



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108265115 A

(43)申请公布日 2018.07.10

(21)申请号 201710770882.3

(22)申请日 2017.08.31

(30)优先权数据

10-2016-0179225 2016.12.26 KR

10-2017-0080906 2017.06.27 KR

(71)申请人 MD保健株式会社

地址 韩国首尔

申请人 阿昂梅迪克斯公司

(72)发明人 金润根 全成圭

(74)专利代理机构 上海胜康律师事务所 31263

代理人 李献忠 张华

(51)Int.Cl.

C12Q 1/6886(2018.01)

权利要求书3页 说明书41页  
序列表1页 附图7页

(54)发明名称

用于通过细菌的宏基因组分析诊断肺癌的  
试剂盒和方法

(57)摘要

本发明涉及用于通过细菌的宏基因组分析诊断肺癌的试剂盒和方法。提供了通过细菌的宏基因组分析提供肺癌诊断的信息的试剂盒,更具体地涉及用于经由使用来源于受试者的样品的细菌的宏基因组分析通过分析来源于特异性细菌的细胞外囊泡的含量的增减来预测患肺癌的风险或诊断肺癌的试剂盒。环境中的细菌分泌的EV吸入人体,会直接影响癌症发生,因难以在出现症状之前对肺癌早期诊断,故难以治疗。依本公开可通过使用来源于人体的样品对来源于细菌的EV的宏基因组分析来预测肺癌,导致对患肺癌的高风险组的早期诊断和预测,故可延迟肺癌的发作或可通过适当控制预防肺癌,且即使在肺癌发生后也可实现对肺癌的早期诊断,降低疾病发生率并提高治疗效果。

1. 一种用于提供用于肺癌诊断的信息的试剂盒,所述试剂盒包括:  
具有SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的成对的引物;以及  
操作手册,所述操作手册包括以下步骤:  
从分离自受试者样品的细胞外囊泡中提取DNA;  
使用具有SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的所述成对的引物对提取的所述DNA进行聚合酶链式反应(PCR);以及  
通过对PCR的产物进行测序比较所述受试者样品的来源于细菌的细胞外囊泡的含量与来源于正常个体的样品的来源于细菌的细胞外囊泡的含量的增加或减少。
2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其中所述比较包括比较来源于选自由绿弯菌门(Chloroflexi)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、酸杆菌门(Acidobacteria)和迷踪菌门(Elusimicrobia)组成的群组中的一种或多种细菌的细胞外囊泡的含量的增加或减少。
3. 根据权利要求2所述的试剂盒,其中,在病例中来源于所述绿弯菌门(Chloroflexi)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、或酸杆菌门(Acidobacteria)的所述细胞外囊泡的含量与来源于正常个体的样品的来源于所述绿弯菌门(Chloroflexi)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、或酸杆菌门(Acidobacteria)的所述细胞外囊泡的含量相比增加,或在病例中来源于所述迷踪菌门(Elusimicrobia)的细胞外囊泡的含量与来源于正常个体的样品的来源于所述迷踪菌门(Elusimicrobia)的细胞外囊泡的含量相比减少,则该病例被诊断为肺癌。
4. 根据权利要求1所述的试剂盒,其中所述比较包括比较来源于选自疣微菌纲(Verrucomicrobiae)、热微菌纲(Thermomicrobia)、索利氏菌纲(Solibacteres)、芽单胞菌纲(Gemmatimonadetes)、绿弯菌纲(Chloroflexi)、红色杆菌纲(Rubrobacteria)、迷踪菌纲(Elusimicrobia)以及RF3纲中的一种或多种细菌的细胞外囊泡的含量的增加或减少。
5. 根据权利要求4所述的试剂盒,其中,在病例中来源于所述疣微菌纲(Verrucomicrobiae)、热微菌纲(Thermomicrobia)、索利氏菌纲(Solibacteres)、芽单胞菌纲(Gemmatimonadetes)、绿弯菌纲(Chloroflexi)、或红色杆菌纲(Rubrobacteria)的细胞外囊泡的含量与来源于正常个体的样品的来源于所述疣微菌纲(Verrucomicrobiae)、热微菌纲(Thermomicrobia)、索利氏菌纲(Solibacteres)、芽单胞菌纲(Gemmatimonadetes)、绿弯菌纲(Chloroflexi)、或红色杆菌纲(Rubrobacteria)的细胞外囊泡的含量相比增加,或在病例中来源于所述迷踪菌纲(Elusimicrobia)或所述RF3纲的细胞外囊泡的含量与来源于正常个体的样品的来源于所述迷踪菌纲(Elusimicrobia)或所述RF3纲的细胞外囊泡的含量相比减少,则该病例被诊断为肺癌。
6. 根据权利要求1所述的试剂盒,其中所述比较包括比较来源于选自疣微菌目(Verrucomicrobiales)、栖热菌目(Thermales)、立克次氏体目(Rickettsiales)、索利氏菌目(Solibacterales)、RF32目、JG30-KF-CM45目、脱硫弧菌目(Desulfovibrionales)、芽单胞菌目(Gemmatimonadales)、交替单胞菌目(Alteromonadales)、AKIW781目、红色杆菌目(Rubrobacterales)、硫发菌目(Thiotrichales)、图利茨菌目(Turicibacterales)、不等鞭毛目(Stramenopiles)和ML615J-28目组成的群组中的一种或多种细菌的细胞外囊泡的含量的增加或减少。
7. 根据权利要求6所述的试剂盒,其中,在病例中来源于所述疣微菌目

(Verrucomicrobiales)、栖热菌目 (Thermates)、立克次氏体目 (Rickettsiales)、索利氏菌目 (Solibacterales)、RF32目、JG30-KF-CM45目、脱硫弧菌目 (Desulfovibrionales)、芽单胞菌目 (Gemmatimonadales)、交替单胞菌目 (Alteromonadales)、AKIW781目、或红色杆菌目 (Rubrobacterales)的细胞外囊泡的含量与来源于正常个体的样品的来源于所述疣微菌目 (Verrucomicrobiales)、栖热菌目 (Thermates)、立克次氏体目 (Rickettsiales)、索利氏菌目 (Solibacterales)、RF32目、JG30-KF-CM45目、脱硫弧菌目 (Desulfovibrionales)、芽单胞菌目 (Gemmatimonadales)、交替单胞菌目 (Alteromonadales)、AKIW781目、或红色杆菌目 (Rubrobacterales)的细胞外囊泡的含量相比增加,或在病例中来源于所述硫发菌目 (Thiotrichales)、图利茨菌目 (Turicibacterales)、不等鞭毛目 (Stramenopiles)或 ML615J-28目的所述细胞外囊泡的含量与来源于正常个体的样品的来源于所述硫发菌目 (Thiotrichales)、图利茨菌目 (Turicibacterales)、不等鞭毛目 (Stramenopiles)或 ML615J-28目的所述细胞外囊泡的含量相比减少,则该病例被诊断为肺癌。

8.根据权利要求1所述的试剂盒,其中所述比较包括比较来源于选自由疣微菌科 (Verrucomicrobiaceae,)、栖热菌科 (Thermaceae)、F16科、线粒体科 (mitochondria)、Ellin6075科、红色杆菌科 (Rubrobacteraceae)、脱硫弧菌科 (Desulfovibrionaceae)、希瓦氏菌科 (Shewanellaceae)、气球菌科 (Aerococcaceae)、瘤胃菌科 (Ruminococcaceae)、肠球菌科 (Enterococcaceae)、盐单胞菌科 (Halomonadaceae)、毛螺旋菌科 (Lachnospiraceae)、消化链球菌科 (Peptostreptococcaceae)、迷踪菌科 (Elusimicrobiaceae)、鱼立克次体科 (Piscirickettsiaceae)、图利茨菌科 (Turicibacteraceae)、低嗜盐细菌科 (Dehalobacteriaceae)、梭菌科 (Clostridiaceae)、葡萄球菌科 (Staphylococcaceae)、假单胞菌科 (Pseudomonadaceae)、莫拉菌科 (Moraxellaceae)、韦荣氏球菌科 (Veillonellaceae)、以及丙酸杆菌科 (Propionibacteriaceae)组成的群组中的一种或多种细菌的所述细胞外囊泡的含量的增加或减少。

9.根据权利要求8所述的试剂盒,在病例中来源于所述疣微菌科 (Verrucomicrobiaceae,)、栖热菌科 (Thermaceae)、F16科、线粒体科 (mitochondria)、Ellin6075科、红色杆菌科 (Rubrobacteraceae)、脱硫弧菌科 (Desulfovibrionaceae)、希瓦氏菌科 (Shewanellaceae)、气球菌科 (Aerococcaceae)、瘤胃菌科 (Ruminococcaceae)、肠球菌科 (Enterococcaceae)、盐单胞菌科 (Halomonadaceae)、毛螺旋菌科 (Lachnospiraceae)、或消化链球菌科 (Peptostreptococcaceae)的所述细胞外囊泡的含量与来源于正常个体的样品的来源于所述疣微菌科 (Verrucomicrobiaceae,)、栖热菌科 (Thermaceae)、F16科、线粒体科 (mitochondria)、Ellin6075科、红色杆菌科 (Rubrobacteraceae)、脱硫弧菌科 (Desulfovibrionaceae)、希瓦氏菌科 (Shewanellaceae)、气球菌科 (Aerococcaceae)、瘤胃菌科 (Ruminococcaceae)、肠球菌科 (Enterococcaceae)、盐单胞菌科 (Halomonadaceae)、毛螺旋菌科 (Lachnospiraceae)、或消化链球菌科 (Peptostreptococcaceae)的所述细胞外囊泡的含量相比增加,或在病例中来源于所述迷踪菌科 (Elusimicrobiaceae)、鱼立克次体科 (Piscirickettsiaceae)、图利茨菌科 (Turicibacteraceae)、低嗜盐细菌科 (Dehalobacteriaceae)、梭菌科 (Clostridiaceae)、葡萄球菌科 (Staphylococcaceae)、假单胞菌科 (Pseudomonadaceae)、莫拉菌科 (Moraxellaceae)、韦荣氏球菌科 (Veillonellaceae)、或丙酸杆菌科 (Propionibacteriaceae)的所述细胞外囊泡的含量与

来源于正常个体的样品的来源于所述迷踪菌科 (Elusimicrobiaceae)、鱼立克次体科 (Piscirickettsiaceae)、图利茨菌科 (Turicibacteraceae)、低嗜盐细菌科 (Dehalobacteriaceae)、梭菌科 (Clostridiaceae)、葡萄球菌科 (Staphylococcaceae)、假单胞菌科 (Pseudomonadaceae)、莫拉菌科 (Moraxellaceae)、韦荣氏球菌科 (Veillonellaceae)、或丙酸杆菌科 (Propionibacteriaceae) 的所述细胞外囊泡的含量相比减少, 则该病例被诊断为肺癌。

10. 根据权利要求1所述的试剂盒, 其中所述比较包括比较来源于选自枸橼酸杆菌属 (Citrobacter)、布劳特氏菌属 (Blautia)、肠球菌属 (Enterococcus)、瘤胃菌属 (Ruminococcus)、阿克曼菌属 (Akkermansia)、盐单胞菌属 (Halomonas)、粪球菌属 (Coprococcus)、新鞘氨醇杆菌属 (Novosphingobium)、栖热菌属 (Thermus)、多拉菌属 (Dorea)、栖粪杆菌属 (Faecalibacterium)、脱硫弧菌属 (Desulfovibrio)、气球菌属 (Aerococcus)、希瓦氏菌属 (Shewanella)、下水道球菌属 (Amaricoccus)、嗜胆菌属 (Bilophila)、红细菌属 (Rhodobacter)、厌氧特菌属 (Anaerotruncus)、弯曲短杆菌属 (Varibaculum)、柠檬球菌属 (Citricoccus)、红色杆菌属 (Rubrobacter)、潘多拉菌属 (Pandora) 、加德纳菌属 (Gardnerella)、玫瑰单胞菌属 (Roseomonas)、变形杆菌属 (Proteus)、诺尔氏菌属 (Knoellia)、巨单胞菌属 (Megamonas)、微小杆菌属 (Exiguobacterium)、图利茨菌属 (Turicibacter)、从毛单胞菌属 (Comamonas)、克雷伯氏菌属 (Klebsiella)、颗粒链菌属 (Granulicatella)、葡萄球菌属 (Staphylococcus)、罗氏菌属 (Rothia)、韦荣氏球菌属 (Veillonella)、不动杆菌属 (Acinetobacter)、假单胞菌属 (Pseudomonas)、微球菌属 (Micrococcus) 和丙酸杆菌属 (Propionibacterium) 中的一种或多种细菌的所述细胞外囊泡的含量的增加或减少。

## 用于通过细菌的宏基因组分析诊断肺癌的试剂盒和方法

### 相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求于2016年12月26日提交的韩国专利申请No. 2016-0179225和2017年6月27日提交的韩国专利申请No. 2017-0080906的优先权和权益,其公开内容通过引用整体并入本文。

### 技术领域

[0002] 本公开涉及用于通过细菌的宏基因组分析提供用于肺癌诊断的信息的方法和试剂盒,更具体地,涉及用于经由使用来源于受试者的样品的细菌的宏基因组分析,通过分析来源于特异性细菌的细胞外囊泡的含量的增加或减少来预测肺癌的风险或诊断肺癌的方法和试剂盒。

### 背景技术

[0003] 肺癌是源于肺部的恶性肿瘤,尽管现代医学科学发展,但是在韩国,肺癌能活过5年的比例不到50%,是最大的死因。根据组织学类型,肺癌大致分为小细胞肺癌和非小细胞肺癌,小细胞肺癌在治疗和预后方面具有与其他类型肺癌明显区别的特征,从而肺癌的组织学检查结果在决定治疗策略方面非常重要。

[0004] 肺癌有诸如咳嗽、咯血、胸痛、呼吸困难等症状。然而,当出现这种症状时,有许多肺癌正在进行中,但是即使肺癌正在进行中,不出现症状的案例也经常发生,只有5%至15%的肺癌患者在他们没有症状时就被确诊,而大多数肺癌患者是在经历此类症状后被确诊。迄今为止,在症状出现之前,没有认证的用于早期检测肺癌的筛查方法,早期使用胸部计算机断层扫描(CT)的肺癌检测是最常用的,但其有效性尚未得到证实。因此,迫切需要开发通过早期检测肺癌来提高治疗效率的方法,并且在开发这种方法之前,通过预测肺癌的风险来区分早期诊断和治疗方法是非常重要的,因此需要研究和开发这些方法。

[0005] 同时众所周知,在人体内共生的微生物数量为100万亿,是人类细胞数的10倍,微生物的基因数超过人类基因数的100倍。微生物群(microbiota)或微生物菌群(microbiome)是一个微生物群落,其中包括在给定栖息地中存在的细菌、古细菌和真核生物。已知空气和肠道微生物群在人类的生理现象中起着至关重要的作用,并通过与人类细胞的相互作用对人体健康和疾病产生重大影响。存在于周围环境中的细菌分泌纳米级的囊泡,以便与其他细胞交换关于基因、蛋白质等的信息。呼吸道和胃肠粘膜形成不允许尺寸为200nm或以上的粒子通过的物理阻隔膜,因此共生在粘膜中的细菌不能通过,但来源于细菌的囊泡具有大约为100nm或以下的尺寸,因此相对自由地通过粘膜并被吸收到人体内。

[0006] 慢性炎症导致癌症的事实长期以来一直在增长,最近已经报道结肠直肠癌是由Th17对来源于生活在肠内的细菌的毒素的免疫应答引起的(NatCommun. 2015Apr 24;6: 6956),并且已知胃癌是由已知在胃中共生的幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*)引起的。关于肺癌的发生,近来非吸烟者肺癌发病率的增加表明除吸烟外还有其他导致肺癌的因素。

[0007] 宏基因组学(也称为环境基因组学)是针对从环境中收集的样品获得的宏基因组数据的分析学。最近,已经使用基于16s核糖体RNA(16srRNA)碱基序列的方法列出了人类微生物群的细菌组成,并通过下一代测序(NGS)平台分析细菌的碱基序列来鉴定微生物。然而,关于肺癌的发生,没有关于从人类流体(例如血液、尿液等)通过对存在于来源于细菌的囊泡中的宏基因组的分析来鉴定肺癌的致病因子和预测肺癌的方法的报道。

## 发明内容

[0008] 为了诊断肺癌,本公开的发明人从来源于受试者的血液中分离出囊泡,从其中提取DNA,并对所提取的DNA进行细菌宏基因组学分析,结果鉴定出已在来源于肺癌患者的血液中显示出显著增加或减少的来源于细菌的囊泡,从而完成本公开。

[0009] 在一些方面,本公开的目的在于通过对存在于囊泡中的DNA的细菌的宏基因组学分析提供用于肺癌诊断的信息的方法。

[0010] 然而,本公开的技术目标不限于上述目标,本领域普通技术人员根据下面的描述将清楚地了解其它未提及的技术目标。

[0011] 根据本公开的一个方面,提供了一种提供用于肺癌诊断的信息的方法,所述方法包括:从分离自受试者样品的细胞外囊泡中提取DNA;使用具有SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的成对的引物对提取的所述DNA进行聚合酶链式反应(PCR);以及通过对PCR的产物进行测序比较所述受试者样品的来源于细菌的细胞外囊泡的含量与来源于正常个体的样品的来源于细菌的细胞外囊泡的含量的增加或减少。

[0012] 在一实施方式中,所述比较包括比较来源于选自由绿弯菌门(Chloroflexi)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、酸杆菌门(Acidobacteria)和迷踪菌门(Elusimicrobia)组成的群组中的一种或多种细菌的细胞外囊泡的含量的增加或减少。

[0013] 在另一实施方式中,在病例中来源于所述绿弯菌门(Chloroflexi)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、或酸杆菌门(Acidobacteria)的所述细胞外囊泡的含量与来源于正常个体的样品的来源于所述绿弯菌门(Chloroflexi)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、或酸杆菌门(Acidobacteria)的所述细胞外囊泡的含量相比增加,或在病例中来源于所述迷踪菌门(Elusimicrobia)的细胞外囊泡的含量与来源于正常个体的样品的来源于所述迷踪菌门(Elusimicrobia)的细胞外囊泡的含量相比减少,则该病例被诊断为肺癌。

[0014] 在另一实施方式中,所述比较包括比较来源于选自疣微菌纲(Verrucomicrobiae)、热微菌纲(Thermomicrobia)、索利氏菌纲(Solibacteres)、芽单胞菌纲(Gemmatimonadetes)、绿弯菌纲(Chloroflexi)、红色杆菌纲(Rubrobacteria)、迷踪菌纲(Elusimicrobia)以及RF3纲中的一种或多种细菌的细胞外囊泡的含量的增加或减少。

[0015] 在另一实施方式中,在病例中来源于所述疣微菌纲(Verrucomicrobiae)、热微菌纲(Thermomicrobia)、索利氏菌纲(Solibacteres)、芽单胞菌纲(Gemmatimonadetes)、绿弯菌纲(Chloroflexi)、或红色杆菌纲(Rubrobacteria)的细胞外囊泡的含量与来源于正常个体的样品的来源于所述疣微菌纲(Verrucomicrobiae)、热微菌纲(Thermomicrobia)、索利氏菌纲(Solibacteres)、芽单胞菌纲(Gemmatimonadetes)、绿弯菌纲(Chloroflexi)、或红色杆菌纲(Rubrobacteria)的细胞外囊泡的含量相比增加,或在病例中来源于所述迷踪菌纲(Elusimicrobia)或所述RF3纲的细胞外囊泡的含量与来源于正常个体的样品的来源于

所述迷踪菌纲 (Elusimicrobia) 或所述RF3纲的细胞外囊泡的含量相比减少,则该病例被诊断为肺癌。

[0016] 在另一实施方式中,所述比较包括比较来源于选自由疣微菌目 (Verrucomicrobiales)、栖热菌目 (Thermates)、立克次氏体目 (Rickettsiales)、索利氏菌目 (Solibacterales)、RF32目、JG30-KF-CM45目、脱硫弧菌目 (Desulfovibrionales)、芽单胞菌目 (Gemmatimonadales)、交替单胞菌目 (Alteromonadales)、AKIW781目、红色杆菌目 (Rubrobacterales)、硫发菌目 (Thiotrichales)、图利茨菌目 (Turicibacterales)、不等鞭毛目 (Stramenopiles) 和ML615J-28目组成的群组中的一种或多种细菌的细胞外囊泡的含量的增加或减少。

[0017] 在另一实施方式中,在病例中来源于所述疣微菌目 (Verrucomicrobiales)、栖热菌目 (Thermates)、立克次氏体目 (Rickettsiales)、索利氏菌目 (Solibacterales)、RF32目、JG30-KF-CM45目、脱硫弧菌目 (Desulfovibrionales)、芽单胞菌目 (Gemmatimonadales)、交替单胞菌目 (Alteromonadales)、AKIW781目、或红色杆菌目 (Rubrobacterales) 的细胞外囊泡的含量与来源于正常个体的样品的来源于所述疣微菌目 (Verrucomicrobiales)、栖热菌目 (Thermates)、立克次氏体目 (Rickettsiales)、索利氏菌目 (Solibacterales)、RF32目、JG30-KF-CM45目、脱硫弧菌目 (Desulfovibrionales)、芽单胞菌目 (Gemmatimonadales)、交替单胞菌目 (Alteromonadales)、AKIW781目、或红色杆菌目 (Rubrobacterales) 的细胞外囊泡的含量相比增加,或在病例中来源于所述硫发菌目 (Thiotrichales)、图利茨菌目 (Turicibacterales)、不等鞭毛目 (Stramenopiles) 或ML615J-28目的所述细胞外囊泡的含量与来源于正常个体的样品的来源于所述硫发菌目 (Thiotrichales)、图利茨菌目 (Turicibacterales)、不等鞭毛目 (Stramenopiles) 或ML615J-28目的所述细胞外囊泡的含量相比减少,则该病例被诊断为肺癌。

[0018] 在另一实施方式中,所述比较包括比较来源于选自由疣微菌科 (Verrucomicrobiaceae,)、栖热菌科 (Thermaceae)、F16科、线粒体科 (mitochondria)、Ellin6075科、红色杆菌科 (Rubrobacteraceae)、脱硫弧菌科 (Desulfovibrionaceae)、希瓦氏菌科 (Shewanellaceae)、气球菌科 (Aerococcaceae)、瘤胃菌科 (Ruminococcaceae)、肠球菌科 (Enterococcaceae)、盐单胞菌科 (Halomonadaceae)、毛螺旋菌科 (Lachnospiraceae)、消化链球菌科 (Peptostreptococcaceae)、迷踪菌科 (Elusimicrobiaceae)、鱼立克次体科 (Piscirickettsiaceae)、图利茨菌科 (Turicibacteraceae)、低嗜盐细菌科 (Dehalobacteriaceae)、梭菌科 (Clostridiaceae)、葡萄球菌科 (Staphylococcaceae)、假单胞菌科 (Pseudomonadaceae)、莫拉菌科 (Moraxellaceae)、韦荣氏球菌科 (Veillonellaceae)、以及丙酸杆菌科 (Propionibacteriaceae) 组成的群组中的一种或多种细菌的所述细胞外囊泡的含量的增加或减少。

[0019] 在另一实施方式中,在病例中来源于所述疣微菌科 (Verrucomicrobiaceae,)、栖热菌科 (Thermaceae)、F16科、线粒体科 (mitochondria)、Ellin6075科、红色杆菌科 (Rubrobacteraceae)、脱硫弧菌科 (Desulfovibrionaceae)、希瓦氏菌科 (Shewanellaceae)、气球菌科 (Aerococcaceae)、瘤胃菌科 (Ruminococcaceae)、肠球菌科 (Enterococcaceae)、盐单胞菌科 (Halomonadaceae)、毛螺旋菌科 (Lachnospiraceae)、或消化链球菌科 (Peptostreptococcaceae) 的所述细胞外囊泡的含量与来源于正常个体的样品

的来源于所述疣微菌科 (Verrucomicrobiaceae)、栖热菌科 (Thermaceae)、F16科、线粒体科 (mitochondria)、Ellin6075科、红色杆菌科 (Rubrobacteraceae)、脱硫弧菌科 (Desulfovibrionaceae)、希瓦氏菌科 (Shewanellaceae)、气球菌科 (Aerococcaceae)、瘤胃菌科 (Ruminococcaceae)、肠球菌科 (Enterococcaceae)、盐单胞菌科 (Halomonadaceae)、毛螺旋菌科 (Lachnospiraceae)、或消化链球菌科 (Peptostreptococcaceae) 的所述细胞外囊泡的含量相比增加,或在病例中来源于所述迷踪菌科 (Elusimicrobiaceae)、鱼立克次体科 (Piscirickettsiaceae)、图利茨菌科 (Turicibacteraceae)、低嗜盐细菌科 (Dehalobacteriaceae)、梭菌科 (Clostridiaceae)、葡萄球菌科 (Staphylococcaceae)、假单胞菌科 (Pseudomonadaceae)、莫拉菌科 (Moraxellaceae)、韦荣氏球菌科 (Veillonellaceae)、或丙酸杆菌科 (Propionibacteriaceae) 的所述细胞外囊泡的含量与来源于正常个体的样品的来源于所述迷踪菌科 (Elusimicrobiaceae)、鱼立克次体科 (Piscirickettsiaceae)、图利茨菌科 (Turicibacteraceae)、低嗜盐细菌科 (Dehalobacteriaceae)、梭菌科 (Clostridiaceae)、葡萄球菌科 (Staphylococcaceae)、假单胞菌科 (Pseudomonadaceae)、莫拉菌科 (Moraxellaceae)、韦荣氏球菌科 (Veillonellaceae)、或丙酸杆菌科 (Propionibacteriaceae) 的所述细胞外囊泡的含量相比减少,则该病例被诊断为肺癌。

[0020] 在另一实施方式中,所述比较包括比较来源于选自枸橼酸杆菌属 (Citrobacter)、布劳特氏菌属 (Blautia)、肠球菌属 (Enterococcus)、瘤胃菌属 (Ruminococcus)、阿克曼菌属 (Akkermansia)、盐单胞菌属 (Halomonas)、粪球菌属 (Coprococcus)、新鞘氨醇杆菌属 (Novosphingobium)、栖热菌属 (Thermus)、多拉菌属 (Dorea)、栖粪杆菌属 (Faecalibacterium)、脱硫弧菌属 (Desulfovibrio)、气球菌属 (Aerococcus)、希瓦氏菌属 (Shewanella)、下水道球菌属 (Amaricoccus)、嗜胆菌属 (Bilophila)、红细菌属 (Rhodobacter)、安柔特菌属 (Anaerotruncus)、弯曲短杆菌属 (Varibaculum)、柠檬球菌属 (Citricoccus)、红色杆菌属 (Rubrobacter)、潘多拉菌属 (Pandora)、加德纳菌属 (Gardnerella)、玫瑰单胞菌属 (Roseomonas)、变形杆菌属 (Proteus)、诺尔氏菌属 (Knoellia)、巨单胞菌属 (Megamonas)、微小杆菌属 (Exiguobacterium)、图利茨菌属 (Turicibacter)、从毛单胞菌属 (Comamonas)、克雷伯氏菌属 (Klebsiella)、颗粒链菌属 (Granulicatella)、葡萄球菌属 (Staphylococcus)、罗氏菌属 (Rothia)、韦荣氏球菌属 (Veillonella)、不动杆菌属 (Acinetobacter)、假单胞菌属 (Pseudomonas)、微球菌属 (Micrococcus) 和丙酸杆菌属 (Propionibacterium) 中的一种或多种细菌的所述细胞外囊泡的含量的增加或减少。

[0021] 在另一实施方式中,在病例中来源于所述枸橼酸杆菌属 (Citrobacter)、布劳特氏菌属 (Blautia)、肠球菌属 (Enterococcus)、瘤胃菌属 (Ruminococcus)、阿克曼菌属 (Akkermansia)、盐单胞菌属 (Halomonas)、粪球菌属 (Coprococcus)、新鞘氨醇杆菌属 (Novosphingobium)、栖热菌属 (Thermus)、多拉菌属 (Dorea)、栖粪杆菌属 (Faecalibacterium)、脱硫弧菌属 (Desulfovibrio)、气球菌属 (Aerococcus)、希瓦氏菌属 (Shewanella)、下水道球菌属 (Amaricoccus)、嗜胆菌属 (Bilophila)、红细菌属 (Rhodobacter)、安柔特菌属 (Anaerotruncus)、弯曲短杆菌属 (Varibaculum)、柠檬球菌属 (Citricoccus)、或红色杆菌属 (Rubrobacter) 的所述细胞外囊泡的含量与来源于正常个体

的样品的来源于所述枸橼酸杆菌属 (*Citrobacter*)、布劳特氏菌属 (*Blautia*)、肠球菌属 (*Enterococcus*)、瘤胃菌属 (*Ruminococcus*)、阿克曼菌属 (*Akkermansia*)、盐单胞菌属 (*Halomonas*)、粪球菌属 (*Coprococcus*)、新鞘氨醇杆菌属 (*Novosphingobium*)、栖热菌属 (*Thermus*)、多拉菌属 (*Dorea*)、栖粪杆菌属 (*Faecalibacterium*)、脱硫弧菌属 (*Desulfovibrio*)、气球菌属 (*Aerococcus*)、希瓦氏菌属 (*Shewanella*)、下水道球菌属 (*Amaricoccus*)、嗜胆菌属 (*Bilophila*)、红细菌属 (*Rhodobacter*)、厌氧特菌属 (*Anaerotruncus*)、弯曲短杆菌属 (*Varibaculum*)、柠檬球菌属 (*Citricoccus*)、或红色杆菌属 (*Rubrobacter*) 的所述细胞外囊泡的含量相比增加,或在病例中来源于所述潘多拉菌属 (*Pandora*)、加德纳菌属 (*Gardnerella*)、玫瑰单胞菌属 (*Roseomonas*)、变形杆菌属 (*Proteus*)、诺尔氏菌属 (*Knoellia*)、巨单胞菌属 (*Megamonas*)、微小杆菌属 (*Exiguobacterium*)、图利茨菌属 (*Turicibacter*)、从毛单胞菌属 (*Comamonas*)、克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*)、颗粒链菌属 (*Granulicatella*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、罗氏菌属 (*Rothia*)、韦荣氏球菌属 (*Veillonella*)、不动杆菌属 (*Acinetobacter*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、微球菌属 (*Micrococcus*) 或丙酸杆菌属 (*Propionibacterium*) 的细胞外囊泡的含量与来源于正常个体的样品的来源于所述潘多拉菌属 (*Pandora*)、加德纳菌属 (*Gardnerella*)、玫瑰单胞菌属 (*Roseomonas*)、变形杆菌属 (*Proteus*)、诺尔氏菌属 (*Knoellia*)、巨单胞菌属 (*Megamonas*)、微小杆菌属 (*Exiguobacterium*)、图利茨菌属 (*Turicibacter*)、从毛单胞菌属 (*Comamonas*)、克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*)、颗粒链菌属 (*Granulicatella*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、罗氏菌属 (*Rothia*)、韦荣氏球菌属 (*Veillonella*)、不动杆菌属 (*Acinetobacter*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、微球菌属 (*Micrococcus*) 或丙酸杆菌属 (*Propionibacterium*) 的细胞外囊泡的含量相比减少,则该病例被诊断为肺癌。

[0022] 所述受试者样品可以是血液、呼出的呼吸物、或尿液。

[0023] 所述血液可以是全血、血清、血浆或血液单核细胞。

[0024] 所述肺癌可以是腺癌、小细胞肺癌或鳞状细胞癌。

[0025] 在一些方面,本发明提供了用于本文考虑的任何方法的试剂盒。在实施方式中,该试剂盒用于肺癌诊断。在其它实施方式中,试剂盒用于预防或治疗肺癌。在其它实施方式中,试剂盒用于抑制肺癌。

[0026] 在相关的实施方式中,试剂盒含有具有SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的成对的引物。

[0027] 在相关的实施方式中,该试剂盒包含用于在本文考虑的任何方法中提供用于肺癌诊断的信息的操作手册。

[0028] 具体而言,本发明的一些方面可以阐述如下:

1. 一种用于提供用于肺癌诊断的信息的试剂盒,所述试剂盒包括:

具有SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的成对的引物;以及

操作手册,所述操作手册包括以下步骤:

从分离自受试者样品的细胞外囊泡中提取DNA;

使用具有SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的所述成对的引物对提取的所述DNA进行聚合酶链式反应 (PCR); 以及

通过对PCR的产物进行测序比较所述受试者样品的来源于细菌的细胞外囊泡的含量与

来源于正常个体的样品的来源于细菌的细胞外囊泡的含量的增加或减少。

2. 根据条款1所述的试剂盒,其中所述比较包括比较来源于选自由绿弯菌门(Chloroflexi)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、酸杆菌门(Acidobacteria)和迷踪菌门(Elusimicrobia)组成的群组中的一种或多种细菌的细胞外囊泡的含量的增加或减少。

3. 根据条款2所述的试剂盒,其中,在病例中来源于所述绿弯菌门(Chloroflexi)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、或酸杆菌门(Acidobacteria)的所述细胞外囊泡的含量与来源于正常个体的样品的来源于所述绿弯菌门(Chloroflexi)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、或酸杆菌门(Acidobacteria)的所述细胞外囊泡的含量相比增加,或在病例中来源于所述迷踪菌门(Elusimicrobia)的细胞外囊泡的含量与来源于正常个体的样品的来源于所述迷踪菌门(Elusimicrobia)的细胞外囊泡的含量相比减少,则该病例被诊断为肺癌。

4. 根据条款1所述的试剂盒,其中所述比较包括比较来源于选自由疣微菌纲(Verrucomicrobiae)、热微菌纲(Thermomicrobia)、索利氏菌纲(Solibacteres)、芽单胞菌纲(Gemmatimonadetes)、绿弯菌纲(Chloroflexi)、红色杆菌纲(Rubrobacteria)、迷踪菌纲(Elusimicrobia)以及RF3纲中的一种或多种细菌的细胞外囊泡的含量的增加或减少。

5. 根据条款4所述的试剂盒,其中,在病例中来源于所述疣微菌纲(Verrucomicrobiae)、热微菌纲(Thermomicrobia)、索利氏菌纲(Solibacteres)、芽单胞菌纲(Gemmatimonadetes)、绿弯菌纲(Chloroflexi)、或红色杆菌纲(Rubrobacteria)的细胞外囊泡的含量与来源于正常个体的样品的来源于所述疣微菌纲(Verrucomicrobiae)、热微菌纲(Thermomicrobia)、索利氏菌纲(Solibacteres)、芽单胞菌纲(Gemmatimonadetes)、绿弯菌纲(Chloroflexi)、或红色杆菌纲(Rubrobacteria)的细胞外囊泡的含量相比增加,或在病例中来源于所述迷踪菌纲(Elusimicrobia)或所述RF3纲的细胞外囊泡的含量与来源于正常个体的样品的来源于所述迷踪菌纲(Elusimicrobia)或所述RF3纲的细胞外囊泡的含量相比减少,则该病例被诊断为肺癌。

6. 根据条款1所述的试剂盒,其中所述比较包括比较来源于选自由疣微菌目(Verrucomicrobiales)、栖热菌目(Thermales)、立克次氏体目(Rickettsiales)、索利氏菌目(Solibacterales)、RF32目、JG30-KF-CM45目、脱硫弧菌目(Desulfovibrionales)、芽单胞菌目(Gemmatimonadales)、交替单胞菌目(Alteromonadales)、AKIW781目、红色杆菌目(Rubrobacterales)、硫发菌目(Thiotrichales)、图利茨菌目(Turicibacterales)、不等鞭毛目(Stramenopiles)和ML615J-28目组成的群组中的一种或多种细菌的细胞外囊泡的含量的增加或减少。

7. 根据条款6所述的试剂盒,其中,在病例中来源于所述疣微菌目(Verrucomicrobiales)、栖热菌目(Thermales)、立克次氏体目(Rickettsiales)、索利氏菌目(Solibacterales)、RF32目、JG30-KF-CM45目、脱硫弧菌目(Desulfovibrionales)、芽单胞菌目(Gemmatimonadales)、交替单胞菌目(Alteromonadales)、AKIW781目、或红色杆菌目(Rubrobacterales)的细胞外囊泡的含量与来源于正常个体的样品的来源于所述疣微菌目(Verrucomicrobiales)、栖热菌目(Thermales)、立克次氏体目(Rickettsiales)、索利氏菌目(Solibacterales)、RF32目、JG30-KF-CM45目、脱硫弧菌目(Desulfovibrionales)、芽单胞菌目(Gemmatimonadales)、交替单胞菌目(Alteromonadales)、AKIW781目、或红色杆菌目(Rubrobacterales)的细胞外囊泡的含量相比增加,或在病例中来源于所述硫发菌目

(Thiotrichales)、图利茨菌目 (Turicibacterales)、不等鞭毛目 (Stramenopiles) 或 ML615J-28 目的所述细胞外囊泡的含量与来源于正常个体的样品的来源于所述硫发菌目 (Thiotrichales)、图利茨菌目 (Turicibacterales)、不等鞭毛目 (Stramenopiles) 或 ML615J-28 目的所述细胞外囊泡的含量相比减少,则该病例被诊断为肺癌。

8. 根据条款1所述的试剂盒,其中所述比较包括比较来源于选自由疣微菌科 (Verrucomicrobiaceae,)、栖热菌科 (Thermaceae)、F16科、线粒体科 (mitochondria)、Ellin6075科、红色杆菌科 (Rubrobacteraceae)、脱硫弧菌科 (Desulfovibrionaceae)、希瓦氏菌科 (Shewanellaceae)、气球菌科 (Aerococcaceae)、瘤胃菌科 (Ruminococcaceae)、肠球菌科 (Enterococcaceae)、盐单胞菌科 (Halomonadaceae)、毛螺旋菌科 (Lachnospiraceae)、消化链球菌科 (Peptostreptococcaceae)、迷踪菌科 (Elusimicrobiaceae)、鱼立克次体科 (Piscirickettsiaceae)、图利茨菌科 (Turicibacteraceae)、低嗜盐细菌科 (Dehalobacteriaceae)、梭菌科 (Clostridiaceae)、葡萄球菌科 (Staphylococcaceae)、假单胞菌科 (Pseudomonadaceae)、莫拉菌科 (Moraxellaceae)、韦荣氏球菌科 (Veillonellaceae)、以及丙酸杆菌科 (Propionibacteriaceae) 组成的群组中的一种或多种细菌的所述细胞外囊泡的含量的增加或减少。

9. 根据条款8所述的试剂盒,在病例中来源于所述疣微菌科 (Verrucomicrobiaceae,)、栖热菌科 (Thermaceae)、F16科、线粒体科 (mitochondria)、Ellin6075科、红色杆菌科 (Rubrobacteraceae)、脱硫弧菌科 (Desulfovibrionaceae)、希瓦氏菌科 (Shewanellaceae)、气球菌科 (Aerococcaceae)、瘤胃菌科 (Ruminococcaceae)、肠球菌科 (Enterococcaceae)、盐单胞菌科 (Halomonadaceae)、毛螺旋菌科 (Lachnospiraceae)、或消化链球菌科 (Peptostreptococcaceae) 的所述细胞外囊泡的含量与来源于正常个体的样品的来源于所述疣微菌科 (Verrucomicrobiaceae,)、栖热菌科 (Thermaceae)、F16科、线粒体科 (mitochondria)、Ellin6075科、红色杆菌科 (Rubrobacteraceae)、脱硫弧菌科 (Desulfovibrionaceae)、希瓦氏菌科 (Shewanellaceae)、气球菌科 (Aerococcaceae)、瘤胃菌科 (Ruminococcaceae)、肠球菌科 (Enterococcaceae)、盐单胞菌科 (Halomonadaceae)、毛螺旋菌科 (Lachnospiraceae)、或消化链球菌科 (Peptostreptococcaceae) 的所述细胞外囊泡的含量相比增加,或在病例中来源于所述迷踪菌科 (Elusimicrobiaceae)、鱼立克次体科 (Piscirickettsiaceae)、图利茨菌科 (Turicibacteraceae)、低嗜盐细菌科 (Dehalobacteriaceae)、梭菌科 (Clostridiaceae)、葡萄球菌科 (Staphylococcaceae)、假单胞菌科 (Pseudomonadaceae)、莫拉菌科 (Moraxellaceae)、韦荣氏球菌科 (Veillonellaceae)、或丙酸杆菌科 (Propionibacteriaceae) 的所述细胞外囊泡的含量与来源于正常个体的样品的来源于所述迷踪菌科 (Elusimicrobiaceae)、鱼立克次体科 (Piscirickettsiaceae)、图利茨菌科 (Turicibacteraceae)、低嗜盐细菌科 (Dehalobacteriaceae)、梭菌科 (Clostridiaceae)、葡萄球菌科 (Staphylococcaceae)、假单胞菌科 (Pseudomonadaceae)、莫拉菌科 (Moraxellaceae)、韦荣氏球菌科 (Veillonellaceae)、或丙酸杆菌科 (Propionibacteriaceae) 的所述细胞外囊泡的含量相比减少,则该病例被诊断为肺癌。

10. 根据条款1所述的试剂盒,其中所述比较包括比较来源于选自枸橼酸杆菌属 (Citrobacter)、布劳特氏菌属 (Blautia)、肠球菌属 (Enterococcus)、瘤胃菌属

(*Ruminococcus*)、阿克曼菌属 (*Akkermansia*)、盐单胞菌属 (*Halomonas*)、粪球菌属 (*Coprococcus*)、新鞘氨醇杆菌属 (*Novosphingobium*)、栖热菌属 (*Thermus*)、多拉菌属 (*Dorea*)、栖粪杆菌属 (*Faecalibacterium*)、脱硫弧菌属 (*Desulfovibrio*)、气球菌属 (*Aerococcus*)、希瓦氏菌属 (*Shewanella*)、下水道球菌属 (*Amaricoccus*)、嗜胆菌属 (*Bilophila*)、红细菌属 (*Rhodobacter*)、安柔特菌属 (*Anaerotruncus*)、弯曲短杆菌属 (*Varibaculum*)、柠檬球菌属 (*Citricoccus*)、红色杆菌属 (*Rubrobacter*)、潘多拉菌属 (*Pandoraea*)、加德纳菌属 (*Gardnerella*)、玫瑰单胞菌属 (*Roseomonas*)、变形杆菌属 (*Proteus*)、诺尔氏菌属 (*Knoellia*)、巨单胞菌属 (*Megamonas*)、微小杆菌属 (*Exiguobacterium*)、图利茨菌属 (*Turicibacter*)、从毛单胞菌属 (*Comamonas*)、克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*)、颗粒链菌属 (*Granulicatella*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、罗氏菌属 (*Rothia*)、韦荣氏球菌属 (*Veillonella*)、不动杆菌属 (*Acinetobacter*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、微球菌属 (*Micrococcus*) 和丙酸杆菌属 (*Propionibacterium*) 中的一种或多种细菌的所述细胞外囊泡的含量的增加或减少。

11. 根据条款10所述的试剂盒, 其中, 在病例中来源于所述枸橼酸杆菌属 (*Citrobacter*)、布劳特氏菌属 (*Blautia*)、肠球菌属 (*Enterococcus*)、瘤胃菌属 (*Ruminococcus*)、阿克曼菌属 (*Akkermansia*)、盐单胞菌属 (*Halomonas*)、粪球菌属 (*Coprococcus*)、新鞘氨醇杆菌属 (*Novosphingobium*)、栖热菌属 (*Thermus*)、多拉菌属 (*Dorea*)、栖粪杆菌属 (*Faecalibacterium*)、脱硫弧菌属 (*Desulfovibrio*)、气球菌属 (*Aerococcus*)、希瓦氏菌属 (*Shewanella*)、下水道球菌属 (*Amaricoccus*)、嗜胆菌属 (*Bilophila*)、红细菌属 (*Rhodobacter*)、安柔特菌属 (*Anaerotruncus*)、弯曲短杆菌属 (*Varibaculum*)、柠檬球菌属 (*Citricoccus*)、或红色杆菌属 (*Rubrobacter*) 的所述细胞外囊泡的含量与来源于正常个体的样品的来源于所述枸橼酸杆菌属 (*Citrobacter*)、布劳特氏菌属 (*Blautia*)、肠球菌属 (*Enterococcus*)、瘤胃菌属 (*Ruminococcus*)、阿克曼菌属 (*Akkermansia*)、盐单胞菌属 (*Halomonas*)、粪球菌属 (*Coprococcus*)、新鞘氨醇杆菌属 (*Novosphingobium*)、栖热菌属 (*Thermus*)、多拉菌属 (*Dorea*)、栖粪杆菌属 (*Faecalibacterium*)、脱硫弧菌属 (*Desulfovibrio*)、气球菌属 (*Aerococcus*)、希瓦氏菌属 (*Shewanella*)、下水道球菌属 (*Amaricoccus*)、嗜胆菌属 (*Bilophila*)、红细菌属 (*Rhodobacter*)、安柔特菌属 (*Anaerotruncus*)、弯曲短杆菌属 (*Varibaculum*)、柠檬球菌属 (*Citricoccus*)、或红色杆菌属 (*Rubrobacter*) 的所述细胞外囊泡的含量相比增加, 或在病例中来源于所述潘多拉菌属 (*Pandoraea*)、加德纳菌属 (*Gardnerella*)、玫瑰单胞菌属 (*Roseomonas*)、变形杆菌属 (*Proteus*)、诺尔氏菌属 (*Knoellia*)、巨单胞菌属 (*Megamonas*)、微小杆菌属 (*Exiguobacterium*)、图利茨菌属 (*Turicibacter*)、从毛单胞菌属 (*Comamonas*)、克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*)、颗粒链菌属 (*Granulicatella*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、罗氏菌属 (*Rothia*)、韦荣氏球菌属 (*Veillonella*)、不动杆菌属 (*Acinetobacter*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、微球菌属 (*Micrococcus*) 或丙酸杆菌属 (*Propionibacterium*) 的细胞外囊泡的含量与来源于正常个体的样品的来源于所述潘多拉菌属 (*Pandoraea*)、加德纳菌属 (*Gardnerella*)、玫瑰单胞菌属 (*Roseomonas*)、变形杆菌属 (*Proteus*)、诺尔氏菌属 (*Knoellia*)、巨单胞菌属 (*Megamonas*)、微小杆菌属 (*Exiguobacterium*)、图利茨菌属 (*Turicibacter*)、从毛单胞菌属 (*Comamonas*)、克雷伯氏菌

属 (*Klebsiella*)、颗粒链菌属 (*Granulicatella*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、罗氏菌属 (*Rothia*)、韦荣氏球菌属 (*Veillonella*)、不动杆菌属 (*Acinetobacter*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、微球菌属 (*Micrococcus*) 或丙酸杆菌属 (*Propionibacterium*) 的细胞外囊泡的含量相比减少,则该病例被诊断为肺癌。

12. 根据条款1所述的试剂盒,其中所述受试者样品是血液、呼出的呼吸物、或尿液。

13. 根据条款12所述的试剂盒,其中所述血液是全血、血清、血浆或血液单核细胞。

14. 根据条款1所述的试剂盒,其中所述肺癌是腺癌、小细胞肺癌或鳞状细胞癌。

## 附图说明

[0029] 通过参照附图详细描述本公开的示例性实施方式,本公开的上述和其它目的、特征和优点对于本领域普通技术人员而言将变得更加明显,其中:

[0030] 图1A和1B是用于体内评估来源于细菌的细胞外囊泡的分布模式的视图。图1A示出了在小鼠口服给药后肠细菌和每时间(0小时、5分钟、3小时、6小时和12小时)从细菌产生的细胞外囊泡(EV)的分布模式的图像。图1B示出了在小鼠口服给药之后肠细菌和来源于细菌的EV的分布模式的图像,并且在12小时后,提取小鼠的血液和各种器官(心脏、肺、肝、肾、脾、脂肪组织和肌肉)。

[0031] 图2是使用来源于人的样品的来源于细菌的囊泡的宏基因组分析图。

[0032] 图3显示对存在于肺癌患者和正常个体的血清中的囊泡进行细菌宏基因组分析后的门级分析结果;

[0033] 图4显示了根据肺癌亚型在对肺癌患者的血清中存在的囊泡进行细菌宏基因组分析后的门级宏基因组分析结果;

[0034] 图5显示了在分析肺癌患者和正常个体的血清中存在的囊泡中的细菌的宏基因组后的纲级分析结果;

[0035] 图6示出了根据肺癌亚型在对存在于肺癌患者的血清中的囊泡进行细菌的宏基因组分析之后的纲级宏基因组分析结果;

[0036] 图7显示了在对存在于肺癌患者和正常个体的血清中的囊泡进行细菌的宏基因组分析后的目级分析结果;

[0037] 图8显示了根据肺癌亚型在对肺癌患者血清中存在的囊泡进行细菌的宏基因组分析后的目级宏基因组分析结果;

[0038] 图9显示了在对存在于肺癌患者和正常个体的血清中的囊泡进行细菌的宏基因组分析后的科级分析结果;

[0039] 图10显示了根据肺癌亚型在对肺癌患者血清中存在的囊泡进行细菌宏基因组分析后的科级宏基因组分析结果;

[0040] 图11显示了在对存在于肺癌患者和正常个体的血清中的囊泡进行细菌的宏基因组分析后的属级分析结果;

[0041] 图12显示了根据肺癌亚型在对肺癌患者血清中存在的囊泡进行细菌的宏基因组分析后的属级宏基因组分析结果;以及

[0042] 图13示出了在针对存在于在正常个体和肺癌患者的血液中的来源于细菌的囊泡中的基因组的宏基因组分析而选择重要生物标志物之后开发预测和诊断模型的实例。

## 具体实施方式

[0043] 下面将参考附图详细描述本公开的示例性实施方式。虽然结合本发明的示例性实施方式示出和描述了本公开,但是对于本领域技术人员显而易见的是,在不脱离本发明的精神和范围的情况下,可以进行各种修改。

[0044] 本公开涉及通过细菌宏基因组分析提供关于肺癌诊断的信息的方法。本公开的发明人使用来源于受试者的样品从囊泡中提取基因,对其进行细菌的宏基因组学分析,并基于来源于细菌的细胞外囊泡鉴定肺癌诊断生物标志物。

[0045] 因此,本发明提供了一种提供关于肺癌诊断的信息的方法,所述方法包括:

[0046] (a) 从分离自受试者样品的细胞外囊泡中提取DNA;

[0047] (b) 使用具有SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的成对的引物对提取的所述DNA进行聚合酶链式反应(PCR);以及

[0048] (c) 通过对PCR的产物进行测序比较所述受试者样品的来源于细菌的细胞外囊泡的含量与来源于正常个体的样品的来源于细菌的细胞外囊泡的含量的增加或减少。

[0049] 本文所用的术语“肺癌诊断”是指确定患者是否有患肺癌的风险,患肺癌的风险是否相对较高,或者是否已经患有肺癌。本公开的方法可以用于通过对特定患者的特殊和适当的护理来延迟肺癌发作(所述特定患者是具有高的患肺癌的风险的患者)或预防肺癌发作。此外,该方法可以临床上用于通过早期诊断肺癌经由选择最合适的治疗方法来确定治疗。

[0050] 本公开的肺癌诊断方法的优点在于其可以同时诊断各种亚型的肺癌,例如腺癌、小细胞肺癌、鳞状细胞癌和非小细胞肺癌。

[0051] 本文所用的术语“宏基因组”(“metagenome”)涉及包括在诸如粪便、动物肠等分离的区域中的所有病毒、细菌、真菌等的全部基因组,并且主要用作基因组的概念,其解释了使用测序仪同时鉴定许多微生物以分析非培养的微生物。特别地,宏基因组不是指一种物种的基因组,而是指基因组的混合物,包括环境单位的所有物种的基因组。这个术语源于这样一种观点:当在生物学发展到组学(omics)的过程中定义一个物种时,各种物种以及现有的一个物种在功能上相互作用以形成完整的物种。在技术上,它是使用快速测序以识别一个环境中的所有物种并验证相互作用和代谢来分析所有DNA和RNA的技术的主题,无论物种如何都如此。在本公开中,使用从血清分离的囊泡进行细菌的宏基因组分析。

[0052] 在本公开中,受试者样品可以是血液、呼出的呼吸物或尿液,并且血液可以是全血、血清、血浆或血液单核细胞,但不限于上述实施例。

[0053] 在本公开的一实施方式中,对来源于细菌的细胞外囊泡进行宏基因组分析,实际上通过在门级、纲级、目级、科级和属级的分析,鉴定来源于细菌的细胞外囊泡作为患肺癌的风险因子和肺癌诊断的生物标志物。

[0054] 更具体地说,在本公开的一实施方式中,作为在门级分析来源于细菌的宏基因组的结果,证实了,与来源于正常个体的血清相比,在肺癌患者的血清中来源于所述绿弯菌门(Chloroflexi)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、和酸杆菌门(Acidobacteria)的囊泡增加,而与正常个体的血清相比,在肺癌患者的血清中来源于迷踪菌门(Elusimicrobia)的囊泡减少。(参见实施例4)。

[0055] 在本公开的另一实施方式中,更具体地,作为在纲级分析来源于细菌的宏基因组的结果,证实了,与正常个体的血清相比,在肺癌患者的血清中来源于所述疣微菌纲(Verrucomicrobiae)、热微菌纲(Thermomicrobia)、索利氏菌纲(Solibacteres)、芽单胞菌纲(Gemmatimonadetes)、绿弯菌纲(Chloroflexi)、或红色杆菌纲(Rubrobacteria)的囊泡增加,而与正常个体的血清相比,在肺癌患者的血清中来源于所述迷踪菌纲(Elusimicrobia)或所述RF3纲的囊泡减少。(参见实施例5)。

[0056] 在本公开的另一实施方式中,更具体地,作为在目级分析来源于细菌的宏基因组的结果,证实了,与正常个体的血清相比,在肺癌患者的血清中来源于选自所述疣微菌目(Verrucomicrobiales)、栖热菌目(Thermales)、立克次氏体目(Rickettsiales)、索利氏菌目(Solibacterales)、RF32目、JG30-KF-CM45目、脱硫弧菌目(Desulfovibrionales)、芽单胞菌目(Gemmatimonadales)、交替单胞菌目(Alteromonadales)、AKIW781目、和红色杆菌目(Rubrobacterales)中的细菌的囊泡增加,而与正常个体的血清相比,在肺癌患者的血清中来源于选自所述硫发菌目(Thiotrichales)、图利茨菌目(Turicibacterales)、不等鞭毛目(Stramenopiles)或ML615J-28目中的细菌的囊泡减少。(参见实施例6)。

[0057] 在本公开的另一实施方式中,更具体地说,作为在科级分析来源于细菌的宏基因组的结果,证实了,与正常个体的血清相比,在肺癌患者的血清中来源于选自所述疣微菌科(Verrucomicrobiaceae)、栖热菌科(Thermaceae)、F16科、线粒体科(mitochondria)、Ellin6075科、红色杆菌科(Rubrobacteraceae)、脱硫弧菌科(Desulfovibrionaceae)、希瓦氏菌科(Shewanellaceae)、气球菌科(Aerococcaceae)、瘤胃菌科(Ruminococcaceae)、肠球菌科(Enterococcaceae)、盐单胞菌科(Halomonadaceae)、毛螺旋菌科(Lachnospiraceae)、和消化链球菌科(Peptostreptococcaceae)中的细菌的囊泡增加,而与正常个体的血清相比,在肺癌患者的血清中来源于选自迷踪菌科(Elusimicrobiaceae)、鱼立克次体科(Piscirickettsiaceae)、图利茨菌科(Turicibacteraceae)、低嗜盐细菌科(Dehalobacteriaceae)、梭菌科(Clostridiaceae)、葡萄球菌科(Staphylococcaceae)、假单胞菌科(Pseudomonadaceae)、莫拉菌科(Moraxellaceae)、韦荣氏球菌科(Veillonellaceae)、和丙酸杆菌科(Propionibacteriaceae)中的细菌的囊泡减少。(参见实施例7)。

[0058] 在本公开的另一实施方式中,更具体地说,作为在属级分析来源于细菌的宏基因组的结果,与正常个体的血清相比,在肺癌患者的血清中来源于选自枸橼酸杆菌属(Citrobacter)、布劳特氏菌属(Blautia)、肠球菌属(Enterococcus)、瘤胃菌属(Ruminococcus)、阿克曼菌属(Akkermansia)、盐单胞菌属(Halomonas)、粪球菌属(Coproccoccus)、新鞘氨醇杆菌属(Novosphingobium)、栖热菌属(Thermus)、多拉菌属(Dorea)、栖粪杆菌属(Faecalibacterium)、脱硫弧菌属(Desulfovibrio)、气球菌属(Aerococcus)、希瓦氏菌属(Shewanella)、下水道球菌属(Amaricoccus)、嗜胆菌属(Bilophila)、红细菌属(Rhodobacter)、安柔特菌属(Anaerotruncus)、弯曲短杆菌属(Varibaculum)、柠檬球菌属(Citricoccus)、和红色杆菌属(Rubrobacter)中的细菌的囊泡增加,而与正常个体的血清相比,在肺癌患者的血清中来源于选自潘多拉菌属(Pandoraea)、加德纳菌属(Gardnerella)、玫瑰单胞菌属(Roseomonas)、变形杆菌属(Proteus)、诺尔氏菌属(Knoellia)、巨单胞菌属(Megamonas)、微小杆菌属

(*Exiguobacterium*)、图利茨菌属(*Turicibacter*)、从毛单胞菌属(*Comamonas*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、颗粒链菌属(*Granulicatella*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、罗氏菌属(*Rothia*)、韦荣氏球菌属(*Veillonella*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、微球菌属(*Micrococcus*)和丙酸杆菌属(*Propionibacterium*)中的细菌的囊泡减少。(参见实施例8)。

[0059] 根据上述实施例的结果可以确认,在肺癌患者内的含量与正常个体相比显示出显著的变化,从肺血清中分离出的来源于细菌的细胞外囊泡通过对其进行宏基因组分析并通过经由宏基因组分析来分析在每级的来源于细菌的囊泡的含量的增加或减少而被鉴定,可以预测患肺癌的风险或可以诊断肺癌。

[0060] 为了验证这一点,在本公开的另一个实施方式中,基于上述结果,根据细菌的宏基因组分布(其中与正常个体相比在肺癌患者中显示出显著变化)开发了预测和诊断模型。特别是,当基于与正常对照的相比,9个生物标志物在肺癌患者的血液中显示显著增加以及9个生物标志物在肺癌患者的血液中显示显著减少制造出预测和诊断模型时,该模型显示诊断性能,即肺癌诊断敏感度为85%,肺癌诊断特异度为88%,并且肺癌诊断准确率为86%。

[0061] 根据上述结果确认,所鉴定的来源于细菌的细胞外囊泡的分布变量可以有效地用于预测肺癌的发生和诊断肺癌。

#### 试剂盒

[0062] 本发明提供用于提供肺癌诊断的信息;预防或治疗肺癌;以及抑制肺癌的试剂盒。在实施方式中,试剂盒含有具有本文所述的SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的成对的引物。在实施方式中,该试剂盒提供操作手册。该操作手册可以涉及本文所述的任何方法。在相关的实施方式中,该操作手册涉及以下步骤:从分离自受试者样品的细胞外囊泡中提取DNA;使用具有SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的成对的引物对提取的DNA进行聚合酶链式反应(PCR);并通过对PCR的产物进行测序来比较受试者样品的来源于细菌的细胞外囊泡的含量与来源于正常个体的样品的来源于细菌的细胞外囊泡的含量的增加或减少。根据本发明的这个方面的试剂盒可以包括诸如盒、纸盒、管等的载体装置,其中密封地限制一个或多个容器装置,例如小瓶、管、安瓿、瓶等。在实施方式中,试剂盒以由管理制造、使用或销售药物或生物制品的政府机构规定的形式提供通知,该通知反映了制造、使用或销售试剂盒的机构的批准以及其中供人施用的组分。

[0063] 在下文中,将参照示例性实施方式来描述本发明以帮助理解本公开。然而,这些实施例仅为了说明的目的而提供,且并不意图限制本公开的范围。

#### [实施例]

[0065] 实施例1. 肠细菌和来源于细菌的囊泡的体内吸收、分布和排泄模式的分析

[0066] 为了评估肠细菌和来源于细菌的细胞外囊泡是否通过胃肠道系统地吸收,使用以下方法进行实验。更具体地,将由荧光标记的假单胞菌(*Pseudomonas*)肠细菌和来源于该细菌的细胞外囊泡(EV)各50 $\mu$ g口服给药至小鼠的胃肠道,并在0小时,以及在5分钟、3小时、6小时和12小时后测量荧光。

[0067] 作为观察小鼠整体图像的结果,如图1A所示,细菌在施用时不被系统吸收,而在给药后5分钟,来源于细菌的EV分布在肺中,并且在给药后3小时,在膀胱中观察到强的荧光,从中确认EV通过呼出的呼吸物和尿液排出,并且直到给药后12小时存在于包括肺在内的各

种器官中。

[0068] 除了上述结果之外,为了评价肠细菌和来源于细菌的EV在被系统吸收后侵入人体的各种器官的模式,将用荧光标记的细菌和来源于细菌的EV各50 $\mu$ g使用与上述相同的方法给药,然后在给药后12小时,从每只小鼠中提取血液、心脏、肺、肝、肾、脾、脂肪组织和肌肉。作为在提取的组织中观察荧光的结果,如图1B所示,证实肠细菌未被吸收到各器官中,而来源于细菌的EV分布在血液、心脏、肺、肝、肾、脾、脂肪组织和肌肉中。

[0069] 实施例2.从血液中进行囊泡分离和DNA提取

[0070] 为了从血液中分离囊泡并提取DNA,首先将血清加入到10ml管中,以3,500 $\times$ g和在4 $^{\circ}$ C下离心10分钟,沉淀出悬浮液,且仅收集上清液,然后将其置于新的10ml管中。收集的上清液用0.22 $\mu$ m过滤器过滤以除去细菌和杂质,然后置于中心离心过滤器(50kD)中,并以1500 $\times$ g和在4 $^{\circ}$ C下离心15分钟以丢弃尺寸小于50kD的材料,然后浓缩至10ml。再次使用0.22 $\mu$ m的过滤器除去细菌和杂质,然后将所得浓缩物以150,000 $\times$ g和在4 $^{\circ}$ C下进行超高速离心3小时以除去上清液,并将聚集的沉淀物用磷酸盐缓冲液(PBS)溶解,从而获得囊泡。

[0071] 将根据上述方法从血清中分离的100 $\mu$ l泡囊在100 $^{\circ}$ C下煮沸,使内部DNA从脂质中脱出,然后在冰上冷却。接下来,将所得的囊泡以10,000 $\times$ g和在4 $^{\circ}$ C下离心30分钟以除去剩余的悬浮液,仅收集上清液,然后使用NanoDrop分光光度计定量所提取的DNA的量。此外,为了验证所提取的DNA中是否存在来源于细菌的DNA,使用下表1所示的16S rDNA引物进行PCR。

[0072] <表1>

| 引物       |          | 序列                                                            | SEQ ID NO. |
|----------|----------|---------------------------------------------------------------|------------|
| 16S rDNA | 16S_V3_F | 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3'      | 1          |
|          | 16S_V4_R | 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3' | 2          |

[0073] 实施例3.使用从血液提取的囊泡中的DNA进行细菌的宏基因组分析

[0074] 如下表2所示,使用与实施例2中使用的方法相同的方法,使用318例肺癌患者(90例腺癌,66例小细胞癌,91例鳞状细胞癌,71例其他类型)和234名正常人的血清样品提取DNA,然后使用16S rDNA引物对其进行PCR,以扩增DNA,随后进行测序(Illumina MiSeq测序仪)。将结果作为标准流程图(SFF)文件输出,并将SFF文件使用GS FLX软件(v2.9)转换为序列文件(.fasta)和核苷酸质量得分文件,然后确定用于阅读的信用评级,并且除去具有小于99%(Phred评分<20)的窗口(29bps)平均碱基响应(base call)准确度的部分。在删除低质量部分之后,仅使用长度为300bp或更大的阅读(Sickle版本1.33),并且为了进行操作分类单元(OTU)分析,使用UCLUST和USEARCH根据序列相似性进行聚类。特别地,基于对于属的94%的序列相似性,对于科的90%的序列相似性,对于目的85%的序列相似性,对于纲的80%的序列相似性,以及对于门的75%的序列相似性进行聚类,并且对每个OUT的门级、纲级、目级、科级和属级进行分类,并使用BLASTN和GreenGenes的16S DNA序列数据库(108,

453个序列)分析具有97%或以上序列相似性的细菌(QIIME)。对于统计分析,当各组的平均分布比例不同于1.5倍或以上且p值为0.01或以下时,使用t检验选择在对照组和肺癌患者组中以显著不同比例存在的细菌。

[0075] <表2>

| 组             | 样品类型 | 数量  |
|---------------|------|-----|
| 肺癌            | 血清   | 318 |
| 腺癌            | 血清   | 90  |
| 小细胞癌          | 血清   | 66  |
| 鳞状细胞癌         | 血清   | 91  |
| 其他(混合的,非特异性的) | 血清   | 71  |
| 正常对照          | 血清   | 234 |

[0076] 实施例4. 门级宏基因组分析结果

[0077] 根据实施例3的方法,使用来源于从血清样品提取的囊泡的DNA进行细菌的宏基因组分析,然后在门级分析正常个体和肺癌患者的血液样品中的来源于细菌的EV的分布。结果,如图3和下表3所示,与正常人的血清样品相比,肺癌患者的血清样品中来源于绿弯菌门(Chloroflexi)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、和酸杆菌门(Acidobacteria)中的细菌的囊泡增加,而与正常人的血清样品相比,在肺癌患者的血清样品中来源于迷踪菌门(Elusimicrobia)中的细菌的囊泡减少。

[0078] <表3>

|  | 对照 | 肺癌 | 变化倍 | t-检验 |
|--|----|----|-----|------|
|--|----|----|-----|------|

|                                 |        |        |        |        | 数    |          |
|---------------------------------|--------|--------|--------|--------|------|----------|
| 类别                              | 平均值    | SD     | 平均值    | SD     |      | p 值      |
| 细菌界;疣微菌门                        | 0.0130 | 0.0240 | 0.0278 | 0.0236 | 2.13 | 0.000000 |
| 细菌界;酸杆菌门                        | 0.0011 | 0.0025 | 0.0029 | 0.0084 | 2.74 | 0.000241 |
| 细菌界;厚壁菌门                        | 0.3123 | 0.1105 | 0.3456 | 0.1122 | 1.11 | 0.000594 |
| 细菌界;绿弯菌门                        | 0.0011 | 0.0040 | 0.0022 | 0.0047 | 2.03 | 0.002634 |
| 细菌界;变形杆菌门                       | 0.3915 | 0.1480 | 0.3576 | 0.1200 | 0.91 | 0.004258 |
| 细菌界;迷踪菌门                        | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.00 | 0.004709 |
| 细菌界;放线菌门                        | 0.1244 | 0.0787 | 0.1097 | 0.0490 | 0.88 | 0.012539 |
| 细菌界;柔膜菌门                        | 0.0017 | 0.0052 | 0.0009 | 0.0018 | 0.53 | 0.029148 |
| 细菌界;OD1 门                       | 0.0005 | 0.0032 | 0.0001 | 0.0006 | 0.11 | 0.036885 |
| 细菌界;黏胶球形菌门<br>(p_Lentisphaerae) | 0.0000 | 0.0001 | 0.0000 | 0.0000 | 0.00 | 0.045733 |
| 细菌界;蓝细菌门                        | 0.0146 | 0.0197 | 0.0190 | 0.0320 | 1.30 | 0.046607 |
| 古生菌界;广古菌门<br>(p_Euryarchaeota)  | 0.0011 | 0.0028 | 0.0016 | 0.0044 | 1.56 | 0.057294 |
| 细菌界;互养菌门<br>(p_Synergistetes)   | 0.0001 | 0.0005 | 0.0002 | 0.0010 | 2.04 | 0.071113 |
| 细菌界;纤维杆菌门<br>(p_Fibrobacteres)  | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.00 | 0.116236 |
| 细菌界;栖热菌门(p_Thermi)              | 0.0023 | 0.0056 | 0.0031 | 0.0065 | 1.33 | 0.131054 |
| 细菌界;芽单胞菌门                       | 0.0003 | 0.0016 | 0.0005 | 0.0019 | 1.69 | 0.150598 |
| 细菌界;p_TM6                       | 0.0000 | 0.0003 | 0.0000 | 0.0000 | 0.00 | 0.158749 |
| 细菌界;p_TM7                       | 0.0042 | 0.0077 | 0.0051 | 0.0081 | 1.23 | 0.159846 |
| 细菌界;p_BRC1                      | 0.0000 | 0.0001 | 0.0000 | 0.0000 | 0.15 | 0.217028 |

|                                    |        |        |        |        |      |          |
|------------------------------------|--------|--------|--------|--------|------|----------|
| 细菌界;p__GN04                        | 0.0000 | 0.0004 | 0.0000 | 0.0000 | 0.00 | 0.243057 |
| 细菌界;p__AC1                         | 0.0000 | 0.0003 | 0.0000 | 0.0000 | 0.00 | 0.243057 |
| 古生菌界; 泉古菌门<br>(p__Crenarchaeota)   | 0.0000 | 0.0002 | 0.0000 | 0.0000 | 0.00 | 0.243057 |
| 细菌界;p__BHI80-139                   | 0.0000 | 0.0001 | 0.0000 | 0.0000 | 0.00 | 0.243057 |
| 细菌界;p__SAR406                      | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.00 | 0.243057 |
| 细菌界;p__NKB19                       | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.00 | 0.243057 |
| 细菌界; 暖发菌门(p__[Caldithrix])         | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.00 | 0.243057 |
| 细菌界; 螺旋体门<br>(p__Spirochaetes)     | 0.0004 | 0.0035 | 0.0002 | 0.0010 | 0.40 | 0.251186 |
| 细菌界; 拟杆菌门                          | 0.0821 | 0.0741 | 0.0761 | 0.0373 | 0.93 | 0.261830 |
| 细菌界; 浮霉菌门                          | 0.0005 | 0.0016 | 0.0008 | 0.0041 | 1.58 | 0.274792 |
| 细菌界; 脱铁杆菌门<br>(p__Deferribacteres) | 0.0001 | 0.0006 | 0.0001 | 0.0006 | 0.64 | 0.322735 |
| 细菌界; 衣原体门<br>(p__Chlamydiae)       | 0.0000 | 0.0003 | 0.0000 | 0.0001 | 0.20 | 0.329341 |
| 细菌界; OP8 门                         | 0.0001 | 0.0009 | 0.0000 | 0.0002 | 0.17 | 0.350077 |
| 细菌界; SR1 门                         | 0.0002 | 0.0011 | 0.0001 | 0.0009 | 0.54 | 0.395902 |
| 细菌界; 其他                            | 0.0000 | 0.0001 | 0.0000 | 0.0001 | 0.69 | 0.433863 |
| 细菌界;p__                            | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.62 | 0.495102 |
| 细菌界; WPS-2 门                       | 0.0002 | 0.0010 | 0.0003 | 0.0022 | 1.49 | 0.522410 |
| 细菌界; 产水菌门                          | 0.0002 | 0.0026 | 0.0001 | 0.0006 | 0.43 | 0.532028 |
| 细菌界; AD3 门                         | 0.0000 | 0.0001 | 0.0000 | 0.0001 | 0.53 | 0.604307 |
| 细菌界; 装甲菌门                          | 0.0008 | 0.0030 | 0.0009 | 0.0050 | 1.19 | 0.672276 |
| 细菌界; 梭杆菌门                          | 0.0050 | 0.0114 | 0.0047 | 0.0095 | 0.94 | 0.764480 |

|                      |        |        |        |        |      |          |
|----------------------|--------|--------|--------|--------|------|----------|
| 细菌界;GN02 门           | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0001 | 1.39 | 0.803183 |
| 细菌界;硝化螺旋菌门           | 0.0000 | 0.0003 | 0.0000 | 0.0003 | 1.20 | 0.871567 |
| 细菌界;绿菌门(p__Chlorobi) | 0.0000 | 0.0003 | 0.0000 | 0.0002 | 0.86 | 0.907466 |
| 细菌界;FBP 门            | 0.0000 | 0.0003 | 0.0000 | 0.0003 | 1.07 | 0.947158 |
| 细菌界;WS3 门            | 0.0000 | 0.0002 | 0.0000 | 0.0003 | 1.09 | 0.949281 |

[0079] 根据实施例3的方法,使用来源于从血清样品提取的囊泡的DNA进行细菌宏基因组分析,然后根据肺癌亚型在门级分析来源于细菌的EV在血液中的分布。结果,如图4和下表4所示,证实根据肺癌亚型,来源于细菌的EV在血清中的分布没有差异。

[0080] <表4>

| 类别                       | 腺癌         |           | 小细胞癌       |           | 鳞状细胞癌      |           | 其他         |           |
|--------------------------|------------|-----------|------------|-----------|------------|-----------|------------|-----------|
|                          | 平均值<br>(%) | SD<br>(%) | 平均值<br>(%) | SD<br>(%) | 平均值<br>(%) | SD<br>(%) | 平均值<br>(%) | SD<br>(%) |
| <b>Gr(+)</b>             |            |           |            |           |            |           |            |           |
| 放线菌门<br>(Actinobacteria) | 10.82      | (4.59)    | 10.44      | (4.89)    | 11.03      | (5.31)    | 11.58      | (4.76)    |
| 厚壁菌门<br>(Firmicutes)     | 35.65      | (11.91)   | 35.21      | (11.27)   | 34.57      | (10.84)   | 32.54      | (10.72)   |
| TM7                      | 0.52       | (0.64)    | 0.42       | (0.74)    | 0.52       | (0.67)    | 0.59       | (1.16)    |
| <b>Gr(-)</b>             |            |           |            |           |            |           |            |           |
| 拟杆菌门<br>(Bacteroidetes)  | 7.59       | (3.85)    | 7.93       | (3.45)    | 7.64       | (3.82)    | 7.31       | (3.79)    |
| 蓝细菌门                     | 1.79       | (1.79)    | 1.78       | (2.50)    | 2.35       | (5.02)    | 1.67       | (1.93)    |

|                           |       |         |       |         |       |         |       |         |
|---------------------------|-------|---------|-------|---------|-------|---------|-------|---------|
| (Cyanobacteria)           |       |         |       |         |       |         |       |         |
| 梭杆菌门<br>(Fusobacteria)    | 0.38  | (0.50)  | 0.61  | (1.66)  | 0.54  | (0.86)  | 0.37  | (0.46)  |
| 变形菌门<br>(Proteobacteria)  | 35.36 | (12.70) | 34.83 | (11.05) | 35.47 | (11.91) | 37.52 | (12.12) |
| 疣微菌门<br>(Verrucomicrobia) | 2.56  | (2.02)  | 3.65  | (3.01)  | 2.50  | (2.24)  | 2.60  | (2.04)  |

[0081] 实例5. 纲级宏基因组分析结果

[0082] 根据实施例3的方法, 使用来源于从血清样品提取的囊泡的DNA进行细菌的宏基因组分析, 然后在纲级分析正常个体和肺癌患者的血液样品中的来源于细菌的EV的分布。结果, 如图5和下表5所示, 与正常个体的血清样品相比, 肺癌患者的血清样品中来源于所述疣微菌纲 (Verrucomicrobiae)、热微菌纲 (Thermomicrobia)、索利氏菌纲 (Solibacteres)、芽单胞菌纲 (Gemmatimonadetes)、绿弯菌纲 (Chloroflexi)、和红色杆菌纲 (Rubrobacteria) 中的细菌的囊泡增加。

[0083] <表5>

| 类别                                         | 对照       |          | 肺癌       |          | 变化<br>倍数 | t-检验     |
|--------------------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
|                                            | 平均值      | SD       | 平均值      | SD       |          | p 值      |
| 细菌界; 疣微菌门; 疣微菌纲                            | 0.012776 | 0.023968 | 0.027557 | 0.023539 | 2.16     | 0.000000 |
| 细菌界; 厚壁菌门; 梭菌纲                             | 0.153777 | 0.106506 | 0.198036 | 0.099901 | 1.29     | 0.000001 |
| 细菌界; 酸杆菌门; Solibacteres 纲(c__Solibacteres) | 0.000307 | 0.001556 | 0.001335 | 0.005144 | 4.35     | 0.000857 |
| 细菌界; 变形杆菌门; γ 变形菌纲                         | 0.289147 | 0.146724 | 0.252447 | 0.098185 | 0.87     | 0.001012 |
| 细菌界; 放线菌门; 红色杆菌纲                           | 0.000001 | 0.000015 | 0.000248 | 0.001371 | 168.82   | 0.001457 |
| 细菌界; 绿弯菌门; 热微菌纲                            | 0.000521 | 0.001907 | 0.001235 | 0.003308 | 2.37     | 0.001482 |
| 细菌界; 芽单胞菌门; 芽单胞菌纲                          | 0.000066 | 0.000432 | 0.000366 | 0.001802 | 5.58     | 0.004388 |

|                                        |          |          |          |          |      |          |
|----------------------------------------|----------|----------|----------|----------|------|----------|
| 细菌界;柔膜菌门;RF3 纲                         | 0.000021 | 0.000105 | 0.000001 | 0.000022 | 0.06 | 0.004687 |
| 细菌界;迷踪菌门;迷踪菌纲                          | 0.000005 | 0.000031 | 0.000000 | 0.000000 | 0.00 | 0.004709 |
| 细菌界;绿弯菌门;绿弯菌纲                          | 0.000052 | 0.000396 | 0.000361 | 0.001906 | 6.94 | 0.005182 |
| 细菌界;放线菌门;放线菌纲                          | 0.113420 | 0.080481 | 0.097722 | 0.047206 | 0.86 | 0.008154 |
| 细菌界;变形菌门; $\epsilon$ 变形菌纲              | 0.000785 | 0.002610 | 0.000272 | 0.001918 | 0.35 | 0.011448 |
| 细菌界;OD1 门;SM2F11 纲                     | 0.000435 | 0.003208 | 0.000000 | 0.000000 | 0.00 | 0.015976 |
| 细菌界;变形菌门; $\delta$ 变形菌纲                | 0.001084 | 0.002510 | 0.001667 | 0.003156 | 1.54 | 0.016242 |
| 细菌界;变形菌门; $\beta$ 变形菌纲                 | 0.038425 | 0.029072 | 0.033002 | 0.024936 | 0.86 | 0.022170 |
| 细菌界;蓝细菌门;念珠藻亚纲(c__Nostocophycidae)     | 0.000124 | 0.001220 | 0.000395 | 0.001580 | 3.19 | 0.023256 |
| 细菌界;柔膜菌门;柔膜菌纲                          | 0.001654 | 0.005185 | 0.000894 | 0.001835 | 0.54 | 0.033228 |
| 细菌界;TM7 门;TM7-1 纲                      | 0.000102 | 0.000833 | 0.000325 | 0.001628 | 3.18 | 0.036514 |
| 细菌界;变形菌门; $\alpha$ 变形菌纲                | 0.062054 | 0.044724 | 0.070154 | 0.045183 | 1.13 | 0.037255 |
| 细菌界;黏胶球形菌门;黏胶球形菌纲(c__[Lentisphaeria])  | 0.000015 | 0.000134 | 0.000000 | 0.000000 | 0.00 | 0.045733 |
| 细菌界;酸杆菌门;氯酸菌纲(c__[Chloracidobacteria]) | 0.000423 | 0.001499 | 0.001027 | 0.005205 | 2.43 | 0.050604 |
| 细菌界;酸杆菌门;DA052 纲                       | 0.000004 | 0.000037 | 0.000000 | 0.000000 | 0.00 | 0.061710 |
| 细菌界;疣微菌门;土圈菌纲(c__[Pedosphaerae])       | 0.000071 | 0.000503 | 0.000200 | 0.001104 | 2.82 | 0.066543 |
| 细菌界;互养菌门;互养菌纲                          | 0.000116 | 0.000546 | 0.000236 | 0.001003 | 2.04 | 0.071113 |
| 细菌界;蓝细菌门; $\sigma^+$ 绿体纲               | 0.013206 | 0.019253 | 0.017055 | 0.031562 | 1.29 | 0.077168 |
| 古生菌界;广古菌门;盐杆菌纲                         | 0.000153 | 0.000864 | 0.000446 | 0.002819 | 2.92 | 0.081525 |
| 细菌界;浮霉菌门;浮霉菌纲(c__Phycisphaerae)        | 0.000095 | 0.000679 | 0.000245 | 0.001388 | 2.58 | 0.094933 |
| 细菌界;酸杆菌门;AT-s54 纲                      | 0.000000 | 0.000001 | 0.000000 | 0.000000 | 0.00 | 0.098346 |
| 细菌界;纤维杆菌门;纤维杆菌纲                        | 0.000001 | 0.000012 | 0.000000 | 0.000000 | 0.00 | 0.116236 |
| 细菌界;柄杆菌门;异常球菌纲(c__Deinococci)          | 0.002332 | 0.005574 | 0.003110 | 0.006468 | 1.33 | 0.131054 |
| 细菌界;AD3 门;ABS-6 纲                      | 0.000010 | 0.000124 | 0.000000 | 0.000000 | 0.00 | 0.152050 |
| 细菌界;绿弯菌门;Ellin6529 纲                   | 0.000102 | 0.000726 | 0.000029 | 0.000327 | 0.29 | 0.154161 |
| 细菌界;酸杆菌门;酸杆菌纲-5                        | 0.000004 | 0.000053 | 0.000000 | 0.000000 | 0.00 | 0.154745 |
| 细菌界;TM6 门;SJA-4 纲                      | 0.000023 | 0.000293 | 0.000000 | 0.000000 | 0.00 | 0.158749 |
| 细菌界;厚壁菌门;芽孢杆菌纲                         | 0.150808 | 0.094217 | 0.140665 | 0.072731 | 0.93 | 0.171132 |
| 细菌界;放线菌门;酸微菌纲(c__Acidimicrobia)        | 0.000280 | 0.000952 | 0.000494 | 0.002701 | 1.77 | 0.190610 |

|                                                          |          |          |          |          |        |          |
|----------------------------------------------------------|----------|----------|----------|----------|--------|----------|
| 细菌界;绿弯菌门;S085 纲                                          | 0.000001 | 0.000011 | 0.000085 | 0.001197 | 113.42 | 0.212236 |
| 细菌界;蓝细菌门;ML635J-21 纲                                     | 0.000004 | 0.000056 | 0.000030 | 0.000384 | 8.32   | 0.222462 |
| 细菌界;酸杆菌门;酸杆菌纲-6                                          | 0.000115 | 0.000668 | 0.000385 | 0.003868 | 3.35   | 0.222939 |
| 细菌界;酸杆菌门;RB25 纲                                          | 0.000025 | 0.000375 | 0.000000 | 0.000000 | 0.00   | 0.241067 |
| 细菌界;绿弯菌门;Dehalococcoidetes 纲<br>(c_ Dehalococcoidetes)   | 0.000086 | 0.001311 | 0.000000 | 0.000000 | 0.00   | 0.243057 |
| 细菌界;GN04 门;GN15 纲                                        | 0.000028 | 0.000423 | 0.000000 | 0.000000 | 0.00   | 0.243057 |
| 细菌界;绿菌门;Ignavibacteria 纲(c_ Ignavibacteria)              | 0.000018 | 0.000281 | 0.000000 | 0.000000 | 0.00   | 0.243057 |
| 细菌界;疣微菌门;Methylacidiphilae 纲<br>(c_ [Methylacidiphilae]) | 0.000017 | 0.000259 | 0.000000 | 0.000000 | 0.00   | 0.243057 |
| 细菌界;螺旋体门;钩端螺旋体纲(c_ [Leptospirae])                        | 0.000013 | 0.000197 | 0.000000 | 0.000000 | 0.00   | 0.243057 |
| 古生菌界;泉古菌门;MCG 纲                                          | 0.000012 | 0.000177 | 0.000000 | 0.000000 | 0.00   | 0.243057 |

[0084] 根据实施例3的方法,使用来源于从血清样品提取的囊泡的DNA进行细菌的宏基因组分析,然后根据肺癌亚型在纲级分析来源于细菌的EV在血液中的分布。作为分析的结果,如图6和下表6所示,根据肺癌亚型,在纲级来源于细菌的EV在血清中的分布没有差异。

[0085] <表6>

| 类别                       | 腺癌         |           | 小细胞癌       |           | 鳞状细胞癌      |           | 其他         |           |
|--------------------------|------------|-----------|------------|-----------|------------|-----------|------------|-----------|
|                          | 平均值<br>(%) | SD<br>(%) | 平均值<br>(%) | SD<br>(%) | 平均值<br>(%) | SD<br>(%) | 平均值<br>(%) | SD<br>(%) |
| Gr(+)                    |            |           |            |           |            |           |            |           |
| 放线菌门<br>(Actinobacteria) |            |           |            |           |            |           |            |           |
| 放线菌纲<br>(Actinobacteria) | 9.64       | (4.30)    | 9.10       | (4.82)    | 9.94       | (5.14)    | 10.35      | (4.59)    |

|                                        |       |         |       |         |       |         |       |        |
|----------------------------------------|-------|---------|-------|---------|-------|---------|-------|--------|
| 红螯菌纲<br>(Coriobacteriia)               | 1.10  | (0.91)  | 1.07  | (1.39)  | 0.96  | (1.05)  | 0.95  | (1.01) |
| 厚壁菌门(Firmicutes)                       |       |         |       |         |       |         |       |        |
| 芽孢杆菌纲(Bacilli)                         | 14.49 | (5.92)  | 14.21 | (7.16)  | 13.50 | (7.63)  | 14.12 | (8.48) |
| 梭菌纲(Clostridia)                        | 20.43 | (10.26) | 20.37 | (10.14) | 20.34 | (10.00) | 17.80 | (9.42) |
| 产芽胞菌<br>(Erysipelotrichi)              | 0.70  | (0.73)  | 0.63  | (0.75)  | 0.72  | (0.94)  | 0.61  | (0.67) |
| TM7                                    |       |         |       |         |       |         |       |        |
| TM7-3                                  | 0.50  | (0.63)  | 0.38  | (0.71)  | 0.48  | (0.67)  | 0.56  | (1.15) |
| Gr(-)                                  |       |         |       |         |       |         |       |        |
| 拟杆菌门<br>(Bacteroidetes)                |       |         |       |         |       |         |       |        |
| 拟杆菌纲(Bacteroidia)                      | 6.50  | (3.92)  | 7.00  | (3.57)  | 6.76  | (3.67)  | 6.30  | (4.02) |
| 黄小杆菌纲<br>(Flavobacteriia)              | 0.66  | (1.03)  | 0.54  | (0.91)  | 0.42  | (0.54)  | 0.62  | (1.04) |
| 蓝细菌纲<br>(Cyanobacteria)                |       |         |       |         |       |         |       |        |
| 叶绿体(Chloroplast)                       | 1.52  | (1.74)  | 1.56  | (2.42)  | 2.16  | (4.97)  | 1.48  | (1.91) |
| 梭杆菌门<br>(Fusobacteria)                 |       |         |       |         |       |         |       |        |
| 梭杆菌纲<br>(Fusobacteriia)                | 0.38  | (0.50)  | 0.61  | (1.66)  | 0.54  | (0.86)  | 0.37  | (0.46) |
| 变形菌门<br>(Proteobacteria)               |       |         |       |         |       |         |       |        |
| $\alpha$ 变形菌纲<br>(Alphaproteobacteria) | 7.08  | (4.84)  | 7.06  | (4.71)  | 6.91  | (4.34)  | 7.02  | (4.23) |

|                                        |       |        |       |        |       |        |       |         |
|----------------------------------------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|---------|
| <i>β</i> 变形菌纲<br>(Betaproteobacteria)  | 2.89  | (2.24) | 3.24  | (2.92) | 3.16  | (2.14) | 4.05  | (2.68)  |
| <i>γ</i> 变形菌纲<br>(Gammaproteobacteria) | 25.21 | (9.55) | 24.34 | (8.25) | 25.17 | (9.90) | 26.22 | (11.38) |
| 疣微菌门<br>(Verrucomicrobia)              |       |        |       |        |       |        |       |         |
| 疣微菌纲<br>(Verrucomicrobiae)             | 2.53  | (2.01) | 3.64  | (3.01) | 2.48  | (2.24) | 2.57  | (2.04)  |

[0086] 实施例6. 目级宏基因组分析结果

[0087] 根据实施例3的方法, 使用来源于从血清样品提取的囊泡的DNA进行细菌的宏基因组分析, 然后在目级分析正常个体和肺癌患者的血液样品中的来源于细菌的EV的分布。结果, 如图7和下表7所示, 证实了, 与正常个体的血清样品相比, 肺癌患者的血清样品中来源于疣微菌目 (Verrucomicrobiales)、栖热菌目 (Thermales)、立克次氏体目 (Rickettsiales)、索利氏菌目 (Solibacterales)、RF32目、JG30-KF-CM45目、脱硫弧菌目 (Desulfovibrionales)、芽单胞菌目 (Gemmatimonadales)、交替单胞菌目 (Alteromonadales)、AKIW781目、和红色杆菌目 (Rubrobacterales) 中的细菌的囊泡增加, 而与正常的血清样品相比, 在肺癌患者的血清样品中来源于选自硫发菌目 (Thiotrichales)、图利茨菌目 (Turicibacterales)、不等鞭毛目 (Stramenopiles) 和 ML615J-28目中的细菌的囊泡减少。

[0088] <表7>

| 类别                   | 对照       |          | 肺癌       |          | 变化倍<br>数 | t-检验     |
|----------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
|                      | 平均值      | SD       | 平均值      | SD       |          | p 值      |
| 细菌界:厚壁菌门;梭菌纲;梭菌目     | 0.153120 | 0.106480 | 0.197635 | 0.099694 | 1.29     | 0.000000 |
| 细菌界:变形菌门;γ变形菌纲;假单胞菌目 | 0.175448 | 0.115488 | 0.133369 | 0.079064 | 0.76     | 0.000001 |

|                                                                        |          |          |          |          |      |          |
|------------------------------------------------------------------------|----------|----------|----------|----------|------|----------|
| 细菌界:厚壁菌门;芽孢杆菌纲;乳杆菌目                                                    | 0.087805 | 0.050905 | 0.099759 | 0.055106 | 1.14 | 0.000002 |
| 细菌界:变形菌门;γ变形菌纲;肠杆菌目                                                    | 0.100564 | 0.092235 | 0.098152 | 0.062272 | 0.98 | 0.000047 |
| 细菌界:放线菌门;放线菌纲;放线菌目                                                     | 0.096416 | 0.083155 | 0.081364 | 0.045846 | 0.84 | 0.000071 |
| 细菌界:拟杆菌门;拟杆菌纲;拟杆菌目                                                     | 0.071917 | 0.076126 | 0.066316 | 0.037916 | 0.92 | 0.000078 |
| 细菌界:厚壁菌门;芽孢杆菌纲;芽孢杆菌目                                                   | 0.059586 | 0.085513 | 0.039258 | 0.050777 | 0.66 | 0.000716 |
| 细菌界:放线菌门;放线菌纲;放线菌目                                                     | 0.012776 | 0.023968 | 0.027557 | 0.023539 | 2.16 | 0.000857 |
| 细菌界:变形菌门;α变形菌纲;鞘脂单胞菌目                                                  | 0.022144 | 0.021864 | 0.026068 | 0.025278 | 1.18 | 0.001059 |
| 细菌界:变形菌门;β变形菌纲;伯克氏菌目                                                   | 0.028660 | 0.024457 | 0.025749 | 0.021170 | 0.90 | 0.001095 |
| 细菌界:变形菌门;α变形菌纲;根瘤菌目                                                    | 0.021792 | 0.019274 | 0.023871 | 0.020492 | 1.10 | 0.001334 |
| 细菌界:蓝细菌门;叶绿体纲;微形噬胞目                                                    | 0.011815 | 0.017899 | 0.016663 | 0.031422 | 1.41 | 0.001457 |
| 细菌界:放线菌门;放线菌纲;双歧杆菌目                                                    | 0.016937 | 0.016256 | 0.016352 | 0.014395 | 0.97 | 0.001618 |
| 细菌界:放线菌门;红螺菌纲;红螺菌目                                                     | 0.009983 | 0.012307 | 0.010214 | 0.010797 | 1.02 | 0.002448 |
| 细菌界:变形菌门;α变形菌纲;红细菌目                                                    | 0.008418 | 0.012308 | 0.008037 | 0.012622 | 0.95 | 0.003350 |
| 细菌界:厚壁菌门;产芽孢杆菌纲;芽孢杆菌目                                                  | 0.007717 | 0.015896 | 0.006718 | 0.007841 | 0.87 | 0.003887 |
| 细菌界:变形菌门;γ变形菌纲;巴斯德氏菌目                                                  | 0.005177 | 0.007521 | 0.006463 | 0.011936 | 1.25 | 0.004495 |
| 细菌界:变形菌门;β变形菌纲;舍基氏球菌目                                                  | 0.007572 | 0.014384 | 0.005767 | 0.011811 | 0.76 | 0.004687 |
| 细菌界:拟杆菌门;黄小杆菌纲;黄小杆菌目                                                   | 0.005563 | 0.007870 | 0.005601 | 0.008951 | 1.01 | 0.008959 |
| 细菌界:变形菌门;γ变形菌纲;气单胞菌目                                                   | 0.000893 | 0.003755 | 0.005507 | 0.031899 | 6.16 | 0.009212 |
| 细菌界:变形菌门;α变形菌纲;拟杆菌目                                                    | 0.005193 | 0.008372 | 0.004962 | 0.007180 | 0.96 | 0.009647 |
| 细菌界:梭状杆菌门;梭状杆菌纲;梭状杆菌目                                                  | 0.004967 | 0.011413 | 0.004691 | 0.009508 | 0.94 | 0.011072 |
| 细菌界:变形菌门;α变形菌纲;立克次氏体目                                                  | 0.001214 | 0.002879 | 0.003337 | 0.008867 | 2.75 | 0.011357 |
| 细菌界:变形菌门;γ变形菌纲;海洋螺菌目                                                   | 0.001795 | 0.003932 | 0.003208 | 0.006150 | 1.79 | 0.011448 |
| 细菌界:变形菌门;α变形菌纲;红螺菌目(α_Rhodospirillales)                                | 0.003024 | 0.006528 | 0.003056 | 0.008294 | 1.01 | 0.012638 |
| 细菌界:变形菌门;γ变形菌纲;黄单胞杆菌目                                                  | 0.002464 | 0.005575 | 0.002565 | 0.005875 | 1.04 | 0.012942 |
| 细菌界:变形菌门;γ变形菌纲;交替单胞菌目                                                  | 0.000822 | 0.002013 | 0.002190 | 0.008059 | 2.66 | 0.013691 |
| 细菌界:TM7门;TM7-3纲;TM25目                                                  | 0.000851 | 0.002956 | 0.001856 | 0.005923 | 2.18 | 0.015976 |
| 细菌界:栖热菌门;异常球菌纲;栖热菌目(α_Thermales)                                       | 0.000633 | 0.002235 | 0.001716 | 0.003912 | 2.71 | 0.018277 |
| 细菌界:TM7门;TM7-3纲;CW040目                                                 | 0.000916 | 0.004434 | 0.001633 | 0.004009 | 1.78 | 0.019078 |
| 细菌界:拟杆菌门;纤维丝菌纲;噬纤维菌目                                                   | 0.001748 | 0.004840 | 0.001536 | 0.004925 | 0.88 | 0.022390 |
| 细菌界:拟杆菌门;鞘脂杆菌纲;鞘脂杆菌目                                                   | 0.001834 | 0.004846 | 0.001446 | 0.004147 | 0.79 | 0.023675 |
| 细菌界:栖热菌门;异常球菌纲;异常球菌目                                                   | 0.001698 | 0.005190 | 0.001394 | 0.005323 | 0.82 | 0.024091 |
| 细菌界:酸杆菌门;Solibacteres纲(e_Solibacteres);Solibacteres目(α_Solibacterales) | 0.000107 | 0.001556 | 0.001335 | 0.005144 | 4.35 | 0.029968 |
| 细菌界:厚壁菌门;芽孢杆菌纲;Gemellales目(α_Gemellales)                               | 0.001465 | 0.004357 | 0.001201 | 0.003208 | 0.82 | 0.030316 |
| 古细菌界;广古菌门;甲硫杆菌纲;平硫杆菌目                                                  | 0.000898 | 0.002738 | 0.001196 | 0.003362 | 1.33 | 0.036514 |
| 细菌界:蓝细菌门;藻蓝素纲;色球藻目                                                     | 0.000967 | 0.004165 | 0.001161 | 0.003564 | 1.20 | 0.045427 |
| 细菌界:变形菌门;β变形菌纲;红环菌目                                                    | 0.001957 | 0.006101 | 0.001157 | 0.004491 | 0.59 | 0.045659 |
| 细菌界:绿菌门;热微菌纲;JG30-KF-CN45目                                             | 0.000458 | 0.001805 | 0.001147 | 0.003257 | 2.51 | 0.052003 |
| 细菌界:拟杆菌门;腐殖酸菌纲;腐殖酸菌目                                                   | 0.000879 | 0.002223 | 0.001037 | 0.003389 | 1.13 | 0.053545 |

|                                                                                    |          |          |          |          |        |          |
|------------------------------------------------------------------------------------|----------|----------|----------|----------|--------|----------|
| 细菌界;酸杆菌门;乳酸杆菌纲;RB41 目                                                              | 0.000418 | 0.001499 | 0.001014 | 0.005202 | 2.43   | 0.061710 |
| 细菌界;变形菌门;δ变形菌纲;脱硫弧菌目                                                               | 0.000407 | 0.001607 | 0.000939 | 0.002492 | 2.31   | 0.064137 |
| 细菌界;装甲菌门;Eimbrimonadia 纲(o_[Eimbrimonadia]);Eimbrimonadales 目(o_[Eimbrimonadales]) | 0.000775 | 0.002962 | 0.000920 | 0.005050 | 1.19   | 0.066543 |
| 细菌界;柔膜菌门;柔膜菌纲;RF39 目                                                               | 0.001518 | 0.005172 | 0.000810 | 0.001712 | 0.53   | 0.071113 |
| 细菌界;放线菌门;嗜热放线菌纲;土壤红色杆菌目                                                            | 0.000555 | 0.003478 | 0.000628 | 0.004588 | 1.13   | 0.073638 |
| 细菌界;放线菌门;链霉菌纲;链霉菌目                                                                 | 0.000280 | 0.000952 | 0.000494 | 0.002701 | 1.77   | 0.080447 |
| 细菌界;变形菌门;α变形菌纲;RF32 目                                                              | 0.000052 | 0.000391 | 0.000481 | 0.002057 | 9.24   | 0.081525 |
| 古生菌界;广古菌门;盐杆菌纲;盐杆菌目                                                                | 0.000153 | 0.000864 | 0.000446 | 0.002819 | 2.92   | 0.082873 |
| 细菌界;厚壁菌门;芽孢杆菌纲;固氮杆菌目(o_[Turicibacterales])                                         | 0.001797 | 0.004971 | 0.000425 | 0.001748 | 0.24   | 0.091150 |
| 细菌界;蓝细菌门;念珠藻亚纲;裹核藻目                                                                | 0.000124 | 0.001220 | 0.000394 | 0.001580 | 3.19   | 0.092883 |
| 细菌界;放线菌门;嗜热放线菌纲;Gaiellales 目(o_[Gaiellales])                                       | 0.000106 | 0.000664 | 0.000384 | 0.004452 | 3.61   | 0.094856 |
| 细菌界;厚壁菌门;梭菌纲;厌氧乳菌目                                                                 | 0.000612 | 0.002635 | 0.000381 | 0.002003 | 0.62   | 0.098319 |
| 细菌界;酸杆菌门;酸杆菌纲;6301-15 目                                                            | 0.000113 | 0.000664 | 0.000371 | 0.003867 | 3.27   | 0.098346 |
| 细菌界;变形菌门;δ变形菌纲;链球菌目(o_[Bdellovibrionales])                                         | 0.000110 | 0.000381 | 0.000332 | 0.001518 | 3.02   | 0.099054 |
| 细菌界;芽生胞菌门;芽生胞菌纲;芽生胞菌目(o_[Gemmatimonadales])                                        | 0.000034 | 0.000235 | 0.000332 | 0.001774 | 9.70   | 0.099381 |
| 细菌界;绿弯菌门;绿弯菌纲;AKIW781 目                                                            | 0.000019 | 0.000285 | 0.000328 | 0.001895 | 17.21  | 0.102161 |
| 细菌界;浮霉菌门;浮霉菌纲(o_[Planctomycetia]);浮霉菌目(o_[Planctomycetales])                       | 0.000166 | 0.001143 | 0.000315 | 0.003761 | 1.90   | 0.107322 |
| 细菌界;变形菌门;δ变形菌纲;黏球菌目(o_[Myxococcales])                                              | 0.000213 | 0.000950 | 0.000284 | 0.001173 | 1.33   | 0.111565 |
| 细菌界;变形菌门;α变形菌纲;弯曲菌目(o_[Campylobacteriales])                                        | 0.000785 | 0.002610 | 0.000272 | 0.001918 | 0.35   | 0.116236 |
| 细菌界;变形菌门;γ变形菌纲;弧菌目(o_[Vibrionales])                                                | 0.000297 | 0.001294 | 0.000265 | 0.002065 | 0.89   | 0.117890 |
| 细菌界;放线菌门;红色杆菌纲;红色杆菌目                                                               | 0.000001 | 0.000015 | 0.000248 | 0.001371 | 168.82 | 0.122445 |
| 细菌界;互养菌门;互养菌纲;互养菌目                                                                 | 0.000116 | 0.000546 | 0.000236 | 0.001003 | 2.04   | 0.135814 |
| 细菌界;蓝细菌门;4C0d-2 纲;MLE1-12 目                                                        | 0.000113 | 0.000574 | 0.000235 | 0.001722 | 2.07   | 0.136050 |
| 细菌界;蓝细菌门;叶绿体纲;绿藻目目(o_[Chlorophyta])                                                | 0.000120 | 0.000795 | 0.000217 | 0.001333 | 1.80   | 0.145054 |
| 细菌界;放线菌门;土菌纲;土菌目(o_[Pedosphaerales])                                               | 0.000071 | 0.000503 | 0.000200 | 0.001104 | 2.82   | 0.145446 |
| 细菌界;螺旋体门;螺旋体纲;螺旋体目(o_[Spirochaetales])                                             | 0.000435 | 0.003453 | 0.000181 | 0.000964 | 0.41   | 0.147601 |
| 细菌界;绿弯菌门;沃氏菌纲;Ardenscatenales 目(o_[Ardenscatenales])                               | 0.000007 | 0.000101 | 0.000173 | 0.001760 | 26.24  | 0.152050 |
| 细菌界;浮霉菌门;浮霉菌纲;WD2101 目                                                             | 0.000085 | 0.000663 | 0.000169 | 0.001235 | 1.98   | 0.153456 |
| 细菌界;TM7 门;TM7-3 纲;EW055 目                                                          | 0.000254 | 0.002032 | 0.000154 | 0.000759 | 0.61   | 0.154161 |
| 细菌界;蓝细菌门;叶绿体纲;不等鞭毛目                                                                | 0.001219 | 0.004754 | 0.000148 | 0.001576 | 0.12   | 0.154745 |

[0089] 根据实施例3的方法,使用来源于从血清样品提取的囊泡的DNA进行细菌的宏基因组分析,然后根据肺癌亚型在目级分析来源于细菌的EV在血液中的分布。作为分析的结果,如图8和下表8所示,根据肺癌亚型,在目级来源于细菌的EV在血清中的分布没有差异。

[0090] <表8>

| 类别                                        | 腺癌             |           | 小细胞癌           |           | 鳞状细胞癌          |           | 其他             |           |
|-------------------------------------------|----------------|-----------|----------------|-----------|----------------|-----------|----------------|-----------|
|                                           | 平均<br>值<br>(%) | SD<br>(%) | 平均<br>值<br>(%) | SD<br>(%) | 平均<br>值<br>(%) | SD<br>(%) | 平均<br>值<br>(%) | SD<br>(%) |
| <b>Gr(+)</b>                              |                |           |                |           |                |           |                |           |
| 放线菌纲<br>(Actinobacteria)                  |                |           |                |           |                |           |                |           |
| 放线菌目<br>(Actinomycetales)                 | 8.06           | (4.15)    | 7.35           | (4.52)    | 8.17           | (5.05)    | 8.91           | (4.51)    |
| 双歧杆菌目<br>(Bifidobacteriales)              | 1.58           | (1.24)    | 1.75           | (1.74)    | 1.77           | (1.58)    | 1.43           | (1.14)    |
| 红螺菌目<br>(Coriobacteriales)                | 1.10           | (0.91)    | 1.07           | (1.39)    | 0.96           | (1.05)    | 0.95           | (1.01)    |
| 厚壁菌门(Firmicutes)<br>芽孢杆菌目<br>(Bacillales) | 3.52           | (2.58)    | 4.80           | (7.24)    | 3.41           | (2.34)    | 4.28           | (7.15)    |
| 乳杆菌目<br>(Lactobacillales)                 | 10.78          | (4.84)    | 9.24           | (4.25)    | 9.95           | (6.71)    | 9.68           | (5.62)    |
| 梭菌目(Clostridiales)                        | 20.41          | (10.24)   | 20.35          | (10.13)   | 20.24          | (9.97)    | 17.79          | (9.41)    |
| 丹毒丝菌目<br>(Erysipelotrichales)             | 0.70           | (0.73)    | 0.63           | (0.75)    | 0.72           | (0.94)    | 0.61           | (0.67)    |
| <b>Gr(-)</b>                              |                |           |                |           |                |           |                |           |

|                              |      |        |      |        |      |        |      |        |
|------------------------------|------|--------|------|--------|------|--------|------|--------|
| 拟杆菌纲<br>(Bacteroidetes)      |      |        |      |        |      |        |      |        |
| 拟杆菌目<br>(Bacteroidales)      | 6.50 | (3.92) | 7.00 | (3.57) | 6.76 | (3.67) | 6.30 | (4.02) |
| 黄小杆菌目<br>(Flavobacteriales)  | 0.66 | (1.03) | 0.54 | (0.91) | 0.42 | (0.54) | 0.62 | (1.04) |
| 蓝细菌目<br>(Cyanobacteria)      |      |        |      |        |      |        |      |        |
| 链形植物目<br>(Streptophyta)      | 1.50 | (1.73) | 1.56 | (2.42) | 2.10 | (4.95) | 1.43 | (1.89) |
| 梭杆菌纲<br>(Fusobacteria)       |      |        |      |        |      |        |      |        |
| 梭杆菌目<br>(Fusobacteriales)    | 0.38 | (0.50) | 0.61 | (1.66) | 0.54 | (0.86) | 0.37 | (0.46) |
| 变形菌门<br>(Proteobacteria)     |      |        |      |        |      |        |      |        |
| 柄杆菌目<br>(Caulobacteriales)   | 0.45 | (0.71) | 0.45 | (0.62) | 0.56 | (0.71) | 0.51 | (0.83) |
| 根瘤菌目(Rhizobiales)            | 2.39 | (2.45) | 2.21 | (1.82) | 2.37 | (1.64) | 2.57 | (2.19) |
| 红细菌目<br>(Rhodobacterales)    | 0.98 | (1.51) | 0.86 | (1.52) | 0.59 | (0.79) | 0.80 | (1.13) |
| 鞘脂单胞菌目<br>(Sphingomonadales) | 2.56 | (2.54) | 2.69 | (2.35) | 2.68 | (2.92) | 2.49 | (2.16) |
| 伯克氏菌目<br>(Burkholderiales)   | 2.18 | (1.74) | 2.46 | (2.11) | 2.32 | (1.72) | 3.52 | (2.69) |

|                                      |       |        |       |        |       |        |       |        |
|--------------------------------------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|
| 奈瑟氏球菌目<br>( <i>Neisseriales</i> )    | 0.54  | (1.06) | 0.70  | (1.78) | 0.68  | (1.10) | 0.37  | (0.56) |
| 气单胞菌目<br>( <i>Aeromonadales</i> )    | 0.55  | (2.26) | 0.25  | (0.80) | 0.34  | (1.57) | 1.11  | (5.94) |
| 肠杆菌目<br>( <i>Enterobacteriales</i> ) | 9.84  | (5.25) | 9.39  | (6.75) | 9.82  | (6.44) | 10.18 | (6.68) |
| 巴斯德氏菌目<br>( <i>Pasteurellales</i> )  | 0.61  | (1.23) | 0.83  | (1.71) | 0.59  | (0.93) | 0.59  | (0.81) |
| 假单胞菌目<br>( <i>Pseudomonadales</i> )  | 13.38 | (8.60) | 12.99 | (7.92) | 13.55 | (8.30) | 13.33 | (6.48) |
| 疣微菌门<br>( <i>Verrucomicrobia</i> )   |       |        |       |        |       |        |       |        |
| 疣微菌纲<br>( <i>Verrucomicrobiae</i> )  | 2.53  | (2.01) | 3.64  | (3.01) | 2.48  | (2.24) | 2.57  | (2.04) |

[0091] 实施例7. 科级宏基因组分析结果

[0092] 根据实施例3的方法,使用来源于从血清样品提取的囊泡的DNA进行细菌的宏基因组分析,然后在科级分析正常个体和肺癌患者的血液样品中的来源于细菌的EV的分布。作为分析的结果,如图9和下表9所示,证实了,与正常个体的血清样品相比,肺癌患者的血清样品中来源于疣微菌科(*Verrucomicrobiaceae*)、栖热菌科(*Thermaceae*)、F16科、线粒体科(*mitochondria*)、Ellin6075科、红色杆菌科(*Rubrobacteraceae*)、脱硫弧菌科(*Desulfovibrionaceae*)、希瓦氏菌科(*Shewanellaceae*)、气球菌科(*Aerococcaceae*)、瘤胃菌科(*Ruminococcaceae*)、肠球菌科(*Enterococcaceae*)、盐单胞菌科(*Halomonadaceae*)、毛螺旋菌科(*Lachnospiraceae*)、和消化链球菌科(*Peptostreptococcaceae*)中的细菌的囊泡增加,而与来源于正常个体的血清样品相比,在肺癌患者的血清样品中来源于选自迷踪菌科(*Elusimicrobiaceae*)、鱼立克次体科(*Piscirickettsiaceae*)、图利茨菌科(*Turicibacteraceae*)、低嗜盐细菌科(*Dehalobacteriaceae*)、梭菌科(*Clostridiaceae*)、葡萄球菌科(*Staphylococcaceae*)、假单胞菌科(*Pseudomonadaceae*)、莫拉菌科(*Moraxellaceae*)、韦荣氏球菌科(*Veillonellaceae*)、和丙酸杆菌科(*Propionibacteriaceae*)中的细菌的囊泡减少。

[0093] <表9>

|                           | 对照       |          | 肺癌       |          | 变化<br>倍数 | t-检验     |
|---------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 科                         | 平均值      | SD       | 平均值      | SD       |          | p 值      |
| 肠杆菌科                      | 0.100564 | 0.092235 | 0.098152 | 0.062272 | 0.98     | 0.000000 |
| 瘤胃菌科                      | 0.057972 | 0.051586 | 0.092283 | 0.057932 | 1.59     | 0.000000 |
| 假单胞菌科                     | 0.099551 | 0.078901 | 0.076739 | 0.053295 | 0.77     | 0.000000 |
| 毛螺菌科                      | 0.033105 | 0.024401 | 0.058605 | 0.039729 | 1.77     | 0.000003 |
| 莫拉菌科                      | 0.075835 | 0.063748 | 0.056484 | 0.047973 | 0.74     | 0.000009 |
| 乳杆菌科                      | 0.032005 | 0.027852 | 0.045382 | 0.045377 | 1.42     | 0.000023 |
| 链球菌科                      | 0.034494 | 0.030859 | 0.031632 | 0.024714 | 0.92     | 0.000056 |
| 拟杆菌目;拟杆菌科                 | 0.028958 | 0.029502 | 0.027926 | 0.021234 | 0.96     | 0.000063 |
| 疣微菌目;疣微菌科                 | 0.012776 | 0.023968 | 0.027557 | 0.023539 | 2.16     | 0.000071 |
| 鞘脂单胞菌科(Sphingomonadaceae) | 0.021458 | 0.021399 | 0.024958 | 0.024345 | 1.16     | 0.000085 |
| 葡萄球菌科                     | 0.042895 | 0.077575 | 0.024613 | 0.044632 | 0.57     | 0.000114 |
| 棒状杆菌科                     | 0.029306 | 0.039343 | 0.023757 | 0.024058 | 0.81     | 0.000155 |
| 普雷沃氏菌科                    | 0.024867 | 0.043657 | 0.022701 | 0.017481 | 0.91     | 0.000264 |
| 微球菌科                      | 0.022854 | 0.026341 | 0.018594 | 0.017507 | 0.81     | 0.000492 |
| 双歧杆菌科                     | 0.016937 | 0.016256 | 0.016352 | 0.014395 | 0.97     | 0.000535 |
| 草酸杆菌科                     | 0.016905 | 0.021252 | 0.014831 | 0.015727 | 0.88     | 0.000908 |

|                                  |          |          |          |          |      |          |
|----------------------------------|----------|----------|----------|----------|------|----------|
| 丙酸杆菌科                            | 0.017598 | 0.019973 | 0.012484 | 0.011675 | 0.71 | 0.001059 |
| 根瘤菌科                             | 0.009065 | 0.010905 | 0.011796 | 0.014956 | 1.30 | 0.001130 |
| 红螺菌科                             | 0.009983 | 0.012307 | 0.010214 | 0.010797 | 1.02 | 0.001363 |
| 韦荣氏球菌科                           | 0.013179 | 0.016297 | 0.009512 | 0.009420 | 0.72 | 0.001371 |
| 肠球菌科                             | 0.005709 | 0.007759 | 0.009176 | 0.012355 | 1.61 | 0.001426 |
| 芽孢杆菌科                            | 0.008493 | 0.016692 | 0.008491 | 0.014850 | 1.00 | 0.001457 |
| 红细菌科                             | 0.008307 | 0.012107 | 0.007926 | 0.012540 | 0.95 | 0.001618 |
| 气杆菌科                             | 0.004385 | 0.006543 | 0.006946 | 0.011661 | 1.58 | 0.001869 |
| 紫单胞菌科                            | 0.007802 | 0.010593 | 0.006916 | 0.010514 | 0.89 | 0.002249 |
| 丛毛单胞菌科                           | 0.007077 | 0.008963 | 0.006727 | 0.009307 | 0.95 | 0.002439 |
| 丹毒丝菌科                            | 0.007717 | 0.015896 | 0.006718 | 0.007841 | 0.87 | 0.003224 |
| 甲基杆菌科                            | 0.007832 | 0.011630 | 0.006659 | 0.008416 | 0.85 | 0.003451 |
| 巴斯德氏菌科(asteurellaceae)           | 0.005171 | 0.007522 | 0.006463 | 0.011936 | 1.25 | 0.004495 |
| 奈瑟氏球菌目                           | 0.007572 | 0.014384 | 0.005767 | 0.011811 | 0.76 | 0.004687 |
| 气单胞菌目                            | 0.000850 | 0.003728 | 0.005502 | 0.031900 | 6.47 | 0.004807 |
| 柄杆菌目                             | 0.005191 | 0.008371 | 0.004962 | 0.007180 | 0.96 | 0.007356 |
| 诺卡氏菌科                            | 0.004434 | 0.016491 | 0.004778 | 0.010251 | 1.08 | 0.008743 |
| 梭菌科                              | 0.013739 | 0.045765 | 0.004002 | 0.005970 | 0.29 | 0.008959 |
| 活动球菌科                            | 0.005440 | 0.007930 | 0.003848 | 0.010501 | 0.71 | 0.010411 |
| 明串珠菌科(Leuconostocaceae)          | 0.005844 | 0.025853 | 0.003687 | 0.006802 | 0.63 | 0.011357 |
| Weeksellaceae 科([Weeksellaceae]) | 0.003561 | 0.006681 | 0.003621 | 0.007429 | 1.02 | 0.012902 |
| 消化链球菌科                           | 0.002003 | 0.003016 | 0.003590 | 0.006002 | 1.79 | 0.013476 |
| 间孢囊菌科(Intrasporangiaceae)        | 0.003259 | 0.006423 | 0.003509 | 0.006615 | 1.08 | 0.013561 |
| 梭杆菌科                             | 0.002901 | 0.006447 | 0.003484 | 0.008956 | 1.20 | 0.013619 |
| 放线菌科                             | 0.003899 | 0.006411 | 0.003473 | 0.005977 | 0.89 | 0.013691 |
| 组织菌科([Tissierellaceae])          | 0.003626 | 0.007843 | 0.003252 | 0.006902 | 0.90 | 0.015311 |

|                                       |          |          |          |          |       |          |
|---------------------------------------|----------|----------|----------|----------|-------|----------|
| 盐单胞菌科                                 | 0.001547 | 0.003858 | 0.002659 | 0.004109 | 1.72  | 0.018277 |
| 理研菌科(Rikenellaceae)                   | 0.002620 | 0.006628 | 0.002377 | 0.004772 | 0.91  | 0.019600 |
| 黄单胞杆菌目                                | 0.002292 | 0.005536 | 0.002359 | 0.005811 | 1.03  | 0.020052 |
| S24-7                                 | 0.001287 | 0.003882 | 0.002036 | 0.003995 | 1.58  | 0.022408 |
| 慢生根瘤菌科                                | 0.001482 | 0.003719 | 0.002013 | 0.005393 | 1.36  | 0.023675 |
| 黄杆菌科                                  | 0.002002 | 0.004066 | 0.001970 | 0.004926 | 0.98  | 0.024091 |
| 栖热菌科                                  | 0.000633 | 0.002235 | 0.001716 | 0.003912 | 2.71  | 0.029968 |
| 伯克氏菌科                                 | 0.002592 | 0.007038 | 0.001716 | 0.006416 | 0.66  | 0.030316 |
| 类诺卡氏菌科                                | 0.001369 | 0.003569 | 0.001705 | 0.004581 | 1.25  | 0.032519 |
| 芽孢乳杆菌科                                | 0.000009 | 0.000136 | 0.000010 | 0.000098 | 1.14  | 0.348077 |
| 黄小杆菌目; 螭螭杆状体科<br>(f__ Cryomorphaceae) | 0.000000 | 0.000002 | 0.000010 | 0.000180 | 81.23 | 0.356597 |

[0094] 根据实施例3的方法,使用来源于从血清样品提取的囊泡的DNA进行细菌的宏基因组分析,然后根据肺癌亚型在科级分析来源于细菌的EV在血液中的分布。作为分析的结果,如图10和下表10所示,根据肺癌亚型,在科级来源于细菌的EV在血清中的分布没有差异。

[0095] <表10>

| 类别                              | 腺癌      |        | 小细胞癌    |        | 鳞状细胞癌   |        | 其他      |        |
|---------------------------------|---------|--------|---------|--------|---------|--------|---------|--------|
|                                 | 平均值 (%) | SD (%) | 平均值 (%) | SD (%) | 平均值 (%) | SD (%) | 平均值 (%) | SD (%) |
| <b>Gr(+)</b>                    |         |        |         |        |         |        |         |        |
| <i>放线菌纲</i><br>(Actinobacteria) |         |        |         |        |         |        |         |        |
| <i>棒状杆菌科</i>                    | 2.16    | (1.60) | 1.77    | (2.06) | 2.39    | (2.71) | 3.19    | (2.91) |

|                                 |      |        |      |        |      |        |      |        |
|---------------------------------|------|--------|------|--------|------|--------|------|--------|
| (Corynebacteriaceae)            |      |        |      |        |      |        |      |        |
| 微球菌科<br>(Micrococcaceae)        | 1.81 | (1.55) | 1.77 | (1.90) | 1.99 | (1.91) | 1.84 | (1.66) |
| 诺卡氏菌科<br>(Nocardiaceae)         | 0.75 | (1.68) | 0.38 | (0.70) | 0.35 | (0.47) | 0.38 | (0.53) |
| 丙酸杆菌科<br>(Propionibacteriaceae) | 1.25 | (1.00) | 1.28 | (1.40) | 1.22 | (1.28) | 1.24 | (1.00) |
| 双歧杆菌科<br>(Bifidobacteriaceae)   | 1.58 | (1.24) | 1.75 | (1.74) | 1.77 | (1.58) | 1.43 | (1.14) |
| 红螺菌科<br>(Coriobacteriaceae)     | 1.10 | (0.91) | 1.07 | (1.39) | 0.96 | (1.05) | 0.95 | (1.01) |
| 厚壁菌门(Firmicutes)                |      |        |      |        |      |        |      |        |
| 芽孢杆菌科<br>(Bacillaceae)          | 0.94 | (1.50) | 0.76 | (1.62) | 0.83 | (1.28) | 0.84 | (1.61) |
| 活动球菌科<br>(Planococcaceae)       | 0.36 | (0.93) | 0.40 | (0.90) | 0.27 | (0.43) | 0.55 | (1.69) |
| 葡萄球菌科<br>(Staphylococcaceae)    | 2.04 | (1.94) | 3.40 | (6.80) | 2.09 | (1.72) | 2.60 | (6.12) |
| 气杆菌科<br>(Aerococcaceae)         | 0.77 | (1.34) | 0.71 | (1.21) | 0.68 | (1.13) | 0.61 | (0.92) |
| 肠球菌科<br>(Enterococcaceae)       | 1.21 | (1.72) | 0.80 | (0.93) | 0.76 | (0.83) | 0.85 | (1.15) |
| 乳杆菌科<br>(Lactobacillaceae)      | 4.69 | (3.14) | 4.49 | (3.65) | 4.63 | (6.40) | 4.27 | (3.94) |
| 链球菌科<br>(Streptococcaceae)      | 3.44 | (2.82) | 2.78 | (1.73) | 3.24 | (2.80) | 3.07 | (2.11) |
| 梭菌目(Clostridiales)              | 2.38 | (2.60) | 2.84 | (2.94) | 2.11 | (1.57) | 1.79 | (1.48) |

|                                |      |         |      |         |      |         |      |         |
|--------------------------------|------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|
| (o))                           |      |         |      |         |      |         |      |         |
| 毛螺菌科<br>(Lachnospiraceae)      | 6.62 | (4.62 ) | 5.79 | (3.77 ) | 5.92 | (3.57 ) | 4.89 | (3.61 ) |
| 瘤胃菌科<br>(Ruminococcaceae)      | 9.02 | (5.54 ) | 9.72 | (6.20 ) | 9.75 | (6.25 ) | 8.37 | (5.06 ) |
| 韦荣氏球菌科<br>(Veillonellaceae)    | 0.98 | (0.93 ) | 0.86 | (1.02 ) | 0.90 | (0.81 ) | 1.07 | (1.04 ) |
| 丹毒丝菌科<br>(Erysipelotrichaceae) | 0.70 | (0.73 ) | 0.63 | (0.75 ) | 0.72 | (0.94 ) | 0.61 | (0.67 ) |
| Gr(-)                          |      |         |      |         |      |         |      |         |
| 拟杆菌门(Bacteroidetes)            |      |         |      |         |      |         |      |         |
| 拟杆菌科<br>(Bacteroidaceae)       | 2.53 | (1.98 ) | 3.14 | (2.28 ) | 2.87 | (2.14 ) | 2.71 | (2.12 ) |
| 紫单胞菌科<br>(Porphyromonadaceae)  | 0.76 | (1.38 ) | 0.75 | (1.03 ) | 0.70 | (0.90 ) | 0.54 | (0.73 ) |
| 普雷沃氏菌科<br>(Prevotellaceae)     | 2.27 | (1.63 ) | 2.27 | (1.88 ) | 2.32 | (1.66 ) | 2.20 | (1.90 ) |
| 蓝细菌门<br>(Cyanobacteria)        |      |         |      |         |      |         |      |         |
| 链形植物目<br>(Streptophyta (o))    | 1.50 | (1.73)  | 1.56 | (2.42)  | 2.10 | (4.95)  | 1.43 | (1.89)  |
| 变形菌门<br>(Proteobacteria)       |      |         |      |         |      |         |      |         |
| 柄杆菌科<br>(Caulobacteraceae)     | 0.45 | (0.71 ) | 0.45 | (0.62 ) | 0.56 | (0.71 ) | 0.51 | (0.83 ) |
| 甲基杆菌科<br>(Methylobacteriaceae) | 0.41 | (0.52 ) | 0.79 | (0.99 ) | 0.82 | (0.83 ) | 0.67 | (0.97 ) |

|                               |      |        |      |        |      |        |       |        |
|-------------------------------|------|--------|------|--------|------|--------|-------|--------|
| 根瘤菌科(Rhizobiaceae)            | 1.53 | (2.11) | 0.85 | (0.92) | 1.06 | (1.13) | 1.19  | (1.32) |
| 红杆菌科<br>(Rhodobacteraceae)    | 0.96 | (1.51) | 0.84 | (1.48) | 0.59 | (0.79) | 0.80  | (1.13) |
| 鞘脂单胞菌科<br>(Sphingomonadaceae) | 2.48 | (2.48) | 2.50 | (2.03) | 2.60 | (2.91) | 2.38  | (2.08) |
| 丛毛单胞菌科<br>(Comamonadaceae)    | 0.46 | (0.52) | 0.46 | (0.66) | 0.66 | (0.81) | 1.16  | (1.42) |
| 草酸杆菌科<br>(Oxalobacteraceae)   | 1.36 | (1.36) | 1.60 | (1.88) | 1.33 | (1.19) | 1.73  | (1.90) |
| 奈瑟氏球菌科<br>(Neisseriaceae)     | 0.54 | (1.06) | 0.70 | (1.78) | 0.68 | (1.10) | 0.37  | (0.56) |
| 气单胞菌科<br>(Aeromonadaceae)     | 0.55 | (2.26) | 0.25 | (0.80) | 0.34 | (1.57) | 1.11  | (5.94) |
| 肠杆菌科<br>(Enterobacteriaceae)  | 9.84 | (5.25) | 9.39 | (6.75) | 9.82 | (6.44) | 10.18 | (6.68) |
| 巴斯德氏菌科<br>(Pasteurellaceae)   | 0.61 | (1.23) | 0.83 | (1.71) | 0.59 | (0.93) | 0.59  | (0.81) |
| 莫拉菌科<br>(Moraxellaceae)       | 5.51 | (4.89) | 5.97 | (5.05) | 5.62 | (4.72) | 5.57  | (4.63) |
| 假单胞菌科<br>(Pseudomonadaceae)   | 7.86 | (5.49) | 7.02 | (4.32) | 7.91 | (6.48) | 7.76  | (4.30) |
| 疣微菌门<br>(Verrucomicrobia)     |      |        |      |        |      |        |       |        |
| 疣微菌科<br>(Verrucomicrobiaceae) | 2.53 | (2.01) | 3.64 | (3.01) | 2.48 | (2.24) | 2.57  | (2.04) |

[0096] 实施例8. 属级宏基因组分析结果

[0097] 根据实施例3的方法, 使用来源于从血清样品提取的囊泡的DNA进行细菌的宏基因组分析, 然后在属级分析正常个体和肺癌患者的血液样品中的来源于细菌的EV的分布。结果, 如图11和下表11所示, 证实了, 与正常个体的血清样品相比, 肺癌患者血清样品中来源于枸橼酸杆菌属(Citrobacter)、布劳特氏菌属(Blautia)、肠球菌属(Enterococcus)、瘤胃

菌属 (*Ruminococcus*)、阿克曼菌属 (*Akkermansia*)、盐单胞菌属 (*Halomonas*)、粪球菌属 (*Coprococcus*)、新鞘氨醇杆菌属 (*Novosphingobium*)、栖热菌属 (*Thermus*)、多拉菌属 (*Dorea*)、栖粪杆菌属 (*Faecalibacterium*)、脱硫弧菌属 (*Desulfovibrio*)、气球菌属 (*Aerococcus*)、希瓦氏菌属 (*Shewanella*)、下水道球菌属 (*Amaricoccus*)、嗜胆菌属 (*Bilophila*)、红细菌属 (*Rhodobacter*)、安柔特菌属 (*Anaerotruncus*)、弯曲短杆菌属 (*Varibaculum*)、柠檬球菌属 (*Citricoccus*)、和红色杆菌属 (*Rubrobacter*) 中的细菌的囊泡增加,而与正常个体的血清样品相比,在肺癌患者的血清样品中来源于潘多拉菌属 (*Pandora*)、加德纳菌属 (*Gardnerella*)、玫瑰单胞菌属 (*Roseomonas*)、变形杆菌属 (*Proteus*)、诺尔氏菌属 (*Knoellia*)、巨单胞菌属 (*Megamonas*)、微小杆菌属 (*Exiguobacterium*)、图利茨菌属 (*Turicibacter*)、从毛单胞菌属 (*Comamonas*)、克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*)、颗粒链菌属 (*Granulicatella*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、罗氏菌属 (*Rothia*)、韦荣氏球菌属 (*Veillonella*)、不动杆菌属 (*Acinetobacter*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、微球菌属 (*Micrococcus*) 和丙酸杆菌属 (*Propionibacterium*) 中的细菌的囊泡减少。

[0098] <表11>

| 类别    | 对照       |          | 肺癌       |          | 变化倍数 | t-检验     |
|-------|----------|----------|----------|----------|------|----------|
|       | 平均值      | SD       | 平均值      | SD       |      | p 值      |
| 假单胞菌属 | 0.094838 | 0.076772 | 0.071722 | 0.049427 | 0.76 | 0.000000 |
| 栖粪杆菌属 | 0.016697 | 0.022777 | 0.047749 | 0.039163 | 2.86 | 0.000000 |

|                          |          |          |          |          |      |          |
|--------------------------|----------|----------|----------|----------|------|----------|
| (Faecalibacterium)       |          |          |          |          |      |          |
| 乳杆菌属<br>(Lactobacillus)  | 0.031574 | 0.027817 | 0.044409 | 0.045386 | 1.41 | 0.000000 |
| 不动杆菌属<br>(Acinetobacter) | 0.050124 | 0.060394 | 0.030816 | 0.027726 | 0.61 | 0.000000 |
| 链球菌属                     | 0.031645 | 0.030532 | 0.028886 | 0.024112 | 0.91 | 0.000000 |
| 拟杆菌属                     | 0.028694 | 0.029481 | 0.027922 | 0.021226 | 0.97 | 0.000003 |
| 阿克曼氏菌                    | 0.012668 | 0.023991 | 0.027402 | 0.023573 | 2.16 | 0.000004 |
| 棒状杆菌属                    | 0.029306 | 0.039343 | 0.023757 | 0.024058 | 0.81 | 0.000006 |
| 葡萄球菌属                    | 0.041938 | 0.077666 | 0.023704 | 0.044408 | 0.57 | 0.000008 |
| 水栖菌属                     | 0.024223 | 0.026444 | 0.023542 | 0.029191 | 0.97 | 0.000008 |
| 普雷沃氏菌属<br>(Prevotella)   | 0.024866 | 0.043656 | 0.022697 | 0.017480 | 0.91 | 0.000009 |
| 鞘氨醇单胞菌属                  | 0.014386 | 0.014832 | 0.017722 | 0.020797 | 1.23 | 0.000071 |
| 粪球菌属                     | 0.006491 | 0.009001 | 0.014606 | 0.015113 | 2.25 | 0.000085 |
| 双歧杆菌属                    | 0.014701 | 0.015674 | 0.012740 | 0.012966 | 0.87 | 0.000175 |
| 丙酸杆菌属                    | 0.017570 | 0.019930 | 0.012460 | 0.011679 | 0.71 | 0.000182 |
| 布劳特氏菌属                   | 0.005743 | 0.006391 | 0.008665 | 0.013014 | 1.51 | 0.000242 |
| 肠球菌属                     | 0.004685 | 0.007077 | 0.008421 | 0.012029 | 1.80 | 0.000259 |
| 枸橼酸杆菌属                   | 0.005245 | 0.008189 | 0.007883 | 0.009907 | 1.50 | 0.000329 |
| 贪铜菌属                     | 0.008156 | 0.017430 | 0.006655 | 0.009820 | 0.82 | 0.000343 |
| 微球菌属                     | 0.009384 | 0.014915 | 0.006389 | 0.009831 | 0.68 | 0.000380 |
| 副球菌属                     | 0.006114 | 0.011052 | 0.006167 | 0.010246 | 1.01 | 0.000382 |
| 瘤胃菌属                     | 0.005754 | 0.009936 | 0.006156 | 0.010201 | 1.07 | 0.000492 |

|                            |          |          |          |          |      |          |
|----------------------------|----------|----------|----------|----------|------|----------|
| 嗜血杆菌属<br>(Haemophilus)     | 0.004320 | 0.006421 | 0.005599 | 0.011020 | 1.30 | 0.000560 |
| 副杆状菌属<br>(Parabacteroides) | 0.004701 | 0.007049 | 0.005516 | 0.009888 | 1.17 | 0.000617 |
| 柯林斯菌属                      | 0.005573 | 0.010829 | 0.004906 | 0.007244 | 0.88 | 0.000686 |
| 红球菌属                       | 0.004432 | 0.016491 | 0.004680 | 0.010168 | 1.06 | 0.001008 |
| 罗氏菌属                       | 0.007126 | 0.012614 | 0.004355 | 0.007551 | 0.61 | 0.001059 |
| 奈瑟氏球菌属                     | 0.005592 | 0.011088 | 0.004079 | 0.010104 | 0.73 | 0.001472 |
| 甲基杆菌属                      | 0.003706 | 0.009784 | 0.004054 | 0.006970 | 1.09 | 0.001618 |
| 多拉菌属                       | 0.001492 | 0.002243 | 0.004030 | 0.006765 | 2.70 | 0.001628 |
| 第 V 属<br>(Catenibacterium) | 0.004893 | 0.013860 | 0.004028 | 0.006552 | 0.82 | 0.001869 |
| 芽孢杆菌属<br>(Bacillus)        | 0.005284 | 0.013182 | 0.003942 | 0.010731 | 0.75 | 0.003044 |
| 韦荣氏球菌属                     | 0.005324 | 0.008390 | 0.003536 | 0.005451 | 0.66 | 0.004033 |
| 梭杆菌属                       | 0.002862 | 0.006439 | 0.003483 | 0.008956 | 1.22 | 0.004495 |
| 小杆菌属                       | 0.003476 | 0.007299 | 0.003386 | 0.004811 | 0.97 | 0.004687 |
| 放线菌属                       | 0.003567 | 0.006197 | 0.003163 | 0.005706 | 0.89 | 0.004738 |
| 颤螺菌属<br>(Oscillospira)     | 0.002812 | 0.005952 | 0.002748 | 0.005538 | 0.98 | 0.004930 |
| 乳球菌属<br>(Lactococcus)      | 0.002660 | 0.005340 | 0.002644 | 0.005160 | 0.99 | 0.005799 |
| 考克氏菌属<br>(Kocuria)         | 0.001522 | 0.005046 | 0.002564 | 0.005863 | 1.68 | 0.006372 |
| 盐单胞菌属                      | 0.001151 | 0.003055 | 0.002542 | 0.003966 | 2.21 | 0.007139 |

|                              |          |          |          |          |      |          |
|------------------------------|----------|----------|----------|----------|------|----------|
| (Halomonas)                  |          |          |          |          |      |          |
| 气球菌属                         | 0.000763 | 0.002603 | 0.002380 | 0.008358 | 3.12 | 0.007287 |
| 魏斯氏菌属<br>(Weissella)         | 0.001616 | 0.004880 | 0.002157 | 0.004964 | 1.33 | 0.007332 |
| 金黄杆菌属<br>(Chryseobacterium)  | 0.002104 | 0.004979 | 0.002012 | 0.004428 | 0.96 | 0.007708 |
| 新鞘氨醇杆菌属<br>(Novosphingobium) | 0.000797 | 0.003082 | 0.001982 | 0.004444 | 2.49 | 0.007930 |
| 皮球菌属<br>(Dermacoccus)        | 0.001285 | 0.003088 | 0.001894 | 0.004797 | 1.47 | 0.009188 |
| 栖热菌属                         | 0.000628 | 0.002234 | 0.001651 | 0.003771 | 2.63 | 0.009916 |
| Kaistobacter 属               | 0.001091 | 0.003528 | 0.001589 | 0.005499 | 1.46 | 0.010204 |
| 土壤杆菌属<br>(Agrobacterium)     | 0.001527 | 0.004513 | 0.001553 | 0.003727 | 1.02 | 0.012467 |
| 短杆菌属<br>(Brevibacterium)     | 0.001678 | 0.005265 | 0.001499 | 0.006043 | 0.89 | 0.012902 |
| 雷尔氏菌属<br>(Ralstonia)         | 0.001174 | 0.003176 | 0.000991 | 0.003342 | 0.84 | 0.029968 |

[0099] 根据实施例3的方法,使用来源于从血清样品提取的囊泡的DNA进行细菌的宏基因组分析,然后根据肺癌亚型在属级分析来源于细菌的EV在血液中的分布。作为分析的结果,如图12和下表12所示,根据肺癌亚型,在属级来源于细菌的EV在血清中的分布没有差异。

[0100] <表12>

| 类别 | 腺癌 | 小细胞癌 | 鳞状细胞癌 | 其他 |
|----|----|------|-------|----|
|----|----|------|-------|----|

|                            | 平均<br>值 (%) | SD (%) | 平均<br>值<br>(%) | SD<br>(%) | 平均<br>值<br>(%) | SD<br>(%) | 平均<br>值<br>(%) | SD<br>(%) |
|----------------------------|-------------|--------|----------------|-----------|----------------|-----------|----------------|-----------|
| <b>Gr(+)</b>               |             |        |                |           |                |           |                |           |
| 放线菌纲<br>(Actinobacteria)   |             |        |                |           |                |           |                |           |
| 棒状杆菌属<br>(Corynebacterium) | 2.16        | (1.60) | 1.77           | (2.06)    | 2.39           | (2.71)    | 3.19           | (2.91)    |
| 微球菌属<br>(Micrococcus)      | 0.65        | (0.98) | 0.61           | (1.01)    | 0.69           | (1.07)    | 0.59           | (0.85)    |
| 罗氏菌属 (Rothia)              | 0.38        | (0.53) | 0.52           | (0.95)    | 0.44           | (0.65)    | 0.42           | (0.92)    |
| 红球菌属<br>(Rhodococcus)      | 0.72        | (1.67) | 0.38           | (0.70)    | 0.35           | (0.47)    | 0.38           | (0.53)    |
| 丙酸杆菌属                      | 1.25        | (1.00) | 1.28           | (1.40)    | 1.22           | (1.28)    | 1.24           | (1.00)    |
| 双歧杆菌属<br>(Bifidobacterium) | 1.32        | (1.10) | 1.35           | (1.57)    | 1.38           | (1.50)    | 1.01           | (0.89)    |
| 柯林斯菌属<br>(Collinsella)     | 0.55        | (0.67) | 0.54           | (0.79)    | 0.49           | (0.85)    | 0.37           | (0.53)    |
| 厚壁菌门<br>(Firmicutes)       |             |        |                |           |                |           |                |           |
| 芽孢杆菌科 (aceae (f))          | 0.51        | (1.29) | 0.24           | (0.38)    | 0.37           | (0.86)    | 0.31           | (0.70)    |
| 葡萄球菌属<br>(Staphylococcus)  | 2.00        | (1.94) | 3.19           | (6.76)    | 2.00           | (1.72)    | 2.55           | (6.11)    |
| 肠球菌属<br>(Enterococcus)     | 1.13        | (1.69) | 0.76           | (0.91)    | 0.67           | (0.75)    | 0.77           | (1.13)    |

|                                       |      |        |      |        |      |        |      |        |
|---------------------------------------|------|--------|------|--------|------|--------|------|--------|
| 乳杆菌属<br>( <i>Lactobacillus</i> )      | 4.52 | (3.12) | 4.41 | (3.67) | 4.57 | (6.41) | 4.21 | (3.94) |
| 链球菌属<br>( <i>Streptococcus</i> )      | 3.06 | (2.73) | 2.54 | (1.66) | 3.00 | (2.79) | 2.85 | (2.04) |
| 梭菌目( <i>Clostridiales</i><br>(o))     | 2.38 | (2.60) | 2.84 | (2.94) | 2.11 | (1.57) | 1.79 | (1.48) |
| 毛螺菌科<br>( <i>Lachnospiraceae</i> (f)) | 1.89 | (1.49) | 2.04 | (1.70) | 2.19 | (1.86) | 1.54 | (1.36) |
| 布劳特氏菌属<br>( <i>Blautia</i> )          | 1.22 | (2.01) | 0.67 | (0.80) | 0.74 | (0.74) | 0.76 | (1.01) |
| 粪球菌属<br>( <i>Coprococcus</i> )        | 1.57 | (1.37) | 1.54 | (1.57) | 1.48 | (1.70) | 1.21 | (1.37) |
| 多拉菌属( <i>Dorea</i> )                  | 0.57 | (0.84) | 0.45 | (0.85) | 0.29 | (0.43) | 0.30 | (0.44) |
| 瘤胃菌科<br>( <i>Ruminococcaceae</i> (f)) | 3.50 | (2.55) | 3.73 | (2.61) | 3.61 | (2.32) | 3.19 | (2.26) |
| 栖粪杆菌属<br>( <i>Faecalibacterium</i> )  | 4.57 | (3.80) | 5.04 | (3.79) | 5.10 | (4.41) | 4.36 | (3.52) |
| 瘤胃菌属<br>( <i>Ruminococcus</i> )       | 0.60 | (1.28) | 0.59 | (0.88) | 0.70 | (1.03) | 0.55 | (0.73) |
| Gr(-)                                 |      |        |      |        |      |        |      |        |
| 拟杆菌纲<br>( <i>Bacteroidetes</i> )      |      |        |      |        |      |        |      |        |
| 拟杆菌属<br>( <i>Bacteroides</i> )        | 2.53 | (1.98) | 3.14 | (2.28) | 2.87 | (2.14) | 2.71 | (2.12) |
| 副杆状菌属<br>( <i>Parabacteroides</i> )   | 0.62 | (1.34) | 0.63 | (0.97) | 0.56 | (0.84) | 0.38 | (0.56) |

|                                          |      |         |      |         |      |         |      |         |
|------------------------------------------|------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|
| 普雷沃氏菌属<br>( <i>Prevotella</i> )          | 2.27 | (1.63 ) | 2.27 | (1.88 ) | 2.32 | (1.66 ) | 2.20 | (1.90 ) |
| 蓝细菌门<br>( <i>Cyanobacteria</i> )         |      |         |      |         |      |         |      |         |
| 链形植物 ( <i>Streptophyta</i><br>(o))       | 1.50 | (1.73 ) | 1.56 | (2.42 ) | 2.10 | (4.95 ) | 1.43 | (1.89 ) |
| 变形菌门<br>( <i>Proteobacteria</i> )        |      |         |      |         |      |         |      |         |
| 根瘤菌科 ( <i>Rhizobiaceae</i><br>(f))       | 0.87 | (1.49 ) | 0.39 | (0.44 ) | 0.49 | (0.59 ) | 0.61 | (0.78 ) |
| 副球菌属<br>( <i>Paracoccus</i> )            | 0.62 | (0.88 ) | 0.76 | (1.45 ) | 0.47 | (0.71 ) | 0.67 | (1.06 ) |
| 鞘氨醇单胞菌属<br>( <i>Sphingomonas</i> )       | 1.67 | (1.95 ) | 1.79 | (1.79 ) | 1.93 | (2.55 ) | 1.69 | (1.83 ) |
| 丛毛单胞菌科<br>( <i>Comamonadaceae</i> (f))   | 0.33 | (0.47 ) | 0.29 | (0.52 ) | 0.42 | (0.68 ) | 0.70 | (1.28 ) |
| 草酸杆菌科<br>( <i>Oxalobacteraceae</i> (f))  | 0.64 | (1.26 ) | 0.76 | (1.67 ) | 0.51 | (0.86 ) | 0.54 | (0.60 ) |
| 贪铜菌属<br>( <i>Cupriavidus</i> )           | 0.56 | (0.70 ) | 0.56 | (0.65 ) | 0.61 | (0.76 ) | 0.97 | (1.57 ) |
| 奈瑟氏球菌属<br>( <i>Neisseria</i> )           | 0.41 | (0.91 ) | 0.51 | (1.64 ) | 0.45 | (0.82 ) | 0.26 | (0.44 ) |
| 气单胞菌科<br>( <i>Aeromonadaceae</i> (f))    | 0.55 | (2.26 ) | 0.25 | (0.80 ) | 0.33 | (1.57 ) | 1.11 | (5.94 ) |
| 肠杆菌科<br>( <i>Enterobacteriaceae</i> (f)) | 8.28 | (4.46 ) | 7.86 | (6.15 ) | 8.22 | (5.81 ) | 8.54 | (6.12 ) |

|                                    |      |        |      |        |      |        |      |        |
|------------------------------------|------|--------|------|--------|------|--------|------|--------|
| 黑草菌属 ( <i>Buchnera</i> )           | 0.00 | (0.00) | 0.00 | (0.00) | 0.00 | (0.02) | 0.00 | (0.00) |
| 枸橼酸杆菌属<br>( <i>Citrobacter</i> )   | 0.80 | (1.28) | 0.79 | (0.81) | 0.81 | (0.86) | 0.74 | (0.90) |
| 嗜血杆菌属<br>( <i>Haemophilus</i> )    | 0.54 | (1.19) | 0.69 | (1.54) | 0.52 | (0.82) | 0.51 | (0.77) |
| 不动杆菌属<br>( <i>Acinetobacter</i> )  | 3.03 | (3.01) | 3.25 | (3.05) | 3.14 | (2.55) | 2.92 | (2.51) |
| 水栖菌属<br>( <i>Enhydrobacter</i> )   | 2.24 | (2.84) | 2.53 | (2.91) | 2.31 | (2.99) | 2.39 | (2.99) |
| 假单胞菌属<br>( <i>Pseudomonas</i> )    | 7.47 | (5.37) | 6.58 | (4.04) | 7.27 | (5.72) | 7.22 | (4.04) |
| 疣微菌门<br>( <i>Verrucomicrobia</i> ) |      |        |      |        |      |        |      |        |
| 阿克曼氏菌属<br>( <i>Akkermansia</i> )   | 2.52 | (2.00) | 3.63 | (3.01) | 2.47 | (2.24) | 2.55 | (2.06) |

[0101] 实施例9. 基于宏基因组分析的肺癌预测和诊断模型的开发

[0102] 基于上述实施例3至实施例8的结果, 使用正常对照, 根据血液中来源于细菌的囊泡的宏基因组分析, 开发肺癌预测和诊断模型。如图13所示, 当基于与正常对照相比, 9个生物标志物在肺癌患者的血液样品中显示显著增加以及9个生物标志物在肺癌患者的血液样品中显示显著减少制造出预测和诊断模型时, 该模型显示诊断性能, 即85%的敏感度, 88%的特异度, 以及86%的准确率。

[0103] 从环境中存在的细菌分泌的EV被吸收到人体内, 因此可能直接影响癌症的发生, 并且由于难以在出现症状之前实现对肺癌的早期诊断, 因而难以进行有效的治疗。因此, 根据本公开, 可以通过使用来源于人体的样品对来源于细菌的EV的宏基因组分析来预测患肺癌的风险, 因此可以延迟肺癌的发作或可以通过适当的控制预防肺癌, 并且即使在肺癌发生后, 也可以实现对肺癌的早期诊断, 从而降低疾病发生率并提高治疗效果。此外, 通过对诊断患有肺癌的患者进行宏基因组分析可以预测致病因素, 因此患者能够避免暴露于致病因素, 从而改善肺癌的进展, 或可以预防肺癌的复发。

[0104] 提供本公开的前述描述仅用于说明性目的, 并且本公开所属技术领域的普通技术人员应理解, 本发明可以以各种修改形式实施, 而不脱离本发明的精神或必要的特点。因此, 本文描述的实施方式应仅在说明性意义上被考虑, 而不是用于限制的目的。

## 序列表

|       |                                                              |    |
|-------|--------------------------------------------------------------|----|
| <110> | MD保健株式會社<br>阿昂梅迪克斯公司                                         |    |
| <120> | 用于通过细菌的宏基因组分析来诊断肺癌的试剂盒和方法                                    |    |
| <130> | MP017-035CN                                                  |    |
| <150> | KR 10-2016-0179225                                           |    |
| <151> | 2016-12-26                                                   |    |
| <150> | KR 10-2017-0080906                                           |    |
| <151> | 2017-06-27                                                   |    |
| <160> | 2                                                            |    |
| <170> | SIP0SequenceListing 1.0                                      |    |
| <210> | 1                                                            |    |
| <211> | 50                                                           |    |
| <212> | DNA                                                          |    |
| <213> | 人工序列(Artificial Sequence)                                    |    |
| <220> |                                                              |    |
| <221> | misc_feature                                                 |    |
| <222> | (1) .. (50)                                                  |    |
| <223> | 16S_V3_F                                                     |    |
| <400> | 1                                                            |    |
|       | tcgtcggcag cgtcagatgt gtataagaga cagcctacgg gnggcwgcag       | 50 |
| <210> | 2                                                            |    |
| <211> | 55                                                           |    |
| <212> | DNA                                                          |    |
| <213> | 人工序列(Artificial Sequence)                                    |    |
| <220> |                                                              |    |
| <221> | misc_feature                                                 |    |
| <222> | (1) .. (55)                                                  |    |
| <223> | 16S_V4_R                                                     |    |
| <400> | 2                                                            |    |
|       | gtctcgtggg ctcggagatg tgtataagag acaggactac hvgggtatct aatcc | 55 |

口服应用肠道微生物和微生物 EV 后的体内 IVIS 成像

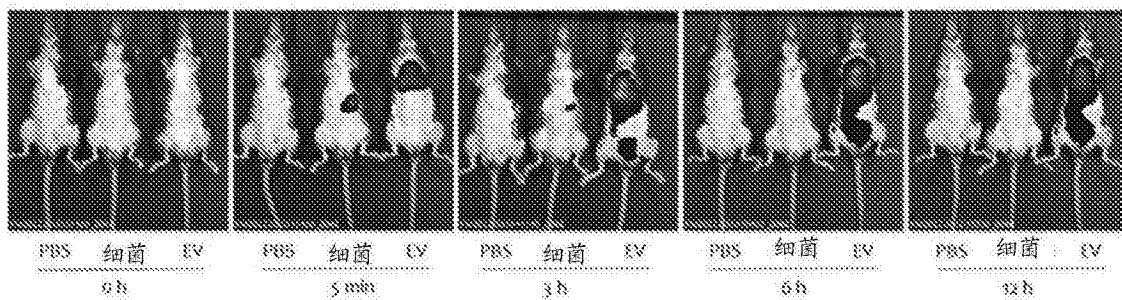


图1A

口服应用肠道微生物和微生物 EV12 小时后的 IVIS 成像

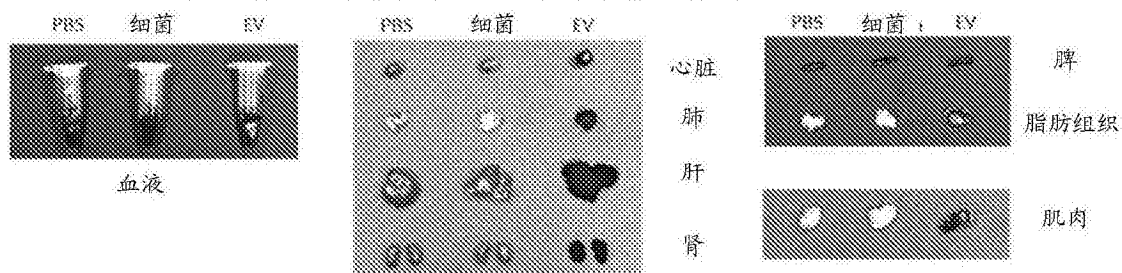


图1B

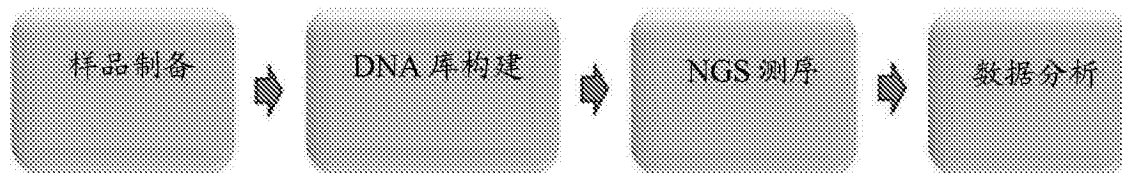


图2

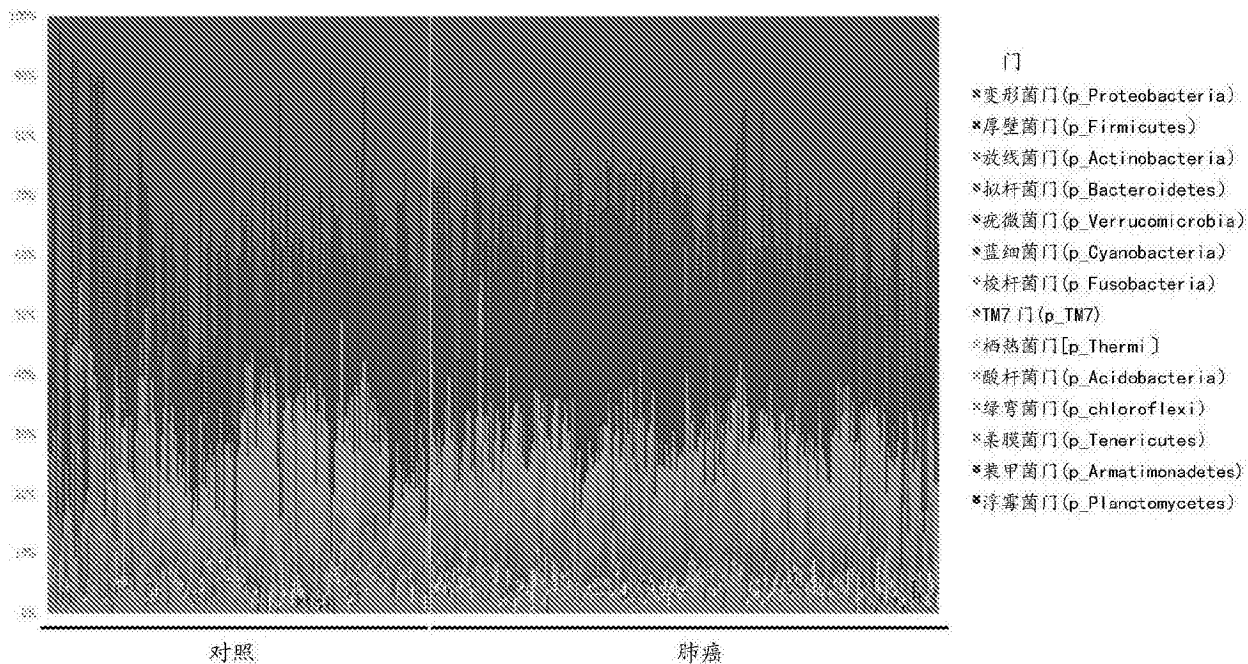


图3

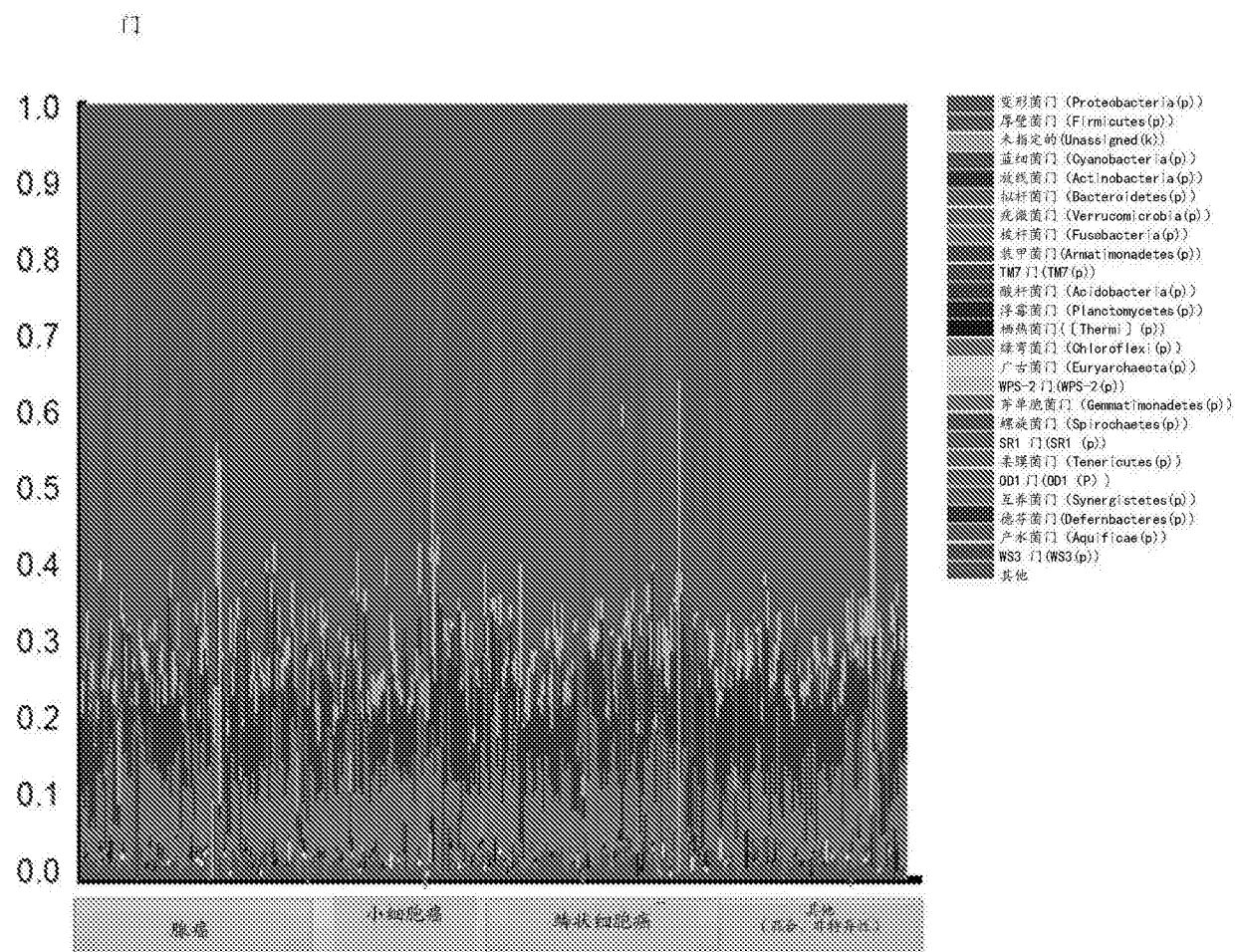


图4

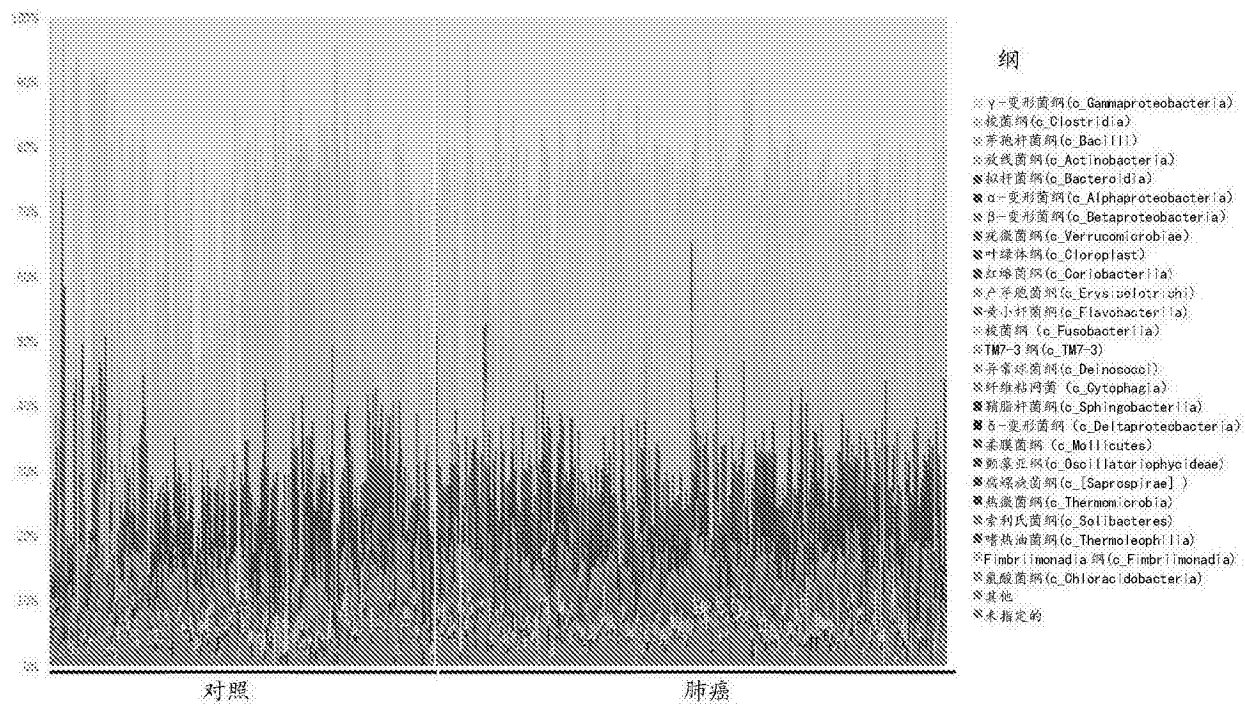


图5

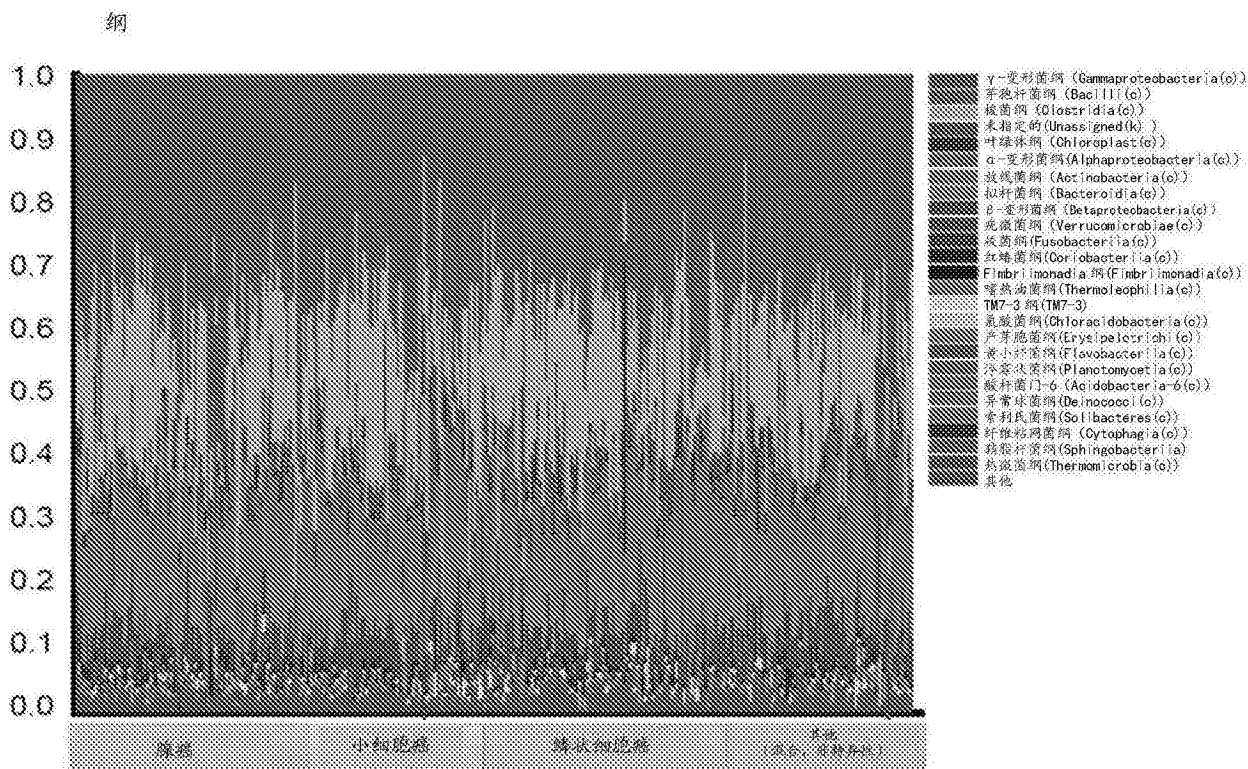


图6

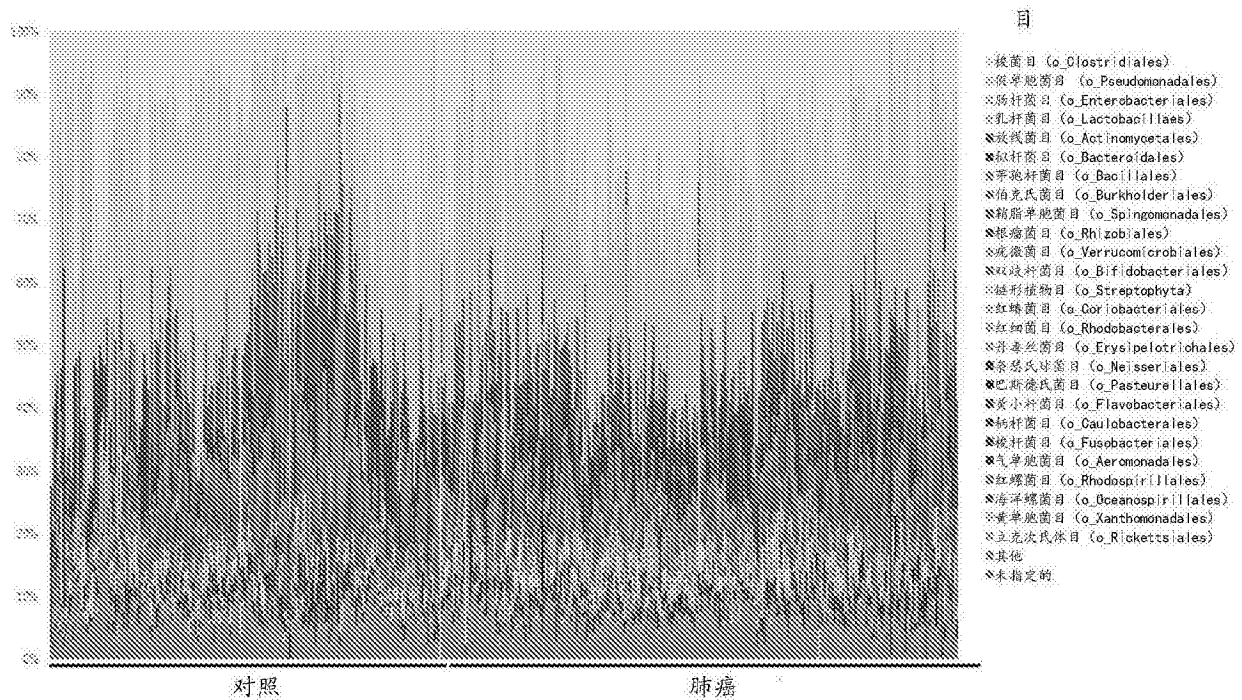


图7

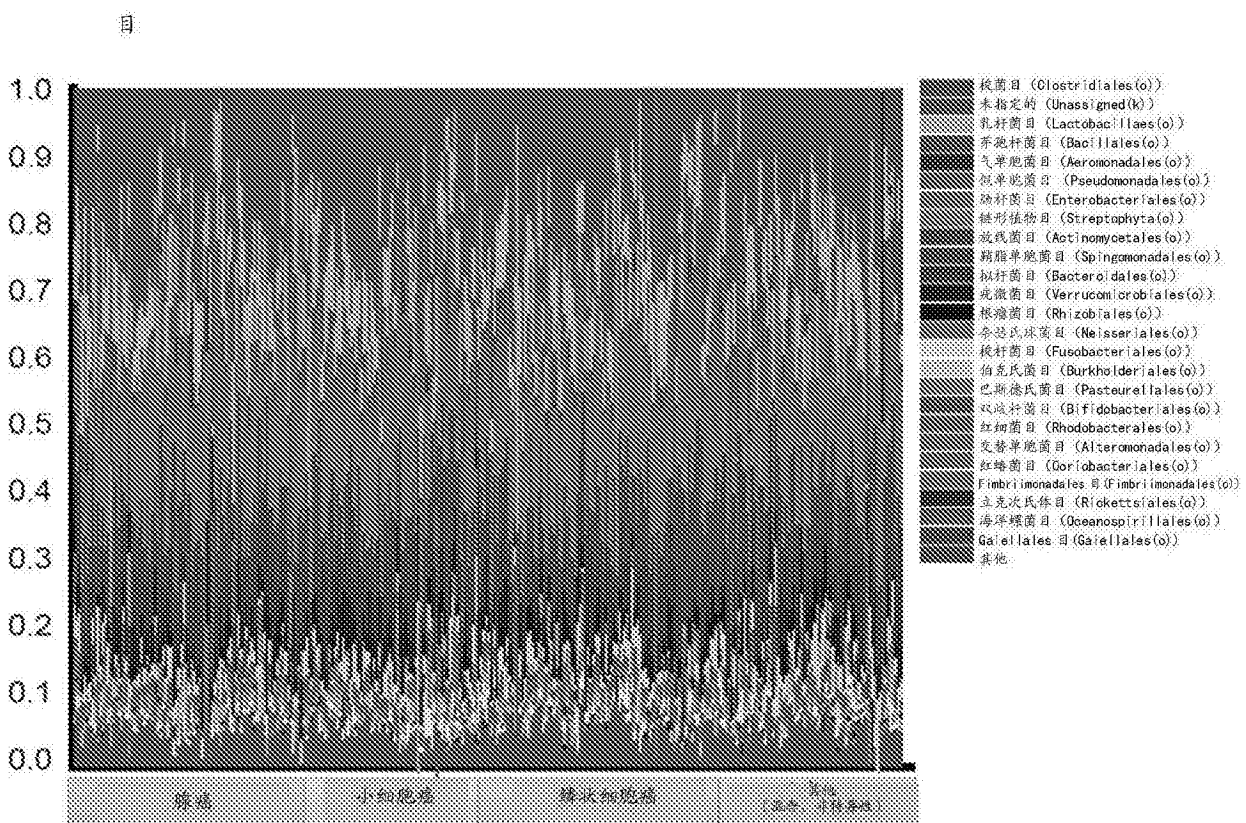


图8

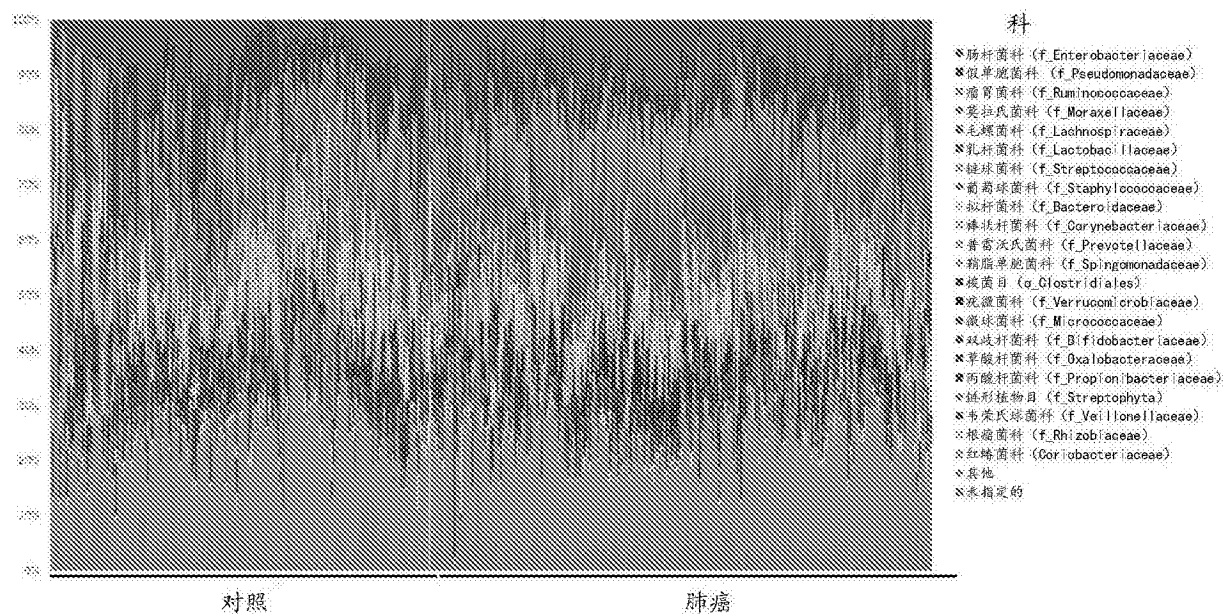


图9

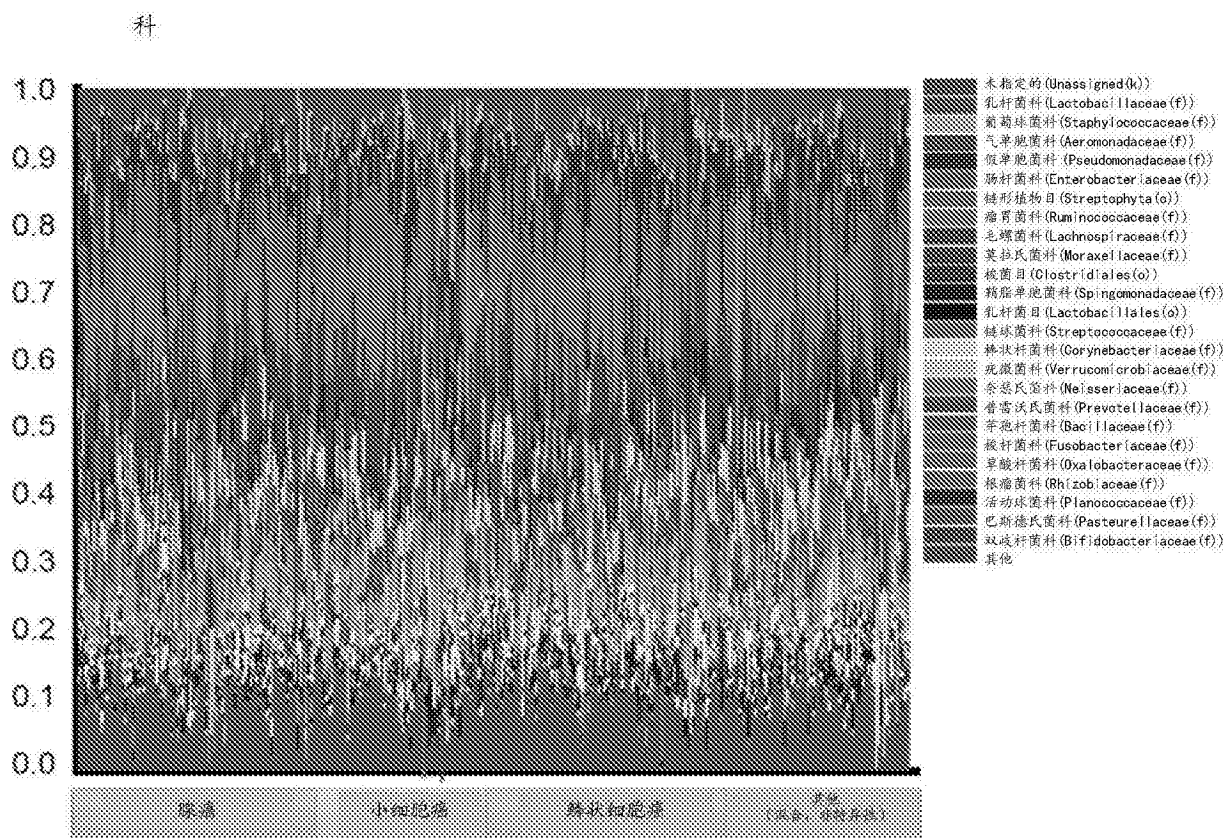


图10

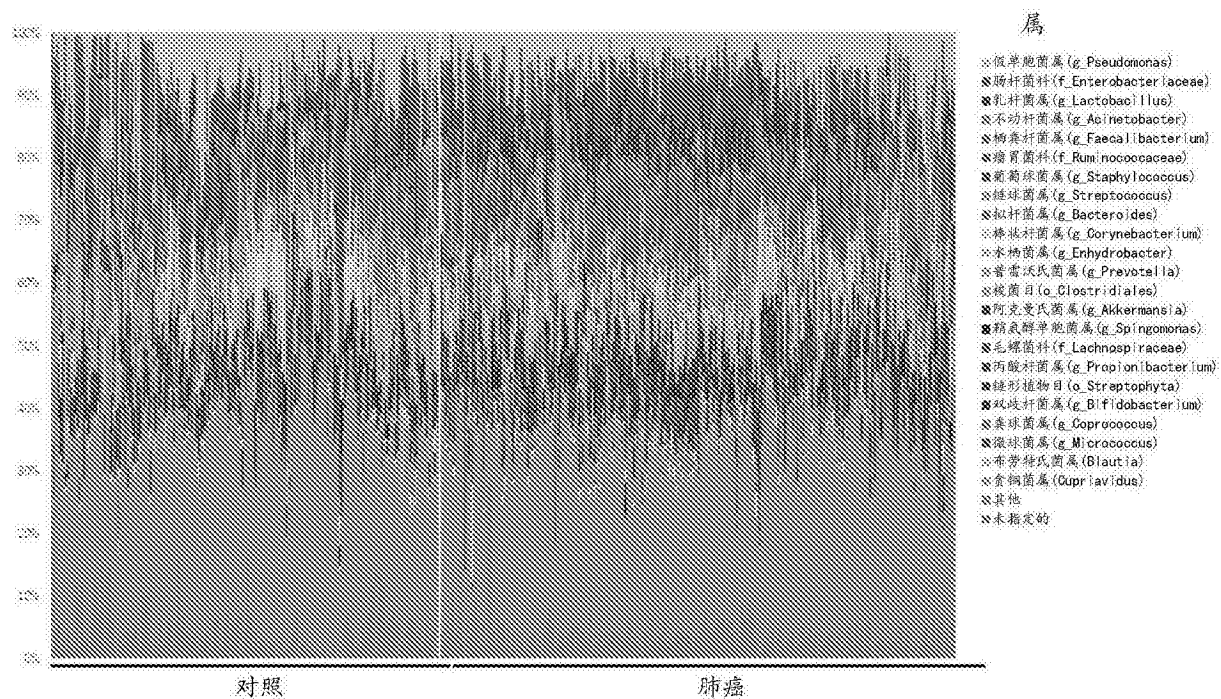


图11

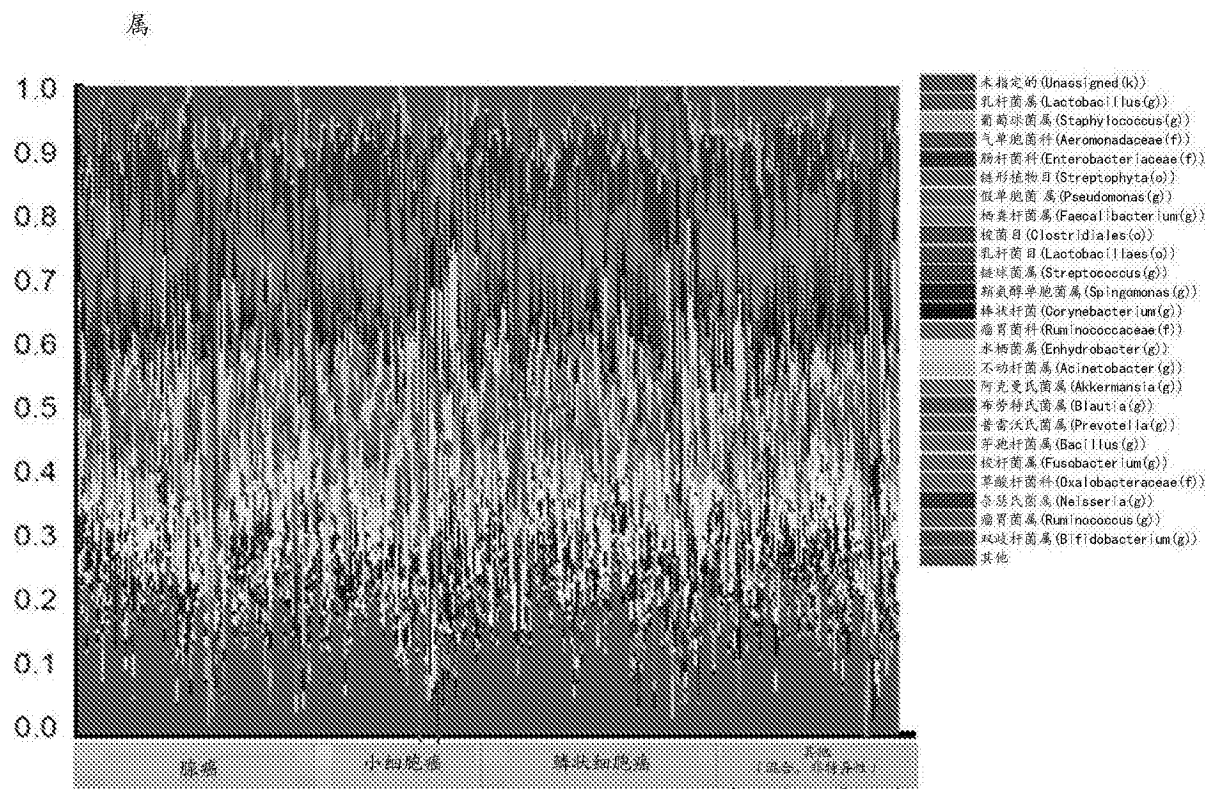


图12

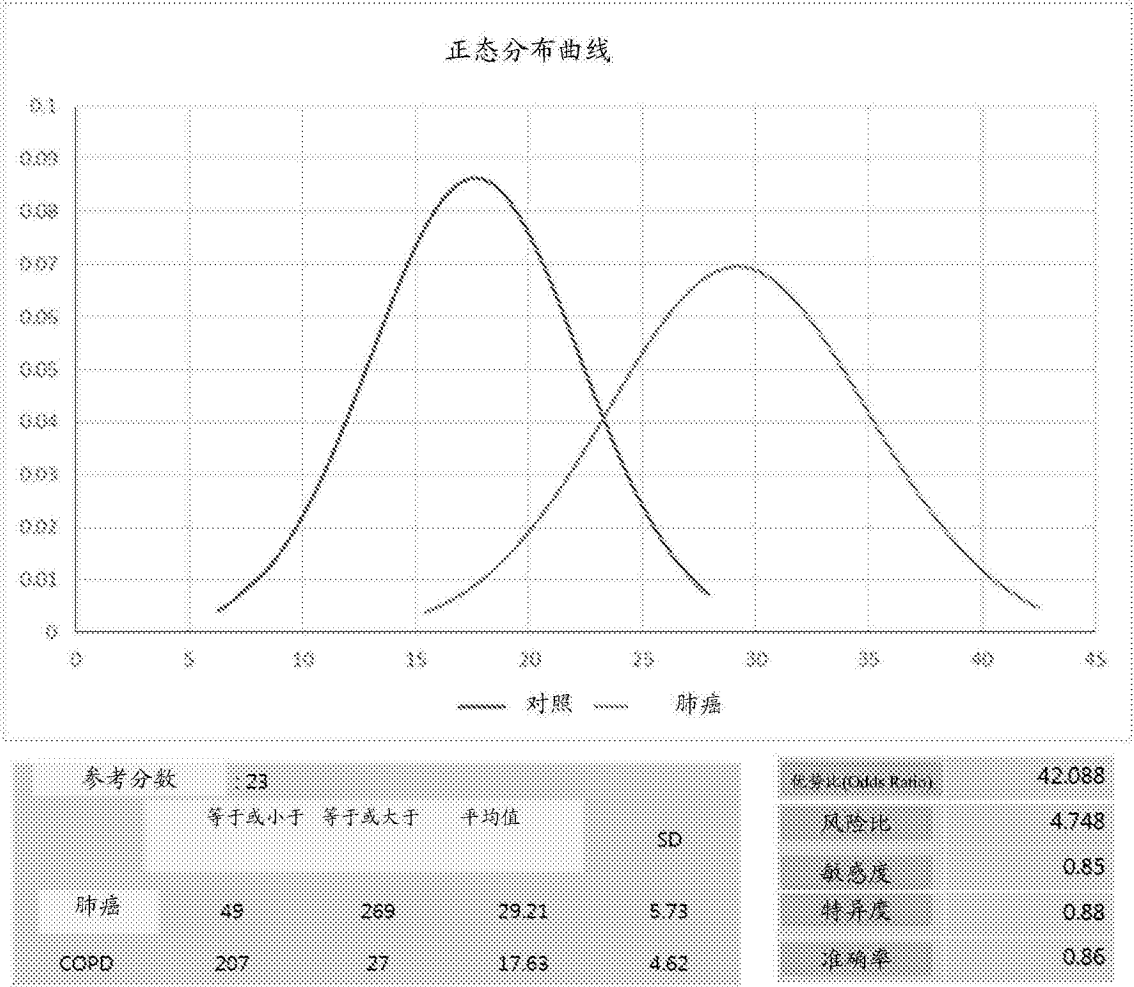


图13