



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112522402 A

(43) 申请公布日 2021.03.19

(21) 申请号 202011440736.2

(22) 申请日 2020.12.08

(71) 申请人 青岛泐深生物医药有限公司

地址 266000 山东省青岛市崂山区科苑纬
一路1号青岛国际创新园二期D2栋千
山大厦2503室

(72) 发明人 杨承刚 宋宏涛

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6886 (2018.01)

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/573 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

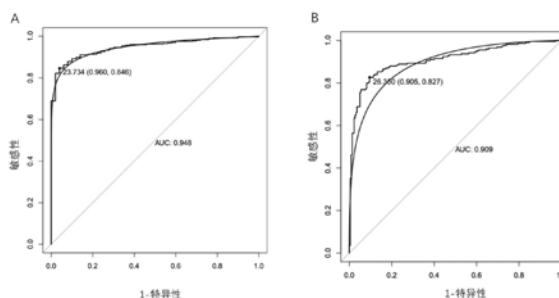
权利要求书1页 说明书6页 附图6页

(54) 发明名称

基因标志物的诊断用途

(57) 摘要

本发明公开了基因标志物的诊断用途。本发明还公开了检测基因标志物的试剂、检测产品以及包含基因标志物的诊断系统。



1. 一种肝癌诊断的标志物,其特征在于,所述标志物包括PTK2B、SMAD7;
优选地,所述标志物包括PTK2B、SMAD7、SOD1;
优选地,所述标志物包括EGFR、PTK2B、SMAD7、SOD1。
2. 如权利要求1所述的标志物的检测试剂;
优选地,所述检测试剂包括检测所述标志物的mRNA表达量的试剂、检测所述标志物的蛋白表达量的试剂;
优选地,所述检测试剂包括荧光定量PCR引物、荧光定量PCR探针、抗体、抗体功能性片段、偶联抗体。
3. 包含权利要求2所述的检测试剂的检测产品;优选地,所述检测产品包括试剂盒、芯片、试纸、高通量测序平台;
优选地,所述试剂盒包括qPCR试剂盒、免疫印迹检测试剂盒、免疫层析检测试剂盒、流式细胞分析试剂盒、免疫组化检测试剂盒、ELISA试剂盒和电化学发光检测试剂盒。
4. 一种肝癌的诊断系统,其特征在于,所述诊断系统包含:
检测构件:所述检测构件用以检测权利要求1所述的标志物的表达量;
结果判断构件:所述结果判断构件用于根据所述检测构件所检测的所述标志物的表达量的结果,输出肝癌患者疾病结果;
优选地,所述的标志物的表达量包括所述标志物的mRNA表达量、所述标志物的蛋白表达量。
5. 如权利要求4所述的诊断系统,其特征在于,所述结果判断构件含有输入模块、分析模块和输出模块;输入模块用于输入所述标志物的表达量;分析模块用于根据所述标志物的表达量,分析出肝癌患者疾病风险结果的可能性;输出模块用于输出分析模块的分析结果。
6. 如权利要求4所述的诊断系统,其特征在于,所述检测构件包括qPCR试剂盒、免疫印迹检测试剂盒、免疫层析检测试剂盒、流式细胞分析试剂盒、免疫组化检测试剂盒、ELISA试剂盒、电化学发光检测试剂盒、qPCR仪、免疫印迹检测装置、流式细胞仪、免疫组化检测装置、ELISA检测装置、电化学发光检测装置。
7. 如权利要求2所述的检测试剂在制备肝癌的诊断产品中的应用。
8. 如权利要求7所述的应用,其特征在于,所述检测产品是权利要求3所述的检测产品。
9. 如权利要求2所述的检测试剂在制备肝癌的诊断系统中的应用。
10. 如权利要求9所述的应用,其特征在于,所述诊断系统是权利要求4-6中任一项所述的诊断系统。

基因标志物的诊断用途

技术领域

[0001] 本发明涉及疾病诊断领域,更具体地,本发明涉及基因标志物的诊断用途。

背景技术

[0002] 原发性肝癌(primary carcinoma of liver,以下简称肝癌)是我国常见的恶性肿瘤之一。据20世纪90年代统计,我国肝癌的年死亡率为20.37/10万,在恶性肿瘤死亡顺位中占第2位,在城市中仅次于肺癌;农村中仅次于胃癌。由于血清甲胎蛋白(AFP)的临床应用和各种影像学技术的进步,特别是AFP和超声显像用于肝癌高危人群的监测,使肝癌能够在无症状和体征的亚临床期作出诊断,加之外科手术技术的成熟,以及各种局部治疗等非手术治疗方法的发展,使肝癌的预后较过去有了明显提高。

[0003] 原发性肝癌的临床病象极不典型,其症状一般多不明显,特别是在病程早期。通常5cm以下小肝癌约70%左右无症状,无症状的亚临床肝癌亦70%左右为小肝癌。症状一旦出现,说明肿瘤已经较大,其病势的进展则一般多很迅速,通常在数周内即呈现恶病质,往往在几个月至1年内即衰竭死亡。临床病象主要是两个方面的病变:①肝硬化的表现,如腹水、侧支循环的发生,呕血及肢体的水肿等;②肿瘤本身所产生的症状,如体重减轻、周身乏力、肝区疼痛及肝脏肿大等。

[0004] 在世界任何地区都同样发现,任何原因导致的慢性肝病都可能在肝癌发生和发展过程中起着重要的作用。流行病学和实验研究均表明病毒性肝炎与原发性肝癌的发生有着特定的关系,目前比较明确的与肝癌有关系的病毒性肝炎有乙型、丙型和丁型3种。其中以乙型肝炎与肝癌关系最为密切,近年HBsAg阴性肝癌数增加与丙型肝炎有关,而前苏联则以丁型为多。我国肝癌患者中约90%有乙型肝炎病毒(HBV)感染背景。其他危险因素包括酒精性肝硬化、肝腺瘤、长期摄入黄曲霉素、其他类型的慢性活动性肝炎、Wilson病、酪氨酸血症和糖原累积病。

[0005] 目前常用的用于肝癌诊断的方法包括如下方式:

[0006] 1、实验室检查

[0007] (1) 肝癌标志物的检测近年来用于肝癌检测的血清标志物主要有:①甲胎蛋白(AFP)及其异质体;②各种血清酶,如 γ 谷氨酰转肽酶同工酶II (GGT-II)、碱性磷酸酶同工酶I (ALP-I)、醛缩酶同工酶A (ALD-A)、岩藻糖苷酶(AFU)、抗胰蛋白酶I (AAT)、5'核苷酸磷酸二酯酶同工酶V (5'-NPD-V)、丙酮酸激酶同工酶(M2-PyK)、谷胱甘肽S-转移酶(GST)等;③异常凝血酶原;④铁蛋白与酸性铁蛋白。其中AFP的诊断价值最大。对于AFP阴性肝癌的诊断,以上几种血清标志物联合应用,具有一定的诊断价值。

[0008] 2、其他辅助检查

[0009] (1) 超声检查;(2) 计算机X线体层扫描(CT);(3) 磁共振显像(MRI);(4) 肝动脉造影;(5) 放射性核素显像;(6) 肝穿刺活体组织检查。

[0010] 但是利用血清标志物诊断肝癌的缺陷是不敏感,利用其它辅助检查诊断肝癌的缺陷是不能在疾病早期作出诊断,耽误病情。要想提高肝癌的治愈率关键在于在发病早期即

可作出精确的诊断,为此本申请研究的目的是在基因水平上寻找能够用于肝癌诊断的早期分子标志物。

发明内容

[0011] 本发明目的之一在于提供一种在检测敏感性高、特异性强的肝癌诊断的标志物。

[0012] 本发明的进一步的目的在于提供一种检测敏感性高、特异性强的肝癌的诊断试剂/试剂盒。

[0013] 本发明还有一个目的在于提供一种肝癌的诊断系统。

[0014] 本发明首次提供了一种分子标志物组合,该分子标志物组合的检出量与肝癌具有极高的对应关系。

[0015] 具体地,本发明提供了一种肝癌诊断的标志物,所述标志物包括PTK2B、SMAD7。

[0016] 在本发明的一个实施例中,所述标志物包括PTK2B、SMAD7、SOD1。

[0017] 在本发明的一个实施例中,所述标志物包括EGFR、PTK2B、SMAD7、SOD1。

[0018] 本发明还提供了前面所述的标志物的检测试剂。

[0019] 进一步,所述检测试剂包括检测所述标志物的mRNA表达量的试剂、检测所述标志物的蛋白表达量的试剂。

[0020] 更进一步,所述检测试剂包括荧光定量PCR引物、荧光定量PCR探针、抗体、抗体功能性片段、偶联抗体。

[0021] 本发明还提供了前面所述的检测试剂的检测产品。

[0022] 进一步,所述检测产品包括试剂盒、芯片、试纸、高通量测序平台。

[0023] 更进一步,所述试剂盒包括qPCR试剂盒、免疫印迹检测试剂盒、免疫层析检测试剂盒、流式细胞分析试剂盒、免疫组化检测试剂盒、ELISA试剂盒和电化学发光检测试剂盒。

[0024] 本发明还提供了一种肝癌的诊断系统,所述诊断系统包含:

[0025] 检测构件:所述检测构件用以检测前面所述的标志物的表达量;

[0026] 结果判断构件:所述结果判断构件用于根据所述检测构件所检测的所述标志物的表达量的结果,输出肝癌患者疾病结果。

[0027] 进一步,所述的标志物的表达量包括所述标志物的mRNA表达量、所述标志物的蛋白表达量。

[0028] 作为一种可以选择的实施方式,所述结果判断构件含有输入模块、分析模块和输出模块;输入模块用于输入所述标志物的表达量;分析模块用于根据所述标志物的表达量,分析出肝癌患者疾病风险结果的可能性;输出模块用于输出分析模块的分析结果。

[0029] 作为一种可以选择的实施方式,所述检测构件包括qPCR试剂盒、免疫印迹检测试剂盒、免疫层析检测试剂盒、流式细胞分析试剂盒、免疫组化检测试剂盒、ELISA试剂盒、电化学发光检测试剂盒、qPCR仪、免疫印迹检测装置、流式细胞仪、免疫组化检测装置、ELISA检测装置、电化学发光检测装置。

[0030] 某些实施例中,本发明的检测产品或诊断系统所针对的样品为组织、体液或排泄物。

[0031] 其中一个实施例中,所述组织为肝组织。

[0032] 某些实施例中,所述体液为血液、细胞外液、组织液、淋巴液、脑脊液或房水。

[0033] 作为一种优选的实施方式,所述体液为血液。

[0034] 作为一种更为优选的实施方式,所述体液为血浆。

[0035] 某些实施例中,所述排泄物为痰、唾液、尿液或粪便。

[0036] 产品中包括的引物可以通过化学合成来制备,通过使用本领域技术人员知道的方法参考已知信息来适当地设计,并通过化学合成来制备。

[0037] 本发明的检测产品或诊断系统中的抗体,可以使用任何结构、尺寸、免疫球蛋白类别、起源等的抗体或其片段,只要它结合靶蛋白质即可。本发明的检测产品中包括的抗体或其片段可以是单克隆的或多克隆的。抗体片段指保留抗体对抗原的结合活性的抗体一部分(部分片段)或含有抗体一部分的肽。抗体片段可以包括F(ab')₂、Fab'、Fab、单链Fv(scFv)、二硫化物键合的Fv(dsFv)或其聚合物、二聚化V区(双抗体)、或含有CDR的肽。

[0038] 抗体可以通过本领域技术人员公知的方法来获得。例如,制备保留整个或部分靶蛋白质的多肽或整合编码它们的多核苷酸的哺乳动物细胞表达载体作为抗原。使用抗原免疫动物后,从经过免疫的动物获得免疫细胞并融合骨髓瘤细胞以获得杂交瘤。然后从杂交瘤培养物收集抗体。最后可以通过使用被用作抗原的标志物蛋白或其部分对获得的抗体实施抗原特异性纯化来获得针对标志物蛋白的单克隆抗体。可以如下制备多克隆抗体:用与上文相同的抗原免疫动物,从经过免疫的动物收集血液样品,从血液中分离出血清,然后使用上述抗原对血清实施抗原特异性纯化。可以通过用酶处理获得的抗体或通过使用获得的抗体的序列信息来获得抗体片段。

[0039] 标志物与抗体或其片段的结合可以通过本领域普遍知道的方法来实现。例如,可以如下荧光标记蛋白质或肽:用磷酸盐缓冲液清洗蛋白质或肽,添加用DMSO、缓冲剂、等准备的染料,然后混合溶液,再于室温放置10分钟。另外,标记可使用商品化的标记试剂盒,诸如生物素标记试剂盒,如生物素标记试剂盒-NH₂、生物素标记试剂盒-SH(Dojindo Laboratories);碱性磷酸酶标记试剂盒诸如碱性磷酸酶标记试剂盒-NH₂、碱性磷酸酶标记试剂盒-SH(Dojindo Laboratories);过氧化物酶标记试剂盒诸如过氧化物酶标记试剂盒-NH₂、过氧化物酶标记试剂盒-NH₂(Dojindo Laboratories);藻胆蛋白标记试剂盒诸如藻胆蛋白标记试剂盒-NH₂、藻胆蛋白标记试剂盒-SH、B-藻红蛋白标记试剂盒-NH₂, B-藻红蛋白标记试剂盒-SH、R-藻红蛋白标记试剂盒-NH₂、R-藻红蛋白标记试剂盒SH(Dojindo Laboratories);荧光标记试剂盒诸如荧光素标记试剂盒-NH₂、HiLyte Fluor(TM) 555标记试剂盒-NH₂、HiLyte Fluor(TM) 647标记试剂盒-NH₂(Dojindo Laboratories);及DyLight 547和DyLight647(Techno Chemical Corp.)、Zenon(TM)、Alexa Fluor(TM)抗体标记试剂盒、Qdot(TM)抗体标记试剂盒(Invitrogen Corporation)和EZ-标志物蛋白质标记试剂盒(Funakoshi Corporation)。为了正确标记,可以使用适宜的仪器来检测经过标记的抗体或其片段。

[0040] 本发明还提供了一种诊断肝癌的方法,所述方法包括如下步骤:

[0041] (1) 获取受试者的样品;

[0042] (2) 检测受试者样品中前面所述的标志物的表达水平;

[0043] (3) 将测得的所述标准物的表达水平与受试者的患病与否关联起来。

[0044] (4) 与正常对照相比,所述标志物的表达水平降低,则该受试者被判断具有患有肝癌的倾向、或者已经患有肝癌,或者肝癌患者被判断为复发、或者肝癌患者被判断为预后不

良。

[0045] 在本发明的上下文中，“肝癌诊断”包括判断受试者是否已经患有肝癌、判断受试者是否存在患有肝癌的风险、判断肝癌患者是否已经复发、判断肝癌患者的预后。

[0046] SOD1在NCBI中Gene ID:6647。

[0047] COCH在NCBI中Gene ID:1060。

[0048] PRDM2在NCBI中Gene ID:7799。

[0049] VTN在NCBI中Gene ID:7448。

[0050] PTK2B在NCBI中Gene ID:2185

[0051] EGFR在NCBI中Gene ID:1956。

[0052] SMAD7在NCBI中Gene ID:4092。

[0053] ATG7在NCBI中Gene ID:10533。

[0054] SERPINA3在NCBI中Gene ID:12。

[0055] PLP2在NCBI中Gene ID:5355。

[0056] 本发明的优点和有益效果：

[0057] 本发明的标志物组合与肝癌具有极高的关联度，敏感性和特异性可高达0.75以上，即本发明的肝癌诊断试剂或者试剂盒具有极高的灵敏度和特异性；这在临床上是非常难得的，可用于肝癌的早期发现，为患者争取时间，尽早开始治疗，提高患者的生存率，降低死亡率，减轻我国的医疗负担具有重大的意义。

附图说明

[0058] 图1显示PTK2B基因mRNA表达的箱线图，其中，A:TCGA;B:GEO;

[0059] 图2显示SMAD7基因mRNA表达的箱线图，其中，A:TCGA;B:GEO;

[0060] 图3显示SOD1基因mRNA表达的箱线图，其中，A:TCGA;B:GEO;

[0061] 图4显示EGFR基因mRNA表达的箱线图，其中，A:TCGA;B:GEO;

[0062] 图5显示VTN基因mRNA表达的箱线图，其中，A:TCGA;B:GEO;

[0063] 图6显示PRDM2基因mRNA表达的箱线图，其中，A:TCGA;B:GEO;

[0064] 图7显示PLP2基因mRNA表达的箱线图，其中，A:TCGA;B:GEO;

[0065] 图8显示SERPINA3基因mRNA表达的箱线图，其中，A:TCGA;B:GEO;

[0066] 图9显示PTK2B+SMAD7组合的ROC曲线图，其中，A:TCGA;B:GEO;

[0067] 图10显示PTK2B+SMAD7+SOD1组合的ROC曲线图，其中，A:TCGA;B:GEO;

[0068] 图11显示EGFR+PTK2B+SMAD7+SOD1组合的ROC曲线图，其中，A:TCGA;B:GEO。

[0069] 具体的实施方式

[0070] 以下通过具体的实施例进一步说明本发明的技术方案，具体实施例不代表对本发明保护范围的限制。其他人根据本发明理念所做出的一些非本质的修改和调整仍属于本发明的保护范围。

[0071] 实施例1筛选肝癌差异表达基因

[0072] 1、数据来源

[0073] 数据来自TCGA与GEO数据库。TCGA数据库中的样本量为肝癌癌旁：肝癌=50:371（测试集），GEO数据库中使用的是GSE14520数据集，样本量为肝癌癌旁：肝癌=220:225（验

证集)。

[0074] 2、数据预处理

[0075] TCGA的数据下载后,使用参考基因组,版本GRCh38进行注释,最后使用Voom方法进行标准化。而GEO数据下载了标准化后的基因表达矩阵,通过Platform文件进行注释,多个探针对应同一个基因的,取平均值作为该基因的表达量。

[0076] 3、差异表达分析

[0077] 使用R包“limma”(版本3.36.5)对肝癌的TCGA和GEO的数据进行差异表达分析,筛选标准为FDR<0.05。在TCGA中有12845个差异表达基因,GEO中有10204个差异表达基因。其中,两个共有且表达趋势一致的差异表达基因有5710个。

[0078] 4、结果

[0079] 本发明中涉及的差异表达基因PTK2B、SMAD7、SOD1、EGFR、VTN、PRDM2、PLP2、SERPINA3的表达水平见图1-图8;

[0080] 差异表达基因COCH的logFC为2.6755(癌vs癌旁,P=0.00000000038)、在GEO中的logFC为1.4548(癌vs癌旁,P=3.78115491966993E-35)。

[0081] 差异表达基因ATG7在TCGA中的logFC为0.2232(癌vs癌旁,P=0.000252335);在GEO中的logFC为0.3312(癌vs癌旁,P=1.28280890970982E-18)。

[0082] 实施例2诊断效能验证

[0083] 使用R包“pROC”(版本1.15.0)绘制受试者工作曲线(ROC),分析AUC值、敏感性和特异性。结果见表1-3和图9-11。

[0084] 表1单个基因诊断效能统计

标志物	TCGA AUC	GEO AUC
SERPINA3	0.735	0.720
SOD1	0.771	0.745
COCH	0.778	0.779
PLP2	0.735	0.783
ATG7	0.700	0.743
PRDM2	0.715	0.743
VTN	0.765	0.743
SMAD7	0.757	0.766
PTK2B	0.769	0.764
EGFR	0.764	0.756

[0086] 表2测试集TCGA数据库中基因组合的诊断效能统计

[0087]

标志物	AUC	敏感性	特异性
PTK2B+SMAD7	0.830	0.590	0.920
ATG7+PRDM2	0.561		
PTK2B+SMAD7+SOD1	0.925	0.846	0.900
COCH+SERPINA3+SMAD7	0.578		
EGFR+PTK2B+SMAD7+SOD1	0.948	0.846	0.960

[0088]

PLP2+PRDM2+SMAD7+VTN	0.651		
----------------------	-------	--	--

[0089] 表3验证集GEO数据库中基因组合的诊断效能统计

[0090]

标志物	AUC	敏感性	特异性
PTK2B+SMAD7	0.829	0.756	0.786
ATG7+PRDM2	0.631		
PTK2B+SMAD7+SOD1	0.894	0.836	0.823
COCH+SERPINA3+SMAD7	0.523		
EGFR+PTK2B+SMAD7+SOD1	0.909	0.827	0.905
PLP2+PRDM2+SMAD7+VTN	0.507		

[0091] 通过本实施例的结果可知,并不是任何几种标志物的组合对于肝癌的诊断效果都好于单个标志物,而是特定的标志物组合才具有更好的诊断效能。

[0092] 上述实施例的说明只是用于理解本发明的方法及其核心思想。应当指出,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以对本发明进行若干改进和修饰,这些改进和修饰也将落入本发明权利要求的保护范围内。

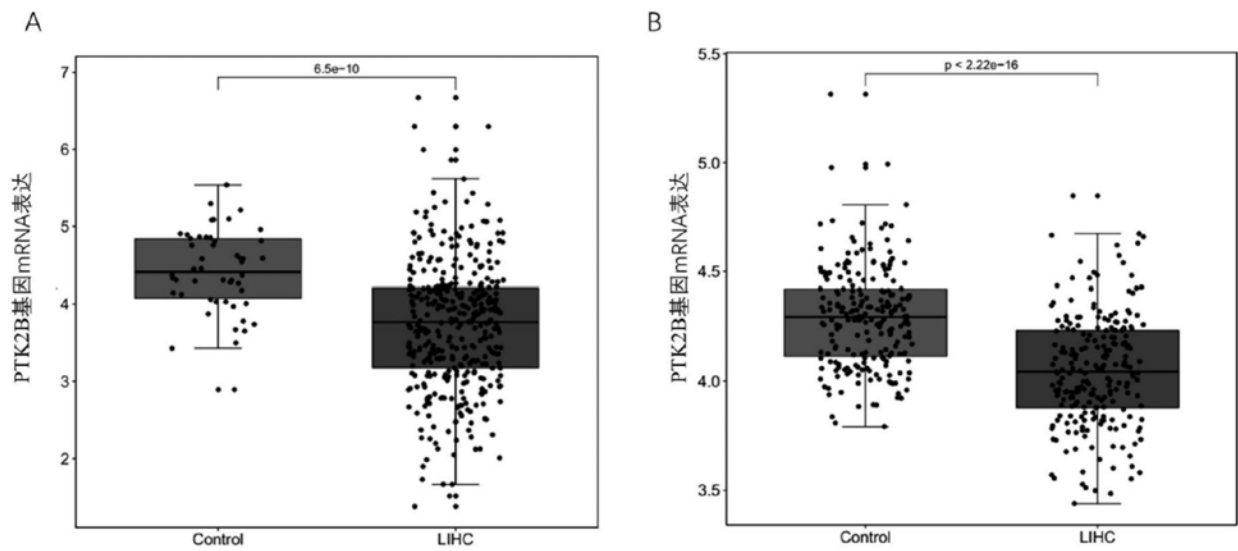


图1

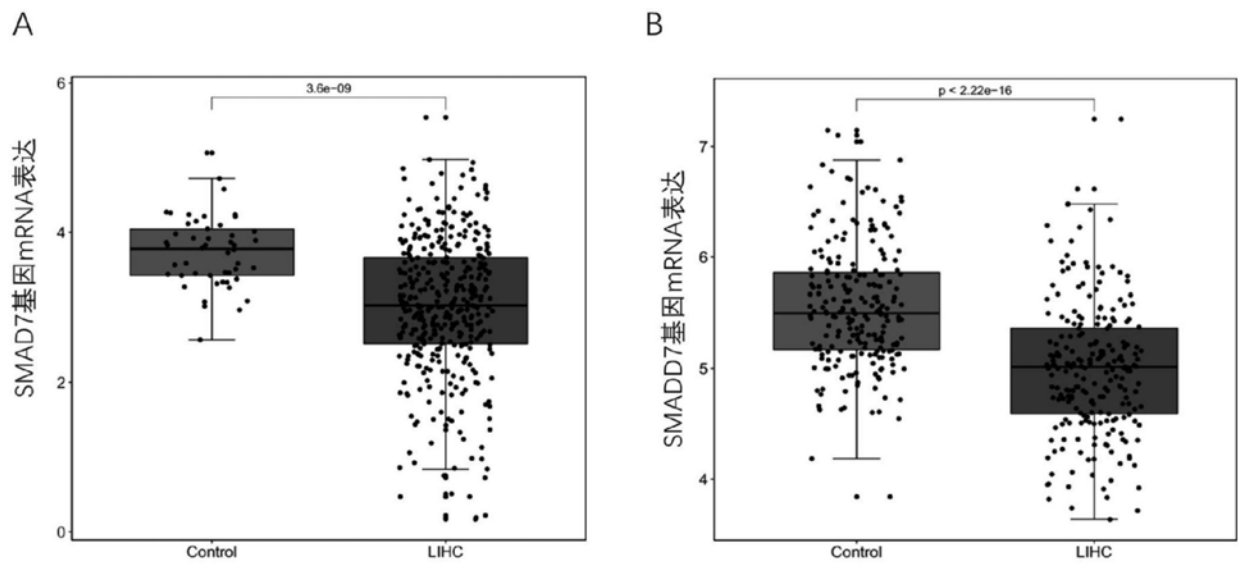


图2

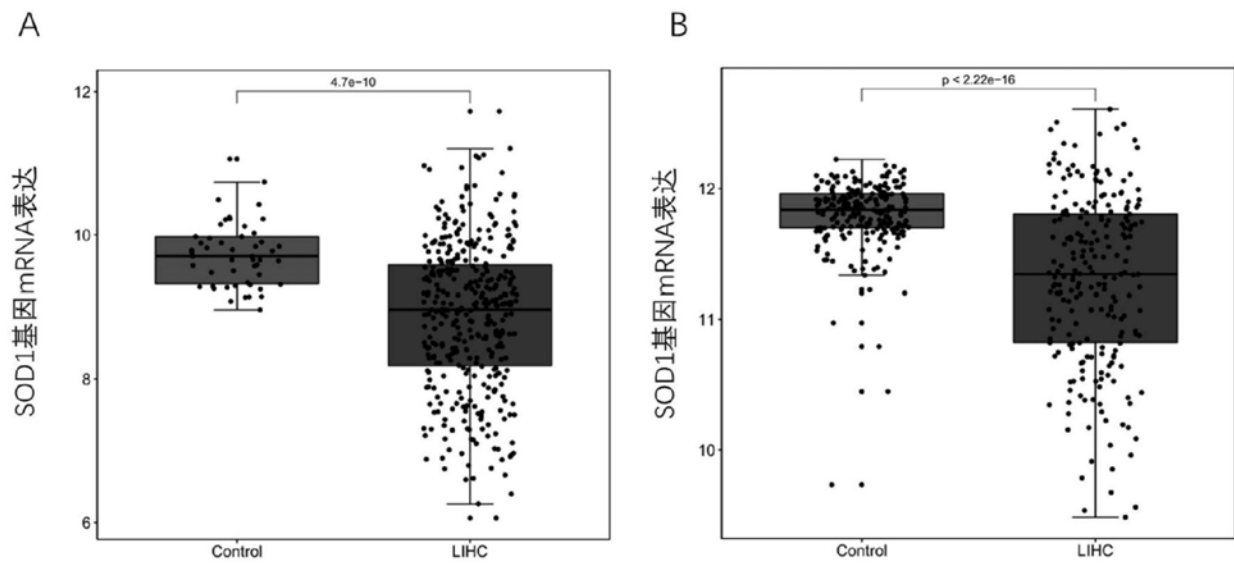


图3

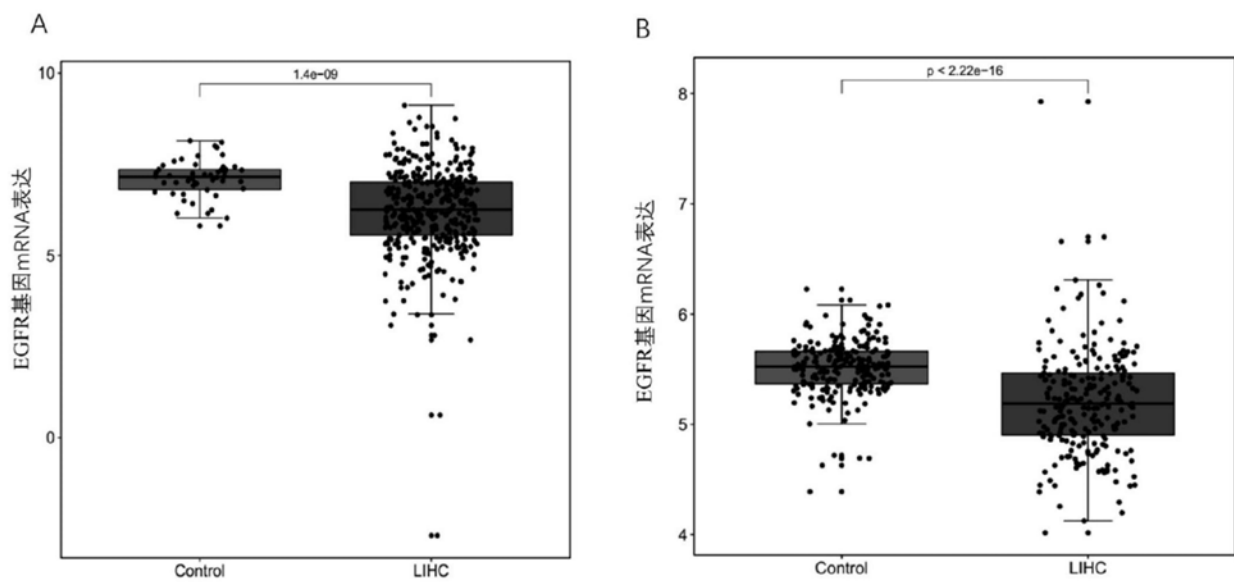


图4

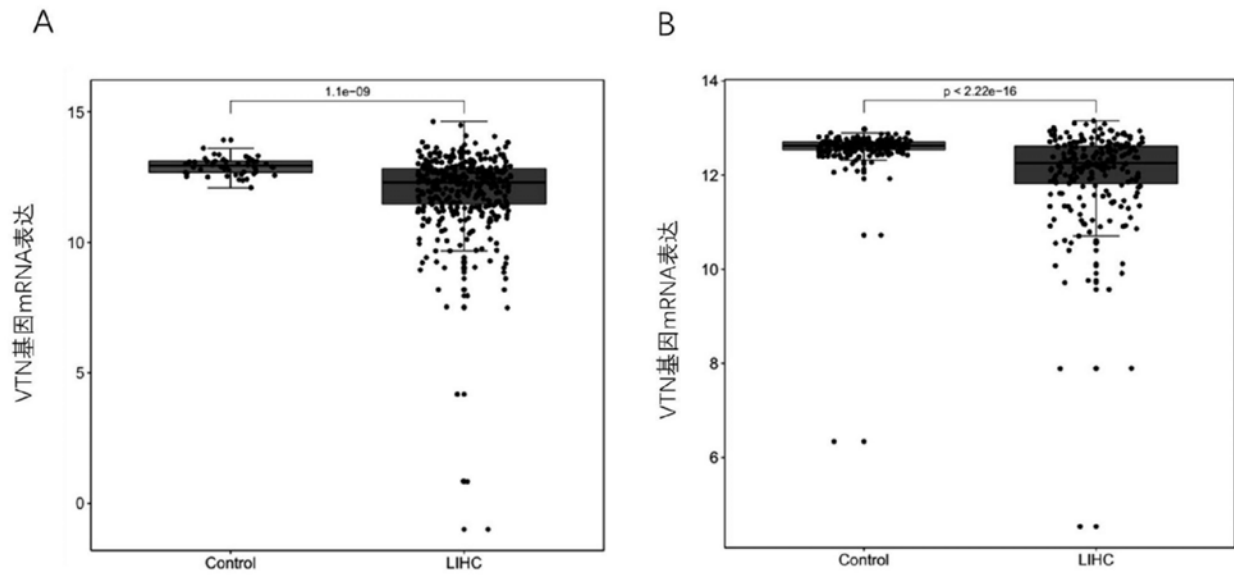


图5

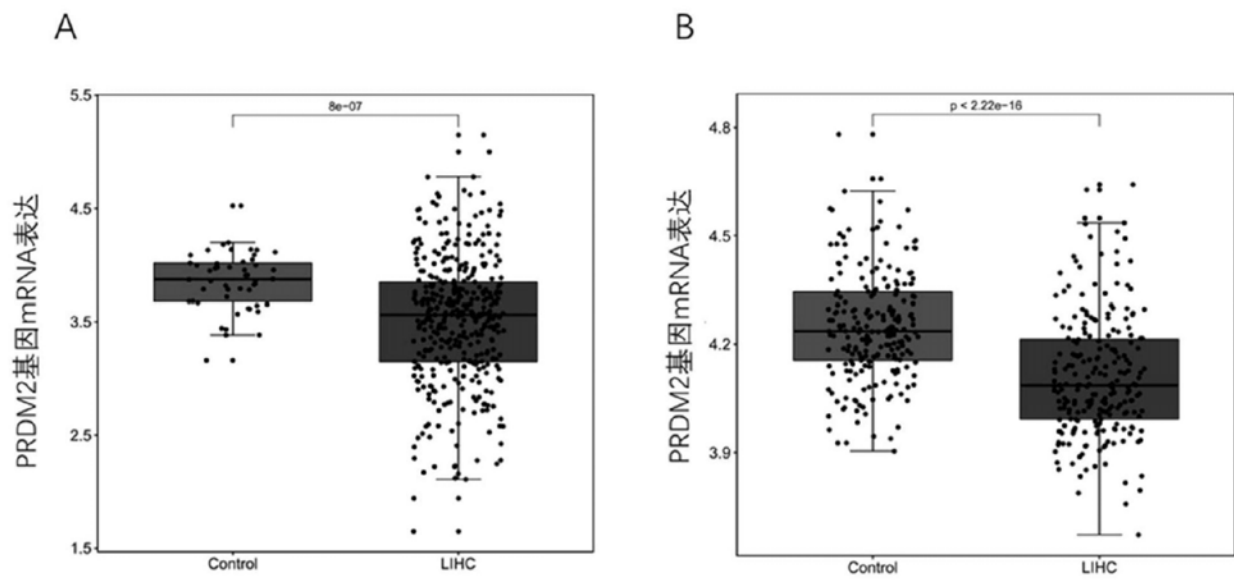


图6

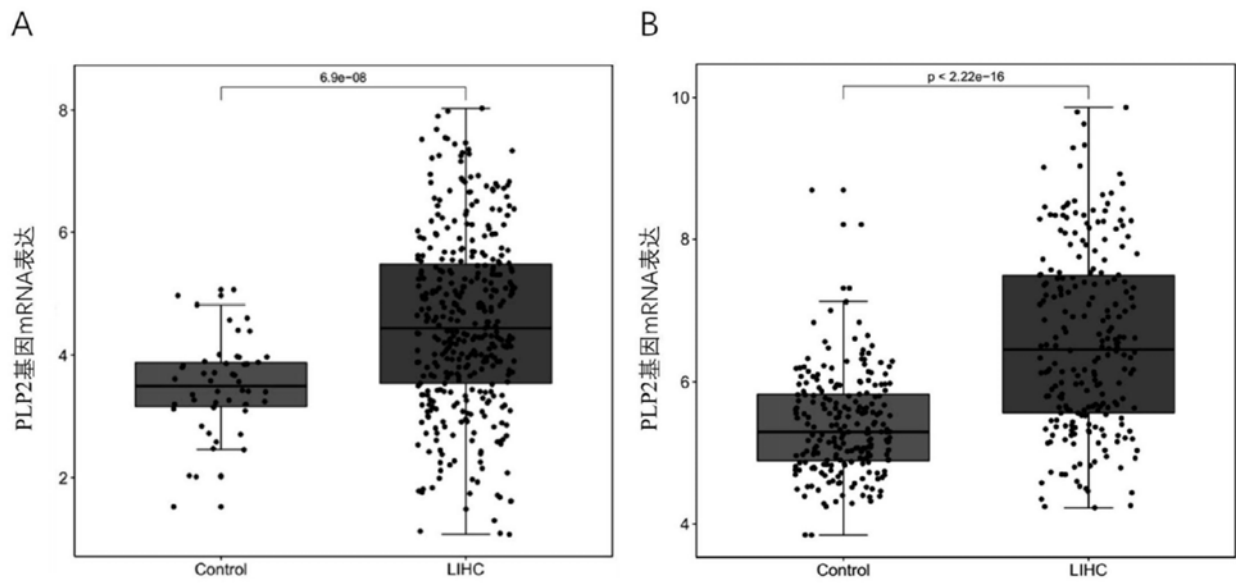


图7

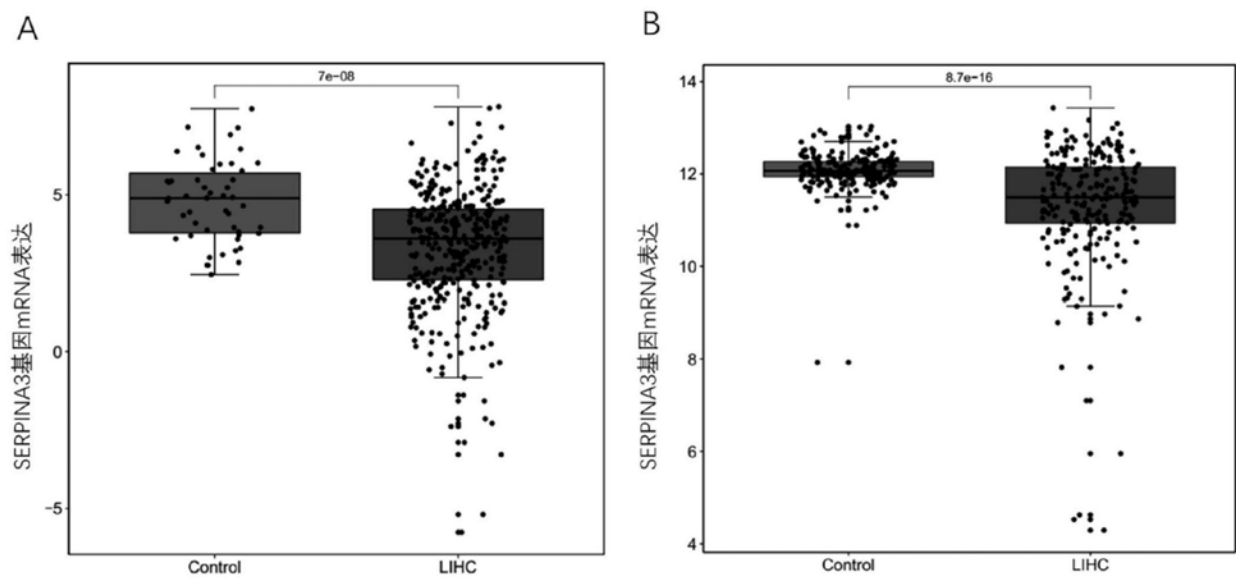


图8

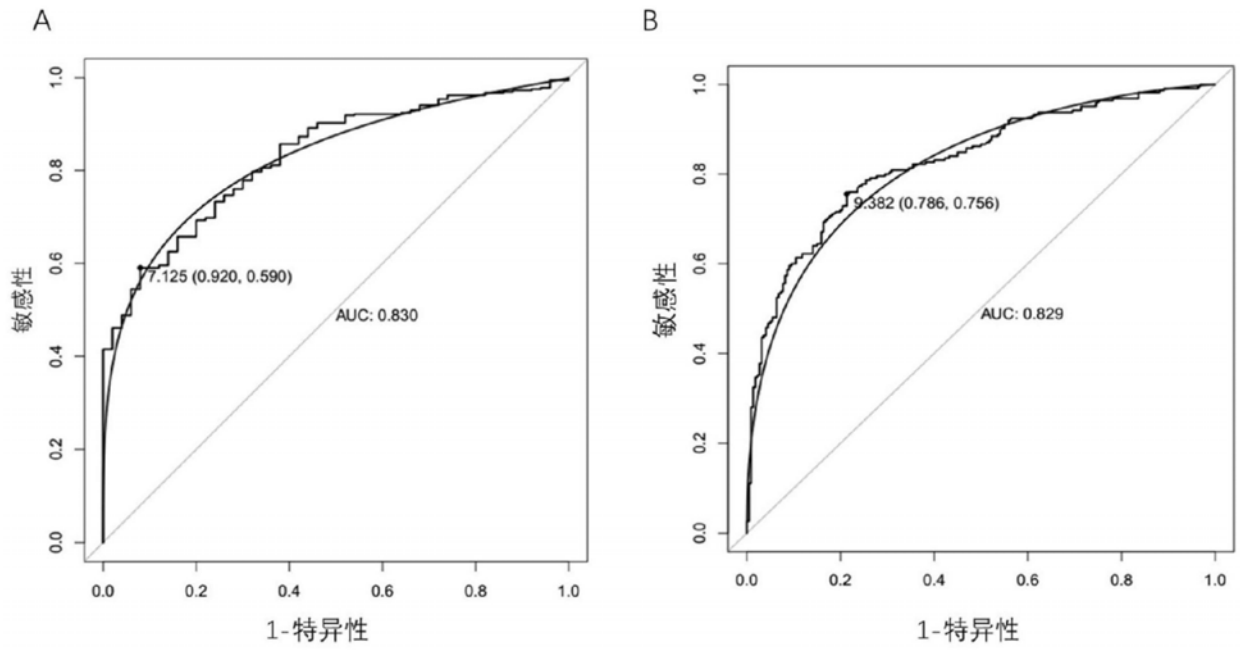


图9

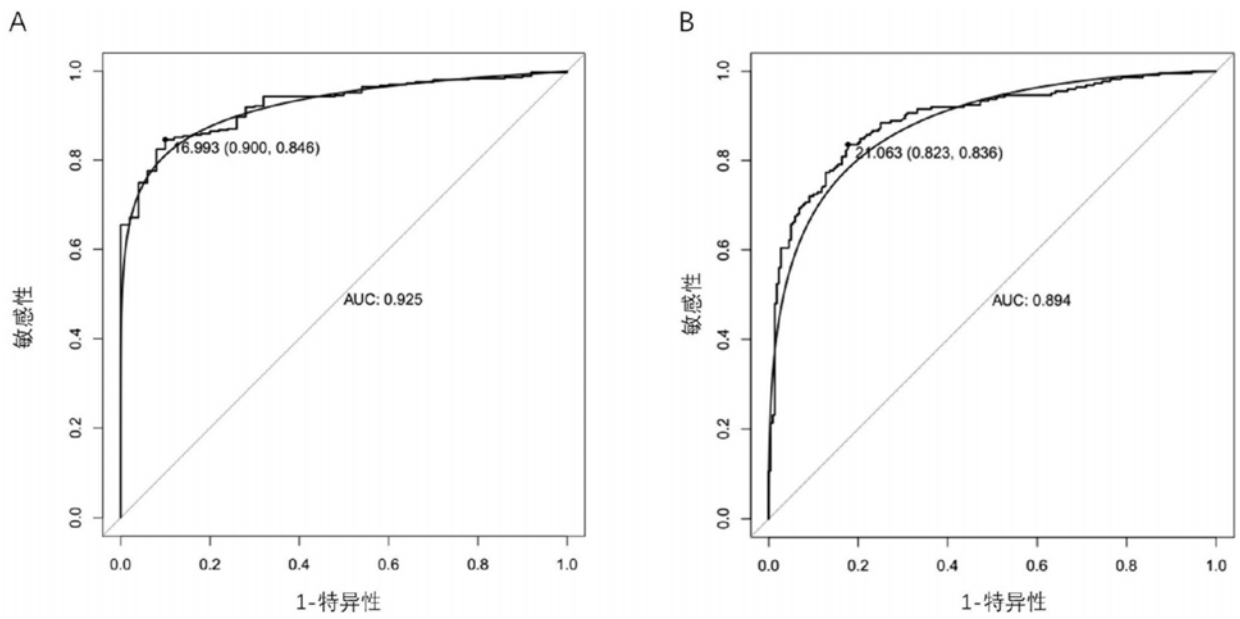


图10

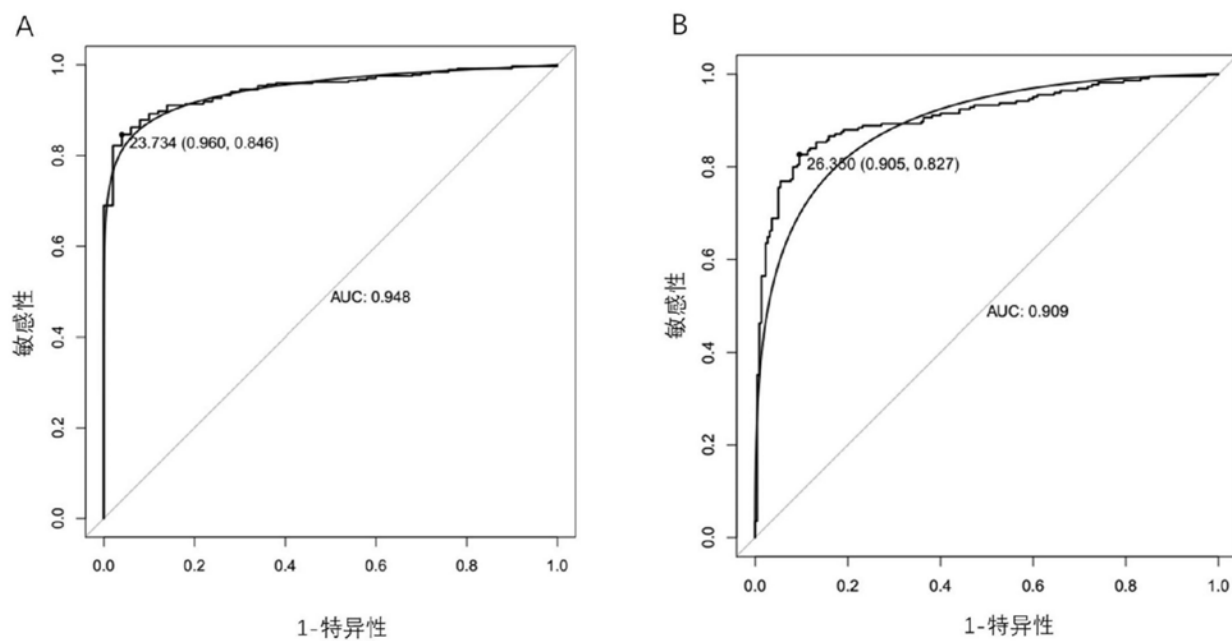


图11