

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2024 年 2 月 22 日 (22.02.2024)



(10) 国际公布号
WO 2024/036802 A1

(51) 国际专利分类号:

C12Q 1/6886 (2018.01) **C12N 15/11** (2006.01)

C12Q 1/6858 (2018.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/134024

(22) 国际申请日: 2022 年 11 月 24 日 (24.11.2022)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

202210978815.1 2022年8月16日 (16.08.2022) CN

(71) 申请人: 山东大学(SHANDONG UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国山东省济南市历城区山大南路 27 号, Shandong 250199 (CN)。

(72) 发明人: 王传新(WANG, Chuanxin); 中国山东省济南市历城区山大南路 27 号, Shandong 250199 (CN)。杜鲁涛(DU, Lutao); 中国山东省济南市历城区山大南路 27 号, Shandong 250199 (CN)。李培龙(LI, Peilong); 中国山东省济南市历城区山大南路 27 号, Shandong 250199 (CN)。李娟(LI, Juan); 中国山东省济南市历城区山大南路 27 号, Shandong 250199 (CN)。

(74) 代理人: 济南泉城专利商标事务所(JINAN QUANCHENG PATENT&TRADEMARK OFFICE); 中国山东省济南市历下区经十路 14717 号齐源大厦 A611, Shandong 250014 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ,

LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

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

根据细则 4.17 的声明:

- 关于发明人身份(细则 4.17(i))
- 关于申请人有权申请并被授予专利(细则 4.17(ii))
- 关于申请人有权要求在先申请的优先权(细则 4.17(iii))
- 发明人资格(细则 4.17(iv))

本国际公布:

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

(54) Title: MULTI-GENE METHYLATION KIT FOR EARLY DIAGNOSIS OF LUNG ADENOCARCINOMA

(54) 发明名称: 一种用于肺腺癌早期诊断的多基因甲基化试剂盒

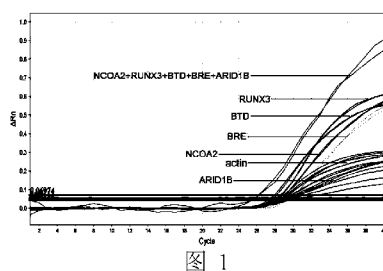


图 1

(57) Abstract: Disclosed is a multi-gene methylation kit for early diagnosis of lung adenocarcinoma. The kit comprises the following primers and probes: methylation-specific primers for NCOA2, RUNX3, BTD, BRE, and ARID1B gene target sites; methylation-specific Taqman probes for NCOA2, RUNX3, BTD, BRE, and ARID1B gene target sites; and a primer and a Taqman probe for a reference gene.

(57) 摘要: 公开了一种用于肺腺癌早期诊断的多基因甲基化试剂盒。试剂盒包括以下引物与探针: NCOA2、RUNX3、BTD、BRE、ARID1B 基因目的位点的甲基化特异性引物; NCOA2、RUNX3、BTD、BRE、ARID1B 基因目的位点的甲基化特异性 Taqman 探针; 内参基因引物、Taqman 探针。

WO 2024/036802 A1

一种用于肺腺癌早期诊断的多基因甲基化试剂盒

技术领域

本发明属于肿瘤分子生物学领域，具体涉及一种用于肺腺癌早期诊断的多基因甲基化试剂盒。

背景技术

肺癌是呼吸系统最常见的恶性肿瘤之一，是癌症相关死亡最主要的原因，严重危害人类健康。从病理学分型的角度来看，肺癌包括小细胞肺癌和非小细胞肺癌，其中非小细胞肺癌约占 85%。在非小细胞肺癌当中，肺腺癌约占 50%。腺癌是肺癌最常见的病理类型。尽管手术、放疗、化疗、靶向治疗等治疗技术有了一定的进步，肺腺癌的预后仍不乐观。其中，很重要的一个原因是肺腺癌的早期诊断存在一定的困难，相当多的患者在初诊时已经处于中晚期，预后较差。目前，低剂量螺旋 CT 是筛查早期肺腺癌常用的检查手段，但是它存在特性差的弊端，许多肺部良性病变可能会被误诊为肺癌。传统的血清肿瘤标志物（NSE、SCC、Cyfra 21-1、ProGRP、CEA 等）的灵敏度和特异性有限。因此，寻找一种新型非侵入性、特异性高的肺腺癌诊断标志物显得尤为重要。

DNA 甲基化作为表观遗传修饰的一种形式，在肿瘤的发生发展中扮演着重要的角色。DNA 甲基化是指在甲基转移酶的作用下，于胞嘧啶第五位碳原子上添加 S-腺苷甲硫氨酸提供的一个甲基，通常发生在 CpG 岛，对维持染色体的结构稳定、调控基因表达等有重要作用。一般地，高甲基化会抑制基因的表达，低甲基化会促进基因的表达。原癌基因的低甲基化和（或）抑癌基因的高甲基化会促进肿瘤的发生发展。已有研究证明，许多恶性肿瘤，如结直肠癌、胃癌、乳腺癌、胰腺癌等，存在 DNA 甲基化水平的异常改变，使用基因甲基化水平作为

恶性肿瘤诊断的生物标志物已成为一个新的研究方向。

NCOA2 属于 NCOA 家族中的一员,研究表明,NCOA 家族尤其是 NCOA2 和 NCOA3 参与正常的生物过程和致癌作用。例如, NCOA3 的激活促进了胰腺导管腺癌的肿瘤生长。NCOA2 介导的抗肿瘤靶基因共激活抑制 MYC 诱导的肝癌。NCOA2 的抑制严重减弱了前列腺癌的存活、生长和转移能力。在肺癌中, NCOA2 可被 PFKFB4 在 Ser487 位点磷酸化, NCOA2 的转录活性因此发生改变, 从而促进肺癌细胞增殖、迁移和侵袭。

RUNX 家族转录因子是发育的关键调节因子, 并且在癌症中常常失调。RUNX3 是 RUNX 家族中的一员, 被描述为肿瘤启动子或抑制子, 反映了它在肿瘤发生中的复杂作用。RUNX3 是 TGF- β 信号通路的下游效应分子, 在调节细胞死亡、血管生成、内皮间质转化、细胞迁移和侵袭等方面作用重大。Runx3 沉默通过 miR-148a-3p 调节 YBX1 表达, 通过增加 Cyclin D1、Cyclin B1、Slug-1、MMP-2 和 MMP-9 水平来促进非小细胞肺癌的进展。RUNX3 的表达被确定为胰腺导管腺癌细胞倾向于局部增殖或在全身播散的关键因素。RUNX3 的过表达促进了头颈癌细胞的生长并抑制了凋亡。此外, 有研究表明, RUNX3 在免疫和炎症中发挥重要作用, 因此 RUNX3 可能间接影响肿瘤的发生发展。

BTD (生物素酶) 基因位于染色体 3p25。迄今为止, 已报道了 BTD 的四个外显子中的三个中的 61 个突变和一个内含子基因中的 1 个突变, 这些突变导致了严重的 BTD 缺陷。BTD 是可以切割生物胞素的酶, 生物胞素是全羧化酶蛋白水解消化的产物。严重的 BTD 缺乏 (血清中的平均正常活性低于 10%) 是一种常染色体隐性遗传疾病, 病人不能切割生物胞素, 不能回收生物素。未经治疗的个体会继发性地缺乏生物素, 这反过来会导致生物素依赖性羧化酶的活性降低, 从而导致有毒代谢物的积累, 进而导致相应临床症状的出现。生物素酶缺乏症的特征主要是神经、皮肤表现和代谢异常。然而, BTD 基因在肿瘤中的

报道较少，值得进一步研究。

BRE，又称为 TNFRSF1A 调节剂和 BRCC45，是一种进化上高度保守的蛋白质。它是细胞质中的一种死亡受体相关蛋白，也是细胞核中含有 BRCA1/2 的 DNA 修复复合物的组成部分。研究发现 BRE 具有抗凋亡活性，BRE 的高表达可通过促进细胞周期进程和抗细胞凋亡来增强食管鳞癌细胞生长，BRE 的沉默抑制了食管鳞癌细胞的这些恶性表型。机制研究表明，BRE 过表达激活了 AKT 的磷酸化，并且 MK2206 对 AKT 通路的抑制降低了 BRE 诱导的食管鳞癌细胞生长和凋亡抗性。

ARID1B 位于 6q25.3，是典型的核肿瘤抑制因子。然而，细胞质定位的 ARID1B 可以结合 c-RAF (RAF1) 和 PPP1CA，从而刺激 RAF-ERK 信号传导和 β -连环蛋白 (CTNNB1) 转录活性。ARID1B 细胞质定位与 ERK1 和 ERK2 (也称为 MAPK3 和 MAPK1) 活性形式和 β -连环蛋白水平的增加，与晚期肿瘤分期和淋巴结阳性水平显著相关。在乳腺癌中，ARID1B 的高表达与浸润性乳腺癌的组织学分级和肿瘤大小密切相关。在侵袭性三阴性乳腺癌亚型中，ARID1B 的表达常常增加，并与五年无病生存率降低有关。与对照组相比，具有 ARID1B 活性降低的 MDA-MB-231 细胞在 G1 期到 S 期细胞周期过渡中表现出延迟，因此细胞增殖减少。髓母细胞瘤是一种常见的儿童恶性脑肿瘤，ARID1B 的表达下降导致髓母细胞瘤细胞的恶性潜能显著增加。在膀胱尿路上皮癌中，ARID1B 表达与肿瘤大小、TNM 分期、总生存期和无进展生存期显著相关。在 ARID1B 低表达患者中，辅助化疗的益处优于在 ARID1B 高表达患者中观察到的益处，表明 ARID1B 可能是高风险亚组中选择辅助化疗患者的预测标志物。在非小细胞肺癌中，7% 的非小细胞肺癌患者携带 ARID1A 突变，4% 的非小细胞肺癌患者携带 ARID1B 突变。ARID1A 和 ARID1B 的突变被证实与非小细胞肺癌患者对免疫检查点抑制剂的敏感性相关。携带这些突变的患者对治疗有更好的反应，并且无进展生存期延长。

外周血具有侵入性小、较易获得的优势。外周血单个核细胞包括单核细胞、淋巴细胞，可由试剂盒提取分离得到，简单方便，且成本较低。作为免疫系统的重要组成部分，外周血单个核细胞在肿瘤免疫中发挥着重要作用。已有研究表明，T 淋巴细胞、B 淋巴细胞的 DNA 甲基化水平异常改变与癌症发生有关。这为我们研究肺腺癌患者外周血单个核细胞的 DNA 甲基化水平提供了依据，为肺腺癌的早期诊断提供了新思路。

相比于单基因甲基化检测，多基因甲基化检测限更低，敏感性更高，尤其适用于肺腺癌的早期诊断。一种用于肺腺癌早期诊断的多基因甲基化试剂盒要成为一种诊断试剂，需要满足以下条件：第一，该标志物在外周血单个核细胞中的含量要足够、稳定存在、易被检测；第二，该标志物应具有较高的灵敏度和特异度，以便能够检出并辨别肿瘤细胞的甲基化状态和正常细胞的甲基化状态，并且还能区别其他肿瘤以及非肿瘤性疾病的甲基化状态。第三，该标志物的水平不受其他肿瘤、非肿瘤性疾病、运动、饮食、怀孕等影响。

发明内容

本发明针对传统肺腺癌早期诊断中存在的问题提出一种新型的用于肺腺癌早期诊断的多基因甲基化试剂盒。外周血单个核细胞来源的 NCOA2、RUNX3、BTD、BRE、ARID1B 基因甲基化水平标志物可作为肺腺癌患者的诊断标志物，这一检查方法容易被受检者接受，更可能成为肺腺癌患者的早期诊断的有效手段。

为了达到上述目的，本发明是采用下述的技术方案实现的：

一种用于肺腺癌早期诊断的多基因甲基化试剂盒，试剂盒包括以下六组引物与探针：NCOA2、RUNX3、BTD、BRE、ARID1B 基因目的位点的甲基化特异性引物；NCOA2、RUNX3、BTD、BRE、ARID1B 基因目的位点的甲基化特异性 TaqMan 探针；内参基因引物；内参基因 TaqMan 探

针。所述内参基因为 *actin*。

所述 *NCOA2* 基因目的位点的甲基化特异性引物和探针包括：

正向引物：TAAAAGTTATTGTCGGTGGTAGAAGA，

反向引物：ATTTTACTAAATAATAATCTTCTTTCTCCG；

探针：TCCTCTTCTTTCATTATCATATTTACTCATTTCTTTC。

所述 *RUNX3* 基因目的位点的甲基化特异性引物和探针包括：

正向引物：GGGGTTTATAGTTAGTTTGGGTTC，

反向引物：AAATAACAACCTCTAAACCTAAACTAAACG；

探针：ACCCTAACATCTATTATAAAATCCCGATACATCTAT。

所述 *BTD* 基因目的位点的甲基化特异性引物和探针包括：

正向引物：TATATTTTTTTTTTAATAAATTTTTTAGTATGCG，

反向引物：AAAAAACCCCAAACCACTACTTTAT；

探针：AACTAACATTTATTTTTATTTTAACTTAAACCAATCG。

所述 *BRE* 基因目的位点的甲基化特异性引物和探针包括：

正向引物：GTTTTATTTAATAAGTTTTTTAGAAGTTTTTCG，

反向引物：AACATACCCTCAACTCACTATTCTCAA；

探针：AACGAAAACGAAAATTATAACAAAAATATCAACC。

所述 *ARID1B* 基因目的位点的甲基化特异性引物和探针包括：

正向引物：TTTGTTAGGTAGTGCGGTGTTTG，

反向引物：AATACTAATTCTAACACTCCCTAACAACG；

探针：ACCTCTCTAAACTATAATTCTATCATCTATAAAATAACTACG。

所述内参基因的引物和探针包括：

正向引物：TGGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGT，

反向引物：AACCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAAA；

探针：ACCACCACCCAACACACAATAACAAACACA。

所述试剂盒中，还包括：KAPA PROBE FAST qPCR Master Mix(2

×); KAPA PROBE FAST ROX Low(50×); ddH₂O。

所述试剂盒中, PCR 扩增反应的体系组成为: KAPA PROBE FAST qPCR Master Mix(2×): 5 μl; KAPA PROBE FAST ROX Low(50×): 0.2 μl; NCOA2 正向引物(F): 0.25 μl; NCOA2 反向引物(R): 0.25 μl; NCOA2 探针: 0.1 μl; RUNX3 正向引物(F): 0.25 μl; RUNX3 反向引物(R): 0.25 μl; RUNX3 探针: 0.1 μl; BTD 正向引物(F): 0.25 μl; BTD 反向引物(R): 0.25 μl; BTD 探针: 0.1 μl; BRE 正向引物(F): 0.25 μl; BRE 反向引物(R): 0.25 μl; BRE 探针: 0.1 μl; ARID1B 正向引物(F): 0.25 μl; ARID1B 反向引物(R): 0.25 μl; ARID1B 探针: 0.1 μl; actin 正向引物(F): 0.06 μl; actin 反向引物(R): 0.06 μl; actin 探针: 0.05 μl; DNA: 1 μl; ddH₂O: 0.63 μl。

本发明基于 NCOA2、RUNX3、BTD、BRE、ARID1B 基因甲基化联合检测, 通过 NCOA2、RUNX3、BTD、BRE、ARID1B 基因与内参基因 PCR 扩增结果的计算, 来对检测结果给出判定, 提高了检测结果的敏感性和稳定性。NCOA2、RUNX3、BTD、BRE、ARID1B 基因与内参基因的 PCR 扩增结果是指 Ct 值, 即 NCOA2、RUNX3、BTD、BRE、ARID1B 基因与内参基因的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环次数。通过 NCOA2、RUNX3、BTD、BRE、ARID1B 基因与内参基因 PCR 扩增结果的计算来对检测结果给出判定的标准为: ΔCt 值(NCOA2、RUNX3、BTD、BRE、ARID1B 基因 Ct 值-内参基因 Ct 值) ≤ -1.236 , 判定结果: 甲基化阳性; ΔCt 值(NCOA2、RUNX3、BTD、BRE、ARID1B 基因 Ct 值-内参基因 Ct 值) > -1.236 , 判定结果: 甲基化阴性。若 actin Ct 值 > 32 或无扩增, 所有结果均无效, 需重新检测。

与现有技术相比, 本发明的优点和积极效果在于:

1. 本发明基于多基因甲基化联合检测, 敏感性高, 大大提高了

早期肺腺癌的检出率。采用 qPCR 方法，操作简便，且结果判读较简单。

2. 本发明只需抽取患者 2-3ml 血液，创伤性小、患者依从性好、操作相对简便，适合临床大规模应用。

3. 本发明从肿瘤免疫的角度出发，取材自人外周血单个核细胞，检测结果更为准确。

附图说明

图 1 为内参基因甲基化 qPCR 扩增曲线，NCOA2、RUNX3、BTD、BRE、ARID1B 单个基因甲基化 qPCR 扩增曲线，以及多基因甲基化 qPCR 扩增曲线对比图。

图 2 为样本检测结果的散点图。

图 3 为样本检测结果的 ROC 曲线。

具体实施方式

为了能够更清楚地理解本发明的上述目的、特征和优点，下面结合具体实施例对本发明做进一步说明。需要说明的是，在不冲突的情况下，本申请的实施例及实施例中的特征可以相互组合。

在下面的描述中阐述了很多具体细节以便于充分理解本发明，但是，本发明还可以采用不同于在此描述的其他方式来实施，因此，本发明并不限于下面公开说明书的具体实施例的限制。

实施例 1

目的基因的筛选与验证

1. 目的基因的筛选

1.1 研究对象

本实施例中，外周血标本共来自经受试者同意的 35 例肺腺癌患者和 30 例健康体检者。所有外周血标本来自山东大学第二医院和山东大学齐鲁医院。35 例肺腺癌患者均为首次入院接受治疗的患者，且入院

前未曾接受手术、放疗、化疗、免疫治疗等任何相关治疗，其病理类型均经术后病理检查确认。所有外周血标本均在患者首次入院且未接受任何治疗前取得。30 例健康体检者均无恶性肿瘤病史、自身免疫病以及心、肝、肾等其他重大疾病。

1.2 标本采集

每位研究对象采集外周血一次(2-3ml/管)后，轻轻颠倒混匀 5-10 次，立即提取单个核细胞。

1.3 外周血单个核细胞的分离

将外周血进行如下处理获得单个核细胞：在 15ml 离心管加 3ml 人淋巴细胞分离液，然后将外周血轻轻转移到分离液上面，随后 400g 离心 30min；另取 15ml 离心管 1 支，加入 10ml PBS，从离心 30min 结束后离心管中吸取中间白膜层，转移至 PBS 中，250g 离心 10min；离心结束后，弃上清，加入 5ml PBS，250g 离心 10min；弃上清，沉淀即为外周血单个核细胞，放-80℃待用。

1.4 外周血单个核细胞 DNA 的提取

(1) 取外周血单个核细胞，10000rpm($\sim 11200 \times g$)离心 1min，倒尽上清，加 200 μ l 缓冲液 GA，振荡至彻底悬浮。

(2) 加入 20 μ l Proteinase K 溶液，混匀。

(3) 加入 200 μ l 缓冲液 GB，充分颠倒混匀，70℃放置 10min，溶液应变清亮，简短离心以除去管盖内壁的水珠。

(4) 加入 200 μ l 无水乙醇，充分振荡混匀 15sec，此时可能会出现絮状沉淀，简短离心以除去管盖内壁的水珠。

(5) 将上一步所得溶液和絮状沉淀都加入一个吸附柱 CB3 中(吸附柱 CB3 放入收集管中)，12000rpm($\sim 13400 \times g$)离心 30sec，倒掉废液，将吸附柱 CB3 放回收集管中。

(6) 向吸附柱 CB3 中加入 500 μ l 缓冲液 GD(使用前请先检查是

否已加入无水乙醇)，12000 rpm ($\sim 13400 \times g$) 离心 30sec，倒掉废液，将吸附柱 CB3 放回收集管中。

(7) 向吸附柱 CB3 中加入 600 μ l 漂洗液 PW (使用前请先检查是否已加入无水乙醇)，12000 rpm ($\sim 13400 \times g$) 离心 30sec，倒掉废液，将吸附柱 CB3 放回收集管中。

(8) 重复操作步骤 (7)。

(9) 将吸附柱 CB3 放回收集管中，12000rpm ($\sim 13400 \times g$) 离心 2min，倒掉废液。将吸附柱 CB3 置于室温放置数分钟，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

(10) 将吸附柱 CB3 转入一个干净的 1.5 ml 离心管中，向吸附膜中间部位悬空滴加 50-200 μ l 洗脱缓冲液 TB，室温放置 2-5min，12000rpm ($\sim 13400 \times g$) 离心 2min，将溶液收集到离心管中。

1.5 外周血单个核细胞 DNA 的修饰

(1) CT Conversion Reagent 简短离心 (3000r $\times$ 5min)，避光开盖，加 900ul 双蒸水、300ul M-Dilution Buffer、50ul M-Dissolving Buffer，颠倒混匀，室温震荡 10min (震荡时包上锡纸，避光)，完全溶解。(震荡时准备 PCR 管)。

(2) 20ul DNA 样本加入 PCR 管中 (依据 DNA 浓度计算 DNA 的量，1000/DNA 浓度，若 ≥ 20 ，取 20，若为 3.1，加 4，最少 2ul (即向上进 1)，一共 20ul，不够的用双蒸水补齐)，在各 PCR 管中再加 130ul 完全溶解的 CT Conversion Reagent。

(3) 将 PCR 管中液体漩涡混匀，简短离心后加入 PCR 仪中，设置程序：98 $^{\circ}$ C，10min，64 $^{\circ}$ C，2.5h，4 $^{\circ}$ C，hold。

(4) 将收集管套入 Zymo-spin[™] Ic Column，加入 600ul M-Binding Buffer。

(5) 将 PCR 内液体加入 (约 150ul) 含有 600ul M-Binding Buffer

的 Zymo-spin[™] Ic Column 中，关盖，颠倒混匀 1min（用手来回摇晃就行）。

（6）匀速离心（13400r/min）30s，弃废液。

（7）向 Colum 中加入 100ul M-wash Buffer，匀速离心 30s，弃废液。

（8）向 Colum 中加入 200ul M-Desulphonation Buffer，室温放置 15-20min，匀速离心 30s，弃废液。

（9）向 Colum 中加入 200ul M-wash Buffer，匀速离心 30s，弃废液。

（10）重复步骤 9。

（11）将吸附栓置于 1.5ml EP 管中，加入 20ul M-Elution Buffer 到核区（柱底部），全速离心 30s，洗脱修饰后的 DNA（只取清液）。

（12）将 1.5ml EP 管做标记，放入-20° C 备用。

1.6 Illumina Infinium Methylation EPIC BeadChip 测试

（1）采用 Illumina Infinium Methylation EPIC BeadChip 对 35 例肺腺癌患者和 30 例健康体检者外周血单个核细胞 DNA 甲基化水平进行检测，测序数据主要用 R 语言中的 ChAMP 包进行分析。

（2）用 β 值表示 DNA 甲基化水平，经过探针过滤、矩阵归一化、校正批次效应后，采用 Benjamini-Hochberg 法计算 adj. p 值。

（3）将 $|\Delta \beta| > 0.06$ 且 adj. p 值 < 0.05 的 CpG 定义为差异甲基化位点，通过比较肺腺癌与健康对照组甲基化水平，我们初步筛选了 1415 个差异甲基化位点，其中包括 1178 个高甲基化位点和 237 个低甲基化位点。进一步，我们将筛选条件调整为 $|\Delta \beta| > 0.08$ 且 adj. p 值 $< 1.0E-05$ 。结果显示，共有 29 个差异甲基化位点，其中包括 26 个高甲基化位点和 3 个低甲基化位点。最后，我们综合考虑基因与位点的位置关系、引物设计因素等，选出 5 个高甲基化位点用于后

续验证，这 5 个高甲基化位点对应的基因分别为 NCOA2、RUNX3、BTD、BRE、ARID1B。

2. 目的基因的验证

外周血标本共来自经受试者同意的 35 例肺腺癌患者和 50 例健康体检者。所有外周血标本来自山东大学第二医院和山东大学齐鲁医院。其入组标准、标本采集、外周血单个核细胞的分离、外周血单个核细胞 DNA 的提取、外周血单个核细胞 DNA 的修饰，均同目的基因的筛选阶段。

将筛选出的 5 个高甲基化位点进行焦磷酸测序分析。

2.1 引物设计：使用 PyroMark Assay Design 2.0 进行引物设计，引物序列信息，如下表 1 所示。

表 1 引物序列

基因名称	引物名称	序列 (5' to 3')	5' 修饰
NCOA2	正向引物	AAGTTATTCTAGGTGGTAGAAGAATAGA	
	反向引物	ACTTATTTCAATTATTTCCCTCACTAT	5'-Biotin
	测序引物	AATGAAACAAGACGATAAAATT	
RUNX3	正向引物	AATATTTATATGTTTTGGGTGTTATTGAT	5'-Biotin
	反向引物	CCACATCTTCCTCTAACAATCTCTC	
	测序引物	CTCTAACAATCTCTCAATATAC	
BTD	正向引物	TTATTTTTTTGGGTTTGTAGATAGTAGTTT	
	反向引物	AACTCCACAATAAATATTAAAAACCC	5'-Biotin
	测序引物	GGGTTTGGGGTTGGA	
BRE	正向引物	AGGTCTTAATTATTATGTAGTATGGGTGTA	
	正向引物	AAACCCTACTCAAAACAATCTCATCTAA	5'-Biotin
	测序引物	ACTATGGGTCTAAAGATATT	
ARID1B	正向引物	TAGGTTTTAGTATTTGGGTGTGAATAT	
	反向引物	CCACAATTCAAAAAAATTAAACCACTTAT	5'-Biotin
	测序引物	ATTGGTTTTGATATTTTITAGTAG	

2.2PCR 扩增：PCR 扩增体系（50 μ L），如表 2 所示。

表 2 PCR 扩增体系

试剂	体积 (μL)
H ₂ O	34.8
5 $\times$ buffer GC (KAPA)	10
dNTP (10mM/each)	1
Primer (up50pM/ μL)	1
Primer (down50pM/ μL)	1
Template	2
Taq (5U/ μL)	0.2

PCR 扩增程序如下：

95 $^{\circ}\text{C}$	3min	
94 $^{\circ}\text{C}$	30sec	
55 $^{\circ}\text{C}$	30sec	} 40 cycles
72 $^{\circ}\text{C}$	1min	
72 $^{\circ}\text{C}$	7min	
4 $^{\circ}\text{C}$	∞	

2.3 Pyrosequencing 检测

在 96 孔 PCR 反应板中加入反应结合珠 2 μL ，结合缓冲液 38 μL ，PCR 产物 40 μL ，室温下充分混匀 10min。开启真空泵吸取结合珠及 PCR 产物混悬液，依次浸入 70%乙醇，0.2M NaOH 和冲洗缓冲液中各 5s。关闭真空泵，将探头上的结合珠及 PCR 产物置于 40 μL 退火缓冲液（含测序引物 1.5 μL ）中，85 $^{\circ}\text{C}$ 变性 2 min，冷却至室温，使引物与模板退火杂交。根据 Pyrosequencing 软件序列设计信息，计算出剂量，在试剂舱中依次加入底物混合物、酶混合物及四种 dNTP（QIAGEN）。将试剂舱及 96 孔反应板放入 Pyrosequencing 检测仪（PyroMark Q96 ID，QIAGEN）中进行反应。

2.4 数据分析

分析焦磷酸测序数据，5 个高甲基化位点得到了验证，可用于肺腺癌的早期诊断。这 5 个高甲基化位点对应的基因分别为 NCOA2、RUNX3、BTD、BRE、ARID1B。

综上，本发明经过上述筛选与验证，最终确定了用于肺腺癌早期

诊断的 5 个甲基化基因：NCOA2、RUNX3、BTD、BRE、ARID1B，为肺腺癌的早期诊断提供了一种新型检测方法。

实施例 2

用于肺腺癌早期诊断的多基因甲基化试剂盒，其中试剂盒包括：KAPA PROBE FAST qPCR Master Mix(2×)；KAPA PROBE FAST ROX Low(50×)；ddH₂O；NCOA2、RUNX3、BTD、BRE、ARID1B 基因目的位点的甲基化特异性引物；NCOA2、RUNX3、BTD、BRE、ARID1B 基因目的位点的甲基化特异性 TaqMan 探针；内参基因引物；内参基因 TaqMan 探针。所述内参基因为 actin。NCOA2 基因目的位点为位于 5' UTR 的一个甲基化修饰的位点，RUNX3 基因目的位点为位于 Body 的一个甲基化修饰的位点，BTD 基因目的位点为位于 3' UTR 的一个甲基化修饰的位点，BRE 基因目的位点为位于 Body 的一个甲基化修饰的位点，ARID1B 基因目的位点为位于 Body 的一个甲基化修饰的位点。

该试剂盒的优势在于在一个 PCR 反应孔中，对上述 5 个基因同时进行联合检测，提高了检测的灵敏度，尤其适用于肺腺癌的早期检测。

所述 NCOA2 基因目的位点的甲基化特异性引物和探针包括：

正向引物：TAAAAGTTATTGTCGGTGGTAGAAGA，

反向引物：ATTTTACTAAATAATAATCTTCTTTCTCCG；

探针：TCCTCTTCTTTCATTATCATATTTACTCATTTCTTTC。

所述 RUNX3 基因目的位点的甲基化特异性引物和探针包括：

正向引物：GGGGTTTATAGTTAGTTTGGGTTC，

反向引物：AAATAACAACCTCTAAACCTAAACTAAACG；

探针：ACCCTAACATCTATTATAAAATCCCGATACATCTAT。

所述 BTD 基因目的位点的甲基化特异性引物和探针包括：

正向引物：TATATTTTTTTTTTAATAAATTTTTTAGTATGCG，

反向引物：AAAAAACCCTAAACCACTACTTTAT；

探针：AACTAACATTTATTTTTATTTTAACTTAAAACCAATCG。

所述 BRE 基因目的位点的甲基化特异性引物和探针包括：

正向引物：GTTTTATTTAATAAGTTTTTTAGAAAGTTTTTCG，

反向引物：AACATACCCTCAACTCACTATTCTCAA；

探针：AACGAAAACGAAAATTATAACAAAAATATCAACC。

所述 ARID1B 基因目的位点的甲基化特异性引物和探针包括：

正向引物：TTTGTTAGGTAGTGCGGTGTTTG，

反向引物：AATACTAATTCTAACACTCCCTAACAACG；

探针：ACCTCTCTAACTATAATTCTATCATCTATAAAATAACTACG。

所述内参基因的引物和探针包括：

正向引物：TGGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGT，

反向引物：AACCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAAA；

探针：ACCACCACCCAACACACAATAACAAACACA。

（1）仪器、试剂、引物：

仪器：NANNODROP 2000、ABI QuantstudioDX、离心机、水浴锅、旋涡震荡仪、冰箱。

试剂：Histopaque-1077 人淋巴细胞分离液(SIGMA)、DNA 提取试剂盒(TIANGEN)、EZ DNA Methylation-Gold Kit(Zymo)、KAPA PROBE FAST qPCR Master Mix(2×)；KAPA PROBE FAST ROX Low(50×)、ddH₂O。

引物：所有引物纯度应达到电泳级(PAGE)或 HPLC 级，不含杂带。提供合成机构出具的合成产物的质检证明，如 PAGE 电泳结果或 HPLC 分析图谱，证明使用 PAGE 或者 HPLC 纯化后应有明显单峰 PAGE 或 HPLC 分析图谱，浓度为 10ng/μl 备用。

（2）研究对象

外周血标本共来自经受试者同意的 84 例肺腺癌患者和 84 例健康体检者。所有外周血标本来自山东大学第二医院和山东大学齐鲁医院。

入组标准同目的基因筛选阶段。

(3) 标本采集

同实施例 1 目的基因筛选阶段。

(4) 外周血单个核细胞的分离

同实施例 1 目的基因筛选阶段。

(5) 外周血单个核细胞 DNA 的提取

同实施例 1 目的基因筛选阶段。

(6) 外周血单个核细胞 DNA 的修饰

同实施例 1 目的基因筛选阶段。

(7) 多基因甲基化联合检测方法的建立

基于 qPCR 方法，在一个反应孔中，同时定量检测多个基因的甲基化水平。因此，本实施例设计一种带有两种不同荧光团探针的多重甲基化 PCR 检测方法。FAM 荧光团用于标记 5 个甲基化基因，VIC 荧光团用于标记内参基因，该方法定量检测 5 个基因的总甲基化水平。

(8) qPCR 反应的体系和条件

所述 qPCR 扩增反应的体系组成为：KAPA PROBE FAST qPCR Master Mix(2×)：5 μl；KAPA PROBE FAST ROX Low(50×)：0.2 μl；NCOA2 正向引物 (F)：0.25 μl；NCOA2 反向引物 (R)：0.25 μl；NCOA2 探针：0.1 μl；RUNX3 正向引物 (F)：0.25 μl；RUNX3 反向引物 (R)：0.25 μl；RUNX3 探针：0.1 μl；BTD 正向引物 (F)：0.25 μl；BTD 反向引物 (R)：0.25 μl；BTD 探针：0.1 μl；BRE 正向引物 (F)：0.25 μl；BRE 反向引物 (R)：0.25 μl；BRE 探针：0.1 μl；ARID1B 正向引物 (F)：0.25 μl；ARID1B 反向引物 (R)：0.25 μl；ARID1B 探针：0.1 μl；actin 正向引物 (F)：0.06 μl；actin 反向引物 (R)：0.06 μl；actin 探针：0.05 μl；DNA：1 μl；ddH₂O：0.63 μl。

所述检测基因为 NCOA2 甲基化基因、RUNX3 甲基化基因、BTD 甲基

化基因、BRE 甲基化基因、ARID1B 甲基化基因,所述内参基因为 actin。所述 NCOA2、RUNX3、BTD、BRE、ARID1B 基因的探针 5' 端报告荧光基团为 FAM, NCOA2、RUNX3、BTD、BRE、ARID1B 基因的探针 3' 端猝灭基团为 BHQ1, 内参基因的探针 5' 端报告荧光基团为 VIC, 内参基因的探针 3' 端猝灭基团为 BHQ1。

按照步骤 (8) 在 qPCR 管中配制下混合液, 然后按照下述条件进行 PCR 反应: 预变性 Reps: 1, 95℃, 3min; 循环反应: Reps: 40, 95℃, 3sec; 58℃, 30sec。

(9)PCR 反应的加样布局(见表 3, 表 4)

将待测样品于 PCR 仪 96 孔板中加样, 布局见下表。表中 NC 代表健康人样本, LUAD 代表肺腺癌患者样本。

表 3 PCR 反应的加样布局

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	健康 1	健康 9	健康 17	健康 25	健康 33	健康 41	健康 49	健康 57	健康 65	健康 73	健康 81	
B	健康 2	健康 10	健康 18	健康 26	健康 34	健康 42	健康 50	健康 58	健康 66	健康 74	健康 82	
C	健康 3	健康 11	健康 19	健康 27	健康 35	健康 43	健康 51	健康 59	健康 67	健康 75	健康 83	
D	健康 4	健康 12	健康 20	健康 28	健康 36	健康 44	健康 52	健康 60	健康 68	健康 76	健康 84	
E	健康 5	健康 13	健康 21	健康 29	健康 37	健康 45	健康 53	健康 61	健康 69	健康 77		
F	健康 6	健康 14	健康 22	健康 30	健康 38	健康 46	健康 54	健康 62	健康 70	健康 78		
G	健康 7	健康 15	健康 23	健康 31	健康 39	健康 47	健康 55	健康 63	健康 71	健康 79		
H	健康 8	健康 16	健康 24	健康 32	健康 40	健康 48	健康 56	健康 64	健康 72	健康 80		

表 4 PCR 反应的加样布局

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	肺腺 癌 1	肺腺 癌 9	肺腺 癌 17	肺腺 癌 25	肺腺 癌 33	肺腺 癌 41	肺腺 癌 49	肺腺 癌 57	肺腺 癌 65	肺腺 癌 73	肺腺 癌 81	
B	肺腺 癌 2	肺腺 癌 10	肺腺 癌 18	肺腺 癌 26	肺腺 癌 34	肺腺 癌 42	肺腺 癌 50	肺腺 癌 58	肺腺 癌 66	肺腺 癌 74	肺腺 癌 82	
C	肺腺 癌 3	肺腺 癌 11	肺腺 癌 19	肺腺 癌 27	肺腺 癌 35	肺腺 癌 43	肺腺 癌 51	肺腺 癌 59	肺腺 癌 67	肺腺 癌 75	肺腺 癌 83	
D	肺腺 癌 4	肺腺 癌 12	肺腺 癌 20	肺腺 癌 28	肺腺 癌 36	肺腺 癌 44	肺腺 癌 52	肺腺 癌 60	肺腺 癌 68	肺腺 癌 76	肺腺 癌 84	
E	肺腺 癌 5	肺腺 癌 13	肺腺 癌 21	肺腺 癌 29	肺腺 癌 37	肺腺 癌 45	肺腺 癌 53	肺腺 癌 61	肺腺 癌 69	肺腺 癌 77		
F	肺腺 癌 6	肺腺 癌 14	肺腺 癌 22	肺腺 癌 30	肺腺 癌 38	肺腺 癌 46	肺腺 癌 54	肺腺 癌 62	肺腺 癌 70	肺腺 癌 78		
G	肺腺 癌 7	肺腺 癌 15	肺腺 癌 23	肺腺 癌 31	肺腺 癌 39	肺腺 癌 47	肺腺 癌 55	肺腺 癌 63	肺腺 癌 71	肺腺 癌 79		
H	肺腺 癌 8	肺腺 癌 16	肺腺 癌 24	肺腺 癌 32	肺腺 癌 40	肺腺 癌 48	肺腺 癌 56	肺腺 癌 64	肺腺 癌 72	肺腺 癌 80		

（10）检测结果以及结果分析

样本的内参基因 *actin* 均应有扩增信号, *actin* Ct 值 ≤ 32 , 且呈 S 型扩增曲线, 满足以上条件时, 证明实验有效, 可继续分析。否则, 建议重新检测。

图 1 为内参基因甲基化 qPCR 扩增曲线, *NCOA2*、*RUNX3*、*BTD*、*BRE*、*ARID1B* 单个基因甲基化 qPCR 扩增曲线, 以及多基因甲基化 qPCR 扩增曲线对比图。其中, 横坐标表示 qPCR 扩增达到阈值所需的循环次数, 纵坐标表示校正荧光强度的对数值。可以看出, 多基因甲基化 qPCR 扩增效果是多个单基因甲基化 qPCR 扩增效果的叠加。

图 2: 依据样本检测结果, 绘制散点图。其中, 横坐标表示样本类型, 纵坐标表示 qPCR 扩增达到阈值时, 多基因的循环次数与内参基因循环次数的差值。可以看出, 肺腺癌患者与健康对照者的多基因甲基化差异明显 ($P < 0.0001$)。

图 3: 依据样本检测结果, 绘制 ROC 曲线。诊断临界值为 -1.236, $AUC = 0.893$, 敏感性为 88.1%, 特异性为 82.1%。

以上所述, 仅是本发明的较佳实施例而已, 并非是对本发明作其它形式的限制, 任何熟悉本专业的技术人员可能利用上述揭示的技术内容加以变更或改型为等同变化的等效实施例应用于其它领域, 但是凡是未脱离本发明技术方案内容, 依据本发明的技术实质对以上实施例所作的任何简单修改、等同变化与改型, 仍属于本发明技术方案的保护范围。

权 利 要 求 书

1. 外周血单个核细胞中的 NCOA2、RUNX3、BTD、BRE、ARID1B 基因甲基化水平标志物肺腺癌早期诊断试剂盒中的应用。
2. 一种用于肺腺癌早期诊断的多基因甲基化试剂盒，其特征在于，包括 NCOA2、RUNX3、BTD、BRE、ARID1B 基因目的位点的甲基化特异性引物和甲基化特异性 TaqMan 探针，以及内参 actin 基因引物和内参 actin 基因 TaqMan 探针，
NCOA2 基因目的位点的甲基化特异性引物序列如序列表 SEQ ID NO.1 和 SEQ ID NO.2 所示，探针序列如序列表 SEQ ID NO.3 所示；
RUNX3 基因目的位点的甲基化特异性引物序列如序列表 SEQ ID NO.4 和 SEQ ID NO.5 所示，探针序列如序列表 SEQ ID NO.6 所示；
BTD 基因目的位点的甲基化特异性引物序列如序列表 SEQ ID NO.7 和 SEQ ID NO.8 所示，探针序列如序列表 SEQ ID NO.9 所示；
BRE 基因目的位点的甲基化特异性引物序列如序列表 SEQ ID NO.10 和 SEQ ID NO.11 所示，探针序列如序列表 SEQ ID NO.12 所示；
ARID1B 基因目的位点的甲基化特异性引物序列如序列表 SEQ ID NO.13 和 SEQ ID NO.14 所示，探针序列如序列表 SEQ ID NO.15 所示；
内参 actin 基因目的位点的甲基化特异性引物序列如序列表 SEQ ID NO.16 和 SEQ ID NO.17 所示，探针序列如序列表 SEQ ID NO.18 所示。
3. 根据权利要求 2 所示用于肺腺癌早期诊断的多基因甲基化试剂盒，其特征在于，NCOA2、RUNX3、BTD、BRE、ARID1B 基因的探针 5' 端报告荧光基团为 FAM，NCOA2、RUNX3、BTD、BRE、ARID1B 基因的探针 3' 端猝灭基团为 BHQ1，内参 actin 基因的探针 5' 端报告荧光基团为 VIC，内参 actin 基因的探针 3' 端猝灭基团为 BHQ1。

4. 根据权利要求 2 所示用于肺腺癌早期诊断的多基因甲基化试剂盒，其特征在于，还包括一个诊断模型，公式为：

$\Delta Ct \text{ 值} = (\text{NCOA2、RUNX3、BTD、BRE、ARID1B 基因总 Ct 值}) - \text{内参基因 Ct 值}$ ；

若 $\Delta Ct \text{ 值} \leq -1.236$ ，则表示甲基化阳性；

若 $\Delta Ct \text{ 值} > -1.236$ ，则表示甲基化阴性；

actin Ct 值 > 32 或无扩增，为无效结果，需重新检测。

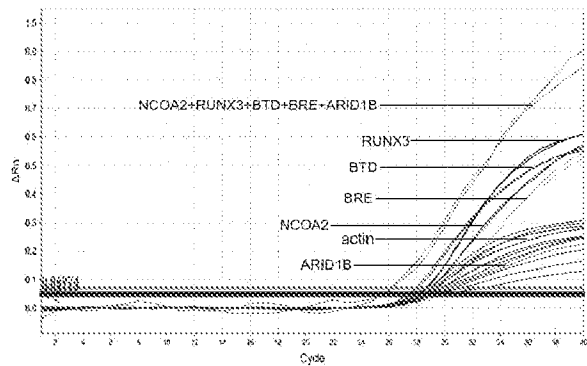


图 1

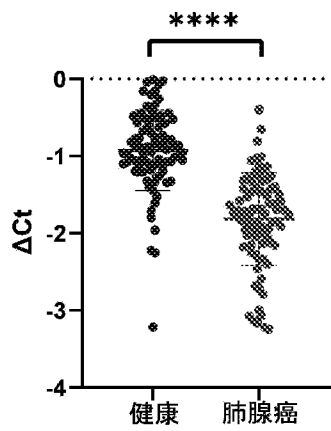


图 2

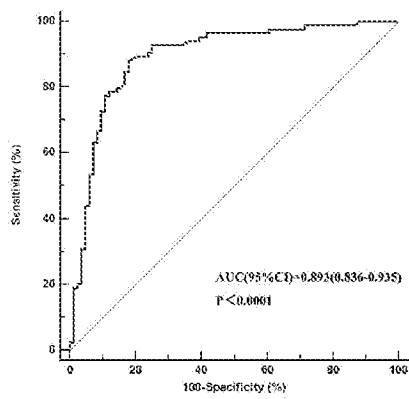


图 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/134024

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/6886(2018.01)i;C12Q 1/6858(2018.01)i;C12N 15/11(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q, C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNMED, CNABS, DWPI, WPABS, WPABSC, CJFD, AUABS, TWMED, ILABS, HKABS, MOABS, CNTXT, ENTXT, ENTXTC, WOTXT, USTXT, VCN, VEN, GBTXT, EPTXT, CATXT, CNKI, PubMed, EMBL, Web of Science, GoogleScholar: lung cancer, 肺腺癌, adenocarcinoma, 甲基化, methylation, NCOA2, RUNX3, BTB, BRE, ARID1B, PBM, 中国专利生物序列检索系统, Chinese Patent Biological Sequence Retrieval System; NCBI, EMBL, STN: 基于SEQ ID NO: 1-15的序列检索, search for SEQ ID NO: 1-15

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 113774131 A (BEIJING CHEST HOSPITAL, CAPITAL MEDICAL UNIVERSITY; BEIJING TUBERCULOSIS AND THORACIC TUMOR RESEARCH INSTITUTE) 10 December 2021 (2021-12-10) abstract	1-4
A	KR 102194103 B1 (KANGWON NATIONAL UNIVERSITY HOSPITAL) 22 December 2020 (2020-12-22) abstract	1-4
A	US 2018066324 A1 (GENOMIC TREE INC.) 08 March 2018 (2018-03-08) description, p. 2	1-4
A	CN 111187841 A (HUADONG HOSPITAL) 22 May 2020 (2020-05-22) claims 1-3	1-4



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 “D” document cited by the applicant in the international application
 “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
 “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 April 2023

Date of mailing of the international search report

29 April 2023

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District,
Beijing 100088

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/134024

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2022023233 A1 (SERVIER LABORATORIES; UNIVERSITÉ PARIS; CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE; INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE; HOPITAUX PARIS ASSIST PUBLIQUE;SORBONNE UNIVERSITÉ;) 03 February 2022 (2022-02-03) claims 1-5	1-4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/134024

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/134024

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	113774131	A	10 December 2021	None			
KR	102194103	B1	22 December 2020	None			
US	2018066324	A1	08 March 2018	US	10767231	B2	08 September 2020
CN	111187841	A	22 May 2020	None			
WO	2022023233	A1	03 February 2022	EP	3945135	A1	02 February 2022
				WO	2022023233	A9	31 March 2022

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2022/134024

A. 主题的分类

C12Q 1/6886(2018.01)i;C12Q 1/6858(2018.01)i;C12N 15/11(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12Q, C12N

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNMED, CNABS, DWPI, WPABS, WPABSC, CJFD, AUABS, TWMED, ILABS, HKABS, MOABS, CNTXT, ENTXT, ENTXTC, WOTXT, USTXT, VCN, VEN, GBTXT, EPTXT, CATXT, CNKI, PubMed, EMBL, Web of Science, GoogleScholar:lung cancer, 肺腺癌, adenocarcinoma, 甲基化, methylation, NCOA2, RUNX3, BTB, BRE, ARID1B, PBMC 中国专利生物序列检索系统, NCBI, EMBL, STN: 基于SEQ ID NO: 1-15的序列检索

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 113774131 A (首都医科大学附属北京胸科医院 北京市结核病胸部肿瘤研究所) 2021年12月10日 (2021 - 12 - 10) 摘要	1-4
A	KR 102194103 B1 (KANGWON NATIONAL UNIV HOSPITAL) 2020年12月22日 (2020 - 12 - 22) 摘要	1-4
A	US 2018066324 A1 (GENOMICTREE INC) 2018年3月8日 (2018 - 03 - 08) 说明书第2页	1-4
A	CN 111187841 A (华东医院) 2020年5月22日 (2020 - 05 - 22) 权利要求1-3	1-4
A	WO 2022023233 A1 (SERVIER LAB;UNIV PARIS;CENTRE NAT RECH SCIENT;INST NAT SANTE RECH MED;HOPITAUX PARIS ASSIST PUBLIQUE;UNIV SORBONNE;) 2022年2月3日 (2022 - 02 - 03) 权利要求1-5	1-4

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“D” 申请人在国际申请中引证的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2023年4月19日

国际检索报告邮寄日期

2023年4月29日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

授权官员

张艳霞

电话号码 (+86) 010-62089438

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的:

a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

b. ☐ 为国际检索的目的在国际申请日之后提交(细则13之三. 1(a)),

☐ 附有说明序列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。

2. ☐ 本报告是在没有收到符合WIPO ST. 26标准的序列表的情况下, 考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 在可进行有意义检索的范围内做出的。

3. 补充意见:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/134024

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	113774131	A	2021年12月10日	无			
KR	102194103	B1	2020年12月22日	无			
US	2018066324	A1	2018年3月8日	US	10767231	B2	2020年9月8日
CN	111187841	A	2020年5月22日	无			
WO	2022023233	A1	2022年2月3日	EP	3945135	A1	2022年2月2日
				WO	2022023233	A9	2022年3月31日