

(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
2014 年 11 月 27 日 (27.11.2014)



WIPO | PCT



(10) 国际公布号
WO 2014/187308 A2

- (51) 国际专利分类号:
C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2014/077944
- (22) 国际申请日: 2014 年 5 月 20 日 (20.05.2014)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201310189964.0 2013 年 5 月 21 日 (21.05.2013) CN
- (71) 申请人: 生物梅里埃股份公司 (BIOMÉRIEUX) [FR/CN]; 法国马赛埃托勒埃托勒, Marcy F-69280 (FR)。
- (72) 发明人: 孟夏 (MENG, Xia); 中国上海市徐汇区东安路 270 号 2 号楼 1313 室, Shanghai 200032 (CN)。徐清华 (XU, Qinghua); 中国上海市徐汇区东安路 270 号 2 号楼 1313 室, Shanghai 200032 (CN)。叶迅 (YE, Xun); 中国上海市徐汇区东安路 270 号 2 号楼 1313 室, Shanghai 200032 (CN)。刘芳 (LIU, Fang); 中国上海市徐汇区东安路 270 号 2 号楼 1313 室, Shanghai 200032 (CN)。吴非 (WU, Fei); 中国上海市徐汇区东安路 270 号 2 号楼 1313 室, Shanghai 200032 (CN)。
- (74) 代理人: 成都高远知识产权代理事务所 (普通合伙) (GAOYUNG INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY (GENERAL PARTNERSHIP)); 中国四川省成都市高新区衣冠庙邮局 A-42 号信箱 (高朋大道 5 号博士创业园), Sichuan 610041 (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, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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, 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:

- 关于申请人有权申请并被授予专利(细则 4.17(ii))
- 发明人资格(细则 4.17(iv))

本国际公布:

- 不包括国际检索报告, 在收到该报告后将重新公布(细则 48.2(g))。
- 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

(54) Title: COLORECTAL CANCER PROGNOSIS AGENT KIT

(54) 发明名称: 一种大肠癌预后试剂盒

(57) Abstract: The present invention discloses a colorectal cancer prognosis agent kit which includes agents relevant to detecting the level of gene expression of any one or plurality of the 5 genes below: BST1, as shown in SEQ ID NO: 1; MGST1, as shown in SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 or 10; HP, as shown in SEQ ID NO: 11 or 12; RCAN3, as shown in SEQ ID NO: 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 or 22; SRA1, as shown in SEQ ID NO: 23 or 24. The present invention additionally discloses the use of the agents for detecting the level of gene expression of any one or plurality of the above 5 genes in the preparation of colorectal cancer prognosis agents. The agent kit of the present invention provides accurate prognoses for colorectal cancer patients and has good prospects for clinical application.

(57) 摘要: 本发明公开了一种大肠癌预后试剂盒, 它包括检测如下 5 个基因中的任意一个或者多个基因的表达水平的相关试剂: BST1, 如 SEQ ID NO:1 所示; MGST1, 如 SEQ ID NO:2、3、4、5、6、7、8、9 或者 10 所示; HP, 如 SEQ ID NO:11 或者 12 所示; RCAN3, 如 SEQ ID NO:13、14、15、16、17、18、19、20、21 或者 22 所示; SRA1, 如 SEQ ID NO:23 或者 24 所示。本发明还公开了检测上述 5 种基因中的任意一个或者多个基因的表达水平的试剂在制备大肠癌预后试剂中的用途。本发明试剂盒可以对大肠癌患者进行准确预后, 临床应用前景良好。



WO 2014/187308 A2

说明书

一种大肠癌预后试剂盒

技术领域

本发明涉及一种试剂盒，特别涉及一种大肠癌预后试剂盒。

背景技术

大肠癌，是最常见的恶性肿瘤之一，其在美国人肿瘤发病率中排名第五，在中国人肿瘤发病率中排名第四，是欧洲人第三大致死肿瘤疾病。大肠癌的血液和淋巴结转移严重影响了大肠癌的预后，是导致患者死亡的重要原因，全世界大肠癌的发生率每年以 2% 的速度上升，急需一种有效预测大肠癌发展过程及结果的手段。

发明内容

为了解决上述问题，本发明提供了一种大肠癌预后试剂盒。

本发明大肠癌预后试剂盒，它包括检测如下 5 个基因中的任意一个或者多个基因的表达水平的相关试剂：BST1，如 SEQ ID NO: 1 所示；MGST1，如 SEQ ID NO: 2、3、4、5、6、7、8、9 或者 10 所示；HP，如 SEQ ID NO: 11 或者 12 所示；RCAN3，如 SEQ ID NO: 13、14、15、16、17、18、19、20、21 或者 22 所示；SRA1，如 SEQ ID NO: 23 或者 24 所示。

其中，所述试剂为检测所述基因转录的 RNA，特别是 mRNA 的量的试剂。

其中，所述试剂为检测与所述 mRNA 互补的 cDNA 的量的试剂。

其中，所述试剂为检测与所述 cDNA 互补的 cRNA 的量的试剂。

其中，所述试剂为探针。

其中，所述试剂为检测所述基因编码的多肽的量的试剂。

其中，所述试剂为抗体、抗体片段或者亲和性蛋白。

检测如下 5 个基因中任意一个或者任意多个基因的表达水平的相关试剂在制备大肠癌预后试剂中的用途：BST1，如 SEQ ID NO: 1 所示；MGST1，如 SEQ ID NO: 2、3、4、5、6、7、8、9 或者 10 所示；HP，如 SEQ ID NO: 11 或者 12 所示；RCAN3，如 SEQ ID NO: 13、14、15、16、17、18、19、20、21 或者 22 所示；SRA1，如 SEQ ID NO: 23 或者 24 所示。

其中，所述试剂为检测所述基因转录的 RNA，特别是 mRNA 的量的试剂。

其中，所述试剂为检测与所述 mRNA 互补的 cDNA 的量的试剂。

其中，所述试剂为检测与所述 cDNA 互补的 cRNA 的量的试剂。

其中，所述试剂为探针。

其中，所述试剂为检测所述基因编码的多肽的量的试剂。

其中，所述试剂为抗体或者亲和性蛋白。

本发明检测人体样本，特别是人血液样本中基因表达的方法，包括：1) 测定受试者血样的基因组中任意一个或者任意多个基因转录的 RNA 的水平，所述基因组包括如下基因：BST1，如 SEQ ID NO: 1 所示；MGST1，如 SEQ ID NO: 2、3、4、5、6、7、8、9 或者 10 所示；HP，如 SEQ ID NO: 11 或者 12 所示；RCAN3，如 SEQ ID NO: 13、14、15、16、17、18、19、20、21 或者 22 所示；SRA1，如 SEQ ID NO: 23 或者 24 所示。

(2) 检测受试者血样中的基因表达。

优选地，所述步骤 (1) 是测定基因组中 5 个基因转录的 RNA 的水平。

其中，所述样本是大肠癌患者的血液样本。

其中，所述步骤 (1) 使用至少一个寡核苷酸。

其中，一个寡核苷酸仅与一个基因转录的 RNA 杂交，和/或可以与所述基因转录的 RNA 互补的 cDNA 杂交。

其中，所述步骤 (1) 包括如下步骤：

a、扩增所述基因转录的 RNA，得扩增产物；

b、使用至少一个引物检测步骤 a 所得扩增产物的量。

其中，所述步骤 (1) 包括如下步骤：

i、用至少一个探针与所述基因转录的 RNA 互补的 cDNA 杂交，得杂交产物；

ii、检测步骤 i 所得杂交产物的量。

其中，所述步骤 (1) 包括扩增所述基因转录的 RNA 的方法。

其中，所述步骤 (1) 包括检测所述基因转录的 RNA 互补的 cDNA 的量的方法。

其中，所述步骤 (1) 至少使用一个探针。

其中，所述步骤 (1) 至少使用一个引物。

本发明寡核苷酸，它仅与一个基因转录的 RNA 杂交，和/或可以与所述基因转录的 RNA 互补的 cDNA 杂交，所述属于一个基因组的基因由如下基因组成：BST1，如 SEQ ID NO: 1 所示；MGST1，如 SEQ ID NO: 2、3、4、5、6、7、8、9 或者 10 所示；HP，如 SEQ ID NO: 11 或者 12 所示；RCAN3，如 SEQ ID NO: 13、14、15、16、17、18、19、20、21 或者 22 所示；SRA1，如 SEQ ID NO: 23 或者 24 所示。

所述的寡核苷酸选自 SEQ ID NO: 25~34 所示的核苷酸序列。

本发明检测人体样本，特别是人血液样本中基因表达的试剂盒，包括 5 个基因的 5 种表达产物的特异配偶体，每个配偶体与每个基因特定配合，所述 5 个基因如下所示：BST1，如 SEQ ID NO: 1 所示；MGST1，如 SEQ ID NO: 2、3、4、5、6、7、8、9 或者 10 所示；HP，如 SEQ ID NO: 11 或者 12 所示；RCAN3，如 SEQ ID NO: 13、14、15、16、17、18、19、20、21 或者 22 所示；SRA1，如 SEQ ID NO: 23 或者 24 所示。

其中，所述特异配偶体是寡核苷酸，特别是探针和/或引物。

其中，所述特异配偶体选自 SEQ ID NO: 25~34 所示的核苷酸序列的集合。

其中，所述特异配偶体包含抗体和/或亲和性蛋白。

本发明通过血液样本预测大肠癌患者的发展情况的方法，它包括如下步骤：

a) 取血液样本，检测如下 5 个基因中任意一个或者任意多个基因的表达产物的量：BST1，如 SEQ ID NO: 1 所示；MGST1，如 SEQ ID NO: 2、3、4、5、6、7、8、9 或者 10 所示；HP，如 SEQ ID NO: 11 或者 12 所示；RCAN3，如 SEQ ID NO: 13、14、15、16、17、18、19、20、21 或者 22 所示；SRA1，如 SEQ ID NO: 23 或者 24 所示；

b) 将步骤 a) 检测到的基因的表达产物的量输入支持向量机模型，计算预后指数； c) 根据步骤 b) 计算得到的结果，判断大肠癌患者的预后：

若样本的预后指数大于 0，其被归类为高风险病例；若样本的预后指数小于 0，其被归类为低风险病例。优选地，所述步骤 a) 是检测 5 个基因中每个基因的表达产物的量。

其中，所述步骤 a) 中，检测至少一个基因的表达产物的量是将所述基因的表达产物与该表达产物的特异配偶体接触。

其中，步骤 a) 中，检测基因的表达产物的量，所述基因的核酸序列选自 SEQ ID NO: 1~24 所示序列集合。

其中，步骤 a) 所述表达产物包括至少一个 RNA 转录物或者一个多肽。

其中，所述表达产物包括至少一个 mRNA。

其中，所述 RNA 转录物通过杂交、扩增或者测序的方法来检测和定量。

其中，所述 RNA 转录物在预设条件下与至少一个探针和/或至少一个引物接触，在预设条件下，所述探针和/或引物可以与 RNA 转录物杂交。

其中，与所述 RNA 转录物的 cDNA 在预设条件下与至少一个探针和/或至少一个引物接触，在预设条件下，所述探针和/或引物可以与 cDNA 杂交。

其中，所述多肽的检测是通过将多肽与至少一个特异配体接触来检测的，特别是与抗体或者亲和性蛋白接触。

其中，所述多肽与至少两个特异配体接触，特别是与两个抗体、两个亲

和性蛋白或者一个抗体和一个亲和性蛋白接触。

本发明通过血液样本体外筛查大肠癌患病风险的试剂盒，包括 5 个基因中任意一个或者任意多个基因的表达产物的特异配偶体，每个配偶体与每个基因特定配合，所述 5 个基因如下所示：BST1，如 SEQ ID NO: 1 所示；MGST1，如 SEQ ID NO: 2、3、4、5、6、7、8、9 或者 10 所示；HP，如 SEQ ID NO: 11 或者 12 所示；RCAN3，如 SEQ ID NO: 13、14、15、16、17、18、19、20、21 或者 22 所示；SRA1，如 SEQ ID NO: 23 或者 24 所示；

所述特异配偶体与基因的表达产物特异结合；

所述 5 个基因的核酸序列选自 SEQ ID NO: 1~24 所示序列的集合。

优选地，包括 5 个基因中每个基因的表达产物的特异配偶体。

其中，所述特异配偶体包括至少一个杂交探针。

其中，所述特异配偶体包括至少一个杂交探针和至少一个引物。

其中，所述特异配偶体包括至少一个杂交探针和两个引物。

其中，所述特异配偶体包括至少一个特异配体，特别是抗体或者亲和蛋白。

其中，所述特异配偶体包括至少两个特异配体，特别是两个抗体、两个亲和性蛋白或者一个抗体和一个亲和性蛋白。

本发明核酸序列如 SEQ ID NO: 1~24 所示的 5 个基因的表达产物的特异配偶体在制备体外筛查大肠癌患病风险的试剂中的用途，所述特异配偶体与 5 个基因的表达产物特异结合。

优选地，所述特异配偶体是 5 个基因中每个基因的表达产物的特异配偶体。

其中，所述特异配偶体包括至少一个杂交探针。

其中，所述特异配偶体包括至少一个杂交探针和至少一个引物。

其中，所述特异配偶体包括至少一个杂交探针和两个引物。

其中，所述特异配偶体包括至少一个特异配体，特别是抗体或者亲和蛋白。

其中，所述特异配偶体包括至少两个特异配体，特别是两个抗体、两个亲和性蛋白或者一个抗体和一个亲和性蛋白。

本发明基因表达水平的检测可以通过检测 RNA 转录物来实现。

术语“RNA 转录物”是指总 RNA，即编码或者非编码 RNA，包括直接来自于外周血样本中，也包括间接来自于细胞裂解后的血液样本中的 RNA。细胞裂解的方法可以采用申请号：WO 99/05338 的专利申请公开的磁性和机械裂解方法，或者采用申请号：WO 99/53340 的专利申请公开的磁裂解方法，或者采用申请号：WO 99/15321 的专利申请公开的机械裂解方法，当然，也

可以采用本领域公知的方法，如，热裂解、高渗透压裂解或者使用胍盐等裂解液的化学裂解方法。细胞裂解后，还需要将核酸从裂解步骤产生的其他细胞组成物中分离出来，通常来讲，离心即可纯化核酸。总 RNA 包含 tRNA，mRNA 和 rRNA，其中，mRNA 包括目标基因转录的 mRNA，也包括来自于其他非目标基因的 mRNA。

本发明中，RNA 转录物可以通过杂交、扩增或者测序的方法来检测和量化。比如，将 RNA 转录物与探针或者引物杂交。

术语“杂交是指在适当条件下，两个核酸片段通过稳定且特异的氢键结合，形成双螺旋复合物的过程。所述氢键存在于互补的腺嘌呤 A 和胸腺嘧啶 T（或者尿嘧啶 U）之间，简称 A-T 键，或者存在于互补的鸟嘌呤 G 和胞嘧啶 C 之间，简称 G-C 键。

两段核酸片段的杂交可能是完全的（即形成完全互补的核苷酸片段或者序列），杂交过程中形成双螺旋复合物仅包含 A-T 键和 G-C 键；也可能是局部的（即形成充分互补的核苷酸片段或者序列），杂交过程中形成双螺旋复合物包含 A-T 键和 G-C 键，使得其可以形成双螺旋结构，也包含未绑定到双螺旋复合物上的碱基。

两段核酸片段的杂交程度取决于杂交的反应条件，特别是严格程度。所述严格程度是指两个核酸片段的碱基组成函数，也指两个核酸片段的错配程度。严格程度取决于反应条件，比如，杂交溶液中，离子的浓度和种类，变性剂的性质和浓度，和/或杂交温度。这些条件是常规条件，本领域技术人员能确定合适的条件。通常来讲，根据待杂交核酸片段的长度，杂交温度在 20~70℃ 之间，优选在 35~65℃ 之间，生理盐水的浓度在 0.5~1M 之间。

术语“扩增引物”，是指包含 5~100 个核苷酸的核酸片段，优选地，包含能起始酶促反应（比如，酶促扩增反应）的 15~30 个核苷酸。

术语“酶促扩增反应”是指通过在至少一种酶的作用下产生核酸片段多拷贝的过程。所述扩增反应是本领域公知常识，且在如下技术中被提及：美国专利 No.4,683,195、美国专利 No.4,683,202 和美国专利 No.4,800,159 中描述的 PCR(多聚酶链式反应)，申请号为：EP 0 201 184 的专利申请中公开的 LCR(连接酶链式反应)，申请号为：WO 90/01069 的专利申请中公开的 RCR（修复链式反应），申请号为：WO 90/06995 的专利申请中记载的 3SR（自主序列复制），申请号为：WO 91/02818 的专利申请中记载的 NASBA（依赖核酸序列的扩增技术），美国专利 No.5,399,491 中记载的 TMA（转录介导的扩增）。

当酶促扩增反应为 PCR 时，扩增一个目标基因至少需要 2 个目标基因特异性的引物，保证扩增产物与目标基因特异性一致。如，扩增产物可以为

目标基因 mRNA 逆转录制备的互补 DNA (cDNA)，或者，与该 cDNA 互补 RNA (cRNA)。当酶促扩增反应是反转录酶介导的 PCR，即为 RT-PCR。

术语“杂交探针”是指包括至少 5 个核苷酸的核酸序列，比如，包含 5~100 个核苷酸，其能在指定条件下与目标基因的表达产物或者该表达产物的扩增产物杂交形成复合物。在本发明中，所述目标基因的表达产物包含目标基因 mRNA，所述目标表达产物的扩增产物包括与目标产物 mRNA 互补 DNA cDNA 或者与 cDNA 互补的 cRNA。杂交探针上还包括用于检测的标志物。

术语“检测”是指计数方式等直接检测法和使用标志物方式等间接检测方法。目前，有很多用于核酸检测的方法（比如，Kricka et al., *Clinical Chemistry*, 1999, no 45 (4), p. 453-458 or Keller G. H. et al., *DNA Probes*, 2nd Ed., Stockton Press, 1993, sections 5 and 6, p. 173-249 记载的方法）。

术语“标志物”是指可以产生能被检测的信号示踪剂。示踪剂列表：包括产生能被检测到的信号的酶，比如，辣根过氧化物酶，碱性磷酸酶， β -半乳糖苷酶，葡萄糖-6-磷酸或者脱氢酶，通过比色法，荧光或发光法检测；发色团，如荧光，发光，染料化合物；电子密度基团，通过电子显微镜或凭借其导电性等电学性能、由安培法、伏安法或者阻抗测量的方法检测；基团，通过光学方法，比如，衍射，表面等离子体共振，或接触角变化，或原子力光谱隧道效应等物理方法检测；放射性分子，比如 ^{32}P , ^{35}S 或者 ^{125}I 。

上述杂交探针是一种检测探针。检测探针被标志物标记的探针，如，Tyagi & Kramer (*Nature biotech*, 1996, 14:303-308)所述，检测探针具体是指“分子信标”检测探针。“分子信标”具有茎-环结构，包括一个荧光基团和一个淬灭基团，当“分子信标”特异的环序列与其互补的目标基因的结合将会导致茎展开，并在适当的波长的激发过程中发射荧光。检测探针具体还包括“报告探针”，如 NanoStringTMs 技术所示，其包括一个“颜色编码的条形码”。

检测探针包括荧光团和淬灭剂，如，6-羧基-荧光素或者 6-羧基-X-罗丹明，3'末端有淬灭剂：4-二甲胺基苯基偶氮苯磺酰氯。

为了检测杂交反应，需要对目标序列进行标记，可以是直接标记，具体是在目标序列内部加入标志物，也可以是间接标记，即使用检测探针。具体是在杂交之前，实施包括标记和/或剪切目标序列的步骤，比如，在酶促扩增反应中使用被标记了的脱氧核糖核三磷酸。咪唑或者氯化锰可以达到剪切的作用。目标序列也可以在扩增步骤之后再标记，比如，通过申请号：WO 91/19812 的专利申请文件中记载的三明治杂交技术杂交一个检测探针。另外一种优选的方法是申请号：FR 2780059 的专利申请文件中记载的标记核酸序列的方法。

上述杂交探针也是一种“捕获”探针。“捕获”探针可以通过任何适合的方

法，直接地或者间接地固定在固体基质上，比如，通过共价键结合或者吸附。所述固体基质，可以是合成材料，也可以是化学修饰或者非化学修饰的天然材料，具体可以是多糖，如，基于纤维素的材料、葡聚糖、共聚物和聚合物，基于纤维素的材料包含纸、纤维素衍生物，纤维素衍生物包括醋酸纤维素、硝酸纤维素；可以是苯乙烯型单、棉等天然纤维或者等合成纤维；可以是无机材料，如，二氧化硅、石英、玻璃或者陶瓷；还可以是乳胶、磁性粒子、金属衍生工具、凝胶等。固体基质可以是微量滴定板，可以是申请号：

WO-A-94/12670 的专利申请文件中的固定膜，也可以是颗粒。针对每个目标基因，也可以在基质上固定不同捕获探针，具体地，一个能够固定大量探针的基因芯片作为基质即可以实现。“基因芯片”是指很微小但固定了许多捕获探针的固体基质，捕获探针固定在预定位置上。

基因芯片，或者说 DNA 芯片的概念可以追溯到 20 世纪 90 年代初。它基于多学科技术，结合了微电子技术，核酸化学，图像分析和信息技术。它的工作原理是分子生物的基础：杂交现象，即，两个 DNA 或者 RNA 序列的互补配对。基因芯片的方法基于固定在固体基质上的捕获探针，直接或者间接荧光素标记的目标核酸片段的样本可以与该探针相互作用。捕获探针特异的固定在基质或者芯片上，每个杂交均可以给出一条与目标基因相关的特定信息。特定信息的集合使得计量一个或者多个目标基因的表达水平成为可能。为了分析目标基因的表达水平，需要准备包含大量探针的基质，这些探针与所有或者部分转录为 mRNA 的目标基因相关。其中，“低密度基质”是指包含的探针低于 50 个的基质，“中等密度基质”是指包含的探针数量为 50~10000 的基质，“高密度基质”是指包含超过 10000 个探针的基质。

目标基因的 cRNA 或者 cDNA 与特定的捕获探针杂交后，清洗芯片或者基质，被标记的 cDNA 或者 cRNA 与捕获探针的复合物可以通过绑定了荧光标签的高亲和力配体显示出来。并通过信息技术作出分析荧光，得出结果。进行分子诊断时，不得不提 Affymetrix 公司制备的 DNA 芯片（("Accessing Genetic Information with High-Density DNA arrays", M.Chee et al., Science, 1996, 274, 610-614. "Light-generated ligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis", A. Caviani Pease et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, 91, 5022-5026），在该技术中，捕获探针往往很小，含有 25 个左右的核苷酸。其他一些生物芯片分别在如下文献中公开：G. Ramsay, Nature Biotechnology, 1998, No. 16, p. 40-44; F. Ginot, Human Mutation, 1997, No. 10, p. 1-10 ; J. Cheng et al, Molecular diagnosis, 1996, No. 1 (3), p. 183-200 ; T. Livache et al, Nucleic Acids Research, 1994, No. 22 (15), p. 2915-2921 J. Cheng et al, Nature Biotechnology, 1998, No. 16, p. 541-546 ，或者在美国专利 No. 4,981,783、美

国专利 No. 5,700,637、美国专利 No. 5,445,934、美国专利 No. 5,744,305 和美国专利 No. 5,807,522 中。固体基质的主要特征是保守捕获探针与目标核酸片段的杂交，但产生的背景噪音却很小。

捕获探针固定在基质上的方式主要有三种：

1、将预先合成的探针布放于玻片载体上。通过微量、缩微或喷墨装置，这种探针可以被直接附着到芯片上。这个技术允许附着的探针具有一系列大小不等的碱基，从几个碱基（5~10 个），到较大尺寸的 60 个碱基（印刷），再到几百个碱基（微印刷）。

所述印刷与打印机的方式相似，是基于小球体流体以 4000 转/s 的速度推进。所述微印刷包括将含有几十到几百个碱基的长探针附着到玻璃载片表面上。这些探针通常来自于数据库，是扩增和纯化的产物。DNA 可以处在小于 4cm^2 大小的面积范围内，制备得到微阵列芯片，微阵列可以携带大约 1 万个识别区域的斑点。使用直径为 0.5~1mm 的尼龙膜，携带扩增的产物（通常是 PCR 扩增的），称为巨阵列，其最大密度为 25 斑点/ cm^2 。许多实验室采用该技术。本发明中，微印刷技术是包含生物芯片的，如申请号：WO-A-00/71750 或者 FR 00/14896 的专利申请文件所示，一定体积的样品可以沉积在微量滴定板的底部，或者依照如申请号：FR 00/14691 的专利申请文件，一定数目的其他液滴能够沉积在微量滴定板或者裴氏培养皿底部。

2、第二种在基质和芯片上附着芯片方法是原位杂交。这种技术在芯片表面直接产生短探针。该技术基于原位寡核苷酸合成（详见申请号：WO 89/10977 和申请号：WO 90/03382 的专利申请文件）和寡核苷酸合成程序。它包括一个移动的反应室，在该反应室中，寡核苷酸衍生反应可以沿着玻璃表面进行。

3、第三种技术叫做光刻，即 Affymetrix 公司开发的专门用于基因芯片的程序。它也是一种原位杂交技术，来自于微处理器技术。具体地，芯片表面被附着物活化，附着物是能够被光活化的不稳定化学基团。这些基团一旦被活化就可以与寡核苷酸序列的 3' 末端反应。通过在芯片表面用预定形状掩膜掩盖的方式可以选择性的活化和激活芯片区域，在该掩盖区域，可以结合四种核苷酸一个或者其他。不同掩膜的成功使用使得保护/反应可以交替循环，因而可以在大小约几十平方微米的斑点产生寡核苷酸探针。该方式可以在几平方厘米的表面区域产生成百上千的斑点。光刻的优点：可以通过 4 倍 N 循环产生 N-mers 的芯片。

杂交检测目标基因表达还可以使用如下方法：（1）同上述方法步骤（1），提取全血的总 RNA，逆转录得到该生物材料 mRNAs 的 cDNAs。使用 T7 聚合酶，在启动子的作用下，使 cDNA 的互补 RNA 发生聚合，得到以 DNA 为模版的互补

RNA(cRNA)。得到包含目标基因特异性cRNAs与非目标基因特异性的cRNAs的混合物。(2) 将cRNAs与固定了目标基因特异性的捕获探针的基质混合, 目标基因特异性的捕获探针将与目标基因特异性的cRNAs发生杂交反应, 而非目标基因特异性的cRNAs不发生杂交反应。通过在基质上同时固定不同的捕获探针(一个探针与一个目标基因对应), 可以同时检测不同目标基因的表达水平。在杂交反应之前也可以先对目标基因特异性的cRNAs按照前述方法进行标记和/或剪切。(3) 检测杂交反应的结果。检测是通过将基质与带有标签的检测探针混合后, 检测标签发出的信号实现的, 所述基质上带有目标基因特异性的捕获探针, 该探针可以与目标基因特异性的cRNAs杂交。若之前已经对目标基因特异性的cRNAs进行标记, 则直接检测即可。当基质上有大量探针时, cRNA的优势尤其明显。

本发明基因表达水平的检测可以通过检测多肽来实现。具体是将多肽与至少一种特定配体相结合。前述试剂为检测所述基因编码的多肽的量的试剂。

优选地, 所述试剂为抗体或者亲和性蛋白。在本发明优选实施例中, 是将表达的多肽与至少两个特定配体结合。本发明特定配体可以是抗体或者名叫“Nanofitin™”的亲和蛋白。

所述“抗体”包括多克隆抗体、单克隆抗体、人源化抗体和重组抗体, 它们的制备方法是本领域公知常识。

基因表达数据具有数据量大、维数高、样本小、非线性的特点。对基因表达数据分析的重要任务之一是对样品进行判别分类, 即根据已知的基因表达数据建立判别模型, 对未知样本进行分类, 这对疾病的诊断具有非常重要的意义。传统的统计分类方法如线性判别、logistic 判别等有很大的局限性, 由于这些方法本质上是线性的, 难以适合复杂的情况, 同时基因表达数据分析中变量(基因)的个数远大于样本的例数, 无法进行有效的计算。

支持向量机(Support Vector Machine, SVM)是近年来在统计学习理论的基础上发展起来的一种新型机器学习方法。它采用了结构风险最小化原则, 能较好的解决小样本学习的问题, 尤其是针对维数高、样本小、非线性的基因表达数据, 支持向量机表现出了很好的性能。Guyon 首次将其应用于白血病基因表达数据的研究, 获得成功(I. Guyon, Machine Learning, 2002, No. 46, p. 389-422; J.)。近年来, 国内学者的研究也证实了支持向量机算法优越的性能(Z. Zhu, Journal of Clinical Oncology, 2009, No. 7, p. 1091-1099; Y. Xu, Clincial Cancer Research, 2013, No. 19, p. 3039-3045)。

本发明试剂盒可以有效预测大肠癌患者的发展情况, 并且操作简单, 仅需血液检查, 患者依从性高, 为临床大肠癌患者的治疗提供了可靠的依据, 具有良好的应用前景。

显然，根据本发明的上述内容，按照本领域的普通技术知识和惯用手段，在不脱离本发明上述基本技术思想前提下，还可以做出其它多种形式的修改、替换或变更。

以下通过实施例形式的具体实施方式，对本发明的上述内容再作进一步的详细说明。但不应将此理解为本发明上述主题的范围仅限于以下的实例。凡基于本发明上述内容所实现的技术均属于本发明的范围。

附图说明

图1 组1中54例I-IV期患者Kaplan-Meier曲线。

图2 组2中33例II期患者Kaplan-Meier曲线。

图3 组2中54例III期患者Kaplan-Meier曲线。

具体实施方式

实施例1 样本采集

经过知情同意，外周血样本来自于141例经过临床病理诊断确诊的大肠癌患者（CRC），采集于2006.10~2009.5年间。

CRC招募于中国复旦大学上海癌症中心结直肠外科，均按照国际抗癌联盟（UICC）建议的TNM分期系统进行分期。患者均未接受术前化疗或者放疗。患有遗传性结直肠癌或炎症性肠道疾病（Corhn病或溃疡性结肠炎）的患者被排除在本发明之外。检测样本的人口特征和临床特征如表1所示：

表1 检测样本的特征

变量	组 1	组 2
年龄		
平均年龄	58.1	54.7
分布范围	27-78	24-78
性别-百分比(%)		
Male	31 (57.4)	47(54.0)
Female	23 (42.6)	40(46.0)
癌症位置-百分比(%)		
结肠	22 (40.7)	15(17.2)
直肠	32 (59.3)	72(82.8)
分期 -百分比(%)*		
I 期	18 (33.4)	-

II 期	8 (14.8)	33(37.9)
III 期	8 (14.8)	54(62.1)
IV 期	20 (37.0)	-

血液样本的收集：取每个参与者2.5ml外周血于PAXgene™血液RNA管（PreAnalytix GmbH, Hombrechtikon, CH），并按照制造商的指导方法进行处理。中国复旦大学上海癌症中心，镜检一周后，手术前，收集CRCs的血液样本。

分组：组1包括18例I期、8例II期、8例III期和20例IV期患者；组2包括33例II期和54例III期患者。

实施例2 BST1等5个基因的表达量检测

1、实验方法

(1) 管家基因的选择

以CSNK1G2, DECR1, FARP1表达水平的几何平均数为“元管家基因”，作为实时定量PCR数据的校正因子。

(2) RNA提取和实时定量PCR检测

全血抽取：取每个参与者2.5ml外周血于PAXgene™血液RNA管（PreAnalytix GmbH, Hombrechtikon, CH），并按说明书进行处理；

总RNA提取：按照说明书，用PAXgene™血液RNA系统(PreAnalytix)提取总RNA；用分光光度计在OD值为260nm下检测总RNA的量，用安捷伦生物分析仪上的RNA6000 Nano LabChip®试剂盒(Agilent Technologies, Palo Alto, CA, U.S.A.)检测总RNA的质量，完整值在7.0以上的RNA用于分析；

逆转录：以下面列出的目标基因的引物对为引物，使用QuantiTect® 逆转录试剂盒 (Qiagen GmbH, Hilden, Germany)，按照说明书的标准流程，用320毫微克的总RNA进行逆转录得到cDNA；

cDNA扩增：以下面列出的目标基因的引物对为引物，使用SYBR Premix DimerEraser试剂盒 (Takara biotechnology, Dalian, China)，按照制造者提供的标准流程，扩增cDNA；

cDNA检测：扩增过程用Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR 系统进行实时监测(Life Technologies, Carlsbad, CA, U.S.A.)，根据目标基因的表达量与管家基因表达量，计算目标基因的相对表达量： $\Delta Ct(\text{基因相对表达量}) = Ct(\text{目标基因}) - Ct(\text{管家基因})$ ，计算目标基因的相对表达量。表达量为负表明目标基因的Ct值低于管家基因的Ct值；相对表达量为正表明目标基因的Ct值高于管家基因的Ct值。

管家基因的引物对：

1、CSNK1G2

F:5'-GCCGCAGTGATGTTCTAGC-3'

R:3'-TCTGCTGCCGTGCAAATC-5'

2、DECR1:

F:5'-CGATGCTACCACCTAATAGT-3'

R:3'-TAGGCTGGACAGAAGAGT-5'

3、FARP1:

F:5'-ACCTGTCGTTATTCCTATATCC-3'

R:3'-GAAACCGTGTTCCCTGTG-5'

目标基因的引物对：

1、BST1:

F:5'-ATAGCCACCTCCTTGTTA-3'

R:3'-TAATCGAGTCCAGAGTCAT-5'

2、MGST1:

F:5'-TAGAACGTGTACGCAGAG-3'

R:3'-CAATGGTGTGGTAGATCC-5';

3、HP:

F:5'-GGTTCAGAAGACCATAGC-3'

R:3'-ATCTTATCGCATCCACTC-5'

4、RCAN3:

F:5'-ACCAGGAAGGAACAGAAC-3'

R:3'-AGAACGAAACCACAATGAC-5'

5、SRA1:

F:5'-GCAGCCAATGAAGAGAAA-3'

R:3'-GGGAACCGAGGATTATGA-5'

实施例3 基因表达量与大肠癌的相关性

1、单个基因表达量与大肠癌预后的相关性

按照实施例2的方法分别检测实施例1中组1的54名患者的血液样本中5个基因的表达水平—相对表达量，采用COX比例风险模型分析结合前向特征选择算法，筛选表达模式与患者预后具有显著相关性的目标基因。根据统计分析结果，5个基因的表达模式对患者预后具有各自独立的、显著的预测意义。

(1) BST1 (bone marrow stromal cell antigen 1):

基因符号	Wald 统计量	P 值	风险比
<i>BST1</i>	5.6	0.02	3.3

BST1基因的表达量与大肠癌患者的预后显著相关 ($P = 0.02$)。该基因高表达将增加大肠癌患者死亡的风险。风险比为3.3, 表明该基因表达量每增加一个单位, 患者死亡的风险将增加3.3倍。

(2) MGST1 (microsomal glutathione S-transferase 1):

基因符号	Wald 统计量	P 值	风险比
<i>MGST1</i>	6.4	0.01	4.5

MGST1基因的表达量与大肠癌患者的预后显著相关 ($P = 0.01$)。该基因高表达将增加大肠癌患者死亡的风险。风险比为4.5, 表明该基因表达量每增加一个单位, 患者死亡的风险将增加4.5倍。

(3) HP (haptoglobin):

基因符号	Wald 统计量	P 值	风险比
<i>HP</i>	7.7	0.005	2.3

HP基因的表达量与大肠癌患者的预后显著相关 ($P = 0.005$)。该基因高表达将增加大肠癌患者死亡的风险。风险比为2.3, 表明该基因表达量每增加一个单位, 患者死亡的风险将增加2.3倍。

(4) RCAN3 (RCAN family member 3):

基因符号	Wald 统计量	P 值	风险比
<i>RCAN3</i>	11.8	0.001	0.6

RCAN3基因的表达量与大肠癌患者的预后显著相关 ($P = 0.001$)。该基因低表达将增加大肠癌患者死亡的风险。风险比为0.6, 表明该基因表达量每降低一个单位, 患者死亡的风险将增加1.7倍。

(5) SRA1 (Steroid receptor RNA activator 1):

基因符号	Wald 统计量	P 值	风险比
<i>SRA1</i>	17.7	0.001	0.1

SRA1基因的表达量与大肠癌患者的预后显著相关 ($P = 0.001$)。该基因低表达将增加大肠癌患者死亡的风险。风险比为0.1, 表明该基因表达量每降低一个单位, 患者死亡的风险将增加10倍。

2、5个基因的表达量与大肠癌预后的相关性

发明人采用通行的R统计语言、“e1071”软件工作包，调用支持向量机算法，结合上述54例样本中5个基因的表达数据，建立分类模型。根据该分类模型可以计算每个待检大肠癌患者的预后指数。

若样本的预后指数大于0，其被归类为高风险病例；若样本的预后指数小于0，其被归类为低风险病例。实施例1组1中25例患者被归入高风险组，29例患者归入低风险组。高风险组的25例患者中有20例死亡，低风险组的29名患者中仅3例死亡，提示低风险组的预后要显著地优于高风险组。Log-rank检验P值小于0.001，具有统计学意义。采用Kaplan-Meier曲线和Log-rank检验比较两组患者的生存率。Kaplan-Meier曲线如图1所示。采用多因素COX回归分析比较病理TNM分期与5个基因预测模型评估患者预后的性能，结果如表1所示，TNM分期和5个基因预测结果均与患者预后具有显著的相关性（P值小于0.01），并且5个基因预测模型能够提供独立于现有临床病理分期的、可用于评估患者死亡风险的信息。

表1

预后因子	B	Exp(B)	Wald	Sig.
TNM 分期	1.06	2.88	12.38	0.001
5-gene Signature	1.75	5.75	7.34	0.007

按照实施例3的方法检测实施例1组2中33例II期患者的血液样本中5个基因的表达水平。根据5个基因的表达水平，用前述分类模型分类，计算预后指数。其中，15例患者被归入高风险组，18例患者归入低风险组。采用Kaplan-Meier曲线和Log-rank检验比较两组患者的生存率。Kaplan-Meier曲线如图2所示。

按照实施例3的方法检测实施例1组2中54例III期患者的血液样本中5个基因的表达水平。根据5个基因的表达水平，用前述分类模型分类，计算预后指数。其中，26例患者被归入高风险组，28例患者归入低风险组。采用Kaplan-Meier曲线和log-rank检验比较两组患者的总生存时间，结果如图3所示。

同时，观察上述样本的病情发展情况，II期高风险组的15例患者中有3例死亡，低风险组的18名患者全部存活，提示低风险组的预后要优于高风险组。Log-rank检验P值等于0.05，具有统计学意义；III期高风险组的26例患者中有7例死亡，低风险组的28例患者中有1例死亡，提示低风险组的预后要优于高风险组。Log-rank检验P值等于0.016，具有统计学意义。

综合上述结果，统计如表2：

表2

	II期		III期	
检测结果	高风险15人	低风险18人	高风险26人	低风险28人
实际发展情况	3人死亡，12人存活	全部存活	7人死亡，19人存活	全部存活

由上述结果可以看出，因大肠癌死亡的患者全部属于本发明试剂盒预测属于高风险的人群，本发明预测属于低风险的人群全部存活，说明本发明试剂盒可以准确预后。

实施例4 本发明试剂盒的组成及待检样本的检测

1、试剂盒的组成

实时定量PCR检测试剂盒（50人份）：

（1）总RNA提取试剂

PAXgeneTM血液RNA系统。

（2）逆转录试剂

逆转录酶(50ul)；逆转录缓冲液(200 ul)；基因组DNA去除缓冲液(100 ul)；引物(50 ul)；无酶水(1.9 ml)； PCR 反应板：含正向引物溶液和反向引物溶液的384孔板。

管家基因的引物对：

1、CSNK1G2

F:5'-GCCGCAGTGATGTTCTAGC-3'

R:3'-TCTGCTGCCGTGCAAATC-5'

2、DECR1:

F:5'-CGATGCTACCACCTAATAGT-3'

R:3'-TAGGCTGGACAGAAGAGT-5'

3、FARP1:

F:5'-ACCTGTCGTTATTCCTATATCC-3'

R:3'-GAAACCGTGTTCCCTGTG-5'

目标基因的引物对：

1、BST1:

F:5'-ATAGCCACCTCCTTGTTA-3'

R:3'-TAATCGAGTCCAGAGTCAT-5'

2、MGST1:

F:5'-TAGAACGTGTACGCAGAG-3'

R:3'-CAATGGTGTGGTAGATCC-5';

3、HP:

F:5' - GGTTCAGAAGACCATAGC -3'

R:3'- ATCTTATCGCATCCACTC -5'

4、RCAN3:

F:5' - ACCAGGAAGGAACAGAAC-3'

R:3'- AGAACGAAACCACAATGAC-5'

5、SRA1 :

F:5'- GCAGCCAATGAAGAGAAA -3'

R:3'- GGGAACCGAGGATTATGA -5'

(3) cDNA扩增试剂

含有反应酶和荧光染料的混合缓冲液(20ml); ROX参考染料(800ul)PCR反应板: PCR 反应板: 同逆转录试剂中PCR反应板。

2、试剂盒的使用方法

(1) 待检参与者2.5ml外周血采集于PAXgene™血液RNA管(PreAnalytix GmbH, Hombrechtikon, CH), 并按照制造商的指导方法进行处理; 按照制造者提供的说明书, 用PAXgene™血液RNA系统(PreAnalytix)提取待检样本。

(2) 逆转录

以步骤(1)的总RNA为模板, 用上述逆转录试剂, 得到5个目标基因和管家基因的cDNA。

(3) cDNA扩增

取步骤(2)得到的cDNA为模板, 用上述cDNA扩增试剂扩增, 使用Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR 系统检测cDNA的量。

(4) 将检测到的5个基因的表达水平输入支持向量机模型, 计算预后指数。若样本的预后指数大于0, 其被归类为高风险病例; 若样本的预后指数小于0, 其被归类为低风险病例。

备注: 本发明试剂盒中, 目标基因引物对的数目可以根据需要任意选择一对或者多对。

综上所述, 本发明5个基因与大肠癌发展密切相关, 这些基因的高/低表达会显著提高大肠癌的危险性, 可通过单独或者同时检测这5个基因的表达水平测定大肠癌患者病情的发展情况, 准确度高。

工业应用性

本发明公开的大肠癌预后试剂盒, 可以对大肠癌患者进行准确预后, 临床应用前景良好。

权 利 要 求 书

1、一种大肠癌预后试剂盒，其特征在于：它包括检测如下5个基因中的任意一个或者多个基因的表达水平的相关试剂：BST1，如SEQ ID NO: 1所示；MGST1，如SEQ ID NO:2、3、4、5、6、7、8、9或者10所示；HP，如SEQ ID NO:11或者12所示；RCAN3，如SEQ ID NO: 13、14、15、16、17、18、19、20、21或者22所示；SRA1，如SEQ ID NO:23或者24所示。

2、根据权利要求1所述的试剂盒，其特征在于：所述试剂为检测所述基因转录的RNA，特别是mRNA的量的试剂。

3、根据权利要求2所述的试剂盒，其特征在于：所述试剂为检测与所述mRNA互补的cDNA的量的试剂。

4、根据权利要求3所述的试剂盒，其特征在于：所述试剂为检测与所述cDNA互补的cRNA的量的试剂。

5、根据权利要求2~4任意一项所述的试剂盒，其特征在于：所述试剂为探针。

6、根据权利要求1所述的试剂盒，其特征在于：所述试剂为检测所述基因编码的多肽的量的试剂。

7、根据权利要求6所述的试剂盒，其特征在于：所述试剂为抗体、抗体片段或者亲和性蛋白。

8、检测如下5个基因中任意一个或者任意多个基因的表达水平的相关试剂在制备大肠癌预后试剂盒中的用途：BST1，如SEQ ID NO: 1所示；MGST1，如SEQ ID NO:2、3、4、5、6、7、8、9或者10所示；HP，如SEQ ID NO:11或者12所示；RCAN3，如SEQ ID NO: 13、14、15、16、17、18、19、20、21或者22所示；SRA1，如SEQ ID NO:23或者24所示。

9、根据权利要求8所述的用途，其特征在于：所述试剂为检测所述基因转录的RNA，特别是mRNA的量的试剂。

10、根据权利要求9所述的用途，其特征在于：所述试剂为检测与所述mRNA互补的cDNA的量的试剂。

11、根据权利要求10所述的用途，其特征在于：所述试剂为检测与所述cDNA互补的cRNA的量的试剂。

12、根据权利要求9~11任意一项所述用途，其特征在于：所述试剂为探针。

13、根据权利要求8所述的用途，其特征在于：所述试剂为检测所述基因编码的多肽的量的试剂。

14、根据权利要求13所述的用途，其特征在于：所述试剂为抗体或者亲

和性蛋白。

15、一种检测人体样本，特别是人血液样本中基因表达的方法，包括：

(1) 测定受试者血样的基因组中任意一个或者任意多个基因转录的 RNA 的水平，所述基因组包括如下基因：BST1，如 SEQ ID NO: 1 所示；MGST1，如 SEQ ID NO:2、3、4、5、6、7、8、9 或者 10 所示；HP，如 SEQ ID NO:11 或者 12 所示；RCAN3，如 SEQ ID NO: 13、14、15、16、17、18、19、20、21 或者 22 所示；SRA1，如 SEQ ID NO:23 或者 24 所示；

(2) 检测受试者血样中的基因表达。

16、根据权利要求 15 所述的方法，其特征在于：所述步骤 (1) 是测定基因组中 5 个基因转录的 RNA 的水平。

17、根据权利要求 15 所述的方法，其特征在于：所述样本是大肠癌患者的血液样本。

18、根据权利要求 15 所述的方法，其特征在于：所述步骤 (1) 使用至少一个寡核苷酸。

19、根据权利要求 18 所述的方法，其特征在于：其中，一个寡核苷酸仅与一个基因转录的 RNA 杂交，和/或可以与所述基因转录的 RNA 互补的 cDNA 杂交。

20、根据权利要求 19 所述的方法，其特征在于：所述步骤 (1) 包括如下步骤：

- a、扩增所述基因转录的 RNA，得扩增产物；
- b、使用至少一个引物检测步骤 a 所得扩增产物的量。

21、根据权利要求 20 所述的方法，其特征在于：所述步骤 (1) 包括如下步骤：

- i、用至少一个探针与所述基因转录的 RNA 互补的 cDNA 杂交，得杂交产物；
- ii、检测步骤 i 所得杂交产物的量。

22、根据权利要求 15 所述的方法，其特征在于：所述步骤 (1) 包括扩增所述基因转录的 RNA 的方法。

23、根据权利要求 15 所述的方法，其特征在于：所述步骤 (1) 包括检测所述基因转录的 RNA 互补的 cDNA 的量的方法。

24、根据权利要求 15 所述的方法，其特征在于：所述步骤 (1) 至少使用一个探针。

25、根据权利要求 15 所述的方法，其特征在于：所述步骤 (1) 至少使用一个引物。

26、一种寡核苷酸，它仅与一个基因转录的 RNA 杂交，和/或可以与所述基因转录的 RNA 互补的 cDNA 杂交，所述属于一个基因组的基因由如下基因组成：BST1，如 SEQ ID NO: 1 所示；MGST1，如 SEQ ID NO: 2、3、4、5、6、7、8、9 或者 10 所示；HP，如 SEQ ID NO: 11 或者 12 所示；RCAN3，如 SEQ ID NO: 13、14、15、16、17、18、19、20、21 或者 22 所示；SRA1，如 SEQ ID NO: 23 或者 24 所示。

27、根据权利要求 26 所述的寡核苷酸，其特征在于：其选自 SEQ ID NO: 25~34 所示的核苷酸序列。

28、一种检测人体样本，特别是人血液样本中基因表达的试剂盒，其特征在于：包括 5 个基因的 5 种表达产物的特异配偶体，每个配偶体与每个基因特定配合，所述 5 个基因如下所示：BST1，如 SEQ ID NO: 1 所示；MGST1，如 SEQ ID NO: 2、3、4、5、6、7、8、9 或者 10 所示；HP，如 SEQ ID NO: 11 或者 12 所示；RCAN3，如 SEQ ID NO: 13、14、15、16、17、18、19、20、21 或者 22 所示；SRA1，如 SEQ ID NO: 23 或者 24 所示。

29、根据权利要求 28 所述的试剂盒，其特征在于：所述特异配偶体是寡核苷酸，特别是探针和/或引物。

30、根据权利要求 29 所述的试剂盒，其特征在于：所述特异配偶体选自 SEQ ID NO: 25~34 所示的核苷酸序列的集合。

31、根据权利要求 30 所述的试剂盒，其特征在于：所述特异配偶体包含抗体和/或亲和性蛋白。

32、通过血液样本预测大肠癌患者的发展情况的方法，其特征在于：它包括如下步骤：

a) 取血液样本，检测如下 5 个基因中任意一个或者任意多个基因的表达产物的量：BST1，如 SEQ ID NO: 1 所示；MGST1，如 SEQ ID NO: 2、3、4、5、6、7、8、9 或者 10 所示；HP，如 SEQ ID NO: 11 或者 12 所示；RCAN3，如 SEQ ID NO: 13、14、15、16、17、18、19、20、21 或者 22 所示；SRA1，如 SEQ ID NO: 23 或者 24 所示。

b) 将步骤 a) 检测到的基因的表达产物的量输入支持向量机模型，计算预后指数； c) 根据步骤 b) 计算得到的结果，判断大肠癌患者的预后。

33、根据权利要求 32 所述的方法，其特征在于：所述步骤 a) 是检测 5 个基因中每个基因的表达产物的量。

34、根据权利要求 32 所述的方法，其特征在于：所述步骤 a) 中，检测至少一个基因的表达产物的量是将所述基因的表达产物与该表达产物的特异配偶体接触。

35、根据权利要求 32 所述的方法，其特征在于：步骤 a) 中，检测基因

的表达产物的量，所述基因的核酸序列选自 SEQ ID NO:1~24 所示序列集合。

36、根据权利要求 32 所述的方法，其特征在于：步骤 a) 所述表达产物包括至少一个 RNA 转录物或者一个多肽。

37、根据权利要求 32 所述的方法，其特征在于：所述表达产物包括至少一个 mRNA。

38、根据权利要求 36 所述的方法，其特征在于：所述 RNA 转录物通过杂交、扩增或者测序的方法来检测和定量。

39、根据权利要求 36 所述的方法，其特征在于：所述 RNA 转录物在预设条件下与至少一个探针和/或至少一个引物接触，在预设条件下，所述探针和/或引物可以与 RNA 转录物杂交。

40、根据权利要求 39 所述的与所述 RNA 转录物的 cDNA 在预设条件下与至少一个探针和/或至少一个引物接触，在预设条件下，所述探针和/或引物可以与 cDNA 杂交。

41、根据权利要求 36 所述的方法，其特征在于：所述多肽的检测是通过将多肽与至少一个特异配体接触来检测的，特别是与抗体或者亲和性蛋白接触。

42、根据权利要求 41 所述的方法，其特征在于：所述多肽与至少两个特异配体接触，特别是与两个抗体、两个亲和性蛋白或者一个抗体和一个亲和性蛋白接触。

43、一种通过血液样本预测大肠癌患者的发展情况的试剂盒，其特征在于：包括 5 个基因中任意一个或者任意多个基因的表达产物的特异配偶体，每个配偶体与每个基因特定配合，所述 5 个基因如下所示：BST1，如 SEQ ID NO: 1 所示；MGST1，如 SEQ ID NO:2、3、4、5、6、7、8、9 或者 10 所示；HP，如 SEQ ID NO:11 或者 12 所示；RCAN3，如 SEQ ID NO: 13、14、15、16、17、18、19、20、21 或者 22 所示；SRA1，如 SEQ ID NO:23 或者 24 所示。

所述特异配偶体与基因的表达产物特异结合；

所述 5 个基因的核酸序列选自 SEQ ID NO:1~24 所示序列的集合。

44、根据权利要求 43 所述的试剂盒，其特征在于：包括 5 个基因中每个基因的表达产物的特异配偶体。

45、根据权利要求 43 所述的试剂盒，其特征在于：所述特异配偶体包括至少一个杂交探针。

46、根据权利要求 45 所述的试剂盒，其特征在于：所述特异配偶体包括至少一个杂交探针和至少一个引物。

47、根据权利要求 46 所述的试剂盒，其特征在于：所述特异配偶体包括

至少一个杂交探针和两个引物。

48、根据权利要求 43 所述的试剂盒，其特征在于：所述特异配偶体包括至少一个特异配体，特别是抗体或者亲和蛋白。

49、根据权利要求 48 所述的试剂盒，其特征在于：所述特异配偶体包括至少两个特异配体，特别是两个抗体、两个亲和性蛋白或者一个抗体和一个亲和性蛋白。

50、核酸序列如 SEQ ID NO:1~24 所示的 5 个基因中任意一个或者任意多个基因的表达产物的特异配偶体在制备大肠癌预后试剂中的用途。

51、根据权利要求 50 所述的用途，其特征在于：所述特异配偶体是 5 个基因中每个基因的表达产物的特异配偶体。

52、根据权利要求 50 所述的用途，其特征在于：所述特异配偶体包括至少一个杂交探针。

53、根据权利要求 52 所述的用途，其特征在于：所述特异配偶体包括至少一个杂交探针和至少一个引物。

54、根据权利要求 53 所述的用途，其特征在于：所述特异配偶体包括至少一个杂交探针和两个引物。

55、根据权利要求 50 所述的用途，其特征在于：所述特异配偶体包括至少一个特异配体，特别是抗体或者亲和蛋白。

56、根据权利要求 55 所述的用途，其特征在于：所述特异配偶体包括至少两个特异配体，特别是两个抗体、两个亲和性蛋白或者一个抗体或者一个亲和性蛋白。

说明书附图

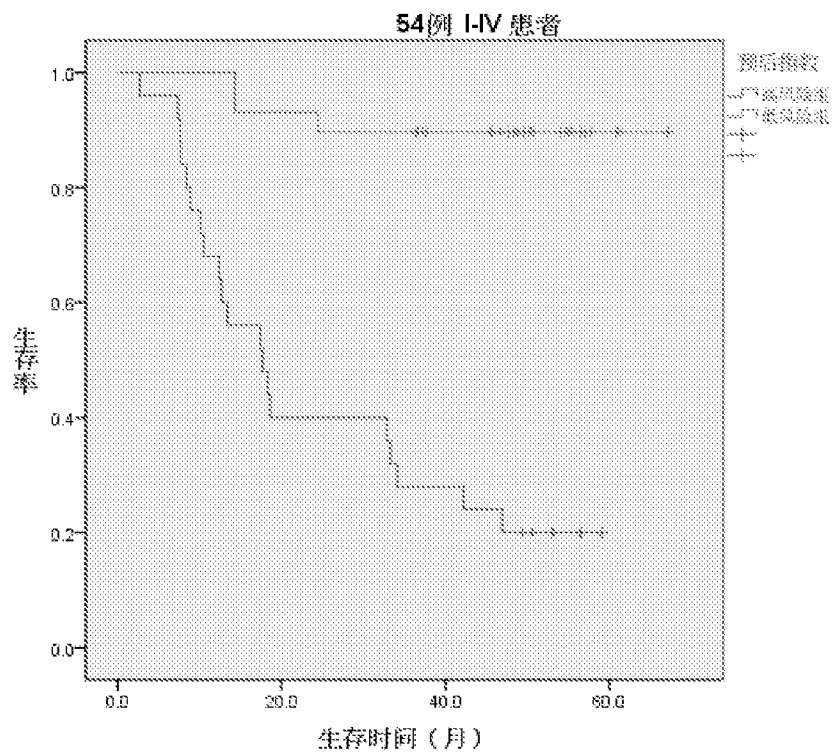


图 1

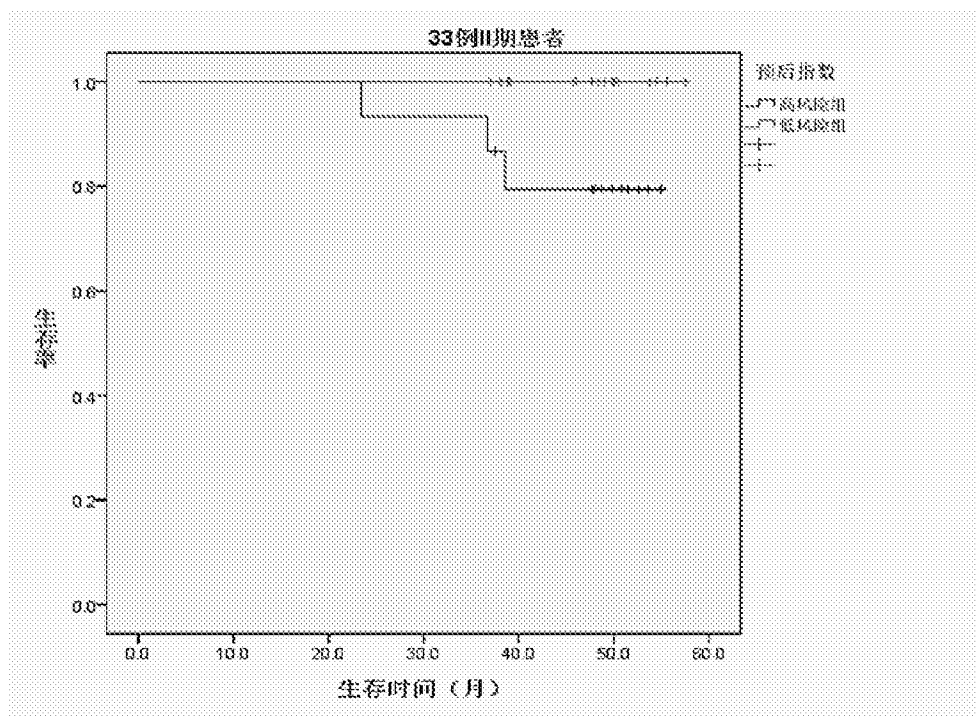


图 2

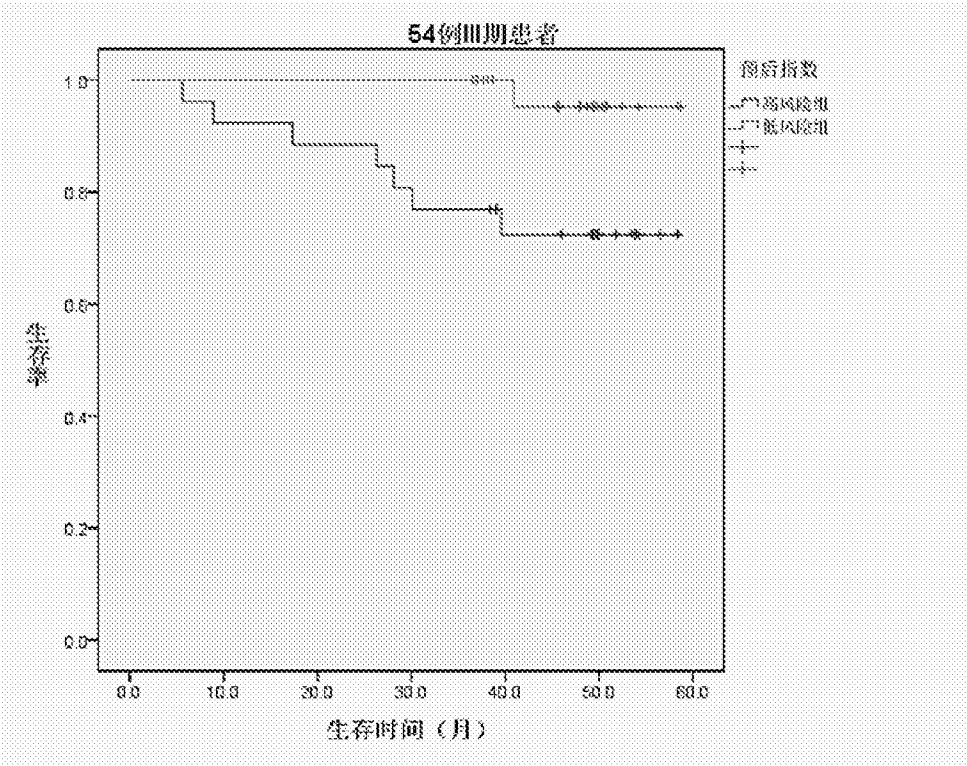


图 3