PCR 引物为 SEQ ID NO.17 所示的上游引物和 SEQ ID NO.18 所示的下游引物;

30 和/或,针对 SEQ ID NO.6 的特异性 PCR 引物为 SEQ ID NO.19 所示的上游引物和 SEQ ID NO.20 所示的下游引物;

和/或,针对 SEQ ID NO.7 的特异性 PCR 引物为 SEQ ID NO.21 所示的上游引物和 SEQ ID NO.22 所示的下游引物;

和/或,针对 SEQ ID NO.8 的特异性 PCR 引物为 SEQ ID NO.23 所示的上游引物和 SEQ ID NO.24 所示的下游引物。

5 27.根据权利要求 26 所述的甲基化检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括以下特异性 PCR 引物中的至少一种:

由 SEQ ID NO.25 所示的上游引物和 SEQ ID NO.26 所示的下游引物组成的特异性 PCR 引物;

10 和/或,由 SEQ ID NO.27 所示的上游引物和 SEQ ID NO.28 所示的下游引物组成的特异性 PCR 引物;

和/或,由 SEQ ID NO.29 所示的上游引物和 SEQ ID NO.30 所示的下游引物组成的特异性 PCR 引物;

和/或,由 SEQ ID NO.31 所示的上游引物和 SEQ ID NO.32 所示的下游引物组成的特异性 PCR 引物。

15 28.根据权利要求 26 或 27 所述的甲基化检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括 Phusion DNA 聚合酶、T4 核酸内切酶、和/或 DNA 纯化磁珠。

29.一种生物样本基因组 DNA 或游离 DNA 分子的甲基化检测试剂盒,其特征在于,包括针对以下 CpG 位点中至少一对引物:

针对 cg16673106 的 SEQ ID NO.49 和 50;

20 针对 cg14477452 的 SEQ ID NO.51 和 52;

针对 cg12622139 的 SEQ ID NO.53 和 54;

针对 cg25497529 的 SEQ ID NO.55 和 56;

针对 cg06080005 的 SEQ ID NO.57 和 58;

针对 cg14242042 的 SEQ ID NO.59 和 60;

25 针对 cg21715963 的 SEQ ID NO.61.和 62;

针对 cg07959338 的 SEQ ID NO.64 和 65;

针对 cg22101924 的 SEQ ID NO.66 和 67;

针对 cg21542248 的 SEQ ID NO.68 和 69;

针对 cg25381667 的 SEQ ID NO.70 和 71;

30 针对 cg25999722 的 SEQ ID NO.72 和 73;

针对 cg14589148 的 SEQ ID NO.74 和 75;

- 针对 cg24496978 的 SEQ ID NO.76 和 77;
针对 cg24016939 的 SEQ ID NO.78 和 79;
针对 cg11679177 的 SEQ ID NO.80 和 81;
针对 cg03556653 的 SEQ ID NO.82 和 83;
5 针对 cg02596331 的 SEQ ID NO.84 和 85;
针对 cg13119884 的 SEQ ID NO.86 和 87;
针对 cg23516634 的 SEQ ID NO.88 和 89;
针对 cg07696033 的 SEQ ID NO.90 和 91;
针对 cg13552710 的 SEQ ID NO.92 和 93;
10 针对 cg24876786 的 SEQ ID NO.94 和 95;
针对 cg15811719 的 SEQ ID NO.96 和 97;
针对 cg06123396 的 SEQ ID NO.98 和 99;
针对 cg00901765 的 SEQ ID NO.100 和 101;
针对 cg12180984 的 SEQ ID NO.102 和 103;
15 针对 cg23753247 的 SEQ ID NO.104 和 105;
针对 cg07944863 的 SEQ ID NO.106 和 107;
针对 cg04234680 的 SEQ ID NO.108 和 109;
针对 cg16712637 的 SEQ ID NO.110 和 111;
针对 cg14603466 的 SEQ ID NO.112 和 113。

20

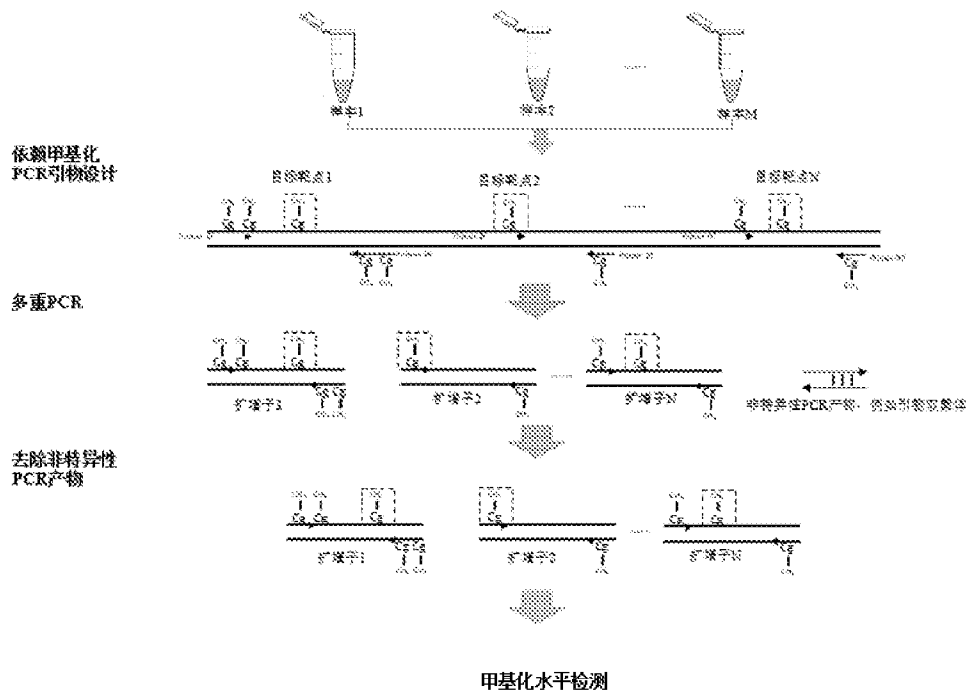


图 1

hg19_ct_UserTrack_3545_20_range=chr5:40681226-40682224_5'pad=0_3'pad=0_strand=-_repeatMasking=none

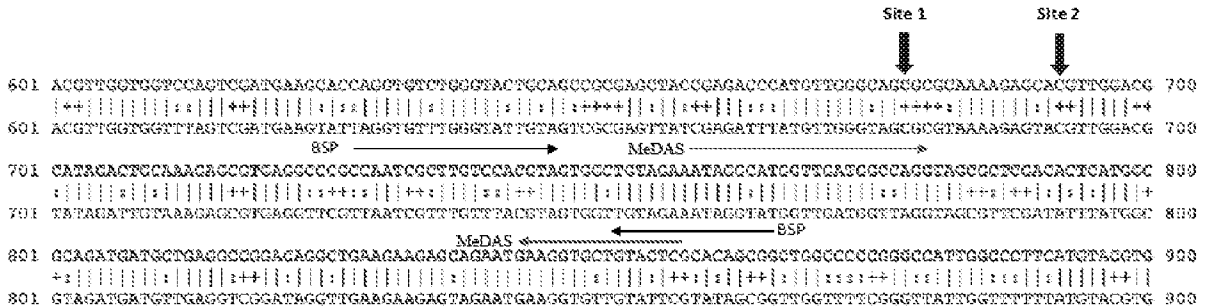


图 2

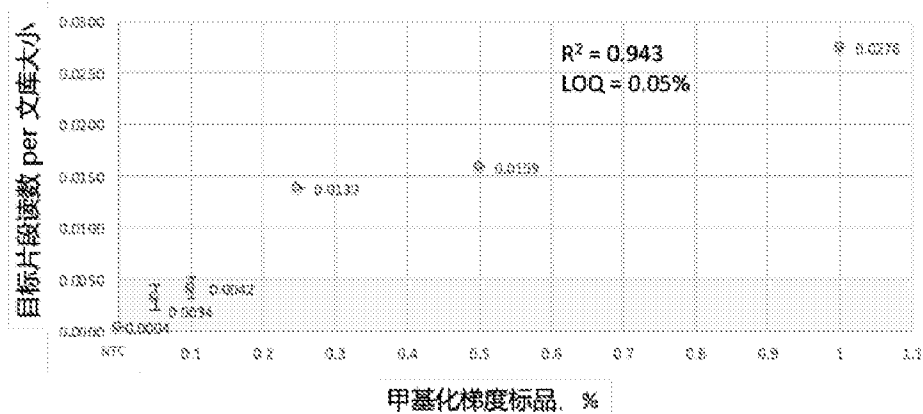


图 3

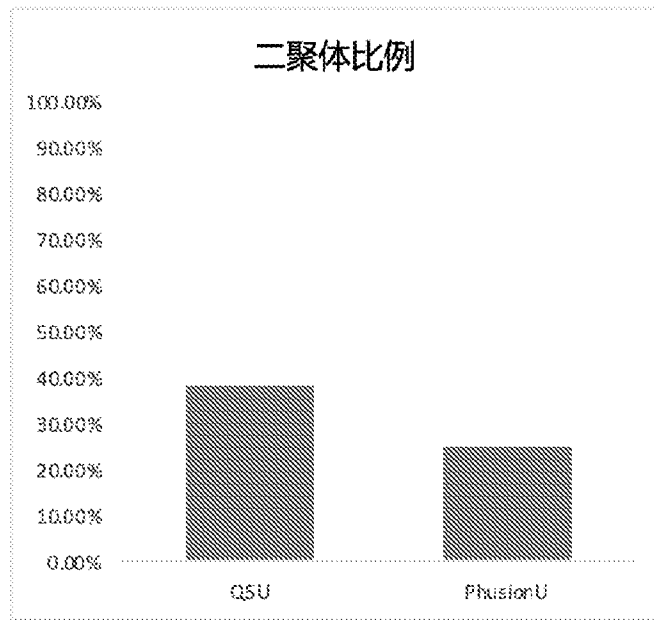


图 7

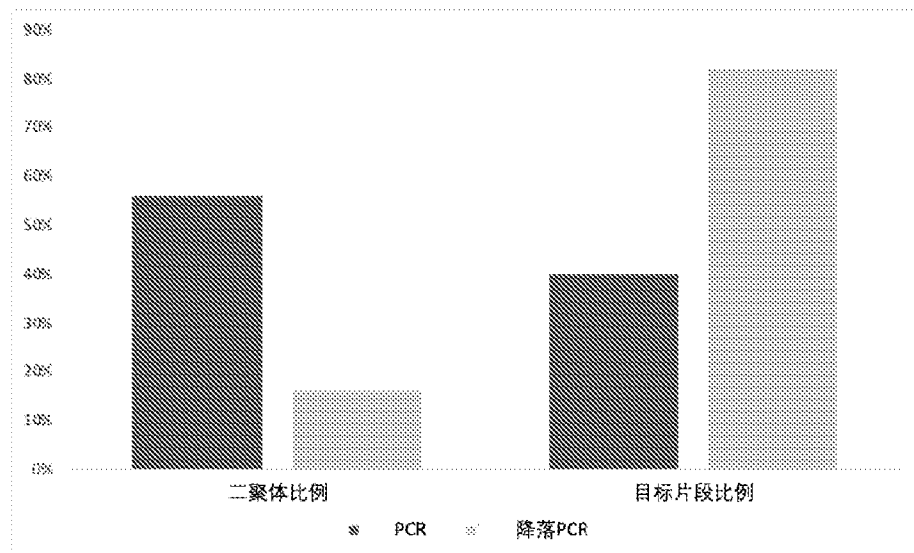


图 8

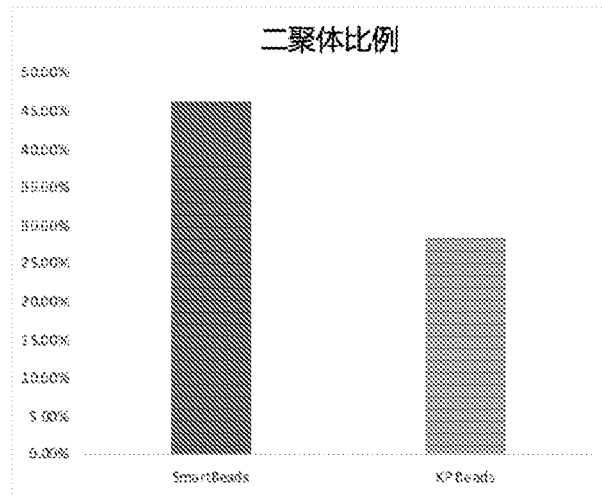


图 9

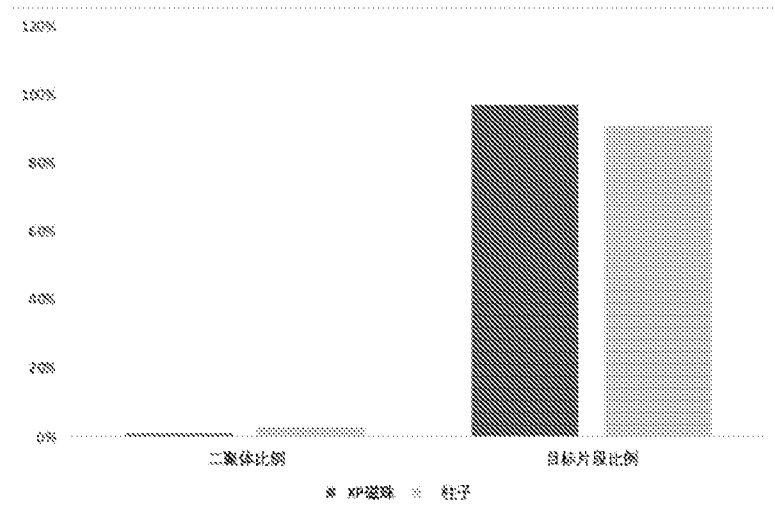


图 10

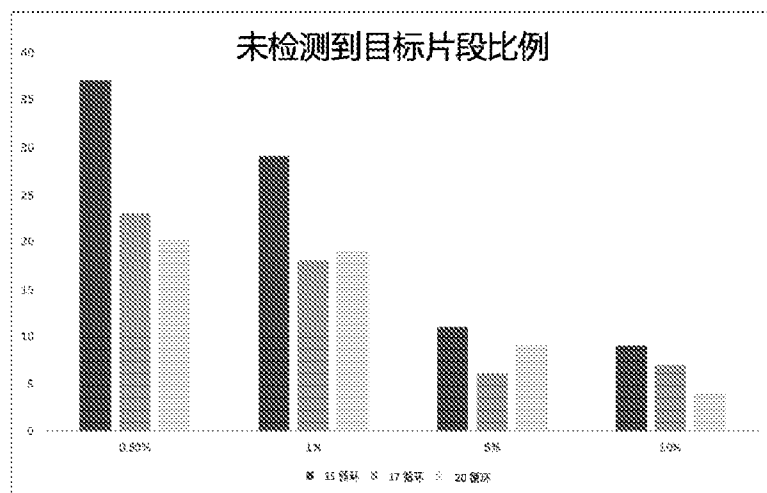
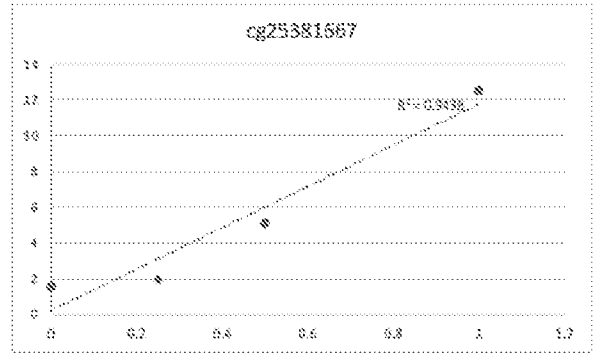
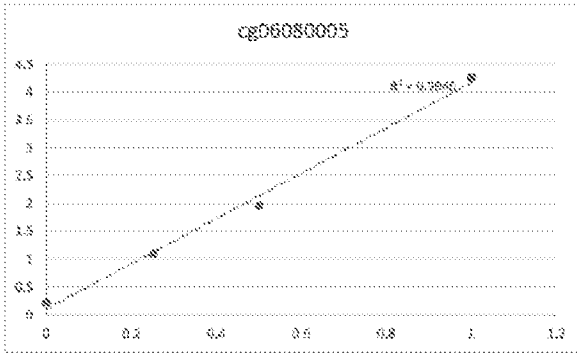
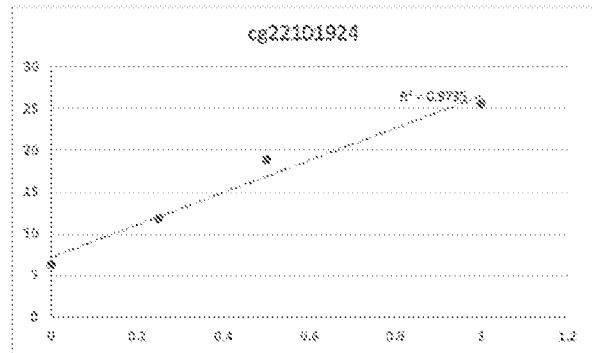
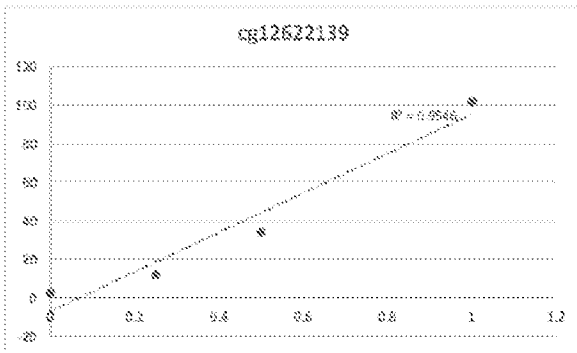
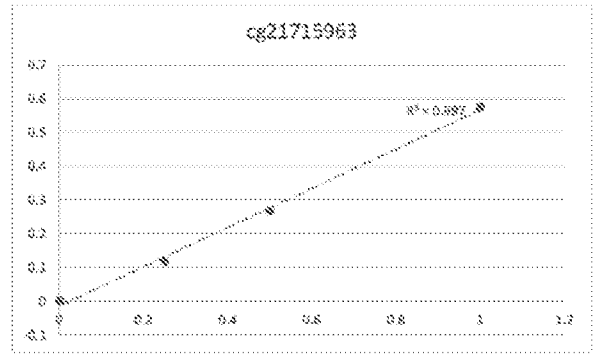
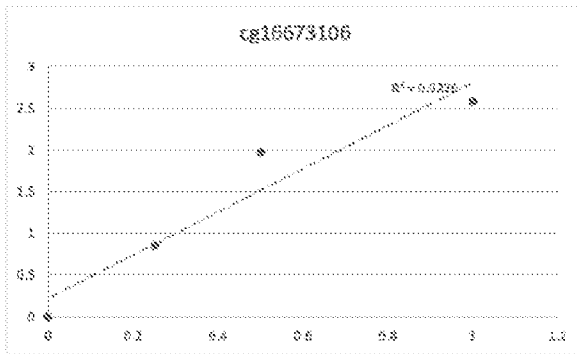
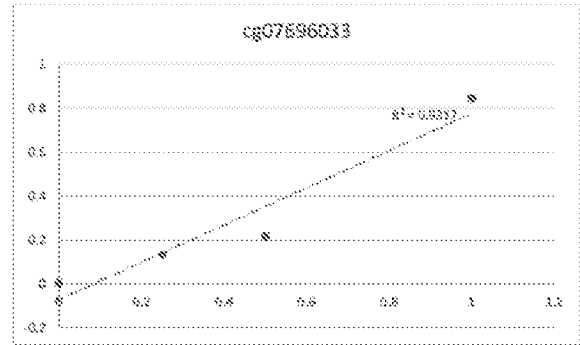
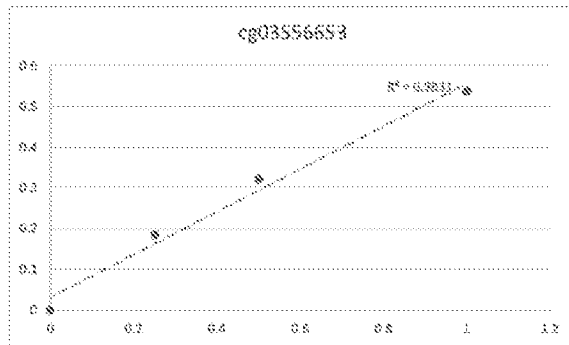
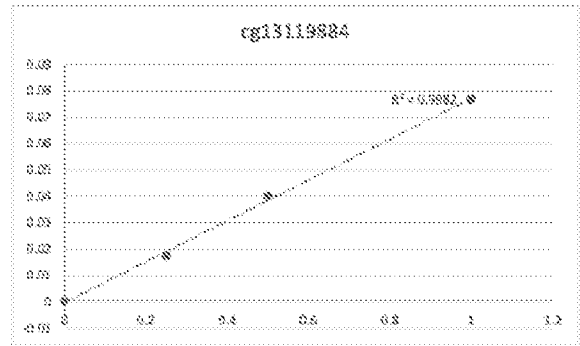
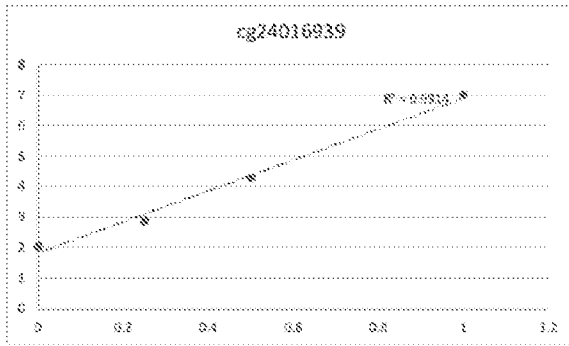
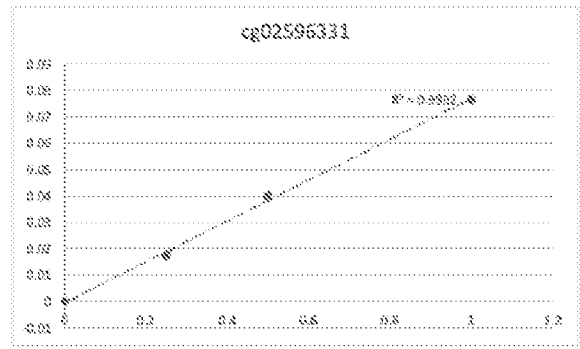
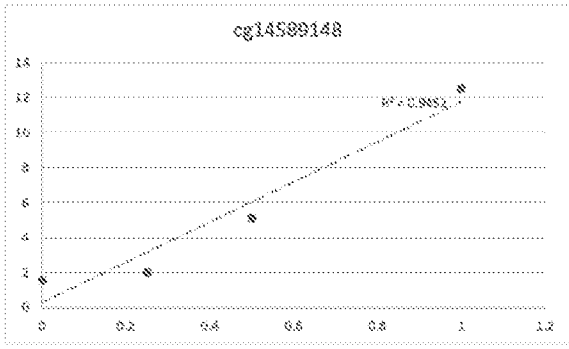


图 11





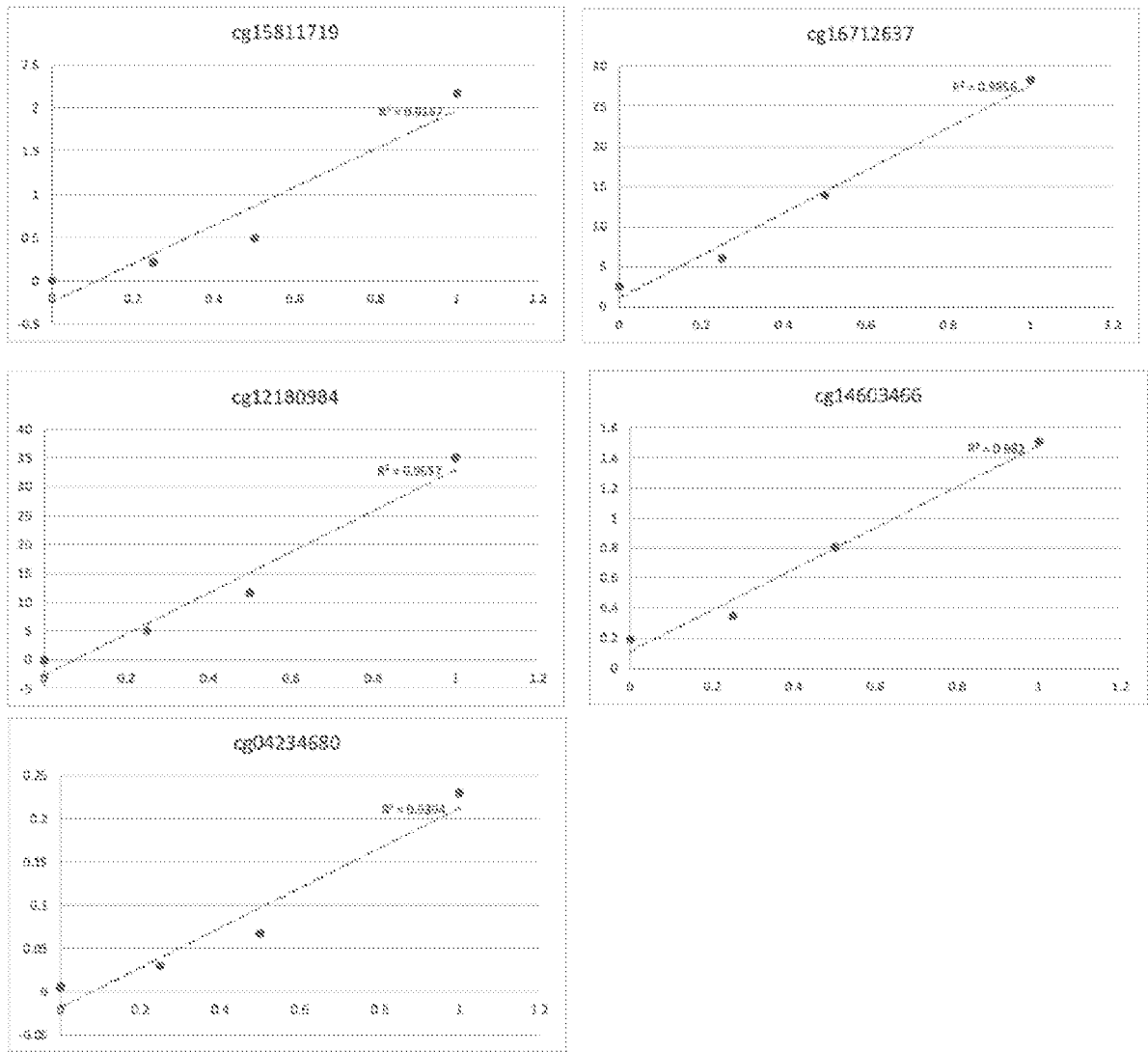


图 12

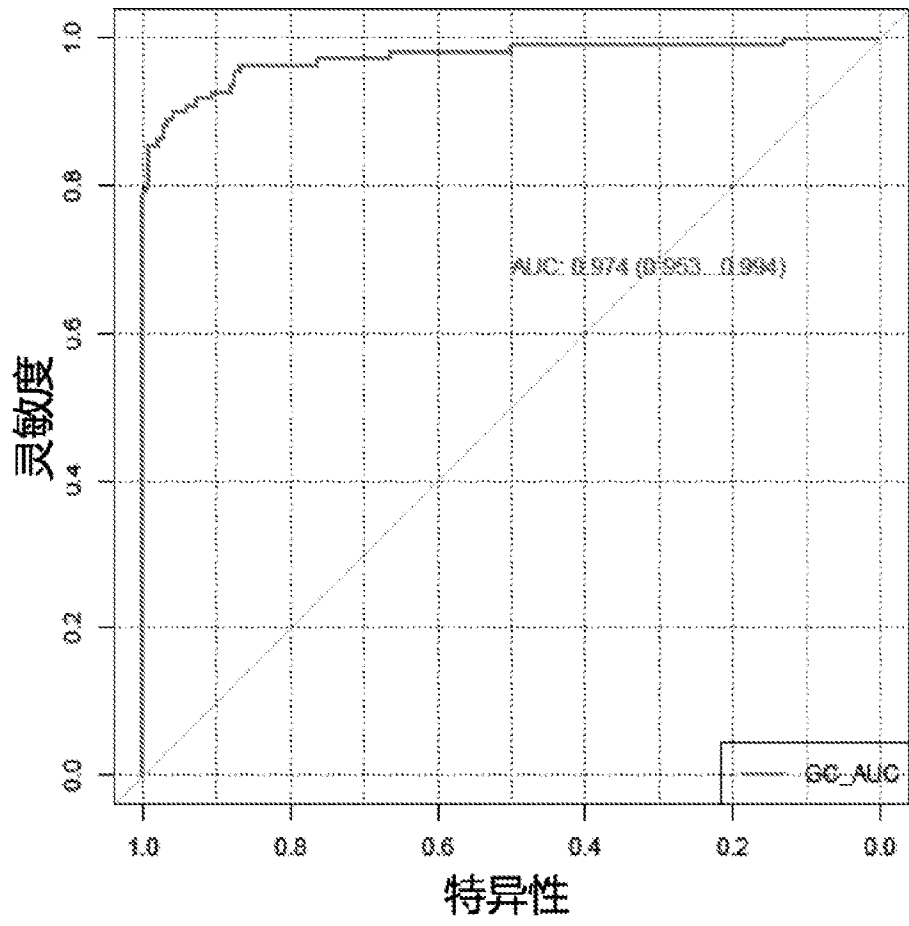


图 13

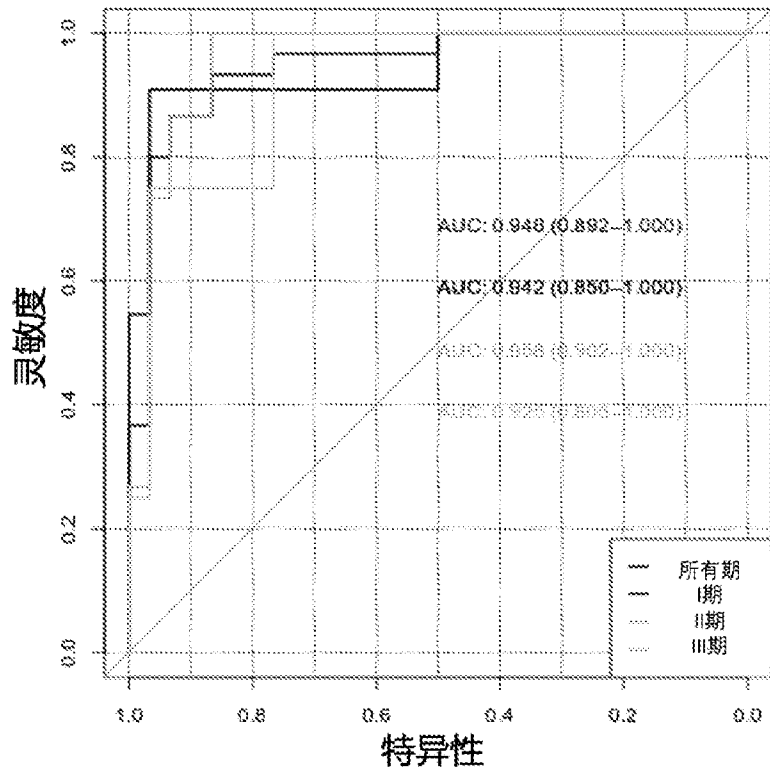


图 14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/102727

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12Q 1/6809(2018.01)i; C12Q 1/6876(2018.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNMED, CNABS, SIPOABS, DWPI, CNTXT, WOTXT, EPTXT, USTXT, CNKI, 万方, WEB OF SCIENCE, PUBMED, ELSEVIER SCIENCE, Genbank, China Patent Biological Sequence Search System: 甲基化, 特异性, 引物, 亚硫酸, 吡啶硼烷, 纯化, 提取, DNA, 多重, PCR, 扩增, 磁珠, 测序, TET, APOBEC, pyridine borane, methylation, specific, primer, bisulfite, purif +, extraction, multi+, amplification, bead, sequenc+, sequence search for SEQ ID Nos: 1-112		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2018312919 A1 (SHANGHAI EPICAN GENETECH CO LTD) 01 November 2018 (2018-11-01) claim 1, description paragraphs [0028]-[0037], embodiment 1	1-13, 16-26, 28, 29
Y	US 2018312919 A1 (SHANGHAI EPICAN GENETECH CO LTD) 01 November 2018 (2018-11-01) claim 1, description paragraphs [0028]-[0037], embodiment 1	14, 15, 27
X	CN 104894233 A (SHANGHAI ANGPU BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 09 September 2015 (2015-09-09) claims 1-9, description paragraphs [0048]-[0135]	1-13, 16-26, 28, 29
Y	CN 104894233 A (SHANGHAI ANGPU BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 09 September 2015 (2015-09-09) claims 1-9, description paragraphs [0048]-[0135]	14, 15, 27
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 22 September 2021		Date of mailing of the international search report 11 October 2021
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088 China Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/102727

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Luca Morandi et al. "DNA methylation analysis by bisulfite next-generation sequencing for early detection of oral squamous cell carcinoma and high-grade squamous intraepithelial lesion from oral brushing" <i>Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery</i> , Vol. 43, No. 8, 04 August 2015 (2015-08-04), abstract, page 1495 left-hand column last paragraph -- page 1496 right-hand column paragraph 2, figure 1	1-13, 16-26, 28, 29
Y	Luca Morandi et al. "DNA methylation analysis by bisulfite next-generation sequencing for early detection of oral squamous cell carcinoma and high-grade squamous intraepithelial lesion from oral brushing" <i>Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery</i> , Vol. 43, No. 8, 04 August 2015 (2015-08-04), abstract, page 1495 left-hand column last paragraph - page 1496 right-hand column paragraph 2, figure 1	14, 15, 27
X	US 2003032026 A1 (Kurt Berlin) 13 February 2003 (2003-02-13) abstract, claim 1, description paragraphs [0027]-[0045]	1-13, 16-26, 28, 29
Y	US 2003032026 A1 (Kurt Berlin) 13 February 2003 (2003-02-13) abstract, claim 1, description paragraphs [0027]-[0045]	14, 15, 27
Y	WO 2019106149 A1 (OSLO UNIVERSITETSSYKEHUS HF) 06 June 2019 (2019-06-06) abstract, claim 1, embodiments 1 and 2	14, 15, 27
X	CN 108085395 A (HAN, Linzhi) 29 May 2018 (2018-05-29) abstract, claims 5, 6, embodiment 2	1-13, 16-26, 28, 29
Y	CN 108085395 A (HAN, Linzhi) 29 May 2018 (2018-05-29) abstract, claims 5, 6, embodiment 2	14, 15, 27
X	娄加陶 等 (LOU, Jiatao et al.). "10个肺癌相关基因多重甲基化特异性PCR检测方法的建立 (10个肺癌相关基因多重甲基化特异性PCR检测方法的建立)" <i>生物医学工程与临床 (Biomedical Engineering and Clinical Medicine)</i> , Vol. 16, No. 1, 31 January 2012 (2012-01-31), abstract, page 79 right-hand column paragraph 2- page 81 right-hand column paragraph 4, table 1	1-13, 16-26, 28, 29
Y	娄加陶 等 (LOU, Jiatao et al.). "10个肺癌相关基因多重甲基化特异性PCR检测方法的建立 (10个肺癌相关基因多重甲基化特异性PCR检测方法的建立)" <i>生物医学工程与临床 (Biomedical Engineering and Clinical Medicine)</i> , Vol. 16, No. 1, 31 January 2012 (2012-01-31), abstract, page 79 right-hand column paragraph 2 - page 81 right-hand column paragraph 4, table 1	14, 15, 27

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/102727

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	2018312919	A1	01 November 2018	WO	2017147946	A1	08 September 2017
				CN	105695577	B	19 March 2019
				CN	105695577	A	22 June 2016
				US	10648032	B2	12 May 2020

CN	104894233	A	09 September 2015	CN	104894233	B	27 April 2018

US	2003032026	A1	13 February 2003	IL	147845	D0	14 August 2002
				AU	772002	B2	08 April 2004
				DE	19935772	C2	07 November 2002
				JP	3637308	B2	13 April 2005
				IS	6206	A	18 December 2001
				DE	19935772	A1	08 February 2001
				WO	0107647	A3	09 August 2001
				EP	1204765	B1	28 September 2005
				AU	6981800	A	13 February 2001
				WO	0107647	A2	01 February 2001
				US	7153671	B2	26 December 2006
				AT	305520	T	15 October 2005
				DE	50011259	D1	03 November 2005
				CA	2378569	A1	01 February 2001
				JP	2003516117	A	13 May 2003
				EP	1204765	A2	15 May 2002
WO	0107647	A9	23 January 2003				

WO	2019106149	A1	06 June 2019	GB	201720088	D0	17 January 2018
				US	2021032701	A1	04 February 2021

CN	108085395	A	29 May 2018	None			

<p>A. 主题的分类</p> <p>C12Q 1/6809(2018.01)i; C12Q 1/6876(2018.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																				
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C12Q</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNMED, CNABS, SIPOABS, DWPI, CNTXT, WOTXT, EPTXT, USTXT, CNKI, 万方, WEB OF SCIENCE, PUBMED, ELSEVIER SCIENCE, Genbank, 中国专利生物序列检索系统: 甲基化, 特异性, 引物, 亚硫酸, 吡啶硼烷, 纯化, 提取, DNA, 多重, PCR, 扩增, 磁珠, 测序, TET, APOBEC, pyridine borane, methylation, specific, primer, bisulfite, purif+, extraction, multi+, amplification, bead, sequenc+, 对SEQ ID Nos: 1-112的序列检索</p>																				
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>US 2018312919 A1 (SHANGHAI EPICAN GENETECH CO LTD) 2018年 11月 1日 (2018 - 11 - 01) 权利要求1, 说明书第[0028]-[0037]段, 实施例1</td> <td>1-13, 16-26, 28, 29</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 2018312919 A1 (SHANGHAI EPICAN GENETECH CO LTD) 2018年 11月 1日 (2018 - 11 - 01) 权利要求1, 说明书第[0028]-[0037]段, 实施例1</td> <td>14, 15, 27</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 104894233 A (上海昂朴生物科技有限公司) 2015年 9月 9日 (2015 - 09 - 09) 权利要求1-9, 说明书第[0048]-[0135]段</td> <td>1-13, 16-26, 28, 29</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 104894233 A (上海昂朴生物科技有限公司) 2015年 9月 9日 (2015 - 09 - 09) 权利要求1-9, 说明书第[0048]-[0135]段</td> <td>14, 15, 27</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>Luca Morandi等. "DNA methylation analysis by bisulfite next-generation sequencing for early detection of oral squamous cell carcinoma and high-grade squamous intraepithelial lesion from oral brushing" Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery, 第43卷, 第8期, 2015年 8月 4日 (2015 - 08 - 04), 摘要, 第1495页左栏倒数第1段--第1496页右栏第2段, 图1</td> <td>1-13, 16-26, 28, 29</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	US 2018312919 A1 (SHANGHAI EPICAN GENETECH CO LTD) 2018年 11月 1日 (2018 - 11 - 01) 权利要求1, 说明书第[0028]-[0037]段, 实施例1	1-13, 16-26, 28, 29	Y	US 2018312919 A1 (SHANGHAI EPICAN GENETECH CO LTD) 2018年 11月 1日 (2018 - 11 - 01) 权利要求1, 说明书第[0028]-[0037]段, 实施例1	14, 15, 27	X	CN 104894233 A (上海昂朴生物科技有限公司) 2015年 9月 9日 (2015 - 09 - 09) 权利要求1-9, 说明书第[0048]-[0135]段	1-13, 16-26, 28, 29	Y	CN 104894233 A (上海昂朴生物科技有限公司) 2015年 9月 9日 (2015 - 09 - 09) 权利要求1-9, 说明书第[0048]-[0135]段	14, 15, 27	X	Luca Morandi等. "DNA methylation analysis by bisulfite next-generation sequencing for early detection of oral squamous cell carcinoma and high-grade squamous intraepithelial lesion from oral brushing" Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery, 第43卷, 第8期, 2015年 8月 4日 (2015 - 08 - 04), 摘要, 第1495页左栏倒数第1段--第1496页右栏第2段, 图1	1-13, 16-26, 28, 29
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
X	US 2018312919 A1 (SHANGHAI EPICAN GENETECH CO LTD) 2018年 11月 1日 (2018 - 11 - 01) 权利要求1, 说明书第[0028]-[0037]段, 实施例1	1-13, 16-26, 28, 29																		
Y	US 2018312919 A1 (SHANGHAI EPICAN GENETECH CO LTD) 2018年 11月 1日 (2018 - 11 - 01) 权利要求1, 说明书第[0028]-[0037]段, 实施例1	14, 15, 27																		
X	CN 104894233 A (上海昂朴生物科技有限公司) 2015年 9月 9日 (2015 - 09 - 09) 权利要求1-9, 说明书第[0048]-[0135]段	1-13, 16-26, 28, 29																		
Y	CN 104894233 A (上海昂朴生物科技有限公司) 2015年 9月 9日 (2015 - 09 - 09) 权利要求1-9, 说明书第[0048]-[0135]段	14, 15, 27																		
X	Luca Morandi等. "DNA methylation analysis by bisulfite next-generation sequencing for early detection of oral squamous cell carcinoma and high-grade squamous intraepithelial lesion from oral brushing" Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery, 第43卷, 第8期, 2015年 8月 4日 (2015 - 08 - 04), 摘要, 第1495页左栏倒数第1段--第1496页右栏第2段, 图1	1-13, 16-26, 28, 29																		
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p> <p>* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件</p>																				
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2021年 9月 22日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2021年 10月 11日</p>																		
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国 北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>杜娟</p> <p>电话号码 01062411561</p>																		

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	Luca Morandi等. "DNA methylation analysis by bisulfite next-generation sequencing for early detection of oral squamous cell carcinoma and high-grade squamous intraepithelial lesion from oral brushing" Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery, 第43卷, 第8期, 2015年 8月 4日 (2015 - 08 - 04), 摘要, 第1495页左栏倒数第1段--第1496页右栏第2段, 图1	14, 15, 27
X	US 2003032026 A1 (Kurt Berlin) 2003年 2月 13日 (2003 - 02 - 13) 摘要, 权利要求1, 说明书第[0027]-[0045]段	1-13, 16-26, 28, 29
Y	US 2003032026 A1 (Kurt Berlin) 2003年 2月 13日 (2003 - 02 - 13) 摘要, 权利要求1, 说明书第[0027]-[0045]段	14, 15, 27
Y	WO 2019106149 A1 (UNIV OSLO HF) 2019年 6月 6日 (2019 - 06 - 06) 摘要, 权利要求1, 实施例1和2	14, 15, 27
X	CN 108085395 A (韩林志) 2018年 5月 29日 (2018 - 05 - 29) 摘要, 权利要求5、6, 实施例2	1-13, 16-26, 28, 29
Y	CN 108085395 A (韩林志) 2018年 5月 29日 (2018 - 05 - 29) 摘要, 权利要求5、6, 实施例2	14, 15, 27
X	娄加陶 等. "10个肺癌相关基因多重甲基化特异性PCR检测方法的建立" 生物医学工程与临床, 第16卷, 第1期, 2012年 1月 31日 (2012 - 01 - 31), 摘要, 第79页右栏第2段-第81页右栏第4段, 表1	1-13, 16-26, 28, 29
Y	娄加陶 等. "10个肺癌相关基因多重甲基化特异性PCR检测方法的建立" 生物医学工程与临床, 第16卷, 第1期, 2012年 1月 31日 (2012 - 01 - 31), 摘要, 第79页右栏第2段-第81页右栏第4段, 表1	14, 15, 27

第1栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列列表进行的:
- a. 作为国际申请的一部分提交的:
- 附件C/ST. 25文本文件形式
 - 纸件或图形文件形式
- b. 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:
- c. 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:
- 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))
 - 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)
2. 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。
3. 补充意见:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/102727

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
US	2018312919	A1	2018年 11月 1日	WO	2017147946	A1	2017年 9月 8日
				CN	105695577	B	2019年 3月 19日
				CN	105695577	A	2016年 6月 22日
				US	10648032	B2	2020年 5月 12日

CN	104894233	A	2015年 9月 9日	CN	104894233	B	2018年 4月 27日

US	2003032026	A1	2003年 2月 13日	IL	147845	D0	2002年 8月 14日
				AU	772002	B2	2004年 4月 8日
				DE	19935772	C2	2002年 11月 7日
				JP	3637308	B2	2005年 4月 13日
				IS	6206	A	2001年 12月 18日
				DE	19935772	A1	2001年 2月 8日
				WO	0107647	A3	2001年 8月 9日
				EP	1204765	B1	2005年 9月 28日
				AU	6981800	A	2001年 2月 13日
				WO	0107647	A2	2001年 2月 1日
				US	7153671	B2	2006年 12月 26日
				AT	305520	T	2005年 10月 15日
				DE	50011259	D1	2005年 11月 3日
				CA	2378569	A1	2001年 2月 1日
				JP	2003516117	A	2003年 5月 13日
				EP	1204765	A2	2002年 5月 15日
				WO	0107647	A9	2003年 1月 23日

WO	2019106149	A1	2019年 6月 6日	GB	201720088	D0	2018年 1月 17日
				US	2021032701	A1	2021年 2月 4日

CN	108085395	A	2018年 5月 29日	无			
